

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292030

研究課題名(和文) 内生細菌を利用した難防除植物細菌病の生物的防除の基盤構築

研究課題名(英文) Establishment of biological control of serious plant diseases by endophytic bacteria

研究代表者

古屋 成人 (furuya, naruto)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10211533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：トマト接ぎ木癒合組織茎内に生息する全細菌相をPCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE)法により解析するための手法を確立することに成功した。さらに世界的に被害が深刻で効果的な防除手段がない青枯細菌病を植物内の定着能が優れた内生細菌を利用することによる新規の生物的防除法の開発を試みた。接ぎ木癒合組織内に生息する優先度の高い内生細菌の中に青枯病に対する生物的防除活性の高い細菌種の選抜を行った。

研究成果の概要(英文)：The analysis method for total bacterial structure in the grafted tomato plants by denaturing gradient gel electrophoresis was established in this study. Biological control of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, which is serious disease in the world, by using endophytic bacteria was developed. The effective bacterial strains as biocontrol agents were selected among predominant bacterial endophytic species living in the grafted tomato plants.

研究分野：植物病理学

キーワード：内生細菌 接ぎ木 青枯細菌病 生物的防除 細菌群集構造 DGGE

### 1. 研究開始当初の背景

植物細菌病の防除は農薬の散布や抵抗性品種の利用によっても困難な場合が多いのが現状である。特に世界的に防除困難なナス科植物青枯病や蔬菜類軟腐病などを対象にした生物的防除の研究事例は多くあるものの、実用化に至ったものは殆どない。この原因の一つに用いる防除素材菌の対象作物への定着力の不安定性がある。これまで植物内生細菌は主として根圏や葉圏をその分離源とされてきた。しかしながら、比較的研究が進んでいる生物的防除においても、未だに導入した細菌を植物内に効率的に定着させることは容易でない。そこで本研究では、生物的防除素材菌の定着力に焦点をあて、従来顧みられることのなかった世界的にも伝統的な接ぎ木法により感染する細菌群集構造の解明を行うと同時に難防除植物細菌病の生物的防除に有効な菌の機能解析と利用技術の開発を試みようとしたものである。

### 2. 研究の目的

本課題は、世界的に防除が困難であるナス科植物青枯病や蔬菜類軟腐病などの細菌病を、植物内生細菌を利用した生物的防除法により制御するための基盤構築を行ったものである。これまでの研究成果に基づき、伝統的な接ぎ木技術において癒合組織内に高度な定着力と病害抵抗性を誘導する細菌種が存在する現象を見出している。そこで、これら内生細菌の群集構造と機能解析に基づき効果的な生物的防除素材候補菌を選抜し、難防除植物細菌病に対する発病抑制効果と防除機序を解明するための研究を展開している。本研究の目的は、環境負荷の軽減を指向した病害防除において、内生細菌を利用した難防除植物細菌病の生物的防除のための実用的利用技術の開発と学術的基盤構築を確立することである。

### 3. 研究の方法

ナス科植物の接ぎ木癒合組織内に生息する内生細菌相の群集構造を解析するとともに培養可能な内生細菌について生物的防除活性発現に密接に関与する各種の性状を分析した。さらに有望菌株の植物内での動態や植物の病害抵抗性遺伝子群の発現などの感染生理学的な検討を加えることにより防除効果の機序についての学術的知見の蓄積を行った。

#### (1) 培養可能な細菌数の測定と内生細菌の分離保存

温室内で栽培した台木と穂木のトマト苗を対象とし、栽培期間中経時的(約10日間隔)に採取した。具体的には、播種後約1ヶ月の苗の茎を切断し、接ぎ木を行い、傷口の癒合が完了する約10日目から接ぎ木部位を中心に上下1cm間隔ごとに分画しサンプルとした。各採取時期に原則3反復以上を採取

し、サンプル量を測定し、表面殺菌後、乳鉢で磨砕して内生細菌懸濁液を作製した。必要に応じて遠心分離により植物残渣を取り除き、普通寒天培地を用いた平板希釈法により懸濁液中の培養可能な細菌数を測定し、残液は超低温冷凍庫に保存し、PCR-DGGEの試料とした。普通寒天培地上に形成された集落を1サンプルから系統的に約30個ずつ爪楊枝で新鮮培地上に分離培養し、凍結保存を行った。

#### (2) PCR-DGGEによる植物内での細菌の解析手法の開発

市販のDNA抽出キットを使用して内生細菌懸濁液からDNAを抽出した。PCRプライマーとしては、細菌の16S rDNAで報告されている各種のプライマーを比較して、最も適切なプライマーの選抜を行った。同時に得られたPCR産物をDGGEに供試し、変性ゲルの濃度などについての検討を行った。DGGE解析により得られるDNAバンドパターンは画像情報として記録保存した。

#### (3) 発色蛍光遺伝子を利用した内生細菌の局在性観察

生物的防除素材候補菌にGFP発色蛍光遺伝子を導入し、蛍光顕微鏡により植物内での病原細菌と候補菌株の発光の強度と分布状況を観察した。

#### (4) 内生細菌の性状解析

菌密度制御に関係する*N*-アシル-L-ホモセリンラクトン(AHL)の産生・分解能について、AHL検出菌株を利用した画線法により検定した。また青枯病菌に対する抗菌活性をプレートクロロホルム法により調べた。さらに植物の生育に密接に関与するリン溶解性についての検討を加えた。同時にトマト幼苗の生育促進あるいは阻害菌株並びにタバコ過敏反応(HR)陽性菌株の存在の有無を明らかにし、上記性状との関連性について解析を行った。

#### (5) 発病抑制効果試験

青枯病に対する分離菌株の発病抑制効果についてトマト並びにタバコ幼苗を用い*in vitro*で行い、発病を抑制する菌株を一次選抜した。次に汚染土壌による防除活性を温室内で検定することで、生物的防除素材候補菌株を選抜した。

#### (6) 植物の応答反応解析

有望菌株による青枯病の発病抑制機構を植物側の反応から解析するために、サリチル酸経路並びにエチレン・ジャスモン酸経路に関わる抵抗性遺伝子群の発現解析をリアルタイムPCRにより行った。内生細菌を感染させたトマト幼植物より液体窒素で冷却しながら葉、茎、根と部位別にサンプルを採取し、全RNAを市販の植物RNA抽出キットにより

抽出後、cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型に各種プライマーを用いたリアルタイム PCR により抵抗性遺伝子群の発現量を解析し、内生細菌に対する植物の応答反応がどのような経路に依存しているのかを調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 培養可能な細菌数の測定と内生細菌の分離保存

接ぎ木をしていないトマト茎内からは細菌は全く分離されず、内生細菌は接ぎ木癒合組織の周辺部に生息していることが明らかとなった。内生細菌は接ぎ木作業時に感染定着するものと推察される。普通寒天培地により菌量を測定すると生重 1g 当たり約  $10^6$  cfu と一定しており、下部方向にゆっくりと移動拡散している結果が得られた。

接ぎ木癒合組織部位を中心に上下方向の各分画より培養可能な内生細菌を 474 菌株分離保存した。分離細菌について 16S rDNA の塩基配列の相同性に基づき属レベルでの推定を行った。培養可能な内生細菌は 32 属から形成され、グラム陰性ならびに陽性細菌の属数は 16 と半々であった。また分離菌株の約 40% がグラム陰性で約 60% が陽性細菌で占められていた。 *Microbacterium* 属、 *Sphingomonas* 属 *Bacillus* 属などの細菌が各分画から共通に分離され、分離頻度も高いことからこれらが優占属であることが明らかとなった (図 1)。

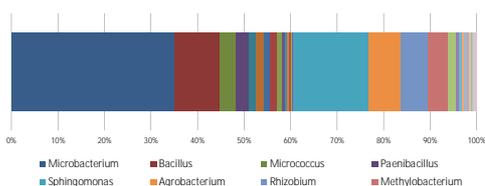


図 1 接ぎ木トマト茎内の培養可能な細菌属の構成比

##### (2) PCR-DGGE による内生細菌相の解析

植物組織内に生息する内生細菌の群集構造を PCR-DGGE により解析するためには植物由来の DNA の除去が重要となる。特に葉緑体とミトコンドリアは進化学的に細菌と同様に原核生物を同一の起源とするため 16S rDNA を標的とした PCR において、内生細菌と共通の増幅反応産物得られる。そこでこの問題を出来るだけ避ける目的で内生細菌を出来る限り特異的に増幅するプライマーの設計と PCR 条件の検討を試みた。その結果、ミトコンドリアならびに葉緑体の DNA 増幅産物をアガーローズ電気泳動により識別出来るプライマーを設計し、細菌由来と推察されるバンドから DNA を溶出させ、これを鋳型に再度細菌特異的プライマーを用いた PCR 増幅産物を用いることで、内生細菌の群集構造を DGGE 法により解析することが可能となった (図 2)。 DGGE 像のバンドをクラスター解析したところ大きく 2 つのクラス

ターを形成することが明らかとなった。クラスターには、接ぎ木部や台木部由来のサンプルの多くが含まれていた。穂木部由来のサンプルは、主に非接ぎ木植物と同じクラスターに類別された。しかし、接ぎ木 10 日目の台木部由来のサンプルはすべてクラスターではなくクラスターに類別された。

以上の結果から、接ぎ木後に茎内に定着した細菌は少なくとも 10 日間をかけて台木部に移動すると推察される。

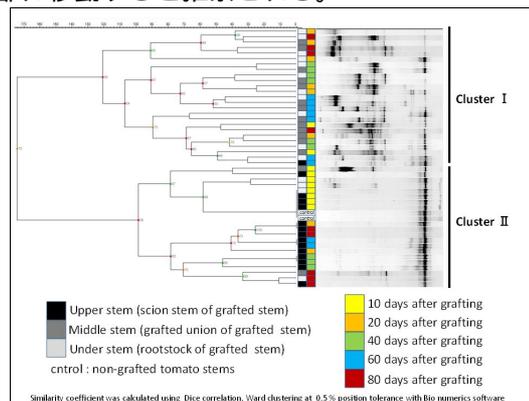


図 2 PCR-DGGE によるトマト接ぎ木茎内の細菌相の解析

##### (3) 内生細菌の特性評価

分離された内生細菌の植物生育促進に關する性状や青枯病菌の増殖を制御する生理活性物質の産生性など生物的防除活性に密接に關与する諸性質について検討した結果、各性状は菌株間で著しく異なり、多様性が認められた。

分離細菌は全て HR 陰性であり植物病原性を有する菌株は存在しないものと推察された。AHL 産生能は分離菌株の 16%、分解能は 2% の菌株で検出された。90 菌株が青枯病菌の生育を阻害する抗菌活性を有していた。このうちグラム陽性細菌では *Microbacterium* 属や *Bacillus* 属、グラム陰性細菌では *Rhizobium* 属が多くを占めていた。 *Sphingomonas* 属で抗菌活性が確認できた菌株は 6.9% に留まった。リン酸溶解活性は約 60% の菌株で検出された。根長促進する菌は 8 菌株と全体の約 2% に留まったのに対し、根長を抑制する菌は全体の約 28% にあたる 127 菌株であった。一方で、茎長促進菌は 15 菌株と約 3% 存在したが、茎長を抑制する菌株の存在は認められなかった。このことから、接ぎ木によってトマト茎内に定着する細菌は、大半がトマト幼苗の根長に影響を与えない、あるいは負の影響をもたらし、茎長には負の影響を与えないことが示唆された。

##### (4) GFP を導入した生物的防除候補菌の動態解析

青枯病発病抑制効果の高かった *Sphingomonas* 属菌株に GFPuv 標識した。GFP

導入内生細菌 *Sphingomonas* 属の sgs163 は根に定着していることが視覚的に観察された (図3)。

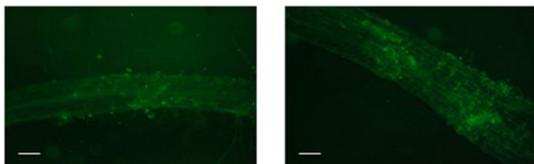


図3 GFP 導入細菌の根での定着の様子

(5) *in vitro* での青枯病発病抑制効果

供試した 474 菌株のうち、青枯病発病を全く抑制しない菌株が過半数を占めていた。一方で、発病を著しく抑制した菌株が 13.5% 存在した。顕著に発病を抑制した菌株の発病率は 35% を下回り、激しい病徴は認められなかった。

発病を著しく抑制した 35 菌株の内訳はグラム陽性細菌が 62.9%、グラム陰性細菌が 34.3% であった。発病抑制を示したグラム陽性細菌の 87.0% が Actinobacteria 綱であり、特に *Microbacterium* 属が優占していた。Bacilli 綱に関しては、*Bacillus* 属 2 菌株、*Staphylococcus* 属 1 菌株が存在した。また、グラム陰性細菌は全て  $\alpha$ -proteobacteria 綱で構成されており、その内訳は *Sphingomonas* 属 7 菌株、*Rhizobium* 属 5 菌株であった。

(6) 温室における青枯病発病抑制効果

発病度に関して有意差検定を行った結果、*Microbacterium* sp. sgs219 と *Sphingomonas* sp. sgs163 は移植後 42 日後で対照区と有意差が認められた (図4)。つまり、温室での汚染土壌でも *in vitro* の結果と同様に青枯病に対して発病抑制効果が認められた。

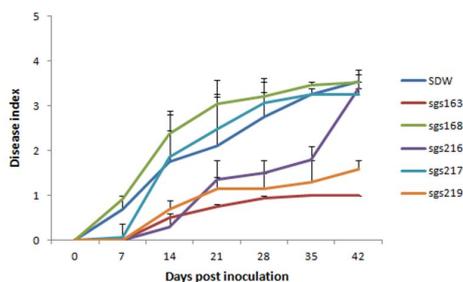


図4 内生細菌による青枯発病抑制

(7) 抵抗性関連遺伝子解析

RT-qPCR により抵抗性関連遺伝子 (*PR-1(p6)*, *NPR1*, *PR-2b*, *ERF4*, *PR-6*, *COII*) の発現誘導について解析した結果、ジャスモン酸応答性 *PR-6*, *COII*、エチレン応答性 *PR-2b*, *ERF4* およびサリチル酸応答性 *PR-1(p6)*, *NPR1* の発現は誘導されなかった。すなわち、これら遺伝子が発現する経路が活性化されなかった可能性が示唆された。

また、病原細菌 *R. solanacearum* を接種した場合でも、今回の実験で用いた抵抗性関連遺伝子の発現は誘導されなかった。ただし、この実験では青枯病菌接種後 3 日後に回収したため、接種後短時間でサンプルを回収し実験を行う必要がある。

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 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

今村友哉, 古屋 成人, 黒瀬大介, 高原令央, 土屋健二, 接ぎ木部位に定着する内生細菌の PCR-DGGE 解析と青枯病に対する発病抑制効果, 日本植物病理学会, 2016.03.23.

高原令央, 古屋 成人, 石田絵里子, 今村友哉, 竹下 稔, 土屋 健二, 接木トマト茎内から分離された内生細菌による青枯病の発病抑制機構の解析, 日本植物病理学会, 2015.03.30.

今村友哉, 古屋 成人, 黒瀬大介, 高原令央, 石田絵理子, 竹下 稔, 土屋 健二, 内生細菌による生物的防除法開発を目的とした接木トマト植物茎内細菌相の DGGE 解析, 日本植物病理学会, 2015.03.30.

高原令央, 古屋 成人, 石田絵理子, 今村友哉, 吉本翔二, 竹下 稔, 土屋 健二, 接木トマト茎内から分離された内生細菌の生物的防除素材の選抜, 日本植物病理学会, 2014.06.03.

今村友哉, 古屋 成人, 黒瀬大介, 高原令央, 石田絵理子, 竹下 稔, 土屋 健二, PCR-DGGE 法による接木トマト植物茎内細菌相の解析手法の検討, 日本植物病理学会, 2014.06.03.

石田絵理子, 古屋 成人, 城野隆宏, 今村友哉, 高原令央, 黒瀬大介, 竹下 稔, 土屋 健二, 接木トマト茎内に生息する培養可能な内生細菌群集構造の解析, 日本植物病理学会, 2014.06.03.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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

古屋 成人 (FURUYA, Naruto)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：10211533

##### (2)研究分担者

土屋 健一 (TSUCHIYA, Kenichi)  
九州大学・大学院農学研究院・名誉教授  
研究者番号：40150510

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )