

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：27401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03091

研究課題名(和文) トマトの難防除土壌伝染性病害である青枯病と半身萎凋病に対する新しい防除法の確立

研究課題名(英文) Establishing new control methods for bacterial wilt and verticillium wilt, which are difficult-to-control soil-borne diseases of tomatoes

研究代表者

松添 直隆 (MATSUZOE, NAOTAKA)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：50239018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：土壌培地3種類において、クエン酸単独添加やクエン酸と鉄化合物の混合添加によりPC化が誘導された。青枯病菌汚染土壌への低濃度エタノールの添加において、PC化頻度は培養温度、エタノール濃度、土壌pHに影響されること、土壌微生物や多様性に及ぼす影響は土壌の種類により異なることが明らかになった。PC株を接種したトマトでは、根と葉において病害防御関連遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。

珪鉄(鉄化合物)の土壌混和处理がトマトの生育に及ぼす影響を調査した。珪鉄の施用は10 a当たり春夏作で1.2 t、夏秋作では2.4 tの施用量までならば、生育に影響を及ぼさないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物生産では化学農薬を使用しない等、環境に優しい農業技術の開発が望まれている。化学農薬に代わる農業技術として、生物農薬の開発が急務である。本研究では、安価で、安全なクエン酸や鉄化合物を利用して、土壌伝染性病害である青枯病細菌をPC化(病原性の低下、非病原化すること)することで、青枯病や半身萎凋病を防除することができることを明らかにした。本防除法の特徴は、土壌の「殺菌・消毒」ではなく、細菌と植物の生態的な特性を組み合わせたとところにある。本研究がさらに発展することで、食の安全・安心や作業性・経済性等の観点からの新たな土壌病害防除法の開発が進むと考える。

研究成果の概要(英文)：Through this study, it was clarified that the PC (phenotypic conversion) of *R. Solanacearum* is induced by the addition of citric acid alone or the mixed addition of citric acid and iron compound even in three types of soil media. In the application of low concentrations of ethanol to soil contaminated with *R. Solanacearum*, the frequency of PC was affected by incubation temperature, ethanol concentration, and soil pH. Furthermore, the effects on soil microbes and diversity varied with soil type. In tomatoes inoculated with a PC mutant, expression of disease defense-related genes was induced in roots and leaves. The effect of soil mixing treatment of silica iron (iron compound) on the growth of tomatoes was investigated. In the spring-summer crops, there were no differences in comparisons with the control and 1.2 t/10 a applied silica iron treatment. In the summer-autumn crops, there were no differences in comparisons with control and 2.4 t/10 a applied silica iron treatment.

研究分野：環境農学

キーワード：青枯病 半身萎凋病 土壌伝染性病害 生物的防除 鉄資材 低濃度エタノール 病原性の低下・非病原化

1. 研究開始当初の背景

トマトの青枯病と半身萎凋病は多犯性であり、安定的な作物生産を脅かす土壌伝染性病害で、国内外で深刻な問題となっている。本病害に対しては、耕種的・物理的防除や化学農薬等による土壌消毒が行われているが、完全ではない。また、食の安全・安心や作業性・経済性等の観点から新たな防除法の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、「植物に障害を与えない」、「安全で安価である」、水溶性鉄溶液を利用したトマト青枯病菌・半身萎凋病の簡便な防除法の開発である。その防除機構は以下の通りである（PC化：病原性細菌が非病原化すること）。《青枯病汚染土壌に水溶性鉄溶液を添加→青枯病菌のPC化促進→病原菌の密度低下（PC株の密度増加）→PC株の植物感染→抵抗性誘導による青枯病・半身萎凋病の発病を抑制》本研究では防除法の開発に必要な基礎的並びに実用的な実験を設定した。

3. 研究の方法

(1) 液体培地を用いた *in vitro* 実験系

1) *in vitro* 実験系における鉄添加によるPC化誘発の条件検討

糖の存在が鉄添加によるPC化に及ぼす影響について、グルコースを添加した通常のMM液体培地、グルコースを添加していないMM液体培地、0.5%グルコース水溶液を液体培地として供試した。また、鉄無添加区（対照区）と鉄処理区を設けた。青枯病菌の病原性株8238rifを接種後、28で静置培養し、14日間の菌密度とPC化率を調査した。

