

研究論文

圃場における窒素固定エンドファイト接種サトウキビの固定窒素量の推定

中村和美・谷田将人・園田誠一郎・鶴戸西夏奈・佐伯雄一・赤尾勝一郎・山本昭洋

宮崎大学農学部生物機能科学講座

(2008年11月28日 受理)

The estimation of the amount of nitrogen fixation in the sugarcane inoculated diazotrophic endophyte in field

Kazumi NAKAMURA, Masato TANIDA, Seiichiro SONODA, Kana UDONISHI,
Yuichi SAEKI, Shoichiro AKAO, Akihiro YAMAMOTO

Division of Biotechnology and Biochemistry, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

Summary : While the nitrogenous fertilizer produced industrially brought the significant increase of crop harvests, it also caused problems by excess fertilizer application, such as groundwater pollution. We investigated the inoculation effect of the nitrogen-fixing endophytic bacteria (diazotrophic endophytes) on non-leguminosae plants sugarcane in field condition, using diazotrophic endophytes as one means for realizing fertilization nitrogen reduction. Two diazotrophic endophytes, *Enterobacter* sp. No. 35 and *Herbaspirillum* sp. B501, were inoculated into two sugarcane cultivars (NiF8, Ni15), and change of the plant growth and the fixed nitrogen contribution by ^{15}N dilution method were measured. Although the plant growth was promoted for both inoculated sugarcanes immediately after inoculation, a difference was not observed at a crop season. It was suggested that the utilization rate of nitrogen fertilization would become high and a possibility that growth by an inoculated diazotrophic endophyte would be promoted in *Herbaspirillum* sp. B501 inoculated sugarcanes. But, in *Enterobacter* sp. No. 35 inoculated sugarcanes, the contributing rate of fixed nitrogen was not difference. When the infection and fixing in sugarcane were investigated using the GFP-labeled diazotrophic endophytes, being infected and fixed to the root one month after inoculation was observed. Moreover, high activity of nitrogen fixation was observed in sugarcane which inoculated diazotrophic endophytes.

Key words : Diazotrophic endophytes, Nitrogenous fertilizer reduction, Sugarcane,
 ^{15}N dilution technique

緒言

作物の生産性を支配する大きな要因は窒素であり、Harber-Bosch法によって工業的に生産された窒素肥料は、過去数十年間に農作物の飛躍的な増収をもたらした。しかし、一方で、窒素肥料の工業的生産によって排出される二酸化炭素や、過剰

施肥による地下水汚染が懸念されている。投入された肥料窒素の作物への利用率は、多くて70%、通常は50%に満たないのが現状であり、吸収されなかった窒素の地下水への浸透が社会問題となっている。飲料の主要な水源を地下水に依存している欧米では、早い時点で人の健康を脅かす硝酸態

窒素の地下水汚染の元凶として農耕地に窒素を投入する農業活動が指摘され、窒素肥料と地下水汚染との関連が詳細に調査されてきた。その結果、農耕地における窒素の投入と地下水の硝酸態窒素汚染との関連はもはや疑う余地のないことが明らかとなった。わが国、特に、沖縄を含むその周辺諸島など飲用水の地下水への依存が高い地域では硝酸態窒素による地下水の汚染の問題は深刻である。そこで、農耕地に投入した施肥窒素の地下水への流出を逡減させるために肥料の被覆や施肥法の再検討がなされているが、最も効果的な手段として生物的窒素固定機能の活用が見直されている(赤尾他 2002)。

一般によく知られている生物的窒素固定として、マメ科植物と根粒菌との間に成立している共生窒素固定系がある。この共生系は、根粒構造を介してのみ成立する系であると同時に、マメ科植物に特有の共生系である。多くの研究者が、この共生系のマメ科以外の植物への付与を試みてきたが、誰一人として成功するものは無く、非マメ科植物への共生系の付与は、夢物語にすぎないと考えられ始めていた。ところが、1988年、ブラジルにおける窒素固定研究のリーダーDöbereiner率いるグループが、サトウキビ体内からまったく新しい窒素固定微生物(以下、窒素固定エンドファイト)を発見した(Cavalcante & Döbereiner 1988)。この植物体内に棲息する窒素固定エンドファイトは、窒素寄与率(植物体が吸収した総窒素量の内、窒素固定エンドファイトにより固定された窒素量)が0~72%の範囲にあり、一部には、根粒菌の窒素寄与率50~80%に勝るとも劣らない寄与率を示すものの存在が判明した。また、窒素固定エンドファイトは、その後、サツマイモやイネ等様々な植物から発見され、根粒菌とは異なり、宿主特異性が緩やかであると考えられている(Chelius & Triplett 2001; Elbeltagy *et al.* 2001)。

当研究室では、窒素固定エンドファイトの活用により、非マメ科植物に窒素固定能を付与し、農地への窒素肥料の投入量を削減するための研究を重ねてきた。これまでの研究により、サトウキビとサツマイモから窒素固定活性を示す*Enterobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp.などを単離し、それらの一部にはGFP(緑色蛍光蛋白質)遺伝子の導入に成功している(Tanaka *et al.* 2006)。

また、野生イネから単離された*Herbaspirillum* sp. B501が、サトウキビに感染することを確認するとともに、同じ研究グループのAsis *et al.* (2002)は、6ヶ月間のサトウキビ栽培実験で、サトウキビの全窒素の約2~3割がエンドファイト窒素固定系による固定窒素でまかなわれていることも明らかとした。しかし、サトウキビを収穫期まで栽培した時の窒素寄与率のデータに関する報告例が少なく、特に国内での報告例は見当たらない。そこで、本研究では、窒素固定エンドファイトを接種した圃場植えサトウキビが収穫期までの間に吸収した窒素のうち、エンドファイトによるサトウキビへの固定窒素の寄与率を明らかにし、窒素肥料削減の可能性を探ることを目的として実施した。

材料および方法

I. 供試植物

試験に供したサトウキビ (*Saccharum* spp. hybrid) は、NiF8とNi15の2品種であり、いずれも沖縄県農業試験場宮古支場作物研究室から分与され、宮崎大学応用生物科学科の圃場で育成しているものである。試験に用いたサトウキビ幼苗は、バーミキュライトを入れた苗床に種茎を伏せ込み(図1A)、成長した新芽(萌芽茎)がおおよそ30~50cmとなった時点(種茎を伏せ込み後、約2ヶ月)で掘り起こした種茎から切り出した。なお、切り出した幼苗の根に近い、縦、横、約1.5cm程度の種茎を残した(図1B)。幼苗の育成に用いたレオナルド・ジャーは、図1Cに示した通りであり、内容積900mlのポリ容器2個を繋ぎ、下段の水耕培地は中央に取り付けた木綿紐を介して上段のバーミキュライトに供給する仕組みとなっている。移植後2ヶ月間は0.5mMの窒素(KNO₃で供給)を含む水耕培地(赤尾, 河内 1989)で栽培、その後1ヶ月間を無窒素水耕培地に切り換えて栽培した後に、生育の揃っているサトウキビを圃場試験においては各品種18本ずつ、室内試験においては各品種12本ずつ選抜し、窒素固定エンドファイトを接種した。なお、サトウキビの幼苗伏せ込みは2006年5月2日、圃場試験終了によるサトウキビの採取は2008年2月5日であり、本試験の実施期間は1年9ヶ月に及んだ。



図1. サトウキビ萌芽茎栽培の様子。
 A: サトウキビ種茎より発芽した萌芽茎（伏せ込み後21日目）。
 B: 切り出したサトウキビ幼苗（伏せ込み後60日目）。
 C: レオナルド・ジャー移植直後のサトウキビ（伏せ込み後60日目）。

II. 供試菌株および窒素固定エンドファイトの接種

試験に供した窒素固定エンドファイトは、*Herbaspirillum* sp. B501（以下、*Herba.*）と *Enterobacter* sp. No. 35（以下、*Entero.*）の2種であり、*Herba.*とそのGFP標識菌株（*Herba.-gfp*）は東北大学大学院生命科学研究科の南澤教授から分与されたものであり、*Entero.*とそのGFP標識菌株（*Entero.-gfp*）は当研究室においてサトウキビ（品種：Ni15）から単離した株である（Tanaka *et al.* 2006）。接種菌株の培養にはLB液体培地を用い、28℃で培養した。*Herba.*および*Herba.-gfp*は培養開始4日後、*Entero.*および*Entero.-gfp*は2日後に、血球計算盤で菌数をカウントして 10^7 cells/mlの菌懸濁液を作成し、レオナルド・ジャー下段の水耕培地と入れ替えて1ヶ月半接種栽培を行った。接種期間終了後は、菌懸濁液を無窒素水耕培地と入れ替え、再び水耕栽培とした。なお、圃場試験には*Herba.*および*Entero.*、室内実験には、*Herba.-gfp*および*Entero.-gfp*を用いた。

III. 圃場試験

1. 生育調査

サトウキビの生育調査は、種茎を伏せ込み、上述した方法で育苗した萌芽茎に内生窒素固定エンドファイトである*Herba.*と*Entero.*を接種した後、2週間毎に実施した。調査項目は草丈、茎の直径、葉数とした。収穫後の試料は、地上部は茎と葉に分けて新鮮重と乾物重を測定し、地下部については行わなかった。

2. ^{15}N 同位体希釈法による固定窒素量の測定

^{15}N 同位体希釈法による固定窒素量の測定に供するサトウキビの栽培法は、窒素固定エンドファイトの接種から13週間後（WAI: weeks after inoculation）のサトウキビ36本（各試験区6本ずつ）をレオナルド・ジャーからワグネルポットに鉢上げし、27 WAIに圃場へ移植した。圃場は前年度未耕作の黒ボク土圃場（3.35 m×10 m）を使用した。31 WAIに元肥として試験区および隣接するボーダー区に重窒素10atom %の K^{15}NO_3 を290 g/26.8 m²、その他のボーダー区には K^{14}NO_3 を181.25 g/6.7 m²施用した。リン酸と加里は、試験区とボーダー区併せて17 % 過リン酸石灰を1.971 kg/33.5 m²、50 % K_2SO_4 を670 g/33.5 m²施用した。41 WAIに追肥として重

窒素10 atom%の $K^{15}NO_3$ を290 g/26.8 m², $K^{14}NO_3$ を181.25 g/6.7 m², それぞれ元肥と同様に施用し, 全施肥量を $N:P_2O_5:K_2O = 3:10:10$ g/m²とした. 試験終了時に採取した茎と葉は, それぞれの生重を測定した後, ¹⁵Nの測定に供する茎は, その一部, 即ち, 節毎に茎の1/8を採取し, 熱風乾燥させた後, 小型強力粉砕機 (フォースミル FM-1, 大阪ケミカル株式会社) を用いて粉砕した. 葉は, 生葉のみを同様に熱風乾燥させ, 粉砕した. 茎・葉それぞれ粉砕試料の全窒素および重窒素分析を昭光通商株式会社に依頼した.

IV. 室内試験

1. 接種菌の定着確認

GFP標識菌株 (*Herba.-gfp*, *Entero.-gfp*) 接種開始から約1ヶ月後のサトウキビの根, 茎および葉の一部を採取し, 根はそのままプレパラートにした. 茎と葉はそれぞれカミソリ刃で薄くスライスし, 作成した組織片をプレパラートにして蛍光顕微鏡 (ECLIPSE E600, 株式会社ニコン) で検鏡し, 接種菌の感染部位を観察した.

2. 接種菌および土着菌の菌密度

蛍光顕微鏡観察用に一部切り取った残りのサトウキビから, 根, 茎および葉の各部を0.2 gずつ採取し, クリーンベンチ内で表面を滅菌蒸留水で洗浄した後, それぞれ別の乳鉢に移し, 滅菌水各2 mlを加えて擦り潰した. 擦り潰して得られた懸濁液を 10^{-1} 液とし, 段階希釈によって 10^{-8} までの希釈液を作成した. 一連の希釈液をLB寒天平面培地 (シクロヘキシミド50 mg/l含む) に100 μ lずつ塗布, 27 °Cで培養した. 出現したコロニーを蛍光顕微鏡 (SMZ 1500, 株式会社ニコン) で検鏡し, 緑色蛍光を発するコロニーは接種したGFP標識菌株に由来するもので, 蛍光を発しないコロニーは土着のエンドファイト (親株から発生した萌芽茎にすでに内在していた細菌) としてカウントした.

3. 接種植物のアセチレン還元活性 (ARA)

蛍光顕微鏡観察および菌密度測定用に一部切り取った残りの植物体を, 密閉容器 (400 ml容量) に封入し, ヘッドスペースの10%をアセチレンガスで置換した後, 24時間暗所培養を行った. 各

容器のヘッドスペースから0.5 mlずつ採取し, ガスクロマトグラフ (GC-8A, 株式会社島津製作所) を用いてエチレン生成量を求めた.

V. 統計処理

実験結果の差の検定には, Bonferroniの方法 (エクセル統計2006, 株式会社社会情報サービス) を用いた.

結果および考察

I. 圃場試験

1. サトウキビ生育量の経時的変化

サトウキビの生育調査は, 菌を接種した後2週間毎に, 茎の直径 (以下, 茎径), 草丈, 葉数を測定することにより実施した.

図2, 3, 4は, この順に草丈, 茎径, 葉数の生育に伴う推移を60週にわたり調査した結果である. これらの調査は, 菌接種後であり, 26週までは温室内でのポット栽培期間に, 27週目以降は圃場にて定植して栽培した期間に実施されたものである.

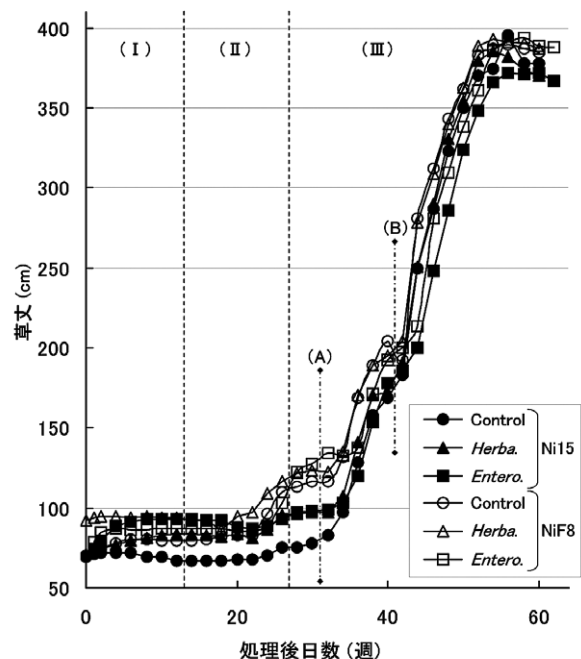


図2. 窒素固定細菌接種後サトウキビの草丈の経時的変化.

- (I): 接種後0~13週間はガラス温室にてレオナルド・ジャーによる水耕栽培
 (II): 接種後13~27週間はガラス温室にて1/5000aワグネルポット栽培
 (III): 接種後27週以降は圃場栽培
 (A): 接種後31週に元肥, (B): 接種後41週に追肥を施用した.

Ni15では*Herba.*と*Entero.*のどちらの接種区の場合にも、10~32 WAIの草丈および8~32 WAIの茎径は無接種区に比べ高い値を示した(図2, 3)。一方、NiF8では*Herba.*接種区の28~40 WAIの茎径が*Entero.*接種区やControl区に比べて高く推移したが、40 WAI以降はControl区とほぼ同じであった(図3)。また、*Entero.*接種区の葉数は20~34 WAIと50 WAI以降、茎径も40 WAI以降はControl区よりも高く推移した(図3, 4)。

図5には、試験終了時における植物1個体あたりの茎と葉の乾物重を示した。植物1個体あたりの茎と葉を併せた地上部重は0.393 kgから0.474 kgの範囲であり、両品種ともにControl区の地上部重が最も多かった。従って、NiF8, Ni15ともに供試した窒素固定エンドファイト接種による地上部重の増加は認められなかったことになる。

サトウキビへの窒素固定エンドファイトの接種は、初期の生育を促進する傾向は見られたが、試験終了時まで接種効果を持続させるのは難しいことが判明した。

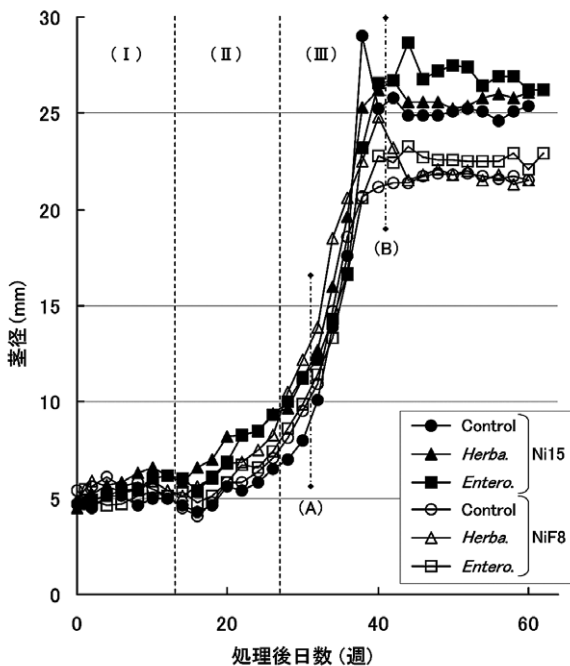


図3. 窒素固定細菌接種後サトウキビの茎径の経時的変化。(I)~(III)および(A), (B)は図2に準ずる。

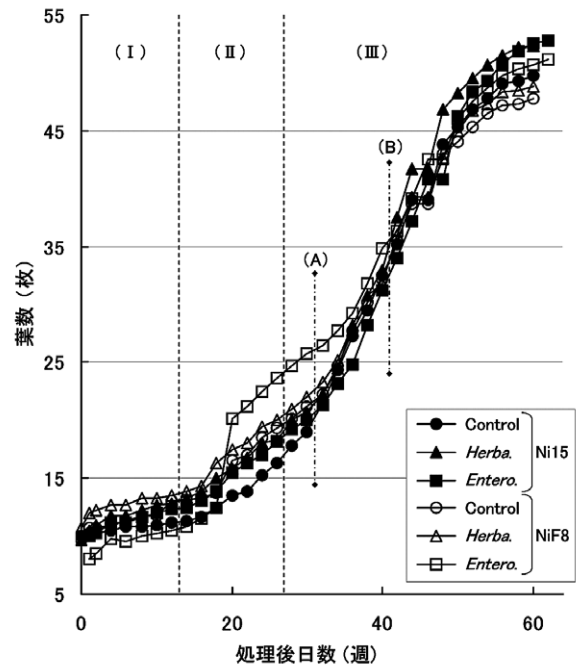


図4. 窒素固定細菌接種後サトウキビの葉数の経時的変化。(I)~(III)および(A), (B)は図2に準ずる。

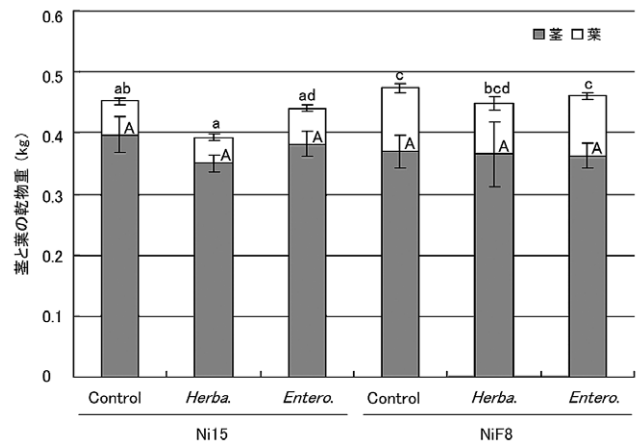


図5. 圃場試験終了時のサトウキビの茎と葉の乾物重。エラーバーは標準誤差 (n=6) を示す。異なる符号間に有意差が認められた (p < 0.05)。

2. 固定窒素量の推定

本研究に供したサトウキビは茎挿しによる萌芽茎を利用したものであり、茎挿し17ヶ月後(68 WAI)に収穫し、地上部を茎と葉に分けて解体した。茎と葉の窒素含有率(%)と重窒素(¹⁵N)含有率(atom%)の品種および窒素固定エンドファイト接種による違いは図6, 7に示した。茎の窒素含有率は、Ni15とNiF8のどちらも窒素固定エンドファイトの接種により増加する傾向が認められた。具体的には図6に示したとおり、Control区のNi15の窒素含有率0.244%であるの

に対し、*Herba.*接種区0.262%，*Entero.*接種区0.262%であり、NiF8のControl区0.212%に対し、*Herba.*接種区0.230%，*Entero.*接種区0.217%であった。一方、葉の窒素含有率は茎のそれと異なり、Ni15の*Entero.*接種区を除き、窒素固定エンドファイトの接種により、葉中の窒素含有率は低下した。このことは窒素固定エンドファイトを接種すると、接種された内生菌の定着場所が葉よりも茎で多いことを反映しているのではないかと推測している。Njoloma *et al.* (2006) は、サトウキビの根部に窒素固定エンドファイト *Herbaspirillum sp. B501gfp1* を接種したところ、接種菌は根の表皮細胞表面や細胞間隙、木部組織、柔組織、茎の細胞間隙や木部組織、柔組織には接種した菌によるコロニー形成を認めたが、葉への移行は認められなかったとしている。ほぼ同様な結果がイネへの接種試験 (Zakria *et al.* 2007) においても観察されていることから上述の推測は十分に予想されることである。

図7は葉および茎の重窒素含有率 (atom%) を

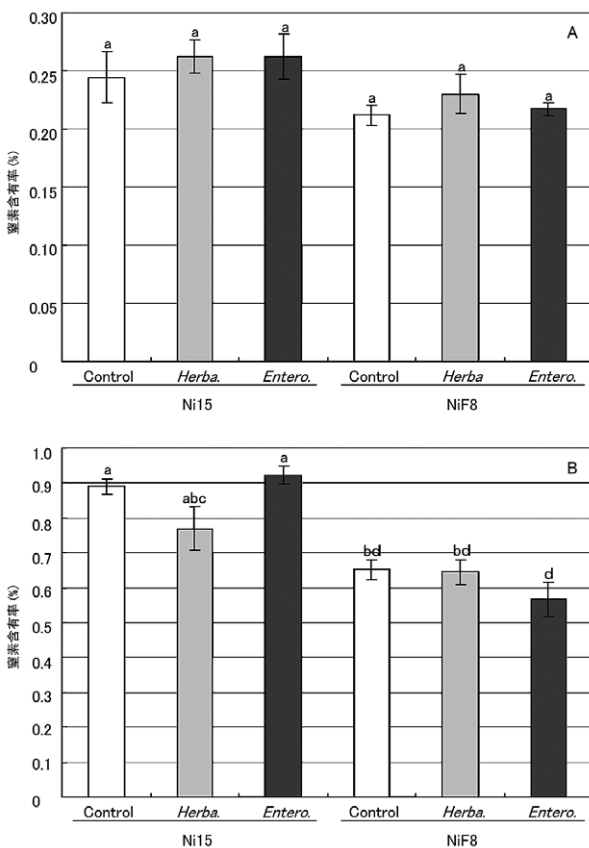


図6. サトウキビ茎 (A) および葉 (B) の窒素含有率。エラーバーは標準誤差 (n=6) を示す。異なる符号間に有意差が認められた (p < 0.05)。

示している。肥料として投入した窒素を重窒素で標識したので、窒素固定エンドファイトの接種区における重窒素含有率が、Control区のそれよりも高ければ土壌窒素 (土壌に投入した重窒素で標識した肥料窒素+サトウキビ作付け前に土壌中に存在した窒素) の吸収が旺盛であったことを、逆に低い値であれば、接種した内生窒素固定エンドファイトによる固定窒素によって、吸収された土壌窒素が希釈されたことを示すことになる。従って、窒素固定エンドファイトを接種したことにより、重窒素含有率の値がControl区のそれよりも低い値を示した場合は、その接種区における窒素固定量が増加したことを示しており、*Entero.*を接種した区のNiF8では、茎、葉、共に、接種した*Entero.*により窒素固定量の増加したことを示している。一方、*Herba.*を接種した区では、Ni15とNiF8のいずれの場合も重窒素含有率 (atom%) がControl区のそれらよりも高い値を示しているので、窒素固定エンドファイト *Herba.* の接種による窒素固定量の増加は無かったと推定される。

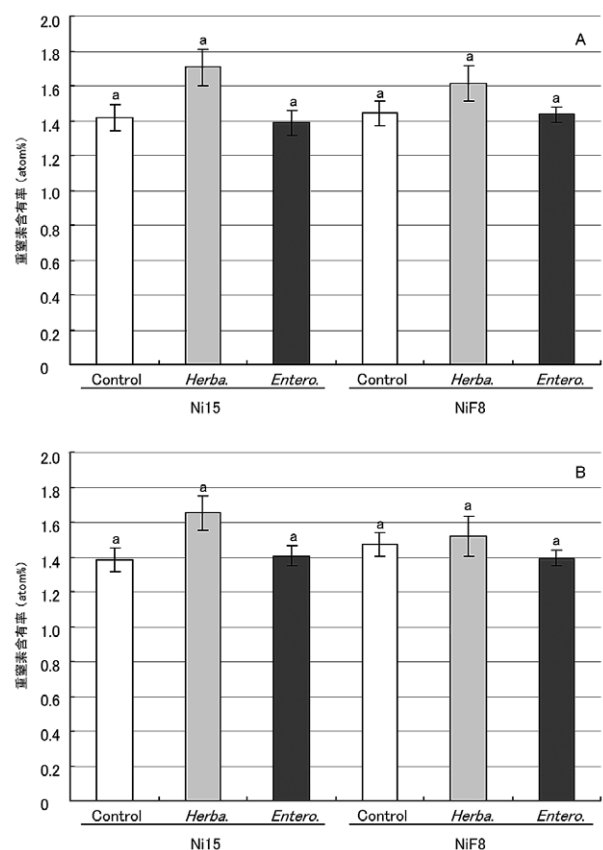


図7. サトウキビ茎 (A) および葉 (B) の重窒素含有率。エラーバーは標準誤差 (n=6) を示す。異なる符号間に有意差が認められた (p < 0.05)。

II. 室内試験

1. 接種菌の感染と定着

根部に接種した窒素固定エンドファイトが、接種したサトウキビに感染し、コロニーを形成する場所（部位）や頻度を調査する目的で、サトウキビ幼植物を供し、GFPで標識した窒素固定エンドファイト *Herba.-gfp* と *Entero.-gfp* を接種し、それらの挙動を蛍光顕微鏡を用いて追跡調査した。

その観察の結果、全ての接種区で根および茎への接種菌の移動とコロニー形成が確認された。根は細いのでそのままをスライドグラス上に並べて、茎は0.1 mm厚で横断または縦断切片を作成して観察したものであり、根では、表皮細胞の表面（図8A）や表皮細胞と表皮細胞の間隙（図9C）、根毛表面（図9A）、さらに木部導管と思われる部位（図8C）などでのコロニー形成（増殖）が

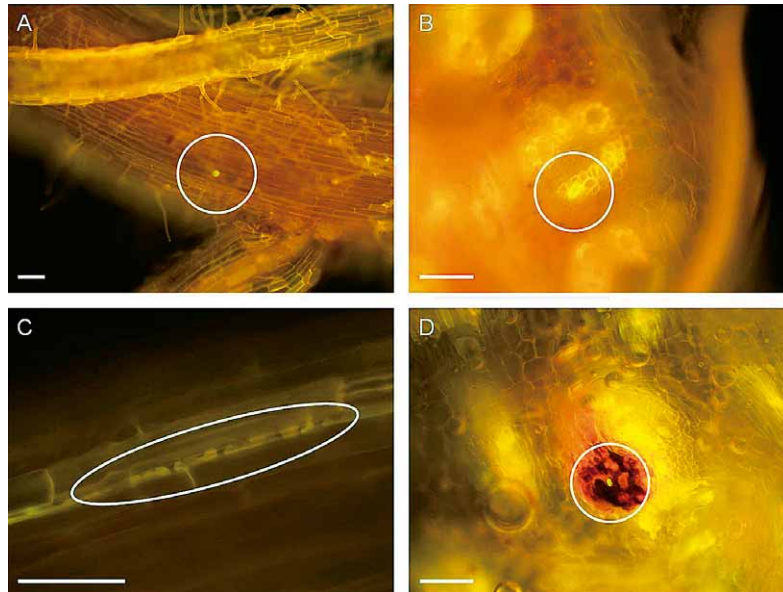


図8. *Herba.-gfp*接種Ni15 (A, B) とNiF8 (C, D) の根 (A, C) および茎 (B, D) の蛍光顕微鏡写真。

図中の円は接種菌の感染部位（緑色蛍光を発している部位）を示す。
図中のバーは100 μ mを示す。

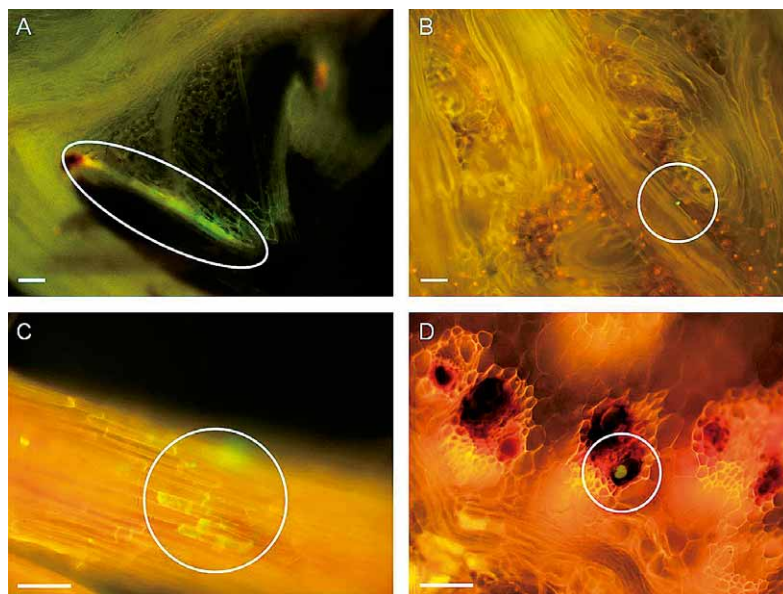


図9. *Entero.-gfp*接種Ni15 (A, B) とNiF8 (C, D) の根 (A, C) および茎 (B, D) の蛍光顕微鏡写真。

図中の円は接種菌の感染部位（緑色蛍光を発している部位）を示す。
図中のバーは100 μ mを示す。

表 1. 各試験区の接種菌および土着内生細菌の菌密度

			根	茎	葉
Control区	土着菌	Ni15	$(0.33\sim 8.00)\times 10^6$	$(1.00\sim 6.00)\times 10^5$	$(0.33\sim 6.50)\times 10$
		NiF8	$(0.33\sim 6.00)\times 10^5$	$(0.07\sim 1.70)\times 10^6$	$(0.09\sim 13.1)\times 10^5$
Herba.-gfp 接種区	GFP 標識菌	Ni15	0	$(0\sim 3.33)\times 10^3$	$(0\sim 3.33)\times 10^3$
		NiF8	0	0	0
	土着菌	Ni15	$(0.33\sim 11.7)\times 10^4$	$(0.47\sim 1.77)\times 10^6$	$(0.08\sim 357)\times 10^3$
		NiF8	$(0.77\sim 11.3)\times 10^5$	$(0.20\sim 14.7)\times 10^6$	$(0.06\sim 13.0)\times 10^2$
Entero.-gfp 接種区	GFP 標識菌	Ni15	$(0.17\sim 16.7)\times 10^5$	$(0.23\sim 9.67)\times 10^5$	$(0\sim 1.47)\times 10^3$
		NiF8	$(0.93\sim 3.67)\times 10^6$	$(0.90\sim 10.0)\times 10^6$	$(0\sim 4.67)\times 10^4$
	土着菌	Ni15	$(0.04\sim 45.7)\times 10^6$	$(0.33\sim 20.0)\times 10^6$	$(0.13\sim 19.7)\times 10^2$
		NiF8	$(0.12\sim 2.27)\times 10^8$	$(0.13\sim 14.0)\times 10^7$	$(0.05\sim 900)\times 10^2$

(cells/ml)

認められた。また、茎では導管内での増殖が多く認められた (図 8 B, 8 D, 9 D)。一方、葉におけるコロニー形成部位は全く認められなかった。しかし、希釈平板法による接種菌密度の測定では、根、茎の他に葉にも接種菌の存在が確認されたことから、接種菌の一部は葉にも移動して増殖はするが、クロロフィルなど蛍光を発する様々な化合物により GFP 蛍光の検出が困難であった可能性が示唆された (表 1)。

希釈平板法によって検出された土着のエンドファイトの菌密度は根と茎で高く、葉で低い傾向があったが、接種区と無接種区間に大きな差は認められなかった (表 1)。

2. 窒素固定エンドファイトの接種がサトウキビの窒素固定活性 (アセチレン還元活性) に及ぼす影響

サトウキビに接種した窒素固定エンドファイト、*Entero.*や*Herba.*が、サトウキビに感染し増殖していれば、サトウキビの窒素固定活性 (アセチレン還元活性で評価) は、無接種の Control 区よりも接種した区の活性の方が高いはずである。接種区は無接種区に比べアセチレン還元活性 (ARA) が高い傾向を示し、Ni15よりNiF8の方が高い値を示した (図10)。Herba.-gfp接種Ni15は無接種区の2.7倍、NiF8は4.2倍のARAを示し、Entero.-gfp接種Ni15は無接種区の1.3倍、NiF8は3.2倍のARAを示した。このことから、窒素固定エンドファイトの接種によりサトウキビのARAは接種開始から1ヶ月後までは向上しており、その効果はNiF8で特に顕著であることが分かった。

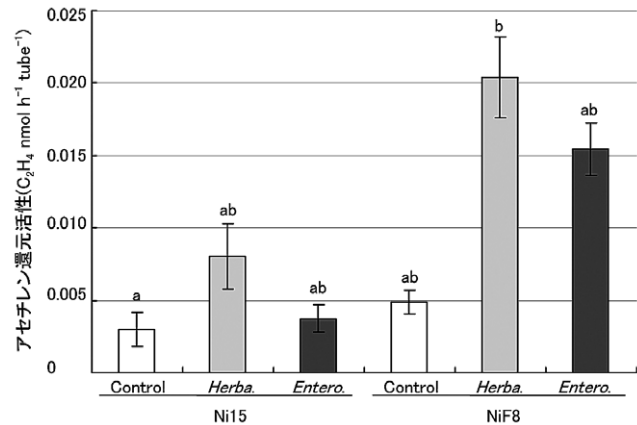


図10. サトウキビの窒素固定活性.

エラーバーは標準誤差 (n=4) を示す。
異なる符号間に有意差が認められた (p < 0.05)。

本研究では2種の窒素固定エンドファイトである*Enterobacter* sp. No. 35, *Herbaspirillum* sp. B501およびそのGFP標識菌株を用い、圃場試験等を行った。その結果、生育が早い特性を持つ*Enterobacter* sp. No. 35は、接種1ヶ月で根から葉まで定着し、土着のエンドファイトとあまり変わらない菌密度を示した。接種したサトウキビのARAも無接種区より高い傾向が見られた。しかし、試験終了時には無接種区と同等の重窒素含有率を示し、*Entero.*による固定窒素の寄与率は圃場レベルで差が出るほど高くはなかった。何らかの理由で窒素固定活性が低下したか、若しくは接種菌が流出または死滅した可能性も考えられる。一方、生育が遅い特性を持つ*Herbaspirillum* sp. B501は、シクロヘキシミドを含むLB寒天平面培地を用いた菌密度測定では検出できなかったものの、蛍光顕微鏡観察では定着が確認でき、ARA

は最も高かった。しかし、試験終了時には無接種区よりも施肥窒素の利用率が高くなっていた。今回は試験終了時の地下部の重量は測定していないが、もしかしたら*Herba*.の接種によって草勢が強まり、窒素吸収力が向上して、結果的に施肥窒素の利用率が向上したのかもしれない。今後は、エンドファイト接種方法を含め実用化に向けた更なる検討を重ねていくことが重要であると考えている。

要約

工業的に生産された窒素肥料は農作物の飛躍的な増収をもたらしたが、一方で、過剰施肥による地下水汚染が問題となっている。そこで、農耕地へ投入した施肥窒素による地下水汚染を削減させる効果的な手段として、非マメ科植物に内生し、窒素固定活性を持つ細菌（窒素固定エンドファイト）の活用が注目を集めている。本研究は、窒素固定エンドファイトを接種した圃場植サトウキビの固定窒素の寄与率を明らかにし、窒素肥料削減の可能性を探ることを目的として行った。供試したサトウキビ2品種（NiF8, Ni15）に、窒素固定エンドファイト*Enterobacter* sp. No. 35と*Herbaspirillum* sp. B501を各々接種し、生育量の経時的変化を追うと共に、収穫後¹⁵N同位体希釈法による固定窒素の寄与率を測定した。両接種区とも接種直後は生育量が促進されたが、収穫期には差が見られなかった。*Enterobacter* sp. No. 35接種区では、無接種区と同等の重窒素含有率を示し、接種菌による固定窒素の寄与率は圃場レベルで差が出るほど高くはなかった。一方、*Herbaspirillum* sp. B501接種区では、施肥窒素の利用率が高くなっており、接種菌によって草勢が強まる可能性が示唆された。またGFP標識した窒素固定エンドファイトの接種試験を行い、接種直後のサトウキビにおける感染、定着ならびに窒素固定活性を調査した。その結果、接種1ヶ月で根などに感染、定着していることが観察され、窒素固定活性も接種サトウキビにおいて無接種区より高い傾向が得られた。

キーワード：サトウキビ、施肥窒素削減、窒素固定エンドファイト、¹⁵N同位体希釈法

謝辞

窒素固定エンドファイト*Herbaspirillum* sp. B501ならびに*Herbaspirillum* sp. B501gfp1を分与して下さった東北大学大学院生命科学研究科の南澤教授に謝意を表す。また、本研究の一部は農林水産省「生物機能を活用した環境負荷低減技術の開発」により実施された。

引用文献

- 赤尾勝一郎・河内宏（1989）根粒菌によるダイズ根毛カーリングの顕微鏡観察。土肥誌 60, 53-55.
- 赤尾勝一郎・田島茂行・大山卓爾・安藤象太郎・南澤究（2002）共生窒素固定研究の展開と持続的食糧生産（2001年高知大会シンポジウムの概要）。土肥誌 73, 3-78.
- Asis, C. A. Jr., M. Kubota, H. Ohta, Y. Arima, Y. Ohwaki, T. Yoneyama, K. Tsuchiya, N. Hayashi, Y. Nakanishi, S. Akao (2002) Estimation of the nitrogen fixation by sugarcane cultivar NiF-8 using ¹⁵N dilution and natural ¹⁵N abundance techniques. *Soil Sci. Plant Nutr.* 48, 283-285.
- Cavalcante, V. A., & J. Döbereiner (1988) A new acid-tolerant nitrogenfixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108, 23-31.
- Chelius, M. K., & E. W. Triplett (2000) Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 783-787.
- Elbeltagy, A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, K. Minamisawa (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5285-5293.
- Njoloma, J. P., M. Oota, K. Taroura, Y. Saeki, S. Akao (2006) Colonization ability of *Herbaspirillum* spp. B501gfp1 in sugarcane, a non-host plant in the presence of indigenous diazotrophic endophytes. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 836-841.
- Tanaka, K., T. Shimizu, M. Zakria, J. P. Njoloma, Y. Saeki, M. Sakai, T. Yamakawa, K. Minamisawa, S. Akao (2006) Incorporation of a DNA sequence encoding green fluorescent protein (GFP) into endophytic diazotroph from sugarcane and sweet potato and the colonizing ability of these bacteria in *Brassica oleracea*. *Microbes Environ.* 21, 122-128.
- Zakria, M., J. P. Njoloma, Y. Saeki, S. Akao (2007) Colonization and nitrogen-fixing ability of

Herbaspirillum sp. strain B501 *gfp1* and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. *Microbes Environ.* **22**, 197-206.