

農業微生物研究の現状と今後の展望

農研機構 北海道農業研究センター
大規模畑作研究領域

池田 成志

はじめに

研究開始当初は懐疑的な声も多かったヒト共生微生物群集の研究 (Human Microbiome Project) は、今や従来の医学研究の常識を一新させる研究成果を続々と生み出す巨大なフロンティア領域となった (Huttenhower *et al.* 2014)。ヒトの共生科学の発展によりヒトの健康科学に対する概念が大きく変わったように、植物共生微生物群集 (plant microbiome) の多様性や機能性の解明は従来の動植物科学中心の農学だけでは解決できなかった課題に答えを与え得る可能性が高いと考えられる。

国際的な潮流としても、アメリカ植物病理学会は2015年に「Phytobiomes Initiative」を立ち上げ、植物圏生態系 (Phytobiome) の総合的な研究の重要性と推進を表明し (www.phytobiomes.org/), 特に植物共生微生物群集の多様性と機能性の解明が重視されている (Berg *et al.* 2017)。国内においても2017年に戦略プロポーザルとして「植物と微生物叢の相互作用の研究開発戦略」(CRDS-FY2016-SP-01) が示され、農学や食品科学、環境科学の問題解決に向けて、植物共生微生物の群集レベルでの研究を推し進める機運が国内外で高まっている。

土壌微生物や共生微生物における多様性解析の有用性は①生物農業や化学農業の影響評価、②病原体の検出、③新規の生物防除資材開発のための有用微生物の探索、④病原微生物の中間宿

主となる昆虫や線虫、原生動物等の特定等がAbdelfattah ら (2018) により指摘されている。これらに加えて、⑤化学肥料や栽培管理、作物の品種など多様な環境要因が作物の抵抗性や有用生物、有害生物に及ぼす影響評価なども今後の持続的農業技術の開発のために重要である。本稿では植物共生微生物群集の研究を中心に、植物共生科学分野における近年のトピックスを紹介し、それらの農業・食品産業における問題解決や技術開発への応用の可能性について私見を紹介したい。

1. 植物共生微生物群集の網羅的解析技術

農業に関係する微生物の中で、作物に共生する微生物が一番直接的に農業生産に影響するということは容易に想像し得ることである。しかしながら、ごく最近までは植物共生微生物の研究はごく一部の菌群に限られ、植物

共生微生物群集の多様性や機能性の全貌はブラックボックスであった。このような状況の中で筆者らのグループは2009年に世界で初めて植物共生微生物について群集レベルでの本格的な分析法 (細菌細胞濃縮法) を開発することに成功した (Ikeda *et al.* 2009) (図-1)。本法は多様性解析だけではなく、メタゲノム解析 (Ikeda *et al.* 2014; Tsurumaru *et al.* 2015; 池田ら 2016) やプロテオミクス解析 (Bao *et al.* 2014), 濃縮画分からの分離培養 (Ikeda *et al.* 2009; Anda *et al.* 2011) など植物共生系の網羅的な解析に利用できる。一方で、本法は比較的少量の解析試料を必要とすること、実験操作が比較的複雑かつ長時間になること、植物組織に強固に付着している微生物細胞の分析が困難な可能性があること等の問題点を持つ。現在、筆者らのグループでは本法を改善した簡易かつ迅速な植物共生微生物群集のメタゲノムDNA調製法を開発中である。

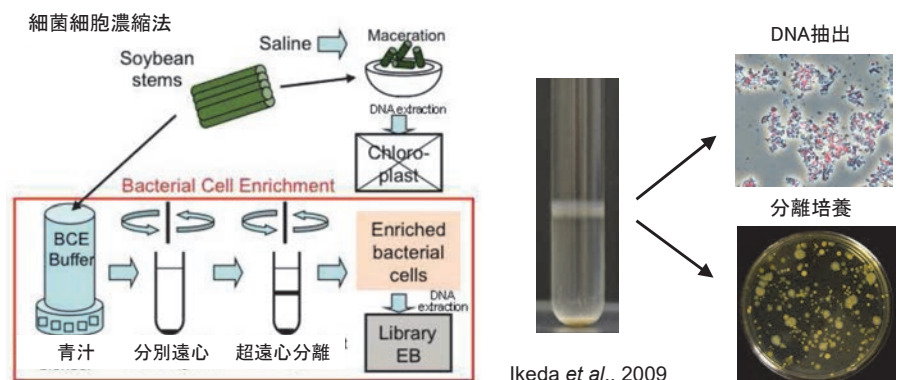


図-1 植物共生細菌群集分析のための細菌細胞濃縮法の概略
他の共生微生物分析法とは異なり、共生微生物の細胞を物理的に濃縮していることから、系統的な多様性解析だけでなく、各種のオミクス解析が可能である。

最近になり、アメリカや鹿児島大学のグループ等から人工核酸の使用による植物共生微生物のリボソーム RNA 遺伝子領域の特異的 PCR 増幅法が報告された (Toju *et al.* 2012; Lundberg *et al.* 2013; Ikenaga and Sakai 2014)。これらの手法は PCR ベースの技術であるため、簡易かつ迅速な方法が求められる病原微生物の診断や多検体を必要とする生態的研究等への活用が期待されるが、多様性解析以外のオミクス解析は不可能である。植物に共生する細菌や糸状菌の多様性解析については、上記で紹介した何れの共生微生物分析法についても国内の民間企業 (株式会社生物技研, 神奈川県相模原市) で受託サービスとして利用可能である。

最近では根組織などの微生物存在量の多い組織については、最新の次世代シーケンシング装置を利用すれば植物組織から直接抽出した DNA を用いて“力技”で多様性解析を行うことも可能である。例えば、イネの根から直接抽出した DNA を使用して次世代シーケンシングにより 16S rRNA 遺伝子を解析した場合、約 10 万配列の半分が根共生細菌由来であり、一般的な植物共生細菌の多様性解析に耐え得るデータ量と判断された (筆者ら, 未発表データ)。根のような微生物量の多い組織での多様性解析の場合は実験的なステップの少ない次世代シーケンシングによる“力技”のほうが望ましいと考えられる。

上述のような植物共生微生物群集の

多様性解析により、従来の方法では不可能であった植物や農産物組織中の未知の微生物群の探索や既知の有用・有害微生物等の動態解析、群集全体での定性・定量的な解析が可能になった。また、配列情報に基づいた共生微生物群集の多様性やメタゲノム解析を行うことにより、Alphaproteobacteria 綱や Rhizobiales 目などの異なる分類単位での動態解析や、系統情報と機能情報の関係性の解明などの研究を行うことが非常に容易になった。

(1) 植物共生微生物群集と肥料の相互作用

共生微生物の多様性解析技術の開発は、品種の違いや理化学的環境、生物間相互作用等の多様な要因が共生微生物群集の系統的・機能的多様性に与える影響の評価を可能にした (Ikeda *et al.* 2010a; Ikeda *et al.* 2015; Okubo *et al.* 2014; Okubo *et al.* 2015)。例えば、筆者らのグループでは窒素の施肥レベルの違いで植物共生微生物の群集構造は大きく変化することを明らかにした。即ち、窒素施肥量の多い条件では Gammaproteobacteria 綱の割合が増加し、逆に窒素施肥量の少ない条件では Alphaproteobacteria 綱の割合が増加するという現象をダイズやイネなど系統的に大きく異なる作物種で見出した (Ikeda *et al.* 2010b; Ikeda *et al.* 2014)。これら 2 つの菌群の拮抗的な関係は、植物共生系において、高窒素条件の植物組織には高栄養要求性の (Copiotrophic な性質の

強い) Gammaproteobacteria 綱が、低窒素条件の植物組織には低栄養要求性の (Oligotrophic な性質の強い) Alphaproteobacteria 綱がそれぞれ適応しやすいと考えると生態的な視点からは理解しやすい。即ち、共生微生物群の栄養源となる植物由来の代謝物組成の変動が共生微生物の多様性の変動要因となっている可能性が考えられる。トウモロコシのゴマ葉枯病では、葉共生細菌の多様性と病害の間に負の相関がみられ、窒素施肥は葉共生細菌の多様性の減少を助長することが報告されている (Manching *et al.* 2014)。有用微生物を農業で活用するためには、施肥管理は植物に影響を与えるだけでなく、植物の代謝物の変動を介して地上部も含めた植物共生系全体の微生物群集の多様性や機能性に強く影響を与える、と認識することが重要である。

植物は活発な細胞分裂を行っている組織において細胞壁のペクチン合成の副産物としてメタノールを生成するが (Fall and Benson 1996)、植物共生系の主要な菌群である Alphaproteobacteria 綱、特に根粒菌を含む有用微生物群が属する Rhizobiales 目の細菌群はメタノールを中心とした C1 化合物を積極的に代謝する能力を有していることが近年の研究において明らかにされている (Kolb and Stacheter 2013)。メタノールのような植物が老廃物として放出する化合物を自らの栄養源として代謝できる微生物群は植物との栄養的な競合を避けることができるため、有用

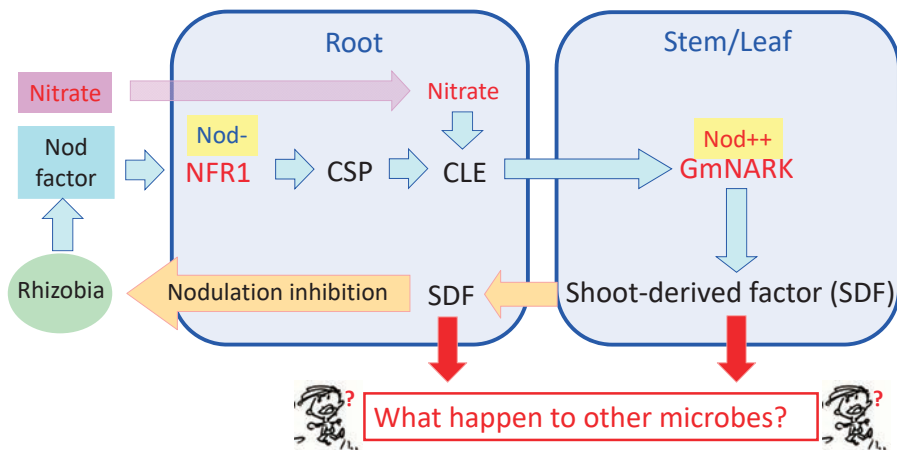


図-2 ダイズにおける根粒菌制御系の概略

NFR1, CLE, GmNARK はそれぞれ根粒菌制御に関わるダイズ遺伝子, CSP は根粒菌と菌根菌の両方の共生に必須の情報伝達系 (Common Symbiosis Pathway) を示す。NFR1 と GmNARK が変異すると根粒非着生 (Nod-) と根粒超着生 (Nod++) の表現型になる。十分な量の共生微生物が感染している時や, 十分な量の養分が土壌中にある時は, 根粒菌や菌根菌の感染を制御する物質 (SDF) が葉で生成され, 根に移行して共生微生物の感染を阻害すると考えられている。例えば, 根粒菌の場合, 土壌溶液中の硝酸態窒素が一定以上の濃度になると, 根粒菌の感染レベルに関係なく CLE 以下の伝達系が活性化される。

微生物として植物と相互作用できるように進化している可能性が高いのではないだろうか」と筆者は推察している。

上記に加えて, なぜ高窒素条件下で Alphaproteobacteria 綱が抑制されるのか, という点については, CSP (Common Symbiosis Pathway) のような植物の有用共生微生物の制御系が高栄養状態で起動するという可能性が考えられる(池田ら 2013)(図-2)。CSP において最も重要な遺伝子と考えられている CCaMK 遺伝子はアブシジン酸を介した抗酸化酵素の誘導による活性酸素の制御システムに参与している(Shi *et al.* 2014)。したがって, 活性酸素に対する耐性の有無が根粒菌や菌根菌と同じように, 幅広い共生微生物群においても CSP を通じた感染初期における活性酸素の生成と制御が病原菌と識別するための植物との相互作用として重要であるのかもしれない(Nanda *et al.* 2010)。

