

土壤改良資材「十和田石」と地域未利用バイオマスを活用した葉ネギ栽培土壤の分子生物学的解析

都城高専 (学) 宮田彩圭、(非) 新朋香、(学) 川添末裕、(非) 大峯奈菜
TGA 株式会社 (非) 大池達矢
長岡技科大 (学) 平片悠河、(正) 幡本将史、(非) 牧慎也、(正) 山口隆司
都城高専 (正) 黒田恭平

1. はじめに

近年、作物栽培において肥料の過剰施肥による地下水汚染などが問題となっている。肥料の施肥量は農家の経験に頼ることが多く、適切な施肥設計の確立が重要となっている。秋田県比内町で生産される緑色凝灰岩「十和田石」は、建築資材として用いられているが製品加工時や採石時に大量の碎石が生じており、この碎石の活用法の確立が求められている。十和田石は pH 緩衝能や硝化促進作用を持つこと、作物栽培において物質循環などの重要な役割を担う土壤微生物の繁茂しやすい環境をつくることがわかっており、土壤改良資材としての効果が認められている。

葉ネギの栽培では切り戻しと言われる根を残し、地上部位（葉や茎）を切り取ることにより 2~3 回葉ネギを収穫し、収量を増加させる技術が用いられている。しかし、切り戻しを行うと葉を切り取ることにより日光に当たる部分が減少し、光合成ができなくなることから、炭水化物不足が生じるという問題点がある [1]。また、葉ネギの生育では共生微生物である菌根菌が重要な役割を果たしており、特にアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）は植物のリンの吸収を促進させるなど植物の生育を改善することが知られている [2]。

切り戻しにおける炭水化物不足を解消するために、本研究では十和田石だけでなく地域未利用バイオマスである廃菌床と竹材を組み合わせた有機肥料を用いた施肥設計を行った。土壤改良資材である十和田石と有機肥料を組み合わせることで、土壤微生物の活動促進や pH 緩衝（葉ネギの栽培における最適 pH は 6.0~7.4）などによる作物の成長促進が期待できると考えた。また、未利用資源を用いることにより地域未利用バイオマスの循環の構築も期待できる。本研究では、ハウスと露地の 2 種の栽培土壤において栽培試験を行った。ハウス栽培では有機肥料と十和田石、菌根菌資材を組み合わせた施肥設計を適用し、その効果測定のために次世代 DNA シークエンサー MiSeq (Illumina) を用いた細菌・アーキアの微生物群集構造解析を行い、葉ネギの収量、土壤分析データとの相関性の調査を行った。また露地栽培では菌根菌資材と十和田石を施用し、AM 菌の検出、定量を実施した。

表 1 ハウス栽培における施肥条件

区画	肥料	施肥量 [Kg/反]
試験区1 (Tr_1)	廃菌床と竹材 (ビガーグリーン) の混合堆肥	900
	有機堆肥 (有機入り配合8-2-1)	360
	十和田石 (ヒナイグリーン)	240
試験区2 (Tr_2)	廃菌床と竹材 (ビガーグリーン) の混合堆肥	900
	有機堆肥 (有機入り配合8-2-1)	360
	十和田石 (ヒナイグリーン)	240
	菌根菌資材 (MYKOS GOLD)	1
対照区(CT)	化成肥料(マイティコート)	150

2. 実験方法

2.1 土壤微生物の群集構造解析

ハウス栽培の施肥設計を表 1 に示す。土壤採取は 313 日間の栽培期間中に施肥前、施肥後、3 回の切り戻し前後で計 7 回行った。採取方法は中区間 5 区画を 5 箇所に分け、中区間 5 区間×5 箇所×少区間 5 区間で計 125 個土壤を採取し、少区間 5 区間を一つにまとめた (図 1 参照)。採取した土壤は FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いて DNA 抽出を行った。

抽出した DNA は、16S rRNA 遺伝子を対象とした Univ515F-909R プライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。その後、MiSeq を用いて DNA シークエンス解析を行った。得られた 16S rRNA 遺伝子データは QIIME 2 による解析を行い、土壤微生物の群集構造や種多様性の解析結果を対照区と比較した。

2.2 PCR によるアーバスキュラー菌根菌の検出

露地栽培では表 2 に示す施肥条件に浸漬処理をした葉ネギを用いた。菌根菌資材は MYKOS GOLD (RTI-AG) を用いた。葉ネギの根をすり鉢ですり潰した後、2.1 の土壤と同様に DNA 抽

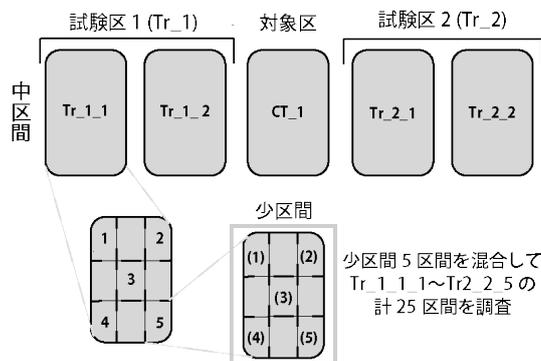


図 1 土壤採取方法

出を行った。葉ネギの根に共生する AM 菌を検出するため 18S rRNA 遺伝子を対象とした 2 種類の AM 菌特異的なプライマーセット (intra, moss) を用いて抽出した DNA の PCR 増幅を行った [3]。Intra のターゲットとなる AM 菌は *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 w と *Glomus mycorrhizal symbiont of Marchantia foliacea*, moss は *Glomus sp.*NBRmc である。ポジティブコントロールとして AM 菌を含む菌根菌資材 MYKOS GOLD (RTI-AG) (AM 菌: 300 propagules/g) から抽出した DNA を用いた。PCR 産物は電気泳動により増幅サイズを確認した。

3. 結果と考察

本研究では、バクテリア・アーキアの微生物群集構造を解析し、試験区 1 と試験区 2 を一つとして対照区と比較を行った。16S rRNA 遺伝子に基づいた葉ネギ栽培土壌の門レベルでの微生物群集構造を解析した結果、試験区と対照区ともに *Firmicutes* 門, *Proteobacteria* 門, *Cyanobacteria* 門, *Acidobacteria* 門の存在が確認された。さらに、種多様性 (faith_pd) を解析した結果、栽培日数 93 日目, 191 日目と 261 日目で得られた系統的種多様性は対照区では 45.7, 45.6 と 47.4

であるのに対して試験区では 54.9, 52.8 と 53.6 であり試験区で高くなっていることがわかった ($p < 0.05$) (表 3)。栽培日数 93 日目に試験区で見られる種多様性の急激な上昇は、豊富な有機物を含む有機肥料を分解する複合微生物が増殖したためと考えられ、この多様性の上昇には十和田石によるミネラル供給や pH 緩衝などが関与していることが期待できる。微生物多様性の高い土壌は、土壌中で微生物同士の栄養や住み場所の競合による病害抑制が期待できることや有機物の分解といった土壌機能が安定することが報告されている[4],[5]。そのため、有機肥料の施肥は化成肥料の施肥に比べ病害抑制や土壌機能の安定化が期待される。葉ネギ栽培土壌の化学分析を行った結果、pH は試験区で高くなる傾向が見られた(表 4)。また、試験区のアンモニア態窒素の濃度が低いことから試験区では硝化作用が働いていることが考えられ、これらは十和田石のもつ pH 緩衝能や硝化促進作用によるものだと考えられる。

PCR 法による AM 菌の検出を行った結果、intra と moss どちらのプライマーも MYKOS のみを施用した試験区において AM 菌が検出された。一方、MGT (MYKOS と十和田石を施用) においてはどちらのプライマーも AM 菌が検出されなかった。しかし、GT (十和田石のみ施用) では MYKOS のみを施用した試験区と同様にどちらのプライマーにおいても AM 菌が検出された。AM 菌は土壌中に普遍的に棲息していることが知られており、この結果より十和田石を施用することにより、土壌中の AM 菌と作物を共生させることが可能となることが考えられた。

4. 今後の課題

土壌微生物の群集構造の解析を行い、栽培土壌の分析データと葉ネギの収量との相関性を調査する。また、葉ネギの根から抽出した DNA をリアルタイム PCR 法を用いて絶対定量を行い AM 菌の存在量を明らかにする。

5. 参考文献

[1] 農耕と園芸編集部, 誠文堂新光社, 2014. [2] 石井孝昭, 農山協村文化協会, 2014. [3] C.thonar *et al.*, Molecular Ecology Resources, 2012. [4] 星野 (高田) 裕子ら, 土と微生物, 2005. [5] 和田さと子ら, 土と微生物, 2005.

表 2 露地栽培における施肥条件

区画	MYKOS使用量	十和田石使用量
	(Kg)	(Kg)
MYKOS有	2.5	0
MYKOS無	0	0
*MGT	5	1.25
GT	0	2.5

※M...菌根菌資材 MYKOS GOLD

GT...green tuff (緑色凝灰岩 十和田石)

表 3 葉ネギ栽培土壌の微生物多様性解析結果

Cultivation time(days)	Cultivation situation	OTU s (-)		faith_pd(-)	
		Control***	Tr_total***	Control	Tr_total
1	施肥前	296	402*	24.2	31.2*
13	施肥後	589	400	38.7	26.2
93	切り戻し1回目前	454	685*	45.7	54.9*
141	切り戻し1回目後	451	508	41.8	46.2
191	切り戻し2回目前	535	618	45.6	52.8*
261	切り戻し3回目前	590	685*	47.4	53.6*
313	切り戻し3回目後	562	649	46.4	53.2

※ p < 0.05, **対照区, ***試験区

表 4 葉ネギ栽培土壌の化学分析結果

		施肥前	施肥後	切り戻し 1回目前		切り戻し 2回目前		切り戻し 3回目前	
				1回目前	1回目後	2回目前	2回目後	3回目前	3回目後
pH	試験区	5.7	6.4	5.7*	N.D.**	6.0	5.9*	5.5	
	対照区	5.7	6.4	5.3	N.D.	5.9	5.6	5.3	
アンモニア態窒素 (mg/100g-dry)	試験区	9.7	37.8*	2.0	N.D.	2.4*	6.9	0.9*	
	対照区	9.7	63.8	5.1	N.D.	5.8	6.3	5.9	
硝酸態窒素 (mg/100g-dry)	試験区	19.5	13.1*	37.1*	N.D.	12	13.8	13.3	
	対照区	19.5	29	78.4	N.D.	35.6	26.3	11.1	

※ p < 0.05, **No data