

植物地下部に侵入する寄生菌類の網羅的検出技術開発

1. 連作に伴うシンテッポウユリ生育不良の原因究明における利用

古屋廣光¹, 羽根坂駿¹, 奈良知春¹, 戸田武¹, 藤晋一¹, 穴戸邦明²¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科² 福島県農業総合センター

圃場の土壌微生物は作物生産に大きな影響を与える。しかし今日、個別の圃場の土壌微生物について十分な科学的情報をもとに生産を行っている生産者はほとんどいない。実用的な分析技術がないことがその主要な要因の一つと考え、その開発を旨とすることとした。基本的な方針として、土壌そのものでなく作物の根に寄生する糸状菌を網羅的に検出する技術を基盤として作物生産に役立つ実用的な技術の開発を行うこととした。本研究では、シンテッポウユリの連作障害の主因究明にあたって、ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis) 法による地下部糸状菌相の網羅的解析の有用性を検証した。連作圃場の土壌で栽培されて生育不良となったシンテッポウユリの吸収根の糸状菌相を健全株の根と比較したところ、サイズ値 665 付近に特異的な増幅産物が得られた。この増幅産物をシーケンス解析したところ *Fusarium oxysporum* と相同性が高かったことから同菌を純粋分離し、コッホの原則にもとづいて病原体の究明を試みた。その結果、同菌が調査圃場における本障害の主因と結論された。病原が明らかでない病害の主因究明にあたっては病原の推定が必要であるが、植物地下部を ARISA 解析することによって病原菌を推定できることが示された。また根に侵入する糸状菌を網羅的に解析することによって圃場に存在する土壌病菌の効果的な検出が可能であることが示唆された。

キーワード： ARISA, 地下部糸状菌相, シンテッポウユリ, 連作障害, 土壌伝染性病害, *Fusarium oxysporum*

土壌微生物は作物の生育に大きな影響を与える。しかし今日、圃場の土壌微生物がどのような状態にあるか正確に知って栽培をしている生産者はほとんどいない。そのため時として土壌病害など有害微生物による障害に見舞われることもある。また AM 菌など相利共生菌の有効利用も必ずしも有効に行われているとは言い難い。このようなことから我々は、個別圃場の土壌に存在し、作物の生育に影響を与える土壌菌類の実用的検出の開発を行っている。ここでは、土壌伝染性病原菌（以下、土壌病菌）の検出技術とその有効性について紹介する。

土壌病菌は作物ごとに数種から十数種類ある。個々の病原菌を土壌から検出するこれまでの主な技術は寒天培地を用いて病原菌を分離するというものである。しかしこの方法では作業が煩雑で一度に検

査できるサンプル数も限られるほか、長期間（多くの場合 1-2 週間）を要する。そのため研究用に使われることはあっても、農家圃場の土壌診断に実用的に使われる事はほとんどない。これに対して近年発達しつつある遺伝子検出技術では、従来法に比べてより迅速かつ正確に検出可能であり、実用的な利用もできるようになりつつある（古屋、戸澤、藤, 2015）。しかしそれでもなお、莫大な数の土壌微生物の中から土壌病菌を検出するのはなお困難（多くの場合 0.0001%にも満たない）、土壌を正確に診断できる技術の開発はあまり進んでいない。このようなことから我々は、土壌ではなく、植物地下部の微生物相を解析することで圃場に存在する土壌病菌に関する有用な情報を得ることを考えた。土壌病菌は全て寄生菌であり、植物地下部に侵入して害を与える。侵入

した寄生菌は地下部組織で増殖し、多くの場合、その優先種となる。植物組織からの菌類の検出は土壌からの検出に比べて一般に容易である。検出技術として主として ARISA 解析 (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) を用いることとした。この方法では、糸状菌を中心とする真核微生物を網羅的に検出することができる。本研究ではこれを利用して、連作に伴って発生するシンテッポウユリ (*Lilium x formolongo*) の激しい生育不良の原因究明をおこなった。

シンテッポウユリ連作障害の原因究明

福島県の2年1作体系で栽培されているシンテッポウユリ圃場において、2作目に根腐れを伴う地上部の生育不良といった障害がしばしば発生している(図1、改植時のこの現象を現地では連作障害と呼んでいる。ここでもこれに従ってこれを連作障害と呼ぶこととする)。

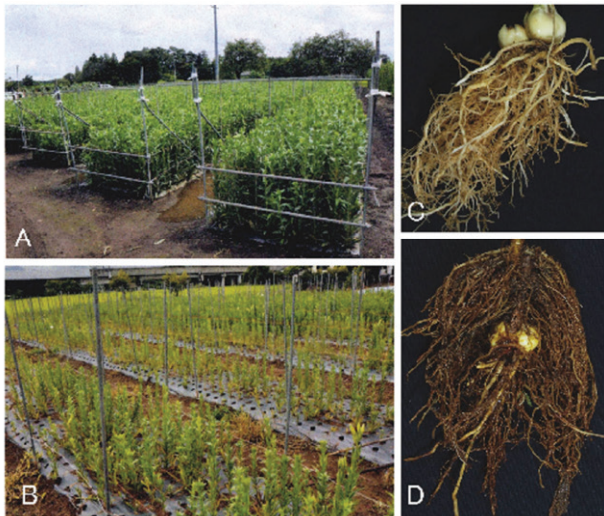


図1 栽培歴が異なる近接圃場におけるシンテッポウユリの生育 (H23年7月29日, 福島県)。

A:1作1年目圃場。 B:2作1年目圃場。 C: 1作1年目圃場で生育した地下部。
D:2作1年目圃場(B)で生育した地下部。

【土壌の蒸気殺菌の効果】連作圃場から土壌を採取して二分し、一方を低温蒸気処理 (60°C, 30分) した。この土壌におけるシンテッポウユリ (雷山2号) の生育を無処理土壌比較したところ (温室栽培, 約18週間), 無処理土壌で生育した株では葉の黄化や根

の褐変が見られたのに対し、処理土壌ではこのような症状はみられず、明らかに生育が良好であった (図2, 羽根坂ら, 2014)。前述の生育不良を引き起こす要因はこの処理で失活したことから、連作障害に土壌微生物が強く関与すると考えられた。

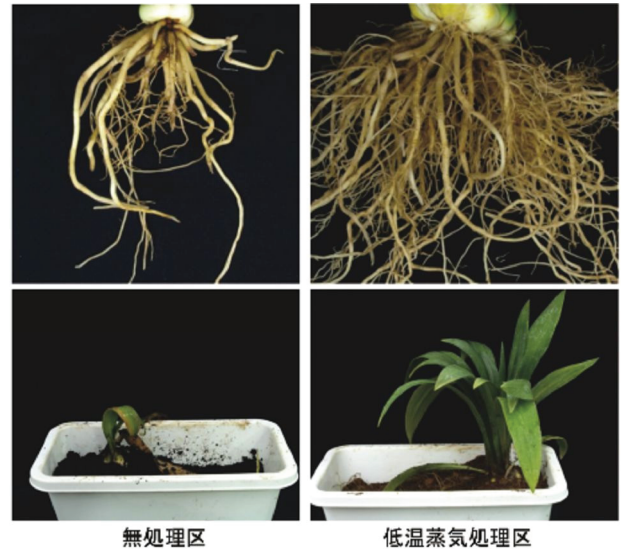


図2 シンテッポウユリ連作圃場の土壌に対する低温蒸気処理 (60°C, 30分) の影響

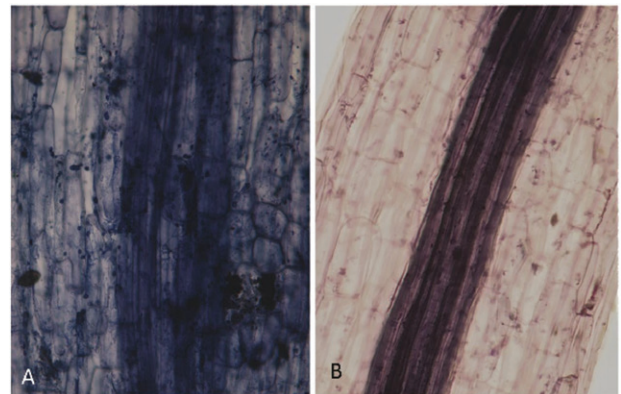


図3 連作にともなって生育不良となったシンテッポウユリ (A) と健全な同植物 (B) の吸収根

【植物の地下部糸状菌相の解析】連作圃場で発生した生育不良株と作付け1年目の圃場で生育した健全株の吸収根を顕微鏡観察したところ、前者の皮層組織では糸状菌菌糸の旺盛な生育が容易に観察された (図3)。しかしこの観察からこれらの菌の種を明らかにすることはできない。そこでこれらの根の微生物相を ARISA 解析によって調査した。生育不良株は福島県の連作した3圃場 (A, B, D) と秋田県の2

