

修士論文

内生放線菌を用いたキャベツセル成型苗黒すす病の 新規生物防除技術の開発

三重大学大学院 生物資源学研究科 資源循環学専攻

生態循環学教育研究分野 博士前期課程 2 年

2008 年 3 月 中筋 智子

目次

第一章 緒言	1
第二章 植物内生放線菌の分離および有望菌株の選抜と同定	4
第一節 序	4
第二節 キャベツからの内生放線菌の分離と有望菌株の選抜	5
第一項 材料と方法	
1. 放線菌用培地の組成および調製法	
2. 内生放線菌の分離および保存	
3. 黒すす病菌および放線菌分離株の接種源の調製	
4. 2005 年選抜試験	
(1) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する放線菌株の選抜	
①一次選抜試験	
②二次選抜試験	
③三次選抜試験	
④確認試験	
(2) 黒すす病菌汚染種子に対する有望株 MBCY58-1 の防除活性の検定	
5. 2006 年選抜試験	
(1) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する放線菌株の選抜	
①黒すす病防除活性を有する放線菌株の選抜	
②確認試験	
(2) 黒すす病菌汚染種子に対する有望株 MBCN152-1 の防除活性の検定	
6. 最終候補株の選抜	
(1) MBCN152-1 胞子懸濁液の調製	
(2) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する最終候補株の選抜	
第二項 結果	
1. 内生放線菌の分離および保存	
2. 2005 年選抜試験	
(1) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する放線菌株の選抜	

①一次選抜試験	
②二次選抜試験	
③三次選抜試験	
④確認試験	
(2) 黒すす病菌汚染種子に対する有望株 MBCY58-1 の防除活性	
3. 2006 年選抜試験	
(1) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する放線菌株の選抜	
①黒すす病防除活性を有する有望放線菌株の選抜	
②確認試験	
(2) 黒すす病菌汚染種子に対する有望株 MBCN152-1 の防除活性	
4. 最終候補株の選抜	
第三節 MBCN152-1 の同定	26
第一項 材料と方法	
1. MBCN152-1 のコロニー性状および形態の観察	
2. 光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (SEM) による MBCN152-1 の形態観察	
(1) 光学顕微鏡観察	
(2) SEM 観察	
3. MBCN152-1 の 16S rDNA 塩基配列の解析	
(1) MBCN152-1 菌体からのゲノム抽出	
(2) PCR 増幅とシーケンス解析	
第二項 結果	
1. MBCN152-1 のコロニー性状および形態	
2. MBCN152-1 の形態	
3. MBCN152-1 の 16S rDNA 塩基配列	
第四節 考察	34
第三章 実用化に向けた <i>Streptomyces</i> sp. MBCN152-1 の特性の解析	37
第一節 序	37
第二節 MBCN152-1 の処理方法の検討	38

第一項 材料と方法

1. MBCN152-1 胞子の育苗培土混和による黒すす病防除効果の検討

(1) 噴霧接種した黒すす病菌に対する効果

(2) 黒すす病菌汚染種子に対する効果

2. MBCN152-1 胞子葉面散布による黒すす病防除効果の検討

第二項 結果

1. MBCN152-1 胞子の育苗培土混和による黒すす病防除効果

(1) 噴霧接種した黒すす病菌に対する効果

(2) 黒すす病菌汚染種子に対する効果

2. MBCN152-1 胞子葉面散布による黒すす病防除効果

第三節 MBCN152-1 のキャベツ苗への定着性の検定

46

第一項 材料と方法

第二項 結果

第四節 黒すす病に対する *Streptomyces lydicus* WYEC108 株および MBCN152-1 株の

47

防除効果の比較

第一項 材料と方法

1. *Streptomyces lydicus* WYEC108 胞子懸濁液の調製法

2. 噴霧接種した黒すす病菌に対する MBCN152-1 および WYEC108 の防除効果の比較

3. 黒すす病菌汚染種子に対する MBCN152-1 および WYEC108 の防除効果の比較

第二項 結果

1. 噴霧接種した黒すす病菌に対する MBCN152-1 と WYEC108 の防除効果

2. 黒すす病菌汚染種子に対する MBCN152-1 および WYEC108 の防除効果

第五節 MBCN152-1 胞子の長期保存性の検討

51

第一項 材料と方法

1. MBCN152-1 凍結乾燥胞子の調製

2. 保存温度が MBCN152-1 凍結乾燥胞子中の生菌数に及ぼす影響の検討

第二項 結果

1. 保存温度が MBCN152-1 凍結乾燥胞子中の生菌数に及ぼす影響

第六節 考察

53

第四章 MBCN152-1 の黒すす病防除メカニズムの解析	56
第一節 序	56
第二節 キャベツ病原糸状菌に対する MBCN152-1 の拮抗性の検定	58
第一項 材料と方法	
第二項 結果	
第三節 MBCN152-1 が素寒天上で黒すす病菌に及ぼす影響の解析	59
第一項 材料と方法	
第二項 結果	
第四節 黒すす病菌接種した MBCN152-1 処理苗の光学顕微鏡観察	62
第一項 材料と方法	
第二項 結果	
第五節 黒すす病菌を接種した MBCN152-1 処理苗の走査型電子顕微鏡 (SEM)	66
第一項 材料と方法	
第二項 結果	
第六節 考察	70
 第五章 総合考察	 74
摘要	78
引用文献	80
謝辞	87

第一章 緒言

2008 年現在で約 66 億人の世界人口は、2050 年には 93 億人にまで達すると推定されている（梅津 2004）。その一方で、砂漠化や環境の悪化によって、耕地はむしろ減少しているのが現状である。この膨大な地球人口を支える食糧を生産するには、多収量品種の育成や多収栽培技術の開発により単位面積当たりの作物生産量を増加させるとともに、病虫害の防除技術を充実させなければならない。仮に、病虫害を一切防除しなかった場合、水稻では 28%、リンゴでは 97%、キャベツでは 63%、トマトでは 39%が減収すると言われている（山田 2000）。すなわち、病虫害対策なくして、農業は成り立たないのである。このような損失を少しでも減少させるためには化学農薬の施用が必要不可欠であるが、今日では化学物質による生態系の攪乱や環境汚染などが懸念されているため、化学農薬の規制が厳しくなっている。

その一例として臭化メチルが挙げられる。土壌燻蒸剤として最も広く利用されてきた臭化メチルは、処理が簡便、低温時にも有効、安価、防草効果などの利点を併せ持つ化学農薬で、土壌伝染性病害が危惧される作物生産の現場で多く使用されてきた。しかし、本剤はオゾン層破壊に関与する物質として位置付けられ、先進各国では 2010 年に使用禁止となることが決定した（西 2002）。我が国では、臭化メチルの農薬は既に失効しているため、現在、臭化メチル代替技術の動向が注目されている。また、中国をはじめとするアジア産の輸入野菜から、食品衛生法食品規格に示された残留農薬基準を超える農薬が頻繁に検出され、大きな社会問題となっている（梅津 2004）。

このような問題を背景に、生物源農薬の利用や耕種的防除、抵抗性品種を組み合わせる化学物質の使用量を最小限に止める総合的病虫害管理（Integrated Pest Management: IPM）の考え方が近年注目されている（久能ら 1998）。中でも、拮抗微生物を利用した病害の生物防除は重要な位置を占めており、これまでに各種の微生物が資材化されている（百町ら 2003）。例えば、非病原性 *Erwinia carotovora* はバイオキパー水和剤として製剤化され、ハクサイなどのアブラナ科植物やジャガイモ、レタスに発生する軟腐病の防除に利用されている（日本植物防疫協会 2002）。この他にも、トリコデルマ生菌（*Trichoderma lignorum*）やボトキラー水和剤（*Bacillus subtilis*）、モミゲンキ水和剤（*Pseudomonas fluorescens*）などの糸状菌や細菌を有効成分とする微生物殺菌剤が開発・商品化されている。また、多くの研究機関や民間企業で現在でも拮抗微生物を活用した生物防除技術に関する研究が盛んに行われている。ところが、我が国における微生物殺菌剤の登録数は意外に少なく、わずか 16 剤しかない（農林水産消費安全技術センターホームページ：

<http://www.acis.famic.go.jp/toroku/torokukin.htm>)。微生物農薬の新規登録が進まない理由として、*in vitro* で強い防除効果を示す拮抗微生物でも、圃場試験では十分な効果が得られない場合が多いことが挙げられる。これは、土壤中に生息している微生物による干渉作用や栄養の競合、環境の変動などによって、処理した有用微生物が防除効果を発揮するのに十分な菌密度を維持できないことが圃場試験で防除効果が低下する原因だとされている(百町 2003)。そのため、百町ら(2003)は、植物の根圏あるいは根面に定着できる菌や、植物体内に生活している内生菌を生物防除エージェントとして利用することを提案している。

1990 年代から、植物に共生的に内生する放線菌が抗生物質や生理活性物質の探索源として注目されだした(清水と久能 2003)。放線菌は、「高 G+C 含量グループのグラム陽性細菌」と定義される微生物群の総称であり、多様な二次代謝産物を生産することで有名である。これまでに発見された微生物由来の抗生物質の約 2/3 は放線菌が生産しており、これらの多くが医薬や農薬、動物薬として幅広く利用されている(日本放線菌学会 2001)。当研究室の清水らは、拮抗性内生放線菌 *Streptomyces galbus* MBR-5 株を定着させたシャクナゲ組織培養苗がペスタロチア病や根腐病に耐病性を示すことを明らかにした(清水と久能 2003)。さらに、Coombs *et al.*(2004)は、コムギおよびオオムギ由来の拮抗性内生放線菌を予めコムギ種子に粉衣すると、*Gaeumannomyces graminisi* や *Rhizoctonia solani* によって引き起こされるコムギ立枯病の発生を軽減できることを報告している。内生放線菌は植物体内に内生する能力と抗菌物質産生能という2つの能力を有するため、微生物農薬が抱える問題を打破できる有望な生物防除エージェントであると考えられる。

三重県では、平成 6 年度から野菜・茶業試験場(現 野菜茶業研究所)と農業研究センター(現 三重県科学技術振興センター)とが共同で開始した地域先導技術総合研究「水田における省力・高付加価値露地野菜生産システムの確立」の一環として、セル成型苗の利用を核にしたキャベツ栽培の機械化一貫体系の確立に向けた技術開発と農家への技術定着が進められた。このような技術導入の背景には、上述したアジアなど諸外国からの輸入野菜の増加の問題がある。輸入野菜の安全性が疑問視されている中でも、日本は食糧の多くを海外からの輸入に頼っている。例えば、野菜に注目してみると、2000 年の生鮮野菜の輸入量は 92 万 6 千トンに上り、現在でも増加する一方である(若尾 2003)。また、穀物においては、総輸入量が年々増加し、3000 万トンを超えていくまでに至っている(西川 1999)。この作物輸入量の増加は、輸入野菜と国産野菜との間で起こる価格競争を激化させ、国産野菜の販売量の伸び悩みを招いている。この現状に対応するために、重量作物の収穫作業の機械化や機械化の困難な果菜類における栽培管理の省力化が

求められている(若尾 2003)。

このため、現在では三重県中部地域を中心とした県内各所でセル成型育苗が定着し、JA 育苗センターなどの大型育苗施設でキャベツセル成型苗が大量生産されている。ところが、このセル成型苗に多様な病害が発生して重大な問題となっている(窪田 2000)、特に黒すす病による苗の枯死被害は最も深刻である(窪田 2006; 中筋 2006)。2008 年現在、キャベツセル成型苗黒すす病に適用できる登録農薬は、ポリオキシシン AL 水溶剤(科研製薬(株))のみである(農林水産消費安全技術センターホームページ; <http://www.acis.famic.go.jp/searchF/vtllm000.html>)。しかし、ポリオキシシンの単用は耐性株の出現を招く危険性が高い。このように、黒すす病の化学的防除技術は今のところ不十分で、早急に新たな対策を立てる必要があるが、育苗施設のような閉鎖空間内での農薬散布は、栽培者に危険が及ぶ場合がある。このため、このような施設農業では微生物農薬の活用が期待されている。

そこで、内生放線菌を用いたキャベツセル成型苗黒すす病の生物防除技術の確立を最終目標とし、本研究では、1) 黒すす病防除活性を有するキャベツ内生放線菌の探索、2) 有望菌株の特性の解析、3) 防除メカニズムの解析を行うこととした。

第二章 植物内生放線菌の分離および有望菌株の選抜と同定

第一節 序

第一章で述べたように、三重県ではキャベツ生産における省力化技術として、県中部地域を中心とした県内各所でセル成型育苗が定着し、JA 育苗センターなどの大型育苗施設でキャベツセル成型苗が大量生産されている。セル成型苗には、①育苗管理による生育調節で均質な苗が容易に育成できる、②本圃への機械移植に対応した苗の育成が可能であるため移植作業の省力・軽作業化が図れる、③少面積で多数の苗を一度に生産できるなど数多くの利点がある (Hartmann *et al.* 1997)。一方で、セル成型育苗は密植、根域の制限によって、地上部および根域の乾湿の変動が激しくなり作物に大きなストレスがかかる。また、使用する培養土はピートモスを主要素材とし、従来の土を主要素材とした培養土とは大きく異なる。このように、これまでとは育苗条件が大きく異なるため、従来では問題とならなかった病害が被害をもたらす可能性がある。また、このような育苗現場における病害の発生は、産地全体に大きな被害を与える可能性が高い (窪田 2000)。2004 年 8 月から 2005 年 3 月にかけて県内の育苗施設でキャベツセル成型苗の病害の発生実態を調査したところ、*Pythium megalacanthum* による苗立枯病や *Alternaria brassicae* による黒斑病など様々な病害が発生しており、その中でも *Alternaria brassicicola* によって引き起こされる黒すす病の被害が最も深刻であることが明らかとなった (窪田ら 2006; 中筋 2006)。一般的に、黒すす病は本圃において収穫期前後に外葉に発生するが、収穫物に対する大きな実害がないため従来は問題視されなかった (窪田ら 2003)。しかし、キャベツセル成型苗では、発病初期には子葉に黒色の微小斑点が発生し、次第に大型の壊死斑へと拡大する。さらに病徴が進展すると、子葉の基部から胚軸へと壊死が広がり、やがて苗の生育不良や枯死に至る。また、本病原菌は種子伝染することが知られており、セル成型育苗においても初発生源は汚染種子であるとされている (黒田ら 1998; 大畑ら 1999)。調査を行った育苗センターでは、苗上部から高圧噴霧器で散水や液体肥料の施肥が一定時間毎に行われている。しかし、これらの作業は、罹病苗上での黒すす病菌の分生子形成を促進するとともに、分生子が周囲の健全苗へ飛散するのを著しく助長する。また、セルトレイは苗が密植状態であるため、罹病苗から健全苗への伝染が速い。このようなセル成型苗の育苗環境が、黒すす病の発生に好適な条件となっているため、被害を大きくさせていると考えられる。均質なセル成型育苗を大量生産する上で、多くの苗に生育不良や遅延、欠株をもたらす黒すす病は深刻な病害といえる。

キャベツセル成型苗に発生する黒すす病に適用できる登録農薬は、ポリオキシシン AL 水溶剤の

みである。ポリオキシンは、*Alternaria* 病害の防除に有効な殺菌剤として様々な作物で使用されている。しかし、1972 年にリンゴ斑点落葉病菌 (*Alternaria alternate*) のポリオキシンの耐性株が出現し、本病害の防除にポリオキシンの使用ができなくなった事例がある (Ishii 1997)。このように、ポリオキシンの単用は、ポリオキシンの耐性黒すす病菌の出現を招く可能性が高い。

以上のように、黒すす病の化学的防除技術は今のところ十分に整っておらず、早急に対策を講じる必要がある。一方で、育苗施設という閉鎖空間内で農薬散布すると、栽培管理者が農薬を吸引して健康を害する恐れがある。また、風雨に曝されない育苗施設内の植物体には農薬が残留しやすいため、栽培管理者が農薬に曝される危険性は一層高くなる (Jarvis 1992)。このため、施設農業では微生物農薬の活用が期待されている (山田 2000)。そこで、本研究では、キャベツセル成型苗に発生する黒すす病の生物防除に利用する内生放線菌の分離および選抜を行うこととした。

第二節 キャベツからの内生放線菌の分離と有望菌株の選抜

第一項 材料と方法

1. 放線菌用培地の組成および調製法

放線菌の培養に用いた各種培地と抗生物質混合液の組成および調製法を以下に示した。

IMA-2 寒天培地 (Shimizu *et al.* 2000)

D-グルコース	5.0g	塩化ナトリウム	2.0g
可溶性デンプン	5.0g	炭酸カルシウム	1.0g
肉エキス	1.0g	粉末寒天	15.0g
酵母エキス	1.0g	イオン交換水	1000ml
NZ-case	2.0g		

全ての試薬をイオン交換水に溶解し、高圧滅菌 (121°C、20 分) した。

培地添加用の抗生物質混合液 (Shimizu *et al.* 2000)

