

グミ属の根粒内生菌

On the Endophyte of the Root Nodules of Elaeagnus

渡 辺 成 美
Narumi Watanabe

高 橋 幸 枝
Yukie Takahashi

Although the plants that belong to Genus Elaeagnus are non-leguminous, they have conspicuous root nodules. This report deals with the isolation of the endophyte which yields root nodules on the roots of the three plants : Elaeagnus macrophylla, Elaeagnus glabra and Elaeagnus pungens. By using the root nodules of and the soil around the roots of these plants as the materials for the experiments, the present author has succeeded in the isolation and pure culture of two strains of Actinomycetes common to each other. From the morphological and cultural aspects, one of them was identified as Streptomyces violascens (Preobrazhenskaya and Sveshnikova) Pridham et al. 1958, 68. ISP 5183 but the other was diagnosed as Streptomyces sp. because it did not indicate any morphological and cultural characteristics which are necessary for its identification. Therefore, about the latter, more of the data are now under examination. The filtrate of the liquid medium in which Streptomyces violascens was cultured, was proved as antibiotic to Bacillus subtilis only. Considering the results of the experiments, it is supposed that Actinomycetes producing the root nodules on the roots of the plants that belong to genus Elaeagnus may originate in the soil around their roots.

根粒のできる非マメ科植物には6目7科14属が数えられる。グミ科植物も根粒植物として知られ、Elaeagnus, Hippophaë, Shepherdia の3属を包含しているが、日本にはグミ属 (Elaeagnus) のみが産する。これまで、根粒内に生存する菌糸状の生物は単に内生菌 (Endophyte) として取り扱われ、いろいろな研究が行われている。グミについても研究報告は相当数があり、内生菌の分類学上の位置については細菌、放線菌、粘菌、糸状菌などいろいろな記載されている。

表1 グミ属の根粒内生菌についての研究史

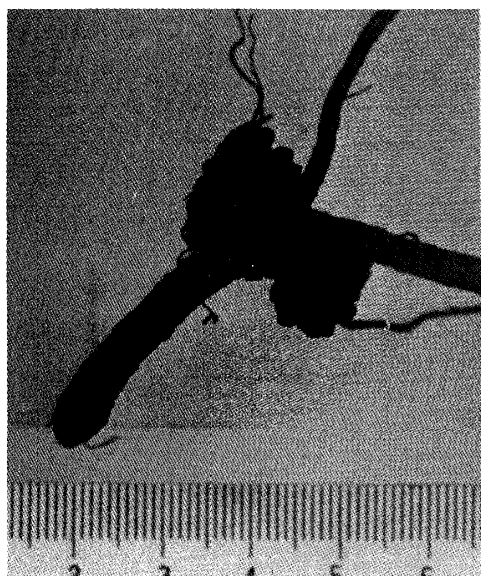
年 代	人 名	研 究 内 容
1886	Brunchörst	<u>Elaeagnus angustifolia</u> の根粒についての研究。
"	Schröter	<u>E. angustifolia</u> の根粒菌を粘菌に属する <u>Plasmodiophora</u> の一種とみなし、 <u>P. elaeagni</u> Schröter と命名。
1908	Zach	<u>E. angustifolia</u> の根粒中に菌糸が存在することを確認し、糸状菌に属す、と報告。
1909	Maire & Tison	<u>Frankiella elaeagni</u> (Schröter) Maire & Tison と命名。
1910	Arzberger	<u>E. argentea</u> にも根粒が生ずることを確認。
1912	Spratt	グミの根粒中に桿状及び球状細菌を認め、 <u>Bacillus radicolica</u> に類似したものであることを報告。
1917	Shibata & Tahara	各種根粒植物を研究し、グミの菌については、ハンノキのそれと酷似しており、放線菌又はこれに近いもので、根粒の細胞内で繁殖し、その後吸収

年 代	人 名	研 究 内 容
1917	Harshberger "Mycology and Plant Pathology"	されて養分になる、と発表。 <u>Plasmodiophora elaeagni</u> Schröter として掲載。 所属については疑問点あり、再考を要することを報告。
1932	Yendo & Takase	<u>Tetramyxa</u> 属に属する一新種と認め、 <u>Tetramyxa elaeagni</u> Yendo sp. nov. と命名。
1934	Roberg	<u>Actinomyces elaeagni</u> と命名。
1961	Uemura	ハンノキ属を中心に、ヤマモモ、アキグミ等、非マメ科植物の根粒について研究し、 <u>Streptomyces</u> を分離。
1970	Becking	非マメ科根粒植物の共生菌を <u>Actinomycetales</u> の中の <u>Frankiaceae</u> に属するものとして、 <u>Frankia elaeagni</u> を type species とした。
1974	Bergey	<u>Frankia elaeagni</u> を含め、14種の非マメ科根粒植物に共生する10種の菌名が記載され、現在に至る。

最近では、このうち放線菌説が有力で、Becking は Frankia elaeagni としており、これは "Bergey's Manual of determinative bacteriology" 8 Ed. 1974 によって認められている。しかし、なおこれらのデータに関しても明らかでない点も多い。本研究はグミの根粒形成に関与すると思われる放線菌を根粒から分離し、これが内生菌として働くものであることを明らかにしたものである。異った種類のグミ、及び異った場所に生育する同種のグミを材料とし、これらから分離された放線菌間の関係、さらに該放線菌と根粒の周囲の土壌中に生育する放線菌との関連性を求めた実験報告である。

実験材料及び方法

グミの根粒は根の不定の位置につき、その形成初期はしずく型であるが、成長するとサンゴ状構造 (Coralloid structure) になる。直径は普通 5 ～ 6 mm から 2 cm ぐらいまでであるが、大きいものでは 5 cm に達することがある。植村 (1952) によって指摘されているように、菌の分離



に供する根粒は若い苗木の根に着生した新鮮で充実したものが望ましいとされるので、本実験材料としてもそのような根粒が用いられた。材料となったグミの種及び土壌の採集地・採集日は次の通りである。

マルバグミ E. macrophylla

君津市大佐和海岸 1%, 1%
館山市 1% (月/日)

ツルグミ E. glabra

市原市三石山 1%

ナワシログミ E. pungens

夷隅郡夷隅町山林 1%

マルバグミ根粒周囲の土壌

安房郡鋸南町勝山 1%

分離方法として次のものが採用された。

(イ) 1. 根粒を根から切りとる。土壤その他の付着物を取りさるため流水中で20～30分間洗う(管びん使用)。 2. 0.1%昇汞水で5分間殺菌。 3. 滅菌水で数回洗浄。 4. アルコール火炎で滅菌したスライドガラス上に根粒材料をのせ、消毒したピンセットで細かに潰す。 5. 生じた乳様液をつかい三面平板塗沫による分離法を行う。 6. 27℃, 1週間培養すれば集落は明らかになる。

(ロ) (イ)法によると細菌やカビなどによる汚染が甚しいから、これを防ぐために希釈法が奨められる。筆者は専らこれに従った。 1. 根粒を滅菌生理的食塩水と共に振盪洗浄する(Rotary Shakerで1時間)。 2. アルコール火炎で滅菌したピンセット2本を用い、滅菌ペトリ皿内で根粒の皮部をむき去り内部だけを材料とする。 3. 内部材料を再び300ml滅菌生理的食塩水で30～60分振盪洗浄する。 4. 0.1%昇汞水で5～6分殺菌。 5. 滅菌生理的食塩水で数回洗浄。 6. 材料をHomoginizerでくだき滅菌生理的食塩水1mlを加え均質な懸濁液をつくる。 7. 滅菌生理的食塩水で希釈する。(直径約1cmの根粒を材料とするとき、ペトリ皿の培地上に約100箇の集落を得るためには、 10^3 , 10^4 , 10^5 倍程度の希釈が必要である。) 8. 希釈液1mlを滅菌ペトリ皿にとり、培地15mlを注入する。放線菌以外の雑菌の汚染を防ぐため、抗真菌剤として抗生物質シクロヘキシミド Cycloheximide (和光純薬)を、抗細菌剤としてフラスキン Furaskin (日本薬局方 Nitrofurazon, 上野製薬)を、それぞれ20mcg/mlになるように培地に加える。 9. 27℃, 1週間培養。

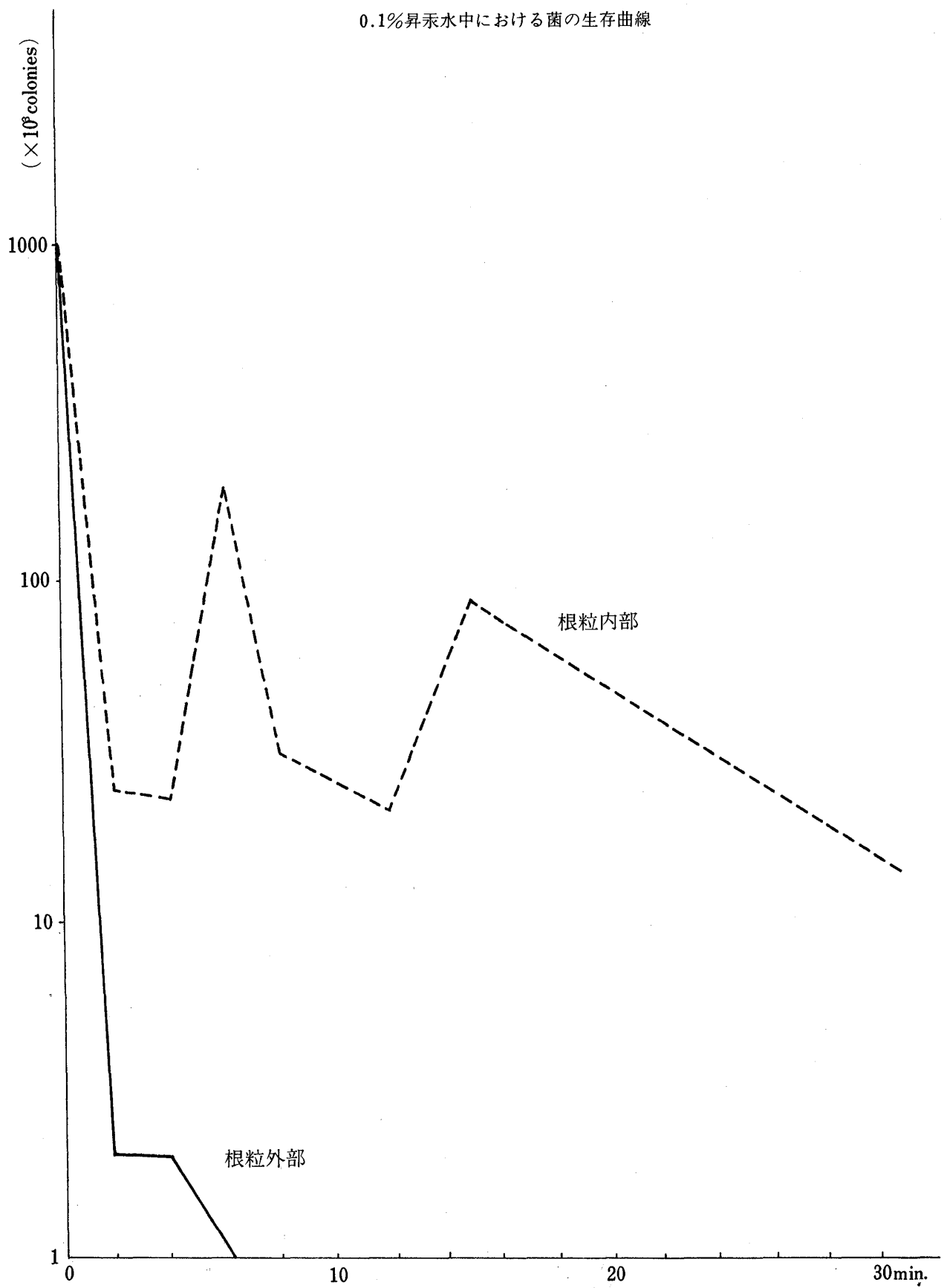
(ハ) 根粒の皮部を材料とする場合は(ロ)法の(3), (4), (5)を省略して進行すればよい。

(ニ) 土壤から放線菌を分離する方法で、これによって得られた放線菌が寄主植物の根粒から得られた菌と同一であるか否か、即ち根粒形成菌が土壤に由来するものかを確定するために行われる。 1. 土壤1gを100mlの滅菌生理的食塩水と共に三角フラスコにいれる。(× 10^2 希釈) 2. 土壤細分化のために振盪器で20分処理。 3. 静置したのち、上澄液1mlを滅菌生理的食塩水9ml中にくわえる。(× 10^3 希釈) 4. 同様にしてつくられた× 10^4 , × 10^5 , × 10^6 希釈液を1mlずつペトリ皿にとり、前記の抗真菌剤及び抗細菌剤を加えた培地を注ぐ。 5. 27℃で1週間培養。

根粒皮部を剥ぎとり内部のみを材料とする所謂(ロ)法を実施するとき、皮部表面の菌が内部菌として分離される可能性も生ずるから、内部材料のみを更に殺菌処理し完全さを期待した。材料の殺菌には一般には0.1%昇汞水が使用されるが、その処理時間は明確でない場合が多い。皮部と内部を別々に0.1%昇汞水で処理し、平面分離培養法を行い発生した菌の集落をかぞえたところ次の様な生存曲線が得られた。即ち根粒外部に付着する菌は殺菌処理6分で死滅するが、内部に由来する菌は可成りの殺菌時間に耐えることが出来る。なお曲線中根粒内部よりの菌数が6分、15分のところに多く生存しているが、これは根粒の個体差によるものと考えられる。以上の結果から昇汞水による殺菌処理時間を5～6分とすれば、内部菌のみを取り出すことが可能であることが判明した。

分離用培地として次の6種類がつかわれた。

- I. Casein starch agar
- II. Glucose asparagine agar
- III. Czapek's Dox agar
- IV. Glucose starch agar
- V. Yeast starch agar
- VI. Oat meal agar



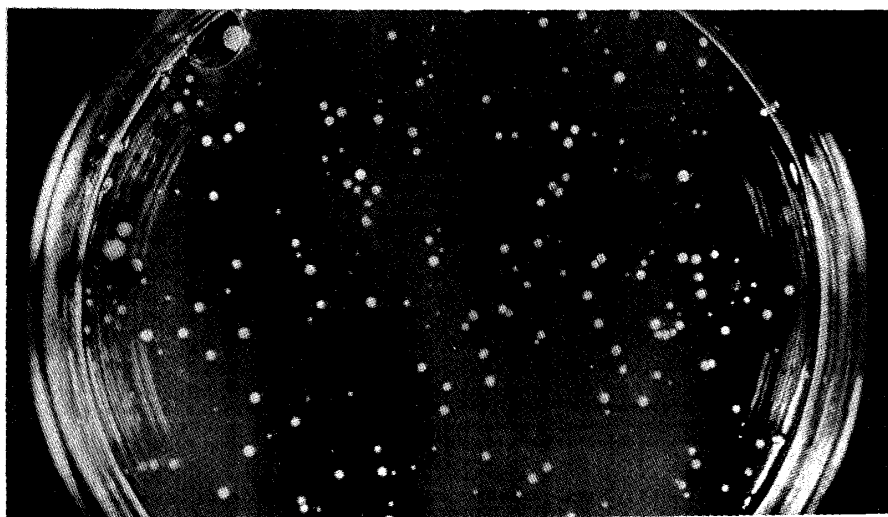
分離結果と考察

分離の結果は下表の示すとおりである。

	ナワシログミ (内部)	ツルグミ (内部外部)	マルバグミ (内部外部)	マルバグミ (内部外部)	マルバグミ (内部外部)	マルバグミ (内部)	マルバグミ周囲の土壌4材料①②③④
分離実施日	49. 6. 11	49. 10. 7	49. 10. 28	49. 11. 11	49. 11. 29	49. 12. 16	49. 8. 13
分離培地	III	I, VI, V	IV, V	V	VI, V	VI, V	I, II, VI
分離方法	(イ)	(ロ), (ハ)	(ロ), (ハ)	(ロ), (ハ)	(ロ), (ハ)	(ロ), (ハ)	(ニ)
結 果	細菌, カビにより汚染される。 放線菌は3集落のみ。	放線菌 内部 15種類 外部 20	放線菌 内部 1種類 外部 1	放線菌 内部 3種類 外部 2	放線菌 内部 3種類 外部 1	放線菌 内部 1種類	放線菌 ① 12種類 ② 13 ③ 16 ④ 22
備 考	汚染がはなはだしい。 分離には不適である。	皮部をとりさり、その後の表面殺菌を省略した。内部菌として外部菌の出た可能性が大きい。			根粒は少量の水を加え4℃で保存したものを供試。 分離実施は採集日より9日後。		土壌採取後5日、分離実施。

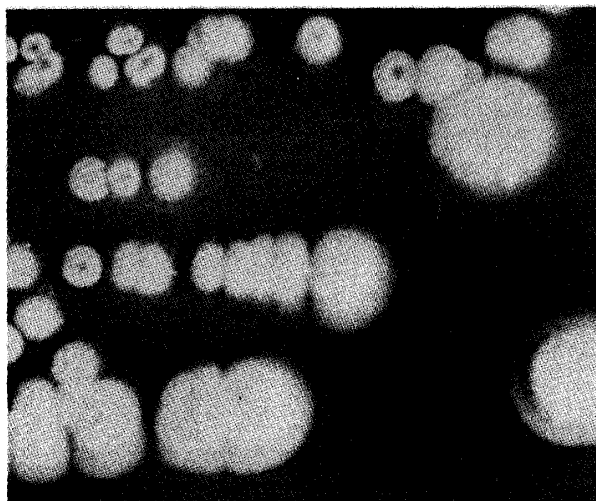
特記のほかは採集日の翌日に分離を施行。

根粒の内部及び外部材料から、いずれも1～3種の放線菌が分離された。外部からの分離は殺菌処理を施さないで培養が行われるから、雑菌による汚染が甚しく放線菌の得られない場合が多い。これに反して10月28日のマルバグミの根粒内部を材料とした分離実験では、培地上に同種とおもわれる放線菌の集落が多数に出現している。

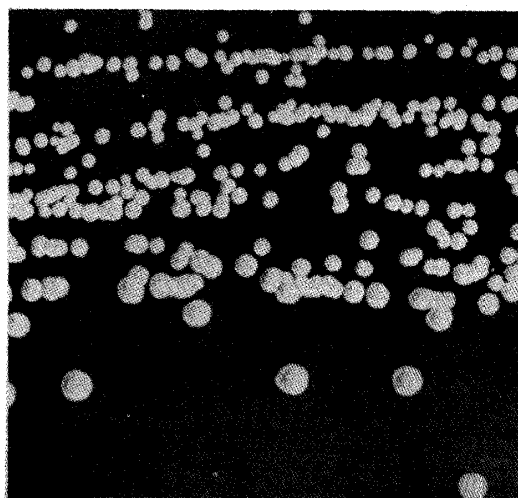


培地：Yeast starch agar

根粒付近の土壌、根粒の皮部、根粒の内部から共通する放線菌がえられれば、根粒内生菌は本来土壌中に生存している放線菌が根に侵入して根粒形成をおこす内生菌となる、と考えることは妥当であろう。又土壌放線菌は土地、場所によって異なるから、異なった場所から採集したマルバグミに共通する放線菌、或は異った種のグミ間に共通する放線菌が得られれば、グミ属は根粒内生菌として共通の放線菌をもつ可能性が極めて強いことになる。この様な理論的推理にたって分離培地に生じた共通の放線菌を求めると、2株即ちNo. AとNo. Bが得られた。



No. Aの集落 培地：Yeast starch agar



No. Bの集落 培地：Glucose asparagine agar

菌 の 同 定

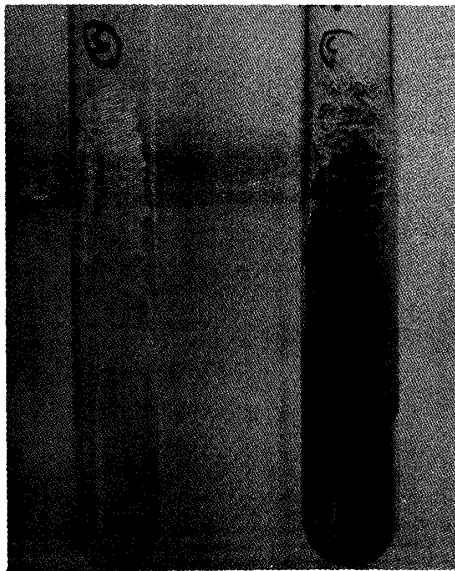
No. A株はナワシログミ内部、ツルグミ内部・皮部・土壌4試料に共通する種で、青紫色の気菌糸をもつ放線菌であり、No. B株はツルグミの内部・皮部・マルバグミの内部・皮部（ $\frac{1}{29}$ 実施の皮部よりの分離をのぞく）・土壌2試料に共通する白色の気菌糸をもつ種である。特にNo. B株は前記ペトリ皿培地上に集落として示されたごとく、極めて分離が良好であり主要な内生菌としての可能性が強いと考えられる。

同定用培地としては前記分離の際に用いられたもの以外に次のものが用いられた。

1. Glycerol asparagine agar
2. Tyrosine agar (Shinobu)
3. Inorganic salts starch agar
4. Nitrate reduction medium
5. Gelatine medium
6. Litmus milk
7. Cellulose medium
8. Nutrient medium
9. Enriched nutrient agar (1% glucose nutrient agar)
10. Yeast extract-malt extract agar

(a) 生理学的性質

No.Aはチロジナーゼ反応陽性でクロモジェニック型に属し、No.Bはチロジナーゼ反応陰性で非クロモジェニック型に属する。その他の生理学的性質については表に示されたとおりである。



チロジナーゼ反応
右：No.A株
左：No.B株
A株は陽性を示している。
培地：Tyrosine agar

検 査 項 目	被 験 菌	
	A	B
硝酸塩の還元	+	+
ゼラチンの溶解 (18℃, 2週間培養)	—	—
リトマスミルク		
凝 固	+	+
ペプトン化	+	+
PH変化	7.0	8.0
セルロースの分解 (27℃, 2週間培養)	—	—

(b) 糖の利用能

negative controlとして炭素源を全く加えないもの、positive controlとしてD-glucoseを使用した。糖は高压蒸気釜で121℃, 10min.滅菌後、滅菌生理的食塩水で10%溶液とし、さらにPridham培地を加えて最終濃度1%溶液となるようにする。8種の糖の利用能は次の表のとおりである。

糖の利用能					
各 糖	被 験 菌		各 糖	被 験 菌	
	A	B		A	B
D-glucose	2+	2+	D-fructose	2+	2+
raffinose	2+	±	i-inositol	±	—
sucrose	+	2+	L-rhamnose	—	—
L-arabinose	2+	2+	D-xylose	±	—

2+：利用度大
+： " 普通
±： " 疑
—： " なし

Pridham 培地

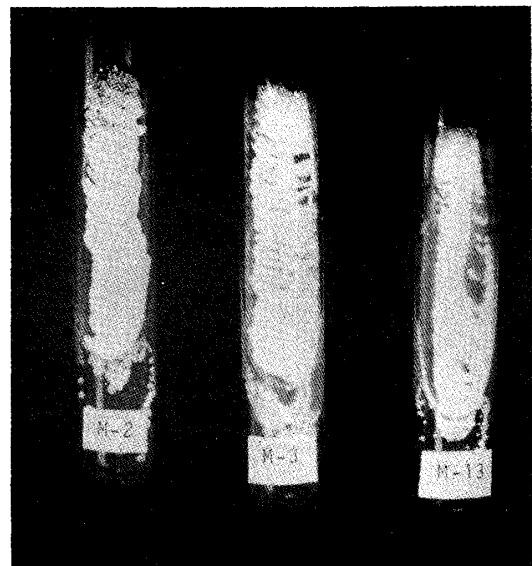
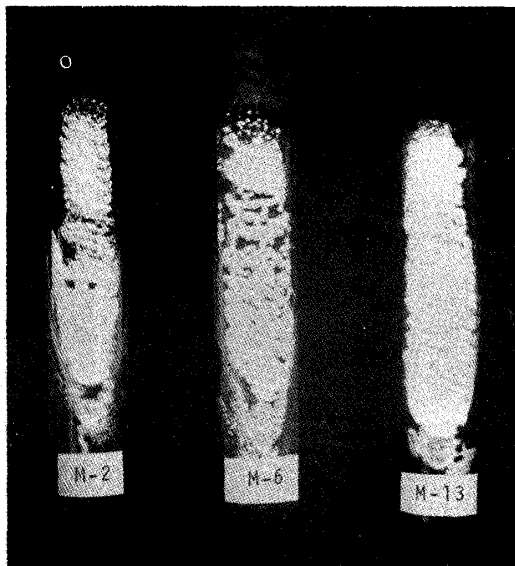
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64 g
KH ₂ PO ₄ anhydrous	2.38
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.00
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	5.65
Agar	20.0
H ₂ O	1000ml

以上の培地に次の組成液 1 ml を加える。

CuSO ₄ ·5H ₂ O	6.4 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7.9
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
H ₂ O	100ml

(c) 培養性状

各培地におけるNo.A 及びNo.B 株の培養性状は次表に示される。No.A は培地に青紫色の気菌糸を形成することから Violet color series に属するものと思われ、No.B は培地に白色の気菌糸を形成するから White ないし Yellow color series で、培地は淡黄色から淡褐色に着色する。



No.A 株の培養性状

培地：M-2：Glucose asparagine agar
 M-6：Inorganic salts starch agar
 M-13：Yeast extract-malt extract agar

No.B 株の培養性状

培地：M-2：Glucose asparagine agar
 M-3：Glycerol asparagine agar
 M-13：Yeast extract-malt extract agar

培 養 性 状

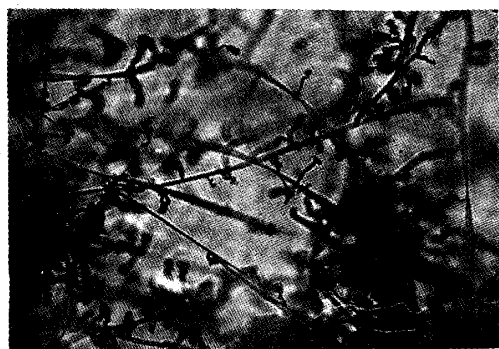
培 地		A	B
Sucrose nitrate agar	A M	中程度, 粉状, 白色ないし黄白色	豊富, 粉状, 白色ないし黄白色
	V M	生育良, オリーブ色	生育良, 無色ないし淡黄色
	D P	なし	なし
Glucose asparagine agar	A M	中程度, 粉状, 青紫色	中程度, 粉状, 白色ないし黄白色
	V M	生育良, 白色ないし淡黄色	生育良, 淡赤褐色
	D P	なし	淡赤褐色

培 地		A	B
Glycerol asparagine agar	AM VM DP	豊富, 粉状, 白色ないし黄白色 生育良, 白色ないし淡黄色 無色ないし淡黄色	豊富, 粉状, 白色ないし灰白色 生育良, 淡黄色ないし淡赤褐色 淡赤褐色
Inorganic salts starch agar	AM VM DP	豊富, 綿毛状, 青紫色 生育良, 無色ないし淡黄色 わずかに淡黄色	なし 痕跡程度に生育 なし
Nutrient agar	AM VM DP	なし 中程度, 表面光沢あるコロニー, 茶褐色 黒褐色	中程度, 粉状, 白色ないし淡黄白色 生育良, 淡黄色 なし
Enriched nutrient agar	AM VM DP	中程度, 綿毛状, 白色ないし灰白色 生育良, 淡褐色ないし黒褐色 褐色	豊富, 粉状, 白色ないし淡黄白色 生育良, 淡黄褐色 淡黄褐色
Oat meal agar	AM VM DP	中程度, 綿毛状, 淡青紫色 無色ないし淡白黄色 なし	ほとんど着生せず, 粉状, 白色 生育不良, 白色 なし
Yeast extract-malt extract agar	AM VM PP	豊富, 綿毛状, 淡青紫色ないし青紫色 生育良, 淡黒褐色 淡褐色	豊富, 粉状, 白色ないし淡黄白色 生育良, 淡黄色ないし淡茶褐色 なし

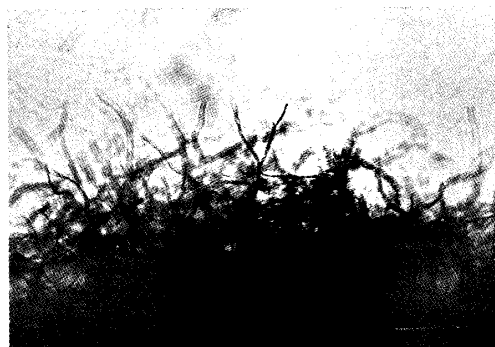
AM: 気菌糸
VM: 栄養菌糸
DP: 可溶性色素

(d) 気菌糸の形態

顕微鏡観察によればNo.Aの気菌糸はらせん状であるが, No.Bのそれは殆んど直線にのびる。(RFである)



No.Aの気菌糸



No.Bの気菌糸

以上の諸形状や性質からNo.A株を

Streptomyces violascens (Préobrazhenskaya and Sveshnikova) Pridham et al. 1958, 68, ISP 5183

と同定した。No.B株については特徴的な性質をかくすため同定困難であり, このため Streptomyces sp. とし目下検討中である。

考察と結論

グミの根粒内から *Streptomyces* に属する放線菌 2 種が分離されたが、果して該菌が根粒形成の原因となるか否かは宿主植物への接種試験により確かめねばならない。ハンノキ属では接種が試みられたという報告があるが成功していない。又根粒形成には放線菌以外に、さらに未知の内生菌が同時に関与するのではないかと報告もある。本実験の結果として、地理的に異った場所から採集され同種のグミの根粒及び異種のグミの根粒から、同種の放線菌が分離されたことで、少くとも放線菌が根粒内生菌である可能性は示唆されたことになる。なおグミの根の周囲の土壌からも同種の放線菌が容易に分離されることから、根粒内生菌は土壌に由来するものと断定できよう。

抗菌活性

一般に放線菌は抗生物質を生産する可能性をもっている。このため No.A 及び B 株の培養濾液と菌体抽出液の両者について抗菌活性が調べられた。培養濾液は Glucose starch bouillon で 27℃、3 日間振盪培養ののち菌体をとりのぞいたもの、菌体抽出液は同量のメタノールで抽出されたものである。検定はペーパーディスク法で行われた。下表のような被験菌の 4 種についての検定の結果、No.A 株の培養濾液のみが *Bacillus subtilis* に対して抗菌作用のあることが認められた。(No.B 菌体は極めて少量のため抽出液検定から除外した)

被 験 菌	No.A		No.B
	菌体抽出液	濾 液	濾 液
<i>Escherichia coli</i> F ₁ 3002	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	—	+	—
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 4013	—	—	—
<i>Candida stellatoidea</i> IFM 4024	—	—	—

根粒の組織観察

根粒を改修ナワシン液 No.1 で固定し、パラフィン切片法をおこない、Heidenhein's haematoxylin で染色すると皮層部に多くの泡状体が観察される。この根粒組織内の泡状体については、現在では根粒内生菌の退行形 (Involution form) であるとみなされている。植村 (1961) はハンノキ属の根粒から分離した放線菌株が、酒石酸グリセリン寒天培地で培養されると、菌糸の先端に退行形と思われる球状膨大物がつくられ、これは形態及び染色性からも極めて泡状体に類似しているという。しかしこの点については未だ明らかでない事が多い。

摘 要

本実験はグミ属植物の根粒から内生菌としての放線菌を分離し、これと該植物の根付近の土壌から分離された放線菌との関係を究明しようとしたものである。

1. 分離のさい、抗真菌剤としてシクロヘキシミド、抗細菌剤としてニトロフラゾン (薬品名フラスキン) を加えた培地を使用し、平板塗沫により成功に導いた。

2. 根粒の表面殺菌には 0.1% 昇汞水で 5~6 分処理することが最適であり、材料は懸濁し

て希釈する必要がある。

3. 根粒の内部・皮部及び根付近の土壌から分離された放線菌のうち、各々に共通するものとして2種がえられた。形態及び生理学的性状から1種は Streptomyces violascens (Preobrazhenskaya and Sveshnikova) Pridham et al. と同定され、他の1種は目下検討中のため Streptomyces sp. とした。(決定的特性をかくためである。) 後者は分離に際して出現度が大であり根粒内生菌としての可能性が強大である。

4. 根粒形成の放線菌は少くとも根周囲の土壌中に起源をもつものと推考される。

5. Streptomyces violascens の培養濾液は Bacillus subtilis に対してわづかながらの抗菌活性をもつ。

本研究にさいし実験設備の使用を心よくお許しください御便宜を賜りました千葉大学生物活性研究所抗性物質研究部新井正教授にお礼申しあげ、同研究部三上囊先生から絶大の御指導を得ましたことに深く感謝いたします。

文 献

- 1) Becking, J. H. : Frankiaceae fam. nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus Frankia Brunchorst 1886, 174.
International Journal of Systematic Bacteriology, 20: 201-220 (1970)
- 2) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th Ed. (1957), 8th Ed. (1974)
- 3) 升本修三: 本邦産土壌放射菌の分類学的研究 第一報, 分類上重要な形質に関する実験及び考察。広島文理大理紀 (植物), 5: 97-128 (1943)
- 4) 岡田要之助: 土壌微生物学概論, 養賢堂, (1949)
- 5) Roberg, M. : Über den Erreger der Wurzelknöllchen von Alnus und den Elaeagnaceen Elaeagnus und Hippophaë. Jarb. Wiss. Bot., 79: 472-492 (1934a)
- 6) Shinobu, R. : Physiological and Cultural Study for the Identification of Soil Actinomycetes Species. Memo. Osaka Univ. Liberal arts and Education. Nat. Sci. No. 7 (1958)
- 7) ———— : Studies on Fixation of Free Nitrogen by Actinomycetes. Memo. Osaka Univ. Liberal arts and Education Nat. Sci. No. 2 (1953)
- 8) Shirling E. B. and Gottlieb D. : Methods for Characterization of Streptomyces species. International Jour. Syst. Bact. 16: 313-340 (1966)
- 9) ———— : Cooperative Description of the Type Culture of Streptomyces. II. Species description from first Study. International Jour. Syst. Bot. 18: 69-189 (1968)
- 10) ———— : ————. III. Additional species description from first and second studies. 18: 279-392 (1968)
- 11) ———— : ————. IV. Species description from the second, third and forth studies. 19: 39-512 (1969)
- 12) ———— : Cooperative Description of Type Strains of Streptomyces. V. Additional description 22: 265-394 (1972)
- 13) 植村誠次: ハンノキ属に関する研究, 第4報, ハンノキ属根粒より放射状菌 (Actinomycetes) の分離に関する試験。林試研報, 52: 1-18 (1952C)
- 14) ———— : ハンノキ属に関する研究, 第5報, ハンノキ属根粒より Streptomyces の分離に関する2, 3の新方法について。林試研報, 57: 209-226 (1952d)

- 15) ————：ハンノキ属の根粒から分離された放射状菌に関する研究・ハンノキ属およびその他2,3の非マメ科植物（ヤマモモ，アキグミ，モクマオウ）の根粒から主として分離される放射状菌（Streptomyces）の形態学的，生理学的諸性質について。ハンノキ属の根瘤に関する研究。第6報，農林水産技術会議事務局，研究成果，7：1—90（1961）
- 16) 遠藤保太郎，高瀬毅一：グミの根粒に就て。蚕糸学雑誌，4：114—134（1932）
- 17) Waksman, S.A. : The ACTINOMYCETES （1950）
- 18) ————：The ACTINOMYCETES. A summary of current knowledge （1967）
- 19) ————：Cultural studies of species of Actinomyces. Soil Sci., 8：71—215（1919）
- 20) Waksman S.A. and Curtis R.E. : The Actinomyces of the Soil. Soil Sci., 1：99—134（1916）