

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 4 月 4 日現在

機関番号：14101  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22658048  
 研究課題名（和文）森林生態系における放線菌類の機能の多様性に関する研究  
 研究課題名（英文）Functional diversity of actinomycetes in forest ecosystems

研究代表者  
 伊藤 進一郎（ITO SHIN-ICHIRO）  
 三重大学・大学院生物資源学研究科・教授  
 研究者番号：90092139

研究成果の概要（和文）：本研究では、ブナ科樹木に内生あるいはその根圏土壌に生息する放線菌とブナ科樹木の萎凋病菌 (*Raffaelea quercivora*) に対する抗菌性を明らかにするため、コナラ、アラカシ、ウバメガシを対象として、葉、茎、根の器官からの放線菌の分離と同定を行った。その結果、根、根圏土壌から多くの菌株を獲得された。葉に由来する株は根、土壌とは分子系統的に異なる仲間であった。*R. quercivora* 菌株に対する抗菌性は菌株間で異なり、460 菌株中 17 菌株は、複数の *R. quercivora* 菌株に抗菌性を示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify taxonomic identity and fungal antagonistic of endophytics and rhizospheric actinomycetes associated with the Fagaceae trees. For this purpose, isolates were obtained from leaves, stems and roots of 3 oak trees species. Larger numbers of isolates were obtained from roots and rhizospheric soils. Isolates originated from leaves were phylogenetically different from ones from roots and soils. Fungal antagonistic of obtained actinomycetes isolates were varied, and 17 out of 460 isolates showed positive resistances against multiple isolates of Japanese oak wilt pathogen, *Raffaelea quercivora*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	0	2,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	240,000	3,340,000

研究分野：森林病理学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：放線菌，萎凋病，ブナ科樹木，内生菌，生物防除

1. 研究開始当初の背景

放線菌類は土壌中での分布が最も多く、土壌の肥沃な森林には放線菌類が多数生育しており、リターの分解者として、森林生態系の中でその存在・役割が注目されてきた。一方近年になって、植物体内に内生する放線菌が発見され、新規抗生物質の探索源として医薬・農薬開発の分野で注目を集めている。現在までに、多様な植物から数十種の内生放線

菌が分離され、新規物質も単離されている。同時に、宿主植物に対して耐病性・耐乾燥性の付与や生長促進作用を示す放線菌種の存在も明らかとなり、植物病理学分野でも研究が始まっている。また、根圏での放線菌の存在が、菌根菌の生育を制御している可能性がある。しかし、森林樹木の内生放線菌に関する研究例は、国内外を問わず殆ど行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ブナ科樹木に内生あるいはその根圏土壌の放線菌を分離し、病原菌に対して抗菌性を示す放線菌を選抜することを目的とした。そのため本研究では、ブナ科樹木の萎凋病菌 *Raffalea quercivora* に対して拮抗性を示す菌株を獲得するため、コナラ属の3樹種を対象に、放線菌の分離、同定、拮抗性の検定を行った。具体的には以下の項目について実施した。

- (1) コナラからの内生放線菌の分離と同定
- (2) ブナ科樹木からの放線菌の分離
- (3) *Raffalea* 菌株に拮抗性を示すコナラ属3樹種由来の放線菌の選抜

## 3. 研究の方法

(1) コナラからの内生放線菌の分離と同定  
2008年4月に三重県林業研究所の実習林内からコナラの実生、成木の葉を3個体から採取した。周辺土壌の採取も行った。成木の葉、葉・茎・根に分けた実生の表面殺菌を行い、抗生物質を添加した1.5%素寒天培地上に静置し、30℃で内生放線菌の分離を行った。放線菌が分離されたら、メンブレンフィルターを敷いたIMA-2寒天培地上に画線接種し、純粋培養を行った。胞子形成を確認してから、メンブレンフィルターを剥がし、同一条件で更に培養した。土壌由来の放線菌は腐食酸ービタミン培地上で分離し、菌叢形態が明らかに異なるものを選抜した。獲得した菌株は16S rDNA全領域の塩基配列解析に用いた。解読された配列は最類似の配列とともに、近隣結合法により系統樹を作成し、分子系統学的位置づけを推定した。

