

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2019

課題番号：16KT0032

研究課題名(和文) 安心・多収・良食味を実現するサツマイモの地域適応型エンドファイト利用技術の開発

研究課題名(英文) Development of technology to utilize region-adapted endophyte of sweet potatoes for safety, high yield and good taste

研究代表者

井藤 和人 (Itoh, Kazuhito)

島根大学・学術研究院環境システム科学系・教授

研究者番号：20273922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：サツマイモ塊根内部で優占する細菌群集構造(培養法)は、土壌よりも栽培環境に影響を受けたが、細菌群集構造(非培養法)は、土壌や栽培環境に影響されなかった。サツマイモの窒素固定率は、栽培期間の日平均気温が高くなるに従って増加した。また、窒素施肥条件に関わらず、個体当たりの乾物重との間に正の相関関係を示した。

サツマイモ苗にダイズ根粒菌を接種することにより、地上部の生育および塊根数を増加させた。また、サツマイモの同化産物の供給量と窒素固定率の間の正の相関関係が、接種区でのみ認められた。根粒菌接種サツマイモの食味と購入意向調査で、食味評価値と生サツマイモの支払意思額は、非接種サツマイモで有意に高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栽培環境がサツマイモ内生細菌の群集構造(培養法)に影響し、内生菌に起因する窒素固定が栽培環境条件に影響を受けることが明らかとなった。また、ダイズ根粒菌の接種が収量を増加させ、窒素固定率が同化産物の供給量に正の相関があるなど、内生菌の作物生育への寄与が明らかにされた。

各地の栽培環境に適応した内生菌を活用することの重要性が示唆され、内生菌群集の機能と環境因子との関係を解明することで効率的な増収促進が期待できる。

微生物が内生したサツマイモが食品として消費者が受け入れる際の課題が明らかになった。内生菌の接種技術が消費者の理解を得て活用されるには、社会科学的なアプローチも必要なことが確認された。

研究成果の概要(英文)：Culturable endophytic bacterial communities of the sweet potato tubers were affected by climatic conditions rather than soils, whereas the corresponding culture-dependent communities were not affected. The fixed atmospheric nitrogen of sweet potato increased as the daily average temperature during cultivation increased, and showed a positive correlation with the dry weight per plant regardless of the nitrogen fertilization conditions.

Inoculation of sweet potato seedlings with the soybean nodulating strain increased the growth in the above-ground parts and the number of tubers. In addition, a positive correlation between the amount of assimilated carbon in sweet potato and the fixed atmospheric nitrogen was observed only under the inoculation conditions.

In the taste and purchase intention survey of sweet potatoes inoculated with the soybean rhizobia, the taste evaluation value and willingness to pay for raw sweet potatoes were significantly higher in the non-inoculated sweet potatoes.

研究分野：微生物生態学

キーワード：エンドファイト サツマイモ 共生 食味

様式C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農林水産省は「不測時の食料安全保障マニュアル」を策定し、1人1日あたりの供給熱量が2000kcalを下回ると予測される場合をレベル2と定義し、先ずとるべき対策として、生産の転換を挙げ、熱量効率の高い作目であるサツマイモの利用を提唱している。サツマイモは肥料輸入が停止した場合でも生産を維持できる能力を持つ。この貧栄養でも成長できるサツマイモの特性は、植物体内に棲息する内生菌(エンドファイト)の窒素固定に依るところが大きい。空気中から植物に必須な窒素を環境負荷なく供給できる重要性にもかかわらず、エンドファイトを積極的に活用する試みはほとんど進んでいない。

【エンドファイトの評価法を開発】申請者らは、サツマイモの台木の主茎に由来・品種が異なるさまざまな穂木を接木すると、穂木によっては最大で約4割増大する現象を発見し、その促進原因が穂木品種の遺伝的特性に加えて、穂木に棲息するエンドファイトが台木に感染することで生育が促進されることを明らかにした。さらに、無菌的に栽培した台木に穂木を部分接木することで、エンドファイトの生育促進効果が極めて容易に評価できる方法を開発した。

【エンドファイト利用の手がかりをつかむ】同研究において、顕著な生育促進効果があったサツマイモは特定の農家の苗に由来し、その茎からは窒素固定能を示すアセチレン還元活性が測定された。また、活性は特定の品種で高く、生育時期によっても活性が大きく変動する現象が観察された。これらの結果から、エンドファイトの利用性を向上させる上で、育苗条件によってエンドファイト感染が向上できること、感染しやすい品種あるいは窒素固定活性を高める品種があること、気象条件あるいは植物体内成分の変化により窒素固定活性が影響されることが示唆され、これらの要因を科学的に解明することで、生産性を高める技術の開発が期待できる。

【エンドファイト利用を推進する上での生産と消費上の課題】サツマイモではエンドファイトの地域性に関する報告は極めて少なく、温度条件による微生物群集構造への影響は明らかでない。サツマイモ苗は全国的に流通・販売されており、近年では寒地の北海道にまで栽培が広がっている。温度条件や土壌によるエンドファイトの地域適性を明らかにすることは、実用的な接種法の開発とともに、エンドファイトを有効利用する上で極めて重要である。一方、芋の「おいしさ」にエンドファイトが影響するかもしれない事例を申請者らは観察している。これらエンドファイトと食味や貯蔵性との関係は、生産者と消費者の双方の大きな関心事であると考えられる。しかしながら、エンドファイトがサツマイモに棲息することは一般に知られていないため、生産者と消費者の双方にエンドファイト利用の可能性と限界を明示していないことが技術普及上のボトルネックとなっている。エンドファイトの利用を高度化するためには、生産者と消費者に実態を解説し、意向の社会科学的な分析に基づいた分野融合的な技術開発により、生産者と消費者にとともに受け入れられることが求められる。

2. 研究の目的

エンドファイトの利用を生産者と消費者にとともに受け入れられ、効果的に利用できる微生物-作物-栽培環境-社会経済学的条件を明らかにし、自然科学・社会科学とその融合アプローチから安心・多収・良食味を実現するエンドファイトの高度利用技術を確認する。本研究では、以下の研究課題を解明することを目的とする。

- (1) 環境条件がサツマイモエンドファイトの群集構造に及ぼす影響の解明
- (2) 栽培条件がサツマイモの窒素固定活性に及ぼす影響の解明
- (3) 優良微生物を接種したサツマイモの生産性に及ぼす影響の解明
- (4) 微生物を接種したサツマイモの消費者意識の解明

3. 研究の方法

- (1) 環境条件がサツマイモエンドファイトの群集構造に及ぼす影響の解明

サツマイモの内生細菌の群集構造に及ぼす土壌と気候条件の影響を調べるため、拓殖大学北海道短期大学(北海道深川市)、島根大学(島根県松江市)、宮崎大学(宮崎県宮崎市)の各実験圃場に、それぞれ3圃場の土壌を運び、サツマイモを約3ヶ月間栽培した。塊根からの内生菌を分離し、それらの代表的な菌株については、16SrRNA遺伝子の部分塩基配列を分析することにより近縁種を同定し、門/クラスと属のレベルに基づいて内生細菌群集を解析した。

また、同じサツマイモサンプルを用いて、ロックされた核酸オリゴヌクレオチドを用いたPCRクランプ技術とメタゲノム解析を適用し、培養に依存しないサツマイモの内生細菌の群集構造に対する土壌と気候条件の影響について検討し、培養法で得られた結果と比較した。

- (2) 栽培条件がサツマイモの窒素固定活性に及ぼす影響の解明

圃場に3段階の窒素処理区(10a当たり窒素0kg、5kg、15kg)を設け、3年間にわたり、サツマイモ(ペニアズマ)を栽培し、重窒素自然存在比法から求めた窒素固定率と生育初期の乾物生産および収量との関係について解析を行った。また、株間を40cmまたは60cmとする区を設け、単位面積当たりまたは個体当たりの乾物生産量と窒素固定率との関係について解析を行った。

温度条件が窒素固定率に及ぼす影響を明らかにするため、標高4~562mにある松江・掛合・頓原・都加賀の4地点の黒ボク土圃場にペニアズマを6月上旬に定植し、9月~10月上旬に収穫した。また、葉の間引き処理により、同化産物供給が窒素固定率に及ぼす影響について検討した。地点により微生物相が異なる可能性を考慮し、根粒菌AMP1の菌液に定植前日に挿穂を24時間

浸漬した接種区と、接種を行わずに土着菌を評価する非接種区を設けた。部位別乾物重を求めた後、地上部試料の窒素固定率を求めた。

(3) 優良微生物を接種したサツマイモの生産性に及ぼす影響の解明

サツマイモの生育に対する窒素固定細菌である根粒菌の影響を評価するために、平成 28 年度の調査結果から選抜した *Bradyrhizobium* 属根粒菌 AMP1、AZJ1、ASA1、AMS4 の 4 菌株を供試し、サツマイモ無菌苗（ベニアズマ）への接種試験を行った。サツマイモ苗を根粒菌液に浸漬し、ワグネルポットに移植後 61 日間栽培した後に生育調査を行った。また、供試した 4 菌株について、植物ホルモンであるインドール酢酸（IAA）の生産能について調査した。

平成 30 年にも必続き、同条件で選抜した根粒菌 4 菌株のサツマイモ（ベニアズマ）苗への接種実験を行った。7 月下旬に供試根粒菌をサツマイモ苗に接種し、1/5000a ワグネルポットに定植して 10 月上旬まで栽培し、生育収量に基づき、根粒菌の接種効果を評価した。

(4) 微生物を接種したサツマイモの消費者意識の解明

接種イモの栽培実験から得たサンプルを用いて、2017 年 11 月 30 日、12 月 8 日に 24 名の被験者（男子大学生 58%、普段野菜を買う 50%）に対して食味調査を行った。ベニアズマを用い、定植前の苗に対する根粒菌接種の有無を処理とする、栽培条件と調理法（蒸し方）が同じ蒸し芋を供試した。引き続き、2018 年 11 月 3 日に、根粒菌接種サツマイモの食味と購入意向調査について、栽培実験から得たサンプルを用いて、76 名（40～59 歳 89.5%）の被験者に対して実施した。

4. 研究成果

(1) 環境条件がサツマイモエンドファイトの群集構造に及ぼす影響の解明

62 株の内生菌が分離、同定された。深川土壌、松江土壌、宮崎土壌を用いて、それぞれ対応する深川、松江、宮崎でサツマイモを栽培すると、それぞれ、 γ -プロテオバクテリア（96%）、 α -プロテオバクテリア（87%）およびアクチノバクテリア（88%）が優占した。土壌を他の場所に移動してサツマイモの栽培に用いた時には、上記のそれぞれの栽培場所で優占した内生菌が、新しい場所で増加した。内生菌の植物内における菌密度も土壌より栽培場所の影響を受けた。以上の結果から、サツマイモ内生菌群集と菌密度には、土壌よりも栽培場所が重要な要素であることが明らかとなった。

クロロプラスト、ミトコンドリア、未同定の塩基配列を除いた後、サンプルあたりの塩基配列と operational taxonomic units (OUT) の平均値は、それぞれ 20,891 と 846 であった。プロテオバクテリア（85.0%）、バクテロイデス（6.6%）、アクチノバクテリア（6.3%）で全塩基配列の 97.9% を占め、中でも γ -プロテオバクテリア（66.3%）が最も優占していた。上位 10 属で全体の 81.2% を占め、中でも *Pseudomonas*（31.9～45.0%）が最も優占していた。全体的な内生細菌群集はサンプル間で類似しており、土壌と気候条件が全内生菌の群集構造に大きな影響を与えなかったことが明らかとなった。元々サツマイモ苗に存在していた内生細菌群集が、栽培期間中も維持された可能性が示唆された。以上の結果は、培養可能な内生細菌群集だけが、栽培場所の影響を受けて変動していることを示唆している。

PCR クランプ技術が予定通り機能せず、サンプルあたりの塩基配列と OUT の平均値は、それぞれ 4,899 と 724 であった。苗では γ -プロテオバクテリア（74-97%）が優占していたが、サツマイモ塊根では、 γ -プロテオバクテリア（15-16%）が減少し、 α -プロテオバクテリア（36-37%）、 β -プロテオバクテリア（13-14%）、バクテロイデス（12%）、アクチノバクテリア（5-7%）が増加した。今回の結果では、前年度の結果が反映されず、内生菌細菌群集は、苗中の内生菌とは異なる内生菌細菌群集が形成され、また、それらは土壌、地域に影響されなかった。

(2) 栽培条件がサツマイモの窒素固定活性に及ぼす影響の解明

生育前半の全乾物重と窒素固定率との間には 0.1% 水準で有意な正の相関関係にあり、窒素固定率と収量との間には 1% 水準で有意な正の相関関係にあった。これらの結果から、サツマイモ（ベニアズマ）では、土壌中窒素含量が高いと地上部乾物重および全乾物重が増加し、窒素固定率が高まることで収量増加につながることを示唆された。

また、窒素固定率は単位面積当たりの全乾物重とは二次式で示される関係、個体当たりの全乾物重とは一次式で示される正の相関関係にあった。関係性がより強かった個体当たりの全乾物重と窒素固定寄与率との関係を詳細に解析すると、0N 区と 1N 区では株間を広げることで個体当たりの全乾物重は増加し、窒素固定寄与率も上昇していたが、3N 区では全乾物重の増加は小さく、窒素固定寄与率も上昇しなかった。サツマイモにおける窒素固定は窒素条件に関わらず個体当たりの乾物生産に影響を受けて増減することが示唆された。

栽培地の標高により 3.5（2018 年）の温度差を設けることができた。栽培期間の日平均気温と窒素固定率との関係を求めると、非接種区の窒素固定率は栽培期間の日平均気温にともない窒素固定率は直線的に増加した。接種区の窒素固定率は非接種区との間に有意差は認められなかった。土着菌と根粒菌との間に有意差が認められなかったことから、両者を平均した窒素固定率と日平均気温との関係を求めると、両者の関係は密接な正の一次直線でよく近似することがで

き、この近似線の傾きから、サツマイモの窒素固定率は気温 1 の上昇により 4.1%の割合で増加することが明らかになった。

平均葉数と窒素固定率との関係を求めると、根粒菌の接種区では窒素固定率は同化産物供給により増加した。非接種区では窒素固定率と葉数との間に関係が認められなかったことから、共生細菌により同化産物供給に対する依存度が異なる可能性があること示唆された。

(3) 優良微生物を接種したサツマイモの生産性に及ぼす影響の解明

サツマイモへの各根粒菌の接種区と無接種区の間に、サツマイモの地上部重および地下部重に、有意差は認められず、生育促進効果や塊根生産増に対する明瞭な結果を得ることができなかった。供試菌株の IAA 生産能については、どの菌株も IAA を生産したが、 $21.5 \mu\text{M}$ ~ $74.6 \mu\text{M}$ と菌株によってその生産能力に差があることが明らかとなった。

平成 30 年調査では、地上部の生育については、供試菌株接種区は無接種区と比較して定植後 12 日目で 1.42~1.96 倍、24 日目で 1.26~1.59 倍伸長した。塊根数についても、無接種区よりも供試菌株接種区のほうが 0.97~1.8 本多くなったが、いずれも無接種区と供試菌株接種区との間に有意な差は認められなかった。また、サツマイモの主茎長と塊根数との間に有意な正の相関 ($r=0.817$, $p<0.01$) が認められたことから、根粒菌接種により地上部の生育が促進されれば、収量の増加につながる可能性が示唆された。

