

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580488

研究課題名(和文)植物糸状菌病害の発生を助長するヘルパーバクテリアの発病助長因子の解明

研究課題名(英文)Verification of causal factors promoting fungal diseases of plants in helper bacteria

研究代表者

吉田 重信(YOSHIDA, SHIGENOBU)

独立行政法人農業環境技術研究所・その他部局等・主任研究員

研究者番号：90354125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：各種イチゴ生息細菌保存株を用い炭疽病の発病助長効果を調べた結果、Brevundimonas属およびMethylobacterium属細菌等で発病助長効果を持つことを見出した。Methylobacterium属細菌W1447株の発病助長因子の探索を行った結果、助長因子は本菌の菌体の膜壁成分および培養上清の水溶性画分中に存在することが示唆された。そこで、本属菌に特徴的な菌体外多糖の構成成分であるマンノースおよびピルビン酸の発病助長効果を調べた結果、それらの添加により発病が助長された。以上のことから、菌体外多糖の構成成分等が本属細菌の発病助長因子として機能している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bacterial strains obtained from healthy strawberry plants and belonged to various taxonomical positions were examined for promoting effect of anthracnose disease caused by *Glomerella cingulata*. Consequently, several strains belonging to *Methylobacterium* and *Brevundimonas* were found to particularly promote the disease. By using a representative strain of *Methylobacterium* bacterium, W1447, the disease promotion was observed by adding its fraction of cell wall and/or plasma membrane, and water soluble fraction of culture filtrates, indicating that the causal compounds were included in the fractions. Among sugars consisting of extracellular polysaccharides, mannose and pyruvic acid, which have been reported to include dominantly in the bacterial genus, were verified to promote the disease. These results suggest that sugars in the extracellular polysaccharides are causal compounds of *Methylobacterium* bacteria for the disease promotion.

研究分野：微生物整体学

キーワード：ヘルパーバクテリア イチゴ 炭疽病

1. 研究開始当初の背景

農作物等の植物に常在的に生息する微生物のうち、ヘルパーバクテリアと呼ばれる細菌は、糸状菌による病害の発生を助長する常在性の細菌として知られている。しかし、ヘルパーバクテリアの種類や存在割合は明確にはされておらず、その助長因子についても不明な点が多い。

糸状菌病害であるイチゴ炭疽病は、苗に潜在感染する感染形態をとり生産現場で問題となっているが、筆者らの予備実験の結果、その潜在感染の顕在化には、イチゴに常在するヘルパーバクテリアが関与している可能性が示唆された。ヘルパーバクテリアの本病の発生に果たす役割を正しく評価するためには、イチゴに生息する細菌群集内における種類や存在割合を明らかにすることが必要であり、また、その発病助長因子を特定することが重要である。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、イチゴ炭疽病の発生を助長する細菌の種類や構成を明らかにするとともに、その発病助長因子を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヘルパーバクテリア菌群の解明

当研究所保有のイチゴ生息細菌計 57 菌株(表 1)を供試し、液体培養で得られた菌体の懸濁液を滅菌水で調製した。また、病原菌の接種源として、イチゴ炭疽病菌 *Glomerella cingulata* S0709 株の分生子懸濁液を調製した。これらの接種源を、イチゴポット苗(品種女峰)の切り取った健全小葉の小片の表面に共接種した。すなわち、一枚の健全小葉から調製した複数の各小片にそれぞれの細菌株の懸濁液を滴下接種するとともに、各小片に炭疽病菌の分生子懸濁液を滴下接種した。各菌株の接種には、10~20 小葉由来の小片を用いた。接種後は、湿室内に 6 日間保持し、その後接種部位に出現する病斑の直径を測定した。その際、病原菌の潜在感染の状態からの発病助長効果を評価するために、対照区である炭疽病菌の単独接種イチゴ小片上で病斑が形成された場合は、その調製源となったイチゴ小葉に由来する小片での発病データを除外することとし、対照小片で無発病であった小葉由来のデータで助長効果を評価することとした。

(2) ヘルパーバクテリア菌株の選抜

(1)において発病助長効果の見られた *Brevundimonas* 属および *Methylobacterium* 属細菌の中から最も効果の高い菌株を選抜するために、保有株の中でそれらに属する全菌株(各 7 菌株)を供試し、(1)と同様の検討を共接種のタイミング別(細菌懸濁液の接種タイミング:病原菌接種の 2 日前、同時、2 日後)に行った。さらに、選抜された菌株の炭疽病菌の分生子発芽等の感染初期行動

に与える影響を顕微鏡観察で評価した。

表1. 供試菌株の属名および発病助長活性

菌種(属名)	菌株数	病斑直径(mm) ¹⁾		
		病斑形成菌株全体の平均値	病斑形成菌株中の最小値	病斑形成菌株中の最大値
<i>Acinetobacter</i>	2	0.72	0.44	1.00
<i>Aeromicrobium</i>	1	2.75		
<i>Agrobacterium</i>	4	0.16	0.00	0.36
<i>Aurantimonas</i>	2	0.76	0.19	1.19
<i>Brevundimonas</i>	3	2.22	0.25	3.41
<i>Burkholderia</i>	1	0.00		
<i>Chryseobacterium</i>	1	0.00		
<i>Curtobacterium</i>	1	0.63		
<i>Deinococcus</i>	1	0.00		
<i>Flavobacterium</i>	1	0.67		
<i>Methylobacterium</i>	4	1.54	0.73	3.83
<i>Microbacterium</i>	7	0.47	0.00	2.00
Not identified	3		0.00	0.17
<i>Nocardioides</i>	2	1.17	0.00	2.33
<i>Pseudomonas</i>	2	0.71	0.00	1.42
<i>Sinorhizobium</i>	1	0.00		
<i>Sphingomonas</i>	15	0.45	0.00	2.33
<i>Variovorax</i>	1	0.00		
<i>Xanthomonas</i>	2	0.00		

1)各菌株の病斑直径は共接種後6日後に出現した病斑(n=6~16)を基に平均地を算出

(3) 発病助長因子の解明

選抜菌株を Nutrient Broth (NB)、ジャガイモ・ペプトン・スクロース (PPG) およびイチゴ葉煎汁液体培地で 6 日間振盪培養した後、培養上清と培養菌体を分別し、それらの発病助長効果を調べた。さらに、培養菌体では、熱処理の助長効果への影響や、超音波破碎および超遠心分離により菌体画分液を調製し、それぞれの発病助長効果を(1)の方法に準じて評価した。

(4) 菌体外糖成分の発病助長効果の検討

発病助長効果を示す細菌として選抜された *Methylobacterium* 属細菌の生産する菌体外多糖において、特徴的に含まれる構成成分の中にマンノースおよびピルビン酸があると考えられる(文献1)。そこで、これらの糖類の水溶液(100mM)の発病助長効果を(1)の方法に準じて評価した。

4. 研究成果

(1) ヘルパーバクテリア菌群の解明

健全イチゴ葉小片に各供試菌株と炭疽病菌を共接種した結果、12 属の 36 細菌株との共接種により病斑が形成されることを明らかにした(表 1)。特に、*Brevundimonas* および *Methylobacterium* 属細菌では、複数菌株で高い発病助長効果が見られた。この結果から、ヘルパーバクテリアの種類は複数属で構



図1. *Methylobacterium*属細菌の併用処理による炭疽病の病斑形成上列、炭疽病菌のみの接種(感染が潜在化)下列、*Methylobacterium*属細菌処理+炭疽病菌接種

成され、その中でも、*Brevundimonas* 属および *Methylobacterium* 属細菌等が活性の高いヘルパーバクテリアであることが示唆された (図 1)。

(2) ヘルパーバクテリア菌株の選抜

Brevundimonas および *Methylobacterium* 属に属する保有菌株を供試して、各菌株の発病助長活性を調べた結果、*Brevundimonas* 属では WI667 株で最も強い助長効果を示した (図 2)。また、*Methylobacterium* 属の接種では、一般に *Brevundimonas* 属菌株の接種時よりも大型の病斑形成が認められ、特に WI441 株および WI447 株の接種により平均直径 6mm 以上の大型の病斑が形成され、強い発病助長効果が確認された (図 2)。以上の結果を踏まえ、*Methylobacterium* 属細菌の WI441 株とほぼ同等の助長効果を示した WI447 株を、代表菌株として以降の試験に用いることとした。

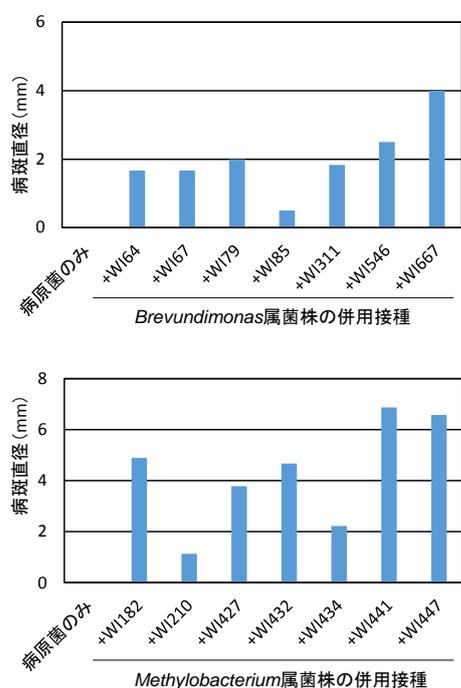


図2. *Brevundimonas*属または *Methylobacterium* 属細菌の併用処理による炭疽病の病斑形成病斑直径は、それぞれ2回または3回試験 (n=3~5) の平均を示す。

上述の発病助長効果は、潜在感染条件下でのイチゴ小葉の小片上での結果であったため、潜在感染条件下ではなく、通常の発病条件下における発病助長効果の確認を行った。すなわち、WI447 株を噴霧した小葉および対照無処理の小葉に炭疽病菌を噴霧接種し、7日間保持後に小葉上に出現した病斑数を計測した。その結果、WI447 株の処理により病斑数は増加することが確認され、通常の発病条件下でも発病が助長されることが示唆された (図 3)。

WI447 株の処理タイミングを検討した結果、発病助長効果は炭疽病菌分生子の接種と同時および接種 2 日後処理で認められたのに対し、接種 2 日前の処理では顕著には認めら

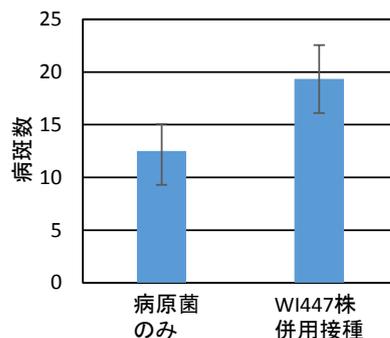


図3. *Methylobacterium*属細菌WI447株の併用処理によりイチゴ小葉上に形成された炭疽病の病斑数病斑数は、12枚の小葉上での計測の平均値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

れなかった。このことから、WI447 株は、葉面上に既に存在している炭疽病菌分生子の感染初期行動の活性化に関与している可能性が考えられた。そこで、WI447 株処理の炭疽病菌の感染初期行動に対する影響を調べるために、スライドグラス上に滴下した炭疽病菌分生子懸濁液に WI447 株の細胞懸濁液を添加した場合と添加しない場合での発芽率、付着器形成割合を調べた。また、対照として発病助長効果の無かった菌株も同様に供試した。その結果、炭疽病菌の分生子懸濁液のみの処理では、発芽率は約 4 割であったが、WI447 株の添加により約 8 割に上昇した (図 4)。また、付着器形成率も、分生子懸濁液のみの処理では 1 割未満であったのに対し、WI447 株の添加により約 7 割に上昇した (図 4)。なお、発病助長効果の無かった菌株の処理では、発芽率および付着器形成率の上昇は見られなかった。このことから、WI447 株の発病助長効果は、炭疽病菌の発芽や付着器形成が促進されることで起きることが示唆された。

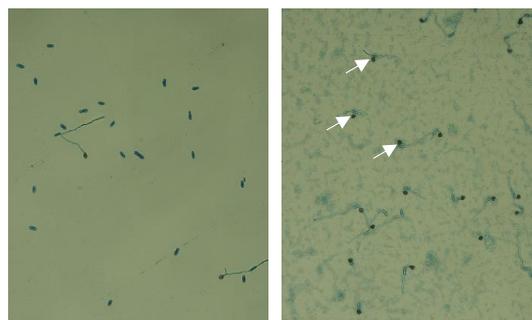


図4. 炭疽病菌分生子の発芽形態
左、炭疽病菌分生子懸濁液のみの滴下
右、炭疽病菌分生子懸濁液にWI447株細胞懸濁液を添加
WI447株細胞懸濁液の添加により、分生子の発芽および付着器(矢印)の形成が促進。

(3) 発病助長因子の解明

WI447 株の各種液体培地培養液から得られた培養上清の発病助長効果を調べた結果、NB および PPG の培養液から調製した培養上清では、対照とした培地そのものでも同程度の直径の病斑形成が認められたため、発病助長効果の評価ができなかったが、イチゴ葉煎汁液培地の培養上清では対照液と比べて病斑直

径の拡大が見られ、発病助長効果が確認された。培養上清の助長効果は、上清を熱処理しても変化せず、溶媒画分で得られた水溶性画分で助長効果が見られた(図4)。また、本菌株の培養液から分別された菌体でも発病助長効果が確認された。菌体を更に超音波破碎後、超遠心分離により菌体の可溶性画分、膜壁画分に分別し、それぞれの発病助長効果を調べた結果、膜壁画分で発病が助長された。さらに、この膜壁画分を炭疽病菌の分生子懸濁液に添加したところ、分生子の発芽そのものには明確な影響は与えなかったが、発芽分生子の付着器形成が促進された(図5)。しかし、その隔壁成分からの更なる助長因子の特定には至らなかった。

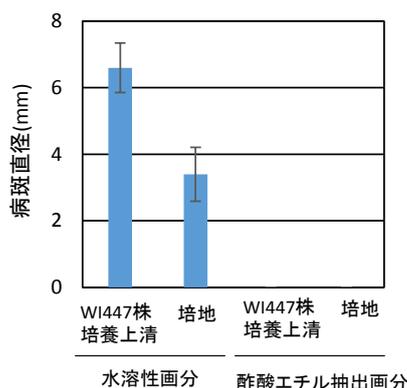


図4. イチゴ葉煎汁液体培地の培養で得られたWI447株の培養上清の溶媒画分液の併用処理による炭疽病の病斑形成
病斑直径は平均値(n=5)を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

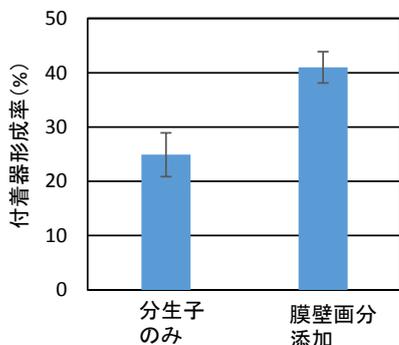


図5. WI447株の菌体膜壁画分の添加の有無によるイチゴ炭疽病菌の発芽分生子の付着器形成率
付着器形成率は、30-50個の発芽分生子の付着器形成の有無により算出し、4反復の計測の平均値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

(4) 菌体外糖成分の発病助長効果の検討

(3)の結果を踏まえ、培養上清に含まれる発病助長因子は低分子の水溶性成分である可能性が考えられた。そこで、*Methylobacterium* 属細菌が生産する菌体外多糖中に特徴的に含まれるマンノースおよびピルビン酸(文献1)に着目し、両糖の水溶液を炭疽病菌に添加した場合の発病助長効果を調べた。その結果、両糖ともに、その処理で本病の病斑形成が促進され、発病助長

