

No. 16

March, 2022

# バイオコントロールの実用化研究の最前線 および展開方向

Frontline of applied research on biocontrol  
and its development direction

2022 オンライン開催

日本植物病理学会 バイオコントロール研究会

**PSJ Biocontrol Workshop**

本報告（電子ファイル）の取り扱いについて  
①第三者への配布は固く禁止します。  
②本報告掲載の研究成果の中には未公開のものも含まれております。従って、複製・転載および引用に当たっては、必ず原著者の了承を得るよう、特にご注意ください。

はじめに

日本植物病理学会バイオコントロール研究会は 1989年に第1回が開催されて以来、今回で第16回目の開催となります。新型コロナウイルス感染症の影響に伴い、2018年の前回(15回)開催から実に4年ぶりの開催となりますが、この間、世の中の情勢は目まぐるしい速度で変化を起こしています。バイオコントロールを含めた植物防疫に関する我が国の農林水産行政施策においても、二つの大きな動きがありました。一つ目は、改正農薬取締法に基づく既登録農薬の再評価が2021年度から開始されたこと、二つ目は、化学農薬の使用量を2050年までに50%低減(リスク換算)することなどをめざす「みどりの食料システム戦略」が農林水産省により策定されたことです。化学農薬の使用低減に関係したこれらの取り組みは、いわば、化学農薬に代替しうる防疫技術の開発・普及の強化の必要性を意味しており、バイオコントロールについても基礎から応用そして実用化に至るまでの各工程での研究または技術開発の強化がより一層必要な状況となっていると感じます。さらに、本バイオコントロール研究会に対しても、その果たすべき使命や活動への期待が4年前よりもさらに大きなものになっていると思います。

こうした観点も踏まえ、第16回の本研究会では、「バイオコントロールの実用化研究の最前線および展開方向」というテーマを設けて、最前線でご活躍されている諸先生方に話題提供をしてもらうことといたしました。第一部のセッション「バイオコントロールの実用化研究の最前線」では、新たな微生物資材開発または上市を目指した研究開発の取り組み状況について、4名の先生方からご講演頂くこととしました。また、第二部のセッション「実用化のためのバイオコントロール研究の展開方向」では、2名の先生方に今後の実用化が期待されるバイオコントロール関連研究の紹介をして頂くとともに、今後の中長期的なバイオコントロール研究のあり方や方向性を探るための情報として、近年世界的に高い関心を集め、「みどりの食料システム戦略」にも盛り込まれている新たな農業資材「バイオスティミュラント」の展開方向等についてバイオスティミュラント協議会の鈴木氏からご講演頂くこととしました。

以上の各講演内容に対する参加者の皆様との活発な情報交換を通じて、バイオコントロール研究のさらなる活性化が図られ、今回の研究会が今後の我が国の農業生産への貢献に結び付く新たな研究や技術開発の契機となることを期待しています。

令和4年3月29日

著者しるす

# 目次

## 基調講演

- 生物的防除研究のこれまでとこれから・・・・・・・・・・・・・・・・・・1  
古屋 成人（九州大学）

## 第一部 バイオコントロールの実用化研究の最前線

- 微生物殺虫剤ボタニガード ES の病害防除における作用機作・・・・・・・・・・9  
飯田 祐一郎（摂南大学）

- 微生物殺虫剤ボタニガード ES の殺菌剤としての実用化と展開・・・・・・・・・・14  
山中 聡（アリスタ ライフサイエンス（株））

- Bacillus* 属細菌を利用した微生物資材によるダイズ土壌病害軽減技術・・・・・・・・・・19  
佐藤 孝（秋田県立大学）

- SIP における植物病害抑制菌株の探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・27  
窪田 昌春（農研機構植物防疫研究部門）

## 第二部 実用化のためのバイオコントロール研究の展開方向

- 日本バイオスティミュラント（BS）協議会と BS 資材の展望について・・・・・・・・・・32  
鈴木 基史（愛知製鋼（株））

- 沖縄微生物ライブラリーを活用した植物病害防除の可能性・・・・・・・・・・39  
上野 誠（島根大学）・新里 尚也（琉球大学）・伊藤 通浩（琉球大学）

- エンドファイトー土着細菌共生系が作物生産を変える？・・・・・・・・・・47  
成澤 才彦（茨城大学）

# 生物的防除研究のこれまでとこれから

九州大学大学院農学研究院 古屋 成人

## From now and past of biological control

### Abstract

More than 30 years have passed since the PSJ Biocontrol Workshops started in 1989. During the fourteen Workshops, many subject themes were discussed and considered. It can be said that the current state of researches and practices of biological control of plant diseases in Japan has already been shown in its entirety and is in prospect possible situations. Therefore, in this section, on the basis of look back on my own research the points of future biological control research are discussed.

### はじめに

バイオコントロール研究会は、脇本哲九州大学教授と農業生物資源研究所鈴木孝仁博士らが発起人となって、1989年に設立されて以来、すでに30年余の歳月が流れた。北海道大学で開催された第1回研究会において、脇本博士は、本研究会の発足に当たり、我が国における、今後の生物的防除研究の方向性を示した。即ち、減農薬栽培が指向され、かつ有効な農薬開発が困難となりつつあった当時の社会的背景の下、難防除病害に対する生物的防除開発の必要性を強調した。そして植物病害の防除に農薬や抵抗性品種による防除法と矛盾なく併用できる生物的防除法開発の重要性を論じている。

2007年に百町は「バイオコントロール研究会の10回を振り返って」の演題で、過去10回における研究会で発表された総計92題について整理、解析を行うことで、これまでの研究会の歴史とその歩みについて総括している。土屋（2009）は研究会発足から20年間の国内における生物的防除の研究事例に基づいた課題とその解決に向けた対応について論じた。また對馬（2012、2014）は、生物的防除技術の開発と普及課題についてIPMの観点から微生物農薬の新たな活用事例を紹介し、今後の方向性を示している。さらに相野（2016）は、日本植物病理学会の創設100年の節目に第1巻から81巻までの学会誌を総覧し、我が国における生物的防除に関する研究の歴史について総括を行った。

2009年には本研究会の20周年を記念して、「微生物と植物の相互作用—病害と生物防除—」の出版がなされた。以上のように、我が国における植物病害の生物的防除の研究と実践の現状については、その全容が既に示され、展望可能な状況にあるものと言えそうである。そこで、本稿では筆者自身の研究を振り返って、今後の生物的防除研究が目指すべき点について考えてみたい。

## 生物的防除素材菌の探索源を何に求めるか

植物細菌病を防除するためには、従来、抵抗性品種の育成と農薬の開発・利用が重視されてきた。しかし、土壌伝染性や維管束侵犯性の細菌病には防除困難なものが多く、それらの被害は甚大である。これらの難防除細菌病を防除するために、生物的方法を利用する研究が盛んに試みられてきている。筆者が、協本教授の下で卒論実験を開始した1980年初



B. glumaeの青枯病菌に対する抗菌活性

頭は、欧米におけるPGPR研究に倣って抗菌性物質産生細菌の利用と物質の純化が主要な研究課題となっていた。そこで探索源を広く自然界に求め、細菌の分離を試みた結果、イネ葉上から分離された*Burkholderia gladioli*の一菌株が各種の重要植物病原細菌に対して広い抗菌スペクトラムを示す産生菌であることが明らかとなった。このため、本菌に近縁な*Burkholderia*属や*Pseudomonas*属の植物病原細菌の中にも抗菌物質産生菌の存在が予想された。農薬あるいは医薬として有望な抗菌物質の純化を進めると同時に病原性を喪失させ

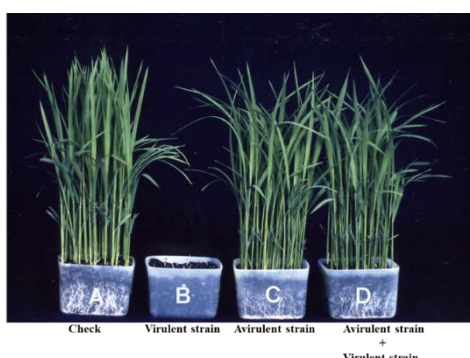


非病原性*Burkholderia glumae*によるトマト青枯病の発病抑制

た菌株の生物防除への利用開発が期待された。病原性を喪失したイネもみ枯細菌病菌 (*B. glumae*) の菌液をトマト幼苗の根系に接種することで*Ralstonia solanacearum*による青枯病の発病が顕著に抑制される現象を認めた。そこで、こ

の作用機序が抗菌物質によるものか否かの解析を進めた結果、抗菌物質非産生株、死菌あるいは菌体多糖などでも発病を抑制することが明らかとなった。このように非病原性*B. glumae*を用いたトマト青枯病の発病抑制効果の発現は抗菌活性、感染部位の競合や誘導抵抗性などの複数の要因が絡んでいることが推察された(古屋、1989)。しかしながら、圃場実証試験においては、安定した発病抑制効果を得ることが出来なかった。

そこで、生態的ニッチや感染増殖部位を考慮した非病原性菌株の利用法として、*B. glumae*



非病原性*Burkholderia glumae*によるイネ苗腐敗症の発病抑制

によるイネ苗腐敗症への生物的防除法の適用の可能性を検討した。実際、イネ種子を非病原性の菌液に浸漬処理するだけで、化学農薬の散布と同レベルの高い発病抑制効果が得られることが明らかとなった。また、開花期頃に非病原性菌株を噴霧処理した場合にも、もみ枯症を顕著に抑制することが明らかとなった。作用機序の解析を行った結果、死菌や菌体多糖では効果は全く認められず、生菌が示す何らかの拮抗作用であることが示された。まず、幼根と幼芽の基部付近における病原性菌株の増殖抑制と同時に病原性菌株が産生する毒素トキソフラビンが分解される現象を認めた。さらに発病抑制効果発現にバクテリオシンの産生

も関与していることを明らかにした。

以上、*B. glumae* の非病原性菌株を利用したトマト青枯病とイネ苗腐敗症の生物的防除の研究により、同一の生物的防除候補菌であっても、対象植物や標的病害が異なると発病抑制効果発現の機序が大きく異なることが明らかとなった。また、相野(1999)が「いかにうまく効かせるかを考える姿勢がなければ生物的防除を成功させることはできない」と述べている通り、圃場実証試験で効果が不十分であっても対象植物や標的病害を変えることで実用可能となる場合があると推察した。

非病原性菌株の利用は、根頭癌腫病の生物的防除に代表されるように今後も重要な開発素材となる可能性を秘めている。これまでも実際、土壌伝染性細菌病に対する金字塔である *Agrobacterium radiobacter* をはじめ、我が国でも非病原性 *Rhizobium vitis* の利用 (川口、2014)、非病原性 *Xanthomonas* 属細菌 (井上、2016) や非病原性 *Erwinia carotovora* (高原、1994) などの成功例などがある。

生物的防除候補菌の探索において、研究当初は、各種植物の葉圏や根圏にその分離源を求めていた。また病害の発生圃場で発病を逃れた作物からの分離を行うこともあった。生物的防除研究の流れが次第に定着性に傾くようになり、根系などを表面殺菌後に分離されるいわゆる内生細菌の利用が盛んに注目されるようになり現在に至っている。内生細菌は環境の変動をあまり受けず安定した定着性が期待される。探査植物としては対象病害の宿主である野生種や接ぎ木癒合組織部位に求めるのも一つの方向性となるかもしれない。以下にその研究例を示す。

### 野生植物の根系に内生細菌を求める

野生植物は栽培種よりも共進化の過程でより適応した内生細菌が生息しているものと推察される。筆者らはこれまでに、生物的防除素材菌の探索源として、熱帯～亜熱帯地域に自生する野生ナス科植物 (*Solanum* sp.) の根内部に求め、そこに生息する内生



Solanum sp.  
熱帯原産のナス科野生植物

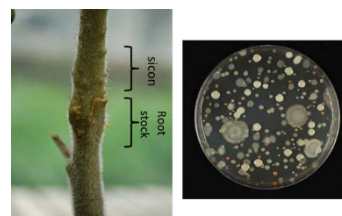
細菌の性状を解析した。その結果、選抜した *Pseudomonas* 属の 3 菌株がタバコ立枯病を顕著に抑制し、これら内生細菌 3 菌株はいずれもタバコ幼苗内に約  $10^{5-6}$  cfu/g で定着し、青枯病菌の侵入・増殖を抑制していることが菌数測定や GFP 遺伝子を導入した青枯病菌を利用することにより示された。また、これら内生細菌を処理したタバコ幼苗での防御応答遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。その結果、3 菌株の処理でいずれもサリチル酸応答マーカー遺伝子 *PR1* の発現が増加し、ジャスモン酸やエチレンのシグナル経路に関連するマーカー遺伝子の発現誘導は認められなかった。さらに、サリチル酸非蓄積系統である NahG 形質転換タバコでは、発病抑制効果が認められず、*PR1* 遺伝子の発現も増加しなかった。これらの結果から、3 菌株による発病抑制機構としてサリチル酸シグナル経路の関与が示唆された。このように、野生植物の根系内部には多種多様な内生細菌が生息しているものと推察される。これら内生細菌は栽培作物の根内部に生息する細菌よりも長い共進化



を経て根内部に適応している可能性があり、定着性に優れた生物的防除候補菌が今後発見される可能性が高い。

### 接ぎ木植物の癒合組織に内生細菌を求め

これまで植物内生細菌は主として根圏や葉圏をその分離源とされてきた。しかしながら、比較的研究が進んでいる生物的防除においても、未だに導入した細菌を植物内に効率的に定着させることは容易でない。そこで、生物的防除素材菌の定着力に焦点をあて、従来顧みられることのなかった世界的にも伝統的な接ぎ木植物に着目し、感染する細菌群集構造の解明を行っ



接ぎ木植物の癒合組織部位

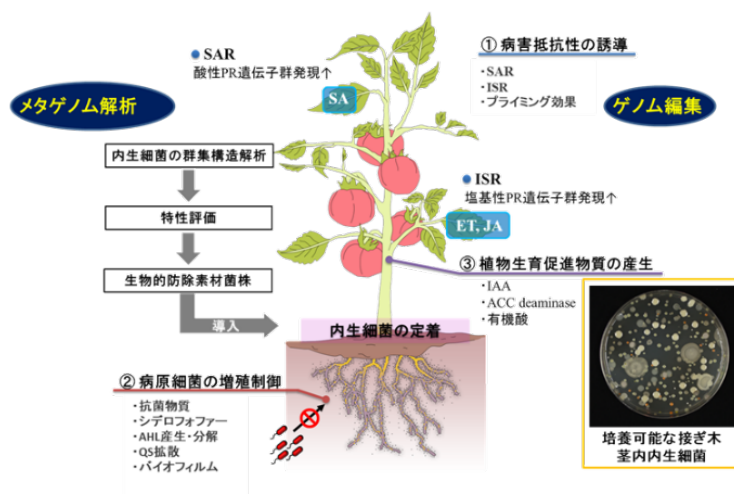
た。さらに、難防除植物細菌病の生物的防除に有効な菌の機能解析と利用技術の開発を試みた。病害防除を目的とした接ぎ木には、野生植物由来の抵抗性台木が一般に用いられる。接ぎ木作業時には接合部を大気中に晒すことから細菌感染が起きる。しかし、感染した細菌群は植物の生体防御機構により接合部の癒合とともに死滅していくものと考えられていた。しかしながら、癒合組織内には培養可能な細菌が約  $10^6$  cfu/g の一定の菌密度で生息していることを明らかにした。この接ぎ木内に形成される細菌群集構造を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により解析したところ、接ぎ木癒合部位における細菌種の多様性は一定しており、定着した細菌群集は台木部位へ移動することが明らかとなった。この現象は、台木による病害抵抗性の発現機構に内生細菌の存在が深く関係していることを推察させる。このような研究背景の下、接ぎ木癒合組織内の細菌群集を解析することにより、高度な定着力を有する内生細菌を利用した難防除植物病害の生物的防除の可能性が示唆された。

癒合組織内から培養可能な細菌の分離を行ったところ、*Sphingomonas*、*Bacillus*、*Pandora*、*Rhizobium* 属など約 20 属の菌群で構成されていた。これらの分離細菌について、生物的防除活性の発現と密接に関連する各種植物ホルモン産生性や重要植物病原細菌に対する抗菌活性などの性状解析により有望菌の選抜を進めた結果、*Sphingomonas* 属の菌株がトマト青枯病の発病を温室内で顕著に抑制することを明らかにした。この菌株に GFP 遺伝子を導入し、植物組織内での動態解析を行ったところ、根部の皮層部位に約  $10^8$  cfu/g の菌密度で定着している様子が観察された。さらに選抜菌株を接ぎ木時に切断面に接種したところ、無接種に比べて青枯病の発病が顕著に抑制され、癒合組織に約  $10^6$  cfu/g の濃度で定着すると同時に台木方向への緩やかな移動が見られた。

以上の研究成果は接ぎ木癒合組織内が内生細菌種の新たな探索源となる可能性を示すものであり、この細菌群集内には難防除植物細菌病の生物的防除素材の候補菌の存在だけではなく産業利用上にも有益な細菌種が生息しているものと推察される。接ぎ木癒合組織内の群集構造解析により、台木による病害抵抗性や穂木生育に及ぼす内生細菌の影響が明らかになり、伝統的な接ぎ木技術のより効果的な利用促進に寄与するものと期待される。

## 生物的防除効果発現の機序

生物的防除の効果発現の機構はこれまでに様々な面から解析がなされてきている。細菌による防除効果発現の様式は、①防除用細菌と病原菌との関係、②防除用細菌と他の微生物との関係、③防除用細菌と植物との関係の三通りの相互作用に大別される。①では抗菌物質やシデロフォアなどの二次代謝産物の産生能など感染部位や栄養源の競合、②ではクオラムセンシングやバイオフィームなど、③では誘導抵抗性、プライミング効果や植物生育促進などの研究事例がある。



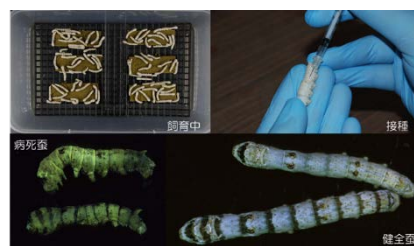
一方、植物の抵抗性誘導に関する研究は今後も盛んに進むことが予想される。生物的防除においては、植物の生育への影響が少ない、病原体の感染時のみに抵抗性が誘導されるプライミング現象の解析とプライミングエフェクターの研究の進展が重要となろう。また根からの浸出液と導入菌の定着との関係で代謝オミックスの研究などが期待される。

作用機作の解明には遺伝子組換え実験に基づいた解析が重要になるが、国内における組換え微生物の野外散布は禁止されている。今後、遺伝子組換えにより機能を改良した微生物の分子育種は生物的防除の安定した効果の向上のためにも必要不可欠となることが予想される。遺伝子操作は最近では CRISPR/Cas9 や TALEN 等のゲノム編集技術が急速に進んでおり、タンパクだけで核酸を利用しない TALEN による生物的防除効果を増強した改良微生物の野外散布実験などが可能となることが期待される。

