

南九州におけるイネ科植物内生性窒素固定細菌の収集と評価

国際農林水産業研究センター 畜産草地部
安藤康雄

Collection of Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria from Gramineous Plants in South Kyusyu, Japan

Yasuo ANDO

Animal Production and Grassland Division,
Japan Research Center for Agricultural Sciences
Ohwashi 1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan

1. 目的

健全なイネ科植物体内にも種々の微生物が宿主に病徴を示すことなく共生的に感染し、中には宿主の生育を手助けしているものがある。これらの微生物を制御し利用することができれば、イネ科作物の生産性を上げることができると考えられる。

これまでに多数のイネ科植物において植物内生性（エンドファイティックな）窒素固定細菌の感染を確認している。この中で北九州地域で各種イネ科植物を採集し窒素固定細菌の感染状況および分離同定を行ってきたが、南九州においては未検討であった。そこで、この地域でイネ科植物を採集して、窒素固定細菌を分離・同定、および窒素固定能の評価を行った。

2. 探索概要

2002年9月1日から5日の5日間にわたって、宮崎県および鹿児島県においてイネ科植物の採集を行った（表1、図1）。収集した植物体は、冷蔵した状態で持ち帰り分離源とした。

3. 収集成果

1) 細菌の分離

採集した各種イネ科植物の地際茎と根を70%エタノールと次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて表面殺菌後に植物組織を細かく裁断し、そのまま改変 Rennie 半流動培地¹⁾に接種した（直接浸せき法）。各植物の茎では10本、根では5本の培地を使用した。28℃で4~5日間培養後に容器内空

気容積の10%相当をアセチレンと交換し、さらに一定時間培養を続け、ガスクロマトグラフィーでエチレン濃度を測定してアセチレン還元能を調べた²⁾。アセチレン注入後7日後まで活性を調べた。陽性を示したチューブより改変 Rennie 平板培地を用いて窒素固定細菌を分離した。

26種類の試料のうち、茎では12種類で、根では21種類でアセチレン還元活性があった(表2)。それらの陽性チューブから窒素固定能(アセチレン還元能)をもつ細菌を茎から54株、根から175株、合計229株を分離した(表2)。

表1 探索・収集日程表

年月日		行程	行動内容
2002年9月	1日	つくば市→羽田→国分市	移動(陸路, 空路)
	2日	国分市→都城市→大隅町→鹿屋市→桜島町	探索収集
	3日	桜島町→輝北町→国分市→始良町→蒲生町→伊集院町→串木野市	探索収集
	4日	東市来町→日吉町→吹上町→鹿児島市→樋脇町→川内市	探索収集
	5日	川内市→国分市→羽田→つくば	移動(陸路, 空路)

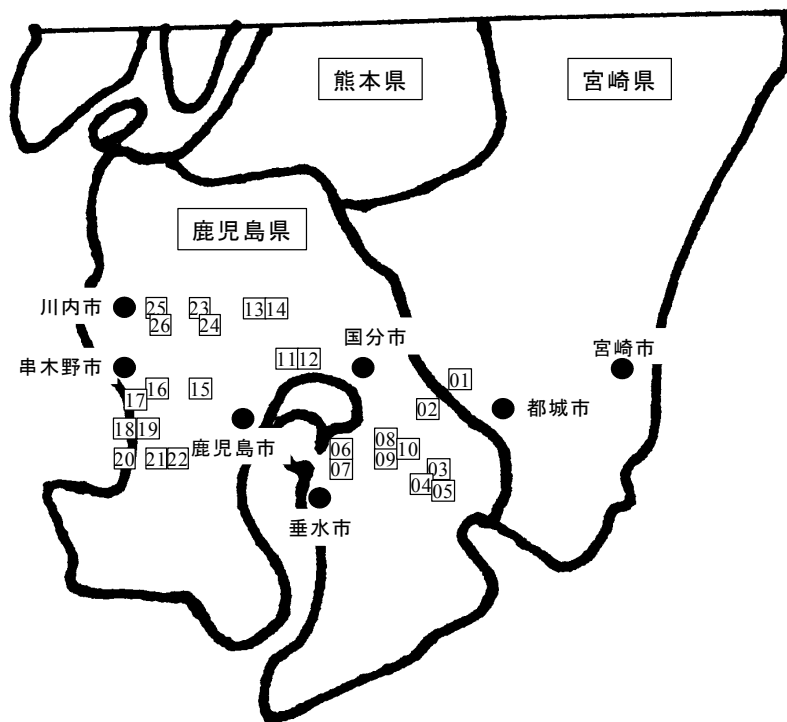


図1 探索収集地点

2) 分離細菌の系統解析

分離株のうち16菌株について16S rDNAの部分塩基配列を決定し、この配列をもとにBLAST検索を行った。その結果、3株が *Azospirillum* 属, 1株が *Azorhizobium* 属, 3株が *Herbaspirillum* 属, 6株が *Klebsiella* 属, 3株が *Pantoea* 属に属していると考えられた(表3)。

表2 収集植物とそれらのアセチレン還元活性 (ARA) の陽性率と分離菌株数

植物名	採集地	採集月日 (2002年)	チューブでの ARA陽性率 (%)		分離菌株数	
			茎	根	茎	根
アキノエノコログサ(01)	宮崎県都城市関之町大倉田	9月2日	40	100	11	15
アキノエノコログサ(22)	鹿児島県吹上町藤元	9月4日	0	40	0	7
アキノエノコログサ(25)	鹿児島県川内市吉野山	9月4日	0	60	0	3
キンエノコロ(05)	鹿児島県大隅町土成	9月2日	20	60	6	2
キンエノコロ(13)	鹿児島県蒲生町広水	9月3日	0	80	0	1
オヒシバ(03)	鹿児島県大隅町土成	9月2日	10	100	4	5
オヒシバ(20)	鹿児島県吹上町吹上浜	9月4日	0	40	0	0
オヒシバ(26)	鹿児島県川内市天辰町	9月4日	0	80	0	9
ススキ(04)	鹿児島県大隅町土成	9月2日	0	20	0	2
ススキ(07)	鹿児島県垂水市上ノ原	9月3日	20	80	4	13
ススキ(10)	鹿児島県輝北町仏山	9月3日	0	40	0	0
ススキ(12)	鹿児島県始良町木場	9月3日	10	0	2	0
ススキ(23)	鹿児島県樋脇町市比野	9月4日	0	0	0	0
セイバンモロコシ(16)	鹿児島県東市来町坂之上下	9月4日	10	80	4	9
タチスズメノヒエ(02)	鹿児島県財部町宇部	9月2日	10	100	2	15
タチスズメノヒエ(06)	鹿児島県垂水市上ノ原	9月3日	10	100	3	15
タチスズメノヒエ(14)	鹿児島県蒲生町広水	9月3日	10	100	0	16
タチスズメノヒエ(18)	鹿児島県日吉町天神ヶ尾海水浴場	9月4日	20	80	9	25
トダシバ(08)	鹿児島県輝北町仏山	9月3日	0	0	0	0
ネズミノオ(21)	鹿児島県吹上町藤元	9月4日	0	80	0	19
ハイキビ(15)	鹿児島県伊集院町下神殿	9月3日	0	0	0	0
ハイキビ(19)	鹿児島県日吉町天神ヶ尾海水浴場	9月4日	0	0	0	0
メヒシバ(11)	鹿児島県始良町木場	9月3日	20	60	5	10
メヒシバ(17)	鹿児島県東市来町江口	9月4日	0	60	0	6
メヒシバ(24)	鹿児島県樋脇町市比野	9月4日	10	20	4	0
メリケンカルカヤ(09)	鹿児島県輝北町仏山	9月3日	0	40	0	3

表3. 分離菌株の16S rDNAの部分塩基配列に基づく系統解析の結果

分離菌株番号	学名	相同性 (%)	分離源	
			植物名	部位
2002R0501	<i>Azospirillum</i> sp.	98.6	タチスズメノヒエ	根
2007R0401	<i>Azospirillum</i> sp.	99.1	ススキ	根
2022R0501	<i>Azospirillum</i> sp.	99.8	アキノエノコログサ	根
2005S0901	<i>Azorhizobium</i> sp.	97.4	キンエノコロ	茎
2011S0901	<i>Herbaspirillum</i> sp.	99.6	メヒシバ	茎
2011R0501	<i>Herbaspirillum</i> sp.	99.4	メヒシバ	根
2024S0902	<i>Herbaspirillum</i> sp.	99.2	メヒシバ	茎
2001S0101	<i>Klebsiella</i> sp.	100	アキノエノコログサ	茎
2001S0806	<i>Klebsiella</i> sp.	100	アキノエノコログサ	茎
2001R0201	<i>Klebsiella</i> sp.	100	アキノエノコログサ	根
2002S0701	<i>Klebsiella</i> sp.	100	タチスズメノヒエ	茎
2016R0401	<i>Klebsiella</i> sp.	100	セイバンモロコシ	根
2016R0511	<i>Klebsiella</i> sp.	100	セイバンモロコシ	根
2006R0306	<i>Pantoea</i> sp.	97.7	タチスズメノヒエ	根
2026R0201	<i>Pantoea</i> sp.	98.4	オヒシバ	根
2026R0501	<i>Pantoea</i> sp.	98.6	オヒシバ	根

4. 所感

本探索では、南九州地域において各種イネ科植物に感染している窒素固定細菌の分離を行った。サンプル数が必ずしも十分ではないが、植物種によってアセチレン還元能に差異が見られ、各植物種が本来的にもつ窒素固定細菌との親和性の程度を示すものかどうか興味あるところであり、今後の接種試験が必要とされる。また、分離細菌の同定がかなり残されているので、今後さらに検討を進める。

5. 参考文献

- 1) Elbeltagy, A., Sato, T., Nishioka, K., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. and Minamisawa, K. (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5285-5293.
- 2) 浅沼修一 (1992). 新編土壌微生物実験法 (土壌微生物研究会編) . pp. 224-230. 養賢堂, 東京.

Summary

Twenty-six gramineous plants were collected in South Kyushu, Miyazaki and Kagoshima prefectures in September 1-5, 2002. Stems and roots of these samples after sterilization were separately inoculated to a modified Rennie medium, and these cultures were examined by acetylene reduction assay (ARA). From ARA-positive tubes, 229 bacteria were isolated. Sixteen strains were subjected to 16S ribosomal DNA (rDNA) sequencing for homology analysis. Three, one, three, six and three strains showed high homology to the genus *Azospirillum*, the genus *Azorhizobium*, the genus *Herbaspirillum*, the genus *Klebsiella* and the genus *Pantoea*, respectively.