

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月12日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380181

研究課題名（和文） 異種生物を利用した侵略的外来雑草の伝統的生物的防除の再構築

研究課題名（英文） Rebuilding of classical biological control of an alien invasive weed using different kind organisms

研究代表者

古屋 成人（FURUYA NARUTO）

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：10211533

研究成果の概要（和文）：日本原産のイタドリが欧米諸国で大繁殖し、その被害拡大が深刻化している。そこで我が国のイタドリ群落に生息している植食性昆虫や植物病原菌類を利用した伝統的生物的防除法の開発を展開した。これまでに得られた研究成果に基づき、イタドリマダラキジラミの野外放飼実験が英国で開始された。しかしながら期待された防除効果は得られておらず、斑点病菌の撒布計画が立案されている。本研究では、斑点病についての生態学的知見を得る目的で、本病の発生状況、病原菌の接種条件の検討と分子追跡の手法の開発並びに発病に密接に関与した内生菌の探索などを行い、本病原菌を英国に導入させるための基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：Japanese knotweed has become weedy and invasive, and has become seriously problematic in Europe and North America. Therefore, the utilization of the phytophagous insects inhabiting the Japanese knotweed and phytopathogenic fungi living in Japan for development of traditional biological control method was promoted. Based on the results of research provided so far, a field-experiment of *Aphalara itadori* as a biocontrol agent was started in the UK. However, the expected biocontrol effect is not provided to date, and introduction-plan of *Mycosphaerella polygoni-cuspidati* (*Mp*) as second agent is drawn up. In this study, investigation of occurrence situation of leafspot disease caused by *Mp* in Japan, development of the technique for the artificial inoculation and the molecules chase of *Mp*, and search of useful endophytic fungi as a helper of biocontrol agent were performed to get the ecological knowledge on the leafspot disease which is next introduction of a biocontrol agent in the UK.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2012年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：イタドリ、斑点病菌、内生菌、生物的防除

1. 研究開始当初の背景

近年、欧米諸国、特に英国において、19世紀前半に長崎在中のシーボルトにより持ち込まれた日本起源のイタドリ雌1株が大繁殖しており、その被害が深刻化している。除草剤による化学的防除法は高コストを要し、かつ除草剤耐性株の出現など、本雑草の蔓延防止が極めて困難な状況下にある。一方、わが国では天敵や病原微生物などの存在により他種在来植物との間で生物多様性が維持されており、有害雑草にはなっていない。そこで本邦のイタドリ群落に生息している植食性昆虫や植物病原糸状菌を利用する伝統的生物的防除法の開発を英国 CABI との間で国際的共同研究を推進している。

2. 研究の目的

これまでに得られた研究成果に基づき、イタドリマダラキジラミやイタドリ斑点病菌などが有望な導入素材であること、並びに斑点病を助長する内生菌の存在を見出している。これら素材候補生物の中で 2009 年 7 月、英国政府はイタドリマダラキジラミを導入することを決定した。現在、本植食性天敵の試験放飼後の個体群密度について追跡調査が実施されている状況である。これまでの野外調査ではイタドリ群落での定着は確認されているものの、本雑草の繁殖を抑制する密度までには至っていない。そこで斑点病菌の追加導入の計画が立案されている。このような研究状況の下、斑点病菌並びに内生菌を利用したより高い効果の期待されるであろう伝統的生物的防除法の開発を推進することにより、最終的には在来植物の繁殖を回復させ、生物多様性を維持することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) イタドリの伝統的生物的防除において次期導入が有望視されている斑点菌の本邦における野外での発生生態を明らかにする目的で調査群落の選定を行うと同時に季節毎の病勢の進展状況を解析する。

(2) イタドリ群落の健全葉に生息する内生菌の菌群構造を明らかにする。

(3) 内生菌と病原菌の相互関係を解析することにより、内生菌の伝統的生物的防除素材菌としての利用の可能性について調べる。

(4) 斑点病菌の菌糸体を用いた場合における効果的な接種条件の確立を図る。

(5) 野外での斑点病菌の種特異的分子追跡手法の開発を行う。

(6) イタドリマダラキジラミと斑点病との相互関係について調べる。

4. 研究成果

(1) 調査地点の選定

イタドリ斑点病の野外での発病状況や本病の発生拡大を助長する内生菌を探索する目的で図 1 に示した、北部九州のイタドリ群落 3 地点、すなわち英彦山（福岡県）、玖珠（大分県）、雲仙（長崎県）を野外での定点調査地として選定した。これら 3 地点のイタドリ群落は、英彦山では群落が林間に覆われ低温湿潤、玖珠では河川部に隣接する平原、雲仙では比較的高温で乾燥した火山地帯とそれぞれ異なった生態環境条件に位置している。

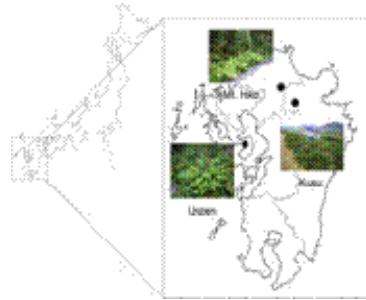


図 1. 北部九州におけるイタドリ群落の調査地点

(2) 野外における斑点病の発生状況解析
斑点病はイタドリの新葉が出る初春から群落全体に発生がみられるが、その病斑は極めて小さいものである。図 2 に示すように、6 月の梅雨期から梅雨明けの 7 月にかけて著しい病斑の拡大と融合が起きる。また図 3 か



図 2. 野外における斑点病の季節毎の病徴

らも明らかのように、9月から11月上旬まで激しい感染の拡大が続き、病斑が拡大した葉は次々に落葉し、新たに形成されてくる葉も急速な感染と病斑の形成がくり返される。やがて気温が低下し始める12月には群落全体

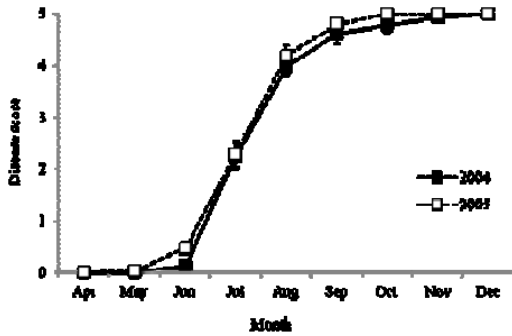


図3. 野外における斑点病の病勢進展

が落葉し、同様の現象が毎年くり返されることで、群落の拡大が抑制されていることが判明された。

(3) 内生菌相の解析

有望な防除素材である斑点病菌の分離に際して、表面殺菌した病斑部位には斑点病菌だけではなく、多種多様な糸状菌が生息していることが明らかとなった。この現象に基づき、イタドリ葉には病斑部位だけではなく、健全葉にも内生菌が生息している可能性が示唆された。予備試験の結果、実際に健全葉から多種類の内生菌が分離されることが認められたことから、生育環境条件が異なるイタドリ群内における内生菌相の解明を試みた。健全葉から分離・保存した内生菌、計1,581菌株について、形成された菌叢や胞子の形態並びに rDNA-ITS 領域の塩基配列の情報に基づき、内生菌の同定と分類学的位置付けを行った。その結果、季節により多少の変動は見られるものの、イタドリ内生菌は約15の分類群から構成されていることを解明した(図4)。またいずれのイタドリ群落からも、*Colletotricum*, *Psetalotiopsis*, *Phome*, *Phomopsis* および *Alternaria* 属の菌種が高頻度に分離されることから、これらが優占的にイタドリ健全葉に生息していることが明らかとなった。さらにこれら代表的な優占菌株を、内生菌が感染しないように空調温室内で生育させた図

