

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2014～2018

課題番号：26257418

研究課題名(和文) 熱帯作物の謎を解く - 環境ストレス耐性への共生微生物寄与の解明

研究課題名(英文) Secret of tropical crops - Contribution of symbiotic endophytic microorganisms on plant tolerance to environmental stresses

研究代表者

縄田 栄治 (Nawata, Eiji)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：30144348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、貧栄養で保水力の乏しい土壌の卓越する熱帯地域において、環境ストレス耐性への共生微生物の寄与の有無を解明し、生産性向上にめざすことを目的として実施した。タイ・コンケン大学試験圃場において栽培したキャッサバ3品種を用いて内生菌相解析を行った結果、真菌相・細菌相とも多様かつ品種特異的であること、一方で共通に見られる菌種が存在することを確認した。また、アフリカの栽培品種を用いて、キャッサバ菌根菌の同定を行った。ストレス耐性向上に寄与する内生菌及び菌根菌の存在が示唆された。さらに、茎頂培養によりキャッサバの無菌個体作出の組織培養系を確立し、無菌個体を使ったストレス耐性試験実施を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、地球温暖化が進行に伴う降雨特性の変化などにより栽培環境が不安定化することが予想され、ストレス環境下での作物生産の機会が増加する。このような状況下で、キャッサバやサトウキビの環境ストレス耐性のメカニズムの解明に近づいたことの学術的意義は大きい。本研究では、キャッサバやサトウキビの環境ストレス耐性と共生微生物の関係の一端を明らかにした。近い将来、本研究科の成果を基礎として、一層の研究が進むことが期待される。内生菌などの共生微生物の関与と、環境条件や寄主植物との関係の解明が進むと、栽培技術への応用や育種的应用が可能となり、その実用的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to clarify the contribution of symbiotic microorganisms to the improvement of the tolerance to environmental stresses in the tropics, where unfavorable soils prevail, such as poor-nutritious soils with low water holding capacity, and to aim at the increase in productivities of tropical crops. The analysis of the endophyte flora using 3 varieties of cassava cultivated in an experimental farm in Khon Kaen University, Thailand, revealed that in both endophytic fungi and bacteria diverse species were found, that some of them were variety specific and that many of them were common in used varieties. Using African cassava varieties, mycorrhiza species were identified. These results strongly suggested the existence of symbiotic microorganisms that may contribute to the improvement of stress tolerance. In addition, a system to produce endophyte free plants was established, by which future research on stress tolerance using the established endophyte free plants.

研究分野：熱帯農学

キーワード：熱帯作物 環境ストレス 共生微生物 東南アジア 熱帯アフリカ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

熱帯の作物には、サトウキビなど、C4植物が多く、高温・強日射の環境下で栽培されるため、一般に温帯の作物より生産性が高い。キャッサバはC3植物であるが、やはり高生産力を誇る。サトウキビもキャッサバも、環境ストレス耐性が顕著に優れることでも知られている。サトウキビは、耐暑性、耐乾性、耐湿性に優れ、幅広い栽培環境に適応できる。キャッサバは、驚くべき貧栄養耐性、耐乾性、耐暑性をもち、熱帯地域では、殆ど天水条件下で栽培され、今なお無施肥で栽培されることも多い。この両作物の優れた環境ストレス耐性のメカニズムは、未だ完全に解明されておらず、高等植物の様々な機能をもってしても、両作物の環境ストレス耐性は完全には説明できず、謎として残されている。このため、栽培技術の向上や育種の上で、妨げとなっている。

近年、検出技術の向上によって、植物と共生関係にある微生物、植物の生長に大きな役割を果たしていることが徐々に解明されつつあり、サトウキビとキャッサバについても、研究が進められている。特に、サトウキビの内生窒素固定菌については、ブラジルを中心に研究が進められ (Taulé et al., 2012 など) わが国でも近年急速に進められている (Thaweenut et al. 2011 など) 。

しかし、内生菌による窒素固定については、栽培環境、植物・内生菌双方の遺伝子型、栽培管理などの影響を受け、どの程度、サトウキビの生育、収量に寄与しているのか、不明な点が多い。また、栄養繁殖によって、内生菌が安定的に次世代に受け継がれるかどうか、明らかとなっていない。さらに、他の環境ストレスに対する共生微生物の寄与については、殆ど研究されていない。キャッサバについては、内生菌等共生微生物に関する研究は進められている (de Melo et al., 2009 など) が、サトウキビ以上に貧栄養耐性に優れるキャッサバの、共生微生物の寄与に関する研究例は乏しい。両作物とも、通常の機能では説明できない環境ストレス耐性のメカニズムが、内生菌等、共生微生物の寄与により説明できる可能性は、相当高いと思われるが、研究は殆ど進められていない。

(参考文献: de Melo et al., *Sci. Agric.*, 66:583-592, 2009; Taulé et al., *Plant Soil*, 356:35-49, 2012; Thaweenut, N. et al., *Plant Soil*, 338:435-449, 2011)

2. 研究の目的

本研究課題は、サトウキビ・キャッサバの謎、環境ストレス耐性の解明を目的として、共生微生物の環境ストレス耐性に果たす役割を中心に、栽培試験と農家圃場での調査、実験室での分析を組み合わせて実施した。なお、当初、両作物の内生菌相を明らかにする目的で開始したが、サトウキビの国内での実験に支障があったため、キャッサバに注力した。まず、植物体内の微生物相及び外生菌根菌相を明らかにすることを目的として、栽培したキャッサバの菌相を明らかにした。海外での現地栽培試験の場所は、タイ・コンケン大学、カメルーン農業研究所の試験圃場とした。特に、キャッサバで優れる貧栄養耐性については、内生菌分析により、貧栄養耐性に寄与すると思われる内生菌を探索した。サトウキビについては、天水で栽培が行われているにもかかわらず、単年度の収量では他の地域に匹敵する収量をあげている、タイ東北部のサトウキビ農家で、N15 同位体比法によって、空中窒素の寄与率を実測した。さらに、キャッサバにおいて、内生菌フリー植物体を通常条件とストレス条件下で栽培し、ストレスの影響の有無を解析するために、組織培養により内生菌フリーの植物体作出系の確立をめざした。

今後、地球温暖化が進行すると、降雨特性の変化などにより栽培環境が不安定化することが予想され、ストレス環境下での作物生産の機会が増加すると思われる。このような状況下で、サトウキビとキャッサバの環境ストレス耐性のメカニズムを詳細に解明することの学術的意義は大きい。また、内生菌などの共生微生物の関与と、環境条件や寄主植物との関係が解明されると、栽培技術への応用や育種的应用が可能となり、その実用的意義は大きい。

3. 研究の方法

本研究課題では、高い生産力を持ち環境ストレス耐性に優れる熱帯作物キャッサバの微生物相を解析することにより、環境ストレス耐性に関与すると思われる有用微生物の同定・単離を行った。特に、キャッサバの貧栄養耐性に着目し、タイ・コンケン大学内及び京都大学内の試験圃場で栽培実験を行い、内生菌相の分析を行った。さらに、ストレス耐性への内生菌関与の分析に付すことを目的として、組織培養による内生菌フリー個体の作出を行った。

タイ・コンケン大学での栽培試験で供試材料としたキャッサバの品種・系統 (Kasetsart 50、Huay Bong 80、Rayong 72) は、コンケン大学農学部を通じて入手した。また、京都大学内圃場でも同様の試験を行い、栽培環境の違いの影響を分析する予定であったが、ABS 関係の調整の遅れにより、国内での分析は、国内で入手可能な系統 (ブラジル産 Mantiqueira、Yara) を用いた。また、タイの内生菌相の解析は、非培養法と培養法を併用し、外部病徴のない植物体から採取した各部位 (葉、茎、根) の内部組織から CTAB 法により直接 DNA を抽出した後、得られた DNA を鋳型として菌類特異的プライマーによる PCR 増幅を行い、産物の DGGE 解析およびシーケンス解析から内生菌相を明らかにした。同時に、同様に外部病徴のない植物体の表面殺菌した各部位 (葉、茎、根) を 2% MEA 培地上で 25°C 暗条件下で培養し、出現したコロニーを単離して純粋株を確立後、rDNA ITS 領域の塩基配列を決定して菌種を推定した。さらに、カメルーン国立農業開発研究所及び京都大学農学研究科の試験圃場で、貧栄養耐性に寄与する菌根菌の同定を行った。外生菌根菌は、培養法により菌相を分析した。

サトウキビについては、コンケン大学周辺の農家 20 軒を選定し、植物体と土壌をサンプリングし、N15 同位体比法によって、植物体内窒素における空中窒素の寄与率を実測した。

組織培養系については、当初予定していたタイ、カメルーンからの材料の入手が困難となったため、国内で入手可能な系統（沖縄の系統、系統名不明）を用い、微生物の感染が殆どないとされる生長点を利用して、組織培養により、内生菌フリー個体の作出をめざした。好適な培地、植物ホルモンの組合せを明らかにするため、異なる組成の培地、植物ホルモンに関する試験を行った。

4. 研究成果

1. キャッサバ植物体における内生微生物相の解析手法を確立するための予備実験を行うことにより、根、茎、葉の各サンプルからの DNA 抽出及び保存条件の最適化、ならびに微生物（真菌及び細菌）相解析のためのプライマーの選定を行った後、タイ・コンケン大学試験圃場において、3 品種を用いて菌相の解析を行った。さらに、国内実験により、2 品種を用いて、同様の解析を行った。その結果、真菌類では、Kasetsart 50 からは 7 菌種、Huay Bong 80 からは 18 菌種、Rayong 72 からは 12 菌種が単離された。また、Mantiqueira からは 7 菌種、Yara からは 13 菌種が単離された。全ての品種の地上部に *Colletotrichum* 属菌が見られ、ブラジル産の 2 品種では *C. siamense* が、タイ産の 3 品種では *C. gloeosporioides* が共通して見られた。ブラジル産の品種の葉には、*Cladosporium halotolerans* が、地上部には *Fusarium equiseti* と *F. oxysporum* が共通して見られた。タイ産の品種の主茎からは、*Diaporthe phaseolorum*、*Nigrospora sphaerica* が共通して見られた。全ての品種に見られた *Colletotrichum* 属菌、Mantiqueira 以外の品種に見られた *Diaporthe* 属菌はキャッサバの内生真菌である可能性があることが示唆された。一方、ブラジル産の 2 品種に共通して見られた種（*C. siamense*、*F. equiseti*、*F. oxysporum*）とタイ産の 3 品種に共通して見られた種（*C. gloeosporioides*、*D. phaseolorum*、*N. sphaerica*）があり、地域によって、あるいは土壌特性によって異なる真菌種がキャッサバの内生真菌である可能性が示された。単離された真菌種の中でも、ブラジル産の 2 品種に共通して見られた *F. equiseti* はイネの内生真菌、*F. oxysporum* はイネとトウモロコシの内生真菌であると報告されている。なお、以上については、大学院生が学会で発表し、学生発表優秀賞を獲得した。

