

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06005

研究課題名(和文) 輪作体系に基づくトウモロコシへのアーバスキュラー菌根群集の貢献度の推定

研究課題名(英文) Assessment of ecosystem services in arbuscular mycorrhizal fungal communities for corn production in crop rotational systems

研究代表者

肥後 昌男 (HIGO, Masao)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80708008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、耕起法と冬作管理を組み合わせた輪作体系でのアーバスキュラー菌根菌(AM菌)の群集構造とトウモロコシの養分吸収や生産性との関係性を明らかにするとともに、国内のトウモロコシにおける共生微生物利用型栽培体系を確立するための基盤情報を得ることを目的として実施した。その結果、ロータリ耕、不耕起処理ともに冬作物を導入した区で休閑区に比ベトウモロコシのリン吸収、収量の改善が示された。さらに、トウモロコシに感染するAM菌の群集構造も冬作管理と耕起法の組み合わせにより変化する傾向が示された。これらの群集構造の変化はトウモロコシのリン吸収を改善し収量を増加させる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以上の成果は、国内のトウモロコシにおける共生微生物利用型栽培体系を確立できる可能性を示した。リン酸肥料の原料であるリン鉱石が枯渇しつつある状況で、新たな栽培技術の可能性を見いだした点は大きな意義があるといえる。また、土壌や根内のAM菌の群集構造の決定に関わる環境要因はかなり複雑であることも示された。特にAM菌群集構造の決定要因の解明はトウモロコシのリン吸収の改善の重要なファクターである一方、AM菌以外の土壌微生物群集との関係性等が示唆された本研究の結果を踏まえ、今後よりデータの蓄積が期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study was carried out to determine the relationship between the communities of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and nutrient uptake and productivity of maize in a crop rotation system combining tillage and winter crop management, and to obtain basic information for establishing a plant-microbe based cropping system for maize cultivation in Japan. The results showed that both rotary and no-till treatments improved phosphorus (P) uptake and yield of maize in winter crop treatments compared with the fallow. Furthermore, the community structure of AMF colonizing maize roots also tended to change with the combination of winter crop management and tillage methods. These changes in community structures of AMF may improve the P uptake and yield of maize.

研究分野：土壌微生物生態学

キーワード：アーバスキュラー菌根菌 土壌微生物生態 耕起法 冬作緑肥 輪作体系 アンブリコンシーケンス 群集構造 トウモロコシ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

土壌 1g に対し 100 億匹の微生物、根圏では最大で土壌の 100 倍の微生物が存在すると考えられているが、人工的に培養できる微生物は数%とも見積もられているため、土壌微生物の働きや生態系はほとんど解明されていない。さらに、植物は土壌からの養分吸収以外にも様々な根圏微生物と複雑な相互作用をしている。その中で比較的フィールド研究が進みつつあるのが糸状菌の一種であるアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) である。この AM 菌を作物栽培に活用する際、畑由来の土着菌の機能を上手く利用できれば、作物によるリン酸吸収の効率を高まることはこれまでによく知られている (前作効果)。AM 菌は、宿主作物が栽培されると根に感染して増殖する一方で、非宿主作物が栽培されると感染できずに減少する。AM 菌の宿主作物跡における後作トウモロコシは、非宿主作物跡より AM 菌感染率および初期生育量が顕著に高まる (Karasawa ら 2001, 2002, Higo ら 2010)。同様に、冬季に異なる冬作物 (コムギ, ナタネなど)、何も栽培しない休閑を導入し、後作としてトウモロコシ (Higo ら 2018, 2019)、ダイズ (Higo ら 2018) を栽培する輪作体系から、冬作物の根に感染する AM 菌の群集構造、土壌中の AM 菌の群集構造が異なることを報告している (Higo ら 2015, 2016)。しかし、冬作物の導入により変化した AM 菌の群集構造が後作トウモロコシ、ダイズの生育・収量にまで影響を及ぼさなかった (Higo ら 2018, 2019)。この要因の一つに耕起により AM 菌の菌系のネットワークが崩壊したことで、作物への生育促進効果が減少したためと考えられる。実際、耕起した土壌は不耕起に比べ、AM 菌量が少ないことや耕起による菌系のネットワークの回復には数年かかる (Wortmann ら 2008)。ゆえに、不耕起栽培では AM 菌の菌系のネットワークも維持され、その後の作物の生育に影響を及ぼすと考えられる。ただし、耕起法と冬作管理を組み合わせた輪作体系での AM 菌の群集構造とトウモロコシの養分吸収や生産性との関係性は明らかでない。本研究は、国内のトウモロコシにおける共生微生物利用型栽培体系を確立するために重要な要因を整理することである。

2. 研究の目的

本研究は土着 AM 菌利用を基盤としたトウモロコシへのリン酸施肥を削減できる作付体系の開発に必要な基盤情報を得ることを目的としている。申請者らは不耕起・耕起でヘアリーベッチ、カラシナの栽培、何も栽培しない休閑区を設け、それらの跡地にトウモロコシを栽培する輪作体系を 2016 年 11 月から設けている。輪作 1 年目の結果では、不耕起・耕起であまり差はみられないが、冬作物の違いによりトウモロコシのリン酸吸収、生育が向上しつつあった。そこで、本研究では以下の点を調査することを目的とした。具体的には、種々の冬作物とトウモロコシを耕起・不耕起で栽培する輪作体系から、土壌中や根に感染する AM 菌の群集構造の動態、菌量を網羅的な解析を目的とした調査、また耕起法や冬作管理の違いが AM 菌の感染、活性を維持し、その養分吸収機能を低下させずに、トウモロコシの生育初期のリン酸欠乏を回避できるのか調査を実施した。

3. 研究の方法

(1) 冬作管理及び耕起法の違いがトウモロコシの生育に及ぼす影響

本研究は気候条件などの年次変動を考慮し冬季に異なる冬作物とトウモロコシ (品種: P1690) を耕起・不耕起で継続栽培した。試験は 2016 年 11 月から日本大学生物資源科学部付属圃場にて 5m x 4m の区画に冬作処理 (宿主のライムギ, ヘアリーベッチ, 非宿主のカラシナ, 何も栽培しない休閑, ライムギは 2019 年度から開始), 耕起法 (ロータリ耕, 不耕起) を 3 反復設けている (表

1) これらの栽培体系から冬作管理と耕起法の違いによる土壌リン酸の変化とトウモロコシ生産との関係性を評価した。また、トウモロコシ根のAM菌感染率を生育初期のリン酸欠乏との関係性を明らかにするため生育初期の第6葉期に採取・調査する。また、収穫期のリン酸吸収・生育の変動調査を実施した。

表1 本研究における輪作体系の試験概要

冬作物	耕起方法	冬作物刈取・すき込み	土壌採取	トウモロコシ播種	トウモロコシ刈取	収穫
ライムギ(宿主作物)	ロータリ耕	4月中・下旬	5月中旬	5月中・下旬	第6葉期	9月下旬
	不耕起	4月中・下旬	5月中旬	5月中・下旬	第6葉期	9月下旬
ヘアリーベッチ(宿主作物)	ロータリ耕	4月中・下旬	5月中旬	5月中・下旬	第6葉期	9月下旬
	不耕起	4月中・下旬	5月中旬	5月中・下旬	第6葉期	9月下旬
カラシナ(非宿主作物)	ロータリ耕	4月中・下旬	5月中旬	5月中・下旬	第6葉期	9月下旬
	不耕起	4月中・下旬	5月中旬	5月中・下旬	第6葉期	9月下旬
休閑(非宿主作物と同様)	ロータリ耕	4月中・下旬	5月中旬	5月中・下旬	第6葉期	9月下旬
	不耕起	4月中・下旬	5月中旬	5月中・下旬	第6葉期	9月下旬

