

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380177

研究課題名(和文) 遺伝子マーカーを用いた植物に基礎抵抗性の増強をもたらす微生物群集の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of plant resistant gene markers expressed by microbial community

研究代表者

百町 満朗 (HYAKUMACHI, Mitsuro)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90113612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円、(間接経費) 3,990,000円

研究成果の概要(和文)：アーバスキュラー菌根菌(AMF)である *Glomus mosseae* と植物生育促進菌類(PGPF)を組み合わせ、地上部の病害である炭疽病に対して相乗的な抑制効果が示すことが明らかになった。AMFとPGPFを組み合わせ、地上部のウイルス病害であるCucumber mosaic virus 病に対しても相乗的な抑制効果が示すことが明らかになった。PGPFのVOCの抵抗性誘導の効果を検定した結果、*Cladosporium* sp.と *Ampelomyces* sp. 由来の2種の揮発性成分が、シロイヌナズナに斑葉細菌病原菌の感染に対する抵抗性を誘導することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The co-inoculation of plant growth-promoting fungi(PGPF) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) resulted in additive effect on the suppression of anthracnose disease. The co-inoculation of PGPF and AMF also resulted in effective control of Cucumber mosaic virus disease severity. Two volatile organic compounds emitted from PGPF significantly reduced disease severity in Arabidopsis plants against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：発病抑制 抵抗性誘導 組み合わせ接種 遺伝子マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

化学農薬のみに頼らない環境保全型防除法の確立が強く望まれている中、有益な微生物を利用して病原菌の働きを抑制する生物防除法が世界的に注目されている。有用微生物による植物の生体防御機構については有用微生物と植物および病原菌の3者を対象としたモデル実験系の研究が主に行われているが、圃場のような複雑な微生物相下で導入した有用微生物による植物への生体防御機構に関する研究はほとんどなされていない。根圏や葉圏では多種類の微生物が相互に関連しながら生態系を形成しており、実際の根圏・葉圏で起こっている事象を明らかにするためには、微生物コミュニティを対象としたアプローチが必要とされる。生物防除の成功の鍵を握るためにはまさに、病原菌、有用微生物、および植物の3者の系に加えて、根圏・葉圏の微生物群との相互関係を多面的に解析する必要がある。

当該領域では1970年代中盤から、植物病害の有用な生物防除エージェントの探索が積極的に行われた(Baker & Cook 1974)。植物根圏に生息する微生物の中には、植物の根と高い親和性を持ち、植物の生育を著しく促進するものが見出され、植物生育促進性微生物として注目されてきた(Klopper et al 1980)。一方、有用微生物の植物根への定着をさらに進めた形で、1990年代後半からの各種の内生微生物利用に焦点を当てた研究が盛んになっている。内生微生物には細菌、放線菌、菌類など多様な微生物群が

見出されている。植物生育促進性微生物の一部のものは内生微生物の性格を有しており、植物との共生者として位置づけられているものも多い。学術的にはこれら植物生育促進性微生物や内生微生物の防除機構、特に植物への全身的抵抗性誘導機構の研究が精力的に行われている。

## 2. 研究の目的

我が国の有用微生物を用いた生体防御機構に関する分子生物学的研究は、国外に比べるとかなり遅れている。また、有用微生物の相互認識及び作用に関する研究は、国内外ともに研究例が著しく少ない。圃場レベルで有用な生物防除エージェントが単独で安定した防除効果を示すことは稀であるが、その理由として、導入した圃場土壤中で生物防除エージェントが在来の微生物とどのように協調・競合・棲み分けしているかが不明な点が挙げられる。植物の根に有用微生物あるいはその培養液を処理すると、植物に抵抗性が誘導され、地上部の発病が抑制されることが知られている。安定した生物防除法を確立する上で、導入した有用微生物の根圏・葉圏における動態とそれに伴う微生物コミュニティの変化や働きを解明することは急務であり、本研究はその一端を示しうる可能性をもつ。また、本研究では、根圏・葉圏の微生物相制御機構を植物と微生物の生態・生理・分子レベルで解明して、導入した有用微生物とそれに伴う根圏・葉圏に形成される微生物相による“安定した生物防除法の確立”をモデル

ル植物での抵抗性誘導発現を指標に明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) 有用微生物の単独・混合接種における病害抑制効果試験

各種植物(キュウリ、タバコ、シロイヌナズナ)と PGPF を用いた誘導抵抗性試験のモデル系(ポット試験)を内生菌やアーバスキュラー菌根菌を加えた混合処理試験にも用いる。空気伝染性の病原菌については直接キュウリ本葉に接種し、病斑数および病斑面積から病害抑制効果を測定する。土壌病原菌については、病原菌の孢子懸濁液または含菌大麦粒を土壌に混合し root split 法を組み合わせ、立枯率あるいは根の褐変度から防除価を求める

(2) 有用微生物の単独・混合接種における根圏・葉圏微生物相の解析

根圏・葉圏での糸状菌相は 5.8SrDNA-ITS を、また、細菌相は 16SrDNA を用いた多様性解析を行う。また、菌量の評価は希釈法を用いる。有用微生物を処理したときとしなかったときの違いは DGGE 法を用いて調べる。

(3) 有用微生物の単独・混合接種における病害耐性の分子生物学的解析

複数の植物種でマイクロアレイ解析を実施し、代謝マップとの統合解析やネットワーク解析を行うことにより、病害抵抗性能力の種間差を特定する。

### 4. 研究成果

(1) アーバスキュラー菌根菌(AMF)や植物生育促進菌類(PGPF)等の植物の生育を促進する微生物は土壌の肥沃性を保ちつつ植物の健康を向上するのに不可欠の存在である。また、これらの微生物の利用は持続的な作物生産管理技術の向上を図る上でも非常に重要である。有用な微生物間の相互作用が同調的であるかあるいは拮抗的であるかを明らかにすることはそれらを生物防除エージェントや生物肥料として利用する上で必要となる。本研究では、AMF である *Glomus mosseae* と各種 PGPF を組み合わせて同時に接種したときのキュウリの生育、根や根圏での着生、および各種病原菌の進展・抑制に及ぼす影響を制御環境下で調べたものである。その結果、*G. mosseae* と *F. equiseti* は互いにキュウリ根への定着に対し拮抗的に働くが、この拮抗関係はキュウリに対するこれらの菌の生育促進効果には影響を及ぼさないこと、*F. equiseti* は地上部の病害である炭疽病と地下部病害の苗立枯病の両方に対し抑制効果が示すこと、*G. mosseae* は地上部の病害である炭疽病には抑制効果を示すが地下部病害の苗立枯病に対しては示さないこと、さらに、*G. mosseae* と *F. equiseti* を組み合わせて接種すると、地上部の病害である炭疽病に対しては相乗的な抑制効果が示すが、地下部病害の苗立枯病に対してはそのような効果を示さないこと、が明らかになった。

(2) 植物の根は土壌微生物の活性に著しい影響を与える。根からの代謝物は基質として微生物に利用され、その結果、根の周りの微

生物バイオマスと活性を増大する。この現象は“根圏効果”とよばれている。根圏では微生物間の、また、微生物と植物間の相互作用が活発であり、そうした相互作用は植物に有益、無関係、あるいは有害な影響を与えている。なかでも興味深いのは、植物の潜在的な防御能力を増大させ、広範囲の病原菌に対し効果的な、抵抗性誘導（ISR）を引き起こす特定の根圏菌類の能力である。本研究はキュウリモザイクウイルス（CMV）に対する根圏菌類の防御効果に焦点を合わせ ISR の有無を調べた。PGPF の *Penicillium simplicissimum* GP17-2 を用いて、本菌がシロイヌナズナとタバコにおいて CMV に対し抵抗性を誘導するかを評価した結果、GP17-2 の培養液（CF）の処理したものでは対照の無処理のものに比べ発病程度が著しく減少した。また、ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）の検定結果、GP17-2 及び CF を処理した植物では CMV の集積が無処理のものに比べ著しく少ないことが明らかになった。RT-PCR の結果、GP17-2 及び CF を処理した植物ではサリチル酸（SA）やジャスモン酸/エチレン（JA/ET）のシグナル伝達経路に依存した防御関連遺伝子の発現が増大することが明らかとなった。これらの結果は、GP17-2 よりもたらされるシロイヌナズナとタバコの CMV への抵抗性には複数の防御伝達経路があることを示している。また、同じ根圏菌類で PGPF でもあり、また、すでに微生物農薬として知られている *Trichoderma asperellum* SKT-1 を用いて CMV に対する抵抗性誘導の有無を調べた結果、SKT-1 及びその CF を処理したものでは対照の無処理のものに比べ発病程度が著しく減少した。

SKT-1 の含菌大麦粒処理では主に SA に依存したシグナル伝達経路が、また、CF では SA や JA/ET に依存した複数のシグナル伝達経路が関与していることが明らかになった。

さらに、PGPF の *Fusarium equiseti* GF18-3 とアバスキュラ - 菌根菌（AMF）である *Glomus mosseae* (Gm)を用いてキュウリの CMV に対する抵抗性を誘導を調べた結果、Gm と GF18-3 は相互にキュウリの根への定着を抑制する拮抗的な傾向を示したものの、これらの菌が持つキュウリの生育促進効果を損なうことはなかった。また、GF18-3 の単独処理及び GF18-3 と Gm の混合処理はいずれも CMV の発病程度と CMV 集積の著しい低下をもたらした。RT-PCR の結果、GF18-3 処理は SA に依存した防御関連遺伝子の発現が顕著に増大したのに対し、Gm では JA 依存の遺伝子の発現がみられた。

（3）植物は病原体の攻撃を受けると、遺伝子発現制御により抗ストレスタンパク質群の生合成を行うことで感染防御を行う。生物ストレス応答には全身的な応答があることが知られており、サリチル酸（SA）、 $H_2O_2$ 、ジャスモン酸（JA）の3種類の植物ホルモン（様分子）が関与している。他の植物ホルモンであるエチレン（ET）とアブシジン酸（ABA）の関与もまた示唆されている。それぞれの植物ホルモンの作用機作についてはこれまで活発に研究が進められてきており、その分子機構が明らかにされつつある一方で、複数の植物ホルモン間の協調作用や拮抗作用に関してはまだ知見は少ない。本研究では PGPF を処理したときの植物ホルモン間の協調作用や拮抗作用を調べた。

まず、PGPFによる成長促進を理解するために、100種類程度の真菌類から揮発性成分(VOC)を採集し、その成長促進効果の有無をタバコを用いて検定した。その結果、*Phoma* sp. GS8-3より得たVOCが有意に成長促進を引き起こせることを見出した。

次に、VOCの耐病性誘導の効果を検定した結果、PGPFの*Cladosporium* sp. (D-c-4)、*Ampelomyces* sp. (F-a-3)由来の2種のVOCが、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)において病原菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (pst) DC3000)の感染に対する耐病性誘導を引き起こせることを見出した。また、これらの活性を持つVOCの主要成分として、2種類の新規な揮発性化合物 *m*-cresol (*Ampelomyces* 由来)及び methyl benzoate (MeBA) (*Cladosporium* 由来)を同定し、それぞれの合成標品を用いてその効果を確認した。さらに、同定されたVOCによる耐病性誘導のシグナル伝達機構について解析を行い、SA経路、JA/ET経路に欠損を持つシロイヌナズナの変異体に *m*-cresol もしくは MeBA 処理を行い病害抵抗性及びISRに関わる転写応答を解析した結果、*m*-cresol に対してはSA経路及びJA経路が共に関与しISRを引き起こすこと、MeBAについてはJA経路が主要なものであり、SA経路の関与は少ないこと、を明らかにした。

別のPGPFである *Penicillium simplicissimum* GP17-2はVOCではなく未知の水溶性の化合物によりISR活性化を行う。この分子メカニズムを解明するために、マイクロアレイを用いた転写応答解析を行った。その際、公開されている感染応答並び

に植物ホルモン応答についてのマイクロアレイ情報が参照された。その結果、GP17-2処理の6時間後にSA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 応答のピークが生じ、24時間後にはABA応答が現れる、ことを見いだした。これらの結果は、PGPFであるGP17-2処理によりSA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 応答からABA応答へと、ホルモン応答が順序だてて生じることを強く示唆している。

次に、マイクロアレイデータを用いて、GP17-2処理により引き起こされるISRに関わる転写制御配列の予測が行われた。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を持つ新しいベクターが開発され、それを用いて予測された配列の植物での機能検証が行われた。発現解析の結果、2種類の転写制御配列についてそれぞれ単独で概日リズムによる転写応答を与えうることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17件)

1. Naznin, H.A., Kiyohara, D., Kimura, M., Miyazawa, M., Shimizu, M., and Hyakumachi, M. (2014). Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE (in press). (査読有) Doi:10.1371/journal.pone.0086882
2. Naznin, H.A., Kimura, M., Miyazawa, M., and Hyakumachi, M. (2013). Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS8-3 for growth promotion effects on tobacco. *Microbes Environ* 28, 42-49. (査読有)

doi:10.1264/jsme2.ME12085.

3. Elsharkawy, M.M., Shimizu, M., Takahashi, H., Ozaki, K., and Hyakumachi, M. (2013). Induction of systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. *Plant Pathol J* 29, 193-200. (査読有) doi:10.5423/PPJ.SI.07.2012.0117.
4. Elsharkawy, M.M., Shimizu, M., Takahashi, H., and Hyakumachi, M. (2012). The plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induce systemic resistance against *Cucumbers mosaic virus* in cucumber plants. *Plant Soil* 361, 397-409. (査読有) doi:10.1007/s11104-012-1255-y.
5. Elsharkawy M. M., Shimizu M., Takahashi H. and Hyakumachi M. (2012). Induction of systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Pathology* 61, 964-976. (査読有) Doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02573.x

[学会発表](計 10件)

1. Hushna Ara Naznin, Yoshioka, Y., Hieno, A., Hyakumachi, M. and Yamamoto, Y. (2012). *In silico* analysis of transcriptional regulatory elements related with disease resistance. In the program

and abstract brochure of the 15th International congress on molecular plant microbe interaction (IS-MPMI) at Kyoto, Japan (July 29- August 02, 2012). Poster presentation, PS05-252.

[図書](計 3件)

1. Saldajeno, M.G.B and Hyakumachi, M. (2011) Arbuscular mycorrhizal interactions with rhizobacteria or saprotrophic fungi and its implications to biological control of plant diseases. *In Mycorrhizal Fungi* (ed. by Fulton, S.M.). Nova Science Publishers, Inc., pp.187-212.
2. Saldajeno, M.G.S., Naznin, H.A., Elsharkawy, M.M., Shimizu, M. and Hyakumachi, M. (2014). Enhanced resistance of plants to disease using *Trichoderma* spp. *In Biotechnology and Biology of Trichoderma*. (Eds. Gupta, V.K., et al.) . Elsevier, Amsterdam. pp.477-493

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

百町 満朗 (HYAKUMACHI Mitsuro)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：90113612

### (2)研究分担者

山本 義治 (YAMAMOTO Yoshiharu)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：50301784