

水稲根系からの出液中に含まれるサイトカイニン (t-ZR) 含有量と栽培条件との関連性

鯨 幸夫*¹⁾・狩野 紫¹⁾・葭田隆治²⁾

(*¹⁾金沢大学教育学部, 金沢市角間町, 〒920-1192, ²⁾富山県立大学短期大学部)

Relationship between Cytokinin (t-ZR) Content in the Bleeding Sap and Cultivated Conditions of Paddy Rice

Yukio KUJIRA*¹⁾, Yukari KANO¹⁾ and Ryuji YOSHIDA²⁾

(*¹⁾Faculty of Education, Kanazawa University, Kanazawa, 920-1192, Japan,

²⁾Collage of Technology, Toyama Prefectural University)

水稲根系からの出液速度および出液中に含まれるサイトカイニン (t-ZR) 含有量を酵素抗体法 (ELIZA法) を用いて定量した。有機資材を連続施用した圃場のコシヒカリは、出穂期におけるサイトカイニン含有量が高い傾向を示した。長野県伊那市の多収コシヒカリではサイトカイニン含有量が高く、根の活力は高いものと考えられる。最高分けつ期前後の出液速度と茎数および地上部乾重との間には、有意な正の相関関係が認められた。出液速度と株間の根乾重との間に、有意な相関関係は認められなかった。塩粳48号とコシヒカリとの間には、サイトカイニン含有量に関して品種間差異が認められた。

Cytokinin content in the bleeding sap of paddy rice was analyzed using ELIZA method (Trans-Zeatin Riboside Immunoassay Detection Kit). t-ZR content in the bleeding sap of rice grown with continuous organic fertilizers applications was high compared to conventional rice. Cytokinin content of Koshihikari grown in Ina city was extremely high. It may be recognized that root of rice grown in Ina city keeps high physiological activity. There were a significant positive correlations between bleeding sap and stem number per plant, aboveground dry weight per plant, respectively. There was no significant correlation between root dry weight of interhill space and bleeding sap.

キーワード : イネ, *Oryza sativa* L., 酵素抗体法, 根系, サイトカイニン含有量, 出液速度, t-ゼアチンリボシド

Key words : Bleeding rate, Cytokinin, Eliza-method, *Oryza sativa* L., Rice, Root system, t-ZR

イネの根系と地上部生育および収量との間には、密接な関連性が存在する。また、根系の形態と機能はそれぞれが単独の要因として存在するのではなく、何らかの因果関係があるものと考えられ、両者の関連づけを解明するための研究が行われている (鯨ら, 2000)。

本研究では、根系の形態と機能とを結び付ける要因として、根からの出液速度と根の先端で生合成されて地上部に送られ、葉の老化に影響を及ぼすサイトカイニン (t-ZR) 含有量に着目した。根系からの出液速度が大きく、また出液に含まれるt-ZRの含有量が多ければ、根の活力が高いと評価できるものと考えた。栽培条件や収量性が異なる水稲根乾重の土壤中における階層分布と出液速度および出液に含まれるサイトカイニン (t-ZR) 含有量を定量し、これらの要因と地上部生育や収量性との関連性についても検討しながら、根の構造と機能が地上部生育と収量性に及ぼす影響についても解析した。

材料および方法

1) 栽培管理

第1表に示した栽培条件下で生育したコシヒカリと塩粳48号 (中国短粒品種) を材料に用いた。

実験は、1999年に農家水田において実施した。石川県根上町の水田は、過去24年間にわたり第1表に示した栽培管理でコシヒカリを栽培している圃場である。石川県野々市町の水田は、カルス菌を用いたボカシ堆肥を施用してコシヒカリの条抜き有機栽培を行っている。石川県松任市の圃場は、牛ふん糞から堆肥を連用してコシヒカリの有機栽培している水田である。石川県農業総合研究センターの圃場においては、慣行栽培、不耕起移植栽培および湛水土中打込み点播栽培のコシヒカリを調査対象とした。石川県輪島市町野町の水田は、カルス菌によるボカシ肥料を施用してコシヒカリおよび塩粳48号を栽培している圃場である。長野県伊那市の圃場は、多肥栽培でV字型イナ作を実践して多収コシヒカリを栽培している水田である。出液速度の測

第1表 栽培管理状況

試験区	概要
根上2区	化学肥料連用区 (24年間)
根上3区	イナわら連用区 (24年間)
根上4区	豚ふん堆肥連用区 (24年間)
野々市・外側	ポカシ有機 (条抜き栽培)
野々市・内側	ポカシ有機 (条抜き栽培)
松任・外側	牛ふん糞がら堆肥 (条抜き)
松任・内側	牛ふん糞がら堆肥 (条抜き)
試験場3区	耕起区 (対照区: 5年目)
試験場5区	耕起区 (堆肥区: 1年目)
試験場7区	不耕起移植区 (5年目)
試験場点播区	湛水土中打込み点播栽培
町野町・有機	ポカシ有機栽培
町野町・外側*	ポカシ有機栽培
町野町・内側*	ポカシ有機栽培
長野1 (伊那)	化学肥料 (多収穫水田)
長野2 (伊那)	化学肥料 (多収穫水田)

*: 塩粳48号、無印: コシヒカリ

定は、7月8日、15日、29日、8月4日、11日に行った。

2) 出液速度の測定および出液の保存

出液速度の測定は、各栽培区について各々5株を対象に午前中に実施した。調査株を紐で束ね、地際から8~10cmの高さで茎葉部を切除する。予め重量を測定しておいた化粧用コットン(パフ)を茎葉切断面にあて、その上をラップで包み輪ゴムで固定する。1時間経過後、コットンを外してラップで密封しクーラーボックス内で冷蔵保存し、実験室に戻りしだい速やかに重量を測定し、コットンの重量差を出液速度とした。調査株は、茎数を測定し切除した地上部の乾重を測定した。出液速度を測定したサンプル液はラップで密封したまま、 -30°C にて冷凍保存しておく。

サイトカイニンの定量前に、冷凍保存しておいたサンプルを解凍し、遠心分離用試験管を用いて出液を回収した。遠心管にビニールチューブ(1cm ϕ , 3~5cmL)を入れ、ついで口紙、サンプル液を含んだコットンの順に入れて遠心分離機にかけ、3000~4000回転で15分間遠心処理を行った。この条件により出液量の8割は回収可能であった。回収された出液はサンプル瓶に入れ、同量の無水エタノール

(98%)を加えて密封し、 -30°C で冷凍保存した。

3) サイトカイニン (t-ZR) の測定

出液中のサイトカイニンの定量は酵素抗体法(ELIZA法)を用いて行った。根系からの出液をTLC(薄層クロマトグラフィー)によって分析したところ、測定を行うまでのレベルには至らなかったが、UVランプ(245nm)でぼんやりとグレーになりサイトカイニンの存在が推定されたため、酵素抗体法(ELIZA法)による分析を行った。

4) 出液中のサイトカイニンの抽出・精製

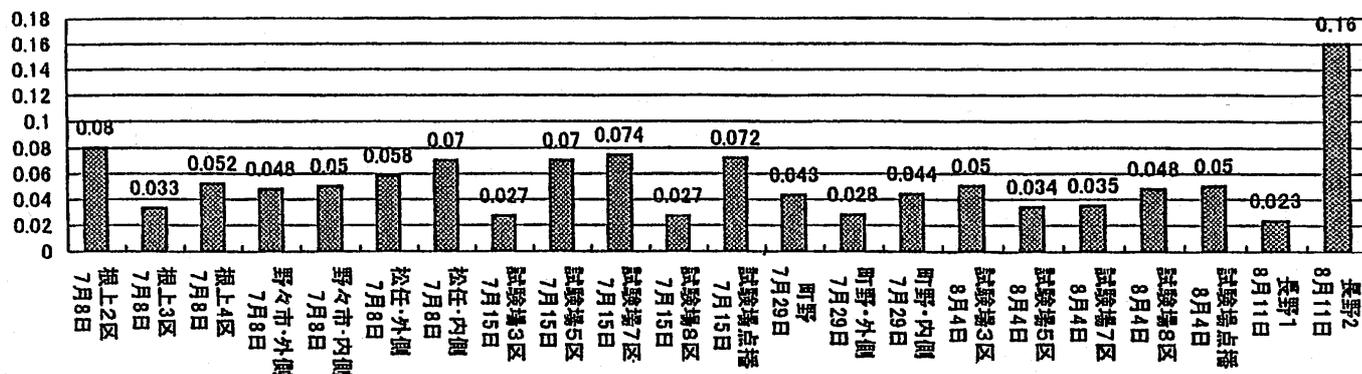
- 1) サンプル液を解凍し、ロータリーエバポレーターでアルコールを飛ばして濃縮し、5%メタノールを3ml加える。
- 2) 5%メタノールを5mlBond-Eluteに通過させる。
- 3) サンプル \rightarrow 5%メタノール5mlの順でBond-Eluteに通し、サンプル瓶Aとする。
- 4) 別のサンプル瓶に55%メタノール5mlを2回通過させ、遊離型のサイトカイニンを溶出する。
- 5) 0.1Nの酢酸/メタノール5ml(2回) \rightarrow 5%メタノール5ml(2回)にてBond-Eluteを洗浄する。10サンプルごとにBond-Eluteを交換する。
- 6) サンプル瓶B(55%メタノール抽出物)をロータリーエバポレーターにて再び濃縮する。5%メタノールを元のサンプルの1/5量加える(サンプルC)。
- 7) 6)のサンプルからマイクロピペットを用いて定量を採取し、5%メタノールで希釈し、100倍(サンプルD)と1,000倍(サンプルE)のサンプルを作る。
- 8) サンプルC, D, Eをソニキュレーターにかけ超音波で内容物を攪拌させ均一化する。

5) サイトカイニンの分析

ELIZA法による使用キットとしては、Sigma Plant Cell Culture PRG-5 (PDK09348/0096), Trans-Zeatin Riboside Immunoassay Detection Kitを用いた。前処理を行ったサンプルは405nmで吸光度を測定し、スタンダード曲線から得られた直線部分の標準線から各サンプルのt-ZRの含有量を計算した。

6) 根系生育の階層構造調査

根系調査は株間において、コアサンプル法(53mm ϕ , 400mmD)を用いて実施した。各栽培区において3個ずつのこ



第1図 サイトカイニン量 (pM/0.1ml)

アサンプルを採取した。採取した根系コアは、10cm間隔で切断し、各階層ごとの根量を測定した。根系を含んだコアはRoot Washing Unit (Gillison's社)を用いて洗浄したのち、手作業によってゴミ等を除き、乾燥処理後、乾物重の測定を行った。

結果および考察

1) 単位出液量 (0.1ml) あたりのサイトカニン含有量

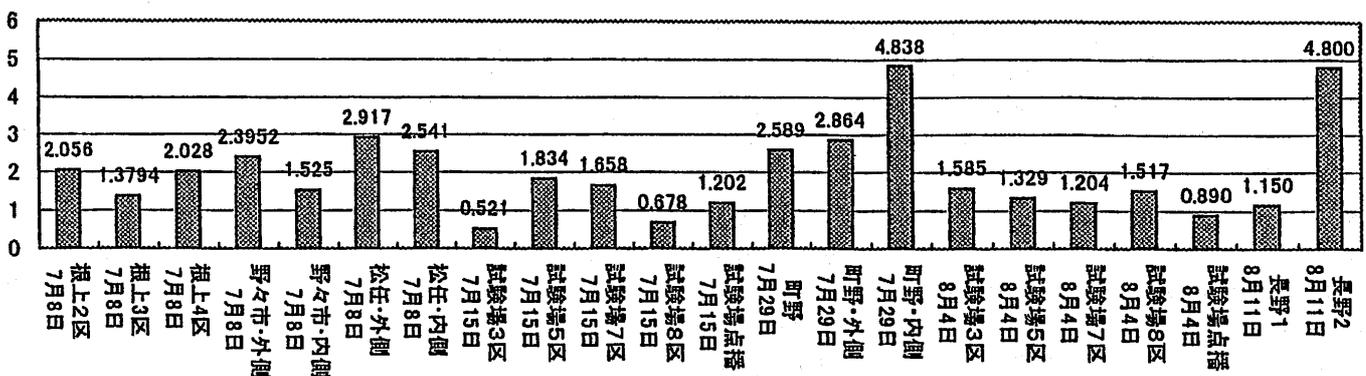
最高分け期から幼穂形成期および出穂期における出液0.1ml中に含まれるサイトカニン含有量を第1図に示した。出穂期における町野町・内側、外側で表示した栽培区は、塩粳48号であり、その他の栽培区はコシヒカリの結果である。幼穂形成期前後のサイトカニン含有量は、0.027~0.08pMの範囲であり、24年間化学肥料連用区(根上2区)、不耕起5年目(試験場7区)および湛水土中打込み点播区(試験場点播区)で高い傾向が示された。一方、24年間イナわらすき込み区(根上3区)、耕起慣行区(試験場3区)および不耕起1年目(試験場8区)では、単位出液量(0.1ml)中のサイトカニン含有量は低かった。出穂期は、水稻の生育期間中の根量が最大になる時期である。この時期におけるサイトカニン含有量には、長野の事例を除いて、本実験の範囲内で大きな違いは認められなかった。長野の試験区は、1992年に998kg/10aの収量実績が報告されている(松島 1995)多収穫水田であり、1999年の収量も830kg/10a(Kujira et al., 2000)と多収の水田である。長野1と長野2では、サイトカニン含有量に大きな違いが見られた。長野1の水田は、湛水条件下(水深6cm)での測定値であり、長野2は、田面水が認められない条件下での測定結果であった。その他の栽培区では、すべて田面水がある湛水条件下での測定値である。水田の湛水状態の程度は出液速度に大きく影響されると考えられ、出液中のサイトカニン含有量にも影響を及ぼすと考えられる。長野2では、サイトカニン含有量/株・時間の値も大きいため、出液速度と単位出液量あたりのサイトカニン含有量ともに大きい値を示していたことから、水稻根の活力は高いものと評価できる。

