

ミニ特集：新たな土壌診断技術

トマト褐色根腐病発病履歴が異なる土壌における微生物群集の PCR-DGGE 法による評価

(独)農研機構北海道農業研究センター* 関 口 博 之

はじめに

農作物に病害を引き起こすことから「病原菌」として扱われている病原微生物も多様な土壌微生物群集のなかのほんの一部に過ぎない。植物病原微生物と植物との関係は土壌病害発生の主因ではあるが、土壌微生物を利用して病害を制御していくためには、病原菌以外の土壌微生物群集との関係を理解していくことが必要不可欠である。例えば、土壌微生物群集が病害の抑止にかかわっている事例として、病害抑止型土壌が知られているが、このような顕著な土壌においても、詳しいことはあまりよくわかっていない。

その要因の一つとして、自然環境中の微生物は培養が困難なことから、微生物群集に関して十分な情報を得ることができなかつたことが挙げられるが、近年、環境中の遺伝子 (Environmental DNA : eDNA) を解析する技術の発展により、培養操作を経ることなく微生物群集の解析が可能となってきた。土壌においても、土壌から効率よく DNA を抽出できるキットの利用や、土壌から DNA 抽出で問題となっていた土壌粒子への DNA の吸着が、スキムミルクを利用することで低減できることが相次いで報告されてから (IKEDA et al., 2004 ; TAKADA-HOSHINO and MATSUMOTO, 2004), 土壌微生物群集の分子生物学的な解析事例や得られる情報量が飛躍的に増大した。

このような背景のもと、平成 18 ~ 22 年度にかけて、農林水産省農林水産技術会議のプロジェクト「土壌微生物相の解明による土壌生物性の解析技術の開発 (eDNA プロジェクト)」(対馬: 本誌 1 ページ) が実施された。筆者らはその中で、北海道沙流郡平取町で発生しているトマト褐色根腐病を対象に、病害の発生、抑制にかかわる微生物群集の探索のために、「病害発生履歴の異なる土壌」の微生物群集構造を PCR-DGGE により解析し

た。ここでは、その概要を紹介する。

I 解析対象とした土壌病害とその発生地帯の概要

北海道日高地方の平取町では、台木を用いない自根苗によるトマト栽培が行われている (図-1)。1973 年からトマト栽培が開始されて以来、平成 19 年には栽培面積 110 ha (166 戸)、出荷高 11,900 t、取扱額 33 億円に達し、日本有数のトマト産地となったが、近年、特に比較的低温期の 3 ~ 4 月に定植するトマトに褐色根腐病が発生し問題となっている。トマト褐色根腐病は病原糸状菌 *Pyrenochaeta lycopersici* が引き起こす土壌病害で、典型的な病徴は根部のコルク化褐変腐敗とそれに伴う地上部の萎凋である。病勢が進むと、萎凋は回復しなくなり枯死にいたる (森田, 1984)。*P. lycopersici* の生育適温は 18 ~ 20℃前後と比較的低温であり、寒冷な気候である北海道の特徴が反映された土壌病害である (図-2)。

本病害への対策として、フスマによる還元消毒や熱水消毒が普及し、病害低減に一定の効果が認められているが、数年ごとに再発するため、消毒を繰り返しているのが現状で、根本的な解決には至っていない。ところが、平取町内には、本病害が恒常的に発生するハウスがある一方で、30 年以上にわたり病害発生履歴のないハウスも点在している。これら土壌の微生物群集を比較解析した結果から、病害の発生しにくい土壌の微生物群集構造の特徴を明らかにし、本土壌病害の低減に寄与することを目的として、現地圃場における微生物群集の解析を行った。

II 病害発生履歴の有無と土壌微生物群集構造

2008 年 3 月に北海道沙流郡平取町内において、病害発生履歴がない 4 農家 7 ハウスおよび病害発生履歴がある 5 農家 6 ハウスより採取した土壌の細菌群集および糸状菌群集を PCR-DGGE により比較した。

PCR-DGGE に際しては、eDNA プロジェクトにおいて確立した共通手法である「土壌細菌・糸状菌相解析マニュアル」に従い、土壌より直接抽出した DNA を鋳型として PCR を行い、増幅産物である糸状菌の 18S rRNA 遺伝子 (18S rDNA) を、変性剤の濃度勾配を有するア

Evaluation of Microbial Community in Soil with Different History of Corky Root Disease of Tomato Determined by PCR-DGGE.
By Hiroyuki SEKIGUCHI

(キーワード: PCR-DGGE, 土壌病害, トマト褐色根腐病, 土壌微生物群集)

* 現 (独)農研機構近畿中国四国農業研究センター



図-1 北海道沙流郡平取町におけるトマト栽培概要
町内にはトマトを栽培するハウスが立ち並ぶ。

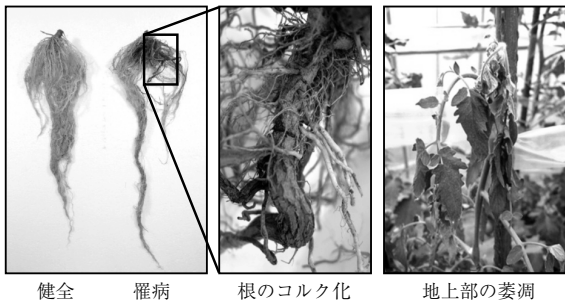


図-2 トマト褐色根腐病の病徴

クリルアミドゲル上にそれぞれ電気泳動した (図-3)。その結果、糸状菌群集の DGGE プロファイルにおいて、病害発生履歴のない土壌に優占する特徴的なバンドが認められた (図-3)。

さらに、得られた DGGE プロファイルの違いを視覚的に示すため、バンド移動度と輝度情報を画像解析により取得し、そのデータに基づいて主成分分析を行った。その結果、病害発生履歴のない土壌はプロットの中央部に位置したことから、これら土壌の糸状菌群集が似通っていること、また、病害発生履歴のある土壌はプロットの縁辺部に分布したことから、土壌ごとに糸状菌群集が異なることが示された (図-4)。このことは、病害発生履歴のない土壌では土着の糸状菌群集が維持されているのに対し、病害発生履歴のある土壌では、土着の糸状菌群集が還元消毒などの土壌消毒や、消毒を実施したあとの生産者それぞれの肥培管理により異なる糸状菌群集が形成されたことが反映されたためと考えられた。

図-4 に示したプロットの大きさは、それぞれの土壌の糸状菌 DGGE プロファイルより算出したシャノンの

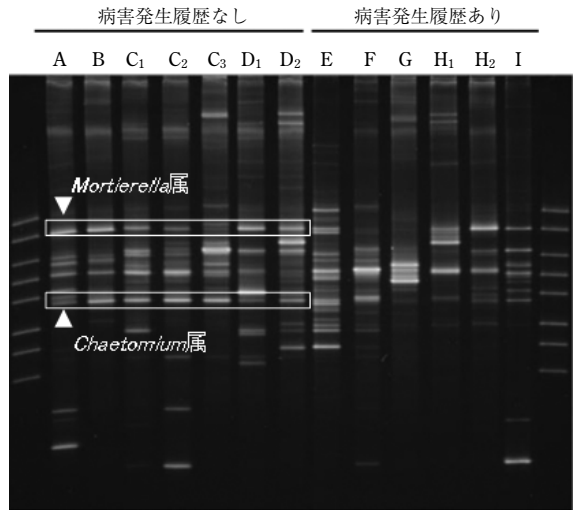


図-3 発病履歴の異なる土壌における糸状菌群集の DGGE バンドプロファイル
同一のアルファベットは同じ農家の異なるハウスを示す。□で囲ったバンドは病害履歴のないハウス土壌において特徴的なバンド。

多様性指数の大きさを示したものである。病害発生履歴のある土壌ではプロットが小さく、糸状菌群集の多様性が小さいのに対し、病害発生履歴のない土壌ではプロットが大きく多様性が維持されていることが示され、病害発生履歴のある土壌においては、土着の糸状菌群集構造の大きな変貌とともに多様性についても低下したままとなっていることがわかった。

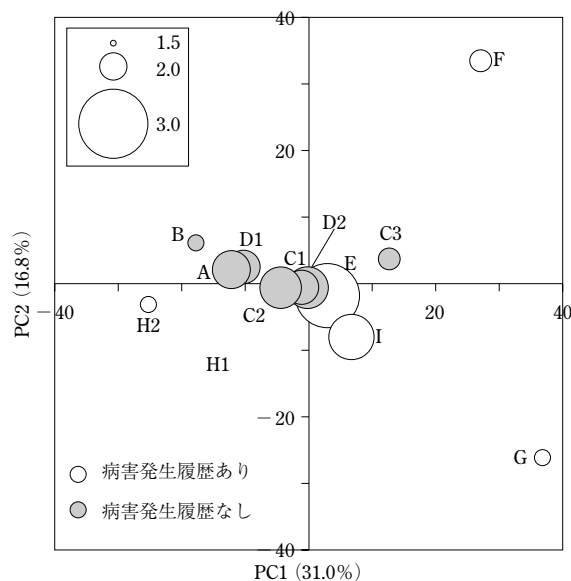


図-4 DGGEバンドプロファイルの主成分分析と多様性指数
 プロットの面積は Shannon-Wiener の多様性指数 (H')。
 各軸の () 内の数字は各主成分の寄与率。

III 病害発生履歴がない土壌に特徴的な糸状菌の分離

前述の病害発生履歴のない土壌に特徴的に見出されたバンドに相当する糸状菌については、切り出したバンドの塩基配列より、それぞれ、*Chaetomium* 属、*Mortierella* 属の糸状菌であると推定された。*Chaetomium* 属糸状菌は、稲わらや麦わらを施用した土壌に優占すること (ROBINSON et al., 1993) や、セルロース分解能が高い土壌糸状菌として報告されている (ROBINSON et al., 1993 ; HALLEY et al., 1996) が、生物防除微生物としての研究事例はわずかにあるのみである (雨宮ら, 1985)。また、*Mortierella* 属糸状菌は、森林土壌 (ARNEBRANT and SODERSTROM, 1990) や落ち葉の分解過程 (KJØLLER and STRUWE, 1980) から分離された事例や、強い β グルコシダーゼ活性を示す糸状菌として報告がなされているが (HAYANO and TUBAKI, 1985)、こちらについても生物防除微生物としての研究例はない。

これらの糸状菌について、DNA の塩基配列から系統的な配置がある程度推定できたものの、土壌中における病害低減効果については、分離した菌株による接種試験を実施する必要がある。そこで、土壌希釈平板培養によ

り培地上に生育してきたコロニーより、18S rDNA を PCR で増幅し、DGGE 上での移動度が元の DGGE プロファイルの移動度と一致するものを選択した。

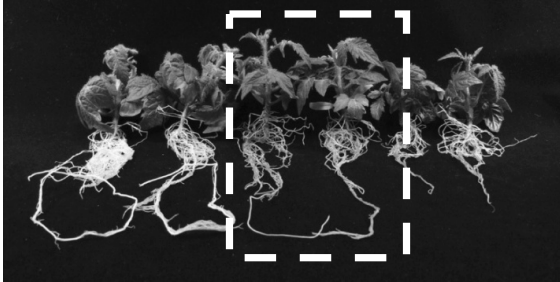
この培養操作に際して、当初、一般的な土壌糸状菌の培養温度である 25℃で行ったが、そのときは、フザリウムなどの生育の早い糸状菌が先にシャーレの培地を覆ってしまい、目的の糸状菌を分離することができなかった。特に *Mortierella* 属糸状菌については生育できる温度の範囲が広く、10℃以下の低温にすることで分離頻度が高くなるという報告に (BOTH A et al., 1999 ; WEBER and TRIBE, 2003) 基づいて、8℃において再度分離を試みたところ、*Mortierella* 属糸状菌のコロニーが生育する頻度が大幅に上昇し、分離するに至った。この過程は、通常の培養方法では見出すことすらできない場合でも、DGGE によって先に存在が確認できていれば、培養条件を変えることで目的の菌を分離できることを示している。

上述のような過程を経て、病害発生履歴のない土壌に特徴的な糸状菌を分離した後、褐色根腐病汚染土壌とモデル植物である矮性トマト (マイクロトム) を用いた発病実験に、液体培養により得られた菌糸体懸濁液を接種した。その結果、無接種の場合と比較して根部の褐変は認められるものの、腐敗による根の脱落が大幅に改善し、病徴が軽減することを確認できた (図-5)。

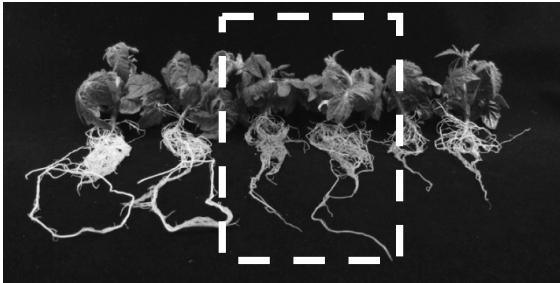
本稿では DGGE の解析結果に基づいて、特徴的な 2 種の糸状菌が病害低減に関与することが示されたが、多様な土壌微生物群集の中には今回分離したような微生物はほかにも存在していると考えられる。

IV eDNA による解析と培養菌体を用いた生物検定

PCR-DGGE などの eDNA 解析の長所は、培養することなく、多くの試料の微生物群集を、同時に比較解析できる点にある。本稿の事例では、病害発生履歴の有無という土壌の違いに着目して PCR-DGGE で比較したことにより、土壌病害発生履歴の有無で糸状菌群集が異なること、土壌消毒による糸状菌群集への影響、消毒後の肥培管理による糸状菌微群集への影響等が評価できた。さらに、病害発生履歴のない土壌に特徴的な糸状菌については、PCR-DGGE などの培養を伴わない手法でなければ見いだすことはできなかったと考える。もし、PCR-DGGE による解析結果がない状態で、培養法だけで見いだそうとしたならば、各温度条件ごとの培養と、分離した糸状菌すべてについて生物検定を行う等、非常に多くの時間と労力が必要だっただろう。その一方で、PCR-DGGE とバンドの塩基配列から得られる遺伝子の

Mortierella

殺菌汚染土 汚染土+接種 汚染土

Chaetomium

殺菌汚染土 汚染土+接種 汚染土

図-5 分離した糸状菌による褐色根腐病の低減効果
モデル植物である矮性トマト品種（マイクロトム）
を用いて測定した。根部の褐変は認められるが、腐
敗による脱落が軽減された。

情報だけでは確認できない部分を、分離した糸状菌を用いた生物検定により確認できたということも忘れてはならない。本成果はまさに、eDNA解析と培養法の双方の長所の融合によるものであると捉えている。

おわりに

本稿で紹介したような事例、すなわち、病害の発生履歴がない土壌（あるいは発病が弱い土壌）に特徴的な微生物群集は、ほかの地域、作物種、病害ごとに存在する

と予想される。こうした事例の蓄積は土着の微生物を利用した土壌病害の防除技術開発に役立つと思われることから、今後も農業現場からの情報の収集と微生物群集解析データの蓄積を続けていく必要があると考えられる。また、本稿の事例では、発病履歴の有無という非常におおざっぱなグルーピングで解析を行ったが、今後の解析では、生物検定などに基づいた土壌ごとの発病リスクや病原菌密度等で詳細にグルーピングすることで、これらの違いに直接的な関連性を有する微生物群集（土壌の理化学性も含めて）の探索ができるかもしれない（そのためにはより多くの試料数が必要となるが）。

生物農薬のように病害を直接的に抑制する生物防除も重要な手段ではあるが、病害の発生しにくい土壌の微生物群集の特徴が明らかとなれば、各種の有機物や微生物資材の施用等の肥培管理により、土壌微生物や理化学性を人為的に制御して、病害の発生しにくい土壌に近づけていくというような試みへの展開も期待できる。

なお、本発表の内容は農林水産省農林水産技術会議事務局のプロジェクト「土壌微生物相の解明による土壌生物性の解析技術の開発」からの助成を受けて行われた研究成果の一部である。

引用文献

- 1) 雨宮良幹ら (1985) : 日植病報 51 : 327 ~ 328 (講要).
- 2) ARNEBRANT, K. and B. SODERSTROM (1990) : Soil Biol. Biochem. 22 : 309 ~ 312.
- 3) BOTH, A. et al. (1999) : Antonie Van Leeuwenhoek 75 : 253 ~ 256.
- 4) HALLEY, J. M. et al. (1996) : J. Appl. Ecol. 33 : 493 ~ 507.
- 5) HAYANO, K. and K. TUBAKI (1985) : Soil Biol. Biochem. 17 : 553 ~ 557.
- 6) IKEDA, S. et al. (2004) : Microbes Environ. 19 : 301 ~ 309.
- 7) KJOLLER, A. and S. STRUWE (1980) : Soil Biol. Biochem. 12 : 425 ~ 431.
- 8) 森田 儔 (1984) : 新版土壌病害の手引, 日本植物防疫協会, 東京, p. 41 ~ 42.
- 9) ROBINSON, C. H. et al. (1993) : Mycol. Res. 97 : 547 ~ 558.
- 10) TAKADA-HOSHINO, Y. and N. MATSUMOTO (2004) : Microbes Environ. 19 : 13 ~ 19.
- 11) WEBER, R. W. S. and H. T. TRIBE (2003) : Mycologist 17 : 134 ~ 139.

農林水産省プレスリリース (23.6.16 ~ 23.7.15)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。
http://www.maff.go.jp/j/press/syouan の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

◆ 平成 23 年度病害虫発生予報第 3 号の発表について (6/16)
/syokubo/110616.html

◆ 平成 23 年度病害虫発生予報第 4 号の発表について (7/7)
/syokubo/110707.html