圃場 (G, I 圃場) で採取し, 健全株は作付け 1 年目の圃場 (E 圃場) で採取した株および 圃場 A, B, D 圃場で採取して低温蒸気処理した土壌で栽培 (本学温室) した株とした. これらの株の地下部を 100mg ずつ採取し, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) によって DNA を抽出し, ARISA 解析を行った (羽根坂駿, 2016) .

プライマーは 1406f (5'-TGYACACACCGCCCGT-3') および VIC 蛍光標識プライマー 3126T (5'-ATATGCTTAGTTCA GCGGGT -3') を使用し, PCR産物のサイズ値はジェネティックアナライザー

表1 シンテッポウユリ栽培圃場で採取あるいは同圃場土壌で生育したシンテッポウユリ地下部のARISA解析

圃場記号	NO.	増幅産物のサイズ値(上)と蛍光強度(下) ¹⁾			
1. 連作圃場あるいは同圃場で生育したシンテッポウユリ					
A	1	665.1 4687			735.2 953
	2	665.4 2229	677.6 985	688.6 679	735.4 275
	3	665.3 7887			832.0 340
B	1	665.2 1938	678.2 3258		
	1	665.6 5952	678.3 2066		
D	2	665.1 4013	677.6 361	688.6 448	
	3	665.3 2708	678.3 807		
	1	665.0 5340			832.0 2292
G	2				832.53 1709
	3	608.1 2451	665.6 4990		832.39 611
	4		665.1 4032		831.7 493
	1	607.6 1570	664.7 8336		
I	2	607.4 460	664.6 8031		831.4 409
	3	608.1 626	664.6 8021		830.9 757
	2. シンテッポウユリ栽培歴のない圃場の土壌で生育したシンテッポウユリ				
E	1				728.1 2489 2380
	2				727.9 6928 2062
3. 低温蒸気処理した連作圃場の土壌で生育したシンテッポウユリ					
A	1		677.6 2814		812.4 235 2415
	1		678.6 253	746.2 323	812.5 183 5035
D	1		678.3 4743	745.4 233	832.1 3100

1)検査に供した試料のうち2つ以上の試料から検出されたサイズ値のみを記載した. また紙面の都合により, 664と832付近以外のサイズ値は縦欄で必ずしも揃っていない.

3735XL (Applied Biosystems, 本学バイオテクノロジーセンター) によって求めた.

その結果, 連作圃場で採取あるいは連作圃場で生育したシンテッポウユリの根ではサイズ値 664-666 を示す増幅産物が検出されたのに対して, 始めてシンテッポウユリが栽培された圃場あるいは連作圃場の土壌であっても低温蒸気処理した土壌で生育した同ユリの地下部からはこのサイズ値の増幅産物は検出されなかった. この PCR 産物を 2%アガロースゲル電気泳動後にゲルから切出し, 精製後のサンプルをダイレクトシーケンス解析 (本学バイオテクノロジーセンター) し, その結果をもとに National Center for Biotechnology Information において BLAST 検索したところ, 本産物は *Fusarium oxysporum* と 100%に近い相同性を示した.

【糸状菌の分離と病原性試験】福島県と秋田県で採取した生育不良株の主に根から常法によって糸状菌を分離したところ, *Fusarium* 属菌が得られた. これらの菌株を用いて, 最初に福島県で分離された 4 菌株 A1-4, A2-4, A2-5 および D2-1 菌株を用いて接種試験を行った. 供試菌株をそれぞれ PDB 培地で約 10 日間振とう培養し, 形成された分生子を回収して菌株によって $5.6-9.8 \times 10^4$ /ml の孢子懸濁液を得た. これを定植直後に 100ml/株ずつ株元に灌注して温室で栽培し, 定植 80 日後まで発病と生育を調査した. その結果, 4 菌株を接種した土壌のいずれにおいても.

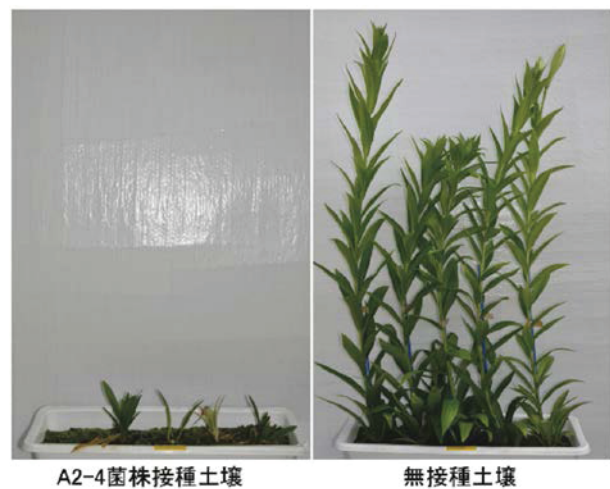


図4 シンテッポウユリから分離された *F. oxysporum* (A2-4 菌株) を接種した土壌におけるシンテッポウユリの生育

地上部の著しい生育不良や根の褐変が見られた (図 4)

次いで秋田で分離された菌株について接種試験を行った。供試菌株 (1bk-1, 1bk-2, 3b-1, 3b-6) を PDB 培地で 10 日間 (25℃) それぞれ培養し、得られた菌体 2.5 g (生重) を粉碎して菌体懸濁液を得た。これを園芸培土 (サカタスーパーミックス A, サカタのタネ) 450 g (生重) に混和し、長方鉢 (17×8×4 cm) に詰め、実生のシンテッポウユリ (雷山 2 号, 3 ヶ月育苗, ムラカミシード社製) 10 株を移植し 22-27℃ の温室で約 8 週間栽培した。

その結果, 1bk-1, 1bk-2 および 3b-6 菌株接種土壌において移植株の著しい生育不良と根の腐敗がみられた。1b-1 菌株接種土壌では地下部の生育不良がみられたが, 地上部の生育は無接種区と大差なかった (図 5)。

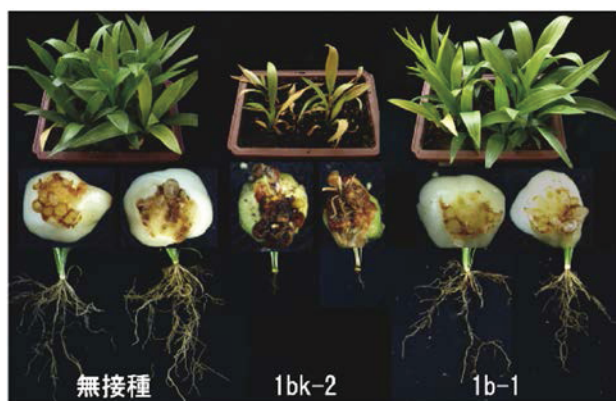


図 5 シンテッポウユリから分離された *F. oxysporum* (1bk-2, 1b-1 菌株) を接種した土壌におけるシンテッポウユリの生育

以上のことから, 福島県と秋田県北部で発生するシンテッポウユリの連作に伴う生育不良には *F. oxysporum* が関与すると考えられた。本種によるユリ類の土壤伝染性病害として乾腐病が知られている。おもに食用ユリで被害があり, 病原菌は *F. oxysporum* f. sp. *lilii* とされる (田中, 長浜, 児玉, 1991)。ユリ類に病原性を示す分化型はこのほかに *F. oxysporum* f. sp. *gradioli* が知られている。両者は侵す植物の種類で区別される。以上のいずれの病原菌 (分化型) による病気も, シンテッポウユリでの報告は国内外でみあたらない。本病がいずれの分化型

によるか今後, 明らかにする必要がある。

前述のようにシンテッポウユリの連作に伴う障害は長い間原因が不明であった。その理由の一つは, これが微生物によることを示すことができなかったことにある。本研究ではこれを低温蒸気 (60℃) 処理で失活することで明らかにした。この方法は土壌の物理性や化学性への影響が少ないことから, 微生物の関与を検証するときに有効である。

関与する微生物の特定にあたって, ARISA 解析による植物地下部の糸状菌の網羅的検出すなわち糸状菌相の解析が極めて有効であった (表 1)。従来の方法では, 肉眼や顕微鏡観察 (図 3) をもとに推定される病原菌を分離して検証していく。推定にあたって豊富な経験と知識が必要である。しかし本法ではこの経験を必ずしも必要としない。本法を用いることによって, 従来, 時間と労力を要する糸状菌相の解析が極めて短時間で可能となった。

本研究によって ARISA 解析による真菌類の網羅的な検出が, 作物の土壤伝染性病害の診断において効果的であることが示された。今後, 圃場に存在する植物地下部侵入糸状菌の検出や動態解析に利用するとともに, 圃場診断に利用することが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたって, 福島県ならびに秋田県鹿角地域振興局管内の農業協同組合並びにシンテッポウユリ生産者の方々には観察や試料採取にあたってご協力を賜った。記して厚い謝意を表する。

文献

- 宍戸邦明, 畑有季, 羽根坂駿, 古屋廣光 (2016). 「クロロピクリンくん蒸剤マルチ畦内処理がシンテッポウユリ連作障害回避に及ぼす影響」。H28 年度日本植物病理学会, 岡山市, H28 3.21-23.
- 田中文夫, 長浜恵, 児玉不二雄 (1991). 「食用ユリの乾腐病菌 *Fusarium oxysporum* の分化型」。『日植病報』 57, 395-396.
- 羽根坂駿 (2016). 「シンテッポウユリ連作障害の原因と関与する病原菌の特異的検出に関する研

究」. 『平成 27 年度 秋田県立大学修士論文』,
46pp.

羽根坂駿, 戸田武, 藤晋一, 古屋廣光 (2014). 「東北地方で発生するシンテッポウユリの連作障害の主因解明と地下部糸状菌相解析の有用性」. 『日本植物病理学会報』 80, 265.

羽根坂駿, 宍戸邦明, 戸田武, 藤晋一, 古屋廣光 (2016). 「福島県および秋田県で発生するシンテッポウユリの連作障害の主因である *Fusarium oxysporum* の検出法」. 『日本植物病理学会報 82,40』.

古屋廣光, 戸澤清徳, 藤晋一 (2014). 「土壌からのホモプシス根腐病菌検出技術の開発と秋田県におけるその利用」. 『植物防疫』 68:6-11

古屋廣光 (2014). 「土壌・根の遺伝子検査の有用性」. 『土壌伝染病談話会レポート』 No.27, 85-95.

〔平成 28 年 7 月 20 日受付〕
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

Development of a molecular technique for the detection of deleterious and pathogenic soil microorganisms in plant roots

Study on the causal agent of the severe growth inhibition of *Lilium x formolongo* in continuous cropping systems.

Hiromitsu Furuya¹, Shun Hanesaka¹, Chiharu Nara¹, Takeshi Toda¹, Shin-ich Fuji¹, Kuniaki Shishido²

¹ Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

² Agricultural Experiment Station, Fukushima Prefecture

Lilium x formolongo, “shin-teppo-yuri” in Japanese, is a popular ornamental plant in Japan. Growth of the plant is very often heavily inhibited when it is replanted in the field as part of a continuous cropping system. An automated ribosomal intergenic spacer analysis was used to comprehensively detect fungi growing in the roots. In the Fukushima and Akita prefectures, an amplicon with a size value of 664–666 was detected in the roots of most of the plants collected in the fields where the lily was grown continuously for several years. Conversely, an amplicon of this size was seldom detected in roots obtained from plants grown in fields where the plant was grown for the first time. This amplicon was also undetectable in the roots of plants grown in soil collected from continuously lily-cropped fields that was partially sterilized by steaming at 30°C for 30 min. We isolated fungi from the roots of lily plants grown in the continuously cropped fields. The isolates size value was between 664 and 666. Based on morphological characteristics, the fungus that showed pathogenicity in the lily plant, *Lilium x formolongo*, was identified as *Fusarium oxysporum*. Thus, *F. oxysporum* is involved in the growth inhibition of shin-teppo-yuri found in fields adopting continuous cropping systems in both prefectures. The comprehensive detection of root-infecting fungi was effective in revealing the causal agent(s) of previously undiagnosed disease and growth inhibition. Furthermore, this technique is useful for the detection of pathogenic root-infecting fungi not assumed to exist in the soil of particular fields. Even in modern agriculture, most farmers grow plants in fields without any scientific data on the local soil microorganisms. However, it is difficult to obtain these data.

Keywords: automated ribosomal intergenic spacer analysis, comprehensive detection, root-infecting fungi, ornamental lily, continuous cropping, *Fusarium oxysporum*