

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2008
課題番号：18580040
研究課題名 (和文) 植物病害を抑制する土着の機能微生物集団 (ギルド) の研究
研究課題名 (英文) Study of plant disease suppression by indigenous microbial community (guild)
研究代表者
氏名 (ローマ字)：穴戸 雅宏 (MASAHIRO SHISHIDO)
所属機関・部局・職：千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号：80302537

研究成果の概要：農業生産上重要な4病害（ウリ類ホモブシス根腐病および黒点根腐病，キュウリうどんこ病，リンゴ紫紋羽病）について，発生抑制に関わる土着の微生物集団（ギルド）の調査を行った。得られた結果の中で，特にリンゴ紫紋羽病がまん延した微生物群集はリンゴ園内とその周辺部で似通っていたが，健全土壌の土壌微生物群集はリンゴ園内と周辺部で大きく異なっていることが判明し，病原菌の抑制には土着の微生物集団の構造的変化を伴うことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：(F) 病害防除，表以外 [生物防除]

1. 研究開始当初の背景

合成化学農薬による環境負荷を軽減する意味で，生物的防除への期待は高い。しかし，本防除法は効果の不安定性が高いことや，新たな微生物の導入による生態系の攪乱が問題となる。そこで，著者らは土着の微生物群による安全で安定性の高い土壌病害防除システムを探索した（平成14～16年度科学研究費補助金・基盤研究C(2)）。その結果，土着微生物群の構造変化と土壌病害抑制効果に関連性を見出した。

一方，生態系の中で，微生物はそれぞれに特定の機能を持つコミュニティ（ギルド）を

形成し，生態的地位（ニッチ）を維持していると考えられる。したがって，植物病原微生物に対して抑制機能を有する土着微生物集団（ギルド）の存在が示唆され，その機能を明らかにすることは環境保全型農業への知的貢献が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では，（1）植物病原微生物に対して抑制機能を持つ土着微生物コミュニティ（ギルド）の特定と，（2）それらの病害抑制機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

前研究では、ナス科野菜の土壌病害が軽減された土壌では数種の土着微生物の台頭が見られた。本研究では、病害抑制機能を有する土着微生物コミュニティを特定するために、「病原菌-宿主-土着の土壌病害抑制菌群」の関係を

- (1) 基質資化性 (BIOLOG 法),
- (2) 全脂質脂肪酸組成 (FAME 法),
- (3) 濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE 法) を利用して調査した。

対象病害は、難防除病害となっているウリ類ホモプシス根腐病および黒点根腐病と果樹類の紫紋羽病と白紋羽病をモデルとして検討した。これらの病害は病勢の進展が緩慢であり、徐々に感染が進むことが知られている。

さらに、土壌中の土着微生物群集のみならず、植物地上部の微生物群集にも着目し、キュウリおよびマサキの葉圏微生物群集の解析を行い、罹病葉と健全葉における微生物集団 (ギルド) の機能性の相違を上記3方法によって調査した。

一般に、生態系の中で病勢進展の遅い K 戦略者は世代時間の短い r 戦略者よりも密度依存淘汰性が高く、競合の影響を受けやすい。前研究において、土着微生物群によって抑制される土壌病害は病勢進展の緩慢な病害でより効果が高かったことから、「土着微生物群構造の変化によって誘起される病害抑制には生態的地位の競合が要因となっている」という仮説が提起され、この検証を行った。

また、競合以外の病害抑制機能として、抗生や寄生、さらには宿主植物の抵抗性誘導も含め、病害抑制に働いている土着微生物集団の具体的な構成員の特定を試みた。

4. 研究成果

(1) ウリ類急性萎凋症 (黒点根腐病またはホモプシス根腐病) の特異的検出方法の開発

これらの病害の発病抑止土壌の探索と病害発生状況を把握するために、メロン急性萎凋症の発生が激しい圃場と少ない圃場を千葉県銚子市近郊の温室メロン生産地域から探索し、土壌を採取した。これらの土壌から DNA を抽出し、黒点根腐病またはホモプシス根腐病に特異的な PCR プライマーを用いて、当該病原菌の有無を調査したところ、供試土壌の多くには黒点根腐病の方が多数存在することが明らかになった。

そこで、これら両病原菌量と病害発生の関係を明らかにするために、本菌に特異的な real-time PCR 用プライマーの構築を試み、ウリ類宿主 (スイカ、メロン、キュウリ、カボチャ) における感染性および寄生性の相違について調査した。その結果、ホモプシス根

