

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780033  
 研究課題名（和文）内生放線菌を用いた生物防除の新展開～アブラナ科野菜セル苗黒すす病の防除機構の解明  
 研究課題名（英文）Biocontrol activity of an endophytic *Streptomyces* sp. strain MBCN152-1 and its mode of action  
 研究代表者  
 清水 将文 （SHIMIZU MASAFUMI ）  
 三重大学・大学院生物資源研究科・助教  
 研究者番号：60378320

## 研究成果の概要（和文）：

*Streptomyces* sp. MBCN152-1株はキャベツ苗のクチクラ層上と層下の細胞間隙に定着することがわかった。本菌株は黒すす病菌の細胞壁にのみ寄生するが、イチゴ炭疽病菌にも防除効果を示した。黒すす病菌を接種した本菌株定着苗の細胞内には、パピラなどの物理的障壁の形成は確認されなかった。以上のことから、本菌株の防除機構には、菌寄生以外に、パピラ形成などを伴わない抵抗性の誘導が関与するものと推測された。

## 研究成果の概要（英文）：

By scanning electron microscopy, it was revealed that *Streptomyces* sp. strain MBCN152-1 colonized cuticle surface and intercellular spaces of cabbage cotyledons. Light and fluorescent microscopic observation indicated that MBCN152-1 could discern *A. brassicicola* from other fungi, and parasitize hyphal cell wall of *A. brassicicola*. However, interestingly, MBCN152-1 exhibited intensive biocontrol effect against non-host pathogen *Glomerella cingulata*, causal agent of strawberry anthracnose. When cabbage seedlings colonized by MBCN152-1 were inoculated with *A. brassicicola*, infection by the pathogen was significantly suppressed, though formation of physical barrier such as papillae was not observed in the cells which were penetrated by infection hyphae of the pathogen. These results suggested that mycoparasitism and induction of systemic resistance without formation of physical barrier in the host plant cells were involved in the mechanisms of biocontrol by strain MBCN152-1.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：内生放線菌，生物防除，黒すす病，菌寄生

### 1. 研究開始当初の背景

キャベツのセル苗に深刻な黒すす病被害が発生していた。本病に対する登録農薬はポリオキシシン1剤のみで、それ以外の有効な防除法がなく、防除が困難であった。そこで、申請者らは、黒すす病に対する微生物農薬の開発を目指して一連の研究を開始し、有望な植物内生放線菌 *Streptomyces* sp. MBCN152-1株の分離に成功した。最適処理法などの諸検討を終え、特許も出願した。しかし、本菌株を実用化する上で重要な防除機構の解明が未検討課題として残されていた。

### 2. 研究の目的

キャベツセル苗黒すす病に防除活性を示す *Streptomyces* sp. MBCN152-1株の防除機構を解析し、本技術を実用化に結び付ける基礎データを得ることを目的とする。具体的には、(1) 苗上(内)での有望菌株および病原菌の行動、(2) 有望菌株の病原菌に対する寄生性、(3) 有望菌株定着苗の抵抗性反応などを解析する。これらの実験で得られた情報を基に、MBCN152-1株の病害防除機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 苗上(内)での有望菌株および病原菌の行動の観察  
MBCN152-1株を処理したキャベツ苗に黒すす病菌を接種し、両微生物の行動を光学、蛍光、電子顕微鏡で観察する。

(2) 有望菌株の菌寄生性および生物防除スペクトラムの検討  
MBCN152-1株をキャベツ黒すす病菌 (*Alternaria brassicicola*)、キャベツ黒斑病菌 (*A. brassicae*)、アブラナ科炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*)、イチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) と寒天培地上で共培養し、寄生行動の有無を光学顕微鏡観察する。また、寄生行動が見られた場合には、その詳細を蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で観察する。

さらに、上記病原菌に対する MBCN152-1株の防除効果を検討する。

(3) 有望菌株定着苗の抵抗性反応の解析  
MBCN152-1株を処理したキャベツ苗に黒すす病菌を接種し、細胞レベルでの抵抗反応を光学、蛍光顕微鏡で観察する。

### 4. 研究成果

(1) 苗上(内)での有望菌株および病原菌の行動  
MBCN152-1株を処理したキャベツ苗を走査型電子顕微鏡で観察したところ、本菌株が葉のクチクラ層表面で旺盛に増殖している様子

が確認できた(図1)。さらに、層下の細胞間隙にもわずかに菌糸が侵入して定着していることがわかった。

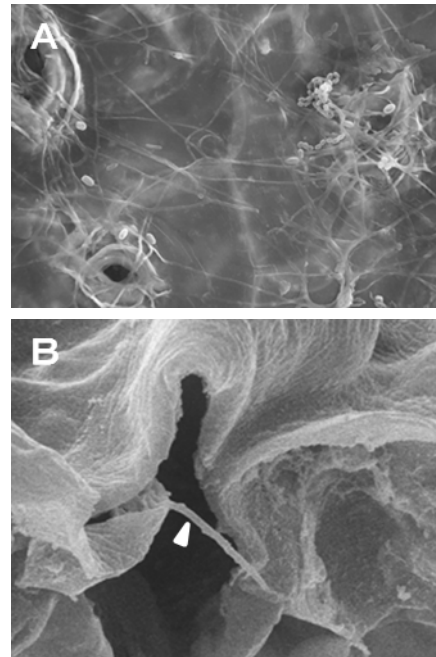


図1 キャベツ苗のクチクラ層表面および子葉の細胞間隙で菌糸生育する MBCN152-1株  
A: 子葉のクチクラ表面で増殖した MBCN152-1株菌糸, B: 子葉の活断面に現れた MBCN152-1株菌糸(矢頭)。表皮細胞と葉肉細胞との間隙に伸展している。

また、MBCN152-1株処理キャベツ苗上では、黒すす病菌の発芽管伸長と付着器形成が顕著に抑制されることを明らかにした(図2)。

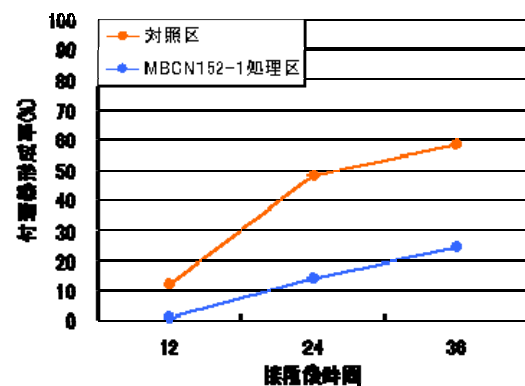


図2 MBCN152-1株処理キャベツ苗上における黒すす病菌の付着器形成の抑制

電子顕微鏡で詳細に観察したところ、黒すす病菌に MBCN152-1 株が激しく絡みついて寄生していることが明らかとなった (図 3)。

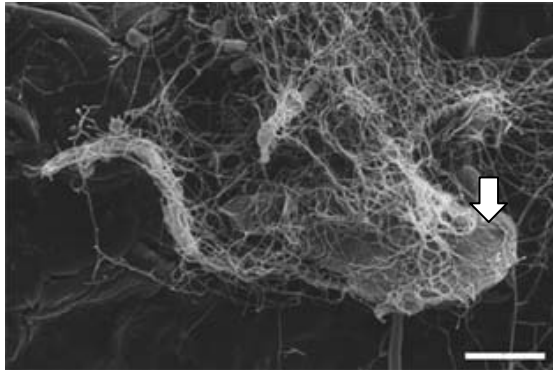


図 3 キャベツ苗上で黒すす病菌に寄生する MBCN152-1 株  
矢印：黒すす病菌胞子，その周囲に絡みついている細い菌糸が MBCN152-1 株。(バーは 20µm)

#### (2) 有望菌株の菌寄生性および生物防除スペクトラム

MBCN152-1 株は検定病原菌 4 種のうち、黒すす病菌にのみ特異的に寄生することを明らかにした。また、MBCN152-1 株は黒すす病菌の菌糸に絡みついた後、細胞壁内に侵入し、菌糸を溶解して死滅させることを光学・蛍光顕微鏡および透過型電子顕微鏡観察により突き止めた (図 4)。

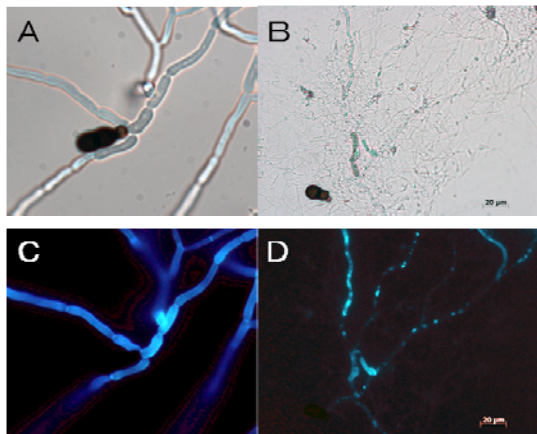


図 4 MBCN152-1 株により寄生され、溶解した黒すす病菌の菌糸の様子  
A と C：黒すす病菌単独培養区の光学顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真 (黒すす病菌細胞壁を蛍光色素で標識)。菌糸が蛍光色素により満遍なく青色の蛍光を発している、B と D：MBCN152-1 株共培養区の光学顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真。共培養区の黒すす病菌菌糸は完全に溶解し、菌糸細胞壁の蛍光発色もほとんど消失している。

さらに、MBCN152-1 株の 4 種病原菌に対する防除活性を検討したところ、黒すす病菌だけでなく、イチゴ炭疽病菌にも顕著な活性を示すことが明らかとなった (図 5)。しかし、黒すす病菌と同じ *Alternaria* 属菌を病原菌とするキャベツ黒斑病、イチゴ炭疽病菌と同じ *Colletotrichum* 属菌を病原菌とするアブラナ科炭疽病には全く防除活性が認められなかった。

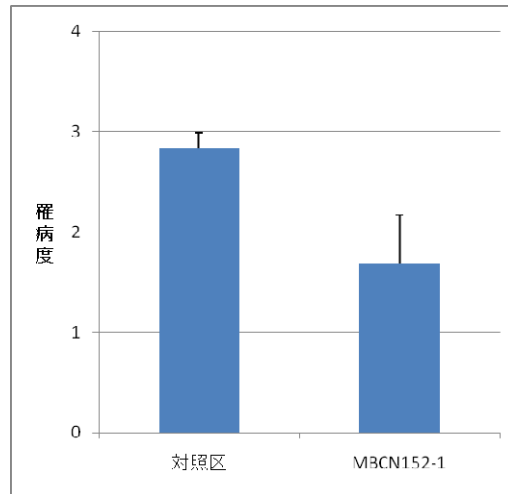


図 5 MBCN152-1 株のイチゴ炭疽病に対する防除効果

#### (3) 有望菌株定着苗の抵抗性反応

MBCN152-1 株を処理したキャベツ苗に黒すす病菌を接種し、細胞レベルでの抵抗反応を観察したが、パピラ形成や細胞質凝集などの物理的障壁の形成は全く認められなかった。しかし、黒すす病菌の侵入菌糸の形成は顕著に抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、MBCN152-1 株の病害防除機構には、菌寄生と物理的障壁形成を伴わない全身抵抗性の誘導が関与するものと考えられた。

本研究により、MBCN152-1 株の実用化に必須の重要な知見が得られた。また、放線菌による菌寄生に関する諸データは、植物病理学的・微生物学的にも極めて新規性が高い。さらに、黒すす病以外の病害にも適用可能であることが明らかとなったので、より有用性の高い微生物農薬の開発に展開する可能性が見出された。

## 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 Shimizu, M., Yazawa, S. and Ushijima, Y. (2009) A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. *Journal of General Plant Pathology* 75: 27-36. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① Masafumi Shimizu, Mikiyasu Nakayama and Tomoko Suzuki. Hyperparasitism of *Alternaria brassicicola* by the biocontrol strain *Streptomyces* sp. MBCN152-1. The 2009 KSPP fall meeting and the 1<sup>st</sup> Japan-Korea joint symposium, 2009 年 10 月 28 日～31 日, 韓国濟州島
- ② 中山幹康・中筋智子・窪田昌春・鈴木智子・清水将文. *Streptomyces* sp. MBCN152-1 株に関する研究. (2) *Alternaria brassicicola* に対する MBCN152-1 株の寄生性. 平成 21 年度日本植物病理学会関西部会, 2009 年 10 月 17 日, 神戸市
- ③ 清水将文・中筋智子・中山幹康・窪田昌春・鈴木智子・山中聡. *Streptomyces* sp. MBCN152-1 株に関する研究. (1) キャベツセル成型苗黒すす病に対する生物防除活性. 日本植物病理学会大会, 2009 年 3 月 26～28 日, 山形市

[図書] (計 1 件)

- ① 清水将文, 微生物と植物の相互作用: 病害と生物防除 (分担: 内生放線菌による誘導抵抗), ソフトサイエンス社, 2009 年, 173-178 ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 将文 (SHIMIZU MASAFUMI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・助教  
研究者番号: 60378320

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: