

学位論文要旨	
氏名	ジョイス プリスカ ジョロマ
題目	内生菌による窒素固定システムがサトウキビに定着する仕組みの解明 (Establishment mechanism of nitrogen fixing system by endophytic bacteria in the Japanese sugarcane plant)
<p>サトウキビは、熱帯あるいは亜熱帯に位置している多くの農業立地国の基幹作物であり、外貨獲得や国内消費の換金作物として重要である。一般に、サトウキビの栽培には 10a 当たり 30~40kg の窒素(N)を投入しているが、ブラジル国のある地方では無窒素もしくは極少量の窒素投入で栽培されている。しかし、無窒素で栽培されている、その地方のサトウキビの収量が窒素を潤沢に与えて栽培している地方の収量とほぼ同じであることから始まった研究が、マメ科のような根粒を介さなくても成立している新規の窒素固定システムであり、この新規窒素固定システムの仕組みを実際の栽培技術として活用するための基礎資料を得ることが本研究の目的である。</p> <p>本研究は、内生窒素固定細菌としてよく知られている <i>Herbaspirillum</i> を供し、イネから単離した <i>Herbaspirillum</i> がサトウキビにも感染しうるか否か、感染するとすれば感染した後のサトウキビ内での増殖に品種間差があるか否か、また、ホスト植物、サトウキビが無菌的に栽培された場合と、すでに他の内生菌が住み着いている状態では接種菌の感染と体内における増殖に違いが認められるか否かなどを緑色蛍光タンパク質をコードした <i>gfp</i> 遺伝子を挿入したイネ由来の <i>Herbaspirillum</i> sp. B501gfp1 菌株を利用して詳しく調査した。得られた結果は次の通りである。</p> <p>イネ由来の内生窒素固定細菌 <i>Herbaspirillum</i> sp. B501gfp1 はサトウキビにも容易に感染した。<i>Herbaspirillum</i> のサトウキビへの感染頻度とサトウキビ組織内での増殖の程度は、接種時の菌密度とサトウキビの品種のどちらにも影響され、接種時の菌密度の高い <math>10^8 \text{ ml}^{-1}</math> 処理区での感染頻度が <math>10^2 \text{ ml}^{-1}</math> よりも明らかに多かった。また、供した二品種、NiF8 と Ni15 の間では生育の旺盛な品種 Ni15 において、接種菌の感染と、組織内における増殖の旺盛なことが認められた。さらに、接種試験に供するサトウキビが既に幾種類もの内生菌を生息させている場合でも接種した <i>Herbaspirillum</i> は感染し組織内で増殖する様子が確認された。以上のことから、<i>Herbaspirillum</i> のサトウキビへの感染と組織内での増殖には、接種菌の感染部位(不定根や側根の発生部位に生じたクラック、傷ついた表皮細胞など)、接種時の菌密度、感染後の増殖部位(師部、木部、導管など)などが影響していると推定された。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	JOYCE PRISCA NJOLOMA
題 目	Establishment mechanism of nitrogen fixing system by endophytic bacteria in the Japanese sugarcane plant. (内生菌による窒素固定システムがサトウキビに定着する仕組みの解明)
<p>Sugarcane (<i>Saccharum officinarum</i> L.) is one of the most important agricultural crops whose products are both for export and domestic consumption in most of the tropical and subtropical countries of the world. Several recent studies have confirmed that biological nitrogen fixation (BNF) by endophytic bacteria contributes significantly to the nitrogen nutrition of sugarcane. Endophytic diazotrophic bacteria, which have been isolated in association with sugarcane plants, includes <i>Acetobacter diazotrophicu</i> and <i>Herbaspirillum</i> spp. In this research work, the main objective was to study the mechanisms involved in the establishment of nitrogen-fixing system in sugarcane plant through the investigation of the mode of infection by which the endophytic diazotrophic bacteria colonizes sugarcane after inoculation.</p> <p><i>Herbaspirillum</i> sp B501gfp1 (B501gfp1) bacterium, an isolate from wild rice was used in this study. Its GFP fluorescence could be easily distinguished in the stem than in the leaf tissues due to the presence of chloroplasts. And its brightness levels varied with time as a result of fluctuations in the bacterial cell density. Colonization studies under sterile conditions were carried out using two Japanese sugarcane plants cultivars (cvs) NiF8 and Ni15 inoculated with 2 inoculum doses of <math>10^8</math> and <math>10^2</math> bacterial cells <math>ml^{-1}</math> suspension. The results showed that bacterial cells colonized both the root and stem tissues and colonization was apparent in the intercellular spaces. Higher bacterial numbers were detected in plant tissues corresponded to the higher inoculum concentration treatment. Bacterial numbers also varied between the 2 cultivars with the higher values determined in cv. Ni15. Study results on colonization ability of B501gfp1 in the presence of indigenous endophytes (unsterile conditions) using same inoculum concentrations showed internal tissue in plants inoculated with both the <math>10^2</math> and <math>10^8</math> B501gfp1 bacterial cells <math>ml^{-1}</math> inoculum concentrations. However, extensive colonization and higher bacterial numbers were determined in the basal stem tissues of plants inoculated with the <math>10^8</math> bacterial cells <math>ml^{-1}</math>. In this study, we have presented the potential of an inoculated bacterium to extensively colonize the sugarcane plant tissues both under sterile and in the presence of naturally inhabiting endophytes (unsterile) growth condition. In addition, the inoculation techniques used have some significant impact on the infection sites, bacterial numbers, their localization and the subsequent internal tissue colonization.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	Joyce Prisca Njoloma
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 赤尾 勝一郎
	副査 宮崎 大学 教授 明石 良
	副査 鹿児島 大学 教授 稲永 醇二
	副査 宮崎 大学 教授 藪谷 勤
	副査 佐賀 大学 教授 井上 興一
審査協力者	
題目	Establishment mechanism of nitrogen fixing system by endophytic bacteria in the Japanese sugarcane plant (内生菌による窒素固定システムがサトウキビに定着する仕組みの解明)
<p>サトウキビは、熱帯あるいは亜熱帯に位置している多くの農業立地国の基幹作物であり、外貨獲得や国内消費の換金作物として重要である。一般に、サトウキビの栽培には10a当たり30～40kgの窒素を投入しているが、サトウキビによる施用窒素の利用率は20数%に過ぎず、残りの多くは硝酸態窒素として農地水系の水質汚染源になると懸念され、施肥窒素量の削減技術や利用率向上技術の開発がサトウキビ栽培における最重要課題とされている。一方で、ブラジル国のある地方では、「サトウキビ栽培に窒素は不要」が常識とされ、そのサトウキビ収量が、窒素を潤沢に与えている地方の収量とほぼ同じであることから、その秘密を探る研究がスタートした。その結果、無窒素栽培を継続している地方のサトウキビには、マメ科のような根粒組織を介さなくても成立する新規の窒素固定システムが示唆され、その新共生システムの研究が精力的に展開されるに至っている。本論文は、サトウキビ栽培に、新規に見いだされた窒素固定システムを定着させるための技術開発に不可欠となる基礎的知見、窒素固定エンドファイト細菌の接種法と宿主植物での定着化、に焦点を絞った研究である。</p> <p>申請者は、特定の地域にのみ定着していると考えられているサトウキビの窒素固定系を、一般のサトウキビ栽培体系に組み込むためには早急に解決すべき課題として、上述の二つ、</p>	

窒素固定活性の高い有用菌を定着させるための接種法と、それぞれの国や地方で異なっているサトウキビ品種と窒素固定エンドファイトとの親和性を明らかにする目的で、緑色蛍光タンパク質をコードした *gfp* 遺伝子を挿入して追跡を容易にしたイネ由来の *Herbaspirillum* sp. B501*gfp1* 菌株を利用して接種菌の感染と宿主内での増殖を詳しく調査していた。

イネ由来の内生窒素固定細菌 *Herbaspirillum* sp. B501*gfp1* は、ホストの異なるサトウキビにも容易に感染した。サトウキビに感染した *Herbaspirillum* のサトウキビ組織内における増殖頻度は、接種時の菌密度とサトウキビの品種のどちらにも影響されたこと。すなわち、接種時の菌密度が高い ( $10^8 \text{ ml}^{-1}$ ) 場合には、接種菌密度の低い ( $10^2 \text{ ml}^{-1}$ ) 場合よりも遙かに多くの接種菌由来の増殖部位が根や茎の内部に認められたこと。さらに、接種菌の葉への移行も接種時の菌密度に影響されることなど多くの知見を明らかにしている。また、供した二品種、NiF8とNi15の間では、生育の旺盛な品種「Ni15」において、接種菌の感染と、組織内における増殖が旺盛であったことを見いだしている。接種試験に供するサトウキビが既に幾種類もの内生菌を生息させている場合でも、接種した *Herbaspirillum* は感染し組織内で増殖することなども確認されるとともに、*Herbaspirillum* のサトウキビへの感染と組織内での増殖には、接種時の菌密度の他に感染後の増殖部位の栄養状態などにも強く影響されることを明らかにしている。以上のように、本研究は農地水系の水質汚染源の一つとして窒素投入量の逓減が課題となっているサトウキビ栽培のみならず、窒素投入量が多く環境汚染源として危惧される畑作物の栽培に、新規の窒素固定系を導入するためには不可欠となる基礎的知識の集積に大きく貢献しており、学位論文として十分価値あるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Joyce Prisca Njoloma
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 赤尾 勝一郎
	副査 宮崎 大学 教授 明石 良
	副査 鹿児島 大学 教授 稲永 醇二
	副査 宮崎 大学 教授 藪谷 勤
	副査 佐賀 大学 教授 井上 興一
審査協力者	
実施年月日	平成 18年 7月 20日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="checkbox"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成18年7月20日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分な学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Joyce Prisca Njoloma
-------------	----------------------

[質問1]: 接種時の菌密度を高低の二水準としているが、その際の菌密度として  $10^2$  cells ml<sup>-1</sup> と  $10^8$  cells ml<sup>-1</sup> にした根拠は何ですか。

[回答1]: 窒素固定細菌の接種試験はマメ科植物を対象とした根粒菌で検討されてきています。また、接種資材も市販されています。その際の実用的な菌密度は  $10^6$  のオーダーです。菌密度が  $10^8$  になると接種菌の感染率の向上が認められていますが経済的には  $10^6$  が妥協点だとされています。また、根粒菌の接種菌密度が  $10^3$  -  $10^6$  の範囲では感染率に有意な差は無いとされています。そこで、 $10^2$  と  $10^8$  で比較しています。

[質問2]: 接種した菌は緑色蛍光で標識されているので、とても識別し易かったです。ところで接種菌の増殖部位は主として根の表面と考えて良いのですか。

[回答2]: 菌の接種部位が“根”ですから、接種後一ヶ月程度は根に生息する接種菌が茎葉より多くなっていますが、経時的に茎葉での密度も増していきます。最終的な菌の増殖部位は茎が主体になると考えています。

[質問3]: 試験に供したサトウキビ品種 NiF8 における接種菌密度は Ni15 における密度に比べて常に低い傾向にあります。その理由は何ですか。

[回答3]: 一般的には茎中の糖濃度の違いによると考えられていますが、前任者の研究成果によると Ni15 の旺盛な乾物生産能との関連が強く示唆されています。

[質問4]: 本試験では、固定窒素活性を菌密度で推定しようとしていますが、固定窒素を量的に把握する必要があるではありませんか。

[回答4]: はい、私も同じ考えにたっています。重窒素で標識した窒素ガスを固定させることにより数日間に固定された窒素の総量を測定する計画を立てています。

[質問5]: 接種菌とサトウキビの品種との間に存在するであろう宿主特異性はどの程度だと考えていますか。マメ科植物と根粒菌の間にはかなりシビアな宿主特異性が存在していますが、

[回答5]: マメ科のように厳格な関係ではないと考えています。今回の試験では、イネから単離した窒素固定細菌がサトウキビに感染していますし、同じ研究室の田中さんの修論研究では、サツマイモから単離した窒素固定細菌 *Enterobacter* sp. がブロッコリー *Brassica oleracea* に感染することを確認していますから。

[質問6]: サトウキビの茎には蔗糖が蓄えられていますが、その蔗糖濃度と内生窒素固定菌の密度には何らかの関係が認められているのでしょうか。

[回答6]: そのことに関しては、すでにAsisらの報告があり、糖濃度の高いサトウキビには高密度の窒素固定細菌が生息していたとされています。