学会賞受賞者講演

植物内生細菌を利用したナス科青枯病の生物防除に関する研究[†]

相野 公孝*

AINO, M.*: Studies on biological control of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* using endophytic bacteria

病害虫等の作物に対する生産障害要因を排除するためには、これまで、農業などの化学物質が用いられ、多大の効果を上げてきた。その反面、これらの化学物質の長期にわたる連用によって、耕地生態系の単純化や環境への影響が懸念されるに至っている。

このような背景の中で、化学物質に代わる新たな素材の開発が世界的に志向され、生物的防除の研究に注目が注がれるようになった。また、内生細菌は種々の生理活性物質を産生し、これらの働きによって内生細菌に感染した植物が病害虫に対して抵抗性になったり、環境ストレスに対して耐性になったりする。このため、植物への有用形質付与に内生細菌の利用研究が行われ、また、植物病害に対して抵抗性を誘導するためのエージェントとして使用する研究が行われている (Aino *et al.*, 1999; 東山ら, 2012)。

一方、ナス科青枯病は、細菌の一種である *Ralstonia solanacearum* によって引き起こされる土壌伝染性病害、とくに導管病と呼ばれる病害の1つである。青枯病菌は寄主植物の根の傷口から侵入し、導管の中で繁殖して導管閉塞をおこし、トマトを枯死に至らす。地上部の症状は、緑色の状態で萎凋し枯死する。畑全体に蔓延し、全滅することも希ではない。トマト青枯病はトマト生産、とくに、栽培が夏期高温時である抑制栽培で発生が多い (Hayward, 1991)。様々な防除対策が講じられているが効果は不十分である。近年、生物的防除の成功例が報告されている (Aino *et al.*, 1997; Ariwiyanto *et al.*, 1994; Bustamante *et al.*, 1989; Furuya *et al.*, 1991; Handlman and Stabb, 1996; 原・小野, 1991; Phae *et al.*, 1992; Takenaka *et al.*, 2008)。

1 内生細菌の分離と有効なエージェントの選抜

兵庫県下で栽培されているトマト、ハクサイ、レタス、ナス、ピーマンの根圏から、約 30,000 菌株の蛍光性シュードモナスを分離した。採取した根を流水で 5 分間洗浄後、根面からは、洗浄した根を殺菌水に浸漬し 30 分間振とう後、懸濁液を希釈した。根内からは、70%のエチルアルコールに 2～10 秒間浸漬し根の表面を殺菌し、滅菌水でエチルアルコールを洗浄、乳鉢で磨砕後、滅菌水に懸濁した。それぞれの懸濁液を、蛍光性シュードモナス選択培地 P1 (Katoh and Itoh, 1983) を用いて分離した。分離株すべてを対象に、トマト青枯病の発病抑制効果について、シードリングバイオアッセイチャンバー法 (Aino *et al.*, 1997) を用いて検定した。その結果、104 菌株の一次スクリーニング株を得た。その中でも青枯病発病抑制効果の高い 2 菌株を選抜することができた。

2 種類の蛍光性シュードモナス、*Pseudomonas fluorescens* FPH9601 (*P. f.* FPH) と FPT9601 (*P. f.* FPT) は、青枯病の生物的防除エージェントとして利用可能と判断された。両菌株の分離源は、青枯病の発生している圃場から採取したトマト根内からである。

2 *P. f.* FPH と *P. f.* FPT の生物的特徴

両菌株はトマトの根内部に定着性が高く、トマト種子の発芽時にできた傷口から根内に侵入する。侵入した菌は、細胞間隙に定着し、自由に細胞間隙を移動するが、形成層内部には侵入することができない。また、本菌株のトマト苗内部の移行を自然耐性菌法を用いて調べた結果、胚軸直下の部位に集積し、根端部に移行する。しかし、胚軸上部には移行することができない特徴がある。1 g 根あたり

[†] 平成 28 年 3 月 21 日 平成 28 年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨の和文版

* 兵庫県立農林水産技術総合センター Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries Bifu, Kasai, Hyogo 679-0198, Japan

10^{5-7} CFU 存在し、トマトの成育中及び生育終了時まで根内部に定着することができる。

培地上における *P.f. FPH* の青枯病菌に対する抗菌活性を調べた結果、抗菌活性物質産生能は低く、*P.f. FPH* 単独で発病抑制効果が現れているとは考えにくい。そこで、*P.f. FPH* が定着したトマト根を青枯病菌混入ケルマン培地上に置き検定すると、定着根の周辺に阻止円が形成された。これは、定着根から多量の抗菌活性物質が漏出することによる。

P.f. FPT はキング B 寒天培地上で蛍光色素を産生する菌株であり、*P.f. FPT* は貧栄養な状況でよく増殖するが、栄養培地上では増殖するがその性質が著しく変異を起こす菌株である。*P.f. FPH* と同じようにトマト根内に定着する能力を有している。*P.f. FPT* 定着トマト根をクリスタルバイオレット加用 PD 寒天培地上に置くと、定着根の周りに蛍光性結晶が多量に析出する。*P.f. FPT* 単独の場合もコロニー周辺に蛍光性結晶が析出するが、植物根と共生状態でより産生が多くなる。本結晶を培地から採取し、ろ紙円法を用いて青枯病菌に対する抗菌活性を調べたところ、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 以上で高い抗菌活性を有していた。この蛍光性結晶の構造を解析すると、2,4-diacetylphloroglucinol であることが判明した。これは、*Pseudomonads* が出す抗菌活性物質の一つであるが、*P.f. FPT* に関しては、その産生量が他の *Pseudomonads* に比べ著しく多く、植物根共生時にはさらに多くなる特質がある。

P.f. FPH 単独でも十分青枯病の発病抑制効果を発揮するが、*P.f. FPT* と同時に感染させると、両菌株の定着量が多くなり、また、発病抑制効果も高くなる傾向を示す。

3 *P.f. FPH* 及び *P.f. FPT* の同時接種による効果増強

P.f. FPH 及び *P.f. FPT* は、単独でもトマトの根に侵入し、根内で高い定着性を示す。しかし、両菌株を同時に感染させると、単独の場合に比べ、それぞれが、さらに高い定着性を示した。それと同じく、青枯病の発病抑制効果においても、単独よりも同時感染の場合の方が、より高い効果を示すことが明らかとなった。トマト、*P.f. FPH* 及び *P.f. FPT* の三者が相利共生状態になるためではないかと考えられる。このことにより、圃場において効果を発現させるためには、両菌株を同時処理するシステムの構築が必要となる。

4 圃場への導入方法の開発

圃場に導入するためには、*P.f. FPH*、*P.f. FPT* の製剤化と大量の菌体が必要となる。大量に菌を得るだけの目的では、栄養源豊富な培地で培養を行えば、菌体量としては比較的簡単に得ることができるが、活性のある菌を培養するには

適しているとは言い難い。そこで、増殖量は少ないが、菌の活性の安定性を重視すると、植物根内で増殖させる方法が最良と考えられた。製剤化の手順は、①液体培地中で菌を植物根と共生培養する。②根と共に菌を固定化ビーズとし、大量培養の種菌を作る。③種菌を糖濃度の低い液体培地で静置培養を行う。④培養液を加える前に、バーミキュライト、赤玉土を 2:1 の割合で混合し、滅菌しておく⑤滅菌培土に培養液ごと菌を混和する。⑥混和状態で室温に置き、さらに 2 週間培養を行う。⑦保存性を高めるために本資材を真空パックし、育苗培土とする。作られた製剤化菌は培土中で長期間、活性を保ったままで生存することができる。このようにして *P.f. FPH*、*P.f. FPT* セル成型育苗培土を作製した。両菌株を内生させ病害抵抗性苗を作り上げるために、この様な培土形態となった。

5 *P.f. FPH*、*P.f. FPT* セル成型育苗培土の圃場におけるトマト青枯病抑制効果

圃場試験は異なった 9 圃場を選定した。兵庫県加西市の農業技術センター内圃場 1 か所、神戸市の一般栽培圃場 7 か所及び姫路市一般栽培圃場 1 か所で行った。農業技術センター内圃場では半促成栽培、抑制栽培の 2 つの栽培型で試験を実施した。その結果、半促成栽培では防除価 43.9、抑制栽培では 53.9 と発病抑制効果を示した。一般栽培圃場 8 か所はすべて抑制栽培で試験を行った。防除価は 31.3 ~ 86.8 とすべての圃場で効果を認めることができた。このことより、*P.f. FPH*、*P.f. FPT* セル成型育苗培土はトマト青枯病に対して有効であることが確認された。

6 種子コーティング技術の開発

特定の病原微生物に対し優れた抵抗性を発揮する内生細菌の選抜、定着化に成功しても、実際の農業生産の現場で活用するためには、その応用技術の開発が不可欠である。想定される内生細菌の活用方法としては、圃場に全面散布する方法、植物の株元局所に散布する方法、育苗中の苗に塗布する方法などがあるが、厳しいコスト環境の下で農作物を生産している農家にとっては、どれも労力や経費の点で現実的とは言えない。そこで、最も適した方法として内生細菌の含有したペレット種子の製造を試みた。

内生細菌を種子コーティングしペレット化した種子を乾燥させずに保存、内生細菌の生存率を調べると、 4°C で 20 日間保存しても 100% の種子から内生細菌が検出可能であるが、30.2% の種子が発芽し、種子の品質に悪影響を示した。また、水分含量を 10.3% まで乾燥させると、発芽はおこらないが、内生細菌の検出率が約 50% となる。このようにペ

レット化を成功させるためには、種子の品質と内生細菌の生存という相反した命題を満足させなければいけない。種皮と種子の間に内生細菌をもぐり込ませる方法をとれば、これまでよりも安定して定着可能となると予想した。そこで、減圧処理を行い通常のペレット製造工程で造粒した。その結果、水分含量を1.1%まで乾燥させても80%の種子から内生細菌を検出することが可能となった。また、造粒後、低温除湿乾燥を行うと、内生細菌の生存率が96.9%まで向上することが判明した。さらに、減圧接種と低温除湿乾燥を組みあわせて造粒すると、内生細菌の生存率が100%となった。本方法を用いて作られたペレット種子は、4°Cで約3月間保存可能であった。以上のように低コストで簡易な内生細菌処理法が完成した。

謝辞：これまでにご指導やご支援をいただいた大学の諸先生方および全国の多くの研究機関の方々、また、研究開発を支えていただいた兵庫県立農林水産技術総合センター、普及センター並びに行政機関の方々に深く感謝申し上げます。加藤肇先生、眞山滋志先生、土屋健一先生、朴杓允先生、土佐幸雄先生、中屋敷均先生、池田健一先生、石井英夫先生、村上二郎先生、古屋成人先生、百町満朗先生、清水将文先生、難波成任先生、前島健作先生、寺岡徹先生、有江力先生、横山正先生、根岸寛光先生、篠原弘亮先生、雨宮良幹先生、宍戸雅宏先生、宇佐美俊行先生、高橋英樹先生、齋藤雅典先生、古屋廣光先生、藤晋一先生、東條元昭先生、望月知史先生、駒田旦先生、松井純爾先生、籠島靖先生、高橋賢治氏、田代定良氏、難波孝志氏、小川圭氏、岡山健夫氏、前川義男氏、秋山泰三氏、吉見幸彦氏、奥村稔氏、松井純子氏、秋津教雄氏、加来久敏氏、小林剛氏、橋本好弘氏、竹林謙二氏、浅賀宏一氏、瀬戸功氏、紀岡雄三氏、野口勝憲氏、池頭靖夫氏、津田謙次氏、高原幸吉氏、坪内正之氏、伊豆進氏、近藤彰宏氏、安井強氏、渡辺哲氏、野崎和俊氏、尾崎剛一氏、小川宗和氏、林博之氏、福本庸平氏、杉本光二氏、阿部ゆづか氏、長谷部亮氏、對馬誠也氏、堀田光生氏、吉田重信氏、河本征臣氏、津田新哉氏、中保一浩氏、鈴木孝仁氏、西山幸司氏、竹内香純氏、石川浩一氏、仲川晃生氏、大崎秀樹氏、野見山孝司氏、平八重一之氏、森脇丈治氏、笹谷孝英氏、植松清次氏、田中千華氏、渡邊健氏、松本みゆき氏、諏訪順子氏、木嶋利男氏、藤永真史氏、小木曾秀紀氏、山岸菜穂氏、後藤進一氏、牧野孝宏氏、市川健氏、向島博行氏、守川俊幸氏、梅沢順子氏、黒田克利氏、鈴木啓史氏、吉川正巳氏、津田和久氏、小坂能尚氏、東山みや子氏、平山喜彦氏、那須英夫氏、川口章氏、角田佳則氏、

鍛冶原寛氏、十河和博氏、西山芳邦氏、森充隆氏、鐘江忠氏、生咲厳氏、竹内繁治氏、矢野和孝氏、下元祥史氏、安達理恵氏、松尾和敏氏、菅康弘氏、川瀬譲氏、神納浄氏、坂本庵氏、吉倉惇一郎氏、合田薫氏、塩飽邦子氏、山田健一氏、入江和巳氏、前川和正氏、神頭武嗣氏、西口真嗣氏、望月証氏、岩本豊氏、松浦克成氏、内橋嘉一氏、二井清友氏、八瀬順也氏、田中雅也氏、柳澤由香里氏、斉藤隆満氏、源昌弘氏、牧浩之氏、牛尾浩司氏、杉本琢磨氏、小林尚司氏。ここに記して、心からお礼申し上げます。

引用文献

- Aino, M., Maekawa, Y., Mayama, S. and Kato, H. (1997). Biocontrol of bacterial wilt of tomato by producing seedlings colonized with endophytic antagonistic pseudomonads. Proceedings of the 4th International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Japan-OECD Joint Workshop, Sapporo 120-123.
- Aino, M., Maekawa, Y., Akiyama, T. and Yoshimi, Y. (1999). Plug mixture for raising seedlings and method for producing it, and method for raising disease tolerant seedlings. U.S. patent number 5935571.
- Ariwiyanto, T., Goto, M., Tsuyumu, S. and Takikawa, Y. (1994). Biological control of bacterial wilt of tomato by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* from *strelitzia reginae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 60: 421-430.
- Bustamante, G.P., Ciampi, P.I. and Guaiquil, G.V. (1989). Inhibition *in vitro* of *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith using an antagonist strain of *Pseudomonas fluorescens* BC8. Revista de Microbiologia 20: 27-33.
- Furuya, N., Kushima, Y., Tsuchiya, K., Matuyama, N. and Wakimoto, S. (1991). Protection of tomato seedling by pretreatment with *Pseudomonas glumae* from infection with *Pseudomonas solanacearum* and its mechanisms. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 57: 371-376.
- Hayward, A.C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 65-87.
- Handlman, J. and Stabb, E.V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. Plant Cell. 8: 1855-1869.
- 原 秀紀・小野邦明 (1991). Effect of weakly-virulent bacteriocin-producing strain of *Pseudomonas solanacearum* on the protection of tobacco plant from bacterial wilt. 日植病報 57: 24-31.
- 東山みや子・大原裕美子・城戸 剛・西ゆり子・坂井玲央菜・相野公孝・中屋敷均 (2012). *Pseudomonas fluorescens* FPP9601 による誘導全身抵抗性機構. 土と微生物 66: 43-46.
- Kato, K. and Itoh, K. (1983). New selective media for *Pseudomonas* strains producing fluorescent pigment. Soil Sci. Plant Nutr. 29: 525-532.
- Takenaka, S., Sekiguchi, H., Nakaho, K., Tojo, M., Masunaka, A. and Takahashi, H. (2008). Colonization of *Pythium oligandrum* in the tomato rhizosphere for biological control of bacterial wilt disease analyzed by real-time PCR and confocal laser-scanning microscopy. Phytopathology 98: 187-195.