

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011～2012

課題番号：23658017

研究課題名（和文） イネにおける生物的窒素固定の評価とその利用に関する研究

研究課題名（英文） Research for evaluation and usage of biological nitrogen fixation in rice

研究代表者

井上 博茂 (INOUE HIROMO)

京都大学・大学院農学研究科・講師

研究者番号：40260616

研究成果の概要（和文）：真砂土を用いてイネをポット栽培した。イネ生育期間を通して純水を用いて灌水を行うことならびに重窒素で標識された硫酸を施肥窒素に用いることにより、生物的窒素固定の量的推定を行うことができた。この方法を用いて、イネの交雑後代 F₂ 集団を評価したところ、生物的窒素固定が遺伝因子によって支配されていることが明らかになった。イネ栽培後土壌より、DNA を抽出し、得られた DNA を鋳型とする PCR を行うことで、土壌中に含まれる窒素固定微生物の同定を容易に行うことができた。

研究成果の概要（英文）：Rice cultivar Taichung 65, Nipponbare, Kasalath and C5444 were cultivated in the pots using masa soil. By using ¹⁵N labeled (NH₄)₂SO₄ as nitrogen fertilizer and pure water as irrigation through total rice growth term, the amount of biological nitrogen fixation in rice could be estimated in the pot experiment. According to this method, biological nitrogen fixation in the F₂ population from the cross between Taichung 65 and C5444 was estimated and it was revealed that this agronomic character may be controlled by genetic factors. Nitrogen fixation microorganisms could be easily detected using the PCR with DNA extracted from the soils, with which rice was cultivated, as the template DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：栽培体系、生物的窒素固定

1. 研究開始当初の背景

イネ根圏における生物的窒素固定（以下 BNF）に関する研究は、1970 年代後半より 1980 年代にかけて、国立遺伝学研究所において、主としてアセチレン還元活性（以下 ARA）をその指標として盛んに行われた。多数のイネインド型品種および日本型品種について ARA が調べられ、イネ出穂期頃に高い ARA を示すこと、インド型品種 C5444 が、日本型品種台中 65 号に比較して高い ARA を発現することなどが示されるとともに、これ

ら 2 品種の交雑後代における ARA を測定した結果から、ARA の発現が量的形質遺伝によって支配されていることが示唆された。これらの実験では、主として灰色低地土、グライ土、多湿黒ボク土といったわが国水田土壌を用いて栽培されたイネが用いられており、大陸などに多く分布する赤色土などの土壌において栽培されたイネは用いられていない。一方、量的形質に関する遺伝学的解析では、分子生物学的手法を用いることにより、微働遺伝子の作用力まで詳細に解析することが

できるようになった。これらの分析手法を利用して BNF に関する遺伝学的解析を進めるためには、BNF を発現させるための栽培条件の検討ばかりではなくイネにおける遺伝的要因についても解析を行う必要がある。しかしながら、遺伝学的解析を行うためには、分離集団を扱うことから、圃場栽培において簡便でしかも正確な評価法の確立が不可欠であるが、現在のところ BNF に関する評価法が確立されているとはいえない。

2. 研究の目的

イネ栽培において、エンドファイトによるイネ根圏での BNF を有効に利用することができれば、化学肥料施用量の低減につながり、環境負荷を低減した持続的農業への道が拓かれるものと期待される。そのためには、BNF を発現させるための栽培条件の検討およびイネの BNF に関する遺伝育種学的解析が必要である。そこで本研究では、3 種類の土壌を用いたイネのポット栽培ならびに水田圃場における栽培を行い、BNF の発現に関与する栽培的要因について検討するとともに、BNF の評価法確立を目指す。これらの結果をもとに、圃場栽培において BNF を発現させるための栽培条件について検討する。

3. 研究の方法

(1) 赤色土壌を用いたイネのポット栽培

イネ品種カサラスを、赤色土壌（島根大学本庄総合農場の畑地下層土）を用いて直播によるポット栽培を行った。栽培には 1/5,000a ワグナーポットを用いた。施肥窒素には重窒素で標識された硫安 (10.7atm%) を用いた。水条件として、畑 (pF=2.0、D) 区および常時湛水 (W) 区の 2 処理を設け、イネ生育期間を通して灌水には純水を用いた。施肥条件として、D 区、W 区ともに、窒素無施用 (NF)、硫安施用 (C)、イナワラ施用 (R) および硫安+イナワラ施用 (CR) の 4 処理を設けた。出穂期を中心に *in situ* 条件下で ARA を測定するとともに、登熟期にイネをサンプリングし、乾物重、全窒素濃度および重窒素含有率を測定した。ポット栽培における窒素施用条件と同条件となるように土壌を調整し、試験管を用いて 30°C で定置培養を行った。培養開始後 0、2 および 4 週後にアンモニア態窒素の含有量を測定し、それぞれの処理区についてアンモニア態窒素発現量を推定した。

(2) 水田土壌を用いたイネのポット栽培

①イネ品種日本晴、台中 65 号、C5444 およびカサラスを、水田土壌（京都大学農学研究科附属高槻農場の水田作土）を用いて移植によるポット栽培を行った。栽培には 1/5,000a ワグナーポットを用いた。施肥条件として、窒素無施用 (N0) および硫安施用 (10gN/m²、

N) の 2 処理を設けた。赤色土壌の場合と同様に畑 (D) および常時湛水 (W) の 2 水分条件で純水を用いて栽培した。赤色土壌の場合と同様に ARA を測定するとともに、登熟期にイネおよび土壌をサンプリングして、乾物重および全窒素濃度を測定した。W 区について、ポットごとに窒素バランス法による窒素収支を計算した。

②W 区におけるイネ栽培後土壌より DNA を抽出し、土壌微生物の 16S リボゾーム RNA 領域を特異的に増幅するプライマーセットを用いて PCR を行い、土壌中に含まれる窒素固定微生物の有無を調査した。増幅酵素には、KOD Plus (東洋紡) を用い、反応条件を 94°C 2 分 → (94°C 15 秒 + 58°C 30 秒 + 68°C 1 分) × 30 → 68°C 7 分とした。

(3) 圃場栽培実験

京都大学大学院農学研究科附属農場（大阪府高槻市）の水田圃場においてイネ品種アキヒカリ、日本晴、台中 65 号、C5444 およびカサラスを移植栽培した。施肥条件として、窒素無施用 (N0) および硫安施用 (8gN/m²、N) の 2 処理を設けた。まず、アキヒカリについて、イネをサンプリングし、部位別分解したサンプルと未分解サンプルについて、ARA を測定し、ARA 発現の部位局所性について検討した。その結果、未分解サンプルにおいて最も大きい ARA を検出することができたこと（後述）から、日本晴、台中 65 号、C5444 およびカサラスについて、出穂期前後にサンプリングを行い、得られたサンプルを部位別分解することなく、ARA を測定するとともに、測定後のサンプルについて乾物重ならびに全窒素濃度を測定した。

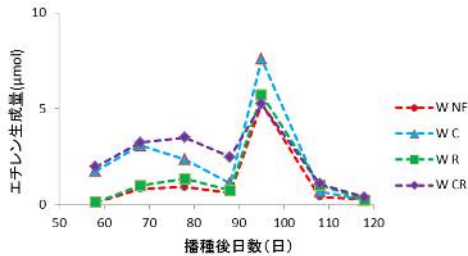
(4) 真砂土を用いたイネのポット栽培

①イネ品種台中 65 号、C5444 およびこれらの交雑後代系統 (F₁ および F₂) を供試して、貧窒素含有土壌である真砂土を用いて直播によるポット栽培を行った。栽培には 1/10,000a ホワイットポットを用いた。施用窒素として重窒素で標識された硫安 (10.7atm%) を用い (15gN/m²)、イネ収穫後にイネの乾物重、全窒素濃度ならびに重窒素含有率を測定して、イネにおける施用窒素の吸収量を推定した。なお、イネの生育期間を通して灌水には純水を用いた。

②イネ品種台中 65 号および C5444 の栽培後土壌より DNA を抽出し、土壌微生物の 16S リボゾーム RNA 領域を特異的に増幅するプライマーセットを用いて PCR を行い、土壌中に含まれる窒素固定微生物の有無を調査した。PCR に用いた増幅酵素ならびに反応条件を (2)②と同様とした。

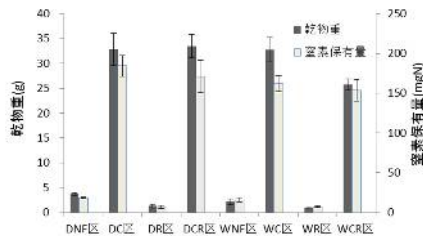
4. 研究成果

(1) 赤色土壌を用いたイネのポット栽培 W 区において、イネ出穂期に高い ARA を検出した (第 1 図) が、D 区では ARA の時期的変化が認められなかった (データ省略)。このことから、赤色土壌では、湛水処理をすることにより BNF が発現することが示唆された。



第1図 W区におけるARAの推移

イネの乾物重ならびに窒素保有量については、W 区、D 区ともに、硫安施用区において大きい値を示したのに対し、硫安無施用区で乾物重の増加が認められなかった (第 2 図)。窒素含有量が極端に低く (後述)、イネ栽培において窒素の供給が不可欠であることおよび湛水処理ではイナワラ添加によって乾物重の増加が抑制されることが示唆された。このことは、赤色土壌における窒素供給源としてイナワラを用いる場合には、投入方法を検討する必要があることを示唆している。



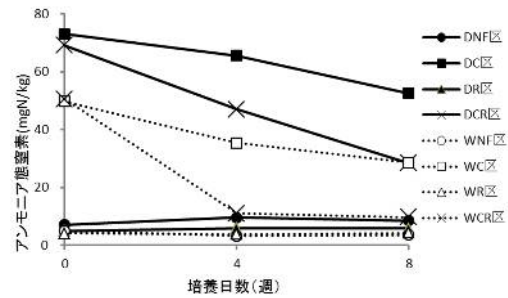
第2図 収穫時のイネの乾物重と窒素保有量

重窒素追跡法に従ってイネおよび赤色土壌における施用硫安の分配について、D 区、W 区ともに、硫安施用区において、大きい施肥外由来窒素量を検出したのに対し、硫安無施用区では施肥外窒素量が小さい値となった (第 1 表)。また、イネの乾物重が大きくなるにつれて、施肥外窒素量も大きくなる傾向を示していた。

処理	播種時		収穫時				
	全窒素 (mgN/pot)	乾物重 (g/pot)	イネ		土壌		イネ施肥外 由来 ¹⁾ (mgN/pot)
			全窒素 (mgN/pot)	施肥由来 (mgN/pot)	全窒素 (mgN/pot)	施肥由来 (mgN/pot)	
D NF区	1,036.00	3.70	18.06	0.00	970.67	0.00	18.06
D C区	1,036.00	32.85	184.39	131.32	989.33	56.67	53.07
D R区	1,036.00	1.28	6.94	0.00	914.67	0.00	6.94
D CR区	1,036.00	33.53	171.21	114.79	942.67	68.82	56.42
W NF区	1,036.00	2.17	15.77	0.00	924.00	0.00	15.77
W C区	1,036.00	32.78	162.05	114.33	1,008.00	51.72	47.72
W R区	1,036.00	1.03	7.12	0.00	942.67	0.00	7.12
W CR区	1,036.00	29.75	153.91	102.23	989.33	73.90	51.68

¹⁾ イネ全窒素 - イネ施肥N由来

土壌を定置培養することにより、アンモニア態窒素の発現量を推定したところ、硫安添加区において発現量の減少が認められた (第 3 図)。このことは、土壌によるアンモニア態窒素の吸着が生じていることを示唆しており、赤色土壌において窒素施用を行う場合には、吸着される量を考慮して、窒素の施用量を加減する必要があることが明らかになった。