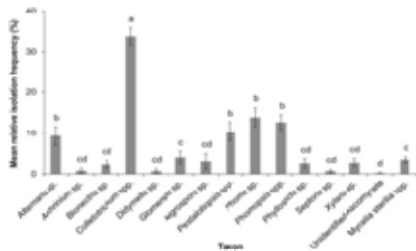


図4. 内生菌の分類群と分離頻度

イタドリ植物個体に接種を試みたところ、数ヶ月間に亘り無病徴で、接種葉からは接種菌と同一の菌株が再分離可能であり、コッホの原則を満たしていることを実証した。

(4) 内生菌と病原菌の関係

導入効果が期待される斑点病やさび病の発病を助長する内生菌の探索を目的として、上記優占菌と病原菌との相互関係について検討を行った。内生菌を感染させた葉に病原菌を接種したところ、図5に示すように、病原菌による発病と病斑の進展を助長するもの、発病に影響のないもの、並びに発病と病斑の形成を抑制する3タイプの内生菌の存在が明らかとなった。発病と病斑の形成を助長するタイプの中で、*Phomopsis* 属の菌株がさび病や斑点病の発病を誘発し、病斑の形成を著しく促進する作用を保有していることが判明した。この現象は病原菌を用いたイタドリの伝統的生物的防除において、内生菌が相乗的に機能することを解明したものであり、内生菌の補助素材としての利用可能性を示唆した。

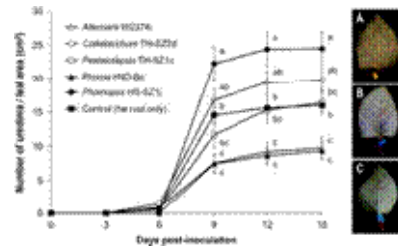


図5. 内生菌と病原菌の相互作用

(5) 斑点病菌の接種条件の検討

斑点病菌を野外散布するためには接種源として大量の子のう胞子が必要となるが、現在までに子のう胞子の形成は *in vivo* で確立されていないことから、感染能を有する本菌の菌糸体を接種源として利用することが想定されている。そこで、菌糸体による効果的な接種条件を確立する目的で、葉齢(図6)、濡れ(RH100%)温度(図7)・時間(図8)、および保持温度(図9)について検討した。その結果、接種した植物体を5°Cまたは35°Cで48時間、あるいは25°Cで6時間未満、それぞれ湿度を100%に保持した場合には、病徴は全く



図6. 葉齢と発病との関係

発現されなかった。これに対して、展開 7-9 日目の葉に斑点病菌を接種し、湿度 100%条件

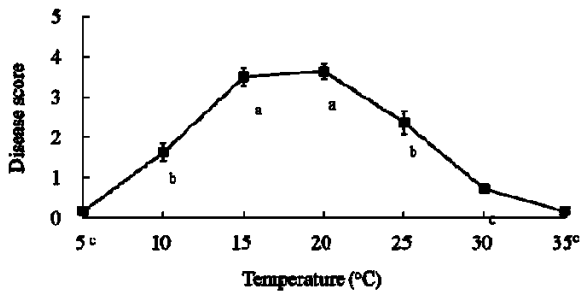


図7. 濡れ温度と発病との関係

下に 15-20°Cで 32-48 時間静置後、空調温室において 19-21°Cに維持することにより、高い発病率および発病度が得られることが明らかになった

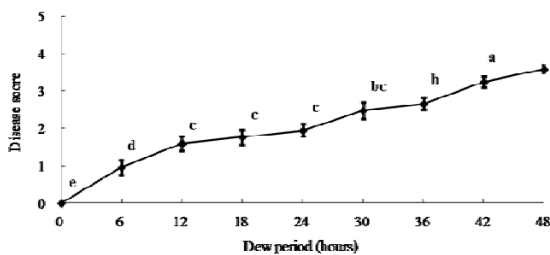


図8. 濡れ時間と発病との関係

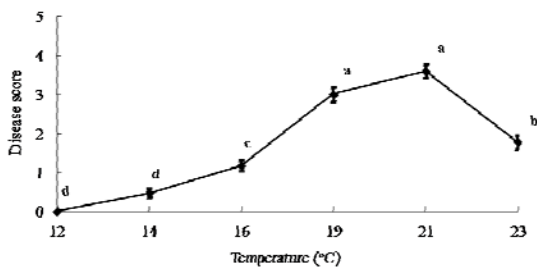


図9. 保持温度と発病との関係

(6) 斑点病菌種特異的 PCR

現在英国では、イタドリマダラキジラミを試験的に野外放飼して、その生物的防除効果を継続的に調査している。しかし、期待される効果が発現されない場合を想定して、次期の導入素材として斑点病菌の利用を計画している。斑点病菌を英国で野外散布した場合には、その動態解析が必要となることから、斑点病菌の分子追跡を目的とした、種特異的プライマーを利用した PCR 法の検討を試みた。プライマーの設計は、rDNA-ITS 領域内の塩基配列情報をもとに、本菌に特異的な配列に着目しプライマーを設計した。設計したプライマーの有効性を検討するために、アニーリング温度の検討や特性の向上を目的としたタッチダウン PCR 条件などについて詳細な解析を加えた。その結果、選定された特異的プライマーは、本種に近縁な菌種の DNA は

増幅せず (図 10)、その検出限界としては、1pg/μl の DNA 量であることが判明した (図 11)。さらに斑点病の罹病葉からも検出可能であることが明らかとなり (図 12)、野外での斑点病菌の分子追跡手法として本法の有効性が示された。

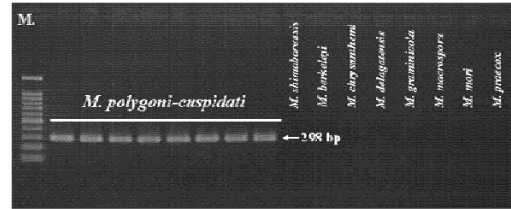


図10. 種特異的プライマーを利用した斑点病菌の特異的検出

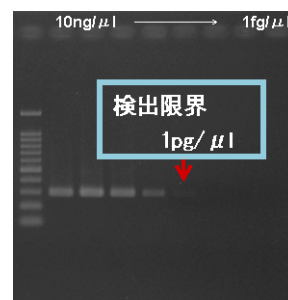


図11. 検出限界の解析

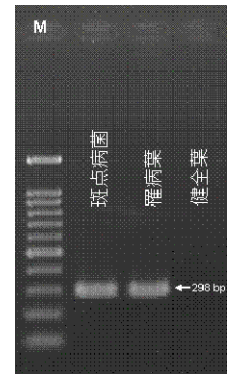


図12. イタドリ葉からの斑点病菌の検出

(7) イタドリマダラキジラミと斑点病との関係

イタドリマダラキジラミが英国で野外放飼されているが、定着は確認されているものの顕著な防除効果が得られていないのが現状である。さらに防除効果を高めるための計画として、斑点病菌の導入が進められている。そこで、イタドリマダラキジラミと斑点病との関連性について予備的実験を行った。イタドリマダラキジラミのイタドリ葉への産卵は斑点病菌の感染の有無に関わらず差異は確認されず、斑点病罹病葉にも健全葉と同程度の卵数を産卵した。また、イタドリマダラキジラミの存在下では、斑点病の病徴進展並びに感染個体の拡大速度が高まる傾向にあった。これらの実験結果は、イタドリマダラキジラミの定着しているイタドリ群落に斑点病菌が感染することにより、生物防除の相乗効果が得られる可能性を示唆するものである。

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 Kurose, D., Furuya, N., Tsuchiya, K., Tsushima, S., Evans, H.C. (2012) Endophytic fungi associated with *Fallopia japonica* (*Polygonaceae*) in Japan and their interactions with *Puccinia polygoni-amphibii* var. *tovariae*, a candidate for classical biological control. *Fungal Biology* 116:785-791
<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.011>,

② Y.Y. Myint, K. Nakahira, M. Takagi, N. Furuya, R.H. Shaw (2012) Using life-history parameters and a degree-day model to predict climate suitability in England for the Japanese knotweed psyllid *Aphalara itadori* Shinji (Hemiptera: Psyllidae)
Biological Control 63(2): 129-134
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.07.004>

[学会発表] (計 11 件)

① 黒瀬大介, 古屋成人, Evans, H.C., 對馬誠也, 土屋健一 イタドリの伝統的生物的防除開発を目的とした北部九州のイタドリ群落における内生糸状菌相の解析 第 85 回九州病害虫研究会、熊本、2013

② Kurose, D., Furuya, N., Djeddour, D.H., Evans, H.C., Tsushima, S., Tsuchiya, K. The potential of a leaf-spot fungus, *Mycosphaerella polygona-cuspidati*, for biological control of Japanese knotweed. FFTC-TUA International Symposium 2012, Tokyo, Japan, 2012

③ Kurose, D., Furuya, N., Djeddour, D.H., Evans, H.C., Tsushima, S., Tsuchiya, K. Potential for biological control of an invasive weed, Japanese knotweed in Europe using *Mycosphaerella polygona-cuspidati*. BIT's 2nd Annual World Congress of Microbes-2012, Guangzhou, China, 2012

④ Kurose, D., Furuya, N., Saeki, T., Djeddour, D.H., Evans, H.C., Tsushima, S., Tsuchiya, K. Potential for classical biological control of invasive weed, Japanese knotweed, using *Mycosphaerella polygona-cuspidati*. The 2nd Korea-Japan Joint Symposium, Fukuoka, Japan, 2012

⑤ Kurose, D., Furuya, N., Inoue, Y., Tsushima, S., Tsuchiya, K., Evans, H.C. A comparative study of endophytic fungi isolated from leaves of *Fallopia japonica* in Japan and the UK, and their interactions with plant pathogens. IUMS, Sapporo, Japan, 2011

⑥ Tsuchiya, K., Kurose, D., Shaw, R.H.,

Djeddour, D.H., Evans, H.C., Tsushima, S., Furuya, N. Survey and screening of classical biological control agents for Japanese knotweed (*Fallopia japonica*). APS-IPPC Joint Meeting, Honolulu, USA, 2011

⑦ Kurose, D., Furuya, N., Djeddour, D.H., Evans, H.C., Tsushima, S., Tsuchiya, K. Evaluation of *Mycosphaerella polygona-cuspidati* for classical biological control of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*). APS-IPPC Joint Meeting, Honolulu, USA, 2011

⑧ Furuya, N., Saeki, T., Kurose, D., Evans, H.C., Tsushima, S., Tsuchiya, K. Species-specific detection of *Mycosphaerella* spp. as classical biological control agents for *Fallopia japonica* (Japanese knotweed) by PCR assay. APS-IPPC Joint Meeting, Honolulu, USA, 2011

⑨ 佐伯哲哉, 黒瀬大介, 古屋成人, Shaw, R.H., Djeddour, D.H., Evans, H.C., 對馬誠也, 土屋健一 生物的防除素材菌としてのイタドリ関連 *Mycosphaerella* 属菌のPCRによる特異的検出 平成23年度日本植物病理学会、東京、2011

⑩ Kurose, D., Furuya, N., Tsushima, S., Tsuchiya, K., Evans, H.C. Endophytic fungi isolated from leaves of *Fallopia japonica* in Japan and their interactions with plant pathogens. International Mycology Congress, Edinburgh, UK, 2010

⑪ 黒瀬大介, 古屋成人, 松元 賢, Shaw, R.H., Djeddour, D.H., Evans, H.C., 對馬誠也, 土屋健一 生物的防除素材としてのイタドリ斑点病菌の感染・発病における環境要因 平成22年度日本植物病理学会大会、京都、2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.cabi.org/japaneseknotweedalliance/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋 成人 (FURUYA NARUTO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：10211533

(2) 研究分担者

土屋 健一 (TSUCHIYA KENICHI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：40150510

高木 正見 (TAKAGI MASAMI)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：20175425