

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658039

研究課題名（和文）花器処理型種子伝染性病害用生物農薬の創成

研究課題名（英文）Novel method for biological control agent application to flowers to prevent seedborne plant diseases

研究代表者

有江 力（ARIE, TSUTOMU）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：00211706

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円、（間接経費） 930,000 円

研究成果の概要（和文）：無病徴イネ組織から分離した非病原性Fusarium属菌から、ばか苗病発病抑制効果を持つ4株を選抜した。選抜菌株は、2株をF. oysporum、残り2株をF. proliferatumと同定した。これらの非病原性Fusarium菌を開花期にイネ花器に噴霧処理することで、その花器由来の種子を播種した場合のばか苗病発病を抑制できる事をポット試験で見だし、圃場試験で実証した。これら非病原性Fusarium菌の処理はイネの生育に悪影響は示さなかった。非病原菌とばか苗病菌の穎花および穎果における挙動をGFPを利用して可視化、非病原菌処理がばか苗病菌の種子内部への侵入を防ぐ事を見いだした。

研究成果の概要（英文）：We obtained four non-pathogenic Fusarium spp., carrying biocontrol activity to rice Bakanae disease, from healthy rice plants' tissues. We identified two of them as Fusarium oysporum and the remaining two as F. proliferatum. Spraying the flower with these non-pathogenic isolates reduced occurrence of Bakanae disease in the plants generated from the seeds produced from the flowers. Treatment of rice with these non-pathogenic Fusarium showed no adverse effect on the growth of rice. This Bakanae disease inhibition may be due to the prevention of Bakanae fungus from entering the interior of the seed by the non-pathogenic Fusarium spp., based on the fluorescence microscopies using fluorescent protein-expressing Bakanae fungus and the non-pathogenic Fusarium spp.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物病害生物防除 非病原性菌株 新規処理方法 花器処理 種子

1. 研究開始当初の背景

(1) 種子伝染性病害の重要性と社会背景

種苗による病原の媒介は、病害の水平的伝搬のみならず、次世代への垂直的伝搬につながる。平成 17～18 年度に、研究代表者は、科学研究費萌芽研究において、土壌伝染性病原でさえ種子が病害の伝搬に重要である事を示した。イネでは旧来から、ばか苗病やいもち病等多様な種子伝染性病害が知られている。化学殺菌剤を用いた種子消毒による防除技術の確立によって種子伝染性病害の重要性は低下していたが、近年、化学農薬削減が社会の求める所となり、「特別栽培農産物に係る表示ガイドライン（2001）」の制定等も相まって、特に化学農薬による種子消毒が削減傾向にある。その結果、イネばか苗病等の種子伝染性病害が各地で再発し問題になってきており、代替防除技術の確立が急務である。

(2) イネ種子伝染性病害に対する生物農薬（微生物殺菌剤）

これに対応して、播種→育苗時処理型の種子伝染性病害用生物農薬の開発研究がすすめられ、すでに 3 剤以上が登録されていた。研究代表者はこのうち 2 剤の作用機作の解明に関与した。しかしながら、これら生物農薬の効果は化学農薬に比べて低く、さらに効果的な生物農薬が求められている。

(3) 着想に至った経緯

研究代表者はイネばか苗病に関する研究の過程で、罹病株組織から、病原菌（フザリウム属）と同時に非病原性のフザリウム属菌が高頻度で分離される事に気づいた。この非病原性株はイネ組織での高い定着能を持つことが想定される。フザリウム病では、非病原性株の事前処理が植物の免疫反応を誘導する等して病害が低減される場合がある事が既知である。一方、ばか苗病菌胞子はイネ花器に感染し、その結果、汚染種子ができる。非病原性株もばか苗病菌と同様な感染・潜在・定着性状（生活環）を有する事が予想される。これらを総合し、開花時に生物農薬資材として非病原性フザリウム属菌の胞子を花器に散布処理、種子に潜在させ、翌年の栽培時のばか苗病等の発生を抵抗性誘導等の機作で抑制する、花器処理型種子伝染性病害用生物農薬を着想した。

2. 研究の目的

イネ開花時に花器に生物農薬資材である非病原性株を散布処理し、非病原性株を潜在させた種子を調製、翌年の種子伝染病の発病を抑制する、新発想の、花器処理型種子伝染性病害用生物農薬の処理技術を創成する事を目標とする。

そのための基盤的知見を得るため、本研究

では、イネ種子伝染性病害としてばか苗病を、非病原性株としてばか苗病菌に近縁の非病原性フザリウム属菌を対象とし、ばか苗病防除に効果を示す非病原性株の選抜、花器処理によるばか苗病防除効果の検定、非病原性菌株の植物組織内動態と作用機作の解明、を目的とする。

これによって、非病原性株を利用したばか苗病防除の可能性、新発想である花器処理による種子伝染性病害の生物防除の可能性、が明らかになる。このような処理が可能になれば、播種時の生物農薬を含む薬剤処理が不要になり、栽培者はあたかも病害抵抗性品種を利用するかのように手間が省ける。また、定着性が高く、生物農薬の欠点である成分微生物の安定定着を担保しやすい。

3. 研究の方法

研究の目標である、花器処理型種子伝染性病害用生物農薬を開発するための基盤として、(1)イネ組織に定着性を有する非病原性株の選抜、(2)ばか苗病発病抑制効果を持つ非病原性株の選抜と花器処理によるばか苗病防除効果の検定、(3)非病原性株の植物組織内動態と作用機作の解析、を行った。

(1) イネ組織に定着性を有する非病原性株の選抜

主に、発病圃場から健全イネ植物体を採集、表面殺菌後の組織から、選択培地等を用いて菌の分離を行った。分離した菌については、イネに対する接種試験で非病原性であることを確認した。

(2) ばか苗病発病抑制効果を持つ非病原性株の選抜と花器処理によるばか苗病防除効果の検定

分離した非病原性菌について、生物検定によってばか苗病の発病抑制効果を示す菌株を選抜した。そのために、ばか苗病菌汚染イネ（品種、短銀坊主）種子を各非病原性菌株の培養液に浸せき処理した後に播種、ばか苗病の発病度が無処理対照に比べて低下した菌株を選抜した。

選抜した菌株は、形態および分子生物学的性状に基づいて同定を行った。

さらに、開花期のイネ（品種、短銀坊主）の花器に各非病原性菌株の培養液を噴霧処理、2 時間後にばか苗病菌を同様に花器に噴霧接種し、形成された種子のばか苗病発病度を調査した。

(3) 蛍光タンパク質発現株を利用した動態観察に基づく作用機作の解析

蛍光タンパク質でラベルしたばか苗病菌および非病原性菌株を用い、花器への噴霧接種／処理し、その後の動態を蛍光顕微鏡等を

利用して観察、その結果に基づき、非病原性菌によるばか苗病発病抑制の作用機作を考察した。

4. 研究成果

(1) イネ組織に定着性を有する非病原性株の選抜

ばか苗病発生圃場で、病徴を示していないイネ植物体を主な対象とし、採集、表面殺菌後に、選択培地等を用いて非病原性 *Fusarium* 属菌約 200 株を分離した。これらの菌株を、すでにイネから分離・収集、保存済みの非病原性 *Fusarium* 属菌株（約 50 株）と併せて以降の試験に供試した。

(2) ばか苗病発病抑制効果を持つ非病原性株の選抜 ばか苗病菌人工汚染種子を、上記で選抜した非病原性株の孢子懸濁液に浸漬処理、その後、播種・栽培し、ばか苗病によって顕わされる立枯れ・黄化・徒長等の病徴を抑制する効果を示すか、をポット試験で検定、発病抑制効果を示す非病原性株 4 株を選抜した（図 1）。

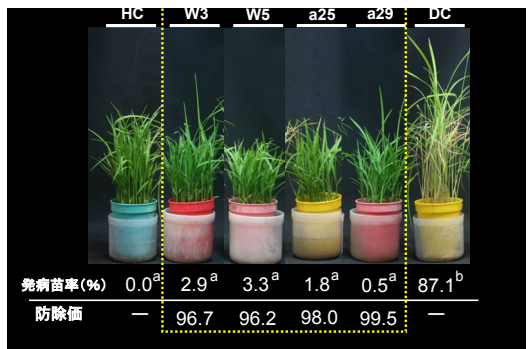


図 1 非病原性 *Fusarium* 属菌 4 株（W3、W5、a23、a29）のイネばか苗病発病抑制効果（イネ品種、短銀坊主）

選抜した菌株は、形態観察と分子解析によって、2 株を *F. oxysporum*、残り 2 株を *F. proliferatum* と同定、保存した（表 1）。

表 1 イネばか苗病発病抑制効果を示す 4 株の非病原性 *Fusarium* 属選抜菌株の同定と由来

菌株	種	分離源	
		採集場所	サンプル
W3	<i>Fusarium oxysporum</i>	宮城県 黒川郡大郷町	健全イネ
W5	<i>F. oxysporum</i>	青森県 南津軽郡田舎館村	健全イネ
a25	<i>F. proliferatum</i>	Tien Giang省	罹病イネ
a29	<i>F. proliferatum</i>	Tien Giang省	罹病イネ

(3) 花器処理によるばか苗病防除効果の検定

選抜した 4 株のうち、国内産の 2 株（W3 および W5）の非病原性 *F. oxysporum* の孢子懸濁液（ 1.0×10^5 spores/ml）を、ポットで栽培、開花期のイネ（品種、短銀坊主）の花器へ噴霧処理、2 時間後に、ばか苗病菌（ 1.0×10^3 spores/ml）を接種、種子を調製・採種した。この種子を播種し、ばか苗病の発病度を調査したところ、非病原性 *F. oxysporum* 無処理の対照区に比べて、ばか苗病発病の抑制効果を認めた（図 2）。このように、開花期の花器への非病原性 *F. oxysporum* の処理がばか苗病菌の次世代への種子伝染を抑制することを見いだした。

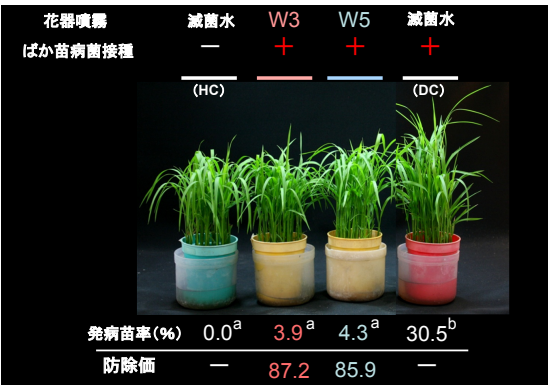


図 2 非病原性 *F. oxysporum* 菌株（W3、W5）の花器噴霧処理によるイネばか苗病種子伝染抑制効果（イネ品種、短銀坊主）

さらに、非病原性 *F. oxysporum* 菌株を花器処理して採種したイネ（品種、短銀坊主）種子の催芽時にばか苗病菌を接種した場合にも発病度が低下することを見いだした。これは、非病原性 *F. oxysporum* 菌株を花器処理で種子に仕込むことによって次世代での隣接株からのばか苗病の感染をも抑制できる可能性を示した。

東京都府中市、青森県黒石市、宮城県大崎市の圃場において、開花時の花器への非病原性 *F. oxysporum* 菌孢子懸濁液の噴霧試験を行ったところ、ポット試験と同様に、採種した種子の次世代におけるばか苗病の発病を有意に抑制し（図 3、表 2）、圃場レベルでの有効性を示した。



図3 非病原性 *F. oxysporum* 菌株 (W3、W5) の花器噴霧処理によるイネばか苗病種子伝染抑制効果 (2012 年度、イネ品種、短銀坊主)。東京都府中市の圃場試験の結果。感染源は、隣接して栽培した感染コシヒカリ

表2 非病原性 *F. oxysporum* 菌株 (W3、W5) の花器噴霧処理によるイネばか苗病種子伝染抑制効果 (2013 年度、イネ品種、短銀坊主)。東京都府中市の圃場試験の結果。感染源は、隣接して栽培した感染コシヒカリ

試験区 A

処理	発病苗率	防除価
対照	8.4	
W3	0.5	94.2
W5	1.0	88.6

試験区 B

処理	発病苗率	防除価
対照	22.2	
W3	4.5	79.7
W5	7.4	66.7

平成 24 年度の圃場試験で得た、W3 または W5 処理済みイネ (品種、短銀坊主) 種子の催芽時にばか苗病菌を接種した。種子の保存期間 39 日では、ばか苗病の防除価はそれぞれ 62.0 と 94.5、保存期間 422 日で防除価はそれぞれ 33.2 と 24.2 であり、長期に亘り種子を保存した場合、やや効果は落ちるものの発病抑制効果が継続する事を示した (表 3)。また、処理した非病原性 *F. oxysporum* の残存を再分離によって確認した。

表3 2012 年度に府中圃場試験で非病原性 *F. oxysporum* を処理、採種した種子を 422 日間の保存後にばか苗病菌を接種したところ、発病抑制が認められた

処理	発病苗率	防除価
対照	23.3	
W3	15.5	33.2
W5	17.6	24.2

(4) 非病原性菌株の植物組織内動態観察と作用機作の考察

イネばか苗病菌 *Gibberella fujikuroi* (Gf) に赤色蛍光タンパク質遺伝子を導入した株 (Gf-RFP) と、非病原性 *F. oxysporum* W5 株に緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した株 (W5-GFP) を、イネ穎花に噴霧接種して、経時的に動態を観察した。Gf-RFP 単独接種の穎花中の穎果では、表皮のみならず、横細胞管細胞層、種皮、胚乳など穎果内部の組織でも Gf が見られた。W5-GFP 単独処理の穎果では、表皮で W5 が見られたが、内部の組織ではほとんど観察されなかった。W5-GFP 処理の 10 分後に Gf-RFP を接種した場合、穎果表皮で両菌が見られたが、表皮より内部の組織で Gf が見られることはほとんどなかった (図 4)。

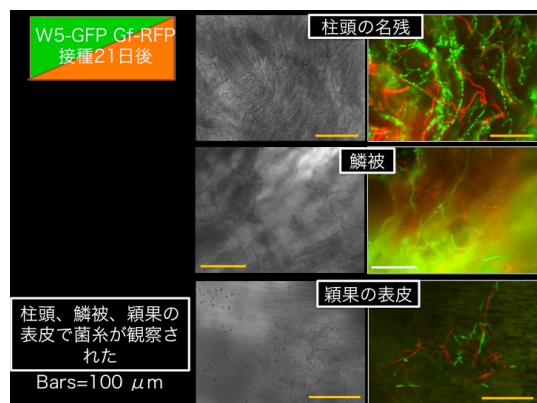


図4 非病原性 *F. oxysporum* W5 を処理する とばか苗病菌の花器経由での侵入は穎果の表面に留まる (イネ品種、短銀坊主)

