

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22580074

研究課題名(和文) 根粒根圏土壌微生物相の群集構造解析によるマメ科作物の連作障害発生機構の解明

研究課題名(英文) Community analysis of nodule-associated rhizosphere for revealing a mechanism of continuous cropping problem in leguminous plants

研究代表者

池田 成志 (IKEDA, Seishi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター大規模畑作研究領域・主任研究員

研究者番号：20396609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：根粒の存在がマメ科作物の連作障害の主因と考え、根粒着生量の異なるダイズ変異体(非着生型、超着生型、野生型)を3年間連作し、前作が連作に弱い後作のインゲンの根圏土壌の微生物多様性に及ぼす影響を検討した。その結果、前作までの連作ダイズの根粒形成量が後作のインゲン根圏土壌に対する影響は線虫を含めた真核微生物の群集構造解析では観察されなかった。しかしながら、根粒非着生ダイズ変異体の連作はインゲンの連作に似た土壌細菌相を形成することが示唆された。また、糸状菌類の解析の結果からは、根粒のバイオマスが増加すると *Mortierella elongata* の割合が根圏で増加することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：As a hypothesis, the nodules biomass in a field was considered as a main factor for causing problems in continuous cropping of leguminous plants. After continuous cropping of three different nodulation phenotypes of soybeans (non-nodule, super-nodule, and wild type soybeans) on the same fields for three years, kidney beans were cultivated on those field as a succeeding crop. The community analysis of rhizosphere soils of these kidney beans revealed that the populations of nematode had no correlation to the nodule biomass in a preceding crop. However, the community structure of non-nodulated soybean mutant was shown to be similar to that of kidney beans which had been continuously cropping for four years. In addition, the community analysis clarified that the relative abundance of *Mortierella elongata* was increased in the rhizosphere of kidney beans as responding to the nodule biomass of preceding crops.

研究分野：植物共生科学、農業微生物学、分子微生物生態学

キーワード：根粒 連作障害 マメ科 土壌微生物 根圏 細菌 糸状菌 線虫

1. 研究開始当初の背景

近年の農業においては、主要作物の作付け制限や高収益性作物への志向による作付作物種の単純化、さらに連作を招き、連作障害が懸念されている。北海道十勝地方の大規模畑作地帯においても、作付け作物種数の減少や輪作年限の短縮により連作障害が危惧されている。特に十勝地方における主要作物種であるマメ科作物の連作は収量の激減を招くことから、詳細な研究がなされてきた。それらの報告に関して奥村(1993)によりマメ科植物の連作障害に関する土壤肥料的研究の総括がなされ、連作障害軽減における土壤微生物の関与、特に根圏における細菌類の菌数や多様性の重要性が指摘されている。

しかしながら、これまでの連作障害に関する多くの研究では環境微生物の多様性解析は主として菌の純粋分離・培養法が用いられており、培養自体による特定の系統群へのバイアスが深刻な問題としてある。また、多大な労力が必要なことから定量的データの取得が非常に困難であり、病原微生物を含めた環境中における生物間相互作用の検討等の生態学的な解析が不可能であった。

一方、近年の分子微生物生態学的手法の発展により、土壌や水中等の環境中の細菌群の多様性を比較的迅速かつ容易に評価することが可能となりつつある。応募者は、これまでダイズを含めた植物共生微生物について、DNA多型解析法やクローンライブラリー法などを活用した群集構造解析を行ってきた。その結果、植物の遺伝型や土壌特性、肥料施肥レベル等が根、茎などの組織に共生する微生物の多様性に非常に大きな影響を与えることを明らかにした。特に、ダイズに関する研究成果から、根粒を伴う根圏(根粒根圏)が糸状菌類、細菌類、線虫類などの土壤微生物の多様性に与える影響の大きさを認識し(Ikeda et al., 2008; Inaba et al., 2009; Okubo et al., 2009)、根粒根圏における微生物多様性の解明が連作障害の発生機構の解明に繋がると確信するに至った。即ち、根粒の形成・腐敗に伴う線虫類(根粒中の根粒菌を捕食して増殖する)の密度増加が根圏中の一般細菌類の密度低下や多様性の減少を引き起こし、本来は競合能の低い腐生的な病原糸状菌類の根圏における増加をもたらすとの仮説を立てるに至った。(図1参照)

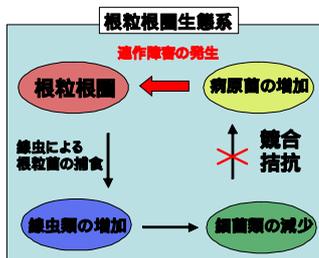


図1. 連作障害において推定される根粒根圏における生物間相互作用

2. 研究の目的

様々な植物遺伝型(根粒非着生・超着生変異体、連作感受性・抵抗性品種)のマメ科作物を連作栽培し、根圏やバルク土壌から環境DNAを抽出する。次に微生物群集構造解析により根粒根圏及び非根粒根圏における特徴的な微生物群の特定を行う。さらに当該微生物の分離・培養を行い、分離微生物を用いた接種実験などにより連作障害発生あるいは、連作障害防除における機能解析を試みる。

3. 研究の方法

連作障害の発生程度が大きいインゲンを中心として用いて連作栽培試験を行い、連作圃場の土壌微生物生態系に及ぼす影響を検討する。また、マメ類相互の連続作付けにおいてもインゲンの連作と同様な障害が発生することから(渡辺ら、1991)、根粒非着生系統や根粒超着生系統などの根粒変異体を用いて連作栽培試験を行い、根粒形成の有無や根粒のバイオマスが連作障害の発生程度及び連作圃場の土壌微生物生態系に及ぼす影響を検討する(表1)。

これらの検討結果から、連・輪作前後のバルク土壌、根粒根圏及び非根粒根圏における特徴的な微生物群の特定及び分離・培養を試みる。さらに、分離微生物を用いた接種実験などによる再構成実験を行うことにより、連作障害発生あるいは、連作障害防除における機能解析を試みる。

4. 研究成果

根粒の存在がマメ科作物の連作障害の主因と考え、根粒着生量の異なるダイズ変異体(非着生型、超着生型、野生型)を3年間連作し、前作が連作に弱い後作のインゲンの根圏土壌の微生物多様性に及ぼす影響を検討した。その結果、前作までの連作ダイズの根粒形成量が後作のインゲン根圏土壌に対する影響は線虫を含めた真核微生物の群集構造解析では観察されなかった。しかしながら、根粒非着生ダイズ変異体の連作はインゲンの連作に似た土壌細菌相を形成することが示唆された。また、糸状菌類の解析の結果からは、根粒のバイオマスが増加すると *Mortierella elongata* の割合が根圏で増加することが示唆された。

<引用文献>

奥村正敏 1993年 日本土壤肥料学会編 植物土壌病害の抑止対策 土壌管理による土壌病害抑止対策 p83-116

Ikeda et al., (2008) Microbial community analysis of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 74, No. 18, 5704-5709

Inaba, et al., (2009) Nitrous oxide emission and microbial community in the rhizosphere of nodulated soybeans during

the late growth period. *Microbes & Environments*, Vol. 24, No. 1, 64-67
Okubo et al., (2009)
Nodulation-dependent communities of culturable bacterial endophytes from stems of field grown soybeans. *Microbes & Environments*, Vol. 24, No. 3, 253-258
渡辺文吉郎 (1991) 植物防疫 35 巻 3 号 3-7

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 21 件)

Unno, Y., T. Shinano, K. Minamisawa, and S. Ikeda. 2015. Bacterial community shifts associated with high abundance of *Rhizobium* spp. in potato roots under macronutrient-deficient conditions. *Soil Biol. Biochem.* 80:232-236. 査読有

Okubo et al., (他 15 人、S. Ikeda 4 番目). 2015. Elevated atmospheric CO₂ levels affect community structure of rice root-associated bacteria. *Front. Microbiol.* 6:1-8. 査読有

Tsurumaru, H., (他 11 人、S. Ikeda 11 番目). 2015. Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet. *Microbes Environ.* 30:63-69. 査読有

Ikeda, S., (他 13 人). 2014. Low nitrogen fertilization adapts rice root microbiome to low nutrient environment by changing biogeochemical functions. *Microbes Environ.* 29:50-59. 査読有

Okazaki, K., (他 9 人、S. Ikeda 9 番目). 2014. An assessment of the diversity of culturable bacteria from main root of sugar beet. *Microbes Environ.* 29:220-223. 査読有

Okubo et al., (他 6 人、S. Ikeda 2 番目). 2014. Phylogeny and functions of bacterial communities associated with field-grown rice shoots. *Microbes Environ.* 29:329-332. 査読有

Ikeda, S., (他 4 人). 2014. An assessment of urea-formaldehyde fertilizer on the diversity of bacterial communities in onion and sugar beet. *Microbes Environ.* 29:231-234. 査読有

Ikeda, S., (他 13 人). 2015. Characterization of leaf blade- and leaf sheath-associated bacterial communities and assessment of their responses to environmental changes in CO₂, temperature, and nitrogen levels under field conditions. *Microbes Environ.* 30:51-62. 査読有

池田成志. 植物共生科学の新展開と農学研究におけるパラダイムシフト. 2013. 化学と

生物. 7:462-470. 査読有

Someya, N., Y.O. Kobayashi, S. Tsuda, and S. Ikeda. 2013. Molecular characterization of the bacterial community in a potato phytosphere.

Microbes Environ. 28:295-305. 査読有

鶴丸博人、橋本萌、池田成志、南澤究. 2013. 植物生育促進細菌の研究動向. 日本土壌肥科学会誌. 84:418-423. 査読有

池田成志. 2013. 環境微生物研究とリスク管理. 日本微生物生態学会. 28:75-76. 査読無

池田成志. 2012. 生産現場で働く微生物資材・連載 3・植物共生微生物と農業・その 2. ニューカントリー 7:50-52. 査読無

池田成志. 2012. 生産現場で働く微生物資材・連載 3・植物共生微生物と農業・その 1. ニューカントリー 6:52-53. 査読無

池田成志. 2012. 植物共生微生物と「土づくり」. あぐりぽーと 101:6. 査読無

Okubo, T., S. Ikeda, A. Yamashita, K. Terasawa, and K. Minamisawa. 2012.

Pyrosequence read length of 16S rRNA gene affects phylogenetic assignment of plant-associated bacteria. *Microbes Environ.* 27:204-208. 査読有

Ishii, S., S. Ikeda, K. Minamisawa, and K. Senoo. 2011. Nitrogen cycling in rice paddy environments: past achievements and future challenges. *Microbes Environ.* 26:282-292. 査読有

Ikeda, S. (他 15 人). 2011. The genotype of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene (*CCaMK*) determines bacterial community diversity in rice roots under paddy and upland field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:4399-4405. 査読有

Anda, M., S. Ikeda, S. Eda, T. Okubo, S. sato, S. Tabata, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2011. Isolation and genetic characterization of *Aurantimonas* and *Methylobacterium* strains from stems of Hypernodulated soybeans. 2011. *Microbes Environ.* 26:172-180. 査読有

Ikeda, S., (他 10 人). 2011. Autoregulation of nodulation interferes with impacts of nitrogen fertilization levels on the leaf-associated bacterial community in soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1973-1980. 査読有

21. Shime, A., S. Kobayashi, S. Ikeda, R. Asano, H. Shime, and T. Shinano. 2011. *J. Appl. Microbiol.* 111:915-924. 査読有

[学会発表](計 17 件)

Ikeda, S., and K. Minamisawa. Molecular community analysis for unraveling plant-microbes interactions in arable land. The 6th East Asian Federation of

Ecological Societies International Congress. (招待講演)2014.4.11.「Huandao Tide Hotel」(Haikou, China)

池田成志、南澤究. 植物共生科学の新展開と農学研究のパラダイムシフト. 日本生物工学会(招待講演). 2014.9.9.「札幌コンベンションセンター」(北海道札幌市)

池田成志、臼木一英、南澤 究. 根粒根圏土壤微生物相の群集構造解析によるマメ科作物の連作障害の発生機構の解明. 日本土壤肥料学会北海道支部会. 2014.12.3.「道民活動振興センター(かでの2・7)」(北海道札幌市)

池田成志. 2012. 植物共生科学の新展開と農業への応用について. 日本微生物生態学会大会. 2012.9.20.「豊橋科学技術大学」(愛知県豊橋市)

南澤 究(発表者代表). *OsCCaMK* は水稲根と陸稲根の細菌群集構造を変化させる. 植物微生物研究会第21回研究交流会. 2011.9.20-22.「岡山大学創立50周年記念館」(岡山県岡山市)

小林 晃(発表者代表). ジャガイモそうか病に対する抵抗性レベルの異なるジャガイモ8品種間における根および塊茎関連細菌群集の構造比較. 日本植物病理学会大会. 2012.03.30.「福岡国際会議場」(福岡県福岡市)

Shime, A. (発表者代表) A rapid and simple PCR-based detection method targeting the genus *Azospirillum*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011.09.07.「札幌コンベンションセンター」(北海道札幌市)

染谷信孝.(発表者代表) ジャガイモから分離した蛍光性シュードモナス菌株の多様性. 日本土壤微生物学会. 2011.11.26.「鳴子公民館」(宮城県大崎市)

染谷信孝.(発表者代表) 非培養法および培養によるジャガイモ共生細菌の多様性比較. 日本微生物生態学会大会. 2011.10.9.「京都大学」(京都府京都市)

池田成志. 有機栽培ジャガイモの根系に共生する細菌群集の構造解析. 日本土壤微生物学会大会. 2011.11.25.「鳴子公民館」(宮城県大崎市)

池田成志. 緩効性肥料が植物共生微生物相に及ぼす影響. 日本土壤肥料学会北海道支部秋季大会. 2011.12.1.「北海道大学」(北海道札幌市)

池田成志. 植物共生微生物相の解析による有機栽培作物の特性評価の試み. 日本有機農業学会. 2011.12.11.「北海道大学」(北海道札幌市)

小林有紀.(発表者代表) Comparison of root- and tuber-associated bacterial communities between common scab-resistant and -susceptible varieties of potato. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011.09.07.「札幌コンベンションセンター」

(北海道札幌市)

崎山弥生.(発表者代表) Taxonomic and ecological evaluation of actinomycetes isolated in Vietnam. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011.09.08.「札幌コンベンションセンター」(北海道札幌市)

染谷信孝.(発表者代表) Genetic diversity of fluorescent pseudomonads in the phyllosphere and rhizosphere of potato plants in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011.09.07.「札幌コンベンションセンター」(北海道札幌市)

染谷信孝.(発表者代表) Molecular diversity of potato-associated bacteria. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011.09.07.「札幌コンベンションセンター」(北海道札幌市)

小林創平.(発表者代表) A rapid and simple PCR method to identify isolates belonging to the Genus *Azospirillum*. 10th international conference of the east and southeast Asia federation of soil science societies. 2011.10.11.「Cinnamon Lakeside」(Colombo, Sri Lanka)

〔図書〕(計 1件)

池田成志(分担). 2012. 改訂新編土壤微生物実験法(13-4 RISA). 養賢堂.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: ジャガイモ作物体の生育状態診断方法
発明者: 関山恭代、富田 理、小野裕嗣、池田成志、浅野賢治、小林 晃、小林有紀
権利者: 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2015-109720

出願年月日: 2015年5月29日

国内外の別: 国内

名称: 植物の生育促進剤

発明者: 岡崎和之、池田成志、他8名
権利者: 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、国立大学法人東北大学、国立大学法人帯広畜産大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-146402

出願年月日: 2013年7月12日

国内外の別: 国内

〔その他〕

アウトリーチ活動

池田成志. 植物共生微生物と農業. 農の周辺講座. 有機実業及び大牧牧場共催(招待講演). 2012.03.02.「とちかちプラザ」(北海道帯広市)

池田成志. 植物共生科学の新展開と肥培管理の再考. NPO 法人有機農業技術会議・第4回有機農業技術原論研究会(招待講演).

2011.06.19.「アジア太平洋資料センター」
(東京都千代田区)

池田成志. 植物共生科学の新展開と肥培管理の再考. 平成 23 年度第 60 回北海道高等学校農業教育研究大会/第 15 回全国高等学校農業協会北海道支部大会・分科会(招待講演).

2011.07.26.「とちプラザ」(北海道帯広市)

池田成志. 植物共生微生物と農業. 北農会第 2 回シンポジウム(招待講演) 2011.11.29. 「北農健保会館」(北海道札幌市)

池田成志. 植物共生科学の新展開と農業再考. 茨城大学推進研究プロジェクト公開シンポジウム(招待講演). 2012.02.11. 「茨城大学」(茨城県稲敷郡阿見町)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 成志 (IKEDA, Seishi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター 大規模

畑作研究領域・主任研究員

研究者番号：20396609