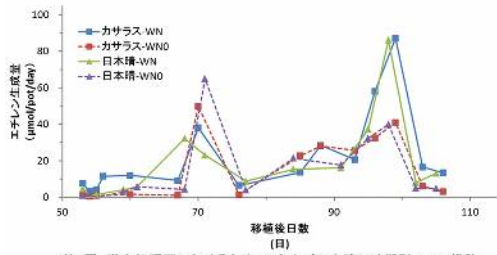


第3図 定置培養によるアンモニア態窒素発現量の変化

以上の結果より、粘土含量が極端に多い赤色土壌では、窒素が土壌に吸着されることによりイネによる窒素吸収量が抑制されること、またその抑制程度は畑条件に比べて湛水条件で大きくなることが示唆された。また、イネを栽培した場合における土壌中の窒素含有量の減少程度については、畑条件に比べて湛水条件で小さくなること、およびこのことには生物的窒素固定が関与している可能性があることが示唆された。

(2) 水田土壌を用いたイネのポット栽培

①カサラスおよび日本晴において、W 区では硫安施用区で出穂期に大きい ARA を示したのに対し、硫安無施用区では ARA の経時変化が認められなかった (第 4 図)。一方、D 区では、硫安施用/無施用に関わらず、ARA の経時変化が認められなかった (データ省略)。台中 65 号および C5444 においても、日本晴およびカサラスと同様の傾向を示したものの、日本晴およびカサラスほど明瞭ではなかった (データ省略)。



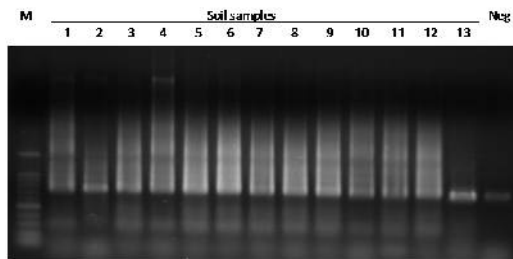
第4図 灌水処理区におけるカサラスおよび日本晴の時期別ARAの推移

窒素バランス法によるポットの窒素収支をW区について計算したところ、C5444のN0区および台中65号のN0区を除き、すべて負の値を示し、また正の値を示した2つの処理区でもその値が極端に小さかったことから、ポット系外からの窒素流入量を推定することができなかった(第2表)。このことは、W区において、イネ栽培を通して、窒素の系外への流出(脱窒、揮散など)が生じていることを示しており、窒素バランス法によるBNFの評価が難しいことが明らかになった。

		移植期			収穫期			ΔN ¹⁾ (mg/pot)
		イネ (mg/pot)	土壌 (mg/pot)	N施肥 (mg/pot)	イネ (mg/pot)	土壌 (mg/pot)		
カサラス	WN	2.72	2,842.59	200.00	238.94	2,375.81	Δ 430.56	
カサラス	WNO	2.72	2,842.59	0.00	135.14	2,506.47	Δ 203.70	
日本晴	WN	2.54	2,842.59	200.00	337.90	2,389.55	Δ 317.68	
日本晴	WNO	2.54	2,842.59	0.00	165.27	2,600.22	Δ 79.64	
C5444	WN	2.20	2,842.59	200.00	185.95	2,702.61	Δ 56.23	
C5444	WNO	2.20	2,842.59	0.00	110.03	2,798.59	63.83	
台中65号	WN	2.83	2,842.59	200.00	194.49	2,714.47	Δ 36.46	
台中65号	WNO	2.83	2,842.59	0.00	101.47	2,799.59	55.64	

1) 収穫期全窒素量 - 移植期全窒素量 で求めた。

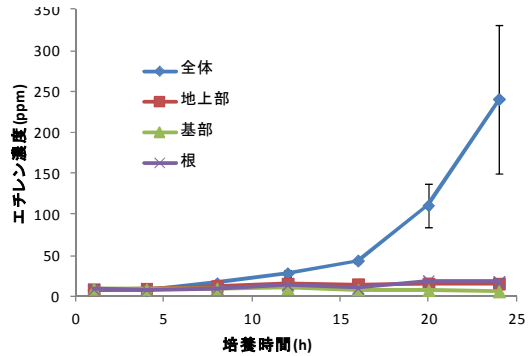
②W区におけるイネ栽培後土壌よりDNAを抽出することができた。窒素固定微生物である *Azospirillum* および *Herbaspirillum* の16SリボゾームRNA領域を特異的に増幅するプライマーセットを用いて土壌DNAを鋳型とするPCRを行い、すべての土壌サンプルについて増幅断片を得ることができた(第5図)。W区における生物的窒素固定の発現にこれら土壌微生物が関与している可能性があることが示唆された。



