

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14680

研究課題名(和文) ヤムイモ (*Dioscorea* spp.) の窒素固定細菌との共生に関する研究研究課題名(英文) Study on the symbiosis with nitrogen-fixing endophytes bacterium in yams (*Dioscorea* spp.)

研究代表者

志和地 弘信 (Hironobu, Shiwachi)

東京農業大学・国際食料情報学部・教授

研究者番号：40385505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ダイジョ(熱帯産ヤムイモ)の新品種の育成過程で窒素肥料がなくても生育する品種を見いだした。この品種には根粒菌の*Rhizobium*、*Ralstonia*属の他、窒素固定細菌の*Bacillus*、*Azospirillum*、*Pantoea*、*Shinella*、*Kosakonia*、*Pantoea*属が共生していた。また、トゲイモ(ヤムイモの一種)からも根粒菌や窒素固定細菌が分離され、11属が推定された。次に、ダイジョ19系統について調べたところ、多くの窒素固定細菌が分離され、19属が推定された。これらの結果、ヤムイモの生育には窒素固定細菌が関与すると思われる、世界で初めての報告となった。

研究成果の概要(英文)：Water yam and lesser yam is able to grow under poor fertile soil conditions unless nitrogen fertilization. However, the source of nutrition in survived both yams was not identified in previous study. From the experiment of isolation and estimation of nitrogen-fixing endophytes bacterium using the acetylene reduction activity test and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence, 11 species of nitrogen-fixing endophytes bacteria were found in water yam and lesser yam plants. They have related species of the genera *Azospirillum*, *Bacillus*, *Cohnella*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Shinella* and *Xanthomonas*. And more, individual plants of 19 water yam accessions grown in nutrient-poor subsoil, 19 bacterial genera were isolated from plants. This is first report on nitrogen-fixing endophytes bacteria associated with yams.

研究分野：作物学

キーワード：作物学 育種学 ヤムイモ 施肥技術 窒素固定細菌

## 1. 研究開始当初の背景

ヤマイモとはヤマノイモ科の植物の食用種を指す。日本のナガイモやジネンジョもヤマイモの仲間である。ヤマイモは日本以外の先進国では食する習慣がないが、世界では約6,500万トン生産され、主食として重要な地域もある。しかし、その生産は伝統的な農法で行われており生産性が低い。そこで、生産性を上げるために化学肥料を施す試みが行われているが、イモの収量に及ぼす化学肥料の効果は不明である。申請者らはヤマイモの一種のダイジョ品種の育成過程で(科研基盤B アフリカの孤児作物に関する研究:平成25-27年度)窒素肥料がなくても生育する品種(コードナンバーN511)を見いだした。この品種の植物体の窒素同位体 $^{15}\text{N}$ を測定したところ、空気中の窒素を固定している可能性を発見した(Takada *et al.*, 2017)。このことはヤマイモの生育に窒素固定細菌が関わっていることを示唆するものであった。

## 2. 研究の目的

ヤマイモのいくつかの種はやせた土地に育ち、また、焼き畑で巨大なイモが生産出来ることが知られているがそのメカニズムについてほとんど判っていない。ヤマイモが種および品種によっては化学肥料をあまり必要としないことが明らかになれば、無駄な投入が必要なくなり、生産のコストを下げられる。マメ科作物に似た特性をヤマイモが見つけたのは世界で初めてであり、本研究では共生菌の探索と窒素固定能力を明らかにすることを目的にした。

## 3. 研究の方法

研究は3年間の予定で実施した。

### (1) 窒素固定細菌の分離・推定技術の開発

ヤマイモの一種である東南アジア原産のダイジョ(N511品種)及びトゲイモ(E2品種)を腐植や養分が入っていない沖縄県宮古島

の島尻マージ深土(総窒素量0.06%)を用いて無施肥条件下で栽培し、生育量並びに生育に伴って推移する植物体中の窒素同位体

$^{15}\text{N}$ 比を測定した。対照の品種には10a当たり30kgの窒素肥料(尿素)を与えた。栽培した植物体の茎と根を培養し、アセチレン還元活性(ARA)を測定した。活性のあった菌群には窒素固定細菌が含まれると考えられることから、分離して培養し、単離を行った。単離した細菌は次に細菌遺伝子について *nifH* 遺伝子を用いたPCR-DGGE解析およびシーケンスを行い、その種類および相同性を同定した。窒素固定細菌の *nifH* 遺伝子は塩基配列がデータベース化されている。ヤマイモから抽出したDNAおよびRNAをPCR増幅して、*nifH* 遺伝子の増幅断片をデータベースと照合・解析して細菌を推定した。

### (2) ヤマイモ系統と窒素固定細菌の多様性

ダイジョ19系統について同様の栽培試験を行い、葉、茎及び根の組織を培養し、ARAを測定した。活性のあった細菌コロニーから細菌を分離・単離して、*nifH* 遺伝子配列から細菌を推定した。

### (3) 窒素固定細菌の感染経路の解明

ダイジョN511品種を滅菌した種芋と砂で栽培し、葉、茎及び根の組織培養から窒素固定細菌を単離・推定した。比較の植物体には細菌を含む土壌を添加した。そして、細菌の感染経路を推測した。

## 4. 研究成果

### (1) 窒素固定細菌の分離・推定技術の開発

ダイジョN511とトゲイモ品種は無施肥でも収穫時まで生育した。ダイジョN511品種の窒素固定の能力について、偶然性を排除して再確認するために、窒素固定を行わない対照作物(カボチャ)との $^{15}\text{N}$ の推移および生育を比較した。その結果ダイジョの窒素寄与率は38%であり、高い窒素固定能力を示した

(Takada *et al*, 2018)

ダイジョ N511 およびトゲイモ E2 品種から多数の窒素固定細菌を分離することに成功した。DNA 解析で特定されたダイジョの窒素固定細菌は根粒菌の *Rhizobium* 属の他、*Bacillus*, *Azospirillum*, *Kosakonia* 属であった(高田ら 2016)。また、トゲイモからは根粒菌の *Devosia* 属や *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Xanthomonas* 属が見つかった(Rezaei *et al*, 2017)。

(2) **ヤマイモ系統と窒素固定細菌の多様性**  
ダイジョ 19 系統を窒素施用と無施肥の条件で栽培して窒素固定細菌の分離を試みた。その結果、19 系統は無施肥でも生育が可能であり、全ての系統において、いずれの条件からも窒素固定細菌が分離され、19 属が推定された。このうちの 10 属はマメ科以外で初めて分離された窒素固定細菌であった。これらの結果、ヤマイモの生育には窒素固定細菌が関与すると考えられ、マメ科以外にも共生する窒素固定細菌が多く存在することについて、世界で初めての報告となった(Ouyabe *et al*, 2017)。

### (3) **窒素固定細菌の感染経路の解明**

土壌を添加した植物体からは多くの窒素固定細菌が分離されたことから土壌からの感染が推定された。しかし、滅菌した砂だけで栽培したダイジョからも *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Shinella*, *Ochrobactrum*, *Bosea*, *Labrys* 及び *Leifsonia* などの窒素固定細菌が分離された(三輪ら 2017)。このことから窒素固定細菌は空気中からも感染すると考えられた。

ヤマイモには施肥をあまり必要としない種・系統群が存在すると推察された。今後にはヤマイモに共生する作用機序と菌叢を解明し、ヤマイモ栽培における窒素固定細菌の利用技術を開発したい。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Kanako Takada, Hidehiko Kikuno, Pachakkil Babil and Hironobu Shiwachi. 2018. Analysis of the source of nitrogen during water yam (*Dioscorea alata* L.) growth using <sup>15</sup>N observations. Tropical Agriculture and Development 査読有 No.62: 印刷中  
Abdul Qayom Rezaei, Hidehiko Kikuno, Pachakkil Babil, Naoto Tanaka, Byoung-Jae Parak, Michio Onjo and Hironobu Shiwachi. 2017.

Nitrogen-fixing Endophytic Bacteria is involved with the lesser yam (*Dioscorea esculenta* L.) growth under low fertile soil condition. Tropical Agriculture and Development. 査読有 No.61: 40-47.

Knako Takada, Hidehiko Kikuno, Pachakkil Babil, Kenji Irie and Hironobu Shiwachi. 2017. Water yam (*Dioscorea alata* L.) is able to grow under low fertile soil. Tropical Agriculture and Development. 査読有 No.61: 8-14.

Abdul Qayom Rezaei, Hidehiko Kikuno, Kaoru Sugiyama, Pachakkil Babil, Byoung-Jae Parak, Michio Onjo and Hironobu Shiwachi. 2016. Effect of Nitrogen Fertilizer on Growth of the Lesser Yam (*Dioscorea esculenta* L.). Tropical Agriculture and Development. 査読有 No. 60: 185-190.

[学会発表](計7件)

志和地弘信、菊野日出彦、パチャキルバビル ヤマイモ研究セミナー。日本熱

帯農業学会第 204 回研究集会 玉川大学  
2018 年 3 月 11 日.

Ouyabe, M., Babil, P., Kikuno, H.,  
Tanaka, N. and H. Shiwachi. 2017.  
Diversity of endophytic diazotrophs  
associated with yam (*Dioscorea* spp.) .  
熱帯農業研究第 10 巻別号 2. P 93-94. 日  
本熱帯農業学会第 122 回講演会 香川大  
学 2017 年 10 月 21 - 22.

三輪菜都美、菊野日出彦、田中尚人、志  
和地弘信. 2017. ダイジョ(*D. alata* L.)  
における窒素固定細菌の共生機序に関す  
る研究. 熱帯農業研究第 10 巻別号 2.  
P30-31. 日本熱帯農業学会第 122 回講演  
会 香川大学 2017 年 10 月 21 - 22.

Abdul Qayom Rezaei, Hidehiko Kikuno,  
Kaoru Sugiyama, Pachakkil Babil,  
Byoung-Jae Parak, Michio Onjo and  
Hironobu Shiwachi. Effect of Nitrogen  
Fertilizer on Growth of the Lesser Yam  
(*Dioscorea esculenta* L.). 日本熱帯農  
業学会第 119 回講演会 明治大学 2016 年  
3 月 23 - 24 日.

高田花奈子, 菊野日出彦, 池永誠, 境雅  
夫, 遠城道雄, 朴炳宰, Babil Pachakkil,  
志和地弘信. ダイジョに内生する窒素固  
定細菌に関する研究. 日本熱帯農業学会  
第 119 回講演会 明治大学 2016 年 3 月 23  
- 24 日.

Abdul Qayom Rezaei, Hidehiko Kikuno,  
Pachakkil Babil, Naoto Tanaka,  
Byoung-Jae Parak, Michio Onjo and  
Hironobu Shiwachi. 2017.

Nitrogen-fixing Endophytic Bacteria  
associated with the lesser yam  
(*Dioscorea esculenta* L.). 日本熱帯農  
業学会第 120 回講演会 鹿児島大学 2016  
年 10 月 8 - 9 日

Kanako Takada, Hidehiko Kikuno,  
Makoto Ikenaga, Masao Sakai, Michio

Onjo, Byoung-Jae Park and Hironobu  
Shiwachi. Study on biological nitrogen  
fixation associated with water yam  
(*Dioscorea alata* L.) 日本熱帯農業学会  
第 118 回講演会および 2015 ISSAAS  
International Congress 共催 東京農業  
大学 2015 年 11 月 7 - 8 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志和地 弘信 (SHIWACHI Hironobu)  
東京農業大学・国際食料情報学部・教  
授  
研究者番号 : 40385505

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )