

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 22 日現在

機関番号：82112
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25292209
 研究課題名(和文) Vigna属野生植物を利用した超耐塩性・超アルカリ耐性・共生利用型新作物の開発

 研究課題名(英文) Development of saline and alkaline tolerant novel crops with symbiotic N fixing ability using adaptation genes from wild Vigna genetic resources

 研究代表者
 友岡 憲彦 (Tomooka, Norihiko)

 国立研究開発法人農業生物資源研究所・多様性活用研究ユニット・ユニット長

 研究者番号：40373253
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：超耐塩性・超アルカリ耐性マメ科作物の開発に、沖縄県のサンゴ砂浜に適応したハマササゲを利用するため、ハマササゲ耐塩性、耐塩性根粒菌の塩環境下における共生N固定能力を調査し、以下のことを明らかにした。ハマササゲの耐塩性は非常に高く400mM NaCl、pH9.5に耐え、根粒菌は5%NaCl、pH11に耐える能力を有する。一方、80mM NaClで根粒着生に必要な根毛のカーリングが起こらなくなり、共生系の確立は低塩濃度で大きく阻害された。しかし、一旦根粒が着生すると根粒数やN固定能力は、ダイズが枯死した400mMでも対象区の60%-70%を維持できた。今後、根粒着生時の耐塩性改良が必要である。

研究成果の概要(英文)：To develop new crop which can tolerate high level of salt and alkaline salt stress, we investigated salt stress responses of beach cowpea (*Vigna marina*) and symbiotic bacteria (*Sinorhizobium* sp.) under salt conditions. Beach cowpea which adapted to the coral beach habitat of Yaeyama islands, Okinawa, Japan, was revealed to have ability to grow under 400mM NaCl and pH9.5 conditions. Nitrogen fixing symbiotic bacteria isolated from roots of beach cowpea could tolerate up to 5% NaCl and pH11 conditions. However, nodulation process was severely damaged probably because of inhibition of root hair curling under 80mM NaCl condition. In contrast, once nodules were successfully formed, N fixing ability of beach cowpea was maintained at 60-70% of that of control (no NaCl condition) even at 7 days after 400mM NaCl treatment. On the contrary, soybean (cv. 'Enrei') nodulated with *B. japonicum* (USDA110) died within 7 days under 400mM NaCl condition.

研究分野：植物遺伝資源学

キーワード：野生種 耐塩性 耐アルカリ性 根粒菌 共生 窒素固定

1. 研究開始当初の背景

研究代表者(植物遺伝資源学)と研究分担者(根粒菌学)とは、種々の土壌ストレス環境下での安定した食糧生産の達成には、既存の作物の改良ではなく、それらの劣悪土壌環境に適応して生育する能力を進化の過程で獲得している野生植物を新たに作物化して利用するというストラテジーのもとに共同研究を続けていた。その過程で、塩害土壌地帯での利用可能性が高い野生植物として、*Vigna marina* (マリナ)を発見していた。



図1. 熱帯の砂浜で旺盛な生育を示す *V. marina* (マリナ)の集団と根粒(石垣島)

2. 研究の目的

地球上の塩性土壌地帯は、8億 ha (日本の全耕地面積の200倍)、塩基性土壌は40億 ha (同1000倍)にも及んでおり、これらの土地で栽培可能な共生窒素固定利用型の新マメ科作物を開発することが本研究の究極的目的である。そのような新マメ科作物が開発できれば、現在作物栽培ができていない上記の塩害土壌地帯で、窒素肥料を投入することなく持続的な食糧生産が可能になり、なおかつ継続的なマメ科作物の栽培によって、その土壌肥沃度や土壌環境の改善が期待できる。

3. 研究の方法

その目的達成の可能性を有する新規遺伝資源として、熱帯の砂浜に自生して共生窒素固定を行いながら旺盛な生育を示すマリナとその根粒菌に注目した。さらに、マリナに不足している種子生産性の増大とマリナの耐塩性の遺伝解析のための素材として、マリナと交雑可能な近縁種 *Vigna luteola* (ルテオラ)を用いた。

マリナに着生して共生窒素固定を行っている根粒菌は、マリナの自生地のひとつである沖縄県西表島のものを用いた。

4. 研究成果

(マリナの耐塩性遺伝子 No.1)

ルテオラ(系統62)とマリナ(系統63)の第一雑種集団のF2世代:120個体を用いて、150個のSSRマーカーから構成される分子連鎖地図(11連鎖群、遺伝距離77.6cM)を作製した。F2:3集団を用いて、水耕栽培条件下で耐塩性(300mM NaClで30日間処理)を評価した結果、第一連鎖群の101.6cMの位置に寄与率50.

7%の耐塩性QTL1個を検出した。このことにより、マリナの高度耐塩性は、1個の寄与率の高い遺伝子の突然変異によって獲得されたことが示唆され、本遺伝子は耐塩性育種に大きく貢献できる遺伝子であると思われる。

(マリナの耐塩性遺伝子 No.2)

ルテオラ(系統61)とマリナ(系統64)の第二雑種集団F2個体を用いた耐塩性QTL解析の結果、同じ第一連鎖群ではあるが、前年度に検出したQTLとは別の位置に新たな耐塩性QTL(寄与率20%)を検出した。この解析で用いたルテオラ系統は、ルテオラの中では最も耐塩性が高い系統であり、その耐塩性は1年目に用いたマリナに匹敵する。今年度用いたマリナは、1年目に用いたマリナより高い耐塩性を有する系統であり、本マリナ系統が有するさらに高度な耐塩性の獲得には、本解析で明らかになった遺伝子の突然変異が寄与していると考えられた。

(マリナのアルカリ塩耐性)

第一雑種集団の両親系統ルテオラ62とマリナ63について、挿し木を用いてアルカリ塩NaHCO₃(2000ppm)に対する耐性を水耕条件下で比較した。H25年10月7日に挿し木を行い、10月9日に500ppm、10月21日に1000ppm、10月23日に1500ppm、10月25日に2000ppmに濃度を上げ、その後1週間ごとに枯死の程度を評価した。ルテオラ62は、2000ppm処理開始後2週目から葉が枯死し始めたが、その時点でマリナ63に枯死した葉はなかった。2000ppm処理開始後3週目には、ルテオラ62はほぼすべての葉が枯死していたが、その時点でマリナ63の葉の枯死率は10%程度であった。このことから、挿し木を用いた水耕条件下において、マリナ63はルテオラ62と比較して顕著なアルカリ塩耐性を示すことが明らかになった。

さらに同じ両親系統を用いて土耕栽培を行い、それにNaHCO₃処理(4000ppm)を行った場合にもマリナ63は処理後3週目に枯死率50%であったのに対し、ルテオラ62はほぼ完全に枯死していた。このことから、マリナ63はルテオラ62と比較して、水耕、土耕の両条件下においてアルカリ塩に対して高い抵抗性を有することが明らかになり、アルカリ塩害土壌地帯における利用に関しても有望な遺伝資源であることが明らかになった。

(マリナ根粒菌とマリナの共生系耐塩性)

マメ科作物における共生系の研究において、最も研究が進んでいるダイズ(品種:エンレイ)と *Bradyrhizobium* 属根粒菌(系統USDA110)の組み合わせを比較対象として、耐塩性に関する実験を行った結果、以下のことが明らかになった。

共生成立に重要な役割を果たすと考えられている根毛は、根粒菌が分泌する **Nod Factor** をよばれる物質に反応して変形（カーリング）する。そこで、塩処理がカーリングに与える影響を調べたところ、80 mMの塩処理によってマリナの根毛のカーリングは5%程度に減少していた。一方、ダイズの根毛のカーリングは25%程度を維持していた。このことが、耐塩性自体はダイズよりはるかに優れているマリナにおいて、80 mM程度の低塩濃度条件下における根粒形成が大きく阻害された大きな要因であると考えられた。

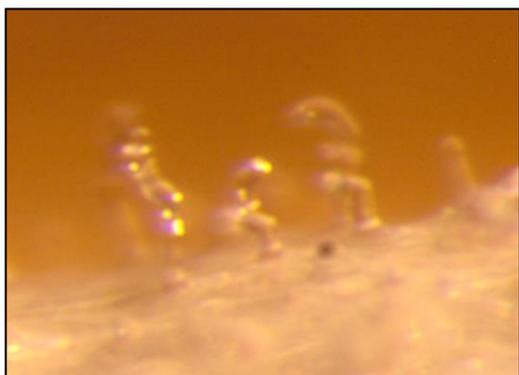


図2. カーリングしている根毛の様子

次に、根粒着生直後の根粒原基肥大期における塩処理（7日間）の影響を比較した。その結果、200 mM NaCl 処理までは、ダイズとマリナの生育や根粒数、N 固定能力に差はみられなかった。しかし、400 mM NaCl においては、ダイズは枯死した一方、マリナは根粒数66%、N 固定能力59%を維持できていた。

次に、根粒成熟期（播種後28日目）から7日間の塩処理の影響を比較した。根粒着生数について、ダイズ共生系では400 mM NaCl 処理から顕著な減少が見られたのに対し、マリナ共生系では600 mM NaCl 濃度下でも維持されていた。また、N 固定能力については、ダイズ共生系では NaCl 濃度が上昇するにつれて急激に低下し、200 mMで16%、400 mMで5%、600 mMで2%まで低下して完全に阻害された。一方、マリナでは、NaCl 処理による減少は見られるものの、200 mMで53%を維持し、600 mMでも25%の活性を発現していた。

これらのことから、マリナの共生系は根粒着生時に最も塩の影響を受けやすいが、一度根粒が形成されると共生系は高い耐塩性を示すことが明らかになった。

図3. 完全に成熟した根粒

本研究によって、マリナは極めて高い耐塩性とアルカリ塩耐性を持つこと、またマリナに着生する根粒菌はマリナ以上の高い耐塩性や耐アルカリ性を持つことが明らかにな

った。さらに、ルテオラを利用することで、マリナの耐塩性が少数の作用力の大きな遺伝子突然変異によってもたらされたことも明らかになった。しかし、一方でマリナとマリナ根粒菌の根粒形成は、比較的低濃度の塩によって阻害されることも明らかになった。今後は、マリナにおける根粒形成時の耐塩性をいかにして高めるのがが主要な研究課題になる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計10件）

1) Naoko Ohkama-Ohtsu, Haruna Honma, Mariko Nakagome, Maki Nagata, Hiroko Yamaya-Ito, Yoshiaki Sano, Norina Hiraoka, Takaaki Ikemi, Akihiro Suzuki, Shin Okazaki, Kiwamu Minamisawa and Tadashi Yokoyama
Growth rate and gene expression of a mutant of a TetR family transcriptional regulator gene (blr7984) in *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110
Microbes Environ. 受理 2016

2) Win K.T., Oo A.Z., Kojima K., Salem D., Yamaya H., Bellingrath-Kimura S.D., Tomooka N., Kaga A., Ohkama-Ohtsu N., Yokoyama T.
Genotypic difference in (137) Cs accumulation and transfer from the contaminated field in Fukushima to azuki bean (*Vigna angularis*).
J Environ Radioact. 2016 Jul; 158-159:138-47. doi: 10.1016/j.jenvrad.2016.04.011. Epub 2016 Apr 19.

3) KunYuan, HiroKi Miwa, MaKi IizuKa, Tadashi Yokoyama, Yoshiharu Fujii, and Shin Okazaki
Genetic Diversity and Symbiotic Phenotype of Hairy Vetch Rhizobia in Japan.
Microbes Environ. doi:10.1264/jmsme2.ME15184, May 3, 2016

4) Win K.T., Oo A.Z., Aung H.P., Terasaki A., Yokoyama T., Bellingrath-Kimura S.D.
Varietal differences in growth and Cs allocation of blackgram (*Vigna mungo*) under water stress.
Environ. Exp. Botany, 109, 244-253, 2015

5) Ohkama-Ohtsu N., Ichida S., Yamaya H., Ohwada T., Itakura M., Hara Y., Mitsui H., Kaneko T., Tabata S., Tejima K., Saeki K., Omori H., Hayashi M., Maekawa M., Murooka Y., Tajima S., Simomura S., Nomura M., Uchiumi T., Suzuki A., Shimoda Y., Abe M., Minamisawa K., Arima Y., Yokoyama T.
Peribacteroid solution of soybean root nodules partly induces genomic loci for differentiation into bacteroids of free-living *Bradyrhizobium*

japonicum cells.

Soil Sci. Plant Nutr., 61, 461-470, 2015

6) Yoshida Y., Marubodee R., Ogiso-Tanaka E., Iseki K., Isemura T., Takahashi Y., Muto C., Naito K., Kaga A., Okuno K., Ehara H., Tomooka N. (2015) Salt tolerance in wild relatives of adzuki bean, *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi. *Genetic Resources and Crop Evolution*. DOI 10.1007/s10722-015-0272-0

7) Sehrawat, N.; Jaiwal, P. K.; Bhat, K. V.; Tomooka, N.; Kaga, A.; Yadav, M. (2014) Breeding mediated improvement of mungbean [*Vigna radiata* (L) Wilczek] for salt tolerance. *Thai Journal of Agricultural Science*. Vol. 47 No. 2 pp. 109-114

8) Tomooka N., Naito K, Kaga A, Sakai H, Isemura T, Ogiso-Tanaka E, Iseki K and Takahashi Y (2014) Evolution, domestication and neo-domestication of the genus *Vigna*. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 12 (S1): S168-S171.

9) Sehrawat N, Bhat K.V, Kaga A, Tomooka N., Yadav M, Jaiwal P.K (2014) Development of new gene-specific markers associated with salt tolerance for mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) *Spanish Journal of Agricultural Research* 12(3):732-741

10) Chankaew S, Isemura T, Naito K, Ogiso-Tanaka E, Tomooka N., Somta P, Kaga A, Vaughan DA, Srinives P (2013) QTL mapping for salt tolerance and domestication-related traits in *Vigna marina* subsp. *oblonga*, a halophytic species. *Theoretical and Applied Genetics* 127: 691-702.

〔学会発表〕（計 2 件）

1) 丸山雄大・武田喜代子・友岡憲彦・横山正・佐藤勝也・大野豊

Vigna 属野生植物の環境耐性型新作物の開発に向けた根粒菌のイオンビーム照射による改良

第 10 回高崎量子応用研究シンポジウム

2015 年 10 月 8 日 国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 高崎量子応用研究所

2) 丸山雄大・友岡憲彦・内藤健・大津直子・横山正

南西諸島の海浜に分布するハマアズキと耐塩性 *Sinorhizobium* 属根粒菌の共生成立を許容する NaCl 濃度について

日本土壌微生物学会、2015 年 5 月 22 日、つくば市

6. 研究組織

(1)研究代表者

友岡 憲彦 (TOMOOKA, Norihiko)

国立研究開発法人・農業生物資源研究所
多様性活用研究ユニット

ユニット長

研究者番号：40373253

(2)研究分担者

横山 正 (YOKOYAMA, Tadashi)

東京農工大学・(連合) 農学研究科 (研究院)・教授

研究者番号：70313286