2) 培養液の添加がPC化に及ぼす影響

これまでの結果から、青枯病菌のPC化には高密度な増殖が関係していると予想されたため、青枯病菌を高密度で増殖させた培養液の添加によるPC化への影響を調査した。鉄を添加していないMM液体培地で青枯病菌8238rifを1週間培養し、培養液をフィルターを通して培養液を調製した。滅菌超純水を用いて培養液の濃度を0、10、50、100%に調整し、液体培地として用いた。対照区と鉄処理区を設けて、青枯病菌8238rifを接種後、28で静置培養し、14日間の菌密度とPC化率を調査した。

3) PC株接種によるトマトの病害防御関連遺伝子の発現誘導

PC株8238PCの菌液（ 10^8 cfu mL⁻¹）に24時間浸根接種したトマト‘Micro-Tom’の根と葉からRNA抽出キットを用いてtotal RNAを抽出した。対照として、PC株を接種していない植物から抽出したtotal RNAを用いた。抽出したRNAサンプルはrDNase処理によりゲノムDNAを除去した。RNAの品質と濃度は、アガロースゲル電気泳動と微量吸光度計を用いて確認した。遺伝子の発現量はインターカーレーター法によるRT-qPCRで調査した。ターゲット遺伝子として病害防御応答に関わるPR-1、PR-2a、PR-2b、PR-3a、PR-3b、PR-4、PR-5、PR-6、PR-10、NPR1、PAL、PPO、LOX、POD、SOD、CATの計16遺伝子について発現量を解析した。リファレンス遺伝子としてactinを用いた。各遺伝子の発現量は各組織のリファレンス遺伝子actinの発現量で相対化し、さらに対照区の発現量（平均値）を1としたときの相対発現量（ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 値）を算出した。

(2) 青枯病細菌の汚染土壌へのクエン酸や鉄の添加が青枯病菌のPC化に及ぼす影響

供試土壌はタネまき培土（タキイ(株)）、熊本県立大学研究圃場で採取した土（以下、圃場の土）、黒ボク土を用いた（表1）。

1) *in vitro* 実験系における鉄化合物とクエン酸添加によるPC化への影響

100 mLのプラスチックボトルにオートクレーブ滅菌（121、60分）した圃場の土を10g充填し、 4.0×10^6 cfu mL⁻¹に調整した菌液10 mLを混和後、50 mg L⁻¹鉄化合物水溶液と1%クエン酸水溶液の混合またはクエン酸水溶液を単独で10 mL混和した。28で静置培養し、7、14、21、28日目に土壌を1g採取後、滅菌水に懸濁し、菌密度とPC化率を調査した。

2) *in vivo* 実験系における鉄化合物とクエン酸添加によるPC化への影響

ポリ塩化ビニル管（高さ6 cm）にポリ塩化ビニルキャップ（直径2 mmの穴を9個空けたもの）を上下につけた培養管にオートクレーブ滅菌したタネまき培土、圃場の土、黒ボク土をそれぞれ充填した。その後、蒸留水10 mL、 1.0×10^4 cfu mL⁻¹に調整した菌液10 mLを混和し、50 mg L⁻¹鉄化合物水溶液と0.5%または1%クエン酸水溶液を混合またはクエン酸溶液を単独で20 mL添加した。混和後、28で静置培養し、14、21、28日目に菌密度とPC化率を調査した。

(3) 土壌への低濃度エタノールの添加が青枯病菌のPC化と土壌微生物のバイオマス・多様性に及ぼす影響

1) *in vitro* 実験系に無菌条件下における土壌への低濃度エタノールの添加による青枯病菌のPC化

表 1. 供試した土壌のECとpH

土の種類	EC (mS cm ⁻¹)	pH
タネまき培土	3.04	5.30
圃場の土	2.18	5.41
黒ボク土	0.19	5.45

プラスチックボトルに培養土(タネまき培土、タキイ種苗)を充填し、蒸留水を加えてオートクレーブ滅菌した土壌に、無菌条件下で青枯病菌および低濃度エタノール溶液を添加し、恒温器で培養した。異なる初期菌密度(10³、10⁶ cfu g⁻¹)、培養温度(10、20、25、28、35、40、45)添加エタノール濃度(0、1、2、4%)および土壌 pH(5.43、5.96、6.21、7.20)で実験を行い、培養 20 または 40 日後にサンプリングした土壌の青枯病菌の密度および PC 化について調査した。

2) 土壌への低濃度エタノール添加により PC 化した青枯病菌の長期的動態

プラスチックボトルに培養土を充填し、蒸留水を加えてオートクレーブ滅菌した土壌に、青枯病菌(10⁶ cfu g⁻¹)、エタノール溶液(0、2、4%)を添加後、35 で培養し、30 および 75 日後に土壌の青枯病菌の密度および PC 化を調査した。

3) *in vivo* 実験系における土壌への低濃度エタノールの添加が土壌微生物のバイオマス・多様性に及ぼす影響

異なる土壌[タネまき培土、有機園芸培土(関東農産)に水を加えオートクレーブ滅菌して実験に供試する滅菌土、タネまき培土、有機園芸培土、滋賀大学大津キャンパス内圃場の土壌をそのまま実験に供試する未滅菌土]をプラスチックポットに充填し、青枯病菌を添加して作製した汚染土壌(10⁷-10⁸ cfu g⁻¹)に 0、4%エタノール溶液を添加し、20 日間培養した。培養 0、20 日目に平板希釈法により土壌から菌を分離し、菌密度および PC 化について調査した。さらに、未滅菌土壌において土壌懸濁液を作成し、菌士郎®ATP 発光キット Ver.2(東洋ビーネット)により土壌微生物の ATP 量を、BIOLOG®EcoPlate により土壌微生物の多様度を調査した。

(4) 珪鉄の土壌混和処理がトマトの生育に及ぼす影響

供試品種は桃太郎 8 を用い、春夏作(播種:2021 年 3 月 18 日、定植:4 月 21 日、栽培終了:7 月 26 日)と夏秋作(播種:2021 年 6 月 14 日、定植:7 月 14 日、栽培終了:10 月 29 日)の 2 作を行った。播種は培土を充填した 72 穴セルトレイに行った。定植は培土を充填した縦 64.5 cm、横 36 cm、高さ 37 cm のプランターに 2 株ずつ行った。処理区は珪鉄を 10 a 当たり 0.3 t 施用した 0.3 t 区、1.2 t 施用した 1.2 t 区、2.4 t 施用した 2.4 t 区、および珪鉄無施用の 0 t 区の 4 処理区とし、それぞれ 4 プランターで 8 株ずつ定植した。かん水はイオン交換水を用い、育苗を含め栽培期間中は全て底面給水で行った。着果処理は、開花後に 100 倍希釈した 4-CPA を適時噴霧した。追肥は OAT ハウス A 処方 0.5 単位をかん水時に施用した。摘心は第 5 花房上の本葉を 2 枚残して行った。生育調査は 14 日ごとに行い、茎長と葉数を測定した。収穫は完熟期に行い、果重、糖度、および酸度を測定した。栽培終了後、本葉を全て除去した植物体を地際で切り取り、第 1 花房直下の茎径、茎新鮮重と乾物重、およびプランター内の 2 株分の地下部乾物重を測定した。果実の分析試料は硫酸-過酸化水素分解法を用いて分解した後、原子吸光分光光度計で Fe 含有量を測定した。

4. 研究成果

(1) 液体培地を用いた *in vitro* 実験系

1) *in vitro* 実験系における鉄添加による PC 化誘発の条件検討

グルコースを添加した通常の MM 液体培地では、青枯病菌は 10⁶ cfu mL⁻¹以上に増殖し、鉄添加によって高頻度な PC 化が誘発された。グルコース欠乏 MM 液体培地では、青枯病菌の増殖量は低く、鉄添加により増殖量はわずかに増加したが、PC 化は低頻度であったことから、グルコースは青枯病菌の増殖と PC 化に関与すると推察された。一方で、0.5%グルコース水溶液の結果では、グルコースと鉄のみが存在する条件では、青枯病菌の増殖量と PC 化率は低かったことから、青枯病菌の増殖と PC 化にはグルコース(炭素源)や鉄だけでなく、MM 液体培地に含まれる他の栄養組成(窒素、リン、カリウムなど)も必要であることが推察された。

2) 培養液の添加が PC 化に及ぼす影響

いずれの培養液濃度において、鉄無添加区では高頻度な PC 化は確認されなかった。100%と 50%培養液における鉄添加区では、7 日目までに高密度で増殖し、高頻度な PC 化が確認されたが、14 日目の菌密度と PC 化率は顕著に減少した。10%の培養液の鉄添加区では、菌密度は 10⁶-10⁷ cfu mL⁻¹で推移し、PC 化率は 7 日目で 57%、14 日目で 99.7%と推移した。一方で、いずれの鉄添加区において、14 日間培養後の pH は 4.3~4.5 まで低下しており、菌増殖による pH の低下が菌密度減少の一因となることが推察された。本実験では、培養液のみの添加では PC 化は誘発されず、鉄の存在が PC 化に関与することがわかった。

3) PC 株接種によるトマトの病害防御関連遺伝子の発現誘導

PC 株を根に接種したトマトでは、根と葉の両方において PR-2b と PR-3a は対照区よりも処理区で顕著に発現した(図 1)。トマトの葉では、PR-1、PR-2a、PR-4、PR-10、NPR1、SOD、CAT は対照区と比べて処理区で顕著に発現した。根では PR-5、PAL、LOX、POD は対照区と比べて処理区で顕著に発現した。これらの結果から、PC 株接種によって植物の病害防御応答遺伝子の発現が誘導され、植物の組織部位(根と葉)で誘導される遺伝子の種類や発現量が異なることが示唆された。

(2) 青枯病菌の汚染土壌へのクエン酸や鉄の添加が青枯病菌の PC 化に及ぼす影響

1) *in vitro* 実験系における鉄化合物とクエン酸添加による PC 化への影響

クエン酸を単独添加した区では土壤の菌密度は $5.5\text{-}6.8 \log(\text{cfu g}^{-1})$ であり、PC 化率は 14 日目に 88.1%を示したが、14 日目以降は徐々に減少する傾向になった。鉄化合物とクエン酸を混合添加した区は菌密度が $5.3\text{-}6.4 \log(\text{cfu g}^{-1})$ で、PC 化率は 0.0-3.0%であった。

2) *in vivo* 実験系における鉄化合物とクエン酸添加による PC 化への影響

1 反復目は土壤の種類に関係なく 14 日目に高い PC 化率を示したが、それ以降は低下した。2 反復目は 1 反復目とは異なり、PC 化率が処理区によって不規則に誘発された。本研究において、3 種類の土壤培地においてクエン酸単独添加やクエン酸と鉄化合物の混合添加により PC 化が誘導されることが明らかになった。(図 2)

(3) 土壤への低濃度エタノールの添加が青枯病菌の PC 化と土壤微生物のバイオマス・多様性に及ぼす影響

1) *in vitro* 実験系における土壤への低濃度エタノールの添加による青枯病菌の PC 化

無菌条件下の青枯病菌汚染土壤に 0%および 2%エタノール溶液を添加し、青枯病菌を培養すると、初期密度 (10^3 、 10^6cfu g^{-1}) に関係なく、全ての処理区で 10^7cfu g^{-1} 以上に増殖した(図 3)。PC 化は滅菌水を混和した 0%区においてほとんど見られなかったが、2%エタノール処理区で高頻度に見られ、その頻度は初期菌密度間で差はなかった。また、青枯病菌汚染土壤 (10^5cfu g^{-1}) に低濃度エタノール溶液を添加すると、濃度に関わらず菌が増殖して PC 化が認められ、その頻度は、エタノールの濃度が高くなるに伴い高くなった。さらに、培養温度においては、20-35℃では高温になるに伴い、土壤酸度では低くなるに伴い PC 化頻度は高くなった。

2) 土壤への低濃度エタノール添加により PC 化した青枯病菌の長期的動態

in vitro 実験系で青枯病菌汚染土壤に低濃度エタノール溶液を添加すると、培養 30 日目では高頻度に菌の PC 化が認められたが、75 日目では菌が検出されず、長期培養により PC 株が死滅または VBNC 化 (viable but non-culturable、微生物が「生きているけれども培養できない」状態) することが示唆された。

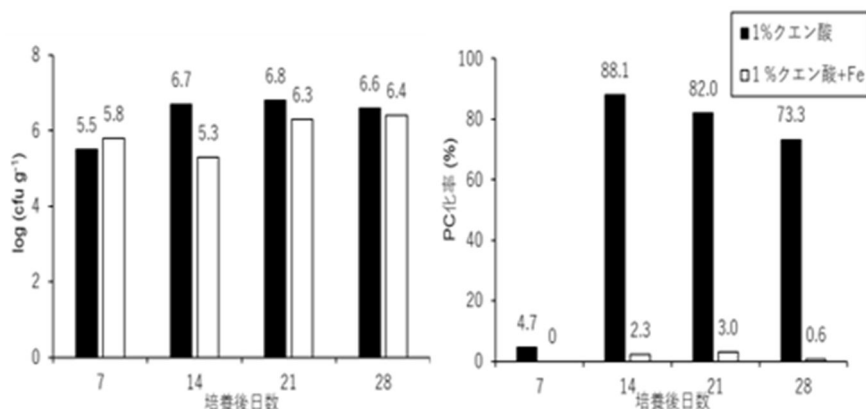
3) *in vivo* 実験系における土壤への低濃度エタノールの添加が土壤微生物のバイオマス・多様性に及ぼす影響

in vivo 実験系において、全ての処理区において青枯病菌の密度は低下したが、未滅菌土壤において低濃度エタノールを添加した区では低下率が大きかった。また、土壤の種類においても低下率は異なり、タネまき培土で大きく低下した。また、低濃度エタノールを添加することによる土壤微生物の ATP 量や多様度の変化は、土壤の種類によって異なり、有機園芸培土および圃場の土では変化がなく、タネまき培土においては、ATP 量は大きく増加し、多様度も増加傾向であった。本研究の実験条件下では、低濃度エタノールの添加により、土壤微生物の ATP 量や多様度が增加する種まき培土において青枯病菌密度の低下率が大きかったことから、青枯病菌以外の多様な微生物が増殖し、青枯病菌の密度を抑制したことが示唆された。

(4) 珪鉄の土壤混和処理がトマトの生育に及ぼす影響

茎長および葉数は、いずれの調査日においても処理区間における差はなかった。果重は処理区間に差はなかった。糖度は珪鉄の施用量に比例して減少する傾向があり、0 t 区と比べ春夏作で 1.2 t 区および 2.4 t 区が、夏秋作では 2.4 t 区が低かった。酸度は 1.2 t 以上の施用で減少する傾向があり、0 t 区と比べ春夏作で 2.4 t 区が低かったが、夏秋作では差はなかった。茎径は処理区間における差はなかった(表 2)。茎新鮮重および茎乾物重は珪鉄の施用量に比例して減少する傾向があり、0 t 区と比べ春夏作で 2.4 t 区が低かったが、夏秋作では差はみられなかった。地下部乾物重は処理区間における差はみられなかった。果実の Fe 含有量は 0t 区と比べ春夏作で差はなかったが、夏秋作では 0.3t 区が多かった。以上の結果から、珪鉄の施用は 10 a 当たり春夏作で 1.2 t、夏秋作では 2.4 t の施用量までならば、生育に影響を及ぼさないことが示された。しかし、果実の糖度および酸度は 10 a 当たり 1.2 t 以上施用すると減少する傾向が認められた。よって、果実品質も考慮すると、珪鉄の施用は 10 a 当たり 0.3 から 1.2 t が適量と考えられた。

図 2. *in vitro* 実験系におけるクエン酸単独添加や鉄化合物とクエン酸混合添加による菌密度(左)と PC 化率(右)の経日変化



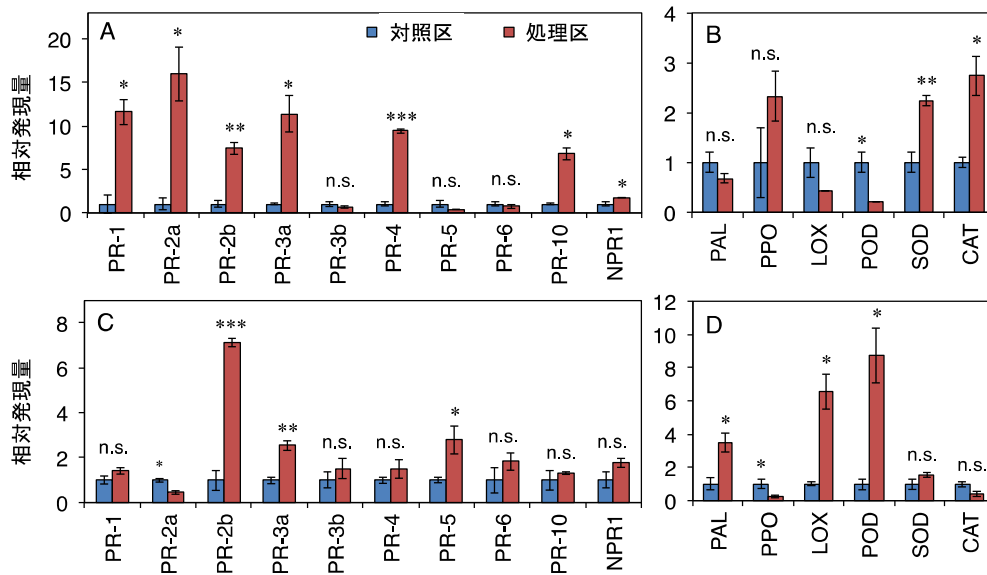


図1. PC株接種によるトマトの葉(AとB)と根(CとD)における病害防御関連遺伝子の発現量

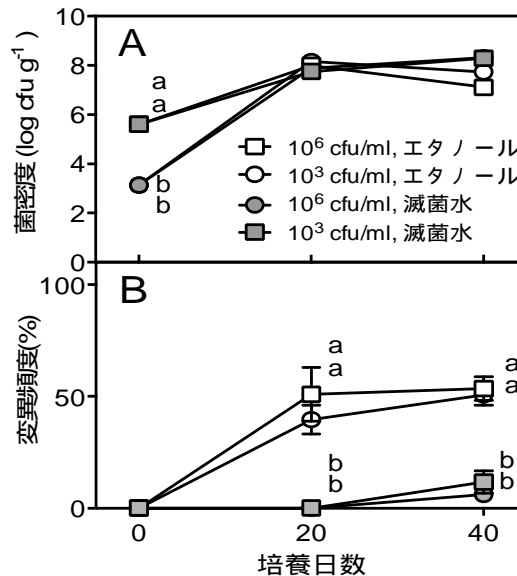


図3. 青枯病菌汚染土壌への低濃度エタノールの土壌添加における初期菌密度が菌の増殖(A)とPC化(B)に及ぼす影響. 図中の縦線は標準誤差を示す(n=3).異なる英文字間にはTukey法により有意差があることを示す(p<0.05)

表2. 珪鉄の施用がトマトの成育に及ぼす影響

作型	処理区	茎径(mm)	茎新鮮重(g)	茎乾物重(g)	地下部乾物重 ^y (g)
春夏作	0t区	20.2 a ^z	288.3 a	40.0 a	19.29 a
	0.3t区	20.4 a	254.6 ab	35.7 ab	16.42 a
	1.2t区	18.8 a	230.0 ab	31.3 ab	14.88 a
	2.4t区	18.9 a	203.6 b	26.7 b	13.12 a
夏秋作	0t区	15.1 a	165.4 a	25.5 a	8.56 a
	0.3t区	15.7 a	157.9 a	24.1 a	9.20 a
	1.2t区	14.9 a	158.2 a	24.2 a	8.04 a
	2.4t区	14.6 a	148.2 a	21.3 a	6.39 a

^z異なるアルファベット間には5%水準で有意な差があることを示す (n=7-8)

^yプランター当たり (2株分), 春夏作: n=4, 夏秋作: n=3-4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakahara Hiroki, Mori Taro, Matsuzoe Naotaka	4. 巻 142
2. 論文標題 Screening of phenotypic conversion mutant strains of <i>Ralstonia solanacearum</i> for effective biological control of <i>Verticillium</i> wilt in eggplant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Crop Protection	6. 最初と最後の頁 105530 ~ 105530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cropro.2020.105530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中原浩貴, 森 太郎, 松添直隆	4. 巻 46
2. 論文標題 青枯病菌の非病原性変異株を利用した病害防除-ナス科植物における青枯病と半身萎凋病の生物的防除-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本農業学会誌	6. 最初と最後の頁 20-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.W21-03	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 太郎, 山本龍之介, 中原浩貴, 近藤謙介, 松添直隆
2. 発表標題 有機物の土壌混和による青枯病菌の表現型変異
3. 学会等名 農業生産技術管理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松野聖士, 小松亜璃沙, 中原浩貴, 森 太郎, 近藤謙介, 松添直隆
2. 発表標題 Fe(III)-EDTA添加が土壌中の青枯病菌とトマトの生育に与える影響
3. 学会等名 日本生物環境工学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猿渡あゆみ, 小松亜璃沙, 中原浩貴, 森 太郎, 近藤謙介, 松添直隆
2. 発表標題 Fe()-EDTA浸漬処理が青枯病発病抑制効果に及ぼす影響
3. 学会等名 日本生物環境工学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土壌への鉄化合物水溶液添加が青枯病菌の増殖に及ぼす影響
2. 発表標題 森 健仁, 小松亜璃沙, 中原浩貴, 森 太郎, 近藤謙介, 松添直隆
3. 学会等名 日本生物環境工学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

〔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	中原 浩貴 (Nakahara Hiroki) (30828364)	鳥取大学・乾燥地研究センター・特別研究員 (PD) (15101)	
研究分担者	近藤 謙介 (Kondo Kensuke) (70403376)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	
研究分担者	森 太郎 (Mori Taro) (90725053)	滋賀大学・教育学部・准教授 (14201)	

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
---------	---------