

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05995

研究課題名(和文) イネの生育にアーバスキュラー菌根菌が与える影響の遺伝・生理・生態学的研究

研究課題名(英文) Ecophysiological and genetic study on effects of arbuscular mycorrhiza on rice growth

研究代表者

鴨下 顕彦 (Kamoshita, Akihiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：10323487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イネとアーバスキュラー菌根菌(AM菌)の共生に関して、水環境条件の変化に対する菌叢は、畑の灌漑によって2つの菌種が増加し乾燥への応答はなかったが、対照作物のトウジンビエでは乾燥によりClaroideoglossumの割合が増加した。水環境条件の変化に対してAM菌感染率は比較的安定していた。土壌深層ではRhizophagusの比率が高く、浅層よりも感染率が高かった。多様なイネ64品種の間では、感染率は、地下部への分配比と関連していた。Kinandang Patongの感染率が高い理由を、根の太さと側根の形状から説明した。イネよりも対照作物のトウジンビエの方が、AM菌に対する応答が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AM菌の接種効果、土着菌の動態、品種間差異、水環境への応答について、イネに関する基礎的な知見を得、さらにより乾燥適応性の高いトウジンビエとも比較をした。気候変動の悪化への懸念が増大する社会状況にあって、農業分野でも二酸化炭素排出の少ない生産システムの設計が求められている。化学肥料の投入量を減らしながら、作物生産の養分管理を行う1つの方法として、本研究成果をさらに発展させてゆき、農業生態系の中で活用できる技術へと応用してゆくことが期待される。圃場を主にした実験系で、イネのAM菌の水環境条件への応答と、品種間差に関して、学術的に重要な知見を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the symbiosis between rice and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, focusing on water regimes and rice varietal differences. We clarified the infection rate of roots by AM fungi, AM fungal community composition, and their impact on crop growth. Higher irrigation under upland fields enhanced 2 Operational Taxonomic Units (OTU) in AM fungi, whereas drought conditions enhanced Claroideoglossum in pearl millet (a reference crop) but not in rice. The infection rate remained relatively stable across upland water regimes. In the deep soil layers, the proportion of the genus Rhizophagus was high, and the infection rate was higher than in the shallow layers. Among various 64 rice varieties, the higher infection rate was associated with a higher biomass distribution to roots. Higher infection rate in a variety Kinandang Patong was clarified through its root thickness and characteristics of lateral roots. Pearl millet responded to AM fungi greater than rice.

研究分野：生産農学

キーワード：イネ 菌根菌 水条件 品種間差 接種 感染率 菌叢 トウジンビエ

## 1. 研究開始当初の背景

アーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) の圃場での作物生産への利用は 40 年以上前から期待されてきたが (Hayman 1980)、未だ栽培技術体系の中で広範に取り入れられてはいない。確かに、輪作体系の中で、土着菌根菌を利用したリンの減肥技術や (大友ら 2015)、長期休耕地での生産性改良のための菌根菌資材添加 (Thompson et al., 2013) は実証的に提案され、一定の成果が出されてきた。また、近年 AM 菌の分子生理学的研究の成果が急速に出され (例 ゲノム高精度解読 (Maeda et al., 2018)、培養の可能性 (Kameoka et al., 2019))、次世代シーケンサの開発と普及による、土壤微生物の菌叢の解明が進展し、圃場での研究がさらに発展させられることを期待した。作物生産・生態学的な知見の解明や、資材添加と環境や栽培条件の交互作用の解明が必要であった。

そこでまず第 1 に、水環境に着目して、AM 菌の感染の環境適応性を調べてゆくことを構想した。研究代表者が、これまで、広範な水環境条件の変化に対するイネの生育・生産の解析を行ってきたことと (Deshmukh et al., 2017)、畑条件では、AM 菌との共生による乾燥ストレス抵抗性の改良が期待できること (Auge 2001) を踏まえて、水環境条件に焦点を当てた。圃場を系にしたイネでの報告はなかった。嫌気的な環境の水田では畑と比べて感染が低下することはよく知られていたが、菌根菌の湛水条件での応答に関する報告もあったので (Bao et al., 2019) 水田でも、中干や節水栽培による感染増加の可能性を想定した。そして、畑での乾燥条件から、水田での湛水条件まで、幅広い水環境を設定した。

第 2 に、イネ品種間の菌根菌感染の変異を予想し、根形質との関連性を解明することを構想した。AM 菌は一部を除く多くの陸上植物と共生系を作ることが知られているが、イネの品種間で、AM 菌との共生の程度や、資材添加効果に差異があるのか、数例の報告があった。例えば、*Funneliformis mosseae* の接種試験があるが、生育や収量の品種間差の原因は十分には解明されていなかった (Sisaphaithong et al., 2017, Suzuki et al., 2015)。感染する根系については、伸長角度や中心柱の太さ、側根の量などの形態や構造について、フェノタイプング技術の急速な進歩により、高度な情報が得られ、遺伝子・遺伝子座が解明され、生理生態学的な形質評価もされてきた (Atkinson et al., 2019, Strock et al., 2019, Ramalingam et al., 2017, Y et al., 2000, Nguyen et al., 2022)。しかし、根形質の遺伝的変異と AM 菌の感染の関連については不明であった。

## 2. 研究の目的

作物と AM 菌との共生について、つまりイネの生育に AM 菌が与える影響を、遺伝・生理・生態学的に解明するべく、AM 菌の感染率と菌叢、作物成長への効果を評価した。研究目的は第 1 に、イネ・AM 菌の共生系が水環境条件によってどのように変化するか、分子生物学的、形態的、作物生理学的に明らかにし、さらにイネの成長への影響も明らかにすることであった。畑では灌水よりは乾燥条件で、水田では、湛水よりは節水した非湛水条件で、感染が増加し成長へのプラス効果がより大きくなるのではないかと予想した。目的の第 2 は、イネ品種間で AM 菌感染率と菌叢を定量的に評価し理由を解明することであった。

## 3. 研究の方法

幼植物検定、ポット試験、圃場試験 (合計 12 試験) を組み合わせて、AM 菌の感染率、作物根系と成長、感染菌叢の評価を行った (表 1)。試験 (3)-(10) では水環境条件、試験 (11), (12) では品種が処理であった。試験 (1), (4)-(6), (8)-(12) では、菌根菌接種処理も加えた (資材 1 は *Glomus* spp. の R10 株)。2 つの研究目的ごとに課題を立てた。課題 1 「AM 菌とイネの共生系の水環境条件に対する応答の解明」では、水環境条件を、畑条件では、100% 灌水、50% 灌水、無灌水として、水田条件では常時湛水と非湛水期間のある節水として設定した。イネ品種、とうごう 4 号 (ハイブリッド) について、2020 年度はコシヒカリも加えて、さらに両年とも、イネよりも乾燥適応性が高く、湛水適性の低い、トウジンビエ 2 系統 (ICMB89111, ICMB95411; 国際半乾燥熱帯作物研究所より) も比較対象として加えた。課題 2 「イネ品種間差の AM 菌の感染特性の検証」では、日本在来種コアコレクション (50 品種; ジーンバンクより) を含む、多様なイネ 64 品種を用いた。感染率は、トリパンブルー染色・格子法による顕微鏡観察によった。サンプル根から DNeasyR Plant Mini Kit により抽出した DNA (濃度を NanoDrop で定量) をプライマー AMF4.5NF・AMVR により 18S rRNA 遺伝子を増幅して qPCR 法により定量した。MiSeq により、プライマー FLd3・FLR2 により 28S rRNA 遺伝子を増幅してメタゲノムプロファイルを作成し、Kazusa パイプラインによるバイオインフォーマティクス解析、R により phyloseq, ggplot2, vegan, DESeq2 により菌叢の多様性解析を行った。

**表1** 研究課題1(水分条件)および課題2(品種間差)を構成する12の試験(幼植物、ポット、圃場)の概要とアーバスキュラー菌根菌のイネへの感染率

試験名	処理	培地	滅菌	接種	リン施肥 (g/m <sup>2</sup> )	サンプルス テージ	根サンプル法 (圃場)	感染率*** (%)
課題1：水分条件への応答								
(1)幼植物1*	-	市販培土	滅菌	資材1・2・3	0			6 (0-15) <0→2>
(2)幼植物2*	-	クロボク土	-	- (土着菌)	0	苗立ち期	全体	22 (4-29)
(3)幼植物3	湛水, 灌水100%, 50%, 25%	市販培土	-	- (土着菌)	0			1.8 (0-7)
(4)幼植物4	灌水, 飽水, 灌水 100%, 50%, 0%	市販培土	滅菌	資材1**	0			1.4 (0-6) <0→3>
(5)畑圃場20	灌水100%, 50%, 0%	クロボク土 (3NE)	-	資材1**	0	出穂期	コアサンプル	43 (15-69) <46→42>
(6)畑圃場21					4.5		トレンチ	25 (6-45) <16 33>
(7)ポット1	灌水100% 50%(表 層), 50%(深層), 0%	クロボク土 (60%), 市販培土(40%)	-	- (土着菌)	0	出穂期	全体	13 (2-39)
(8)ポット2	灌水100%, 0%	市販培土	滅菌	資材1**	0	幼穂分化期		8 (0-53) <0→16>
(9)水田圃場20	慣行, 節水	クロボク土	-	資材1**	0	出穂期	コアサンプル	2 (0-6) <3 2>
(10)水田圃場21					4.5		トレンチ	2 (0-10) <1 2>
課題2：品種間差の検証								
(11)畑品種圃場21	64品種	クロボク土 (5N)	-	資材1**	4.5	出穂期	トレンチ	28 (14-55) <28 28>
(12)畑品種圃場22					4.5			解析中-

\*: 水分処理を含まない \*\*; 非接種区を含む \*\*\*; 平均値、(範囲)、<非接種区 接種区> (太字は接種効果が大きいことを示す)

## 4. 研究成果

12 試験を横断的にみると、水田では畑に比べて著しく感染は少なく(菌叢も異なった; データ非提示)、市販培土に資材を加えるよりも、クロボク土の土着菌による感染が多い傾向であり、幼植物期よりは出穂期の根の方が感染が多い傾向があった(表1)。菌根菌資材接種効果は、平均感染率が5%以上の畑条件の4試験のうち、非接種区の感染率が低い場合の2試験((6), (8))で認められた。これら接種効果が大きかった試験では、それぞれ、根長密度(+12%, +22%)、リン吸収量(+61%, +83%)、地上部乾物重(+25%, +72%)であり、リン吸収量の増加に最も大きな効果があった。

### 4.1. AM菌とイネの共生系の水環境条件に対する応答の解明

#### 4.1.1 感染率への影響

畑での灌漑から乾燥までの水環境条件の変化に対して、感染率は比較的安定していた(5), (6), (7), (8), 表1)。水環境条件の変化は、根にも茎葉にも成長の大きな変化を生じさせており、適応的な変化や水ストレスへの抵抗性を予想していたが、感染率は概して動じなかった(データ非提示)。Auge(2001)の水分条件のAM菌感染の広範なレビューにおいて、ポット等での実験では、イネ以外の作物で、水分低下によるAM菌の感染率の増加と作物のストレス適応性が報告されているが、圃場では乾燥ストレスによる同化産物の低下によるAM菌への炭素の供給低下が実際に感染を制限していたのかもしれない。なお、試験(7)の深層灌漑処理により深層の根の感染率は増加したが、永久しおれ点に近いより強い乾燥処理では感染率は増加しなかった。

