

PCR-DGGE 法による土壤微生物相の解析に基づく ハクサイ黄化病発生の評価

国立研究開発法人 農業環境技術研究所 ^{ながせ}長瀬 ^{はるか}陽香・^{よしだ}吉田 ^{しげのぶ}重信

はじめに

農作物の土壤病害の発生には、病原微生物の圃場内における存在や気象条件以外に、土壤の物理性、化学性、生物性が環境要因として関与していることが知られている。土壤病害の発生と土壤の理化学性との関連については、多くの病害で古くから報告がある一方で、近年開発された変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) 法による土壤微生物相の標準的解析法により、土壤病害の発生と土壤の生物性との関連についての知見も得られ始めてきている。今回筆者らは、ハクサイの重要病害である黄化病の発生圃場を対象に、PCR-DGGE 法による土壤微生物相の多様性、さらに本病の病原菌および発病助長因子のキタネグサレセンチュウの土壤中の存在程度を経時的に解析し、それらと本病の発生程度との関連性を調べた。本稿では、その概要およびその関連性に基づく病害の診断や管理への展開の可能性について解説する。

I PCR-DGGE 法による土壤微生物相評価と 土壤病害発生との関連

土壤病害の発生は、その主因である病原体の有無やその存在形態等に加え、土壤の物理性、化学性、生物性に影響を受けるとされている。このうち、物理性や化学性と発病の関連については複数の土壤病害で明らかにされているが、生物性については、土壤微生物の多くが培養困難であるという背景から、その関係説明が遅れていた。しかし、PCR-DGGE 法による土壤微生物相の標準的解析法 (森本・星野 (高田), 2008; 大場・岡田, 2008) の開発により、土壤病害の発生と土壤の生物性との関連を解析することが可能となり、これまでに、セルリー萎黄病 (藤永ら, 2012)、トマト褐色根腐病 (関口, 2011)、ハウレンソウ萎凋病 (浦嶋ら, 2011) 等の病害発生に土壤生物性が関連していることが明らかにされて

きている。例えば、藤永ら (2012) は、セルリー萎黄病多発圃場では、少発圃場に比べて糸状菌相の多様性指数が土壤消毒処理後に激減し、土壤消毒後の多様性低下による感染閾値の低下が病害の多発生につながることを明らかにしている。また、関口 (2011) は、トマト褐色根腐病の発生履歴のない土壤に特徴的な糸状菌を見いだすとともに、病害発生履歴のない土壤では、発生履歴のある土壤と比べて糸状菌相の多様性が維持されていることを明らかにしている。浦嶋ら (2011) は、ハウレンソウ連作圃場において、糸状菌の多様性指数と病原菌の小型分生胞子の発芽率との間に負の相関関係があることを見いだしている。このように、病害発生に与える土壤の生物性のインパクトは様々な形で存在しうと考えられるが、その知見はまだ限られている。そこで筆者らは、ハクサイの重要土壤病害として知られる黄化病を対象に PCR-DGGE 法による土壤微生物相の解析を行い、その解析結果について本病発生との関連性の有無を調べることとした。

II ハクサイ黄化病発生圃場における 土壤微生物相の解析

ハクサイ黄化病は、糸状菌 *Verticillium dahliae* および *V. longisporum* によって引き起こされる土壤伝染性の重要病害であり、発病すると結球期より外葉が黄化し、重症株では葉ボタン状となり、商品価値が著しく損なわれる。また、本病原菌は耐久体である微小菌核の形態で土壤中に長期間生存し、次作にも影響を及ぼすことから、全国各地のハクサイ生産現場において大きな問題となっている。さらに、キタネグサレセンチュウ (*Pratylenchus penetrans*) が本病の発生を助長することが知られており (百田ら, 1985; 1988; 池田ら, 2013)、本センチュウも含めた防除対策が必要となってくる。こうした観点から、筆者らは、群馬県内のハクサイ黄化病発生程度の異なる圃場を対象に、細菌相・糸状菌相・一般線虫相の多様性ととともに、本病原菌およびキタネグサレセンチュウの土壤中の存在程度を PCR-DGGE 法により解析し、それぞれの特徴と黄化病発生程度との関連性を調査した。

調査圃場は、2010～12 年の群馬県内の四つのハクサイ栽培圃場 (A・B: 吾妻郡長野原町, C・D: 伊勢崎市

Assessment of Chinese Cabbage Yellows Based on Analysis of Soil Microbial Community by PCR-DGGE. By Haruka NAGASE and Shigenobu YOSHIDA

(キーワード: 土壤病害, ハクサイ黄化病, キタネグサレセンチュウ, PCR-DGGE 法, 多様性指数, 評価)

内)とし、それぞれの圃場で試験区を2～4区設け、計19の試験区を設定した。各試験区から非根圏土壌を、栽培前年の9～10月および12月、栽培当年の4月と5～7月および収穫期の8～9月に採取した。各採取土壌およびその土壌に生息する線虫から、既報のマニュアル(森本・星野(高田), 2008; 大場・岡田, 2008)に準じてDNAを抽出し、これを鋳型としたPCR-DGGE法による細菌相・糸状菌相・一般線虫相の解析を行った。さらに線虫については、植物寄生性線虫種の識別のために、植物寄生性線虫に特異的なプライマー(KUSHIDA, 2013)を用いたPCR-DGGE法による解析も併せて行った。

各微生物相の解析では、まず得られたDGGE画像を基に画像解析ソフトを用いてバンドの強度を数値化し、1レーン中の各バンドの数値情報およびバンド数を基に各微生物相のShannon-Wienerの多様性指数を算出した

(図-1)。ここでの多様性指数は、種の豊富さとそれぞれの個体数の多さを加味した数値として表され、この数値が大きくなるほど、生物の多様性が高いことを表す。解析の結果、各試験区における多様性指数は、細菌相では、1.00～3.72、糸状菌相では1.07～3.60、一般線虫相では、1.09～2.95であった。また、糸状菌相のDGGE画像より、黄化病菌由来のDGGEバンドと同じ移動度であったバンドを黄化病菌バンドと見なし、1レーン中の相対的なバンドの強さ(相対強度)を算出した(図-1)。キタネグサレセンチュウに相当するバンドについても同様に相対強度を算出した。

III ハクサイ黄化病の発生程度と土壤微生物相との関連性の解析

1 各圃場におけるハクサイ黄化病の発病程度

各年の収穫時期(8～9月)に、各試験区のハクサイを掘り上げ、根部の褐変程度を程度別に指数化し、各試験区における発病度を算出した。その発病度に基づいて、各圃場の黄化病発生程度を評価すると、2011年のA圃場はすべての試験区で甚発生、B圃場は少発生、C圃場は未発生となり、2012年ではA圃場は中発生、B圃場は4試験区中2区で発生が見られず、D圃場は少発生となり、同じ圃場においても、年度や試験区の違いで、様々な発生程度であった(図-2)。

2 細菌相・糸状菌相・一般線虫相の多様性指数と発生程度との関係

次に、採取時期別の土壌中の各微生物相の解析結果と、実際の各試験区での黄化病の発生程度との関係を以下の手順により調べた。まず、各栽培年の収穫時における各試験区のハクサイ株の発病の有無と、各時期の微生物相の多様性指数あるいは病原因子(黄化病菌およびキタネグサレセンチュウ)に相当するバンドの有無との関係について、一般化線型モデルによるロジスティック回帰分析と赤池情報量規準によるモデル選択を行い、試験区における両者の関係性の有無を評価し、関係性があると判断された試験区の解析データを抽出した。次に、抽出された試験区の土壌採取時期別の全データを対象に、実際の発病度と多様性指数・病原因子バンドの相対強度との相関係数を算出し、関係性の度合いを評価した。その結果、細菌相は8～9月、糸状菌相は前年12月に採取した土壌において、発病度と正の相関関係(それぞれ $r = 0.72, 0.61$)が見られた。一方、一般線虫相と発病度との間では、前年9～10月に採取した土壌サンプルにおいて負の相関関係($r = -0.81$)が見られた(表-1)。

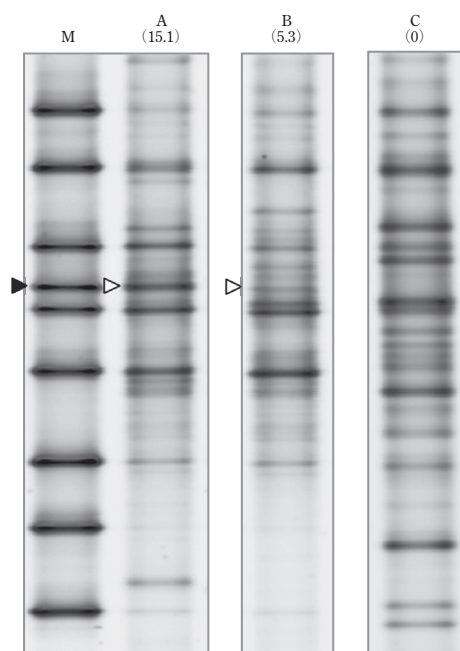


図-1 2010年9～10月に採取したA・B・C圃場の土壌由来の糸状菌相DGGE画像

Mはマーカーを表す。バンドの数は微生物種の数、バンドの濃淡は個体数の多さを表す。

次式により、バンドの相対強度(P_i)およびShannon-Wienerの多様性指数(H')を算出した。

P_i = 一つのバンドの強度/1サンプル中のすべてのバンドの強度の和、 $H' = -\sum P_i \ln P_i$ 。

マーカーにおける黒三角は、ハクサイ黄化病菌(*Verticillium longisporium*)由来のDNAを示す。

各圃場の土壌由来のDNAにおける白三角は、黄化病菌に相当するバンドを表し、その相対強度を括弧内に示した。

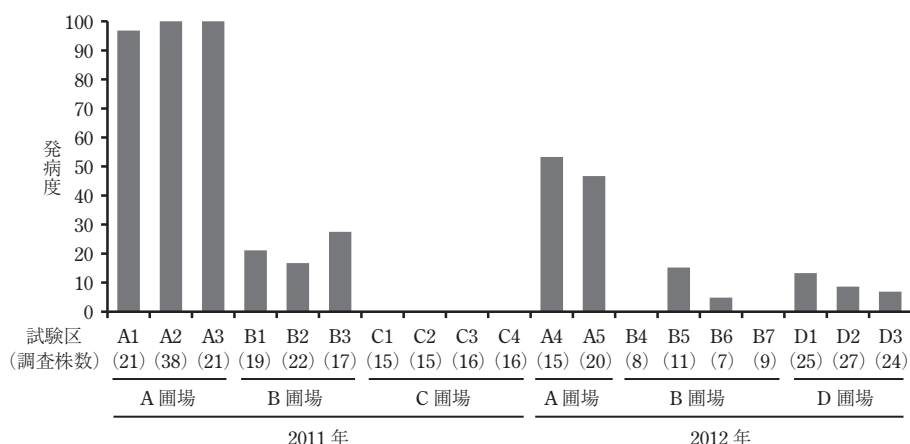


図-2 2011 年および 2012 年の各試験区におけるハクサイ黄化病の発病度
 根部の褐変程度を以下の基準で程度別に指数化し、以下の式により発病度算出した。
 発病程度 0：発病を認めない、1：主根の一部に道管褐変を認める、
 2：道管褐変が主根の大部分に認められ、芯部にまで及ぶ、
 3：道管褐変が葉柄基部に及ぶ。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{程度別発病株数} \times \text{指数}) / (3 \times \text{調査株数}) \times 100.$$