2) 1株・1時間あたりのサイトカニン含有量

1株・1時間あたりのサイトカニン含有量を第2図に示した。これは、1株・1時間あたりの出液中に含まれるサイトカニンの総量を示したものである。単位出液量あたりのサイトカニン含有量が少なくても出液量が多ければ絶対値としての含有量は大きくなる。幼穂分化期前後の調査では、松任・外側で大きい値が示された。牛ふん糞堆肥を連用してコシヒカリを条抜き栽培した場合、条抜き側の株ではサイトカニン含有量が高い傾向が示された。耕起対照区(試験場3区)および不耕起1年目(試験場8区)では、株あたりのサイトカニン含有量が少なかった。サイトカニン含有量を根の活力を示す指標と考えた場合、栽培条件の違いによる差はあるものと考えられる。慣行栽培(化学肥料)や不耕起1年目の水稻では、根の活力が低いと考えられた。出穂期では、試験場の各栽培区(慣行耕起区、不耕起区、点播区)と比較して、塩粳48号(町野・内側)、町野区(有機コシヒカリ)のサイトカニン含有量が高い傾向が示された。単位出液量中のサイトカニン含有量には大きな差は認められないため、出液量が大きいたことが原因の一つと考えられる。出穂期における根の活力は、有機栽培区で高い傾向を示しているものと考えられる。

3) 出液速度と各生育量との相関関係

最高分け期から幼穂分化期および出穂期前後における出液速度と各種生育量との相関関係を第2表および第3表に示した。最高分け期から幼穂分化期においては、出液速度と茎数および地上部乾物重との間に有意な正の相関関係が認められたが、コアサンプル法(53mmφ×400mmD)によって採取した土壤中の全根乾物重との間には、有意な相関関係は認められなかった。土壌10cmごとの階層に含まれる各階層の根乾重と出液速度との間にも、有意な相関関係は認められなかった。出穂期における出液速度と茎数との間には正の相関傾向は認められたものの、地上部乾重との間には有意な相関関係が認められなかった。土壌中の階層別根乾重と出液速度との間にも有意な関連性は認められなかった。最高分け期および出穂期における出液速度と物理的な量としての根量との相互関連性は低いものと考えられた。



第2図 サイトカニン量 (g/株)

第2表 最高分けつ期から幼穂分化期における
出液速度と各生育量との相関関係

出液	生育	相関係数 (r)
出液速度 (g/株・hr)	莖数	0.748*
	地上部乾重	0.790*
	総根乾重	0.240
	根乾重 0-10cm	0.060
	10-20cm	0.416
	20-30cm	0.451
	30-40cm	0.430

*P<0.05

サイトカイニン¹は、細胞分裂促進、葉緑素分解防止（老化防止）、核酸・タンパク合成促進、光合成産物受容器官（シンク、穀実、果実）の活性、等を通して生体内で重要な働きをしている。根の先端で生合成されたサイトカイニンは出液中の成分として地上部に運ばれるが、出液中のゼアチンとその誘導化合物の存在については、次々に明らかになってきており、イネに関しては、葭田ら（1971）によってzeatin, zeatin riboside, zeatin ribotideの存在が報告されている。今回、サイトカイニンの定量に用いたELIZA法（酵素結合抗体法）は、サイトカイニンの全精製工程を必要とせず、粗精製の段階にて定量できる方法として開発され、検出限界は生物検定法と比較してピコモルオーダーの高感度であることを特徴としている。

本実験の結果、出液に含まれるサイトカイニン含有量は、栽培条件の違いによって異なり、また出穂期においては品種間差異も認められた。耕起対照区や不耕起1年目のコシヒカリでは、出液に含まれるサイトカイニンの絶対量と単位出液量あたりのサイトカイニン含有量が少ないことから、根の活力は低いものと考えられる。出穂期においては、塩粳48号とコシヒカリに大きな品種間差異が認められた。この原因が有機栽培と慣行栽培といった栽培条件の違いに由来するのか、品種間差異によるのかについては、今後検討する必要がある。長野県伊那市の多収穫コシヒカリのサイトカイニン含有量は、他の栽培区と比較して明かに高い値を示し、根量は通常栽培と比較しても著しく多く、地表から10cm以内に多くの根を分布していた（Kujira et al., 2000）。根量および根の分布形状をサイトカイニン含有量を指標とした根の活力と関連づけて考察した場合、伊那のコシヒカリの根の活力は高いと推定することが可能である。出液速度と莖数および地上部乾重との間に有意な正の相関関係が認められることから、地上部のバイオマスの大小が出液速度に影響しているものと推定される。出穂期には、バイオマス量は一定値となるため、この時期の出液速度は蒸散量や根の活力と深い関係を持つてくることが示唆される（Oritani et al. 2000）。また、有機資材を連続施用した圃場においては、出穂期における根の活力が高く維持されているものと推測され、この場合には土壌の物理化学的特性の改善も影響しているものと考えられる。

第3表 出穂期における出液速度と生育量との相関関係

出液	生育	相関係数 (r)
出液速度 (g/株・hr)	莖数	0.588
	地上部乾重	0.312
	総根乾重	0.030
	根乾重 0-10cm	0.060
	10-20cm	0.525
	20-30cm	0.001
	30-40cm	0.365

謝 辞

本研究を行うにあたり、金沢大学教育学部院生の中島裕司、学生の佐野智子、吉村絃美、内浜朗、冨澤佳代 諸氏の協力を得た。石川県農業総合研究センター、作物科の橋本良一氏、環境土壌科の北田敬宇氏、畑中博英氏、梅本英之氏には調査ご協力を頂いた。石川県野々市町の三納和之氏、松任市の中野正剛氏、穴水町の西出隆一氏、輪島市町野町の向面正一氏および国永剛氏、長野県伊那市の春日照夫氏には圃場調査での便宜を図って頂いた。伊那市の調査は、富山県立大学短期大学部折谷隆志教授と共同して実施したものである。記して感謝の意を表します。

本研究の一部は、文部省科学研究費（番号11660015）により行った。

引用文献

- 鯨 幸夫ら 2000. 日作紀 69 別2 : 20-21.
 鯨 幸夫ら 2000. 日作紀 69 別2 : 22-23.
 Kujira Y. et al. 2000. Abstracts of 3rd ICSC, Germany:160.
 Oritani T. et al. 2000. Abstracts of 3rd ICSC, Germany: Supplementary Abstracts.
 作物学会北陸支部・北陸育種談話会編, 1995. コシヒカリ, 農文協 : 544-549.
 葭田隆治 1991. “サイトカイニンバイブル”, 酪農学園出版部 : 1-125.

(2000年11月30日受付, 2001年2月13日受理)