

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02191

研究課題名（和文）エンドファイトと土着微生物との共生系を利用すると安定して土壌病害を抑制できる

研究課題名（英文）Using a symbiotic system between endophytes and native microorganisms can stably suppress soil diseases.

研究代表者

成澤 才彦（Narisawa, Kazuhiko）

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90431650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：DSEの有効性を強化するDSE-バクテリア共生系を選抜した。さらに、育苗時にはDSEと親和性バクテリアの供接種が有効であることを明らかにした。DSEおよびその親和性バクテリアを供接種することで、植物の生育が有意に促進され、植物根部にフロボノイド等の代謝物質の産生を上昇させることが推定された。

苗根部は、*C. chaetospora*処理により、根圏の菌類叢に変化が生じた。また、育苗時には、Ccが*V. simplex*に比べ高い定着率を示したが、圃場では、むしろVsが高い値を維持した。また、両DSEで増える菌類やVsのみ、またはCcのみで増える菌類や細菌類が認められ、これらをリスト化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単独生物に注目するのではなく、植物-DSE-バクテリアを1つの系としてとらえ、その相互作用を明らかにし、利用することで、これまで圃場での効果が不安定であった有用微生物の利用技術にブレークスルーをもたらすことが出来る。さらに、我々が菌類として認識していた生物が、生態系では、いわば菌類とバクテリアの共生体として振る舞うという、これまでの菌類学の概念を覆し、新たな生物共生系の存在を示すことになる。

研究成果の概要（英文）：A DSE-bacteria symbiosis that enhances the effectiveness of DSE was selected. Furthermore, it was found that the inoculation of DSE and its compatible bacteria during seedling cultivation is effective. It was estimated that the inoculation of DSE and its compatible bacteria significantly promoted plant growth and increased the production of metabolic substances such as flavonoids in the plant roots.

In the seedling roots, the fungal flora in the rhizosphere was changed by treatment with *C. chaetospora*. Furthermore, during seedling cultivation, Cc showed a higher colonization rate than *V. simplex*, but in the field, Vs maintained a higher colonization rate. Fungi that grew with both DSEs, and fungi and bacteria that grew only with Vs or only with Cc were identified and listed.

研究分野：農学

キーワード：エンドファイト 土着微生物 共生 土壌病害防除

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高度経済成長期に始まった効率性を重視した生産システムは、農業分野においても、化学農薬や肥料に依存した農作物生産を普及させた。しかし、現在では、農薬や肥料の使用を削減し、有機質資源等を利用する、いわゆる環境保全型農業が求められている。元来、広い面積で限られた種の作物を栽培する農地は、自然生態系から見て、極めて特殊な環境である。病害虫の多くは宿主特異性があるため、一定の作物栽培を続けると、生態系のバランスが崩れ、ある特定種の病害虫だけの増殖を助長することになり、作物生産にダメージを与える。これらの問題を解決するにあたり、有用微生物は重要な役割を担っているが、自然生態系に比べ、作物生産においてその機能は十分に活用されていない。

土壌中には有用微生物ばかりで無く、病原微生物を含めた植物の生育にマイナスに働く微生物も多様に存在する。申請者らが着目するエンドファイト(DSE)は、単独でも、後述のように植物に対するプラスの効果が発揮されるが、近年、野外でも安定した効果を維持するためには、理想的な有用微生物ネットワークの構築が必要であることがわかってきた。

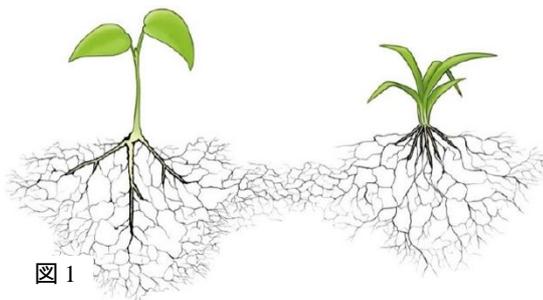


図 1

当研究グループでは、*Cladophialophora chaetospora* や *Veronaeopsis simplex* などの DSE の活用に注目し、これらを植物に定着させることで、植物に病害抑制など様々な機能が付加できることを明らかにしてきた(成澤,



図 2

2011)。図 1 のように、植物と DSE が 1 つの共生系(黒色糸状体は植物根ではなく、DSE の菌糸である)として成立すれば、DSE の効果で根の能力が高められ、窒素やリン等の養分吸収の促進、高温や酸性土壌などの環境ストレスに対する耐性が付与される(図 2 はポット試験でのイチゴ萎黄病の抑制成功例: A 対照区、B-D DSE 処理区)(Harsonowati, Narisawa, *et al.* 2020 *Frontiers in Microbiology*)。しかし、圃場で安定した効果を得るためには、DSE 単独の動態ばかりで無く、さらに植物の生育に有効な他の微生物との相互作用を解明する必要がある。

2. 研究の目的

単独生物に注目するのではなく、植物-DSE-バクテリアを 1 つの系としてとらえ、その相互作用を明らかにし、利用することで、これまで圃場で効果が不安定であった有用微生物の利用技術にブレークスルーをもたらすことを目的とする。さらに、我々が菌類として認識していた生物が、生態系では、いわば菌類とバクテリアの共生体として振る舞うという、これまでの菌類学の概念を覆し、新たな生物共生系の存在を示すことも目的とする。

3. 研究の方法

1. DSE-バクテリア間相互作用の解明と育苗への利用

特別な栄養要求や走化性を利用して選択的に分離する釣餌法を改変し、DSE に定着する有用バクテリアを獲得する。今までに、*A. pusense* などが DSE に対して親和性が高いことを明らかにしているが、親和性の高い他の種が存在する可能性は高い。そこで、本実験では、土壌病害抑制能を有する新規の菌類内外生バクテリアを選抜するために、バクテリアと相性の良い *V. simplex* を用いて様々な環境条件下から獲得する。その際、今までにバクテリア単独でも同病害に抑制効果を示している菌株も候補とする。

2. DSE-バクテリア共生系の共生および病害抑制機構の解析

DSEとその内外生バクテリアによる共生および病害抑制メカニズムを、主に植物側から明らか

にする。DSEとバクテリアによる共生機構を明らかにするため、バクテリアの有無に分けて時系列トランスクリプトーム解析を行い、共生効果の発揮と活性が関連する植物・菌の遺伝子群の同定を目指す。栄養吸収などの共生関連遺伝子群に加えて、防御関連応答に関連する植物遺伝子群の動態にも着目する。

3. 選抜した DSE-バクテリア共生系を利用した圃場での環境微生物叢の制御と病害抑制効果の検討

上述のように相性の良いバクテリアを選抜した DSE-バクテリア共生系を処理して育苗されたトマト苗を供試して、圃場での実証試験を行い、その効果を確認する。DSE が圃場レベルで土壌および植物根域圏の微生物群集に与える影響を DNA レベルで解析し、微生物叢・動態変化を経時的に追跡する。また、定植後、対照区との比較はもちろんであるが、発病抑制に成功した場合とそうでない場合を選定し、メタゲノム解析により、DSE-バクテリア共生系以外の土着の微生物叢の違いを明らかにし、植物の生育を支える微生物叢全体を把握する。

4. 研究成果

1. DSE-バクテリア間相互作用の解明と育苗への利用

今までに獲得されたDSE親和性バクテリアの利用方法を確立するため、DSE+バクテリア、および対照区で植物生育試験を行い、候補となっているバクテリアとDSEの組み合わせの中で、DSEの有効性を強化するDSE-バクテリア共生系を選抜した。なお、親和性バクテリアの接種時期に2条件、すなわち1) DSE接種1週間後に親和性バクテリアを接種、および2) DSEと同時接種を設定した。その結果、1)の条件では、植物生育に差は認められなかったが、2)の条件である供接種をすることで、対照区に比較して植物の生育が有意に促進され、育苗時にはDSEと親和性バクテリアの供接種が有効であることが示された。

2. DSE -バクテリア共生系の共生および病害抑制機構の解析

DSEの単独接種では、植物側が光合成に依存しないDSEを通じての養分吸収が行われていることが示された。また病害抵抗性に関わるメカニズムが活発に働いていた。一方、DSEおよびその親和性バクテリアを供接種することで、植物の生育が有意に促進された。DSEおよびその親和性バクテリアが植物根部にフロポノイド等の代謝物質の産生を上昇させることがその理由であることが推定された。また、ストレス条件下の*V. simplex* Y34接種区において、セスキテルペン合成に関する遺伝子が高発現していた。セスキテルペンはストレス耐性向上に関与していることが知られているため、*V. simplex* Y34によるストレス耐性付与のメカニズム解明に繋がると考えられた。

3. DSE-バクテリア共生系を利用した圃場での環境微生物叢の制御と病害抑制効果の検討

C. chaetospora および*V. simplex*を供試して、育苗した。この苗根部の微生物叢を解析したところ、対照区と比較して、*C. chaetospora*処理により、根圏の菌類叢に変化が生じた。また、育苗時には、CcがVsに比べ高い値を示したが、圃場では、むしろVsが高い値を維持した。また、DSE処理を行うことにより、特に根圏の微生物叢に影響があることが明らかになった。両DSEで増える菌類やVsのみ、またはCcのみで増える菌類や細菌類が認められ、これらをリスト化した。一方、DSE菌叢ディスクを接種した育苗培土で育成した3週齢トマト苗(ポンテローザ)へ青枯病菌(*Ralstonia pseudosolanacearum*)を灌注接種し、発病を調査した。その結果、対照区に比べてDSE区では、青枯病の発症が早まる傾向が認められた。根圏土壌のOTU構成を非計量多次元尺度構成法にて解析したところ、菌類叢はDSEが優占することによる影響が示された。特に、*Colletotrichum*属菌、*Plectosphaerella cucumerina*、*Acremonium nepalense*などは、DSE処理により増加し、一方、*Dipodascus geotrichum*、*Rousoella neopustulans*などは減少した。また、細菌叢でも菌類叢ほどではないが、*Enterobacteriaceae*など増加するグループも認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Bando Kei, Kushibe Ryoga, Kitaoka Naoki, Tamai Yutaka, Narisawa Kazuhiko, Matsuura Hideyuki	4. 巻 79
2. 論文標題 Isolation, structural elucidation, and biological activity of a novel isocoumarin from the dark septate endophytic fungus <i>Phialocephala fortinii</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Zeitschrift fur Naturforschung C	6. 最初と最後の頁 89 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/znc-2023-0139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sun Han, Nishizawa Tomoyasu, Ohta Hiroyuki, Narisawa Kazuhiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Dark septate endophytic fungi associated with pioneer grass inhabiting volcanic deposits and their functions in promoting plant growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biogeosciences	6. 最初と最後の頁 4737 ~ 4749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5194/bg-20-4737-2023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Innosensia Ni Luh Putu Citra, Suputra I Putu Wirya, Wirya Gusti Ngurah Alit Susanta, Narisawa Kazuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 First Report of Tripartite Symbiosis Potential among Soybean, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , and Dark Septate Endophytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 1788 ~ 1788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy13071788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 YanZhang, BixiaQin, LingXie, KazuhikoNarisawa, QianNong, LipingQin	4. 巻 170
2. 論文標題 The Dark Septate Endophyte, <i>Phialocephala fortinii</i> J2PC4, Mitigating Southern Rice Black-Streaked Dwarf Disease and Lethal to White Back Planthopper.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological Control	6. 最初と最後の頁 104911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biocontrol.2022.104911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Marian Malek, Takashima Yusuke, Harsonowati Wiwiek, Murota Haruhiko, Narisawa Kazuhiko	4. 巻 163
2. 論文標題 Biocontrol of Pythium root rot on lisianthus using a new dark septate endophytic fungus <i>Hyaloscypha variabilis</i> J1PC1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 97 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10658-022-02459-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Harsonowati Wiwiek, Masrukhin, Narisawa Kazuhiko	4. 巻 295
2. 論文標題 Prospecting the unpredicted potential traits of <i>Cladophialophora chaetospora</i> SK51 to alter photoperiodic flowering in strawberry, a perennial SD plant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 110835 ~ 110835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scienta.2021.110835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤佑飛、成澤才彦
2. 発表標題 ゴボウの土壌病害には種子由来の菌類が影響する！ - エンドファイトでの防除の取り組み -
3. 学会等名 日本有機農業学会 第24回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 穂積由樹、成澤才彦
2. 発表標題 農作物への重金属の蓄積をエンドファイトは制御できるのか？
3. 学会等名 日本有機農業学会 第24回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沼倉千紘, 野口愛, 浅木直美, 坂上伸生, 成澤才彦
2. 発表標題 茨城県におけるテンサイの生育と共生菌類の接種による耐暑性付与.
3. 学会等名 日本土壤微生物学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田翔央、成澤才彦
2. 発表標題 Cladophialophora sp.13nは乾燥ストレス条件下でトウモロコシの生育を促進する
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大好優華・助川歩乃佳・野口 愛・Wibawa IGKS・松浦江里・高田圭太・成澤才彦・坂上伸生
2. 発表標題 トマト苗への根部エンドファイトVeronaeopsis simplex接種が土壤化学性および植物体元素組成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田 真丈, 高嶋 尚哉, 野口 愛, 成澤 才彦, 坂上 伸生, 小松崎 将一
2. 発表標題 ロボット芝刈機と根部エンドファイトを利用したミニトマトの新しい不耕起草生・有機栽培技術の検討
3. 学会等名 第79回農業食料工学会(令和3年度)年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関根直人, 成澤才彦
2. 発表標題 Dark Septate Endophytesのイネ生育への影響について
3. 学会等名 日本有機農業学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂上 伸生 (Sakagami Nobuo) (00564709)	茨城大学・農学部・准教授 (12101)	
研究分担者	晝間 敬 (Hiruma Kei) (20714504)	東京大学・大学院総合文化研究科・准教授 (12601)	
研究分担者	清水 将文 (Shimizu Masafumi) (60378320)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------