

胚軸切断接種法を利用した内生細菌のナス青枯病に対する 発病抑制効果

誌名	高知県農業技術センター研究報告
ISSN	09177701
著者名	矢野,和孝 森田,泰彰 川田,洋一
発行元	高知県農業技術センター
巻/号	11号
巻号補足	
掲載ページ	p. 1-5
発行年月	2002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



胚軸切断接種法を利用した内生細菌の ナス青枯病に対する発病抑制効果

矢野和孝*・森田泰彰*・川田洋一*

Suppressive Effect of Endophytic Bacteria Using the Method of Hypocotyls
Cutting Inoculation against Bacterial Wilt of Eggplant

Kazutaka YANO, Yasuaki MORITA and Youichi KAWADA

要 約

青枯病発生後に再生したナスの地際部組織から分離した細菌139菌株、および胚軸切断捕捉法で分離した細菌184菌株のナス青枯病に対する発病抑制効果を検討した。その結果、浸根接種法よりも胚軸切断接種法を用いて細菌を接種した場合に、発病遅延効果が認められる菌株が多かった。比較的发病抑制効果が高かった胚軸切断捕捉法で分離した3菌株は、圃場試験においても発病抑制効果が認められた。以上の結果から、胚軸切断接種法を利用した内生細菌によるナス青枯病防除の可能性が示唆された。

キーワード：ナス、青枯病、生物防除、内生細菌、胚軸切断捕捉法、胚軸切断接種法

はじめに

Ralstonia solanacearum によって引き起こされるナス青枯病は、ひとたび発生すると発病株は回復が見込めないことから、その被害は大きく、高知県においては毎年栽培圃場の4割程度で発生が見られる⁹⁾。本病の防除法としては、抵抗性台木の利用^{7,10,16)}や太陽熱を利用した土壤消毒³⁾があり、実用に供されている。また、この他にも非病原性青枯病菌²⁾、植物体に抵抗性を誘導する細菌¹⁴⁾、バクテリアオシン産生菌^{5,14)}、非病原性 *Pseudomonas glumae*⁴⁾等、微生物を利用した防除法がトマトやタバコに対して報告されている。しかし、これらの生物防除法は発病が抑制されたことの報告のみにとどまっており、未だ実用化には至っていない。

一方、トマト青枯病に対する内生 *Pseudomonas*¹⁾やアブラナ科根こぶ病に対する根部エンドファイト^{12,13)}の内生微生物が生物防除に有効であることが近年報告されている。これらは、前述の生物防除法と比較して、植物組織内に微生物が定着しやすく、外界の環境条件に影響されにくいという利点を備え

るとともに、抵抗性の誘導も期待できることから、実用化が期待されている¹⁾。また、木嶋ら⁸⁾も組織内共生微生物を利用し、ハクサイ根こぶ病、キュウリつる割病、トマト萎凋病等に防除効果があったことを報告している。

そこで、ナス青枯病に対しても組織内微生物を利用した防除法を検討したところ、胚軸切断捕捉法で分離した3菌株の細菌を胚軸切断接種法で接種した場合に発病抑制効果が認められたので、その概要について報告する。

材料および方法

1. 供試細菌の分離

1998年2月に高知県安芸市のナス栽培農家圃場(品種: '千両二号', 台木: ヒラナス)で、青枯病発生のため地上部を切除した株のうち、腋芽が再生した株を採集し、その茎の地際部を約2 cmに切断して表皮を除去した。これを10 mlの殺菌水とともにホモジナイザーで細かく碎き、ガーゼで濾過した濾液から肉エキスを寒天培地を用い、希釈平板法で139菌株

の細菌を分離した。

また、胚軸切断捕捉法⁸⁾によっても細菌の分離を試みた。すなわち、当農業技術センター内の露地圃場の土壌を入れた容器（大きさ：50×36×10cm）に播種14日後のヒラナスの胚軸を切断して挿し木し、その2週間後に約 10^9 cfu/mlの濃度の青枯病細菌（菌株番号：下山5B，IV群菌）液を約500ml土壌灌注接種した。この中で約2カ月後においても枯死しなかった株の地際部の茎を約2cmに切断し、上記と同様な方法で184菌株の細菌を分離した。

なお、分離した細菌はいずれもスキムミルクに懸濁して-80℃で凍結保存した。

2. ポット試験

1) 1次スクリーニング

(1) 浸根接種法

各供試菌株をイースト・ペプトン・デキストロース液体培地（以下 YPDB と略記する）5 ml で30℃、150rpm、2日間振とう培養し、これに播種15日後のヒラナスの根を約30分間浸漬した。浸漬後は直ちに市販育苗培土（土太郎、スミリン農産工業株式会社製）を詰めた直径7.5cmのポリポットに植え付けた。7日後にYPDBで30℃、150rpm、2日間振とう培養し、10倍に希釈した青枯病細菌（菌株番号：下山5B，IV群菌）液を1ポット当たり約10ml、土壌灌注接種した。接種後は最低温度25℃に設定したガラス温室内で管理し、接種から発病が見られるまでの日数を調査した。調査終了後に、最も早く発病した株と最も遅く発病した株を除いた3株の平均発病日数を算出し、無接種に対する発病遅延日数を求めた。なお、試験には1菌株当たり5ポット供試し、青枯病接種50日後まで発病の有無を調査した。ただし、症状の認められなかった株については50日後に発病したものと仮定して算出した。

(2) 胚軸切断接種法

播種15日後のヒラナスの胚軸を切断し、前項と同様に培養した供試細菌の培養液に胚軸切断部を約30分間浸漬後、直ちに市販育苗培土を詰めた直径7.5cmのポリポットに挿し木した。14日後に青枯病細菌液を前項と同様な方法で接種し、同様に管理、調査した。

2) 2次スクリーニング

胚軸切断接種法による1次スクリーニングで28日

以上の発病遅延効果が認められた細菌8菌株を供試した。前項と同様に細菌を胚軸切断接種した後、青枯病細菌液を接種した。接種後は毎日発病の有無を調査し、発病株率を算出した。試験は30℃に設定したコイトロン内で行い、1菌株当たり12ポット供試した。なお、コイトロン内で一度に8菌株の試験を実施するのは困難であったので、3回に分けて試験を実施した。また、第1回目の試験でやや発病抑制効果が認められたYN729については、第3回目の試験においても繰り返して供試した。

3. 圃場試験

2次スクリーニングで発病抑制効果が認められたYN729，YN736，YN750を供試した。2000年5月10日に播種したヒラナスの胚軸を5月25日に切断し、1次スクリーニングと同様な方法で胚軸切断接種した。接種後は直ちに市販育苗培土を詰めた直径10.5cmのポリポットに挿し木した。6月19日に‘千両二号’を接ぎ木し、7月21日に当農業技術センター内の青枯病菌に汚染された露地圃場に定植した。発病が見られ始めた8月14日から2～4日間隔で発病の有無を調査し、発病株率を算出した。試験は1区10株3連制で実施し、栽植距離は1.1×0.4mとした。なお、無処理区には胚軸を切断しないヒラナスを台木として用いた。

結 果

1. 1次スクリーニング

発病遅延効果が認められた菌株は、浸根接種法よりも胚軸切断接種法で多く、28日以上発病遅延効果が認められたのは、胚軸切断接種法では8菌株であったが、浸根接種法では全く認められなかった。また、浸根接種法と胚軸切断接種法の発病遅延効果に相関は認められず、胚軸切断接種法で発病遅延効果の高かった8菌株は、浸根接種法では7日未満と低かった（第1表）。

2. 2次スクリーニング

胚軸切断接種法で28日以上発病遅延効果が認められた8菌株について、供試苗数を12株に増やして再度試験したところ、YN729，YN736，YN750の3菌株で発病抑制効果が認められた（第1～3図）。

