

博士論文要約 (Summary)

平成 26 年 4 月入学
連合農学研究科 生物生産科学 専攻
氏 名 齊 佳鶴玲

タイトル	Potential of biological control for tomato complex disease by root-knot nematode and <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> using entomopathogenic <i>Bacillus thuringiensis</i>
<p>「序論及び目的」</p> <p>トマトの栽培において、トマト萎凋病（植物病害）とネコブセンチュウ（植物寄生性線虫）による複合病は世界的に非常に問題になっており、大きな経済損失をもたらしている。現在、この複合病に対する防除方法は土壌消毒を中心とした化学的防除法や抵抗性品種を用いた方法等が実施されている。しかし、抵抗性を侵す新レースの発生や化学薬剤に依存しない環境保全型農業が求められており、代替防除技術の提案が必要とされている。そこで、本研究では <i>Bacillus thuringiensis</i> (以下 BT) を微生物防除資材として利用し、複合病の原因となるトマト萎凋病菌 (<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> 以下 FOL) とサツマイモネコブセンチュウ (<i>Meloidogyne incognita</i> 以下 RKN) をターゲットとし実験を計画した。</p> <p>BT は自然環境から分離されており、人体や環境に安全かつ効果的な微生物殺虫剤で、世界で一番利用されている。最近、BT が害虫だけでなく線虫や土壌病害の被害を抑制する報告もなされている。このため、本研究では、BT のこれらの特性を生かし、植物の病害と植物寄生性線虫を同時に抑制する生物防除資材としての可能性を探ることを目的とし、以下の実験を計画した。</p> <p>すなわち、実験 1 では BT によるトマト萎凋病菌の拮抗作用、ポット試験による発病抑制</p>	

効果と植物成長促進効果（PGPR）について検討した。次に、実験2では実験1による萎凋病抑制効果のメカニズムの一端を解明するため、BTの植物根面へのバイオフィーム形成能力を調査した。さらに、実験3ではBTのネコブセンチュウに対する殺線虫効果について検討した。最後に実験4では以上3つの実験結果を踏まえ、BTをもちいて、トマト萎凋病とサツマイモネコブセンチュウの複合病に対する防除効果をポット試験によりその防除効果の可能性を探った。

実験1：BTによるトマト萎凋病菌の拮抗作用、ポット試験による発病抑制効果と植物成長促進効果（PGPR）

FOLに対するBTの対峙培養では、*B. thuringiensis japonensis* (BT17)と*B. thuringiensis kurstaki* (BT18)の2系統がFOLに対して強い拮抗作用を示した。また、BTを育苗ポットに混和し生育させたトマト苗をFOL汚染土に移植し、4週間後にトマト萎凋病の外部病徴を調査したところ、BT処理区すべてに発病抑制効果が認められ、特にBT17と*B. thuringiensis* CR371-H (BT20)処理区の効果が顕著であった。これらの結果から、BTにはいくつかの系統でトマト萎凋病原菌に対する拮抗作用が認められ、ポット試験においてもBTを根部に処理することにより萎凋病の発病を抑制することが明らかになったが、BT20はFOLに対する拮抗性が認められなかったのでその効果は誘導抵抗性によるもの推察された。また、トマトの種子や苗に対するBTのPGPR (Plant Growth Promote Rhizobacteria)としての効果を栄養細胞および培養ろ液を用いてロータール法により検討したところ、すべての系統において発芽促進(対照区に比べ35.7~107.1%)、および幼苗伸長効果(87.7~381.1%)が認められ、これらの効果も発病を抑制する役割の一部を担っていると考えられた。

実験2：BTによるバイオフィーム形成能

BT 6 系統 *B. thuringiensis sotto* (BT15)、*B. thuringiensis israelensis* (BT16)、*B. thuringiensis japonensis* (BT17)、*B. thuringiensis kurstaki* (BT18)、*B. thuringiensis roschildensis* (BT19)、*B. thuringiensis CR371-H* (BT20) と比較のためエスマルク DF (*B. thuringiensis*)、ジャックポット顆粒水和剤 (*B. thuringiensis*)、ボトキラー水和剤 (*B. subtilis*)、*B. simplex* モミホープ水和剤 (*B. simplex*) を供試した。それぞれの培養液をマイクロプレートに分注し静置培養の後、CV 染色によりバイオフィーム形成量の定量化を行った(Sandrine et al., 2005)。また、土壌および液体培地中において、トマト苗と供試菌株を共存培養し根面のバイオフィーム形成を光学顕微鏡観察で評価した。その結果、静置培養の 1 日目から 2 日目にかけて、全ての菌株でマイクロプレート中の CV 染色量の増加が認められた。染色量の増加はマイクロプレート内のバイオフィーム形成量の増加と考えられた。それ以降は菌株によりバイオフィーム形成量の違いが認められた。次に土壌および液体培地条件下での共存培養し、トマト根面には BT のコロニー塊が付着しているのが確認された。以上の結果より、トマト根面に対し BT によりバイオフィームが形成され、そのことがトマト萎凋病を抑制する可能性が示唆された。

実験 3 : BT のサツマイモネコブセンチュウに対する毒性

サツマイモネコブセンチュウに対する BT の毒性を調査するため、0.1ml 2 期線虫懸濁液 (50J2/well) と 0.9ml BT の培養ろ液、菌体 (栄養胞子) を 24well マイクロプレートで共存培養した。24 時間後、BT の培養ろ液、菌体処理区とも線虫の 2 期幼虫の致死率は高く、BT に殺線虫効果があることを確認した。さらに、BT と 48 時間共存培養したネコブセンチュウの卵のうを滅菌水に移し、7 日後孵化した 2 期幼虫をカウントした。また、この卵のうを押しつぶし、中の正常卵と異常卵を数えたうえで、BT の栄養細胞、栄養細胞の代謝産物が線虫の孵化率を抑制することと異常卵の形成率が増加することを明らかにした。

実験4: BT によるトマト萎凋病とサツマイモネコブセンチュウの複合病抑制効果

以上の1～3の結果を踏まえ、BT17、BT18とBT20を選択し実験に供した。表面殺菌したトマト種子を催芽させた後に滅菌土に播種し、25℃温室条件で4週間生育させた。このトマト苗にBT3菌株の懸濁液(3×10^8 cfu/ml)を10mlずつ根圏に接種した。1週間後、5ml サツマイモネコブセンチュウ2期幼虫懸濁液(500 J2s/pot)を植物の根圏に接種した。さらに1週間後、BTとサツマイモネコブセンチュウを接種したトマト苗を萎凋病原菌汚染土に移植し、4週間後に外部病徴含めた複合病の被害調査(地上部生重、内部病徴、ネコブ指数)を実施した。実験には11処理区を設置した。すなわち、3系統(BT17、BT18、BT20)BT+萎凋病処理区;3系統(BT17、BT18、BT20)BT+ネコブセンチュウ処理区;3系統(BT17、BT18、BT20)BT+複合病実験区;萎凋病だけ対照区;ネコブセンチュウ対照区;複合病対照区と無接種対照区を設けた。発病調査の結果、BT処理区はすべて複合病の病徴を抑えた。

以上の結果から、BT17～20の3系統は難防除病害であるトマトの萎凋病とサツマイモネコブセンチュウの複合病の発病を抑制できる微生物防除資材として有望であることが明らかになった。