

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26310307

研究課題名(和文) 有機性廃棄物連用土壌の微生物叢と作物生産性

研究課題名(英文) Microbiome and crop production of the fields under long-term treatment of organic waste-recycled composts

研究代表者

柘植 尚志 (Tsuge, Talkashi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30192644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：名古屋大学附属農場では、1987年から、有機性廃棄物堆肥の連用圃場を維持管理している。本圃場には、無肥料区、化学肥料区、化学肥料に牛糞厩肥、コーヒー粕堆肥またはバーク堆肥をそれぞれ上乗せ施用する慣行区、コーヒー区、バーク区、多量の厩肥のみを単用する厩肥区が設けられている。本研究では、厩肥連用土壌の土壌病害抑止効果と植物成育促進効果を確認するとともに、滅菌土壌を用いて病害抑止効果に土壌微生物が関与することを明らかにした。さらに、各区土壌の次世代シーケンサーを用いた細菌叢および糸状菌叢解析によって、有機物施用の有無、有機物の種類と量が微生物の群集構造を大きく変化させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Since 1987, the Nagoya University affiliated farm has maintained the field under long-term treatment of organic waste-recycled composts. In the field, there are six areas: fertilizer-free area, chemical fertilizer area, chemical fertilizer + cow manure area, chemical fertilizer + coffee compost area, chemical fertilizer + bark compost area and large amount cow manure area. In this study, we observed that soil of the large amount cow manure area has the suppressive effect on soil-borne diseases and the promotion effect on plant growth and clarified that soil microorganisms are involved in the disease suppressive effect by using sterilized soil. Furthermore, soil microbiome analysis of the field using the next-generation sequencer clarified that the population structures of bacteria and fungi in soil were greatly changed by not only the presence or absence of organic compost application but also the type and amount of organic composts.

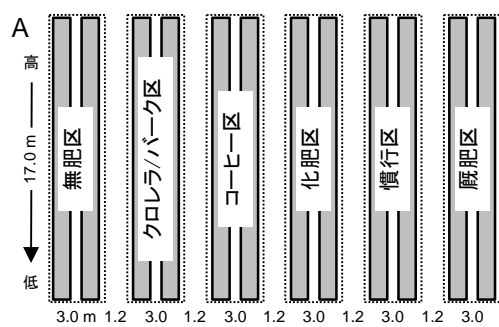
研究分野：植物病理学

キーワード：食料循環 土壌微生物 作物生産 土壌病害 病害抑止土壌

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が勤務する名古屋大学生命農学研究科附属フィールド科学教育研究センター東郷フィールド(附属農場)では、1987年から有機性廃棄物を継続施用している連用圃場を管理している。当圃場は、有機物含量の少ない、礫の多い鈣質洪積土壌(赤黄色土)からなり、開設前は全炭素含量、全窒素含量がそれぞれ1.65%、0.19%と少なく、陽イオン交換容量が10.4 cmol/kg 乾土と低い、典型的な貧栄養土であった。本圃場には、1区約50 m<sup>2</sup> (3 m×17 m、2畝に分割)の試験区が6区、傾斜長辺にそって配置されており、無肥料区、化学肥料区、化学肥料に牛糞厩肥、コーヒー粕堆肥またはクロレラ堆肥(2005年度からバーク堆肥)をそれぞれ上乗せ施用する慣行区、コーヒー区、クロレラ/バーク区、多量の厩肥のみを単用する厩肥区が設けられている(図1)。図2は、処理区間の土壌の色調の違いを示した、畦立て前の圃場の空撮写真である。

作付けは年2回、作目は1997年度までは春作メロン、秋作キャベツ、1998年度からは春作トウモロコシ、秋作ハクサイを栽培している。本圃場を用いて、土壌の各種性質、作物の育成、病害発生程度などが経年的にモニ



**B**

試験区	化学肥料	有機物
無肥料区	-	-
化学肥料区	+	-
慣行区	+	牛糞厩肥 2 t/10 a/作
コーヒー区	+	コーヒー粕コンボ 2 t/10 a/作
クロレラ/バーク区*	+	クロレラ藻体粉末0.2 t/10 a/作 バーク堆肥(2 t/10 a/作)
厩肥区	-	牛糞厩肥 20 t/10 a/作

\*2005年からバーク堆肥に変更。

図1 試験区の概要。

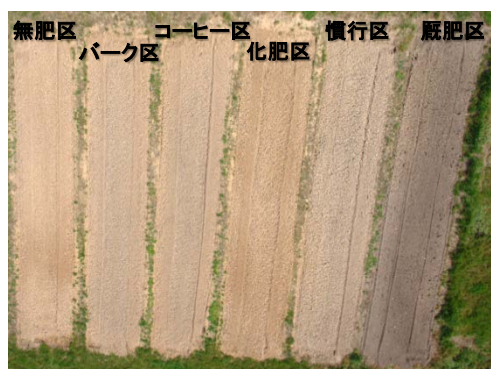


図2 施肥後、畝立て前の圃場。

ターされ、それらのデータが蓄積されており、本圃場は他に例がない極めて貴重な研究資源である。

春作トウモロコシと秋作ハクサイともに厩肥区で顕著に育成が促進されているが、化学肥料に各種有機性廃棄物を上乗せ施用した場合には、厩肥施用の慣行区では育成が促進されるが、コーヒー区、クロレラ/バーク区ではほとんど促進効果は認められず、投入資材による効果の違いが確認されている。

本圃場のもうひとつの特徴は、アブラナ科作物の土壌伝染性重要病害である根こぶ病(*Plasmodiophora brassicae*)が激発することである。開設当初から秋作にキャベツを栽培していたが、1996年まで本病は発生しなかった。1997年に初めて発生が確認され、1998年からハクサイに変更した後も毎年発病し、2006年以降その被害が著しい。このような激発圃場でありながら、厩肥区では発病株率が低く推移し、顕著な根こぶ病抑止効果が確認されている(図3)。

有機性廃棄物施用は、農耕文化の歴史の中で経験的に有効性が認識され、受け継がれてきた伝統的な循環型・持続型の耕地利用法である。肥料資源枯渇化への対応や国土における健全な元素循環のためには、食料循環(生産・加工・消費)の過程で排出される有機性廃棄物の農地還元による有効利用は極めて重要な課題である。これまで、様々な有機性廃棄物が利用され、肥料効果、病害抑止効果などが指摘されているが、それらが土壤微生物叢に与える具体的な影響については明らかにされていない。



図3 ハクサイ根こぶ病の発生(2007年11月)。

2. 研究の目的

上述した厩肥区の作物育成の促進効果や病害抑止効果は何に起因するのか? 有機物施用の効果については、土壌の物理性、化学性の改善に加え、微生物叢の豊かさ(多様化)がその要因として常に語られるが、“豊かさ”の実態は不明である。これは、土壌中の莫大な種類と数の微生物を定性的、定量的に検出

する技術がなかったためである。近年の次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析技術の進歩は、土壤微生物生態学にも強力なツールを提供した。本研究では、土壤 DNA の次世代シーケンサー解析によって、各区における微生物叢を質的・量的に把握するとともに、作物生産、病害抑止への土壤微生物叢の関与について評価し、有機物施用-微生物叢動態-作物生産性相関について総合的に検証することを目的とした。

メタゲノム解析技術の登場によって、土壤微生物の生態学研究は新たなステージに突入している。このような研究では、研究目的に適した土壤の選択が重要である。当連用圃場では、1987 年から継続してきた施肥管理によってそれぞれに適応した微生物叢がすでに確立されており、メタゲノム解析によって各土壤の微生物叢の違いを確実に検出できると期待された。

### 3. 研究の方法

年間の栽培管理は、従来とほぼ同様に下記の通り行った。

春作：

- 4 月中旬施肥・耕起・畝立
- 4 月下旬トウモロコシ苗植付
- 7 月中旬トウモロコシ収穫・調査

秋作：

- 9 月中旬施肥・耕起・畝立
- 9 月下旬ハクサイ苗植付
- 1 月上旬ハクサイ収穫・調査

#### (1) 土壤の微生物群集構造の解析

化肥区、慣行区、コーヒー区、厩肥区および無肥区について、秋作ハクサイ定植前と定植 1 か月後の各区土壤を採取した。各区 2 畝のそれぞれ 3 カ所から土壤を採取（ハクサイ定植後は株間土壤を採取）、混合し、それぞれからビーズビーティング法により DNA を抽出した（5 処理区×2 畝=10 サンプル、施肥前、定植後で合計 20 サンプル）。

本研究では、細菌叢と糸状菌叢をそれぞれ解析対象とし、各菌の群集構造を高感度で検出することができるリボソーム RNA 遺伝子（rDNA）の一部領域、具体的には細菌の 16S rDNA V3・V4 領域、糸状菌の rDNA ITS 領域を土壤 DNA からそれぞれ PCR 増幅した。PCR プライマーにサンプルごとに異なるタグ配列を付加し、次世代シーケンサー MiSeq によって混合解析した。得られた配列情報から QIIME 1.9 を用いて、各区の微生物群集構造を解析した。なお、このプログラムでは、97% 以上配列が一致するものを一つの OTU（Operational Taxonomic Unit）としている。本解析によって得られた各処理区の細菌種と糸状菌種、それらの分布頻度データを整理し、各区の微生物叢プロファイルを作成した。

また、化肥区、慣行区、コーヒー区および厩肥区を対象として、ハクサイ定植 1 か月後に各区 2 畝のそれぞれからハクサイを掘り起

し、空中振とう法によって根に付着した土壤（根圏土壤）を採取した。採取土壤から DNA を抽出し、上記と同様に細菌と糸状菌の群集構造を解析し、株間土壤の群集構造と比較した。

#### (2) 各区土壤の物理化学性の分析

化肥区、慣行区、コーヒー区、厩肥区および無肥区の秋作ハクサイ定植前と定植 1 か月後の土壤について、土壤の物理化学性の指標となる 26 項目（pH、EC、仮比重、窒素全量、炭素全量、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、無機態窒素、有効態リン酸、交換性加里、交換性石灰、交換性苦土、リン酸吸収係数、陽イオン交換容量、腐植、加里飽和度、苦土飽和度、石灰飽和度、塩基飽和度、石灰/苦土、苦土/加里、水溶性ホウ素、可給態鉄、交換性マンガン、可溶性亜鉛、可溶性銅）の分析を実施した。

#### (3) 厩肥区土壤の病害抑止性の検定

厩肥区は、顕著なハクサイ根こぶ病の抑止効果を示す。他の病害に対する効果を検定するために、化肥区を対照区として、慣行区、コーヒー区および厩肥区土壤のメロンつる割病菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*、土壤病害）、灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*、地上部病害）に対する抑止効果をポット試験によって検定した。また、厩肥区の病害抑止性への微生物の関与を確認するために、無処理土壤、エチレンオキシサイド滅菌土およびオートクレーブ滅菌土を用いて、それらのつる割病抑止効果を検定した。なお、土壤の化学性・物理性をできるだけ維持しつつ、土壤微生物を殺菌するためにエチレンオキシサイド滅菌を採用した。

#### (4) 厩肥区土壤の作物成育促進効果の検定

例年通り、春作トウモロコシの収穫時の地上部重量、秋作ハクサイの収穫時の地上部重量と根こぶ病の発生率を調査した。

他の作物に対する厩肥区の成育促進効果を検定するために、各区土壤でメロン、ダイズ、イネをポット栽培し、成育を比較した。

また、ラジコンヘリによってハクサイ圃場を経時的に空撮し、ラジコンヘリ・リモートセンシングによる作物診断を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 土壤の微生物群集構造の解析

化肥区、慣行区、コーヒー区、厩肥区および無肥区のハクサイ定植前と定植 1 か月後の土壤から DNA を抽出したところ、厩肥区、慣行区およびコーヒー区では、化肥区、無肥区と比べて DNA 収量が顕著に多く、有機物施用によって微生物バイオマスが増加することが示唆された。

抽出 DNA から、細菌の 16S rRNA V3・V4 領域、糸状菌の rDNA ITS 領域をそれぞれ PCR 増幅し、MiSeq によって 20 万リードを超える

配列を得た。QIIME 1.9 プログラムを用いて解析した微生物群集構造について、各区内の細菌群集の多様性、いわゆる  $\alpha$  多様性を算出し、上記の土壌 DNA の収量の結果と比較した。その結果、厩肥区と慣行区は、化肥区、無肥区と比べて微生物の量、種類どちらも多いこと、一方、コーヒー区は微生物の量は多いが、種類は少ないことが示唆された。

各区の細菌の群集構造を比較するために、門レベルの分布頻度図を作成した。その結果、定植前と定植後で分布パターンにほとんど違いがなく、長期連用によって、各区の細菌叢がすでに安定化していることが明らかとなった (図4)。さらに、各区の違いを、主座標分析 (PCoA) によって比較したところ、各区とも畦ごと、定植前と定植後で明確な違いは認められなかったが、無肥料区と化学肥料区の群集構造が類似していること、一方、コーヒー区、慣行区、厩肥区はそれぞれ独立して分布し、有機物施用の有無、有機物の種類と量が微生物の群集構造を顕著に変えることが明確に示された (図5)。

糸状菌についても同様な解析を行ったところ、長期連用によって、細菌叢と同様に、各区の糸状菌叢がすでに安定化していること、無肥料区と化学肥料区の群集構造は類似しているが、厩肥区、慣行区、コーヒー区はそれぞれ独立して分布し、有機物施用の有無、有機物の種類と量が糸状菌叢も顕著に変えることが確認できた。

さらに、ハクサイの根圏土壌と非根圏土壌の微生物叢を比較したところ、細菌、糸状菌

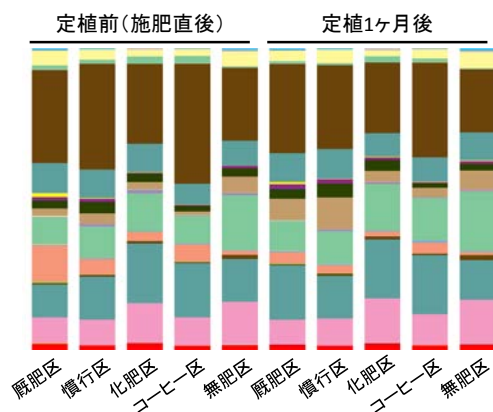


図4 各区の細菌群集構造(門レベル).

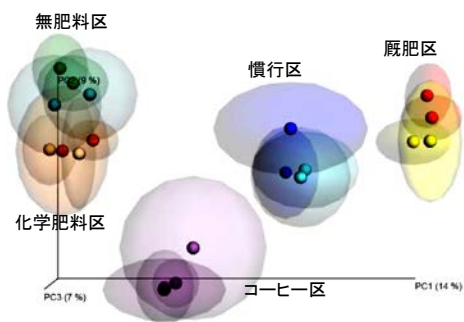


図5 細菌群集のPCoA (主座標分析). 各区の薄い丸が定植前、濃い丸が定植1か月後.

ともに両方で群集構造に違いがあることが明らかとなった。

### (2) 各区土壌の物理化学性の分析

化肥区、慣行区、コーヒー区、厩肥区および無肥区土壌の物理化学性を分析した。予想通り、厩肥区では他区と比較して、窒素、リン酸、加里の3要素、さらにカルシウム、マグネシウムの含量も有意に多く、この性質が作物成育促進効果の主要因であることが明らかとなった。

### (3) 厩肥区土壌の病害抑止性の検定

化肥区、慣行区、コーヒー区および厩肥区土壌のメロンつる割病に対する抑止効果をポット試験によって検定した。本葉が1枚展開したメロン苗の根をつる割病菌の孢子懸濁液に浸漬した後、各区土壌に定植、育成した。その結果、化肥区、コーヒー区、厩肥区では接種8日後には接種苗がほぼ枯死したが、厩肥区土壌では、発病のタイミングが遅れ、14日後でも枯死しなかった (図6)。

エチレンオキシド滅菌、オートクレーブ滅菌した厩肥区土壌を用いて同様な接種試験を行ったところ、滅菌土壌では発病抑止効果が失われ (図6)、抑止効果には土壌の生物性 (微生物) が関与することが確認された。

厩肥区土壌に孢子を混合した汚染土壌を用いて、メロンつる割病抑止性を検定した。その結果、浸根接種よりも顕著な抑止性が認められ、厩肥区土壌の病害抑止性には、土壌微生物による拮抗作用と植物の抵抗性誘導の両者が関与することが示唆された。

土壌病害の発病抑止効果が認められた厩肥区土壌と効果が認められなかった慣行区土壌でトマトを栽培し、灰色かび病菌を葉に接種した。その結果、どちらのトマトでも同様に発病し、厩肥区土壌も地上部病害には抑止効果がないことが確認された。

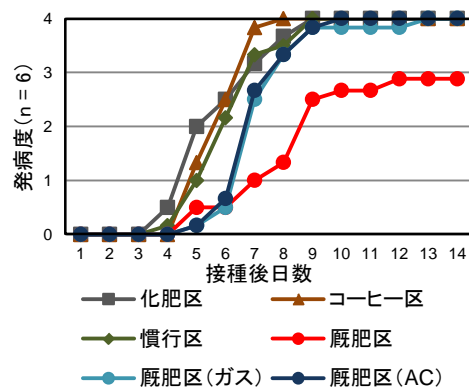


図6 厩肥区土壌のメロンつる割病抑止効果. 発病度:1, 葉の硬化;2, 葉の黄化;3, 萎凋;4, 枯死. 厩肥区(ガス), エチレンオキシド滅菌;厩肥区(AC), オートクレーブ滅菌.

### (4) 厩肥区土壌の作物成育促進効果の検定

化肥区、慣行区、コーヒー区および厩肥区土壌を用いてメロンを栽培し、厩肥区土壌に



成育促進効果があることを確認した(図7)。また、エチレンオキサイド滅菌またはオートクレーブ滅菌した厩肥区土壌はさらに高い成育促進効果を示すことを見出した(図7)。ダイズ、トマト、イネについても厩肥区土壌の成育促進効果を確認するとともに、厩肥区の滅菌土壌を用いて、これら作物についても土壌滅菌によって成育が促進されることを確認した(図7)。厩肥区の非滅菌、滅菌土壌の化学性を分析したところ、滅菌土壌ではアンモニア態窒素量が増加しており、この増加が成育促進の原因であると考えられた。



図7 厩肥区土壌のメロン(定植後14日目)およびダイズ(播種17日目)に対する成育促進効果。厩肥区(ガス), エチレンオキサイド滅菌; 厩肥区(AC), オートクレーブ滅菌。

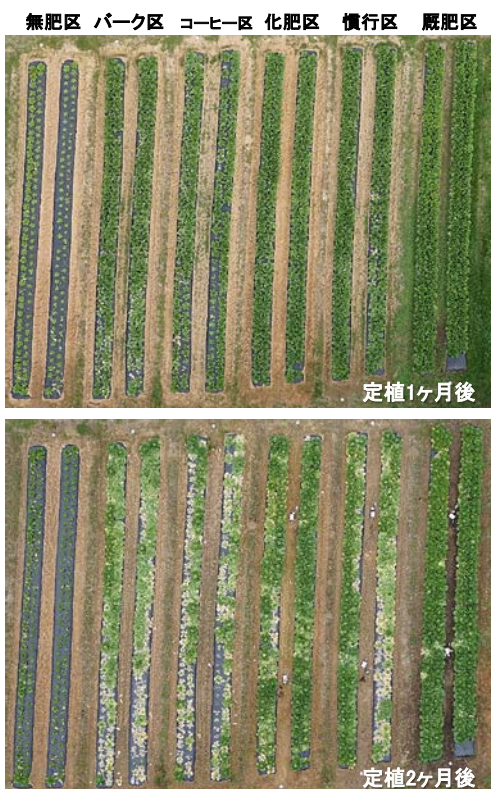


図8 ラジコンヘリ(ドローン)によって空撮したハクサイ定植1ヶ月後と2ヶ月後の圃場。根こぶ病によって枯死した個体は白色化している。

ハクサイ定植後、1週間ごとにラジコンヘリによって圃場を撮影した(図8)。得られた画像情報を統合・解析、植物体の成育状況、根こぶ病徴進展をモニタリングすることによって、ラジコンヘリ・リモートセンシングが施肥管理効果の評価、経時的な作物診断に有効であることが示唆された。

本研究によって、厩肥連用土壌の土壌病害抑止効果、作物成育促進効果を再確認するとともに、有機物施用の有無、有機物の種類と量が微生物の群集構造に大きく影響することを明らかにした。今後、微生物群集構造のより詳細な比較解析によって、作物の安定生産をもたらす“豊かな微生物叢”の実態にさらに迫りたいと考えている。

## 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)

[学会発表] (計3件)

- ① 村瀬潤, 田原保樹, 日置真優, 西内俊策, 北野英己, 柘植尚志 異なる有機物資材の長期施用が畑土壌の細菌群集に及ぼす影響. 日本土壌肥料学会大会, 2015年9月9日~11日, 京都大学(京都)
- ② 村瀬潤, 西内俊策, 亀岡笑, 田原保樹, 日置真優, 伊達康博, 菊地淳, 北野英己, 柘植尚志 長期有機物連用圃場の植物病害抑止性と微生物叢. 日本植物病理学会大会, 2016年3月21~23日, 岡山コンベンションセンター(岡山)
- ③ 村瀬潤, 田原保樹, 日置真優, 西内俊策, 北野英己, 柘植尚志 有機物資材の長期施用が畑土壌の病害抑止性と微生物群集に及ぼす影響. 日本土壌微生物学会大会, 2016年6月11・12日, 岐阜大学(岐阜)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

柘植 尚志 (TSUGE TAKASHI)  
名古屋大学・生命農学研究科・教授  
研究者番号: 30192644

### (2)研究分担者

村瀬 潤 (MURASE JUN)  
名古屋大学・生命農学研究科・准教授  
研究者番号: 30285241

### (3) 研究分担者

西内 俊策 (NISHIUCHI SYUNSAKU)  
名古屋大学・生命農学研究科・助教  
研究者番号: 30726980

### (4) 研究分担者

北野 英己 (KITANO HIDEMI)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授  
研究者番号: 50144184