

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19164

研究課題名（和文）エンドファイト - バクテリア共生系がイチゴの花芽形成を促進する

研究課題名（英文）Endophyte-bacterial symbiosis promotes flower bud formation in strawberry

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：2倍体野生種イチゴのランナー苗に対し、DSEを処理し、花芽非誘導条件下で栽培を行い、RNA抽出をした後時系列トランスクリプトーム解析を行った。その結果、細菌感染により発現が誘導されるWRKY41、リンの取り込みに関与するWRKY75がDSEによって根および茎頂で発現が誘導された。DSEの接種によりこれらの遺伝子が全身で発現し花成誘導に関与したことが示唆された。DSEおよびその親和性バクテリアをダイズに供接種することで、根粒の形成数およびダイズ苗の生育が促進された。DSEが植物根部にフラボノイド等の代謝物質の産生を上昇させることがその原因であることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、植物の環境応答やその仕組みに関する分子生理学的な研究が進んでいる。有用微生物であるDSEも植物に環境ストレス耐性を付与するなど様々な機能を付加できることが明らかになってきたが、DSEによる花芽形成誘導に関しては、本研究が初めてである。本研究による成果によって、高品質なイチゴ果実の周年収穫を可能とする持続的な栽培技術にもつながると考える。

研究成果の概要（英文）：Runner seedlings of diploid wild strawberry plants were treated with DSE and cultivated under non-flower-inducing conditions. RNA was extracted from strawberries and analyzed using time-series transcriptome. As a result, expression of WRKY41, a gene whose expression is induced by bacterial infection, and WRKY75, a gene involved in phosphorus uptake, was induced in the roots and shoot apex by DSE. It was suggested that these genes were expressed throughout the plant by inoculation with DSE and were involved in flower induction. Inoculation of soybean with DSE and its compatible bacteria promoted the number of nodules formed and the growth of soybean seedlings. It was presumed that this was due to increased production of metabolic substances such as flavonoids in the plant roots by inoculation with DSE.

研究分野：農学

キーワード：根部エンドファイト イチゴ 花芽誘導 菌類親和性バクテリア

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イチゴ栽培を含む、限られた作物種を栽培する農地は、自然生態系から見て、極めて特殊な環境である。限られた作物種の栽培を続けると、生態系のバランスが崩れ、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、農地では、その機能は十分に活用されていない。

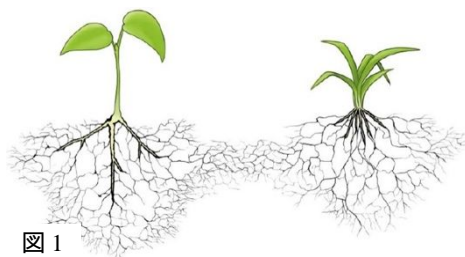


図1

申請者らは、*Cladophialophora chaetospora* などのエンドファイト(DSE)の活用に注目し、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。図1のように、植物とDSEが1つの共生系(黒色系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。その中で、今回の材料として、イチゴ萎黄病を抑制するDSE *C. chaetospora*S K51を選抜した(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、Dが*C. chaetospora*S K51)。



図2

申請者らは、*Cladophialophora chaetospora* などのエンドファイト(DSE)の活用に注目し、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。図1のように、植物とDSEが1つの共生系(黒色系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。その中で、今回の材料として、イチゴ萎黄病を抑制するDSE *C. chaetospora*S K51を選抜した(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、Dが*C. chaetospora*S K51)。

2. 研究の目的

一般に、イチゴの花芽形成には温度と日長が関係する。約15°C以下になると日長に関係なく花芽を形成し、15°C~25°Cでは、短日下でのみ花芽を形成する。また25°Cを越えると日長に関係なく花芽を形成しない。そのため、短日・低温条件を与えて花成誘導を行う夜冷短日処理や低温暗黒処理などの方法が普及している。

しかし、上述の、DSEを供試したイチゴの病害抑制試験において、DSEを接種したイチゴ苗に、驚くことに花芽および果実の形成誘導が認められた(図2、BおよびD処理区)。この際の栽培条件は、対照区のイチゴが十分に花芽を形成出来ない23°C一定の温度および16時間の長日条件であった。

そこで、本提案では、『有用微生物であるDSEがイチゴの花芽形成を誘導する』この新知見を1)植物側から遺伝子レベルで解析・確認し、さらに同効果を向上・安定させ圃場での持続可能な生産につなげる為、2)他の微生物との相互作用を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1. DSEによるイチゴ花芽形成促進機構の解析

DSEによる花芽形成促進のメカニズムを植物側から明らかにする。時系列トランスクリプトーム解析を行い、DSEによって発現が変動する花芽形成関連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、花芽形成に関連する植物遺伝子群の動態に着目する。得られた植物側候補遺伝子群に関しては、研究分担者の黒倉が有するイチゴ組換え体などを利用することで、その役割を実証する。仮に、これまでに他の相互作用系で報告されていた植物因子が重要因子として同定された場合でも、DSE-イチゴ共生系そのものがユニークであり、かつ、これまで同共生系を支える植物の分子基盤については明らかになっておらず、得られた分子知見は基礎研究の観点からも十分インパクトがある。

また、花芽形成に不適な条件、例えば25°C以上の温度等の環境下での試験も行い、促進効果の限界条件を明らかにする。さらに、イチゴは低窒素条件でも花芽形成が促進されるため、DSE処理によるイチゴ体内への窒素含量低減効果も確認する。

2. DSE-バクテリア間相互作用の解明と育苗への利用

DSE単独でもイチゴに対して花芽を誘導することが明らかとなったが、さらに圃場レベルでの実用化を見据え、菌類の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菌糸圏に定着する有用バクテリアを獲得する。今までに*Agrobacterium 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、他にも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、イチゴの生育や花芽形成を促進する新規の菌類内外生バクテリアを選抜し、DSEの有効性を強化するDSE-バクテリア共生系を構築し、同効果の促進と安定化をはかる。なお、本実験は1と連動して行ない、同共生系の効果を確認する。

3. DSEを利用した環境微生物叢の制御と花芽誘導の有効性の検討

DSEを処理して育苗されたイチゴ苗(図3工程1,2)を供試して、圃場レベルでの栽培試験を行い、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、

花芽誘導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以外の土着の微生物叢の違いを明らかにし、イチゴの花芽形成に参与する微生物叢全体を把握する(図3工程3)。なお、本実験は2と連動して行う。

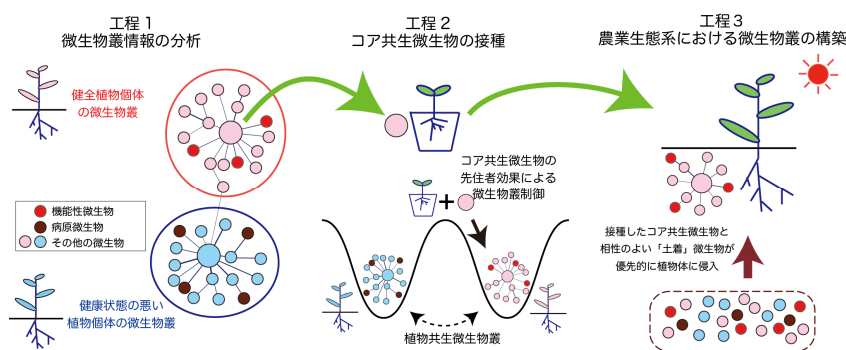


図3. 花芽誘導に最適なコア DSE を含む植物-DSE-バクテリア共生ネットワーク構築の方法

工程1: 微生物叢情報の分析, 上部が健全植物, 工程2: コア微生物接種植物の育苗, 工程3: 接種したコア微生物に有用な土着微生物の選択 (Toju, Narisawa, et al. 2018 *Nature Plants* 説明資料より引用)

4. 研究成果

1. DSEによるイチゴ花芽形成促進機構の解析

長日条件下におかれたDSE無施用の個体は花成が見られなかったのに対し、DSEを施用した個体では試験開始後約19週間で開花が認められた。以上より、イチゴモデル植物である2倍体野生種イチゴ *Fragaria vesca* におけるDSEによる花芽非誘導条件下における花成促進効果を確認した。一方で生育パラメータのうち、発生したランナーの本数にはDSEの施用による効果が認められ、DSEによってランナー発生が促進されることが明らかとなった。

根の時系列トランスクリプトーム解析によりDSEの施用特異的に発現が変動する遺伝子群(および変動が見られない遺伝子群)の配列が明らかとなった。花成を直接的に制御していることが知られている遺伝子群(*FvTFL1*, *FvSOC1*, *FvAGL14*)の発現変動は認められなかった。一方、*WRKY41*, *WRKY75* のホモログはDSEによって根および茎頂での発現が誘導されることが明らかとなった。詳細は不明であるものの、DSEの接種によりこれらの遺伝子が全身で発現し花成誘導に参与した可能性が示唆された。

2. DSE-バクテリア間相互作用の解明と育苗への利用

DSEおよびその親和性バクテリアを接種することで、対照区に比較して根粒の形成数およびダイズ苗の生育が有意に促進された。根粒は、数ばかりで無く大きさにも違いが認められた。また、そのメカニズムを植物側の遺伝子解析より解明したところ、この手法により、根粒形成および生育を促進するのは、DSEが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メカニズムであることが推定された。

3. DSEを利用した環境微生物叢の制御と花芽誘導の有効性の検討

定植後、破壊調査を行った結果、DSE処理区の乾物重は対照区に比べて有意に大きかった。また、平均出蕾日は、DSE処理区が対照区に比較して約2週間開花が早かった。以上のことからDSEの接種は種子繁殖性イチゴの開花・収穫日を前進化できる可能性が示唆された。

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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

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, Bradyrhizobium japonicum, 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 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 YanZhang, BixiaQin, LingXie, KazuhikoNarisawa, QianNong, LipingQin	4. 巻 170
2. 論文標題 The Dark Septate Endophyte, Phialocephala fortiniiJ2PC4, 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 該当する

〔学会発表〕 計5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 Haoyue Lu, Kazuhiko Narisawa
2. 発表標題 Screening of root endophytes to promote maize growth under stress conditions.
3. 学会等名 日本土壌微生物学会 2022年度大会
4. 発表年 2022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 日本土壌微生物学会 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

〔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	黒倉 健 (Kurokura Takeshi) (10650898)	宇都宮大学・農学部・准教授 (12201)	
研究 分担者	西澤 智康 (Nishizawa Tomoyasu) (40722111)	茨城大学・農学部・教授 (12101)	

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
---------	---------