

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380190

研究課題名(和文)植物-エンドファイト-内生バクテリア共生系を利用した新たな環境浄化技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of new environmental clean-up technique by used the plant-fungi-bacteria symbiosis

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) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス環境下で植物の生育を促進するDSEの選抜と内生バクテリアの相互作用を解明するため、*Veronaeopsis simplex*を選抜した。本DSEには培養可能な複数種のバクテリアが関係していた。宿主植物の生育促進には植物ホルモン様物質が関わっており、この物質は主にバクテリアから生産されることが示唆された。また、宿主への高温耐性の付与にも主にバクテリアが関与していることが示された。

また、ハクサイあるいはトマトへDSEを処理しCdおよびCs汚染浄化効果を検討した。その結果、ハクサイでは、Cs吸収が約2倍に促進されたが、同接種トマトでは、逆に約70%抑制された。

研究成果の概要(英文)：We selected a species of the dark septate endophytic fungus (DSE), *Veronaeopsis simplex*, which promotes the growth of host plant even under the stressed conditions. Interestingly, the presence of bacterial communities living outside and inside mycelium of the fungus was revealed. We showed that the DSE has a complex interaction with associated bacteria involving host plant playing a role in growth promotion and environmental stress tolerance.

With regards to the Cs accumulation, it varied with the host plant considered. In Chinese cabbage, the DSE inoculation caused higher Cs accumulation in above ground plant parts, whereas in tomato, Cs accumulation decreased significantly with the isolate tested, suggesting low-risk transfer on the food chain as a result of high and negative plant reactions rather than high and positive reactions as it is the case with Chinese cabbage.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：共生 エンドファイト 菌類内生バクテリア 環境浄化

1. 研究開始当初の背景

平成23年2月に改正される食品衛生法では「米に含有されるカドミウム及びその化合物の玄米及び精米中に含まれるCdの濃度基準が従来の1ppmから0.4 ppm」へ変更される。それに伴い「農用地土壌汚染防止法」に基づく土壌汚染対策地域の指定要件の見直しなど、米に含有されるカドミウムの低減に係る施策の改正等も予定されている。一方、旧基準でも、現在までに、96 地域・6,945 ha で基準値以上のCdが検出され、63 地域・6,428 ha が農用地土壌汚染対策地域に指定されている。約90%の地域で対策済とされているが、汚染地域の分布は日本全国に及んでいる。今後の基準変更に伴い、更なる対策地域の増加が予想される。今までは、多くの地域で、土木工学的手法である客土が行われ、また最近では、理化学的手法である科学洗浄の新しい技術も報告された。しかし両法とも、農地の土壌環境を大きく変えてしまうことやコストがかかることなどの理由から、環境負荷が少なく、低コストである浄化植物を利用したファイトレメディエーション技術が注目されている。

2. 研究の目的

水田土壌に含まれる Cd 濃度を減少させるため、従来のファイトレメディエーションの問題点(根部バイオマス量が不十分、不溶化Cdの吸収が不可等)を植物-エンドファイト-内生バクテリア 3 者共生系を利用して改善する。まず、過剰な土壌水分、酸性および低温等の環境ストレス下でも、宿主生育を促進する DSE 菌株を選抜する。次に DSE 内生バクテリアによる Cd 酸化・還元能力等を検討し、吸収メカニズムの違いで最適な宿主を選び、新たなバイオレメディエーション技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

オリジナル DSE 菌株を供試して、ストレス環境下でも宿主の生育を促進する菌株を選抜する。さらに qPCR/T-RFLP により選抜した菌株の生態を明らかにし、Cd 汚染土壌浄化でキーとなる DSE 種を特定する。次に DSE と内生するバクテリアとの相互作用を解明し、さらに有用バクテリアを人工的に内生させる技術を確認する。最後に Cd 耐性メカニズムの違いにより、DSE-内生バクテリア共生体を処理する植物の選抜を行う。

4. 研究成果

(1) ストレス環境下で植物の生育を促進する DSE の選抜とその生態解明

供試植物として Cd 吸収能に優れ、温暖な地域から寒冷な地域まで栽培が可能な植物であるスイートソルガムとナタネを選抜した。まず、実験室内で、両植物の地上部バイオマスを増加させる菌株の選抜試験を行った結果、

鹿児島県屋久島(亜熱帯)森林起源 *Veronaeopsis simplex*、茨城県阿見町(温帯)森林起源 *Helminthosporium velutinum*、及びカナダアルバータ州(亜寒帯)森林起源 *Phialophora fortinii* の3種を宿主の生育を促進する根部エンドファイトとして選抜した。また、異なる温度条件での宿主への根部エンドファイト接種試験では、13°Cでは *P. fortinii*、23°Cでは *V. simplex* の接種が最も高い生育促進効果を示し、接種菌株の生育至適温度に対応していた。

その中で、*V. simplex*を選抜しバクテリア間相互作用の解明を行った。本エンドファイトには培養可能な *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Delftia* および *Rhizobium* 属等複数種のバクテリアが関係していた。そこで、エンドファイトに外生するこれらバクテリアを物理的な手法で取り除いた菌株を作成し、実験に供試した。その結果、宿主植物であるハクサイの生育促進には植物ホルモン様物質が関わっており、この物質は主に外生しているバクテリアから生産されることが示唆された。また、ハクサイへの高温耐性の付与にも主に外生バクテリアが関与していることが示された。

(2) 植物 - DSE-内生バクテリア共生体によるCd汚染浄化効果の検討と利用法開発

日本国内でCd汚染の多くが認められる水田は低酸素環境である。そのため、好気的環境を好むDSE利用に問題が生じることが予想される。そこで、低酸素環境である養液栽培系を用いて上述のDSE、*V. simplex*をスイートソルガムに接種したところその生育を促進することが認められた。この生育促進は、植物が根圏に分泌するアミノ酸を利用し、同エンドファイトがIAAを分泌するメカニズムが働いていることが示唆された。さらに同条件でも金属の吸収量が対照区と比較して約2倍増加していることが認められた。

選抜された“DSE-内生バクテリア共生体”を宿主植物に処理して、CdやCs汚染の浄化能力を検討したところ、供試したDSEは菌体単独でもCdを吸収することが明らかとなり、特に *V. simplex* のCd吸収率が最も高かった。スイートソルガムへの接種試験においても、*V. simplex* 接種区で栽培溶液のCd濃度の有意な減少がみられ、植物体のCd吸収量も *V. simplex* 接種区が最も多かった。この *V. simplex* 接種スイートソルガムは、対照区の約1.5-2.7倍のCd吸収効果があった。さらに、これらDSEは単独でもCsを取り込むことも確認された。スイートソルガムへの接種試験においては、1個体当たりのCs吸収量は、全ての接種区で有意に増加し、特に *P. fortinii* 接種区で多く蓄積していた。最も効果のあった *P. fortinii* 接種区

イトソルガムは、対照区の約13倍のCs吸収効果があった。

また、植物 - DSE-内生バクテリア共生体が十分なバイオマスを示せば、メカニズムがCs吸収促進か抑制かを明らかにし、浄化植物としてアブラナ科植物であるハクサイ（促進）あるいはトマトなどの農作物（抑制）へ処理し効果を確認した。その結果、供試した全てのDSEがハクサイとトマトの生育を82-122%促進した。一方、Cs吸収に関しは、宿主植物とDSEの組み合わせで結果が異なった。特に、*V. simplex* 接種ハクサイでは、Cs吸収が約2倍に促進されたが、同接種トマトでは、逆に約70%抑制された。今回、DSEをトマトに接種することで、Cs吸収が抑制されることが初めて明らかとなった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計5件)

Lahlali R, McGregor L, Song T, Gossen BD, Narisawa K, and Peng G. *Heteroconium chaetospora* Induces Resistance to Clubroot via Upregulation of Host Genes Involved in Jasmonic Acid, Ethylene, and Auxin Biosynthesis. PLoS ONE 9(4): e94144. doi:10.1371/journal.pone.0094144 :2014. 査読有

Rida O. Khastini, T. Ogawara, Y. Sato and Narisawa K. Control of Fusarium wilt in melon by the fungal endophyte, *Cadophora* sp. Eur J Plant Pathol 139: 333-342, 2014. DOI 10.1007/s10658-014-0389-6: 2014. 査読有

Rola S. Mahmoud and Narisawa, K, A new fungal endophyte, *Scolecobasidium humicola*, promoting growth of tomato under organic nitrogen conditions. PLoS ONE 8(11): e78746. doi:10.1371/journal.pone.0078746: 2013. 査読有

Diene, O., Wang, W. T. and Narisawa, K, *Pseudosigmoidea ibarakiensis* sp. nov., a Dark Septate Endophytic Fungus from a Cedar Forest in Ibaraki, Japan. Microbes and Environments 28: 381-387, 2013. DOI: 10.1264/jsme2.ME13002 査読有

Rida O. Khastini, H. Ohta and Narisawa K. The role of a dark septate endophytic fungus, *Veronaeopsis simplex* Y34, in Fusarium disease suppression in Chinese cabbage. THE JOURNAL OF MICROBIOLOGY Volume 50, Number 4, 618-624, DOI: 10.1007/s12275-012-2105-6.: 2012. 査読有

〔学会発表〕(計17件)

山本翔也、小松崎佑樹、塩津文隆、成澤才

彦 スイトソルガム連作障害の原因解明と *Veronaeopsis simplex* Y34 を利用した同病害抑制について 第29回日本微生物生態学会大会 鹿児島大学 2013年

寺田晴菜, 成澤才彦 根部エンドファイト *Veronaeopsis simplex* Y34 による高温条件下でのトマトの生育促進及び萎凋病の抑制 第29回日本微生物生態学会大会 鹿児島大学 2013年

松岡 勇人, 菊池 聖永, 畑 明李, 成澤才彦 根部エンドファイト *Phialocephala fortinii* を用いたアスパラガス育苗法の有効性 第29回日本微生物生態学会大会 鹿児島大学 2013年

Erika Usui, Kazuhiko Narisawa The fungal endophytes *Cladophialophora* sp. and *Phialocephala helvetica* which promote growth of tomato plant under salinity stressed conditions. International Society for Environmental Biogeochemistry, Huazhong Agricultural University, China 2013

Saki Shingaki, Kazuhiko Narisawa Selection of Dark-septate endophytic (DSE) fungus associate with the roots of *Spiranthes sinensis*. 31st New Phytologist Symposium Orchid Symbiosis. University of Calabria, Italy 2013

白井絵里香, 成澤才彦 ピーマンへ耐塩性付与効果を示す根部エンドファイト 2種 *Phialocephala helvetica* および *Cladophialophora* sp. について 日本菌学会第56回大会 岐阜大学 2012年

高島勇介, 成澤才彦 *Cunninghamella elegans* に内生する *Burkholderia* 属細菌について 日本菌学会第56回大会 岐阜大学 2012年

親泊貴志, 高島勇介, 成澤才彦 *Mortierella* 属菌の保有する内生細菌の地理的分布について 日本菌学会第56回大会 岐阜大学 2012年

小松崎佑樹, 成澤才彦 低酸素条件における根部エンドファイト *Veronaeopsis simplex* Y34 株の植物生育促進効果 第28回日本微生物生態学会大会 豊橋技術科学大学 2012年

皆川源一郎, 成澤才彦 Colonization by the root endophytic fungus *Camposporium indicum* within roots of *Rhododendron mucronatum* 第28回日本微生物生態学会大会 豊橋技術科学大学 2012年

Rida Khastini, Yoshinori. Sato, Hiroyuki Ohta, Kazuhiko Narisawa Change in the community of associated bacteria with *Veronaeopsis simplex* in the response of high temperature stress 第27回日本微生物生態学会大会 2011年

Rola sameer Mahmoud, Kazuhiko Narisawa Assessment of bacterial and fungal community structures in infected and

non-infected field soil with *Fusarium oxysporum* 第 27 回日本微生物生態学会大会 京都大学 2011 年

小松崎 佑樹、ワン・ウェイ、成澤 才彦 低酸素条件での利用に向けた DSE の獲得と選抜の試み 第 27 回日本微生物生態学会大会 京都大学 2011 年

臼井 絵里香、成澤 才彦 植物に塩類耐性を付与する Dark-septate endophytic fungi (DSE) の選抜 第 27 回日本微生物生態学会大会 京都大学 2011 年

皆川源一郎、成澤 才彦 冷温帯落葉広葉樹林に生息するスギゴケからの菌類エンドファイトの分離と選抜 第 27 回日本微生物生態学会大会 京都大学 2011 年

高島勇介、佐藤嘉則、東條元昭、成澤才彦 *Pythium aphanidermatum* 及び *P. nunn* に内生する細菌様構造物の検出 第 27 回日本微生物生態学会大会 京都大学 2011 年

Rida O. Khastini, Kazuhiko Narisawa, Hiroyuki Ohta Assessment of *Veronaepsis simplex* in plant growth promotion and Fusarium disease suppression on Chinese cabbage *in vitro*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Sapporo Japan, 2011

〔図書〕(計 4 件)

太田寛行、成澤才彦 土・植物・動物のつながりを探る科学 「農学入門」-食料・生命・環境科学の魅力- 養賢堂 81-101, 2013年

成澤才彦 「エンドファイトの働きと使い方」農文協 1-117, 2011年

Narisawa, K., and Diene, O. Isolation and selection of fungal endophytes for the suppression of soil-borne diseases, *In: A. M. Pirttilä and S. Sorvari (Ed.), Prospects and Applications for Plant-Associated Microbes: A laboratory Manual*. BioBien Innovations, Paimio, Finland. p. 127-130. 2011.

Narisawa, K., and Diene, O. Evaluation of fungal endophytes for the control of plant diseases, *In: A. M. Pirttilä and S. Sorvari (Eds.), Prospects and Applications for Plant-Associated Microbes: A laboratory Manual*. BioBien Innovations, Paimio, Finland. p. 257-259. 2011.

〔その他〕

ホームページ等

<http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/webse-arch/index.htm>

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

太田 寛行 (OHTA HIROYUKI)

茨城大学農学部 教授

研究者番号 : 80168947