

## 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 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580052

研究課題名（和文）フィールド・マージンの微生物群集構造と病原菌バンク機能の解明

研究課題名（英文）Studies of microbial community structure and function for pathogen bank in field margins

研究代表者

宍戸 雅宏（MASAHIRO SHISHIDO）

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：80302537

研究成果の概要（和文）：フィールド・マージンの病原菌バンク機能を明らかにするために、ウリ類ホモプシス根腐病菌およびナン白紋羽病菌をモデルとして病原生態学的研究を行った。最初に両菌を特異的に検出・定量する手法を開発し、次にフィールド・マージンにおける病原菌量と微生物群集構造との関係を明らかにした。その結果、フィールド・マージンにおける病原菌量は微小であり、病原菌は圃場内土壌に留まっていること、さらに一部の微生物群にのみ影響していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ecology of black root rot of cucurbitaceae and white root rot of Japanese pear were studied to elucidate functions for pathogen bank in field margins. After developing real-time PCR protocols to quantify these plant pathogens, relationships between pathogen quantities and microbial community structures of both in-fields and field margins. The research results suggested that pathogens were least proliferate in field margins, mostly remaining inside the fields, and affected only particular groups of microorganisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：感染・増殖，病原菌生態，微生物群集，フィールド・マージン，病原菌バンク，リアルタイム PCR，土壌伝染性病害

## 1. 研究開始当初の背景

作物圃場の周辺域（フィールド・マージン）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と考えられる。Marshallら（2002, 2006）は、フィールド・マージンの面積を増やすことによって動植物や昆虫の多様性が増大することを指摘し、また

Hollandら（2008）はフィールド・マージンが害虫や天敵昆虫の生息地として機能していることを報告している。植物病理学の分野でも、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。しかし、フィールド・マージ

ンに生息する病原菌の詳しい生態的知見は少ない。Shishidoら(2008)は、圃場面積の約1/3に紫紋羽病が発生しているリンゴ園を対象に、罹病リンゴ株と健全リンゴ株がそれぞれ分布する場所の圃場内および圃場周辺に生息する土壤微生物群集構造を2年間調査した。その結果、病原菌汚染土壌と健全土壌から抽出した微生物群集構造は、圃場内よりも圃場周辺で大きく異なっていた。このとき、リンゴ園周辺の植物種数や多様性指数は園内よりも有意に高く、多様な植物種構成が病原菌を含めた微生物群集構造に影響を与えている可能性が考えられた。

農業生態系における微生物群集は、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、その生物が群集内で他種の個体と相互に関係する中で決められていく。したがって、植物病原菌のニッチも共存する微生物群集との関係で決定される。環境保全型農業では、土壌くん蒸剤や除草剤の使用は限定的となり、圃場周辺までは効果が及びにくい。また、農家の高齢化に伴い圃場周辺の除草にまで手が回らないことも多い。これらの状況から、フィールド・マージンが植物病原菌をその微生物群集の一員として保持するバンク機能を有するか、或いは病原菌のニッチ形成を許さずに排除しているか、2つの場合が想定される。したがって、フィールド・マージンにおける微生物群集構造とその病原菌バンクとしての機能を解明することは、今後の環境保全型農業における病害管理に有用な知見となる。

Holland, J.M. et al. (2008) *Biol. Cont.* 47: 71-76.

Marshall, E. J. P., Moonen, A. C. (2002) *Agric. Ecosyst. Environ.* 89: 5-21.

Marshall, E. J. P. et al. (2006) *Agric. Ecosyst. Environ.* 113: 36-44.

Shishido, M. et al. (2008) *Soil Biol. Biochem.* 40: 1460-1473.