第1表 ナス組織中から分離された細菌のナス青枯病に対する発病遅延効果

分離源	浸根接種法における 発病遅延効果	胚軸切断接種法における発病遅延効果					合計
		7日未満	7日以上 14日未満	14日以上 21日未満	21日以上 28日未満	28日以上	
再生株	7日未満	77	21	12	9	0	119
	7日以上14日未満	7	0	2	0	0	9
	14日以上21日未満	3	4	1	0	0	8
	21日以上28日未満	3	0	0	0	0	3
	28日以上	0	0	0	0	0	0
	合計	90	25	15	9	0	139
胚軸切断	7日未満	128	16	7	15	8	174
	7日以上14日未満	8	0	0	0	0	8
	14日以上21日未満	1	0	1	0	0	2
	合計	137	16	8	15	8	184
挿し木株	21日以上28日未満	0	0	0	0	0	0
	28日以上	0	0	0	0	0	0
	合計	0	0	0	0	0	0
	合計	137	16	8	15	8	184

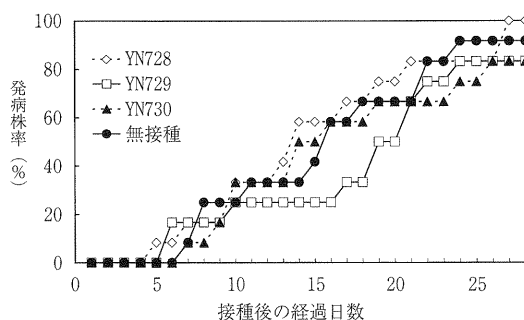
数字は発病遅延効果の認められた菌株数。

3. 圃場試験

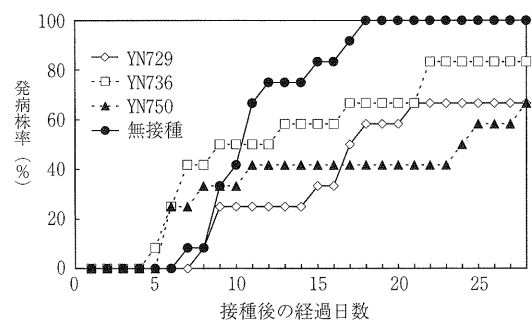
YN729接種区では、初発生時期が無処理区よりもやや遅く、その後の発病も無処理区より少なかった。YN736接種区は、無処理区と同じく7月30日から発病が見られ始めたが、その発病は無処理区と比較して少なく、その後も無処理区より少ない発病で経過した。YN750接種区の発病は、8月6日まで無処理区とほぼ同じであったが、8月9日以降の発病は無処理区よりも少なかった（第4図）。

考 察

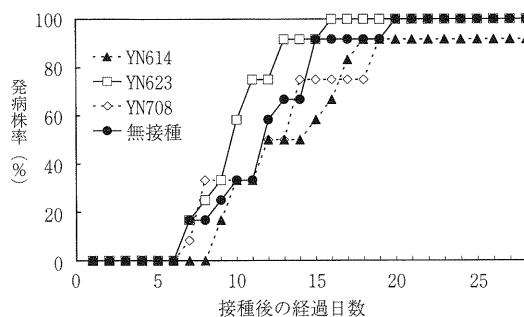
木嶋ら⁸⁾は、たとえ外見上は健全な植物体であっても、例外的にシクラメンやサツマイモなどでは組織内に細菌や糸状菌が存在することを見出し、拮抗細菌を共生させるとシクラメン炭疽病、サツマイモの割病に対して抵抗性を示すことを明らかにした。更に、微生物を共生させる方法として、胚軸切断接種法が優れていることを見つけ、本法を用いて細菌を共生させたトマトが萎凋病に対して抵抗性を



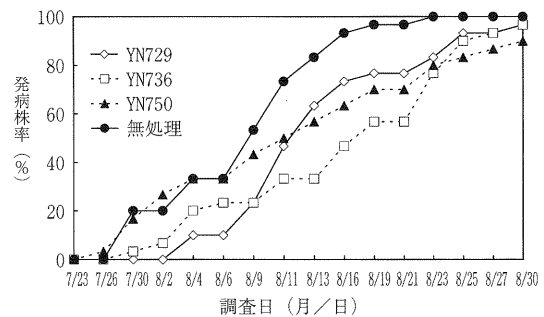
第1図 胚軸切断接種法による細菌のナス青枯病に対する発病抑制効果（その1）



第3図 胚軸切断接種法による細菌のナス青枯病に対する発病抑制効果（その3）



第2図 胚軸切断接種法による細菌のナス青枯病に対する発病抑制効果（その2）



第4図 圃場における胚軸切断接種した細菌のナス青枯病に対する発病抑制効果

示すことを明らかにした。本試験においても、浸根接種法より胚軸切断接種法で発病遅延効果の認められる菌株が多く、2次スクリーニングにおいて発病抑制効果が認められた3菌株は、圃場試験においても発病抑制効果が認められた。このことから、胚軸切断接種法はナス青枯病に対しても有効であると考えられた。

一方、発病遅延効果の認められる菌株が少なかった浸根接種法については、根圏細菌を用いた森田ら¹¹⁾の試験と比較しても発病遅延効果の認められる菌株が少ない傾向であった。本試験の供試菌株は、いずれもヒラナスの地際部の組織中より分離したために、根への定着性は低かったのではないかと考えられた。

現地農家圃場でナス青枯病が発生した場合には、地上部は切除される場合が多い。通常発病株から腋芽が発生することはないが、稀に再生してくる現象が観察される。1998年2月に現地農家でナス青枯病の防除試験を実施した際に、発病後に再生した株が見られたので顕微鏡観察すると、導管部にわずかではあったが、細菌の存在を確認した。そこで、導管部に存在する細菌が発病を抑制しているのではないかと考え、細菌の分離を行い、試験に供した。その結果、胚軸切断接種法において7日以上発病遅延効果が認められる菌株が139菌株中49菌株見つかり、その割合は胚軸切断捕捉法で分離した場合より高かった。しかし、より発病遅延効果の高い菌株の割合は胚軸切断捕捉法で分離した場合の方が高かった。また、圃場試験において発病抑制効果の認められた3菌株も胚軸切断捕捉法で分離された菌株であった。胚軸切断接種法を利用したナス青枯病防除の実用化のためには、この3菌株よりも更に発病抑制効果の高い細菌を見つけることが必要となるが、菌株採集という点からも、稀にしか見つけないことのできない再生株より、いつでも実施できる胚軸切断捕捉法が利用しやすいと考えられる。

胚軸切断接種法では、11科32種の植物において組織内に微生物を共生させることに成功している⁸⁾。この中に、ナスは含まれているが、その台木として用いられるヒラナスは含まれていない。本試験では、接種した細菌が実際にヒラナスの組織内に定着しているかどうか確認していない。しかし、胚軸切断捕捉法等により実際にヒラナスの組織内から細菌を分離できたことから、ヒラナスにおいても細菌を

共生させることが可能と考えられる。今後は、ヒラナスの組織内においても細菌の定着を確認するとともに、発病抑制効果の認められる細菌の分類学的な所属や性質、効果発現のメカニズム等、詳細な調査が必要である。

胚軸切断接種法によって微生物が共生した植物では、生育促進や生育抑制が報告されている⁸⁾。また、植物の生育を促進する微生物は、植物生育促進根圏細菌 (Plant growth promoting rhizobacteria: PGPR)¹⁵⁾ や植物生育促進菌類 (plant growth promoting fungi: PGPF)⁶⁾ と呼ばれ、病害防除だけでなく、作物の生育を促進させ、増収効果も期待されている。本試験では、ヒラナスに対する生育促進は観察されなかったが、胚軸切断捕捉法で分離した細菌の一部では、青枯病菌の接種前に枯死する場合や生育抑制が観察された。圃場試験において発病抑制効果の認められた3菌株については、生育抑制が認められなかったが、今後は、更に発病抑制効果が高く、ナスの生育を促進させる性質も兼ね備えた細菌の選抜が期待される。

