

土壤微生物的観点からみた耕起栽培によるトウモロコシの  
収量向上要因の解明

日本大学生物資源科学研究科

立脇祐哉

2023

# 目 次

序論	1
第 1 章 ロータリー耕起が飼料用トウモロコシの生育，収量に及ぼす影響	5
緒言	
材料および方法	
結果	
考察	
第 2 章 ロータリー耕起が飼料用トウモロコシ根の AM 菌の感染と群集構造に及ぼす影響	29
緒言	
材料および方法	
結果	
考察	
第 3 章 ロータリー耕起が飼料用トウモロコシ根に感染する AM 菌群集構造およびトウモロコシのリン吸収に及ぼす影響	48
緒言	
材料および方法	
結果	
考察	

第4章 ロータリー耕起が土壌の理化学性に及ぼす影響・・・・・・・・・・68

緒言

材料および方法

結果

考察

第5章 ロータリー耕起が土壌中のリン溶解菌に及ぼす影響・・・・・・・・・・79

緒言

材料および方法

結果

考察

総合考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・101

摘要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・106

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・109

## 序 論

我が国の濃厚飼料の自給率は 12%と低く（農林水産省 2022）、ほとんどの飼料を輸入に依存している。近年、国際的な飼料作物の需要の増加や生産国の作況の悪化（農林水産省 2023a）、海上運賃の上昇（農林水産省 2023b）、および円安傾向などによって家畜飼料の価格が高騰し、畜産経営を維持していくうえで大きな負担となっている。そのため、配合飼料の中で最も多い割合を占める飼料用トウモロコシを、我が国においても生産できるようにすることが求められている。飼料用トウモロコシは単位面積当たりの穀物収量が優れており、同じイネ科のコムギやオオムギと比較しても約 2 倍高い収量が得られる（Diédhiou ら 2022）。さらに、飼料用トウモロコシは栄養価も非常に高く、エネルギー源となる炭水化物を豊富に含んでいる（Saeed and Saeed 2020）。このようなことから、国内では飼料用トウモロコシの生産拡大に対する社会的な期待が高まっている。しかし、我が国における飼料用トウモロコシの作付面積はほとんど拡大せず、ほぼ横ばい傾向にある。実際に、全国の飼料用トウモロコシの作付面積は 2017 年から 2021 年の 5 年間で 1,000 ヘクタールしか拡大していない（農林水産省 2023c）。飼料用トウモロコシは一般的に養分要求量が大きく（Palai ら 2020）、栽培に多量の施肥が必要であることからコスト面で負担になりやすい。この一因として、リン酸やカリ等の肥料価格が高騰（農林水産省 2023d）したことが考えられる。従って、我が国の飼料用トウモロコシの栽培においては施用した肥料の吸収割合を高める作付体系の確立が必要不可欠である。

我が国の国土には黒ボク土が約 31%分布し（小原ら 2016）、飼料用トウモロコシを栽培している畑の土壌も黒ボク土の割合が最も高い。黒ボク土はリン酸吸収係数の高い土壌であり、施用したリン酸が速やかに土壌に固定されるため、これまで黒ボク土での作物栽培では多量のリン酸肥料が施肥されてきた。このリン酸肥料のほとんどはリン鉱石から生産されているが、リン鉱石はほぼ 100%を国外からの輸入に頼っている状況である（大竹 2019）。そしてリン鉱石は今後数百年以内に枯渇が懸念される有限の資源であることから（大竹 2019）、未利用なリン酸資源をリン酸肥料に活用することは社会的にも重要な意義がある。実際、農林水産省の「みどりの食料システム戦

略」では、輸入に依存せずに未利用資源を活用した肥料の製造を推進し、化学肥料の使用量を 30%低減することを目標にしている（農林水産省 2021）。さらに、ロシアのウクライナ侵攻を契機とした化学肥料の価格高騰を考慮した上で、土壌に蓄積されたリン酸を効果的に活用することを掲げている点で非常に重要といえる。

近年、飼料価格の高止まりを背景に省力的で低コストな不耕起栽培による作付け体系が注目されている（Blanco and Ruis ら 2018）。不耕起栽培は土壌侵食防止や耕起作業の省力化、化石エネルギー節減などの面で優れた農法である（Cerdà ら 2020, Calcante and Oberti 2019）。しかし、その収量性は耕起と比べ低下することも報告されている（Anjum ら 2019）。このように不耕起栽培には多くのメリットがあるものの収量性がやや不安定であり、国内で本格的に導入するには難しいと考える。従来、作物のリン酸吸収量を高めるために一般的に栽培技術のひとつとして行われてきたのが土壌の耕起、耕耘である。耕起、耕耘の一般的なメリットとして、土壌の通気性の向上、肥料の混合、雑草の防除（Gajda ら 2018）が挙げられる。さらに、過去の報告では耕起や耕耘を行うことで土壌の貫入抵抗値が減少することが示されている（Mairghany ら 2019）。貫入抵抗値と根の総根長の間には負の相関関係がみられることも報告されており（Paul ら 2021）、土壌の硬度が低下するほど、根の伸長は良くなるといえる。施肥されたリン酸は土壌中のアルミニウムや鉄などの鉱物と吸着、固定化、沈殿する特徴を持つため、土壌中で移動しにくい元素のひとつである（Mardamootoo ら 2021）。その結果植物は根の表面から 2~3 ミリの範囲でしかリン酸を吸収できず、土壌中に存在しても根の表面から離れたリン酸の多くは根で吸収することができない（小八重 2020）。従って、耕起、耕耘による根の伸長を促進させることや根量を増大させることがリン酸吸収を促進させるために重要といえる。実際、植物のリン酸吸収量は根長と正の相関関係がみられることも明らかにされている（Ning ら 2019）。一方で、リン酸吸収量と根長の関係は必ずしも一定ではなく品種間差がみられることも明らかにされている（McLachlan ら 2021）。従って根長だけでは説明できない可能性があるが、多くの場合、品種間差よりも根長の方がリン酸吸収に対する影響が大きいと考えられる。

さらに近年、耕起、耕耘は土壌中の微生物にも影響を与えることが多数報告されて

いる (Mitchell ら 2017, Yin ら 2017). 例えば, 耕起, 耕耘によって細菌数が増加する報告や (Lu ら 2019), 真菌数が減少するといった報告もある (Nyamwange ら 2021). さらに耕起, 耕耘によって細菌および真菌の群集構造 (Srour ら 2020) や多様性 (Hong ら 2021) が変化することも明らかにされている. 耕起, 耕耘が土壤微生物に対してこのような変化を及ぼす要因として耕起, 耕耘による土壤の酸素含有量の増加が挙げられる (Guan ら 2022). つまり, 耕起や耕耘は土壤の酸素含有量が増加して好気性細菌が増殖しやすい環境を作り出し, 反対に嫌気性細菌が増殖しにくい環境を作り出すため (Guan ら 2022), 結果として細菌数や群集構造に違いが出ると考えられる. また, 真菌の減少は, 耕起, 耕耘によって引き起こされる菌糸ネットワークの物理的な攪乱に起因すると考えられており (Stahl ら 1999), ネットワークの切断が真菌数や群集構造に影響を及ぼすと考えられる.

これまで述べてきたように耕耘, 耕起によってさまざまな土壤微生物の生態が影響されるのであれば, 真菌に分類されるアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) や細菌に分類されるリン溶解菌などの微生物も耕起や耕耘によって何らかの影響が出る可能性がある. AM 菌はリン酸などの土壤中の無機養分を宿主植物に供給する能力や (Smith and Read 2008), 固定化されたリン酸を可溶化する酵素を放出する能力を持っている (Selim ら 2021). そのため, AM 菌が根に感染すると宿主植物の生育が促進することが報告されている (Zhan ら 2019, Juntahum ら 2022, Udo ら 2023). 一方, リン溶解菌は土壤中の難溶性リン酸を可溶化する働きを持つ (Bouizgarne ら 2023). 従って, 土壤中のリン溶解菌密度が高まることで土壤中の可給態リン酸の増加 (Peng ら 2022) や, 作物のリン酸含有量や収量が向上した報告がいくつも存在する (Hussain ら 2019, Bilal ら 2021, Adnan ら 2022). ただし, これまでに耕起, 耕耘によって作物のリン酸吸収や生育が改善された要因をこれらの土壤微生物の観点から明らかにした研究事例はない. そこで本研究では黒ボク土条件下においてロータリー耕起をした時にトウモロコシの生育, 収量, リン吸収が変化する要因を土壤中の AM 菌やリン溶解菌などの微生物群の観点から明らかにすることを目的とした.

まず, 第 1 章ではロータリー耕起が飼料用トウモロコシの生育, 収量に及ぼす影響を調査した. さらに, 第 2 章ではロータリー耕起が飼料用トウモロコ

シ根の AM 菌の感染と群集構造に及ぼす影響を調査し、次に第 3 章においてロータリー耕起によって飼料用トウモロコシのリン酸吸収量が増大する要因を根に感染する AM 菌の群集構造の観点から調査した。また、第 4 章ではロータリー耕起が土壌の理化学性に及ぼす影響を調査し、第 5 章ではロータリー耕起によって土壌の可給態リン酸含有量が高まる要因をリン溶解菌の観点から調査した。最後に、各章の成果を総合的に考察し、ロータリー耕起がトウモロコシの生育、収量を向上させる要因を AM 菌やリン溶解菌などの土壌微生物的観点から論じた。

## 第1章 ロータリー耕起が飼料用トウモロコシの生育，収量に及ぼす影響

### 1-1. 緒言

これまでの報告では耕起によってダイズ (Adamič and Leskovšek 2021), イネやコムギ (Zhang ら 2023) などの収量が向上した報告がある。一方で，耕起と不耕起の違いではイネやコムギの収量に影響を及ぼさない報告や (Guo ら 2021), 反対に耕起によってトウモロコシ (da Silva ら 2020, Li ら 2022a) やダイズ (da Silva ら 2020), コムギ (Omara ら 2019, Li ら 2022b), ソルガム (da Silva ら 2020) などの作物の収量が低下したことも明らかにされており，結果は様々である。

このような結果が得られる原因として，耕起，耕耘による土壌や作物の根の変化が考えられる。これは耕起，耕耘を行ったことによる土壌の物理性の変化が要因と考えられる。例えば，嵩密度，土壌貫入抵抗性，浸透性，土壌水分含有量，空隙率などが耕起，耕耘によって影響を受ける可能性が示唆されている (Mairghany ら 2019)。また，Ren ら (2018) は土壌物理性の変化が根の成長や分布に影響を与える可能性があることを指摘している。実際，過去の報告では，耕起，耕耘を行うことによって根長密度が高まることが報告されており (Guan ら 2015)，土壌貫入抵抗値と乾燥根重量，総根長の間には負の相関がみられることも示されている (Paul ら 2021)。さらに，根が広がることによって作物の養分吸収量が改善されることが示されている (Liu ら 2020)。このような耕起，耕耘による土壌の貫入抵抗性や根張りの変化が作物の収量性の向上に寄与している可能性がある。

その一方で耕起，耕耘は土壌構造が破壊されるため，土壌中の水分が急速に減少する (Vizioli ら 2021)。植物の生育に適切な土壌水分は，種子の発芽や作物の健全性，および高い収量を確保するために重要である (Li ら 2020)。このことから土壌の水分含有量の減少は耕起，耕耘で収量が低下する原因のひとつといえる。さらに，耕起，耕耘による収量の減少は，土壌侵食による土壌有機物および全窒素の損失にも起因している (Chalise ら 2020)。侵食が発生すると，最初に流される土壌の層は表土であるが，表土は一般に深層に比べ肥沃とされている (Chalise ら 2020)。土壌有機物は土壌中の栄養循環など生化学プロセスにも大きな影響を与えることが明らかにされてお



り、全窒素は作物の光合成速度や物質生産量促進するはたらきがある (Lawlor ら 2001, Zhao ら 2016). このようなことから、耕起、耕耘は作物の生育や収量を低下させる可能性もある.

さらに耕起、耕耘による作物の根や収量への影響は、気候や (Pittelkow ら 2015), 土壌の特性 (Steward ら 2018), 作物種の違いや降雨 (Liu ら 2012) などの条件に左右される可能性がある. 例えば、湿潤気候下では耕起、耕耘によって高い収量が得られるのに対し、乾燥気候下では不耕起栽培によって高い収量が得られることが示されている (Pittelkow ら 2015). また、粘土含有量が高い土壌では耕起、耕耘によって作物の収量性が向上するのに対し、保水力の低い土壌 (粘土含有量の低い砂質土壌) では不耕起によって作物の収量性が向上することが示されている (Steward ら 2018). このように、気候や土壌、作物種などの違いによって耕起、耕耘の作物に対する影響は変わる可能性がある.

そこで、本章では温帯条件下における黒ボク土でロータリー耕起を行ったときに、土壌の硬度やそれにともなう根の伸育がどのように変化するか調査し、飼料用トウモロコシの養分吸収量と生育収量がどのように変化するか評価することとした.

## 1-2. 材料及び方法

### 1) 試験耕種概要

本試験は神奈川県藤沢市にある日本大学生物資源科学部附属農場 (黒ボク土) にて 2019 年 4 月から 2020 年 9 月に行った (第 1-3 図). 試験区はロータリー耕起区および不耕起区を設け、1 作目の試験のプロットと同じ場所で 2 作目の試験を実施した. 各試験区の 1 反復の大きさは 4.5 m×5.25 m とし、各区 3 反復とした. 不耕起区は実験期間中 (2019 年 4 月~2020 年 9 月) ロータリー耕起を行わず、ロータリー耕起区は飼料用トウモロコシの播種 1 か月前 (2019 年 4 月 16 日, 2020 年 4 月 11 日) と飼料用トウモロコシの播種前日 (2019 年 5 月 19 日, 2020 年 5 月 13 日) に表層約 20 cm をロータリー耕耘機 (KRA850, 株式会社クボタ, 大阪府) でロータリー耕起した. 飼料用トウモロコシ (*Zea mays* L., 品種: P1690, パイオニアエコサイエンス株式会社, 東京都) は 2019 年 5 月 20 日, 2020 年 5 月 14 日に、株間 20 cm となるよう表層 2 cm の位

置に 1 か所に 3 粒播種をした。3 週間後に間引きを行い、1 株 1 本仕立てとし、1 m<sup>2</sup> あたり 6.7 本とした。施肥は 2019 年、2020 年ともに基肥として窒素（硫酸アンモニウム）、カリウム（塩化加里）を成分量として 1 m<sup>2</sup> 当たり 10 g ずつとなるように播種の前日に両試験区において表層 3 cm の位置に条施肥した。播種後は芽が出るまで毎日スプリンクラーで散水し、防虫管理として発芽後 1 週間後にサンケイデナポン 5 % ベイト（住友化学園芸株式会社、東京都）を散布した。雑草管理としてアルファード液剤（日本曹達株式会社、東京都）を栄養成長期、絹糸抽出期、成熟期の 1 週間前に散布した。2019 年 9 月から 2020 年 4 月までの間、各区の畑は休閑とし、全ての区において適宜手で雑草を抜いた。なお、この期間はロータリー耕起を全く行わなかった。生育期間中および平年の気象データとする積算降水量、平均気温、積算日照時間は圃場試験の実施場所から約 5 km 離れている気象庁のアメダス地点「辻堂」の気象データを用いた。

## 2) 生育調査

飼料用トウモロコシの栄養成長期（2019 年 7 月 1 日：播種後 42 日、2020 年 6 月 25 日：播種後 42 日）と絹糸抽出期（2019 年 7 月 25 日：播種後 66 日、2020 年 7 月 23 日：播種後 70 日）に 1 反復、大きさに関係なく連続した 15 個体の生育調査を行った（第 1-1 図）。また、栄養成長期と絹糸抽出期に同一の個体を調査した。調査項目は草丈、SPAD 値、莖径、葉面積指数（LAI）とした。SPAD 値は SPAD 計（SPAD-502、コニカミノルタ、東京都）を用いて主莖の最上位展開葉を 3 回ずつ測定し、その平均値を個体の代表値とした。莖径はデジタルノギス（700-112, Mitutoyo, 神奈川県）を用いて地際の長径と短径を測定し、その平均値を個体の代表値とした。また、LAI は各反復から代表の 1 個体を選抜し、個体の葉面積を葉面積計（LI-3100C, LI-COR 社, ネブラスカ州, USA）で測定し、残りの 9~7 個体の葉面積を算出した。各反復の葉面積を算出したのち、LAI を求めた。

## 3) 飼料用トウモロコシのサンプリングと乾物重及び子実重の測定

地上部と根は、栄養成長期（2019 年 7 月 1 日：播種後 42 日、2020 年 6 月 25 日：播

種後 42 日) と絹糸抽出期 (2019 年 7 月 25 日 : 播種後 66 日, 2020 年 7 月 23 日 : 播種後 70 日) に 1 反復, 大きさに関係なく連続した 8~10 個体をサンプリングした (第 1-1 図). 地上部は地際で根と切断した後, 乾燥機 (DRL823WA, ADVANTEC, 東京都) に 80°C, 48 時間入れて完全に乾燥させ, 電子天秤 (GX-3000R, 株式会社エー・アンド・デイ, 東京都) を用いて乾物重を測定した. 測定後, 粉碎機で茎葉のみ粉末状にした.

成熟期 (2019 年 9 月 19 日 : 播種後 122 日, 2020 年 9 月 9 日 : 播種後 118 日) に 1 反復, 大きさに関係なく連続した 15 個体の地上部をサンプリングし (第 1-1 図), 子実と, 穂軸, 茎葉に分別した. 子実重および百粒重は穀類水分計 (PM-650, 株式会社ケツト科学研究所, 東京都) を用いて子実の水分含有量を測定し, その値から水分含有量を 15.5% に換算して算出した. 全粒数は全粒重を百粒重で割って 100 を掛けた値として算出した. なお, 調査では未熟種子を含む全ての種子を測定した. その後, 子実と穂軸, 茎葉は乾燥機で 80°C, 48 時間完全に乾燥させ, それぞれの乾物重を測定した. 地上部乾物重は子実と穂軸, 茎葉の乾物重を合計し算出した.

#### 4) 茎葉の全リン酸, 全窒素, 全炭素含有量の分析

全リン酸測定のための酸分解は, 両年ともに乾燥, 粉碎した茎葉試料 1 g を, ケーラダール窒素分解装置 (KL-2E, 宮本理研工業社製, 大阪府) を用い 3 時間, 20 mL の過塩素酸 (60%) にて加熱分解した. 酸分解後, メタバナジン酸比色法 (関谷 1976) を用い, マルチモードプレートリーダー (Synergy HTX, ワケンビーテック株式会社, 京都府) を使用して波長 410 nm で全リン酸の含有量を測定した. その後, 茎葉乾物重とリン酸濃度をかけあわせてリン酸吸収量を算出した. 全炭素含量と全窒素含量は試料約 80 mg 用い, CN コーダー (MT-700, ヤナコテクニカルサイエンス株式会社, 東京都) で測定した. その後, 茎葉乾物重と全炭素濃度, 全窒素濃度をかけあわせて炭素吸収量, 窒素吸収量を算出した.

#### 5) 土壌貫入抵抗性

播種前日の 2019 年 5 月 19 日, 2020 年 5 月 13 日に各反復ランダムに 6 箇所, 深さ

0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm の深度毎で簡易型貫入式土壌硬度計 (DIK-5590, 大起理化学工業株式会社, 埼玉県) を用い土壌貫入抵抗値を調査した。

#### 6) 根の採取および根長密度, 根重の測定

根の採取は地上部のサンプリングと同日に行った。各反復, 上述した 8~10 個体とは別の 5 個体を選抜し, 直径 4 cm の土壌コアサンプラー (DIK-102A, 大起理化学工業株式会社, 埼玉県) を, 垂直に打ち抜いて根の採取を行った。各個体の株元からの距離 0 cm, 10 cm, 20 cm, 30 cm (第 1-2 図) で深さ 0-10, 10-20, 20-30 cm 別に根を採取した。5 個体から採取した根は 1 つのビニール袋にまとめ, そこに熱湯を注ぎ良く攪拌し, 土壌の塊を崩した後, 篩 (篩目の大きさ: 53  $\mu\text{m}$ , 篩の直径: 22 cm) に注いだ。また, 細かい泥が洗い流せるまで水道水を何度も篩に通した。そのあと, 篩上の根および残渣をバットに移し, 水でよく攪拌した。浮遊したすべての根を含む上澄みを再び篩に注ぎ, 篩上に残った根と残渣を, 水を入れたボウルに移した。棒で水を回転させ, 水の回転が止まる寸前にボウルを静かに傾けゴミの混入を避けながら上層に浮遊している根を, 茶こしを使って回収した。採取したすべての太さの根をクリアファイル上に重ならないよう広げた。その後, スキャナ付きプリンター (PX-M5041F, セイコーエプソン株式会社, 長野県) を用い, TIFF 形式の解像度 400 dpi で画像を読み込んだ。ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) で根のピクセル数を算出した後, ピクセル数から長さに変換し (<https://www.size-info.com/pixe/>), 根長を求めた。その後, コアの体積から根長密度を算出した。採取した根を各試験区の 1 反復ごとにまとめて新鮮重を測定した。

### 1-3. 結果

#### 1) 栽培期間中における月ごとの積算降水量および平均気温

2019 年の積算降水量は平年と比較して 5 月下旬で 43 mm 多く, 6 月上旬で 53 mm 多く, 9 月上旬では 41 mm 多かった (第 1-1 表)。さらに, 2020 年の積算降水量は平年と比較して 6 月下旬で 67 mm 多く, 7 月上旬で 87 mm 多く, 7 月下旬では 84 mm 多かった。2019 年の平均気温は平年と比較して 5 月下旬で 1.9°C 高く, 7 月上旬で 2.5°C

低く、9月上旬では1.2°C高い結果となった。また、2020年の平均気温は平年と比較して6月上旬で2.3°C高く、8月下旬で2.5°C高く、9月では2.7°C高い結果となった。2019年の積算日照時間は平年と比較して6月下旬で37時間長く、7月上旬で62時間短く、8月上旬では41時間長い結果となった。加えて2020年の積算日照時間は平年と比較して7月下旬で49時間短く、8月上旬で47時間長く、8月下旬では49時間長い結果となった。

## 2) 飼料用トウモロコシの生育

2019年、2020年において栄養成長期および絹糸抽出期の草丈、SPAD値、茎径、LAIを調査した（第1-2表）。栄養成長期および絹糸抽出期の草丈、茎径に関して2019年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020年も同様な結果を示した。さらに、耕起管理間で有意差が認められた。栄養成長期および絹糸抽出期のSPAD値に関して2019年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020年も同様な結果を示した。また、年次間および耕起管理間で有意差が認められた。栄養成長期のLAIに関して2019年、2020年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した。加えて、耕起管理間で有意差が認められた。絹糸抽出期のLAIに関して2019年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020年も同様な結果を示したが、年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった。

## 3) 飼料用トウモロコシの茎葉乾物重

2019年、2020年において栄養成長期および絹糸抽出期の茎葉乾物重を調査した（第1-3表）。栄養成長期および絹糸抽出期の茎葉乾物重に関して2019年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020年も同様な結果を示した。また、耕起管理間で有意差が認められた。

## 4) 飼料用トウモロコシの茎葉養分吸収量

2019年、2020年において栄養成長期および絹糸抽出期の茎葉リン酸濃度、茎葉リン酸吸収量、茎葉炭素濃度、茎葉炭素吸収量および茎葉窒素濃度、茎葉窒素吸収量を

調査した（第 1-4 表）．栄養成長期の茎葉リン酸濃度に関して 2019 年，2020 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した．さらに，年次間で有意差が認められた．絹糸抽出期の茎葉リン酸濃度に関して 2019 年，2020 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した．ただし，年次間および耕起管理間では有意差が認められなかった．栄養成長期および絹糸抽出期の茎葉リン酸吸収量に関して 2019 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し，2020 年も同様な結果を示した．また，耕起管理間で有意差が認められた．栄養成長期および絹糸抽出期の茎葉炭素濃度に関して 2019 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し，2020 年も同様な結果を示した．栄養成長期では年次間および耕起管理間で有意差が認められたのに対し，絹糸抽出期では年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった．栄養成長期および絹糸抽出期の茎葉炭素吸収量に関して 2019 年，2020 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した．なお，栄養成長期では耕起管理間で有意差が認められたのに対し，絹糸抽出期では年次間で有意差が認められた．栄養成長期の茎葉窒素濃度に関して 2019 年，2020 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した．また，年次間および耕起管理間で有意差が認められた．絹糸抽出期の茎葉窒素濃度に関して 2019 年は不耕起とロータリー耕起で同じ値を示し，2020 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した．さらに，年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった．栄養成長期および絹糸抽出期の茎葉窒素吸収量に関して 2019 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し，2020 年も同様な結果を示した．栄養成長期では耕起管理間で有意差が認められたのに対し，絹糸抽出期では年次間で有意差が認められた．

##### 5) 飼料用トウモロコシ播種前土壌の貫入抵抗性

2019 年，2020 年はすべての土壌深度においてロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した．また，年次，耕起管理間および深度間で有意差が認められた（第 1-4 図）．

##### 6) 飼料用トウモロコシの根長密度および根重

2019 年，2020 年の栄養成長期に行った調査では，株からの距離 0 cm の根長密度は年次間，耕起管理間および深度間で有意差が認められた（第 1-5 図）．また，ロータリ

一耕起および不耕起において 2020 年よりも 2019 年で高い値を示した。さらに、両年において不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した。株からの距離 10 cm, 20 cm の根長密度は深度間でのみ有意差が認められた。株からの距離 30 cm の根長密度は耕起管理間および深度間で有意差が認められた。加えて、両年において不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した。2019 年, 2020 年の絹糸抽出期に行った調査では、株からの距離 0cm, 10 cm, 20 cm, 30 cm の根長密度は年次間, 耕起管理間および深度間では有意差が認められなかった (第 1-6 図)。

2019 年, 2020 年の栄養成長期に行った調査では、株からの距離 0 cm の根重は年次間および深度間で有意差が認められた (第 1-7 図)。さらに、ロータリー耕起および不耕起において 2020 年よりも 2019 年で高い値を示した。株からの距離 10 cm の根重は年次間および耕起管理間で有意差が認められた。また、ロータリー耕起および不耕起において 2020 年よりも 2019 年で高い値を示した。さらに、両年において不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した。株からの距離 20 cm の根重は年次間で有意差が認められた。加えて、ロータリー耕起および不耕起において 2020 年よりも 2019 年で高い値を示した。株からの距離 30 cm の根重は年次間, 耕起管理間および深度間で有意差が認められなかった。2019 年, 2020 年の絹糸抽出期に行った調査では、株からの距離 0cm の根重は深度間でのみ有意差が認められた (第 1-8 図)。株からの距離 10 cm の根重は年次間でのみ有意差が認められた。また、ロータリー耕起および不耕起において 2020 年よりも 2019 年で高い値を示した。株からの距離 20 cm, 30 cm の根重は年次間, 耕起管理間および深度間で有意差は認められなかった。

#### 7) 飼料用トウモロコシの収量

2019 年, 2020 年において子実重, 百粒重, 全粒数, 茎葉バイオマス, 地上部バイオマス量を調査した (第 1-5 表)。子実重および地上部バイオマス量に関して 2019 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し, 2020 年も同様な結果を示した。また, 耕起管理間で有意差が認められた。百粒重に関して 2019 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し, 2020 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した。さらに, 年次間で有意差が認められた。全粒数に関して 2019 年は不耕起よりもロータ

リー耕起で高い値を示し、2020 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した。さらに、年次間で有意差が認められた。茎葉バイオマスに関して 2019 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020 年も同様な結果を示した。加えて、年次間および耕起管理間で有意差が認められた。

#### 1-4. 考察

耕起管理の違いによる飼料用トウモロコシの生育に及ぼす影響を調査した結果、栄養成長期、絹糸抽出期の草丈や茎葉乾物重、成熟期の子実収量や地上部バイオマス量は耕起によって増加する傾向がみられた（第 1-2 表，第 1-3 表，第 1-5 表）。過去，耕起，耕耘によってトウモロコシの生育，収量は増加する報告から低下する報告まで様々な結果がある。このうち生育，収量が低下する要因は耕起，耕耘を行うと土壤栄養素の損失，土壤構造の破壊，微生物の多様性の減少が考えられている（Xu ら 2021）。一方，生育，収量が向上する要因としては Wang ら（2015）は土壤の圧縮が軽減されることで物理性が改善され，トウモロコシの根系の分布が改善し，栄養素や水の吸収量が向上することをあげている。また，耕起と不耕起を比較した時，トウモロコシの収量は大きな違いはなかった報告もある（Haddadi 2016）。このようにこれまでの研究において耕起や耕耘のトウモロコシの生育，収量に対する影響は様々である。さらに耕起，耕耘の作物の生育に対する効果は，土壤，作物の種類，農業システム，作物残留物，気候など様々な要因にも影響されることが明らかにされている（Xu ら 2021）。このようなことから耕起，耕耘によってトウモロコシの生育が変化した場合はその原因を明らかにすることは大変有益と考える。本試験ではリン酸肥料を施用しておらず，リン酸要求量の高いトウモロコシはリン酸欠乏状態にあると考えられ，耕起処理の有無に関わらず体内のリン酸含量の状況が植物体の生育を左右しやすい状況であったと推察される。実際に飼料用トウモロコシのリン酸吸収量を調査したところ，不耕起よりもロータリー耕起で高い傾向を示したことから（第 1-4 表），ロータリー耕起で生育・収量が高まった要因としてリン酸吸収の促進が考えられる。また，ロータリー耕起によってリン酸吸収が促進した要因として根の拡大が考えられる（Guan ら 2014）。本研究においては土壤の貫入抵抗値はロータリー耕起と不耕起で有意差を示し，地表



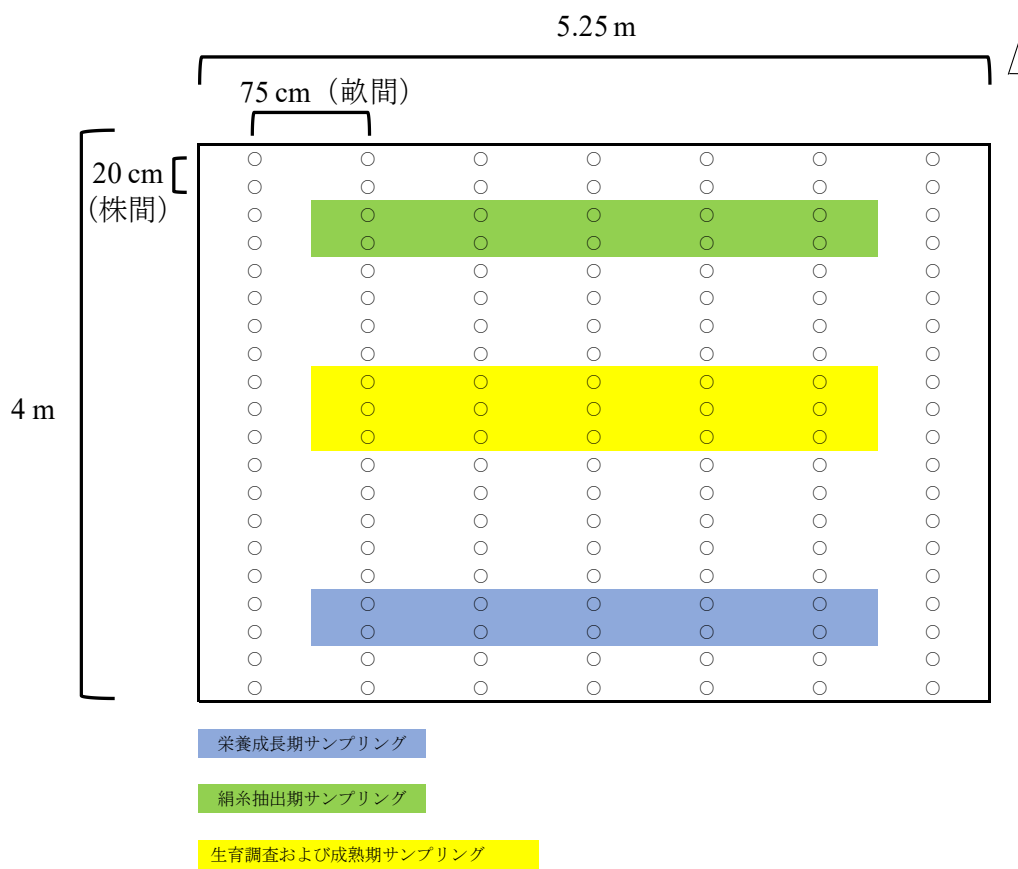
からの深さ 30 cm の土壌は不耕起で固かった (第 1-4 図)。つまり、不耕起よりもロータリー耕起を実施した方が土壌中に根が伸長しやすい状況にあり、実際栄養成長期の根長密度や根重は不耕起に比べてロータリー耕起で高い傾向を示した (第 1-5 図, 第 1-6 図, 第 1-7 図, 第 1-8 図)。これらのことから、ロータリー耕起によって飼料用トウモロコシの生育、収量が向上した要因として耕起による土壌硬度の低下や、それに伴う根の伸長拡大がリン吸収を促進したこと要因の一つであることが解明された。

年次間の違いにおいて、土壌貫入抵抗値は 2019 年よりも 2020 年で高い傾向を示した (第 1-4 図)。一方、栄養成長期における飼料用トウモロコシの根長密度や根重は 2019 年よりも 2020 年で低い傾向を示した (第 1-5 図, 第 1-7 図)。これらの結果から圃場の連用効果によって土壌が硬くなったため、栄養成長期における根の広がりも 2019 年よりも 2020 年で抑制されたと推察される。ただし、不耕起栽培の連用の効果は作物にプラスの効果を及ぼす可能性がある。He ら (2011) は 11 年間に渡る不耕起栽培によって土壌有機物や表層 10 cm の窒素およびリンを増加させ、コムギとトウモロコシの収量を増加させたことを報告している。本研究は 4 年間と不耕起の期間が短かったことから今後、継続していくことによって不耕起の生育、収量がロータリー耕起と比較して増加する可能性がある。

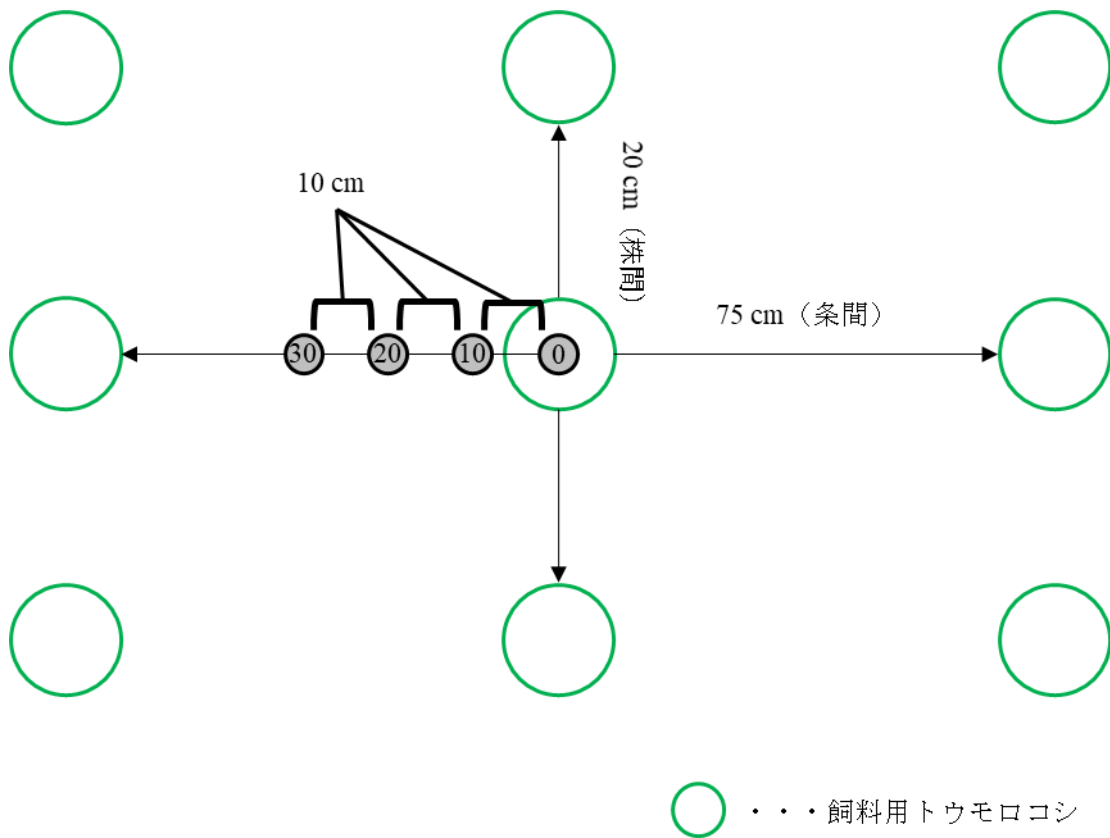
また、成熟期の飼料用トウモロコシの百粒重や茎葉バイオマス量は 2019 年よりも 2020 年で高い傾向を示した (第 1-5 表)。この要因として炭素吸収量の変化が関与していると考えられる。過去、同化された炭素は茎葉や生殖器官などの地上部バイオマスに割り当てられることが示されている (Rangel-castro ら 2005)。本研究においては 2019 年よりも 2020 年で炭素吸収量の増加が確認されており (第 1-4 表)、これらが成熟期の百粒重や茎葉バイオマス量を増加させた要因であると考えられる。さらに、2019 年よりも 2020 年で炭素吸収量が増加した要因として日照時間などの環境要因の違いが考えられる。本試験地の日照時間は、2019 年 8 月下旬は平年よりも 25 時間短いのに対し、2020 年 8 月下旬は平年よりも 49 時間長い結果となった (第 1-1 表)。このような日照時間の違いが 2020 年で栽培した飼料用トウモロコシの光合成能力を高め、炭素吸収を促し、百粒重や茎葉バイオマス量を増加させたと推察される。

これまで耕起、耕耘が根の伸長を促し、それが作物のリン酸吸収を促進した可能性

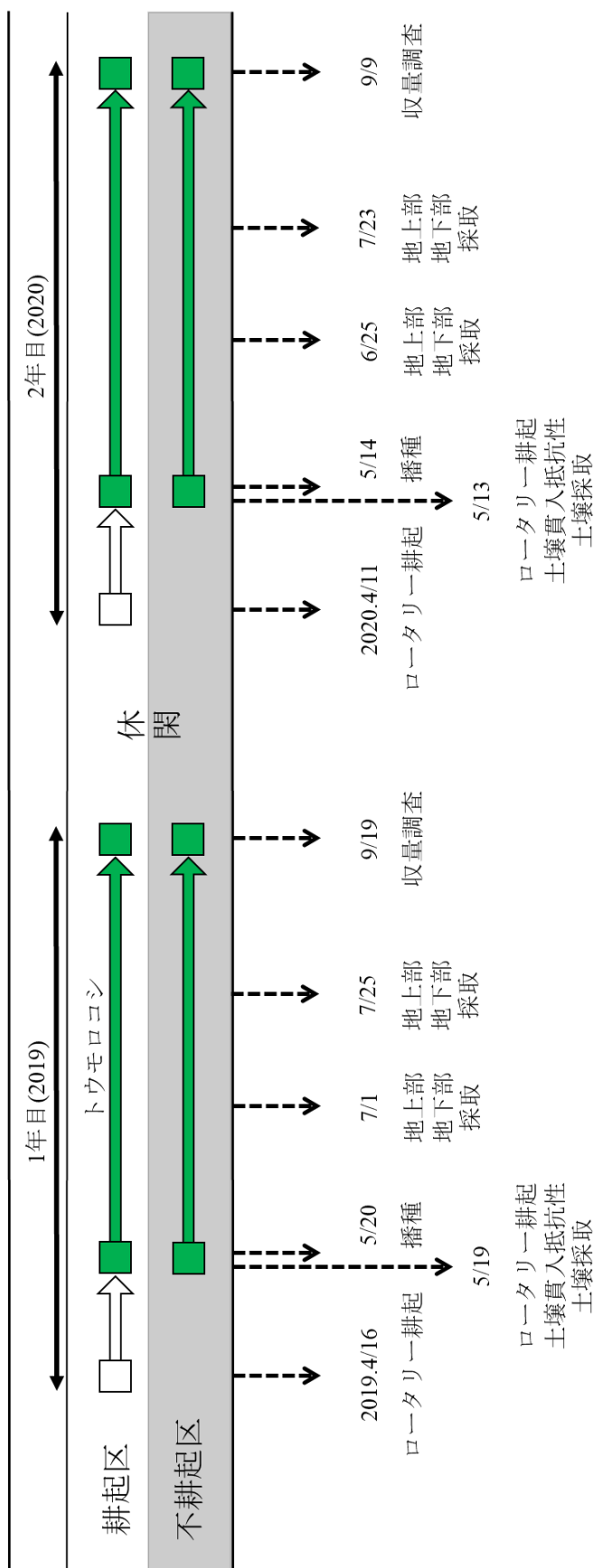
を述べてきたが、過去の研究では耕起、耕耘でアーバスキュラー菌根菌(以下, AM 菌)やリン溶解菌など植物のリン酸吸収や土壌のリン酸の形態変化に関する微生物が影響を受けることも報告されている (Thanni ら 2022)。AM 菌は植物の根に感染することで宿主のリン酸吸収を促進させる働きを持つことが示されている (Smith and Read 2008)。さらに, AM 菌には宿主親和性があり (Bi ら 2020), 種によってリン酸の吸収量が異なることも報告されている (Juntahum ら 2022)。加えて AM 菌の群集構造の違いも作物のリン酸吸収や生育に影響することが明らかとなっている (Van Der Heijden ら 1998, Jansa ら 2008, Njeru ら 2014)。このようなことから耕起でリン酸吸収量が促進された要因のひとつに AM 菌が関与している可能性も考えられる。そこで第 2 章ではロータリー耕起によって AM 菌の根への感染と群集構造がどのように変化するか調査した。



第 1-1 図 各生育期のサンプリング位置.



第1-2図 飼料用トウモロコシ根の採取位置。  
 \*0; 株元からの距離0 cm, 10; 株元からの距離10 cm,  
 20; 株元からの距離20 cm, 30; 株元からの距離30 cm



第1-3図 圃場管理等の概要および日程.

第1-1表 飼料用トウモロコシ生育期間中の積算降水量と平均気温、  
積算日照時間.

月	旬	積算降水量 (mm)		
		2019	2020	平年値
5	下	131 ( +43 ) <sup>1)</sup>	49 ( -38 )	87
6	上	134 ( +53 )	66 ( -15 )	81
	下	86 ( -1 )	154 ( +67 )	87
7	上	100 ( +22 )	166 ( +87 )	78
	下	35 ( -29 )	147 ( +84 )	63
8	上	44 ( -15 )	4 ( -56 )	59
	下	64 ( -13 )	10 ( -67 )	77
9	上	146 ( +41 )	63 ( -42 )	104

月	旬	平均気温 (°C)		
		2019	2020	平年値
5	下	21.4 ( +1.9 )	19.6 ( +0.0 )	19.6
6	上	20.5 ( -0.4 )	23.2 ( +2.3 )	20.9
	下	23.0 ( +0.4 )	23.1 ( +0.5 )	22.6
7	上	22.2 ( -2.5 )	24.0 ( -0.6 )	24.6
	下	26.1 ( +0.1 )	24.3 ( -1.6 )	25.9
8	上	28.4 ( +1.1 )	28.6 ( +1.3 )	27.3
	下	27.6 ( +1.0 )	29.1 ( +2.5 )	26.6
9	上	26.6 ( +1.2 )	28.0 ( +2.7 )	25.3

月	旬	積算日照時間 (hr)		
		2019	2020	平年値
5	下	97 ( +10 )	100 ( +13 )	87
6	上	71 ( +1 )	86 ( +17 )	70
	下	88 ( +37 )	61 ( +9 )	51
7	上	12 ( -62 )	30 ( -43 )	74
	下	91 ( +1 )	41 ( -49 )	90
8	上	142 ( +41 )	149 ( +47 )	102
	下	70 ( -25 )	145 ( +49 )	95
9	上	94 ( +16 )	61 ( -16 )	77

1) 括弧内には平年値 (1998年から2018年の20年間での平均値)  
に対する積算降水量, 平均気温と積算日照時間の差を示した.

第1-2表 耕起管理が飼料用トウモロコシの生育に及ぼす影響.

栽培年次	耕起管理	草丈 (cm)		SPAD値	
		栄養成長期	絹糸抽出期	栄養成長期	絹糸抽出期
2019	ロータリー耕起	96.4 ± 2.7 <sup>1)</sup>	247.8 ± 2.5	45.7 ± 1.4	51.8 ± 0.8
	不耕起	70.0 ± 4.6	181.9 ± 13.3	36.3 ± 2.1	45.3 ± 1.2
2020	ロータリー耕起	101.0 ± 0.9	226.2 ± 2.5	50.1 ± 0.9	39.3 ± 1.8
	不耕起	76.7 ± 3.3	207.8 ± 1.9	46.5 ± 1.2	37.2 ± 1.5
年次	2019	83.2 ± 6.4	214.8 ± 15.9	41.0 ± 2.4	48.5 ± 1.6
	2020	88.8 ± 5.7	217.0 ± 4.3	48.3 ± 1.0	38.2 ± 1.2
耕起管理	ロータリー耕起	98.7 ± 1.6	237.0 ± 5.1	47.9 ± 1.2	45.5 ± 2.9
	不耕起	73.3 ± 2.9	194.9 ± 8.3	41.4 ± 2.5	41.2 ± 2.0
分散分析	年次(A)	n.s. <sup>2)</sup>	n.s.	***	***
	耕起管理(B)	***	***	**	*
	(A)×(B)	n.s.	**	n.s.	n.s.

栽培年次	耕起管理	茎径 (mm)		LAI	
		栄養成長期	絹糸抽出期	栄養成長期	絹糸抽出期
2019	ロータリー耕起	19.8 ± 0.7	21.8 ± 0.5	0.40 ± 0.07	3.71 ± 0.34
	不耕起	13.4 ± 1.1	17.2 ± 1.1	0.27 ± 0.03	2.87 ± 0.43
2020	ロータリー耕起	19.8 ± 0.5	20.2 ± 0.1	0.44 ± 0.01	3.73 ± 0.29
	不耕起	15.5 ± 0.5	19.8 ± 0.8	0.31 ± 0.01	3.20 ± 0.14
年次	2019	16.6 ± 1.5	19.5 ± 1.2	0.33 ± 0.04	3.29 ± 0.31
	2020	17.7 ± 1.0	20.0 ± 0.3	0.38 ± 0.03	3.47 ± 0.19
耕起管理	ロータリー耕起	19.8 ± 0.4	21.0 ± 0.4	0.42 ± 0.03	3.72 ± 0.20
	不耕起	14.5 ± 0.7	18.5 ± 0.8	0.29 ± 0.02	3.03 ± 0.22
分散分析	年次(A)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	耕起管理(B)	***	**	**	n.s.
	(A)×(B)	n.s.	*	n.s.	n.s.

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

2) 二元配置分散分析において\*は5%, \*\*は1%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.

第1-3表 耕起管理が飼料用トウモロコシの茎葉乾物重に及ぼす影響.

栽培年次	耕起管理	乾物重 (g/m <sup>2</sup> )	
		栄養成長期	絹糸抽出期
2019	ロータリー耕起	77.4 ± 1.7 <sup>1)</sup>	529.0 ± 31.3
	不耕起	44.1 ± 2.9	400.5 ± 70.0
2020	ロータリー耕起	83.3 ± 7.4	670.3 ± 35.7
	不耕起	40.0 ± 2.5	450.8 ± 38.9
年次	2019	60.8 ± 7.6	464.7 ± 44.7
	2020	61.7 ± 10.3	560.5 ± 54.5
耕起管理	ロータリー耕起	80.4 ± 3.6	599.6 ± 38.1
	不耕起	42.1 ± 1.9	425.7 ± 37.5
分散分析	年次(A)	n.s. <sup>2)</sup>	n.s.
	耕起管理(B)	***	**
	(A)×(B)	n.s.	n.s.

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

2) 二元配置分散分析において\*\*は1%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.



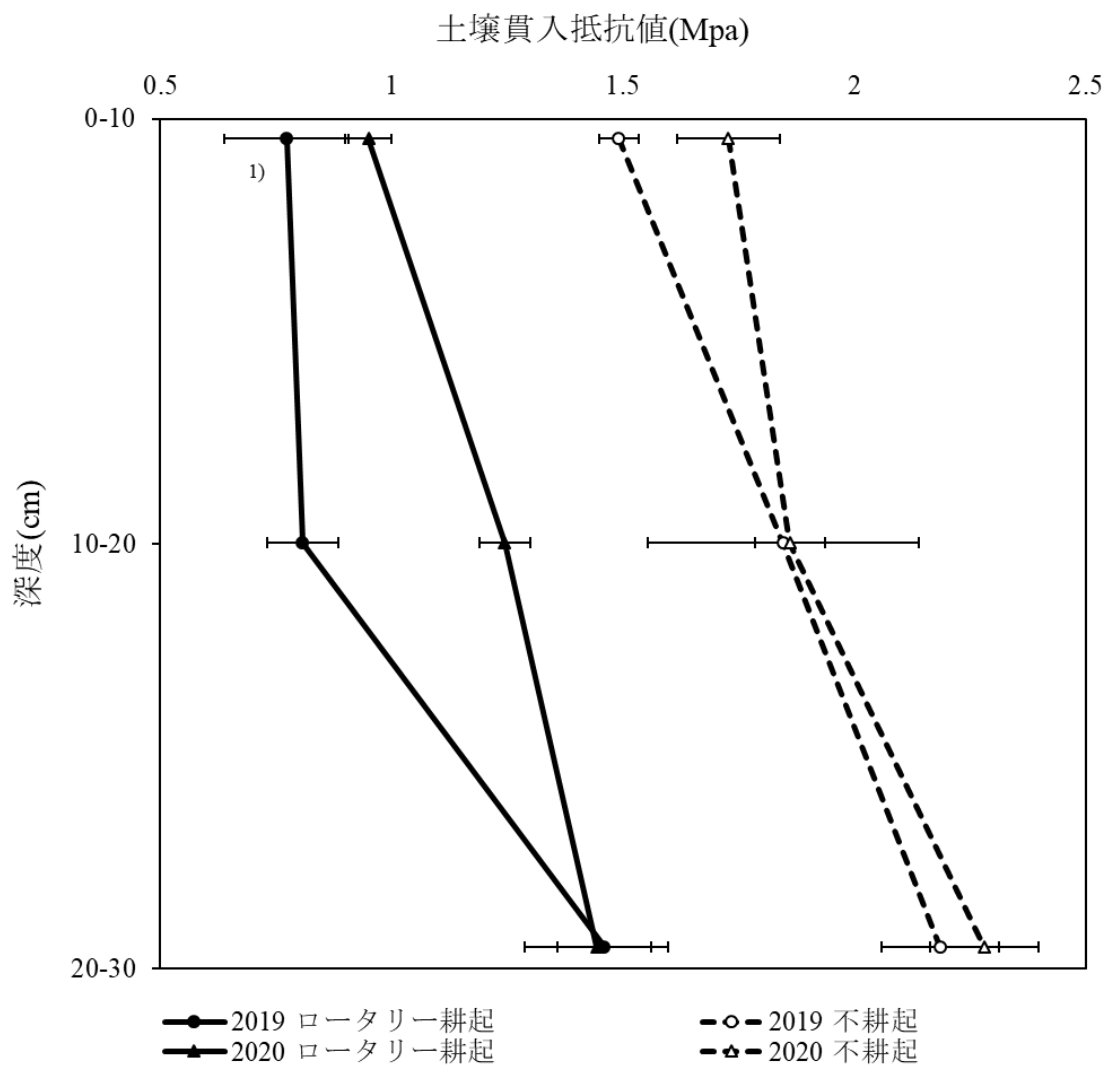
第1-4表 耕起管理が飼料用トウモロコシの茎葉養分吸収量に及ぼす影響.

栽培年次	耕起管理	リン酸濃度 (mg/g)		リン酸吸収量 (mg/m <sup>2</sup> )	
		栄養成長期	絹糸抽出期	栄養成長期	絹糸抽出期
2019	ロータリー耕起	3.0 ± 0.2 <sup>1)</sup>	1.9 ± 0.1	232.2 ± 19.6	1013.9 ± 50.8
	不耕起	2.6 ± 0.2	1.7 ± 0.1	115.5 ± 14.1	709.4 ± 150.8
2020	ロータリー耕起	3.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	277.1 ± 21.0	1326.3 ± 40.6
	不耕起	3.1 ± 0.1	1.8 ± 0.2	123.5 ± 5.5	832.2 ± 150.3
年次	2019	2.8 ± 0.2	1.8 ± 0.1	173.9 ± 28.2	861.7 ± 98.5
	2020	3.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1	200.3 ± 35.7	1079.3 ± 130.6
耕起管理	ロータリー耕起	3.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	254.7 ± 16.3	1170.1 ± 75.7
	不耕起	2.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	119.5 ± 7.0	770.8 ± 99.1
分散分析	年次(A)	* <sup>2)</sup>	n.s.	n.s.	n.s.
	耕起管理(B)	n.s.	n.s.	***	**
	(A)×(B)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
栽培年次	耕起管理	全炭素 (%)		炭素吸収量 (g/m <sup>2</sup> )	
		栄養成長期	絹糸抽出期	栄養成長期	絹糸抽出期
2019	ロータリー耕起	41.0 ± 0.3	42.6 ± 0.1	31.7 ± 0.5	225.4 ± 14.0
	不耕起	40.7 ± 0.3	42.4 ± 0.3	17.9 ± 1.1	170.2 ± 30.7
2020	ロータリー耕起	40.6 ± 0.1	42.8 ± 0.1	33.8 ± 3.0	352.8 ± 19.4
	不耕起	39.4 ± 0.2	42.5 ± 0.2	15.8 ± 0.9	326.7 ± 25.0
年次	2019	40.8 ± 0.2	42.5 ± 0.2	24.8 ± 3.1	197.8 ± 19.5
	2020	40.0 ± 0.3	42.7 ± 0.1	24.8 ± 4.3	339.7 ± 15.3
耕起管理	ロータリー耕起	40.8 ± 0.1	42.7 ± 0.1	32.7 ± 1.4	289.1 ± 30.4
	不耕起	40.0 ± 0.3	42.5 ± 0.2	16.8 ± 0.8	248.4 ± 39.2
分散分析	年次(A)	**	n.s.	n.s.	***
	耕起管理(B)	*	n.s.	***	n.s.
	(A)×(B)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
栽培年次	耕起管理	全窒素 (%)		窒素吸収量 (g/m <sup>2</sup> )	
		栄養成長期	絹糸抽出期	栄養成長期	絹糸抽出期
2019	ロータリー耕起	3.1 ± 0.3	1.2 ± 0.1	2.4 ± 0.3	6.7 ± 1.1
	不耕起	3.1 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.1	5.0 ± 0.9
2020	ロータリー耕起	3.3 ± 0.0	1.2 ± 0.1	2.8 ± 0.2	10.1 ± 1.0
	不耕起	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1	9.9 ± 1.2
年次	2019	3.1 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.3	5.8 ± 0.7
	2020	2.5 ± 0.4	1.3 ± 0.0	1.7 ± 0.5	10.0 ± 0.7
耕起管理	ロータリー耕起	3.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	2.6 ± 0.2	8.4 ± 1.0
	不耕起	2.4 ± 0.3	1.3 ± 0.0	1.0 ± 0.2	7.4 ± 1.3
分散分析	年次(A)	**	n.s.	n.s.	**
	耕起管理(B)	***	n.s.	***	n.s.
	(A)×(B)	***	n.s.	*	n.s.

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

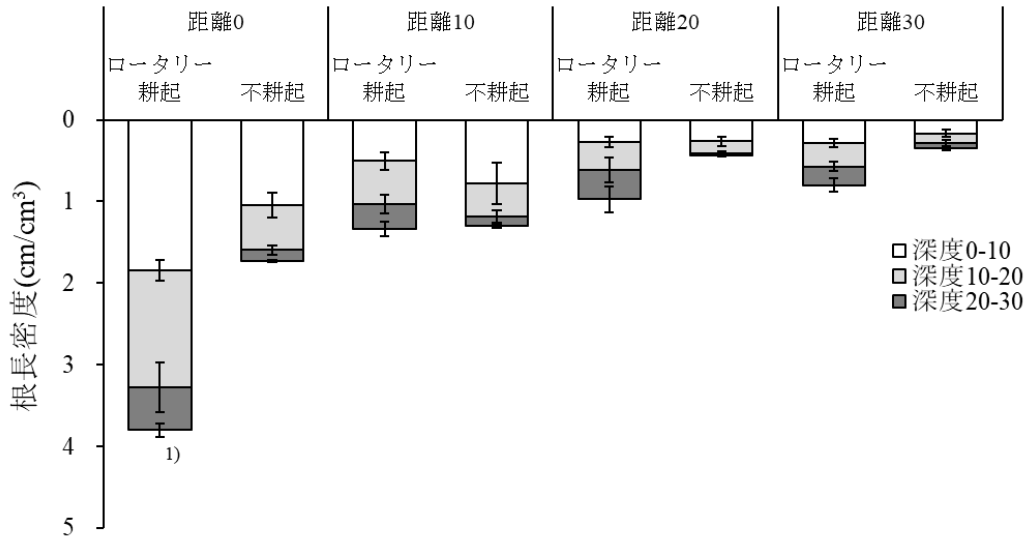
2) 全炭素, 全窒素の統計処理は角変換後に行った. 二元配置分散分析において\*は5%, \*\*は1%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.

年次(A): \*, 耕起管理(B): \*\*\*<sup>2)</sup>, 深度(C): \*\*\*,  
 (A)×(B): n.s., (A)×(C): n.s., (B)×(C): n.s., (A)×(B)×(C): n.s.

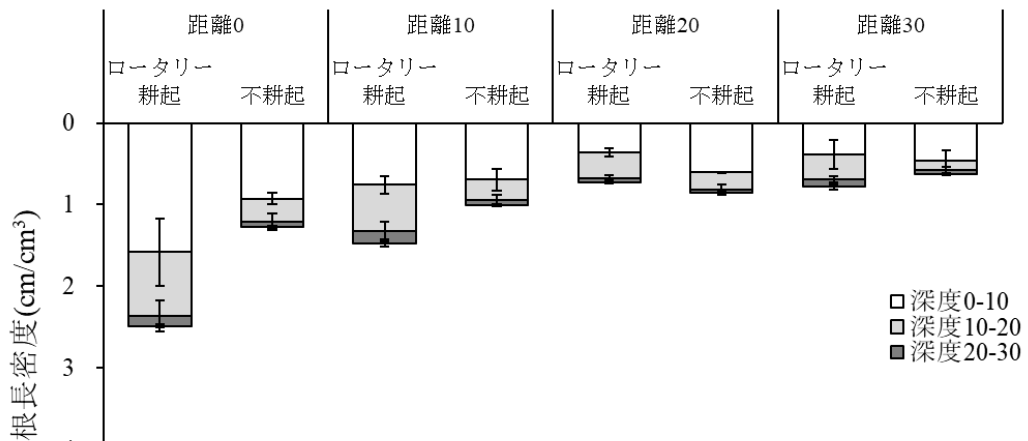


第1-4図 耕起管理と深度が土壌硬度に及ぼす影響.

2019



2020

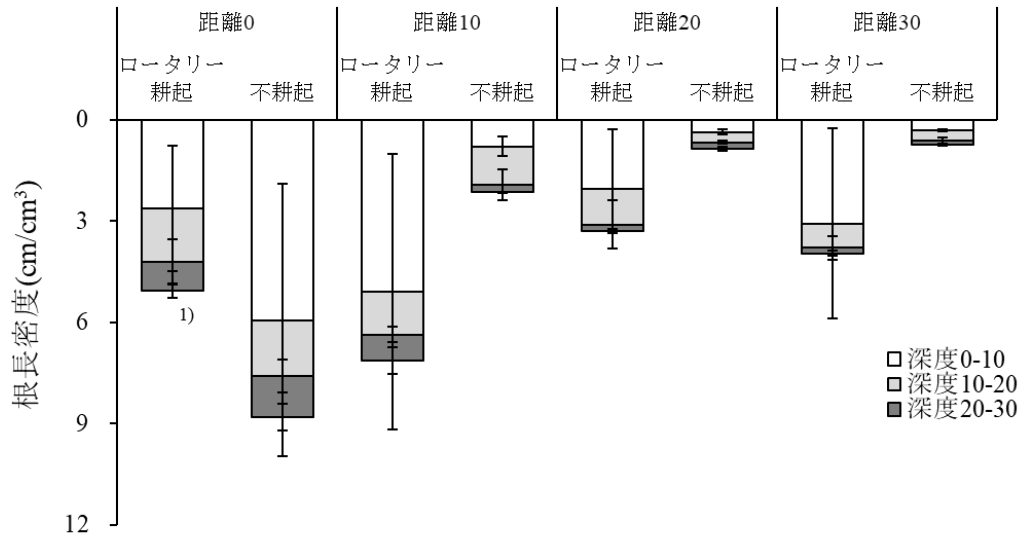


Year	Treatment	Year (A)	Tillage (B)	Depth (C)	(A) × (B)	(A) × (C)	(B) × (C)	(A) × (B) × (C)
2019	Distance 0	**2)	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 10	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 20	n.s.	n.s.	***	*	**	*	n.s.
	Distance 30	n.s.	n.s.	**	n.s.	*	n.s.	n.s.
2020	Distance 0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 10	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 20	n.s.	n.s.	***	*	**	*	n.s.
	Distance 30	n.s.	n.s.	**	n.s.	*	n.s.	n.s.

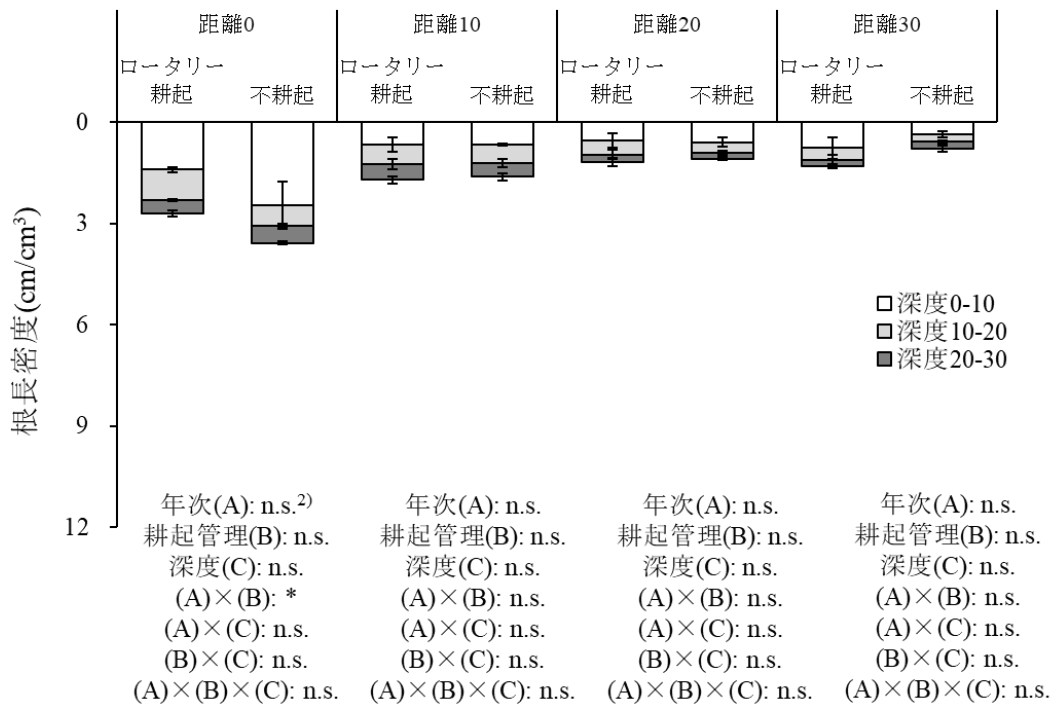
第1-5図 耕起管理と深度が栄養成長期における飼料用トウモロコシの根長密度に及ぼす影響。

1) エラーバーは標準誤差を示す。  
 2) 三元配置分散分析において\*は5%, \*\*は1%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す。

2019



2020

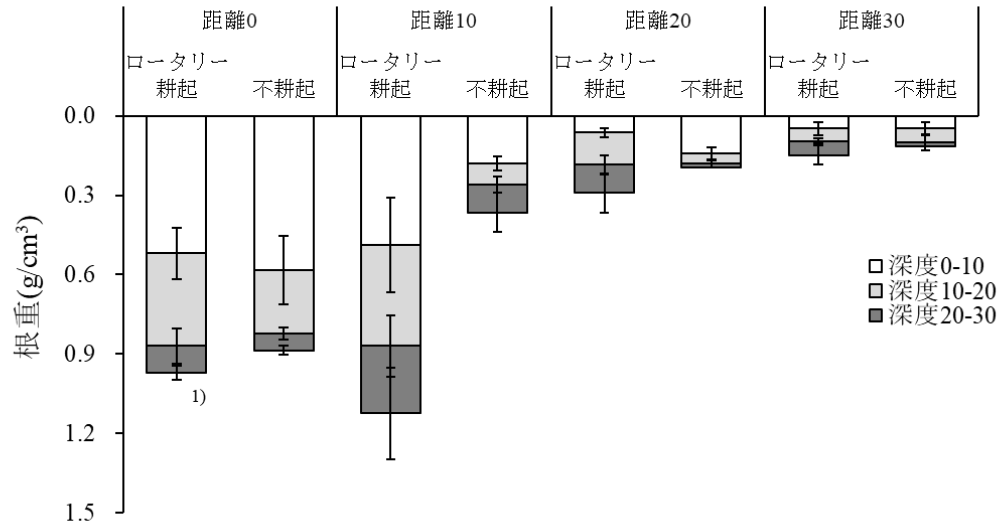


第1-6図 耕起管理と深度が絹糸抽出期における飼料用トウモロコシの根長密度に及ぼす影響。

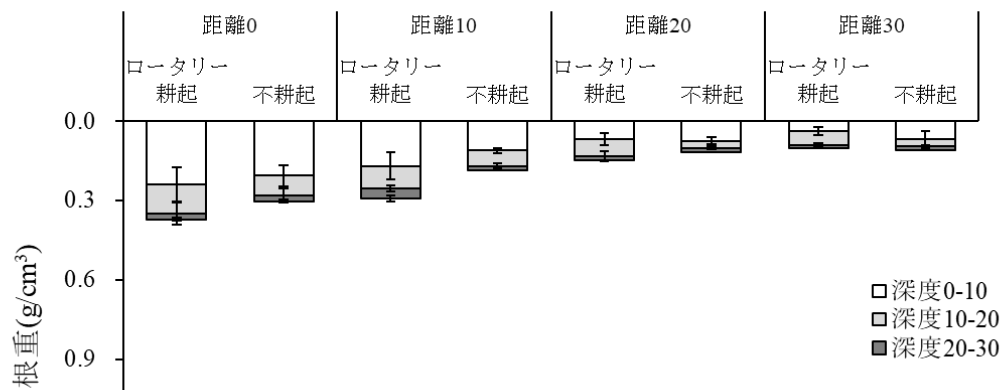
1) エラーバーは標準誤差を示す。

2) 三元配置分散分析において\*は5%水準で有意差があることを示し、n.s.は有意差がないことを示す。

2019



2020



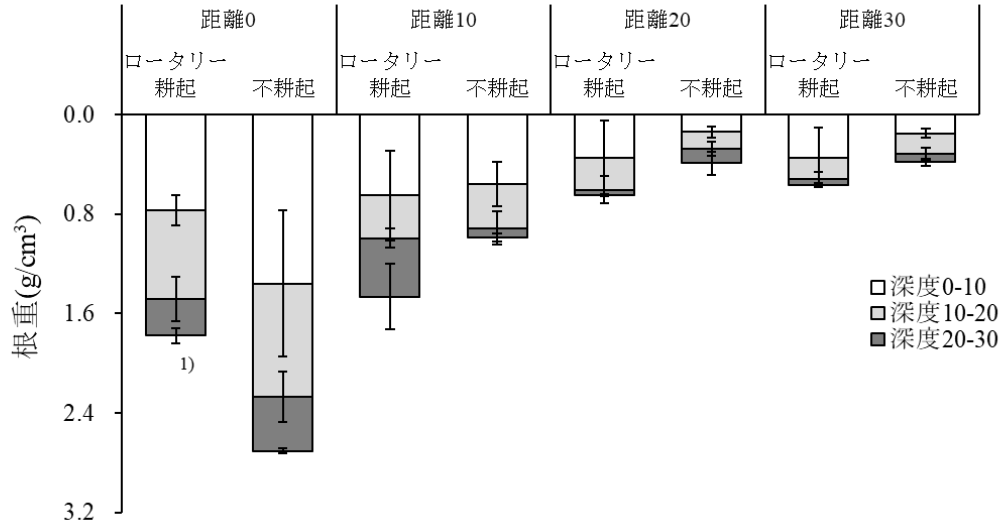
年次(A): ***2)	年次(A): **	年次(A): *	年次(A): n.s.
耕起管理(B): n.s.	耕起管理(B): *	耕起管理(B): n.s.	耕起管理(B): n.s.
深度(C): ***	深度(C): n.s.	深度(C): n.s.	深度(C): n.s.
(A)×(B): n.s.	(A)×(B): **	(A)×(B): n.s.	(A)×(B): n.s.
(A)×(C): *	(A)×(C): n.s.	(A)×(C): n.s.	(A)×(C): n.s.
(B)×(C): n.s.	(B)×(C): n.s.	(B)×(C): n.s.	(B)×(C): n.s.
(A)×(B)×(C): n.s.	(A)×(B)×(C): n.s.	(A)×(B)×(C): *	(A)×(B)×(C): n.s.

第1-7図 耕起管理と深度が栄養成長期における飼料用トウモロコシ根の新鮮重に及ぼす影響。

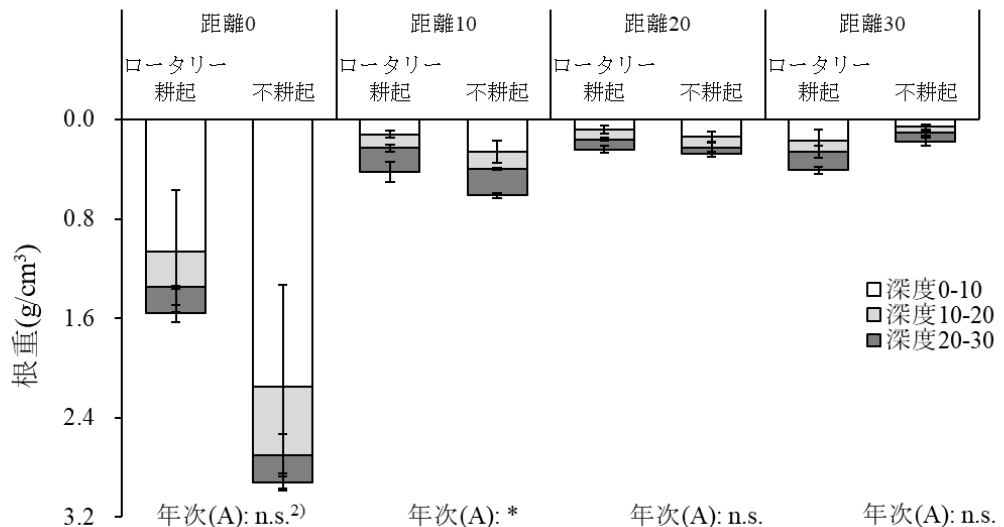
1) エラーバーは標準誤差を示す。

2) 三元配置分散分析において\*は5%水準で有意差があることを示し、n.s.は有意差がないことを示す。

2019



2020



Year	Treatment	Year (A)	Tillage (B)	Depth (C)	(A) × (B)	(A) × (C)	(B) × (C)	(A) × (B) × (C)
2019	Distance 0	n.s. <sup>2)</sup>	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 10	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 20	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 30	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2020	Distance 0	n.s. <sup>2)</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 10	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 20	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Distance 30	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

第1-8図 耕起管理と深度が絹糸抽出期における飼料用トウモロコシ根の新鮮重に及ぼす影響。

1) エラーバーは標準誤差を示す。

2) 三元配置分散分析において\*は5%、\*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し、n.s.は有意差がないことを示す。

第1-5表 耕起管理が飼料用トウモロコシの収量に及ぼす影響.

栽培年次	耕起管理	子実重 (g/m <sup>2</sup> )	百粒重 (g)	全粒数 (粒/m <sup>2</sup> )
2019	ロータリー耕起	698.3 ± 46.2 <sup>1)</sup>	20.8 ± 0.6	3345.3 ± 161.8
	不耕起	541.3 ± 36.7	21.2 ± 0.3	2568.7 ± 223.7
2020	ロータリー耕起	592.6 ± 23.3	24.9 ± 0.8	2392.0 ± 160.5
	不耕起	577.5 ± 23.5	23.3 ± 0.4	2442.4 ± 45.3
年次	2019	619.8 ± 43.9	21.0 ± 0.3	2957.0 ± 213.1
	2020	585.0 ± 15.2	24.1 ± 0.5	2417.2 ± 75.4
耕起管理	ロータリー耕起	645.5 ± 33.1	22.8 ± 1.0	2868.7 ± 236.3
	不耕起	559.4 ± 21.1	22.2 ± 0.5	2505.5 ± 105.9
分散分析	年次(A)	n.s. <sup>2)</sup>	***	*
	耕起管理(B)	*	n.s.	n.s.
	(A)×(B)	n.s.	n.s.	*
栽培年次	耕起管理	茎葉乾物重 (g/m <sup>2</sup> )	地上部乾物重 <sup>3)</sup> (g/m <sup>2</sup> )	
2019	ロータリー耕起	540.6 ± 25.3	1191.5 ± 106.7	
	不耕起	386.7 ± 44.4	942.1 ± 82.8	
2020	ロータリー耕起	685.4 ± 20.7	1291.6 ± 13.6	
	不耕起	524.1 ± 18.0	1104.4 ± 31.5	
年次	2019	463.6 ± 41.3	1066.8 ± 82.2	
	2020	604.8 ± 38.1	1198.0 ± 44.6	
耕起管理	ロータリー耕起	613.0 ± 35.5	1241.5 ± 53.1	
	不耕起	455.4 ± 37.5	1023.2 ± 53.7	
分散分析	年次(A)	**	n.s.	
	耕起管理(B)	***	*	
	(A)×(B)	n.s.	n.s.	

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

2) 二元配置分散分析において\*は5%, \*\*は1%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.

3) 子実+穂軸+茎葉の乾物重

## 第2章 ロータリー耕起が飼料用トウモロコシ根のAM菌の感染と群集構造に及ぼす影響

### 2-1. 緒言

第1章ではロータリー耕起によって飼料用トウモロコシのリン酸吸収が促進されたことが示された。その要因として、従来からいわれている土壌硬度の改善やそれに伴う根の伸育促進だけではない可能性も示唆されている。過去の報告ではAM菌が属する糸状菌の群集構造が耕起、耕耘によって変化することが明らかとなっている (Jansa ら 2003, Srour ら 2020)。AM菌は様々な地上の植物種と共生関係をつくり、土壌リン酸の吸収を助長することで植物の成長を改善する (Smith and Read 2008)。日本国内においても作物の生育、収量に対するAM菌の有用性は多く報告されている (Tawarayama ら 2012, Isobe ら 2014, Karasawa and Takahashi 2015, Koyama ら 2019)。慣行農業において農地を耕起、耕耘することは一般的であるが、耕起、耕耘により土壌中のAM菌の菌糸のネットワークが著しく崩壊し、AM菌の作物根への定着が遅延したり減少したりすることによってリン酸吸収量が低下し、作物の生育が抑制されることもある (Kabir ら 1997, Borie ら 2006)。その一方で、不耕起や省耕起をした場合のAM菌感染率、孢子密度や菌糸の長さは耕起した場合に比べ高くなり、それに伴いAM菌菌糸からの土壌有機物の増加やそれに伴う団粒形成の促進、土壌構造の改善が示されている (Kabir ら 1997, Borie ら 2006, Dai ら 2015)。以上のことから、土壌中のAM菌ネットワークを維持し、作物への感染率を高めるためには耕起、耕耘をしない、もしくは軽減することも作物栽培では選択肢の一つであると考えられる。

これまでに、耕起管理の違いにより作物根内 (Alguacil ら 2008, Mirás-Avalos ら 2011) や土壌中 (Säle ら 2015, De Pontes ら 2017, Lu and Liao 2018) のAM菌群集構造が変化することが報告されている。その要因としてAM菌種の攪乱耐性の違いが考えられる。基本的に、土壌の耕起、耕耘はAM菌の共生に悪影響を与えることが報告されている (Thangavel ら 2022)。Oehl and Koch (2018) は、耕起、耕耘による土壌の機械的攪乱がAM菌の外生菌糸を破壊し、それによってAM菌の孢子形成を低下させる可能性を示唆している。ただし、土壌攪乱に対する感受性は、AM菌種によって異なる



傾向がある (Thangavel ら 2022). 例えば, Glomeraceae は, 胞子ではなく主に菌糸によって作物根に感染するため, 耕起, 耕耘による菌糸の損傷を受けやすい (Hart and Reader 2004). 従って, Glomeraceae は Gigasporaceae よりも攪乱の影響を受けやすいとされている (Hart and Reader 2004). このような AM 菌種の攪乱に対する反応の違いは AM 菌群集構造を変化させる要因の一つであると考えられる. また, AM 菌の群集構造や多様性の変化は, 作物のリン酸吸収や生育に影響を及ぼす可能性があることが複数の研究により示されており (Van der Heijden ら 1998, 2015, Mäder ら 2002, Gosling ら 2016, Crossay ら 2019), 耕起管理の違いが, 土壌中や作物根に感染する AM 菌の群集に及ぼす影響を明らかにすることは重要である.

さらに, 臼木ら (2005) は温度変化によって AM 菌の発芽や菌糸の伸長性が変動し, 作物の生育促進効果に違いが出る可能性を示唆している. AM 菌の感染には適温域があることや (Raju ら 1990), 作物のリン酸吸収は低温で阻害されることから (唐澤 2004), 様々な気候下において AM 菌と飼料用トウモロコシ生育との関係を調査することは重要である. これまでの報告では, 寒冷地で異なる耕起管理を行った時に AM 菌群集構造が変化したことが明らかにされている (Jansa ら 2003). しかし, 温暖地で耕起管理を行った時に, AM 菌の種構成や挙動に対してどのように影響するかは依然明らかになっていない. そこで本章ではまず, ロータリー耕起が飼料用トウモロコシ根の AM 菌の感染と群集構造に及ぼす影響を調査することとした.

## 2-2. 材料及び方法

### 1) 試験耕種概要

本試験は神奈川県藤沢市にある日本大学生物資源科学部附属農場 (黒ボク土) にて 2016 年 11 月から 2018 年 6 月に行った (第 2-1 図). 本試験農場は 2016 年の冬作物管理を行う前に夏作物として飼料用トウモロコシが栽培されており, 飼料用トウモロコシの播種前と刈取後に計 2 回のロータリー耕起が行われている. また, 土壌化学性は 2017 年に飼料用トウモロコシを播種する前にすべての区画から土壌を採取し, 各項目で平均値を算出した. 土壌 pH (H<sub>2</sub>O) は  $5.3 \pm 0.0$ , EC が  $0.67 \pm 0.09$  mS/cm, 硝酸態窒素含有量が  $23.8 \pm 3.2$  mg/kg, トルオーグリン酸含有量が  $91.2 \pm 14.2$  mg/kg, 全リン酸

含有量が  $360.9 \pm 12.0$  mg/kg であった。主処理として不耕起区と表層 20 cm を耕耘機 (KRA850, 株式会社クボタ, 大阪府) でロータリー耕起したロータリー耕起区を設けた。また, 副処理としてベッチ区, カラシナ区, 何も栽培しなかった休閑区を設けた冬作物管理区を組合わせた計 6 処理区を分割区法を用いて配置し, その跡地に飼料用トウモロコシを栽培する輪作体系を設けた。各試験区の 1 反復の大きさは  $4 \text{ m} \times 5.25 \text{ m}$  とし, 各 3 反復とした。2016 年 11 月 10 日, 2017 年 11 月 20 日にヘアリーベッチ (*Vicia villosa* Roth., 品種: まめっこ, カネコ種苗株式会社, 群馬県) とカラシナ (*Brassica juncea* (L.) Czern., 品種: 辛神, 雪印種苗株式会社, 北海道) を条間 40 cm で播種した。1 m<sup>2</sup> 当たりの播種量はヘアリーベッチ 26 g を, カラシナ 15.6 g でロータリー耕起区, 不耕起区ともに深さ 1 cm の溝を切り, 手で播種した。2016 年は化成肥料 (14-14-14) を窒素, リン酸, カリウムが成分量として 1 m<sup>2</sup> 当たり 8 g になるよう全ての試験区において条施肥し, 2017 年は窒素 (硫酸アンモニウム), カリウム (塩化加里) を成分量として 1 m<sup>2</sup> 当たり 4 g になるよう全ての試験区で表層施肥した。なお, 両年ともに施肥は播種の前日に行った。また, 休閑区は施肥を行わなかった。11 月から 4 月は適宜手で除草を行い, 灌水, 農薬散布は行わなかった。ロータリー耕起区ではヘアリーベッチおよびカラシナの地上部を 2017 年 4 月 24 日, 2018 年 4 月 23 日に刈高 20 mm に設定したハンマーナイフモア (HRC662B, 株式会社 ISEKI アグリ, 東京都) で細断した後, 地上部残渣を耕耘機で土壌へすき込み (深さ 20 cm 程度) を行った。また, 休閑区ではロータリー耕起のみ行った。一方, 不耕起区では刈高 20 mm に設定したハンマーナイフモアで細断した冬作物地上部残渣を土壌表面に放置した。その跡地に夏作物として飼料用トウモロコシ (*Zea mays* L., 品種: P1690, パイオニアエコサイエンス株式会社, 東京都) を栽培した。飼料用トウモロコシは 2017 年 5 月 18 日, 2018 年 5 月 17 日に畝間 75 cm, 株間 20 cm で播種をした。飼料用トウモロコシ種子は 1 箇所につき 3 粒播きし, 播種後 3 週間後に間引きを行い, 1 株 1 本仕立てとし, 1 m<sup>2</sup> あたり 6.7 本となるようにした。2017 年は基肥として窒素 (硫酸アンモニウム), リン酸 (リンスター 30: ジェイカムアグリ株式会社, 東京都), カリウム (塩化加里) を成分量として 1 m<sup>2</sup> 当たり 20 g, 15 g, 20 g となるように播種の前日に全ての試験区において条施肥した。2018 年は基肥として窒素 (硫酸アンモニウム), カリウム (塩化加里) を成

分量として 1 m<sup>2</sup> 当たり 15 g を播種の前日に全ての試験区において表層施肥した。また、2017 年における冬作物の栽培および 2018 年における飼料用トウモロコシの栽培ではリン酸を施肥しなかった。

## 2) 飼料用トウモロコシ根の採取

2017 年 7 月 2 日、2018 年 6 月 28 日に飼料用トウモロコシ根を 1 試験区あたり 9～10 個体、スコップ（深さ 20 cm 程度）で採取した（両年ともにサンプリング時の生育ステージは第 6 葉展開期）。その後 1 個体ずつあたり 10 mg 程度、2 次根または 3 次根を 1cm 程度の長さに切り、採取した。

## 3) 飼料用トウモロコシ根への AM 菌感染率の計測

採取した根を 10%水酸化カリウム溶液に浸した後、電子レンジ（500W で 1 分、その後は様子を見て追加）で加熱し、細胞質や核などを可溶化して除去した。その後、蒸留水で洗浄し、10%過酸化水素を入れて 15 分間放置した。蒸留水で洗浄し、2%塩酸を入れ室温で 5 分間放置し蒸留水で洗浄後、27 mL のリン酸緩衝生理食塩水（PBS : Phosphate-buffered saline）、3 mL の 30%アルブミン溶液、0.4 μL の小麦胚芽凝集素（WGA : Wheat germ agglutinin）の混合溶液を 2 mL 入れ、室温で 16 時間以上放置した。その後 PBS 溶液で洗浄し、2 mL の PBS、ペルオキシダーゼ染色 DAB キット（ナカライテスク、京都府）を添加し、室温で 24～48 時間放置した。染色した飼料用トウモロコシ根は染色液を捨て、蒸留水で洗浄した。AM 菌感染率の測定は 5 mm 方眼シャーレを用い、ライン交差点法（Giovanetti and Mosse 1980）により反復毎に感染の有無を 200 点以上調査し、感染率を%で示した。なお、根外に新しく形成された孢子もしくは根内に形成された樹枝状体や嚢状体などが確認された場合は AM 菌感染とみなした。

## 4) PCR-DGGE 解析（2017）

新鮮重 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）で粉碎した後、DNA 抽出キット（DNA-suisui P,

株式会社リーズ) を用い, 抽出キットに付属されたプロトコール (<https://rizo.co.jp/image/90.pdf>) に基づいて DNA を含むサンプル溶液を調製した.

飼料用トウモロコシ根から抽出した DNA 溶液を鋳型として, Nested-PCR を行った. 1st-PCR プライマーとして 2017 年は, AM 菌の 18S rRNA 遺伝子領域の部分塩基配列を増幅するプライマー AM1 (5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGA-3') (Helgason ら 1998) と NS31 (5'-TTGGAGGGCAGTCTGGTGCC-3') (Simon ら 1992) を用いた. 反応系は 10  $\mu$ L の 2 $\times$ Go Taq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 各 0.4  $\mu$ L の AM1 と NS31 プライマー (最終濃度 0.4  $\mu$ M), 10 倍希釈したテンプレート DNA 溶液を 2  $\mu$ L, 滅菌水 7.2  $\mu$ L の計 20  $\mu$ L とした. 1st-PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C : 2 分, [94 $^{\circ}$ C : 60 秒, 66 $^{\circ}$ C : 60 秒, 72 $^{\circ}$ C : 90 秒]  $\times$ 30 サイクル, 72 $^{\circ}$ C : 10 分を 1 サイクルの条件で行った. その後, 1st PCR 産物を鋳型として 2nd-PCR を行った. 2nd-PCR のプライマーには Glo1 (5'-GCCTGCTTTAAACTCTA-3') (Cornejo ら 2004) と NS31-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') (Kowalchuk ら 2002) を用いた. 反応系は 10  $\mu$ L の 2 $\times$ Go Taq Green Master Mix, 各 0.4  $\mu$ L の Glo1 と NS31-GC プライマー (最終濃度 0.4  $\mu$ M), 10 倍希釈した 1st-PCR 産物を 2  $\mu$ L, 滅菌水 7.2  $\mu$ L の計 20  $\mu$ L とした. 2nd-PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C : 5 分, [94 $^{\circ}$ C : 45 秒, 52 $^{\circ}$ C : 45 秒, 72 $^{\circ}$ C : 60 秒]  $\times$ 35 サイクル, 72 $^{\circ}$ C : 10 分を 1 サイクルの条件で行った.

Nested PCR で得られた増幅産物を 35-55%の変性剤濃度勾配を有する 6.75%ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド : ビスアクリルアミド=37.5 : 1) を用いて, Higo ら (2018a, 2018b) と同様の PCR-DGGE 法に基づき, Dcode mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて, 55 $^{\circ}$ C 50 V で 960 分間泳動を行った. 泳動後は SYBR GREEN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 染色し, UV トランスイルミネーター (AE-6911, ATTO, 東京都) を用いてゲル撮影を行った (第 2-1 表). CLIQS 1D Pro (<http://www.totallab.com/cliqs/>) を用い PCR-DGGE バンドパターンの画像解析と数値化を行い, 得られたバンドの有無を 0/1 データに変換した. その後, R.3.6.1 (<http://www.r-project.org/>) の gplots パッケージ version 3.0.1.1 (Warnes ら 2019) を用い, 各処理間の特異的 AM 菌バンド数の違いを調査するためベン図を作成した.

冗長性分析 (RDA) (長谷川 2006) は Bray-Curtis 非類似度距離行列に基づき, R.3.6.1 の *vegan* パッケージ version 2.5-5 (Oksanen ら 2019) を用い解析, 作図した. AM 菌群集構造の有意差検定には *permutational multivariate ANOVA* (PERMANOVA) を行い, *vegan* パッケージの "adonis" フังก์ションを用いた.

5) AM 菌の 18S rRNA 遺伝子領域の部分塩基配列に基づくアンプリコンシーケンス解析 (2018)

新鮮重 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) で粉碎した後, DNA 抽出キット (NucleoSpin® Plant II, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany) を用い, 抽出キットに付属されたプロトコール ([https://catalog.takara-bio.co.jp/com/tech\\_info\\_detail.php?mode=2&masterid=M100005884&unitid=U100006680](https://catalog.takara-bio.co.jp/com/tech_info_detail.php?mode=2&masterid=M100005884&unitid=U100006680)) に基づいて DNA を含むサンプル溶液を調製した.

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 と NS31 を用いて DNA を増幅した. 反応系は 5  $\mu$ L の 2 $\times$ KOD One Master Blue Mix (TOYOBO, 大阪府), 各 0.2  $\mu$ L の AM1 と NS31 プライマー溶液 (最終濃度 0.4  $\mu$ M), 10 倍希釈した DNA 溶液を 1  $\mu$ L, 滅菌水 3.6  $\mu$ L の計 10  $\mu$ L とした. 1st-PCR 反応は 94°C : 2 分, [94°C : 10 秒, 60°C : 5 秒, 68°C : 15 秒]  $\times$ 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. 反応系は 10  $\mu$ L の 2 $\times$ KOD One Master Blue Mix, 各 0.6  $\mu$ L の AMV4.5NF と AMDGR プライマー溶液 (最終濃度 0.3  $\mu$ M), 10 倍希釈した 1st-PCR 産物を 2  $\mu$ L, 滅菌水 6.8  $\mu$ L の計 20  $\mu$ L とした. 2nd-PCR 反応は 94°C : 2 分, [94°C : 10 秒, 60°C : 5 秒, 68°C : 15 秒]  $\times$ 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）にある次世代シーケンサー（イルミナ社，Miseq システム）によって，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．取得した配列は SILVA データベースの分子的操作的分類群（OTU，97%）を用いクラスタリングを行い（Callahan ら 2016），その後，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．

アンプリコンシーケンス後の解析データは，R.3.6.1 の iNEXT パッケージ version 2.0.19（Chao ら 2014，Hsieh ら 2019）を用いレアファクションカーブを作成し，各試験区間のリード数を 2000 に統一した．その後，R.3.6.1 (<http://www.r-project.org/>) の gplots パッケージ version 3.0.1.1（Warnes ら 2019）を用い，各処理間の特異的 AM 菌 OTU 数の違いを調査するためベン図を作成した．AM 菌群集構造の比較には OTU 出現の有無である 0/1 に変換したデータを用いた．冗長性分析（RDA）（長谷川 2006）は Bray-Curtis 非類似度距離行列に基づき，R.3.6.1 の vegan パッケージ version 2.5-5（Oksanen ら 2019）を用い解析，作図した．AM 菌群集構造の有意差検定には permutational multivariate ANOVA（PERMANOVA）を行い，vegan パッケージの”adonis”ファンクションを用いた．

## 2-3. 結果

### 1) 飼料用トウモロコシ根内における AM 菌感染率

栄養成長期および絹糸抽出期における飼料用トウモロコシ根内の AM 菌感染率を調査した（第 2-2 図）．栄養成長期の AM 菌感染率に関して 2017 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し，2018 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した．絹糸抽出期は 2017 年，2018 年ともにロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した．また，2017 年よりも 2018 年で高い値を示した．栄養成長期，絹糸抽出期ともに年次間で有意差が認められた．

## 2) 飼料用トウモロコシ根に感染した AM 菌のバンド数, OTU 数

DGGE バンドパターン (第 2-3 図) に基づく, ロータリー耕起, 不耕起の違いがバンド数に及ぼす影響を第 2-1 表に示した. バンド数は, 不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した. ただし, 耕起管理間で有意差は認められなかった. また, アンプリコンシーケンス解析による OTU 数の影響を第 2-1 表に示した. 796,858 リードのうち, 625,508 リードが *Glomeromycotina* に属した合計 265 OTU の 18S rRNA 遺伝子配列データが得られた. OTU 数は, 不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した. しかし, 耕起管理間で有意差は認められなかった.

## 3) 特異的な飼料用トウモロコシ根に感染した AM 菌叢

DGGE バンドパターンに基づき, 耕起管理間で特異的な AM 菌のバンド数に及ぼす影響を第 2-4 図に示した. 検出された 33 本のバンドのうち, 27% (=9/33) がロータリー耕起のみ, 12% (=4/33) が不耕起のみにおける特異的バンドとして検出された. 次に, アンプリコンシーケンス解析結果を用い, 各管理に特異的な AM 菌の OTU 数に及ぼす影響を第 2-4 図に示した. アンプリコンシーケンス解析において検出された 265 OTU のうち, 43% (=115/265) がロータリー耕起のみ, 19% (=49/265) が不耕起のみにおける特異的 OTU として検出された.

## 4) 飼料用トウモロコシ根に感染した AM 菌の種構成の違い

各管理区における AM 菌群集の違いを詳細に比較するため, 2018 年のアンプリコンシーケンス解析の結果をもとに飼料用トウモロコシ根内の AM 菌の科別相対出現頻度を解析した結果を第 2-2 表に示した. *Acaulosporaceae* は不耕起よりもロータリー耕起で高い出現頻度を示し, *Glomeraceae* はロータリー耕起よりも不耕起で高い出現頻度を示した. また, *Acaulosporaceae* および *Glomeraceae* の出現頻度は耕起管理間で有意差が認められた. 一方, *Diversisporaceae* と *Gigasporaceae* の出現頻度は耕起管理間で有意差が認められなかった.

## 5) 飼料用トウモロコシ根に感染した AM 菌の群集構造

PCR-DGGE 解析によって得られたバンドパターンを用い、冗長性分析 (RDA) を行った結果を第 2-5 図に示した。RDA の結果、飼料用トウモロコシ根内の AM 菌群集構造はロータリー耕起と不耕起で大きく左右に分布が分かれた。PERMANOVA の結果、AM 菌の群集構造は耕起管理間で有意差が認められた。さらに、アンプリコンシーケンス解析によって得られたデータを用い、RDA を行った結果を第 2-6 図に示した。アンプリコンシーケンス解析においても PCR-DGGE 解析と同様な傾向がみられ、飼料用トウモロコシ根内の AM 菌群集構造はロータリー耕起と不耕起で大きく左右に分布が別れていることが確認できた。また、PERMANOVA の結果、AM 菌の群集構造は耕起管理間で有意差が認められた。

#### 2-4. 考察

過去の報告で、不耕起条件下で栽培したトウモロコシ根内や土壌中の AM 菌の DGGE バンド数や OTU 数がプラウ耕、チゼル耕、ロータリー耕に比べ増加することが報告されている (Jansa ら 2003, Lu ら 2018, Oehl and Koch 2018)。しかし、本研究において、飼料用トウモロコシ根内の AM 菌の DGGE バンド数や OTU 数は耕起管理の違いによる差がみられなかった (第 2-1 表)。上記の報告では 4 年から 39 年間不耕起管理を行っており本研究はそれらと比較して 15 か月間と短かった (第 2-1 図)。これらのことを考慮すると、今後さらに試験を継続することで AM 菌の DGGE バンド数や OTU 数の違いが耕起管理の違いで顕著になっていく可能性が考えられる。

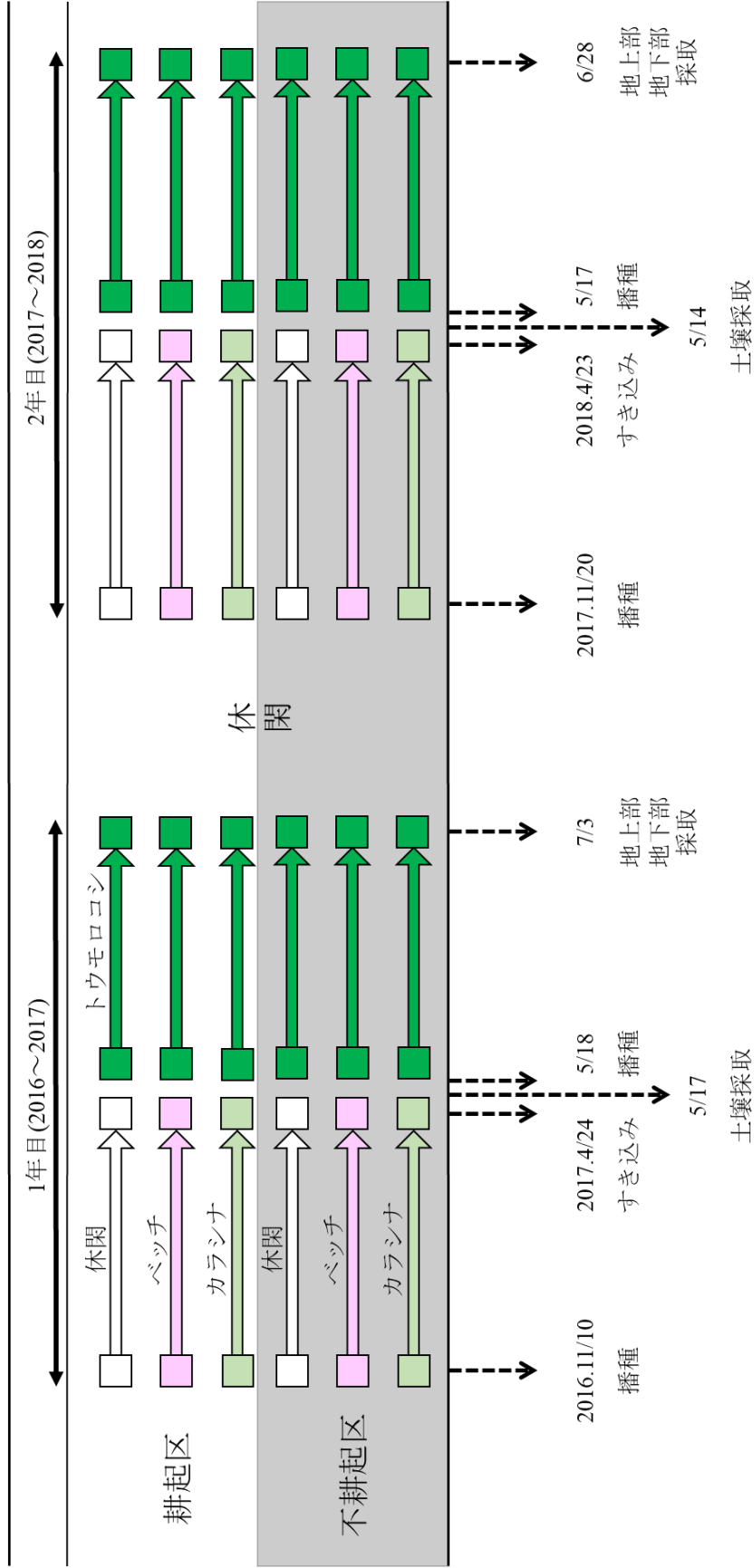
耕起管理が AM 菌種の構成に及ぼす影響を示した研究として、不耕起土壌において少数の AM 菌種が優占するのに対し、耕起した土壌では多数の種が共存するようになることが報告されている (Mirás-Avalos ら 2011)。本研究においてもロータリー耕起にのみ検出される AM 菌の DGGE バンド数や OTU 数は不耕起のみに検出される AM 菌の DGGE バンド数や OTU 数より多くなる傾向を示した (第 2-4 図)。これより、異なる耕起管理における特異的な AM 菌種の違いが、AM 菌の群集構造が異なった要因の一つと考えられる。実際、過去において作物の根に感染する AM 菌の群集構造は耕起管理により異なることを示した研究例がある (Jansa ら 2003, Alguacil ら 2008)。本研究においても、PCR-DGGE 解析のバンドパターンに基づき、耕起管理の違いによ



り AM 菌の群集構造が異なることが示され (第 2-5 図), 過去の報告と同様な傾向を示した (Alguacil ら 2008, Mirás-Avalos ら 2011). しかし, Sarkodee-Addo ら (2020) は PCR-DGGE 解析では, AM 菌の多様性や群集構造を必ずしも正確に捉えきれないことも指摘している. そこで, PCR-DGGE 解析で不明瞭であった菌叢の違いを明らかにするため, 2 年目のサンプルについてアンプリコンシーケンス解析を行った. その結果, PCR-DGGE 解析と同様に, 耕起管理の違いにより, AM 菌の群集構造が有意に異なることが示された (第 2-2 表, 第 2-6 図). Jansa ら (2003) も異なる耕起条件下で栽培したトウモロコシ根内の AM 菌群集構造が異なったことを報告しており, その要因を次のように考察している. すなわち耕起によって外生菌糸のネットワークが破壊された場合, 攪乱ストレスに感受性の高い AM 菌は減少し, 一方, 耕起による機械的攪乱に対して耐性がある AM 菌は減少しない可能性を示唆している (Jansa ら 2003). また, AM 菌は種間で感染速度や菌糸ネットワークの構築速度が異なることも報告されている (Giovannetti ら 1999, Oehl ら 2004, Avio ら 2006, Giovannetti 2008). 以上のことをふまえると, 感染速度の速い菌種ほど今回の実験においてロータリー耕起をした時に根内に優占した可能性が考えられる. 本研究も一般的に感染速度や菌糸ネットワークの構築が速いとされる *Glomus* 属, *Rhizophagus* 属や *Funneliformis* 属などが含まれる Glomeraceae の AM 菌の構成割合は不耕起で増加する傾向がみられている (第 2-2 表). 一方, Acaulosporaceae の AM 菌がロータリー耕起で増加する傾向がみられた. 本研究では土壤中の AM 菌種構成は調査出来ていないが, Castillo ら (2006) は 2 年間の耕起, 不耕起を設けた試験から土壤中の *Acaulospora* 属の AM 菌が不耕起より耕起で多く検出されたことを報告している. 今後, 本研究で検出された AM 菌分類群の感染速度などといった生理機能の調査・検討と土壤中の AM 菌種構成の解析結果が, 耕起管理により AM 菌の群集構造が変化した要因の解明に重要である. また, Jansa ら (2002) は目視による AM 菌胞子の形態分類を行った結果, AM 菌多様度 (シンプソン多様性指数およびシャノン多様性指数) は耕起管理による影響を受けなかったのに対し, AM 菌種の構成は耕起管理による影響を受けたことを示している. 比較的少数の種が優勢であるような群集では, 耕起管理が多様性に有意な影響を与えないことが指摘されており, 本研究においても同様な現象が起こったと推察される.

寒冷地におけるこれまでの報告では、耕起管理の違いにより AM 菌群集構造が異なると示されており (Jansa ら 2003), 温暖地における本研究においても同様な傾向を示した (第 2-5 図, 第 2-6 図). Schenck and Smith (1982) は, 24°Cでは AM 菌種ごとの感染率が大きく異なるのに対し, 30°Cになると AM 菌種ごとの感染率に差異が無くなることを報告している. このことから温暖地では寒冷地と比べ種ごとの AM 菌感染の差異が小さくなり, 異なる耕起管理を行っても根内における AM 菌群集構造の差異は少なくなるものと考えられる. しかし, 温暖地にて行われた本研究においても耕起管理の違いによる AM 菌群集構造の違いが飼料用トウモロコシ根で確認できたことから (第 2-2 表, 第 2-5 図, 第 2-6 図), 気温などの要因よりも耕起などの物理的な要因の方が, より根に感染する AM 菌の群集構造に影響を及ぼす可能性が示唆された.

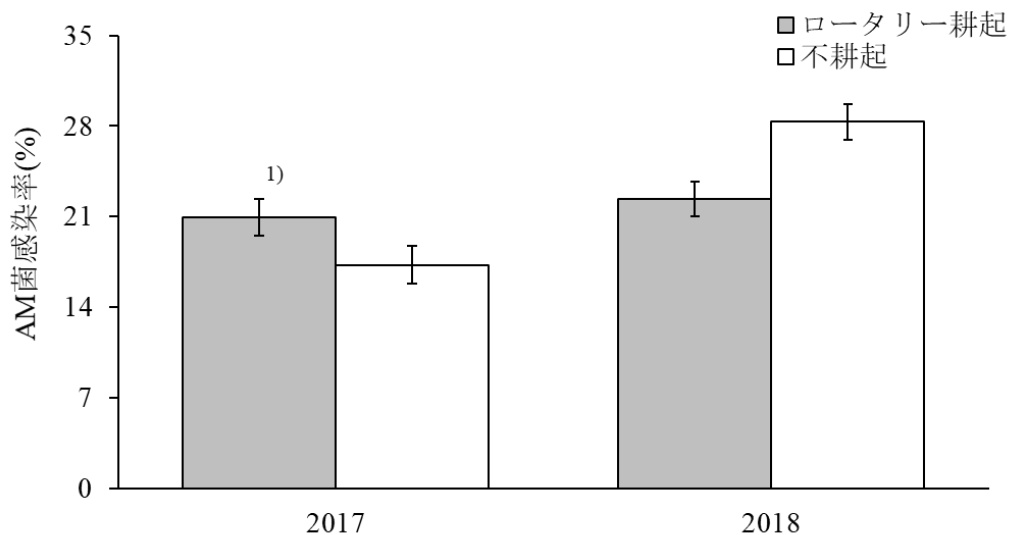
また, AM 菌の菌種によってリン酸獲得機能 (Van der Heijden and Scheublin 2007) やリン酸吸収効率 (Thonar ら 2011) は異なることが報告されていることから, 異なるリン酸獲得機能を持つ AM 菌種の優占程度によって飼料用トウモロコシのリン酸吸収に差異が出るものと考えられる. 従って, 耕起管理の違いで根内に感染する AM 菌の具体的な種の違いを明らかにすることや, AM 菌の攪乱耐性を解明することは今後の農作物のリン酸吸収と生産性向上に重要である. 本章において, ロータリー耕起によって飼料用トウモロコシの根に感染する AM 菌の群集構造に変化が生じることが明らかとなった. AM 菌群集構造と飼料用トウモロコシのリン酸吸収との関連性については第 3 章で解析する.



第2-1図 圃場管理等の概要および日程.

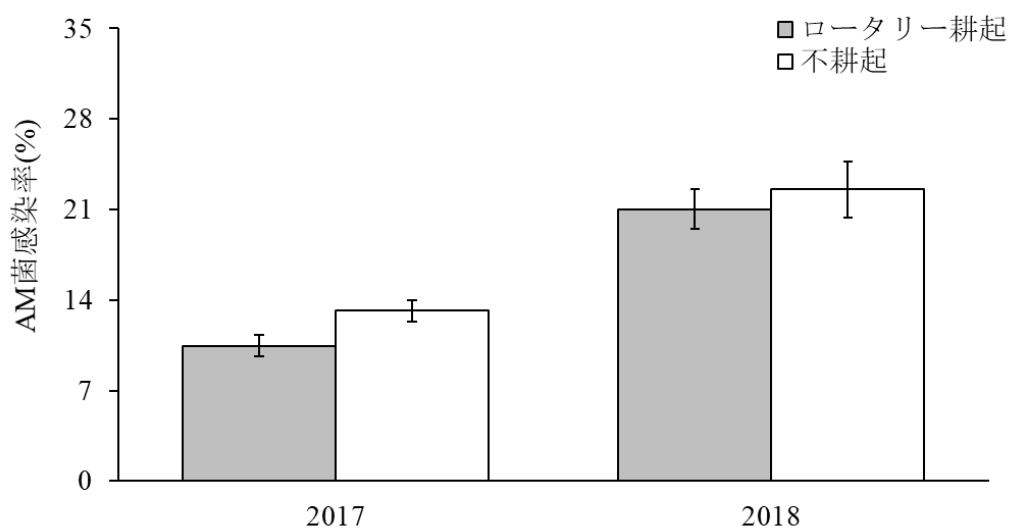
栄養成長期

年次(A): \*\*\*<sup>2)</sup>, 耕起管理(B): n.s., (A)×(B): \*\*



絹糸抽出期

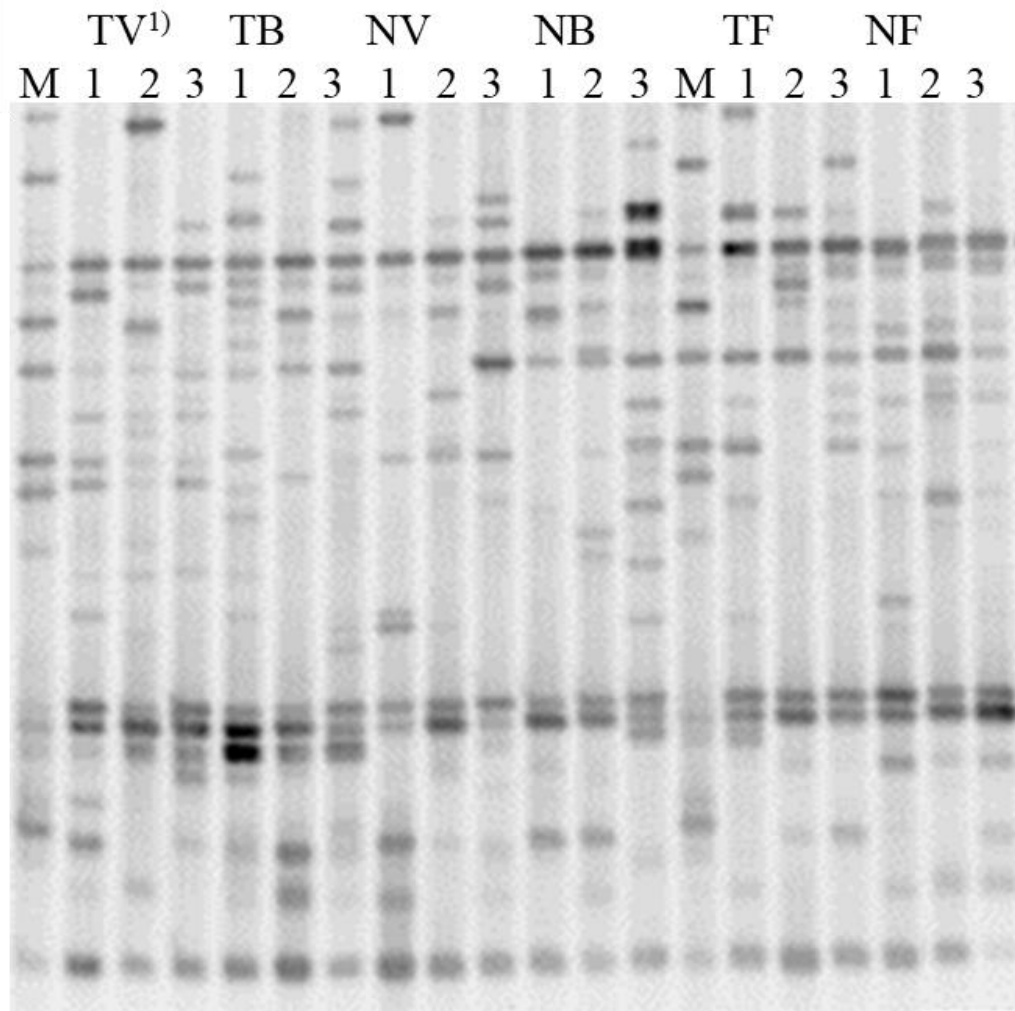
年次(A): \*\*\*, 耕起管理(B): n.s., (A)×(B): n.s.



第2-2図 耕起管理が飼料用トウモロコシ根に感染するAM菌感染率に及ぼす影響.

1) エラーバーは標準誤差を示す.

2) 統計処理は角変換後に行った. 二元配置分散分析において\*\*は1%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.



第2-3図 各試験区より得られたAM菌群集のPCR-DGGEバンドパターン (2017) .  
 1) 図上の1-3は各区における反復番号を示す.  
 M: Marker, V: ベッチ, B: カラシナ, F: 休閒,  
 T: ロータリー耕起, N: 不耕起

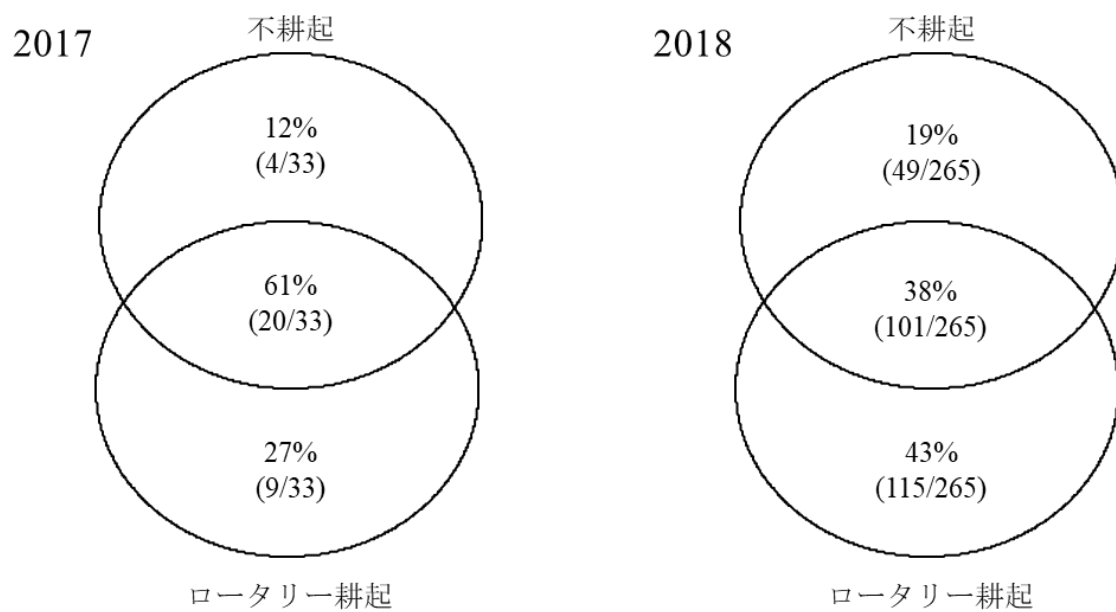
第2-1表 耕起管理が飼料用トウモロコシ根のバンド数（2017年）およびOTU数（2018年）に及ぼす影響（2017年:PCR-DGGE, 2018年:アンプリコンシーケンス解析）。

耕起管理	冬作物管理	バンド数	OTU数
ロータリー耕起	ベッチ	10.3 ± 1.7 <sup>1)</sup> a <sup>2)</sup>	73.0 ± 3.5 a
	カラシナ	12.0 ± 1.0 a	80.3 ± 7.7 a
	休閑	9.0 ± 0.6 a	65.3 ± 9.7 a
不耕起	ベッチ	8.7 ± 0.3 a	71.3 ± 2.6 a
	カラシナ	10.0 ± 1.7 a	72.0 ± 3.6 a
	休閑	10.0 ± 0.6 a	70.7 ± 5.5 a
耕起管理	ロータリー耕起	10.4 ± 0.7	72.9 ± 4.3
	不耕起	9.6 ± 0.6 n.s. <sup>3)</sup>	71.3 ± 2.0 n.s.

1) 平均値 ± 標準誤差を示す。

2) 同一アルファベット間には冬作物管理間においてTukey法5%水準で有意差がないことを示す。

3) t検定法においてn.s.は有意差がないことを示す。



第2-4図 検出されたPCR-DGGEバンド（2017年）およびOTU（2018年）の関係。  
 各反復から検出されたバンドまたはOTUを全て合わせたデータを用い、ベン図を作成した。

第2-2表 耕起管理が飼料用トウモロコシ根から検出されたAM菌の相対出現頻度に及ぼす影響（2018年: アンプリコンシーケンス解析）.

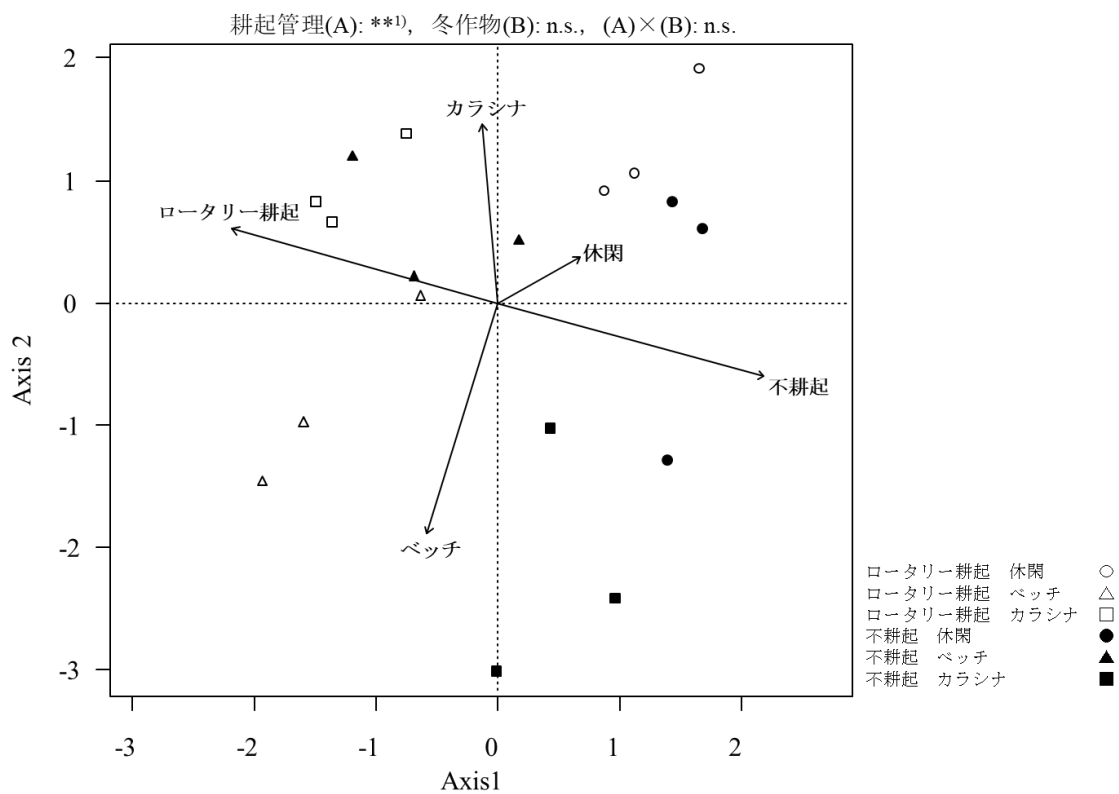
耕起管理	冬作物管理	Acaulosporaceae		Diversisporaceae	
		(%)		(%)	
ロータリー耕起	ベッチ	19.1 ± 0.4 <sup>1)</sup>	a <sup>2)</sup>	7.8 ± 0.5	a
	カラシナ	20.4 ± 0.6	a	8.0 ± 1.1	a
	休閒	18.8 ± 1.5	a	7.8 ± 0.4	a
不耕起	ベッチ	16.3 ± 1.5	a	7.0 ± 0.3	a
	カラシナ	18.6 ± 0.7	a	6.5 ± 0.2	a
	休閒	15.8 ± 1.3	a	7.5 ± 1.0	a
耕起管理	ロータリー耕起	19.4 ± 0.0	* <sup>3)</sup>	7.9 ± 0.0	n.s.
	不耕起	16.9 ± 0.5		7.0 ± 0.3	
耕起管理	冬作物管理	Glomeraceae		Gigasporaceae	
		(%)		(%)	
ロータリー耕起	ベッチ	47.1 ± 1.5	a	26.0 ± 0.9	a
	カラシナ	44.0 ± 2.1	a	27.6 ± 2.0	a
	休閒	43.3 ± 2.3	a	30.2 ± 1.4	a
不耕起	ベッチ	49.9 ± 2.0	a	26.8 ± 2.6	a
	カラシナ	47.6 ± 2.2	a	27.4 ± 2.2	a
	休閒	48.6 ± 1.5	a	28.1 ± 2.7	a
耕起管理	ロータリー耕起	44.8 ± 0.0	*	27.9 ± 0.0	n.s.
	不耕起	48.7 ± 1.4		27.4 ± 1.1	

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

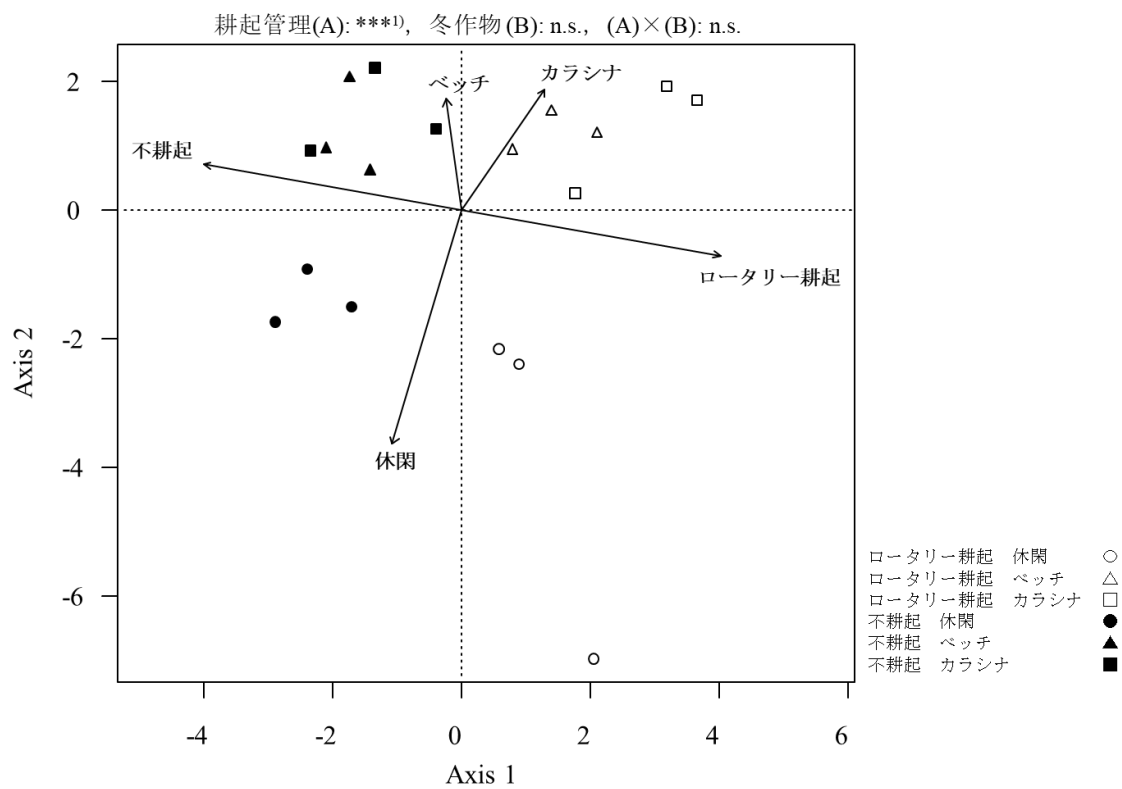
2) 統計処理は角変換後に行った. 同一アルファベット間は冬作物管理間において Tukey法5%水準で有意差がないことを示す.

3) 統計処理は角変換後に行った. t検定法において\*は5%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.





第2-5図 PCR-DGGEバンドパターンに基づく、耕起管理が飼料用トウモロコシ根のAM菌群集構造に及ぼす影響の冗長性分析 (RDA: 2017) .  
 1) PERMANOVAにおいて\*\*は1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.



第2-6図 アンプリコンシーケンス解析に基づく、耕起管理が飼料用トウモロコシ根のAM菌群集構造に及ぼす影響の冗長性分析 (RDA: 2018)。

1) PERMANOVAにおいて\*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し、n.s.は有意差がないことを示す。

### 第3章 ロータリー耕起が飼料用トウモロコシ根に感染する AM 菌群集構造およびトウモロコシのリン吸収に及ぼす影響

#### 3-1. 緒言

第2章より、ロータリー耕起を行うことで飼料用トウモロコシ根に感染する AM 菌の感染率には影響はないが群集構造が変化することが明らかとなった。ただしこの AM 菌の群集構造の変化が飼料用トウモロコシのリン吸収と関連しているかまでは明らかになっていない。土壌微生物の群集構造の違いが作物の収量に影響を及ぼすことが示唆されており (Ma ら 2020), 本研究においても AM 菌の群集構造の変化がロータリー耕起による作物の生育や収量を向上させた要因の一つである可能性がある。

これまでの研究から耕起, 耕耘によって特定の AM 菌種の増減が確認されている。例えば, *Glomus* 属は耕起, 耕耘を行った土壌において最も優占する AM 菌種であることが報告されている (Sakariyaw ら 2019)。これは, *Glomus* 属が孢子形成や根への感染が速い特徴を持つため, 耕起, 耕耘を行っても優占しやすいからである (Oehl ら 2003)。反対に *Gigaspora* 属は耕起, 耕耘を行うことで優占率が減少する AM 菌種であることが報告されている (Pellegrino ら 2020)。*Gigaspora* 属を含む *Gigasporaceae* は, 一度外生菌糸を切断されると再接続できないことが知られており, 物理的な土壌攪乱に特に弱いとされている (De La Providencia ら 2005)。ただし, 最近の報告では耕起, 耕耘によって *Gigaspora* 属の優占率が増加することも報告されている (Mhlanga ら 2022)。このような耕起, 耕耘による AM 菌種の異なる消長反応に関してはいまだ明らかになっていない部分も多い。

AM 菌が感染することで農作物の収量が向上する事例はいくつも報告されている (Rozpadek ら 2016, Gao ら 2020, Watts-Williams ら 2022)。ただし, AM 菌染率の増加がそのまま農作物の収量増加に繋がるとは限らない。AM 菌は現在約 300 種類確認されているが (Yu ら 2022a), 種の違いでリン獲得能力 (Munkvold ら 2004, Thonar ら 2011) は異なることが報告されている。低リン条件下において *Rhizophagus irregularis* を接種した植物のリン取り込みは, *Glomus mosseae* を接種した植物よりも有意に高いことが報告されている (Zheng ら 2015)。さらに, ソルガムの地上部のリ

ン含有量は *Gigaspora gigantea* 接種および非接種と比較して、*Rhizophagus minimumis* を接種することによって最も高くなることが報告されている (Kaur ら 2022)。このような報告からリン獲得能力の高い AM 菌種が多く感染すれば作物の生育は向上し、リン獲得能力の低い AM 菌種が多く感染すれば作物の生育が向上する割合は小さいと考える。

第 1 章ではロータリー耕起によって飼料用トウモロコシのリン酸吸収が促進することが明らかとなり、第 2 章ではロータリー耕起によって飼料用トウモロコシ根に感染する AM 菌群集構造が変化することが明らかになった。そこで本章では、これら 2 つの事象の関連性、すなわちロータリー耕起が飼料用トウモロコシのリン酸吸収を促進し、収量を向上させた要因を、感染する AM 菌種の観点から明らかにすることを目的とした。

### 3-2. 材料及び方法

#### 1] 実験 1：圃場試験

##### 1) 試験耕種概要

栽培概要は第 1 章と同様であり、第 1 章で栽培した飼料用トウモロコシを第 3 章でも用いた。根の採取は第 1 章と同日に第 2 章と同様の方法で行った。

##### 2) 飼料用トウモロコシ根内における AM 菌感染率の評価

飼料用トウモロコシ根内における AM 菌感染率の評価は第 2 章と同様である。

##### 3) 土壌採取

飼料用トウモロコシ播種の前日である 2019 年 5 月 19 日、2020 年 5 月 13 日に 1 反復あたりランダムに 20 箇所、深さ 0-20 cm、直径 4 cm の範囲で土壌コアサンプラー (DIK-102A, 大起理化工業株式会社, 埼玉県) を用い採取した。採取した 20 箇所の土壌は 1 つにまとめ、生のまま 2 mm の篩にかけた。篩にかけた土壌の半分は土壌化学性分析用に通風乾燥させ、半分は土壌ホスファターゼ活性、グロマリン様タンパク質、DNA 抽出、孢子密度測定用に生土のまま -30°C で凍結保存した。

#### 4) 土壌における AM 菌胞子密度の測定

AM 菌の胞子抽出は齋藤 (1992) のプロトコールを改変し行った。生土壌を 3 g 量りとり、網目 500  $\mu\text{m}$  の篩にかけ、水で土壌などを取り除き、53  $\mu\text{m}$  の篩に残された土壌を AM 菌胞子密度の測定に用いた。その土壌を 1,000 mL 容ビーカーに水で流し入れ、超音波洗浄器 (MUS-20 D, 東京理化学器械株式会社, 東京都) に 25 秒間かけ AM 菌胞子の表面を洗浄した。その後、懸濁液を 53  $\mu\text{m}$  の篩にかけて細かい粒子を流した後、もう一度 1,000 mL 容ビーカーに水で流し入れた。再度、超音波洗浄器に 25 秒間かけ、この操作をもう一度繰り返した。篩上の土壌を 50 mL 容の遠沈管に入れ、ホールピペットを用い 60 %スクロース液を適量、遠沈管の底に静かに入れ、遠心機 (H-103N, 国産遠心器株式会社, 東京都) を用い 1,500 rpm で 7 分 30 秒遠心した。土壌懸濁液とスクロース液の境界にある AM 菌胞子を駒込ピペットで採取後、AM 菌胞子を実体顕微鏡 (BX50, OLYMPUS, 東京都) で観察し、胞子数を測定した。AM 菌胞子であることの判定は、有柄針で AM 菌胞子を潰して行った。

#### 5) 根からの DNA 抽出

根組織の DNA を抽出するために NucleoSpin® Plant II (Takara Bio, 滋賀県) を使用した。各区の根を新鮮重で 100 mg 測り、 $-30^{\circ}\text{C}$  で冷却しておいた 2 mL 容のビーズチューブに入れ、液体窒素で凍結させながら 4,000 rpm で 60 秒間ビーズ式粉碎装置 (MS-100, TOMY, 東京都) を用いて凍結粉碎した。その後、Buffer PL2 を 400  $\mu\text{L}$  加え、ビーズ式粉碎装置で 60 秒間ボルテックス混合し、そこに RNaseA 溶液 10  $\mu\text{L}$  加えた。再びビーズ式粉碎装置で 60 秒間ボルテックス混合し、 $65^{\circ}\text{C}$  で 10 分間、恒温機 (DTU-1B, TAITEC, 愛知県) にてインキュベートした。その後、Buffer PL3 を 100  $\mu\text{L}$  加え、氷上で 5 分間静置した。それを微量高速冷却遠心機 (Centrifuge 5415R, Eppendorf Japan, 東京都) を用いて  $11,000\times g$  で 5 分間遠心し上澄み液ができるまで何回か繰り返し行った。NucleoSpin Filter (青紫色リング) をセットした 2 mL 容の Collection Tube にこの上澄み液を移し、 $11,000\times g$  で 2 分間遠心した。1.5 mL チューブにろ液を移し、これに Buffer PC を 450  $\mu\text{L}$  加え、5 秒間ボルテックス (SI-0286, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA) で混合した。NucleoSpin Plant II Column (緑色リング) をセットした

2 mL 容の Collection Tube にこの上澄み液 700  $\mu\text{L}$  を移し、11,000 $\times g$  で 1 分間遠心し、ろ液を捨てた。上澄み液が多い場合は、この作業を繰り返した。Buffer PW1 を Column に 400  $\mu\text{L}$  加え、微量高速冷却遠心機を用いて 11,000 $\times g$  で 1 分間遠心した。ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube に Column をセットし Buffer PW2 を 400  $\mu\text{L}$ 、700  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$  の順で加え、それぞれ微量高速冷却遠心機を用いて 11,000 $\times g$  で 1 分間（最後の 200  $\mu\text{L}$  の時は 2 分間）遠心し、ろ液を捨てた。Column を新しい 1.5 mL チューブに移し、フィルターの上に Buffer TE を 30  $\mu\text{L}$  を加え、65 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間恒温機を用いインキュベートした。その後 11,000 $\times g$  で 1 分間遠心を行い、カラムの下の沈殿物を DNA 溶液とした。

#### 6) AM 菌群集のアンプリコンシーケンス解析

作物根から抽出した DNA 溶液は AM 菌のリボソーマル DNA 小サブユニット (18S rDNA) 領域を特異的に増幅するため、Nested PCR 法による増幅を行った。

1st-PCR では、まず 18S rDNA の 5' 末端の領域を菌類特異的なプライマーである AM1 (5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGA-3') (Helgason ら 1998) と NS31 (5'-TTGGAGGGCAGTCTGGTGCC-3') (Simon ら 1992) を用い増幅した。反応系はテンプレート DNA 溶液 1  $\mu\text{L}$ 、KOD One Master Blue Mix 5.0  $\mu\text{L}$ 、プライマー溶液 2 種各 0.2  $\mu\text{L}$  (それぞれ 20  $\mu\text{M}$ ) 及び滅菌水 3.6  $\mu\text{L}$  を含む 10  $\mu\text{L}$  で行った。PCR 条件は 94 $^{\circ}\text{C}$  : 2 分, [94 $^{\circ}\text{C}$  : 10 秒, 60 $^{\circ}\text{C}$  : 5 秒, 68 $^{\circ}\text{C}$  : 15 秒]  $\times$  35 サイクルで行った。その後、生成した PCR 産物を滅菌水で 10 倍希釈し、2nd-PCR のテンプレートとした。

2nd-PCR ではプライマーとして AMV4.5NF (5'-AAGCTCGTAGTTGAATTCG-3') と AMDGR (5'-CCCAACTATCCCTATTAATCAT-3') (Sato ら 2005) を用い増幅した。反応系はテンプレート DNA 溶液 2  $\mu\text{L}$ 、KOD One Master Blue Mix 10  $\mu\text{L}$ 、プライマー溶液 2 種各 0.6  $\mu\text{L}$  (それぞれ 10  $\mu\text{M}$ ) 及び滅菌水 6.8  $\mu\text{L}$  を含む 20  $\mu\text{L}$  で行った。PCR 条件は 94 $^{\circ}\text{C}$  : 2 分, [94 $^{\circ}\text{C}$  : 10 秒, 60 $^{\circ}\text{C}$  : 5 秒, 68 $^{\circ}\text{C}$  : 15 秒]  $\times$  40 サイクルで行った。その後、TAE Buffer (40 mM Tris-HCL pH8.0, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA) 100 mL に Agarose-II を 1.0 g 溶かし、Atlas ClearSight DNA Stain (フナコシ, 東京都) を 3.5  $\mu\text{L}$  添加した 1%アガロースゲルを用いて 125 V, 40 分で電気泳動を行い、AM

菌の DNA が 250 bp 付近に存在することをバンドで確認した.

3rd-PCR ではプライマーとしてアダプター A (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2-ACACTCTTTCCCTACACGACGC-3') 及び 8 bp の DNA タグを結合させた 3rd-F とアダプター B (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-Index1-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3') を結合させた 3rd-R を用いタグ付けを行った. 反応系は KOD One Master Blue Mix 30  $\mu$ L, プライマー溶液 2 種各 3  $\mu$ L (それぞれ 10  $\mu$ M) 及び滅菌水 18  $\mu$ L を含む 54  $\mu$ L のミクスチャーを 22.5  $\mu$ L ずつ分注し, テンプレート DNA 溶液 2.5  $\mu$ L ずつ添加し, 2 反復設けて行った. PCR 条件は, 94°C : 2 分, [98°C : 10 秒, 60°C : 30 秒, 68°C : 10 秒]  $\times$  16 サイクル行い, 最後に 72°C : 10 分の伸長反応の延長時間を設けた. 増幅した各反復 2 つの PCR 産物をプールし, NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany) により精製した. 精製した PCR 産物は DS-11 Nano Pad (388-02611, FUJIFILM, 東京都) で DNA 濃度を計測した. その後, 精製された PCR ライブラリーはイルミナ Miseq シークエンサー (株式会社生物技研, 神奈川県) でアンプリコンシークエンシングを行った.

取得したアンプリコン配列データは, QIIME 2 v2022.8 (<http://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>) の DADA2 で解析し, ペアエンド配列のノイズ除去, 重複除去, キメラフィルタリングを行った (Callahan ら 2016, Bolyen ら 2019, Stefani ら 2020). 品質スコアが 20 未満の塩基およびフォワードとリバースの 5' 末端における最初の 21 塩基と 20 塩基をトリミングした. フォワードとリバースの 3' 末端は, それぞれ 230 塩基と 210 塩基で切り捨てた.

各アンプリコン配列変異体 (ASV) の分類学的同定は, Stefani ら (2020) の手順で実施した. 各 ASV は, NCBI BLAST を用いて GenBank (Sayers ら 2019) で見つかった最も近い配列と同定された. BLAST 結果の最初のヒット (ペアワイズ類似度が最も高く, クエリーカバレッジが 97%以上のヒット) のみが保存された.

#### 7) 飼料用トウモロコシ根における AM 菌の群集構造解析

各試験区のリード数を揃えるため, 5) のデータを用いて, R 4.0.2 の vegan v2.5.6 パ

パッケージ, arefy 関数を用いて, 各区におけるサンプルあたりのリード数が最も少ない場合 (栄養成長期: 27,284 リード; 絹糸抽出期: 33,793 リード) のレアファクション解析を実施した. 次に, AM 菌の群集構造解析は, R 4.0.2 (<https://www.R-project.org/>) の *vegan* v2.5.6 パッケージ (Oksanen ら 2019) を用い, ASV 数, シャノン多様度指数 ( $H'$ ) とシンプソン指数 ( $1/D$ ) を算出した. その後, AM 菌群集構造の比較には冗長性分析 (RDA) (長谷川 2006) を R 4.0.2 の *vegan* v2.5.6 パッケージを用い作図した. AM 菌群集構造の有意差検定には *permutational multivariate ANOVA* (PERMANOVA) を R 4.0.2 の *vegan* v2.5.6 パッケージの *adonis* ファンクションを用いた (鈴木・竹中 2009).

#### 8) 属レベルでの AM 菌の種構成解析

各 ASV の分類学的同定を補完し, 改良するために, よく識別された AM 菌培養物の参照配列を使用して, 系統樹を作成した. 各参照配列の分類名は, NCBI GeneBank で確認し, 必要に応じて更新した. RAxML v8.2.10 (<https://github.com/stamatak/standard-RAxML>) (Stamatakis ら 2014) で最尤樹を計算した. ブートストラップ再サンプリングは 1,000 に設定し, GTRGAMMA 配列進化モデルが選択された. 系統樹での位置に基づく各 ASV の分類学的位置は, MaarjAM (Öpik ら 2010) および NCBI GenBank データベースを直接照会して取得した分類学的情報と比較した. 相対出現頻度は, 全 AMF に占める各 AM 菌属の割合として算出した. 本解析結果の BioProject Accession Number は PRJDB142011 であり, 日本 DNA データバンクに登録した.

## 2] 実験 2: ポット接種試験

### 1) AM 菌の接種と飼料用トウモロコシの育成条件

本試験は, 昼温 25°C, 夜間は 22°C, 日長 14 時間に設定された人工気象室 (FR-535A-S2 型, 小糸工業株式会社, 静岡県) で行った. 黒ボク土と珪砂を 121°C, 60 分でオート高圧滅菌機パーソナルクレーブ (HA300M II, HIRAYAMA, 埼玉県) で滅菌した後 1:1 の割合で混合し, 1/10,000 a ワグネルポットに 1,000 g 充填した. AM 菌の接種源として *Acaulospora longula* F-1 (以下 *Acaulospora* 属 F-1 とする) を 1,000 孢子,



*Acaulospora morrowiae* AP-5(以下 *Acaulospora* 属 AP-5 とする)を 100 孢子, *Dentiscutata cerradensis* TK-1 (以下 *Racocetra* 属 TK-1 とする)を 500 孢子, *Cetraspora Pellucida* SZ-3 (以下 *Racocetra* 属 SZ-3 とする)を 1,000 孢子, 飼料用トウモロコシの種子直下になるようあらかじめ充填しておいた土壌に穴を掘り, それぞれの種の孢子が含まれた培養土を添加し, 覆土した. 接種源は農業生物資源ジーンバンク (NARO Genebank, [https://www.gene.affrc.go.jp/index\\_j.php](https://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php)) で入手した. なお, 接種する菌株間で感染率がほぼ同じになるような接種孢子数を明らかにする予備実験を行い, 接種する孢子数を決めた. 対照区として何も接種しないポットも用意した. 飼料用トウモロコシの品種は圃場試験と同じ P1690 を用い, 種子はポットあたり 3 粒を 2021 年 6 月 24 日 (*Acaulospora* 属 F-1, *Acaulospora* 属 AP-5) と 2021 年 9 月 21 日 (*Racocetra* 属 TK-1, *Racocetra* 属 SZ-3) 播種した. その後出芽 7 日後にあたる 2021 年 7 月 1 日 (*Acaulospora* 属 F-1, *Acaulospora* 属 AP-5) と 2021 年 9 月 28 日 (*Racocetra* 属 TK-1, *Racocetra* 属 SZ-3) に間引きをして 1 株にした. それぞれの区で 3 反復 (3 pot) 設けた. 播種後 35 日目に茎葉と根のサンプリングを行った.

## 2) 飼料用トウモロコシ根内における AM 菌感染率の評価

AM 菌感染率の調査は, 実験 1 と同様の手法で染色・測定を行った.

## 3) 飼料用トウモロコシの茎葉乾物重, 茎葉リン酸濃度

茎葉乾物重, 茎葉リン酸濃度は第 2 章と同様の方法で求めた.

### 3-3. 結果

#### 1] 実験 1 : 圃場試験

#### 1) 飼料用トウモロコシ根内における AM 菌感染率, 播種前土壌における AM 菌孢子密度

栄養成長期および絹糸抽出期における飼料用トウモロコシ根内の AM 菌感染率を調査した (第 3-1 図). 栄養成長期および絹糸抽出期の AM 菌感染率に関して 2019 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し, 2020 年も同様な結果を示した. また,

栄養成長期では年次間で有意差が認められたのに対し、絹糸抽出期では年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった。次に、土壌中における AM 菌胞子密度を調査した（第 3-2 図）。AM 菌胞子密度に関して 2019 年、2020 年ともにロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した。さらに、年次間および耕起管理間で有意差が認められた。

### 3) 飼料用トウモロコシ根内における AM 菌の多様度

*Glomeromycota* に属する合計 902,362 個のペアエンド配列が得られた。さらに、飼料用トウモロコシ根内において、合計 104 の *Glomeromycota* に属するアンプリコン配列変異体 (ASV) が確認された（第 3-3 図）。飼料用トウモロコシ根の AMF ASV の相対出現頻度は、栄養成長期、絹糸抽出期の違いに関わらず、耕起管理間によって異なる傾向があり、特定の AMF ASV で増減がみられた（第 3-4 図）。栄養成長期および絹糸抽出期における飼料用トウモロコシ根内の AM 菌 ASV 数、AM 菌シャノン多様度指数、AM 菌シン普森多様度指数を調査した（第 3-1 表）。栄養成長期の AM 菌 ASV 数およびシャノン多様度指数に関して、2019 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し、2020 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した。さらに、AM 菌 ASV 数、シャノン多様度指数において年次間で有意差が認められた。絹糸抽出期の AM 菌 ASV 数および AM 菌シャノン多様度指数は 2019 年、2020 年ともにロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した。また、AM 菌 ASV 数では年次間および耕起管理間で有意差は認められなかったのに対し、シャノン多様度指数では耕起管理間で有意差が認められた。栄養成長期のシン普森多様度指数に関して、2019 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し、2020 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した。ただし、年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。絹糸抽出期のシン普森多様度指数に関して、2019 年、2020 年ともにロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し、耕起管理間で有意差が認められた。

### 3) 飼料用トウモロコシ根内における AM 菌の群集構造の違い

RDA を用いて飼料用トウモロコシ根の AM 菌群集構造の違いを明らかにした（第

3-5 図) . RDA における PERMANOVA において栄養成長期の AM 菌群集構造は年次間および耕起管理間で有意差が認められた. 加えて, 絹糸抽出期の AM 菌群集構造は耕起管理間で有意差が認められた.

次に, 栄養成長期, 絹糸抽出期における飼料用トウモロコシ根内の AM 菌相対出現頻度に及ぼす影響を調査した (第 3-6 図) . 栄養成長期の AM 菌相対出現頻度に関しては *Racocetra* 属, *Gigaspora* 属が不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し, *Rhizophagu* 属, *Glomus* 属および *Acaulospora* 属がロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した. また, *Racocetra* 属のみ耕起管理間で有意差が認められた. 絹糸抽出期の AM 菌相対出現頻度に関しては *Racocetra* 属, *Gigaspora* 属および *Rhizophagu* 属が不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し, *Glomus* 属, *Acaulospora* 属がロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した. それに加え, *Racocetra* 属, *Gigaspora* 属, *Glomus* 属および *Acaulospora* 属に関して耕起管理間で有意差が認められた.

## 2] 実験 2 : ポット接種試験

### 1) AM 菌接種株の違いにおける飼料用トウモロコシの茎葉乾物重, リン酸濃度

ポット接種試験において異なる AM 菌接種株が飼料用トウモロコシの茎葉乾物重, リン酸濃度に及ぼす影響を調査した (第 3-2 表) . まず, 異なる AM 菌接種株の間で感染率に有意差がないことを確認した. 茎葉乾物重は *Acaulospora* 属 AP-5 で最も高い傾向がみられ, *Racocetra* 属 TK-1 で最も低い傾向がみられた. ただし Dunnett 法によって, 対照区と比較したところ *Acaulospora* 属 AP-5, *Acaulospora* 属 F-1, *Racocetra* 属 TK-1, *Racocetra* 属 SZ-3 のいずれも有意差は認められなかった. 茎葉リン酸濃度は *Racocetra* 属 TK-1 で最も高く, *Acaulospora* 属 F-1 で最も低かった. 同様に, Dunnett 法によって, 対照区との比較を行ったところ *Acaulospora* 属 AP-5, *Acaulospora* 属 F-1 では有意差が認められなかったものの, *Racocetra* 属 TK-1, *Racocetra* 属 SZ-3 では有意差が認められた.

## 3-4. 考察

一般的に, 耕起, 耕耘は AM 菌の菌糸ネットワークを破壊し, AM 菌感染率を低下

させるといわれている (Bowles ら 2017, Mariotte ら 2018, Sommermann ら 2018). これに対し, 耕起, 耕耘によってコムギの根に菌根が急速に形成された報告 (Battie-Laclau ら 2019) や耕起, 耕耘が AM 菌感染率に影響しない報告 (Patanita ら 2020, Kurm ら 2023) もあり, AM 菌の感染に対する影響は様々である. 本研究における AM 菌感染率はロータリー耕起の有無で差はみられなかった (第 3-1 図). Holden (2019) は耕起, 耕耘しても AM 菌の感染が抑制されない要因として, 根系の残存状態が影響する可能性を示唆しており, 土壌中に根が密に存在すると耕起, 耕耘によって物理的破壊を受けても迅速に菌根が形成されることを明らかにしている. 本研究においては, 前年の飼料用トウモロコシ根がロータリー耕起後も残存し, 翌年まで土壌中で根系が密になっていた可能性があり, このことがロータリー耕起の有無で AM 菌感染率に影響を及ぼさなかった一因と考えられる.

AM 菌は種によってリン酸吸収を促進するものもあれば, そうでないものもある (Anusha ら 2022, Juntahum ら 2022). 前述したように, 今回の試験では AM 菌感染率にロータリー耕起の影響はみられなかったが, ロータリー耕起と不耕起で感染する AM 菌群集構造に違いが認められた (第 3-4 図, 第 3-5 図). これまでの先行事例においても, 土壌や根内の AM 菌群集構造は耕起法の違いの影響を強く受けることが報告されている (Lu ら 2018, Gu ら 2020, 立脇ら 2021, Liu ら 2022). Jansa ら (2003) は, 耕起や耕耘などの土壌攪乱によって, 根内の *Scutelospora* 属の存在量が減少し, *Gigaspora* 属の存在量は変化がなく, *Glomus* 属の存在量は増加したことを報告している. 土壌中に存在する AM 菌の種構成の変化に関しても報告があり, de Pontes ら (2017) は不耕起では *Acaulospora* 属や *Glomus* 属, *Palaglomus* 属が最も優占し, 耕起や耕耘では *Gigaspora* 属や *Racocetra* 属が最も優占したことを明らかにしている. 今回の研究ではロータリー耕起によって *Racocetra* 属を含む *Gigasporaceae* の優占率が高まり, 不耕起では *Acaulospora* 属を含む *Acaulosporaceae* の優占率が高まること明らかとなった (第 3-6 図). 過去, *Gigasporaceae* と *Acaulosporaceae* は pH の低い土壌に生息することが報告されている (Stürmer ら 2018). 本研究における土壌も酸性条件であることから, *Gigasporaceae* と *Acaulosporaceae* はもともと土壌に多く生息していたと推察される. また, 通常 *Gigasporaceae* に属する AM 菌は根への感染を外生菌糸に依存せ

ず、胞子のみから行う (Biermann and Lindermann 1983). さらに, *Gigaspora* 属は耕起, 耕耘などの土壌攪乱にも耐えることが示唆されている (Hart and Reader 2004, Soteris ら 2015). この様な *Gigasporaceae* が持つ攪乱耐性は他の菌種よりも有利に働くため, ロータリー耕起で *Gigasporaceae* の優占率が高まったと思われる. これに対し, Jasper ら (1991) や Li ら (2007) は *Acaulospora* 属の AM 菌の菌糸は土壌が攪乱されると感染能力を失うことを報告している. また, *Acaulosporaceae* の AM 菌は感染速度が遅いことも示されている (Brundrett ら 1999). このような *Acaulosporaceae* の攪乱に対する脆弱性や感染の遅さから, ロータリー耕起で優占することができず, 不耕起で優占したものである. ただし, 本研究で明らかになったのはアンプリコンシーケンス解析を用いた相対出現頻度であり, 絶対量まで明らかにすることはできなかった. 脂肪酸 (C16: 1cis11) は, 土壌中の AM 菌バイオマスを測定するのによく用いられており (Drijber and Jeske 2019), 絶対量の比較に適した方法である. 従って, 今後は AM 菌特異的脂肪酸を調査することで絶対量を評価する必要がある.

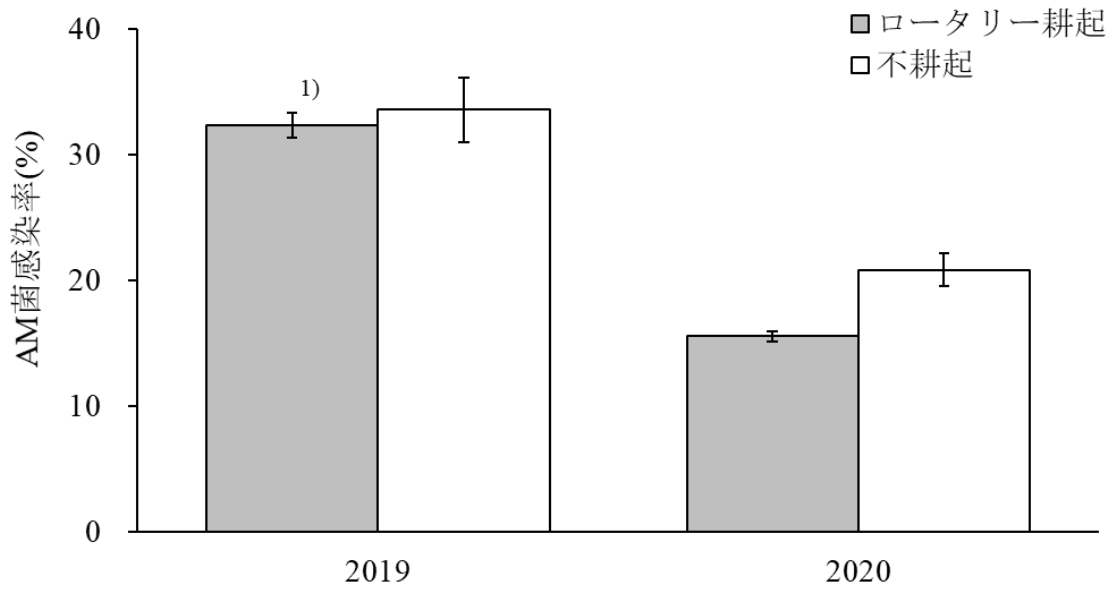
また, 実際にロータリー耕起の有無による AM 菌種構成の違いが飼料用トウモロコシのリン酸吸収や生育に変化をもたらしたのであれば, 両科の AM 菌を単独で接種させた場合, 飼料用トウモロコシの生育やリン酸吸収量に差が出ると考えられる. そこで次に実験 2 では *Acaulospora* 属 F-1, *Acaulospora* 属 AP-5, *Racocetra* 属 TK-1, *Racocetra* 属 SZ-3 を接種したポット試験を行った. 圃場試験において感染率に違いが無かったことから (第 2-2 図, 第 3-1 図), ポット試験においても接種孢子数で統一せず, 感染率で統一を行った. 感染率が同じ時の飼料用トウモロコシの生育やリン酸濃度を比較した結果, リン酸濃度は *Acaulospora* 属 F-1, *Acaulospora* 属 AP-5 よりも *Racocetra* 属 TK-1, *Racocetra* 属 SZ-3 を接種すると高まった (第 3-2 表). このことから飼料用トウモロコシに対しては *Acaulospora* 属よりも *Racocetra* 属のほうがリン酸吸収の促進効果が高いと考えられる. *Racocetra* 属を含む *Gigasporaceae* の AM 菌は外生菌糸が広範囲に広がるのに対し, *Acaulospora* 属を含む *Acaulosporaceae* の AM 菌は, 外生菌糸があまり大きく広がらないことが報告されている (Hart and Reader 2002, Maherali and Klironomos 2012, Chagnon ら 2013). このような菌糸拡大の違いが土壌からのリン酸吸収量に影響したと思われる. ただし, 本研究のポット試験での AM 菌感染率は圃場

試験と比較して著しく低く、AM 菌感染が本当にリン吸収を促進させたかは定かではない。今後は接種源する孢子量を増やし、圃場試験の感染率と同等にしたうえで再度評価する必要がある。

今回の実験結果により、ロータリー耕起によって根に感染する AM 菌の種構成が変化し、飼料用トウモロコシのリン酸吸収や生育、収量に変化をもたらす一つの要因になることが示唆された。上述した内容は本研究の新規性で、収量向上要因の解明に繋がった。

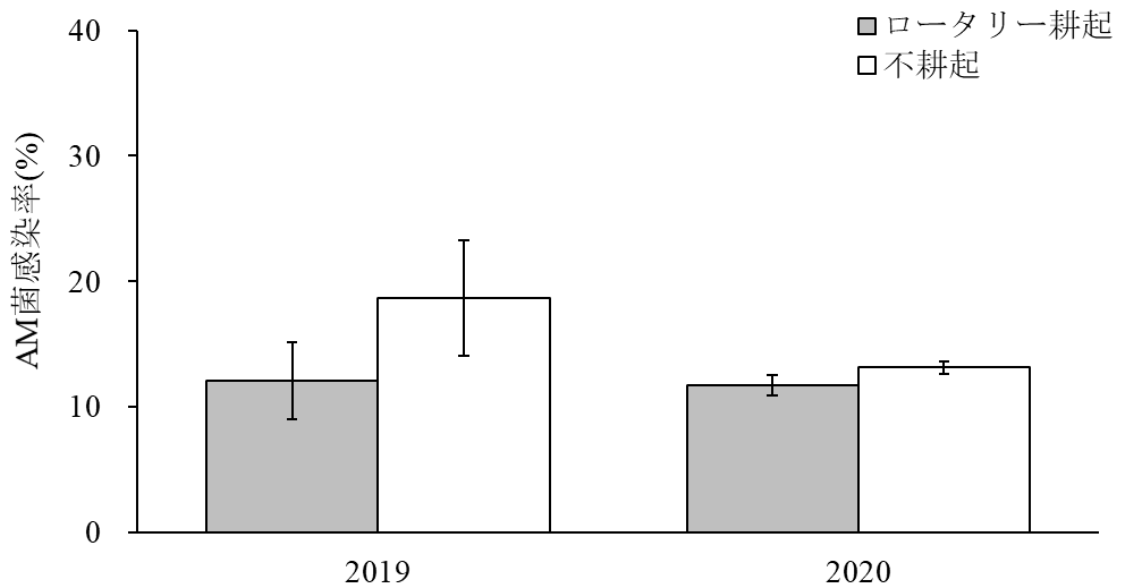
### 栄養成長期

年次(A): \*\*\*<sup>2)</sup>, 耕起管理(B): n.s., (A)×(B): n.s.



### 絹糸抽出期

年次(A): n.s., 耕起管理(B): n.s., (A)×(B): n.s.

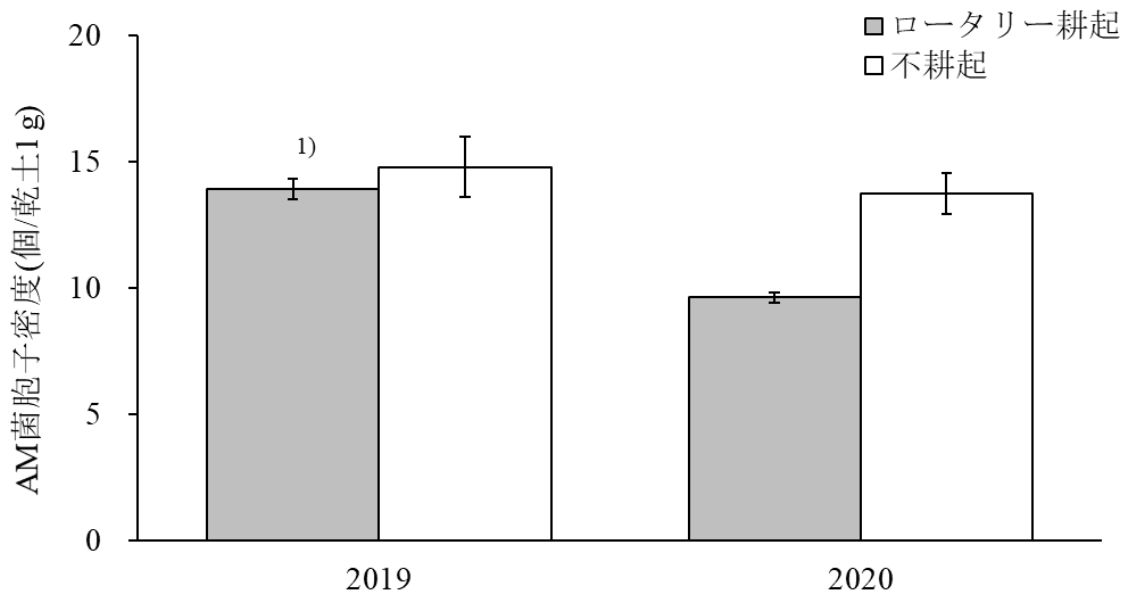


第3-1図 耕起管理が飼料用トウモロコシ根に感染するAM菌感染率に及ぼす影響.

1) エラーバーは標準誤差を示す.

2) 統計処理は角変換後に行った. 二元配置分散分析において\*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.

年次(A): \*\*<sup>2)</sup>, 耕起管理(B): \*, (A)×(B): n.s.

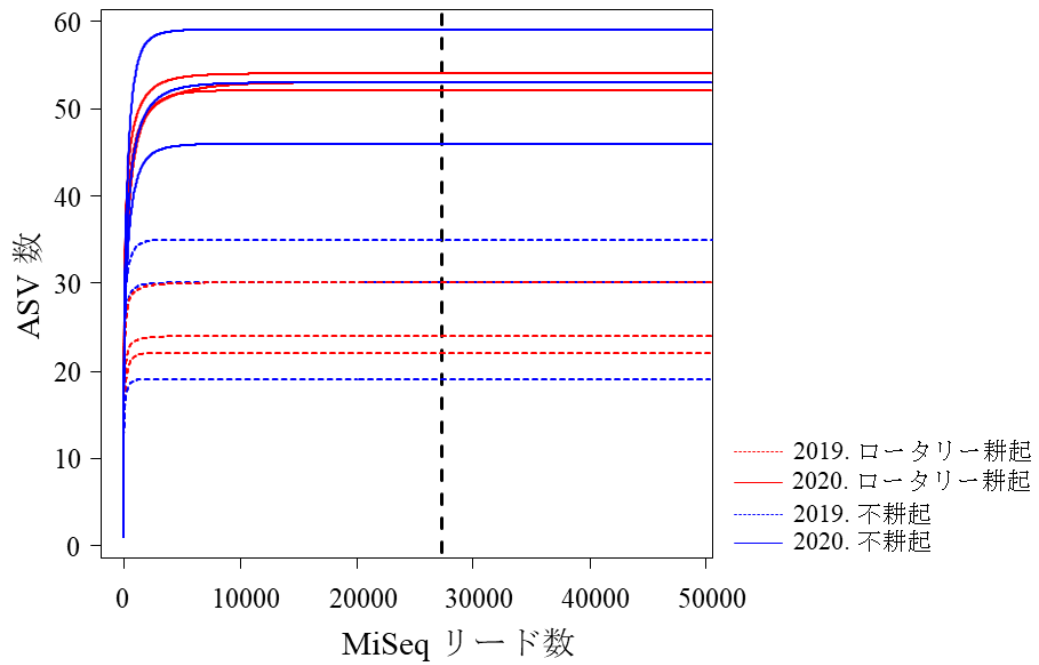


第3-2図 耕起管理が土壌中のAM菌胞子密度に及ぼす影響.

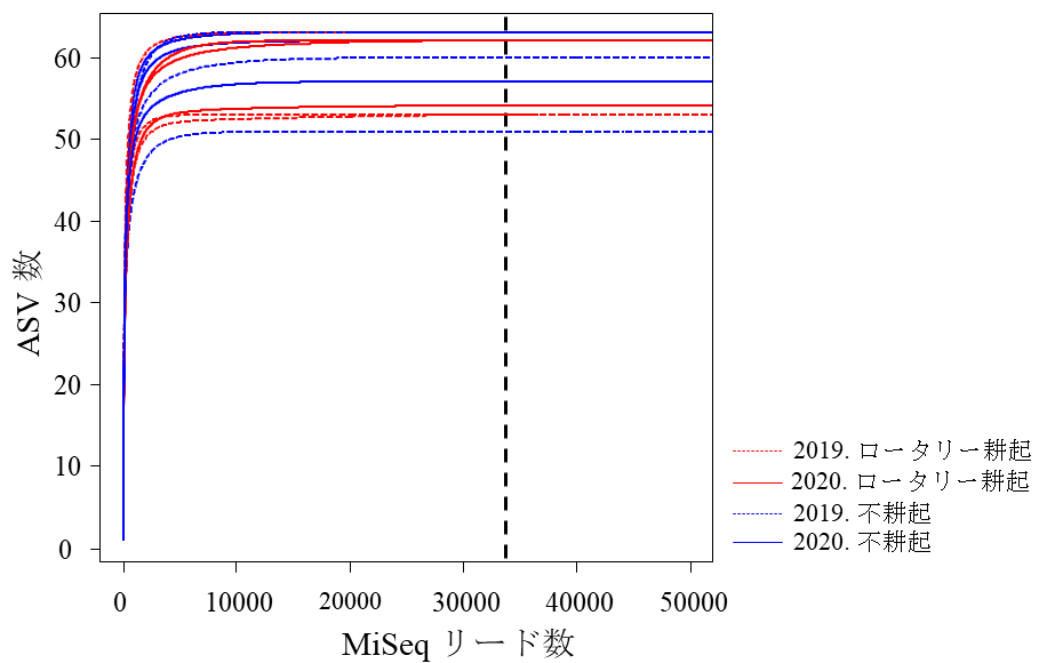
- 1) エラーバーは標準誤差を示す.
- 2) 二元配置分散分析において\*は5%, \*\*は1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.



### 栄養成長期

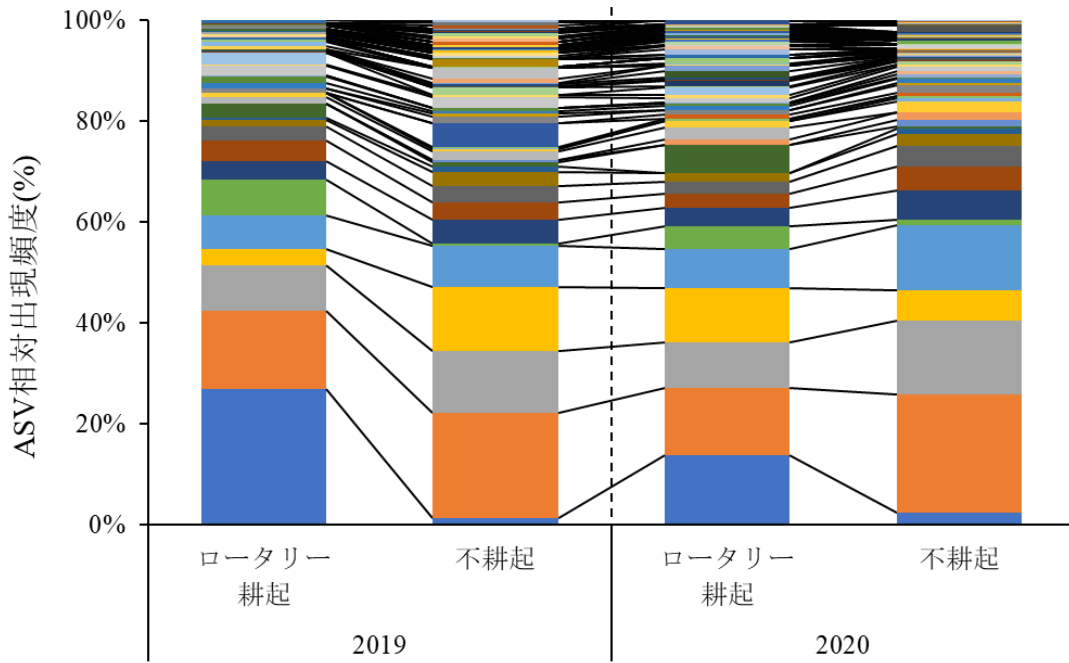


### 絹糸抽出期

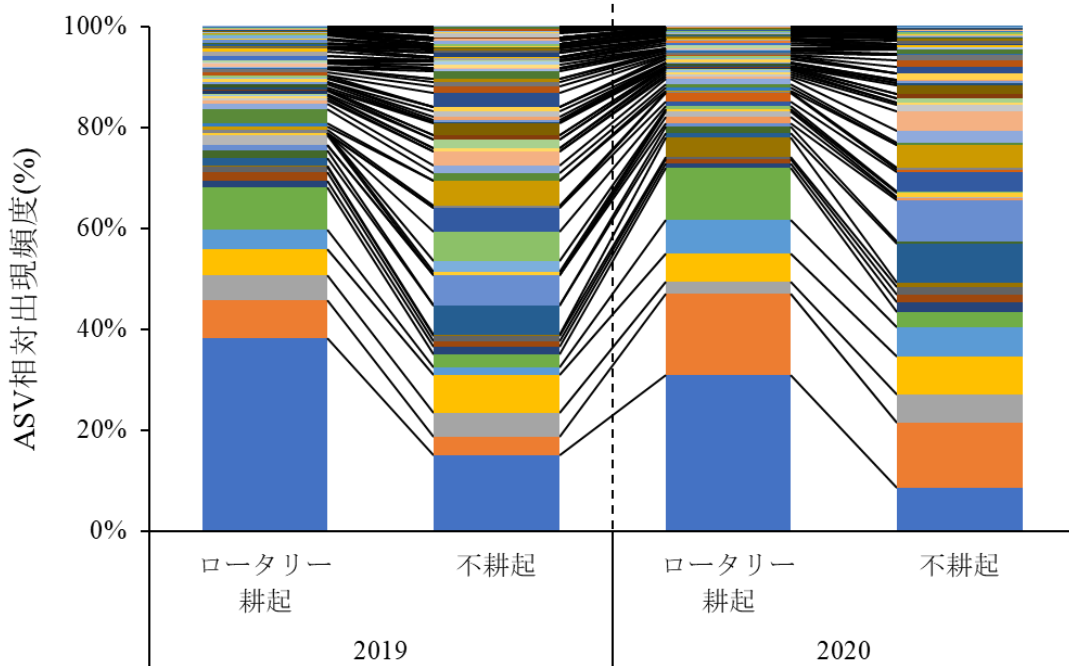


第3-3図 飼料用トウモロコシの根におけるIllumina MiSeqアンプリコンシーケンスに基づくレアファクションカーブ。  
 \* 縦破線は、栄養成長期および絹糸抽出期において、それぞれ27284リードと33793リードに配置し、カットオフレベルとして定義した。

栄養成長期



絹糸抽出期



第3-4図 耕起管理が飼料用トウモロコシ根に感染するASV相対出現頻度に及ぼす影響.

第3-1表 耕起管理が飼料用トウモロコシ根内のAM菌多様度に及ぼす影響.

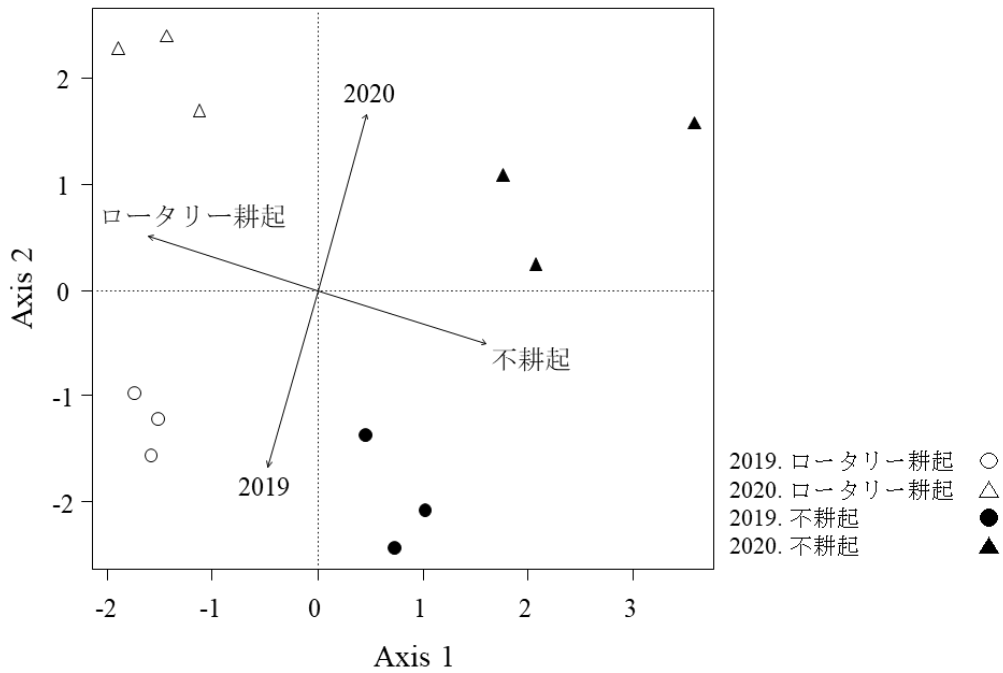
栽培年次	耕起管理	AM菌 ASV数		シャノン多様度指数 ( $H'$ )		シン普森多様度指数 ( $D'$ )	
		栄養成長期	絹糸抽出期	栄養成長期	絹糸抽出期	栄養成長期	絹糸抽出期
2019	ロータリー耕起	25.3 ± 2.4 <sup>1)</sup>	56.3 ± 3.3	2.39 ± 0.22	2.60 ± 0.11	0.84 ± 0.04	0.82 ± 0.03
	不耕起	28.0 ± 4.7	58.0 ± 3.6	2.64 ± 0.18	3.19 ± 0.07	0.89 ± 0.02	0.94 ± 0.00
2020	ロータリー耕起	53.0 ± 0.6	59.3 ± 2.7	2.99 ± 0.09	2.56 ± 0.06	0.92 ± 0.01	0.83 ± 0.02
	不耕起	52.7 ± 3.8	60.7 ± 1.9	2.76 ± 0.08	3.15 ± 0.04	0.89 ± 0.01	0.93 ± 0.01
年次	2019	26.7 ± 2.4	57.2 ± 2.2	2.52 ± 0.14	2.90 ± 0.14	0.87 ± 0.02	0.88 ± 0.03
	2020	52.8 ± 1.7	60.0 ± 1.5	2.88 ± 0.07	2.86 ± 0.14	0.90 ± 0.01	0.88 ± 0.02
耕起管理	ロータリー耕起	39.2 ± 6.3	57.8 ± 2.0	2.69 ± 0.17	2.58 ± 0.05	0.88 ± 0.03	0.83 ± 0.02
	不耕起	40.3 ± 6.1	59.3 ± 1.9	2.70 ± 0.09	3.17 ± 0.04	0.89 ± 0.01	0.93 ± 0.00
分散分析	年次(A)	*** <sup>2)</sup>	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
	耕起管理(B)	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	***
	(A)×(B)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

2) 二元配置分散分析において\*は5%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.

