

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780317

研究課題名(和文)ネギ属植物根圏への拮抗細菌集積の機構解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms involved in accumulation of bacterial antagonists in the rhizosphere of Allium plants

研究代表者

清水 将文 (Shimizu, Masafumi)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60378320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ネギ属植物の混植・輪作にはウリ類フザリウム病抑制効果がある。ネギ属根圏には、共通して高いフザリウム病抑止性を有する拮抗細菌 *Burkholderia*、*Pseudomonas*、*Flavobacterium* 及び *Chryseobacterium* が優占生息しているが、キュウリやトマトなどの非ネギ属植物では抑止性をほとんど示さない *Streptomyces* が優占生息していた。これらのことから、ネギ属が根から放出する特有成分(おそらくアリル化合物)が、これら拮抗細菌の集積に関わっていると推定された。

研究成果の概要(英文)：Intercropping/rotating cucurbits with Alliums has been used as an effective control method for Fusarium wilt of cucurbits. In this study, we analyzed the bacterial communities in the rhizospheres of Allium and non-Allium plants. Next generation sequencing of 16S rDNA amplicons revealed that *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* and *Chryseobacterium* were predominant in the Allium rhizospheres, while *Streptomyces* was predominant in the rhizosphere of cucumber and tomato. Subsequently, these bacteria were isolated from the rhizospheres and tested for their ability to suppress cucumber Fusarium wilt. As a result, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* and *Chryseobacterium* isolated from Alliums showed suppressive tendency on disease incidence, while *Streptomyces* isolated from cucumber were not suppressive. These results suggest that unique compounds found only in the root exudate of Alliums may be a key factor affecting recruitment of antagonistic bacteria to Allium roots.

研究分野：植物病理学

キーワード：混植 フザリウム病 根圏細菌 ネギ属

1. 研究開始当初の背景

栃木県や中国には昔から、カンピョウなどのウリ科作物の株元にネギを混植したり、タマネギと輪作する伝承農法がある。ネギ類の混植・輪作には、ウリ科やナス科などの作物に発生する土壌伝染性フザリウム病を抑制する効果があるとされており、現在では北海道のスイカ産地などにも同農法が普及している。ネギ混植によるフザリウム病抑制にはネギ根圏の抗菌性細菌が関与する可能性が約25年前に示されていた。そこで申請者は、各地のネギ、キュウリ、トマトの根圏から細菌と放線菌を分離し、フザリウム病菌に対する抗菌活性とキュウリつる割病抑制性を数年間解析してきた。その結果、他の作物と比較して、ネギの根圏では、フザリウム拮抗性細菌の生息密度が特異的に高いことが明らかとなった。このような興味深い現象はこれまでの報告に見られないため、ネギ類に特有の極めてユニークな性質と考えられる。

国外では、発病衰退現象や発病抑制土壌の土壌病害抑制機構の解明が精力的に進められている。分子生物学的解析によって土壌病害抑制に関わる拮抗微生物群は特定されつつあるが、それら拮抗微生物が根圏や土壌に集積する原因は未だ明らかにされていない。拮抗微生物集積の機構の解明は、根圏微生物相の人為的制御による土壌病害の生物的・生態的防除法の確立に結びつくため、当該分野では極めて重要な課題である。ネギ類という特殊な植物を研究対象とすることで、拮抗微生物集積を促す物質を世界に先駆けて発見できると考え、本課題を申請するに至った。

2. 研究の目的

食の安全・安心および環境保全が重視される昨今では、防除困難な土壌病害対策として化学的土壌くん蒸消毒よりも生物的・生態的防除法に強い関心と期待が寄せられている。古来、わが国には篤農家が経験的に編み出した伝統的病虫害防除法がある。ネギ類・除虫菊混植などはその典型である。土壌病害防除に有効とされるネギ類の根圏微生物相を数年間解析し、(1) 地域に関わらず同根圏ではフザリウム拮抗性細菌の生息密度が特異的に高い、(2) ネギ類特有成分「アリル化合物」が関与する可能性が高いことなどを明らかにした。本研究の目的は、拮抗細菌とアリル化合物との関連を重点的に解析し、根圏微生物相を人為的に制御して栽培現場への科学的活用を目指すことにある。

3. 研究の方法

2012 - 2013年度は、4種のネギ属植物(ネギ、ニラ、タマネギ及びニンニク)と非ネギ属植物(キュウリ及びトマト)の根圏から各種細菌を分離し、フザリウム病菌に対する拮抗性及びキュウリつる割病(病原菌:

Fusarium oxysporum f. sp. *cucumerinum*) に対する発病抑制性を解析した。さらに、*Burkholderia* 属菌が産生する抗菌物質の同定を行った。

2014年度は、4種ネギ属植物及び非ネギ属植物の根圏細菌相を次世代シーケンスで網羅解析した。さらに、この解析で明らかとなったネギ属根圏の優占細菌群を全種類分離し、拮抗性及び発病抑制性を解析した。また、*Burkholderia* 属菌の発病抑制性におけるピオケリンの役割を調べるため、同物質の生産性に影響を及ぼす鉄を添加し、拮抗性並びに発病抑制性を検討した。

根圏細菌の発病抑制性には抗菌作用以外の要因、すなわち免疫誘導の関与も予想されたことから、スプリット・ルート法でネギ混植時の発病抑制効果を検討した。

4. 研究成果

2012 - 2013年度に行った培養法による根圏細菌相解析の結果、ネギ属植物の根圏には共通して *Burkholderia* 属菌及び *Pseudomonas* 属菌が高密度で生息していることが明らかとなった。これら細菌を根圏より分離し、フザリウム病菌に対する抗菌活性及びキュウリつる割病に対する発病抑制性を検定したところ、顕著な活性を示す菌株が多数認められた。抗菌活性と発病抑制性との関係性を見てみると、抗菌活性のある細菌の方が発病抑制も強いという傾向が認められ、これら細菌の発病抑制性には抗菌作用が関与する可能性が考えられた。そこで、抗菌性 *Burkholderia* 属菌が産生する抗菌物質を同定した結果、シデロフォア(鉄キレート物質)の一種であるピオケリンであることが明らかとなった。

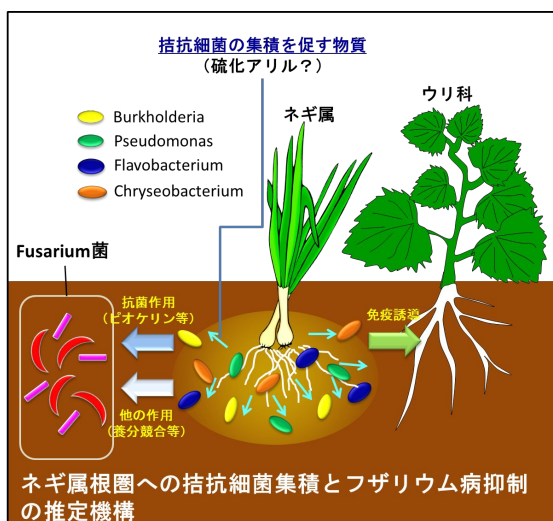
2014年度に行った次世代シーケンスの結果、ネギ属植物の根圏では、*Burkholderia* 属、*Pseudomonas* 属、*Flavobacterium* 属及び *Chryseobacterium* 属に属するグラム陰性菌が優占生息しているのに対して、非ネギ属植物(キュウリ及びトマト)の根圏では *Streptomyces* 属菌が優占菌であることが明らかとなった。*Burkholderia* 属菌、*Pseudomonas* 属菌及び *Streptomyces* 属菌は既存の選択培地で分離が可能であったが、*Flavobacterium* 属菌及び *Chryseobacterium* 属菌については選択培地が存在せず、分離が極めて困難であったため、両菌群を効率的に分離するための選択培地を開発した。これらの既存及び新規開発した選択培地を用いて各植物の根圏から優占細菌群を分離し、フザリウム病菌拮抗性及びキュウリつる割病抑制性を調べたところ、ネギ属根圏の優占細菌群は発病抑制性を示す傾向にあったのに対して、非ネギ属の優占細菌である *Streptomyces* 属菌には顕著な発病抑制は認められなかった。抗菌活性と発病抑制性との関係性を見てみると、*Burkholderia* 属菌、*Pseudomonas* 属菌及び *Flavobacterium* 属

菌 には 相 関 が 認 め ら れ た が , *Chryseobacterium* 属 菌 では 相 関 が 認 め ら れ な っ た 。 こ の こ と か ら , 前 者 3 細 菌 群 の 発 病 抑 止 性 に お い て は 抗 菌 物 質 が 重 要 な 要 因 で あ る が , 後 者 *Chryseobacterium* 属 菌 は 抗 菌 作 用 と は 別 の 機 構 で 発 病 を 抑 制 す る と 推 察 さ れ た 。

前年度までの研究により ,*Burkholderia* 属 菌 は 抗 菌 物 質 ピ オ ケ リ ン を 産 生 す る こ と が 明 ら か と な っ て い た の で , 寒 天 培 地 に 鉄 を 添 加 し , 抗 菌 活 性 に 及 ぼ す 影 響 を 調 べ た 結 果 , 鉄 添 加 に よ り 活 性 が 完 全 に 消 失 し た 。 つ ぎ に , 土 壌 へ の 鉄 添 加 が 同 菌 群 の 発 病 抑 止 性 に 及 ぼ す 影 響 を 調 べ た と こ ろ , 一 部 の 菌 株 で は 発 病 抑 制 が 著 し く 低 下 し た が , 低 下 し な い 菌 株 も 存 在 し た 。 こ の 結 果 は , *Burkholderia* 属 菌 に お い て も , 発 病 抑 止 機 構 を 抗 菌 物 質 生 産 の み で 説 明 で き な い こ と を 示 唆 し て い る 。

抗 菌 作 用 以 外 の 要 因 と し て , 免 疫 誘 導 の 関 与 が 伺 わ れ た こ と か ら , キ ュ ウ リ 根 を 半 分 に 分 け , 一 方 の 根 を ネ ギ と 混 植 し , 残 り の 一 方 の 根 に つ る 割 病 菌 を 接 種 す る ス プ リ ッ ト ・ ル ー ト 試 験 を 行 っ た 結 果 , 発 病 が 抑 制 さ れ た 。 こ の こ と か ら , 根 圏 細 菌 の フ ザ リ ウ ム 病 抑 制 に は 免 疫 誘 導 も 関 与 す る こ と が 明 ら か と な っ た 。

以 上 の 結 果 に 基 づ き , ネ ギ 類 の 混 植 ・ 輪 作 に よ る ウ リ 類 フ ザ リ ウ ム 病 の 抑 制 機 構 の 全 体 像 を 世 界 で 初 め て 明 ら か に し た (下 図) 。 本 研 究 で は , 残 念 な が ら 拮 抗 細 菌 を 集 積 す る 原 因 化 合 物 の 特 定 ま で に は 至 ら な っ た が , ネ ギ 属 特 有 の 根 浸 出 物 成 分 (硫 化 ア リ ル 等) が 原 因 物 質 で あ る こ と は 明 確 と な っ た 。 3 年 間 の 研 究 に よ り , ネ ギ 属 植 物 の 根 圏 に 優 占 生 息 す る 拮 抗 細 菌 群 を 全 て 分 離 す る こ と に 成 功 し た 。 現 在 , こ れ ら 細 菌 を 集 積 さ せ る 原 因 物 質 を 特 定 す べ く , 分 離 細 菌 株 の 根 浸 出 物 に 対 す る 走 化 性 の 解 析 を 進 め て い る 。



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 2件)

(1) Nishioka, T., Suzuki, Y., Suga, H., Kobayashi, I., Kobayashi, Y., Hyakumachi, M. and Shimizu, M. Metagenomic analysis of bacterial flora in rhizosphere of Allium plants and suppressive activity of rhizopseudomonas isolates against Fusarium wilt of cucumber. IOBC-WPRS Bulletin (in press) (査読なし)

(2) Suzuki, Y., Shimizu, M. and Hyakumachi, M. Population of antagonistic actinomycetes and bacteria against Fusarium oxysporum in the rhizosphere of cucumber and Welsh onion. IOBC-WPRS Bulletin 86: 187-188. (2013) (査読なし)

〔学会発表〕(計 8件)

(1) 西岡友樹, 鈴木陽子, 田中千尋, 小林一成, 小林裕子, 須賀晴久, 百町満朗, 清水将文. ネギ属根圏の細菌叢の網羅解析と優占菌群のキュウリつる割病抑制活性. 日本土壤微生物学会, 2015年5月22日-23日, つくば国際会議場(つくば市・茨城県).

(2) 西岡友樹, 鈴木陽子, 須賀晴久, 百町満朗, 清水将文. ネギおよびタマネギの根圏から分離した Flavobacterium および Chryseobacterium 属菌のキュウリつる割病抑制活性. 日本植物病理学会大会, 2015年3月28日-31日, 明治大学(千代田区神田駿河台・東京都).

(3) 田中千尋, 鈴木陽子, 西岡友樹, 長坂拓弥, 須賀晴久, 百町満朗, 清水将文. ネギ混植のキュウリつる割病抑制効果における根圏 Burkholderia のピオケリンの役割. 日本植物病理学会大会, 2015年3月28日-31日, 明治大学(千代田区神田駿河台・東京都).

(4) 五十嵐千佳, 浅野雄二, 西岡友樹, 須賀晴久, 百町満朗, 清水将文. ネギ類の混植によるハウレンソウ萎凋病の抑制. 日本植物病理学会大会, 2015年3月28日-31日, 明治大学(千代田区神田駿河台・東京都).

(5) 西岡友樹, 鈴木陽子, 須賀晴久, 百町満朗, 清水将文. ネギ, タマネギおよびキュウリの根圏から分離した Burkholderia 属菌のキュウリつる割病抑制活性の比較. 日本植物病理学会関西西部会, 2014年9月27日-28日, 富山大学(富山市・富山県).

(6) Nishioka, T., Suzuki, Y., Suga, H., Kobayashi, I., Kobayashi, Y., Hyakumachi, M. and Shimizu, M. Metagenomic analysis of

bacterial flora in rhizosphere of Allium plants and suppressive activity of rhizopseudomonas isolates against Fusarium wilt of cucumber. IOBC-WPRS XIII Meeting of the Working Group of Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogen. 2014年6月15日-18日, スウェーデン大学(ウプサラ・スウェーデン).

(3)連携研究者
なし

(7) 西岡友樹, 鈴木陽子, 小林一成, 小林裕子, 須賀晴久, 百町満朗, 清水将文. ネギ属根圏の細菌叢の網羅解析と根圏由来 Pseudomonas 属菌のキュウリつる割病抑制活性. 日本植物病理学会大会, 2014年6月2日-4日, 札幌コンベンションセンター(札幌市・北海道).

(8) Nishioka, T., Suzuki, Y., Hyakumachi, M., Shimizu, M., Suga, H., Kobayashi, I. and Kobayashi, Y. Comparison of bacterial communities in rhizospheres of Allium plants. The 4th International Symposium on Life Science in Toyama, 2013年11月28日, 富山大学(富山市・富山県).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

受賞:平成26年度日本農学進歩賞

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 将文(Shimizu Masafumi)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号:60378320

(2)研究分担者

なし