

学 位 論 文 題 名

Ammonium-oxidizing bacteria in the root environment:
studies on their ecology and contribution to N uptake
of rice (*Oryza sativa* L.)

（根環境におけるアンモニア酸化細菌：イネ（*Oryza sativa* L.）根圏内での
アンモニア酸化細菌の生態と窒素供給への寄与に関する研究）

学位論文内容の要旨

Rice roots support the selective enrichment of microorganisms by providing metabolically active surfaces and exudate gradients. We hypothesized that ammonium-oxidizing bacteria (AOB) that are localized on rice roots contribute to the overall nitrogen uptake of rice. This possibility was investigated at a fine level of resolution by applying various molecular microbial ecology techniques.

DNA extracted directly from the soil and root environment served as PCR template for studying the abundance and diversity of the ammonium monooxygenase (*amoA*) gene on the roots and in the rhizosphere soil of rice. The AOB populations and activities were studied under conditions designed to simulate tropical rainfed lowlands (alternating flood and dry periods) that tend to favor nitrification using rice cultivars designed to tolerate such conditions.

Comparisons of the activity and diversity of ammonium-oxidizing bacteria in the root environment of different rice cultivars found marked differences despite identical environmental conditions during growth. The abundance of PCR amplicates of the *amoA* gene produced from root samples was higher in a modern variety IR63087-1-17 compared to two traditional varieties (Mahsuri and Kao Dawk Mali 105 [KDML105]). Likewise, gross nitrification rates obtained from a ¹⁵N dilution experiment were significantly higher for the modern variety. Different strains of AOB associated with rice roots were characterized and identified by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and clone sequencing, which showed that *amoA* sequences associated with roots were generally more diverse than those found in the bulk soil. The most predominant ammonium oxidizer sequences retrieved were from strains related to *Nitrosospira multiformis*. Less predominant *Nitrosomonas europaea* sequences were associated with IR63087-1-17 although rarely detected in samples from the traditional cultivars and unplanted soil. Fluorescence *in situ* hybridization using group-specific oligonucleotide probes was used to quantify the AOB on root surfaces, and confirmed the PCR-based results.

Oxygen concentration profiles around secondary roots, which were obtained using microelectrodes, differed significantly among the tested rice varieties, of which

IR63087-1-17 showed maximum leakage of oxygen. While this could partially explain the detection of more abundant and diverse *amoA* sequences on the roots of this variety, it failed to explain why ammonium at the plant uptake site is somehow available for bacterial consumption.

Root-associated bacteria observed using FISH were found within a discrete biofilm coating the root surface. Depending on the variety, AOB may constitute 10-15% of the indigenous biofilm bacterial community, although this proportion may rise up to 20-25% in the presence of excess applied ammonium. Analysis of the total microbial communities also suggests that different rice varieties support different microbial populations even under identical environmental conditions.

Analysis of AOB in the root environment predicts that a significant proportion of the nitrogen taken up by certain rice varieties is in the form of nitrate provided by the AOB. Measurement of plant growth of hydroponically-grown plants showed that IR63087-1-17 had the stronger response to the co-provision of ammonium and nitrate. In this variety, the N use efficiency can be improved by 20% under ammonium fertilization compared to nitrate fertilization.

The results of these studies indicate that the abundance and population structure of AOB on root biofilms may reflect certain physiological traits of rice, such as oxygen leakage and the mechanism of N uptake. Moreover, AOB in the root environment is an advantage to rice varieties that benefit from co-provision of ammonium and nitrate.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 興太郎

副 査 教 授 荒 木 義 雄

副 査 助教授 奥 山 英登志

副 査 助教授 山 崎 健 一

副 査 助教授 岡 部 聡 (北海道大学大学院工学研究科)

学 位 論 文 題 名

Ammonium-oxidizing bacteria in the root environment: studies on their ecology and contribution to N uptake of rice (*Oryza sativa* L.)

(根環境におけるアンモニア酸化細菌：イネ (*Oryza sativa* L.) 根圏内での
アンモニア酸化細菌の生態と窒素供給への寄与に関する研究)

イネは通常灌漑された土地（水田）で栽培されている。一方で、東南アジアを中心に、全世界のイネ耕作域の 1/4 または 4000 万 ha は低地であって、その水源を自然降雨に依存しており、洪水と乾燥という極めて不安定な水の供給を受けざるを得ない。このために、硝化反応によって生成した硝酸（塩）は脱窒や溶出などによって土壌から迅速に失われることとなり、その割合は投与された窒素の 70% におよぶと計算されている。

アンモニアを硝酸へと酸化する硝化反応はアンモニア酸化細菌 (AOB) の活性に依存するが、これまでイネ根圏における AOB の集団構造が硝化反応にどのような影響を及ぼしているか、また、AOB の構造がイネそのものあるいは他の環境要因によってどのように影響されるかについてほとんど研究されていなかった。本研究は、イネの窒素利用に関して、生理学的手法及び分子生物学的手法を用いることによって、根および根圏の AOB の関与を微生物生態学的見地から明らかにしたものである。

申請者は材料としてイネ (*Oryza sativa* L.) の伝統品種である Mahsuri と Kao Dawk Mali 105 (以下 KDML という) および改良品種である IR63087-1-17 (以下 IR という) を主に用いたが、全てフィリピンなど東南アジア地域で広く用いられているいわゆる長粒のインディカ米である。それぞれの品種はフィリピンの水田土壌を用い、実験室において自然状態に近い灌水および乾燥条件下で培養した。

申請者はまず、イネにおける根および根圏土壌中の AOB の菌叢を明らかにするために、根に付着している土壌と土を取り除いた根そのものから DNA を抽出し、これを鋳型とし、AOB

中の特異的酵素であるアンモニアモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*amoA*) で保存されている配列をもとに作製した DNA 断片をプライマーとして PCR を行った。その結果、根圏土壤の DNA に由来する PCR 産物量は改良種である IR において明らかに高かったが、根の AOB に由来する PCR 産物量はいずれの品種においてもほぼ同程度であった。一方、 ^{15}N で標識したアンモニア塩を植物体に与えて、 ^{15}N 希釈法により全硝化活性を測定したところ、IR が Mahsuri、KDML よりも明らかに高い値を示すことを見出した。

申請者はこのイネ品種間で硝化活性が異なる原因をイネの根と根圏土壤の AOB の菌種、およびその集団構造の違いにあるのではないかと考え、上述の *amoA* 遺伝子の PCR 産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) により分離し、品種によりその泳動パターンに明確な違いのあることを見出した。さらに、ゲルから回収した DNA 断片のシーケンスとその塩基配列の解析を行ったところ、改良種である IR の根および土壌ともに、伝統種のものに比べて多様性に富む AOB から構成されていることがわかった。AOB の構成種については、イネの品種に関わらず *Nitrosospira multiformis* に類縁の菌種が認められたが、改良品種においては、伝統品種の根や土壌においてほとんど検出されない *Nitrosomonas europaea* 類縁種が優先していた。この傾向は *amoA* 遺伝子の配列をもとに作製したプローブを用いて行った蛍光インシトゥハイブリダイゼーション (FISH) 法によっても確認された。FISH 法によつては、さらに、AOB が根の表層に不均一なバイオフィルムを形成していること、イネの品種が異なってもバイオフィルム上の AOB の頻度 (菌数) はほとんど異ならないが、AOB の種類と構造は品種により大きく異なること、IR の根に付着する AOB の 50% 近くが *Nitrosomonas* であることが明らかにされた。AOB に限ってはあなが、イネ根圏の微生物の種組成を異なる方法で確認したのは本研究が初めてである。

申請者は上述のようなイネの品種間にみられる AOB の多様性の違いがイネの根から供給される酸素の量の違いにあるのではないかと考え、根の近傍の酸素濃度を微小電極法によって測定した。その結果、IR が Mahsuri など伝統品種のいずれよりも高い濃度の酸素を供給していることを明らかにしている。

根圏における AOB の分析によって、イネが取り込む窒素源の分子形態は AOB によってもたらされる硝酸塩であることは予想されていたが、栽培中のイネを用いた ^{15}N 希釈実験により、IR はアンモニウム塩と硝酸塩をともに与えられたときに、より活発な窒素の取り込みを示し、また、硝酸を単独で与えた時に比べてアンモニウム塩を単独で与えた時に窒素の取り込みは 20% 改善した。この結果は窒素の取り込みに AOB が関与していることだけでなく、窒素施肥に関して AOB を介しての窒素取り込みがより有効であることを示すものである。

以上の結果はイネ根のバイオフィルムを構成する AOB の集団構造と硝化活性は、根からの酸素の漏出や窒素の取り込み機構など、イネの品種の生理学的な特性を反映していることを明確に示すものといえる。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士 (地球環境科学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。