

根圏を調べる方法

杉山 暁史^{1*}

Methods for the analysis of rhizosphere

Akifumi Sugiyama^{1*}

概要

植物の根の近傍領域である根圏は植物の生育に重要な役割を担う。根圏には土壤中とは異なる微生物のコミュニティが形成され、植物と相互作用する。根粒菌や菌根菌のように直接植物に養分を与える微生物以外にも、根圏には植物の生育と密接に関係する微生物が多く存在し、農業的にも重要な領域である。ここでは植物の根圏を解析する手法について紹介する。

1. はじめに

私たち人類の生存を支える空間である生存圏は人間生活圏から森林圏、大気圏、宇宙圏に広がる巨大な空間である。森林圏の一部として土壌圏があるが、その中で根圏は「植物の根から影響を受ける領域」¹⁾と定義されている極めて微小な領域である。土壌は植物に水や窒素、カリウム、リン等の栄養素を供給することから、植物の生育に重要なことは言うまでもない。植物は土壌圏から養分を吸収するだけでなく、土壌に生息する様々な生物と相互作用をしている。根粒菌や菌根菌のように植物の生育に必要な養分を供給する共生菌の他、植物に感染し被害を与える病原菌、線虫など、その相互作用は複雑である。これらの相互作用は根圏で起こる現象であることから、土壌の中でもとりわけ根圏に生息する生物は、植物の生育と密接に関係している。人類の生存を支える食料生産においても根圏での相互作用は重要であることから、根圏の研究は古くからおこなわれてきたが、近年、微生物を網羅的に解析するシーケンス技術や代謝物を包括的に解析するメタボローム技術が飛躍的に進歩したこともあり、根圏微生物叢研究は世界的に盛んである²⁻⁴⁾。

根圏研究で最も重要なのが、どのようにして根圏を調べるか、ということである。根圏は根の周りの土壌であるが、厳密に根から何mm以内



図1：圃場で生育するダイズの根圏

2018年7月9日受理.

¹⁾〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所森林圏遺伝子統御分野.

* E-mail: akifumi_sugiyama@rishi.kyoto-u.ac.jp

と規定されているわけではない。したがって、根圏をどのように調べるかによって、そこから得られる結果は異なってくる点に注意しなければならない。本解説では、根圏を調べる主要な方法についてその利点と欠点を紹介するとともに、今後根圏研究で重要になる解析手法についても紹介する。

2. 空中分画法と水中分画法

根圏研究で古くから用いられてきた手法は、土壌から植物を引き抜き、手でゆすって土を落とした後に、さらに根に付着している土を刷毛を使って優しく落としたりしたもの「根圏」とする空中分画法である。この方法は特別な道具が必要なく簡便であり、筆者らがダイズ圃場において根圏微生物叢の変動を調べた研究においても用いた⁵⁾。手法は簡便であるが、土壌の条件や刷毛で落とす強さの違いによって、安定的にサンプリングできる方法とは言い難く、しばしばバルク土壌（植物から離れたところの土壌）と区別できない結果となる。そのため、空中分画法を用いる際には、サンプリングの条件を十分検討して同じ道具、スピードで行う必要がある。

空中分画法の不安定性を克服すべく、近年は、リン酸バッファーで根を懸濁して根圏を採取する「水中分画法」が主流となってきている。特にシロイヌナズナ等のモデル植物では2012年に発表された論文において動画付きで手法を紹介しており、以降、この方法が基本となっている⁶⁾。シロイヌナズナのような小さな植物の場合は15 ml チューブで根圏を分画できるが、ダイズのような比較的大きな作物の場合にはビーカーを使って分画しなければならない。筆者らは、圃場で栽培したダイズの根圏土壌を500 ml のビーカーを使って分画し、根圏、根面、根内の画分を得た。バッファーによる分画法と空中分画法で得られた各土壌からDNAを抽出し、16S rRNA 配列のアンプリコン解析により微生物叢を比較したところ、バッファーにより分画される最初の画分（根圏画分）と、空中分画法で得られた根圏土壌が同様の群集構造であった。さらにソニケーションにより得られた画分（根面画分）は空中分画法で得られた根圏土壌とは異なる群集構造であった。圃場栽培したダイズにおいても実験室内で栽培したモデル植物と同様のバッファーを用いた根圏分画法が利用できることは、より多くの圃場で統一的に根圏土壌をサンプリングするためには重要である。

3. 根箱を使った根圏の可視化

根圏は土の中にあることから直接観測できず、空中分画法、水中分画法のいずれにおいても、植物が生育している環境を直接解析することはできない。圃場環境を疑似的に再現する方法として、根箱での栽培は古くから用いられている。筆者らも図2のようなアクリル製の根箱を作成し、圃場の土やパーミキュライト、砂等を用いてダイズを栽培し、ダイズの根を経時的に観察する手法を確立した。根箱は非破壊的に根圏解析を行うことができ、放射性核種を活用した分泌物の解析や、センサーを用いた根圏解析に活用されている^{7,8)}。

根圏研究のもう一つの障壁は、根圏に生息する微生物の多く（99%とも言われている）が実験室内で培養できないという問題である。DNA配列の解析ではそこに存在する微生物の種類を調べることができるが、根圏における微生物の機能は配列の解析のみでは明らかにできない。そこで、根圏を「培養できる微生物のみで再現する」Synthetic community 解析という手法が用いられるようになってきた

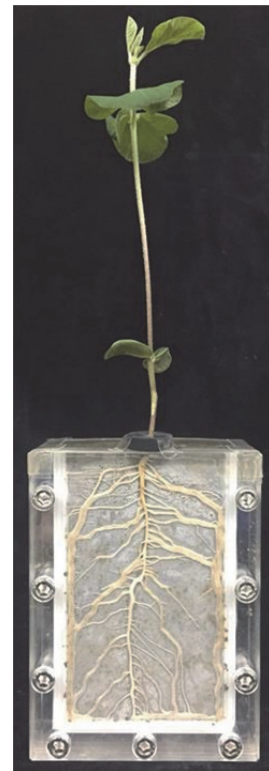


図2：根箱を用いたダイズ栽培

9, 10)。根圏から様々な培地を用いて実験室内で培養できる微生物を単離し、それらを組み合わせることによって根圏の多様性もった人工的な微生物群集を作る手法である。根箱と人工的な微生物群集構造を用いることによって、再現良く解析することができ、根圏相互作用における因果関係の解明に役立つと期待されている。

参考文献

- 1) Hiltner L Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* **98**, 59-78. 1904.
- 2) Hassani MA, Durán P, Hacquard S. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*. **6**(1), 58. 2018.
- 3) 杉山 暁史 根圏微生物のダイズ持続的生産への活用 *アグリバイオ* 9月号, 28-31, 2017.
- 4) Tkacz A, Poole P. Role of root microbiota in plant productivity. *J Exp Bot*. **66**(8), 2167-75. 2015
- 5) Sugiyama A, Ueda Y, Zushi T et al. Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field. *PLoS ONE* **9**(6), e100709. 2014.
- 6) Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* **488**(7409), 91-5. 2012.
- 7) Lenzewski N, Mueller P, Meier RJ, Liebsch G, Jensen K, Koop-Jakobsen K. Dynamics of oxygen and carbon dioxide in rhizospheres of *Lobelia dortmanna* - a planar optode study of belowground gas exchange between plants and sediment. *New Phytol*. **218**(1), 131-141. 2018.
- 8) Kreuzeder A, Santner J, Scharsching V, Oburger E, Hofer C, Hann S, Wenzel WW. In situ observation of localized, sub-mm scale changes of phosphorus biogeochemistry in the rhizosphere. *Plant Soil* **424**(1), 573-589. 2018.
- 9) Niu B, Paulson J.N, Zheng X Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **114**(12): E2450-E2459. 2017.
- 10) Zhalnina K, Louie KB, Hao Z, Mansoori N, da Rocha UN, Shi S, Cho H, Karaoz U, Loqué D, Bowen BP, Firestone MK, Northen TR, Brodie EL. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nat Microbiol*. **3**(4), 470-480. 2018.

著者プロフィール



杉山 暁史 (Akifumi Sugiyama)

<略歴> 2008年3月京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了、博士(農学) / 2008年4月京都大学生存圏研究所研究員 / 2009年4月日本学術振興会海外特別研究員(コロラド州立大学) / 2010年10月京都大学生存圏研究所助教 / 2016年2月京都大学生存圏研究所准教授、現在に至る。<研究テーマと抱負>根圏代謝物の機能解析と作物生産への応用 <趣味>旅行(特に鉄道)、ピザ作り、スポーツ観戦