

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660016

研究課題名(和文)エンドファイト共生イネ科植物混植による園芸作物の線虫防除

研究課題名(英文) Biocontrol of parasitic nematodes by using endophyte infected plants as companion planting for horticultural crops

研究代表者

古賀 博則 (KOGA, Hironori)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：60290079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： エンドファイト共生のイネ科植物を園芸作物(トマト、イチジク)と混植した結果、対照のエンドファイト非共生植物との混植や単作区と比較して、サツマイモネコブセンチュウによる根こぶ発生が顕著に抑制された。これと同様な結果は、家畜毒性がなくて耐虫性アルカロイドを産生するエンドファイトでも得られた。また、土壌中の本線虫をメタゲノム法で定量する方法を確立した。

他方、イチジクではトマトと異なって、本線虫は卵のうを根内に形成し、そこで二期幼虫が孵化することを明らかにした。また、巨大細胞内の三次元の微細構造の観察結果は、管状の小胞体が養水分の移動や線虫の主な体成分である脂質合成に関わっていることを示唆した

研究成果の概要(英文)： The results demonstrated that some of Neotyphodium endophyte-infected grasses were available as companion plants for tomatoes and/or fig trees to protect from *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). The similar results were gained by using non-toxic endophyte infected grasses. Also, quantitative detection method of the nematode from soil was established by using soil compaction and real-time PCR.

It was also clarified that in fig trees most of egg sacs were formed by root-knot nematodes inside of their roots. It is in contrast with those in tomatoes in which most of egg sacs were formed outside of their roots. The observations using osmium maceration coupled with field emission scanning electron microscopy suggest that tubular ER functions as vascular bundles in giant cells, facilitating the transport of nutrients. We propose that lipids and steroids are synthesized at the smooth branched ER and stored in the capsule-shaped structures until needed by the nematode.

研究分野：植物病理学、植物共生菌、線虫

キーワード：エンドファイト サツマイモネコブセンチュウ 生物防除 混植 トマト イチジク

1. 研究開始当初の背景

(1) サツマイモネコブセンチュウ

Meloidogyne incognita は、寄主範囲が広く、植物の根に根こぶを形成する。これにより、作物の生育不良や商品価値の低下が生じ、減収被害を引き起こす。ネコブセンチュウの防除には土壌消毒が一般的だが、食の安心安全や環境保全型農業への関心の高まりから、化学農薬に依存しない生物防除法の開発が求められている。もし、家畜毒性のないエンドファイト共生植物の混植による線虫防除ができるようになれば、この方法を本線虫防除に普及できるものと考えられる。

(2) サツマイモネコブセンチュウ防除をより効果的に行えるようにするためには、本線虫の寄主植物への寄生、養分吸収、卵のう形成などについての基礎的知見を把握しておく必要がある。これまで、サツマイモやトマトなどでは研究されているが、イチジクなど木本の多年性作物については試料作製の困難さから詳細な研究報告は見当たらない。また、本線虫は未分化の維管束細胞から誘導された巨大細胞からのみ養分を吸収するが、巨大細胞内での養分の形成や本線虫の巨大細胞からの養分吸収機構はほとんど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

(1) エンドファイト共生植物との混植による根こぶ被害の軽減技術の開発

エンドファイト共生植物を混植することによって園芸作物の根こぶ発生の軽減技術の開発を目的とする。エンドファイトには家畜毒性のアルカロイドを産生するものが多いため、家畜毒性のないエンドファイト共生植物を探索し、それを利用した根こぶ防除法の確立を目指す。

(2) 土壌中の本線虫のリアルタイムPCRを用いた定量法の確立

より迅速で、正確な診断が可能なメタゲノム法(リアルタイムPCRによる土壌中線虫密度の推定)を用いて、土壌中の本線虫の定量法の確立を目指す。

(3) 本線虫の寄主植物への寄生機構の解明

エンドファイトの分泌アルカロイドによるネコブセンチュウ防除が、より効果的に行えるように、本線虫の寄主植物への寄生、養分吸収、卵のう形成などについての基礎的知見を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 供試した牧草・芝草の品種とエンドファイト共生率の調査法

牧草・芝草品種とロシア国で収集したトールフェスク品種(ブリアンガルスカヤ)を用いた。これらの植物の種子内のエンドファイト共生率を古賀(1994)の方法で調査した。

(2) 供試した線虫と園芸作物

サツマイモネコブセンチュウ(*Meloidogyne incognita*)の二期幼虫を接種に用いた。園芸作物として、トマト(品種:強力米寿)およびイチジク(品種:セレストブルー)を供試した。トマトはポットに育苗培土を入れ、播種1ヶ月後に混植に使用した。イチジクは挿し芽を使用し、温室で栽培し、根がポットの底まで張り巡らせたものを混植に使用した。

(3) エンドファイト共生イネ科植物と園芸作物との混植および線虫接種法

各のエンドファイト共生植物との混植によって、根こぶ発生が抑制されるかどうかを試験するために、園芸作物のみ栽培(以下、単独と表記する) エンドファイト非共生植物と園芸作物と

の混植（以下、E - ） エンドファイト共生植物と園芸作物との混植（以下、E + ）の3区を設けた。そこに本線虫をMiyashita et al.(2014)の方法で接種した。根こぶ発生検定のための発生程度は、線虫実験法(2004)に準拠した。

(4) エンドファイトの産生するアルカロイドの定量

エンドファイトは耐虫性アルカロイド（ペラミン、ロリンアルカロイド）、家畜中毒アルカロイド（ロリロレム B、エルゴバリン）を産生する。ロシアで収集したブリアンガルスカヤについて上記5種のアルカロイドについて、各含有量の測定を（財）日本食品分析センターに依頼した。

(5) 土壌中のサツマイモネコブセンチュウのリアルタイムPCRを用いた定量法

石川県立大学ガラス温室内のトマト圃場から土壌を採取し、線虫無検出土壌を作製した。これに任意の頭数（0,1,5,25,125,1000頭）の線虫を添加し、線虫のDNAを抽出した。これを鋳型として、リアルタイムPCRを行い、計測されたCt値（PCR増幅産物量が閾値に達したときのサイクル数）と各線虫添加頭数の関係から検量線を作成した。

(6) エンドファイト共生トールフェスクからの抽出物が本線虫の行動に及ぼす効果試験

エンドファイトが産生したアルカロイドが、本線虫にどの濃度で、どのように抑制効果を示すかを調べる目的で、ブリアンガルスカヤの幼苗を、エンドファイト共生したもの、共生していないものに分けて、それぞれからクロロホルム-メタノール(2:1)で組抽出した。減圧下で濃縮・乾涸した抽出液を、10~23匹の線虫を放飼したホールスライドにそれぞれ50μlずつ滴下し、線虫の運

動性に対する影響を経時的に調査した。また、抽出液を1/10、1/100に希釈して同様の実験を行った

(7) 走査電顕観察

根こぶの徒手あるいはマイクロスライサー切片を、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウム固定後にエタノール脱水し、凍結乾燥後に白金を蒸着し、高分解能走査電顕S4700で観察した。

(8) オスミウム浸軟処理による高分解能走査電顕観察

細胞内のオルガネラ内の三次元構造を観察するため、Koga et al.(1991)の方法でオスミウム浸軟処理を行った後、高分解能走査電顕S4700で観察した。

4. 研究成果

(1) エンドファイト共生イネ科植物の混植による根こぶ防除試験

トマト（品種：強力米寿）の根を調査したところ、エンドファイト共生ペレニアルライグラス（E+）混植区では、エンドファイト非共生ペレニアルライグラス（E-）混植区およびトマト単植区と比較して根こぶの発生程度が顕著に抑制されていた。また、イチジク（品種：セレストブルー）の根でも同様に（E+）混植区では、根こぶの発生程度が有意に抑制されていた。

(2) 家畜毒性のないエンドファイトの探索

ロシア国で収集したトールフェスクのアルカロイド分析の結果、家畜毒性アルカロイドのエルゴバリンとロリトレムBそして耐虫性活性のあるペラミンは検出されず、耐虫性活性アルカロイドのN-ホルミルロリンとN-アセチルロリンがそれぞれ3483ppmと716ppm検出された。

(3) 家畜毒性のないエンドファイト共生イネ科植物の混植による根こぶ防除

家畜毒性アルカロイドを産生しないエンドファイト共生トールフェスクをトマトと

混植した結果、エンドファイト共生ペレニアルライグラス (E+) 混植区では、エンドファイト非共生ペレニアルライグラス (E-) 混植区およびトマト単植区と比較して根こぶの発生程度が有意に抑制されていた (図 1)。

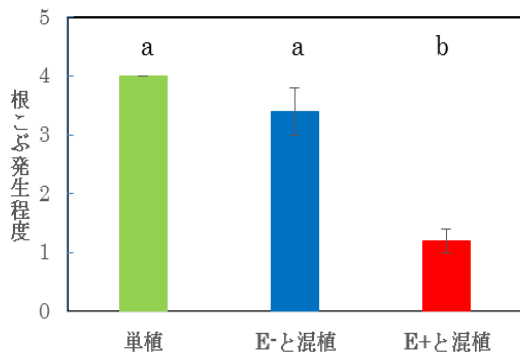


図 1 家畜毒性のないエンドファイト共生トールフェスクの混植がトマトの根こぶ発生に及ぼす影響 図中の異なる英字間には 5%水準で有意差あり (Tukey 法) パーは標準誤差を示す。

(4) 土壌中のサツマイモネコブセンチュウのリアルタイム PCR を用いた定量法の確立

線虫無検出土壌 20g に線虫を 0, 1, 5, 25, 125, 1000 頭添加したときの、Ct 値はそれぞれ 33.2 ± 1.3 , 33.2 ± 1.9 , 31.0 ± 3.0 , 28.0 ± 1.0 , 26.5 ± 0.5 , 26.4 ± 6.8 (平均 \pm 標準偏差) であった。その結果、 $y = -2.790x + 33.96$ ($R^2 = 0.941$) という有意な回帰式 (検量線) が得られた。このことにより、今後同圃場の土壌中線虫密度の定量化が可能と考えられる。

(5) エンドファイト共生植物からの抽出液が本線虫の行動に対する抑制効果の検定

エンドファイト共生植物からの抽出液の原液 (ロリンアルカロイドを 3900ppm 含むと考えられる) および 1/10 希釈液処理区では、線虫の行動が処理 1 時間後に

は有意に抑制された。しかし、1/100 希釈液区では、蒸留水およびエンドファイト非共生植物からの抽出液と同様に、行動の抑制は認められなかった。

(6) 本線虫の卵のう形成部位のトマトとイチジクでの比較

本線虫はイチジクでもトマトなど同様に寄主細胞に巨大細胞形成を誘導し、巨大細胞を取り囲むように木部を配置していた。しかし、イチジクでは卵のうが主に根内に形成され、そこにふ化した二期幼虫が観察された。トマトなどでは卵のうは根外に形成されるため、イチジクでの結果と著しく異なっていた。

(7) 本線虫によって誘導された巨大細胞内の微細構造の三次元的解析

巨大細胞内では、管状の小胞体が束となって、細胞壁の内部生長部位と feeding tube (線虫が巨大細胞から養水分を吸収するための装置) と連結していたことから、これらの束状の管状の小胞体は細胞壁の内部生長部位で吸収された養水分を feeding tube へ輸送するのに関わっていることが示唆された。

また、巨大細胞内には滑面小胞体が詰まったカプセル状のものが散在していた。滑面小胞体は脂質やステロイド類の生合成に関わっており、他方ネコブセンチュウは脂質やステロイド類を自ら生合成することはなく外部から吸餌することが知られている。これらのことから、この滑面小胞体で脂質とステロイド類が生合成され、線虫が吸餌するまでカプセル内に貯蔵されていると推測される。

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 2 件)

MIYASHITA, N. AND KOGA, H. (2017)
Three-dimensional ultrastructure of feeding tubes and interconnected

endoplasmic reticulum in root-knot nematode-induced giant cells in rose balsam. *Protoplasma* 査読有、DOI 10.1007/s00709-016-1072-x.

一柳 友祐・宮下 奈緒・藪 哲男・古賀博則 (2016) イチジク根に寄生したサツマイモネコブセンチュウの卵のう形成の光学顕微鏡および走査電子顕微鏡観察. 北陸病虫研報、査読有、Vol.65、pp.15-20.

〔学会発表〕(計7件)

上田 瞭、*Neotyphodium* エンドファイト共生植物の混植によるトマト及びイチジクの線虫防除. 第69回北陸病虫研究会、2017年2月16日、富山市、富山県民共生センター、サンフォルテ

鈴木優里、サツマイモネコブセンチュウによってハウセンカ根に誘導された巨大細胞の高分解能走査電子顕微鏡による観察.、第69回北陸病虫研究会、富山市、富山県民共生センター、サンフォルテ

宮下奈緒、サツマイモネコブセンチュウによってハウセンカ根に誘導された巨大細胞の高分解能走査電子顕微鏡による観察、日本線虫学会、2016年9月15日、小金井市、東京農工大学小金井キャンパス

藤澤祐里、石川県立大圃場でのリアルタイム PCR を用いたサツマイモネコブセンチュウの定量法の確立、第68回北陸病虫研究会、2016年2月18日、長野市、功労者女性会館開館しなのき

小巻諒昌、サツマイモネコブセンチュウの人工接種によってイチジク根に形成された根こぶ組織の電界放射形走査電子顕微鏡観察、第68回北陸病虫研究会、2016年2月18日、長野

市、功労者女性会館開館しなのき
一柳友祐、サツマイモネコブセンチュウが感染したイチジク根の光顕および走査電顕観察、第67回北陸病虫研究会、2015年1月28日、長岡市、長岡グランドホテル
古賀博則、ロシア国で収集したトールフェスクからの *Neotyphodium* エンドファイト菌の分離・培養と我が国の牧草への人工接種による感染、日本菌学会第58回大会、2014年6月13日石川県小松市、サイエンスヒルズこまつ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 博則(KOGA, Hironori)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号：60290079

(2) 研究分担者

高原 浩之(TAKAHARA, Hiroyuki)

石川県立大学・生物資源環境学部・
准教授

研究者番号：30397898