

## GUS代謝産物のフェノール抽出による 土壌中の *gus* 導入根粒菌数の推定

皆川律子\*・磯田香保理\*・大竹憲邦\*・山田真也\*  
五十嵐太郎\*・南沢 究\*\*・大山卓爾\*

キーワード    ダイズ根粒菌, GUS 活性, 接種効果, 根粒形成, 土着根粒菌

### 1. はじめに

マメ科植物は根から吸収する化合態窒素だけではなく、土壌中に生息する根粒菌と共生して根に根粒を形成し空中窒素をも固定利用できる。ダイズなどのマメ科作物では優良根粒菌の接種により窒素固定を促進させる目的で多くの接種試験が行われてきたが、すでに土着菌が生息する土壌では接種菌による根粒形成が極めて少ない事例が多い<sup>1,3,8)</sup>。圃場において接種菌による根粒形成率が低い理由の理解はいまだに不十分であるが、接種菌の土壌中での増殖、移動、生残性さらには土着菌との競合などが接種根粒菌の根粒形成率に影響を及ぼすと考えられている。したがって、接種菌による接種効果を向上させるためには、土壌中の接種菌の挙動を知ることが重要である。

接種菌と土着菌の識別には、従来、抗生物質耐性マーカー<sup>5,14)</sup>や血清型 (enzyme-linked immunosorbent assay 等)<sup>4,10)</sup>を用いて、根粒から根粒菌を単離培養して識別する方法が一般的であった。しかし、これらの方法では、煩雑な根粒菌の分離操作や長時間の培養が必要とされ、多数の土壌試料の接種菌数を測定することは困難であり、かつ土着菌と接種菌の識別が必ずしも明確ではなかった。

最近、新しいマーカーとして大腸菌由来の  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子 (*gusA*) を導入した根粒菌が作製され、GUS 活性によって標識根粒菌を土着菌と識別することが可能になった<sup>15-17)</sup>。*gus* 導入根粒菌は基質である 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronide (X-Gluc) を与えると、これを菌体内に取り込み、GUS の酵素作用によりグルクロン酸とインドキシル部位に加

水分解する。二分子のインドキシル部位が酸化重合し、青色のインジゴ色素 (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-3,3'-bis-indigo) の沈殿を集積する<sup>15)</sup>。一般に、植物や土壌微生物は GUS 活性をほとんど持たず、接種菌による根粒形成を判定するときに非常に優れたマーカーである。我々は、*gus* 導入根粒菌が集積した青色色素をフェノールで抽出後比色定量し、土壌中の接種根粒菌数の推定を試みた。

### 2. 材料および方法

#### 1) 供試菌株

本研究では、テネシー大学の GRESSHOFF 博士より分譲された *gus* 導入ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum* 61 A 124 a 株) を供試した。本菌株は、*gus* カセット (カナマイシン耐性遺伝子のプロモーター *Paph*, 大腸菌由来の *gusA* 構造遺伝子, ターミネーター *rrnB*) を Tn5 中に挿み込んだベクター pKW 107 を、接合により宿主大腸菌からダイズ根粒菌に導入した株であり、Tn5 内に挿まれた *gus* カセットが根粒菌の染色体遺伝子に組み込まれている。また、61 A 124 a は Tn5 に由来するカナマイシン、スペクチノマイシン耐性を有する<sup>15-17)</sup>。この菌株は、GUS 活性を単生・共生にかかわらず常時発現しており、わが国においても本株を利用した感染経路の追跡に関する報告がある<sup>11)</sup>。

培養菌を用いた実験では、酵母エキス・マンニトール液体培地 (カナマイシン硫酸塩 100 mg L<sup>-1</sup>, スペクチノマイシン 50 mg L<sup>-1</sup> を含む) で 5~10 日間振盪培養した根粒菌を滅菌水で一度洗った後、抗生物質 (カナマイシン硫酸塩 100 mg L<sup>-1</sup>, スペクチノマイシン 50 mg L<sup>-1</sup>, シクロヘキシミド 500 mg L<sup>-1</sup>) を含む滅菌水に懸濁して GUS 検定に用いた。なお、あらかじめ希釈平板法によりプレート上のコロニー形成数と濁度の関係を求めておき、以後、同様に培養調製した根粒菌密度は濁度から求めた。

\* 新潟大学農学部 (950-21 新潟市五十嵐 2-8050)

\*\* 東北大学遺伝生態研究センター (980-77 仙台市青葉区片平 2-1-1)

1996年2月16日受付・1996年5月29日受理

日本土壌肥料学雑誌 第68巻 第2号 p. 148~155(1997)

## 2) 試薬および GUS 反応

GUS 反応の基質である 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronide cyclohexylammonium salt (X-Gluc 和光純薬, 生化学用) は *N,N*-ジメチルホルムアミドの 1% 溶液あるいは, 2% 溶液として  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。根粒組織の GUS 活性染色には 2% 溶液を, 根粒菌や土壌懸濁液の GUS 反応には 1% 溶液を使用した。

根粒切片の GUS 活性の測定では, 2% X-Gluc *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液  $100\ \mu\text{L}$  と 10% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液  $40\ \mu\text{L}$  を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 20 mL に添加した溶液を測定時に調合した<sup>12)</sup>。

根粒の GUS 活性測定方法は次のとおり行った。

① 採取した根粒を氷冷しながら切断する。直径が約 4 mm 以上の大きな根粒では, 互いに垂直な三方向から 1/8 に切断し, それ以下の小さな根粒では半分に切断する。

② 根粒の切片を 96 穴マイクロプレートウェルに入れ, 上記の基質溶液を  $100\ \mu\text{L}$  加える。

③ マイクロプレートに蓋をし, 周囲をパラフィルムで巻いて密封し,  $30^{\circ}\text{C}$  暗所で 1~2 晩静置する。

④ GUS 活性有無の判定を行う。GUS 活性陽性では, 感染域が青色に染まる。

根粒菌懸濁液の GUS 活性の測定操作は以下のように行った。

① 上記の抗生物質を含む滅菌水に懸濁した根粒菌 ( $10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) を綿栓付き試験管に 1 mL 入れ, 1% X-Gluc *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液  $20\ \mu\text{L}$  を加える。

②  $30^{\circ}\text{C}$  暗所で 4 日間静置する。

③ 液体フェノール (湯浴で溶解した特級フェノール 500 g に 47 mL の水を加え混合する。  $30^{\circ}\text{C}$  で液体として保存可能) を 2 mL 加える。

④ 振盪器で 1 時間攪拌後, 2 層に分離するまで暗所に静置する。通常 1 晩放置する。

⑤ 下層 (フェノール層) をピペットで分取し, 波長

645 nm における吸光度を測定する。なお, 室温が低いとフェノールが白濁するのでその際は  $25^{\circ}\text{C}$  前後に加温する。

土壌中に生存する接種菌の GUS 反応は, 上記①のかわりに, 土壌 0.1 g に対し, 抗生物質を含む滅菌水 1 mL と 1% X-Gluc *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液  $20\ \mu\text{L}$  を加えて良く攪拌し, ②以下の操作は根粒菌懸濁液と同様に行った。なお, 土壌が含まれる場合には, GUS 代謝産物の集積が抑制されることが認められたため, 土壌中の菌数の推定には, *gus* 導入菌を接種していない土壌 0.1 g に, 根粒菌密度が  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$   $\text{mL}^{-1}$  となるように希釈した根粒菌懸濁液をおのおの 1 mL 添加して作成した菌数と吸光度の検量線から求めた。

## 3) 根箱に局部接種した *gus* 根粒菌の挙動

供試土壌は新潟県長岡市長倉土壌 (沖積土), 同中沢土壌 (火山灰土), 新潟市曾野木土壌 (沖積土), 同五十嵐土壌 (砂質土壌) およびパーミキュライトの 5 種類を用いた。土壌は風乾後 2 mm のふるいを通した。土壌の諸性質を第 1 表に示す。土性はピペット法<sup>2)</sup>, pH ( $\text{H}_2\text{O}$ ) はガラス電極法, CEC は PEECH 法<sup>7)</sup>, 全窒素はセミ・マイクロケルダール法, 有効態窒素は, 土壌を樋口法<sup>6)</sup> で抽出した後インドフェノール法でアンモニアを比色定量した<sup>13)</sup>。

各土壌の土着菌数を most probable number 法 (MPN 法) で求めたところ, 長倉土壌が  $5.8 \times 10^5$ , 中沢土壌が  $3.1 \times 10^5$ , 曾野木土壌が  $1.7 \times 10^4$ , 五十嵐土壌が  $8$  cells  $\text{g}^{-1}$  であった。なお, 長倉, 中沢土壌では, 転換畑でダイズの栽培が行われているが, 曾野木, 五十嵐では近年ダイズの栽培が行われていない。

根箱は, 縦, 横, 高さ,  $14 \times 3.5 \times 14$  cm のプラスチックケースに各種風乾土壌を高さ 9 cm まで詰め, 最大含水量の 50~60% の滅菌水を加えた。ダイズ (品種エンレイ) の種子を 70% エタノールと 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて表面殺菌して, 各ケースの中央深さ 2 cm の位置に 1 粒播種した。土壌の一方の隅に

第 1 表 土壌の諸性質

	土性	pH( $\text{H}_2\text{O}$ )	CEC (meq/100 g)	全窒素 (%)	有効態窒素 (mg/100 g)	有効態リン酸 (mg/100 g)
長倉土壌	loam	6.52	27.36	0.08	3.49	20.03
中沢土壌	light clay	6.50	34.86	0.23	6.34	32.67
曾野木土壌	clay loam	6.64	21.64	0.13	12.85	57.10
五十嵐土壌	loamy sand	6.75	4.60	0.03	2.04	7.28
パーミキュライト		6.78	64.73	0.00	0.56	2.10

*gus* 導入菌懸濁液 ( $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>) を 1 mL シリンジで注入した。播種時に総重量を測定しておき、以後給水するさいは重量減少分だけ滅菌水を補給した。なお、給水は、根粒菌の接種位置から行った。栽培は、光照射用恒温庫 (TAITEC LX-3000) 内で行った。栽培条件は、明期 25°C, 16 時間, 暗期 20°C, 8 時間に設定した。実験は各土壌 3 連で行った。播種 25 日後に根箱の土壌を根とともにナイフで縦横各 3 等分し、計 9 区画に分けた。各領域の土壌はダイズの根を回収したのち、全重量を測定してから攪拌均一化して、生土 0.1 g に含まれる接種根粒菌数をフェノール抽出法で測定した。各区画のダイズの根に着生した約 2 mm 径以上の根粒を回収して計数するとともに全ての根粒について GUS 検定を行った。

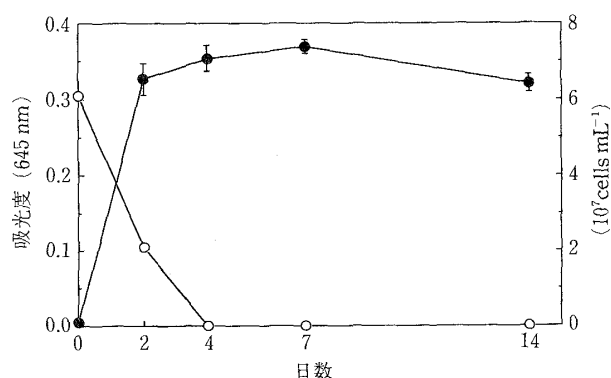
### 3. 結果および考察

#### 1) フェノール抽出法による *gus* 導入菌数の推定方法の検討

トランスポゾンによる *gus* カセットの挿入位置により、根粒形成に変異を起こしている恐れがあるため、61 A 124 a 株と標準的なダイズ根粒菌 USDA 110 株について根粒形成能力を比べた。液体培養した両株を等密度

第 2 表 61A124a 株と USDA110 株の等密度懸濁液 ( $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>) を混合接種した際の根粒形成率

	GUS 活性	
	GUS(+)	GUS(-)
根粒数 (%)	86	89
	49.14	50.86



第 1 図 GUS 反応開始後における GUS 代謝産物の吸光度と菌数の変化

●: フェノール抽出液の吸光度, ○: 希釈平板法で測定した反応液中の増殖可能な菌の数。

( $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>) に含むように調製し、各々 1 mL を混合してグロースポーチで栽培したダイズに接種した。根に形成した根粒の切片を GUS 染色により判定を行った結果、61 A 124 a 株による感染率が 49%、USDA 110 株による感染率が 51%であった (第 2 表)。したがって、*gus* 遺伝子の導入に伴う根粒形成能および競合力の大きな変化はないものと考えられた。

液体培養した *gus* 導入根粒菌に基質である X-Gluc を添加して静置すると、時間とともに培地が青くなった。顕微鏡で観察すると菌体全体が青く染まって見えた。GUS 反応後の培養液を遠心法 (10000 rpm × 15 分) で分離したところ、青色物質は全て菌体とともに沈降し上澄液は無色透明になった。同様に、GUS 反応後の青色の培養液を 0.45 μm のフィルターに通すと、青色の GUS 代謝産物は全てフィルター上に残り、濾液はやはり無色透明であった。これらの結果は、GUS 反応により生じた青色の色素は全て菌体内に集積しており、培地への溶出がなかったことを示す。

純粋培養した菌の懸濁液では X-Gluc を添加した後の懸濁液の吸光度と菌数の間には比例関係が認められたが、*gus* 導入菌を含む土壌に X-Gluc を添加した場合には、上澄液は透明に近くほとんど青くならなかった。顕微鏡観察により、根粒菌が土壌粒子に吸着していたため、土壌粒子と根粒菌の分離を試みた。電気的な吸着現象であれば高塩濃度により分離できる可能性があるため、終濃度 0.85% になるように塩化ナトリウムを添加して振盪したが菌は上澄液に遊離してこなかった。そこで、界面活性剤である SDS を終濃度 0.2% になるように加えたところ、菌とともに土壌粒子も分散してしまい吸光度測定が妨害された。そこで更にフェノールにより菌体を破壊するとともに GUS 代謝産物の抽出を試みたところ、大部分の土壌微粒子が上層の水層または、二層の界面に分配され、下層のフェノール層は非常に透明な青色を呈した。上層と下層の 645 nm における吸光度を測定したところ下層が 0.265 であったのに対し、上層では 0.007 と極めて低かった。これにより、菌体内に蓄積した青色色素の大部分が土壌粒子や菌体残さを含まないフェノール層に分配されることが確認された。

第 1 図に、抗生物質入り滅菌水に懸濁した  $6 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup> の菌数の 61 A 124 a 株に、GUS の基質である X-Gluc を添加した後に、フェノールにより GUS 代謝産物を抽出して波長 645 nm における吸光度を調べた結果を示す。

同時に同一条件で処理した菌の生菌数を希釈平板法により測定した結果も付記した。

GUS 代謝産物の吸光度は、基質添加後 2 日目までにはほぼ一定に達し、その後比較的長期間安定であった。別に行った実験では、基質添加 1 日後には吸光度はかなり低く 2 日後以降吸光度は急激に高まり一定値に達した。基質添加直後の吸光度の上昇にタイムラグが存在する理由は不明であるが、基質の取り込み、加水分解または、二分子のインドキシル部位の酸化重合がおこるのにある程度の時間を必要とするのかもしれない。いずれにしても、本方法は、GUS の酵素活性を直接測定するのではなく、GUS 代謝産物の蓄積量が菌数と比例することを利用した分析法なので、十分な処理時間として基質添加 4 日後の代謝産物集積量を測定した。

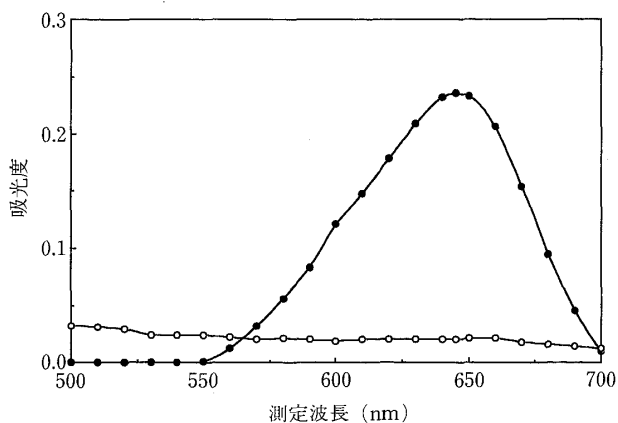
なお、X-Gluc 添加後に根粒菌が死滅ないし著しく増殖する場合には菌数の正しい判定はできない。そこで、基質添加後に根粒菌が増殖しないことを確認した。液体培養した *gus* 導入菌に基質を加えて 4 日目の培養液を光学顕微鏡で観察した結果、どの菌も菌体全体が均一に青く染色されていた。多くの菌が活発に運動していたが、集団となって動かない菌も見られた。基質処理前後で顕微鏡で直接計数した菌数は変わらなかったため、この間に菌の増殖はおこらなかったと判断された。ただし、第 1 図に示されるように、希釈平板法で測定した生菌数は、基質添加 2 日後には添加前の 34% に低下し、4 日目以降には菌は全く増殖能を失っていた。増殖能力の喪失は *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解した X-Gluc を添加したことによると考えられたので、はじめに *N,N*-ジメチルホルムアミドの影響を、寒天平板法で調べた。酵母エキス・マニトール培地を含む寒天培地に、終濃度、0, 0.5, 1, 2, 5, 10% の *N,N*-ジメ

チルホルムアミドを添加して根粒菌を培養した。その結果、0.5% ではほとんど影響が見られなかったが、1% 添加ではコロニー数は変わらなかったもののコロニーの直径が 0% のコロニーの約半分に減少した。さらに、2% 以上の *N,N*-ジメチルホルムアミドを含む寒天培地ではコロニーが認められなかった。GUS 反応液に含まれる *N,N*-ジメチルホルムアミドの濃度は 2% であるので、GUS 反応中根粒菌が増殖しなかった理由の一つは、溶媒の影響であると判断された。さらに、GUS 代謝産物の菌体内蓄積が根粒菌の増殖能を完全に喪失させた。基質を含まない 2% *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液で処理した菌を洗浄後、*N,N*-ジメチルホルムアミドを含まない寒天培地で培養すると菌が増殖してくるのに対し、X-Gluc を含む溶液で処理した菌は洗浄して GUS 基質を除去しても全く増殖できなかった。

青色色素を体内に蓄積した *gus* 導入菌は、しばらく生理活性は保っているものの、恐らく体内に蓄積した青色色素の直接または間接的影響で分裂能を失うものと考えられた。また、X-Gluc が培地に残っていても青色色素生成量が一定で頭打ちを示す (第 1 図) 理由もこの色素の集積量が限界に達するとそれ以上酵素反応を持続できなくなるためと推定された。なお、根粒菌懸濁液に 4% ホルムアルデヒドを添加して菌を殺すと GUS 活性は全く認められなかったことから、GUS 反応は生きた菌体でのみ行われると考えられた。

土壤中の *gus* 導入菌数を GUS 代謝産物のフェノール抽出によって測定する際、土壤色素によるバックグラウンドおよび土壤微生物による GUS 活性が問題となる。第 2 図に GUS 反応後の *gus* 導入根粒菌懸濁液と導入菌と基質を含まない土壤溶液のフェノール抽出液の吸光スペクトルを示した。GUS 反応液では、波長 645 nm 付近にピークが見られたが、土壤溶液では、波長による特徴的な吸光度変化は見られず、GUS 代謝産物の測定波長 (645 nm) 付近の吸光度は約 0.02 であった。

一般に植物や土壤微生物はほとんど GUS 活性を持っておらず、これらのバックグラウンド活性の低いことが、GUS 活性をマーカーとして用いる大きな利点である<sup>13)</sup>。しかしながら、土壤によっては GUS 活性を持つ土壤微生物が生息する可能性もある。また、基質処理期間中、土壤微生物が大量に増殖したり、根粒菌を捕食するおそれもあるが、本法では、カナマイシン、スペクチノマイシン、シクロヘキシミドを加えているため、土壤微生物の生育を抑えるとともに、GUS のバックグラウンド活性も波長 645 nm の吸光度で約 0.03 以下に抑えることができた。



第 2 図 GUS 代謝産物と土壤のフェノール抽出液の吸光スペクトル

●: *gus* 導入菌を液体培養した GUS 代謝産物のフェノール抽出液, ○: 土壤ブランク液。

*gus* 導入根粒菌に X-Gluc を添加して 2 日後に土壤 0.1 g を添加し、さらに 2 日間静置後フェノール抽出をおこない GUS 代謝産物の回収率を求めた。その結果、土壤を加えない場合の回収率を 100% とし、五十嵐土壤で 89%、バーミキュライトで 86%、中沢土壤と曾野木土壤で 77%、長倉土壤で 65% の順に低下した。このことから、土壤によって GUS 代謝産物の回収率が異なることが示唆された。オートクレーブで滅菌した土壤と未滅菌土壤の回収率は同じであったため、土壤添加による回収率の低下は、土壤微生物による影響ではなく GUS 代謝産物の土壤粒子への物理的吸着によると推定された。

第 3 図は、各種土壤に *gus* 導入根粒菌数を変えて添加し、GUS 代謝産物集積量をフェノール抽出により測定した結果を示す。ただし、ここでは、土壤微生物によるバックグラウンド活性は差し引いており、*gus* 根粒菌菌数 0 の時の吸光度を 0 に補正してある。

純粋培養した *gus* 導入根粒菌では、菌数とフェノール抽出液の吸光度には、菌数  $1 \times 10^7$  から  $6 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup> まで比例関係が見られた。土壤を添加した場合には、一般に吸光度は菌培養液に比べて低下する傾向にあった。そこで、土壤中の *gus* 導入菌の菌数測定にさ

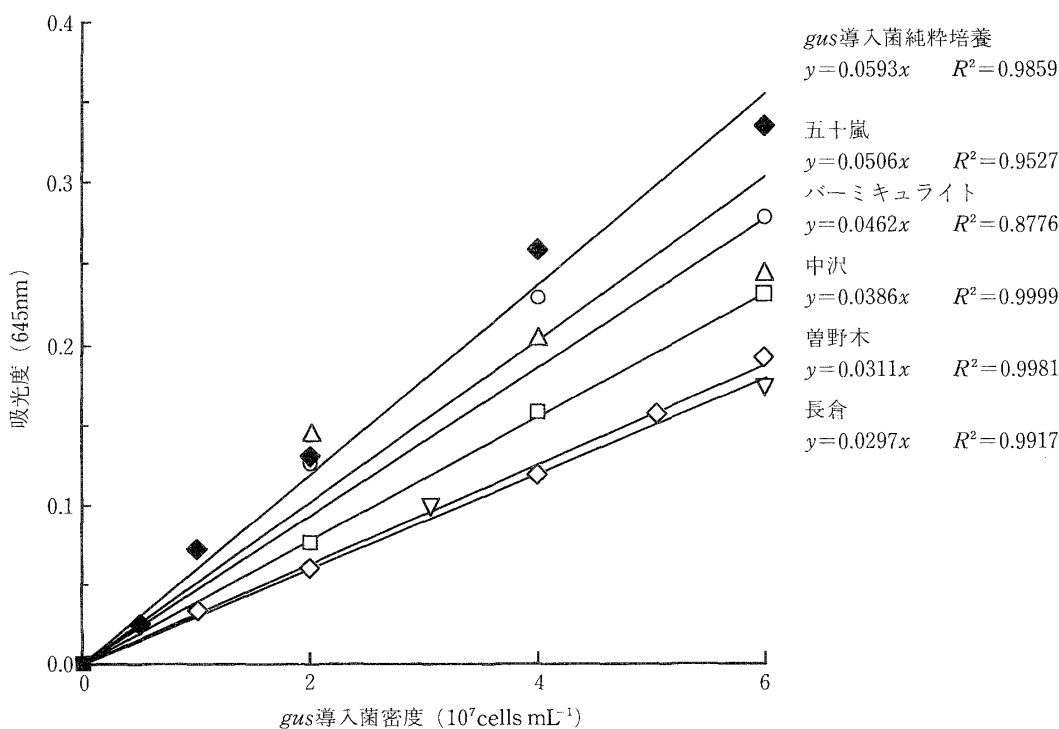
いしては、第 3 図のように供試土壤を含む菌数と吸光度の関係性を求め、これを検量線として使用する必要があると判断された。土壤を添加した時の検量線の傾きの低下の主な原因は、土壤からの GUS 代謝産物の回収率が低いことによると考えられた。

上記の検討結果から、事前に供試土壤に対応した検量線を作成しておけば、土壤中に生息する *gus* 導入根粒菌数を GUS 代謝産物のフェノール抽出法により推定できると判断された。ただし、第 3 図に示されるように、菌密度の測定限界は  $1 \times 10^7$  cells g<sup>-1</sup> 程度であり、これより菌密度が低い場合には適用困難である。

## 2) 根箱法による接種菌の動態の解析

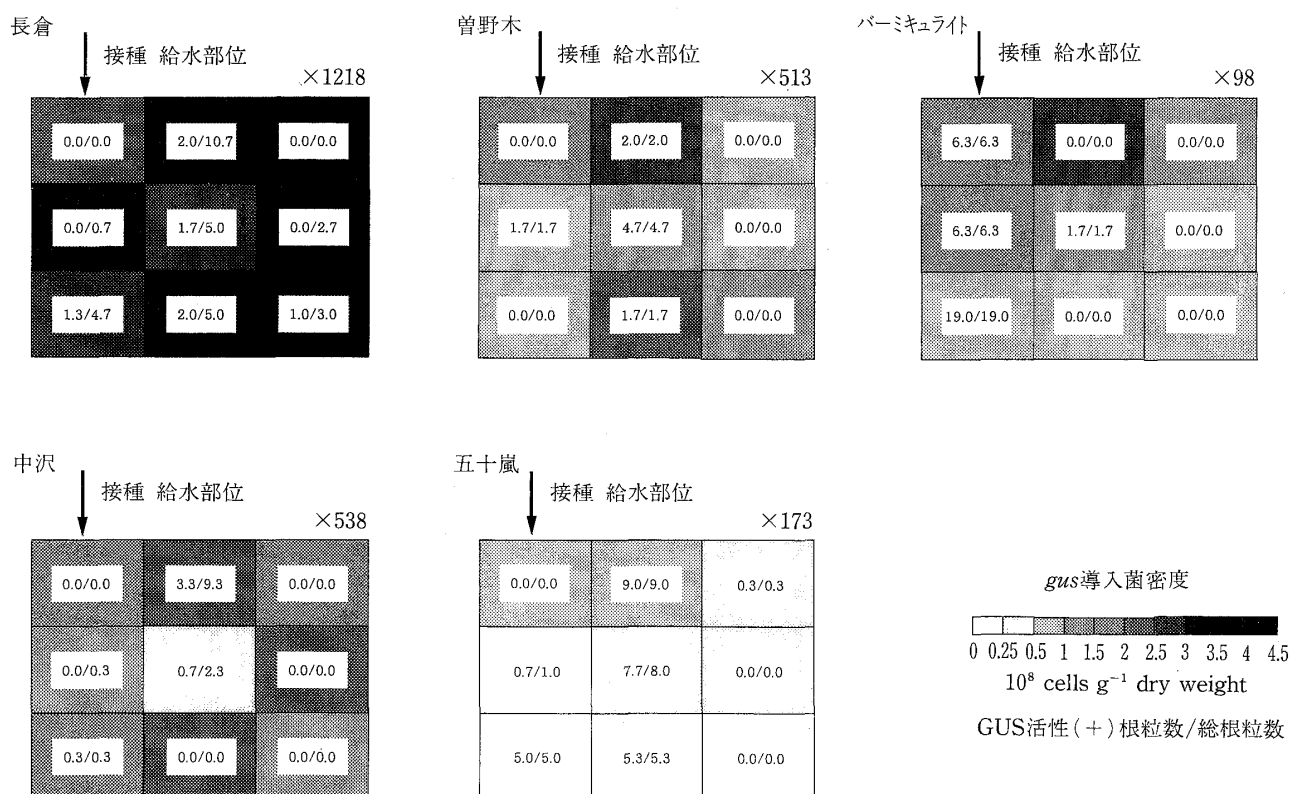
GUS 検定による根粒菌の動態解析のモデル系として、簡単な根箱でダイズを栽培し、接種した根粒菌の根箱土壤中の移動と分布を調べた。あわせて、着生した根粒のうち、接種菌が感染したものと土着菌が感染したものを根粒切片の GUS 染色により検定した。

第 4 図は、接種 25 日後の根箱の各土壤を 9 等分 ( $3 \times 3$ ) したそれぞれの領域における導入菌の菌密度と形成された根粒数を示す。また、各土壤の図の右上の数値は接種菌の増殖倍率を示した。どの土壤においても接種した菌は増殖していたが、長倉土壤でもっとも高い



第 3 図 *gus* 導入菌数とフェノール抽出液吸光度の関係

◆: *gus* 導入菌を純粋培養したもの, ▽: 長倉土壤, □: 中沢土壤, ◇: 曾野木土壤, ○: 五十嵐土壤, △: バーミキュライト。



第4図 根箱における接種菌の分布密度と根粒形成数

ダイズ種子は中心上部に植えこみ、*gus* 標識菌の接種および水の補給は左上から行った。各図右上の倍率は接種菌の増殖倍率を示す。

1218 倍に達した。中沢土壌では 538 倍、曾野木土壌では 513 倍の増殖率を示した。一方、五十嵐土壌、バーミキュライトでは、増殖率は、それぞれ、173 倍、98 倍にとどまった。この結果から、接種菌の増殖率は、土着根粒菌数よりも土壌の物理性、化学性などにより影響を受けるものと推定された。

接種菌の分布についてみると、バーミキュライトや五十嵐土壌では、接種菌は接種位置に対して水平方向に多く分布していたが、その他の土壌では全体に分布していた。菌の分布は、ダイズ根系の発達や水の移動により影響を受けると考えられるが詳しい解析は今後の課題である。

根粒切片の GUS 検定結果では、バーミキュライトや五十嵐土壌および曾野木土壌では、ほとんど全ての根粒が接種菌により形成されていたのに対し、長倉土壌、中沢土壌では、接種根粒菌の増殖率が高いにもかかわらず、土着菌による感染が優先していた。これまで、土壌中の根粒菌の分布と根粒形成率の関係については、根粒菌密度が希薄になるために接種菌による根粒形成率が低下するという見方が主であった<sup>9,18)</sup>。しかし、これまで

の研究では、滅菌した土壌を用いていたため、本来の生物的環境が保たれていない場合が多かった。本実験では土壌の生物的環境を損なうことなく接種菌と土着菌の関係を検討できた。したがって、接種菌の密度と接種菌による根粒形成との間には必ずしも明確な相関関係はなく、むしろ、土着菌と接種菌の相対密度やその他の要因が重要であることが示唆された。

以上、*gus* 導入根粒菌とフェノール抽出法を用いることによって、これまで困難であった土壌中の根粒菌の挙動について容易に捉えることが可能となった。しかしながら、*gus* 導入根粒菌は組換え体であり、野外での利用が制限されている。また、本測定法の検出限界が約 10<sup>7</sup> cells g<sup>-1</sup> 土壌であるため、長期にわたり生残性を追跡するには感度的に問題がある。

#### 4. 要 約

大腸菌由来の  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子 *gusA* を導入したダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* 61 A 124 a 株は、基質である X-Gluc を与えると、単生・共生のいずれの状態においても青色の GUS

代謝産物を菌体内に集積した。この GUS 代謝産物をフェノールで抽出して吸光度を測定することにより土壌中の *gus* 導入菌数の推定を試みた。

根粒菌は土壌粒子に強く接着し、分離困難であったため、液体フェノールによって菌体を破壊して GUS 代謝産物を抽出し、フェノール層の波長 645 nm の吸光度を測定した。菌密度とフェノール抽出液の吸光度には直線関係が認められた。土壌中の菌数測定には、土壌ごとに検量線を作成することにより吸光度から菌密度の推定が可能であった。なお、根粒菌の増殖は X-Gluc の溶媒として用いた *N,N*-ジメチルホルムアミドと GUS 代謝産物によって抑えられることから、GUS 反応中における根粒菌数は一定に保たれていた。

プラスチックケースに各種土壌を詰めてダイズを栽培し、*gus* 導入菌を局所接種して接種菌の分布と根粒形成を判定した。その結果、根粒菌の増殖速度や分布は土壌によって違いが見られた。土着菌が多く生息する土壌では、接種菌の増殖率が高いにもかかわらず、根粒感染率は低かった。一方、土着根粒菌密度の低い土壌では、接種菌の増殖率が低くても大部分の根粒が接種菌により形成されていた。

**謝 辞** 本研究の一部は文部省科学研究費補助金の援助を受けましたので感謝いたします。*gus* 導入根粒菌 61 A 124 a を供与頂いたテネシー大学の P. GRESHOFF 博士、提供にご助力頂いた農業生物資源研究所の赤尾勝一郎博士、長倉、中沢土壌の試料を提供いただいた新潟県農業試験場の高橋能彦博士、曾野木土壌を提供していただいた西脇俊和氏に謝意を表します。

## 文 献

- 1) BERG, R. K., Jr., LOYNACHAN, T. E., ZABLOTOWICZ, R. M. and LIEBERMAN, M. T.: Nodule occupancy by introduced *Bradyrhizobium japonicum* in Iowa soils. *Agron. J.*, **80**, 876~881 (1988)
- 2) 土壌標準分析・測定法委員会編：土壌標準分析・測定法, p. 14~22, 博友社, 東京 (1986)
- 3) ELLIS, W. R., HAM, G. E. and SCHMIDT, E. L.: Persistence and recovery of *Bradyrhizobium japonicum* inoculum in a field soil. *Agron. J.*, **76**, 573~576 (1984)
- 4) FUHRMANN, J. J. and VASILAS, B. L.: Field response of the *Glycine-Bradyrhizobium* symbiosis to modified early-nodule occupancy. *Soil Biol. Biochem.*, **25**, 1203~1209 (1993)
- 5) HERRIDGE, D. F., ROUGHLEY, R. J. and BROCKWELL, J.: Low survival of *Rhizobium japonicum* inoculant leads to reduced nodulation, nitrogen fixation, and yield of soybean in the current crop but not in the subsequent crop. *Aust. J. Agric. Res.*, **38**, 75~82 (1987)
- 6) 樋口太重：有機物連用土壌の地力窒素的な評価, 土肥誌, **53**, 214~218 (1982)
- 7) 京都大学農学部農芸化学教室編：新改版農芸化学実験書(増補)第一巻, p. 244~247, 産業図書, 東京 (1965)
- 8) KVIEN, C. S., HAM, G. E. and LAMBERT, J. W.: Recovery of introduced *Bradyrhizobium japonicum* strains by soybean genotypes. *Agron. J.*, **73**, 900~905 (1984)
- 9) MCDERMOTT, T. R. and GRAHAM, P. M.: *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2493~2498 (1984)
- 10) MCLOUGHLIN, T. J., HEARN, S. and ALT, S. G.: Competition for nodule occupancy of introduced *Bradyrhizobium japonicum* strains in a Wisconsin soil with a low indigenous bradyrhizobia population. *Can. J. Microbiol.*, **36**, 839~845 (1984)
- 11) 皆川康雄・中山泰次・赤尾勝一郎・南沢 究：レポーター遺伝子利用による根粒菌の感染経路の追跡, 植物微生物研究会, 第 3 回研究交流会講演要旨集, p. 56~58 (1993)
- 12) SHARMA, S. B. and SIGNER, E. R.: Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meriloti* in planta revealed by transposon Tn 5-*gusA*. *Genes Dev.*, **4**, 344~356 (1990)
- 13) 植物栄養実験法編集委員会編：植物栄養実験法, p. 175~177, 博友社, 東京 (1990)
- 14) WADISIRISUK, P., DANSO, S. K. A., HARDARSON, G. and BOWEN, G. D.: Influence of *Bradyrhizobium japonicum* location and movement on nodulation and nitrogen fixation in soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1711~1716 (1984)
- 15) WILSON, K. J.: Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. *Soil Biol. Biochem.*, **27**, 501~514 (1995)
- 16) WILSON, K. J., GILLER, K. E. and JEFFERSON, R. A.:  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) operon fusions as a tool for studying plant-microbe interactions. *Adv. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact.*, **1**, 226~229 (1991)
- 17) WILSON, K. J., SESSITSCH, A., CORBO, J. C., GILLER, K. E., AKKERMANS, A. D. L. and JEFFERSON, R. A.:  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology*, **141**, 1691~1705 (1995)
- 18) ZDOR, R. E. and PUEPPKE, S. G.: Competition for nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum* 123 and 138 in soil containing indigenous rhizobia. *Soil Biol. Biochem.*, **22**, 607~613 (1990)

**Estimation of *gus* Marked Bradyrhizobial Number  
by Phenol Extraction of GUS Metabolite**

**Ritsuko MINAGAWA, Kaori ISODA, Norikuni OHTAKE, Shinya YAMADA,  
Taro IKARASHI, Kiwamu MINAMISAWA\* and Takuji OHYAMA\*\***

(Fac., Agric., Niigata Univ., \*Inst. Genet. Ecol., Tohoku Univ., \*\*Corresponding author)

*Bradyrhizobium japonicum* strain 61 A 124 a, in which *Escherichia coli gus A* gene was introduced to *Bradyrhizobium japonicum*, absorbs and hydrolyzes GUS-substrate (X-Gluc), and precipitates an indigo pigment. We attempted to use the absorbance of the accumulated GUS-metabolite as an indicator of the rhizobial number in soil.

The accumulated indigo blue metabolite in rhizobia were extracted by phenol-water after they are incubated with X-Gluc (20  $\mu$ L of 1% X-Gluc solution in *N,N*-dimethylformamide was added to 1 mL of culture solution) for 4 d. The absorbance of the extracted blue pigment in the phenol layer was measured at 645 nm. The initial number of rhizobia and the absorbance of the GUS-metabolite was positively correlated either in cultured 61 A 124 a or in the various types of soil inoculated with 61 A 124 a strain. In the presence of soil, the absorbance per rhizobial number was low compared with the pure culture. Therefore, a standard curve between rhizobial number of 61 A 124 a and the absorbance should be made for every soil sample. During incubation with X-Gluc, rhizobia did not proliferate because of the depression effect on cell growth of *N,N*-dimethylformamide and the accumulation of indigo pigment.

The proliferation and mobility of inoculated 61 A 124 a strain was examined in a rhizobox containing various soil types into which soybeans were planted. The distribution and movement of the marked strain depended on the soil type. In the absence or very low density of indigenous *Bradyrhizobium japonicum*, the nodule was exclusively formed by the strain 61 A 124 a. On the other hand, the major part of nodules were formed by indigenous strains in the soil types containing a high population of indigenous bradyrhizobia, although the inoculated strain proliferated very well.

*Key words* *Bradyrhizobium japonicum*, GUS activity, indigenous rhizobia, inoculation, nodule formation

(Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., 68, 148-155, 1997)