

## 11. イネに共生する窒素固定エンドファイトの新規グループ

[要約] 圃場で栽培したイネから *nifH* 遺伝子を培養を介さずに検出すると、既分離の窒素固定細菌の *nifH* 遺伝子との相同性が低い配列が多数見つかリ、これらは独立した一つのクラスターを形成する。RT-PCR でこのクラスターの割合が高いことから、新規グループの窒素固定エンドファイトがイネでは重要な役割を担っていることが示唆される。

所属	国際農林水産業研究センター・畜産草地部			連絡先	029(838)6356		
推進会議名	国際農林水産業	専門	農業微生物	対象	イネ	分類	研究

### [背景・ねらい]

イネ科植物では植物体内に窒素固定細菌が共生的に生息していることが多数報告されていることから、これまでに各種イネ科牧野草から窒素固定能を有する *Azospirillum* 属、*Klebsiella* 属、*Herbaspirillum* 属等の細菌を多数分離し、その系統解析や接種試験を行ってきた。しかし、これまでの培養法では、培養困難な窒素固定細菌が分離されない可能性が高い。すなわち、感染している窒素固定エンドファイトの一部についてのみの情報しか得ていないことが予想される。そこで、イネをモデル植物として培養を介さない分子生態学的手法を用いて解析し、共生する窒素固定エンドファイトの全体像を明らかにする。

### [成果の概要・特徴]

- ほ場で栽培したイネの根と地際茎から DNA と RNA を抽出して、*nifH* 遺伝子をターゲットとして PCR あるいは RT-PCR を行い、それらの産物を大腸菌にクローニングしたのち、挿入断片の塩基配列を決定する。さらに、これらの塩基配列から推定される *nifH* タンパク質のアミノ酸配列をもとに系統樹を作成する。
- 品種「スプライス」と「Tetep」の根および茎から抽出した RNA を増幅対象とする RT-PCR により得られた塩基配列から推定される *nifH* タンパク質のアミノ酸配列の多くは、既分離の窒素固定細菌の *nifH* タンパク質との相同性が低く、独立した一つのクラスターを形成する (図 1、クラスター X)。両品種とも、根と茎を比べると茎のほうが新規クラスターに位置する配列の割合が高い (図 2)。
- DNA を増幅対象とする PCR の結果でも、割合は低いものの新規クラスターに位置するアミノ酸配列がみられる (図 2)。しかし、培養法でよく分離される *Klebsiella* 属 (クラスター A)、*Azospirillum* 属や *Herbaspirillum* 属 (クラスター B)、*Paenibacillus* 属 (クラスター C) 等が属するクラスターの配列の検出頻度は、培養法で得られる場合に比べ低い。
- 以上の結果は、本グループの窒素固定細菌がイネの窒素固定エンドファイトの重要な構成要素であることを示唆している。

### [成果の活用面・留意点]

- 新規グループの窒素固定エンドファイトは、培養によらない方法によりその存在が示唆されたが、その実体は不明のままであるので、イネから菌の分離を行いその細菌学的性状を明らかにするとともに、接種試験を行い宿主との親和性を明らかにする必要がある。
- 品種・系統別、生育ステージ別、施肥条件別等の解析をさらに解析数を増やすとともに、量的解析を行い、新規グループの窒素固定エンドファイトの動態を明らかにする必要がある。

### [具体的データ]

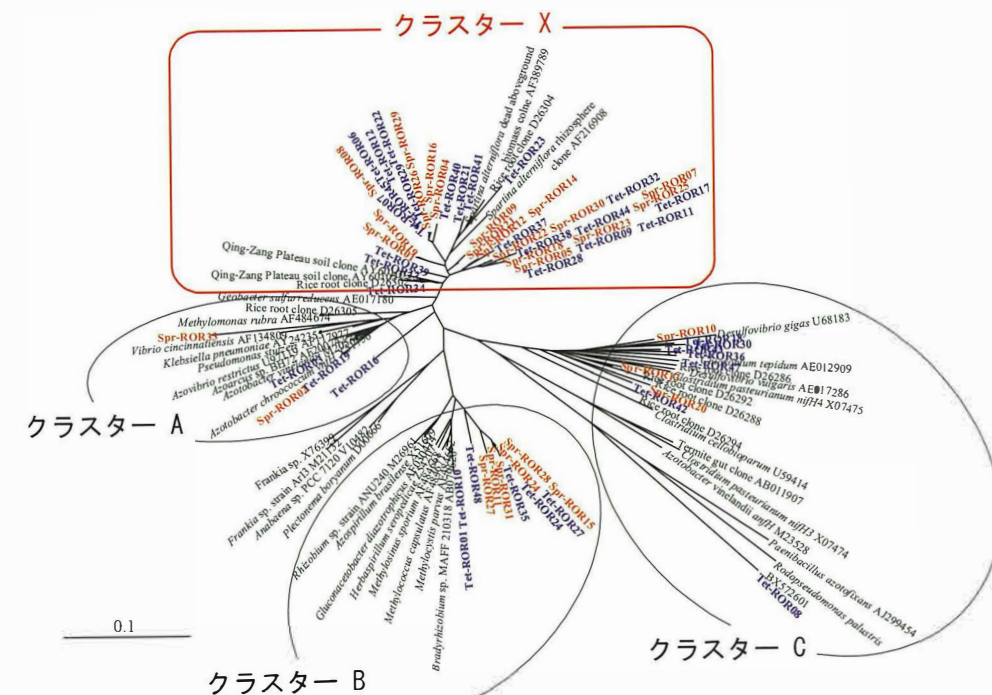


図 1 イネ品種「スプライス」と「Tetep」(出穂期)の根の RNA より増幅した RT-PCR 産物の塩基配列から推定される *nifH* タンパク質のアミノ酸配列の無根系統樹 (NJ 法) Spr-RORxx、「スプライス」由来; Tet-RORxx、「Tetep」由来

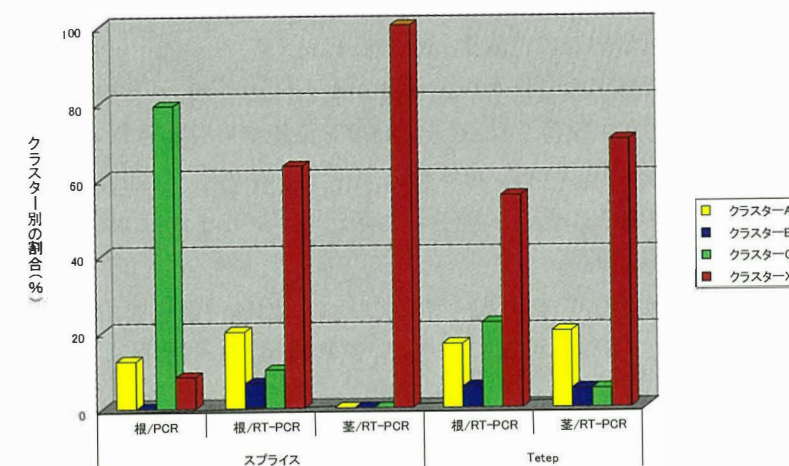


図 2 イネ品種「スプライス」と「Tetep」(出穂期)の根と茎から抽出した DNA および RNA を用いて増幅した PCR と RT-PCR の各産物の塩基配列から推定される *nifH* タンパク質のアミノ酸配列の分子系統解析の結果から得られた各クラスター (図 1 参照) ごとのクローンの分布割合

### [その他]

研究課題: 有用植物体内細菌の特性評価

予算区分: 基盤研究、つくば招へい

研究期間: 2004 年度 (2003 ~ 2005 年度)

研究担当者: 安藤康雄、Adel Elbeltagy (Faculty of Agriculture, Minufiya University)

発表論文等:

Adel Elbeltagy and Yasuo Ando (2005): Phylogenetic analysis of *nifH* gene sequences from nitrogen-fixing endophytic bacteria associated with the roots of three rice varieties. Journal of Food, Agriculture and Environment, 3, 237-242.