

Botrytis tulipae菌核由来細菌によるBotrytis cinerea菌核の生育抑制効果について

誌名	茨城県病害虫研究会報
ISSN	03862739
著者名	橋本,俊祐 奥山,亜耶子 中島,雅己 阿久津,克己
発行元	茨城県病害虫研究会
巻/号	49号
掲載ページ	p. 65-68
発行年月	2010年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Botrytis tulipae 菌核由来細菌による *Botrytis cinerea* 菌核の生育抑制効果について

橋本 俊祐・奥山亜耶子・中島 雅己・阿久津克己

はじめに

灰色かび病を引き起こす病原菌 *Botrytis cinerea* は、糸状菌の一種で不完全菌類に属し、果樹、野菜、花卉などさまざまな植物に寄生する多犯性の病原菌である。野菜類では、20℃前後の低温、多湿条件が本菌による発病を助長する。特に開花期に多発し、葉、花器、果房を犯し、秋季に気温18℃～20℃で2～3日の雨降、4～5日晴天が交互に続くと急激に発生することが報告されている。本菌の菌核は、生育に不利な条件下で生存するために必須の構造体であり、灰色かび病の第一次伝染源としての重要な役割を果たしている。本研究では、菌核を本病防除のターゲットとし、同じ *Botrytis* 属菌である *B. tulipae* 菌核に発芽抑制効果を示した細菌を用いて、*B. cinerea* 菌核に対して生育抑制効果のある細菌の探索を行った。

材料および方法

1. 供試細菌

チューリップ褐色斑点病の罹病部から分離した *B. tulipae* をチューリップ球根培地 (守川, 2002) (チューリップ球根を厚さ約3mmの切片とし、それを300mlのフラスコに入れてオートクレーブで20分間滅菌したもの) で22℃、2ヶ月間培養して形成された菌核をメッシュ袋に入れて、2007年4月に毎年チューリップを栽培している茨城大学農学部附属フィールドサイエンス教育研究センター内の圃場に0cm、10cm、20cmの深さで埋設した。その1ヶ月後から埋設した菌核を回収し、分解が進んでいる菌核から細菌の分離を行った。菌核をカミソリで半分に切断して髓の部分が黒色となったものを選抜し、それらをマイクロチューブに入れた100μlの滅菌水に加え、ボルテックスで3分間激しく攪拌した。得られた懸濁液を分離用平板培地に塗布し、25℃で18～24時間培養後、培地上に現れたコロニーを単離した。分離用の培地としてはPDA (pH 6.8)、1/5PDA (pH 6.8)、LBA、1/5LBA、キングB寒天、1/5キングB寒天を用いた。本研究では、分離された細菌のうち *B. tulipae* 菌核の発芽に対して抑制効果を示した14細菌株 (王ら, 2009) を供試した。

2. *B. cinerea* に対する生育抑制効果の評価

1) 対峙培養試験

1/5キングB寒天培地を用いて25℃、24時間前培養した細菌株を滅菌水に懸濁し、遠心分離 (3000g、10分、24℃) により培地成分を除いた後、懸濁液 (OD₆₀₀=0.5) を調整した。この懸濁液に滅菌したペーパーディスクを浸漬し、1/5キングB寒天培地とPSA培地の周囲4カ所にそれぞれ置床した。この中央にPSA培地を用いて22℃、4日間培養した *B. cinerea* の菌糸プラグを置床した。対照として、分離細菌

茨城県病害虫研究会会報49 (2010) : 65～68. 茨城大学農学部

キーワード：菌核由来細菌, *Botrytis cinerea*, 菌核

の代わりに滅菌水を用いた区を設定した。これらを25℃で4日間培養し、各細菌株による*B. cinerea*の菌糸生育に対する抑制効果を調査した。

2) 菌核に対する生育抑制効果の検定

1/5キングB寒天培地を用いて25℃、24時間前培養した細菌株を1/5キングB液体培地に懸濁し、25℃、141rpmで16時間振とう培養を行った。培養後、遠心分離(3000g, 10分, 24℃)により培地成分を除き、懸濁液(OD₆₀₀=1.0)を調整した。これに*B. cinerea*の菌核4個を入れてシリコ栓をし、25℃、141rpmで1時間振とう処理を行った。その後、菌核だけを取り出して、シャーレ内の滅菌した土壤上に置床し、25℃で1週間培養した。1週間後の菌核の発芽と菌糸の生育を観察後、菌核および菌糸の及ぶ範囲の土壤を滅菌水1ml中に懸濁し、血球計算盤を用いて形成された分生孢子数を測定した。

