

助成番号 0631

耐塩性根粒菌の分離と宿主マメ科植物への耐塩性の付与に関する研究

横田 明

東京大学分子細胞生物学研究所

概要 耐塩性根粒菌の分離を目的として国内各地のマメ科植物から根粒菌の分離を行った。国内沿岸地域に生育しているマメ科植物から根粒を採集し、耐塩性根粒菌を分離した。分離された根粒菌の同定は以下の様にして行った。16S rRNA 遺伝子の塩基配列、および *gyrB*, *recA*, *nodA*, *nifH* 遺伝子の塩基配列を求めて近縁種と比較、DNA-DNA 相同性試験、ユビキノン組成、菌体脂肪酸組成、DNA G+C 含量などの化学分類学的解析を行い、また API テスト、BIOLOG テストにより生理・生化学性状を調べた。

塩分を多く含む環境である千葉県房総半島の海岸に生育する野生のマメ科植物を採取し、それらの根粒から 3% 食塩含有 YM 培地を用いて耐塩性根粒菌の分離を試みた。その結果、ミヤコグサ根粒より食塩耐性根粒菌 5 株 (TKR, YSUR, SRHM, Y103A, Ka9123) が分離された。得られた分離株の系統的位置を知るため、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し、データベースから得た塩基配列を加えて系統樹を作成した。その結果、TKR と YSUR 株は *Mesorhizobium amorphae* および *Mesorhizobium septentrionale* に近縁であり、SRHM 株は *Mesorhizobium tianshanense* に近縁であった。一方、Y103A 株と Ka9123 株は *Mesorhizobium* 属とは離れ、非根粒菌の属である *Aminobacter* 属の菌種であることが判明した。

根粒菌であることの確認は宿主への接種試験により行った。無窒素培地にミヤコグサの種子を接種し、同時にそれぞれの菌株を接種したところ、根粒の形成がみられ、また宿主植物が無窒素培地で生育することを可能としていることから、窒素固定も行っていることが判明した。形成された根粒から再度を分離した結果、接種前の菌と同一であると認められ、まさしく根粒菌であることが確認された。

DNA-DNA hybridization 実験の結果より、Ka9123, Y103A 株は *Aminobacter* 属の新菌種と結論され、本属の新種 *Aminobacter nodurans* sp. nov. と命名した。また、YSUR と TKR 株は *Sinorhizobium* 属の新種と、また SRHM 株も前述の株とは異なる *Sinorhizobium* 属の新種と判断された。

1. 研究目的

地球上のかなりの耕地は塩分により破壊されていて植物の生育、作物の栽培が不可能となっており、世界の耕地面積の約 7%、9.5 億ヘクタールに達するとの報告がある。塩分を含む土壌では、有機資材を利用したり、食塩耐性の共生性の根粒菌や菌根菌を作物や植物に接種して栄養条件を改善することにより、植物の塩分に対するストレスから解放する試みがなされている。

窒素固定能を持つ生物の中で根粒菌は宿主植物に比べ、塩分に対してより耐性を示すことが知られている。根粒菌の種によって塩分に対する感受性は異なる。マメ科植物 *Medicago sativa* の根粒菌 *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii* はある程度塩分耐性を示すことが知られているが、*Rhizobium leguminosarum* は塩分感受性で

ある。マメ科植物では根粒形成の初期段階が最も食塩に対して感受性を示す。塩分は植物の根を縮小させ、マメ科植物の窒素固定量を低下させることが知られている。耐塩性根粒菌の分離と利用は耐塩性植物の開発に繋がる。細菌との共生の働きを強めて窒素肥料なしに痩せた土地や塩分の多い土地でも生育できる植物の創成につながる。

本研究では耐塩性根粒菌の分離を目的として国内各地のマメ科植物から根粒菌の分離を行った。

2. 研究方法

2.1 菌株の分離

国内沿岸地域に生育しているマメ科植物から根粒を採集し、根粒菌を分離した。根粒菌の分離は以下の様に行

った。

根粒の表面を滅菌水で数回水洗後、95% エタノールで2分間、70% エタノールで3分処理後、5% 過酸化水素水で5分間滅菌した。水洗後、YM 培地中で根粒を砕いて懸濁液とし、これを希釈して3% NaCl 含有 YM 寒天プレートに塗布し、出現したコロニーをさらに純化して実験に供した。

3% NaCl 含有 YM 培地

Yeast extract	0.5 g
Mannitol	5.0 g
Lactose	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
NaCl	30 g
CaCl ₂ H ₂ O	0.2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.1 g
Distilled water	1.0 L
Agar	20 g
Adjusted pH	7.0

2. 2 菌株の同定方法

1) 電子顕微鏡観察

べん毛観察は酢酸ウランでネガティブ染色後、JEM-1010 透過型電子顕微鏡(日本電子)で観察した。

2) API 20E, API 50CH, API ZYM

糖の利用性、糖から酸の産生は API Microtest Galleries を用いて 30°C, 2 日間保温することにより調べた。API ZYM は 37°C で 4 時間の保温により調べた。

3) BIOLOG Microplates

ヒツジ血清添加 BUG 培地に 28°C, 72 hr の培養で生育した菌体を滅菌食塩水に懸濁し、これを GN Microplate に分注して反応させることにより調べた。

4) キノン分析

乾燥菌体からクロロホルム-メタノール(2:1)で抽出し、濃縮液を TLC で展開した後、キノンのスポットを掻き取り、抽出濃縮後、HPLC で分析した。

5) 菌体脂肪酸組成

Tryptic Soy Agar で 30°C, 2 日間培養した菌体を MIDI の方法に従ってメチル化し、ガスクロマトグラフィーで分析した。

6) DNA G+C 含量の測定

Marmur(1961)と Saito and Miura(1963)の方法に従って DNA を調製した。DNA の G+C 含量は Mesbah et al. の

方法(1989)により行った。すなわち、DNA を加熱変性後 Nuclease P₁ で処理し、Alkaline phosphatase で脱リン酸処理して HPLC で分析した。

7) DNA-DNA 相同性試験

江崎らのフォトビオチン-マイクロプレート法(Ezaki et al., 1989)により行った。

2. 3 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅

1.5 ml の培養液を遠心分離機で遠心、洗浄後、100°C, 5 分加熱、氷水中で冷却し、遠心分離して上清を DNA 源とした。

Table 1 に示したプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。反応液は 10 X Ex Taq buffer, 5.0 µl; dNTPs mixture, 4.0 µl; 3 µM Primer-1 (forward), 5.0 µl; ; 3 µM Primer-2 (reverse), 5.0 ml; 80 µg/ml template DNA, 5.0 ml; Takara Ex Taq, 0.25 µl; water, 25.75 µl (Total 50 µl) より成る。PCR 反応は 94°C 2 min 処理後、94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min を 30 cycle 繰り返し、最後に 72°C 5 min 処理した。

Table 1 Primers used for PCR amplification and sequencing for 16S rRNA gene

Forward	
8F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG OH-3'
520F	5'-CAGCAGCCGCGTAATAC OH-3'
926F	5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG OH-3'
Reverse	
350R	5'-CTGCTGCCTCCCGTA OH-3'
704R	5'-TCTACGCATTCACC OH-3'
1100R	5'-GGGTTGCGCTCGTTG OH-3'
1510R	5'-GGCTACCTTGTTACGA OH-3'

2. 4 *gyrB*, *recA*, *nodA*, *nifH* 遺伝子の PCR 増幅

Table 2 に示したプライマーを用いて *gyrB* gene, *recA* gene, *nodA* gene, *nifH* gene を増幅した(Yamamoto and Harayama, 1996; Graunt et al., 2001; Haukka et al., 1998; Ueda et al., 1995)。反応液は2. 3に述べたのと同様の組成である。

2. 5 塩基配列の決定

塩基配列決定用の PCR 反応は、Big-dye-pre-mixture, 4.0 µl; Primer, 0.5 µl; 100 µg/ml template DNA, 1.5 µl; water, 4.0 µl (total 10.0 µl) を含む反応液により、PCR 反応は 96°C 2 min 処理後、96°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 4min を 30 cycle 繰り返し、反応終了後、4°C に保存した。

Table 2 Primers used for PCR amplification and sequencing for *gyrB* gene, *recA* gene, *nodA* gene, *nifH* genes

For <i>gyrB</i> gene	
Forward	
UP1	5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGACAYGCNNGGNGGNAARTTYGA OH-3'
UP1S	5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA OH-3'
gyrB840	5'-CTTCACCAACAACATCCC OH-3'
Mesor320F	5'-GTCATCTGCSCAGCTBCA OH-3'
Reverse	
UP2r	5'-TACTGNTRCGNTRCANTRCCGAGCGTGTAGGCATGGGACG OH-3'
UP2rS	5'-CCGAGCGTGTAGGCATGGGACGA OH-3'
QTKr	5'-GTYTGGTTCTGTTCCGASCA OH-3'
Mesor1088R	5'-ACNTGCTTGTCTTSGTCTG OH-3'
For <i>recA</i> gene	
Forward: nodA-1	5'-TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAA OH-3'
Reverse: nodA-2	5'-GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA OH-3'
For <i>nodA</i> gene	
Forward: nodA-1	5'-TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAA OH-3'
Reverse: nodA-2	5'-GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA OH-3'
For <i>nifH</i> gene	
Forward	
PolF	5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC OH-3'
IGK	5'-TACGGYAARGGBGGYATCGG OH-3'
PaenibF	5'-GGAATTCTGTGATCCTAAAGCTGA OH-3'
Reverse	
PolR	5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA OH-3'
AQE	5'-GACGATGATYTCCTG OH-3'
750R	5'-TCCATBGTGATCGGGDCGGGATG OH-3'
PaenibR	5'-AGCATAATTGCCATCATTTCAC OH-3'

2. 6 系統解析

分離株および近縁既知種の塩基配列を CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) を用いて多重アライメントを行った。Kimura の方法 (1980) により進化距離 *K_{nuc}* を計算し、Neighbour-Joining 法 (Saitou & Nei, 1987) により系統樹を作成した。系統樹のトポロジー評価はブートストラップ法 (Felsenstein, 1985) を用いて再抽出を 1,000 回行った。

3. 研究結果および考察

3. 1 食塩耐性根粒菌の分離

塩分を多く含む環境である千葉県房総半島の海岸に生育する野生のマメ科植物を採取し、それらの根粒から

3% 食塩含有 YM 培地を用いて耐塩性根粒菌の分離を試みた。その結果、ミヤコグサ根粒より食塩耐性根粒菌 5 株が分離された。

Table 3 分離株と分離源

分離株	分離源	採集地
YSUR	<i>Lotus japonicus</i>	千葉県鴨川市吉浦海岸
TKR	<i>Lotus japonicus</i>	千葉県千倉町海岸
SRHM	<i>Lotus japonicus</i>	千葉県白浜町海岸
Ka9123	<i>Lotus japonicus</i>	千葉県鴨川市海岸
Y103A	<i>Lotus japonicus</i>	千葉県鴨川市吉浦海岸

3. 2 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

得られた分離株の系統的位置を知るため、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し、データバンクから得た塩基配列を加えて系統樹を作成した。その結果を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。分離株のうち、TKR と YSUR 株は

Mesorhizobium amorphae および *Mesorhizobium septentrionale* に近縁であり、SRHM 株は *Mesorhizobium tianshanense* に近縁であった。一方、Y103A 株と Ka9123 株は *Mesorhizobium* 属とは離れ、非根粒菌の属である *Aminobacter* 属の菌種であることが判明した。

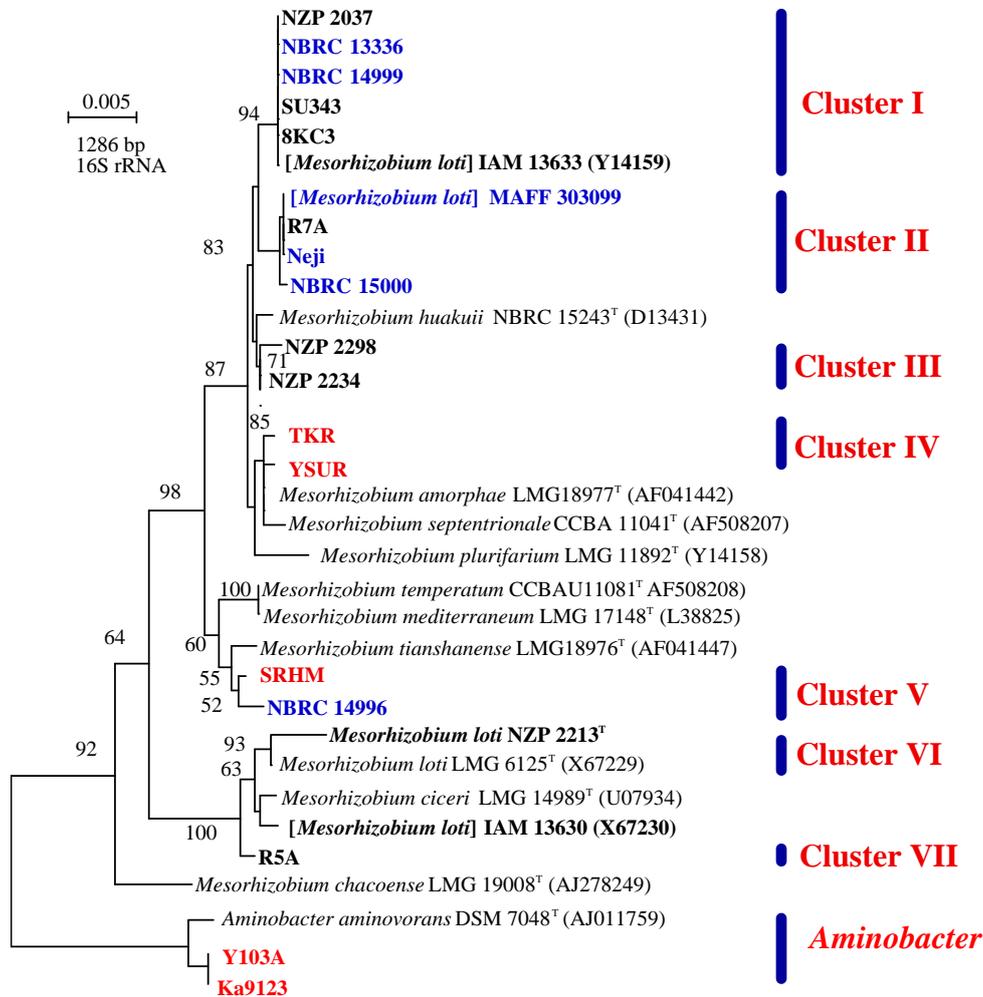


Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strains, TKR, YSUR, SRHM, Y103A and Ka9123.

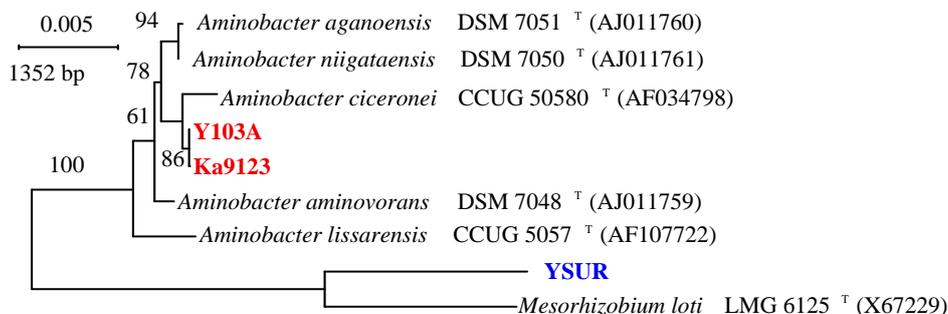


Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strains, Y103A and Ka9123.

3.3 *recA* および *gyrB* 遺伝子に基づく系統解析

得られた分離株の系統的位置を知るため、さらに *recA* または *gyrB* 遺伝子塩基配列を解析し、データベースから得た塩基配列を加えて系統樹を作成した。Ka9123 株は *recA* 遺伝子による系統樹でも *Aminobacter* 属のクラスターの中に位置していた (Fig. 3)。一方、SRHM, TKR, YSUR 株については *gyrB* の比較を行ったが、その結果、分離株 SRHM は独立した系統であったが TKR と YSUR 株は *M. amorphae* と近縁であった (Fig. 4)。

3.4 *nodA* 遺伝子の検出とその遺伝子配列に基づく系統解析

分離株について根粒形成に関与する遺伝子 *nodA* の検出を試みた結果、何れの株にも両遺伝子が検出された。この遺伝子に基づく系統樹を Fig. 5 に示した。*Aminobacter* 属菌種である Ka9123 株および Y103A 株の *nodA* 遺伝子塩基配列は同様にミヤコグサ根粒菌である *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 株のものと非常に近縁であることがわかった。

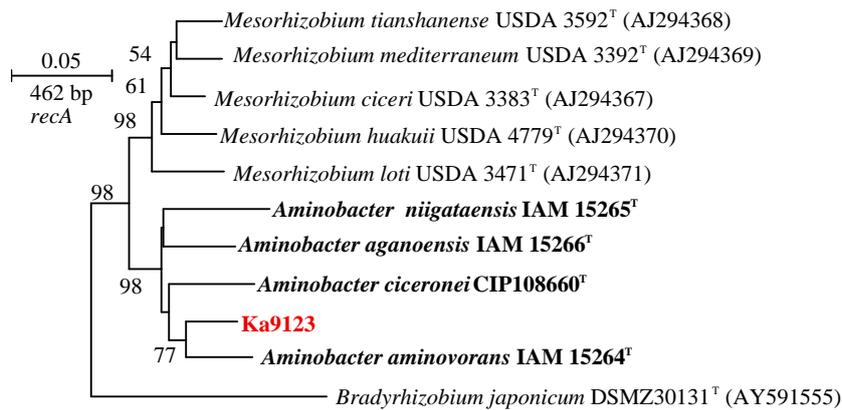


Fig. 3 Phylogenetic tree based on *recA* gene sequence of strain Ka91.

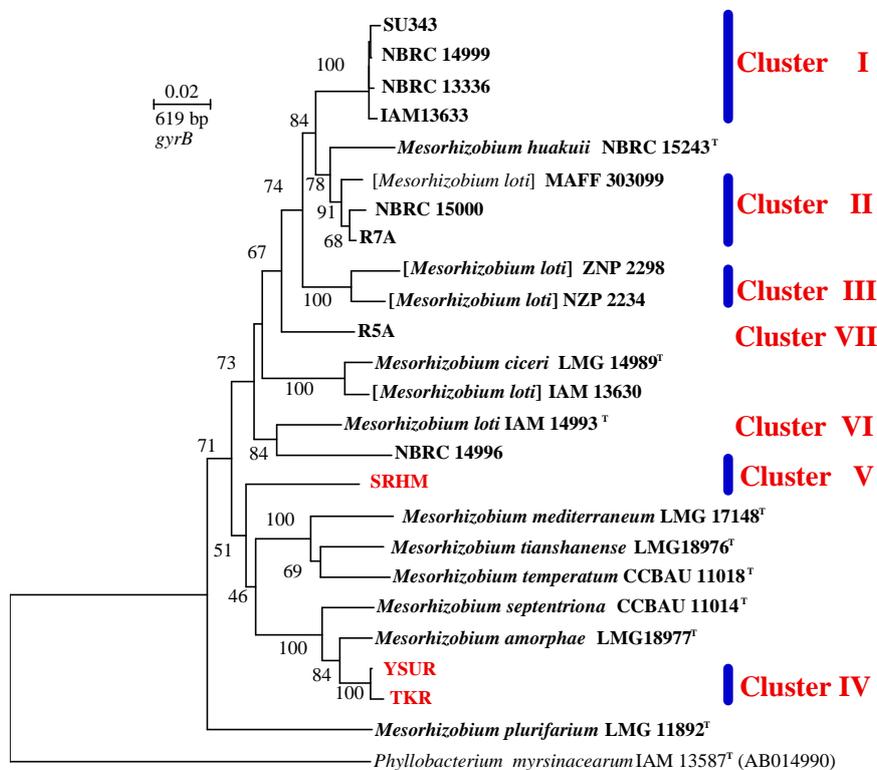


Fig. 4 Phylogenetic tree based on *gyrB* gene sequence of strains SRHM, YSUR and TKR.

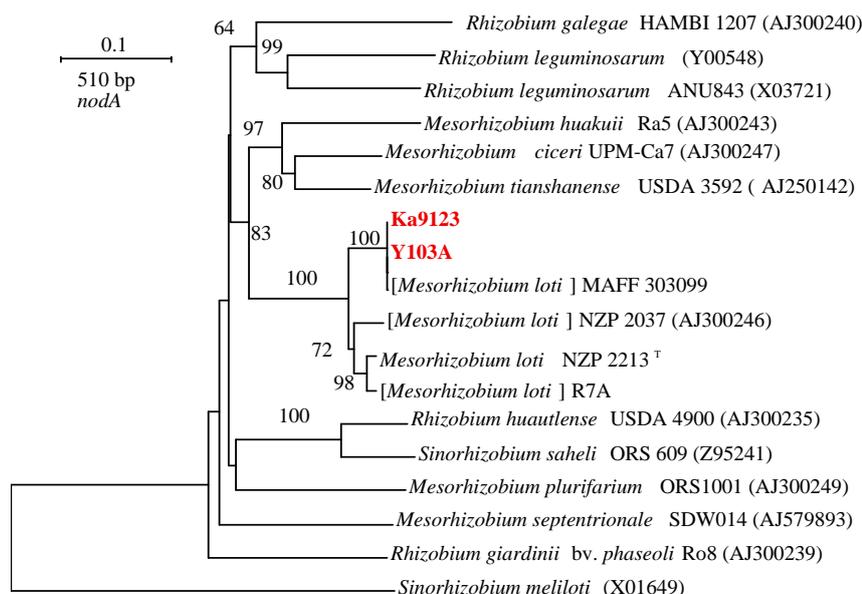


Fig. 5 Phylogenetic tree based on *nodA* gene sequences.

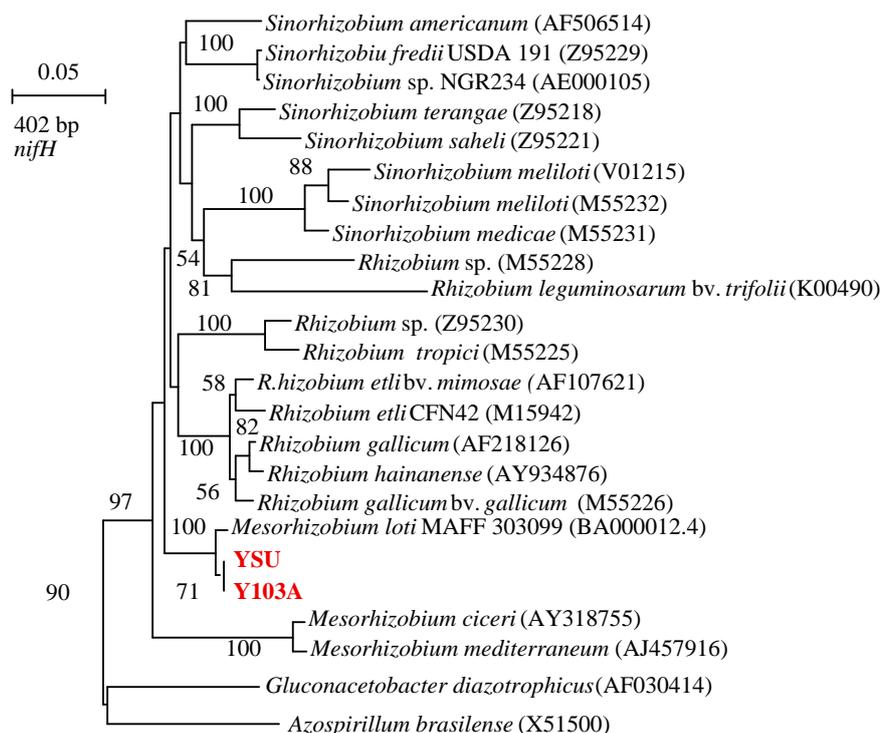


Fig. 6 The phylogenetic tree of the isoates and the rhizobia based on 402-bp of *nifH* gene sequences.

3. 5 *nifH* 遺伝子に基づく系統解析

分離株について窒素固定に関与する遺伝子 *nifH* の検出を試みた結果、何れの株にも本遺伝子が検出された。Y103A 株のミヤコグサ根粒菌である *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 株のものと非常に近縁であることがわかった。この遺伝子に基づく系統樹を Fig. 6 に示した。

3. 6 分離株の根粒形成試験

分離された菌株が真に根粒菌であるかを確認するため、宿主への接種試験を行った。無窒素培地にミヤコグサの種子を接種し、同時にそれぞれの菌株を接種した。Fig. 7 に示したように、分離株 Y103A と Ka9123 株では根粒の形成がみられ、また無窒素培地での生育を可能として

いることから窒素固定も行っていることが判明した。対照として用いたのは *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株である。これらの株は大和ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) と西洋ミヤコグサ (*Lotus corniculatus*) のどちらも宿主とすることができた。

Lotus japonicus, *Lotus corniculatus*, *Lotus pedunculatus*,

Leucaena leucocephala を用いて行った分離株の根粒形成および窒素固定試験の結果を Table 4 にまとめた。

分離株 YSUR, TKR, SRHM, Ka9123, Y103A の何れも *L. japonicus*, *L. corniculatus* に根粒を形成し、窒素固定を行った。しかし、これらの株は *L. pedunculatus* に対しては根粒は形成したが窒素固定は起こらなかった。

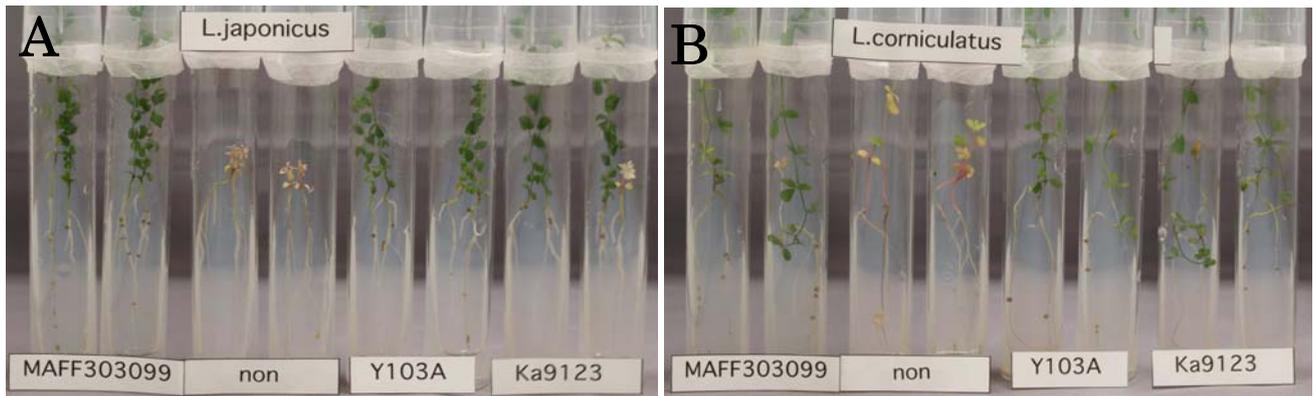


Fig. 7 Nodulation test: strains Ka9123 and Y103A were able to nodulate in (A) *Lotus japonicus* and (B) *Lotus corniculatus*.

Table 4 Host range of isolated strains

Strains	Host plants	<i>L. japonicus</i>		<i>L. corniculatus</i>		<i>L. pedunculatus</i>		<i>Leucaena leucocephala</i>		Secretion system	
		Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	III	IV
1. MAFF 303099		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
2. YSU		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
3. TKR		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
4. SRHM		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
5. Ka9123		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
6. Y103A		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
7. NBRC 13336		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
8. NBRC 14996		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
9. NBRC 15000		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
10. Tono		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
11. Kaimon		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
12. KJ		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
13. Sata		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
14. Neji		+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
15. R5A		+	+	+	+	+	-	+	-	ND	ND
16. R7A		+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
17. NZP 2014		+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
18. NZP 2037		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
19. NZP 2213T		+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
20. NZP 2234		+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
21. NZP 2298		+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
22. 8KC3		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
23. SU343		+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND

Some of secretion system data were taken from Hubber et al. (2004).

3.7 分離株の形態

分離株は何れも桿菌ないしは短桿菌で、運動性を有するグラム陰性細菌であった。Ka9123 株の電子顕微鏡写真と光学顕微鏡写真像を Fig. 8 に示す。

3.8 分離株の生理・生化学的性質

Ka9123, Y103A 株の生理生化学的性質を Table 5 に、YSUR, TKR, SRHM 株の生理生化学的性質を Table 6 に示した。

3.9 分離株の同定

Ka9123, Y103A 株は *Aminobacter* 属に含まれるが、本属の近縁の種 (*Aminobacter aminovorans*, *Aminobacter ciceronei*, *Aminobacter aganoensis*, *Aminobacter niigataensis*) と DNA-DNA hybridization 実験を行った結

果、何れの種ともDNA相同性が低かったことから、別種と判断され、本属の新種 *Aminobacter nodurans* sp. nov. と命名した。

YSUR と TKR 株は *Mesorhizobium amorphae* に近縁であったが、DNA-DNA hybridization 実験を行った結果、DNA 相同性が低かったことから、別種と判断され、*Sinorhizobium* 属の新種と判断された。

SRHM 株は *Mesorhizobium tianshanense* および *Mesorhizobium loti* NBRC 14996 と近縁であったが、両株との DNA-DNA hybridization 実験を行った結果、DNA 相同性が低かったことから、別種と判断され、*Sinorhizobium* 属の新種と判断された。

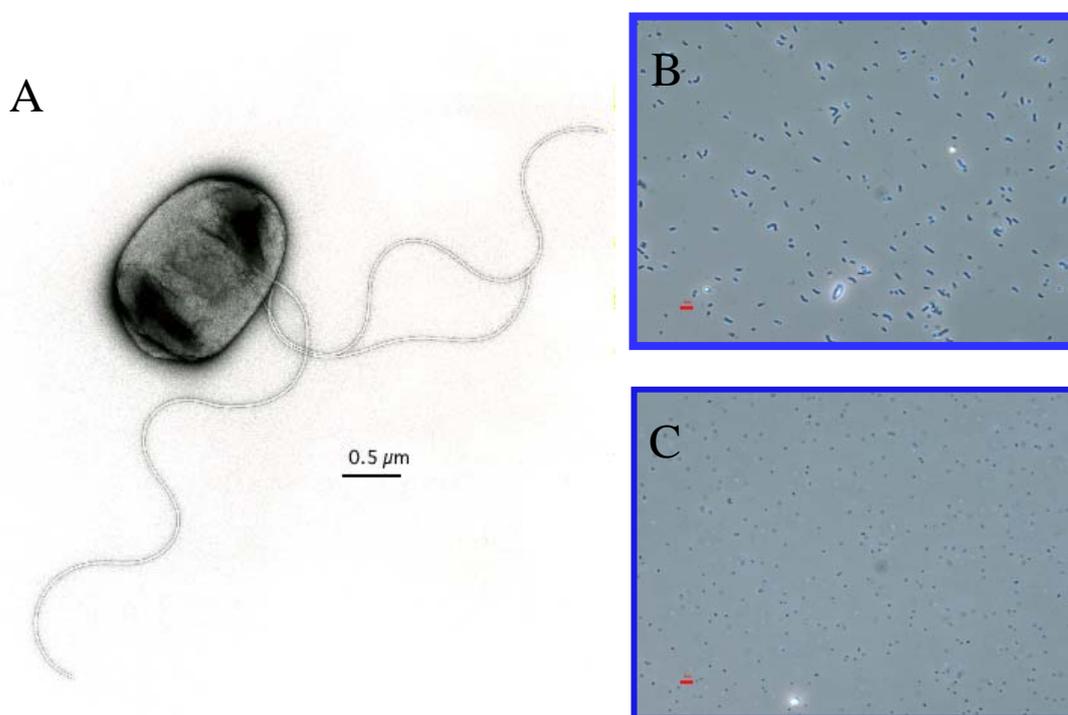


Fig. 8 Transmission electron micrograph of negative-stained cell of strain Ka9123 (A) and phase-contrast micrograph of bacteroid cells (B) and free-living (C) and strain Ka9123. Bar, 1 μm.

Table 5 Differential characteristics of the isolates and the species of the genus *Aminobacter*.
0 = strains Ka9123 and Y103A. 1 = *A. niigataensis*, 3 = *A. aganoensis*, 4 = *A. ciceronei*, 5 = *A. lissarensis*.

Characteristics	0	1	2	3	4	5
Good growth on 37 °C	-	+	+	+	ND	ND
3% NaCl tolerance	+	-	-	-	ND	ND
Urease	+	-	-	-	ND	ND
Hydrolysis of PNPG	-	w	w	w	-	-
Acids produced by aerobically						
Cellobiose	+	w	-	-	-	-
Dulcitol	-	w	w	-	-	-
Glucose	+	w	w	w	w	w
Inositol	+	w	w	-	-	-
Mannitol	+	w	w	w	w	w
Mannose	+	w	w	w	w	w
Raffinose	-	w	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	w	w	-	w
Xylose	+	w	w	w	w	w
Assimilation of						
Rhamnose	-	+	+	-	+	+
L-ornithine	-	+	+	+		
L-arabinose	+	-	+	-	+	+
Glycerophosphate	w	+	-	-	ND	ND
Maltose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	+	-	-	ND	ND
Fructose	+	+	+	-	+	+
Trehalose	+	+	+	+	ND	ND

Table 6 Differential characteristics of the isolates and the close relatives.

Characteristics	YSUR	TKR	NBRC 14996	NBRC15000	MAFF 303099	NBRC 14999	IAM 13336	SRHM
NaCl 2.5%	+	+	-	-	-	-	-	+
pH9.5	-	-	+	+	+	+	+	-
37 °C	-	-	-	+	w	+	-	-
Acid produces from								
Arabinose	-	-	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	w	+	+	+	+	w
Dulcitol	+	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	-	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	w	+	+	+	+	+	-
Raffinose	-	-	w	+	w	+	w	-
Sorbitol	+	+	+	-	+	+	+	-
α-methyl-glucoside	-	-	w	-	-	-	-	-
N-acetyl-glucosamine	+	+	-	-	-	+	+	-
Arbutin	+	w	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	-
Enzyme reaction								
Alkaline phosphatase	-	NT	+	-	-	NT	-	-
Valine arylamidase	-	NT	-	+	+	NT	+	-
Cystine arylamidase	-	NT	-	w	w	NT	w	-
Trypsine	w	NT	-	+	+	NT	+	+
Chitinase	-	NT	+	-	-	NT	-	-
G+C content (mol%)	63.3	63.8	63.2	61.0	59.0%	61.2	61.6	61.3

4. まとめ

本研究では塩分を含む環境からマメ科植物を採取し、耐塩性根粒菌を分離することを試みてきた結果、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) から1 Mまでの食塩(約6%)に耐性を示す耐塩性根粒菌を分離することができた。これらの分離株は *Mesorhizobium* 属および *Aminobacter* 属に含まれるものの、何れも新規の菌種と考えられた。通常環境に生育のミヤコグサの根粒菌は耐塩性のない *Mesorhizobium loti* であることから、ミヤコグサが高塩環境に生育可能としているものと推定された。

今後さらに広くマメ科植物を探索してこのような耐塩性根粒菌を分離することにより、既知のマメ科植物の耐塩化をはかることができるものと考えられる。

そして得られた根粒菌について耐塩化遺伝子をつきとめることができれば、耐塩化遺伝子の導入による既知の根粒菌の創成、および耐塩化植物の創成が可能となろう。

引用文献

- Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224-229.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. & Young J. P. W. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 2037-2048.
- Haukka, K., Lindström, K. & Young, J. P. W. (1998). Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol* **64**, 419-426.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* **3**, 208-218.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G1C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167.
- Saito, H. and K. Miura (1963) Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim Biophys Acta* **72**. 619-629.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Swofford, D. L. (1998). PAUP* Phylogenetic analysis using parimony (* and other methods), version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N. & Matsuguchi, T. (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J Bacteriol* **177**, 1414-1417.
- Yamamoto, S. & Harayama, S. (1996). Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequence of *gyrB* gene and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 506-511.

No. 0631

Studies on Isolation of Salt-Tolerant Nodulating Bacteria and Improvement of Salt-Tolerance in Host Plant

Akira Yokota

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

Summary

Bacteria which form nodules on legume plants belong to the *alphaproteobacteria*, but some species of genera *Ralstonia* and *Burkholderia* belonging to *betaproteobacteria* are also known. Historically, the rhizobia isolated from genus *Lotus* was named as *Mesorhizobium loti*. During the course of isolation of salt-resistant, nodulating bacteria from the root nodules of *Lotus japonicus* which are grown on seaside area in Chiba Prefecture, we isolated salt-resistant symbiotic rhizobium strains designated as YSUR, TKR and SRHM, and two salt-resistant, non-rhizobial symbiotic strains designated as Ka9123 and Y103A. Based on phenotypic and genotypic studies, the former three strains were found to belong to the genus *Mesorhizobium*, but the latter two strains were to belong to genus *Aminobacter*. These strains are able to nodulate both with *L. japonicus* and *Lotus corniculatus*.

Nodulation test, sequencings of 16S rRNA gene, *recA*, *nifH* and *nodA* genes were determined. After infection test, strains were re-isolated from the nodules and re-identified based on 16S rRNA gene and *nifH* gene sequences, physiological and chemotaxonomic characteristics.

According to 16S rRNA gene sequence analyses, strains YSUR, TKR and SRHM were found to fall within the genus *Mesorhizobium*, but strains Ka9123 and Y103A shows high similarity (99.9%) with the species of genus *Aminobacter*. Strains YSUR and TKR was considered to be a new species of the genus *Mesorhizobium*, and the strain SRHM was also belong to another new species of the genus *Mesorhizobium*. DNA-DNA hybridization study indicate that strains Ka9123 and Y103A showed low level of DNA-DNA relatedness to three *Aminobacter* species (*A. aganoensis*, *A. niigataensis*, and *A. ciceronei*). The isolates could be distinguished from *Aminobacter* species based on cellular fatty acid profile and phenotypic characteristics. Therefore, these two strains would be a novel species of the genus *Aminobacter*, for which *Aminobacter nodulans* sp. nov. is proposed. The positive result for nodulation test, sequencings of *nod* and *nifH* genes strongly suggest that these genes could be transferred in the rhizosphere from *Mesorhizobium* species to these salt-resistant strains.