

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2019～2021

課題番号：19KT0011

研究課題名(和文) 根圏生態系の季節変動から紐解く二毛作体系の生物学的な持続性

研究課題名(英文) Biological sustainability of double-cropping supported by seasonal change in root microbiome

研究代表者

谷 明生 (Tani, Akio)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：00335621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では岡山県を含む日本の西南暖地で古くから行われてきたイネ・ムギの二毛作における高い土地利用効率と持続性を説明するために微生物機能に注目し、3年間にわたり研究所圃場における微生物群集構造を含む圃場環境のデータ化に取り組んだ。その結果、イネ・オオムギにおけるそれぞれ特異的な微生物群集構造が3年間にわたり維持されること、根・根圏土壌・土壌のサンプルにそれぞれ異なる微生物が存在すること、肥料の有無によってもその構造が変わることなどを明らかにした。土壌のイオンについても施肥の影響は大きく出ていることがわかった。これらの情報から持続的な農業の確立のために必要な基礎的な生物学的知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二毛作は高い土地生産性を誇るがその持続性を説明できる生物学的要因は必ずしも明らかではない。本研究では3年間にわたり二毛作圃場において施肥の有無、品種の違い、根、根圏土壌、土壌の各部位についての根圏微生物叢の構造を解析し、微生物機能からの説明を試みた。品種の違いは微生物群集構造にあまり影響しなかったが、施肥と部位は大きく影響を与えていた。またシーズン(イネ、オオムギ)により微生物叢は再構築されていた。これらの解析から、各要因に左右される微生物のそれぞれのニッチが明らかになり、持続的農業の確立に向けた基礎データとして貢献できる。今後は主要な微生物の分離と特徴の解明、実際の利用へと展開する。

研究成果の概要(英文)：We focused on the microbial functions to explain sustainability of rice-barley double cropping, which has been utilized for long in west-south part of Japan including Okayama. We visualized the field environmental factors including microbiome structure of three years in the experimental fields. 16S rRNA amplicon sequencing analysis of 2400 samples was done for the soil, rhizosphere soil, and root samples of two different rice and barley cultivars (total 4 cultivars) grown in the fertilized and non-fertilized fields. The microbiome structures that have different structures depending on the part of samples (root, rhizosphere, and soil) were distinct between rice and barley that repeated well in three years, and they were also affected by fertilization. Soil solutes analysis also revealed that it is affected by fertilization. Also we got data of wild plant species and physicochemical factors. These data serves as a basis to develop sustainable agriculture.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物叢 農業 植物微生物相互作用

1. 研究開始当初の背景

作物の生育や収量はその遺伝子型に規定された表現型に依存する。降雨や温度といった環境要因は作物の表現型に影響を与え、または直接的に収量にも影響する。一方、施肥などの人為的な介入も環境に影響を与え、収量に影響する。さらに、人為的介入や作物の表現型、環境など全ての要因は植物と共生する微生物の組成や機能に影響する。これらの要因の様々な相互作用の結果、作物の収量は規定されると考えられる。肥料の供給不安や環境変動などの背景から、微生物叢の機能解明は持続的農業を支える上で益々重要になることが予想されている。

岡山県を含む日本の西南暖地では、古くから同じ耕地でイネとムギを栽培する二毛作が営まれている。その歴史は少なくとも鎌倉時代迄遡り、地力低下や連作障害などの問題に経験的に対処しながら高い土地利用効率を実現してきた。二毛作体系は、西南暖地の環境に適応した持続的農業生産体系と捉えることが出来るが、その持続性の基盤要因は生物学的には殆ど理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では、四半世紀以上にわたってイネ・オオムギ二毛作体系を継続する岡山大学資源植物科学研究所の慣行栽培区(施肥区)および無施肥区実験圃場を二毛作体系の農業生態系モデルとして位置づけ、根圏土壌を中心とした計測可能な様々な生物及び非生物的要素の通年定点観測を通して根圏生態系のデータ化に取り組む。複数年にわたる二つのデータセットの比較により、特に無施肥区の**持続的生産性に関わる要因を探索する事**を目的とする。一連の研究を通じて、西南暖地に根付いた農業体系である二毛作の科学的基盤を明らかにし、持続的**社会構築のための新しい農資源**として提案するため、主に二毛作における微生物叢の変遷を可視化し、様々な要因がそれら微生物叢の構成にどのように影響するかをまず明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

二毛作は一年を通して二つの異なる作物を作付けすることから、作物の根圏環境は大きく変化する。二毛作の持続的生産性を科学的に捉えるためには、この環境の季節変化が作物の生長や季節変動に沿ってどのように変化するかを理解することが必要である。二毛作体系の持続的生産性を支えるのは、栽培環境に適応的な品種の選定とそれを取り巻く生物を含めた環境(農業生態系)である(図1)。二毛作の持続的生産性を特徴付ける農業生態系要因として、根圏微生物叢や土壌ミネラル、周辺環境、野生植物相等に着目した。本研究では、以下の条件でサンプリングと測定を行った。

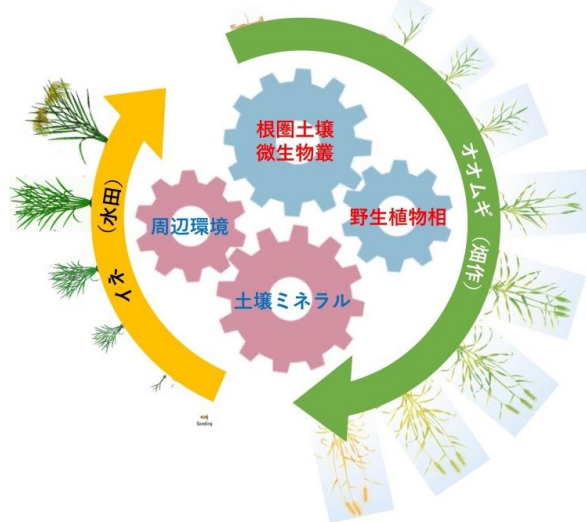
- ・ 期間 2018-2021 年
- ・ 作物 イネ、オオムギ
- ・ 品種 日本晴れ及び Star1 変異株 (AI 感受性株) 早木曾二号 (在来種オオムギ) はるな二条 (栽培種オオムギ)

- ・ 圃場 慣行区 (施肥区) 及び無施肥区
- ・ 隔週または隔月
- ・ 反復 3 または 6

・ サンプリング 植物体の根に付着した土を洗い落とした画分 (Wash)、根を超音波処理して強固に付着した土壌を落とした画分 (Sonic)、根 (Root) の 3 つと根の影響が及ばないと考えられる圃場の土サンプル (Soil)

これらについて、根圏微生物叢を 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングにより解析した。また植物体が植わっている根圏土壌を別にサンプリングし、水で抽出可能な金属イオンを ICP-MS で分析し、pH を測定した。各試験圃場区画における野生植物 (雑草) の種・占有率の変遷もモニタリングした。フィールドサーバーと土壌センサーを用いて圃場環境をストリームデータとして得た。

図 1. 二毛作体系を取り巻く農業生態系



4. 研究成果

3年間のサンプリングにより 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングサンプルは計 2388 サンプルとなった。QIIME2 による解析、クラスタ解析、多様性、多様性、また主要な微生物 OTU (Operational taxonomic unit) について、その平均優占度を説明する変数として各パラメータ（年、月、圃場、植物種、植物株、部位）により重回帰解析を行った。

全てのサンプルを通じて真核生物由来配列を除くと 4275 の OTU が検出された。反復データを平均化して微生物叢を可視化すると、各作物（イネ、オオムギ）のサンプルで 3 年間同様のパターンを示しており、連作してもほぼ同じであることがわかった。オオムギ、イネでは微生物叢の組成は当然大きく異なっていたが、共通して存在する OTU も見いだされた。クラスタ解析ではオオムギとイネのサンプルは明確に分かれた。オオムギのサンプルでは Soil 画分から Root 画分へ向けて微生物群集構造の変遷が見いだされた。逆にイネでは各画分の特徴的における違いは必ずしも明確ではないが、それでも Root 画分にむけて変遷していることがわかった。

多様性解析では各作物の品種の違い、施肥の有無での違いは明確ではなかった。これらのパラメータは群集の種の数にはそれほど影響しないと考えられた。

多様性 (Weighted_Unifrac) では第一軸 (17.5%) が Soil から Root への変遷を、第二軸 (10.8%) がイネとオオムギの違いを、第三軸 (6.7%) が年の違いを反映した。

重回帰分析で各 OTU の説明変数の偏回帰係数と p 値、影響度を表す T 値を求めた。平均優占度 0.5% 以上の OTU について調べたところ、Root, Sonic, Wash のパラメータが優占度に正に影響するものと負に影響するものが見いだされ、それぞれ植物に物理的距離として近いところに存在する OTU と離れて存在するものがあることがわかった。作物（オオムギ、イネ）パラメータにそれぞれ特異的に応答するグループがいることと、どちらに対しても正または負に影響されるグループの存在もわかった。施肥の有無に関しても正負に影響されることがわかった。作物品種パラメータではやはりその差は小さく、本研究での条件では品種の違いが微生物群集構造に与える影響は小さいことがわかった。時期のパラメータは作物と連動するが、それでも比較的低温な時期 (1-2 月) には特異的な菌叢があること等、各季節が各 OTU の存在量に正・負に大きく影響していることが見いだされた。

土壌サンプルの物理化学パラメータの測定においては、まず慣行区（施肥区）では無施肥区に比べて pH が低いアルミニウム毒性が発揮される (pH<4) ほど低くなく、pH 5.5 程度であった。施肥区においては施肥に含まれる K, P の濃度が高く、栽培後期に向けて減少した。その他、慣行区では Mo, Cd, Ca, S が高く、Si, Fe, Mn, Ni, Mg, Co, Al が相対的に低いことが見いだされた。使用した圃場では必ずしも施肥による酸性化は顕著ではないことがわかった。

野生植物の調査では施肥区、無施肥区で大きな違いがあり無施肥区では水田雑草の種類が多く、施肥区ではそれ以外の種が多い傾向があった。また、フィールドセンサーによる温度、電気伝導度のデータも蓄積した。オオムギの生育調査では栽培品種で肥料が有効に利用されていないこともわかってきた。以上のようなデータを用い、さらに高次元の圃場環境パラメータの相互作用やネットワークの解析に取り組む。

オオムギの Root サンプルにおいて、特異的に *Janthinobacterium* と *Methylbium* とアノテーションされる OTU が多く検出されることを見いだした。これらは Wash, Sonic 画分には見られないため、根に特異的に存在していると考えられた。そこで、2021 年にオオムギの根から無差別に細菌株を 103 株分離し、16S rRNA 遺伝子配列解析により同定した。23 属 37 種の細菌を同定し、そのうち根から多くの *Rugamonas* 属細菌が分離された。アンプリコン解析で *Janthinobacterium* とアノテーションされた配列は基準株の *Janthinobacterium* 属細菌のそれよりも、分離された *Rugamonas* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子配列と類似していたため、*Rugamonas* 属細菌が *Janthinobacterium* 属細菌として検出されたと結論した。分離した *Rugamonas* 属細菌のゲノム解析を行ったところ、既知の本属細菌種とは異なる新種細菌であることがわかった。オーキシン・シデロフォア合成能があり、オオムギの根の伸張を促進した。また対峙培養において *Fusarium* 属カビの成長を阻害した。興味深いことに分離菌はピオラセインを合成する。ピオラセインは抗菌・抗腫瘍活性のある紫色の色素である。本属細菌がオオムギの根に何故特異的に存在するのか、ピオラセインを合成する意義は何か、今後検討を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木代 勝元、谷 明生
2. 発表標題 オオムギの根圏に生息する微生物の調査
3. 学会等名 岡山バイオアクティブ研究会第57回シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木代勝元、最相大輔、山下純、山地直樹、山本敏夫、門田有希、持田恵一、中川智行、谷 明生
2. 発表標題 オオムギ根圏の共生微生物の単離と同定
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kishiro K., Saisho D, Yamashita J., Yamaji N., Yamamoto T., Monden Y., Mochida K., Nakagawa T., Tani A.
2. 発表標題 Isolation and identification of novel barley endophytes.
3. 学会等名 Phyllosphere Fortnight 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷 明生
2. 発表標題 植物表層共生細菌の生態と応用
3. 学会等名 第2回生物刺激制御研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木代勝元, 最相大輔, 山下純, 山地直樹, 山本敏央, 門田有希, 持田恵一, 中川智行, 谷明生
2. 発表標題 オオムギ根から分離された新種細菌Rugamonas sp.の性質
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会(第60回講演会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木代 勝元、最相 大輔、山下 純、山地 直樹、山本 敏央、門田 有希、持田 恵一、中川 智行、谷 明生
2. 発表標題 オオムギ根内生微生物の同定と役割の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 植物生長促進能を有する細菌及びその分離方法	発明者 谷 明生、木代勝元、 最相大輔、山地直 樹、山下純	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2021-015090	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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 敏央 (Yamamoto Toshio) (00442830)	岡山大学・資源植物科学研究所・教授 (15301)	
研究 分担者	山地 直樹 (Yamaji Naoki) (00444646)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	

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
研究分担者	山下 純 (Yamashita Jun) (20432627)	岡山大学・資源植物科学研究所・助教 (15301)	
研究分担者	門田 有希 (Monden Yuki) (30646089)	岡山大学・環境生命科学研究所・准教授 (15301)	
研究分担者	中川 智行 (Nakagawa Tomoyuki) (70318179)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	
研究分担者	最相 大輔 (Saisho Daisuke) (90325126)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	
研究分担者	持田 恵一 (Mochida Keiichi) (90387960)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー (82401)	

	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	木代 勝元 (Kishiro Katsumoto) (15301)	岡山大学・資源植物科学研究所・学生 (15301)	

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