

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580028

研究課題名 (和文)：忌地現象における根圏微生物相解析と植物生育改善法の確立

研究課題名 (英文)：Analysis of soil microorganism and establishment of growth control method in sick soil phenomena.

研究代表者：松原 陽一 (MATSUBARA YOICHI)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40301212

## 研究成果の概要：

国内の主要アスパラガス産地 (5 道県 20 圃場) の忌地 (いやち) 圃場では、立枯病菌及び株腐病菌が発病主導因子であることを分子生物学的手法により明らかにした。また、AMF 共生アスパラガスでは、アレロパシー物質含有土壌における生長促進、立枯病及び株腐病耐性が確認され、抗酸化機能変動もみられた。これらのことから、忌地現象における化学的・生物的誘導因子への対策として、AMF による総合的植物生育改善が有効な手法となることを実証した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：忌地現象, 菌根菌, アスパラガス, 耐病性, アレロパシー, フザリウム, PCR-SSCP

## 1. 研究開始当初の背景

忌地現象は、園芸植物生産において定植・改植後に生育不良、収量減少が発生する症状である。野菜における事例として、アスパラガスでは国内外産地において忌地現象が深刻化しており、近年、特に改植期を迎えた圃場での忌地現象発生による生育不良、収量低下が産地・産業に多大な被害を与えている。忌地現象発生因子としては、生物的・非生物

的因子が判明しているが、未だに不明な点が多い。このことから、国内産地における生物的因子の解明や、病害防除・植物生育改善を軸とした忌地現象軽減対策の確立が要望されている

## 2. 研究の目的

園芸植物生産における重要課題である忌地現象について、国内外で問題となるアスパラガス忌地現象を対象事例とし、忌地病発生機構解明として根圏微生物相解析を分子生物学的手法により行うと共に、忌地土壌における植物生育改善法として、有用微生物 (arbuscular 菌根菌) による耐病性付与及びアレロパシー障害軽減効果の検討を行い、さらに耐性機構解明を目的とした調査を行った。これらの検討により、植物生産全般における忌地現象克服への応用を含め、持続的作物生産技術の基礎的、応用的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、概略、以下の項目で行った。

### (1) 忌地現象発生圃におけるフザリウム菌相解析

アスパラガス産地の忌地現象に関わるフザリウム菌種の分布特徴について、以下の方法により検討した。

国内のアスパラガス産地 (北海道、福島、長野、香川、佐賀 : 5 地域 20 圃場) において、栽培年数の異なる数圃場より生育不良症状を呈した株をサンプリングした。各圃場の株から貯蔵根を採取 (10 本/株, 10 株/圃) して表面殺菌後に根切片を作成し、駒田培地に置床して 10 日間分離培養を行った。出現した菌株を純粋化し PDA 培地で 5 日間培養後、DNA 抽出・PCR を行って SSCP (single-stranded conformational polymorphism) 解析に供試した。PCR は rDNA の ITS2 領域 (primer: ITS3, ITS4) について行い、PCR により目的 DNA を増幅後、アガロース電気泳動により増幅 DNA の positive 確認をした (対象 band は 350bp)。続いて、増幅 DNA を 95°C、2 分間で denaturing 処理し、single-strand 状態の DNA についてポリアクリルアミド電気泳動を行った。なお、検出対象として 4 SSCP profile を用いた。

### (2) AMF 共生したアスパラガスにおける耐病性検定

AMF4 菌種 (*Gigaspora margarita*, *Glomus intraradices*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus mosseae*) をそれぞれ接種したアスパラガス (*Asparagus officinalis* L., cv. Welcome) 苗を忌地現象発生土壌 (長野県より採取) または市販育苗土へ定植し、AMF 接種 10 週間後に立枯病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*)、株腐病菌 (*F. proliferatum*;  $10^6$  孢子/ml 懸濁液) 及び紫紋羽病菌 (*Helicobasidium mompa*) を接種し、発病・生育状況を調査した。

### (3) AMF 共生したアスパラガスにおけるアレロパシー障害耐性評価

数種忌地圃場土 (長野県より採取) について土壌抽出液法によるバイオアッセイを行い、土壌中のアレロパシー物質存在確認を行った。その後、AMF 接種したアスパラガスをアレロパシー物質含有土壌で育苗し、生育改善効果について検討した。

### (4) AMF 共生による抗酸化機能変動解析

耐病性機構解明として、AMF 共生によるアスパラガス植物体の抗酸化機能及び抗酸化成分変動を調査した。抗酸化機能として、抗酸化酵素 [スーパーオキシドジスムターゼ (SOD), アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)] 活性及び DPPH ラジカル捕捉能、抗酸化成分として、アスコルビン酸、ポリフェノールを分析した。

## 4. 研究成果

### (1) 忌地現象発生圃におけるフザリウム菌相解析

国内の 5 地域 20 圃場におけるアスパラガス生育不良株では、全ての株の貯蔵根において褐変部位が確認され、検出・同定されたのは主に 3 種 [*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (Foa), *F. proliferatum* (Fp), *F. solani* (Fs)] であった。中でも Foa の分布密度が極めて高く、次いで Fp であり、Fs はわずかであった。この場合、各種の分布密度には国内地域・圃場間差が顕著にみられ、圃場ごとに発病誘導種が異なることが示唆された。地域別にみると、北海道サンプルでは Foa、Fp および Fs の 3 種が検出されたが 80% 以上が Foa であり、採取圃場の優占種は Foa であることが示唆された。また、Fp、Fs とも単一株に集中して検出されたことから、Fp、Fs は散在せず局部的に存在するものと思われた。長野サンプルでも Foa、Fp および Fs の 3 種が検出されたが、90% 以上が Fp である圃場、Foa が 100% であった圃場が存在するなど、同地域においても圃場間で検出種および分布密度が大きく異なった。福島、香川、佐賀では、Foa、Fp の 2 種が検出され、Foa および Fp の検出割合には圃場間差があり、Foa のみの圃場も存在した。なお、Fp の分布は国内では北日本で相対的に低く、南下と共に増大する傾向がみられた。

今回の結果では、各圃場の栽培年数と種分布についての特徴は確認されなかったが、栽培期間経過とともに Foa および Fp の割合は変動する可能性があると思われる。一方、圃場間での分布差の誘導因子について現段階では不明であり、環境条件 (地温、土壌湿度等)、株の移動等の因子が関連する可能性が

ある。これらのことから、国内のアスパラガス産地における忌地圃では立枯病 (Foa) および株腐病 (Fp) が発病主導フザリウム菌種であることが示唆され、特に立枯病の発生率が高い可能性がある。よって、忌地対策として、生物的因子面においては主に立枯病および株腐病に対する防除策を講じる必要があると考えられた。

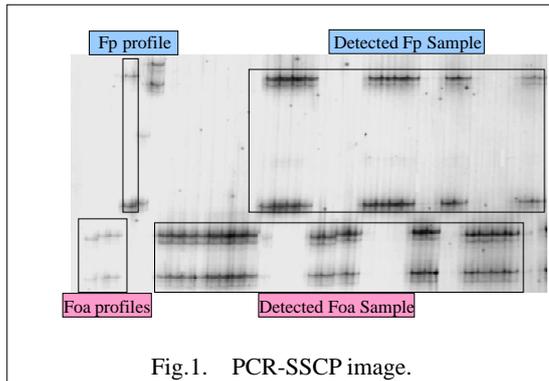


Fig.1. PCR-SSCP image.

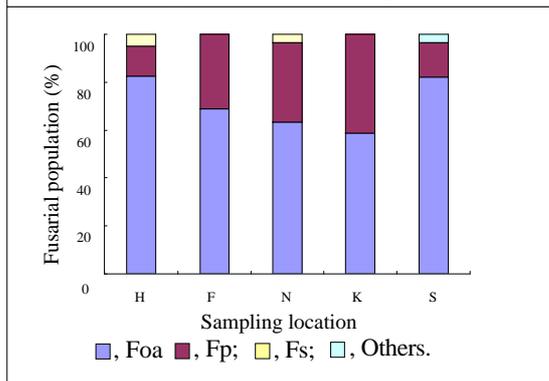


Fig.2. Fusarial population in 5 locations. H, Hokkaido; F, Fukushima; N, Nagano; K, Kagawa; S, Saga.

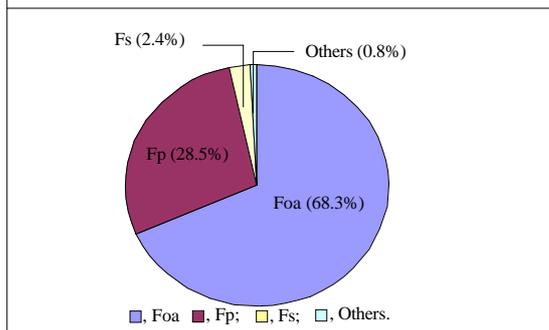


Fig.3. Fusarial population in asparagus decline fields in Japan.

### (2) AMF 共生したアスパラガスにおける耐病性検定

AMF (4菌種) 処理したアスパラガスにおいて、立枯病 (Foa) 及び株腐病 (Fp)、さらに紫紋羽病に対する発病軽減効果が大部分の忌地圃場土及び市販育苗土の両方で確認された。この場合、その効果には菌種間差がみられ、*Glomus intraradices* 及び *Gigaspora margarita* が相対的に有効であった。また、各病原菌接種後の乾物重についても、大部分のAMFで有意に増加していた。これらのことから、AMFによる耐病性に関しては、同時に複数の病害に対する耐性誘導を図れる可能性も考えられた。

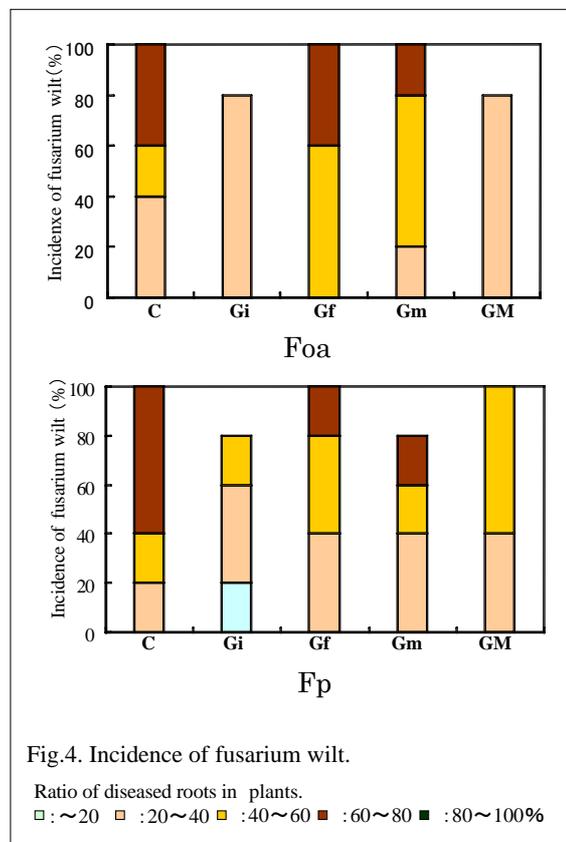


Fig.4. Incidence of fusarium wilt.

Ratio of diseased roots in plants.  
 □ : ~20    □ : 20~40    □ : 40~60    □ : 60~80    □ : 80~100%

### (3) AMF 共生したアスパラガスにおけるアレロパシー障害耐性評価

忌地現象における化学的誘導因子の対策として、数種忌地圃場土 (長野県より採取) をバイオアッセイし、アレロパシー物質含有を確認後に AMF による生育改善を検討した。バイオアッセイの結果、生育阻害程度には圃場間差がみられたが、大部分の圃場で抑制効果が現れた。最も抑制効果が強かった忌地土壌により生育改善効果を検討した結果、無接種区及び AMF 区とも健全圃場土の

生育より忌地圃場土で生育不良となったが、AMF区では植物体生長促進効果により忌地土壌における生育改善効果が確認された。これには、AMFによる生育促進のポテンシャルがアレロパシー物質による負の作用を上回ったことによると考えられた。

一方、アレロケミカルとして推測されているフェルル酸、カフェ酸を処理（濃度2段階）した市販育苗土でAMF接種したアスパラガスを育苗した結果、無接種区では特に高次の萌芽抑制がアレロケミカル添加区でみられ、AMF区ではその障害が軽減されていた。

これらのことから、アレロパシー障害に対するAMFによる生育改善が実践的手法として有効であることが示唆された。

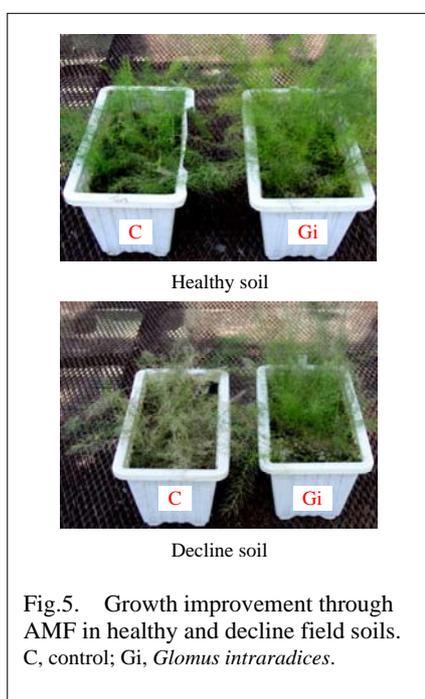


Fig.5. Growth improvement through AMF in healthy and decline field soils. C, control; Gi, *Glomus intraradices*.

#### (4) AMF共生による抗酸化機能変動解析

AMF共生による抗酸化酵素、抗酸化物質変動を解析した結果、全ての項目においてAMF共生により増大する場合がみられた。この場合、ポリフェノール含量に関しては、葉、茎、貯蔵根の全てにおいて、アスコルビン酸では葉、茎においてAMF区で含量増大がみられ、その効果には菌種間差があった。これらのことから、植物体の抗酸化機能はAMFによって変動することが明らかとなり、この変化はAMFによる耐病性誘導とも密接に関わる可能性があると考えられた。

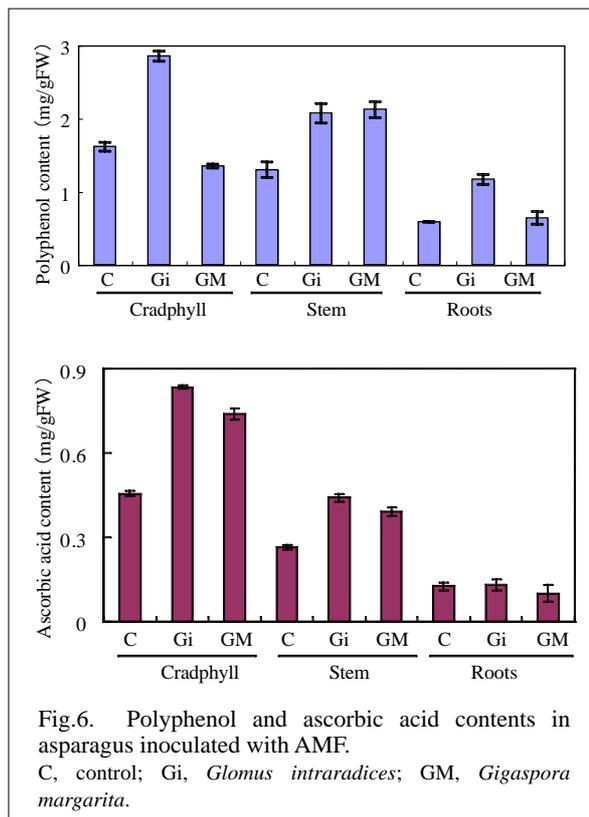


Fig.6. Polyphenol and ascorbic acid contents in asparagus inoculated with AMF. C, control; Gi, *Glomus intraradices*; GM, *Gigaspora margarita*.

#### (5) 総合考察

本研究では、アスパラガス忌地現象発生因子に関する基礎的知見が得られ、忌地現象における化学的・生物的誘導因子への対策として、AMFによる総合的植物生育改善が有効な手法となることが実証された。このことから、国内におけるアスパラガス忌地現象発生圃における病害を基軸とした特徴を把握でき、これは忌地現象発生機構解明に大きく寄与すると考えられる。また、発病抑制・植物体生育改善を狙ったAMF接種導入による忌地障害軽減効果について実践的な結果が得られたことから、他作物における忌地現象克服への応用も期待される。一方、AMF共生による植物体の抗酸化機能・抗酸化関連成分の変動特性解析により、植物体抗酸化関連機能の生物的制御の可能性も示唆された。このことは今後、AMF共生による環境ストレス耐性向上により、複合環境ストレス下における作物生産の安定・向上化、収穫物の付加価値化に大きく寄与できるものと期待される。また、本研究は減農薬・減化学肥料に基づいた持続的植物生産技術の基礎的、応用的知見として寄与することが考えられる。

## 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)

[学会発表] (計3件)

- ① 松原陽一・Nahiyah A.S.M・Louisa Robinson・Peter Jeffries: PCR-SSCP 法によるアスパラガス忌地現象の生物学的解析. 第18回植物微生物研究会講演要旨集(印刷中), 2008年9月18日(奈良女子大学)
- ② ナヒヤン・松原陽一: アスパラガス生育不良株における PCR-SSCP 解析. 園芸学会平成20年度春季大会. 園学研.(別冊1): 380, 2008年3月29日(東京農業大学)
- ③ 岡田朋大・松原陽一: アスパラガスの生育阻害因子における AMF による生育改善法の検討. 園芸学会平成20年度春季大会. 園学研.(別冊1): 381, 2008年3月29日(東京農業大学)

[図書] (計1件)

- ① 松原陽一: 3. 紫紋羽病. 「微生物と植物の相互作用-病害と生物防除-」. 百町満朗・對馬誠也監修. p. 271-275. ソフトサイエンス社(共著), 2009.

[その他]

ホームページ

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~ymatsu/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松原 陽一 (MATSUBARA YOICHI)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号: 40301212

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし