

博士論文

テンサイ根圏における細菌群集の多様性と植物生育促進細菌
に関する研究

令和 5 年度

東北大学大学院生命科学研究科
生態発生適応科学専攻

岡崎 和之

目次

序章

第 1 章 季節変動がテンサイ側根共生細菌の群集構造に及ぼす影響

1-1. 材料と方法

1-2. 結果と考察

第 2 章 分離培養されるテンサイ側根共生細菌の多様性に及ぼす培地の影響

2-1. 材料と方法

2-2. 結果と考察

第 3 章 テンサイ共生細菌の群集構造解析に基づく植物生育促進細菌の選抜

第 1 節 低肥料条件下のテンサイ共生細菌の群集構造解析

3-1-1. 材料と方法

3-1-2. 結果と考察

第 2 節 低肥料条件下のテンサイ側根からの植物生育促進細菌の選抜

3-2-1. 材料と方法

3-2-2. 結果と考察

第 4 章 総合考察

論文内容要旨

引用文献

謝辞

序章

1. テンサイの重要性

テンサイ (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, L.) は地中海沿岸を原産地とするヒユ科の二年生植物である。播種 1 年目は主に栄養成長を行い、秋には肥大した主根にショ糖を高濃度に蓄積する。そして、越冬後の 2 年目に生殖成長を開始し、開花・結実に至る。このため、テンサイは砂糖の原料作物として、米国、ロシア、フランス、ドイツ、トルコなど、主に北半球の温帯から亜寒帯にかけて栽培されている。その栽培面積は世界で約 460 万 ha (2019 年) に達し、バイオマスベースでは全農作物中で 8 番目の生産量を有する (FAOSTAT, 2022)。全世界で生産される砂糖の約 2 割がテンサイから作られる等、テンサイは世界的な重要作物の 1 つとなっている (北海道農産協会, 2021)。

テンサイの栽培は、国内では北海道のみに限られるが、コムギ、バレイショ、マメ類とともに国内最大の農業地帯である北海道の畑輪作体系を支える基幹作物として、その栽培面積は約 56,000 ha に達し、砂糖の国内消費量の約 35% を担っている (北海道農産協会, 2021)。また、北海道にはテンサイを原料とする製糖会社が 3 社、製糖工場が 7 工場あり、地域の基幹産業として多くの雇用と関連産業を創出するなど、テンサイは地域経済の維持に重要な作物となっている (北海道農政部, 2011)。しかしながら、省力化が比較的進んだことで栽培面積が増加したコムギとは対照的に、栽培戸数の減少に伴う経営規模の拡大や生産者の高齢化による労働力不足などの背景から、春先の育苗作業が必要であり、かつ重量作物であるテンサイは労働負荷の大きい作物として敬遠される傾向にあり、テンサイの栽培面積は年々減少し、圃場の健全性の維持や経済的なリスク分散として重要な輪作体系の維持が困難となりつつある (藤田ら, 2020)。現時点においてはテンサイと代替可能な適当な経済作物はなく、健全な輪作体系の維持や食料安全保障、地域経済の維持等を考えると、テンサイ栽培面積の減少に歯止めをかけることが重要である。

2. テンサイ栽培における課題

明治初めの導入当初から、北海道におけるテンサイの栽培は、海外と同様、種子を圃場に直接播種する直播栽培が行われてきた。しかしながら、北海道は残雪の関係で圃場への播種時期が遅く、フランスやドイツと比べて生育期間が 1 か月程度短いため、収量が低いことが課題となっていた。1962 年に日本甜菜製糖株式会社によって開発された移植栽培は、ハウス等で 40

日程度、育苗した苗を圃場に移植する栽培方法であり、生育期間の確保と霜害や風害などの被害を軽減できる安定多収技術として、1994年には栽培面積の98%に普及するなど、北海道の標準栽培法となっている。移植栽培において、根張りの良い健全な苗を育成することが移植後の良好な活着と初期成育にとって重要である。吉村ら(1991)は、根量が多い苗は初期生育が良くなり、移植直後の凍霜害にも強く、収量も安定することを報告している。一方で、移植栽培は育苗管理や移植作業に関わる人的・経済的負担が大きいことが課題となっている(辻, 2018)。そのような背景からテンサイの栽培戸数は近年減少の一途を辿っており、2000年の約11000戸から2019年は約6900戸と、過去20年間で4割減少している。それに伴い、1戸当たりの栽培面積は2000年の6.1 haから2019年は8.2 haと3割増加している(北海道農産協会, 2021)。このような状況と生産者の高齢化も加わり、近年は移植栽培と比べて労働時間で45%、栽培コストで23%の削減が可能な直播栽培(北海道立十勝農業試験場, 2004)が急増しており、2020年には栽培面積に占める直播栽培の割合が31.2%にまで達した(北海道農産協会, 2021)。先に触れたように、直播栽培の最大の課題は収量性が低いことにある。直播栽培の収量性について、池谷(2019)は、移植栽培と比べて糖分は同程度であるものの、収量(糖量)は2割程度低下することを報告している。上述したように生育期間が短いことに加え、遅霜などの気象災害や病害虫の影響も受けやすく、初期成育が不安定であることも直播栽培の収量低下に関連する重要な要因となっている。直播栽培の増加傾向は今後も続くと推測されるため、直播栽培の収量性の向上を目指した多収性の育種や初期生育の促進・安定化に資する技術開発の重要性は高い。

さらに、テンサイの主産地である十勝地方(土壌区分:火山性土)における要素当たりの施肥基準(kg/10 a)は、N: 18、P₂O₅: 11、K₂O: 16であり(表0-1)、畑作物の中でも施肥量が多い作物とされている(笛木ら, 2011)。2019年の統計では、肥料費は10 a当たり23,1251円と生産費の24.7%を占める(北海道農産協会, 2021)。このため、近年の化学肥料原料の国際価格の大幅な上昇はテンサイ生産者に与える影響が大きく、栽培面積の減少に拍車をかける可能性がある。また、近年の世界的な環境意識の高まりから、化学肥料・化学農薬に過度に依存した農業から環境負荷を軽減した持続的な農業への転換が求められている。2021年に農林水産省が公表した「みどりの食料システム戦略」においては、2050年までの達成目標として、化学肥料の使用量の30%低減と化学農薬使用量(リスク換算)の50%低減が掲げられており、テンサイの栽培においても減肥料や減農薬に資する技術開発への要望は強い。

3. テンサイ栽培の課題解決策としての植物生育促進細菌 (PGPB) 研究の重要性

近年、環境への負荷が少ない化学肥料・化学農薬の低減技術として、有用な微生物を活用した微生物資材が注目されており、その市場規模が世界的に拡大している (Timmusk *et al.*, 2017)。植物組織の表面や内部には多種多様な細菌が生息しているが、これらの中には生育促進効果や病原微生物に対する拮抗作用など、宿主植物にとって有用な効果をもたらす細菌が存在する。これら有用な細菌は植物生育促進細菌 (PGPB; Plant Growth Promoting Bacteria) と呼ばれ、古くから世界中で PGPB の単離・選抜が行われ、微生物資材を活用した減肥料栽培や減農薬栽培が検討されてきた。PGPB は様々な因子によって植物の生育を促進することが知られている。代表的な因子として、生育を促進する植物ホルモン IAA (indole-3-acetic acid) の生産能 (Duca and Glick, 2020)、根圏等での植物の生育阻害因子となり得るエチレンの合成を阻害する ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase 生産能 (Glick, 2005)、大気中の窒素を植物が利用可能なアンモニアに固定する窒素固定能 (Bandeppa *et al.*, 2022)、難溶性の有機態リンであるフィチンを植物が利用可能なリンの形にするフィターゼ生産能 (Singh and Satyanarayana, 2011)、無機態のリンや各種ミネラル類を可溶化して作物に吸収可能にする各種の有機酸生産能、鉄をキレート化するシデロフォア生産能、抗生物質などの分泌による病原微生物の生育阻害 (Dunne *et al.*, 1998) や誘導全身抵抗性による病害抑制能 (Choudhary *et al.*, 2016) などがあり、これらの因子を複数持つ微生物も多く存在する (Ahmad *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012; Quecine *et al.*, 2012; 鶴丸ら, 2013)。

上述したような有用形質を持つ PGPB の活用は、環境に配慮しながら、テンサイ栽培の課題である化学肥料の低減と初期生育の促進による収量性の向上・安定化を解決できる可能性がある。これまでに報告されているテンサイの PGPB としては、Kloepper ら (1980) が *Pseudomonas* 属を報告して以降、*Acinetobacter* 属や *Bacillus* 属、*Burkholderia* 属、*Chryseobacterium* 属、*Paenibacillus* 属、*Rhodobacter* 属、*Stenotrophomonas* 属と、様々な種が報告されている (Shi *et al.*, 2010; Çakmakçi *et al.*, 2001; Çakmakçi *et al.*, 2006; Dunne *et al.*, 1998)。特に、実用化を目指した生物防除の試験研究においては、*Bacillus* 属と *Pseudomonas* 属が PGPB としての多くの有用形質を持つ菌群として歴史的に長く検討されてきた (Wolfgang *et al.*, 2023)。しかし、これまでに報告されている多くの植物種における共生細菌の系統学的多様性を考慮すると (鶴丸ら, 2013)、これらテンサイの PGPB の多くは *Bacteroidetes* 門や *Firmicutes* 門、*Gammaproteobacteria* 綱などの特定の分類群に偏っており、他の多様な分類群の中にも多くの未知の有用微生物が存在する可能性がある。

4. 既報の PGPB 研究の課題と課題解決に向けた提案

これまで、テンサイも含め、多くの植物から PGPB の単離と選抜が行われてきた。しかしながら、環境が安定している実験室レベルでは効果が認められるものの、環境が日々変化する圃場条件下で安定した効果が得られないことが多く、効果の安定化が資材化の大きな課題の 1 つとなっている。即ち、土壌からの養分吸収やストレス耐性の向上など、PGPB の有用な効果は多様な生育環境の影響を受けている (Timmusk *et al.*, 2017)。この原因の 1 つとしては、これまでの PGPR の選抜過程においては植物組織への親和性や定着性が十分に考慮されていなかったことが考えられる (Compant *et al.*, 2010; 池田, 2016; Rilling *et al.*, 2019)。これまでの PGPB の選抜では、上述したような IAA 生産能や窒素固定能などの植物生育促進因子に着目した選抜が主として行われてきた。しかし、高い IAA 生産能や窒素固定能を有していても、宿主植物に定着できなければ有用な効果を与えることはできないため、宿主植物への親和性や定着性を考慮した選抜が重要と考えられる (Ambreetha and Balachandar 2023)。PGPB の植物組織への定着性に関しては、GFP 遺伝子などによる標識株を用いた無菌的な培養実験系の植物組織を用いた局在性解析も行われているが、実際の圃場条件下では多様な微生物群との競合や生物間相互作用も考慮する必要がある (大久保ら, 2016; Timmusk *et al.*, 2017)。また、栽培される土壌や気象、肥料、農薬、中間管理などの栽培環境、宿主植物の品種の違いなどによっても微生物と植物の相互作用は大きな影響を受けることが明らかとなっている (池田, 2016; Dastogeer *et al.*, 2020)。このため、圃場条件下での定着性を知ることが重要であると考えられる。共生微生物の群集構造解析から得られる存在比は、宿主植物への定着性を推測する 1 つの指標として利用可能であり、共生微生物の群集構造の解析結果を考慮することで実用性の高い PGPB 選抜が可能になると考えられる。

5. 植物共生細菌の群集構造解析の現状

植物共生細菌の群集構造を解析する方法には大きく 2 つの方法がある。1 つは従来から行われてきた培養を用いる方法で、培養によって単離した共生微生物群を解析する方法 (以下、培養法) である。培養法は菌数の絶対値データの取得や、培養に続いて PGPB の選抜や機能解析が可能であるなどのメリットがある。一方で、単離作業に多大な労力を要することや培地の種類や培養条件によるバイアス、培養可能な細菌が実際よりも遥かに少ないこと (Amann *et al.*, 1995; 平石, 2016) などのデメリットもある。もう 1 つの方法は、培養を経ずに抽出した DNA

から解析する方法（以下、非培養法）である。非培養法は研究時点の技術では培養できない微生物群も解析対象とすることができるため、より正確に共生微生物の群集構造を把握することが可能である。当初、植物共生微生物の非培養法による解析では、宿主植物由来の DNA や PCR 阻害物質がサンプルに混入することが大きな障害となっていたが、Ikeda ら（2009）は微生物細胞画分を抽出する手法を開発し、イネやダイズなどの共生細菌を明らかにしている。また、その後の次世代シーケンサー（以下、NGS）の登場により、大量の DNA 塩基配列の迅速かつ容易な解読が可能になったことで、近年の植物共生細菌の群集構造の解析では NGS による解析が主流となっている。現在では NGS を利用した 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシング解析やメタゲノム解析などのオミクス解析により、根圏共生細菌の群集構造や機能についてある程度の知見を得ることが可能となっている（増岡ら，2022）。しかしながら、共生細菌の生態や機能の解明、産業利用のためには細菌の単離が必要であり、培養法と非培養法を融合することの重要性も指摘されている（Anguita-Maeso *et al.*, 2020; Medina *et al.*, 2017）。

6. 本研究の目的

これまで述べたように、PGPB は環境負荷が小さく、化学農薬・化学肥料の代替技術としての期待が大きいにも関わらず、その圃場での効果の不安定さのため、研究事例数に比べて微生物資材などの形で実用化されることが少ないのが実情である。その原因の 1 つは、PGPB の選抜過程における植物共生微生物の生態学的情報の欠如があったと考えられる。近年の分子微生物生態学の発展は、共生微生物群集の多様性や機能性を培養によるバイアスを受けずに解析することを可能としている。このため、共生微生物群集の多様性や機能性の情報を PGPB の選抜に活用することで、植物組織に対して高い親和性と定着性があり、安定した効果を示す PGPB の効率的な選抜が期待できるとともに、従来の限られた規模の培養実験での目視による菌株選抜や、既知の植物生育促進形質に依存した PGPB の選抜とは系統的に異なった、より多様な種の PGPB の効率的な選抜が可能になると考えられる（Okubo *et al.*, 2009; Anda *et al.*, 2011）。

本研究の目的は、テンサイを研究材料に、PGPB 選抜における分子微生物生態学的アプローチの有効性を検証することである。テンサイは、通常の栽培条件下においては播種から主根の収穫までに生殖生長への転換が起こらないことから、イネやダイズなどの子実作物と比べて非常に単純な生理生態的特性を持つ（図 0-1A）。また、収量の構成要素は主として主根の重量と主根に含まれるショ糖のみと比較的単純であるなど、重要作物の中では、テンサイは共生微生物の研究材料としての適性を多く持つ、比較的扱いやすい植物と考えられる。

上記のような背景から、第 1 章では、圃場条件下において養分吸収の場であると同時に、根からの分泌物を介した根圏微生物との相互作用や土壌中からの有用微生物の根圏への誘引の場として重要と考えられる側根について、生育期間の初期から後期（初期生育期：6 月、根部肥大期：7 月から 8 月、糖分蓄積期：9 月）における共生細菌の群集構造の季節的変動を解明した。第 2 章では、根圏共生微生物研究の基盤構築のため、多様な共生細菌群を対象とした大規模な菌株コレクションの構築と、そのための分離培地の影響について検討を行った。第 3 章では、多様な環境下で安定して定着できる PGPB を選抜するため、異なる施肥条件下での培養法と非培養法による共生細菌の多様性の解明と、それらの知見に基づいた接種試験による PGPB の探索と選抜を行った。なお、本研究では植物の組織内および表面に定着する微生物を広義の植物共生微生物と定義する。また、側根については、土壌からの養分吸収に中心的な役割を持つと考えられる直径 1 mm 程度以下（図 0-1B）を対象とした。

表0-1. 十勝地方(土壌区分:火山性土)における主要畑作物の施肥基準

作物名	要素あたりの施肥基準(kg/10 a)				備考
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	
テンサイ(移植)	18	11	16	3~4	
コムギ(秋まき)	16	14~15	9~10	3~4	日本めん用
バレイショ	6	18~20	12~13	3~4	生食用
ダイズ	1.5~2	20	8	3~4	
イネ(移植)	9.5	8	8	—	上川中央の低地土(乾)での施肥基準。うるち米

北海道施肥ガイド2020より抜粋(<https://www.pref.hokkaido.lg.jp/ns/shs/clean/index.html>)

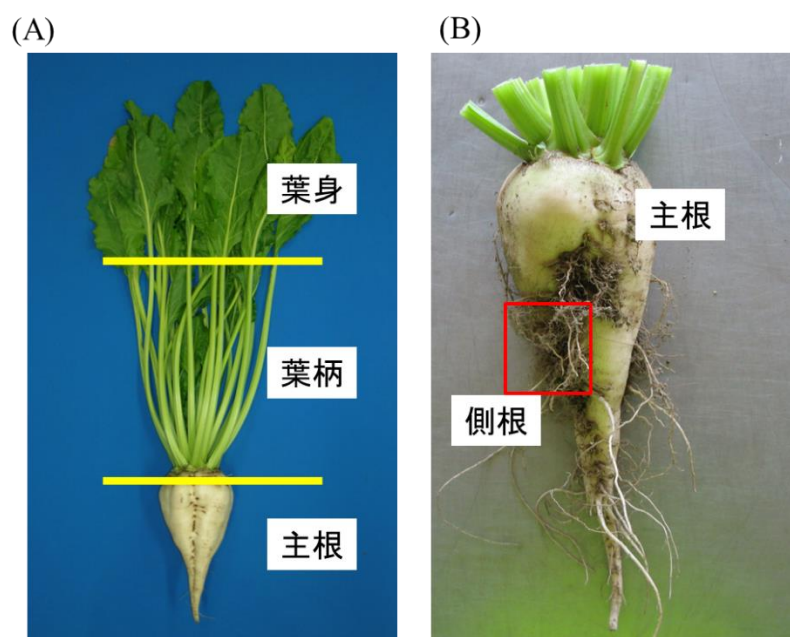


図 0-1. テンサイの形態

(A) : 収穫時期 (10 月) の形態。主根の重さは約 800 g で、約 17% のショ糖を根内に蓄積する。(B) : 7 月中旬の根部の形態。細い側根は、土壌から養分と水分の吸収に参与している。

第1章 季節変動がテンサイ側根共生細菌の群集構造に及ぼす影響

序

近年の次世代シーケンサー（NGS）などの培養を伴わない解析手法の進歩により、これまでブラックボックスであった植物共生微生物の群集構造とその動態の解明が大きく進展するにつれ、宿主植物や微生物、環境に関連する様々な要因が、植物共生微生物の群集構造や多様性に影響を与えることが明らかとなってきた（Dastogeer *et al.*, 2020; Hara *et al.*, 2019; Ikeda *et al.*, 2014; Masuda *et al.*, 2016; Unno *et al.*, 2015）。このため、実用的な PGPB の選抜のためには、環境が安定した実験室ではなく、実際の圃場で栽培中の植物組織に安定して定着できる能力を評価することが重要と考えられる。根圏土壌を対象とした微生物群集の季節変動を観察した報告事例は比較的多数存在する（Bell *et al.*, 2015; Chaparro *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015; Smalla *et al.*, 2001）。しかしながら、植物の生育ステージが根の共生微生物群集に与える影響を圃場条件下で時系列的に解析することは、より多くの手間とコストを要するため比較的少数の事例に限られている（Houlden *et al.*, 2008; Emmett *et al.*, 2020）。

テンサイの根系組織は大きく主根と側根に分けることができる。主根が主に植物体を支え、肥大してショ糖の貯蔵器官として機能するのに対し、側根は土壌からの養分と水分の吸収を担う。このため、側根は土壌からテンサイへの養分吸収を促進する PGPB が活動する重要な場と考えられる。分子微生物生態学的手法によるテンサイ根圏を対象にした微生物群集の解析については、根圏土壌（Hudz and Skivka 2021; Mendes *et al.*, 2011）や主根（Shi *et al.*, 2014; Tsurumaru *et al.*, 2015）を対象にした報告はあるものの、側根を対象にした報告はほとんどない。また、DGGE 法を用いた研究では、側根も含む根の表皮における共生微生物群集の多様性が生育ステージにより影響を受けることが報告されているが（Houlden *et al.*, 2008）、群集構造の詳細な変動については明らかとなっていない。

本研究の目的は、圃場条件下で安定した効果が期待できる実用的な PGPB 候補菌株の効率的な選抜における分子微生物生態学的手法の活用の有用性の検証であり、そのためには圃場条件下でテンサイの各生育ステージにおける共生微生物群集の動態を理解することが重要である。そこで本章では、NGS 解析により、テンサイの生育ステージが側根の共生細菌の群集構造に及ぼす影響を明らかにする。

1-1. 材料と方法

1-1-1. テンサイの栽培条件と側根および栽培土壌の採取

解析に供試した側根は、農業・食品産業技術総合研究機構（以下、農研機構）北海道農業研究センター芽室研究拠点（北海道河西郡芽室町）の試験圃場（北緯 42 度 52 分 59 秒、東経 143 度 4 分 24 秒、標高 99 m）で移植栽培したテンサイ（品種名「リッカ」）から採取した。2014 年 3 月 13 日にペーパーポット（ビート用規格 1 号、日本甜菜製糖株式会社）に播種後、ガラス室で育苗した。育苗管理について、温度設定は播種から 1 週間程度は 18~20℃とし、以降は 5 日で 2.5℃の割合で温度を徐々に下げ、播種 1 か月以降は外気と同じ温度とした（最低気温のみ 5℃以上）。灌水は播種時に十分に与えた以降は、苗の徒長を防止するため、過ぎ過ぎない程度の最小限の灌水に留め、移植の 2 日前から前日にかけて、数回に分けて十分に灌水した。育苗中の苗立枯病防除については、播種の覆土にはリゾレックス H 粉剤（ホクサン株式会社）を規定量、混和した圃場の土壌を用い、出芽が揃った播種 10 日後にタチガレン液剤（三井化学アグロ株式会社）とバリダシン液剤（住友化学株式会社）を規定量、散布した。光条件は自然光とした。4 月 22 日に畦間 60 cm、株間 22.5 cm で苗を圃場に移植した。施肥は基肥のみとし、複合肥料 S014（ホクレン肥料（株））を 150 kg/10 a、作畦時に施肥した。要素当たりの施肥量(kg/10 a)は、N: 15、P₂O₅: 31.5、K₂O: 21 であった。側根の採取は 6 月 16 日、7 月 15 日、8 月 12 日、9 月 17 日に行った。目視により外観が健全な株を無作為に 6 個体抜き取り、側根表面に緩く付着した土壌を水道水で洗浄して除いた後、滅菌水で濯ぎ、個体別に直径が 1 mm 程度以下の側根を採取した。採取した側根は DNA 抽出まで -30℃で凍結保存した。

試験圃場の土壌採取は 2014 年 7 月 15 日に行った。3 カ所の畦間から、オーガを用いて深さ 5-15 cm の土壌を採取し、採取した土壌を等量混合して化学分析用の土壌サンプルとした。土壌の化学分析は十勝農業組合連合会農産化学研究所に依頼し、以下の方法で行った（表 1-1）。pH (H₂O) は pH メーターにより測定した。アンモニア体窒素 (NH₄-N) および硝酸態窒素 (NO₃-N) の測定は、それぞれインドフェノール法、ヒドラジン還元法に従った。また、可給態リン酸 (P₂O₅) およびリン酸吸収係数の測定は、Murphy-Riley 法およびバナドモリブデン酸アンモニウム吸収光度法（緩衝液の抽出時間は 30 分）を用いた。交換性塩基の K₂O、MgO および CaO の測定は、それぞれ、炎光光度法、キシリジルブルー法、o-クレゾールフタレインプレクソン法を用い、陽イオン交換容量 (CEC) はインドフェノール法（簡易法）に従い、それぞれ分析した。なお、pH 以外の分析は、土壌・作物体総合分析装置 SFP-4i（藤平工業株式会社）を用いて行った。

1-1-2. 16S rRNA 遺伝子配列の NGS と系統解析

側根からの DNA 抽出は、池田らの方法 (Ikeda *et al.*, 2004) の一部を改変して行った。即ち、ビーズによる破砕行程に FastPrep®24 (MP Biomedicals) を用い、DEAE-cellulose column による精製過程を省略した。抽出した DNA を鋳型に、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象にした MiSeq (Illumina 株式会社) による NGS を行った。シーケンス解析の実務と統計解析前の配列データの編集作業は下記の作業内容で株式会社ファスマックに外注依頼して行った。

NGS については、細菌の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅する 1st-515f_MIX と 1st-806r_MIX のプライマーセットを用いて細菌 16S rRNA 遺伝子の部分配列の PCR を行った (Caporaso *et al.*, 2011)。PCR の反応条件は次のとおりである。最初に 94°C で 2 分間加熱後、30 サイクルのプログラム (94°C で 30 秒間、50°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間) を行い、最後に 72°C で 5 分間とした。次に、細菌の 16S rRNA 遺伝子の PCR アンプリコンを鋳型 DNA として 2 回目の PCR を行い、Nakamura ら (2020) の記載に従って MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina 株式会社) を用いて MiSeq シーケンサーでペアエンドシーケンス (2×300 bp) を行った。

シーケンス解析によって得られた配列について、Nakamura ら (2020) の記載に従って、完全なプライマー配列を含む生リードを抽出し、プライマーおよび 50 塩基の 3' 末端配列の除去およびトリミング (最小長 40 塩基、最小平均品質スコア 20) を行った。トリミングした配列は、FLASH ソフトウェア (Magoc and Salzberg 2011) を用いて結合した (最小オーバーラップ 10 塩基; 平均マージ長 250 塩基; 配列の平均長 230 塩基)。解析パイプライン Qiime (Caporaso *et al.*, 2010) により、古細菌、葉緑体、ミトコンドリアおよび未同定配列に分類された配列を除去した。解析パイプライン Qiime2 の dada2 オプション (Bolyen *et al.*, 2019) を用いてキメラ配列やノイズ配列を除去した後、amplicon sequence variant (ASV) とその代表配列の生成を行った。代表配列の分類は、Greengenes の 97% OTUs と比較し、Qiime2 の feature-classifier オプションで行った。アルファ多様性の解析は Qiime により行った。

1-1-3. 統計解析

サンプリング月間における分類群の存在比の統計解析は、統計解析ソフト JMP version 12 (SAS Institute Inc.) を用いて行った。存在比の値をアークサイン変換した後、分散分析および Tukey の HSD 検定を実施した。

1-1-4. 塩基配列のアクセッション番号

本研究で使用した生リードは、NCBI SAR データベースに以下のアクセッション番号で登録した。

BioProject accession number: PRJNA826328

1-2. 結果と考察

1-2-1. アルファ多様性と主座標分析

1 サンプルあたり 5491 配列でサブサンプリングしたデータを用いた Qiime の解析結果を表 1-2 に示す。Singleton はサンプル中のユニークな配列の数（含まれる配列数が 1 個のみの ASV の数）を表し、Chao1 および ACE は、若干異なる重み付け方法を用いて ASV の個数を推定した値である（小谷野，2012）。また、Shannon と Simpson も若干異なる重み付け方法を用いた多様性指数である（小谷野，2012）。ASV の実数と推定値である Chao1 と ACE の差が小さいことは、本研究のデータ量が多様性を評価する上で十分であることを示唆しているものと考えられる。全てのアルファ多様性指標は 6 月から 7 月または 8 月にかけて有意に増加したことから、側根の共生細菌の多様性は 6 月から 8 月にかけて増加し、8 月から 9 月にかけて飽和することが明らかとなった。この様に全ての多様性指標がサンプリング月によって大きく変動することは、テンサイ側根の共生細菌の多様性を評価する上で、時系列解析が重要であることを示唆している。また、7 月から 8 月の根部肥大期にかけて各種の多様性指数が最も高くなるという結果は Shi ら（2014）の報告とも一致した。

UniFrac 距離に基づく主座標分析の結果を図 1-1 に示す。一般に、unweighted UniFrac 距離は、観察された各微生物分類群における存在／非存在のデータを考慮してサンプル間の微生物群集構造の質的差異を表し、weighted UniFrac 距離は、各微生物分類群における存在／非存在のデータとそれら分類群における存在量データの質と量の両方を考慮したサンプル間の微生物群集構造の差異を表す（Wu *et al.*, 2010）。unweighted UniFrac、weighted UniFrac ともに、サンプルは PC1 に沿って、サンプリング月に対応した 4 つのグループに大別され、6 月から 9 月のサンプリング月の順に並んでいた。これらの結果から、テンサイ側根の共生細菌の群集構造は成長過程に応じて連続的に変化していることが明らかとなった。Houlden ら（2008）は、テンサイの根圏（根表皮）の微生物群集構造が成長過程に応じて顕著に変化したことを報告しており、本研究の結果も彼らの結果と一致していた。6 月と 9 月のサンプルは、7 月と 8

月のサンプルに比べ、より緩やかにクラスター化していた。この要因としては、試験地の気象条件下において、6月はテンサイの生育が小さく（図 1-2）、植物体が根圏微生物に与える影響が小さいことを示唆しているものと考えられる。一方、9月はテンサイの成長が徐々に停滞し、葉や葉柄から主根に糖分を移動・蓄積し始める時期であり、側根の伸長停止や側根からの分泌される有機物の減少、根系の老化等を反映している可能性が考えられた。以上の主座標分析の結果からも、側根における共生細菌の群集構造は、テンサイの生育期間中に劇的、かつ連続的に変化することが明らかとなり、根圏の細菌群集の多様性を評価するための時系列解析の重要性が示された。

1-2-2. テンサイ側根における共生細菌群集の分類学的組成の特徴

全サンプルの配列データに基づいて系統解析を行った結果、試験条件下のテンサイ側根の共生細菌群として 32 門、85 綱、174 目、295 科、473 属、542 種が認められた。また、2734 個の ASV（同一 ASV 内の配列の類似度は 100%）に分類された。これらの分類群または ASV のうち、何れかのサンプリング月で優占的な分類群（存在比が 1%以上の分類群）は、6 門、9 綱、14 目、24 科、40 属、40 種であり、ASV 数は 39 個であった。

各サンプリング月における門から科までの各分類群の存在比を図 1-3 と表 1-3 に示した。門レベルでは、全てのサンプリング月で *Actinobacteria*、*Bacteroidetes* および *Proteobacteria* の 3 つの門で 90%以上（92.2%~96.2%）を占めることが明らかとなった。

綱および目レベルについては、それぞれ、6 つの綱 (*Actinobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Saprosirae*、*Sphingobacteriia*) と 8 つの目 (*Actinomycetales*、*Burkholderiales*、*Caulobacterales*、*Rhizobiales*、*Saprosirales*、*Sphingobacteriales*、*Sphingomonadales*、*Xanthomonadales*) が優占して存在し、それぞれ、サンプリング月の 80%以上（84.3%~92.6%）と 70%以上（74.8%~87.9%）を占めていた。科レベルでは、11 の科 (*Bradyrhizobiaceae*、*Caulobacteraceae*、*Chitinophagaceae*、*Comamonadaceae*、*Hyphomicrobiaceae*、*Nocardioideaceae*、*Rhizobiaceae*、*Sphingomonadaceae*、*Sphingobacteriaceae*、*Streptomycetaceae*、*Xanthomonadaceae*) が全てのサンプリング月で優占化していた。これら 11 科の占める存在比は、6~8 月までは 70%以上（70.2%~73.1%）を占めていたが、9 月には 55.9%に大きく低下することが明らかとなった。

属および種における存在比を表 1-4 に示す。属レベルでは、11 の属 (*Caulobacter*、*Chitinophaga*、*Devosia*、*Kribbella*、*Niastella*、*Novosphingobium*、*Rhizobium*、*Sphingomonas*、

Streptomyces、unclassified *Chitinophagaceae*、unclassified *Comamonadaceae*) が全てのサンプリング月で優占して存在し、11 属の占める存在比は 37.3%~47.1%であった。これらの菌群は生育期に安定して定着できる能力を持ち、実用的な PGPB の探索にとって重要な菌群と考えられた。種レベルの 11 の優占的な菌群は、上記の 11 属に属していたものの、本研究で利用したデータベース (Greengenes) では、*Caulobacter henricii* と *Chitinophaga arvensicola* の 2 種を除いて種を分類することができなかった。

ASV レベルでは、ASV_001(*Streptomyces*)、ASV_002(*Chitinophagaceae*)、ASV_003(*Caulobacter henricii*)、ASV_005 (*Chitinophaga arvensicola*)、ASV_006 (*Rhizobium*) の 5 個の ASV が全てのサンプリング月で優占して存在し、これら 5 個の ASV が占める存在比は、6 月~9 月にかけて、それぞれ、22.1%、16.9%、16.3%、7.8%と減少することが明らかとなった (表 1-5)。また、各分類群に含まれる ASV の数には大きな差があることが明らかとなった (表 1-6)。種レベルで優占して存在していた Unclassified *Amycolatopsis*、*Asticcacaulis biprosthecium*、*Chitinophaga arvensicola*、Unclassified *Kutzneria*、*Sphingomonas azotifigens* は、それぞれ 1 つの ASV に分類された。これに対し、すべてのサンプリング月で優占して存在していた Unclassified *Chitinophagaceae* と、9 月に存在比が高かった Unclassified *Comamonadaceae*、Unclassified *Cytophagaceae*、Unclassified *Ellin329*、Unclassified *Gammaproteobacteria*、Unclassified *Haliangiaceae*、Unclassified *Myxococcales*、Unclassified *Sinobacteraceae* の 8 つの分類群に含まれる ASV の数は、それぞれ 147、24、56、23、32、33、94、39 個であり、これらの分類群における遺伝的多様性の高さが示唆された。

テンサイ根圏の共生細菌の群集構造に関して、Wolfgang ら (2020) は発芽 2 週間後の幼苗の根について *Proteobacteria*、*Acidobacteria*、*Actinobacteria* の 3 門が優占化していると報告している。主根について、Shi ら (2014) は生育ステージ全体を通して、*Proteobacteria* 門、特に *Alphaproteobacteria* 綱が優占的であることを明らかにし、Tsurumaru ら (2015) はメタゲノム解析により、テンサイの主根には *Proteobacteria* 門 (特に *Alphaproteobacteria* 綱) と *Actinobacteria* 門が優占的であることを報告している。テンサイの根圏土壌細菌については、Mendes ら (2011) は *Proteobacteria* 門が最も優占的で、次いで *Firmicutes* 門、*Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門が多いことを報告している。また、Hudz and Skivka (2021) は *Proteobacteria* 門と *Actinobacteria* 門が優占的であることを報告している。これら主根や根圏土壌における既報と同様、本研究の側根における共生細菌の多様性解析においても、6 月から 9 月にかけて *Proteobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes* の 3 門が優占化している

ことが明らかになった（図 1-3 (A)、表 1-3）。*Proteobacteria* 門の中でも特に *Alphaproteobacteria* 綱が 6 月から 9 月にかけて側根で最も優占的であることが明らかとなった（図 1-3 (B)、表 1-3）。この綱には潜在的に多くの有用な細菌群が含まれていることが知られている（Garrido-Oter *et al.*, 2018; Okazaki *et al.*, 2021）。このため、本結果はテンサイの高バイオマスが有用な細菌群との共生関係によって成り立っていることを示唆しているのかもしれない。主根におけるメタゲノム解析の結果（Tsurumaru *et al.*, 2015）とは異なり、側根では *Bacteroidetes* 門が優占的な菌群の 1 つであることが明らかとなった。一般に *Bacteroidetes* 門は豊富な炭素源を利用するコピオトロフィックな細菌群と考えられている（Fierer *et al.*, 2007）。このため、本研究の結果は *Bacteroidetes* 門が側根から分泌される有機物に反応していることを示唆しているのかもしれない（Mastný *et al.*, 2020）。一方、テンサイを含め、様々な植物の PGPB として報告がある *Bacillus* 属（Shi *et al.*, 2010）や *Paenibacillus* 属（Çakmakçi *et al.*, 2006）が属する *Firmicutes* 門は、ほとんど検出されなかった。このため、*Bacillus* 属は、本研究の実験条件下においてはテンサイに安定して定着できず、実用的な PGPB になり得ない可能性が示唆された。しかしながら、Zachow ら（2014）が報告しているように、土壌の種類によって根圏細菌の多様性が門レベルで異なる可能性もある。また、テンサイの地中組織の形態や生理は成長過程で大きく変化するが、これには気候や土壌の理化学性、栽培管理の形態などの環境要因も深く関与する可能性がある。したがって、テンサイの側根共生細菌群集の特徴をより深く理解するためには、今後、土壌の種類や気象条件の異なる幾つかの地域において側根共生細菌の群集構造の時系列的解析を比較検討することが望ましいと考えられる。

1-2-3. テンサイ側根の共生細菌の群集構造の季節変化

サンプリングされた月の間での存在比の変動を統計解析した結果、11 門、32 綱、52 目、84 科、120 属、137 種と 263 個の ASV において、サンプリング月の間で存在比に統計的有意差が認められた。これらのうち、サンプリングされた何れかの月で優占的な菌群（存在比が 1% 以上）は、4 門、9 綱、14 目、21 科、33 属、34 種と 34 個の ASV であった。門レベルでは、6 月から 9 月にかけて、*Chloroflexi*、*Proteobacteria*、*Verrucomicrobia* の 3 門は緩やかに存在比が増加したのに対し、*Actinobacteria* 門は大幅に減少することが明らかとなった（表 1-7）。綱レベルでは、*Proteobacteria* 門において、存在比の季節変動の傾向が各綱によって大きく異なることが明らかとなった。*Alphaproteobacteria* 綱は 8 月に最も高い存在比を示し、

Betaproteobacteria 綱は逆に 8 月が最も低く、*Gammaproteobacteria* 綱と *Deltaproteobacteria* 綱については 9 月に急激に増加することが明らかとなった。目レベルでは、*Alphaproteobacteria* 綱において、*Caulobacteriales*、*Rhizobiales*、*Sphingomonadales* の 3 目が 7 月から 8 月にかけて最も高く、*Ellin329* 目は 8 月から 9 月にかけて高かった。*Gammaproteobacteria* 綱と *Deltaproteobacteria* 綱に含まれる目については、6 月から 7 月にかけて存在比が高かった *Pseudomonadales* 目を除き、9 月に存在比が最も高かった。*Bacteroidetes* 門については、*Sphingobacteriales* 目および *Flavobacteriales* 目は 6 月から 7 月にかけて存在比が高いのに対し、*Cytophagales* 目は 9 月が最も高かった。*Burkholderiales* 目および *Saprospirales* 目は、全般的に安定して存在していたものの、それぞれ 8 月と 6 月の存在比は他の月と比べて低いことが明らかとなった。

科より下位の分類群における統計解析の結果 (表 1-8)、目までの上位分類群と同様、主に *Actinobacteria*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* の 3 門の低位の分類群で群集構造の大きな季節変動が認められた。6 月に優占化していた分類群については、*Streptomyces* 属など 12 の分類群 (*Asticcacaulis biprosthecium*、Unclassified *Bradyrhizobiaceae*、*Caulobacter henricii*、*Janthinobacterium* 属、*Kribbella* 属、Unclassified *Oxalobacteraceae*、*Pedobacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Rhodanobacter* 属、*Sphingobium* 属、*Sphingopyxis* 属) は、存在比が 6 月をピークに 9 月にかけて徐々に低下した。また、*Rhizobium* 属など 7 の分類群 (Unclassified *Chitinophagaceae* (Greengenes データベースでは「*Chitinophagaceae* ; g_」として分類)、*Chitinophaga arvensicola*、*Devosia* 属、*Mesorhizobium* 属、*Novosphingobium* 属、*Sphingomonas* 属) は 7 月から 8 月に存在比が多かった。一方、Unclassified *Comamonadaceae* および *Cytophagaceae* は 9 月に最も高い存在比を示した。

6 月には存在比が 1% に満たなかったマイナーな分類群については、*Bradyrhizobium* 属など 7 分類群 (*Agrobacterium* 属、*Dokdonella* 属、Unclassified *Ellin329*、*Flavobacterium* 属、*Kutzneria* 属、*Sphingomonas azotifigens*) が 7 月から 8 月にかけて存在比が増加し、*Steroidobacter* 属など 7 分類群 (*Amycolatopsis* 属、Unclassified *Chitinophagaceae* (Greengenes データベースでは「*Chitinophagaceae* ; _」として分類)、Unclassified *Gammaproteobacteria*、*Haliangiaceae* 科、Unclassified *Myxococcales*、Unclassified *Sinobacteraceae*) は 9 月に最も高い存在比を示した。

一方、*Burkholderia* 属など優占的な 9 分類群 (Unclassified *Cytophagaceae*、Unclassified *Haliangiaceae*、*Hyphomicrobiaceae* 科、*Lysobacter* 属、*Niastella* 属、Unclassified

Rhizobiaceae、Unclassified *Rhodanobacter*、および Unclassified *Sphingobacteriaceae*) については、サンプリング月の間で存在比に有意差は認められなかった (表 1-3 および表 1-4)。

ASV での存在比のサンプリング月間での変動 (表 1-5) は、科より下位の分類群における解析結果 (表 1-8) と同様の傾向を示した。即ち、*Streptomyces* 属や *Janthinobacterium* 属に分類された ASV_001 や ASV_030 などは、6 月から 9 月にかけて存在比が徐々に低下し、*Rhizobium* 属や *C. arvensicola* に分類された ASV_006 や ASV_005 などは 7 月から 8 月にかけて存在比が高かった。一方で、*Steroidobacter* 属に分類された ASV_026 や *Comamonadaceae* 属に分類された ASV_025、ASV_040 は、9 月にその存在比が最も高かった。上記の変動が見られた ASV と異なり、*Niastella* 属、*Devosia* 属および *Sphingobacteriaceae* 科に分類された ASV_008、ASV_033、ASV_018 および ASV_031 の 4 個の ASV は、サンプリングされた月の間で存在比に有意な差は認められなかった。

側根における共生細菌の群集構造を時系列的に解析した結果、アルファ多様性や主座標分析と同様に、生育に伴って群集構造が質的にも量的にも大きく変化していることが明らかとなった。本研究で側根に優占することが明らかとなった *Rhizobiales* 目の 5 属 (*Agrobacterium*、*Bradyrhizobium*、*Devosia*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium*) と *Sphingomonadales* 目の 4 属 (*Novosphingobium*、*Sphingobium*、*Sphingomonas*、*Sphingopyxis*) には、植物の生育促進に有用な細菌が多く含まれることが報告されているが (Antoun *et al.*, 1998; Chhetri *et al.*, 2022; Garrido-Oter *et al.*, 2018; Vurukonda *et al.*, 2016; Okazaki *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2016)、これらの属の多くは、7 月から 8 月にかけて高い存在比を示した (表 1-8)。一般に、試験地の北海道十勝地域におけるテンサイの生育は、7 月から 8 月にかけて急激に成長するため (図 1-2)、7 月から 8 月の側根には、テンサイの生育に寄与する菌群が優占して存在している可能性が考えられる。したがって、上記のような 7 月から 8 月にかけて高い存在比を示す *Rhizobiales* 目や *Sphingomonadales* 目の菌群がテンサイの急激な成長に寄与している可能性が考えられた。

6 月から 7 月に優占することが明らかとなった *Actinomycetales*、*Burkholderiales*、*Flavobacteriales*、*Pseudomonadales*、*Sphingobacteriales* の 5 目については (表 1-7)、植物病原菌への拮抗作用と植物の生育促進作用を有する細菌が多いことが知られている (Doubou *et al.*, 2001; O'Sullivan and O'Gara, 1992; Francis *et al.*, 2014)。*Flavobacteriales* 目については、*Rhizoctonia solani* の汚染圃場で栽培した無病徴のテンサイ感受性品種の根圏において、高い存在比を示す指標種としても報告されている (Kusstascher *et al.*, 2019)。

6月から7月にかけての生育初期は、それ以降の8月や9月と比べて、テンサイ根腐病の病原菌である *R. solani* やテンサイ黒根病の病原菌である *Aphanomyces cochlioides* などの病原菌に対して脆弱な生育時期であると考えられる(内藤ら, 1980; 内野・渡辺, 1998)。このため、上記の分類群に属する細菌群がテンサイの初期生育における病原菌からの防御に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。このような推察は、テンサイ苗の根圏における *Burkholderiaceae* 科、*Pseudomonadaceae* 科、*Actinobacteria* 門の存在量が *R. solani* による病害の抑制と強い関連性を示した Mendes ら (2011) の報告とも一致する。

Burkholderiales 目に属する *Oxalobacteraceae* 科と *Comamonadaceae* 科では、存在比の季節変動の傾向が大きく異なる(表 1-8)。このため、*Burkholderiales* 目は生態学的に異なる機能を持つ多様な菌群から構成されていることが示唆された。6月から7月の生育初期に存在比が高い *Janthinobacterium* 属 (*Oxalobacteraceae* 科) は植物病原菌の *Pythium* 属および *Rhizoctonia* 属に対して拮抗活性を有することが報告されており (Yin *et al.*, 2013)、病害の抑制に関与している可能が考えられる。また、*Oxalobacteraceae* 科に分類された ASV_022 の配列については、*Herbaspirillum* 属の1種と100%の類似度を示した(表 1-9)。*Herbaspirillum* 属ではイネに生育促進効果を示した PGPB が報告されており (Ramos *et al.*, 2020)、テンサイの生育にも関与しているかもしれない。一方、8月に存在比が高かった *Comamonadaceae* 科については、ASV_25 と ASV_40 の2個の ASV が検出された(表 1-5)。このうち、ASV_40 の配列は *Methylibium* 属の種と100%の類似度を示した(表 1-9)。*Methylibium* 属については、バレイショの生育を促進した PGPB の報告事例がある (Santiago *et al.*, 2017)。また、ASV_025 の代表的配列については、*Polaromonas* と *Variovorax* の両属の種と100%の類似度を示した。*Variovorax* 属ではテンサイを含む多くの植物種に対して生育促進効果を示す PGPB が報告されている (Natsagdorj *et al.*, 2019)。以上から、テンサイの生育が盛んな8月に高い存在比を示した *Comamonadaceae* 科の菌群は、圃場条件下においてもテンサイの生育に関与している可能性が考えられる。

6月から7月にかけて存在比が高かった *Pseudomonas* 属や *Streptomyces* 属の菌群は歴史的にも古くから抗菌性物質の生産など、多くの有用形質を持つことが知られており (Andersen *et al.*, 2003; Zachow *et al.*, 2015)、多様な病原菌に拮抗作用を示すことがよく知られている PGPB を多く含む菌群である (Janvier *et al.*, 2007)。特に、*Streptomyces* 属が含まれる *Streptomycetaceae* 科はテンサイの重要病害の立枯病の病原菌である *Rhizoctonia* 属に対する高い拮抗性を持つことが知られている (van der Voort *et al.*, 2016)。同様に、病害抑制効

果が報告されている *Janthinobacterium* 属 (Yin *et al.*, 2021) や *Kribbella* 属 (Zhang *et al.*, 2022)、*Pedobacter* 属 (de Boer *et al.*, 2007) も 6 月から 7 月にかけて存在比が高かった。6 月から 7 月にかけての生育初期は、それ以降と比べて根部の病害の被害に脆弱であるため、この時期にテンサイが病原菌に拮抗作用を有する細菌群と強い共生関係を持つことは合理的であるように思われる。一方で、*Streptomyces* 属に分類された ASV_001 の配列は、バレイショそうか病の病原菌 *S. scabiei* と *S. turgidiscabies* に 100% の類似度を示した (表 1-9)。本結果は、テンサイは *S. turgidiscabies* の代替宿主であり、テンサイ栽培後のバレイショ生産におけるそうか病発生の危険性を指摘した Sakuma ら (2011) の報告とも符合し、輪作体系を考える上での重要な情報と考えられる。

Chloroflexi 門、*Cytophagales* 目、*Ellin329* 目、*Myxococcales* 目、*Saprospirales* 目、*Verrucomicrobia* 門、*Xanthomonadales* 目など、8 月から 9 月にかけて存在比が高まることが明らかとなった分類群は (表 1-7)、テンサイの糖分蓄積に伴う根系の老化に関係している可能性が考えられる。Houlden ら (2008) は、若い植物の根圏細菌は単純なアミノ酸を優先的に利用するのに対し、成熟した植物の根圏細菌は、より複雑な炭水化物を利用することを報告している。実際、*Ellin329* 目や *Myxococcales* 目、*Verrucomicrobia* 門の細菌は、土壌中の有機物分解に重要な役割を担っていることが報告されている (Harbison *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017)。

以上の細菌群集構造の解析結果を要約すると、6 月から 7 月に高い存在比を示す菌群は病害抑制に、7 月から 8 月にかけて高い存在比を示した菌群は植物組織の伸長や肥大に、9 月に高い存在比を示した菌群は根系・根圏の老化に由来する土壌有機物の分解に、それぞれ生態学的役割を担っている可能性が考えられた。

本章では、生育初期の 6 月から糖分蓄積が始まる 9 月までの期間について、圃場条件下のテンサイ側根共生細菌の群集構造を時系列的に解析した。その結果、共生細菌の群集構造はテンサイの生育期間中に劇的、かつ連続的に変化することを明らかにした。また、全調査期間を通して側根には *Proteobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes* の 3 門が優占的に存在し、6 月から 7 月の生育初期には *Streptomyces* 属や *Pseudomonas* 属などの病原微生物に対して高い拮抗能を持つことが知られている菌群が、7 月から 8 月の生育盛期には特に *Rhizobiales* 目や *Sphingomonadales* 目などの *Alphaproteobacteria* 綱の菌群を中心に、植物ホルモンや窒素固定などを介した生育促進効果について既知の報告事例がある菌群が優占化することを明らか

にした。以上のような生育前期のテンサイと相利共生的な関係を持つ可能性が示唆される菌群は、圃場条件下でも有用効果が安定的に得られる可能性が高く、テンサイ PGPB の候補菌群として優先的に生育促進効果を調査する価値が高いと考えられた。

表 1-1. 試験圃場の土壌の化学分析の結果

Table 1-1. Chemical characteristics of the soil sample on July 15, 2014 in the present study

pH (H ₂ O)	NH ₄ -N (mg·kg ⁻¹)	NO ₃ -N (mg·kg ⁻¹)	Total nitrogen (g kg ⁻¹)	Available P ₂ O ₅ (mg·kg ⁻¹)	Exchangeable cations			Phosphate absorption coefficient (mg/100g)	CEC (cmolc·kg ⁻¹)
					K ₂ O (mg·kg ⁻¹)	MgO (mg·kg ⁻¹)	CaO (mg·kg ⁻¹)		
6.0	5.2	17	2.3	214	451	478	2,294	1,331	176

表 1-2. 黒ボク土壌の圃場で栽培したテンサイ側根共生細菌の 6 月から 9 月にかけての多様性指標の季節的変動

Table 1-2. Diversity indexes for lateral root-associated bacteria of sugar beet grown in an Andosol experimental field in Japan from June to September

Diversity index ^a	Sampling month ^b				Sig. ^c
	June	July	August	September	
No. of singletons	14.0 ± 12.9 b	39.5 ± 32.6 ab	91.3 ± 33.6 a	72.0 ± 49.1 a	**
No. of ASVs	230.0 ± 64.0 b	332.5 ± 96.3 ab	444.3 ± 78.4 a	440.2 ± 111.2 a	**
Chao1	235.5 ± 69.7 b	353.8 ± 115.4 ab	504.3 ± 107.2 a	484.2 ± 146.8 a	**
ACE	235.5 ± 69.3 b	354.6 ± 119.5 ab	508.3 ± 107.5 a	485.9 ± 150.0 a	**
Shannon	6.4 ± 0.4 b	7.1 ± 0.3 a	7.3 ± 0.2 a	7.5 ± 0.3 a	***
Simpson	0.968 ± 0.016 b	0.984 ± 0.004 a	0.986 ± 0.002 a	0.989 ± 0.002 a	***

^aDiversity indexes are calculated based on 5491 reads per sample.

