

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05662

研究課題名(和文)植物病害抑制効果を持つ微生物の複合種バイオフィーム形成による発病抑制効果の安定化

研究課題名(英文)Stability of inhibitory effect of microbial biocontrol agents against plant disease by mixed species biofilm formation

研究代表者

吉田 重信(Yoshida, Shigenobu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・植物防疫研究部門・グループ長

研究者番号：90354125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：複合種バイオフィーム(BF)形成による新たな生物的防除法開発の基盤情報を得ることを目的に、トマト灰色かび病の発病抑制能を持つ細菌株Pseudomonas sp. 62AP4株に対して安定的に複合種BFを形成する細菌株を探索した。その結果、62AP4株との共培養によりBF形成を促進する細菌株62HD-25株をトマト生息細菌群の中から見出し、これら両菌株によるBF中の62AP4株の局在や定着様式およびBFの最適形成条件を明らかにした。さらに、両菌株を共接種したトマト葉では灰色かび病の発病が抑制され、その抑制活性はBF形成による灰色かび病菌の分生子発芽抑制活性に基づく可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、ある一定の発病抑制ポテンシャルを持つ微生物株に他の微生物種との協同体を形成させ、植物体上での定着性を増強させて抑制効果を安定化させようとする、農作物病害の新たな生物的防除法開発の実現可能性を提示する基盤的成果であるだけでなく、微生物生態学的観点でも異種微生物間の相互作用の理解増進と新たな機能解明に役立つ成果でもあることから、その学術的な意義は大きい。また、本成果は「みどりの食料システム戦略」に代表される近年の我が国の農林水産行政施策の目標の一つとなっている化学農薬に代替しうる病害防除法の新たな開発に資する成果でもあることから、社会的にも大きな意義を持つものである。

研究成果の概要(英文)：To obtain fundamental knowledge on the development of the novel biocontrol strategy by enhancing biofilm (BF) formation of biocontrol agents on plant surface using BF formation promoting microbes, we investigated bacterial strains enhancing BF formation together with Pseudomonas sp. strain 62AP4, which shows inhibitory effect against gray mold of tomato caused by Botrytis cinerea. Consequently, we found the bacterial strain 62HD-25, obtained from culture collection of tomato phyllosphere, stably enhanced BF formation with strain 62AP4, and verified optimal co-inoculation condition of both strains for the formation. When potted tomato plants were co-inoculated with both bacterial strains, then inoculated with B. cinerea, occurrence of gray mold symptom was stably suppressed on the leaf surface, and this suppression was suggested owing to inhibition of conidial germination of B. cinerea by BF formed by co-inoculation with strains 62AP4 and 62HD-25.

研究分野：植物病理学

キーワード：バイオフィーム バイオコントロール

## 1. 研究開始当初の背景

微生物農薬などの「病害抑制活性を示す微生物(バイオコントロールエージェント:BCA)」を活用した生物的防除はIPMの中で重要な役割を担うが、その普及や利用上の欠点として、防除効果の不安定さが挙げられる。この防除効果の不安定さは、BCAの植物体への定着性の不安定さに起因しており、効率的に微生物の定着を高め、発病抑制効果を高める技術開発が必要である。一般に植物体に生息する微生物は、バイオフィルム(BF:細胞がマトリックスに包まれた状態で物質表面に付着し形成される微生物集団と定義)を形成して、植物体表面に定着・生存していることが知られているが、植物体上で高い定着力を持つ微生物はBF形成能力も高く、定着性とBF形成力は強い関係性を持っていることがこれまでの研究で知られている。一方、自然環境下では、劣悪な生育環境に適応するために複数種の微生物が協同でBFを形成して定着・存在している。すなわち、植物体表面を含む自然環境下でBFを効果的に形成させるためには、その植物に親和性の高い複数の微生物種と協同形態をとらせることが有効であり、さらに、複合種によるBF形成に伴い構成微生物種の持つ機能性も向上できる可能性が期待できる。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、複合種BF形成を介した新たな生物的防除法開発の基盤情報を得ることを目的に、トマト地上部の重要病害である灰色かび病をモデル病害に、BCAの安定的な複合種BF形成を可能とする植物生息細菌種が存在を明らかにし、複合種BF中のBCAの局在や定着様式およびBFの最適形成条件を解明するとともに、最適形成条件に基づく植物体上への処理による発病抑制効果の安定化の検証を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) BCAとの安定的なBF形成を可能とする植物生息細菌株の選抜

生物的防除効果を示す細菌株(BCA株)との安定的なバイオフィルム(BF)形成を可能とするトマト常在性の細菌株の選抜を目的に、トマト灰色かび病のBCA株として有望な*Pseudomonas* sp. 62AP4株、*Pantoea ananatis* 125NP12株に対してBF形成促進効果を持つ細菌株を、トマト生息細菌コレクション(計490株)の中からPVC製の96穴のマイクロプレートウェルを用いたBF定量法(文献 )により選抜した。すなわち、PPGA培地で前培養した各BCA株と各コレクション細菌株の懸濁液( $OD_{595}=0.1\sim 0.2$ )を3倍希釈PPG液体培地を100ul入れたマイクロプレートウェルに等量接種し、24時間共培養後に各ウェルの壁面に形成されたBFをクリスタルバイオレットで染色後、その染色程度を分光光度計で定量し、各BCA株または各コレクション細菌株単独で形成されたBF量との比較を行い、共培養によるBF形成量が各細菌株それぞれ単独で形成されるBF量の和よりも安定的に上回った組み合わせのコレクション細菌株を選抜することとした。

### (2) 複合種BFの最適共接種条件の解明

(1)で選抜した62AP4株とのBFの形成を促進する菌株(BF形成促進菌株)の最適共接種条件として、まず、62AP4株と選抜菌株の接種量比を変えた場合のBF形成程度への影響を検討した。62AP4株とBF形成促進菌株の細菌懸濁液( $OD_{595}\approx 0.1$ )の接種量(計10ul)の量比を1:9、1:1および9:1に変えて3倍希釈PPG液体培地(100ul)に同様のマイクロプレートウェルに接種した場合のBF形成量を比較した。次に、62AP4株とBF形成促進菌株の最適接種タイミングの検討として、各供試菌株の懸濁液(各5ul)を24時間前後差で処理した場合、または同時に処理した場合のBF形成量を比較した。また、これらにより明らかにした最適共接種条件により、PVC製のプレート上に形成させたBF中における62AP4株の局在や分布を走査型電子顕微鏡で観察した。

### (3) 複合種BFのトマト灰色かび病菌に対する生育抑制活性およびトマト切葉上における灰色かび病の発病抑制活性

(2)で明らかにした共接種条件下で形成させた複合種BFのトマト灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)に対する生育抑制活性およびトマト切葉上における灰色かび病の発病抑制活性を評価した。については、最適共接種条件で62AP4株とBF形成促進菌株による複合種BFをPVC製プレート上に形成させ、その形成BFにトマト灰色かび病菌の分生子懸濁液を滴下し、温室保持後の分生子の発芽率を調べることで、灰色かび病菌に対する生育抑制活性を評価した。については、温室で育成したトマトセル苗の本葉を切り取り、その表面上にの試験と同様に62AP4株とBF形成促進菌株による複合種BFを形成させた後、灰色かび病菌の分生子懸濁液を滴下接種した。各接種葉を温室で保持後、処理葉に出現する病斑の出現割合で発病抑制効果の程度を評価した。

### (4) 複合種BFのトマトポット植物体上における灰色かび病の発病抑制活性

(2)で明らかにした共接種条件下により、トマトポット植物体上に形成させた複合種BFの

灰色かび病の発病抑制活性を評価した。温室で3週間育成したトマトセル苗（品種、桃太郎）を9cmポリポットに鉢上げ後、2週間育成した植物体の地上部に、ツーン20を添加（0.1%: v/v）した62AP4株およびBF形成促進菌株の細菌懸濁液を、それぞれ各植物体に噴霧器で単独または共接種し、1日間室内で保持し植物体上に各接種細菌株を定着させた。その後、灰色かび病菌の分生子懸濁液を同様に噴霧接種し、湿室内で保持後温室に管理した。接種5日後に各植物体の任意の10葉中に出現する灰色かび病の罹病葉の割合を調べ、BF形成促進菌株の接種による発病抑制効果を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) BCA との安定的なBF形成を可能とする植物生息細菌株の選抜

計490菌株のトマト生息細菌コレクション株を供試し、各BCA株の共培養でBF形成を増強する菌株の選抜を試みた。その結果、共培養によるBF形成量がBCA株と各供試細菌株のそれぞれ単独で形成されるBF量の和よりも上回った組み合わせの細菌株数は、62AP4株では66、125NP12株では79であり、BF形成を増強させる常在細菌が一定割合存在することを明らかにした。さらに、これらの増強させる菌株のうち、共培養でOD<sub>595</sub>の値で0.1以上となるBF量を形成し、そのOD<sub>595</sub>値が各供試菌株単独の接種で形成されるOD<sub>595</sub>値の1.5倍以上となる菌株を高いBF形成増加を示す細菌株とみなし、62AP4株および125NP12株に対してそれぞれ9菌株

ずつ一次選抜した（図1）。これらの菌株の分類学的位置を調べた結果、62AP4株に対しては*Bacillus*属が最も多く、その他の株は複数属で構成されていた。一方、125NP12株に対しては

*Pseudomonas*

属が最も多く、その他の株は複数属で構成されており、BCAの種類によって、BF形成を促進する細菌種のグループは異なっていることが明らかとなった（表1）。以上の一次選抜株の中から、繰り返し実験により、より安定的に複合種BFを形成できる菌株を選定した結果、62AP4株に対してトマト生息細菌株62HD-25株が安定的にBF形成を促進することが確認され、本菌株をBF形成促進菌株として以降の試験に供試した。

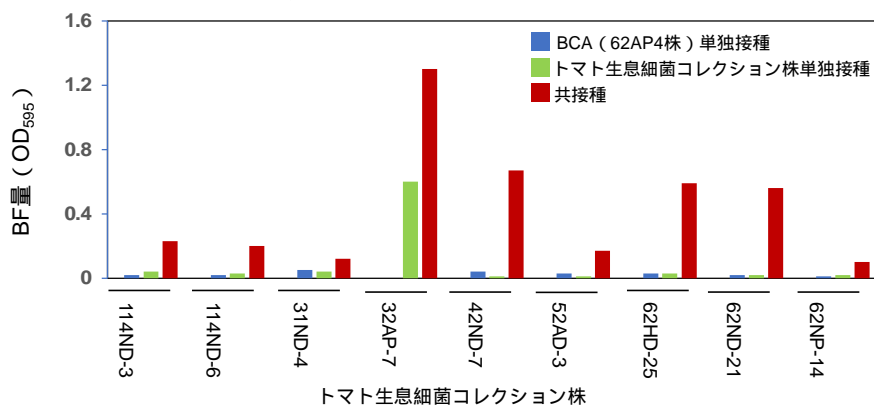


図1 BCA株（62AP4株）と選抜されたコレクション株の単独または共培養によるBF形成

表1 トマト生息細菌コレクションから選抜された各BCA株におけるBF形成促進菌株（9菌株）の分類学的所属

<i>Pseudomonas</i> sp. 62AP4株		<i>Pantoea ananatis</i> 125NP12株	
属名	菌株数	属名	菌株数
<i>Bacillus</i>	4	<i>Cellulomonas</i>	1
<i>Paenibacillus</i>	1	<i>Microbacterium</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	1	<i>Pseudomonas</i>	4
<i>Rathayibacter</i>	2	<i>Sphingomonas</i>	2
<i>Sphingomonas</i>	1	Unidentified	1

##### (2) 複合種BFの最適共接種条件の解明

BCA株である62AP4株と選抜されたBF形成促進菌株（62HD-25株）それぞれの接種量比を変えた場合のBF形成程度への影響を検討した結果、62AP4株と各生息細菌株が同量の接種条件下で最もよくBFが形成されることを明らかにした。また、62AP4株と62HD-25株の処理を24時間前後または同時に処理して共培養させた結果では、同時処理で最もBF形成が促進されることが見出され、BF形成に最適な共接種条件を明らかにすることができた。この最適共接種条件によりPVC製プレート上に形成されたBF中での62AP4株の局在、定着様式について走査型電子顕微鏡で観察した結果、付着細胞数は62AP4株と62HD-25株それぞれの菌株の単独接種よりも両菌株の共接種によって増加し、BFの立体的構造が形成されていることも観察された。細胞形態に基づき、この共接種で形成されたBF中の62AP4株細胞の局在・分布を推定した結果、BF中でランダムに分布している可能性が示された（図2）。

##### (3) 複合種BFのトマト灰色かび病菌に対する生育抑制活性およびトマト切葉上における灰色かび病の発病抑制活性

複合種BFのトマト灰色かび病菌に対する生育抑制活性を評価するために、PVCプレート上に形成させた複合種BF上での*B. cinerea*の分生子発芽率を調べた。その結果、分生子発芽は62AP4株単独接種のプレート上で発芽が抑制される傾向であったが、その発芽率の低下の程度は、62AP4株と62HD-25株との複合種BF上で増強されることが確認された（図3）。次に、複合種

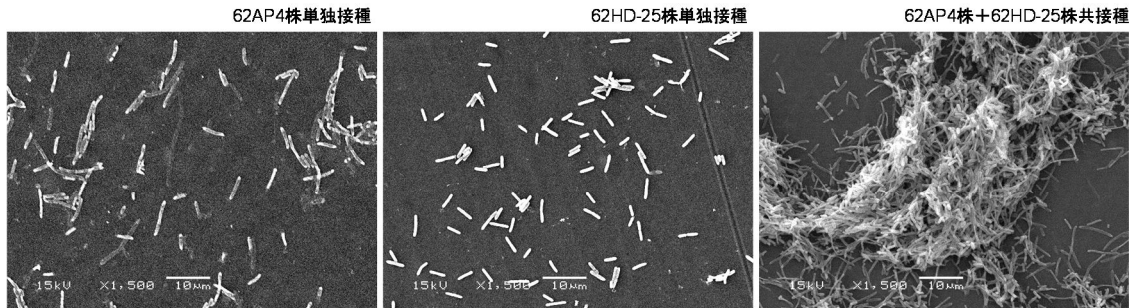


図2 BCA株（62AP4株）およびBF形成促進菌株（62HD-25株）が単独または共接種されたPVC製プレート上での走査電子顕微鏡画像

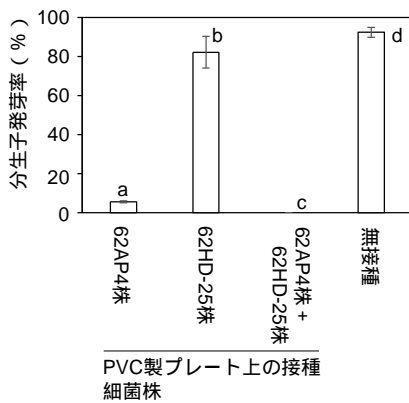


図3 BCA株（62AP4株）およびBF形成促進菌株（62HD-25株）が単独または共接種されたPVC製プレート上での灰色かび病菌の分生子発芽率

エラーバーは3反復の標準誤差、異なるアルファベット文字はライオン検定により有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示す。

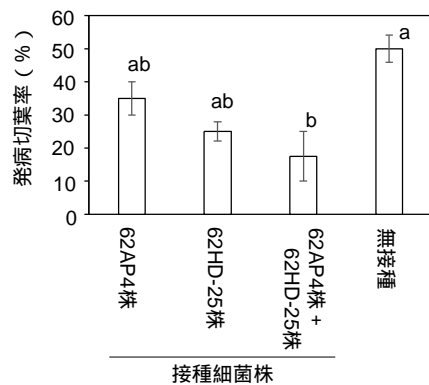


図4 BCA株（62AP4株）およびBF形成促進菌株（62HD-25株）が単独または共接種されたトマト切葉上での灰色かび病の発病程度

エラーバーは3反復の標準誤差、異なるアルファベット文字はライオン検定により有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示す。

BFを形成させたトマト切葉上での灰色かび病の発病抑制活性を評価した。その結果、62AP4株と62HD-25株を共接種した葉における病斑の出現割合は、対照処理葉と比べて低下する傾向が認められた(図4)。以上の結果から、最適共接種条件で形成される62AP4株と62HD-25株による複合種BFは、その形成によってトマト灰色かび病菌の分生子発芽や灰色かび病の発生を効果的に抑制できる可能性が示された。

#### (4) 複合種BFのトマトポット植物体上における灰色かび病の発病抑制活性

トマトの栽培環境に近い条件下での複合種BFによる灰色かび病の発病抑制効果を評価するために、62AP4株と62HD-25株を最適共接種条件で処理したトマトポット植物体における発病抑制活性を調べた。その結果、対照区の発病程度が多発生条件下において、62AP4株を単独接種した植物体での発病程度に比べ、62AP4株とBF形成促進菌株を共接種した植物体での発病程度は低下する傾向が確認された。また、対照区の発病が中発生の条件下においても、両菌株を共接種した植物体では病原菌接種のみの対照区と比べて発病が抑制され、対照区の発病程度が少発生の条件下においても、62AP4株単独接種の植物体での活性と比べ、両菌株の共接種により顕著な発病抑制活性が確認された。以上の対照区での発病程度が異なる条件下での試験結果を平均化し、62AP4株と62HD-25株を共接種した植物体での発病程度を総合的に評価した結果、62AP4株を単独接種した場合の発病抑制程度に比べて抑制効果の増強が確認され、複合種BFの形成による発病抑制活性は様々な発病条件下においても頑健的である傾向が確認された(図5)。

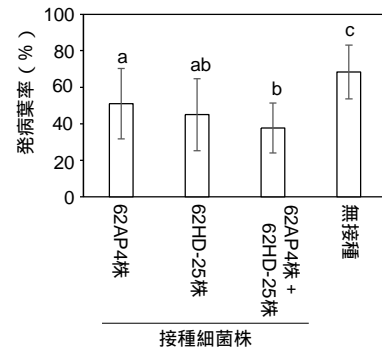


図5 BCA株（62AP4株）およびBF形成促進菌株（62HD-25株）が単独または共接種されたトマトポット葉上での灰色かび病の発病程度

エラーバーは3反復(細菌株無接種の対照区での発病程度が少、中、多発生条件下での試験)の標準誤差、異なるアルファベット文字はライオン検定により有意差 ( $p < 0.05$ ) があることを示す。

#### (5) 全体総括

以上の試験結果を通じて、BCA株である *Pseudomonas* sp. 62AP4株のBF形成促進効果を示す菌株としてトマト生息細菌株62HD-25株を見出し、その複合種BF形成の最適共接種条件を解明するとともに、本接種条件により

形成された BF 中での 62AP4 株の分布を推定することができた。また、トマト植物体上で形成させた複合種 BF は、異なる感染強度の条件下でも、灰色かび病の発病を頑健的に抑制できることが確認され、その抑制活性は植物体表面上の BF による灰色かび病菌の分生子発芽抑制活性に起因している可能性も見出された。これらの得られた知見は、研究実施者らが本研究課題で設定した「BCA と異種微生物との組み合わせで BF 形成を増強・安定化させることで、BCA の発病抑制機能が有効に発揮される」とする仮説を支持するものであり、農作物病害に対する複合種 BF の形成に基づく新たな生物的防除法開発の基盤的知見として活用されることが期待できる。

#### <引用文献>

Yoshida, S. and others, Enhanced biofilm formation and 3-chlorobenzoate degrading activity by the bacterial consortium of *Burkholderia* sp. NK8 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, Journal of Applied Microbiology, Volume 106, Issue 3, 1 March 2009, Pages 790-800

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山内 智史  (Yamauchi Norihito)  (50442760)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中日本農業研究センター・上級研究員    (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関