これらのことから、W5 前処理によって、Gf の穎果内部への進展が抑制され、これが W5 によるばか苗病生物防除の機作の一つであることが示唆された (図 5)。

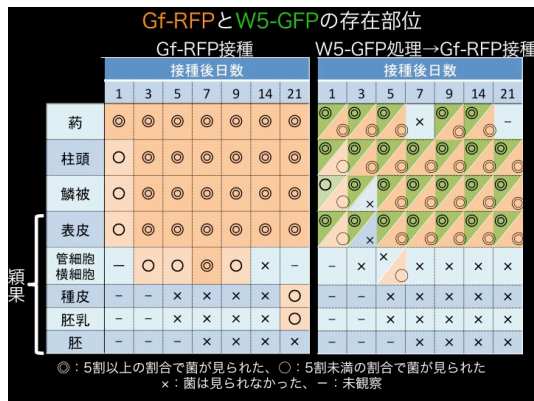


図5 非病原性 *F. oxysporum* W5 処理によって、Gf の穎果内部への進展が抑制され、これが W5 によるばか苗病生物防除の機作の一つと考えられた

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)

〔学会発表〕(計5件)

- ① 田中 淳、加藤亮宏、徳永智美、寺岡徹、小松 健、有江 力、イネばか苗病菌と生物防除資材候補菌のイネ穎花および種もみにおける動態、平成26年度日本植物病理学会大会、平成26年6月3日、札幌市
- ② 有江 力、微生物防除剤の課題と将来展望、第6回環境保全型農業シンポジウム、平成26年3月10日、江東区
- ③ 有江 力、微生物殺菌剤の現状とブレークスルーに向けて、第18回農薬相模セミナー、平成26年1月9日、綾瀬市
- ④ 加藤亮宏、野中陽子、徳永智美、田中 淳、倉内賢一、鈴木智貴、寺岡 徹、有江 力、非病原性 *Fusarium oxysporum* のイネ花器への噴霧処理によるばか苗病生物防除、平成25年度日本植物病理学会大会、平成25年3月30日、岐阜市
- ⑤ 加藤亮宏、野中陽子、徳永智美、田中 淳、倉内賢一、鈴木智貴、寺岡 徹、有江 力、イネばか苗病生物防除のための非病原性 *Fusarium* 属菌の 新規処理方法、第38回日本農薬学会大会、平成25年3月15日、茨城県つくば市

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

- ①名称：育苗期病害耐病性植物種子の製造方

法及び育苗期病害の発病予防及び防除方法
 発明者：有江 力、寺岡 徹、野中陽子、加藤亮宏、田中 淳、徳永智美、倉内賢一、鈴木智貴
 権利者：有江 力、寺岡 徹、野中陽子、加藤亮宏、田中 淳、徳永智美、倉内賢一、鈴木智貴
 種類：特許
 番号：願 2013-047121
 出願年月日：2013年03月08日
 国内外の別：国内

②名称：育苗期病害耐病性植物種子の製造方法及び育苗期病害の発病予防及び防除方法
 発明者：有江 力、寺岡 徹、野中陽子、加藤亮宏、田中 淳、徳永智美、倉内賢一、鈴木智貴
 権利者：有江 力、寺岡 徹、野中陽子、加藤亮宏、田中 淳、徳永智美、倉内賢一、鈴木智貴
 種類：特許
 番号：PCT/JP2014/056059 (願 2013-047121 を基礎とする優先権出願)
 出願年月日：2014年03月07日
 国内外の別：国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有江 力 (ARIE, Tsutomu)
 東京農工大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：00211706

(2) 研究協力者

加藤亮宏 (KATO, Akihiro)
 東京農工大学・農学部・産学連携研究員

田中淳 (TANAKA, Jun)
 東京農工大学・大学院農学府・修士課程学生

徳永智美 (TOKUNAGA, Tomomi)
 東京農工大学・大学院農学府・修士課程学生

倉内賢一 (KURAUCHI, Kenichi)
 青森県産業技術センター農林総合研究所・研究管理員

鈴木智貴 (SUZUKI, Tomotaka)
 宮城県古川農業試験場・研究員