引用文献

- 1) 相野公孝 (1998). 土壤消毒併用による生物防除資材 HT9601セル成型育苗培土のトマト青枯病発病抑制効果. 今月の農業. 42 (6) 76-79.
- 2) Arwiyanto, T., M. Goto, S. Tsuyumu and Y. Takikawa (1994). Biological control of bacterial wilt of tomato by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Strelitzia reginae*. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 60 : 421-430.
- 3) 伊達寛敬・那須英夫・畑本 求 (1990). 促成栽培ナスの青枯病に対する太陽熱消毒および抵抗性台木などの組合せ効果. 岡山農試研報. 8 : 25-30.
- 4) 古屋成人・土屋健一・松山宣明・脇本 哲 (1987). 非病原性 *Pseudomonas glumae* によるトマト青枯病発病抑制の機作. 日植病報. 53 : 412-413.
- 5) Hara, H. and K. Ono (1991). Effect of weakly-virulent bacteriocin-producing strain of *Pseudomonas solanacearum* on the protection of tobacco plant from bacterial wilt. Ann. Phytopath. Soci. Japan. 57 : 24-31.
- 6) 百町満朗 (1994). 植物生育促進菌類について. 植物防疫. 48 : 252-257.

- 7) 川合貴雄・伊達寛敬・飛川光治・坪井 勇(1993). ナス耐病性台木「トレロ」の特性. 岡山農試研報, 11: 27-34.
- 8) 木嶋利男・天谷正行・郷間秀夫・米内貞夫・大橋一夫・生井 潔・須永哲央・小栗尚子・橋田弘一・熊田欽丈・小林光子(1995). 組織内共生微生物を用いた生育及び病害の制御. 栃木農試研報, 43: 47-86.
- 9) 高知県(2001). 平成12年度農作物有害動植物発生予察事業年報. 263.
- 10) 峯岸正好・内藤 潔・位田晴久・野村寿志・宮本重信(1991). ナス青枯病抵抗性台木「カレヘン」の特性と実用性. 農業および園芸, 66: 1065-1069.
- 11) 森田泰彰・土屋健一・川田洋一(1997). ナス青枯病菌に対して拮抗性を示す細菌の検出. 高知農技セ研報, 6: 1-7.
- 12) 成澤一彦・羽柴輝良(1995). 根面菌によるハクサイ根こぶ病菌(*Plasmodiophora brassicae*)の生物防除について. 日植病報, 61: 269.
- 13) 成澤一彦・羽柴輝良(1996). *Plasmodiophora brassicae*によるハクサイ根こぶ病を抑制する根部エンドファイト, *Heteroconium chaetospira*. 日植病報, 62: 281.
- 14) 小野邦明(1991). 拮抗細菌によるタバコ立枯病の防除. 植物防疫, 45: 96-100.
- 15) 穴戸雅宏(1999). PGPR 物語: 今昔そして未来. 植物防疫, 53: 316-320.
- 16) 矢野和孝・森田泰彰・川田洋一・古谷眞二(2000). 高知県におけるナス青枯病の菌群分布と抵抗性台木による防除. 高知農技セ研報, 9: 9-16.

Summary

One hundred and thirty nine isolates of bacteria isolated from the inner tissue of the base stem of an eggplant, which were regenerated after the development of bacterial wilt of eggplant, and 184 isolates of bacteria isolated by the method of hypocotyls cutting capture were examined of controlling effect against bacterial wilt of eggplant. As the results, such isolates were numerous found in which development delay effect was observed in case bacteria were inoculated by the method of hypocotyls cutting inoculation than by the method of root soaking inoculation. In three isolates of bacteria isolated by the method of hypocotyls cutting capture in which the development inhibition effect was relatively high, development inhibition effect was also recognized in the field test. These results suggest that it would be possible to control bacterial wilt of eggplant by endophytic bacteria using the method of hypocotyls cutting inoculation.

Key words: eggplant, bacterial wilt, biological control, endophytic bacteria, method of hypocotyls cutting capture, method of hypocotyls cutting inoculation.