

令和元年5月29日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07310

研究課題名(和文) 雑草と共生する土壌病原菌の伝染機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of spreading soilborne pathogens symbiotic to weeds

研究代表者

穴戸 雅宏 (Shishido, Masahiro)

千葉大学・大学院園芸学研究所・教授

研究者番号：80302537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、土壌棲息菌である*Rosellinia necatrix*と根系棲息菌である*Diaporthe sclerotioides*を供試病原菌とし、以下の調査・研究を行った。(1)病原菌が無病徴感染(=共生)できる雑草の種類を病原菌汚染圃場で生育している雑草根を用いて定性PCRによって判定した。(2)病原菌と共生する雑草種を用い、接種試験によって病原菌と雑草との共生期および栽培植物との寄生期について、病原菌量を定量PCRによって測定した。(3)病原菌汚染土壌で感受性宿主と共生する雑草種を同時に栽培し、雑草との共生が病原菌感染を助長し得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病理学において、雑草は第一次伝染源となる場合に耕種の防除の重要項目として取り上げられて来た。しかし、農業生態系の中で栽培植物に寄生し病原性を示す微生物が、雑草に対して共生している事例は一部の病原菌のみでしか明らかにされていない。その理由として、多種多様で、しかも無病徴である雑草から病原菌を検出・定量する困難さが考えられるが、この問題は病原菌に対する定量PCRアッセイを適用することで解決できた。本研究では、土壌中で異なった棲息形態を示す2種の土壌病原菌について、この手法を雑草との共生に適用することによって、今日まで隠れていた病原菌の生態の一端を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to evaluate the effect of symbiotic relationship between weeds and soilborne pathogens using *Rosellinia necatrix* as a soil inhabitant and *Diaporthe sclerotioides* as a root inhabitant in the following experiments. (1) Weed species that were able to be colonized non-symptomatically by these pathogens were determined using species specific PCR. (2) Using realtime PCR assays, fungal quantities were assessed during the symbiotic and pathogenic phases to weed roots and their host crop roots, respectively. (3) The effect of symbiotic relationship between weed roots and these pathogens on their infections was evaluated by co-planting weeds and their host crops in the infested soils.

研究分野：植物病理学

キーワード：ナシ白紋羽病菌 ウリ類ホモブシス根腐病菌 雑草 共生 無病徴感染 感染源

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

### 1. 研究開始当初の背景

作物圃場の雑草は、圃場内生態系に少なからず重要なインパクトを与えている。従来、イネの病害やウイルス病を中心に圃場周辺の雑草に寄生する病原菌やウイルスの研究が行われ、伝染源となる雑草の除去が提唱されてきた。また、*Verticillium dahliae*などの土壌病原菌が圃場内の雑草に無病徴感染している事例も多数報告されている。しかし、一般に雑草根に棲息する土壌病原菌の生態学的知見は少ない。

植物は多様な物質を根から滲出し、土壌中の生物間相互作用を仲介している。それらの中には、抗菌性物質や殺虫・殺線虫効果を持つ化合物も含まれており、病害虫から身を守る場合もあれば、菌根菌やPGPR等の共生生物の感染を誘導し、植物自身の生育を増強させる事例も知られている。農業生態系における土壌微生物は、環境の物理化学性のみならず生物的要因にも影響を受け、特に植生の影響は多大である。一方、生物の生態的地位(ニッチ)は種に固有な性質ではなく、その生物が棲息する生態系内で他生物との相互関係の中で決められていく。したがって、植物病原菌のニッチも棲息する生態系内の他生物との関係を含めた環境条件で決定される。

近年、我が国で推進されている環境保全型農業では、殺菌剤や除草剤の使用は限定的となり、より効率的な防除法が求められる。また、農家の高齢化に伴い、除草に掛かる労働負担は増大する一方である。これらの状況から、圃場生態系における土壌病原菌のニッチ形成に、どの種の雑草が関与し、その効果が栽培植物の病害発生にどの程度の影響を及ぼすのかを明らかにすることは、これからの環境保全型農業における病害管理にとって極めて重要な知見となり得る。

### 2. 研究の目的

本研究では、最初に土壌棲息型で宿主特異性の低い病原菌と根系棲息型で宿主特異性の高い病原菌について、雑草根に無病徴感染(=片利共生)している現象を明らかにすること目的1とした。即ち、仮説1「土壌病原菌は雑草根と共生している」が肯定される雑草種の探索を行った。

次に、仮説1で明らかになった共生雑草種を用いて、これら2種類の病原菌による雑草との共生フェーズが、栽培宿主との寄生フェーズにおよぼす影響を調査することを目的2とした。即ち、仮説2「雑草との共生は土壌病原菌の栽培宿主への感染を助長する」の検証を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試病原菌および共生雑草種の探索

本研究では、土壌棲息菌である *Rosellinia necatrix* と根系棲息菌である *Diaporthe sclerotioides* を供試菌とし、これらの病原菌が無病徴感染(=片利共生)できる雑草の種類を探索するために、それぞれの病原菌汚染圃場で自然に生育している雑草根での病原菌の着生状況を菌に特異的なPCRアッセイによって調査した。

*R. necatrix* は各種植物の白紋羽病の病原菌であり、極めて宿主範囲が広く、土壌棲息型の条件的寄生菌である。千葉大学環境健康フィールド科学センター内ナシ園は本菌が蔓延しており、本ナシ園を調査圃場とした。本ナシ園に自然に生育している20種の雑草種根を洗浄し、全DNAを抽出した後、それを鋳型としてITS1およびITS4プライマーを用いて、リボゾームDNAのITS領域を増幅した。更にそれを鋳型として、Schena et al. (2002)によって開発された *R. necatrix* に特異的なR2プライマー(CAA AAC CCA TGT GAA CAT ACC A)とR5プライマー(CAA TGC TAA ACA GAG TTT CGT G)を用いてPCRを行い、想定される増幅サイズである133 bpのバンドが検出された場合、供試された雑草に本菌が着生していると判定した。

一方、*D. sclerotioides* はウリ類ホモブシス根腐病の病原菌であり、根系棲息型の条件的腐生菌である。本菌の宿主範囲はウリ科に限定されており、宿主範囲が狭いのが特徴である。千葉大学園芸学部付属研究圃場には、*D. sclerotioides* の汚染圃場としてメロンを連作しているコンクリート枠試験地があり、本試験地を調査圃場とした。調査圃場に自然に生育している雑草37種の根から全DNAを抽出した後、それを鋳型としてITS1およびITS4プライマーを用いて、リボゾームDNAのITS領域を増幅した。更にそれを鋳型として、Shishido et al. (2010)によって開発された *D. sclerotioides* に特異的なCPs2fプライマー(ACT GCT TGG TGT TGG GGC ACC)とCPs2r1プライマー(TCC AGA ACG AAA TAT AAT TTA CTA CGC T)を用いてPCRを行い、想定される増幅サイズである101 bpのバンドが検出された場合、供試された雑草に本菌が着生していると判定した。

#### (2) 雑草との共生フェーズが土壌病原菌の寄生フェーズに及ぼす影響

実験(1)の結果から *R. necatrix* は20種中9種で、また、*D. sclerotioides* は32種中13種の雑草根で着生していることが判明した。これらの中から採種が容易で栽培試験がしやすいイヌムギ(*Bromus catharticus*)をモデル雑草種として供試し、接種試験によって病原菌と雑草との共生が栽培植物への寄生期に及ぼす影響を調査した。

*R. necatrix* を用いた実験では、縦55 cm・横18 cm・深さ18 cmのプランタに蒸気殺菌土を充填し、イヌムギ栽培区と無栽培区を設けた。プランタの一端にナシ枝に培養した *R. necatrix* を埋土した。イヌムギ丈が約20 cmに成長した40日後に、*R. necatrix* を埋土した反対側の端に白紋羽病感受性であるキバナルピナス(*Lupinus luteus*)種子を3粒播種した。2週間後、

キバナルピナスの萎凋・倒伏を確認したため、*R. necatrix* のプランタ内での進展程度を調査した。即ち、病原菌接種源から 3 cm、25 cm、50 cm の土壌から全 DNA を抽出し、(1) で用いた PCR アッセイを用いて本菌の有無を確認した。さらに、実体顕微鏡を用いて、本菌の菌糸束がイヌムギ根面に着生している状況を観察した。

次に、*D. sclerotioides* を用いた実験では、本菌汚染土にイヌムギを播種し、1 ヶ月後に植物体を掘り上げて根を洗浄後、蒸気殺菌土を充填した縦 55 cm・横 18 cm・深さ 18 cm のプランタに移植した。そのプランタ内に催芽したメロン種子を播種し、1 ヶ月間栽培した。その後、メロン根を掘り出し、洗浄後、全 DNA 抽出し、それを鋳型として、(1) で用いた PCR アッセイによって本菌の有無を確認すると共に、Shishido et al. (2013) によって開発されたリアルタイム PCR アッセイを用いて、メロン根内の *D. sclerotioides* 量を推定した。さらに、pBht2-GFP を用いて緑色蛍光タンパク質 (GFP) を *D. sclerotioides* に導入した形質転換体を作成し、共焦点レーザー顕微鏡によって、本菌のイヌムギ根への着生・侵入状況を観察した。

追加実験として、多様な雑草にサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) が寄生することが知られていることから、(1) および (2) で用いた PCR アッセイを利用して、*M. incognita* が *D. sclerotioides* の感染に及ぼす影響についても調査した。

#### 4. 研究成果

(1) *Rosellinia necatrix* および *Diaporthe sclerotioides* が潜在感染 (= 片利共生) している雑草種の特定

千葉大学環境健康フィールド科学センター内ナシ園に生育していた全 20 種の雑草のうち、*R. necatrix* に特異的な PCR によって本菌が根から検出されたのは、イヌムギ、ノシバ、エノコログサ、メヒシバ、スズメノカタビラ、ベニバナボロギク、カラスノエンドウ、ヒメオドリコソウ、ノミノツツリの 9 種で、どの雑草も本菌の宿主として登録されていなかった。

一方、千葉大学園芸学部附属研究圃場から採種された 37 種の雑草のうち、*D. sclerotioides* が特異的な PCR アッセイによって検出されたのは、スベリヒコ、シロツメクサ、オッタチカタバミ、オオバコ、カヤツリグサ、ネジバナ、ネズミムギ、メヒシバ、イヌムギ、エノコログサ、ヒメムカシヨモギ、オオアレチノギク、ブタクサ、ヨモギの 14 種であった。

(2a) 雑草との共生フェーズが *Rosellinia necatrix* の寄生フェーズに及ぼす影響

イヌムギをモデル雑草種として *R. necatrix* との片利共生が、本菌の宿主であるキバナルピナスに及ぼす影響を調査したところ、イヌムギ栽培区のプランタでは接種 2 ヶ月目には 50 cm 先まで菌糸が到達し、キバナルピナスは発病した (図 1)。また、このとき、イヌムギ根面に *R. necatrix* の菌糸束が観察され (図 2) かつ、*R. necatrix* DNA が検出された (図 3)。一方、イヌムギ無栽培区のキバナルピナスは健全で、その根圏から *R. necatrix* DNA は検出されなかった (図 1、図 3)。



図 1 . イヌムギ栽植の有 (左)・無 (右) によるキバナルピナス白紋羽病発病の相違

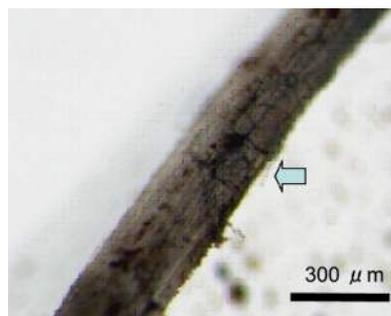


図 2 . イヌムギ根面に観察された *Rosellinia necatrix* の菌糸束

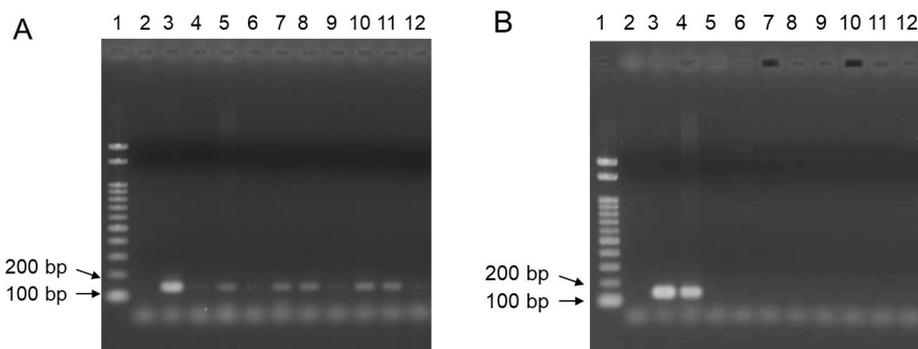


図 3 . イヌムギ栽培区 (A) および無栽培区 (B) の土壌から検出された *Rosellinia necatrix* DNA .

(2b) 雑草との共生フェーズが *Diaporthe sclerotioides* の寄生フェーズに及ぼす影響

イヌムギをモデル雑草種として *D. sclerotioide* との片利共生が、本菌の宿主であるメロンに及ぼす影響を調査した。病原菌汚染土で生育したイヌムギを移植し、メロンと混合栽培した場合、メロン根から本菌が検出され、イヌムギが感染源になることが示唆された(図4)。また、緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入した *D. sclerotioide* の形質転換株を用いてイヌムギとメロンの根を観察したところ、どちらの植物でも同様に内部侵入が観察された(図5)。

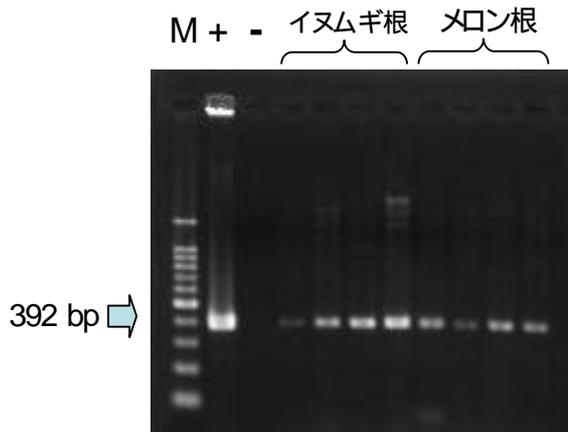


図4 . *Diaporthe sclerotioides* 汚染土で生育したイヌムギを移植したプランタで栽培したメロン根から検出された *D. sclerotioide* DNA . M : サイズマーカー , + : 菌体 DNA , - : 鋳型 DNA 無し .

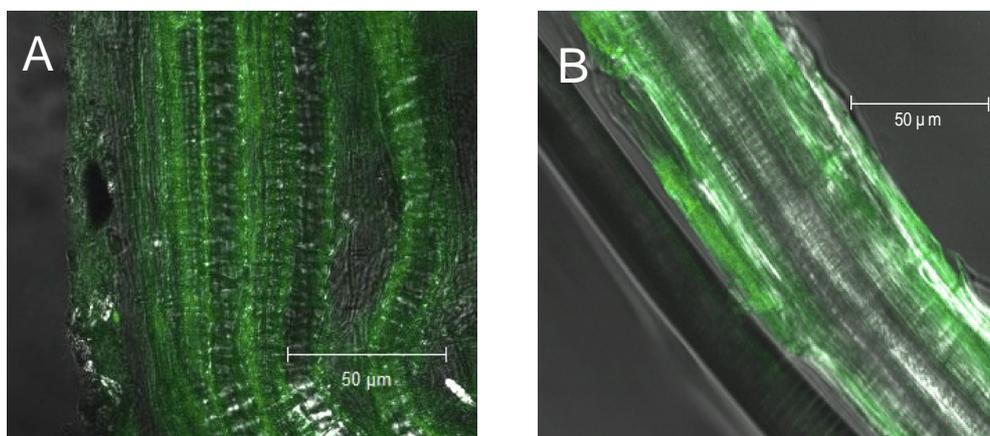


図5 . 緑色蛍光タンパク質 (GFP) を導入した *Diaporthe sclerotioide* の形質転換株を用いたメロン根 (A) およびイヌムギ根 (B) の共焦点レーザー顕微鏡画像。どちらの植物でも本菌の内部侵入が観察された。

< 引用文献 >

- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A. (2002) Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real-time Scorpion-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108:355-366.
- Shishido, M., Sato, K., Yoshida, N., Tsukui R., Usami, T. (2010) PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotioides* n plants and soil. *Journal of General Plant Pathology* 76:21-30.
- Shishido, M., Kubota, I., Nakamura, H. (2012) Development of real-time PCR assay using TaqMan probe for specific and quantitative detection of *Rosellinia necatrix* in plant and soil. *Journal of General Plant Pathology* 78:115-120.
- Shishido, M., Kubota, I., Ohashi, T., Usami, T. (2013) Comparison of PCR assays for detection and quantification of *Phomopsis sclerotioides* in plants and soil. *Journal of General Plant Pathology* 79:18-27.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Shiragane, H., Usami, T., Shishido, M. (2019) Weed roots facilitate spreading of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of white root rot. *Microbes and Environments*, 査読有, (in press)

Fukada, H., Derie, M. L., Shishido, M., du Toit, L. J. (2018) Phomopsis black root rot of cucumber in Washington state caused by *Diaporthe sclerotioides*. *Plant Disease*, 査読有, Vol.102, p.1657. DOI:10.1094/PDIS-12-17-1949-PDN

Shishido, M., Hata, T., Yokoyama, T. (2016) Root-knot nematodes do not affect black root rot disease severity on watermelon and bottle gourd. *Plant Pathology*, 査読有, Vol.66, pp. 606-611. DOI:10.1111/ppa.12610

### 〔学会発表〕(計5件)

澤田 舞・宮下弥大・宇佐見俊行・宍戸雅宏：ウリ科植物ホモブシス根腐病菌への GFP 遺伝子導入と形質転換株．日本土壌微生物学会 2018 年度大会，広島大学，2018 年 6 月 16 日～17 日

宮下弥大・高橋 遥・宇佐見俊行・宍戸雅宏：雑草はウリ科植物ホモブシス根腐病菌に第一次伝染源としての場を提供する．平成 30 年度日本植物病理学会大会，神戸国際会議場，2018 年 3 月 25 日～27 日

宍戸雅宏・本多悠一・國友映理子・横山とも子・牛尾進吾：幼苗検定 - 最確値法による土壌病原菌の感染源ポテンシャル単位 (IPU) の推定．日本土壌微生物学会 2016 年度大会，岐阜大学，2016 年 06 月 11 日～12 日

宍戸雅宏・畑 俊男・横山とも子：スイカホモブシス根腐病はネコブセンチュウの影響を受けない．岡山コンベンションセンター，2016 年 03 月 21 日～23 日

本多悠一・國友映理子・横山とも子・牛尾伸吾・宍戸雅宏：幼苗検定による最確値法を用いたメロンホモブシス根腐病菌の感染源ポテンシャル単位 (IPU) の推定．平成 28 年度日本植物病理学会，岡山コンベンションセンター，2016 年 03 月 21 日～23 日

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

### 〔その他〕

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

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。