

酸性硫酸塩土壌におけるイネ科パイオニア植物ススキの内生細菌由来 *nifH* mRNA の多様性: 土壌理化学性および菌根共生の影響

生命分子化学講座 根圏制御学分野
荒川 竜太

【背景および目的】 荒廃地に最初に侵入・定着するパイオニア植物はアーバスキュラー菌根 (AM) 菌やマメ科根粒菌などの根圏微生物と共生することで、貧栄養や強酸性などの厳しい環境に適応する戦略を有していることが示唆されている。最近、代表的なイネ科パイオニア植物であるススキにおいては、内生の窒素固定細菌が窒素獲得に貢献している可能性が指摘されている。一般に、生物的窒素固定反応には多量のリン酸が必要であり、窒素固定活性はしばしば環境中のリン酸量に律速されることから、パイオニア植物の内生細菌の窒素固定活性は、土壌理化学性もしくは菌根共生によるリン酸供給に律速されるとの仮説が成り立つ。本研究では、酸性硫酸塩土壌をモデルフィールドに i) 土壌理化学性および ii) AM 共生がパイオニア植物内生窒素固定細菌の種構成および窒素固定活性に及ぼす影響を明らかにするために、ニトロゲナーゼレダクターゼ遺伝子 (*nifH*) の mRNA の塩基配列に基づく群集構造解析を行うと共に、分類群単位で *nifH* 遺伝子の発現量を定量するための方法について検討を行った。

【材料と方法】 土壌理化学性の影響: 愛知県幡豆町および沖縄県名護市に露出した酸性硫酸塩土壌に自生するススキ 15 個体の根圏から土壌を採取し、約 2 か月間ススキ実生を栽培した。地下部を表面殺菌後、直ちに液体窒素により凍結し、 -80°C で保存した。これらの根から抽出した RNA を鋳型に cDNA を合成し、*nifH* 遺伝子約 370 bp を、nested PCR により増幅した。増幅に成功したサンプルごとにクローンライブラリーを作成し、それぞれからランダムに選んだ約 20 クローン (幡豆: 124 クローン、名護: 153 クローン) の塩基配列を決定した。データベース上の既知生物の塩基配列との比較により分類単位を規定し、正準相関分析 (CCA) により各分類群の出現と相関のある環境因子の特定を行った。

AM 共生の影響: 名護市より採取したススキ 14 個体の根圏土壌を等量ずつ混合した土壌 (+AM 菌区)、滅菌した土壌に滅菌前の土壌のろ液を添加した区および滅菌土壌に 5% (v/v) の非滅菌土壌を混合した区 (以上、対照区) において約 2 か月間ススキ実生を栽培した (3 反復)。根から RNA を調整後、同様の方法で塩基配列を決定し (60 クローン/試験区)、群集構造解析を行った。

【結果と考察】 *Metylocapsa* 属、*Azospira* 属および *Paenibacillus* 属に近縁な分類群は低 pH かつ窒素含量の多い土壌に棲息するススキで検出される頻度が有意に高く、*Bradyrhizobium* 属および嫌気性菌に近縁な分類群は高 pH かつ窒素含量の少ない土壌のススキからの検出頻度が高かった。また、*Burkholderia* 属に近縁な分類群は AM 共生したススキから特異的に検出された。これらのことから、土壌理化学性および AM 菌はパイオニア植物内生窒素固定細菌の群集構造に重要な影響を及ぼすことが示唆された。