

# ダイズの実用栽培品種からの根粒菌の探索収集

青森県農林総合研究センター

桑田 博隆・近藤 伸子・岩谷香緒里

## Collection of the Root Nodule Bacterium from Commercial Soybean Cultivars

Hiroataka KUWATA, Nobuko KONDO and Kaori IWAYA

Aomori Prefectural Agriculture and Forestry Research Center

Sakaimatsu1-1-1, Kuroishi, Aomori 036-0389, Japan

### 1. 目的

ダイズ根粒菌は、世界的な食料安定供給のみならず、窒素質肥料がごく少なく済むという点において、環境保全型農業に最大級の貢献をなしてきた。

ダイズ根粒菌に関しては、「生物窒素固定」という学問的見地からの研究例は極めて多数にのぼり、そのために収集された菌株も多数が保存されているが、それらのほとんどは研究目的のための特殊なダイズ品種由来のものであり、実用品種由来の菌株はごく少数に限られている。

根粒菌に関する実用技術開発試験を実施するに当たり、「ダイズ品種と根粒菌の親和性」の問題は常につきまとう課題であり、研究目的達成のためには、対象とするダイズ品種固有の「親和性菌株」を探索することが大前提となる。そこで、青森県を中心とする主に東北地域の栽培品種並びに有望系統ダイズの根粒菌を探索収集することとした。

### 2. 探索概要

#### 1) 根粒菌の分離

(1) 供試ダイズ品種：下記の27品種・系統を供試した

#### ○青森県栽培ダイズ品種

青森県農林総合研究センター畑作園芸試験場作物改良部より分譲

普通ダイズ：おおすず・スズカリ・オクシロメ・ワセスズナリ、納豆用小粒：鈴の音

エダマメ：あおもり福丸・あおもり豊丸・毛豆、黒豆：桧山黒・光黒

#### ○東北他県主要品種・有望系統

(独) 東北農業研究センター水田利用部大豆育種研究室 (刈和野) より分譲

主要品種：ナンブシロメ・トモユタカ・タンレイ・リュウホウ・あやこがね・ミヤギシロメ・タチナガハ・ふくいぶき・タチユタカ・スズユタカ・青丸くん・コスズ  
 有望系統：東北146・154・159・160・161号

- (2) 供試土壌：当初構想では、ほとんどの品種・系統の育成地である「刈和野土壌」を用いる計画であったが、今冬の記録的豪雪により消雪が大幅に遅れる見込みとなったことから、畑作園芸試験場の硬質プラスチックハウスで、2004年度にエダマメ栽培試験を実施した場所（根粒着生は試験担当者により確認）の土壌を採取し、1/5000 a ワグネルポットにつめて供試した（表-1、図-1）。
- (3) ダイズ播種：2005年3月19日実施。各品種・系統の種子をポット当たり数粒ずつ播種し、萌芽後にポット当たり1本に仕立て、ガラス室内に管理した。

表-1 探索日程表

年月日	行程及び行動内容
2005.3.15	黒石市 → 上北郡六戸町：県畑作園芸試験場 → 黒石市 (出発) (土壌試料採取) (帰着)

注) 青森県公用車により移動

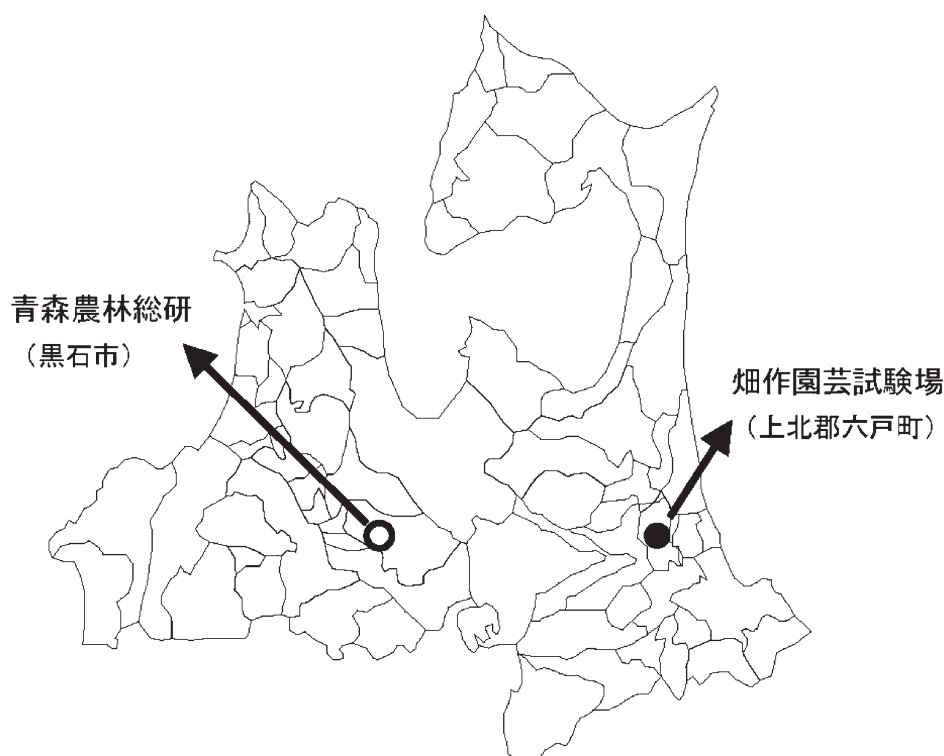


図-1 探索収集地点

- (4) 根粒からの菌の分離：2005年5月1日実施（播種42日後）。ダイズ各個体から外観正常な根粒4個ずつを選抜し、水道水で洗浄後に75%エタノールに数秒間浸漬し、有効塩素2%次亜塩素酸ソーダ溶液に2分間浸漬した後、滅菌蒸留水で3回洗浄した。根粒1個ずつを数mlの滅菌水

中で火炎滅菌ガラス棒先端により砕き、白濁が速やかに水中に拡散することが確認されたものにつき、YMA平板培地に画線移植し、27℃暗黒下に培養した。培養14日後に、1根粒由来の *Bradyrhizobium sp.* と推定される単コロニーを釣菌し、YMA斜面培地に移植し、暫定的な菌株とした。

- (5) ダイズ各品種・系統の根粒着生程度の評価：ダイズの根を水洗後、達観調査により「おおすず」の根粒着生程度を「+++」と評価（根粒の大きさは5～7mmで、ダイズ1個体当たり50～70個程度で、経験的にこの程度の着生であれば十分と判定）し、下記基準により他品種・系統の着生程度を評価した。「おおすず」は青森県の主要品種（2005年度ダイズ作付面積3,770haのうち93%）であることから暫定的に対照品種とした。

++：根粒の大きさはほぼ同じであるが若干少なめ（おおすずでも個体により++）

＋：根粒の大きさはほぼ同じであるが極めて少ない（個体当たり10個未満）

±：根粒は極めて小さい（直径2mm前後）かつ極めて少ない（個体当たり10個未満）

但し、+及び±でも「親和性菌の分離」目的は達成可能

## 2) 分離菌株の接種及び再分離

- (1) 分離菌株の接種源培養：500ml容三角フラスコにYM液体培地400mlを分注し、121℃・15分間のオートクレーブ滅菌・冷却後に、ダイズ各品種・系統由来の各4菌株（一部3菌株）につき1菌株ずつを移植し、27℃暗黒下に静置培養し、菌濃度約 $10^6$ cfu/mlに増殖した段階で接種に供試した。
- (2) ダイズへの接種：直径12cm丸型黒ポリポットにバーミキュライトをつめ、各品種・系統の種子を1粒ずつ播種し、ガラス室内に管理し、初生葉展開時（V1）に接種源培養をポット当たり200ml灌注した。
- (3) 接種菌の再分離（接種6週間後）：各ダイズをポットから取り出し、根を水洗後に根系全体の根粒着生程度を達観により調査し、「おおすず：経験的にこの程度の着生であれば十分と判断される数」と同等またはそれ以上の根粒形成の認められたダイズ各品種・系統を2個体選抜し、各個体からの5根粒を再分離試験に供試した。再分離試験の結果、再分離供試5根粒のうち1根粒でも菌の発育不良その他のトラブル発生が認められた菌株は廃棄した。

## 3) 分離菌株の細菌学的性質の検査

- (1) 供試菌株：ダイズ分離菌40菌株を検査に供試した。
- (2) 検査項目：末尾記載の文献から主要な項目を適宜選択して実施した。これらの文献はまた分類学的考察の典拠としても引用した。
- (3) 検査方法
- 接種試験：前出2)－(2)に記した接種方法によった。
  - 細菌学的性質の検査：基本培地をYMA培地<sup>1)</sup>とした他は後藤・瀧川<sup>3)</sup>に従った。
  - 培養条件：培養はすべて25℃で行い、特記以外は培養期間を2週間とした。

### 3. 収集成果

1) ダイズ品種・系統による根粒着生程度：青森県栽培各品種では、10品種のいずれも十分な量の根粒着生が認められたが、他県栽培主要品種並びに有望系統では、根粒の大きさは同等であるものの着生数が著しく少ないもの、あるいは根粒の大きさ・数とも著しく劣るものが幾つか認められた（表－2）。

表－2 ダイズ品種・系統による根粒着生程度の比較

青森県栽培品種		東北他5県栽培品種		有望系統	
品種名	着生程度	品種名	着生程度	系統名	着生程度
おおすず	+++	ナンブシロメ	+	東北146号	±
スズカリ	++	トモユタカ	++	東北154号	+
オクシロメ	++	タンレイ	++	東北159号	±
ワセスズナリ	++	リュウホウ	+	東北160号	±
鈴の音	+++	あやこがね	++	東北161号	±
あおもり福丸	+++	ミヤギシロメ	+		
あおもり豊丸	+++	タチナガハ	++		
毛豆	+++	ふくいぶき	++		
桧山黒	+++	タチユタカ	+		
光黒	+++	スズユタカ	++		
		青丸くん	+		
		コスズ	±		

注) +++及び++が実用上十分の着生程度と判定  
+及び±でも「親和性菌の分離」目的は達成可能

2) 分離菌株の選定：ダイズの全27品種・系統から各4根粒ずつ、合計108根粒のうち、102根粒から *Bradyrhizobium* sp. と推定される菌が分離された。接種及び再分離の結果に基づき、最終的に27品種・系統よりの40菌株を選定した。菌株番号は選定された順に1～40の通し番号を付し、番号の前にダイズを意味するGm（ダイズ学名の頭文字）を付した（表－3）。

例：Gm-21 Gm：*Glycine max* 21：21番目の菌株

### 3) 検査結果の概要

#### i) 属レベルの判定

分離菌40菌株はいずれも斉一な性質を示し、ダイズに根粒を形成したが、エンドウ・インゲンマメ・シロクローバには根粒を形成しなかった。グラム陰性・好気性で、YMA培地上で粘液性の発育をし、コロニーは白色・円形・全縁・わずかに中高で、27°Cで培養7日後のコロニー

表-3 選抜菌株番号及び由来ダイズ品種・系統名

菌株番号	ダイズ品種・系統名	菌株番号	ダイズ品種・系統名
G m-1	おおすず	G m-2 1	ミヤギシロメ
G m-2	おおすず	G m-2 2	タチナガハ
G m-3	スズカリ	G m-2 3	タチナガハ
G m-4	スズカリ	G m-2 4	ふくいぶき
G m-5	オクシロメ	G m-2 5	ふくいぶき
G m-6	ワセスズナリ	G m-2 6	タチユタカ
G m-7	ワセスズナリ	G m-2 7	タチユタカ
G m-8	鈴の音	G m-2 8	スズユタカ
G m-9	あおもり福丸	G m-2 9	スズユタカ
G m-1 0	あおもり豊丸	G m-3 0	青丸くん
G m-1 1	あおもり豊丸	G m-3 1	青丸くん
G m-1 2	毛豆	G m-3 2	コスズ
G m-1 3	桧山黒	G m-3 3	コスズ
G m-1 4	光黒	G m-3 4	東北1 4 6号
G m-1 5	ナンブシロメ	G m-3 5	東北1 5 4号
G m-1 6	トモユタカ	G m-3 6	東北1 5 9号
G m-1 7	タンレイ	G m-3 7	東北1 5 9号
G m-1 8	リュウホウ	G m-3 8	東北1 6 0号
G m-1 9	あやこがね	G m-3 9	東北1 6 0号
G m-2 0	あやこがね	G m-4 0	東北1 6 1号

は直径1mmに達せず、14日後に直径1mmを超え、アルカリを産生した。以上の結果より、本分離菌40菌株はいずれも *Bradyrhizobium* 属<sup>1, 2, 4)</sup> に属するものと判定された(表-4)。

ii) 種レベルの判定

39℃で発育できず、2% NaCl 耐性は陰性、硝酸還元は6菌株のみ陽性で他は陰性、硝酸イオン存在下での嫌氣的発育・3-ケトラクトース産生・カゼイン加水分解は陰性で、YMA培地上で0.0025%コンゴレッドを吸収した。単糖類グルコース・ガラクトース・フルクトース・ラムノースを利用しアルカリを産生した。アラビノース(培養期間3週間)を利用したが、他の糖類と異なり酸を産生した点で特異的であった。二糖類ラクトース・スクロース(培養期間3週間)を利用しアルカリを産生した。マロン酸は利用したにも拘わらず酸もアルカリも産生しなかった。ナリジクス酸50mg/l及びクロラムフェニコール500mg/lに対して耐性を示し、ストレプトマイシン100mg/lには3/40が耐性、カルベニシリン500mg/lには2/40が耐性を示したが、その他の抗生物質に耐性を示さなかった(表-4)。

iii) 分類学的考察

*Bradyrhizobium* 属として記載されている4種<sup>1, 2, 4, 5, 6, 7, 8)</sup>の中で、*B. liaoningense*<sup>7)</sup>とは発育速度の点で、また *B. yuanmingense*<sup>8)</sup>とはダイズに対する寄生性の点で、それぞれ異なる。

表-4 ダイズ分離菌株の細菌学的性質

性 質	供試菌株※※		
	40 菌株	<i>B. japonicum</i>	<i>B. elkanii</i>
根粒形成能：ダイズ	+	+	+
エンドウ	-	-	n.d.
インゲンマメ	-	-	n.d.
シロクロローバ	-	-	n.d.
グラム反応	-	-	-
好気性発育	+	+	+
形態※	短桿状	短桿状	短桿状
運動性※	+	+	+
YMA培地・27℃・1週間後のコロニー直径	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm
"          2週間後のコロニー直径	> 1 mm	> 1 mm	> 1 mm
YMA培地上での粘性性発育	+	+	+
YMA培地上でのコロニー	白色	白色	白色
	円形	円形	円形
	全縁	全縁	全縁
	中高	中高	中高
YMA培地上での酸・アルカリ産生	アルカリ	アルカリ	アルカリ
39℃での発育	-	-	-
2% NaCl 耐性	-	-	-
硝酸還元	6/40 +	+	-
硝酸イオン存在下での嫌氣的発育	-	+	-
3-ケトラクロースの産生	-	-	-
カゼインの加水分解	-	-	-
YMA培地上での0.0025%コンゴレッド吸収能	+	-	n.d.
インドール-3-酢酸の産生	+	-	+
単糖類利用能：グルコース	+ア	+	+
ガラクトース	+ア	+	+
フルクトース	+ア	+	+
アラビノース	+サ	+	+
二糖類利用能：ラクトース	+ア	-	+
スクロース	+ア	-	+
ラムノース	+ア	-	+
マロン酸利用能	+	+	-
抗生物質耐性：ナリジクス酸 50mg/l	+	-	+
テトラサイクリン 100mg/l	-	-	+
ストレプトマイシン 100mg/l	3/40 +	-	+
エリスロマイシン 250mg/l	-	-	+
クロラムフェニコール 500mg/l	+	-	+
リファンピシン 500mg/l	-	-	+
カルベニシリン 500mg/l	2/40 +	-	+

※一部の菌株のみ実施

※※ *B. japonicum* : 蒲生 (1988) 及び Kuykendall (2005) のデータ

*B. elkanii* : Kuykendall et al. (1992) 及び Kuykendall (2005) のデータ

+ : 反応陽性 - : 反応陰性 ア : アルカリ産生 サ : 酸産生 n.d. : データなし

分離菌は、硝酸イオン存在下での嫌氣的発育・YMA培地上でのコンゴレッド吸収能・インドール-3-酢酸産生・二糖類（ラクトース・スクロース・ラムノース）利用能などで *B. japonicum* と異なり、むしろ *B. elkanii* に近いと思われた。しかし抗生物質耐性検査では、分離菌はナリジクス酸及びクロラムフェニコールにのみ耐性を示し、多くの抗生物質に耐性である *B. elkanii* の大きな特徴<sup>4, 5, 6)</sup>とは異なった。

以上の限られた範囲の表現形質検査結果からは、分離菌は *B. japonicum* と *B. elkanii* との中間的

な地位にあるものと考えられ、本報告では暫定的に分離菌をいずれも *Bradyrhizobium* sp. とするにとどめ、最終的な分類学的地位の確定のためには、16S-rRNA の塩基配列相同性に基づいて判定しなければならない。

#### 4) 最終選抜菌株のMAFF登録番号

前掲40菌株の中から、各品種・系統由来の1菌株ずつ、計27菌株を選抜し、MAFFに登録した。青森県並びにMAFFにおける登録番号対照表を表-5に示した。

表-5 最終選抜菌株の青森県及びMAFFにおける登録番号対照表

青森県番号	ダイズ品種名	MAFF番号	青森県番号	ダイズ品種名	MAFF番号
Gm-1	おおすず	211646	Gm-19	あやこがね	211660
Gm-3	スズカリ	211647	Gm-21	ミヤギシロメ	211661
Gm-5	オクシロメ	211648	Gm-22	タチナガハ	211662
Gm-6	ワセスズナリ	211649	Gm-24	ふくいぶき	211663
Gm-8	鈴の音	211650	Gm-26	タチユタカ	211664
Gm-9	あおもり福丸	211651	Gm-28	スズユタカ	211665
Gm-10	あおもり豊丸	211652	Gm-30	青丸くん	211667
Gm-12	毛豆	211653	Gm-32	コスズ	211668
Gm-13	桧山黒	211654	Gm-34	東北146号	211669
Gm-14	光黒	211655	Gm-35	東北154号	211670
Gm-15	ナンブシロメ	211656	Gm-36	東北159号	211671
Gm-16	トモユタカ	211657	Gm-38	東北160号	211672
Gm-17	タンレイ	211658	Gm-40	東北161号	211673
Gm-18	リュウホウ	211659			

注) MAFF211666は欠番 (MAFFからの通知による)

#### 5. 謝辞

本事業実施に当たり、ダイズ種子を分譲して頂いた青森県農林総合研究センター畑作園芸試験場作物改良部前島敦夫技師並びに(独)東北農業研究センター水田利用部大豆育種研究室湯本節三室長に篤くお礼申し上げます。

#### 6. 参考文献

- 1) D.C.Jordan (1984). FAMILY III. RHIZOBIACEAE Conn 1938. (In) N.R.Krieg and J.G.Holt (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol.1:234-244. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

- 2) 蒲生卓磨 (1988). 生物窒素固定研究における最近の成果 [1]・[2] マメ科根粒菌の分類①・②. 農業及び園芸 63 : 769-774・887-892.
- 3) 後藤正夫・瀧川雄一 (1984). 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方(1)・(2)・(3)・(4). 植物防疫 38 : 339-344・385-389・432-437・479-484.
- 4) L.D.Kuykendall (2005). Genus I. *Bradyrhizobium* Jordan 1982. (In) D.J.Brenner, N.R.Krieg and J.T.Staley (eds.) Bergey' Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed., vol.2, partC: 438-443. Springer, USA.
- 5) L.D.Kuykendall, B.Saxena, T.E.Devine and S.E.Udell (1992). Genetic Diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a Proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology 38: 501-505.
- 6) 澤田宏之 (2003). 根粒菌の系統分類—過去・現在・未来—. 土と微生物 57 : 39-64.
- 7) L.M.Xu, C.Ge, Z.Cui, J.Li and H.Fan (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., Isolated from the Root Nodules of Soybean. International Journal of Systematic Bacteriology 45: 706-711.
- 8) Z.Y.Yao, F.L.Kan, E.T.Wang, G.H.Weil and W.X.Chen (2002). Characterization of Rhizobia that Nodulate Legume Species of the Genus Lespedeza and Description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 2219-2230.

## Summary

Twenty seven commercial cultivars of soybean were cultivated in pots using one kind of field soil under greenhouse conditions. Isolation of the bradyrhizobia from the root nodules of each cultivar was conducted 42 days after sowing with the YMA medium. From the results of isolation, inoculation test to each corresponding cultivar, reisolation of the bacterium from the nodules formed, and tests of bacteriological characteristics, all 27 isolates revealed the intermediate characteristics between *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*. Therefore, they were treated as *Bradyrhizobium* sp. provisionally, and were registered in MAFF Genebank.



## 微生物の探索収集プロフィール



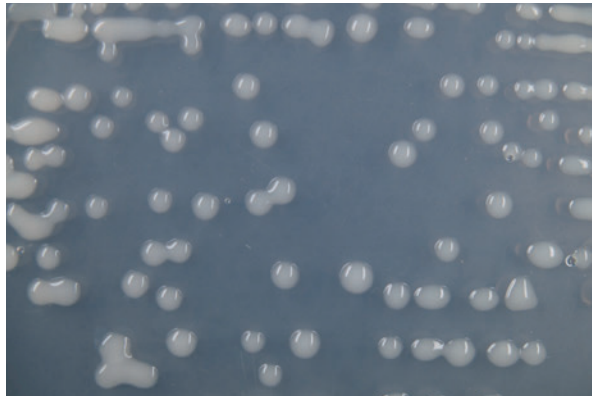
探索収集地である北海道十勝の芽室圃場(斎藤)



コムギより分離した植物内生酵母の外観(斎藤)



ダイズ根粒の着生状況(桑田)



根粒菌のコロニー(桑田)



台湾・宜蘭縣玉蘭 Ilang(Yilang)のウーロン茶向け茶園での探索(長尾)



マレーシア・キャメロンハイランドの紅茶向け茶園での探索(長尾)