

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14666

研究課題名(和文)植物病原糸状菌を休眠させる細菌のメカニズム解析

研究課題名(英文)Fungistatic activity of bacteria isolated from a novel hydroponics system

研究代表者

飯田 祐一郎(Iida, Yuichiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・野菜病虫害・機能解析研究領域・主任  
研究員

研究者番号：00456609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新たな養液栽培システムである有機質肥料活用型養液栽培は、有機質肥料を炭素源に水中で土壌細菌を培養し、硝酸態窒素へと分解させることで、栽培中の植物に窒素源を供給する栽培方法である。また地下部病害に対する高い防除効果を示す。栽培期間中、植物病原菌は有機質養液内から検出されるが、植物は全く病徴を示さない。しかしながら、養液内から病原菌のみを分離すると、植物に対する病原性は維持されていることが明らかとなった。この病原菌の休眠(静菌)作用には、養液内の細菌との直接的な接触が重要である。そこで、有機質養液での休眠作用に関わる細菌の探索・単離によって、病原菌の抑制メカニズムの解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：Multiple parallel mineralization (MPM) is a novel hydroponics system in which soil microorganisms mineralize organic fertilizers in a hydroponic solution, supplying nitrate nitrogen to plants. The MPM solution exhibits operative suppressiveness of both fungal and bacterial root-borne diseases, similar to natural disease-suppressive soils. The microbial community is able to inhibit mycelial growth and chlamydospore germination of plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*, but does not eliminate the pathogen (showing fungistatic activity). In this study, we investigated which members of the MPM microbiota contribute to root disease suppression, and analyzed the mechanisms for its fungistatic activity.

研究分野：植物病理学

キーワード：有機質肥料活用型養液栽培 *Fusarium oxysporum*

### 1. 研究開始当初の背景

新たな養液栽培システムである有機質肥料活用型養液栽培（以下、有機質養液栽培と省略）は、有機質肥料を炭素源に水中で土壌細菌を培養し、硝酸態窒素へと分解させることで栽培中の植物に窒素源を供給する栽培方法である。一般に、無機肥料を用いた慣行型の養液栽培（無機養液栽培）では、養液内へ微生物や有機物の混入があると植物根は腐敗する。一方、有機質養液栽培では、有機物と硝化菌などの多様な細菌群が共存し、植物 - 微生物間の生態系を構築している<sup>1,2</sup>。また本システムで栽培されたいずれの植物においても地下部病害の発生は報告されておらず、糸状菌病だけでなく細菌病にも全く病徴を示さない<sup>3,4</sup>。この病害に対する高い防除効果についても、養液中の微生物叢が関与している。

レタス根腐病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*) を無機養液栽培のレタスに接種すると全ての苗が枯死するが、有機質養液栽培では全く病徴を示さない。病原菌は有機質養液内でほとんど細胞増殖することができないが、駆逐されることなく生存し続けることが明らかとなっている (図 1A)。養液内から *F. oxysporum* を分離すると、通常の細胞増殖とレタスへの病原性を示すことから、病原菌自体が増殖能力や病原性を失っているわけではない<sup>4</sup>。有機質養液のみでも同様の現象が認められる。一般的な無機養液中では *F. oxysporum* は増殖することができるが、有機質養液ではほとんど増殖しない (図 1B)。この増殖抑制効果は、有機質養液の上清にはなく、また有機質養液の滅菌によっても失われる。一方、有機質養液内の細菌群を回収し、同量の無機養液に懸濁した場合には *F. oxysporum* の病原性や増殖の抑制 (図 1B)、厚膜胞子の形成など、有機質養液内と全く同じ現象が認められる。以上の結果から、有機質養液内に生息する細菌群が、*F. oxysporum* の病原性と細胞増殖を抑制し、休眠 (静菌) 状態に陥れていると考えられる。

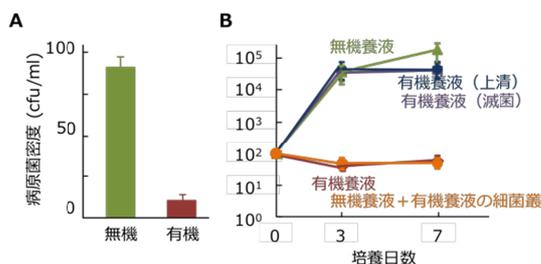


図 1. 病原菌は有機質養液中の微生物によって休眠し、宿主植物に感染できない。

(A) 植物栽培中の養液に病原菌を接種し、10 日後の養液内の病原菌密度。発病しない有機質養液内でも病原菌は生存している。

(B) 有機質養液における病原菌の *in vitro* 増殖抑制効果。有機質養液内の細菌叢を無

機養液に添加すると、有機質養液と同様に病原菌の増殖を抑制する。(引用文献 4 の図を改変)

### 2. 研究の目的

有機質養液は土壌細菌の集積培養によって作製されるため<sup>1,2</sup>、養液中の現象は一般土壌中でも起こりうる現象であり、普遍的な病原糸状菌の休眠 (静菌) 作用の解明につながる。また糸状菌を抑制する細菌の同定とそのメカニズムの解明は、新たな病原菌抑制技術の開発にも寄与する。また有機質養液栽培は既に実用化されている栽培技術であるため、防除効果の機作解明は農業現場へフィードバックされ、さらなる栽培技術の改良につながることを期待される。本研究では、有機質養液栽培における地下部病害に対する防除効果の解明を最終目的として、植物病原糸状菌 *F. oxysporum* の休眠作用に関わる細菌を探索し、病原性および増殖の抑制メカニズムを解析することで、養液内のどの細菌が、どの組み合わせで、どのように病原菌を休眠させるかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 有機質養液からの休眠作用に関わる細菌の分離

異なる細菌用培地を用いて有機質養液より細菌を分離する。単独または複数の菌株の組み合わせによって無機養液内の *F. oxysporum* に対する増殖抑制を検証する。また分離細菌を接種した植物体での *F. oxysporum* の感染の有無を検定する。有機質養液あるいは分離細菌を懸濁した無機養液を用いて、*F. oxysporum* の菌体表面における相互作用を顕微鏡観察する。*F. oxysporum* に恒常的に発現する GFP 遺伝子を形質転換系によって導入し、養液内における糸状菌 - 細菌相互作用を蛍光顕微鏡を用いて解析する。

(2) *F. oxysporum* の休眠作用に関わる細菌因子の探索

分離した細菌の中で *F. oxysporum* に対する増殖抑制効果が最も高い菌株について、近縁種のゲノムをリファレンス配列として、分離細菌の全ゲノムシーケンスを行う。また分離細菌について、トランスポゾンを用いた突然変異体を作成する。GFP を発現する *F. oxysporum* に対して、96 ウェルプレート等を用いて無機養液内で分離細菌の変異体と共培養を行い、*F. oxysporum* の増殖を検定することで、効率的に細菌変異体を選抜する。*F. oxysporum* の増殖を許す変異体について、変異遺伝子を細菌ゲノム情報等を用いて特定し、休眠作用に関わる細菌因子の同定を目指す。

### 4. 研究成果

### (1)有機質養液からの休眠作用に関わる細菌の分離

希釈した有機質養液を細菌用培地で培養し、コロニーの形状等が異なる42株を分離した。有機質養液を作製する際の集積培養は常温で行うことから、これら細菌の培養温度も常温とした。分離した42株のうち、液体培地による振盪培養で増殖効率がよく、菌体の回収が容易な13株に絞って以後の研究を推進した。また16s rDNAの配列情報を基に、各細菌株を同定した(図2)。有機質養液内は多様な細菌種が共存していることから、はじめに全ての細菌株を等濃度で混合し、*F. oxysporum* 病原菌の*in vitro*における増殖を測定した。その結果、有機質養液内と同様に顕著な増殖抑制が認められた。次に、液体培地での増殖スピードによって13株を、7株と6株のグループに分けたところ、7株の混合においてのみ*F. oxysporum*の増殖が抑制された。しかしながら、それぞれ単独での処理では抑制効果を示さなかったことから、有機質養液内の病原系細菌は、複合的な細菌種の組み合わせによる創発的な効果によって増殖が抑制されていることが明らかとなった(図2)。

これら7株は単独では効果を発揮できないことから、さらに有用な細菌種を絞り込むために、2株ずつの混合によって*F. oxysporum*の増殖抑制を検証した。その結果、20通りの組み合わせのうち、有機質養液と同様の病原菌の休眠作用を示した5通りの細菌種が明らかとなった(図2)。興味深いことに、その組み合わせは *Kaistia* 属菌 - *Bosea* 属菌、*Kaistia* 属菌 - *Ancylobacter* 属菌、*Bosea* 属菌 - *Cupriavidus* 属菌、*Bosea* 属菌 - *Sphingopyxis* 属菌、*Ancylobacter* 属菌 - *Brevibacillus* 属菌と、それぞれ全く異なっていた。次に、検定植物としてシロイヌナズナを、病原菌としてキャベツ萎黄病菌(*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*)を用いて、単独および2株の組み合わせの分離細菌の防除効果を解析した。その結果、*in vitro*で*F. oxysporum*の増殖を抑制した5通りの組み合わせにおいてのみ、発病抑止効果が認められた。

一方、*in vitro*での混合処理で効果が認められなかった6株についても、単独での処理を行ったところ、*Rhizobium* 属菌 TBD182株が*F. oxysporum*の増殖を抑制することが明らかとなった(図3)。つまり、*Rhizobium* 属菌が持つ病原菌の抑止効果は、他の5株によって抑制されていたことになる。以上の結果から、有機質養液栽培における病原菌の休眠作用は、特定の細菌種が主要な役割を担っているわけではなく、複雑な細菌ネットワークが関与することが明らかとなった。

有機質養液に*F. oxysporum*を接種すると、細胞増殖しないが減少することもなく、また栽培中の植物に感染することもできない

休眠状態に陥る。先の研究成果から、養液内で*F. oxysporum*が生息していること、また越冬器官である厚膜胞子を形成していること、一部の菌糸が膨潤化することを明らかにしている<sup>4</sup>。本研究において増殖抑制効果を示した細菌種7株の混合、および5通りの2株の混合においても、同様に*F. oxysporum*の厚膜化および膨潤化が観察され、また生存も確認された。しかしながら、*F. oxysporum*に対するそのような活性は、これらの細菌の混合培養液の上清には認められないことから、分解性が高い物質が分泌されているか、細菌-糸状菌間の直接的な接触が重要であると考えられた。

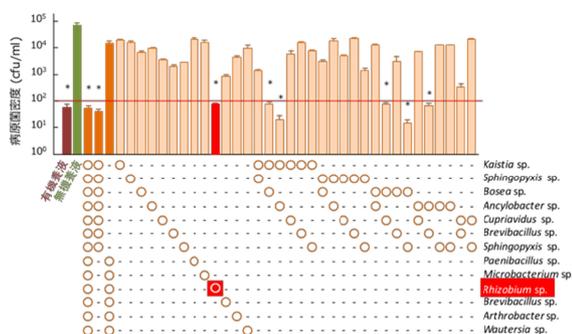


図2. 有機質養液は、多様な細菌種の創発的な抑止効果によって病原菌の増殖を抑制している。

それぞれの養液で細菌(約  $1 \times 10^7$  cfu/ml)および*F. oxysporum* ( $1 \times 10^2$  胞子/ml)を混合し、1週間の振盪培養後に選択培地による希釈平板によって病原菌の密度を測定した。*Rhizobium* sp. TBD182株のみが単独でも病原菌に対する増殖抑制を示した。

\* 病原菌が初期濃度よりも減少した細菌の組み合わせ ( $P < 0.01$ )

### (2)*Rhizobium* 属菌 TBD182株の解析

単独での処理によって唯一、*F. oxysporum*の増殖を*in vitro*で抑制した*Rhizobium* 属菌 TBD182株について詳細に解析した。TBD182株を無機養液あるいは1/10NB液体培地に混合し、*F. oxysporum*を接種すると有機質養液と同様に増殖が抑制されるが、養液のみを通すフィルターを隔てて細菌と共培養した場合は、*F. oxysporum*は通常の菌糸生育を示す(図3)。そのため、少なくともTBD182株による病原菌の休眠作用には細菌の直接的な接触が必須であることが明らかとなった。そこで、作用機作の解明のために本株の詳細なゲノム情報を整備した。Illumina HiSeq 2000を用いたペアエンドシーケンスによって、505 Mb(約89倍のカバレッジ)の配列情報を得た。最も近縁な細菌は*Rhizobium radiobacter*(syn. *Agrobacterium tumefaciens*)Ach5株であったが、TBD182株はシロイヌナズナに病原性を示さず、トマトへの付傷接種でも癌腫を形成しなかった。K-mer解析により TBD182

株のゲノムサイズは 5.69 Mb であり、5,342 の open reading frame が検出された。その中には、病原菌の増殖抑制への関与が予想される糸状菌細胞壁の分解酵素やタンパク質分解酵素のコード領域、細菌間の情報伝達物質であるクオールの生合成遺伝子、また広く細菌に保存されている I、II、III、IV および VI 型の分泌機構に関わる遺伝子群が見出された。

次に、Tn5 トランスポゾンを用いた TBD182 株の突然変異体を作出し、*F. oxysporum* に対する抑制効果の欠失変異体を選抜した。GFP を恒常的に発現する *F. oxysporum* と 96 ウェルプレート内で共培養し、4032 個の中から 2 つの変異体を見出した。そのうち TBD182m18D3 株は、Tn5 トランスポゾンが III 型分泌機構の構成遺伝子の 5' 上流に挿入されていたことから、TBD182 株の III 型分泌装置が *F. oxysporum* の増殖抑制効果に関与することが示唆された。他の細菌 - 糸状菌間の相互作用においても、III 型分泌機構に関わることが報告されている<sup>4,5</sup>。III 型分泌機構は注射器のようにタンパク質等を宿主内に分泌することから、ターゲットとの直接的な接触は必須である。TBD182 株による病原菌 *F. oxysporum* の休眠作用には直接的な接触が必須であることが明らかであり、III 型分泌機構が重要な機能を果たしている可能性は高い。

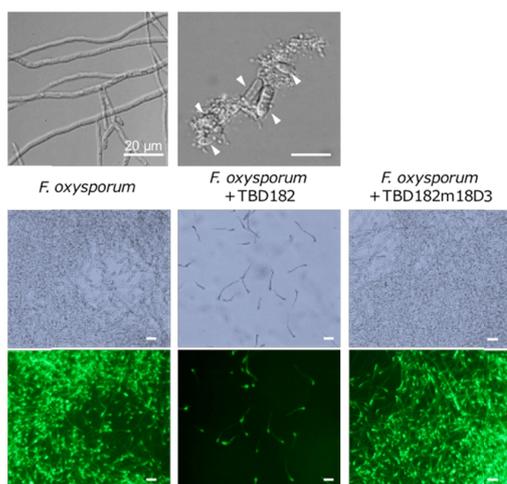


図 3 .TBD182 株は単独で *F. oxysporum* の増殖を抑制する。

TBD182m18D3 株は、増殖抑制効果を欠失した変異体である。矢印は *F. oxysporum* の厚膜化した菌糸を示す。

#### <引用文献>

<sup>1</sup> Shinohara M. et al. (2011) Microbial mineralization of organic nitrogen into nitrate to allow the use of organic fertilizer in hydroponics. *Soil Science and Plant Nutrition*. 57:190-203.

<sup>2</sup> 篠原 信 (2006) 有機肥料の養液栽培～並行複式無機化法による養液内微生物生態系構築法。農業および園芸。81: 753-764.

<sup>3</sup> Fujiwara K. et al. (2012) Suppression of *Ralstonia solanacearum* bacterial wilt disease by an organic hydroponic system. *Journal of General Plant Pathology*. 78: 217-220.

<sup>4</sup> Fujiwara K. et al. (2013) The rhizosphere microbial community in a multiple parallel mineralization system suppresses the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *MicrobiologyOpen*. 2: 997-1009.

<sup>5</sup> Rezzonico F. et al. (2005) The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic *Chromista pythium ultimum* and promotes cucumber protection. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 991-1001.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Iida Y., Fujiwara K., Someya N., Shinohara M. (2017) Draft genome sequence of *Rhizobium* sp. strain TBD-182, an antagonist of the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*, isolated from a novel hydroponics system using organic fertilizer. *Genome announcement*. 5: e00007-17. (査読有)

Fujiwara K., Iida Y., Someya N., Takano M., Ohnishi J., Terami F., Shinohara M. (2016) Emergence of antagonism against the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* by interplay among non-antagonistic bacteria in a hydroponics using multiple parallel mineralization. *Journal of Phytopathology*. 164: 853-862. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

種村 竜太、大竹 憲邦、安藤 晃規、篠原 信. 人工光リーフレタス栽培における有機質肥料活用技術の開発 第 2 報 肥料の違いが生育と品質に及ぼす影響. 園芸学会平成 29 年度春季大会 2017.3.20 日本大学(神奈川県・藤沢市)

篠原 信、高田 惟名、河邑 ちひろ、藤原 和樹、安藤 晃規、宮本 憲二、加藤 康夫、小川 順、高野 雅夫. 必要最小限の土壌微生物(エレメンタル土壌微生物)の有機物耐性. 017 年度日本農芸化学会大会. 2017.03.19 京都女子大学(京都府・京都市)

SAIJAI S., ANDO A., OKADA W., MIYAMOTO K., KATO Y., SHINOHARA M., OGAWA J. Construction of a microbial co-culture useful for ammonification and

nitrification. 2017 年度日本農芸化学会  
大会.

2017.03.19 京都女子大学(京都府・京都市)

飯田 祐一郎, 藤原 和樹, 篠原 信,  
渡辺 郁栄. *Fusarium oxysporum* の菌糸伸  
張を抑制する土壌細菌 *Rhizobium* sp. フザ  
リウム研究会.

2015.8.28 神宮会館(三重県・伊勢市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯田 祐一郎 (IIDA, Yuichiro)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術  
総合研究機構・野菜花き研究部門 野菜  
病害虫・機能解析研究領域・主任研究員  
研究者番号: 00456609

### (2) 研究分担者

篠原 信 (SHINOHARA, Makoto)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術  
総合研究機構・野菜花き研究部門 野菜  
病害虫・機能解析研究領域・上級研究員  
研究者番号: 90326075

### (3) 研究協力者

藤原 和樹 (FUJIWARA, Kazuki)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術  
総合研究機構・九州沖縄農業研究センタ  
ー 生産環境研究領域・任期付研究員  
研究者番号: 40725008

### (4) 研究協力者

染谷 信孝 (SOMEYA, Nobutaka)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術  
総合研究機構・野菜花き研究部門 野菜  
生産システム研究領域・上級研究員  
研究者番号: 60360575