腐病菌の感染性・寄生性に宿主特異性はないが、菌株間の病原性の相違は今まで知られていた以上に大きいことが明らかになった。

さらに、これら両病原菌の存在とウリ類急性萎凋症発生の関係を明らかにするために、これら2菌を同時に検出できるマルチプレックス PCR 用プライマーを構築した (表1)。

表1. ホモプシス根腐病および黒点根腐病検出用 PCR プライマー配列

プライマー	シーケンス (5' - 3')	Tm(°C)
CPs-1	GCC TCG GGG CAG GCC GGC CTC ACC	74.1
CPs-2	GGG GCC TTC CAG AAG GAA ATA TAA TTT	59.0
CMc-1	CTT ACC CGC CGG TGG ACC ATC TAA ACT CTT	66.0
CMc-3	AAC CTA CCC GGG AGC TAC TCT AGA GT	63.6
CMc-2	TAG GGG GGG TTT AGT GGC CAG AAG CCA GCG	70.1

その結果、マルチプレックス PCR 法により各菌濃度 50 fg/50 μl reaction の感度で両菌を検出できる可能性が示された。また、両菌を混合接種した人工汚染土からもマルチプレックス PCR 法による検出が可能であった (図1)。この成果により、ウリ類急性萎凋症の主因を土壌中の DNA を分析することによって容易に把握することが可能となった。

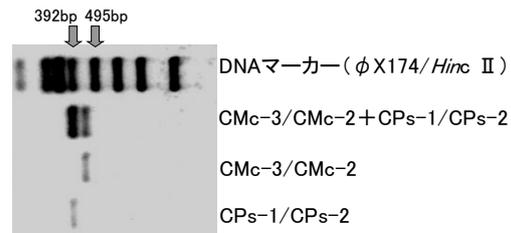


図1. ウリ類ホモプシス根腐病用プライマー (CPs-1/CPs-2) および黒点根腐病用プライマー (CMc-3/CMc-2) とそれらを組み合わせたマルチプレックスプライマーによる両菌の検出。

(2) メロン黒点根腐病菌子のう胞子発芽促進作用を持つ土着微生物集団の探索

メロン黒点根腐病菌は土壌中の子う胞子が第一次伝染源と考えられている。そこで、本菌の子う胞子発芽促進要因を土着の微生物集団の側面から検討した。

非滅菌または滅菌した畑土壌懸濁液を添加した培土に子う胞子を接種後、メロンを栽培し、その根系における胞子発芽を計数したところ、非滅菌土の胞子発芽率が有意に高く、胞子発芽に対する土壌微生物の関与が示唆された。

そこで、千葉大学園芸学部研究圃場土から任意に21菌株の細菌を分離し、それらを単独接種した滅菌培土でメロンを栽培後、根系における胞子発芽率を調査したところ、菌株 gn8 または gp22w の接種によって胞子発芽率が有意に増加した。

また、これら2細菌の培養ろ液を添加した培土でも胞子発芽率の向上が認められ、これ

らの土壌細菌が産生する物質によってメロン黒点根腐病菌の子のう胞子発芽が誘導されていることが示唆された。なお、16S rDNA塩基配列から菌株 gn8 および gp22w は、それぞれ *Shinorhizobium* sp. と *Microbacterium* sp. と推定された。しかし、黒点根腐病の発病程度とこれらの子のう胞子発芽促進細菌群（ギルド）の明確な関係は見られなかった。

そこで、本病が発生している千葉県銚子市近郊のメロン生産地域における土壌から人工培地上で本菌の発芽を誘導する細菌 10 菌株を分離し、16S rDNA 領域を基に種名を推定した。その結果、上記 *Shinorhizobium* 属菌や *Microbacterium* 属菌の他に *Agrobacterium* 属菌や *Stenotrophomonas* 属菌等が新たに見つかった。

(3) ウリ類ホモプシス根腐病の発病抑制に関わる機能微生物集団（ギルド）の構成要員と役割の調査

千葉県旭市近郊の温室メロン生産地域における発病抑制圃場からホモプシス根腐病菌の生育を抑制する菌群を探索し、単独で抑制作用を示す菌株と複数で抑制作用を示す菌株、合計 8 菌株（細菌）を分離した。また、これらの細菌の 16S rDNA 領域を基に種名を推定し、*Burkholderia cepacia* 等のバイオコントロールエージェント（BCA）として知られている菌の他、これまで BCA としては未報告の *Mitsuaria* 属菌等を選抜した。

本病原菌である *Phomopsis sclerotioides* の生育を抑制する細菌 5 菌株を用いて、単独で抑制作用を示す菌株と複数で抑制作用を示す菌株それぞれについて、全ての組合せ接種試験によりメロン苗での生物防除効果を判定した。その結果、発病抑制作用の再現性は認められず、本機能への培養不可能な微生物の関わりが示唆された。

(4) キュウリおよびマサキうどんこ病に罹病葉の葉圏微生物群集機能の解析

土壌病害と異なり、植物の地上部病害には葉の状態だけでなく、葉に存在している微生物も葉圏環境の一部として関わっている。また、葉圏微生物は植物葉から有機酸やアミノ酸などの栄養を得て生育しているだけでなく、葉圏の環境条件や葉齢、葉細胞のダメージなどに影響を及ぼすことが知られている。

そこで、本研究では葉圏微生物群集を全脂肪酸組成、基質資化性、濃度勾配ゲル電気泳動法で解析し、キュウリ葉とマサキ葉をモデルに健全葉とうどんこ病罹病葉での微生物集団を比較・検討した。

全脂肪酸組成に関しては、非培養法では解析できる量の脂肪酸が得られず、葉圏微生物群集を解析するための手法として不適であることが明らかになった。

一方、基質資化性、濃度勾配ゲル電気泳動法で解析した結果、キュウリおよびマサキの両方で健全葉よりも罹病葉の方が微生物群集構造が多様化し、微生物の全体量も多かった。このことから、うどんこ病菌の感染により、葉圏コンディションが変化し、土着の葉圏微生物群集に影響を与えている可能性と、逆に土着の葉圏微生物群集の変化が葉圏コンディションに影響し、うどんこ病菌が感染しやすい状態を形成している可能性の 2 仮説が考えられた。

(5) リンゴ紫紋羽病発生に関わる土着の微生物集団の解析

千葉県環境フィールド科学センター付属リンゴ園（沼田市）に発生した紫紋羽病をモデル病害に加え、その発生抑制に関わる微生物集団（ギルド）の調査を行った。

その結果、土壌の基質資化性、全脂肪酸組成、DNA 多型から紫紋羽病がまん延した土壌微生物群集はリンゴ園内とその周辺部で似通っていたが、健全土壌の土壌微生物群集はリンゴ園内と周辺部で大きく異なっていた（図 2）。このことから、リンゴ紫紋羽病菌の抑制や進展には土着の微生物集団の構造的変化が伴うことが示唆された。

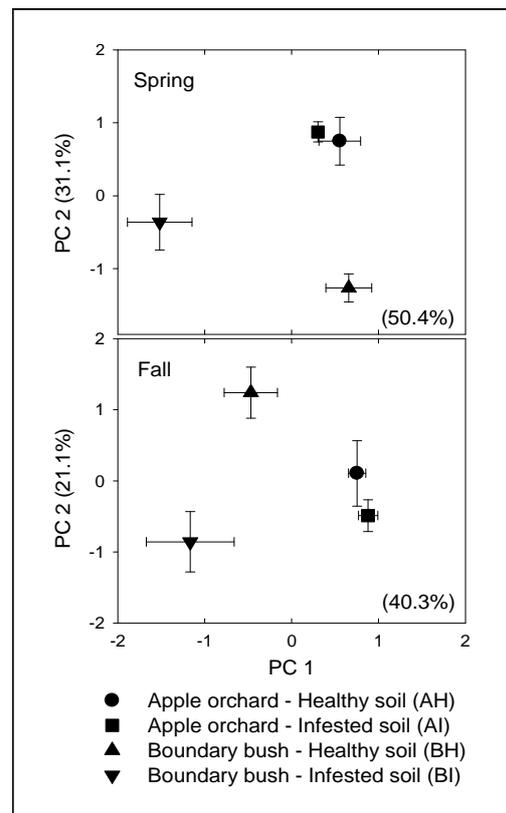


図 2. リンゴ園内および周辺土壌の細菌群集構造の相違 (PCR-DGGE によるバンドパターンを主成分分析した結果)

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① 宍戸雅宏 (2006) ウリ科野菜のホモプシス根腐病, 植物防疫 60 (12), 583-586 (査読無し)
- ② Momma, N., Yamamoto, K., Simandi, P., Shishido, M. (2006) Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfection (BSD). Journal of General Plant Pathology 72(4): 247-252 (査読有り)
- ③ Shishido, M., Yoshida, N., Usami, T., Shinozaki, T., Kobayashi, M., Takeuchi, T. (2006) Black root rot of cucurbits caused by *Phomopsis sclerotioides* in Japan and the grouping of the pathogen based on the phylogenetic analysis. Journal of General Plant Pathology 72(4): 220-227 (査読有り)
- ④ 門馬法明・宇佐見俊行・宍戸雅宏 (2007) 土壌還元消毒効果を示す *Clostridium* sp. の検出と還元土壌から発生する気体のトマト萎凋病菌および青枯病菌の抑制効果. 土と微生物 61 (1) :3-9 (査読有り)
- ⑤ 宍戸雅宏・竹内妙子・牛尾進吾・久保周子・鈴木純也・津久井理恵・国友映理子 (2007) 千葉県に発生するウリ科野菜急性萎凋症の早期診断法の開発, 食と緑の科学 61, 55-59 (査読有り)
- ⑥ Shishido, M., Yokoyama, H., Momma, N., Sakamoto, K., Miyashita, S. (2008) Changes in microbial communities in an apple orchard and its adjacent bush soil in response to season, land-use, and violet root rot infestation. Soil Biology and Biochemistry 40: 1460-1473 (査読有り)
- ⑦ Suda, W., Oto, M., Amachi, S., Shinoyama, H., Shishido, M. (2008) A direct method to isolate DNA from phyllosphere microbial communities without disrupting leaf tissues. Microbes and Environments 23(3): 248-252 (査読有り)
- ⑧ Suda, W., Nagasaki, A., Shishido, M. (2009) Powdery mildew-infection changes bacterial community composition in the phyllosphere. Microbes and Environments (in press) (査読有り)

[学会発表] (計8件)

- ① 宍戸雅宏・吉田菜々子・宇佐見俊行 (2006) PCRによるウリ類ホモプシス根腐病菌の簡易検出法, 日本植物病理学会報

72(4): 251.

- ② 宍戸雅宏・横山秀美・門馬法明・坂本一憲・宮下俊一郎 (2006) 紫紋羽病発生リンゴ園と隣接林地の土壌微生物群, 土と微生物 60(2): 129.
- ③ 中野麻美・宇佐見俊行・宍戸雅宏 (2007) メロン黒点根腐病菌の子のう胞子発芽を促進する土壌細菌, 日本植物病理学会報 73(3): 186.
- ④ 宍戸雅宏・國友映理子・牛尾進吾・久保周子・竹内妙子 (2007) 幼苗検定PCR法によるウリ類ホモプシス根腐病菌汚染土壌の診断. 土と微生物 61(2): 166. (優秀ポスター賞)
- ⑤ 須田互・大藤道衛・宍戸雅宏・篠山浩文・山本顕吾・安達伸・手塚静雄・Shannon Hall (2007) 全自動チップ電気泳動装置“Experion”を用いたARDRAによる16S rRNA gene高速解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学学会大会合同大会プログラム・要旨集 p. 882.
- ⑥ 須田 互・長崎麻美・宍戸雅宏 (2008) うどんこ病罹病葉と健全葉の葉圏細菌群集の解析, 日本植物病理学会報 74(3): 212.
- ⑦ 津久井理恵・宍戸雅宏 (2008) マルチプレックスPCRとリアルタイムPCRを用いたメロンホモプシス根腐病菌および黒点根腐病菌の検出と定量, 日本植物病理学会報 74(3): 174-175.
- ⑧ 宍戸雅宏・横山秀美・須田互・牛尾進吾 (2008) ナシ剪定枝コンポストによる白紋羽病菌抑制作用の微生物学的研究, 土と微生物 62(2): 134.

[その他]

- ① 宍戸雅宏 (2008) 最近の土壌病害研究の動向と展望, 2007年度近畿中国四国地域問題別研究会資料, (独)農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業試験研究センター編

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宍戸 雅宏 (SHISHIDO MASAHIRO)
千葉大学・大学院園芸学研究所・准教授
研究者番号: 80302537