3. 抗菌要因の調査

1) 菌核に対する分解活性の検定

2本の試験管に同じ濃度の細菌懸濁液(OD₆₀₀=0.1)を調整した。片方の試験管にのみ菌核を入れ、それぞれ25℃、141rpmで1週間振とう培養し、24時間毎に各培養液についてOD₆₀₀の値を測定した。また、菌核の分解に関与する酵素の1つと考えられるキチナーゼの分泌についても調査した。0.08%の濃度でコロイダルキチンを含む1/5キングB寒天培地に細菌懸濁液を穿刺接種して25℃で6日間培養し、コロイダルキチンを分解することにより形成される透明帯の検出を行った。

2) 揮発性抗菌物質産生の検定

濃度を調整した細菌懸濁液(OD₆₀₀=0.5)に滅菌したペーパーディスクを浸漬した。二分するように中央部の培地を幅1cmで取り除いた1/5キングB寒天培地を用意し、一方にペーパーディスクを置床し、他方には*B. cinerea*の菌糸プラグを置床した。これらを25℃で4日間培養し、細菌の産生する揮発性物質による抗菌作用を調査した。

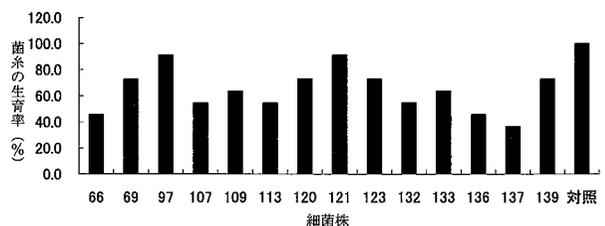
4. 細菌の同定

*B. cinerea*に対する生育抑制効果の高かった細菌株についてAPI20NE(SYSMEX)を用いた簡易同定を行った。

結果および考察

1. *B. cinerea*に対して生育抑制効果を示す細菌の検出

*B. tulipae*の菌核に対し発芽抑制効果を示した14細菌株の*B. cinerea*に対する生育抑制効果を、対峙培養試験により調査した。その結果、対照区と比較してほとんどの細菌株において*B. cinerea*に対する生育抑制効果が認められた(第1図、第2図)。これらの細菌株による土壤での*B. cinerea*菌核の生育に対する抑制効果を調査したところ、細菌株133と137処理区で菌糸生育の高い抑制が見られた(第3図)。また、各細菌の処理菌核に形

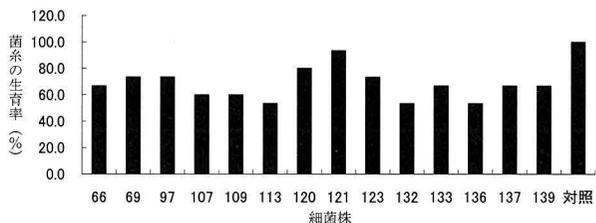


第1図 *Botrytis tulipae*菌核由来細菌による1/5 King B寒天培地における*Botrytis cinerea*の菌糸生育に対する抑制効果

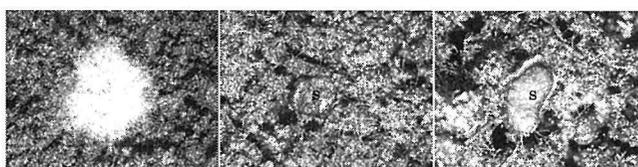
成された分生孢子数を測定したところ、この2株においては分生孢子形成も抑制されていることが明らかとなった(第4図)。これらの細菌株を簡易同定した結果、細菌株133は *Pseudomonas fluorescens*、細菌株137は *Burkholderia cepacia* であることが明らかとなった。これまでに *P. fluorescens* については、抗菌作用のあるリポペプチドを生産すること (Nielsen et al., 2003) やキチナーゼ、グルカナーゼ、シアン化水素、サリチル酸など植物病害抑制にかかわる物質を生産すること (Nagarajkumar et al., 2004)、また、灰色かび病菌と同じ *Botrytis* 属菌である *Botrytis mali* に対して生育抑制効果を示すこと (Mikani et al., 2008) などが報告されている。また、*B. cepacia* については、抗菌作用のあるピロールニトリンの産生により、*Rhizoctonia solani* によるポインセチアの立枯病に抑制効果を示すことなどが報告されている (Hwang et al., 2002)。本研究で選抜された細菌株133と137は、灰色かび病に対するバイオコントロール・エージェントとしての可能性が期待される。

2. 抗菌要因の検討

上記2細菌株に見られる抗菌活性の要因について調査を行った。まず、菌核のみを加えた細菌懸濁液を振とう培養し、菌核に対する分解活性を調査したところ、細菌株133は培養5日後から増殖を示した(第5図)。一方、細菌株137では濁度に変化は見られず、増殖は確認できなかった。このことから細菌株133は *B. cinerea* 菌核の分解活性を持つことが明らかとなった。また、菌核の分解活性に関与すると考えられるキチナーゼ活性について調査した結果、上記の2細菌株ではキチナーゼ活性は見られなかった。

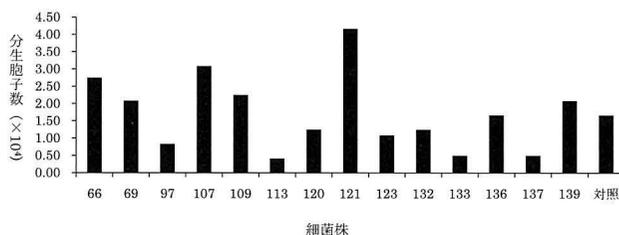


第2図 *Botrytis tulipae* 菌核由来細菌によるPSA培地における *Botrytis cinerea* の菌糸生育に対する抑制効果

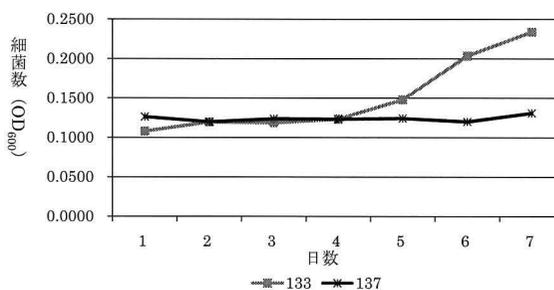


対照区 細菌株133処理区 細菌株137処理区

第3図 *Botrytis tulipae* 菌核由来細菌による土壌での *Botrytis cinerea* 菌核の生育に対する抑制効果
s: 菌核



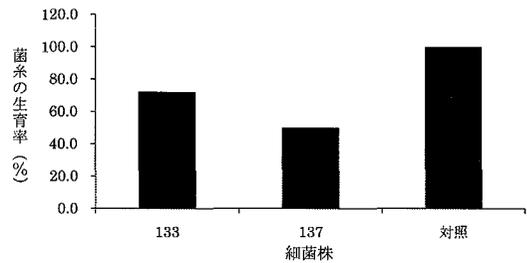
第4図 *Botrytis tulipae* 菌核由来細菌による土壌での *Botrytis cinerea* 菌核からの分生孢子形成に対する抑制効果



第5図 *Botrytis tulipae* 菌核由来細菌133株と137株による *Botrytis cinerea* の菌核に対する分解活性

*P. fluorescens*については、分解活性に関与する酵素としてキチナーゼの他にグルカナーゼを生産する細菌株の存在が知られていることから (Nagarajkumar et al., 2004), 細菌株133で見られた分解活性がキチナーゼ以外の酵素による可能性が示唆された。

これまでに、アリルアルコールによる *Sclerotinia sclerotiorum* の菌核発芽の抑制 (Huang et al., 1997), *Pseudomonas* により生産されたシアン化水素によるタバコ根腐病の防除 (Voisard et al., 1989) など数種の病原菌に対する有機揮発性物質の抗菌性が明らかにされている。また、アリルアルコールは *P. fluorescens* と *P. putida* のようなバイオコントロールとして有益な細菌の増殖に関与することも報告されており (Altman and Lawlor, 1966), 有機揮発性物質が細菌における拮抗活性の発現に重要な役割を果たすと考えられている。そこで、2細菌株が産生する揮発性抗菌物質の有無を調査した。その結果、両細菌株が *B. cinerea* に抗菌活性を示す揮発性物質を産生することが明らかとなり、細菌株137ではより高い菌糸生育抑制効果が見られた (第6図)。



第6図 *Botrytis tulipae* 菌核由来細菌133株と137株による *Botrytis cinerea* に対する揮発性抗菌物質の産生

以上の結果から、細菌株133では主な抗菌要素としてキチナーゼ以外の溶菌酵素が関与し、また細菌株137では主な抗菌要素として揮発性抗菌物質が関与することが示唆された。

引用文献

- Altman, J. and Lawlor, S. (1966) J. Appl. Bacteriol 29:260-265.
- Huang, H., Huang, J. W., Saidon, G. and Erickson, R. (1997) Can. J. Plant Pathol. 19:43-46.
- Hwang, J., Chilton, W. S. and Benson, D. M. (2002) Biological Control 25:56-63.
- Mikani, A., Etebarian, H. R., Sholberg, P. L., O' Gorman, D. T., Stokes, S. and Alizadeh, A. (2008) Postharvest Biology and Technology 48:107-112.
- 守川俊幸 (2002) チューリップ病害の病原および発生生態に関する研究 (東京農工大学大学院連合農学研究科博士論文) pp.147-173
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R. and Velazhahan, R. (2004) Microbiological Research 159:73-81.
- Nielsen, T. H. and Sørensen J. (2003) Appl. Environ. Microbiol. 69:861-868.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. and Defago, G. (1989) The EMBO J. 8:351-358.
- 王 政・奥山亜耶子・中島雅己・阿久津克己 (2009) 茨城病虫研報 48:43-47.