② トマト萎凋病・ナス青枯病に対する Bacillus thuringiensis serovar fukuokaensis B88-82 株の利用

1) Bacillus thuringiensis serovar fukuokaensis B88-82 株について

Bacillus thuringiensis serovar fukuokaensis B88-82 株は、グラム陽性の芽胞を形成する桿菌で、北海道大学で保存されています。本菌株は、BT 毒素を生産し、鱗翅目昆虫に対する殺虫活性を有することが確認されています。その一方で、トマト青枯病菌に対して抗菌活性は無いことが確認されています²⁾。



図 1 1. Bacillus thuringiensis serovar fukuokaensis B88-82 株のコロニー (岐阜大学)

2) B88-82 株の培養条件、接種源の調製法

B88-82 株の培養は、以下のいずれかの方法で行います。

(方法1)

- ・B88-82 株の凍結ストック (40% グリセロール) を 1 白金耳分掻き取り、300ml の改変 NB 培地 (ペプトン 3g, 肉エキス 1g, K₂HPO₄ 1g をイオン交換水 1000ml に混合後、高圧滅菌したもの) に懸濁して、24 時間振とう培養する。
- ・培養後に、B88-82 株の培養液を遠心分離(3000rpm, 10 分間) した後、上清を棄て、ペレットを滅菌水で2回洗浄し、分光光度計でOD₆₀₀=0.5 に調製したものを接種源とする。 (方法2)
- ・B88-82 株を 9 cm シャーレに作成した 1/3NA 平板培地(組成:1% (w/v) 乾燥ブイヨン、2% (w/v) アガロース、121℃、20 分間高圧蒸気滅菌)で暗黒下、28℃で 2 日間培養後、滅菌水 20 ml をそのシャーレに入れ、懸濁後に分光光度計で計測し、OD600=0.5 に調製したものを接種源とする。

(岐阜大学・東京農工大学)

3) 植物体への処理法

ナス、トマト苗に対する B88-82 株の処理は、次の手順で行うのが効果的です。

- ・鉢上げしたナスまたはトマト苗に対し、定植 5 日前に、B88-82 株の接種源をポットサイズの 1/12 量分を灌注する (例:直径 9cm ポット [360 ml 容量] の場合は 30ml 灌注)。
- ・苗の圃場への定植後は、その効果の持続を期待するために、10-14 日毎に接種源を OD_{600} =0.2 に希釈したものを株あたり 100ml 灌注する。

(岐阜大学・埼玉県農林総合研究センター)

- ・トマト萎凋病に対しては、土壌改良資材 (カルシウム資材:商品名、ミネカル) との併用処理により、防除効果が向上することがポットおよび圃場試験で確認されています。
- ・土壌改良資材は、定植前に圃場に 2.5t/10a の割合で混和する。

(奈良県農業総合センター・東京農工大学)

4) 圃場での防除効果の検討

ナス青枯病

B88-82 株の処理によるナス青枯病に対する防除効果を圃場で検討した事例を紹介します。圃場試験例の概要は以下の通りです。

- ・試験場所、作型:埼玉県農林総合研究センター園芸研究所内隔離圃場(褐色低地土)、露地栽培
- ・供試品種:千両二号接木苗(ヒラナス台木)
- ・区制:青枯病菌(Ralstonia solanacearum IV群)に感染したトマトと健全トマト株残渣を土壌に
 鋤込んで汚染圃場を作成。1区12株(畦幅80cm×株間70cm2条植え)、3反復
- ・耕種概要: 10.5cm ポットで育成した苗を 6月 29日に定植する。
- ・B88-82株の苗への処理:上記3)に準じて定植前および定植後2週間毎に処理する。
- ・発病調査:定植後1ヶ月後から約7日間隔で発病株率を調査。
- ・収量調査:栽培期間中に収穫されたナス果実の各区の重量を調査する。

(埼玉県農林総合研究センター)

試験の結果、対照無処理区の発病株率が、定植37日目で22%、最終調査時で86%程度の発病条件下において、B88-82株の苗への定植前と定植後2週間毎の株元灌注処理により、防除価50、39の防除効果(図12)が見られるとともに、果実収量も無処理区に比べ約20%増加しました(図13)。

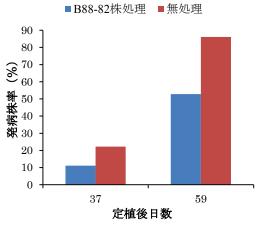


図12. 圃場における B88-82 株の処理に よるナス青枯病発病抑制効果 (埼玉県農林総合研究センター)

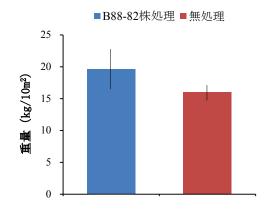


図13. 圃場における B88-82 株の処理 による栽培期間中の果実収量 (バーは標準誤差) (埼玉県農林総合研究センター)

トマト萎凋病

B88-82 株の処理によるトマト萎凋病に対する防除効果を圃場で検討した事例を紹介します。圃場試験例の概要は以下の通りです。

- ・試験場所、作型:奈良県農業総合センター内ビニルハウス (灰色低地土壌)、無加温半促成栽培
- ・供試品種: 桃太郎 8
- ・区制:ふすま培養 4) したトマト萎凋病菌レース3を土壌に混和して汚染圃場を作成。1区(2.2 m²) 12株(畝幅120cm×株間30cm、2条植)、4 反復
- ・耕種概要: 2月上旬に培土 (TM-1 (タキイ種苗)) を充填したセルトレイに播種。約40日間育成後に 9cm ポットに鉢上げし、約1ヶ月後の4月中旬に圃場に定植。ポット鉢上げまでは加温。
- ・土壌改良資材(カルシウム資材)の処理:上記3)に準じて、定植前に土壌混和する。
- ・B88-82 株の苗への処理:上記3) に準じて定植前に処理する。定植後の処理は、9日後に1回実施。
- ・発病調査:発病を程度別に調査し、次式により発病度を求めて防除価を算出。

発病度= $\{(\Sigma 程度別発病株数) \times 指数÷ (調査株数×4)\} \times 100$

発病程度別基準:0, 発病無し;1, 株の1/3 未満の葉にしおれ;2, 株の $1/3\sim2/3$ の葉にしおれ 3, 株の2/3 以上の葉にしおれ;4, 枯死

(奈良県農業総合センター)

試験の結果、75日後の無処理区の発病度が、23の発病条件下において、B88-82株と土 壌改良資材の併用処理により、定植47日後と75日後で、それぞれの防除価が67と32の 防除効果が見られました(図14)。

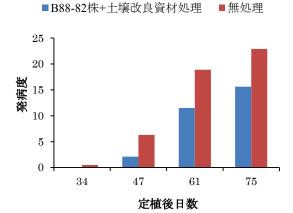


図14. 圃場における B88-82 株と土壌改 良資材の併用処理によるトマト萎凋病発 病抑制効果

(奈良県農業総合センター)

5) 防除効果が期待できる利用場面

ナス青枯病

B88-82 株の苗への処理によるナス青枯病防除効果は、1回の灌注処理により約2週間程度維持するものと考えられます。従って、本菌を使用する場合は、2週間に1回程度、継続的に灌注処理を行うことが必要です。また、圃場における青枯病の発病程度(発病株率)とB88-82 株の処理効果(防除価)との関係を見ると、効果は発病株率(%)が60程度までの発生程度と想定される圃場条件では、防除価が概ね50以上になると考えられ、一定の効

果が期待できます。しかし、それ以上の発病程度と想定される圃場では高い防除効果は困難であると予想されるので、別の防除対策を講じる必要があります(図15)。

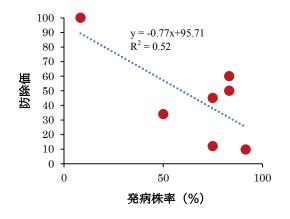


図15. 圃場試験区におけるナス青枯病の無 処理区の発病株率と B88-82 株処理 による防除効果(防除価)との関係 (埼玉県農林総合研究センター)

トマト萎凋病

B88-82 株と土壌改良資材の併用処理によるトマト萎凋病防除効果(防除価)と圃場における萎凋病の発病程度(発病株率)との関係を見ると、発病度が30程度までの圃場条件では、防除価が概ね40以上になると想定され、一定の効果が期待できます。しかし、それ以上の発病程度と想定される圃場では、高い防除効果は困難であると予想されるので、別の防除対策を講じる必要があります(図16)。

また、PCR-DGGE に基づく土壌微生物相の解析 3) により、定植前の土壌中の細菌相の多様性程度と B88-82 株処理による抑制効果との間で負に相関する関係が見られています。このことから、土壌細菌相の多様性が極端に低い圃場では、防除効果が期待以上に発揮されない可能性があります(図17)。

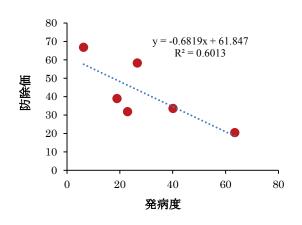


図16. 圃場試験区におけるトマト萎凋 病の対照区の発病度と、B88-82 株お よび土壌改良資材の併用処理によ る防除効果(防除価)との関係 (奈良県農業総合センター)

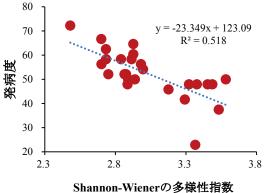


図17. 定植前の圃場内非根圏土壌中の PCR-DGGE による細菌相の多様性 程度とRG1-6株処理トマトの青枯病 の発病程度との関係

((独) 農業環境技術研究所)

6) 防除効果の作用メカニズム

B88-82 株の防除効果は、菌体の懸濁液あるいは培養上清を土壌に灌注処理することで顕著な効果がみられます。一方で、これらの接種源のナス青枯病菌やトマト萎凋病菌に対する直接的な抗菌活性は認められないことから、B88-82 株の防除効果の作用メカニズムとしては、B88-82 株が土壌中あるいは根圏においてトマト植物体に対して抵抗性を誘導していることが考えられます。実際に、根部に B88-82 株の培養液や菌体懸濁液を処理したトマト苗の葉などのほぼ全身で、PAL、LePR-1、LeChi3、LeGluB、B-CHT、Bgl、LOXなどの防御関連遺伝子の発現が確認されています(図18)^{2,5)}。また、B88-82 株を根部に処理したトマト苗の子葉上部の茎にトマト青枯病菌の懸濁液を針接種した場合でも、顕著な防除効果がみられたことから、抵抗性が苗に全身的に誘導されていることが示唆されます²⁾。

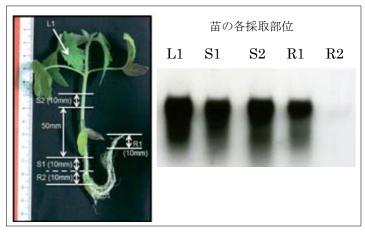


図18. B88-82 株の培養上清を根部に処理したトマト苗の各部位における処理2日後のサリチル酸誘導性防御関連遺伝子(LePR-I)の発現状態(ノーザン解析)

(東北大学)