(2) ブナ科樹木からの放線菌の分離  
放線菌分離のため、三重大学構内に生育するコナラ属3樹種(コナラ、アラカシ、ウバメガシ)の実生を供試した。採取は2010年12月、2011年2月、4月の3回、成木の樹冠下に生育する実生を対象に行った。1回の採取につき、上記3樹種の実生を各3個体採取し、葉、茎、根の3部位に分けた。実生の根系に付着した土壌を熱殺菌したピンセットで払い落としした後、滅菌水100mlが入った三角フラスコに浸し、振とう培養機にかけ、根圏土壌の懸濁液を作製した。さらに懸濁液を希釈し、抗生物質を添加した腐植酸ービタミン寒天培地に滴下し、30℃で30日以上培養を行った。葉・茎・根は表面殺菌を行い、抗生物質を添加した1.5%素寒天培地上に静置し、30℃で約2ヶ月間培養を行った。放線菌が分離された後、純粋培養を行った。根圏土壌から分離した放線菌は、IMA-2寒天培地上に画線接種し、30℃、暗条件下で培養を行った。

実生から分離した内生放線菌は、メンブレンフィルターを敷いたIMA-2寒天培地上に画線接種し、30℃、暗条件下で培養を行った。胞子形成を確認してから、メンブレンフィルターを剥がし、同一条件で更に培養した。

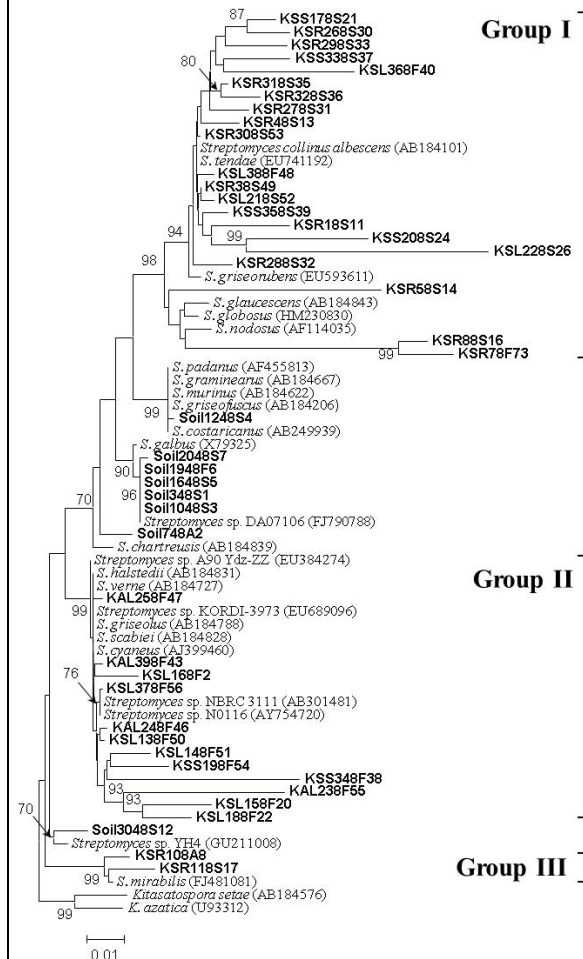


図1. 近隣結合法により構築されたコナラと土壌由来する放線菌の16S rDNA領域の系統樹

本研究で得られた配列は太字で示した。コナラ由来は3英字で表現し、実生葉; KSL, 実生茎; KSS, 実生根; KSR, 成木葉; KAL, 土壌由来はSoilで示した。ブートストラップ検定(n=1000)による枝の支持が70%以上の場合にその値を明示した。 *Kitasatospora setae* と *K. azatica* を外群とした。

(3) *Raffalea* 菌株に拮抗性を示すコナラ属3樹種由来の放線菌の選抜  
2010年6月から2011年4月の間に6回、三重大学構内に生育するコナラ属3樹種(コナラ、アラカシ、ウバメガシ)の実生を採取し、実生の葉、茎、根系、根圏土壌から放線菌の分離と純粋培養を行った。純粋培養した放線菌全てを対峙培養試験に供試した。 *R. quercivora* は、山形県、鹿児島県、富山県、三重県(紀北町、いなべ市)、東京都(三宅

島)で採取され、三重大学生物資源学部森林生物循環学研究室に保存されている6菌株を供試した。純粋培養した放線菌を直径6mmのコルクボーラで菌叢ディスクを打ち抜き、等量の1/2濃度のポテトデキストロース寒天培地上の一端に静置し、2日間培養を行った。その後、*R. quercivora*を放線菌から6cm離して静置し、さらに5日間培養した。7日間後、両菌株の距離を生長阻止帯として計測し、阻止帯を示した放線菌株を*R. quercivora*に抗菌性のある菌株と判断した。

#### 4. 研究成果

(1) コナラからの内生放線菌の分離と同定調査期間中、葉、茎、根から48, 19, 71菌株の合計138菌株が検出された。そのうち35菌株のみが純化に成功した。4菌株は成木葉から、それ以外は実生由来で葉、茎、根からそれぞれ10, 6, 15菌株得られた。内生菌35菌株と土壌由来8菌株の塩基配列の解読に成功し、1353bpから1494bpが得られた。いずれもBLAST検索により最類似配列は*Streptomyces*属菌(E値=0)であった。

得られた内生放線菌は3つのクレードに分けられたが、土壌由来の菌株と同じクレードに位置づけられることはなかった(図1)。内生放線菌由来の3クレードのうち、地上部由来、すなわち実生の葉、茎および成木葉の12菌株、が他の登録配列とともにブートストラップ値99%(n=1000)で1つのクレード(グループ2)を形成した。これらの結果は、コナラには内生放線菌が生息しており、その分布にはコナラの樹齢よりは器官が影響しており、樹上部には土壌、地下部根系に関係する放線菌類とは異なる分類群が関与する可能性を示唆する。

(2) ブナ科樹木からの放線菌の分離  
コナラ、アラカシ、ウバメガシの根圏土壌から分離された放線菌は、それぞれ258, 175, 64菌株で、合計497菌株であった。その内、純粋培養に成功したのは150, 108, 52菌株の合計310菌株であった(表1)。各実生から分離された内生放線菌は、コナラ、アラカシ、ウバメガシ各218, 91, 110菌株で、合計419菌株であった。その中で、メンブレンフィルターを通過し、純粋培養できたのは43, 16, 8菌株で、合計は67菌株であった。分離菌株数と純粋培養菌株数の詳細は表に示した。樹種別に分離菌株数を見ると、コナラ、ウバメガシは根からの分離菌株数が最も多かったが、アラカシは茎からの分離菌株数が最も多かった。このことから、内生放線菌は樹種によって、樹体内での分布が異なるのではないかと考えられる。また、実生はコナラ、アラカシ、ウバメガシの順に少なくなっており、根圏土壌にも同様の傾向が見られたため、放

線菌が根圏土壌に多く生息している樹種は樹体内にも多く生息するのではないかと考えられた。

表1 コナラ属3樹種の実生とその根圏土壌から分離・純粋培養された放線菌株

分離源 部位	樹種			
	コナラ	アラカシ	ウバメガシ	
実生	根	31 <sup>a</sup> /135 <sup>b</sup>	7/22	5/61
	茎	12/83	3/44	2/38
	葉	— <sup>c</sup>	6/25	1/11
	合計	43/218	16/91	8/110
根圏土壌	150/258	108/175	52/64	
小計	193/476	124/266	60/174	
合計	377/916			

a ; 純粋培養された菌株数, b ; 分離された菌株数, c コナラは採取時期に葉が落葉していたため実生の葉からの分離はできなかった。

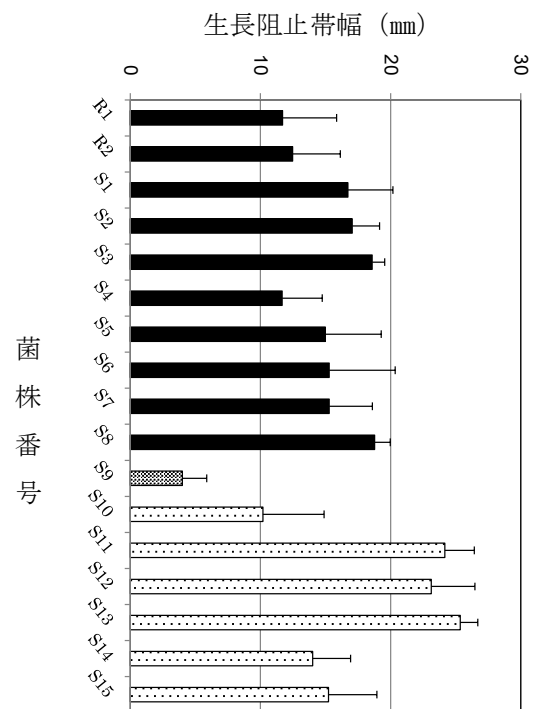


図2. *Raffaelea quercivora* 6菌株全てに生長阻止帯を示した放線菌株の生長阻止帯幅

Rは実生から分離した菌株, Sは根圏土壌から分離した菌株, 各値は生長阻止帯の平均値(n=6)±SD

(3) *Raffaelea* 菌株に拮抗性を示すコナラ属3樹種由来の放線菌の選抜

合計で実生から501菌株, 根圏土壌から1196菌株の放線菌が分離された。その中で、実生から80菌株, 根圏土壌から380菌株が

純粋培養できた。純粋培養された放線菌 460 菌株中、17 菌株が *R. quercivora* の全ての菌株に生長阻止帯を形成した。17 菌株の内、2 菌株は実生から、15 菌株は根圏土壌から分離した菌株であった (図 2)。以上より、コナラ属樹種付近に生息する放線菌の中で萎凋病病原菌に対して抗菌性を潜在的に有するものが選抜された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Thongsandee W, Matsuda Y, Shimizu M, Ehara H, Ito S, Isolation of endophytic streptomycetes from above- and below-ground organs of *Quercus serrata*. Journal of Forest Research (掲載決定), 査読有
- ② Seo MY, Matsuda Y, Nakashima C, Ito S, Taxonomic re-evaluation of *Raffaelea quercivora* isolates collected from mass mortality of oak trees in Japan. Mycoscience (掲載決定), 査読有
- ③ 清水将文 (2012) 植物内生放線菌を利用した病害防除研究の現状. 植物防疫 66:39-42, 査読有
- ④ Thongsandee W, Matsuda Y, Ito S (2012) Temporal variations in endophytic fungal assemblages of *Ginkgo biloba* L. Journal of Forest Research 17: 213-218, 査読有
- ⑤ Torii M, Matsuda Y, Murata M, Ito S (2011) Spatial distribution of *Raffaelea quercivora* hyphae in transverse sections of seedlings of two Japanese oak species. Forest Pathology 41: 293-298, 査読有
- ⑥ 村田政徳・山田利博・松田陽介・伊藤進一郎 (2011) *Raffaelea quercivora* を接種したブナ科樹木 4 種の菌糸分布と防御反応の比較. 東京大学農学部演習林報告 125: 11-21, 査読有

[学会発表] (計 23 件)

- ① Torii M, Matsuda Y, Ito S (2012) How a pathogenic fungus of Japanese oak wilt, *Raffaelea quercivora*, grows within seedlings of two oak species? 2nd Japan-Korea Joint Symposium of plant pathology, 2nd Korea - Japan Joint Symposium, Fukuoka International Congress Center, 2012/3/27
- ② 鳥居正人・松田陽介・伊藤進一郎(2012) 樹木の道管配列が *Raffaelea quercivora* に対するコナラ属樹種の感受性に与える影響. 第 123 回日本森林学会大会. 宇都宮大学, 2012/3/26
- ③ Thongsandee W, Matsuda Y, Shimizu M, Ehara H, Ito S (2011) Endophytic bacteria isolated from leaves of two oak species. 樹木医学会第 16 回大会, 東京大学, 2011/11/27

- ④ Ito S, Matsuda Y, Torii M, Yamamoto A (2011) The establishment of control system on witches's broom of cherry -Past knowledge on witches' broom of cherry and future direction of study-. 29th Sino - Japanese Modern Engineering and Technology Symposium, 国立臺灣科技大学, 2011/11/22
- ⑤ 伊藤瑠里子・兼本宏之・松田陽介・伊藤進一郎(2011)コナラ属 3 樹種から分離された放線菌が *Raffaelea quercivora* の菌糸伸長に及ぼす影響. 第 1 回中部森林学会, 石川県地場産業振興センター, 2011/10/22
- ⑥ Yamada Y, Murata M, Torii M, Matsuda Y, Ito S (2011) An overview of Japanese oak wilt epidemic. Asian mycological congress 2011, Incheon University, Korea, 2011/8/7

[図書] (計 1 件)

- ① Shimizu M (2012) Endophytic actinomycetes: Biocontrol agents and growth promoters. In: Bacteria in Agrobiolgy: Plant growth responses. Maheshwari DK ed, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 201-220

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/junkan/busshitsu/lab2/indexj.htm>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 進一郎 (ITO SHIN-ICHIRO)  
三重大学・大学院生物資源学研究所・教授  
研究者番号：90092139

##### (2) 研究分担者

清水 将文 (SHIMIZU MASAFUMI)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号：60378320

磯野 直人 (ISONO NAOTO)  
三重大学・大学院生物資源学研究所・助教  
研究者番号：70378321

松田 陽介 (MATSUDA YOSUKE)  
三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授  
研究者番号：30324552

##### (3) 連携研究者

なし