

野生イネ科植物から分離される窒素固定嫌気共生系

みなみさわ きわむ にしおか きよ みやき たろう ゆうはし けんいち さとう ただし

○南澤 究・西岡 きよ・宮木太郎・遊橋健一・佐藤 雅志・

東北大学遺伝生態研究センター

【目的】 近年、*Acetobacter*, *Herbasprillum*, *Azoarcus* 属などのイネ科植物に内生する窒素固定菌（窒素固定エンドファイト）が、植物の窒素収支に貢献している可能性が指摘されている。実際、私達も改変 Rennie(RMR)半流動培地を用いて日本に保存されている野生イネの茎から *Herbaspirillum* 属細菌を分離し、イネ幼植物において $10^6 \sim 10^8$ オーダーでコロナイズし、アセチレン還元活性も検出された。しかし、パイオニア植物や自生している野生イネから窒素固定菌の比較的高い計数値が得られるにもかかわらず、通常の方法では全く窒素固定菌が単離されなかった。そこで、複数の細菌の相互作用によって窒素固定活性が発現している可能性の検討を行った。

【方法】 フィリッピン ピナツボ火山泥流地帯のパイオニア植物ワセオバナ、雲仙普賢岳火山泥流地帯のパイオニア植物ススキ、東南アジアに自生している野生イネの茎および根を 1~2% 次亜塩素酸で表面殺菌後、滅菌生理食塩水で石英砂を入れて植物組織の摩砕液を調製した。希釈系列を、RMR 半流動培地に接種し、1 週間 30℃で培養し、アセチレン還元活性(ARA)を測定し、窒素固定菌の MPN 計測値を求めた。窒素固定菌の分離は、表面殺菌した植物切片から培養した ARA 陽性の培養液または MPN 計測時の ARA 陽性の最高次希釈液から、RMR 寒天平板培地を用いて好気条件および嫌気条件で菌をシングルコロニー単離を行い、それらの単離菌を組み合わせ RMR 半流動培地に接種し、ARA 活性を測定した。また、ARA 活性発現に關与する単離菌の形態および培養性状を観察した。

【結果】 パイオニア植物ワセオバナでは表面殺菌した茎で 10^4 オーダー、根で 10^5 オーダーの窒素固定菌数が、ススキの表面殺菌した根では 10^4 オーダーの窒素固定菌数が計測された。野生イネの茎の MPN 計測はしていないが、茎切片（約 2 cm）の窒素固定菌の検出頻度は 86% 以上であった。好気および嫌気条件で単離された菌株は、RMR 半流動培地ですべて ARA 陰性であった。そこで、それぞれの単離菌を混合し培養を行ったところ、嫌気単離株を含む場合 ARA 陽性となった。得られた嫌気単離株は嫌気条件下では単独でも ARA 陽性を示し、RMR 培地で生育がよく内生孢子が観察される *Clostridium* 様のグループと、GAM 培地で生育が旺盛なグループが認められた。以上の結果より、野生イネ科植物体内には、窒素固定能を持つ嫌気性細菌と窒素固定能を持たない好気性（通性嫌気性）細菌の両方が生息しており、分離過程で両者が酸素分圧を介して共同し窒素固定活性を示していることが明かとなった。