## 2. 研究の目的

(1) フィールド・マージンの病原菌量を調査し、病原菌バンクとしての機能を解明すること、(2) フィールド・マージン(圃場周辺域)に生息する微生物群集の構造を病原菌も含めて明らかにすること、さらに、(1)と(2)の知見を統合し、フィールド・マージンにおける病原菌の生態的地位について考察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究の対象モデル病害をナシ白紋羽病とキュウリホモプシス根腐病とした。白紋羽病は代表的な土壌生息型の未分化寄生

菌であり、宿主範囲が広いのが特徴である。また、本菌は蔓延範囲が果樹園内に比較すると園外で小さいことが知られている。千葉大学環境健康フィールド科学センター内ナシ園(千葉県柏市)の約半分が本病に罹病しており、研究材料として好適な状態であった。

一方、キュウリホモプシス根腐病は関東・東北地方の露地キュウリ産地に拡大している病害で、ホモプシス根腐病菌は代表的な根系生息型の未分化寄生菌である。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。当初、福島県二本松市の本病激発圃場をモデル圃場として供試し、フィールド・マージンの雑草根圏と土壌の微生物群集構造を白紋羽病菌と同様の項目について調査し、病原菌を含めた微生物群集構造がフィールド・マージンの植生環境に依存するかどうかを検証する予定であった。しかし、東日本大震災およびその後の東京電力福島第一原子力発電所の事故のため、当該圃場を供試することが困難となり、千葉大学園芸学部内の研究圃場(千葉県松戸市)に人工的にホモプシス根腐病菌汚染圃場を設置して対応した。そのためにホモプシス根腐病をモデルとしてフィールド・マージンの病原菌バンク機能の解明についての圃場試験は2012年秋に終了予定である。

(2) フィールド・マージンに生息する白紋羽病菌とホモプシス根腐病菌を定量的に検出するために、まず両菌に特異的なリアルタイムPCR用プライマーを開発した。従来の定性PCR用プロトコルをTaqMan probeを用いた定量PCRプロトコルに改良し、検出感度と信頼性を上げた。次に、このリアルタイムPCR法を用いて、これら白紋羽病菌のフィールド内およびフィールド・マージンにおいて定量化した。

(3) ナシ白紋羽病発生圃場およびその周辺(フィールド・マージン)土壌における微生物群集構造の特徴を病原菌も含めて、基質資化性、全脂質脂肪酸組成、核酸配列多型から解析した。

## 4. 研究成果

(1) 白紋羽病菌を植物体および土壌中から定量的に検出できるリアルタイムPCR法の開発

フィールド・マージンの病原菌バンク機能を明らかにするために、白紋羽病菌を定量的に検出できるPCRプロトコルを構築した。具体的には、TaqMan probeを用いたPCRプライマーとプローブの塩基配列を2組決定した。

その結果、本プロトコルの検出限界はDNA約0.01pgであり、極めて高感度であること(図1)、そして、罹病ナシ根や病原菌汚染土壌から抽出したDNAを鋳型にした場合でも定量可能であることが実証された。

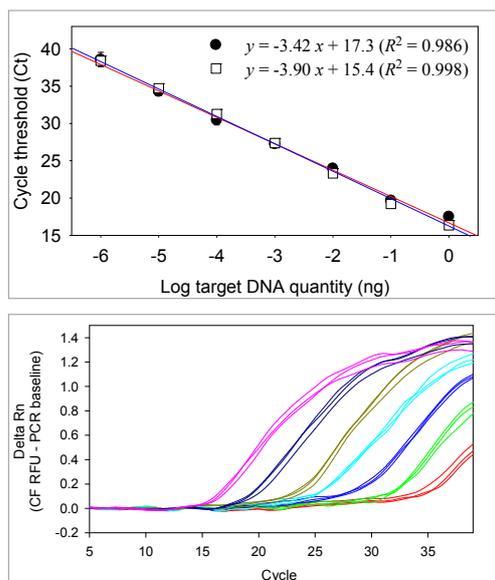


図 1. [上]白紋羽病菌用リアルタイム PCR による Ct 値と DNA 量との関係, [下]PCR サイクル数に対する DNA 増幅量

(2) ウリ類ホモプシス根腐病菌を植物および土壌中から定量的に検出できるリアルタイム PCR 法の開発

白紋羽病菌と同様にフィールド・マージンの病原菌バンク機能を明らかにするツールとして、ウリ類ホモプシス根腐病菌を定量的に検出するプロトコルを構築した。具体的には、TaqMan probe を用いた PCR プライマーとプローブの塩基配列を 3 組決定した。その結果、このプロトコルでの検出限界も DNA 約 0.01pg であり、極めて高感度であることが実証された。

また、この新規プロトコルを従来の定性 PCR 法および SYBR Green I を用いた定量 PCR 法と比較したところ、定量 PCR は TaqMan probe 法でも SYBR Green I 法でもほぼ同等の検出感度を示し、その値は従来の定性 PCR 法の約 100 倍であった。

しかし、土壌抽出 DNA を PCR の鋳型とした場合、火山灰土壌や有機質土壌のように DNA 抽出効率が極端に低下する土壌や、土壌中の PCR 阻害物質によって PCR 効率が低下し、検出限界が大きくなる例が認められた。この問題を解決するために、土壌には存在しない GFP 遺伝子を組み込んだ大腸菌を土壌サンプルに添加し、病原菌 DNA と同時に GFP 遺伝子量を測定することで、より正確な病原菌量を定量することが可能になった。さらに、この改良版プロトコルは、ホモプシス根腐病菌以外で既に定量 PCR のプロトコルが完成している白紋羽病菌や黒点根腐病菌にも適用が可能であったことから、これらの土壌病原菌のモニタリングに有用であると考えられた。

(3) ウリ類ホモプシス根腐病菌の宿主特異性の検証

前項で完成させた PCR プロトコルを利用して、ウリ類ホモプシス根腐病菌の宿主特異性を確認した。これはフィールド・マージンの病原菌バンク機能が病原菌の宿主特異性に依存している可能性があるため、具体的にはウリ科野菜 4 種から分離したホモプシス根腐病菌と 6 種のウリ科植物を供試し、全ての組合せの発病程度と病原菌の感染・侵入程度を接種試験によって判定した。

その結果、供試した病原菌の全てが全ウリ科植物に感染・発病させると共に菌の侵入程度にも宿主特異性は認められず、これにより本菌はウリ科内で宿主特異性を持たないか、或いは極めて小さいことが確かめられた。ただし、宿主植物間での感受性や菌株間での病原力と感染力には有意差が認められ、これらの相違の原因を探求することが本病原菌の生態を解明する上で重要であると考えられた。

(3) ナシ園フィールド・マージンの微生物群集の構造と白紋羽病菌の生態的地位

フィールド・マージンの病原菌バンク機能を明らかにするために、前項で完成させた白紋羽病菌の定量 PCR 法を用いてナシ園内およびナシ園周辺における、*Roseellinia necatrix* の定量を行った。また、同時に基質資化性、全脂質脂肪酸組成、核酸配列多型 (PCR-DGGE: 図 2) から土壌微生物群集構造を解析した。

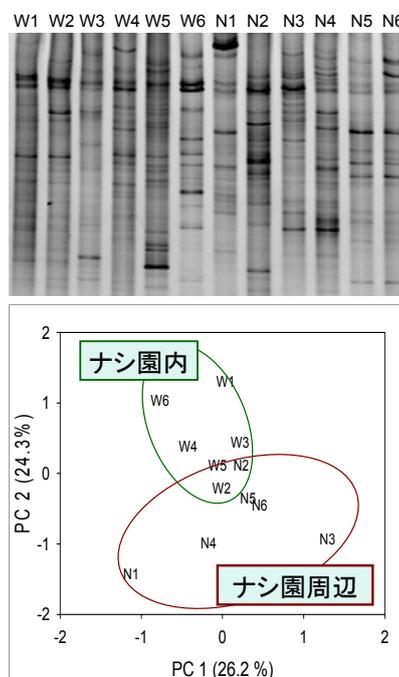


図 2. ナシ白紋羽病が発生しているナシ園内およびナシ園周辺土壌の細菌群集構造解析 (PCR-DGGE)

その結果、白紋羽病に罹病しているナシ根圏土壌 (図2 : W1, W2, W3) の微生物群集構造は健全ナシ根 (図2 : W4, W5, W6) のものとはある程度異なっているものの、全体としては似通っており、病害発生は微生物群集の一部の細菌群に影響を及ぼしているに過ぎないことが示唆された。さらに、この結果は基質質化性や全脂質脂肪酸組成をパラメータにした場合でもほぼ同等であった。また、フィールド・マージン土壌 (図2 : N1~N6) では *R. necatrix* の DNA はほとんど検出されず、白紋羽病菌は宿主根圏に留まっていることが推察された。したがって、本病の蔓延は宿主根の進展に伴って病原菌が拡散するためと考えられた。

一方、ナシ園内とナシ園周辺の土壌微生物群集構造は大きく異なっており、ナシ園周辺土壌に白紋羽病菌のバンク機能が見出されなかった要因が微生物群集構造に相違に因るものかどうかを解明することは、今後ナシ白紋羽病の蔓延要因を明らかにする上で重要である。

#### 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4件)

① Shishido, M., Kubota, I., Nakamura, H. (2012) Development of real-time PCR assay using TaqMan probe for specific and quantitative detection of *Roseellinia necatrix* in plant and soil. *Journal of General Plant Pathology* 78 (2): 115-120. DOI:10.1007/s10327-012-0366-x

② Nimitkeatkai, H., Shishido, M., Okawa, K., Ohara, H., Ban, Y., Kita, M., Moriguchi, T., Ikeura, H., Hayata, Y., Kondo, S. (2011) Effect of jasmonates on ethylene biosynthesis and aroma volatile emission in Japanese apricot infected by a pathogen (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (12): 6423-6429.

DOI:10.1021/jf2010996

DOI:10.1021/jf2010996

③ Shishido, M. (2011) Plant disease management in protected horticulture (review). *HortResearch* 65: 7-18. <http://www.h.chiba-u.ac.jp/chiiki/hortresearch.html>

④ Shishido, M., Sato, K., Yoshida, N., Tsukui, R., Usami, T. (2010) PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotioides* in plants and soil. *Journal of General Plant Pathology* 76(1): 21-30. DOI:10.1007/s10327-009-0209-6

[学会発表] (計4件)

① Shishido, M., Yoshida, N., Tsukui, R., Yokoyama, T., Usami, T. (2012) Development of real-time PCR assay using TaqMan probe for detection and quantification of *Monosporascus cannonballus* in plant and soil. The 2nd Korea-Japan Joint Symposium, The Phytopathological Society of Japan (PSJ) and The Korean Society of Plant Pathology (KSPP), pp.113, 2012年3月27日~30日, 福岡国際会議場.

② 宍戸雅宏・久保田斎・中村 仁 (2011) TaqMan probe を用いたリアルタイムPCRによる白紋羽病菌の定量と検出. 日本土壌微生物学会, 2011年11月25日~26日, 土と微生物 65 (2): 152, 大崎市鳴子公民館.

③ 宍戸雅宏・久保田斎・大橋竜也 (2011) TaqManプローブを用いたリアルタイムPCRによる *Phomopsis sclerotioides* 検出および定量法の改良. 平成23年度日本植物病理学会大会, 2011年3月27日~29日, 日本植物病理学会報 77: 206, 東京農工大学.

④ 宍戸雅宏 (2010) ホモプシス根腐病菌はウリ科作物に宿主特異性を示さない. 平成22年度日本植物病理学会大会, 2010年4月18日~20日, 日本植物病理学会報 76(3): 239, 国立京都国際会館.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宍戸 雅宏 (SHISHIDO MASAHIRO)

千葉大学・大学院園芸学研究所・准教授

研究者番号: 80302537