

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770029

研究課題名(和文) マングローブ植物の窒素獲得における土壌窒素固定菌の役割

研究課題名(英文) Mangrove plants and nitrogen fixers

研究代表者

井上 智美 (Inoue, Tomomi)

独立行政法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員

研究者番号：80435578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、マングローブ植物の周囲で窒素固定活性が高くなっていることを確認すること、マングローブ植物の近傍で窒素固定を行っている酵素が干潟土壌のものと同じか否かを検証することである。生育段階の異なるマングローブ植物(ヤエヤマヒルギ)の周囲の土壌窒素固定活性を測定したところ、樹木の生育ステージが進むにつれて土壌窒素固定活性が高くなっていることが明らかとなった。また、植物近傍の土壌と干潟土壌の窒素固定反応の活性化エネルギーを測定したところ、両者には明瞭な違いが見られた。以上より、マングローブ植物近傍と干潟では、窒素固定反応に関与している酵素の種類が異なっていることが確認された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify spatial dynamics of soil nitrogen fixation around mangrove plant roots. We observed that soil nitrogen fixing activity (nitrogenase activity) was significantly higher in mangrove root zone compared with that in no root zone. This tendency was getting clear in accordance with progress of plant growth stage. Furthermore, we found that activation energy of nitrogen fixing reaction was significantly higher in mangrove root zone than in no root zone. These results lead to interpretations that mangrove plants gather nitrogen fixers around their roots and the enzymes participating in nitrogen fixation around mangrove roots are different from those in no root zone.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生態・環境

キーワード：マングローブ植物 根 窒素固定 呼吸根 通気組織

1. 研究開始当初の背景

マングローブ植物が生育地とする沿岸域は、頻繁に繰り返される潮汐変動によって有機物と共に窒素が海域へ流出するため、低窒素に陥りやすい特徴を持っている。窒素は植物の生育に欠かすことの出来ない必須元素の一つである。このような場所で旺盛な生育を見せるマングローブ植物はいったいどこからどのように窒素を獲得しているのだろうか？申請者はこれまで、マングローブ植物の根近傍における窒素動態に焦点をあてて研究を行ってきた。野外においてマングローブ土壌中の窒素含有量を測定したところ、根の近傍では窒素含有量が高く、わずか数 cm の間でも炭素/窒素比に違いがある事が明らかとなった。この事は、マングローブ植物の根近傍で活発な窒素同化が起きている事を示唆している。また、ポットにマングローブ植物を植えて土壌窒素含有量の経時変化を計測したところ、植栽後 2 週間で上昇を始め、半年後には無植生ポットの土壌に比べておよそ 4 倍の窒素含有量に増加していた。さらに、植物を植えたポットの土壌は無植生土壌に比べて高い窒素固定活性を示していた。以上の事から、マングローブ植物の根近傍には窒素固定菌が集まっている可能性が示唆された。マングローブ植物と窒素固定菌の相互関係について、定性的および定量的に検討を行うことで、マングローブ生態系の高い生産機構の解明へ大きな成果が期待できる。

2. 研究の目的

本課題の目的は、マングローブ植物が自分の根の周りに窒素固定菌を集めているかどうかを検証することである。さらに、窒素固定菌を集めていた場合、冠水土壌中に生息する窒素固定菌への窒素供給経路として、マングローブ植物に発達している呼吸根の通気組織が機能し得るか否かを検証する。最後に、マングローブの根の周りに集まっている窒

素固定菌と、干潟に生息する窒素固定菌が同じものなのかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 根近傍の窒素固定活性

マングローブ生態系を構成する代表的な植物であるヤエヤマヒルギ (*Rhizophora stylosa*) について、樹木をとりまく土壌窒素固定活性を調査した。沖縄県西表島船浦湾にて、3 段階の生育ステージ (樹高約 1m・2m・3m) にある孤立木を無作為に 3 本ずつ選定し、調査木とした。各調査木の中心から 3 方向へラインを引き、ライン上の土壌を 30cm 間隔で採取して土壌窒素固定活性を測定した。また、広域での検証を行うため、沖縄県西表島船浦湾のマングローブ林内から海域へ全長 500m のトランセクトを引き、25m 間隔に土壌窒素固定活性を測定した。

(2) 窒素固定菌への窒素供給経路

呼吸根の形態が異なるマングローブ植物 3 種 (*Avicennia marina*, *Rhizophora stylosa*, *Bruguiera gymnorrhiza*) を材料とした。沖縄県西表島船浦湾にて、それぞれの樹種の呼吸根を採取し、通気組織のガス拡散コンダクタンスを測定した。得られた値を、土壌を通じた場合のガス拡散コンダクタンス値と比較した。また、窒素供給経路として考慮すべき流路範囲を明らかにするため、呼吸根の部位ごとに窒素固定活性を測定して窒素固定菌の定着傾向を観察した。

(3) 根近傍と非近傍の窒素固定菌

窒素固定反応の温度依存性を計測して、以下に示すアレニウス式にあてはめると、プロットの傾きから、反応の活性化エネルギーを算出することができる。活性化エネルギーが異なっていれば、そこに関与している酵素が異なっていることが分かる。

$$k=A \exp (-E(RT)^{-1})$$

k : 反応速度定数, A : 指数前因子, E : 活性化エネルギー, T : 温度, R : 気体定数

沖縄県西表島の船浦湾に生育する *Rhizophora stylosa* を調査対象として、根近傍と非近傍で窒素固定反応の活性化エネルギーを比較した。まず、周囲 5m 圏内が無植生である孤立木を 9 個体選定し、これらを調査木とした。各調査木の根近傍 (根 5cm 圏内) および非近傍 (根近傍から 500cm 地点) の土壌を採取し、4 段階の異なる温度条件下 (12, 15, 21, 28°C) における窒素固定速度をアセチレン還元法により計測した。

3. 研究成果

(1) 根近傍の窒素固定活性

樹木レベルでは、樹木の生育ステージが進むにつれて、樹木周辺の土壌窒素固定活性が高くなっていった。樹高 3m では樹木中心から 1m 圏内の土壌窒素固定活性が高くなっていることが明瞭に示された(Fig.1)。

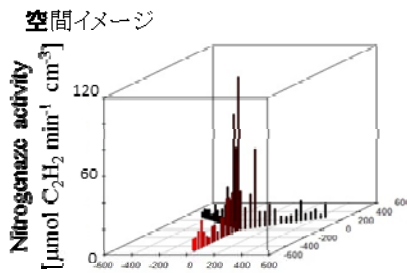
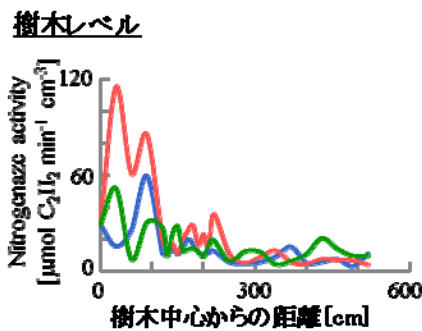


Fig.1 樹木中心から3方向に土壌窒素固定活性を測定すると、中心部付近で活性が高くなっている。

また、森林レベルでは、マングローブ林内で土壌窒素固定活性が高く、干潟に出ると活性が低くなっていた(Fig.2)。

森林レベル

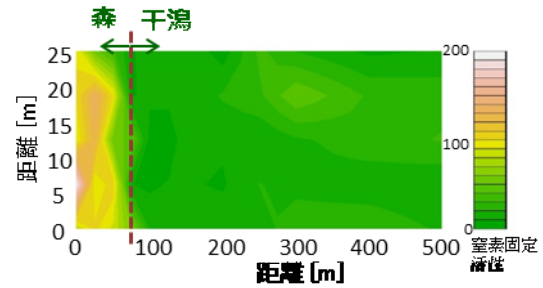


Fig.2 森林レベルで土壌窒素固定活性を測定すると、森林のある場所で活性が著しく高くなっている。

(2) 窒素固定菌への窒素供給経路

流路長と断面積で標準化した拡散コンダクタンスで比較をすると、呼吸根の通気組織を通じたガス拡散は、土壌を通じた場合に対して 16-27 倍効率が良いことが明らかとなった。樹種別では、 $A.m > R.s > B.g$ の順に通導性 (拡散コンダクタンス) が高かった。通気組織の構造が樹種によって異なっていることが窺える(Fig.3)。

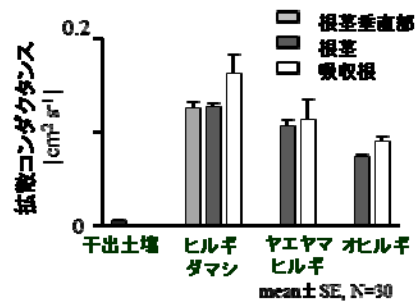


Fig.3. マングローブ3種の呼吸根ガス拡散コンダクタンス

得られた拡散コンダクタンス値を用いて、土壌および通気組織を通じたガス拡散速度を算出したところ、土壌を通じた場合では流路約 3cm で拡散速度がほぼゼロになるのに対し、通気組織を通じた場合では流路約 20cm でも拡散が起きることが示された。各樹種の根系平均断面積を加味した通気組織内の拡散速度は $B.g \approx R.s > A.m$ の順に高かった。 $B.g$

は通気組織の通導性は低い、根系が太いため、より多くのガス輸送が可能になっている。

一方、各樹種の根圏における窒素固定ポテンシャルは、ガス輸送能力が高い *B.g* で最も高く、ガス輸送能力が低い *A.m* で最も低かった。また *B.g* では、根の基部から先端までの至る所から窒素固定活性が検出されるのに対し、*R.s* では根基部 5cm の範囲に窒素固定活性が限定されていた。3 種共、根の表皮部分で窒素固定活性が高かったことから、窒素固定菌のほとんどは通気組織の外に存在していると考えられる。ただし、根内部の通気組織や中心柱からも僅かながら窒素固定活性が検出されたため、根の内部に窒素固定菌が入り込んでいる可能性がある。

(3) 根近傍と非近傍の窒素固定菌

窒素固定反応の活性化エネルギーは、各調査木の根近傍と非近傍で異なっており ($P < 0.01$)、すべての調査木において、根近傍の方が非近傍より高かった。この結果は、反応に関与している窒素固定酵素の種類が根近傍と非近傍で異なっていることを示している。

また、今回得られたアレニウスプロットは、根近傍・非近傍の区別なく、やや直線性が低くなる場合があった。直線性が保たれない理由として、(i) 設定した温度範囲内でバクテリアの生物活性に温度依存性があった、(ii) 活性化エネルギーが異なる複数種の窒素固定酵素が土壤中に存在していたなどの可能性が考えられる。自然界で窒素固定反応を担っているバクテリアが持っている酵素ニトロゲナーゼは、これまでに、活性中心金属や構造が異なる 3 種類が報告されている。複数種のバクテリアと酵素の組み合わせによる複層反応になっている場合、活性化エネルギーの異なる反応の寄与率が増すほど、アレニウスプロットの直線性が失われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① [Inoue T.](#), Fujimoto K. ed. (2013) Key studies on tropical mangrove ecosystems. *Global Environmental Research* 17. (責任編集) 査読有
- ② [Inoue T.](#), Asano T. (2013) Characteristics of water quality and nitrogen-associated bacterial functions in Mekong delta mangroves. *Global Environmental Research* 17, 199-206. 査読有
- ③ Nie L., Kubota M., [Inoue T.](#), Wu X. (2013) Effect of acid solutions on plants studied by the optical beam deflection method. *Journal of Environmental Sciences* 25, S93-S96. 査読有
- ④ Baba S., [Inoue T.](#), Kadoya T., Fukuda K. (2012) Butterflies and mangrove branches ISME/GLOMIS Electronic Journal, 10, 13-15. 査読有
- ⑤ [Inoue T.](#), Mastumoto K., Nohara S, Anzai Y. (2011) What happens to soil chemical properties after mangrove plants colonize? *Plant Soil*, 346, 259-273. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① [井上智美](#), 小山里奈, 松尾奈緒子 (2014) マングローブ植物は硝酸を利用するか? —硝酸態窒素濃度に対する応答—, 第61回日本生態学会、広島、3月
- ② [井上智美](#), 竹中明夫, (2013) マングローブ根圏には特異的な窒素固定バクテリアが存在するのか? —反応の温度依存性から考察する—, 第19回目日本マングロー

ブ学会、東京、12月

- ③ 新貝陽香, 藤本潔, 谷口真吾, 小野賢二, 渡辺信, 井上智美, 平田泰雅, 田淵隆一, Lihpai S. (2013) ミクロネシア連邦ポンペイ島における急激な海面上昇がマングローブ生態系に及ぼしつつある影響について, 第19回目日本マングローブ学会、東京、12月
- ④ 井上智美, 馬場繁幸 (2013) 海と生きる森とも言われるマングローブ林, OWS海のトークショー (招待)、東京、11月
- ⑤ Inoue T. (2013) What happens to soil chemical properties after mangrove plants colonize? International Workshop on Mangrove Conservation in India (招待), Gujarat, July
- ⑥ 井上智美, 竹中明夫 (2013) マングローブ植物の呼吸根と窒素固定菌の関係—戦略か副産物か, 第60回日本生態学会、静岡、3月
- ⑦ Inoue T., Kondo N., Matsumoto K. (2012) Mangrove root respiratory responses to different nitrogen conditions. The 5th EAFES International Congress、滋賀、3月
- ⑧ 井上智美 (2012) マングローブ植物の窒素獲得メカニズム—植物と窒素固定菌との関係. 総合地球環境学研究所 アラブなりわいプロジェクト会議 (招待)、京都
- ⑨ Xing-Zheng W., Rongjiao N., Kubota M., Miyamoto C. Inoue T. (2012) Effect of acid rain on a plant surface studied by optical beam deflection method. The 5th International Symposium on Environmental

Economy and Technology、福岡

- ⑩ 井上智美, 竹中明夫, 安西康晴 (2012) マングローブ呼吸根の通気組織と窒素固定菌の関係, 第18回目日本マングローブ学会、東京、12月
- ⑪ 井上智美, 松本勝美, 安西康晴 (2011) マングローブ植物の窒素獲得メカニズム. 第17回目日本マングローブ学会, 同予稿集, 12、東京、11月

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上智美 (INOUE TOMOMI)

独立行政法人国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 主任研究員

研究者番号 : 80435578