

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06050

研究課題名(和文)植物病原性Pantoea属細菌の生態の解明

研究課題名(英文)Ecological study of plant pathogenic Pantoea spp.

研究代表者

瀧川 雄一 (Takikawa, Yuichi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：90163344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネやネギの重要病原であるPantoea ananatisについて各種植物や昆虫から分離を行い、病原性決定遺伝子領域PASVILの保有率を調査した。イネ科植物などからP. ananatisは分離されたが、分離頻度とPASVIL保有率は植物種や場所・時期によって大きく異なった。イネからの分離頻度と保有率はともに高かった。土壌からは分離されなかった。昆虫については、水田周辺で捕獲されたミナミアオカメムシからのみPASVIL保有株が分離された。一方、他の昆虫からは病原性株は分離されなかった。このようにP. ananatisの病原性株の分布は様ではなく、特定の昆虫と植物病害の関連が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ内穎褐変病などのPantoea ananatisによって生じる病害は、その発生生態が十分に解明されていないことから防除手法が確立されていない。その大きな原因は病原性株と非病原株とを区別した生存様態が把握されていないことによる。本研究により病原性のP. ananatis株はイネ植物体上のほか様々な植物にも低頻度ながら存在していること、土壌などにはおらず、昆虫ではミナミアオカメムシから高率に分離されることなどが明らかになった。これによりカメムシと植物細菌病との関連が初めて強く示唆されたため、今後害虫防除による病害の同時防除の可能性があり農業への応用上重要な成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：A plant pathogenic bacterium, Pantoea ananatis was isolated from various plants and insects. Presence or absence of the pathogenicity determinant genetic locus PASVIL was investigated for the isolates. P. ananatis could be isolated from various gramineous plants, among which rice plants yielded high number and ratio of PASVIL positive isolates. Isolation of P. ananatis from insects are not so often. Only southern green stink bug (Nezara viridula) produced P. ananatis colonies of PASVIL-positive plant pathogenic isolates. This is the first report of isolation of plant pathogenic P. ananatis from stink bug. This stink bug is also known as an important rice pest and its ecological relationship was strongly suggested with rice palea browning disease caused by P. ananatis.

研究分野：植物病理学

キーワード：Pantoea ananatis 生態 ミナミアオカメムシ

## 1 . 研究開始当初の背景

*Pantoea ananatis* による植物の病害にはイネの内穎褐変病 , ネギ・タマネギの腐敗病 , メロン果実内腐敗病 , パイナップルの花樟病などがあるが , これまで日和見感染あるいは不定性病害などとして研究が十分になされていなかった . イネ内穎褐変病などはほぼ全国で発生しているにも関わらずその生態や防除に関する十分な研究は行われていない . メロン果実内腐敗病はわれわれの手によってようやく病原性系統が明らかになった段階でありその生態や防除は未知の部分が多い . このように *Pantoea* 属菌の研究が進んでいない最大の理由は , 接種しても発病による病徴の再現が 100% でなく研究を進めにくいことなどにより , 実際に分離された *Pantoea* 属菌が病原菌なのか非病原菌なのかかわからずに試験が行われていたことによる . さらには , 近年行われた多くのゲノム解析によりこれらの *Pantoea* 属では他の病原細菌において主要な病原性決定機構である II 型 , III 型 , IV 型のタンパク分泌機構を欠落しており , ますます病原・非病原の境界が不明確なままであった .

われわれの研究室では近年 , これらの病害をおこす *P. ananatis* の研究から同菌がイネ・ネギ・パイナップル病原系統 ( group I ) とメロン病原系統 ( group II ) および非病原系統 ( group III ) に分けられることを明らかにした ( Kido et al. 2010 ) . そのうち group II については *iaaM* , *iaaH* , *etz* の IAA 合成遺伝子の特異的に保持していることを明らかにし ( Kido et al. 2010 , Kido and Takikawa 2017 ) , さらには group I に特異的な遺伝子領域を特定してその部分が病原性発現に必須であることを明らかにして PASVIL (*Pantoea ananatis* specific virulence locus ) と呼ぶことを提案した ( 瀧川 2015 ) . これらの遺伝子の発病における作用機序は未だに完全には解明できてはいないが , 本研究ではこの我々の研究室で得た病原性決定遺伝子についての知見を利用することによって今まで十分に解明されてこなかった *P. ananatis* の病原性株がどこでどのように生存し伝染してゆくのかを解明することを目指した .

## 2 . 研究の目的

この研究では , 我々の研究室で明らかにして来た *Pantoea* 属の病原性決定遺伝子である PASVIL 領域と IAA 合成遺伝子群を指標として病原株と非病原株を判別し , 圃場や周辺の雑草など , どこにどれくらいの *P. ananatis* が生存しているのか , *P. ananatis* による植物病害との関係が示唆されているアザミウマやカメムシなどの昆虫ではどれくらいの頻度で病原株が生存しているのかなど *P. ananatis* による病害の発生生態を解明することを目的とした .

## 3 . 研究の方法

植物 , 昆虫などの各種サンプルは , エタノールで表面殺菌したのち滅菌水中で磨砕して懸濁液を作成し , それを YP 寒天平板培地に画線して単一集落を得た . 土壌や一部の昆虫など雑菌が多数存在することが予想された場合には長谷川ら (2003) の NSCV-In 培地を選択培地として用いた . 培養は全て 25℃ で行った . おおよそ一つのプレートから約 10 コロニーを釣菌し , 試験に供した . 釣菌した集落は直接コロニーダイレクト法によって PCR 試験に供したほか , YP 液体培地に移植して培養し , 一晚培養ののちにタバコ葉に注入して壊死反応の有無を確認した . 残りの培養液はインドール生産試験に供した . さらにコロニーからは OF 培地に移植して OF 試験を実施した . PCR 試験は PASVIL 領域の *pavD* 遺伝子を検出する YKL23 , YKL24 プライマー , 氷核活性遺伝子 *ina* を検出する *inaF* , *inaR* プライマー , インドール酢酸合成遺伝子 *iaaM* を検出する *iaaMF* と *iaaMR* プライマーを混合してマルチプレックス PCR として行った .

## 4 . 研究成果

令和元年度は , 静岡大学近隣および大学フィールドセンターを含む静岡県内の各地より *Pantoea ananatis* を分離することを目標に , イネ , トウモロコシ , タマネギ , ニラ , ソルガム , エノコログサ , ススキの 7 種類の植物 , ヒラズハナアザミウマ , セイヨウミツバチの 2 種の昆虫 , 水田およびタマネギ畑の 2 箇所の土壌から選択培地などを用いて分離を行った . その結果 , 223 点のサンプルを供試したうち 60 点より *P. ananatis* と推定される細菌株を得ることができた . このうち , アザミウマとミツバチの昆虫試料および土壌試料からは全く分離することはできなかった . 60 点の資料から分離された菌株数は 347 株であった . このうち , イネやタマネギへの病原性を支配する遺伝子である PASVIL 領域を保持する菌株は 210 株であった . イネやトウモロコシからの分離株における PASVIL 保有頻度は 30 から 70% 程度であり , 場所や時期により多少の変動はあるものの定常的に存在していることがわかった . ネギ・タマネギからの分離では 11 月にわずかに PASVIL 保有株が検出できたが , 1 , 2 月における試料からの分離はできなかった .

これらのことから , *P. ananatis* の存在と病原性株との割合は植物種や環境によって変化することが明らかとなった .

2 年目である令和 2 年度は , 前年に引き続き静岡大学近隣および大学フィールドセンターなどからサンプルを収集した . 得られたイネ , エノコログサ , メヒシバ , オヒシバ , カタバミ , レ

モン、ヒエの7種類の植物、トビイロウンカ、ミナミアオカメムシの2種の昆虫から選択培地および非選択性の培地を用いて分離を行ったところ、66点のサンプルのうち26点のサンプルから *P. ananatis* と推定される菌株を分離することができた。分離菌株の合計は225株であり、このうちイネやタマネギへの病原性を決定する遺伝子である PASVIL 領域を保持してタバコに壊死反応を引き起こすものは121株であった。イネやエノコログサ、メヒシバ、オヒシバ、ヒエなどのイネ科植物由来サンプルからの分離頻度は0%の場合もあったが多くの場合は30から90%程度であり、場合によっては1サンプルからの分離株の100%が病原性株であった。この傾向は前年度と同様であった。一方、特筆すべきは昆虫からの分離例であり、過去に *P. ananatis* の分離例の報告のあるトビイロウンカからは全く分離されなかったが、イネの上で捕獲されたミナミアオカメムシについては供試した24匹のうち9匹から19菌株の *P. ananatis* が分離され、そのうちの9菌株(47.4%)は病原性を有していた。カメムシからの分離例は今まで報告がなく、その病原性が示されたことからイネ内穎褐変病へのカメムシの関与が強く示唆された。

3年目の令和3年度も引き続き静岡大学の近隣および大学フィールドセンターなどからサンプルを集めて試験を実施した。供試植物としては、イネ(内穎褐変病)、コムギ(赤かび病罹病穂)、ニラ(さび病病斑)、ネギ(さび病病斑)を用い、供試昆虫としてはヒラズハナアザミウマ、ミカンキイロアザミウマ、ミナミアオカメムシ、チャバネアオカメムシ、クサギカメムシを用いた。全部で63点のサンプルのうち29点のサンプルから223株の *P. ananatis* が分離された。その中で病原性決定遺伝子領域である PASVIL を保有する菌株は61株(27.4%)であった。PASVIL の保有とタバコ・タマネギへの病原性は一致していた。保有率はイネ分離株では25/25株(100%)と高率であった。コムギおよびニラ分離株では5/100株(5%)、5/21株(23.8%)であった。今回ネギからは0/45株(0%)と分離されなかった。昆虫からはミナミアオカメムシで26/26株(100%)と高率に分離され、チャバネアオカメムシからは0/6株(0%)であり、それ以外の昆虫サンプルからは *P. ananatis* 自体が分離されなかった。前年までの結果と同様、イネ以外の植物からの分離はバラツキが大きいことがわかった。一方で前年に引き続きミナミアオカメムシから高頻度で分離されたことからカメムシとイネ病害との関連性が強く示唆された。

以上、3年間を通じて全部で352点のサンプルより分離を行い、115サンプルから795菌株の *P. ananatis* を得た。そのうちPASVIL を保有する病原性株は392株(49.3%)であった。植物については、イネをはじめとするイネ科植物やネギ、ニラなどから *P. ananatis* が分離された。いずれも健全部からはほとんど検出されず、他の菌類病などの罹病部や、傷などで組織が壊死した部分から分離された。その中でPASVIL 遺伝子領域保有株はイネで割合が高かった植物ではバラツキがあるものの比較的低率であった。PASVIL 陽性株は全て病原性も陽性だった。また今回の研究ではIAA合成遺伝子は全く検出されず、*P. ananatis* のII群菌(メロン果実内腐敗病菌)の存在は認められなかった。試料採集地の近隣にメロン果実内腐敗病が発生している圃場がなかったことと一致していた。土壌からは *P. ananatis* は検出されなかった。また、昆虫からの分離に関しては、過去に *P. ananatis* の分離の報告があるトビイロウンカやアザミウマ類からは検出されなかった一方、ミナミアオカメムシおよびチャバネアオカメムシからは分離され、特にミナミアオカメムシからは高率に分離されただけでなくPASVIL 保有率も高かった。ミナミアオカメムシはいずれも藤枝フィールドセンターの水田圃場でイネに止まっている個体を採集したものであり、同昆虫とイネとの密接なつながりはもちろんであるが、病原菌を保持して媒介している可能性が示唆された。これは初めての報告であり、特にイネの内穎褐変病の防除に当たっては重く考慮されるべき事態である。今後、実験的な昆虫媒介試験はもちろん、害虫防除によって病害の低減が図れるかどうか実証的に調査する必要があると思われる。

#### 引用文献

- 長谷川優, 畔上耕児, 吉田浩之, 尾谷浩(2003) イネ内穎褐変病 *Erwinia ananas* 検出のための選択培地. 日本植物病理学会報. 69: 224-228.
- Kido, K., Hasegawa, M., Matsumoto, H., Kobayashi, M. and Takikawa, Y. (2010) *Pantoea ananatis* strains are differentiated into three groups based on reactions of tobacco and welsh onion and on genetic characteristics. J. Gen. Plant Pathol. 76巻 208-218頁(国際) 2010
- Kido, K. and Takikawa, Y. (2017) Detection of *Pantoea ananatis* in melon seeds. In Fatmi, M.B., Walcott, R.R. and Schaad N. W. eds., Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material, 2nd ed., APS Press, St. Paul, Minn., U.S.A. p.195-201.
- 瀧川雄一(2015) 植物病原細菌 *Pantoea ananatis* の病原性決定因子について. 植物感染生理談話会論文集 50: 1-10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------