

## <sup>15</sup>N同位体希釈法によるサトウキビの固定窒素量の推定

西口友広・清水 友・Joyce NJOLOMA・大田守也<sup>1)</sup>・佐伯雄一・赤尾勝一郎

宮崎大学農学部生物機能科学講座, <sup>1)</sup> 沖縄県農業試験場宮古支場

(2005年1月28日 受理)

## The estimation of the amount of nitrogen fixation in the sugarcane by <sup>15</sup>N dilution technique

Tomohiro NISHIGUCHI, Tasuku SHIMIZU, Joyce NJOLOMA, Moriya OOTA<sup>1)</sup>, Yuichi SAEKI, Shoichiro AKAO

Division of Biotechnology and Biochemistry, University of Miyazaki, <sup>1)</sup>Miyako Branch, Okinawa Prefectural Agricultural Experiment Station

**Summary :** Recently, the pollution of underground water by nitrate nitrogen which flows from sugarcane fields has been a major problem in Okinawa. Therefore, it is expected that the use of biologically fixed nitrogen will reduce the amount of fertilizer nitrogen. In this study, we estimated the contribution of N<sub>2</sub>-fixation by bacteria existing inside sugarcane plant tissues to total nitrogen in sugarcane by using <sup>15</sup>N dilution technique. Cultivars (Ni 15, F 172 and NiF 8) of different characteristics were used in the determination of the number of N<sub>2</sub>-fixing bacteria inside the stem of parent sugarcane plants before sprouting new shoots, new-grown shoots were cultivated in 100 ml MS nitrogen free liquid medium with and without K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> (<sup>15</sup>N : 10.3 atom %). It was expected that by terminating K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> supply the activity of the endophyte will be enhanced. However, considering the amount of dry weight in K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> terminated treatments, it is not enough to supply the nitrogen which host plant demand. But, cultivar Ni 15 in K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> terminated treatments showed equal growth to cultivar NiF 8 in K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> continuation treatments. Cultivar Ni 15 is an early high-sugar cultivar, and it's conceivable that this characteristic enhances growth of N<sub>2</sub>-fixing bacteria. Ni 15 showed higher rate of root dry weight than the other cultivars thus, with the high root biomass it can be suggested that the amount of absorbed soil nitrogen could also be high. Therefore, it's considered that cultivar Ni 15 has high contribution of N<sub>2</sub>-fixation by bacteria and high absorption of soil nitrogen. These characteristics fit in well with the fertilizer placement method used for delayed release fertilizer, it can be suggested that cultivar Ni 15 could be utilized to reduce pollution of underground water by nitrate nitrogen.

**Key word :** Sugarcane, Nitrogen fixation, <sup>15</sup>N dilution technique, Endophyte, Potassium Nitrate

## I 緒言

日本国内、とくに、沖縄を含むその周辺諸島など飲料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汚染の問題は深刻である(中西2001)。台風などの強風に耐え、生産性の高い作物として知られているサトウキビは沖縄県における基幹作物の一つであるが、窒素要求量の高い割に施肥窒素の利用率の低い(沖縄農試平成5年度試験研究等検討会資料(サトウキビ部門・土壤肥料関係)から引用)ことが問題である。そこで、農耕地に投入した施肥窒素の地下水への流出を低減させるために、肥料の被覆や施肥法の再検討などが試みられているが、最も効果的な手段として生物的窒素固定(BNF)機能の活用が見直されている(赤尾ら2002)。こうした問題を解決するためにサトウキビ栽培における現況の施肥基準の見直しが検討されているが、一方で、サトウキビには、窒素固定細菌が内生しており、内生菌による固定窒素の寄与率がマメ科植物における固定窒素の寄与率に匹敵するほどの高い値を示す場合も報告されており(米山1997)、窒素固定エンドファイトを活用した窒素施肥の軽減が期待されている(米山・赤尾1998)。

畑土壌への窒素施肥とエンドファイトによる固定窒素量の因果関係は、ダイズ根粒菌の場合には、窒素固定活性が硝酸態窒素によって抑制されることはよく知られているが(桑原1986)、窒素固定エンドファイトにおいては硝酸態窒素供給の有無が窒素固定活性や植物体の生育にどのような影響を与えるかはほとんど分かっていない。そこで、本実験では特性の異なるサトウキビ三品種の幼植物を供試作物とし、硝酸態窒素供給の有無が固定窒素量や植物体の生育に与える影響を検討した。

## II. 材料及び方法

### 1. 供試植物

試験に供したサトウキビは、沖縄県農業試験場宮古支場で栽培されているNi15, F172, NiF8の3品種であり、茎の表面は水洗後70%エタノールで殺菌処理した後に、2~3節を残して切断し、得られた切断茎を図1に示したように滅菌パーミキュライト(水分30%)を入れた表面殺菌済のプラスチック容器に茎挿しした。プラスチック容器の上部はサランラップで覆い、室温24℃の定温室に静置した。2週間後、図1に示したように各節から発生し、根をつけた新芽を供試材料とした。なお、表1には試験に供したサトウキビ品種の特性を示した。

### 2. 内生菌密度及び窒素固定活性の測定

内生菌密度の測定には茎の搾汁液を用いた。搾汁液の採取に供した茎は、70%エタノールに5分、3%過酸化水素水に1分間浸漬して表面殺菌を行った。表面殺菌後の茎はクリーンベンチ内で皮を除き、細かく切断したのち乳鉢に移し、乳棒で圧搾して汁液を採取した。搾汁液は滅菌水を用いて $10^0$ から $10^5$ までに10倍ごとに薄めた希釈液を



図1. サトウイキビ茎の節に発生した新芽

表1. 供試品種の特性

品種	特 性
Ni15	早期型高糖性品種。登熟が早く、蔗汁質は安定して高い。新植(春植, 夏植)では多収であるが株出はやや劣る。可製糖率が高く、3作型で砂糖収量は高い。耐病性は高く、特に黒穂病への耐性が強い。
F172	晩期型低糖性品種。晩熟で比較的糖度は低いが収量は安定。また病害虫に強く、風折抵抗性・干ばつにも強い
NiF8	早期型高糖性品種。茎の伸長は生育初期から早く糖分含量、糖度共に高く、品質的に優れている。易脱葉性で機械収穫適性も高い。耐病性は極めて高いが風折抵抗性・耐干性は中である。

調整し、MPN法 (Miyamoto 2004) を用いて菌密度を測定した。菌の培養には炭素源として精製スクロースの代わりにサトウキビ蔗糖を使用する改変LGIP半流動培地 (Reisら1994) を用いた。アセチレン還元活性の測定は、改変LGIP半流動培地15 mlを45 ml容の試験管に入れ、その中に搾汁液の希釈液を200  $\mu$ lずつ注入し24  $^{\circ}$ Cで6日間静置培養した後、各培地試験管のヘッドスペースの10% をアセチレンガスに置換し、同条件下で24時間反応させた後に生成するエチレンを測定することにより求めた。エチレンの測定には、PORAPAC Nカラムと水素炎イオン化検出器を装着したガスクロマトグラフ (島津 GC-8A, 京都) を用いて行った。なお、キャリアガスにはヘリウムガス、カラム温度は50  $^{\circ}$ Cとした。

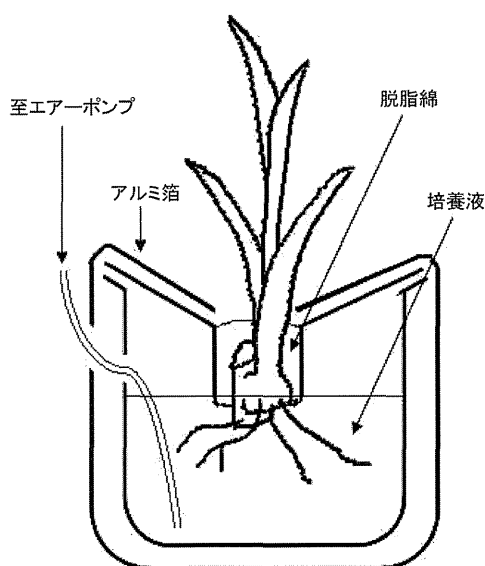


図2. 栽培ポットの模式図

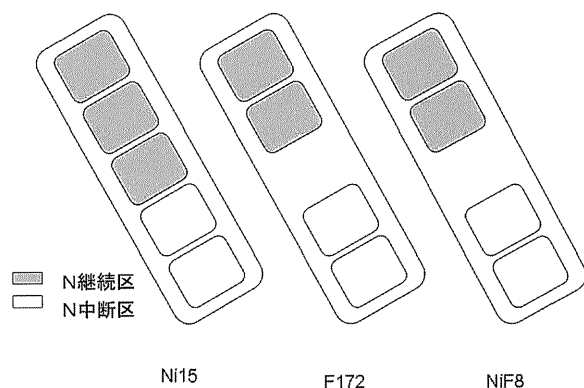


図3. ポットの配置

### 3. $^{15}$ N水耕栽培試験

水耕試験に用いた幼植物は、上述した茎挿しのサトウキビから発生した新芽を、茎の一部と根をつけた状態で切り出して用いた。切り出した新芽 (以下、幼植物) は、品種別に図2に示した長方形のプラスチック容器に移植し、24  $^{\circ}$ Cの定温室に設置した簡易型グロースチャンバー内で3000~6000ルクスの照明で、明13時間、暗11時間の条件下で水耕栽培した。培養液には0.5 mMとなるように $K^{15}NO_3$  [ $^{15}N$  10.3 atom%] を添加したMS無窒素培養液を用い、幼植物の水耕には100 mlの培養液を用い、24時間毎に培養液の交換を行った。なお、栽培14日後には各幼植物を図3に示したポットに再移植し、培養液にはエアープンプを用いて曝気を行い、酸素濃度を高め栽培を続けた。栽培45日後には各幼植物を $K^{15}NO_3$ 添加継続区と停止区とに図5のように一区画2個体 (左が継続区, Ni15継続区のみ3個体) に分け、更に45日間栽培した。図5は区分け時の栽培状態を示したものである。栽培開始から90日後に栽培を終了し、地上部、地下部、基部、枯死部の別に分けて生重を測定した後、85  $^{\circ}$ Cの定温器に入れて二日間乾燥させた。各部位の乾燥重量を測定した後、薬研を用いて摩砕し粉末として窒素含有率・重窒素含有率の測定に供した。重窒素の測定は昭光通商杉戸研究所SI分析センターに依頼した。

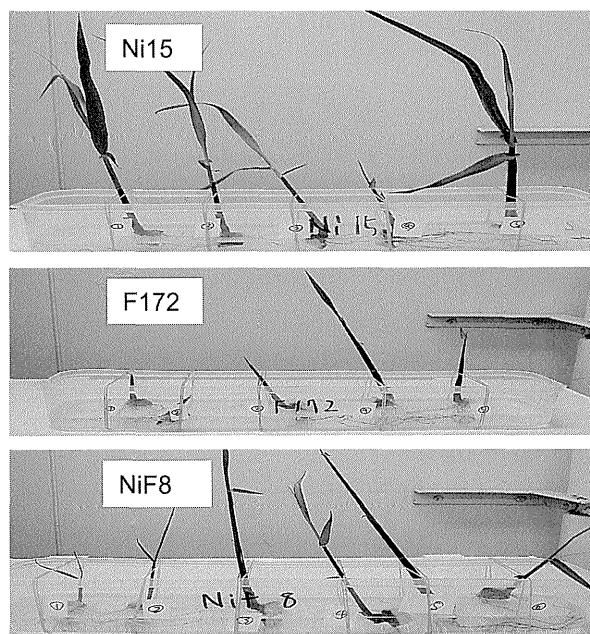


図4. 発根したサトウキビ側枝を共通培地に移植した状態

### Ⅲ. 結果

#### 1. 内生菌密度及び窒素固定活性の測定

サトウキビ汁液中に生息する内生菌密度と内生菌中の窒素固定菌の密度を表2に示した。試験に供したサトウキビに内生していた全細菌密度は汁液1 ml当たり $10^3$ オーダーで、その内で、窒素固定細菌の占める割合は1%以下であった。内生窒素固定菌密度にも品種による違いは小さく、最大のもので、F172の20.0~21.0 cfu/ml、次いで、Ni15の14.0 cfu/mlであり、NiF8が最も低く1.8~14.0 cfu/mlであった。一方、アセチレン還元活性には品種による違いが認められ、Ni15が $17.2 \pm$

$14.6 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ tube}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ と高かったものの個体間のばらつきが大きかった。次いでF172が $7.9 \pm 2.6 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ tube}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ と安定した活性を示し、NiF8は $0.31 \pm 0.12 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ tube}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ と低い値を示した。

#### 2. サトウキビに内生する窒素固定菌による固定窒素量の推定

##### 1) 植物の生育

図1に示したようにバーミキュライトに茎挿して発生した新芽(側枝)を水耕に移した様子を図4に示した。新芽の生長程度には品種による違いがあり、Ni15の生育がもっとも良好で、次いでNiF8、F172の順であった。窒素を除いたMS培地に、 $^{15}\text{N}$ で標識した硝酸カリウムで窒素を0.5 mMになるように添加して水耕試験を開始した。開始時点における幼植物の様子は図4に示したとおりである。栽培開始45日後に、各個体を一本ずつ、縦、横、 $6 \times 6 \text{ cm}$ 、高さ12 cmのポリ容器に移し、 $^{15}\text{N}$ 硝酸態窒素処理の継続区と中断区に分け、その際の植物体の生育状態を図5に、さらに45日間栽培を続けた時点における生育の様子を図6に示した。試験開始時には、生育の早い個体でもようやく2葉が展開し終えた状態であったが、その後における45日間の処理期間中に展開葉の総数は平均して6~7葉に達した。しかし、一方で、下葉から枯れあがる葉も生じる関係で個体当たりの健全葉は5~6枚であった。その後、さらに45日間培養した時点では、ほぼ9~10枚の展葉が認められたが、下位の4~5葉は枯れあがっていた。表3には、処理開始時と処理終了時における個体乾物重並びに $^{15}\text{N}$ 処理期間中に増加した乾物重を示した。処理開始時の乾物重は、 $^{15}\text{N}$ 処理栽培試験開始時に実測した個体の生体重に乾物率を乗じて算出した値である。処理開始時の1個体当たりの乾物重は0.6から1.2 gであったが90日間の処理

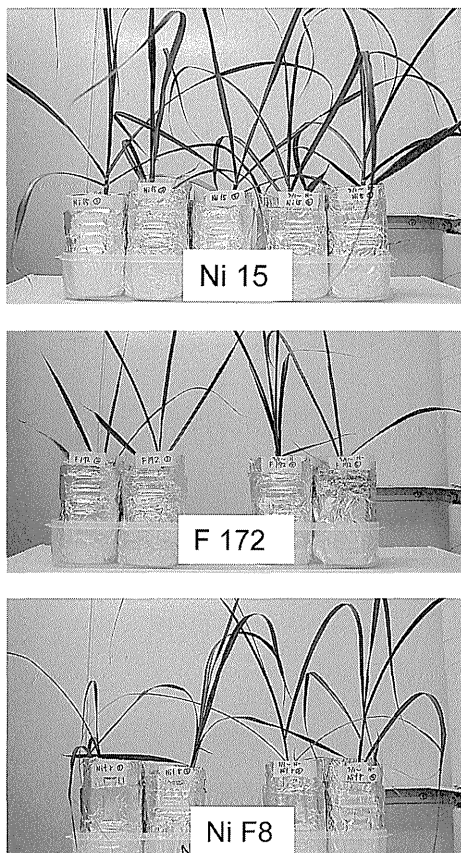


図5.  $^{15}\text{N}$ 処理45日後の生育状況

表2. サトウキビ汁液中の内生菌及び内生菌中の窒素固定菌密度とアセチレン還元活性

サトウキビ 品種	全細菌数 cfu ml <sup>-1</sup>	窒素固定細菌数 cfu ml <sup>-1</sup>	アセチレン還元活性 nmol 24h <sup>-1</sup> tube <sup>-1</sup>
Ni F 8	$1.8 \times 10^3$	1.8~14.0	$0.31 \pm 0.12$
Ni 15	$2.4 \times 10^3$	14.0	$17.2 \pm 14.6$
F 172	$2.4 \times 10^3$	20.0~21.0	$7.9 \pm 2.6$



図6.  $^{15}\text{N}$ 処理終了時における生育状況

期間中に1.1から3.4 gにまで増加した。それらの詳細を、品種や処理との関連で整理すると次のようであった。90日間の処理終了時における個体当たりの乾物重は、N継続、中断のいずれの処理にあってもNi15で最も多く、N継続区では、処理開始時の5.3倍、N中断区にあっても処理開始時の2.3倍に増大していた。一方、F172の処理終了時における乾物重の増加は、N継続区で1.6倍、N中断区で1.4倍、NiF8では、N継続区1.9倍、N中断区2.0倍であり、処理期間中における乾物重の増加割合はF172よりもNiF8において多かった。また、F172では、窒素の施用を途中で中止したN中断区における乾物重の増加割合がN継続区よりも低かったのに対し、NiF8では窒素施用を中止しても乾物重の増加割合に変化を示さなかった。処理終了時の乾物重から処理開始時の乾物重を差し引いて得られた値（処理期間中に増加した乾物重、表3は処理期間中の増加として表示）もNi15で最も高く、次いでNiF8、F172の順であった。

## 2) 窒素固定寄与率

### (1) 増加窒素量

栽培開始時の生重量と栽培終了後の試料粉末の分析結果から得た乾物重率と窒素含有率から栽培開始時の窒素含有量を推定し、栽培終了後の乾燥重量から求めた窒素含有量と栽培開始時のそれとの差から増加窒素量を求め、その結果を図7に示した。

生育の項で述べた増加乾物重量ではNi15のみが区間で有意な差を示したが、増加窒素量ではNi15とNiF8において窒素停止区は窒素継続区に比べ増加窒素量が有意水準5%以内で有意に減少し、生育が抑制されていることが確かめられた。

表3. サトウキビ3品種の乾物生産に及ぼす窒素(N)供給の影響

処理	品種	乾物重 $\text{g kg}^{-1}$		
		処理開始時	終了時	処理期間中の増加
N継続	Ni 15	$0.63 \pm 0.11^*$	$3.37 \pm 0.38$	$2.74 \pm 0.35$
	F 172	$0.66 \pm 0.05$	$1.07 \pm 0.07$	$0.41 \pm 0.03$
	Ni F8	$0.81 \pm 0.32$	$1.53 \pm 0.51$	$0.72 \pm 0.23$
N中断	Ni 15	$1.16 \pm 0.40$	$2.65 \pm 0.94$	$1.49 \pm 0.54$
	F 172	$0.96 \pm 0.18$	$1.36 \pm 0.27$	$0.40 \pm 0.31$
	Ni F8	$0.65 \pm 0.14$	$1.30 \pm 0.39$	$0.65 \pm 0.35$

