

# 食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	植物寄生性線虫と拮抗する土壌微生物叢と線虫叢の探索
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人
研究組織	浅水 恵理香（農学部・教授）研究代表者 大門 弘幸（農学部・教授） 吉村 大輔（農学部・農場専門技術助手） 佐藤 修正（東北大学大学院生命科学研究所・教授）
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
キーワード	(1) 緑肥 (2) 連作 (3) 土壌化学特性 (4) 微生物叢 (5) 植物寄生性線虫 (6) 線虫叢

## 1. 2022年度の研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

1. 有機物として緑肥を導入した作付体系の試行  
線虫被害が連作障害の一要因として考えられるナス科作物（ナス、ピーマンなど）の連作圃場を想定して、直接の線虫抑制効果を持たない夏作の緑肥作物（飼料用トウモロコシ、セスバニア）を栽培し、ナス科作物の定植前にすき込む（腐熟期間は2週間前後とする）。すき込み直後から、腐熟期間およびその後のナス科作物の生育期間を通して、下記の化学分析と微生物叢の解析を行う。
2. 土壌化学性の推移  
試験圃場の土壌分析については、無機要素（pH, EC, 硝酸態窒素, 可給態リン酸, 交換性K, Mg, Caなど）の経時的測定を行い、緑肥すき込み後とナス科作物の生育時期別の推移を明らかにする。
3. 微生物叢の解析  
栽培開始時と連作の各回後の土壌をサンプリングし、微生物叢（細菌叢）のシーケンス解析を行う。
4. 線虫叢の解析と線虫感染実験  
細菌叢に特徴が見られた土壌サンプルを用いて、線虫叢を調べる。植物寄生性線虫への影響を調べるため、ポットを用いた接種試験を実施する。

## 2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

### 1. 有機物として緑肥を導入した作付体系の試行

龍谷大学牧圍場の畝(約 90m)を使用し、緑肥デントコーン区、緑肥セスバニア区、緑肥無施用区を 2 反復ずつとして、ナスと接木ピーマンを連作する区を設けた(図 1)。2021/4/1 には、デントコーン[‘ゴールドデント KD850 (RM135)’、カネコ種苗]とセスバニア(‘田助’、雪印種苗)を 0.5m 間隔で播種し、間引いて 1 個体を残し、栽培を続けた。7/20 に地上部を細断し、トラクターで根と共に土壤にすき込んだ。その後 17 日間を緑肥腐熟期間として、8/6 にナス(‘千両二号’、太田種苗)と接木ピーマン(‘京みどり’、太田種苗)の苗を 0.5m 間隔で定植した。連作は約 1 ヶ月ごとにあと 2 回繰り返し、2 回目は 9/7 に、3 回目は 10/15 に定植した。2022 年もほぼ同様の栽培試験を実施した。緑肥作物を 3/22 に播種し、ガラス温室で育苗した苗を 5/6 に畝に定植した。7/20 に緑肥作物の地上部を刈り取って細断し、7/22 にすき込んだ。ナス苗と接木ピーマン苗を 8/8、9/14、10/26 に定植した。