大変興味深いことに, 根粒菌や菌根菌の共生に関与する CCaMK のような植物遺伝子が破壊されると, ダイズとイネの両方の共生微生物群集

で Alphaproteobacteria 綱が強い影響を受け, 特に Rhizobiales 目の菌群が植物の強い遺伝的制御下にあることが示唆された(Ikeda *et al.* 2010a; Ikeda *et al.* 2011)。イネに共生する Alphaproteobacteria 綱が窒素施肥と CSP の植物遺伝子群の両方から強い影響を受けることはマメ科による根粒菌制御との類似から大変興味深い(Minamisawa *et al.* 2016)。

(2) 微生物多様性解析による病害抑止土壌の機構解明

これまでブラックボックス状態であった病害抑止土壌の機構解明に関する研究報告数も大きく増加しつつある。一般的には土壌の(微)生物多様性が高いこと, 糸状菌類よりも細菌類の増加が病害防除には望ましいと考えられることが多いが, Xiong *et al.* (2017) は, パニラの *Fusarium* 萎凋病の抑制土壌では非抑止土壌と比較して糸状菌類の多様性が高く, 細菌類の多様性が低かったと報告している。糸状菌類では Zygomycota 門, Basidiomycota 門, 細菌類では

Acidobacteria 門, Verrucomicrobia 門, Actinobacteria 門, Firmicutes 門の割合が病害抑止土壌において高いと報告された。特に, 糸状菌の *Mortierella* 属の割合は抑止土壌の糸状菌類の全多様性において 37% を占めていたと報告されたが, その微生物学的な意味は現段階では不明である。

コムギ赤カビ病菌に対する抑止土壌についても, 抑止土壌において細菌類の多様性が高いことや, 赤カビ病菌に対して拮抗性を持つと期待される特定の細菌群 (*Pseudomonas* 属と *Bacillus* 属) が抑止土壌に多いことが報告されている(Legrand *et al.* 2019)。Campos *et al.* (2016) は, これらの抑止土壌の微生物多様性解析から 4 科の細菌群 (Chitinophagaceae, Acidobacteriaceae, Xanthomonadaceae, Burkholderiaceae) がコムギ赤カビ病の発病抑制と相関を持つことを明らかにしている。

バナナのパナマ病の抑止土壌では, 門レベルで Acidobacteria 門の割合が高いこと, 属レベルで *Gp4* 属, *Gp5* 属, *Chthonomonas* 属, *Pseudomonas* 属, *Tumebacillus* 属等の割合が高いことが明らかとなった(Shen *et al.* 2015)。特に, *Gp5* 属と *Pseudomonas* 属については有効態リン酸と共に発病抑制と有意な相関があることが明らかにされている。

細菌性の土壌病害では, ミシガン州で調べられたジャガイモそうか病抑止土壌について *Lysobacter* 属や Acidobacteria 門の *Gp4* 属と *Gp6* 属

の割合が増加していることが報告されている (Rosenzweig *et al.* 2012)。さらに、病害抑止土壌と同様に、菌根菌についても特定の土壌において菌根菌の根外菌糸体の活性が阻害されることが見いだされている。このような菌根菌の共生を阻害する土壌では Acidobacteria 門や、糸状菌類に対する拮抗細菌群が優占化している酸性土壌が特定されている (Svenningsen *et al.* 2018)。このような土壌の特性は病害抑止土壌と類似しており、菌根菌の共生効果も土壌微生物相の影響を強く受けることが明らかとなった。

以上のような知見から、病害抑止土壌では病原体に対する既知の拮抗微生物群が優占化しているだけでなく、門レベルでは Acidobacteria 門、属レベルでは *Mortierella* 属、*Gp4* 属等の従来の植物病害研究では研究対象になることが少なかった特徴的な微生物群が検出されている。多様性解析にもとづいた微生物生態的な研究の推進により、土壌の持つ病害抑止機構の詳細な解明や土壌の微生物性診断技術の開発への期待が高まりつつある。

(3) 光環境による農業微生物の制御の可能性

近年の共生微生物研究における驚きの成果の1つは、作物が受ける光の質が有用微生物との共生を制御していることが明らかにされたことである (Suzuki *et al.* 2011; Nagata *et al.* 2015)。根粒菌や菌根菌などの有用微生物の共生は宿主植物が受ける赤

色 (Red) と遠赤色 (Far Red) の光の比 (R/FR) により強く制御される (生物学・農学分野では Red は波長が 660nm, Far Red は 730nm にピークを持つ光)。この制御系は作物に照射する光について、R/FR が高いときはジャスモン酸の生合成が活性化されて有用微生物の共生を促進し、R/FR が低いときは有用微生物との共生を阻害する、というものである。以上のような視点から、微生物資材や微生物農薬の研究の歴史を振り返ってみると、上述したような光環境を考慮した研究は皆無であることに気づく。このような重要な光環境の情報の欠落が、従来まで微生物資材や微生物農薬の効果が農業現場で不安定であったことの原因の1つではないかと筆者は考えている。

(4) 農薬が農業微生物に及ぼす影響

農薬の種類や量が共生系に及ぼす影響も有用微生物の安定的かつ効果的な農業利用のために大変重要な情報である。実際に、殺虫剤や除草剤が根粒菌の共生を強く阻害することは以前から知られている (Fox *et al.* 2007; Zablotowicz and Reddy 2007)。市販されている農薬は当然ながら、合法的な販売のために法律上で定義された生物群に対する安全性は担保されているが、決して生態系全体の生物群に対する安全性が完全に保障されているのではない。その種類に関わらず、農薬の散布は標的外の微生物群にも強い影響を与えることは以前から良く知られている科学的事実である (Sanogo

et al. 2000)。

除草剤の中でも、グリホサート系除草剤については圃場へ散布すると *Fusarium* 属を土壌中で増加させる作用がある (Johal and Huber 2009)。グリホサート系除草剤の施用は作物の病害抵抗性を弱めるだけでなく、根圏微生物やエイドファイトの増殖も阻害し、トウモロコシ苗における赤カビ病のような病害を助長する可能性もあることも指摘されている (Carranza *et al.* 2019)。また、各種の「殺菌剤」の施用は土壌細菌の多様性に影響を与えるだけではなく、アルカリホスファターゼやβ-グルコシダーゼ等の一部を除いて、多様な土壌酵素の活性も阻害する (Baćmaga *et al.* 2018)。環境中で緩やかに分解される農薬類については、短期的な調査では環境に対する影響が少なく過小評価される危険性があり、調査期間も長期間にわたって行われるべきだと考えられる。

無菌のシロイヌナズナを使った基礎研究ではあるが、葉面への糸状菌 (*Pleospora rosae*, *Cochliobolus sp.*, *Alternaria tenuissim*, *Cladosporium macrocarpum*) の接種により開花が遅くなり、種子のバイオマスが増加することが報告されている (Zahn and Amend 2019)。このような共生微生物の宿主作物に対する有用効果は、農業現場では葉面への農薬散布により阻害されている可能性があり、このような地上部組織の共生微生物が植物の各種形質に及ぼす影響評価は今後検討する余地が大きいと考えられる。

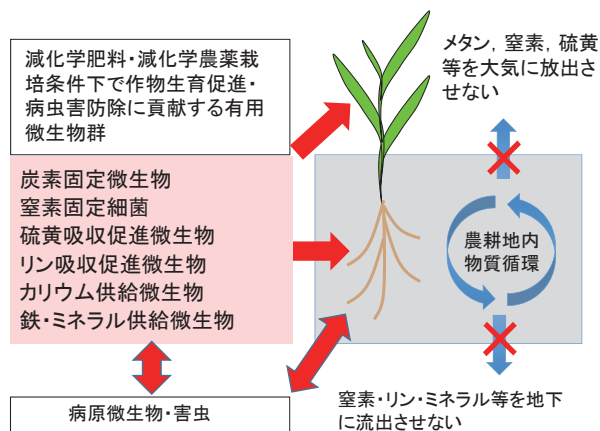


図-3 有用微生物を利用した持続的農業の概念図

炭素や窒素、硫黄、各種のミネラルなど植物の代謝系と地球化学的な物質循環をつなげる微生物群の中に、動植物に対して安全性が高く、同時に、作物の生育促進や病害防除に有用なものが多い。ただし、それらの有用微生物の多くは化学肥料や化学農薬の施用、頻繁な耕起作業等により増殖が阻害されたり、死滅しやすい。

土壌殺菌剤による病害防除は一時的な効果は期待できるが、中長期的には殺菌剤分解微生物の増加により病害が多くなることも指摘されている (Finckh *et al.* 2015)。レタスの褐色根腐病は慣行栽培においては化学肥料や除草剤 (プロピザミド) で助長される (Ariena *et al.* 2015)。生産者にとって化学肥料や除草剤が病虫害の発生を助長する可能性があるということは思いもよらないものであり、このような不合理が「残酷な悪循環」として指摘されている。産官学の農業関係組織は化学肥料や化学農薬の利用法だけでなく、そのリスクについても慣行栽培生産者のための学習の機会を提供する必要がある。

栽培後の除草作業として散布された除草剤のグリホサートとクレトジムが作物残渣の根圏の真菌類と卵菌類に及ぼす影響が検討され、除草剤散布後、*Pythium volutum* と *Myrmecridium* 属菌の割合がコムギの弱った根や枯死した根の上で急激に増加することも明らかにされ (Schlatter *et al.* 2018)、このように一時的に増えた病原菌が十分に減少するまで、上記の除草剤散布後 2～3 週間程度の期間を空けてから次作を始めることが重要であると結論づけ

られた。このように、除草剤散布により枯死・衰弱した雑草や作物の根で *Rhizoctonia* 属や *Pythium* 属等の病原菌が増加するリスクを認識する必要がある。さらに、グリホサート系除草剤のような浸透移行性や幅広い「殺菌スペクトラム」を考えると、菌根菌のような農業上の有用微生物だけでなく、メタン酸化などの地球の物質循環や温暖化問題にも関与する重要な微生物群にも影響する可能性もある。

上述したような化学農薬や化学肥料の農耕地生態系の微生物群に対する影響評価を通して、各種の化学物質との併用が可能な有用微生物の探索や利用方法の開発等を検討することも価値があることのように思われる。その際に、次世代シーケンシング技術による土壌微生物や植物共生微生物の多様性解析やメタゲノム解析は、農薬の農耕地生態系に対する実用的な環境影響評価法の一部として効果的に使える可能性がある。

3. 有用微生物の分離

(1) 有用微生物の分離培地

有用微生物の探索や選抜は増殖のために植物の代謝系に依存しつつも、植

物と栄養的に強い競合関係を持たない低栄養要求性の微生物群が有用微生物の探索源の候補として望ましいと考えられる (図-3)。このような条件に合う市販の培地としては R2A 培地が挙げられる。R2A 培地は水系の低栄養要求性細菌の分離用培地として開発されたが (Reasoner *et al.* 1979)、筆者の研究グループはこの R2A 培地を植物組織からの共生細菌の分離培養に利用して従来の培地よりも系統的に多様な植物共生微生物が得られる傾向があること、特に Alphaproteobacteria 綱の分離頻度が高くなる傾向があることを明らかにしている (Okubo *et al.* 2009; Someya *et al.* 2013; Okazaki *et al.* 2014)。本培地の利用により、一般的に難培養性とされる Verrucomicrobia 門の菌群もテンサイ主根から容易に分離することができた。

また、植物細胞と増殖のための栄養分について競合しない低栄養要求性の有用微生物群を分離するための他の培地としては、メタンやメタノールなどの C1 化合物、植物由来のアルコール類やアルデヒド類、蟻酸、根圏で分泌される有機酸、リグニン等の植物由来の比較的代謝の難しい化合物を炭素源とした培地の利用が考えられる。特に、メタンやメタノール、アルデヒド類、炭化水素類などの植物の炭素代謝に関連した共生微生物群の中から有用微生物を探索・選抜することは重要だと思われる。

アラビドプシス根圏では *Bacillus* 属の有用細菌をリンゴ酸で誘引すること

や (Rudrappa *et al.* 2008), 冠水条件下のイネに多く含まれるエタノールが内生細菌により利用されている可能性なども報告されている (Krause *et al.* 2011)。 *Pseudomonas* 属においては根由来の内生株の特徴として、一般的な植物の木部の成分として最も含量の多い L-アラビノースを利用できることが明らかにされている (Malfanova *et al.* 2013)。オキザロ酢酸に対する炭素源利用能 (Oxalotrophy) が *Burkholderia* 属内の植物有用菌の特性であると同時に、宿主への定着に重要であることも大変興味深い (Kost *et al.* 2014)。上記のような知見を活用して有用な菌群を積極的に探索・選抜することで植物に親和性の高い有用微生物を選抜することが可能であろう (大久保ら 2016)。