(2) 冬作管理及び耕起法の違いがトウモロコシに感染するAM菌群集に及ぼす影響

冬作管理，耕起法の違いでのAM菌を介した後作トウモロコシへのリン酸吸収能を明らかにするため，土壌中とトウモロコシ第6葉期にて根内のAM菌の群集構造解析を次世代シーケンス（アンプリコンシーケンス解析）にて調査した。トウモロコシ根からのDNA抽出は新鮮重で100 mgの根を，液体窒素凍結条件下においてビーズ式細胞破碎装置（MS-100，株式会社トミー精工，東京都練馬区）を用いて粉碎した後，DNA抽出キット（NucleoSpin® Plant II，MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG，Düren，Germany）を用い，プロトコールに基づいて調製した。

抽出したDNAを用いてNested PCR法により得られたAM菌18S rRNA遺伝子のアンプリコンシーケンス解析を行った。まず，1st-PCRではプライマーに，AM1（Helgasonら1998）とNS31（Simonら1992）を用いてDNAを増幅した。PCR反応溶液は5 µlの2 × KOD One Master Blue Mix（TOYOBO，大阪市），各0.2 µlのAM1とNS31プライマー（最終濃度0.4 µM），10倍希釈したDNA溶液を1 µl，滅菌水3.6 µlの計10 µlとした。1st-PCR反応は94℃：2分，[94℃：10秒，60℃：5秒，68℃：15秒] × 35サイクルの条件で行った。2nd-PCRはイルミナ社MiSeqを用いたアンプリコンシーケンス解析用にアダプター配列が付加されたAMV4.5NF（5' - AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG -3'）とAMDGR（5' - CCCAACTATCCCTATTAATCAT -3'）（Satoら2005）を用いDNAを増幅した。PCR反応溶液は10 µlの2 × KOD One Master Blue Mix，各0.6 µlのAMV4.5NFとAMDGRプライマー（最終濃度0.3 µM），10倍希釈した1st-PCR産物を2 µl，滅菌水6.8 µlの計20 µlとした。2nd-PCR反応は94℃：2分，[94℃：10秒，60℃：5秒，68℃：15秒] × 40サイクルの条件で行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動により増幅を確認した後，イルミナ社MiSeq解析のプロトコールに従ってタグ付けを行った。その後，増幅したPCR産物は，NucleoSpin® Gel and PCR Clean-upにより精製し，株式会社生物技研（神奈川県相模原市）において，2 × 300 bpの条件でアンプリコンシーケンス解析を行った。アンプリコンシーケンス後，Qiime 2.0（<https://qiime2.org/>）プラットフォームのDADA2を用いプライマーに相当する長さをトリムし，ノイズ除去された配列を取得した。取得した代表配列はMaarjAM（<https://maarjam.botany.ut.ee/>）とNCBI Nucleotide BLAST search（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）のデータベースからAM菌の系統を推定した。

4. 研究成果

(1) 冬作管理及び耕起法の違いが後作トウモロコシの生育に及ぼす影響

トウモロコシのリン酸吸収，収量性の変動を3年間に渡る冬作管理と耕起法を組み合わせた輪作体系から調査を実施した。3年間に渡る輪作体系の結果，ロータリ耕，不耕起処理ともに冬作

物を導入した区で休閑区に比べ、土壌理化学性の改善やトウモロコシの第 6 葉期の地上部乾物重、リン吸収量が顕著に増加することを確認した。トウモロコシの収量、地上部総乾物重も生育初期と同様の傾向を示し、ロータリ耕、不耕起処理の両処理区で冬作物導入による後作トウモロコシへの生育促進効果を確認した。

(2) 冬作管理及び耕起法の違いがトウモロコシに感染する AM 菌群集に及ぼす影響

トウモロコシに感染する AM 菌群集の変動を 3 年間に渡る冬作管理と耕起法を組み合わせた輪作体系から調査を実施した。冬作物根とトウモロコシ播種前土壌の AM 菌群集構造において不耕起の各処理で特異的なグループが検出された。また、トウモロコシ根内の AM 菌群集構造においては第 6 葉期で特異的なグループの構成割合が耕起区に比べ不耕起区において高くなる傾向が示された。これらの AM 菌の群集構造の変動はトウモロコシのリン吸収、収量にも影響する可能性がある。ただし、本研究遂行中において、後作トウモロコシ根に感染する AM 菌の種数は耕起処理と冬作物管理の影響を受けなかった。また、トウモロコシの生育、収量に関する中核となる AM 菌群に一定の傾向を見出すこともできなかった。畑土壌中には AM 菌以外の様々な機能的微生物が存在するため、今後は土壌微生物群集全体の制御からトウモロコシの生育を改善する要因とその条件を整理していく必要があると考えられる。

<引用文献>

1. Karasawa, T., Kasahara, Y., & Takebe, M. (2001). Variable response of growth and arbuscular mycorrhizal colonization of maize plants to preceding crops in various types of soils. *Biology and Fertility of Soils*, 33(4), 286-293.
2. Karasawa, T., Kasahara, Y., & Takebe, M. (2002). Differences in growth responses of maize to preceding cropping caused by fluctuation in the population of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(6), 851-857.
3. Higo, M., Isobe, K., Kang, D. J., Ujiie, K., Drijber, R. A., & Ishii, R. (2010). Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi or crop rotation with mycorrhizal plants improves the growth of maize in limed acid sulfate soil. *Plant Production Science*, 13(1), 74-79.
4. Higo, M., Takahashi, Y., Gunji, K., & Isobe, K. (2018). How are arbuscular mycorrhizal associations related to maize growth performance during short term cover crop rotation?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1388-1396.
5. Higo, M., Tatewaki, Y., Gunji, K., Kaseda, A., & Isobe, K. (2019). Cover cropping can be a stronger determinant than host crop identity for arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing maize and soybean. *PeerJ*, 7, e6403.
6. Higo, M., Sato, R., Serizawa, A., Takahashi, Y., Gunji, K., Tatewaki, Y., & Isobe, K. (2018). Can phosphorus application and cover cropping alter arbuscular mycorrhizal fungal communities and soybean performance after a five-year phosphorus-unfertilized crop rotational system?. *PeerJ*, 6, e4606.
7. Higo, M., Isobe, K., Kondo, T., Yamaguchi, M., Takeyama, S., Drijber, R. A., & Torigoe, Y. (2015). Temporal variation of the molecular diversity of arbuscular mycorrhizal communities in three different winter cover crop rotational systems. *Biology and Fertility of Soils*, 51(1), 21-32.
8. Higo, M., Isobe, K., Miyazawa, Y., Matsuda, Y., Drijber, R. A., & Torigoe, Y. (2016). Molecular diversity and distribution of indigenous arbuscular mycorrhizal communities colonizing roots of two different winter cover crops in response to their root proliferation. *Journal of Microbiology*, 54(2), 86-97.

9. Wortmann, C. S., Quincke, J. A., Drijber, R. A., Mamo, M., & Franti, T. (2008). Soil microbial community change and recovery after one-time tillage of continuous no-till. *Agronomy Journal*, 100(6), 1681-1686.
10. Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (1998). Ploughing up the wood-wide web?. *Nature*, 394(6692), 431-431.
11. Simon, L., Lalonde, M., & Bruns, T. (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), 291-295.
12. Sato, K., Suyama, Y., Saito, M., & Sugawara, K. (2005). A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction denature gradient gel electrophoresis. *Grassland Science*, 51(2), 179-181.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 立脇祐哉・肥後昌男・磯部勝孝	4. 巻 75
2. 論文標題 南関東での冬作物管理の違いや耕起の有無が後作トウモロコシに感染するアーバスキュラー菌根菌の群集構造に及ぼす影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 土と微生物	6. 最初と最後の頁 23～31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18946/jssm.75.1_23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Higo Masao, Tatewaki Yuya, Iida Karen, Yokota Kana, Isobe Katsunori	4. 巻 10
2. 論文標題 Amplicon sequencing analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing maize roots in different cover cropping and tillage systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58942-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 肥後昌男, 郡司賢人, 卯木崇光, 坂本実由季, 立脇祐哉, 磯部勝孝	4. 巻 55
2. 論文標題 南関東におけるヘアリーベッチ導入が飼料用トウモロコシのリン吸収, 生育・収量に及ぼす影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 農作業研究	6. 最初と最後の頁 35～42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4035/jsfwr.55.35	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 肥後昌男	4. 巻 54
2. 論文標題 菌根菌（AM菌）を利用した作物の生育制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植調	6. 最初と最後の頁 270～285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tatewaki Yuya, Matsuno Ryo, Nakamura Koya, Wada Kengo, Higo Masao, Isobe Katsunori
2. 発表標題 Different Tillage Systems rather than Winter Cropping Affect the Corn Growth and Yield, and, the Community Composition of Arbuscular Mycorrhizal Fungi
3. 学会等名 10th Asian Crop Science Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立脇祐哉・肥後昌男・橋本 航・磯部勝孝
2. 発表標題 耕起法の違いがトウモロコシに感染するアーバスキュラー菌根菌の群集構造と生育に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 航・肥後昌男・立脇祐哉・磯部勝孝
2. 発表標題 冬作物と耕起法の違いが根内と土壌のアーバスキュラー菌根菌の群集構造に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立脇祐哉, 肥後昌男, 川村佳大, 中村航也, 磯部勝孝
2. 発表標題 耕起法およびリン酸施肥レベルの違いがトウモロコシ根に感染するアーバスキュラー菌根菌の群集構造に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2019年度大会（札幌）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuya Tatewaki, Masao Higo, Yoshihiro Kawamura, Koya Nakamura, Katsunori Isobe
2. 発表標題 Effect of P fertilization level on arbuscular mycorrhizal communities and maize growth under a tilled and no-tilled system
3. 学会等名 The 10 th International Conference on Mycorrhiza (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Higo, Yuya Tatewaki, Koya Nakamura, Yoshihiro Kawamura, Katsunori Isobe
2. 発表標題 Impact of different cover cropping on the arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing maize roots
3. 学会等名 The 10 th International Conference on Mycorrhiza (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuya Tatewaki, Masao Higo, Yoshihiro Kawamura, Koya Nakamura, Katsunori Isobe
2. 発表標題 Impact of cover cropping with rotary- or no-tillage practice on the arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing maize roots
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村航也, 立脇祐哉, 杉戸聖規, 飯田佳怜, 横田佳奈, 肥後昌男, 磯部勝孝
2. 発表標題 南関東における耕起法及び冬作管理の違いが飼料用トモロコシの生育とアーバスキュラー菌根菌の感染に及ぼす影響【第1報】生育・収量に及ぼす影響
3. 学会等名 日本作物学会関東支部第108回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立脇祐哉, 肥後昌男, 中村航也, 川村佳大, 磯部勝孝
2. 発表標題 南関東における耕起法及び冬作管理の違いが飼料用トモロコシの生育とアーバスキュラー菌根菌の感染に及ぼす影響【第2報】根に感染するアーバスキュラー菌根菌の群集構造の変化
3. 学会等名 日本作物学会関東支部第108回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Higo, Kento Gunji, Yuya Tatewaki, Katsunori Isobe
2. 発表標題 Impact of cover cropping and host identity on arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing maize and soybean roots in a cover crop rotation
3. 学会等名 2019 Soil Science Society of America International Soils Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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