図 1 デントコーン(左)とナス(右)栽培の様子。畝に黒マルチ(住化積水フィルム)を貼り、穴あけ器で開けた穴に定植した。

緑肥すき込み前、腐熟後、ナス科連作 1 回目・2 回目・3 回目後に土壤をサンプリングした。サンプリング地点は、図 2 の通りである。

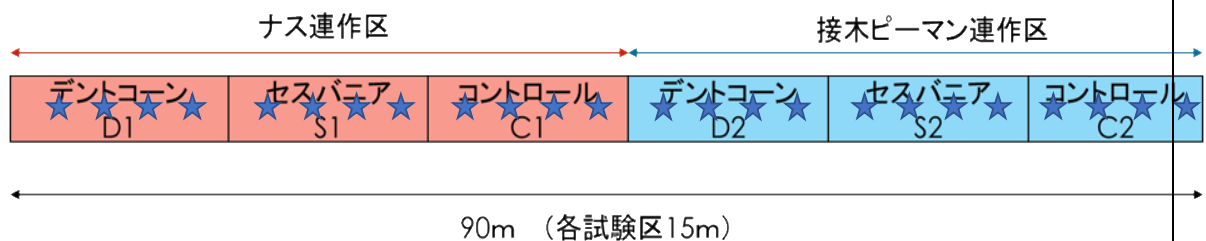


図 2 畝の D1 区(西側)から C2 区(東側)の各区において、4 カ所(星印)から土壤をサンプリングした。区内の採取地点の間隔は 3m とし、区間は 6m 空けた。採取地点では、線虫スコップ(内径 2.5cm、深さ 20cm; 藤原製作所)を垂直に挿して回転させ、約 100cm<sup>3</sup>×10 回分を採取した。

土壤採取直後に約 1g を土壤 DNA 抽出用に -20℃ で保存し、20g をベルマン漏斗にかけ、線虫を採集した。約 300g を屋内で 1 週間風乾後、乳鉢と乳棒で粉碎して化学分析に供した。残りは 10℃ に保管した。

栽培結果を比較すると、2021 年にはセスバニアのすき込み時草丈が 1m 程度だったが、2022 年には 2m 程度と旺盛に生育した。ナス科作物の生育については、2021 年には 2 連作目まで開花結実して収穫できたが、2022 年には全タイミングにおいてまともな結実が見られなかった。

## 2. 土壌化学性の推移

採取した土壌サンプルについて、pH と EC をポケット型マルチテスター（竹村電機製作所）、硝酸態窒素を RQ フレックス法、可給態リン酸をトルオーグ法、Ca, K, Mg を ICP 発光分析法で測定した。pH の結果を図 3 に示す。

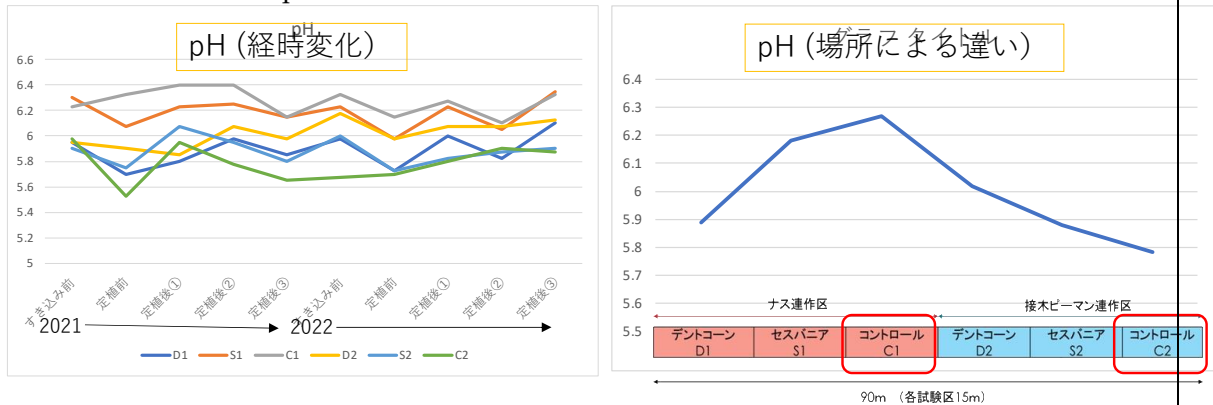


図 3 圃場の pH は、場所によって異なることが示された。畝の両端でより酸性に傾いており、とくに緑肥無施用の 2 区間で差が大きいことが分かった。

硝酸態窒素では、経時変化が見られた（図 4）。

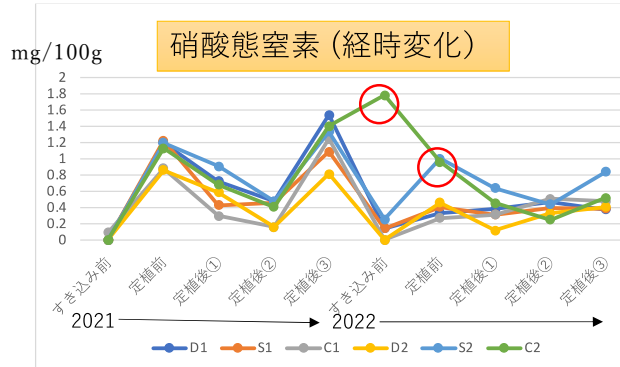


図 4 2022 年すき込み前 C2 区で残留が見られた（上の赤丸）。緑肥作物による吸収がなかったためと考えられるが、反復区 C1 では見られていない。2022 年腐熟後（図では定植前と表記）の S2 区で上昇が見られた（下の赤丸）。マメ科セスバニアの共生窒素固定細菌に由来する有機態窒素が分解された結果と期待できるが、こちらも反復区 S1 では見られなかった。

pH と硝酸態窒素以外の要素については、場所による違いや、緑肥施用の有無による変化は見られなかった。本試験で使用した圃場土壌の特徴として、EC 値が低い特徴が見られた（図 5）。

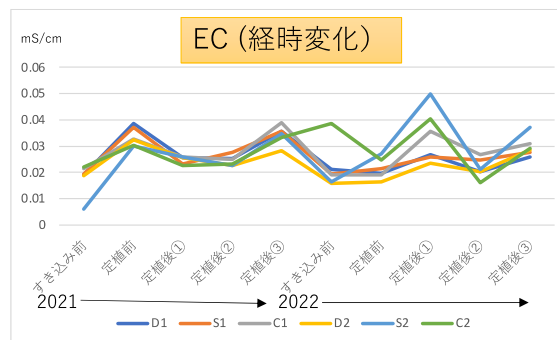


図 5 EC は 0.01~0.05 mS/cm の間を推移した。一般的な農作物栽培の適正值は 0.4~1.0 mS/cm とされていることから、非常に低いといえる。

### 3. 細菌叢の解析

2021年の土壌サンプルから NucleoSpin Soil (タカラバイオ) で DNA を単離し、16S rRNA V3-V4 領域 (約 450 bp) のアンプリコンシーケンスを Illumina MiSeq で行った。2022年の土壌サンプルからも同様の方法で DNA を単離し、16S rRNA V1-V9 領域 (約 1500 bp) のアンプリコンシーケンスを Oxford Nanopore で進めている。

2021年データの解析には、QIIME2 (*Nature Biotechnology* 37: 852–857, 2019) を使用した。DADA2 で Amplicon Sequence Variant (ASV) を推定し、16S rRNA データベース Silva 138 99% OTUs full-length sequences (MD5: b8609f23e9b17bd4a1321a8971303310) (*Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596, 2013) への対応付けと系統分類を行った。60 サンプル (6 区画×5 タイミング×2 反復) の系統分類結果から、 $\alpha$  多様性と  $\beta$  多様性について調べた。

Shannon 指標で表した  $\alpha$  多様性 (サンプル内における細菌種の豊富さと均質性) を図 6 に示す。

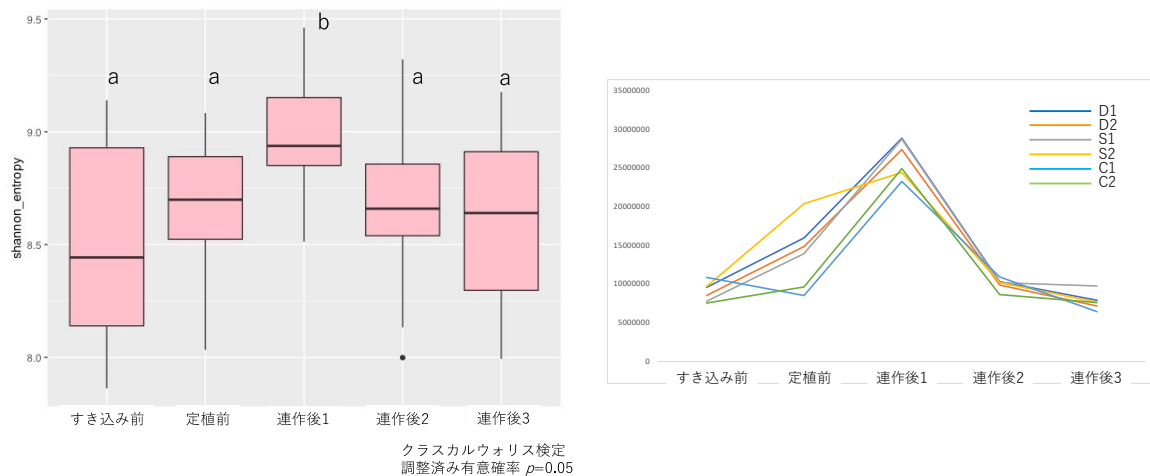


図 6 タイミング別の  $\alpha$  多様性 (左) と、希釈平板法で調べた菌数 (CFU) の変化 (右)。連作 1 回度で有意な差が見られており、その差は菌数の変化と連動することが示された。緑肥作物とナス科作物が根圏細菌叢に与える影響がそれぞれ異なり、多様性が増すとともに、存在量自体も増えたと考えられる。

サンプル間での菌叢の類似性 ( $\beta$  多様性) を調べることは、機能的な違いを発掘する上で有効である。上記結果からタイミングによる特徴が考えられたものの、区別できない結果が得られた。一方で、緑肥施用の有無と緑肥の種類によって、特徴が見られた (図 7)。

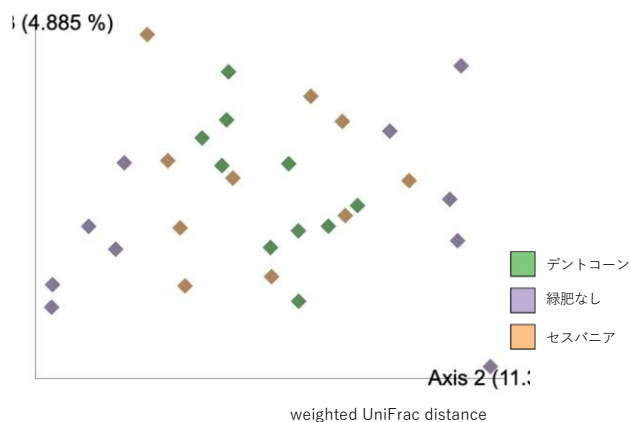


図 7 Weighted UniFrac Distance 法によるサンプル間菌叢距離解析の結果を主座標分析 (PCoA) で表した。緑肥あり区に菌叢構造に多様性がある可能性が示唆された。緑肥なし区が二分されたのは場所によっており、pH の違い (図 3) による影響が考えられる。

#### 4. 線虫叢の解析と線虫感染実験

α 多様性の増加が認められた連作 1 回後の土壌サンプルからベルマン漏斗法で土壌線虫を抽出し、得られた 153 個体それぞれからゲノム DNA を抽出し、18S rRNA V6-V8 領域 (約 500 bp) をサンガー法でシーケンスした。WarmBase Parasite DB (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) に対して BLASTN 検索し、種同定を行った。その結果、細菌食性の *Plectus sambesii* が最も多く見られ (98 配列)、次いで細菌食性の *Propanagrolaimus ju765* (53 配列)、残りの 2 配列は植物寄生性または菌食性の *Tylenchorhynchus sp.* と高い相同性を示した。

デントコーン区において、*Propanagrolaimus ju765* が顕著に増加しており、*Plectus sambesii* についても他の区と比較して 2 倍程度増加していた (図 8)。細菌食性線虫の増加は、そのエサとなる細菌が増加した結果と捉えられる。図 6 で見られた α 多様性の増加は、主にデントコーン区の細菌叢変化が要因となった可能性が高い。

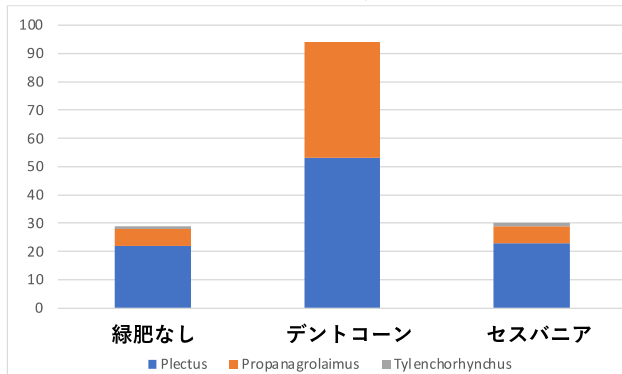


図 8 連作 1 回後の各区における自活性線虫種数の比較

デントコーン区において変化した細菌にはどのようなものが含まれるのか、370 属のシーケンスリード数を正規化して比較した (図 9)。

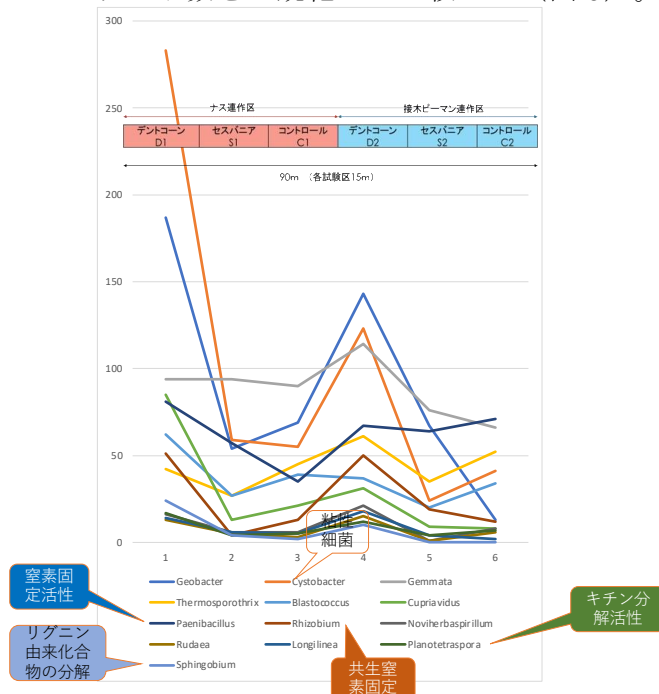


図 9 デントコーン区で増えた細菌 (13 属) には、イネ科作物残渣分解に必要な機能であるリグニン分解能をもつものなどが含まれていた。

本研究では、植物寄生性線虫と土壌微生物叢および線虫叢との関連を実験的に調べることを最終的な目標としていた。保管していた圃場土壌を用いてポット接種試験を行った

が、確かなデータを出すところに到達してない。

圃場試験を実践したことで多くの知見が得られたが、課題も多い結果となった。化学分析結果と連作作物の生育の様子から、緑肥の施用量が十分だったのか検証が必要である。植物寄生性線虫との関連を調べるためには、圃場の土壌環境を再現しつつ、条件検討ができる方法論の確立が急務である。得られた知見と課題を整理し、今後更に発展させていきたい。

### 3. 研究成果の社会的還元について

本研究プロジェクトの研究成果について（１）社会的な意義や影響（２）社会にどのように発信したのか、を平易にご説明ください。

- (1) 国内のサツマイモ圃場では、全国的にサツマイモネコブセンチュウによる被害が多発している。この線虫はナス科やウリ科などの作物にも広く寄生でき、発生すると甚大な被害をもたらすため、生産者は土壌燻蒸剤や殺線虫剤といった農薬を使って防除している。農薬の一つとして使用されていた臭化メチルが 2005 年に撤廃されて以降、環境保全への関心が高まり、より安全で持続可能な生物防除法の開発が求められている。本研究の目的は、緑肥を投入した圃場における土壌微小生物の生態への影響について、シーケンスデータを蓄積して調べることで、環境負荷の少ない方法を提案することである。土壌中には数千から数万種類の細菌や線虫が生息しており、種類や生息数が多いほど豊かな土壌とされている。土壌微小生物のバランスは化学的、物理的、生物的な影響を受けて変化するため、多角的にデータを集めることが有効である。シーケンスデータを通して目に見えない土壌微小生物のふるまいを捉え、環境条件との関連を明確にすることで、生息に適した条件を見出せると考えている。
- (2) 国内と国際学会発表に加えて、龍谷大学発酵醸造微生物リソース研究センターシンポジウム「緑肥圃場での線虫群のふるまいを捉える試み」においては、非専門家を対象とした講演を行った。線虫叢を土壌環境の指標として利用する技術の試行と可能性について話題提供した。

### 4. 収支報告

(非公開)

### 5. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

< 学会発表 >

周藤充哉<sup>1</sup>・上田要<sup>1</sup>・林大輔<sup>1</sup>・松本遼太郎<sup>1</sup>・吉村大輔<sup>1</sup>・佐藤修正<sup>2</sup>・浅水恵理香<sup>1\*</sup>（<sup>1</sup>龍谷大農・<sup>2</sup>東北大院生命科学）「緑肥施用圃場において植物寄生性線虫と関連する土壌パラメータの探索」日本線虫学会第 29 回大会 2022 年 11 月 5～6 日

浅水恵理香<sup>1\*</sup>・周藤充哉<sup>1</sup>・上田要<sup>1</sup>・林大輔<sup>1</sup>・松本遼太郎<sup>1</sup>・大門弘幸<sup>1</sup>・佐藤修正<sup>2</sup>・吉村大輔<sup>1</sup>（<sup>1</sup>龍谷大農・<sup>2</sup>東北大院生命科学）「緑肥施用圃場において植物寄生性線虫と関連する土壌パラメータの探索」2022 年度土壌肥料学会関西支部会 2022 年 11 月 28 日～12 月 2 日

< 発表論文（査読有り） >

Asamizu, E.\*, Kitabayashi, S. & Iwahori, H. (2022) A rapid method of DNA detection in field soil infested by the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*. *Nematological Research*, 52(1/2), 1-8.

Lemaire-Chamley, M., Koutouan, C., Jorly, J., Assali, J., ... Asamizu, E., ... Fernie A. R. & Rothan, C. (2022). A chimeric TGA repressor slows down fruit maturation and ripening in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 63(1), 120-134.

Mustamin, Y., Akyol, T.Y., Gordon, M., Manggabarani, A.M., Isomura, Y., Kawamura, Y., Bamba, M., Williams, C., Andersen, S.U. & Sato, S\*. (2022) *FER* and *LecRK* show haplotype-dependent cold-responsiveness and mediate freezing tolerance in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 191(2), 1138-1152.

Arashida, H., Odake, H., Sugawara, M., Noda, R., Kakizaki, K., Ohkubo, S., ... Sato S. & Minamisawa, K. (2022). Evolution of rhizobial symbiosis islands through insertion sequence-mediated deletion and duplication. *The ISME journal*, 16(1), 112-121.

< 発表論文（査読無し） >

浅水恵理香\*、岩堀英晶、北林聡「土壌サンプルからのテンサイシストセンチュウ DNA の検出と定量」(2023)『植物防疫』第 77 巻第 3 号 23～26 頁

< 招待講演・国際学会発表 >

浅水恵理香「緑肥圃場での線虫群のふるまいを捉える試み」2022 年度龍谷大学発酵醸造微生物リソース研究センターシンポジウム（オンライン開催）2023 年 3 月 10 日

Erika Asamizu<sup>1</sup>, Kazuma Tanioka<sup>1</sup>, Haruki Sawada<sup>1</sup>, Yuzuka Senoo<sup>1</sup>, Yusaku Nezu<sup>1</sup>, Daisuke Yoshimura<sup>2</sup> (<sup>1</sup> Department of Plant Life Science, Ryukoku University, Otsu, Shiga, Japan; <sup>2</sup> Department of Bioresource Science, Ryukoku University, Otsu, Shiga, Japan) Identification of soil factors associated with root-knot nematode density in green manure-applied fields. *7<sup>th</sup> International Congress of Nematology (ICN2022)*, Antibes Juan-les-Pins, France, 1-6 May 2022 (Participated online)

< 学外資金獲得状況 >

国立大学法人筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センター「形質転換植物デザイン研究拠点」共同利用・共同研究 浅水恵理香（代表）「サツマイモネコブセンチュウレース検定を容易にするレポーターシステム構築」（350 千円）令和 5 年度

科研費（基盤 C）浅水恵理香（代表）「ネコブセンチュウゲノムの可塑性とサツマイモ病原性レースとの関連」（3300 千円）令和 4～6 年度