

ISSN 0916-958X

No. 17

March. 2024

持続可能な食料システム実現に貢献するバイオコントロール

～現場で活用するための先導的アプローチ～

Biocontrol as a tool for achieving sustainable food systems

～Leading approaches to establishing practical biocontrol strategies
useful for disease control in actual crop production～

2024 Sendai

日本植物病理学会 バイオコントロール研究会

PSJ Biocontrol Workshop

(バイオコントロール研究会レポート第 17 号)
Proceedings of PSJ Biocontrol Workshop XVII

本報告の取り扱いについて

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

2024 年は、1000 年に一度といわれる規模の能登半島地震という悲劇的な災害で幕を開けました。多くの方々が被災され、200 人を超える方々がお亡くなりになりました。植物病理学会の会員やそのご家族、ご親戚の中にも被害を受けた方々がいらっしゃることを承知しております。まず、被災された方々に心よりお見舞い申し上げるとともに、お亡くなりになられた方々のご冥福をお祈り申し上げます。また、被災された地域の日も早い復興を切にお祈り申し上げます。

日本植物病理学会バイオコントロール研究会は、1989 年に初めて開催されて以来、今回で 17 回目を迎えます。新型コロナウイルス感染症が 5 類感染症に変更されるとともに流行も大幅に収束したことから、2018 年の第 15 回研究会以来、6 年ぶりの「対面」での開催を決定いたしました。前回（第 16 回）はオンラインでの開催でしたが、今回は対面での交流が再び可能となり、そのことを大変嬉しく思っております。

2021 年に策定された「みどりの食料システム戦略」では、2050 年までに化学農薬の使用量を 50%削減するという目標が掲げられており、拮抗微生物を用いたバイオコントロールは減農薬防除を実現する中核的な手段として期待されています。しかし、残念ながら、わが国では過去 10 年以上にわたりバイオコントロール研究が停滞気味にあったため、微生物農薬のラインナップは増えておらず、また、バイオコントロール法に関連する新しいノウハウの蓄積も十分とはいえない状況にあります。日本の風土や農業体系に適した実用的なバイオコントロール法を開発・普及するためには、卓効を示す拮抗微生物株の選抜、資材化、そして施用方法に関するさまざまな技術のアップデートが不可欠と考えられます。

そこで今回の研究会の第一部では、生産現場で微生物資材を有効活用するための実践的な施用方法やユニークな微生物資材に関して 3 名の先生方にご講演いただきます。そして、第二部では、拮抗微生物の探索や機能向上の手法などに焦点を当てた先端的な研究をされている 4 名の先生方に話題を提供していただきます。

今回は、上記の講演内容・構成で、「持続可能な食料システム実現に貢献するバイオコントロール～現場で活用するための先導的アプローチ～」というテーマを設定して研究会を開催いたします。皆様には、有益な情報を提供し、研究の新たなインスピレーションを得ていただけることを期待しております。

令和 6 年 2 月 13 日 編者記す

目次

基調講演

- バイオコントロール研究の今後の課題と展望・・・・・・・・・・・・・・・・・・1
吉田 重信(農業・食品産業技術総合研究機構)

第一部 実践的な微生物資材施用法および微生物資材の開発

- 常温煙霧処理技術を用いたトマトうどんこ病に対するボーベリア・バシアーナ乳剤の
防除効果・・10
村田 つばさ(三重県農業研究所)

- 微生物農薬を主体とし頭上散布装置を利用したトマト灰色かび病に対する省力的
防除技術・・17
宮崎 暁喜(岐阜県農業技術センター)

- 植物病害抑制効果に着目したミミズ堆肥の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・22
東條 元昭(大阪公立大学大学院)

第二部 拮抗微生物の効率的探索と機能向上のための新しいアプローチ

- 青枯病菌の表現型変異株を利用した生物的病害防除・・・・・・・・・・29
中原 浩貴(農業・食品産業技術総合研究機構)・森 太郎(滋賀大学)・松添
直隆(熊本県立大学)

- 根圏微生物叢の理解を通じたバイオコントロールの可能性・・・・・・・・38
橋本 将典(静岡大学)

- グルタミン酸による植物保護細菌の機能向上・・・・・・・・・・・・・・・・47
竹内 香純(農業・食品産業技術総合研究機構)

- 微小液滴技術を用いた拮抗微生物の迅速スクリーニング法の開発・・・・・・・・54
成川 恵(筑波大学)・市橋 泰範(理化学研究所バイオリソース研究センター)

バイオコントロール研究の今後の課題と展望

農研機構 植物防疫研究部門 吉田 重信

Future challenges and perspectives on biocontrol study
Shigenobu YOSHIDA : Institute for Plant Protection, NARO

Abstract

To promote development and utilization of biopesticides, it is significant to vitalize biocontrol studies based on both tangible (finding and using novel superior microbial agents) and intangible (deriving to maximize control abilities of microbial agents) approaches. Here lecture contents presented in PSJ Biocontrol Workshops held in recent 10 years are reviewed from the viewpoint of the tangible and intangible elements in biocontrol studies, together with reviewing current situation on the development of biopesticides and trends of biocontrol studies. Future challenges and perspectives on biocontrol study based on the reviews is lastly discussed.

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年に設立されてから今年で35年目を迎え、昨年までの間計16回の定例会を開催し、今年は17回目の定例会開催となる。定例会では、その時勢にあった研究トレンドや課題に沿ったテーマを設定し、関連する話題提供や議論を行ってきた。直近のおよそ10年間に開催された定例会のテーマを振り返ってみると、2014年の第13回の開催では「生物農薬の実用化に向けた展望」、2016年の第14回では「微生物農薬の研究開発の方向性と研究シーズの融合に向けて」、2018年の第15回では「微生物農薬開発のイノベーションと微生物群衆構造などに着眼した生物的防除研究の動向」、2022年の第16回では「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」というテーマが設定されており、講演内容も微生物農薬の実用化を志向する内容が多く取り上げられてきている。これらのテーマの設定には、微生物農薬に対する生産現場における期待は従前から変わらずに根強くある一方でその開発スピードは2010年以降に鈍化しているという実態を踏まえ、開発の一助となる様々な研究シーズ的成果や国内外における開発の成功事例などを広く周知し、その活用によって微生物農薬の開発や普及を前に進めてほしいという主催側の意図が込められていることを感じ取ることができる。

微生物農薬の開発や普及を加速化するための戦略については、これまでに歴代の本研究会会長をはじめとする諸先生方の総説（相野，2018；古屋，2022；土屋，2009；對馬，2012；吉田・對馬，2013）などで取り上げられてきているところであるが、研究開発の観点で考えてみた場合には、より優れた新規有用微生物株を探索し活用を目指すというアプローチと、バイオコントロールエージェントの持つ能力の最大化を果たすための最良の工夫を施すというアプローチの両方の充実が必要であると筆者は考えている。すなわち、前者を「ハード」

的要素の充実と例えた場合には、後者は「ソフト」的要素の充実と例えることができると思うが、こうした「ハード」と「ソフト」的要素の研究開発の充実を図る取組みが、微生物農薬の開発や普及の活性化にもつながっていくのではないかと考える。

本稿では、微生物農薬開発・普及の活性化を図るための「ハード」的要素と「ソフト」的要素の充実という視点に基づき、直近のおよそ10年間に開催された定例会で取りあげられた話題提供について振り返るとともに、微生物農薬の開発や普及を今後進めていく上での課題や展望についての私見を述べてみたい。

1 「ハード」的要素の充実に資する研究開発

直近のおよそ10年間に開催された定例会で取りあげられた講演内容を振り返ってみると、「ハード」的要素の充実に資する研究開発として、当時製剤化や上市されて間もない微生物農薬の紹介に加え、新規有用微生物株に関する報告が幾つかかなされている。例えば、第13回の定例会では、川口章氏がブドウ根頭がんしゅ病に対する新たな生物防除につながる微生物株 (*Rhizobium vitis* ARK-1) を活用した研究成果を報告しており (川口, 2014)、そのエージェントの優れた防除効果に着目した企業と製剤開発を進め、農薬登録へと実用化のプロセスを進めている。まさに、優れた研究シーズが社会実装を阻む「魔の川」と「死の谷」を超えて実用化に繋がった好例であり、今後多くの生産現場での利用が期待できる。ARK-1株は、根頭がんしゅ病菌と同種の非病原性株であるが、こうした病原微生物と同種の非病原性株の生物防除への活用の可能性を示唆する報告は他にも定例会の中で行われている。第14回の定例会では、井上康宏氏が非病原性 *Xanthomonas* 属細菌を用いた *Xanthomonas* 属細菌病害抑制の可能性を、山岸菜穂氏らが非病原性 *Plectosphaerella* sp. 株を用いたセルリー萎黄病およびイチゴ萎黄病の生物防除の可能性をそれぞれ報告している (井上, 2016; 山岸ら, 2016)。非病原性微生物株を用いた生物防除の有効性は古くから知られているところであるが、それらの持つ高いポテンシャルが最近の定例会においても改めて示された形となっている。なお、上記の報告の中で実用化までには至っていない研究については、実用化を阻む原因や課題が講演の中で説明されていたが、逆に言えば、解決すべき課題が明確となっている分、その克服によって一気にブレークスルーが図られる可能性がある状況と考えることもできる。

また、上記以外には、根圏生息性 *Pseudomonas* 属細菌 (竹内, 2014)、かび毒デオキシニバレノール分解微生物 (佐藤・伊藤, 2016)、ネギ類栽培土壌のフザリウム病抑止性に関与する根圏生息細菌 (西岡, 2018)、有機育苗培土中の細菌群集構造の中の細菌集団を活用したイネもみ枯細菌病の防除研究 (安藤・高橋, 2018) ダイズの実圃場で施用されている乾燥鶏ふん資材由来の黒根腐病を抑制できる *Bacillus* 属細菌 (佐藤, 2022)、土着細菌が共生した根部エンドファイトの活用による病害抑制の可能性 (成澤, 2022) などのシーズとなりうる微生物株の成果紹介も行われている。これらを活用した微生物農薬の開発に向けたさらなる研究の展開が期待される。

さらに、各種の微生物コレクションから有望株を選抜するアプローチに関する話題提供も複数行われており、イネに生息する細菌フローラの約3000菌株のコレクションを用いたイネもみ枯細菌病や苗立枯病などに対する発病抑制菌株の選抜研究 (篠原, 2016) や、沖縄県内の土壌や海洋、植物などから収集された約4000菌株からなる微生物ライブラリーからの植物

病原菌に対する抑制効果を有する微生物およびその代謝産物の探索研究（上野ら，2022）、理化学研究所の微生物遺伝資源の中の保存微生物1362菌株を活用した各種植物病害抑制能を有する菌株のスクリーニングに関する研究（窪田，2022）がこれまでに報告されてきた。これらの研究により見出された微生物株の多くは、実用化までにはさらなる種々の検討が必要であるものの、今後の新規の微生物農薬開発への道筋を開く有望素材として活用できる可能性がある。

2 「ソフト」的要素の充実に資する研究開発

バイオコントロールエージェントや微生物農薬の持つ能力の最大化を目指すための工夫の重要性はこれまでも提唱されている。對馬誠也氏（2012）は、微生物農薬の開発・普及で直面している課題として、「新しい技術の開発以前に、これまでの技術をモデルケースとして、それらをうまく利用できる場面がないか、そのためには何が必要かを考えること」を述べている。また、同氏はその克服手段として、a) 既存技術の処理法等の工夫による普及、b) 新しい防除戦略（利用できる場面の限定、要防除水準の設定など）の構築などを挙げている。

こうした視点で、近年の定例会で行われた「ソフト」的要素の充実に資する話題提供を調べてみると、上述の「ハード」的要素の充実に関する報告ほど多くないことに気づく。a) の工夫に関する報告としては、野津あゆみ氏（2014）が北海道の施設トマト栽培における減農薬栽培に向けた*Bacillus*製剤の体系防除の構築に関する報告を行っている。また、直接的な微生物農薬ではないが、微生物製剤中の微生物の生残性を高めるキャリアに関する研究成果などの報告もなされている（横山ら，2016）。一方で、b) の防除戦略に関連すると考えられる報告事例としては、昆虫病原微生物株を病害防除に活用しようとする複数の研究成果の報告が挙げられる。すなわち、昆虫病原糸状菌として知られる *Beauveria*、*Metarhizium*、*Lecanicillium* 属菌の病害防除の可能性（小池，2014）や、BT剤として知られる、*Bacillus thuringiensis*などを病害防除のエージェントとして活用しようとする研究成果（吉田，2014）の報告が2014年に行われ、さらに、ハダニ類、アブラムシ類などの害虫用途に開発されている微生物製剤である *Beauveria bassiana* 剤が、野菜類のうどんこ病に対しても防除効果（2019年に適用拡大）を有することを明らかにした研究成果（飯田，2022；山中，2022）が2022年に報告されている。これらの微生物を病害用途に用いようとするアイデア自体は古くからあったと思われるが、*B. bassiana* 剤に代表されるように実際に製剤として実装できた成果は、研究シーズと現場ニーズをマッチさせるなど、防除および実装の戦略を研究サイドとメーカーサイドで明確化・共有して得られた結果の賜物ではないかと思われる。以上のような話題提供がこれまでに報告されているが、さらに多くの研究の取組および成果のPRが望まれる。本年の定例会では「現場で活用するための先導的アプローチ」に関する話題提供も取り上げられており、まさしく「ソフト」的要素の充実につながる各種の研究成果が報告されることが期待できる。これらの研究事例・知見を多くの関係者の参考としてもらい、微生物農薬開発・普及の活性化に繋がっていくことに期待をしたい。

3 今後の研究課題および展望

1) 我が国におけるバイオコントロール研究および微生物農薬開発の現状

我が国におけるバイオコントロール研究のすう勢として、相野公孝氏（2016）は、1918年から2015年までの日本植物病理学会報に報告されている関連研究報告の内容を調査している。これによると、バイオコントロールに関連する研究報告数は、1918年から2015年までの間で約1450件以上にのぼり、それらをターゲット病害の種類別にみた場合には、約600件が土壌伝染性病害をターゲットとしたものであると論じている。その一方で、同氏は微生物農薬の開発の現状にも触れており、2014年時点での微生物殺菌剤の用途別内訳を販売額ベースでみた場合には、水稻種子消毒剤用途で4割、地上部病害用途で4割であるのに対し、土壌病害用途の割合は2割にとどまっており、土壌病害に対する研究事例が多いにもかかわらず微生物農薬の開発は停滞していることを示唆する報告をしている。土壌病害用途の殺菌剤の割合については、2021年時点では3割程度と若干増えてはいるものの、開発が遅れているという状況は現在も変わっていないと考えられる。

こうした土壌病害用途の開発の停滞の状況は、バイオコントロールエージェントの登録数の推移をEUと比較することによっても浮かび上がってくる。清水将文氏（2016）は、EUで病害防除剤の有効成分として認可されている微生物の種類を調べ、2016年1月時点で合計29菌株が登録されており、2010年と比較して（10種）11菌株増加しており、特に土壌病害用途の微生物菌株が増えている特徴があると述べている。一方、我が国の登録数は2023年12月時点で（14種）18菌株で2010年と比較して2菌株減少している状況である。我が国とEUとでは耕地や栽培の環境に加えバイオコントロールにまつわる社会的背景などが異なるため、単純な比較はできないが、こうした数の相違には土壌病害用途の開発状況の違いが影響を与えて

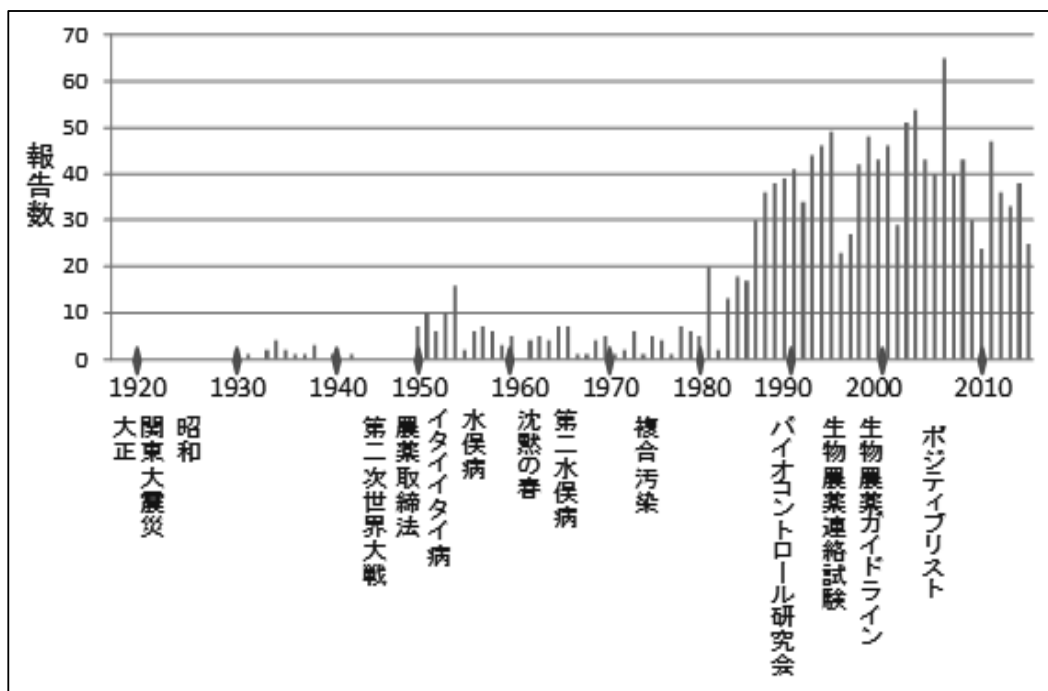


図1. 日本植物病理学会報における生物的防除関連研究の年次別報告数(1918~2015)

出展：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より引用

いる可能性が読み取れる。

以上のように、土壤病害用途のバイオコントロール研究の状況と微生物農薬の開発の現状との間にはある種の溝が生じており、その溝を埋めるための解決策の導出や工夫を施すことが、微生物農薬の開発・普及の加速化のためには重要であると筆者は考える。

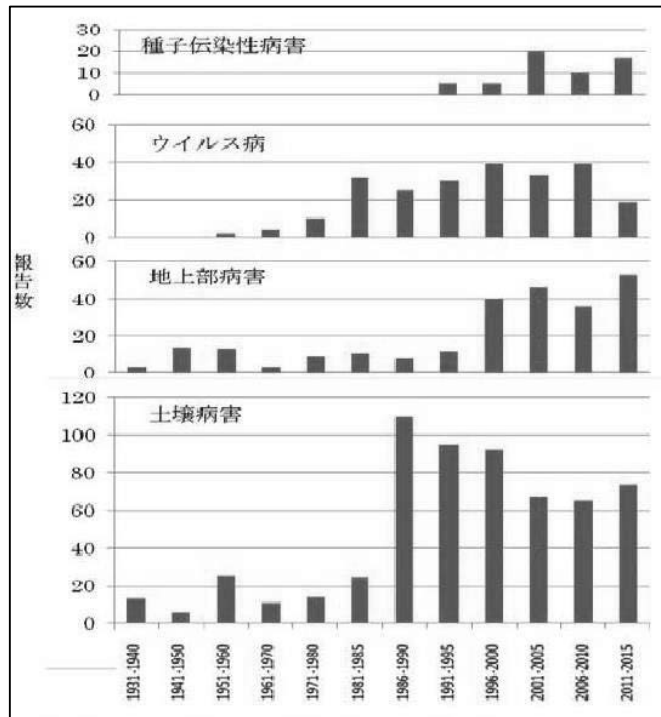


図2. バイオコントロールの対象病害ごとの年次別報告

出展：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 より引用

表1. R5.12月時点の国内で登録されている病害用途の微生物農薬の微生物種(カッコは株名) (ABC順)

バチルス アミロリクエファシエンス
バチルス シンプレクス
バチルス ズブチリス(D747)
バチルス ズブチリス(HAI-0404)
バチルス ズブチリス(HAI-0404)
バチルス ズブチリス(QST-713)
バチルス ズブチリス(Y1336)
ポーベリア バシアーナ
非病原性エルビニア カロトボーラ
コニオチリウム ミニタンス
ラクトバチルス プランタラム
ペキロマイセス テヌイセス
シュードモナス フルオレッセンス
シュードモナス ロデシア
タラロマイセス フラバス
トリコデルマ アトロピリデ
パリオボラックス パラドクス
ズッキーニ黄斑モザイクウイルス弱毒株

2) 土壤病害をターゲットとしたバイオコントロール研究の方向性

上記を踏まえ、土壤病害用途の微生物農薬の開発や普及の活性化のためには、今後どのようなバイオコントロール研究の強化が必要となるかについて、「ハード」的要素および「ソフト」的要素という切り口で考察してみたい。

まず、「ハード」的要素の研究においては、従前どおりターゲットとする土壤病害に対して少しでも高い防除効果を示す微生物株の探索を行うことは重要であるが、その際には、社会実装に向けた出口戦略を明確にしたうえで研究に臨むことが肝要と考える。例えば、相野公孝氏(2018)は、微生物農薬の社会実装のためには研究開始前からそれなりの覚悟と入念な開発ロードマップを構築する必要性を論じており、併せて、対象病害虫や開発するエージェントの種類などを決める際に留意すべき点にも言及している。

以上のような点を踏まえて「ハード」的要素の研究の充実を図ることは有望であるが、それ以上に高い可能性を秘めているものに「ソフト」的要素の研究、すなわち、使い方の改良・工夫の深化に資する研究の充実があると筆者は考える。微生物農薬は基本的には「生き物」であるため、そのマイルドな作用性などにより特に難防除の土壤病害に対して

は効果が出にくいことは想像しやすい。その一方で、日本植物防疫協会で行きまとめている新農薬実用化試験の成績やこれまでの研究知見などに基づく、土壌病害の発生程度が低い条件や接種圧が低い条件下においては、微生物農薬またはバイオコントロールエージェントが安定的な防除効果を発揮している傾向が一般に認められる。すなわち、土壌病害の発生程度が低い圃場の状況下といった「効果が期待できる場面」での利用により、微生物農薬の防除効果が十分に発揮できる可能性が考えられる。

では、効果が期待できる場面での利用促進のためには、どのような研究の強化が必要であろうか？筆者は二つの研究解明の強化が重要ではないかと考えており、一つ目は、微生物農薬またはバイオコントロールエージェントの能力を正しく見極める研究、具体的には、圃場における対象病害の発生程度と防除価の関係解明が必要と考える。この解明により、EILの視点も踏まえて、活用を想定する微生物農薬またはバイオコントロールエージェントの最低限必要な防除価を出せる圃場のコンディション（病害発生程度）を把握できるようになる。

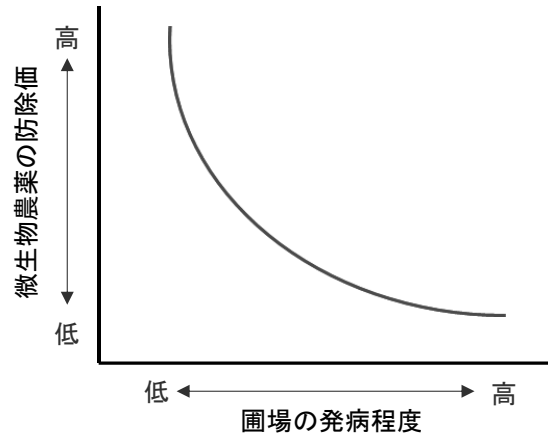


図3. 圃場における対象病害の発生程度と防除価の関係のイメージ

二つ目の研究は、対象圃場の病害発生しやすさの程度（発病ポテンシャル）を予め診断・評価するための研究である。この診断評価ができれば、対象圃場が一つ目の研究で解明される最低限必要な防除価が出せる状態かどうかを栽培前にあらかじめ把握することが可能となり、バイオコントロール実施の可否の意思決定に役立てることができるようになる。筆者らは、ヒトの健康診断に基づく予防医学の概念を参考に、圃場の発病ポテンシャルの診断・評価結果に応じて土壌病害の予防的な対策を講じる病害管理法「ヘソディム（HeSoDiM : Health checkup

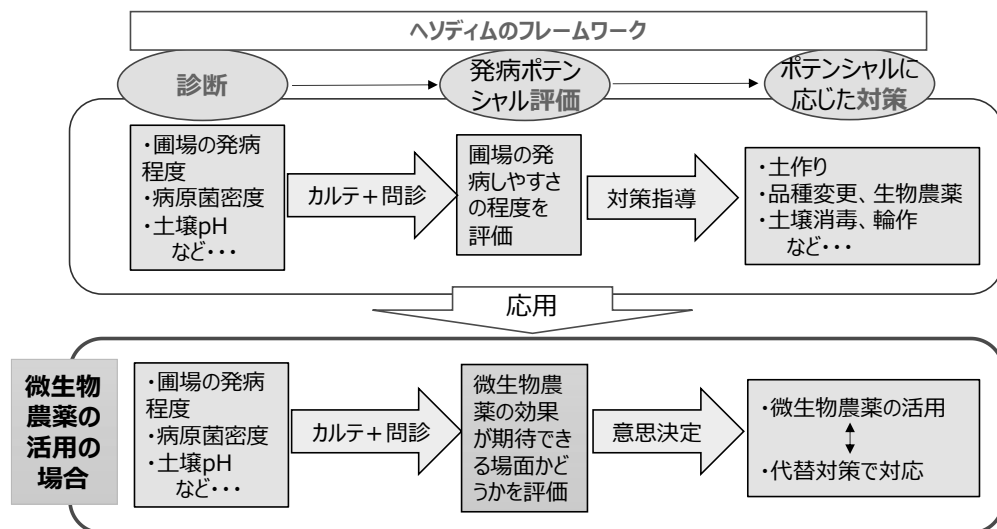


図4. ヘソディムのフレームワークを活用した土壌病害用途の微生物農薬の効果的活用のイメージ

based Soil-borne Disease Management）」を提唱（Tsushima・Yoshida, 2012; Tsushima, 2014; Yoshida, 2023）し、複数の代表的な土壌病害を対象にマニュアル（農業環境技術研究所, 2012; 2016）や AI を活用したシステム（吉田, 2023）をこれまでに開発しているが、このヘソディムのフレームワークに落とし込む形で、対象圃場がバイオコントロールの効果が期待できる状態かどうかを評価し、評価結果を踏まえてバイオコントロールの実施の判断に役立てることができる。

以上述べたような研究を通じて、特に「ソフト」的要素に関する研究の充実・深化を図ることが、停滞している微生物農薬の開発や普及の活性化つなげるための有力なアプローチになると考える。

おわりに

本稿では、直近のおよそ 10 年間に開催された定例会での話題紹介の内容について、「ハード」と「ソフト」的要素の研究開発という切り口で振り返り、今後の微生物農薬の開発・普及の活性化には、特に土壌病害用途の「ソフト」的要素の研究の充実などが重要であるとする私見を述べてきた。土壌病害用途の微生物農薬の開発・普及に関しては、ハードルは高いということ踏まえたうえで、そのハードルを少しでも下げるための工夫の取組が必要と考える。一方で、より大きなブレークスルーのためには、もっと斬新でイノベーターティブなアプローチやアイデアの活用が必要になってくるかもしれない。その創出のためは、バイオコントロール研究に携わるさまざまな立場の関係者を増やして、各人の持つ多様な発想やアイデアを取り入れた研究開発に取り組んでいくことも必要であると感じる。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 相野公孝 (2018). 社会実装を目指した微生物農薬の開発戦略. バイオコントロール研究会レポート 15 : 1-6.
- 3) 安藤杉尋・高橋英樹 (2018). 有機栽培培土の微生物コミュニティを利用したイネもみ枯細菌病の生物的防除.
- 4) 古屋成人 (2022). 生物的防除研究のこれまでとこれから. バイオコントロール研究会レポート 16 : 1-8.
- 5) 飯田祐一郎 (2022). 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. バイオコントロール研究会レポート 16 : 9-13.
- 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) 小池政徳 (2014). 昆虫病原菌によるデュアルコントロール. バイオコントロール研究会レポート 13 : 32-39.
- 9) 窪田昌春 (2022). SIPにおける植物病害抑制菌株の探索. バイオコントロール研究会レポー

- ト 16 : 27-31.
- 10) 山中聡 (2022). 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. バイオコントロール研究会レポート 16 : 14-18.
 - 11) 成澤才彦 (2022). エンドファイト - 土着細菌共生系が作物生産を変える?. バイオコントロール研究会レポート 16 : 47-48.
 - 12) 西岡友樹 (2018). ネギ類栽培土壌のフザリウム病抑止性の機構解明. バイオコントロール研究会レポート 15 : 37-40.
 - 13) 野津あゆみ (2014). 北海道の施設園芸における生物防除 ~バチルス ズブチルス水和剤を利用したトマトの減農薬栽培~. バイオコントロール研究会レポート 13 : 11-17.
 - 14) 農業環境技術研究所 (現: 農研機構農研機構農業環境研究部門) (2012). 次世代土壌病害診断 (ヘソディム) マニュアル. <https://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/techdoc/hesodim/>
 - 15) 農業環境技術研究所 (現: 農研機構農研機構農業環境研究部門) (2016). 土壌消毒剤低減のためのヘソディムマニュアル. <https://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/techdoc/hesodim2/>
 - 16) 佐藤育男・伊藤通浩 (2016). かび毒デオキシニバレノールの分解微生物の探索およびその活用の可能性. バイオコントロール研究会レポート 14 : 51-58.
 - 17) 佐藤孝 (2022). *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. バイオコントロール研究会レポート 16 : 19-26.
 - 18) 清水将文 (2016). ヨーロッパにおける微生物農薬開発研究の現状. バイオコントロール研究会レポート 14 : 11-18.
 - 19) 篠原弘亮 (2016). 有用微生物の探索とそれらの種子処理技術に関する取り組み. バイオコントロール研究会レポート 14 : 59-67.
 - 20) 竹内香純 (2014). 植物根圏に生息する*Pseudomonas*属細菌の抗菌性制御メカニズムとその利用. バイオコントロール研究会レポート 13 : 55-62.
 - 21) 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.
 - 22) 對馬誠也 (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.
 - 23) Tsushima, S. (2014). Integrated control and integrated pest management in Japan: the need for various strategies in response to agricultural diversity. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 389- 400.
 - 24) Tsushima, S. and Yoshida, S. (2012). A new health-checkup based soil-borne disease management (HeSoDiM) and its use -Introduction of MAFF project (2011–2013). TTUA-FFTC international seminar on emerging infectious diseases of food crops in Asia. Abstract, 204.
 - 25) 上野誠・新里尚也・伊藤通浩 (2022). 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. バイオコントロール研究会レポート 16 : 39-46.
 - 26) 山岸菜穂・石山佳幸・藤永真史(2016). 非病原性*Plectosphaerella* sp.株を用いたセルリー萎黄病およびイチゴ萎黄病の生物防除の検討. バイオコントロール研究会レポート 14 : 40-44.
 - 27) 横山正・安藤象太郎・相野公孝(2016). FNCAバイオ肥料プロジェクトでの耐病性機能を付与した多機能バイオ肥料の開発について. バイオコントロール研究会レポート 14 : 25-34.
 - 28) 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 51:541-547.

- 29) 吉田重信 (2014). 殺虫活性を持つ微生物を活用した植物病害防除の可能性. バイオコントロール研究会レポート 13 : 40-48.
- 30) 吉田重信 (2023). 圃場毎の土壌病害の発病ポテンシャルを診断するAIアプリ「HeSo+」の開発. 植物防疫 77: 31-35.
- 31) Yoshida, S. (2023). Studies on health checkup based management against soil-borne diseases. J. Gen. Plant Pathol. 89: 365-368.

常温煙霧処理技術を用いたトマトうどんこ病に対する

ボーベリア・バシアーナ乳剤の防除効果

三重県農業研究所 村田つばさ

Control of tomato powdery mildew with *Beauveria bassiana*
using non-heating fog treatment technology

Tsubasa Murata : Mie Prefecture Agricultural Research Institute

Abstract

In recent years, as the scale of protected horticulture farming has become larger, non-heating fog treatment technology is once again attracting attention as a labor-saving spraying technique. In addition, the use of microbial pesticides needs to be expanded to achieve the goals of Strategy for Sustainable Food Systems MIDORI. However, since multiple applications of them are recommended before the onset of disease, the burden on agricultural producers is heavy. Therefore, we tested the efficacy of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using non-heating fog treatment technology for control of powdery mildew, which are problems in tomato cultivation in Mie prefecture. *Beauveria bassiana* was found to be effective in controlling the disease even when applied as non-heating fog treatment technology. Although high-concentration, small-volume spraying is generally used for non-heating fog treatment, the pest control effect of *Beauveria bassiana* was more stable with low-concentration, large-volume spraying than with high-concentration, small-volume spraying when the total amount of biopesticides dropped was the same.

はじめに

農林水産省のみどりの食料システム戦略では、持続可能な食糧生産の実現のため、2050年までに化学農薬使用量（リスク換算）を50%低減することを目標に掲げている（2021）。そのため、化学農薬の代替技術の一つとして微生物農薬の利用拡大が求められている。その一方で、微生物農薬が安定的な効果を発揮するためには、多くの場合、発病前から頻繁に散布することが推奨される。生産現場では散布に係る負担が大きくなることから、省力的な処理技術が求められている。

常温煙霧処理は、農薬の高濃度希釈液を細霧化してハウス内に噴霧する省力的な散布技術として、1980年代に開発された。本技術を導入することにより、日中の作業に割いていた労働力を有効に活用できる、作業者の農薬曝露が回避できる等のメリットがあるが、登録農薬の少なさや防除効果の不安定さから、当時は普及しなかった。しかし、近年大規模経営体が増加しており、防除の省力化が求められるなか、再び注目されている。

三重県では、現在常温煙霧処理技術を用いたトマト病害に対する微生物農薬の防除効果

について検討を行っている（図1）。本稿では、本県で問題となるトマトうどんこ病に対するボーベリア・バシアーナ乳剤の防除効果に関する結果について紹介する。



図1. 常温煙霧処理の様子
※株式会社丸山製作所の常温煙霧機
（フレッシュハウサーLVM16）を使用

ボーベリア・バシアーナ乳剤を用いたトマトうどんこ病に対する常温煙霧処理の防除効果の検討

ボーベリア・バシアーナ乳剤（商品名：ボタニガード ES、以下、ボーベリア乳剤）は、昆虫病原性糸状菌である *Beauveria bassiana* GHA 株の分生子を有効成分とする微生物殺虫殺菌剤である。本菌は、コナジラミ類やアザミウマ類等の微小害虫に高い感染力を有する。また、植物表面や植物内部に定着し、植物の病原抵抗性を誘導することで、野菜類のうどんこ病に対しても防除効果を示す（Iida et al., 2023）ことから、本剤は2019年に野菜類うどんこ病に適用拡大された（山中, 2022）。本剤を散布することにより、病害虫を同時に防除することができ（デュアルコントロール）、農薬散布回数が減少することによる省力化、使用する農薬の種類が減ることによる環境負荷低減が期待できる。

（1）散布条件の検討

ボーベリア乳剤は、トマトうどんこ病に対しては、7日間隔の散布の効果が高いことが報告されている（川上ら, 2022）。そこで、本剤の常温煙霧処理がトマトうどんこ病の防除に有効であるかを確認するため、研究所内において圃場試験を行った。供試品種は CF 桃太郎ファイトを用いた。常温煙霧処理区は 33 倍希釈・10L/10a および 1,000 倍希釈・150L/10a とし、茎葉散布区は 1,000 倍希釈・300L/10a とした。薬剤処理は、両区とも 16 時頃から開始し、7 日間隔で計 4 回行った。その結果、常温煙霧処理区は、茎葉散布区より防除効果が劣るものの、発病を一定程度抑制することが確認した（表1）。常温煙霧処理区の防除価は、33 倍希釈で 47.7、1,000 倍希釈で 69.8 となり（表1、図2）、総投下液量が 1,000 倍希釈より 33 倍希釈の方が多いにもかかわらず、散布液量の多い 1,000 倍希釈で処理する方が防除効果は高くなった。

以上より、本剤を常温煙霧処理する場合、散布液量が多い方が防除効果が高くなることが示唆された。なお、常温煙霧処理では、有効成分投下量が同じでも散布液量を増やすと薬効が安定するケースが多いことが知られており（北條ら，2019）、本試験の結果も同様の傾向を示した。

表 1. 常温煙霧処理によるボーベリア乳剤のトマトうどんこ病に対する防除効果

区	散布方法	希釈倍数	散布液量 (L/10a)	散布間隔	散布回数	総投下薬液量 (mL/10a)	発病葉率 (%)	発病度	防除価
1	常温煙霧	33倍	10	7日	4回	1,200	18.7	4.5	47.7
2	常温煙霧	1,000倍	150	7日	4回	600	7.0	2.6	69.8
3	茎葉散布	1,000倍	300	7日	4回	1,200	0.4	0.1	98.8
4	無処理	-	-	-	-	-	26.8	8.6	-

※2020年度に実施。供試品種：CF桃太郎ファイト 1区50株（約45m²）
 トマトうどんこ病は少発生（接種条件）。



図 2. 下位葉の発病状況
 (左から常温煙霧 33 倍希釈、常温煙霧 1,000 倍希釈、茎葉散布 1,000 倍希釈、無処理)

次に、ボーベリア乳剤の常温煙霧処理によるトマトうどんこ病の効果的な処理条件について、トマト幼苗（供試品種：桃太郎 8）を用いて、ポット試験により検討した。薬剤は、ハンドスプレーにより処理した。検討項目は、①希釈倍数（散布液量一律 100L/10a）、②散布液量（希釈倍数一律 1,000 倍）、③希釈倍数と散布液量の組み合わせ（投下薬液量一律 50mL/10a）とし、処理 1 日後に葉面上のボーベリア菌数を計測し、処理 7 日後にトマトうどんこ病の発病度を調査した。

①希釈倍数について検討したところ、1,000 倍希釈以上の高濃度の場合に、葉面上のボーベリア菌数が 2,000cfu/cm²以上となり、トマトうどんこ病の発病を抑制した（図 3）。また、②散布液量については、散布量が 34L/10a 以下の場合には菌数が 2,000cfu/cm²以下となり、発病が認められたが、50L/10a 以上の場合には菌数が 2,000cfu/cm²以上となり、発病を抑制した（図 4）。さらに、③希釈倍数と散布液量の組み合わせについて検討したところ、

250 倍希釈以上の高濃度・少量散布の場合は菌数のバラつきが大きくなった (図 5)。一方、500 倍希釈以下の低濃度・多量散布の場合は菌数が安定して 2,000cfu/cm² 以上となった (図 5)。

以上の結果から、常温煙霧処理技術を用いてボーベリア乳剤をトマトうどんこ病に対して効果的に使用する条件は、500 倍から 1,000 倍希釈程度の希釈濃度で、50L/10a 以上散布することであると考えられた。しかし、現行の常温煙霧機のタンク容量は 7L か 14L であることから、50L/10a の処理は現実的ではない。そこで、1 回あたりの散布液量を 20L/10a、散布間隔を 1 日 (連日散布) とし、以下の試験を行った。

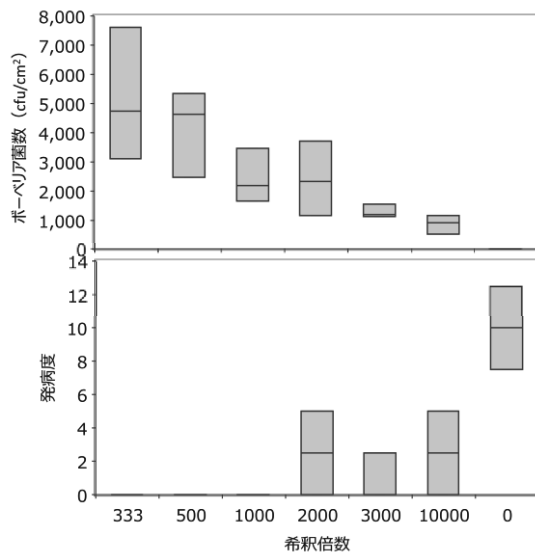


図 3. 希釈倍数の検討
※散布液量は一律 100L/10a とした。

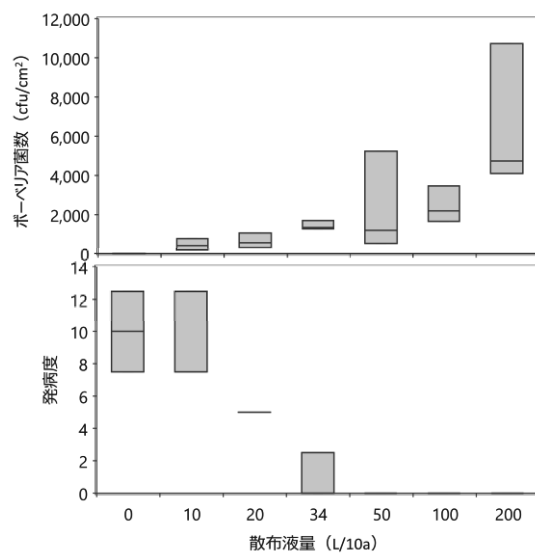


図 4. 散布液量の検討
※希釈倍数は一律 1,000 倍とした。

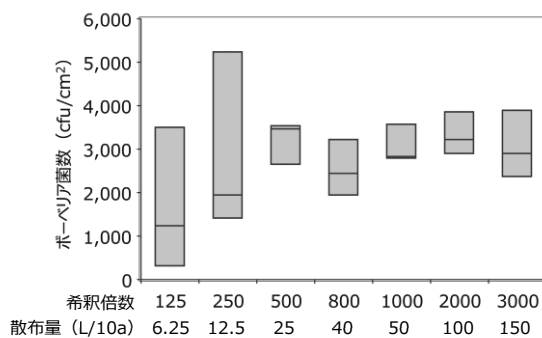


図 5. 希釈倍数と散布液量の組み合わせの検討
※投下薬液量は一律 50mL/10a とした。

(2) 圃場試験における防除効果の検討

2021 年度から 2022 年度にかけて計 3 回、研究所内の圃場での常温煙霧処理によるボーベリア乳剤のトマトうどんこ病に対する防除効果を検証した。試験は、2 連棟のビニールハウスをビニールで仕切って試験区を分け、1 棟を常温煙霧処理区 (90m²)、もう 1 棟を茎葉散布区 (60m²) と無処理区 (30m²) とした。供試品種は CF 桃太郎ファイトを用いた。茎葉散布区は 1,000 倍希釈・300L/10a とした。薬剤の処理開始時刻は両区とも 16 時頃とし、常温煙霧処理区は連日、茎葉散布区は 7 日間隔で散布を行った。

2021年度の2回の試験では、常温煙霧処理区をボーベリア乳剤の常用濃度である1,000倍希釈の20L/10aの効果について検討した。その結果、いずれの試験区も葉面上のボーベリア菌数は低く推移したものの、常温煙霧処理区の防除価は51.9となった(図6)。茎葉散布区の68.4よりやや劣ったが、うどんこ病に対する一定の防除効果を確認した。さらに、2022年度の試験では、ボーベリア乳剤の500倍希釈の20L/10a処理の効果について検討した。常温煙霧処理区の菌数は、処理4日後以降は2,000cfu/cm²前後で推移した(図7)。常温煙霧処理区の防除価は56.4となり、茎葉散布区の63.2と同程度の防除効果が認められた(図7)。しかし、500倍希釈の場合、夕方や降雨日など、処理後に葉液が乾きにくい条件で一部薬害が確認されたため、実用的に使用する条件としては、1,000倍希釈液の複数回連続散布が望ましいと考えられた。

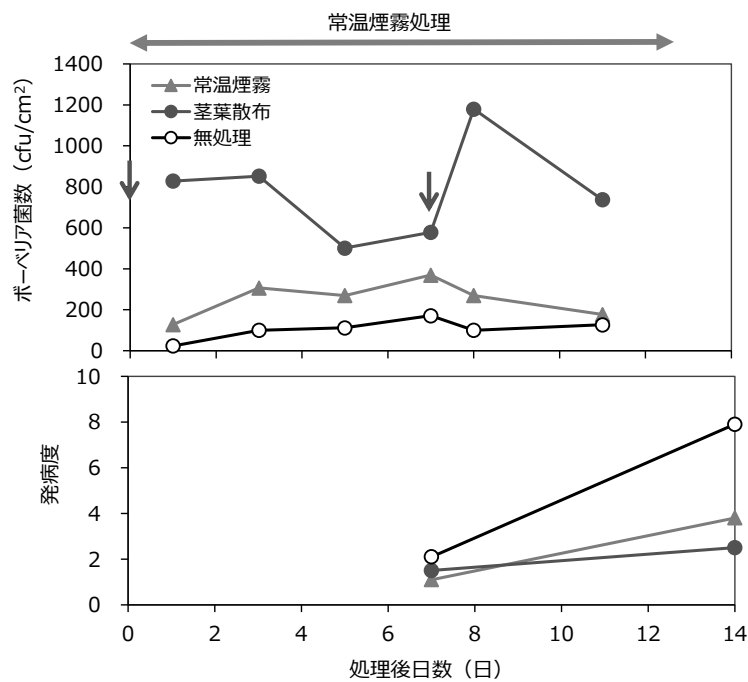


図6. 常温煙霧処理によるボーベリア乳剤のトマトうどんこ病に対する防除効果

※2021年度実施。供試品種：CF桃太郎ファイト

常温煙霧処理区：1,000倍希釈・20L/10a・14回処理。(緑矢印の期間に連日散布)

茎葉散布区：1,000倍希釈・20L/10a・2回処理。(青矢印は処理日を示す)

トマトうどんこ病は少発生(自然発生)。

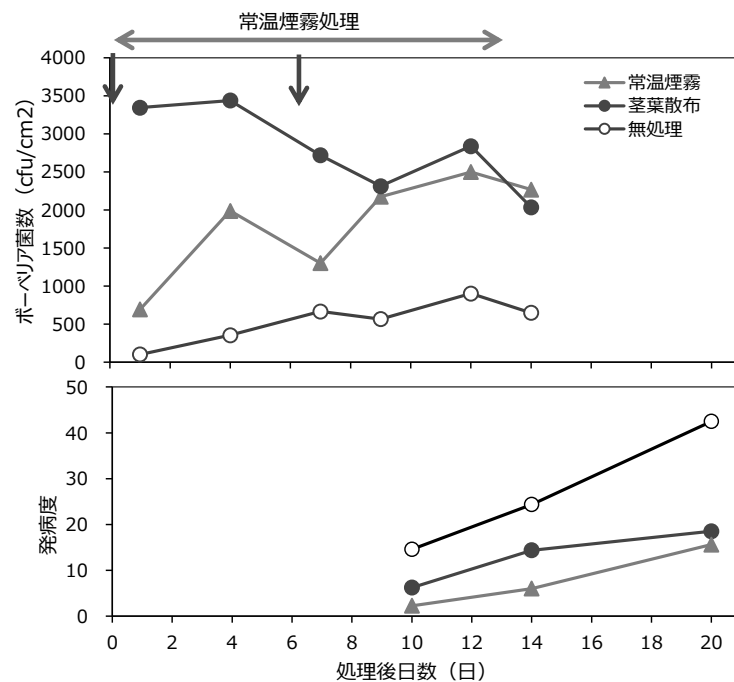


図 7. 常温煙霧処理によるボーベリア乳剤のトマトうどんこ病に対する防除効果

※2022年度実施。供試品種：CF 桃太郎ファイト

常温煙霧処理区：500倍希釈・20L/10a・14回処理。（緑矢印の期間に連日散布）

茎葉散布区：1,000倍希釈・200L/10a・2回処理。（青矢印は処理日を示す）

トマトうどんこ病は多発生（自然発生）。

おわりに

ボーベリア乳剤の常温煙霧処理によるトマトうどんこ病に対する防除効果について、圃場試験では1,000倍希釈・20L/10a・連日散布での効果を確認した。しかし、実際の防除場面を想定した場合、省力的な散布技術である常温煙霧処理であっても、毎日の散布は負担が大きい。常温煙霧処理技術の利点の一つに、高濃度少量散布することで施設内の湿度の上昇を抑え（加藤ら，1991）、病害の発生リスクが少なくなることがある。その一方で、連日散布では圃場内の湿度が高まり、その他の病害の発生を助長する可能性がある。そのため、今後は防除回数を減らした上で安定的に防除効果を確保できる条件の検討が必要である。なお、1,000倍希釈・連日散布の常温煙霧処理で、タバココナジラミの幼虫数が茎葉散布区と同程度に密度抑制されることが認められており（佐々木ら，2023）、ボーベリア乳剤を用いることにより常温煙霧処理においてもデュアルコントロールが可能となることが期待される。

本県では、今後も微生物農薬を中心に常温煙霧処理によるトマトの病害虫防除の可能性について検討していく予定である。

謝辞

本研究は、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（JPJ007097）「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」によって実施した。

引用文献

- 1) 北條 広・荒井雄太・沼田京太・中村達都・河野敏郎・富田恭範 (2019). 常温煙霧法の特性解明と保護殺菌剤の適用拡大. 植物防疫第 73 巻第 7 号 : 23-27
- 2) Iida, Yuichiro, Yumiko Higashi, Oumi Nishi, Mariko Kouda, Kazuya Maeda, Kandai Yoshida, Shunsuke Asano, Taku Kawakami, Kaori Nakajima, Katsutoshi Kuroda, Chiharu Tanaka, Ayano Sasaki, Katsumi Kamiya, Naho Yamagishi, Masashi Fujinaga, Fumihiko Terami, Satoshi Yamanaka, Masaharu Kubota (2023). Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*-based bioinsecticide suppresses severity of powdery mildews of vegetables by inducing the plant defense responses. *Frontiers in Plant Science* : Volume14
- 3) 加藤 保・小竹美恵子・糟谷真彦・今井克彦・豊田一郎 (1991). 施設における農薬散布方法とその特性(3) 常温煙霧の特性. 愛試験農業総合試験場研究報告 23 号 : 297-302
- 4) 川上 拓・中嶋香織・西野 実 (2022). ボーベリア・バシアーナ乳剤を用いたトマトうどんこ病に対する防除体系の検討. 関西病虫害研究会第 104 回大会講演要旨 : 3
- 5) 農林水産省 (2021). みどりの食料システム戦略～食料・農林水産業の生産力向上と持続性の両立をイノベーションで実現～.
(<https://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyo/seisaku/midori/attach/pdf/index-10.pdf>)
- 6) 佐々木彩乃・村田つばさ・中嶋香織・川上 拓・西野 実・田中千晴 (2023). *Beauveria bassiana* 乳剤の常温煙霧処理によるタバココナジラミに対する防除効果. 第 67 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨集 : 91 (講要)
- 7) 山中 聡 (2022). 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. バイオコントロール研究会レポート第 16 号 : 14-18

微生物農薬を主体とし頭上散布装置を利用した

トマト灰色かび病に対する省力的防除技術

岐阜県農業技術センター 宮崎 暁喜

Labor-saving control technology for tomato gray mold using microbial pesticides with overhead spray equipment.

Akiyoshi Miyazaki : Gifu Prefectural Agricultural Technology Center

Abstract

Gray mold (*Botrytis cinerea* Persoon: Fries) is one of the most important diseases in tomato cultivation. In production areas, the disease could not control adequately because the onset of the disease coincides with the harvesting season. In addition, since pesticide resistant fungi have emerged, it is necessary to pay attention to the pesticides to be used. Therefore, this study examined a labor-saving pest control method based mainly on microbial pesticides. A daily mist spray of *Bacillus* formulation using an overhead spray device with a mist nozzle was found to delay or suppress the onset of disease. It was also found that regular mist application of the bacillus formulation can reduce the number of times chemical pesticides are applied by manual spraying. Not only *Bacillus* formulation but also potassium bicarbonate was effective as an overhead fungicide. Alternate application of *Bacillus* and potassium bicarbonate at one-week intervals was found to be effective in suppressing the incidence of tomato gray mold. In addition to mist spraying, the use of watering tubes as overhead spraying equipment, which can be installed at a lower cost, was also found to be effective.

はじめに

トマト栽培において灰色かび病や葉かび病、すすかび病といった地上部病害は依然として生産現場で問題となっている。特に灰色かび病については、発病適期と収穫時期が重なり、防除作業に充てる時間が十分に確保できないことが発病を抑制できない要因となっている。2019年度に岐阜県内の夏秋トマト産地の防除作業実態について142戸を対象にアンケート調査を行った結果、15～49aの栽培面積を少人数で管理するケースが多いことが明らかとなった。また、使用する防除器具は、一部の生産者では走行式自動噴霧器を導入しているが、半数以上の生産者は動力噴霧器による手散布で防除を実施しており、1回の防除にかかる平均所要時間は栽培面積15～49aの規模で約3時間であることも判明した。そのため、収穫等の繁忙期でも、大規模な面積を短時間で防除できる省力的な方法を生産現場に提案していく必要がある。

一方、薬剤耐性菌の出現も地上部病害を抑制できない原因の一つである。灰色かび病については、ベンゾイミダゾール剤、ジカルボキシイミド剤、QoI 剤、SDHI 剤などに対し耐性菌が確認されている（山本，1975；尾松ら，1991；Ishii et al., 2009；鈴木ら，2012）。岐阜県内においても、これらの薬剤の他、近年ではフルジオキシニル剤に対しても感受性の低下が確認されており（渡辺，2019；小島ら，2021）、化学農薬のみに頼らない防除が急務である。このような中、バチルス剤をはじめとした微生物農薬は化学合成殺菌剤とは異なる作用機作であるため、耐性菌の出現リスクが低く（山中，2004）、既に薬剤耐性菌が確認されている地域でも効果的に本病を防除できることから、微生物農薬を積極的に活用することが必要である。また、施設栽培では、細霧冷房効果や散水を目的に細霧ノズルを設置することがあり、省力的に農薬を散布する方法として活用できる可能性がある。そこで、細霧ノズル等による頭上散布装置を利用し、微生物農薬を主体とした散布体系によるトマト灰色かび病の省力的な防除方法について検討したので紹介する。

1 ミスト散布による微生物農薬の単用散布の防除効果

トマト灰色かび病に効果がある微生物農薬としてバチルスズブチリス剤（以下、BS 剤）が挙げられる。BS 剤の散布方法として動力噴霧器等による薬液散布やダクト散布などが知られているが、細霧ノズル（ネタフィム社製、粒子径 $65\mu\text{m}$ ）による頭上散布（以下、ミスト散布）による防除効果は不明であった。そこで、ミスト散布により BS 剤を毎日 1 回単用した際のトマト灰色かび病の防除効果について確認した。その結果、無防除に比べ、発病の遅延や抑制効果が認められ、防除への有効性を確認することができた。しかし、化学農薬を毎週 1 回手散布した区と比較すると、その効果は低く、BS 剤のみミスト散布するだけでは十分な防除効果が得られないことも明らかとなった（図 1）。

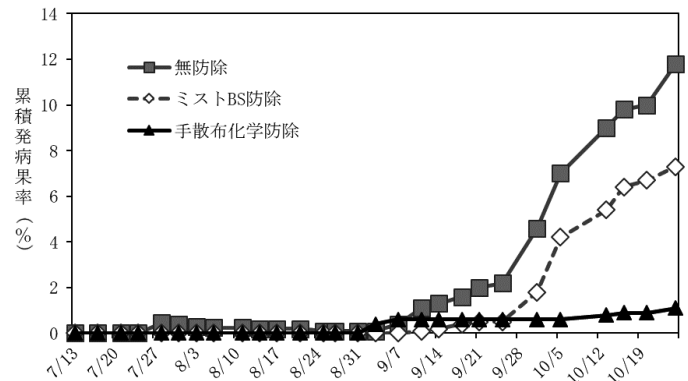


図 1 BS 剤ミスト散布および化学農薬手散布における灰色かび病累積発病果率の推

2 ミスト散布による微生物農薬の単用散布および化学農薬手散布の併用効果

そこで、BS 剤のミスト散布に加え、手散布にて化学農薬を併用散布した際の灰色かび病の防除効果について検討した。なお、化学農薬を 10 日に 1 回散布した区を化学農薬区、20 日に 1 回散布した区を化学農薬 50%削減区とし、用いた化学農薬は多作用点接触活性剤を中心に使用し、

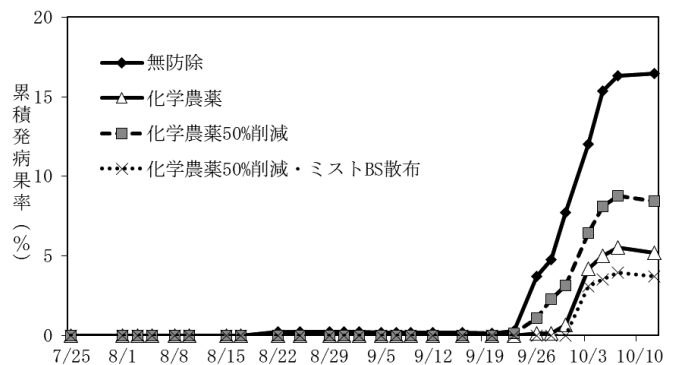


図 2 BS 剤ミスト散布および化学農薬手散布併用における灰色かび病累積発

BS 剤は週 3 回散布した。その結果、BS 剤のミスト散布に加え 20 日に 1 回化学農薬を散布することで、化学農薬区と同等の防除効果が得られた (図 2)。このことから、BS 剤を定期的に散布することで化学農薬の手散布頻度を少なくすることができ、且つ使用する薬剤についても薬剤耐性菌の発現リスクが低い剤を中心に組み立てることができると考えられた。

3 ミスト散布による微生物農薬と炭酸水素カリウム剤の交互散布の防除効果

生産者の経営を考慮した場合、病害防除にかかる経費は極力抑制していく必要がある。そのため、ミスト散布に使用する殺菌剤として、微生物農薬以外で比較的安価で且つ環境負荷軽減につながる殺菌剤の使用についても検討する必要がある。その候補として、有機 JAS に使用できる炭酸水素カリウム剤が挙げられる。炭酸水素カリウム剤は水溶性の高い剤であるため、細霧ノズルからスムーズに吐出でき、残留農薬や散布回数の観点でも、比較的ミスト散布に適した剤と考えられる。また、岐阜県内のトマト産地では、バチルス剤の中でもバチルス アミロリクエファシエンス剤 (以下 BA 剤) の使用頻度が高いため、BA 剤と炭酸水素カリウム剤を 1 週間間隔で交互にミスト散布した際のトマト灰色かび病の防除効果について確認した結果、無防除と比べ有意に発病を抑制した (表 1)。このことから、1 週間間隔で BA 剤と炭酸水素カリウム剤をミスト散布する防除方法は、農薬費用を抑制でき、



図 3 ミスト散布の様子

トマト灰色かび病を省力的に防除できる手法であると考えられた。

4 チューブ散布による微生物農薬と炭酸水素カリウム剤の交互散布の防除効果

ミスト散布に用いる装置はポリエチレンチューブや、細霧ノズル、鉄骨資材類等が必要であり、設置経費を考慮すると、より安価で簡易に設置できる仕組みを考える必要がある。頭上散布する仕組みの一つとして、散水チューブがあり、主に葉物野菜などへの灌水に用いる資材として、様々な散水パターンの資材が販売されている。そこで、散水チューブ (住化農業資材株式会社製、ミストエース 20 葉水くん[®]) による散布 (以下、チューブ散布) について、灰色かび病に対する防除効果を検討した。なお試験は、1 週間間隔で BA 剤と炭酸水素カリウム剤を交互散布した区、および、この交互散布に加え、炭酸水素カリウム剤を散布する回に多作用点接触活性剤を手散布する区を設け実施した。その結果、発病株率に有意差は無いものの、無処理に比べ、BA 剤と炭酸水素カリウム剤を交互散布した区では防除効果が認められた (表 1)。また、多作用点接触活性剤を手散布にて併用処理することで、より防除効果が得られることも明らかとなった (表 1)。この傾向は散水パターンの異なる別のタイプの散水チューブでも同様の結果が得られている

(データ未掲載)。ミスト散布と比較すると、粒径が大きく葉面への付着が不均一になり、防除効果が劣るものの、安価に簡易設置ができることや防除効果も得られることから、有

表1 ミスト散布およびチューブ散布によるバチルス アミロリクエファシエンス剤と炭酸水素カリウム剤の交互防除及び化学農薬手散布併用におけるトマト灰色かび病の防除効果

試験区	反復	調査株数	指数別株数					発病株率 (%)	発病度	防除価
			0	1	2	3	4			
ミスト交互防除区	1	20	13	7	0	0	0	35	8.8	64.1
	2	20	15	4	1	0	0	25	7.5	
	3	20	10	10	0	0	0	50	12.5	
	平均	20	12.7	7.0	0.3	0.0	0.0	36.7	bc	
ミスト交互および手散布併用防除区	1	20	13	7	0	0	0	35	8.8	67.2
	2	20	13	7	0	0	0	35	8.8	
	3	20	13	7	0	0	0	35	8.8	
	平均	20	13.0	7.0	0.0	0.0	0.0	35.0	bc	
チューブ交互防除区	1	20	7	12	1	0	0	65	17.5	42.2
	2	20	9	9	2	0	0	55	16.3	
	3	20	11	8	1	0	0	45	12.5	
	平均	20	9.0	9.7	1.3	0.0	0.0	55.0	ab	
チューブ交互および手散布併用防除区	1	20	18	2	0	0	0	10	2.5	82.8
	2	20	16	4	0	0	0	20	5.0	
	3	20	15	5	0	0	0	25	6.3	
	平均	20	16.3	3.7	0.0	0.0	0.0	18.3	c	
無防除区	1	20	5	10	5	0	0	75	25.0	—
	2	20	6	12	0	2	0	70	22.5	
	3	20	6	4	8	2	0	70	32.5	
	平均	20	5.7	8.7	4.3	1.3	0.0	71.7	a	

※発病株率に付したアルファベットはホルムの方法で調整したカイ二乗検定結果を示し、異なるアルファベットの数値間には5%水準で有意差があることを示す。

※発病指数0：発病小葉数0枚，1：発病小葉数1～5枚，2：発病小葉数6～10枚，3：発病小葉数11～15枚，4：発病小葉数16枚以上の株

※発病度 = Σ (指数別発病株数 × 指数) / (調査株数 × 4) × 100 防除価 = 100 - ((各発病度 / 無防除区発病度)

効な防除方法であると考えられた。

おわりに

農業の生産現場では担い手不足が深刻化しているため、少ない従事者でも農業を維持できる技術を開発、普及していく必要がある。また、物価高騰や環境負荷低減の推進といった社会情勢も考慮し、技術開発を進めていかなければいけない。

今回紹介した技術は、岐阜県の夏秋トマト産地が抱える、少人数で大面積を病害防除する実態や課題に合わせ検討した技術であり、ミスト散布やチューブ散布による微生物農薬を主体とした散布の有用性についてまとめたが、生産者の栽培環境に応じ改良を重ねる必要があるため、今後も検討を続け、より生産現場に対応した技術にしたいと考えている。

引用文献

- 1) Ishii, H., J. Fountaine, W. H. Chung, M. Kansako, K. Nishimura, K. Takahashi and M. Oshima (2009). Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Manag. Sci.* 65: 916–922.
- 2) 小島一輝・渡辺秀樹 (2021). 灰色かび病菌のフルジオキシニル感受性検定法の改良と岐阜県内トマト産地における感受性の状況. *関西病虫研報* 63 : 109-113.
- 3) 尾松直志・和泉勝一・島越博明 (1991). 果菜類の灰色かび病薬剤耐性菌の発生動態と防除対策. *九州病虫研会報* 37 : 15–20.
- 4) 鈴木啓史・田口裕美・黒田克利 (2012). ボスカリド感受性の低下した灰色かび病菌の YBA 寒天培地ペーパーディスク法による検出. *日植病報* 78 : 56. (講要)
- 5) 渡辺秀樹・小島一樹・久富茂樹・嶋津光鑑 (2021). 温湿度データによるトマト灰色かび病菌の感染危険度推定. *関西病虫研報* 63 : 59-65.
- 6) 山本磐 (1975). ベノミル耐性灰色かび病菌の野菜における発生と対策. *植物防疫* 29 : 194–196.
- 7) 山中聡 (2004). 新規微生物殺菌剤：バチルス ズブチリス剤新菌株の特性とその使い方. *植物防疫* 58 : 360-363.

植物病害抑制効果に着目したミミズ堆肥の開発

大阪公立大学大学院 農学研究科 東條元昭

Development of vermicompost focusing on plant disease suppression effects.

Motoaki Tojo: Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University

Abstract

Vermicompost refers to compost produced through a non-thermophilic oxidation process by earthworms and related microorganisms. Vermicompost can suppress plant diseases. In most cases, the mechanism of plant disease suppressive effects is not a direct antibacterial action, but an indirect action that occurs by supporting healthy plant growth. However, it also includes direct effects such as the involvement of antibacterial substances. In this presentation, the author will introduce the current state of the worldwide research on the effects of vermicompost on plant disease control, introduce the authors' study, and consider future challenges and prospects for this research field.

1. はじめに

ミミズ堆肥とは、ミミズとその関連微生物による非好熱性の酸化過程を経て産生される堆肥を指す(Pathma and Sakthivel 2012)。生分解性固形廃棄物の農業循環手法の1つとして位置づけられる(Elvira et al. 1998)。ミミズ堆肥の農業利用は農耕の始まりとともに自然発生的に行われるようになった。ミミズ堆肥が植物病害を抑制することも古くから知られていたが、科学的評価が行われるようになったのは1990年代の後半以降である。近年の材料としては、動物の糞尿や、調理場や農場で排出される野菜や果物のくずが多い(Atiyeh et al. 2000; Garg et al. 2006)。一般に、植物の幼弱期から成長期にかけて土壌伝染性の病害を起こす植物病原体を抑制する能力が高いとされ、育苗培土に添加して使われる例が多い。*Globisporangium ultimum* (syn. *Pythium ultimum*)、*Rhizoctonia solani*、*Verticillium* sp.などへの効果が知られている(Scheuerell et al. 2005; Chaoui et al. 2002)。

ここでは、ミミズ堆肥の植物病害抑制効果に関する世界の研究の現状と、それらを踏まえた筆者らの研究を紹介し、この研究分野の今後の課題や展望についてごいっしょに考えたい。

2. ミミズ堆肥の植物病害抑制効果とメカニズム

ミミズ堆肥の植物病害抑制効果のメカニズムは、多くの場合に直接的な抗菌作用ではなく、健全な植物成育を助けることによって生じる間接的な働きによる。例えば、栄養素の増加、オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニンなどの植物成長の産生、さらには植物病原体に敵対する微生物や線虫の多様性や活動を高め、結果として、とくに土壌伝染性の植物病原体によって引き起こされる害虫や病気を抑制する(Yatoo et al. 2021)。そのため、ミミズ堆肥を肥料取締法のカテゴリーに当てはめると土壌改良資材(野島 2021; 農林水産省

2024)に入る。つまり、植物病害抑制効果においてミミズ堆肥は、化学肥料や農薬に期待されるような短期的な有益性で評価されるものではなく、土壌の物理的性質、化学的性質あるいは生物的性質に変化をもたらした結果として病気も抑制する効果が発揮されるという長期的な目的で使われる資材として捉える必要がある。

一方でミミズ堆肥の近年の研究のメタ解析からは、この堆肥の速効的な効果も示されている。Blouin et al. (2019) はミミズ堆肥についての論文等を統合的・統計学的にメタ解析した。その結果、ミミズ堆肥は経済的収量、総バイオマス、茎葉バイオマスおよび根バイオマスで、それぞれ平均値で 26%、13%、78% および 57%の増加をもたらすことがわかった。Blouin et al. (2019) はさらに、ミミズ堆肥を土壌容積の 30~50%添加したときに植物成長へのプラス効果が最大になることや、ミミズ堆肥が添加される側の培土の種類によっては植物成長効果が大きく低下すると述べている。またミミズ堆肥の材料として牛糞が最も適しているとし、植物との相性ではウリ科、キク科、マメ科などがミミズ堆肥との適性が高いことも示している。このように作物や土壌の種類との関係によっては植物成長や病害抑制に速効的な作用を示す可能性があることもミミズ堆肥の魅力の一つである。

ミミズ堆肥は固体としてだけではなく液体としても利用される(Yatoo et al. 2021)。水で抽出し希釈して使うことでコストが抑えられ、農薬や液肥の散布機も使えるようになる。ミミズ堆肥と水の希釈率を 1:10 または 1:20 にして数日間エアレーションを行い、多様な生物活性分子 (bioactive molecules) や好気性微生物の総量を増加させたのちに、土壌や植物に投与する。このような方法で作出されるコンポストティー (ミミズ堆肥の水抽出液) は、施肥や植物病害予防の目的で広く利用されている(Edwards et al. 2006)。ミミズ堆肥のコンポストティーの植物病害抑制効果については、土壌伝染性植物病原菌や(Scheuerell and Mahaffee 2004 等)、植物病原線虫 (Arancon et al. 2002 等) で報告がある。また、コンポストティーにすると葉面散布できるようになるため、空気伝染性病害にも応用し易くなる。ミミズ堆肥のコンポストティーの病害抑制メカニズムも基本的には、固体のミミズ堆肥の場合と同様である。植物病原体と競合する微生物の多様性を高め、感染場所を減らす効果があるとされる。エンドウうどんこ病 (Singh et al. 2003)やトマト疫病(Zaller 2006)、イネばか苗病(Manandha and Yami 2008)などで防除効果が確認されている。

3. タケ由来ミミズ堆肥の開発のきっかけ

筆者らは 2013 年頃から放置竹林のタケ材をミミズ堆肥化する技術の開発を進めてきた。背景には、南東北以西の山林や平地でモウソウチク (*Phyllostachys edulis*) を主とする放置竹が各地で大きな面積ではびこっている現状がある。樹林や耕地の荒廃、生物多様性の低下、景観の急激な劣化を引き起こしている。農業生産者が高齢化する中で竹林に隣接するハウスや農耕地にタケの地下茎が侵入し生産活動ができなくなり重機で除去しない限り耕作放棄地となる例が後を絶たない。この状況を予防するために現状では竹材 1 トン当たり 2 万円以上の費用をかけて処分されるが、竹林の増加に全く追いついていない。放置竹材を農業や緑化で活用できる堆肥に変えて、地域で循環させることができれば、放置竹林と耕土劣化の二つの課題を同時に解決にすることにつながる。筆者らは、放置竹材を堆肥化して放置竹材に新たな価値を付与することを考えた。放置竹材を、植物病害抑制効果とい

う付加価値をもつ堆肥に変える方法が確立されれば、現在は多大な費用をかけて処分されている放置竹材を有用な資源に変えることができる。堆肥化技術を開発して病害抑制効果を実証することは、放置竹林と耕土劣化の課題を解決する手段の1つになると考えた。

一方でタケ材を堆肥化した前例はほとんどなかった。竹材は他の木質材に比べてコスト面で粉碎しにくく、竹材チップとして堆積させて腐朽を促す方法が主であった。そのような中で筆者らは、地元大阪府の河内長野市や企業と放置竹材の効率的な堆肥化手法を開発しようとするプロジェクトに参加する機会を得て、その研究の過程で、パウダー化したタケ材が釣りエサ用のシマミミズ (*Eisenia fetida*) によって速やかに糞化 (堆肥化) されることを見出した (You et al. 2019a)。本稿「2.」で述べたようにミミズ堆肥は植物病害抑制効果が広く知られているため、タケ由来ミミズ堆肥も発病抑制効果を示す可能性がある。そこでミミズによって堆肥化したタケパウダーの植物病害抑制効果を調べたところ、いくつかの病害に対して一定の抑制効果を示すことが明らかになった。

4. タケ由来ミミズ堆肥の作出

タケ材のミミズ堆肥化はこれまで世界的にも例が無く、その植物病害抑制効果についても不明であったためその作出方法から検討した。当初の実験でモウソウチクの粉末化の直後にミミズを投入した。しかし、竹材に含まれるサポニン等の影響で逃亡するか体液を出しながら死亡した。一方、一晩水道水に晒した後のモウソウチク粉末に投入すると、ミミズがほとんど逃亡せずに長期間生存することがわかった。当時、本研究室の大学院生だった尤 暁東博士 (You Xiaodong、現、クミアイ化学工業株式会社) らと追加実験を行う中で、タケ由来ミミズ堆肥作出のためのレシピを下記のようにまとめた (You et al. 2019a)。

<材料>

モウソウチク粉末 (一晩水に浸けたもの) 10 kg

クズ (*Pueraria lobata*) の乾燥茎葉 100 g

シマミミズ 100 g

※クズはミミズの生育を促す窒素源として与えた。

<方法>

一晩水に浸けて湿った状態のモウソウチク粉末とクズをプラスチックケースなどに入れて混ぜ合わせ、上面にシマミミズ 100 g を置く。28°C前後で8~12週間静置し、モウソウチク粉末全体がほぼミミズの糞となり黒褐色を帯びたらタケ由来ミミズ堆肥の完成。

※シマミミズを使わずに堆肥化した場合、モウソウチク粉末の堆肥化に16週間以上の期間を要した。

※本レシピについてはその後に改良を進め、一部を日本植物病理学会大会、同簡裁部会および土壤微生物学会大会で口頭発表している (川澄ら 2022; 川澄・東條 2022; 川澄・東條 2023a-c)

5. タケ由来ミミズ堆肥の植物病害抑制効果

上記のレシピに従って作成したタケ由来ミミズ堆肥についてハクサイピシウム腐敗病菌 (*Pythium aphanidermatum*) に対する抑制効果を調べたところ、市販育苗土に対して高い抑制効果を示した (図1)。また同様にキュウリ等に立枯れを起こす *Rhizoctonia solani* AG-1 IB に対する影響を調べたところ、この堆肥の無菌ろ過液の添加によって培地上での菌糸生育が抑制されることが明らかになった (図2)。

さらに温室と圃場で植物寄生性線虫に対する抑制効果をササゲを用いて評価した。野菜残渣由来ミミズ堆肥を比較対照とした。その結果、モウソウチク由来と野菜残渣由来の両方のミミズ堆肥で、殺線虫効果や卵の孵化抑制および線虫の根への侵入の抑制が見られた。その一方で、モウソウチク由来ミミズ堆肥の方が試験の時期に関わらず安定した抑制効果を示した (You et al. 2018)。タケ由来ミミズ堆肥が野菜くずミミズ堆肥よりも効果が安定した理由として、野菜くずに比べて構成成分の質が時期に関わらず安定していることが考えられた (You et al. 2018)。タケ材を発病抑制効果を示すミミズ堆肥に変える技術はこれまで知られていなかったため「タケコンポスト及び植物の病害防除剤」として特許登録した (東條ら 2020)。

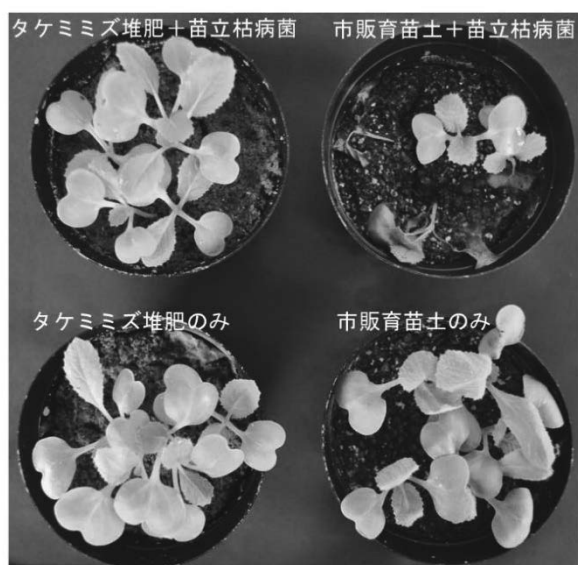


図1. *Pythium aphanidermatum* によるハクサイの苗立枯れに対するタケ由来ミミズ堆肥の抑制効果 (You et al. 2019a; 尤・東條 2020)

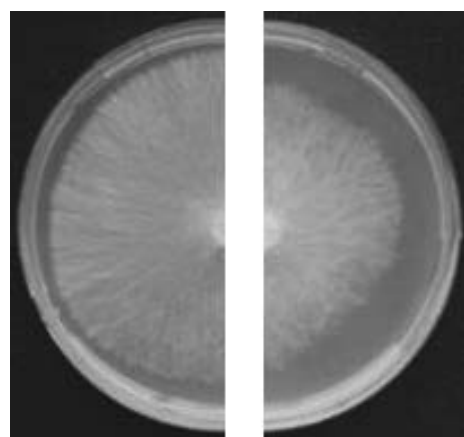


図2. 無菌フィルター (ポアサイズ $0.22 \mu\text{m}$) を通したタケ由来ミミズ堆肥抽出液の *Rhizoctonia solani* AG1-IB の菌叢抑制効果。左が比較対象 (滅菌蒸留水区)、右が抽出液処理区 (You et al. 2019b)。

さらに、タケ由来ミミズ堆肥をパーミキュライトで 1/5 に希釈し、その 0.2g を株元に施用することで、養液栽培条件のハウレンソウ立枯病に対するタケ由来ミミズ堆肥の防除効果が見られた。この手法は少量で効果を示すためコストパフォーマンスも高いと考えられる。本技術は、発明の名称「養液栽培用添加剤」として特許出願中である (東條・川澄 2022)。

なお、上述のレシピや、発病抑制効果を最大にする手法については改良の余地が多々あり、本研究室大学院生の川澄らを中心に現在研究を行っている。

タケ由来ミミズ堆肥中の微生物量や種類を培養法や次世代シーケンサーで調べたところ、市販育苗土よりも多くの種類と密度の微生物を含むことがわかった (You et al. 2019a)。またこの堆肥に含まれる抗糸状菌物質の一部を単離し、**ergosterol peroxide** およびそのアナログと同定した。これらの物質はタケ由来ミミズ堆肥の原料であるモウソウチクからは検出されなかったことから、この堆肥が作られる過程で産生されたと考えられた (You et al. 2019b)。タケ由来ミミズ堆肥の病害抑制効果は不明な部分が数多く残されており、現在、当研究室の大学院生が中心になって解明を進めている。

タケ由来ミミズ堆肥の将来ビジョン

これまでにあきらかになった特性から、この堆肥を作物生産現場で活用できる可能性が示されたと考えている。これまでの成果を踏まえた今後の課題として、1) タケ由来ミミズ堆肥の植物病害抑制効果についての圃場試験でのさらなる評価、および2) 大型粉砕機による大規模で実用的なミミズ堆肥作りと少量施用効果の実証によるさらなるコストダウン化が挙げられる。タケ由来ミミズ堆肥の技術を応用して給食残渣とシュレッダー紙の混合物のミミズ堆肥化にも成功した (Hashimoto et al. 2021)。タケ由来ミミズ堆肥を土壤改良剤として実用化し、有機・減農薬栽培を通じて未利用資源の地域循環の1つのツールとすべく (図3)、タケ由来ミミズ堆肥をより使いやすいものなるよう今後も開発を続けたい。

おわりに

食品廃棄物や家畜糞などのミミズ堆肥化技術の研究・開発が欧米やインドを中心に盛んに行われるようになり、植物病害抑制効果が注目されるようになるようになったのは2000年代以降である (Chaoui et al. 2002; Szczech and Smolińska 2001 等)。日本のとくに西南暖地の温暖多湿な気候はミミズ堆肥化において好適な環境と言える。ミミズは自ら移動して堆肥産物(糞)を生産するため繰り返し作業が少なく済むため、高齢化によって堆肥化を諦める農業現場が多い中での堆肥生産意欲の向上につながる可能性がある。ミミズ堆肥の植物病害抑制効果について短期的・長期的な視点で今後も世界の動きを注視しながら、日本独自の技術の作出も行っていきたいと考えている。



図3. タケ由来ミミズ堆肥利用の将来ビジョン

引用文献および特許

- Atiyeh, R. M., Domínguez, J., Subler, S. and Edwards, C. A. (2000). Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seedling growth. *Pedobiologia* 44:709-724.
- Arancon, N. Q., Edwards, C. A., Lee, S. S., & Yardim, E. (2002). Management of plant parasitic nematode populations by use of vermicomposts. In Brighton crop protection conference pests and diseases (Vol. 2, pp. 705-710). <https://vermitak.ir/wp-content/uploads/2018/09/nematod.pdf>
- Blouin, M., Barrere, J., Meyer, N., Lartigue, S., Barot, S. and Mathieu, J. (2019). Vermicompost significantly affects plant growth. A meta-analysis. *Agronomy for Sustainable Development*, 39:1-15. DOI: 10.1007/s13593-019-0579-x
- Garg, P., Gupta, A. and Satya, S. (2006). Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: A comparative study. *Bioresource technology*, 97:391-395. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.03.009
- Hashimoto, S., Furuya, M., You, X.D., Wanibuchi, G., Tokumoto, H., Tojo, M. and Shiragaki, K. (2021). Chemical and microbiological evaluation of vermicompost made from school food waste in Japan. *JARQ* 55:225-232. DOI: 10.6090/jarq.55.225
- 川澄留佳・藤江隼平・東條元昭(2022).養液栽培で発生する *Pythium aphanidermatum* によるハウレンソウ立枯病に対するタケミミズ堆肥の抑制効果の可能性. *日本植物病理学会報* 88:227 (講要)
- 川澄留佳・東條元昭(2022). 加熱処理したタケミミズ堆肥の微生物相と同堆肥が水耕ハウレンソウの成長に及ぼす影響. *土と微生物* 76:82 (講要)
- 川澄留佳・東條元昭 (2023a). 土耕や水耕栽培でのタケ由来ミミズ堆肥による病害抑制効果の評価と抑制メカニズムの解明. *日本植物病理学会報* 89:22 (講要)
- 川澄留佳・東條元昭 (2023b). 異なる原料から作られたタケ由来ミミズ堆肥の病害抑制効果の比較. *日本植物病理学会報* 89:206 (講要)
- 川澄留佳・東條元昭 (2023c). タケ由来ミミズ堆肥の植物病害抑制効果に関わる化学的要因の調査. *土と微生物* 77:111 (講要)
- Manandhar, T. and Yami, K. D. (2008). Biological control of foot rot disease of rice using fermented products of compost and vermicompost. *Scientific world*, 6: 52-57. <https://sciencemuseum.gov.np/wp-content/uploads/2020/07/Scientific-world-volume-6.pdf#page=55>
- 野島夕紀. (2021). 肥料取締法の改正概要と木質バイオマス燃焼灰の肥料利用について. *日本エネルギー学会機関誌えねるみくす*, 100: 74-80. DOI: 10.20550/jieenergymix.100.1_74
- 農林水産省 (2024). 土壌改良資材. https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyhozen_type/h_sehi_kizyun/pdf/kana_20.pdf
- Pathma, J. and Sakthivel, N. (2012). Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. *SpringerPlus* 1: 1-19. DOI: 10.1186/2193-1801-1-26

- Scheuerell, S. J. and Mahaffee, W. F. (2004). Compost tea as a container medium drench for suppressing seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 94:1156-1163. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1156.
- Scheuerell, S. J., Sullivan, D. M. and Mahaffee, W. F. (2005). Suppression of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*, *P. irregulare*, and *Rhizoctonia solani* in container media amended with a diverse range of Pacific Northwest compost sources. *Phytopathology* 95:306-315. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-95-0306>
- Singh, U. P., Maurya, S. and Singh, D. P. (2003). Antifungal activity and induced resistance in pea by aqueous extract of vermicompost and for control of powdery mildew of pea and balsam. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 544-553. <https://www.jstor.org/stable/43215548>
- 東條元昭・尤暁東・下神幸博 (2020). 特許:発明の名称「タケコンポスト及び植物の病害防除剤」、特許第 6712044 号
- 東條元昭・川澄留佳 (2022). 特許出願: 発明の名称「養液栽培用添加剤」、特願 2022-42948
- Yatoo, A. M., Ali, M. N., Baba, Z. A. and Hassan, B. (2021). Sustainable management of diseases and pests in crops by vermicompost and vermicompost tea. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41:1-26. DOI: 10.1007/s13593-020-00657-w
- You, X.D., Kimura, N., Okura, T., Murakami, S., Okano, R., Shimogami, Y., Matsumura, A., Tokumoto, H., Ogata, Y. and Tojo, M. (2019a). Suppressive effects of vermicomposted-bamboo powder on cucumber damping-off. *JARQ* 53:13-19. DOI: 10.6090/jarq.53.13
- You, X.D., Wakana, D., Ishikawa, K., Hosoe, T. and Tojo, M. (2019b). Antifungal activity of compounds isolated from bamboo vermicompost against *Rhizoctonia solani* AG1-IB. *Advances in Microbiology* 9:957-970. DOI: 10.4236/aim.2019.912061
- 尤 暁東・東條元昭 (2020). モウソウチク由来ミミズ堆肥中の土壌微生物と植物病害抑制効果. *土と微生物* 74:50-53. DOI: 10.18946/jssm.74.2_50
- You, X.D., Tojo, M., Ching, S. and Wang, K.-H. (2018). Effects of vermicompost water extract prepared from bamboo and kudzu against *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology* 50:569-578. DOI: 10.21307/jofnem-2018-054
- Zaller, J. G. (2006). Foliar spraying of vermicompost extracts: effects on fruit quality and indications of late-blight suppression of field-grown tomatoes. *Biological agriculture & horticulture*, 24:165-180.

謝辞

烏帽子山里山クラブ（河内長野市）ならびに河内長野市役所環境政策課の皆様には竹材の提供で多大なご努力をいただいた。大阪公立大学教育研究フィールド技師の皆様には竹材の粉碎作業に際し多くのご助力をいただいた。北海道立総合研究機構 農業研究本部の三澤知央博士には *Rhizoctonia solani* AG1-IB の菌株を分譲していただいた。本研究の実施に当たり、株式会社ゲオール商事様、JA バンク大阪信連産学連携研究支援事業、ならびに国立研究開発法人科学技術振興機構 A-STEP 機能検証フェーズ（グラント番号：JPMJTM19CN）により支援をいただいた。以上の皆様ならびに支援事業に深く感謝申し上げます。

青枯病菌の表現型変異株を利用した生物的病害防除

元 鳥取大学 乾燥地研究センター（現 農研機構 植物防疫研究部門） 中原浩貴
滋賀大学 教育学部 森 太郎
熊本県立大学 環境共生学部 松添直隆

Biocontrol of plant diseases by using phenotype conversion mutants of *Ralstonia pseudosolanacearum*

Hiroki Nakahara : Former: Arid Land Research Center, Tottori University (Current Affiliation: National Agriculture and Food Research Organization)

Taro Mori : Faculty of Education, Shiga University

Naotaka Matsuzoe : Graduate School of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto

Abstract

Bacterial wilt and *Verticillium* wilt are serious soil-borne plant diseases that cause the wilt and death of more than 200 species of plants, including *Solanum* plants such as tomatoes, eggplants, and potatoes. *Ralstonia pseudosolanacearum* causes bacterial wilt and undergoes spontaneous phenotype conversion (PC) from its wild-type form to avirulent or weak virulent strain. Several studies reported that bacterial wilt and *Verticillium* wilt diseases were suppressed by pre-inoculation with PC mutants into plants. The biocontrol techniques have not been put into practical use. We are conducting research on the biocontrol against the plant diseases by using PC mutant, and introduce the trends in the research, the biological control mechanism, and approaches for future development.

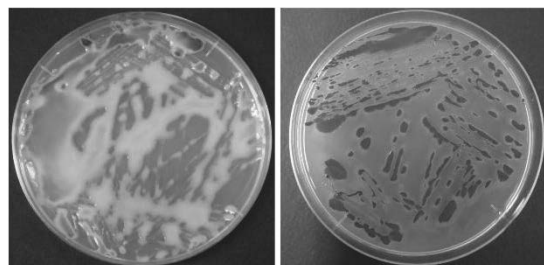
はじめに

青枯病や半身萎凋病はトマト、ナス、ジャガイモ等のナス科植物をはじめ経済的に重要な作物を含む200種以上の植物を萎凋・枯死させるため、作物の安定生産を脅かす深刻な病害である (Loganathan et al., 2009)。これら土壌伝染性病害の防除法として、クロルピクリン等の殺菌剤を利用した土壌殺菌、低濃度エタノールや糖蜜等の有機物を利用した土壌還元消毒、抵抗性台木植物を利用した接ぎ木栽培が普及している。一方で、化学農薬による土壌殺菌は土壌中の有用な微生物まで死滅させるため環境や生態系への負荷が大きいこと、土壌還元消毒でも土壌深部の病原菌の防除が難しいこと、ジャガイモやショウガなどの作物では接ぎ木栽培ができないことや強い病原性株の出現により抵抗性植物が罹病化する等の課題もあるため、複数の防除法を組み合わせた防除が重要である。また、環境に配慮した防除法として、有用微生物を利用した生物的防除法の開発が盛んに進められており、青枯病等の萎凋病害に防除効果を有する様々な有用細菌や糸状菌が分離されている (Eljounaidi et al., 2016)。しかし、現在までに青枯病や半身萎凋病に対して有効な生物農薬・微生物資材として実用化されているものは極めて少ない。筆者らの研究グループでは、青枯病菌の表現型変異株 (PC株) を利用したナス科植物における青枯病や半身萎凋病の生物的防除法について研究を行っ

ており、本発表ではこれまでのPC株を利用した病害防除研究の動向、防除機構および今後の発展に向けたアプローチについて紹介したい。

1 青枯病菌の表現型変異株を利用した病害防除研究の動向

青枯病菌 (*Ralstonia pseudosolanacearum*) の病原性野生型株 (以下、野生型株) は、寒天培地上で流動性のあるコロニーを呈するが、培地・土壌・植物内等で自発的に表現型変異 (Phenotype conversion; PC化) し、寒天培地上で非流動性のコロニーを呈する変異株 (以下、PC株) となる (図1; Mori et al., 2007, 2011, 2012)。



病原性野生株 表現型変異 (PC) 株

図1. 青枯病菌の表現型変異

PC株は、菌体外多糖類 (EPS) などの病原性因子の産生能が顕著に低下し、弱病原性や非病原性である場合が多い。タバコ、トマト、ナスおよびジャガイモでは、PC株を事前に植物根に接種することで野生型株の感染後の青枯病の発病が抑制されることが知られている (図2A; Chen and Echandi, 1984; McLaughlin and Sequeira, 1988; Trigalet and Trigalet-Demery, 1990; Arwiyanto et al., 1994a; 小川ら, 2011; 黒木ら, 2016)。

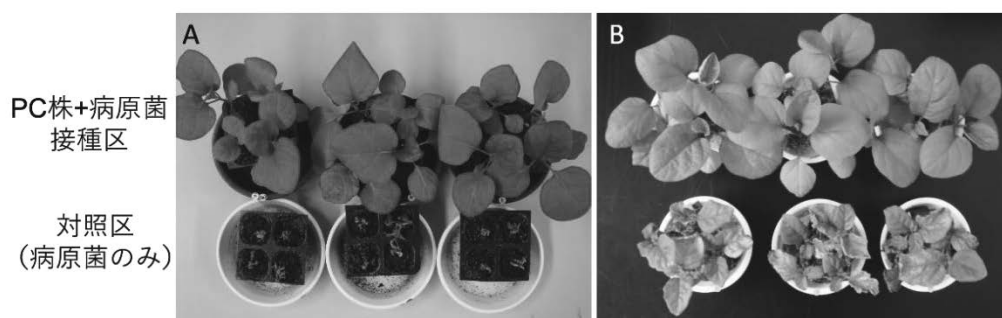


図2. PC株接種による青枯病 (A) と半身萎凋病 (B) の防除効果

現在までにPC株を利用した生物的病害防除技術の実用化には至っていないものの、研究は古くから行われている。PC株による青枯病防除研究は、1950~60年代に青枯病菌の生態学的研究から表現型変異によるPC株が発見されて以降、1960年代には既にPC株による青枯病 (タバコ立枯病) の発病抑制効果が確認された (Main, 1968)。その後、国内外の複数の研究グループで活発に研究され、1980~90年代にPC株を利用したタバコ、ジャガイモ、トマト等のナス科植物における青枯病の生物的防除法について多くの研究論文が発表された (例: Chen and Echandi, 1984; McLaughlin and Sequeira, 1988; Trigalet and Trigalet-Demery, 1990; Arwiyanto et al., 1994a)。2000年代に入り、本防除法に関する研究論文は減少したものの、青枯病菌のPC化・非病原化の要因や変異条件に関する研究論文は増加した (例: 巖原ら, 2002; Mori et al., 2007, 2011, 2012)。2010年以降には、再びPC株を利用した青枯病防除法の研究について国内外での研究論文が増加し、現在では筆者らの研究グループ (代表者: 松添直隆) の他に、海外 (中国、インド、エジプト等) のいくつかのグループで研究が行われているようである。

なお、この間に青枯病菌の分類は*Pseudomonas*属、*Burkholderia*属、*Ralstonia*属へと変遷し、現在は*R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, *R. syzygii*を含む種の複合体*Ralstonia solanacearum* species complexと総称される (Safni et al., 2014)。

近年の研究では、PC株接種による病害防除効果は青枯病だけでなく糸状菌*Verticillium dahliae*による半身萎凋病に対しても発揮され (図2B)、PC株接種は細菌病害と糸状菌病害の防除にも有効であることが見出された (前原ら, 2017; Nakahara et al., 2021b)。さらに、PC株接種と接ぎ木栽培を組み合わせた青枯病や半身萎凋病の複合的な病害防除技術の検討も行われている (Nakahara et al., 2021a)。青枯病菌のPC化に関する研究においては、野生型株とPC株との生理生態的特徴および各菌株が特異的に生産する物質 (Zheng et al., 2022) や、鉄化合物添加による青枯病菌のPC化の促進に関する研究 (Nakahara et al., 2021c) などが行われている。

2 PC株による病害防除機構

PC株による青枯病防除機構には、病原菌に対するPC株の抗菌作用、病原菌とPC株との定着場所や栄養の競合 (ニッチの競合)、PC株による植物への抵抗性誘導などの複数の要因が考えられている。

(1) 抗菌作用

青枯病菌株の中には抗菌物質を生産し、青枯病菌の他の菌株に対して抗菌作用を示すものがある。青枯病菌が生産する抗菌物質は同定されていないが、熱に不安定な高分子量のタンパク質性物質と推定されている (Cuppels et al., 1978; Arwiyanto et al., 1993; Nakahara et al., 2017)。病原菌株に対して抗菌作用を示さないPC株を植物に接種した場合でも、青枯病の発病が抑制されることからPC株の抗菌作用は防除機構の主要因ではなく、防除機構には他の要因が強く関与すると考えられる (Nakahara et al., 2016b, 2016c)。

(2) 栄養や定着場所をめぐる競合

青枯病菌の野生型株とそのPC株に別々の抗生物質 (リファンピシンまたはストレプトマイシン) 耐性を付与し、各菌株に相応した抗生物質添加寒天培地で各菌株の菌密度を選択的に測定する実験系を用いて、液体培地、土壌および植物組織内における野生型株とPC株の増殖競合を調査した。両菌株をBG液体培地中で長期混合培養した場合、PC株 (ストレプトマイシン耐性PC株) の生菌密度は高密度で維持したが、培養8日~24日に野生型株 (リファンピシン耐性野生型株) の生菌密度のみ顕著に減少したことから、野生型株よりもPC株の方が培地内の栄養減少や培地成分の変化に適応できると考えられた (Nakahara et al., 2016a, 2021c)。また、青枯病菌はPC株に変異することで、鉄獲得に関与するシデロフォアを生産するため、シデロフォアによるPC株の有利な鉄獲得能は病原菌の増殖抑制因子の一つとして推察されている (Nakahara et al., 2021c)。

一方で、土壌中で野生型株とPC株を同密度で混合培養した場合では、両菌株は同様に推移した (中原ら, 2016a)。青枯病菌はクオラムセンシング機構により増殖に伴い増加するシグナル物質を認識しており、シグナル物質が閾値を超える高密度になることでEPS等を生産し病原性を発現する (Kai, 2023)。両菌株を同密度で接種した土壌に植物を定植した場合、

野生型株は無病徴の植物組織内では比較的低密度に、萎凋症状を示した植物組織内では高密度に存在しており、PC株はいずれの植物組織でも低密度に存在したことから（中原ら、2016a）、野生型株は植物を認識し、植物組織内ではPC株よりも高い増殖能を発揮すると考えられた。

PC株による防除効果は、土壤中の野生型株の菌密度よりも高濃度のPC株を事前に接種した植物で発揮されやすい。土壤中の野生型株の菌密度よりも低濃度または高濃度のPC株菌液を接種した植物を野生型株の汚染土壌に移植し、1週間後の植物組織内（根・茎・葉）における両菌株の菌密度を調査した（中原ら、2016a）。その結果、低濃度のPC株接種区では非発病個体と発病個体とともに、根における野生型株の菌密度は対照区と同様に高く、非発病個体でも直に萎凋症状を示すと考えられた。一方、高濃度のPC株接種区では、PC株が高密度で定着しており、発病が抑制された個体では低濃度のPC株接種区や対照区と比べて根における野生型株の定着が顕著に抑制されていた。これらの結果から、PC株による青枯病防除効果の発揮には、根における野生型株の定着抑制が重要であると推察された。

つぎに、根におけるPC株と野生株の定着挙動を詳しく調査するため、各菌株を別々の蛍光タンパク質遺伝子（*gfp*または*rfp*）で標識し、根組織内の両菌株の定着を蛍光顕微鏡下で観察した（中原ら、2016b）。野生型株（*gfp*標識株）を単独で接種した植物の根では、野生型株は根の広範囲に高密度で定着した。PC株（*rfp*標識株）を事前に接種した植物の根では、PC株は根毛、皮層、細胞間隙、導管周辺細胞等の根の広範囲に高密度で定着し、PC株が確実に定着していた組織・細胞内では野生型株の定着は顕著に抑制されていた。これらの結果から、PC株による防除機構には根組織におけるPC株の高密度定着による野生型株の定着抑制が関与すると考えられた。

(3) 植物への抵抗性誘導

PC株を接種したトマト根では、トマトに静菌作用を示すトマチンの生産（Arwiyanto et al. 1994b）や

感染特異的（Pathogenesis related ; PR）タンパク質であるβ-1,3-グルカナーゼ（*PR-2*）やキチナーゼ（*PR-3*）の遺伝子発現が誘導される（Nakahara et al., 2016b）。また、PC株を根に接種した植物では、根と葉の両方で病害防御関連遺伝子の発現誘導が起こっていることもわかった（図3；中原ら、2022）。PC株接種区では根と葉の両方で*PR-2b*と*PR-3a*の発現量が対照区と比べて有意に増加した。葉では、根において顕著な発現誘導がみられなかった

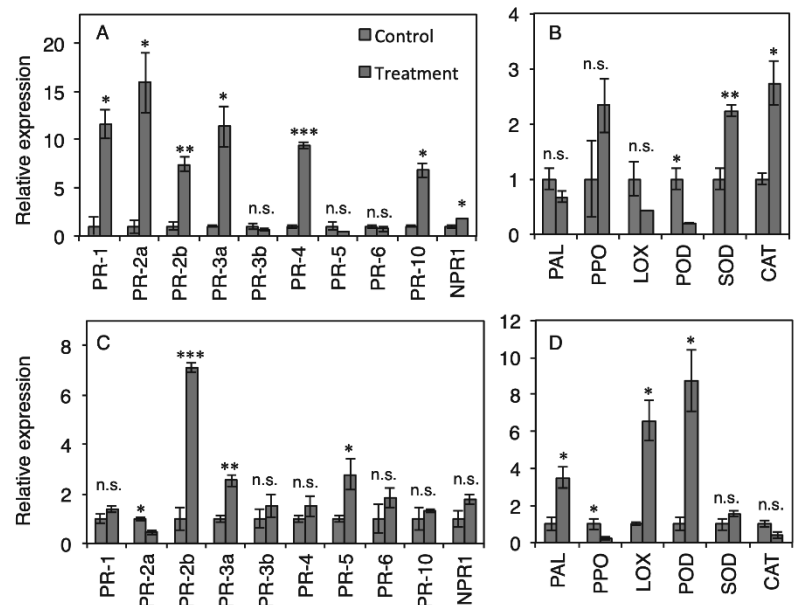


図3. PC株接種によるトマト葉 (A, B) と根 (C, D) における病害防御関連遺伝子の発現

PR-1、PR-2a、PR-4、PR-10、NPR1、SOD、CAT の発現量が対照区と比べて有意に増加した。一方で、根では、葉において顕著な発現誘導がみられなかった PR-5、PAL、LOX、POD の発現量が有意に増加した。すなわち、PC 株接種によって誘導される病害防除関連遺伝子の発現特性（遺伝子の種類と発現量）は植物の組織（根と葉）で異なり、いくつかの遺伝子は根と葉で逆転的に発現した。これらの結果から PC 株を接種した植物では、サリチル酸、エチレン、ジャスモン酸等の複数のシグナル伝達物質を介して植物全身的な抵抗性が誘導されると推察された。

以上のことから、PC株による病害防除効果の発揮には、PC株を植物組織内に確実にかつ高密度に定着させ、野生型株の組織内定着を病原性発現が起こる菌密度以下に抑えることが重要であり、PC株による病害防除機構には、PC株の高密度定着による病原菌の定着阻害と植物への抵抗性誘導が強く関与すると考えられる。

3 PC株を利用した病害防除技術の発展に向けたアプローチ

(1) PC株による防除効果が現場で発揮されるためのアプローチ

これまでの研究から、PC株による高い病害防除効果が発揮されるために必要な接種条件を以下のようにまとめた。PC株による病害防除効果は、死菌や培養液では防除効果は低く、生菌接種で防除効果が高い（小川ら, 2011）。土壤中の病原菌密度よりも低密度のPC株菌液を接種した場合や、病原菌の感染後の植物にPC株を接種した場合では防除効果は低く、土壤中の病原菌密度よりも高密度のPC株菌液を、病原菌の感染前に植物根部に接種する（ポット苗の根部を一部断根し、PC株菌液を灌注接種または浸漬接種する）ことで高い防除効果が発揮される（小川ら, 2011；中原ら, 2016a）。PC株接種直後から7日目の苗では組織内のPC株の定着量が高く、本苗を青枯病菌または半身萎凋病菌の汚染土壤に定植した場合には防除効果が発揮されるが、PC株接種後14日目や21日目の苗はPC株の定着量が低下しており、苗定植後の防除効果は低くなるため（中原ら, 2016a; Nakahara et al., 2021b）、持続的な防除効果の発揮には定期的なPC株接種等が必要である。PC株の接種部位よりも上部の組織に病原菌が感染した場合（例えば、根にPC株を接種後、整枝剪定作業等で病原菌が付着したハサミを介して地上部に青枯病菌が感染した場合）には防除効果は発揮されにくい（小川ら, 2012）。ジャガイモにおいては、種芋へのPC株接種では青枯病の防除効果は発揮されにくく、塊茎から発根後の根にPC株を接種することで防除効果が発揮されやすい（黒木ら, 2016）。

青枯病菌株はレースやbiovar等の系統の異なる菌株が多数存在し、それらのPC株の病害防除効果も異なる。また、PC株による病害防除効果は植物の種類や品種によっても異なっている。筆者らの研究では、青枯病や半身萎凋病に対して高い防除効果を発揮するPC株や複数の植物種・品種に共通して高い防除効果を発揮するPC株を選抜した（Nakahara et al., 2016b, 2016c, 2021b）。さらに、罹病品種の中でも青枯病や半身萎凋病に対する潜在的な耐病性（病害の罹りにくさ）は植物品種によって異なっており、病害に罹りやすい品種よりも比較的罹りにくい品種にPC株を接種した場合に発病が抑制されやすいため、接種する品種の選択も重要である（Nakahara et al., 2016c, 2021a）。また、青枯病や半身萎凋病に対して完全な抵抗性を有するナス科抵抗性台木品種はなく、抵抗性台木との接ぎ木苗でも罹病する。接ぎ木苗にPC株を接種することで、接ぎ木苗のみの防除効果よりも高い防除効果が発揮され、抵抗

性植物との接ぎ木栽培とPC株接種を組み合わせることで、青枯病や半身萎凋病等の萎凋病害の効果的な複合防除が可能である (Nakahara et al., 2021a)。

(2) 表現型変異機構の解明に向けた研究

青枯病菌の自発的な表現型変異 (PC化) の機構は解明されていないが、青枯病菌の野生型株をBG液体培地等の栄養培地中で2週間程度、長期静置培養することで容易にPC株を作出・分離することができる (Mori et al., 2012)。また、青枯病菌の汚染圃場や感染植物内からもPC株を分離することができ、PC化は自然界でも普遍に起きる現象である (Mori et al., 2007, 2011)。

筆者らの研究において、鉄を含まない最小栄養培地 (MM液体培地) 中で青枯病菌の野生型株を長期静置培養した場合ではPC化はほとんど起きないが、20 μ M程度の鉄溶液を添加することで表現型変異が促進され、早期にかつ高頻度にPC化が誘発されることが明らかになった (Nakahara et al., 2021c)。一方で、滅菌水を培地とした場合や増殖に不適なpH条件のMM培地中では、鉄溶液を添加しても高頻度なPC化は誘導されないことから、高頻度なPC化の誘導には鉄の存在だけでなく、青枯病菌の増殖に適した条件 (あるいは高密度な増殖に伴い蓄積される菌体成分や培地成分の変化) が必要であると推察された。Zheng et al. (2022) の研究では、野生株とPC株の菌体懸濁液をHPLCで分析し、野生株懸濁液とPC株懸濁液のそれぞれに特異的に検出される物質のピークがあることを報告しており、今後、野生型株とPC株の物質生産の違いに関する研究発展も期待される。

これまでの研究では、PC株への変異は、病原性因子の発現制御を司る*phcA*の変異によって起こると考えられてきた (Brumbley et al., 1993; Poussier et al., 2003)。また、*phcA*形質転換株は、自発的なPC株と類似した表現型を呈することから人工的なPC株として扱われている場合もある。一方で、筆者らの研究において、液体培地中で培養した野生型株とそのPC株の遺伝子発現をRNA-seqで解析したところ、*phcA*遺伝子よりも野生型株と比較してPC株では発現していないあるいは顕著に低下している遺伝子が数多くあることが分かった (未発表)。現在、熊本県立大学の研究グループを中心に両菌株の全ゲノム解析により自発的なPC化に関わる遺伝子の特定が進められている。

(3) 表現型変異促進を利用した新しいアプローチによる病害防除技術の開発

防除資材としてPC株を直接利用するには、製剤化や菌体の生存性の課題がある。また、PC株をトマトの根滲出物と接触させると、病原性株に戻る変異復帰が起こることが報告され (Poussier et al., 2003)、病原性株への変異復帰に対する懸念は、これまでPC株が病害防除資材として実用化されてこなかった大きな要因の一つであると思われる。しかし、もともと土着の青枯病菌をPC株に変換する防除技術であれば、その抵抗感は小さいように思われる。青枯病汚染圃場内に存在する青枯病菌の病原性株を高頻度でPC化させることができれば、青枯病の病原菌密度を減らすと同時に、植物に病害抵抗性を誘導するPC株を増やすことができる。熊本県立大学・滋賀大学等の研究グループ (代表者: 松添直隆) では、この概念による防除技術を開発するため、青枯病菌汚染土壌への鉄含有農業資材の施用によるPC化促進技術の開発を進めており、今後、新しい病害防除技術として発展が期待される。

おわりに

本技術の実用化に向けて、PC株を利用した病害防除技術の圃場での有効性の検証、現場での利用方法、変異復帰等の安全性の検証など、検討すべき事柄はまだ多く、これからも研究を継続していくことが重要である。今後、PC化に関与する物質や遺伝子が特定されれば、表現型変異機構・変異復帰機構の解明や圃場内の青枯病菌の効率的なPC化促進技術等の防除技術開発が一層加速すると期待される。最後に、技術の実用化には様々な機関との産学官連携が必要であり、本研究発表が実用化に向けた取り組みのきっかけになることを期待する。

謝辞

本発表で紹介した筆者らの研究内容の一部は、科研費基盤研究B（19H03091および22H02478, 代表者：松添直隆）、基盤研究C（15K07299, 代表者：松添直隆）、若手研究B（26850030, 代表者：森 太郎）、特別研究員奨励費（17J10980, 代表者：中原浩貴）の助成を受けて実施した。なお、本稿第一著者の研究内容は、熊本県立大学および鳥取大学乾燥地研究センターに所属時（2012~2022年度）に実施したものである。本研究にご協力いただきました方々に感謝申し上げます。

引用文献

1. Arwiyanto, T., Goto, M., and Takikawa, Y. (1993). Characterization of bacteriocins produced by *Pseudomonas solanacearum*. *Jpn. J. Phytopathol.*, 59: 114-122.
2. Arwiyanto, T., Goto, M., Tsuyumu, S., and Takikawa, Y. (1994a). Biological control of bacterial wilt of tomato by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Strelitzia reginae*. *Jpn. J. Phytopathol.*, 60: 421-430.
3. Arwiyanto, T., Sakata, K., Goto, M., Tsuyumu, S., and Takikawa, Y. (1994b). Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. *Jpn. J. Phytopathol.*, 60: 288-294.
4. Brumbley, S. M., Carney, B. F., and Denny, T. P. (1993). Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional regulator. *J. Bacteriol.*, 175: 5477-5487.
5. Chen, W. Y., and Echandi, E. (1984). Effects of avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tobacco. *Plant Pathol.*, 33: 245-253.
6. Cuppels, D. A., Hanson, R. S., and Kelman, A. (1978). Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. *Microbiol.*, 109: 295-303.
7. Eljounaidi, K., Lee, S. K., and Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biol. Control*, 103:62-68.
8. 巖原美穂, 高木滋樹, 横山和平, 丸本卓哉. (2002). 土壌中における *Ralstonia solanacearum* の菌体外多糖非生産株の誘発と同変異株の発病抑制効果. *土と微生物*, 56: 11-22.
9. Kai, K. (2023). The *phc* quorum-sensing system in *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.*, 77: 213-231

10. 黒木達也, 森太郎, 小松亜璃沙, 中原浩貴, 松崎弘美, 松添直隆. (2016). 挿芽・挿芽苗に対する非病原性 *Ralstonia solanacearum* によるジャガイモ青枯病の発病抑制効果の検定. 園芸学研究, 15: 207-212.
11. Loganathan, M., Rai, A. B., Ramesh, R., Sharma, B. K., Rai, R. K., and Rai, M. (2009). Vascular wilt diseases-a menace in vegetable crops. *Vegetable Science*, 36: 1-13.
12. 前原祥大, 中原浩貴, 森太郎, 松添直隆. (2017). *Ralstonia solanacearum* 非病原性変異菌株を利用したナス半身萎凋病の生物的防除. 園芸学研究, 16: 497-502.
13. Main, C. E. (1968). Induced resistance to bacterial wilt in susceptible tobacco cuttings pretreated with avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.*, 58: 1058-1059.
14. McLaughlin, R. J., and Sequeira, L. (1988). Evaluation of an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* for biological control of bacterial wilt of potato. *American Potato J.*, 65: 255-268.
15. Mori, T., Fujiyoshi, T., Inada, T., Matsusaki, H., Ogawa, K., and Matsuzoe, N. (2011). Phenotypic conversion of *Ralstonia solanacearum* in susceptible and resistant *Solanum* plants. *Environ. Control Biol.*, 49: 165-176.
16. Mori, T., Inada, T., Ogawa, K., Matsusaki, H., and Matsuzoe, N. (2012). Phenotypic conversion of *Ralstonia solanacearum* in water extract of *Solanum toxicarium*. *J. Plant Pathol.*, 94: 535-542.
17. Mori, T., Ozaki, K., Matsusaki, H., and Matsuzoe, N. (2007). Behavior and mutation of *Ralstonia solanacearum* in *Solanum toxicarium* grown in aseptic culture. *J. General Plant Pathol.*, 73: 142-146.
18. 中原浩貴, 森太郎, 松崎弘美, 松添直隆. (2016a). 土壌中と植物内における青枯病菌の野生株と表現型変異株との競合. 植物環境工学, 28: 133-141.
19. 中原浩貴, 森太郎, 松崎弘美, 松添直隆. (2016b). 非病原性 *Ralstonia solanacearum* の植物内定着が青枯病菌の定着に及ぼす影響, 日本植物病理学会報. 83: 77-78 (平成28年度日本植物病理学会九州部会講演要旨)
20. Nakahara, H., Mori, T., Matsusaki, H., and Matsuzoe, N. (2017). Inhibition of *Ralstonia solanacearum* wild-type strains and production of antibacterial substances in culture filtrates of phenotype conversion mutants. 2017 Asian Conference on Plant Pathology (Abstract).
21. Nakahara, H., Mori, T., Matsusaki, H., and Matsuzoe, N. (2016a). Growth inhibition of the *Ralstonia solanacearum* wild-type strain in a culture filtrate of phenotype conversion mutant strain. *Environ. Control Biol.*, 54: 133-138.
22. Nakahara, H., Mori, T., Sadakari, N., Matsusaki, H., and Matsuzoe, N. (2016b). Biological control of the bacterial wilt of the tomato 'Micro-Tom' by phenotype conversion mutants of *Ralstonia solanacearum*. *Environ. Control Biol.*, 54: 139-145.
23. Nakahara, H., Mori, T., Sadakari, N., Matsusaki, H., and Matsuzoe, N. (2016c). Selection of effective non-pathogenic *Ralstonia solanacearum* as biocontrol agents against bacterial wilt in eggplant. *J. Plant Dis. Prot.*, 123: 119-124.
24. Nakahara, H., Maehara, A., Mori, T., and Matsuzoe, N. (2021a). Selection of eggplant cultivars and combination with graft cultivation for effective biological control of vascular wilt diseases using a phenotype conversion mutant of *Ralstonia solanacearum*. *Horticulture J.*, 90: 393-400.

25. Nakahara, H., Mori, T., and Matsuzoe, N. (2021b). Screening of phenotypic conversion mutant strains of *Ralstonia solanacearum* for effective biological control of *Verticillium* wilt in eggplant. *Crop Prot.*, 142: 105530.
26. Nakahara, H., Mori, K., Mori, T., and Matsuzoe, N. (2021c). Induction of spontaneous phenotype conversion in *Ralstonia solanacearum* by addition of iron compounds in liquid medium. *J. Microbiol. Meth.*, 186: 106233.
27. 中原浩貴, 森 太郎, 松崎弘美, 近藤謙介, 松添直隆. (2022). 青枯病菌の表現型変異株によるトマトの病害防御関連遺伝子の発現誘導, 日本生物環境工学会2022年福岡大会講演要旨.
28. 小川晃一郎, 森太郎, 松崎弘美, 松添直隆. (2011). 非病原性 *Ralstonia solanacearum* によるナス青枯病発病抑制効果. *園芸学研究*, 10: 581-587.
29. 小川晃一郎, 森太郎, 松崎弘美, 松添直隆. (2012). 非病原性 *Ralstonia solanacearum* の定着がナス青枯病発病抑制効果に及ぼす影響. *園芸学研究*, 11: 399-403.
30. Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-Demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M., and Trigalet, A. (2003). Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Mol. Microbiol.*, 49: 991-1003.
31. Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., and Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 64: 3087-3103.
32. Trigalet, A., and Trigalet-Demery, D. (1990). Use of avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum* for the biological control of bacterial wilt of tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 36: 27-38.
33. Zheng, X., Wang, Z., Chen, M., Chen, Z., Wang, J., and Zhu, Y. (2022). Genetic stability of virulent, intermediate, and avirulent strains of *Ralstonia solanacearum* after extensive, consecutive subculturing. *Biol. Control*, 167: 104845.

根圏微生物叢の理解を通じたバイオコントロールの可能性

静岡大学 農学部 橋本将典

Biocontrol strategies suggested from basic research on the root microbiota

Masayoshi Hashimoto

Faculty of Agriculture, Shizuoka University

Abstract

In nature, plant roots are colonized by a species-rich microbial community, which is mainly recruited from a subset of the surrounding soil microbiota. Whether and how the beneficial services to host plants are provided by the plant-associated microbiota is attracting many attentions for improving plant productivity and compromising environmental issues by crop production. In the last decades, the two major technological advancements in the plant microbiota research area have been achieved. One is the whole microbial community structure analysis based on PCR amplicon sequencing of marker genes using NGS platform, and the other is the plant microbiota reconstitution systems based on the comprehensive microbial culture collections. These enabled us to tackle the basic research questions on the plant microbiota research. I will discuss how the basic research on the plant root microbiota could contribute to developing biocontrol strategies of plant diseases.

はじめに

植物の根圏には、様々な種類の細菌や糸状菌などの微生物が数多く生息している。これらの根圏に生息する微生物の群集は「根圏微生物叢」と呼ばれ、いわゆる土壌微生物のうち根圏の環境に適応しやすいものが植物の根圏に達したものである。植物病を起こす病原菌も根圏微生物叢の構成メンバーの一員とすることができるが、根圏微生物叢に含まれる微生物の大部分は、植物の生育に影響する活性を持つものから、影響を与えないように見えるものまで様々である。植物の根圏からは、植物の養分吸収や耐病性、環境ストレスへの耐性などを向上させる微生物が発見されることが古くから知られており、このような根圏微生物はバイオコントロール資材として研究・利用されてきた。

多様な微生物からなる複雑な群集である根圏微生物叢のふるまいや働きは、その複雑さゆえに測定や解析のための有力な技術がなかったことが足かせとなり、研究がほとんど進んでいなかった。近年になって、次世代シーケンサーが広く普及したことと、根圏微生物叢の培養コレクションを用いて微生物叢を人工的に再構成する方法論が確立されたことなどから研究が大きく進展しつつある。根圏微生物叢の群集形成には、植物の根から分泌される植物由来の化合物や、植物が病原菌などに対して持つ免疫システムが大きな役割を果たすことが明らかになりつつある (Bulgarelli et al, 2013.)。実際に光合成産物のうち 10%程度が、糖類やアミノ酸、二次代謝産物などの形で根から分泌されると言われており、このことは植物が根圏微生物叢との相互作用に多くの資源を投じていることを示している。さらに、微生物叢を構成する個々の微生物が植物に対して示す作用に加えて、微生物同士の相互作用も重要な機能を持つようである (Mesney et al, 2023.)。このような微生物同士の相

互作用には、微生物が分泌するクオラムセンシング、シデロフォア、抗菌性物質などが関与することがこれまでに報告されている (Getzke et al, 2023.)。

これまでの研究によって、高いバイオコントロール活性を持つ優れた微生物が数多く報告されてきた。しかし、これらの有望な分離株でも、温室などの制御環境下での接種試験では高い効果を示すものの、野外環境では効果がばらついたり、期待したほど高い効果が得られなかったりすることがある。これには、温度や水分など環境の変化によって微生物の活性が低下してしまうことに加えて、有用微生物が土着の微生物叢から排除され定着できないことが原因として指摘されている。微生物の高度な多様性や技術の進歩を踏まえると、有用微生物の探索の努力は尽くされたとは言い難い。今後も様々な分離源や病害を対象として微生物探索が継続され、これまでの想像をはるかに超えるような万能菌 (?) が分離されることを期待したいが、ここでは、根圏微生物叢の基礎研究を通じて得られた知見が、バイオコントロールにどのような可能性を示すのかについて考えていきたい。

ミネラルをめぐる植物と根圏微生物叢の相互作用

土壤に含まれるミネラル類が不足すると、植物は養分不足であることを素早く察知して、植物自身が備える養分を吸収するためのシステムを活性化させる。一方で、植物にとって養分となるミネラルの多くは、微生物にとっても生存に必須な元素であり、ミネラルをめぐることで土壤中で植物と根圏微生物叢が競合する。実際に、リンが不足する条件では、根圏微生物叢の群集構造が変化し、植物のリン欠乏応答は根圏微生物叢の存在によってより強く誘導される (Castrillo et al, 2017.)。

鉄は植物の生育に不可欠な微量元素である。鉄は土壤中に豊富に含まれるが、土壤の pH が中性からアルカリ性になるとただちに不溶化する。双子葉植物の根では、鉄が欠乏するとフェノール性の二次代謝産物であるクマリン類が合成され、 Fe^{3+} をキレートあるいは還元して吸収すると考えられている (Schmid et al, 2014; Rajniak et al, 2018, Paffrath et al, 2023.)。

Harbort らは、3種類のクマリン類 (スコポレチン、フラキセチン、シデレチン) の合成を欠損した *f6'h1* 変異体などを用いて、鉄欠乏土壤における根圏微生物叢との相互作用を調べた (Harbort et al, 2020a.; 図 1)。アルカリ性の石灰質土壤において、*f6'h1* 変異体で葉の黄化などを含む典型的な鉄欠乏症状が見られ、著しい生育不良が生じた (図 2)。また、細菌 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行な

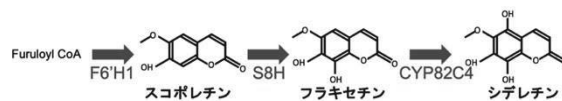


図1 クマリン類の構造と合成経路

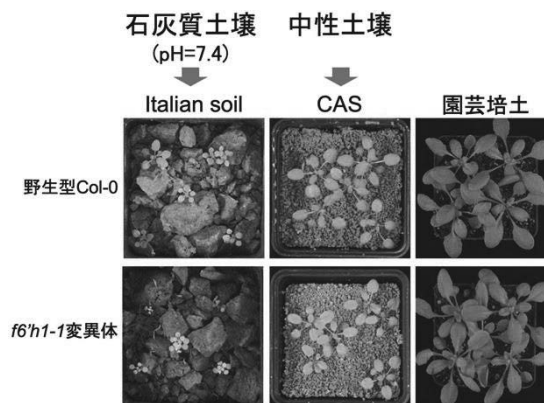


図2 石灰質土壤におけるクマリン合成欠損変異体の生育不全

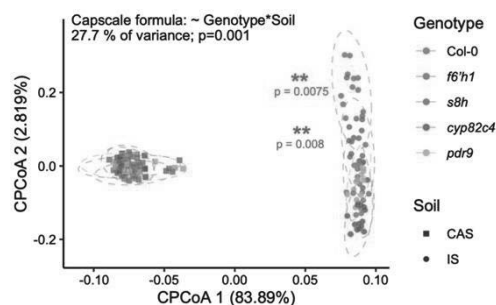


図3 クマリン合成欠損変異体における根圏微生物叢の変化

ったところ、鉄欠乏土壌ではスコブレチンおよびフラキセチンが、根圏微生物叢の形成に重要であることが示された (図 3)。

合成コミュニティ法は、根圏細菌の網羅的な培養コレクションを用いて、根圏微生物叢を人工的に再構成し、その働きを検証する実験手法である。合成コミュニティ法では、人工的に再構成した根圏微生物叢を無菌的に生育させた植物体に接種し、非接種コントロールと比較することにより根圏微生物叢の働きを推定できる。さらに、合成コミュニティ法を改変し、植物の培地の鉄養分条件を変えることにより、鉄欠乏条件における根圏微生物叢の機能を評価することが可能である (Harbort et al, 2020b; 図 4)。鉄欠乏条件において植物を生育させると、典型的な鉄欠乏

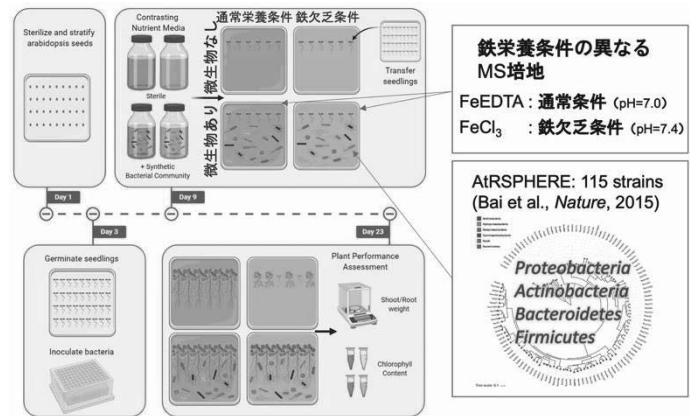


図4 土壌の鉄欠乏条件を再現した合成コミュニティ法

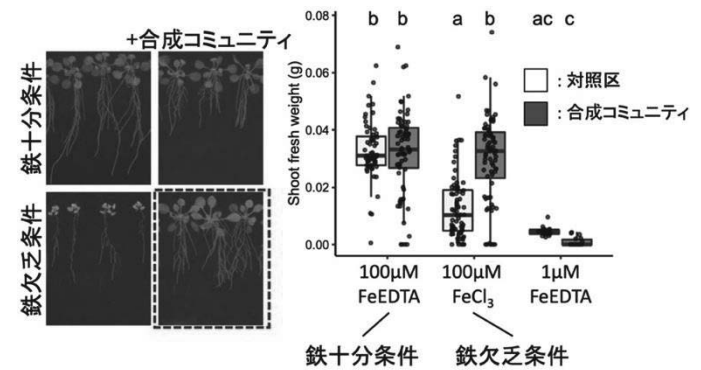


図5 合成コミュニティの接種による植物の生育改善

症状が観察されたが、115 菌株からなる根圏細菌叢の合成コミュニティを接種すると植物の生育が大きく改善した (図 5)。この結果は、根圏微生物叢が鉄欠乏条件において植物の鉄吸収を助ける働きを持つことを示している。さらに、クマリン合成を欠損したシロイヌナズナ変異体やクマリン類の添加実験を行うことにより、根圏微生物叢による生育レスキュー活性には、クマリン類のうちフラキセチンが重要であると考えられた。以上の結果は、植物と根圏微生物叢は鉄をめぐる競争ではなく、根圏微生物叢は植物の鉄吸収に対して有益な働きをするを示している。

同様の結果はイネやトウモロコシでも見出されている。イネは、ジャポニカ種とインディカ種の2種類に大別されるが、一般にインディカ種のほうが窒素肥料の利用効率が高い。Zhang らは、95 のイネ品種で根圏細菌叢を比較し、ジャポニカ種とインディカ種で根圏微生物叢の群集構造が大きく異なることを見出した (Zhang et al, 2019.)。また、インディカ種で優占種となる根圏細菌群をインディカ種に接種したところ、有機質の窒素肥料が効率的に吸収された。同様に、トウモロコシでは *Oxalobacteraceae* 科細菌が植物の窒素吸収に関わることが示されている (Yu et al, 2021.)。一方で、PGPR 活性を持つ根圏細菌 *Bacillus velezensis* では、感染を成立させるために根から鉄を収奪する。この鉄の収奪は、Type VII 分泌機構で分泌されるエフェクターを、根の細胞膜に挿入することにより行われると考えられている。このように一部の根圏細菌では、鉄をめぐる植物と競争の可能性がある。このような鉄をめぐる植物と微生物の競争は、病原細菌の場合にも起こりうるようである (Cao et al, 2024.)。シロイヌナズナにおいて PAMP である *flg22* を処理して免疫を誘導し

た場合に、鉄欠乏条件下では植物の鉄欠乏応答が抑制されることが報告された。この現象は、鉄欠乏条件下で病原細菌にさらされた場合に、植物がクマリン類の産生など、自身の鉄欠乏応答を抑えることで、限られた量の鉄が病原体に利用されるのを防ぐためのメカニズムであると考えられている。

ミネラルをめぐる植物と微生物の相互作用は、植物の養分吸収のみにとどまらない。細菌の鉄吸収には、 Fe^{3+} に結合するシデロフォアと総称される物質群がかかわる。2000以上の根圏細菌のシデロフォア産生能と青枯病菌の増殖への影響を比較した研究では、シデロフォアを介した鉄の競合が根圏細菌による青枯病の抑制に関わることが示唆されている (Gu et al, 2020.)。ソルガムでは、乾燥ストレス条件下で Actinobacteria の割合が増えることで、根の伸長が促進される (Xu et al, 2021)。乾燥条件では、鉄吸収に関わるムギネ酸の分泌やキレート鉄の取り込みに関わるトランスポーター遺伝子の発現量が低下したことなどから、乾燥条件における Actinobacteria の増加には植物の鉄吸収が低下することが引き金になると考えられている。シロイヌナズナでは、病原細菌 *Pseudomonas syringae* に対する effector-triggered immunity (ETI) の発動時に、細菌の鉄欠乏応答システムの転写が抑制される (Nobori et al, 2018.)。鉄欠乏応答に関わる転写因子を過剰発現させると細菌の増殖抑制が部分的に回復するが、 Fe^{3+} を添加しても細菌増殖には影響が見られない。そのため、ETI におけるこの現象は、鉄そのものをめぐる相互作用ではなく、鉄欠乏応答システムが細菌の生存に不可欠という特性を逆手に取った植物免疫の戦略と捉えることができる。

植物の免疫および発病における根圏微生物叢の応答

植物の根圏から分離される根圏細菌のなかには、根に接種すると病原微生物に対する防御応答を植物体全身で誘導するものが頻繁に見出される。このような現象は、病原体の侵入によって植物体全身で誘導される全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance; SAR) に対比され、誘導全身抵抗性 (induced systemic resistance; ISR) と呼ばれる (Pieterse et al., 2014.)。他方で、シロイヌナズナにおいてサリチル酸を介した免疫経路により、根圏微生物叢の群集構造が変化することが示されている (Lebeis et al, 2015.)。これらのことから、根圏微生物叢が植物体全身での防御応答を促す働きを持つ可能性だけでなく、病原体が侵入した組織において免疫システムが影響されたことにより根や葉に生息する微生物叢が変化し、その結果として植物体全身での免疫応答を変化させる可能性がある。実際に、発病に伴う根圏微生物叢の変化を調べた研究は、さまざまな植物種と病原菌の組み合わせでこれまでに数多く報告されている (Berendsen et al., 2018.; Kwak et al, 2018.など)。卵菌類であるべと病菌は、シロイヌナズナにおいて根圏微生物叢の群集構造を変化させる (Berendsen et al., 2018.)。さらに、べと病菌の接種によって根圏で増加する細菌種は、植物で ISR を誘導し、べと病菌の増殖量を低下させる働きを持っていた。この研究のように、発病条件下の微生物叢で有意な変動を示す微生物種に着目することで、バイオコントロール活性を持つ菌株の特定に至った例も多数報告がある。ただし、これらの報告の多くで菌株の活性試験は小規模のポット試験に留まっており、このコンセプトにより特定された菌株がいずれの場合でも実用的レベルの活性を持ちうるとは限らない。しかし、微生物叢全体を見渡しながらバイオコントロールの候補になる菌株の特定を目指すというコンセプトは一定の妥当

性があるように思われ、今後さらに普及していくと考えている。

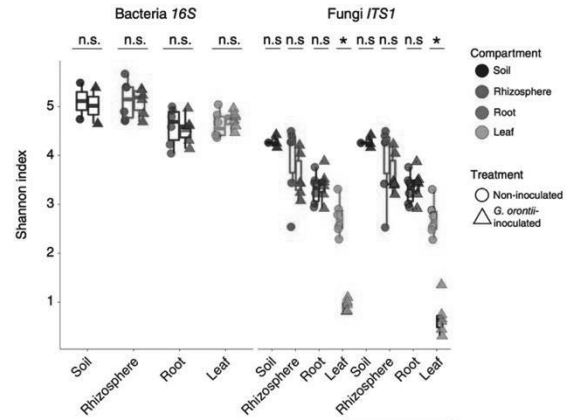
Durán らは、うどんこ病菌がシロイヌナズナの根および葉の微生物叢にどのような影響を与えるかを調べた (Durán et al., 2021)。その結果、うどんこ病菌の接種は、うどんこ病が生じた葉における糸状菌叢の種数を著しく低下させた一方で、根においてはほとんど影響が見られなかった。しかし、細菌叢の種数には、葉と根のいずれの部位においてもうどんこ病菌の接種による

影響がほとんど見られなかった (図 6)。また、微生物叢の群集構造を比較すると、うどんこ病菌の接種によって葉における糸状菌叢と細菌叢の両方が変化した。以上のことから、うどんこ病菌が感染した葉においては、糸状菌叢と細菌叢はともに変化しており、特に糸状菌叢でその影響が大きいことが示された。一方で、うどんこ病菌の感染部位とは離れた根においては、糸状菌叢と細菌叢のいずれもほとんど影響を受けないと考えられる。

さらに、根圏および葉圏から単離された網羅的な細菌培養コレクションによる合成コミュニティ法を用いて、うどんこ病の発病への影響が調べられた。微生物叢の接種によりうどんこ病の病徴が抑制されることが予想されたが、根圏細菌、葉圏細菌のいずれにおいても微生物叢の接種によりうどんこ病の病徴は変化しなかった (図 7)。葉圏細菌およびうどんこ病菌の増殖量を測定すると、うどんこ病菌の増殖量は葉圏細菌の接種の有無によらず変化せず、この結果はうどんこ病菌による病徴が変化しなかったことと対応すると考えられた。一方で、葉圏細菌の増殖量はうどんこ病菌の接種により高まることになった。これらの結果から、うどんこ病菌の接種は、葉圏細菌の群集構造を変化させるだけでなく葉圏細菌の増殖を促す効果があると言えるが、この葉圏細菌叢の変化がどのような働きと結びついているのかは現時点では不明である。

また、先に言及したべと病菌の例と考え合わせると、発病に伴う微生物叢の応答の有無やその部位は、病原体ごとの感染戦略の違いに起因すると予想されるが、具体的にどのような要因が作用するかは明らかになっていない。

植物免疫と根圏微生物叢の相互作用については、シロイヌナズナで確立された根圏微生物叢の網羅的培養コレクションを用いた研究も進められている。これらの培養コレクションは、健全なシロイヌナズナから分離された菌株からなる (Bai et al, 2015)。Ma らは、多様な分類群に属する根圏細菌 151 菌株のうち、およそ 4 割にあたる 62 菌株が根における



Goの配列を除外した場合
図6 うどんこ病菌の接種による菌叢の多様性の変化

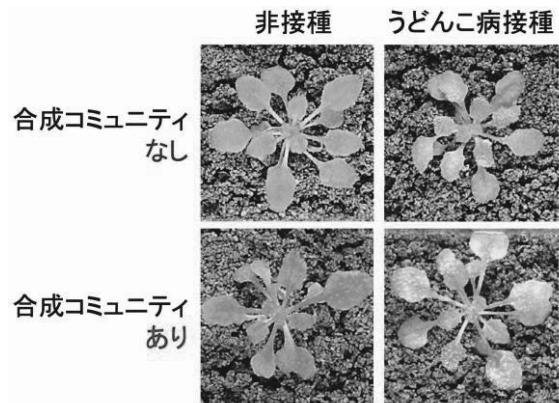


図7 葉圏細菌叢の接種によるうどんこ病発病への影響

PTIの誘導を抑制する活性を持つことを見出した (Ma et al, 2021.)。複数の根圏細菌株を組み合わせた人工的な根圏細菌叢を接種した場合にも、同様に PTI の抑制活性が観察された (Ma et al, 2021; Teixeira et al, 2021)。このような特定の根圏細菌による根の免疫抑制活性は、他の根圏細菌の感染を促進する効果を持つと同時に、病原細菌の感染をも促進する効果を持つ。さらに、培養コレクションの菌株のなかには植物に単独で接種すると強い病原性を示すものが見出されるが、菌叢全体としては病原性を示さない。このようなことから、植物免疫が個々の根圏細菌の侵入に対して抑制的に働くのに対して、一部の根圏細菌は植物免疫を抑制する活性を示し、そのせめぎ合いを通じて根圏細菌叢が形成されると考えられる。

おわりに

ここまで、私がこれまでに関わった研究に言及しつつ、基礎研究から明らかになってきた根圏微生物叢の成り立ちや機能についてその一部を紹介した。我々の研究では、シロイヌナズナの二次代謝産物であるクマリン類を介した植物と根圏微生物叢の相互作用と、植物の鉄吸収における機能の一端を明らかにした。鉄などのミネラルをめぐる植物と微生物の相互作用を理解することは、植物の養分吸収だけでなくバイオコントロールへの応用という観点でも役立つ可能性がある。クマリン類のように、根圏微生物叢の群集形成や機能に作用する植物由来の化合物はこれまでにいくつか報告されている (Koprivova and Kopriva, 2022.)。また、ネギ類の混作によって形成される病害抑止土壌の原因物質として特定された GSAC も、根圏微生物に作用する化合物の一つである (Nishioka et al, 2022)。植物と微生物の種の多様性を考えると、このような作用を持つ化合物は数多く存在すると考えられ、今後このような化合物の構造と微生物叢への作用機作の解明が進み、このような化合物のバイオコントロールへの利用が進むと思われる。

後半では、植物の免疫および発病に伴う根圏微生物叢の応答についてまとめた。発病に伴う微生物叢の応答に加えて、植物や根圏微生物叢がさらされる根圏環境の応答も重要な要素として挙げておきたい。例えば、クマリン類であるフラキセチンの細菌に対する活性は、pH などの周囲の環境によって変化することが示唆されている (Mc Rose et al, 2023.)。また、トマト青枯病発病時の根圏における代謝物を調べ、未発病根圏で見出された代謝物のカクテルを処理することによって青枯病が抑制されることが報告された (Wen et al, 2023.)。代謝物カクテルを使って‘青枯病に強い’根圏微生物叢を作るという、腸内細菌叢で言われる「プレバイオティクス」に近い発想と言える。キッチン資材による病害抑止効果の一部も、このような根圏微生物叢に対する作用に起因すると考えられている。植物病、なかでも土壌病害のバイオコントロールに向けて、根圏微生物叢を視野に入れることにより、新たな菌株や資材の発見や、適切な処理方法を確立する上でのヒントが得られる可能性がある。

引用文献

- Bai Y., Müller DB., Srinivas G., Garrido-Oter R., Potthoff E., Rott M., Dombrowski N., Münch PC., Spaepen S., Remus-Emsermann M., Hüttel B., McHardy AC., Vorholt JA., Schulze-Lefert P. Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota. *Nature* 528(7582):364-9, 2015.
- Berendsen RL., Vismans G., Yu K., Song Y., de Jonge R., Burgman WP., Burmølle M., Herschend J., Bakker PAHM., Pieterse CMJ. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME Journal* 12, 1496-1507, 2018.
- Bulgarelli D., Schlaeppli K., Spaepen S., van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review in Plant Biology* 64, 807-838, 2013.
- Cao M., Platre MP, Tsai HH., Zhang L., Nobori T., Armengot L., Chen Y., He W., Brent L., Coll NS., Ecker JR., Geldner N., Busch W. Spatial IMA1 regulation restricts root iron acquisition on MAMP perception. *Nature* 2024. doi: 10.1038/s41586-023-06891-y. Online ahead of print.
- Castrillo G., Teixeira PJPL., Paredes SH., Law TF., de Lorenzo L, Feltcher ME., Finkel OM, Breakfield NW., Mieczkowski P., Jones CD., Paz-Ares J., Dangl JL. Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature* 543, 513-518, 2017.
- Durán P., Reinstädler A., Rajakrut AL., Hashimoto M., Garrido-Oter R., Schulze-Lefert P., Panstruga R. A fungal powdery mildew pathogen induces extensive local and marginal systemic changes in the Arabidopsis thaliana microbiota. *Environmental Microbiology* 23, 6292-6308, 2021.
- Getzke F., Hassani MA., Crüsemann M., Malisic M., Zhang P., Ishigaki Y., Böhringer N., Fernández AJ., Wang L., Ordon J., Ma KW., Thiergart T., Harbort CJ., Wesseler H., Miyauchi S., Garrido-Oter R., Shirasu K., Schäberle TF., Hacquard S., Schulze-Lefert P. Cofunctioning of bacterial exometabolites drives root microbiota establishment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120(15): e2221508120, 2023.
- Gu S., Wei Z., Shao Z., Friman VP., Cao K., Yang T., Kramer J., Wang X., Li M., Mei X., Xu Y., Shen Q., Rolf Kümmerli R., Jousset A. Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. *Nature Microbiology* 5(8):1002-1010, 2020.
- Harbort CJ.*, Hashimoto M.*, Inoue H., Niu Y., Guan R., Rombolà AD., Kopriva S., Voges MJEEE, Sattely ES., Garrido-Oter R., Schulze-Lefert P. Root-secreted coumarins and the microbiota interact to improve iron nutrition in Arabidopsis. *Cell Host & Microbe* 28, 825-837, 2020. *: equal contribution.
- Harbort CJ.*, Hashimoto M.*, Inoue H.*, Schulze-Lefert P. A gnotobiotic growth assay for Arabidopsis root microbiota reconstitution under iron limitation. *STAR protocols* 1, 100226, 2020. *: equal contribution.
- Koprivova A., Kopriva S. Plant secondary metabolites altering root microbiome composition and function. *Current Opinion in Plant Biology*. 67, 102227, 2022.
- Kwak MJ., Kong HG., Choi K., Kwon SK., Song JY., Lee J., Lee PA., Choi SY., Seo M., Lee HJ., Jung EJ., Park H., Roy N., Kim H., Lee MM., Rubin EM., Lee SW., Kim JF. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology* 36(11):

1117, 2018.

- Lebeis SL., Paredes SH., Lundberg DS., Breakfield, N., Gehring J., McDonald M., Malfatti S., del Rio TG., Jones CD., Tringe SG., Dangl JL. PLANT MICROBIOME. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science* 349(6250):860-4, 2015.
- Ma KW., Niu Y., Jia Y., Ordon J., Copeland C., Emonet A., Geldner N., Guan R., Stolze SC., Nakagami H., Garrido-Oter R., Schulze-Lefert P. Coordination of microbe-host homeostasis by crosstalk with plant innate immunity. *Nature Plants* 7(6): 814-825, 2021.
- McRose DL., Li J., Newman DK. The chemical ecology of coumarins and phenazines affects iron acquisition by pseudomonads. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120(14): e2217951120, 2023.
- Mesny F., Hacquard., Thomma BP. Co-evolution within the plant holobiont drives host performance. *EMBO Rep* 24(9):e57455, 2023.
- Nishioka T., Suga H, Shimizu M. The Stimulation of Indigenous Bacterial Antagonists by γ -Glutamyl- S-Allyl-l-Cysteine Increases Soil Suppressiveness to Fusarium Wilt. *Appl Environ Microbiol* 88(24): e0155422, 2022.
- Nobori T., Velásquez AC., Wu J., Kvitko BH., Kremer JM, Wang Y., He SY., Tsuda K. Transcriptome landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(13): E3055-E3064, 2018.
- Paffrath V., Moya YAT., Weber G., von Wirén N., Giehl RFH. A major role of coumarin-dependent ferric iron reduction in strategy I-type iron acquisition in Arabidopsis. *Plant Cell* 2023. doi: 10.1093/plcell/koad279. Online ahead of print.
- Pieterse CMJ., Zamioudis C., Berendsen RL., Weller DM., Van Wees SCM., Bakker PAHM. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Reviews in Phytopathology* 52, 347-375, 2014.
- Rajniak J., Giehl RFH., Chang E., Murgia I., von Wirén N., Sattely ES. Biosynthesis of redox-active metabolites in response to iron deficiency in plants. *Nature Chemical Biology* 14, 442-450, 2018.
- Schmid NB., Giehl RFH., Döll S., Mock HP., Strehmel N., Scheel D., Kong X., Hider RC., von Wirén N. Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in Arabidopsis. *Plant Physiology* 164, 160-172, 2014.
- Teixeira PJPL, Colaianni NR., Law TF., Conway JM., Sarah Gilbert S., Li H., Salas-González I., Panda D., Del Risco NM., Finkel OM, Castrillo G., Mieczkowski P., Jones CD, Dangl JL. Specific modulation of the root immune system by a community of commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(16): e2100678118, 2021.
- Wen T., Xie P., Liu H., Liu T., Zhao M., Yang S., Niu G., Lauren Hale L., Singh BK., Kowalchuk GA., Shen Q., Yuan J. Tapping the rhizosphere metabolites for the prebiotic control of soil-borne bacterial wilt disease. *Nature Communications* 14(1): 4497, 2023.
- Xu L., Dong Z., Chiniquy D., Pierroz G., Deng S., Cheng Gao C., Diamond S., Tuesday Simmons T., Wipf HM-L., Caddell D., Varoquaux N., Madera MA., Hutmacher R., Deutschbauer A., Dahlberg JA, Guerinot ML., Elizabeth Purdom E., Banfield JF., Taylor JW., Lemaux PG.,

- Coleman-Derr D. Genome-resolved metagenomics reveals role of iron metabolism in drought-induced rhizosphere microbiome dynamics. *Nature Communications* 12(1): 3209, 2021.
- Yu P., Xiaoming He X., Baer M., Beirinckx S., Tian T., Moya YAT., Zhang X., Deichmann M., Frey FP., Bresgen V., Li C., Razavi BS., Schaa G., von Wirén N., Su Z., Bucher M., Tsuda K., Goormachtig S., Chen X., Frank Hochholdinger F. Plant flavones enrich rhizosphere Oxalobacteraceae to improve maize performance under nitrogen deprivation. *Nature Plants* 7(4): 481-499, 2021.
- Zhang J., Liu Y-X., Zhang N., Hu B., Jin T., Xu H., Qin Y., Yan P., Zhang X., Guo X., Hui J., Cao S., Wang X., Wang C., Wang H., Qu B., Fan G., Yuan L., Garrido-Oter R., Chu C., Bai Y. NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nature Biotechnology* 37, 676-684, 2019.

グルタミン酸による植物保護細菌の機能向上

農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 竹内香純

Glutamate positively regulates functions of plant-protecting bacteria

Kasumi Takeuchi: Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food
Research Organization

Abstract

Pseudomonas protegens and the related strains are effective biocontrol bacteria that has adapted to rhizosphere by producing various secondary metabolites with antibiotic activity. The expression of biocontrol factors depends on the Gac/Rsm signal transduction pathway. Thus, mutants defective in the Gac/Rsm signal transduction pathway have a reduced ability to produce such biocontrol factors and to suppress plant diseases. Based on the findings of our metabolomic study, we have identified several primary metabolites as potential signals in the Gac/Rsm pathway and niche adaptation. We also investigated the role of amino acids in the biocontrol trait of *P. protegens* towards *Pythium* damping off and root rot in cucumber. Among the 11 amino acids tested, glutamate showed positive effect on the biocontrol efficacy of *P. protegens*. Based on the RNA-Seq analysis, glutamate appears to be involved in the regulation of several Gac-regulated factors. Parts of the *phl* cluster and *plt* cluster, which encode 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin, respectively, were up-regulated, but the production levels of these metabolites were not increased. Among the up-regulated genes, co-transcription of the chitinase gene cluster (*cbp-chiC*, in which the *cbp* gene was annotated as a gene encoding chitin-binding protein and the *chiC* gene encoded chitinase) was observed. The promoter activity of this cluster and the chitinase activity were characterized in detail, and we found that the activities were up-regulated in response to exogenous glutamate.

Based on the findings, these inexpensive carbon sources have potential as ingredients in formulation mixtures of biocontrol pseudomonads for the optimal suppression of root diseases in aspects of the application of biocontrol agents.

はじめに

植物の根圏に生息し、植物を保護する能力を有する細菌のうち、非病原性シュードモナス属細菌に分類されるものが数多く知られている。欧米においては古くから病害抑止土壌より非病原性シュードモナス属細菌が高頻度で単離されてきたことを背景に、根圏フローラにおいて本属細菌が優勢を占めることが土壌の健全性を示す指標のひとつとされている。本属細菌は二次代謝産物のバリエーションに富むものが多く、病原微生物の増殖を抑える抗菌性物質として作用するものもある。このことが本属細菌の環境適応能力につながっている。抗菌性以外の病害防除のメカニズムとして、病原微生物との競合に強いこと、宿主植物に抵抗性を付与すること、宿主植物の生育を促進すること、などが挙げられ、研究の発展とともにこうした特徴が複合的に寄与する事例も明らかになりつつある。本属細菌をベースにした微生物農薬の研究開発事例は国内外を問わず進められている（竹内 2018）。

著者らが研究対象としている *Pseudomonas protegens* は“plant-protecting bacteria”をその名の由来とする。*P. protegens* は病原菌のほか、害虫・センチュウに対する効果も明らかにされており、広範な病害虫への効果が認められている。モデル系統である *P. protegens* CHA0 株はスイス西部の病害抑止土壌から単離されたものであり（Stutz et al., 1986）、後述の抗菌性制御の中核をなす Gac/Rsm シグナル伝達系に関する研究が進展したことで基礎研究の知見が豊富にある。本研究では、*P. protegens* の抗菌性制御機構に着目して、*P. protegens* とその近縁系統を用いた植物保護機能の向上を目指している。

1 *P. protegens* の抗菌性制御メカニズムと一次代謝産物

P. protegens とその近縁系統は、重要土壌病害の病原菌であるピシウム属菌、フザリウム属菌、リゾクトニア属菌などの植物病原糸状菌および卵菌に対して抗菌性を有するほか、害虫（センチュウを含む）の防除にも効果があることが報告されている（Kupferschmied et al., 2013）。*P. protegens* の抗菌性二次代謝産物は緻密な制御のもと産生されている。具体的には、抗菌性二次代謝産物の合成酵素遺伝子（mRNA）のプロモーター領域には、共通して GGA モチーフとよばれる特異的な配列が存在するが、そこに RNA 結合タンパク質（リプレッサー）が結合することにより負の制御を受けている。一方、周辺環境変化に応じて GacS/GacA 二成分制御系（Gac, Global activator）が活性化すると、連動して調節型 small RNA（rsmX/Y/Z）の発現量が増大するが、これらが上記リプレッサーに直接結合、捕捉することにより、結果として抗菌性二次代謝産物の合成酵素遺伝子の発現を促進する。調節型 small RNA は上述の GGA モチーフに富んでおり、リプレッサーと結合しやすい。すなわち mRNA の GGA モチーフと競合するため、二次代謝産物合成酵素遺伝子の発現が促進される。この一連の制御系は Gac/Rsm シグナル伝達系と称される（Rsm は Regulator of secondary metabolism の略）。このシグナル伝達系の機能を失った変異株では植物保護効果も低下する（Kay et al., 2006）。

著者らはゲノム解析・メタボローム解析等を通じ、様々な一次代謝産物によって上述のシグナル伝達系が制御されることを見出した。例えば TCA サイクルの中間体であるフマル酸やコハク酸は、調節型 small RNA の発現および抗菌性物質生産に正にはたらきかける（Takeuchi et al., 2009）。一方 GABA はアミノ基転移酵素の発現が上述のシグナル伝達系に

よって制御されており、一次代謝産物でありながらその菌体内濃度が緻密に調節されていること、そして GABA 自体は根面への定着の際のシグナル物質として機能すること等が分かった (Takeuchi et al., 2012, Takeuchi, 2018)。

2 植物保護細菌と各種一次代謝産物の併用効果

以上のことから、植物保護細菌の機能の維持・向上のためには、一次代謝産物がシグナル物質として関与すると考えられた。そこで調節型 small RNA の発現に正にはたらきかけるフマル酸に着目し、その代謝酵素 (fumarase) 欠損変異株が野生株と比較し植物保護効果が高まることを期待したが、抗菌性物質生産は亢進したものの、実際の保護効果は逆に低下した (Takeuchi et al., 2009)。過剰な抗菌性物質生産が細菌に負の影響を及ぼした結果と推察される。また GABA の高蓄積系統では根面への定着能が亢進したが、植物保護効果をも高めるには至らなかった (Takeuchi, 2018)。効率的な制御のためには、他の一次代謝産物の同定が重要と考えた。候補物質として、これまで植物保護細菌の機能との関係が不明であった必須アミノ酸を対象とし、植物保護能力に作用するアミノ酸の同定を試みた。アミノ酸は植物に対し病害抵抗性を誘導することが報告されており (Seo et al., 2016)、植物保護細菌との併用効果に興味をもたれた。

各種アミノ酸を *P. protegens* Cab57 株とともに土壤に添加し、*Pythium ultimum* 感染土壤における病害防除効果をキュウリ幼苗の植物重量の比較により評価した。Cab57 株は国内分離株であり、CHA0 株と同様に Gac/Rsm シグナル伝達系の機能が保存されていることを報告している (Takeuchi et al., 2014)。今回、供試したアミノ酸 11 種類 (Glu, His, Gln, Gly, Leu, Phe, Arg, Lys, Val, Ile, Trp, いずれも L 体) の中ではグルタミン酸 (L-Glu) のみに顕著な効果が認められた。グルタミン酸との併用効果を表すキュウリ幼苗の写真を図 1 に示す。グルタミン酸単独処理では病害防除効果が認められず、*P. protegens* との組み合わせにより効果が認められたため、グルタミン酸が *P. protegens* の機能を高めていると考えられた (Takeuchi et al., 2023)。

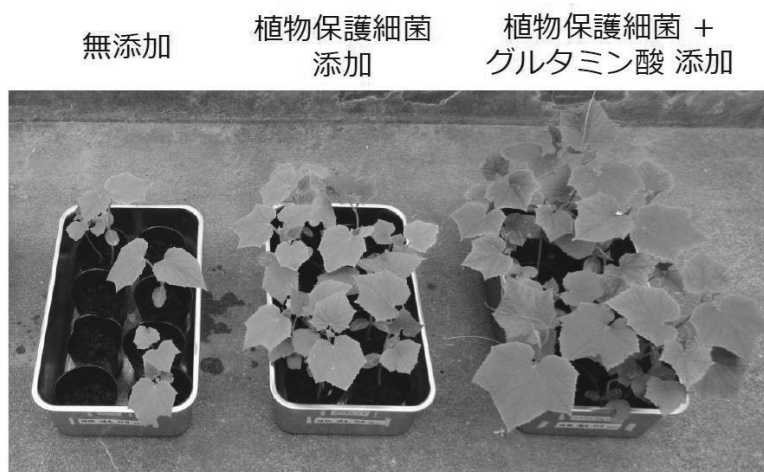


図 1. *Pythium ultimum* 感染土壤におけるキュウリ幼苗の様子
植物保護細菌 (*Pseudomonas protegens*) の添加により生育が回復し、グルタミン酸を併用することで効果が亢進した。写真は土壤にキュウリ種子を播種し、一ヶ月間栽培したもの。

3 グルタミン酸処理による植物保護細菌の応答と機能制御

グルタミン酸と *P. protegens* の機能制御のリンクとして、上述の Gac/Rsm シグナル伝達系に正にはたらきかけることが予測された。CHA0 株を用い、詳細な解析を行ったところ外因性のグルタミン酸の処理により調節型 small RNA の発現が亢進することが明らかとなった。グルタミン酸応答性の遺伝子を網羅的に調べるため、*P. protegens* にグルタミン酸処理を行ったサンプルより RNA を抽出し RNA Seq 解析に供した。無処理区と比較して Gac/Rsm シグナル伝達系の制御下にあるとされる抗菌性二次代謝産物の合成酵素遺伝子のクラスターの一部が亢進していた。その一例を表に示す。具体的には、*phl* (2,4-diacetylphloroglucinol の合成酵素遺伝子群 c59080-c59110) や *plt* (pyoluteorin の合成酵素遺伝子群 c28450-c28580) の一部が含まれていた。培養上清におけるこれら代謝産物の定量を行ったところ、無処理区と比較しグルタミン酸処理区で低下していた。培地中では不安定であることから、異なるタイムポイントでの評価が必要と考えられる。

表. *Pseudomonas protegens* CHA0 にグルタミン酸を処理し発現量が亢進した遺伝子の一覧

Locus tag	Gene	Predicted function	logFC	FDR
c21450	ansB	asparaginase	4.493	2.28E-21
c27430		LysE family translocator	3.402	4.89E-11
c48520	gltI1	glutamate/aspartate ABC transporter substrate-binding protein	2.850	1.64E-09
c36100	aroF1	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	2.849	3.15E-09
c21840	ttgC2	efflux transporter outer membrane subunit	2.658	2.34E-08
c55760	trpG	aminodeoxychorismate/anthranilate synthase component II	2.469	3.59E-07
c21860	bacA1	orfamide A non-ribosomal peptide synthetase OfaA	2.441	3.59E-07
c21850		helix-turn-helix transcriptional regulator	2.401	5.26E-07
c21870	grsB	orfamide A non-ribosomal peptide synthetase OfaB	2.389	5.41E-07
c21880	tycC1	orfamide A non-ribosomal peptide synthetase OfaC	2.348	8.55E-07
c21380	ChiD	chitinase D (のちに chitinase C と改称)	2.301	1.56E-06
c21370	cbp	chitin-binding protein	2.280	2.05E-06
c39220		outer membrane beta-barrel protein	2.224	1.08E-05
c28490	mmgC4	acyl-CoA/acyl-ACP dehydrogenase	2.182	9.97E-06
c59080		hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	2.173	9.09E-06
c55820	trpE	anthranilate synthase component I	2.164	9.09E-06
c28500	tycC2	amino acid adenylation domain-containing protein	2.095	2.40E-05
c38480		hypothetical protein	2.081	2.21E-05
c23130		rhodanese	2.019	0.000219
c25490		DUF2599 domain-containing protein	1.966	9.09E-05
c22450	yhxA	aminotransferase class III-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme	1.966	8.80E-05
c28480	pltD	hypothetical protein	1.963	0.000115
c28460	eryA1	acyltransferase domain-containing protein	1.962	8.91E-05
c28450	pltA	tryptophan 7-halogenase	1.924	0.000132

グルタミン酸処理により亢進した遺伝子の中にはキチナーゼ関連遺伝子群 (*cbp-chiC*, *cbp* は chitin-binding protein を、*chiC* はキチナーゼをコードする) や環状リポペプチド orfamide の合成酵素遺伝子群なども含まれていた。今回、キチナーゼ遺伝子群のプロモーター領域に上述の GGA モチーフが見出されたことから詳細に調べることとした。GGA モチーフの特定により、他の抗菌性二次代謝産物と同様キチナーゼ関連遺伝子群も Gac/Rsm の制御下にあることが推測された。そこで当該プロモーター領域を *lacZ* 遺伝子上流に連結し活性を調べたところ、GacA 変異株では発現量が低下しており、培養上清におけるキチナーゼ活性も失われたことから、Gac/Rsm の制御下にあると考えられた。次に当該プロモーター活性に対するグルタミン酸の影響を調べたところ濃度依存的に活性が亢進しており (図 2)、RNA Seq 解析の結果が支持された (Takeuchi et al., 2023)。卵菌類の場合、細胞壁の主要成分は一般にセルロースとグルカンであるが、*Pythium ultimum* ではキチンも含まれることが報告されており (Cherif et al., 1993)、グルタミン酸処理による植物保護効果の向上とキチナーゼ遺伝子の発現亢進には関連性があると考えられる。一方、キチナーゼ以外の要因も植物保護効果の向上に寄与している可能性があるため今後も解析に取り組む予定である。

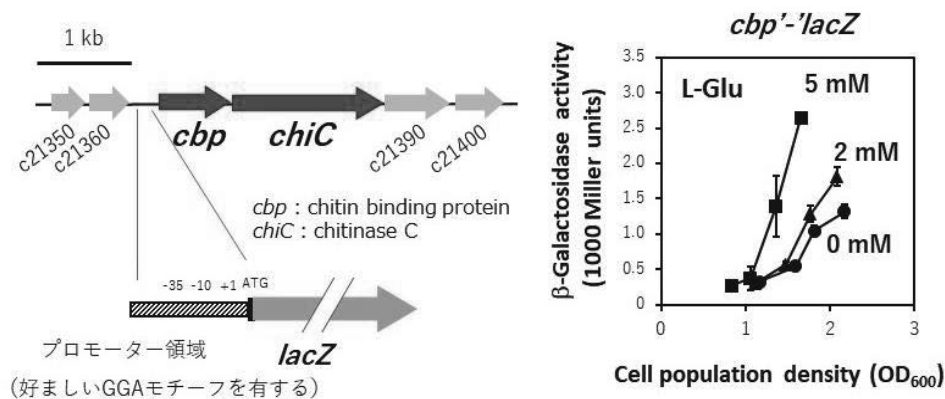


図 2. *Pseudomonas protegens* CHA0 のキチナーゼ関連遺伝子と発現解析

キチナーゼ関連遺伝子の周辺領域およびプロモーター領域を拡大して示した (左)。chitin-binding protein (*cbp*) およびキチナーゼ (*chiC*) をコードする遺伝子上流のプロモーター領域には好ましい GGA モチーフが見出された。プロモーター領域を *lacZ* レポーター遺伝子に連結し、その発現パターンを調べたところ、外因性グルタミン酸 (L-Glu) の濃度依存的に活性が亢進した (右)。

おわりに

根圏に生息する多様な生物がフロラ形成に寄与するが、それら生物由来の代謝産物が作用し健全な土壌形成に大きな役割を果たしていると考えられる。今回、グルタミン酸のプラスの効果は明らかにしたが、そのメカニズムの解明については緒についたばかりである。グルタミン酸あるいはこれを前駆体とする化合物が Gac/Rsm シグナル伝達系に作用し、そ

の下流のキチナーゼ遺伝子等の亢進に繋がっていること等が考えられる。グルタミン酸は植物・微生物間相互作用研究において、これまでも植物側のキチナーゼ遺伝子の発現を誘導するなど防御応答の局面での機能が報告されている (Kadotani et al., 2016)。また傷害を受けた葉では高濃度のグルタミン酸が蓄積することが報告されており (Toyota et al., 2018)、根においても同様の現象が生じるならば、病害虫による物理的な根の傷害がグルタミン酸の源となり得るため、周辺の植物保護細菌に対しシグナル物質として機能し、SOS のメッセージを伝えているのかもしれない。

ちょうど 10 年前の本研究会にて発表の機会を頂き、振り返るとこの間のゲノム情報の拡充や各種オミクス解析技術の飛躍的な進展の恩恵を改めて実感している。持続可能な農業の実現に向けて、有用微生物の機能向上の技術開発に取り組んでいきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、農業・食品産業技術総合研究機構 内外の多くの方々にご協力いただいた。本研究の一部は、科研費 (18H02209、21H02200) の助成、ならびに NARO イノベーションプログラムによる支援を受けたものである。

引用文献

- 1) Cherif M, Benhamou N, Belanger R R (1993) Occurrence of cellulose and chitin in the hyphal walls of *Pythium ultimum*: A comparative study with other plant pathogenic fungi. *Can. J. Microbiol.* 39: 213-222.
- 2) Kadotani N, Akagi A, Takatsuji H, Miwa T, Igarashi D (2016) Exogenous proteinogenic amino acids induce systemic resistance in rice. *BMC Plant Biol.* 16: 60.
- 3) Kay E, Dubuis C, Haas D (2005) Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17136-17141.
- 4) Kupferschmied P, Maurhofer M, Keel C (2013) Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Front. Plant Sci.* 4: 287.
- 5) Seo S, Nakaho K, Hong S W, Takahashi H, Shigemori H, Mitsuhashi I (2016) L-Histidine induces resistance in plants to the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* partially through the activation of ethylene signaling. *Plant Cell Physiol.* 57: 1932-1942.
- 6) Stutz, E.W., Défago G, Kern H (1986) Naturally occurring fluorescent Pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology* 76: 181-185.
- 7) Takeuchi K, Kiefer P, Reimmann C, Keel C, Dubuis C, Rolli J, Vorholt JA, Haas D (2009) Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem*, 284: 34976-34985. Takeuchi K, Yamada K, Haas D (2012) ppGpp controlled by the Gac/Rsm regulatory pathway sustains biocontrol activity in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant-Microbe Interact*, 25: 1440-1449. Takeuchi K, Noda N, Someya N (2014) Complete genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas protegens* Cab57 discovered in Japan reveals strain-specific diversity of this species. *PLoS ONE* 9: e93683.

- 10) 竹内香純 (2018) シュードモナス～基礎と応用をつなぐ, アグリバイオ, 16: 128-132.
- 11) Takeuchi K (2018) GABA, a primary metabolite controlled by the Gac/Rsm regulatory pathway, favors a planktonic over a biofilm lifestyle in *Pseudomonas protegens* CHA0. *Mol Plant-Microbe Interact*, 31: 274-282.
- 12) Takeuchi K, Ogiso M, Morohoshi T, Seo S (2023) Glutamate positively regulates chitinase activity and the biocontrol efficacy of *Pseudomonas protegens*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 36: 323-333.
- 13) Toyota M, Spencer D, Sawai-Toyota S, Jiaqi W, Zhang T, Koo A J, Howe G A, Gilroy S (2018) Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* 361: 1112-1115.
- 14) Voisard C, Bull CT, Keel C, Laville J, Maurhofer M, Schnider U, Défago G, Haas D (1994) Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. In: *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms* (O'Gara, F., Dowling, D.N., and Boesten, B., eds) pp. 67-89, VCH Weinheim, Germany.

微小液滴技術を用いた拮抗微生物の迅速スクリーニング法の開発

筑波大学 生命環境系 成川 恵
理化学研究所 バイオリソース研究センター 市橋 泰範

Development of a screening platform for antagonistic bacteria using microdroplet technology

Megumi Narukawa-Nara: Faculty of Life and Environmental Sciences, Tsukuba University
Yasunori Ichihashi: Bioresource Research Center, RIKEN

Abstract

Biopesticides such as antagonistic bacteria against pathogens have been attracting attention because of low environmental risks. However, the conventional approach using plate cultivation to isolate antagonistic bacteria shows low-throughput and a limited number of candidate strains has been isolated. Therefore, isolation of a wider variety of effective antagonistic bacteria has been demanded. In this study, we aimed to establish a screening platform for antagonistic bacteria utilizing a high-throughput microdroplet technology. The soil pathogen *Ralstonia solanacearum* was used as a model pathogen and the model antagonist bacteria 3-8A strain was isolated from soil. The GFP-labeled *R. solanacearum* was co-cultivated with or without 3-8A strain in the same droplet, then the GFP-negative droplets whose GFP fluorescence were reduced by 3-8A strain were selected. The antagonistic function of the bacteria from the selected droplets were validated by co-cultivation with *R. solanacearum* in plate. Using the established platform, we screened a total of 2 million droplets using soil bacteria and obtained 1,920 candidates, of which 1,216 were culturable. Our results suggest that the microdroplet technology is a powerful tool for screening antagonistic bacteria.

はじめに

全世界において、作物の病害により農作物の10%以上が減収となっている (Strange and Scott, 2005)。特に、植物の土壌病害には糸状菌や細菌、ウイルスが原因となる多様な病害があり、重篤な被害を及ぼすものが多い。土壌病原菌は10年を超えて生存可能な耐久体を作ることや、蒸気や薬剤による消毒の有効な土壌深度よりも深い場所に病原菌が存在すること、病原菌が様々な宿主に感染可能であることなどから、土壌病害を完全に抑えることは著しく困難であり、有効な防除法の開発が急務となっている。

その中で、近代農業における化学肥料や農薬の多量施用に起因する土壌汚染や農作物汚染に対する反省から、植物防除においても化学農薬の使用量をできるだけ少なくすることが求められている。また、近年よく耳にするSDGs「持続可能な開発目標」の中でも、地球環境保全のための農業技術の開発が求められており、環境負荷の少ない防除法として拮抗微生物を利用した生物的防除法に大きな期待が寄せられている。

この防除法には、もとの環境に生息する土着の拮抗微生物を活性化する方法や増殖させ

た拮抗微生物を様々な手段で導入する方法があり、実際に *Agrobacterium radiobacter* strain 84 による核果類果樹や花き類の根頭がん種病の予防（牧野・森田，1985）、非病原性 *Fusarium oxysporum* の前接種によるサツマイモつる割れ病の防除（小川，1989）等が実用化されている。しかし、拮抗微生物の単離はプレート培養を用いた対峙培養を主としているため単離のスループット性に欠けることや、適用病害種が狭く、生物であるがゆえに安定性に欠けること、圃場での定着性が低いことなどが問題となっている。さらに、病害防除の大きな問題として、微生物の進化が早いことによる耐性菌の頻繁な出現が挙げられる。そのため、様々な作用点の防除法を組み合わせることが有効な解決策の一つであり、多種多様な拮抗微生物の効率的な単離・同定法の確立が強く求められている。さらに、拮抗微生物リソースが充実すれば、土地ごとに定着しやすい拮抗微生物を選択することが可能になり、非常に有用な微生物資材となる。そこで、本研究では微小液滴技術を用いて土壤病害菌の拮抗微生物を土壤中からハイスループットに単離する技術を開発し、大量の新規拮抗微生物を単離・同定し、多様な農業現場に対応する微生物を提供することを目的として研究を行った。

1. 微小液滴技術とは？

微小液滴技術とは、直径数 μm までの微小な液滴を作成する技術であり、化粧品や医薬品、インクジェットプリンターなどの工業用途から、デジタル PCR やシングルセル解析、微生物培養などの基礎研究まで、さまざまな分野で活用されている（Day, 2012）。

本研究では、この技術を用いて任意の細菌を直径 30 μm の微小な液滴に封入して培養している。現在、Droplet Generator（株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ）を用いて 1 分間で数千個の液滴を作成することができるため、100 万を超えるオーダーで区画分けされた微生物の培養が容易に可能となり、従来法で用いる 96 ウェルプレートの 1 万枚分の実験が 1.5 mL チューブ 1 本で可能である。このため、既存のスクリーニング方法では実現困難な大規模スクリーニングを実現できる（図 1）。

また、図 1 にあるように、液滴は水溶液もしくはゲルでの作成が可能であり、フッ素オイル中で界面活性剤に包まれた状態で存在している。ゲルボールもしくは界面活性剤の二重膜で包まれたダブルエマルジョンの状態であれば、周辺液を水溶液に置換することが可能である。本研究では、Droplet Selector（株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ）を液滴の選抜・分注に使用していること、および液滴外に出てしまった菌が生存不可能なことから、Water in Oil type (W/O) の液滴を採用している。

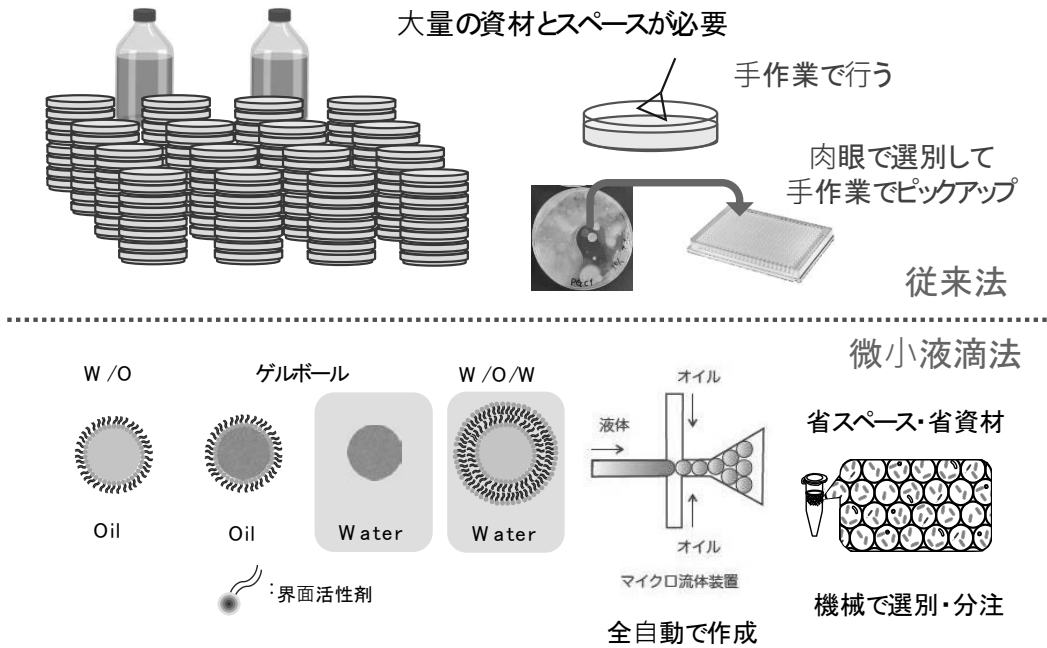


図1 従来法と微小液滴法の比較

2. 拮抗微生物単離のストラテジー

拮抗微生物を単離するために、以下のような実験系を立案した。まず病原菌を蛍光標識し、蛍光標識病原菌と環境微生物を同一の液滴に封入して共培養を行う。蛍光標識病原菌が増殖した液滴は病原菌由来の強い蛍光を発するが、拮抗微生物が増殖した液滴は病原菌の増殖抑制に伴い、蛍光が減衰していると考えられる。つまり、得られた拮抗微生物の拮抗作用が強い場合は蛍光量が一段と低くなり、間接的な作用を持つ拮抗微生物の場合は蛍光量の減衰が少ないと考えられ、病原菌と拮抗微生物を液滴内で共培養したときの拮抗作用を「蛍光の減衰」で可視化、Droplet Selector で自動選抜・分注しストック化することで、ハイスループットな拮抗微生物スクリーニングが可能になる（図2）。

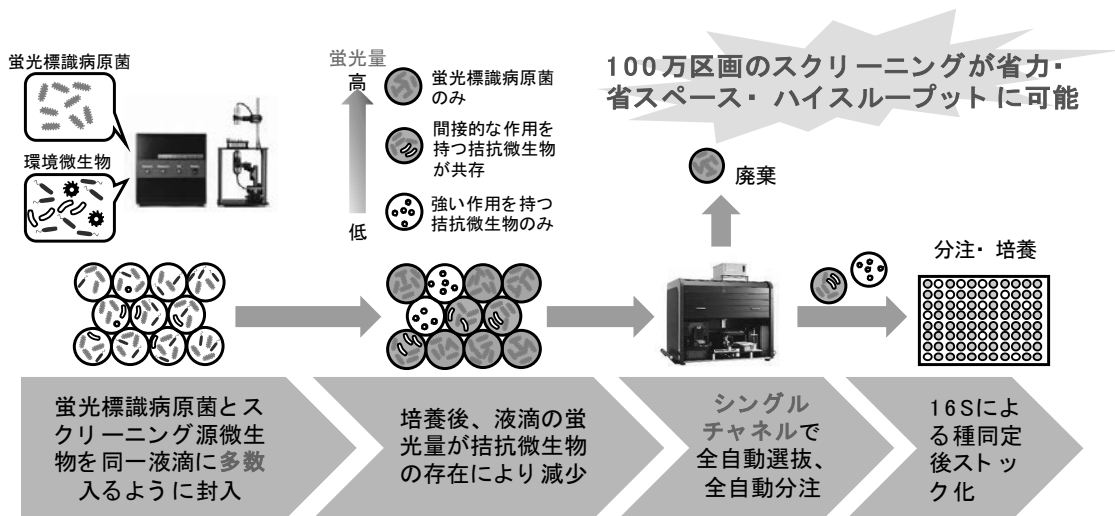


図2 拮抗微生物単離の流れ

従来の微小液滴技術を用いた微生物スクリーニングでは、液滴内の微生物数が 0~1 となるまで微生物懸濁液を希釈する工程を含むが、空の液滴が多数生じることがスループット性を低くしていた (Terekhov *et al.*, 2018)。しかし、本研究では空の液滴が生じないように一つの液滴内に複数の病原菌及びスクリーニング源の環境微生物を封入することで、単一波長での蛍光検出を可能にし、スループット性の飛躍的な向上を達成している。また、複数菌を共培養することから、単一では培養できず共生することで培養が可能になるような微生物のスクリーニングも行えるようになった。

3. スクリーニング源の選定とモデル実験系の確立

本研究では、土壌病原菌である青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) を実験系構築のモデル病原菌として選定した。青枯病菌は、トマト、ジャガイモなどナス科の作物の他に 200 余種もの植物に感染し被害が発生することから防除の必要性は非常に高いが、その発生を安定的に抑えることは現在困難である (Peeters, 2013)。一方で、青枯病菌の形質転換法が確立しており、実験室での取り扱いが容易なこと、すでに拮抗微生物が資材化されていることから、モデルとして使用するのに最適であると考えられた。GFP 標識青枯病菌 8107GFP 株は、瀬尾茂美博士 (農研機構) よりご譲渡いただき、実験に使用した。

青枯病菌が土壌病原菌であることから、拮抗微生物のスクリーニング源として土壌微生物を用いることにした。同一環境中に生育する菌を用いることで、定着性を高められると考えた。さらに、土壌中にはわずか 1 グラムで 100 万種の微生物が存在すると言われていたが、人類が純粋分離に成功できた土壌微生物はわずか 1%未満にすぎず、99%以上が未培養となっている。しかし、培養可能な 1%の土壌微生物には抗生物質産生菌のように人類の発展に欠かすことのできない種が多種多様に存在するため、土壌中に眠る膨大かつ多様な未知微生物群からスクリーニングを行うことで、これまで未取得で有用な拮抗微生物の単離が期待できる。

モデル実験系を構築するにあたって、強い拮抗作用を持つモデル拮抗微生物を得るために、理研バイオリソース研究センター敷地内の土壌から、青枯病菌塗布プレートにおいてハローを形成して青枯病菌の生育が抑える株 (*Pseudomonas* sp.) を単離して#3-8A 株と名付け、以降の実験に使用した。さらに、栄養競合などの異なる拮抗作用を持つモデル拮抗微生物として、清水将文博士 (岐阜大学) より、*Mitsuaria* sp. TWR114 株と *Ralstonia* sp. TCR113 株をご譲渡いただき、こちらもモデル拮抗微生物として用いた。

青枯病菌 8107-GFP 株の増殖と蛍光強度が高く保たれる微小液滴培養条件を検討するため、液滴の大きさや封入菌体数、生育培地組成、生育日数、生育温度などを検討した結果、液滴の大きさ : 30 μ m、封入菌体数 : 8、生育培地 : mGAM、生育日数 : 3 日、生育温度 : 25°C で実験を行うことにした。次に、モデル拮抗微生物#3-8A 株との共培養によって、液滴の青枯病菌 8107-GFP 株由来 GFP 蛍光が減衰するかどうかを確認したところ、#3-8A 株を封入した液滴の割合の増加に伴い、青枯病菌 8107-GFP 株由来の GFP 蛍光を発する液滴が少なくなり、#3-8A 株が全ての液滴に共封入されると、全ての液滴で青枯病菌 8107-GFP 株由来の GFP 蛍光が消失することがわかった。さらに、青枯病菌 8107-GFP 株と#3-8A 株に加えて土壌微生物を同時に封入しても、結果は同じように#3-8A 株封入液滴数の増加に

に伴い、青枯病菌 8107-GFP 株由来の GFP 蛍光をもつ液滴が減少することから、強い拮抗性を持つ微生物が共封入されていれば青枯病菌の GFP 蛍光は消失し、ストラテジー通りのモデル実験系が構築できたことがわかった (図 3)。また、異なる拮抗作用を持つ *Mitsuaria* sp. TWR114 株と *Ralstonia* sp. TCR113 株で同様の試験を行ったところ、液滴の青枯病菌 8107-GFP 株由来 GFP 蛍光が減衰することが分かったため、拮抗作用の強弱が GFP 蛍光強度と相関することで蛍光量を指標にしたさまざまな作用を持つ拮抗微生物が単離できる可能性が示唆された。

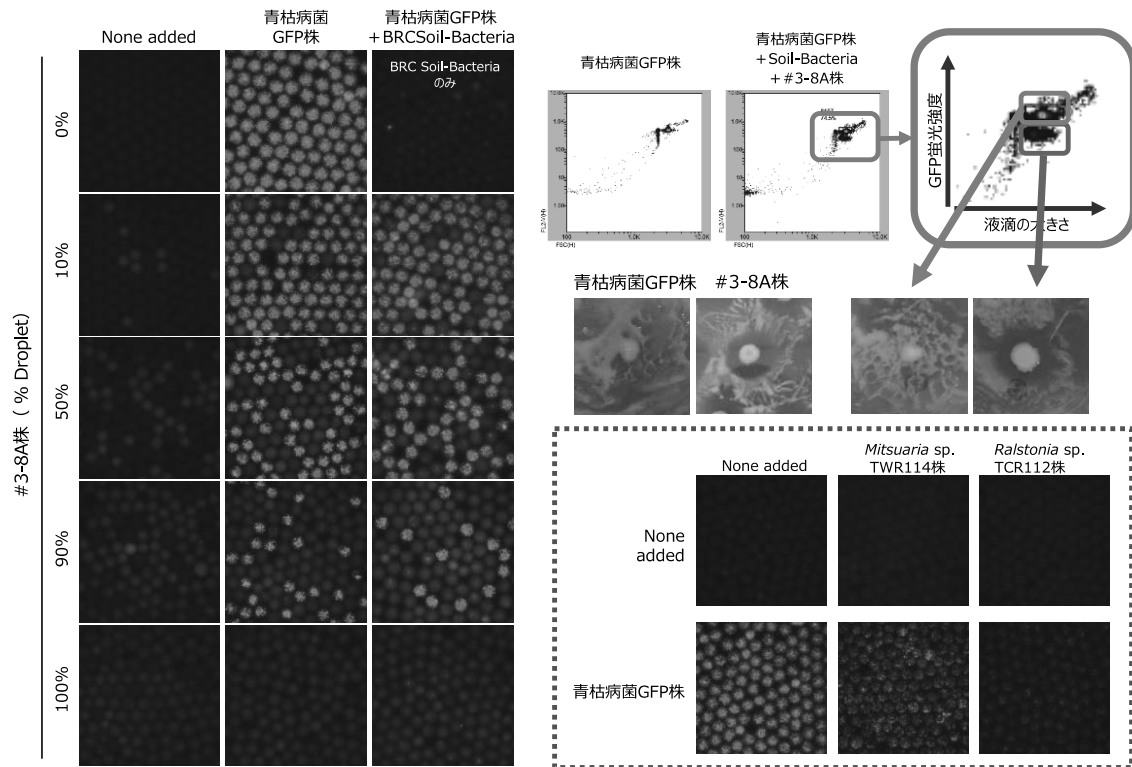


図 3 モデル実験系の構築

次に Droplet Selector を用いて蛍光量が減衰した液滴の選抜と分注ができるか、続いて拮抗微生物の培養とストック化が行えるかどうかを調べた。図 1 より、青枯病菌 8107-GFP 株と#3-8A 株、土壌微生物を共培養した液滴をソーティングすると、青枯病菌 8107-GFP 株単独で培養した液滴と比較して GFP 蛍光が抑制されたプロットが出現し、二つを区別できることがわかった。そこで、青枯病菌 8107-GFP 株と同じ GFP 蛍光強度を持つプロットを緑、その下に出現した蛍光強度の低いプロットを赤のゲートとして設定し、それぞれ別々にソーティングを行って培養し、青枯病菌塗布プレートにおけるハロー形成の有無を確認した。その結果、GFP 蛍光強度が高い液滴由来の微生物は、青枯病菌塗布プレートでハローを形成せず、蛍光顕微鏡下で青枯病菌 8107-GFP 株と同じ GFP 蛍光を保持していた。それと対照的に、GFP 蛍光強度が低い液滴由来の微生物は、青枯病菌塗布プレートでハローを形成し、蛍光顕微鏡下では GFP 蛍光は保持していなかった。これらのことから、蛍光量を指標とした拮抗微生物の選抜、分注および培養は可能であり、ストラテジー通りのモデル実験系が構築できたと考えられた。

4. 土壌を用いた拮抗微生物スクリーニング

モデル実験系が構築できたので、実際の土壌を用いて拮抗微生物のスクリーニングを行った。土壌を取得した季節によって、拮抗微生物候補の液滴の数変動することから、より安定的にこれらが得られるように実験条件を検討した結果、微小液滴での培養に用いる培地で土壌を前培養すると、滅菌水と比較して菌叢が大きく変化し、より多くの拮抗微生物が得られるようになった。そこで、総計 200 万個の液滴からスクリーニングを行い、拮抗微生物候補株を 1920 株選抜し、そのうち培養可能なものとして 1216 株を獲得できた (図 4)。NGS を用いて種同定をおこなった結果、15 属 1211 株の拮抗微生物候補株を同定できたが、この中には *Ralstonia* 属も含まれていたことから、偽陽性の液滴が複数選抜されていることが示唆されており、今後の解析で有用な拮抗微生物をさらに絞り込む予定である。

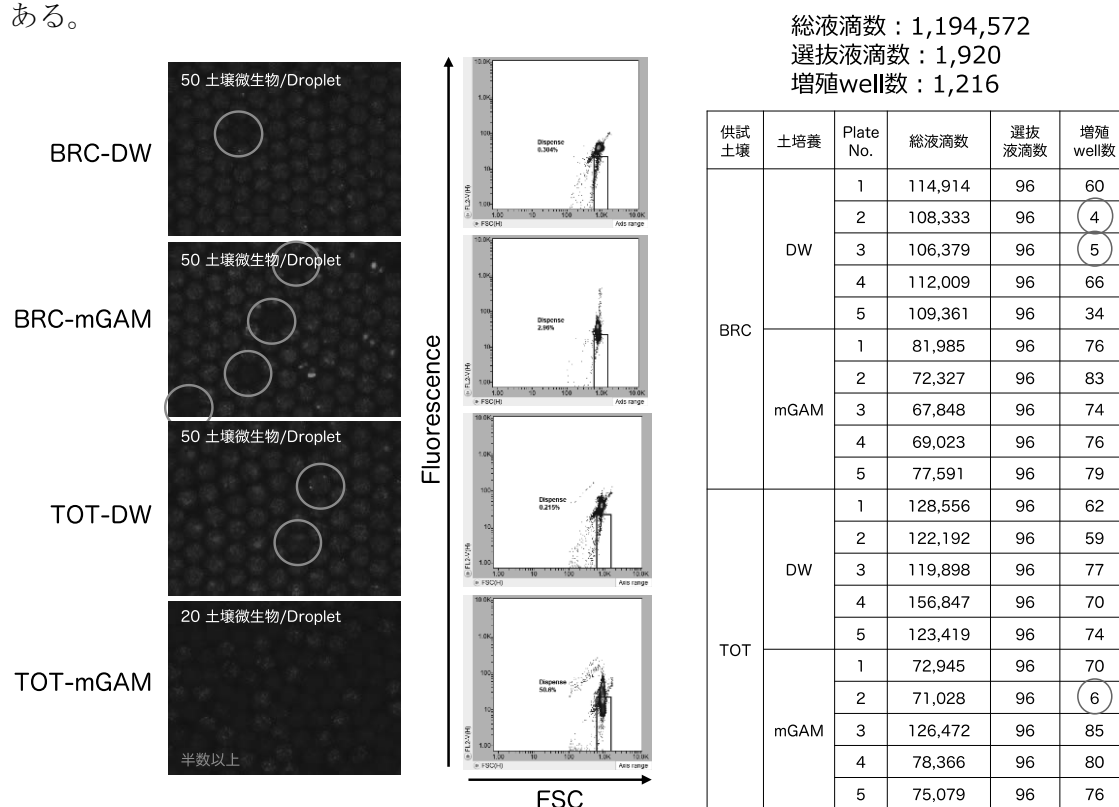


図 4 実際の土壌を用いたスクリーニング

おわりに

このように、最新のマイクロ工学技術を微生物培養に応用することで、拮抗微生物の高効率な単離・同定を実現できた。土壌病原菌は病害が起こっていない圃場から検出される事例もあり、その病害発生の詳細なメカニズム解明が望まれている。そのため病原菌と拮抗微生物の相互作用を解明することで、農業現場に有用な資材の開発のみならず、土壌病害がいかにして起こるのか、その本質の解明の一助となると考えられる。

また、本研究で確立する微小液滴技術を用いた大規模拮抗微生物スクリーニング技術は、植物の土壌病原菌のみならず動物に対する病原菌にも応用可能であり、現在世界規模で問題となっている感染症の有効な防除法確立に大きく貢献することが期待できる。

謝辞

本研究は、理化学研究所「Integrated Symbiology (iSYM)」、内閣府「官民研究開発投資拡大プログラム (PRISM)」およびJSPS科研費 (JP22516055) の支援を受けて実施したものである。

引用文献

- 1) Strange, R. N., Scott, P. R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 83-116
- 2) 牧野孝宏・森田壽 (1985). *Agrobacterium radiobacter* strain 84によるバラ根頭がんしゅ病の生物防除. 静岡県農業試験場研究報告, 30 : 53-59
- 3) 小川奎 (1989). サツマイモつる割病の生物的防除に関する研究. 日本植物病理学会報, 55 (4) : 385-387
- 4) Day, P., Manz, A., Zhang, Y. (Eds.). (2012). Microdroplet technology: principles and emerging applications in biology and chemistry.
- 5) Terekhov, S. S., Smirnov, I. V., Malakhova, M. V., Samoilov, A. E., Manolov, A. I., Nazarov, A. S., Danilov, D. V., Dubiley, S. A., Osterman, I. A., Rubtsova, M. P., Kostryukova, E. S., Ziganshin, R. H., Kornienko, M. A., Vanyushkina, A. A., Bukato, O. N., Ilina, E. N., Vlasov, V. V., Severinov, K. V., Gabibov, A. G., Altman, S. (2018). Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(38), 9551-9556
- 6) Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., Valls, M. (2013). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular plant pathology*, 14(7), 651-662

これまでのバイオコントロール研究会開催状況

第 1回	1989年6月10日	北海道農学部	
第 2回	1990年4月 6日	岡山県農業会館	(参加者 191名)
第 3回	1992年5月29日	岩手県県民会館	(参加者 244名)
第 4回	1994年4月 6日	農水省筑波事務所	(参加者 246名)
第 5回	1997年4月 5日	名城大学農学部	(参加者 255名)
第 6回	1999年4月 5日	新潟大学教養校舎	(参加者 220名)
第 7回	2001年4月 5日	東北大学川内キャンパス	(参加者 200名)
第 8回	2003年3月31日	明治大学リバティールーム	(参加者 170名)
第 9回	2005年3月28日	静岡グランシップ	(参加者 200名)
第10回	2007年3月31日	宇都宮大学農学部	(参加者 150名)
第11回	2009年3月29日	山形大学小白川キャンパス	(参加者 170名)
第12回	2012年3月31日	福岡国際会議場	(参加者 180名)
第13回	2014年6月 5日	北海道大学学術交流会館	(参加者 140名)
第14回	2016年3月24日	岡山大学一般教育棟	(参加者 142名)
第15回	2018年3月28日	神戸大学農学部	(参加者 103名)
第16回	2021年3月29日	オンライン	(参加者 181名)

持続可能な食料システム実現に貢献するバイオコントロール
～現場で活用するための先導的アプローチ～
(バイオコントロール研究会レポート第17号)

原稿受理	2023年1月26日
印刷	2023年2月13日
発行所	日本植物病理学会 東京都北区中里2丁目28番 日本植物防疫協会内 FAX 03-5980-0282 番 E-mail byori@juno.ocn.ne.jp
発行者	日本植物病理学会長 平塚 和之
編者責任者	日本植物病理学会バイオコントロール研究会 吉田 重信・清水 将文
印刷所	株式会社コムラ 〒501-2517 岐阜県岐阜市三輪ふりんとぴあ3 電話 058-229-5858番

Proceedings of PSJ Biocontrol Workshop XVII

CONTENTS

Papers of the 17th PSJ Biocontrol Workshop

“Biocontrol as a tool for achieving sustainable food systems ~Leading approaches to establishing practical biocontrol strategies useful for disease control in actual crop production”

YOSHIDA, S.: Future challenges and perspectives on biocontrol study -----	1
MURATA, T.: Control of tomato powdery mildew with <i>Beauveria bassiana</i> using non-heating fog treatment technology -----	10
MIYAZAKI, A.: Labor-saving control technology for tomato gray mold using microbial pesticides with overhead spray equipment -----	17
TOJO, M.: Development of vermicompost focusing on plant disease suppression effects ----	22
NAKAHARA, H., MORI, T. and MATSUZOE, N.: Biocontrol of plant diseases by using phenotype conversion mutants of <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> -----	29
HASHIMOTO, M.: Biocontrol strategies suggested from basic research on the root microbiota -----	38
TAKEUCHI, K.: Glutamate positively regulates functions of plant-protecting bacteria-----	47
NARUKAWA-NARA, M. and ICHIHASHI, Y.: Development of a screening platform for antagonistic bacteria using microdroplet technology-----	54

PROCEEDING OF THE PSJ BIOCONTROL WORKSHOP is published by the

Phytopathological Society of Japan

BUSINESS CORRESPONDENCE should be made to:

The Phytopathological Society of Japan

c/o JAPAN PLANT PROTECTION ASSOCIATION

2-28-10 Nakazato, Kita-ku, Tokyo, 114-0015 Japan

Editors

Shigenobu Yoshida, Institute for Plant Protection, NARO

Masafumi Shimizu, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University