^bResults of average ± S.D. (n=6) are shown. The same letter indicate no statistical significance among sampling months.

^c*** and ** indicate the statistical significance among sampling months by one-way ANOVA at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

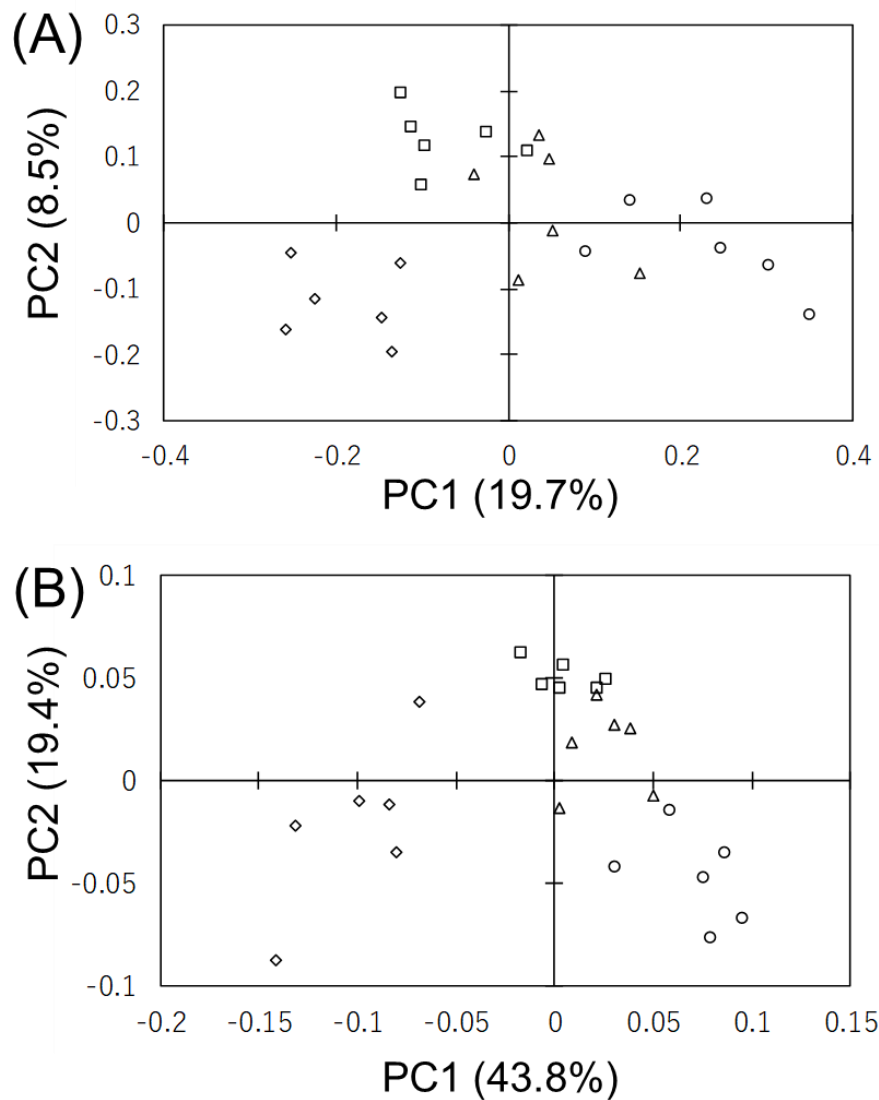


Fig. 1-1. Principal-coordinate analysis for the partial sequences of 16S ribosomal RNA gene amplicon libraries (amplicon sequence variants, ASVs) for the lateral root-associated bacteria of sugar beet in different sampling months. The ordination was constructed using UniFrac distances unweighted (A) and weighted (B) by the relative abundances. Each symbol represents the phylogenetic composition of lateral root-associated bacteria in different sampling months. Sampling months: circle (○): June; triangle (△): July; Square (□): August; diamond (◇): September.

図 1-1. 異なるサンプリング月におけるテンサイ側根共生細菌の 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンライブラリー (ASV) の主座標分析 (PCoA) の結果

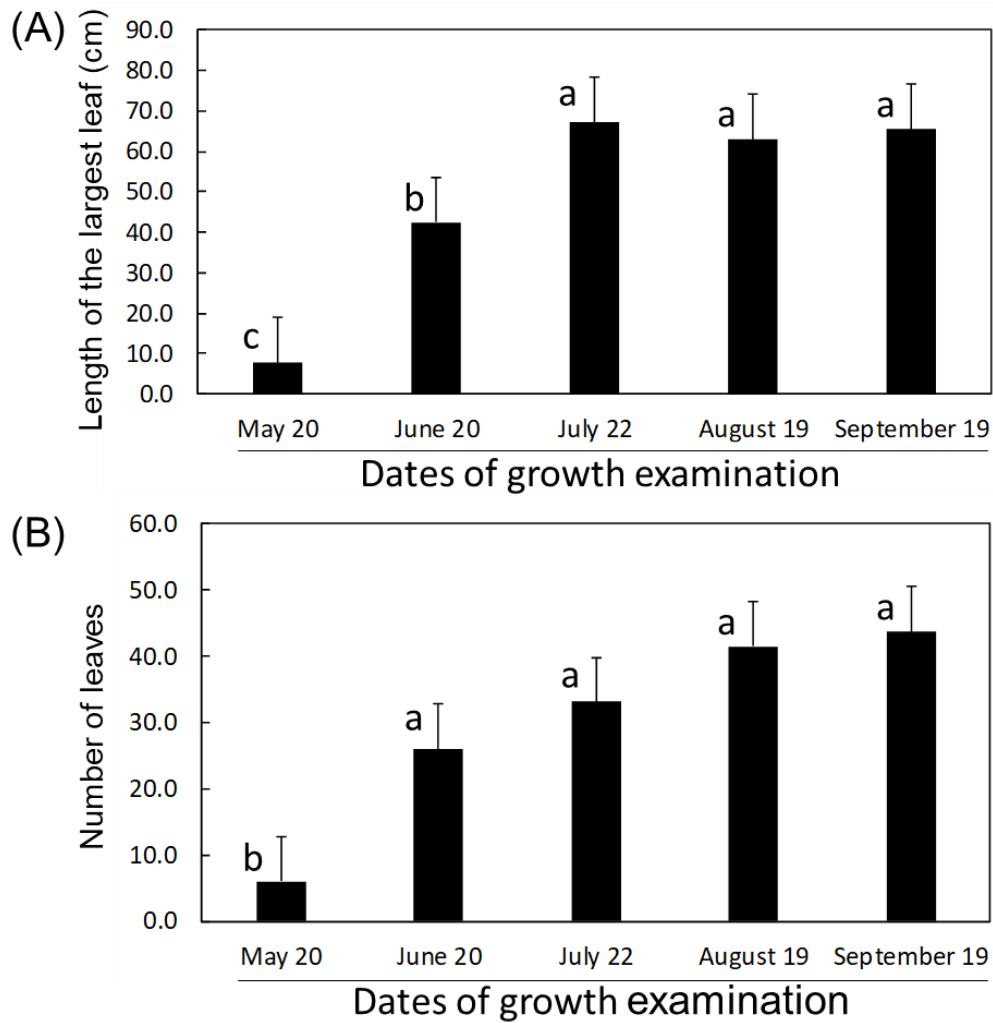


Fig. 1-2. The growth of above ground tissues of sugar beet cultivar “Rycka” planted in the andosol experimental field in the present study from May to September in 2014. Panels A and B indicate the averages of the leaf length of the largest leaf and the number of leaves per plant, respectively, in each of months examined. Error bar indicates standard error. The same letter indicates no statistical significance among the months. The results of one-way ANOVA indicated that there is a significant difference among the months examined at $P < 0.001$ in both panels A and B.

図 1-2. 2014 年 5 月から 9 月にかけての黒ボク土壌の圃場におけるテンサイ品種「リッカ」の地上部組織の生育の季節的变化

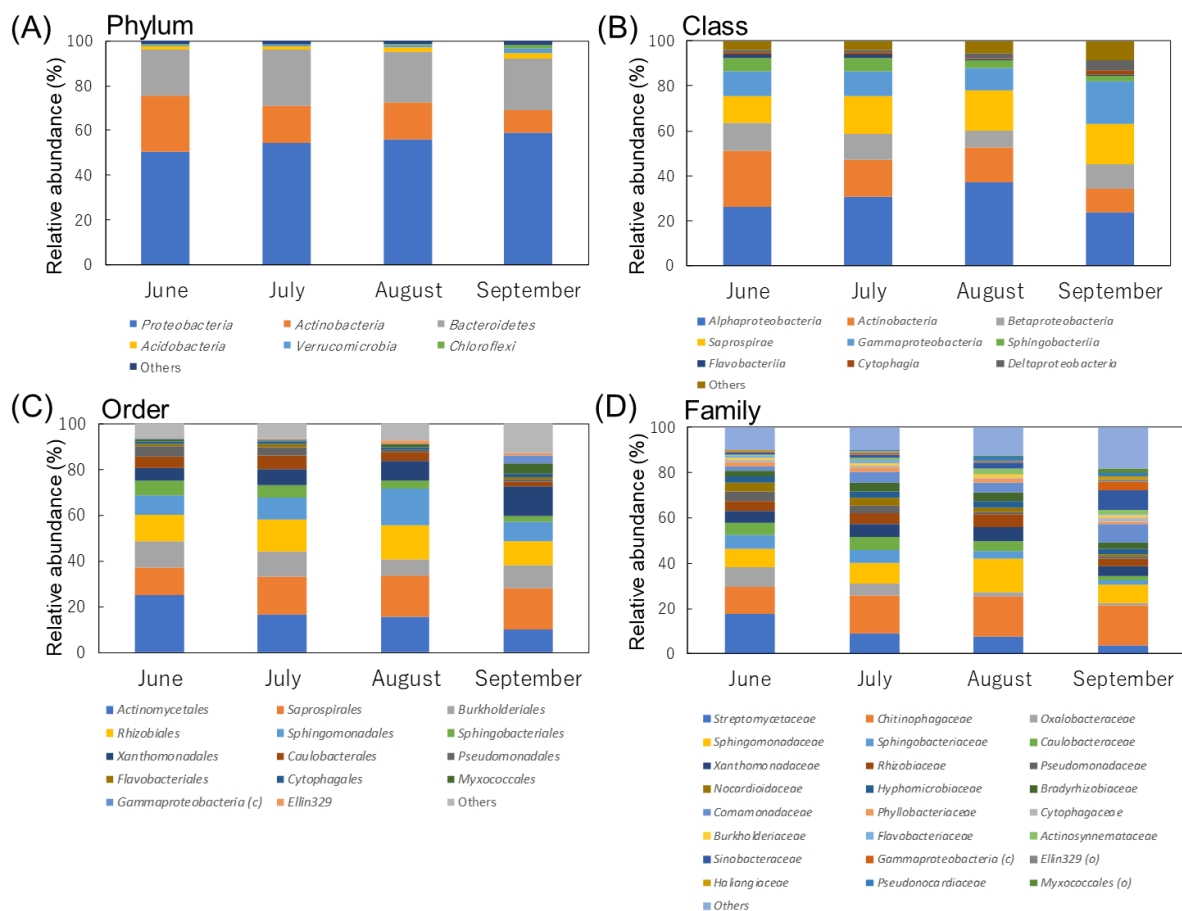


Fig. 1-3. Taxonomical compositions for the lateral root-associated bacteria of sugar beet in different sampling months. The dominant taxa with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of sampling months at the levels of phylum (A), class (B), order (C), and family (D) are shown.

図 1-3. 6 月から 9 月の各サンプリングの月におけるテンサイの側根共生細菌の門、綱、目、科レベルでの分類学的組成 (%)

表 1-3. 黒ボク土壌の圃場で栽培されたテンサイの主要な側根共生細菌群（6月から9月の生育期間中のいずれかの月に門、綱、目、科のいずれかのレベルで1%以上の存在比を示した菌群）

Table 1-3. Relative abundances (%) of lateral root-associated bacteria of sugar beet grown in an Andosol experimental field in Japan during the growth period from June to September at the levels from phylum to family

Taxon ^a	Sampling month ^b				Taxon	Sampling month			
	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.		Jun.	Jul.	Aug.	Sep.
Phylum					Family				
<i>Proteobacteria</i>	50.3	54.3	56.1	58.7	<i>Streptomycetaceae</i>	17.7	9.1	7.6	3.6
<i>Actinobacteria</i>	25.3	16.7	16.1	10.5	<i>Chitinophagaceae</i>	11.9	16.7	17.9	17.7
<i>Bacteroidetes</i>	20.5	25.1	22.6	23.0	<i>Oxalobacteraceae</i>	8.5	5.1	1.7	0.9
<i>Acidobacteria</i>	1.5	1.5	2.2	2.4	<i>Sphingomonadaceae</i>	8.3	9.0	14.8	8.2
<i>Verrucomicrobia</i>	0.5	0.8	0.9	2.0	<i>Sphingobacteriaceae</i>	6.2	5.7	3.5	1.9
<i>Chloroflexi</i>	0.4	0.3	0.6	1.2	<i>Caulobacteraceae</i>	5.5	6.0	4.2	2.1
Others	1.5	1.3	1.4	2.1	<i>Xanthomonadaceae</i>	4.9	5.5	6.3	4.1
Class					<i>Rhizobiaceae</i>	4.6	5.0	5.9	3.6
<i>Alphaproteobacteria</i>	26.1	30.5	37.0	23.7	<i>Pseudomonadaceae</i>	4.1	3.4	0.6	0.8
<i>Actinobacteria</i>	25.0	16.4	15.6	10.2	<i>Nocardioideaceae</i>	4.1	3.4	2.3	1.3
<i>Betaproteobacteria</i>	12.6	11.7	7.5	11.3	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	2.7	2.8	2.6	2.1
<i>Saprosirae</i>	12.0	16.8	18.0	17.8	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	2.3	3.5	4.1	3.1
<i>Gammaproteobacteria</i>	10.8	11.3	9.8	18.8	<i>Comamonadaceae</i>	2.1	4.8	4.0	8.2
<i>Sphingobacteriia</i>	6.2	5.9	3.6	2.5	<i>Phyllobacteriaceae</i>	1.7	2.1	1.9	0.9
<i>Flavobacteriia</i>	1.3	1.4	0.4	0.9	<i>Cytophagaceae</i>	1.0	1.0	0.7	1.7
<i>Cytophagia</i>	1.0	1.0	0.7	1.7	<i>Burkholderiaceae</i>	0.9	1.0	1.3	0.9
<i>Deltaproteobacteria</i>	0.9	0.8	1.7	4.8	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.9	1.1	0.2	0.4
Others	4.2	4.2	5.8	8.4	<i>Actinosynnemataceae</i>	0.8	1.1	2.2	1.9
Order					<i>Sinobacteraceae</i>	0.6	1.5	2.4	8.9
<i>Actinomycetales</i>	25.0	16.4	15.6	10.2	<i>Gammaproteobacteria</i> (c)	0.5	0.4	0.2	3.6
<i>Saprosirales</i>	12.0	16.8	18.0	17.8	<i>Ellin329</i> (o)	0.3	0.7	1.2	1.1
<i>Burkholderiales</i>	11.7	11.0	6.9	10.0	<i>Haliangiaceae</i>	0.2	0.2	0.4	1.4
<i>Rhizobiales</i>	11.6	13.8	15.2	10.6	<i>Pseudonocardiaceae</i>	0.2	0.4	1.1	1.3
<i>Sphingomonadales</i>	8.5	9.5	15.8	8.5	Unclassified <i>Myxococcales</i> (o)	0.1	0.1	0.4	2.2
<i>Sphingobacteriales</i>	6.2	5.9	3.6	2.5	Others	10.0	10.2	12.6	18.2
<i>Xanthomonadales</i>	5.5	7.0	8.7	13.1					
<i>Caulobacterales</i>	5.5	6.0	4.2	2.1					
<i>Pseudomonadales</i>	4.1	3.4	0.6	0.8					
<i>Flavobacteriales</i>	1.3	1.4	0.4	0.9					
<i>Cytophagales</i>	1.0	1.0	0.7	1.7					
<i>Myxococcales</i>	0.8	0.6	1.5	4.5					
Unclassified <i>Gammaproteobacteria</i> (c)	0.5	0.4	0.2	3.6					
<i>Ellin329</i>	0.3	0.7	1.2	1.1					
Others	6.1	6.1	7.4	12.6					

^aTaxon with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of sampling months at the levels from phylum to family are shown. The relative abundance was calculated based on 5491 reads per sample. A letter in parentheses (c and o) indicates the closest taxa (class and order, respectively) at each taxonomic level. Taxa highlighted with gray are dominant taxa in all sampling months and taxa indicated in bold font showed no significant differences for the relative abundance among the sampling months.

^bResults of average (n=6) are shown.

表 1-4. 黒ボク土壌の圃場で栽培されたテンサイの主要な側根共生細菌群（6月から9月の生育期間中のいずれかの月に属、種のいずれかのレベルで1%以上の存在比を示した菌群）

Table 1-4. Relative abundances (%) of lateral root-associated bacteria of sugar beet grown in an Andosol experimental field in Japan during the growth period from June to September at the levels of genus and species

Genus ^a	Sampling month ^b				Species ^a	Sampling month ^b			
	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.		Jun.	Jul.	Aug.	Sep.
<i>Streptomyces</i>	15.7	8.3	7.0	3.4	Unclassified <i>Streptomyces</i> (g)	15.3	8.0	6.7	3.0
Unclassified <i>Chitinophagaceae</i> (f) ¹	4.7	7.8	7.6	5.9	Unclassified <i>Chitinophagaceae</i> (f)	4.7	7.8	7.6	5.9
<i>Pedobacter</i>	4.6	3.2	1.8	0.6	Unclassified <i>Pedobacter</i> (g)	4.2	3.0	1.6	0.6
<i>Pseudomonas</i>	4.1	3.4	0.6	0.8	Unclassified <i>Pseudomonas</i> (g)	3.9	3.1	0.6	0.8
<i>Janthinobacterium</i>	3.9	1.5	0.3	0.2	Unclassified <i>Niastella</i> (g)	3.7	4.7	4.5	5.3
<i>Niastella</i>	3.7	4.7	4.5	5.3	Unclassified <i>Kribbella</i> (g)	3.6	3.0	2.0	1.2
<i>Caulobacter</i>	3.6	3.9	2.5	1.3	<i>Caulobacter henricii</i>	3.6	3.6	2.3	1.0
<i>Kribbella</i>	3.6	3.0	2.0	1.2	Unclassified <i>Janthinobacterium</i> (g)	3.0	1.4	0.2	0.2
<i>Rhizobium</i>	3.0	2.7	3.5	1.6	Unclassified <i>Oxalobacteraceae</i> (f)	2.8	2.5	0.9	0.6
Unclassified <i>Oxalobacteraceae</i> (f)	2.8	2.5	0.9	0.6	Unclassified <i>Rhizobium</i> (g)	2.6	2.3	3.3	1.6
<i>Chitinophaga</i>	2.6	2.5	3.8	3.9	Unclassified <i>Sphingobium</i> (g)	2.3	1.2	1.2	0.4
<i>Rhodanobacter</i>	2.5	2.2	1.9	0.9	Unclassified <i>Devosia</i> (g)	2.2	2.4	1.7	1.5
<i>Sphingobium</i>	2.3	1.3	1.2	0.5	Unclassified <i>Streptomycetaceae</i> (f)	2.0	0.8	0.6	0.2
<i>Devosia</i>	2.2	2.4	1.7	1.5	<i>Chitinophaga arvensicola</i>	1.9	1.2	2.4	1.0
<i>Novosphingobium</i>	2.0	2.5	7.1	4.4	Unclassified <i>Rhodanobacter</i> (g)	1.9	1.7	1.7	0.8
Unclassified <i>Streptomycetaceae</i> (f)	2.0	0.8	0.6	0.2	Unclassified <i>Comamonadaceae</i> (f)	1.7	3.5	3.0	6.2
<i>Sphingomonas</i>	1.9	3.8	4.4	2.7	Unclassified <i>Sphingobacteriaceae</i> (f)	1.3	1.9	1.4	0.9
Unclassified <i>Comamonadaceae</i> (f)	1.7	3.5	3.0	6.2	Unclassified <i>Bradyrhizobiaceae</i> (f)	1.3	1.3	1.3	0.4
<i>Sphingopyxis</i>	1.4	0.9	0.9	0.1	Unclassified <i>Mesorhizobium</i> (g)	1.3	1.6	1.5	0.7
Unclassified <i>Sphingobacteriaceae</i> (f)	1.3	1.9	1.4	0.9	Unclassified <i>Sphingomonas</i> (g)	1.2	1.9	3.4	1.7
Unclassified <i>Bradyrhizobiaceae</i> (f)	1.3	1.3	1.3	0.4	<i>Asticcacaulis biprosthecium</i>	1.1	1.1	0.8	0.1
<i>Mesorhizobium</i>	1.3	1.6	1.5	0.7	Unclassified <i>Novosphingobium</i> (g)	1.1	1.4	3.7	3.5
<i>Asticcacaulis</i>	1.1	1.1	0.8	0.1	Unclassified <i>Rhizobiaceae</i> (f)	1.1	1.0	0.6	0.7
Unclassified <i>Rhizobiaceae</i> (f)	1.1	1.0	0.6	0.7	Unclassified <i>Novosphingobium</i> (g)	0.9	1.0	3.4	0.9
<i>Burkholderia</i>	0.9	1.0	1.3	0.9	Unclassified <i>Bradyrhizobium</i> (g)	0.9	1.8	2.3	2.2
<i>Bradyrhizobium</i>	0.9	2.0	2.7	2.5	Unclassified <i>Cytophagaceae</i> (f)	0.8	0.7	0.4	1.2
<i>Flavobacterium</i>	0.9	1.1	0.2	0.4	Unclassified <i>Lysobacter</i> (g)	0.8	1.1	0.8	0.5
<i>Lysobacter</i>	0.8	1.2	1.0	0.7	Unclassified <i>Chitinophagaceae</i> (f)	0.7	1.6	1.8	2.5
Unclassified <i>Cytophagaceae</i> (f)	0.8	0.7	0.4	1.2	<i>Sphingomonas azotifigens</i>	0.7	1.6	0.9	0.9
Unclassified <i>Chitinophagaceae</i> (f) ¹	0.7	1.6	1.8	2.5	Unclassified <i>Chitinophaga</i> (g)	0.7	1.3	1.4	2.8
<i>Agrobacterium</i>	0.5	1.2	1.8	1.2	Unclassified <i>Agrobacterium</i> (g)	0.5	1.2	1.8	1.2
Unclassified <i>Gammaproteobacteria</i> (c)	0.5	0.4	0.2	3.6	Unclassified <i>Gammaproteobacteria</i> (c)	0.5	0.4	0.2	3.6
<i>Steroidobacter</i>	0.3	0.7	1.6	5.9	Unclassified <i>Steroidobacter</i> (g)	0.3	0.7	1.6	5.9
Unclassified <i>Sinobacteraceae</i> (f)	0.3	0.7	0.8	3.0	Unclassified <i>Sinobacteraceae</i> (f)	0.3	0.7	0.8	3.0
<i>Dokdonella</i>	0.3	0.9	1.6	1.5	Unclassified <i>Dokdonella</i> (g)	0.3	0.9	1.6	1.5
Unclassified <i>Ellin329</i> (o)	0.3	0.7	1.2	1.1	Unclassified <i>Ellin329</i> (o)	0.3	0.7	1.2	1.1
Unclassified <i>Haliangiaceae</i> (f)	0.2	0.2	0.4	1.4	Unclassified <i>Haliangiaceae</i> (f)	0.2	0.2	0.4	1.4
<i>Kutzneria</i>	0.2	0.3	1.2	0.8	Unclassified <i>Kutzneria</i> (g)	0.2	0.3	1.2	0.8
<i>Amycolatopsis</i>	0.2	0.4	1.1	1.3	Unclassified <i>Amycolatopsis</i> (g)	0.2	0.4	1.1	1.3
Unclassified <i>Myxococcales</i> (o)	0.1	0.1	0.4	2.2	Unclassified <i>Myxococcales</i> (o)	0.1	0.1	0.4	2.2
Others	17.6	18.8	21.4	25.8	Others	23.6	24.3	24.9	28.3

^aTaxon with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of sampling months at the genus and species levels are shown. The relative abundance was calculated based on 5491 reads per sample. Letters in parentheses (c, f, g, and o) indicate the closest taxa (class, family, genus and order, respectively) at each taxonomic level. Taxa highlighted with gray are dominant taxa in all sampling months and taxa indicated in bold font showed no significant differences for the relative abundance among the sampling months.

^bResults of average (n=6) are shown.

表 1-5. 黒ボク土壌の圃場で栽培されたテンサイの主要な側根共生細菌群の存在比 (%) の季節変動 (6 月から 9 月の生育期間中のいずれかの月に ASV レベルで 1 % 以上の存在比を示した菌群のみを示す)

Table 1-5. Sugar beet lateral root-associated bacteria showing significant differences of relative abundances among sampling months at ASV level

ASV ID ^a	Closest taxon ^b	Sampling month ^c				Sig. ^d
		June	July	August	September	
ASV_001	<i>Streptomyces</i> (g)	13.9 ± 5.1 a	7.2 ± 2.7 b	6.0 ± 1.1 b	2.6 ± 1.0 c	***
ASV_003	<i>Caulobacter henricii</i>	3.4 ± 0.6 a	3.5 ± 1.1 a	2.3 ± 0.7 a	1.0 ± 0.4 b	***
ASV_030	<i>Janthinobacterium</i> (g)	3.0 ± 1.4 a	1.3 ± 0.5 b	0.2 ± 0.1 c	0.2 ± 0.1 c	***
ASV_014	<i>Pedobacter</i> (g)	2.8 ± 1.1 a	1.7 ± 0.9 ab	0.8 ± 0.5 bc	0.2 ± 0.4 c	***
ASV_015	<i>Sphingobium</i> (g)	2.0 ± 0.9 a	1.1 ± 0.4 a	1.2 ± 0.6 a	0.4 ± 0.2 b	***
ASV_005	<i>Chitinophaga arvensicola</i>	1.9 ± 0.7 ab	1.2 ± 0.7 ab	2.4 ± 1.2 a	1.0 ± 0.5 b	*
ASV_019	<i>Rhodanobacter</i> (g)	1.9 ± 1.0 a	1.2 ± 0.3 a	0.9 ± 0.3 ab	0.3 ± 0.3 b	***
ASV_022	<i>Oxalobacteraceae</i> (f)	1.8 ± 0.7 a	1.5 ± 0.5 a	0.7 ± 0.2 b	0.3 ± 0.2 b	***
ASV_008	<i>Niastella</i> (g)	1.8 ± 0.9	1.5 ± 0.5	0.9 ± 0.4	2.0 ± 1.0	-
ASV_012	<i>Kribbella</i> (g)	1.8 ± 0.7 a	1.5 ± 0.4 a	1.2 ± 0.5 ab	0.7 ± 0.4 b	**
ASV_006	<i>Rhizobium</i> (g)	1.8 ± 0.6 ab	1.5 ± 0.4 ab	2.2 ± 0.4 a	1.2 ± 0.3 b	**
ASV_020	<i>Pseudomonas</i> (g)	1.4 ± 1.2 ab	2.1 ± 2.0 a	0.2 ± 0.1 c	0.4 ± 0.3 bc	**
ASV_038	<i>Kribbella</i> (g)	1.4 ± 0.3 a	1.0 ± 0.5 ab	0.5 ± 0.2 bc	0.2 ± 0.3 c	***
ASV_002	<i>Chitinophagaceae</i> (f)	1.2 ± 0.4 b	3.4 ± 1.1 a	3.4 ± 2.0 a	2.0 ± 1.0 ab	**
ASV_039	<i>Streptomyces</i> (g)	1.2 ± 0.3 a	0.7 ± 0.2 b	0.6 ± 0.3 b	0.4 ± 0.2 b	***
ASV_007	<i>Sphingomonas</i> (g)	1.2 ± 0.5 b	1.1 ± 0.3 b	2.5 ± 0.8 a	0.9 ± 0.9 b	**
ASV_064	<i>Streptomycetaceae</i> (f)	1.2 ± 0.4 a	0.5 ± 0.3 ab	0.2 ± 0.2 b	0.1 ± 0.2 b	***
ASV_032	<i>Asticacaulis biprosthecium</i>	1.1 ± 0.2 a	1.1 ± 0.4 a	0.8 ± 0.4 a	0.1 ± 0.2 b	***
ASV_033	<i>Niastella</i> (g)	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.5	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1	-
ASV_004	<i>Bradyrhizobium</i> (g)	0.9 ± 0.3 b	1.8 ± 0.5 a	2.3 ± 0.4 a	2.2 ± 0.7 a	***
ASV_023	<i>Novosphingobium</i> (g)	0.8 ± 0.6 ab	0.5 ± 0.3 ab	1.4 ± 0.9 a	0.2 ± 0.3 b	**
ASV_018	<i>Devosia</i> (g)	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.4	-
ASV_016	<i>Sphingomonas azotifigens</i>	0.7 ± 0.2 b	1.6 ± 0.4 a	0.9 ± 0.4 b	0.9 ± 0.5 ab	**
ASV_009	<i>Agrobacterium</i> (g)	0.4 ± 0.1 b	1.2 ± 0.4 a	1.8 ± 1.0 a	1.1 ± 0.4 a	***
ASV_031	<i>Sphingobacteriaceae</i> (f)	0.4 ± 0.2	1.0 ± 1.2	0.8 ± 0.5	0.6 ± 0.2	-
ASV_026	<i>Steroidobacter</i> (g)	0.3 ± 0.1 b	0.5 ± 0.2 b	0.6 ± 0.4 b	1.8 ± 0.3 a	***
ASV_024	<i>Sinobacteraceae</i> (f)	0.2 ± 0.2 b	0.5 ± 0.2 b	0.4 ± 0.1 b	1.9 ± 0.8 a	***
ASV_010	<i>Novosphingobium</i> (g)	0.2 ± 0.3 b	0.8 ± 0.6 ab	1.3 ± 0.5 a	1.8 ± 0.8 a	***
ASV_034	<i>Kutzneria</i> (g)	0.2 ± 0.2 b	0.3 ± 0.2 b	1.2 ± 0.3 a	0.8 ± 0.8 ab	**
ASV_021	<i>Chitinophaga</i> (g)	0.2 ± 0.3 b	0.3 ± 0.2 ab	0.7 ± 0.3 ab	2.0 ± 3.0 a	*
ASV_054	<i>Gammaproteobacteria</i> (c)	0.2 ± 0.4 b	0.1 ± 0.2 b	0.0 ± 0.1 b	1.9 ± 1.7 a	***
ASV_017	<i>Amycolatopsis</i> (g)	0.2 ± 0.1 b	0.4 ± 0.2 b	1.1 ± 0.2 a	1.3 ± 0.5 a	***
ASV_027	<i>Dokdonella</i> (g)	0.1 ± 0.1 c	0.5 ± 0.1 b	1.0 ± 0.2 a	0.9 ± 0.4 ab	***
ASV_040	<i>Comamonadaceae</i> (f)	0.1 ± 0.2 c	0.2 ± 0.2 bc	0.4 ± 0.2 b	1.3 ± 0.6 a	***
ASV_025	<i>Comamonadaceae</i> (f)	0.1 ± 0.2 c	0.5 ± 0.2 b	0.5 ± 0.3 b	2.1 ± 0.5 a	***
ASV_013	<i>Novosphingobium</i> (g)	0.1 ± 0.2 c	0.5 ± 0.4 bc	1.8 ± 1.3 a	0.6 ± 0.5 b	***
ASV_011	<i>Steroidobacter</i> (g)	0.0 ± 0.0 c	0.1 ± 0.1 c	0.7 ± 0.3 b	3.2 ± 1.2 a	***
ASV_046	<i>Gammaproteobacteria</i> (c)	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.1 b	0.1 ± 0.1 b	1.1 ± 1.0 a	***

^aASVs with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of sampling months are shown. Relative abundance was calculated based on 5491 reads per sample. ASVs indicated in bold font showed no significant differences for the relative abundance among the sampling months.

^bLetters (c, f, and g) in parentheses indicate taxonomic units (class, family and genus, respectively).

^cResults of average ± S.D. (n=6) are shown. The same letter indicate no statistical significance among the months and months with high, low and moderate abundances are highlighted with dark gray, white and light gray backgrounds, respectively.

^d*, **, and *** indicate the statistical significance among sampling months by one-way ANOVA at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively. "-" indicates no statistical significance among the sampling months.

表 1-6. 黒ボク土壌の圃場で栽培されたテンサイの側根共生細菌群の存在比 (%) の季節変動 (6月から9月の生育期間中のいずれかの月に ASV レベルで 0.1%以上の存在比を示した菌群のみを示す)

Table 1-6. ASVs with 0.1% or more than 0.1% of relative abundance in any one of sampling months for lateral root-associated bacteria of sugar beet grown in an Andosol experimental field in Japan during the growth period from June to September

Close taxon ^a / ASV ID ^b	Sampling month ^c				Sig. ^d	Note
	June	July	August	September		
Unclassified <i>Kutzneria</i> (1 ASV)						
ASV_034	0.17 ± 0.17 b	0.33 ± 0.19 b	1.20 ± 0.35 a	0.79 ± 0.76 ab	**	<i>Actinobacteria</i>
<i>Kribbella</i> (4 ASVs)						
ASV_012	1.77 ± 0.72 a	1.53 ± 0.45 a	1.15 ± 0.46 ab	0.74 ± 0.38 b	**	<i>Actinobacteria</i>
ASV_038	1.38 ± 0.30 a	0.98 ± 0.48 ab	0.47 ± 0.18 bc	0.25 ± 0.26 c	***	<i>Actinobacteria</i>
ASV_115	0.24 ± 0.37	0.11 ± 0.18	0.24 ± 0.12	0.14 ± 0.32		<i>Actinobacteria</i>
ASV_134	0.22 ± 0.23 ab	0.33 ± 0.19 a	0.11 ± 0.09 ab	0.03 ± 0.08 b	*	<i>Actinobacteria</i>
Unclassified <i>Amycolatopsis</i> (1 ASV)						
ASV_017	0.16 ± 0.12 b	0.39 ± 0.18 b	1.09 ± 0.24 a	1.25 ± 0.52 a	***	<i>Actinobacteria</i>
Unclassified <i>Streptomycetaceae</i> (7 ASVs)						
ASV_064	1.18 ± 0.43 a	0.53 ± 0.29 ab	0.23 ± 0.21 b	0.12 ± 0.18 b	***	<i>Actinobacteria</i>
ASV_184	0.62 ± 0.82 a	0.10 ± 0.17 ab	0.003 ± 0.007 b	0 ± 0 b	**	<i>Actinobacteria</i>
ASV_165	0.19 ± 0.34	0.11 ± 0.09	0.16 ± 0.12	0.05 ± 0.13		<i>Actinobacteria</i>
ASV_159	0 ± 0 c	0.03 ± 0.05 bc	0.20 ± 0.05 a	0.07 ± 0.07 b	***	<i>Actinobacteria</i>
<i>Streptomyces</i> in <i>Streptomycetaceae</i> (6 ASVs)						
ASV_001	13.87 ± 5.06 a	7.19 ± 2.69 b	5.99 ± 1.15 b	2.60 ± 0.99 c	***	<i>Actinobacteria</i>
ASV_039	1.20 ± 0.32 a	0.67 ± 0.23 b	0.59 ± 0.26 b	0.37 ± 0.15 b	***	<i>Actinobacteria</i>
ASV_372	0.21 ± 0.51	0.08 ± 0.13	0 ± 0	0 ± 0		<i>Actinobacteria</i>
Unclassified <i>Chitinophagaceae</i> (147 ASVs)						
ASV_002	1.21 ± 0.41 b	3.41 ± 1.10 a	3.45 ± 1.99 a	2.01 ± 1.05 ab	**	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_044	0.73 ± 0.38	0.79 ± 0.31	0.48 ± 0.17	0.44 ± 0.28		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_071	0.66 ± 0.52 a	0.44 ± 0.23 a	0.28 ± 0.35 ab	0.03 ± 0.07 b	*	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_144	0.62 ± 0.52 a	0.11 ± 0.06 b	0.08 ± 0.07 b	0.00 ± 0.01 b	***	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_092	0.29 ± 0.20	0.28 ± 0.18	0.36 ± 0.11	0.12 ± 0.14		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_050	0.27 ± 0.36	0.56 ± 0.39	0.69 ± 0.32	0.36 ± 0.22		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_073	0.24 ± 0.10	0.37 ± 0.14	0.30 ± 0.10	0.38 ± 0.13		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_068	0.16 ± 0.12 b	0.37 ± 0.24 ab	0.29 ± 0.05 ab	0.47 ± 0.10 a	**	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_190	0.15 ± 0.08	0.13 ± 0.07	0.09 ± 0.06	0.02 ± 0.03		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_205	0.12 ± 0.17	0.10 ± 0.10	0.07 ± 0.06	0.01 ± 0.03		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_070	0.11 ± 0.17 b	0.49 ± 0.19 a	0.34 ± 0.22 a	0.42 ± 0.20 a	**	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_194	0.06 ± 0.09	0.23 ± 0.19	0.04 ± 0.08	0.05 ± 0.08		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_042	0.05 ± 0.09 b	0.37 ± 0.25 a	0.70 ± 0.30 a	0.53 ± 0.32 a	***	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_241	0.03 ± 0.06	0.12 ± 0.14	0.003 ± 0.007	0.07 ± 0.09		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_052	0 ± 0 c	0.24 ± 0.10 b	0.45 ± 0.18 b	0.96 ± 0.45 a	***	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_161	0 ± 0 c	0.04 ± 0.05 bc	0.09 ± 0.07 b	0.24 ± 0.06 a	***	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_099	0 ± 0 b	0.05 ± 0.11 b	0.47 ± 0.14 a	0.16 ± 0.31 b	***	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_164	0 ± 0 b	0.12 ± 0.13 ab	0.14 ± 0.08 a	0.06 ± 0.07 ab	*	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_183	0 ± 0 b	0.06 ± 0.10 ab	0.10 ± 0.07 a	0.16 ± 0.14 a	***	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_185	0 ± 0 b	0.03 ± 0.04 b	0.02 ± 0.02 b	0.22 ± 0.16 a	**	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_363	0 ± 0	0.10 ± 0.16	0 ± 0	0.03 ± 0.08		<i>Bacteroidetes</i>
<i>Chitinophaga</i> in <i>Chitinophagaceae</i> (13 ASVs)						
ASV_005	1.90 ± 0.72 ab	1.24 ± 0.70 ab	2.38 ± 1.24 a	1.04 ± 0.48 b	*	<i>Bacteroidetes</i> (<i>C. arvensicola</i>)
ASV_049	0.28 ± 0.16	0.60 ± 0.24	0.49 ± 0.21	0.63 ± 0.39		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_021	0.16 ± 0.29 b	0.35 ± 0.19 ab	0.75 ± 0.26 ab	1.97 ± 3.04 a	*	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_237	0.10 ± 0.25	0.05 ± 0.08	0.06 ± 0.11	0.03 ± 0.07		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_255	0 ± 0	0.07 ± 0.10	0.03 ± 0.05	0.12 ± 0.18		<i>Bacteroidetes</i>

Table 1-6. continued.

