

大豆の金属獲得・蓄積増加に向けたイオノーム解析

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

高野 順平

ダイズにおいて、鉄 (Fe) や亜鉛 (Zn) をはじめとする金属元素は成長のために必須であり、かつ、食品の栄養成分として重要である。本研究では、日本および世界のダイズコアコレクションを解析対象とし、金属を中心とした栄養元素の獲得・蓄積について品種間差を見出すことを目的とした。日本および世界のダイズコアコレクションは農研機構がそれぞれ約 6 千点と約 4 千点のダイズ品種から来歴情報に基づいて絞り込み、遺伝変異と形質変異を広くカバーするそれぞれ 96 系統を選定したものである (Kaga A *et al.* 2012)。前年度までに共同研究者の松村篤博士らがこれらコアコレクションを栽培し、大阪府立大学の圃場にて上位葉にクロロシスを示す 1 品種 (GmJMC167) を、川砂を主体とした栽培ベッドにて下位葉あるいは全体にクロロシスを示す 1 品種 (GmWMC036) を見出した。N, P, K 肥料は十分に与えていたため、上位葉のクロロシスについては鉄などの欠乏、下位葉のクロロシスについてはマグネシウムなどの欠乏が疑われる。鉄はアルカリ土壌での不溶化、マグネシウムは酸性化に伴う溶脱により欠乏することが知られている。本研究ではこれら品種のクロロシスの原因を探るため、異なった土壌 pH とカルシウム (Ca) ・マグネシウム (Mg) 資材の供給下の圃場で栽培し、栄養成長期の生長と葉における元素含量 (イオノーム) を解析した。また、栄養素としての金属蓄積に特徴のある品種を選抜して遺伝資源とすることを目的とし、日本のダイズコアコレクションの種子を用いてイオノーム解析を行った。

実験方法

1, クロロシスの原因を解明するための圃場試験

1-1, 供試品種

農業生物資源ジーンバンクに供与いただいた 2 品種 (表 1) とエンレイ (日本タネセンター, 松本) を用いた。2019 年度の栽培試験において、GmWMC036 では下位葉に葉全体的なクロロシスが、GmJMC167 では上位葉に葉脈間クロロシスが見られた (増本、松村)。

表 1. 供試系統の情報

ID	品種名	品種和名	種類区分	原産地
GmWMC036	MASSHOKUTOU(KOU 502)	秣食豆 (公 5 0 2 号)	在来	中華人民共和国
GmJMC167	NANKAN ZAIRAI 83	南関在来 8 3	在来	熊本

1-2, 土壌の化学性の分析と施肥

畝立て後、施肥前の土壌について、pH、EC、可給態リン酸 (トルオーグ法)、硝酸態窒素 (カタルド法) およびアンモニウム態窒素 (インドフェノール法) を分析した。pH は

5.1-5.3, EC は 64-128 ($\mu\text{s}/\text{cm}$)、可給態リン酸含有量は 32-46 mg/100g、硝酸体窒素含有量は 12.5-20.6 (mg/100g)、アンモニア態窒素含有量は 0.46-0.63 であった。

2019 年 4 月 18 日に実験区 2 と 3 (いずれも 10 m x 70 cm) には苦土石灰 1.3 kg ずつ、実験区 4 (10 m x 70 cm) には消石灰 1.1 kg を混和した。苦土石灰処理では Ca に加えて Mg を供給することを意図した。2 週間後の pH は実験区 1 (未処理) が 6.0、実験区 2 が 6.6、実験区 3 が 7.0、実験区 4 が 8.0 であった。

5 月 9 日に元肥としてくみあい化成 13 号 (全農 NPK 3-10-10) を畝 10 m あたり 700 g 混和した。また、ネキリムシ等の土壤害虫対策としてダイアジノン粒剤 (GREEN JAPAN) を畝 10 m あたり 35 g 混和した。畝にはシルバーマルチ (トーカン) をかけた。

1-3, 栽培

2019 年 5 月 15 日に培養土にて育苗を開始し、5 月 23 日に移植した。各実験区は両端を除き 3 区画 (3 m ずつ) にわけ、さらに 1 m ずつ 3 区画にわけた。1 m の畝に 1 品種を縦 25 cm, 横 30 cm の間隔で 8 株ずつ移植した。

1-4, 葉のイオノーム解析

最新展開葉をサンプリングし、70°C に設定した乾燥機で 2 日間以上乾燥した。硝酸分解は Sha ら (2012) の方法に従った。1g のサンプルあたり濃硝酸 4 ml を加え、酸分解用のホットプレート型分解システム (DigiPREP MS, ジーエルサイエンス) にて 110°C で 3 時間、蓋を閉めずに置いたまま加熱後、蓋を取りさらに 2 時間加熱した。硝酸が少量残った状態で加熱を止め、ホットプレートの温度が 80°C 以下に下がった時点で過酸化水素を 1 ml 加え、110°C で 30 分加熱した。残渣に 2% 希硝酸を 15 ml 加えて溶解し、ろ紙 (No5B、アドバンテック東洋、東京) を用いて濾過した。マルチタイプ ICP 発光分光分析装置 (ICPE-980、島津製作所) により B、Cu、Fe、Mg、K、Na、P、Zn、Mn の濃度を測定した。

2, ダイズコアコレクションの種子のイオノーム解析

2-1, 供試品種と栽培

農業生物生産ジーンバンクより分与いただいた日本のダイズコアコレクションを用いた。本実験では 2018 年と 2019 年に松村篤博士らが栽培して収穫したダイズの種子を用いた。2018 年は 6 月 4 日に撒種し、6 月 13 日に畑に移植し、11 月 28 から 2019 年の 1 月 4 日までに収穫した。2019 年は 8 月 6 日に播種し、8 月 13 日に移植、10 月 18 日から 12 月 25 日にかけて収穫した。

2-2, 種子のイオノーム解析

1 品種につき 10 粒をマルチビーズショッカー(安井機械)で破碎し、そのうち 0.2 g に濃硝酸を 8 ml 加え、1-4 と同様の方法で分解、溶解、濾過して試料溶液を作成した。マルチタイプ ICP 発光分光分析装置 (ICPE-9800、島津製作所) により B、Fe、Mg、K、P、Zn、Mn の濃度を測定した。

結果と考察

1, クロロシスの原因を解明するための圃場試験

5 月 31 日、6 月 11 日、6 月 19 日におけるダイズの生育状況を丈高 (cm) と最新展開葉の SPAD 値で示す。(図 1、図 2)。各品種において、実験区間で生育に大きな差異は認められなかった。また、エンレイと GmJMC167 の一部の葉において葉脈間クロロシスが、GmWMC036 の一部の葉において葉全体のクロロシスが観察された(図 3、6 月 19 日)。これらは処理区に関わらず見られ、pH および Ca と Mg の可給性に依存するものではないと考えられた。

続いて、6 月 27 日に新葉展開葉をサンプリングし、ICP-AES により P、K、Ca、Mg、Fe、Zn、Mn、B の含有量の分析を行った (図 4)。Ca の含有量には、GmJMC167 でやや低い傾向がみられ、全ての処理区においてエンレイもしくは GmWMC036 との間に有意差がみられた。Zn の含有量には、GmJMC167 でやや高い傾向が見られ、対照区 (pH6.0) と苦土石灰区 (pH6.6) において有意差が得られた。B の含有量は、同じ実験区ではエ

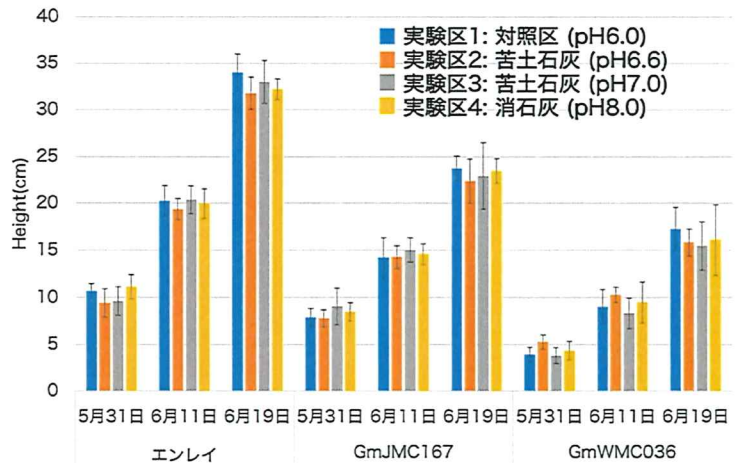


図1 ダイズの丈高 エラーバーは標準偏差 (n=8)

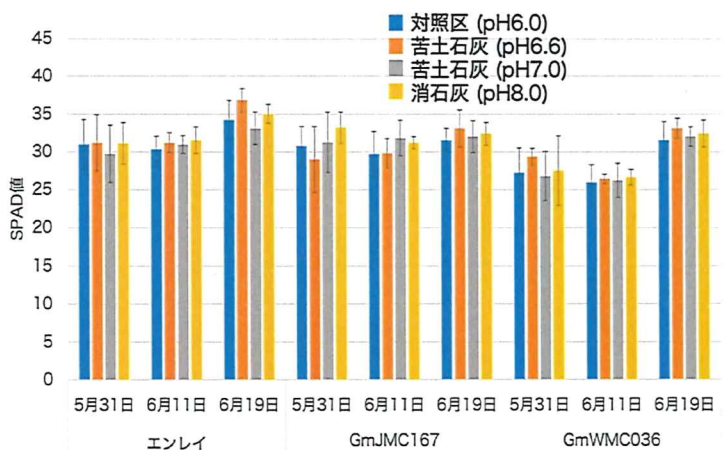
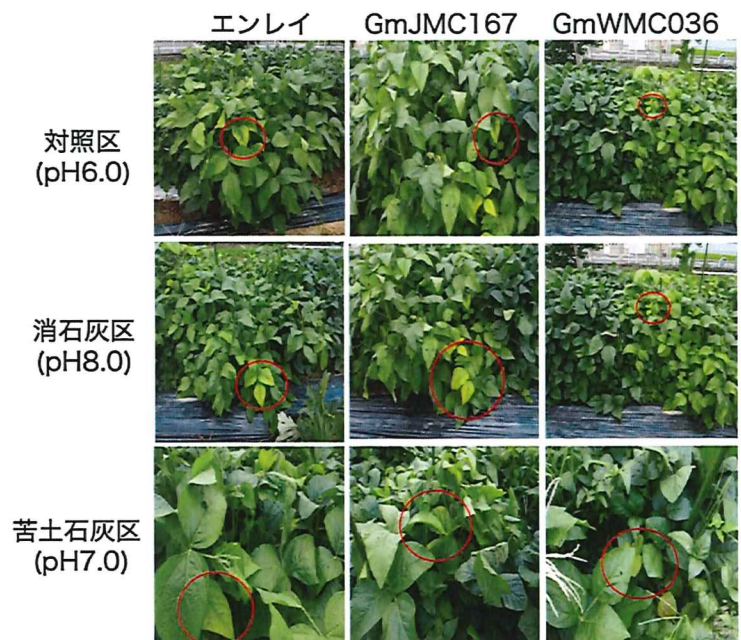
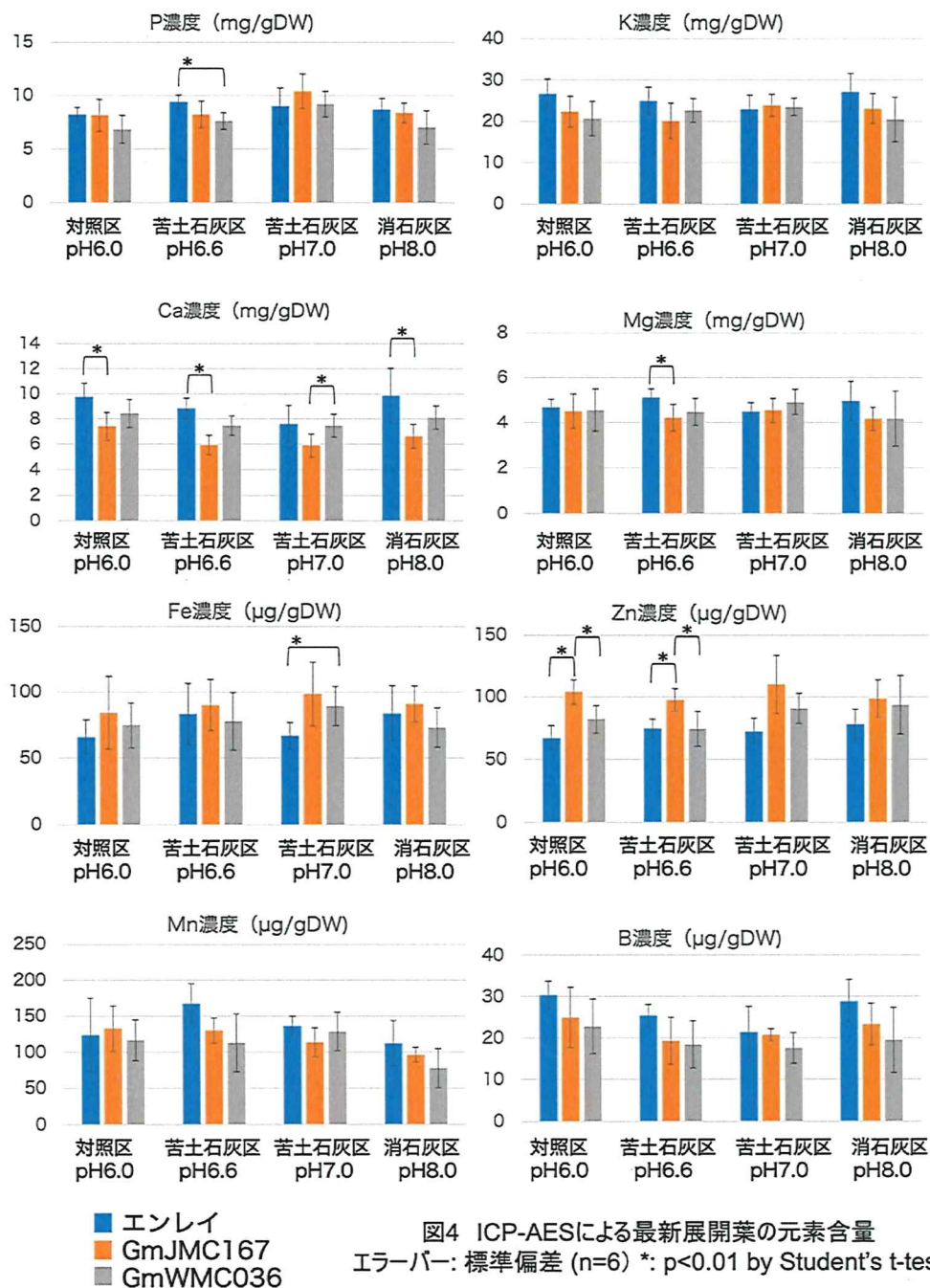


図2 最新展開葉のSPAD値 エラーバーは標準偏差 (n=8)





ンレイで高く GmWMC036 で低い傾向が見られたが有意差はなかった。P、K、Mg、Fe、Mn の含有量には明確な傾向はみられなかった。いずれの品種のいずれの元素についても、処理区による顕著な差は見られなかった。生育後期には猛暑による種子形成不全と虫害が著しく、種子のサンプリングに至らなかった。

以上から、当初着目した Fe と Mg については、GmJMC167 と GmWMC036 の二品種の最新展開葉における濃度に異常が見られず、pH 変化や Mg の供給による影響も見られなかったことから、個体として Fe や Mg の獲得能力が弱いためにクロロシスが発現する可能性は低いと考えられた。一方、GmJMC167 では Ca、GmJMC167 と GmWMC036 では B の葉における濃度が低い傾向がみられた。Ca や B の欠乏によるクロロシスは一般的ではないが、なんらかの別の要因と複合してクロロシスを

発現した可能性はある。

GmJMC	K (mg/g)		P (mg/g)		Ca (mg/g)		Mg (mg/g)		Fe (ug/g)		Zn (ug/g)		Mn (ug/g)		B (ug/g)	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
2		21.5		8.03		2.36		2.57		100.5		77.3		28.9		93.0
3		21.2		7.00		2.60		2.99		102.8		55.4		25.1		24.1
4		20.1		5.95		2.80		2.42		74.1		51.7		24.9		23.4
5		18.9		7.23		2.50		2.53		81.8		54.4		22.1		25.6
7		20.1		8.03		2.85		2.44		90.0		61.4		23.3		28.0
8		22.4		8.33		3.35		3.11		106.5		71.9		30.7		25.0
13		18.1		5.95		2.11		2.37		81.0		51.2		27.8		26.8
16		17.0		5.93		2.29		2.21		95.3		55.2		28.4		23.6
23		18.3		6.30		2.50		2.38		96.8		59.6		29.3		26.0
21		20.6		6.32		2.69		2.51		98.3		59.3		30.2		20.4
25		17.3		6.96		2.02		2.33		70.9		51.5		26.4		25.1
26	19.7	19.2	7.43	6.18	1.61	2.21	2.38	2.47	60.1	102.8	53.7	61.0	15.5	24.7	23.3	28.0
28	17.1		5.31		1.25		2.08		56.7		43.0		19.7		16.3	
30	18.8	18.4	5.34	6.49	1.47	2.33	1.97	2.81	72.2	92.3	41.9	63.9	19.4	26.0	18.4	26.3
31	21.1	20.9	6.26	6.99	2.58	3.09	2.67	3.17	70.1	96.8	51.5	72.4	32.4	32.9	23.0	30.2
32	19.0	20.1	6.58	6.56	2.69	3.54	2.60	2.66	69.8	87.0	47.2	50.3	23.5	27.5	14.4	18.4
34		20.3		7.04		3.35		2.93		93.0		57.9		35.6		27.5
37	19.8	19.7	8.10	5.96	2.15	2.98	3.09	3.28	75.0	90.8	57.5	50.6	24.1	30.6	17.4	18.0
39	19.5	18.7	7.30	6.18	2.42	2.25	2.63	2.78	58.4	80.3	55.3	46.4	21.0	22.4	19.9	19.7
40		17.4		5.90		2.91		2.60		69.0		46.7		25.1		19.4
41		19.8		6.47		2.45		2.69		86.3		55.9		28.3		23.7
42		19.7		6.81		2.09		2.49		97.5		56.4		24.8		18.2
44		17.9		5.96		2.36		2.33		93.8		53.0		27.5		21.0
49	14.8	17.3	6.61	6.07	1.74	2.59	1.94	2.55	51.5	80.3	42.8	52.6	17.8	27.3	15.4	20.9
50	17.0		6.92		1.91		2.05		55.7		45.5		20.2		20.3	
51	17.0	19.7	5.55	7.50	1.80	2.78	2.21	2.72	58.7	84.0	34.4	59.6	21.8	33.7	5.9	26.2
52		20.0		7.40		3.13		2.99		94.3		63.4		32.6		27.1
53	20.9	20.3	6.41	7.40	2.56	2.83	2.85	3.19	73.7	82.5	44.5	56.1	34.1	30.7	20.9	26.3
54	16.9	19.5	5.17	5.39	1.76	2.31	2.00	2.27	68.3	64.7	45.2	54.8	21.5	28.9	19.3	23.8
55	19.7	20.3	6.12	6.35	2.99	3.14	3.17	3.52	81.8	90.8	57.4	67.4	29.3	27.4	23.6	29.6
56	20.6	20.4	7.11	7.25	2.08	3.32	2.03	3.26	96.0	86.3	67.4	57.4	21.8	29.3	28.7	29.9
57	17.8	17.5	6.86	7.35	1.71	2.13	2.23	3.02	76.5	118.5	48.0	71.6	22.1	40.2	18.5	25.0
58	16.6	18.5	7.22	5.33	2.35	3.56	2.72	3.43	92.3	69.8	64.2	50.0	27.8	34.9	19.1	26.1
59	16.1	21.0	5.60	6.30	1.42	2.93	1.89	2.75	59.1	93.0	43.1	59.2	18.4	34.4	10.9	18.8
60	14.6	17.2	4.66	5.06	2.57	1.49	1.87	2.15	74.2	67.5	37.0	42.5	27.8	25.3	6.9	21.0
61	18.9	18.3	6.71	5.65	2.22	2.66	3.11	2.56	90.8	76.5	52.1	52.7	26.7	38.7	22.2	21.2
62	16.8	19.1	5.00	5.21	1.98	2.06	2.19	2.58	93.8	82.5	42.1	51.4	25.7	30.5	17.6	22.7
63	19.4	19.4	7.06	5.62	1.72	2.22	2.15	2.88	75.8	75.8	59.7	55.0	23.9	35.9	24.1	22.1
64	15.6	17.6	6.67	5.03	1.70	2.55	1.98	2.46	71.3	90.0	48.2	49.4	21.0	33.7	23.0	19.0
65	19.1	20.3	6.92	6.20	1.83	2.42	2.12	2.57	79.5	87.0	53.4	60.2	28.3	30.8	25.4	26.0
66		19.8		7.28		3.62		3.02		96.8		73.0		30.0		27.8
67	16.1		4.56		1.22		1.71		57.8		31.5		17.2		12.5	
68	19.4	18.5	7.65	6.52	3.25	2.96	2.39	3.05	60.6	91.5	56.6	58.4	35.6	28.6	34.1	19.7
69	19.6	18.0	5.89	6.76	2.28	3.46	2.15	2.73	67.1	74.6	38.5	52.3	31.2	32.0	12.2	27.2
76	17.7	15.6	8.18	6.83	1.31	1.78	2.18	2.21	78.8	147.0	61.7	63.8	22.1	28.9	24.2	20.3
77	18.5	19.4	6.14	6.17	1.52	1.98	2.03	2.42	63.0	81.8	52.1	55.2	19.7	24.3	17.2	20.6
78	21.5	18.9	7.88	6.86	2.56	3.27	3.23	3.29	81.8	85.5	55.7	50.0	25.4	28.0	28.1	25.6
79	17.6	19.4	5.26	5.91	1.91	3.46	2.63	2.84	73.4	78.0	47.3	47.9	27.5	28.2	20.3	26.8
80	16.9	19.4	4.76	5.16	1.58	2.99	2.09	2.87	52.5	81.0	35.5	46.1	17.2	28.1	16.6	23.3
81	17.6	18.1	6.13	5.54	2.24	3.35	2.54	2.58	81.0	101.3	59.9	53.0	23.6	31.4	21.2	22.7
82	19.1	19.2	6.29	6.08	2.12	2.33	2.46	2.72	75.0	76.5	46.4	52.6	28.0	27.0	18.5	19.8
85	20.1	20.8	6.23	6.82	1.84	2.21	2.30	2.69	78.8	87.0	45.5	54.2	25.1	22.7	22.2	23.7
86		17.9		6.04		2.13		2.35		78.8		50.9		27.5		26.9
88	18.2	18.2	6.75	5.81	1.37	2.43	2.22	2.80	65.0	78.8	51.5	45.6	21.5	25.1	17.7	23.1
90		18.8		6.35		3.22		3.05		83.3		56.7		31.9		20.8
91	18.2	17.7	6.71	6.20	2.07	2.11	2.17	2.49	78.0	96.8	48.1	46.7	19.0	21.2	21.5	21.8
92	20.3	20.9	6.97	6.37	2.12	2.93	2.22	2.72	69.5	73.7	58.7	54.1	23.2	26.7	18.3	27.8
93	15.8	20.1	5.81	6.03	1.87	2.73	2.30	2.95	72.2	83.3	41.5	50.5	19.4	24.6	12.4	22.3
95	17.2	19.1	5.46	8.10	2.19	2.55	2.30	2.30	58.1	85.5	37.1	68.2	26.6	28.0	16.3	29.2
96	19.2	19.0	6.78	7.58	2.55	2.35	2.44	2.42	64.7	81.8	36.8	49.7	23.6	23.4	15.6	25.7
97	19.0	19.0	6.42	6.92	1.98	3.43	2.83	3.32	58.2	81.0	44.0	57.6	27.6	31.5	24.2	26.3
98	19.8	16.5	6.14	5.72	2.11	3.83	2.51	2.90	81.8	102.8	50.5	60.4	27.2	33.5	25.1	28.5
99	20.6		7.08		2.53		3.17		70.1		53.4		27.0		21.4	
100	19.8	20.7	6.03	6.37	1.87	3.26	1.90	2.51	93.8	93.8	44.9	53.1	19.3	26.1	25.9	29.1
101	15.9	19.4	4.74	6.65	1.25	3.13	1.79	2.93	40.2	79.5	30.8	55.1	22.6	28.4	11.4	23.6
104	17.9	20.5	5.75	7.36	1.78	2.72	2.27	3.08	69.5	109.5	39.1	65.9	19.7	23.9	17.0	30.4
105	19.0	19.4	6.46	6.99	1.79	2.39	2.35	2.60	68.9	80.3	47.4	55.2	23.5	25.1	19.7	29.6
105		17.6		6.76		3.39		2.90		99.8		61.7		33.0		28.3
106		18.1		6.31		2.25		2.51		77.3		49.2		23.9		21.3
110	17.7	21.9	5.28	7.14	1.44	2.45	1.49	2.40	84.8	104.3	47.0	64.4	14.1	23.0	23.3	28.1
111	20.7	21.6	7.37	7.36	1.60	2.38	2.36	2.64	73.1	93.8	49.7	61.1	18.6	20.9	26.0	29.3
112	17.2	18.0	5.56	6.04	2.35	2.36	2.02	2.14	83.3	78.8	38.9	45.8	20.0	22.4	19.4	27.4
114	17.3	17.9	6.33	4.54	1.88	2.72	2.67	2.99	61.0	n.d.	43.4	55.2	21.5	49.9	15.7	28.8
116	17.5	16.7	6.92	7.27	1.95	2.93	2.51	2.86	69.5	119.3	45.2	53.2	19.1	25.4	17.8	22.8
117	15.8	21.3	5.11	6.47	2.16	2.66	2.29	2.61	70.8	68.3	36.3	53.7	24.1	26.6	10.8	22.3
121		20.3		6.56		2.66		2.64		97.5		57.2		28.2		20.6
126	18.7	18.0	6.32	6.63	2.06	2.33	2.58	2.35	83.3	73.8	45.8	55.8	24.4	24.5	20.7	25.6
128		18.5		6.94		4.19		3.03		99.0		62.0		36.7		38.9
130		17.5		6.28		3.23		2.93		72.1		51.2		27.8		23.5
131	18.0	19.4	5.78	7.58	2.16	2.12	2.23	2.45	87.0	72.3	43.6	53.9	20.3	24.4	20.4	24.9
133		18.0		5.78		2.28		2.48		72.2		60.6		37.9		27.4
137	16.2	17.3	5.12	7.04	2.18	2.81	1.93	2.22	62.4	85.5	35.8	57.8	23.3	26.4	9.7	31.5
145		18.5		7.95		2.18		2.48		78.0		62.0		27.8		27.1
149	18.2	19.1	5.81	6.64	2.24	2.51	2.24	2.47	73.8	91.5	40.6	55.1	22.7	22.5	16.3	35.3
152		19.6		6.20		2.79		2.71		101.3		58.1		30.2		24.4

