

栽培温度がダイズの生育および 感染ダイズ根粒菌の群集構造に及ぼす影響

城 惣吉¹・間塚真矢¹・門脇正行¹・佐伯雄一²

要 旨

地球温暖化に伴う気候変動の作物生産への影響に関する基礎的知見の蓄積の一環として、異なる栽培温度環境下におけるダイズの生育と有用ダイズ根粒菌の接種効果および感染ダイズ根粒菌群集構造への影響について調査を行った。供試ダイズ品種として、‘オリヒメ’、‘ボンミノリ’、‘フクユタカ’を用い、供試菌株として *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110^T を用いた。栽培は温度傾斜型チャンバー内で行い、低温区、中温区、高温区を設けた。異なる温度環境下での栽培試験の結果、無接種区と比較して、USDA110の接種により主茎長、主茎節数、茎葉乾物重、莢数、莢乾物重、地上部乾物重、根粒数が有意に増加したが、栽培温度の上昇により根粒数を除く項目が有意に減少した。各調査項目間の相関係数は根粒数と茎葉乾物重との関係など多くの組み合わせにおいて有意な正の相関関係を示した。USDA110の根粒占有率は、全ての温度区で接種したUSDA110が優占したが、低温区と中温区、低温区と高温区と比較すると栽培温度の上昇により減少する傾向を示した。以上の結果から、高温環境下では根粒数が減少することでダイズの生育が抑制され、その後の生育や収量に影響すると考えられた。しかし、根粒数とUSDA110の根粒占有率を確保することができれば栽培温度の上昇によるダイズの生産性低下を抑制することができると考えられる。

キーワード ダイズ、栽培温度、ダイズ根粒菌、接種効果、群集構造

1. はじめに

地球温暖化による影響で作物の生産性や品質の低下が問題になっている。例えば、イネ (*Oryza sativa* L.) では、3°C 程度の気温上昇により国平均のコメ収量は現在と同程度かあるいはやや増加するが、それ以上になると北海道・東北地域を除いて減少することが報告されている (横沢ら, 2009)。マメ科作物であるダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) においては、登熟期の日平均気温と子実収量の関係は年次によって異なり、27~31°C の範囲では子実生産に有利に働くものの、これ以上の気温上昇は子実収量を制限する要因となることが報告されている (大江ら, 2007)。よって、地球温暖化の気温上昇はダイズ生産に大きな影響を及ぼすと懸念されるため、高温対策技術の確立が求められている。マメ科植物であるダイズは、土壤細菌である根粒菌が感染することにより根に根粒と呼ばれる共生器官を形成し、その器官を通して根粒菌が大気中から固定した窒素をアンモニアとして獲得する。一方で根粒菌に同化

産物を与える共生関係を築いており、ダイズの吸収する窒素の50~80%を根粒菌からの固定窒素に依存しているため、根粒菌の農業的価値は非常に高い (大山, 2001)。このことから、ダイズの安定多収生産を可能にするための期待される栽培技術の一つとして、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種子に接種するといった手法を用いることで、生産性の向上に繋がると考えられている。有用根粒菌の条件としては、宿主植物に対して親和性が高く、土壤中で速やかに増殖し、土着根粒菌との競合力に優れること、根粒形成後の窒素固定活性が高いといった条件が挙げられる (浅沼, 2004)。ダイズ根粒菌の窒素固定能については、根粒内のニトロゲナーゼの作用により発生する水素を取り込む uptake hydrogenase 活性を有する根粒菌株 (Hup⁺株) の存在が知られており、Hup⁺株はこの活性を持たない Hup⁻株よりも根粒内での窒素固定効率が高まり、窒素固定量が増加することが報告されている (南沢ら, 1985)。さらに、*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110^T (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110^T から種名変更, Delamuta *et al.*, 2013) は Hup⁺株であることが報告されており (Saeki *et al.*, 2004)、ダイズ栽培における有用根粒菌として利用価値の高い菌株である。

宿主植物に対する親和性に関してはダイズが保有する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) が関係していることが知られており、これまでに、*rj*₁, *Rj*₂, *Rj*₃, *Rj*₄, *Rj* 遺伝子を保有しない non-*Rj*

¹ 島根大学生物資源科学部農林生産学科 (690-8504 島根県松江市西川津町1060)

² 宮崎大学農学部応用生物科学科 (889-2192 宮崎県宮崎市園木花台西1-1)

Corresponding Author: 城 惣吉 skc-shiro@life.shimane-u.ac.jp

2020年11月11日受付・2021年3月24日受理

日本土壤肥科学雑誌 第92巻 第3号 p. 255~262 (2021)

が報告されている (Williams and Lynch, 1954; Caldwell, 1966; Vest, 1970; Vest and Caldwell, 1972; Devine and Kuykendall, 1996). rj_1 は全てのダイズ根粒菌を, Rj_2 は *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122 系統のダイズ根粒菌を, Rj_3 は *Bradyrhizobium elkanii* USDA33 系統のダイズ根粒菌を, Rj_4 は *B. elkanii* USDA61 系統のダイズ根粒菌の根粒形成を抑制することが知られており, 土壌から土着ダイズ根粒菌を分離する際は, 数種の異なる Rj 遺伝子型を保有するダイズ品種を用いたほうがより良いと考えられる. また, ダイズ栽培時に窒素固定能の高い有用ダイズ根粒菌を種子に接種し, その根粒占有率を高める技術開発が試みられているが, 宿主ダイズの Rj 遺伝子型や栽培温度が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が報告されている (Shiro *et al.*, 2012). 気温の上昇により接種した有用ダイズ根粒菌が根粒占有率を確保できず, 接種効果を得ることが難しくなることも予想される. しかし, 栽培温度の変化がマメ科作物の生産と根粒菌の感染の両方に及ぼす影響を同時に検証した例は少ない.

そこで, 本研究では, 地球温暖化に伴う気候変動の作物生産への影響に関する基礎的知見の蓄積の一環として, 栽培温度の変化がダイズの生育と根粒菌との共生関係に及ぼす影響について明らかにすることを目的に, 異なる栽培温度環境下におけるダイズの生育と有用ダイズ根粒菌の接種効果および感染ダイズ根粒菌群集構造に関して調査を行った.

2. 材料および方法

1) 栽培温度が有用ダイズ根粒菌の接種効果に及ぼす影響

(1) 供試菌株および接種菌液の調製

供試菌株として *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110^T を用いた. 供試菌株の培養には Yeast-Mannitol (YM) 液体培地 (Vincent, 1970; Keyser *et al.*, 1982) を用い, 28°C で7日間振盪培養した. 培養後, 1×10^6 cells mL⁻¹ となるように滅菌蒸留水で希釈し, 接種菌液とした.

(2) 供試品種およびダイズ栽培の概要

供試品種として‘オリヒメ’ (non- Rj), ‘ボンミノリ’ (Rj_2Rj_3), ‘フクユタカ’ (Rj_4) の3品種を用いた. ダイズの栽培は島根大学生物資源科学部附属生物資源教育研究センター神西砂丘農場に設置された温度傾斜型チャンバー (Temperature Gradient Chamber, 以下 TGC) 内で行った (図1). 栽培には底から5cmの位置に1ヶ所のみ直径2cmの穴をあけた5L容ポリバケツを栽培ポットに用い, 用土として農場内の砂丘未熟土 (pH (H₂O) 5.35, EC 6.4 mS m⁻¹) を用いた. 元肥を単肥で N-P₂O₅-K₂O (g m⁻¹) で 0-10-10 となるよう過リン酸石灰と塩化カリウムを施肥した. 2016年7月20日に土壌表面から深さ約3cmに種子を播種し, 播種後に供試菌株を1種子あたり

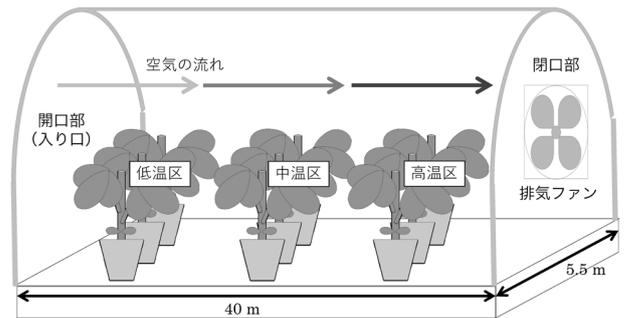


図1 TGCおよび試験区の概要

温室 (ビニルハウス) の閉口部に排気ファンが設置されており, ファンの回転により開口部から外気が取り込まれる. 取り込まれた外気を日射により徐々に昇温させることで内部に温度傾斜を発生させる.

1 mL 接種した接種区と供試菌株を接種していない無接種区を設けた. 高温による発芽不良を避けるために8月5日まで TGC の外に静置し, その後, TGC の開口部付近を低温区, 中央付近を中温区, 排気ファン付近を高温区とし, 栽培ポットを各試験区に設置し栽培した. ダイズは各品種1ポットあたり3個体を栽培し, 無反復とした. 灌水は1日に2回 (6時と18時) 行った. TGC 内の気温および栽培ポット内の地温の測定は8月10日から開始し, 気温は地上から70cmの位置に, 地温は栽培ポットの側面から5cmおよび土壌表面から10cmの位置にセンサーを設置し, おんどり (Thermo Recorder TR-71U, T AND D) を用いて測定した.

(3) 調査項目

調査は2016年9月23日に行い, 主茎長, 主茎節数, 莢数, 器官別乾物重, 根粒数について調査した. 乾物重の測定については, 植物体を乾燥機にて70°Cで72時間以上乾燥を行った後に測定した.

2) 栽培温度が感染ダイズ根粒菌の群集構造に及ぼす影響

(1) 根粒のサンプリング

根粒のサンプルは1)において栽培したダイズの根から採取した. 採取した根粒はクリーンベンチ内で 0.7 kg kg^{-1} エタノールに3分間, 25 g kg^{-1} 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 2.5 g kg^{-1}) に30分間浸して表面殺菌した後, 滅菌蒸留水で5回程度洗浄した. そして, 解析に用いる根粒を1ポットあたりランダムに24個選抜した.

(2) 根粒からの DNA 抽出

根粒から直接, ダイズ根粒菌の 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 mmol m^{-3} トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩, 10 g kg^{-1} Tween 20, 5 g kg^{-1} Nonidet P-40, 1 mmol m^{-3} エチレンジアミン四酢酸, pH 8.0) と滅菌した Milli-Q 水および 1 mg mL^{-1} プロテイナーゼ K を 5 対 4 対 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1.5mL容マイクロチューブに100 μ Lずつ加えてホモジナイズし、60°Cで20分間と95°Cで5分間インキュベートし、卓上マイクロ冷却遠心機 (Model 3520, KUBOTA) にて250s⁻¹、20°Cで10分間遠心した後に上清を回収し、DNA抽出液とした。

(3) 16S-23S rRNA 遺伝子 ITS 領域の PCR

根粒から抽出したDNA抽出液をテンプレートとして、16S-23S rRNA 遺伝子 ITS 領域をターゲットとした Primer set (Saeki *et al.*, 2006) を用いてPCRを行った。1サンプル当たり滅菌 Milli-Q 水を6.75 μ L、10 \times Ex Taq Buffer を1 μ L、dNTP Mixture (2.5 mmol m⁻³ each) を0.8 μ L、10 μ mol m⁻³ Forward primer (Bra-ITS-F: 5'-GAC TGG GGT GAA GTC GTA AC-3') を0.2 μ L、10 μ mol m⁻³ Reverse primer (Bra-ITS-R: 5'-ACG TCC TTC ATC GCC TC-3') を0.2 μ L、5 U μ L⁻¹ TaKaRa *Ex Taq* DNA polymerase を0.05 μ L (TaKaRa Bio)、テンプレートを1 μ Lを混合して反応液とした。PCR反応は94°Cで5分間変性させた後、94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで1分を30サイクル、72°Cで10分、10°Cで保存という条件で行った。PCR終了後、アガロースゲル電気泳動を行い、PCR産物の増幅を確認した。

(4) ダイズ根粒菌からの DNA 抽出

根粒から直接DNAを抽出する方法では2)の(3)のPCRで増幅産物が得られない場合があったため、根粒から分離培養したダイズ根粒菌からDNAを抽出した。

まずはコンゴレッドを含むYM平板培地を用いてダイズ根粒菌の分離を行った。根粒を1個ずつ入れた1.5mL容マイクロチューブに滅菌蒸留水を100 μ L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YM平板培地に画線接種し、28°Cの暗所で7日間静置した。このとき、ダイズ根粒菌以外の菌はコンゴレッドを吸収し赤く染色される特性を利用し、ダイズ根粒菌の判別を行った。次に、DNA抽出用にHEPES-MES (HM) 液体培地 (Cole and Elkan, 1973; Sameshima *et al.*, 2003) を用いて分離したダイズ根粒菌を培養した。14mL容ツーポジションチューブにHM液体培地を1.5mL分注し、ダイズ根粒菌を植菌し、28°Cで5~7日間振盪培養した。この培養液を1.5mL容マイクロチューブに移し、卓上マイクロ冷却遠心機にて150s⁻¹、20°Cで3分間遠心し、集菌した。集菌後、上清を取り除き、9gkg⁻¹塩化ナトリウムを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。その後、BL bufferを用いて2)の(2)と同様の方法でダイズ根粒菌のDNAを抽出し、これを用いて2)の(3)と同様の方法でPCRおよび増幅産物の確認を行った。2)の(2)と(4)により、1ポットあたり24の解析サンプルを得た。

(5) PCR 産物の制限酵素処理

得られたPCR産物は、制限酵素 *MspI* で処理した。1サンプル当たり滅菌 Milli-Q 水を10.5 μ L、10 \times T Buffer (330mmol m⁻³ トリスヒドロキシメチルアミノメタン酢酸塩、100mmol m⁻³ 酢酸マグネシウム、5mmol m⁻³ ジチオトレイトール、660mmol m⁻³ 酢酸カリウム) を2 μ L、1gkg⁻¹ BSA (ウシ血清アルブミン) を2 μ L、10U μ L⁻¹ *MspI* を0.5 μ L (TaKaRa Bio)、PCR産物を5 μ L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。制限酵素処理した消化液は30gkg⁻¹アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、サンプルのバンドパターンと *B. diazoefficiens* USDA110^T、*Bradyrhizobium japonicum* USDA6^T、*Bradyrhizobium elkanii* USDA46、76^T、94の5株の参照菌株のバンドパターンを比較して感染したダイズ根粒菌を同定し、根粒占有率を算出した。

3) 統計処理

統計解析には、R version 4.0.2 (R Core Team, 2020) を用いた。ダイズの生育における *B. diazoefficiens* USDA110^T の接種効果や栽培温度の影響を評価するために、Rで動作する分散分析関数の *anovakun* version 4.8.5 (井関, 2020) を用いて二元配置分散分析を行い、また、*multcomp* パッケージを用いてTukeyの多重検定を行った。各調査項目間の相関関係については、Rの *psych* パッケージを用いて作図を行い、*cor.test* 関数を用いて相関関係の有意性を検定した。

3. 結 果

1) TGC による気温および地温の変化

栽培期間中のTGC内の平均気温およびダイズを栽培した栽培ポットに充填した土壌の平均地温を表1に示した。栽培期間中の日平均気温は、低温区で26.6°C、中温区で27.4°C、高温区で28.4°Cとなり、低温区よりも中温区で0.8°C、高温区で1.9°C高くなった。特に、6時から18時までの平均気温は、低温区よりも中温区で1.5°C、高温区で3.3°C高い値を示したことから、TGCにより栽培温度

表1 ダイズ栽培期間中におけるTGC内の平均気温および平均地温

温度区	平均気温 (°C)			平均地温 (°C)		
	6:00~18:00	18:00~6:00	日平均	6:00~18:00	18:00~6:00	日平均
低温	29.8 (0.0)	23.3 (0.0)	26.6 (0.0)	29.8 (0.0)	25.1 (0.0)	27.5 (0.0)
中温	31.3 (1.5)	23.5 (0.2)	27.4 (0.8)	30.9 (1.1)	25.5 (0.4)	28.2 (0.7)
高温	33.1 (3.3)	23.7 (0.4)	28.4 (1.9)	30.0 (0.2)	25.5 (0.4)	27.8 (0.3)

()内の数値は、低温区との温度差。

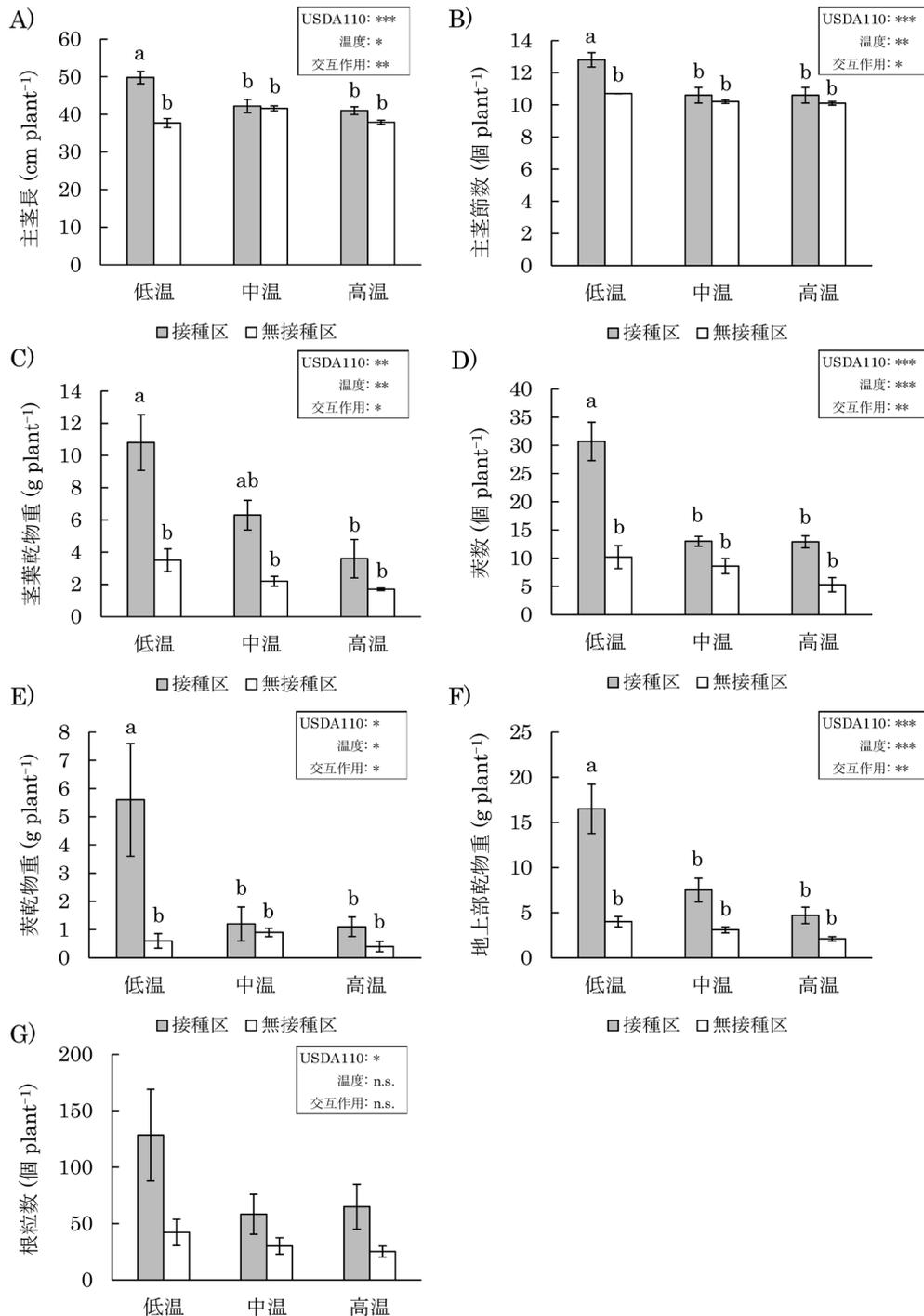


図2 各調査項目における *B. diazoefficiens* USDA110^T の接種と栽培温度の影響

A: 主茎長, B: 主茎節数, C: 茎葉乾物重, D: 莢数, E: 莢乾物重, F: 地上部乾物重, G: 根粒数. 値はダイズ3品種の平均値±標準誤差で, ***は有意水準0.1%, **は有意水準1%, *は有意水準5%で有意差あり. 異なる英小文字間は Tukey の多重比較 (有意水準5%) で有意差あり.

に勾配をつけてダイズを栽培することができた. 地温については, 栽培期間中の日平均地温は低温区で27.5°C, 中温区で28.2°C, 高温区で27.8°Cと同程度の値を示し, 気温のような温度変化は認められなかった.

2) USDA110 の接種と栽培温度の影響

ダイズの生育における *B. diazoefficiens* USDA110^T の接種と栽培温度の影響を図2に示した. 分散分析の結果,

USDA110の接種により主茎長, 主茎節数, 茎葉乾物重, 莢数, 莢乾物重, 地上部乾物重, 根粒数は有意に増加し, 栽培温度の上昇により主茎長, 主茎節数, 茎葉乾物重, 莢数, 莢乾物重, 地上部乾物重は有意に減少した. しかし, 根粒数を除く項目でUSDA110の接種と栽培温度との間に交互作用が認められたため, 6群でTukeyの多重比較検定を行った. その結果, 主茎長, 主茎節数, 莢数, 莢乾

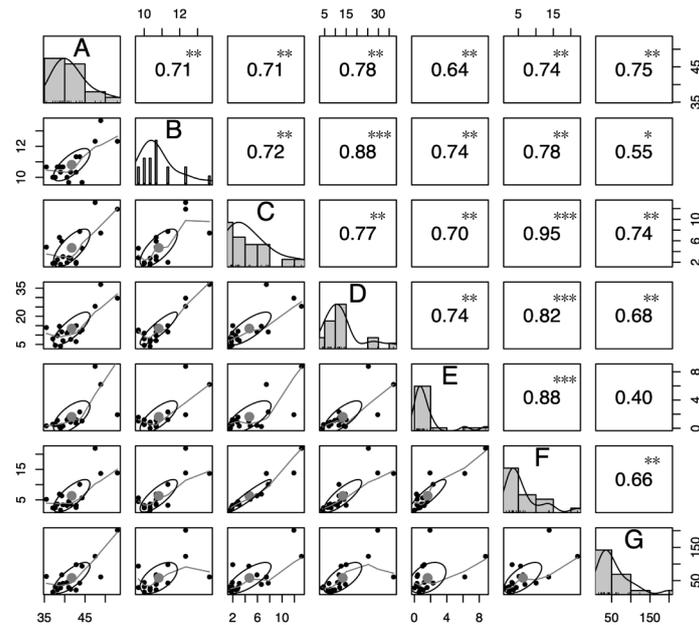


図3 各調査項目間の相関係数

相関係数は図2のデータを基に算出した (n=18)。A：主茎長，B：主茎節数，C：茎葉乾物重，D：莢数，E：莢乾物重，F：地上部乾物重，G：根粒数で，***は有意水準0.1%，**は有意水準1%，*は有意水準5%で有意差あり。

物重，地上部乾物重ではUSDA110接種区の低温区は他の群との比較において有意差が認められ，茎葉乾物重ではUSDA110接種区の中温区との比較において有意差は認められなかったものの，他の群との比較において有意差が認められた。根粒数については，交互作用が認められなかったため多重比較検定を行っていないが，USDA110接種区の低温区は他の群と比較して根粒数が多い傾向を示し，また，栽培温度の上昇により減少する傾向を示した。

主茎長，主茎節数，茎葉乾物重，莢数，莢乾物重，地上部乾物重，根粒数の各調査項目間の相関関係を図3に示した。各調査項目間の相関係数は0.4から0.95となり，根粒数と莢乾物重との関係を除く多くの組み合わせにおいて有意な正の相関関係を示した。

3) USDA110 および土着ダイズ根粒菌の根粒占有率

接種した *B. diazoefficiens* USDA110^T および土着ダイズ根粒菌の根粒占有率を表2に示した。供試したダイズ3品種の平均では，USDA110接種区については，低温区，中温区，高温区でそれぞれ，USDA110が90.2%，72.8%，76.4%，Bj6が2.8%，4.3%，1.4%，Be46が2.8%，1.4%，1.4%，Be76が2.8%，2.9%，6.9%，Be94が1.4%，18.6%，13.9%となり，いずれの栽培温度区でも接種したUSDA110が優占する傾向を示した。しかし，USDA110の占有率は，低温区と中温区，低温区と高温区を比較すると栽培温度の上昇により減少する傾向を示した。USDA110無接種区については，低温区，中温区，高温区でそれぞれ，Bj6が14.1%，22.3%，19.1%，Be46が12.7%，7.5%，5.9%，Be76が23.9%，19.4%，27.9%，Be94が49.3%，49.3%，45.6%，その他が0%，1.5%，1.5%となり，Be94が優占する傾向を示した。

各ダイズ品種におけるUSDA110の根粒占有率については，オリヒメでは低温区と中温区，低温区と高温区を比較すると栽培温度の上昇によりUSDA110の根粒占有率が減少し，特に，中温区と高温区では温度の上昇に伴うBe94やBe76の根粒占有率の増加によりUSDA110の根粒占有率が50%以下に減少する傾向を示した。ボンミノリでは，栽培温度の上昇に伴ってUSDA110の根粒占有率が減少する傾向を示したが，80%以上の根粒占有率を維持した。フクユタカでは，栽培温度の上昇に伴ってUSDA110の根粒占有率は増加する傾向を示し，高温区では解析した根粒の全てがUSDA110の感染によるものであった。USDA110無接種区については，全ての品種でBj6よりもBe76やBe94が優占する傾向を示し，特に，ボンミノリはオリヒメやフクユタカと比較するとBj6よりもBeをより多く感染させる傾向にあった。

4. 考 察

本研究では，地球温暖化に伴う気候変動の作物生産への影響に関する基礎的知見の蓄積の一環として，温度傾斜型チャンバー (TGC) 内でダイズの栽培を行い，異なる栽培温度環境下におけるダイズの生育および感染ダイズ根粒菌群集構造への影響について調査を行った。

ダイズの栽培期間中におけるTGC内の平均気温および平均地温については，日平均気温は0.8~1.9°C，日平均地温は0.3~0.7°C上昇したことから (表1)，TGCを用いることにより栽培温度に変化をつけることができ，異なる温度環境下でダイズの栽培が行えたと考えられる。

ダイズの生育における *B. diazoefficiens* USDA110^T の接種と栽培温度の影響については，分散分析の結果から

根粒数を除く項目で交互作用が認められ、USDA110の接種効果は特に低温区で有意に発揮され、中温区や高温区についてもUSDA110の接種は無接種よりも高い値を示す傾向にあった(図2)。各調査項目間の相関関係については、根粒数とその他の調査項目間全てで正の相関を示した(図3)。金野ら(1990)はダイズの茎葉部の生育量と根粒着生量との関係について調査しており、根粒数と茎葉部乾物重および根粒乾物重と茎葉部乾物重との間に正の相関関係が認められたことを報告している。このことは本研究の結果とも一致しており、根粒をより多く着生させることでダイズの生育や収量の向上につながると期待できる。しかし、根粒が原品種よりも数倍以上着生する根粒超着生系統のダイズは生育量が顕著に小さくなることや原品種よりも生育が劣ることが報告されているため(Akao and Kouchi, 1992; Takahashi *et al.*, 1995)、適切な数の根粒を着生させる必要があると考えられる。また、内川ら(2009)は培土の有無や栽植密度がダイズの生育、収量、窒素固定能(アセチレン還元活性)に及ぼす影響について調査してお

り、 m^2 当たりの窒素固定能と地上部乾物重との間に有意な正の相関関係が認められ、窒素固定能の増加は地上部の生育量の増加に重要であることを報告している。本研究においてUSDA110接種区の根粒数は無接種区よりも多く、中でもUSDA110接種区の低温区では128.4個 $plant^{-1}$ の根粒が着生しており(図2G)、さらに、USDA110の根粒占有率もダイズ3品種平均で90.2%を占めたことから(表2)、これらの要因により低温区で地上部乾物重増加などの接種効果が得られたと考えられる。一方、栽培温度の上昇により接種効果が得られ難くなる原因としては、栽培温度の上昇によりUSDA110接種区の根粒数は128.4個 $plant^{-1}$ から64.9個 $plant^{-1}$ まで減少する傾向を示したこと(図2G)、そして、USDA110の根粒占有率は栽培温度の上昇に伴って90.2%から76.4%まで減少する傾向を示したこと(表2)が要因となったのではないかと考えられる。しかし、USDA110の接種は根粒数を有意に増加させることから(図2G)、高温環境下ではUSDA110を接種することにより根粒数と根粒占有率を同時に増加させるこ

表2 *B. diazoefficiens* USDA110^T および土着ダイズ根粒菌の根粒占有率

品種	USDA110	温度区	占有率(%)					
			Bj6	Be46	Be76	Be94	USDA110	その他
オリヒメ	接種	低温	0.0	0.0	0.0	4.2	95.8	0.0
		中温	4.5	0.0	9.1	50.0	36.4	0.0
		高温	4.2	4.2	20.8	25.0	45.8	0.0
	無接種	低温	8.7	17.4	17.4	56.5	—	0.0
		中温	33.3	9.5	0.0	57.2	—	0.0
		高温	34.8	13.0	17.4	34.8	—	0.0
ボンミノリ	接種	低温	0.0	8.3	0.0	0.0	91.7	0.0
		中温	4.2	4.2	0.0	0.0	91.6	0.0
		高温	0.0	0.0	0.0	16.7	83.3	0.0
	無接種	低温	8.3	4.2	25.0	62.5	—	0.0
		中温	9.1	0.0	22.7	68.2	—	0.0
		高温	4.8	0.0	57.1	33.3	—	4.8
フクユタカ	接種	低温	8.3	0.0	8.3	0.0	83.4	0.0
		中温	4.2	0.0	0.0	8.3	87.5	0.0
		高温	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0
	無接種	低温	25.0	16.6	29.2	29.2	—	0.0
		中温	25.0	12.5	33.3	25.0	—	4.2
		高温	16.6	4.2	12.5	66.7	—	0.0
3品種平均	接種	低温	2.8±2.8	2.8±2.8	2.8±2.8	1.4±1.4	90.2±3.7	0.0±0.0
		中温	4.3±0.1	1.4±1.4	2.9±3.0	18.6±15.5	72.8±17.8	0.0±0.0
		高温	1.4±1.4	1.4±1.4	6.9±6.9	13.9±7.3	76.4±16.0	0.0±0.0
	無接種	低温	14.1±5.5	12.7±4.3	23.9±3.4	49.3±10.3	—	0.0±0.0
		中温	22.3±7.1	7.5±3.8	19.4±9.8	49.3±13.0	—	1.5±1.4
		高温	19.1±8.7	5.9±3.8	27.9±14.1	45.6±10.9	—	1.5±1.6

Bradyrhizobium japonicum USDA6^T, *Bradyrhizobium elkanii* USDA46, 76^T, 94と類似のRFLPパターンを示した菌株をそれぞれ、Bj6, Be46, Be76, Be94とし、参照菌株と異なるRFLPパターンを示した菌株をその他とした。3品種平均の値は、ダイズ3品種の平均値±標準誤差。

とがダイズの生産性を維持するために重要になると考えられる。

ダイズには特定のダイズ根粒菌の感染を抑制する *Rj* 遺伝子の存在が知られており、本研究で供試したダイズの *Rj* 遺伝子型は、オリヒメが non-*Rj*、ボンミノリが *Rj₂Rj₃*、フクユタカが *Rj₄* である。Shiro *et al.* (2012) は、non-*Rj*、*Rj₂Rj₃*、*Rj₄*、*Rj₂Rj₃Rj₄* の *Rj* 遺伝子型を示す13のダイズを用いて、ダイズに感染する土着ダイズ根粒菌の群集構造に対する *Rj* 遺伝子型と栽培温度の影響について調査を行い、感染ダイズ根粒菌の群集構造は *Rj* 遺伝子型や栽培温度によって影響を受けることを明らかにしており、同じ *Rj* 遺伝子を保有する品種でも栽培温度によって感染傾向が異なること、*Rj₂Rj₃* を保有するダイズ品種はその他の *Rj* 遺伝子型を保有するダイズ品種と比較して *B. diazoefficiens* USDA110^T と類似の RFLP パターンを示す土着菌株 (Bd110) を栽培温度に関わらず50%以上感染させる傾向を示すこと、*Rj₄* を保有するダイズ品種は高温環境下で68.3%と低温区や中温区と比較してBd110をより多く感染させる傾向を示すことを報告している。本研究においても、*Rj₂Rj₃* 遺伝子を保有するボンミノリは、低温区と中温区で90%以上、高温区では80%以上のUSDA110の根粒占有率を示しており、さらに、*Rj₄* 遺伝子を保有するフクユタカは栽培温度の上昇に伴ってUSDA110の根粒占有率が増加する傾向を示したことから(表2)、Shiro *et al.* (2012) の報告と同様に高温環境下における *Rj₂Rj₃* 遺伝子や *Rj₄* 遺伝子の有用性を示唆した。また、本研究では、供試した3品種に加えて *Rj* 遺伝子を集積した *Rj₂Rj₃Rj₄* の遺伝子型を示す‘ボンミノリ’と‘フクユタカ’を交配して作出されたダイズ系統も試験的に用いてUSDA110の根粒占有率の調査を行っており、その結果、低温区と中温区で100%、高温区で91.6%のUSDA110の根粒占有率を示した(データ非掲載)。これらの結果から、USDA110の根粒占有率をより多く確保するためには、*Rj₂Rj₃* 遺伝子や *Rj₄* 遺伝子を保有するダイズ品種を用いることが有効であると考えられる。さらに、*Rj* 遺伝子型を意識した育種を行うことで、接種する有用ダイズ根粒菌とより効率的に共生することのできる多収ダイズの作出につながる可能性があると考えられる。

以上のことから、高温環境下では根粒数が減少し、それにより生育に必要な固定窒素を十分に獲得できず、その後の生育や収量の低下につながると考えられるが、*Rj₂Rj₃* 遺伝子や *Rj₄* 遺伝子を保有するダイズ品種を栽培に用いることでUSDA110の根粒占有率を確保することができ、栽培温度の上昇による生産性の低下を抑制することができると考えられる。また、本研究は用土に砂丘未熟土を用い、窒素肥料を無施肥の条件でダイズの栽培を行っているため、土壌や施肥条件が異なると根粒数やUSDA110の根粒占有率も異なることが予測される。今後は、土壌の種類や施肥条件の違いによる影響についても検討し、高温環境下においてもダイズの根粒着生数を増加可能にする技術を

確立することで、より実用的な地球温暖化に対応したダイズの栽培技術の発展に貢献できると考えられる。

付記：本研究は科学研究費助成事業基盤研究(B)「共生窒素固定系の環境適応システムの解明と環境傾度対応型ダイズ栽培技術への応用」(平成26年度～平成29年度)の研究助成により実施した。また、本研究の一部は日本土壤肥料学会2018年度神奈川大会において発表した。

文 献

- Akao, S., and Kouchi, H. 1992. A supernodulating mutant isolated from soybean cultivar Enrei. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **38**, 183–187.
- 浅沼修一 2004. 第15章窒素固定活性の測定と窒素固定菌の計数・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, p. 276–278. 養賢堂, 東京.
- Caldwell, B.E. 1966. Inheritance of a strain-specific ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.*, **6**, 427–428.
- Cole, M.A., and Elkan, G.H. 1973. Transmissible resistance to penicillin G, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**, 248–253.
- Delamuta, J.R.M., Riberio, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., and Hungria, M. 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group la strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63**, 3342–3351.
- Devine, T.E., and Kuykendall, L.D. 1996. Host genetic control of symbiosis in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Soil*, **186**, 173–187.
- Hiraishi, A., Kamagata, Y., and 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.
- 井関龍太のページ 2020. ANOVA 君. <http://riseki.php.xdomain.jp/index.php?ANOVA> 君
- Keyser, H.H., Bohlool, B.B., Hu, T.S., and Weber, D.F. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science*, **215**, 1631–1632.
- 金野隆光・斎藤雅典・石井和夫 1990. ダイズの根粒着生と茎葉部の生育量・栄養状態の関係. 土肥誌, **61**, 396–403.
- 南沢 究・有馬泰紘・田中裕之・熊沢喜久雄 1985. 水素回収系を持つダイズ根粒菌の接種効果. 土肥誌, **56**, 292–299.
- 大江和泉・上郷玲子・城 さやか・倉橋崇之・齊藤邦行・黒田俊郎 2007. 気温上昇がダイズの開花結莢, 乾物生産と子実収量におよぼす影響. 日作紀, **76**, 433–444.
- 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. 森 敏・前 忠彦・米山忠克編 植物栄養学, p. 103–110. 文永堂, 東京.
- R Core Team 2020. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Saeki, Y., Akagi, I., Takaki, H., and 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.
- Saeki, Y., Aimi, N., Hashimoto, M., Tsukamoto, S., Kaneko, A., Yoshida, N., Nagatomo, N., and Akao, S. 2004. Grouping of

- Bradyrhizobium* USDA strains by sequence analysis of 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 517–525.
- Saeki, Y., Aimi, N., Tsukamoto, S., Yamakawa, T., Nagatomo, Y., and Akao, S. 2006. Diversity and geographical distribution of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **52**, 418–426.
- Sameshima, R., Isawa, T., Sadowsky, M.J., Hamada, T., Kasai, H., Shutsrirung, A., Mitsui, H., and 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.
- Shiro, S., Yamamoto, A., Umehara, Y., Hayashi, M., Yoshida, N., Nishiwaki, A., Yamakawa, T., and Saeki, Y. 2012. Effect of *Rj* genotype and cultivation temperature on the community structure of soybean-nodulating bradyrhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 1243–1250.
- Takahashi, M., Kokubun, M., and Akao, S. 1995. Characterization of nitrogen assimilation in a supernodulating soybean mutant En6500. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **41**, 567–575.
- 内川 修・田中浩平・宮崎真行・松江勇次 2009. 北部九州における晩播狭畦栽培ダイズの生育収量および窒素固定能について. *日作紀*, **78**, 163–169.
- Vest, G. 1970. *Rj₃*-A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.*, **10**, 34–35.
- Vest, G., and Caldwell, B.E. 1972. *Rj₄*-A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.*, **12**, 692–693.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Program. Blackwell Scientific, Oxford.
- Williams, L.F., and Lynch, L.D. 1954. Inheritance of a non-nodulating character in the soybean. *Agron. J.*, **46**, 28–29.
- 横沢正幸・飯泉仁之直・岡田将誌 2009. 気候変化がわが国におけるコメ収量変動に及ぼす影響の広域評価. *地球環境*, **14**, 199–206.

The effect of cultivation temperature on the soybean (*Glycine max*) growth and community structure of bradyrhizobia

Sokichi SHIRO¹, Shinya MAZUKA¹, Masayuki KADOWAKI¹ and Yuichi SAEKI²

¹Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University,

²Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

We investigated the growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under different cultivation temperature conditions, and the inoculation effect of useful bradyrhizobial strain and the community structure of infected soybean-nodulating bradyrhizobia to elucidate the effects of climate change on crop production due to global warming. “Orihime,” “Bonminori,” and “Fukuyutaka” were used as the test soybean cultivars, and *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110^T was used as the test strain. The soybean was grown in a temperature-gradient chamber with low-temperature zone, middle-temperature zone, and high-temperature zone. The results of cultivation test under different temperature conditions showed that inoculation with USDA110 significantly increased plant height, number of nodes, stem and leaf dry weight, the number of pods, pod dry weight, total plant dry weight, and number of nodules. However, all investigation items, except for the number of nodules were significantly reduced with increasing cultivation temperature. Correlation coefficients were significantly positive in many combinations, including the relationship between the number of nodules and stem and leaf dry weight. The occupancy of USDA110 was dominated by inoculated USDA110 in all cultivation temperature zones. However, the occupancy tended to decrease with an increase in cultivation temperature when comparing low- and middle-temperature zones and low- and high-temperature zones. These results suggest that the decreased number of nodules under high-temperature conditions inhibited soybean growth, reducing the growth and yield of soybean. However, the reduction of soybean productivity due to the increase in cultivation temperature may be reduced by ensuring the number of nodules and occupancy of *B. diazoefficiens* USDA110^T.

Key words: soybean, cultivation temperature, bradyrhizobia, inoculation effect, community structure