

学位論文題名

Diazotrophs Diversity and Its Beneficial Role in
High Yield Rice Padi Panjang Growing in
Acid Sulfate Paddy Soil in Indonesia.

(インドネシアの硫酸酸性水田土壤に生育する多収イネ Padi Panjang に
おける窒素固定細菌の多様性とその有用性について)

学位論文内容の要旨

イネは最も重要な作物の一つであり、その生産性を向上させるためには窒素肥料の投入が必須である。しかしながら、窒素化学肥料の生産のためには莫大なエネルギーが必要であり、またその不適切な施用が環境に悪影響を及ぼすことも問題である。さらに、多くの発展途上国の農民においては化学肥料に投資をする余裕も無い現状があり、十分な生産性をあげていない。本研究の対象地域としたインドネシア、カリマンタン島には pH が 3-4 の酸性硫酸塩土壤が広がり、水田による利用が進められている。その多くでは十分な還元状態に達していないためアルミニウム毒性、Fe(II)毒性を受け、さらに無肥料による生産が行われているために、生産性はきわめて低い。しかしながら、当地のバンジャルマシン地方のクイン地区の水田において無肥料にも関わらず 4-6 トン/ha の生産性を継続してあげている多収水田が存在していることが近年明らかにされた。そこで、本研究ではこの水田に栽培されている水稻品種 (Padi Panjang) と水田土壤を対象として、この高い生産性に貢献していると予想される微生物による生物的窒素固定能(BNF)を調査した。

BNF は微生物の持つ *nitrogenase* によって大気中の窒素を固定するが、従来の研究の多くが実際に微生物を単離して、それを解析する手法に依存していた。そこで本研究ではまず変成剤ゲル電気泳動法(DGGE)を用いて、土壤および植物体内から回収した DNA 中の *nitrogenase* 遺伝子の一つである *nifH* 遺伝子の構成を調査した。また、実際に窒素固定能を有する微生物を単離して、その特性と人工的に作成した酸性硫酸土壤でのイネの生育に及ぼす効果についての検討を行った。

- 1、 無肥料で多収をあげている現地の農民によって選抜されてきた品種：
Padi Panjang とその親系統である Padi Karang をそれぞれ三カ所の圃場
から採集した。葉、茎、種子、根、根圏土壤、根圏外土壤から DNA を回

収して、この DNA に含まれる *nifH* 遺伝子を PCR 法によって増幅し、DGGE 法によって分離した。分離した PCR 産物はゲルから回収しその遺伝子配列を決定した。葉以外の試料から *nifH* 遺伝子が検出され、その構成種類は Padi Panjang と Padi Karang では異なっていた。前者では特に β -Proteobacteria がほとんどを構成していると考えられた。土壌中から得られた *nifH* 遺伝子は植物体内で得られた場合よりも多様性に富み、その傾向は根圏外土壌で顕著であった。種子中に確認された *nifH* 遺伝子の配列の一つにほぼ同じ配列を持つ物が根、土壌にも共通して存在していることから、種子および土壌を経由してこの圃場において特有の微生物（遺伝子）が残されていることが予想された。

- 2、窒素制限培地を用いて、Padi Panjang の根面および根圏土壌から 26 株の細菌を単離した。内生菌は単離できなかった。16S rDNA 配列(約 1400bp)を決定したところ、その約 1/3 は β -Proteobacteria によって構成されており、 α -Proteobacteria, Bacilli, Actinobacteria がそれぞれ約 1/5 を占めていた。いずれも *nifH* 遺伝子を持っていることを PCR 法によって確認し、それぞれの窒素固定活性をアセチレン還元法で測定した。特に窒素固定能が高かった株の中には菌のみで培養を行った場合に培地に有機酸が存在する場合には培地の pH を高める能力が存在することを見いだした。この株を用いて、イネへの接種試験を人工酸性硫酸土壌を用いて検討した結果、強酸性の pH 3.5 に調整し、アルミニウムを加えた土壌において、生育がコントロールに比較して改善された。一方、植物に対しての窒素栄養の付与の効果は明らかではなかった。

以上の結果からインドネシア、東カリマンタン島、バンジャルマシ、クイン地区で見いだされた酸性硫酸土壌で高い収量をあげているイネ品種 Padi Panjang には多様な窒素固定細菌が内生菌、根圏細菌として存在していることが遺伝子の存在から示唆された。一部の内生菌は種子中にも確認され、根圏土壌から種子までのつながりが想定された。また、窒素制限培地を用いて単離した細菌の中には高い窒素固定能を持つ微生物が見いだされたが、実際の接種試験からはこの細菌の役割は窒素を直接的に植物に付与することよりは、根圏の pH を高めて酸性硫酸土壌下でのアルミニウムなどの害を抑制して植物の生長を補助することにあると考えられた。以上の研究により、これまで不明であった当該地域での無施肥下での高い収量性に微生物が関与していることが初めて明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 崎 満
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 助 教 授 信 濃 卓 郎

学 位 論 文 題 名

Diazotrophs Diversity and Its Beneficial Role in High Yield Rice Padi Panjang Growing in Acid Sulfate Paddy Soil in Indonesia.

(インドネシアの硫酸酸性水田土壌に生育する多収イネ Padi Panjang における窒素固定細菌の多様性とその有用性について)

当論文は140頁、参考文献334報、図16、表9から構成され、他に参考論文が1報附属している。

イネは最も重要な作物の一つであり、その生産性を向上させるためには窒素肥料の投入が必須である。しかしながら、窒素化学肥料の生産のためには莫大なエネルギーが必要であり、またその不適切な施用が環境に悪影響を及ぼすことも問題である。さらに、多くの発展途上国の農民においては化学肥料に投資をする余裕も無い現状があり、十分な生産性をあげていない。本研究の対象地域としたインドネシア、カリマンタンにはpHが3-4の酸性硫酸塩土壌が広がり、水田による利用が進められている。その多くではアルミニウム毒性、Fe(II)毒性を受け、さらに無肥料による栽培が行われているために、生産性はきわめて低い。しかしながら、当地のバンジャルマシン地方のクイン地区の水田において無肥料にも関わらず4-6トン/haの生産性を継続してあげている多収水田が存在していることが近年明らかにされた。そこで、本研究ではこの水田に栽培されている水稻品種(Padi Panjag)と水田土壌を対象として、この高い生産性に貢献していると予想される微生物による生物的窒素固定能(BNF)を調査した。

BNFは微生物の持つnitrogenaseによって大気中の窒素を固定するが、従来の研究の多くが実際に微生物を単離して、それを解析する手法に依存していた。そこで本研究ではまず変成剤ゲル電気泳動法(DGGE)を用いて、土壌および植物体内から回収したDNA中のnitrogenase遺伝子の一つであるnifH遺伝子の構成を調査した。さらに、実際に窒素固定能を有する微生物を単離して、その特

性と人工的に作成した酸性硫酸土壌でのイネの生育に及ぼす効果についての検討を行い、以下の結果を得た。

1. 無肥料で多収をあげている現地の農民によって選抜されてきた品種 (Padi Panjang) とその親系統と推定される Padi Karang をそれぞれ三カ所の圃場から採集した。葉、茎、種子、根、根圏土壌、根圏外土壌から DNA を回収して、この DNA に含まれる *nifH* 遺伝子を PCR 法によって増幅し、DGGE 法によって分離した。分離した PCR 産物はゲルから回収し、その遺伝子配列を決定した。葉以外の試料から *nifH* 遺伝子が検出され、その構成種類は Padi Panjang と Padi Karang では異なっていた。前者では特に β -Proteobacteria がほとんどを構成していると考えられた。土壌中から得られた *nifH* 遺伝子は植物体内で得られた場合よりも多様性に富み、その傾向は根圏外土壌で顕著であった。種子中に確認された *nifH* 遺伝子の配列の一つにほぼ同じ配列を持つ物が根、土壌にも共通して存在していることから、種子および土壌を経由してこの圃場において特有の微生物 (遺伝子) が継代されていることが予想された。
2. 窒素制限培地を用いて、Padi Panjang の根面および根圏土壌から 26 株の細菌を単離した。内生菌は単離できなかった。16S rDNA 配列 (約 1400bp) を決定したところ、その約 1/3 は β -Proteobacteria によって構成されており、 α -Proteobacteria, Bacilli, Actinobacteria がそれぞれ約 1/5 を占めていた。いずれも *nifH* 遺伝子を持っていることを PCR 法によって確認し、それぞれの窒素固定活性能をアセチレン還元法で測定した。特に窒素固定能が高かった株の中には菌のみで培養を行った場合に、培地に有機酸が存在する場合には培地の pH を高める能力が存在することを見いだした。この株を用いて、イネへの接種試験を人工低 pH 土壌を用いて検討した結果、強酸性の pH 3.5 に調整し、アルミニウムを加えた土壌において、生育がコントロールに比較して改善された。一方、植物に対しての窒素栄養の付与の効果は明らかではなかった。

以上の結果からインドネシア、東カリマンタン、バンジャルマシ、クイン地区で見いだされた酸性硫酸土壌で高い収量をあげているイネ品種 Padi Panjang には多様な窒素固定細菌が内生菌、根圏細菌として存在していることが遺伝子の存在から示唆された。一部の内生菌は種子中にも確認され、根圏土壌から種子までのつながりが想定された。また、窒素制限培地を用いて単離した細菌の中には高い窒素固定能を持つ微生物が見いだされたが、実際の接種試験からはこの細菌の役割は窒素を直接的に植物に付与することとさらに、根圏の pH を高めて酸性硫酸土壌下でのアルミニウムなどの害を抑制して植物の生長を補助することにあると考えられた。以上の研究により、これまで不明であった当該地域での無施肥下での高い収量性に微生物が関与していることが初めて明らかとなった。特に、微生物の根圏での機能は未知の部分が多く、学問

的に重要な成果を上げたと考えられる。

よって、審査員一同は、Su Youbo が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。