第5図 イネ栽培後土壌から抽出したDNAを鋳型に用いたPCRによる断片の増幅。Herbaspirillumの領域738bpを増幅するプライマーセットを用いた。

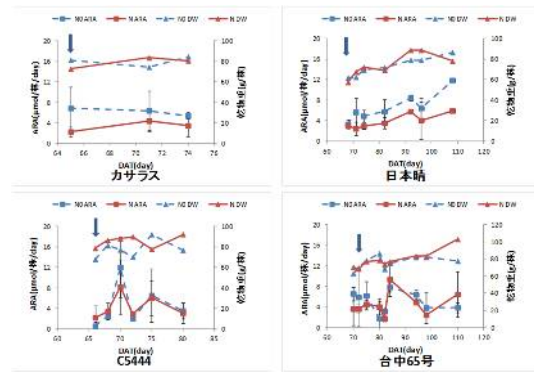
(3) 圃場栽培実験

アキヒカリのサンプルについて、部位別分解サンプルおよび未分解サンプルについてそれぞれARAを測定したところ、未分解サンプルにおいて最も大きいARAを示し、部位別分解したサンプルの測定では、ARAを検出することができないことが明らかになった(第6図)。



第6図 アキヒカリの部位別分解サンプルおよび未分解サンプルにおけるエチレン濃度の経時的変化

カサラス、日本晴、C5444および台中65号の生育時期別ARAをサンプリングした未分解サンプルについて調べたところ、概ね出穂期以降約10日程度で最も大きいARAを示した(第7図)。また、カサラスおよび日本晴では窒素無施用区で高いARAを示したのに対して、C5444および台中65号では、窒素の処理間では明瞭な差異が認められなかった。



第7図 4品種における生育時期別の1株あたり乾物重およびARA(↓は出穂期を示す)

以上のように、カサラスおよび日本晴では、出穂後の生育期間においてN区に比べてN0区において高いARAを示す傾向が認められたものの、C5444および台中65号ではN区およびN0区でARAにおいて明瞭な差異が認められなかった。しかしながら、C5444および台中65号では、イネ出穂後5~10日で最も高いARAを示すことが明らかになった。

わが国水田土壌では、窒素濃度が比較的大きく、特に化学肥料施用条件下では、窒素がイネ生育の制限要因となり難いことが推察され、その結果、BNFが機能していないか、または機能していてもその大きさは土壌中の窒素と比べて極端に小さいことが考えられた。水田土壌を用いた栽培においては、ARAによるBNFの推定ならびに評価が難しいことが考えられた。また、サンプリングした植物体を用いてARAを測定することの難しさも併せて示された。

(4) 真砂土を用いたイネのポット栽培

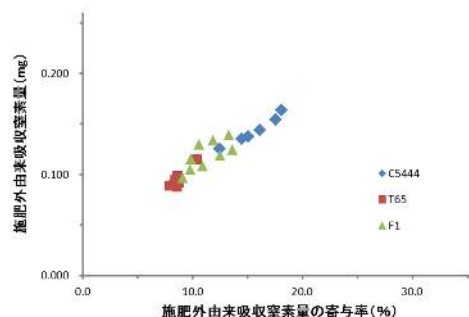
①本実験に供試した真砂土は、水田土壌と比べて、極端に全窒素含有量が小さくかつ可給態窒素量が極めて少なかった(第3表)。水田土壌を用いたイネの栽培では、土壌から供給される窒素量を推定することが難しく、結果としてBNFを評価することが難しかった。そこで、真砂土を用いてイネをポット栽培し、BNFの評価を試みた。

第3表 本研究で供試した土壌の特性

	赤色土 ¹⁾	水田土 ²⁾	真砂土
pH(H ₂ O)	4.86	6.01	5.74
全炭素(%)	0.27	2.17	0.11
全窒素(ppm)	370.0	1,862.0	52.0
可給態窒素(mgN/kg)	3.4	121.9	0.3
粒径組成(%)			
砂	11.4	62.7	87.3
シルト	0.6	23.0	8.8
粘土	88.0	14.3	3.9

