

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 23 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580068

研究課題名（和文）ダイズ根粒菌の地理的分布と環境適応機構に関する研究

研究課題名（英文）Study on geographical distribution and adaptation mechanisms for environmental factors of soybean-nodulating bradyrhizobia

## 研究代表者

佐伯 雄一（SAEKI YUICHI）

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50295200

研究成果の概要（和文）：本研究では、アメリカ土壤から *Rj* 遺伝子型の異なるダイズを使用して分離した *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌の地理的分布と遺伝子多様性を解析した。アメリカの 9 地点の土壤から根粒菌を分離し、16S-23S rRNA 遺伝子 ITS 領域の多型解析によって、得られた質的・量的データから、数理生態学的解析を行った。その結果、北部では *B. japonicum* USDA123 系統株が優占し、中南部では *B. elkanii* 株が優占した。中部では *B. japonicum* USDA 6, 110 系統株の占有も認められた。日本と国土の緯度が類似しているアメリカの土着ダイズ根粒菌は、土地利用の違いによると考えられる根粒菌多様性の差異は認められたが、ダイズ根粒菌群集構造の緯度に沿ったニッチの変遷は、日本と類似していた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the relationship between the genetic diversity of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia and their geographical distribution in the United States using nine soil isolates from eight states. The bradyrhizobia were inoculated on three soybean *Rj* genotypes (non-*Rj*, *Rj*<sub>2</sub>*Rj*<sub>3</sub>, and *Rj*<sub>4</sub>). We analyzed their genetic diversity and community structure by means of restriction-fragment length polymorphisms of PCR amplicon to target the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer region, using 11 USDA *Bradyrhizobium* strains as reference strains. We also performed diversity analysis, multi-dimensional scaling analysis based on the Bray-Curtis index, and polar ordination analysis to describe the structure and geographical distribution of the soybean-nodulating bradyrhizobial community. The major clusters were *Bradyrhizobium japonicum* Bjl23, in the northern U.S., and *Bradyrhizobium elkanii* in the middle to southern regions. Dominance of bradyrhizobia in a community was generally larger for the cluster belonging to *B. elkanii* than for the cluster belonging to *B. japonicum*. The indigenous American soybean-nodulating bradyrhizobial community structure was strongly correlated with latitude. Our results suggest that this community varies geographically.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養・土壌学

キーワード：土壌生物・分子生態

## 1. 研究開始当初の背景

近年、バイオ燃料の原料としてのトウモロコシやダイズの需要高騰は、輸入価格の高騰を招いた。ダイズのほとんどを輸入に頼っている日本においては、国内自給率の向上が唱えられている。ダイズの栽培は、共生窒素固定の寄与により、化学窒素肥料を多く必要とせず、窒素の環境への負荷が小さい作物である。また、窒素固定能の高い菌株による根粒占有率を高めた研究例では 10~20%の収量増が示されている。近年の研究で、窒素固定能の低い根粒菌の感染による  $N_2O$  ガスの発生が報告されており、窒素固定能の高い根粒菌は完全脱窒能を有することから、有用根粒菌の活用の重要性がますます高まっている。しかしながら、実際には窒素固定能の高い有用根粒菌を接種しても土着根粒菌との競合に打ち勝つことが出来ず、占有率を上げ得ていないのが現状である。共生窒素固定を有効利用するためには、土壤に導入されるべき接種根粒菌が、土着根粒菌との競合に打ち勝ち、速やかに宿主に感染し得る特性を有していることが重要である。そのためには接種後の有用根粒菌の土着根粒菌との競合、根圏定着および宿主ダイズとの親和性などの生理・生態学的知見を蓄積する必要がある。このことは各地域に土着化している根粒菌を解析し、地点毎の土壤の理化学性などの環境因子および地理的に離れたところでの環境条件の差異（環境傾度）に対する適応性や宿主による適応性の差異を解析する必要性を強く示唆している。さらに、根粒菌の環境に対する適応機構の解明は、有用根粒菌の生残性や土着化といった観点からも研究の進展が期待されている。本研究ではこれまで日本で解析した土着ダイズ根粒菌の分布結果を基に、国土の緯度が類似しており、ダイズの主要産地も北海道から九州の緯度とほぼ一致する、アメリカの土着ダイズ根粒菌の分布と多様性の土着ダイズ根粒菌を解析し、どのような環境因子の作用の結果、根粒菌の分布が引き起こされているのか検証を行い、環境傾度に対する適応機構の解明を目的に行う。

## 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでの研究で、日本における土着ダイズ根粒菌の分布と多様性を明らかにしてきた。本研究では、アメリカおよび東南アジアの土着ダイズ根粒菌の地理的分布と遺伝子多様性を、日本と同様に解析し、世界的に一定の環境因子の作用の結果、ダイズ根粒菌の多様性とその分布に差異を及ぼしているのかを、分子生態学および数理生態学的に解析を行う。さらに、環境傾度に対する根粒菌の適応機構に関して、有用ダイズ根粒菌の接種技術のための基礎知見の蓄積を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究を進めるに当たり、土壤の採取に関しては、アメリカ農務省(USDA)およびフィリピンの研究者の協力承諾を得、農林水産大臣の許可を取得し、アメリカのダイズ圃場の土壤 (Florida, Louisiana, Georgia, Alabama, Kentucky, North Carolina, Ohio, Michigan) を採取・輸入した (Table 1)。同様にフィリピンの Central Luzon State University (CLSU)の土壤も輸入した。植物インキュベーターにおける一定環境下で、*Rj* 遺伝子型の異なる各種ダイズ品種を栽培し、着生根粒を採取した。着生根粒から YMA 培地を用いて根粒菌を分離し、カルチャーコレクションを収集した。根粒菌のゲノムを抽出し、16S-23S rRNA 遺伝子介在配列(ITS 領域)の制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析による解析法により、遺伝子多型データを蓄積した。これらのデータを数理生態学的に解析し、各地域における環境傾度と根粒菌の分布と遺伝子多様性に関する解析を行い、系統解析および群集構造解析を行った。さらに日本各地で分離された根粒菌とアメリカの土着ダイズ根粒菌との比較解析によって、土着化・優占化に関連する環境因子の特定を、数理生態学的に行った。

TABLE 1. Soil sample sites for analysis<sup>a</sup>

Sampling sites	Soil group	Latitude, Longitude	$\Delta$ Latitude	pH (H <sub>2</sub> O)	EC (dS m <sup>-1</sup> )	C (%)	N (%)	C/N
Michigan (MI)	Loam	43.05°N, -82.53°W	12.84	7.68	0.15	2.03	0.18	11.3
Ohio (OH)	Silt Loam	40.78°N, -81.93°W	10.56	6.34	0.10	0.97	0.09	10.9
Kentucky (KY)	Silt Loam	38.93°N, -86.47°W	6.71	6.14	0.10	2.05	0.19	11.1
North Carolina (NC)	Sandy Loam	35.79°N, -78.69°W	5.57	5.23	0.06	1.37	0.12	11.9
Alabama1 (AL1)	Loamy Sand	32.59°N, -85.49°W	2.37	5.77	0.07	1.16	0.09	13.6
Alabama2 (AL2)	Loamy Sand	32.59°N, -85.49°W	2.37	5.18	0.04	0.91	0.06	15.2
Georgia (GA)	Loamy Sand	31.48°N, -82.22°W	1.26	5.70	0.03	0.45	0.03	17.3
Florida (FL)	Coarse Sand	30.68°N, -85.31°W	0.46	5.58	0.02	0.40	0.01	35.9
Louisiana (LA)	Clay	30.22°N, -91.10°W	0	5.52	0.05	0.94	0.09	10.6

## 4. 研究成果

すべての土壤からダイズの *Rj* 遺伝子型による根粒菌のカルチャーコレクションを一品種あたり 25 株調製し、一土壤あたり 75 株を分離し、トータル 675 株を得た。分離株の根粒菌ゲノムを鋳型とした 16S-23S rDNA ITS 領域の制限酵素断片長多型解析を行った (Fig. 1)。

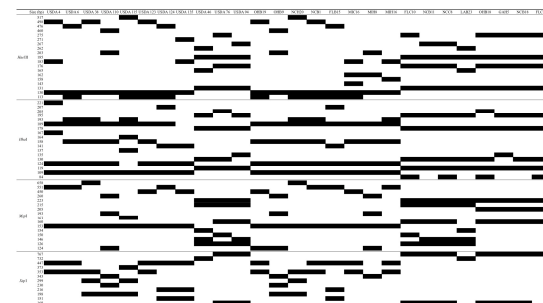


FIG. 1. Schematic representation of RFLP patterns of the 16S-23S rRNA gene ITS region.

解析の結果、Michigan・Ohio では *B. japonicum* USDA123 株、Kentucky・North Carolina では *B. japonicum* USDA110 株と USDA6 株、Florida・Louisiana・Georgia・Alabama では *B. elkanii* のクラスターに含まれる株が優占していた。この結果

は、日本におけるダイズ根粒菌の分布と類似したが、中緯度から南では日本よりも *B. elkanii* の占有率が高いことが明らかとなった(Fig. 2, 3)。これらの結果より、ダイズ根粒菌の土着化・優占化に及ぼす環境因子として温度の影響が示唆された。

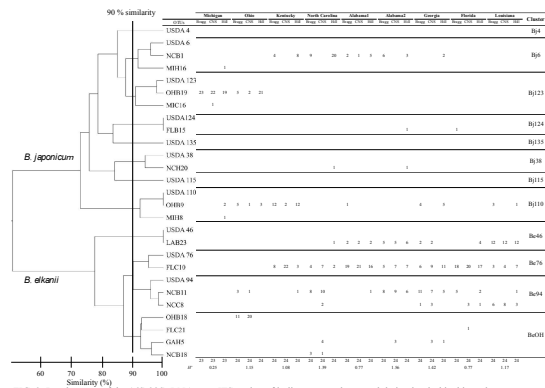


FIG. 2. Dendrogram of the 16S-23S rRNA gene ITS region of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia and *Bradyrhizobium*/USDA reference strains.

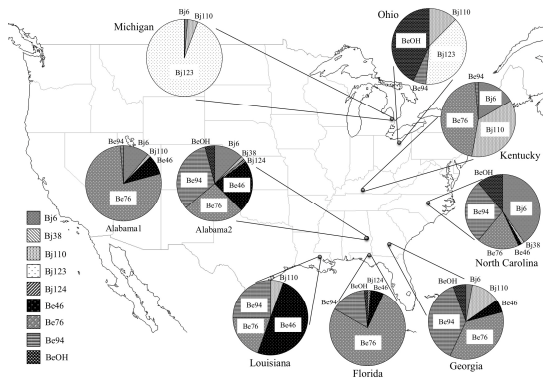


FIG. 3. Distribution of clusters and the population ratio of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in USA.

これらのデータを基にした多様性解析の結果、北部とその他の地域において群集構造が大きく異なることが示された (Table 2, Fig. 4)。

TABLE 2. Alpha, beta and gamma diversity indices for each soil sample site pair

Index	Michigan										Ohio										Kentucky																																								
	MI01	MI02	MI03	MI04	MI05	MI06	MI07	MI08	MI09	MI10	OH01	OH02	OH03	OH04	OH05	OH06	OH07	OH08	OH09	OH10	KY01	KY02	KY03	KY04	KY05	KY06	KY07	KY08	KY09	KY10																															
+diversity (P%)	0.71	0.68	0.64	0.52	0.92	0.85	0.52	0.72	1.12	1.27	0.96	1.26	1.29	0.96	1.16	1.24	0.92	1.02	1.25	0.93	1.13	0.74	0.66	0.66	0.62	0.67	0.65	0.69	0.69	0.58	0.46	0.65	0.54	0.44	0.60	0.56	0.50	0.52	0.26	0.26	0.26	0.55	0.26	1.30	1.17	1.59	1.48	1.21	1.38	1.63	1.75	1.41	1.96	1.72	1.56	1.71	1.14	1.06	1.45	1.15	1.51
+diversity (P%)	1.88	1.65	1.61	1.61	1.68	1.28	1.16	1.69	0.73	0.97	1.69	1.17	1.37	1.09	1.28	1.09	1.28	0.97	1.09	1.28	0.97	0.24	0.11	0.18	0.26	0.35	0.20	0.29	0.09	0.29	0.10	0.16	0.08	0.13	0.14	0.23					1.32	1.29	1.28	1.27	1.63	1.36	1.29	0.98	1.22	1.39	1.32	1.45	1.22	1.45	1.22	1.45	1.19	1.21			

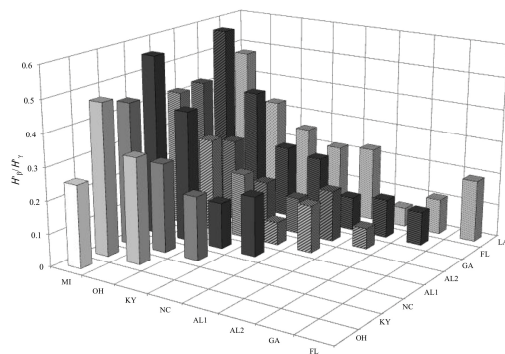


FIG. 4. The proportion of beta diversity to gamma diversity ( $H_{\beta}/H_{\gamma}$ ) among pair of the soil sampling site.

多次元尺度構成法と重回帰分析の結果は、緯度と根粒菌群集間で高い正の相関を示したが、日本ほど高い相関は得られなかった(Fig. 5, 6)。

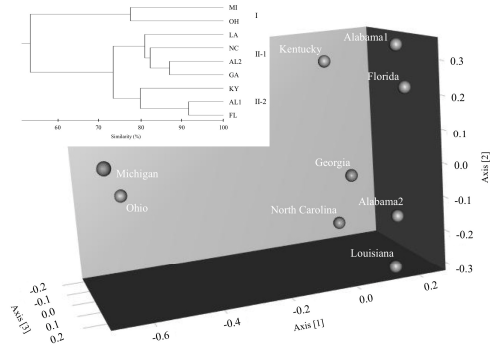


FIG. 5. Plots of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobial community of the soil sampling site by 4-dimensional multidimensional scaling analysis based on Bray-Curtis index and dendrogram from UPGMA analysis. Dendrogram was applied as the objective index for grouping of MDS plots.

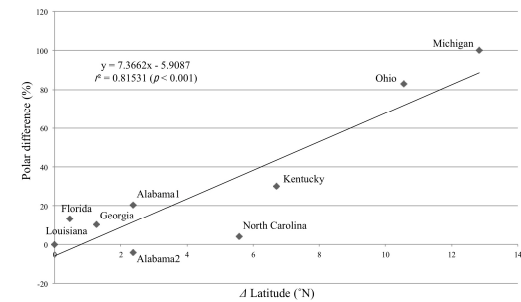


FIG. 6. Relationship between indigenous soybean-nodulating bradyrhizobial community and latitude of the soil-sampling site.

日本では Bj123、Bj110、Bj6、Be76 が主要クラスターとしてニッチの変遷を示すのに対して、アメリカでは Bj123 と *B. elkanii* が主要クラスターとして変遷し、特に、中部で Bj110 の優占度が低く、*B. elkanii* の優占度が高かった。*B. japonicum* USDA110 系統株が少なく、*B. elkanii* の占有率が高い理由として、日本では水田に適する土壌風土であるが、今回調査した地点は畑地利用であり、これらの農地利用の違いや、日本本土に自生していない *B. elkanii* を好むマメ科植物がアメリカで広く分布していることが影響し得る可能性がある。

また、フィリピン国 Central Luzon State University 圃場の土壌から分離した根粒菌は、*B. elkanii* に近縁であるが、これまで分離された暖地型根粒菌とは別のタイプの根粒菌であることが示唆された。

これらのことから、気候・宿主等の違いに起因すると考えられるバツキは見られるものの、緯度に沿ったダイズ根粒菌のニッチの変遷が地球規模で起きていることが強く示唆された。(図表の詳細については Shiro *et al.* 2013 を参照のこと)

## 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 3 件)

・Saeki, Y. et al. Changes in Population Occupancy of Bradyrhizobia under Different Temperature Regimes. *Microbes and Environments*. 査読有, Vol.25, 2010, 309-312.

doi:10.1264/jsme2.ME10128

・Shiro, S, Saeki, Y. 他 Effect of Rj Genotype and Cultivation Temperature on the Community Structure of Soybean-Nodulating Bradyrhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*. 査読有. Vol.78. 2012, 1243-1250.

doi: 10.1128/AEM.06239-11.

・Shiro, S. 他 Genetic Diversity and Geographical Distribution of Indigenous Soybean-Nodulating Bradyrhizobia in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有, Vol.79, 2013, 3610-3618.

doi:10.1128/AEM.00236-13

〔学会発表〕(計 件)

・佐伯雄一 他 国内におけるダイズ根粒菌の分布と多様性における一考察 日本土壤肥料学会九州支部春季例会 2010年4月27-28日 宮崎大学(宮崎)

・佐伯雄一 他 宿主ダイズの Rj 遺伝子型と栽培温度によるダイズ根粒菌の感染傾向に関する研究 日本土壤肥料学会 2010年9月7-9日 北海道大学(札幌)

・Yuichi SAEKI et al. Effect of Rj-genotype and cultivation temperature on the community of soybean-nodulating bradyrhizobia 1<sup>st</sup> Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation 2010年9月21-24日 宮崎  
・城惣吉・佐伯理奈・Gilbert C. Sigua・山本昭洋・佐伯雄一 アメリカの土着ダイズ根粒菌の多様性と地理的分布 日本土壤肥料学会九州支部春季例会 2011年4月25-26日 九州大学(福岡)  
・城 惣吉・山本昭洋・梅原洋佐・林 正紀・佐伯雄一 宿主ダイズの Rj 遺伝子型と栽培温度によるダイズ根粒菌群集構造に関する研究 日本土壤肥料学会 2011年度つくば大会 2011年8月8-10日 つくば(茨城県)

・佐伯雄一・城 惣吉・田島稔之・山本昭洋 多次元尺度構成法によるダイズ根粒菌の地理的分布解析 日本土壤微生物学会 2011年度大会 2011年11月25-26日 宮城県大崎市

・佐伯雄一-アメリカ土着ダイズ根粒菌の多様性と地理的分布 日本土壤肥料学会九州支部 2012年04月25日~2012年04月26日 鹿児島

・佐伯雄一-アメリカ土着ダイズ根粒菌の地理的分布と群集構造解析 日本土壤肥料学会 2012年09月04日~2012年09月06日 鳥取

〔図書〕(計 件)

Yuichi Saeki (共著) Characterization of

Soybean-Nodulating Rhizobial Communities and Diversity In Soybean-Molecular Aspects of Breeding. Edited by Aleksandra Sudaric InTech 163-184/514. 2011.

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐伯 雄一 (SAEKI YUICHI)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 50295200