

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15017

研究課題名(和文) 光計測に基づく植物病害抵抗性誘導の非破壊検出手法の開発

研究課題名(英文) Nondestructive evaluation of plant disease resistance induced by nonbiological stress

研究代表者

荊木 康臣 (Ibaraki, Yasuomi)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：50242160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光照射などの物理刺激により植物体で誘導された病害抵抗性の状態・程度を非破壊的に評価する手法の開発のための基礎的知見を得ることを目的に、シロイヌナズナへのMgOナノ粒子処理をモデル実験系に、葉における病害抵抗性誘導と分光反射との関係を調査した。その結果、MgO処理により、PR1遺伝子の発現量が増加することに伴い、葉における分光反射パターンが変化する可能性を示唆するデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the dynamic relationships between leaf spectral reflectance and the expression of genes involved in plant disease resistance were investigated for Arabidopsis treated (irrigated) with MgO nano-particle aqueous suspension to acquire knowledge on nondestructive evaluation of disease resistance induced by abiotic stress. The pathogenesis-related protein 1 (PR1) gene expression was enhanced in leaves of plants treated by MgO suspension as compared with those treated with water. The leaf spectral reflectance pattern was also changed with MgO treatment. These results suggested that leaf spectral reflectance might have a potential to be used for nondestructive evaluation of the induced disease resistance status.

研究分野：生物環境工学

キーワード：活性酸素 病害抵抗性誘導 分光反射スペクトル PR1 PRI MgOナノ粒子 紫色LED

## 1. 研究開始当初の背景

病害防除は作物生産において必須の技術であるが、環境負荷の低減および食の安全・安心という観点から、薬剤使用量の低減が今日の作物生産における最重要かつ緊急課題となっている。このような背景の下、薬剤散布量の低減をめざす技術として、光照射などの非生物ストレスによる病害防除技術が近年盛んに研究されており、UV-B、紫色光、緑色光、赤色光など、様々な波長の光が病害抵抗性の誘導に効果的であるとの報告がなされている。しかしながら、病害防除効果の再現性の低さや、最適照射条件の品種依存性などの問題が指摘されており、安定的に病害抵抗性を誘導する光照射技術は未だ確立されていないのが現状である。

非生物ストレスによって病害抵抗性を誘導する場合、環境要因などの他のストレス要因の影響を受けやすいことが予想される。つまり、非生物ストレス付加の条件が一定でも病害抵抗性が実際に誘導されるかどうかは、適用場面の環境によって異なる可能性がある。病害抵抗性が実際に誘導されているかを栽培場面で適切に評価することが、ストレス付加条件を最適化し、病害抵抗性誘導技術の実効性の向上を図る上で必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、光照射などの非生物ストレスによる病害防除技術の確立に向けたブレイクスルーをめざし、非生物ストレスにより植物体で誘導された病害抵抗性の状態・程度を非破壊的に評価する手法の開発のための基礎的知見を得ることを目的としている。特に、光による非破壊計測が可能な分光反射やクロロフィル蛍光、活性酸素感応型蛍光プローブを利用して、病害抵抗性の状態を非破壊的に評価する可能性を検討した。具体的には、

- ・モデル実験系の確立
- ・分光反射解析、クロロフィル蛍光解析、活性酸素発生解析などから抽出した様々な評価指標と病害抵抗性に関わる遺伝子の発現との関連性の調査
- ・紫色 LED 光照射による病害抵抗性誘導に関する知見収集
- ・病害抵抗性誘導と関連する非破壊評価指標の検討、を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル実験系の確立と実験概要

非生物ストレスにより、病害抵抗性を誘導する系として、材料が確保しやすく、比較的安定的に病害抵抗性が誘導できるという観点から、シロイヌナズナ苗に対する MgO ナノ粒子処理による病害抵抗性誘導をモデル実験系として使用した。供試植物には、人工光下(恒温インキュベーターもしくは育苗成装置内)、人工培土(パーミキュライト:パーライト = 1:1)で、播種後 30~35 日間育成

したシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*, Columbia, col-0))を使用し、MgO ナノ粒子(UCM 250)の懸濁液(0.15~1 g・L<sup>-1</sup>)を地下部に 10 mL 灌注処理した。対照区には、蒸留水を 10 mL 灌注処理した。

MgO 処理後の葉において、病害抵抗性に関する遺伝子発現と分光反射との関係性、クロロフィル蛍光パラメータの変化、活性酸素種の発生を調査した。

### (2) 分光反射計測

分光反射データは、シロイヌナズナ葉にハ口ゲン光を照射し反射した光の放射照度を 290 nm~850 nm の波長域で測定することにより得た。同一光源下での灰色標準反射板の放射照度スペクトルを利用して、葉における分光反射率スペクトルを求めた。測定は、処理後 12 時間もしくは数日間行い、測定間隔は 4~6 時間もしくは 24 時間とした。なお、分光反射率スペクトルデータの解析は、531 nm 波長域と 570 nm 波長域の反射率を用いて算出され光化学系の状態と関連する光化学反射指数(photochemical reflectance index、以下 PRI)と反射率スペクトルの一次微分値に着目して、行った。

### (3) 病害抵抗性遺伝子発現解析

分光反射測定後(処理後 12 時間後もしくは数日間後)、シロイヌナズナ葉を -80 で凍結保存し病害抵抗性に関わる遺伝子解析を行った。リアルタイム PCR 法を用いて、プライマーには PR1v2 を使用して、pathogenesis-related protein 1 (PR1) 遺伝子の発現量の相対定量解析を行った。基準値には MgO 処理前のサンプルを用いた

### (4) 活性酸素モニタリング

MgO 処理時の葉における活性酸素の発生モニタリングのために、一重項酸素用蛍光プローブ SOSG および過酸化水素用蛍光プローブ BES-H2O2 を、シロイヌナズナの attached leaf に導入し、30 分の暗処理を行った後、処理前の蛍光画像を取得した。その後、MgO ナノ粒子懸濁液あるいは蒸留水の灌注処理を行い、0.5 時間ごと 3 時間までの経時変化および 3、6、12、24、48 時間後の経時変化測定を行った。葉からの蛍光は、蛍光実体顕微鏡に取り付けた冷却 CMOS カメラ(CS-61C, Bitran)で測定した。さらに、同様の手法で紫色 LED 光照射のトマト苗に対しても、活性酸素種の発生を調査すると同時に、文献調査を行い、光環境制御による病害抵抗性誘導に関する知見を収集し、データベースを作成した。

### (5) クロロフィル蛍光計測

クロロフィル蛍光画像解析装置(Fluor cam, PSI)を用いて、MgO 処理前および処理後 12 時間まで、シロイヌナズナ葉におけるクロロフィル蛍光の画像計測を行った。測定は対照区、MgO 処理区ともに、処理前(0)、1、2、3、6、9、12 時間後に測定した。処理前の測定の前には 30 分間暗処理を行い、暗処理後、PSII 最大量子収率  $F_v / F_m$  ( $F_0$ 、 $F_m$ ) 画像を取得

した。その後、ハロゲンランプを PPFD  $100 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  で 2 分間照射後、PSII 実量子収率 PSII (F、Fm') 画像を取得した。MgO 処理後の測定はハロゲンランプを PPFD  $100 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  で 2 分間照射後、PSII (F、Fm') 画像のみを測定した。取得した画像から、クロロフィル蛍光パラメータ Fv / Fm、PSII、NPQ を、各葉において算出した。

#### 4. 研究成果

(1) 葉における病害抵抗性誘導の状態と分光反射の関係

苗の栽培環境や MgO 処理時の環境を変えながら、処理後 12 時間後の PR1 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で定量する実験を繰り返し行った結果、MgO 処理により、その発現量が上昇する傾向は認められたものの、その程度には実験間でバラツキがあった

