

平成 31 年 2 月 22 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07811

研究課題名(和文) 茎葉散布型の土壌病害用微生物農薬の開発

研究課題名(英文) Development of foliar spray-type biopesticide against soil-borne diseases

研究代表者

清水 将文 (SHIMIZU, Masafumi)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60378320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：茎葉散布型の土壌病害防除用微生物農薬の開発を目指し、トマトから内生バチルス83株分離した。次に、分離菌株の青枯病抑制効果をトマト幼苗試験で評価し、効果の高かった7菌株を選抜した。続いて、これら7菌株をトマト苗の茎葉に処理し、青枯病抑制効果を検定した。その結果、GEBT457株が安定した抑制効果を発揮したことから、同菌株を最終候補株として選抜した。GEBT457株の茎葉散布処理による青枯病防除効果を汚染圃場で試験した結果、発病を約40-50%抑制したことから、同菌株は圃場条件下でも防除効果を発揮することが確認された。また、同菌株の防除機構には病害抵抗性誘導が関与する可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a novel microbial pesticide which can control soil-borne diseases by foliar application. For this purpose, we recovered 83 isolates of endophytic *Bacillus* spp. from tomato plants. By the preliminary screening using a tomato seedling assay, we selected 7 isolates, which showed >60% protection against tomato bacterial wilt (TBW), as primary biocontrol candidates. Subsequently, we tested the biocontrol effect of foliar application of the candidate isolates in pot experiments. As a result, an isolate GEBT457 showed the highest and stable suppressive effect against TBW. Accordingly, the isolate GEBT457 was selected as a final candidate. In the field experiments, foliar spraying of the isolate GEBT457 suppressed wilt incidence by about 40-50%, suggesting that this isolate was effective even under the field conditions. The result of gene expression analysis indicated that the candidate isolate induced systemic resistance in tomato plants.

研究分野：植物病理学

キーワード：青枯病 萎凋病 生物防除 内生細菌 茎葉散布

### 1. 研究開始当初の背景

土壤伝染性病害に対する生物防除法の検討が永らく行われてきたが、実用化に至った例は極めて少なかった。その原因は、拮抗微生物の処理方法にあった。従来の研究では、拮抗微生物を土壤あるいは対象植物の根に投入されてきたが、土着の微生物との生存競争に負け、拮抗微生物の生息密度が急激に低下し、防除効果が失われてしまうことが問題となっていた。そのため、拮抗微生物の追加投与が必要であったが、有効土層や根系全体に十分量の拮抗微生物を追加投入することは技術的にもコスト的にも困難であった。このことから、低コスト且つ簡便に拮抗微生物を追加投入し、土壤病害を防除する方法の開発が必要であった。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、低コストで追加投入が簡単に行える茎葉散布により土壤病害を抑制できる新規微生物農薬の開発である。なお、本研究では、数ある土壤病害の中でも被害が大きく、且つ難防除とされるトマト青枯病を防除の主対象として研究を進めることとした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 芽胞形成性の内生バチルス属菌の分離

茎葉散布では、散布される拮抗微生物が乾燥に晒されるため死滅しやすい。このことから、乾燥に強い耐性を示す芽胞を形成し、且つ乾燥ストレスの影響を受けにくい植物体内に内部共生するバチルス属菌が生物防除エージェントとして適していると考えられた。本研究では、効率的に青枯病抑制効果を有するバチルス菌株を分離するため、つぎのような手順で細菌の分離を行った。まず、トマト苗の茎葉を土壤懸濁液に1時間浸し、2日後に苗の株元に青枯病菌を接種した。それらの苗を7日間培養し、青枯病を発病しなかった株をバチルス菌の分離源として用いた。トマト苗から切り取った組織片をエタノール、炎、次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後、磨砕した。つぎに、磨砕液を80℃で10分間加熱処理し、冷却後、NA培地に塗抹した。培養後、培地上に出現したコロニーを純粋分離するとともに、分離菌株の16S rRNA遺伝子の部分配列を解析して同定を行った。

#### 2) シードリングアッセイ

分離したバチルス菌株の青枯病抑制効果を以下に記したシードリングアッセイ法で評価した。植物試験管に滅菌パーミキュライトを詰め、トマト種子(品種:ポンテローザ)を10粒播種した。そこへ、青枯病菌と分離バチルス菌の細胞懸濁液を接種し、28℃で1週間培養した。トマト苗の発病程度に基づいて4段階の発病指数に分類し、対照区に比べて平均発病指数を60%以上低下させたバチルス菌株を選抜した。

#### 3) ポット試験

上述のシードリングアッセイで選抜したバチルス菌株が茎葉散布で青枯病を抑制できるかをポット試験で検定した。3葉期のトマトポット苗(品種:桃太郎)に選抜バチルス菌株の細胞懸濁液( $OD_{600}=0.5$ 、Silwet-L77を0.01%添加)をスプレー接種し、その3日後に青枯病菌を灌注接種し、30℃の温室内で3週間栽培を続けた。栽培期間中、5日毎にバチルス菌の細胞懸濁液を散布した。トマト苗の発病の様子を経日的に観察して5段階の発病指数に分類するとともに、調査最終日にAUDPC(病勢進展曲線下面積)を求めた。この試験で最も効果の高かった1菌株については、16S rRNA遺伝子の全長配列を用いた系統解析を行った。

#### 4) 圃場試験

上述のポット試験で安定した発病抑制効果を示した1菌株(GEBT457株)を候補株として選抜し、青枯病汚染圃場における防除効果を検討した。試験は、岐阜大学構内にある青枯病菌汚染圃場で行った。まず、ポットに鉢上げした3葉期のトマト接ぎ木苗(台木:マグネット、穂木:TYミソラ86)に、GEBT457株の細胞懸濁液( $OD_{600}=0.5$ 、Silwet-L77を0.01%添加)を7日および14日間隔で散布(10ml/株)して8-9葉期に達するまでプラスチックハウス内で栽培した。対照として、GEBT457株を散布せずに栽培した苗を準備した。これらの苗を慣行通り土壤のpH矯正および施肥を行った汚染圃場に定植(1区6苗の4反復)し、1ヶ月間栽培した。なお、栽培期間中も選抜菌株の細胞懸濁液を7日および14日間隔で散布(10ml/株)した。発病状況の調査は毎日実施した。

#### 5) トマト萎凋病に対するGEBT457株の防除効果の検討

GEBT457株のトマト萎凋病(病原菌:*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*、以下FOL)に対する防除効果を検討した。上記3)と同様に3葉期トマト苗にGEBT457株をスプレー接種し、その3日後にFOLの孢子懸濁液を灌注接種した。GEBT457株を7日間隔で散布しながら、30℃の温室内で3週間栽培し、発病を調査した。4段階の発病指数で評価し、その値を用いてAUDPCを算出した。

#### 6) トマト苗へのGEBT457株の定着力の評価

茎葉散布したGEBT457株がトマト苗の葉および茎の内部に定着するのかを調査した。GEBT457株の各種抗生物質に対する耐性を検定した結果、カナマイシンに高度の耐性を示すことが明らかとなった。このことから、同菌株の検出には、カナマイシンを50ppm添加したNA培地を用いることにした。3葉期トマト苗にGEBT457株の細胞懸濁液( $OD_{600}=0.5$ 、Silwet-L77を0.01%添加)を茎葉散布(10ml/株)した後、1、3、5、7、9、14日後に茎

と葉をサンプリングした。それらのサンプルをエタノールと炎で表面殺菌した後、磨碎し、希釈液をカナマイシン添加 NA 培地に塗布して菌密度を測定した。

#### 7) 防御関連遺伝子の発現解析

GEBT457 株は茎葉散布で土壌伝染性の青枯病を抑制することから、その作用には病害抵抗性の誘導が関与すると予想された。そこで、GEBT457 株で処理して 5 日後のトマト苗における防御関連遺伝子 (*PR-1a*、*LoxD*、*Osmotin-like protein*) の発現量を qRT-PCR 法で測定した。

#### 8) GEBT457 株の培養に適した培地の検討

上述の試験では、GEBT457 株を NB 培地で培養してきた。しかし、増殖が極めて緩慢であったため、NB 培地は増殖用培地としては不適当と考えられた。そこで、NB 培地、TSB 培地、LB 培地で同菌株を 24 時間振とう培養し、増殖を比較した。

### 4. 研究成果

#### 1) 芽胞形成性の内生バチルス属菌の分離

トマト苗から合計 83 菌株(葉から 68 菌株、茎から 3 菌株、根から 12 菌株)のバチルス属菌を分離した。

#### 2) シードリングアッセイ

分離した 83 菌株の青枯病抑制効果をシードリングアッセイで検定した結果、54 菌株が抑制効果を示した(図 1)。中でも 8 菌株 (GEBT443, 445, 457, 460, 490, 491, 492, 512) が防除価 60 以上という高い効果を示した。ただし、GEBT492 株はその後の分子同定でヒト病原菌の近縁種と判明したため、候補から除外した。これにより、残りの 7 菌株をポット試験に供試することとした。

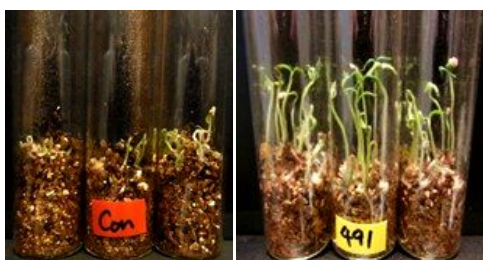


図 1. シードリングアッセイでトマト青枯病を抑制するバチルス菌株の例。(左) 对照区、(右) GEBT491 株処理区

#### 3) ポット試験

2) で選抜した 7 菌株の防除効果をポット試験で検定した。防除効果の再現性を確認するため、この試験は 3 回繰り返して実施した。その結果、3 回の試験を通じて安定して優れた防除効果を発揮したのは GEBT457 株のみ(防除価 63~79)であった(図 2)。このことから、GEBT457 株を候補株として選抜し、つぎの圃場試験に供試することとした。



図 2 ポット試験における GEBT457 株の防除効果。(左) 对照区、(右) GEBT457 株処理区

なお、GEBT457 株は、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析の結果、*Bacillus shackletonii* に近縁な種であることが明らかとなった(図 3)。

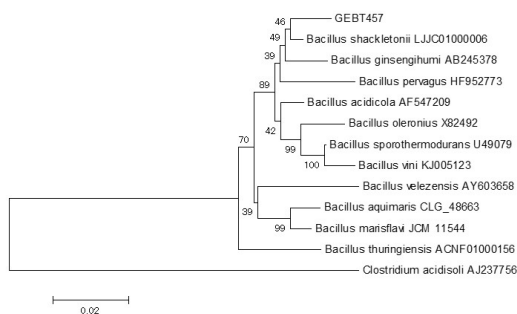


図 3 16S rRNA 塩基配列に基づいて作成した GEBT457 株の分子系統樹

#### 4) 圃場試験

青枯病汚染圃場に定植したトマト苗に GEBT457 株を 7 日および 14 日間隔で散布し、防除効果を検証した。この試験は 2 回実施した。その結果、GEBT457 株処理区で青枯病の発生が約半分程度に抑制された。散布頻度の違いによる防除効果を比較すると、7 日間隔と 14 日間隔のどちらも同程度の防除効果を発揮した(表 1)。この結果から、GEBT457 株は実際の圃場条件下でも青枯病を抑制できる菌株であることが確認された。

表 1 汚染圃場での GEBT457 株の防除効果

| 処理区     | 平均防除価( AUDPC ベース ) |
|---------|--------------------|
| 7 日間隔区  | 44                 |
| 14 日間隔区 | 51                 |

#### 5) トマト萎凋病に対する GEBT457 株の防除効果の検討

GEBT457 株がトマト萎凋病にも抑制効果を示すかをポット試験で検証した結果、3 回の反復試験のうちの 2 回で一定の防除効果(防除価 20 および 60)を発揮した。このことが

ら、同菌株はトマト萎凋病抑制効果にも有効であると考えられた。

#### 6) トマト苗への GEBT457 株の定着力の評価

GEBT457 株を茎葉散布したトマト苗の茎葉を表面殺菌した後、それらから同菌株の再分離を行った。その結果、いずれの部位からも散布 1 日後には  $10^3 \sim 10^4$  cfu/g 程度の密度で同菌株が検出された(図 4)。その後、5 日後まで密度は低下していったが、7 日目以降は菌密度が回復し、 $10^2$  cfu/g 程度で安定した。このことから、GEBT457 株は、低密度ながらも茎葉の内部に定着できることが明らかとなった。

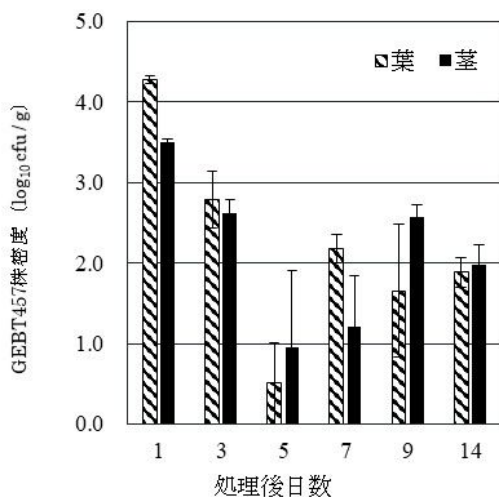


図 4 GEBT457 株のトマト茎葉内における定着密度の推移

#### 7) 防御関連遺伝子の発現解析

GEBT457 株を散布して 5 日後の防御関連遺伝子の発現を調べた結果、サリチル酸依存型の *PR-1a* は発現量に変化は見られなかったものの、ジャスモン酸依存型の *LoxD* とエチレン依存型の *Osmotin-like protein* の発現量が増加していた。このことから、GEBT457 株は、トマト苗にジャスモン酸およびエチレン依存型の抵抗性を誘導することで青枯病を抑制していると考えられた。

#### 8) GEBT457 株の培養に適した培地の検討

NB、TSB および LB 培地で GEBT457 株を振とう培養し、増殖を比較した結果、初期増殖に関しては LB 培地が良い傾向にあるが、最終的(24 時間後)な増殖量は TSB 培地が最も高かった(図 5)。一方、NB 培地で培養した場合はほとんど増殖しなかった。このことから、本菌株の培養には TSB 培地が適していると判断した。

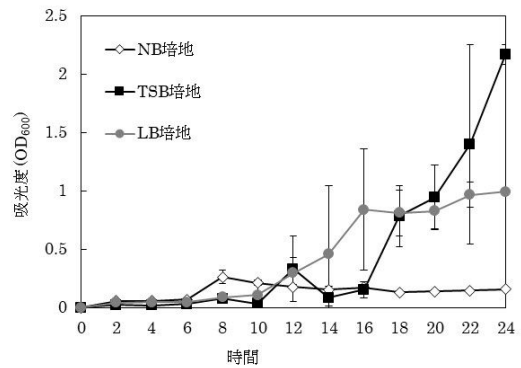


図 5 培地の違いが GEBT457 株の増殖速度に及ぼす影響

#### 9) 総括

本研究により、茎葉散布でトマト青枯病を抑制する *Bacillus* sp. GEBT457 株を見出すことに成功した。本菌株は抵抗性誘導により青枯病を抑制していると考えられるため、他の病害に対しても有効である可能性が高い。実際、再度の検証が必要ではあるが、トマト萎凋病にも一定の防除効果を発揮した。本菌株が、トマト青枯病やその他の土壌病害のみならず、うどんこ病や灰色かび病などの地上部病害にも有効であれば、1 剤で複数の病害を一度に防除可能な微生物農薬となる可能性がある。ただし、実用化に向けては、圃場での青枯病防除効果を向上させるために散布法等の更なる検討が必要であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

清水 将文 (SHIMIZU, Masafumi)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号：60378320