

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780018

研究課題名(和文)作物の高二酸化炭素濃度応答に及ぼす無機窒素形態の影響の解明

研究課題名(英文)Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration and nitrogen form on dry matter production and nitrogen accumulation of some crop species

研究代表者

熊谷 悦史(Kumagai, Etsushi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産環境研究領域・研究員

研究者番号：80583442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、将来の高CO<sub>2</sub>濃度環境で作物生産を向上させ、品質を確保する適応型肥培管理の開発を念頭に、無機窒素形態に対する反応が異なる作物種において、アンモニアあるいは硝酸を単独で供給した場合に高CO<sub>2</sub>に対する応答性が異なるかどうかを調査した。高CO<sub>2</sub>による乾物生産の促進は、好アンモニア性のイネでは硝酸供給下よりもアンモニア供給下で顕著であったが、好硝酸性のエンドウとホウレンソウでは反対に硝酸供給下で顕著であった。高CO<sub>2</sub>による体内窒素含量の低下は、ホウレンソウでのみ、アンモニア供給下よりも硝酸供給下で顕著に見られた。この窒素含量の低下には窒素吸収よりもむしろ葉の硝酸還元能の低下が関与していた。

研究成果の概要(英文)：Aiming to establish the adaptive nitrogen (N) management to future high CO<sub>2</sub> environment, I investigated whether the responsiveness of biomass production and N concentration to CO<sub>2</sub> enrichment varied among crop species differing in preference to nitrogen forms (nitrate vs ammonium). Rice plants (preference to ammonium) received ammonium nutrition showed the greater biomass enhancement to CO<sub>2</sub> enrichment than ones received nitrate nutrition. In both pea and spinach (preference to nitrate), opposite results were obtained: Plants received nitrate nutrition showed the greater biomass enhancement. In spinach, the decline of N concentration due to elevated CO<sub>2</sub> was observed in plants received nitrate, but not in plants received ammonium. This phenomenon resulted from the inhibition of nitrate assimilation in leaves rather than nitrate absorption in roots.

研究分野：作物学、農業気象学

キーワード：乾物生産 光合成 硝酸還元 窒素吸収 高CO<sub>2</sub>濃度 無機窒素形態

## 1. 研究開始当初の背景

大気 CO<sub>2</sub> 濃度は年々上昇している。将来の食糧生産の予測に資するために、これまでに多くの研究グループが作物に及ぼす高 CO<sub>2</sub> 濃度の影響を解析してきた。既往の研究結果をまとめると、高 CO<sub>2</sub> 下では作物の光合成が促進され、乾物生産量や収量が増加するが、反対に体内の窒素含量が低下する傾向にある。これらの変化割合は作物種で大きく異なり、多窒素施肥条件で乾物生産や収量の増加率が大きくなり、窒素含量の低下率が小さくなる。一方で、植物が吸収利用できる無機窒素形態はアンモニア態と硝酸態である。作物はそれらに対して種固有の嗜好性を有し、好アンモニア性作物と好硝酸性作物に大別される。近年、硝酸供給下で栽培した好硝酸性のコムギは、アンモニア供給下で栽培した時と比較して、高 CO<sub>2</sub> 下の乾物生産の増加率が小さくなるとともに、窒素含量の低下が顕著になることが報告され、「将来環境での食料生産や品質確保の観点から、肥料としてアンモニア態窒素の重要性が増す」と提案された (Bloom, 2009)。この現象の原因としては、高 CO<sub>2</sub> によって生じる葉の硝酸還元抑制が考えられている (Bloom ら, 2010)。しかしながら、高 CO<sub>2</sub> が硝酸還元には及ぼす影響は、生育環境、生育ステージ、作物種などで異なり、統一的な見解が得られていない (Stitt and Krapp, 1999)。高 CO<sub>2</sub> が植物の硝酸やアンモニア吸収に及ぼす影響についていくつか報告がある。高 CO<sub>2</sub> 下では、気孔閉鎖に伴い蒸散量が抑制され、その蒸散流によって駆動される窒素の吸収が抑制される。反対に、光合成が増加し、根に供給される炭素骨格が増加するので、窒素吸収が促進されるといった結果が報告されており、統一的な見解が得られていない (Stitt and Krapp, 1999)。将来の高 CO<sub>2</sub> 下で効率的な作物生産を可能とする‘適応型’の肥培管理を考える上で、高 CO<sub>2</sub> 応答に無機窒素形態やそれらに対する作物種の嗜好性 (耐性) がどのような影響を及ぼすかを明らかにすることが重要であるが、それらを解析した報告はほとんどない。

## 2. 研究の目的

本研究では、将来の高 CO<sub>2</sub> 環境‘適応型’の肥培管理を示すことを念頭に、好アンモニア性や好硝酸性の作物種において、高 CO<sub>2</sub> 下での乾物生産量や窒素含量の変化がアンモニアと硝酸を単独供給した場合に異なるかどうかを明らかにすることを目的にした。葉の硝酸還元・アンモニア同化や根の硝酸・アンモニア吸収プロセスに着目し、Bloom (2009) が提案するように、高 CO<sub>2</sub> 環境を農業生産に積極的に利活用するには、アンモニア施用が効果的であるかどうかを検証した。

## 3. 研究の方法

(1) 作物の乾物生産や窒素含量の高 CO<sub>2</sub> 濃度応答に及ぼす無機窒素形態の影響解明

好アンモニア性のイネ (品種コシヒカリ)、好硝酸性でアンモニア耐性を有するダイズ (ナンブシロメ)、エンドウ (スナップエンドウ) および好硝酸性でアンモニア耐性が弱いホウレンソウ (サンライト) を 5L ポットで土耕栽培した。大気 CO<sub>2</sub> 濃度を制御できる自然光利用型のチャンバーを使って、通常 CO<sub>2</sub> 区 (389ppm) と高 CO<sub>2</sub> 区 (589ppm) を設け、その中に硝酸区 (硝酸カルシウムを施用) とアンモニア区 (硫酸アンモニウムを施用) を設け、それらの組み合わせ 4 条件で栽培した。ポット当たりの施肥量が窒素 : リン酸 : カリ = 0.9:1.2:0.8g になるように各種肥料を調整した。なお、アンモニア区には硝化抑制剤を添加した。播種後 40~50 日目に、最大展開葉を対象に、携帯型光合成・蒸散測定装置 (LI-6400, Li-COR) を用い、最大光合成速度を測定した。午前中 (9:00~11:00) に、最大展開葉の一部を採取し、凍結保存後、RQ フレックス (Merck) を用いて葉の硝酸含量を計測した。その後、地上部を採取し、葉面積を計測し、地上部乾物重を調査した。ケルダール法によって、窒素含量を調査した。

(2) 作物の窒素代謝の高 CO<sub>2</sub> 濃度応答に及ぼす無機窒素形態の影響解明

(1) で特徴的な反応を示したエンドウおよびホウレンソウを対象に、1/5000a ワグネルポットで土耕栽培を実施した。通常 CO<sub>2</sub> 濃度区 (400ppm) と高 CO<sub>2</sub> 濃度区 (598ppm) を設け、その中に、硝酸区、アンモニア区、尿素区 (LP コートを施用) を設け、組み合わせ 6 条件で栽培した。ポット当たりの施肥量が窒素 : リン酸 : カリ = 0.9:1.2:0.8g になるように各種肥料を調整した。播種後 27~45 日目に、最大展開葉の一部を採種し、凍結保存した。その後、地上部を採取し、地上部乾物重と窒素含量を調査した。凍結保存した硝酸区のサンプルについて、硝酸含量、硝酸還元酵素と亜硝酸還元酵素の活性を計測した。また、尿素区のサンプルについては、アンモニウム濃度とグルタミン合成酵素活性を計測した。ホウレンソウについて、光合成とクロロフィル蛍光の同時測定を行い、炭酸固定、光呼吸、O<sub>2</sub> 濃度依存 (Water-Water サイクル : 活性酸素消去系など)、O<sub>2</sub> 濃度非依存 (硝酸還元など) のオルタナティブ系への電子伝達速度 (それぞれ、Jc, Jo, Ja (O<sub>2</sub> 依存), Ja (O<sub>2</sub> 非依存)) を推定した。

(3) 作物の窒素吸収の高 CO<sub>2</sub> 濃度応答に及ぼす無機窒素形態の影響解明

エンドウおよびホウレンソウを対象に、通常 CO<sub>2</sub> 濃度区 (406ppm) および高 CO<sub>2</sub> 濃度区 (601ppm) と、硝酸区とアンモニア区を組み合わせた 4 条件で水耕栽培した。窒素源としては、硝酸区とアンモニア区は、それぞれ硝酸カリウムと塩化アンモニウムとし、窒素濃度は 4mM とした。エンドウおよびホウレンソウにおいて、それぞれ播種後 33 日目お

よび 47 日目の夕刻に水耕液中に  $^{15}\text{N}$  (25%atm) でラベルされた硝酸カリウムと塩化アンモニウムを添加し、24 時間経過した後、植物体をサンプリングし、地上部と地下部の乾物重を調査した。24 時間の水耕液の重量変化から蒸散速度を計測した。安定同位体質量分析計 (Sercon, IntegraCN) を用いて、乾物サンプルの窒素含量と  $^{15}\text{N}$  存在比を計測し、 $^{15}\text{N}$  吸収速度を算出した。

#### 4. 研究成果

(1) イネ、ダイズ、エンドウ、ホウレンソウの地上部重および葉面積は、無機窒素形態に関係なく、通常  $\text{CO}_2$  区よりも高  $\text{CO}_2$  区で高くなった (図 1)。その増加率は、イネやエンドウでは硝酸区よりもアンモニア区で大きく、ダイズでは両窒素区で差がなく、ホウレンソウでは硝酸区で大きかった。ホウレンソウではアンモニア区で生育が著しく抑制された。ケルダール窒素 (有機態窒素とアンモニア態窒素を含む) 含量は、イネ、エンドウでは、無機窒素形態に関係なく高  $\text{CO}_2$  区で低下し、ホウレンソウでは、硫酸区で  $\text{CO}_2$  の効果は見られず、硝酸区で著しい低下が見られた。ダイズでは、高  $\text{CO}_2$  による増減が見られなかった。光合成速度は、ダイズ、エンドウ、ホウレンソウでは、無機窒素形態に関係なく、高  $\text{CO}_2$  区で上昇した。イネでは、高  $\text{CO}_2$  による光合成速度の上昇が見られなかった。

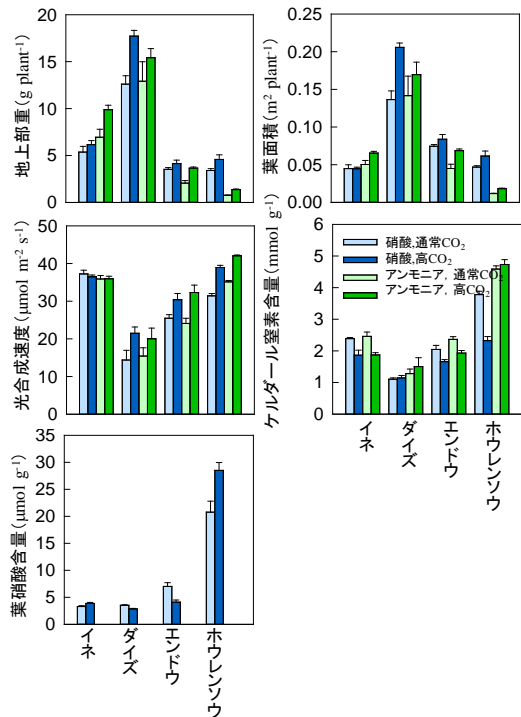


図 1. 作物 4 種の地上部重、葉面積、光合成速度、ケルダール窒素含量、葉の硝酸含量の高  $\text{CO}_2$  応答に及ぼす無機窒素形態の影響。数値は平均値 ± 標準誤差 (n=4)

イネ、ホウレンソウでは、硝酸区の葉硝酸含量が高  $\text{CO}_2$  区で上昇したが、ダイズとエンドウでは反対に低下した。このように、乾物生産に関して、先行研究 (Bloom, 2009) で報告されたコムギと同様な反応を示したのは、イネとエンドウであった。窒素含量や硝酸含量に関しては、先行研究のコムギと同様な反応を示したのは、ホウレンソウのみであった。

(2) エンドウおよびホウレンソウにおいて、硝酸供給、アンモニア供給に加え、アンモニア毒性を抑えた尿素区を加え、無機窒素形態が高  $\text{CO}_2$  応答に及ぼす影響について検討を続けた。両種において、硝酸区、アンモニア区では高  $\text{CO}_2$  による地上部重の増加が見られたが、アンモニア区では  $\text{CO}_2$  効果が見られなかった (図 2)。両種の硝カル区の値が尿素区や硫酸区の値を下回することは無かった。ケルダール窒素含量に関しては、ホウレンソウでは硝酸区でのみ高  $\text{CO}_2$  濃度による低下が見られ、エンドウでは硝酸区と尿素区で高  $\text{CO}_2$  による低下が観察された。

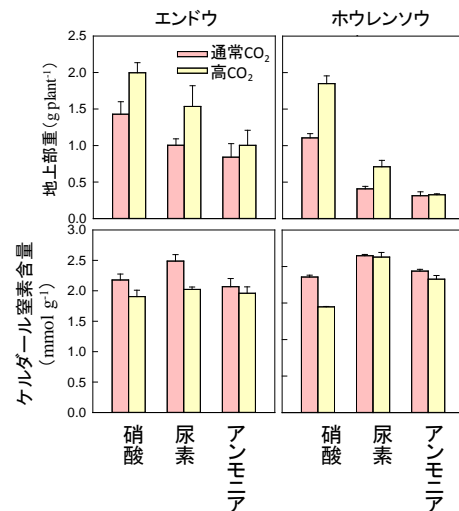


図 2. エンドウ、ホウレンソウにおける地上部重、ケルダール窒素含量の高  $\text{CO}_2$  応答に及ぼす無機窒素形態の影響。数値は平均値 ± 標準誤差 (n=12)。

ホウレンソウでは、硝酸区において高  $\text{CO}_2$  により葉硝酸含量が上昇し、硝酸還元酵素と亜硝酸還元酵素活性が低下し (表 1)、Bloom (2010) のコムギの結果と一致した。エンドウではそれらに  $\text{CO}_2$  効果は見られなかった。エンドウでは尿素区で、高  $\text{CO}_2$  下で葉のアンモニウム含量は変化せず、グルタミン合成酵素活性が増加した。ホウレンソウではそれらに  $\text{CO}_2$  効果が無かった。このように、窒素代謝の高  $\text{CO}_2$  濃度応答には明確な種間差が存在した。

表 1. エンドウ、ホウレンソウにおける葉の硝酸含量、硝酸還元酵素活性、亜硝酸還元酵素活性、アンモニウム含量、グルタミン合成酵素活性に及ぼす高 CO<sub>2</sub> の影響. 数値は平均値±標準誤差 (n=12)

		硝酸含量	硝酸還元酵素活性	亜硝酸還元酵素活性	アンモニウム含量	グルタミン合成酵素活性
		( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
エンドウ	通常	硝酸	2.78	3.44	1.85	-
		尿素	-	-	-	0.29
	高CO <sub>2</sub>	硝酸	2.29	3.03	1.6	-
		尿素	-	-	-	0.27
ホウレンソウ	通常	硝酸	23.1	14.1	3.11	-
		尿素	-	-	-	8.34
	高CO <sub>2</sub>	硝酸	38.1	9.64	2.3	-
		尿素	-	-	-	9.2

ホウレンソウにおいては、無機窒素形態に関係なく、高 CO<sub>2</sub> 濃度区で、炭酸固定への電子伝達速度 (Jc) が増加し、光呼吸、O<sub>2</sub> 濃度依存 (Water-Water サイクルなど)、O<sub>2</sub> 濃度非依存 (硝酸還元など) のオルタナティブ系への電子伝達速度 (それぞれ、Jo, Ja (O<sub>2</sub> 依存), Ja (O<sub>2</sub> 非依存)) が低下した。Bloom ら (2010) が提案するように、硝酸供給下での高 CO<sub>2</sub> 濃度による窒素含量の顕著な低下には、光呼吸抑制に伴う還元力不足に起因した硝酸還元阻害が関与すると考えられた。

(3) エンドウおよびホウレンソウを対象に、高 CO<sub>2</sub> 下で見られる地上部窒素含量の低下に窒素吸収能の低下が関与するか否かを調査するために、両種を水耕条件で栽培した。両種において、硝酸区で高 CO<sub>2</sub> による地上部重と地下部重の顕著な増加が確認された。地上部の全窒素含量は、エンドウでは、両窒素区において、CO<sub>2</sub> の影響を受けず、土耕条件とは異なる結果になった。ホウレンソウでは、硝酸区でのみ、高 CO<sub>2</sub> による低下が見られた。地下部の全窒素含量は、エンドウでは、硝酸区では、高 CO<sub>2</sub> によって増加し、アンモニア供給下では低下した。ホウレンソウでは、両区において CO<sub>2</sub> の影響を受けなかった。個体当たりの蒸散速度は、エンドウでは CO<sub>2</sub> の影響を受けなかったが、ホウレンソウでは、硝酸区でのみ、高 CO<sub>2</sub> による増加が見られた。個体当たりの <sup>15</sup>N 吸収速度は、両種において、硝酸区でのみ、高 CO<sub>2</sub> により増加した (図 3)。高 CO<sub>2</sub> 下では、気孔閉鎖に伴い蒸散流が抑制され、それに乗って吸収される窒素量が低下することが報告されているが (McDonald ら, 2002)、本研究結果はそれを支持しなかった。

(2) の結果とあわせると、ホウレンソウにおける高 CO<sub>2</sub> 下での地上部窒素含量の低下は、蒸散量や窒素吸収量の低下では説明できず、硝酸還元能の低下あるいは炭素蓄積による希釈に因るものと考えられた。

以上の結果をまとめると、好アンモニア性のイネでは、乾物生産に関して、硝酸供給下よりもアンモニア供給下で高 CO<sub>2</sub> 応答が高く

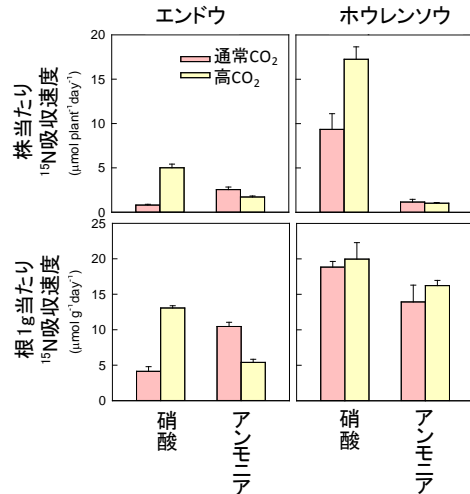


図 3. エンドウ、ホウレンソウにおける <sup>15</sup>N 吸収速度の高 CO<sub>2</sub> 応答に及ぼす無機窒素形態の影響. 数値は平均値±標準誤差 (n=3)

なったが、その他の好硝酸性作物ではそうならず、全ての作物種において、「高 CO<sub>2</sub> 環境では、アンモニア態窒素の重要度が増す」とはいえないと結論した。高 CO<sub>2</sub> が窒素代謝に及ぼす影響については種間差が認められた。ホウレンソウのように、硝酸供給下で高 CO<sub>2</sub> による窒素含量の低下が顕著になる種が見られ、これには根の窒素吸収よりむしろ葉の硝酸還元活性の低下が関与していた。近年、将来の高 CO<sub>2</sub> 下では作物の収穫物のタンパクなどの栄養分が低下することが危惧されている (Myers ら, 2014)。本成果から、高 CO<sub>2</sub> 下で硝酸施用すると、葉の硝酸還元活性の低下を介して、植物体の窒素含量の低下を引き起こす可能性が示唆されたので、これを回避する施肥や栽培技術の検討が今後の重要な課題である。

#### <引用文献>

- ① AJ. Bloom, As carbon dioxide rises, food quality will decline without careful nitrogen management, California Agriculture, 2009, 63, 68-72
- ② AJ. Bloom ら Carbon Dioxide Enrichment Inhibits Nitrate Assimilation in Wheat and Arabidopsis, Science, 2010, 328: 899-903
- ③ M. Stitt, A. Krapp, The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background, Plant Cell Environment 1999, 22, 583-623
- ④ EP. McDonald ら Can decreased transpiration limit plant nitrogen acquisition in elevated CO<sub>2</sub>? Functional Plant Biology 2002, 29, 1115 - 1120
- ⑤ SS. Myers ら Increasing CO<sub>2</sub> threatens human nutrition, Nature, 2014, 510, 139-142.

## 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)

〔学会発表〕(計1件)

熊谷悦史、作物の乾物生産および窒素蓄積における高CO<sub>2</sub>濃度応答に及ぼす施用窒素形態の影響—窒素形態に対する嗜好性の異なる作物種での比較—、日本作物学会第236回講演会、2013年9月9日、東北大学(宮城県、仙台市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊谷 悦史 (KUMAGAI Etsushi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産環境研究領域・研究員

研究者番号：80583442