

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780015

研究課題名(和文)ダイズ湿害における過剰活性酸素生成源の特定

研究課題名(英文)Accumulation of reactive oxygen species in soybean under waterlogging

研究代表者

山根 浩二(Yamane, Koji)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：50580859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、湿害後の過剰活性酸素生成機構をオルガネラレベルで特定することを目的とした。播種後1週間のダイズに1週間の湿害を与え、湿害解除翌日にO₂⁻の発生部位を観察したところ、主根の中央部に染色が観察された。その部分をCeCl₃染色により電顕レベルで過酸化水素局在を観察したところ、皮層細胞の細胞膜に染色が観察された。生育初期に湿害を与えたダイズの生育を播種後98日目に観察したところ、湿害を受けたダイズは対照区と比較して葉の黄化が早まった。また、生育も著しく低下していた。これらの結果から、ダイズが生育初期に受けた湿害は、湿害直後だけではなく、生育後半の生育にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We investigated the accumulation of superoxide (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂) of soybean roots. Soybeans grown for 1 week were affected by waterlogging for 1 week. One day after removing the stress, tap roots were used for the staining of O₂⁻ and H₂O₂. O₂⁻ staining was observed in the middle region of a tap root. The accumulation of H₂O₂ was detected on plasma membrane in a cortical cell of a tap root. Thus, waterlogging induces the excess accumulation of O₂⁻ and O₂⁻ derived H₂O₂ in a cortical cell of a tap root.

We also investigated the growth and yields 98 days after sowing of soybean, which was subjected by waterlogging in an early growth stage. The shoot and root growth, grain and nodule weight, chlorophyll contents and photosynthesis rate of fully uppermost leaves decreased compared with those of the control. These results suggest that waterlogging in the early growth stage induces the decrease in growth and the earlier senescence of leaves in the late growth stage.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：ダイズ 湿害 活性酸素 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本のダイズ栽培は、水田転換畑で栽培されることが多いため、湿害がダイズ生育阻害を引き起こす大きな要因の一つと考えられている。とくに、梅雨が初期生育と重なるため、この時期の湿害がダイズ幼植物の生育不良を引き起こし、その後の生育や収量に多大な影響を引き起こすと考えられている。

(2) 過去の知見から、湿害が引き起こす生育阻害の原因の一つは、冠水解除後、再び酸素が細胞内に流入したときに過剰な活性酸素が生成して障害を受けるためであると考えられている。しかし、活性酸素を原因とした湿害解除後の障害発現機構には未だ不明な点が多く、障害緩和の方策は提唱されていない。そこで、組織化学的手法を用いることで、過剰活性酸素生成が引き起こされる組織やオルガネラを直接特定することができ、どの組織やオルガネラに対する耐湿性向上を目指せば効率的であるかを提案することが可能になると考えられる。

(3) 申請者らは、電顕レベルでの活性酸素染色法を改善し、塩ストレス下における葉緑体内での過剰活性酸素の生成源を特定してきた。この技術をダイズ湿害研究に応用し、湿害下でダイズ幼植物に引き起こされる過剰活性酸素の生成源を特定できれば、耐湿性向上策を提案できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、組織科学的手法を用いて、これまでに解明されていない以下の2点を、光学顕微鏡レベルと電子顕微鏡レベルの観察により明らかにすることを目的とした。

(1) 光学顕微鏡レベルでの過剰活性酸素が生成する組織の特定。

(2) 電子顕微鏡レベルで過剰活性酸素が生成するオルガネラの特定。

また、湿害解除後の生育を長期間観察することにより、初期湿害が生育後期の生長や収量に及ぼす影響を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、近畿大学農学部圃場内のハウスで行った。供試品種は、奈良県奨励品種のサチユタカを用いた。栽培には、1/5000 a ワグネルポットとアクリル製の根箱 (縦 500 mm、横 300 mm、幅 20 mm) を用いた。湿害は、播種後 7 日目にポットと根箱を十分に湛水する方法で 1 週間与えた。

(1) 湿害解除後の活性酸素生成源

根のサンプリングが容易な根箱を用いてダイズを栽培した。湿害を解除した翌日に根を洗い出し、活性酸素染色を行った。スーパーオキシドラジカル (O_2^-) の染色剤としてニトロブルーテトラゾリウム (NBT)、過酸化水素 (H_2O_2) の染色剤としてジアミノベンジジン (DAB) を用いた。染色をした根の写真を撮

影し、対照区と比較して染色の多い部位を特定した。

また、NBT 染色の結果を基に、セリウムクロライド ($CeCl_3$) を用いて電顕レベルの活性酸素染色を行った。染色後、通常の電顕固定を行い、電子顕微鏡観察を行った。

(2) 湿害が生育後期に与える影響

ワグネルポットと根箱を用いてダイズを栽培した。湿害を解除した後、播種後 98 日目まで通常生育を行い、サンプリングを行った。ポット栽培を行ったダイズについては、地上部乾物重、地下部乾物重、SPAD 値、光合成速度、子実数、子実重、根粒数、根粒乾物重の測定を行った。また、根箱で栽培したダイズは、根の形を崩さないようにサンプリングして写真撮影を行い、根と根粒をトレースすることにより根粒の着生分布を調査した。

また、生育後半に受けた湿害の影響も調査した。播種後 56 日目から 7 日間湿害を与え、その後は通常生育に戻して播種後 84 日目 (R4 stage) にサンプリングした。

4. 研究成果

(1) 湿害解除後の活性酸素生成源

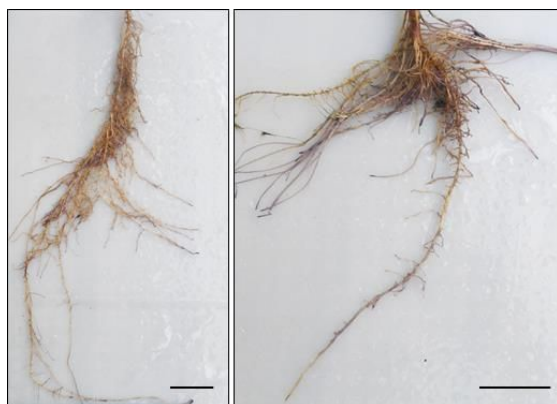
ダイズを 1 週間根箱で生育後、1 週間の湿害ストレスを与えた。その後、土を洗い流して根を観察したところ、湿害区では、土壤表層に多数の不定根が発生しているのが観察された (図 1)。また、主根の中央部付近が黒くなり、障害が発生しているのが観察された (図 1, 矢印)。



図 1. 根箱で 1 週間生育させた後、1 週間の湿害を与えたダイズ根

さらに、NBT 染色を行うことにより、根の O_2^- 分布を調べた。対照区では、NBT 染色による O_2^- の局在は、主に根端部に見られた。湿害を与えたダイズでは、土壤表層の不定根全体が染色された。根端部も強く染色が観察された。主根を観察してみると、根端部の染色は、土壤表層の不定根と比較して薄くなった。また、対照区では染色されなかった主根の中央部付近にも染色が観察された。DAB

染色による結果も、NBT 染色とほぼ同様であった。



<対照区> <湿害区>
図 2. ダイズ根の NBT 染色による O_2^- の発生部位

ダイズ根の中央部付近を切り取り、 $CeCl_3$ 染色によって電子顕微鏡レベルで H_2O_2 の局在を観察したところ、対照区と比較して細胞膜と細胞壁周辺に染色が強く観察された。NBT 染色による O_2^- の局在と併せて考えると、細胞膜に局在する NADPH オキシダーゼが過剰活性酸素生成源であることが示唆された。電顕レベルの染色は、今後さらに観察を続ける必要がある。

(2) 湿害が生育後期に与える影響

(2-1) 湿害が地上部の生長に及ぼす影響

湿害区の地上部乾物重は、対照区と比較して 2 割の減少が観察された。また、最上位展開葉の SPAD 値と光合成速度を計測したところ、有意な差は観察されなかったが、対照区と比較して SPAD 値は 3 割、光合成速度は 4 割にそれぞれ減少していた。湿害区では、対照区と比較して、明らかに葉の黄化が早まることが観察された。

ストレスによるクロロフィル含量の低下は、活性酸素障害が原因であることが報告されている。とくに、 H_2O_2 の過剰な蓄積が関与していることが予想されるため、葉で主に H_2O_2 を消去しているアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) とカタラーゼ (CAT) の活性を測定した。湿害区の APX 活性は対照区とほぼ同等であった。しかし、CAT 活性は湿害区で対照区と比較して 1% レベルで有意な差が観察されるほどに低下した。

(2-2) 湿害が地下部の生長に及ぼす影響

湿害によって、地下部乾物重は地上部乾物重よりも減少した。地下部乾物重は、対照区と比較して半分ほどの値を示し、1% の有意な減少が観察された。根箱を用いた観察では、湿害区で根の量が著しく減少していた。また、根粒数と根粒重を計測したところ、根粒数の減少は観察されなかったが、根粒重は 1% の有意な減少が観察され、共生した根粒の生長

が抑制されたことが示唆された。

(2-3) 湿害が子実に及ぼす影響

湿害によって、子実数は対照区と比較して減少は観察されなかった。しかし、子実重は 2 割ほどの減少が観察された。

(3) 生育後期の湿害が生長に与える影響

湿害区では地上部乾物重、地下部乾物重、SPAD 値、光合成速度、根粒数、根粒重、子実数、子実重の計測した全ての値が有意に減少した。根箱実験では、湿害を受けた区では根粒がほとんど見られず、根粒が着生していた痕跡のみが確認できた。

これらの結果から、ダイズが生育初期に湿害を受けると、湿害直後に過剰活性酸素が発生して根の障害が引き起こされるだけではなく、生育後半の生長量、とくに地下部の生長量が著しく減少することが示唆された。また、葉の早期黄化は、 H_2O_2 を消去する CAT 活性の減少が原因であることが明らかとなった。さらに、生育初期に湿害を受けるよりも、生育後期に湿害を受ける方が、その後の生育阻害や収量に及ぼす影響は、多大であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

山根浩二・飯嶋盛雄、亀裂施肥はダイズが生育初期に受けた湿害を緩和する効果がある、第 237 回日本作物学会、2014 年 3 月 29 日～30 日、千葉大学

山根浩二・飯嶋盛雄、亀裂処理によるダイズ湿害軽減効果の検討、第 236 回日本作物学会、2013 年 9 月 10 日～11 日、鹿児島大学

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

名称:

[その他]

ホームページ等

<http://nara-kindai.univ.jp/02gakka/01nogyo/sakumotu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根 浩二 (YAMANE, Koji)

近畿大学・農学部・講師
研究者番号：50580859

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし