

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-90395  
(P2021-90395A)

(43) 公開日 令和3年6月17日(2021.6.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 1/20 A	2B022
AO1G 7/00 (2006.01)	AO1G 7/00 605Z	2B030
AO1G 22/40 (2018.01)	AO1G 22/40	4B065
AO1H 6/54 (2018.01)	AO1H 6/54	4H011
AO1H 3/00 (2006.01)	AO1H 3/00	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-224008 (P2019-224008)  
(22) 出願日 令和1年12月11日 (2019.12.11)

特許法第30条第2項適用申請有り 研究集会名：第5回植物微生物共生と窒素固定に関するアジア国際会議  
開催日：2019年5月15日～17日 開催場所：東北大学片平キャンパスさくらホール

(出願人による申告)平成30年度、平成31年・令和元年度、国立研究開発法人科学技術振興機構 国際科学技術共同研究推進事業「日欧ネットワークによる気候変動下におけるダイズ栽培技術革新」の委託研究、産業技術力強化法第17条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 504132881  
国立大学法人東京農工大学  
東京都府中市晴見町3-8-1  
(74) 代理人 110002572  
特許業務法人平木国際特許事務所  
(72) 発明者 大津 直子  
東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内  
(72) 発明者 元 坤  
東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内  
(72) 発明者 横山 正  
東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内  
Fターム(参考) 2B022 AA01 AB20

最終頁に続く

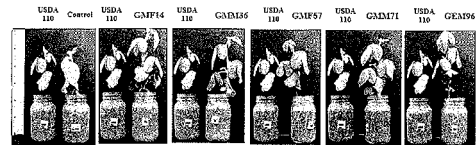
(54) 【発明の名称】新規ダイズ根粒菌、植物生育促進剤、及びダイズ植物の栽培方法

(57) 【要約】

【課題】低温環境においてダイズ植物の根に共生して窒素固定を行う新規なダイズ根粒菌を提供する。

【解決手段】低温条件下においてダイズ植物に根粒を形成し、ブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) 属に分類されるダイズ根粒菌である。

【選択図】図2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

低温条件下においてダイズ植物に根粒を形成し、ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属に分類されるダイズ根粒菌。

## 【請求項 2】

受託番号NITE P-03029、NITE P-03030、NITE P-03031、NITE P-03032及びNITE P-03033で特定されるブラディリゾビウム エスピー (*Bradyrhizobium* sp.) GMF14株、GMM36株、GMF57株、GMM71株及びGEM96株のいずれか又はその変異株であることを特徴とする請求項 1 記載のダイズ根粒菌。

## 【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載のダイズ根粒菌を含む、植物生育促進剤。

## 【請求項 4】

請求項 1 又は 2 記載のダイズ根粒菌若しくは請求項 3 記載の植物生育促進剤をダイズ植物に作用させる、ダイズ植物の製造方法。

## 【請求項 5】

上記ダイズ根粒菌又は上記植物生育促進剤を、上記ダイズ植物の根圏に供給することを特徴とする請求項 4 記載のダイズ植物の製造方法。

## 【請求項 6】

最高気温20 以下の温度環境で上記ダイズ植物を栽培することを特徴とする請求項 4 記載のダイズ植物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ダイズの根に共生して窒素固定を行う新規なダイズ根粒菌 (ブラディリゾビウム *Bradyrhizobium* 属細菌)、当該ダイズ根粒菌を含む植物生育促進剤及び当該ダイズ根粒菌を利用したダイズ植物の栽培方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

窒素固定細菌は作物根圏に緩く共生し、植物体に窒素栄養を供給することで生育促進効果を奏する細菌として知られている。窒素固定細菌のなかでもダイズの根に共生して窒素固定を行うダイズ根粒菌としては、ブラディリゾビウム ジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) やブラディリゾビウム エルカニ (*Bradyrhizobium elkanii*) 等が知られている。

## 【0003】

しかし、これら従来公知のダイズ根粒菌は、低温環境における感染能力が著しく低いため、使用できる温度環境を厳密にコントロールするか、寒冷地を除く土地で使用する必要があった。例えば、特許文献 1 には、低温環境でも共生窒素固定活性が高いヘアリーベッチ根粒菌 (*Rhizobium lecuminosarum*) について記載されている。また、特許文献 2 には、アルファルフアおよびクローバー根粒菌である *Rhizobium meliloti* に属する低温耐性菌について記載されている。

## 【0004】

しかしながら、特許文献 1 に記載された *Rhizobium lecuminosarum* 及び特許文献 2 に記載された *Rhizobium meliloti* のいずれもダイズ根に共生することはできず、ダイズ栽培における接種材として利用することはできない。

## 【0005】

また、非特許文献 1 には、ベネゼイラの土壌から高塩濃度及び高アルミニウムイオン耐性を有するダイズ根粒菌を採知したことが開示されている。しかし、非特許文献 1 で単離されたダイズ根粒菌は、低温条件下においてダイズ根に共生することはできず、低温環境下のダイズ栽培における接種材として利用することはできない。

## 【先行技術文献】

10

20

30

40

50

## 【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特許第4955431号

【特許文献2】国際公開WO1994/025568

## 【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Microbes Environ. Vol. 34, No. 1, 43-58, 2019

## 【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

10

そこで、本発明は、上述したような実情に鑑み、低温環境においてダイズ植物の根に共生して窒素固定を行う新規なダイズ根粒菌、当該ダイズ根粒菌を利用した植物生育促進剤及びダイズ植物の栽培方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上述した目的を達成するため、本発明者らが鋭意検討した結果、ドイズライブニッツ農業景観研究センター周辺の圃場の土壌を分離源として新規なダイズ根粒菌を単離、同定することができた。本発明は、これら新規ダイズ根粒菌が有する窒素固定能に基づいてなされたものである。

【0010】

20

本発明は以下を包含する。

(1) 低温条件下においてダイズ植物に根粒を形成し、ブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) 属に分類されるダイズ根粒菌。

(2) 受託番号NITE P-03029、NITE P-03030、NITE P-03031、NITE P-03032及びNITE P-03033で特定されるブラディリゾビウム エスピー (Bradyrhizobium sp.) GMF14株、GMM36株、GMF57株、GMM71株及びGEM96株のいずれか又はその変異株であることを特徴とする

(1) 記載のダイズ根粒菌。

(3) 上記(1)又は(2)記載のダイズ根粒菌を含む、植物生育促進剤。

(4) 上記(1)又は(2)記載のダイズ根粒菌若しくは上記(3)記載の植物生育促進剤をダイズ植物に作用させる、ダイズ植物の製造方法。

30

(5) 上記ダイズ根粒菌又は上記植物生育促進剤を、上記ダイズ植物の根圏に供給することを特徴とする(4)記載のダイズ植物の製造方法。

(6) 最高気温20 以下の温度環境で上記ダイズ植物を栽培することを特徴とする(4)記載のダイズ植物の製造方法。

## 【発明の効果】

【0011】

本発明に係る新規なダイズ根粒菌は、低温環境下において優れた窒素固定能を有するため、ダイズ植物に対して優れた生育促進作用を示す。したがって、本発明に係るダイズ根粒菌を利用することによって、低温環境下で優れた生育促進作用を有する植物生育促進剤を提供することができる。また、本発明に係るダイズ根粒菌をダイズ植物の栽培に利用することによって、当該ダイズ植物の生育を低温環境下で促進できることとなり、植物製造に係るコストを大幅に低減することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】実施例で使用した18種類の土壌の特徴をまとめた表である。

【図2】ダイズ根粒菌を接種した後に栽培したダイズの地上部を撮像した写真である。

【図3】ダイズ根粒菌を接種した後に栽培したダイズの地上部乾燥重量を測定した結果を示す特性図である。

【図4】ダイズ根粒菌を接種した後に栽培したダイズの根粒乾燥重量を測定した結果を示す特性図である。

50

【図5】ダイズ根粒菌を接種した後に栽培したダイズの地上部を撮像した写真である。

【図6】ダイズ根粒菌を接種した後に栽培したダイズの葉の乾燥重量を測定した結果を示す特性図である。

【図7】ダイズ根粒菌を接種した後に栽培したダイズの根の乾燥重量を測定した結果を示す特性図である。

【図8】ダイズ根粒菌を接種した後に栽培したダイズの根粒の乾燥重量を測定した結果を示す特性図である。

【図9】ダイズ根粒菌を接種した後に栽培したダイズの根粒の数を測定した結果を示す特性図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0014】

<新規ダイズ根粒菌>

本発明に係るダイズ根粒菌は、ブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) 属に分類され、低温環境下でダイズ植物の根部に共生する細菌である。ここで、窒素固定能とは、気体の窒素分子 ( $N_2$ ) をアンモニアに変換する能力を意味する。本発明に係るダイズ根粒菌は、窒素固定能を有するために、根圏に生息することによって植物に窒素を供給することができる。

【0015】

窒素固定能については、いわゆるアセチレン還元法を用いて評価することができる。アセチレン還元法は、窒素固定を担うニトロゲナーゼがアセチレン等の窒素原子間の三重結合を有する化合物を還元する反応に基づいている。具体的に、アセチレン還元法では、アセチレンと根粒とを反応させ、エチレンの生成量を測定する。アセチレン還元法では、エチレンの生成量が多いほど、根粒菌による窒素固定能が高いと判断する。

【0016】

なお、窒素固定能については、例えば、窒素安定同位体自然存在比 ( $^{15}N$ 値) を用いて評価することもできる。 $^{15}N$ 値は元素分析計を接続した質量分析計を用いて測定することができる。この方法は、土壌における $^{15}N$ の自然存在比が高いために土壌由来窒素の原子量は重くなるのに対して、空気中における $^{15}N$ の自然存在比が低いために空気由来窒素の原子量は軽くなるという原理に基づいている。すなわち、化学肥料由来の窒素や微生物による窒素固定で供給された窒素は、土壌中に存在する土壌由来の窒素原子より原子量が軽くなる。そのため、化学窒素肥料や微生物による窒素固定で供給された窒素を蓄積した植物体は、原子量の軽い窒素を多く含むこととなる。一方、土壌由来の窒素を吸収した植物体は、原子量の高い窒素を多く含むこととなる。したがって、供試微生物を植物体の根圏に生息させた後、当該植物体の $^{15}N$ 値を測定することによって、微生物における窒素固定能を評価することができる。

【0017】

また、低温環境下でダイズ植物の根圏に共生するとは、例えば、栽培環境における最高気温が25 以下、好ましくは20 以下、より好ましくは18 以下、更に好ましくは17 以下といった低温条件下において、ダイズに対して根粒を形成することを意味する。すなわち、所定の細菌が低温環境下でダイズ植物の根圏に共生するか否かは、微生物として当該細菌のみを含む土壌を使用して上記低温条件下でダイズ植物を栽培し、栽培したダイズ植物における根粒の有無を確認する。根粒が形成されている場合には、供試した細菌が低温環境下でダイズ植物の根圏に共生する能力を有すると判断できる。

【0018】

本発明者らは、このような手法によってドイズライブニッツ農業景観研究センター周辺の圃場の土壌からブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) 属に分類され、低温環境下でダイズ植物の根部に共生する新規なダイズ根粒菌を複数単離している。本発明者は、これらのうち5つの新規ダイズ根粒菌をそれぞれブラディリゾビウム エスピー (Bradyrhizobi

10

20

30

40

50

um sp.) GMF14株、GMM36株、GMF57株、GMM71株及びGEM96株と命名し、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（NITE特許微生物寄託センター：〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に2019年9月26日付けで、それぞれ受託番号NITE P-03029、NITE P-03030、NITE P-03031、NITE P-03032及びNITE P-03033として寄託している。

【0019】

本発明に係るダイズ根粒菌は、当該受託番号NITE P-03029、NITE P-03030、NITE P-03031、NITE P-03032又はNITE P-03033で特定されるブラディリゾビウム エスピー（*Bradyrhizobium* sp.）GMF14株、GMM36株、GMF57株、GMM71株及びGEM96株並びに、当該GMF14株、GMM36株、GMF57株、GMM71株又はGEM96株と同一の株に分類され、且つ低温条件下で窒素固定能を有するブラディリゾビウム（*Bradyrhizobium*）属細菌に微生物を含むこととなる。

10

【0020】

また、受託番号NITE P-03029、NITE P-03030、NITE P-03031、NITE P-03032及びNITE P-03033で特定されるブラディリゾビウム（*Bradyrhizobium*）属細菌は、それぞれ配列番号1～5に示す塩基配列を含む16SrDNAを有している。したがって、本発明に係るダイズ根粒菌は、配列番号1～5に示す塩基配列のいずれかに対して95%以上、好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の相同性を有する塩基配列を含む16SrDNAを有するブラディリゾビウム（*Bradyrhizobium*）属細菌であって、低温条件下で窒素固定能を有する細菌を含むこととなる。

【0021】

さらに、受託番号NITE P-03029、NITE P-03030、NITE P-03031、NITE P-03032及びNITE P-03033で特定されるブラディリゾビウム（*Bradyrhizobium*）属細菌は、それぞれ配列番号6～10に示す塩基配列を含むrecA遺伝子を有している。したがって、本発明に係るダイズ根粒菌は、配列番号6～10に示す塩基配列のいずれかに対して95%以上、好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の相同性を有する塩基配列を含むrecA遺伝子を有するブラディリゾビウム（*Bradyrhizobium*）属細菌であって、低温条件下で窒素固定能を有する細菌を含むこととなる。

20

【0022】

さらにまた、受託番号NITE P-03029、NITE P-03030、NITE P-03031、NITE P-03032及びNITE P-03033で特定されるブラディリゾビウム（*Bradyrhizobium*）属細菌は、それぞれ配列番号11～15に示す塩基配列を含むatpD遺伝子を有している。したがって、本発明に係るダイズ根粒菌は、配列番号11～15に示す塩基配列のいずれかに対して95%以上、好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の相同性を有する塩基配列を含むatpD遺伝子を有するブラディリゾビウム（*Bradyrhizobium*）属細菌であって、低温条件下で窒素固定能を有する細菌を含むこととなる。

30

【0023】

<植物生育促進剤>

本発明に係るダイズ根粒菌における低温条件下における窒素固定能を利用することによって、植物に栄養窒素を供給することができる。すなわち、本発明に係るダイズ根粒菌は低温環境下において使用可能な植物生育促進剤として使用することができる。ここで、低温環境とは、例えば、栽培環境における最高気温が25 以下、好ましくは20 以下、より好ましくは18 以下、更に好ましくは17 以下である環境とすることができる。

40

【0024】

本発明に係るダイズ根粒菌を植物生育促進剤として利用する場合、例えば、以下に例示列挙するような培地を使用して適切な条件下で培養する。すなわち、使用可能な培地としては、ブラディリゾビウム（*Bradyrhizobium*）属細菌を培養可能な従来公知の培地を特に制限することなく使用することができる。例えば、Yeast extract-mannitol agar (YMA) 培地（1Lの容量に対して、Yeast extract 0.4g、Mannitol 10g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.38g、MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2g、NaCl 0.1g及びAgar 15g）等を使用することができる。また、培養条件としては、培養温度を20～30度、好ましくは28度とすることができ、培地pHは6.8が望ましい。

【0025】

50

以上のように培養された本発明に係るダイズ根粒菌を植物生育促進剤とする場合、本発明に係るダイズ根粒菌を単独で使用しても良いが、当該ダイズ根粒菌と他の任意成分とを配合して特定の製剤としてもよい。製剤の形態としては、例えば、液剤、粉剤、粒剤、乳剤、油剤、懸濁剤、水和剤、水溶剤、粒剤、ペースト剤、カプセル剤、煙霧剤（エアゾール剤）等を挙げることができる。

#### 【0026】

他の任意配合としては、例えば、液体担体や固体担体等のダイズ根粒菌を担持するための担体、乳化剤、分散剤、消泡剤、補助剤等が挙げられる。液体担体としては、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、生理食塩水等が挙げられる。固体担体としては、カオリン、粘土、タルク、ベントナイト、チョーク、石英、アタパルジャイト、モンモリロナイト、ホワイトカーボン、珪藻土等の天然鉱物粉末、ケイ酸、アルミナ、ケイ酸塩等の合成鉱物粉末、チャコール、結晶性セルロース、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等の高分子性天然物が挙げられる。また、固体担体としては、例えば、パーミキュライト、ケイ砂、雲母、軽石、石こう、炭酸カルシウム、ドロマイト、マグネシウム、消石灰、リン石灰、ゼオライト、硫安などの無機物質を使用しても良い。また、固体担体としては、例えば、コンポスト、ピート、籾殻、糠、大豆粉、タバコ粉、クルミ粉、小麦粉、木粉、でんぷん、結晶セルロースなどの植物性有機物質を使用しても良い。さらに、固体担体としては、クマロン樹脂、石油樹脂、アルキド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリアルキレングリコール、ケトン樹脂、エステルガム、コーパルガム、ダンマルガムなどの合成または天然の高分子化合物や、カルナバロウ、蜜ロウなどのワックス類及び尿素類等を使用しても良い。

10

20

#### 【0027】

本発明に係る植物成長促進剤のダイズ根粒菌の含有量は、特に限定されないが、 $10^7 \sim 10^8$  cfu/mlとすることができる。

#### 【0028】

一方、上述のように構成された植物生育促進剤は、特にダイズ植物ダイズ(*Glycine max*)の根圏に供給されることでダイズ植物の生育を促進する。但し、本発明に係る植物生育促進剤は、ダイズ以外の植物に対して利用され、ダイズ以外の植物の生育促進のために使用しても善い。ダイズ以外の植物としては、特に限定されないが、例えば、マメ科に属する植物（下記参照）が挙げられるが、これらの植物に限定されるものではない。マメ科植物としては、エンドウ (*Pisum sativum*)、ソラマメ (*Vicia faba*)、フジ (*Wisteria floribunda*)、ラッカセイ (*Arachis hypogaea*)、ミヤコグサ (*Lotus corniculatus* var. *japonicus*)、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*)、アズキ (*Vigna angularis*) 及びアカシア (*Acacia*) 等をあげることができる。特に、本発明に係る植物生育促進剤は、ダイズ、アズキ等に使用することが好ましい。

30

#### 【0029】

また、Mitchell Andrews et al., J. Mol. Sci. 2017, 18, 705に開示されるようにブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属細菌が感染しうる植物として以下を列挙することができる。すなわち、ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属細菌が感染しうる植物としては、アカシア・アウリカリフォルミス (*Acacia auriculiformis*)、アカシア・マンギウム (*Acacia mangium*)、アカシア・マンギウム × アカシア (*Acacia mangium* × *A. auriculiformis*)、アカシア・メラノキシロン (*Acacia melanoxylon*)、アカシア・サルグナ (*Acacia saligna*)、エスキノメネ・アフラスペラ (*Aeschynomene afraspera*)、エスキノメネ・アメリカーナ (*Aeschynomene americana*)、エスキノメネ・シリアタ (*Aeschynomene ciliata*)、エスキノメネ・エラフロキシロン (*Aeschynomene elaphroxylon*)、エスキノメネ・インディカ (*Aeschynomene indica*)、エスキノメネ・ルディス (*Aeschynomene rudis*)、エスキノメネ・スカブラ (*Aeschynomene scabra*)、エスキノメネ・センシティブ (*Aeschynomene sensitiva*)、エスキノメネ・シンペリ (*Aeschynomene shimperei*)、アモルファ・フルティコサ (*Amorpha fruticosa*)、アンフィカルパエア・ブラクレアタ (*Amphicarpaea bracteata*)、アンフィカルパエア・エジウオルティ (*Amphicarpaea edgeworthii*)、アラキス・デュラネンシス (*Arachis duranensis*)、アラキス・ヒボ

40

50

ガイア (*Arachis hypogaea*)、アスパラサス・リネアリス (*Aspalathus linearis*)、カ  
 ヤヌス・カジャン (*Cajanus cajan*)、カラガナ・インターメディア (*Caragana intermed  
 ia*)、セントロロビウム・パラエンセ (*Centrolobium paraense*)、セントロセマ・パセ  
 カオラム (*Centrosema pascuorum*)、セントロセマ・パベセンス (*Centrosema pubescens*  
 )、クロタラリア・コモサ (*Crotalaria comosa*)、クロタラリア・ハイソピフォリア (*C  
 rotalaria hyssopifolia*)、クロタラリア・ララチロイデス (*Crotalaria lathyroides*)  
 、クロタラリア・パリダ (*Crotalaria pallida*)、シチサス・アエオリカス (*Cytisus ae  
 olicus*)、シチサス・バランサエ (*Cytisus balansae*)、シチサス・ラバーナム (*Cytisu  
 s laburnum*)、シチサス・マルチフロラス (*Cytisus multiflorus*)、シチサス・プロリ  
 フェラス (*Cytisus proliferus*)、シチサス・パーガンズ (*Cytisus purgans*)、シチサ  
 ス・スコパリウス (*Cytisus scoparius*)、シチサス・ストリアタス (*Cytisus striatus*  
 )、シチサス・ビロサス (*Cytisus villosus*)、ダルベルギア・バローニ (*Dalbergia ba  
 roni*)、ダルベルギア・ルーベリ (*Dalbergia louveli*)、ダルベルギア・マダガスカリ  
 エンシス (*Dalbergia madagascariensis*)、ダルベルギア・マリティマ (*Dalbergia mari  
 tima*)、ダルベルギア・モンティコラ (*Dalbergia monticola*)、ダルベルギア・ブルブ  
 ラセン (*Dalbergia purpurascens*)、ダルベルギア sp. (*Dalbergia sp.*)、デスモジウ  
 ム・コーディタム (*Desmodium caudatum*)、デスモジウム・エレガンス (*Desmodium eleg  
 ans*)、デスモジウム・ファラクス (*Desmodium fallax*)、デスモジウム・ガンゲティカ  
 ム (*Desmodium gangeticum*)、デスモジウム・ヘテロカルパン (*Desmodium heterocarpan*  
 )、デスモジウム・マイクロフィラム (*Desmodium microphyllum*)、デスモジウム・ラセモ  
 サム (*Desmodium racemosum*)、デスモジウム・セクアックス (*Desmodium sequax*)、デ  
 スモジウム・トリフロラム (*Desmodium triflorum*)、ファイデルビア・アルビダ (*Faidh  
 erbia albida*)、ジェニスタ・ヒステリック (*Genista hystrix*)、ジェニスタ・ステノ  
 ペチュラ (*Genista stenopetula*)、ジェニスタ・ベルシカラー (*Genista versicolor*)  
 、グリシン・マックス (*Glycine max*)、グリシン・ソジャ (*Glycine soja*)、インディ  
 ゴフェラ・アストラガリナ (*Indigofera astragalina*)、インディゴフェラ・ヒルスタ (*I  
 ndigofera hirsuta*)、インディゴフェラ・セネガセンシス (*Indigofera senegalensis*  
 )、インディゴフェラ・ティンクトリア (*Indigofera tinctoria*)、インガ・エデュリス  
 (*Inga edulis*)、インガ・ラウリナ (*Inga laurina*)、クンメロピア・スティブラセア  
 (*Kummerowia stipulacea*)、クンメロピア・ストリアタ (*Kummerowia striata*)、ラブ  
 ラブ・パーブレウス (*Lablab purpureus*)、レスペデザ・バイカラー (*Lespedeza bicolo  
 r*)、レスペデザ・カピタータ (*Lespedeza capitata*)、レスペデザ・クネアータ (*Lespe  
 deza cuneata*)、レスペデザ・ダウリカ (*Lespedeza daurica*)、レスペデザ・ジュンセ  
 ア (*Lespedeza juncea*)、レスペデザ・プロカンベンス (*Lespedeza procumbens*)、レス  
 ペデザ・スティブラセア (*Lespedeza stipulacea*)、レスペデザ・ストリアタ (*Lespedeza  
 striata*)、ロトノニス sp (*Lotononis sp.*)、ロータス・ウリギノサス (*Lotus uligino  
 sus*)、ルピナス・アルベセンス (*Lupinus albescens*)、ルピナス・アルバス (*Lupinus  
 albus*)、ルピナス・アングスティフォリウス (*Lupinus angustifolius*)、ルピナス・ル  
 テウス (*Lupinus luteus*)、ルピナス・マリアエ-ジョセファエ (*Lupinus mariae-joseph  
 ae*)、ルピナス・ミクランサス (*Lupinus micranthus*)、ルピナス・モンタナス (*Lupinu  
 s montanus*)、ルピナス・ポリフィラス (*Lupinus polyphyllus*)、ルピナス sp (*Lupinu  
 s sp.*)、マイクロロビウス・フォエティダス (*Microlobius foetidus*)、ミレティア・レ  
 ウカンサ (*Milletia leucantha*)、ミモザ・プディカ (*Mimosa pudica*)、ネオノトニア  
 ・ウエイティ (*Neonotonia wightii*)、オーニトプス・コンプレサス (*Ornithopus compr  
 essus*)、オーニトプス・サティバス (*Ornithopus sativus*)、パキリヒス・エロサス (*P  
 achyrhizus erosus*)、パキリヒス・フェラギネウス (*Pachyrhizus ferrugineus*)、パキ  
 リヒス・ツベロス (*Pachyrhizus tuberosus*)、ファセオラス・ルナタス (*Phaseolus lun  
 atus*)、ファセオラス・バルガリス (*Phaseolus vulgaris*)、プロソピス・アルバ (*Pros  
 opis alba*)、ソラレア・ピンナタ (*Psoralea pinnata*)、プテロカルプス・インディカ  
 ス (*Pterocarpus indicus*)、プテロカルプス・オフィシナリス (*Pterocarpus officinal*

is)、プエラリア・パセオロイデス (*Pueraria phaseoloides*)、レタマ・モノスペルマ (*Retama monosperma*)、レタマ・レイタム (*Retama raetam*)、レタマ・スファエロカルパ (*Retama sphaerocarpa*)、リンコシア・ミニマ (*Rhynchosia minima*)、リンコシア・トッタ (*Rhynchosia totta*)、セスバニア・ロストラタ (*Sesbania rostrata*)、ソフォラ・フラベセンス (*Sophora flavescens*)、スパルチアム・ジュンセラム (*Spartium junceum*)、ストリフェノデンドロン sp (*Stryphnodendron sp.*)、テフィロシア・カペンシス (*Tephrosia capensis*)、テフィロシア・ファルシフォルミス (*Tephrosia falciformis*)、テフィロシア・パープレア (*Tephrosia purpurea*)、テフィロシア・ビローサ (*Tephrosia villosa*)、トリフォリウム・ファギフェラス (*Trifolium fragiferum*)、トリフォリウム・レペンス (*Trifolium repens*)、ユレックス・ユーロパエウス (*Ulex europaeus*)、ヴァケリア・ヌビカ (*Vachellia nubica*)、ヒグナ・アンギュラリス (*Vigna angularis*)、ヒグナ・ラジアータ (*Vigna radiata*)、ヒグナ・シネンシス (*Vigna sinensis*)、ヒグナ・サブテラナエ (*Vigna subterranea*)、ヒグナ・アンガイカラタ (*Vigna unguiculata*)、キシリア・キシロカルパ (*Xylocarpa xylocarpa*) 及びゾロニア・グロキディアタ (*Zornia glochidiata*) を挙げることができる。

10

#### 【実施例】

#### 【0030】

以下、実施例を用いて本発明を更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 【0031】

20

#### 〔実施例1〕

#### (ダイズ根粒菌の分離)

2017年11月に、ドイツライプニッツ農業景観研究センター周辺の18か所の圃場から採取した土壌を、植物防疫所の手続きを経て、日本に同年12月に輸入した。これら18か所の圃場の情報を図1にまとめた。これら土壌からの根粒菌の分離は下記の手順で行った。ダイズは日本及び欧州の代表的な品種であるエンレイ及びメルリンを用いた。エンレイ及びメルリンはそれぞれ以下のような特徴を有する。なお、エンレイは日本の代表的な品種であり、外観品質がよく広域適応性の高い中生種である。エンレイはタンパク質含有率が高く豆腐加工に好適で、味噌加工にも適している。メルリンは中央欧州で広く用いられている早熟性の品種である。エンレイと比較すると低温耐性はあるが、タンパク質含有率は低く、家畜飼料として用いられている。

30

#### 【0032】

#### <<手順>>

1. ダイズ種子の表面を70%エタノールで1分間、続いて3%次亜塩素酸で2分間殺菌した。
2. 速やかに滅菌蒸留水で繰り返し8回洗浄し、次亜塩素酸を十分に洗い流した。
3. 表面殺菌したダイズ種子を暗黒下で20℃、3日培養し、発芽させた。
4. オートクレーブで滅菌したパーミキュライト (ヒルイシ化学社製、Hirukon S) を300mlのガラス瓶に詰め、さらに上記土壌5gを全体に混合し、滅菌した窒素を含まない植物培養液で湿らせた。
5. 上記3.で発芽処理したダイズ種子を上記4.で調製した培地に深さ約1cmで播種した。
6. ダイズ植物を25℃、16時間明、8時間暗の光条件で28日間栽培した。
7. 根に着生した根粒表面を70%エタノールで1分間、続いて3%次亜塩素酸で2分間殺菌した。
8. 上記7.で殺菌した根粒を、1個の根粒あたり0.5 mlの15%グリセロール溶液中でつぶし、懸濁液をYeast extract-mannitol (YEM)平面培地上に塗布した。
9. 30℃、暗条件のインキュベーター内で3~7日間培養した。
10. 根粒菌の単一コロニーを取り、新しいYEM培地に移し替えた。

40

#### 【0033】

上記10.においてYEM培地に塗布した単一コロニーを4、15、28、37又は44℃の各温度下で7~14日培養した。その結果、18種類の異なる土壌サンプルから77種類のダイズ根粒

50



菌を得ることができ、その中でも15以下で生育できる5つの根粒菌を単離することができた。これら5つの根粒菌をGMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96と命名した。これらGMF14とGMF57は4という低温でも増殖できる根粒菌であることがわかった。また、これら全ての根粒菌は、44では増殖できず、37で増殖できることがわかった。

## 【0034】

(分離したダイズ根粒菌の同定)

分離した5つの根粒菌GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96の全ゲノムDNAをDNA抽出キット(プロメガ社製、Wizard(登録商標) Genomic DNA Purification Kit)を用いてそれぞれ抽出した。抽出したゲノムDNAを鋳型として、分離した根粒菌の16SrRNA遺伝子、*recA*遺伝子及び*atpD*遺伝子のほぼ全領域をPCRで増幅した。なお、16SrRNA遺伝子、*recA*遺伝子及び*atpD*遺伝子を増幅するためのユニバーサルプライマーの塩基配列を表1に示した。

## 【0035】

## 【表1】

ターゲット遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	配列番号
16S rRNA	16AF	AACTGAAGAGTTTGATCMTGGCTCAG	配列番号16
	1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT	配列番号17
<i>recA</i>	<i>recAF</i>	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA	配列番号18
	<i>recAR</i>	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT	配列番号19
<i>atpD</i>	<i>atpDF</i>	SCTGGGSCGYATCMTGAACGT	配列番号20
	<i>atpDR</i>	GCCGACACTTCCGAACCGCCTG	配列番号21
<i>nodD</i>	<i>nodDF</i>	TTATGGCCCCGACATCCGTTCCGAC	配列番号22
	<i>nodDR</i>	CCAACTATGAGAGGCGGGATCAT	配列番号23
<i>nifH</i>	<i>nifHF</i>	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA	配列番号24
	<i>nifHR</i>	AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA	配列番号25

## 【0036】

また、各遺伝子についてPCRの温度サイクル条件を表2に示した。

## 【0037】

## 【表2】

ターゲット遺伝子	PCR温度サイクル
16S rRNA	3min 95°C, 30×(1min 94°C, 45s 54°C, 2min 72°C), 7min 72°C
<i>recA</i>	5min 95°C, 35×(45s 94°C, 1min 40°C, 90s 74°C), 5min 74°C
<i>atpD</i>	3min 95°C, 35×(45s 94°C, 1min 55°C, 90s 72°C), 5min 72°C
<i>nodD</i>	5min 95°C, 30×(1min 94°C, 2min 55°C, 3min 72°C), 5min 72°C
<i>nifH</i>	2min 95°C, 35×(30s 95°C, 30s 57°C, 1min 72°C), 5min 72°C

## 【0038】

PCR産物はアガロースゲル電気泳動を行い、ニッポンジーン社製FastGene Gel/PCR Extractionキットにより精製後、ユーロフィンジェノミクス社のDNAシーケンス解析により塩基配列を決定した。そして、得られた塩基配列情報を用いてMultilocus sequence (MLSA)解析を行った。MLSA解析では、決定した16SrRNA遺伝子、*recA*遺伝子及び*atpD*遺伝子の

塩基配列を合わせ、GenBankに登録されている既存の塩基配列と比較する方法を採用した。この方法により、GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96は、既存の菌株の中ではBradyrhizobium sp. VAF1269と最も相同性が高く、Bradyrhizobium sp.と同定された。ただし、比較した全ての塩基配列は100%一致ではなかったため、既存のBradyrhizobium sp. VAF1269とは異なる新規のBradyrhizobium sp.株であることが明らかとなった。

【0039】

なお、本実施例で決定したGMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96における16SrRNA遺伝子、recA遺伝子及びatpD遺伝子の塩基配列に関する配列番号を表3にまとめて示した。

【0040】

【表3】

	16SrRNA 遺伝子	recA 遺伝子	atpD 遺伝子
GMF14	配列番号 1	配列番号 6	配列番号 1 1
GMM36	配列番号 2	配列番号 7	配列番号 1 2
GMF57	配列番号 3	配列番号 8	配列番号 1 3
GMM71	配列番号 4	配列番号 9	配列番号 1 4
GEM96	配列番号 5	配列番号 1 0	配列番号 1 5

【0041】

以上、本実施例では、18種類の異なる土壌サンプルから、GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96を含む77種類のダイズ根粒菌を分離したが、そのうち71%がブラディリゾビウム属と同定され、29%がリゾビウム属と同定された。

【0042】

また、GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96について、nodD遺伝子及びnifH遺伝子の塩基配列を比較分析したところ、有意な違いは示されなかった。この結果から、GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96における共生遺伝子が1つのタイプのみに属することが示唆された。なお、nodD遺伝子は根粒を形成する際に働くタンパク質をコードし、nifHは窒素固定を担う酵素であるニトロゲナーゼタンパク質をコードしている。

【0043】

本実施例で単離したBradyrhizobium sp. GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96は、上記MLSA解析の結果と、低温条件下でダイズに根粒を形成する点で公知のBradyrhizobium sp. VAF1269 (Microbes Environ. Vol. 34, No. 1, 43-58, 2019)とは異なる新規株である判定した。本実施例で単離したBradyrhizobium sp. GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (NITE特許微生物寄託センター：〒292-0818千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に2019年9月26日付けで受託番号NITE P-03029、NITE P-03030、NITE P-03031、NITE P-03032及びNITE P-03033としてそれぞれ寄託した。

【0044】

〔実施例2〕

本実施例では、実施例1で単離・同定したBradyrhizobium sp. GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96について、低温条件下におけるダイズポッド栽培での根粒菌接種試験を行った。なお、本実施例では、コントロールとして既知のモデル根粒菌であるBradyrhizobium USDA110株を使用した。

【0045】

本実施例では、まず、ダイズ品種メルリンの種子を、実施例1の<<手順>>と同様に表面殺菌し、その後、発芽処理を行った。発芽種子は、実施例1と同様に滅菌したパーミキュライトを詰めて無窒素水耕液で締めさせた300mlガラスポッドに播種した。その際、2mlの根粒菌培養液 ( $10^7$ の菌数を含む)を、播種した箇所にかけることにより接種した。ダイズは温度及び光を、16時間20 明、8時間10 暗の低温条件で約6週間栽培した。この低温条件は、ドイツ北部の5月の最高気温と最低気温にあたる。5月はダイズ初期成育の時期

10

20

30

40

50

である。

【 0 0 4 6 】

Bradyrhizobium sp. GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96を接種したダイズと、Bradyrhizobium USDA110株を接種したダイズの地上部を撮像した写真を図2に示し、ダイズ地上部の乾燥重量を測定した結果 (n=3) を図3に示した。なお、図2及び3におけるコントロール (Control) はダイズ根粒菌非接種のダイズである。さらに、Bradyrhizobium sp. GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96を接種したダイズと、Bradyrhizobium USDA110株を接種したダイズについて、根粒の乾燥重量を測定した結果 (n=3) を図4に示した。

【 0 0 4 7 】

これら図2～4に示すように、実施例1で単離・同定したBradyrhizobium sp. GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96は、低温条件においてダイズに対して根粒を形成することができ、地上部バイオマスを増大させる効果を有することが明らかとなった。

10

【 0 0 4 8 】

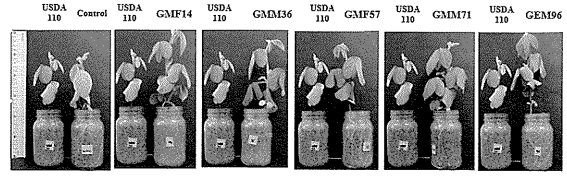
また、比較のためにBradyrhizobium sp. GMF14、GMM36、GMF57、GMM71及びGEM96と系統が比較的近いBradyrhizobium sp. VAF1269 (Microbes Environ. Vol. 34, No. 1, 43-58, 2019) についても、同様に低温条件下におけるダイズに対する接種試験を行った。Bradyrhizobium sp. GMF14、GMM36、GMF57及びGMM71を接種したダイズと、Bradyrhizobium USDA110株を接種したダイズと、Bradyrhizobium sp. VAF1269を接種したダイズの地上部を撮像した写真を図5に示し、葉の乾燥重量を測定した結果を図6に示し、根の乾燥重量を図7に示し、根粒の乾燥重量を図8に示し、根粒の数を図9に示した。その結果、Bradyrhizobium sp. VAF1269は、本実施例に使用したメルリン品種に対して根粒着生が悪く、根粒の乾燥重が低いことがわかった。なお、それにも関わらず、Bradyrhizobium sp. VAF1269を接種したところ葉と根の乾燥重が増加していた。この結果は、Bradyrhizobium sp. VAF1269の共生により窒素固定ではなく、その他の成長促進効果 (ホルモンの分泌など) によるものと考えられた。この結果から、Bradyrhizobium sp. VAF1269は、低温条件下ではダイズに根粒を形成できず、窒素固定活性を上げるものではないと結論付けた。

20

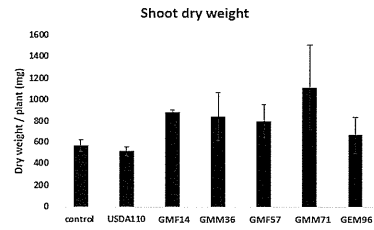
【 図 1 】

土壌サン プルNo.	採取場所	採取日	経度 X	緯度 Y	土壌 pH	クレ イ ト ン 率 (%)	シルト 率 (%)	砂 率 (%)	陽射時間	DAYS栽培	pH
1	Scheidehof	2017/11/20	14.060	52.505	54	27	49	25	アブラナ - 冬小麦	No	7.0 ± 0.15
2	Dedlow	2017/1/19	13.8016	53.3696	45	10	32	58	冬小麦 - トウモロコシ - トウモロコシ	No	6.9 ± 0.05
3	Paulheim	2017/1/22	12.6689	52.6474	45	9	20	72	冬小麦 - アブラナ - 冬小麦 - 冬小麦	No	6.8 ± 0.02
4	Nossen	2017/1/17	13.2693	51.0567	63	16	81	4	冬小麦 - シャガイモ	No	6.5 ± 0.06
5	Kollisch	2017/1/17	13.0942	51.5136	64	14	34	52	冬小麦 - アブラナ - トウモロコシ - 冬小麦 - アブラナ - トウモロコシ	No	6.6 ± 0.02
6	Gömbach	2017/1/28	9.5381	51.9029	75	15	77	9	冬小麦 - 冬小麦 - トウモロコシ	No	6.8 ± 0.02
7	Schneig	2017/1/28	10.8320	52.9016	25	3	5	93	花 - 作物	No	6.0 ± 0.18
8	Müncheberg	2017/1/20	14.1274	52.5156	29	4	10	86	花 - 花 - 花	No	6.4 ± 0.07
9	Müncheberg	2017/1/20	14.1287	52.5205	30	4	10	86	冬小麦 - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ	No	6.7 ± 0.07
10	Müncheberg	2017/1/20	14.1227	52.5185	30	4	10	86	冬小麦 - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ	2014	6.8 ± 0.06
11	Müncheberg	2017/1/20	14.1281	52.5214	30	4	10	86	冬小麦 - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ	2015	6.5 ± 0.06
12	Müncheberg	2017/1/20	14.1326	52.5227	30	4	10	86	冬小麦 - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ	2016	6.1 ± 0.03
13	Müncheberg	2017/1/20	14.1340	52.5223	30	4	10	86	冬小麦 - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ - トウモロコシ - アブラナ	2017	6.3 ± 0.04
14	Felchow	2017/1/29	14.2504	51.8359	27	5	15	80	冬小麦 - トウモロコシ	2013	6.6 ± 0.02
15	Felchow	2017/1/29	14.2759	51.8526	27	5	15	80	冬小麦 - トウモロコシ - トウモロコシ - トウモロコシ	2014	6.3 ± 0.02
16	Felchow	2017/1/29	14.2720	51.8293	43	5	15	80	冬小麦 - トウモロコシ - トウモロコシ - トウモロコシ	2015	6.3 ± 0.02
17	Felchow	2017/1/29	14.2782	51.8543	31	5	15	80	冬小麦 - トウモロコシ - トウモロコシ - トウモロコシ	2016	6.4 ± 0.02
18	Felchow	2017/1/29	14.2412	51.8362	36	5	15	80	冬小麦 - トウモロコシ - トウモロコシ - トウモロコシ	2017	6.3 ± 0.01

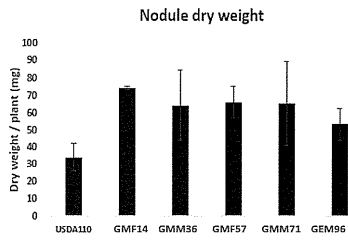
【 図 2 】



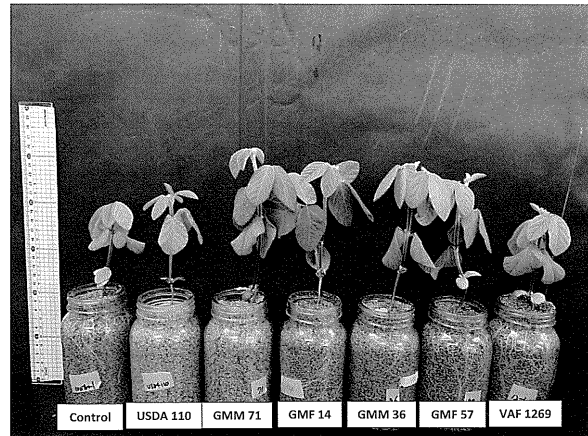
【 図 3 】



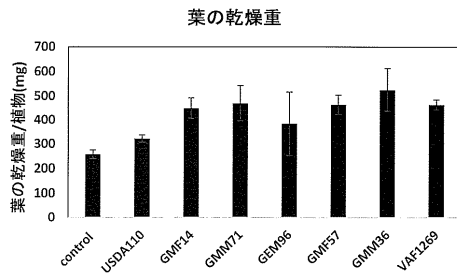
【 図 4 】



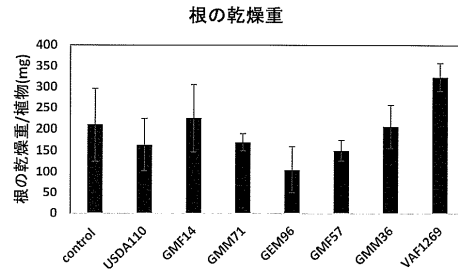
【 図 5 】



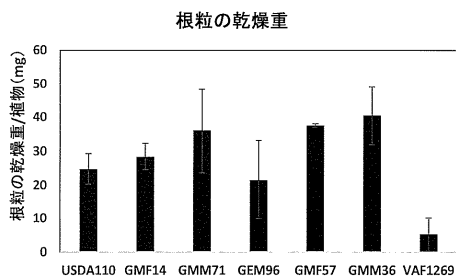
【 図 6 】



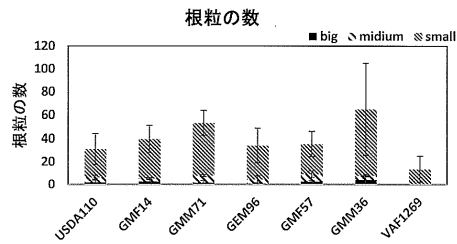
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2021090395000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 0 1 N	63/00	(2020.01)	A 0 1 N	63/00	Z N A F	
A 0 1 P	21/00	(2006.01)	A 0 1 P	21/00		

Fターム(参考) 2B030 AB03 AD06 CA28 CB02  
4B065 AA01X AC03 CA53  
4H011 AB03 BB23 DD03