

宮 崎 大 学 大 学 院
博 士 学 位 論 文

論 文 題 目

ダイズ根粒菌の環境適応機構と群集構造に関する研究

学位授与年月

2014年3月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科

資源環境科学専攻

城 惣吉

謝辞

本研究の遂行および本論文の取りまとめに際し、終始懇切丁寧な御指導と御助言、御校閲の労を賜りました宮崎大学農学部教授 佐伯雄一博士に深甚なる感謝を申し上げます。また、細やかな御指摘・激励のお言葉を頂きました宮崎大学農学部助教 山本昭洋博士、本論文の査読を賜りました宮崎大学農学部教授 西脇亜也博士、宮崎大学農学部教授 吉田ナオト博士、宮崎大学農学部准教授 河原 聡博士、宮崎大学工学部教授 鈴木祥広博士に心からの感謝の意を表し、厚くお礼申し上げます。また、本研究を遂行する上で $Rj_2Rj_3Rj_4$ 遺伝子保有ダイズ系統の種子を分譲していただきました九州大学農学研究院准教授 山川武夫博士に厚くお礼申し上げます。

そして、終始ともに励まし、ともに研究を行い、ともに支えあってきた土壤肥料学研究室の皆様に感謝の意を表します。

目次

第1章 緒論	1
第2章 土着ダイズ根粒菌の群集構造における宿主ダイズの <i>Rj</i> 遺伝子型と栽培温度の影響	5
2-1 緒言	5
2-2 材料および方法	5
2-3 結果および考察	12
第3章 アメリカにおける土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布	24
3-1 緒言	24
3-2 材料および方法	24
3-3 結果および考察	28
第4章 日本とアメリカにおける土着ダイズ根粒菌群集構造の比較解析	40
4-1 緒言	40
4-2 材料および方法	40
4-3 結果および考察	44
第5章 異なる温度環境下における <i>nodC</i> 遺伝子の発現解析	49
5-1 緒言	49
5-2 材料および方法	50
5-3 結果および考察	62

第6章 異なる栽培温度環境下におけるダイズ根粒菌の根粒着生能の評価	70
6-1 緒言	70
6-2 材料および方法	70
6-3 結果および考察	72
第7章 総合考察	80
要約	86
参考文献	88
Appendix	97

第1章 緒論

ダイズ (*Glycine max* [L.] Merr.) は、醤油、味噌、納豆、豆腐など日本の食文化に欠かすことのできない食品の原料として利用されるだけでなく、家畜飼料や油糧、バイオ燃料 (バイオディーゼル) の原料として利用されており、世界的に需要の高い主要な作物である。マメ科植物であるダイズは、ダイズ根粒菌の感染によって根に根粒と呼ばれる共生器官を形成し、その器官を通してダイズ根粒菌によって大気中から固定された窒素をアンモニアとして獲得する。ダイズに感染する主なダイズ根粒菌として、*Bradyrhizobium japonicum* や *Bradyrhizobium elkanii*, *Ensifer / Sinorhizobium fredii* が知られている (Jordan 1982, Scholla and Elkan 1984, Chen *et al.* 1988, Kuykendall *et al.* 1992, Young 2003). 我が国のダイズ栽培では、全窒素の 50–80% を根粒の固定窒素に依存しており、その農業的価値は非常に高いとされる (大山 2006). 現在までに、水田転換畑におけるダイズの本作化が進行するにあたり、作付面積は約 13 万 ha, 生産量は約 23 万 t に達している。しかしながら、ダイズの国内自給率は約 5–6% と他の穀物と比較すると低い水準にあり、国内で消費されるダイズのほとんどを海外からの輸入に依存している。この原因として、水稲と比較して生産効率が悪いこと (平成 24 年度 $180 \text{ kg } 10\text{a}^{-1}$, 農林水産省大豆関連データ集単収の推移, http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_data/), 天候により収量や品質に影響を受け易いことが挙げられ、ダイズの安定供給が求められている。ダイズの生産性を向上させる一つの手段として、有用根粒菌と呼ばれる優れた形質を有するダイズ根粒菌をダイズ栽培時のダイズ種子に接種することが挙げられ、これにより収量を増加させようと試みられている。有用根粒菌の有用性については、利用の目的や接種される土壌の条件によって異なるが、一般的には、宿主植物に対して親和性が高く、土壌中で速やかに増殖し、特に、土着根粒菌に対する競合力に優れて宿主植物根に根粒を形成し、根粒形成後の窒素固定活性が高いといった条件を満たす必要がある (浅沼 2004). 根粒菌による窒素固定反応にはニトロゲナーゼという酵素が関与しており、このニトロゲナーゼによる窒素固定反応は水素発生反応と共役している。従って、ニトロゲナーゼに供給されるエネルギーの一部が水素の酸化に利用されるために、これがエネルギーのロスとなり窒素固定効率が低下する (浅沼 2004). ところが、ダイズ根粒菌の中には発生する水素を再利用する酵素である吸収型ヒドロゲナーゼ (Uptake hydrogenase; Hup) 活性を有するダイズ根粒菌株が知られており、この Hup が窒素固定効率の改善に重要であることが明らかとなっている (有馬 1999, 浅沼

2004). Albrecht *et al.* (1979) は, *hup* 遺伝子を保有する Hup^+ 株と *hup* 遺伝子を欠損した変異型の Hup 株を用いてダイズへの接種試験を行ったところ, ダイズ植物体の全窒素量が 26–49% 増加したと報告した. 以上のことから, より強い Hup 活性を有することが有用ダイズ根粒菌の条件の一つとして挙げられ, 有用ダイズ根粒菌の接種は窒素固定の改善につながり, 結果として, ダイズの収量を増加させると考えられる. しかしながら, 有用ダイズ根粒菌が, 土着のダイズ根粒菌との競合に打ち勝つことが出来ない, 宿主となるダイズと有効な共生関係を確立出来ないなどの場合には接種効果が得られない. そこで, 実際にダイズ栽培の行われる現場にてこの有用ダイズ根粒菌の接種効果を得るためには, 接種した有用ダイズ根粒菌が土壤中で速やかに増殖して根圏に定着し, 土着ダイズ根粒菌との競合に打ち勝つことでダイズ根での根粒占有率を高める必要がある. これらの問題を解決し, 実用的な有用ダイズ根粒菌の接種技術の確立のためには, 有用ダイズ根粒菌と土着ダイズ根粒菌間の競合メカニズムを解明していく必要があり, 土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性や地理的分布, 土着化・優占化に関係する環境因子の特定, 生態的・生理的特性, 環境適応性, および, 宿主ダイズとの親和性に関する知見の蓄積が求められる.

Saeki *et al.* (2006) は, 日本の5地点(北海道, 福島県, 京都府, 宮崎県, 沖縄県)から分離した土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布を, 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer (ITS) 領域の PCR restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) 解析にて調査し, 土着ダイズ根粒菌の地理的分布が日本の北から南へと変遷していることを報告した. また, Saeki *et al.* (2008) は, 日本の土着ダイズ根粒菌の分布が緯度と強い相関を示すことを明らかにした ($r^2 = 0.924$). さらに, 分離された土着ダイズ根粒菌の代表的なクラスターは, *B. japonicum* USDA 123, 110, 6^Tの系統株, そして, *B. elkanii* USDA 76^Tの系統株であり, これらのクラスターに属する土着ダイズ根粒菌が緯度に沿って北から南へと順に変遷することが明らかとなった (Saeki 2011, Saeki *et al.* 2013). Saeki *et al.* (2010) は, *B. japonicum* USDA 6^T, 38, 123 および *B. elkanii* USDA 76^Tの4菌株を混合接種した滅菌土壌および液体培地を4, 15, 25, 35°Cの温度条件下で長期間インキュベーションし, 4菌株の各温度における経時的な占有率の変化を調査したところ, 土壌において USDA 123 および USDA 76^Tの占有率が温度条件に伴った変化を示したため, 温度がダイズ根粒菌の土壌中での占有率に影響を与える環境因子であることを明らかにした. Adhikari *et al.* (2012) は, ネパールの高度依存的な気候変化

や土壌 pH といった土壌特性に関係した土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性を明らかにした。さらに、Suzuki *et al.* (2014) は、ネパールの温帯および亜熱帯地域にそれぞれ優占していた *B. japonicum* の系統株と *B. elkanii* の系統株を用い、温度がこれら 2 菌株間の競合、および、ネパールにおけるダイズ根粒菌種の分布に影響を及ぼすことを明らかにした。これらの報告から、緯度や高度の変化に伴う温度の変化が土着ダイズ根粒菌の土着化・優占化に影響を及ぼす環境因子の一つであると考えられた。また、温度だけでなく、土壌 pH も土着ダイズ根粒菌の土着化・優占化に影響を及ぼす環境因子の一つであると考えられる。Saeki *et al.* (2005) は、ベトナムのアルカリ性土壌における土着ダイズ根粒菌について調査を行ったところ、*S. fredii* の系統株が優占していることを報告した。Suzuki *et al.* (2008) もまた、沖縄県のアルカリ性土壌において *S. fredii* の系統株が優占していることを報告している。これらの結果から、土壌温度や土壌 pH は土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性や地理的分布に対して密接に関係しており、ダイズ根粒菌の環境適応性の解明は必須であると考えられる。さらに、世界最大のダイズ生産・輸出国として知られるアメリカは、日本の国土とほぼ同緯度に位置し、主要なダイズ生産地の緯度も類似しており、アメリカにおける土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布の解明は、ダイズ根粒菌の生態を理解する上で重要な知見となり、高窒素固定能を有するダイズ根粒菌の接種技術の更なる発展につながると考えられる。

有用ダイズ根粒菌の接種技術について、ダイズ根粒菌の宿主となるダイズについて着目すると、ダイズには、特定のダイズ根粒菌の感染を抑制する根粒形成調節遺伝子 (*Rj* 遺伝子) を保有する品種の存在が知られている。*Rj* 遺伝子は天然のものとしてこれまでに、*rj₁*, *Rj₂*, *Rj₃*, *Rj₄*, そして、*non-Rj* の存在が報告されている (Williams and Lynch 1954, Caldwell 1966, Vest 1970, Vest and Caldwell 1972, Devine and Kuykendall 1996)。その中でも、*rj₁* は全てのダイズ根粒菌に対する根粒形成を、*Rj₂* は *B. japonicum* USDA 122 系統のダイズ根粒菌に対する根粒形成を、*Rj₃* は *B. elkanii* USDA 33 系統のダイズ根粒菌に対する根粒形成を、*Rj₄* は *B. elkanii* USDA 61 系統のダイズ根粒菌に対する根粒形成を抑制することが知られている。ダイズ栽培において、*Rj* 遺伝子を保有するダイズ品種を用いることは窒素固定活性の低い土着ダイズ根粒菌の感染を排除し、相対的に有用ダイズ根粒菌の感染率を高め得る可能性が高いため、ダイズの収量増加につながる一つの手段になり得ると考えられる。Yamakawa *et al.* (1999) は、異なる *Rj* 遺伝子保有ダイズ品種である IAC-2 (*Rj₂Rj₃*) と Hill (*Rj₄*) から *Rj* 遺伝子が集積した

$Rj_2Rj_3Rj_4$ 保有ダイズ系統を作出し、これらのダイズ系統が *B. japonicum* USDA 110 系統株を他の Rj 遺伝子保有ダイズ品種よりもより多く選択的に根粒着生する形質であることを示した。Minami *et al.* (2009) は、non- Rj , Rj_2Rj_3 , Rj_3 , Rj_4 , そして、 $Rj_2Rj_3Rj_4$ の 5 遺伝子型 13 品種のダイズを用いて土着ダイズ根粒菌を分離し、16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 法にて解析を行い、 Rj 遺伝子型の違いによる根粒着生の傾向について評価したところ、 Rj_2 遺伝子を保有する遺伝子型ダイズ品種とその他の遺伝子型ダイズ品種間で根粒着生した土着ダイズ根粒菌の群集構造に違いが認められ、 Rj 遺伝子型はダイズ根粒菌の根粒着生に影響を及ぼすことが示唆された。しかしながら、この研究では、異なる栽培温度環境下における土着ダイズ根粒菌の根粒着生傾向について調査されていない。 Rj 遺伝子型ダイズ品種を用いた有用ダイズ根粒菌の接種技術を確立するためには、ダイズ栽培地域の温度環境を考慮した感染ダイズ根粒菌の群集構造を捉える必要があると考えられる。

そこで、本研究では、土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布に関与すると考えられる環境因子の一つである温度に着目し、同緯度地域における緯度に依存的な温度変化に伴う土着ダイズ根粒菌の地理的分布や群集構造の変化、並びに、栽培温度や宿主ダイズの Rj 遺伝子型が土着ダイズ根粒菌の群集構造に及ぼす影響について明らかにすることを目的に研究を行った。さらに、ダイズへの根粒着生に関与するダイズ根粒菌の根粒形成遺伝子に着目し、この遺伝子の温度に対する応答と異なる温度環境下における根粒着生能について調査を行い、温度による根粒形成遺伝子の発現レベルの違いがダイズ根粒菌のダイズへの感染および群集構造の変化に寄与する一因子であるのか検討した。

第2章 土着ダイズ根粒菌の群集構造における宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型と栽培温度の影響

2-1 緒言

日本における土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布は、北から南へと緯度に沿って一定のニッチ (生態的地位) の変遷を示すことが報告されており、緯度に伴った気温の変化がダイズ根粒菌の土着化・優占化に影響を及ぼす一因子であることが示唆されている (Saeki *et al.* 2006, 2008, 2013, Saeki 2011). また、宿主ダイズの *Rj* 遺伝子は、特定のダイズ根粒菌の感染を抑制するだけでなく、ダイズに根粒着生するダイズ根粒菌の群集構造に影響を及ぼすことが示唆されている (Minami *et al.* 2009). そこで、本実験では、温度と *Rj* 遺伝子型に着目し、3 パターンの栽培温度と 4 遺伝子型 13 品種のダイズの組み合わせによる土着ダイズ根粒菌群集構造への影響について解明することを目的に、16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 解析を用いて分離した土着ダイズ根粒菌のクラスター解析を行い、この結果をもとに、数理生態学的手法を用いた群集構造解析により、栽培温度と *Rj* 遺伝子型の群集構造への影響について評価した.

2-2 材料および方法

2-2-1 供試ダイズ品種および供試土壌

供試ダイズ品種として、アキシロメ, Bragg, オリヒメ (non-*Rj*), ボンミノリ, CNS, Hardee, IAC-2 (*Rj*₂*Rj*₃), アキセンゴク, フクユタカ, Hill (*Rj*₄), A-250-3, B-349, C242 (*Rj*₂*Rj*₃*Rj*₄) の 4 遺伝子型 13 品種を用いた. 供試土壌として, Saeki *et al.* (2006) の調査において, 日本の 5 地点の土壌の中で土着ダイズ根粒菌の最も高い多様度指数を示した独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター福島研究拠点のダイズ栽培歴のない黒ボク土壌 (pH [H₂O] = 5.04, EC = 0.05 dS m⁻¹) を用いた.

2-2-2 ダイズの栽培および着生根粒の分離

供試土壌から土着ダイズ根粒菌を分離するために、供試ダイズ品種のポット栽培を行った。まず、ダイズ栽培用のポットをバーミキュライトと無窒素水耕液で調製した。1 L の蒸留水に KH₂PO₄ 95.5 mg, K₂SO₄ 9.6 mg, CaCl₂ · 2H₂O 262 mg, MgSO₄ · 7H₂O 245 mg, EDTA · Fe · 3H₂O

43.9 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.32 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg, H_3BO_3 0.25 mg, Na_2MoO_4 0.05 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.03 mg を混合し、無窒素水耕液とした (Saeki *et al.* 2000). 1 L 容 TPX ビーカーに約 1 L のバーミキュライトを充填し、水分含量が 40% (vol/vol) となるように無窒素水耕液を加え、オートクレーブ滅菌 (121°C 20 分) した. 次に、ダイズ種子の表皮殺菌を行った. 70% エタノールで 30 秒, 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 0.25%) に 3 分間浸し, 滅菌蒸留水で 5 回程度洗浄した. 調製したポットのバーミキュライト表面から深さ約 3 cm に供試土壌を約 2-3 g 置き, その上に表皮殺菌した種子を播種し, バーミキュライトで覆い, ポットの重量を測定した. 栽培はグロースチャンバー (MLR-351, SANYO) で 4 週間行い, 栽培期間中は 1 週間毎に滅菌蒸留水をポットの初期重量となるように加えた. グロースチャンバー内における栽培環境は, 高温 (明期 33°C 16 時間, 暗期 28°C 8 時間), 中温 (明期 28°C 16 時間, 暗期 23°C 8 時間), 低温 (明期 23°C 16 時間, 暗期 18°C 8 時間) にそれぞれ設定した. 4 週間の栽培後, ダイズ根に着生した根粒を分離し, クリーンベッチ内で 70% エタノールに 3 分間, 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 0.25%) に 30 分間浸して表面殺菌した後, 滅菌蒸留水で 5 回以上洗浄した. 各栽培温度の品種毎に根粒をランダムに 20 個選抜し, 1 個ずつ 1.5 mL 容マイクロチューブに回収した. 洗浄後の根粒は, -80°C で保存した.

2-2-3 ダイズ根粒菌のゲノム DNA 抽出

各栽培温度の品種毎にランダムに 20 個選抜した根粒から直接ダイズ根粒菌のゲノム DNA を抽出するために, Hiraishi *et al.* (1995) の手法を改変した手法 (Saeki *et al.* 2000) を用いた. BL buffer (40 mM Tris-HCl, 1% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, pH 8.0) と滅菌 milliQ 水および 1 mg mL^{-1} Proteinase K (nacalai tesque) を 5:4:1 の割合で混合し, ゲノム DNA 抽出緩衝液を調製した. この緩衝液を根粒の入った 1.5 mL 容マイクロチューブに 100 μL ずつ加え, ホモジナイズし, ブロックインキュベーターにて 60°C で 20 分間, そして, 95°C で 5 分間インキュベートした. これに少量の Polyvinylpyrrolidone (PVPP) (SIGMA) を加え $20,000 \times g$, 25°C で 10 分間遠心した後に上清を回収し, ゲノム DNA 抽出液とした. また, 抽出した DNA サンプルは, 低温 (Low) のアキシロメ (AK), Bragg (BR), オリヒメ (OR), ボンミノリ (BO), CNS (CN), Hardee (HA), IAC-2 (IA), アキセンゴク (AG), フクユタカ (FK),

Hill (HI), A-250-3 (A2), B349 (B3), C242 (C2) として LAK 1-20, LBR 1-20, LOR 1-20, LBO 1-20, LCN 1-20, LHA 1-20, LIA 1-20, LAG 1-20, LFK 1-20, LHI 1-20, LA2 1-20, LB3 1-20, LC2 1-20, 中温 (Middle) のアキシロメ (AK), Bragg (BR), オリヒメ (OR), ボンミノリ (BO), CNS (CN), Hardee (HA), IAC-2 (IA), アキセンゴク (AG), フクユタカ (FK), Hill (HI), A-250-3 (A2), B349 (B3), C242 (C2) として MAK 1-20, MBR 1-20, MOR 1-20, MBO 1-20, MCN 1-20, MHA 1-20, MIA 1-20, MAG 1-20, MFK 1-20, MHI 1-20, MA2 1-20, MB3 1-20, MC2 1-20, 高温 (High) のアキシロメ (AK), Bragg (BR), オリヒメ (OR), ボンミノリ (BO), CNS (CN), Hardee (HA), IAC-2 (IA), アキセンゴク (AG), フクユタカ (FK), Hill (HI), A-250-3 (A2), B349 (B3), C242 (C2) として HAK 1-20, HBR 1-20, HOR 1-20, HBO 1-20, HCN 1-20, HHA 1-20, HIA 1-20, HAG 1-20, HFK 1-20, HHI 1-20, HA2 1-20, HB3 1-20, HC2 1-20 と番号を付け, 合計で 780 サンプルを得た.

2-2-4 16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR 増幅

根粒から抽出したゲノム DNA 抽出液をテンプレートとして, 16S-23S rRNA gene ITS 領域をターゲットとした Primer set (Saeki *et al.* 2006) を用いて PCR 増幅を行った. 氷上で, 1 サンプル当たり滅菌 milliQ 水 18.375 μL , $10 \times Ex Taq$ Buffer 2.5 μL , 2.5 mM dNTP Mixture (2.5 mM each) 2 μL , 10 μM Forward primer (Bra-ITS-F: 5'-GACTGGGGTGAAGTCGTAAC-3') 0.5 μL , 10 μM Reverse primer (Bra-ITS-R: 5'-ACGTCCTTCATCGCCTC-3') 0.5 μL , 5 U μL^{-1} TaKaRa *Ex Taq* DNA polymerase 0.125 μL (TaKaRa Bio), テンプレート 1 μL を混合し, 反応液とした. PCR 反応には PCR Thermal cycler (TaKaRa PCR Thermal cycler Dice[®], TaKaRa Bio もしくは Gene Amp[®] PCR System 9700, Applied Biosystems) を使用し, 反応は 94°C 5 分間変性させた後, 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分を 30 サイクル, 72°C 10 分, 4°C 保存という条件で行った. PCR 終了後, PCR 産物の増幅を確認するために, アガロースゲル電気泳動を行った.

50 \times TAE buffer (2 M Tris, 1 M CH₃COOH, 50 mM EDTA, pH 8.0) を milliQ 水で 50 倍希釈した 1 \times TAE buffer とアガロース (SeaKem GTG Agarose, Bio Products) を用いて, 1% アガロースゲルを調製した. PCR 産物 1.5 μL と 10 \times Loading buffer (1% SDS, 50% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue, TaKaRa Bio) 1.5 μL をパラフィルム上でピペッティングし, 全量を 1% アガロースゲルのウェルにアプライし, 100 V で BPB 色素がゲル上部から 3 分の 2 程度の位置

に到達するまで電気泳動を行った。電気泳動後、1% アガロースゲルを $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ エチジウムブロマイド溶液 (NIPPON GENE) に 20 分間浸して染色し、ルミノ・イメージアナライザー LAS-4000 EPUV mini (FUJIFILM) で増幅産物のバンドを確認した。

2-2-5 参照菌株の培養, ゲノム DNA 抽出, 16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR 増幅

供試した福島の土壌からは, *B. japonicum* USDA 6^T, 38, 110, 115, 123, *B. elkanii* USDA 76^T, 94 のクラスターに属する土着ダイズ根粒菌が分離されている (Minami *et al.* 2009). 土壌から分離した土着ダイズ根粒菌を同定するために, *B. japonicum* USDA 4, 6^T, 38, 110, 115, 123, 124, 135, *B. elkanii* USDA 46, 76^T, 94 の 11 の *Bradyrhizobium* USDA 参照菌株を用いた (Saeki *et al.* 2004). まず, 参照菌株を培養するための HM 液体培地 (Cole and Elkan 1973, Sameshima *et al.* 2003) を調製した. 1 L の蒸留水に $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.3153 g, Na_2SO_4 0.25 g, NH_4Cl 0.32 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.18 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0067 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.013 g, HEPES 1.3 g, MES 1.1 g, Yeast Extract (nacalai tesque) 0.25 g, L(+)-Arabinose 1.0 g を加え, よく攪拌した後に pH を 6.8 に調整し, これをオートクレーブ滅菌 (121°C 20 分) した. 調製した HM 液体培地 1.5 mL に参照菌株をそれぞれ植菌し, 28°C で 3 日間培養した. この培養液を 1.5 mL 容マイクロチューブに移し, 卓上遠心機 (DISKBOY, KURABO) にて $4,350 \times g$, 室温で 3 分間遠心し, 集菌した. 集菌後, 上清を取り除き, 0.9% NaCl 500 μL を加えて懸濁し, 菌体の洗浄を行った. この懸濁液を同様に遠心して集菌し, 上清を取り除いた後に -20°C で 20 分間凍結させた.

次に, 集菌したペレットから参照菌株のゲノム DNA の抽出を行った. 滅菌 milliQ 水 40 μL を 1.5 mL 容マイクロチューブに添加して懸濁し, これに 2-2-3 で用いた BL buffer 50 μL および 1 mg mL^{-1} Proteinase K 10 μL をそれぞれ加え, ブロックインキュベーターにて 60°C で 20 分間, そして, 95°C で 5 分間インキュベートした. インキュベート後, $20,000 \times g$, 25°C で 10 分間遠心した後に上清を回収し, ゲノム DNA 抽出液とした. このゲノム DNA 抽出液をテンプレートとして, PCR 反応液の組成および反応条件については 2-2-4 と同様に 16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR 増幅を行った.

2-2-6 制限酵素処理および制限酵素消化液の電気泳動

PCR によって 16S-23S rRNA gene ITS 領域の増幅が確認された各栽培温度の品種毎に分離

した 20 菌株の PCR 産物および参照菌株の PCR 産物を 4 種類の制限酵素 *Hae* III, *Hha* I, *Msp* I, *Xsp* I (TaKaRa Bio) で処理した. 氷上にて, *Hae* III, *Hha* I, *Xsp* I ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) の 3 酵素は 1 サンプル当たり滅菌 milliQ 水 $12.5 \mu\text{L}$, $10 \times$ Buffer (各制限酵素に対応するバッファーは *Hae* III, *Hha* I が M Buffer, *Xsp* I が K Buffer) $2 \mu\text{L}$, 各制限酵素 $0.5 \mu\text{L}$, PCR 産物 $5 \mu\text{L}$ を混合した. また, *Msp* I ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) は, 1 サンプル当たり滅菌 milliQ 水 $10.5 \mu\text{L}$, $10 \times$ T Buffer $2 \mu\text{L}$, 0.1% BSA $2 \mu\text{L}$, 制限酵素 $0.5 \mu\text{L}$, PCR 産物 $5 \mu\text{L}$ を混合した. この反応液を 37°C で 16 時間インキュベートした.

制限酵素処理した消化液を核酸キャピラリー電気泳動装置 QIAxcel System (QIAGEN) を用いて電気泳動した. ゲルカートリッジには QX DNA Screening Cartridge (QIAGEN) を用いた. $20 \mu\text{L}$ の消化液に DNA dilution buffer (QIAGEN) もしくは TE (10 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA , $\text{pH } 8.0$) を $40 \mu\text{L}$ 加えて 3 倍希釈し, この希釈液を QIAxcel で電気泳動した. 泳動後, サンプルの RFLP パターンと参照菌株の RFLP パターンを比較した. 各サンプルの電気泳動の結果をもとに, 同一の RFLP パターンを示した菌株の中から 1 菌株を代表菌株として選抜した. 次に, 選抜した代表菌株および 11 の USDA 参照菌株の制限酵素消化液をアガロースゲルにて電気泳動した. *Hha* I で処理した反応液には 4% アガロースゲルを, *Hae* III, *Msp* I, *Xsp* I で処理した反応液には 3% アガロースゲルを作製した. $10 \times$ TBE buffer (500 mM Tris , $485 \text{ mM H}_3\text{BO}_3$, 20 mM EDTA , $\text{pH } 8.2$) を milliQ 水で 20 倍希釈した $0.5 \times$ TBE buffer とアガロース (NuSieve[®] 3:1 Agarose, Lonza) を用いて, 4% および 3% アガロースゲルを調製した. 制限酵素消化液 $5 \mu\text{L}$ と $10 \times$ Loading buffer $2 \mu\text{L}$ をパラフィルム上でピペッティングし, 全量をアガロースゲルのウェルにアプライし, 100 V で BPB 色素がゲルの末端に泳動されるまで電気泳動を行った. 電気泳動後, SYBR[®] Green I (Lonza) を 1000 倍希釈した溶液にアガロースゲルを 20 分間浸して染色し, ルミノ・イメージアナライザーでアガロースゲルの撮影を行い, 参照菌株の RFLP パターン (Fig. 2-1) と代表菌株の RFLP パターンを比較した.

2-2-7 土着ダイズ根粒菌のクラスター解析および系統樹作成

2-2-6 で得られた結果をもとに, 無加重平均距離法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average : UPGMA) を用いてクラスター解析を行った.

まず, 分離菌株の代表菌株と参照菌株の RFLP パターンを集約し, フラグメントサイズの

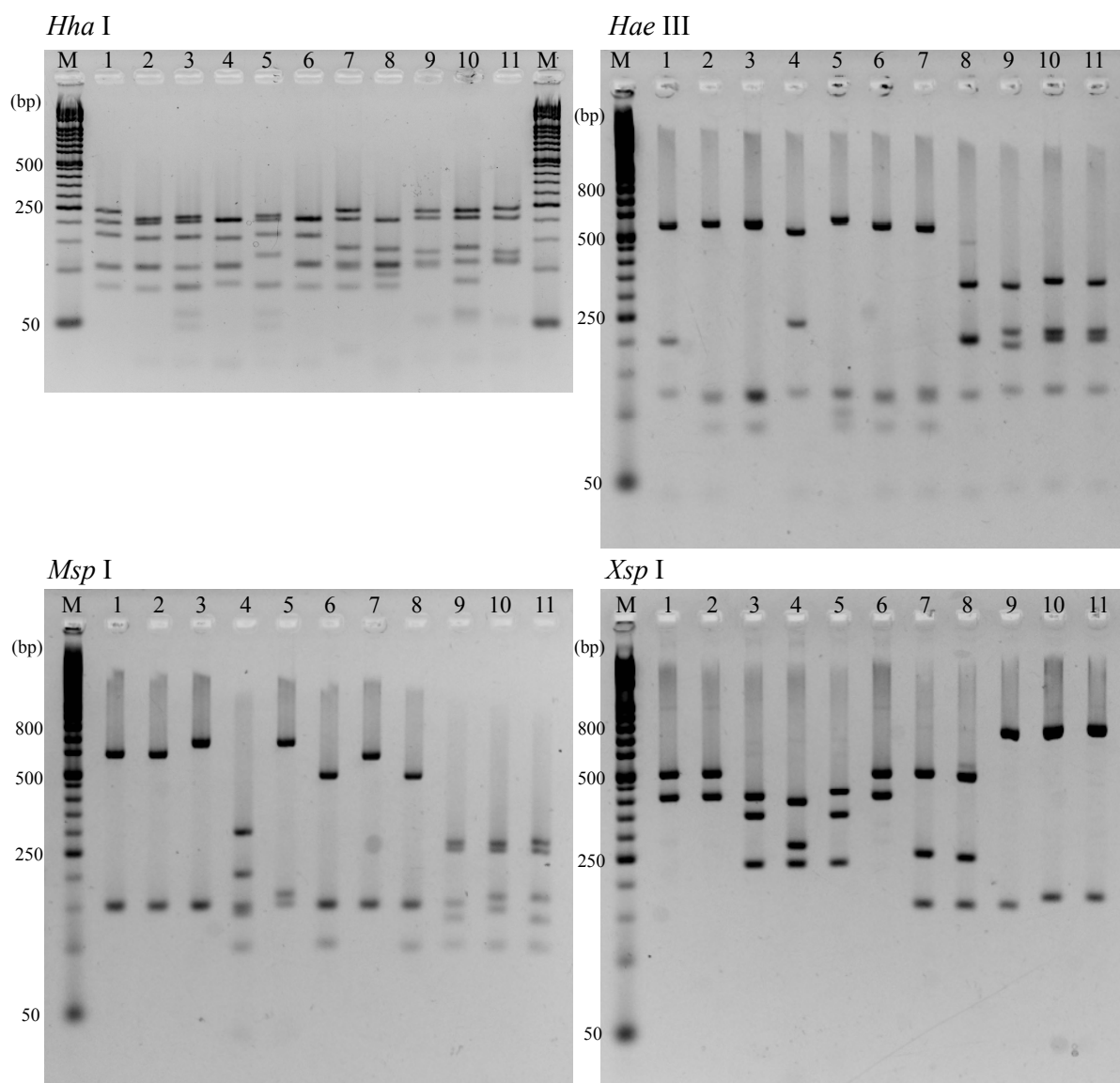


Fig. 2-1 Electrophoresis patterns of restriction fragments in PCR-RFLP analysis of the 16S-23S rRNA gene ITS region of 11 USDA reference strains. The numbers indicate reference strains: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 represent *Bradyrhizobium japonicum* USDA 4, 6^T, 38, 110, 115, 123, 124 and 135, respectively, and 9, 10 and 11 represent *Bradyrhizobium elkanii* USDA 46, 76^T and 94, respectively. M: 50 bp ladder marker.

大きいものから順に番号をつけ、各菌株間で RFLP パターンを比較し、共通のバンドおよびその菌株固有のバンドを検索した。共通のバンド数および固有のバンド数を以下の式 (1) に代入し、菌株間の遺伝的距離 (D) を算出した (Nei and Li 1979, Sakai *et al.* 1998).

$$D = 1 - [2N_{AB} / (N_A + N_B)] \quad (1)$$

N_{AB} は菌株 AB 間で共通の RFLP バンド数を、 N_A および N_B は菌株 A および菌株 B それぞれの RFLP バンド数を表している。算出した D 値から UPGMA 法に基づいて系統樹を作成し、分離菌株のクラスター解析を行った。系統樹の作成には、PHYMLIP software program Ver. 3.69 (Joseph Felsenstein and the University of Washington) を用いた。

2-2-8 土着ダイズ根粒菌群集の多様性解析

多様性の量的尺度に個体数と均等性の影響が少ない Shannon-Wiener 関数を用いて、各ダイズ品種に着生した土着ダイズ根粒菌の多様性を数値化した (MacArthur 1965, Pielou 1969, Saeki *et al.* 2008)。Shannon-Wiener 関数 (2) を以下に示した。

$$H' = - \sum P_i \ln P_i \quad (2)$$

P_i は n_i/N で表され、これは分離株の優占率を示しており、 N は分離株 ($n = 20$) の合計を、 n_i はある特定のクラスターに属する分離株の合計を示している。

また、Whittaker (1972) の提唱した生物の多様性の概念に基づくと、二つの宿主ダイズにおける根粒菌の多様性を比較する場合、宿主ダイズからそれぞれ分離されたダイズ根粒菌群集の多様性指数の加重平均を α 多様性 (H'_α)、比較する二つの宿主ダイズから分離されたダイズ根粒菌群集間のクラスター構成の差の度合いを β 多様性 (H'_β)、比較する二つの宿主ダイズから分離されたダイズ根粒菌群集全体 ($n = 40$) の多様性の度合いを γ 多様性 (H'_γ) と考えることができる (Saeki *et al.* 2008)。各クラスターに分類された分離株数の全体の分離株数に対する比 (P_i) を求め、上記の式に代入し、比較する二つのダイズ根粒菌群集間の加重平均である H'_α を求めた。次に、比較する二つのダイズ根粒菌群集 (栽培温度間または R_j 遺伝子型間) を一つの群集として捉え、同様に各クラスターに分類された分離株数の二つの群集全体の総分離株数に対する比 (P_i) を求め、上記の式に代入し、 γ 多様性を示す H'_γ を求めた。また、これら三つの多様性の度合いの関係は、 $H'_\beta = H'_\gamma - H'_\alpha$ の式で表現されるため、 H'_γ から H'_α を差し引いた値で β 多様性を示し、両群間の差異を求めた。さらに、二つの群集間の多様性の

差異を解析するためには全体の多様性を示す γ 多様性がそれぞれ異なるため、全体の多様性を表す γ 多様性に対する二つの群集間の多様性の違いを表す β 多様性の比 (H'_β/H'_γ) を比較することで評価を行った。この値が小さい場合は着生した土着ダイズ根粒菌の群集構造が類似し、反対に大きい場合は大きく異なることを示す。

2-2-9 MDS およびクラスター解析による土着ダイズ根粒菌の群集構造解析

土着ダイズ根粒菌群集間の相違を評価するために、Bray-Curtis 類似度指数に基づいた多次元尺度構成法 (Multi-dimensional scaling; MDS) による解析とクラスター解析を行った。この Bray-Curtis 類似度指数は、実際の生物群集間の性質の差を最もよく反映することができる指数の一つであると評価されている (Faith *et al.* 1987)。Bray-Curtis 類似度指数 (BC) は下記に示した式 (3) により算出した。

$$BC_{AB} = \sum |n_A - n_B| / \sum (n_A + n_B) \quad (3)$$

BC_{AB} は群集 A および B 間の非類似度を、 n_A および n_B は群集 A および B の特定のクラスターにおける株の合計の数をそれぞれ表している (Bray and Curtis 1957, Michie 1982)。MDS 解析およびクラスター解析は、the R software ver. 2.12.1 (The R Project for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>) を用いて行った。また、クラスター解析は UPGMA 法を用いて行った。

2-3 結果および考察

16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 解析の結果、11 の *Bradyrhizobium* USDA 参照菌株を含む、合計で 36 の OTU (operational taxonomic unit) が検出された (Fig. 2-2)。この結果をもとにクラスター解析を行い、作成した系統樹を Fig. 2-3 に示した。類似性の最大値が 86% を示した *B. japonicum* USDA 38 と USDA 115 間を、クラスターを識別するための基準として適用したところ、11 の参照菌株を含む 11 のクラスターを形成した。中温および高温栽培にて分離した土着ダイズ根粒菌は、*B. japonicum* USDA 6^T のクラスターに属する Bj6, USDA 38 のクラスターに属する Bj38, USDA 110 のクラスターに属する Bj110, USDA 115 のクラスターに属する Bj115, USDA 123 のクラスターに属する Bj123, そして、*B. elkanii* USDA 76^T のクラスターに属する Be76, USDA 94 のクラスターに属する Be94 の 7 つのクラスターに分類さ

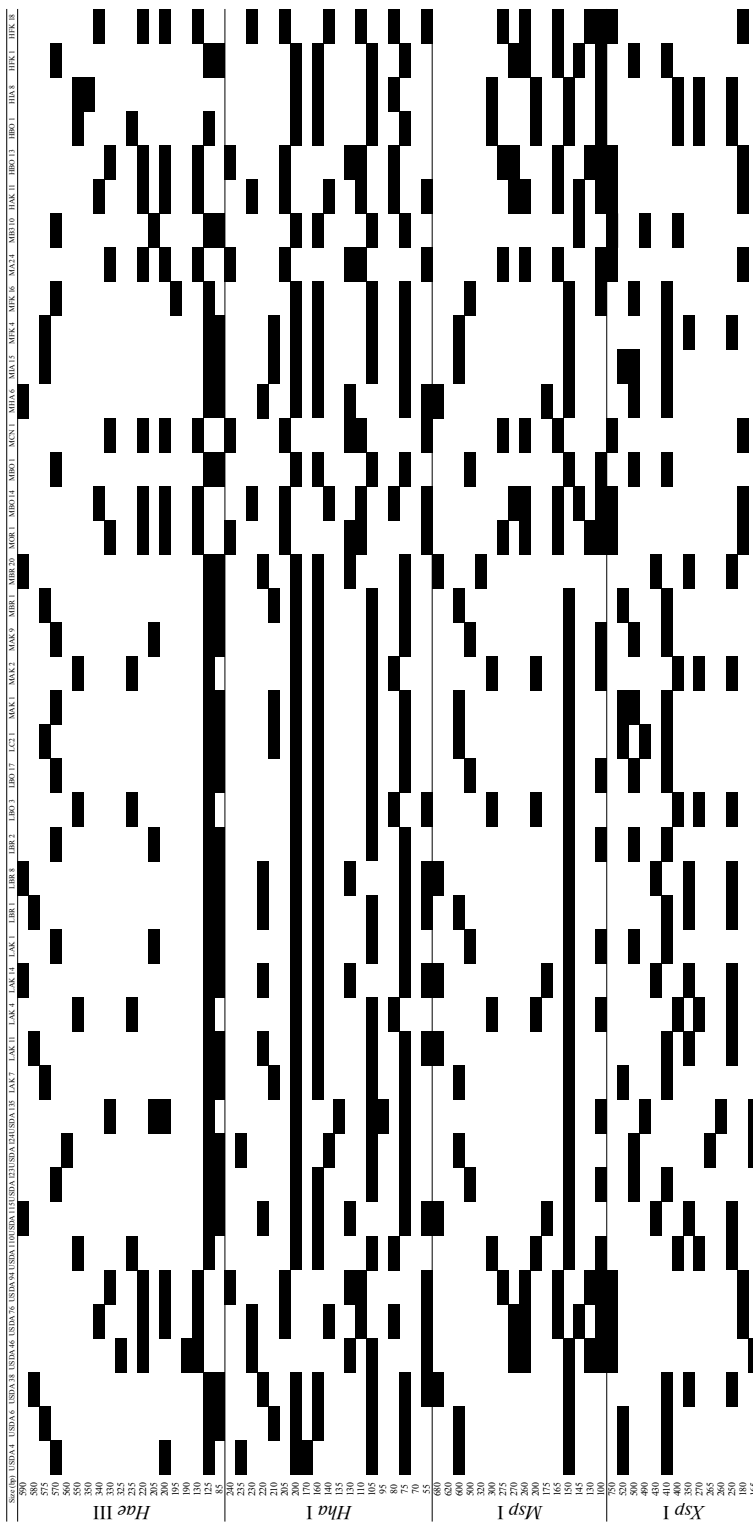


Fig. 2-2 Schematic representation of the restriction fragment length polymorphism patterns of the 16S-23S rRNA gene ITS region. Reference strains and representative isolates are indicated as follows: USDA 4, 6, 38, 110, 115, 123, 124, 135; *Bradyrhizobium japonicum* USDA 4, 6^T, 38, 110, 115, 123, 124, 135; USDA 46, 76, 94; *Bradyrhizobium elkanii* USDA 46, 76^T, 94; Low-Akishirome, Bragg, Bonminor, C242: LAK, LBR, LBO, LC2; Middle-Akishirome, Bragg, Orihime, Bonminor, CNS, Hardee, IAC-2, Fukuyutaka, A-250-3, B349: MAK, MBR, MOR, MBO, MCN, MHA, MIA, MFK, MA2, MB3; High-Akishirome, Bonminor, IAC-2, Fukuyutaka: HAK, HBO, HIA, HFK.

れた。一方、低温栽培にて分離した土着ダイズ根粒菌は、Bj6, Bj38, Bj110, Bj115, そして、Bj123 の 5 つのクラスターに分類された。低温および中温栽培における土着ダイズ根粒菌の大部分は、Bj6, Bj38, Bj110, Bj123 の 4 つのクラスターに分類され、高温栽培における土着ダイズ根粒菌の大部分は、Bj6, Bj38, Bj110, Be76, Be94 に分類された。Bj123 クラスターの土着ダイズ根粒菌は、高温栽培では主要なクラスターとはならなかった (Fig. 2-3)。

クラスター解析および系統樹の結果をもとに、*Rj* 遺伝子型ダイズ品種毎にまとめた各クラスターの根粒占有率を Fig. 2-4 および Table 2-1 に示した。低温栽培における non-*Rj*, *Rj*₄ 遺伝子型で最も優占していた Bj123 クラスターの占有率は、*Rj* 遺伝子型に関わらず、栽培温度の上昇に伴って有意に減少した。一方、Bj110 クラスターの占有率は、栽培温度の上昇に伴って増加する傾向にあった。Be76 や Be94 クラスターの占有率は、Bj110 クラスターと同様の傾向を示したが、Bj110 クラスターの占有率よりも低かった。これは、本実験で供試した土壌中には、もともとこれらのクラスターに属する土着ダイズ根粒菌の存在割合が小さかったことに起因すると考えられた (Saeki *et al.* 2006, Minami *et al.* 2009)。さらに、*Rj*₂ 遺伝子を保有する *Rj*₂*Rj*₃ や *Rj*₂*Rj*₃*Rj*₄ 遺伝子型ダイズ品種は、他の *Rj* 遺伝子型ダイズ品種と比較して Bj110 クラスターが 50-73.8% の高い占有率を示したことから、宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型は特定のダイズ根粒菌の根粒着生に影響を及ぼすことが示唆された (Table 2-1)。Yamakawa *et al.* (2003) は、*B. japonicum* USDA 110 の接種において、*Rj*₂*Rj*₃*Rj*₄ 遺伝子型ダイズ実験系統が他の *Rj* 遺伝子型ダイズ品種よりも優れていることを報告した。本実験では、*B. japonicum* USDA 110 の接種効率については検証を行っていないが、本実験で得られた結果は、*Rj*₂*Rj*₃ や *Rj*₂*Rj*₃*Rj*₄ 遺伝子型ダイズ品種が接種菌としての *B. japonicum* USDA 110 の根粒占有率を高め得ることを示唆した。また、*Rj*₂*Rj*₃*Rj*₄ 遺伝子型における Bj110 クラスターの占有率は試験した 3 パターンの栽培温度間で有意な差が認められなかったことから、*Rj*₂*Rj*₃*Rj*₄ 遺伝子型ダイズ実験系統は栽培温度の影響を受けずに *B. japonicum* USDA 110 の接種効率を高め得ることを示唆した。

各ダイズ品種における栽培温度間の土着ダイズ根粒菌群集構造の差異の程度を、Shannon-Wiener 関数を用いた各多様性指数で表したものを Table 2-2 に示し、 H'_β/H'_γ の値で評価した各 *Rj* 遺伝子型の栽培温度間の土着ダイズ根粒菌群集構造の差異の程度を Fig. 2-5 に示した。低温と高温栽培間における H'_β/H'_γ の値は、他の栽培温度間の組み合わせの値より高かったが、各 *Rj* 遺伝子型ダイズ品種間の土着ダイズ根粒菌群集構造の変化が大きかったために、

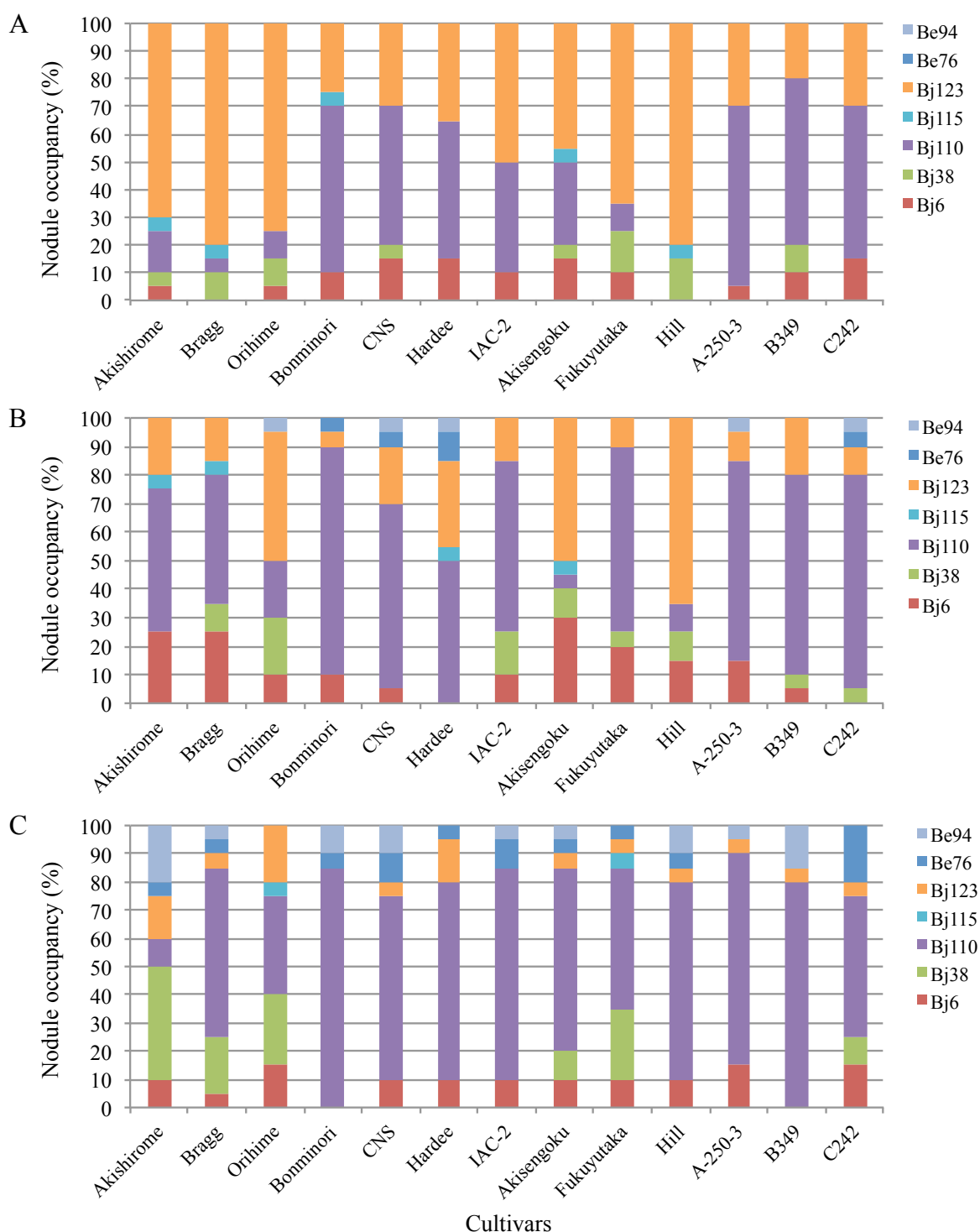


Fig. 2-4 Nodule occupancy of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in each cultivation temperature. A; Low cultivation temperature condition, B; Middle cultivation temperature condition, C; High cultivation temperature condition. Five clusters, Bj6, Bj38, Bj110, Bj115 and Bj123 showed identical or similar RFLP patterns to *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T, 38, 110, 115 and 123, respectively. Cluster Be76 and Be94 showed identical or similar RFLP patterns to *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T and USDA 94, respectively.

Table 2-1 Nodule occupancy rate of soybean-nodulating Bradyrhizobia for cluster analysis ^a

Cluster	Nodule occupancy (%) of clusters on each <i>Rj</i> -genotype											
	non- <i>Rj</i>			<i>Rj₂Rj₃</i>			<i>Rj₄</i>			<i>Rj₂Rj₃Rj₄</i>		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High	Low	Middle	High	Low	Middle	High
Bj6	3.3 ± 1.7 ^b	20.0 ± 5.0 ^a	10.0 ± 2.9 ^{ab}	12.5 ± 1.4	6.3 ± 2.4	7.5 ± 2.5	8.3 ± 4.4	21.7 ± 4.4	10.0 ± 5.0	10.0 ± 2.9	6.7 ± 4.4	10.0 ± 5.0
Bj38	8.3 ± 1.7	10.0 ± 5.8	28.3 ± 6.0	1.25 ± 1.3	3.8 ± 3.8	-	11.7 ± 3.3	8.3 ± 1.7	11.7 ± 7.3	3.3 ± 3.3	3.3 ± 1.7	3.3 ± 3.3
Bj110	10.0 ± 2.9	38.3 ± 9.3	35.0 ± 14.4	50.0 ± 4.1 ^b	63.8 ± 6.3 ^{ab}	73.8 ± 4.3 ^a	13.3 ± 8.8	26.7 ± 19.2	61.7 ± 6.0	60.0 ± 2.9	71.7 ± 1.7	68.3 ± 9.3
Bj115	3.3 ± 1.7	3.3 ± 1.7	1.7 ± 1.7	1.25 ± 1.3	1.3 ± 1.3	-	3.3 ± 1.7	1.7 ± 1.7	-	-	-	-
Bj123	75.0 ± 2.9 ^a	26.7 ± 9.3 ^b	13.3 ± 4.4 ^c	35.0 ± 5.4 ^a	17.5 ± 5.2 ^{ab}	5.0 ± 3.5 ^b	63.3 ± 10.1 ^a	41.7 ± 16.4 ^{ab}	5.0 ± 0.0 ^b	26.7 ± 3.3 ^a	13.3 ± 3.3 ^b	5.0 ± 0.0 ^b
Be76	-	-	3.3 ± 1.7	-	5.0 ± 2.0	7.5 ± 1.4	-	-	5.0 ± 0.0	-	1.7 ± 1.7	6.7 ± 6.7
Be94	-	1.7 ± 1.7	8.3 ± 6.0	-	2.5 ± 1.4	6.3 ± 2.4	-	-	5.0 ± 2.9	-	3.3 ± 1.7	6.7 ± 4.4

^a Nodule occupancy rate was expressed as the mean ± SE (*n* = 3 or 4) of DNA samples belonging to certain clusters within identical *Rj*-genotypes. Significantly different test results were found for each *Rj*-genotype. Different superscript letters are significantly different (Tukey-Kramer test) at *P* < 0.05 for different cultivation temperatures in the same *Rj*-genotype. -, no detected.

Table 2-2. Alpha, beta and gamma diversity indices for each cultivation temperature pair for each host soybean cultivar ^a

		Diversity between each cultivation temperatures on each host soybean cultivar																				
		non- R_j			$R_j R_j$																	
		Bragg			Orihime			Bonminorori			CNS			Hardee			IAC-2					
		L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H			
α diversity (H')	α)	1.07	1.28	1.37	1.04	0.82	1.15	1.10	1.15	1.43	0.87	0.78	0.61	1.10	1.13	1.09	1.12	0.96	1.08	1.02	0.88	0.97
β diversity (H')	β)	0.18	0.28	0.33	0.30	0.56	0.27	0.06	0.17	0.07	0.08	0.20	0.09	0.08	0.14	0.04	0.12	0.05	0.09	0.11	0.25	0.16
γ diversity (H')	γ)	1.25	1.57	1.71	1.34	1.38	1.41	1.16	1.32	1.50	0.95	0.98	0.70	1.17	1.27	1.12	1.24	1.01	1.17	1.14	1.14	1.13
		$R_j R_j R_j R_j$																				
		Fukuyutaka			Hill			A-250-3			B349			C242								
		L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H	L - M	L - H	M - H			
α diversity (H')	α)	1.27	1.25	1.21	1.00	1.20	1.18	0.82	0.81	1.02	0.85	0.80	0.86	0.98	0.85	0.74	0.93	1.15	1.11			
β diversity (H')	β)	0.07	0.18	0.34	0.25	0.27	0.09	0.11	0.60	0.37	0.06	0.08	0.005	0.01	0.15	0.11	0.14	0.15	0.11			
γ diversity (H')	γ)	1.34	1.43	1.55	1.25	1.47	1.27	0.93	1.41	1.39	0.91	0.88	0.86	0.99	1.00	0.85	1.07	1.31	1.23			

^a L-M, L-H and M-H are indicated as combinations of each cultivation temperatures such as low & middle, low & high and middle & high.

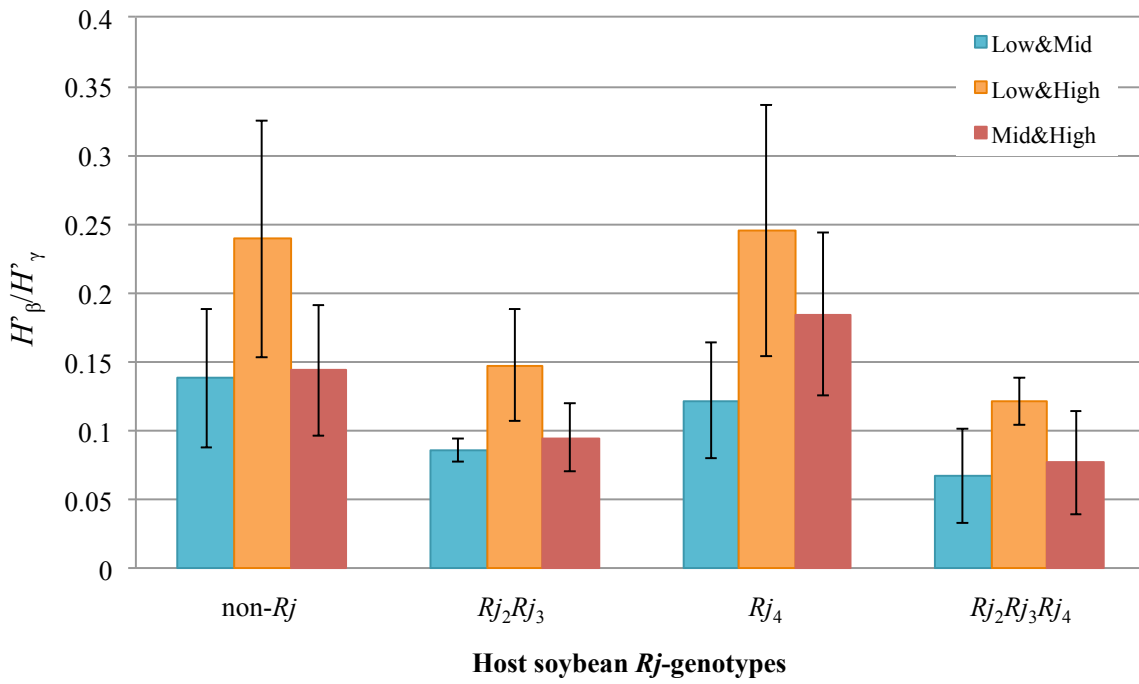


Fig. 2-5 Difference of beta diversity to gamma diversity (H_{β}/H_{γ}) among pairs of cultivation temperatures. Each value was expressed as the mean \pm SE ($n = 3$ or 4).

有意な差が認められなかった。これには、ダイズに根粒着生したダイズ根粒菌群集構造について栽培温度におけるダイズ品種の応答が、同じ R_j 遺伝子を保有しているダイズ品種であるとしても異なることが理由の一つとして考えられた。さらに、 $R_jR_jR_jR_j$ 遺伝子型ダイズ実験系統である A-250-3, B349, C242 の 3 系統の H'_β/H'_γ の値は、non- R_j や R_{j4} 遺伝子型ダイズ品種の H'_β/H'_γ の値よりも低い傾向にあり、 $R_jR_jR_j$ 遺伝子型ダイズ品種の H'_β/H'_γ の値と類似していた (Table 2-2, Fig. 2-5)。 $R_jR_jR_jR_j$ 遺伝子型ダイズ実験系統である A-250-3, B349, C242 は、 $R_jR_jR_j$ 遺伝子型ダイズ品種である IAC-2 と R_{j4} 遺伝子型ダイズ品種である Hill の交配によって作出された R_j 遺伝子集積ダイズ実験系統である (Yamakawa *et al.* 1999)。A-250-3, B349, C242 の各栽培温度間の群集構造の差異が $R_jR_jR_j$ 遺伝子型ダイズ品種のものと類似したのは、IAC-2 の示す形質を A-250-3, B349, C242 が保有しているためと考えられた (Fig. 2-5)。

Bray-Curtis 類似度指数をもとにしたクラスター解析および MDS 解析の結果を、それぞれ、Figs. 2-6, 2-7 に示した。クラスター解析の結果、各群集の MDS プロットは、Cluster I, II, III, IV の大きく 4 つのクラスターに分類された (Fig. 2-6)。この結果を MDS 解析で得られたプロットに適応したところ、低温栽培における群集の MDS プロットは、主に、Cluster I, II, III に分類され、中温栽培における群集の MDS プロットは、主に、Cluster III および Cluster IV に分類され、高温栽培における群集の MDS プロットは、大部分が Cluster IV に分類された (Figs. 2-6, 2-7)。アキシロメ、アキセンゴク、フクユタカの群集の MDS プロットを除く大部分の群集の MDS プロットは、栽培温度の上昇に伴って、図の左側から右側へ (Cluster ナンバーの小さい方から大きい方へ) 遷移した (Fig. 2-7)。さらに、高温栽培におけるボンミノリ、CNS, IAC-2, Hill, A-250-3, B349 の 6 ダイズ品種の MDS プロットは、最も右側の Cluster IV に分布し、低温栽培におけるボンミノリ、CNS, Hardee, A-250-3, B349, C242 の 6 ダイズ品種の MDS プロットは、Cluster III に分布した。一方、低温栽培におけるアキシロメ、Bragg, オリヒメ、フクユタカ、Hill の 5 ダイズ品種の MDS プロットは、最も左側の Cluster I に分布した。これらの結果と各クラスターに属する分離株の数を比較したところ、MDS プロットの分布は、Bj110 クラスターと Bj123 クラスターの 2 つの主要なクラスターによって影響を受けていることが示された (Figs. 2-3, 2-7)。Bj110 クラスターダイズ根粒菌の分離数が多い時は Cluster IV に、Bj123 クラスターダイズ根粒菌の分離数が多い時は Cluster I に MDS プロットが付置される (Fig. 2-7)。しかしながら、低温栽培における $R_jR_jR_j$ 遺伝子を保有するボンミノ

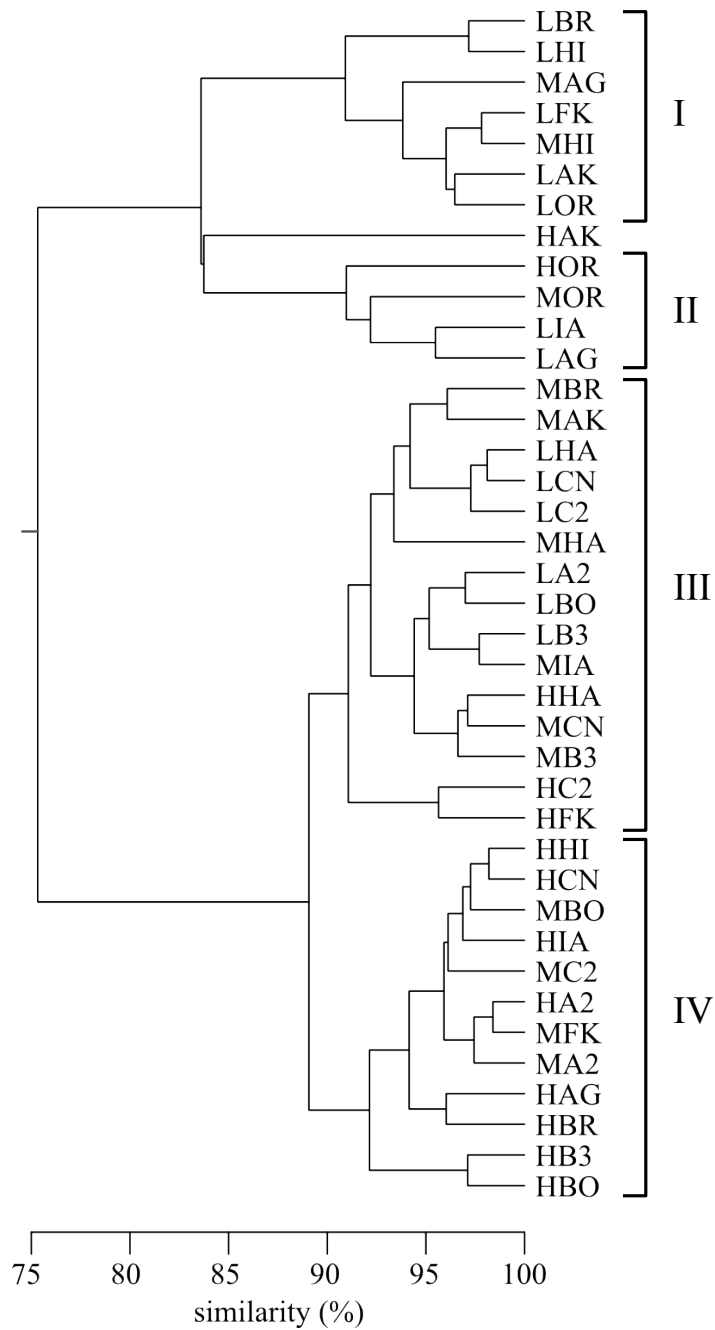


Fig. 2-6 Dendrogram based on the Bray-Curtis similarity measure. The numbers of I, II, III and IV indicate Cluster I, II, III and IV, respectively. The names of OTUs were expressed in combination of cultivation temperature and soybean cultivar. Low, Middle and High cultivation temperature were expressed L, M and H, respectively. The each soybean cultivar were expressed AK (Akishirome), BR (Bragg), OR (Orihime), BO (Bonminori), CN (CNS), HA (Hardee), IA (IAC-2), AG (Akisengoku), FK (Fukuyutaka), HI (Hill), A2 (A-250-3), B3 (B349) and C2 (C242).

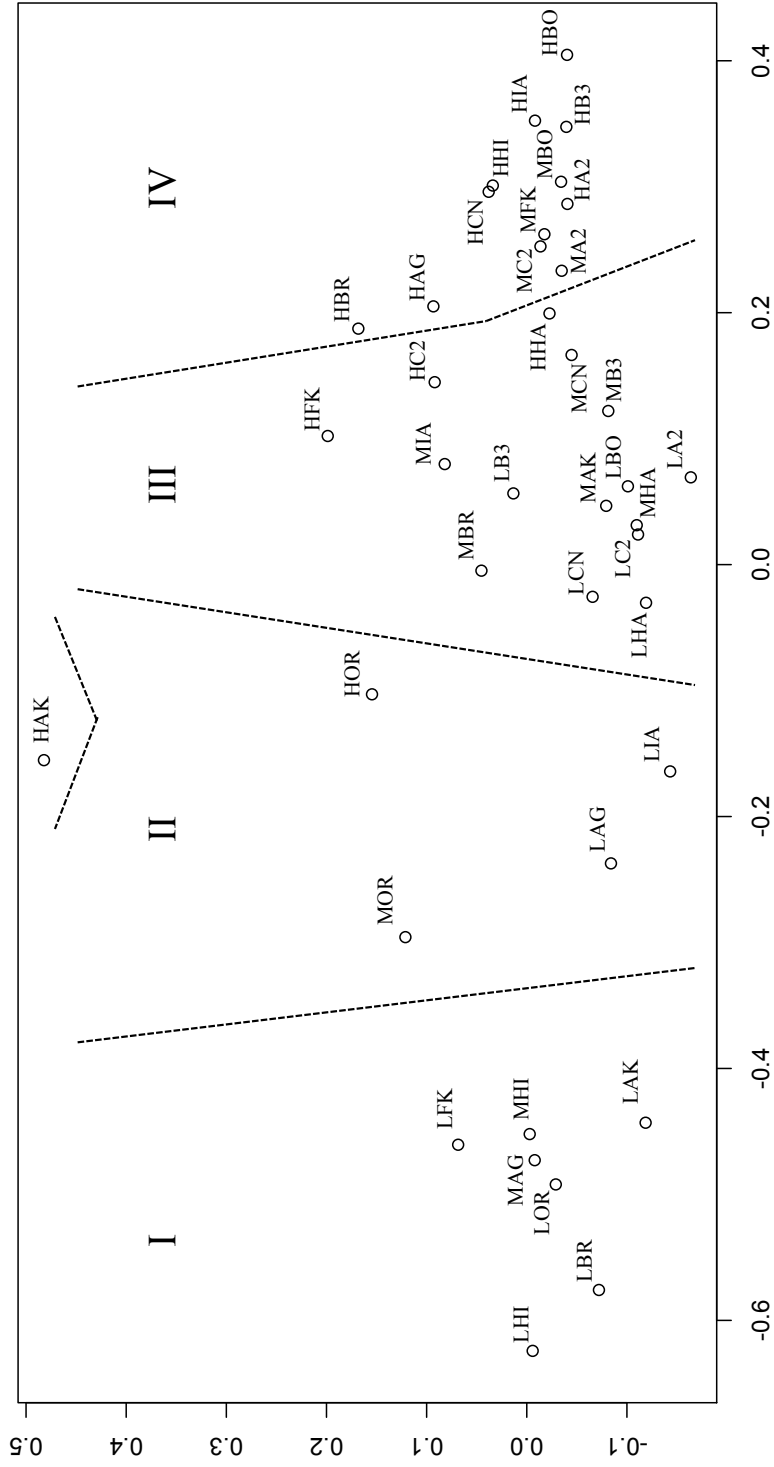


Fig. 2-7 Multi dimensional scaling (MDS) plot of bradyrhizobial communities in combinations of soybean cultivars and cultivation temperatures based on the Bray-Curtis similarity measure. The numbers of I, II, III and IV indicate Cluster I, II, III and IV, respectively. The lines show the boundaries of each cluster. The names of OTUs were expressed in combination of cultivation temperature and soybean cultivar. The expression of cultivation temperatures and soybean cultivars refer to Fig. 2-5.

り, CNS, Hardee, A-250-3, B349, C242 の 6 ダイズ品種の MDS プロットは, Cluster I もしくは Cluster II に分布しなかった (Fig. 2-7). これは, R_j2R_j3 遺伝子保有ダイズ品種が低温栽培下においても Bj110 クラスターの土着ダイズ根粒菌の高い占有率を示したことに起因すると考えられる (Table 2-1). また, アキシロメおよびフクユタカの 2 ダイズ品種における MDS プロットの変遷は, 他のダイズ品種の MDS プロットの遷移と比較すると不規則ではあったが, 部分的には栽培温度の上昇に伴って左側から右側へと遷移した (Fig. 2-7). アキシロメおよびフクユタカに関しては, 中温栽培における MDS プロットが Cluster III もしくは Cluster IV に分布したため, Bj110 クラスターダイズ根粒菌の占有率が高まる至適温度が中温栽培域にあると考えられた.

以上, 本実験で得られた結果は, 宿主ダイズの R_j 遺伝子型および栽培温度が, 宿主ダイズに感染する土着ダイズ根粒菌の群集構造に影響を及ぼすことを示唆した (Shiro *et al.* 2012).

第3章 アメリカにおける土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布

3-1 緒言

日本における土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布は、北から南へと緯度に沿って一定のニッチ (生態的地位) の変遷を示すことが報告されており、その土着ダイズ根粒菌群集は緯度と高い相関を示すことが報告されている (Saeki *et al.* 2006, 2008, 2013, Saeki 2011). アメリカは日本の国土とほぼ同緯度に位置し、主要なダイズ生産地の緯度も類似している. アメリカにおける土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布の解明は、ダイズ根粒菌の生態を理解する上で重要な知見となり得る. そこで、本実験では、アメリカにおける土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布を解明することを目的とし、アメリカの北部から南部地域の地理的に離れた土壌から土着ダイズ根粒菌を分離し、16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 解析を用いて分離した土着ダイズ根粒菌のクラスター解析を行い、この結果をもとに、数理生態学的手法を用いた群集構造解析により、土着ダイズ根粒菌群集と緯度との関係について評価した.

3-2 材料および方法

3-2-1 供試土壌

供試土壌として、アメリカの Michigan, Ohio, Kentucky, North Carolina, Alabama (1 および 2), Georgia, Florida, Louisiana の 8 州, 合計 9 地点の土壌サンプルを用いた. これらの土壌は 2010 年 8 月にサンプリングされた. 供試土壌のサンプリング地点の緯度や経度, 土壌 pH, EC などの情報を Table 3-1 に示した.

3-2-2 土着ダイズ根粒菌の分離

供試土壌から土着ダイズ根粒菌を分離するために、Bragg (non- R_j), CNS (R_jR_j), Hill (R_j) の 3 遺伝子型 3 品種のダイズのポット栽培を行った. 栽培用ポットの調製, ダイズ種子の表皮殺菌, 播種は 2-2-2 と同様に行った. 栽培はグロースチャンバー (MLR-351, SANYO) で 4 週間行い, 栽培期間中は 1 週間毎に滅菌蒸留水をポットの初期重量となるように加えた. グロースチャンバー内における栽培環境は, 明期 28°C 16 時間, 暗期 23°C 8 時間と設定した.

Table 3-1 Soil sample sites for analysis

Sampling sites	Soil group ^a	Latitude, Longitude	Δlatitude	pH (H ₂ O)	EC (dS m ⁻¹)	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, -85.48°W	2.37	5.18	0.04	0.91	0.06	15.2
Georgia (GA)	Loamy Sand	31.48°N, -83.52°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

^a Identification of soil group referred to website of the following: <http://websoilsurvey.nrcs.usda.gov/app/WebSoilSurvey.aspx>

4 週間の栽培後、2-2-2 と同様の方法で根粒の分離および表皮殺菌を行った。根粒は 1 ダイズ品種当たりランダムに 23 個もしくは 24 個選抜し、洗浄後の根粒は-80°C で保存した。

根粒から土着ダイズ根粒菌を分離・培養するためにコンゴレッド (CR) または BTB を含む Yeast extract-Mannitol Agar (YMA) 平板培地 (Vincent 1970, Keyser *et al.* 1982) を用いた (以下、コンゴレッドを含む YMA 平板培地を YMA-CR 平板培地、BTB を含む YMA 平板培地を YMA-BTB 平板培地と略す)。1 L の蒸留水に K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, Yeast Extract (nacalai tesque) 0.4 g, Mannitol 10 g を加え、よく攪拌した後に pH を 6.8 に調整し、YMA-CR 平板培地を調製する場合は 0.25% コンゴレッド溶液 10 mL を、YMA-BTB 平板培地を調製する場合は 0.5% BTB 溶液 5mL をそれぞれ加えた。さらに、Agar (nacalai tesque) を 15 g 加え、これをオートクレーブ滅菌 (121°C 20 分) し、クリーンベンチ内で滅菌シャーレに約 20 mL ずつ分注し、固化させた。また、YMA-CR 培地を 1.8 mL 容スタブチューブに約 1.2 mL 分注したのもも調製し、シングルコロニーのストック用培地とした。

ランダムに選抜した根粒を 1 個ずつマイクロプレートのウェルに入れ、そこに滅菌蒸留水 100 μ L を加え、滅菌した爪楊枝でホモジナイズした。この懸濁液を白金耳で YMA-CR 平板培地に画線接種し、28°C の暗所で 5-7 日間培養した。約 1 週間の培養後、シングルコロニーを YMA-BTB 平板培地に継代し、28°C の暗所で 5-7 日間培養した。シングルコロニーは、滅菌爪楊枝でストック用の YMA-CR 培地に植菌し、培養した後、4°C で保存した。土着ダイズ根粒菌は、1 土壌サンプル当たり 69 もしくは 72 株を分離した。また、分離した株は、土壌サンプルの地名 (Table 3-1) と供試したダイズ品種 (Bragg, B ; CNS, C ; Hill, H), 分離株のナンバー (1-23 もしくは 1-24) の組み合わせで、例えば、Michigan からの分離株は MIB1-23, MIC1-23, MIH1-23 となるようナンバリングした。

3-2-3 分離菌株および参照菌株のゲノム DNA 抽出

3-2-2 で供試土壌から分離した土着ダイズ根粒菌および 2-2-5 で用いた 11 の *Bradyrhizonium* USDA 参照菌株のゲノム DNA 抽出を行った。まず、2-2-5 と同様に HM 液体培地での培養を行った。各菌株は、1.5 mL の HM 液体培地に植菌し、28°C の暗所で 5-7 日間培養した。培養後、各菌株のゲノム DNA を 2-2-5 と同様の方法で抽出した。

3-2-4 16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 解析

3-2-3 で抽出した分離菌株および参照菌株のゲノム DNA 溶液をテンプレートとして 16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR 増幅を行い、その PCR 産物を 4 種の制限酵素 *Hae* III, *Hha* I, *Msp* I, *Xsp* I で処理した。PCR および制限酵素処理については、2-2-4 および 2-2-6 と同様に行った。また、制限酵素処理後の消化液の電気泳動、RFLP パターンの比較、代表菌株の選抜等も 2-2-6 と同様に行った。

3-2-5 土着ダイズ根粒菌のクラスター解析および系統樹作成

3-2-4 で得られた結果をもとに、2-2-7 と同様に代表菌株および参照菌株のクラスター解析、そして、系統樹の作成を行った。

3-2-6 土着ダイズ根粒菌群集の多様性解析

3-2-5 のクラスター解析の結果をもとに、Shannon-Wiener 関数を用いて各供試土壌から分離した土着ダイズ根粒菌群集の多様性解析を行った。多様性解析は、2-2-8 と同様に行った。

3-2-7 MDS, クラスター解析, 極座標付けによる土着ダイズ根粒菌の群集構造解析

土着ダイズ根粒菌群集の特性と供試土壌のサンプリング地点間の相違を特徴付けるために、Bray-Curtis 類似度指数に基づいた MDS 解析とクラスター解析を行った。これらは、the R software ver. 2.15.1 を用いて 2-2-9 と同様に行った。

さらに、土着ダイズ根粒菌群集と緯度との関係性を評価するために、極座標付けを行った。極座標付けとは、ある環境傾度に沿っていくつかの群集サンプルをとった際に、その傾度に対して最も離れた 2 地点を主軸の両端に置き、残りの地点をこの主軸上に座標付けする手法である (Whittaker 1967, 小林 1995, Saeki *et al.* 2008)。まず、MDS で得られたプロットを 3 次元空間上に付置し、得られた座標値 (x , y , z 座標) に基づいて土着ダイズ根粒菌群集の多様性を相対的な距離として換算した。MDS プロット間の距離は、以下に示したユークリッド距離 (Ed) の関数 (4) で算出した。

$$Ed_{AB} = (|X_A - X_B|^2 + |Y_A - Y_B|^2 + |Z_A - Z_B|^2)^{1/2} \quad (4)$$

Ed_{AB} は、MDS プロットにおける群集 A および B 間の直線距離で、 X_A と X_B , Y_A と Y_B , Z_A と Z_B は、それぞれ、群集 A および B の x , y , z 座標を表している。ピタゴラスの定理を用いた極座標付けの説明図を Fig. 3-1 に示した。最も緯度が離れている Michigan と Louisiana の群集を 100% の相違があると見なし、両極の群集からのそれぞれの距離を極差異 (Polar difference ; Pd) に変換した。極差異 (Pd) は 0% の極 (Louisiana の土着ダイズ根粒菌群集) からの値を示しており、以下に示した式 (5) より算出した。

$$Pd = (L^2 + D_1^2 - D_2^2) / 2L \quad (5)$$

L は主軸の合計の長さ (100%) を表しており、 D_1 および D_2 は特定の土着ダイズ根粒菌群集と Louisiana および Michigan それぞれの群集間の百分率差異を表している (Whittaker 1967)。

3-3 結果および考察

各供試土壌から分離した土着ダイズ根粒菌株について、YMA-BTB 培地におけるダイズ根粒菌の属の判定を行ったところ、全ての分離株で BTB の色が緑から青に変化したため、*Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌であると判定された (data not shown)。16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 解析の結果、11 の *Bradyrhizobium* USDA 参照菌株を含む、合計で 24 の OTU (operational taxonomic unit) が検出された (Fig. 3-2)。この結果をもとにクラスター解析を行い、作成した系統樹を Fig. 3-3 に示した。類似性の最大値が 90% を示した *B. elkanii* USDA 76^T と USDA 94 間を、クラスターを識別するための基準として適用したところ、11 の参照菌株のクラスターと参照菌株とは異なるクラスターを形成した 1 クラスターを含む 12 のクラスターを形成した。全ての土着ダイズ根粒菌株は、Bj6, Bj38, Bj110, Bj123, Bj124, Be46, Be76, Be94, そして、BeOH の 9 つのクラスターに分類された。Bj6, Bj38, Bj110, Bj123, Bj124 は、*B. japonicum* USDA 6^T, 38, 110, 123, 124 と同一のもしくは類似した RFLP パターンを示すクラスターをそれぞれ表しており、Be46, Be76, Be94 は、*B. elkanii* USDA 46, 76^T, 94 と同一もしくは類似した RFLP パターンを示すクラスターをそれぞれ表している。BeOH クラスターは、5 地点の土壌から分離され、*B. elkanii* 種ではあるが参照菌株とは独立したクラスターを構成した (Fig. 3-3)。クラスター解析の結果をもとに、各クラスターに属する土着ダイズ根粒菌の地理的分布と占有率を Fig. 3-4 に示した。Bj123 クラスターに属する分離株は Michigan や Ohio の北部地域で検出されたのに対し、Bj6 クラスターに属する分離株は

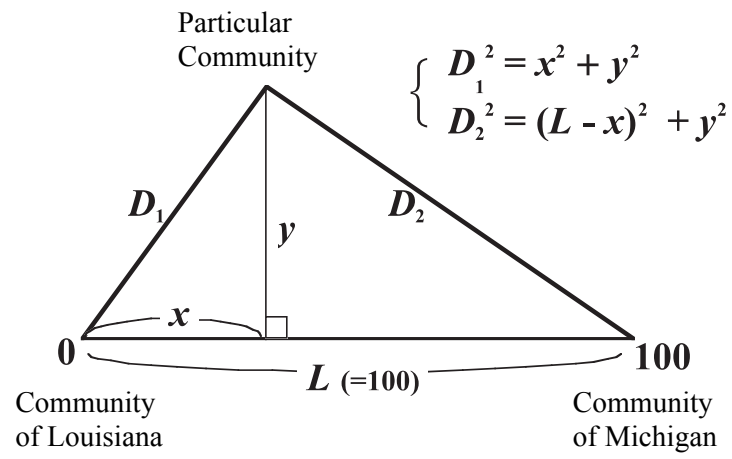


Fig. 3-1 Schematic representation of polar ordination analysis.

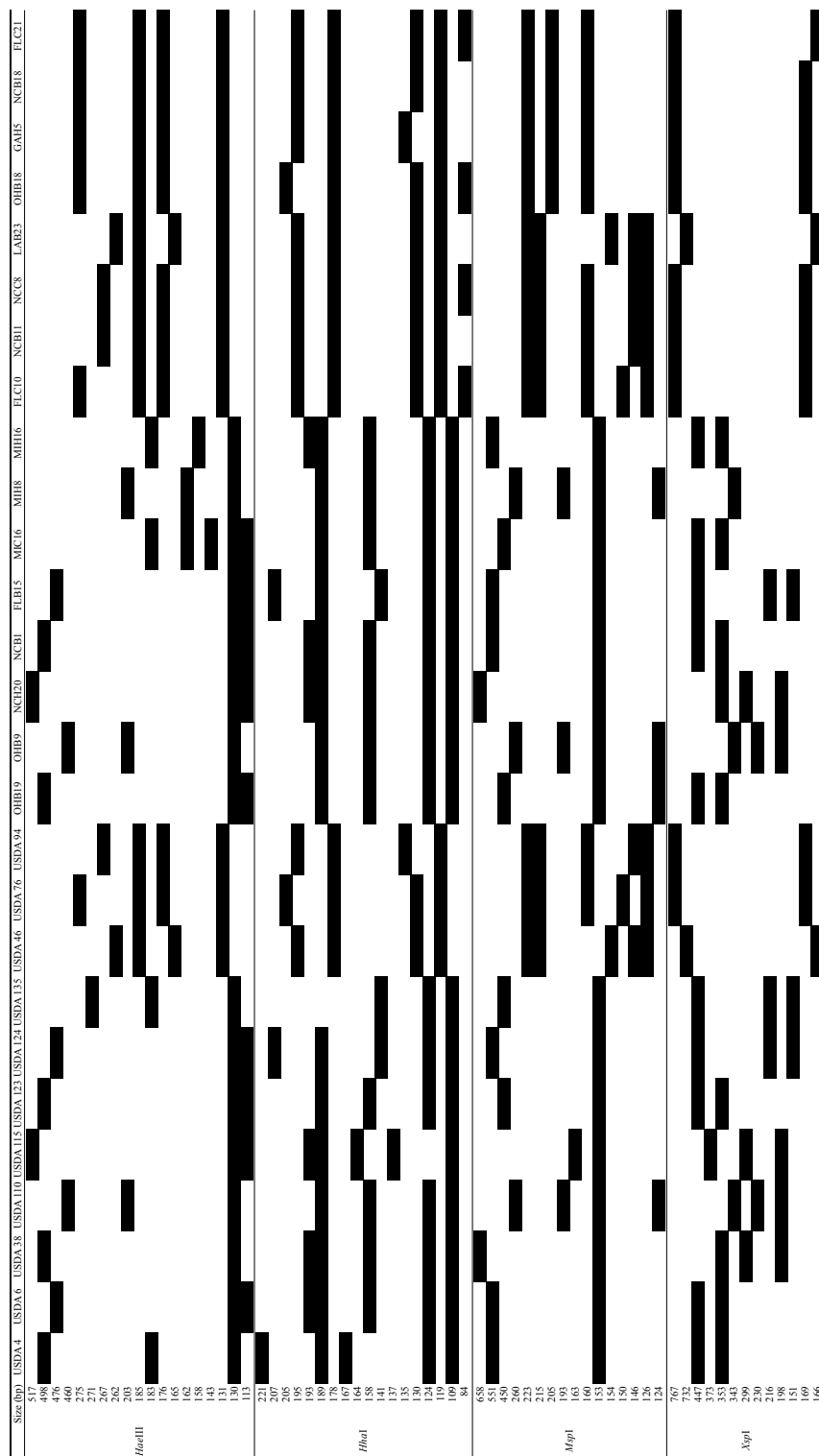


Fig. 3-2 Schematic representation of RFLP patterns of the 16S-23S rRNA gene ITS region. Reference strains and representative isolates are indicated: USDA 4, 6, 38, 110, 115, 123, 124 and 135 represent *Bradyrhizobium japonicum* USDA 4, 6^T, 38, 110, 115, 123, 124 and 135, respectively, and USDA 46, 76 and 94 represent *Bradyrhizobium elkanii* USDA 46, 76^T and 94, respectively. MIC, MIH, OHB, NCB, NCC, NCH, GAH, FLB, FLC and LAB represent Michigan-CNS, Michigan-Hill, Ohio-Bragg, North Carolina-Bragg, North Carolina-CNS, North Carolina-Hill, Georgia-Hill, Florida-Bragg, Florida-CNS and Louisiana-Bragg, respectively.

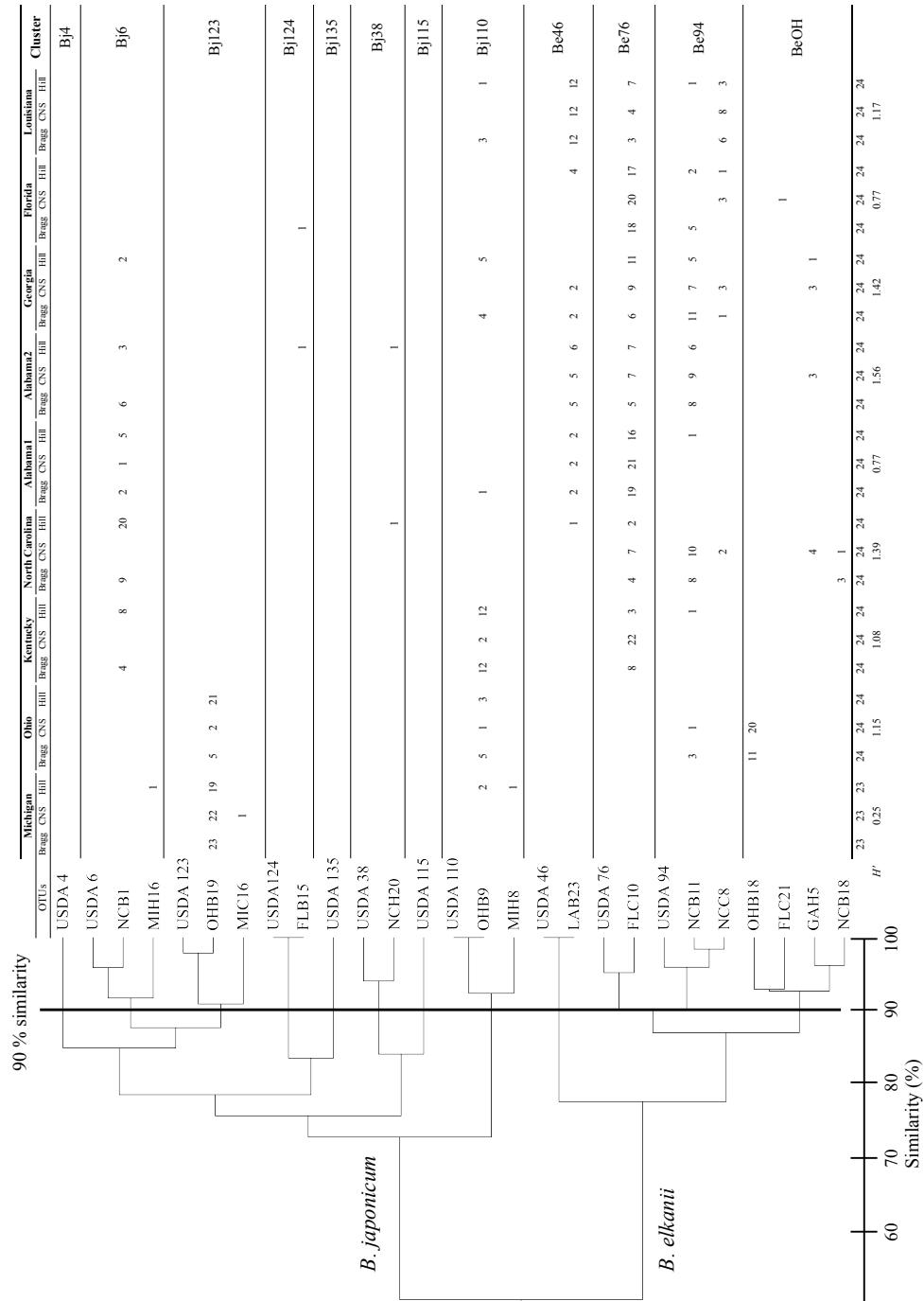


Fig. 3-3 Dendrogram of the 16S-23S rRNA gene ITS region of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia and *Bradyrhizobium* USDA reference strains. The similarity between *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76[†] and USDA 94 (which was 90%) was applied as the criterion to differentiate the clusters. Clusters were designated as indicated on the right. The diversity index (H') was calculated using the following equation: $H' = -\sum P_i \ln P_i$.

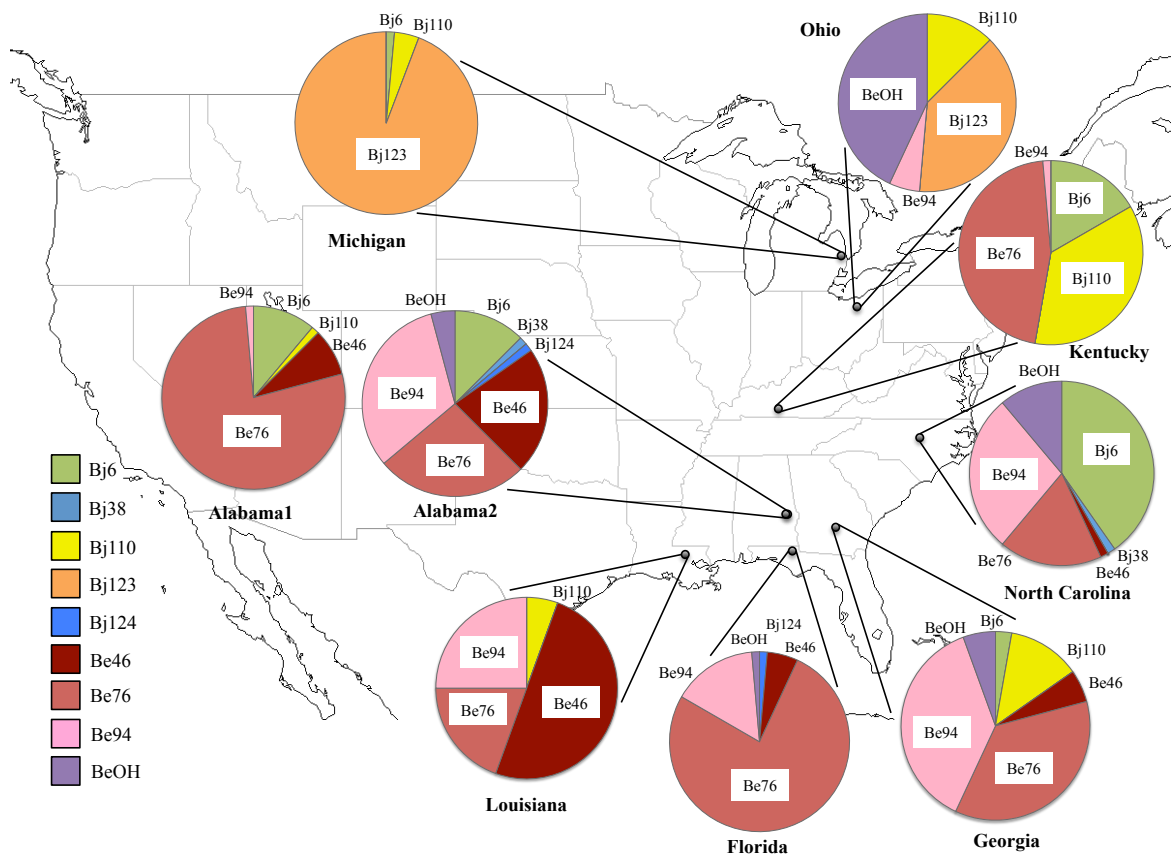


Fig. 3-4 Distribution of clusters and the population ratio of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in USA.

Kentucky, North Carolina, Alabama の中部地域で検出され, Be46 クラスターに属する分離株は Georgia, Florida, Louisiana の南部地域で検出された. さらに, 南部地域は, Be46, Be76, Be94 のクラスターに属する *B. elkanii* の分離株によって占められていた. *B. elkanii* の優占度は, 中部から南部地域における *B. japonicum* の優占度を超えていた (Figs. 3-3, 3-4). Keyser *et al.* (1984) は, アメリカ 12 州 (Arkansas, Delaware, Florida, Kansas, Louisiana, Minnesota, Mississippi, New Jersey, North Carolina, Pennsylvania, South Carolina, South Dakota) における *Bradyrhizobium* serogroup の分布について調査し, *B. elkanii* USDA 31 に属する serogroup 31 が最も優占しており (21.5%), 続いて, *B. japonicum* USDA 123 に属する serogroup 123 (13.6%), *B. elkanii* USDA 76^T に属する serogroup 76 (10.2%) が優占していることを報告した. 興味深いことに, この報告は, 本実験で用いた 16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 解析の結果を裏付けるような, *B. elkanii* が *B. japonicum* よりも優占しているという結果を示した. また, Fuhrmann (1990) は, Delaware の 18 地点の土着ダイズ根粒菌の多様性と共生の有効性について, 血清学, 形態学, リゾビトキシン生産性, そして, ヒドロゲナーゼの表現型を用いて調査し, *B. elkanii* USDA 94 に属する serogroup 94 (17.5%), *B. japonicum* USDA 6^T に属する serogroup 6 (10.3%), *B. japonicum* USDA 122 に属する serogroup 122 (8.6%), *B. elkanii* USDA 76^T に属する serogroup 76 (5.8%) が土着ダイズ根粒菌の serogroup として優占していたことを明らかにした. 一方, 本実験で用いた 16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 解析や 16S-23S rRNA gene ITS 領域のシーケンス解析における *Bradyrhizobium* USDA 株のグルーピングでは, *B. japonicum* USDA 110 と USDA 122, そして, *B. elkanii* USDA 31 と USDA 76^T は同じクラスターに属することが明らかとなっている (van Berkum and Fuhrmann 2000, Saeki *et al.* 2004). 本実験において, Bj110 および Be76 のクラスターに属する分離株の幾つかは, *B. japonicum* USDA 122 および *B. elkanii* USDA 31 の serogroup に含まれる可能性があるため, *B. japonicum* USDA 110 と USDA 122 間, *B. elkanii* USDA 31 と USDA 76^T 間を明確にするために, ハウスキーピング遺伝子や 16S-23S rRNA gene ITS 領域内の一塩基多型 (single-nucleotide polymorphism) のような遺伝子マーカーに基づいた特徴付けの手法が必要となると考えられる.

9つの土壌サンプル地点間の土着ダイズ根粒菌群集における差異を評価するために, H'_β/H'_γ の値を算出した. 多様性指数 (H') の値は, Fig. 3-3 の下部に示してあり, 各供試土壌間の

H'_β/H'_γ の値は Table 3-2 および Fig. 3-5 に示した。アメリカの土着ダイズ根粒菌群集において、Alabama2 が最も高い H' 値 (1.56) を示したのに対し、Michigan が最も低い H' 値 (0.25) を示した。また、 H'_β/H'_γ の値は、Michigan や Ohio の北部地域と他の土壌サンプル地点の比較において大きく、Michigan と Florida 間で最も大きな値を示した。これらの結果は、ダイズに根粒着生したダイズ根粒菌群集が北部地域と南部地域で大きく異なることを示した (Table 3-2, Fig. 3-5)。これには、Michigan と Ohio のみで優占していた Bj123 クラスタや Ohio において優占していた BeOH クラスタが群集間の差異に影響をもたらしたと考えられた。

Bray-Curtis 類似度指数を基ついたクラスタ解析および MDS 解析の結果を Fig. 3-6 および Fig. 3-7 にそれぞれ示した。クラスタ解析の結果、各土壌サンプル群集は、大きく 3 つのグループに分類され、Group I として Michigan と Ohio が、Group II-1 として North Carolina, Alabama2, Georgia, Louisiana が、Group II-2 として Kentucky, Alabama1, Florida がそれぞれ分類された。さらに、Fig. 3-3 に示した結果をもとに、ここで得られた結果と比較したところ、Group I に属したのは *B. japonicum* のクラスタが優占した地域で、Group II-1 に属したのは *B. elkanii* のクラスタの高い多様性を示した地域であり、Group II-2 に属したのは Be76 クラスタの優占した地域であった。MDS 解析で得られた 3 次元座標をもとに得られた極差異に基ついた極座標付けを行い、その結果を Fig. 3-8 に示した。ダイズに根粒着生する土着ダイズ根粒菌の群集構造の変遷は、緯度と強く、そして、有意に関係することが示された ($r^2 = 0.815$, $F = 30.9$, $P < 0.001$)。

以上、本実験で得られた結果は、アメリカの土着ダイズ根粒菌群集の地理的分布は、日本のものと同様に、北から南へと変遷し、さらに、緯度と強い相関を示すことを明らかにした (Shiro *et al.* 2013)。

Table 3-2 Alpha, beta and gamma diversity indices for each soil sample site pair

Index	Michigan												Ohio												Kentucky											
	MI-OH	MI-KY	MI-NC	MI-AL1	MI-AL2	MI-GA	MI-FL	MI-LA	MI-LA	MI-FL	MI-GA	MI-AL2	MI-AL1	MI-NC	MI-KY	MI-OH	OH-KY	OH-NC	OH-AL1	OH-AL2	OH-GA	OH-FL	OH-LA	KY-NC	KY-AL1	KY-AL2	KY-GA	KY-FL	KY-LA							
α diversity (H'_a)	0.71	0.68	0.84	0.52	0.92	0.85	0.52	0.72	1.12	1.27	0.96	1.36	1.28	0.96	1.16	1.24	0.92	1.32	1.25	0.93	1.13	1.24	0.92	1.32	1.25	0.93	1.13	1.24	0.92	1.32	1.25	0.93	1.13			
β diversity (H'_β)	0.24	0.60	0.66	0.65	0.67	0.63	0.69	0.66	0.54	0.48	0.65	0.54	0.44	0.60	0.56	0.30	0.15	0.33	0.20	0.26	0.39	0.30	0.15	0.33	0.20	0.26	0.39	0.30	0.15	0.33	0.20	0.26	0.39			
γ diversity (H'_γ)	0.95	1.28	1.50	1.17	1.59	1.48	1.21	1.38	1.65	1.75	1.61	1.90	1.72	1.56	1.73	1.54	1.08	1.65	1.45	1.19	1.51	1.54	1.08	1.65	1.45	1.19	1.51	1.54	1.08	1.65	1.45	1.19	1.51			

Index	North Carolina						Alabama1						Alabama2						Georgia						Florida					
	NC-AL1	NC-AL2	NC-GA	NC-FL	NC-LA	NC-LA	AL1-AL2	AL1-GA	AL1-FL	AL1-LA	AL1-LA	AL1-LA	AL2-GA	AL2-FL	AL2-LA	AL2-LA	GA-FL	GA-LA	GA-LA	GA-LA	GA-LA	GA-LA	FL-LA	FL-LA	FL-LA	FL-LA	FL-LA	FL-LA		
α diversity (H'_a)	1.08	1.48	1.41	1.08	1.28	1.16	1.09	0.77	0.97	0.97	1.49	1.17	1.37	1.09	1.29	0.97	1.09	1.29	1.29	1.29	1.29	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97			
β diversity (H'_β)	0.24	0.11	0.18	0.28	0.35	0.20	0.20	0.09	0.29	0.29	0.10	0.16	0.08	0.13	0.16	0.23	0.13	0.16	0.16	0.16	0.16	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23			
γ diversity (H'_γ)	1.32	1.59	1.58	1.37	1.63	1.36	1.29	0.86	1.25	1.25	1.59	1.32	1.45	1.22	1.45	1.20	1.22	1.45	1.45	1.45	1.45	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20			

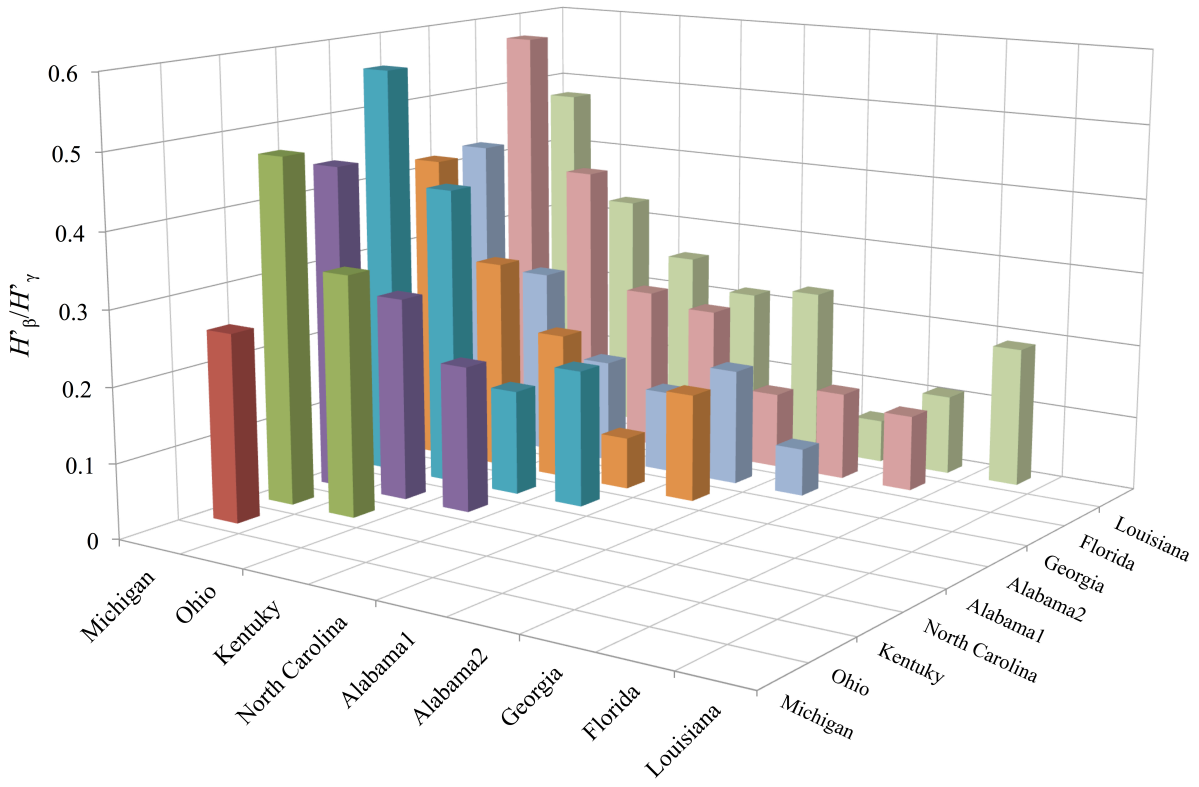


Fig. 3-5 The proportion of beta diversity to gamma diversity (H_{β}/H_{γ}) among pair of the soil sampling site.

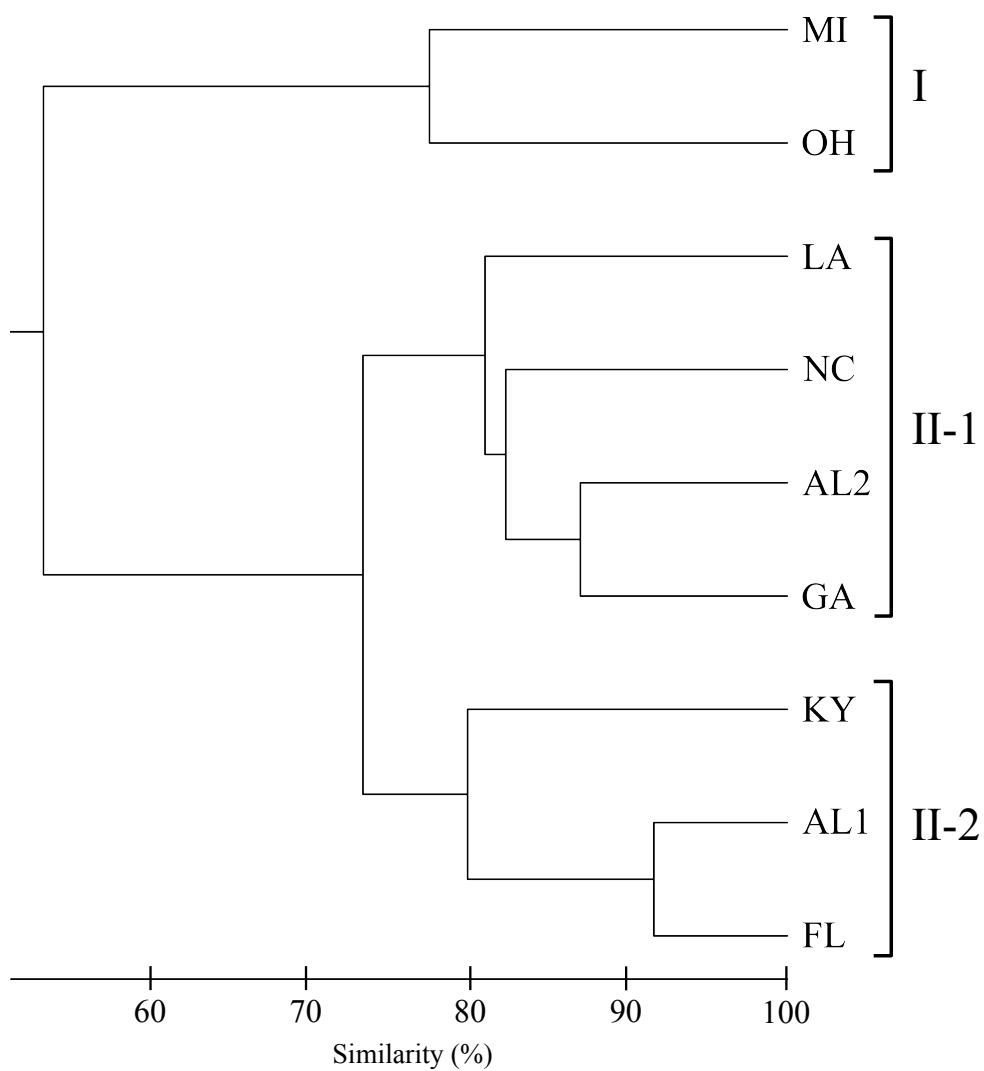


Fig. 3-6 Dendrogram of soybean-nodulating bradyrhizobial community structure in sample field site based on Bray-Curtis index. The numbers of I, II-1 and II-2 indicate Cluster I, II-1 and II-2, respectively.

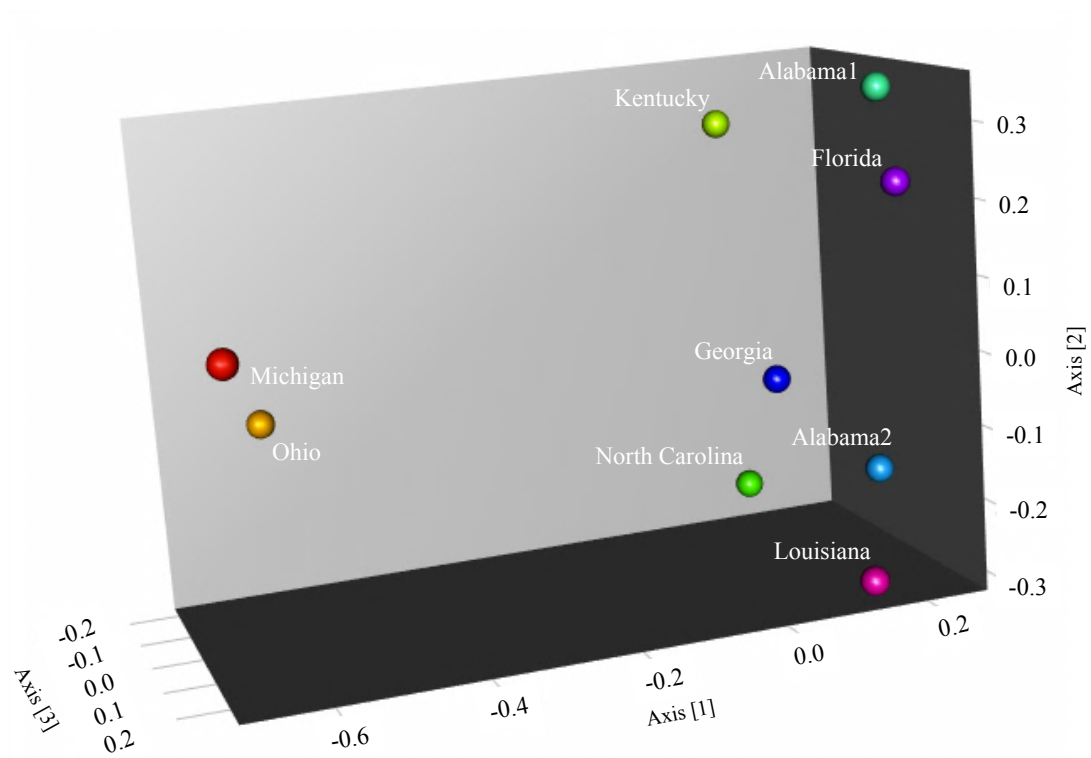


Fig. 3-7 Plots of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobial community of the soil sampling site by 3-dimensional multidimensional scaling analysis based on Bray-Curtis index. The coordinates of axis [1], [2], [3] are as follows: Michigan: -0.685, 0.104, 0.199, Ohio: -0.581, -0.070, -0.188, Kentucky: 0.122, 0.270, -0.208, North Carolina: 0.131, -0.262, -0.177, Alabama1: 0.241, 0.333, 0.079, Alabama2: 0.234, -0.199, 0.053, Georgia: 0.147, -0.088, -0.089, Florida: 0.253, 0.207, 0.101, Louisiana: 0.138, -0.297, 0.230, respectively.

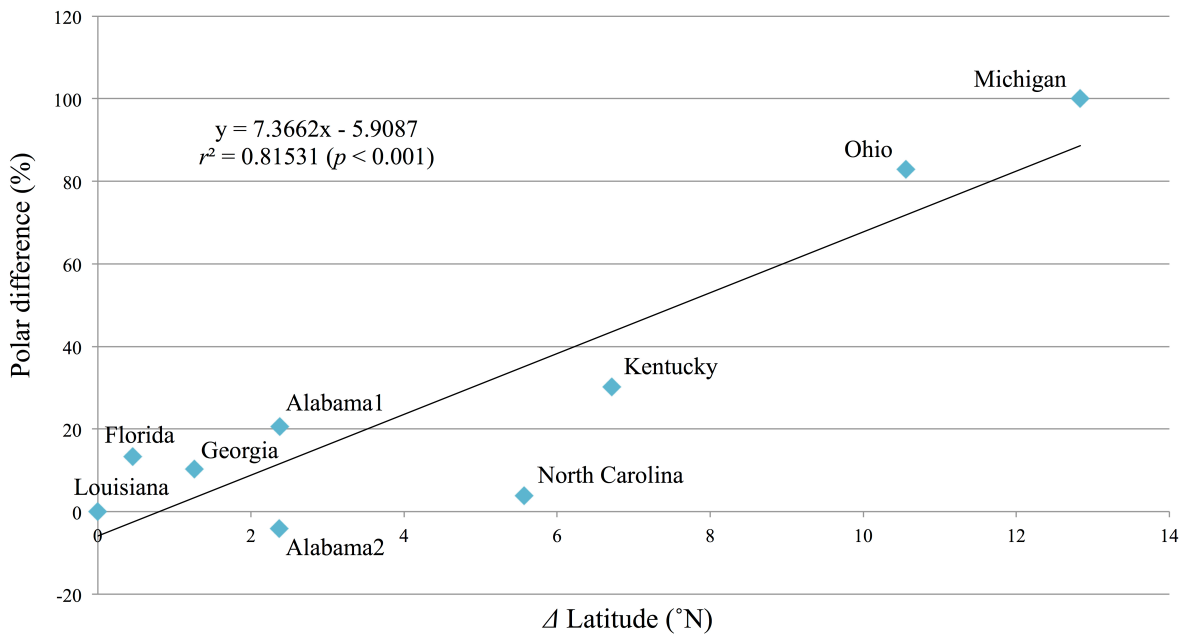


Fig. 3-8 Relationship between indigenous soybean-nodulating bradyrhizobial community and latitude of the soil sampling site.

第4章 日本とアメリカにおける土着ダイズ根粒菌群集構造の比較解析

4-1 緒言

第3章では、アメリカの土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布について、アメリカの北部から南部地域の9地点の土壌から土着ダイズ根粒菌を分離し、16S-23S rRNA gene ITS領域のPCR-RFLP解析を行い、その結果をもとに、数理生態学的手法を用いた群集構造解析により、土着ダイズ根粒菌群集と緯度との関係について評価した。その結果、アメリカの土着ダイズ根粒菌群集の地理的分布は、北から南へと変遷し、さらに、緯度と強い相関を示すことを明らかにした ($r^2 = 0.815$)。さらに、日本における土着ダイズ根粒菌群集の地理的分布は、緯度に沿った変遷を示すことから、日本と同緯度地域における弱酸性から中性土壌の土着ダイズ根粒菌群集の地理的分布は、緯度に伴った気温の変化の影響を受けることを強く示唆した (Saeki *et al.* 2008, 2013)。同緯度地域間の土着ダイズ根粒菌の群集構造をさらに詳細に調査することは、地域依存的なダイズ根粒菌の生態を理解する上で重要な知見となり得る。そこで、同緯度地域における土着ダイズ根粒菌の生態的特徴の違いを評価するために、日本とアメリカ間の緯度による土着ダイズ根粒菌の群集構造の地理的分布について、Saeki *et al.* 2013 と Shiro *et al.* 2013 のデータをもとに、数理生態学的手法を用いて比較解析を行った。

4-2 材料および方法

4-2-1 供試土壌

比較データとして、日本の16地点の土壌 (Saeki *et al.* 2013) と第3章で得られたアメリカの9地点の土壌 (Shiro *et al.* 2013) のデータを用いた。供試土壌のサンプリング地点の緯度や経度、緯度の差、土壌 pH、EC についての情報を Table 4-1 に示した。

4-2-2 土着ダイズ根粒菌群集の数理生態学的解析

日本とアメリカの各供試土壌からそれぞれ分離され、16S-23S rRNA gene ITS領域のPCR-RFLP解析により得られた、各供試土壌における土着ダイズ根粒菌の各クラスターの分離株数を Tables 4-2, 4-3 に示した。この結果をもとに、(1) 供試土壌間の土着ダイズ根粒菌群集の多様性解析、(2) 供試土壌間の土着ダイズ根粒菌群集の MDS 解析、そして、(3) 土着

Table 4-1 Information of soil sample and the location of the sampling site, soil pH and EC in Japan and USA

Japan	USA	Latitude	Longitude	ΔLatitude	pH(H ₂ O)	EC(dS m ⁻¹)
	Michigan	43.05N	82.53W	18.67	7.7	0.15
Hokkaido		42.89N	143.07E	18.51	5.2	0.17
	Ohio	40.78N	81.93W	16.40	6.3	0.10
Akita A		40.01N	139.98E	15.63	6.1	0.06
Akita B		40.00N	139.96E	15.62	5.9	0.05
	Kentucky	38.93N	86.47W	14.55	6.1	0.10
Fukushima		37.71N	140.39E	13.33	5.0	0.05
	North Carolina	35.79N	78.69W	11.41	5.2	0.06
Yamanashi		35.68N	138.49E	11.30	6.1	0.07
Kyoto		35.29N	135.26E	10.91	5.1	0.15
Shizuoka A		34.70N	137.93E	10.32	5.8	0.46
Shizuoka B		34.91N	138.27E	10.53	5.3	0.18
Fukuoka		33.61N	130.46E	9.23	5.6	0.02
Kochi		33.55N	133.68E	9.17	4.9	0.34
	Alabama1	32.59N	85.49W	8.21	5.8	0.07
	Alabama2	32.59N	85.48W	8.21	5.2	0.04
Miyazaki		31.83N	131.42E	7.45	5.7	0.06
	Georgia	31.48N	83.52W	7.10	5.7	0.03
	Florida	30.68N	85.31W	6.30	5.6	0.02
	Louisiana	30.22N	91.10W	5.84	5.5	0.05
Tokunoshima		27.74N	128.97E	3.36	7.3	0.06
Okinawa A		26.25N	127.76E	1.87	4.7	0.06
Okinawa B		26.25N	127.76E	1.87	5.7	0.04
Miyakojima		24.77N	125.33E	0.39	7.5	0.05
Ishigaki		24.38N	124.19E	0.00	6.1	0.03

Table 4-2 Cluster and the number of soybean-nodulating bradyrhizobia from Japan ^a

Site	Cluster	Bj6	Bj38	Bj115	Bj110	Bj123	BjH	BjF	BjO	Be61	Be76	Be94	BeO
Hokkaido						58 (19,19,20)	2 (1,1,0)						
Akita A				38 (13,12,13)		22 (7,8,7)							
Akita B				46 (16,17,13)		14 (4,3,7)							
Fukushima			20 (7,1,12)	3 (1,0,2)	22 (10,10,2)	12 (2,8,2)		2 (0,1,1)			1 (0,0,1) 2 (0,2,0)		
Yamanashi					58 (20,18,20)							3 (0,3,0) 5 (3,0,2)	
Kyoto	14 (8,3,3)	8 (5,0,3)	6 (2,1,3)	29 (5,13,11)									
Shizuoka A	1 (0,0,1)			54 (17,20,17)									
Shizuoka B				60 (20,20,20)									
Fukuoka	15 (3,3,9)			33 (15,9,9)							12 (2,8,2)		
Kochi	24 (10,13,1)	1 (0,0,1)		35 (10,7,18)									
Miyazaki	40 (16,7,17)	7 (4,0,3)										13 (0,13,0)	
Tokunoshima	28 (3,16,9)			30 (15,4,11)							2 (2,0,0) 25 (11,8,6) 41 (15,18,8) 49 (16,16,17) 59 (20,20,19)		8 (1,5,2) 1 (1,0,0) 2 (0,0,2) 1 (0,1,0) 2 (1,0,1)
Okinawa A	25 (7,6,12)							1 (0,1,0)					
Okinawa B	16 (4,2,10)												
Miyakojima	8 (3,3,2)									1 (0,0,1)			
Ishigaki													
No. isolate	171	36	9	405	106	2	2	1	1	191	25	11	
Percentage(%)	17.8	3.8	0.9	42.2	11.0	0.2	0.2	0.1	0.1	19.9	2.6	1.1	

^a Upper number in each column indicates a whole number of isolates and lower indicates a number of isolates from non- R_j , R_{j_2} , R_{j_3} , and R_{j_4} , respectively.

Table 4-3 Cluster and the number of soybean-nodulating bradyrhizobia from USA ^a

Site	Cluster	Bj6	Bj38	Bj110	Bj123	Bj124	Be46	Be76	Be94	BeOH
Michigan		1 (0, 0, 1)		3 (0, 0, 3)	65 (23, 23, 19)					
Ohio				9 (5, 1, 3)	28 (5, 2, 21)			4 (3, 1, 0)	31 (11, 20, 0)	
Kentucky		12 (4, 0, 8)		26 (12, 2, 12)			33 (8, 22, 3)	1 (0, 0, 1)		
North Carolina		29 (9, 0, 20)	1 (0, 0, 1)				1 (0, 0, 1)	13 (4, 7, 2)	20 (8, 12, 0)	8 (3, 5, 0)
Alabama1		8 (2, 1, 5)		1 (1, 0, 0)			6 (2, 2, 2)	56 (19, 21, 16)	1 (0, 0, 1)	
Alabama2		9 (6, 0, 3)	1 (0, 0, 1)			1 (0, 0, 1)	16 (5, 5, 6)	19 (5, 7, 7)	23 (8, 9, 6)	3 (0, 3, 0)
Georgia		2 (0, 0, 2)		9 (4, 0, 5)			4 (2, 2, 0)	26 (6, 9, 11)	27 (12, 10, 5)	4 (0, 3, 1)
Florida						1 (1, 0, 0)	4 (0, 0, 4)	55 (18, 20, 17)	11 (5, 3, 3)	1 (0, 1, 0)
Louisiana				4 (3, 0, 1)			36 (12, 12, 12)	14 (3, 4, 7)	18 (6, 8, 4)	
No. isolate		61	2	52	93	2	67	216	105	47
Percentage (%)		9.5	0.3	8.1	14.4	0.3	10.4	33.5	16.3	7.3

^a Upper number in each column indicates a whole number of isolates and lower indicates a number of isolates from non- R_j , $R_{j_2}R_{j_3}$, and R_{j_4} , respectively.

ダイズ根粒菌群集の多様性と緯度における極座標付けによる群集構造解析を行った。

(1) 供試土壌間の土着ダイズ根粒菌群集の多様性解析

日本とアメリカの供試土壌間の土着ダイズ根粒菌群集の多様性の差異を評価するために、Shannon-Wiener 関数を用いて多様性解析を行った。多様性解析は、2-2-8 と同様に行った。

(2) 供試土壌間の土着ダイズ根粒菌群集の MDS 解析

土着ダイズ根粒菌群集の特性と供試土壌のサンプリング地点間の相違を特徴付けるために、Bray-Curtis 類似度指数に基づいた MDS 解析を行った。MDS 解析は、the R software ver. 2.15.1 を用いて 2-2-9 と同様に行った。

(3) 土着ダイズ根粒菌群集の多様性と極座標付けによる群集構造解析

土着ダイズ根粒菌群集と緯度との関係を評価するために、極座標付けによる群集構造解析を行った。極座標付けは、3-2-7 と同様に行った。

4-3 結果および考察

多様性解析の結果を Table 4-4 に示した。日本とアメリカの各供試土壌間の H'_β/H'_γ の値は、地理的に緯度の類似している地域間ではより小さく、地理的に緯度の離れた地域間ではより大きくなった。さらに、日本で Bj110 クラスターの高い占有率を示しているいくつかの地域とアメリカの各地域間で、高い H'_β/H'_γ の値を示す傾向にあった (Table 4-4)。MDS 解析の結果を Fig. 4-1 に示した。各供試土壌における土着ダイズ根粒菌群集の3次元 MDS プロットは、日本とアメリカ間の距離的な影響を与えずに、地理的に緯度の近い地域で、もしくは、土着ダイズ根粒菌の群集構造が類似している地域でより近くに付置される傾向にあった。日本の土壌において、北から南へと順に、Bj123, Bj110, Bj6, Be76 クラスターに属する土着ダイズ根粒菌が高い頻度で分離され、続いて Bj38, Be94, Bj115 クラスターに属する土着ダイズ根粒菌が分離されている (Table 4-2) (Saeki *et al.* 2006, 2008, 2013, Saeki 2011)。一方、アメリカの土壌では、北部地域で Bj123 のクラスターに属する土着ダイズ根粒菌が主に分離され、中部から南部地域では Be46, Be76, Be94 クラスターに属する土着ダイズ根粒菌が主に分離

Table 4-4 The ratio of beta to gamma diversity (H_{β}/H_{γ}) among soybean-nodulating bradyrhizobial communities in the comparison between Japan and USA

	Michigan	Ohio	Kentucky	North Carolina	Alabama 1	Alabama 2	Georgia	Florida	Louisiana
Hokkaido	0.13	0.29	0.51	0.45	0.59	0.43	0.45	0.59	0.49
Akita A	0.34	0.22	0.29	0.39	0.48	0.37	0.32	0.49	0.39
Akita B	0.45	0.26	0.28	0.41	0.50	0.39	0.33	0.51	0.40
Fukushima	0.32	0.22	0.25	0.31	0.37	0.30	0.27	0.38	0.31
Yamanashi	0.75	0.41	0.27	0.44	0.55	0.41	0.34	0.56	0.43
Kyoto	0.44	0.29	0.17	0.22	0.34	0.25	0.23	0.38	0.30
Shizuoka A	0.66	0.36	0.25	0.38	0.51	0.36	0.28	0.51	0.38
Shizuoka B	0.81	0.44	0.33	0.48	0.61	0.45	0.39	0.62	0.47
Fukuoka	0.49	0.33	0.04	0.22	0.26	0.24	0.20	0.34	0.29
Kochi	0.54	0.35	0.18	0.27	0.41	0.31	0.30	0.47	0.38
Miyazaki	0.55	0.38	0.31	0.11	0.38	0.20	0.27	0.41	0.34
Tokunoshima	0.53	0.35	0.14	0.23	0.36	0.28	0.27	0.44	0.35
Okinawa A	0.50	0.37	0.15	0.13	0.15	0.17	0.21	0.23	0.29
Okinawa B	0.57	0.40	0.13	0.15	0.07	0.16	0.18	0.16	0.29
Miyakojima	0.61	0.42	0.15	0.21	0.06	0.19	0.19	0.14	0.31
Ishigaki	0.80	0.51	0.27	0.35	0.16	0.29	0.27	0.17	0.38

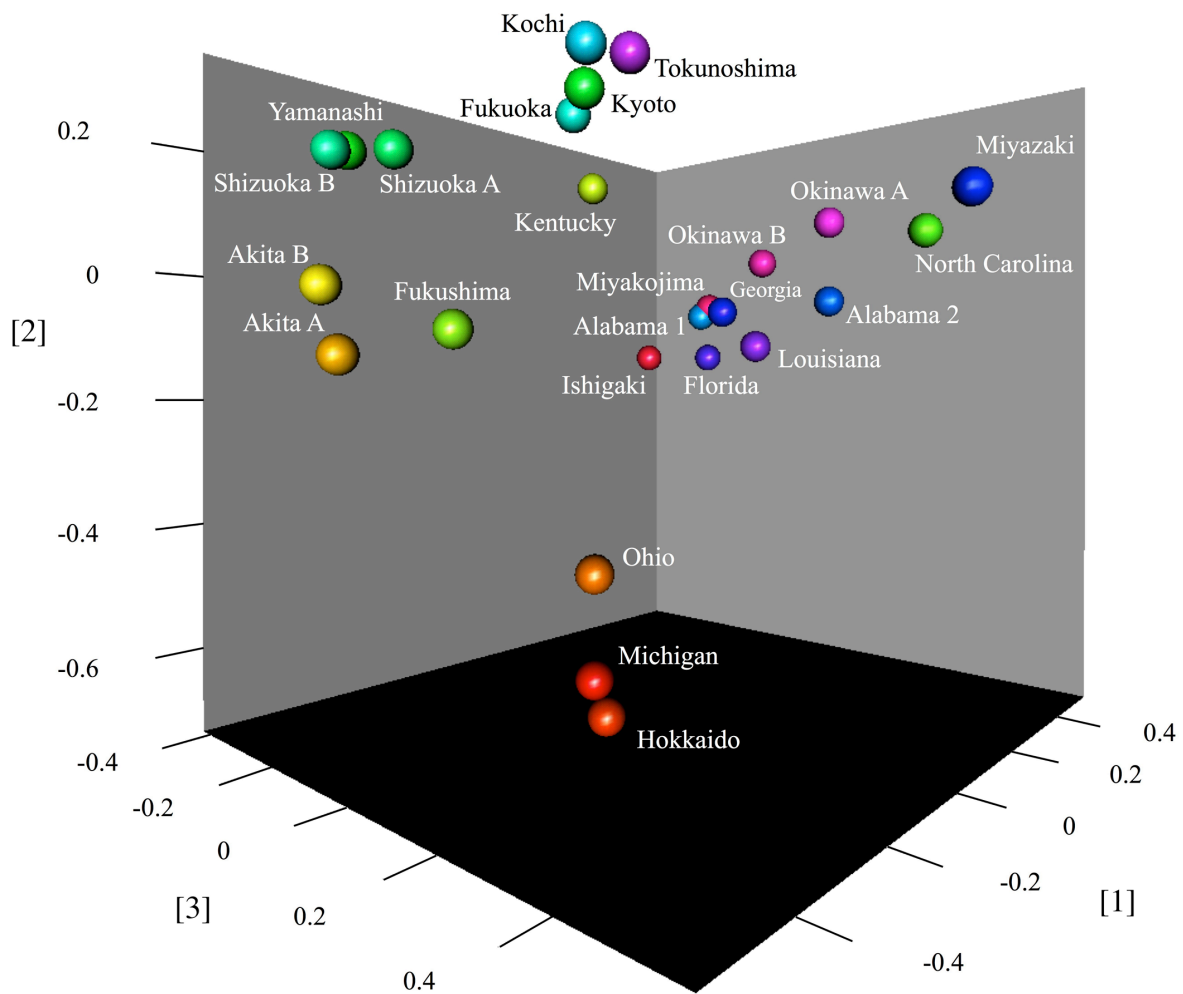


Fig. 4-1 Result of 3D-MDS analysis based on the cluster and the number of isolates as independent variables. The coordinates of axis [1], [2], [3] are as follows: Michigan: -0.208, -0.628, 0.105, Hokkaido: -0.186, -0.688, 0.109, Ohio: -0.224, -0.462, 0.121, Akita A: -0.519, -0.133, -0.099, Akita B: -0.519, -0.030, -0.145, Kentucky: 0.085, 0.213, -0.195, Fukushima: -0.390, -0.095, -0.005, North Carolina: 0.325, 0.097, 0.391, Yamagata: -0.434, 0.192, -0.216, Kyoto: -0.259, 0.260, 0.135, Shizuoka A: -0.410, 0.184, -0.125, Shizuoka B: -0.469, 0.185, -0.205, Fukuoka: -0.123, 0.282, -0.032, Kochi: -0.282, 0.313, 0.162, Alabama 1: 0.459, -0.016, -0.221, Alabama 2: 0.404, -0.007, 0.148, Miyazaki: 0.154, 0.125, 0.548, Georgia: 0.292, -0.026, -0.033, Florida: 0.494, -0.108, -0.229, Louisiana: 0.268, -0.099, 0.067, Tokunoshima: -0.221, 0.309, 0.191, Okinawa A: 0.386, 0.146, 0.159, Okinawa B: 0.449, 0.089, -0.044, Miyakojima: 0.468, 0.004, -0.205, Ishigaki: 0.461, -0.107, -0.382, respectively.

されており, B_j6 や B_j110 クラスターに属する土着ダイズ根粒菌は中部地域において中程度に優占していた (Table 4-3) (Shiro *et al.* 2013). 日本とアメリカにおける中部地域の B_j110 クラスターの優占度, 中部から南部にかけての B_e クラスターの優占度の違いは, 2 国間の土着ダイズ根粒菌群集の比較において特徴的な結果が得られた (Table 4-4, Fig. 4-1). Minamisawa *et al.* (1997) は, *B. japonicum* と *B. elkanii* のダイズ, ツルマメ (*Glycine soja*), サイラトロ (*Macroptilium atropurpureum*) に対する根粒着生の選好性について調査し, *B. japonicum* はダイズに, *B. elkanii* はサイラトロに優先的に根粒着生すること, ツルマメには両ダイズ根粒菌が同程度根粒着生することを報告した. さらに, Marr *et al.* (1997) は, *Amphicarpaea bracteata* が *B. japonicum* や *B. elkanii* との根粒を形成し, *B. elkanii* の元来の宿主でなかったのにも関わらず, *B. elkanii* と窒素固定を行うことを報告した. サイラトロは, オーストラリア, 南および中央アメリカ, いくつかの太平洋諸島の一部を含む熱帯, 亜熱帯地域で栽培されているマメ科牧草である (Shaw and Whiteman 1977). また, *A. bracteata* は北東アメリカに広く分布する一年生マメ科植物である (Turner and Fearing 1964, Parker 1991). *B. elkanii* と根粒形成における親和性を有するこれらマメ科植物の存在が, 北アメリカにおける *B. elkanii* の高い優占に強く貢献している可能性がある. 極座標付け解析の結果を Fig. 4-2 に示した. 日本およびアメリカにおける土着ダイズ根粒菌群集は北から南へと徐々に変遷しており, それぞれの供試土壌において特徴的な群集構造が検出された. 日本およびアメリカにおける土着ダイズ根粒菌群集と緯度との決定係数は, それぞれ, 日本が $r^2 = 0.873$, アメリカが $r^2 = 0.622$ となり, アメリカの決定係数が日本のものより低い値を示したものの, 土着ダイズ根粒菌群集が緯度と相互に関連していることを示した.

これらの結果は, 特徴的な地理的地域において, 土着ダイズ根粒菌群集が緯度に関連した土壌温度だけでなく, 地域の気候に順化したダイズ以外の宿主マメ科植物の多様性による影響を受けているかもしれないことを示唆した.

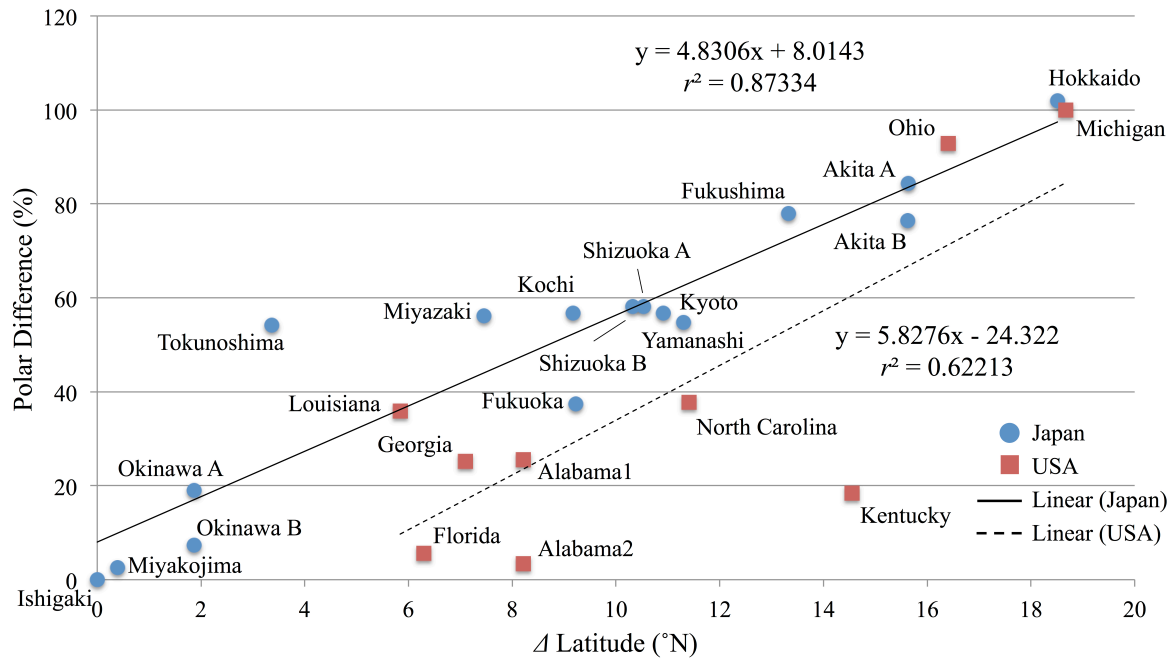


Fig. 4-2 Relationship between latitude and polar difference based on 3D-MDS.

第5章 異なる温度環境下における *nodC* 遺伝子の発現解析

5-1 緒言

第2章において、土着ダイズ根粒菌の群集構造は、栽培温度や宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型の影響を受けることが示唆された (Shiro *et al.* 2013). 特に温度は、ダイズ根粒菌の土着化・優占化に深く関与する環境因子の一つであり、温度によるダイズ根粒菌の生理的応答がダイズへの根粒着生にも影響を及ぼしていると考えられる.

ダイズとダイズ根粒菌の共生関係は、ダイズ根から分泌されるダイゼインやゲニステインといったフラボノイド化合物によって根粒形成遺伝子 (*nod*, *nol*, *noe*) の発現が誘導され、ダイズ根粒菌により生産および分泌された Nod ファクターによって根粒器官の形成が誘導されることにより開始される (Kosslak *et al.* 1987, Schultze and Kondorosi 1998). さらに、根粒菌と宿主マメ科植物との特異性は、根粒形成遺伝子と Nod ファクターの修飾の多様性により決定される (Mergaert *et al.* 1997). 根粒形成遺伝子の中でも、*nodABC* 遺伝子は根粒着生する全ての根粒菌に存在し、これらにコードされているタンパク質は Nod ファクター合成において中核的な機能を担っており、これらの遺伝子が発現することによって Nod ファクターのコアが合成される (Spaink *et al.* 1991). 特に、NodC は Nod ファクター合成経路における最初の酵素で、UDP-*N*-acetyl glucosamine を基質として利用し、chitooligosaccharide を合成する (Geremia *et al.* 1994). そして、種々の根粒菌に存在する *nodC* 遺伝子は、重合の程度が異なる chitooligosaccharide の合成を指定し、根粒形成における宿主特異性に貢献している (Roche *et al.* 1996, Kamst *et al.* 1997). また、*nod* 遺伝子は根粒菌の系統解析においてもその遺伝子型が利用されており、*nodC* 遺伝子をターゲットとした系統解析が行われている (Laguerre *et al.* 2001, Sarita *et al.* 2005, Barcellos *et al.* 2007, Wang *et al.* 2009, Bontemps *et al.* 2010, Li *et al.* 2011, Sánchez-Cañizares *et al.* 2011, de Meyer *et al.* 2011, Noisangiam *et al.* 2012, Parker 2012). これまでに、*nod* 遺伝子の発現解析は、*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 の *nod* 遺伝子を挿入したレポータープラスミド (*nodA*-, *nodB*-, *nodC*-, *nodY-lacZ* fusion) をダイズ根粒菌 (*B. japonicum* 系統株や *Bradyrhizobium elkanii* 系統株) に導入し、*nod* 遺伝子の発現によってその菌株から生成された β -galactosidase 量をモニターするという手法が用いられてきた (Kosslak *et al.* 1987, Banfalvi *et al.* 1988, Rao and Cooper 1995, Begum *et al.* 2001, 横山 2005). しかし

ながら、この手法はレポータープラスミドに挿入された *nod* 遺伝子とレポータープラスミドを導入されるダイズ根粒菌が保有する *nod* 遺伝子とは由来が異なるため、ダイズ根粒菌体内で保存されている *nod* 遺伝子の本来の応答を捉えられているのか疑問が残る。

そこで、本実験では、温度による *nod* 遺伝子の発現レベルの程度がダイズ根粒菌の根粒着生に影響を及ぼすと考えられるため、異なる温度環境下における *nodC* 遺伝子の発現レベルの変化を調査した。ダイズ根粒菌の *nodC* 遺伝子の発現解析はリアルタイム PCR を用いて行い、ダイズ根粒菌に保存される *nodC* 遺伝子の応答について検討した。

5-2 材料および方法

5-2-1 供試菌株

第 2 章で得られた結果から、特に、*B. japonicum* USDA 110 系統株と USDA 123 系統株、*B. elkanii* USDA 76^T 系統株の根粒占有率が栽培温度の上昇に伴って変化していた (Shiro *et al.* 2012)。また、第 3 章において 16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 解析で得られたクラスター解析の結果では、*B. japonicum* USDA 110 と USDA 122, *B. elkanii* USDA 31 と USDA 76^T を判別することがほぼ不可能であるために、クラスター内における正確な占有率を把握することが困難である (van Berkum and Fuhrmann 2000, Saeki *et al.* 2004, Shiro *et al.* 2013)。そこで、本研究の供試菌株として、*B. japonicum* USDA 110, 122, 123, そして、*B. elkanii* USDA 31, 76^T の 5 菌株を選抜し、これらの菌株の *nodC* 遺伝子の発現解析を行った。

5-2-2 *nodC* 遺伝子および *sigA* 遺伝子特異的プライマーの設計

nodC 遺伝子をターゲットとした系統解析において、*B. japonicum* と *B. elkanii* は別のグループとして分類されることが報告されている (Ueda *et al.* 1995)。また、*nodC* 遺伝子の PCR-RFLP 解析においても、*B. elkanii* USDA 76^T は *B. japonicum* USDA 6^T, 110, 123 と異なるパターンを示すことが報告されている (Laguerre *et al.* 2001)。そこで、*nodC* 遺伝子特異的プライマーは、*B. japonicum* と *B. elkanii* 共通で使用できるものを作製することは難しいと考え、*B. japonicum* 用と *B. elkanii* 用でそれぞれ作製した。まず、*B. japonicum* および *B. elkanii* 種のダイズ根粒菌の *nodC* 遺伝子の塩基配列情報を RhizoBase (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>) および DDBJ (DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp>) から取得した。得られた *nodC* 遺伝子

配列情報を GENETYX-MAC Ver. 16.0 (GENETYX) を用いてアライメントを行い、*B. japonicum* および *B. elkanii* 種の中での共通配列を検索した。この共通配列をもとに、リアルタイム PCR 実践編 – プライマー設計ガイドライン – (TaKaRa Bio, <http://www.takara-bio.co.jp/prt/pdfs/prt3-1.pdf>) に従って、プライマー設計プログラム Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) にてプライマーの検索を行った。検索した結果の中から、フォワードプライマーで 3'末端が T でない、それぞれの組み合わせで 3 bp 以上相補的になっていない、GC, AT の偏りが無いものを選択した。選択したものをオリゴ特性計算 (Sigma Genosys, Sigma-Aldrich) にて Tm 値とヘアピンおよびダイマー形成の有無を確認し、ヘアピンおよびダイマー形成の可能性のあるものを除いた。さらに、NCBI の BLAST 検索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を利用し、プライマーが目的遺伝子特異的であるか検討した。

また、リアルタイム PCR による定量で必要なリファレンス遺伝子に *sigA* 遺伝子と 16S rRNA 遺伝子を選択した。この *sigA* 遺伝子は、主要な σ (シグマ) 因子をコードするハウスキーピング遺伝子で、温度による発現量の変化に有意な差が認められないことが示されている (Uchiumi *et al.* 2004, Pessi *et al.* 2007, Wei *et al.* 2008, 2010)。そこで、*B. japonicum* USDA 110 の *sigA* 遺伝子の配列情報を基に、上記に示した *nodC* 遺伝子のプライマー設計手順と同様にプライマーを作製した。16S rRNA 遺伝子特異的プライマーは、以前、本研究室で作製されたものを用いた (小黒 2009)。作製したプライマーおよび既存のプライマーの情報を Table 5-1 に示した。また、*nodC* および *sigA* 遺伝子の配列とそれぞれの遺伝子特異的プライマーの配列のアライメントを Figs. 5-1, 5-2, 5-3 に示した。

5-2-3 DNA 抽出

供試菌株の DNA 抽出は、ISOPLANT (NIPPON GENE) を用いて行った。まず、供試菌株を培養するための HM 液体培地 1.5 mL に供試菌株をそれぞれ植菌し、28°C で 3-4 日間培養した。この培養液を 1.5 mL 容マイクロチューブに移し、卓上遠心機 (DISKBOY, KURABO) にて 4,350 ×g, 室温で 3 分間遠心し、集菌した。集菌後、上清を取り除き、0.9% NaCl を 500 μ L 加えて懸濁し、菌体の洗浄を行った。この懸濁液を同様に遠心して集菌し、上清を取り除いた後に -20°C で 20 分間凍結させた。凍結後、ISOPLANT の取扱説明書に従って抽出操作を行

Table 5-1 Information of the primer sets for real-time PCR

primer set	primer sequence (5' → 3')	T _m	amplification size (bp)
BjnodC-F	CAATGTGGGAAAGCGCAAG	66.6	98
BjnodC-R	ACGTCGGCAGCAAGTATCG	66.3	
BjnodC-F1	CGAGCGATCCGAGATTCAG	66.0	135
BjnodC-R	ACGTCGGCAGCAAGTATCG	66.3	
BenodC-F	TATGCTCAAGGCGGGTTTC	68.1	205
BenodC-R	GCAAGGGGCCGAGATTTTG	68.8	
BenodC-F1	TGGACGGTGCTGACGATTG	68.6	96
BenodC-R1	TGTGAAGCGAGAAGCCGAG	66.8	
BenodC-F2	CGCGCAGTACCTTTCGAGAC	67.0	118
BenodC-R2	TGATGAGAGGGCGAGAAGC	65.7	
sigA-F	ACATGGGCATCAACGTCACC	68.2	84
sigA-R	TCGTTGTTCGGTCTCGTCCTC	67.8	
sigA-F1	GGCATGAACACCGACCACAC	68.9	111
sigA-R1	TCGACGGATGCTTCAGCTTG	68.8	
sigA-F2	CGTGACCTTCGATCAGCTC	63.7	138
sigA-R2	CCTTGTCTTCCTCGCCTTC	63.8	
real time_16SF	GGTAGTCCACGCCGTA AAC	61.9	163
real time_16SR	CGAATTA AACCATGCTCC	61.8	

Bj USDA 6.seq	1	-----	1
Bj USDA 110.seq	1	ATGGACCTGCTCGCGACGACCACTGCTGCCGCCGTTTCATCTTATGCGCTCCTATCGACGATCTATAAGAGCGTGCAAGC	80
Bj USDA 122.seq	1	-----	1
BjnodC-F.seq	1	-----	1
BjnodC-F1.seq	1	-----	1
BjnodC-R.seq	1	-----	1
Bj USDA 6.seq	1	-----	1
Bj USDA 110.seq	81	GCTTTATGCTCAGCCGGCGATCAACTCATCGCTGGACAACCTTGGACAAGCCGAGGTGGTCTGCTTCTGCTGTGGACGTGA	160
Bj USDA 122.seq	1	-----	1
BjnodC-F.seq	1	-----	1
BjnodC-F1.seq	1	-----	1
BjnodC-R.seq	1	-----	1
Bj USDA 6.seq	1	-----	1
Bj USDA 110.seq	161	TCGTGCCGTGCTTCAACGAGAATCCGAACACACTCGCCGAATGTCTGGAGTCGATTGCCAGTCAAGACTACGCCGAAAG	240
Bj USDA 122.seq	1	-----	1
BjnodC-F.seq	1	-----	1
BjnodC-F1.seq	1	-----	1
BjnodC-R.seq	1	-----	1
Bj USDA 6.seq	1	-----GGCAAAACCGCGACGTTGTGCGACATGTACACCGGATATATGCGAGCGATCC	51
Bj USDA 110.seq	241	ATGCAGGTATATGTGGTCGATGACGGATCGGCAAAACCGCGACGTTGTGCGCCGTGTACACCGGATATATGCGAGCGATCC	320
Bj USDA 122.seq	1	-----GGCAAAACCGCGACGTTGTGCGCCGTGTACACCGGATATATGCGAGCGATCC	51
BjnodC-F.seq	1	-----	1
BjnodC-F1.seq	1	-----CGAGCGATCC	10
BjnodC-R.seq	1	-----	1
Bj USDA 6.seq	52	GAGATTCAGTTTTATCTTGTGGCGAACAAATGTGGGAAAGCGCAAGGCGCAGATCGCAGCGATACGCAGCTCATCCGGTG	131
Bj USDA 110.seq	321	GAGATTCAGTTTTATCTTGTGGCGAACAAATGTGGGAAAGCGCAAGGCGCAGATCGCAGCGATACGCAGCTCATCCGGTG	400
Bj USDA 122.seq	52	GAGATTCAGTTTTATCTTGTGGCGAACAAATGTGGGAAAGCGCAAGGCGCAGATCGCAGCGATACGCAGCTCATCCGGTG	131
BjnodC-F.seq	1	-----CAATGTGGGAAAGCGCAAG	19
BjnodC-F1.seq	11	GAGATTCAG-----	19
BjnodC-R.seq	1	-----	1
Bj USDA 6.seq	132	ATCTGGTTCTCAACGTCGATTCCGATACGATACTTGCTGCCGACGTCGTACGAAAGCTTGATTGAAGATGCATGACCCG	211
Bj USDA 110.seq	401	ATCTGGTTCTCAACGTCGATTCCGATACGATACTTGCTGCCGACGTCGTACGAAAGCTTGATTGAAGATGCATGACCCG	480
Bj USDA 122.seq	132	ATCTGGTTCTCAACGTCGATTCCGATACGATACTTGCTGCCGACGTCGTACGAAAGCTTGATTGAAGATGCATGACCCG	211
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	1	-----CGATACTTGCTGCCGACGT-----	19
Bj USDA 6.seq	212	GGAATCGGTGCGGCCATGGGTGAGCTGATCGCGAGCAATCGCAACCAAGACCTGGCTGACCAAGT-----	275
Bj USDA 110.seq	481	GGAATCGGTGCGGCCATGGGTGAGCTGATCGCGAGCAATCGCAACCAAGACCTGGCTGACCAAGCTGATCGACATGGAATA	560
Bj USDA 122.seq	212	GGAATCGGTGCGGCCATGGGTGAGCTGATCGCGAGCAATCGCAACCAAGACCTGGCTGACCAAG-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	561	TTGGCTCGCGTGCAACGAAGAGCGCGGCACAGCGCGCTTGGTGCCGTGATGTTGCTGCGGCCCATGTGCCATGT	640
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	641	ATCGGCGTTCCGCGCTCGCCTTGGCTTCTTGTATCAATATGAAGCCCAATTCCTTCTGTTGGGAAAGCCGAGCGATTTCCGCGAG	720
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	721	GACCGCCACCTAACGATACTCATGCTCAAGGCGGGTTTTGAAACCGAATACGTTCCGGACCCATAGCAGCCACAGTCGT	800
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19

Fig. 5-1 Base sequence alignment of *nodC* gene in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T, 110 and 122.

Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	801	CCCCCACAGTCTTCGGCCATATCTACGACAGCAACTCCGCTGGCGCGAAGTACCTTTGAGATACGTTTCTTGCTTGGC	880
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	881	GCCTGCTGCCAGAGCTCGATGGTTATTTGACGCTAGACGTTATCGGGCAAATCTCGGCCATTGCTCCTCGCCATTTCA	960
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	961	TCACTTGCTGCGCTCGCACAGCTCCTGATCGATGGCTCTATACCCTGGTGGACGGGATTGACGATTGCTGCAATGACTAC	1040
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	1041	GGTCCGGTGCTGTGTGGCAGCGCTTCGTGCCCGGAGCTGCGGTTTATCGGCTTCTCGCTCCACACGCCGATCAATATCT	1120
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	1121	GTCTTTACTGCTTTGAAGCCCTATCGCCTTTGTACATTGAGCAATAGCGATTGGCTATCTCGGAAAGTCACCGATATG	1200
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	1201	CCGACGGAAGAGGGGAAACGCCGTGCATCCTGCACCCGAATGCCGGACGAAATCCTGCTGGTGTAGGGGGCGCCTGCT	1280
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	1281	CCTATTCTAAGCGCGCTTATCGAGCCTCCATCGAGCCTGGCGGACGAGAGTGTTTCCGGTCCGATCGTTTCGAC	1360
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	1361	TGTCTACAAATAAGTGGTCGGCTGATGACTCAGGACGAAAAACCATCAGTTATTAGAGCGAGAGTTGGCTGTCGACGACCC	1440
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19
Bj USDA 6.seq	275	-----	275
Bj USDA 110.seq	1441	GTGGCGCCTCGACACTAG	1458
Bj USDA 122.seq	274	-----	274
BjnodC-F.seq	19	-----	19
BjnodC-F1.seq	19	-----	19
BjnodC-R.seq	19	-----	19

Fig. 5-1 (Continued)

Be USDA 76.seq	1	CACGCTTCGGCGCCGTGATGTGCTGTGCGGGCCGTGTGCCATGTATCGTCGCTCTGCGCTCGCCTTGCTGCTTGATCAA	80
BenodC-F.seq	1	-----	1
BenodC-R.seq	1	-----	1
BenodC-F1.seq	1	-----	1
BenodC-R1.seq	1	-----	1
BenodC-F2.seq	1	-----	1
BenodC-R2.seq	1	-----	1
Be USDA 76.seq	81	TACGAAACGCAATTTTTCTGGGAAAGCCAAAGTATTTTCGGCGAAGATCGTCATCTAACGATCCTTATGCTCAAGGCGGG	160
BenodC-F.seq	1	-----TATGCTCAAGGCGGG	15
BenodC-R.seq	1	-----	1
BenodC-F1.seq	1	-----	1
BenodC-R1.seq	1	-----	1
BenodC-F2.seq	1	-----	1
BenodC-R2.seq	1	-----	1
Be USDA 76.seq	161	GTTTCGAACCGAGTATGTCCCCGACGCGATCGCAGCAACAGTGGTCCGGACAGCCTTGGACCATATCTGCGACAGCAAG	240
BenodC-F.seq	16	GTTTC-----	20
BenodC-R.seq	1	-----	1
BenodC-F1.seq	1	-----	1
BenodC-R1.seq	1	-----	1
BenodC-F2.seq	1	-----	1
BenodC-R2.seq	1	-----	1
Be USDA 76.seq	241	TACGCTGGCGCGCAGTACCTTTGAGACACATTTCTTGCGTTGCGCTTGTGCCCGAGTTGGATCGCTATCTGACGCTC	320
BenodC-F.seq	20	-----	20
BenodC-R.seq	1	-----	1
BenodC-F1.seq	1	-----	1
BenodC-R1.seq	1	-----	1
BenodC-F2.seq	1	-----CGCGCAGTACCTTTGAGAC-----	20
BenodC-R2.seq	1	-----	1
Be USDA 76.seq	321	GACGTTGTCGGACAAAATCTGGCCCCCTTCTTCTCGCCCTCTCATCACTGGCTGCGCTCGCGCAGTTTGTGTCATCGGCGG	400
BenodC-F.seq	20	-----	20
BenodC-R.seq	1	-----CAAATCTCGCCCCCTTGC-----	19
BenodC-F1.seq	1	-----	1
BenodC-R1.seq	1	-----	1
BenodC-F2.seq	20	-----	20
BenodC-R2.seq	1	-----GCTTCTCGCCCTCTCATCA-----	19
Be USDA 76.seq	401	GTCAGTGGCCTGGTGGACGGTGTGACGATTGCGGCCATGACGATGGTCCGGTGCAGTGTGGCAGCGTTCCGTGCTCGCG	480
BenodC-F.seq	20	-----	20
BenodC-R.seq	19	-----	19
BenodC-F1.seq	1	-----TGGACGGTGTGACGATTG-----	19
BenodC-R1.seq	1	-----	1
BenodC-F2.seq	20	-----	20
BenodC-R2.seq	19	-----	19
Be USDA 76.seq	481	ATATGCGGTTTCTCGGCTTCTCGCTTACACACCCATCAATATCTTCTCTTGTGCGCG	539
BenodC-F.seq	20	-----	20
BenodC-R.seq	19	-----	19
BenodC-F1.seq	19	-----	19
BenodC-R1.seq	1	-----CTCGGCTTCTCGCTTACA-----	19
BenodC-F2.seq	20	-----	20
BenodC-R2.seq	19	-----	19

Fig. 5-2 Base sequence alignment of *nodC* gene in *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T.

110_sigA_comp.seq	1	ATGGCCACCAAGGCAAAAGACGCTGCAGGCGAAGGACAAGAAAAAGACGACAAGGCGAGGGATGCTCCCGAAGGATTCCCAGGACGGCCCTCGCCGT	100
sigA-F.seq	1	-----	1
sigA-R.seq	1	-----	1
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	1	-----	1
sigA-R2.seq	1	-----	1
110_sigA_comp.seq	101	TGCTCGATCTGTCCGACGCGGCCGTGAAGAAGATGATCAAGCAGGCCAAGAAGCGCGCTTCGTGACCTTCGATCAGCTCAATGAAGTGTGCCGTCCGA	200
sigA-F.seq	1	-----	1
sigA-R.seq	1	-----	1
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	1	-----CGTGACCTTCGATCAGCTC-----	19
sigA-R2.seq	1	-----	1
110_sigA_comp.seq	201	CCAGACCTCGCCCGAGCAGATCGAGGACATCATGTCCATGCTCTCGGACATGGGCATCAACGTACCCGAAGCCGACGATAGCGAAGGCGAGGAACAAAG	300
sigA-F.seq	1	-----ACATGGGCATCAACGTACCC-----	20
sigA-R.seq	1	-----	1
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----GAAGGCGAGGAACAAAG	19
sigA-R2.seq	1	-----	18
110_sigA_comp.seq	301	GACGAGGGCGCGAGGACGAGACCGACAACGAGCTCGTGGAGTCCCGAAGGCCGTACCGAGGTCAAGAAGAGCGAGCCGGGCGAGCCGACCCGACG	400
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	1	-----GAGGACGAGCCGACAACGA-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	G-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	401	ATCCCGTGGCATGATATCTGCGGAGATGGCACCCGTCGAGTCTCTCCCGAAGGCGAAATCGCGATCGCCAAGCGCATCGAGGCGCCGCGAGGC	500
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	501	GATGATCGCAGGGCTGTGCGAAAGCCCGTGAGCTTCCAGGCCATCATCATCTGGCGACGAGCTCAACGAAGGCAAGATCTTCTCCGCGACATCATC	600
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	601	GATCTCGAAGCGACCTATGCCGCCCGAAGCCAAGGGCGGCATGAACCCGCAATGATCGCGGCCCCACCAGGTGAGAACGGCGAAGCCAGGCCGAGG	700
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	701	GCGGCGAAGCGTTGCAAGTACCAGGGCTGCGCCCGCATGTGCGCCCGCCCGCCGCGCCGCGCCGCGCCGACCCCGTTCCGCGCCGCGCTGCCGCGG	800
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	801	CAACGGCCCGAGGCCGAGAAGGATCCAGGCGAGGCCGCCCGAAGCCGACATGGACGAGACGACGAGTTCGAGAACCAGATGTCGCTTGCCGCGATC	900
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	901	GAGGCCGAGCTCAAGCCCAAGTCTCGAGATCTTCGACAAGATCGCCGAGAGCTACAAGAAGCTCGCGAAGCTTCAGGAGCAGGACATCCAGAACCAGC	1000
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	1001	TCGAGAGCACCTCGCATGGCCCTCGCTCTCGCCGACCAAGGCGCAAGTACCCGAAGCTCAAGGACGAGATCATCGTTCGAGGTGAAGTGCCTGCGCCT	1100
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19

Fig. 5-3 Base sequence alignment of *sigA* gene in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110.

110_sigA_comp.seq	1201	GGCGTCGCGCGGAGGATTTCTGCGCAACTACACCGGCTCGGAGCTCGATCCGCGCTGGCTCAACCCGCTCTCGAAGCTGTGGCCAAAGGGCTGGAAGA	1300
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	1301	ACTTCGTCACCCACGAGAAGGACCGCATCAAGGACCTCCGCCACGAGGTGCATCAGCTCGCTGCGCTCACCGGCTGGAGATCGTCGAGTTCGCAAGAT	1400
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	1401	CGTGCACTCCGTGCAGAAAGGGGAGCGCGAAGCCCGCCAGCCCAAGAAAGAGATGGTGGAAAGCAACCTCCGTCTCGTGATCTCGATCGCGAAGAAGTAC	1500
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	1501	ACCAACCAGCGGCTGCAGTTCTCGACCTGATCCAGGAAGCAACATCGGCCTGATGAAGCCGTCGACAAGTTGAGTATCGCCGCGCTACAAGTTCT	1600
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	1601	CGACCTACGCCACGTGGTGGATCCGGCAGGCGATCACCCGCTCGATCGCCGACCGCGCACCATCCGCATCCCCGTGCACATGATCGAGACGATCAA	1700
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	1701	CAAGATCGTGCAGCAGCCGAGATGCTCAACGAGATCGCCCGAGCCGACCCCTGAAGAGCTCGCCGAGAAGCTCGGCATGCCCTTGGAAGGGTC	1800
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	1801	CGCAAGGTCCCTCAAGATCGCCAAGGAGCCGTTGTCGCTCGAAACCCCGTCGGTGACGAGGAGGATTCGCATCTCGGCGATTTTCATCGAGGACAAAGCG	1900
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	1901	CGATCTTGCCGATCGACGCCGATCCAGTGAACCTGCGGAGACCCACCGCGTCTCGCTCACTCCGCGGAAAGCGCGCTGCTGCGCAT	2000
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----	1
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	2001	GCGCTTCGGATCGGCATGAACACCGACCCACCGCTGGAAGAAGTCGGCAGCAGTTCTCGGTGACCCGAGCGTATTCCGCAATCGAGCCAAAGCG	2100
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	1	-----GGCATGAACACCGACCCAC-	20
sigA-R1.seq	1	-----	1
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19
110_sigA_comp.seq	2101	CTGCGCAAGCTGAAGCATCCGTCGAGGAGCCGGAAGCTGCGGAGCTTCTGGATAACTAA	2160
sigA-F.seq	20	-----	20
sigA-R.seq	20	-----	20
sigA-F1.seq	20	-----	20
sigA-R1.seq	1	-----CAAGCTGAAGCATCCGTCGA-	20
sigA-F2.seq	19	-----	19
sigA-R2.seq	19	-----	19

Fig. 5-3 (Continued)

った。得られたペレットを 50 μL の TE (pH 8.0) に懸濁し、DNA 溶液とした。

5-2-4 PCR によるプライマーの特異性の検討

5-2-2 で作製したプライマーおよび既存のプライマー (Table 5-1) と供試菌株の *nodC*, *sigA*, 16S rRNA 遺伝子との特異性を検討するために、PCR による *nodC*, *sigA*, 16S rRNA 遺伝子の増幅確認を行った。PCR 増幅は Table 5-1 に示したプライマーの組み合わせで行い、2-2-4 と同様に PCR 反応液を調製した。PCR 反応には PCR Thermal cycler (TaKaRa PCR Thermal cycler Dice[®], TaKaRa Bio もしくは Gene Amp[®] PCR System 9700, Applied Biosystems) を使用し、反応は 94°C 5 分で変性した後、94°C 30 秒、63°C 30 秒、72°C 30 秒を 40 サイクル、72°C 10 分、4°C 保存という条件で行った。PCR 反応終了後、*nodC* 遺伝子および *sigA* 遺伝子の PCR 産物を確認するために、2% アガロースゲルにて電気泳動を行った。2% アガロースゲルは 0.5 \times TBE buffer と NuSieve[®] 3:1 Agarose (Lonza) を用いて調製した。電気泳動後、2% アガロースゲルを 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ エチジウムブロマイド溶液 (NIPPON GENE) に 20 分間浸して染色し、ルミノ・イメージアナライザーで増幅産物のバンドを確認した。

5-2-5 リアルタイム PCR によるプライマーの検討

リアルタイム PCR に使用されるプライマーは、非特異的増幅がない、増幅効率が 100%に近い (80-120%が適正範囲)、検量線の決定係数 (r^2) が 0.98 以上という条件を満たす必要がある。そこで、5-2-4 において *nodC* 遺伝子、*sigA* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子の特異的な増幅が認められたプライマーセットの増幅効率について検討した。

リアルタイム PCR は、SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa Bio) を用いて行った。1 反応あたり、SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] II (2 \times) 12.5 μL , PCR Forward Primer (10 μM) 1 μL , PCR Reverse Primer (10 μM) 1 μL , テンプレート 2 μL , 滅菌 milliQ 水 8.5 μL を混合し、反応液とした。テンプレートは、5-2-3 で抽出した供試菌株の DNA 溶液を段階希釈したものを扱い、また、ノンテンプレートコントロール (NTC) として TE (pH 8.0) を用いた。この反応液を Thermal Cycler Dice[®] Real Time System (TP860, TaKaRa Bio) にセットし、95°C 30 秒を 1 サイクル、95°C 5 秒、63°C 30 秒を 40 サイクル、95°C 15 秒、63°C 30 秒、95°C 15 秒を 1 サイクルの反応条件にてリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR にて得られた、各供試

菌株のプライマーの増幅効率を Table 5-2 に示した.

5-2-6 供試菌株の培養および *nodC* 遺伝子の発現誘導

nodC 遺伝子の発現を誘導するために, 5 μ M (終濃度) のゲニステインを用い, 高温 30°C, 中温 25°C, 低温 20°C の異なる 3 パターンの温度環境下で処理を行った. ゲニステインはダイズ根から分泌される代表的なフラボノイド化合物であり, 1-5 μ M (終濃度) の添加で高い *nod* 遺伝子の発現誘導と Nod ファクター産生を示すことが報告されている (横山 2005). これ以外の報告においても, ゲニステインを 5 μ M (終濃度) 添加することを実験条件としている (Prithiviraj *et al.* 2000, Begum *et al.* 2001, Duzan *et al.* 2004, Mabood *et al.* 2006, Wei *et al.* 2008, Miransari and Smith 2009, Wei *et al.* 2010). また, 温度環境の設定については, 第 2 章のダイズ栽培において設定した高温 33-28°C, 中温 28-23°C, 低温 23-18°C の中間の温度域とし, 30°C, 25°C, 20°C と 5°C の間隔を設けた. 各供試菌株を 50 mL の HM 液体培地にて 28°C で 3 日間振盪培養し, そこに 150 mL の新鮮な HM 液体培地を加え, OD₆₀₀ が 0.3-0.5 となるまで培養を続けた. 目標の OD₆₀₀ 値まで培養した後, 1 菌株あたり 3 本の 300 mL 容三角フラスコにて全量が 200 mL となるようにそれぞれの培養液を OD₆₀₀ が 0.1 となるよう新鮮な HM 液体培地で希釈し, そこにゲニステイン (nacalai tesque) を終濃度が 5 μ M となるよう添加した. ゲニステイン添加後すぐに, 高温 30°C, 中温 25°C, 低温 20°C で 24 時間培養した. 培養後, 培養液を氷冷し, 50 mL 容コンカルチューブに培養液を 40 mL ずつ分注し, 冷却遠心機 (MX-160, TOMY) にて 4°C, 6,000 \times g で 1 分間遠心した. その後, コンカルチューブを 180° 反転し, 再び 4°C, 6,000 \times g で 4 分間遠心した. 遠心後, 上清を除去し, 培養液を 40 mL ずつ分注し, Vortex にてペレットを懸濁してから再度上述のとおり遠心した. 培養液の全量を集菌した後, 滅菌 milliQ を 1 mL 加えてペレットを懸濁, 洗浄し, その懸濁液を 1.5 mL 容マイクロチューブに移し, 冷却遠心機 (3500, KUBOTA) にて 4°C, 7,400 \times g で 3 分間遠心した. 遠心後, 上清を除去し, -80°C で 1 時間保存し, フリーズドライヤー (DC41A, Yamato) で一晩凍結乾燥を行った. 実験は 1 菌株あたり 3 反復行った.

5-2-7 RNA 抽出および cDNA 合成

RNA 抽出には, ISOGEN-LS (NIPPON GENE) を用いた. 5-2-6 で凍結乾燥したサンプルに

Table 5-2 Amplification efficiency of primer sets for rial-time PCR in each test strain

Test strain	Primer set	Determination coefficient (r^2)	Amplification efficiency (%)
<i>B. japonicum</i> USDA 110	BjnodC-F, R	0.997	114.0
	BjnodC-F1, R	0.996	115.7
	sigA-F, R	0.998	103.4
	sigA-F1, R1	1.000	120.1
	real time_16SF, R	0.988	115.2
USDA 122	BjnodC-F, R	0.994	115.6
	BjnodC-F1, R	0.994	108.9
	sigA-F, R	0.989	97.2
	sigA-F1, R1	0.990	111.3
	real time_16SF, R	0.995	121.3
USDA 123	BjnodC-F, R	0.997	122.1
	BjnodC-F1, R	0.999	115.9
	sigA-F, R	0.996	117.3
	sigA-F1, R1	1.000	114.2
	real time_16SF, R	0.988	103.4
<i>B. elkanii</i> USDA 31	BenodC-F, R	1.000	110.3
	BenodC-F1, R1	1.000	113.2
	sigA-F, R	0.986	116.1
	sigA-F1, R1	0.999	119.5
	real time_16SF, R	1.000	113.8
USDA 76 ^T	BenodC-F, R	0.999	101.7
	BenodC-F1, R1	0.995	101.1
	sigA-F, R	1.000	80.0
	sigA-F1, R1	1.000	83.9
	real time_16SF, R	0.999	101.4

DEPC 処理水 (Diethylpyrocarbonate 1 mL を蒸留水で 1 L に定容し, 室温で 1 時間以上攪拌し, 121°C 20 分でオートクレーブ) を 250 μ L 添加し, BioMasher II (nippi) にてホモジナイズした後, ISOGEN-LS を 750 μ L 添加し, 懸濁した後, 5 分間静置し, クロロホルムを 200 μ L 添加した. Vortex にて懸濁し, 3 分間静置後, 冷却遠心機 (3500, KUBOTA) にて 4°C, 20,000 $\times g$ で 15 分間遠心した. 遠心後, 上清を 500 μ L 回収し, 等量のイソプロパノールを加え混合し, 10 分間静置した. その後, 4°C, 20,000 $\times g$ で 10 分間遠心し, 上清を除去し, 70% エタノールを 1 mL 添加し, 4°C, 120,00 $\times g$ で 10 分遠心した. 上清を除去し, 減圧乾燥を 5 分程度行い, RNase free water を 30 μ L 添加して溶解し, RNA 溶液とした. そこから 2 μ L を採り, NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) にて RNA 溶液の濃度および純度を測定した. 濃度および純度を測定後, ホルムアルデヒド変性ゲルにて電気泳動を行った. ホルムアルデヒド変性ゲルは, DEPC 処理水 21.125 mL に NuSieve[®] 3:1 Agarose (Lonza) 0.5 g を混合し, 電子レンジで加熱し, 完全に溶解し, ある程度冷ました後, ホルムアルデヒド 1.375 mL, 10 \times MOPS buffer (MOPS 20.95 g, 3 M Sodium acetate [pH 7.0] 8.3 mL, 0.5 M EDTA [pH 8.0] 10 mL を DEPC 処理水で 500 mL に定容) 2.5 mL を混合し, 型に流し込み, ホルムアルデヒドが気化しないようにラップを掛けて室温で固化させた. 1 \times MOPS buffer (10 \times MOPS buffer を DEPC 処理水で 10 倍希釈したもの) 300 mL を泳動槽 (Mupid[®]-S, ADVANCE) に注ぎ, 作製したゲルを設置し, RNA 溶液 4 μ L, 1 mg mL⁻¹ エチジウムブロマイド 1 μ L, サンプルバッファー a (Deionized Formamide 8.5 mL, 37% Formaldehyde 2.5 mL, 10 \times MOPS buffer 2.0 mL を混合) 13 μ L, サンプルバッファー b (Glycerol 1.0 mL, 1% Bromophenol blue 0.8 mL, DEPC 処理水 1.2 mL, 1 mM EDTA [pH 8.0] 6 μ L を混合) 3 μ L を混合したサンプル 20 μ L をウェルにアプライし, 50V で BPB 色素がゲルの末端に到達するまで電気泳動を行った. 電気泳動後, ルミノ・イメージアナライザーで 16S rRNA および 23S rRNA のバンドを確認した.

cDNA 合成には, PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio) を用いた. まず, ゲノム DNA 除去を行った. 1 反応あたり 5 \times gDNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L, 1 μ g 相当の total RNA, RNase Free dH₂O を 10 μ L となるように調製し, 42°C で 2 分, 続いて 4°C でインキュベートした. この反応液を用いて, 逆転写反応を行った. 1 反応あたり 5 \times PrimeScript[®] Buffer 2 (for Real time) 4 μ L, PrimeScript[®] RT Enzyme Mix I 1 μ L, RT primer Mix 1 μ L, RNase Free dH₂O 4 μ L, gDNA 除去反応液 10 μ L を混合し, 37°C で 15 分,

85°C で 5 秒, 続いて 4°C でインキュベートした.

5-2-8 リアルタイム PCR による *nodC* 遺伝子の発現解析

リアルタイム PCR には, 5-2-5 と同様に SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus) を用いた. プライマーには, *B. japonicum* 用の *nodC* 遺伝子特異的プライマーとして BjnodC-F1・R を, *B. elkanii* 用の *nodC* 遺伝子特異的プライマーとして BenodC-F1・R1 を, *sigA* 遺伝子特異的プライマーとして sigA-F・R を, 16S rRNA 遺伝子特異的プライマーとして real time_16SF・R を用いた (Tables 5-1, 5-2). 5-2-5 と同様に 1 反応あたりの反応液を調製し, テンプレートとして 5-2-7 で得られた cDNA 溶液を用いた. また, 反応液は 1 サンプルあたり 3 連分調製した. この反応液を Thermal Cycler Dice[®] Real Time System (TP860, TaKaRa Bio) にセットし, 95°C 30 秒を 1 サイクル, 95°C 5 秒, 63°C 30 秒を 40 サイクル, 95°C 15 秒, 63°C 30 秒, 95°C 15 秒を 1 サイクルの反応条件にてリアルタイム PCR を行った. *nodC* 遺伝子の発現量は, $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて, 各供試菌株の中温の値を 1 とした時の相対量で求めた. 実験は 1 菌株あたり 3 反復行った.

5-3 結果および考察

根粒形成遺伝子の発現誘導物質であるゲニステインを添加し, 高温 (30°C), 中温 (25°C), 低温 (20°C) の温度環境下で培養・処理した際の各供試菌株の 16S rRNA 遺伝子および *sigA* 遺伝子で補正し, 中温における発現量を 1 とした相対的な *nodC* 遺伝子の発現量を Figs. 5-4, 5-5, 5-6, 5-7, 5-8 に示した. *B. japonicum* USDA 110 の 16S rRNA 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は, 中温と比較すると低温で 0.48 倍, 高温で 2.74 倍となり, *sigA* 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は, 中温時と比較すると低温で 0.79 倍, 高温で 1.45 倍となった (Fig. 5-4). *B. japonicum* USDA 122 の 16S rRNA 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は, 中温と比較すると低温で 0.34 倍, 高温で 0.68 倍となり, *sigA* 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は, 中温時と比較すると低温で 0.46 倍, 高温で 0.75 倍となった (Fig. 5-5). *B. japonicum* USDA 123 の 16S rRNA 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は, 中温と比較すると低温で 2.12 倍, 高温で 1.38 倍となり, *sigA* 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は, 中温時と比較すると低温で 1.78 倍, 高温で 0.66 倍となった (Fig. 5-6). *B. elkanii*

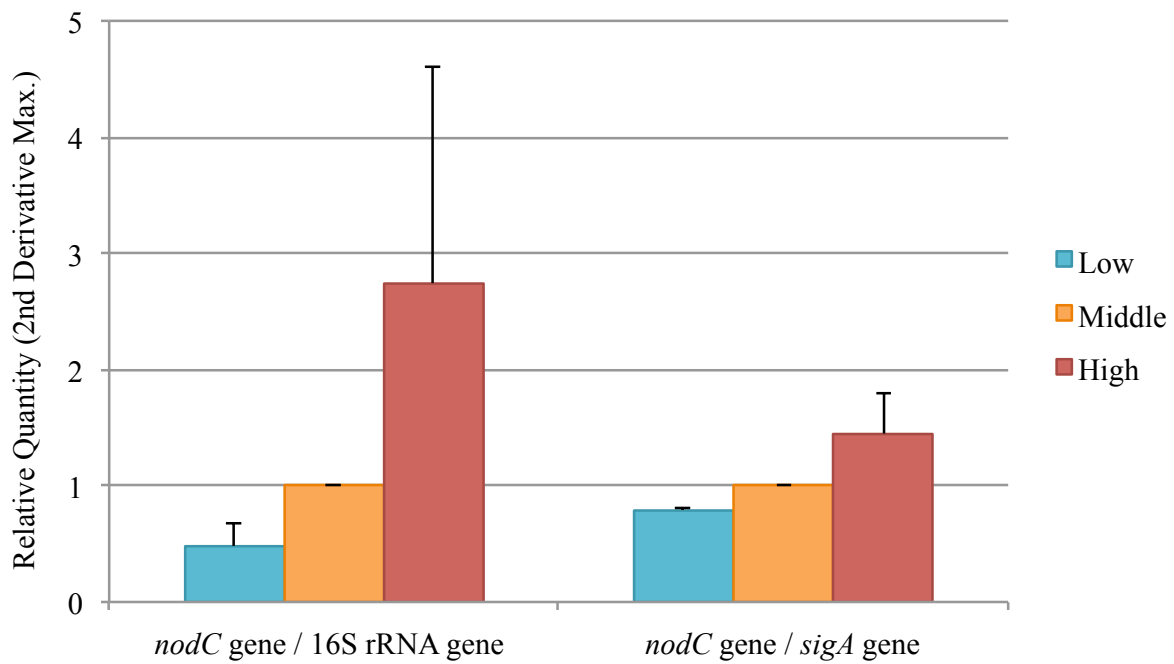


Fig. 5-4 Relative expression quantity of *nodC* gene in *B. japonicum* USDA 110. *nodC* gene / 16S rRNA gene and *nodC* gene / *sigA* gene represent the relative expression quantity of *nodC* gene corrected relative expression quantity of 16S rRNA gene and *sigA* gene, respectively. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$).

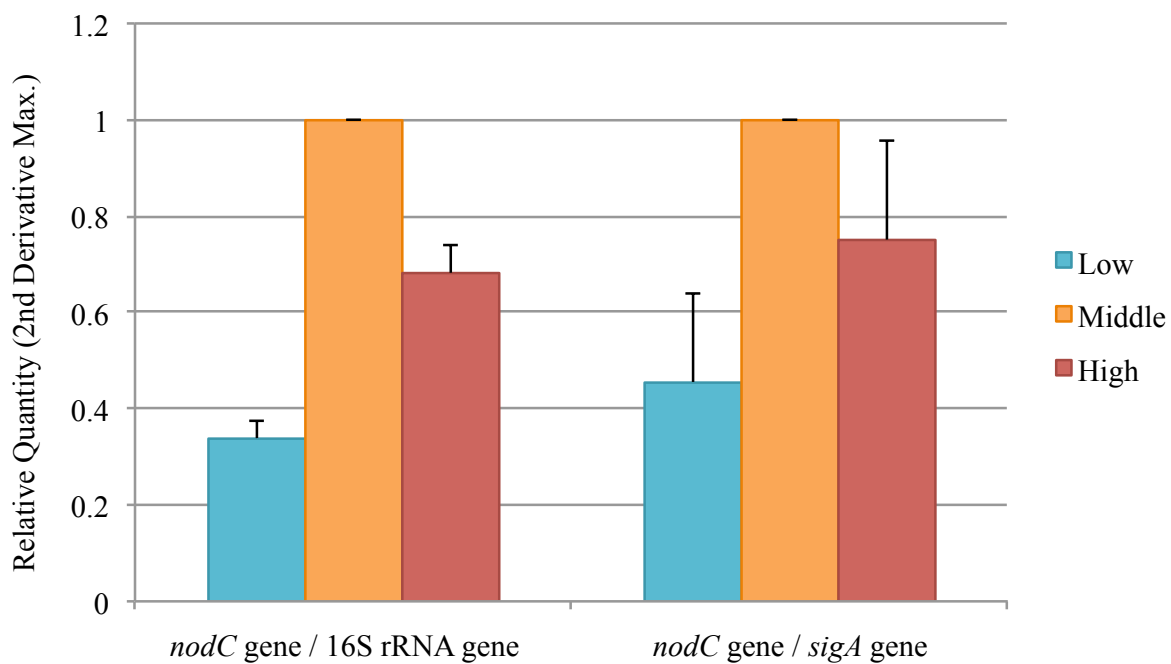


Fig. 5-5 Relative expression quantity of *nodC* gene in *B. japonicum* USDA 122. *nodC* gene / 16S rRNA gene and *nodC* gene / *sigA* gene represent the relative expression quantity of *nodC* gene corrected relative expression quantity of 16S rRNA gene and *sigA* gene, respectively. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$).

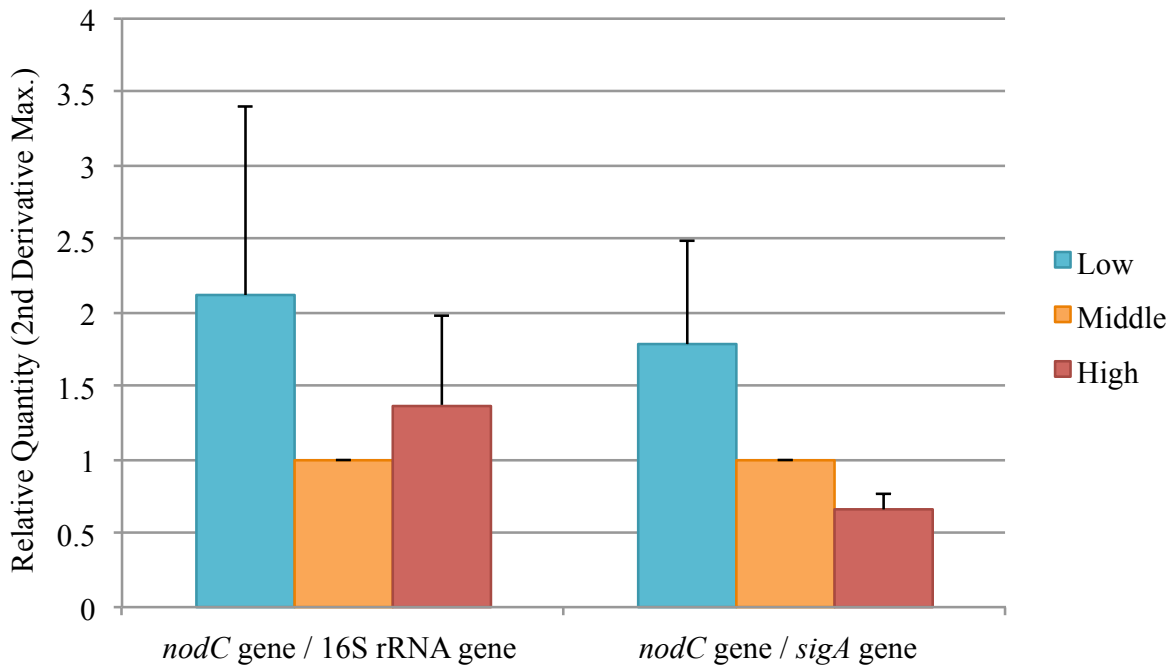


Fig. 5-6 Relative expression quantity of *nodC* gene in *B. japonicum* USDA 123. *nodC* gene / 16S rRNA gene and *nodC* gene / *sigA* gene represent the relative expression quantity of *nodC* gene corrected relative expression quantity of 16S rRNA gene and *sigA* gene, respectively. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$).

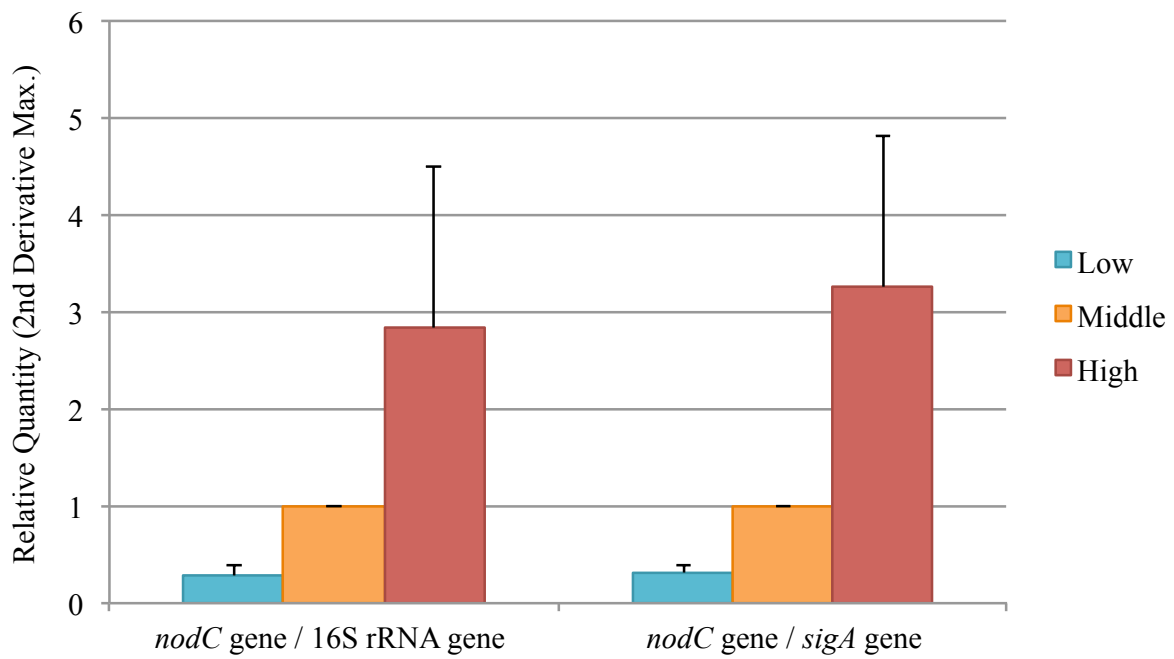


Fig. 5-7 Relative expression quantity of *nodC* gene in *B. elkanii* USDA 31. *nodC* gene / 16S rRNA gene and *nodC* gene / *sigA* gene represent the relative expression quantity of *nodC* gene corrected relative expression quantity of 16S rRNA gene and *sigA* gene, respectively. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$).

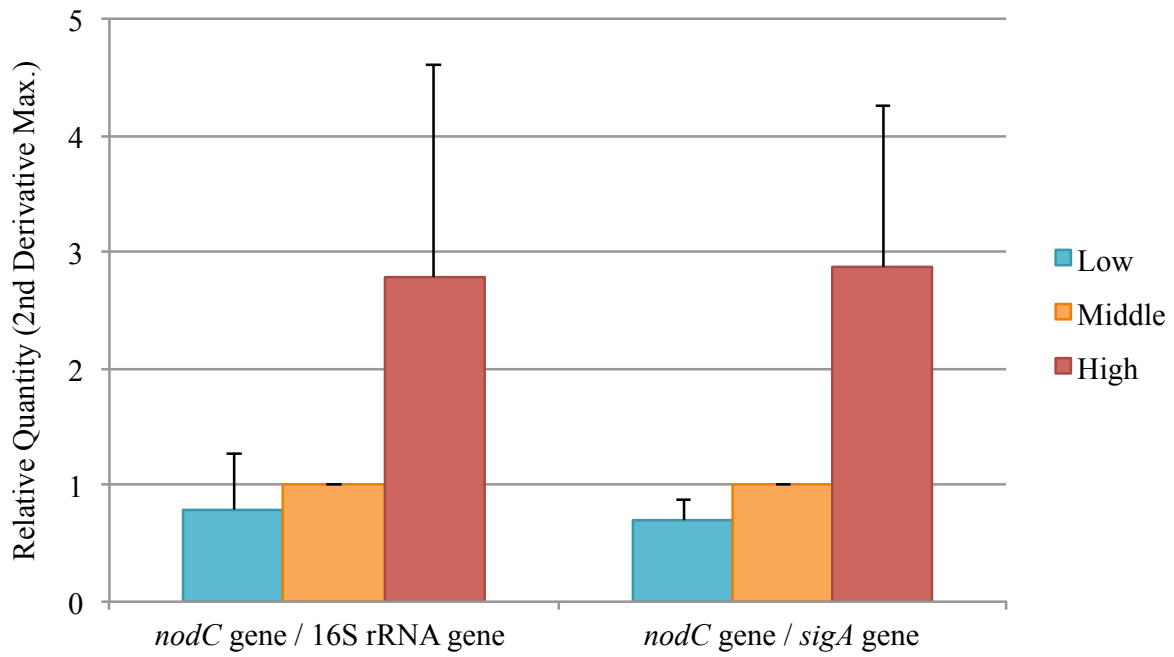


Fig. 5-8 Relative expression quantity of *nodC* gene in *B. elkanii* USDA 76^T. *nodC* gene / 16S rRNA gene and *nodC* gene / *sigA* gene represent the relative expression quantity of *nodC* gene corrected relative expression quantity of 16S rRNA gene and *sigA* gene, respectively. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$).

USDA 31 の 16S rRNA 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は、中温と比較すると低温で 0.28 倍、高温で 2.83 倍となり、*sigA* 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は、中温時と比較すると低温で 0.32 倍、高温で 3.26 倍となった (Fig. 5-7). *B. elkanii* USDA 76^T の 16S rRNA 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は、中温と比較すると低温で 0.79 倍、高温で 2.77 倍となり、*sigA* 遺伝子で補正した際の *nodC* 遺伝子の発現量は、中温時と比較すると低温で 0.70 倍、高温で 2.86 倍となった (Fig. 5-8). 全体的に、USDA 110, USDA 31, USDA 76^T の 3 菌株の *nodC* 遺伝子の発現量は、温度の上昇に伴って上昇する傾向にあった。一方、USDA 123 の *nodC* 遺伝子の発現量は、温度の上昇に伴って減少する傾向にあった。また、USDA 122 の *nodC* 遺伝子の発現量は、低温および高温で中温より低くなる傾向にあったが、低温と高温を比較するとわずかに高温で発現が増加した。

遺伝子の発現解析において、リアルタイム PCR による相対定量法は一般的に用いられており、ある遺伝子の発現量がコントロールに対してどれだけ増減しているかを解析する。そのため、ターゲットとする遺伝子の他に、リファレンスとなる遺伝子が必要となり、そのリファレンス遺伝子には、通常、ハウスキーピング遺伝子が用いられる。ハウスキーピング遺伝子の中には、外的環境条件 (温度, pH など) によりその発現量が変化するものが知られており、本実験で用いた 16S rRNA 遺伝子もこれに該当する。環境傾度に対するターゲット遺伝子の発現解析を行う場合、リアルタイム PCR などのリファレンス遺伝子が必要となる定量解析には複数のリファレンス遺伝子を使用して評価することが必要と考えられる。そこで、本実験では、16S rRNA 遺伝子と *sigA* 遺伝子の異なる 2 種のリファレンス遺伝子を用いて発現解析を行った。16S rRNA 遺伝子と *sigA* 遺伝子のそれぞれで補正された *nodC* 遺伝子の発現量は、ほぼ同様の傾向を示したことから、本実験で設定した温度環境下においては、*nodC* 遺伝子の発現は温度依存的であることが示唆された (Figs. 5-4, 5-5, 5-6, 5-7, 5-8)。

Zhang *et al.* (2002) は、*B. japonicum* の 2 種の野生株と 10 種の変異株を用いて、これらの菌株の Nod ファクター生産における温度 (15, 17, 25°C) とゲニステイン濃度 (0, 0.01, 0.1, 1 μM) について調査し、ゲニステインの濃度が 0.1 および 1 μM で Nod ファクターが検出され、さらに、温度の上昇に伴って Nod ファクターが増加することを報告した。この現象は、温度の上昇に伴った *nod* 遺伝子の発現の増加が Nod ファクターの増加に関与していることを示唆している。Begum *et al.* (2001) は、*Rhizobium leguminosarum* における複数のシグナル物質

(apigenin, daidzein, genistein, hesperetin, kaempferol, luteonin, naringenin, rutin) と温度 (15 および 24°C) による *nodC* 遺伝子の発現を *lacZ* のレポータープラスミドにより調査したところ, hesperetin で *nodC* 遺伝子の最大発現を示し, さらに, 温度を下げると *nodC* 遺伝子の発現が低下することを報告した. 本実験では, *Bradyrhizobium* 属のダイズ根粒菌を供試菌株として用い, *B. japonicum* USDA 110, 122, *B. elkanii* USDA 31, 76^T の 4 菌株は温度の上昇に伴った *nodC* 遺伝子の発現レベルの増加を示し, 一方, *B. japonicum* USDA 123 は温度の上昇に伴った *nodC* 遺伝子の発現レベルの減少を示した (Figs. 5-4, 5-5, 5-6, 5-7, 5-8).

以上, 本実験の結果から, 供試菌株として用いた 5 菌株のダイズ根粒菌の *nodC* 遺伝子の発現は温度依存的であり, 菌株特異的な増減を示すことが示唆された.

第6章 異なる栽培温度環境下におけるダイズ根粒菌の根粒着生能の評価

6-1 緒言

第5章では、リアルタイムPCRにより *Bradyrhizobium japonicum* と *Bradyrhizobium elkanii* の温度依存的な *nodC* 遺伝子の発現レベルの変化を捉えることができた。この温度依存的な *nodC* 遺伝子発現に伴った根粒着生および根粒占有率の変化が、異なる栽培温度環境下でダイズを栽培した際にも現れるのか調査を行い、菌密度が等しくなるよう人為的に調製した土壌(マイクロコズム)におけるダイズ根粒菌の根粒着生能について評価する必要がある。そこで、本実験では、高温、中温、低温の栽培環境下でダイズを栽培し、マイクロコズムから分離したダイズ根粒菌を16S-23S rRNA gene ITS領域のPCR-RFLP法を用いて特定することで根粒占有率を求めた。

6-2 材料および方法

6-2-1 供試菌株の培養

供試菌株には、5-2-1と同様に、*B. japonicum* USDA 110, 122, 123, そして、*B. elkanii* USDA 31, 76^Tの5菌株を用いた。

まず、供試菌株を培養するためのYeast extract-Mannitol Broth (YMB) 培地 (Vincent 1970) を調製した。1 L の蒸留水に K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, Yeast Extract (nacalai tesque) 0.4 g, Mannitol 10 g を加え、よく攪拌した後にpHを6.8に調整し、これをオートクレーブ滅菌(121°C 20分)した。作製したYMB培地をクリーンベンチ内で200 mL容三角フラスコに50 mLずつ分注し、供試菌株をそれぞれ植菌し、28°Cで6-7日間培養した後に菌数を測定した。

6-2-2 マイクロコズムの調製

供試菌株を混合する土壌には、宮崎大学農学部圃場の黒ボク土 (pH [H₂O] = 5.13, EC = 0.07 dS m⁻¹) を用いた。圃場から採取した土壌をふるいに掛け、ふるった土壌をバットに広げ約7日間風乾し、その後、オートクレーブ滅菌(121°C 20分)を3度行った。3度目のオートクレーブ滅菌後、土壌を室温にした後に、クリーンベンチ内にて、6-2-1で培養した各供試菌株

を、① USDA 110, USDA 123, USDA 76^T, ② USDA 110, USDA 123, USDA 31, ③ USDA 122, USDA 123, USDA 76^T, ④ USDA 122, USDA 123, USDA 31 の組み合わせで、各菌株が 1 g の土壌あたり 10⁶ cells の菌密度となるように、全量が土壌重量の 40%となるよう培養菌液と滅菌蒸留水で混合菌液を調製し、これを滅菌土壌に混合し、マイクロコズムとした。供試菌株を混合したマイクロコズムは、ダイズの栽培温度環境下 (6-2-3 参照) で 24 時間インキュベートした。

6-2-3 ダイズの栽培および着生根粒の分離

6-2-2 で調製したマイクロコズムから供試菌株を分離するために、ダイズの栽培を行った。ダイズ品種にはアキシロメ, Bragg, オリヒメ (non-Rj) を用いた。まず、ダイズ栽培用のポットをバーミキュライトと無窒素水耕液で調製した。栽培用ポットの調製, ダイズ種子の表皮殺菌, 播種は 2-2-2 と同様に行った。栽培はグロースチャンバー (MLR-351, SANYO) で 4 週間行い, 栽培期間中は 1 週間毎に滅菌蒸留水をポットの初期重量となるように加えた。グロースチャンバー内における栽培環境は, 高温 (明期 33°C 16 時間, 暗期 28°C 8 時間), 中温 (明期 28°C 16 時間, 暗期 23°C 8 時間), 低温 (明期 23°C 16 時間, 暗期 18°C 8 時間) にそれぞれ設定した。4 週間の栽培後, 2-2-2 と同様の方法で根粒の分離および表皮殺菌を行った。各栽培温度の品種毎に根粒をランダムに 24 個選抜し, 1 個ずつ 1.5 mL 容マイクロチューブに回収した。洗浄後の根粒は-80°C で保存した。

6-2-4 根粒からのゲノム DNA 抽出

6-2-3 で各栽培温度の品種毎にランダムに 24 個選抜した根粒から直接的にダイズ根粒菌のゲノム DNA を抽出するために, 2-2-3 と同様の手法を用いてゲノム DNA 抽出を行った。

6-2-5 16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR 増幅

根粒から抽出したゲノム DNA 抽出液および 5-2-3 で抽出した供試菌株の DNA 溶液をテンプレートとして, 16S-23S rRNA gene ITS 領域をターゲットとした PCR 増幅を行った。PCR 反応液の調製, PCR 反応および PCR 産物の増幅確認は, 2-2-4 と同様に行った。また, PCR 増幅が確認できなかったサンプルに関しては, ゲノム DNA 抽出液を TE (pH 8.0) で希釈する,

もしくは、Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) により再度精製することで PCR 増幅を可能とした。

6-2-6 制限酵素処理

6-2-5 で増幅が確認された PCR 産物を制限酵素 *Msp* I (TaKaRa Bio) を用いて処理した。氷上で1サンプル当たり滅菌 milliQ 水 10.5 μL , $10 \times \text{T Buffer}$ 2 μL , 0.1% BSA 2 μL , *Msp* I (5 U μL^{-1}) 0.5 μL , PCR 産物 5 μL を混合し、この反応液を 37°C で 16 時間インキュベートした。制限酵素処理したサンプルと供試菌株の反応液をアガロースゲルで電気泳動した。3% アガロースゲルの調製および電気泳動は 2-2-6 と同様に行った。電気泳動後、0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ エチジウムブロマイド溶液に 20 分間浸して染色し、ルミノ・イメージアナライザーでアガロースゲルの撮影を行い、RFLP パターンを比較した。

6-2-7 供試菌株の単独接種試験

供試菌株を、YMB 培地を 2 mL ずつ分注した 13 mL 容ツープポジションチューブに植菌し、28°C で 6-7 日間培養した。培養後、菌数を測定し、 10^6 cells mL^{-1} となるよう滅菌蒸留水で希釈した。ダイズ品種、栽培用ポットの調製、種子の表皮殺菌は、2-2-2 と同様に行った。表皮殺菌した種子は、ピンセットでポットのバーミキュライト表面から約 3 cm の深さに播種し、その上に調製した菌液を 1 mL 接種した後に、ポットの重量を測定した。栽培はグロースチャンバー (MLR-351, SANYO) で 3 週間行い、栽培期間中は 1 週間毎に滅菌蒸留水をポットの初期重量となるように加えた。グロースチャンバー内における栽培は、明期 28°C 16 時間、暗期 23°C 8 時間で行った。3 週間の栽培後、ダイズ根に着生した根粒の数を測定した。

6-3 結果および考察

マイクロコズムから分離した菌株の RFLP パターンを供試菌株のものと比較することにより、根粒着生した供試菌株の占有率を求めた。その結果を Figs. 6-1, 6-2, 6-3, 6-4 に示した。USDA 76^T, 110, 123 を混合したマイクロコズムにおいて、USDA 110 はアキシロメの低温、中温、高温、Bragg およびオリヒメの中温、高温で 60%以上の占有率を示し、USDA 123 は Bragg およびオリヒメの低温で 60%以上の占有率を示したが、USDA 76^T の根粒着生は認められなかった (Fig. 6-1 A)。全体的に、USDA 110 の占有率は栽培温度の上昇に伴って有意に増

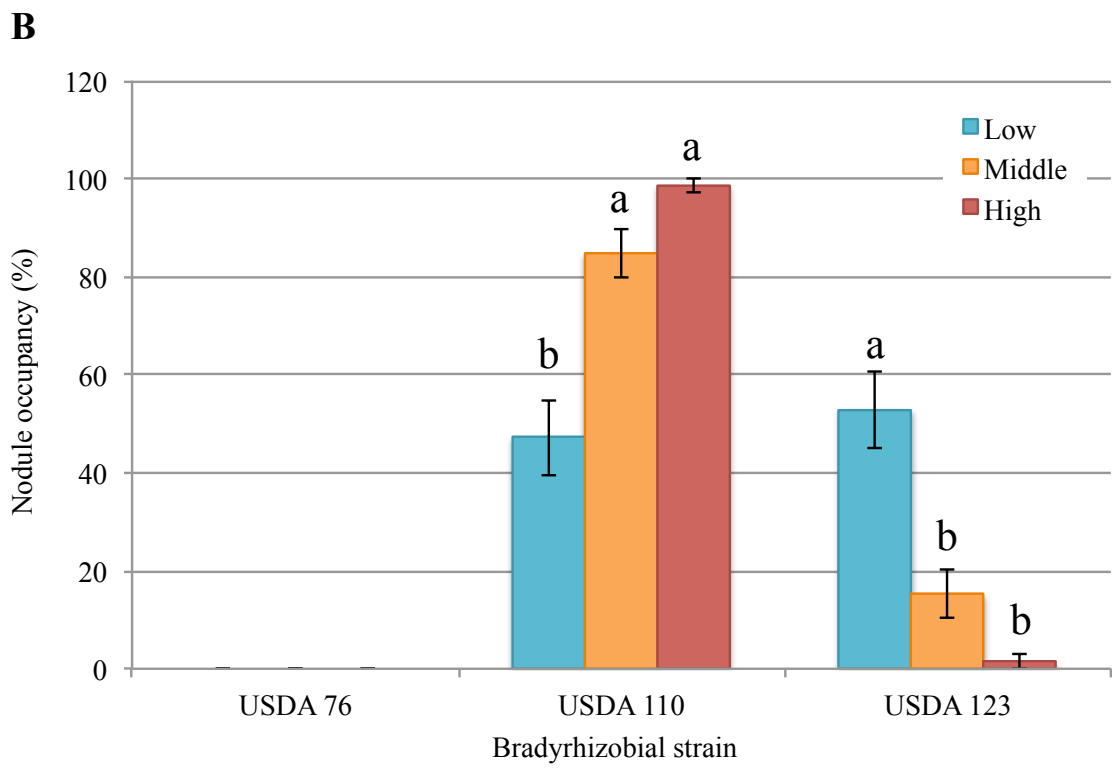
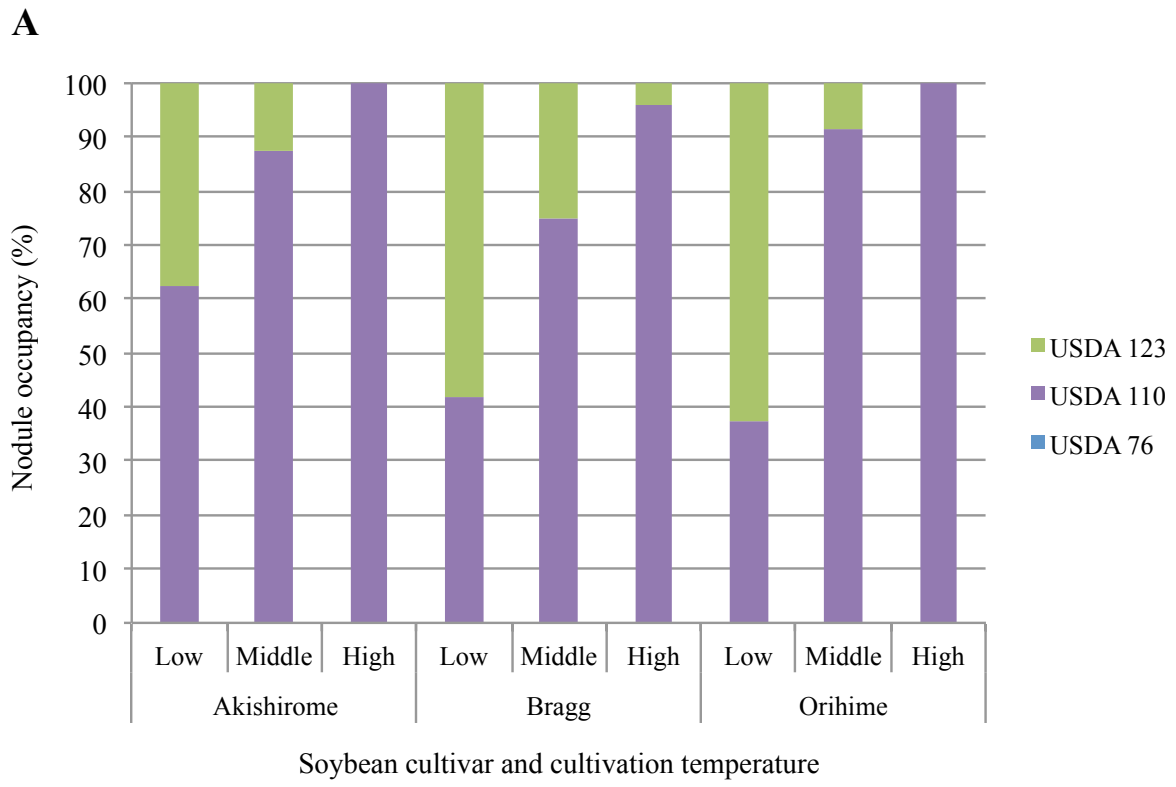


Fig. 6-1 Nodule occupancy of each test strain isolated from soil microcosm mixed *B. japonicum* USDA 110, 123 and *B. elkanii* USDA 76^T. Figure A and B represent the nodule occupancy in each soybean cultivar and the mean of nodule occupancy in total soybean cultivars, respectively. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$). Bars with different superscript letters show significantly different (Tukey Kramer test) at $P < 0.05$.

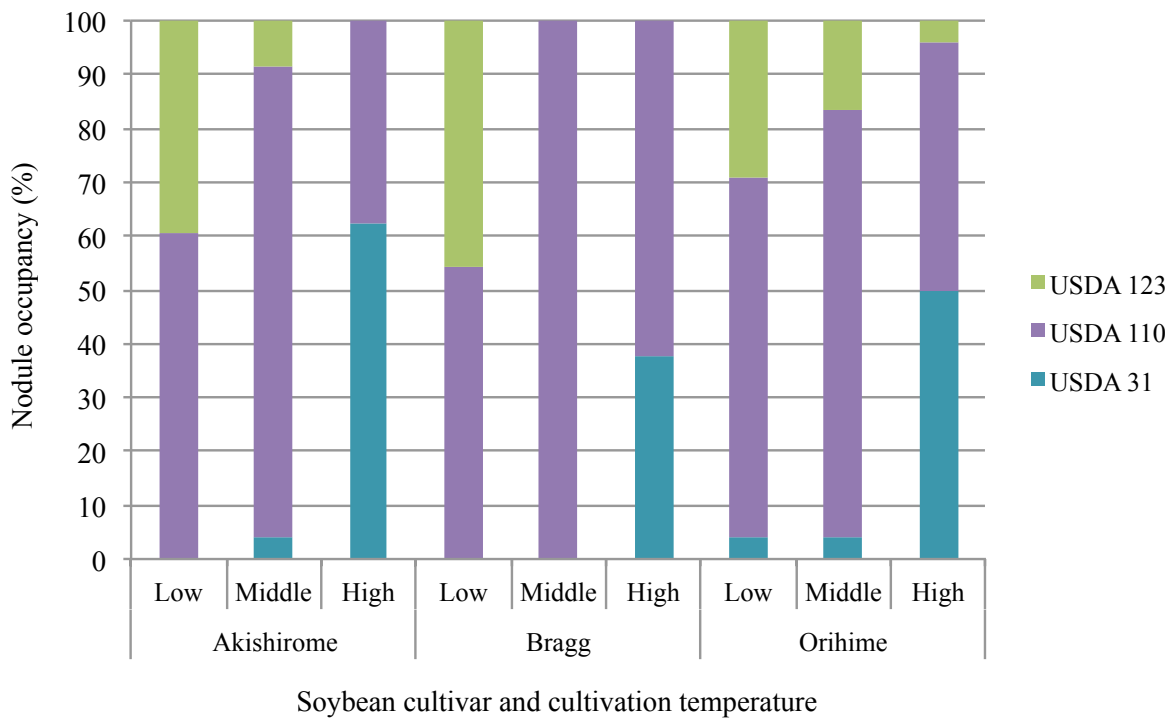
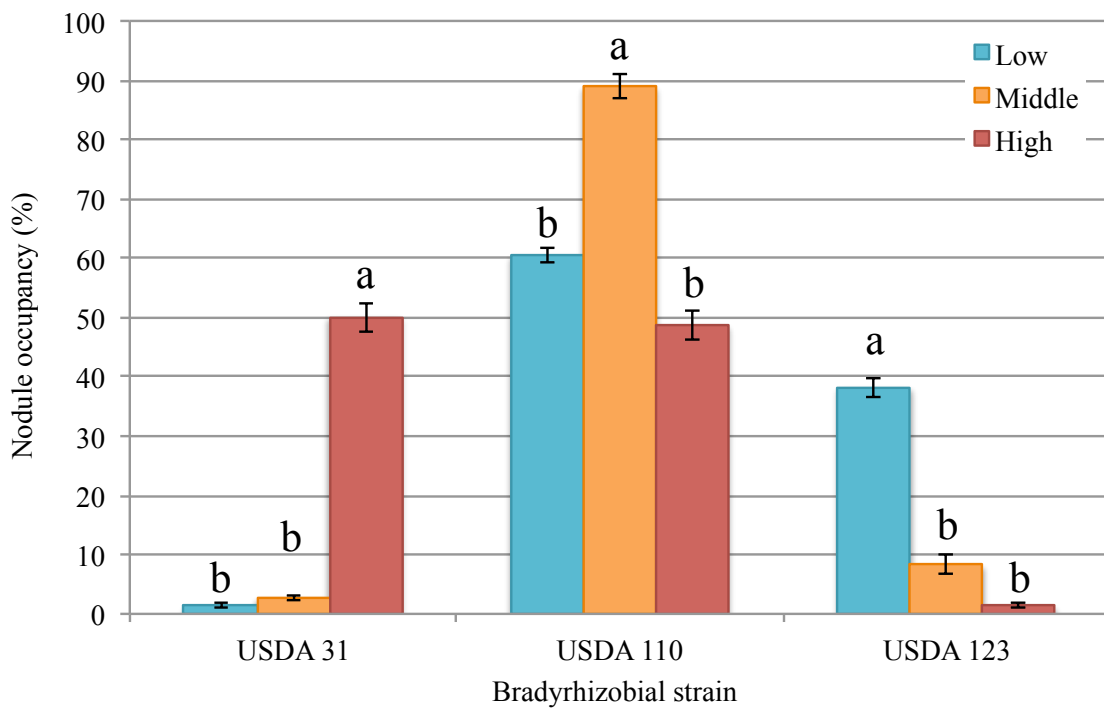
A**B**

Fig. 6-2 Nodule occupancy of each test strain isolated from soil microcosm mixed *B. japonicum* USDA 110, 123 and *B. elkanii* USDA 31. Figure A and B represent the nodule occupancy in each soybean cultivar and the mean of nodule occupancy in total soybean cultivars, respectively. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$). Bars with different superscript letters show significantly different (Tukey Kramer test) at $P < 0.05$.

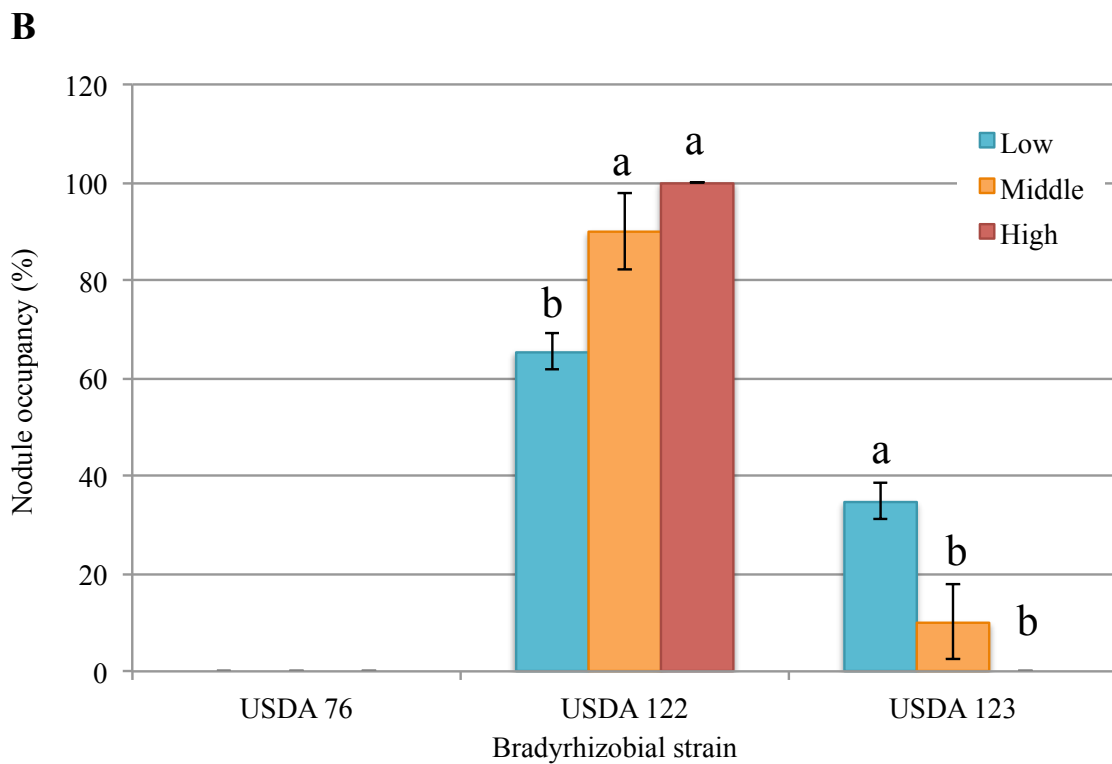
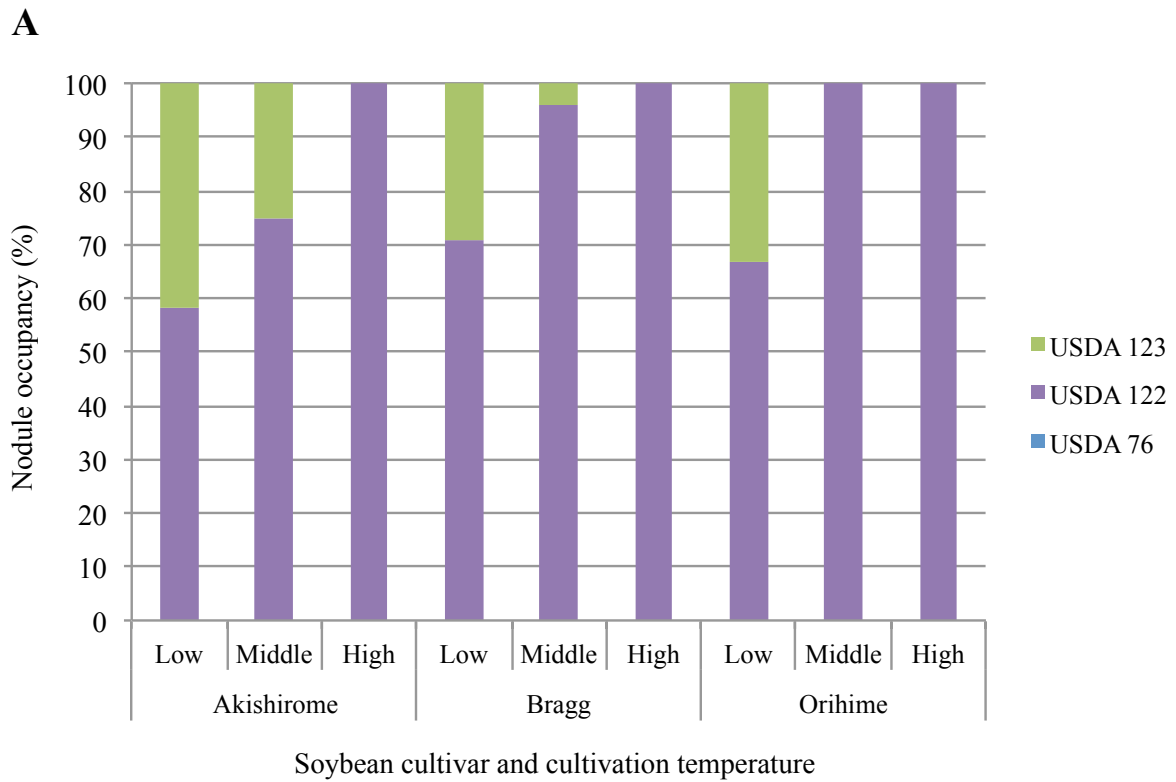


Fig. 6-3 Nodule occupancy of each test strain isolated from soil microcosm mixed *B. japonicum* USDA 122, 123 and *B. elkanii* USDA 76^T. Figure A and B represent the nodule occupancy in each soybean cultivar and the mean of nodule occupancy in total soybean cultivars, respectively. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$). Bars with different superscript letters show significantly different (Tukey Kramer test) at $P < 0.05$.

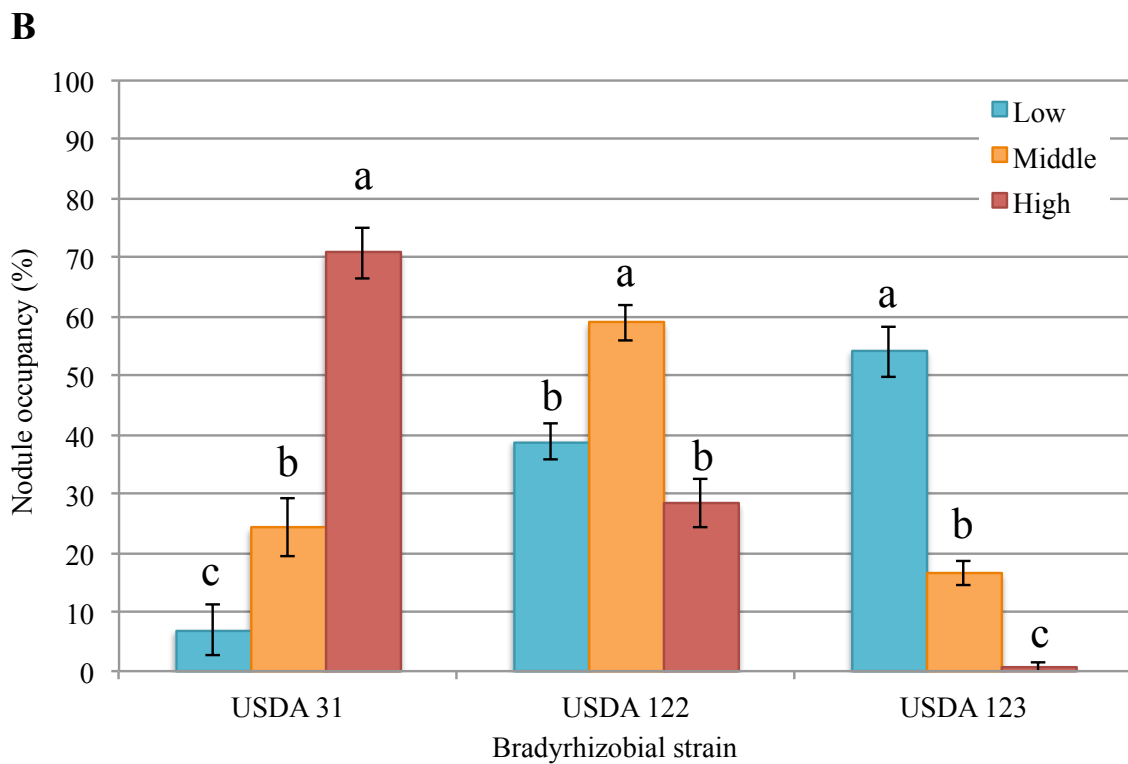
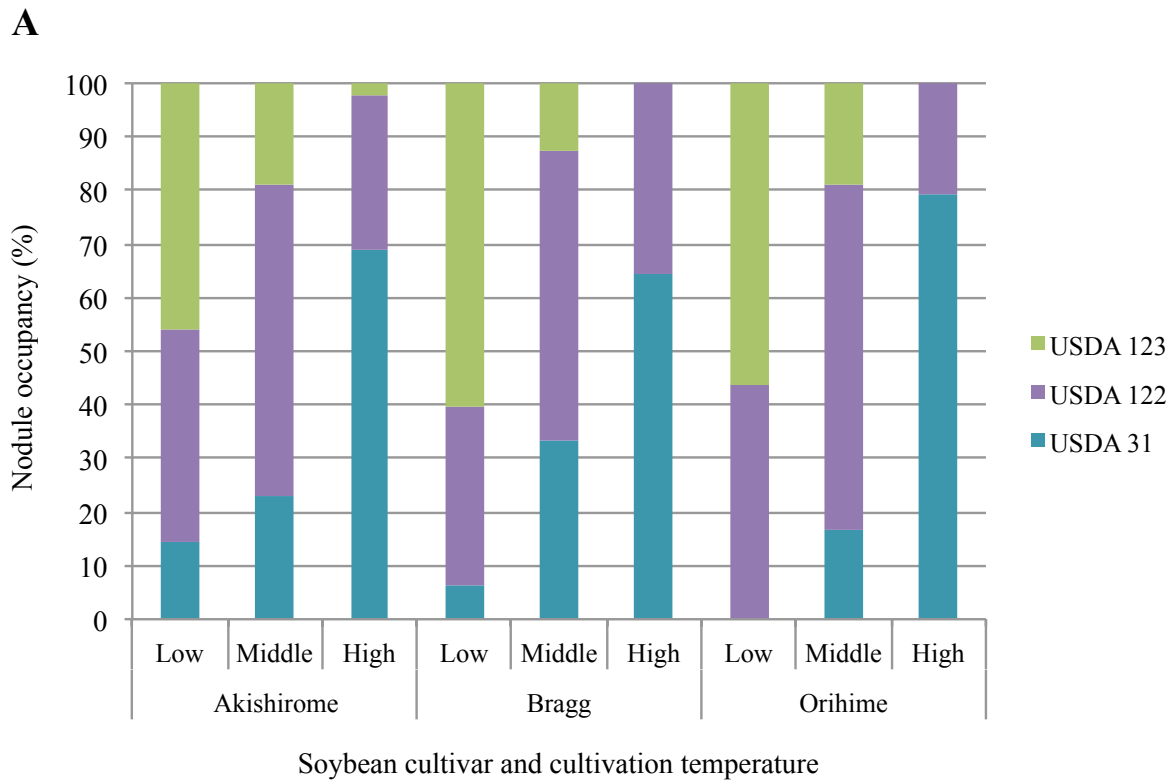


Fig. 6-4 Nodule occupancy of each test strain isolated from soil microcosm mixed *B. japonicum* USDA 122, 123 and *B. elkanii* USDA 31. Figure A and B represent the nodule occupancy in each soybean cultivar and the mean of nodule occupancy in total soybean cultivars, respectively. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$). Bars with different superscript letters show significantly different (Tukey Kramer test) at $P < 0.05$.

加し、一方、USDA 123 の占有率は有意に減少した (Fig. 6-1 B). USDA 31, USDA 110, USDA 123 を混合したマイクロコズムにおいて、USDA 110 はアキシロメおよびオリヒメの低温と中温、Bragg の低温、中温、高温で 50%以上の占有率を示し、USDA 123 はアキシロメおよび Bragg の低温で 40%以上の占有率を示し、そして、USDA 31 はアキシロメ、Bragg、オリヒメの高温において 35%以上の占有率を示した (Fig. 6-2 A). 全体的に、USDA 31 および USDA 110 の占有率は温度の上昇に伴って有意に増加し、一方、USDA 123 の占有率は有意に減少した (Fig. 6-2 B). USDA 76^T, 122, 123 を混合したマイクロコズムにおいて、USDA 122 はアキシロメ、Bragg、オリヒメの全栽培温度で 55%以上の占有率を示し、USDA 123 はアキシロメ、Bragg、オリヒメの低温で 30%以上の占有率を示したが、USDA 76^T の根粒着生は認められなかった (Fig. 6-3 A). 全体的に、USDA 122 の占有率は栽培温度の上昇に伴って有意に増加し、一方、USDA 123 の占有率は有意に減少した (Fig. 6-3 B). USDA 31, USDA 122, USDA 123 を混合したマイクロコズムにおいて、USDA 122 はアキシロメ、Bragg、オリヒメの高温で 50%以上の占有率を示し、USDA 123 はアキシロメ、Bragg、オリヒメの低温で 40%以上の占有率を示し、そして、USDA 31 はアキシロメ、Bragg、オリヒメの高温において 60%以上の占有率を示した (Fig. 6-4 A). 全体的に、USDA 31 および USDA 122 の占有率は温度の上昇に伴って有意に増加し、一方、USDA 123 の占有率は有意に減少した (Fig. 6-4 B). また、高温における USDA 110 と USDA 122 の占有率の減少は、USDA 31 の急激な占有率の増加に起因すると考えられ、高温栽培における USDA 31 の競合能は USDA 110 や 122 よりも高いことが示唆された (Figs. 6-2 B, 6-4 B). 各供試菌株の単独接種における根粒着生数を Fig. 6-5 に示した. 供試菌株間の根粒着生数に有意な差は認められなかったが、USDA 31 および USDA 110 の根粒着生能はほぼ同程度であり、USDA 122, USDA 123 と順に低く、USDA 76^T が最も低い値を示した (Fig. 6-5). この結果から、マイクロコズムにおいて USDA 76^T の根粒着生が認められなかった理由の一つとして、他の供試菌株と比較して根粒着生能が低いこと、もしくは、本実験で用いた non-Rj ダイズ品種との親和性が低いことが示唆された.

横山 (2005) は, *nodY-lacZ* プラスミドを導入した *B. japonicum* USDA 110, *B. elkanii* USDA 76^T, そして、タイの土壌から分離された *Bradyrhizobium* sp. TARC 64 (Yokoyama *et al.* 1996) の異なる温度環境下 (20, 23, 26, 30, 33, 35, 37, 40°C) における *nodY* 遺伝子の発現レベルおよび異なる栽培温度環境下 (23-18°C, 25-25°C, 34-28°C) における接種菌株 (*B. japonicum*

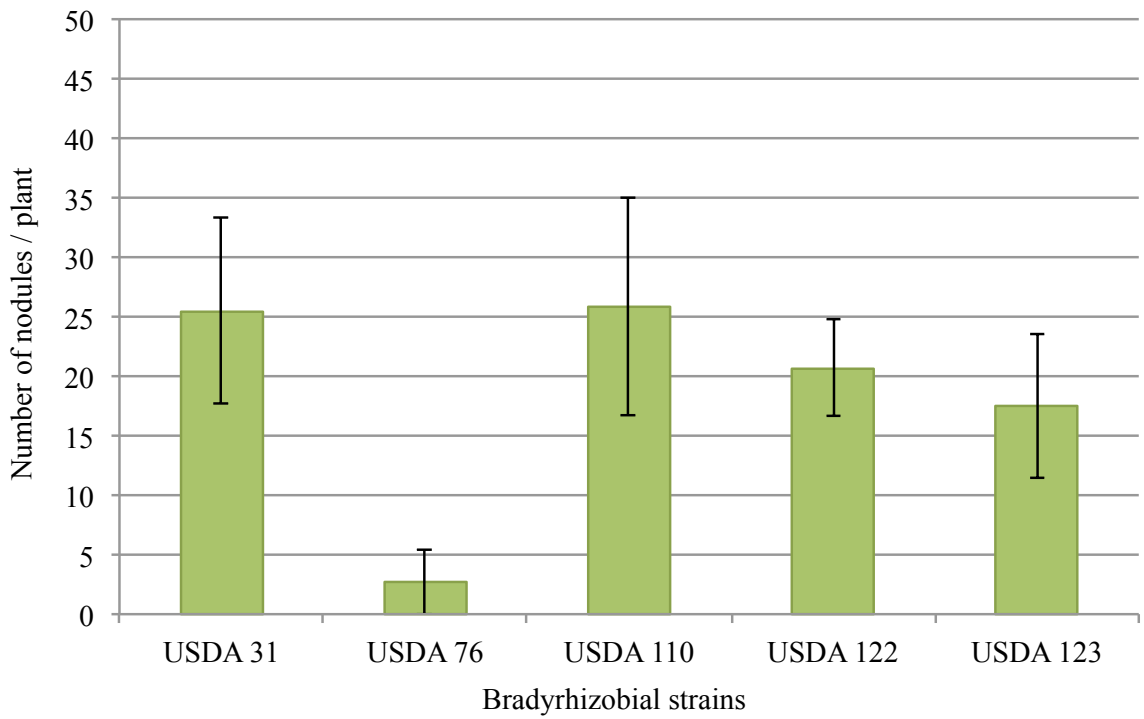


Fig. 6-5 Number of nodules on each test strain in non-*Rj* genotype soybean. Each value was expressed as mean \pm SE ($n = 3$).

USDA 110, 122, 123, 5033, *B. elkanii* USDA 31, 76^T, *Bradyrhizobium* sp. TARC 64) の根粒形成能について調査し, USDA 110 と USDA 76^T の *nodY* 遺伝子の転写応答が 23 から 35°C で明確に異なること, 23–18°C および 25–25°C では USDA 110 の根粒占有率が高かったのに対し, 34–28°C では USDA 31 の根粒占有率が急激に増加することを報告した. 第 5 章において, *B. japonicum* USDA 110, 122, *B. elkanii* USDA 31, 76^T の *nodC* 遺伝子の発現は温度依存的に増加し, *B. japonicum* USDA 123 の *nodC* 遺伝子の発現は温度依存的に減少することが示された (Figs. 5-4, 5-5, 5-6, 5-7, 5-8). さらに, 本章における各供試菌株の根粒着生は, USDA 76^T を除き, USDA 31, 110, 122 は栽培温度の上昇に伴った根粒占有率の増加を示し, 一方, USDA 123 の根粒占有率は栽培温度の上昇に伴って減少した (Figs. 6-1, 6-2, 6-3, 6-4).

以上, 本実験の結果から, *B. japonicum* USDA 110, 122, 123, *B. elkanii* USDA 31 の栽培温度の上昇に伴った根粒占有率の変化は, 温度依存的な *nodC* 遺伝子の発現レベルの変化と一致したことから, *nodC* 遺伝子の温度依存的な発現レベルの変化はダイズへの根粒着生能に影響を及ぼすことが示唆された. しかしながら, *B. elkanii* USDA 76^T においては, *nodC* 遺伝子の温度依存的な発現レベルの増加が検出されたものの, ダイズへの根粒着生が認められなかったため, ダイズ根粒菌の感染能に関与する因子は *nod* 遺伝子とは別であることが示唆された.

第7章 総合考察

本研究では、土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布に関与すると考えられる環境因子の一つである温度に着目し、日本とほぼ同緯度にあるアメリカにおける緯度に沿った気温の変化に伴う土着ダイズ根粒菌の地理的分布や群集構造の遷移、並びに、栽培温度や宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型が土着ダイズ根粒菌の群集構造に及ぼす影響について明らかにすることを目的に研究を行った。さらに、ダイズへの根粒着生において重要な役割を担っているダイズ根粒菌の根粒形成遺伝子、特に、*nodC* 遺伝子に着目し、この遺伝子の温度に対する応答、および、異なる温度環境下における根粒着生能について調査を行い、温度による *nodC* 遺伝子の発現レベルの違いがダイズ根粒菌のダイズへの感染および温度環境の変化に伴った群集構造の遷移に寄与する一因子であるのか検討した。

第2章では、土着ダイズ根粒菌の群集構造に及ぼす栽培温度と宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型の影響について、高温、中温、低温の3パターンの栽培温度環境下で4遺伝子型13品種のダイズを栽培し、分離した土着ダイズ根粒菌の16S-23S rRNA gene ITS領域のPCR-RFLP解析によるクラスター解析を行い、この結果をもとに、数理生態学的手法を用いた群集構造解析を適用することにより、栽培温度と宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型の影響について評価した。分離した土着ダイズ根粒菌のクラスター解析の結果、各クラスターの根粒占有率は、Bj110, Be76, Be94 クラスターは栽培温度の上昇に伴って増加し、一方、Bj123 クラスターは栽培温度の上昇に伴って有意に減少した (Table 2-1, Fig. 2-4)。さらに、*Rj*₂ 遺伝子を保有する *Rj*₂*Rj*₃ や *Rj*₂*Rj*₃*Rj*₄ 遺伝子型ダイズ品種は、他の *Rj* 遺伝子型ダイズ品種と比較して Bj110 クラスターの50-73.8%の高い占有率を示したことから、宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型は特定のダイズ根粒菌の根粒着生に影響を及ぼすことが示唆された (Table 2-1)。Bray-Curtis 類似度指数をもとにしたクラスター解析および MDS 解析の結果、各群集の MDS プロットは、栽培温度の上昇に伴って図の左側から右側へ (Cluster ナンバーの小さい方から大きい方へ) 遷移した (Fig. 2-7)。これらの結果と各クラスターに属する分離株の数を比較したところ、MDS プロットの分布は、Bj110 クラスターと Bj123 クラスターの2つの主要なクラスターによって影響を受けていることが示された (Figs. 2-3, 2-7)。以上の結果から、宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型および栽培温度が、宿主ダイズに感染する土着ダイズ根粒菌の群集構造に影響を及ぼすことを示唆した (Shiro *et al.* 2012)。

第3章では、アメリカの土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布について、16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP 解析による土着ダイズ根粒菌のクラスター解析を行い、この結果をもとに、数理生態学的手法を用いた群集構造解析を適用するにより、土着ダイズ根粒菌群集と緯度との関係について評価した。その結果、アメリカの土着ダイズ根粒菌群集は、日本と同様に緯度と強い相関 ($r^2 = 0.815$) を示し、地理的に変遷することを明らかにした (Fig. 3-8) (Shiro *et al.* 2013)。しかしながら、日本の土着ダイズ根粒菌群集と緯度との相関は $r^2 = 0.871$ であり、アメリカのものよりわずかに高い値を示した (Saeki *et al.* 2013)。この結果を踏まえ、第4章において、日本とアメリカの同緯度地域における土着ダイズ根粒菌の生態的特徴の相違を評価するために、日本とアメリカ間の緯度による土着ダイズ根粒菌の群集構造の地理的分布について、数理生態学的手法を用いた比較解析を行った。多様性解析の結果、日本とアメリカの各供試土壌間の H'_β/H'_γ の値は、地理的に緯度の類似している地域間ではより小さく、地理的に緯度の離れた地域間ではより大きくなった。さらに、日本で Bj110 クラスターの高い占有率を示しているいくつかの地域とアメリカの各地域間で、高い H'_β/H'_γ の値を示す傾向にあった (Tables 4-2, 4-4)。極座標付けによる解析の結果、日本およびアメリカにおける土着ダイズ根粒菌群集は北から南へと徐々に変遷しており、それぞれの供試土壌において特徴的な群集構造が検出された (Fig. 4-2)。日本における土着ダイズ根粒菌の主要なクラスターは、北から南の順に、*B. japonicum* USDA 123, USDA 110, USDA 6^T, そして、*B. elkanii* USDA 76^T のクラスターが規則的に分布しており、*B. japonicum* 系統株が広く優占していた (Table 4-2) (Saeki *et al.* 2006, 2008, 2013, Saeki 2011)。一方、アメリカの土着ダイズ根粒菌の地理的分布は、*B. elkanii* のクラスターが *B. japonicum* のクラスターよりも多く優占しており、中部地域における Bj110 クラスターの優占度は日本よりも低くなった (Fig. 3-4, Table 4-3)。この原因の一つとして、日本に生息していないその地域の気候に順化したダイズ以外の宿主となるマメ科植物の植生などが関係していると考えられる。Minamisawa *et al.* (1997) は、*B. japonicum* と *B. elkanii* のダイズ、ツルマメ (*Glycine soja*)、サイラトロ (*Macroptilium atropurpureum*) に対する根粒着生の選好性について調査し、*B. japonicum* はダイズに、*B. elkanii* はサイラトロに優先的に根粒着生すること、ツルマメには両ダイズ根粒菌が同程度根粒着生することを報告した。Marr *et al.* (1997) は、*Amphicarpaea bracteata* が *B. japonicum* や *B. elkanii* との根粒を形成し、*B. elkanii* の元来の宿主でなかったのにも関わらず、*B. elkanii* と

窒素固定を行うことを報告した。さらに, Tang *et al.* (2012) は, ダイズや土着のマメ科植物 (*A. bracteata* および *Desmodium canadense*) と関係する北東アメリカにおける *Bradyrhizobium* の集団の起源と小進化について調査したところ, 土着のマメ科植物と関係するダイズ根粒菌がダイズ接種に対して生態学的に適応した細菌の新規起源を担うことを示唆した。サイラトロは, オーストラリア, 南および中央アメリカ, いくつかの太平洋諸島の一部を含む熱帯, 亜熱帯地域で栽培されているマメ科牧草である (Shaw and Whiteman 1977)。また, *A. bracteata* は北東アメリカに広く分布する一年生マメ科植物である (Turner and Fearing 1964, Parker 1991)。*B. elkanii* と根粒形成における親和性を有するこれらマメ科植物の存在が, 北アメリカにおける *B. elkanii* の高い優占に強く貢献している可能性がある。しかしながら, Bj123, Bj110, Bj6, そして, Be クラスターの変遷は, 日本のものと共通しており, アメリカの土着ダイズ根粒菌群集も緯度に沿って変遷することを明確に示した (Fig. 3-8)。このように, 温度は, ダイズ根粒菌の土着化・優占化に深く関与する環境因子の一つであると推察されるため, 温度によるダイズ根粒菌の生理的応答がダイズへの根粒着生に影響を及ぼしたと考えられる。また, 第2章で供試した土壌中には, もともと各クラスターが不均一に存在しており, 土壌中で高い占有率を示すクラスターがより根粒着生しやすくなると考えられるため, 温度による生理的応答への影響における群集構造の変遷を捉えるためには, ダイズ根粒菌株の密度が等しい土壌における根粒着生能を評価する必要があると考えられる。そこで, 第5章において異なる温度環境下における *nodC* 遺伝子の発現解析を, 第6章において異なる栽培温度環境下における根粒着生能の評価を行った。

第5章において, 供試した *B. japonicum* USDA 110, 122, 123, そして, *B. elkanii* USDA 31, 76^T の5菌株の *nodC* 遺伝子の発現を比較すると, USDA 110, USDA 31, USDA 76^T の3菌株の *nodC* 遺伝子の発現量は, 温度の上昇に伴って上昇する傾向にあった。一方, USDA 123 の *nodC* 遺伝子の発現量は, 温度の上昇に伴って減少する傾向にあった。また, USDA 122 の *nodC* 遺伝子の発現量は, 低温および高温で中温より低くなる傾向にあったが, 低温と高温を比較するとわずかに高温で発現が増加した (Figs. 5-4, 5-5, 5-6, 5-7, 5-8)。以上の結果から, ダイズ根粒菌の *nodC* 遺伝子の発現は温度依存的であり, 菌株特異的な増減を示すことが示唆された。次に, 第6章において, *B. japonicum* USDA 110, 122, 123, そして, *B. elkanii* USDA 31, 76^T の5菌株を, ① USDA 110, USDA 123, USDA 76^T, ② USDA 110, USDA 123, USDA 31,

③ USDA 122, USDA 123, USDA 76^T, ④ USDA 122, USDA 123, USDA 31 の組み合わせでマイクロコズムを調製し、このマイクロコズムを用いてダイズを高温、中温、低温の栽培温度環境下で栽培し、ダイズに根粒着生するダイズ根粒菌の占有率の変化を調査した。その結果、USDA 31, 110, 122 は栽培温度の上昇に伴った根粒占有率の増加を示し、一方、USDA 123 の根粒占有率は栽培温度の上昇に伴って減少した (Figs. 6-1, 6-2, 6-3, 6-4)。しかしながら、USDA 76^Tについては、ダイズへの根粒着生が認められなかった (Figs. 6-1, 6-3)。以上の結果から、USDA 76^Tを除く 4 菌株においては温度依存的な *nodC* 遺伝子の発現レベルの変化と根粒占有率の変化が一致していたため、*nodC* 遺伝子の温度依存的な発現レベルの変化は、ダイズへの根粒着生能に影響を及ぼすことが示唆された。Kosslak *et al.* (1987) は、ダイズ根から抽出したフラボノイド化合物 (ダイゼインおよびゲニステイン) を用いて、*B. japonicum* USDA 110 および 123 の *nodABC* 遺伝子の発現を β -galactosidase 活性で調査し、ダイゼインで誘導した場合は USDA 123 が、ゲニステインで誘導した場合は USDA 110 がより高い発現を示すことを報告した。Banfalvi *et al.* (1988) は、ダイズ種子から抽出したゲニステインやダイゼインを用いて、*B. japonicum* USDA 110 の *nodY* および *nodC* 遺伝子の発現を β -galactosidase 活性で調査したところ、*nodY* 遺伝子の発現はダイゼインで誘導した場合よりゲニステインで誘導したほうが 2 倍以上の高い値を示し、*nodC* 遺伝子においても同様の傾向がみられたことを報告した。これらの報告から、ダイズ根から分泌されるフラボノイド化合物の種類により、*nodC* 遺伝子の誘導の程度は異なり、さらに、菌株特異的な発現を示すことが示唆された。また、ダイズ栽培時の根圏温度の低下は、ダイズ根粒菌のダイズ根への感染の遅延 (Zhang and Smith 1994) やダイズ根からのゲニステインの分泌の低下 (Zhang and Smith 1996)、それに伴う *nod* 遺伝子の発現の抑制 (Zhang *et al.* 1996) を引き起こすことが報告されている。しかしながら、Pan and Smith (1998) は、根圏温度が低下するほどダイズ根から分泌されるダイゼインの濃度が高くなることを報告している。Kosslak *et al.* (1987) の報告から、*B. japonicum* USDA 123 の *nod* 遺伝子の発現は、ゲニステインよりダイゼインで高くなることが示唆されている。本実験において、低温栽培で USDA 123 の根粒占有率が高くなるという結果を得ている (Table 2-1, Figs. 6-1, 6-2, 6-3, 6-4) が、これは低温における *nodC* 遺伝子の発現の強さだけでなく、栽培温度による根圏温度の変化によりダイズ根から分泌されるフラボノイド化合物の種類とそれらの分泌量の変化も影響しているかもしれない。

また、これまで供試した *B. japonicum* USDA 110, 122, 123, そして, *B. elkanii* USDA 31, 76^T の単独接種試験, 並びに, 2 菌株混合接種試験を行うことにより, ダイズ根粒菌 2 菌株間の根粒着生能および競合能についても評価した. 単独接種試験の結果, USDA 31 および USDA 110 の根粒着生能はほぼ同程度であり, USDA 122, USDA 123 と順に低く, USDA 76^T が最も低い値を示した (Fig. 6-5). この結果から, 第 6 章において USDA 76^T の根粒着生が認められなかった理由の一つとして, 他の供試菌株と比較して根粒着生能が低い, もしくは, 本実験で用いた non-*Rj* ダイズ品種との親和性が低いことが示唆された. 2 菌株混合接種試験の結果, USDA 110, 122, 31 間の根粒着生能は, いくらか栽培温度に依存する場合もあるが, USDA 110 が USDA 31 や USDA 122 よりも高く, USDA 122 が USDA 110 や USDA 31 よりも低いことが示され, 単独接種における根粒着生能とほぼ一致することが示された (Fig. 6-5, Supplemental data Figs. S1, S3, S5). Fuhrmann and Wollum (1989) は, *B. japonicum* USDA 31, 110, 123 (USDA 31 は, 現在, *B. elkanii* に分類される) の USDA 110 に対する競合能と根圏微生物の *Pseudomonas* spp. との混合接種による 3 菌株の根粒占有率の変化について調査したところ, 2 菌株間の競合能については USDA 110 が強く, 根圏微生物と 3 菌株の混合接種では根圏微生物との共存により USDA 110 の根粒着生が他の 2 菌株と比較して増強することを報告した. また, Li *et al.* (2011) は, 競合能の異なる *B. japonicum* 系統の 2 菌株についてダイゼイン添加後に菌体外に分泌されるタンパク質を解析し, これら 2 菌株の競合能に関与するタンパク質について調査したところ, 根粒形成過程に関与する代謝関連, 輸送関連, 転写関連, furagellin のタンパク質の発現が 2 菌株間で異なることを報告した. これらの報告から, ダイズ根粒菌の競合能は, *nodC* 遺伝子の発現の程度だけではなく, 根粒形成に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現や他の根圏微生物の作用により左右されると考えられた.

以上, 本研究を通して, *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布, 土着化・優占化に関与すると考えられる温度は, アメリカのような日本と同緯度地域における土着ダイズ根粒菌の地理的分布, 感染ダイズ根粒菌の群集構造, ダイズ根粒菌の根粒形成遺伝子の発現や根粒着生能に広く関与していることを強く示唆した. さらに, *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌のダイズへの根粒着生は, 根粒着生能が元来低い USDA 76^T を除いて, 温度依存的であり, 温度による *nodC* 遺伝子の発現レベルの変化がダイズへの根粒着生, および, 感染ダイズ根粒菌群集構造の形成に影響を及ぼす一因子であることが示唆された. しかしな

がら、ダイズ根粒菌の感染能に関与する因子は *nod* 遺伝子の発現とは別であることが示唆されたため、今後更なるダイズへの感染機構の解明に関する研究が期待される。ダイズの生産性の向上につながる実用的な有用ダイズ根粒菌接種技術の確立には、土着ダイズ根粒菌の生態的特徴、宿主ダイズとの親和性、土壌温度や pH などの環境傾度に対する適応性について解明し、これらに関する基礎的知見を蓄積する必要があると考えられる。また、感染ダイズ根粒菌の群集構造と土壌中のダイズ根粒菌の群集構造は異なることが予想されることから、土壌中のダイズ根粒菌群集を土壌 DNA から直接的に評価できる手法の開発も必要であり、さらに、開発された手法を用いたダイズ根粒菌群集構造の解析結果とこれまでの手法で得られた感染ダイズ根粒菌群集構造の解析結果との比較を行うことで、群集構造の差異について検討する必要があると考えられる。

本研究は、ダイズ根粒菌の生態的特徴、宿主との親和性、温度に対する生理的応答について検証を行ったものである。本研究で得られた知見が、今後のダイズ根粒菌生態研究の発展に貢献し得るものになると期待している。

要約

ダイズの生産性向上につながる実用的な有用ダイズ根粒菌の接種技術を確立するためには、土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性や地理的分布、土着化・優占化に関係する環境因子の特定、生態的・生理的特性、環境適応性、および、宿主ダイズとの親和性に関する知見の蓄積が求められる。そこで、本研究では、土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布に関与すると考えられる環境因子の一つである温度に着目し、同緯度地域における緯度に依存的な温度変化に伴う土着ダイズ根粒菌の地理的分布や群集構造の変化、並びに、栽培温度や宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型が土着ダイズ根粒菌の群集構造に及ぼす影響について明らかにすることを目的に研究を行った。さらに、ダイズへの根粒着生に関与するダイズ根粒菌の根粒形成遺伝子に着目し、この遺伝子の温度に対する応答、および、異なる温度環境下における根粒着生能について調査を行い、温度による根粒形成遺伝子の発現レベルの違いがダイズ根粒菌のダイズへの感染および群集構造の変化に寄与する一因子であるのか検討した。

まず、土着ダイズ根粒菌の群集構造に及ぼす栽培温度と宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型の影響について、高温、中温、低温の3パターンの栽培温度環境下で4遺伝子型13品種のダイズを栽培し、分離した土着ダイズ根粒菌の16S-23S rRNA gene ITS領域のPCR-RFLP解析によるクラスター解析を行い、この結果をもとに、数理生態学的手法を用いた群集構造解析を適応するにより、栽培温度と宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型の影響について評価した。その結果、Bj110、Be76、Be94 クラスターは栽培温度の上昇に伴って増加し、一方、Bj123 クラスターは栽培温度の上昇に伴って有意に減少し、さらに、群集構造解析の結果、主にBj110とBj123クラスターの感染の程度が *Rj* 遺伝子型と栽培温度によって異なることから、これらのクラスターの感染が群集構造に影響を及ぼしていることが示唆された。以上の結果から、宿主ダイズの *Rj* 遺伝子型および栽培温度が、宿主ダイズに感染する土着ダイズ根粒菌の群集構造に影響を及ぼすことを示唆した。

次に、日本と同緯度地域で、世界最大のダイズ生産国であるアメリカの土着ダイズ根粒菌の遺伝子多様性と地理的分布について、16S-23S rRNA gene ITS領域のPCR-RFLP解析による土着ダイズ根粒菌のクラスター解析を行い、この結果をもとに、数理生態学的手法を用いた群集構造解析を適応するにより、土着ダイズ根粒菌群集と緯度との関係について評価した。その結果、アメリカの土着ダイズ根粒菌群集は、日本と同様に緯度と強い相関 ($r^2 = 0.815$) を

示し、地理的に変遷することを明らかにした。この結果を踏まえ、日本とアメリカの同緯度地域における土着ダイズ根粒菌の生態的特徴の違いを特定するために、日本とアメリカ間の緯度による土着ダイズ根粒菌の群集構造の地理的分布について、既に報告されている既存のデータを用いて、数理生態学的手法を用いた比較解析を行った。その結果、日本およびアメリカにおける土着ダイズ根粒菌群集は北から南へと徐々に変遷しており、それぞれの供試土壌において特徴的な群集構造が検出され、この原因の一つとして、日本に生息していないその地域の気候に順化したダイズ以外の宿主となるマメ科植物の植生などが関係していると考えられた。

さらに、温度による群集構造の変化をダイズ根粒菌の生理的応答の観点から解明するために、ダイズ根粒菌の根粒形成遺伝子の一つである *nodC* 遺伝子の発現応答についてリアルタイム PCR を用いて解析した。供試した *B. japonicum* USDA 110, 122, 123, そして, *B. elkanii* USDA 31, 76^T の 5 菌株の *nodC* 遺伝子の発現は、USDA 110, USDA 31, USDA 76^T の 3 菌株の *nodC* 遺伝子の発現量は、温度の上昇に伴って上昇する傾向にあった。一方、USDA 123 の *nodC* 遺伝子の発現量は、温度の上昇に伴って減少する傾向にあった。また、USDA 122 の *nodC* 遺伝子の発現量は、低温および高温で中温より低くなる傾向にあったが、低温と高温を比較するとわずかに高温で発現が増加した。以上の結果から、ダイズ根粒菌の *nodC* 遺伝子の発現は温度依存的であり、菌株特異的な増減を示すことが示唆された。次に、この *nodC* 遺伝子の発現レベルの変化が、ダイズへの根粒着生に影響を及ぼす一因子であるか特定するために、マイクロゾムを用いて根粒着生能の評価を行った。その結果、USDA 31, 110, 122 は栽培温度の上昇に伴った根粒占有率の増加を示し、一方、USDA 123 の根粒占有率は栽培温度の上昇に伴った減少を示した。しかしながら、USDA 76^T については、全ての温度環境下においてダイズへの根粒着生が認められず、さらに、単独接種時の根粒着生数が他の菌株より少なかったことから、感染能の低さが認められた。

以上の研究結果から、*Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌は、根粒形成遺伝子の温度依存的な発現を示し、これがダイズ根粒菌の地理的分布や感染ダイズ根粒菌の群集構造の形成に影響を及ぼす一因子であることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、今後の根粒菌生態の解明に大きく寄与するものと期待される。

参考文献

1. Adhikari D, Kaneto M, Itoh K, Suyama K, Pokharel BB, Gaihre YK. 2012. Genetic diversity of soybean-nodulating rhizobia in Nepal in relation to climate and soil properties. *Plant Soil*. 357:131–145
2. Albrecht SL, Maier RJ, Hanus FJ, Russell SA, Emerich DW, Evans HJ. 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. *Science*. 203:1255–1257
3. 有馬泰紘. 1999. マメ科作物根粒室素固定の農業利用に関する基礎研究. 日本土壤肥料科学雑誌, 70:247–250
4. 浅沼修一. 2004. 第15章 室素固定活性の測定と室素固定菌の計数, 分離 15. 5. 5 根粒菌の接種 (1) 有用根粒菌の条件. 土壤微生物研究会編. 新編 土壤微生物実験法. 養賢堂, 276–278
5. Banfalvi Z, Nieuwkoop A, Schell M, Besl L, Stacey G. 1988. Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* 214:420–424
6. Barcellos FG, Menna P, da Silva Batista JS, Humgria M. 2007. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in Brazilian savannah soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2635–2643
7. Begum AA, Leibovitch S, Migner P, Zhang F. 2001. Specific flavonoids induced *nod* gene expression and pre-activated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J. Exp. Bot.* 52:1537–1543
8. van Berkum P, Fuhrmann JJ. 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:2165–2172
9. Bontemps C, Elliott GN, Simon MF, Dos Reis Júnior FB, Gross E, Lawton RC, Neto NE, de Fátima Loureiro M, de Faria SM, Sprent JI, James EK, Young JP. 2010. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Mol. Ecol.* 19:44–55

10. Bray JR, Curtis TJ. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27:325–349.
11. Caldwell BE. 1966. Inheritance of a strain-specific ineffective nodulation in soybean. *Crop. Sci.* 6:427–428
12. Sánchez-Cañizares C, Rey L, Durá D, Temprano F, Sánchez-Jiménez P, Navarro A, Polajnar M, Imperial J, Ruiz-Argüeso T. 2011. Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst. Appl. Microbiol.* 34:207–215
13. Chen WX, Yan GH, Li JL. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:392–397
14. Cole MA, Elkan GH. 1973. Transmissible resistance to penicillin G, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4:248–253
15. Devine TE, Kuykendall LD. 1996. Host genetic control of symbiosis in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Soil.* 186:173–187
16. Duzan HM, Zhou X, Souleimanov A, Smith DL. 2004. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* 55:2641–2646.
17. Faith DP, Minchin PR, Belbin L. 1987. Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance. *Vegetatio* 69:57–68
18. Fuhrmann J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:224–229.
19. Fuhrmann J, Wollum II AG. 1989. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. *Biol. Fertil. Soils.* 7:108–112
20. Geremia RA, Mergaert P, Geelen D, van Montagu M, Holsters M. 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:2669–2673

21. Hiraishi A, Kamagata Y, Nakamura K. 1995. Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *J. Ferment. Bioeng.* 79:523–529
22. Jordan DC. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Internat. J. Syst. Bacteriol.* 32:136–139
23. Kamst E, Pilling J, Raamsdonk LM, Lugtenberg BJ, Spaink HP. 1997. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179:2103–2108
24. Keyser HH, Bohlool BB, Hu TS, Weber DF. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science.* 215:1631–1632
25. Keyser HH, Weber DF, Uratsu SL. 1984. *Rhizobium japonicum* serogroup and hydrogenase phenotype distribution in 12 States. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:613–615
26. 小林四郎. 1995. 生物群集の多変量解析. 蒼樹書房.
27. Kosslak RM, Bookland R, Barkei J, Paaren HE, Appelbaum ER. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7428–7432
28. Kuykendall LD, Saxena B, Cevine TE, Udell SE. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38:501–505
29. Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147:981–993
30. Li J, Xiao W, Ma M, Guan D, Jiang X, Cao F, Shen D, Chen H, Li L. 2011. Proteomic study on two *Bradyrhizobium japonicum* strain with different competitiveness for nodulation. *Arg. Sci. China.* 10:1072–1079
31. Li QQ, Wang ET, Zhang YZ, Zhang YM, Tian CF, Sui XH, Chen WF, Chen WX. 2011. Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei Province, China. *Microb. Ecol.* 61:917–931

32. Mabood F, Souleimanov A, Khan W, Smith DL. 2006. Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant. Physiol. Biochem.* 44:759–765
33. MacArthur RH. 1965. Patterns of species diversity. *Biol. Rev.* 40:510–533
34. Marr DL, Devine TE, Parker MA. 1997. Nodulation restrictive genotypes of *Glycine* and *Amphicarpaea*: a comparative analysis. *Plant. Soil.* 189:181–188
35. Mergaert P, van Montagu M, Holster M. 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* 25:811–817
36. de Meyer SE, van Hoorde K, Vekeman B, Braeckman T, Willems A. 2011. Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil. Biol. Biochem.* 43:2384–2396
37. Michie GM. 1982. Use of the Bray-Curtis similarity measure in cluster analysis of foraminiferal data. *Math. Geol.* 14:661–667
38. Minami M, Yamakawa T, Yamamoto A, Akao S, Saeki Y. 2009. Estimation of nodulation tendency among *Rj*-genotype soybeans using the bradyrhizobial community isolated from an Andosol. *Soil Sci. Plant Nutr.* 55:65–72
39. Minamisawa K, Onodera S, Tanimura Y, Kobayashi N, Yuhashi K, Kubota M. 1997. Preferential nodulation of *Glycine max*, *Glycine soja* and *Macroptilium atropurpureum* by two *Bradyrhizobium* species *japonicum* and *elkanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24:49–56
40. Miransari M, Smith DL. 2009. Alleviating salt stress on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) – *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis, using signal molecule genistein. *Eur. J. Soil. Biol.* 45:146–152
41. Nei M, Li HW. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:5269–5273
42. Noisangiam R, Teamtisong K, Tittabutr P, Boonkerd N, Uchiumi T, Minamisawa K, Teaumroong N. 2012. Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene Americana* L. in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:6236–6250

43. 大山卓爾. 2001. 3 共生的窒素固定 (1) 窒素固定の役割と共生的窒素固定. 植物栄養学. 森 敏, 前 忠彦, 米山忠克編. 文永堂, 103-110
44. 小黒紘子. 2009. ダイズ根粒菌のアルカリ耐性機構に関する研究. 宮崎大学大学院農学研究科 平成 20 年度修士論文.
45. Pan B, Smith DL. 1998. Genistein and daidzein concentrations and contents in seedling roots of three soybean cultivars grown under three root zone temperatures. *J. Agronomy. Crop Science.* 180:77-82
46. Parker MA. 1991. Local genetic differentiation for disease resistance in a selfing annual. *Biol. J. Linn. Soci.* 42:337-349
47. Parker MA. 2012 Legumes select symbiosis island sequence variants in *Bradyrhizobium*. *Mol. Ecol.* 21:1769-1778
48. Pessi G, Ahrens CH, Rehrauer H, Lindemann A, Hauser F, Fisher HM, Hennecke H. 2007. Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. *Mol. Plant Microbe interact.* 20:1353-1363
49. Pielou EC. 1969. Ecological diversity and its measurement. An introduction to mathematical ecology, p. 221-235. Wiley Interscience, New York.
50. Prithiviraj B, Souleimanov A, Zhou X, Smith DL. 2000. Differential response of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotype to lipo-chito-oligosaccharide Nod Bj V (C18:1 MeFuc). *J. Exp. Bot.* 51: 2045-2051
51. Rao JR, Cooper JE. 1995. Soybean nodulating rhizobia modify *nod* gene inducers daizein and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity. *Mol. Plant Microbe interact.* 8:855-862
52. Roche P, Maillet F, Plazanet C, Debellé F, Ferro M, Truchet G, Promé JC, Dénarié J. 1996. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:15305-15310
53. Saeki Y. 2011. Characterization of soybean-nodulating rhizobial communities and diversity, p. 163-184. In S. Aleksandra (ed.), Soybean—Molecular Aspects of Breeding. Intech, Rijeka, Croatia.

54. Saeki Y, Aimi N, Hashimoto M, Tsukamoto S, Kaneko A, Yoshida N, Nagatomo N, Akao S. 2004. Grouping of *Bradyrhizobium* USDA strains by sequence analysis of 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50:517–525
55. Saeki Y, Aimi N, Tsukamoto S, Yamakawa T, Nagatomo Y, Akao S. 2006. Diversity and geographical distribution of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 52:418–426
56. Saeki Y, Akagi I, Takaki H, Nagatomo Y. 2000. Diversity of indigenous *Bradyrhizobium* strains isolated from three different *Rj*-soybean cultivars in terms of randomly amplified polymorphic DNA and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46:917–926
57. Saeki Y, Kaneko A, Hara T, Suzuki K, Yamakawa T, Nguyen MT, Nagatomo Y, Akao S. 2005. Phylogenetic analysis of soybean-nodulating rhizobia isolated from alkaline soils in Vietnam. *Soil Sci. Plant Nutr.* 51:1043–1052
58. Saeki Y, Minami M, Yamamoto A, Akao S. 2008. Estimation of the bacterial community diversity of soybean-nodulating rhizobia isolated from *Rj*-genotype soybean. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54:718–724
59. Saeki Y, Ozumi S, Yamamoto A, Umehara Y, Hayashi M, Sigua GC. 2010. Change in population occupancy of bradyrhizobia under different temperature regimes. *Microbes. Environ.* 25:309–312
60. Saeki Y, Shiro S, Tajima T, Yamamoto A, Sameshima-Saito R, Sato T, Yamakawa T. 2013. Mathematical ecology analysis of geographical distribution of soybean-nodulating bradyrhizobia in Japan. *Microbes. Environ.* 28:470–478
61. Sakai M, Futamata H, Kim SJ, Matuguchi T. 1998. Effect of soil salinity on population structure of fluorescent pseudomonads in spinach rhizosphere. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44:701–705
62. Sameshima R, Isawa T, Sadowsky MJ, Hamada T, Kasai H, Shutsrirung A, Mitsui H, Minamisawa K. 2003. Phylogeny and distribution of extra-slow-growing *Bradyrhizobium japonicum* harboring high copy numbers of *RS α* , *RS β* and *IS1631*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44:191–202
63. Sarita S, Sharma PK, Priefer UB, Prell J. 2005. Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiol.*

Ecol. 54:1–11

64. Scholla MH, Elkan GH. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:484–486
65. Schultze M, Kondorosi A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32:33–57
66. Shaw HN, Whiteman PC. 1977. Siratro—a success story in breeding a tropical pasture legume. *Trop. Grassl.* 11:7–14
67. Shiro S, Matsuura S, Saiki R, Sigua GC, Yamamoto A, Umehara Y, Hayashi M, Saeki Y. 2013. Genetic diversity and geographical distribution of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3610–3618
68. Shiro S, Yamamoto A, Umehara Y, Hayashi M, Yoshida N, Nishiwaki A, Yamakawa T, Saeki Y. 2012. Effect of *Rj* genotype and cultivation temperature on the community structure of soybean-nodulating bradyrhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1243–1250
69. Spaink HP, Sheeley DM, van Brussel AAN, Glushka J, York WS, Tak T, Geiger O, Kennedy EP, Reinhold VN, Lugtenberg BJJ. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature.* 354:125–130
70. Suzuki K, Oguro H, Yamakawa T, Yamamoto A, Akao S, Saeki Y. 2008. Diversity and distribution of indigenous soybean-nodulating rhizobia in the Okinawa islands, Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54:237–246
71. Suzuki Y, Adhikari D, Itoh K, Suyama K. 2014. Effect of temperature on competition and relative dominance of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* in the process of soybean nodulation. *Plant Soil.* 374:915–924
72. Tang J, Bromfield ESP, Rodrigue N, Cloutier S, Tambong JT. 2012. Microevolution of symbiotic *Bradyrhizobium* populations associated with soybeans in east North America. *Ecol. Evol.* 2:2943–2961
73. Turner B, Fearing OS. 1964. A taxonomic study of the genus *Amphicarpaea* (Leguminosae). *Southwest. Nat.* 9:207–218

74. Uchiumi T, Ohwada T, Itakura M, Mitsui H, Nukui N, Dawadi P, Kaneko T, Tabata S, Yokoyama T, Tejima K, Saeki K, Maesawa T, Sriprang R, Murooka Y, Tajima S, Simomura K, Nomura M, Suzuki A, Shimoda Y, Sioya K, Abe M, Minamisawa K. 2004. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J. Bacteriol.* 186:2439–2448
75. Ueda T, Suga Y, Matsuguchi T. 1995. Phylogeny of sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment. *J. Bacteriol.* 177:468–472
76. Vest G. 1970. *Rj₃*—A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.* 10:34–35
77. Vest G, Caldwell EB. 1972. *Rj₄*—A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.* 12:692–693
78. Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Program. Blackwell Scientific, Oxford.
79. Wang H, Man CX, Wang ET, Chen WX. 2009. Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem. *Plant Soil.* 314:169–182
80. Wei M, Yokoyama T, Minamisawa K, Mitsui H, Itakura M, Kaneko T, Tabata S, Saeki K, Omori H, Tajima S, Uchiumi T, Abe M, Ohwada T. 2008. Soybean seed extracts preferentially express genomic loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *DNA Res.* 15:201–214
81. Wei M, Takeshima K, Yokoyama T, Minamisawa K, Mitsui H, Itakura M, Kaneko T, Tabata S, Saeki K, Omori H, Tajima S, Uchiumi T, Abe M, Ishii S, Ohwada T. 2010. Temperature-dependent expression of type III secretion system genes and its regulation in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23:628–637
82. Whittaker RH. 1967. Gradient analysis of vegetation. *Biol. Rev.* 49:207–264
83. Whittaker RH. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21:213–251
84. Williams LF, Lynch LD. 1954. Inheritance of a non-nodulating character in the soybean. *Agron. J.* 46:28–29
85. Yamakawa T, Eriguchi M, Hussain AKMA, Ishizuka J. 1999. Soybean preference for *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation – Nodulation by *Rj₂Rj₃Rj₄*-genotypes isolated from the

- progenies of a cross between soybean cvs. IAC-2 (*Rj₂Rj₃*) and Hill (*Rj₄*). *Soil Sci. Plant Nutr.* 45:461–469
86. Yamakawa T, Hussain AKMA, Ishizuka J. 2003. Soybean preference for *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation. Occupation of serogroup USDA 110 in nodules of soybean plants harboring various *Rj*-genes grown in a field. *Soil Sci. Plant Nutr.* 49:835–841
87. 横山 正. 2005. *Bradyrhizobium* 属根粒菌のサイズへの根粒形成における温度の影響. 日本土壤肥料学雑誌. 76:599–607
88. Yokoyama T, Ando S, Murakami T, Imai H. 1996. Genetic variability of the common *nod* gene in soybean bradyrhizobia isolated in Thailand and Japan. *Can. J. Microbiol.* 42:1209–1218
89. Young JM. 2003. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang *et al.* 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination ‘*Sinorhizobium adhaerens*’ (Casida 1982) Willems *et al.* 2003 legitimate? Request for an opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:2107–2110
90. Zhang F, Smith DL. 1994. Effect of low root temperature on the early stages of symbiosis establishment between soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) and *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Exp. Bot.* 45:1467–1473
91. Zhang F, Smith DL. 1996. Genistein accumulation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root systems under suboptimal root zone temperatures. *J. Exp. Bot.* 47:785–792
92. Zhang F, Charles CT, Pan B, Smith DL. 1996. Inhibition of the expression of *B. japonicum nod* genes at low temperatures. *Soil Biol. Biochem.* 28:1579–1583
93. Zhang H, Prithiviraj B, Souleimanov A, D'Aoust F, Charles TC, Driscoll BT, Smith DL. 2002. The effect of temperature and genistein concentration on lipo-chitooligosaccharide (LCO) production by wild-type and mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.* 34:1175–1180

Appendix

異なる栽培温度環境下における 2 菌株共接種試験

材料および方法

供試菌株，供試菌株の培養および混合菌液の調製

供試菌株および供試菌株の培養は，6-2-1 と同様に行った．培養後，菌数を測定し，USDA 110-31, 76^T, 122, 123, USDA 122-31, 76^T, 123 の計 7 パターンの組み合わせで各菌株 10⁵ cells mL⁻¹ となるよう滅菌蒸留水で希釈し，混合菌液とした．

ダイズ栽培および着生根粒の分離

ダイズ品種，栽培用ポットの調製，種子の表皮殺菌は，2-2-2 と同様に行った．表皮殺菌した種子は，ピンセットでポットのバーミキュライト表面から約 3 cm の深さに播種し，その上に調製した混合菌液を 1 mL 接種した後に，ポットの重量を測定した．ダイズの栽培はグロースチャンバー (MLR-351, SANYO) で 4 週間行った．グロースチャンバー内における栽培環境は，2-2-2 と同様に 3 パターン設定した．4 週間の栽培後，2-2-2 と同様に根粒を表面殺菌・洗浄した．洗浄後の根粒は，-80°C で保存した．

根粒からのゲノム DNA 抽出

分離した根粒から 2-2-3 と同様の手法でダイズ根粒菌のゲノム DNA を抽出した．

SNP プライマーを用いたダイズ根粒菌の同定

第 3 章において，16S-23S rRNA gene ITS 領域の PCR-RFLP を用いた土着ダイズ根粒菌分離株のクラスター解析では，*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 と USDA 122 の判別が困難とされているため，ITS 領域内の single nucleotide polymorphisms (SNP) をターゲットとして作製されたプライマーを利用して，これら 2 菌株の判別を行った．根粒から抽出したゲノム DNA 抽出液をテンプレートとして，ITS 領域内の SNP をターゲットとした Primer set もしくは ITS 領域内の菌株特異的な塩基配列をターゲットとした Primer set を用いて PCR 増幅を行った．氷上で，1 サンプル当たり滅菌 milliQ 水 17.875 μ L，10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ L，2.5 mM dNTP Mixture (2.5 mM each) 2 μ L，10 μ M Forward primer-1 0.5 μ L，10 μ M Forward primer-2 0.5 μ L，10

μM Reverse primer 0.5 μL , 5 U μL^{-1} *TaKaRa Ex Taq* DNA polymerase 0.125 μL (TaKaRa Bio), テンプレート 1 μL を混合して, 反応液とした. PCR に用いたプライマーの情報は Table S1 に示した. PCR 反応には PCR Thermal cycler を使用し, 反応は 94°C 5 分, 94°C 30 秒, X°C (Table S1 参照) 1 分, 72°C 30 秒を 30 サイクル, 72°C 10 分, 4°C 保存という条件で行った. PCR 終了後, PCR 産物の増幅を確認は 2-2-4 と同様に行った.

Table S1 Information of the primer set using PCR amplification

Combination of test strains	primer sets	primer sequence (5' → 3')	Annealing temperature (°C)
USDA 110 or 122 vs. 31 or 76	110-ITS-F	CATTTGGCGCTAGTCG	58
	76-ITS-II-F	GCAATTCGTCTGAACCA	
	ITS-Bra-R	GCTCTCATTATCAATGTCCAC	
USDA 110 or 122 vs. 123	110-ITS-F	CATTTGGCGCTAGTCG	58
	123-ITS-F	GTGCGCCTTTCAATGTA	
	ITS-Bra-R	GCTCTCATTATCAATGTCCAC	
USDA110 vs. 122	110-ITS spe-F	CAAATGCAATCGCACAA	55
	122-ITS spe-F	AGTATCGCGCAGAAATCC	
	Bra-ITS R	GACTGGGGTGAAGTCGTAAC	

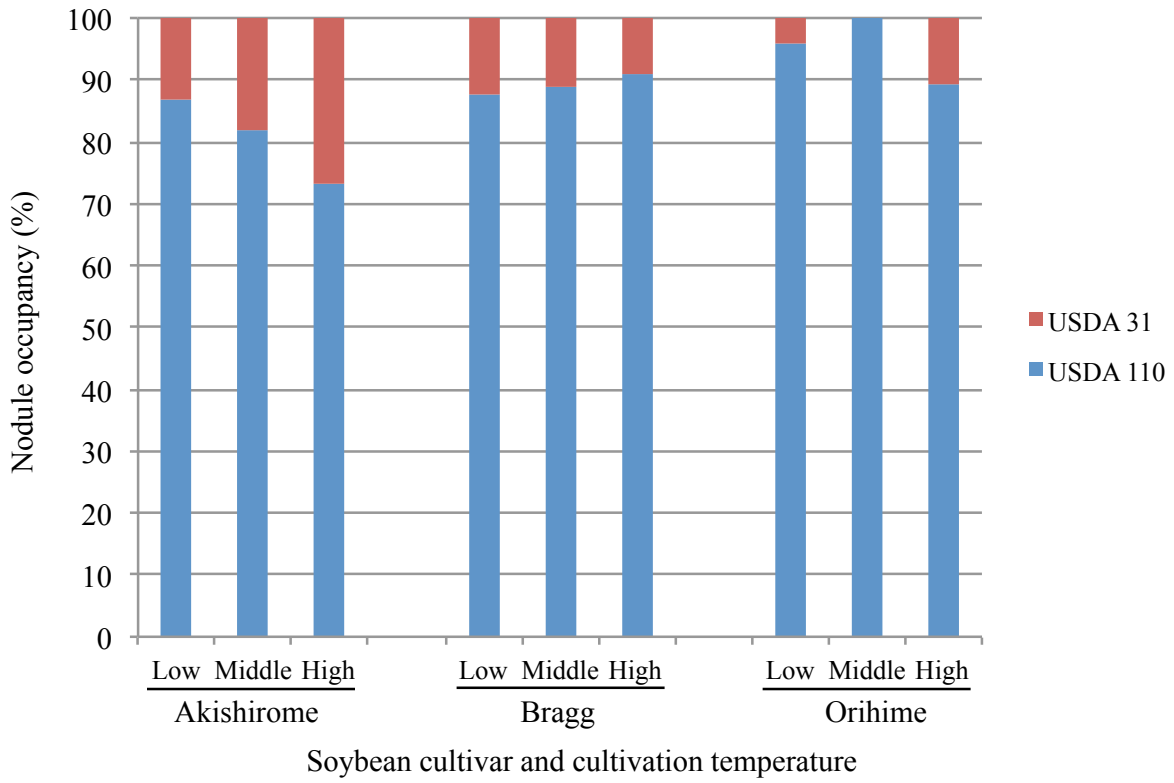


Fig. S1 Nodule occupancy between two bradyrhizobial strains isolated from each soybean cultivar.

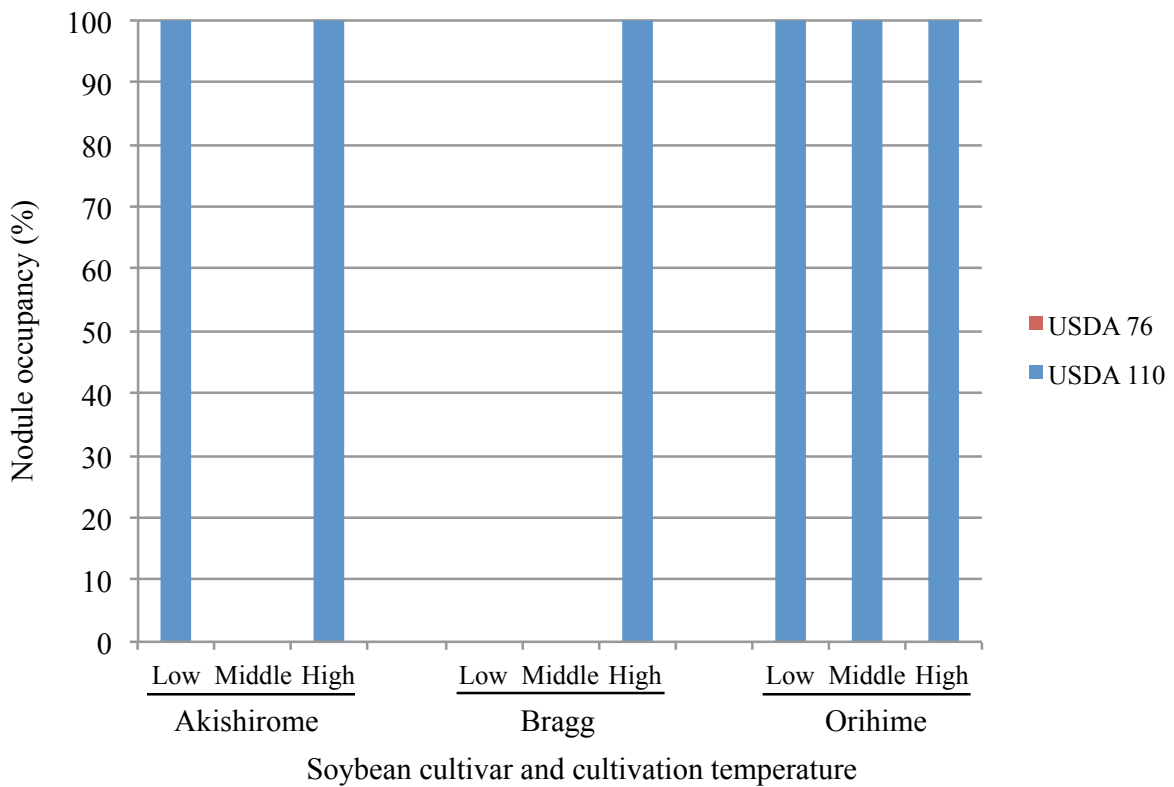


Fig. S2 Nodule occupancy between two bradyrhizobial strains isolated from each soybean cultivar.

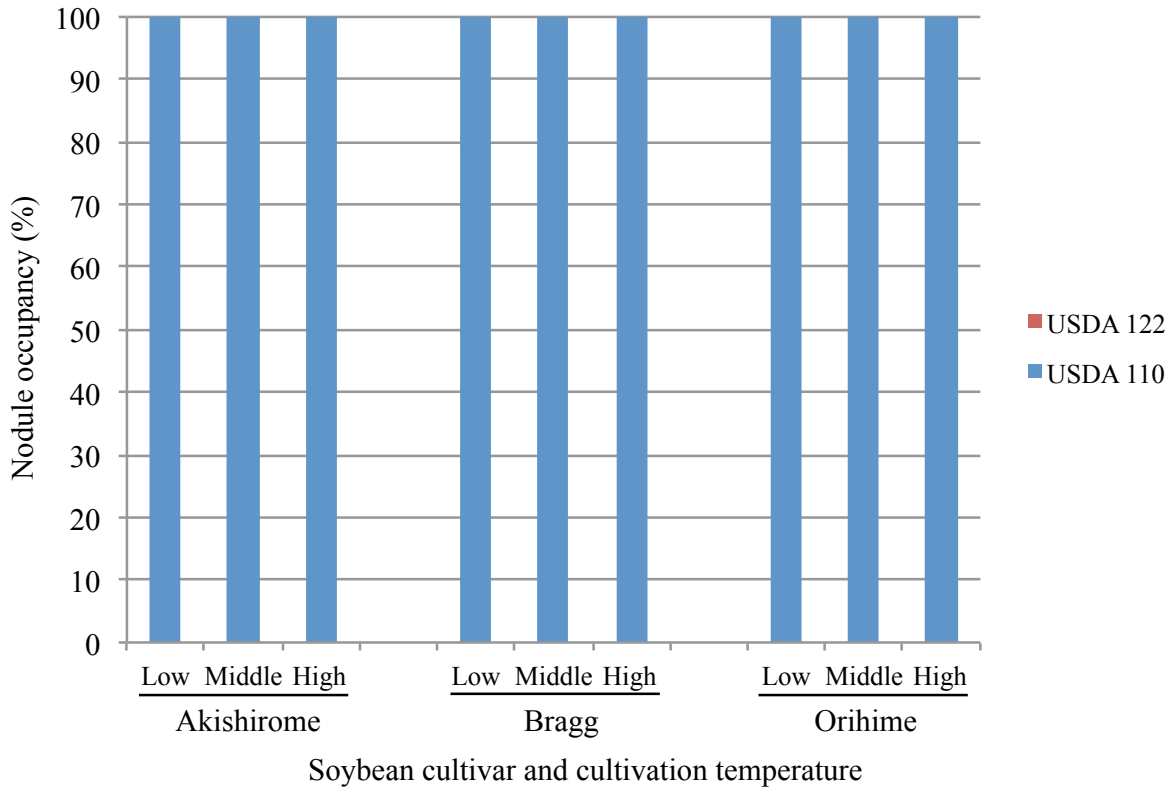


Fig. S3 Nodule occupancy between two bradyrhizobial strains isolated from each soybean cultivar.

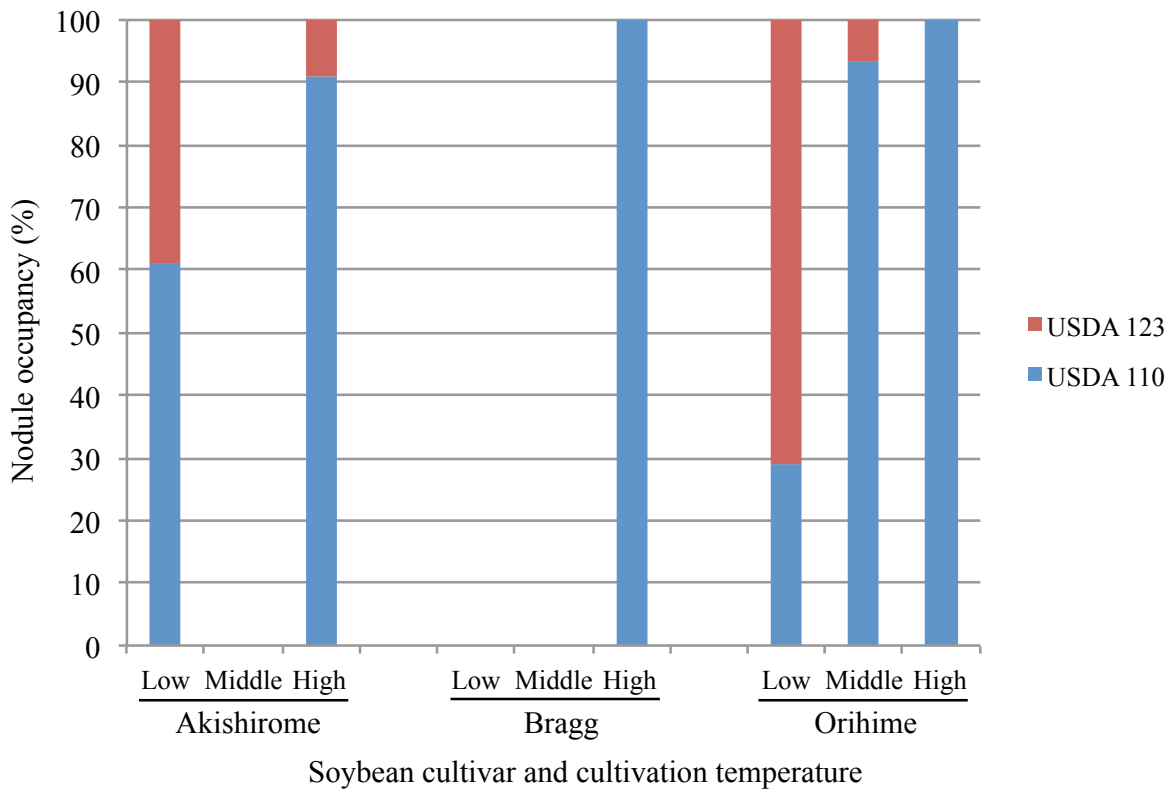


Fig. S4 Nodule occupancy between two bradyrhizobial strains isolated from each soybean cultivar.

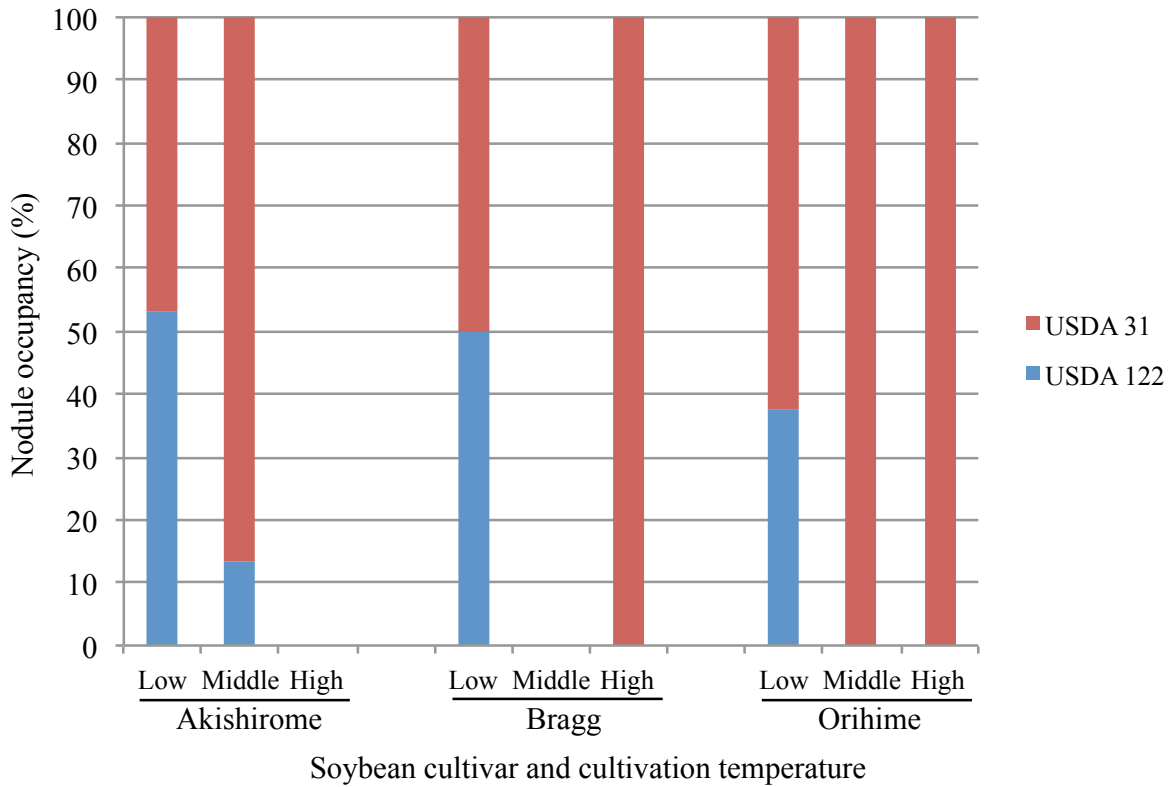


Fig. S5 Nodule occupancy between two bradyrhizobial strains isolated from each soybean cultivar.

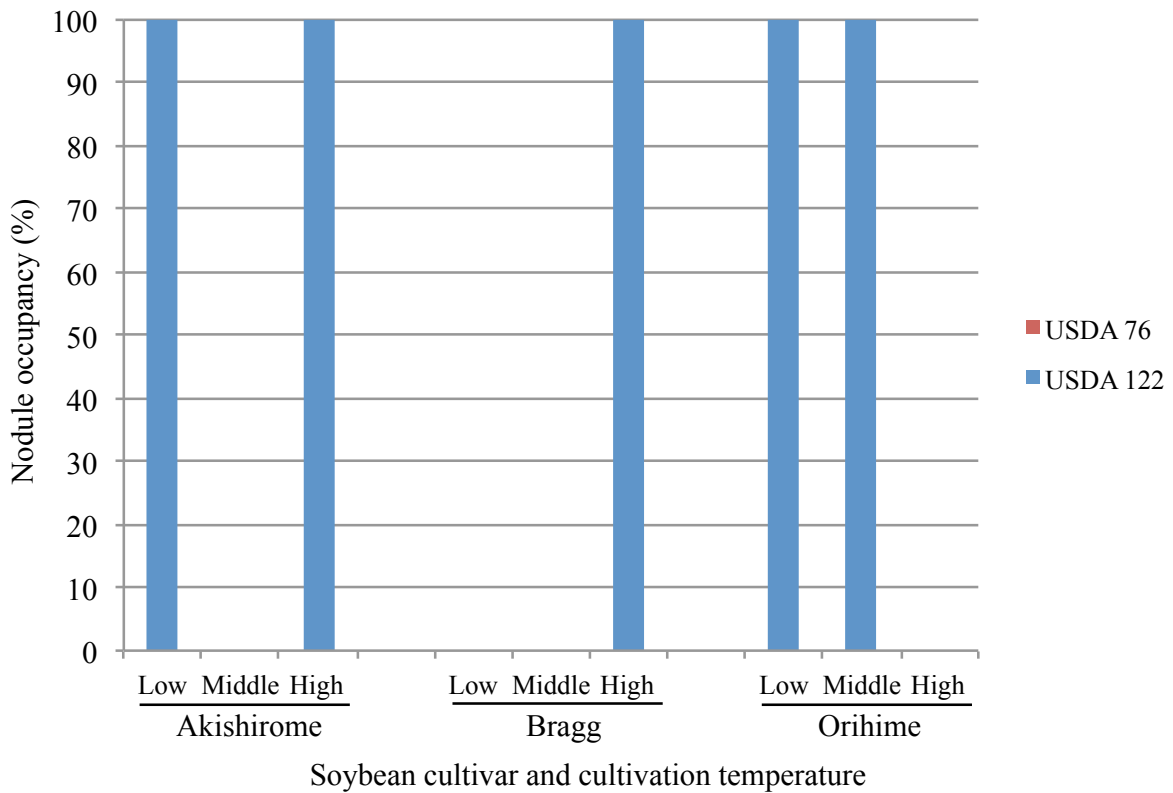


Fig. S6 Nodule occupancy between two bradyrhizobial strains isolated from each soybean cultivar.

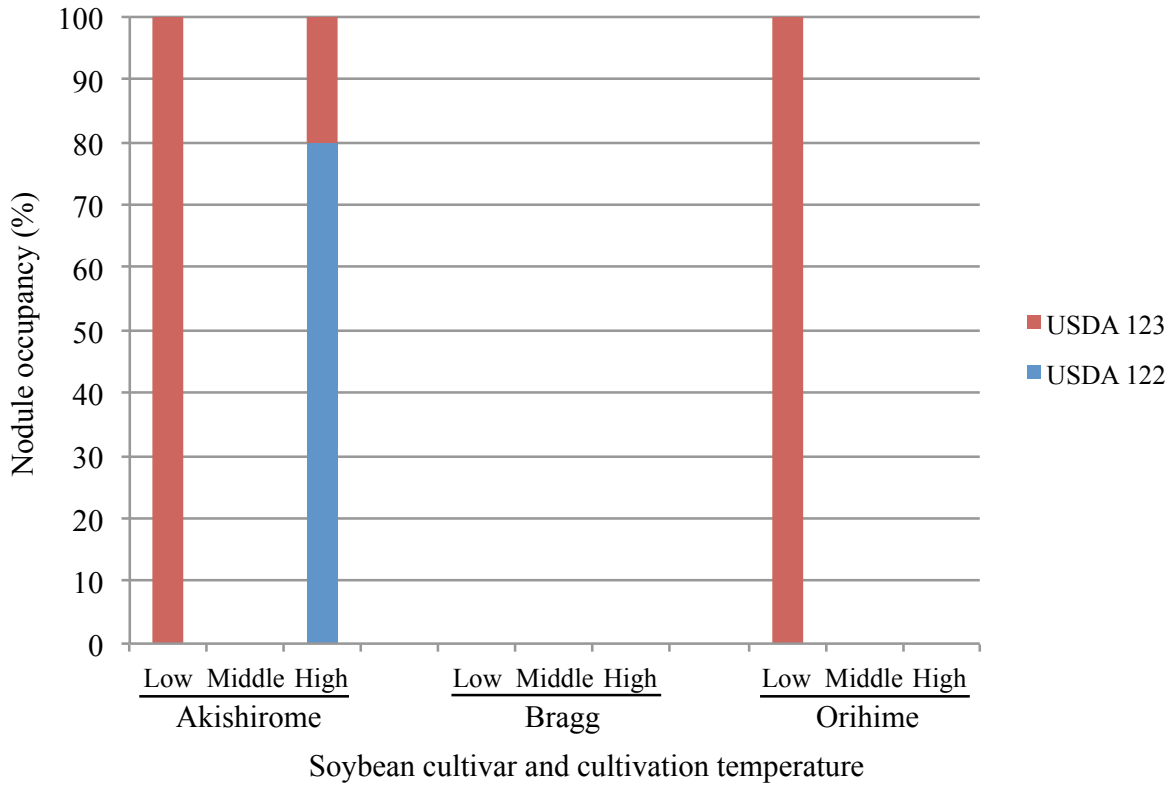


Fig. S7 Nodule occupancy between two bradyrhizobial strains isolated from each soybean cultivar.