

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

Enhancing nitrogen-fixing capacity of plant-soil system in rice paddy field with low fertility

論文題目

貧栄養土壌水田におけるイネ・土壌の窒素固定能の増強

氏名 岡本 卓哲

論文内容の要旨

第1章 研究の背景

水田は肥沃度の維持能力が高く、その一因として空気中の窒素分子を植物の栄養源となるアンモニアに細菌が変換する「生物学的窒素固定 (以下、窒素固定)」能力の高さが挙げられる。貧栄養土壌かつ窒素肥料の施肥が不十分であるイネ生産現場では特に窒素固定の有効な活用が期待される。水田におけるイネ栽培系ではイネ体内、根圏および土壌中に生息する窒素固定細菌による寄与があるとされ、これらを総合的に向上することが効果的と考えられる。窒素固定は多くのエネルギーを消費し、炭素源を多量に必要とすることから体内および土壌では炭素源の種類や量が窒素固定能に影響することが想定される。これまでにイネの体内では茎部で窒素固定能が高いこと、また品種間で体内の窒素固定能に変異があることが報告されているがその要因や原因遺伝子には不明が多い。イネの茎における窒素固定は糖蓄積に応じて高まる可能性があるが、窒素固定の主体となる菌叢や、茎の中の部位は依然不明である。また窒素固定はリンを必要としニトロゲナーゼ酵素はモリブデンや鉄を含有しているため、これらの要素が窒素固定能に影響することも知られる。水田土壌の窒素固定では、リン肥料や有機物、鉄等の金属含有資材の施用が窒素固定能を増強するとの報告もあるが、熱帯土壌を含む幅広い土壌での検証はされていない。

これらの背景をうけて本研究では、イネ体内については茎における窒素固定に着目し、その品種間差異やメカニズムを炭素利用および窒素固定細菌叢の組成から明らかにしようとした。窒素固定能の基質の違いと菌叢の関係を明らかにすることを目指した。さらに、窒素固定能力の高い *Oryza glaberrima* の染色体断片置換系統群 (CSSLs) を利用し、高い窒素固定能力に関与する遺伝子領域の同定を試みた。また、土壌については金属元素を含む鑄造副産物を水田土壌に施用した際の窒素固定の向上効果を評価した。最後に、肥沃度の低い水田の代表例として、マダガスカルに着目し、マダガスカルの実用品種の窒素固定能の評価を行うとともに、炭素源とリンを含む現

地で入手可能な堆肥について施用した場合の窒素固定の促進効果を評価しその要因を解析した。

第2章 イネ茎部の窒素固定の菌叢解析と炭素源の関係

茎部の窒素固定部位を明らかにするため出穂期のイネの茎の基部を $^{15}\text{N}_2$ ガスに暴露し、微細部位ごとの ^{15}N 量を解析した。その結果、不伸長茎部の外側が窒素固定の高い部位として機能していることが明らかになった。さらに、不伸長茎部の外側には、メタンを利用するメタン酸化細菌と、*Paraburkholderia* sp.等の糖を利用する細菌が多く存在したことから、窒素固定はこれらの細菌がメタンと糖を消費しながら行われていたと考えられた。一方で次いで活性の高かった葉鞘では、*Paraburkholderia* sp.や*Sagittula* sp.が主体であり、主に糖類を基質とすることが推察された。これらの結果より部位により主体となる菌叢やその基質が異なる可能性を示した。

第3章 茎部窒素固定能の品種間差異と遺伝要因

イネの茎の窒素固定活性と糖濃度が異なる品種間の窒素固定細菌叢を調べたところ、多くの菌叢は品種間で共通であり、*Paraburkholderia* sp.や*Bradyrhizobium* sp.が主体であることがわかった。一方で、窒素固定活性の高かった*O. glaberrima*のCG14では*Kosakonia* sp.が特異的に高い傾向があるなど、品種に特有の菌叢が存在することも示された。また窒素固定活性に関与するQTLを明らかにするために*O. sativa*を遺伝的背景とし、*O. glaberrima*由来の染色体断片を持つ2種類のCSSLsを栽培し、茎の窒素固定活性を評価した。その結果*O. sativa*親品種よりも高い活性を持つ系統が存在した。それらの系統における*O. glaberrima*由来の染色体断片置換位置は第2、6、7、8、11、12染色体の一部にそれぞれ存在し、*O. glaberrima*の窒素固定能の高さは複数の遺伝要因により制御されている可能性が示された。

第4章 水田土壌の窒素固定に及ぼす鑄造副産物の影響

水田土壌において、鑄物工程から産出される5種類の副産物を日本の3地点の水田土壌に施用した場合の窒素固定能への影響を土壌培養実験によってアセチレン還元能(ARA)および ^{15}N 法によって評価した。好気・光所条件と嫌気・暗所条件下の2条件で評価を行った結果、1種類の資材が好気・光所条件下でセルロースとともに施用することで窒素固定能の促進効果を示した。この資材は鉄を多く含み、またモリブデンも含むことからこれらの要素が好気・光所条件における窒素固定の促進に関与する可能性が示唆された。

第5章 マダガスカルの水田栽培系の窒素固定における現地品種と堆肥の効果の評価

貧栄養土壌が優占するマダガスカルで広く普及しているイネ品種X265を圃場栽培し、生育期間中の窒素固定活性をARAで評価した。栽培期間の総窒素固定量をARAの積算値から推定したところ、X265は日本の品種北陸193号よりも4倍程度高

く、低肥沃度の環境に適応している可能性を示すとともに高活性イネ品種の育種素材として有望であることが明らかになった。また、マダガスカルの中央高地 4 地点の水田土壌を用いて牛糞、稲藁、ブサカ草 (*Aristida* sp.) および土壌を主原料として生産された堆肥や炭素源およびリンの窒素固定能の向上効果を評価した。表層を模した好気・光所条件と下層を模した嫌気・暗所条件下で土壌培養実験を行った。その結果、表層条件では炭素とリンが、下層条件では炭素が窒素固定の律速になること、また堆肥の施用により窒素固定能が促進される可能性が示唆された。一方で、今回土壌培養の期間ではこの堆肥は十分に分解されていないことも明らかになったため、今後、堆肥の分解特性などからより効果的に窒素固定を向上できる堆肥の作出法と施用法の確立が必要と考えられた。

第 6 章 総合考察・結論

イネ体内の窒素固定能を高める方法として、マダガスカルの現地品種 X265 のような茎の窒素固定力が高い品種を栽培することや、*O. glaberrima* 由来の窒素固定に関わる QTL を活用した品種開発が考えられた。また、茎部や根部に異なる菌叢が窒素固定に寄与していることから、根におけるメタン酸化細菌や茎における糖利用性窒素固定細菌を同時に強化することが有効であると考えられる。

鉄を多く含む鋳物工程の副産物は窒素固定に効果がある可能性が示唆された。実用に際しては、マダガスカルのような遊離酸化鉄を多く含み鉄過剰障害の可能性のある土壌を含めて多様な土壌で土壌特性にあった資材の利用が求められる。また炭素源やリンの窒素固定能の促進効果を生かす栽培技術が有用であることも示唆された。本研究の結果をもとに茎など体内の窒素固定量の高い品種や窒素固定を促進できる堆肥が開発されれば、肥沃度の低い水田での窒素固定量が増加し、コメ収量の増加や農家の栄養改善につながることを期待される。

結論として、本研究によって、イネの茎の窒素固定は不伸長茎部の外側が高いこと、そこではメタンと糖を利用する細菌が窒素を固定していると示唆された。また、イネ品種間の菌叢解析により品種固有の菌叢がある一方で、多くの細菌の品種間での共通性を明らかにした。さらに、*O. glaberrima* が *O. sativa* の窒素固定能の向上に有効と思われる染色体部位を同定した。水田土壌の窒素固定能に関しては、鋳造過程副産物が好気・明所条件下で窒素固定を促進することが明らかとなった。またマダガスカルでは、現地品種の X265 は窒素固定能が高く、現地の貧栄養水田土壌では堆肥の施用が窒素固定を促進することを示した。これらの結果は今後、貧栄養水田土壌において、イネと土壌の窒素固定を同時に評価する必要性とそれらの向上の方向性を示唆するものである。