効果が認められた。次に両糖の濃度別(0.1mM~100mM)の発病助長効果を調べた結果、助長効果は両糖共に濃度の上昇と共に高まる傾向が認められた(図6)。

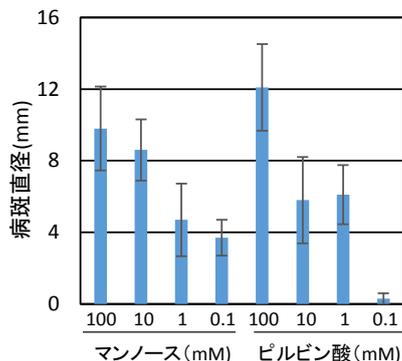


図6. 各濃度のマンノースおよびピルビン酸の添加による炭疽病の病斑形成
病斑直径は平均値(n=10)を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

次に、炭疽病菌の分生子懸濁液を接種したイチゴ葉面上にピルビン酸を添加した場合と添加しない場合の発芽形態等を走査型電子顕微鏡で調べたところ、ピルビン酸の添加により、葉面上での分生子の発芽および付着器の形成が促進される傾向が確認された(図7)。

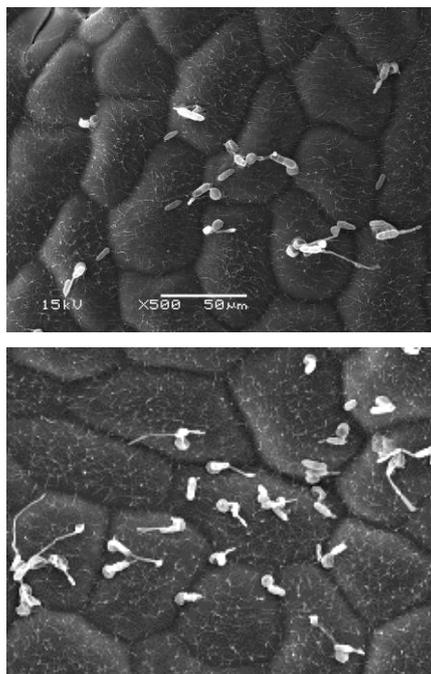


図7. イチゴ葉面における炭疽病菌分生子の発芽形態上、炭疽病菌分生子懸濁液のみの滴下
下、炭疽病菌分生子懸濁液にピルビン酸(100mM)を添加
ピルビン酸液の添加により、分生子の発芽および付着器の形成が促進される傾向が確認。

以上の試験結果から、イチゴ炭疽病のヘルパー細菌には様々な細菌種が存在し、その中でも特に *Brevundimonas* および *Methylobacterium* 属細菌が主要な細菌種であることが明らかとなった。また、

Methylobacterium 属細菌の代表菌株を用いて発病助長因子の解明を行った結果、助長因子は菌体膜壁面分および菌体外生産成分に含まれ、菌体外生産成分については、菌体外多糖類の構成成分が発病助長因子の一つとして機能している可能性を明らかにすることが出来た。さらに、感染初期行動の観察結果より、これらの因子による発病の助長効果は、炭疽病菌分生子の感染初期行動の促進に基づいている可能性を示した。以上の成果は、新たな糸状菌病害の発病メカニズムの発見につながるだけでなく、本病の新たな対策法構築の基盤として活用できると考える。また、今後はこれらヘルパーバクテリアの管理・制御技術の開発が行われ、効率的な病害制御技術の開発に展開されることが期待できる。

<引用文献>

① Verhoef, R., Schols, H. A., Blanco, A., Siika-aho, M., Rättö, M., Buchert, J., Lenon, G. and Voragen, A. G. J., Sugar composition and FT-IR analysis of exopolysaccharides produced by microbial isolates from paper mill slime deposits. *Biotechnol. Bioeng.*, 91: 91-105. 2005.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 件) なし

[学会発表] (計 件) なし

[図書] (計 件) なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 件) なし

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 重信 (YOSHIDA SHIGENOBU)

独立行政法人 農業環境技術研究所 生

物生態機能研究領域 主任研究員

研究者番号：90354125

(2) 研究分担者

小板橋 基夫 (KOITABASHI MOTOO)

独立行政法人 農業環境技術研究所 生

物生態機能研究領域 主任研究員

研究者番号：10355662

(3) 連携研究者

()