## 候補菌株の安全性評価

有効素材細菌が微生物農薬として実際に商品化されるには化学農薬と同様に農薬取締法に基づいた安全性評価試験を行い、動物やヒトに対して影響がないことを示す必要があり、これには多くの時間と費用を要する（鈴木、1992; 坂本、1997）

生物的防除素材菌の選抜は自然界から多数の細菌を分離して、対象病原に対する抗菌活性などの性状を解析し、発病抑制試験などを実施することで有望菌株の選抜を進めるのが通常の方法である。この場合、選抜の最終段階で細菌種の同定を行い、有望菌株の分類学的位置づけが明らかになる。同定の過程で初めて選抜された菌株の安全性が見え始めてくるものである。しかしながら、*B. cepacia* のように「病原菌のバイオセーフティレベル」においてレベル2の危険度に位置づけられ、ヒト日和見感染菌と



安全性評価におけるカイコの利用



しての特性を併せ持つ人畜共通病原微生物も多く存在し、米国では、商品化された同種菌を主体とする微生物農薬が登録抹消になる事態も起きている。このような事態を避けるためにも分離菌株の安全性評価試験は研究の早い段階で実施するのが合理的である。しかしながら、多数の分離細菌に関する安全性確認は通常的手法では困難である。そこで我々は、生物的防除素材の探索と分離などの研究初期段階において、タバコ葉過敏感反応試験を行うことで、植物病原性細菌の可能性のある菌株の除去を行い、その後の選抜過程での解析菌株数を減らしている。動物に対する病原性試験は、多数の菌株を供試して実施することは費用がかかり極めて困難である。このような現状の下、我々はカイコを感染モデル生物として病原性評価に利用している。カイコは病原菌に対する反応が、哺乳類と類似していることが明らかにされており、人工飼料での飼育も可能であることから多数の検体を供試した安全性評価が可能である。検定細菌をカイコの血体腔内に注入することで、血体腔内で増殖した細菌が敗血症を誘発することにより人畜に対する病原性の有無を容易に評価できる可能性がある。有望菌株の予備選抜の段階に、カイコ感染系やタバコ葉過敏感反応試験を取り入れることで、迅速かつ効果的な安全性評価が可能となるものと期待される。

### 伝統的生物的防除

雑草を宿主とする病原微生物を利用した微生物防除剤は処理法の違いによって大きく二つの手法が知られている。一つは、化学農薬と同様に、要防除時期に多量の病原微生物を散布して除草効果を期待する微生物除草剤としての利用法であり、これまで世界各地でその研究と実用化された商品が多く知られている。国内でもこれまで病原糸状菌を利用した水田雑草であるクログワイやノエビを対象にした研究例など



英国におけるイタドリの繁殖状況

などが知られている（郷原、1994）。スズメノカタビラに感染性のある *Xanthomonas campestris* は「キャンペリコ」の商品名で細菌剤としては世界初の除草剤として登録された（山田、1994）。

二つ目は、天敵の利用と同様に要防除地域の一部に病原菌を接種し、その病原菌が感染拡大し、病気の発生が蔓延していくことで雑草密度を次第に低下させる伝統的方法である。この種の研究は古くから西洋において発展し、1950年代頃よりさび病菌を中心に実用化が進められている。

筆者らは、寄生性菌類や植食性昆虫類を利用した伝統的生物防除法により、欧米諸国で被害が急速に進行している日本由来の難防除侵入雑草であるイタドリの分布拡大を抑制し、侵入地における在来植物の繁殖を回復させ、生物多様性を維持することを目的とした国際共同研究を英国・国際生物防除研究所(CABI)との間で展開している（黒瀬、2012）。これまでにイタドリマダラキジラミ(*Aphalara itadori*) やイタドリ斑点病菌(*Mycosphaerella polygони-cuspidati*)が有望な導入素材であること、並びに斑点病菌による発病を助長する内生菌の存在を見出した。現在、英国においてイタドリマダラキジラミを野外に放飼しており、

外来性天敵による雑草の伝統的生物的防除の歴史において欧州初の事例となっている。しかしながら、対象昆虫の生物的防除機能が有効に発揮されているとは言い難く、次策の防除素材候補としての植物病原菌の野外放出に備えて安全性評価や効率的な散布法などの実際的な研究を進めている。

近年、世界中において外来性雑草が侵入・定着し、在来植物との競合などにより生物多様性に影響を与え、自然生態系を攪乱している。このような問題を伝統的生物的防除の手法により解決していくためには、対象雑草の原産国における生態学的調査や侵入国での被害状況の把握など国際的な共同研究が不可欠となる。国内における、雑草の伝統的生物的防除に関する研究の歴史は浅く、今後、国や大学を中心とした研究基盤の確立が求められる。また、伝統的生物的防除法は生物的防除法の王道でもあることから、本法の適用が可能な宿主病害に対してもこの種の研究推進が期待できよう。

## おわりに

気候変動やエネルギー問題などの地球規模の課題を抱える国際社会において、生物的防除の実際的な応用はその必要性をますます高めることが期待される。今後は化学農薬との併用のためにも、IPM 中における生物的防除技術の積極的な成功事例を積み上げていく必要がある。そしてアフリカやアジアの貧困国において低コストで持続可能な生物的防除の技術が無償で利用できる体制の構築も今後重要な課題となる。

## 引用文献

- 1) 相野公孝 (1999) 細菌を用いた病害防除の歩みと展望 6:29-36.
- 2) 相野公孝 (2016) 日本植物病理学会に見る生物的防除関連研究、バイオコントロール研究会レポート 14:1-10.
- 3) 古屋成人 (1989) イネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病に対する発病抑制効果とその機作、バイオコントロール研究会レポート 1:31-39.
- 4) 郷原雅敏 (1994) 微生物除草剤の研究動向、バイオコントロール研究会レポート 4:50-59.
- 5) 百町満朗 (2007) バイオコントロール研究会の 10 回を振り返って、バイオコントロール研究会レポート 10:1-14.
- 6) 井上康宏 (2016) *Xanthomonas* 属細菌による病害全般に防除効果を持つ微生物農薬開発の試み、バイオコントロール研究会レポート 14:45-50
- 7) 川口章 (2014) ブドウ根頭がんしゅ病に対する生物防除、バイオコントロール研究会レポート 13:19-25.
- 8) 黒瀬大介 (2012) 植物病原菌を用いた侵略的外来性雑草イタドリの生物的防除、バイオコントロール研究会レポート 12:50-58.
- 9) 阪本剛 (1997) 農薬登録における微生物農薬の安全性評価、バイオコントロール研究会レポート 5:55-69.

- 10) 鈴木孝仁 (1992) 微生物農薬の安全性評価をめぐる諸問題、バイオコントロール研究会レポート 3:51-62.
- 11) 高原吉幸 (1994) 微生物農薬の開発—野菜軟腐病防除の試み— 4:1-7.
- 12) 土屋健一 (2009) 生物防除の将来展望について、バイオコントロール研究会レポート 11:1-6.
- 13) 對島誠也、相野公孝 (2014) 生物農薬の実用化に向けた展望、バイオコントロール研究会レポート 13:1-10.
- 14) 對島誠也 (2012) 生物農薬が直面している問題点と今後の展開、バイオコントロール研究会レポート 12:1-6.
- 15) 脇本哲 (1989) 植物病害における生物的防除戦略、バイオコントロール研究会レポート 1:1-11.
- 16) 山田昌雄 (1994) 雑草防除のための微生物農薬開発の現状(2) クログワイ、スズメノカタビラの防除、バイオコントロール研究会レポート 4:60-69.

# 微生物殺虫剤ボタニガードESの野菜類うどんこ病に対する作用機作

摂南大学農学部 飯田祐一郎

Mode of action of the microbial insecticide Botanigard ES against powdery mildews of vegetables

Yuichiro Iida : Faculty of Agriculture, Setsunan University

## Abstract

Entomopathogens have been developed as biocontrol agents against a wide range of insect pests. Some entomopathogenic fungi can grow with plants as epiphytes, endophytes or rhizosphere microorganisms, and are used as active ingredients in commercial microbial insecticides. Entomopathogenic fungi have also been reported to be effective against plant pathogens, but their mode of action had not been largely unclear. We found that the entomopathogenic fungus-based bioinsecticide Botanigard ES suppresses powdery mildews of vegetable, and finally registered as a microbial fungicide in Japan. The *Beauveria bassiana* strain GHA, the active ingredient of the Botanigard ES, can grow epiphytically and endophytically on tomato and cucumber plants. Both the Botanigard ES and the conidial suspension of strain GHS showed the biocontrol effect locally. The mode of action of Botanigard ES against powdery mildew is that *B. bassiana* strain GHA induces local resistance via the accumulation of salicylic acid. However, other *B. bassiana* strains exhibited different mode of action for the pathogen, suggesting the strain-depending mechanism.

## はじめに

昆虫寄生性の糸状菌には*Beauveria*属菌、*Lecanicillium*属菌、*Akanthomyces*属菌、*Metarhizium*属菌、*Paecilomyces*属菌などが知られており、微生物殺虫剤の有効成分として実用化されている (Vega et al. 2009)。これらの昆虫寄生菌は、エピファイト、エンドファイトまたは根圏微生物として植物との親和性を示すことから、植物病原菌に対する生物防除剤の候補としても選抜されている。Renwickら (1991) は、コムギ立枯病菌 *Gaeumannomyces graminis* に対する拮抗菌として *B. bassiana* を見出し、昆虫寄生菌の病害防除への適用の可能性を示した。その後も培地上での抗菌活性だけでなく、タマネギ乾腐病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*、苗立枯病 *Rhizoctonia solani* などの植物病原菌に対して生物防除効果を示す昆虫寄生菌が同定されている (Flori and Roberti, 1993; Ownley et al. 2004; 2008; Bamisile et al. 2018)。しかしながら、昆虫寄生菌による病害防除の作用機作は明らかとなっていなかった。

ボタニガードES (アリスタライフサイエンス社) は、昆虫寄生菌 *B. bassiana* GHA 株を有効成分とする乳剤で、アザミウマ類、アブラムシ類、コナジラミ類など幅広い害虫に適用登録のある微生物殺虫剤である。我々は、本剤を散布した施設内でうどんこ病の発生が少ないという使用者からの経験談について、実験室レベルで検証した。ボタニガードESに加えて市販されている7種の微生物殺虫剤についてトマトうどんこ病に対する防除効果を明らかにしたところ、ボタニガードESが最も顕著に発病を抑止し、害虫と病

原菌の両方を防除できるデュアルコントロール剤としての可能性が示された。本稿では、ボタニガードESの微生物殺虫・殺菌剤としての実用化と作用機作に関する研究を紹介する。

## 1 ボタニガード ES の野菜類うどんこ病に対する防除効果と植物親和性

ボタニガードESを含む微生物殺虫剤を対象に、野菜病害に対する防除効果を解析した結果、キュウリ、トマト、イチゴ、ナス、メロンにおいてうどんこ病の発病を効果的に抑制することが明らかとなった(図1)。ウリ科に感染するうどんこ病以外は異なる病原であることから、広く野菜類のうどんこ病に効果を示すことが判明した。また3科5作物での薬効薬害試験を実施したことで、本剤の「野菜類うどんこ病」に対する適用拡大が認可された。



図1. 微生物殺虫・殺菌剤ボタニガード ES

本剤の有効成分である*B. bassiana*は植物に対する親和性が報告されていることを上述したが、いずれの菌株にも共通するわけではなく、また菌株と植物との相性も重要であることが知られていた (Jaber and Ownley, 2018; Klieber and Reineke, 2016)。そこで我々は、本剤に含まれる*B. bassiana* GHA株の植物との親和性を解析することを目的に、恒常的に発現するGFP遺伝子カセットを導入し、トマトおよびキュウリの植物体内外での増殖を観察した。その結果、GHA株は高い湿度条件下において、植物体の葉面や葉柄上で旺盛な菌糸生育と孢子形成を示し、また接種2週間後においてもGFP蛍光が確認されたことから(図2)、植物体上で成育できるエピファイトであることが明らかとなった

(Nishi et al. 2020)。GHA株は、擦り傷などの付傷処理を施したトマト葉柄の組織内から高い頻度で再分離され、走査型電子顕微鏡による組織学的観察でも植物体内に侵入することが確認された。そのため本菌株はエンドファイトとしての機能も有することが示された。一般に野菜類の施設栽培では頻繁に、摘芽、摘葉、摘果、摘芯などの管理作業を伴うため、植物体の表面には傷がつきやすい。そのためボタニガードESの散布は管理作業後、また湿度が上昇する夕刻以降や散布後の湿度制御によって、植物体内外での生存率が高まる可能性が示された。

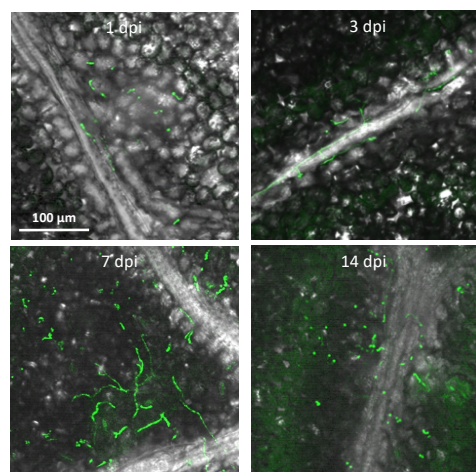


図2. 昆虫寄生菌 *B. bassiana* GHS 株のキュウリ葉面上における定着性.



## 2 昆虫寄生菌 *B. bassiana* と植物との相互作用

*B. bassiana* GHA株が植物への高い親和性を示したことから、ボタニガードESのうどんこ病防除の作用機作は、その有効成分であるGHA株と植物との相互作用が関わるのではと考え、両者の防除効果を比較した。キュウリ葉の半面にボタニガードESを、もう半面に水を処理し、キュウリうどんこ病菌を全面に接種した。その結果、ボタニガードESを処理した半面にのみ防除効果が現れた(図3)。GHA株の孢子懸濁液を噴霧接種した場合も同様に、局所的な防除効果が発揮された。またいずれの処理においても、濃度依存的にキュウリうどんこ病菌の近傍にカロースの蓄積および過敏反応

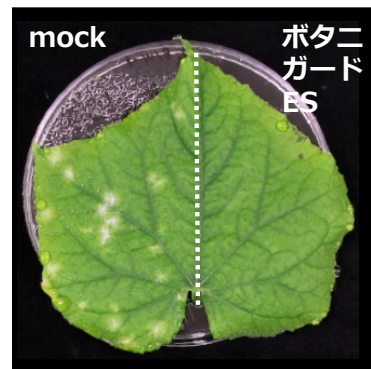


図3. ボタニガードESのキュウリうどんこ病に対する防除効果.

(HR)が認められ、サリチル酸が蓄積することが明らかとなった。またボタニガードESには、うどんこ病菌の発芽および菌糸伸長を抑制する成分が存在しており、サリチル酸を介した局所的な抵抗性を誘導するGHA株と協調的に作用することが示唆されている。

## 3 昆虫寄生菌 *B. bassiana* の病害防除メカニズムは菌株ごとに異なる

最近、昆虫寄生菌の病害防除効果に対する作用機作が初めて報告された。Raadら(2019)は、*B. bassiana* FRh2株およびBG11株をシロイヌナズナに浸根接種することで、地上部で発病する菌核病に対して全身的な抵抗性を発揮することを見いだした。両菌株を接種したシロイヌナズナでは異なる遺伝子発現変動を示し、アブラナ科特有の二次代謝産物であるグルコシノレートの産生パターンも異なっていた。BG11株の接種では根部のバイオマスが増加するなど、菌株によって植物の応答が大きく異なっていた。両菌株ともサリチル酸やジャスモン酸への影響はなかった。上述したようにGHA株はサリチル酸が蓄積する一方でシステミックな防除効果は現れない等、FRh2株とBG11株の示す作用とは明らかに異なっており、*B. bassiana*は植物への親和性だけでなく、防除効果の作用メカニズムも菌株ごとに異なることが示された。

## 4 昆虫寄生菌と植物間における相利共生

昆虫寄生菌は植物と基本的な親和性を示すことが明らかとなってきたが、自然界においてそれにはどのような意義があるのだろうか? Bidochkaらの研究グループは、窒素安定同位体で標識した昆虫に昆虫寄生菌を寄生させ、その死骸を植物の根圏に処理した。その結果、*B. bassiana*や*M. robertsii*などの昆虫寄生菌は、昆虫から植物に窒素源を供給することが明らかとなった(Behie, 2012; Behie and Bidochka 2014)。一方、昆虫寄生菌の細胞壁の構成成分であるキチンや貯蔵糖トレハロースには、植物から同化された炭素が検出されたことから、植物と昆虫寄生菌間における相利共生関係が見事に証明された(Behie et al., 2017)。昆虫寄生菌による植物への窒素供給は、特に*Metarhizium*属菌にお

いて効率がよく、単子葉植物、双子葉植物に関わらないことから、エンドファイトとして機能する昆虫寄生菌は生態的な窒素循環に大きく貢献していることが示唆されている。

## おわりに

世界の生物農薬の市場規模は、2020年に39億6,000万米ドルの価値に達し、2021年から2026年の間に力強い成長を示すと予想されている。世界的には生物農薬の成長率は年平均15%と高く、特に欧州では生物農薬に関連した研究予算が拡大している。生物農薬は、化学農薬に対する耐性の病原菌や害虫の出現リスクが低く、化学的防除の代替として今後さらなる利用拡大が期待されるが、一方で日本の農薬市場に占める生物農薬の割合はわずか0.6%程度（約22億円）の規模に過ぎない。生物農薬は化学農薬と比べて、環境要因等によって防除効果変動しやすく、適用病害虫に限られる、最大限の効果を発揮させるために個々の剤の特性について知識が必要などの理由から敬遠されがちである。そのため、今後の生物農薬の開発においては「病害防除効果」だけでなく、生物に秘められた他の特性も生かした創薬アイデアが必要となってくるだろう。我々は、コスト削減と省力化に貢献する病害虫の同時防除（デュアルコントロール）を実現することで、微生物農薬でも化学農薬に対抗できるのではないかと考え、微生物殺虫・殺菌剤を開発した。今後、新たな概念によって生物農薬が開発されることを期待する。

本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受け、窪田昌春博士（農研機構）、山中聡博士（アリストライフサイエンス社）をはじめとした参画機関と共同で遂行した。

## 引用文献

- 1) Bamisile BS, Dash CK, Akutse KS, Keppanan R, Wang L (2018) Fungal endophytes: beyond herbivore management. *Front Microbiol* 9: 544.
- 2) Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ (2012) Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336(6088):1576-1577.
- 3) Behie SW, Bidochka MJ (2013) Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Appl Environ Microbiol* 80(5):1553-1560.
- 4) Behie SW, Moreira CC, Sementchoukova I, Barelli L, Zelisko PM, Bidochka MJ (2017) Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nat Commun* 8:14245.
- 5) Jaber LR, Ownley BH (2018) Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biol Control* 116:36–45.
- 6) Flori P, Roberti R (1993) Treatment of onion bulbs with antagonistic fungi for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Difesa delle Piante* 16:5–12.
- 7) Klieber J, Reineke A (2016) The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *J Appl Entomol* 140: 580–589.

- 8) Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM (2008) *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *J Invertebr Pathol* 98:267–270.
- 9) Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE (2010) Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol* 55:113-28.
- 10) Raad M, Glare TR, Brochero HL, Müller C, Rostás M (2019) Transcriptional reprogramming of *Arabidopsis thaliana* defence pathways by the entomopathogen *Beauveria bassiana* correlates with resistance against a fungal pathogen but not against insects. *Frontiers in Microbiology* 10: 1481.
- 11) Renwick A, Campbell R, Coe S (1991) Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathol* 40:524–532.
- 12) Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH, Pell JK, Rangel DEN, Roy HE (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol* 2:149–159.

## 微生物殺虫剤ボタニガードESの殺菌剤としての実用化と展開

アリスタ ライフサイエンス(株)製品開発部 山中 聡

Practical use and its development of microbial insecticide, BotaniGard ES as a bio-fungicide

Satoshi Yamanaka

Arysta LifeScience Corp. Product Development Dept.

### Abstract

During research and development of the novel biological control agents, needs from grower, market sizes, target crops and pests are examined, and possibilities of commercialization are scrutinized. Newly active ingredients are very interesting, but application development of the commercialized products is also one of important means.

It has been recognized that BT (*Bacillus thuringiensis*), *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecani*, *Metarhizium anisoprie*, which are already been commercialized as microbial pesticides, have an interaction with plants. Therefore, the above products were investigated for disease control. In this presentation, development of BotaniGard ES (*Beauveria bassiana*) for control of powdery mildew on vegetable plants are summarized and future development of biological control agents and IPM programs for disease control are considered. Part of this research was supported by grants-in-aids from Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, NARO (Research Program on Development of Innovative Technology, 29008B)

### はじめに

新規生物農薬を開発していく過程では、市場ニーズ、市場規模を精査し、対象作物、対象病害虫の標的を検討し、新規有効成分の検索を行うが、既存の生物農薬の新規用途開発も検討すべき1つの手段である。微生物殺虫剤としてすでに製品化しているBT剤（バチルス チューリンゲンシス）、ボーベリア バシアーナ剤、バーティシリウム レカニ剤、メタリジウム アニソプリエ剤、バチルス ズブチルス剤などは植物との相互関係を有することが分かってきており、殺虫活性以外に実用化できる効果を対象作物、対象病害を選別して確認している。今回、「ボタニガードES（ボーベリア バシアーナ剤）」が「野菜類うどんこ病・1000倍」で適用拡大を取得した経緯と内容についてまとめるとともに今後の展開について考察した。なお本発表の一部の資料は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施されたものが含まれる。

### 1. 昆虫病原性糸状菌製剤の殺菌剤としての利用可能性

新規合成化合物による農薬開発と同じように、生物農薬の開発手段では、標的病害

虫に対する新規有効成分のスクリーニング、実用性評価、製造、製剤化研究など多くのステップをクリアしていく必要がある。その中でも新しい微生物などをスクリーニングしていく場合に、標的病害虫に対する活性にばかり注目し、微生物の生産性は次の段階として考えてしまう傾向にある。しかし活性が高くても生産が困難な微生物が多く、商業化までのハードルが高くなることがある。さらに有効成分が微生物である場合には安全性評価にかかわる多くの試験についても実施する必要があり、マーケットに対する開発コストは高つく。既にこれらの工程をクリアし、実用化されている生物農薬については開発にかかるコストを削減できるため、可能な限り対象病害虫に対する適用を拡大していくことが製品開発として有効である。

既存の生物農薬は大きく分けて「害虫防除」、「病害防除」の2つがあり、害虫防除には「天敵昆虫類」、「昆虫病原性微生物群」がある。天敵昆虫類は寄主となる対象害虫が比較的限られているが、昆虫病原性微生物では殺虫活性の広いものがある。例えばポーベリアバシアーナでは、700種以上の昆虫類から分離されたという報告がある。しかしポーベリアバシアーナGHA株を有効成分とする「ボタニガードES」は、「ハダニ類」「アブラムシ類」「アザミウマ類」、「コナジラミ類」等主要害虫に対して適用登録が既にあるので適用拡大を目指す対象害虫は限定されてきている。その他に当社が保有する微生物農薬としては、B T剤（バチルス チューリンジエンシス）、パーティシリウムレカニ剤（レカニシリウムムスカリウム）、メタリジウムアニソプリエ剤、バチルスズブチルス剤があり、これらの適用拡大可能性を探っていくことも農薬の新規用途開発として重要な課題である。

表1. 「ボタニガードESの適用表からの抜粋(2021年4月現在)」

作物名	適用害虫名	希釈倍数	使用時期	使用液量	使用方法
野菜類	うどんこ病	1000倍	発病前～ 発病初期	150～300L/10a	散布
	アザミウマ類	500～1000倍			
	アブラムシ類	1000倍			
	ハダニ類				
	コナジラミ類				
コナガ	500倍				
アオムシ					
キャベツ	オオタバコガ	500～2000倍	発生初期	150～300L/10a	散布
レタス	オオタバコガ				
トマト	オオタバコガ				
ミニトマト	コナジラミ類	500～2000倍	発生初期	150～300L/10a	散布
しそ	チャノホコリダニ マデイラコナカイガラムシ シソサビダニ				
茶	クワシロカイガラムシ	500倍	発生初期	1000L/10a	散布
マンゴー	チャノキアザミウマ	1000倍		200～700L/10a	



## 2. 微生物と植物の相互関係

植物病原性糸状菌に対する微生物農薬としてトリコデルマ菌がトリコデルマ生菌、エコホープというように開発されてきた。一方、トリコデルマ菌は植物との相互関係があり生育促進などPGPF (Plant Growth Promoting Fungi) として働くことも明らかにされてきており (Hermosaら, 2012)、病原菌対有用菌や植物対生育促進微生物などの二者間ではなく、植物、病原菌、有用微生物など三者以上の複雑な生態系を考える必要があると感じてきた (百町, 1998)。近年このような植物とそれを取り巻く生物的要因 (微生物、昆虫、線虫) と非生物的要因 (土壌、環境など) の特定生態学的領域はフィト (ファイト) バイオームと称されている。

それらを考えると、昆虫病原性微生物として製品化された糸状菌製剤及びB T剤成分菌が標的昆虫を致死させることで生物学的な生存競争を生き残ってきたのか、或いは生存競争を勝ち残るために殺虫活性を獲得したのか、さらに植物との相互関係も関与しているのではないかと考えるようになった。関連した研究を参考に自社剤の昆虫



病原性糸状菌製剤のいくつかに関して植物病害に対する効果を調査した結果、「ボタニガードES（ボーベリア バシアーナ剤）」と「マイコタール（パーティシリウム レカニ剤）」ではキュウリ・うどんこ病及びトマト・青枯病に対する抑制効果が確認された。また、「パイレーツ粒剤（メタリジウム アニソプリエ剤）」ではスイカで生育促進効果の可能性が見られた。この研究ではスイカの内根圏からメタリジウムが検出できた。また本菌株はタマネギ苗への内生も確認されている（小池, 2018）

### 3. 微生物殺虫剤を用いた野菜重要病害虫のデュアルコントロール技術の開発

2017（H29）年度より農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業として「微生物殺虫剤を用いた野菜重要病害虫のデュアルコントロール技術の開発」に参画することになった。このコンソーシアムの中で利用できるすべての微生物殺虫剤の地上部、地下部の植物病原菌に対する抑制効果を特にトマト、イチゴを対象作物として調査した。その結果、ボタニガードESの1000倍希釈散布はマイコタール1000倍散布よりうどんこ病に高い効果を示すことが分かり、引き続き3科5作物でうどんこ病に対する薬効薬害試験を実施した。これらの試験成績を取りまとめて2019年に「野菜類うどんこ病・1000倍希釈」の適用拡大申請を行い、現在に至っている。

表2. ボタニガードESの3科5作物・うどんこ病に対する薬効試験概要

作物	年度	試験場所	希釈倍率	処理回数	発生状況	対照*	対無処理	総合判定
キュウリ	2014年	油日アグリサーチ	1000倍	3	中	A(バ) B(ト)	A	A
	2017年	農研機構（つくば）	1000倍	3	中	B(ゴ)	B	B
	2018年	農研機構（つくば）	1000倍	5	多	B(ゴ)	B	B
	2017年	三重県農業研究所	1000倍	5	中	B(ゴ)	B	B
	2018年	三重県農業研究所	1000倍	4	中	B(ゴ)	B	B
	2018年	日植防高知	1000倍	4	甚	D(モ)B(ボ)	C	C
トマト	2017年	岐阜県農業技術センター	1000倍	3	中	A(ゴ)B(カ)	A	A
	2018年	岐阜県農業技術センター	1000倍	3	中	C(カ)	A	A
	2018年	農研機構（安濃）	1000倍	3	中	B(カ)	A	A
ナス	2017年	奈良県農業研究開発セ	1000倍	3	中	B(バ)	B	B
	2018年	奈良県農業研究開発セ	1000倍	3	中	A(ボ)B(バ)	B	B
いちご	2017年	長野県野菜花き試験場	1000倍	3	中	A(サ)	A	A
	2018年	長野県野菜花き試験場	1000倍	5	少	C(サ)	B	B
メロン	2018年	日植防高知	1000倍	3	多	D(ト)D(イ)	C	C
	2018年	日植防宮崎	1000倍	3	中	D(モ)D(タ)	C	C

\*: 対照薬剤表示  
 バ:バチスターx1000, ト:トリフミンx3000, ゴ:ゴッツAx1000, ボ:ボトキラーx1000, サ:サンヨールx500,  
 パ:パンチヨx1000, カ:カリグリーンx800 イ:インプレッションクリアx1000, モ:モレスタンx3000, タ:タフパールFL x2000

### 4. 作用機作の異なる2種の微生物製剤のうどんこ病に対する効果

アリスタ ライフサイエンス（株）ではボタニガードESの野菜類うどんこ病に対する登録取得により、2種類の微生物農薬で野菜類うどんこ病への利用が可能となった。その1つであるバチスター水和剤は「バチルス ズブチルスY-1336株」を有効成分とする微生物殺菌剤で、いわゆる葉面上で病原菌との空間競合、栄養競合が作用機作である。一方、ボタニガードESは、有効成分「ボーベリア バシアーナGHA株」によ

る植物の抵抗性誘導がうどんこ病抑制に対する作用機作である。バチスター水和剤の過去の委託試験成績をまとめてみると空間競合、栄養競合により抑制効果を発揮するバチルス剤では、病原菌の量が多いと、発病を抑えきれないことがある(図1)。しかし、ボタニガードESでは、抵抗性誘導が起きることにより、病原菌が多く無処理区での発病度が高くても処理区の発病度を、バチルス菌の製剤よりも強く抑える(図2)。このように微生物殺菌剤として作用機作の異なる剤が登場することにより、防除体系の中で両者を相互に利用するなど、多様な組み合わせ処理を工夫することができるかと期待する。

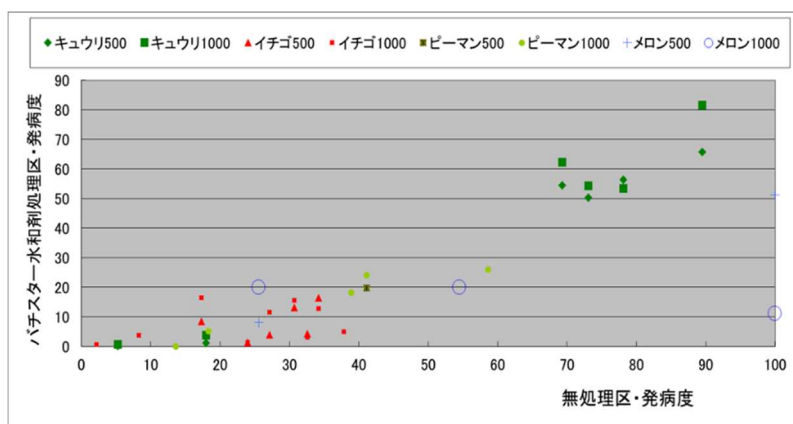


図1. バチスター水和剤の各種作物における委託試験成績の無処理発病度と処理区発病度の相関性

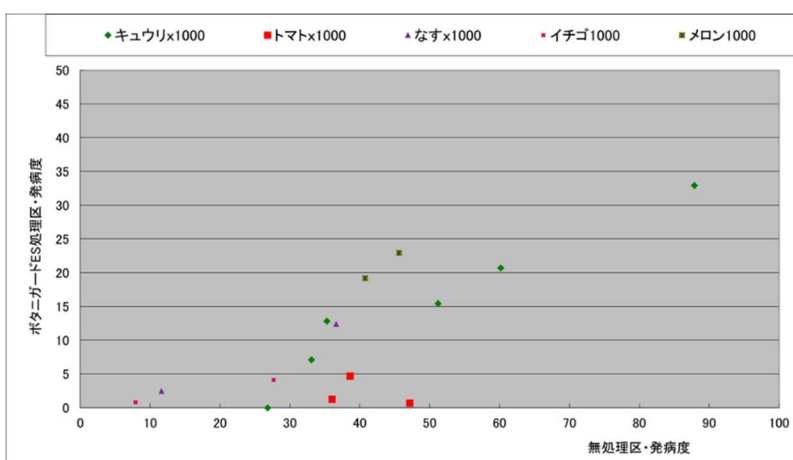


図2. ボタニガードESの各種作物における効果試験成績の無処理発病度と処理区発病度の相関性

## おわりに

現時点では、2020 (R2) 年度よりイノベーション創出強化研究推進事業「微生物殺虫・殺菌剤を用いた野菜重要病害虫のデュアルコントロール技術の確立」の中でボタニガードESの病害虫同時防除による効率的防除効果、省力化を実証しながら普及に向けた実証試験を実施している。病害虫双方に適用取得しているものの作物、作型で同時に防除できる病害虫は限られてくる。まして病害の対象は「うどんこ病」だけであり、害虫は「コナジラミ類、ハダニ類、アブラムシ類、アザミウマ類」である。本剤に関しては、さらなる有効利用のために多くの実証試験を積み重ね、有効性を評価していくこと、またその他の生物農薬開発に関して、病害虫防除におけるIPM防除体系に利用できる資材を広げていくことが今後の課題である。

## 引用文献

- 1) 小池正徳 (2018) 昆虫病原菌のファイトバイオームにおける生態学とそれを考慮した防除法. 第2回 日本生物防除協議会シンポジウム講演要旨: 1-9.
- 2) Hermosa. et.al. (2012) Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes Microbiology 158:17-25.

- 3) 百町満朗(1998) 有用根圏微生物により誘導される植物の全身抵抗性. 日本農薬学会誌 23, 422-426.

# *Bacillus*属細菌を利用した微生物資材によるダイズ土壤病害軽減技術

秋田県立大学 佐藤 孝

## Reduction of soybean soil diseases by application of microbial materials containing *Bacillus* bacteria

Takashi Sato : Akita Prefectural University

### Abstract

In the present study, we aimed to isolate microorganisms that suppress the growth of the causal agent of red crown rot the fungi *Calonectria ilicicola* and to investigate the effect of microbial material mixed with these isolates on the soil-borne diseases of soybean (*Glycine max*). We successfully isolated three strains of *Bacillus subtilis* that suppressed the growth of *C. ilicicola* from dried chicken manure. In order to investigate the effect of the isolates on soil disease reduction in the field cultivation test, the isolates were mixed with chicken manure compost to prepare a microbial material. The isolates were able to survive during the manufacturing of the microbial material due to their thermal tolerance. We observed that application of the microbial material mixed with these isolates to the soil tended to decrease the development of soil-borne diseases of soybean during the growth period and increased the soybean seed yield compared with plants that were grown without the addition of this microbial material. Furthermore, it was clarified that local application of the microbial material further enhances the disease reduction effect. These results indicate that the application of these three isolates within microbial material to the soil reduces the incidence of soil-borne diseases, such as soybean red crown rot, and increases the seed yield due to the increased health and growth of the plants.

### はじめに

ダイズは日本の伝統的な食品の原料となり、私たちの食生活には欠かせない作物であるが、国内のダイズ単収は167 kg/10aと生産性が主要生産国と比較して低い状況にある（農林水産省，2019）。国内のダイズ生産における低収要因として、排水不良による湿害、田畑輪換の長期化による地力の低下、ダイズの連作年数の長期化やダイズ作付頻度の増加に伴う病害虫の増加等の影響が考えられている（農林水産省，2019）。近年は、病害の発生が顕著になってきており、特に、ダイズ黒根腐病やダイズ茎疫病といった土壤病害が拡大していることが大きな問題となっている。ダイズ黒根腐病は全国各地で発生しており、土壤病害のなかでも最も被害が大きいと言われている（西，2008）。

ダイズ黒根腐病は真菌類の一種であるダイズ黒根腐病菌（学名：*Calonectria ilicicola*）によって引き起こされる土壤病害で、開花期以降に病徴が顕在化し、収量にも大きく影響する（西，2008；越智，2014）。また、本病原体はダイズの作付けがなくても複数年は土壤中に存在しており、ダイズ黒根腐病の発生を防ぐには、土壤中のダイズ黒根腐病菌の増殖を抑制する、もしくは菌密度を下げる必要があることを示唆している（西・佐藤，1994）。

これまで、ダイズ黒根腐病の防除に関する研究は世界中で実施され、国内においては生物的防除技術として*Trichoderma harzianum*を用いた技術が開発され、実用化に向けた試験が進行中である（仲川，2004，2017）。また、*Bacillus*属細菌は以前から植物の病原菌に対する拮抗微生物として注目され、*Bacillus*属細菌を原料とした製剤が商品化されている（吉田・對馬，2013）。

一方、秋田県において25年以上ダイズを連作しても収量を240 kg/10a以上に維持し、ダイズ黒根腐病などの土壤病害の発生が少ない圃場がある（金田ら，2018）。この圃場の特徴として、特定の乾燥鶏ふん資材を毎年200kg/10a施用してダイズを栽培しているが、その乾燥鶏ふん資材の施用と土壤病害の発生に関する関係性があるかは不明である。そこで本研究では、長期ダイズ連作多収圃場で施用されている乾燥鶏ふん資材、および作土から土壤病原菌（主にダイズ黒根腐病菌）の増殖を抑制

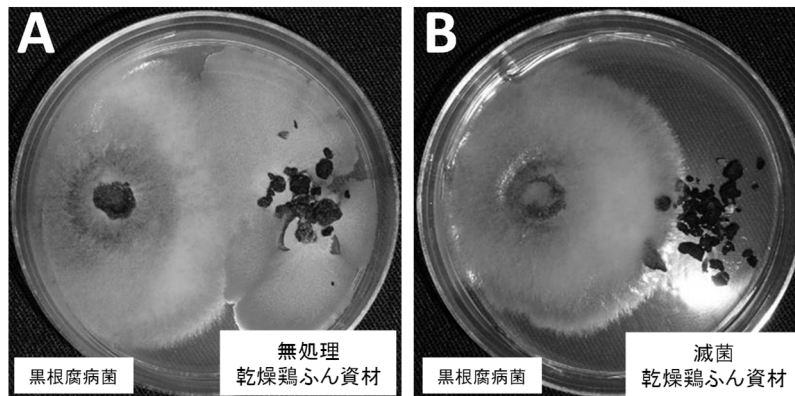
する微生物の分離を試みた。また、分離された微生物を資材化し、圃場条件においてその資材による土壌病害の抑制効果を検証した。

## 1. ダイズ黒根腐病菌の増殖を抑制する微生物の分離

### 1-1. 乾燥鶏ふん資材および土壌試料の黒根腐病菌に対する増殖抑制効果

試料は長期ダイズ連作多収圃場で施用されている乾燥鶏ふん資材（養鶏業者から入手）、および作土層（表面から10 cm）の土壌（作土試料）を用いた。ダイズ黒根腐病菌は*Calonectria ilicicola* AP12株（以下、黒根腐病菌）を用いた。乾燥鶏ふん資材または作土試料をポテトデキストロース寒天培地（PDA）上に塗布し、そこから3 cm離して黒根腐病菌を植菌し、25℃暗所条件下で5日間対峙培養を行った。その結果、作土試料においては黒根腐病菌の増殖抑制効果は判然としなかったが、鶏ふん資材においては黒根腐病菌の増殖が抑制されていた。従って、鶏ふん資材には黒根腐病菌の増殖を抑制する作用があることが確認できた。

乾燥鶏ふん資材中には多様な微生物が生存していると考えられるため、微生物の関与について検証した。無処理の乾燥鶏ふん資材と、121℃・15分でオートクレーブ滅菌処理した乾燥鶏ふん資材を用意し、PDA培地を用いて同様に黒根腐病菌と対峙培養を行った。その結果、滅菌処理した乾燥鶏ふん資材では黒根腐病菌の増殖抑制効果はみられなかったが、無処理の乾燥鶏ふん資材においては対峙面を形成して黒根腐病菌の増殖を抑制していた（図1）。このことから乾燥鶏ふん資材による増殖抑制には、乾燥鶏ふん資材に含有する物質（化合物）ではなく、乾燥鶏ふん資材中の微生物により黒根腐病菌の増殖が抑制されたことを明らかにした。



A：左；黒根腐病菌・右；無処理乾燥鶏ふん資材，B：左；黒根腐病菌・右；滅菌処理乾燥鶏ふん資材（鶴見ら，2020）

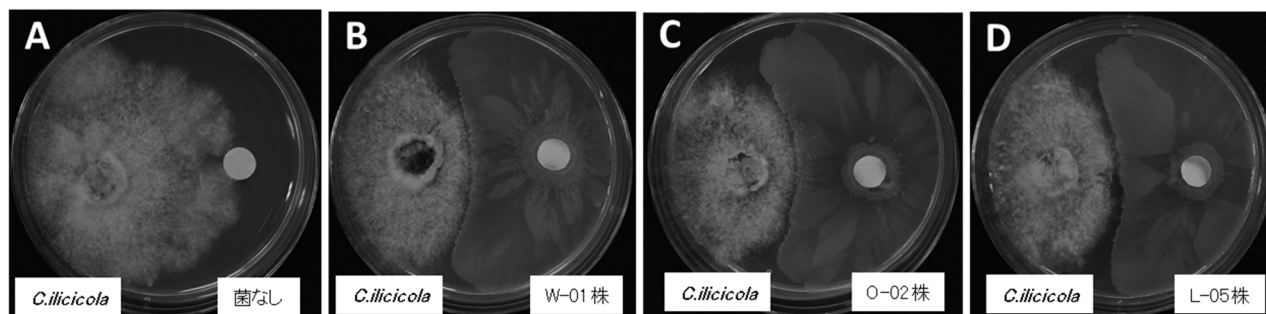
図1 乾燥鶏ふん資材の滅菌処理の有無による対峙培養試験の結果

### 1-2. 乾燥鶏ふん資材から分離した微生物のダイズ黒根腐病菌に対する増殖抑制効果

黒根腐病菌の増殖抑制効果を示した乾燥鶏ふん資材を粉碎して滅菌水に懸濁し、Luria-Bertani寒天培地（LBA）に塗布して30℃・7日間培養した。培地上に形成されたシングルコロニーから微生物（主に細菌）を16菌株分離した。分離した細菌は、2-1と同様にPDA培地上にて対峙培養を行い、分離した細菌が黒根腐病菌に対して増殖抑制効果を示すか検証した。その結果、分離した16菌株のうち3菌株（W-01株，O-02株，T-03株）において黒根腐病菌の増殖抑制効果がみられた。この3菌株では、対峙面が形成されており（図2），対峙面を顕微鏡で観察すると、分離した細菌が黒根腐病



菌の菌糸に沿って増殖し、菌糸を溶解しているような様子がみられた。また、菌体外酵素活性を調べたところ、いずれの菌株においてもキチナーゼおよびグルカナーゼ活性が確認されたことから、黒根腐病菌の増殖抑制には、細胞壁を分解する菌対外酵素等の関与が示唆された(佐藤ら, 2021)。これら3菌株の16S-rRNA遺伝子の塩基配列解読した結果、3菌株とも*Bacillus subtilis*と高い相同性を示した(DDBJ Accession No. : W-01株 ; LC520134, O-02株 ; LC520135, T-03株 ; LC520136)。



A : 黒根腐病菌のみ, B : 黒根腐病菌・W-01株, C : 黒根腐病菌・O-02株, D : 黒根腐病菌・T-03株 (鶴見ら, 2020)

図2 分離した3株と黒根腐病菌の対峙培養試験の結果

## 2. *Bacillus*属細菌を利用した微生物資材の製造

分離された3菌株の*Bacillus*属細菌は、培地上においてダイズ黒根腐病菌の増殖を抑制する能力を持つことから、圃場に施用すればダイズ黒根腐病を含めた土壤病害を抑制できる可能性がある。そこで、分離した*Bacillus*属細菌3菌株を混合した微生物資材(ペレット資材)を作製することにした。

本研究で分離した*Bacillus*属細菌は、生産現場で使用されている乾燥鶏ふん資材から分離されたこともあり、微生物資材の主原料として鶏ふん堆肥を使用した。微生物資材作製の工程は以下のとおりである(図4)。*Bacillus*属細菌の培養液(1×10<sup>7</sup> cells/mL ; 単独で培養後3菌株混合)を原体の重量で2.5%分添加した後に混合し、ペレット状に成型する。その後、資材の水分を一定条件まで低下させるために熱風により乾燥させる。この工程において、ペレット成型時の摩擦熱や乾燥工程において高温となり、資材の温度(品温)は50~70°C近くまで上昇する。そこで、微生物資材の製造過程における、資材中の菌数の変動について調査した。

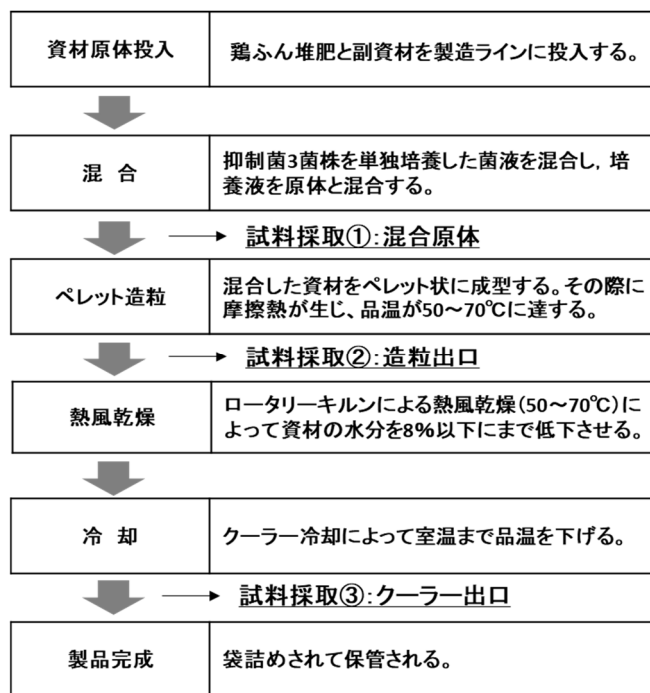


図4 実機(工場)における微生物資材製造工程 (鶴見ら, 2020)

製造過程における資材中の*Bacillus*属細菌(抑制菌)の菌数測定は、①原体(原料)である鶏ふん堆肥と菌液を混合した混合原体、②混合してペレット状に成型して出てきた造粒出口、③熱風乾燥後にクーラーで冷却した資材(クーラー出口)の3か所から試料を採取し、希釈平板法により生菌数を計数した(図4)。製造工程が進むにつれて菌数は減少し、①の2.0×10<sup>6</sup> cells/gから③では

1.6×10<sup>5</sup> cells/gとなった（表2）。資材製造工程において資材中の生菌数は約10分の1に減少したものの、資材製品中に*Bacillus*属細菌が1×10<sup>5</sup> cells/gオーダーで含まれていることから、本製造方法は微生物資材として十分に利用可能な品質を確保できることが明らかとなった（佐藤ら，2019）。

表2 各工程における資材および原料中の抑制菌生菌数

工程	生菌数(cfu/g)				
	製造ロット			平均	標準偏差
	A	B	C		
①混合原体	2.8×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>	1.7×10 <sup>6</sup>	2.0×10 <sup>6</sup>	7.7×10 <sup>5</sup>
②造粒出口	1.8×10 <sup>6</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	3.3×10 <sup>5</sup>	7.8×10 <sup>5</sup>	8.5×10 <sup>5</sup>
③クーラー出口	2.7×10 <sup>5</sup>	7.4×10 <sup>4</sup>	1.5×10 <sup>5</sup>	1.6×10 <sup>5</sup>	9.7×10 <sup>4</sup>

※表中のA・B・Cは実機製造ロットで、それぞれ製造ラインに原体投入して混合した時刻（A；10：00，B；13：00，C；15：30）のサンプルを指す。（鶴見ら，2020）

ペレットタイプの資材は、その形状的特性からブロードキャスター等を用いた全層施用が前提となる。そこで、一般的なダイズ施肥・播種機に適応させるためと、粒状配合肥料（バルクブレンディング）に対応させることを目的として、微生物資材の粒状製品（ブリケットタイプ）を作成した（図5）。ブリケットタイプはペレットタイプと資材の成型方法と乾燥温度が異なるが、資材中の*Bacillus*属細菌密度はペレットタイプと同等以上になることを確認している。



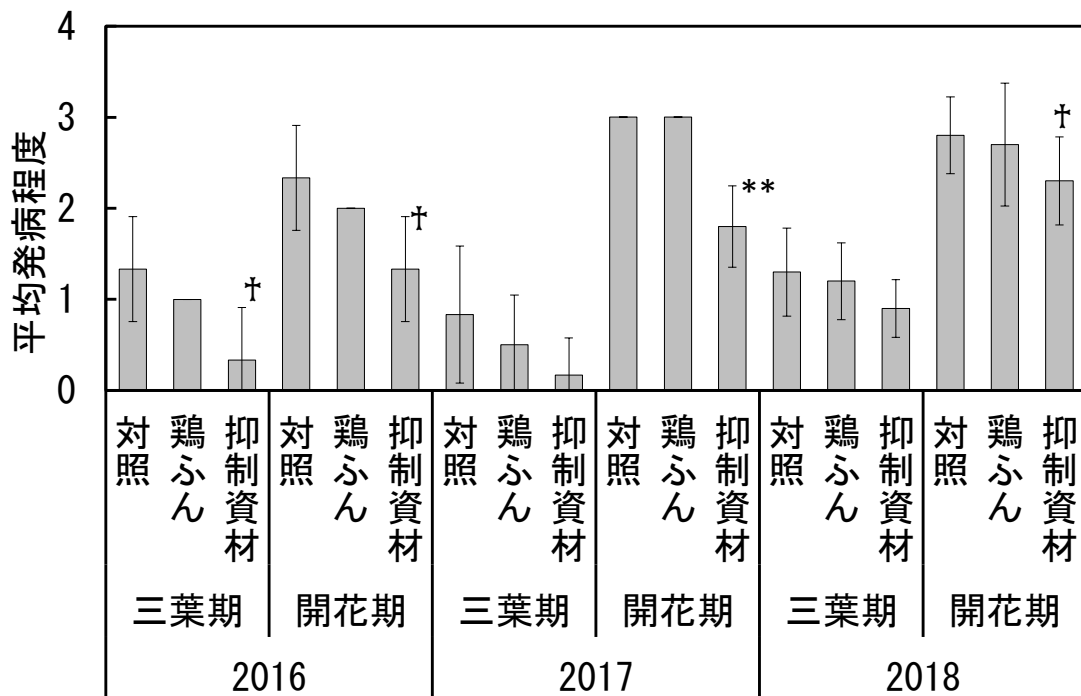
図5 微生物資材の形状

### 3. 微生物資材のダイズ土壤病害抑制効果（圃場栽培試験）

試験は2016年，2017年，及び2018年の3ヵ年において実施した。供試圃場は青森県つがる市の水田転換畑（粗粒質表層灰色グライ低地土（砂壤土））で、過去にダイズを作付した履歴があり、黒根腐病や茎疫病などの土壤病害が多発する圃場である。試験区は、対照区（現地慣行），鶏ふん区（鶏ふん堆肥：資材の原料）および抑制資材区（微生物資材）を設けた。いずれの試験年においても、4月下旬に鶏ふん堆肥および抑制微生物資材を200 kg/10a（5.6 kg-N/10a）施用し、深さ約15 cmで耕起した。6月上旬に対照区には化成肥料（N：P：K＝5.6：7.2：5.6 kg/10a）施用した。ダイズは品種「おおすず」を用い、畝間72 cm，株間15 cmの2粒播きで播種した。三葉期（7月上旬），開花

期（7月下旬）に生育調査及び病徴調査を実施し、10月中旬に収量及び収量構成要素を調査した。ダイズ地下部の病徴調査は、西ら（1999）の発病程度の指標を参考に、ダイズ1個体ごとに、0：無発病、1：根部あるいは地際部に褐変が認められる、2：褐変が主根または地際部全体をとりまくほどに発達している、3：褐変が地際部を中心に長くのびている、4：主根が腐朽し、根量も少ない、の5段階に分けて調査し、試験区全体のダイズ地下部の平均発病程度を算出した。

2016年度試験においては、微生物資材を施用すると、ダイズの初期生育（三葉期）は対照区と比較して旺盛となった。対照区では地下部（根）が土壤病害により褐変していたのに対し、抑制資材区では土壤病害の病徴は見られず、地下部は健全な状態であった。2017年度試験の開花期においては、対照区や鶏ふん区の地下部は主根全体が褐変し、根量も著しく減少していたのに対して、抑制資材区では主根の褐変はあまり見られず、根量も多かった。3ヵ年とも鶏ふん区および抑制資材区では対照区よりも地下部の発病が抑制される傾向を示し、鶏ふん区よりも抑制資材区において抑制効果が高くなった（図6）。抑制資材区では微生物資材を施用したことにより三葉期の発病程度が対照区よりも低下し、その効果が開花期まで継続したため、ダイズ地下部の発病が軽減されたと考えられた。



※ \*\*、†印は試験区間で1%水準、10%水準で有意差あり(Dunnett)。エラーバーは標準偏差を示す。(鶴見ら, 2020)

図6 2016～2018年度試験における三葉期および開花期のダイズ地下部の発病程度

収量は3ヵ年とも抑制資材区および鶏ふん区において対照区より増加する傾向がみられ、2016年度試験においては抑制資材区が顕著に増加した（表3）。百粒重は抑制資材区で高くなる傾向にあり、着莢数も抑制資材区で増加する傾向が見られた。抑制資材区では黒根腐病などの土壤病害の発生が抑制され、ダイズ植物体の生育が健全に保たれたことにより着莢数が増加したと考えられた。また、生育後半（粒肥大期以降）においては光合成活性が維持され、光合成産物の子実への転流が促進されたため、子実が肥大したと考えられた。

表3 2016～2018年度試験におけるダイズの収量及び収量構成要素

年度	試験区	主茎長 (cm)	分枝数 (本)	茎太 (mm)	総莢数 (個/m <sup>2</sup> )	百粒重 (g)	収量 (kg/10a)
2016	対照	48.9	0.0	4.8	355	38.8	248
	鶏ふん	50.5	0.1	5.4*	427	38.7	253
	抑制資材	57.3**	0.2	5.9**	520*	39.8	280
2017	対照	60.3	2.3	8.1	399	37.2	280
	鶏ふん	62.0	0.7	7.9	308	36.9	295
	抑制資材	63.2	2.6	9.3	528	39.2*	297
2018	対照	33.3	2.7	6.9	231	32.6	128
	鶏ふん	35.0	2.0	6.4	333*	34.8**	183**
	抑制資材	36.0*	2.0	7.7	367*	34.9**	186**

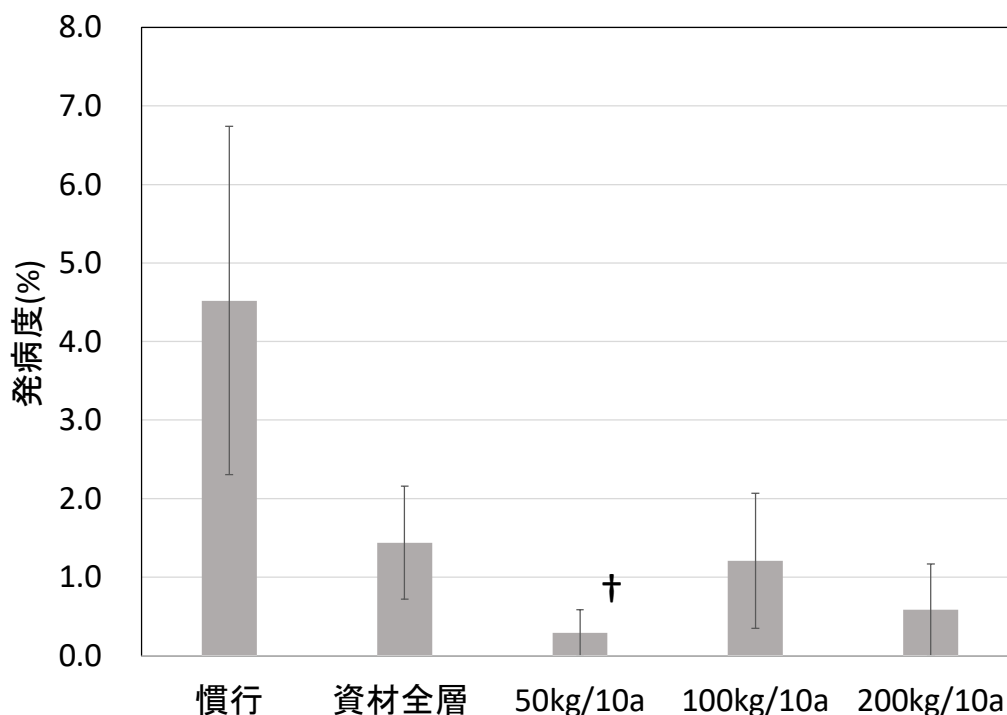
※\*\*, \*印は2群間（対照との比較）で1%水準, 5%水準で有意差あり(Dunnett)

(鶴見ら, 2020)

#### 4. 側条施用（局所施用）による土壌病害軽減と収量向上効果

微生物資材の施用量は200kg/10aを基準としているが、この施用量は投入される菌密度としては非常に低い。そこで微生物資材の密度を高め、土壌病害抑制効果の向上を目的に、側条施用（局所施用）を検討した（2020年度）。側条施用区は、微生物資材（ペレットタイプ）の施用量を200kg, 100kg, 50kg/10aに設定し、ダイズ種子直上に幅20cm, 深さ3cmで施用した。2020年度はダイズ播種後から降雨が多く、圃場は開花期まで過湿状態が続いた。播種2週間においては、全ての試験区において根の褐変が確認され、処理による発病度の違いは認められなかった。しかし、根組織における黒根腐病菌感染率は、慣行（対照）区で約23%, 微生物資材全層区で約13%と、資材施用により低くなった。側条施用区においては、いずれの施用量においても感染は認められず、微生物資材の側条施用は、生育初期における黒根腐病菌の感染を強く抑制することが明らかとなった。

粒肥大期（9/21）においても立枯れ性の病害発生は少なかったが、黒根腐病とみられる病害も散見された。微生物資材施用により地上部の発病程度は小さくなる傾向にあり、側条50kg施用区ではとくに顕著であった（図7）。従って、微生物資材の側条施用は生育初期の黒根腐病菌の感染を抑えることで、生育後半における病害発生を軽減する効果が高いことが明らかとなった。



†は10%水準で統計的に慣行区と有意差があることを示す (n=3, Dunnett検定)。  
エラーバーは標準偏差を示す。

図7 ダイズ地上部の発病度 (2020年9月21日)

慣行区の収量のバラツキが大きく統計的な有意差は確認されなかったが、収量は微生物資材施用により増加する傾向がみられ、とくに側条施用区で顕著に増加した(最大55%増)。着莢数は微生物資材側条施用区で有意に多くなり、百粒重も重くなる傾向が見られた(表4)。微生物資材側条区では土壤病害の発生が軽減されたことにより健全に生育し、着莢数の増加と粒肥大により収量が増加したと考えられた。

表4 ダイズの収量および収量構成要素 (側条施用試験)

試験区	主茎長 (cm)	節数 (節)	分枝数 (本)	茎太 (mm)	総莢数 (個/m <sup>2</sup> )	百粒重 (g/100粒)	収量 (kg/10a)
慣行	35.6	12.2	2.2	8.3	634.9	30.4	161.0
資材全層	39.8	13.2	2.3	9.0	724.2	31.7	211.4
側条 50kg/10a	38.2	12.8	2.7	8.2	863.1	32.4	248.7
側条 100kg/10a	44.1	13.8	2.8	8.9	855.2	32.1	216.6
側条 200kg/10a	40.9	13.0	2.7	8.9	892.9	32.6	238.2

\*異なるアルファベットは5%水準で統計的に有意差があることを示す (n=3, Tukey検定)。

## おわりに

ダイズ黒根腐病菌の増殖を抑制するBacillus属細菌を分離し、分離菌株を鶏ふん堆肥に混合して作製した微生物資材を圃場に施用すると、ダイズ黒根腐病菌の発生を軽減することが明らかとなった。しかし、他の土壤病害への効果は不明であり、地域や土壤の違いにより病害抑制効果が変動する可能性もある。

また、圃場の排水対策や土壤pH矯正を適切に実施しないと、病害抑制効果を得ることは難しい。一方で、微生物資材の施用に加え、培土技術の改良などの耕種的防除や病害抵抗性の高いダイズ品種の導入などを組み合わせることにより、土壤病害に対して高い抑制効果を示す可能性もある。微生物を利用した資材は安定的な効果を維持することが問題となることから、今後も検討を重ね、生産現場に適用できる資材、技術にしたいと考えている。

## 謝辞

本研究の一部は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施したものである。

## 引用文献

- 1) 金田吉弘・磯部百葉・高階史章・佐藤 孝 (2018) . 25年間の長期連作で多収を持続するダイズ栽培の特徴. 農業および園芸 93 : 944-950
- 2) 仲川晃生・竹原利明・中保一浩 (2004) . ダイズ黒根腐病防除のためのトリコデルマ属菌の分離. 土と微生物 58 : 117 (講要)
- 3) 仲川晃生・菊川裕幸・中島千佳・越智 直・薬師堂謙一 (2017) . ダイズ黒根腐病の発病低減を目指した機能性堆肥の調整. 関東東山病害虫研究会報 : 146-147 (講要)
- 4) 西 和文 (2008) . ダイズ立枯性病害の発生実態と発生助長要因. 第225回日本作物学会 講演会 日本作物学会講演会要旨集 225 : 346-347 (講要)
- 5) 西 和文・佐藤文子・唐澤哲二・佐藤 剛・福田徳治・高橋廣治 (1999) . ダイズ黒根腐病の発生生態と防除. 農業研究センター研究報告 30 : 11-109
- 6) 西 和文・佐藤 剛 (1994) . 自然条件下の病土中でのダイズ黒根腐病菌感染能力の推移. 関東東山病害虫研究会年報 41 : 45-46
- 7) 農林水産省 (2019) 大豆をめぐる事情  
(<https://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/attach/pdf/index-120.pdf>) 2020年1月9日閲覧
- 8) 越智 直 (2014) . ダイズ黒根腐病に関する研究. 北海道大学 博士学位論文 乙第6913号
- 9) 佐藤 孝・金田吉弘・高階史章 (2021) . ダイズ黒根腐病防除剤, ダイズ黒根腐病を抑制する微生物資材, 及びダイズ黒根腐病防除方法. 公開特許公報, 特許第6824519号
- 10) 佐藤 孝・高階史章・金田吉弘・浅野智孝・飯塚美由紀・石川伸二・松岡英紀・見城貴志 (2019) . 土壤伝染性病害軽減材, 公開特許公報, 特開2019- 147757
- 11) 鶴見拓哉・森田更紗・間世田安希・高階史章・金田吉弘・浅野智孝・見城貴志・佐藤孝 (2020) . ダイズの土壤病害を抑制する微生物(Bacillus属細菌)の分離と利用. 土と微生物 74 : 13-19
- 12) 吉田重信・對馬誠也 (2013) . 植物病害に対する微生物農薬の研究開発における課題と展望. 化学と生物 51 : 541-54



## SIPにおける植物病害抑制菌株の探索

農業・食品産業技術総合研究機構 窪田昌春

### Search for fungi and yeasts suppressing plant diseases by SIP Masaharu Kubota: National Agriculture and Food Research Organization

#### Abstract

From 2014 to 2019, the Cabinet Office, Government of Japan, supported a national research project, Cross-ministerial Strategic Innovation Promotion Program (SIP). “Technologies for creating next-generation agriculture, forestry and fisheries” (funding agency: Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, NARO) was set in that. In the subject, a group of 10 institutes searched fungal and yeast isolates which suppressed 10 diseases on 8 vegetable plants. For the selection, 367 fungus and 995 yeast bio-resources in Riken Bioresource Research Center were served. Here, screening by the group in the project is roughly introduced.

#### はじめに

2014年度から、内閣府の「戦略的イノベーション創造プログラム（次世代農林水産業創造技術）②持続可能な農業生産のための新たな植物保護技術の開発」が開始され（津田、2015）、その中に「植物保護に有用な糸状菌の探索と有用微生物コート種子の開発」の課題が設けられた。本課題では、農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）野菜花き研究部門、理化学研究所（理研）バイオリソース研究センター、群馬県農業技術センター、埼玉県農業技術センター、静岡県農林技術研究所、富山県農林水産総合技術センター、三重県農業研究所、京都府農林水産技術センター、高知県農業技術センター、出光興産株式会社の10機関による研究コンソーシアムを形成し、理化学研究所の微生物遺伝資源より（理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室、2021）、植物病害を抑える糸状菌、酵母をスクリーニングし、有効な微生物菌株について、製剤化まで進むことを目標としていた。対象病害は、農研機構ではキャベツ黒すす病と *Rhizoctonia solani*によるキャベツとトマト苗立枯病、群馬県ではキュウリ褐斑病、埼玉県でナス半身萎凋病、静岡県でネギ萎凋病、三重県でトマト青枯病、京都府でネギ黒腐菌核病、高知県でショウガ根茎腐敗病とし、各参画県における重要な作目の病害を設定した。特に、農薬散布による防除効果が弱い土壌病害に対する有効菌株の選抜が求められた。理研では、保有する遺伝資源の糸状菌367、酵母995の合計1362菌株を提供するとともに、スクリーニングが進んだ時点で有用菌株の大量増殖方法を検討することとした。出光興産では、有用菌株候補の製剤化方法を検討する計画とした。

本課題では、当初、理研遺伝資源を、府省間連携により活用することを前提として計画され、これまで、主に食品関連あるいは環境関連微生物として収集された当遺伝資源を、農業分野での病虫害防除に利用することについて、可否も含めて検討することを目的とした。また、有用性が認められた菌株について、種子処理から植物体上に定着し、病害抑制ができればという「夢」を描いた課題名とされた。

これまでの病害抑制微生物菌株の選抜に関する知見を鑑みると、培地上での抗菌性等と植物上での病害抑制効果が一致しないことも多いため、できる限り植物を使ったスクリーニングを行い、また、植物病害抑制という視点なしに収集された微生物群を用いるため、できる限り多くの菌種、菌株を網羅的にスクリーニングにかけることも目標とした。このような目標に向かい、理研からは、当初は、提供制限がなく、培養が容易、糸状菌では孢子形成が盛んな菌株、酵母では基準株を多数含む多様な菌株(当時既知の約40%)を選定基準として、各機関へ配布した。その後、各機関でのスクリーニングが進むに従い、選抜された菌株の近縁種などを選定して配布した。また、本課題の外部アドバイザーからは、微生物農薬の前例がない酵母について、強い期待が寄せられた。

当プロジェクト研究開始後3年目の2016年度からは、社会実装をより強く意識した課題編成となるのに伴い、スモールスケールの植物を用いたスクリーニング、即ちほぼゼロからスタートした本課題は縮小され、農研機構、理研、群馬県、京都府、高知県、出光興産の6機関が残り、「植物保護に有用な糸状菌・酵母の選抜と種子コート技術の開発」として、研究を継続する構成となった。

本研究は、内閣府「戦略的イノベーション創造プログラム(次世代農林水産業創造技術)②持続可能な農業生産のための新たな植物保護技術の開発」の支援を受けて行われた。

## 1 アブラナ科黒すす病を抑える菌株のスクリーニング

アブラナ科作物の、特にキャベツ、ブロッコリーではセル成型育苗の密植条件で、種子伝染する*Alternaria brassicicola*による黒すす病による被害がしばしばみられる(窪田、2010)。本病原菌は、生育初期から、連鎖する分生子を大量に形成することから、初期のスクリーニングではキャベツ汚染種子発芽後の種皮での同病菌分生子形成の抑制を指標とした。また、高湿度条件では発病も速やかなため、実生での発病も合わせて指標とした。その結果、糸状菌367菌株からは38菌株、酵母995菌株からは13菌株が選抜された。さらに、それらの菌株の菌体を付着させた汚染種子を園芸培土に播種してスクリーニングを行うと、糸状菌3菌株が特に有望とされた。この3菌株の菌体を汚染種子に付着させて、セル成型育苗して健全苗率を調査したところ、いずれも、無処理と比較して健全苗率が高かったが、最も効果が安定していた1菌株を選抜した。この菌株を種子に付着させた場合、セル成型育苗において、既登録農薬のポリオキシシン水和剤灌注処理と同程度の黒すす病防除効果が認められた。

## 2 キャベツとトマトの苗立枯病を抑える菌株のスクリーニング

培地上での最初のスクリーニングでは、供試糸状菌・酵母菌株のPDA菌叢に健全種子を播種し、発芽後に培地ごと、*Rhizoctonia solani* AG-2-2を培養した素寒天に移植して健全苗が生育した菌株を選抜した。それによりキャベツでは糸状菌26、酵母32、トマトでは糸状菌30、酵母51菌株を選抜した。この菌株群間では糸状菌4、酵母11菌株が一致した。これらの菌株を、播種時の種子菌体付着、あるいは病原菌汚染土壌移植時の菌液灌注により、苗立枯病抑制効果を調査したところ、キャベツでは糸状菌2、酵母1菌株の効果が安定し、これらを選抜した。トマトでは酵母2菌株の効果が安定していた。こ

これらの菌株処理では、既登録農薬の粉剤土壌混和や希釈液灌注よりも病害抑制効果が高かった。

### 3 キュウリ褐斑病を抑える菌株のスリーニング

群馬県農業技術センターではハダニ類への天敵であるスワルスキーカブリダニに影響のないキュウリ褐斑病防除剤の開発を目指し、同病を抑制する菌株のスリーニングを行った。初期スリーニングでは、糸状菌133、酵母845株を供試して、病原菌摩砕片を含むCzapek培地上で供試菌株を培養し、病原菌の生育を抑えた糸状菌33、酵母381菌株を選抜した。これらの菌株の菌液を、ポット育苗したキュウリ苗に噴霧した後に、褐斑病菌分生子懸濁液を接種した。この試験を繰り返し、病害抑制効果が安定していた酵母3菌株を選抜した。これらのうち1菌株はうどんこ病防除効果も認められた。

### 4 ナス半身萎凋病を抑える菌株のスリーニング

埼玉県農業技術センターでは、ナス半身萎凋病菌に対し、糸状菌367、酵母975菌株を病原菌と液体培地で混合培養して、病原菌の胞子形成を抑えた糸状菌41、酵母39菌株を選抜した。そのうちの糸状菌29、酵母31菌株の菌液について、汚染土壌を用いたポットや圃場に灌注処理して、発病遅延が見られた糸状菌4、酵母2菌株を選抜した。これらについて圃場試験を繰り返したが、半身萎凋病抑制効果は不安定であった。

### 5 タマネギリん片腐敗病 (*Pantoea ananatis*) を抑える菌株のスリーニング

富山県農林水産総合技術センターでは、酵母331菌株からの、幼苗を用いた噴霧接種によるスリーニングによって有望な菌株を選定した。それらを用いて圃場における病害抑制効果を調査した結果、このうち1菌株で銅剤と同等、貯蔵後には防除効果がより高くなった。

### 6 ネギ萎凋病を抑える菌株のスリーニング

静岡県農林技術研究所では、糸状367、酵母995菌株の菌液に減圧浸漬した種子を、素寒天の萎凋病菌上に植物用培地を重層した上に播種したときに、播種12日後に苗生存率50%以上となった糸状菌10、酵母11菌株を選抜した。これらの菌株菌液に減圧浸漬した種子を病原菌汚染土壌に播種すると、28日後に酵母4菌株で健全苗率が病原菌無処理よりも高くなった。

### 7 トマト青枯病を抑える菌株のスリーニング

三県農業研究所では、培地上で青枯病菌と糸状菌367、酵母976菌株を混合培養して青枯病菌の生育を抑えた糸状菌100、酵母430菌株を選抜した。これらのうち糸状菌36、酵母255菌株の菌液を、水耕栽培した幼苗に灌注し、その7日後以降は青枯病菌を含む培養液で栽培を続け、苗の生存率が高くなった糸状菌6、酵母58菌株を選抜した。これらのうちの酵母菌株の菌液を株元灌注して、青枯病菌汚染隔離ベッドに植え付けて発病経緯を観察すると、実用レベルとは言えないものの、8菌株で発病遅延が認められた。この8菌株の菌液を、水耕栽培した幼苗の株元に灌注して、病原菌汚染土壌でポット栽培する

と、移植15日後まで3菌株で顕著な発病抑制が認められた。

## 8 ネギ黒腐菌核病を抑える菌株のスクリーニング

京都農林水産技術センターにおいて、幼苗の病原菌汚染土壌への移植時に酵母828菌株の菌液を灌注したときに防除価が高かった24菌株を選抜した。病原菌汚染隔離ベッドへの苗定植時に、この24菌株の菌液灌注する試験を繰り返し、防除価が上位の2菌株が有望と思われた。

## 9 ショウガ根茎腐敗病を抑える菌株のスクリーニング

高知県農業技術センターでは、理研菌株の糸状菌367、酵母995菌株に、独自の糸状菌19菌株を加えてスクリーニングを行った。ポット栽培で菌液を株元灌注後、病原菌を接種する試験により発病遅延効果が高かった糸状菌46、酵母118菌株を選抜した（岡ら、2020）。これらを用いてさらにポット試験を繰り返し、発病遅延や発病度の程度から糸状菌1、酵母2菌株を有望とした。これらのうちの酵母1菌株は、コンテナや露地圃場での栽培試験において効果が安定していた。

## おわりに

このプロジェクトでは、植物病害抑制とは無関係に収集された菌株群から、病害抑制できる菌株のスクリーニングを行ったが、室内やポット試験レベルならば一定数の有効な菌株が得られた。ただし、一部の機関では、病原菌との対峙培養試験も行ったが、そこでの病原菌生育抑制と植物上での病害抑制効果は必ずしも一致しなかった。苗立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) と糸状菌株の例では、程度は様々ながら、ほぼ全ての菌株で生育阻害や拮抗の何らかの相互作用が認められ、培地上でのスクリーニングは有効でないと思われた。

ここで選抜された菌株の多くは、圃場条件に近づくほど、有効性あるいは安定性が弱まった。ポット栽培などの室内レベルの試験では、化学農薬と同等以上の効果が認められたものもあったが、圃場条件での効果をいかに安定させるかが、これまでも言われている通りの微生物農薬の課題であろう。

ここで選抜された菌株については、従来の加工法では保存性が見込めないことから、今のところ商品化の予定はないが、ここで選抜されたような酵母や湿性の分生子を形成する糸状菌について、有効な加工法の開発、あるいは長期保存ができなくても利用できる流通や使用の形態が整えられれば、植物病害防除も含めた微生物利用の可能性が大きく広がるものと考えられる。特に、各微生物の腐生的な生育や増殖を活かせる使用形態の開発に期待する。

欧州の様子をうかがうと、今後、世界的にも化学農薬等の使用制限がますます強くなると考えられ、この動きは、防除効果の強度を度外視したものとも思われる。そのため、非化学農薬の有力候補である微生物資材について、有効な菌株の探索、あるいは使用方法の開発は急務である。欧州等に遅れることなく、日本国内からも有効な微生物資材が開発され、上市されていくことを期待する。

なお、この課題でスクリーニングされた菌株について、今後知財化の可能性もあるた

め、今回は本プロジェクトの紹介と、スクリーニング方法の概要と選抜された菌株数の紹介にとどめた。スクリーニングの詳細や選抜された菌株については、今後、機会があれば紹介したい。

## 引用文献

- 1) 窪田昌春(2010). キャベツのセル成型育苗において発生する病害とその防除に関する研究. 野茶研報9 : 57-92
- 2) 岡美佐子・山崎睦子・森田泰彰・矢野和孝(2020). ポット栽培ショウガを用いたショウガ根茎腐敗病に対する微生物資材スクリーニング法の開発. 日植病報86 : 188 (講要)
- 3) 理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室(2021). オンラインカタログ.  
URL : <https://web.brc.riken.jp/ja/>
- 4) 津田新哉(2015). 戦略的イノベーション創造プログラム (SIP) ～次世代農林水産業創造技術～「持続可能な農業生産のための新たな総合的植物保護技術の開発」. 植物防疫69 : 404-406

# 日本バイオスティミュラント（BS）協議会とBS資材の展望について 日本バイオスティミュラント協議会（所属：愛知製鋼株式会社） 鈴木基史

## The introduction of Japan Biostimulant (BS) Association and a view of BS material Motofumi Suzuki : Aichi Steel Corporation

“Biostimulants (BS)” is a coined word that has been in use since the late 20th century. They are regarded to be agricultural materials applied for the enhancement of nutrient efficiency, abiotic stress tolerance, crop quality and so on, but in a different manner to that of conventional pesticides and fertilizers. The definition and operation of BS are being discussed all over the world. Japan Biostimulant Association (JBSA) was founded in 2018, and its members are discussing what and how BS should be. In this presentation, the activities of JBSA and examples of BS are introduced.

### はじめに

日本バイオスティミュラント協議会（JBSA）は2018年1月に8社の農業資材メーカーで設立し、現在（2021年4月1日）では、正会員28社、賛助会員67社、個人会員30人の団体となっている。バイオスティミュラント（BS）は、肥料・農薬・土壌改良材の概念には収まらない農業技術として国内外で注目を浴びている。

EUでは2011年にEBIC (The European Biostimulants Industry Council)が設立され、バイオスティミュラントの定義や運用について議論されている。日本においては明確な定義はまだないが、当協議会では「植物の能力と農作物の価値を高める」という位置づけで、国内外の「バイオスティミュラント(BS)」の動向を会員で調査・研究するとともに、日本におけるBSの在り方を議論している。

本発表では、BSの国内外の状況、協議会の活動、BS資材の例について紹介させていただく。

### 1 バイオスティミュラント(BS)とは

Biostimulants (BS)という言葉は、1980年頃には文献上で使っていることが見られ(Bryan, 1981)、その後色々な研究者が様々な解釈をしながら(Russo and Berlin, 1990; Du Jardin, 2015)、現在に至っている。日本では2010年代半ばからバイオスティミュラントという言葉が少しずつ浸透してきたと思われる。直訳すると「生物刺激（剤）」であるが、日本ではバイオスティミュラント（BS）という言葉が一般用語として用いられている。

BSは育種・肥料・農薬などの従来技術とは異なった形で作物の収量や品質に貢献する資材の位置づけとして考えられている。種が持っているポテンシャルに対して、肥料（栄養）、農薬（病害虫の防除）の技術だけでは解決できない高温・低温・乾燥等の非生物ストレス（環境ストレス）等に対して効果のある資材、とも表現することができる（図1）



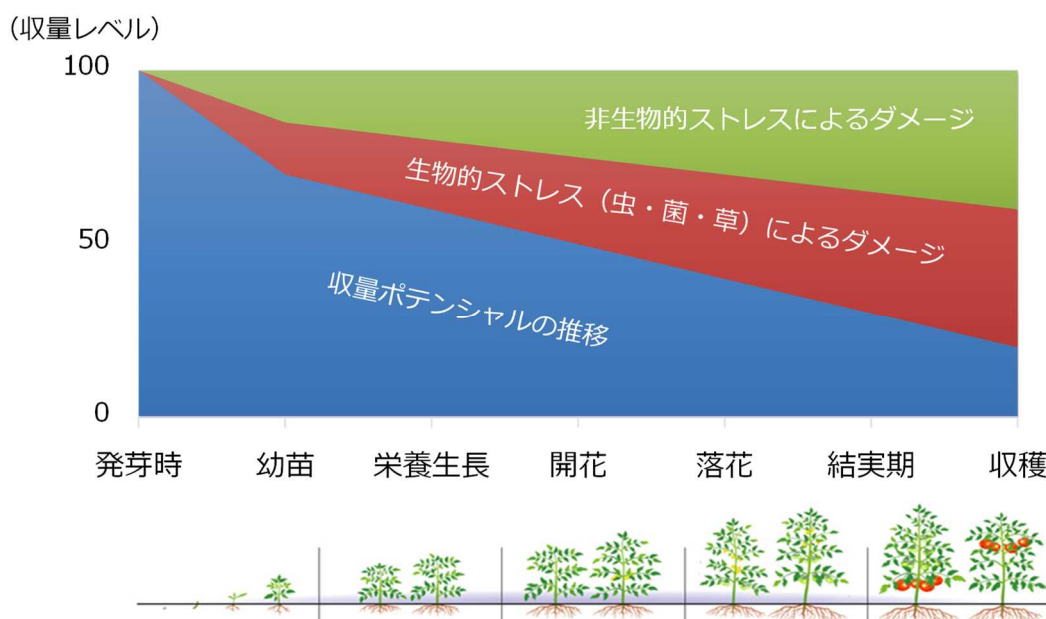


図1：バイオスティミュラントの非生物ストレスに対する効果の概念図  
(出展：バイオスティミュラントガイドブック第1版)

EUはBSについて、「養分の利用効率を向上」、「非生物的ストレスへの耐性を向上」、「品質・形質の向上」、「土壌、根圏での利用困難な養分の取り込み向上」という定義を用いており、農薬規制 (EC No.1107/2009) において「BSは農薬には該当しない」と2019年に改訂された。EUではBSを新肥料法 (2022年施行予定) で取扱う予定になっており、その詳細の運用については今後明らかになっていくと思われる。

BS資材と一言でいっても、その種類は「有機化合物 (アミノ酸・ペプチド・多糖類)」「無機化合物 (ミネラル)」「微生物」「海藻」「腐植」など色々な分類があり、一律に効果・効能や規格を決めることは難しい。すでに日本でBSとして販売されている資材においても、肥料や土壌改良材として登録されているものも多い。減農薬を謳っている資材もあるが、表記の仕方によっては「疑義農薬」と解釈される場合があるので、その点を注意する必要がある。

植物成長調整剤 (Plant growth regulator; PGR) は植物ホルモンなどが該当し、殺菌・殺虫・除草の効果とは異なるが農薬の範疇である。PGRとBSの境はEU、USAでも議論の対象ではあるが、どちらも「PGRとBSは一線を画するもの」としている。USAではEPA (アメリカ合衆国環境保護庁) が、2020年末に米国の農薬規制 (FIFRA: Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act) で登録した物質は農薬としつつ、PGRから除外される17項目の表記をリスト化し (表1)、パブリックコメントを募った。協議会でもこの内容について日本に当てはめた場合等を想定しながら議論をしているが、「訳し方」も今後重要な要素であると考えられる。

表1：アメリカ合衆国環境保護庁（EPA）が「農薬ではない」と提案した表記

①	Alleviates/avoids/corrects/prevents nutrition-based/nutrient deficiency-based plant disorders
②	Enhances/aids/supports/helps/improves abiotic stress tolerance
③	Enhances/aids/supports/helps microbial populations
④	Improves/aids/supports/helps/enhances conversion of applied nutrients to plant available forms
⑤	Improves efficiency of applied fertilizers
⑥	Improves nutrient uptake via natural chelating/complexing agents
⑦	Improves/aids/supports/helps/enhances conditions for better plant establishment
⑧	Improves overall plant nutrition
⑨	Increases plant nutrient assimilation efficiency
⑩	Aids/supports/helps/enhances/improves tolerance of and/or resistance to abiotic stress
⑪	Increased tolerance to sodium (Na)
⑫	Optimizes nutrient use efficiency
⑬	Protects plants/leaves from burning with over-application of foliar nutrients (and burning effects of salt)
⑭	Recovers crops affected by stress due to inefficient management
⑮	Reduces lodging
⑯	Supports nutrient uptake
⑰	Supports/aids/helps nutrient uptake to prevent, mitigate, or correct a specific plant nutrient disorder

引用元：[https://www.epa.gov/sites/production/files/2020-11/documents/pbs-guidance-updated-draft-guidance-document-2020-11-13\\_0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2020-11/documents/pbs-guidance-updated-draft-guidance-document-2020-11-13_0.pdf)

## 2 バイオスティミュラント協議会の活動

日本バイオスティミュラント協議会は正会員・賛助会員・個人会員の3種からなり、年数回の会員向け勉強会と年1回の一般向け講演会を開催している。国内外のBSの動向や、学界のバイオスティミュラントに関する技術などを勉強している。2020年8月には「BSガイドブック（第1版）」を出版し、各企業が考えるBS資材について紹介を行っている。

正会員の企業で「イベント委員会」、「企画・広報委員会」、「技術・調査委員会」を作り、それぞれの委員会が主体となって運営を行っている（図2）。2018年の第1回の講演会は東京大学の弥生講堂一条ホール（定員300名）で開催したが、申し込みを始めてすぐに満席となってしまった。翌年の第2回の講演会は東京大学の伊藤謝恩ホール（定員500名）で行ったが、こちらも満席となり、BS資材への関心の高さが伺えた。2020年はコロナの影響もあり、オンデマンドでの開催を行った。今後も情勢に合わせて開催をしていく予定である。

技術・調査委員会では国内外のBS情報を調査するとともに、協議会の考えるBS規格についても議論している。生産者が安全・安心に資材を使うための「安全性」、「効果・効能」、「品質」についてメーカー側が行うべき事項・レベルを多種多様な資材を扱う企業同士で意見を出し合いながら、方向性を見出そうとしているところである。

なお、バイオスティミュラントガイドブックは協議会HP (<https://www.japanbsa.com/>) から購入することができる。また、過去の講演会情報も協議会HPから見るすることができる。

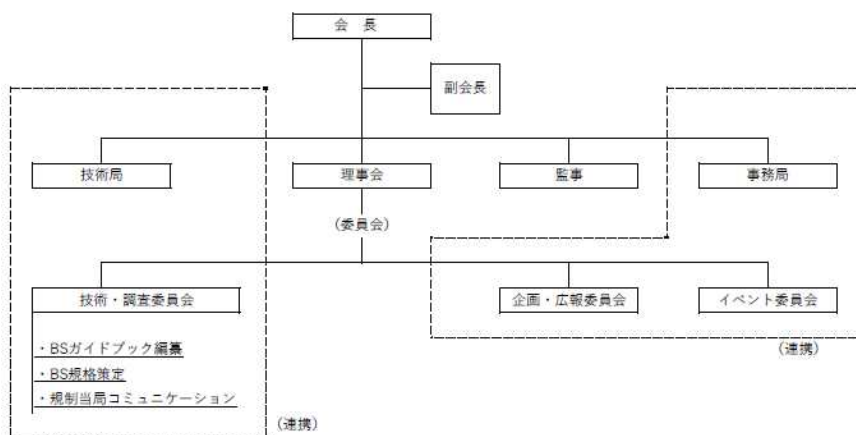


図2 バイオスティミュラント協議会の組織図とバイオスティミュラントガイドブック

### 3 バイオスティミュラント資材の例

バイオスティミュラント資材はその多様性からも分類についても色々な考え方があがるが、ここでは、協議会が昨年発行したBSガイドブック第1版（2020）に基づき記載する。

#### 1) フミン酸とフルボ酸（腐植物質）

動物、植物の生物遺体が微生物により分解・集積・重合されて生成する有機酸や有機物の総称である。土壌診断において、「腐植を多く含む」＝「肥沃な土壌」とみなされ、作物生産を行うために重要な要素とされている。フミン酸やフルボ酸という名前のついた単一物質があるわけではなく、腐植の中でアルカリには溶けて酸には溶けない画分を「フミン酸」、酸にもアルカリにも溶ける画分を「フルボ酸」と呼んでいる。酸・アルカリのどちらにも溶けない画分は「ヒューミン」と呼ぶ。近年、水への溶解性が高く、即効性が期待される「フルボ酸」が注目されている。

腐植の役割としては、「保肥力を高める」、「土壌の緩衝能を高める」、「土壌微生物相を多様化する」、「土壌物理性の改善」が挙げられている。腐植物質は負に帯電して陽イオンのミネラル養分を保持したり、微生物が分解する多種多様な有機物を含むことから、土づくりの3要素である「化学性」、「物理性」、「生物性」の全ての改善効果があり、その結果、根張りの増強、収量の増加などが期待できる。

#### 2) タンパク質加水分解質（アミノ酸、ペプチド）とその他の窒素含有化合物

農業利用されているアミノ酸やペプチドは、特定のアミノ酸に限定せずに生物残渣の加水分解物として製品化されているものもあれば、発酵や化学合成によって、特定のアミノ酸を製造し、肥料原料として使われているものもある。効果が提唱されているものとして、以下のようなものがある。

プロリン	: 浸透圧の調節や金属の輸送
アルギニン	: 窒素利用効率の向上
メチオニン	: 発根の向上
5-アミノレブリン酸	: 気孔の開孔、光合成向上
グリシンベタイン	: 低温耐性
グルタチオン（酸化型）	: 光合成能の安定化、活着促進

ここに挙げたものはほんの一例であり、どのようなアミノ酸・ペプチドにも何かしらの作用はあると考えられる。また、作用も単一ではなく、使用する作物・環境によっても効能は異なってくると考えられる。

有機物は吸収されないという説も根強いが、アミノ酸やグルタチオンのトランスポーターは存在し、根や葉からも吸収されると考えられる。またヘモグロビンのような高分子ペプチド（タンパク質）もエンドサイトーシスで取り込まれることが証明されており（Nishizawa and Mori, 1977, 1978）、アミノ酸やペプチドがそのまま植物体内の代謝系に利用されることはありうることでありと考えられる。

### 3) ミネラル（微量元素）

一般的に「ミネラル」というと、リン酸やカリウムなども鉱物由来であるので、ミネラルの部類であるが、ここでは「微量元素」とする。微量元素は言葉の通り微量しか必要としないが、無ければ生長が止まる。また、欠乏症が見えにくかったり、過剰害が出ることもあるため、適切な量を与えることが非常に難しい。微量元素（金属元素）は、酵素の補因子として機能するため、非常に重要な役割を果たしている。オーケストラでいえば、楽団（アミノ酸・ペプチド）を束ねる指揮者の役割である。

日本では、微量元素（Fe, Zn, Mn, Cu, B, Mo）のうち、「普通肥料」のカテゴリーに入っているのはマンガン（Mn）とホウ素（B）のみである。鉄（Fe）や亜鉛（Zn）、銅（Cu）、モリブデン（Mo）は「効果発現促進材」として登録されたものが肥料に混合することができる。ミネラルそのものが「バイオスティミュラント」とも言えるが、ここでは、鉄についての詳細を少し紹介する。

鉄は土壌中には3～4%含まれており、不足しないと思われがちだが、その溶解度積は非常に低く、pHが1増えると鉄濃度は1000分の1も減少する。イネ科以外の植物は土壌中の鉄を吸収するために、「還元・2価鉄吸収」という戦略（Strategy-I）を持っている（Marschner et al., 1986）。根酸で土壌中の鉄を溶かし出した後、根の還元酵素で2価鉄に還元し、2価鉄イオンとしてトランスポーターを通じて吸収する。多大なエネルギーを使って微量の鉄を吸収しているともいえる。植物が元気な時はこの機構が働くが、低温・低日照などの環境ストレスでは還元活性も低下する。そのため、潜在的な鉄欠乏が発生することがしばしば見られる。2価鉄を含む資材、あるいは還元酵素活性を向上させる資材は、環境ストレス時に効果を発揮するためバイオスティミュラントの概念に適すると考えられる（鈴木 2018）。なお、イネ科植物は、ムギネ酸という6配位の鉄キレート物質を分泌し、「ムギネ酸-鉄錯体」としてトランスポーターを通じて吸収する戦略（Strategy-II）を有している（高城 1985、Marschner et al., 1986）。

### 4) 微生物

殺虫剤に用いる微生物農薬とは別に、作物生産にベネフィット（利益）をもたらす微生物をバイオスティミュラント微生物資材としてここでは紹介する。窒素固定を行い植物に窒素栄養を供給する根粒菌や、土壌中の不溶化されたリン酸を利用し、植物体内に菌糸を伸ばすことで植物にリン栄養を供給するVA菌根菌は植物と「共生」することで、作物生産に役立てることができ。また良性の菌を増殖させることでフザリウム菌などの病害菌の増殖を「抑制」することも作物生産へのベネフィットと考えることができる。この作用としてトリコデルマ菌を用いた資材が農業で使用されており、他の効果として根張りの増強や、固定化された栄養素の吸収促進なども見られている。また、土壌中の有機物の分解促進や、腐植化の促進を行う微生物群もバイオスティミュラント資材と解釈できると考えている。表2に微生物のカテゴリー・種類・機能を示す。

表2 微生物資材の例 (出展：バイオスティミュラントガイドブック第1版より一部改変)

微生物のカテゴリー	微生物の例	働きと役割
菌根菌類	<i>Glomus</i> , <i>Gigaspora</i> 等	土壌中のリン酸成分などの吸収を促進
窒素固定菌類	<i>Azotobacter</i> , <i>Rhizobium</i> 等	空気中の窒素を硝酸態窒素等に変換し、植物が利用
植物成育促進菌類 (PGPF・PGPR)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> 等	植物の健全な生育を助長し、増収をもたらす
環境改善型菌類	<i>Rhodobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> 等	植物の生育に悪影響を与える土壌成分などを好転させる
その他微生物	放線菌、子囊菌、担子菌、卵囊菌、リゾプス、バクテリア等	健全な生育、収量の増加をもたらせられる微生物から選抜されたもの。

#### 5) 海藻及び海藻抽出物、多糖類

海藻は古くから農業に用いられ、日本でも沿岸の農業では伝統的な農法として使われており、作物に良い影響を与えることは経験的に知られている。一方で、その作用機序についてはその複雑性により非常に解明が難しい資材でもある。海藻は多糖類、ミネラル、アミノ酸・ペプチド、ポリフェノール、植物ホルモンなど多くの成分が含まれており、どの成分が効果があるかを解明するというよりも、資材としての効果を評価すべきで、海藻の種類、採取・加工法などを工夫することにより、農業生産への期待が持てるカテゴリーともいえる。世界のBSマーケットでは3割以上が海藻とされており、乱獲しないことや、河川からの栄養流入を自然な状態にするような取組が必要であると考えられる。

#### 6) その他

以上5つのカテゴリーに入らないBS資材として例えば香り成分である「ヘキセナル」が挙げられる。ヘキセナル (*trans-2-hexanal*) ははいわゆる新緑の香りの代表格で芳香剤や食品フレーバーなどにも使用されているが、植物の高温ストレス耐性を向上されることも最近の研究で明らかになってきた。ヘキセナル処理が高温耐性に関わる遺伝子 (*HSA2*) を30分で強力に誘導され、45°Cの高温条件でも障害を受けにくくなるというデータを得た他、気孔を開け、蒸散や放熱の効果があることも証明された (Yamauchi et al., 2015)。

また、酢酸はジャスモン酸のシグナルに作用し外部投与による乾燥耐性が報告され (Kim et al., 2018)、農業資材としても使用されている。これらの農業資材は産学連携や研究所発ベンチャーとしての例でもある。

また、二糖類である「トレハロース」も農業利用されている。トレハロースはスクロースよりも水になじみやすいという特性があり、一般的なお菓子にも多く使用されているが、クマムシなどの動物では乾燥耐性のために体内に高濃度に蓄積する。植物にも生合成経路は存在し、イネでは低温時に一過的に合成することが報告されている (Paramanik and Imai, 2005)。トレハロースの外部投与による乾燥耐性向上 (Ali and Ashraf, 2011) や、塩ストレス・リン酸欠乏の防御 (Rohman et al., 2019) も報告されている。農業用途においても、低温や高温障害、酸化ストレスへの対策として利用されている。

ここに示した以外にもたくさんのBS資材があり、また2種類以上に跨るものもある。

## おわりに

バイオスティミュラントという用語は近年浸透してきた言葉であるが、その技術やノウハウは古くから伝わっているものも多くある。異常気象が叫ばれている現代において、農作物を適切な方法で増収・維持生産するためにも、BS資材の作用機序の解明も重要であるが、農作物と生産者、及び消費者がベネフィットを得られるような仕組みづくりを行うことが必要と考えており、協議会もその一助となるように活動していきたい。

## 引用文献

- 1) 鈴木 基史(2018). 植物物活性材「鉄力あぐり・鉄力あくあ」の農業利用 -日本における潜在的鉄欠乏事例の紹介- アグリバイオ **2**(12): 1168-1172
- 2) 高城 成一(1985). 作物の鉄吸収に関する比較栄養生理研究 (日本土壤肥料学会賞受賞記念講演). 日本土壤肥料学会要旨集 **31**: 202
- 3) 日本バイオスティミュラント協議会(2020). バイオスティミュラントガイドブック第1版
- 4) Ali, Q, Ashraf, M. (2011) Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: Growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **197**: 258-271
- 5) Bryan, H. H. (1981) Accelerating germination and growth of vegetables with pregerminated seeds and sequentially applied biostimulants. *ISHS Acta Horticulturae* **122**: Symposium on Timing of Field Production of Vegetables
- 6) Du Jardin, P. (2015) Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* **196**: 3-14.
- 7) Kim, J.M., To, T., Matsui, A. et al. (2017) Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nature Plants* **3**: 17097
- 8) Marschner, H. Römheld, V. & Kissel, M. (1986) Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* **9**: 695-713
- 9) Nishizawa, N. K. & Mori, S. (1977) Invagination of plasmalemma: its role in the absorption of macromolecules in rice roots. *Plant Cell Physiol.* **18**: 767-782
- 10) Nishizawa, N.K. & Mori, S. (1978) Endocytosis (heterophagy) in plant cells: Involvement of ER and ER-derived vesicles. *Plant Cell Physiol.* **19**: 717-730
- 11) Paramanic, M. H. R. & Imai, R. (2005) Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Mol. Biol.* **58**: 751-762
- 12) Russo, R. and Berlin, G. P. (1990) The use of organic biostimulants to help low input sustainable agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture* **1**:19-42
- 13) Rohman, M.M., Islam, M.R., Monsur, M.B., Amiruzzaman, M., Fujita, M., Hasanuzzaman, M. (2019) Trehalose protects maize plants from salt stress and phosphorus deficiency. *Plants*, **8**: 568
- 14) Yamauchi, Y., Kunishima, M. Mizutani, M. and Sugimoto, Y. (2015) Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression *Sci. Rep.*, **5**: 8030



# 沖縄微生物ライブラリーを活用した植物病害防除の可能性

島根大学生物資源科学部 上野 誠  
琉球大学熱帯生物圏研究センター 新里尚也・伊藤通浩

**Potential use of the Okinawa Microbial Library to control plant diseases**  
**Makoto UENO: Faculty of Life and Environmental Sciences, Shimane University**  
**Naoya SHINZATO, Michihiro ITO: Tropical Biosphere Research Center,**  
**University of the Ryukyus**

## Abstract

Most plant disease-control strategies involve the use of chemical fungicides. Extensive use of such strategies has fostered resistance to these chemicals. A thorough examination of biological diversity to find new inhibitory compounds and microorganisms that might be used to effectively control plant diseases is an attractive and viable alternative strategy. Okinawa, the only subtropical area in Japan with numerous island ecosystems, is expected to harbor diverse microbial resources. In this study, we constructed a culture filtrate library (Okinawa Microbial Library, OML, <http://omlus.jimdo.com/>) that curates microbes isolated from Okinawan soils, ocean, plants, foods, insects, including the Yaeyama Archipelago, and validated its phylogenetic diversity. Several microbes from the OML and their secondary metabolites showed inhibitory activity against plant diseases *in vivo*. Our results suggest that the OML can potentially be exploited to develop new fungicides and biological agents against air-borne and soil-borne diseases caused by pathogenic plant fungi.

## はじめに

持続可能な開発目標（SDGs : Sustainable Development Goals）や温室効果ガス排出量ゼロの達成が重要項目となり、植物保護においても、環境保全型病害虫防除技術や気候変動に対応した植物保護技術の開発が求められている。そのような中で研究者が生産者や消費者のために、生産現場で利用できる新たな防除法を開発・提供することは重要となってきた。農作物生産においては、病害虫及び雑草の発生が安定供給を妨げる要因となる。特に、近年は、温暖化による世界的な異常気象や世界経済の発展による全世界での人や物資の移動の活発化により、国内でも新たな農作物病害虫・雑草の発生の危機にさらされている。このことは、植物検疫統計 (<https://www.maff.go.jp/pps/j/tokei/index.html>) から明らかである。そのような中で、化学農薬は、安定的な食糧生産と供給に貢献し続けているが、継続的な化学農薬の使用による農薬耐性菌の出現が問題となっているのも事実である（FRAC 2019; Ishii et al. 2015）。一方、微生物を用いた生物防除の体制リスクは低く（FRAC 2021）、薬剤耐性菌の出現や化学農薬の使用を減らすための方法として、注目されている。生物防除剤として利用されている微生物の種類は限られており、今後も利用可能な微生物種の探索は

必要であると考えられる。これらの研究は、化学農薬のリスクを減らし、農作物の安定生産に繋がり、最終的にSDGsや効果ガス排出量ゼロへの貢献にも繋がると考えられる。微生物の保存は、国、独立行政法人及び民間などの多くの機関で行われている。例えば、独立行政法人製品評価技術基盤機構には約8万菌株（2015年）の微生物（細菌・放線菌・アーキア・糸状菌・酵母・微細藻類・バクテリオファージ）が保存され、国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンターにも、約2万9千菌株（2019年）が保存されている。これらのライブラリーの中にも生物防除に利用可能な微生物が存在すると考えられる。琉球大学熱帯生物圏研究センターには、2006年から離島を含む沖縄県内の各地の土壤、海洋、植物、食品、昆虫からの微生物の収集を行っており、約4000株からなる沖縄微生物ライブラリー（<https://omljp.jimdofree.com/>）が構築されている（図1）。熱帯・亜熱帯地域に位置する沖縄県には、東西約1000km、南北約400kmに及ぶ広大な海域に160の島々が存在し（沖縄県、2018）、他の地域にない特徴のある微生物が存在する可能性がある。実際に沖縄微生物ライブラリーに保存されている微生物の中には、食品（アルコール生産）、医療・健康（抗酸化活性、アミラーゼ活性、チロシナーゼ活性）、バイオマス関連（セルラーゼ活性、糖資化性）、環境関連（アルカン資化性、アオコ生育抑制）、農業（シデロフォア生産性、インドール酢酸生産性）及び抗マalaria活性を示すものが発見されている。一方、沖縄微生物ライブラリーの微生物等を用いた病害防除に関する研究は行われていなかった。そこで、病害防除に利用可能な微生物等の探索を目的として、琉球大学の研究グループとの共同研究を開始した。本稿では、沖縄微生物ライブラリーに保存されている微生物等を用いた糸状菌による地上病害及び土壌病害の防除の可能性について紹介する。

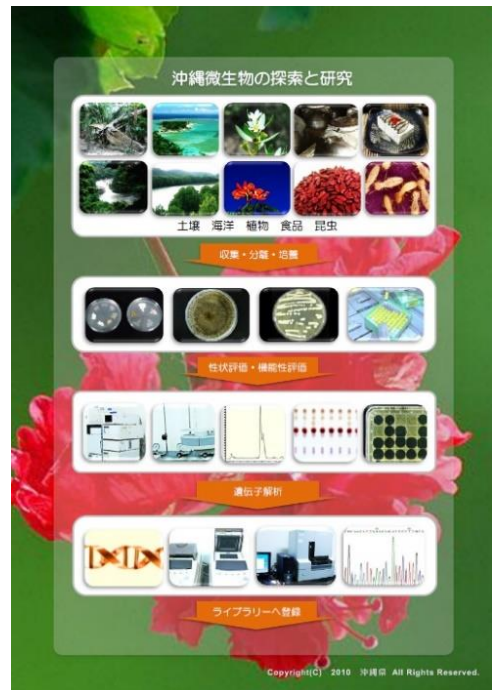


図1 沖縄微生物ライブラリーの概要

## 1 沖縄微生物ライブラリーを用いた微生物及びその代謝産物のスクリーニング

琉球大学熱帯生物圏研究センターの沖縄微生物ライブラリーには、右の写真のように微生物の培養菌体をアセントで抽出した菌体抽出液とグリセロールストックが冷凍保存されており、目的に応じたスクリーニングが行える。著者らは、抗菌物質の探索のために、以下の特殊印刷スライドグラスを用いて、菌体抽出液のスクリーニングを行った。また、生物防除に利用可能な活性を示す菌株の探索は、対峙培養法や2分割シャーレを用いて、グリセロールストックから増殖した菌株でのスクリーニングを行った。



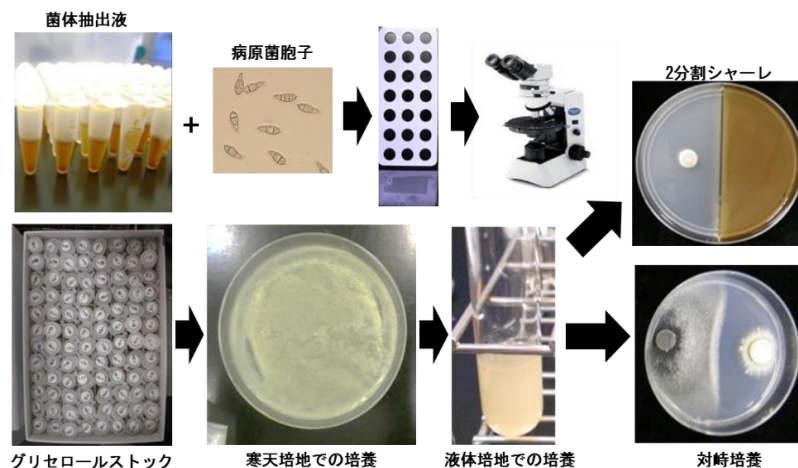


図2 菌体抽出液及びグリセロールストックを用いたスクリーニング

## 2 微生物が生産する揮発性物質による土壌病原菌に対する抑制効果

著者らは、沖縄微生物ライブラリーに保存されている土壌から分離された微生物の中に、土壌病害を抑制できる微生物が存在すると予想した。ここでは、これまでに揮発性の抗菌物質を生産することが知られている*Bacillus*属菌に注目し、土壌殺菌に利用可能な微生物の探索を目的とした。まず、トマト白絹病の原因となるトマト白絹病菌 (*Sclerotium rolfsii*) を用いて、2分割シャーレによる揮発性物質を生産できる*Bacillus*属菌の探索を行った。沖縄微生物ライブラリーに保存されている*Bacillus*属の217株のうち、57菌株を用いて、トマト白絹病菌の抑制を調査した結果、21菌株が高い抑制効果を示した。そこで、5菌株を選抜して、トマト植物体を用いた土壌での抑制効果を調査した。その結果、5菌株 (図3) はいずれも土壌でのトマト白絹病の発病を抑制した (図4)。また、これらの菌株の中には、55°Cでも生育できる株が存在していた。そこで、太陽熱消毒と揮発性物質のハイブリットの抑制効果を期待して、2分割シャーレの一方で菌株を培養し、もう一方にトマト白絹病菌の菌核を置いて、37°Cで1週間培養し、菌核を取り出して、ジャガイモ・スクロース寒天培地で再培養した。その結果、菌株が生産する揮発性物質を処理した菌核の生育が抑制された (図5)。この結果は、菌株の揮発性物

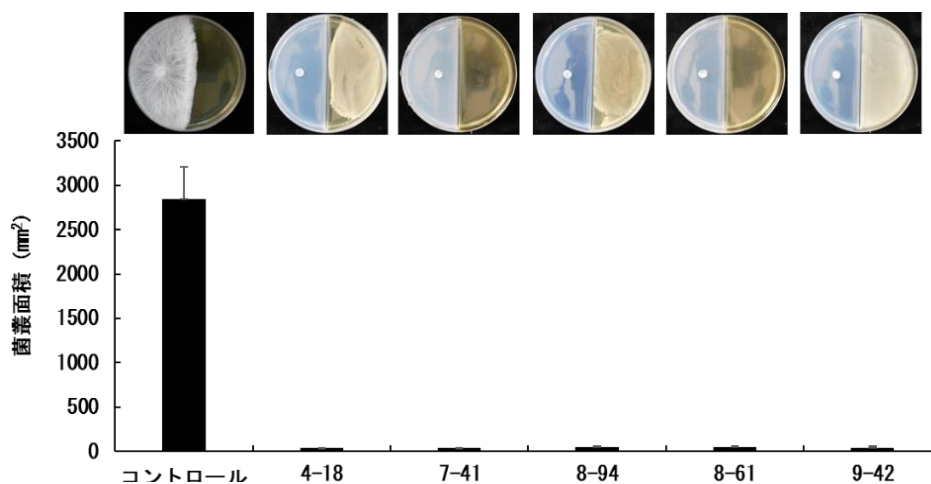


図3 分離株の揮発性物質がトマト白絹病菌の菌糸生育に与える影響

質が、白絹病菌の菌核を殺菌できることを示した。また、これらの菌株の中には、オクラに立枯病を引き起こす *Fusarium buharicum* やマンゴー炭疽病菌の生育を抑制する菌株も確認された。今後、土壌を用いた調査が必要になるが、これらの結果は、太陽熱消毒と微生物の生産する揮発性物質を用いたハイブリット型の土壌殺菌の可能性を示した。



図4 分離株の揮発性物質がトマト白絹病の発病に与える影響 (左: 对照区 右: 分離株区)

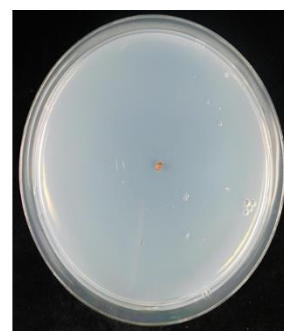


図5 分離株の揮発性物質の処理がトマト白絹病の菌核の生育に与える影響 (左: 对照区 右: 分離株区)

### 3 微生物が生産する代謝産物を用いた植物病原菌の抑制効果

前述の菌体抽出液を用いたスクリーニングでは、イネいもち病菌孢子の感染行動に対する抑制効果の確認だけでなく、イネいもち病菌の形態に影響を及ぼす代謝産物も確認された。これらの代謝産物は、新たな防除剤となる可能性がある。ここでは、イネいもち病菌の付着器の異常な拡大の誘導及び付着器のメラニン化を抑制する物質を菌体内に生産する分離株 (3-45株及び4-27株) について紹介する (Tamura et al. 2019) (図6)。

3-45株 (*Streptomyces erythrochromogenes*)

及び4-27株 (*Streptomyces levis*) は、LB培地で培養後に、1/10LB培地で再培養を行い、その後、50%アセトンで菌体を抽出することにより菌体抽出液を得た。この菌体抽出液とイネいもち病菌孢子を混合すると、イネいもち病菌の付着器の拡大とメラニン化の抑制が観察された。電子顕微鏡による観察では、付着器内の液胞の拡大が観察され、メラニン合成関連遺伝子の発現も抑制されることが明らかにされた。また、菌体抽出液が付着器のキチン及び $\beta$ -1,3-グルカンに与える影響を蛍光顕微鏡で観察した結果、拡大した付着器においてもキチン及び $\beta$ -1,3-グルカンの存在を示す蛍光は観察された。菌体抽出液を混合したイネいもち病菌をイネに接種した。その結果、イネいもち病菌の病斑形成が抑制され、イネごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*)、キュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*) 及びキュウリ炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) でも発芽管の先端が球状に膨潤される作用が確認された。本物質は熱安定な高分子の物質であることが確認されており、物質を単離することで、新たな防除剤として、利用できる可能性

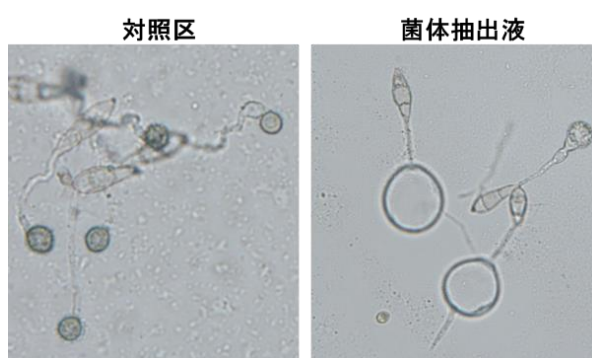


図6 菌体抽出液がイネいもち病菌の付着器の異常拡大とメラニン形成の抑制に与える影響



がある。このように沖縄微生物ライブラリーを活用することにより、植物病原菌を抑制する物質の探索も可能であることが示された。

#### 4 新たな微生物ライブラリーの構築と分離した微生物の抑制効果

##### (1) 島根微生物ライブラリーの構築

上記のように、沖縄微生物ライブラリーに保存されている微生物が植物病害の防除に利用できる可能が室内レベルで示された。そこで著者らは、次に新たな微生物ライブラリーの構築のために、島根県に注目した。山陰地域にある島根県は東西に長く、地域によって気象が異なる。他県と比較して日照時間が少なく、湿度が高いため、微生物の生息には都合が良いと考

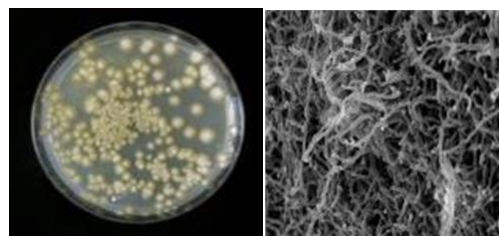


図7 *Streptomyces blastmyceticus* STS1 株

えられる。また、隠岐、匹見、三瓶など未探索の地が多く、未利用の有用微生物が多く存在する可能性がある。著者らは、これまでに、土壌、植物、きのこ等から1800菌株以上の微生物を保存しており、他の研究者からの要望に応じて、利用可能な仕組みを構築している。これまでに島根県で採取した微生物の有用性を示す研究として、いくつかの成果を得ている。1つは、*Streptomyces blastmyceticus* STS1株（図7）によるキュウリ炭疽病及びうどんこ病の抑制に関わる成果である（Ueno et al., 2012; Ganphung et al., 2019）。STS1株は多くの地上及び土壌植物病原菌に対する抑制効果を示しており、利用可能な資源の1つとなる可能性がある。もう1つは、ヨモギから分離された*Bacillus pumilus* NI2株の揮発性物質によるイチゴ灰色かび病菌の抑制に関わる成果である（松原ら2015）。NI2株の揮発性物質は収穫後のイチゴでの病害発生や健全な苗生産にも貢献できる可能性がある。その他にも、*Burkholderia ambifaria*によるキュウリ立枯病菌（Ganphung et al., 2021）、*Paenibacillus polymyxa*によるイネ白葉枯病菌（Haidary et al., 2019）、*Streptomyces plumbues*によるトマト萎凋病菌（Abdullah et al., 2021）などの抑制効果が確認されており、今後、圃場試験や新たなスクリーニングを実施することにより、病害防除に利用可能な微生物やその代謝産物を発見できる可能性がある。

##### (2) *S. blastmyceticus* STS1株によるキュウリ病害の抑制

ここでは、島根県松江市で分離された *S. blastmyceticus* STS1株によるキュウリうどんこ病の抑制について紹介したい。これまでに、*S. blastmyceticus* STS1株が対峙培養により、複数の糸状菌病の菌糸生育を抑制することを明らかにした。また、Watanabe et al. (1957)により、*S. blastmyceticus* が抗菌物質であるblastmycinを生産することが報告されていた。しかし、*S. blastmyceticus* を用いた生物防除に関する研究の報告はなかった。そこで、キュウリうどんこ病に対するSTS1株の効果を調査した。まず、STS1株を前処理したキュウリ葉上で

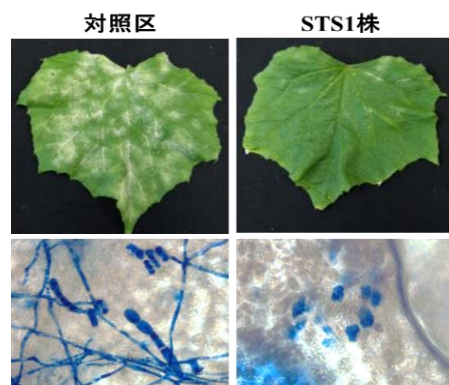


図8 STS1 株のキュウリへの前処理が  
キュウリの発病に与える影響

のうどんこ病の病斑形成を調査した。その結果、うどんこ病菌の孢子発芽による病斑形成の顕著な抑制が確認された(図8)。さらに、STS1株の培養液の経時的な前処理では、前処理後1-9日間に後接種した*Podosphaera xanthii*によるうどんこ病の発生が抑制された。特に前処理5日間までは、高い抑制効果を示した。今回の結果では、STS1株の培養液は、キュウリ葉に対して植物毒性効果を示さなかった。しかし、キュウリの花と果実に対する植物毒性は、STS1株では調査されていない。したがって、今後、実用化するためには、STS1株の培養液のキュウリの花や果実に対する植物毒性を調査する必要がある。さらに、キュウリ葉に発生したキュウリうどんこ病菌にSTS1株の培養液を処理した結果、STS1株が*P. xanthii*の孢子に付着し、崩壊している様子が観察された(図9)。STS1株は、培地上でキチナーゼを生産できることが確認されており、STS1株が植物体上でキチナーゼを生産することにより、うどんこ病を抑制している可能性が考えられた。今後、STS1株の生産する物質について、詳しく調査し、病害抑制との関係を明らかにする必要がある。次に、STS1株のうどんこ病の抑制効果を、ビニールハウス内で栽培したキュウリを用いて調査した。その結果、STS1株を定植後、5日ごとに処理したキュウリ葉では、対照区と比較して、うどんこ病の発生が著しく抑制された(図10)。STS1株の培地上での増殖は、20℃から37℃の間で観察され、STS1株は、キュウリうどんこ病菌の防除に利用されているいくつかの殺菌剤の存在下で増殖可能であった。一般的に、キュウリの成長に最適な温度は25-30℃であり、*P. xanthii*の孢子発芽は、20-30℃で観察される。これらの結果は、STS1株がキュウリ栽培環境で、防除に利用できる可能性を示した。しかし、実際の栽培環境においては、多くの細菌、糸状菌、ウイルス病が発生するため、今後、うどんこ病菌以外の病原菌に対するSTS1株の抑制効果を圃場レベルで調査する必要がある。本研究では、*S. blastomyceticus* STS1株が、キュウリで発生する*P. xanthii*によるうどんこ病を抑制できることを明らかにし、STS1株がキュウリ病害の発生を抑制するための新しい微生物農薬の開発に利用できる可能性を示した。

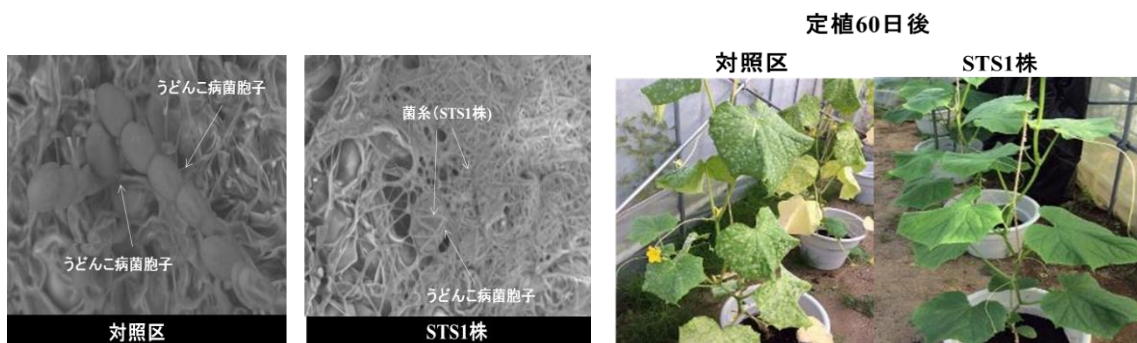


図 9 キュウリうどんこ病が発生したキュウリ葉へのSTS1株の処理がキュウリうどんこ病に与える影響

図 10 ビニールハウス栽培キュウリへのSTS1株の処理がキュウリうどんこ病の発生に与える影響

### おわりに

本稿では、沖縄微生物ライブラリーに保存されている微生物やその代謝産物による植物病原菌の抑制について、述べてきた。これらの研究は実験室レベルの研究が多く、実際には、圃場レベルでの抑制効果を検証する必要がある。特に植物体や土壌での定着が課題になると考えられる。そのため、今後は、スクリーニングされた微生物を植物や土



壤に定着させる技術の構築を進めたい。また、実用的な観点では、スクリーニングされた微生物が多くの植物病原菌を抑制し、さまざまな場所で効果を示すことが求められるが、各農家の圃場に最適なオーダーメイドの微生物探索による防除もアイデアの1つになるのではないかと考えている。一方、様々な微生物ライブラリーが大学や研究所で構築されている中で、それらの利用は十分でないと考えられる。さまざまな研究者が、異なるスクリーニング方法を用いて、各微生物ライブラリーを活用することにより、問題となっている病害抑制に貢献できる可能性があり、多くの研究者が利用しやすいシステムを構築する必要があるかもしれない。今後も、これまでの成果を発展させ、病害防除に関する防除法の開発に貢献できるように努力したい。

## 謝辞

本稿で紹介した研究は、琉球大学熱帯生物圏研究センター共同利用・共同研究事業「沖縄微生物ライブラリーを活用した植物病害防除に関する研究」、科学研究費助成事業「植物病原菌の生体制御破壊型非殺菌性農薬の開発に向けた物質の同定及び作用機構解明」及び一般財団法人沖縄美ら島財団調査研究・技術開発助成事業「土壌微生物を活用した沖縄産農作物の病害防除技術の開発」により著者らが実施したものである。本研究にご協力いただきました多くの方々に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Abdullah, Z. K., Gondo, Y., Ganphung, R., Yokoyama, Y., Kihara, J. and Ueno, M. (2021). Suppressive effect of isolate F31D from soil in Matsue city, Shimane Prefecture, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, the causal agent of Fusarium wilt of tomato. Jpn. J. Phytopathol. 87:51.
- 2) Fungicide resistance action committee (FRAC) 2019. <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>.
- 3) Fungicide resistance action committee (FRAC) 2021. [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2).
- 4) Ganphung, R., Kihara, J. and Ueno, M. (2019). Biological control of powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii* in cucumber by *Streptomyces blastmyceticus* strain STS1 isolated in Shimane Prefecture. J. Jpn. Soc. Agri. Tech. Manage. 26:61-68.
- 5) Ganphung, R., Gondo, Y., Yokoyama, Y., Kihara, J. and Ueno, M. (2021). Suppressive effect of *Burkholderia ambifaria* isolate GT1022 on damping-off disease of cucumber. J. Jpn. Soc. Agri. Tech. Manage. (In press).
- 6) Haidary, M.N., Tamura, T., Kihara, J. and Ueno, M. (2019). Inhibitory activity of *Paenibacillus* sp. isolated from soil in Gotsu city, Shimane Prefecture, against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causal agent of rice bacterial leaf blight. Jpn. J. Phytopathol. 85:78.
- 7) Ishii H. and Hollomon D. W. (2015). Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles

and a Guide to Practical Management. Tokyo, Springer.

- 8) 松原和司・西脇いつか・Nguyen Thi Quyet・木原淳一・荒瀬 榮・上野 誠 (2015). *Bacillus* 属菌の揮発性成分による植物病原菌の抑制について. 日植病報. 81:78
- 9) 沖縄県(2018). 住みよく魅力ある島づくり計画-沖縄21世紀ビジョン離島振興計画-.
- 10) Tamura, T., Shinzato, N., Ito, M., Ueno, M. (2019). Microbial secondary metabolite induction of abnormal appressoria formation mediates control of rice blast disease caused by *Magnaporthe oryzae* J. Phytopathol. 167:156-162.
- 11) Ueno, M., Suzuki, Y., Kumura, Y., Ueda, K., Nguyen T. Q., Kihara, J., Arase, S. and Oshima, A. (2012). Isolation of *Streptomyces* strain STS1 that inhibits the growth of *Colletotrichum orbiculare*. J. Jpn. Soc. Agri. Tech. Manage. 18:191-195.
- 12) Watanabe, K., Tanaka, T., Fukuhara, K., Miyairi, N., Yonehara, H., Umezawa, H. (1957). Blastmycin, a new antibiotic from *Streptomyces* sp.. J. Antibiot. 10:39-45.

# エンドファイト-土着細菌共生系が作物生産を変える？

茨城大学農学部 成澤才彦

## Endophyte-Bacterial Symbiotic Systems Change Crop Production? Kazuhiko Narisawa : College of Agriculture, Ibaraki University

### Abstract

I will explain the efforts of new technology that can stably control soil diseases even in the field by the symbiotic system of root endophyte (DSE) and bacteria. First, I will explain how to construct a DSE-bacterial symbiotic system by catching useful bacteria that interact with DSE from the environment. Furthermore, I will discuss the possibility of practical technology to identify useful microbial flora with DSE as the core, which is optimal for controlling plant diseases in the field.

### はじめに

高度経済成長期に始まった効率性を重視した生産システムは、農業分野においても、化学農薬や肥料に依存した農作物生産を普及させた。しかし、現在では、農薬や肥料の使用を削減し、有機質資源等を利用する、いわゆる環境保全型農業が求められている。元来、広い面積で限られた種の作物を栽培する農地は、自然生態系から見て、極めて特殊な環境である。病虫害の多くは宿主特異性があるため、一定の作物栽培を続けると、生態系のバランスが崩れ、ある特定種の病虫害だけの増殖を助長することになり、作物生産にダメージを与える。これらの問題を解決するにあたり、有用微生物は重要な役割を担っているが、自然生態系に比べ、作物生産においてその機能は十分に活用されていない。

土壌中には有用微生物ばかりでなく、病原微生物を含めた植物の生育にマイナスに働く微生物も多様に存在する。演者らが着目する根部エンドファイト(DSE)は、単独でも、植物に対するプラスの効果が発揮されるが、近年、野外でも安定した効果を維持するためには、理想的な有用微生物ネットワークの構築が必要であることがわかってきた。

### 1 有用微生物利用のパラダイムシフトを提案

当研究グループでは、*Cladophialophora chaetospora* や *Veronaeopsis simplex* などのDSEの活用に注目し、これらを植物に定着させることで、植物に病害抑制など様々な機能が付加できることを明らかにしてきた(成澤, 2011)。図1のように、植物とDSEが1つの共生系(黒色系状体は植物根ではなく、DSEの菌糸である)として成立すれば、DSEの効果で根の

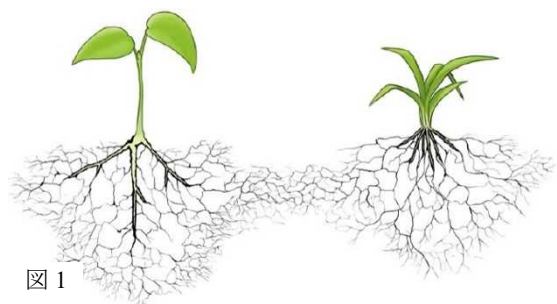


図1

能力が高められ、窒素やリン等の養分吸収の促進、高温や酸性土壌などの環境ストレスに対する耐性が付与される。しかし、圃場で安定した効果を得るためには、DSE単独の動態ばかりで無く、さらに植物の生育に有効な他の微生物との相互作用を解明する必要がある。

### 2 菌類は生態系において単独では存在しない!

生物間の共生関係は、今までに多くの生物種で見出され、互いの生存・繁殖に不可欠である。菌類とバクテリアも相互に様々な影響を及ぼし合っていると考えられており、菌類-バクテリアを

複合系として捉え、その生理、生態を理解することは極めて重要である。当研究グループでは、菌体内外には普遍的にバクテリアが存在し、相互依存の関係にあるという仮説を他に先駆けて提唱している。今までに、イネ苗立枯病菌*Rhizopus microsporus*による毒素生産を内生細菌*Burkholderia rhizoxinica*が制御することが示されているが、大部分の菌類では、その相互作用までは明らかになっていない。

### 3 DSEは有用微生物利用の中心となるコア微生物である！

DSE は宿主特異性が無く、コケから樹木まで多種多様な植物種に定着することが可能である。また、アブラナ科植物と養分のやり取りを行う共生関係が証明されているのも DSE のみである (Usuki and Narisawa, 2007)。この宿主範囲が広いことが微生物叢の動態に特に強い影響を与える「まとめ役」(コア微生物) が DSE である大きな理由ともなっている (Toju, Narisawa, Hiruma *et al.* 2018 *Nature Plants*)。

そこで、DSE で資材を作成し、それを対象の圃場 (慣行栽培圃場, 水田, および有機栽培圃場) に一定期間埋設・回収し、土着の微生物を釣餌した資材を作成した。それらを供試してトマトを育成したところ、何れの埋設資材区でも対照区およびオリジナル資材区 (土着微生物なし) に比較してトマト生育が促進された (図 2)。その DSE 菌糸圏には、処理区ごとに異なったバクテリア叢が認められた。特に有機栽培資材区の生育が顕著に良好であった。菌糸圏には植物成長促進根圏細菌の報告があるバクテリアや DSE からの分離報告がある *Agrobacterium pusense* の近縁種も認められた。さらに、これらバクテリアがそれぞれの土壌由来であることも確認した。以上より、DSE は土着の特異的なバクテリアを菌糸圏に選択的に保持し、その違いが唆された。



### おわりに

本講演では、単独生物に注目するのではなく、植物-DSE-バクテリアを1つの系としてとらえ、その相互作用を明らかにし、利用することで、これまで圃場での効果が不安定であった有用微生物の利用技術にブレークスルーをもたらす取り組みを紹介する。また、我々が菌類として認識していた生物が、生態系では、いわば菌類とバクテリアの共生体として振る舞うという、これまでの菌類学の概念を覆し、新たな生物共生系の存在を示す現象も紹介する。これからのバイオコントロール研究や実践の方向性に関して議論したい。

### 引用文献

- 1) 成澤才彦 (2011) 「エンドファイトの働きと使い方」農文協 1-117.
- 2) Usuki, F. and Narisawa, K. (2007) A mutualistic symbiosis between a dark, septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a non-mycorrhizal plant, Chinese cabbage, with bi-directional nutrient transfer. *Mycologia* 99: 175-184.
- 3) Toju H, Peay K G., Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, Fukuda S, Ushio M, Nakaoka S, Onoda Y, Yoshida K, Schlaeppi K, Bai Y, Sugiura R, Ichihashi Y, Minamisawa K and Kiers E. T (2018) Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants* 4: 247-257.

(バイオコントロール研究会レポート第16号)  
Proceedings of PSJ Biocontrol Workshop X VI

本報告（電子ファイル）の取り扱いについて  
①第三者への配布は固く禁止します。  
②本報告掲載の研究成果の中には未公開のものも含まれております。従って、複製・転載および引用に当たっては、必ず原著者の了承を得るよう、特にご注意ください。