水田圃場試験(9), (10)での感染率は、畑圃場試験((5), (6))よりも著しく低下したことは(表1)新しいことではないが、水田の中での節水区では慣行区に比べて、感染率はわずかだが有意に上昇した(0.3→1.0%)。低い感染率は、大雨の頻発により、2年とも節水区での非湛水期間を長く持つことができなかったためでもあるので、節水強度を高めた条件での、水田でのAM菌感染については、なお検討の余地がある。

#### 4.1.2 菌叢への影響

2021年の畑圃場試験(6)から、感染した菌叢は水環境の変化による変化が示されたが、対照作物であるトウジンビエでは、灌水停止処理によりClaroideoglossusの感染割合が増加したが、イネではそのような変

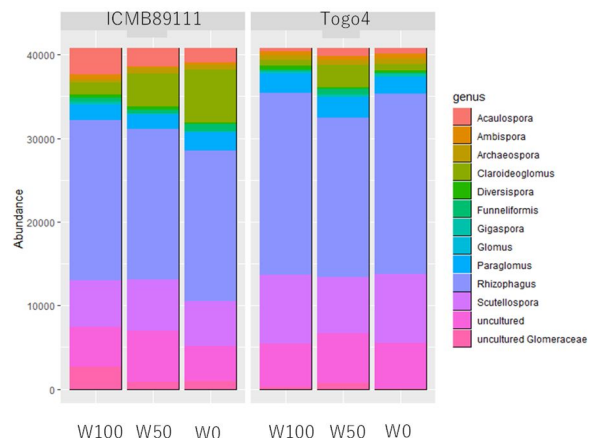


図1. トウジンビエ(ICMB891111)とイネ(Togo4)の3つの水環境条件での菌叢の変化。

化はなかった(図 1)。131\_Cla\_AB812592, 137\_Cla\_AB665521, 482\_Cla\_LC416131 の 3 つの Operational Taxonomic Unit (OTU) では、トウジンビエの無灌水区でリード数が増加する傾向があった(データ非提示)。また、206\_Div\_AB640737, 185\_Aca\_FR750156) の 2 つの OTU は、100%灌水区で高くなった。

水田試験(表 1 の(10))では、節水区では菌叢の多様性は慣行区に比べて減少し、Rhizophagus と Paraglomus の比率が高く、Acaulospora, Ambispora, Scutellospora の割合は慣行の常時湛水田区よりも低下した。水田試験の菌叢は畑試験と大きく異なり、先行研究(例 Noppakat et al., 2021)を確証した。なお、R10 株による接種により、その OTU が直接接種区で検出されるということはなかった。

なお、土壌深層では Rhizophagus 属の比率が高く、浅層よりも菌叢の多様性は低下し、感染率は高くなった(表 2)。

表2 土壌浅層(0-15 cm)と深層(15-30 cm)の根圏環境と感染率、菌叢多様性、根形質。

土層	根圏環境	根長密度 (cm/cm <sup>3</sup> )	根断面積 (x10 <sup>4</sup> μm <sup>2</sup> )	感染率	菌叢多様性*
浅層 (0-15 cm)	含水率: 29% (10-50%) (乾燥 灌溉) pH, C, N, P, K, O <sub>2</sub> 高い	高い 2.4 (0.5-4.8)	太い 59 (33-122)	低い	高い Acaulospora, Claroideoglossum, Paraglomus
深層 (15-30 cm)	含水率: 34% (20-50%) pH, C, N, P, K, O <sub>2</sub> 低い	低い 1.1 (0.2-4.1)	細い 25 (8-63)	高い	低い Rhizophagus, Scutellospora

\*2021年畑圃試験(6)より, \*\*2020年ポット試験(7)を除く。他は2020・2021年の畑圃場・ポット試験(5)-(8))より。

### 1.3 作物成長への影響

接種により感染率はトウジンビエでイネよりもやや高くなる傾向があり、感染率の増加による作物のリン吸収(図 2)と成長量の増加は、イネよりもトウジンビエで顕著であった。イネでは根断面積はより細く根長密度はより高く、灌水停止により水ポテンシャルが大きく低下した(データ非提示)。次節に述べるように、本研究は、イネの品種間差に重点を置いたが、菌根菌の感染率と、感染率に対するリン吸収効果には、作物種間差がある可能性があり、さらに検討する必要がある。

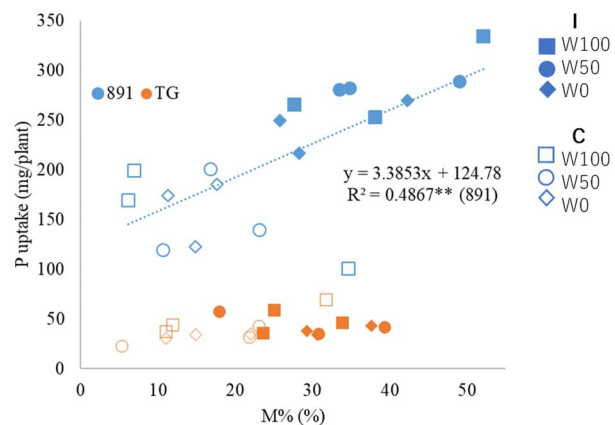


図2. 菌根菌感染率(M%)とリン吸収量の関係(試験(6))：トウジンビエ ICMB891111系統(891)、イネとうごう4号(TG)。

### 4.2. イネ品種間差の AM 菌の感染特性の検証

陸稲と水稲、日本在来種ミニコアコレクションを含むイネ 64 品種では、2021 年度試験(11)では、接種による感染率の変化は検出できなかったが、乾物重が増加する傾向があった(データ非提示)。接種による菌叢の変化として 8 つの OTU が検出され、接種区では Rhizophagus の OTU が増加する傾向であった(表 3)。菌叢の変化により、見かけ上同じ感染率でも、リン吸収や成長を増加させた可能性が示唆された。

表3 接種区(I)と非接種区(C)とで異なるOTUs(試験(11))

	baseMean	log2FoldChange	padj	family	genus
232_Rhz_HE775295	78.137139	-5.466371	1.84E-08	Glomeraceae	Rhizophagus
220_Par_NG_027567	25.494055	-5.589772	1.03E-06	Paraglomeraceae	Paraglomus
372_Unc_LC191611	313.337131	-2.292709	1.76E-03	Glomeraceae	Rhizophagus
187_Aca_FR692354	491.616226	2.870124	1.76E-03	Acaulosporaceae	Acaulospora
018_Rhz_JN937265	8.431592	7.848102	1.76E-03	Glomeraceae	Rhizophagus
348_Scu_LC191590	230.736439	3.010694	2.31E-03	Archaeosporaceae	Archaeospora
371_Par_LC191610	30.112952	-1.851952	9.35E-03	uncultured	uncultured
224_Par_AB812602	118.885287	-2.423383	2.22E-02	Paraglomeraceae	Paraglomus

試験(11)では、菌系感染率(M%)に品種間差が見られ、赤毛、Kinandang Patong、オトメモチなどで高い感染率で(図 3)、Kinandang Patong では、嚢状体形成率(V%/M%)も有意に高かった(データ非提示)。感染率は、地下部への分配比が高く、早生品種で高い傾向があり(オトメモチ他)、収量の応答指数とも弱い正の相関があったが、根形質との明瞭な関係は得られなかった(データ非提示)。また、AM 菌の菌叢に関して、有意な品種間差は検出できなかった。感染率に関して、圃場でのブロック間差も検出され、圃場でのデータの 2 年分を取りまとめ、年次間差や年次間差と品種の交互作用を検定すること、圃場試験とポット試験

とを組み合わせることで進めてゆくべきことが今後の課題である。また、地上部乾物重の接種に対する応答指数には品種間差があり、丈の低い品種で効果が高かった(データ非提示)。

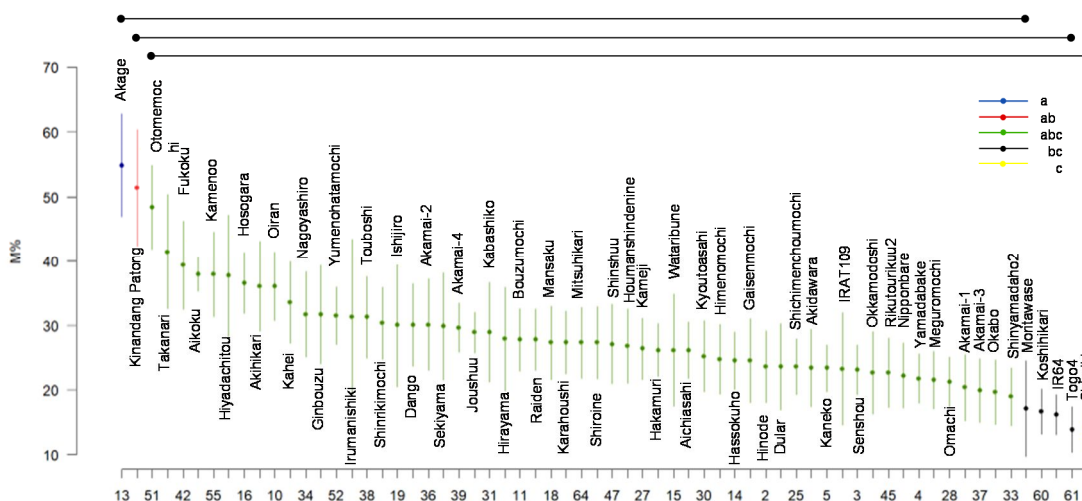


図3. イネ64品種間の菌根菌感染率(M%)の変異(試験(11))

試験(11)のサブ試験で、熱帯ジャポニカの陸稲 Kinandang Patong とインディカのアウス稲 Dular と、ハイブリッドとうごう4号とを選び、4つの異なる根の形状の影響を調べてみると、Kinandang Patong では、側根の多い冠根における qPCR の値がとうごう4号よりも高かった(図4)。同じ傾向は、顕微鏡による感染率の結果からも支持された。Kinandang Patong の冠根(1次根)は他の品種よりも根の径が太かった。側根の太さも、他の品種よりも太い傾向があるかもしれない。1次根から枝分かれする側根の長さは、Kinandang Patong では Dular やとうごう4号よりも短めであった。Kinandang Patong の側根の太さや長さ、1次根長当たりの側根分枝密度についてさらなる解析が必要である。

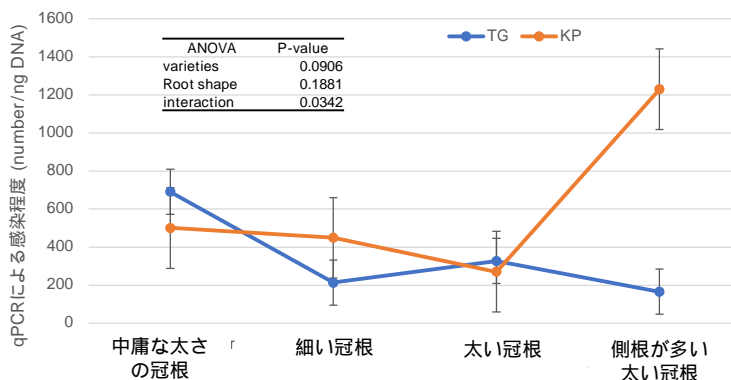


図4. とうごう4号(TG)とKinandang Patong (KP)の4つの根の形状でのqPCRによる感染程度(試験(11)のサブ試験)

以上、イネとAM菌の共生に関して、水環境条件とイネ品種間差の研究成果として、AM菌感染率と菌叢、作物の成長への影響を明らかにした。畑での灌漑から乾燥までの水環境条件の変化に対して、菌叢は変化したが、感染率は比較的安定していた。土壌深層ではRhizophagusの比率が高く、浅層よりも感染率が高かった。多様なイネ64品種の間では、感染率は、地下部への分配比と関連していた。Kinandang Patongの高い感染率を、根の太さと側根の形状から説明した。イネよりも対照作物のトウジンビエの方が、AM菌に対する応答が高いことを示した。なお、本研究では、ストリゴラクトンの作用、遺伝資源としての野生種の活用、土着菌の多様性・不均一性(Bernaola et al., 2018)、ジアミノベンジジン(DAB)による免疫染色法についても、検討を試みようとしたが、十分には研究できなかった。

気候変動の悪化への懸念が増大する社会状況にあって、農業分野でも二酸化炭素排出の少ない生産システムの設計が求められている。化学肥料の投入量を減らしながら、作物生産の養分管理を行う1つの方法として、菌根菌の接種効果、土着菌の動態、品種間や種間の応答性の差異について、本研究成果をさらに発展させてゆき、農業生態系の中で活用できる技術へと応用してゆくことが求められている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Y P, Ohtomo R, Kamoshita A
2. 発表標題 Manipulations of deep irrigation and shading to change infection rate of arbuscular mycorrhizal fungi and growth of rice and pearl millet
3. 学会等名 日本作物学会第255回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 請川弘次朗・大友量・鴨下顕彦
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌の増殖苗床の開発の予備研究
3. 学会等名 日本作物学会第255回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sari A, Ohtomo R, Kamoshita A
2. 発表標題 Rice varietal differences in yield and growth response to arbuscular mycorrhizal inoculation under Andosol upland field
3. 学会等名 日本作物学会第255回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土田修平・大友量・鴨下顕彦
2. 発表標題 前土地管理の差異と2つの菌根菌資材の陸稲生育への効果の比較
3. 学会等名 日本作物学会第255回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y P, Ohtomo R, Nakanishi H, Tsugama D, Kamoshita A
2. 発表標題 Effect of inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi on rice and pearl millet in upland with 3 irrigation levels
3. 学会等名 日本作物学会第254回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sari A, Ohtomo R, Y P, Kamoshita A
2. 発表標題 Rice varietal differences in arbuscular mycorrhizal fungi infection under upland field condition
3. 学会等名 日本作物学会第254回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y P, Kamoshita A, Ohtomo R
2. 発表標題 Infection of arbuscular mycorrhizal fungi on rice and pearl millet under three irrigation regimes in the upland field
3. 学会等名 The 11th International Conference on Mycorrhiza (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kamoshita A
2. 発表標題 Pathway to Sustainability in Industrial and Livelihood Agriculture
3. 学会等名 International Conference on Sustainability in Environment and Agriculture 2022 (ICSEA 2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kamanga P, Kamoshita A, Ohtomo R
2. 発表標題 Changes in native arbuscular mycorrhiza fungus colonisation along crop growth stages in upland rice-winter crop rotation with 4 preceding land uses
3. 学会等名 第57回根研究集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y, Kamoshita, Ohtomo
2. 発表標題 三段階の灌漑の畑でのアーバスキュラー菌根菌のイネ2品種の感染
3. 学会等名 JCOM2021 菌根研究会 2021 年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

菌根菌と根の研究 Mycorrhiza and root study <a href="https://www.kamoshitalab.com/blank-2">https://www.kamoshitalab.com/blank-2</a>
---

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	津釜 大侑 (Tsugama Daisuke) (10726061)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授  (12601)	



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	大友 量  (Ohtomo Ryo)  (80355081)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・上級研究員    (82111)	

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			
インド	タミルナードゥ農業大学			