平均の 1.5 倍以上の値には青色、0.66 倍以下の値には黄色で網掛けした。

2, ダイズコアコレクションの種子のイオノーム解析

大阪府立大学の圃場にて 2018 年と 2019 年に栽培した日本のダイズコアコレクションの種子について、イオノーム解析を行った (図 5)。十分な種子が得られた品種のみ測定したため、2 ヶ年のデータが得られた品種と得られなかった品種がある。P, Ca, Fe, Mn, Zn について、平均より 1.5 倍以上高い値を示した品種がみられた。また、Ca, Fe, Mn, B について、平均より 0.66 倍以下の低い値を示した品種がみられた。前述したクロロシスを示す GmJMC167 では種子のイオノームに特徴はみられなかった。再現性が取れていないため不確かではあるが、GmJMC52 では Fe の蓄積が高い可能性がある。2 年分の再現がみられたのは、GmJMC161 において Ca の蓄積が低いことと、GmJMC177 において B の蓄積が低いことであった。今後、2020 年に松村篤博士らが栽培している日本のダイズコアコレクションの種子についても分析し、再現性を確認する予定である。GmJMC161 と GmJMC177 については、ダイズにおける Ca および B の動態を理解するための材料として特に着目して解析を開始したい。

要約

ダイズにおいて、鉄や亜鉛をはじめとする金属元素は成長のために必須であり、かつ、食品の栄養成分としても重要である。本研究ではダイズにおける金属を中心とした栄養元素の獲得・蓄積について品種間差を解析した。

日本および世界のダイズコレクションを用いた先行研究において、大阪府立大学の圃場にてクロロシスを示す 2 品種が得られていた。本研究ではこれらのクロロシスの原因を探るため、異なった土壌 pH および Ca・Mg 資材の供給下で栽培し、栄養成長期の生長と葉における元素含量 (イオノーム) を解析した。結果として、当初欠乏を予想した Fe と Mg については、2 品種の最新展開葉における濃度に異常が見られず、土壌条件による影響も見られなかった。したがってこれらの品種では Fe や Mg の獲得能力が弱いためにクロロシスが発現する可能性は低いと考えられた。

本研究ではまた、日本のダイズコアコレクションの種子のイオノーム解析を行った。その結果、P、Ca、Fe、Mn、Zn、B の蓄積に品種間差がみられた。Ca と B については 2 回の栽培で共通して蓄積が低い品種がそれぞれ 1 つずつ得られた。再現性の確認は必要であるが、本データはダイズの金属元素獲得・蓄積のメカニズム解明のための基盤となる。特に Ca と B の動態については、本データを元に詳細な研究を開始したい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研

究助成財団に心から感謝申し上げます。また、生育解析と分析を行った蘇可寒さん、ダイズ種子の収穫を行った長沼知宏君、圃場の整備と栽培指導を頂いた川端誠技師、本研究のきっかけと多くの助言を頂いた松村篤講師に謝意を表します。

参考文献

- Sha, Z., Oka, N., Watanabe, T., Tampubolon, B.D., Okazaki, K., Osaki, M., and Shinano, T. (2012). Ionome of soybean seed affected by previous cropping with mycorrhizal plant and manure application. *J. Agric. Food Chem.* 60: 9543–9552.
- Kaga, A., Shimizu, T., Watanabe, S., Tsubokura, Y., Katayose, Y., Harada, K., Vaughan, D.A., and Tomooka, N. (2012). Evaluation of soybean germplasm conserved in NIAS genebank and development of mini core collections. *Breed. Sci.* 61: 566–592.