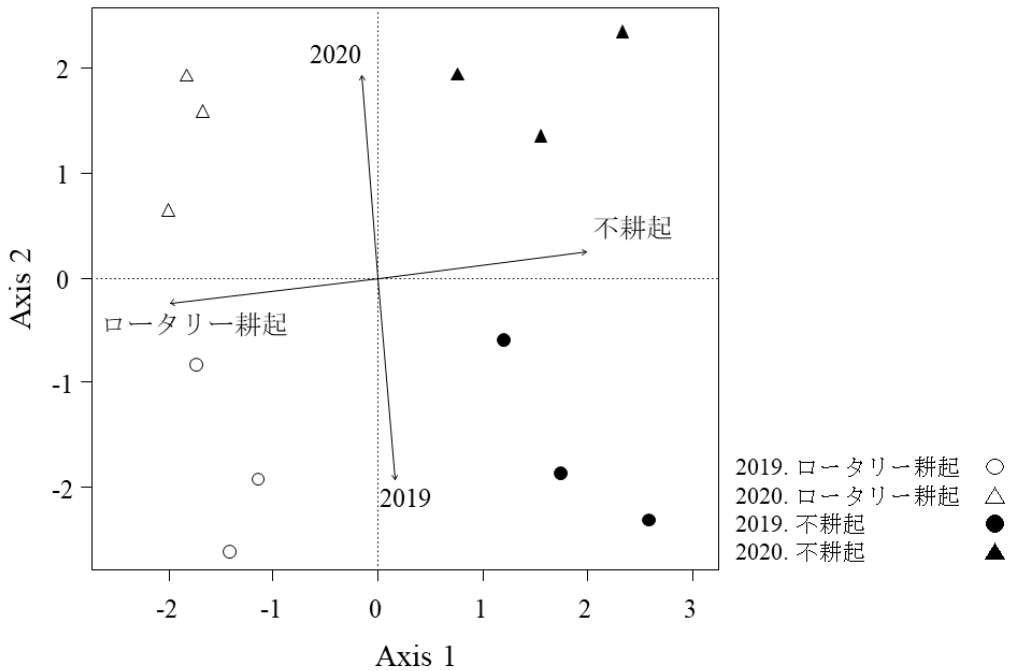
栄養成長期

年次(A): \*\*\*<sup>1</sup>, 耕起管理(B): \*\*\*, (A)×(B): n.s.



絹糸抽出期

年次(A): n.s., 耕起管理(B): \*\*\*, (A)×(B): n.s.

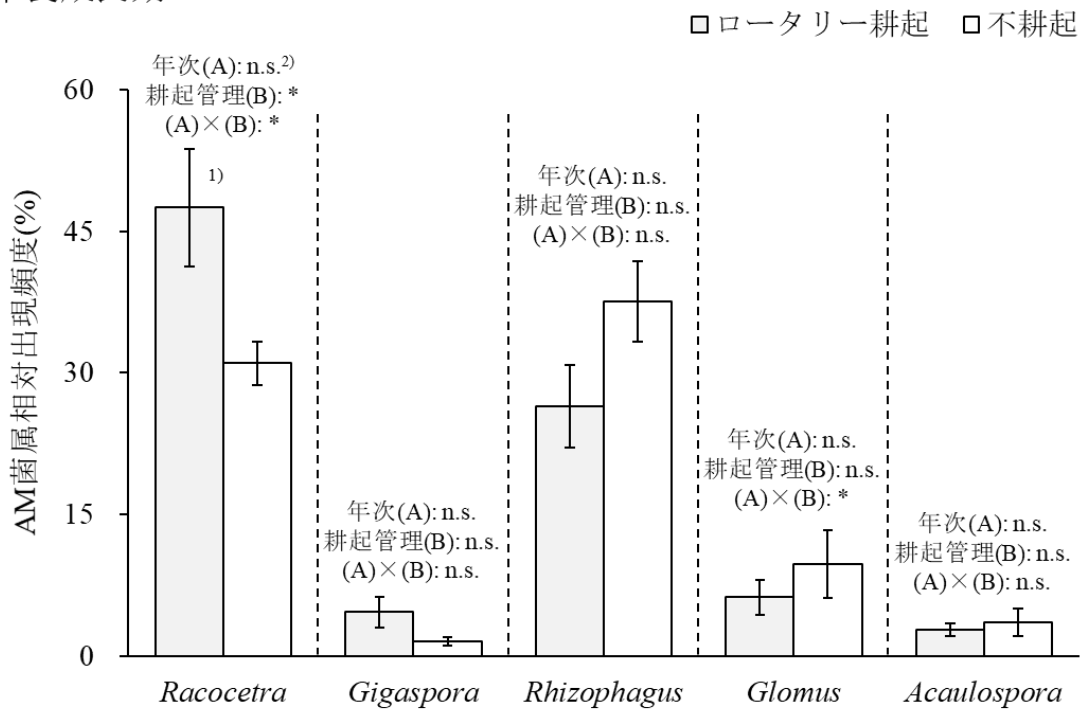


第3-5図 耕起管理がトウモロコシ根に感染するAM菌群集構造に及ぼす影響.

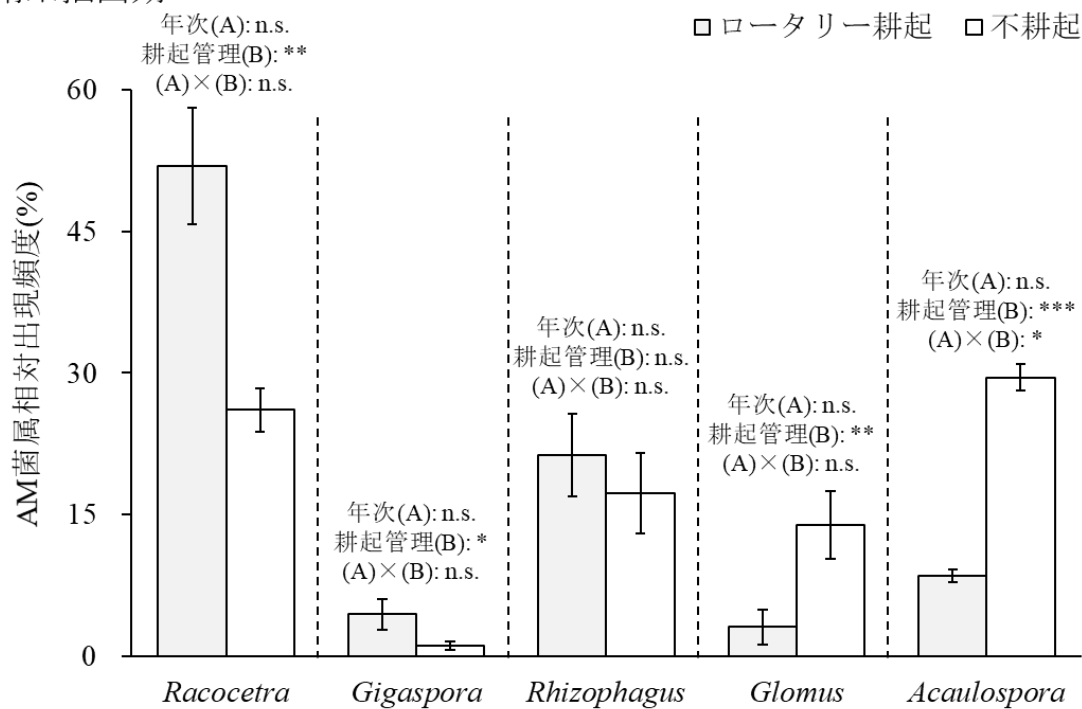
\*元長性分析(RDA)による解析

1) PERMANOVAにおいて\*\*\*は0.1%水準で有意差を示し, n.s.は有意差がないことを示す.

栄養成長期



絹糸抽出期



第3-6図 耕起管理が飼料用トウモロコシ根に感染するAM菌の属ごとにおける相対出現頻度に及ぼす影響。

- 1) エラーバーは標準誤差を示す。
- 2) 統計処理は角変換後に行った。二元配置分散分析において\*は5%、\*\*は1%、\*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し、n.s.は有意差がないことを示す。

第3-2表 AM菌接種株の違いが飼料用トウモロコシの生育及び茎葉リン酸濃度に及ぼす影響.

処理区	AM菌感染率 (%)	茎葉乾物重 (g/plant)	茎葉リン酸濃度 (mg/g)
対照区	—	0.75 ± 0.03	0.68 ± 0.00
<i>Acaulospora</i> 属 AP-5	4.97 ± 3.27 <sup>1)</sup> a <sup>2)</sup>	0.99 ± 0.11 n.s. <sup>3)</sup>	1.23 ± 0.24 n.s.
<i>Acaulospora</i> 属 F-1	0.15 ± 0.15 a	0.87 ± 0.04 n.s.	0.88 ± 0.13 n.s.
<i>Racocetra</i> 属 TK-1	2.88 ± 1.57 a	0.75 ± 0.07 n.s.	1.54 ± 0.18 **
<i>Racocetra</i> 属 SZ-3	5.52 ± 2.34 a	0.89 ± 0.07 n.s.	1.52 ± 0.05 **

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

2) AM菌感染率の統計処理は角変換後に行った. 同一アルファベット間には各項目においてTukey法5%水準で有意差がないことを示す.

3) Dunnett法において対照区に対して\*\*は1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.

## 第4章 ロータリー耕起が土壌の理化学性に及ぼす影響

### 4-1. 緒言

第1章より、ロータリー耕起を行うことによって飼料用トウモロコシのリン酸吸収が向上することが明らかとなった。これまでの報告で耕起、耕耘によって土壌の pH (Montesdeoca ら 2020) や EC (Nwachukwu ら 2020, Maher ら 2020) が変化したことが明らかにされている。さらに Li ら (2022b) は表層 0~20 cm での硝酸態窒素と可給態リン酸の含有量は耕起、耕耘によって変化する一方、交換性カリウムや有機物の含有量は耕起、耕耘による影響をあまり受けないことを報告している。また、Sweeney (2017) は、表層 7.5~15 cm の土壌カリウムの含有量は耕起、耕耘によって高まる可能性を示唆している。He ら (2021) はアルミニウム型リン酸などの特定の形態のリン酸も耕起、耕耘によって増減することを報告している。

このような耕起、耕耘が土壌の化学性に影響を及ぼす仕組みは様々である。例えば Asenso ら (2019) は、耕起、耕耘による pH の変化は間隙の改善により浸透能力が向上したことに起因すると考察している。また、McLauchlan (2006) は耕起、耕耘による可給態リン酸含有量の変化が起こる要因として、リンは土壌粒子と結合していることが多く、耕起、耕耘に伴う土壌侵食によって失われやすいためであると説明している。さらに、Chen ら (2023) はロータリー耕起によって硝酸態窒素の含有量が減った要因として、攪乱により土壌構造が破壊され、通気性が増加したためであると考えている。このようなことから、ロータリー耕起によって飼料用トウモロコシのリン酸吸収量を変化させた要因は土壌物理性の変化に伴う根の伸育促進によるものだけでなく土壌化学性の変化もあると考えられる。

また、様々な土壌酵素が有機物の分解や土壌中の物質循環の触媒として重要な役割を担っていることが明らかにされている (Jin ら 2009, Balota and Chaves 2010, Burns ら 2013, Kotroczo ら 2014)。特にホスファターゼ活性は有機態リン酸の無機化に関する働きを持っており、リン酸の循環に関与しているとされている (Nannipieri ら 2011)。さらに、過去の研究では耕起、耕耘によってホスファターゼ活性が向上することも報告されている (Malobane ら 2020)。上述した現象が起きる要因として耕起、耕耘によ

って土壌の透水性が高まることや、耕盤層を壊して作物の根や微生物の生息域が広がるのがホスファターゼ活性の向上に関係しているといわれている (Huang ら 2020). このことから、ロータリー耕起と難溶性リン酸の分解に関わる土壌ホスファターゼ活性の関係を明らかにすることは極めて重要である.

そこで、本章ではロータリー耕起によって飼料用トウモロコシ播種前土壌の化学性や生物性に影響を及ぼすか明らかにすることを試みた.

## 4-2. 材料及び方法

### 1) 試験耕種概要

栽培概要は第 1 章と同様であり、第 1 章で栽培した飼料用トウモロコシを第 4 章でも用いた.

### 2) 土壌採取

土壌採取は第 3 章と同様の方法であり、第 3 章で採取した土壌を第 4 章でも用いた.

### 3) 土壌化学性の測定

土壌化学性として pH, 電気伝導度 (EC), トルオーグリン酸含有量, 全リン酸含有量, 硝酸態窒素含有量, 交換性カリ含有量, 全炭素含有量, 全窒素含有量を定量した. pH は風乾細土 20 g に蒸留水 50 mL を加え, 振とう器 (YAMATO MK200D, YAMATO, 東京都) で 30 分間攪拌させた. その後, ガラス電極法 (嶋田 1986) に基づきポータブルメーター (HI-9811, HANNA, 千葉県) を用い測定した. EC は風乾細土 10 g に蒸留水 50 mL を加え, 振とう器で 60 分攪拌した後, ポータブルメーターで測定した (伊達 1994). トルオーグリン酸は, 風乾細土 0.5 g に抽出液 (3.0 mL の硫酸を蒸留水で 1.0 L に希釈したもの) を 100 mL 加え, 振とう器で 30 分間攪拌し, 土壌懸濁液をろ紙 (ADVANTEC: No.5B, 直径 110 mm) でろ過したものを試料液とした. その後, モリブデンブルー比色法 (Murphy and Riley 1958) にて, マルチモードプレートリーダーを用いて波長 410 nm の吸光度を測定した. 全リン酸は, 風乾細土 0.5 g について第 1 章と同様な方法で測定した. 硝酸態窒素の抽出は風乾細土 20 g に 50 mL の抽出



液 (2.5 g の硫酸銅・5 水和物を溶かし 1 L にしたもの) を加え, 10 分間振とうして行った. 抽出液に水酸化カルシウムと炭酸マグネシウムの混和物 0.35 g を加え, さらに 5 分間振とうし, ろ紙 (ADVANTEC : No.2, 直径 150 mm) でろ過したものを試料液とした. その後, ろ液の硝酸態濃度を硝酸イオンメーター (B-34X, 堀場製作所, 京都府) で測定した. 交換性カリの抽出は風乾細土 5 g に 0.1 M 酢酸アンモニウム溶液を 10 mL 加え 10 分間振とう後, 15 分静置して行った. 抽出液はろ紙 (ADVANTEC : No.2, 直径 150 mm) でろ過し, ろ液のカリウム濃度を小型カリウムイオンメーター (LAQUA twin B-731, 堀場製作所, 京都府) で測定した. 全炭素含有量と全窒素含有量の測定には風乾細土約 400 mg 用い, 第 1 章と同じ方法で測定した.

#### 4) 土壌ホスファターゼ活性の測定

生土 0.5 g を 15 mL 容のファルコン管にとり, トルエンを 0.1 mL 加えて 10 分間静置した. そこに, 0.9 mL の蒸留水を加え, さらに酸性ホスファターゼ活性 (ACP 活性) では pH 4.9 に調整したトリス-マレイン酸緩衝液, アルカリ性ホスファターゼ活性 (ALP 活性) では pH 8.3 に調整したトリス-マレイン酸緩衝液を 1.5 mL 加えた. これに基質として BPNP 溶液を 0.6 mL 加えてボルテックスした後に, 恒温機 (TM-1, アズワン株式会社, 大阪府) を用い 30°C で 1 時間保温した. その後, 8 mL のエタノールを加えて, ボルテックスした後にろ紙 (ADVANTEC : No.131, 直径 150 mm) でろ過した. ろ液に 2 mL の 2M トリス溶液を加えて, 波長 400 nm の吸光度を測定した (Hayano 1973, 石井・早野 1974).

#### 5) グロマリン様タンパク質含有量 (GRSP 含有量) の測定

風乾細土 2 g を 50 mL 容のファルコン管に入れ, 20 mM のクエン酸ナトリウム (pH 7.0) を 8 mL 加え混ぜた後, オート高圧滅菌機パーソナルクレーブ (HA300M II, HIRAYAMA, 埼玉県) を用い 121°C で 30 分間オートクレーブを行った. その後, 遠心分離機 (EC-57C3, SAKUMA, 東京都) を用い, 3,500×g, 5°C, 10 分間遠心を行い, 7.5 mL 程の上澄み液を 15 mL 容のファルコン管に移した. これを易溶性グロマリン様タンパク質 (EE-GRSP) 試料液とした. 続いて, 試料液を採取した後の土壤に 50 mM

クエン酸ナトリウム (pH 8.0) を 8 mL 加え混ぜた後、オート高圧滅菌機パーソナルクレーブを用い 121°C で 60 分間オートクレーブを行った。その後、遠心分離機を用い、3,500×g, 5°C, 10 分間遠心を行い、7.5 mL 程の試料液を 15 mL 容のファルコン管に移した。これを総グロマリン様タンパク質 (T-GRSP) 試料液とした。それぞれの試料液をディスポーザルセルに 0.1 mL 入れ、ブラッドフォード溶液を 3 mL 加え、30 分静置後、波長 595 nm の吸光度を測定した。

#### 6) 形態別無機態リン酸割合の測定

風乾細土 0.5 g を 50 mL 容ファルコン管に入れ、2.5%酢酸液 50 mL を加えて 2 時間振とうした。その後、遠心分離機 (Sorvall ST 8FR, サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社, 東京都) を用いて 2,500×g, 20 分間で遠心分離 (以下条件同様) を行い、上澄み液を 100 mL 容メスフラスコに移した。このファルコン管に 1 mol/L 塩化アンモニウム液 25 mL を加え、5 分間振とう後、遠心分離を行い、上澄み液を上記と同じ 100 mL 容メスフラスコに加えた。この操作を 2 回繰り返した後、蒸留水で定容した。定容後、ろ紙 (ADVANTEC : No.6, 直径 110 mm) を用いてろ過を行い、カルシウム型リン酸試料液を採取した。カルシウム型リン酸抽出後のファルコン管に残った土壤に 1 mol/L フッ化アンモニウム液 50 mL を加えて、1 時間振とうし、遠心分離を行い、アルミニウム型リン酸試料液を採取した。アルミニウム型リン酸抽出後のファルコン管に残った土壤を飽和塩化ナトリウム液 25 mL で 2 回洗浄し、洗液を捨てた。そこに 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム液 50 mL をファルコン管に加えて 17 時間振とう後、遠心分離を行い、試料液を採取した。試料液が着色していた場合、抽出液 15 mL に濃硫酸を加えて pH 2.0 に調整し、腐植酸を沈殿させた。一晩静置後、ろ紙 (ADVANTEC : No.6, 直径 110 mm) を用いてろ過し、次に pH 2.0 の希硫酸で洗浄しながら 25 mL 容のメスフラスコへで定容し、鉄型リン酸試料液を採取した。抽出液のリン酸濃度について、モリブデンブルー比色法を用いた比色法により分析し、カルシウム型リン酸含有量、アルミニウム型リン酸含有量、鉄型リン酸含有量を求めた (関 1970, 谷ら 2010)。

#### 4-3. 結果

##### 1) 土壌化学性

2019年、2020年における土壌のpH、EC、トルオーグリン酸含有量、全リン酸含有量、硝酸態窒素含有量、交換性カリウム含有量、全炭素含有量と全窒素含有量を調査した（第4-1表）。pHに関して2019年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020年はロータリー耕起と不耕起で同じ値を示した。また、年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった。ECに関して2019年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020年も同様な結果を示した。さらに、年次間で有意差が認められた。トルオーグリン酸含有量および全リン酸含有量に関しては、2019年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020年も同様な結果を示した。加えて、年次間および耕起管理間で有意差が認められた。硝酸態窒素含有量に関して2019年はロータリー耕起と不耕起で同じ値を示し、2020年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した。それに加え、年次間および耕起管理間で有意差が認められた。交換性カリウム含有量に関して2019年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し、2020年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示したが、年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった。全炭素含有量と全窒素含有量に関して2019年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020年も同様な結果を示し耕起管理間で有意差が認められた。

##### 2) 土壌ホスファターゼ活性

2019年、2020年における土壌のACP活性、ALP活性を調査した（第4-2表）。ACP活性に関して2019年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し、2020年はロータリー耕起と不耕起で同じ値を示した。また、年次間で有意差が認められた。ALP活性に関して2019年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し、2020年も同様な結果を示した。さらに、年次間で有意差が認められた。

##### 3) グロマリン様タンパク質含有量

2019年、2020年における土壌のEE-GRSP含有量、T-GRSP含有量を調査した（第

4-2 表). EE-GRSP 含有量に関して 2019 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し, 2020 年も同様な結果を示した. さらに, 年次間および耕起管理間で有意差が認められた. T-GRSP 含有量に関して 2019 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し, 2020 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した. また, 年次間で有意差が認められた.

#### 4) 形態別無機態リン酸割合

2019 年, 2020 年における土壌のカルシウム型リン酸, アルミニウム型リン酸, 鉄型リン酸を調査した (第 4-3 表). カルシウム型リン酸に関して 2019 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し, 2020 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した. また, 年次間および耕起管理間では有意差が認められなかった. アルミニウム型リン酸に関して 2019 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し, 2020 年も同様な結果を示した. それに加えて, 年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった. 鉄型リン酸に関して 2019 年は不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示し, 2020 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した. ただし, 年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった.

#### 4-4. 考察

本研究において土壌中の化学性を調査したところ, 硝酸態窒素含有量は不耕起で高く, 交換性カリウム含有量は年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった. 従ってロータリー耕起で飼料用トウモロコシの収量が増加した要因は硝酸態窒素や交換性カリウムの影響ではない可能性が高い. また, 土壌中の全炭素含有量は耕起管理間で有意差が認められ, ロータリー耕起することにより値が高まった (第 4-1 表). 一般的に耕起, 耕耘を行うと土壌呼吸が促進し大気中に放出されるため, 土壌中の全炭素含有量は低下することが示されている (Neogi ら 2014, Aziz ら 2015). このような過去の報告とは異なる現象が起きた原因に関して本研究では明らかにすることができなかった. よって, 今後は全炭素含有量がロータリー耕起によって増加した要因を調査していく必要がある.

一方、トルオーグリン酸含有量は耕起管理間で有意差が認められ、ロータリー耕起することにより値が高まった(第4-1表)。従って、飼料用トウモロコシのリン酸吸収量が促進された要因として土壌中の可給態リン酸の増加が考えられる。Ismailら(1994)は耕起、耕耘を行うことで表層の可給態リン酸含有量が不耕起よりも高かったことを報告しており、今回の結果は過去の研究と同様な結果となった。この要因として、耕起したことによるホスファターゼ活性の上昇が考えられる。土壌ホスファターゼは有機態リン酸を加水分解することで無機態リン酸に変化させる働きを持つ(Jindoら2023)ことから、土壌中のホスファターゼ活性が高まればロータリー耕起において土壌中の可給態リン酸含有量を増加させた要因の一つであると考えられる。しかし、ロータリー耕起による土壌中のホスファターゼ活性に変化は見られなかった(第4-2表)。これまでに、耕起、耕耘を行うことでACP活性が高まった事例が複数報告されているが(Jiら2014, Ahmedら2020, Erdel2022)、これらの多くはカバークロープなどのすきこみを行っている。本研究においては冬季の間は裸地であり、ロータリー耕起時にカバークロープのすきこみを行っていない。このようなことから土壌中の有機物が十分にはなく、結果としてホスファターゼ活性に差が出なかったと考えられる。

次に耕起によってトルオーグリン酸含有量が高まった原因として考えられるのが土壌微生物の関与である。土壌微生物は土壌中のミネラルの循環において重要な役割を担っている(Fierer2017)。その中でも、リン溶解菌は有機物を利用して難溶性リン酸を溶解し、リン酸を可溶化する特徴を持つ(Bargazら2018)。このようなことからリン溶解菌が難溶性リン酸を可溶化し、ロータリー耕起で可給態リン酸を増加させた要因の一つではないかと推察した。これに関しては、リン溶解菌を含むバイオ肥料を散布することによって、不耕起よりも耕起で土壌中の可給態リン酸が増加した報告がある(Royら2021)。ただし、リン溶解菌の中でもカルシウム型リン酸やアルミニウム型リン酸、鉄型リン酸など、リン酸の形態によって溶解の可否や効率は変わってくる(Damoら2022)。そこで次にリン酸がどのような形態で土壌中に存在しているのを知るために形態別無機態リン酸の割合を調査した。その結果、年次間、耕起管理間に関係なく供試圃場ではアルミニウム型リン酸および鉄型リン酸が優占していることが明らかとなった(第4-3表)。アルミニウム型リン酸および鉄型リン酸が優占した要

因として本試験地の黒ボク土が火山灰に由来していることが考えられる。火山灰土壌はアロフェン質黒ボク土であり、アルミニウムや鉄に富み、リン酸保持容量が高い特徴をもつ（高橋 2019）。このような性質から本研究で用いた圃場の土壌はアルミニウム型リン酸や鉄型リン酸が優占していると考えられる。ただし、Islam ら（2019）の研究によると可溶化率はアルミニウム型リン酸及び鉄型リン酸に比べてカルシウム型リン酸で高いことが報告されている。

これらのことからアルミニウム型リン酸や鉄型リン酸を溶解する菌がロータリー耕起によって増加しているのではないかと考え、第 5 章ではリン酸の溶解に関する土壌微生物の影響を調査することとした。

第4-1表 耕起管理が土壌の化学性に及ぼす影響.

栽培年次	耕起管理	pH (H <sub>2</sub> O)	EC ( $\mu$ S/cm)	トルオーグリン酸 含有量 (mg/100g)	全リン酸 含有量 (mg/100g)
2019	ロータリー耕起	5.94 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	80.0 $\pm$ 1.9	7.8 $\pm$ 0.4	281.5 $\pm$ 5.6
	不耕起	5.89 $\pm$ 0.01	64.4 $\pm$ 8.0	3.2 $\pm$ 0.4	206.3 $\pm$ 12.1
2020	ロータリー耕起	5.90 $\pm$ 0.03	55.6 $\pm$ 5.3	2.7 $\pm$ 0.2	247.8 $\pm$ 3.5
	不耕起	5.90 $\pm$ 0.05	55.0 $\pm$ 2.9	1.7 $\pm$ 0.1	176.2 $\pm$ 5.4
年次	2019	5.91 $\pm$ 0.01	72.2 $\pm$ 5.1	5.5 $\pm$ 1.1	264.7 $\pm$ 8.1
	2020	5.90 $\pm$ 0.02	55.3 $\pm$ 2.7	2.2 $\pm$ 0.2	191.3 $\pm$ 9.0
耕起管理	ロータリー耕起	5.92 $\pm$ 0.02	67.8 $\pm$ 6.0	5.2 $\pm$ 1.2	243.9 $\pm$ 17.8
	不耕起	5.89 $\pm$ 0.02	59.7 $\pm$ 4.4	2.4 $\pm$ 0.4	212.0 $\pm$ 16.3
分散分析	年次(A)	n.s. <sup>2)</sup>	*	***	***
	耕起管理(B)	n.s.	n.s.	***	**
	(A) $\times$ (B)	n.s.	n.s.	***	n.s.
栽培年次	耕起管理	硝酸態窒素 含有量 (mg/100g)	交換性カリウム 含有量 (mg/100g)	全炭素 含有量 (%)	全窒素 含有量 (%)
2019	ロータリー耕起	13.2 $\pm$ 0.2	52.9 $\pm$ 5.8	6.30 $\pm$ 0.05	0.407 $\pm$ 0.003
	不耕起	13.2 $\pm$ 0.5	59.2 $\pm$ 4.5	5.47 $\pm$ 0.06	0.350 $\pm$ 0.006
2020	ロータリー耕起	25.8 $\pm$ 1.0	53.6 $\pm$ 6.9	6.22 $\pm$ 0.07	0.407 $\pm$ 0.003
	不耕起	31.4 $\pm$ 0.7	42.2 $\pm$ 2.5	5.39 $\pm$ 0.04	0.353 $\pm$ 0.004
年次	2019	13.2 $\pm$ 0.2	56.1 $\pm$ 3.6	5.89 $\pm$ 0.19	0.407 $\pm$ 0.002
	2020	28.6 $\pm$ 1.4	47.9 $\pm$ 4.2	5.80 $\pm$ 0.19	0.352 $\pm$ 0.003
耕起管理	ロータリー耕起	19.5 $\pm$ 2.8	53.2 $\pm$ 4.0	6.26 $\pm$ 0.04	0.378 $\pm$ 0.013
	不耕起	22.3 $\pm$ 4.1	50.7 $\pm$ 4.5	5.43 $\pm$ 0.04	0.380 $\pm$ 0.012
分散分析	年次(A)	***	n.s.	n.s.	***
	耕起管理(B)	**	n.s.	***	n.s.
	(A) $\times$ (B)	**	n.s.	n.s.	n.s.

1) 平均値  $\pm$  標準誤差を示す.

2) 全炭素, 全窒素の統計処理は角変換後に行った. 二元配置分散分析において\*は5%, \*\*は1%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.

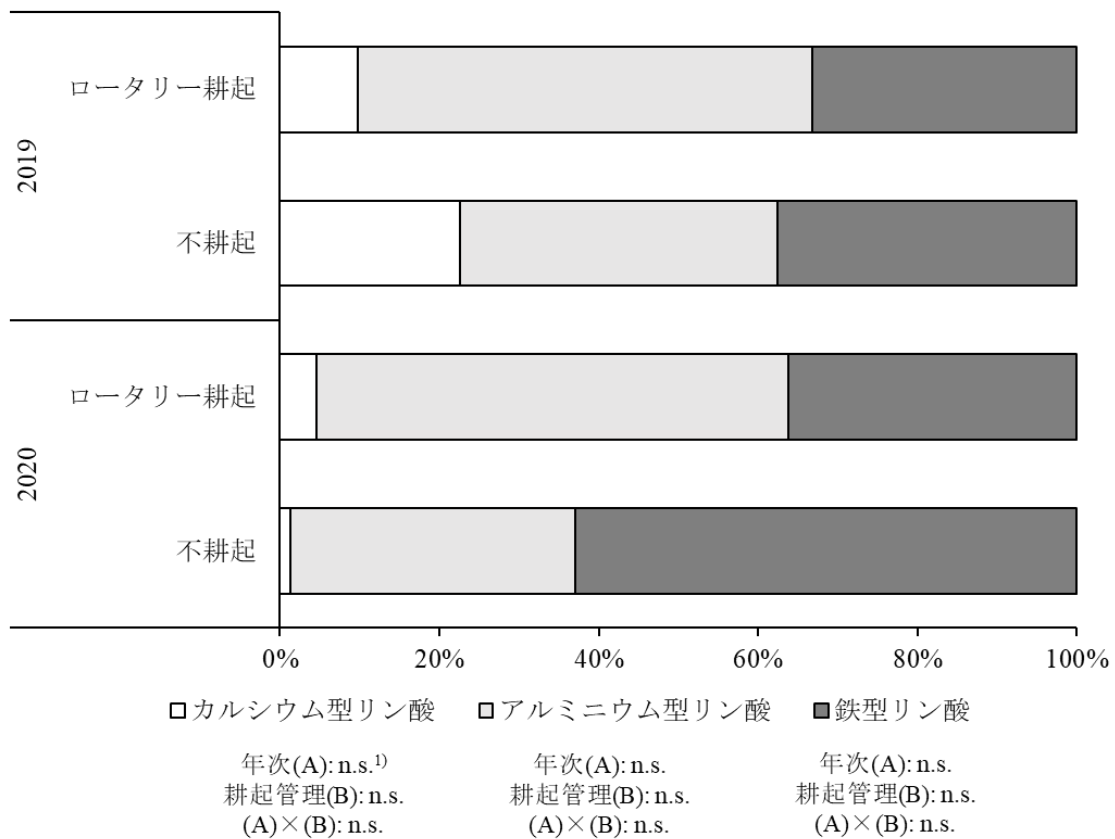
第4-2表 耕起管理が土壌の酵素活性，グロマリン様タンパク質含有量に及ぼす影響.

栽培年次	耕起管理	ACP活性 (mU/g)	ALP活性 (mU/g)
2019	ロータリー耕起	17.6 ± 0.5 <sup>1)</sup>	13.2 ± 0.5
	不耕起	16.4 ± 0.6	13.6 ± 0.6
2020	ロータリー耕起	7.8 ± 0.3	16.9 ± 0.3
	不耕起	7.8 ± 0.3	17.3 ± 0.3
年次	2019	17.0 ± 0.4	13.4 ± 0.4
	2020	7.8 ± 0.2	17.1 ± 0.2
耕起管理	ロータリー耕起	12.7 ± 2.2	15.1 ± 2.3
	不耕起	12.1 ± 2.0	15.4 ± 1.5
分散分析	年次(A)	*** <sup>2)</sup>	***
	耕起管理(B)	n.s.	n.s.
	(A)×(B)	n.s.	n.s.
栽培年次	耕起管理	EE-GRSP含有量 (mg/g)	T-GRSP含有量 (mg/g)
2019	ロータリー耕起	0.51 ± 0.01	1.46 ± 0.06
	不耕起	0.39 ± 0.05	1.53 ± 0.02
2020	ロータリー耕起	0.32 ± 0.02	1.17 ± 0.02
	不耕起	0.22 ± 0.02	1.02 ± 0.03
年次	2019	0.45 ± 0.04	1.50 ± 0.03
	2020	0.27 ± 0.03	1.10 ± 0.04
耕起管理	ロータリー耕起	0.42 ± 0.04	1.32 ± 0.07
	不耕起	0.30 ± 0.05	1.27 ± 0.12
分散分析	年次(A)	***	***
	耕起管理(B)	**	n.s.
	(A)×(B)	n.s.	*

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

2) 二元配置分散分析において\*は5%, \*\*は1%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.





第4-1図 耕起管理が土壌の形態別無機態リン酸含有量に及ぼす影響。  
 1) 左から順にカルシウム型リン酸，アルミニウム型リン酸，鉄型リン酸の統計結果を示す。統計処理は角変換後に行った。また，二元配置分散分析においてn.s.は有意差がないことを示す。

## 第5章 ロータリー耕起が土壌中のリン溶解菌に及ぼす影響

### 5-1. 緒言

第4章より、ロータリー耕起を行うことによって土壌中の可給態リン酸が増加することが明らかとなった。その要因に、リン溶解菌が関与している可能性がある。リン溶解菌は、土壌中の難溶化しているリン酸を可溶化する働きを持ち (Aye ら 2021, Song ら 2022), リン溶解細菌とリン溶解真菌に大別される。さらに、リン溶解細菌は土壌に生息する細菌の1~50%を、リン溶解真菌は土壌に生息する真菌の0.1~0.5%を占めるとされており (Sharma ら 2013), その種構成は土壌によって異なると考えられている。また、*in vitro* 条件下において、リン溶解菌は土壌 pH の低下、有機態リン酸の無機化、またはカルシウム、アルミニウムおよび鉄のキレート化により、無機態リン酸を増加させるはたらきを持つことが明らかになっている (Browne ら 2009, Sharma ら 2013, Etesami 2020)。このようなことから、リン溶解菌を土壌に接種すると可給態リン酸含量が高まり (Mayadunna ら 2023), 結果としてダイズやトウモロコシ (Lucero ら 2021), イネ (Fitriatin ら 2021), コムギ (Dasila ら 2023) など様々な作物の生育や収量が改善される報告されている。

ただし、リン酸を溶解する能力は種や菌株によって異なり (El-Hamshary ら 2019, Rezakhani ら 2022), さらに、それぞれのリン溶解菌の溶解能は土壌中のリン酸の形態、すなわちカルシウム型リン酸やアルミニウム型リン酸、鉄型リン酸などの量と比率によって変わることが明らかにされている (Damo ら 2022)。具体的に述べると Spagnoletti ら (2017) は、カルシウム型リン酸が最も溶解しやすく、ついでアルミニウム型リン酸、鉄型リン酸の順であることを報告している。加えて土壌条件がリン溶解菌のリン酸可溶化量に影響を及ぼすことが示されている (Wakelin ら 2007)。例えば、リン溶解菌の機能は、土壌 pH や土壌の可給態リン酸含有量などの土壌特性によって大きく影響される。さらに、従来、耕起や耕耘を行うことによって土壌構造が変化し、土壌微生物の活性が向上することが知られており (Nikitin ら 2020, Zhang ら 2022), リン溶解菌の溶解能が向上するのも同様な理由が考えられる。

しかしながら、リン溶解菌に関する多くの報告が *in vitro* 条件下やポットでの環境

がコントロールされた条件であり、圃場条件下での報告は少ない。加えてロータリー耕起の有無におけるリン溶解菌の存在量や溶解量の違いを明らかにした報告は無い。そこで本章では、ロータリー耕起が土壌中の可給態リン酸含有量を増加させた要因を、土壌内に存在するリン溶解菌の数や種の違い、それらの溶解能について *in vitro* 試験を行った。

## 5-2. 材料及び方法

### 1) 土壌採取

土壌採取は第3章と同様の方法であり、第3章で採取した土壌を第5章でも用いた。

### 2) 土壌懸濁液の作成

リン酸カルシウムを溶解する菌の評価を行うために生土 1 g に 9 mL の 0.85%滅菌塩化ナトリウムを加え、リン酸アルミニウムを溶解する菌の評価を行うために生土 5 g に 5 mL の 0.85%滅菌塩化ナトリウムを加え、リン酸鉄を溶解する菌の評価を行うために生土 2 g に 8 mL の 0.85%滅菌塩化ナトリウムを加え（第 5-1 表）、10 分間振とうした。次に土壌懸濁液を  $10^4$ 、 $10^{4.5}$ 、 $10^5$ 、 $10^{5.5}$  倍に希釈した。

### 3) PVK 培地の作成

1 L 当たりの PVK 培地 (Pikovskaya 1948) を作成するために蒸留水 1 L に、グルコース 10 g、硫酸アンモニウム 0.5 g、塩化ナトリウム 0.2 g、硫酸マグネシウム 0.1 g、塩化カリウム 0.2 g、酵母抽出液 0.5 g、硫酸マンガン 0.004 g、硫酸鉄 0.002 g および炭酸カルシウム 2 g を溶解した。また、リン源としてそれぞれリン酸カルシウム 3 g、リン酸アルミニウム 5 g あるいはリン酸鉄 1.5 g を添加した。その後、1 mol/L 水酸化ナトリウムで pH 7.2 に調整し、蒸留水で 500 mL にメスアップした。また、別のフラスコで寒天 15 g と 0.5%プロモクレゾールグリーン 5 mL を蒸留水で 500 mL にメスアップした。それらをオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌し、素早くクリーンベンチ内 (PAU-1300AG, 株式会社ダルトン, 東京都) で混合した後、大きさ 9 cm の滅菌シャーレに 17 mL 程度流し込み PVK 固形培地とした。

#### 4) リン溶解菌数の測定

各反復 3 シャーレ用意し、 $10^4$ 、 $10^{4.5}$ 、 $10^5$ 、 $10^{5.5}$  倍に希釈した土壌懸濁液を PVK 固形培地上に 200  $\mu$ L 分注した。それらを 30°C の恒温機 (FIN-600M, 株式会社平山製作所, 埼玉県) 内で 240 時間インキュベートした。240 時間後, プリントグラフ-FX (AE-6911, アトー株式会社, 東京都) にて写真を撮影した。画像を目視で確認し, ハローゾーンができたコロニーのみ数えた。測定後, それぞれのデータの平均値を算出し, 希釈倍率と塗布した培養液量から元の土壌 1 g 中にある生菌数を推定した。

#### 5) リン酸溶解量の測定

リン源としてそれぞれリン酸カルシウム, リン酸アルミニウムあるいはリン酸鉄を添加した PVK 液体培地を 50 mL 容ファルコン管に 15 mL 注入した。そこに 4) でハローゾーンがみられたコロニーを滅菌爪楊枝でつかみ取り投入し, 30°C で振とう培養を行った。41 時間後ならびに 240 時間後に一度振盪をストップし, 2,500 $\times$ g, 25°C で 10 分間遠心し, 上澄み液 5 mL を採取した後, Gro Line pH テスター (HI 98115, HANNA, 千葉県) を用いて pH ならびに可給態リン酸含有量を測定した。また, インキュベーション開始時は pH が 7.0, リン酸溶解量が 0 であることを確認した。可給態リン酸含有量の測定の方法は第 3 章と同様の方法で行った。

#### 6) 土壌からの DNA 抽出

生土から細菌や真菌の DNA を抽出するために NucleoSpin® Soil (Takara Bio, 滋賀県) を使用した。土壌 500 mg を, -30°C で冷却しておいたセラミックビーズ入りの 2 mL 容のビーズチューブに入れた。その後, 滅菌済みの 20% スキムミルクを 200  $\mu$ L, Buffer SL2 を 700  $\mu$ L 加え, 60 秒間ビーズ式粉碎装置 (MS-100, TOMY, 東京都) を用いて粉碎した。その後, 微量高速冷却遠心機 (Centrifuge 5415R, Eppendorf Japan, 東京都) を用いて 20,000 $\times$ g で 1 分間遠心した。遠心後, Enhancer SX を 250  $\mu$ L 加え, 再び 60 秒間ビーズ式粉碎装置を用いて粉碎し, 20,000 $\times$ g で 4 分間遠心し, 泡を取り除いた。1.5 mL 容の Collection Tube に泡を取り除いた上澄み液を移した。再度, 20,000 $\times$ g で 4 分間遠心し, 1.5 mL 容の Collection Tube に上澄み液を移した。1.5 mL 容

の Collection Tube に集めた上澄み液に Buffer SL3 を 250  $\mu$ L 加え、5 秒間ボルテックスで混合し、氷上で 5 分間静置し、20,000 $\times$ g で 4 分間遠心した。NucleoSpin Inhibitor Removal Column (赤色リング) をセットした 2 mL 容の Collection Tube にこの上澄み液を 700  $\mu$ L 移し、20,000 $\times$ g で 3 分間遠心し、新たな 1.5 mL 容の Collection Tube に移した。上澄み液が多い場合は再度 NucleoSpin Inhibitor Removal Column (赤色リング) をセットした 2 mL 容の Collection Tube に残りを移し、20,000 $\times$ g で 3 分間遠心し、1.5 mL 容の Collection Tube に移した。このろ液に Buffer SB を 350  $\mu$ L 添加し、5 秒間ボルテックスで混合した。混合したろ液は NucleoSpin Soil Column (緑色リング) をセットした 2 mL 容の Collection Tube に 650  $\mu$ L 移し、20,000 $\times$ g で 3 分間遠心し、ろ液は捨てた。混合液が多い場合は、同じ NucleoSpin Soil Column (緑色リング) をセットした 2 mL 容の Collection Tube に残りを移し、20,000 $\times$ g で 3 分間遠心した。同じ Collection Tube に Column をセットし Buffer SB を 500  $\mu$ L 加え、20,000 $\times$ g で 3 分間遠心し、ろ液は捨てた後、同じ Collection Tube に Column をセットし、Buffer SW1 を Column に 550  $\mu$ L 加え、20,000 $\times$ g で 3 分間遠心し、ろ液を捨てた。Buffer SW2 を 700  $\mu$ L (1 回目)、700  $\mu$ L (2 回目) 加え、微量高速冷却遠心機を用いて 20,000 $\times$ g で 3 分間 (1 回目)、3 分間 (2 回目) 遠心した。遠心後、同じ Collection Tube に Column をセットし、20,000 $\times$ g で 4 分間空遠心した。Column を新しい 1.5 mL チューブに移し、フィルターの上に Buffer TE を 15  $\mu$ L を加え、65 $^{\circ}$ C で 1 分間恒温機を用いインキュベートした。20,000 $\times$ g で 2 分間遠心を行い、カラムの下の沈殿物を DNA 溶液とした。

#### 7) 細菌および真菌群集のアンプリコンシーケンス解析

細菌の DNA は Nested PCR 法による増幅を行った。なお、1st-PCR のプライマーには、341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG -3') (Klindworth ら 2013) と 926R (5'-CCGYCAATYMTTTRAGTTT-3') (Parada ら 2016) を用いた。また、反応系は 10 倍希釈をしたテンプレート DNA 溶液 1  $\mu$ L, KOD One Master Blue Mix 5  $\mu$ L, プライマー溶液 2 種各 0.2  $\mu$ L (それぞれ 20  $\mu$ M) 及び滅菌水 3.6  $\mu$ L を含む 10  $\mu$ L で行った。PCR 条件は 94 $^{\circ}$ C : 2 分, [94 $^{\circ}$ C : 45 秒, 50 $^{\circ}$ C : 60 秒, 72 $^{\circ}$ C : 90 秒]  $\times$  30 サイクルで行い、最後に 72 $^{\circ}$ C : 10 分の伸長反応の延長時間を設けた。その後、生成した PCR 産物を滅菌

水で 10 倍希釈し、これを 2nd-PCR のテンプレートとした。2nd-PCR のプライマーには、515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Parada ら 2016) と 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') (Apprill ら 2015) を用いた。反応系はテンプレート DNA 溶液 2  $\mu$ L, KOD One Master Blue Mix 10  $\mu$ L, プライマー溶液 2 種各 0.8  $\mu$ L (それぞれ 10  $\mu$ M) 及び滅菌水 6.4  $\mu$ L を含む 20  $\mu$ L で行った。PCR 条件は 1st-PCR と同様である。

真菌の DNA も Nested PCR 法による増幅を行った。なお、1st-PCR のプライマーには、5.8S-Fun (5'-AACTTTYRRCAAYGGATCWCT-3') (Taylor ら 2016) と ITS4-B (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3') (Gardes and Bruns 1993) を用いた。また、反応系は 10 倍希釈をしたテンプレート DNA 溶液 1  $\mu$ L, KOD One Master Blue Mix 5  $\mu$ L, プライマー溶液 2 種各 0.2  $\mu$ L (それぞれ 20  $\mu$ M) 及び滅菌水 3.6  $\mu$ L を含む 10  $\mu$ L で行った。PCR 条件は 94°C : 2 分, [94°C : 30 秒, 55°C : 45 秒, 72°C : 90 秒]  $\times$  35 サイクルで行い、最後に 72°C : 10 分の伸長反応の延長時間を設けた。その後、生成した PCR 産物を滅菌水で 10 倍希釈し、これを 2nd-PCR のテンプレートとした。2nd-PCR のプライマーは、fITS7 (5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3') と (Ihrmark ら 2012) ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White ら 1990) を用いた。反応系はテンプレート DNA 溶液 2  $\mu$ L, KOD One Master Blue Mix 10  $\mu$ L, プライマー溶液 2 種各 0.8  $\mu$ L (それぞれ 10  $\mu$ M) 及び滅菌水 6.4  $\mu$ L を含む 20  $\mu$ L で行った。PCR 条件は 1st-PCR と同様である。その後、125 V, 40 分で電気泳動を行い、細菌の DNA が 300 bp 付近、真菌の DNA が 340 bp 付近に存在することをバンドで確認した。増幅した各反復 3 つの PCR 産物を、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up により精製した。精製した PCR 産物は DS-11 Nano Pad で DNA 濃度を計測した。その後、精製された PCR ライブラリーはイルミナ Miseq シークエンサー (株式会社生物技研, 神奈川県) でアンプリコンシークエンシングを行った。細菌および真菌の群集構造解析は、各試験区のリード数を揃えるため、R 4.0.2 の `vegan v2.5.6` パッケージ, `rarefy` 関数を用いて、サンプルあたりのリード数が最も少ない場合 (細菌 : 86,217 リード ; 真菌 : 34,839 リード) のレアファクション解析を実施した。

ASV の分類学的同定はイルミナ Miseq シークエンサー (株式会社生物技研, 神奈川

県) で得られたアンプリコン配列データに基づいて行った。相対出現頻度は、全細菌に占める各細菌属の割合として算出し、真菌も同様な解析を行った。また、門、科、属ごとにこれまでリン溶解菌として報告のある菌種だけを抽出し (Rodríguez and Fraga 1999, Gupta ら 2012, Mander ら 2012, Tahir ら 2013, Ruangsanka 2014, Suleman ら 2018, Zheng ら 2018, Zhang ら 2018, Chen and Liu 2019, Kalayu 2019, Li ら 2019, Doilom ら 2020, Pande ら 2020, Wang ら 2020, Chen ら 2021, Divjot ら 2021, 大園・門 2021, Qarni ら 2021, Shen ら 2021), 解析に用いた。

### 5-3. 結果

#### 1) 土壌中のリン溶解菌数

カルシウム型リン酸, アルミニウム型リン酸を溶解する菌数に関して, 2019 年, 2020 ともに不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した (第 5-1 図, 第 5-2 図)。また, カルシウム型リン酸を溶解する菌数は耕起管理間で有意差が認められたものの, アルミニウム型リン酸を溶解する菌数は年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった。鉄型リン酸を溶解する菌数に関して, 2019 年はロータリー耕起より不耕起で高い値を示し, 2020 年は不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した (第 5-3 図)。しかし, 年次間および耕起管理間で有意差が認められなかった。

#### 2) 土壌中のリン酸溶解量

PVK 液体培地における難溶解性リン酸の溶解についての *in vitro* 試験の結果を述べる。まず, カルシウム型リン酸の溶解量についての結果を第 5-2 表に示した。41 時間後の pH に関して 2019 年はロータリー耕起と不耕起で同じ値を示し, 2020 年はロータリー耕起より不耕起で高い値を示した。240 時間後の pH に関して 2019 年, 2020 年ともにロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した。また, 41 時間, 240 時間後の pH は年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。41 時間, 240 時間後のリン酸溶解量, リン酸溶解速度に関して 2019 年, 2020 年ともにロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した。さらに, 41 時間, 240 時間後のリン酸溶解量, リン酸溶解速度は年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。振盪開始から 41 時間

と 240 時間の間におけるリン溶解量の推移は、ロータリー耕起で 57.7 mg/L、不耕起で 67.0 mg/L であり、不耕起の方が増加する結果となった。次に、アルミニウム型リン酸の溶解量について調査した（第 5-3 表）。41 時間、240 時間後の pH に関して 2019 年、2020 年ともにロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した。加えて、41 時間、240 時間後の pH は年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。41 時間後のリン酸溶解量に関して 2019 年は不耕起よりロータリー耕起で高い値を示し、2020 年はロータリー耕起より不耕起で高い値を示した。240 時間後のリン酸溶解量に関して 2019 年は同じ値を示し、2020 年は不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した。ただし、41 時間、240 時間後のリン酸溶解量は年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。41 時間後のリン酸溶解速度に関して 2019 年はロータリー耕起と不耕起で同じ値を示し、2020 年はロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示した。240 時間後のリン酸溶解速度に関して 2019 年は同じ値を示し、2020 年は不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した。しかし、41 時間、240 時間後のリン酸溶解速度は年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。振盪開始から 41 時間と 240 時間の間におけるリン溶解量の推移は、ロータリー耕起で 7.4 mg/L、不耕起で 5.7 mg/L であり、ロータリー耕起の方が増加する結果となった。最後に鉄型リン酸の溶解量について調査した（第 5-4 表）。41 時間後の pH に関して 2019 年、2020 年ともに不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した。240 時間後の pH に関して 2019 年ではロータリー耕起よりも不耕起で高い値を示し、2020 年では不耕起よりもロータリー耕起で高い値を示した。また、41 時間、240 時間後の pH は年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。41 時間、240 時間後のリン酸溶解量、リン酸溶解速度に関して 2019 年は不耕起よりロータリー耕起で高い値を示し、2020 年はロータリー耕起より不耕起で高い値を示した。さらに、41 時間、240 時間後のリン酸溶解量、リン酸溶解速度は年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。振盪開始から 41 時間と 240 時間の間におけるリン溶解量の推移は、ロータリー耕起で 24.9 mg/L、不耕起で 29.8 mg/L であり、不耕起の方が増加する結果となった。

### 3) 土壌中におけるリン溶解菌の種構成の違い



細菌に属する合計 1,105,653 個のペアエンド配列と真菌に属する合計 493,818 個のペアエンド配列が得られた。さらに、合計 11,225 の細菌と合計 268 の真菌に属するアンプリコン配列変異体 (ASV) が確認された (第 5-4 図)。

次に、耕起管理の違いが土壌中のリン溶解菌相対出現頻度に及ぼす影響を門レベルで調査した (第 5-5 図)。細菌では *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Pseudomonadota* が検出され、真菌では *Ascomycota*, *Basidiomycota* が検出された。リン溶解細菌に関して、2019 年 2020 年ともに不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した。さらに、年次間および耕起管理間で有意差が認められた。リン溶解真菌に関して、2019 年はロータリー耕起より不耕起で高い値を示したものの、2020 年は不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した。ただし、年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。次に、耕起管理の違いが土壌中のリン溶解菌相対出現頻度に及ぼす影響を科レベルで調査した (第 5-6 図)。細菌では *Bacillaceae*, *Burkholderiaceae*, *Caulobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Moraxellaceae*, *Nocardiaceae*, *Nocardoidaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Streptomycetaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Xanthomonadaceae* が検出され、真菌では *Hypocreaceae*, *Nectriaceae*, *Tremellaceae*, *Trichocomaceae* が検出された。リン溶解細菌に関して、2019 年 2020 年ともに不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した。加えて、年次間および耕起管理間で有意差が認められた。リン溶解真菌に関して、2019 年 2020 年ともに不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した。しかし、年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。また、耕起管理の違いが土壌中のリン溶解菌相対出現頻度に及ぼす影響を属レベルで調査した (第 5-7 図)。細菌では *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Massilia*, *Mesorhizobium*, *Novosphingobium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* が検出され、真菌では *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Trichoderma* が検出された。リン溶解細菌に関して、2019 年はロータリー耕起より不耕起で高い値を示し、2020 年は不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した。それに加え、年次間において有意差が認められた。リン溶解真菌に関

して、2019年2020年ともに不耕起よりロータリー耕起で高い値を示した。しかし、年次間および耕起管理間で有意差は認められなかった。

#### 5-4. 考察

本研究においてカルシウム型リン酸を溶解する菌数はロータリー耕起で高まった（第5-1図）。その要因として土壌の気相率の変化が考えられる。ほとんどの土壌細菌は酸素濃度の高い土壌を好む好気性細菌であり、酸素を利用することで炭素化合物を分解する（Hoorman 2016）。本研究においても土壌中に好気性細菌が多く存在し、ロータリー耕起によって土壌に酸素が送り込まれることでリン溶解細菌が増殖したと推察される。対して、アルミニウム型リン酸及び鉄型リン酸を溶解する菌数はロータリー耕起の有無で差が無かった（第5-2図、第5-3図）。Islamら（2019）の研究からカルシウム型リン酸はアルミニウム型リン酸及び鉄型リン酸に比べて可溶化率が高いことが明らかになっている。これはカルシウムに比べてアルミニウムや鉄がリンと強い結合を持つからであり（Islamら 2019）、この結合力が可溶化に大きな影響を与えていると考えられる。さらに、カルシウム型リン酸は土壌が酸性化するだけでも溶解可能なのに対し、鉄型リン酸の溶解は酸性化に加え、金属のキレート化も必要になってくる（Whitelaw 2000）。上記のことからカルシウム型リン酸を溶解する菌数はロータリー耕起で高まったのに対し、アルミニウム型リン酸及び鉄型リン酸を溶解する菌数に差は出なかった要因であると考えられる。ただし、本研究における供試土壌ではカルシウム型リン酸の優占は著しく低いため（第4-1図）、カルシウム型リン酸を溶解する菌数の影響は小さいものと思われる。また、本試験では培養したコロニーの種名まで明らかにできていないことから、複数の形態のリン酸を溶解できる菌種がいるかは不明なままである。過去の報告では *Trinickia* 属はカルシウム型リン酸と鉄型リン酸を溶解し、*Pseudomonas* 属と *Priestia* 属はカルシウム型リン酸とアルミニウム型リン酸を溶解することが示されている（Damoら 2022）。さらに、*Paraburkholderia* 属はアルミニウム型リン酸と鉄型リン酸を溶解し、*Burkholderia* 属はカルシウム型リン酸とアルミニウム型リン酸、鉄型リン酸すべてのリン酸の形態を溶解することが明らかにされている（Damoら 2022）。よって今後はそれぞれの形態のリン酸を添加した培地からコ

ロニーをピックした後、コロニーから DNA を抽出し、塩基配列を読むことで菌種まで明らかにしていく。そして、複数の形態のリン酸を溶解できる菌種がいるか調査する予定である。

カルシウム型リン酸、アルミニウム型リン酸、鉄型リン酸の溶解量は耕起管理間、年次間ともに有意差がみられなかった（第 5-2 表、第 5-3 表、第 5-4 表）。つまり、ロータリー耕起の有無はそれぞれの型のリン酸を溶解するリン溶解菌の活性に影響を及ぼさなかったことを示す。この様にロータリー耕起がカルシウム型リン酸、アルミニウム型リン酸及び鉄型リン酸の溶解量に影響を及ぼさなかった要因としては、土壌中の有機物が耕起をしても増加しなかったためであると考えられる。Scervino ら (2011) および Jia ら (2022) はリン溶解菌の活性は低分子の炭素源を添加することによって刺激され、有機酸の分泌を増加させ、リン酸可溶化能を高めることができることを明らかにしている。本研究においてはロータリー耕起をしてもカバークロップなどの有機物を外部から取り入れていないため、十分な栄養源を得ることができず、耕起管理間でリン溶解菌の活性に差が出なかったと考えられる。

次にアンプリコンシーケンス解析を用いて土壌中のリン溶解菌の相対出現頻度を調査したところ細菌の科レベルにおいてロータリー耕起でリン溶解菌の相対出現頻度が高かった（第 5-6 図）。特に本研究ではロータリー耕起によって Bacillaceae, Caulobacteraceae, Comamonadaceae, Flavobacteriaceae, Micrococcaceae, Moraxellaceae, Nocardiodaceae, Oxalobacteraceae, Paenibacillaceae, Planococcaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Sphingobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Streptomycetaceae, Xanthomonadaceae が増加した。過去 Bacillaceae に分類される *Bacillus* 属は多くの論文でリンを可溶化することが証明されている (Prakash and Arora 2019, Azaroual ら 2020, Gomez-Ramirez and Uribe-Velez 2021)。さらに、深耕によって Bacillaceae などの好気性細菌の活性が促進されることが観察されており (Chen ら 2022)、本研究においても同様な傾向が確認された。Nocardiodaceae は、植物の根長を延ばし、栄養分と水分の吸収を改善するジベレリンやインドール-3-酢酸 (IAA) などの植物ホルモンを分泌する働きを持つ (Azaroual ら 2022)。Paenibacillaceae に分類される *Paenibacillus* 属はリン酸の可溶化だけでなく、窒素固定や植物ホルモンなどの植物成長促進剤を生産するこ

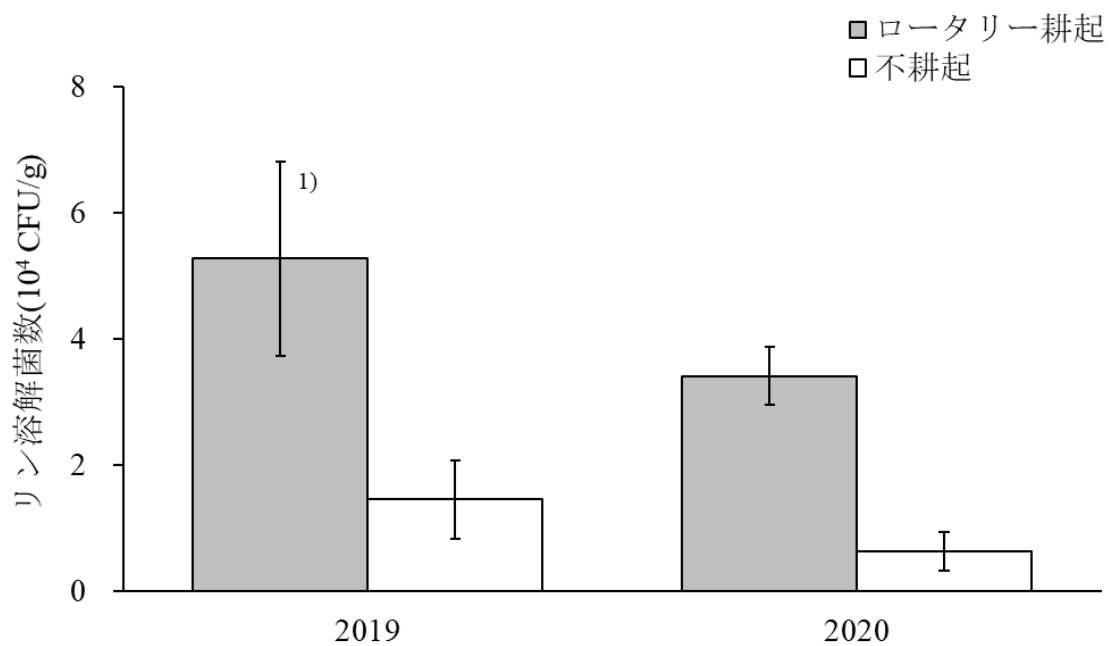
とができる (Liu ら 2019). さらに, *Paenibacillus* 属は抗生物質特性を持つリポペプチドを生成し, 病原体から植物を守る働きを持つ (Naing ら 2014). 従って, *Paenibacillaceae* は, 植物の抵抗性や土壌を改善するのに役立つ可能性が示唆されている (Dobrzyński ら 2021). *Pseudomonadaceae* に分類される *Pseudomonas* 属は *Bacillus* 属に並ぶ最もリンを可溶化する細菌として知られている (Satyaprakash ら 2017). *Pseudomonadaceae* は様々な有機酸を生成する働きを持ち, シュウ酸, リンゴ酸, 乳酸, クエン酸, コハク酸や (Adhikarira ら 2021), グルコン酸, 酢酸, シュウ酸 (Suleman ら 2018), キナ酸 (de Amaral Leite ら 2020) など多岐にわたる. 上述した様々な有機酸の生成は難溶性リン酸を可溶化するのに大きく貢献する可能性がある. *Sphingomonadaceae* は環境適応性と耐性に優れており, どのような環境下においても生存できる微生物の一種であることが知られている (Baboshin ら 2008, Liu ら 2018). *Xanthomonadaceae* は過去, 耕起や耕耘によって増加した報告がある (Tyler ら 2021). *Xanthomonadaceae* に関しても好気性細菌であることが報告されており (Xu ら 2023), ロータリー耕起による土壌中の酸素量の増加が *Xanthomonadaceae* の活性を促し, 増殖させた要因である可能性が示唆された. また, 本研究における供試土壌ではアルミニウム型リン酸, 鉄型リン酸で優占しているため (第 4-1 図), 上述した細菌がアルミニウム型リン酸や鉄型リン酸を溶解する可能性が示唆された.

今回の研究結果により, ロータリー耕起によって土壌中のリン溶解細菌の出現頻度が増加し, 難溶性リン酸が可溶化されることで土壌の可給態リン酸含量が高まり, 飼料用トウモロコシのリン酸吸収や生育, 収量を改善する要因であることが新しく解明された.

第5-1表 土壤懸濁液の作成条件

	リン酸カルシウム	リン酸アルミニウム	リン酸鉄
生土(g)	1	5	2
0.85%滅菌塩化ナトリウム(mL)	9	5	8

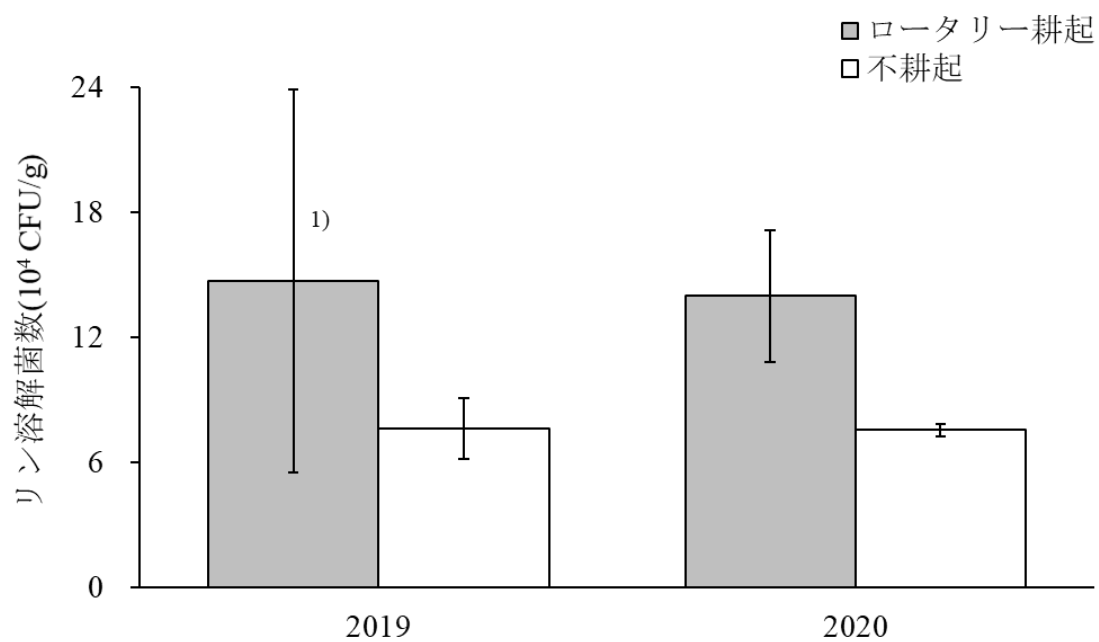
年次(A): n.s.<sup>2)</sup>, 耕起管理(B): \*\*, (A)×(B): n.s.



第5-1図 耕起管理がカルシウム型リン酸を溶解する菌数に及ぼす影響.

- 1) エラーバーは標準誤差を示す.
- 2) 二元配置分散分析において\*\*は1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.

年次(A): n.s.<sup>2)</sup>, 耕起管理(B): n.s., (A)×(B): n.s.

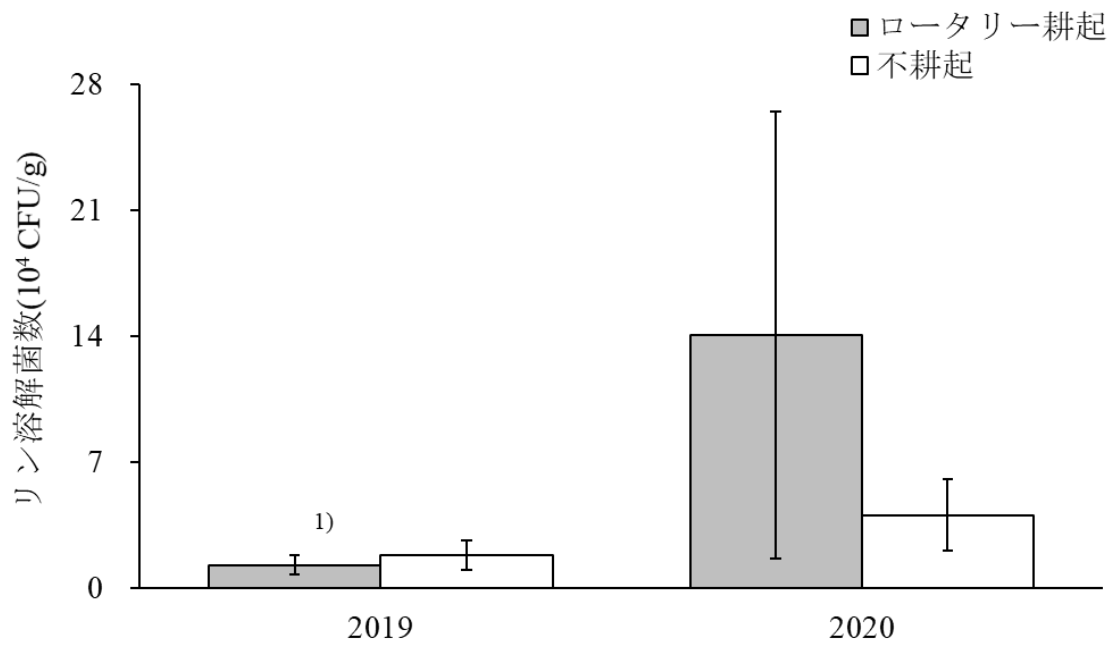


第5-2図 耕起管理がアルミニウム型リン酸を溶解する菌数に及ぼす影響.

1) エラーバーは標準誤差を示す.

2) 二元配置分散分析においてn.s.は有意差がないことを示す.

年次(A): n.s.<sup>2)</sup>, 耕起管理(B): n.s., (A)×(B): n.s.



第5-3図 耕起管理が鉄型リン酸を溶解する菌数に及ぼす影響.

1) エラーバーは標準誤差を示す.

2) 二元配置分散分析においてn.s.は有意差がないことを示す.



第5-2表 耕起管理がカルシウム型リン酸溶解量に及ぼす影響.

栽培年次	耕起管理	pH (H <sub>2</sub> O)		リン酸溶解量 (mg/L)		リン酸溶解速度 (mg/L/hr)	
		41時間後	240時間後	41時間後	240時間後	41時間後	240時間後
2019	ロータリー耕起	6.2 ± 0.1 <sup>1)</sup>	4.8 ± 0.2	8.5 ± 1.1	46.3 ± 15.4	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.06
	不耕起	6.2 ± 0.1	5.0 ± 0.1	11.0 ± 0.9	59.8 ± 15.5	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.06
2020	ロータリー耕起	6.1 ± 0.0	4.5 ± 0.2	11.4 ± 0.6	89.0 ± 29.1	0.28 ± 0.02	0.37 ± 0.12
	不耕起	6.4 ± 0.2	4.8 ± 0.1	11.8 ± 2.6	97.0 ± 16.4	0.29 ± 0.06	0.40 ± 0.07
年次	2019	6.2 ± 0.1	4.9 ± 0.1	9.7 ± 0.9	53.0 ± 10.2	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.04
	2020	6.3 ± 0.1	4.6 ± 0.1	11.6 ± 1.2	93.0 ± 15.0	0.28 ± 0.03	0.39 ± 0.06
耕起管理	ロータリー耕起	6.2 ± 0.0	4.6 ± 0.2	10.0 ± 0.9	67.7 ± 17.6	0.24 ± 0.02	0.28 ± 0.07
	不耕起	6.3 ± 0.1	4.9 ± 0.1	11.4 ± 1.2	78.4 ± 13.1	0.28 ± 0.03	0.33 ± 0.05
分散分析	年次(A)	n.s. <sup>2)</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	耕起管理(B)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	(A)×(B)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

2) 二元配置分散分析においてn.s.は有意差がないことを示す.

\* インキュベーション開始時はpHが7.0, リン酸溶解量が0であることを確認した.

第5-3表 耕起管理がアルミニウム型リン酸溶解量に及ぼす影響.

栽培年次	耕起管理	pH (H <sub>2</sub> O)		リン酸溶解量 (mg/L)		リン酸溶解速度 (mg/L/hr)	
		41時間後	240時間後	41時間後	240時間後	41時間後	240時間後
2019	ロータリー耕起	6.4 ± 0.1 <sup>1)</sup>	4.8 ± 0.1	1.4 ± 0.3	7.6 ± 0.5	0.03 ± 0.01	0.19 ± 0.01
	不耕起	6.5 ± 0.1	5.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2	7.6 ± 1.0	0.03 ± 0.01	0.19 ± 0.02
2020	ロータリー耕起	6.4 ± 0.1	4.5 ± 0.2	1.0 ± 0.2	9.5 ± 2.8	0.02 ± 0.00	0.23 ± 0.07
	不耕起	6.5 ± 0.1	4.8 ± 0.1	1.1 ± 0.2	6.0 ± 0.7	0.03 ± 0.00	0.15 ± 0.02
年次	2019	6.4 ± 0.1	4.9 ± 0.1	1.3 ± 0.2	7.6 ± 0.5	0.03 ± 0.00	0.19 ± 0.01
	2020	6.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	7.8 ± 1.5	0.02 ± 0.00	0.19 ± 0.04
耕起管理	ロータリー耕起	6.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1	1.2 ± 0.2	8.6 ± 1.3	0.03 ± 0.00	0.21 ± 0.03
	不耕起	6.5 ± 0.1	4.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	6.8 ± 0.7	0.03 ± 0.00	0.17 ± 0.02
分散分析	年次(A)	n.s. <sup>2)</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	耕起管理(B)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	(A)×(B)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

2) 二元配置分散分析においてn.s.は有意差がないことを示す.

\* インキュベーション開始時はpHが7.0, リン酸溶解量が0であることを確認した.

第5-4表 耕起管理が鉄型リン酸溶解量に及ぼす影響.

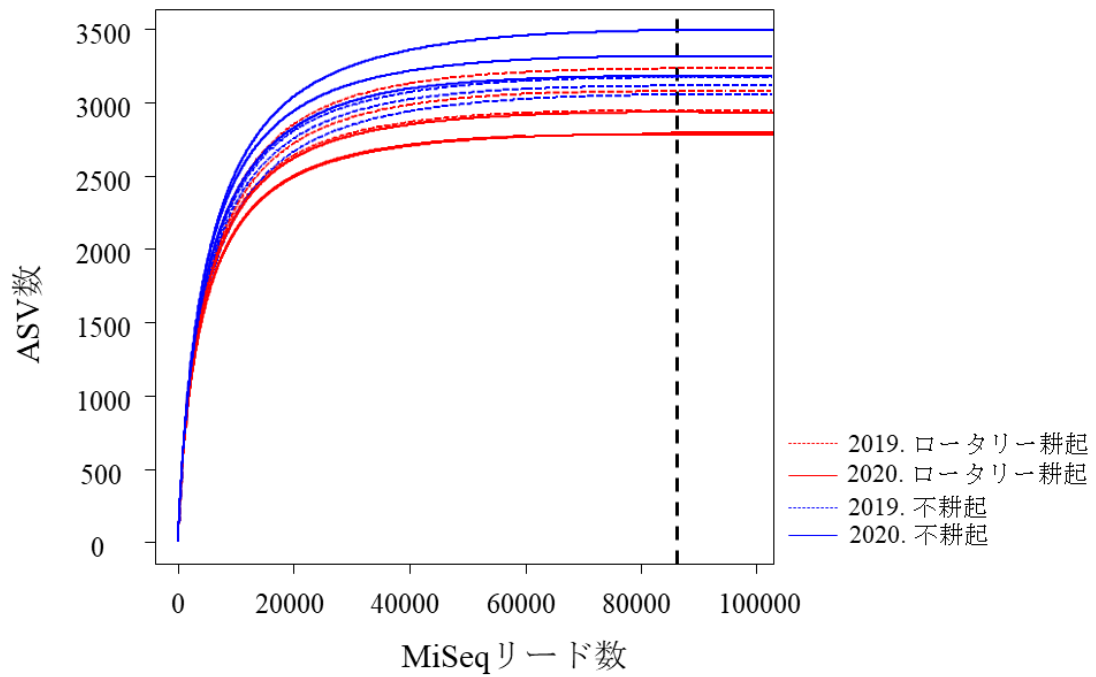
栽培年次	耕起管理	pH (H <sub>2</sub> O)		リン酸溶解量 (mg/L)		リン酸溶解速度 (mg/L/hr)	
		41時間後	240時間後	41時間後	240時間後	41時間後	240時間後
2019	ロータリー耕起	6.1 ± 0.1 <sup>1)</sup>	5.1 ± 0.2	3.6 ± 0.8	25.2 ± 4.9	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02
	不耕起	6.0 ± 0.1	5.2 ± 0.4	1.4 ± 0.5	20.9 ± 3.0	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.01
2020	ロータリー耕起	6.1 ± 0.1	5.3 ± 0.3	2.3 ± 1.3	30.5 ± 1.0	0.06 ± 0.03	0.13 ± 0.00
	不耕起	5.5 ± 0.1	4.7 ± 0.4	4.4 ± 0.5	44.6 ± 1.7	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.01
年次	2019	6.0 ± 0.1	5.2 ± 0.2	2.5 ± 0.6	23.1 ± 2.6	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01
	2020	5.8 ± 0.1	5.0 ± 0.2	3.4 ± 0.6	37.6 ± 1.3	0.08 ± 0.02	0.16 ± 0.01
耕起管理	ロータリー耕起	6.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2	3.0 ± 0.6	27.9 ± 2.8	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.01
	不耕起	5.8 ± 0.1	5.0 ± 0.3	2.9 ± 0.8	32.7 ± 1.9	0.07 ± 0.02	0.14 ± 0.01
分散分析	年次(A)	n.s. <sup>2)</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	耕起管理(B)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	(A)×(B)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.

1) 平均値 ± 標準誤差を示す.

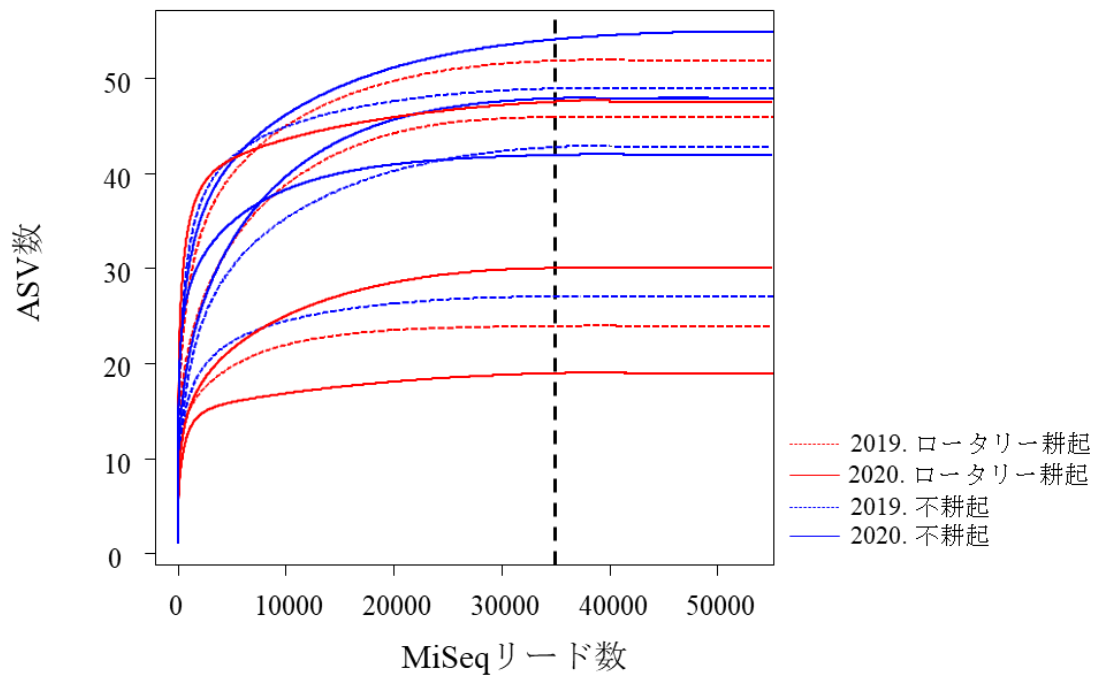
2) 二元配置分散分析において\*\*は1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.

\* インキュベーション開始時はpHが7.0, リン酸溶解量が0であることを確認した.

### 細菌



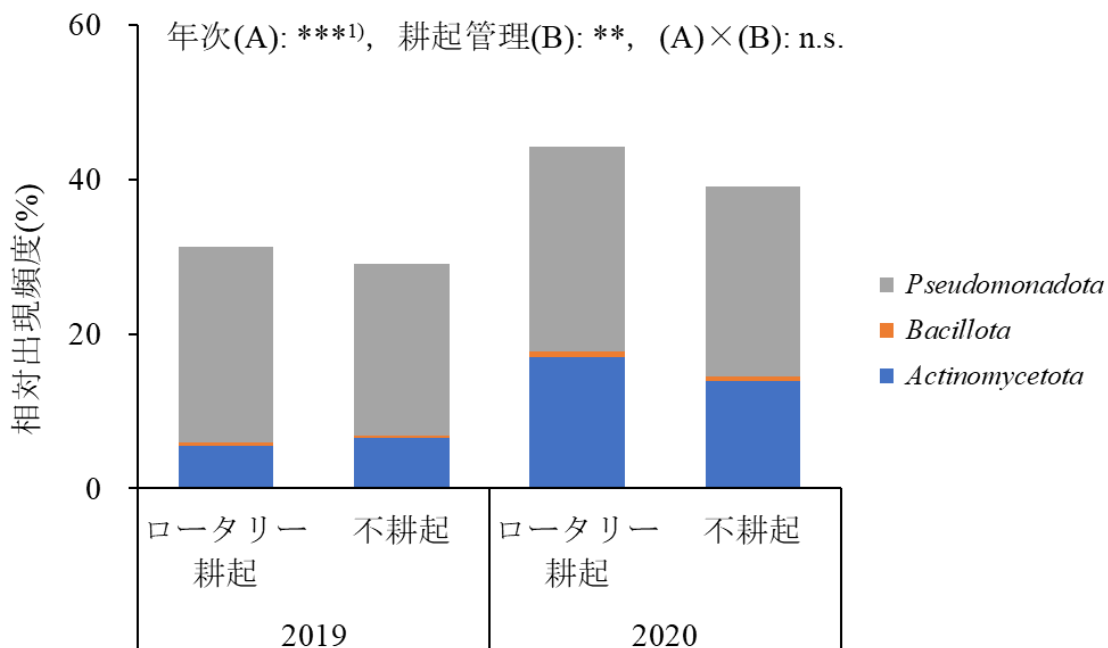
### 真菌



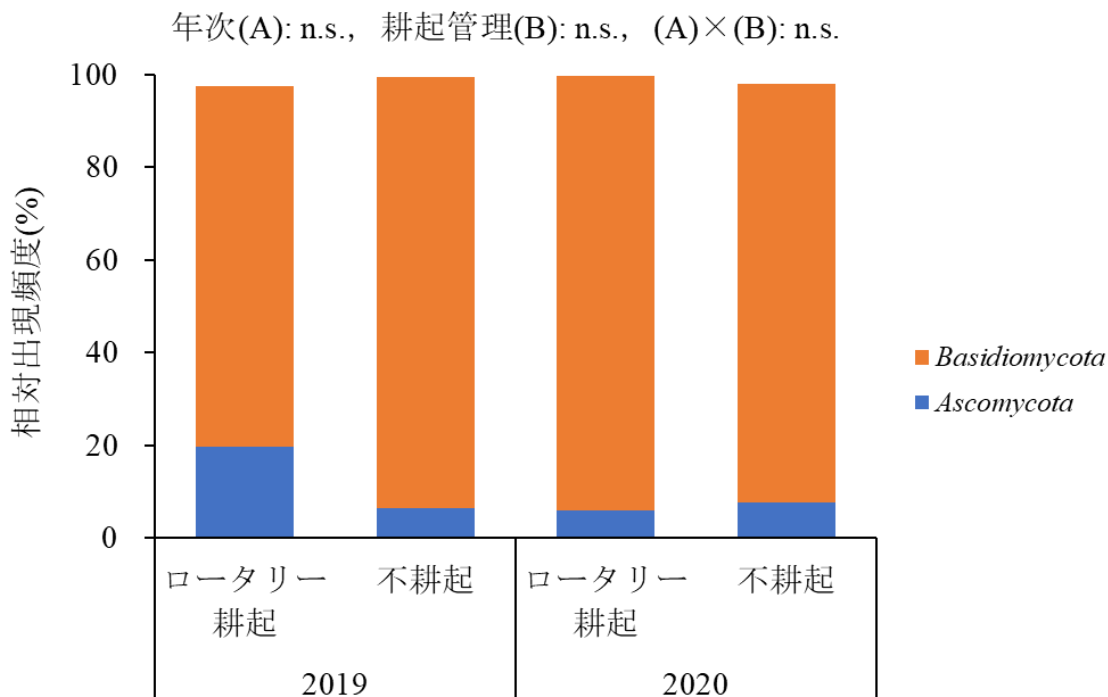
第5-4図 土壤中におけるIllumina MiSeqアンプリコンシーケンスに基づくレアファクションカーブ。

\* 縦破線は、細菌および真菌において、それぞれ86217リードと34839リードに配置し、カットオフレベルとして定義した。

細菌

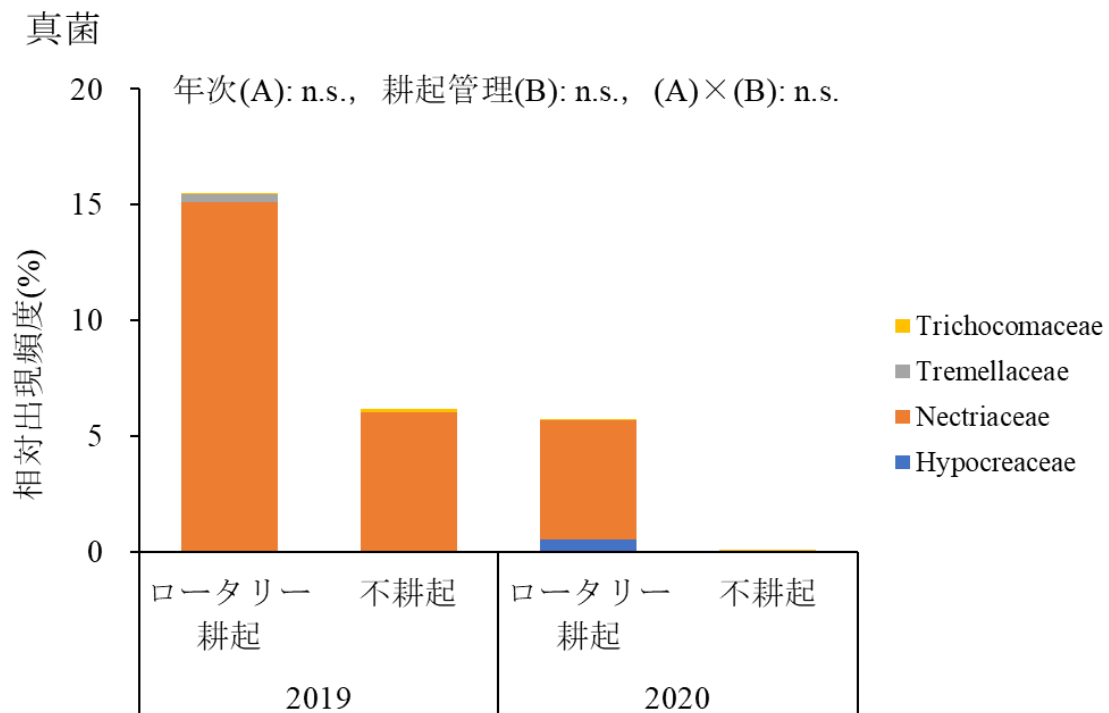
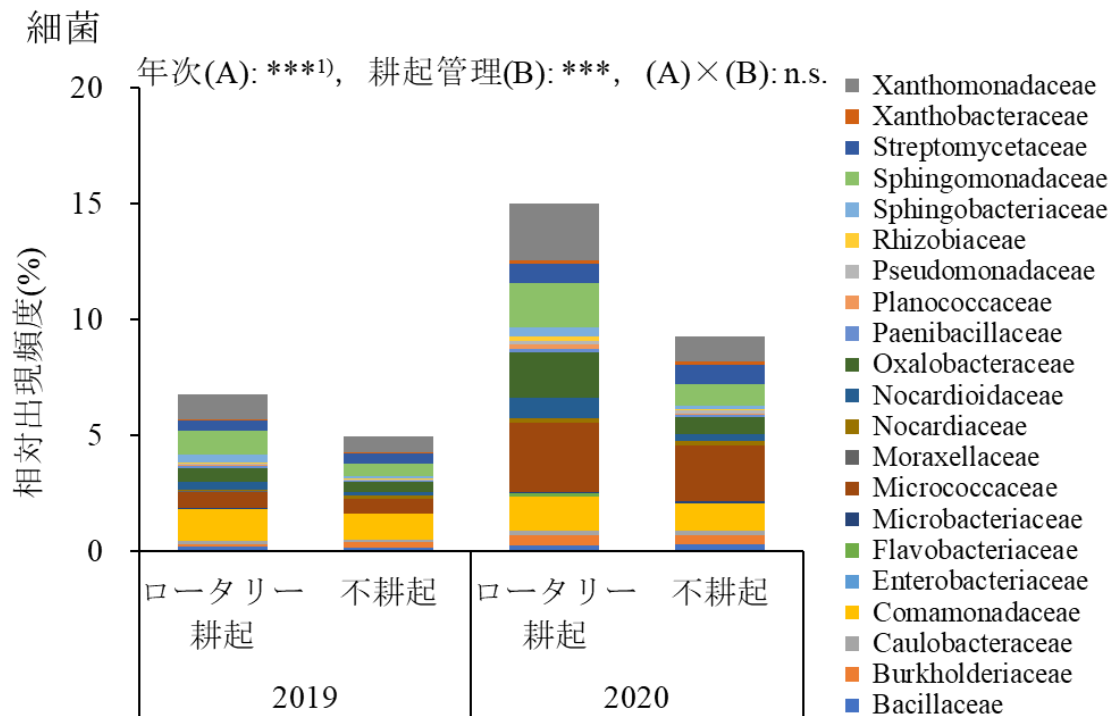


真菌



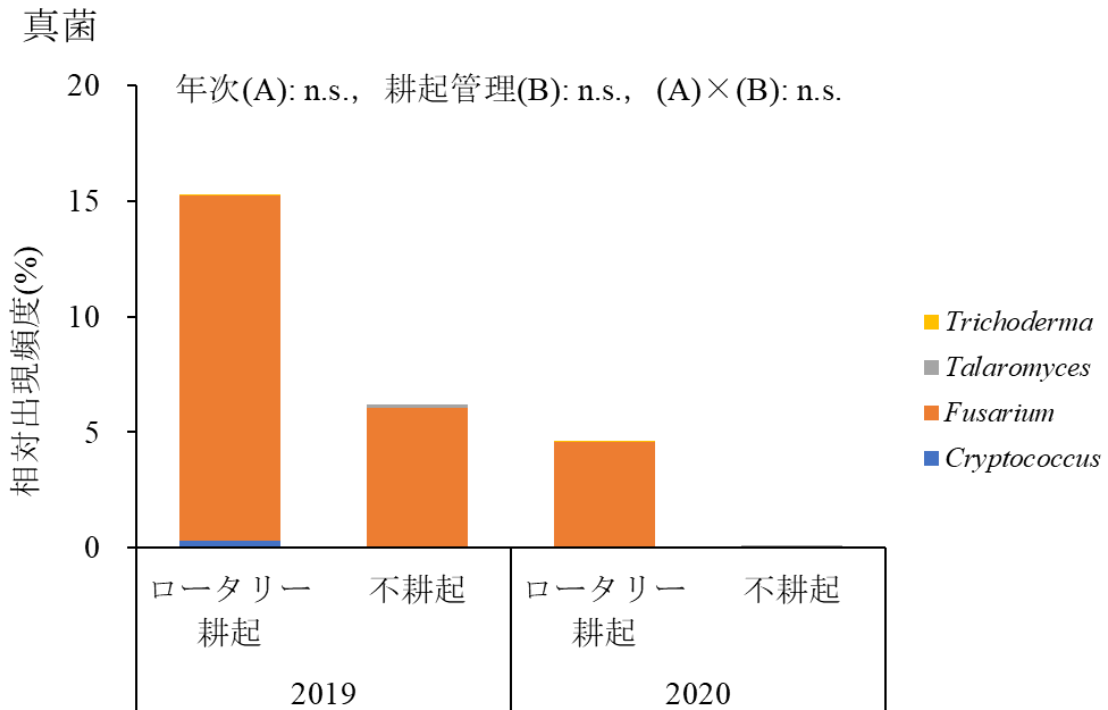
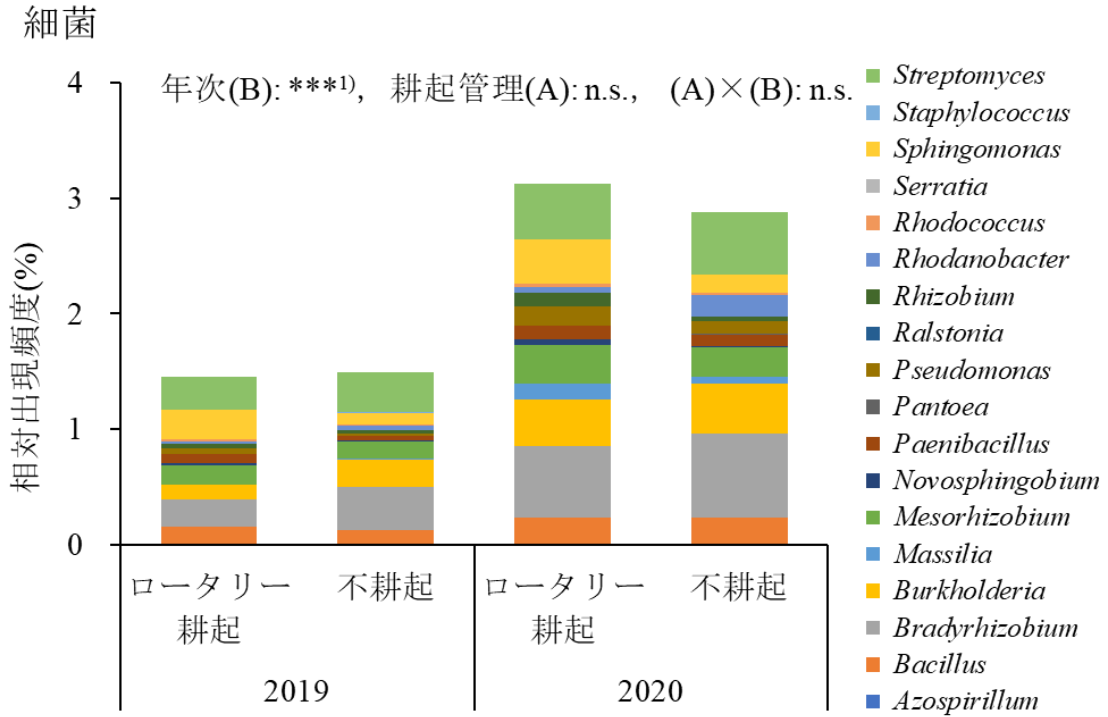
第5-5図 耕起管理が土壌中のリン溶解菌相対出現頻度（門）に及ぼす影響.

1) 統計処理は角変換後に行った. 二元配置分散分析において\*\*は1%, \*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し, n.s.は有意差がないことを示す.



第5-6図 耕起管理が土壤中のリン溶解菌相対出現頻度（科）に及ぼす影響。

1) 統計処理は角変換後に行った。二元配置分散分析において\*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し、n.s.は有意差がないことを示す。



第5-7図 耕起管理が土壌中のリン溶解菌相対出現頻度（属）に及ぼす影響。

1) 統計処理は角変換後に行った。二元配置分散分析において\*\*\*は0.1%水準で有意差があることを示し、n.s.は有意差がないことを示す。

## 総合考察

過去，耕起や耕耘によってトウモロコシの生育・収量は向上する報告や（Anjum ら 2019），変化なし（Haddadi 2016），或いは低下する報告（da Silva ら 2020，Li ら 2022a）など様々である．本研究では温暖地，黒ボク土条件下でロータリー耕起を行うことによって不耕起よりも飼料用トウモロコシの生育，収量が促進されることが明らかとなった（第 1-3 表，第 1-4 表，第 1-5 表）．序論でも述べた通り，不耕起栽培には多くのメリットがある反面，収量性がやや不安定であることから国内で本格的に導入するのはまだ難しいと考える．本研究の結果は，それを裏付ける結果となった．

ロータリー耕起を行うことによって飼料用トウモロコシの生育，収量が促進された要因の 1 つとして，飼料用トウモロコシの養分吸収の改善が考えられる．実際本研究においてロータリー耕起を行うことによって飼料用トウモロコシのリン酸吸収が促進されることが明らかとなった（第 1-4 表）．さらに，リン酸吸収が促進された要因として従来では，耕起，耕耘を行うことで土壌硬度の低下（Mairghany ら 2019）や，それに伴う根の広がりによって作物の養分吸収量が改善されることが示されている（Liu ら 2020）．本研究においてもロータリー耕起によって土壌硬度が低下し，根域が拡大することで飼料用トウモロコシのリン酸吸収が促進されたと考えられる．また，根酸化活性（ROA）や根の酸性ホスファターゼ（RAP）活性などの根の生理活性も土壌中のリン可溶化や吸収量の増加に重要な役割を果たしていることが報告されている（Raghothama ら 2005，Lynch ら 2008）．ただし，本研究において根そのもののリン酸吸収活性については測定できていないので，今後明らかにしていく必要がある．

さらに本研究において根以外に 2 つの要因がロータリー耕起によって飼料用トウモロコシのリン酸吸収を促進させた要因であることが示唆された．1 つは根内で優占する AM 菌の変化である．AM 菌は種によってリン酸吸収が異なることも明らかにされている（Anusha ら 2022，Juntahum ら 2022）．本試験においてはロータリー耕起によって *Racocetra* 属を含む *Gigasporaceae* の優占率が高まり，不耕起では *Acaulospora* 属を含む *Acaulosporaceae* の優占率が高まった（第 3-6 図）．ポット試験では飼料用トウモロコシのリン酸濃度は *Acaulospora* 属 F-1，*Acaulospora* 属 AP-5 よりも *Racocetra* 属



TK-1, *Racocetra* 属 SZ-3 を接種すると高まった (第 3-2 表)。これは本研究における新規な部分であり、ロータリー耕起の収量向上要因の解明に繋がった。ただし、リン酸吸収の変化が AM 菌によるものなのか、飼料用トウモロコシの根から直接吸収したものであるかは定かでない。その理由として AM 菌のライフサイクルに関する特性に由来する。植物との共生関係を確立する AM 菌は、宿主植物なしではライフサイクルを完了できない絶対共生菌である (Sugiura ら 2020)。従って陸上植物の 80%の根には AM 菌が感染しており (Smith and Read 2008)、多くの植物の根には AM 菌の菌糸が混在しているものと考えられる。このことから AM 菌と植物のどちらが土壌中のリン酸を吸収したのか判別が難しい。過去の報告ではリン酸の取り込み、移行の際にリン酸トランスポーター遺伝子 (*ZmPht*) が植物の葉、茎、根や感染した AM 菌の菌糸で発現することが知られている (Hu ら 2020, Kumar ら 2022)。そのうち、*ZmPht1; 3*, *ZmPht1; 5*, *ZmPht1; 8* および *ZmPht1; 13* の発現は植物の根におけるリン酸の直接取り込み経路に関与しており、*ZmPht1; 2*, *ZmPht1; 4*, *ZmPht1; 6*, *ZmPht1; 7*, *ZmPht1; 9* および *ZmPht1; 11* は AM 菌が定着した根 (共生経路) を介した間接的なリン酸の取り込みに関与している (Nagy ら 2006, Liu ら 2016, Sawers ら 2017, Kumar ら 2022)。本試験ではそれぞれの菌種がどれだけリン酸を宿主に送り込んでいるか不明であることから、今後それぞれの AM 菌種がどれだけリン酸吸収に貢献したか明らかにするためにリン酸トランスポーター遺伝子の発現量も並行して調査していく必要がある。

もう 1 つは土壌中のトルオーグリン酸含有量の増加である。本試験においてロータリー耕起することにより土壌中のトルオーグリン酸含有量が高まった (第 4-1 表)。ただし、ロータリー耕起による土壌中の ACP 活性や ALP 活性に変化は見られなかったことから (第 4-2 表)、土壌微生物の活性化が土壌中のトルオーグリン酸含有量を増加させた要因の一つではないと考えられる。そこでアンプリコンシーケンス解析を用いて土壌中のリン溶解菌相対出現頻度を調査したところ、細菌の科レベルにおいてロータリー耕起で高い出現頻度を示すことが明らかとなった (第 5-6 図)。過去の報告では *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Streptomyetaceae* がアルミニウム型リン酸および鉄型リン酸を溶解し、*Sphingomonadaceae* がアルミニウム型リン酸のみ溶解することが明らかにされている (Damo ら 2022, Kyaw ら 2022, Martínez-Hidalgo

ら 2022, Trung 2022). よってこれらの菌が主にアルミニウム型リン酸および鉄型リン酸を溶解し土壌中の可給態リン酸を向上させた要因であることが示唆された. ただし, 本研究ではロータリー耕起によってリン溶解菌の菌株の構成が変化するかまでは明らかにできていない. 過去の報告では, 同じ属でも接種するリン溶解菌の菌株の違いによってリン酸の溶解量が異なることが示されている (De Abreu ら 2017, Yu ら 2022b). このことから最もリン酸を溶解する菌種と溶解しない菌を明らかにするためには, 今後種や菌株レベルまで調査していく必要がある.

以上2つの土壌微生物の変化が耕起をした際に飼料用トウモロコシのリン酸吸収や生育, 収量に寄与していることが解明された. また, 近年では AM 菌とリン溶解菌の相互作用に関しても研究がなされている (Ain ら 2023). Nacoon ら (2023) は AM 菌とリン溶解菌の同時接種によって作物の生育が向上したことを明らかにしている. また, Mahant ら (2018) は AM 菌とリン溶解菌の接種によってダイズ, コムギの根長密度を増加させ, リン酸吸収を促進させたことを報告している. さらに, Ordoñez ら (2016) は *Pseudomona* 属などのリン溶解菌が *Rhizophagus irregularis* などの AM 菌の外生菌糸に沿って増殖したことを明らかにしている. 一方で土壌微生物間では負の相互作用も認められており, 別の種に対して必要とする資源を搾取する間接的な競合と, 別の種に対して成長を阻害する直接的な競合の 2 つが確認されている (Hibbing ら 2010, Foster and Bell 2012, García-Bayona and Comstock 2018). さらに, 土壌中の可給態リン酸含量が高まると根内の AM 菌の感染率や土壌中の孢子密度が低下することが報告されている (Ma ら 2023). このことからリン溶解菌が土壌中の可給態リン酸濃度を高めると AM 菌の感染率が低下するトレードオフが起こりうる. 一方 Nacoon ら (2021) は圃場条件において AM 菌とリン溶解菌を同時接種した試験を行ったところ, 根圏土壌中のリン溶解菌数は植物中のリン酸含有量, AM 菌孢子密度および AM 菌感染率と正の相関があったことを報告している. このように, AM 菌とリン溶解菌の接種効果を最大限にするためには, ロータリー耕起を行った際にどのようにしたら両微生物の菌密度を高め, 競合が起こらないようにすることができるか検討することが必要である.

本研究はロータリー耕起によって飼料用トウモロコシ根内の AM 菌の種構成が変化

し、黒ボク土条件下においてリン酸を施肥しなくてもリン酸吸収を改善できる可能性が示唆された（第 1-4 表，第 3-6 図，第 3-2 表）。従って，黒ボク土でロータリー耕起を行い *Racocetra* 属の AM 菌を増殖させることができれば，我が国の飼料用トウモロコシ栽培においてリン酸肥料の使用削減に貢献できると考えられる。実際，大友ら（2015）は北海道のダイズ栽培において，AM 菌が感染することによってリン酸施肥量を標準値から 3 割減肥できることを示している。このように AM 菌を上手に利用することでリン酸肥料を節約でき，経済的に有益である。加えて，農林水産省が掲げる「みどりの食料システム戦略」の化学肥料の使用量を 30%低減する目標も達成することができる。さらに本研究はロータリー耕起によってリン溶解菌が増殖し，土壤中の可給態リン含量を改善できる可能性が示唆された（第 4-1 表，第 4-3 表，第 5-5 図，第 5-6 図）。リン酸肥料の原料であるリン鉱石はほぼ 100%を国外からの輸入に頼っており，今後数百年以内に枯渇が懸念される有限の資源である（大竹 2019）。このことから土壤中に未利用のまま埋没するリン資源をリン溶解菌によって利用できるようになることは社会的にも意義があると考えられる。

本研究ではロータリー耕起によって飼料用トウモロコシが増収するメカニズムの一端を明らかにすることができた。1 つはリン吸収を促進させる AM 菌種の発見と，もう 1 つは土壤中の難溶性リンを可溶化するリン溶解菌の発見である。これらの菌種を増殖させることができれば，リン酸の施肥量を削減しても安定した飼料用トウモロコシの収量が期待できる。さらに，本研究で得られた知見は AM 菌やリン溶解菌を資材とした生物農薬などの開発の一助となり得る。ただし，AM 菌やリン溶解菌などの資材を外部から投入しても効果が発現されない例も多く（Raymond ら 2019，Rosa ら 2020），更なる知見の集積を要する。今後は明らかになった菌種を現場圃場に直接接種し，効果が得られることを確認する必要がある。また，2015 年に開催された国連サミットで，持続可能な開発目標：SDGs（外務省 2023）における 17 のゴールが掲げられた。そのうち目標 2 は飢餓を終わらせ，食料安全保障及び栄養の改善を実現し，持続可能な農業を促進することをゴールに位置付けている。目標 15 は陸域生態系の保護，回復，持続可能な利用の推進，持続可能な森林の経営，砂漠化への対処ならびに土地の劣化の阻止・回復及び生物多様性の損失を阻止することを

ゴールに位置付けている。本研究における知見は上述した SDGs で掲げられた 2 つの課題解決に向けて貢献できる。

## 摘 要

飼料用トウモロコシは単位面積当たりの穀物収量が優れており、栄養価も非常に高い。このようなことから、国内での生産拡大に対する期待が高まっている。しかし、飼料用トウモロコシの栽培には多量の施肥が必要であることから、コスト面で負担になりやすい。一方、我が国で広く分布する黒ボク土は、施用したリン酸が土壤に固定されやすい。従って、これまでの作物栽培では多量のリン酸肥料が施肥されてきた。ただし、リン酸肥料の原料はほぼ 100%、輸入に頼っており国際情勢の影響や価格高騰の影響を受けやすい。加えて今後数百年以内にリン鉱石の枯渇が懸念されている。これらのことから、土壤中に埋没する未利用なリン資源を利用できるようにすることは社会的にも重要な意義を持っている。従来作物のリン酸吸収量を高めるために一般的に栽培技術のひとつとして行われてきたのが土壤の耕起、耕耘である。耕起や耕耘によって根の伸長促進や根量を増大させることはリン酸吸収を促進させるために重要といえる。さらに近年、耕起、耕耘は土壤微生物にも影響を与えることが多数報告されている。しかし、これまでに耕起、耕耘によって作物のリン酸吸収や生育が改善された要因を土壤微生物の観点から明らかにした研究事例は少ない。そこで本研究では黒ボク土条件下においてロータリー耕起をした時にトウモロコシの生育、収量、リン酸吸収が変化する要因を土壤中の AM 菌やリン溶解菌などの土壤微生物群の観点から明らかにすることを目的とした。

1) ロータリー耕起の有無による飼料用トウモロコシの生育に及ぼす影響を調査した結果、栄養成長期、絹糸抽出期の草丈や茎葉乾物重、成熟期の子実収量や地上部バイオマス量は不耕起区に比べロータリー耕起区でより高かった。さらに、飼料用トウモロコシのリン酸吸収量もロータリー耕起区でより高かった。土壤の貫入抵抗値はロータリー耕起区で低くなり、栄養成長期の根長密度や根重はロータリー耕起区で高かったが、絹糸抽出期ではロータリー耕起の有無で差がなかった。これらのことから、ロータリー耕起によって飼料用トウモロコシの生育、収量やリン酸吸収量が向上したのは根の伸長拡大が要因の一つであると考えられた。

2) 根内に感染する AM 菌がリン酸吸収を促進させる働きを持つことから AM 菌の感染率や群集構造に関して調査を行った。飼料用トウモロコシ根における AM 菌感染率や DGGE バンド数, OTU 数を調査したところロータリー耕起の有無で差がなかった。しかし, ロータリー耕起区のみの特異的に検出される AM 菌の DGGE バンド数や OTU 数は不耕起区のみの特異的に検出される AM 菌の DGGE バンド数や OTU 数より多くなる傾向を示した。次に AM 菌種の構成の違いを調査したところ PCR-DGGE 解析, アンプリコンシーケンス解析ともにロータリー耕起の有無で AM 菌の群集構造が異なることが示された。飼料用トウモロコシ根の AM 菌の相対出現頻度を調査したところ, ロータリー耕起区では *Acaulosporaceae* の優占率が高くなり, 不耕起区では *Glomeraceae* の優占率が高かった。以上のことから, 耕起の有無での飼料用トウモロコシのリン酸吸収量の違いには根に優占的に感染する AM 菌の科の違いが影響を及ぼした可能性が示唆された。

3) ロータリー耕起の有無による根に感染する AM 菌種の構成の変化とそれに伴うトウモロコシのリン酸吸収量の関係を調べるために, AM 菌の ASV 相対出現頻度を属レベルで調査したところ, いずれの生育ステージにおいてもロータリー耕起によって *Racocetra* 属の優占率が高くなり, 不耕起では絹糸抽出期で *Acaulospora* 属の優占率が高かった。また, *Racocetra* 属と *Acaulospora* 属の各 2 株を接種したポット試験を行い, 飼料用トウモロコシの生育やリン酸濃度を比較した。茎葉のリン酸濃度は対照区に比べ *Racocetra* 属の接種で高くなった。これらの結果から, ロータリー耕起によって根に感染する AM 菌の種構成が変化し, *Racocetra* 属をはじめとするリン酸の吸収能の高い AM 菌が感染するようになったことが, 飼料用トウモロコシのリン酸吸収や生育, 収量を向上させた要因であることが示唆された。

4) ロータリー耕起が土壌の理化学性に及ぼす影響を調査した。硝酸態窒素含有量は不耕起区で高くなり, 交換性カリウム含有量はロータリー耕起の有無で差がなかった。一方, トルオーグリン酸含有量はロータリー耕起区で高くなった。このことから, AM 菌感染によるリン酸吸収促進以外に, ロータリー耕起によってトウモロコシのリン酸

吸収量が高くなった原因のひとつに、トルオーグリン酸含有量の向上が考えられた。土壌のトルオーグリン酸が高くなった要因としては土壌ホスファターゼの関与が考えられたが、ロータリー耕起によって土壌のホスファターゼ活性に変化はなかった。

さらに、試験を行った圃場の形態別無機態リン酸の割合を調査した結果、供試圃場ではアルミニウム型リン酸および鉄型リン酸が優占していることが明らかとなった。このことからアルミニウム型リン酸や鉄型リン酸を溶解する菌がロータリー耕起によって増加した可能性が示唆された。

5) ロータリー耕起による難溶性リン酸溶解菌の消長について検討した。カルシウム型リン酸を溶解する菌数はロータリー耕起によって高くなったが、アルミニウム型リン酸及び鉄型リン酸を溶解する菌数はロータリー耕起の有無で差がなかった。さらに、カルシウム型リン酸、アルミニウム型リン酸、鉄型リン酸の溶解量もロータリー耕起の有無で差がなかった。アンプリコンシーケンス解析を用いて土壌中のリン溶解菌の相対出現頻度を調査したところ、細菌の科レベルにおいてロータリー耕起でリン溶解菌の相対出現頻度が高くなった。そのうち、*Bacillaceae*、*Paenibacillaceae*、*Pseudomonadaceae*、*Streptomycetaceae* はアルミニウム型リン酸および鉄型リン酸を溶解し、*Sphingomonadaceae* はアルミニウム型リン酸のみ溶解することが明らかにされていることからロータリー耕起をした区では細菌の中でもアルミニウム型リン酸および鉄型リン酸に対する溶解菌が増え土壌中の可給態リン酸を向上させた可能性が示唆された。

以上、ロータリー耕起をした際に飼料用トウモロコシのリン酸吸収量や生育、収量が向上した要因として根の伸長促進以外に土壌中の微生物相の変化が寄与している可能性が示唆された。一つはロータリー耕起によって根内に *Racocetra* 属の AM 菌が優占し、飼料用トウモロコシのリン酸吸収を促進した可能性である。もう一つは、ロータリー耕起によって土壌中のリン溶解菌出現頻度が高まり、土壌の可給態リン酸含有量を増加させた可能性である。このように本研究は、土壌微生物相の変化がロータリー耕起による作物のリン酸吸収量を高める要因であることを明らかにした。

## 引用文献

- Adamič, S. and Leskovšek, R. 2021. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Growth, Yield, and Nodulation in the Early Transition Period from Conventional Tillage to Conservation and No-Tillage Systems. *Agronomy* 11:2477.
- Adhikari, P., Jain, R., Sharma, A. and Pandey, A. 2021. Plant growth promotion at low temperature by phosphate-solubilizing *Pseudomonas* spp. isolated from high-altitude Himalayan soil. *Microb. Ecol.* 82:677–687.
- Adnan, M., Fahad, S., Saleem, M.H., Ali, B., Mussart, M., Ullah, R., Jr, A., Arif, M., Ahmad, M., Shah, W.A., Romman, M., Wahid, F., Wang, D., Saud, S., Liu, K., Harrison, M.T., Wu, C., Danish, S., Datta, R., Muresan, C.C. and Marc, R.A. 2022. Comparative efficacy of phosphorous supplements with phosphate solubilizing bacteria for optimizing wheat yield in calcareous soils. *Sci. Rep.* 12:1–17.
- Ahmed, W., Qaswar, M., Jing, H., Wenjun, D., Geng, S., Kailou, L., Ying L, Ao T, Mei S, Chao L, Yongmei, X., Ali, S., Normatov, Y., Mehmood, S., Khan, M.N. and Huimin, Z. 2020. Tillage practices improve rice yield and soil phosphorus fractions in two typical paddy soils. *J. Soils Sediments* 20:850–861.
- Ain, A.A. and Noraini, M.J. 2023. Effects of rice husk biochar (RHB) with combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and phosphate solubilizing bacteria (PSB) on growth of maize (*Zea mays*). In *IOP Conference Series: Environ. Earth Sci.* 1131:12007.
- Alguacil, M.M., Lumini, E., Roldan, A., Salinas-Garcia, J.R., Bonfante, P. and Bianciotto, V. 2008. The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. *Ecol. Appl.* 18:527–536.
- Anjum, S.A., Raza, M.M., Ullah, S., Yousaf, M.M., Mujtaba, A., Hussain, M., Shah, M.J., Ahmad, B. and Ahmad, I. 2019. Influence of different tillage practices on yield of autumn planted maize (*Zea mays* L.). *Pak J Agric Sci* 32:293–301.
- Anusha, K., Gopal, K.S. and Ajithkumar, B. 2022. *Funneliformis mosseae* enhanced growth, tuber yield and P-uptake of *Solenostemon rotundifolius* under acidic and lateritic soil of



- Kerala. *J Trop Agric* 59:236–244.
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R. and Weber, L. 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 75:129–137.
- Asenso, E., Hu, L., Issaka, F., Tian, K., Zhang, L., Zhang, L., Zeng, J., Zhu, Y.F. and Li, J. 2019. Four tillage method assessments on soil organic carbon, total nitrogen, biological activities, and maize grain yield in Southern China. *Food Energy Secur.* 8:e176.
- Avio, L., Pellegrino, E., Bonari, E. and Giovannetti, M. 2006. Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytol.* 172:347–357.
- Aye, P.P., Pinjai, P. and Tawornpruek, S. 2021. Effect of phosphorus solubilizing bacteria on soil available phosphorus and growth and yield of sugarcane. *Walailak J Sci Technol* 18:10754.
- Azaroual, S.E., Hazzoumi, Z., Mernissi, N.E., Aasfar, A., Meftah Kadmiri, I. and Bouizgarne, B. 2020. Role of inorganic phosphate solubilizing *bacilli* isolated from moroccan phosphate rock mine and rhizosphere soils in wheat (*Triticum aestivum* L) phosphorus uptake. *Curr. Microbiol.* 77:2391–2404.
- Azaroual, S.E., Kasmi, Y., Aasfar, A., Arroussi, H.E., Zeroual, Y., Kadiri, Y.E., Zrhidri, A., Elfahime, E., Sefiani, A. and Kadmiri, I.M. 2022. Investigation of bacterial diversity using 16S rRNA sequencing and prediction of its functionalities in Moroccan phosphate mine ecosystem. *Sci. Rep.* 12:3741.
- Aziz, I., Bangash, N., Mahmood, T. and Islam, K.R. 2015. Impact of no-till and conventional tillage practices on soil chemical properties. *Pak J Bot* 47:297–303.
- Baboshin, M., Akimov, V., Baskunov, B., Born, T.L., Khan, S.U. and Golovleva, L. 2008. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. VKM B-2434. *Biodegradation* 19:567–576.
- Balota, E.L. and Chaves, J.C.D. 2010. Enzymatic activity and mineralization of carbon and nitrogen in soil cultivated with coffee and green manures. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34:1573–1583.

- Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y. and Dhiba, D. 2018. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Front. Microbiol.* 9:1606.
- Battie-Laclau, P., Taschen, E., Plassard, C., Dezette, D., Abadie, J., Arnal, D., Benezech, P., Duthoit, M., Pablo, A.L., Jourdan, C., Laclau, J.P., Bertrand, I., Taudière, A. and Hinsinger, P. 2019. Role of trees and herbaceous vegetation beneath trees in maintaining arbuscular mycorrhizal communities in temperate alley cropping systems. *Plant Soil* 453:153–171.
- Bi, Y., Ma, W., Xing, F., Gao, Y., Li, Z., Chen, C., Mu, X., Li, X. and Zhu, X. 2020. Diversity and specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of six plants in the Songnen grassland, China. *Écoscience* 27:11–21.
- Biermann, B. and Linderman, R.G. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol.* 95:97–105.
- Bilal, S., Hazafa, A., Ashraf, I., Alamri, S., Siddiqui, M. H., Ramzan, A., Qamar, N., Sher, F., and Naeem, M. 2021. Comparative effect of inoculation of phosphorus-solubilizing bacteria and phosphorus as sustainable fertilizer on yield and quality of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plants* 10:2079.
- Blanco-Canqui, H. and Ruis, S.J. 2018. No-tillage and soil physical environment. *Geoderma* 326:164–200.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Silva, R.D., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.X., Lofffield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian,

- S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson II, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., Hooft, J.J.J.V.D., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E. Hippel, M.V., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R. and Caporaso, J.G. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37:852–857.
- Borie, F., Rubio, R., Rouanet, J.L., Morales, A., Borie, G. and Rojas, C. 2006. Effects of tillage systems on soil characteristics, glomalin and mycorrhizal propagules in a Chilean Ultisol. *Soil Tillage Res* 88:253–261.
- Bouizgarne, B., Bakki, M., Boutasknit, A., Banane, B., Ouarrat, H.E., Maalem, S.A.E., Amenouz, A., Ghousmi, A. and Meddich, A. 2023. Phosphate and potash solubilizing bacteria from Moroccan phosphate mine showing antagonism to bacterial canker agent and inducing effective tomato growth promotion. *Front. Plant Sci.* 14:970382.
- Bowles, T.M., Jackson, L.E., Loehrer, M. and Cavagnaro, T.R. 2017. Ecological intensification and arbuscular mycorrhizas: a meta-analysis of tillage and cover crop effects. *J Appl Ecol* 54:1785–1793.
- Browne, P., Rice, O., Miller, S.H., Burke, J., Dowling, D.N., Morrissey, J.P. and O’Gara, F. 2009. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Soil Ecol.* 43:131–138.
- Brundrett, M.C., Jasper, D.A. and Ashwath, N. 1999. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia: II. The effect of nutrient levels and host species on the isolation of fungi. *Mycorrhiza* 8:315–321.
- Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N. and Zoppini, A. 2013. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* 58:216–234.
- Calcante, A. and Oberti, R. 2019. A technical-economic comparison between conventional tillage and conservative techniques in paddy-rice production practice in northern Italy.

- Agronomy 9:886.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. and Holmes, S.P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13:581–583.
- Castillo, C.G., Rubio, R., Rouanet, J.L. and Borie, F. 2006. Early effects of tillage and crop rotation on arbuscular mycorrhizal fungal propagules in an Ultisol. *Biol. Fertil. Soils* 43:83–92.
- Cerdà, A., Rodrigo-Comino, J., Yakupoğlu, T., Dindaroğlu, T., Terol, E., Mora-Navarro, G., Arabameri, A., Radziemska, M., Novara, A., Kavian, A., Vaverková, M.D. Abd-Elmabod, S.K. Hammad, H.M. and Daliakopoulos, I.N. 2020. Tillage versus no-tillage. Soil properties and hydrology in an organic persimmon farm in Eastern Iberian Peninsula. *Water* 12:1539.
- Chagnon, P.L., Bradley, R.L., Maherali, H. and Klironomos, J.N. 2013. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends Plant Sci.* 18:484–491.
- Chalise, D., Kumar, L., Sharma, R. and Kristiansen, P. 2020. Assessing the impacts of tillage and mulch on soil erosion and corn yield. *Agronomy* 10:63.
- Chao, A., Gotelli, N.J., Hsieh, T.C., Sander, E.L., Ma, K.H., Colwell, R.K. and Ellison, A.M. 2014. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol. Monogr.* 84:45–67.
- Chen, Q. and Liu, S. 2019. Identification and characterization of the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea* sp. S32 in reclamation soil in Shanxi, China. *Front. Microbiol.* 10:2171.
- Chen, J., Zhao, G., Wei, Y., Dong, Y., Hou, L. and Jiao, R. 2021. Isolation and screening of multifunctional phosphate solubilizing bacteria and its growth-promoting effect on Chinese fir seedlings. *Sci. Rep.* 11:9081.
- Chen, W., Li, P., Li, F., Xi, J. and Han, Y. 2022. Effects of tillage and biochar on soil physiochemical and microbial properties and its linkage with crop yield. *Front. Microbiol.* 13:929725.
- Chen, N., Zhao, X., Dou, S., Deng, A., Zheng, C., Cao, T., Song, Z. and Zhang, W. 2023. The Tradeoff between Maintaining Maize (*Zea mays* L.) Productivity and Improving Soil Quality under Conservation Tillage Practice in Semi-Arid Region of Northeast China. *Agriculture*

13:508.

Cornejo, P., Azcon-Aguilar, C., Barea J.M. and Ferrol, N. 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 241:265–270.

Crossay, T., Majorel, C., Redecker, D., Gensous, S, Medevielle, V., Durrieu, G., Cavaloc, Y. and Amir, H. 2019. Is a mixture of arbuscular mycorrhizal fungi better for plant growth than single-species inoculants?. *Mycorrhiza* 29:325–339.

Dai, J., Hu, J., Zhu, A., Bai, J., Wang, J. and Lin, X. 2015. No tillage enhances arbuscular mycorrhizal fungal population, glomalin-related soil protein content, and organic carbon accumulation in soil macroaggregates. *J. Soil. Sediment.* 15:1055–1062.

Damo, J.L.C., Ramirez, M.D.A., Agake, S.I., Pedro, M., Brown, M., Sekimoto, H., Yokoyama, T., Sugihara, S., Okazaki, S. and Ohkama-Ohtsu, N. 2022. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria from Paddy Field Soils in Japan. *Microbes Environ.* 37:ME21085.

Dasila, H., Sah, V. K., Jaggi, V., Kumar, A., Tewari, L., Taj, G., Chaturvedi, S., Perveen, K., Bukhari, N.A., Siang, T.C. and Sahgal, M. 2023. Cold-tolerant phosphate-solubilizing *Pseudomonas* strains promote wheat growth and yield by improving soil phosphorous (P) nutrition status. *Front. Microbiol.* 14:1135693.

Da Silva, P.C.G., Tiritan, C.S., Echer, F.R., dos Santos Cordeiro, C.F., Rebonatti, M.D. and dos Santos, C.H. 2020. No-tillage and crop rotation increase crop yields and nitrogen stocks in sandy soils under agroclimatic risk. *Field Crops Res.* 258:107947.

伊達昇 1994. 土壤標準分析・測定法. 土壤標準分析・測定法委員会編, 博友社, 東京 70–71.

De Abreu, C.S., Figueiredo, J.E.F., Oliveira-Paiva, C.A., Dos Santos, V.L., Gomes, E.A., Ribeiro, V. P., Barros, B.de A., Lana, U.G.de P. and Marriel, I.E. 2017. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genet. Mol. Res.* 16:gmr16019294.

De Amaral Leite, A., de Souza Cardoso, A.A., de Almeida Leite, R., de Oliveira-Longatti, S.M., Filho, J.F.L., de Souza Moreira, F.M. and Melo, L.C.A. 2020. Selected bacterial strains enhance phosphorus availability from biochar-based rock phosphate fertilizer. *Ann.*

- Microbiol. 70:1–13.
- De La Providencia, I.E., De Souza, F.A., Fernández, F., Delmas, N.S. and Declerck, S. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytol.* 165:261–271.
- De Pontes, J.S., Oehl, F., Pereira, C.D., De Toledo Machado, C.T., Coyne, D., Da Silva, D.K.A. and Maia, L.C. 2017. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian's Cerrado and in soybean under conservation and conventional tillage. *Appl. Soil Ecol.* 117:178–189.
- Divjot, K.O.U.R., Rana, K.L., Tanvir, K.A.U.R., Yadav, N., Yadav, A.N., Kumar, M., Kumar, V., Dhaliwal, H.S. and Saxena, A.K. 2021. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and-mobilizing microbes: A review. *Pedosphere* 31:43–75.
- Diédhiou, I., Martínez, P.P., Castro, E.M. and Ceiro-Catasú, W.G. 2022. Nitrogen level impact on the production of double row fodder of maize. *N. A. J. Adv. Res. Rev.* 2022. 13:223–230.
- Dobrzyński, J., Wierzchowski, P.S., Stępień, W. and Górska, E.B. 2021. The reaction of cellulolytic and potentially cellulolytic spore-forming bacteria to various types of crop management and farmyard manure fertilization in bulk soil. *Agronomy* 11:772.
- Doilom, M., Guo, J.W., Phookamsak, R., Mortimer, P.E., Karunarathna, S.C., Dong, W., Liao, C.F., Yan, K., Pem, D., Suwannarach, N., Promputtha, I., Lumyong, S. and Xu, J.C. 2020. Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. *Front. Microbiol.* 11:585215.
- Drijber, R.A. and Jeske, E.S. 2019. Polarity of chloroform eluent critical to quantification of arbuscular mycorrhizal biomass in soil using the neutral lipid fatty acid biomarker C16:1*cis*11. *Soil Biol. Biochem.* 138:107582.
- Erdel, E. 2022. Soil Enzyme Activities Affecting by Different Tillage Systems and Cover Crops Following Corn Cultivation. *JIST* 12:1134–1142.
- Etesami, H. 2020. Enhanced phosphorus fertilizer use efficiency with microorganisms. Nutrient dynamics for sustainable crop production. 215–245.
- Fierer, N. 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil

- microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 15:579–590.
- Fitriatin, B.N., Sofyan, E.T. and Turmuktini, T. 2021. Increasing soil P and yield of upland rice through application phosphate solubilizing microbes. *Haya: Saudi J. Life Sci.* 6:163–167.
- Foster, K.R. and Bell, T. 2012. Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Curr. Biol.* 22:1845–1850.
- 外務省 2023. 持続可能な開発目標（SDGs）達成に向けて日本が果たす役割 [https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/oda/sdgs/pdf/sdgs\\_gaiyou\\_202305.pdf](https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/oda/sdgs/pdf/sdgs_gaiyou_202305.pdf) (2023.9.15 閲覧).
- Gajda, A.M., Czyż, E.A., Dexter, A.R., Furtak, K.M., Grządziel, J. and Stanek-Tarkowska, J. 2018. Effects of different soil management practices on soil properties and microbial diversity. *Int Agrophys* 32:81.
- Gao, X., Guo, H., Zhang, Q., Guo, H., Zhang, L., Zhang, C., Gou, Z., Liu, Y., Wei, J., Chen, A., Chu, Z. and Zeng, F. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) enhanced the growth, yield, fiber quality and phosphorus regulation in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Sci. Rep.* 10:1–12.
- García-Bayona, L. and Comstock, L.E. 2018. Bacterial antagonism in host-associated microbial communities. *Science* 361:eaat2456.
- Gardes, M. and Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113–118.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84:489–500.
- Giovannetti, M., Azzolini, D. and Citernesi, A.S. 1999. Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5571–5575.
- Giovannetti, M. 2008. Structure, extent and functional significance of belowground arbuscular mycorrhizal networks. *Mycorrhiza* 59–72.
- Gomez-Ramirez, L.F. and Uribe-Velez, D. 2021. Phosphorus solubilizing and mineralizing *Bacillus* spp. contribute to rice growth promotion using soil amended with rice straw. *Curr.*

- Microbiol. 78:932–943.
- Gosling, P., Jones, J., Bending, G.D. 2016. Evidence for functional redundancy in arbuscular mycorrhizal fungi and implications for agroecosystem management. *Mycorrhiza* 26:77–83.
- Gu, S., Wu, S., Guan, Y., Zhai, C., Zhang, Z., Bello, A., Guo, X. and Yang, W. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungal community was affected by tillage practices rather than residue management in black soil of northeast China. *Soil Tillage Res* 198:104552.
- Guan, D., Al-Kaisi, M.M., Zhang, Y., Duan, L., Tan, W., Zhang, M. and Li, Z. 2014. Tillage practices affect biomass and grain yield through regulating root growth, root-bleeding sap and nutrients uptake in summer maize. *Field Crops Res.* 157:89–97.
- Guan, D., Zhang, Y., Al-Kaisi, M.M., Wang, Q., Zhang, M. and Li, Z. 2015. Tillage practices effect on root distribution and water use efficiency of winter wheat under rain-fed condition in the North China Plain. *Soil Tillage Res* 146:286–295.
- Guan, Y., Xu, B., Zhang, X. and Yang, W. 2022. Tillage practices and residue management manipulate soil bacterial and fungal communities and networks in maize agroecosystems. *Microorganisms* 10:1056.
- Guo, L., Zhang, L., Liu, L., Sheng, F., Cao, C. and Li, C. 2021. Effects of long-term no tillage and straw return on greenhouse gas emissions and crop yields from a rice-wheat system in central China. *Agric Ecosyst Environ* 322:107650.
- Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B. and Tewari, R. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiol. Res.* 167:358–363.
- Haddadi, M.H. 2016. The effects of tillage system and varieties on yield and yield components of corn (*Zea mays* L.). *Intl J Farm Alli Sci* 5:16–20.
- Hart, M.M. and Reader, R.J. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 153:335–344.
- Hart, M.M. and Reader, R.J. 2004. Do arbuscular mycorrhizal fungi recover from soil disturbance differently?. *Trop Ecol* 45:97–112.
- 長谷川元洋 2006. 土壤動物群集の研究における座標付け手法の活用. *Edaphologia* 80:35–64.



- Hayano, K. 1973. A method for the determination of  $\beta$ -glucosidase activity in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 19:103–108.
- He, J., Li, H., Rasaily, R. G., Wang, Q., Cai, G., Su, Y., Qiao, X. and Liu, L. 2011. Soil properties and crop yields after 11 years of no tillage farming in wheat–maize cropping system in North China Plain. *Soil Tillage Res* 113:48–54.
- He, J., Du, L., Zhai, C., Guan, Y., Wu, S., Zhang, Z., Ogundeji, A.O. and Gu, S. 2021. Influence of tillage practices on phosphorus forms in aggregates of Mollisols from northeast China. *J. Sci. Food Agric.* 101:4523–4531.
- Helgason, T., Daniell, T.J., Husband, R., Fitter A.H. and Young, J.P.W. 1998. Ploughing up the wood-wide web?. *Nature* 394:431.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R. and Peterson, S.B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:15–25.
- Higo, M., Takahashi, Y., Gunji, K. and Isobe, K. 2018a. How are arbuscular mycorrhizal associations related to maize growth performance during short-term cover crop rotation? *J. Sci. Food Agric.* 98:1388–1396.
- Higo, M., Sato, R., Serizawa, A., Takahashi, Y., Gunji, K., Tatewaki, Y. and Isobe, K. 2018b. 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.
- Holden, J., Grayson, R., Berdeni, D., Bird, S., Chapman, P., Edmondson, J., Firbank, L., Helgason, T., Hodson, M.E. and Hunt, S. 2019. The role of hedgerows in soil functioning within agricultural landscapes. *Agric Ecosyst Environ* 273:1–12.
- Hong, Y., Zhao, D., Zhang, F., Shen, G., Yuan, Y., Gao, Y., Yan, L., Wei, D. and Wang, W. 2021. Soil water-stable aggregates and microbial community under long-term tillage in black soil of Northern China. *Ecotoxicology* 30:1754–1768.
- Hoorman, J.J. 2016. *Role of Soil Bacteria: Update and Revision.*
- Hsieh, T.C., Ma, K.H. and Chao, A. 2019. iNEXT: iNterpolation and EXTrapolation for species diversity. R package version 2.0.19.
- Hu, A.Y., Xu, S.N., Qin, D.N., Li, W. and Zhao, X.Q. 2020. Role of silicon in mediating

- phosphorus imbalance in plants. *Plants* 10:51.
- Huang, B., Wang, M., Jin, X., Zhang, Y. and Hu, G. 2020. Effects of different tillage measures on soil microbes and enzymatic activity. *Nat. Environ. Pollut. Technol.* 19:1443–1452.
- Hussain, A., Adnan, M., Iqbal, S., Fahad, S., Saeed, M., Mian, I.A., Muhammad, M.W., Romman, M., Wahid, F., Subhan, F., Raza, M.A., Zamin, M., Ullah, F., Rehmanand, K.U. and Andaleeb, S. 2019. Combining phosphorus (P) with phosphate solubilizing bacteria (PSB) improved wheat yield and P uptake in alkaline soil. *PAB* 8:1809–1817.
- Ihrmark, K., Bödeker, I.T., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K.E. and Lindahl, B.D. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82:666–677.
- 石井忠雄・早野恒一 1974. 土壌のフォスフォジエステラーゼ活性の測定法. *土肥誌* 45:505–508.
- Islam, M.K., Sano, A., Majumder, M.S.I., Hossain, M.A. and Sakagami, J.I. 2019. Isolation and molecular characterization of phosphate solubilizing filamentous fungi from subtropical soils in Okinawa. *Appl Ecol Environ Res* 17:9145–9157.
- Ismail, I., Blevins, R.L. and Frye, W.W. 1994. Long-term no-tillage effects on soil properties and continuous corn yields. *Soil Sci Soc Am J* 58:193–198.
- Isobe, K., Higo, M., Kondo, T., Sato, N., Takeyama, S. and Torigoe, Y. 2014. Effect of winter crop species on arbuscular mycorrhizal fungal colonization and subsequent soybean yields. *Plant Prod. Sci.* 17:260–267.
- Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I. and Frossard, E. 2002. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12:225–234.
- Jansa, J., Mozafar, A., Kuhn, G., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I.R. and Frossard, E. 2003. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecol. Appl.* 13:1164–1176.
- Jansa, J., Smith, F.A. and Smith, S.E. 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi?. *New Phytol.* 177:779–789.

- Jasper, D.A., Abbott, L.K. and Robson, A.D. 1991. The effect of soil disturbance on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soils from different vegetation types. *New Phytol.* 118:471–476.
- Ji, B., Hu, H., Zhao, Y., Mu, X., Liu, K. and Li, C. 2014. Effects of deep tillage and straw returning on soil microorganism and enzyme activities. *Sci. World J.* 2014:1–12.
- Jia, Z., Zhao, L., Zhang, J., Jiang, W., Wei, M., Xu, X., Jiang, Y. and Ge, S. 2022. Glucose increases the abundance of phosphate solubilizing bacterial community for better apple seedling growth and phosphate uptake. *Agronomy* 12:1181.
- Jin, K., Sleutel, S., Buchan, D., De Neve, S., Cai, D.X., Gabriels, D. and Jin, J.Y. 2009. Changes of soil enzyme activities under different tillage practices in the Chinese Loess Plateau. *Soil Tillage Res* 104:115–120.
- Jindo, K., Audette, Y., Olivares, F.L., Canellas, L.P., Smith, D.S. and Paul Voroney, R. 2023. Biotic and abiotic effects of soil organic matter on the phytoavailable phosphorus in soils: A review. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 10:1–12.
- Juntahum, S., Ekprasert, J. and Boonlue, S. 2022. Efficiency of Arbuscular Mycorrhizal Fungi for the Growth Promotion of Sugarcane Under Pot Conditions. *Sugar Tech* 24:1738–1747.
- Kabir, Z., O'halloran, I.P, Fyles, J.W. and Hamel, C. 1997. Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: hyphal density and mycorrhizal root colonization. *Plant Soil* 192:285–293.
- Kalayu, G. 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *Int. J. Agron.* 2019:1–7.
- 唐澤敏彦 2004. 輪作におけるアーバスキュラー菌根菌の動態と作物の生育に関する研究, 北海道農研報 179:1–71.
- Karasawa, T. and Takahashi, S. 2015. Introduction of various cover crop species to improve soil biological P parameters and P uptake of the following crops. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 103:15–28.
- Kaur, S., Campbell, B.J. and Suseela, V. 2022. Root metabolome of plant–arbuscular mycorrhizal symbiosis mirrors the mutualistic or parasitic mycorrhizal phenotype. *New Phytol.* 234:672–687.

- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41:e1.
- 小八重善裕 2020. 植物の土壌からの有機的なリン酸吸収メカニズム. *土肥誌*, 91: 455–463.
- Kotroczó, Z., Veres, Z., Fekete, I., Krakomperger, Z., Tóth, J. A., Lajtha, K. and Tóthmérész, B. 2014. Soil enzyme activity in response to long-term organic matter manipulation. *Soil Biol. Biochem.* 70:237–243.
- Kowalchuk, G.A., De Souza, F.A. and Veen, J.A.V. 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol. Ecol.* 11:571–581.
- Koyama, T., Adachi, K. and Suzuki, T. 2019. Response of soybean plants to two inoculation methods with arbuscular mycorrhizal fungus of *Glomus* sp. strain R-10 under field condition. *Plant Prod. Sci.* 22:215–219.
- Kumar, K., Yadava, P., Gupta, M., Choudhary, M., Jha, A.K., Wani, S.H., Dar, Z.A., Kumar, B. and Rakshit, S. 2022. Narrowing down molecular targets for improving phosphorus-use efficiency in maize (*Zea mays* L.). *Mol. Biol. Rep.* 49:12091–12107.
- Kurm, V., Schilder, M.T., Haagsma, W.K., Bloem, J., Scholten, O.E. and Postma, J. 2023. Reduced tillage increases soil biological properties but not suppressiveness against *Rhizoctonia solani* and *Streptomyces scabies*. *Appl. Soil Ecol.* 181:104646.
- Kyaw, E.P., Lynn, T.M., Thant, S., Aung, N.N., Oo, N.N., Win, K.K. and Yu, S.S. 2022. Identification and Characterisation of the Salt Tolerant Phosphate-Solubilising Bacterial Isolates for Enhancing Soil Fertility. *APJORD* 32:37–53.
- Lawlor, D.W., Lemaire, G. and Gastal, F. 2001. Nitrogen, plant growth and crop yield. *Plant nitrogen*, 343–367. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Li, L., Li, T. and Zhao, Z. 2007. Differences of arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community; between a cultivated land, an old field, and a never cultivated field in a hot and arid ecosystem of southwest China. *Mycorrhiza* 17:655–665.
- Li, Y., Zhang, J., Zhang, J., Xu, W. and Mou, Z. 2019. Characteristics of inorganic phosphate-

- solubilizing bacteria from the sediments of a eutrophic lake. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16:2141.
- Li, J., Wang, Y.K., Guo, Z., Li, J.B., Tian, C., Hua, D.W., Shi, C.D., Wang, H.Y., Han, J.C. and Xu, Y. 2020. Effects of conservation tillage on soil physicochemical properties and crop yield in an arid Loess Plateau, China. *Sci. Rep.* 10:4716.
- Li, Z., Zhang, Q., Qiao, Y., Du, K., Li, Z., Tian, C., Zhu, N., Leng, P., Yue, Z., Cheng, H. and Li, F. 2022a. Influence of straw mulch and no-tillage on soil respiration, its components and economic benefit in a Chinese wheat–maize cropping system. *Glob. Ecol. Conserv.* 34:e02013.
- Li, F., Zhang, X., Xu, D., Ma, Q., Le, T., Zhu, M., Li, C., Zhu, X., Guo, W. and Ding, J. 2022b. No-Tillage Promotes Wheat Seedling Growth and Grain Yield Compared with Plow–Rotary Tillage in a Rice–Wheat Rotation in the High Rainfall Region in China. *Agronomy* 12:865.
- Liu, S., Zhang, X.Y., Yang, J. and Drury, C.F. 2012. Effect of conservation and conventional tillage on soil water storage, water use efficiency and productivity of corn and soybean in Northeast China. *Acta Agric Scand B Soil Plant Sci* 63:383–394.
- Liu, F., Xu, Y., Jiang, H., Jiang, C., Du, Y., Gong, C., Wang, W., Zhu, S., Han, G. and Cheng, B. 2016. Systematic identification, evolution and expression analysis of the *Zea mays* *PHT1* gene family reveals several new members involved in root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Int. J. Mol. Sci.* 17:930.
- Liu, H., Xiong, W., Zhang, R., Hang, X., Wang, D., Li, R. and Shen, Q. 2018. Continuous application of different organic additives can suppress tomato disease by inducing the healthy rhizospheric microbiota through alterations to the bulk soil microflora. *Plant Soil* 423:229–240.
- Liu, X., Li, Q., Li, Y., Guan, G. and Chen, S. 2019. *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. *PeerJ* 7:e7445.
- Liu, Y.X., Sun, J.H., Zhang, F.F. and Li, L. 2020. The plasticity of root distribution and nitrogen uptake contributes to recovery of maize growth at late growth stages in wheat/maize intercropping. *Plant Soil* 447:39–53.

- Liu, W., Ma, K., Wang, X., Wang, Z. and Negrete-Yankelevich, S. 2022. Effects of no-tillage and biologically-based organic fertilizer on soil arbuscular mycorrhizal fungal communities in winter wheat field. *Appl. Soil Ecol.* 178:104564.
- Lu, X., Lu, X. and Liao, Y. 2018. Effect of tillage treatment on the diversity of soil arbuscular mycorrhizal fungal and soil aggregate-associated carbon content. *Front. Microbiol.* 9:2986.
- Lu, J., Qiu, K., Li, W., Wu, Y., Ti, J., Chen, F. and Wen, X. 2019. Tillage systems influence the abundance and composition of autotrophic CO<sub>2</sub>-fixing bacteria in wheat soils in North China. *Eur. J. Soil Biol.* 93:103086.
- Lucero, C.T., Lorda, G.S., Anzuay, M.S., Ludueña, L.M. and Taurian, T. 2021. Peanut endophytic phosphate solubilizing bacteria increase growth and P content of soybean and maize plants. *Curr. Microbiol.* 78:1961–1972.
- Lynch, J.P. and Brown, K.M. 2008. Root strategies for phosphorus acquisition. In *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions.* 83–116, Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Ma, G., Kang, J., Wang, J., Chen, Y., Lu, H., Wang, L., Wang, C., Xie, Y., Ma, D. and Kang, G. 2020. Bacterial community structure and predicted function in wheat soil from the North China plain are closely linked with soil and plant characteristics after seven years of irrigation and nitrogen application. *Front. Microbiol.* 11:506.
- Ma, X., Xu, X., Geng, Q., Luo, Y., Ju, C., Li, Q. and Zhou, Y. 2023. Global arbuscular mycorrhizal fungal diversity and abundance decreases with soil available phosphorus. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 32:1423–1434.
- Mahanta, D., Rai, R.K., Dhar, S., Varghese, E., Raja, A. and Purakayastha, T.J. 2018. Modification of root properties with phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhiza to reduce rock phosphate application in soybean-wheat cropping system. *Ecol. Eng.* 111:31–43.
- Maher, H., Moussadek, R., Zouahri, A., Douaik, A., Dakak, H., Moudane, M.E.l. and Ghanimi, A. 2020. Effect of no tillage on the physico-chemical properties of soils of the El Koudia region, Rabat (Morocco). *E3S Web Conf.* 150:3010.
- Maherali, H. and Klironomos, J.N. 2012. Phylogenetic and trait-based assembly of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Plos One* 7:e36695.

- Mairghany, M., Yahya, A., Adam, N.M., Su, A.S.M., Aimrun, W. and Elsoragaby, S. 2019. Rotary tillage effects on some selected physical properties of fine textured soil in wetland rice cultivation in Malaysia. *Soil Tillage Res* 194:104318.
- Malobane, M.E., Nciizah, A.D., Nyambo, P., Mudau, F.N. and Wakindiki, I.I. 2020. Microbial biomass carbon and enzyme activities as influenced by tillage, crop rotation and residue management in a sweet sorghum cropping system in marginal soils of South Africa. *Heliyon* 6:e05513.
- Mander, C., Wakelin, S., Young, S., Condron, L. and O’Callaghan, M. 2012. Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* 44:93–101.
- Mardamootoo, T., Du Preez, C.C. and Barnard, J.H. 2021. Phosphorus management issues for crop production: A review. *Afr. j. agric. res.* 17:939–952.
- Mariotte, P., Mehrabi, Z., Bezemer, T.M., De Deyn, G.B., Kulmatiski, A., Drigo, B., Veen, G.C., Van der Heijden, M.G. and Kardol, P. 2018. Plant–soil feedback: bridging natural and agricultural sciences. *Trends Ecol. Evol.* 33:129–142.
- Martínez-Hidalgo, P., Humm, E.A., Still, D.W., Shi, B., Pellegrini, M., de la Roca, G., Veliz, E., Maymon, M., Bru, P., Huntemann, M., Clum, M., Palaniappan, K., Varghese, N., Mukherjee, S., Reddy, T.B.K., Daum, C., Ivanova, N.N., Kyrpides, N.C., Shapiro, N., Eloe-Fadrosh, E.A. and Hirsch, A. M. 2022. *Medicago* root nodule microbiomes: insights into a complex ecosystem with potential candidates for plant growth promotion. *Plant Soil*:1–20.
- Mayadunna, N., Karunarathna, S.C., Asad, S., Stephenson, S.L., Elgorban, A.M., Al-Rejaie, S., Kumla, J., Yapa, N., and Suwannarach, N. 2023. Isolation of Phosphate-Solubilizing Microorganisms and the Formulation of Biofertilizer for Sustainable Processing of Phosphate Rock. *Life* 13:782.
- McLauchlan, K. 2006. The nature and longevity of agricultural impacts on soil carbon and nutrients: a review. *Ecosystems* 9:1364–1382.
- McLachlan, J.W., Guppy, C.N. and Flavel, R.J. 2021. Differences in phosphorus acquisition and critical phosphorus requirements among nine *Desmanthus* spp. genotypes. *Crop Pasture Sci* 72:742–753.

- Mhlanga, B., Ercoli, L., Piazza, G., Thierfelder, C. and Pellegrino, E. 2022. Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising off-season and in-season weeds and their relationship with maize yield under conservation agriculture. *Biol. Fertil. Soils* 58:917–935.
- Mirás-Avalos, J.M., Antunes, P.M., Koch, A., Khosla, K., Klironomos, J.N., Dunfield, K.E. 2011. The influence of tillage on the structure of rhizosphere and root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Pedobiologia* 54:235–241.
- Mitchell, J.P., Shrestha, A., Mathesius, K., Scow, K.M., Southard, R.J., Haney, R.L., Schmidt, R., Munk, D.S. and Horwath, W.R. 2017. Cover cropping and no-tillage improve soil health in an arid irrigated cropping system in California’s San Joaquin Valley, USA. *Soil Tillage Res* 165:325–335.
- Montesdeoca, F., Ávila, M., Quishpe, J., Borie, F., Cornejo, P., Aguilera, P., Alvarado, S. and Espinosa, J. 2020. Early changes in the transition from conventional to no-tillage in a volcanic soil cultivated with beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chil. J. Agric. Anim. Sci.* 36:181–189.
- Munkvold, L., Kjølner, R., Vestberg, M., Rosendahl, S. and Jakobsen, I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 164:357–364.
- Murphy, J. and Riley, A.J. 1958. A single-solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.* 37:9–14.
- Mäder, P., Fliessbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P. and Niggli, U. 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296:1694–1697.
- Nacoon, S., Jogloy, S., Riddech, N., Mongkolthanasak, W., Ekprasert, J., Cooper, J. and Boonlue, S. 2021. Combination of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria on growth and production of *Helianthus tuberosus* under field condition. *Sci. Rep.* 11:6501.
- Nacoon, S., Seemakram, W., Ekprasert, J., Jogloy, S., Kuyper, T. W., Mongkolthanasak, W., Riddech, N., Somdee, T. and Boonlue, S. 2022. Promoting growth and production of sunchoke (*Helianthus tuberosus*) by co-inoculation with phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi under drought. *Front. Plant Sci.* 13:1–18.



- Nagy, R., Vasconcelos, M.J.V., Zhao, S., McElver, J., Bruce, W., Amrhein, N., Raghothama, K.G. and Bucher, M. 2006. Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.). *Plant Biol* 8:186–197.
- Naing, K.W., Anees, M., Kim, S.J., Nam, Y., Kim, Y.C. and Kim, K.Y. 2014. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Ann. Microbiol.* 64:55–63.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L. and Renella, G. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. *Phosphorus in action: biological processes in soil phosphorus cycling* 26:215–243.
- Neogi, S., Bhattacharyya, P., Roy, K.S., Panda, B.B., Nayak, A.K., Rao, K.S. and Manna, M.C. 2014. Soil respiration, labile carbon pools, and enzyme activities as affected by tillage practices in a tropical rice–maize–cowpea cropping system. *Environ. Monit. Assess.* 186:4223–4236.
- Nikitin, D.A., Ivanova, E.A., Zhelezova, A.D., Semenov, M.V., Gadzhumarov, R.G., Tkhakakhova, A.K. Chernov, T.I., Ksenofontova, N.A. and Kutovaya, O.V. 2020. Assessment of the impact of no-till and conventional tillage technologies on the microbiome of southern agrochernozems. *Eurasian Soil Sci.* 53:1782–1793.
- Ning, Y., Xiao, Z., Weinmann, M. and Li, Z. 2019. Phosphate uptake is correlated with the root length of celery plants following the association between arbuscular mycorrhizal fungi, *Pseudomonas* sp. and biochar with different phosphate fertilization levels. *Agronomy* 9:824.
- Njeru, E.M., Avio, L., Sbrana, C., Turrini, A., Bocci, G., Barberi, P. and Giovannetti, M. 2014. First evidence for a major cover crop effect on arbuscular mycorrhizal fungi and organic maize growth. *Agron Sustain Dev* 34:841–848.
- 農林水産省 2021. みどりの食料システム戦略トップページ  
<https://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyo/seisaku/midori/> (2023.6.1 閲覧).
- 農林水産省 2022. 飼料をめぐる情勢 畜産局飼料課  
[https://www.maff.go.jp/chushi/seisan/chikuan/attach/pdf/siryoku\\_kennsyuukai-23.pdf](https://www.maff.go.jp/chushi/seisan/chikuan/attach/pdf/siryoku_kennsyuukai-23.pdf)  
(2023.5.30 閲覧).
- 農林水産省 2023a. 世界の飼料生産の概況

- [https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j\\_rep/monthly/attach/pdf/r4index-35.pdf](https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j_rep/monthly/attach/pdf/r4index-35.pdf) (2023.6.2 閲覧).
- 農林水産省 2023b. 飼料をめぐる情勢 (データ版) 畜産局飼料課・消費・安全局畜水産安全管理課 [https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_siryu/attach/pdf/index-908.pdf](https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryu/attach/pdf/index-908.pdf) (2023.6.1 閲覧).
- 農林水産省 2023c. 作況調査 (水陸稲, 麦類, 大豆, そば, かんしょ, 飼料作物, 工芸農作物) [https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_kome/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html) (2023.6.1 閲覧).
- 農林水産省 2023d. 肥料をめぐる情勢 農産局技術普及課 [https://www.maff.go.jp/j/seisan/sien/sizai/s\\_hiryu/attach/pdf/index-1.pdf](https://www.maff.go.jp/j/seisan/sien/sizai/s_hiryu/attach/pdf/index-1.pdf) (2023.6.2 閲覧).
- Nwachukwu, C.P., Orakwe, L.C., Nwajinka, C.O., Umembamalu, C.J. and Anizoba, D.C. 2020. Effects of Tillage Methods and Soil Depths on Soil Chemical Properties in South Eastern Nigeria. *JAET* 25:79–94.
- Nyamwange, M.M.E., Njeru, E.M. and Mucheru-Muna, M. 2021. Tillage, mulching and nitrogen fertilization differentially affects soil microbial biomass, microbial populations and bacterial diversity in a maize cropping system. *Front. Sustain. Food Syst.* 5:614527.
- 小原洋・高田裕介・神山和則・大倉利明・前島勇治・若林正吉・神田隆志 2016. 包括的土壌分類第1次試案に基づいた1/20万日本土壌図. *農環研報* 37:133–148.
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Boller, T. and Wiemken, A. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2816–2824.
- Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, K., Boller, T. and Wiemken, A. 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138:574–583.
- Oehl, F. and Koch, B. 2018. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in no-till and conventionally tilled vineyards. *J. Appl. Bot. Food. Qual.* 91:56–60.
- 大友量・酒井治・塚本康貴・杉戸智子・谷藤健・岡紀邦 2015. 北海道のダイズ作における輪作順序を考慮したリン酸減肥法. *土肥誌* 86:549–552.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R.,

- O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E. and Wagner, H. 2019. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6.
- Omara, P., Aula, L., Eickhoff, E.M., Dhillon, J.S., Lynch, T., Wehmeyer, G.B. and Raun, W. 2019. Influence of no-tillage on soil organic carbon, total soil nitrogen, and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) grain yield. *Int. J. Agron.* 2019:1–9.
- Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J.M., Reier, Ü and Zobel, M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *New Phytol.* 188:223–241.
- Ordoñez, Y.M., Fernandez, B.R., Lara, L.S., Rodriguez, A., Uribe-Velez, D. and Sanders, I.R. 2016. Bacteria with phosphate solubilizing capacity alter mycorrhizal fungal growth both inside and outside the root and in the presence of native microbial communities. *Plos One* 11:e0154438.
- 大園享司・門祐太 2021. リン溶解菌の機能的多様性. 同志社大学ハリス理化学研究報告= The Harris science review of Doshisha University, 61:221–229.
- 大竹久夫 2019. リンのはなし: 生命現象から資源・環境問題まで. 朝倉書店, 東京 29–44.
- Palai, J.B., Jena, J. and Lenka, S.K. 2020. Growth, yield and nutrient uptake of maize as affected by zinc application—A review. *Ind. J. Pure App. Biosci.* 8:332–339.
- Pande, A., Kaushik, S., Pandey, P. and Negi, A. 2020. Isolation, characterization, and identification of phosphate-solubilizing *Burkholderia cepacia* from the sweet corn cv. Golden Bantam rhizosphere soil and effect on growth-promoting activities. *Int. J. Veg. Sci.* 26:591–607.
- Parada, A.E., Needham, D.M. and Fuhrman, J.A. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* 18:1403–1414.
- Patanita, M., Campos, M.D., Félix, M.D.R., Carvalho, M. and Brito, I. 2020. Effect of tillage system and cover crop on maize mycorrhization and presence of *Magnaportheopsis maydis*. *Biology* 9:46.
- Paul, P.L.C., Bell, R.W., Barrett-Lennard, E.G. and Kabir, E. 2021. Impact of rice straw mulch

- on soil physical properties, sunflower root distribution and yield in a salt-affected clay-textured soil. *Agriculture* 11:264.
- Pellegrino, E., Gamper, H.A., Ciccolini, V. and Ercoli, L. 2020. Forage rotations conserve diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and soil fertility. *Front. Microbiol.* 2969.
- Peng, Q., Xiao, Y., Zhang, S., Zhou, C., Xie, A., Li, Z., Tan, A., Zhou, L., Xie, Y., Zhao, J., Wu, C., Luo, L., Huang, L., He, T. and Sun, R. 2022. Mutation breeding of *Aspergillus niger* by atmospheric room temperature plasma to enhance phosphorus solubilization ability. *PeerJ* 10:e13076.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17:362–370.
- Pittelkow, C.M., Linnquist, B.A., Lundy, M.E., Liang, X., Van Groenigen, K.J., Lee, J., Gestel, N.V., Six, J., Venterea, R.T. and Van Kessel, C. 2015. When does no-till yield more? A global meta-analysis. *Field Crops Res.* 183:156–168.
- Prakash, O., Green, S.J., Jasrotia, P., Overholt, W.A., Canion, A., Watson, D.B., Brooks, S.C. and Kostka, J.E. 2012. *Rhodanobacter denitrificans* sp. nov., isolated from nitrate-rich zones of a contaminated aquifer. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:2457–2462.
- Prakash, J. and Arora, N.K. 2019. Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. *3 Biotech* 9:126.
- Qarni, A., Billah, M., Hussain, K., Shah, S.H., Ahmed, W., Alam, S., Sheikh, A.A., Jafri, L., Munir A., Malik, K.M. and Khan, N. 2021. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from rock phosphate mines and their potential effect for sustainable agriculture. *Sustainability* 13:2151.
- Raghothama, K.G. and Karthikeyan, A.S. 2005. Phosphate acquisition. *Plant Soil* 274:37–49.
- Raju, P.S., Clark, R.B., Ellis, J.R. and Maranville, J.W. 1990. Effects of species of VA-mycorrhizal fungi on growth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. *Plant Soil* 121:165–170.
- Rangel - Castro, J.I., Prosser, J.I., Ostle, N., Scrimgeour, C.M., Killham, K. and Meharg, A.A. 2005. Flux and turnover of fixed carbon in soil microbial biomass of limed and unlimed plots of an upland grassland ecosystem. *Environ. Microbiol.* 7:544–552.

- Raymond, N.S., Jensen, L.S., van der Bom, F., Nicolaisen, M.H. and Müller-Stöver, D. 2019. Fertilising effect of sewage sludge ash inoculated with the phosphate-solubilising fungus *Penicillium bilaiae* under semi-field conditions. *Biol. Fertil. Soils* 55:43–51.
- Ren, B., Li, X., Dong, S., Liu, P., Zhao, B. and Zhang, J. 2018. Soil physical properties and maize root growth under different tillage systems in the North China Plain. *The Crop Journal*, 6:669–676.
- Rezakhani, L., Motesharezadeh, B., Tehrani, M.M., Etesami, H. and Hosseini, H.M. 2022. The effect of silicon fertilization and phosphate-solubilizing bacteria on chemical forms of silicon and phosphorus uptake by wheat plant in a calcareous soil. *Plant Soil* 477:259–280.
- Rillig, M.C. 2004. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecol. Lett.* 7:740–754.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319–339.
- Rodríguez, F.C., Otto, R. and Fernández-Palacios, J.M. 2022. Changes in soil chemical properties and plant species composition during primary succession on an oceanic island. *J. Veg. Sci.* 33:e13137.
- Rosa, D., Pogiatis, A., Bowen, P., Kokkoris, V., Richards, A., Holland, T. and Hart, M. 2020. Performance and establishment of a commercial mycorrhizal inoculant in viticulture. *Agriculture* 10:539.
- Roy, D., Sinha, A., Rao, K., Rakesh, S., Sahoo, S., Mukhopadhyay, P., Bhattacharya, P.M., Ghosh, A. and Mukherjee, P. 2021. Short term effect of tillage, residue and biofertilizer on some physicochemical soil attributes under teraiagro-ecological zone of West Bengal, India: Effect of tillage, residue and biofertilizer on physicochemical soil attributes under teraiagro-ecological zone. *JAS*, 8:318–324.
- Rozpądek, P., Rapała-Kozik, M., Wężowicz, K., Grandin, A., Karlsson, S., Ważny, R., Anielska, R. and Turnau, K. 2016. Arbuscular mycorrhiza improves yield and nutritional properties of onion (*Allium cepa*). *Plant Physiol. Biochem.* 107:264–272.
- Ruangsanaka, S. 2014. Identification of phosphate-solubilizing bacteria from the bamboo rhizosphere. *Sci. Asia* 40:204–211.

- Saeed, M.S. and Saeed, A. 2020. Health benefits of maize crop an overview. *Curr Res Agric Farming* 1:5–8.
- 斎藤雅典 1992. 新編土壤微生物実験法. 土壤微生物研究会編, 養賢堂, 東京 297–311.
- Sakariyawo, O.S., Mogaji, A.A., Adeyemi, N.O., Atayese, M.O. and Lawal, I.O. 2019. Performance of maize (*Zea mays* L.) cultivars and community structure of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in response to tillage practices and soil amendments in a derived Savanna. *Acta fytotechn zotechn*, 22:114–23.
- Sarkodee-Addo, E., Yasuda, M., Lee, C.G., Kanasugi, M., Fujii, Y., Omari, R.A., Abebrese, S.O., Bam, R., Asuming-Brempong, S., Dastogeer, K.M.G. and Okazaki, S. 2020. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Rice (*Oryza sativa* L.) in Ghana: Effect of Regional Locations and Soil Factors on Diversity and Community Assembly. *Agronomy* 10:559.
- Sato, K., Suyama, Y., Saito, M. and Sugawara, K. 2005. A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis. *Grassl. Sci.* 51:179–181.
- Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E.U.B., Sadhana, B. and Vani, S.S. 2017. Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *Int. j. curr. microbiol. appl. sci.* 6:2133–2144.
- Sawers, R.J., Svane, S.F., Quan, C., Grønlund, M., Wozniak, B., Gebreelassie, M.N., Muñoz, E.G., Montes, R.A.C., Baxter, I., Goudet, J., Jakobsen, I. and Paszkowski, U. 2017. Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters. *New Phytol.* 214:632–643.
- Sayers, E.W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K.D. and Karsch-Mizrachi, I. 2019. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 47(Database issue), D94.
- Scervino, J.M., Papinutti, V.L., Godoy, M.S., Rodriguez, M.A., Monica, I.D., Recchi, M., Pettinari, M.J. and Godeas, A.M. 2011. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 110:1215–1223.

- Schenck, N.C. and Smith, G.S. 1982. Responses of six species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their effects on soybean at four soil temperatures. *New Phytol.* 92:193–201.
- 関宏三 1970. 土壤養分分析法. 土壤養分測定法委員会編, 養賢堂, 東京 235–238.
- 関谷宏三 1976. 土壤養分分析法. 土壤養分測定法委員会編, 博友社, 東京 229–231.
- Selim, S., Abuelsoud, W., Alsharari, S.S., Alowaiesh, B.F., Al-Sanea, M.M., Al Jaouni, S., Madany, M.M.Y., AbdElgawad, H. 2021. Improved mineral acquisition, sugars metabolism and redox status after mycorrhizal inoculation are the basis for tolerance to vanadium stress in C3 and C4 grasses. *J. Fungi*, 7:915.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2:1–14.
- Shen, M., Li, J., Dong, Y., Liu, H., Peng, J., Hu, Y. and Sun, Y. 2021. Profiling of plant growth-promoting metabolites by phosphate-solubilizing bacteria in maize rhizosphere. *Plants* 10:1071.
- 嶋田典司 1986. 土壤標準分析・測定法. 土壤標準分析・測定法委員会編. 博友社, 東京 114–116.
- Simon, L., Lalonde, M. and Bruns, T.D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:291–295.
- Smith, S.E. and Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis* 3rd ed. 31–134, Academic Press, New York.
- Sommermann, L., Geistlinger, J., Wibberg, D., Deubel, A., Zwanzig, J., Babin, D., Schlüter, A. and Schellenberg, I. 2018. Fungal community profiles in agricultural soils of a long-term field trial under different tillage, fertilization and crop rotation conditions analyzed by high-throughput ITS-amplicon sequencing. *Plos One* 13:e0195345.
- Song, C., Wang, W., Gan, Y., Wang, L., Chang, X., Wang, Y. and Yang, W. 2022. Growth promotion ability of phosphate-solubilizing bacteria from the soybean rhizosphere under maize–soybean intercropping systems. *J. Sci. Food Agric.* 102:1430–1442.

- Soteras, F., Grilli, G., Cofré, M.N., Marro, N. and Becerra, A. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungal composition in high montane forests with different disturbance histories in central Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 85:30–37.
- Spagnoletti, F.N., Tobar, N.E., Di Pardo, A.F., Chiocchio, V.M. and Lavado, R.S. 2017. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. *Appl. Soil Ecol.* 111:25–32.
- Srour, A.Y., Ammar, H.A., Subedi, A., Pimentel, M., Cook, R.L., Bond, J. and Fakhoury, A.M. 2020. Microbial communities associated with long-term tillage and fertility treatments in a corn-soybean cropping system. *Front. Microbiol.* 11:1363.
- Stahl, P.D., Parkin, T.B. and Christensen, M. 1999. Fungal presence in paired cultivated and uncultivated soils in central Iowa, USA. *Biol. Fertil. Soils* 29:92–97.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313.
- Stefani, F., Bencherif, K., Sabourin, S., Hadj-Sahraoui, A.L., Banchini, C., Séguin, S. and Dalpé, Y. 2020. Taxonomic assignment of arbuscular mycorrhizal fungi in an 18S metagenomic dataset: a case study with saltcedar (*Tamarix aphylla*). *Mycorrhiza* 30:243–255.
- Steward, P.R., Dougill, A.J., Thierfelder, C., Pittelkow, C.M., Stringer, L.C., Kudzala, M. and Shackelford, G.E. 2018. The adaptive capacity of maize-based conservation agriculture systems to climate stress in tropical and subtropical environments: A meta-regression of yields. *Agric Ecosyst Environ* 251:194–202.
- Stürmer, S.L., Oliveira, L.Z. and Morton, J.B. 2018. Gigasporaceae versus Glomeraceae (phylum Glomeromycota): a biogeographic tale of dominance in maritime sand dunes. *Fungal Ecol* 32:49–56.
- Suleman, M., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B.M. and Mirza, M.S. 2018. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PloS one* 13:e0204408.
- 鈴木千夏・竹中眞 2009. 土壤微生物生態研究における正準対応分析 (Canonical



- Correspondence Analysis: CCA) の利用法. 土と微生物 63:32–38.
- Sweeney, D.W. 2017. Does 20 years of tillage and N fertilization influence properties of a claypan soil in the eastern Great Plains?. *Agric. Environ. Lett.* 2:170025.
- Säle, V., Aguilera, P., Laczko, E., Mäder, P., Berner, A., Zihlmann, U., Van der Heijden, M.G.A. and Oehl, F. 2015. Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 84:38–52.
- Tahir, M., Mirza, M.S., Zaheer, A., Dimitrov, M.R., Smidt, H. and Hameed, S. 2013. Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum*, *Bacillus* and *Enterobacter* strains by 16SrRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Aust J Crop Sci* 7:1284–1292.
- 高橋正 2019. 火山灰土壌の多様性の解明—アルミニウム-腐植複合体の機能を中心に—. *土肥誌* 90:327–330.
- 谷昌幸・溝田千尋・八木哲生・加藤拓・小池正徳 2010. 十勝地域の未耕地土壌および農耕地土壌におけるリン酸の垂直分布と蓄積量. *土肥誌*, 81:350–359.
- 立脇祐哉・肥後昌男・磯部勝孝 2021. 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. *土と微生物* 75:23–31.
- Tawarayama, K., Hirose, R. and Wagatsuma, T. 2012. Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi can substantially reduce phosphate fertilizer application to *Allium fistulosum* L. and achieve marketable yield under field condition. *Biol. Fertil. Soils* 48:839–843.
- Taylor, D.L., Walters, W.A., Lennon, N.J., Bochicchio, J., Krohn, A., Caporaso, J.G. and Pennanen, T. 2016. Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for Illumina amplicon sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:7217–7226.
- Thangavel, P., Anjum, N.A., Muthukumar, T., Sridevi, G., Vasudhevan, P. and Maruthupandian, A. 2022. Arbuscular mycorrhizae: Natural modulators of plant–nutrient relation and growth in stressful environments. *Arch. Microbiol.* 204:264.
- Thanni, B., Merckx, R., De Bauw, P., Boeraeve, M., Peeters, G., Hauser, S. and Honnay, O. 2022. Spatial variability and environmental drivers of cassava—arbuscular mycorrhiza

- fungi (AMF) associations across Southern Nigeria. *Mycorrhiza* 1–13.
- Thonar, C., Schnepf, A., Frossard, E., Roose, T. and Jansa, J. 2011. Traits related to differences in function among three arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 339:231–245.
- Trung, Q. 2022. Enhance the phytoremediation efficiency of *Echinochloa colona* (L.) Link for Pb-contaminated soil by phosphorus solubilizing bacteria. *Acta Agric. Slov.* 118:1–9.
- Tyler, H.L. 2021. Shifts in bacterial community in response to conservation management practices within a soybean production system. *Biol. Fertil. Soils* 57:575–586.
- Udo, I.A., Akpan, J.F., Bello, O.S. and Otie, V.O. 2023. Arbuscular mycorrhizal fungus species differed in bio-control potential on pepper genotypes infected with *Meloidogyne incognita*. *Int. J. Veg. Sci.* 1–14.
- 臼木一英・山本泰由・田澤純子・松尾和之・辻博之 2005. 耕起法の違いがアーバスキュラー菌根菌の感染およびトウモロコシとエンバクの生育・収量に及ぼす影響. *日作紀* 74:417–421.
- Van der Heijden, M.G., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Sanders, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69
- Van Der Heijden, M.G. and Scheublin, T.R. 2007. Functional traits in mycorrhizal ecology: their use for predicting the impact of arbuscular mycorrhizal fungal communities on plant growth and ecosystem functioning. *New Phytol.* 174:244–250.
- Van der Heijden, M.G., Martin, F.M., Selosse, M.A. and Sanders, I.R. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol.* 205:1406–1423.
- Veresoglou, S.D., Shaw, L.J. and Sen, R. 2011. *Glomus intraradices* and *Gigaspora margarita* arbuscular mycorrhizal associations differentially affect nitrogen and potassium nutrition of *Plantago lanceolata* in a low fertility dune soil. *Plant Soil* 340:481–490.
- Vizioli, B., Cavalieri-Polizeli, K.M.V., Tormena, C.A. and Barth, G. 2021. Effects of long-term tillage systems on soil physical quality and crop yield in a Brazilian Ferralsol. *Soil Tillage Res* 209:104935.
- Wakelin, S.A., Gupta, V.V.S.R, Harvey, P.R. and Ryder M.H. 2007. The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern

- Australia. *Can. J. Microbiol.* 53:106–115.
- Wang, X., Zhou, B., Sun, X., Yue, Y., Ma, W. and Zhao, M. 2015. Soil tillage management affects maize grain yield by regulating spatial distribution coordination of roots, soil moisture and nitrogen status. *PloS one* 10:e0129231.
- Wang, W., Sarpong, C. K., Song, C., Zhang, X., Gan, Y., Wang, X., Yong, T., Chang, X., Wang, Y. and Yang, W. 2020. Screening, identification and growth promotion ability of phosphate solubilizing bacteria from soybean rhizosphere under maize-soybean intercropping systems. *bioRxiv* 2020–12.
- Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W.H.A. and Lumley, T. 2019. *gplots: various R programming tools for plotting data.* R package version 3.0.1.1
- Watts-Williams, S.J., Gill, A.R., Jewell, N., Brien, C.J., Berger, B., Tran, B.T.T., Mace, E., Cruickshank, A.W., Jordan, D.R., Garnett, T. and Cavagnaro, T. R. 2022. Enhancement of sorghum grain yield and nutrition: A role for arbuscular mycorrhizal fungi regardless of soil phosphorus availability. *Plants people planet* 4:143–156.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315–322.
- Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69:99–151.
- Xu, L., Tang, G., Tian, J., Wang, X. and Zhang, J. 2021. Effects of no-tillage sowing on soil properties and forage wheat and Italian ryegrass yields in winter fallow paddy fields. *PeerJ* 9:e10573.
- Xu, Y., Xu, S., Qian, Y., Liu, T., Zhang, L., Li, D., Zhang, Y., Chen, J. and Zhou, X. 2023. Who does better for in-situ eutrophic remediation in anoxic environment improvement and nutrient removal: MgO<sub>2</sub> versus CaO<sub>2</sub>. *Chemosphere* 139145.
- Yin, C., Mueth, N., Hulbert, S., Schlatter, D., Paulitz, T.C., Schroeder, K., Prescott, A. and Dhingra, A. 2017. Bacterial communities on wheat grown under long-term conventional tillage and no-till in the Pacific Northwest of the United States. *Phytobiomes* 1:83–90.
- Yu, F., Goto, B.T., Magurno, F., Błaszowski, J., Wang, J., Ma, W., Feng, H. and Liu, Y. 2022a.

- Glomus chinense* and *Dominikia gansuensis*, two new *Glomeraceae* species of arbuscular mycorrhizal fungi from high altitude in the Tibetan Plateau. *Mycol. Prog.* 21:1–11.
- Yu, H., Wu, X., Zhang, G., Zhou, F., Harvey, P.R., Wang, L., Fan, S., Xie, X., Li, F., Zhou, H., Zhao, X. and Zhang, X. 2022b. Identification of the phosphorus-solubilizing bacteria strain JP233 and its effects on soil phosphorus leaching loss and crop growth. *Front. Microbiol.* 13:892533.
- Zhan, F., Li, B., Jiang, M., Li, T., He, Y., Li, Y. and Wang, Y. 2019. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and heavy metal accumulation of bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] grown in a lead–zinc mine wasteland. *Int J Phytoremediation* 21:849–856.
- Zhang, Y., Chen, F.S., Wu, X.Q., Luan, F.G., Zhang, L.P., Fang, X.M., Wan, S.Z., Hu, X.F. and Ye, J.R. 2018. Isolation and characterization of two phosphate-solubilizing fungi from rhizosphere soil of moso bamboo and their functional capacities when exposed to different phosphorus sources and pH environments. *PloS one* 13:e0199625.
- Zhang, Y., Bo, G., Shen, M., Shen, G., Yang, J., Dong, S., Shu, Z. and Wang, Z. 2022. Differences in microbial diversity and environmental factors in ploughing-treated tobacco soil. *Front. Microbiol.* 13:924137.
- Zhao, S., Li, K., Zhou, W., Qiu, S., Huang, S. and He, P. 2016. Changes in soil microbial community, enzyme activities and organic matter fractions under long-term straw return in north-central China. *Agric Ecosyst Environ* 216:82–88.
- Zheng, C., Chai, M., Jiang, S., Zhang, S., Christie, P. and Zhang, J. 2015. Foraging capability of extraradical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi to soil phosphorus patches and evidence of carry-over effect on new host plant. *Plant Soil* 387:201–217.
- Zheng, B.X., Ibrahim, M., Zhang, D.P., Bi, Q.F., Li, H.Z., Zhou, G.W., Ding, K., Peñuelas, J., Zhu, Y.G. and Yang, X.R. 2018. Identification and characterization of inorganic-phosphate-solubilizing bacteria from agricultural fields with a rapid isolation method. *AMB express* 8:1–12.