

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：82111  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21580081  
 研究課題名（和文） サツマイモ体内での *Bradyrhizobium* 属細菌の共生的窒素固定機構の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of the endophytic nitrogen fixation of bradyrhizobia in sweet potato.  
 研究代表者  
 大脇 良成（OHWAKI YOSHINARI）  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域・主任研究員  
 研究者番号：60355542

## 研究成果の概要（和文）：

サツマイモより分離した *Bradyrhizobium* 属内生窒素固定菌は、植物体内に存在する有機酸類をエネルギー源にして、酸素濃度の低い条件で窒素固定を行うことを明らかにした。また、根より感染した菌は、地上部全体に移行し定着することが示された。これらのことから、*Bradyrhizobium* 属内生窒素固定菌は、サツマイモ組織内の低酸素部位で窒素固定活性を発現できる可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Endophytic diazotrophs isolated from sweet potato were characterized. The isolated *Bradyrhizobium* showed acetylene reduction activity in the medium containing carboxylic acids as the carbon source under micro-aerobic conditions. Colonization in the stems after inoculation of the *Bradyrhizobium* to the roots was observed in sweet potatoes. These results suggested that the *Bradyrhizobium* endophyte can express nitrogenase activity in the microsites with low oxygen tension in plants.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：サツマイモ、エンドファイト、窒素固定、*Bradyrhizobium* 属細菌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物-微生物間の窒素固定は、マメ科

根粒中での共生的窒素固定、および根圏における協同的窒素固定が知られていたが、近年

になって植物体内細菌（エンドファイト）による窒素固定が発見された。申請者らも、サトウキビ、熱帯イネ科牧草やサツマイモで、エンドファイトによる窒素固定が全窒素集積量の30%程度あることを報告してきた。

(2) 申請者らは、培養を用いない方法によりサツマイモ体内で窒素固定を行う菌を探索し、根粒菌と近縁な *Bradyrhizobium* 属細菌が窒素固定を行っている可能性を示唆した。さらに、これらの情報をもとに、培養法によりサツマイモ体内から *Bradyrhizobium* 属を含むいくつかの窒素固定菌を分離した。

(3) マメ科根粒中での窒素固定能の発現機構は、分子レベルで明らかになりつつあるが、エンドファイト窒素固定菌が植物体内で窒素固定機能を発現する機構は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究ではサツマイモより分離した *Bradyrhizobium* 属内生窒素固定細菌が、植物体内に感染し窒素固定機能を発現する条件を、宿主植物から供給される炭素化合物、宿主植物の窒素栄養条件、植物組織内の酸素分圧などマメ科根粒中における窒素固定の制御因子と類似の観点から解析する。そしてこれらの結果より、サツマイモ中でのエンドファイト窒素固定の発現機構を、宿主との相互作用の観点から明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) サツマイモより分離した *Bradyrhizobium* 属内生窒素固定細菌が、単生条件下で窒素固定活性を発現する条件を、培地の炭素源および酸素分圧との関連で調査する。

(2) サツマイモの根に *Bradyrhizobium* 属内生窒素固定細菌を接種し、感染と地上部各

部位への移行を調査する。また、菌の感染・定着に対する植物体の窒素栄養条件の影響について検討する。

(3) *Bradyrhizobium* 属窒素固定細菌の感染が、サツマイモの生育へ及ぼす影響について調査する。また、重窒素同位体希釈法を用いて、サツマイモ体内における窒素固定の可能性を検討する。さらに、植物体内の酸素分圧を測定し、窒素固定活性の発現との関連を推定する。

## 4. 研究成果

(1) サツマイモ塊根より分離した *Bradyrhizobium* 属内生細菌は、単生条件下においてリンゴ酸、コハク酸、乳酸、ピルビン酸を唯一の炭素源とした半流動培地でアセチレン還元活性を示した(表1)。一方、クエン酸およびマンニトールを唯一の炭素源とした半流動培地では、アセチレン還元活性は低かった。また、液体流動培地を用いた振とう培養条件においては、いずれの炭素源を用いた培地でも、アセチレン還元活性は低かった。これらのことから、*Bradyrhizobium* 属内生細菌は、単生条件下においてモノカルボン酸およびジカルボン酸をエネルギー源として、微好気的な条件下で窒素固定を行うものと考えられた。また、サツマイモの抽出液を用いた半流動培地においてもアセチレン還元活性が認められたことから、*Bradyrhizobium* 属内生細菌はサツマイモ中に存在するこれらの有機酸類を利用して窒素固定を行う可能性が示唆された。

表1 *Bradyrhizobium* 属窒素固定細菌のアセチレン還元活性に及ぼす炭素源の影響

炭素源	アセチレン還元活性 (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> tube <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
リンゴ酸	0.418 (±0.050)
コハク酸	0.999 (±0.032)
乳酸	0.562 (±0.018)
ピルビン酸	0.984 (±0.129)
クエン酸	0.006 (±0.003)
マンニトール	0.027 (±0.021)

(2) 高窒素および低窒素条件で無菌的に栽培したサツマイモの根に *Bradyrhizobium* 属内生細菌を接種したところ、葉、葉柄、茎および根に菌の感染が確認された。各部位における菌数は植物体新鮮重あたり 10<sup>3</sup>~10<sup>5</sup> の範囲であり、窒素の施用量は各部位の菌数に大きな影響を与えなかった (表2)。これらのことから、根より感染した *Bradyrhizobium* 属内生細菌は、地上部の各部位に移行・定着することが明らかになった。また、植物の窒素栄養条件は、植物体への菌の感染および体内での増殖に影響を与えないものと考えられた。

表2 *Bradyrhizobium* 属窒素固定細菌のサツマイモへの感染・定着に及ぼす窒素の影響

器官	低窒素	高窒素
	(CFU gFW <sup>-1</sup> )	
葉	5.8 × 10 <sup>4</sup>	1.8 × 10 <sup>5</sup>
葉柄	1.1 × 10 <sup>3</sup>	5.1 × 10 <sup>3</sup>
茎	3.1 × 10 <sup>4</sup>	6.8 × 10 <sup>4</sup>
根	2.1 × 10 <sup>4</sup>	8.0 × 10 <sup>4</sup>

(3) サツマイモより分離した *Bradyrhizobium* 属内生細菌 (AT1 株) およびクサネム根粒より分離された *Bradyrhizobium* 属根粒菌 (MAFF210318 株) を

サツマイモに接種し無菌的に栽培したところ、菌の接種により生育促進が見られた (図1)。また、葉の重窒素存在比は、菌の接種により低下する傾向にあった (図2)。このことから、接種した *Bradyrhizobium* 属細菌が、植物体内で窒素固定を行っている可能性が示唆された。微小酸素電極を用いて、サツマイモ器官内の酸素濃度を測定したところ、根、茎および葉のそれぞれの器官内に内生細菌が窒素固定可能な低酸素領域があることが確認された。本結果は、酸素濃度が高く窒素固定には不適と考えられてきた葉においても、窒素固定能が発現可能な低酸素部位があることを明確に示したものである。

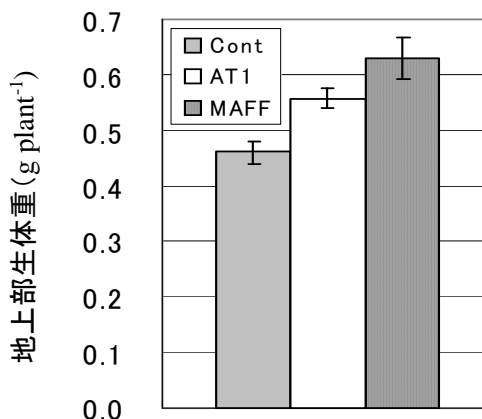


図1 サツマイモの生育に及ぼす菌接種の影響

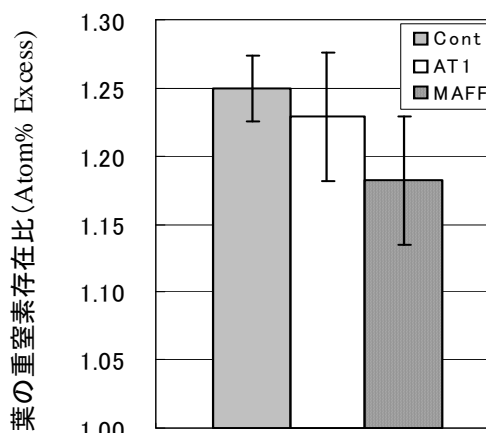


図2 サツマイモの葉の重窒素存在比に及ぼす菌接種の影響

(4) これらの結果から、*Bradyrhizobium* 属内生窒素固定細菌はサツマイモ全体に感染・定着し、植物体内に存在する有機酸類をエネルギー源にして、組織内部の低酸素部位で窒素固定活性を発現するものと推定された。これらは、根粒菌の共生的窒素固定発現条件と類似していたが、窒素による感染制御機構などに関して異なる点も明らかになった。

本研究により、これまで不明であったエンドファイト細菌が植物体内で窒素固定能を発現する主要な条件が明らかになった。内生窒素固定細菌は、宿主特異性が低いため幅広い作物に感染することが可能である。本研究で得られた成果により、エンドファイト窒素固定菌の利用技術の開発が進むことが期待される。

#### 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1件)

①大脇良成、植物の生育を助けるエンドファイトーその働きと農業利用に向けた取り組み、土づくりとエコ農業、査読なし、43巻、2011年、2-7

[学会発表] (計11件)

① 大脇良成、寺門純子、Endophytic colonization of sweet potato by a diazotrophic bradyrhizobia、17th International Congress on Nitrogen Fixation、2011年11月30日、エスプラネードホテル (オーストラリア)

② 寺門純子、藤原伸介、大脇良成、サツマイモから分離した窒素固定エンドファイトの機能評価、日本土壤肥料学会、2010年9月7日、北海道大学 (北海道)

③ 大脇良成、寺門純子、藤原伸介、Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of bradyrhizobia isolated from sweet potato、III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology、2009年12月3日、リスボン大学 (ポルトガル)

④ 大脇良成、寺門純子、藤原伸介、サツマイモより分離した *Bradyrhizobium* 属内生窒素固定菌の接種効果、日本土壤肥料学会、2009年9月15日、京都大学 (京都府)

[図書] (計2件)

① 寺門純子、安藤象太郎、大脇良成、米山忠克、Wiley/Blackwell、*Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*、2012年、掲載決定 (印刷中)

② 大脇良成、農林統計出版、農業・農村環境の保全と持続的農業を支える新技術、2011年、118-121

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大脇 良成 (OHWAKI YOSHINARI)

(独) 農研機構・中央農業総合研究センター・土壌肥料研究領域・主任研究員

研究者番号：60355542