これまでに、筆者のグループでは大量の分離菌の多様性情報を種レベルの OTU (Operational Taxonomic Unit) として扱い、数千株規模の菌株コレクションから作物に強い親和性を持つ有用微生物群を迅速かつ容易に特定することが可能となった (Okubo *et al.* 2009; 農林水産技術会議事務局 2015)。また、上述した細菌細胞濃縮法を活用すれば植物組織中に散在している微生物群を濃縮画分から効率的かつ網羅的に分離培養することも可能であることも示した (Anda *et al.* 2011)。さらに、植物共生系のメタゲノム解析を通して着目する共生微生物群集の機能遺伝子の情報に基づいて特定の機能性を持つ有用微生物 (群) を

効率的に選抜することも可能かつ重要である (Tsurumaru *et al.* 2015)。

(2) 種子共生微生物

有用微生物の分離源としては、以前から発芽後に最初に植物共生系で優占化できるチャンスが高いと考えられる種子共生微生物が注目されていた (Kaga *et al.* 2009)。しかしながら、一般的に種子は成熟しながら乾燥も進む組織であるため、種子中の微生物の多くは休眠状態にあり、従来までは分離培養が難しいとも考えられていた (Truyens *et al.* 2015)。近年の多様性解析により非常に多様な微生物が種子に共生していることが明らかにされたことから (Klaedtke *et al.* 2016)、国内外の国際的な種苗会社の多くが市販用種子の付加価値向上を目的として植物共生微生物の研究に興味を示し、一部の会社では既に大々的な有用共生微生物の研究を始めている。栽培化の過程において有用な微生物との相互作用が改変されてきたかもしれないという推察のもとに、野生種と作物種の比較により種子の共生微生物の多様性や共進化の解明の必要性も指摘されている (Berg and Raaijmakers 2018)。

種子の発芽過程はメタノールが大量に発生する場と考えられ (Gambonnet *et al.* 2001)、実際に多くの植物種子には *Methylobacterium* のような C1 代謝微生物が優占種として検出されており (Kaga *et al.* 2009)、それら微生物群が種子の発芽に伴い葉面でのメタノール代謝にも関与していることも幾つか

の作物種で示唆されている (Holland and Polacco 1994)。さらに、多くの種子や果実では成熟化にともなって浸透圧が高まることから、浸透圧耐性を指標とした有用微生物の選抜なども合理的であると考えられる。耐性機構の類似性から、浸透圧耐性微生物は耐乾性や耐熱性を持つ可能性も高く、それらの微生物群は資材化適性の面からも有利になる可能性も高い。

4. 微生物農薬・微生物資材の製剤化の問題

微生物資材の製品開発のための有用微生物の製剤化や保存性に関する研究は大変重要であるにも関わらず、当該分野では過去 20 年近くにわたり見るべき大きな進展がない (Bashan *et al.* 2014)。これまでに資材化された微生物群は耐乾性や耐熱性、胞子形成能等を持つ *Bacillus* 属や *Streptomyces* 属等のグラム陽性細菌群、糸状菌類が殆どである。グラム陰性細菌群の有用微生物について多くの研究がなされてきたにも関わらず、耐乾性や耐熱性が弱いことから製剤化につながった例は非常に少ない。今後は、多様な微生物群の製剤適性の向上に関する技術開発、それらの基盤となる微生物のストレス耐性 (獲得) 機構の解明を進める必要があると考えられる。また、土壌病虫害防除のためには、深い土壌深度における根組織のような微好気的な環境下での活用が期待できる有用微生物の探索や選抜も検討する必要があるかもしれない。

5. 共生工学

植物、害虫、天敵の3者間の相互作用に関する研究は分子生物学から群集生態学に至る広い分野で長い研究の歴史があるが、この3者の相互作用に根圏の共生微生物も関与していることを示す論文が特に近年に至り続々と発表されている (Tao *et al.* 2017)。本稿では特に作物の代謝物や形態の改変、天敵生物の誘引能力などを介して、作物・害虫・天敵・共生微生物の4者が係る共生系を改変するという共生工学的な病虫害軽減技術の話題を中心について紹介したい。なお、農業現場における有用微生物の共生工学的な研究情報、特に病虫害防除に関する実用的なものについては別の総説論文にまとめたので、興味のある読者はそちらを参照して頂きたい (池田 2019)。

トマトの糸状菌エンドファイト (非病原性 *Fusarium solani*) はトマトのナミハダニ (*Tetranychus urticae*) に対するトマトの抵抗性を強化するだけでなく、ナミハダニの天敵 (*Phytoseiulus persimilis*: チリカブリダニ) も強く誘引する (Pappas *et al.* 2018)。また、トマトの根に共生する別の糸状菌エンドファイト (非病原性 *Fusarium* 属菌) は、宿主のトマト上にコナジラミがいない時は、雑食性のコナジラミの天敵昆虫 (*Macrolophus pygmaeus*: 捕食性カスミカメムシ) の増殖を抑制するが、トマトがコナジラミの食害を受けている時は当該天敵昆虫の増殖を阻害しな

いという精妙な生物間相互作用を制御してトマトとの共生関係を保っている (Eschweiler *et al.* 2019)。このような共生機構の解明は、害虫にもなり得る可能性があるために農業利用が難しい雑食性の天敵昆虫の効果的な活用技術の開発にもつながる可能性がある。さらに、上記の根に共生する非病原性 *Fusarium* 属菌エンドファイトの共生により、生理病である尻腐果の発生も減少することも明らかにされている。

さらに、植物ウイルス (bean pod mottle virus: BPMV) はダイズに感染すると、自身のベクターである害虫 (*Epilachna varivestis*: インゲンテントウ) の天敵 (*Pediobius foveolatus*: 寄生バチ) がダイズによって誘引されることを抑制するが、ダイズに根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) ともう1種の有用細菌 (*Delftia acidovorans*) が共生すると、BPMVの感染に科関係なくダイズによる寄生蜂の誘引が強化されるという複雑な生物間相互作用が存在することも明らかとなっている (Pulido *et al.* 2019)。

Beauveria bassiana や *Metarhizium anisopliae* 等の昆虫病原糸状菌類は土壤中だけではなく、糸状菌エンドファイトとして植物組織内部にも生息し、植物の生育を促進している (Pineda *et al.* 2017)。さらに、これらの糸状菌類は宿主植物を害虫の被害から守るだけでなく (Jaber and Enkerli 2016)、殺した害虫を分解する過程で菌糸を介して宿主植物への養分供給にも貢献しているという驚くべき現象

も明らかにされている (Behie *et al.* 2012)。

これまで病害防除の視点からの利活用が検討されてきた *Trichoderma* 属菌のような根圏土壌に生息する有用微生物が地上部の葉等の組織内部にも共生し、アザミウマ類のような害虫の増殖を阻害することも報告されている (Muvea *et al.* 2014)。*Trichoderma hazarnium* については、根への共生により寄生バチ (*Aphidius ervi*: エルビアブラバチ) がアブラムシ (*Macrosiphum euphorbiae*: チューリップヒゲナガアブラムシ) の食害を受けているトマトにより強く誘引されることも報告されている (Coppola *et al.* 2017)。

Trichoderma 属菌と同様に病害防除研究に広く用いられてきた *Bacillus pumilis* や *Pseudomonas fluorescens* が害虫の天敵 (寄生者) を誘引することも報告されている (Pangesti *et al.* 2015)。逆に、同じ *P. fluorescens* の菌株が同じ宿主上で、別の害虫の寄生者を減らし、害虫を増やしてしまうという例も報告されており (Pineda *et al.* 2012)、情報の整理と今後の研究の方向性を丁寧に検討することが求められている。

また、菌根菌の共生率が高くなると葉が厚くなるなどの植物の形態変化や師管中の窒素含量を減らすことを介してアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*: エンドウヒゲナガアブラムシ) の生育を阻害することも報告されている (Garzo *et al.* 2018)。菌根菌について

も菌株や種の遺伝的背景の違いにより、病原菌と同様に地上部害虫に対して多様な影響を与えることが知られ始めており、特に菌根菌の遺伝的背景を丁寧に検討した上での今後の研究の展開が望まれる。

6. 共生育種

従来の植物育種は「緑の革命」に象徴されるように大量の化学肥料と化学農薬の使用を前提として行われており、開発された品種の多くに半矮性遺伝子のような自然条件下では負の作用をもたらすと考えられる遺伝子が意図的に導入されている。このような遺伝子の導入は *Septoria* 属菌のような病原菌に対する抵抗性の低下や養分吸収のための根圏機能低下等につながり、減化学肥料や減化学農薬での栽培条件下では収量の減少や病虫害の発生等の問題の原因となる。このような問題を解決し、持続的な農業を推進するための先進的な育種として、海外では有用微生物を誘引する植物育種の可能性が指摘され (Parker 2012)、実際に持続的農業に適した品種の育種も真剣に検討され始めている (Nuijten *et al.* 2017)。

例えば、コムギ立枯病の自然抑止土壌の形成において蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌が立枯病菌の増殖を抑制することは広く知られている。この蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌はコムギの根から分泌される有機物をエサとして根圏土壌中で増殖するが、その増殖の

程度には品種間差異があることが報告されている (Mazzola 2002)。また、高い病害抵抗性を持つコムギ品種の根圏では多様性解析の結果、拮抗性真菌類 (*Chaetomium* 属, *Clonostachys* 属, *Gliomastix* 属, *Sarocladium* 属, *Trichoderma* 属等) の割合が高いことも報告されている (Lenc *et al.* 2016)。トウモロコシゴマ葉枯病では葉共生細菌の多様性が宿主により遺伝的に制御され、葉共生細菌の多様性がゴマ葉枯病抵抗性にも関与していることが示唆されている (Balint-Kurti *et al.* 2010)。

細菌病関係では、青枯病に対する抵抗性トマト品種では感受性品種よりも細菌エンドファイトの多様性が高いことや、青枯病菌に対して拮抗性を示すと考えられる細菌群 (*Pseudomonas oleovorans*, *Pantoeaananatis* 属, Enterobactercloacae 科) がより多く共生することが明らかにされている (Upreti and Thomas 2015)。また、モモの根頭がんしゅ病の抵抗性品種と感受性品種の根の細菌エンドファイトを比較した結果、抵抗性品種で細菌類の多様性が高く、多くの生菌数が検出された (Li *et al.* 2019)。同時に、根では *Streptomyces* 属と *Pseudomonas* 属、小枝では *Rhizobium* 属等の *Agrobacterium* 属病原細菌に対する拮抗細菌が抵抗性品種から多く検出された。これらの結果は抵抗性品種の抵抗性に有用微生物が関与している可能性を示唆している。

おわりに

農業や食品の現場において有用微生物を人間の都合の良い形で安定的かつ効果的に利用するためには、それらの微生物が積極的に定着し、有用機能を発揮してくれるような環境条件を人間が整えることが重要であると思われる。そのためには、植物科学や微生物学だけでなく、膨大な植物の代謝情報、微生物群集の多様性や機能性情報、栽培場所の環境情報を農業ビッグデータとして処理する情報科学 (平藤, 2015) や環境計測科学 (白井, 2013) などの分野との連携が今後重要になるであろう。以上のような研究情報を集積・活用して無理のない減農薬や減化学肥料を進め、安定した収量や品質を確保するという形で真にスマートな持続的農業を推進することが望ましい。さらに、そのような農業体系は病虫害や雑草の薬剤耐性化を抑制すると考えられ、結果として既存の化学農薬や抵抗性品種の効果的かつ長期的な利用にもつながると筆者は考える。

謝 辞

本研究の一部は科研費基盤研究 (C) 「地上部光環境による植物根圏共生微生物群集の制御機構の解明」 (19K05759)、JST, CREST, JPMJCR1512 (フィールドセンシング時系列データを主体とした農業ビッグデータの構築と新発見の発見) の支援を受けたものである。