さらに、同一品種の複数個体から単離された真菌種の検出頻度を明らかにすることで、上記試験でキャッサバの内生菌として推定された真菌種の検証を行った。供試材料として Huai Bong 80 を用いて、コンケン大学試験圃場で栽培した 11 個体の根・茎（主茎）・葉の各サンプルから、同様の真菌類菌相の解析を行った結果、葉からは計 83 菌株 32 菌種が、主茎からは 117 菌株 57 菌種が、根からは 31 菌株 23 菌種が単離された。葉・主茎・根からは平均してそれぞれ 7.5、10.6、2.8 菌株が単離された。各部位から高い頻度で単離された種は、葉からは、*Colletotrichum gloeosporioides* が全ての供試個体から単離され、次いで *Colletotrichum boninense* が約 91%、*Colletotrichum siamense*、*Nigrospora sphaerica* が約 82%、*Fusarium equiseti*、*Nigrospora oryzae*、*Phyllosticta capitalensis* が約 45% の頻度で単離された。主茎からは、*Colletotrichum gloeosporioides* が約 91%、*Colletotrichum siamense* が約 82%、*Diaporthe phaseolorum* が約 73%、*Colletotrichum boninense*、*Phomopsis phyllanthicola* が約 64%、*Phyllosticta capitalensis* が約 55%、*Fusarium equiseti* が約 45% の頻度で単離された。根からは、*Fusarium solani* が約 45% の頻度で単離された。葉・主茎・根の全ての部位から共通して単離されたのは 5 菌種、葉と主茎から共通して単離されたのは 13 菌種、主茎と根から共通して単離されたのは 5 菌種だった。以上の結果、葉と主茎に共通して見られる菌種数の方が主茎と根のものよりも多いことから、葉と主茎の方が主茎と根よりも内生真菌叢の類似度が高いことが示唆された。キャッサバは、挿木繁殖で内生真菌の感染経路としては、挿木に用いた母株から茎（主茎）・葉への感染が主要であると考えられる。そのため、Huay Bong 80 の主茎から高い頻度で見られた *C. boninense*、*C. gloeosporioides*、*C. siamense*、*D. phaseolorum*、*F. equiseti*、*P. phyllanthicola*、*P. capitalensis* はキャッサバの内生真菌である可能性が非常に高いことが示された。いくつかの菌種は、抗菌性をもたらすなどの生理活性があることが知られており、キャッサバの虫害抵抗性や病害抵抗性に参与している可能性が示唆された。このような内生菌による病虫害抵抗性の向上が間接的に環境ストレス耐性に寄与している可能性が考えられる。

2. タイ・コンケン大学周辺のサトウキビ農家を選定し、植物体と土壌をサンプリングして、N15 同位体比法によって、植物体内窒素における空中窒素の寄与率を実測した。その結果、対照の雑草との差異がなく、手法の再考を迫られる結果となった。

3. キャッサバについては、カメルーンの品種を用いて、菌根菌活性を中心に解析を行った。アーバスキュラ菌根菌とキャッサバ根との共生関係に及ぼす施肥・耕起の有無の影響を、カメルーンの 2 試験地（南部、東部）で検証した。その結果、根の菌根菌感染率は平均で、東部では 35%、南部では 45% を示した。両試験地で施肥・耕起は、菌根菌の感染率を減少させた。さらに、キャッサバ菌根菌の同定を行った。

4. 内生菌フリー個体作出のため、茎頂培養を行った。培地に置床した茎頂分裂組織は肥大し

てカルスを形成する個体と萌芽する個体に分かれた。カルスを形成した個体は、そのままさらに大きなカルスを形成する個体と萌芽する個体に分かれた。萌芽した個体は、そのまま生長しカルスの肥大や主茎の伸長、複数の葉の形成などが見られた。培養開始後 100 日までに萌芽した個体の一部は肥大したカルスから再度萌芽した。また、培養開始後 50 日目以降にある程度の大きさのカルスを形成し、かつ萌芽した個体からは発根していた。再度萌芽した個体や発根した個体は特に生長が速い傾向が見られた。培養開始 100 日後の生存率は 51.1%であった。添加した植物ホルモンについては、カルスは BA, NAA の濃度がそれぞれ 2mg/L、1mg/L の際に、最も大きくなった。萌芽は BA の濃度が 0.05-2 mg/L の範囲で発生した。発根は BA, NAA の濃度がそれぞれ 0.05-1 mg/L、1-4 mg/L の範囲で発生する頻度が高くなった。茎頂培養法を用いたキャッサバの組織培養に最適な植物ホルモンの濃度の組み合わせは BA の濃度が 0.2 mg/L、NAA の濃度が 0.2-2 mg/L であることを示した。本実験で確立した組織培養によって分化した個体の無菌性を確認した所、真菌・細菌・ウイルスとも感染していないことを確認した。

5 . タイで気温・降水量・雲量のデータ収集を進め、耐暑性、耐乾性についての分析の基礎資料とした。東南アジア大陸部では、キャッサバ栽培の現況に関する現地調査を行った。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Njukwe E., O. Onadipe, D. A. Thierno, R. Hanna, H. Kirscht, B. Maziya-Dixon S. Araki, A. Mbairanodji and T. Ngue-Bissa. Cassava processing among small-holder farmers in Cameroon: Opportunities and challenges. *Int. J. Agric. Pol. Res.* 2: 113-124. 2014. (査読有)
2. 遠藤力也. *Candida* 属とは何か? ~命名法改訂がもたらす酵母学名の再編~. *日本微生物資源学会誌*. 30: 169-175. 2014. (査読有)
3. Kunthiphun, S., R. Endoh, M. Takashima, M. Ohkuma, S. Tanasupawat and A. Akaracharanya. 2016. *Trichosporon heliocopridis* sp. nov., a urease-negative basidiomycetous yeast associated with dung beetles (*Heliocopris bucephalus* Fabricius). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 1180-1186. (査読有)
4. Sarr, P. S., J. W. Okon, D. Aime, B. Begoude, S. Araki, Z. Ambang, M. Shibata and S. Funakawa. Symbiotic N₂-fixation estimated by the 15N tracer technique and growth of *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. inoculated with Bradyrhizobium strain in field conditions. *Scientifica*. 7026859 (10 pages). 2016. (査読有)
5. Sarr, P. S., D. A. B. Begoude, T. L. Y. Mpon, D. A. Owanda, M. N. Kapeua and S. Araki. Composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) cultivars as influenced by chemical fertilization and tillage in Cameroon. *J. Appl. Biosci.* 98: 9270-9283. 2016. (査読有)
6. Sarr, P. S., A. Sugiyama, A. D. B. Begoudeb, K. Yazaki, S. Araki and E. Nawata. Molecular assessment of the bacterial community associated with Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) cultivation in Cameroon. *Microbio. Res.* 197: 22-28. 2017. (査読有)
7. Karim, Md. A., Md. A. Quayyau, S. Samsuzzaman, H. Higuchi and E. Nawata. Challenges and opportunities in crop production in different types of Char lands of Bangladesh: Diversity in crops and cropping. *Trop. Agric. Dev.* 61: 77-93. 2017. (査読有)
8. Uzuhashi S., R. Endoh, R. Manabe and M. Ohkuma. Draft genome sequences of the oomycete *Pilasporengium apinafurcum* strains JCM 30513 and JCM 30514, formerly classified as *Pythium apinafurcum*. *Gen. Announce.* 5: e00899-17. 2017. (査読有)
9. 岡三徳. タイにおけるキャッサバの技術開発の進展と生産の現状. *農業*. 1639. 2017(査読無)
10. Uzuhashi, S., R. Endoh, R. Manabe and M. Ohkuma. Draft genome sequences of the oomycete *Pilasporengium apinafurcum* strains JCM 30513 and JCM 30514, formerly classified as *Pythium apinafurcum*. *Genome Announcements* 5: e00899-17. 2017. (査読有)
11. Nakamura, N., E. Tanaka, C. Tanaka and Y. Takeuchi-Kaneko. Localization of helotialean fungi on ectomycorrhizae of *Castanopsis cuspidata* visualized by in situ hybridization. *Mycorrhiza*. 28: 17-28. 2018. (査読有)
12. Boxuan Y. and E. Nawata. Long-term trends of air temperature and the possible impacts on agriculture in Thailand. *J. ISSAAS* 24: 57-80. 2018. (査読有)

[学会発表](計 10 件)

1. Kunthiphun S., R. Endoh, M. Takashima, M. Ohkuma, S. Tanasupawat and A. Akaracharanya. Isolation and identification of yeasts associated with dung beetles (*Heliocopris bucephalus* Fabricius) in the north of Thailand. The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 2014. Chiang Rai, Thailand.
2. Sarr, P. S., S. Araki, M. Yemefack, A. G. Manga, A. D. Begoude, D. Ndong and F. Kaho. Effect of a two-year Pueraria fallow on soil characteristics and yields of cassava over two season cultivation in

- Andom, Eastern Cameroon. JST-JICA/SATREPS Project (FOSAS) Workshop. 2015. Yaounde, Cameroon.
3. Araki, S., Sarr, P. S., Saito, H., D. Ndong and M. Yamefack. Monitoring soil erosion and water runoff under different management. FOSAS International Symposium. 2015. Yaounde, Cameroon.
 4. 砂野唯・下野佑依・小阪花梨・P. Mankong・縄田栄治. GIS を用いたタイ中部畑作における作付体系動態の解析. 熱帯農業学会第 117 回講演会. 2015.
 5. Endoh, R. and M. Ohkuma. Transport of yeast consortium by the forest pest ambrosia beetle *Platypus quercivorus* (Platypodiace, Coleoptera). The 14th International Congress on Yeasts. 2016. Awaji, Hyogo.
 6. 遠藤力也・眞鍋理一郎・金城幸宏・鈴幸二・高島昌子・大熊盛也. 多様な真核微生物約 120 株のドラフトゲノム情報の公開と JCM オンラインカタログの利便性の向上. 第 11 回新産業酵母研究会講演会. 2016.
 7. 西村涼・竹内祐子・遠藤力也・J. Sanitchon・縄田栄治. キャッサバ植物体の表層および組織内に分布する真菌相の分析. 熱帯農業学会第 122 回講演会. 2017.
 8. 中村慎崇・田中千尋・竹内祐子. 根部内生菌 *Glutinomyces brunneus* 集団間における遺伝的分化の検出. 第 129 回日本森林学会大会. 2017.
 9. Endoh, R. and M. Ohkuma. Toward expansion of strain information on the yeasts in RIKEN BRC-JCM. Joint Meeting of the 9th ANRRC International Meeting & International Microbiome Workshop. 2017.
 10. 多田光史・田中千尋・白岩立彦. ダイズの生育初期に及ぼすダイズ茎疫病菌接種と短期湛水の影響. 第 186 回近畿作物育種研究会例会. 2018.

〔図書〕(計 1 件)

1. 岡三徳. イモ類の栽培と利用(岩間和人編). 朝倉書店. 2017. (総ページ数 245).

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：白岩立彦
ローマ字氏名：Shiraiwa Tatsuhiko
所属研究機関名：京都大学
部局名：農学研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：30154363

研究分担者氏名：間藤徹
ローマ字氏名：Matoh Toru
所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科
職名：教授（現在、名誉教授）
研究者番号（8桁）：50157393

研究分担者氏名：岡三徳
ローマ字氏名：Oka Mitsunori
所属研究機関名：東京農業大学
部局名：その他部局
職名：教授
研究者番号（8桁）：10354028

研究分担者氏名：荒木茂
ローマ字氏名：Araki Shigeru
所属研究機関名：京都大学
部局名：アジア・アフリカ研究科
職名：教授（現在、名誉教授）
研究者番号（8桁）：00158734

研究分担者氏名：竹内祐子
ローマ字氏名：Takeuchi Yuko
所属研究機関名：京都大学
部局名：農学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：80452283

研究分担者氏名：遠藤力也
ローマ字氏名：Endoh Rikiya
所属研究機関名：理化学研究所
部局名：その他部局
職名：研究員
研究者番号（8桁）：90634494

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。