N継続：0.5 mM  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ を90日間継続施用

N中断：後半の45日間を無Nで培養

\*：標準偏差

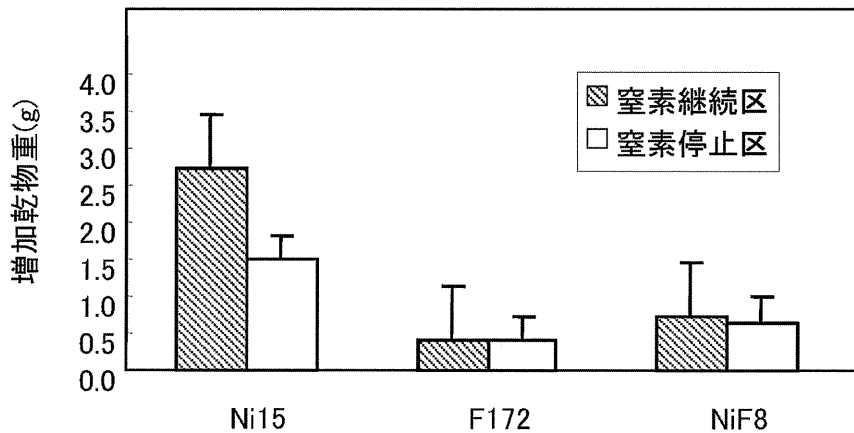


図7. 栽培期間中に増加した乾物重

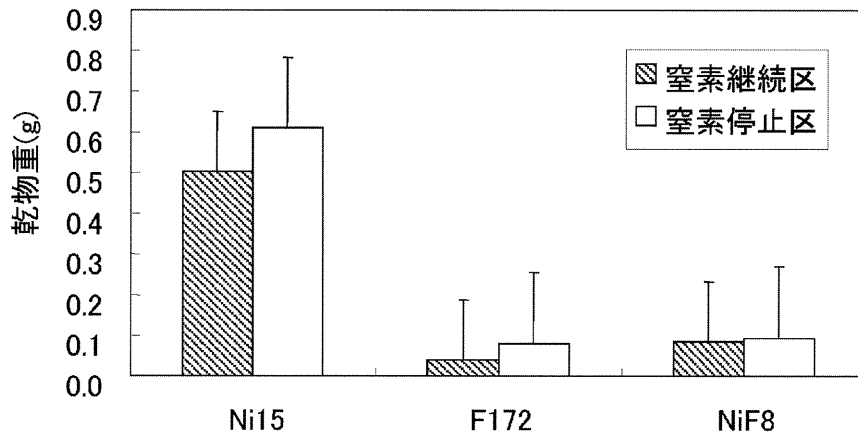


図8. 栽培終了時の地下部(根)の乾物重

しかしながらF172では有意な差は認められなかった。品種間で比較すると窒素継続区ではNi15の増加窒素量が最も多く、次いでNiF8, F172の順であり、増加乾物重量と同様の結果であった。窒素停止区でも同様にNi15が最も多かったが、NiF8とF172の間にほとんど差異は認められなかった。また、窒素停止区のNi15は窒素継続区のNiF8とほぼ同等の増加窒素量を示した。

## (2) 窒素固定寄与率・窒素固定量

各部位の重窒素含有率と乾物重量から植物体全体での重窒素含有量を求め、さらに増加窒素量から増加窒素中の重窒素含有率(excess%)を求めた。

ここで、次式により植物体の窒素固定寄与率と固定窒素量を求めることができる。

$$\text{窒素固定寄与率}(\%) = (1 - \frac{\text{増加窒素の}^{15}\text{N excess \%}}{\text{培養液の}^{15}\text{N excess \%}}) \times 100$$

$$\text{窒素固定量}(\text{mg}) = \text{増加窒素量}(\text{mg}) \times \text{窒素固定寄与率}(\%)$$

以上の結果から各品種の両処理区の増加窒素量、 $^{15}\text{N}$  excess %, 窒素固定寄与率, 固定窒素量を表4に示し、窒素固定寄与率を図9, 窒素固定量を図10に示した。

窒素固定寄与率については品種間でばらつきが大きかったが、区間で比較すると窒素停止区は窒素継続区よりも有意水準5%以内で有意に窒素固定寄与率が高かった。これにより生育初期に窒素供給を停止すると窒素固定活性が高まることが示唆された。窒素継続供給区では窒素固定寄与率は三品種とも10%程度で品種間による差異は認められなかったが、窒素停止区では品種間で大きな差が認められた。Ni15は窒素停止処理により窒素固定寄与率が窒素継続供給区の約4倍高まり、対してF172は2倍程度、NiF8は1.5倍程度の増加であった。

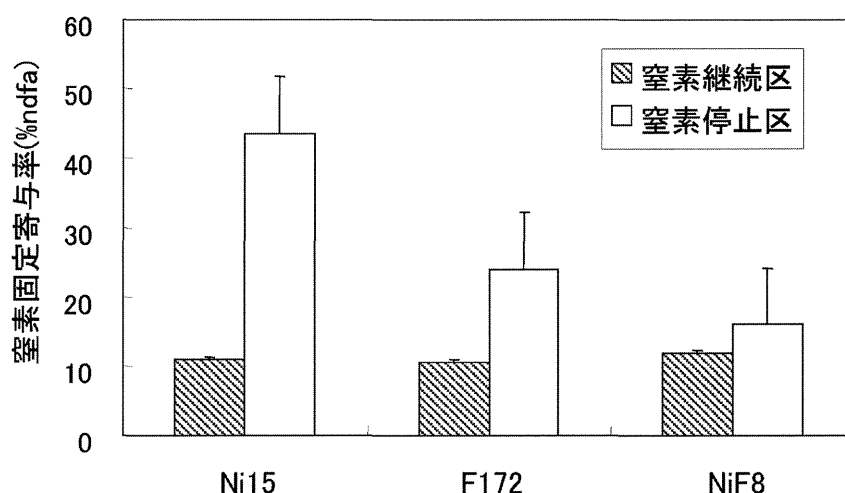


図9. 窒素固定寄与率

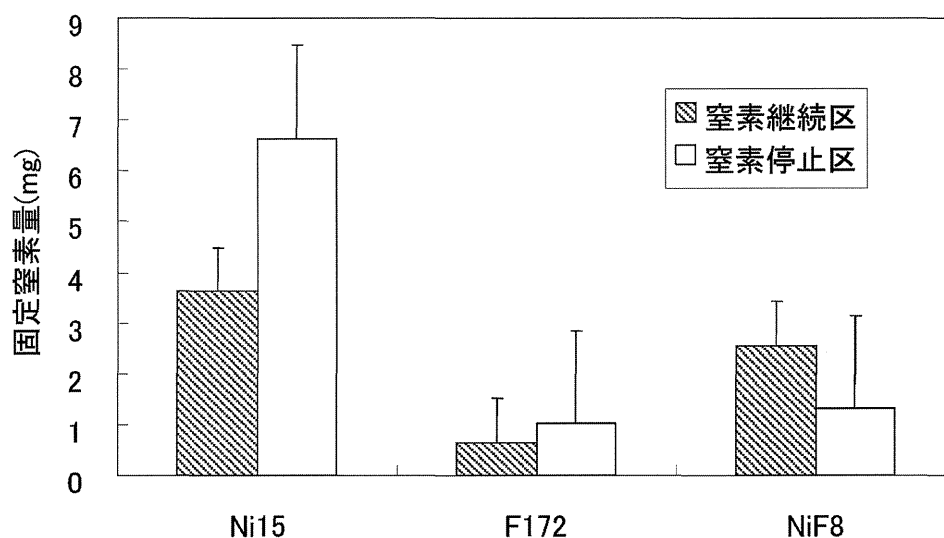


図10. 固定窒素量

固定窒素量では、Ni15は窒素停止区が継続区より2倍弱増加したが、逆にNiF8では有意に減少した。F172においては区分けによる有意な差は認められなかった。

#### IV 考察

サトウキビの窒素固定寄与率については、多くの機関で調べられているが (Ando 2002, Yoneyama et al. 1997, 中央農研 2001), 硝酸態窒素供給が窒素固定寄与率に与える影響についてはほとんど分かっておらず、*Acetobacter diazotrophicus* の *in vitro* における硝酸態窒素の影響 (Muthukumarasamy et al. 2002) や、硝酸態窒素濃度がサトウキビ茎内の *Acetobacter*

*diazotrophicus* の菌数や生重量へ与える影響 (Reis et al. 1999) の報告があるのみである。そこで本実験では、<sup>15</sup>N栽培期間90日の前半45日間は、試験区全体に0.5 mMの窒素を供給し、後半の45日間には、そのまま継続投与する区と窒素供給を停止させ全く供給しない区に二分することで、窒素の供給が窒素固定活性にどのような影響を与えるかを検討した。

図9に示したとおり、固定窒素寄与率は窒素供給停止処理によって有意に高まることが確かめられた。しかし増加乾燥重量 (図7), 増加窒素量 (表3) は窒素継続区の方が高いことから固定窒素のみでは植物本来の窒素要求量を満たすには至らなかったと推察される。葉の展開数や枯死数



表 4. 栽培供試植物の増加窒素量,  $^{15}\text{N}$  excess %, 窒素固定寄与率, 固定窒素量

	増加窒素量 (mg)	$^{15}\text{N}$ excess (%)	窒素固定寄与率 (%)	固定窒素量 (mg)
Ni15窒素継続区	33.063	8.844	11.0	3.63
Ni15窒素停止区	14.255	5.609	43.5	6.64
F172窒素継続区	6.269	8.886	10.5	0.65
F172窒素停止区	4.382	7.549	24.0	1.01
NiF8窒素継続区	17.940	8.761	11.8	2.56
NiF8窒素停止区	8.025	8.339	16.1	1.32

からも窒素供給停止によって窒素欠乏に陥り生育が抑制されたことが示唆された。増加生重は硝酸態窒素 7 mM の濃度で最も高まるという報告があり (Reis 1999), 今回の実験結果でも窒素継続区の生育がよくほぼ同様の結果を示した。F172, NiF8において窒素固定寄与率は高まったにもかかわらず固定窒素量は窒素停止区の方が窒素継続区より減少したことから, 窒素固定寄与率が増加しても個体の成育量が大きく抑制されると固定窒素量は減少してしまうことが示唆された (図 8, 9, 10)。未発表ながら新潟大の大山らによって無窒素に限らず少窒素施肥においても窒素寄与率は向上することが確認されており, 供給窒素濃度を更に細かく設定した試験により, 窒素固定寄与率を向上させつつ生育量の抑制を最小限に抑える施肥窒素量, 施肥形態を明らかにすることが今後の検討課題である。

図 8, 9 に示したように窒素固定寄与率や増加窒素量には品種間による大きな違いが認められた。こうした違いを生じさせる要因として, 親株となるサトウキビ茎中に内生する窒素固定細菌の密度や窒素固定活性との関連が考えられる。表 2 に示したとおり F172 と Ni15 に内生する窒素固定細菌の密度は NiF8 のそれよりも高かったこと, さらに, F172 と Ni15 のアセチレン還元能も NiF8 のそれより明らかに高かったことが考えられる。Ni15 については, 内生窒素固定細菌の生息密度と窒素固定活性の指標となるアセチレン還元能が高かったことから説明できそうである。しかし, F172 の場合には様相が異なっている。すなわち, 親株の内生窒素固定細菌密度とアセチレン還元能のいずれも Ni15 とほぼ同水準にあったにもかかわらず図 7 に示したように生育量の少なかったことである。試験に供した苗は, 親株から発生した

芽を使用していることから, 親株に生息していた窒素固定細菌の芽への移行量に違いのあったことも考えられる。しかし, この点に関する報告例は見あたらないので, この件に関しては今後解決すべき課題として残される。親株から新芽への内生窒素固定細菌の移行, 今回試験に供したような幼植物における内生菌の増殖 (窒素固定能に反映する) に及ぼす品種間差異はなかったであろうか。サトウキビ茎中に内生する窒素固定細菌数は, 茎中の糖濃度と比例することが報告されており (Constancio 2003), 高糖性品種は窒素固定細菌が増殖するポテンシャルが高いと考えられている。表 1 に示したように Ni15 と NiF8 は高糖性品種, 特に Ni15 は優れた高糖性であり, 早期に糖の集積が始まるとされている (宮城 2002)。こうした背景は, 幼植物における茎中の窒素固定細菌の増殖に影響を与えた可能性を示唆している。今後, 親株サトウキビ茎中の窒素固定細菌数と幼植物中のそれとの関連の解明が必要である。

前述において窒素停止区の固定窒素量は植物本来の窒素要求量に満たないと述べたが, ここで増加乾燥重量, 増加窒素量の点から Ni15 の窒素停止区は NiF8 の窒素継続区と同等の生育を示したことが特徴として挙げられる。また, Ni15 は他品種に比較して窒素停止処理により吸収窒素への依存度が大きく下がっていることが示唆された。これは同一環境下で栽培した場合, Ni15 は他品種よりも固定窒素の寄与率が高く植物体の生育をより補助し低窒素環境に耐えると考えられる。また, 増加窒素量は窒素継続区が停止区より 2 倍高い値を示した結果から窒素要求量自体は大きいことが示唆され, さらに発根も旺盛なため低窒素環境下では土壤窒素の吸収率は高いと思われる。

低窒素環境下において窒素固定寄与率が高く植



物体の生育を補助し、土壤窒素の吸収率も高いという二つの特性は、硝酸態窒素汚染対策に用いられる緩効性肥料を用いた施肥形態と適合しており、Ni15は施肥窒素の低減に有用な品種であると推察される。

## 要約

沖縄県やその周辺諸島では地下水の硝酸態窒素汚染が深刻な問題となっており、沖縄での基幹作物であるサトウキビ畑からの流出窒素の低減が求められている。そこでサトウキビに内生する窒素固定細菌を活用した施肥窒素の低減が期待されており、本試験では硝酸態窒素濃度が与える植物体の生育や窒素固定活性への影響を調査した。試験には特性の異なる三品種 (Ni15, F172, NiF8) を供し、茎内の窒素固定細菌数を計測すると共に、幼植物を重窒素標識したKNO<sub>3</sub> 0.5 mMを加えたMS無窒素培養液を用い、窒素供給の継続・停止区に分け水耕栽培を行った。その結果として、窒素固定寄与率は窒素供給停止により全ての品種で向上が認められたが、乾物重では窒素継続区に比較して減少しており植物本来の窒素要求量には満たなかったと考えられた。しかし、窒素停止処理区のNi15は窒素継続区のNiF8と乾物重において同等の生育を示した。Ni15は早期高糖性品種であり窒素固定細菌の増殖に有利な特性を有し、また本試験では全体に占める根の乾物割合が他品種と比較して高いという特徴が認められ、土壤窒素の高い吸収量が示唆された。これらのことから低窒素の同一環境下においてNi15は窒素固定寄与率が高く、同時に土壤窒素の吸収量も高いと考えられ、緩効性肥料を用いた施肥形態との適合性が高く、硝酸態窒素汚染問題の解決のための有用な品種である可能性が示唆された。

**キーワード:** さとうきび, 窒素固定, <sup>15</sup>N同位体希釈法, エンドファイト, 硝酸態窒素

## 謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費基盤研究B(2)課題研究番号16380053と農水省プロジェクト「生物機能」経費の補助を受けて実施されたものであり、心から感謝の意を表します。

## 引用文献

- 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 土肥誌 73, 73-78
- Ando, S. S. Meunchang, S. Thippayarugs, P. Prasertsak, N. Matsumoto and T. Yoneyama (2002) Evaluation of sustainability of sugarcane production in Thailand based on nitrogen fixation, efficiency of nitrogen fertilizer and flow of organic matter. *JIRCAS Working Report* 30, 61-64
- Constancio A. Asis, Jr., T. Shimizu, M. K. Khan and S. Akao (2003) Organic acid and sugar contents in sugarcane stem apoplast solution and their role as carbon source for endophytic diazotrophs. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 49, 915-920
- 桑原真人 (1986). ダイズの多収条件と窒素代謝 (1). 農及園 61 : 473-479
- 宮城克浩・伊禮信・謝花治・宮平永憲・高江洲賢文・伊志嶺正人・大工政信 (2002). 早期高糖性さとうきび新品種「Ni15」の特性. 日本作物学会九州支部報. 68, 47-49
- Miyamoto T., M. Kawahara, K. Minamisawa (2004). Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol.* 70, 6580-6586.
- Muthukumarsamy R, D. Revathi, P. Loganathan (2002). Effects of inorganic N on the population, in vitro colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant Soil.* 243 : 91-102.
- 中西康博 (2001) 沖縄県宮古島におけるサトウキビへの施肥実態と地下水窒素濃度との関係. 土肥誌 72 : 499-504
- 大脇良成・藤原伸介 (2002) 植物体内細菌 (エンドファイト) による作物の窒素固定—パイオニア特別研究の成果から—。農業技術 57, 399-403
- Reis V. M., F. L. Olivares and J. Dobereiner (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of

- its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **10**, 401-405
- Reis, V. M., F. L. Olivares, A. L. M. Oliveira, J. Reis, B. F. abio, J. Baldani, J. Dobobereiner, (1999) Technical approach to inoculate micro-propagated sugar caneplants with *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant Soil*. **206**, 205-211
- Yoneyama T (2002):  $N_2$  fixation by three types of plant-microbe interaction: carbon as the major limiting. *Proceedings of Plant-Microbe Interaction*. Chonnam National University, Korea, p. 33-44 April
- 米山忠克 (1997) サトウキビ茎葉での窒素固定. *化学と生物* **35**, 402-403
- 米山忠克・赤尾勝一郎 (1998) 非マメ科に共生窒素固定系を付与するための研究戦略と問題点ー根圏の窒素固定からエンドファイテック窒素固定ー. *土肥誌* **69**, 403-409
- Yoneyama, T., T. Muraoka, T. H. Kim, E. V. Dacanay, and Y. Nakanishi. (1997). The natural  $^{15}N$  abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant Soil* **189** 239-244.