引用文献

- Abdelfattah *et al.* 2018. Metabarcoding, A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biol. Control*. 120,1-10.
- Anda *et al.* 2011. Isolation and genetic characterization of *Aurantimonas* and *Methylobacterium* strains from stems of hypernodulated soybeans. *Microbes Environ.* 26, 172-180.
- Ariena *et al.* 2015. The vicious cycle of lettuce corky root disease, effects of farming system, nitrogen fertilizer and herbicide. *Plant Soil* 388,119-132
- Baćmaga 2018. Changes in microbiological properties of soil during fungicide degradation. *Soil Sci. Annual.* 69,169-176.
- Balint-Kurti *et al.* 2010. Maize leaf epiphytic bacteria diversity patterns are genetically correlated with resistance to fungal pathogen infection. *MPMI.* 23,473-484.
- Bao *et al.* 2014. Metaproteomic identification of diazotrophic methanotrophs and their localization in root tissues of field-grown rice plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 80,5043-5052.
- Bashan *et al.* 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology, formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil* 378,1-33.
- Behie *et al.* 2012. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336,1576-1577.
- Berg *et al.* 2017. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, fix050.
- Berg, G. and J.M. Raaijmakers 2018. Saving seed microbiomes. *The ISME Journal* 12,1167-1170.
- Campos *et al.* 2016. Soil suppressiveness and its relations with the microbial community in a Brazilian subtropical agroecosystem under different management systems. *Soil Biol. Biochem.* 96,191-197.
- Carranza *et al.* 2019. Effect of in vitro glyphosate on *Fusarium* spp. growth and disease severity in maize. *J. Sci. Food Agric.*, 99,5064-5072.
- Coppola *et al.* 2017. *Trichoderma harzianum* enhances tomato indirect defense against aphids. *Insect Sci.*, 24,1025-1033.
- Eschweiler *et al.* 2019. Tomato inoculation with a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* enhances pest control by changing the feeding preference of an omnivorous predator. *Front. Ecol. Evol.* 7,213.
- Fall, R. and A.A. Benson 1996. Leaf methanol—the simplest natural product from plants. *Trends Plant Sci.* 1,296-301.
- Finckh, M.R., A.H.C. van Bruggen, and L. Tamm. eds. 2015. *Plant Diseases and their Management in Organic Agriculture*. St. Paul, Minnesota, APS Press.
- Fox *et al.* 2007. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104,10282-10287.
- 古屋廣光ら 2015. 秋田県でみられるアスパラガス生育不良の原因究明. 秋田県立大学ウェブジャーナル 2,176-180.
- Gambonnet *et al.* 2001. Folate distribution during higher plant development. *J. Sci. Food Agr.* 81,835-841.
- Garzo *et al.* 2018. High levels of arbuscular mycorrhizal fungus colonization on *Medicago truncatula* reduces plant suitability as a host for pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*). *Insect Sci.*, 17,1-14.
- 平藤雅之 2015. スマート農業とフェノミクス. 北海道土壤肥料研究通信 61,1-6.
- Holland, M.A., and J.C. Polacco 1994. PPFMs and other covert contaminants, is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45,197-209.
- Huttenhower *et al.* 2014. Advancing the microbiome research community. *Cell*, 159,227-230.
- Ikedo *et al.* 2009. Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. *Microb. Ecol.* 58,703-714.
- Ikedo *et al.* 2014. Low nitrogen fertilization adapts rice root microbiome to low nutrient environment by changing biogeochemical functions. *Microbes Environ.* 29,50-59.
- Ikedo *et al.* 2010a. Community- and genome-based views of plant-associated bacteria, plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol.* 51,1398-1410.
- Ikedo *et al.* 2015. Characterization of leaf blade- and leaf sheath-associated bacterial communities and assessment of their responses to environmental changes in CO₂, temperature, and nitrogen levels under field conditions. *Microbes Environ.* 30,51-62.
- Ikedo *et al.* 2010b. Community shifts of soybean stem-associated bacteria responding to different nodulation phenotypes and N levels. *ISME J.* 4,315-326.
- Ikedo *et al.* 2011. The genotype of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene (*CCaMK*) determines bacterial community diversity in rice roots under paddy and upland field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77,4399-4405.
- 池田成志 2019. 作物圏共生微生物による病虫害防除. 日本有機農業学会監修「有機農業大全」, 東京, pp.260-278.

- 池田成志ら 2013. 植物共生科学の新展開と農学研究におけるパラダイムシフト. 化学と生物 51,462-470.
- 池田成志ら 2016. 植物共生細菌群集のメタゲノム解析. 服部正平監修「メタゲノム解析実験プロトコール」, pp. 124-130.
- Ikenaga, M. and M. Sakai 2014. Application of locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide-PCR clamping technique to selectively PCR Amplify the SSU rRNA genes of bacteria in investigating the plant-associated community structures. *Microbes Environ.* 29,286-295.
- Jaber, L.R. and J. Enkerli 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biol. Control* 103,187-195.
- Johal, G.S. and D.M. Huber 2009. Glyphosate effects on diseases of plants. *Europ. J. Agronomy.* 31,144-152.
- Kaga *et al.* 2009. Rice seeds as sources of endophytic bacteria. *Microbes Environ.* 24,154-162.
- Klaedtke *et al.* 2016. Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environ. Microbiol.* 18,1792-1804.
- Kolb, S.P.D. and A. Stacheter 2013. Prerequisites for amplicon pyrosequencing of microbial methanol utilizers in the environment. *Front. Microbiol.* 4,268.
- Kost *et al.* 2014. Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated *Burkholderia* species, is involved in successful root colonization of lupin and maize by *Burkholderia phytofirmans*. *Front. Microbiol.* 9,421.
- Krause *et al.* 2011. Exploring the function of alcohol dehydrogenases during the endophytic life of *Azoarcus* sp. strain BH72. *MPMI* 24,1325-1332.
- Legrand *et al.* 2019. Co-occurrence analysis reveal that biotic and abiotic factors influence soil fungistasis against *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95,fiz056.
- Lenc *et al.* 2016. Effects of farming system on root-zone fungal populations in wheat. *J. Plant Pathol.* 98,471-482.
- Li *et al.* 2019. Insight into the bacterial endophytic communities of peach cultivars related to crown gall disease resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 85,e02931-18.
- Lundberg *et al.* 2013. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nat. Methods*, 10,999-1002.
- Malfanova *et al.* 2013. Is L-arabinose important for the endophytic lifestyle of *Pseudomonas* spp.? *Arch. Microbiol.* 195,9-17.
- Manching *et al.* 2014. Southern leaf blight disease severity is correlated with decreased maize leaf epiphytic bacterial species richness and the phyllosphere bacterial diversity decline is enhanced by nitrogen fertilization. *Front. Plant Sci.* 5,403.
- Minamisawa *et al.* 2016. Are symbiotic methanotrophs key microbes for N acquisition in paddy rice root? *Microbes Environ.*, 31,4-10.
- Muvea *et al.* 2014. Colonization of onions by endophytic fungi and their impacts on the biology of *Thrips tabaci*. *PLoS One*, 9,e108242.
- Mazzola, M. 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81,557-564.
- Nagata *et al.* 2015. Red/far red light controls arbuscular mycorrhizal colonization via jasmonic acid and strigolactone signaling. *Plant Cell Physiol.* 56,2100-2109.
- Nanda *et al.* 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J. Integr. Plant Biol.* 52,195-204.
- 農林水産技術会議事務局 2015. 気候変動に対応した循環型食料生産等の確立のためのプロジェクト. プロジェクト研究成果シリーズ 539,1-65.
- Nuijten *et al.* 2017. Concepts and strategies of organic plant breeding in light of novel breeding techniques. *Sustainability* 9,18.
- Okazaki *et al.* 2014. An assessment of the diversity of culturable bacteria from main root of sugar beet. *Microbes Environ.* 29,220-223.
- Okubo *et al.* 2014. Effects of elevated carbon dioxide, elevated temperature, and rice growth stage on the community structure of rice root-associated bacteria. *Microbes Environ.* 29,184-90.
- Okubo *et al.* 2015. Elevated atmospheric CO2 levels affect community structure of rice root-associated bacteria. *Front. Microbiol.* 6,136.
- Okubo *et al.* 2009. Nodulation-dependent communities of culturable bacterial endophytes from stems of field-grown soybeans. *Microbes Environ.* 24,253-258.
- 大久保早ら 2016. 植物共生細菌群集を利用した持続的農業. 土と微生物, 70,10-16.
- Pangesti *et al.* 2015. Rhizobacterial colonization of roots modulates plant volatile emission and enhances the attraction of a parasitoid wasp to host-infested plants. *Oecologia* 178,1169-1180.
- Pappas *et al.* 2018. The beneficial endophytic fungus *Fusarium solani* strain K alters tomato responses against spider mites to the benefit of the plant. *Front. Plant Sci.* 9,1603.
- Parker, M.A. 2012. Legumes select symbiosis island sequence variants in *Bradyrhizobium*. *Mol. Ecol.* 21,1769-1778.
- Pineda *et al.* 2012. Rhizobacteria modify plant-aphid interactions, a case of induced systemic susceptibility. *Plant Biol.*, 14(Suppl.1),83-90.

- Pineda *et al.* 2017. Steering soil microbiomes to suppress aboveground insect pests. *Trends Plant Sci.* 22,770-778.
- Pulido *et al.* 2019. Combined effects of mutualistic rhizobacteria counteract virus-induced suppression of indirect plant defences in soya bean. *Proc. R. Soc. B.* 286, 20190211.
- Reasoner *et al.* 1979. Rapid seven-hour fecal coliform test. *Appl. Environ. Microbiol.* 38,229-236.
- Rosenzweig *et al.* 2012. Microbial communities associated with potato common scab-suppressive soil determined by pyrosequencing analyses. *Plant disease* 96,718-725.
- Rudrapp *et al.* 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol.* 148,1547-1556.
- Sanogo *et al.* 2000. Effects of herbicides on *Fusarium solani* f.sp. *glycines* and development of sudden death syndrome in glyphosate-tolerant soybean. *Phytopathology* 90,57-66.
- Schlatter *et al.* 2018. Succession of fungal and Oomycete communities in glyphosate-killed wheat roots. *Phytopathology* 108,582-594.
- Shen *et al.* 2015. Soils naturally suppressive to banana *Fusarium* wilt disease harbor unique bacterial communities. *Plant Soil* 393, 21-33.
- Shi *et al.* 2012. OsDMI3 is a novel component of abscisic acid signaling in the induction of antioxidant defense in leaves of rice. *Mol. Plant.* 5,1359-1374.
- Someya *et al.* 2013. Molecular characterization of the bacterial community in a potato phytosphere. *Microbes Environ.* 28,295-305.
- Suzuki *et al.* 2011. Lotus japonicus nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108,16837-16842.
- Svenningsen *et al.* 2018. Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. *The ISME Journal* 12,1296-1307.
- Tao *et al.* 2017. Microbial root mutualists affect the predators and pathogens of herbivores above ground, Mechanisms, magnitudes, and missing links. *Front. Ecol. Evol.* 5,160.
- Toju *et al.* 2012. High-coverage ITS Primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS One*, 7,e40863.
- Truyens *et al.* 2015. Bacterial seed endophytes, genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ. Microbiol. Rep.* 7,40-50.
- Tsurumaru *et al.* 2015. Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet. *Microbes Environ.* 30,63-69.
- Upreti, R., and P. Thomas 2015. Root-associated bacterial endophytes from *Ralstonia solanacearum* resistant and susceptible tomato cultivars and their pathogen antagonistic effects. *Front. Microbiol.* 6,255.
- 白井靖浩 2013. 水田における物理環境計測の進歩と溶存酸素 (DO)・pH・酸化還元電位 (Eh) の動態解明および湛水層における対流の発見. *生物と気象* 13,25-32.
- Xiong *et al.* 2017. Distinct roles for soil fungal and bacterial communities associated with the suppression of vanilla *Fusarium* wilt disease. *Soil Biol. Biochem.* 107,198-207.
- Zablutowicz, R.M. and K.N. Reddy 2007. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. *Crop Prot.* 26,370-376.
- Zahn, G. and A.S. Amend 2019. Foliar fungi alter reproductive timing and allocation in *Arabidopsis* under normal and water-stressed conditions. *Fungal Ecol.* 41,101-106.