

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：14201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850030

研究課題名(和文) 病原菌の表現型変異を利用したジャガイモ青枯病総合管理システムの構築

研究課題名(英文) Construction of integrated management system of bacterial wilt in potato using phenotypic conversion of the pathogen

研究代表者

森 太郎 (MORI, Taro)

滋賀大学・教育学部・准教授

研究者番号：90725053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：青枯病菌は培地、土壌、植物、植物磨砕液などで流動性コロニーの病原性野生株から非流動性コロニーの非病原性変異株へと表現型変異する。本研究では、植物を土壌に混和し、高含水率、高温で管理することにより、高頻度で青枯病菌が表現型変異することを明らかにした。また、非病原性変異株の生菌が高濃度でジャガイモ苗に感染すると、高い青枯病発病抑制効果が得られることを明らかにした。そのメカニズムの一つとして、植物の抵抗性誘導が示唆された。これらの結果を基に、青枯病菌汚染土壌に植物体を混和することで病原菌を表現型変異させ、その土壌でジャガイモを栽培すると青枯病の発病が抑制される管理システムを実証することができた。

研究成果の概要(英文)：The phytopathogen *Ralstonia solanacearum* undergoes spontaneous phenotypic conversion (PC) from a pathogenic (fluidal white colony) to a non-pathogenic (non-fluidal red colony) form in culture media, soil, plant, and plant homogenate. In this study, we showed that the pathogen undergoes PC at high frequency by mixing plant in soil and managing at high soil moisture and temperature. In addition, we revealed that infection of live PC mutants at high concentration to potato seedlings shows to have high protective effect against bacterial wilt disease. Furthermore, it was suggested that resistance induction in plants is involved in the suppression of bacterial wilt by PC mutants. Based on these results, we demonstrated a management system to control potato bacterial wilt by cultivating potato in soil where the pathogen underwent PC by mixing plant in *R. solanacearum* infested soil.

研究分野：栽培学

キーワード：青枯病菌 表現型変異 非病原性 ジャガイモ 生物防除 抵抗性誘導 土壌

1. 研究開始当初の背景

我が国において、ジャガイモ青枯病は九州西南暖地、鹿児島県の南西諸島および沖縄県で発生がみられ、ジャガイモ生産の大きな阻害要因となっている。本病害は地球温暖化の進行により、全国的に被害が拡大・深刻化することが懸念される。ジャガイモでは、トマトなどで効果的な防除技術である接ぎ木栽培を行うことができないため、土壌くん蒸剤などの農薬処理、土壌加熱（蒸気、熱水、太陽光）処理、および土壌還元処理による土壌消毒が一般的である。しかし、青枯病菌は土壌深部においても長期間生存可能なため、土壌消毒のみでは防除が不完全となる場合が多い。さらに、環境負荷の低減および食の安全・安心の観点から化学農薬使用量の削減が求められている。そこで、ジャガイモ青枯病の防除には、複数の防除法を組み合わせた総合的管理システムの構築が重要であり、化学農薬を使用しない安定的な新規防除技術の確立が必要である。

青枯病菌は、土壌中、液体培地中および寒天培地上での長期培養において、培地上に流動性のコロニーを形成する病原性野生株から非流動性のコロニーを形成する非病原性変異株へと表現型変異するが、ナス属植物内およびナス属植物磨砕液中での静置培養においても表現型変異する。これらより、植物を土壌に混和することにより青枯病菌の非病原化が促進されることが考えられる。また、トマトおよびナスに非病原性変異株を感染させることにより、青枯病発病抑制効果を付与できることが明らかになっている。トマトやナスと同じナス科のジャガイモにおいても、非病原性変異株を感染させることで、青枯病の発病を抑制することが可能であると考えられる。さらに、土壌への植物の混和により、表現型変異した非病原性変異株がジャガイモに感染することで、青枯病の発病抑制が可能になることも考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、1) 土壌への植物混和による青枯病菌の非病原化、2) ジャガイモへの非病原性変異株の感染による青枯病発病抑制という青枯病菌の表現型変異を利用したジャガイモ青枯病防除技術を確立し、接ぎ木ができないジャガイモ栽培における青枯病の総合的管理システムを構築することを目的とし、以下の3点について研究を行った。

(1) 無菌条件下で植物の磨砕液を混和した土壌において、青枯病菌を高頻度で表現型変異させる条件を明らかにし、さらに、非無菌条件下で実証試験を行い、土壌における青枯病菌の最適な非病原化技術を確立する。

(2) 高い防除効果が得られる非病原性変異株の接種方法を明らかにし、非病原性変異株の感染によるジャガイモ青枯病発病抑制技術を確立する。また、簡易検定を用いて、発病抑制効果のジャガイモ品種・系統間差異の

調査、発病抑制効果の高い非病原性変異株の選抜を行う。さらに、発病抑制メカニズムの解明のため、植物の抵抗性誘導の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性を測定する。

(3) (1), (2) で確立した防除技術とメカニズムを基にして、ジャガイモ青枯病の総合的管理システムを考察し、実証する。

3. 研究の方法

(1) 土壌への植物混和による青枯病菌の非病原化技術の確立

無菌条件下でジャガイモ磨砕液（植物体と2倍量 (v/w) のイオン交換水を磨砕）を混和した土壌に青枯病菌 8266 野生株を接種し、恒温器内で培養後、経時的に土壌から菌を分離し、菌密度および変異頻度（表現型変異菌数/分離された全菌数）を調査した。具体的には、異なる培養温度（20, 28, 35°C）、土壌の種類（パーミキュライト、培養土）、土壌含水率（20g のパーミキュライトに磨砕液 50, 100, 150g 混和）、植物の部位（地上部、地下部）、植物の処理方法（1cm に裁断した植物、水抽出物、乾燥粉末）、植物種（ナス、サツマイモ、ハクサイ、米ぬか）について土壌の菌密度および変異頻度を調査した。

また、非無菌条件下での実証試験として、ビニルハウス内で培養土および圃場の土を詰めたプランターにジャガイモ磨砕液を高含水率になるように混和し、高温条件下で40日間管理後、選択培地に土壌から菌を分離し、土壌の菌密度および変異頻度を調査した。

(2) 非病原性変異株の感染によるジャガイモ青枯病発病抑制技術の確立

青枯病感受性のジャガイモ‘デジマ’の種いもを1/4に縦断し、ポット育苗した。5~6葉齢の苗に 10^6 および 10^8 cfu mL⁻¹に調整した青枯病菌の非病原性変異株 8266PC の菌液 20mL を断根接種した（前接種）。また、8266PC の培養ろ液、8266PC の菌液（ 10^8 cfu mL⁻¹）を加熱処理した死菌液も同様に接種した。接種後7日目に 10^7 cfu mL⁻¹に調製した8266野生株の菌液 20mL を灌注接種し（再接種）、14日間病徴を調査した。なお、病徴は病徴指数（0:萎凋なし~4:76%以上の葉が萎凋）で評価した。

(3) 発病抑制効果のジャガイモ品種・系統間差異の調査および発病抑制効果の高い非病原性変異株の選抜

非病原性変異株の感染によるジャガイモ青枯病発病抑制効果の簡易検定法を検討した。‘デジマ’の種いもから3mm程度萌芽した芽を中心にくりぬいた抉芽をパーミキュライトを詰めたセル成形トレーに植え付けて育苗した。3~5葉齢の抉芽苗の根を根端から1/3の長さの部位で切断し、 10^8 cfu mL⁻¹に調製した8266PCの菌液に30分間浸漬した。その後、8266野生株の汚染土壌（ 10^6 cfu mL⁻¹）

に移植し、14日間病徴を調査した。

また、細胞培養系を用いた簡易検定法も検討した。MS培地で無菌的に栽培したジャガイモ苗の茎切片をカルス誘導固形培地で培養してカルスを得た。カルスを非病原性変異株8266PCの菌液 (10^6 cfu mL⁻¹) に浸漬後、カルス誘導固形培地に置床し、そこにカルス誘導液体培地と青枯病菌8266野生株の培養ろ液 (フィルター滅菌) の混合溶液 (100mg L⁻¹ のストレプトマイシンを含む) をカルスが完全に浸る程度に注いだ。その後、人工気象器内で3週間培養し、カルス重量を測定した。

挿芽苗による簡易検定法を用いて、発病抑制効果のジャガイモ品種・系統間差異の調査および発病抑制効果の高い非病原性変異株の選抜を行った。ジャガイモ16品種・系統の挿芽苗の根を断根し、8266PCの菌液 (10^8 cfu mL⁻¹) に浸漬後、8266野生株の汚染土壌 (10^6 cfu mL⁻¹) に移植し、21日間の病徴を調査した (処理区)。また、ジャガイモ‘デジマ’の挿芽苗の根を断根し、系統の異なる野生株から作出した表現型変異株12菌株の菌液 (10^8 cfu mL⁻¹) に浸漬後、8266野生株の汚染土壌 (10^6 cfu mL⁻¹) に移植し、21日間の枯死率を調査した (処理区)。なお、対照として挿芽苗に滅菌水を浸漬接種後、汚染土壌に移植した (対照区)。接種後21日目の病徴指数または枯死率を基に次の式で算出した。防除価 = [(対照区-処理区) / 対照区] × 100

(4) 非病原性変異株が感染したジャガイモ苗におけるPAL活性の測定

真砂土を詰めたセル成形トレーで‘デジマ’の挿芽苗を育苗した。3~5葉齢の苗に発病抑制効果が高い非病原性変異株8103PCの菌液 (10^8 cfu mL⁻¹) を10ml灌注接種した。その後、人工気象器内で管理し、24, 48, 72時間後に根をサンプリングした。L-フェニルアラニンを経質として根の抽出液と40℃で2時間反応させ、桂皮酸の生成量を測定した。PAL活性は1時間あたりタンパク質1gあたりの桂皮酸の生成量で算出した。

(5) 病原菌の表現型変異を利用したジャガイモ青枯病の総合管理システムの実証

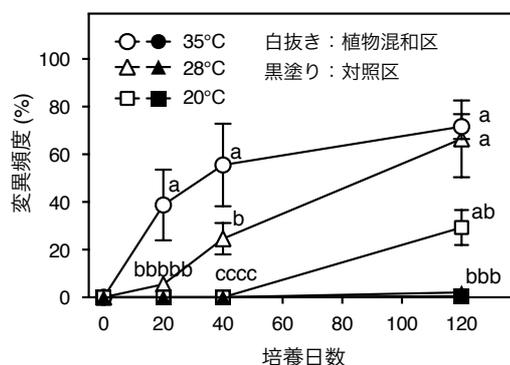
プランターに充填した青枯病菌汚染土壌に、自然乾燥して裁断したジャガイモ地上部をすき込み、高含水率、高温条件下で40日間管理後、選択培地に土壌から菌を分離し、土壌の菌密度および変異頻度を調査した。その後、5~6葉齢のジャガイモ苗を定植し、27日間病徴を調査した。

4. 研究成果

(1) 土壌への植物混和による青枯病菌の非病原化技術の確立

無菌条件下での実験において、対照としてイオン交換水を土壌に混和した区では菌密度が低下し、植物を混和した区では一定もしくはわずかに増加した。表現型変異は対照区

ではほとんど認められず、植物を混和した区において、長期培養、高温 (第1図)、高含水率、地上部で高頻度に認められた。一方、土壌の種類、混和する植物の処理方法、植物種にはほとんど影響を受けなかった。



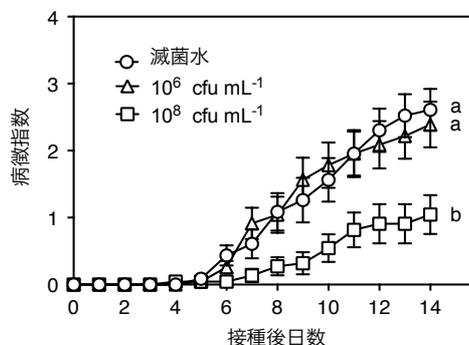
第1図. 培養温度が植物磨砕液の土壌への混和による青枯病菌の表現型変異に及ぼす影響。図中のエラーバーは標準偏差を示す (n=3)。異なる英文字は Tukey's multiple comparisons test により5%水準で有意差があることを示す。

また、非無菌条件下において培養土および圃場の土を詰めたプランターにジャガイモ磨砕液を混和すると、菌密度は低下したが、無菌条件下と同様に高頻度で表現型変異を起こした (培養土: 79.4%, 圃場の土: 60.5%)。

以上より、植物 (特に地上部) を土壌に混和し、高含水率、高温条件下で管理することにより、高頻度で土壌中の青枯病菌を表現型変異させることができることが明らかになった。

(2) 非病原性変異株の感染によるジャガイモ青枯病発病抑制技術の確立

10^6 cfu mL⁻¹ の8266PCを前接種した区では、対照として滅菌水を接種した区と比較して、再接種後14日目の病徴指数に有意な差はなかった (第2図)。一方、 10^8 cfu mL⁻¹ の8266PCを前接種した区では、対照区と比較して病徴指数が有意に低く、発病抑制効果が認められた。また、培養ろ液および死菌の前接種では、



第2図. 非病原性変異株の接種濃度がジャガイモ青枯病の発病抑制効果に及ぼす影響。図中のエラーバーは標準誤差を示す (n=24)。異なる英文字は Dunn's multiple comparisons test により5%水準で有意差があることを示す。

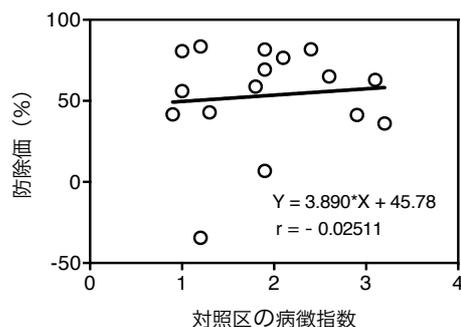
発病抑制効果が認められなかったのに対し、生菌を前接種した場合のみ発病が抑制された。以上より、ジャガイモに高濃度の青枯病菌の生菌を感染させることで高い青枯病発病抑制効果を付与できることが明らかになった。

(3) 発病抑制効果のジャガイモ品種・系統間差異の調査および発病抑制効果の高い非病原性変異株の選抜

非病原性変異株の感染によるジャガイモ青枯病発病抑制効果の簡易検定法を、挿芽苗を用いて検討した。その結果、5~6葉齢の苗と同様に、高濃度の青枯病菌の生菌を感染させることで高い青枯病発病抑制効果を付与することができ、挿芽苗を用いた簡易検定が利用できることが明らかになった。

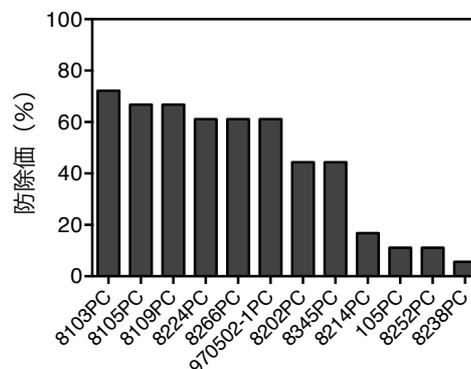
また、簡易検定法について細胞培養系を用いて検討した結果、対照としてカルスを滅菌水に浸漬後、青枯病菌の培養液中で培養すると、カルスの重量減少と褐変が認められたが、非病原性変異株の菌液に浸漬後、青枯病菌の培養液中で培養すると、カルスの重量増加が認められた。この結果から、カルスを用いた簡易検定が可能であることが示唆された。なお本実験は、当初計画より遅れたため、簡易検定は挿芽苗を用いた方法で行った。

挿芽苗を用いた簡易検定により、発病抑制効果のジャガイモ品種・系統間差異の調査を行った。品種・系統間で野生株に対する感受性は異なり、本来有する抵抗性に差があることが明らかになった。また、15品種・系統で発病抑制効果が認められ、その防除価は、6.8~83.6%と品種・系統間差異が見られた。特に‘農林1号’、‘さんじゅう丸’、‘春あかり’および‘西海37号’は80%以上と高い防除価であった。これらより、非病原性変異株により十分な青枯病発病抑制効果を得るためには、品種の選択が重要であることが考えられた。また、対照区における病徴指数と防除価との間には、スピアマンの順位相関係数の検定により有意な相関関係は認められなかった ($p > 0.05$) (第3図)。この結果より、本来有する抵抗性が低い品種においても、品種によっては非病原性変異株による発病抑制効果が期待できることが示唆された。



第3図. ジャガイモ品種・系統の抵抗性と非病原性変異株による青枯病発病抑制効果との関係。

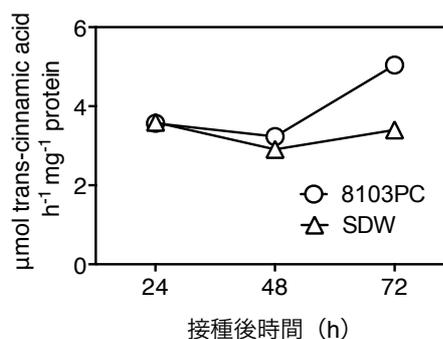
また、挿芽苗を用いた簡易検定により、発病抑制効果の高い非病原性変異株の選抜を行った。発病抑制効果は、供試した全ての非病原性変異株で認められ、その防除価は5.6~72.2%と菌株間差異が見られた(第4図)。特に8103PC、8105PC、8109PCを接種した場合、高い防除価が得られ、ジャガイモ青枯病の発病抑制効果が高い非病原性変異株を選抜することができた。



第4図. ジャガイモ青枯病発病抑制効果における非病原性変異株間差異。

(4) 非病原性変異株が感染したジャガイモ苗におけるPAL活性の測定

発病抑制効果が高い非病原性変異株8103PCを接種した区において、接種72時間後にPAL活性が増加し、対照として滅菌水を接種した区より活性が高くなる傾向が見られた(第5図)。この結果より、非病原性変異株の感染によるジャガイモ青枯病発病抑制効果のメカニズムの一つとして、植物の抵抗性誘導が示唆された。



第5図. 非病原性変異株の感染によるジャガイモ根のPAL活性の経時変化。

(5) 病原菌の表現型変異を利用したジャガイモ青枯病の総合管理システムの実証

青枯病菌汚染土壌にジャガイモ地上部をすき込まなかった対照区では、表現型変異が認められなかった。一方、すき込んだ処理区では、表現型変異が見られたが、その頻度は19.5%と低かった。その土壌にジャガイモ苗を定植した結果、病徴指数が処理区は1.3、対照区では2.7になり、処理区で発病が抑制される傾向にあった。これらの結果から、青枯病菌汚染土壌に植物体を混和することに

より、病原菌を表現型変異させ、その土壌でジャガイモを栽培すると青枯病の発病が抑制される管理システムを実証することができた。

(1)において、ジャガイモ磨砕液を土壌に混和すると、高頻度に表現型変異させることができたが、本実験では実用性の観点から自然乾燥して裁断したジャガイモ地上部をすき込んだ。無菌条件下では、変異頻度は同等であったが、非無菌条件下では変異頻度は低かった。本管理システムにおいて、高い発病抑制効果を得るためには、高頻度の表現型変異が必要であると考えられる。本研究において、無菌条件下であるが米ぬかの土壌混和においても、高頻度の表現型変異が認められた。米ぬかの利用は、植物体よりも簡易で実用的であることが考えられ、今後、本研究で得られた知見を基に、米ぬかの土壌混和によるジャガイモ青枯病の総合的管理システムの確立について、研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

① 黒木達也, 森 太郎, 小松亜璃沙, 中原浩貴, 松崎弘美, 松添直隆, 2016. 挿芽・挿芽苗に対する非病原性 *Ralstonia solanacearum* によるジャガイモ青枯病の発病抑制効果の検定. 園芸学研究 15: 207-212. 査読あり
DOI: 10.2503/hrj.15.207

[学会発表] (計7件)

① 黒木達也, 小松亜璃沙, 森 太郎, 松崎弘美, 松添直隆, 非病原性 *Ralstonia solanacearum* によるジャガイモ青枯病の発病抑制, 環境系微生物学会合同大会 2014, 平成 26 年 10 月 21~24 日, アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

② 中原浩貴, 森 太郎, 松崎弘美, 松添直隆, 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の病原性株と非病原性株との競合, 環境系微生物学会合同大会 2014, 平成 26 年 10 月 21~24 日, アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

③ 坂尾 智, 渡辺那智, 中原浩貴, 松添直隆, 森 太郎, 青枯病菌の表現型変異を利用したジャガイモ青枯病の生物防除, 園芸学会平成 27 年度秋季大会, 平成 27 年 9 月 26~27 日, 徳島大学 常三島キャンパス (徳島県徳島市)

④ 黒木達也, 森 太郎, 中原浩貴, 松崎弘美, 松添直隆, 挿芽苗に対する非病原性 *Ralstonia solanacearum* の接種によるジャガイモ青枯病の発病抑制, 平成 27 年度日本植物病理学会九州部会, 平成 27 年 11 月 11~12 日, ホテルセントヒル長崎 (長崎県長崎市)

⑤ 森 太郎, 渡辺那智, 坂尾 智, 中原浩貴, 松添直隆, 土壌への植物混和による

Ralstonia solanacearum の表現型変異, 平成 28 年度日本植物病理学会大会, 平成 28 年 3 月 21~23 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

⑥ 森 太郎, 林 優花, 坂尾 智, 貴島柚子, 中原浩貴, 松添直隆, *Ralstonia solanacearum* の表現型変異を利用したジャガイモ青枯病の発病抑制, 園芸学会平成 28 年度秋季大会, 平成 28 年 9 月 10~11 日, 名城大学 天白キャンパス (愛知県名古屋)

⑦ 吉川麻璃萌, 中原浩貴, 轟田純子, 森 太郎, 松添直隆, ナス科植物 (ジャガイモ・ナス・トマト) における青枯病発病抑制効果の高い非病原性 *Ralstonia solanacearum* の選抜, 日本農業気象学会九州支部・日本生物環境工学会九州支部 2016 合同大会, 平成 28 年 11 月 25~26 日, 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 太郎 (MORI, Taro)

滋賀大学・教育学部・准教授

研究者番号: 90725053