Close taxon ^a / ASV ID ^b	Sampling month ^c				Sig. ^d	Note
	June	July	August	September		
<i>Niastella</i> in <i>Chitinophagaceae</i> (13 ASVs)						
ASV_008	1.85 ± 0.94	1.45 ± 0.50	0.89 ± 0.39	2.03 ± 1.00		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_033	1.03 ± 0.26	0.82 ± 0.47	0.77 ± 0.18	0.51 ± 0.13		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_061	0.30 ± 0.25	0.50 ± 0.31	0.38 ± 0.16	0.39 ± 0.11		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_028	0.24 ± 0.38 b	0.61 ± 0.32 a	0.83 ± 0.26 a	0.95 ± 0.34 a	**	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_045	0.21 ± 0.18	0.52 ± 0.41	0.63 ± 0.32	0.60 ± 0.31		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_037	0.08 ± 0.10 b	0.56 ± 0.17 a	0.73 ± 0.43 a	0.74 ± 0.27 a	***	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_152	0 ± 0 b	0.08 ± 0.10 ab	0.12 ± 0.07 a	0.13 ± 0.08 a	**	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_251	0 ± 0 b	0.04 ± 0.09 ab	0.12 ± 0.13 a	0 ± 0 b	*	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Cytophagaceae</i> (56 ASVs)						
ASV_085	0.14 ± 0.13 b	0.34 ± 0.15 a	0.19 ± 0.06 ab	0.43 ± 0.13 a	**	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_145	0.12 ± 0.09	0.13 ± 0.05	0.09 ± 0.05	0.20 ± 0.10		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_095	0.07 ± 0.12 b	0.06 ± 0.12 b	0.19 ± 0.12 ab	0.35 ± 0.35 a	*	<i>Bacteroidetes (Dyadobacter)</i>
ASV_234	0.04 ± 0.05	0.13 ± 0.11	0.04 ± 0.07	0.03 ± 0.07		<i>Bacteroidetes (Dyadobacter)</i>
ASV_199	0.01 ± 0.02 b	0.02 ± 0.02 b	0.02 ± 0.03 b	0.22 ± 0.14 a	**	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Flavobacterium</i> (32 ASVs)						
ASV_175	0.25 ± 0.36 ab	0.30 ± 0.24 a	0.02 ± 0.02 b	0 ± 0 b	*	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_204	0.18 ± 0.28	0.21 ± 0.20	0.05 ± 0.10	0.01 ± 0.02		<i>Bacteroidetes (F. succinicans)</i>
ASV_352	0.17 ± 0.42	0 ± 0	0.04 ± 0.10	0 ± 0		<i>Bacteroidetes (F. succinicans)</i>
ASV_126	0.05 ± 0.13	0.11 ± 0.13	0 ± 0	0.24 ± 0.55		<i>Bacteroidetes (F. succinicans)</i>
ASV_380	0 ± 0 b	0.12 ± 0.17 a	0.01 ± 0.01 ab	0 ± 0 b	*	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Pedobacter</i> (13 ASVs)						
ASV_014	2.83 ± 1.07 a	1.68 ± 0.89 ab	0.79 ± 0.52 bc	0.24 ± 0.41 c	***	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_051	0.61 ± 0.22	0.56 ± 0.31	0.63 ± 0.43	0.19 ± 0.09		<i>Bacteroidetes</i>
ASV_157	0.44 ± 0.38 a	0.17 ± 0.11 ab	0.08 ± 0.14 ab	0.05 ± 0.13 b	*	<i>Bacteroidetes</i>
ASV_153	0.32 ± 0.39	0.15 ± 0.18	0.12 ± 0.14	0 ± 0		<i>Bacteroidetes (P. terricola)</i>
ASV_104	0.24 ± 0.42	0.54 ± 0.72	0.09 ± 0.10	0.08 ± 0.13		<i>Bacteroidetes</i>
<i>Caulobacteraceae</i> (6 ASVs)						
ASV_032	1.09 ± 0.25 a	1.11 ± 0.43 a	0.81 ± 0.44 a	0.13 ± 0.16 b	***	<i>Alphaproteobacteria (A. biprosthecium)</i>
ASV_003	3.36 ± 0.64 a	3.52 ± 1.14 a	2.31 ± 0.72 a	1.02 ± 0.36 b	***	<i>Alphaproteobacteria (C. henricii)</i>
ASV_207	0.22 ± 0.24	0.08 ± 0.09	0.04 ± 0.05	0 ± 0		<i>Alphaproteobacteria (C. henricii)</i>
ASV_127	0.07 ± 0.07 b	0.27 ± 0.14 a	0.14 ± 0.09 ab	0.24 ± 0.11 a	**	<i>Alphaproteobacteria (Caulobacter)</i>
Unclassified <i>Ellin329</i> (23 ASVs)						
ASV_081	0.06 ± 0.10 b	0.28 ± 0.19 a	0.26 ± 0.08 a	0.47 ± 0.16 a	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_215	0.03 ± 0.08	0.08 ± 0.10	0.06 ± 0.07	0.12 ± 0.17		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_122	0 ± 0 b	0.08 ± 0.13 b	0.41 ± 0.37 a	0.02 ± 0.04 b	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_148	0 ± 0 b	0.18 ± 0.10 a	0.10 ± 0.06 a	0.14 ± 0.13 a	**	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_286	0 ± 0	0 ± 0	0.15 ± 0.33	0.05 ± 0.12		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_287	0 ± 0	0 ± 0	0.03 ± 0.07	0.14 ± 0.17		<i>Alphaproteobacteria</i>
Unclassified <i>Bradyrhizobiaceae</i> (9 ASVs)						
ASV_056	0.84 ± 0.25 a	0.49 ± 0.13 b	0.62 ± 0.17 ab	0.12 ± 0.09 c	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_112	0 ± 0 b	0.19 ± 0.22 ab	0.29 ± 0.10 a	0.07 ± 0.11 b	**	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_135	0.27 ± 0.18 a	0.27 ± 0.18 a	0.12 ± 0.06 ab	0.02 ± 0.04 b	*	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_149	0.22 ± 0.40	0.09 ± 0.11	0.12 ± 0.10	0.05 ± 0.07		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_225	0 ± 0 b	0.17 ± 0.08 a	0.06 ± 0.05 ab	0.05 ± 0.11 b	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Bradyrhizobium</i> in <i>Bradyrhizobiaceae</i> (2 ASVs)						
ASV_004	0.91 ± 0.35 b	1.81 ± 0.48 a	2.28 ± 0.41 a	2.23 ± 0.69 a	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_090	0 ± 0 c	0.18 ± 0.09 b	0.39 ± 0.10 a	0.32 ± 0.17 ab	***	<i>Alphaproteobacteria</i>

Table 1-6. continued.

Close taxon ^a / ASV ID ^b	Sampling month ^c				Sig. ^d	Note
	June	July	August	September		
Unclassified <i>Devosia</i> (12 ASVs)						
ASV_018	0.76 ± 0.22	1.07 ± 0.43	0.98 ± 0.20	0.93 ± 0.39		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_114	0.59 ± 0.36 a	0.35 ± 0.10 ab	0.16 ± 0.05 b	0.02 ± 0.02 c	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_096	0.51 ± 0.22 a	0.33 ± 0.23 ab	0.27 ± 0.37 ab	0.08 ± 0.07 b	*	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_181	0.24 ± 0.15 a	0.05 ± 0.05 ab	0.12 ± 0.12 ab	0.01 ± 0.01 b	**	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_151	0.13 ± 0.13	0.26 ± 0.21	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.06		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_195	0 ± 0 b	0.27 ± 0.12 a	0.08 ± 0.11 b	0.09 ± 0.11 b	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Phyllobacteriaceae</i> (6 ASVs)						
ASV_077	0.46 ± 0.16 a	0.45 ± 0.12 a	0.34 ± 0.11 a	0.15 ± 0.08 b	***	<i>Alphaproteobacteria (Aminobacter)</i>
ASV_029	0.73 ± 0.09 a	0.82 ± 0.24 a	0.98 ± 0.28 a	0.36 ± 0.09 b	***	<i>Alphaproteobacteria (Mesorhizobium)</i>
ASV_074	0.33 ± 0.07 ab	0.46 ± 0.06 a	0.36 ± 0.13 ab	0.28 ± 0.08 b	*	<i>Alphaproteobacteria (Mesorhizobium)</i>
ASV_121	0.20 ± 0.17 ab	0.30 ± 0.21 a	0.18 ± 0.11 ab	0.05 ± 0.07 b	*	<i>Alphaproteobacteria (Mesorhizobium)</i>
<i>Rhizobiaceae</i> (9 ASVs)						
ASV_009	0.42 ± 0.08 b	1.23 ± 0.41 a	1.77 ± 0.96 a	1.11 ± 0.42 a	***	<i>Alphaproteobacteria (Agrobacterium)</i>
ASV_006	1.75 ± 0.62 ab	1.52 ± 0.43 ab	2.19 ± 0.42 a	1.17 ± 0.29 b	**	<i>Alphaproteobacteria (Rhizobium)</i>
ASV_035	0.49 ± 0.43 ab	0.78 ± 0.36 ab	0.93 ± 0.27 a	0.23 ± 0.19 b	*	<i>Alphaproteobacteria (Rhizobium)</i>
ASV_097	0.46 ± 0.25 a	0.42 ± 0.20 a	0.21 ± 0.08 ab	0.06 ± 0.12 b	**	<i>Alphaproteobacteria (Rhizobium)</i>
ASV_119	0.31 ± 0.59	0 ± 0	0.19 ± 0.39	0.18 ± 0.20		<i>Alphaproteobacteria (Rhizobium)</i>
Unclassified <i>Novosphingobium</i> (13 ASVs)						
ASV_023	0.85 ± 0.55 ab	0.49 ± 0.34 ab	1.35 ± 0.91 a	0.21 ± 0.33 b	**	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_060	0.33 ± 0.56	0.20 ± 0.23	0.42 ± 0.47	0.65 ± 0.34		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_010	0.20 ± 0.31 b	0.79 ± 0.60 ab	1.35 ± 0.52 a	1.78 ± 0.81 a	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_202	0.15 ± 0.23	0.06 ± 0.12	0.09 ± 0.11	0.08 ± 0.20		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_066	0.13 ± 0.15	0.04 ± 0.10	0.76 ± 1.16	0.13 ± 0.16		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_288	0.12 ± 0.18	0.02 ± 0.05	0.06 ± 0.10	0 ± 0		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_076	0.08 ± 0.20 b	0 ± 0 b	0.26 ± 0.49 ab	0.54 ± 0.38 a	**	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_120	0.08 ± 0.14	0.05 ± 0.13	0.29 ± 0.46	0 ± 0		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_013	0.07 ± 0.16 c	0.50 ± 0.43 bc	1.85 ± 1.28 a	0.56 ± 0.47 b	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_169	0.03 ± 0.07	0.06 ± 0.06	0.15 ± 0.09	0.07 ± 0.08		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_080	0 ± 0 c	0.22 ± 0.08 b	0.44 ± 0.12 a	0.33 ± 0.18 ab	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
Unclassified <i>Sphingobium</i> (7 ASVs)						
ASV_015	2.03 ± 0.87 a	1.13 ± 0.43 a	1.16 ± 0.60 a	0.43 ± 0.15 b	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_249	0.15 ± 0.10 a	0.08 ± 0.09 ab	0.03 ± 0.03 ab	0.02 ± 0.02 b	*	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_395	0.13 ± 0.20	0.03 ± 0.07	0 ± 0	0 ± 0		<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Sphingomonas</i> (20 ASVs)						
ASV_007	1.19 ± 0.49 b	1.07 ± 0.34 b	2.49 ± 0.81 a	0.93 ± 0.85 b	**	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_016	0.68 ± 0.17 b	1.58 ± 0.41 a	0.86 ± 0.42 b	0.94 ± 0.50 ab	**	<i>Alphaproteobacteria (S. azotifigens)</i>
ASV_036	0 ± 0 b	0.80 ± 0.24 a	0.85 ± 0.34 a	0.72 ± 0.25 a	***	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_224	0 ± 0	0.13 ± 0.18	0.09 ± 0.11	0.02 ± 0.04		<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_335	0 ± 0	0.13 ± 0.15	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.04		<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Sphingopyxis</i> (5 ASVs)						
ASV_069	0.77 ± 0.78 a	0.44 ± 0.29 ab	0.34 ± 0.23 ab	0.03 ± 0.05 b	*	<i>Alphaproteobacteria</i>
ASV_086	0.44 ± 0.44	0.34 ± 0.28	0.27 ± 0.18	0.11 ± 0.08		<i>Alphaproteobacteria (S. alaskensis)</i>
ASV_137	0.14 ± 0.23	0.16 ± 0.29	0.23 ± 0.14	0 ± 0		<i>Alphaproteobacteria</i>

Table 1-6. continued.

Close taxon ^a / ASV ID ^b	Sampling month ^c				Sig. ^d	Note
	June	July	August	September		
Unclassified <i>Comamonadaceae</i> (24 ASVs)						
ASV_059	0.94 ± 0.45 a	0.86 ± 0.29 a	0.19 ± 0.21 b	0.02 ± 0.06 b	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_041	0.29 ± 0.38	0.53 ± 0.23	0.99 ± 1.06	0.36 ± 0.09		<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_091	0.12 ± 0.18 b	0.34 ± 0.17 ab	0.15 ± 0.14 ab	0.42 ± 0.28 a	*	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_040	0.10 ± 0.24 c	0.15 ± 0.18 bc	0.36 ± 0.18 b	1.34 ± 0.56 a	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_025	0.08 ± 0.16 c	0.48 ± 0.16 b	0.50 ± 0.33 b	2.13 ± 0.46 a	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_094	0.06 ± 0.07 c	0.56 ± 0.20 a	0.11 ± 0.05 bc	0.28 ± 0.12 ab	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_084	0 ± 0 c	0.06 ± 0.11 bc	0.33 ± 0.23 a	0.26 ± 0.31 ab	**	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_125	0 ± 0 c	0.02 ± 0.04 bc	0.06 ± 0.04 b	0.42 ± 0.25 a	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_132	0 ± 0	0.06 ± 0.09	0.18 ± 0.17	0.19 ± 0.21		<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_143	0 ± 0	0.25 ± 0.42	0.02 ± 0.06	0.21 ± 0.23		<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_150	0 ± 0 c	0.08 ± 0.08 b	0.09 ± 0.07 ab	0.19 ± 0.07 a	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_321	0 ± 0 b	0.01 ± 0.01 b	0.02 ± 0.02 b	0.10 ± 0.05 a	***	<i>Betaproteobacteria</i>
Unclassified <i>Oxalobacteraceae</i> (14 ASVs)						
ASV_022	1.85 ± 0.74 a	1.48 ± 0.54 a	0.70 ± 0.21 b	0.34 ± 0.19 b	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_128	0.59 ± 0.32 a	0.27 ± 0.09 b	0.10 ± 0.05 c	0 ± 0 d	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_113	0.46 ± 0.44 a	0.40 ± 0.08 a	0.11 ± 0.09 ab	0.03 ± 0.08 b	**	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_172	0.29 ± 0.16 a	0.12 ± 0.08 b	0.16 ± 0.10 ab	0.00 ± 0.01 c	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_179	0.22 ± 0.13	0.25 ± 0.17	0.04 ± 0.05	0.06 ± 0.05		<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_367	0.15 ± 0.27	0.05 ± 0.13	0 ± 0	0 ± 0		<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_212	0.02 ± 0.04 b	0.09 ± 0.09 ab	0.06 ± 0.04 ab	0.12 ± 0.06 a	*	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_253	0 ± 0	0.17 ± 0.37	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02		<i>Betaproteobacteria</i>
<i>Janthinobacterium</i> in <i>Oxalobacteraceae</i> (5 ASVs)						
ASV_030	3.00 ± 1.39 a	1.28 ± 0.55 b	0.21 ± 0.09 c	0.18 ± 0.11 c	***	<i>Betaproteobacteria</i>
ASV_141	0.87 ± 0.48 a	0.15 ± 0.16 b	0.03 ± 0.03 b	0 ± 0 b	***	<i>Betaproteobacteria (J. lividum)</i>
Unclassified <i>Myxococcales</i> (94 ASVs)						
ASV_213	0.17 ± 0.18	0.04 ± 0.05	0.09 ± 0.08	0.03 ± 0.03		<i>Deltaproteobacteria</i>
ASV_244	0.13 ± 0.13	0.03 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.02 ± 0.02		<i>Deltaproteobacteria</i>
ASV_079	0.06 ± 0.10 c	0.13 ± 0.06 bc	0.31 ± 0.10 ab	0.46 ± 0.25 a	***	<i>Deltaproteobacteria</i>
ASV_093	0 ± 0 c	0 ± 0 c	0.18 ± 0.10 b	0.59 ± 0.31 a	***	<i>Deltaproteobacteria</i>
ASV_162	0 ± 0 c	0 ± 0 c	0.04 ± 0.03 b	0.30 ± 0.18 a	***	<i>Deltaproteobacteria</i>
ASV_210	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.28 ± 0.13 a	***	<i>Deltaproteobacteria</i>
ASV_221	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.003 ± 0.007 b	0.22 ± 0.20 a	***	<i>Deltaproteobacteria</i>
ASV_261	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.01 ± 0.02 b	0.22 ± 0.15 a	***	<i>Deltaproteobacteria</i>
Unclassified <i>Haliangiaceae</i> in <i>Myxococcales</i> (33 ASVs)						
ASV_109	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.13 ± 0.12 ab	0.45 ± 0.34 a	***	<i>Deltaproteobacteria</i>
ASV_156	0 ± 0 b	0.07 ± 0.07 b	0.05 ± 0.05 b	0.29 ± 0.26 a	***	<i>Deltaproteobacteria</i>
ASV_170	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.38 ± 0.43 a	***	<i>Deltaproteobacteria</i>
Unclassified <i>Gammaproteobacteria</i> (32 ASVs)						
ASV_310	0.24 ± 0.59	0.04 ± 0.07	0.01 ± 0.02	0 ± 0		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_054	0.16 ± 0.40 b	0.14 ± 0.16 b	0.03 ± 0.05 b	1.85 ± 1.71 a	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_046	0 ± 0 b	0.05 ± 0.08 b	0.14 ± 0.08 b	1.07 ± 1.01 a	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_200	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.37 ± 0.81		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_236	0 ± 0	0 ± 0	0.02 ± 0.04	0.18 ± 0.25		<i>Gammaproteobacteria</i>

Table 1-6. continued.

Close taxon ^a / ASV ID ^b	Sampling month ^c				Sig. ^d	Note
	June	July	August	September		
<i>Pseudomonas</i> (14 ASVs)						
ASV_020	1.39 ± 1.16 ab	2.15 ± 2.05 a	0.18 ± 0.10 c	0.36 ± 0.28 bc	**	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_072	1.23 ± 2.21	0.16 ± 0.23	0.14 ± 0.19	0.25 ± 0.37		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_101	0.62 ± 1.08	0 ± 0	0.16 ± 0.36	0.03 ± 0.07		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_160	0.25 ± 0.41	0.34 ± 0.31	0.06 ± 0.10	0 ± 0		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_307	0.23 ± 0.33	0 ± 0	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.07		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_245	0.22 ± 0.54	0.19 ± 0.22	0 ± 0	0 ± 0		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_238	0.11 ± 0.26	0.17 ± 0.36	0.04 ± 0.10	0 ± 0		<i>Gammaproteobacteria (P. umsongensis)</i>
ASV_243	0.04 ± 0.07	0.18 ± 0.36	0.01 ± 0.01	0 ± 0		<i>Gammaproteobacteria (P. viridiflava)</i>
ASV_302	0 ± 0	0.19 ± 0.20	0 ± 0	0.06 ± 0.14		<i>Gammaproteobacteria</i>
Unclassified Sinobacteraceae (26 ASVs)						
ASV_024	0.20 ± 0.18 b	0.48 ± 0.20 b	0.40 ± 0.09 b	1.91 ± 0.78 a	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_106	0.04 ± 0.09 b	0.14 ± 0.11 ab	0.23 ± 0.11 a	0.30 ± 0.13 a	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_176	0.03 ± 0.07 b	0.09 ± 0.11 b	0.00 ± 0.01 b	0.26 ± 0.11 a	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_265	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.05 ± 0.06 ab	0.11 ± 0.11 a	**	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_320	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.01 ± 0.02 b	0.10 ± 0.06 a	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
Unclassified Steroidobacter in Sinobacteraceae (13 ASVs)						
ASV_026	0.25 ± 0.08 b	0.48 ± 0.20 b	0.63 ± 0.41 b	1.78 ± 0.34 a	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_011	0.03 ± 0.04 c	0.11 ± 0.09 c	0.72 ± 0.26 b	3.19 ± 1.17 a	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_082	0.02 ± 0.04 c	0.09 ± 0.08 bc	0.17 ± 0.08 b	0.66 ± 0.25 a	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
Unclassified <i>Dokdonella</i> (12 ASVs)						
ASV_027	0.15 ± 0.09 c	0.53 ± 0.11 b	1.02 ± 0.19 a	0.93 ± 0.36 ab	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_138	0.07 ± 0.07	0.10 ± 0.09	0.21 ± 0.06	0.11 ± 0.08		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_186	0.04 ± 0.07	0.07 ± 0.11	0.07 ± 0.08	0.19 ± 0.17		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_136	0.03 ± 0.05 b	0.14 ± 0.07 a	0.15 ± 0.12 ab	0.16 ± 0.10 a	*	<i>Gammaproteobacteria</i>
Unclassified <i>Rhodanobacter</i> (6 ASVs)						
ASV_019	1.88 ± 1.03 a	1.16 ± 0.27 a	0.92 ± 0.35 ab	0.34 ± 0.31 b	***	<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_107	0.44 ± 0.30	0.33 ± 0.22	0.14 ± 0.12	0.13 ± 0.12		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_178	0.11 ± 0.26	0.21 ± 0.30	0.12 ± 0.12	0 ± 0		<i>Gammaproteobacteria</i>
ASV_053	0 ± 0 b	0.48 ± 0.54 ab	0.72 ± 0.80 a	0.42 ± 0.51 ab	*	<i>Gammaproteobacteria</i>

^aNumbers of ASV belonging to each taxon are shown in parentheses. ASVs with less than 0.1% of relative abundance in all sampling months are not shown.

^bASVs with 0.1% or more than 0.1% of relative abundance in any one of sampling months are shown. Relative abundance was calculated based on 5491 reads per sample. ASVs listed in Table 4 are indicated in bold font.

^cResults of average ± S.D. (n=6) are shown. The same letter indicate no statistical significance among the months and months with high, low and moderate abundances are highlighted with dark gray, white and light gray backgrounds, respectively.

^d*, **, and *** indicate the statistical significance among sampling months by one-way ANOVA at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively.

表 1-7. 黒ボク土壌の圃場で栽培されたテンサイの主要な側根共生細菌群の存在比 (%) の季節変動 (6月から9月の生育期間中のいずれかの月に門、綱、目のいずれかのレベルで1%以上の存在比を示した菌群のみを示す)

Table 1-7. Sugar beet lateral root-associated bacteria showing significant differences of relative abundances (%) among sampling months at the levels of phylum, class, and order

Taxon ^a	Sampling month ^b				Sig. ^c
	June	July	August	September	
<i>Proteobacteria</i>	50.3 ± 5.4 b	54.3 ± 2.1 ab	56.1 ± 3.6 ab	58.7 ± 5.5 a	*
<i>Alphaproteobacteria</i>	26.1 ± 2.0 bc	30.5 ± 2.5 b	37.0 ± 5.7 a	23.7 ± 3.0 c	***
<i>Rhizobiales</i>	11.6 ± 1.2 b	13.8 ± 1.3 a	15.2 ± 1.4 a	10.6 ± 1.6 b	***
<i>Sphingomonadales</i>	8.5 ± 1.2 b	9.5 ± 0.9 b	15.8 ± 3.9 a	8.5 ± 1.4 b	***
<i>Caulobacterales</i>	5.5 ± 0.8 a	6.0 ± 1.6 a	4.2 ± 0.9 a	2.1 ± 0.6 b	***
<i>Ellin329</i>	0.3 ± 0.1 b	0.7 ± 0.3 ab	1.2 ± 0.7 a	1.1 ± 0.3 a	***
<i>Betaproteobacteria</i>	12.6 ± 3.1 a	11.7 ± 1.7 a	7.5 ± 1.4 b	11.3 ± 1.8 a	**
<i>Burkholderiales</i>	11.7 ± 3.1 a	11.0 ± 1.7 a	6.9 ± 1.3 b	10.0 ± 1.4 a	**
<i>Gammaproteobacteria</i>	10.8 ± 3.3 b	11.3 ± 2.1 b	9.8 ± 1.0 b	18.8 ± 3.6 a	***
<i>Xanthomonadales</i>	5.5 ± 1.2 c	7.0 ± 1.1 bc	8.7 ± 1.3 b	13.1 ± 2.4 a	***
<i>Pseudomonadales</i>	4.1 ± 2.3 a	3.4 ± 2.1 a	0.6 ± 0.4 b	0.8 ± 0.5 b	***
Unclassified <i>Gammaproteobacteria</i> (c)	0.5 ± 0.7 b	0.4 ± 0.3 b	0.2 ± 0.1 b	3.6 ± 2.2 a	***
<i>Deltaproteobacteria</i>	0.9 ± 0.5 b	0.8 ± 0.3 b	1.7 ± 0.7 b	4.8 ± 2.0 a	***
<i>Myxococcales</i>	0.8 ± 0.4 b	0.6 ± 0.2 b	1.5 ± 0.6 b	4.5 ± 1.9 a	***
<i>Actinobacteria</i>	25.3 ± 6.9 a	16.7 ± 4.3 b	16.1 ± 2.0 bc	10.5 ± 3.3 c	***
<i>Actinomycetales</i>	25.0 ± 6.9 a	16.4 ± 4.4 b	15.6 ± 2.1 b	10.2 ± 3.3 b	***
<i>Verrucomicrobia</i>	0.5 ± 0.3 b	0.8 ± 0.4 b	0.9 ± 0.3 b	2.0 ± 0.7 a	***
<i>Chloroflexi</i>	0.4 ± 0.2 b	0.3 ± 0.2 b	0.6 ± 0.2 b	1.2 ± 0.6 a	***
<i>Bacteroidetes</i>	20.5 ± 2.9	25.1 ± 3.0	22.6 ± 2.6	23.0 ± 5.1	-
<i>Saprospirales</i>	12.0 ± 1.4 b	16.8 ± 1.7 a	18.0 ± 3.2 a	17.8 ± 4.7 a	**
<i>Sphingobacteriales</i>	6.2 ± 1.2 a	5.9 ± 2.2 a	3.6 ± 0.7 b	2.5 ± 0.5 b	***
<i>Flavobacteriales</i>	1.3 ± 0.6 a	1.4 ± 0.6 a	0.4 ± 0.1 b	0.9 ± 0.5 ab	**
<i>Cytophagales</i>	1.0 ± 0.3 b	1.0 ± 0.2 b	0.7 ± 0.2 b	1.7 ± 0.6 a	***

^aTaxa with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of sampling months are shown. When the same value for relative abundance is obtained at different taxonomic levels for a bacterial group, only the lowest taxonomic group is shown. Relative abundance was calculated based on 5491 reads per sample. Letters (c) in parentheses indicate taxonomic units (class). Bacteroidetes showed no significant differences for the relative abundance among the sampling months, but it is listed as a reference for the orders of this phylum.

^bResults of average ± S.D. (n=6) are shown. The same letter indicate no statistical significance among the months and months with high, low and moderate abundances are highlighted with dark gray, white and light gray backgrounds, respectively.

^c*, ** and *** indicate the statistical significance among months by one-way ANOVA at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively. "-" indicates no statistical significance among the sampling months.

表 1-8. 黒ボク土壌の圃場で栽培されたテンサイの主要な側根共生細菌群の存在比 (%) の季節変動 (6 月から 9 月の生育期間中のいずれかの月に科、属のいずれかのレベルで 1% 以上の存在比を示した菌群のみを示す)

Table 1-8. Sugar beet lateral root-associated bacteria showing significant differences of relative abundances (%) among sampling months at family, genus, and species levels

Taxon ^a	Sampling month ^b				Sig. ^c
	June	July	August	September	
<i>Streptomycetaceae</i>	17.7 ± 6.4 a	9.1 ± 3.0 b	7.6 ± 1.5 b	3.6 ± 1.3 c	***
<i>Streptomyces</i>	15.7 ± 5.7 a	8.3 ± 3.0 b	7.0 ± 1.4 b	3.4 ± 1.2 c	***
Unclassified <i>Streptomycetaceae</i> (f)	2.0 ± 1.1 a	0.8 ± 0.5 b	0.6 ± 0.2 b	0.2 ± 0.3 b	***
<i>Chitinophagaceae</i> ^d	11.9 ± 1.4 b	16.7 ± 1.7 a	17.9 ± 3.2 a	17.7 ± 4.7 a	**
Unclassified <i>Chitinophagaceae</i> (f)'	4.7 ± 0.6 b	7.8 ± 1.1 a	7.6 ± 2.0 a	5.9 ± 1.0 ab	***
Unclassified <i>Chitinophagaceae</i> (f)''	0.7 ± 0.2 c	1.6 ± 0.5 b	1.8 ± 0.5 ab	2.5 ± 0.6 a	***
<i>Chitinophaga arvensicola</i>	1.9 ± 0.7 ab	1.2 ± 0.7 ab	2.4 ± 1.2 a	1.0 ± 0.5 b	*
<i>Oxalobacteraceae</i>	8.5 ± 1.7 a	5.1 ± 0.8 b	1.7 ± 0.3 c	0.9 ± 0.1 d	***
<i>Janthinobacterium</i>	3.9 ± 1.3 a	1.5 ± 0.7 b	0.3 ± 0.1 c	0.2 ± 0.1 c	***
Unclassified <i>Oxalobacteraceae</i> (f)	2.8 ± 0.7 a	2.5 ± 0.4 a	0.9 ± 0.2 b	0.6 ± 0.1 b	***
<i>Sphingomonadaceae</i>	8.3 ± 1.1 b	9.0 ± 0.7 b	14.8 ± 3.5 a	8.2 ± 1.3 b	***
<i>Sphingobium</i>	2.3 ± 1.0 a	1.3 ± 0.4 b	1.2 ± 0.6 b	0.5 ± 0.2 c	***
<i>Novosphingobium</i>	2.0 ± 0.6 c	2.5 ± 0.3 c	7.1 ± 2.9 a	4.4 ± 0.7 b	***
<i>Sphingomonas</i>	1.9 ± 0.6 c	3.8 ± 0.8 ab	4.4 ± 0.8 a	2.7 ± 1.3 bc	***
<i>Sphingomonas azotifigens</i>	0.7 ± 0.2 b	1.6 ± 0.4 a	0.9 ± 0.4 b	0.9 ± 0.5 ab	**
<i>Sphingopyxis</i>	1.4 ± 0.8 a	0.9 ± 0.5 a	0.9 ± 0.4 a	0.1 ± 0.1 b	***
<i>Sphingobacteriaceae</i>	6.2 ± 1.2 a	5.7 ± 2.2 a	3.5 ± 0.7 b	1.9 ± 0.7 b	***
<i>Pedobacter</i>	4.6 ± 1.3 a	3.2 ± 1.3 ab	1.8 ± 0.8 b	0.6 ± 0.4 c	***
<i>Caulobacteraceae</i>	5.5 ± 0.8 a	6.0 ± 1.6 a	4.2 ± 0.9 a	2.1 ± 0.6 b	***
<i>Caulobacter</i>	3.6 ± 0.6 ab	3.9 ± 1.2 a	2.5 ± 0.8 b	1.3 ± 0.4 c	***
<i>Caulobacter henricii</i>	3.6 ± 0.6 a	3.6 ± 1.1 ab	2.3 ± 0.7 b	1.0 ± 0.4 c	***
<i>Asticcacaulis biprosthecium</i>	1.1 ± 0.2 a	1.1 ± 0.4 a	0.8 ± 0.4 a	0.1 ± 0.2 b	***
<i>Rhizobiaceae</i>	4.6 ± 0.8 ab	5.0 ± 0.8 a	5.9 ± 1.1 a	3.6 ± 0.5 b	***
<i>Rhizobium</i>	3.0 ± 1.1 a	2.7 ± 0.7 a	3.5 ± 0.5 a	1.6 ± 0.4 b	**
<i>Agrobacterium</i>	0.5 ± 0.2 b	1.2 ± 0.4 a	1.8 ± 1.0 a	1.2 ± 0.4 ab	**
<i>Pseudomonas</i>	4.1 ± 2.3 a	3.4 ± 2.1 a	0.6 ± 0.4 b	0.8 ± 0.6 b	***
<i>Nocardiodiaceae</i>	4.1 ± 0.9 a	3.4 ± 0.7 ab	2.3 ± 0.8 bc	1.3 ± 0.8 c	***
<i>Kribbella</i>	3.6 ± 0.8 a	3.0 ± 0.7 ab	2.0 ± 0.8 bc	1.2 ± 0.8 c	***
<i>Rhodanobacter</i>	2.5 ± 1.2 a	2.2 ± 0.7 ab	1.9 ± 1.1 ab	0.9 ± 0.8 b	*
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	2.3 ± 0.3 b	3.5 ± 0.5 a	4.1 ± 0.7 a	3.1 ± 0.8 ab	***
Unclassified <i>Bradyrhizobiaceae</i> (f)	1.3 ± 0.7 a	1.3 ± 0.2 a	1.3 ± 0.2 a	0.4 ± 0.2 b	***
<i>Bradyrhizobium</i>	0.9 ± 0.3 b	2.0 ± 0.4 a	2.7 ± 0.5 a	2.5 ± 0.8 a	***
<i>Devosia</i>	2.2 ± 0.5 ab	2.4 ± 0.7 a	1.7 ± 0.6 ab	1.5 ± 0.2 b	*
<i>Comamonadaceae</i>	2.1 ± 1.1 c	4.8 ± 1.0 b	4.0 ± 1.0 b	8.2 ± 1.9 a	***
Unclassified <i>Comamonadaceae</i> (f)	1.7 ± 0.8 c	3.5 ± 0.8 b	3.0 ± 1.0 b	6.2 ± 1.5 a	***
<i>Phyllobacteriaceae</i>	1.7 ± 0.4 a	2.1 ± 0.3 a	1.9 ± 0.4 a	0.9 ± 0.3 b	***
<i>Mesorhizobium</i>	1.3 ± 0.2 a	1.6 ± 0.2 a	1.5 ± 0.4 a	0.7 ± 0.2 b	***
<i>Cytophagaceae</i>	1.0 ± 0.3 b	1.0 ± 0.2 b	0.7 ± 0.2 b	1.7 ± 0.6 a	***
<i>Flavobacterium</i>	0.9 ± 0.5 a	1.1 ± 0.6 a	0.2 ± 0.1 b	0.4 ± 0.5 ab	**
<i>Actinosynnemataceae</i>	0.8 ± 0.3 b	1.1 ± 0.4 b	2.2 ± 0.2 a	1.9 ± 0.9 a	***
<i>Kutzneria</i>	0.2 ± 0.2 b	0.3 ± 0.2 b	1.2 ± 0.3 a	0.8 ± 0.8 ab	**
<i>Sinobacteraceae</i>	0.6 ± 0.2 c	1.5 ± 0.5 b	2.4 ± 0.6 b	8.9 ± 2.0 a	***
<i>Steroidobacter</i>	0.3 ± 0.1 d	0.7 ± 0.2 c	1.6 ± 0.5 b	5.9 ± 1.0 a	***
Unclassified <i>Sinobacteraceae</i> (f)	0.3 ± 0.1 c	0.7 ± 0.3 b	0.8 ± 0.1 b	3.0 ± 1.1 a	***
<i>Dokdonella</i>	0.3 ± 0.1 c	0.9 ± 0.1 b	1.6 ± 0.3 a	1.5 ± 0.5 a	***
Unclassified <i>Gammaproteobacteria</i> (c)	0.5 ± 0.7 b	0.4 ± 0.3 b	0.2 ± 0.1 b	3.6 ± 2.2 a	***
Unclassified <i>Ellin329</i> (o)	0.3 ± 0.1 b	0.7 ± 0.3 ab	1.2 ± 0.7 a	1.1 ± 0.3 a	***
<i>Haliangiaceae</i>	0.2 ± 0.1 b	0.2 ± 0.2 b	0.4 ± 0.2 b	1.4 ± 0.9 a	***
<i>Amycolatopsis</i>	0.2 ± 0.1 b	0.4 ± 0.2 b	1.1 ± 0.2 a	1.3 ± 0.5 a	***
Unclassified <i>Myxococcales</i> (o)	0.1 ± 0.1 c	0.1 ± 0.1 c	0.4 ± 0.2 b	2.2 ± 0.7 a	***

^aTaxa with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of sampling months are shown. Relative abundance was calculated based on 5491 reads per sample. Letters (f, c and o) in parentheses indicate taxonomic units (family, class and order, respectively).

^bResults of average ± S.D. (n=6) are shown. The same letter indicate no statistical significance among the months and months with high, low and moderate abundances are highlighted with dark gray, white and light gray backgrounds, respectively.

^c*, ** and *** indicate the statistical significance among months by one-way ANOVA at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

^dUnclassified *Chitinophagaceae* (f)' and (f)'' stand for "f__Chitinophagaceae:g__" and "f__Chitinophagaceae:___", respectively as outputs with the taxonomic analyses at the level of genus.

表 1-9. 6月から9月のサンプリング月の間の存在比(%)の変動に有意差が認められた主要な ASV (いずれかの月の存在比が1%以上の ASV) の配列に対する Blast 検索の結果

Table 1-9. Results of Blast analyses with representative sequences of ASVs showing statistical differences for their relative abundances among the sampling months

ASV ^a	Length (base)	Closest known species (Accession No.)	Score (bit)	Expect	Identity (%)
ASV_001 (<i>Streptomyces</i>) ^b	253	<i>Streptomyces aurantiacus</i> (OM909107)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces cacaoi</i> (MZ165333)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces cacaoi</i> (ON217557)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces davaonensis</i> (OK067768)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces dioscori</i> (OM971584)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces ederensis</i> (MW363055)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces fagopyri</i> (MZ254825)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces lacrimiflumini</i> (MW642153)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces neopeptinius</i> (OK135801)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces ossamyceticus</i> (MZ254802)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces platensis</i> (OM818541)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces rishiriensis</i> (MZ413773)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces scabiei</i> (OM971414)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces tauricus</i> (OM541329)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> (OL691265)	457	3.E-124	100
	253	<i>Streptomyces umbrinus</i> (MZ292113)	457	3.E-124	100
ASV_002 (<i>Chitinophagaceae</i>)	253	<i>Niastella populi</i> (AB682649)	430	4.E-116	97.6
ASV_003 (<i>Caulobacter henricii</i>)	253	<i>Caulobacter henricii</i> (MH929866)	457	3.E-124	100
	253	<i>Caulobacter mirabilis</i> (MN684273)	457	3.E-124	100
	253	<i>Caulobacter rhizosphaerae</i> (MT373603)	457	3.E-124	100
	253	<i>Caulobacter soli</i> (NR_174334)	457	3.E-124	100
ASV_005 (<i>Chitinophaga arvensicola</i>)	253	<i>Chitinophaga ginsengisegetis</i> (MT856245)	457	3.E-124	100
	253	<i>Luteifibra arvensicola</i> (AM237315)	457	3.E-124	100
ASV_006 (<i>Rhizobium</i>)	253	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (ON201512)	457	3.E-124	100
	253	<i>Rhizobium multihospitium</i> (OM909424)	457	3.E-124	100
	253	<i>Rhizobium sophorae</i> (OM736176)	457	3.E-124	100
ASV_007 (<i>Sphingomonas</i>)	253	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> (MN181194)	457	3.E-124	100
	253	<i>Sphingomonas mali</i> (JN592470)	457	3.E-124	100
	253	<i>Sphingomonas melonis</i> (MN181188)	457	3.E-124	100
	253	<i>Sphingomonas pruni</i> (MK192021)	457	3.E-124	100
ASV_009 (<i>Agrobacterium</i>)	253	<i>Agrobacterium cavarae</i> (OM971167)	457	3.E-124	100
	253	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> (MT367829)	457	3.E-124	100
	253	<i>Agrobacterium rosae</i> (MZ389115)	457	3.E-124	100
	253	<i>Agrobacterium rubi</i> (LC667774)	457	3.E-124	100
	253	<i>Agrobacterium salinitolerans</i> (MZ203655)	457	3.E-124	100
	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (MZ768713)	457	3.E-124	100
	253	<i>Agrobacterium vaccinii</i> (MT46040)	457	3.E-124	100
	253	<i>Neorhizobium alkalisoli</i> (MT634586)	457	3.E-124	100
	253	<i>Neorhizobium galegae</i> (CP090095)	457	3.E-124	100
	253	<i>Neorhizobium tomejilense</i> (MW748050)	457	3.E-124	100
	253	<i>Neorhizobium vignae</i> (MW748048)	457	3.E-124	100
	253	<i>Rhizobium panacihumi</i> (OM971096)	457	3.E-124	100
	253	<i>Rhizobium skieniewicense</i> (MN826327)	457	3.E-124	100

Table 1-9. Continued.

ASV ^a	Length (base)	Closest known species (Accession No.)	Score (bit)	Expect	Identity (%)
ASV_010 (<i>Novosphingobium</i>)	253	<i>Novosphingobium naphthalenivorans</i> (AB649005)	448	2.E-121	99.2
ASV_011 (<i>Steroidobacter</i>)	253	<i>Steroidobacter flavus</i> (KU195414)	416	9.E-112	96.4
	253	<i>Steroidobacter agariperforans</i> (MW186159)	416	9.E-112	96.4
ASV_012 (<i>Kribbella</i>)	253	<i>Kribbella albertanoniae</i> (MT415193)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella antibiotica</i> (NR_029048)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella endophytica</i> (KX502948)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella flavida</i> (KF620272)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella italica</i> (KJ875927)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella karoonensis</i> (NR_043327)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella pittospori</i> (MT239507)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella swartbergensis</i> (KP052783)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella turkmenica</i> (MG770857)	457	3.E-124	100
	253	<i>Nocardioides fulvus</i> (AJ871312)	457	3.E-124	100
ASV_013 (<i>Novosphingobium</i>)	253	<i>Novosphingobium naphthalenivorans</i> (AB649005)	448	2.E-121	99.2
ASV_014 (<i>Pedobacter</i>)	253	<i>Pedobacter cryoconitii</i> (KC788066)	457	3.E-124	100
	253	<i>Pedobacter foliorum</i> (MT441864)	457	3.E-124	100
	253	<i>Pedobacter ginsengisoli</i> (MT758241)	457	3.E-124	100
	253	<i>Pedobacter humi</i> (NR_149285)	457	3.E-124	100
	253	<i>Pedobacter panaciterrae</i> (MT102295)	457	3.E-124	100
	253	<i>Pedobacter quisquiliarum</i> (MT804242)	457	3.E-124	100
ASV_015 (<i>Sphingobium</i>)	253	<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> (MF101093)	457	3.E-124	100
ASV_016 (<i>Sphingomonas azotifigens</i>)	253	<i>Mesorhizobium plurifarium</i> (KJ609581)	457	3.E-124	100
	253	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> (MT634400)	457	3.E-124	100
	253	<i>Sphingomonas canadensis</i> (OM971160)	457	3.E-124	100
	253	<i>Sphingomonas kyeonggiensis</i> (MT634556)	457	3.E-124	100
	253	<i>Sphingomonas mali</i> (MN421334)	457	3.E-124	100
	253	<i>Sphingomonas mucosissima</i> (KM502884)	457	3.E-124	100
ASV_017 (<i>Amycolatopsis</i>)	253	<i>Amycolatopsis bullii</i> (KX502982)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis eburnea</i> (MH598363)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> (MT568584)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis lexingtonensis</i> (MK968580)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> (KF469352)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> (KX502981)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis rifamycinica</i> (MT568585)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis stemonae</i> (LC011703)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis tolypomycina</i> (LC656369)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis vancoresmycina</i> (HE966414)	457	3.E-124	100
	253	<i>Amycolatopsis vastitatis</i> (NR_164904)	457	3.E-124	100
ASV_019 (<i>Rhodanobacter</i>)	253	<i>Rhodanobacter hydrolyticus</i> (KY117469)	457	3.E-124	100
	253	<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i> (MH209632)	457	3.E-124	100
	253	<i>Rhodanobacter spathiphylli</i> (KU220865)	457	3.E-124	100
	253	<i>Rhodanobacter thiooxydans</i> (HG794332)	457	3.E-124	100
	253	<i>Rhodanobacter umsongensis</i> (NR_108435)	457	3.E-124	100
	253	<i>Rhodanobacter xiangquanii</i> (NR_132710)	457	3.E-124	100

Table 1-9. Continued.

ASV ^a	Length (base)	Closest known species (Accession No.)	Score (bit)	Expect	Identity (%)	
ASV_020 (<i>Pseudomonas</i>)	253	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> (MW854008)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas baetica</i> (OM533724)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas caricapapayae</i> (MW927165)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas coronafaciens</i> (MW927187)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ON072244)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas jessenii</i> (ON337522)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas kilonensis</i> (MZ642820)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas kitaguniensis</i> (MW927169)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas mandelii</i> (OK135850)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas migulae</i> (OM533710)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas mohnii</i> (OK393666)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas prosekii</i> (MZ045714)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas reinekei</i> (MW799926)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas silesiensis</i> (ON028726)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas synxantha</i> (ON056019)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (MZ642912)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (OM533715)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Pseudomonas vancouverensis</i> (MZ031292)	457	3.E-124	100	
	ASV_021 (<i>Chitinophaga</i>)	253	<i>Chitinophaga aurantiaca</i> (NR_164960)	434	3.E-117	98.0
		253	<i>Chitinophaga japonensis</i> (MF101181)	434	3.E-117	98.0
253		<i>Chitinophaga ginsengihumi</i> (KY649382)	434	3.E-117	98.0	
ASV_022 (<i>Oxalobacteraceae</i>)	253	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HQ406764)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Herminiimonas fonticola</i> (MT992769)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Oxalicibacterium horti</i> (MH259951)	457	3.E-124	100	
ASV_023 (<i>Novosphingobium</i>)	253	<i>Novosphingobium stygium</i> (MT825194)	448	2.E-121	99.2	
	253	<i>Parablastomonas arctica</i> (KC759680)	448	2.E-121	99.2	
ASV_024 (<i>Sinobacteraceae</i>)	253	<i>Acidibacter ferrireducens</i> (NR_126260)	398	2.E-106	94.9	
ASV_025 (<i>Comamonadaceae</i>)	253	<i>Polaromonas aquatica</i> (MG763906)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Polaromonas cryoconiti</i> (KY302274)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Polaromonas eurypsychrophila</i> (MT373578)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Polaromonas glacialis</i> (MH482239)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Polaromonas hydrogenivorans</i> (KU179860)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Polaromonas jejuensis</i> (MT373588)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Variovorax boronicumulans</i> (MW186161)	457	3.E-124	100	
ASV_026 (<i>Steroidobacter</i>)	253	<i>Steroidobacter flavus</i> (KU195414)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Steroidobacter agariperforans</i> (MW186159)	457	3.E-124	100	
ASV_027 (<i>Dokdonella</i>)	253	<i>Dokdonella ginsengisoli</i> (KX255018)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Dokdonella soli</i> (NR_044554)	457	3.E-124	100	

Table 1-9. Continued.

ASV ^a	Length (base)	Closest known species (Accession No.)	Score (bit)	Expect	Identity (%)
ASV_030 (<i>Janthinobacterium</i>)	253	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i> (MT373677)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia antarctica</i> (OM243916)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia aquatica</i> (MN612042)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia atriviolacea</i> (NR_171529)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia aurea</i> (MN197561)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia brevitalea</i> (MH667859)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia eurypsychrophila</i> (MT373674)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia frigida</i> (MN612049)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia glaciei</i> (MH667841)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia mucilaginoso</i> (MN612044)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia niabensis</i> (MT373587)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia puerhi</i> (MN014073)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia rubra</i> (MN612022)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia soli</i> (MT950109)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia timonae</i> (MH127823)	457	3.E-124	100
	253	<i>Massilia violaceinigra</i> (MT373681)	457	3.E-124	100
	ASV_032 (<i>Asticcacaulis biprosthecium</i>)	253	<i>Asticcacaulis benevestitus</i> (NR_042433)	425	2.E-114
253		<i>Asticcacaulis biprosthecium</i> (NR_114729)	425	2.E-114	97.2
253		<i>Asticcacaulis taihuensis</i> (OL773519)	425	2.E-114	97.2
253		<i>Novosphingobium subterraneum</i> (HM032869)	425	2.E-114	97.2
ASV_034 (<i>Kutzneria</i>)	253	<i>Kutzneria albida</i> (NR_122053)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kutzneria buriramensis</i> (NR_109430)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kutzneria chonburiensis</i> (NR_145619)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kutzneria kofuensis</i> (MT760419)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kutzneria viridogrisea</i> (MT760436)	457	3.E-124	100
ASV_038 (<i>Kribbella</i>)	253	<i>Kribbella alba</i> (MT415180)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella catacumbae</i> (NR_042657)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella ginsengisoli</i> (KY432698)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella karoonensis</i> (FJ796408)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella koreensis</i> (FN178450)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella qitaiheensis</i> (NR_148308)	457	3.E-124	100
	253	<i>Kribbella sandramycini</i> (MT072122)	457	3.E-124	100

Table 1-9. Continued.

ASV ^a	Length (base)	Closest known species (Accession No.)	Score (bit)	Expect	Identity (%)	
ASV_039 (<i>Streptomyces</i>)	253	<i>Streptomyces aureocirculatus</i> (OM534621)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces avermitilis</i> (OL773534)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces bobili</i> (OM478626)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces bungoensis</i> (MZ703139)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces bungoensis</i> (OM019293)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces caeruleatus</i> (OM478629)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces cellostaticus</i> (OK513247)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces chartreusis</i> (OM019273)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces cyaneochromogenes</i> (OL468465)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces cyaneus</i> (OM478628)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces cyslabdanicus</i> (OL468320)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces fodineus</i> (OM019279)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces galilaeus</i> (OM909121)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces griseoruber</i> (OK148892)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces lasalocidi</i> (OK083686)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces lincolnensis</i> (OL614842)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces neopeptinius</i> (OM909118)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> (ON364563)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> (ON361562)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces osmaniensis</i> (OM971471)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces plumbiresistens</i> (OM478614)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces prunicolor</i> (ON231552)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces qaidamensis</i> (MZ854154)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces shaanxiensis</i> (MZ854153)	457	3.E-124	100	
	ASV_040 (<i>Comamonadaceae</i>)	253	<i>Rhizobacter bergeniae</i> (MN598643)	457	3.E-124	100
		253	<i>Rhizobacter gummiphilus</i> (MH174432)	457	3.E-124	100
253		<i>Methylibium</i> sp. (KM187564)	457	3.E-124	100	
ASV_046 (<i>Gammaproteobacteria</i>)	253	<i>Thiohalobacter thiocyanaticus</i> (NR_116699)	389	1.E-103	94.1	
ASV_054 (<i>Gammaproteobacteria</i>)	253	<i>Thiohalobacter thiocyanaticus</i> (AP018052)	403	6.E-108	95.3	
ASV_064 (<i>Streptomycetaceae</i>)	253	<i>Streptomyces achromogenes</i> (OM200076)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces asoensis</i> (CP049838)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces dioscori</i> (MT856259)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces ederensis</i> (MT322154)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces galbus</i> (MN314487)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> (MN421416)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces torulosus</i> (MT322181)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces umbrinus</i> (MN684267)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces phaeofaciens</i> (MK431531)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces montanisoli</i> (MW228048)	457	3.E-124	100	
	253	<i>Streptomyces cinereoruber</i> (MT760637)	457	3.E-124	100	
	ASV_079 (<i>Myxococcales</i>)	253	<i>Aetherobacter rufus</i> (NR_148645)	379	8.00E-101	93.7
		253	<i>Chondromyces lanuginosus</i> (FJ176774)	379	8.00E-101	93.7

^aASVs showing statistical differences for their relative abundances among the sampling months

^bClosest taxon to a representative sequence of an ASV is shown in parentheses.

第2章 分離培養されるテンサイ側根共生細菌の多様性に及ぼす培地の影響

序

第1章では、6月から9月の生育期間におけるテンサイ側根の共生細菌群集の多様性を16S rRNA 遺伝子配列のアンプリコンシーケンスを用いた非培養法により解析した結果、テンサイの生育に伴って群集構造は連続的に大きく変化し、生育期全般にわたり *Alphaproteobacteria* 綱が最も優占的な菌群であることを明らかにした。特に急激に成長する7月から8月にかけては、これまでに多くのPGPBが報告されている *Rhizobiales* 目の5属 (*Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*) と *Sphingomonadales* 目の4属 (*Novosphingobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*) の存在比が増加し、テンサイ PGPB の候補として有望な菌群であると推察された。

近年はNGSによるオミクス解析が共生細菌群集解析の主流となっているものの、生育促進効果などの共生微生物の機能性の解明や産業利用には、依然として培養法による微生物単離が必要である。本研究の目的である共生細菌の群集構造に基づくPGPB選抜の有効性を検証するためには、できるだけテンサイ細菌群集を反映した多様な菌株コレクションを迅速かつ大規模に構築する必要がある。培養される微生物の多様性は、培養温度や培養日数などとともに使用する培地にも大きな影響を受けることが、これまでに多くの論文で報告されている (Buyer 1995; Hattori *et al.*, 1997; Hattori and Hattori, 2000; Mitsui *et al.*, 1997; Mitsui and Hattori, 1997)。しかしながら、培地や培養期間の違いで得られる菌株群の多様性の違いについては、主に目視によるコロニーの形態観察や菌数測定、選抜された菌株の系統樹解析などで評価されており、コロニーの外観形態の変化に乏しい細菌群の遺伝的多様性について、定性的、定量的、網羅的に厳密な検討が加えられたものとは言い難い。そこで第2章では、テンサイ側根から単離される共生細菌群の多様性に対する培地の影響評価を菌株の16S rRNA 遺伝子配列データに基づいた群集構造解析により行った。分離培地には、一般的な細菌の単離に使用される TSA (Tryptic soy broth Agar) 培地および Nutrient agar 培地に加え、*Pseudomonas fluorescens* や *P. syringe* の同定の際によく用いられる King B 培地、低栄養条件下の従属栄養性水生細菌の生菌数測定のために開発された R2A 培地 (Reasoner and Geldreich, 1985) の4種類の培地を用いた。同時に、PGPBの網羅的かつ迅速な探索・選抜を目的とした、分子微生物生態学的手法を応用した大規模な菌株コレクション構築のための実験的手順の有用性を評価した。

2-1. 材料と方法

2-1-1. テンサイ側根および栽培土壌の採取

解析に供試した側根は、農研機構北海道農業研究センター芽室研究拠点（北海道河西郡芽室町）の試験圃場（北緯 42 度 52 分 57 秒、東経 143 度 4 分 14 秒、標高 100m）で移植栽培したテンサイ（品種名「リッカ」）から採取した。2012 年 3 月 14 日にペーパーポット（ビート用規格 1 号、日本甜菜製糖株式会社）に播種後、ガラス室で育苗した苗を 4 月 25 日に圃場に畦間 60 cm、株間 22.5 cm で移植した。育苗管理は、第 1 章 1-1-1. に準じて行った。施肥は基肥のみとし、複合肥料 S014（ホクレン肥料（株））を 150 kg/10 a、作畦時に施肥した。要素当たりの施肥量（kg/10 a）は、N: 15、P₂O₅: 31.5、K₂O: 21 であった。7 月 17 日に外観が健全な株を無作為に 3 個体抜き取り、付着した土壌を水道水で洗浄した後、滅菌水で濯ぎ、直径が 1 mm 程度以下の側根を採取した。採取した側根を乳鉢で摩砕した後、67 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）で 10 倍に希釈にした。この希釈液に濃度が 15% になるようにグリセロールを添加した側根摩砕液を細菌単離まで -30℃ で凍結保存した。

試験圃場の土壌採取は 2012 年 8 月 24 日に行った。抜き取った個体の近傍、3 カ所の畦間からオーガを用いて深さ 5-15 cm の土壌を採取し、採取した土壌を等量混合して化学分析用の土壌サンプルとした。化学分析は十勝農業組合連合会農産化学研究所に依頼し、第 1 章 1-1-1. に記載した方法で行った（表 2-1）。

2-1-2. 側根に共生する細菌の網羅的な分離培養

分離培地には R2A 寒天培地（ベクトン・ディッキンソン株式会社；以下、R2A 培地）、Nutrient Agar（ベクトン・ディッキンソン株式会社；以下、NA 培地）、King B 寒天培地（栄研化学；以下、KB 培地）、Tryptic soy broth（ベクトン・ディッキンソン株式会社）に 1.5% の Bacto Agar（ベクトン・ディッキンソン株式会社）を加えた TSA 培地の 4 種類を用いた。なお、各培地には、糸状菌の発生を抑制するため、シクロヘキシミド（和光純薬株式会社）を 50 mg/ml で添加した。培地上で適当なコロニー数が得られるように 67 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）で段階希釈した側根摩砕液を分離培地に塗布し、24℃・暗黒条件下で 5~6 日間培養した。分離培地から約 200 個のコロニーを無作為に単離した後、シングルコロニーアイソレーションを 2 回実施して菌株の純化を行った。グリセロール 15% 濃度の各液体培地に純化した菌株の新鮮なコロニーの一部を懸濁し、-80℃ で凍結保存した。

菌株のゲノム DNA 抽出は Ikeda ら (2004) の方法に従って行い、方法の概要は以下のとおりである。0.5 g のジルコニアビーズ (直径 0.5 mm) が入った 2 ml チューブに菌体と 350 μ l の抽出バッファー (0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 M EDTA、0.1 M NaCl、2% SDS)、350 μ l の 0.3 M リン酸バッファー (pH 8.0) を加えた後、細胞破碎装置 FastPrep (MP-Biomedicals 社) を用いて 5.5 M/S の設定で 30 秒間、破碎処理を行った。チューブを室温で高速遠心 (12,000 rpm、10 分) した後、上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、これに 8 M 酢酸カリウムを 120 μ l 加えた。転倒混和の後、チューブを室温で高速遠心 (12,000 rpm、5 分) し、上清を新しい 1.5 ml に移した。チューブに 2.5 μ l のグリコーゲン (20 mg/ml、ナカライテスク (株))、600 μ l のイソプロパノール (富士フィルム和光純薬株式会社)、60 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加えて転倒混和し、室温で高速遠心 (12,000 rpm、10 分) して DNA の沈殿を回収した。回収した DNA の沈殿は 85% エタノールでの洗浄および風乾の後、50 μ l の滅菌水に溶解して以降の PCR の鋳型 DNA として用いた。

16S rRNA 遺伝子部分配列の PCR 増幅は、ユニバーサルプライマー 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') および 1525R (5'-AAGGAGGTGTCCARCC-3') を用い (Wawrik *et al.*, 2005)、PCR の反応条件は次のとおりである。最初に 94°C で 2 分間加熱後、25 サイクルのプログラム (94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 2 分間) を行い、最後に 72°C で 10 分間とした (Someya *et al.*, 2013)。増幅した 16S rRNA 遺伝子の部分配列 (*Escherichia coli* の遺伝子で 109~665 塩基の位置に相当) の決定は、ユニバーサルプライマー 27F をシーケンス用プライマーとして用い、タカラバイオ株式会社のプレート単位塩基配列解析 (ワンパス・ロングシーケンス) に外注し、サンガー法により行った。

2-1-3. 16S rRNA 遺伝子配列のクラスタリング解析

シーケンス解析で得られた約 800 菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分配列については、配列の長さが 550 塩基以下の短い配列を除いた後、解析ソフト Orientation Checker (Ashelford *et al.*, 2006) により配列の方向と 16S rRNA 遺伝子配列であることを確認した後、解析ソフト MALLARD (Ashelford *et al.*, 2006) によりキメラ配列の除去を行った。CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) によるアライメント結果に基づき、PHYLIP ver. 3.66 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) の DNADIST プログラムを用いて、デフォルトのパラメータで配列間の距離行列を作成した。作成した距離行列から Mothur プログラム (Schloss *et al.*, 2009) を用い、配列の類似度の閾値を 99% とした operational

taxonomic units (OTUs) の作成と多様性指数の算出を行った。また、ライブラリーのカバーレージは Kemp and Aller (2004) に従って算出した。

2-1-4. 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた主座標分析 (PCoA)

クローンライブラリー間の群集構造の類似性を視覚化するため、UniFrac プログラム (Lozupone *et al.*, 2006) による主座標分析を行った。分析では、ライブラリーの配列数を考慮する abundance weight のオプションを使用して行った。

2-1-5. 16S rRNA 遺伝子配列の系統解析

クローンライブラリーと菌株コレクションの分類学的組成 (各分類群の存在比) については、Ribosomal Database Project (RDP; Wang *et al.*, 2007) において、信頼度閾値 80% として解析した。また、ライブラリー間の統計的比較は、RDP の Library Compare プログラムを用いて行った (Cole *et al.* 2014)。

2-2. 結果と考察

2-2-1. アルファ多様性と主座標分析

4つの分離培地を用いて、テンサイ側根から合計 745 菌株を単離した (表 2-2)。Mothur によるクラスタリング解析 (配列の類似度 99%) の結果、745 菌株は 155 個の OTU に分類された。各培地における OTU 数は 60~74 個で R2A 培地が他の培地と比べて多い傾向を示した。実測された OTU 数は、OTU 数の推定値である Chao1 および ACE と比べて、いずれの培地においても値に大きな開きが見られた。このため、菌株コレクションの多様性を正確に評価するには、さらに多くの菌株の単離が必要と考えられた。しかしながら、ライブラリーのカバー率は 78.9%~84.5% であり、R2A 培地と KB 培地のライブラリーのカバー率は TSA 培地と NA 培地と比べて低かった。また、Shannon と Simpson の多様性指数はいずれも R2A 培地が最も高かったことから、R2A 培地は、他の 3 つの培地と比べて、多様な細菌を単離できる可能性が示唆された。

主座標分析の結果を図 2-1 に示す。PC1 (56.9%) については、NA 培地と TSA 培地が最も離れた位置にプロットされた。また、R2A 培地は NA 培地に近く、KB 培地は NA 培地と TSA 培地のほぼ中間に位置していた。PC2 (35.8%) に対しては、R2A 培地と KB 培地が最も離れた位置にプロットされていた。全体として、NA 培地と R2A 培地は他の培地と比べて近くに位置し、類似した群集構造を持つと考えられ、多様性指数の値を考慮すると (表 2-2)、NA 培地は多様性指

数が高い R2A 培地で補完できる可能性がある。

2-2-2. 分離培養される共生細菌の群集構造に及ぼす培地の影響

全ての菌株について系統解析を行った結果、4 門、8 綱、11 目、28 科、58 属に分類された。門から科までの各分類群の存在比を表 2-3 に示す。門レベルでは、どの培地においても *Proteobacteria* 門が大部分を占め、第 1 章でテンサイ側根に優占することが明らかとなった *Actinobacteria* 門や *Bacteroidetes* 門の割合は少なかった。対照的に、筆者が R2A 培地を用いて行ったテンサイ主根からの細菌単離の事例では、*Bacteroidetes* 門と *Actinobacteria* 門の存在比は、それぞれ、4.3%と 16.6%であった (Okazaki *et al.*, 2014)。このような主根と側根の組織間で観察された分離菌の多様性の大きな違いについて、明確な原因は不明ではあるが、主根と側根の間の理化学性の違いが共生細菌の多様性に影響している可能性が考えられる。加えて、本研究の分離培養実験では培養期間が 5~6 日と主根についての同様の検討実験と比べて 1~2 日程度短く、増殖速度が比較的遅い菌群が多いと思われる *Actinobacteria* 門のコロニーが小さく、見落とされた可能性も考えられる。また、単離に使用した組織の破碎液サンプルの凍結保存期間が 1 年と長期であったことが影響した可能性も考えられる。*Firmicutes* 門に属する菌株は TSA 培地からのみ単離された。TSA 培地は他の 3 つの培地と比べて比較的高栄養な培地であり、そのような条件を好む *Firmicutes* 門に属する菌群の分離により適しているのかもしれない。第 1 章での結果から、*Firmicutes* 門は本研究の実験条件下のテンサイ側根中では優占的な菌群ではないことが示唆されたが、*Firmicutes* 門には *Bacillus* 属や *Paenibacillus* 属など、テンサイを含め、多くの植物の PGPB を含むグループであることから、*Firmicutes* 門の細菌を積極的に単離したい場合は、本研究で検討した他の 3 つの培地と比べ、TSA 培地は比較的有效な培地と考えられる。

綱レベルでは、TSA 培地を除く 3 つの培地において、*Alphaproteobacteria* 綱が 50%以上を占めた。特に、NA 培地は *Alphaproteobacteria* 綱の存在比が 66.1%と最も高かったが、*Betaproteobacteria* 綱は他の培地と比べて少なかった。一方、TSA 培地は *Alphaproteobacteria* 綱の存在比は 21.9%と低く、*Betaproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱の方が多く単離されるなど、他の培地と比べて分離培養される菌株の分類学的組成が大きく異なる傾向がみられた。

科レベルにおいても、TSA 培地は *Betaproteobacteria* 綱に属する *Burkholderiaceae* 科や *Comamonadaceae* 科、*Oxalobacteraceae* 科、*Gammaproteobacteria* 綱に属する *Pseudomonadaceae*

科の存在比が高く、他の培地と比べて菌株の分類学的組成が大きく異なっていることが明らかとなった。また、KB 培地については、*Rhizobiaceae* 科が 40% を占め、*Oxalobacteraceae* 科を加えた 2 つの科で 50% を超えており、単離される菌群に大きな偏りが認められた。このことが、KB 培地の多様性指標が最も低かった要因と考えられた (表 2-2)。

属レベルでは、TSA 培地は他の培地と比べて *Burkholderia* 属、*Collimonas* 属、*Pseudomonas* 属、*Variovorax* 属の存在比が高かった (表 2-4)。テンサイ根圏においては、*Variovorax* 属の細菌は主根よりも側根部分に多く共生していることが、TSA 培地を使用した培養法により報告されている (Lilley *et al.*, 1996)。興味深いことに、上記の 4 属はいずれも過去に PGPB として多くの報告がある菌群であった。一方で、第 1 章の結果から *Collimonas* 属や *Variovorax* 属は本研究の実験条件下のテンサイ側根の全共生細菌群集の中では非常に存在比の小さい菌群だと考えられる。対照的に第 1 章の結果からテンサイ側根で優占的な菌群だと考えられる *Caulobacter* 属や *Mesorhizobium* 属、*Sphingomonas* 属は TSA 培地でほとんど単離されないなど、本研究の実験条件下では、TSA 培地はテンサイ側根に優占的に共生する細菌群の単離には適さないことが明らかとなった。しかしながら、TSA 培地は *Bacillus* 属など、他の培地では単離できなかった細菌を単離し、菌株コレクションの群集構造の分類学的組成は他の 3 つの培地とは大きく異なっていた。したがって、分類学的に幅広い細菌種の効率的な単離を目的とした場合、TSA 培地を補足的に活用することは有益だと考えられる。

R2A 培地は他の培地と比較して、単離された菌株の多様性が高く (表 2-2)、第 1 章でテンサイ側根に優占的に共生していることが明らかにされた *Rhizobiales* 目 (*Agrobacterium* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Devosia* 属、*Mesorhizobium* 属、*Rhizobium* 属) や *Sphingomonadales* 目 (*Novosphingobium* 属、*Sphingobium* 属、*Sphingomonas* 属、*Sphingopyxis* 属) の菌群も多く単離できることから、テンサイ側根共生細菌群の網羅的かつ効率的な分離培養に適していると考えられた。Medina ら (2017) は、アメリカヒキガエルの皮膚の共生細菌群集を培養法と非培養法で解析した結果、低栄養な R2A 培地は比較的高栄養な TSA 培地や LB 培地と比較して、より多様な細菌群の単離が可能であり、共生細菌の単離に最も適した培地であると、本試験の結果と同様の結果を報告している。共生細菌の中には、生育速度の異なる多様な細菌が存在している。高栄養な培地では、生育の速い細菌が遅い細菌の生育を阻害することで、遅い細菌の単離を阻害している可能性がある。R2A 培地は水生環境由来の生育の遅い細菌の単離に適した培地とされており (Medina *et al.*, 2017)、このことが多様な細菌の単離に繋がった可能性が考えられる。NA 培地については、R2A 培地と類似した細菌群を単離できることが明らかとなった (図

2-1)。属レベルでの R2A 培地と NA 培地で存在比に有意差が認められたのは *Rhizobium* 属と *Rhodanobacter* 属のみであった (表 2-4)。しかしながら、NA 培地における *Rhizobium* 属の存在比は 29.0% と高く、このことが NA 培地で単離される菌株の多様性が低くなる要因と考えられる (表 2-2)。

OTU レベルの解析について、いずれかの培地で存在比が 1% 以上となった OTU の数は 66 個であった (表 2-5)。OTU レベルでの分類学的組成を解析したところ、*Rhizobium* 属、*Rhodanobacter* 属、*Sphingomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Pseudomonas* 属に分類された OTU 数は、それぞれ、13 個、11 個、8 個、7 個、7 個であり、これらの分類群は遺伝的な多様性が高い菌群であると考えられた。また、*Novosphingobium* 属についてみると、OTU-18 は R2A 培地を除く 3 培地で比較的高い頻度で単離されているが、OTU-29 は R2A 培地でしか単離されないなど、同じ属の中でも種に相当する分類群レベルで菌群毎の単離頻度に大きな差が生じ得ることが示された。

以上から、本研究で検討した 4 培地の中では、R2A 培地は多様な細菌の単離が可能であり、植物共生細菌群集の多様性を反映した菌株コレクションの構築に適していることが明らかとなった。また、より多様な菌株コレクションを構築するためには、単離される菌株の分類学的組成が他の 3 つの培地と異なる TSA 培地の利用も有効であると推察された。

表 2-1. 分離培養実験に使用された側根の採種時のテンサイの栽培試験圃場の土壌の化学分析の結果

Table 2-1. Characteristics of field soil used in the present study

pH (H ₂ O)	Total nitrogen (%)	Available P ₂ O ₅ (mg/100g)	Phosphate absorption coefficient	Exchangeable cations			CEC (me/100g)
				K ₂ O (mg/100g)	CaO (mg/100g)	MgO (mg/100g)	
5.8	0.30	21.2	1750	33.9	151.4	52.9	17.6

表 2-2. 異なる種類の培地を用いてテンサイ側根から分離培養された菌株コレクションの 16S rRNA 遺伝子配列データに基づいた各種のアルファ多様性指数

Table 2-2. Alpha diversity indices of 16S rRNA gene sequences for the isolate collections derived from lateral roots of sugar beet by using various isolation media

	isolation media				Total
	R2A ^a	TSA ^a	NA ^a	KB ^a	
Statistics					
No. of sequences	190	187	183	185	745
No. of OTUs ^b	74	62	60	65	155
No. of singletons	40	29	29	36	78
Library coverage (%) ^c	78.9	84.5	84.2	80.5	89.5
Diversity indexes					
Chao1	119.9	120.0	93.8	113.5	
ACE	204.7	91.9	125.9	180.3	
Shannon index (<i>H'</i>)	3.9	3.7	3.6	3.6	
Simpson index (<i>1/D</i>)	39.7	31.0	25.9	21.2	

^a R2A, TSA, NA and KB stand for R2A agar, triptic soy brothe agar, nutrient agar and king B agar, repetively.

^b OTUs were defined at 99% sequence identity by using MOTHUR.

^c Library coverage Cx was calculated as follows; $Cx=1-(n/N)$, where *n* is the number of singletons that appear once in a library, and *N* is the number of isolates.

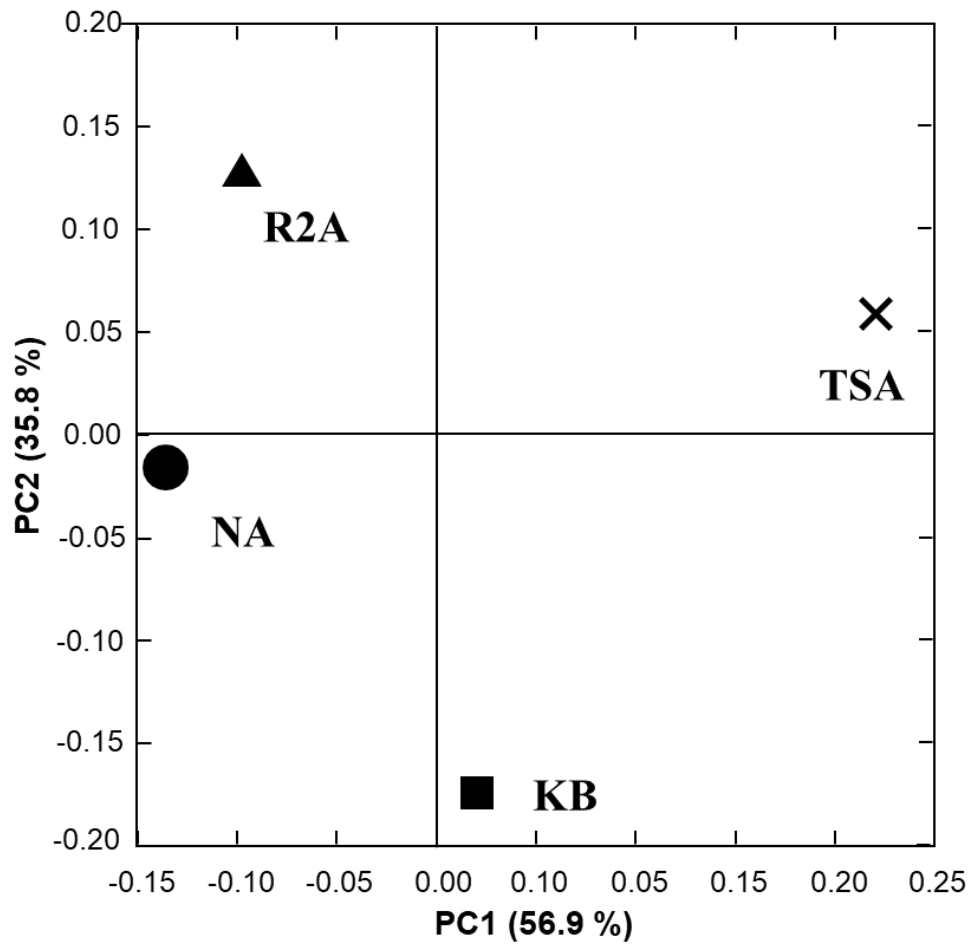


Fig. 2-1. Principal coordinate analysis (PCoA) of the 16S rRNA gene sequences of isolates derived from lateral roots of sugar beet by using various isolation media. The library name is indicated on the right side of each symbol.

図 2-1. 異なる種類の培地を用いてテンサイ側根から分離培養された菌株コレクションの 16S rRNA 遺伝子配列データに基づいた主座標分析 (PCoA) の結果

表 2-3. 異なる種類の培地を用いてテンサイ側根から分離培養された菌株コレクションにおける門から科までの各分類群の存在比(%)

Table 2-3. Relative abundances (%) of bacterial isolate collections derived from lateral roots of sugar beet by using various isolation media at the levels from phylum to family^a

Taxa ^b	Isolation media				Taxa	Isolation media			
	R2A ^c	TSA ^c	NA ^c	KB ^c		R2A	TSA	NA	KB
Phylum					Family				
<i>Actinobacteria</i>	2.1	5.3	0.5	5.4	<i>Bacillaceae 1</i>	-	4.3	-	-
<i>Bacteroidetes</i>	2.1	4.3	2.7	3.2	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	6.8	2.1	7.1	3.2
<i>Firmicutes</i>	-	4.3	-	-	<i>Burkholderiaceae</i>	2.1	13.4	1.6	4.9
<i>Proteobacteria</i>	95.8	86.1	96.7	91.4	<i>Caulobacteraceae</i>	6.3	-	2.7	2.2
Class					<i>Comamonadaceae</i>	8.9	12.8	4.9	5.4
<i>Actinobacteria</i>	2.1	5.3	0.5	5.4	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.5	3.2	0.5	0.5
<i>Alphaproteobacteria</i>	55.3	21.9	66.1	58.4	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	3.7	2.7	4.4	5.4
<i>Bacilli</i>	-	4.3	-	-	<i>Micrococcaceae</i>	-	1.1	-	1.1
<i>Betaproteobacteria</i>	14.2	38.5	8.7	22.2	<i>Mycobacteriaceae</i>	-	2.7	0.5	1.1
<i>Flavobacteria</i>	0.5	3.2	0.5	0.5	<i>Nocardioideaceae</i>	1.6	-	-	-
<i>Gammaproteobacteria</i>	25.8	25.1	21.3	10.8	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.6	12.3	2.2	11.9
<i>Sphingobacteria</i>	1.6	1.1	2.2	2.7	<i>Phyllobacteriaceae</i>	7.4	1.1	8.7	1.6
Other	0.5	0.5	0.5	-	<i>Pseudomonadaceae</i>	3.7	11.2	5.5	5.4
Order					<i>Rhizobiaceae</i>	13.7	5.3	29.0	40.0
<i>Actinomycetales</i>	2.1	5.3	0.5	5.4	<i>Rhodospirillaceae</i>	-	0.5	1.1	0.5
<i>Bacillales</i>	-	4.3	-	-	<i>Sphingobacteriaceae</i>	1.1	0.5	2.2	2.2
<i>Burkholderiales</i>	14.2	38.5	8.7	22.2	<i>Sphingomonadaceae</i>	16.8	9.6	13.1	5.4
<i>Caulobacteriales</i>	6.3	-	2.7	2.2	<i>Streptomycetaceae</i>	-	0.5	-	1.6
<i>Flavobacteriales</i>	0.5	3.2	0.5	0.5	<i>Xanthomonadaceae</i>	22.1	13.9	15.8	5.4
<i>Pseudomonadales</i>	3.7	11.2	5.5	5.4	Others	2.1	2.1	-	2.2
<i>Rhizobiales</i>	32.1	11.8	49.2	50.3					
<i>Rhodospirillales</i>	-	0.5	1.1	0.5					
<i>Sphingobacteriales</i>	1.6	1.1	2.2	2.7					
<i>Sphingomonadales</i>	16.8	9.6	13.1	5.4					
<i>Xanthomonadales</i>	22.1	13.9	15.8	5.4					

^a Gray highlight indicates the taxa with significant difference ($P < 0.05$) compared to R2A isolate collection.

^b Taxon with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of isolation collection at the levels from phylum to family are shown.

^c R2A, TSA, NA and KB stand for R2A agar, tryptic soy broth agar, nutrient agar and king B agar, respectively.

表 2-4. 異なる種類の培地を用いてテンサイ側根から分離培養された菌株コレクションにおける属レベルでの各分類群の存在比(%)

Table 2-4. Relative abundances (%) of bacterial isolate collections derived from lateral roots of sugar beet by using various isolation media at genus level^a

Taxa ^b	Isolation media				Taxa	Isolation media			
	R2A ^c	TSA ^c	NA ^c	KB ^c		R2A	TSA	NA	KB
<i>Arthrobacter</i>	-	1.1	-	0.5	<i>Novosphingobium</i>	5.8	4.3	2.2	4.3
<i>Bacillus</i>	-	4.3	-	-	<i>Pedobacter</i>	0.5	0.5	0.5	2.2
<i>Bosea</i>	0.5	2.1	2.2	3.2	<i>Pelomonas</i>	1.1	-	-	-
<i>Bradyrhizobium</i>	1.1	-	0.5	-	<i>Phyllobacterium</i>	-	1.1	-	0.5
<i>Burkholderia</i>	2.1	12.8	1.6	4.3	<i>Polaromonas</i>	7.4	-	2.7	-
<i>Caulobacter</i>	5.8	-	2.2	2.2	<i>Pseudomonas</i>	3.2	11.2	5.5	5.4
<i>Collimonas</i>	0.5	7.0	0.5	7.6	<i>Rhizobium</i>	13.7	5.3	29.0	40.0
<i>Devosia</i>	3.7	2.7	4.4	5.4	<i>Rhodanobacter</i>	16.8	4.3	8.2	-
<i>Dyella</i>	3.2	3.2	4.4	1.6	<i>Sphingobium</i>	2.6	3.7	3.3	1.1
<i>Flavobacterium</i>	0.5	2.7	-	-	<i>Sphingomonas</i>	7.4	0.5	7.7	-
<i>Herbaspirillum</i>	1.6	5.3	1.6	4.3	<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	0.5	1.1
<i>Inquilinus</i>	-	0.5	1.1	0.5	<i>Streptomyces</i>	-	0.5	-	1.6
<i>Luteibacter</i>	1.1	6.4	1.6	1.6	<i>Variovorax</i>	0.5	12.8	2.2	5.4
<i>Mesorhizobium</i>	6.3	-	8.7	1.1	unclassified Bradyrhizobiaceae	5.3	-	4.4	-
<i>Mucilaginibacter</i>	0.5	-	1.1	-	unclassified Sphingomonadaceae	0.5	1.1	-	-
<i>Mycobacterium</i>	-	2.7	0.5	1.1	Others	6.8	2.7	2.7	4.9
<i>Nocardioides</i>	1.1	-	-	-					

^a Gray highlight indicates the taxa with significant difference ($P < 0.05$) compared to R2A isolate collection.

^b Taxon with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of isolation collection at the levels from phylum to family are shown.

^c R2A, TSA, NA and KB stand for R2A agar, triptic soy brothe agar, nutrient agar and king B agar, repetively.

表 2-5. 異なる種類の培地を用いてテンサイ側根から分離培養された菌株コレクションにおける各 OTU の存在比 (%)

Table 2-5. Relative abundance (%) of OTUs in bacterial isolate collections of the 16S rRNA genes derived from lateral roots of sugar beet by using various isolation media

OTU No. ^a	Isolation media				BlastN search results ^c		
	R2A ^b	TSA ^b	NA ^b	KB ^b	Closest known species	Accession No.	Identity (%)
<i>Bacillus</i> (1OTU)							
OUT-28	0.0	4.3	0.0	0.0	<i>Cytobacillus firmus</i>	MK026774	100.0
<i>Bosea</i> (3OTUs)							
OUT-20	0.0	1.6	1.1	2.7	<i>Bosea robiniae</i>	MN832978	100.0
OUT-42	0.0	0.5	1.1	0.5	<i>Bosea thiooxidans</i>	HG794268	100.0
Unclassified <i>Bradyrhizobiaceae</i> (6OTUs)							
OUT-27	0.5	0.0	3.8	0.0	<i>Tardiphaga robiniae</i>	KJ721001	100.0
OUT-60	1.1	0.0	0.0	0.0	<i>Bradyrhizobium lablabi</i>	LT670844	98.7
OUT-69	1.1	0.0	0.0	0.0	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	AB498820	98.9
<i>Bradyrhizobium</i> (2OTUs)							
OUT-55	1.1	0.0	0.5	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	KC816573	100.0
OUT-57	1.6	0.0	0.0	0.0	<i>Afipia massiliensis</i>	KY319044	100.0
<i>Burkholderia</i> (7OTUs)							
OUT-17	1.1	3.2	1.1	1.1	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	MN595030	100.0
OUT-33	0.5	1.6	0.5	0.5	<i>Burkholderia ambifaria</i>	MN181365	100.0
OUT-34	0.0	1.6	0.0	1.6	<i>Paraburkholderia hospita</i>	CP024938	100.0
OUT-36	0.5	1.6	0.0	0.5	<i>Paraburkholderia kirstenboschensis</i>	MN069326	100.0
OUT-43	0.0	2.1	0.0	0.0	<i>Paraburkholderia aromaticivorans</i>	NR_163658	100.0
OUT-44	0.0	1.6	0.0	0.5	<i>Paraburkholderia graminis</i>	JX841031	100.0
OUT-58	0.0	1.1	0.0	0.0	<i>Paraburkholderia caribensis</i>	CP026101	99.8
<i>Caulobacter</i> (1OTU)							
OUT-7	5.8	0.0	2.2	2.2	<i>Caulobacter rhizosphaerae</i>	CP048815	99.6
<i>Collimonas</i> (4OTUs)							
OUT-16	0.0	1.6	0.5	4.9	<i>Collimonas arenae</i>	NR_042824	99.2
OUT-30	0.5	2.1	0.0	1.6	<i>Collimonas fungivorans</i>	AB740926	100.0
OUT-31	0.0	2.7	0.0	1.1	<i>Collimonas pratensis</i>	KU311452	99.8
<i>Devosia</i> (4OTUs)							
OUT-13	1.1	2.7	1.1	4.3	<i>Devosia neptuniae</i>	JX841065	100.0
OUT-32	1.6	0.0	1.6	0.5	<i>Devosia limi</i>	MZ311806	100.0
OUT-37	1.1	0.0	1.6	0.0	<i>Devosia insulae</i>	NR_044036	99.8
<i>Dyella</i> (3OTUs)							
OUT-6	3.2	3.2	4.4	0.5	<i>Dyella ginsengisoli</i>	KY228986	100.0
<i>Flavobacterium</i> (5OTUs)							
OUT-63	0.0	1.1	0.0	0.0	<i>Flavobacterium panici</i>	CP100437	98.5
<i>Herbaspirillum</i> (3OTUs)							
OUT-15	1.1	2.7	1.1	2.7	<i>Herbaspirillum hiltneri</i>	NR_043582	100.0
OUT-23	0.5	2.1	0.5	1.6	<i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i>	MF509845	99.8
<i>Inquilinus</i> (1OTU)							
OUT-46	0.0	0.5	1.1	0.5	<i>Inquilinus limosus</i>	MN044787	100.0
<i>Luteibacter</i> (2OTUs)							
OUT-9	1.1	6.4	1.1	1.6	<i>Luteibacter jiangsuensis</i>	MZ411680	100.0
<i>Mesorhizobium</i> (4OTUs)							
OUT-5	5.3	0.0	6.6	1.1	<i>Mesorhizobium loti</i>	CP033368	100.0
OUT-41	1.1	0.0	1.6	0.0	<i>Mesorhizobium jarvisii</i>	MT126293	100.0
<i>Mycobacterium</i> (5OTUs)							
OUT-50	0.0	1.6	0.0	0.0	<i>Mycobacterium llutzerense</i>	MN030318	100.0
<i>Nocardioidea</i> (1OTU)							
OUT-59	1.1	0.0	0.0	0.0	<i>Nocardioidea fulvus</i>	AY167844	99.0

Table 2-5. continued

OTU No. ^a	Isolation media				BlastN search results ^c		
	R2A ^b	TSA ^b	NA ^b	KB ^b	Closest known species	Accession No.	Identity (%)
<i>Novosphingobium</i> (4OTUs)							
OUT-18	0.0	3.2	0.5	2.7	<i>Novosphingobium lindaniclasticum</i>	MT605461	100.0
OUT-24	0.5	1.1	1.6	1.6	<i>Novosphingobium resinovorum</i>	NR_044045	100.0
OUT-29	4.2	0.0	0.0	0.0	<i>Novosphingobium naphthalenivorans</i>	AB649005	98.9
OUT-74	1.1	0.0	0.0	0.0	<i>Novosphingobium arvoryzae</i>	OL773518	99.8
<i>Polaromonas</i> (2OTUs)							
OUT-10	6.8	0.0	2.7	0.0	<i>Polaromonas jejuensis</i>	KY484547	99.7
<i>Pseudomonas</i> (7OTUs)							
OUT-14	2.1	3.7	1.1	1.1	<i>Pseudomonas mandelii</i>	MN215467	100.0
OUT-19	0.5	2.7	1.6	1.1	<i>Pseudomonas putida</i>	MT626824	100.0
OUT-25	0.0	1.6	2.2	1.1	<i>Pseudomonas koreensis</i>	ON597469	100.0
OUT-35	0.5	1.6	0.0	1.1	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	MG571697	100.0
OUT-51	0.0	1.1	0.5	0.0	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	OM319725	100.0
OUT-67	0.0	0.0	0.0	1.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MT605329	100.0
<i>Rhizobium</i> (13OTUs)							
OUT-1	5.8	0.0	13.7	15.7	<i>Rhizobium grahamii</i>	KF477161	100.0
OUT-3	1.6	0.0	6.6	10.3	<i>Rhizobium viscosum</i>	MT534119	100.0
OUT-4	1.6	2.7	4.9	5.9	<i>Rhizobium etli</i>	KX008304	100.0
OUT-22	1.1	1.6	0.5	1.6	<i>Rhizobium herbae</i>	MK611737	99.1
OUT-38	0.5	1.1	0.5	0.5	<i>Rhizobium tropici</i>	MT539147	100.0
OUT-39	0.0	0.0	1.1	1.6	<i>Rhizobium tibeticum</i>	JN896365	100.0
OUT-40	1.6	0.0	1.1	0.0	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	NR_103919	100.0
OUT-47	0.5	0.0	0.5	1.1	<i>Agrobacterium fabrum</i>	CP125095	100.0
OUT-56	0.5	0.0	0.0	1.1	<i>Rhizobium galegae</i>	Y12360	100.0
<i>Rhodanobacter</i> (11OTUs)							
OUT-12	6.3	0.0	3.3	0.0	<i>Rhodanobacter ginsengisoli</i>	OQ457059	98.8
OUT-21	2.1	2.1	1.1	0.0	<i>Rhodanobacter soli</i>	MW748054	99.3
OUT-26	3.2	1.1	0.5	0.0	<i>Rhodanobacter spathiphylli</i>	NR_042434	99.8
OUT-45	2.1	0.0	0.0	0.0	<i>Rhodanobacter fulvus</i>	NR_040952	100.0
OUT-49	0.0	0.0	1.6	0.0	<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	MN181302	100.0
OUT-52	1.1	0.0	0.5	0.0	<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	AB245365	100.0
OUT-62	1.1	0.0	0.0	0.0	<i>Rhodanobacter spathiphylli</i>	KY078839	99.1
<i>Sphingobium</i> (2OTUs)							
OUT-8	2.6	3.2	3.3	1.1	<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i>	MF101093	100.0
<i>Sphingomonas</i> (8OTUs)							
OUT-11	4.7	0.0	4.9	0.0	<i>Sphingomonas mali</i>	NR_113762	100.0
OUT-53	0.0	0.0	1.6	0.0	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i>	MT634400	99.1
OUT-61	1.1	0.0	0.0	0.0	<i>Sphingomonas oligophenolica</i>	AB365794	100.0
OUT-71	1.1	0.0	0.0	0.0	<i>Sphingomonas laterariae</i>	MZ976822	99.1
<i>Stenotrophomonas</i> (2OTUs)							
OUT-72	0.0	0.0	0.0	1.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MN826555	100.0
<i>Variovorax</i> (3OTUs)							
OUT-2	0.0	12.8	2.2	4.9	<i>Variovorax paradoxus</i>	NR_074646	100.0

^a OTUs with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of isolation collection are shown.

^b R2A, TSA, NA and KB stand for R2A agar, tryptic soy broth agar, nutrient agar and king B agar, respectively.

^c Results with approximately 500 bp are shown.

第3章 テンサイ共生細菌の群集構造解析に基づく植物生育促進細菌の選抜

序

現在まで、テンサイの PGPB としては、*Acinetobacter* (Shi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010)、*Bacillus* (Çakmakçi *et al.*, 1999; Çakmakçi *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010)、*Burkholderia* (Çakmakçi *et al.*, 2001)、*Chryseobacterium* (Shi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010)、*Pseudomonas* (Dunne *et al.*, 1998; Kloepper *et al.*, 1980; Çakmakçi *et al.*, 2001; Çakmakçi *et al.*, 2006)、*Paenibacillus* (Çakmakçi *et al.*, 2006)、*Rhodobacter* (Çakmakçi *et al.*, 2006)、*Stenotrophomonas* (Dunne *et al.*, 1998) と、多くの属において報告されている。しかしながら、第1章で示したように、テンサイ側根の共生細菌の群集構造解析の結果からは、側根には *Proteobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes* の3門が優占的に存在し、特に *Alphaproteobacteria* 綱は、生育期全般にわたって最も優占化していることが明らかとなった。このように、既報の PGPB に関する研究の多くは *Bacteroidetes* 門や *Firmicutes* 門、*Gammaproteobacteria* 綱と、特定の分類群に限定され、植物共生系における優占的な菌群である *Alphaproteobacteria* 綱や *Actinobacteria* 門に関する PGPB の報告は少ないなど、これまでの PGPB 研究で対象とされてきた菌群が必ずしも実際の圃場環境下での共生細菌の群集構造を反映・考慮したものとはなっていなかった可能性が考えられる。

従来 of PGPB の探索・選抜の多くは、窒素固定能や IAA 生産能、シデロフォア生産能、病害抑制能など、植物生育促進に関わる代表的な因子に基づいて行われてきた (Ahmad *et al.*, 2008; Bal *et al.*, 2013; Çakmakçi *et al.*, 2001; Dunne *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2009)。しかし、この様に分離・選抜された PGPB が有用な効果を発揮するためには、それらの細菌が植物組織に感染・定着する必要があり、植物組織に対する親和性・定着性の評価が実用的・効果的な PGPB の選抜において最も重要な形質の1つになると考えられる (Compant *et al.*, 2010; Lugtenberg *et al.*, 2009)。

植物共生微生物の植物組織に対する親和性・定着性は、植物組織における存在量にも反映され得ると考えられる。このため、共生細菌の群集構造を考慮して PGPB を探索することは微生物生態学的な視点から合理的な戦略と考えられる。第1章で示したように、テンサイの共生細菌の群集構造は、植物の成長に伴って大きく変動し得る。また、イネやダイズなどでは、施肥条件によっても共生細菌の群集構造は大きな影響を受けることが報告されている (Ikeda *et*

al., 2014; Unno *et al.*, 2015; Masuda *et al.*, 2016)。このため、異なる施肥条件などの多様な栽培環境でも安定して植物組織に存在できる細菌群から PGPB を探索することは、PGPB の有用機能を活用した農業の展開を考える上で、重要なポイントの 1 つになると考えられる。

そこで本章では、共生細菌の群集構造を考慮した PGPB 探索の有効性を検証するため、(i)異なる施肥条件下でのテンサイ共生細菌の群集構造の解明、(ii)PGPB 探索のリソースとするための側根共生細菌の菌株コレクションの構築、(iii)群集構造解析の結果を考慮した接種試験による PGPB の探索、を目的として、培養法と非培養法の両方の手法に基づいてテンサイ共生細菌群集の多様性解析とテンサイ幼苗への接種試験を行った。

第 1 節 低肥料条件下のテンサイ共生細菌の群集構造解析

3-1-1. 材料と方法

3-1-1-1. テンサイ植物体および栽培土壌の採取

解析に供試したテンサイの植物体は、農研機構北海道農業研究センター芽室研究拠点（北海道河西郡芽室町）の 3 要素試験圃場（北緯 42 度 53 分 19 秒、東経 143 度 4 分 28 秒、標高 95m）で移植栽培したテンサイ（品種名「アマホマレ」）から採取した。2010 年 3 月 16 日にペーパーポット（ビート用規格 1 号、日本甜菜製糖株式会社）に播種後、ガラス室で育苗した苗を 4 月 26 日に圃場に畦間 66 cm、株間 20 cm で移植した。育苗管理は、第 1 章 1-1-1. に準じて行った。

試験区として、窒素、リン酸、カリウムを施肥する NPK 区、リン酸とカリウムを施肥する PK 区、カリウムのみを施肥する K 区を設けた（無反復）。これらの試験区の場所は芽室研究拠点に設置され、約 30 年間輪作体系の下で維持管理されていた 3 要素試験区の一部に対応するものである。施肥は基肥のみとし、硫酸アンモニウム（N: 15 kg/10 a）、過リン酸カルシウム（P₂O₅: 25 kg/10 a）、硫酸カリウム（K₂O: 16 kg/10 a）の各単肥を移植前に全層施肥した。植物サンプルの採取は 7 月 12 日に行った。それぞれの試験区から目視により外観が健全な株を無作為に 9 個体抜き取り、付着した土壌を水道水で洗浄した後、主根、側根（目視で直径 1 mm 程度以下のもの）、葉身および葉柄に分けて採取し、-30℃で凍結保存した。

試験圃場の土壌採取は植物サンプルの採取と同じ 2010 年 7 月 12 日に行った。3 カ所の畦間から、オーガを用いて深さ 5-15cm の土壌を採取し、採取した土壌を等量混合して化学分析用

の土壌サンプルとした。化学分析は十勝農業組合連合会農産化学研究所に依頼した（第 1 章 1-1-1. 参照）。

3-1-1-2. テンサイ共生細菌の 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーの構築

3 種類の試験区（NPK 区、PK 区、K 区）と 4 種類の植物組織（主根、側根、葉身、葉柄）を組み合わせた 12 種類のクローンライブラリーを構築した。植物サンプルからの細菌細胞の抽出は、個体別に、細菌細胞濃縮法（Ikeda *et al.*, 2009）により行った。主根については 1~2 cm の角切りに裁断した 100 g のサンプルを 500 ml の Bacterial cell extraction buffer（以下、BCE buffer；50 mM Tris-HCl（pH 7.5）、1% Triton X-100、2 mM 2-mercaptoethanol）とともにブレンダーで 1 分間ごと、氷冷しながら 3 回破碎した後、粉碎液をミラクロス（CalBiochem 社）で濾して植物残渣を取り除いた。ろ液を低速遠心（1,800 rpm、5 分、10℃）した後、上清を更に高速遠心（6,000 rpm、20 分、10℃）した。得られた沈殿物に 25 ml の BCE buffer を加えて溶解後、キムワイプ（日本製紙クレシア）を使って懸濁液をろ過して不溶性物質を取り除き、ろ液を高速遠心（10,000 rpm、20 分、10℃）する工程を 2 回繰り返した。遠心後に得られた沈殿に 20 ml の BCE buffer を加えて溶解後、キムワイプで懸濁液をろ過した。BCE buffer で 80%（w/v）に溶解した Nycodenz（1002424、AXS 社）溶液が 4 ml 入った超遠心用チューブにろ液を重層した後、スイングローターで超遠心（8,900 rpm、40 分、10℃）した。超遠心後、中間層から細菌を含む白層の画分を抽出し、滅菌水で 2 回洗浄後、得られた沈殿を以降の DNA 抽出に用いた。葉身および葉柄については 25 g のサンプルと 250 mL の BCE buffer を用いて、側根については液体窒素中でペッスルを用いて摩砕した 1 g のサンプルと 250 mL の BCE buffer を用いて、主根と同様の方法により細菌細胞画分を調整した。

抽出した細菌細胞から、Ikeda ら（2004）の方法に従って DNA を抽出し（第 1 章 1-1-2. 参照）、16S rRNA 遺伝子の PCR の鋳型 DNA として使用した。16S rRNA 遺伝子配列の増幅には、ユニバーサルプライマー 27F（5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3'）および 1525R（5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'）を用いた。PCR の反応条件は次のとおりである。最初に 94℃で 2 分間加熱後、25 サイクルのプログラム（94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、72℃で 2 分間）を行い、最後に 72℃で 10 分間とした（Someya *et al.*, 2013）。PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動した後、NucleoSpin Extract II（Macherey-Nagel 社）を用いて想定される約 1500 bp のアンプリコンを精製し、試験区および植物組織ごとに等量混合し、pGEM-T Easy TA cloning vector（Promega 社）を用いてクローニングした。各クローンの 16S rRNA 遺伝子（*Escherichia*

coli の遺伝子で 109~665 の位置に相当) の部分配列の決定は、ユニバーサルプライマー-27F をシーケンス用プライマーとして用い、タカラバイオ株式会社のプレート単位塩基配列解析 (ワンパスシーケンス) に委託して、サンガー法により行った。

3-1-1-3. 側根共生細菌の菌株コレクションの構築

低肥料条件下での補償効果として、植物の生育に有用な細菌が増殖している可能性がある、との推論のもと、PK 区と K 区で栽培された個体の側根に共生する細菌の単離を行った。各区で栽培した 3 個体から採取した側根 (各個体 1 g、合計 3 g) を乳鉢で磨砕後、30 ml の 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、ミラクロス (CalBiochem 社) で濾過して植物残渣を除いた摩砕液を細菌分離に用いた。分離培地には R2A 寒天培地 (ベクトン・ディッキンソン株式会社、以下、R2A 培地) と Tryptic soy broth (ベクトン・ディッキンソン株式会社) に 1.5% の Bacto Agar (ベクトン・ディッキンソン株式会社) を加えた TSA 培地を用いた。なお、糸状菌の発生を抑制するため、各培地にはシクロヘキシミド (和光純薬株式会社) を 50 mg/ml で添加した。24°C・暗黒条件下で 1 週間培養後、生じたコロニー、約 200 個を無作為に単離し、シングルコロニーアイソレーションを 2 回実施して菌株の純化を行った。グリセロールを 15% 濃度で加えた各液体培地に純化した菌株を懸濁し、-80°C で凍結保存した。

菌株のゲノム DNA 抽出は Ikeda ら (2004) の方法に従って行った (第 2 章 2-1-2 参照)。菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分配列の決定は、3-1-1-2. で前述したクローンライブラリーにおける配列決定と同様、ユニバーサルプライマー-27F をシーケンス用プライマーとして使用し、タカラバイオ株式会社に委託してサンガー法により行った。また、テンサイ幼苗への接種試験の結果、生育促進または生育阻害の効果が認められた菌株については、r1L (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3')、926f (5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3') および f2L (5'-CCAGCAGCCGGTAATAG-3') をシーケンス用プライマーとして使用し (Tanaka *et al.*, 2008)、タカラバイオ株式会社に委託して、サンガー法を用いて 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長配列を決定した。

3-1-1-4. 16S rRNA 遺伝子配列のクラスタリング解析

16S rRNA 遺伝子配列のクラスタリング解析は、クローンライブラリーと菌株コレクションの配列データを統合して行った。解析ソフト Orientation Checker (Ashelford *et al.* 2006) により配列が正方向の 16S rRNA 遺伝子配列であることを確認した後、解析ソフト MALLARD

(Ashelford *et al.*, 2006) によりキメラ配列を取り除き、CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) によるアライメントを行った。アライメントに基づき、PHYLIP ver. 3.66 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) の DNADIST プログラムを用いて、デフォルトのパラメータで配列間の距離行列を作成した。作成した距離行列から Mothur プログラム (Schloss *et al.*, 2009) を用い、配列の類似度の閾値を 97% とした operational taxonomic units (OTUs) の作成と多様性指数の算出を行った。ライブラリーのカバレッジは Kemp and Aller (2004) に従って算出した。

3-1-1-5. 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリーの主座標分析 (PCoA)

クローンライブラリー間の群集構造の類似性を視覚化するため、UniFrac プログラム (Lozupone *et al.*, 2006) による主座標分析を行った。分析では、ライブラリー中の配列数を考慮する abundance weight のオプションを使用して行った。

3-1-1-6. 16S rRNA 遺伝子配列の系統解析

クローンライブラリーと単離菌コレクションの系統構成 (分類群の相対的な存在量) については、Ribosomal Database Project (RDP; Wang *et al.*, 2007) において、信頼度閾値 80% として解析した。また、ライブラリー間の統計的比較は、RDP の Library Compare プログラムを用いて行った (Cole *et al.*, 2014)。

3-1-1-7. 塩基配列のアクセッション番号

本研究で使用した塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank のデータベースに登録済みである。クローンライブラリーと菌株コレクションにおける塩基配列の登録番号は、それぞれ LC038237~LC040216、LC040217~LC040864 である (表 3-1)。生育促進効果と生育抑制効果を示した菌株の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長配列 (約 1400 bp) の登録番号は、LC040865~LC040881 と LC602158~LC602165 である。

3-1-2. 結果と考察

3-1-2-1. 植物組織と施肥条件の違いがテンサイ共生細菌群集に及ぼす影響

土壌分析の結果は表 3-2 に示す通りである。処理区間で土壌中の窒素レベルに差は認められなかったが、草丈、葉数ともに NPK 区 > PK 区 > K 区の順に値は小さくなり、低肥料条件下での

生育の抑制が認められた（図 3-1）。

Mothur による解析結果を表 3-3 に示す。クローンライブラリーのカバー率について、地下部組織の値は 61.5%～76.4%であり、地上部組織の値（88.3%～93.3%）と比べて低かった。アルファ多様性指標について、Chao1 および ACE は観測された OTU の数のみを考慮した OTU 数の推定値であり、Shannon および Simpson は OTU 数と均等度を考慮した多様度指数である（小谷野，2012）。解析の結果、いずれのアルファ多様性指数の値も地下部組織は地上部組織よりも大きく、地下部組織は地上部組織と比べて共生細菌の多様性が高いと考えられた。興味深いことに、葉身と葉柄における OTU 数や Shannon および Simpson の値は施肥条件の悪化に応じて NPK 区 > PK 区 > K 区と大きく減少していたが、主根と側根では施肥条件の悪化に伴う値の変動が小さく、比較的安定していた。これらの結果から、地上部組織の共生細菌の多様性は、地下部組織と比べて施肥管理に対してより敏感に反応すると考えられた。

UniFrac 距離に基づき、クローンライブラリー間の群集構造の類似性を可視化した主座標分析の結果を図 3-2 に示す。テンサイ共生細菌群集は大きく、地上部組織、主根および側根の 3 つにグループ化されることが明らかとなった。多様性指数と同様に、地上部組織の共生細菌群集の多様性は施肥条件によって大きく変動し、主根および側根では施肥条件の変化に対する共生細菌群集の変動は小さかった。即ち、主座標分析においても地上部組織は地下部組織と比べて施肥管理に敏感に反応することが明らかとなった。以上の結果から、有用微生物（の機能）の農業利用にあたっては、地上部組織の共生微生物よりも地下部組織の共生微生物群に焦点を当てることにより、有用微生物の安定的な組織への定着や機能発現が期待し得る可能性があると考えられた。

表 3-4、表 3-5 および表 3-6 にクローンライブラリーまたは菌株コレクションにおける系統分類と OTU の存在比を示す。多くの分類群で施肥条件に応答した存在比の変動が認められ、そのような応答は地上部組織でより顕著であった。これらの結果は、地上部と地下部の植物組織間における各共生細菌群にとっての栄養要求性の違いを示唆している可能性がある。特に、*Firmicutes* 門に属する分類群で、PK 区と K 区で存在比の大きな減少が認められたが、本研究の菌株コレクション構築においては、*Firmicutes* 門に属する細菌群は R2A 培地ではほとんど単離されなかった（表 3-4）。同様に、第 2 章の 4 種類の培地を使った側根共生細菌の単離実験においても、R2A 培地では *Firmicutes* 門の細菌を単離できなかった（表 2-3）。一般的に R2A 培地は比較的低栄養な培地と考えられるため、*Firmicutes* 門の共生細菌を効率的に単離するためには、より高栄養な培地が好ましい可能性が考えられた。地上部組織に共生する細菌は、

その栄養源のほとんどを植物の代謝物に依存していると考えられる。このため、施肥条件の悪化に伴ってテンサイの生育が低下した結果（図 3-1）、植物からの代謝物の滲出が少なくなり、高栄養条件を好む *Firmicutes* の存在比が大きく低下した可能性が考えられた。一方で、地下部組織に共生する細菌は、植物の代謝だけでなく土壌を介しても栄養を摂取することが可能であるため、施肥条件の負の影響が緩和されやすいのかもしれない。

クローンライブラリーの分類学的組成の解析結果から、テンサイ共生細菌の特徴として、*Proteobacteria* 門、特に *Alphaproteobacteria* 綱と *Gammaproteobacteria* 綱の菌群が全組織で優占的であることが明らかとなった（表 3-4）。*Alphaproteobacteria* 綱の中では、*Rhizobiales* 目と *Sphingomonadales* 目の菌群が葉身、葉柄、主根に多かった。*Rhizobiales* 目においては、地上部組織では *Methylobacterium* 属と *Phyllobacterium* 属が多かった（表 3-5）。地上部組織で *Methylobacterium* 属が優占することはテンサイを含む多くの植物種でも報告されており（Della Lucia *et al.*, 2021; Delmotte *et al.*, 2009; Okubo *et al.*, 2014; Someya *et al.*, 2013; Hara *et al.*, 2019; Minami *et al.*, 2016; Wolfgang *et al.*, 2020;）、本研究の結果、テンサイでも同様であることが明らかとなった。*Methylobacterium* 属については、本菌群がテンサイ褐斑病に対する抵抗性に寄与し得ることが最近の研究において明らかにされている（Broccanello *et al.*, 2022）。一方、*Devosia* 属、*Mesorhizobium* 属、未知の *Bradyrhizobiaceae* 科の菌群（Unclassified *Bradyrhizobiaceae*）などの *Alphaproteobacteria* 綱の菌群については、地下部組織のみに観察された。これらの菌群を含め、主根では *Rhizobiales* 目の菌群の存在比が 28.3%~38.8%と高く、優占化していた。Tsurumaru ら（2015）は、テンサイ主根におけるメタゲノム解析の結果、*Mesorhizobium* 属と *Bradyrhizobiaceae* 科の配列が多いことを報告しており、本研究のテンサイ主根の解析結果とも一致した。属レベルでは、*Rhizobium* 属が、シロイヌナズナ（Bodenhausen *et al.*, 2013）やバレイシヨ（Someya *et al.*, 2013; Unno *et al.*, 2015）など、他の植物種での報告と同様、テンサイの植物組織全体に普遍的に存在していることが明らかとなった。このような *Rhizobium* 属の多様な植物種の様々な組織における常在性は、本属が植物にとって重要な、未知の生理生態学的役割を担っている可能性を示唆しているのかもしれない。

Sphingomonadales 目においては、*Sphingomonas* 属と *Novosphingobium* 属が多かったが、両者の各組織における分布パターンは大きく異なっていた。即ち、*Sphingomonas* 属は主に地上部組織に存在し、*Novosphingobium* 属は地下部組織、特に主根で最も優占化していた（表 3-5）。*Sphingomonas* 属が地上部組織で優占化していることは他のグループとの結果とも一致してい

た (Wolfgang *et al.*, 2020; Bertoldo *et al.*, 2021; Della Lucia *et al.*, 2021)。上記の 2 属のテンサイ組織における分布パターンの違いは、これらの属がテンサイの地上部組織と地下部組織において、それぞれ生理生態学的に大きく異なる性質を持つことを示唆していると考えられる。主根に *Novosphingobium* 属が存在することは、鶴丸らのメタゲノム解析でも報告されているが (Tsurumaru *et al.*, 2015)、そのメタゲノム解析では *Novosphingobium* 属の存在比は約 3%と、本研究の結果 (14%~22%) と比べて小さく、その代わりに *Mesorhizobium* 属については存在比が 14%と、本研究の主根での値 (2.6%~6.7%) と比べて大きかった。

テンサイに共生する *Gammaproteobacteria* 綱の細菌は、主に *Enterobacteriaceae*、*Xanthomonadaceae*、*Pseudomonadaceae* の 3 科であった (表 3-4)。*Enterobacteriaceae* 科と *Xanthomonadaceae* 科の組織分布パターンには対照的な大きな違いが見られ、*Enterobacteriaceae* 科は地上部組織で優占して存在し、*Xanthomonadaceae* 科は側根で多かった。一方、*Pseudomonadaceae* 科は分析した全ての組織において優占的な菌群として検出された。また、*Enterobacteriaceae* 科と *Pseudomonas* 属については葉身と比べて葉柄での存在比が大きく低下する傾向がみられ、対照的に *Methylobacterium*、*Phyllobacterium*、*Sphingomonas* の *Alphaproteobacteria* 綱に含まれる 3 属は葉身よりも葉柄での存在比が高い傾向がみられた。これらの事実は、前者の *Gammaproteobacteria* 綱の菌群と後者の *Alphaproteobacteria* 綱の菌群の間での競合的な関係を示唆しているのかもしれない。同一サンプルではないため、厳密な比較はできないが、本章のクローンライブラリー解析では第 1 章の NGS の結果と比べて *Actinobacteria* 門と *Alphaproteobacteria* 綱の存在比が低く、逆に *Gammaproteobacteria* 綱の割合が高い傾向が見られた。

上述のような *Actinobacteria* 門、*Alphaproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱、*Novosphingobium* 属、*Mesorhizobium* 属の存在比について、第 1 章と第 3 章、Tsurumaru ら (2015) によるメタゲノム解析の間で結果の違いが生じた要因としては、*Novosphingobium* 属のようにメタゲノム解析におけるゲノムデータが不十分なため機能性遺伝子に基づいた系統解析結果に偏りが生じることや、PCR に用いたプライマーの種類や解析対象領域の違い、PCR 増幅条件などに起因したバイアスが存在する可能性などが考えられる (Okubo *et al.*, 2012)。また、既に上述したような鋳型 DNA の調製法や PCR に起因している可能性もある。NGS 解析では、細菌のゲノム DNA を側根組織から直接抽出しているのに対し、クローンライブラリー法では、細胞濃縮法で抽出した細菌が含まれる画分から DNA を抽出していることから、細胞濃縮の過程で植物組織に強固に定着していた細菌が植物残渣として除去された可能性も考えられる。即ち、

本研究の第1章のNGS解析と第3章のクローンライブラリー解析の間の結果の差異は、側根への物理的な定着性の強さを反映し、*Actinobacteria* 門と *Alphaproteobacteria* 綱は、側根に強く定着する一方、*Gammaproteobacteria* 綱は緩やかに定着していることを示唆しているのかもしれない。上記に加えて、NGSのアンプリコン解析とクローンライブラリー解析におけるPCRのプライマーや増幅条件などにおけるバイアスが原因となっている可能性も考えられる。

その他、テンサイ共生細菌の特徴として、*Verrucomicrobia* 門と *Planctomycetes* 門は、施肥条件に依らず、地下部組織に存在し、*Acidobacteria* 門と *Bacteroidetes* 門は側根のみから検出された(表 3-4)。特に側根における *Bacteroidetes* 門の存在比は 19%~26%と多かったが、それらの菌群の多くは *Niastella* 属であった(表 3-5)。第1章でのNGSの解析結果でも、*Niastella* 属はテンサイの生育期間全般に渡って高い存在比で安定して優占的な菌群であることが明らかとなっており(表 1-4)、*Niastella* 属が側根においてのみ優占化することは、テンサイ共生細菌のユニークな特徴の1つと考えられる。Yeohら(2016)は、栽培土壌と比較して、テンサイと同様、砂糖の原料作物であるサトウキビの根に *Niastella* 属細菌が多く存在していたことを報告しており、糖を蓄積する作物の根圏には、*Niastella* 属を誘引する分泌物が存在する可能性も考えられる。今後の研究において、砂糖の原料作物群の根分泌物と根圏微生物との関係を明らかにすることで、*Niastella* 属のような根圏微生物群の制御技術の開発につながられるかもしれない。

3-1-2-2. 側根共生細菌の大規模菌株コレクションの構築

分離培地に R2A 培地または TSA 培地を用い、PK 区または K 区で栽培したテンサイ側根からの細菌の単離を行った結果、合計 665 の菌株からなる 4 つの菌株のコレクションを構築した(表 3-3)。アルファ多様性指標について、R2A 培地の菌株コレクション(LR-PK-R および LR-K-R)における値は、TSA 培地の菌株コレクション(LR-PK-T および LR-K-T)と比べて高い傾向を示し、特に K 区からの菌株コレクション LR-K-R と LR-K-T の間でその傾向は顕著であった。これらの結果は、第2章での結果や過去の報告(Okubo *et al.*, 2009; Okazaki *et al.*, 2014)にあるように、R2A 培地は TSA 培地よりも分類学的に多様な細菌の単離に適していることを示唆していると考えられる。例えば *Mesorhizobium* 属や *Neorhizobium* 属、*Nocardioides* 属、*Polaromonas* 属および *Sphingomonas* 属は、R2A 培地でのみ単離された。対照的に *Pantoea* 属に関しては、TSA 培地でのみ単離された(表 3-5)。R2A 培地は TSA 培地と比較して炭素源や NaCl の濃度が低い。そのような培養条件の違いが一般的に低栄養環境に高い適応能力を持つ(オリ

ゴトロフィックな性質を強く持つ) 細菌群の R2A 培地上での増殖促進に寄与している可能性が考えられる。一方で、TSA 培地や NA 培地などの塩濃度が高く、栄養成分に富む培地は、*Pantoea* 属のような富栄養条件に高い適応能力を持つ (コピオトロフィックな性質を強く持つ) 細菌群の増殖に適しているのかもしれない。

本研究におけるクローンライブラリーと菌株コレクションの間で最も顕著な分類学的組成の相違は、*Niastella* 属の存在比であった (表 3-5)。これまでに報告されている *Niastella* 属の既知種は、全て土壌から単離されており、いずれも R2A 培地上で生育が可能であると報告されている (Weon *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015)。*Niastella* 属の既知の 6 種のうち、*N. koreensis* と *N. yeongjuensis* の 2 種は、高麗人参の栽培土壌から単離されているが、Vendan ら (2010) は、高麗人参の組織から *Niastella* 属細菌を単離できなかつたと報告している。これらの報告や今回の結果から、植物に共生している *Niastella* 属細菌群の単離は、標準的な R2A 培地では分離培養が難しく、当該菌群の分離培養にあたっては新規の技術的な工夫の必要性があるように思われる。

第 2 節 低肥料条件下のテンサイ側根からの植物生育促進細菌の選抜

3-2-1. 材料と方法

3-2-1-1. 供試菌株の選抜

テンサイ幼苗への接種試験に供試する菌株を選抜するため、菌株コレクションの OTU の中から、以下の基準を満たす OTU を選抜した。

- ① 分類学的新規性 (最も近縁な既知種との配列の類似度が 97% 未満) が高いもの、あるいは、既報の PGPB との類似度が高いもの
- ② 組織特異性 (主根または側根に優占的、あるいは特異的に存在)
- ③ 安定性 (施肥条件に依らず安定的に存在)
- ④ 存在比 (ライブラリーにおける存在量が 1% 以上)

なお、実用的な観点から、植物、動物、またはヒトの病原体の配列に高い類似度を示す OTU は除外した。

上記の基準で選抜した各 OTU に対応する菌株を接種試験の供試菌株とした。供試菌株は、単離に用いた R2A 培地または TSA 培地の培地上で 24℃・暗黒条件下で 3 日間培養後、菌体を滅菌水に懸濁した。菌体懸濁液を遠心分離にかけて菌体をペレットとして回収後、660 nm における OD 値が 0.1 となるように滅菌水で調整し、接種試験に用いた。

3-2-1-2. テンサイ幼苗への接種試験

接種試験にはテンサイ品種「リッカ」を供試した。種子を 70%エタノールに 1 分間浸した後、Tween20 を 0.01%濃度で添加した 1%次亜塩素酸ナトリウムに 15 分間浸漬して種子の表面殺菌を行った。滅菌水で濯いだ種子を湿らせたろ紙に包み、滅菌したシャーレに入れて 25℃・暗黒条件下で 1 日間、発芽させた。121℃で 5 分間、オートクレーブ滅菌した育苗培土「ポットエース」（片倉コープアグリ株式会社）80 ml を充填したポット（41x41x43.5 mm；セルボックス、明和株式会社）に発芽種子を 2 粒、播種した後、育苗培土 20 ml で覆土した。播種後、前述の調整した細菌懸濁液 1 ml を接種した。対照区においては、滅菌水を接種した。栽培は、明期：25℃・16 時間、暗期：20℃・8 時間に設定した人工気象室（NK システム E5ZS-34、日本医療化学機器株式会社）で行い、必要に応じて脱塩水で灌水した。栽培 1 週間後に 1 ポットに 1 株となるように間引きを行った。栽培 4 週間後、テンサイ幼苗の根に付着した培土を水洗により取り除いた後、地上部と根部に分けてサンプリングし、80℃で 3 日間風乾後、乾物重を測定した。1 回の接種試験では 1 菌株につき 12 株のテンサイ苗に接種を行い、接種結果の再現性を確保するため、3~4 回の繰り返し試験を行った。データの解析に当たっては、繰り返し試験間のデータを補正するため、対照区に対する乾物重の比率を用い、Welch の *t* 検定（両側）で統計解析を行った。

3-2-1-3. 系統樹解析

系統樹解析は、CLUSTAL W を用いて配列のアライメントをした後、近隣結合法（Saitou and Nei, 1987）により行った。PHYLIP 形式の tree file の出力には、ブートストラップ（Felsenstein 1985）による 1000 回の反復を適用し、TreeView（Page, 1996）を用いて系統樹を作成した。

3-2-2. 結果と考察

クローンライブラリー（1980 クローン）と菌株コレクション（665 菌株）の 16S rRNA 遺伝子配列、合計 2465 配列について、類似度の閾値を 97%としてクラスタリングした結果、456 個の OTU に分類された（表 3-6）。側根に関連する 279 個の OTU のうち、93 個は菌株のみ、30 個はクローン配列と菌株の両方を含んでいた。残り 156 個の OTU については、今回の実験では対応する菌株は得られなかった。分類学的新規性や組織特異性などの基準に基づき、表 3-7 に示した 44 個の OTU に対応する代表的な菌株を PGPB の候補菌株として、テンサイ幼苗への接種試

験に供試した。接種試験の結果、8菌株は接種により対照区と比較して乾物重が増加し、生育促進効果を示した。一方、6菌株は接種によって乾物重の減少が認められ、生育抑制効果を示した（図 3-3、図 3-4）。

本研究で選抜した生育促進細菌または生育抑制細菌について、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長配列を決定し、BLAST 検索を行った結果、生育促進効果を示した *Asticcacaulis* sp. RK043 と *Mesorhizobium* sp. TP027 の 2 菌株は、既知種との類似度が低く、新種である可能性が考えられた（表 3-8）。さらに、系統樹解析の結果から、先の *Asticcacaulis* sp. RK043 と *Mesorhizobium* sp. TP027 に、生育抑制効果を示した *Rhizobacter* sp. RK021 を加えた 3 菌株は、系統樹上における位置からも新規種の可能性が高いことが示唆された（図 3-5、図 3-6、図 3-7）。今回、テンサイの PGPB として 8 属の菌株、*Nocardioides* sp. RP110、*Asticcacaulis* sp. RK043、*Mesorhizobium* sp. TP027、*Sphingobium* sp. RK166、*Sphingomonas* sp. RP195、*Sphingopyxis* sp. RK106、*Polaromonas* sp. RK103 および *Variovorax* sp. RK170 の（それぞれ、図 3-3 の菌株 4、11、19、30、33、34、36、37）を選抜したが、このうち *Variovorax* 属は、テンサイを含む幅広い植物種の PGPB の典型的なグループとして知られている（Zhou *et al.*, 2017）。一方、*Nocardioides*、*Asticcacaulis*、*Mesorhizobium*、*Sphingobium*、*Sphingomonas*、*Sphingopyxis* および *Polaromonas* の 7 属に分類された菌株については、本研究において属レベルで初めてテンサイの PGPB としての機能を持つことが明らかにされた。さらに、このうち *Asticcacaulis* 属と *Polaromonas* 属の菌株については、テンサイ以外の植物も含めて、本研究において属レベルで初めて植物に対する生育促進効果を持つことが明らかにされた。

生育促進効果を示した上記の 8 菌株のうち、*Asticcacaulis* sp. RK043、*Mesorhizobium* sp. TP027、*Sphingobium* sp. RK166、*Sphingomonas* sp. RP195 の 4 菌株は、第 1 章の NGS 解析結果において、テンサイの生育が急激に成長する 7~8 月にかけて、側根で優占化する菌群に属することが明らかにされており、テンサイ生育盛期の成長に関与している可能性が示唆された（表 1-8）。特に、*Sphingobium* sp. RK166 と *Sphingomonas* sp. RP195 の 2 菌株については、本章のクローンライブラリーの解析結果から、施肥条件が悪化しても側根に安定して存在することが明らかとなっており（表 3-9）、減肥栽培でも安定した効果が期待できる微生物資材開発への利用が考えられる。*Polaromonas* sp. RK103 と *Variovorax* sp. RK170 の 2 菌株は両方とも *Comamonadaceae* 科に属し、これらの菌株と近縁な第 1 章の Unclassified *Comamonadaceae* は、NGS 解析では属レベルに分類できなかったが、主に 9 月に存在比が大きくなることが明らかとなっていることから（表 1-8）、生育盛期の生育への関与は小さいのかもしれない。

上記の PGPB の 8 属のうち、テンサイ以外で報告されている PGPB に関する報告については、*Nocardioides* 属は病害抑制効果を有し (Coombs *et al.*, 2004)、IAA 生産能に優れた菌株は塩ストレス下のコムギの発芽を促進したことが報告されている (Meena *et al.*, 2020)。*Mesorhizobium* 属はマメ科植物の窒素固定細菌として広く知られており、ヒヨコマメに根粒形成し窒素固定することで生育促進と増収をもたらす菌株が報告されている (Verma *et al.*, 2013)。また、Menéndez ら (2020) は、*Mesorhizobium* 属には、IAA 生産能をもつ菌株が多く、シデロフォア生産能やリン酸可溶化能をもつ菌株も存在すること、トマトの生育促進菌株が得られたことを報告している。土壌の汚染物質の分解者としてよく知られている *Sphingobium* 属については、イネの IAA 生産を促進し、根の伸長とバイオマス量増加に効果を示すことが報告されている (Jou *et al.*, 2022)。*Sphingomonas* 属に関しては、病害抑制効果や IAA による生育促進効果、乾燥耐性向上効果が報告されている (Innerebner *et al.*, 2011; Asaf *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2019)。*Sphingopyxis* 属の PGPB としての報告は少ないが、IAA 生産能力を有し、イチゴの生育を促進したとの報告がある (Dias *et al.*, 2009)。

本研究で PGPB であることが初めて明らかとなった *Asticcacaulis* 属はアラビドプシスの PGPB としての報告がある *Caulobacter* 属と同じ *Caulobacteraceae* 科に属する (Luo *et al.*, 2019)。これまでのところ *Asticcacaulis* 属についての植物への生育効果に関する報告はほとんどないが、Ishizawa ら (2017) は、IAA 生産能やシデロフォア生産能を有するもののウキクサの生育を阻害する菌株を報告している。*Polaromonas* 属も植物への生育効果についての報告事例がほとんどない菌群であるが、多くの植物で PGPB が報告されている *Variovorax* 属と同じ *Comamonadaceae* 科に属している。本研究で選抜した *Polaromonas* sp. RK103 については、Natsagdorj ら (2019) が IAA 生産能やシデロフォア生産能、ACC deaminase 生産能を有していることを報告している。これらの PGPB としての有用機能に加えて、*Variovorax* と *Polaromonas* の 2 属を含む *Comamonadaceae* 科の菌群は根圏での硫黄の有機態から無機態への代謝を介して植物への硫黄供給のために重要な存在であることが知られており (İnceoğlu *et al.*, 2010; Kertesz *et al.*, 2007; Schmalenberger *et al.*, 2008)、菌群の存在比から想定される以上に、有機物の循環的利用に基づいた持続的農業を支えるキーストーン的な有用微生物として重要な菌群である可能性も考えられる。

過去の PGPB の選抜は、窒素固定能や IAA 生産能、シデロフォア生産能など、既知の植物生育促進に関わる代表的な因子（以降、植物生育促進関連因子とする）の分析結果に基づいて行われることが多かった。しかし、生育促進関連因子の分析は時間と労力の負担が大きく、大規

模な選抜は困難であった。さらに重要なことは、上記のような植物生育促進関連因子を有することが、接種試験で植物に対する生育促進効果を示すことと、必ずしも一致しないことが頻繁に起こり得ることであった (Barazani and Friedman, 1999; Cardinale *et al.*, 2015)。本研究では、最初に PGPB (の有用機能) の利用における標的組織である側根の共生細菌を無作為に単離して大規模な菌株コレクションを構築し、次に 16S rRNA 遺伝子配列データに基づく PGPB の候補菌株の選抜を行った。クローンライブラリーと菌株コレクションの配列情報を統合したクラスタリング解析を行った後、PGPB の候補菌株の選抜は、分類学的新規性、標的組織における存在比と安定性、既報の有用細菌または非病原性細菌との類似度の 4 つの基準を考慮して行った。その結果、従来の PGPB の探索研究よりも迅速かつ効率的に、新規性の高い PGPB を多数得ることに成功した。植物組織への親和性は PGPB にとって重要な形質であり (Lugtenberg *et al.*, 2009, Quecine *et al.*, 2012)、組織における OTU の存在比は植物組織における OTU の親和性と安定性を反映しているものと考えられる。したがって、このような配列データに基づいた PGPB の初期選抜は実用的な PGPB 研究の効率的な推進に貢献し得ると考えられた。

本研究の実験条件下では *Bacillus* sp. TP182、*Neorhizobium* sp. RK064、*Pantoea* sp. RK126、*Rhizobacter* sp. RK021、*Tardiphaga* sp. RK140、*Streptomyces* sp. TP071 の 6 菌株がテンサイ幼苗に生育抑制効果を示すことが明らかとなった (図 3-3)。これらの菌群のうち、*Bacillus* 属菌はテンサイを含む多くの植物に対して生育促進効果を示し、一般に有用な細菌と見なされている (Park *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2010; Çakmakçi *et al.*, 2006)。このことは、系統情報のみに依存した PGPB の選抜が難しいことを示唆しており、PGPB の選抜における接種試験の重要性を示すものと考えられる。また、*Streptomyces* sp. TP071 については、第 1 章 NGS 解析の結果から、生育の全般に渡って側根に安定して存在することが明らかとなった *Streptomyces* 属の菌株である (表 1-4)。本研究では生育促進効果は認められなかったが、*Streptomyces* 属は *Bacillus* 属とともに病原微生物に対する拮抗作用がよく知られている。病原微生物に対する高い拮抗能と宿主植物への高い共生能を持つ植物共生微生物は、接種試験時の菌密度が高いとトレードオフのような形で宿主植物の生育を抑制することも起こり得ることが考えられる (Oleńska *et al.*, 2020)。したがって、本章で接種試験の供試菌株として選抜された 44 菌株については、接種時の菌密度を下げた条件下での植物生育促進効果の再評価や、病原微生物の存在下での接種試験による病害防除効果や生育促進効果の有無についても検討する必要があると考えられた。

また、根における存在比から、上記の生育抑制菌株は高い定着能力を持っていると考えられ

る（表 3-9）。生育抑制細菌は他の PGPB との生息場所の競合だけでなく、作物に対する PGPB の有益な効果を妨害する可能性も考えられる。生育抑制細菌群の根における高い存在比は、圃場で安定した PGPB の効果が得られない場合が多い理由の 1 つとして、これまでに想像されている以上に生育抑制細菌の PGPB への干渉が原因として大きいことを示唆しているのかもしれない。このため、PGPB の有用な効果を最大化するためにも、生育抑制菌の特性解析や生態学的理解、さらには、それら菌株の制御技術の開発も今後の重要な検討課題と考えられる。

以上から、農業微生物研究において分子微生物生態学的手法を積極的に活用することにより、実用性の高い有用微生物の効率的な探索と選抜が可能であることが本研究で明らかとなった。植物共生微生物群集に係る分子生態的情報を活用することで、古典的な有用微生物研究では困難であった効果的、安定的な微生物資材の開発や、圃場での栽培条件の管理・制御を介した有用微生物や有害微生物を含む共生微生物制御技術等の開発が実現可能と考えられる。

表 3-1. 塩基配列の登録番号

Table 3-1. List of accession numbers of nucleotide sequences

Library / collection names	No. of sequences	Accession No.		
		Beginig	-	End
LB-NPK	176	LC038237	-	LC038411
LB-PK	177	LC038412	-	LC038588
LB-K	167	LC038589	-	LC038755
PE-NPK	145	LC038756	-	LC038900
PE-PK	178	LC038901	-	LC039078
PE-K	178	LC039079	-	LC039256
LR-NPK	180	LC039257	-	LC039436
LR-PK	135	LC039437	-	LC039571
LR-K	151	LC039572	-	LC039722
TR-NPK	152	LC039723	-	LC039874
TR-PK	164	LC039875	-	LC040038
TR-K	178	LC040039	-	LC040216
LR-PK-R	169	LC040217	-	LC040385
LR-K-R	171	LC040386	-	LC040556
LR-PK-T	145	LC040557	-	LC040701
LR-K-T	163	LC040702	-	LC040864

表 3-2. 試験圃場の土壌の化学分析の結果

Table 3-2. Chemical characteristics of soils in experimental fields of the present study

Experimental fields	pH (H ₂ O)	P ₂ O ₅ (mg·kg ⁻¹)	K ₂ O (mg·kg ⁻¹)	MgO (mg·kg ⁻¹)	CaO (mg·kg ⁻¹)	Total nitrogen (%)	NO ₃ -N (mg·kg ⁻¹)	NH ₄ -N (mg·kg ⁻¹)	Phosphate absorption coefficient	CEC (mg·kg ⁻¹)
NPK	5.4	106	181	135	1,498	0.27	36	5.5	1,812	196
PK	5.9	144	237	229	2,319	0.27	52	5.7	1,678	208
K	5.8	50	215	191	1,560	0.26	35	5.5	1,737	180

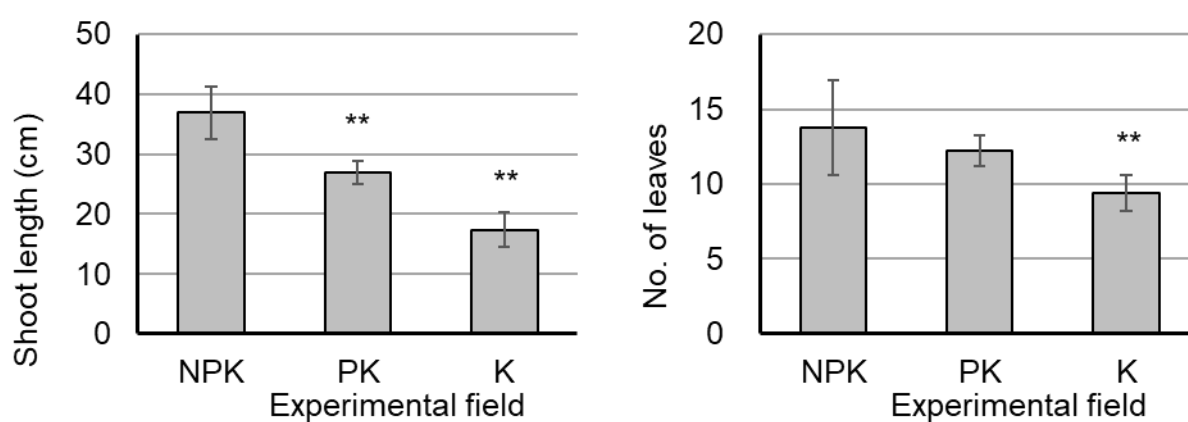


Fig. 3-1. Shoot length and number of leaves for sugar beet plants at the time of sampling. NPK, PK, and K denote plots with standard fertilization, only P and K fertilization (no N fertilization), and only K fertilization (no fertilization with either N or P), respectively. Each value indicates a mean±standard deviation of 10 individual plants. Double asterisks indicate a significant difference compared to NPK by Welch's *t*-test (two-tailed) at $P < 0.01$.

図 3-1. サンプルング時における各試験区のテンサイの草丈および葉数

表 3-3. テンサイ共生細菌のクローンライブラリーおよび菌株コレクションの 16S rRNA 遺伝子配列データに基づいた各種のアルファ多様性指標

Table 3-3. Alpha diversity indices of 16S rRNA gene sequences for the clone libraries and isolate collections derived from sugar beet-associated bacteria

Libraries / Collections	Clone libraries												Isolate collections			
	Leaf blade (LB)			Petiole (PE)			Tap root (TR)			Lateral root (LR)			Lateral root (LR)			
Tissues	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K	
Experimental fields																
Isolation media	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R2A	TSA	R2A	TSA
Library / collection names	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-R	LR-PK-T	LR-K-R	LR-K-T
Statistics																
No. of sequences	175	177	167	145	178	178	152	164	178	180	135	151	171	148	180	166
No. of OTUs ^a	42	37	35	40	35	31	70	72	71	97	75	85	52	48	54	48
No. of singletons	20	14	16	17	18	12	47	49	42	61	52	58	28	24	30	28
Library coverages (%) ^b	88.6	92.1	90.4	88.3	89.9	93.3	69.1	70.1	76.4	66.1	61.5	61.6	83.6	83.8	83.3	83.1
Diversity indexes																
Chao1	63	48	55	59	73	44	224	170	133	199	186	212	115	73	163	86
ACE	105	49	76	59	90	52	164	291	197	318	300	378	124	102	148	97
Shannon index (<i>H'</i>)	3.1	2.9	2.9	3.2	2.9	2.6	3.7	3.6	3.7	4.3	4.0	4.2	3.4	3.3	3.5	3.1
Simpson index (<i>1/D</i>)	15.3	12.5	11.9	17.9	13.6	8.0	25.8	16.1	25.1	79.0	54.8	67.0	21.3	15.5	26.1	11.8

^a OTUs were defined at 97% sequence identity.

^b Library coverage C_x was calculated as follows; $C_x = 1 - (n/N)$, where n is the number of singletons that are encountered only once in a library or collection, and N is the total number of clones or isolates.

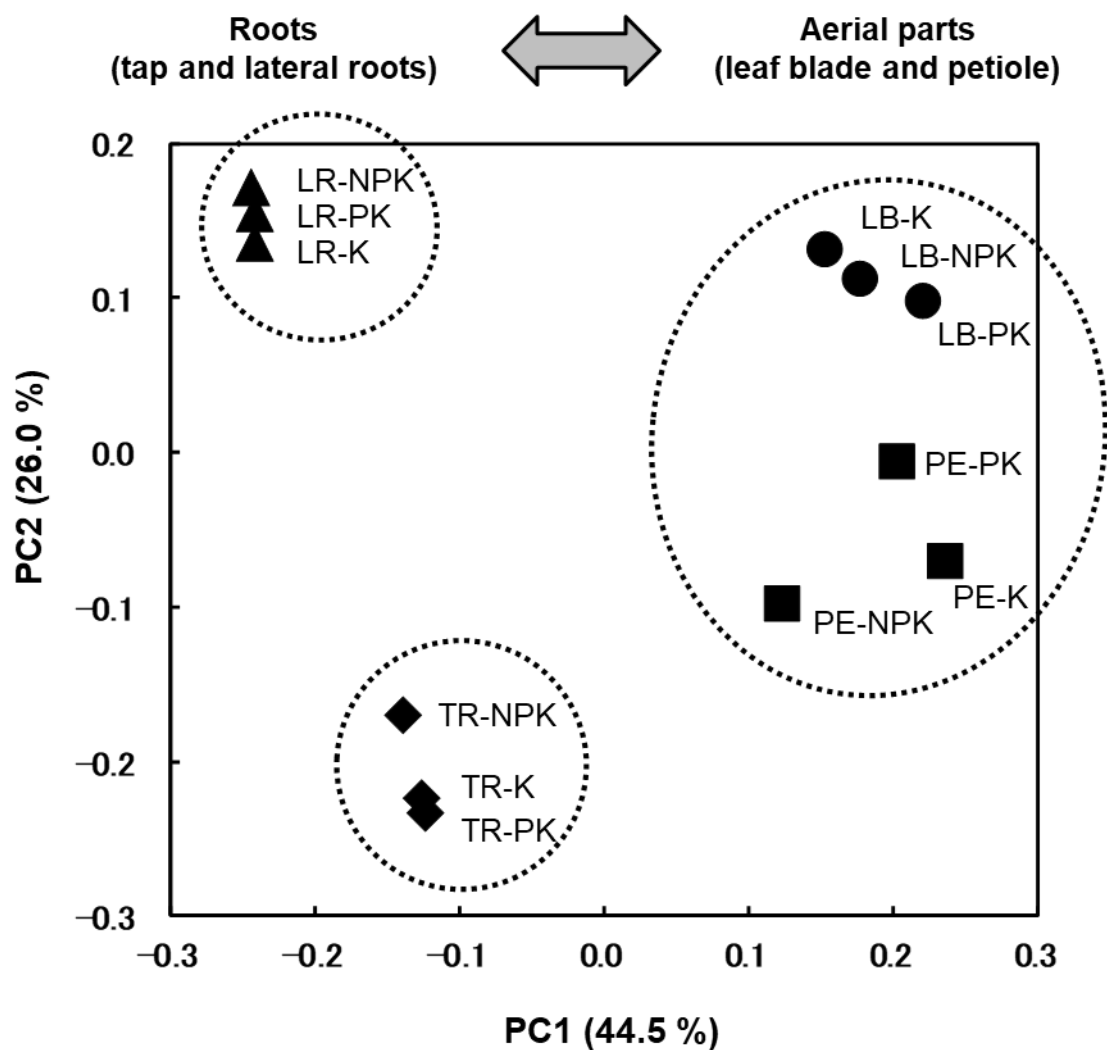


Fig. 3-2. Principal coordinate analysis (PCoA) of the 16S rRNA gene sequences of sugar beet-associated bacteria. The library name is indicated on the right side of each symbol. Circles, squares, diamonds, and triangles denote leaf blade (LB)-, petiole (PE)-, taproot (TR)-, and lateral root (LR)-derived libraries, respectively. NPK, PK, and K denote plots with standard fertilization, only P and K fertilization (no N fertilization), and only K fertilization (no fertilization with either N or P), respectively.

図 3-2. テンサイの各組織の共生細菌群集の 16S rRNA 遺伝子配列データに基づいた主座標分析 (PCoA) の結果

表 3-4. テンサイ共生細菌のクローンライブラリーおよび菌株コレクションの門から科の主要な分類群の存在比 (%)

Table 3-4. Relative abundance of major taxa for clone libraries or isolate collections derived from sugar beet-associated bacteria ^a

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)			
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root			
	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K	
Experimental fields													R2A	TSA	R2A	TSA
Isolation medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Library / collection name	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-R	LR-PK-T	LR-K-R	LR-K-T
Phylum																
<i>Acidobacteria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.9	2.2	4.0	-	-	-	-
<i>Actinobacteria</i>	5.1	7.9	5.4	9.7	2.2	2.8	7.2	6.1	3.9	6.7	1.5	4.6	34.5	52.0	14.4	42.2
<i>Bacteroidetes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26.1	19.3	19.2	1.2	-	3.9	-
<i>Firmicutes</i>	6.9	4.0	1.2	8.3	2.2	1.1	2.6	0.6	1.1	0.6	-	1.3	-	3.4	0.6	3.6
<i>Planctomycetes</i>	-	0.6	0.6	-	-	-	4.6	4.3	6.7	2.8	0.7	1.3	-	-	-	-
<i>Proteobacteria</i>	88.0	87.6	92.2	81.4	95.5	94.4	79.6	86.0	83.1	56.1	69.6	61.6	64.3	44.6	81.1	54.2
<i>Verrucomicrobia</i>	-	-	-	-	-	-	4.6	2.4	2.2	1.7	1.5	4.0	-	-	-	-
Others	-	-	0.6	0.7	-	1.7	1.3	0.6	2.8	2.2	5.2	4.0	-	-	-	-
Class																
<i>Actinobacteria</i>	5.1	7.9	5.4	9.7	2.2	2.8	7.2	6.1	3.9	6.7	1.5	4.6	34.5	52.0	14.4	42.2
<i>Alphaproteobacteria</i>	29.1	41.2	22.8	57.2	58.4	69.7	46.7	59.8	59.6	15.6	25.9	23.2	52.0	29.7	61.1	27.7
<i>Bacilli</i>	6.9	2.8	1.2	8.3	2.2	1.1	2.6	0.6	1.1	-	-	0.7	-	3.4	0.6	3.6
<i>Betaproteobacteria</i>	2.9	1.1	10.2	9.0	2.8	2.2	13.2	6.7	9.6	13.3	9.6	14.6	1.8	2.7	9.4	-
<i>Deltaproteobacteria</i>	-	-	-	-	-	-	-	1.2	0.6	3.9	1.5	2.0	-	-	-	-
<i>Gammaproteobacteria</i>	56.0	45.2	59.3	15.2	34.3	22.5	19.7	17.7	11.8	22.8	31.9	21.2	10.5	12.2	10.6	26.5
<i>Planctomycetia</i>	-	0.6	0.6	-	-	-	4.6	4.3	6.7	2.8	0.7	1.3	-	-	-	-
<i>Spartobacteria</i>	-	-	-	-	-	-	3.9	1.8	1.1	-	-	0.7	-	-	-	-
<i>Sphingobacteriia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.3	17.8	16.6	1.2	-	1.1	-
Others	-	1.1	0.6	0.7	-	1.7	2.0	1.8	5.6	11.7	11.1	15.2	-	-	2.8	-
Order																
<i>Actinomycetales</i>	5.1	7.9	5.4	9.7	1.1	2.8	7.2	6.1	3.9	6.7	0.7	4.6	34.5	52.0	14.4	42.2
<i>Bacillales</i>	4.6	0.6	-	7.6	0.6	1.1	2.6	0.6	1.1	-	-	0.7	-	3.4	0.6	3.6
<i>Burkholderiales</i>	2.9	1.1	10.2	9.0	2.8	2.2	13.2	6.7	9.6	12.2	8.1	12.6	1.8	2.7	9.4	-
<i>Caulobacteriales</i>	-	-	-	-	-	-	0.7	0.6	0.6	2.2	2.2	1.3	4.7	1.4	1.1	-
<i>Enterobacteriales</i>	33.1	28.8	41.3	9.0	19.1	12.9	0.7	-	1.1	1.1	-	1.3	0.6	1.4	2.2	19.9
<i>Legionellales</i>	-	-	-	-	-	0.6	3.9	3.0	0.6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Planctomycetales</i>	-	0.6	0.6	-	-	-	4.6	4.3	6.7	2.8	0.7	1.3	-	-	-	-
<i>Pseudomonadales</i>	22.3	15.8	15.0	4.8	10.1	6.7	2.6	2.4	2.8	8.9	11.1	7.9	2.9	4.7	4.4	3.6
<i>Rhizobiales</i>	25.1	36.7	21.0	44.8	48.9	63.5	28.3	35.4	38.8	8.3	11.9	11.3	28.1	25.7	33.3	26.5
<i>Sphingobacteriales</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.3	17.8	16.6	1.2	0.0	1.1	-
<i>Sphingomonadales</i>	4.0	2.8	1.8	11.7	9.6	4.5	16.4	23.2	18.5	3.9	11.1	9.9	19.3	2.7	25.0	1.2
<i>Xanthomonadales</i>	0.6	0.6	2.4	1.4	4.5	1.7	2.0	0.6	1.1	4.4	14.8	3.3	7.0	6.1	3.9	3.0
Unclassified	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gammaproteobacteria</i>	-	-	0.6	-	0.6	0.6	10.5	11.6	6.2	5.6	5.9	7.9	-	-	-	-
Others	2.3	5.1	1.8	2.1	2.8	3.4	7.2	5.5	9.0	20.6	15.6	21.2	-	-	4.4	-

Table 3-4. continued

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)			
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root			
	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K	
	-			-			-			-			R2A	TSA	R2A	TSA
Library / collection name	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-R	LR-PK-T	LR-K-R	LR-K-T
Family																
<i>Bacillaceae 1</i>	3.4	-	-	2.8	-	1.1	1.3	-	0.6	-	-	0.7	-	2.7	0.6	3.0
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	-	-	0.6	-	0.6	-	7.2	7.9	15.7	1.7	3.0	1.3	1.8	1.4	2.2	3.0
<i>Burkholderiaceae</i>	-	-	4.8	2.1	-	-	4.6	2.4	1.7	2.2	0.7	0.0	1.2	-	-	-
<i>Caulobacteraceae</i>	-	-	-	-	-	-	0.7	0.6	0.6	2.2	2.2	1.3	4.7	1.4	1.1	-
<i>Chitinophagaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.1	17.0	15.2	-	-	0.6	-
<i>Comamonadaceae</i>	1.1	1.1	4.8	6.2	2.8	2.2	3.3	1.8	1.7	4.4	3.0	8.6	-	0.7	8.9	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	33.1	28.8	41.3	9.0	19.1	12.9	0.7	-	1.1	1.1	-	1.3	0.6	1.4	2.2	19.9
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	-	-	-	0.7	-	-	1.3	1.2	4.5	1.7	0.7	2.0	4.1	8.1	5.0	7.8
<i>Methylobacteriaceae</i>	15.4	29.9	14.4	24.1	32.6	45.5	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacteriaceae</i>	1.1	2.8	0.6	0.7	-	-	0.7	0.6	0.6	-	-	-	8.8	18.9	1.1	3.0
<i>Micrococcaceae</i>	3.4	2.8	4.2	4.8	0.6	2.2	-	-	-	-	-	-	1.2	0.7	1.1	3.0
<i>Mycobacteriaceae</i>	0.6	-	0.6	2.8	0.6	0.0	2.6	1.8	1.7	-	-	-	1.2	-	-	1.2
<i>Nocardioideaceae</i>	-	1.1	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	4.1	0.7	1.1	-
<i>Oxalobacteraceae</i>	1.7	-	0.6	0.7	-	-	3.3	1.8	5.6	5.6	4.4	4.0	-	-	0.6	-
<i>Phyllobacteriaceae</i>	5.1	2.8	0.6	13.8	10.1	9.6	3.3	6.7	7.3	0.6	0.0	2.0	10.5	6.1	6.7	1.2
<i>Planctomycetaceae</i>	-	0.6	0.6	-	-	-	4.6	4.3	6.7	2.8	0.7	1.3	-	-	-	-
<i>Pseudomonadaceae</i>	21.7	15.8	15.0	4.8	9.6	6.7	2.6	2.4	2.8	8.9	11.1	7.9	2.9	4.7	4.4	3.6
<i>Rhizobiaceae</i>	2.3	3.4	5.4	5.5	3.4	6.7	15.8	17.1	9.6	3.9	6.7	4.6	11.1	9.5	18.3	13.9
<i>Sphingomonadaceae</i>	4.0	2.8	1.8	11.7	9.6	4.5	16.4	23.2	18.5	3.9	11.1	9.9	19.3	2.7	24.4	1.2
<i>Staphylococcaceae</i>	-	-	-	4.1	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomycetaceae</i>	-	-	-	-	-	-	2.6	2.4	1.1	5.0	0.7	4.6	16.4	25.7	9.4	33.1
<i>Xanthomonadaceae</i>	0.6	0.6	2.4	1.4	4.5	1.7	2.0	0.6	1.1	4.4	14.1	3.3	7.0	6.1	3.9	3.0
Others	6.3	7.3	2.4	4.8	6.2	6.2	27.0	25.0	18.5	30.6	24.4	31.8	5.3	9.5	8.3	3.0

^a Gray indicates the taxa with significant difference ($P < 0.05$) compared to the NPK field library in each tissue.

表 3-5. テンサイ共生細菌のクローンライブラリーおよび菌株コレクションの主要な属の存在比 (%)

Table 3-5. Relative abundance of major genera for clone libraries or isolate collections derived from sugar beet-associated bacteria^a

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)			
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root			
Tissues	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K	
Experimental fields																
Isolation media	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R2A	TSA	R2A	TSA
Library / collection names	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-R	LR-PK-T	LR-K-R	LR-K-T
Genus																
<i>Arthrobacter</i>	2.9	2.8	4.2	4.8	0.6	2.2	-	-	-	-	-	-	0.6	-	0.6	3.0
<i>Bacillus</i>	2.9	-	-	2.8	-	1.1	1.3	-	0.6	-	-	0.7	-	2.7	0.6	3.0
<i>Curtobacterium</i>	-	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Devosia</i>	-	-	-	-	-	-	1.3	1.2	4.5	1.1	0.7	2.0	4.1	8.1	5.0	7.8
<i>Enterobacter</i>	-	-	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mesorhizobium</i>	-	-	-	-	-	-	2.6	5.5	6.7	-	-	2.0	6.4	-	6.1	-
<i>Methylobacterium</i>	15.4	29.9	14.4	24.1	32.6	45.5	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium</i>	0.6	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	5.3	16.9	1.1	1.8
<i>Mycobacterium</i>	0.6	-	0.6	2.8	0.6	-	2.6	1.8	1.7	-	-	-	1.2	-	-	1.2
<i>Neorhizobium</i>	-	-	-	-	-	-	-	1.2	1.7	2.2	3.7	2.0	2.9	-	7.8	-
<i>Niastella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.7	11.1	7.9	-	-	-	-
<i>Nocardioides</i>	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	4.1	-	1.1	-
<i>Novosphingobium</i>	-	-	-	-	0.6	-	15.8	22.0	14.0	3.3	8.1	4.6	1.8	2.0	10.6	1.2
<i>Pantoea</i>	5.1	2.3	6.6	2.8	-	5.6	-	-	1.1	1.1	-	0.7	-	1.4	-	4.8
<i>Phyllobacterium</i>	5.1	2.8	0.6	13.8	10.1	9.6	-	1.2	0.6	-	-	-	0.6	2.7	-	0.6
<i>Polaromonas</i>	-	-	-	-	-	-	2.6	1.2	0.6	2.2	1.5	3.3	-	-	7.2	-
<i>Pseudomonas</i>	21.7	15.8	15.0	4.8	9.6	6.7	2.6	2.4	2.8	7.2	7.4	6.0	2.9	4.7	3.9	3.0
<i>Ralstonia</i>	-	-	3.6	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium</i>	2.3	3.4	4.8	5.5	3.4	6.7	15.1	15.2	7.9	1.7	3.0	2.6	7.0	9.5	9.4	13.3
<i>Sphingomonas</i>	4.0	2.8	1.8	11.7	9.0	4.5	-	-	-	0.6	1.5	1.3	13.5	-	7.2	-
<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	-	-	2.6	2.4	1.1	5.0	0.7	4.6	16.4	24.3	9.4	33.1
<i>Variovorax</i>	1.1	1.1	4.8	6.2	2.8	1.7	0.7	0.6	0.6	1.7	-	-	-	0.7	1.1	-
<i>Yersinia</i>	2.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unclassified <i>Bradyrhizobiaceae</i>	-	-	-	-	-	-	0.7	1.2	5.1	-	1.5	0.7	-	-	0.6	-
Unclassified <i>Chitinophagaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.2	2.2	6.0	-	-	-	-
Unclassified <i>Enterobacteriaceae</i>	22.3	20.9	28.1	4.1	16.9	5.1	0.7	-	-	-	-	0.7	-	-	1.1	10.8
Others	13.1	15.3	12.6	15.2	14.0	10.7	51.3	43.3	50.6	55.0	58.5	55.0	33.3	27.0	27.2	16.3

^a Gray highlight indicates the taxa with significant difference ($P < 0.05$) compared to the NPK field library in each tissue.

表 3-6. テンサイ共生細菌のクローンライブラリーおよび菌株コレクションの主要な OTU の存在比 (%)

Table 3-6. Relative abundance of OTUs in clone libraries or isolate collections of the 16S rRNA genes derived from sugar beet-associated bacteria ^a

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)				Closest relatives in known species	Acc. No.	Identity (%)		
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root								
	Experimental fields	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK	K	R2A				TSA	R2A
Isolation medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Library / Collection name	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-F	LR-PK-T	LR-K-R	LR-K-T					
OTU-1	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella drancourtii</i>	NR_026335	88
OTU-2	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella hackeliae</i>	NR_104894	88
OTU-3	-	-	-	-	-	-	2.0	-	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella hackeliae</i>	NR_104894	87
OTU-4	-	-	-	-	-	-	1.3	1.8	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella clemsonensis</i>	CP016397	88
OTU-5	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella clemsonensis</i>	KX694517	88
OTU-6	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella hackeliae</i>	NR_104894	88
OTU-7	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella clemsonensis</i>	CP016397	88
OTU-8	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella hackeliae</i>	NR_104894	88
OTU-9	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella hackeliae</i>	NR_104894	87
OTU-10	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella hackeliae</i>	NR_104894	88
OTU-11	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella cardiaca</i>	NR_109426	88
OTU-12	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aquicella siphonis</i>	NR_025764	91
OTU-13	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aquicella siphonis</i>	AY359284	92
OTU-14	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aquicella siphonis</i>	NR_025764	92
OTU-15	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aquicella siphonis</i>	NR_025764	94
OTU-16	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aquicella siphonis</i>	NR_025764	92
OTU-17	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aquicella siphonis</i>	NR_025764	92
OTU-18	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Rickettsiella grylli</i>	RGU97547	97
OTU-19	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella norrlandica</i>	KU508790	97
OTU-20	-	-	-	-	-	-	-	1.2	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella worsleiensis</i>	NR_044971	97
OTU-21	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella worsleiensis</i>	NR_044971	95
OTU-22	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella drozanskii</i>	NR_036803	96
OTU-23	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella donaldsonii</i>	KM504126	96
OTU-24	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella pneumophila</i>	FR799702	90
OTU-25	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ca. Berkiella cookevillensis</i>	EF492067	88
OTU-26	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Methylococcus capsulatus</i>	KF952440	87
OTU-27	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella clemsonensis</i>	CP016397	88
OTU-28	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Legionella clemsonensis</i>	CP016397	87
OTU-29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Ca. Ovatusbacter abovo</i>	LN875063	92
OTU-30	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ca. Ovatusbacter abovo</i>	LN875063	94
OTU-31	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ca. Ovatusbacter abovo</i>	LN875063	91
OTU-32	-	-	-	-	-	-	-	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ca. Ovatusbacter abovo</i>	LN875063	88
OTU-33	-	-	-	-	-	-	0.7	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ca. Ovatusbacter abovo</i>	LN875063	91
OTU-34	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ca. Berkiella cookevillensis</i>	EF492067	89
OTU-35	-	1.1	-	1.4	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas gingeri</i>	KX817286	99

Table 3-6. Continued

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)				Closest relatives in known species	Acc. No.	Identity (%)		
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root								
	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K						
	Experimental fields	Isolation medium	Library / Collection name	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-F				LR-PK-T	LR-K-R
OTU-36	2.3	2.3	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas endophytica</i>	NR_136473	99
OTU-37	14.3	11.3	5.4	2.1	1.1	3.9	2.0	1.8	1.7	2.2	5.2	3.3	2.3	4.7	-	1.8	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	MF523621	100		
OTU-38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Pseudomonas mohnii</i>	MG571738	96		
OTU-39	5.1	1.1	9.6	1.4	7.3	2.8	0.7	0.6	1.1	4.4	2.2	2.6	0.6	-	3.9	1.2	<i>Pseudomonas granadensis</i>	MG269629	100		
OTU-40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Burkholderia dabaoshanensis</i>	NR_133711	90	
OTU-41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	0.7	0.7	-	-	-	-	-	<i>Cellvibrio japonicus</i>	NR_074804	92	
OTU-42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	0.7	0.7	-	-	-	-	-	<i>Pseudohongiella acticola</i>	NR_136444	91	
OTU-43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.9	3.7	6.0	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	KY882086	91	
OTU-44	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	MF754134	99	
OTU-45	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Moraxella osloensis</i>	NR_104936	99	
OTU-46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	1.3	-	-	-	-	-	<i>Acidibacter ferrireducens</i>	NR_126260	94	
OTU-47	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Sulfuriflexus mobilis</i>	NR_152000	91	
OTU-48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	<i>Steroidobacter flavus</i>	KU195414	93	
OTU-49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Coxiella burnetii</i>	CP000890	91	
OTU-50	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Coxiella cheraxi</i>	NR_116014	92	
OTU-51	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Coxiella burnetii</i>	CP014561	87	
OTU-52	12.0	16.4	22.8	1.4	14.0	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	EF178670	99	
OTU-53	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	EF178670	97	
OTU-54	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	HM016083	97	
OTU-55	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	HM016083	98	
OTU-56	0.6	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Cedecea davisae</i>	KX062011	100	
OTU-57	1.7	1.7	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Erwinia toletana</i>	JX134630	100	
OTU-58	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>	CP024232	99	
OTU-59	0.6	-	3.0	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	LC361167	100	
OTU-60	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Citrobacter freundii</i>	KU570381	97	
OTU-61	-	-	1.8	2.1	2.2	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Serratia marcescens</i>	CP026050	100	
OTU-62	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Erwinia persicina</i>	KF429292	93	
OTU-63	6.9	3.4	-	0.7	2.2	3.4	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pantoea dispersa</i>	KF135238	99	
OTU-64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Rahnella aquatilis</i>	KY810674	99	
OTU-65	5.1	-	3.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Yersinia kristensenii</i>	KJ956650	100	
OTU-66	1.1	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Hafnia alvei</i>	MG190854	100	
OTU-67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	<i>Pantoea ananatis</i>	KM603631	95	
OTU-68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Pantoea ananatis</i>	KM603631	96		
OTU-69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.2	0.6	<i>Pantoea ananatis</i>	KX011138	96		
OTU-70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	<i>Pantoea ananatis</i>	KX118705	96	

Table 3-6. Continued

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)				Closest relatives in known species	Acc. No.	Identity (%)
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root						
	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K				
	Experimental fields	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R2A	TSA	R2A	TSA			
Isolation medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Library / Collection name	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-F	LR-PK-T	LR-K-R	LR-K-T			
OTU-71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	<i>Pantoea ananatis</i>	KM603631	97
OTU-72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	<i>Pantoea ananatis</i>	KM603631	96
OTU-73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Pantoea ananatis</i>	KM603631	96
OTU-74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.6	<i>Pantoea ananatis</i>	KM603631	98
OTU-75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	-	-	<i>Pantoea vagans</i>	KY816320	97
OTU-76	5.1	2.3	6.6	2.8	-	5.6	-	-	1.1	1.1	-	0.7	-	-	-	-	<i>Pantoea vagans</i>	KY127421	100
OTU-77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Pantoea ananatis</i>	KM603631	97
OTU-78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Pantoea agglomerans</i>	MG544110	92
OTU-79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Pantoea ananatis</i>	KX011138	97
OTU-80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Flavobacterium acidificum</i>	MG571690	98
OTU-81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Flavobacterium acidificum</i>	MG571690	97
OTU-82	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Providencia burhodogranaria</i>	EU587089	99
OTU-83	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Morganella morgani</i>	DQ358125	99
OTU-84	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pantoea deleyi</i>	GQ169377	84
OTU-85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	<i>Variovorax paradoxus</i>	KX981413	97
OTU-86	1.1	1.1	4.8	6.2	2.8	1.7	0.7	0.6	0.6	1.7	-	-	-	0.7	0.6	-	<i>Variovorax paradoxus</i>	KY486805	100
OTU-87	-	-	-	-	-	-	2.6	1.2	0.6	2.2	1.5	3.3	-	-	7.2	-	<i>Polaromonas ginsengisoli</i>	AB245355	100
OTU-88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	<i>Rhodiferax ferrireducens</i>	KC855480	97
OTU-89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Rhodiferax antarcticus</i>	AY609198	98
OTU-90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.7	1.3	-	-	0.6	-	<i>Acidovorax radialis</i>	MF101116	100
OTU-91	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	KY810708	100
OTU-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	<i>Pelomonas saccharophila</i>	KC914555	99
OTU-93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	<i>Pelomonas saccharophila</i>	AB495144	100
OTU-94	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	0.7	-	-	-	-	<i>Roseateles depolymerans</i>	AB495143	100
OTU-95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	<i>Leptothrix mobilis</i>	FM886901	96
OTU-96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	4.4	2.0	-	-	0.6	-	<i>Rhizobacter dauci</i>	KU341400	98
OTU-97	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.7	-	-	-	-	-	-	<i>Burkholderia terrae</i>	FJ796430	99
OTU-98	-	-	-	-	-	-	0.7	0.6	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Paraburkholderia phytofirmans</i>	KF981504	99
OTU-99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Burkholderia soli</i>	KF981587	100
OTU-100	-	-	1.2	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	1.2	-	-	-	<i>Paraburkholderia fungorum</i>	MG576015	100
OTU-101	-	-	-	-	-	-	3.3	0.6	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Burkholderia metallica</i>	MG571741	100
OTU-102	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pandoraea pnomenus</i>	LN997983	100
OTU-103	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ralstonia pickettii</i>	DQ997838	93
OTU-104	-	-	3.6	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ralstonia pickettii</i>	NR_043152	100
OTU-105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	<i>Cupriavidus pauculus</i>	AM418462	99

Table 3-6. Continued

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)				Closest relatives in known species	Acc. No.	Identity (%)		
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root								
	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K						
	Experimental fields	Isolation medium	Library / Collection name	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-F				LR-PK-T	LR-K-R
OTU-106	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	AB695331	99
OTU-107	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.4	-	-	<i>Achromobacter spanius</i>	KX527629	100
OTU-108	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Candidimonas nitroreducens</i>	MF480397	99
OTU-109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.7	0.7	-	-	-	-	-	<i>Georgfuchsia toluolica</i>	NR_115995	94
OTU-110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Georgfuchsia toluolica</i>	NR_115995	94
OTU-111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	<i>Methylothera mobilis</i>	NR_102842	97
OTU-112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Noviherbaspirillum psychrotolerans</i>	NR_109468	98
OTU-113	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Janthinobacterium lividum</i>	MF979551	98
OTU-114	-	-	-	-	-	-	0.7	0.6	1.7	1.1	0.7	2.0	-	-	-	-	-	-	<i>Herminiimonas fonticola</i>	AB512142	100
OTU-115	1.1	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	-	-	-	<i>Duganella zoogloeoides</i>	LN812952	100
OTU-116	-	-	-	-	-	-	2.0	0.6	3.9	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Collimonas fungivorans</i>	AB740926	100
OTU-117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	NR_028859	99
OTU-118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	<i>Herbaspirillum hiltneri</i>	KU305712	96
OTU-119	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	1.7	-	-	-	-	-	-	-	<i>Undibacterium pigrum</i>	KP196819	98
OTU-120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Undibacterium terreum</i>	NR_109599	98
OTU-121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.5	1.3	-	-	-	-	-	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	AY167838	99
OTU-122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Duganella nigrescens</i>	EF584756	98
OTU-123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Massilia aerilata</i>	HF585365	99
OTU-124	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	KY124206	91
OTU-125	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Collimonas fungivorans</i>	AB740926	92
OTU-126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	-	<i>Tepidimonas ignav</i>	NR_025041	90
OTU-127	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	2.9	3.4	0.6	0.6	-	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KX349202	100
OTU-128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	0.6	-	-	<i>Pseudoxanthomonas yeongjuensis</i>	AB682413	99
OTU-129	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	KJ561110	100
OTU-130	0.6	0.6	1.8	1.4	3.9	1.7	-	0.6	-	-	-	-	-	-	2.0	0.6	2.4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CP015612	100	
OTU-131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KR065721	99
OTU-132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	3.0	2.0	-	-	-	-	-	<i>Dokdonella soli</i>	NR_044554	99
OTU-133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	<i>Dokdonella fugitiva</i>	NR_042397	97
OTU-134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Dokdonella immobilis</i>	NR_108377	99
OTU-135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	<i>Lysobacter korlensis</i>	NR_108236	97
OTU-136	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	0.6	1.5	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysobacter ginsengisoli</i>	NR_112563	99
OTU-137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.5	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysobacter niastensis</i>	JQ342848	100
OTU-138	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysobacter mobilis</i>	NR_134760	98
OTU-139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysobacter pocheonensis</i>	EU273938	100
OTU-140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Rhodanobacter humi</i>	KX674374	100

Table 3-6. Continued

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)				Closest relatives in known species	Acc. No.	Identity (%)		
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root								
	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K						
	Experimental fields	Isolation medium	Library / Collection name	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-F				LR-PK-T	LR-K-R
OTU-141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.4	-	-	2.9	-	2.2	-	<i>Rhodanobacter soli</i>	NR_116741	99
OTU-142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	0.6	-	-	0.6	-	-	-	<i>Rhodanobacter umsongensis</i>	NR_108435	99
OTU-143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	<i>Rhodanobacter spathiphylli</i>	NR_042434	93
OTU-144	-	-	0.6	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Luteibacter rhizovicinu</i>	MF525359	99
OTU-145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	<i>Rudaea cellulositytica</i>	NR_044566	99
OTU-146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.2	-	-	-	-	-	<i>Metallibacterium scheffleri</i>	KC257407	93
OTU-147	-	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Commensalibacter intestini</i>	LT631761	99
OTU-148	-	-	-	0.7	-	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Roseomonas mucosa</i>	MF525216	100
OTU-149	-	-	-	-	-	-	8.6	9.1	1.7	1.1	-	0.7	-	0.6	-	2.8	3.0	<i>Rhizobium herbae</i>	KX881443	99	
OTU-150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	-	-	-	<i>Rhizobium herbae</i>	KX881443	98
OTU-151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Rhizobium giardinii</i>	KR014110	94	
OTU-152	1.1	-	1.2	2.1	-	0.6	-	-	0.6	-	0.7	-	1.8	2.7	-	1.2	<i>Rhizobium metallidurans</i>	KX664481	100		
OTU-153	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Rhizobium tubonense</i>	NR_116255	100	
OTU-154	-	-	-	-	-	0.6	4.6	0.6	-	0.6	1.5	1.3	0.6	-	1.7	-	<i>Rhizobium grahamii</i>	KF477161	99		
OTU-155	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	0.7	0.7	4.7	-	2.2	-	<i>Rhizobium alamii</i>	KU305699	100		
OTU-156	1.1	-	-	-	0.6	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	JX393010	99	
OTU-157	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aureimonas rubiginis</i>	NR_118424	98	
OTU-158	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aureimonas rubiginis</i>	NR_118424	93	
OTU-159	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aureimonas ureilytica</i>	NR_043995	99	
OTU-160	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Aureimonas pseudogalii</i>	NR_151994	99	
OTU-161	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Rhizobium qilianshanense</i>	NR_132606	99	
OTU-162	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.6	<i>Tianweitania sediminis</i>	NR_148593	99	
OTU-163	0.0	0.6	0.6	0.7	0.6	-	2.0	1.8	1.1	-	-	-	-	2.7	-	0.6	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	KF673154	100		
OTU-164	1.1	2.8	3.0	2.8	2.2	5.6	0.7	3.0	1.7	-	-	-	0.6	2.7	2.2	8.4	<i>Rhizobium nepotum</i>	MG576194	100		
OTU-165	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Neorhizobium alkalisoli</i>	LN774523	98	
OTU-166	-	-	-	-	-	-	-	1.2	1.7	2.2	3.7	2.0	2.9	-	7.8	-	<i>Neorhizobium galegae</i>	KF356027	100		
OTU-167	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	0.7	-	-	-	<i>Rhizobium daejeonense</i>	HF585487	98	
OTU-168	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	<i>Ensifer mexicanus</i>	MG016487	98	
OTU-169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	0.6	-	-	<i>Mesorhizobium gobiense</i>	KJ556378	98	
OTU-170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.1	3.4	1.1	-	<i>Aminobacter anthyllidis</i>	HG974525	98		
OTU-171	-	-	-	-	-	-	2.6	5.5	6.7	-	-	2.0	6.4	-	5.6	-	-	<i>Mesorhizobium loti</i>	AF017605	100	
OTU-172	5.1	2.8	0.6	13.8	10.1	9.6	-	1.2	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	NR_113874	100	
OTU-173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.4	-	0.6	-	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	AY512821	99	
OTU-174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	-	-	-	<i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	MG461619	100	
OTU-175	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bartonella elizabethae</i>	AB246807	98	

Table 3-6. Continued

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)				Closest relatives in known species	Acc. No.	Identity (%)		
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root								
	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K						
	Experimental fields	Isolation medium	Library / Collection name	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-F				LR-PK-T	LR-K-R
OTU-176	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.6	-	-	<i>Aminobacter aminovorans</i>	KJ689311	100
OTU-177	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Rhizobium rosettiformans</i>	KJ401121	97
OTU-178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	0.7	0.7	-	-	1.1	-	<i>Devosia insulae</i>	NR_044036	99
OTU-179	-	-	-	-	-	-	1.3	1.2	3.4	-	0.7	-	-	-	3.5	6.8	3.9	7.8	<i>Devosia neptuniae</i>	MF796810	100
OTU-180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	<i>Devosia lucknowensis</i>	NR_132697	99
OTU-181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	-	-	<i>Devosia riboflavina</i>	AF501346	99
OTU-182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	<i>Devosia ginsengisoli</i>	KC676321	97
OTU-183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Paradevosia shaoguanensis</i>	NR_136441	97
OTU-184	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Novosphingobium arabidopsis</i>	NR_133799	99
OTU-185	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	<i>Novosphingobium hassiacum</i>	NR_028962	99
OTU-186	-	-	-	-	-	-	-	1.2	0.6	0.6	-	-	-	-	-	2.2	-	-	<i>Novosphingobium barchaimii</i>	NR_118314	98
OTU-187	-	-	-	-	0.6	-	15.8	22.0	15.2	2.2	8.1	5.3	1.8	2.0	8.3	1.2	-	-	<i>Novosphingobium naphthalenivorans</i>	AB649005	99
OTU-188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Sphingosinicella vermicomposti</i>	KU133480	98
OTU-189	-	-	-	-	-	-	0.7	-	2.8	-	1.5	2.0	0.6	-	-	3.3	-	-	<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i>	NR_042479	98
OTU-190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	<i>Sphingobium czechense</i>	KR088386	99
OTU-191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.5	1.3	12.9	-	5.0	-	-	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i>	NR_113761	100
OTU-192	1.1	0.6	0.6	4.1	1.7	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	<i>Sphingomonas melonis</i>	HE716911	99
OTU-193	0.6	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Sphingomonas faeni</i>	MG561802	100
OTU-194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	<i>Sphingomonas desiccabilis</i>	NR_042372	98
OTU-195	0.6	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Sphingomonas yunnanensis</i>	EU730917	98
OTU-196	1.7	1.7	-	7.6	7.3	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Sphingomonas zeeae</i>	NR_136793	100
OTU-197	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.2	-	-	<i>Sphingomonas ginsengisoli</i>	KX504221	99
OTU-198	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	<i>Altererythrobacter epoxidivorans</i>	KC921173	99
OTU-199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.5	0.7	2.2	-	<i>Sphingopyxis taejonensis</i>	AB795553	100
OTU-200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	<i>Nordella oligomobilis</i>	NR_114615	97
OTU-201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	<i>Nordella oligomobilis</i>	KU258275	94
OTU-202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Hyphomicrobium facile</i>	Y14312	100
OTU-203	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i>	NR_025082	96
OTU-204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Labrys wisconsinensis</i>	NR_116004	96
OTU-205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Labrys wisconsinensis</i>	NR_116004	94
OTU-206	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Kaistia geumhonensis</i>	NR_108141	99
OTU-207	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Methylocapsa palsarum</i>	NR_137418	98
OTU-208	0.6	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Methylosinus sporium</i>	KF981557	93
OTU-209	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Methylobacterium cerastii</i>	NR_117118	99
OTU-210	2.9	13.0	8.4	13.8	14.0	29.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Methylobacterium goesingense</i>	MG778820	99

Table 3-6. Continued

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)				Closest relatives in known species	Acc. No.	Identity (%)
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root						
	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K				
	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	R2A	TSA	R2A	TSA			
OTU-211	12.6	14.1	6.0	2.1	6.7	13.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	KT720195	100
OTU-212	-	1.1	-	4.8	9.0	1.1	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Methylobacterium populi</i>	MG778712	100
OTU-213	-	1.1	-	3.4	2.8	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Methylobacterium aquaticum</i>	KR920749	99
OTU-214	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.6	-	-	-	0.6	1.4	0.6	3.0	<i>Bosea lupini</i>	KF730777	100
OTU-215	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	EU573787	98
OTU-216	-	-	0.6	-	0.6	-	2.6	2.4	7.3	1.1	1.5	1.3	0.6	-	-	-	<i>Bradyrhizobium embrapense</i>	NR_145861	100
OTU-217	-	-	-	-	-	-	2.0	3.0	3.4	-	-	-	-	-	-	-	<i>Rhodopseudomonas faecalis</i>	LC066638	99
OTU-218	-	-	-	-	-	-	2.6	1.8	4.5	0.6	0.7	-	0.6	-	1.7	-	<i>Tardiphaga robiniae</i>	KX881440	100
OTU-219	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Rhodoplanes oryzae</i>	LC178576	95
OTU-220	-	-	-	-	-	-	-	1.2	1.1	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudolabrys taiwanensis</i>	EU938323	95
OTU-221	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.6	1.1	-	-	-	-	-	-	<i>Phenylobacterium immobile</i>	NR_026498	98
OTU-222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Phenylobacterium aquaticum</i>	KT309087	98
OTU-223	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	0.7	1.3	1.2	-	0.6	-	<i>Caulobacter henricii</i>	AM921622	99
OTU-224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	<i>Brevundimonas bullata</i>	MG576189	100
OTU-225	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	1.2	0.7	-	-	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	MG819328	100
OTU-226	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	2.3	-	0.6	-	<i>Asticcacaulis benevestitus</i>	NR_042433	99
OTU-227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	<i>Rhizomicrobium electricum</i>	NR_108115	85
OTU-228	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Rhodoplanes piscinae</i>	LC178578	89
OTU-229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	0.7	-	-	-	-	<i>Rhizomicrobium electricum</i>	NR_108115	92
OTU-230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Pleomorphomonas oryzae</i>	NR_114056	90
OTU-231	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	1.7	-	<i>Inquilius ginsengisoli</i>	NR_112560	100
OTU-232	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lacibacterium aquatile</i>	NR_125556	91
OTU-233	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Ca. Paracaedibacter acanthamoebae</i>	CP008941	95
OTU-234	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Reyranella soli</i>	NR_109674	99
OTU-235	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	NR_113385	97
OTU-236	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	KC921178	87
OTU-237	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	KF952438	87
OTU-238	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	-	0.7	-	-	-	-	<i>Chondromyces pediculatus</i>	GU207875	91
OTU-239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Jahnella thaxteri</i>	NR_117461	91
OTU-240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	<i>Byssovorax cruenta</i>	NR_042341	97
OTU-241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	<i>Kofleria flava</i>	HF937255	87
OTU-242	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	<i>Kofleria flava</i>	HF543825	88
OTU-243	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	<i>Jahnella thaxteri</i>	NR_117461	85
OTU-244	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Sandaracinus amylolyticus</i>	KP306728	90
OTU-245	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pyxidicoccus fallax</i>	MF163327	95

Table 3-6. Continued

Libraries / Collections	Clone libraries (%)												Isolate collections (%)				Closest relatives in known species	Acc. No.	Identity (%)
	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Lateral root						
	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	PK		K				
	Experimental fields												R2A	TSA	R2A	TSA			
Isolation medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Library / Collection name	LB-NPK	LB-PK	LB-K	PE-NPK	PE-PK	PE-K	TR-NPK	TR-PK	TR-K	LR-NPK	LR-PK	LR-K	LR-PK-F	LR-PK-T	LR-K-R	LR-K-T			
OTU-281	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	<i>Kutzneria chonburiensis</i>	NR_145619	100
OTU-282	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	<i>Actinoplanes octamyacinicus strain</i>	NR_112131	98
OTU-283	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Cellulomonas denverensis</i>	AB491158	99
OTU-284	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	<i>Catenulispora graminis</i>	NR_109018	99
OTU-285	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	<i>Nakamurella panacisegetis</i>	KJ606832	95
OTU-286	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Mycobacterium frederiksbergense</i>	HG941823	99
OTU-287	0.6	-	0.6	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Mycobacterium hodleri</i>	FN796799	100
OTU-288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	<i>Mycobacterium goodii</i>	DQ447773	99
OTU-289	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	JN049510	98
OTU-290	-	-	-	-	-	-	0.7	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Mycobacterium moriokaense</i>	KC494311	99
OTU-291	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Mycobacterium moriokaense</i>	KC494311	97
OTU-292	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	<i>Mycobacterium flavescens</i>	KX954376	96
OTU-293	-	-	-	2.8	0.6	-	-	0.6	0.6	-	-	-	0.6	-	-	0.6	<i>Mycobacterium abscessus</i>	AP018436	100
OTU-294	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.7	-	0.6	<i>Rhodococcus jostii</i>	MF796707	99
OTU-295	-	-	-	-	-	-	0.7	-	0.6	-	-	-	-	0.7	-	0.6	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	MG722792	100
OTU-296	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	<i>Rhodococcus fascians</i>	MG205633	100
OTU-297	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	<i>Nocardia tengchongensis</i>	NR_152644	100
OTU-298	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lawsonella clevelandensis</i>	NR_151867	99
OTU-299	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Corynebacterium efficiens</i>	BA000035	99
OTU-300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	<i>Nocardioides albus</i>	KC800806	100
OTU-301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.3	-	-	-	<i>Nocardioides ganghwensis</i>	JF505976	100
OTU-302	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	-	0.6	-	<i>Nocardioides hankookensis</i>	JX841081	99
OTU-303	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Nocardioides islandensis</i>	NR_044235	94
OTU-304	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Marmoricola aquaticus</i>	JN615437	98
OTU-305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	<i>Aeromicrobium kwangyangensis</i>	EU834249	99
OTU-306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	<i>Glycomyces lechevalierae</i>	NR_025790	100
OTU-307	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Cutibacterium acnes</i>	LC341280	100
OTU-308	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.7	-	0.6	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	MG819350	97
OTU-309	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Conexibacter woesei</i>	NR_074830	90
OTU-310	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Solirubrobacter phytolaccae</i>	NR_133858	92
OTU-311	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Gaiella occulta</i>	NR_118138	94
OTU-312	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	KY680229	100
OTU-313	0.6	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	<i>Bacillus pumilus</i>	LC010662	99
OTU-314	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MG651420	99
OTU-315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	<i>Bacillus benzoovorans</i>	NR_115578	98

表 3-7. テンサイ幼苗への接種試験に供試した菌株リスト

Table 3-7. List of bacterial isolates used for the inoculation test on sugar beet seedlings

OTU No.	Isolates	BlastN search results with partial sequence of 16S rRNA genes ^a	
		Closest known species	Identity (%)
<i>Actinobacteria</i>			
1 OTU-264	<i>Leifsonia</i> sp. TK069 (LC040755)	<i>Leifsonia xyli</i> (HQ530514)	99
2 OTU-260	<i>Microbacterium</i> sp. TK080 (LC040765)	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (MF796703)	100
3 OTU-302	<i>Nocardioides</i> sp. RP084 (LC040865)	<i>Nocardioides hankookensis</i> (JX841081)	99
4 OTU-301	<i>Nocardioides</i> sp. RP110 (LC040866)	<i>Nocardioides cavernae</i> (NR_156135)	100
5 OTU-271	<i>Streptomyces</i> sp. RP008 (LC040224)	<i>Streptomyces humidus</i> (KU324480)	100
6 OTU-278	<i>Streptomyces</i> sp. RP073 (LC040284)	<i>Streptomyces aomiensis</i> (NR_112998)	100
7 OTU-276	<i>Streptomyces</i> sp. TK192 (LC040867)	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> (KY412831)	100
8 OTU-272	<i>Streptomyces</i> sp. TP071 (LC040603)	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> (NR_112483)	100
<i>Bacilli</i>			
9 OTU-316	<i>Bacillus</i> sp. TK156 (LC040868)	<i>Bacillus aryabhatai</i> (KY777355)	100
10 OTU-329	<i>Bacillus</i> sp. TP182 (LC040689)	<i>Bacillus gibsonii</i> (MG651558)	100
<i>Alphaproteobacteria</i>			
11 OTU-226	<i>Asticcacaulis</i> sp. RK043 (LC040869)	<i>Asticcacaulis benevestitus</i> (NR_042433)	99
12 OTU-214	<i>Bosea</i> sp. TK063 (LC040870)	<i>Bosea robiniae</i> (NR_108516)	98
13 OTU-216	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RP196 (LC040385)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (KY000642)	100
14 OTU-223	<i>Caulobacter</i> sp. RK066 (LC040442)	<i>Caulobacter henricii</i> (MG982457)	99
15 OTU-178	<i>Devosia</i> sp. No.184 (LC040871)	<i>Devosia insulae</i> (NR_044036)	99
16 OTU-179	<i>Devosia</i> sp. TK103 (LC040784)	<i>Devosia neptuniae</i> (MF796810)	100
17 OTU-171	<i>Mesorhizobium</i> sp. RK190 (LC040872)	<i>Mesorhizobium gobiense</i> (KJ556378)	100
18 OTU-171	<i>Mesorhizobium</i> sp. RP126 (LC040326)	<i>Mesorhizobium huakuii</i> (KP331546)	99
19 OTU-170	<i>Mesorhizobium</i> sp. TP027 (LC040873)	<i>Mesorhizobium chacoense</i> (NR_025411)	98
20 OTU-166	<i>Neorhizobium</i> sp. RK064 (LC602160)	<i>Neorhizobium galegae</i> (HG938355)	100
21 OTU-186	<i>Novosphingobium</i> sp. RK010 (LC040874)	<i>Novosphingobium barchaimii</i> (NR_118314)	98
22 OTU-187	<i>Novosphingobium</i> sp. RK036 (LC040415)	<i>Novosphingobium naphthalenivorans</i> (AB649005)	99
23 OTU-187	<i>Novosphingobium</i> sp. RK163 (LC040527)	<i>Novosphingobium lindaniclasticum</i> (MG516209)	99
24 OTU-187	<i>Novosphingobium</i> sp. RK193 (LC040875)	<i>Novosphingobium resinovorum</i> (KU305726)	99
25 OTU-173	<i>Phyllobacterium</i> sp. TP192 (LC040876)	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (AY512821)	99
26 OTU-154	<i>Rhizobium</i> sp. RK005 (LC040877)	<i>Rhizobium grahamii</i> (JX841042)	100
27 OTU-155	<i>Rhizobium</i> sp. RK061 (LC040438)	<i>Rhizobium gallicum</i> (AY509211)	100
28 OTU-149	<i>Rhizobium</i> sp. TK032 (LC040728)	<i>Rhizobium giardinii</i> (HQ263115)	99
29 OTU-152	<i>Rhizobium</i> sp. TP011 (LC040563)	<i>Rhizobium etli</i> (KX008304)	100
30 OTU-189	<i>Sphingobium</i> sp. RK166 (LC040530)	<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> (MF101093)	98
31 OTU-197	<i>Sphingomonas</i> sp. RK102 (LC040472)	<i>Sphingomonas ginsengisoli</i> (KX504221)	98
32 OTU-191	<i>Sphingomonas</i> sp. RP089 (LC040298)	<i>Sphingomonas kwangyangensis</i> (EF693741)	98
33 OTU-191	<i>Sphingomonas</i> sp. RP195 (LC040384)	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> (NR_113761)	100
34 OTU-199	<i>Sphingopyxis</i> sp. RK106 (LC602163)	<i>Sphingomonas taejonensis</i> (NR_024999)	100
35 OTU-218	<i>Tardiphaga</i> sp. RK140 (LC602161)	<i>Tardiphaga robiniae</i> (CP050292)	99
<i>Betaproteobacteria</i>			
36 OTU-87	<i>Polaromonas</i> sp. RK103 (LC040879)	<i>Polaromonas ginsengisoli</i> (AB245355)	100
37 OTU-86	<i>Variovorax</i> sp. RK170 (LC040880)	<i>Variovorax paradoxus</i> (CP002417)	100
<i>Gammaproteobacteria</i>			
38 OTU-69	<i>Pantoea</i> sp. RK126 (LC040494)	<i>Pantoea ananatis</i> (KX011138)	96
39 OTU-74	<i>Pantoea</i> sp. TK182 (LC040852)	<i>Pantoea ananatis</i> (KX011138)	98
40 OTU-37	<i>Pseudomonas</i> sp. TP131 (LC040646)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (KU351091)	100
41 OTU-37	<i>Pseudomonas</i> sp. TP180 (LC040881)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (KP418807)	99
42 OTU-96	<i>Rhizobacter</i> sp. RK021 (LC040878)	<i>Methylubium petroleiphilum</i> (CP000555)	99
43 OTU-141	<i>Rhodanobacter</i> sp. RK114 (LC040483)	<i>Rhodanobacter spathiphylli</i> (KY078839)	100
44 OTU-141	<i>Rhodanobacter</i> sp. RP069 (LC040280)	<i>Rhodanobacter soli</i> (NR_116741)	99

^aResults with approximately 500 bp are shown.

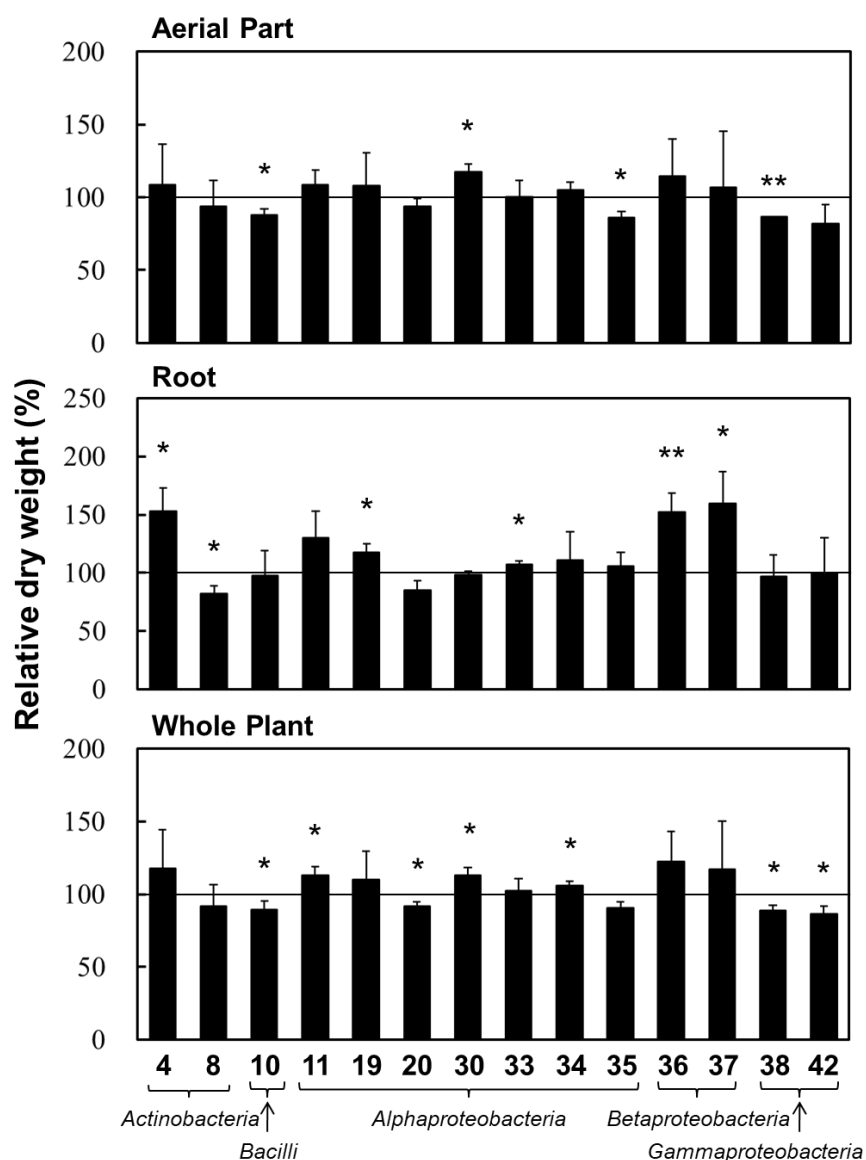


Fig. 3-3. Inoculation effects of sugar beet lateral root-associated bacteria on sugar beet seedling growth. Lateral root-associated bacteria were inoculated onto sugar beet seedlings grown in a pot, and the dry weights of seedlings were measured after 4 weeks of cultivation. Control plants were inoculated with sterilized water. Twelve seedlings in a tray were used in an inoculation test with each isolate, and this test was repeated three or four times at different dates for ensuring the reproducibility of PGP effects. The dry weights of inoculated seedlings were compared to those of control seedlings (non-inoculated seedlings) by Welch's *t*-test (two-tailed). Error bars indicate the standard deviation. Single and double asterisks indicate statistical significance at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. Bacterial isolates: 4, *Nocardioides* sp. RP110; 8, *Streptomyces* sp. TP071; 10, *Bacillus* sp. TP182; 11, *Asticcacaulis* sp. RK043; 19, *Mesorhizobium* sp. TP027; 20, *Neorhizobium* sp. RK064; 30, *Sphingobium* sp. RK166; 33, *Sphingomonas* sp. RP195; 34, *Sphingopyxis* sp. RK106; 35, *Tardiphaga* sp. RK140; 36, *Polaromonas* sp. RK103; 37, *Variovorax* sp. RK170; 38, *Pantoea* sp. RK126; 42, *Rhizobacter* sp. RK021.

図 3-3. テンサイ側根から分離培養した PGPB 候補菌株のテンサイ幼苗の生育に対する接種効果

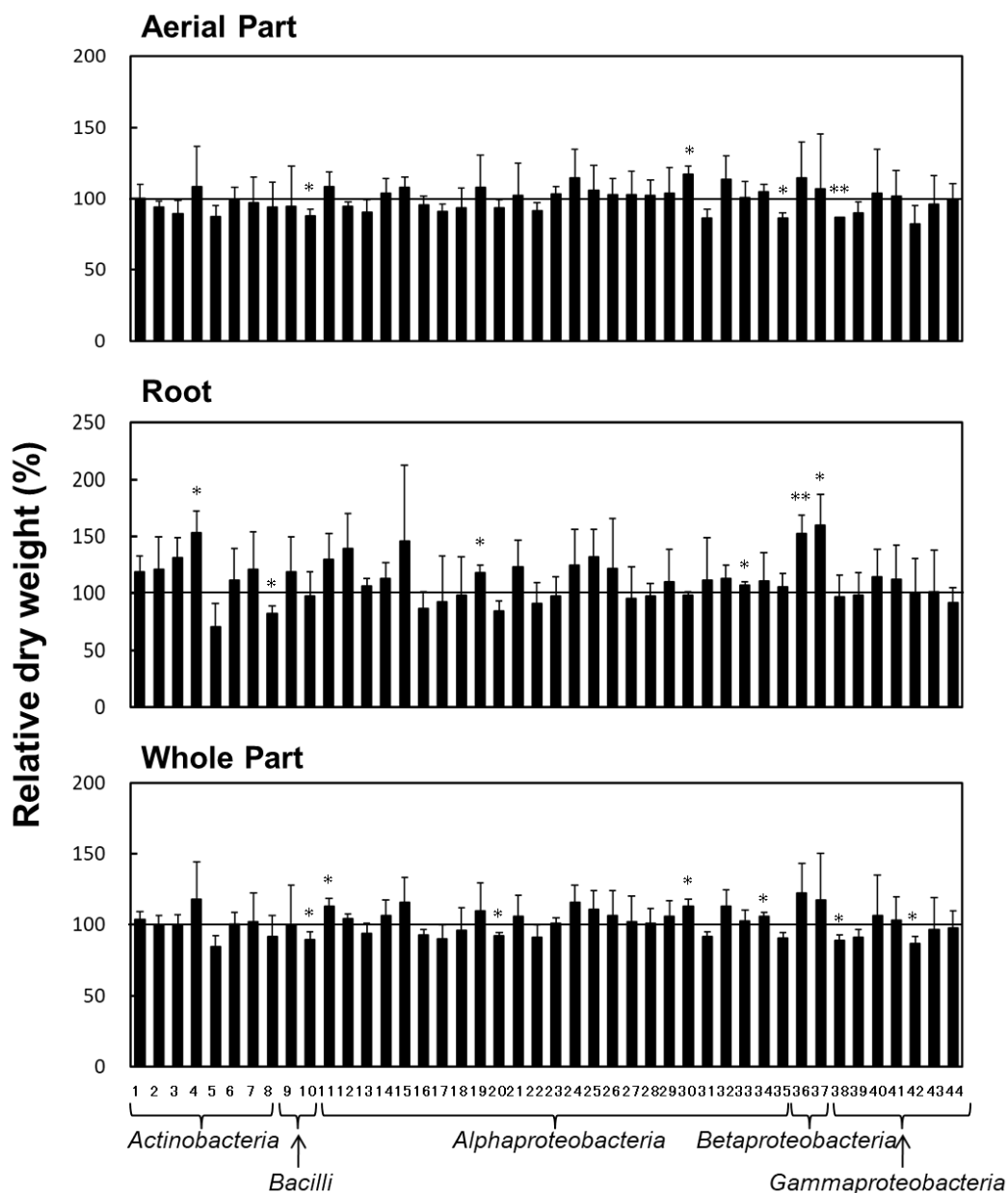


Fig. 3-4. Screening of sugar beet growth-promoting bacteria. Forty-four lateral root-associated bacterial isolates were inoculated onto sugar beet seedlings. After 4 weeks of cultivation, dry weights were measured. Control plants were inoculated with sterilized water. Twelve seedlings in a tray were used in an inoculation test with each isolate, and this test was repeated three or four times at different dates for ensuring the reproducibility of PGP effects. The dry weights of inoculated seedlings were compared to those of control seedlings (non-inoculated seedlings) by Welch's *t*-test (two-tailed). Single and double asterisks indicate statistical significance at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. Bacterial isolates: 4, *Nocardioides* sp. RP110; 8, *Streptomyces* sp. TP071; 10, *Bacillus* sp. TP182; 11, *Asticcacaulis* sp. RK043; 19, *Mesorhizobium* sp. TP027; 20, *Neorhizobium* sp. RK064; 30, *Sphingobium* sp. RK166; 33, *Sphingomonas* sp. RP195; 34, *Sphingopyxis* sp. RK106; 35, *Tardiphaga* sp. RK140; 36, *Polaromonas* sp. RK103; 37, *Variovorax* sp. RK170; 38, *Pantoea* sp. RK126; and 42, *Rhizobacter* sp. RK021.

図 3-4. テンサイ生育促進細菌のスクリーニング結果

表 3-8. テンサイ幼苗に対する生育促進細菌および生育抑制細菌の 16S rRNA 遺伝子の BlastN 解析に基づいた最近縁種

Table 3-8. BlastN search results with nearly full sequence of 16S rRNA gene of growth-promoting and -inhibiting bacteria for sugar beet seedlings

OTU No.	Isolate name	Inoculation effect ^a	BlastN search results ^b	
			Closest known species	Identity (%)
<i>Actinobacteria</i>				
4 OTU-301	<i>Nocardioides</i> sp. RP110 (LC040866) ^c	+	<i>Nocardioides cavernae</i> (NR_156135)	100
8 OTU-272	<i>Streptomyces</i> sp. TP071 (LC602158)	-	<i>Streptomyces mirabilis</i> (EF371431)	100
<i>Bacilli</i>				
10 OTU-329	<i>Bacillus</i> sp. TP182 (LC602159)	-	<i>Bacillus gibsonii</i> (FJ937920)	100
<i>Alphaproteobacteria</i>				
11 OTU-226	<i>Asticcacaulis</i> sp. RK043 (LC040869)	+	<i>Asticcacaulis benevestitus</i> (NR_042433)	98
19 OTU-170	<i>Mesorhizobium</i> sp. TP027 (LC040873)	+	<i>Mesorhizobium chacoense</i> (NR_025411)	98
20 OTU-166	<i>Neorhizobium</i> sp. RK064 (LC602160)	-	<i>Neorhizobium galegae</i> (HG938355)	100
30 OTU-189	<i>Sphingobium</i> sp. RK166 (LC602162)	+	<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i> (MF101093)	100
33 OTU-191	<i>Sphingomonas</i> sp. RP195 (LC602164)	+	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> (NR_029327)	100
34 OTU-199	<i>Sphingopyxis</i> sp. RK106 (LC602163)	+	<i>Sphingopyxis taejonensis</i> (NR_024999)	100
35 OTU-218	<i>Tardiphaga</i> sp. RK140 (LC602161)	-	<i>Tardiphaga robiniae</i> (CP050292)	99
<i>Betaproteobacteria</i>				
36 OTU-87	<i>Polaromonas</i> sp. RK103 (LC040879)	+	<i>Polaromonas ginsengisoli</i> (AB245355)	100
37 OTU-86	<i>Variovorax</i> sp. RK170 (LC040880)	+	<i>Variovorax paradoxus</i> (CP002417)	100
<i>Gammaproteobacteria</i>				
38 OTU-69	<i>Pantoea</i> sp. RK126 (LC602165)	-	<i>Pantoea ananatis</i> (CP020943)	100
42 OTU-96	<i>Rhizobacter</i> sp. RK021 (LC040878)	-	<i>Methylbium petroleiphilum</i> (CP000555)	99

^a"+" and "-" indicate growth-promoting and -inhibiting bacteria, respectively.

^bResults with approximately 1400 bp using NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) are shown.

^cThe number in parentheses indicates the accession number.

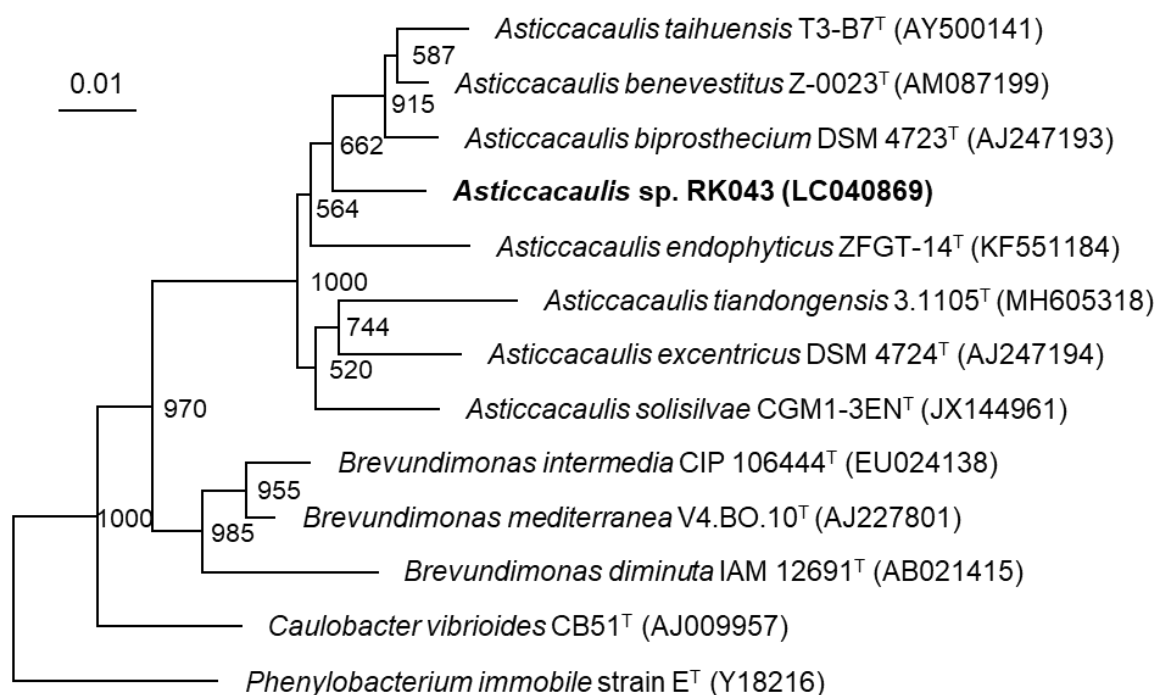


Fig. 3-5. Phylogenetic tree analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Asticcacaulis* sp. RK043. The tree was constructed using the neighbor-joining method with the sequences of a closely related type strain. The accession numbers are given in parentheses. The sequence of *Phenylobacterium immobile* was used as an outgroup. The numbers at the nodes are the proportions of 1000 bootstrap replicates, and values exceeding 500 are shown.

図 3-5. テンサイ生育促進細菌 *Asticcacaulis* sp. RK043 の系統樹解析

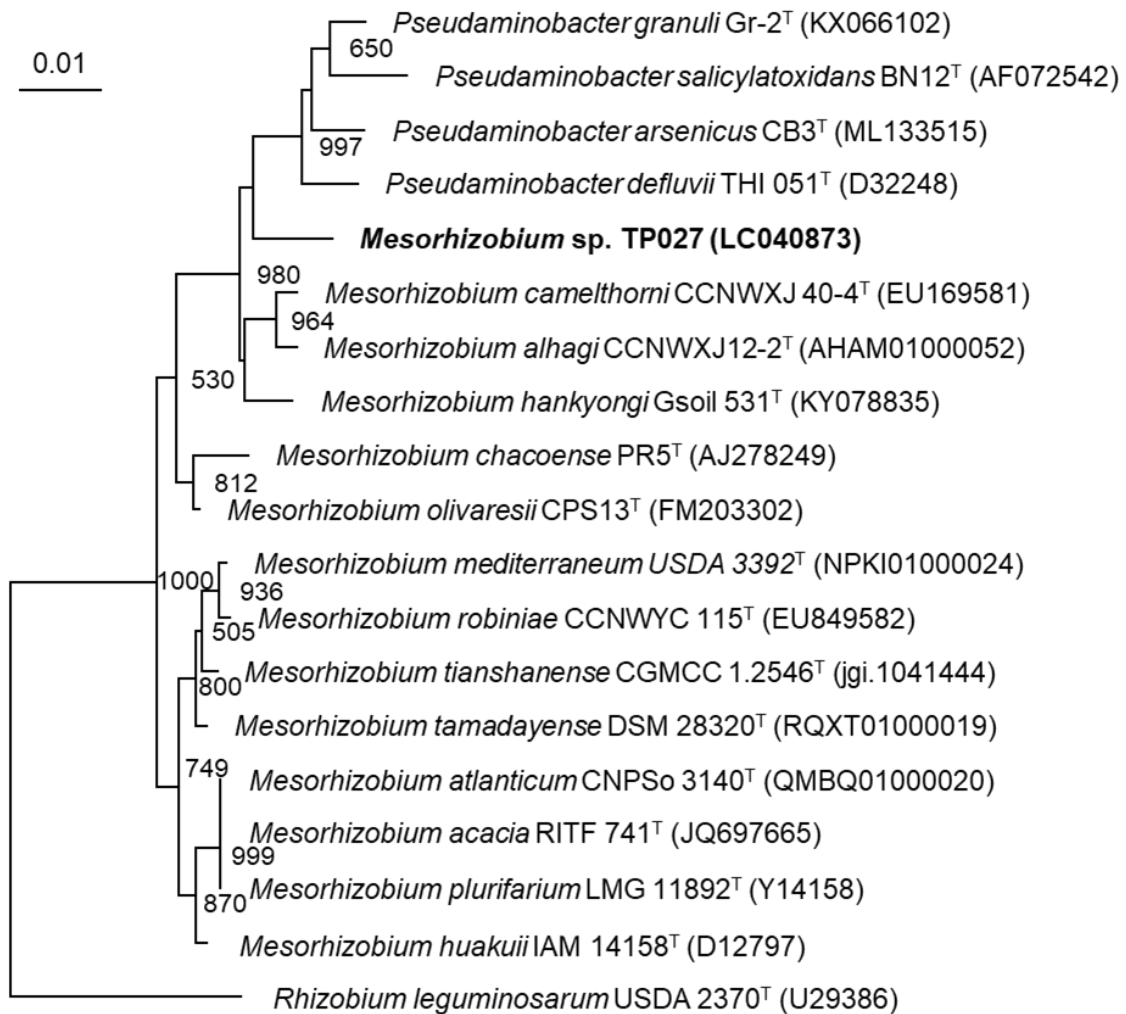


Fig. 3-6. Phylogenetic tree analysis of the 16S rRNA gene sequences of *Mesorhizobium* sp. TP027. The tree was constructed using the neighbor-joining method with the sequences of a closely related type strain. The accession numbers are given in parentheses. The sequence of *Rhizobium leguminosarum* was used as an outgroup. The numbers at the nodes are the proportions of 1000 bootstrap replicates, and values exceeding 500 are shown.

図 3-6. テンサイ生育促進細菌 *Mesorhizobium* sp. TP027 の系統樹解析

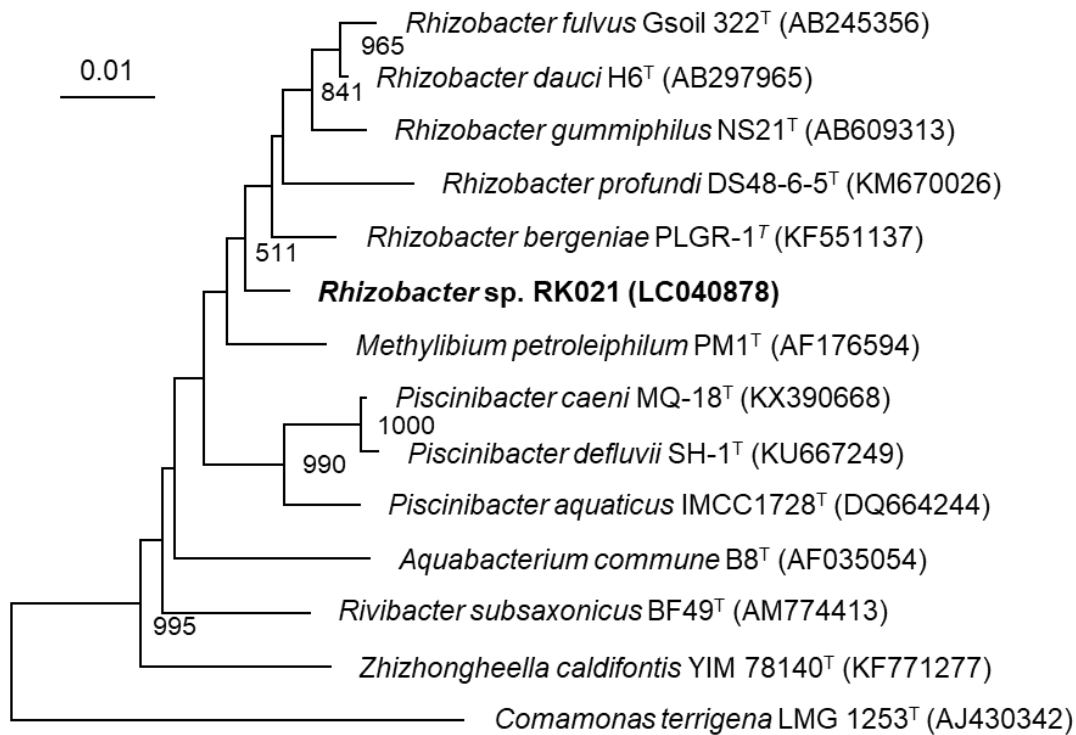


Fig. 3-7. Phylogenetic tree analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Rhizobacter* sp. RK021. The tree was constructed using the neighbor-joining method with the sequences of a closely related type strain. The isolates in the present study are shown in bold font. The accession numbers are given in parentheses. The sequence of *Comamonas terrigena* was used as an outgroup. The numbers at the nodes are the proportions of 1000 bootstrap replicates, and values exceeding 500 are shown.

図 3-7. テンサイ生育抑制細菌 *Rhizobacter* sp. RK021 の系統樹解析

表 3-9. テンサイの生育促進細菌と生育抑制細菌に対応する OTU の 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーにおける存在比 (%)

Table 3-9. Relative abundance of OTUs in the clone libraries of 16S rRNA genes derived from sugar beet-associated bacteria

Tissues	Leaf blade			Petiole			Tap root			Lateral root			Isolate name	
	Experimental fields	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK	K	NPK	PK		K
Growth-inhibiting bacteria														
OTU-69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pantoea</i> sp. RK126 (LC602165)
OTU-96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	4.4	2.0	<i>Rhizobacter</i> sp. RK021 (LC040878)
OTU-166	-	-	-	-	-	-	-	1.2	1.7	2.2	3.7	2.0		<i>Neorhizobium</i> sp. RK064 (LC602160)
OTU-218	-	-	-	-	-	-	2.6	1.8	4.5	0.6	0.7	-		<i>Tardiphaga</i> sp. RK140 (LC602161)
OTU-272	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	0.7	0.7		<i>Streptomyces</i> sp. TP071 (LC602158)
OTU-329	1.7	-	-	2.8	-	-	1.3	-	0.6	-	-	-		<i>Bacillus</i> sp. TP182 (LC602159)
Growth-promoting bacteria														
OTU-86	1.1	1.1	4.8	6.2	2.8	1.7	0.7	0.6	0.6	1.7	-	-		<i>Variovorax</i> sp. RK170 (LC040880)
OTU-87	-	-	-	-	-	-	2.6	1.2	0.6	2.2	1.5	3.3		<i>Polaromonas</i> sp. RK103 (LC040879)
OTU-170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		<i>Mesorhizobium</i> sp. TP027 (LC040873)
OTU-189	-	-	-	-	-	-	0.7	-	2.8	-	1.5	2.0		<i>Sphingobium</i> sp. RK166 (LC602162)
OTU-191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.5	1.3		<i>Sphingomonas</i> sp. RP195 (LC602164)
OTU-199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		<i>Sphingopyxis</i> sp. RK106 (LC602163)
OTU-226	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-		<i>Asticcacaulis</i> sp. RK043 (LC040869)
OTU-301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		<i>Nocardioides</i> sp. RP110 (LC040866)

第4章 総合考察

これまでのエネルギー大量投入型の農業から環境に配慮した持続可能な農業への転換が求められる中、植物共生微生物の有効活用は、生産力向上と持続性の両立を実現する技術としての期待が高く、近年の微生物資材の市場は世界的に拡大傾向にある (Timmusk *et al.*, 2017; 大久保ら, 2016)。しかしながら、これまでの微生物資材の開発研究に目を向けると、圃場での効果の不安定性のため、研究事例数に比べて微生物資材などの形で実用化されることは少なく、化学肥料や化学農薬の代替技術となり得ていないのが実情である (池田, 2016)。

本研究では、序章で述べたような植物・微生物間相互作用の解析対象としての利点を多く持つと考えられるテンサイを研究材料として、PGPB の選抜過程における植物共生微生物の生態学的情報の欠如が農業現場での微生物資材の不安定さの原因の1つであることを第1章で提起し、さらに PGPB の分離培養においても近年の分子微生物生態学的手法を取り入れることで、より効率的かつ大規模に PGPB の探索と選抜が可能であることを第2章で示した。最後に、それらの研究の過程から得られる共生微生物の多様性や生態的特性に関する情報を活用した PGPB 選抜の有効性の検証を目的とした研究を第3章で示した。本章では、初めに各章の結論と考察を整理したのち、それらの成果を踏まえて、現在の農業微生物研究の現状と課題、今後の展望について議論し、総合考察としたい。

第1章では季節変動がテンサイ側根共生細菌の群集構造に及ぼす影響について検討し、本研究の実験条件下において、テンサイの栄養吸収に関与すると考えられる側根の共生細菌は、主に *Actinobacteria*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* の3門で構成され、特に *Proteobacteria* 門の細菌が全体の約半数を占めることを明らかにした。共生細菌の群集構造は生育に伴い、劇的かつ連続的に変化し、6月から7月の生育初期には *Streptomyces* 属や *Pseudomonas* 属などの病原微生物に対する拮抗作用を持つ有用細菌群として広く知られている菌群が優占して存在し、病虫害に対して脆弱なテンサイの生育初期における病害抑制に関与している可能性が示唆された。また、テンサイが最も成長する7月から8月にかけては、これまでに他の多くの作物種において PGPB として報告されている *Rhizobiales* 目の5属 (*Agrobacterium*、*Bradyrhizobium*、*Devosia*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium*) や *Sphingomonadales* 目の4属 (*Novosphingobium*、*Sphingobium*、*Sphingomonas*、*Sphingopyxis*) の存在比が高まることを明らかにした。これらの結果は、上記の属の菌群が圃場条件下でテンサイの急激な成長へ関与する可能性を示唆するとともに、それらの菌群が実用的な PGPB の候補として有望であると推察

された。

第 2 章では分子微生物生態学的手法を利用して分離培養されるテンサイ側根共生細菌の多様性に及ぼす培地の影響を評価し、16S rRNA 遺伝子の配列情報に基づいた PGPB 候補菌株の迅速な探索と選抜のための実験系の構築と評価を行った。即ち、多様な分類群の細菌を含む菌株コレクションを構築するため、4 種類の培地を用い、培地が分離培養される共生細菌の多様性に及ぼす影響を調査した。その結果、R2A 培地は同時に検討した他の 3 種類の培地と比べ、より分類学的に多様なテンサイ側根共生細菌の分離培養が可能であることを明らかにした。加えて、第 1 章で側根に優占して存在することが明らかとなった *Rhizobiales* 目や *Sphingomonadales* 目についても、より多くの系統群が分離できるなど、R2A 培地は植物共生細菌群集の多様性を反映した細菌の分離培養に適していることを明らかにした。一方、TSA 培地は、本研究で検討した他の 3 種類の培地とは大きく異なる系統群の細菌の分離培養が可能であり、分類学的に多様な菌群をカバーする菌株コレクションを構築するためには、検討した 4 種類の培地の中では、R2A 培地と TSA 培地の 2 つの培地の利用が効率的であると結論した。従来の細菌の分離培養実験では、コロニーの色や形態、増殖速度など、主に実験者が目視で識別できる外観的特徴に基づいて分離培養された比較的少数のコロニーに依存して行われることが多かった。しかしながら近年はシーケンスコストも下がっていることから、無作為かつ大量に分離培養したコロニーについての 16S rRNA 遺伝子の配列情報を比較的安価に取得することが可能となっている。第 2 章の結果から、多様な細菌群の分離培養に適した培地の定性・定量的な評価や選択、新規培地の開発、目的とする菌株の迅速かつ大規模な探索・選抜のために、16S rRNA 遺伝子の配列情報に基づいた分子微生物生態学的手法を取り入れた実験系が有効であることが明らかとなった。

第 3 章では分子微生物生態学的な解析に基づいた植物生育促進細菌の選抜についての有効性を検討するため、異なる施肥条件下のテンサイ共生細菌の群集構造解析とテンサイ根圏からの植物生育促進細菌の選抜を行った。その結果、地上部組織（葉身および葉柄）の共生細菌群集は、地下部組織（主根および側根）の共生細菌群集と比べて多様性が低く、施肥条件に対して敏感に反応することを明らかにした。テンサイ共生細菌群集の多様性の特徴として、*Proteobacteria* 門、特に *Alphaproteobacteria* 綱と *Gammaproteobacteria* 綱の菌群が全組織で優占して存在し、側根には、*Burkholderiales* 目、*Pseudomonadales* 目、*Rhizobiales* 目、*Sphingobacteriales* 目、*Sphingomonadales* 目が施肥条件に依らず安定して存在することを明らかにした。特に、*Sphingomonadales* 目は、施肥条件の悪化に伴う存在比の明らかな増加が認

められ、*Novosphingobium* 属や *Sphingomonas* 属などの *Sphingomonadales* 目の細菌群については、低栄養条件下でのテンサイとの密接な相互作用やテンサイの生育への関与の可能性が示唆された。また、第 1 章の NGS 解析と第 3 章のクローンライブラリー解析の間の結果の比較から、両結果の違いは細胞濃縮法に起因する可能性があり、クローンライブラリー解析で存在比が低かった *Actinobacteria* 門と *Alphaproteobacteria* 綱は側根組織への物理的な定着が強固である可能性が推察された。

R2A 培地と TSA 培地の 2 つの培地を用いて側根から合計 665 菌株の細菌を分離培養し、クローンライブラリーと菌株から得られた合計 2465 配列の 16S rRNA 遺伝子の部分配列（ワンパスシーケンスで得られた部分配列）をクラスタリング解析した。配列データを利用して多様性解析を行い、既知種に対する類似度に基づいた分類学的な新規性や動植物の病原細菌に対する類似度、群集構造解析に基づいた主根または側根への親和性や定着性を指標に選抜した 44 菌株をテンサイ幼苗への接種試験に供試した。その結果、8 菌株は生育促進効果を、6 菌株は生育抑制効果を示すことを明らかにした。8 菌株のうち *Variovorax* 属の菌株を除く、7 菌株はテンサイの PGPB としては未報告の 7 属 (*Asticcacaulis*, *Mesorhizobium*, *Nocardioides*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Polaromonas*) に分類され、これらの属の中でも *Asticcacaulis* 属と *Polaromonas* 属については他の植物を含めて、植物生育促進効果を持つ菌株の分離は初めての事例となった。以上のような結果は、第 1 章、第 2 章で検討した植物共生細菌研究における分子微生物生態学的なアプローチが、PGPB 研究の迅速かつ効率的な推進において非常に有用であることを示している。

表 4-1 に、第 1 章で行ったテンサイ側根共生細菌の NGS の結果の中から、本研究を含め、これまでにテンサイの PGPB または生育抑制効果を示す菌株が報告されている 21 属について要約した。それらの属のうち 8 属 (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Rhodobacter*, *Stenotrophomonas*) については、本研究の圃場栽培したテンサイ側根における存在比は非常に小さく、側根への安定した定着が期待できないため、本研究で使用した圃場と類似した土壌や地域における実用的な資材開発には適さない可能性が高いと考えられる。一方、本研究で PGPB として選抜した菌株に対応する属の多くは、生育初期から生育盛期である 6 月から 8 月にかけて、テンサイ側根において安定的に優占化して存在することが確認され、本研究で検討した圃場条件下でのテンサイの生育に寄与している可能性が示唆された。また、本研究で選抜した菌株には、*Asticcacaulis* 属や *Polaromonas* 属など、従来のテンサイの PGPB 研究では報告例が少ない細菌群から多数の PGPB を選抜することに成功

した。この理由としては、大規模かつ無作為な分離培養作業により、従来の培養実験では見逃されていた菌群の分離効率が上がり、より多様な菌群について効率的に接種試験で評価できたことによると考えられる。このように、本研究で実践した植物共生微生物群集の構造解析とクラスタリング解析を活用することで、従来の生育促進因子（IAA 生産能や窒素固定能など）に基づいた PGPB 研究では得られ難い実用的な PGPB や、新規性の高い PGPB の効率的な探索や選抜が可能であると考えられた。今後は、選抜した菌株の生育促進メカニズムの解明と圃場レベルでの効果の検証が望まれる。テンサイ主根におけるメタゲノム解析の結果から、病害抑制やリン酸溶解能、メタノール資化性、ACC deaminase 生産能が生育に重要な役割を担っている可能性が示唆されていることから (Tsurumaru *et al.*, 2015)、これらの形質についても選抜菌株での解析が必要と考えられる。また、群集構造解析における各菌群の存在比は植物組織中での親和性や定着性の目安にはなり得るが、各菌群の絶対的なバイオマスや活性、組織中の局在性など実用的な PGPB の選抜・利用のために重要と考えられる他の生態的情報は得ることができない。したがって、今後は植物共生系における菌株レベルや群集レベルでの脂肪酸分析や定量 PCR 等によるバイオマス量や菌量の測定、組織化学的な解析、代謝活性の測定などについても検討が必要と考えられる (Natsagdorj *et al.*, 2019)。

本研究では、6 菌株がテンサイ幼苗に対して生育抑制効果を示すことを明らかにした (図 3-3)。 *Streptomyces* 属や *Bacillus* 属、 *Pantoea* 属は、既にテンサイの PGPB として報告がある属であり (表 4-1)、同じ属の中でも生態的機能が異なる菌株が存在する可能性があることが明らかとなった。 Berrios and Ely (2020) は、 *Caulobacter* 属内にアラビドプシスへの生育促進を示す菌株と生育抑制を示す菌株の両方が存在し、両方の菌株ともに生育促進因子の能力を持つことを報告している。これらの結果は、PGPB 研究における菌株の分離培養と、それら菌株を用いた接種試験による機能性評価の重要性を示すものであり、本研究で構築した菌株コレクションは、テンサイ共生細菌の生態的、機能的役割の解明に有用な資源であると考えられる。また、生育と抵抗性がトレードオフの関係にある植物の病害抵抗性の発動のように、病原微生物に対する高い拮抗能と共生能を持つ植物共生微生物は接種試験時の菌密度が高いとトレードオフのような形で宿主植物の生育を抑制するというようなことも起こり得ることが考えられる (Oleńska *et al.*, 2020)。したがって、第 3 章において接種試験の供試菌株として選抜した 44 菌株については、接種時の菌密度を下げた条件下での植物生育促進効果の再評価や、病原微生物の存在下での接種試験による病害防除効果や生育促進効果の有無についても今後検討する価値があるように思われる。

NGS など培養を伴わない分子生物学的手法により、気象や土壌などの栽培環境だけでなく、肥料・農薬の施用や耕起などの栽培方法や、品種や生育ステージなどの宿主植物など、様々な要因が共生細菌に影響を与えることが明らかとなっている（池田，2016；Dastogeer *et al.*，2020）。そのような微生物生態的な知見は、本研究で検証した植物への定着性を考慮した PGPB 探索に加え、選抜した PGPB の定着性と効果を高める栽培管理法についての研究の必要性を示唆しているのではないだろうか。実際に、*Lysobacter* 属のような PGPB の土壌中での増殖を高めると考えられるキチンや食肉加工残渣などのタンパク含量の高い有機物の施用により *Rhizoctonia* によるテンサイの土壌病害が軽減され得ることも報告されている（Postma and Schilder，2015）。同様に、窒素分の多いミミズ堆肥の施用により病害の軽減に寄与し得る *Firmicutes* 門や *Streptomyetaceae* 科の菌群がテンサイ根圏で増加することも近年の研究で明らかにされている（Wolfgang *et al.*，2020）。さらに、テンサイ根系から比較的多くの無機態窒素が根圏に分泌されることが知られており（Wolfgang *et al.*，2023）、易分解性の窒素成分に対する *Rhizoctonia* との競合が緩和された結果、PGPB のような菌群の拮抗作用が *Rhizoctonia* による苗立枯病に対する土壌の静菌作用として現れている可能性も提示されている（Wolfgang *et al.*，2023）。ただし、*Pseudomonas* 属や *Lysobacter* 属はグラム陰性菌であるのに対して、*Firmicutes* 門や *Streptomyetaceae* 科の菌群はグラム陽性菌であることから、土壌湿度や農薬などに対する耐性などが両菌群の増殖や機能発現に大きな影響を与えると推測され、栽培地域の土壌・気象条件や栽培管理の違いを考慮した PGPB の活用方法も今後検討する必要があるように思われる。さらに、農業現場を想定したオミクスによる植物と共生微生物との相互作用の解明が更に進めば、PGPB 自体の研究だけではなく、テンサイにおいても共生微生物からの視点を取り込んだ根の構造や機能の理化学性の改変等を介して、共生育種のような研究の展開も今後期待できると考えられる（Khorassani *et al.*，2011；Wolfgang *et al.*，2023）。

表 4-1. 本研究および過去に他の研究グループからテンサイに対する生育促進効果または生育抑制効果が報告されている菌群の第 1 章の 6 月から 9 月の生育期間中のテンサイ側根における存在比 (%) の変化

Table 4-1. Changes of relative abundances (%) during the growth period from June to September for sugar beet lateral root-associated bacterial groups which have been reported to have plant growth promoting or inhibiting effect for sugar beet in previous studies

Genus ^a	Sampling month ^b				Sig. ^c	PGP activity ^d	References
	June	July	August	September			
<i>Streptomyces</i>	15.7 ± 5.7 a	8.3 ± 3.0 b	7.0 ± 1.4 b	3.4 ± 1.2 c	***	N	Okazaki et al., 2021
<i>Pseudomonas</i>	4.1 ± 2.3 a	3.4 ± 2.1 a	0.6 ± 0.4 b	0.8 ± 0.6 b	***	P	Kloepper et al., 1980
						P	Dunne et al., 1998
						P	Çakmakçi et al., 2001
						P	Zachow et al., 2008
<i>Sphingobium</i>	2.3 ± 1.0 a	1.3 ± 0.4 b	1.2 ± 0.6 b	0.5 ± 0.2 c	***	P	Okazaki et al., 2021
<i>Sphingomonas</i>	1.9 ± 0.6 c	3.8 ± 0.8 ab	4.4 ± 0.8 a	2.7 ± 1.3 bc	***	P	Okazaki et al., 2021
<i>Sphingopyxis</i>	1.4 ± 0.8 a	0.9 ± 0.5 a	0.9 ± 0.4 a	0.1 ± 0.1 b	***	P	Okazaki et al., 2021
<i>Mesorhizobium</i>	1.3 ± 0.2 a	1.6 ± 0.2 a	1.5 ± 0.4 a	0.7 ± 0.2 b	***	P	Okazaki et al., 2021
<i>Asticcacaulis</i>	1.1 ± 0.2 a	1.1 ± 0.4 a	0.8 ± 0.4 a	0.1 ± 0.2 b	***	P	Okazaki et al., 2021
<i>Burkholderia</i>	0.9 ± 0.8	1.0 ± 1.0	1.3 ± 0.9	0.9 ± 1.0		P	Çakmakçi et al., 2001
<i>Flavobacterium</i>	0.9 ± 0.5 a	1.1 ± 0.6 a	0.2 ± 0.1 b	0.4 ± 0.5 ab	**	P	Zachow et al., 2008
<i>Lysobacter</i>	0.8 ± 0.4	1.2 ± 0.7	1.0 ± 0.5	0.7 ± 0.3		P	Zachow et al., 2008
<i>Paenibacillus</i>	0.28 ± 0.26 a	0.07 ± 0.05 ab	0.049 ± 0.043 ab	0.01 ± 0.02 b	*	P	Çakmakçi et al., 2006
<i>Stenotrophomona</i>	0.23 ± 0.31	0.05 ± 0.08	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.08		P	Dunne et al., 1998
<i>Methylibium</i>	0.2 ± 0.2 b	0.4 ± 0.1 ab	0.4 ± 0.1 ab	0.6 ± 0.3 a	*	N	Okazaki et al., 2021
<i>Bacillus</i>	0.12 ± 0.09 ab	0.22 ± 0.04 a	0.04 ± 0.04 b	0.11 ± 0.08 ab	**	P	Çakmakçi et al., 1999
						P	Zachow et al., 2008
						N	Okazaki et al., 2021
<i>Polaromonas</i>	0.05 ± 0.09 c	0.70 ± 0.23 a	0.35 ± 0.07 b	0.56 ± 0.17 ab	***	P	Okazaki et al., 2021
<i>Chryseobacterium</i>	0.05 ± 0.13	0.04 ± 0.04	0.012 ± 0.015	0.01 ± 0.01		P	Shi et al., 2009
<i>Pantoea</i>	0.01 ± 0.02	0	0	0		P	Zachow et al., 2008
						N	Okazaki et al., 2021
<i>Nocardioides</i>	0 ± 0	0.04 ± 0.05	0.02 ± 0.03	0.02 ± 0.04		P	Okazaki et al., 2021
<i>Acinetobacter</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.02 ± 0.02		P	Shi et al., 2009
<i>Rhodobacter</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.01 ± 0.01		P	Çakmakçi et al., 2006
<i>Microbacterium</i>	0 ± 0	0 ± 0	0.003 ± 0.007	0 ± 0		P	Zachow et al., 2008

^aFamilies or closest taxa with 1% or more than 1% of relative abundance in any one of sampling months are shown. Relative abundance was calculated based on 5491 reads per sample.

^bResults of average ± S.D. (n=6) are shown. The same letter indicate no statistical significance among the months and months with high, low and moderate abundances are highlighted with dark gray, white and light gray backgrounds, respectively.

^c*, ** and *** indicate the statistical significance among months by one-way ANOVA at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

^dN and P stand for the plant growth inhibiting (negative) and promoting (positive) activity, respectively.

論文内容要旨

テンサイ根圏における細菌群集の多様性と植物生育促進細菌
に関する研究

令和 5 年度

東北大学大学院生命科学研究科
生態発生適応科学専攻

岡崎 和之

テンサイ根圏における細菌群集の多様性と植物生育促進細菌に関する研究

生態発生適応科学専攻

岡崎 和之

序章

テンサイ (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, L.) は、肥大した主根にショ糖を高濃度に蓄積する。このため、テンサイは砂糖の原料作物として、世界で約 460 万 ha で栽培される世界的な重要作物の 1 つである。国内では北海道のみでの栽培だが、コムギ、バレイショ、マメ類とともに畑輪作体系を支える重要な基幹作物として、その栽培面積は約 56,000 ha に達し、テンサイを原料とする製糖工場は、地域の基幹産業として多くの雇用と関連産業を創出するなど、テンサイは地域経済の維持に重要な作物となっている。

テンサイの収量の向上と安定化にとって、霜害や病虫害の影響を受けやすい初期成育の促進と安定化は重要な課題である。また、畑作物の中でも施肥量が多い作物とされるテンサイにとって、近年の肥料費の上昇は生産者に与える影響が大きく、減肥料や減農薬に資する技術開発への要望は強い。

近年、環境への負荷が少ない化学肥料・化学農薬の低減技術として、有用な微生物を活用した微生物資材が注目されており、その市場規模が世界的に拡大している。植物組織の表面や内部に生息し、宿主植物にとって有用な効果をもたらす細菌は植物生育促進細菌 (PGPB; Plant Growth Promoting Bacteria) と呼ばれ、古くから世界中で PGPB の単離・選抜が行われ、微生物資材を活用した減肥料栽培や減農薬栽培が検討されてきた。PGPB の活用は、環境に配慮しながら、テンサイ栽培の課題である化学肥料の低減と初期生育の促進による収量の向上・安定化を解決できる可能性がある。しかしながら、これまで多くの植物から PGPB の単離と選抜が行われてきたが、圃場条件下の接種で安定した効果が得られないことが多く、効果の安定化が資材化の大きな課題の 1 つとなっている。この原因の 1 つは、従来の PGPB の選抜は、IAA 生産能や窒素固定能などの植物生育促進因子に着目した選抜が行われ、植物組織への定着性が十分に考慮されていなかったことが考えられる。

近年の分子微生物生態学の発展は、共生微生物群集の多様性や機能性を、培養によるバイアスを受けずに解析することを可能としている。このため、共生微生物群集の多様性や機能性の情報を PGPB の選抜に活用することで、植物組織に対して高い親和性や定着性があり、安定した効果を示す PGPB の効率的な選抜が期待できるとともに、従来の限られた規模の培養実験での目視による菌株選抜や、既知の植物生育促進形質に依存した PGPB の選抜とは系統的に異なる

る、より多様な種の PGPB の効率的な選抜が可能になると考えられる。

本研究の目的は、テンサイを研究材料に、PGPB 選抜における分子微生物生態学的アプローチの有効性を検証することである。上記のような背景から、第 1 章では、圃場条件下において養分吸収の場であると同時に、根からの分泌物を介した根圏微生物との相互作用や土壌中からの有用微生物のテンサイ根圏への誘引の場として重要と考えられる側根の共生細菌群集の多様性について、生育期間の初期から後期（初期生育期：6 月、根部肥大型：7 月から 8 月、糖分蓄積期：9 月）における群集構造の季節的変動を解明した。第 2 章では、テンサイ共生微生物研究の基盤構築のため、多様な共生細菌群を対象とした大規模な菌株コレクションの構築と、そのための分離培地の影響について検討を行った。第 3 章では、多様な環境下で安定して定着できる PGPB を選抜するため、異なる施肥条件下での培養法と非培養法による共生細菌の多様性の解明とそれらの知見に基づいた接種試験による PGPB の探索と選抜を行った。

第 1 章 季節変動がテンサイ側根共生細菌の群集構造に及ぼす影響

圃場条件下のテンサイ側根の共生細菌群集の多様性を次世代シーケンスにより解析した結果、側根の共生細菌は、主に *Actinobacteria*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* の 3 門で構成され、特に *Proteobacteria* 門の細菌が全体の約半数を占めることを明らかにした。共生細菌の群集構造は生育に伴い、劇的かつ連続的に変化し、生育初期の 6 月から 7 月にかけては、*Streptomyces* 属や *Pseudomonas* 属など、病原微生物に対する拮抗作用を持つ有用細菌群として広く知られている菌群が優占して存在し、病虫害に対して脆弱なテンサイの生育初期における病害抑制に関与している可能性が示唆された。また、テンサイが最も成長する 7 月から 8 月にかけては、これまでに他の多くの作物種において PGPB として報告されている *Rhizobiales* 目の 5 属 (*Agrobacterium*、*Bradyrhizobium*、*Devosia*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium*) や *Sphingomonadales* 目の 4 属 (*Novosphingobium*、*Sphingobium*、*Sphingomonas*、*Sphingopyxis*) の存在比が高まることを明らかにした。上記の圃場条件下でテンサイの急激な成長へ関与する可能性が示唆された属の菌群は、圃場条件下でも有用効果が安定的に得られる可能性が高く、実用的な PGPB の候補菌群として優先的に生育促進効果を調査する価値が高いと考えられた。

第 2 章 分離培養されるテンサイ側根共生細菌の多様性に及ぼす培地の影響

植物共生微生物の群集構造解析の情報に基づいた PGPB 候補菌株の迅速な探索と選抜には、多様な共生細菌群を対象とした大規模な菌株コレクションの構築が重要である。そこで、第 2

章では、テンサイ側根から4種類の培地を用いて無作為かつ大規模な分離培養を行い、全菌株の16S rRNA 遺伝子配列データに基づいた群集構造解析から、培地が分離培養される共生細菌の多様性に及ぼす影響を評価した。その結果、低栄養条件下の従属栄養性水生細菌の生菌数測定のために開発されたR2A培地は、本研究で検討した他の3種類の培地と比べて分類学的に多様な細菌の分離培養が可能であることを明らかにした。また、第1章で側根に優占的に存在することが明らかとなった *Rhizobiales* 目や *Sphingomonadales* 目についても、より多くの系統群が分離できるなど、R2A培地は植物共生細菌群集の多様性を反映した細菌の分離培養に適していることを明らかにした。一方、Tryptic soy broth Agar培地（以下、TSA培地）は、本研究で検討された他の3つの培地とは大きく異なる系統群の細菌の分離培養が可能であることが明らかとなった。以上の結果から、系統的に多様な菌群をカバーする菌株コレクションを構築するためには、検討した4種類の培地の中では、R2A培地とTSA培地の2つの培地の利用が効率的であると結論された。

第3章 テンサイ根圏共生細菌の群集構造解析に基づく生育促進細菌の選抜

異なる施肥条件下のテンサイ共生細菌の群集構造を解析した結果、地上部組織（葉身および葉柄）は地下部組織（主根および側根）と比べて共生細菌の多様性が低く、施肥管理に対して敏感に反応することを明らかにした。テンサイ共生細菌の特徴として、*Proteobacteria* 門、特に *Alphaproteobacteria* 綱と *Gammaproteobacteria* 綱の菌群が全組織で優占的に存在することが明らかとなった。側根には、*Burkholderiales* 目、*Pseudomonadales* 目、*Rhizobiales* 目、*Sphingobacteriales* 目、*Sphingomonadales* 目が施肥条件に依らず安定して存在することを明らかにした。特に、*Sphingomonadales* 目は、施肥条件の悪化に伴う明らかな存在比の増加が認められ、*Novosphingobium* 属や *Sphingomonas* 属などの *Sphingomonadales* 目の細菌群については、低栄養条件下でのテンサイとの密接な相互作用やテンサイの生育への関与の可能性が示唆された。また、第1章のNGS解析と第3章のクローンライブラリー解析の間の結果の比較から、両結果の違いは細胞濃縮法に起因する可能性があり、クローンライブラリー解析で存在比が低かった *Actinobacteria* 門と *Alphaproteobacteria* 綱は側根組織への物理的な定着が強固である可能性が推察された。

第2章の結果から、分類学的に多様な菌群をカバーする菌株コレクション構築に有効と考えられたR2A培地およびTSA培地を用いてテンサイ側根から合計665菌株の細菌を分離培養した。これら菌株とクローンライブラリーから得られた合計2465配列の16S rRNA 遺伝子の部分

配列（ワンパス・ロングシーケンスで得られた部分配列）は、クラスタリング解析の結果、456 個の OTU に分類された。菌株が得られている 123 個の OTU の配列データから、既知種に対する類似度に基づいた分類学的な新規性や動植物の病原細菌に対する類似度、細菌群集構造解析に基づいた主根または側根における親和性・定着性、施肥条件に対する安定性などを指標に 44 菌株を選抜し、人工気象室内でのテンサイ幼苗への接種試験に供試した。その結果、8 菌株は生育促進効果を、6 菌株は生育抑制効果を示すことを明らかにした。8 菌株のうちテンサイを含む幅広い植物種で PGPB が報告されている *Variovorax* 属の菌株を除く 7 菌株はテンサイの PGPB としては未報告の 7 属 (*Asticcacaulis*、*Mesorhizobium*、*Nocardioides*、*Sphingobium*、*Sphingomonas*、*Sphingopyxis*、*Polaromonas*) に分類された。さらに、*Asticcacaulis* 属と *Polaromonas* 属については、他の植物を含めて、本研究が植物生育促進効果を持つ菌株の分離の初めての事例となった。このような従来の PGPB 研究では報告例が少ない菌群から多数の PGPB を選抜できた要因としては、16S rRNA 遺伝子配列データに基づく共生細菌の構造解析とクラスタリング解析を活用したことで、より多様な菌群の機能を効率的に接種試験で評価できたことによるものと考えられる。また、第 1 章の NGS 解析の結果から、本研究で PGPB として選抜した菌株に対応する属の多くは、生育初期から生育盛期である 6 月から 8 月にかけて、テンサイ側根において安定的に優占化して存在することが確認され、本研究で検討された圃場条件下でのテンサイの生育に寄与している可能性が示唆された。したがって、このような配列データに基づいた PGPB の初期選抜は実用的な PGPB 研究の効率的な推進に貢献し得ると考えられた。

まとめ

本研究では、テンサイ側根から、他の植物を含めて、本研究が PGPB の分離が初めてとなる *Asticcacaulis* 属と *Polaromonas* 属の 2 菌株を含む、8 菌株のテンサイの PGPB の効率的な選抜に成功し、分子微生物生態学的なアプローチが、PGPB 研究の迅速かつ効率的な推進において非常に有用であることを明らかにした。今後は、選抜した菌株の生育促進メカニズムの解明と圃場レベルでの効果の検証が必要と考えられる。

引用文献

- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163: 173-181.
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* 59.1: 143-169.
- Ambreetha, S., and Balachandar, D. (2023) SCAR marker: A potential tool for authentication of agriculturally important microorganisms. *J Basic Microbiol* 63.1: 4-16.
- Anda, M., Ikeda, S., Eda, S., Okubo, T., Sato, S., Tabata, S., *et al.* (2011) Isolation and genetic characterization of *Aurantimonas* and *Methylobacterium* strains from stems of hypernodulated soybeans. *Microbes Environ* 26.2: 172-180.
- Andersen, J. B., Koch, B., Nielsen, T. H., Sørensen, D., Hansen, M., Nybroe, O., *et al.* (2003) Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology* 149.1: 37-46.
- Anguita-Maeso, M., Olivares-García, C., Haro, C., Imperial, J., Navas-Cortés, J. A., and Landa, B. B. (2020) Culture-dependent and culture-independent characterization of the olive xylem microbiota: effect of sap extraction methods. *Front Plant Sci* 10: 1708.
- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R., and Lalonde, R. (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). In *Molecular microbial ecology of the soil*. Springer, Dordrecht, pp. 57-67.
- Asaf, S., Khan, M. A., Khan, A. L., Waqas, M., Shahzad, R., Kim, A. Y., *et al.* (2017) Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of *Sphingomonas* sp. and *Serratia marcescens*. *J Plant Interact* 12.1: 31-38.

- Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J., and Weightman, A. J. (2006) New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol* 72: 5734-5741.
- Bal, H. B., Nayak, L., Das, S., and Adhya, T. K. (2013) Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant Soil* 366: 93-105.
- Bandeppa, S., Phule, A. S., Rajani, G., Babu, K. V., Barbadikar, K. M., Babu, M. B. B., *et al.* (2022). Effect of nitrogen-fixing bacteria on germination, seedling vigour and growth of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Int j plant soil sci* 34.16: 94-106.
- Barazani, O. Z., and Friedman, J. (1999) Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J Chem Ecol* 25: 2397-2406.
- Bell, C. W., Asao, S., Calderon, F., Wolk, B., and Wallenstein, M. D. (2015) Plant nitrogen uptake drives rhizosphere bacterial community assembly during plant growth. *Soil Biol Biochem* 85: 170-182.
- Berrios, L., and Ely, B. (2020) Plant growth enhancement is not a conserved feature in the *Caulobacter* genus. *Plant and Soil* 449: 81-95.
- Bertoldo, G., Della Lucia, M. C., Squartini, A., Concheri, G., Broccanello, C., Romano, A., *et al.* (2021) Endophytic microbiome responses to sulfur availability in *Beta vulgaris* (L.). *Int J Mol Sci* 22.13: 7184.
- Bodenhausen, N., Horton, M. W., and Bergelson, J. (2013) Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PloS One* 8: e56329.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., *et al.* (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37: 852-857.
- Broccanello, C., Ravi, S., Deb, S., Bolton, M., Secor, G., Richards, C., *et al.* (2022). Bacterial endophytes as indicators of susceptibility to *Cercospora* Leaf Spot (CLS) disease in *Beta vulgaris* L. *Sci Rep* 12.1: 10719.
- Buyer, J. S. (1995) A soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration

- medium that inhibits *Bacillus mycoides*. *Appl Environ Microbiol* 61.5: 1839-1842.
- Çakmakçi, R., Kantar, F., and Algur, Ö. F. (1999) Sugar beet and barley yields in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* inoculation. *J Plant Nutr Soil Sci* 162: 437-442.
- Çakmakçi R., Kantar, F., and Sahin, F. (2001) Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *J Plant Nutr Soil Sci* 164: 527-531.
- Çakmakçi, R., Dönmez, F., Aydın, A., and Şahin, F. (2006) Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol Biochem* 38: 1482-1487.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335-336.
- Caporaso J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., *et al.* (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 Suppl 1: 4516-4522.
- Cardinale, M., Ratering, S., Suarez, C., Montoya, A. M. Z., Geissler-Plaum, R., and Schnell, S. (2015). Paradox of plant growth promotion potential of rhizobacteria and their actual promotion effect on growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. *Microbiological research* 181: 22-32.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., and Vivanco, J. M. (2014) Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J* 8.4: 790-803.
- Chhetri, G., Kim, I., Kang, M., Kim, J., So, Y., and Seo, T. (2022) *Devosia rhizoryzae* sp. nov., and *Devosia oryziradicis* sp. nov., novel plant growth promoting members of the genus *Devosia*, isolated from the rhizosphere of rice plants. *J Microbiol* 60: 1-10.
- Choudhary, D. K., Kasotia, A., Jain, S., Vaishnav, A., Kumari, S., Sharma, K. P., *et al.* (2016) Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. *J Plant Growth Regul* 35: 276-300.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., *et al.* (2014)

- Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42: D633-D642.
- Compant, S., Clément C., and Sessitsch, A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42: 669-678.
- Coombs, J. T., Michelsen, P. P., and Franco, C. M. (2004) Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol Control* 29.3: 359-366.
- Dastogeer, K. M., Tumpa, F. H., Sultana, A., Akter, M. A., and Chakraborty, A. (2020) Plant microbiome-an account of the factors that shape community composition and diversity. *Curr Plant Biol* 23: 100161.
- de Boer, W., Wagenaar, A.M., Klein Gunnewiek, P.J., and van Veen, J.A. (2007) In vitro suppression of fungi caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 59: 177-185.
- Della Lucia, M. C., Bertoldo, G., Broccanello, C., Maretto, L., Ravi, S., Marinello, F., *et al.* (2021) Novel effects of leonardite-based applications on sugar beet. *Front. Plant Sci* 12: 646025.
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., *et al.* (2009) Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16428-16433.
- Dias, A. C., Costa, F. E., Andreote, F. D., Lacava, P. T., Teixeira, M. A., Assumpção, L. C., Araújo, W. L., Azevedo, J. L., and Melo, I. S. (2009) Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J Microbiol* 25: 189-195.
- Duca, D. R., and Glick, B. R. (2020) Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 8607-8619.
- Dunne, C., Moënne-Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D. N., and O'gara, F. (1998) Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. *Plant*

- Pathol* 47: 299-307.
- Doumbou, C. L., Hamby Salove, M. K., Crawford, D. L., and Beaulieu, C. (2001) *Actinomycetes*, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82: 85-102.
- Emmett, B. D., Buckley, D. H., and Drinkwater, L. E. (2020) Plant growth rate and nitrogen uptake shape rhizosphere bacterial community composition and activity in an agricultural field. *New Phytol* 225.2: 960-973.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FAOSTAT (2022) Available online at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data> (accessed June 24, 2022).
- Fierer, N., Bradford, M. A., and Jackson, R. B. (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88: 1354-1364.
- Francis, I. M., Jochimsen, K. N., de Vos, P., and van Bruggen, A. H. (2014) Reclassification of rhizosphere bacteria including strains causing corky root of lettuce and proposal of *Rhizorhapis suberifaciens* gen. nov., comb. nov., *Sphingobium mellinum* sp. nov., *Sphingobium xanthum* sp. nov. and *Rhizorhabdus argentea* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 1340-1350.
- 笛木伸彦. (2011) てん菜の適正施肥管理によるコスト削減. *北農* 78: 133-138.
- 藤田直聡、辻博之、有岡敏也. (2020) 稼働費用の比較から見たてん菜新技術の導入に必要な作業面積— ロボット 6 畦狭畦用短紙筒移植機および高効率大型 6 畦狭畦収穫機を対象に—. *農研機構研究報告* 3: 9-17.
- Garrido-Oter, R., Nakano, R. T., Dombrowski, N., Ma, K. W., Team, T. A., McHardy A. C., *et al.* (2018) Modular traits of the *Rhizobiales* root microbiota and their evolutionary relationship with symbiotic rhizobia. *Cell Host Microbe* 24: 155-167.
- Glick, B. R. (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol* 251.1: 1-7.
- Gupta, S., Meena, M. K., and Datta, S. (2014) Isolation, characterization of plant growth promoting bacteria from the plant *Chlorophytum borivilianum* and *in-vitro* screening for activity of nitrogen fixation, phosphate solubilization and IAA

- production. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 3: 1082-1090.
- Hattori, T., and Hattori, R. (2000) The plate count method. An attempt to delineate the bacterial life in the microhabitat of soil. *Soil Biol Biochem* 10: 271-302.
- Hattori, T., Mitsui, H., Haga, H., Wakao, N., Shikano, S., Gorlach, K., *et al.* (1997) Advances in soil microbial ecology and the biodiversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 21-28.
- Hara S, Matsuda M, and Minamisawa K. (2019) Growth stage-dependent bacterial communities in soybean plant tissues: *Methylobacterium* transiently dominated in the flowering stage of soybean shoot. *Microbes Environ* 34: 446-450.
- Harbison, A. B., Carson, M. A., Lamit, L. J., Basiliko, N., and Bräuer, S.L. (2016) A novel isolate and widespread abundance of the candidate alphaproteobacterial order (*Ellin 329*), in southern Appalachian peatlands. *FEMS Microbiol Lett* 363: fnw151.
- 平石明. (2016) 環境微生物の培養性とその生態学的意義. *日本微生物資源学会誌* 32.1: 1-11.
- 北海道農政部. (2011) 北海道のてん菜生産の現状について. *特産種苗* 12: 6-8.
- 北海道農産協会. (2021) てん菜糖業年鑑 2021 年版. 北海道農産協会: 137-245.
- 北海道立十勝農業試験場. (2004) てん菜直播栽培マニュアル 2004. 北海道てん菜協会
- Houlden, A., Timms-Wilson, T. M., Day, M. J., and Bailey, M. J. (2008) Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 193-201.
- Hudz, S. O., and Skivka, L. M. (2021) Formation of the eubacterial complex in the rhizosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*) under different fertilization systems. *Biotechnol Acta* 14: 81-86.
- 池田成志. (2016) 土壤微生物が創る共生の世界—その先端的研究事例と農業への応用的研究展開 5. 作物圏共生微生物の生態研究の現状と農業・食品産業への応用の可能性. *日本土壌肥科学雑誌* 87.5: 373-382.
- Ikeda, S., Kaneko, T., Okubo, T., Rallos, L. E., Eda, S., Mitsui, H., *et al.* (2009) Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. *Microb Ecol* 58: 703-714.

- Ikeda, S., Suzuki, K., Kawahara, M., Noshiro, M., and Takahashi, N. (2014) An assessment of urea-formaldehyde fertilizer on the diversity of bacterial communities in onion and sugar beet. *Microbes Environ* 29.2: 231-234.
- Ikeda, S., Watanabe, K., Minamisawa, K., and Ytow, N. (2004) Evaluation of soil DNA from arable land in Japan using a modified direct-extraction method. *Microbes Environ* 19: 301-309.
- 池谷聡. (2019) 近年のテンサイ品種における直播栽培適性についての考察. *てん菜研究会報* 60: 28-31.
- İnceoğlu, Ö., Salles, J. F., van Overbeek, L., and van Elsas, J. D. (2010) Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. *Appl Environ Microbiol* 76.11: 3675-3684.
- Innerebner, G., Knief, C., and Vorholt, J. A. (2011) Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Appl Environ Microbiol* 77.10: 3202-3210.
- Ishizawa, H., Kuroda, M., Morikawa, M., and Ike, M. (2017) Differential oxidative and antioxidative response of duckweed *Lemna minor* toward plant growth promoting/inhibiting bacteria. *Plant Physiol Biochem* 118: 667-673.
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., and Steinberg, C. (2007) Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biol Biochem* 39.1: 1-23.
- Jou, Y. T., Tarigan, E. J., Prayogo, C., Kobua, C. K., Weng, Y. T., and Wang, Y. M. (2022) Effects of *Sphingobium yanoikuyae* SJTF8 on rice (*Oryza sativa*) seed germination and root development. *Agriculture* 12.11: 1890.
- Kemp, P. F., and Aller, J. Y. (2004) Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiol Ecol* 47: 161-177.
- Kertesz, M. A., Fellows, E., and Schmalenberger, A. (2007) Rhizobacteria and plant sulfur supply. *Adv Appl Microbiol* 62: 235-268.
- Khorassani, R., Hettwer, U., Ratzinger, A., Steingrobe, B., Karlovsky, P., and

- Claassen, N. (2011) Citramalic acid and salicylic acid in sugar beet root exudates solubilize soil phosphorus. *BMC Plant Biol* 11.1: 1-8.
- Kim, S. J., Ahn, J. H., Weon, H. Y., Hong, S. B., Seok, S. J., Kim, J. S., and Kwon, S. W. (2015) *Niastella gongjuensis* sp. nov., isolated from greenhouse soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 3115-3118.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.
- 小谷野仁 (2012) α 多様性の測定と確率文字列の理論. *数理統計* 60.2: 26-278.
- Kumar, P., Dubey, R. C., and Maheshwari, D. K. (2012) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol Res* 167: 493-499.
- Kusstatscher, P., Cernava, T., Harms, K., Maier, J., Eigner, H., Berg, G., and Zachow, C. (2019) Disease incidence in sugar beet fields is correlated with microbial diversity and distinct biological markers. *Phytobiomes J* 3.1: 22-30.
- Li, F., Chen, L., Zhang, J., Yin, J., and Huang, S. (2017) Bacterial community structure after long-term organic and inorganic fertilization reveals important associations between soil nutrients and specific taxa involved in nutrient transformations. *Front Microbiol* 8: 187.
- Lilley, A. K., Fry, J. C., Bailey, M. J., and Day, M. J. (1996) Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). *FEMS Microbiol* 21.3: 231-242.
- Lozupone, C., Hamady, M., and Knight, R. (2006) UniFrac-an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinf* 7: 371.
- Lugtenberg, B., and Kamilova, F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 541-556.
- Luo, D., Langendries, S., Mendez, S. G., De Ryck, J., Liu, D., Beirinckx, S., *et al.* (2019) Plant growth promotion driven by a novel *Caulobacter* strain. *MPMI* 32.9: 1162-1174.
- Luo, Y., Wang, F., Huang, Y., Zhou, M., Gao, J., Yan, T., Sheng, H., and An, L. (2019)

- Sphingomonas* sp. Cra20 increases plant growth rate and alters rhizosphere microbial community structure of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Front Microbiol* 10: 1221.
- Magoc, T., and Salzberg, S. L. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27: 2957-2963.
- Mastný, J., Bárta, J., Kaštovská, E., and Pícek, T. (2020) Root exudate input stimulates peatland recalcitrant DOC decomposition by r-strategic taxa of *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidetes*.
- Masuda, S., Bao, Z., Okubo, T., Sasaki, K., Ikeda, S., Shinoda, R., *et al.* (2016) Sulfur fertilization changes the community structure of rice root-, and soil-associated bacteria. *Microbes Environ* 31: 70-75.
- 増岡弘晃、高安伶奈、木口悠也、関家紗愛、須田互. (2022) 腸内マイクロバイオーーム解析の最新手法. *腸内細菌学雑誌* 36.3: 149-158.
- Medina, D., Walke, J. B., Gajewski, Z., Becker, M. H., Swartwout, M. C., and Belden, L. K. (2017) Culture media and individual hosts affect the recovery of culturable bacterial diversity from amphibian skin. *Front Microbiol* 8: 1574.
- Meena, K. K., Bitla, U. M., Sorty, A. M., Singh, D. P., Gupta, V. K., Wakchaure, G. C., and Kumar, S. (2020) Mitigation of salinity stress in wheat seedlings due to the application of phytohormone-rich culture filtrate extract of methylotrophic actinobacterium *Nocardioides* sp. NIMMe6. *Front Microbiol* 11: 2091.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J.H., *et al.* (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332: 1097-1100.
- Menéndez, E., Pérez-Yépez, J., Hernández, M., Rodríguez-Pérez, A., Velázquez, E., and León-Barrios, M. (2020) Plant growth promotion abilities of phylogenetically diverse *Mesorhizobium* strains: effect in the root colonization and development of tomato seedlings. *Microorganisms* 8.3: 412.
- Minami, T., Anda, M., Mitsui, H., Sugawara, M., Kaneko, T., Sato, S., *et al.* (2016) Metagenomic analysis revealed methylamine and ureide utilization of soybean-associated *Methylobacterium*. *Microbes Environ* 31: 268-278.

- Mitsui, H., Gorlach, K., Lee, H. J., Hattori, R., and Hattori, T. (1997) Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. *J Microbiol Methods* 30.2: 103-110.
- Mitsui, H., and Hattori, T. (1997) Bacterial collections for studying soil bacterial community. *NEWSL ETTER* 6.
- 内藤繁男、神沢克一、杉本利哉. (1980) テンサイの紙筒移植と根腐病の発生との関係. *てん菜研究会報* 22: 18-24.
- Nakamura, Y., Ishibashi, M., Kamitani, Y. and Tsurumaru, H. (2020) Microbial community analysis of digested liquids exhibiting different methane production potential in methane fermentation of swine feces. *Appl Biochem Biotechnol* 191: 1140-1154.
- Natsagdorj, O., Sakamoto, H., Santiago, D. M. O., Santiago, C. D., Orikasa, Y., Okazaki, K., *et al.* (2019) *Variovorax* sp. has an optimum cell density to fully function as a plant growth promoter. *Microorganisms* 7(3), 82.
- Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., and Vangronsveld, J. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Sci Total Environ* 743: 140682.
- Okazaki, K., Iino, T., Kuroda, Y., Taguchi, K., Takahashi, H., Ohwada, T., *et al.* (2014) An assessment of the diversity of culturable bacteria from main root of sugar beet. *Microbes Environ* 29: 220-223.
- Okazaki, K., Tsurumaru, H., Hashimoto, M., Takahashi, H., Okubo, T., Ohwada, T., *et al.* (2021) Community analysis-based screening of plant growth-promoting bacteria for sugar beet. *Microbes Environ* 36: ME20137.
- Okubo, T., Ikeda, S., Kaneko, T., Eda, S., Mitsui, H., Sato, S., *et al.* (2009) Nodulation-dependent communities of culturable bacterial endophytes from stems of field-grown soybeans. *Microbes Environ* 24.3: 253-258.
- Okubo, T., Ikeda, S., Sasaki, K., Ohshima, K., Hattori, M., Sato, T., *et al.* (2014) Phylogeny and functions of bacterial communities associated with field-grown rice shoots. *Microbes Environ* 29: 329-332.
- Okubo, T., Ikeda, S., Yamashita, A., Terasawa, K., and Minamisawa, K. (2012)

- Pyrosequence read length of 16S rRNA gene affects phylogenetic assignment of plant-associated bacteria. *Microbes Environ* 27.2: 204-208.
- 大久保卓、池田成志、南澤究. (2016) 植物共生細菌群集を利用した持続的農業. 土と微生物 70.1: 10-16.
- O' Sullivan, D.J., and O' Gara, F. (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev* 56: 662-67.
- Page, R. D. (1996) Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics* 12: 357-358.
- Park, Y. G., Mun, B. G., Kang, S. M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C. W., *et al.* (2017) *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS One* 12: e0173203.
- Postma, J., and Schilder, M. T. (2015) Enhancement of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* in sugar beet by organic amendments. *Appl Soil Ecol* 94: 72-79.
- Quecine, M. C., Araújo, W. L., Rossetto, P. B., Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P. T., *et al.* (2012) Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Appl Environ Microbiol* 78: 7511-7518.
- Ramos, A. C., Melo, J., de Souza, S. B., Bertolazi, A. A., Silva, R. A., Rodrigues, W. P., *et al.* (2020) Inoculation with the endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* promotes growth, nutrient uptake and photosynthetic efficiency in rice. *Planta* 252: 1-8.
- Reasoner, D. J., and Geldreich, E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49.1: 1-7.
- Rilling, J. I., Acuña, J. J., Nannipieri, P., Cassan, F., Maruyama, F., and Jorquera, M. A. (2019) Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. *Soil Biol Biochem* 130: 205-219.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sakuma, F., Maeda, M., Takahashi, M., Hashizume, K., and Kondo, N. (2011) Suppression

- of common scab of potato caused by *Streptomyces turgidiscabies* using lopsided oat green manure. *Plant Dis* 95: 1124-1130.
- Santiago, C.D., Yagi, S., Ijima, M., Nashimoto, T., Sawada, M., Ikeda, S., *et al.* (2017). Bacterial compatibility in combined inoculations enhances the growth of potato seedlings. *Microbes Environ* 32: 14-17.
- Schmalenberger, A., Hodge, S., Bryant, A., Hawkesford, M. J., Singh, B. K., and Kertesz, M. A. (2008) The role of *Variovorax* and other *Comamonadaceae* in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes. *Environ* 10.6: 1486-1500.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., *et al.* (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537-7541.
- Singh, B., and Satyanarayana, T. (2011) Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiol Mol Biol Plants* 17: 93-103.
- Shi, S., Nuccio, E., Herman, D. J., Rijkers, R., Estera, K., Li, J., *et al.* (2015) Successional trajectories of rhizosphere bacterial communities over consecutive seasons. *MBio* 6.4 10-1128.
- Shi, Y., Lou, K., and Li, C. (2009) Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. *Biol Fertil Soils* 45: 645-653.
- Shi, Y., Lou, K., and Li, C. (2010) Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. *Photosynth Res* 105: 5-13.
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J., and Lou, K. (2014) Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 6375-6385.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., and Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* 67.10: 4742-4751.

- Someya, N., Kobayashi, Y. O., Tsuda, S., and Ikeda, S. (2013) Molecular characterization of the bacterial community in a potato phytosphere. *Microbes Environ* 28: 295-305.
- Tanaka, D., Isobe, J., Watahiki, M., Nagai, Y., Katsukawa, C., Kawahara, R., *et. al.* (2008) Genetic features of clinical isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. *J Clin Microbiol* 46.4: 1526-1529.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., and Aronsson, A. C. (2017) Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Front Plant Sci* 8: 49.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- 辻博之. (2018) 北海道畑作の大規模化における課題と今後の展望. *農作業研究* 53: 3-13.
- 鶴丸博人、橋本萌、池田成志、南澤究. (2013) 植物生育促進細菌の研究動向. *日本土壌肥料学雑誌* 84.5: 418-423.
- Tsurumaru, H., Okubo, T., Okazaki, K., Hashimoto, M., Kakizaki, K., Hanzawa, E., *et al.* (2015) Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet. *Microbes Environ* 30: 63-69.
- 内野浩克、渡辺英樹. (1998) テンサイ黒根病の発生推移と薬剤防除適期. *てん菜研究会報* 40: 85-91.
- Unno, Y., Shinano, T., Minamisawa, K., and Ikeda, S. (2015) Bacterial community shifts associated with high abundance of *Rhizobium* spp. in potato roots under macronutrient-deficient conditions. *Soil Biol Biochem* 80: 232-236.
- van der Voort, M., Kempenaar, M., van Driel, M., Raaijmakers, J. M., and Mendes, R. (2016) Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. *Ecol Lett* 19.4: 375-382.
- Vendan, R. T., Yu, Y. J., Lee, S. H., and Rhee, Y. H. (2010) Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *J Microbiol*

48: 559-565.

- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., and Kumar, A. (2013) Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecol Eng* 51: 282-286.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., and SkZ, A. (2016) Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 184: 13-24.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261-5267.
- Wawrik, B., Kerkhof, L., Zylstra, G. J., and Kukor, J. J. (2005) Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Appl Environ Microbiol* 71.5: 2232-2238.
- Weon, H. Y., Kim, B. Y., Yoo, S. H., Lee, S. Y., Kwon, S. W., Go, S. J., and Stackebrandt, E. (2006) *Niastella koreensis* gen. nov., sp. nov. and *Niastella yeongjuensis* sp. nov., novel members of the phylum *Bacteroidetes*, isolated from soil cultivated with Korean ginseng. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1777-1782.
- Wolfgang, A., Temme, N., Tilcher, R., and Berg, G. (2023) Understanding the sugar beet holobiont for sustainable agriculture. *Front Microbiol* 14: 1151052.
- Wolfgang, A., Zachow, C., Müller, H., Grand, A., Temme, N., Tilcher, R., and Berg, G. (2020) Understanding the impact of cultivar, seed origin, and substrate on bacterial diversity of the sugar beet rhizosphere and suppression of soil-borne pathogens. *Front. Plant Sci* 11: 560869.
- Wu, G. D., Lewis, J. D., Hoffmann, C., Chen, Y. Y., Knight, R., Bittinger, K., *et al.* (2010) Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC microbiol* 10: 206.
- Yeoh, Y. K., Paungfoo-Lonhienne, C., Dennis, P. G., Robinson, N., Ragan, M. A., Schmidt, S., *et al.* (2016) The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. *Environ Microbiol* 18: 1338-1351.

- Yin, C., Casa Vargas, J. M., Schlatter, D. C., Hagerty, C. H., Hulbert, S. H., and Paulitz, T. C. (2021) Rhizosphere community selection reveals bacteria associated with reduced root disease. *Microbiome* 9: 86.
- Yin, C., Hulbert, S. H., Schroeder, K. L., Mavrodi, O., Mavrodi, D., Dhingra, A., *et al.* (2013) Role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl Environ Microbiol* 79: 7428-7438.
- 吉村康弘、柳沢朗、大槌勝彦. (1991) 苗質の違いがテンサイの生育・収量に及ぼす影響について. *育種・作物学会北海道談話会会報* 31: 15.
- Zachow, C., Jahanshah, G., de Bruijn, I., Song, C., Ianni, F., Pataj, Z., *et al.* (2015) The novel lipopeptide poaeamide of the endophyte *Pseudomonas poae* RE* 1-1-14 is involved in pathogen suppression and root colonization. *MPMI* 28.7: 800-810.
- Zachow, C., Müller, H., Tilcher, R., and Berg, G. (2014) Differences between the rhizosphere microbiome of *Beta vulgaris* ssp. *maritima*-ancestor of all beet crops- and modern sugar beets. *Front Microbiol* 5: 415.
- Zhang, K., Wang, Y., Tang, Y., Dai, J., Zhang, L., An, H., *et al.* (2010) *Niastella populi* sp. nov., isolated from soil of Euphrates poplar (*Populus euphratica*) forest, and emended description of the genus *Niastella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 542-545.
- Zhang, L., Gao, J. S., Kim, S. G., Zhang, C. W., Jiang, J. Q., Ma, X. T., *et al.* (2016) *Novosphingobium oryzae* sp. nov., a potential plant-promoting endophytic bacterium isolated from rice roots. *Int J Syst Evol Microbiol* 66: 302-307.
- Zhang, Z., Zhang, Q., Cui, H., Li, Y., Xu, N., Lu, T., *et al.* (2022) Composition identification and functional verification of bacterial community in disease-suppressive soils by machine learning. *Environ Microbiol* doi:10.1111/1462-2920.15902.
- Zhou, N., Zhao, S., and Tian, C. Y. (2017) Effect of halotolerant rhizobacteria isolated from halophytes on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *FEMS Microbiol Lett* 364: fnx091.

謝辞

本論文を取りまとめるに際し、東北大学大学院生命科学研究科 南澤究 特任教授、佐藤修正 教授には、懇切丁寧なご指導と詳細なご高閲を賜りました。謹んで感謝を申し上げます。論文をご精読いただき、最終試験の副査を務めてくださいました東北大学大学院生命科学研究科 東谷篤志 教授、永田裕二 教授、並びに最終試験の審査員を務めてくださいました東北大学大学院生命科学研究科 日出間純 准教授、三井久幸 准教授に謹んで感謝を申し上げます。

農研機構北海道農業研究センター 池田成志 上席研究員からは、本研究の開始から丁寧なご指導をいただきました。本研究分野に関する新旧の知見や研究手法に留まらず、研究姿勢や考え方など、多くのことをご教授いただきました。また、本論文の執筆にあつては、丁寧なご高閲と貴重なご意見を数多くいただきました。本論文を取りまとめることができたのも、池田成志氏に依るところが非常に大きいと痛感しております。謹んで感謝申し上げます。

帯広畜産大学大学院畜産学研究科 大和田琢二 教授には、接種試験と有用細菌の根組織での局在性や生育促進関連因子の解析にご協力をいただくとともに、本研究の遂行にあたり有益なご助言をいただきました。鹿児島大学大学院農林水産学研究科 鶴丸博人 助教には、接種試験と遺伝子解析にご協力をいただくとともに、Qiime など、本研究の遂行に必要な解析手法や有益な知見を丁寧にご教授いただきました。また、本研究に関して多くのディスカッションをさせていただきました。元東北大学大学院生命科学研究科の大久保卓氏には、Mothur などのバイオインフォマティクスの解析手法をご教授いただきました。農研機構植物防疫研究部門 染谷信孝 上級研究員には、接種試験や遺伝子解析など、多くの実験方法をご教授いただきました。元片倉コープアグリ株式会社 野口勝憲氏、片倉コープアグリ株式会社 紀岡雄三氏、三星暢公氏には微生物資材開発に関する貴重な知見をご教授いただきました。十勝農業協同組合連合会 土田勝一氏には、圃場での接種試験や資材化試験にご協力をいただきました。山形県農業総合研究センター 浅野目謙之氏、鹿児島県農業開発総合センター 富濱毅氏、長崎県農林技術開発センター 森一幸氏、農研機構植物防疫研究部門 関口博之 上級研究員、野見山孝司 上級研究員には、有用細菌のテンサイ以外の作物への接種試験にご協力をいただきました。また、本研究の接種試験に供試したテンサイ品種「リッカ」の裸種子は、北海道糖業株式会社 根津隆次氏、妹尾吉晃氏、藤井寛氏に分譲していただきました。サンアグ

ロ株式会社の高橋直和氏、鈴木崇範氏には緩効性肥料に関する有益な情報をご教授いただきました。皆様に深く感謝申し上げます。

元北海道農業試験場てん菜育種研究室長 田中征勝氏、農林水産省技術会議事務局大潟直樹 研究調整官、農研機構西日本農業研究センター 高橋宙之氏 領域長補佐、農研機構中日本農業研究センター 田口和憲 上級研究員には、テンサイの栽培方法から試験方法、研究への取り組み方など幅広くご指導をいただくとともに、学位取得に向けて叱咤激励をいただきました。特に、高橋宙之氏と田口和憲氏とはテンサイの試験研究に多くの時間を共有し、たくさんのディスカッションをさせていただきました。皆様に厚く御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、北海道農業研究センター 黒田洋輔 上級研究員、松平洋明 主任研究員、成廣翼 研究員、農研機構野菜花き研究部門 上田重文 主席研究員には多大なご協力をいただきました。特に、黒田洋輔氏と松平洋明氏には、日ごろから研究の相談に乗っていただき、有益なご助言をいただきました。深くお礼申し上げます。

農研機構北海道管理部の柴田和洋氏、北海道技術支援センター北海道第3業務科技術専門員の阿部勝繁氏、佐藤義一氏、小川英明氏、高倉朋宏氏、森住淳氏、深谷貴志氏、小田嶋和之氏、杉沢良太氏、平尾隆幸氏、大泉正文氏、鈴木雄大氏には、圃場での栽培管理や調査など多大なご協力をいただきました。特に、小川英明氏、杉沢良太氏、大泉正文氏、鈴木雄大氏には研究以外の部分でも大変お世話になりました。皆様のお陰で楽しい研究生活を送ることができました。また、非常勤職員の吉野朱美氏、太田康子氏には、細菌単離やDNA実験に、高橋千鶴氏、佐々木真由美氏には材料の養成やサンプル調査などにご協力をいただきました。皆様にお礼を申し上げます。

最後に、陰から支えてくれた妻さやかと両親に心より感謝を申し上げます。