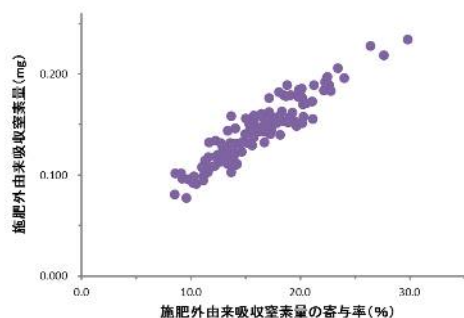
- 1) 島根大学本庄総合農場の畑地下層土
2) 京都大学農学研究科附属高槻農場の水田作土

台中65号(T65)、C5444およびこれらの交雑後代F₁について、施肥由来外吸収窒素量およびその全窒素保有量に占める割合(寄与率)を求めたところ、台中65号およびC5444を明瞭に区別することができ、またF₁は両親の中間型を示した(第8図)。



第8図 台中65号、C5444およびそれらの交雑F₁における施肥外由来吸収窒素量とその寄与率との関係

同様に、交雑F₂集団について、施肥由来外吸収窒素量およびその全窒素保有量に占める割合(寄与率)についてみたところ、両親のレンジを超越する個体が多数出現しており、C5444よりも多くの施肥由来外吸収窒素量を示した個体の出現が顕著に認められた(第9図)。

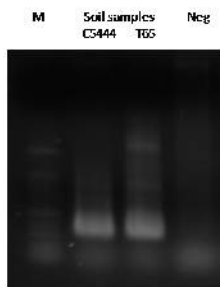


第9図 交雑F₂集団における施肥外由来吸収窒素量とその寄与率との関係

本実験で栽培に用いた真砂土は、その全窒素含有量が極端に小さく、かつ可給態窒素量も極端に小さい(第3表)ことから、土壌からの窒素供給量を0と仮定することで、施肥由来外吸収窒素量をBNFによる吸収窒素量とすることができる。この仮定をもとに台中65号、C5444およびF₁におけるBNFを評価したところ、C5444>F₁>台中65号となり、また、F₂集団では、BNFが最も大きかったC5444を超える個体が多数出現しており、台中65号よりも小さいBNFを示したF₂個体も出現していた(第9図)。これらのことから、BNFについては、遺伝的因子の関与が示唆され、C5444および台中65号といったBNFが異なる系統間において交雑を行い、得

られた交雑後代系統において、より高いBNFを示す個体を選抜することができると考えられた。

②イネ栽培前の土壌よりDNAを抽出することができなかったが、栽培後土壌からはDNAを抽出することができた。これらDNAを鋳型として、窒素固定微生物である *Azospirillum* および *Herbaspirillum* の 16S リボゾーム RNA 領域を特異的に増幅するプライマーセットを用いてPCRを行ったところ、すべてのDNAについて、DNA断片の増幅が認められた(第10図)。



第10図 イネ栽培後土壌から抽出したDNAを鋳型に用いたPCRによる断片の増幅
Azospirillum の領域352bpsを増幅するプライマーセットを用いた

栽培に用いた台中65号、C5444およびそれらの交雑後代系統では、いずれも播種前に市販の殺菌剤および殺虫剤を用いて種子消毒を行っており、いもち病、ばかなえ病などを予防している。栽培前の真砂土からDNAを抽出することができなかったが、栽培後の真砂土からはDNAを抽出することができ、かつ窒素固定微生物である *Azospirillum* および *Herbaspirillum* の存在が示唆された。これら土壌微生物の移入経路については現在のところ不明であるが、イネを栽培する過程において、混入したと考えるのが自然であろう。市販の殺菌剤が窒素固定微生物に対して殺菌作用があるかどうかは不明であることから、移入経路については推定することが困難である。

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)

①井上博茂・齋田賢児・稲村達也、赤色土壌の水田化がイネによる窒素の吸収とその利用に及ぼす影響、日本作物学会、2012年3月29日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 博茂 (INOUE HIROMO)

京都大学・大学院農学研究科・講師

研究者番号：40260616

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：