

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14662

研究課題名（和文）土壌-植物-昆虫の境界を突破して種を維持する微生物

研究課題名（英文）Soil microorganisms can freely change their niches in the environments, to maintain their population in the ecosystems.

研究代表者

多胡 香奈子 (Tago, Kanako)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター 物質循環研究領域・主任研究員

研究者番号：20432198

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：害虫（カメムシ）へ殺虫剤耐性を付与する殺虫剤分解菌の感染経路調べる過程で、土壌微生物は土壌だけでなく植物や昆虫の体内にも適応し、住処を移動しながら種を維持しているのではないかと考えた。これを明らかにするためまず圃場試験を行い、分解菌はダイズ植物体までは比較的容易に移動するがカメムシへの感染は難しいことが示唆された。一方、分解能のないカメムシ共生菌は農地土壌に広く存在していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Some fenitrothion-degrading bacteria living in soil can transmit to stinkbugs and establish symbiosis with the host stinkbug. We have been clarified the infection route of the degraders to stinkbugs; soil and plants (sugarcane) are their reservoirs. Then we hypothesized that soil microorganisms adapt not only to the soil but also to the body of plants and insects, and in some cases, freely change their niches, to maintain their population in the ecosystems.

To test the hypothesis, we conducted a field experiment and showed that the degraders can migrate relatively easily from soil to soybean plants, but it seems difficult to transmit to the stinkbugs. The non-degraders which is phylogenetically close to the degraders are present widely in agricultural soil.

研究分野：環境微生物学

キーワード：農薬分解菌

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、土壤微生物の適応と多様性変動プロセスを農薬分解菌をモデルにして明らかにしてきた。有機リン系殺虫剤フェニトロチオンを土壤に数回散布すると、これを分解する細菌が増加し土壤の分解能が上昇する (Tago *et al.*, *Microbes Environ.*, 2006)。この分解菌の適応過程では、はじめに分解能を獲得した *Burkholderia* 属細菌が複数現れ、菌数が増加すると競争排除の原理が働き 1 種が優占した (Tago *et al.*, *Mol. Ecol.*, 2015)。

これらの分解菌の一部の種は環境中からカメムシに共生し、宿主にフェニトロチオン抵抗性を付与した (Kikuchi *et al.*, *PNAS*, 2012, Ohbayashi *et al.*, *PNAS*, 2015)。一方、土壤に出現する分解菌と、植物体を主な生息場所とするカメムシの接点是不明であったため、分解菌が共生したカメムシが蔓延している一般農地で野外調査を行った。すると、カメムシから検出された分解菌が土壤だけでなく、地表面から離れた植物地上部からも検出された (Tago *et al.*, *Microbes Environ.*, 2015)。これらの土壤では全 *Burkholderia* 属 (カメムシ共生種と非共生種を含む) の多様性にも違いがみられた。すなわち、耐性カメムシがいない畑土壤ではカメムシ共生種の割合は低かったが、分解菌が出現し耐性カメムシが発生している畑土壤では、カメムシ共生種の割合が明らかに高かったのである (Tago *et al.*, *Microbes Environ.*, 2014)。

これらのことから『フェニトロチオンの投入で土壤中のカメムシ共生種が分解能を獲得し分解菌として適応・増殖し、さらに植物体やカメムシへニッチを獲得する。植物体の枯死やカメムシの移動と死滅などによって、共生種 (分解菌) が再び土壤に還る。』というサイクルが繰り返され、土壤に共生種が集積されていったのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、微生物の土壤 植物 昆虫の移動と、それが土壤微生物の群集構造に与える影響を明らかにし、土壤微生物の多様性は植物や昆虫を中心とした地上の生物によっても維持されるという新たなメカニズムの提案を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ダイズ畑圃場における殺虫剤の散布頻度と分解菌の出現

農環研所有のダイズ畑において6月よりダイズ栽培を開始した。この時、殺虫剤の散布は以下の3パターン設けた。(n = 4)

1. フェニトロチオンを農家慣行と同様にダイズの開花期以降に約2週間に1度散布
2. フェニトロチオンをダイズ播種直後から約2週間に1度散布
3. トレボン剤 (ピレスロイド系殺虫剤) を農家慣行と同様にダイズの開花期以降に約2週間に1度散布

各圃場から土壤 (表層約 5 cm) を定期的に回収して分解菌を計数した。

その後、ダイズが充実する頃にダイズ植物体に網をかけ、そのなかにカメムシの幼虫を放って飼育した。(図1)



図1. 圃場試験の様子

経時的に圃場から土壤とカメムシ、ダイズ植物を回収し、ダイズ植物は莢を分別してそれぞれを試料とした。各試料から分解菌を希釈平板法により計数した。

(2) 畑土壤における *Burkholderia* 属細菌及びカメムシ共生菌の多様性と分布

以下の種類の異なる栽培圃場から土壤を回収して用いた。

1. ダイズ (マメ科) - 農家慣行施肥区および不耕起栽培区
2. キャベツ (アブラナ科) - 農家慣行施肥区
3. 茶 (ツバキ科) - 研究機関の農家慣行施肥区と有機肥料施肥区および一般農家の茶園

土壤から市販のキットを用いて DNA を抽出した。電気泳動および Nanodrop による定量を行い、抽出した DNA のクオリティをチェックしたのち、Miseq に供して 16S rRNA 遺伝子の多様性解析を行った。

4. 研究成果

(1) ダイズ畑圃場における殺虫剤の散布頻度と分解菌の出現

フェニトロチオンを散布した2つの区では、開花期以降に分解菌が検出された。(図2)

農家慣行と同様に散布した区での分解菌数は n=4 のいずれにおいても $10^2 \sim 10^4$ g⁻¹ dry

soil であり、開花期以降の 1 か月程度その菌数を維持した。また植物体や莢からも分解菌がわずかで検出された。

播種直後からフェニトロチオンの散布を開始した土壌でも分解菌は検出されたが、その数は検出限界 ($100 \text{ g}^{-1} \text{ dry soil}$) 程度で、かつ計数のたびに検出されたりされなかったりした。そのため、土壌中での分解菌数は不安定であると考えられた。また植物体や莢からは検出されなかった。

またカメムシ消化管から分解菌が検出されることはなかった。

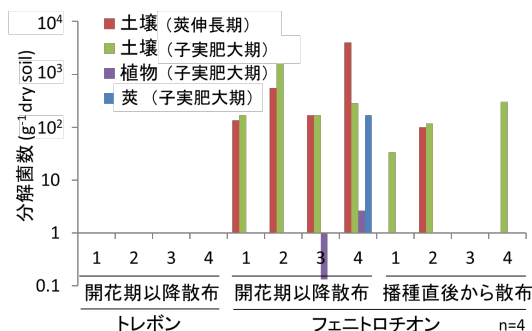


図 2. フェニトロチオン分解菌数

以上の結果から、フェニトロチオン散布回数が農家慣行と同じ場合に最も多くの分解菌が出現することが明らかとなった。しかも土壌だけでなく植物体からも見つかったことから、分解菌は容易に土壌 植物と住処を変えることができる、つまり両者のニッチとしての境界は分解菌にとってはそれほど厳密ではないと考えられた。しかしフェニトロチオンの散布回数は多くても少なくとも分解菌の出現は減る。従ってフェニトロチオンはやはり分解菌の土壌におけるポピュレーションを維持・崩壊させる重要なファクターであることが圃場試験でも証明された。一方でカメムシには分解菌は感染しなかったが、カメムシの飼育方法が不慣れであったなど技術的な面で改善すべき点も多く、今後改良を行う必要がある。

(2) 畑土壌における *Burkholderia* 属細菌及びカメムシ共生菌の多様性と分布

圃場でのダイズ栽培試験では分解菌はフェニトロチオンを散布した土壌から見つかったが、カメムシ体内からは見つからなかった。従って土壌中にはフェニトロチオン分解能はないがカメムシと共生できる *Burkholderia* 属が豊富に存在していると考えられた。また圃場試験は年に 1 度しかできず効率が悪いということもあり、視点を変えて、カメムシ共生菌はそもそも農耕地土壌にどの程度存在しているのか調べることにした。作物と施肥管理が異なる圃場を代表として選び、それらの土壌における *Burkholderia* 属の多様性を Miseq を用いた次世代シーケンス解析に供して調べた。

その結果、*Burkholderia* 属はダイズ畑土壌で平均 0.11%、キャベツ畑土壌で平均 0.45%、茶園土壌で平均 0.65% 存在していることが分かった。次に *Burkholderia* 属内での解析を進めた。その結果、各土壌で優占していたのは 2 つから 3 つの OTU であり、その割合は各地点に存在する *Burkholderia* 属の 84% 以上を占めた。これらの優占した OTU を *Burkholderia* 属の系統樹に当てはめた。なおカメムシ共生菌は *Burkholderia* 属の一部の種に限られることは既に明らかになっており、それは SBE クレードと名付けられている (Kikuchi *et al.*, ISME J., 2011, Tago *et al.*, Mol. Ecol., 2015)。そのため系統樹上で SBE クレードに入るかどうかでカメムシと共生可能か判断できる。Miseq で得られる塩基配列長は短いために系統発生が一部不正確なところはあるが、以下に各土壌での特徴を述べる。

ダイズ畑土壌

2 つの OTU が優占しており、その割合は慣行施肥区と不耕起栽培区で逆転していた (表 1)。

表 1. ダイズ畑土壌で優占した 2 つの OTU の各圃場における割合

	慣行施肥区	不耕起栽培区
OTU A	70.15	24.32
OTU B	24.75	62.99

このうち OTU A は SBE クレードに含まれた。キャベツ畑土壌

1 つの OTU が約 74% を占めており、それはカメムシと共生できる SBE クレードであった。次いで優占した 2 つの OTU はいずれも生態系に広く存在する一般細菌と植物に共生可能な種で構成される PBE クレードに含まれ、その割合はいずれも 10% 程度であった。

茶園土壌

3 つの OTU が優占し、これらで全 *Burkholderia* 属の 84% 以上を占めた。茶園土壌ではサンプリングのポイントによって優占種の割合が大きく異なり、大半のポイントでは PBE クレードの OTU が最も優占したが一部のポイントでは SBE クレードが優占した。これは、茶園は永年作物であり、剪定した茶樹の枝葉などが堆積することから、土壌の中がヘテロな環境になりやすいことが原因と考えられた。

以上のことから、カメムシ共生菌は各農地土壌に広く存在していることが分かった。特にカメムシが被害をもたらすダイズ畑土壌だけではなくキャベツ土壌でも同じような傾向が認められた。*Burkholderia* 属は土壌 pH の影響を受けるといわれていることから、土壌の成分分析結果と合わせると何らかの傾向がみられるかもしれない。

今回は全細菌中の *Burkholderia* 属の割合を知りたかったため、全細菌の 16S rRNA 遺

伝子をターゲットにした解析を行った。Miseq による次世代シーケンス解析では得られる塩基配列の長さが短いため分類の解像度は低くなるのが欠点である。今後 *Burkholderia* 属を詳細に解析する際には、以前我々が考案した *Burkholderia* 属を特異的に検出するプライマーを用いて解析を進める。

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)

Hideomi Itoh, Kanako Tago, Masahito Hayatsu, Yoshitomo Kikuchi. 2018. Detoxifying symbiosis: microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. Natural Product Reports, 査読有, Printing, doi:10.1039/C7NP00051K

Hideomi Itoh, Tomoyuki Hori, Yuya Sato, Atsushi Nagayama, Kanako Tago, Masahito Hayatsu, Yoshitomo Kikuchi. 2018. Infection dynamics of insecticide-degrading symbionts from soil to insects in response to insecticide spraying. The ISME Journal, 査読有, 12, 909-920, doi:10.1038/s41396-017-0021-9.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多胡 香奈子 (TAGO Kanako)
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター
物質循環研究領域・主任研究員
研究者番号：20432198

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

早津 雅仁 (HAYATSU Masahito)
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター
物質循環研究領域・主席研究員
研究者番号：70283348

(4) 研究協力者

なし ()