そこで、対照区の遺伝子発現量に対する処理区の遺伝子発現量の比(以下、遺伝子発現量比)を算出し、PRI および一次微分値の変化量(処理前からの変化量)との関係を調べた結果、処理後一定時間後の PRI の変化量、もしくは一次微分値のピーク波長(520 nm および 700 nm)における変化量と遺伝子発現量比との間に相関が認められる場合があった。一例として、比較的高い相関が認められた MgO 処理 8 時間後における、520 nm における一次微分値の変化量と遺伝子発現量比との関係を図 1 に示す。

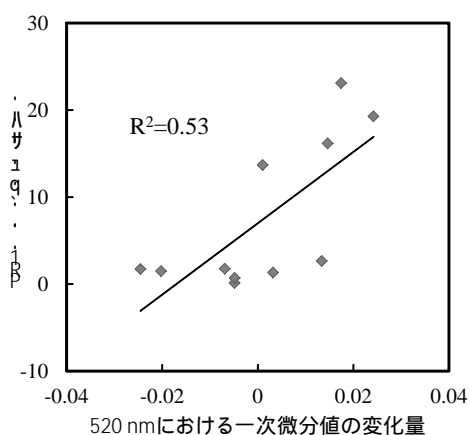


図 1 520 nm における反射率の一次微分値の変化量(処理後 8 時間)と PR1 遺伝子発現量比(対照区に対する処理区の発現増加比)との関係

以上、葉における分光反射が、病害抵抗性誘導の状態に応じて変化する可能性が示唆され、病害抵抗性誘導の評価に分光反射を利用できる可能性があると考えられた。

(2) MgO 処理時の活性酸素モニタリングとクロロフィル蛍光パラメータの変化

MgO ナノ粒子懸濁液を植物の根に与えた際の植物葉の活性酸素種のモニタリングおよびクロロフィル蛍光測定を行った。MgO 処理

を行った個体では、対照区(蒸留水処理)と比べて、処理後 3 時間以降で、葉において過酸化水素に対応した蛍光強度に差が見られ、処理後 6 時間以降で MgO 処理区の蛍光強度が有意に高くなった。一方、一重項酸素に対応した蛍光強度は処理後 3 時間まで、両試験区で明確な差は認められなかった。すなわち、MgO 処理により、植物葉では過酸化水素が発生する可能性が考えられた。

また、クロロフィル蛍光測定では、個体における PSII 量子収率 PSII および熱放散指標 NPQ の平均値には差は見られなかったが、葉位に分けて見ると、下位葉、中位葉の PSII は MgO 処理区で低くなり、NPQ は下位葉において MgO 処理区が高くなり、MgO 処理が、クロロフィル蛍光パラメータにも影響を与える可能性が示唆された。

(3) 紫色 LED 照射による病害抵抗性誘導における知見収集

紫色 LED 光照射したトマト葉において、活性酸素種の発生を調査した結果、一重項酸素が発生していることが確認できた。

また、光環境制御による病害抵抗性誘導や機能性成分増加に関する文献データを収集し、データベースとして整備した。

(4) まとめ

MgO 処理による病害抵抗誘導をモデル実験系にした解析から、MgO ナノ粒子懸濁液の地下部への灌注処理によって、葉において光計測により検出可能な生理状態の変化が起こり、それらは、病害抵抗性誘導の状態に対応している可能性を示すデータが得られた。

#### 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 1 件)

(1) 荊木康臣・山本和美、光環境制御に関する知識ベース構築の試み、中国四国の農業気象、30: 34-35、2017 (査読なし)

〔学会発表〕(計 1 件)

(2) 荊木康臣・中島大・西村正隆・伊藤真一、非生物ストレス処理による病害抵抗性誘導時の葉面分光反射、日本生物環境工学会 2018 年東京大会、2018 年 9 月(予定)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

荊木 康臣 (IBARAKI, Yasuomi)  
山口大学・大学院創成科学研究科・教授  
研究者番号: 50242160

(2) 研究分担者

伊藤 真一 (ITO, Shinichi)  
山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：30243629