(4) 微生物を接種したサツマイモの消費者意識の解明

2017 年の調査では、食味評価平均値 (5 件法、普通 3.7、接種 4.1) に 10%水準で有意差があった。同イモの蒸芋糖度平均値は普通 23.2、接種 25.9 ($P=0.06$) であった。接種イモの栽培法・効果の説明前後で、接種生イモの平均支払意思額 (1kg 換算) は、買わない 17%を除いて、説明前 223 円、説明後 248 円で、説明後と普通生イモ 214 円 (買わない 25%を除く) との間に 10%水準で有意差があった。

2018 年の調査では、食味と購入意向調査について、栽培実験から得たサンプルを用いて、生サツマイモの実際の購買層である 40~50 代の夫婦を中心に実施した。根粒菌接種説明前、食味評価値と生サツマイモの支払意思額は、いずれも非接種 (普通) サツマイモで有意に高かった。また、根粒菌接種の説明を受けた後の接種生サツマイモの支払意思額と、試食した非接種 (普通) サツマイモの支払意思額に有意差は認められなかった。

2018 年調査では、非接種 (普通) サツマイモの評価の方が高くなった。これは、根粒菌接種以外の栽培条件の影響によって、接種サツマイモの蒸芋糖度 (平均 14.34 度) が非接種より平均 2.89 度低いことなどが主な要因と考えられる。一方で、根粒菌接種の説明を受けても支払意思額に有意差はみられなかったことから、正確な情報があれば、一般の壮年消費者においても、根粒菌接種をネガティブに捉える可能性が低いことが示唆された。

2 年間の消費者調査を通じて、大学生から壮年世代まで、正確な情報があれば、根粒菌接種に対するネガティブな評価はみられず、根粒菌接種による食味 (糖度) への好影響を期待する傾向もみられた。また、農業生産の知識がある若い世代 (大学生) には、根粒菌接種による付加価値の訴求が期待できることも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ramesh Raj Puri, Fumihiko Adachi, Masayuki Omichi, Yuichi Saeki, Akihiro Yamamoto, Shohei Hayashi and Kazuhito Itoh	4. 巻 13
2. 論文標題 Culture-Dependent Analysis of Endophytic Bacterial Community of Sweet Potato (<i>Ipomoea batatas</i>) in Different Soils and Climates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Advances in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.9734/JAMB/2018/45442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ramesh Raj Puri, Fumihiko Adachi, Masayuki Omichi, Yuichi Saeki, Akihiro Yamamoto, Shohei Hayashi, Md Arshad Ali, Kazuhito Itoh	4. 巻 35
2. 論文標題 Metagenomic study of endophytic bacterial community of sweet potato (<i>Ipomoea batatas</i>) cultivated in different soil and climatic conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11274-019-2754-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城 惣吉、門脇正行、足立文彦、井上憲一、井藤和人
2. 発表標題 Bradyrhizobium属細菌の接種がサツマイモの生育に及ぼす影響
3. 学会等名 農業生産技術管理学会平成30年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 門脇正行、星野司、井出泰史、足立文彦、城 惣吉、松本真悟、井藤和人
2. 発表標題 窒素施肥量がサツマイモの窒素固定および収量に及ぼす影響
3. 学会等名 日本作物学会第246回講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	門脇 正行 (KADOWAKI MASAYUKI) (00379695)	島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授 (15201)	
研究分担者	足立 文彦 (ADACHI FUMIHIKO) (10335549)	島根大学・学術研究院農生命科学系・助教 (15201)	
研究分担者	大道 雅之 (OMICHI MASAYUKI) (20461692)	拓殖大学北海道短期大学・その他部局等・教授(移行) (40123)	
研究分担者	井上 憲一 (INOUE KEN-ICHI) (60391398)	島根大学・学術研究院農生命科学系・教授 (15201)	
研究分担者	城 惣吉 (SHIRO SOUKICHI) (20721898)	島根大学・学術研究院農生命科学系・助教 (15201)	
研究分担者	佐伯 雄一 (SAEKI YUICHI) (50295200)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	