

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04446

研究課題名(和文)米ぬかのコナギ抑草効果に關与する土壤有機酸および土壤微生物相の解明

研究課題名(英文)Analyses of organic acids and microorganisms of lowland soil related to the suppressive effect of rice bran on *Monochoria vaginalis* in organic rice production

研究代表者

内野 彰 (UCHINO, Akira)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：20355316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：水稻有機栽培における米ぬか散布によるコナギ抑草効果の機構を解明するため、米ぬか散布後に生成される土壤中の有機酸と土壤微生物の解析を行った。芳香族カルボン酸を想定した屋外実験ではコナギ抑草効果を説明することができなかったことから、コナギ抑草効果を再現する室内実験系の検討を行い、安定的に圃場の抑制効果を再現する条件を明らかにして実験系を構築した。この実験系を使うことにより、土壤中に含まれる微生物および米ぬかと反応して生成する物質がコナギ発芽阻害に重要であることが確認された。実験系を用いてコナギ抑草効果と相関する微生物と物質の同定を試みたが、研究期間内では単離することが出来なかった。

研究成果の概要(英文)：Organic acids and microorganisms of lowland soil were analyzed in order to elucidate the mechanism of suppressive effect of rice bran on *Monochoria vaginalis* in organic rice production. Outdoor experiments could not reveal the mechanism on the assumption of the effect of aromatic carboxylic acids. Therefore, laboratory experimental system simulating the suppressive effect of rice bran was established. The system revealed the essentiality of microorganisms and chemicals produced through the reaction of the microorganisms and rice bran. However, the microorganisms and chemicals could not be identified in the research period.

研究分野：雑草学

キーワード：有機農業 水田雑草 米ぬか コナギ 有機酸 土壤微生物 水稻有機栽培

## 1. 研究開始当初の背景

水稲有機栽培では雑草防除が一つの大きな課題となっており、特に一年生水田雑草のコナギが優占草種として残ることが多い。有機栽培農家では米ぬか散布による雑草防除がよく知られているが、そのコナギに対する効果は不安定であり、効果を疑問視する農家も多い。一方我々はこれまで、米ぬか散布のコナギ抑草効果が極めて不安定であるものの、散布後の土壌表層溶液の電気伝導度(EC)とコナギの発芽率との間に極めて高い負の相関関係があることを見だし、ECが高くなる条件であれば米ぬかのコナギ抑草効果が安定することを明らかにした(Nozoe et al. 2012)。

土壌溶液 EC 値は溶液のイオン強度に依存して変動する値であり、イオン強度の上昇は土壌微生物による米ぬか分解活性の上昇をもたらしたとすると、コナギ抑草効果は土壌微生物の米ぬか分解活性に由来するものと考えられる。水田への有機物施用によって土壌中に生成される植物生長阻害物質としては酢酸やプロピオン酸などが挙げられるが、これらは米ぬか散布後に直ぐに土中から消失する。このため、不斉に数週間に渡って発生するコナギに対しては発芽阻害物質の候補とはならない。一方、田中(2002)は有機物施用後の土壌中に酢酸やプロピオン酸の1/100程度の濃度で土中に生成される複数の芳香族カルボン酸が、酢酸やプロピオン酸の1000倍程度の水稲根伸長阻害活性があることを報告している。これら芳香族カルボン酸類は土壌中に数週間以上残存していたことから、コナギの発芽阻害物質として十分候補となりうると考えられた。そこで本研究では「米ぬか散布によって増殖する土壌微生物由来の芳香族カルボン酸によってコナギの発芽が阻害される」との仮説をたて、コナギ発芽阻害を行う芳香族カルボン酸類の同定とそれらを生成する微生物の同定などを行ってコナギ抑草機構の解明を進めることとした。

## 2. 研究の目的

上記の仮説を検証するため、コナギ抑草効果の異なる土壌を用いて米ぬか散布後のコナギ抑草効果と芳香族カルボン酸類の濃度を定量し、抑草効果と高い相関関係を示す芳香族カルボン酸類を明らかにする。次に、候補となる芳香族カルボン酸の濃度を変えた水溶液を作成し、コナギ発芽率と芳香族カルボン酸との濃度反応曲線を作成して、コナギ抑草効果を説明できる芳香族カルボン酸を同定する。

また土壌中の微生物相を明らかにするため、コナギ抑草効果の異なる土壌間でPCR-DGGE法(PCRを用いた変性濃度勾配ゲル電気泳動法)を用いて土壌微生物相の違いを調べる。PCR-DGGE法において、抑草効果の高い土壌で特異的に増幅する微生物 rRNA 遺伝

子を単離し、その塩基配列をDNAデータベースに照らし合わせて類似性の高い微生物を検索し、米ぬか散布効果の高い土壌で特異的に増殖している微生物群を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) コナギ発芽阻害物質としての芳香族カルボン酸類の解析

コナギ種子を埋土種子として大量に保持する水田土壌を50cm角のコンクリートポットに詰めて屋外に維持した。これによりコナギ種子の休眠状態が自然に近い条件を作り、この土壌を用い、5月および6月にそれぞれ代かき、水稲移植および移植同日に米ぬか散布(100kg/10a相当)を行い、9月に抑草効果を評価した。また代かき直後の土壌表層に直径2.5mm(内径1.5mm)、長さ50mmの土壌溶液採取管を設置し、1週間おきに4週間後まで定期的に土壌溶液を採取した。この溶液について候補となる5種類の芳香族カルボン酸類(安息香酸、2-フェニルプロピオン酸、3-フェニルプロピオン酸および4-フェニル酪酸、フェニル酢酸)の濃度をGC-MSで解析し、コナギ抑草効果との関連性を調査した。

また5種類の芳香族カルボン酸について、土壌表層溶液中の濃度をもとに希釈系列の水溶液を作成し、各水溶液中でコナギ発芽試験を行ってそのコナギ発芽阻害効果を調べた。

### (2) コナギ抑草効果に関与する土壌微生物の同定

上記で用いた土壌について、土壌からDNAを抽出し、PCR-DGGE法で16Sおよび18S rRNAのバンドパターンを比較した。比較した結果からコナギ抑草効果と高い相関関係を示すバンドを特定した。PCR-DGGE法は既存のマニュアル(農業環境技術研究所2011年)に従い、DNAの抽出は市販のキット(Q-BioGene社のFastDNA SPIN Kit for Soil)を使い、細菌群集構造の解析は16S rRNA遺伝子のV6-8可変領域を標的とするプライマーセット、糸状菌群集構造の解析は18S rRNA遺伝子を標的とするプライマーセットを使用した。

特定されたバンドをゲルから切り出して、クローニング後に塩基配列を決定し、その配列と相同性のある塩基配列を微生物のDNAデータベースで検索した。

### (3) 室内実験系の作成

米ぬか散布後のコナギ抑草効果が異なる数種類の土壌について、50mLチューブ内で湛水し、一定時間後に土壌溶液を抽出した。土壌溶液と米ぬかを混合して20-30°Cの条件で数日間培養した後、培養液を濾過してコナギ発芽試験を行った。この湛水におく期間や温度などの条件や米ぬかと混合した後の期間や温度などの条件の検討を行い、圃場における土壌のコナギ抑草効果が再現できるような条件を設定した。また滅菌・未滅菌の条件でコナギ発芽阻害効果を評価し、各ステップ

における微生物活性の寄与についても明らかにした。

(4) 室内実験系を用いた土壤微生物の解析  
 発芽阻害活性のある土壤溶液や米ぬかと混合した後の溶液から、DNAを抽出し、(2)と同様にPCR-DGGE法のバンドパターンを比較し、コナギ発芽阻害活性と相関するバンドを特定した。この塩基配列をデータベースで検索することにより、コナギ発芽阻害活性と関連性の高い微生物群を同定した。

(5) 室内実験系を用いたコナギ発芽阻害物質の解析

室内実験系において発芽阻害活性のある溶液を分画・精製して、発芽阻害物質同定のための実験系を組み立て、HPLCやGC-MSなどを用いて発芽阻害物質の同定を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) コナギ発芽阻害物質としての芳香族カルボン酸類の解析

5種類の芳香族カルボン酸類について、米ぬかの効果が異なる土壤間で土壤表層溶液中の濃度を比較した。米ぬか処理を行った土壤から安息香酸、フェニル酢酸、3-フェニルプロピオン酸の3種化合物が検出され、その他の芳香族カルボン酸はほとんど検出されなかった。また米ぬかを処理しなかった対照土壤では、安息香酸しか検出されなかった。米ぬかの効果との相関性をみると、安息香酸には顕著な関連性が認められなかったが、フェニル酢酸および3-フェニルプロピオン酸は米ぬか効果の高い土壤において高い濃度で検出された。その濃度はフェニル酢酸で10-50  $\mu\text{M}$ 、3-フェニルプロピオン酸で1-10  $\mu\text{M}$ 程度であった。

5種類の芳香族カルボン酸類の発芽阻害効果を比較したところ、3-フェニルプロピオン酸の活性が最も高かったが、発芽を50%以下に阻害する濃度が150  $\mu\text{M}$ 程度であり、フェニル酢酸については250  $\mu\text{M}$ 以上の濃度が必要であった。実際の土壤表層溶液中の濃度はこの1/5から1/15以下であり、この濃度ではいずれも発芽阻害効果が認められなかった。

(2) コナギ抑草効果に關与する土壤微生物の同定

PCR-DGGE法を用いて、米ぬか抑草効果の高い土壤と低い土壤を比較し、異なる増幅効率を示した細菌rRNA遺伝子を単離して塩基配列を同定したところ6種類の細菌が同定された。そのうちの1種の細菌 *Corynebacterineae bacterium* については、特異的プライマーを設計してPCRでrRNA遺伝子を増幅させることができ、米ぬか抑草効果の高い土壤で多く増幅されることが確認された。

(3) 室内実験系の作成

芳香族カルボン酸を想定した屋外実験ではコナギ抑草効果を説明することが出来なかったことから、室内実験系によって安定的に圃場の抑草効果を再現する条件を検討し、

土壤を介さない実験系の分析によって阻害物質と関連微生物を同定することとした。米ぬか散布後のコナギ抑草効果が異なる3種類の土壤について、風乾土壤と蒸留水を混合して1週間後の土壤ろ液と米ぬかを混合し、この混合液を用いてコナギ発芽試験を行った。この結果、温度、米ぬか量およびコナギ種子の条件を検討することで、コナギ抑草効果を再現する実験系の条件が明らかとなった。

供試種子については、種子を次亜塩素酸で殺菌すると採取年や休眠覚醒の有無にかかわらず比較的安定した結果が得られた。米ぬか培養時までの温度を25として発芽試験を30とし、米ぬか0.4gと土壤ろ液1mLを反応液で混合すると土壤間差が認められた(図1)。

米ぬか0.4gでは、圃場条件で最も抑草効果の高かった4-5R圃場の土壤(表1)で最も高い発芽阻害効果が認められ、圃場条件で効果の低かった8-9圃場の土壤ではほとんど発芽阻害効果が認められなかった。

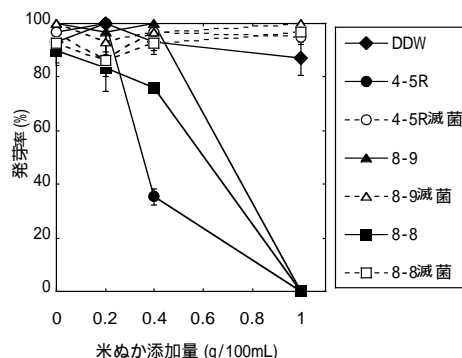


図1 室内実験系における米ぬか添加量とコナギ発芽率との関係

DDW: 蒸留水と混合した場合。4-5R、8-9、8-8は土壤を採取した圃場番号。各圃場における米ぬか散布の効果は表1を参照。滅菌は、土壤ろ液を抽出後に滅菌してから米ぬかと混合して培養した場合の結果。

表1 2015年の水稲有機栽培試験圃場におけるコナギ抑草効果(図1の土壤に対応)

圃場	処理	本数(本/m <sup>2</sup> )	乾物重(g/m <sup>2</sup> )
4-5R (連作8年目)	無除草区	600 ± 198	33 ± 7
	米ぬか散布区(株間)	0 (0) ± 0	0 (0) ± 0
8-8 (連作5年目)	無除草区	1044 ± 217	65 ± 3
	米ぬか散布区(株間)	245 (23) ± 32	32 (49) ± 6
8-9 (連作6年目)	無処理区	3200 ± 340	141 ± 35
	米ぬか散布区(株間)	1650 (52) ± 297	101 (72) ± 22

注) ( )内の数値は各圃場の無除草区を100とした時の相対値

この系をもとに各種土壤の評価を行ったところ、2017年に圃場から採取した風乾土は、2015年に採取した風乾土の結果と同様な結果が得られたが、2016年に採取した風乾土には発芽阻害効果が認められなかった。2016年採取土は過乾燥により微生物相が影響を受けた可能性があり、生土を使った場合の再現性も含めて採取土壤の条件検討が必要であった。

この実験系では、土壤ろ液を滅菌してから米ぬかと混合して培養するとコナギの発芽阻害が認められなかったことから、土壤ろ液中に存在する微生物が発芽阻害に関与していることが明らかとなった（図1）。

（4）室内実験系を用いた土壤微生物の解析  
 上記の室内実験系で作成した土壤ろ液について、ろ液中のDNAを抽出し、PCR-DGGE法で16S rRNAのバンドパターンを比較し、コナギ発芽阻害活性と相関するバンドを特定した。数本の候補となるバンドを切り出して塩基配列を決定し、BLAST検索した結果、*Clostridium*属菌が同定された（図2）。しかし、配列をもとに特異的PCRプライマーを設計し、水稻有機栽培試験圃場の表層1cmの土壤から抽出したDNAから同菌の検出を試みたところ、増殖効率が低く、圃場の抑草効果との相関が認められなかった。

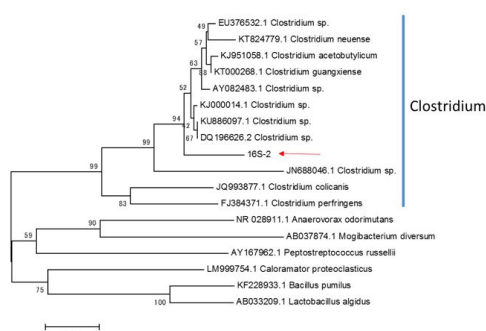


図2 細菌16S rRNAから単離したバンド配列と近縁配列の分子系統樹  
 赤矢印が単離したバンド配列を示す。青線で示した近縁種はすべて *Clostridium* 属細菌。系統樹はNJ法による。

（5）室内実験系を用いたコナギ発芽阻害物質の解析

発芽阻害が認められた土壤ろ液と米ぬかの培養液をろ過滅菌したところ、滅菌後の培養液にもコナギ発芽阻害効果が認められたことから、培養液に何らかの発芽阻害物質が含まれることが確認された。

酢酸エチルを使って培養液を酸性分画とアルカリ分画に分けたところ、原液を蒸発乾固しただけで発芽阻害活性が無くなるのが認められた（図3）。分画作業中には蒸発乾固の過程が入るため、蒸発乾固にかわる分離手法など分画条件の検討が必要であった。

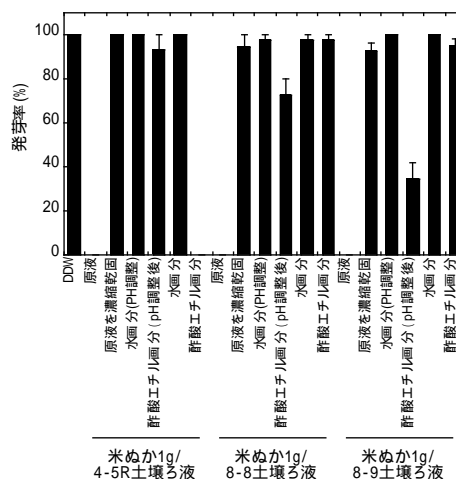


図3 米ぬか培養液を分画した後のコナギ発芽阻害効果

原液（米ぬか培養液）をHClでpH調整した後に酢酸エチル層と水層に分画して、コナギ発芽試験に供試。pH調整しない場合と原液を濃縮乾固しただけの場合の発芽試験結果と比較。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

浦嶋 泰文、早川 宗志、内野 彰. 米ぬか等新鮮有機物施用のコナギ抑草機構の解明と診断指標の確立、土壤肥料学会、2018

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内野 彰 (UCHINO, Akira)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター生産体系研究領域・上級研究員

研究者番号：20355316

### (2) 研究分担者

浦嶋 泰文 (URASHIMA, Yasufumi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター土壤肥料研究領域・上級研究員

研究者番号：90355610

### (3) 研究協力者

早川 宗志 (HAYAKAWA, Hiroshi)

大場 広輔 (OHBA, Hirosuke)