

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05376

研究課題名(和文) フィリピンの上着ダイズ根粒菌のゲノム多様性と群集構造解析

研究課題名(英文) Genomic diversity and community structure of soybean bradyrhizobia in Philippines

研究代表者

佐伯 雄一 (Saeki, Yuichi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50295200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯のダイズ根粒菌の多様性を評価する目的で、フィリピン11地点の土壌から根粒菌を分離し、解析を行った。全分離株はBradyrhizobium属根粒菌に分類された。その分布と群集構造に影響する環境因子は湛水であり、土壌理化学性が続いた。結果、非湛水土壌には*B. elkanii* が、湛水土壌には*B. diazoefficiens*, *B. japonicum* が優占した。分離株の窒素固定活性を測定した結果、フィリピンの栽培環境で有用根粒菌として期待される根粒菌を見出した。また、塩ストレス下における根粒菌の共生能を検証した結果、*Sinorhizobium*属根粒菌の塩ストレス下における優占化を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、地球温暖化が進む中、熱帯に土着化している土壌微生物を解析することは将来の日本の農業にとっても重要な知見になる。本研究においては、ダイズと共生窒素固定を行う根粒菌について、多様性と群集構造に関して研究を行った。特にフィリピンは日本と同じ島嶼国であり、高度により温帯から熱帯気候が分布しており、温暖化の進行に伴う土壌環境を解析する研究フィールドとして適していると考えられる。本研究結果は、日本本土から南西諸島、フィリピンと根粒菌の多様性を検出し、その群集構造は緯度による差と土壌の利用形態によって遷移することを示した。温帯から熱帯地域における共生窒素固定利用について基盤となる成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, the diversity of indigenous bradyrhizobia collected from the soils at 11 locations in the Philippines was investigated using a local soybean cultivar. All the isolates were classified under the Bradyrhizobium species. The major influence on the distribution and diversity of soybean bradyrhizobia is attributed to the difference in the flooding period, followed by soil properties. As determined, it is proposed that the major micro-symbiont of soybean in the Philippines are *B. elkanii* for non-flooded soils, then *B. diazoefficiens* and *B. japonicum* for flooded soils. The most efficient and effective strain that can be used as an inoculant under the Philippines' local condition was *B. elkanii* isolate in terms of symbiotic N-fixation and nodulation. In terms of their symbiotic N-fixation and nodulation under salt stress conditions, the results obtained from the mix inoculation test indicated the dominance of *sinorhizobia* under saline conditions.

研究分野：土壌肥料学

キーワード：ダイズ 根粒菌 Bradyrhizobium Sinorhizobium 群集構造 共生窒素固定 環境傾度 熱帯

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ダイズは、根粒菌との共生窒素固定の寄与により化学窒素肥料を多く必要とせず、窒素の環境負荷が小さい作物である。また、窒素固定能の高い菌株による根粒占有率を高めた研究では 10～20%の収量増が示されている。地球温暖化が進む中、マメ科植物と根粒菌の共生における活性や土壌中の群集構造にも影響が及ぶことが予測され、熱帯に土着化している根粒菌を解析することは将来の日本の農業にとっても重要な知見になる。特にフィリピンは日本と同じ島嶼国であるため研究フィールドとして適していると考えられる。フィリピンは熱帯に分布するが高度により温帯から熱帯気候が分布しており、多地点土壌の根粒菌を解析することは、ダイズ根粒菌の分布と多様性に関してグローバルな生態解明を進展させるに極めて有用である。熱帯湿潤地域でのダイズ根粒菌群集構造に関する報告は極めて少なく、特にフィリピンからの報告は未だ為されていない。

## 2. 研究の目的

本研究ではアジアモンスーン地帯の東南アジア、特に日本と同じ島嶼国であるフィリピン（マニラの平均気温 26-27℃）のダイズ栽培土壌の土着化ダイズ根粒菌のゲノム多様性と群集構造を解析し、温帯—熱帯湿潤地帯におけるダイズ根粒菌群集構造の比較解析によって、ダイズ根粒菌の生態研究を行い、温暖化などの気候変動と根粒菌群集構造の変遷を解析する。本研究の大きな目的は、世界的なダイズ根粒菌の分布と多様性に関して地球規模での生態解明を進展させ、気候変動に対応した根粒菌の農業利用のための基礎知見を得ることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 土壌輸入、ダイズ栽培、根粒菌カルチャーコレクション収集

土壌および栽培ダイズの採取に関しては、フィリピン Central Luzon State Univ. の研究者の協力の元、輸入許可を得た上で、ダイズ圃場の土壌 11 点を採取輸入した。ダイズ根粒菌を分離するために、土壌を埋設した栽培ポットを調製し、フィリピンのダイズ品種 SY2 を表皮殺菌後、播種した。フィリピンと類似の栽培温度に設定した植物インキュベーターで栽培し着生根粒を採取した。根粒懸濁液を培地に塗布し、コロニー分離によって根粒菌を分離した。分離株は、ダイズへの接種試験によって根粒着性能を確認し、ダイズ根粒菌とした。土壌の理化学性について、pH(H<sub>2</sub>O)、EC、全 C、全 N、Bray-P、交換態 K および粘土・シルト・砂の texture を測定した。各土壌採取地の気象データは PAGASA より得た。土地利用状況は現地聞き取り調査によって行った。

### (2) 根粒菌のゲノム多型解析・群集構造解析

根粒菌カルチャーコレクションの 16S rRNA 遺伝子、16S-23S rRNA 遺伝子 Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域、ハウスキーピング遺伝子の多型解析を行い、フィリピンに分布する根粒菌のゲノム構造の多様性を元にクラスター解析や群集構造解析を行い、日本の根粒菌群集構造との比較によって環境傾度との関連性について検討した。解析対象遺伝子は ITS 領域、*rpoB* 遺伝子とした。土壌の理化学性分析によって得られたデータ、pH、EC、Total-C、Total-N、Bray-P、K、texture および、農業利用形態について得られた情報を元に、各地の根粒菌群集構造の主成分分析によって群集構造の特性を解析した。

### (3) 接種根粒菌としての有用株のスクリーニング

*Bradyrhizobium* 属分離株から代表株 12 株を選抜した。熱帯ダイズとしてフィリピンの 2 品種 (Col1, SY2)、温帯ダイズとして 3 品種 (IAC-2, Orihime, Akisengoku) について接種試験を行い、

熱帯の栽培環境下で有用な形質を示す根粒菌の選抜を試みた。熱帯の栽培温度に設定した植物インキュベーターで28日間栽培を行った。試料採取時にダイズの新鮮重・乾燥重・根粒数・根粒重・葉のSPAD値および地上部の全窒素含量を測定した。分離株の窒素固定効率を評価し、窒素固定活性の高い有用根粒菌の候補株を選抜した。

#### (4) 塩類ストレス条件下における感染ダイズ根粒菌の群集構造と窒素固定能

農地では台風等による塩水被害や干ばつによるストレスを受けることになる。そのため、塩類集積下における根粒菌の群集構造と窒素固定能およびダイズの耐塩性を評価し、感染根粒菌による耐塩性の差を評価した。本試験には、ダイズ栽培品種 CNS、根粒菌 *B. diazoefficiens* USDA110<sup>T</sup>、*B. elkanii* USDA31、*Sinorhizobium fredii* USDA191, 192, 193 を使用し、塩処理 0, 20, 50, 100mM による根粒着生数、地上部生育量および窒素含量、窒素固定効率の評価、および混合接種下における感染根粒菌群集構造に対する塩処理による影響について検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 土壌輸入、ダイズ栽培、根粒菌カルチャーコレクション収集

フィリピン CLSU の研究者の協力で、フィリピン各地 11 箇所の土壌を採取し、農林水産大臣の許可を得て輸入した。土着化しているダイズ根粒菌を宿主ダイズ SY2 栽培して着生した根粒を採取した。シングルコロニー分離によっておよそ 600 株を分離した。分離株については、ダイズ品種 SY2 への接種試験によって根粒着性能が認められた約 400 の分離株をフィリピン土壌の *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌とした。

#### (2) 根粒菌のゲノム多型解析・群集構造解析

分離した *Bradyrhizobium* 属分離株 HM 培地による培養後、遠心分離によって集菌した根粒菌から DNA を抽出し、PCR 鋳型とした。16S rRNA 遺伝子、16S-23S rRNA gene ITS 領域、および *rpoB* ハウスkeeping 遺伝子をターゲットとし、PCR 増幅を行い、遺伝子増幅が認められた 372 株のシーケンス解析を行った。その結果、フィリピンには温帯地域よりも多様なダイズ根粒菌が存在し、群集を形成していることが明らかとなった(図1)。フィリピンにおいては *B. elkanii* 根粒菌が主として存在するが、*B. diazoefficiens* や *B. japonicum* も水田利用されている土壌から分離された。その分布は、温度や pH、全C、全N、Bray-P、EC および土壌の texture や利用形態によって群集を形成する主要な根粒菌として特徴付けることが可能であった(図2)。

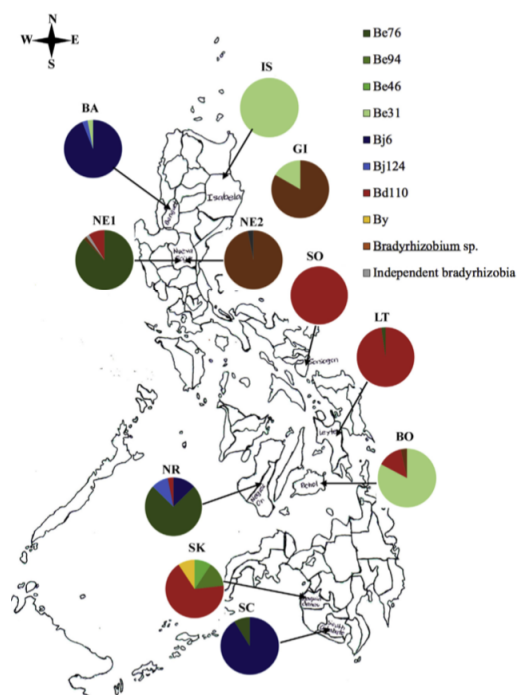


図1 フィリピンにおける *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌の分布 (Mason et al. 2018)

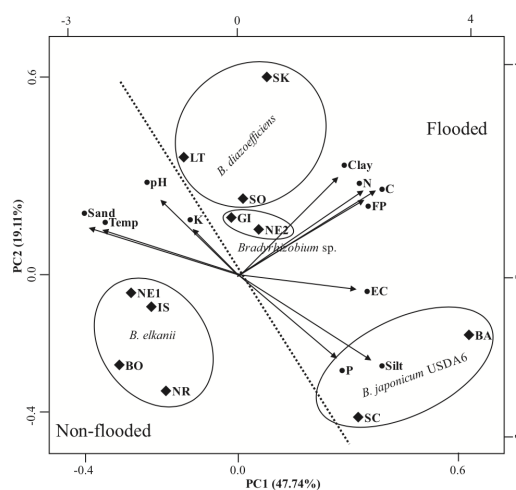


図2 根粒菌群集構造に対する環境要因の主成分分析 (Mason et al. 2018)

### (3) 接種根粒菌としての有用株のスクリーニング

フィリピンの土着ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium* 属代表株 12 株のうち、フィリピン株 IS-2 は他の分離株と比較してフィリピンダイズ品種において有意に高い窒素固定効率を示した (図3)。対象的に SK-5 は日本のダイズ品種との共生で高い窒素固定効率を示した。この結果から、フィリピンダイズと日本ダイズに適した接種菌は異なり、気候に適したダイズ品種と接種菌を使用することにより高い窒素固定効率を得られることが示唆された。さらに、根粒菌の窒素固定能を表すアセチレン還元活性と窒素固定効率 (共生効率: Symbiotic Efficiency) は高い正の相関を示し、窒素固定効率による根粒菌の窒素固定能の評価が可能であることも明らかとなった。

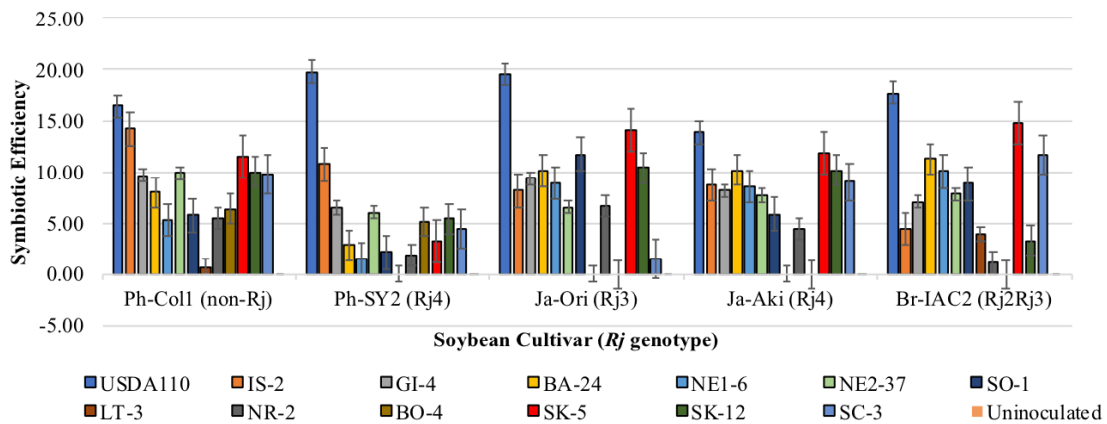


図3 フィリピンと温帯のダイズ品種によるフィリピン株の窒素固定効率 (Mason *et al.* 2021)

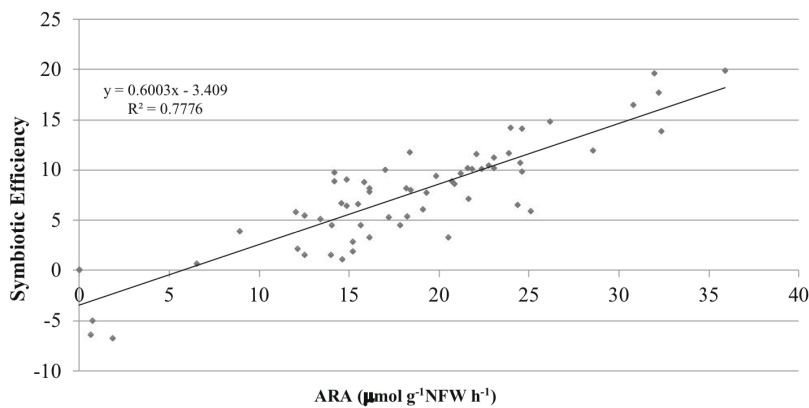


図4 アセチレン還元活性と窒素固定効率との相関関係 (Mason *et al.* 2021)

### (4) 塩類ストレス条件下における感染ダイズ根粒菌の群集構造と窒素固定能

乾燥地や海岸線の農地に起こりやすい塩類ストレスに着目して研究を行った。塩処理条件下の根粒菌単独接種試験では、*B. diazoefficiens* USDA110<sup>T</sup> の根粒形成時期が遅くなり、根粒形成位置が主根から側根へ変遷していた。

一方、*S. fredii* USDA191 の根粒形成時期が早まり、根粒形成位置が側根から主根へ変遷していた。また、*B. elkanii* USDA31 の根粒形成時期や位置への影響は確認できなかった。窒素固定効率においては何れの処理区においても *B. diazoefficiens* USDA110<sup>T</sup>、*B. elkanii* USDA31 の効率

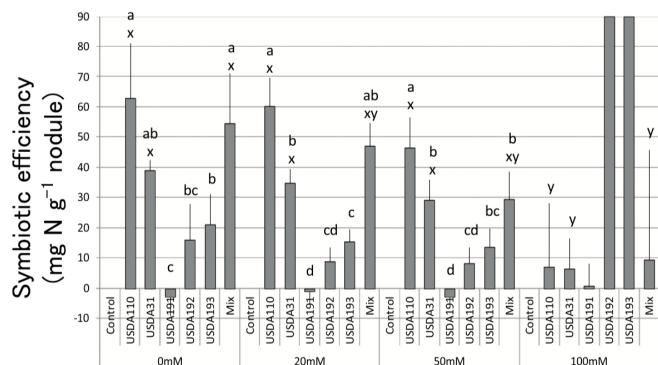


図5 塩濃度による根粒菌の窒素固定効率 (Niatawaki *et al.* 2021)

が高く、*S. fredii* は低い値となった (図5)。混合接種における根粒菌の根粒占有率は、塩濃度が高くなるにつれて、*S. fredii* の占有率が次第に高くなっていった (図6)。

以上の結果から、塩ストレス条件でも *Bradyrhizobium* 属根粒菌の窒素固定活性が高く、*Sinorhizobium* 属根粒菌の

活性は低いが、土壌の塩類集積に伴い、*Bradyrhizobium* 属根粒菌の感染が抑制され、*S. fredii* が高くなることが示唆された。この結果は、乾燥地や塩類集積土壌における *S. fredii* の根粒占有率の高さを説明する要因の一つであると考えられる。また、塩ストレス条件下で窒素固定能の高い *Bradyrhizobium* 属の根粒占有率を上げることが塩類化土壌での生産性を維持する上で重要であることが示唆された。

現在、これらの現象を解明するために、塩ストレス条件下における宿主ダイズからのイソフラボン分泌量と根粒菌の根粒形成遺伝子の発現とを詳細に解析を行っている。

#### 引用文献

1. Mason MLT, Baby TLC, Yamamoto A, Saeki Y. (2018) Influence of flooding and soil properties on the genetic diversity and distribution of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in the Philippines. *Heliyon* 4: e00921.
2. Mason MLT, De Guzman BLT, Yamamoto A, Saeki Y. (2021) Symbiotic performance of indigenous soybean bradyrhizobia from the Philippines with soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) cultivars harboring different *Rj* genotypes. *Symbiosis* 83: 55-63.
3. Nitawaki Y, Kitabayashi H, Mason MLT, Yamamoto A, Saeki Y. (2021) Effect of salt stress on soybean growth and nodulation under inoculation with soybean rhizobia. *Soil Science and Plant Nutrition* 67: 103-113.

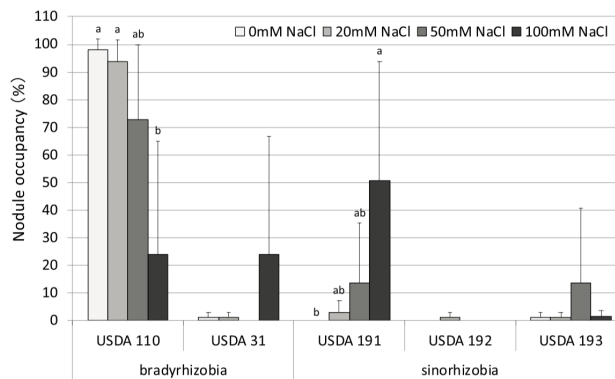


図6 BradyrhizobiaとSinorhizobiaの混合接種による根粒占有率の変化 (Nitawaki et al. 2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mason MLT, Tabing BLC, Yamamoto A, Saeki Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 Influence of flooding and soil properties on the genetic diversity and distribution of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in the Philippines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2018. e00921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mason MLT, De Guzman BLT, Yamamoto A, Saeki Y.	4. 巻 83
2. 論文標題 Symbiotic performance of indigenous soybean bradyrhizobia from the Philippines with soybean ( <i>Glycine max</i> [L.] Merrill) cultivars harboring different Rj genotypes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Symbiosis	6. 最初と最後の頁 55-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13199-020-00731-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nitawaki Y, Kitabayashi H, Mason MLT, Yamamoto A, Saeki Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Effect of salt stress on soybean growth and nodulation under inoculation with soybean rhizobia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 103-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2020.1860644	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安河内孝晃, 直野晋也, 北林颯人, 山本昭洋, 佐伯雄一
2. 発表標題 塩類集積土壌での Sinorhizobium 属根粒菌の優占化のメカニズム解明 塩類集積が根粒菌の根 粒形成遺伝子の発現に与える影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北林颯人, 安河内孝晃, 山本昭洋, 佐伯雄一
2. 発表標題 塩ストレス下におけるダイズの耐塩性と感染根粒菌の群集構造
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maria Luisa Tabing Mason, Akihiro Yamamoto, Yuichi Saeki
2. 発表標題 Genetic diversity and distribution of soybean bradyrhizobia in the Philippines
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北林颯人, 山本昭洋, 佐伯雄一
2. 発表標題 ダイズの耐塩性と感染根粒菌の群集構造構築に関する研究 根粒菌の接種がダイズの耐塩性に与える影響およびダイズの根粒着生調節遺伝子Rfg1について
3. 学会等名 日本土壌肥料学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平島紘子, 吉武欣之介, 山本昭洋, 佐伯雄一
2. 発表標題 アンブリコンシーケンス解析によるBradyrhizobium属ダイズ根粒菌群集構造解析の試み
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2020年

## 〔図書〕 計2件

1. 著者名 Maria Luisa Tabing Mason, Yuichi Saeki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Intech	5. 総ページ数 18 (執筆ページ)
3. 書名 Nitrogen Fixation (Distribution and Characterization of the Indigenous Soybean- Nodulating Bradyrhizobia in the Philippines)	

1. 著者名 Arakawa Y, Kusaba T, Kubotera H, Uezono I, Miyamaru N, Saeki Y, Niimi H, Nakano K, Koga N, Hara Y, Yamada Y, Inoue K, Ihara H, Nagatomo M, Yoshida K, Yamaguchi N, Hayashi H, Kondo T, Yamane T, Akagi I, Kinjo K, Shima T, Mitsugi K	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 372
3. 書名 The Soils of Japan	

## 〔産業財産権〕

## 〔その他〕

<p>宮崎大学農学部応用生物科学科ホームページ  <a href="http://www.miyazaki-u.ac.jp/abs/">http://www.miyazaki-u.ac.jp/abs/</a></p> <p>ISSN: 2432-5511          佐伯雄一・山本昭洋 2019 ダイズ根粒菌の生態研究を環境傾度対応型ダイズ生産技術へ. アグリバイオ. 北隆館</p>
--

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山本 昭洋  (Akihiro Yamamoto)  (30452915)	宮崎大学・農学部・准教授   (17601)	



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	マーソン マリア ルイーサ ター ピング  (Mason Maria Luisa Tabing)		Assistant Professor, College of Agriculture, Central Luzon State Univ. Philippines.

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関