

(論文内容の要旨)

Azolla-Anabaena 間の共生による生物学的窒素固定を作付体系に取り込む試みは、水田土壌の地力維持を図る目的から、数十年来、多くの研究者にとって興味の対象となってきた。しかしながら、その共生関係の利用には、集約的イネ作付体系への適用が必ずしも容易でないこと、あるいは、種々の *Azolla* 系統の合理的な識別法が未整備であることなどが障害となっていた。本研究は、イネ-*Azolla* 共存栽培系における窒素利用効率に関して解析を行い、この共存栽培系の適用によってイネの初期生育が抑制される機構を明らかにするとともに、これまでに知られている多様な *Azolla* 系統を網羅する系統集団を供試して、分子マーカーRAPD (random amplified polymorphic DNA) の利用による系統関係の再構築を行い、さらに、RAPD マーカーをSTS (sequence tagged site) マーカーに変換してより簡便で再現性の高いマーカーを開発しようとしたものである。以下に成果の概要を示す。

1. イネ単独栽培区とイネ-*Azolla* 共存栽培区それぞれについて、窒素施肥区、無施肥区を設けて試験を行った。イネの乾物重、窒素含量および成長速度 (CGR) は、*Azolla* を緑肥として土壌中に施用するまでは、共存栽培区で低く、イネ-*Azolla* 共存栽培系によるイネ初期生育に対する抑制効果が確認された。共存栽培区の方が単独栽培区に比べて土壌中の有効窒素量が多く (0.5~2.7mg/100g 乾土)、また、 ^{15}N の吸収量は両栽培区間で差がなかったことから、この初期生育抑制効果は窒素の競合によるものではないことが明らかになった。5 日間の共存栽培試験の結果、1℃/日の地温低下が観察され、水田の地温および水温の低下が共存栽培区における初期生育抑制の原因であることが判明した。一方、生育抑制は共存栽培状態の期間のみの現象であり、*Azolla* を緑肥として土壌中に施用した直後から速やかな成長量の回復が認められた。また、SPAD 値で表わされる葉色についても、*Azolla* 施用後 10 日の間に 5 増加し、葉緑素含量の回復が観察された。最終的なイネの収量は、共存栽培区の方が単独栽培区に比べ 10~35%多くなり、イネ-*Azolla* 共存栽培系における高い窒素吸収が検証された。さらに多様な栽培系を設定して調査を行った結果、イネ単独栽培区に他の場所で栽培した *Azolla* を緑肥として施用した場合がもっとも収量が増大した (804 g/m²) が、共存栽培区との差は有意ではなく、水資源が豊富な地域では、地力維持および省力化の観点から、イネ-*Azolla* 共存栽培系がもっとも有効であると結論された。

2. 水生シダ *Azolla* 属として分類されている全 7 種を含む 33 系統を供試して、RAPD マーカーによる系統関係の解析を行った。10 塩基のランダムプライマーを 15 種類

用いて、*Anabaena*が共生している状態の*Azolla*から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行い、DNA断片を増幅した。その結果、各プライマーで300～3000bpの長さの増幅産物が12から29断片得られ、284のRAPD（異なる*Azolla*系統間で多型を示す増幅断片）が検出された。各RAPDの存否をスコア化し、プログラムソフト‘RESTDIST’を用いてNeiの遺伝的距離を算出し、そのデータから、UPGMA法による系統樹を作成した。その結果、*Azolla*属は5種からなる*Azolla*節クラスター、*A. pinnata*種クラスターおよび*A. nilotica*種クラスターに分類されること、および*A. nilotica*種クラスターは他のクラスターに対して大きな遺伝的距離をもつことが明らかとなった。これまでの形態や細胞遺伝学的な知見を基になされた分類では、*A. nilotica*種のみが*Tetrasporocarpia*亜属に分類され、他は*Azolla*亜属に分類さる。また、*Azolla*亜属は*Rhyzosperma*節と*Azolla*節に分類され、前者の節には*A. pinnata*種のみが含まれているものとされている。RAPDデータによる系統樹から推定される近縁関係はそれらを支持するものであった。したがって、本研究の結果得られた分子マーカーを利用することによって、各*Azolla*種を正しく分類することが可能であると判断された。

3. 得られた種の識別 RAPDをより簡便でかつ再現性の高いSTSマーカーとすることを試みた。*A. nilotica*種と*A. pinnata*種それぞれに特異的に見出されるRAPDを選び、それらDNA断片をゲルから切り出した後、プラスミッドでクローニングし、塩基配列を得た。その配列から新たに特異性の高いプライマーを設計して、2種のプライマー対（A10NI5002₇₅₀ および A10PN7016₁₀₀₀）を作出した。それらのプライマー対を用いてPCRを行ったところ、*A. nilotica*種と*A. pinnata*種それぞれのみに特異的に増幅産物が得られ、それぞれ*Azolla*属の各種を分類する有効な道具となることが確認された。

(論文審査の結果の要旨)

Azolla-Anabaena 間の共生による生物学的窒素固定の作付体系への取り込みは、水田土壌の地力維持を図る上で有用であると考えられている。しかし、集約的イネ作付体系への適用が必ずしも容易でないこと、あるいは、種々の *Azolla* 系統の合理的な識別法が未整備であることなどが障害となって活発な取り込みが行われていない。本研究は、イネ-*Azolla* 共存栽培系における窒素利用効率を解析するとともに、これまでに知られている多様な *Azolla* 系統を網羅する系統集団を供試して、分子マーカー (RAPD) による系統樹の再構築を図ったものである。本研究の評価すべき点は以下のとおりである。

1. イネ-*Azolla* 共存栽培系がイネの栄養成長や収量構成要素形質に及ぼす効果について解析し、この系におけるイネの初期生育の不良がイネと *Azolla* 間の窒素競合によるものではなく、水田の地温および水温の低下が原因であることを見出した。水資源が豊富な地域では、地力維持および省力化の観点から、イネ-*Azolla* 共存栽培系が有効であることを示した。

2. *Azolla* 属として現在分類されている全 7 種 33 系統を供試して、15 種類のランダムプライマーを用いて PCR を行い、284 の RAPD を検出した。各 RAPD の存否をスコア化し、プログラムソフト ‘RESTDIST’ を用いて Nei の遺伝的距離を算出し、そのデータから、UPGMA 法による系統樹を作成した。得られた系統樹から、*Azolla* 属は、*Azolla* 節クラスター、*A. pinnata* 種クラスターおよび *A. nilotica* 種クラスターに分類されること、および *A. nilotica* 種クラスターは他のクラスターに対して大きな遺伝距離をもつことを明らかにした。これらの分類は、形態や細胞遺伝学的な知見を基にした従来分類とほぼ一致した。

3. RAPD 分析の結果得られた RAPD マーカーの STS 化を図り、*A. nilotica* 種と *A. pinnata* 種それぞれに固有の STS マーカーを開発した。

以上のように、本研究は、イネと *Azolla* の共存栽培系を集約的イネ栽培へ導入する際の留意点を提示するとともに、*Azolla* 種の識別に有用な分子マーカーを開発したものであり、植物育種学、雑草学、栽培学、植物遺伝資源学および分類学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 21 年 2 月 16 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。