

非病原性 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* による軟腐病菌の病斑形成の抑制

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	高原, 吉幸 岩淵, 哲哉 塩田, 正幸 木村, 俊夫 菊本, 敏雄
発行元	日本植物病理學會
巻/号	59巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 581-586
発行年月	1993年10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



非病原性 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* による軟腐病菌の病斑形成の抑制

高原 吉幸*・岩渕 哲哉*・塩田 正幸*・木村 俊夫**・菊本 敏雄***

Yoshiyuki TAKAHARA*, Tetsuya IWABUCHI*, Masayuki SHIOTA*, Toshio KIMURA**
and Toshio KIKUMOTO*** : Suppression of Soft-Rot
Lesion Development by Avirulent Strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Abstract

Avirulent strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* CGE234M403 and CGE10M2 obtained by mutagenesis using ethylmethanesulfonate, suppressed soft rot of cabbage leaf efficiently. The degree of soft rot suppression correlated with the ratio of the cell concentration of avirulent strain to virulent strain. Only living cell of avirulent strains showed soft rot suppressiveness. Whereas heat-killed bacteria and supernatant broth excluding bacteria did not show soft rot suppressiveness. The strain CGE10M2 suppressed the growth of wild strains of *Erwinia* which were susceptible to the bacteriocin produced by CGE10M2. On the other hand, the strain CGE234M403 showed strong suppression activity to even some virulent strains which were resistant to the bacteriocin. Therefore, although antibacterial activity of bacteriocins may contribute to disease suppression, other factor(s) may play a part in the soft rot suppression mechanisms.

(Received January 14, 1993)

Key words: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, avirulent strain, biological control, bacteriocin.

緒 言

野菜類軟腐病は難防除病害として知られ、現在の市販されている農薬では十分な防除は困難であり、高い防除効果をもつ薬剤の開発が望まれている。近年、植物病害に対する防除手段として生物防除法が見直されており、種々の病害について研究がなされ、軟腐病に対しても微生物による防除が試みられている^{6,7,10)}。これらは主に、ジャガイモ軟腐病について研究され、*Pseudomonas fluorescens* や *Pseudomonas putida* などを拮抗細菌として用い、それらの細菌の分泌する pyrrolnitrin などの抗菌性化合物や siderophore が拮抗性の因子と考えられている。

一方、軟腐病以外の病害については非病原性菌株に

よる植物病防除の試みが弱病原性 *Pseudomonas solanacearum* によるタバコ立枯病防除³⁾、非病原性変異株によるイネもみ枯細菌病防除¹⁾ および非病原性 *Fusarium* 属菌によるサツマイモつる割病の防除⁹⁾ などでなされ、高い防除効果が得られている。これらはそれぞれ抗菌タンパクであるバクテリオシンの抗菌活性⁹⁾、抗菌化合物および交差防御、すなわち植物への誘導抵抗性付与が主な防除因子として考えられている。

植物病原菌の非病原性株を病害防除に用いる場合に、非病原性菌は病害の発生しやすい気象および土壌環境や作物の生育ステージにおいて病原菌と同様に増殖することが期待でき、定着の点から生物防除に有利な条件を備えていると考えられる。

本報では野菜類軟腐病の生物防除の一つの試みとし

* セントラル硝子(株)東京研究所 Central Glass Co. Ltd., Tokyo Research Center, 2805 Imafuku-nakadai, Kawagoe, Saitama 356, Japan

** 宮城県農業短期大学 Miyagi Agricultural College, 2-2-1 Hatatate Taihaku-ku, Sendai 982-02, Japan

*** 東北大学遺伝生態研究センター Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980, Japan

て、その病原細菌である *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* の非病原性変異株が³, 効果的に軟腐病菌によるキャベツ葉の病斑形成を抑制することを見出したので報告する。

材料および方法

供試菌株 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* CGE10株は市販セロリーの、CGE6, 11, 14株は市販ハクサイの健全組織より分離した。CGE56株は自然発病していたダイコンの罹病組織より、CGE129, 184, 234株は同様にハクサイ罹病組織より分離した。病原細菌の接種試験には市販の新鮮なハクサイとキャベツ葉を使用した。

変異原物質処理による非病原性変異株の作出 分離した各 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 株を IFO-802 培地 (ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 2 g, 硫酸マグネシウム・7 水塩 1 g, 蒸留水 1 l) 中, 30°C で約 $1 \sim 2 \times 10^8$ cfu/ml の菌濃度まで振盪培養させたのち, エチルメタンスルホニルを細菌懸濁液の 2% (v/v) 濃度になるように添加し, さらに 80 分間振盪培養した。遠心後, 菌体ペレットを IFO-802 培地で洗浄したのち, 同培地を加え一夜培養した。培養菌液 0.1 ml にペクチン酸を唯一の炭素源とする培地 (ペクチン酸ナトリウム 7 g, 硫酸アンモニウム 2 g, 硫酸マグネシウム・7 水塩 0.2 g, 蒸留水 1 l, pH 7.0) 5 ml を加え, さらにペニシリン GK 塩 (最終濃度 250 ユニット/ml) を添加し, 30°C で 6 時間振盪培養した。培養液を IFO-802 寒天培地上に塗布し, 増殖したコロニーをペクチン酸含有寒天培地 (ペクチン酸 7 g, カザミノ酸 3 g, 酵母エキス 2 g, 硫酸マグネシウム・7 水塩 0.2 g, 硫酸アンモニウム 2 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 l) に移植し 28°C で一夜培養した。次に, 寒天培地に 10% CaCl_2 溶液を注加し, 産生ペクチン酸リアーゼ由来の白色ハロー⁵⁾を周囲に形成しないコロニーを選抜した。

野菜葉への細菌の接種 変異株の病原性は 1×10^9 cfu/ml 濃度の細菌懸濁液 20 μl をハクサイ葉の中肋部に針接種したのち, 湿度を保った 28°C の恒温槽内に置き, 24 時間後に形成された病斑長を調査した。

病斑形成の抑制試験は直径 15 mm のコルクボーラで打ち抜いたキャベツ葉 10 枚を変異株および病原性株の所定細菌濃度懸濁液中に 1 時間浸漬したのち, 28°C の恒温槽に 24 時間静置した。病斑程度の調査は水浸状病斑の面積により以下のように判定し, 病斑指数 (disease index, %) を計算した。指数 3: キャベツ葉ディスクの全面に病斑形成, 指数 2: 病斑面積

50~99%, 指数 1: 病斑面積 50% 以下, 指数 0: 病斑なし

$$\text{病斑指数 (\%)} = \frac{\sum \text{指数} \times \text{調査ディスク数}}{3 \times \text{総調査ディスク数}} \times 100$$

増殖能の測定 普通ブイヨン培地中の増殖能を測定するために, 同培地に病原性株, 非病原性変異株をそれぞれ 10^6 cfu/ml ずつ加え, 30°C で振盪培養し, 培養 6, 24 時間後に希釈平板法により生菌数の測定を行った。

キャベツ葉上の増殖についてはコルクボーラにより直径 15 mm に打抜いたディスクを用いた。所定の細菌濃度に調整した懸濁液にキャベツ葉のディスクを 1 時間浸漬したのち, 懸濁液を抜き取りガラスシャーレ内に置いたガラス板上に並べ 28°C の恒温槽内に静置した。なお, ガラス板の下には湿った紙をしき, 湿度を保った。次に, 所定時間後にキャベツ葉のディスク 5 枚に 20 ml の滅菌蒸留水を加え, ミキサーで磨砕しドリガルスキー改良培地 (肉エキス 4 g, ペプトン 10 g, 乳糖 10 g, プロモチモールブルー 0.04 g, 寒天 16 g, 蒸留水 1 l) を用いて希釈平板法により軟腐病菌濃度を求めた。次に, 非病原性変異株および病原性株の各々の菌数はドリガルスキー改良培地上のコロニーをペクチン酸含有培地に移植し, 28°C で一夜培養したのち 10% CaCl_2 溶液を注加し, コロニー周囲のハロー形成の有無により判定して求めた。

実験結果

非病原性変異株の作出

エチルメタンスルホニルによる変異誘発処理により産生ペクチン酸リアーゼに由来するハローを形成しない変異株を 1000 株以上作成した。さらにこれらをハクサイ葉の中肋部に高濃度 (約 10^9 cfu/ml) で接種し, 24 時間後に病斑を形成しない変異株を選抜した。これらの非病原性変異株を病原性株と共にキャベツもしくはハクサイなどの野菜葉に接種すると, 病原性株による水浸状病斑形成を抑える現象がみられた。非病原性変異株の比較的多くの菌株が程度の差はあるものの抑制効果を示し, その中で, 比較的影響効果の強い菌株である CGE234M403 株および CGE10M2 株について詳しい検討を行った。

非病原性変異株と病原性株の混合接種による病斑形成抑制

非病原性変異株と病原性株 CGE6 とを混合した懸濁液にキャベツ葉ディスクを浸した後, 28°C, 24 時間後の病斑面積を測定した。その結果, 非病原性変異株

CGE234M403 および CGE10M2 株は病原性株による病斑形成を明らかに抑制した (Table 1)。一方、対照に用いたキャベツに対して病原性を示さない *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* は病斑形成の抑制効果を全く示さなかった。

さらに、病原性株に対する CGE234M403 株の菌濃度比を上げると抑制効果が強くなり、病原性株の 10 倍の菌濃度の場合にはほとんど完全に病斑形成を抑制した (Table 1, Table 2)。また、キャベツ葉ディスクを非病原性変異株の懸濁液に浸漬し、3 時間後に病原性株を接種した場合には、両菌株の濃度が等しい場合においても病斑形成を強く抑制した。

一方、この病斑形成の抑制効果は生菌を用いた場合にのみ認められ、加熱死菌および菌体を除いた培養上清には抑制効果がなかった (Table 3)。

バクテリオシン産生と病斑抑制の関係

病斑形成の抑制効果の機構を明らかにするために、

非病原性株の産生するバクテリオシンに対して感受性を異にする病原性株 6 株を供試し病斑抑制の差異を調べた。非病原性変異株 CGE234M403 株および CGE10M2 株の病原性株 6 株に対するキャベツ葉での病斑抑制の程度を Table 4 に示した。同時に、非病原性変異株の分泌するバクテリオシンの病原性株への抗菌性と病原性株の分泌するバクテリオシンに対する感受性をも示した。CGE10M2 株はその産生するバクテリオシンに対して感受性である CGE11 株、および CGE14 株に対して強い抑制効果を、CGE6 株に対しては弱い抑制効果を示した。一方、バクテリオシンに耐性である CGE56, 184 株に対してほとんど抑制効果がみられず、病斑抑制効果とバクテリオシン感受性との間にほぼ相関が認められた。しかし、CGE234M403 株は供試した全ての病原性株、すなわちバクテリオシン感受性株、耐性株いずれに対しても高い病斑形成の抑制効果を示し、バクテリオシン感受性との関連は認められなかった。

Table 1. Suppression of soft rot of cabbage leaf disks by treatment with avirulent strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Strain	Concentration (cfu/ml)	Disease index ^{a)}
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> CGE234M403	10 ⁸	0.0
	10 ⁷	33.3
	10 ⁶	66.6
	10 ⁵	66.6
	10 ⁴	93.3
	10 ⁷	0.0 ^{b)}
CGE10M2	10 ⁷	75.0
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> NIAES 1318	10 ⁷	100.0
—	—	100.0

a) Disease index after 24 hr by treatment of virulent strain CGE6 (10⁷ cfu/ml) with avirulent strain.

b) Inoculated with CGE6 after incubation at 28°C for 3 hr after pre-treatment with CGE234M403.

Table 3. Suppression on soft rot of cabbage leaf disks by treatment with living and killed cells of avirulent *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Treatment ^{a)}	Concentration (cfu/ml)	Disease index
—	—	100.0
living bacteria	10 ⁸	0.0
„	10 ⁷	33.3
heat-killed bacteria ^{b)}	10 ⁸	96.7
„	10 ⁷	100.0
supernatant broth ^{c)}	10 ⁸	100.0
„	10 ⁷	100.0

a) Avirulent strain (CGE234M403), virulent strain (CGE6) at the concentration of 1×10⁷ cfu/ml.

b) Heated at 65°C for 30 min.

c) Supernatant after centrifugation of stationary growth of CGE234M403 in nutrient broth.

Table 2. Suppression of soft rot of cabbage leaf disks at different concentration of avirulent and virulent bacterial suspensions

Avirulent	Concentration cfu/ml	Virulent	Concentration cfu/ml	Disease index
—	—	CGE 6	10 ⁷	100.0
CGE234M403	10 ⁷	CGE6	10 ⁷	33.3
—	—	CGE6	10 ⁶	89.0
CGE234M403	10 ⁷	CGE6	10 ⁶	0.0
—	—	CGE6	10 ⁵	24.0
CGE234M403	10 ⁷	CGE6	10 ⁵	0.0
CGE234M403	10 ⁷	—	—	0.0
—	—	—	—	0.0

Table 4. Suppression of soft rot of cabbage leaf disks by treatment of avirulent strains

Avirulent ^{a)}	Disease index					
	Virulent CGE6 ^{b)}	CGE11	CGE14	CGE56	CGE129	CGE184
—	100.0	100.0	73.3	26.7	86.7	31.7
CGE10M2	80.0(+/-) ^{c)}	23.3(+/-)	33.3(+/-)	36.7(-/-)	28.3(-/-)	36.7(-/-)
CGE234M 403	0.0(+/-)	0.0(-/-)	26.7(+/-)	0.0(+/-)	20.0(-/-)	6.7(-/+)

a) Concentration of avirulent strain (10⁷ cfu/ml)b) Concentration of virulent strain (10⁶ cfu/ml)

c) Upper mark of quotation shows anti-bacterial activity of avirulent strain's bacteriocin to virulent strain. Lower mark shows that of virulent strain to avirulent strain.

Table 6. Growth of avirulent and virulent strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in cabbage leaf disks

Virulent strain	Avirulent strain	Conc. of virulent strain			Conc. of avirulent strain		
		0 hr	6 hr	10 hr	0 hr	6 hr	10 hr
CGE6	—	0.31 ^{a)}	2.9	7.8	—	—	—
CGE6	CGE10M2	0.17	1.4	2.2	0.31	1.9	1.4
CGE6	CGE234M403	0.13	0.18	0.40	0.33	1.3	5.5
CGE129	—	0.72	5.7	11.6	—	—	—
CGE129	CGE10M2	0.24	2.6	4.9	0.32	1.1	2.0
CGE129	CGE234M403	0.44	1.9	2.0	0.36	2.3	4.5

a) Concentration : $\times 10^7$ cfu per disk of cabbage leaf.

Table 5. Growth of avirulent and virulent strains in nutrient broth

Ex. no	Strain	Concentration ($\times 10^8$ cfu/ml)		
		0 hr	6 hr	24 hr
1 ^{a)}	CGE234M403	0.01	0.15	19
	CGE6	0.01	0.59	13
2 ^{b)}	CGE234M403	0.02	1.3	4.9
	CGE129	0.02	2.4	9.3

a) Mixture of CGE234M403 and CGE6.

b) Mixture of CGE234M403 and CGE129.

キャベツ葉上における非病原性株と病原性株の増殖競合

次に、病斑形成の抑制効果とキャベツ葉上における両菌株の増殖競合との関係について調べた。CGE234M403株のキャベツ葉上の増殖を病原性株と比較した。キャベツ葉ディスクにCGE234M403株と病原性株とを混合接種した後、菌数の変動を経時的に追跡した。また対照としてパイヨン培地における増殖競合も検討した。パイヨン培地では、CGE234M403株と2つの病原性株、すなわち、CGE6株あるいはCGE129株との間では増殖の差はほとんどみられなかった (Table 5)。

一方、キャベツ葉に接種した場合には、混合した病原性株と非病原性変異株との組合せにより、病原性株の増殖が大きく異なった (Table 6)。すなわち、病斑形成の抑制効果の高い非病原性株 CGE234M403株はキャベツ葉上でCGE6株の増殖を強く抑制した。CGE129株に対しても弱い抑制が示された。一方、非病原性株 CGE10M2株と病原性株を混合接種した場合には、病原性株の増殖速度が病原性株単独の場合よりも低下するものの、CGE234M403株-CGE6株系の場合ほどの大きな増殖抑制はみられなかった。なお、ここで用いた菌株の中ではCGE234M403株およびCGE10M2株の生産するバクテリオシンはCGE6株に対して抗菌活性があり、CGE129株に対しては抗菌活性はない。また、CGE6株のバクテリオシンにCGE10M2株は感受性である (Table 4)。

考 察

軟腐病菌の病原性は主としてペクチン酸リアーゼにあり、ペクチンリアーゼおよびポリガラクトナーゼが補助的な役割をしていると考えられている²⁾。したがって、変異誘発処理によりペクチン酸リアーゼの分泌欠損株を多数作出し、病斑を形成しない菌株を選抜した。それらの非病原性変異株の中には病原性軟腐病

菌株と混合しキャベツ葉へ接種すると、病原性株による病斑形成を抑制する菌株が存在することを見出した。*P. syringae* pv. *lachrymans* の場合には病斑形成への抑制効果は認められず、非病原性軟腐病菌株に特有の抑制効果と考えられる。

病原性株に対する非病原性特異株の菌濃度比を大きくした場合や非病原性変異株を病原性株よりも前に接種すると病斑形成の抑制効果が上昇した。また、この病斑形成の抑制作用は生菌で認められ、加熱死菌および培養ろ液にはこの抑制効果はなかった。

さて、この病斑抑制機構については、*E. carotovora* subsp. *carotovora* ではよく知られている抗菌性バクテリオシンの影響が考えられたのでその検討を行った。キャベツ葉への病原性株と非病原性変異株との混合接種において、非病原性株 CGE10M2 株については、そのバクテリオシンに感受性を示す軟腐病菌に対しては抑制効果を示すものの、耐性の病原性株に対しては抑制効果がなく、この菌株のバクテリオシンの抗菌作用が抑制効果に深く関与しているものと考えられた。しかし、もう一方の非病原性株 CGE234M403 株については検討した全ての病原株に対して病斑形成を抑制した。これらの病原性株の中には CGE234M403 株の分泌するバクテリオシンに耐性の菌株も含まれているので、バクテリオシンだけでは説明できない。

混合接種後の葉組織での菌数測定結果によると、CGE234M403 株は自身が生産するバクテリオシンに感受性の病原性株 CGE6 株の増殖を強く抑え、また耐性の CGE129 株に対しても弱い増殖抑制がみられ、この増殖競合が病斑形成の抑制に関与したのと考えられる。この増殖競合にはバクテリオシン以外の要因も関係していると考えられる。一方、非病原性株 CGE10M2 株の場合には CGE6 株および CGE129 株ともに組織内増殖への抑制効果は小さいが病原性単独接種に比べると明らかに病原性株の増殖は抑えられており、これが病斑形成抑制に関わったのと考えられる。なお、ブイヨン液体培地ではこれらの菌株間の増殖抑制は認められず、植物組織でのみ認められたことから増殖抑制因子は植物内でのみ発現するものと考え

られる。

微生物による植物病害の防除機構については、これまで種々の生物防除の試みがなされ、抗菌物質による殺菌効果、競合もしくは宿主作物への誘導抵抗性付与などが防除の因子として提案されている⁴⁾。本研究で示した非病原性軟腐病菌による軟腐病の病斑形成の抑制機構についても、一つの可能性として、少なくとも CGE10M2 株においてバクテリオシンの関与が示唆された。しかしながら、バクテリオシンのみの効果ではキャベツ葉を用いた病斑形成抑制の全ての結果を説明することはできず、他の要因の関与も考えられ、この拮抗機構についてはより詳しい検討が必要である。また、本研究で示したように非病原化した軟腐病菌が野菜葉上で軟腐病菌による病斑形成に対して抑制効果をもつことがわかり、実用化も期待されるので現在検討中である。

摘 要

軟腐病菌を変異誘発剤エチルメタンスルホニルにより処理し、非病原性変異株を多数作出した。非病原性変異株 CGE234M403 と病原性軟腐病菌株とを混合してキャベツ葉に接種すると、病原性株のみの接種に較べて、病斑形成が強く抑制された。病原性株に対する CGE234M403 株の菌濃度比が大きくなるにつれて、病斑形成への抑制効果は高くなった。また、CGE234M403 株を先に接種すると混合接種よりも病斑形成を強く抑制した。また、この抑制作用は、生菌にのみあり、加熱死菌および培養ろ液にはみられなかった。CGE234M403 株は供試した全ての病原性株に対して抑制効果が認められ、その中には本菌株が生産するバクテリオシンに耐性の病原性株も含まれていた。さらに、キャベツ葉組織内での細菌の増殖実験では、CGE234M403 株はそのバクテリオシンに感受性の病原性株 CGE6 の増殖を著しく阻害した。一方、この増殖阻害は液体培養ではみられず、植物組織が必要であった。したがって、病斑形成の抑制にはバクテリオシンの関与が考えられるものの、他の因子の関与も示唆された。

引用文献

1. Furuya, N., Okamoto, T., Kori, Y., Matuyama, N. and Wakimoto, S. (1991). Control of bacterial seedling rot of rice by avirulent strains of *Pseudomonas glumae*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57 : 371-376.
2. 後藤正夫 (1981). 新植物細菌病学. ソフトサイエンス社, 東京. pp. 61-64.
3. Hara, H. and Ono, K. (1991). Effect of weakly-virulent bacteriocin-producing strain of *Pseudomonas solanacearum* on the protection of tobacco plant from bacterial wilt. Ann. Phytopath. Soc. Japan 57 : 24-31.
4. 本間善久 (1990). 農業有用微生物 (梅谷献二・加藤 肇編). 養賢堂, 東京. pp. 109-123.

5. Keen, N.T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. and Belser, W. (1984). Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 159 : 825-831.
6. Kloepper, J.W. (1983). Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting *rhizobacteria* on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. Phytopathology 73 : 217-219.
7. Loao, C.H. (1989). Antagonism of *Pseudomonas putida* strain PP22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. Plant Dis. 73 : 223-226.
8. 小川 奎・駒田 旦 (1984). 非病原性 *Fusarium oxysporum* によるサツマイモつる割病の生物防除. 日植病報 50 : 1-9.
9. Vidaver, A.K. (1976). Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. Ann. Rev. Inc. 451-465.
10. Xu, G.-W. and Gross, D.C. (1986). Field evaluations of the interactions among fluorescent *Pseudomonads*, *Erwinia carotovora*, and potato yields. Phytopathology 76 : 423-430.