

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19780049

研究課題名（和文）田畑輪換体系がダイズ根粒菌の多様性に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effect of irrigated paddy rice and upland crop rotation on diversity of soybean rhizobia.

研究代表者

佐藤 孝（Takashi Sato）

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：50315602

研究成果の概要（和文）：水田と畑を交互に利用する田畑輪換体系圃場におけるダイズ根粒菌の生態を把握するために、水田転換畑土壌と畑地土壌におけるダイズ根粒菌の遺伝的多様性と生理的特徴を比較した。水田転換畑土壌と畑地土壌における優占しているダイズ根粒菌の系統は同じであったが、遺伝的多様性は水田転換畑土壌の方が高かった。窒素固定活性は、水田転換畑土壌と畑地土壌で明確な傾向は見られなかったが、増殖速度は水田転換畑土壌から分離した菌株が早い傾向が見られた。このように、田畑輪換体系のダイズ根粒菌は遺伝的多様性が高まり、土壌環境に適した生理的機能を有していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We investigated genetic and physiologic diversity of soybean rhizobia in order to clarify the ecology of soybean rhizobia in an irrigated paddy rice and upland crop rotation. In this study, we obtained some soybean rhizobia from an upland field and an upland field converted from paddy field, and then compared their genetic and physiologic properties. The rhizobia in the upland field and the upland field converted from paddy field were same genetic line, though genetic diversity in the upland field converted from paddy field was higher than that in the upland field. The nitrogen fixation activity of the rhizobia was not different between the two fields. The growth rate of rhizobia in the upland field converted from paddy field was faster than that in the upland field. It is suggested that soybean rhizobia in the upland field converted from paddy field had complicated genetic diversity and physiological property to adopt the soil environment in the irrigated paddy rice and upland crop rotation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	660,000	3,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：土壌生物

1. 研究開始当初の背景

日本のダイズ生産は低迷している。国産ダイズの平均収量は10a当たり150kgで、世界平均(230kg)と比べると生産性は極めて低い。国内のダイズ生産の約7割は水田転換畑で行われており、田畑輪換作付体系に組み込まれた形で生産されているのが現状である。日本の主なダイズ生産地は、粘土成分を多く含むいわゆる重粘土壤中に分布している。重粘土の水田転換畑では、圃場の排水性が悪いためにダイズ根の伸長が抑制され、根の養水分吸収活性が低下する。そのため、生育に必要な窒素源は根粒菌による共生窒素固定に強く依存している(Sato et al. 2003, 金田ら 2004)。従って、重粘土壤の水田転換畑でダイズ生産性を向上させるためには、根粒の窒素固定活性を高く維持する必要がある。

土壌中には多様な特性を持った根粒菌が生息しており、窒素固定能力が高い優良根粒菌の感染率を上げることは、根粒の窒素固定活性を高める一つの要因となる。田畑輪換作付体系においては、土壌の物理的環境(水分条件、酸化還元状態など)が劇的に変化し、それに伴い土壌の化学性(pHやECなど)も変化する。土壌環境中での根粒菌の生態については不明な点が多く、土壌環境の変化が根粒菌の生態に及ぼす影響についてはほとんど明らかにされていない。本研究は、田畑輪換作付体系の土壌環境変化に、ダイズ根粒菌がどのような生存戦略で対応しているかを明らかにし、根粒菌の生態を把握するために行う。

2. 研究の目的

本研究を遂行するにあたり、以下の2つについて重点的に検討する。

1) 水田、水田転換畑および畑作物連作圃場におけるダイズ根粒菌の遺伝的多様性を比較する。

2) 各圃場からダイズ根粒菌を分離し、その生理的特性を解析する。

以上の結果から、重粘土壤中における土壌環境変化がダイズ根粒菌の生態に及ぼす影響について解析し、田畑輪換作付体系における土壌環境中での根粒菌の生存に有利な生理的特性、遺伝的特性を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 水田土壌と畑地土壌における根粒菌の多様性の比較

秋田県内における灰色低地土(重粘土)の水田、畑地および水田転換畑の土壌の物理的

特性(水分条件、酸化還元電位など)および化学性(pH、EC、塩基類など)を調査する。

各圃場の土壌中の根粒菌数を土壌DNA抽出-PCR法を用いて計数する。

各圃場の土壌から全DNAを抽出し、根粒菌特異的遺伝子をPCR増幅し、DGGE法を用いて根粒菌群集解析を行う。

2) 供試土壌からのダイズ根粒菌の分離とその遺伝的多様性の解析

前記圃場土壌および培養土壌試料からダイズ根粒菌を分離し、16S-rDNAの塩基配列、16S-23S-rRNA ITS領域、各種フィンガープリンティングプロファイルにより系統解析を行う。

土壌DNA抽出液のPCR-DGGE解析により得られたゲルバンドからDNAを回収してPCR増幅し、対応する根粒菌を相同性検索する。

分離根粒菌とDGGEプロファイルの結果を比較する。

3) 圃場土壌から分離した土着根粒菌の生理的特性の解析

分離土着根粒菌の培地中における増殖速度を調べる。

土着根粒菌をダイズに感染させ、共生状態における窒素固定活性をアセチレン還元法により測定する。

共生状態における吸収型ヒドロゲナーゼ(Hup)活性を測定する。

4) 圃場土壌から分離した土着根粒菌の遺伝的特性の解析

分離した土着根粒菌からゲノムDNAを抽出し、遺伝子解析を行う。とくに還元条件におけるエネルギー獲得に深く関係する吸収型ヒドロゲナーゼ遺伝子(hup遺伝子)の有無を調べる。

5) 総括

圃場試験と培養実験の結果から、田畑輪換による土壌環境変化が、ダイズ根粒菌の生態に及ぼす影響について検討する。また、土壌環境中において根粒菌の生存に有利な生理的特性および遺伝的特性について考察する。

4. 研究成果

1) 水田および畑地における根粒菌の遺伝的多様性の比較

水稲連作圃場では、作土(0~15cm)と深度21cm以下の群集構造に違いが認められた(図1)。その理由として、水田の深度15~21cmのすき床層の下には還元的なグライ層

があり、還元状態に適応した根粒菌が生存していたためと考えられた(図1)。一方、ダイズ連作圃場では深度別に大きな違いが見られなかった。2年のダイズ栽培によって、深度21cm以下にも根域が拡大し、表層に生息する根粒菌が下層でも生存が可能となったと考えられた。

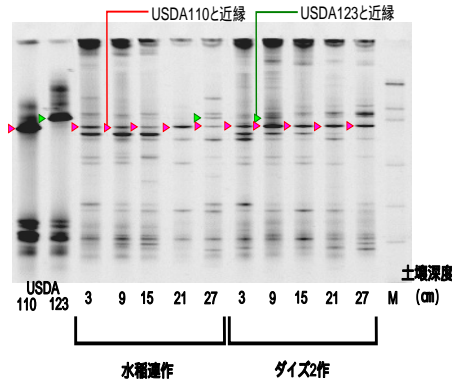


図1 PCR-DGGE法によるダイズ根粒菌の群集構造解析

2) 田畑輪換圃場および水田圃場から分離した根粒菌の特性

分離根粒菌の遺伝的多様性の解析 PCR-RFLP法によって得られたバンドパターンから系統樹を作成し、分離根粒菌は4グループに分類された(図2)。分離した根粒菌の多くは、*Bradyrhizobium japonicum* USDA110 グループに分類された。この3グループは、両圃場から分離した根粒菌の割合が同程度であった。また、分離根粒菌のうち77%は *B. japonicum* USDA110 菌株と同じグループであり、両圃場には USDA110 系統が多く生息していることが明らかとなった。

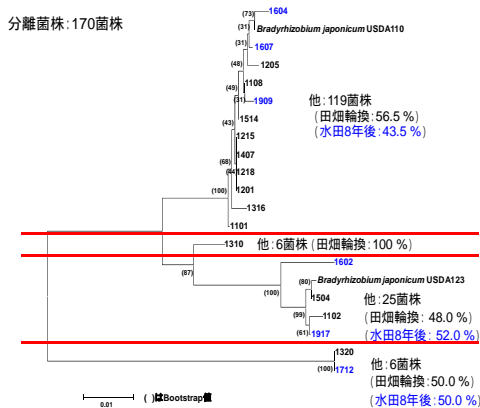


図2 16S-23S rDNA ITS 領域による分離根粒菌の系統

分離根粒菌の *hup* 遺伝子の検出 分離した根粒菌の多くは、*hup* 遺伝子を持つ *B. japonicum* USDA110 菌株と同じグループであったが、多くの菌株は *hup* 遺伝子を持っていなかった(表1)。このことから、根粒菌の

hup 遺伝子の保有は、長期水田や田畑輪換による還元・酸化という土壌環境の変化と関連性がないと考えられた。

表1 分離根粒菌の *hup* 遺伝子の検出

圃場	菌株	<i>hupS</i>	<i>hupL</i>	<i>hup</i> 遺伝子	圃場	菌株	<i>hupS</i>	<i>hupL</i>	<i>hup</i> 遺伝子	
水稲連作	1101	+	-	-	田畑輪換	1215	+	-	-	
	1102	+	-	-		1218	-	+	-	-
	1108	+	-	-		1310	-	-	-	-
	1201	+	-	-		1316	+	-	-	-
	1205	+	-	-		1320	-	+	-	-
	1215	+	-	-		1407	-	+	-	-
ダイズ作	1602	+	-	-	1504	-	-	-	-	
	1604	+	+	+	1514	+	-	-	-	
	1712	-	-	-						
	1900	+	-	-						
	1917	+	-	-						
	対照菌株	USDA110	+	+	+					
	USDA123	-	-	-						

*: *hupS*, *hupL*の両方を持つもの

分離根粒菌の共生窒素固定活性

窒素固定活性は分離菌株によって異なっていた(図3)。1108 菌株と 1604 菌株は、USDA110 菌株と同程度の窒素固定活性を示し、その他の菌株の活性は低かった。1108 菌株は田畑輪換圃場から分離され、1604 菌株は水田8年後圃場からそれぞれ分離された菌株であった。共生窒素固定活性は、分離した圃場による傾向が見られなかったことから、水田年数の違いは根粒菌の窒素固定能力に影響しないことが明らかとなった。

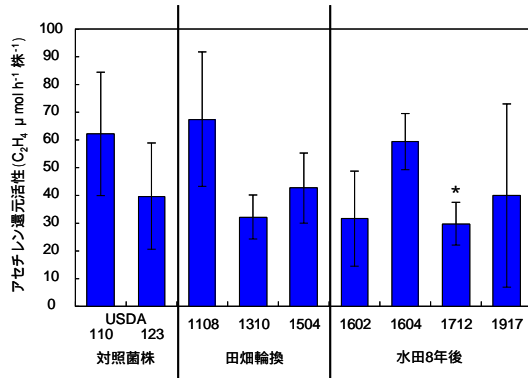


図3 分離ダイズ根粒菌の窒素固定活性

分離根粒菌の増殖能力の評価

30 培養においては、全ての分離根粒菌が増殖した(図4)。一方、15 培養において、増殖が確認できた分離根粒菌は5菌株であり、そのうちの3菌株は水田8年後圃場から分離した菌株であった。USDA110 菌株や 1108 菌株は、30 培養で増殖が速かったが、15 培養では増殖が確認できなかった。低温で増殖した5菌株は USDA110 系統や USDA123 系統の菌株であったが、増殖能力は異なっていた。この5菌株は秋田県のような寒冷地に対応し、ダイズ播種前から播種後6月下旬までの気温が低い時期においても高い生存能力があり、宿主への感染に有利な特性であると考えられた。ダイズを作付けする田畑輪換圃場での、根粒菌は単生増殖能力が低くでも土壌中で生存できる。一方、長期水田における根粒菌

は、畑と異なり低温や湛水状態でも単生で増殖する必要があるため、単生増殖能力が高い根粒菌が生き残ってきた可能性が高いと考えられた。

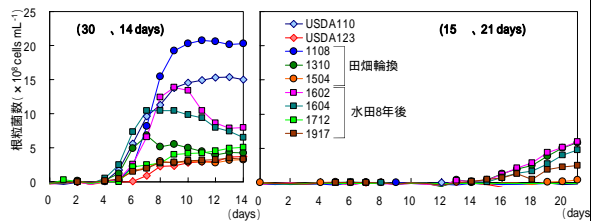


図4 YMB 培地における分離根粒菌

4) まとめ

根粒菌の群集構造は、下層土では水稻連作圃場とダイズ2作後圃場で異なっており、水稻作はダイズ根粒菌の遺伝的生態に影響していると考えられた。一方、水田と田畑輪換圃場における分離根粒菌は、遺伝的多様性に大きな違いがなかった。しかし、寒冷地水田のダイズ根粒菌における増殖特性などの生理的性質は、水稻作年数により影響を受けていると推察され、土壤環境に適応して生存していると考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

佐藤孝、善本さゆり、中村結、金田吉弘
重粘土壤水田転換畑から分離したダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の特徴
植物微生物研究会 第17回研究交流会
2007年9月21日(鹿児島大学)

中村結、佐藤恵美子、高階史章、金田吉弘、佐藤孝
異なる土壤環境におけるダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の多様性の比較
日本土壤微生物学会 2009年6月12日(九州大学)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 孝 (Takashi Sato)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：50315602