表-1 各採取時期の土壌における微生物相の多様性指数または病原因子のバンド相対強度と発病度との間の相関係数

土壌採取時期	Shannon-Wiener の多様性指数 (H')			DGGE バンドの相対強度	
	細菌相	糸状菌相	一般線虫相	黄化病菌	カタネグサレセンチュウ
前年 9～10 月	0.24	- 0.08	- 0.81	0.51	0.81
前年 12 月	0.45	0.61		0.53	0.88
4 月	0.50	- 0.15	0.21	0.29	0.66
5～7 月		0.23	- 0.10	0.68	0.69
8～9 月	0.72	- 0.14	0.46	0.01	0.89

2011～12 年のデータを合算して解析した。

空欄は赤池情報量基準に基づく解析により関係性がなかったことを示す。

太字は $r = 0.50$ より大きい正負の相関が見られた関係性を表す。

3 病原因子のバンド相対強度と発生程度との関係

次に、各病原因子（黄化病菌あるいはカタネグサレセンチュウ）のバンド相対強度と発病度との間の相関係数を同様に算出した。その結果、黄化病菌のバンドでは前年 9～10 月と 12 月、栽培当年の 5～7 月に採取した土壌サンプルにおいて正の相関関係 ($r = 0.51 \sim 0.68$) があり、カタネグサレセンチュウでは前年 9～10 月と 12 月、栽培当年の 8～9 月に採取した土壌サンプルにおいて強い正の相関関係 ($r = 0.81 \sim 0.89$) が見られた (表-1)。また、前年 9～10 月の時期では、一般線虫相の多様性指数と発病度との間に負の相関関係があったことから、この時期の各試験区の土壌における一般線虫相

の多様性指数とカタネグサレセンチュウのバンド相対強度との関係について解析したところ、両者の間に負の相関関係 ($r = -0.61$) が認められ (図-3)、一般線虫相の多様性が高いほど、カタネグサレセンチュウのバンド相対強度が小さくなることが示された。

IV 関係性解明に基づく病害管理への展開の可能性

以上のように、各試験区土壌の微生物相あるいは各病原因子のバンド相対強度と発病度との関連性は、複数の採取時期の土壌で確認された。その中でも特に前作収穫後の時期の土壌においては、一般線虫相の多様性や病原菌およびカタネグサレセンチュウのバンドの相対強度と

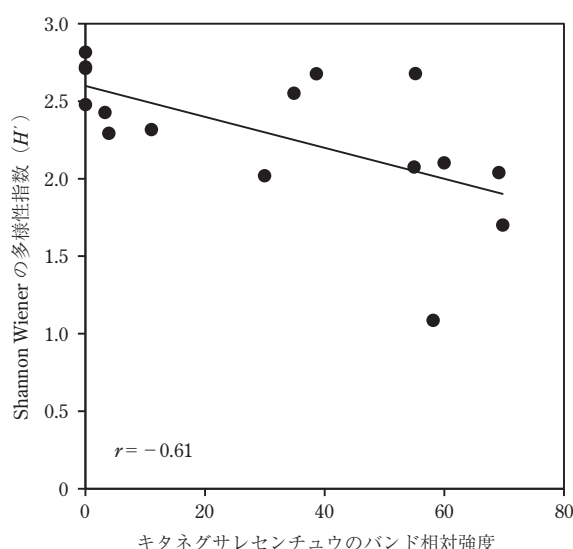


図-3 前年収穫後（9～10月）に採取した線虫サンプルにおけるキタネグサレセンチュウのDGGEバンドの相対強度と一般線虫多様性指数（ H' ）との関係（2011～12年のデータを合算して解析）

翌年の発病度との間に相関関係があることが示された。このことから、前年収穫後の時期の土壌を用いて、これらの土壌微生物の特徴をあらかじめ調べることで、翌年の本病の発生のしやすさの診断に活用できる可能性が考えられた。収穫後の時期は、次作の耕作開始までの期間が長いため、現地で診断を行ううえでは最適な時期でもある。そこで筆者らは、収穫後の時期における土壌微生物のこれらの要素を、次作の本病の発生のしやすさ評価のための診断の項目とするとともに、土壌タイプなどこれまでの研究知見から発生程度と関連すると考えられた他の診断項目を選定し、それぞれの診断結果を基に本病の発生のしやすさを総合的に評価する方法を提案し、「ハクサイ黄化病診断マニュアル（ver.1.0）」として取りまとめた。

しかし、生産者や営農指導員の最大の関心事は、土壌病害の発生のしやすさの評価結果を知ることではなく、結果に応じた対策方法を知ることである。すなわち、土壌病害の適切な管理のためには、「診断」および「評価」に応じた「対策」を一体的に開発していくことが重要となってくる。こうした観点から、(研)農業環境技術研究所では、ヒトの健康診断に代表される予防医学の発想を参考に、土壌病害の発生のしやすさを「診断」、「評価」し、さらにその評価結果に応じて「対策」を講じようとする土壌病害管理「ヘソディム（HeSoDiM）」を考案

(Tsushima and Yoshida, 2012) し、これまでの間に代表的な土壌病害に対するヘソディムおよびそのマニュアルの開発を行っている（吉田，2015）。ハクサイ黄化病に対しても、上述の診断マニュアルをベースにヘソディムの開発が現在進められており、これにより診断の評価結果に応じた対策法が提示され、無理無駄のない効率的な病害管理が可能となることが期待される。

おわりに

本稿では、ハクサイ黄化病を対象にPCR-DGGE法による土壌微生物相の特徴と発病との関連性、さらにはその関連性に基づく本病の診断やヘソディムへの応用の可能性について概説したが、PCR-DGGE法については、上述のようにすでに標準的解析法が開発されている。この解析法を活用することで、他の土壌病害に対しても土壌微生物相と発病との関連性が同様に見いだされる可能性が十分にある。こうした関連性の解明が、より多くの土壌病害に対するヘソディムの開発や高度化に活用され、低コストで環境負荷の少ない土壌病害管理の推進に役立てられるようになることを期待したい。なお、本稿の一部は、日本植物病理学会報，第81巻，第1号で報告した。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、群馬県農業技術センターの池田健太郎氏、長野県野菜花き試験場の山岸菜穂氏、農研機構 北海道農業研究センターの串田篤彦氏、ほか多くの方々にご尽力いただいた。また、(研)農業環境技術研究所の大澤剛士氏および山村光司氏には貴重なご意見、ご助言を賜った。ここに記して、深謝の意を表する。本研究の一部は、農林水産省レギュラトリーサイエンス新技術開発事業（2010～12年度）「ハクサイ土壌病害中の総合的病害管理（IPM）体系に向けた技術確立」および2013～15年度農林水産省農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（25056C）の支援により実施した。

引用文献

- 1) 藤永真史ら（2012）：日植病報 **78**：204（講要）。
- 2) 池田健太郎ら（2013）：関東東山病虫研報 **60**：150（講要）。
- 3) KUSHIDA, A. (2013): Microbes Environ. **28**: 269～274.
- 4) 百田洋二ら（1985）：応動昆 **29**: 60（講要）。
- 5) ————ら（1988）：日植病報 **54**: 370（講要）。
- 6) 森本 晶・星野（高田）裕子（2008）：土と微生物 **62**: 63～68.
- 7) 大場広輔・岡田弘明（2008）：同上 **62**: 69～73.
- 8) 関口博之（2011）：植物防疫 **65**: 465～468.
- 9) TSUSHIMA, S. and S. YOSHIDA (2012): FFTC-TUA International Seminar (Program and Papers), p. 204.
- 10) 浦嶋泰文ら（2011）：土肥要旨集 **57**: 46（講要）。
- 11) 吉田重信（2015）：植物防疫 **69**: 770～772.