アンホテリシン B 溶液	10ml
アンホテリシン B (Wako (株))	50mg
Dimethyl-sulfoxid (以下、DMSO と略記)	10ml
リファンピシン-ビクシリン溶液	10ml
リファンピシン (Calbiochem Co.)	0.02g
ビクシリン (明治製菓 (株))	1g
100%エタノール	16ml
イオン交換水	4ml
30 倍希釈ヘリテージ (シンジェンタ (株))	10ml

※ 培地への添加は次の手順で行った。約 50°C の IMA-2 寒天培地 1000ml に抗生物質混合液 30ml を無菌的に添加し、よく攪拌した。

Mannitol/soya agar (MSA) 培地 (Hobbs *et al.* 1989)

きな粉	20g
マンニトール	20g
粉末寒天	20g
水道水	1000ml

全ての試薬を水道水に溶解して高圧滅菌 (121°C、20 分) した後、一旦 60°C まで冷まし、再び高圧滅菌 (121°C、20 分) した。

Bennet 培地 (Xiaohua *et al.* 2004)

酵母エキス	1.0g
肉エキス	1.0g
NZ アミン	2.0g
グルコース	10g
粉末寒天	15g
イオン交換水	1000ml

粉末寒天以外の全ての試薬をイオン交換水に溶解し、pH7.2 に調整した後、粉末寒天を加えて高温滅菌 (121℃、20 分) した。

2. 内生放線菌の分離および保存

2004 年と 2005 年に三重大学附属農場 (津市高野尾町) および野菜茶業研究所の実験圃場 (安芸郡安濃町) から採集した健全なキャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*) を放線菌の分離源とした。分離方法は Shimizu *et al.* (2000) の方法に準拠した。

まず、キャベツを水道水で十分に洗浄した後、根・茎・葉を約 1cm² (根は約 1cm 長) の大きさに細断した。これらを 0.1% Tween20 に約 1 分間浸漬した後、1% 次亜塩素酸ナトリウムに 3 分間浸漬して表面殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した。さらに、70% エタノールに 1 分間浸漬して表面殺菌した後、クリーンベンチ内で風乾させた。試料表面が十分に乾燥したことを確認した後、抗生物質混合液を添加した 1.5% 素寒天および IMA-2 寒天培地上に試料を置床し、30℃ で約 1 ヶ月間培養した。試料上に出現してきた放線菌のコロニーを滅菌爪楊枝 (121℃ で 20 分間高圧滅菌) でかき取り、IMA-2 寒天培地上に敷いた滅菌メンブレンフィルター (セルロース混合エステル、孔径=0.2 μm; Advantec、121℃ で 20 分間高圧滅菌) 上に画線接種し、恒温培養器内 (30℃、暗所) で培養した。メンブレンフィルター上に放線菌が孢子形成したら、メンブレンフィルターを培地から剥がし取り、培地上で孢子形成するまで同培養器内で培養した。その後、培地上の放線菌孢子と菌体を白金耳でかき取り、MSA 培地に移植して再び孢子形成するまで培養した。この培地上に 10% グリセリン溶液 (グリセリン 10ml をイオン交換水 80ml に溶解して高圧滅菌した後、DMSO 10ml を無菌的に添加) を流し入れ、白金耳で孢子を懸濁した。つぎに、この懸濁液の 10⁴~10⁶ 倍希釈液 100 μl を

Bennet 寒天培地上に滴下し、コンラージュ棒で均一に塗布した後、約 1 週間培養した。培地上に形成されたコロニーの中から1コロニーだけを白金耳でかき取り、MSA 培地に移植して孢子形成するまで培養した。ここに 10%グリセリン溶液を流し入れ、白金耳で孢子を懸濁した後、500 μ l ずつチューブ (1.5ml Graduated microcentrifuge tube with flat top cap; Porex Bio Products Inc.) に分注して、-80°Cで保存した(以下、孢子懸濁液と称する)。なお、本研究では、IMA-2 寒天培地および MSA 培地上での孢子形成が旺盛であった菌株のみを分離株として保存し、以下の実験に供試した。

3. 黒すす病菌および放線菌分離株の接種源の調製

本研究では、独立行政法人野菜茶業研究所 窪田昌春氏から分譲されたキャベツ黒すす病菌 (*Alternaria brassicicola*) を病原菌として供試した。継代培養用のジャガイモ・グルコース寒天 (PDA) 斜面培地から黒すす病菌の菌体を白金耳でかき取り、PDA 平板に移植して恒温培養器内 (25°C、暗所) で 1 週間前培養した。菌叢周縁部より菌体をかき取り、新たに調製した PDA に移植してさらに 1 週間培養した。つぎに、この PDA 上に滅菌水を流し入れ、菌叢表面を滅菌綿棒で擦り、分生子と菌糸を懸濁した。これをプラスチックチューブ (Centrifuge tube: Sumitomo bakelite Co., Ltd) に移し入れて攪拌した後、二層のキムワイプでろ過して菌糸を除去した。得られた分生子懸濁液を滅菌水で希釈し、血球計算板を用いて 10^5 分生子/ml に調整したものを黒すす病菌接種源とした。なお、以下の全ての実験(第四章第二節の対峙培養を除く)では、同手順で調製した黒すす病菌接種源を用いた。

また、放線菌分離株の孢子懸濁液 100 μ l を IMA-2 液体培地 100ml に接種して 24 時間振盪培養 ($\times 200$ rpm、30°C) し、放線菌接種源とした。

4. 2005 年選抜試験

窪田 (2000) は、キャベツセル成型苗に発生する黒すす病の一次伝染源は、黒すす病菌が潜在感染した汚染種子であると述べている。さらに、汚染種子から発芽した苗の罹病組織上に形成された分生子が、高圧噴霧器による頭上灌水や風で飛散し周囲の健全苗へ二次伝染しているとも述べている(窪田ら 2003)。このことから、育苗施設内での黒すす病の発生と蔓延を防ぐためには、一次伝染源である汚染種子から発芽した苗が発病するのを抑制するとともに、発病苗から健全苗への二次伝染を防ぐことが重要だと考えられる。そこで本研究では、汚染種子由来苗の発病

および飛散分生子による感染・発病の両方を抑制する放線菌株を有望株として選抜することとした。

まず、二次伝染を想定して、噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する放線菌株を選抜することとした。つぎに、選抜菌株が汚染種子由来苗の発病を抑制するか否かを検定した。ただし、2004 年と 2005 年の分離菌株からの選抜試験はそれぞれ 2005 年と 2006 年に行い、各年で試験方法が若干異なるため、本節では各年別に試験方法を記述した。

(1) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する放線菌株の選抜

① 一次選抜試験

本試験には、2004 年に分離した孢子形成と生育が旺盛な放線菌 77 株を供試した。キャベツ種子(品種 松波; 石井育種場)を 10 分間流水にさらして種子表面の殺菌剤を除去した後、1%次亜塩素酸ナトリウムで 3 分間表面殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した。高圧滅菌(121℃で 20 分間高圧滅菌し、24 時間後に再び同条件で滅菌)したセル成型育苗用の育苗培土(ヤンマーナプラ養土; ヤンマー農機(株))を 128 穴セルトレイに充填し、適量の水道水を灌水した。つぎに、表面殺菌キャベツ種子を 1 セル当たり 1 粒ずつ播種し、滅菌バーミキュライトで覆土して 26℃で 24 時間培養した。各セルに放線菌接種源を 1ml ずつ滴下し、人工気象器内(26℃、12 時間光照射)で 1 週間培養した。対照区として、IMA-2 液体培地を 1ml ずつ滴下し、同条件で培養した。これらの苗に黒すす病菌接種源を噴霧接種(1 苗当たり約 200 μ l)し、人工気象器内(26℃、12 時間光照射)に設置した半透明プラスチックケース(相対湿度 90%以上)に入れて 3 日間培養した後、ケースから取り出して同人工気象器内でさらに 4 日間培養した。本試験では、子葉に大型の壊死斑が形成された苗(重症苗)と壊死・腐敗が進み枯死した苗(枯死苗)(図 1)の割合(重症・枯死苗率)を次式に従って算出した。

$$\text{重症・枯死苗率(\%)} = (\text{重症苗} + \text{枯死苗}) / \text{全苗} \times 100$$

これにより、対照区と比較して重症・枯死苗率を明らかに低下させた分離株を一次選抜株として選抜した。なお、本試験では、各処理区につき 12 苗を供試した。



図1 黒すす病に罹病して重症化・枯死した苗の子葉

②二次選抜試験

二次選抜では、一次選抜株の防除活性を再度検定することとした。まず、上記と同様の手順で表面殺菌したキャベツ種子をセルトレイに播種し、26℃で24時間培養した後、各セルに放線菌接種源を3mlずつ滴下し、ガラス温室に設置したビニルハウス内で1週間培養した(図2)。対照区にはIMA-2液体培地を3mlずつ滴下した。これらの苗に黒すす病菌接種源を噴霧接種(1苗当たり約312μl)し、同ビニルハウス内(加湿器で相対湿度を100%に調節した)でさらに一週間培養した。苗を肉眼観察し、上記と同様に重症・枯死苗率を算出した。これにより、対照区と比較して重症・枯死苗率を明らかに低下させた分離株を二次選抜株として選抜した。なお、本試験では、各処理区につき96苗を供試した。



図2 ビニルハウス内での二次選抜試験の様子

③三次選抜試験

三次選抜では、二次選抜株の防除活性を再度検定することとした。本試験は、本項4-(1)-②と同様の手順でセルトレイにキャベツを播種し、24 時間後に放線菌処理を行った後、人工気象器内(26℃、12 時間光照射)で1 週間育苗した。黒すす病菌を苗に噴霧接種し、人工気象器内(26℃、12 時間光照射)に設置した半透明プラスチックケース内(相対湿度 90%以上)で3 日間培養した後、同人工気象器内でさらに4 日間培養した。苗を肉眼観察し、4 段階{0:病徴なし、1:軽症(子葉に黒い小斑点または小さな壊死斑が認められる苗)、2:重症(子葉に大きな壊死斑が認められるが、枯死には至っていない苗)、3:枯死(壊死病斑が全身的に広がり、腐敗・枯死した苗)}の罹病度に分類し(図3)、次式に従って平均罹病度を算出した。

$$\text{平均罹病度} = \sum (\text{罹病度} \times \text{苗数}) \times 4 / \text{全調査苗数}$$

これにより、対照区と比較して平均罹病度を明らかに低下させた分離株を二次選抜株として選抜した。なお、本試験では、各処理区につき96 苗を供試した。

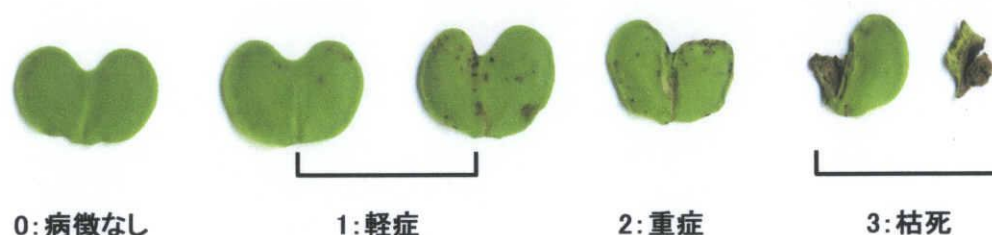


図3 黒すす病徴の進展程度に対応した罹病度の分類

④確認試験

三次選抜株 MBCY58-1 の防除活性を再度検定することとした。本試験は、上記の三次選抜試験と同様の手順で行った。ただし、黒すす病菌接種後は接種槽内(26℃、相対湿度 100%、12 時間光照射)で1 日間培養した後、人工気象器内(26℃、12 時間光照射)で6 日間培養した。その後、上記と同様にして苗を4 段階の罹病度に分類し、平均罹病度を算出した。なお、本試験では、各処理区につき128 苗を供試し、3 反復の試験を行った。

(2) 黒すす病菌汚染種子に対する有望株 MBCY58-1 の防除活性の検定

本項 3 の手順で黒すす病菌接種源(10^6 分生子/ml)を調製した。本項 4-(1)-①の手順で流水洗浄したキャベツ種子約 200 粒を、黒すす病菌接種源 20ml に 2 時間浸漬した。つぎに、これらの種子を回収し、滅菌ろ紙上に載せてクリーンベンチ内で約 15 分間風乾した(以下、汚染種子と称す)。滅菌ガラスシャーレ(内径 9cm)内の滅菌育苗培土 20g に MBCY58-1 接種源 30ml を滴下して十分混和した後、汚染種子を 30 粒播種し、滅菌バーミキュライトで覆土した。これらを接種槽内(26℃、相対湿度 100%、12 時間光照射)に設置した半透明のプラスチック容器内に入れて 3 日間培養した後、人工気象器(26℃、12 時間光照射)に移して 11 日間培養した(図 4)。対照区として、IMA-2 液体培地 30ml を混和した育苗培土に汚染種子を 30 粒播種し、同条件で培養した。培養後、キャベツ苗を観察し、4 段階の罹病度[病徴なし、軽症(子葉に黒色小斑点または胚軸に黒い筋が認められる)、重症(子葉に灰色～黒色の大型病斑または胚軸の腐敗が認められる)、枯死](図 5)に分類し、次式に従って発病苗率を算出した。

$$\text{発病苗率(\%)} = (P+Q+R) / \text{全調査苗数} \times 100$$

P: 軽症苗数

Q: 重症苗数

R: 枯死苗数

なお、本実験では、各処理区につき 3 反復の試験を行った。また、発病苗率については t 検定により解析した。



図 4 汚染種子に対する有望株の防除活性の検定試験の様子



図5 黒すす病菌汚染種子から発芽した苗の罹病度

5. 2006 年選抜試験

(1) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する放線菌株の選抜

① 黒すす病防除活性を有する放線菌株の選抜

本試験には、2005 年に分離した放線菌のうち、孢子形成と生育が旺盛であった唯一の菌株である MBCN152-1 を供試した。キャベツ苗への MBCN152-1 処理および黒すす病菌接種の方法は、本項 4-(1)-④と同様である。また、本項 4-(1)-①と同様にして重症・枯死苗率(%)を算出した。なお、本試験では、各処理区につき 32 苗を供試した。

② 確認試験

結果でも述べるように、上記①の試験で MBCN152-1 には黒すす病防除活性が認められた。そこで、本菌株の防除活性を再度検定することにした。各処理区につき 128 苗を供試し、本項 4-(1)-④と同様の手順で試験を行い、本項 4-(1)-③で定めた基準に従い苗の罹病度を 4 段階に分類し、平均罹病度を算出した。

(2) 黒すす病菌汚染種子に対する有望株 MBCN152-1 の防除活性の検定

本項 4-(2)と同様に、MBCN152-1 混和育苗培土に黒すす病菌汚染種子を播種して 14 日間培養した後、発病苗率(%)を算出した。なお、本実験では、各処理区につき 3 反復の試験を行った。また、発病苗率については t 検定により解析した。

6. 最終候補株の選抜

最終候補株の選抜は濃度を調節した放線菌胞子を用いて行うこととした。

(1) MBCN152-1 胞子懸濁液の調製

各放線菌胞子懸濁液 100 μ l を MS 培地に滴下し、コンラージュ棒で均一に塗布した後、胞子形成するまで恒温培養器内(30℃、暗所)で約2週間培養した。この培地上に10%グリセリン溶液を流し入れ、培地表面の菌体を白金耳で懸濁し、プラスチックチューブに集菌した。つぎに、超音波破碎機(Ultrasonic washer; アズワン)を用いて懸濁液中の胞子鎖を10分間破碎した後、滅菌綿でろ過し、ろ液を回収した。これを新たなプラスチックチューブに移し入れて-80℃で保存した(以下、胞子懸濁液と称する)。懸濁液中の菌濃度は、希釈平板法により計測した。

(2) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する最終候補株の選抜

2005年度および2006年度にそれぞれ MBCY58-1 株および MBCN152-1 株を選抜した。これら2菌株の黒すす病防除活性を比較し、最終的な候補株を選抜することとした。

本試験は、本項 4-(1)-②の選抜試験と同様の手順で行った。ただし、本試験では、黒すす病菌接種後に接種槽内(26℃、相対湿度 100%、12 時間光照射)で1日間培養した後、温室で13日間培養した。調査時には既に本葉 2-3 枚が展開していたため、本葉を正常に展開していなかった苗を生育不可能苗として計数した。さらに、上記と同様にして苗を4段階の罹病度に分類し、平均罹病度を算出した。なお、本試験では、各処理区につき64苗を供試し、3反復の試験を行った。また、生存不可能苗率および平均罹病度については、フィッシャーの最小有意差検定(LSD 検定)により検定した。

第二項 結果

1. 内生放線菌の分離および保存

表面殺菌したキャベツの根、茎、葉を抗生物質添加 IMA-2 培地および素寒天培地上で約1ヶ月間培養した結果、白色や灰色、赤色など多彩な色調を呈する綿状や粉状の放線菌菌体が試料内部から表面に出現してきた(図 6)。これらの放線菌を分離・純化し、2004年に108菌株、2005年に21株を得たが、これらの中には胞子形成が乏しく生育の遅い菌株が多数含まれていた。そこで、このような菌株を除き、2004年に77菌株(MBCY1-2~MBCY58-1、MBCN1-1~MBCN146-1)、2005年に1菌株(MBCN152-1)を分離株として保存し、以下の実験に供試することとした。



図 6 試料表面に出現した放線菌菌体(矢頭)

2. 2005 年選抜試験

(1) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する放線菌株の選抜

①一次選抜試験

2004 年の分離株の中から、黒すす病防除活性を有する菌株を選抜することとした。本選抜試験では、分離株 77 株の防除活性を 4 回に分けて検定したため(試験 1～4)、それぞれの試験結果を図 7-A～D に示した。

対照区では、黒すす病菌を噴霧接種すると、接種 3 日目には子葉に黒色の小斑点が形成され始め、徐々に拡大して約 1 週間で子葉に灰～黒色の大きな病斑が形成されるか子葉が腐敗枯死した。その結果、試験 1(図 7-A)の対照区では、約 46%の苗が重症化・枯死していた。一方、MBCY3-1 および MBCY6-2、MBCY8-1、MBCY11-1、MBCY17-1 処理区では病徴の進展が抑制され、重症・枯死苗率は 20%以下であった。中でも、MBCY8-1 と MBCY11-1 処理区の重症・枯死苗率は約 8%であり、他の 3 菌株のそれよりも明らかに低かったことから、これら 2 菌株を試験 1 の一次選抜株とした。

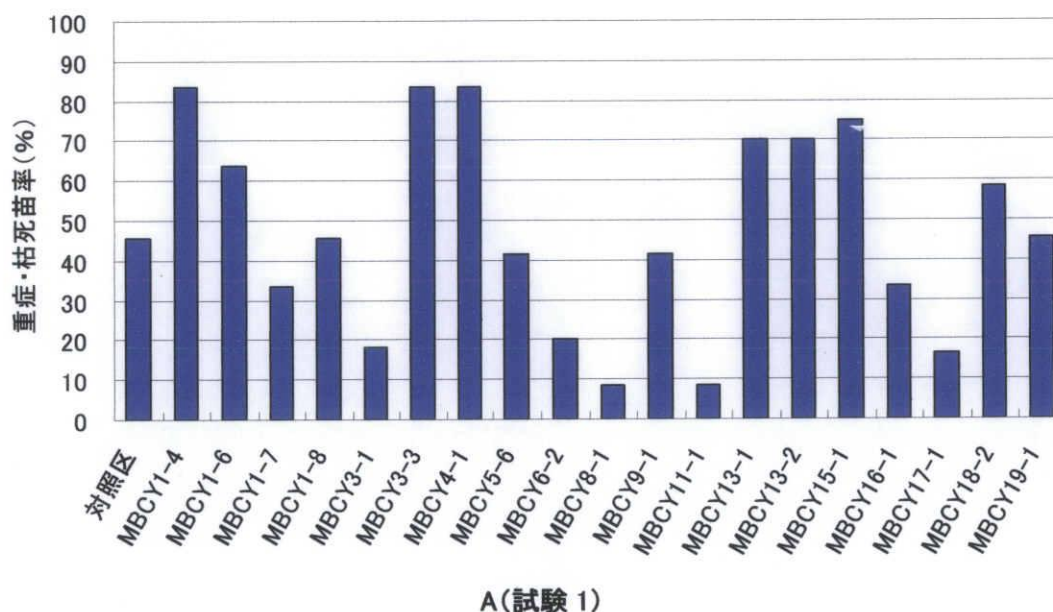
試験 2(図 7-B)の対照区では、病徴が著しく進行し、92%の苗が枯死したが、7 処理区(MBCN24-4、MBCN42-1、MBCN43-1、MBCN50-3、MBCN56-1、MBCN64-1)では重症・枯死苗率が対照区の半分以下であった。特に、MBCN43-1 および MBCN56-1 処理区の重症・枯死苗率は、共に 33%と最も低かったことから、試験 2 では MBCN43-1 と MBCN56-1 を一次選抜株として選抜した。

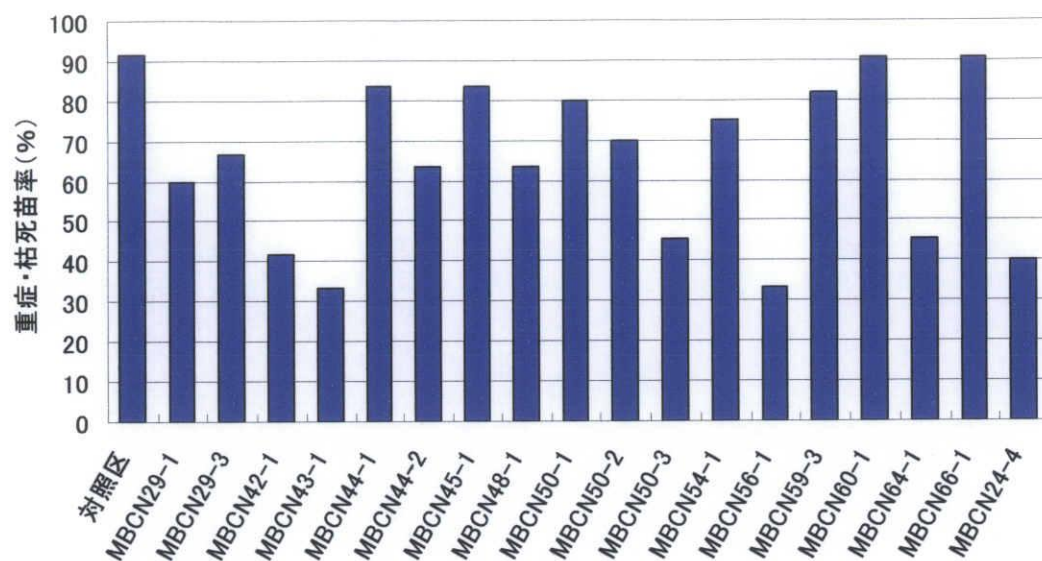
試験 3(図 7-C)では、いずれの分離株にも顕著な病徴進展抑制の効果は認められず、重症・枯

死苗率が対照区と同程度あるいは対照区よりも高い処理区が多かった。このことから、試験 3 では菌株を選抜しなかった。

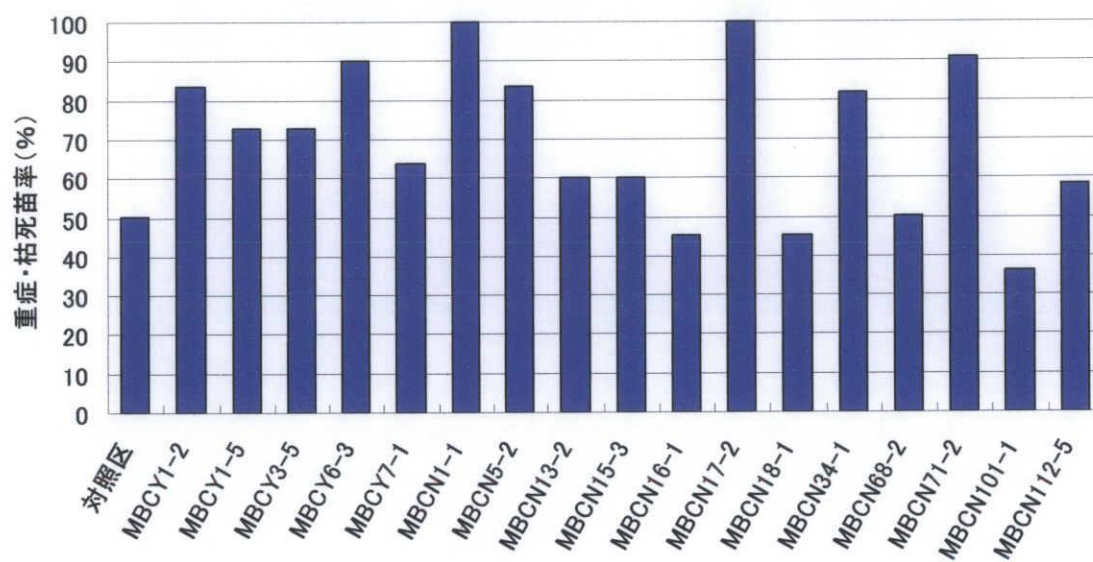
試験 4(図 7-D)の対照区では、70%の苗が重症化・枯死した。それに対して、多くの分離株処理区で病徴進展が抑制されており、無病徴の健全苗を残す処理区も多かった。最も発病を抑制していた MBCY26-1 および MBCY58-1、MBCN80-2 処理区では、重症・枯死苗が認められず、全ての苗が健全に生長していた。そこで、試験 4 では、MBCY26-1、MBCY58-1、MBCN80-2 の 3 株を一次選抜株として選抜した。

以上のように一次選抜試験では、MBCY8-1、MBCY11-1、MBCN43-1、MBCN56-1、MBCY26-1、MBCY58-1、MBCN80-2 の 7 菌株を選抜した。





B(試験 2)



C(試験 3)

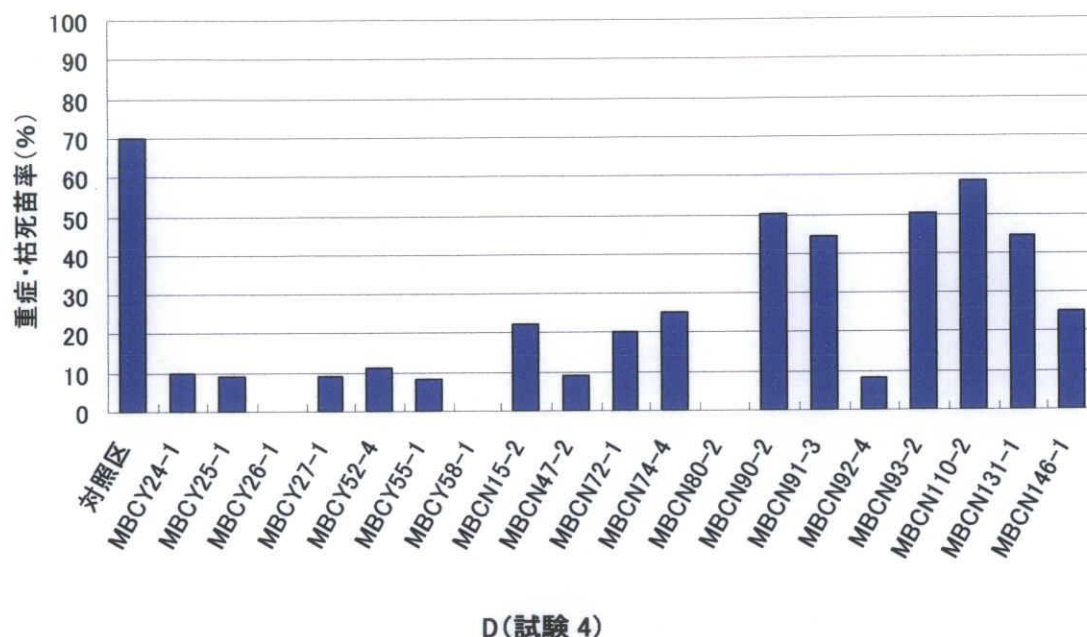


図 7 一次選抜試験での各放線菌処理区の重症・枯死苗率

②二次選抜試験

二次選抜試験では、一次選抜株 7 株の防除活性を改めて検定した。その結果、対照区では、19%の苗で病徴が進展して子葉に大型の病斑が形成し、枯死した。放線菌分離株処理区でも重症化・枯死した苗は観察されたが、その割合には処理区間で差が見られた。MBCY8-1、MBCY11-1、MBCY26-1、MBCN80-2 処理区の重症・枯死苗率はそれぞれ 17%、26%、20%、23%となり(図 8)、対照区と同程度またはそれ以上であったことから、これらの分離株には生物防除効果は認められないと判断した。それに対して、MBCY58-1、MBCN43-1、MBCN56-1 処理区では病徴進展が抑制され、それぞれの重症・枯死苗率は 11%、7%、9%と他の処理区よりも明らかに低かった。以上の結果から、MBCY58-1、MBCN43-1、MBCN56-1 の 3 菌株を二次選抜菌株として選抜することとした。

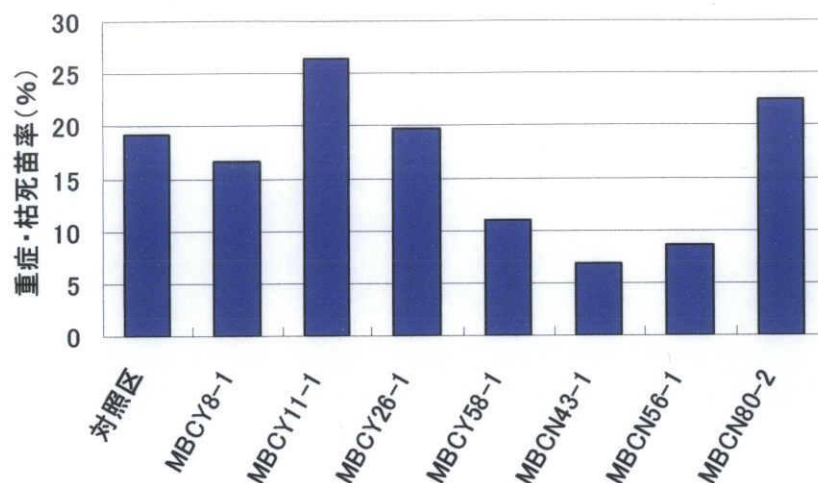


図 8 二次選抜試験における各放線菌処理区の重症・枯死苗率

③黒すす病防除活性を有する有望放線菌株の選抜(三次選抜)

三次選抜では、二次選抜で防除活性を示した3菌株の防除活性を改めて検定した。その結果、対照区とMBCN43-1処理区の平均罹病度は共に30であったことから、MBCN43-1に黒すす病防除活性はないと判断した(図9)。一方で、MBCN56-1処理区およびMBCY58-1処理区では、対照区よりも平均罹病度が低下していた。特にMBCY58-1処理区は、放線菌3処理区の中で最も病徴進展が抑制されていたため、MBCY58-1を三次選抜株として選抜した。

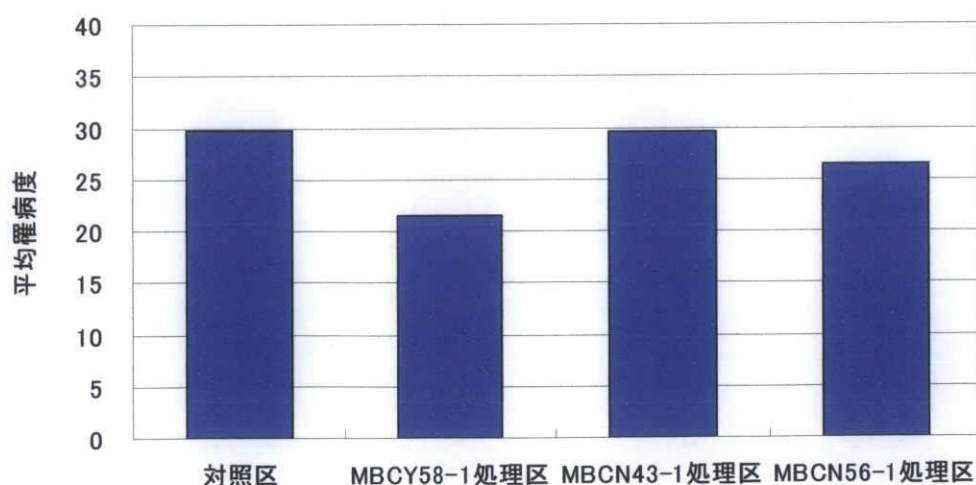


図 9 三次選抜試験における各放線菌処理区の平均罹病度

④黒すす病防除活性を有する有望放線菌株の選抜(確認試験)

本試験では、MBCY58-1 の黒すす病防除活性を再度検定した。両処理区の平均罹病度を比較したところ、対照区では 37 であったが、MBCY58-1 処理区では 32 と低かった(図 10) 以上の結果から、MBCY58-1 を 2005 年の有望株とした。

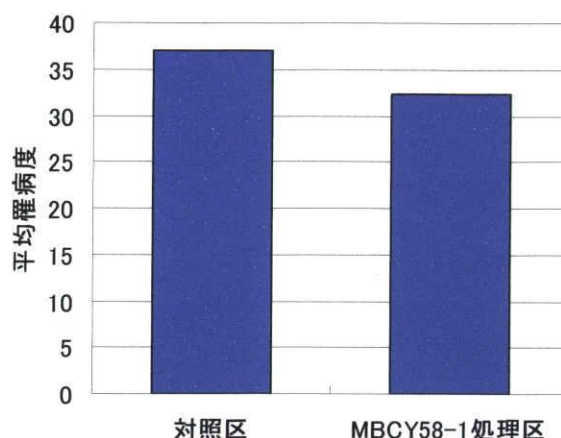


図 10 黒すす病菌接種した MBCY58-1 処理苗の平均罹病度

(2)黒すす病菌汚染種子に対する有望株 MBCY58-1 の防除活性

MBCY58-1 混和育苗培土に汚染種子を播種して 2 週間育苗した。その結果、図 11-A に示したように、対照区では多数の苗が黒すす病を発病して完全に枯死していたが、MBCY58-1 処理区では健全な苗が明らかに多かった(図 11-B)。両処理区の発病苗率を算出したところ、対照区が平均 64%であったのに対して MBCY58-1 処理区では平均 41%と有意に低かったことから、MBCY58-1 処理により発病が抑制されたことが明らかとなった(図 12)。また、重症苗および枯死苗に注目してみると、対照区の重症苗率および枯死苗率はそれぞれ 25%および 8%であったが、MBCY58-1 処理区ではそれぞれ 9%および 1%であった。このことは、MBCY58-1 が病徴の進展も抑制したことを示唆している。以上の結果から、MBCY58-1 混和育苗培土で汚染種子を播種・育成すると、発芽した苗の発病および病徴進展が抑制されることが明らかとなった。

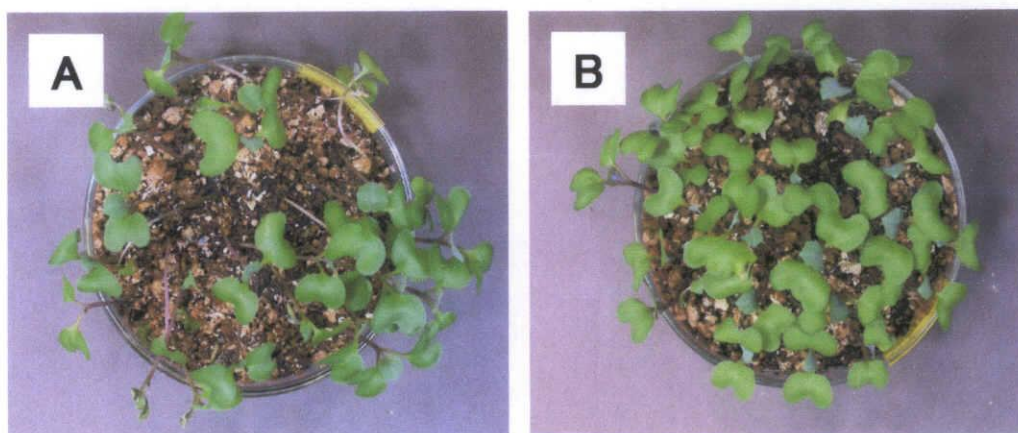


図 11 MBCY58-1 混和育苗培土に播種した汚染種子から発芽したキャベツ苗

A: 対照区 B: MBCY58-1 処理区

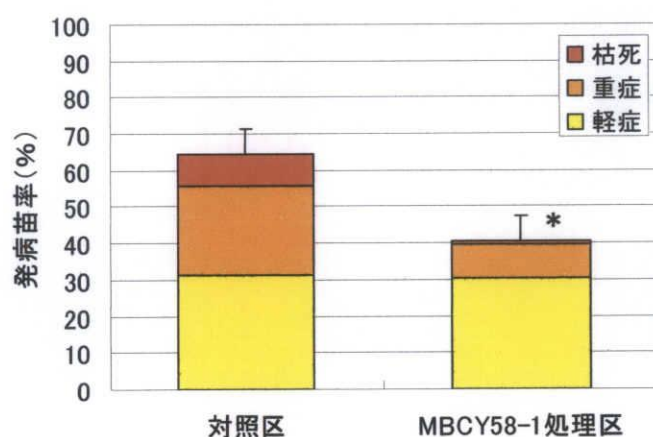


図 12 MBCY58-1 処理区における汚染種子由来苗の発病率

* t 検定の結果、5%水準で有意差があることを示す

バーは標準誤差を示す

3. 2006 年選抜試験

(1) 噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制する放線菌株の選抜

① 黒すす病防除活性を有する有望放線菌株の選抜

2005 年度に分離した中で唯一孢子形成が良好であった MBCN152-1 の黒すす病防除活性を検定した。対照区の苗では病徴が急速に進展し、黒すす病菌接種 7 日目には 88%の苗が重症化または枯死した(図 13)。それに対して、MBCN152-1 処理区では対照区と比べて重症・枯死苗が著

しく減少し、64%の苗が健全または軽症であった(図 13)。以上の結果から、MBCN152-1 は黒すす病防除活性を有すると判断した。

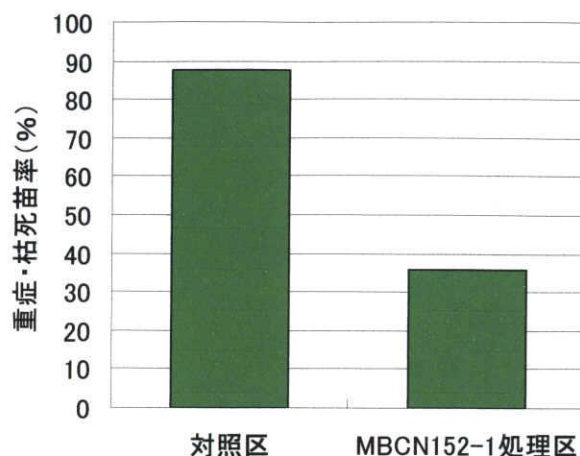


図 13 MBCN152-1 処理区における重症・枯死苗率

②確認試験

MBCN152-1 の黒すす防除活性を再度検定した。その結果、対照区の平均罹病度は 29 であったのに対し、MBCN152-1 処理区では 22 であった(図 14)。このことから、MBCN152-1 が黒すす病防除活性を有することを確認できた。以上の結果から、MBCN152-1 を 2006 年の有望株として選抜した。

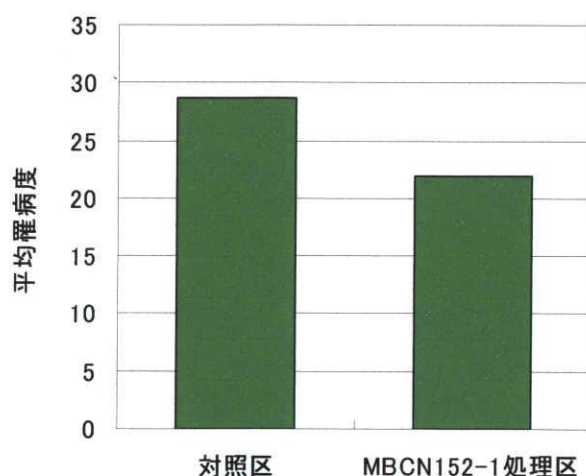


図 14 黒すす病菌接種した MBCN152-1 処理区の平均罹病度

(2) 黒すす病菌汚染種子に対する有望株 MBCN152-1 の防除活性

MBCN152-1 混和育苗培土に汚染種子を播種して 2 週間育苗した。その結果、対照区では 92% の苗が発病し、無病徴苗はわずか 8%ほどであった(図 15-A、図 16)。49%の苗は胚軸腐敗や子葉枯死などの重症症状を示し、17%は完全に腐敗枯死していた。それに対して、MBCN152-1 処理区の発病苗率は 16%にとどまっており、有意に発病が抑制されていた(図 15-B、図 16)。また、本処理区では枯死苗は観察されず、重症苗もわずか 4%と少なかった。このことから、MBCN152-1 は汚染種子から発芽した苗の発病とともに病徴進展も抑制することが明らかとなった。



図 15 MBCN152-1 混和育苗培土に播種した汚染種子から発芽したキャベツ苗

A: 対照区 B: MBCN152-1 処理区

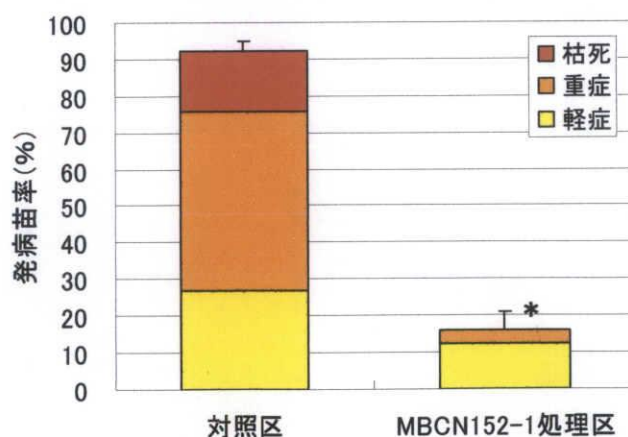


図 16 MBCN152-1 処理区における汚染種子由来苗の発病率

* t 検定の結果、5%水準で有意差があることを示す。

バーは標準誤差を示す。

4. 最終候補株の選抜

図 17-A および図 18 に示したように、対照区では 41% の苗が本葉を展開しておらず、今後の生育が不可能な状態となっていた。MBCY58-1 処理区の生存不可能苗率は 29% で、対照区と比較すると減少していたが、有意差は認められなかった。また、MBCN152-1 処理区と比較すると、病徴が進展して黄化している子葉が多かった(図 17-B、図 18)。対して、MBCN152-1 処理区の生育不可能苗率は 5% と極めて少なく、ほとんどの苗が正常に本葉を展開していた(図 17-C、図 18)。また、子葉が黄化した苗もほとんど認められなかった。各処理区の平均罹病度を比較すると、対照区、MBCY58-1 処理区、MBCN152-1 処理区でそれぞれ 30、27、18 となり、MBCN152-1 処理区で有意に黒すす病が抑制されたことが明らかとなった(図 19)。以上の結果から、MBCN152-1 を最終候補株として選抜した。



図 17 各処理区の黒すす病の発病状況

A: 対照区 B: MBCY58-1 処理区 C: MBCN152-1 処理区

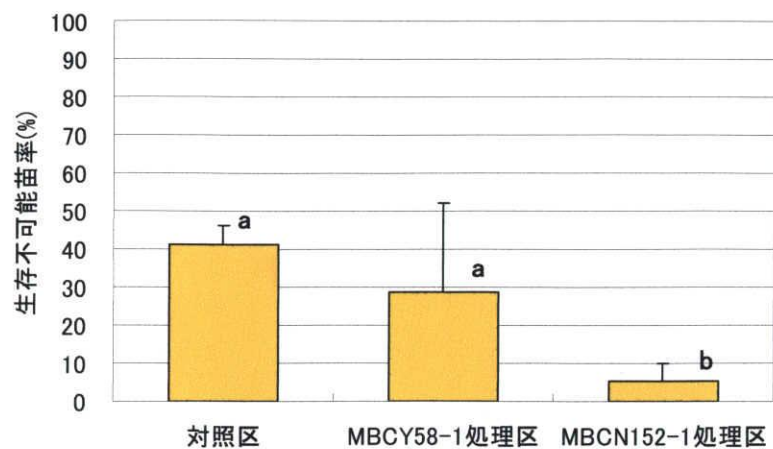


図 18 各処理区の生存不可能苗率

フィッシャーの最小有意差検定 (LSD 検定) の結果、異なる文字間では 5%水準で有意差があることを示す

バーは標準誤差を示す。

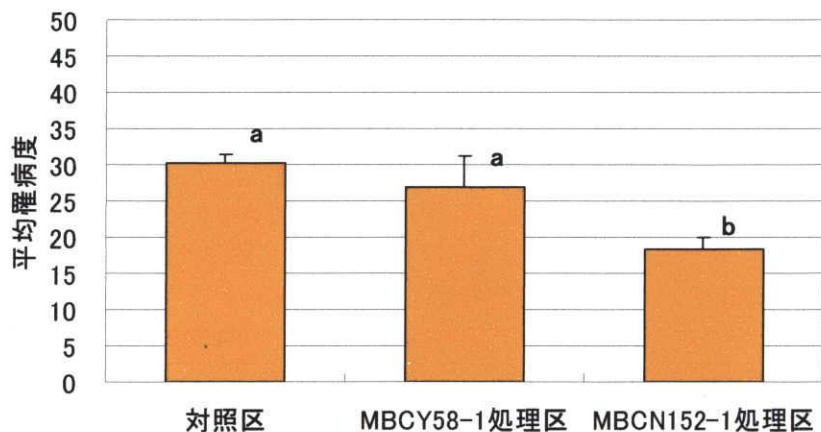


図 19 各処理区の平均罹病度

フィッシャーの最小有意差検定 (LSD 検定) の結果、異なる文字間では 5%水準で有意差があることを示す

バーは標準誤差を示す。

第三節 MBCN152-1 の同定

第一項 材料と方法

1. MBCN152-1 のコロニー性状および形態の観察

コロニー性状の観察には、ISP-2(放線菌培地ダイゴ No. 2;Wako)、ISP-3(放線菌培地ダイゴ No. 3;Wako)、ISP-4(ISP medium 4;Difco、USA)、ISP-5(放線菌培地ダイゴ No. 5;Wako)を用いた。各培地に MBCN152-1 孢子懸濁液を 50 μ l ずつ滴下し、白金耳で基盤目状に画線した後、30℃で培養した。約 2 週間後の晴天日に、北側の窓からの自然光の下で以下の性状を肉眼で観察した。

- 基生菌糸の生育および表面、裏面の色調
- 気菌糸の生育および色調
- 拡散性色素の有無および色調

なお、色調は新色名事典(1987)の標準色片を基準に判定した。

2. 光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡(SEM)による MBCN152-1 の形態観察

放線菌の孢子表面の形状や孢子鎖、孢子囊などの形態は、属によって大きく異なる(日本放線菌学会 2001)。このことから、形態的特徴が属を特定する重要な判断基準となる。そこで、MBCN152-1 の形態を光学顕微鏡および SEM で観察することとした。

(1) 光学顕微鏡観察

ISP-2~5 で 2 週間培養した MBCN152-1 のコロニーから、コルクボーラー(直径 8mm)で含菌ディスクを打ち抜いた。このディスクをスライドガラス上に置き、光学顕微鏡(Axio; Zeiss、Germany)の 400 倍視野で観察した。

(2) SEM 観察

日本放線菌学会(2000)に記載されている方法に従って SEM 観察を行った。

まず、上記の手順で調製した MBCN152-1 含菌ディスクをガラスシャーレ内に置き、ディスク周囲に数滴の4%オスミウム酸(OsO_4)を滴下した後、密閉して一晩蒸気固定を行った。つぎに、ドラフト内で開封し、15 分間放置して余分なオスミウムガスを散逸させた。このディスクをステンレス製カゴ(臨界点乾燥装置用包埋カゴ 20m/m、日新 EM(株))に移し、凍結乾燥瓶に入れた後、液体

窒素を注ぎ入れて急速凍結させた。少量の液体窒素が残った状態で凍結乾燥瓶を凍結乾燥機に装着し、約 6 時間凍結乾燥した。得られた試料を電子顕微鏡専用の試料台に載せ、イオンスパッターで金コーティングした後、15.0kV で観察した。

3. MBCN152-1 の 16S rDNA 塩基配列の解析

(1)MBCN152-1 菌体からのゲノム抽出

MBCN152-1 孢子懸濁液 100 μ l を GY 液体培地 100ml に接種し、一晩振盪培養 (30°C、200rpm) した。この培養液をプラスチックチューブに移し変えて遠心分離 (3000rpm、5 分) し、上清を除去した。ここに滅菌水を適量加えて十分攪拌した後、再度遠心分離 (3000rpm、5 分) することで菌体を洗浄した。十分に菌体を洗浄するため、この作業を 3 回繰り返した。つぎに、沈殿した菌液 200 μ l をエッペンドルフチューブに取り、遠心分離 (15000rpm、1 分) して上清を除去した。細胞壁を分解するため、10mg/ml [Solution I : 50mM グルコース, 25mM トリス塩酸 (pH8.0), 10mMEDTA (pH8.0)] リゾチーム 400 μ l を加え、ブロックヒーターを用いて 37°C で 1 時間加温した。さらに、タンパク質を分解するために protenase K 1mg、10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 20 μ l、RNAase 0.1 μ l を加え、再び 55°C で 30 分間加温した。その後、SDS およびタンパク質を除去するため、新しいエッペンドルフチューブ内で 99.5%エタノール 800 μ l と MBCN152-1 分解液 400 μ l を混合した (エタノールの終濃度約 70%)。これを遠心分離 (15000rpm、5 分) して上清を除去した後、DNA Speed Vac (Savent) を用いて 3 分間減圧乾燥した。乾燥した沈殿物を Tris-EDTA 緩衝液 (以下、TE 緩衝液と略す: 1% 1M トリス塩酸 (pH8.0), 0.5% 0.5M EDTA (pH8.0)) 400 μ l で溶解し、等量の 0.1M トリス塩酸飽和フェノールを加えてよく混合した。これを遠心分離 (15000rpm、1 分) して 2 層 (上層: トリス塩酸, 下層: DNA を含むフェノール) に分離させた後、下層液 400 μ l を新しいエッペンドルフチューブに移し取った。これをさらに遠心分離 (15000rpm、5 分) して 3 層 (上層: DNA, 中層: タンパク質, 下層: フェノール) に分離させ、上層液のみを新しいエッペンドルフチューブに移し取った。つぎに、液中のフェノールを完全に除去するため、クロロホルム 400 μ l を加えて混合した後、遠心分離 (15000rpm、5 分) して 2 層 (上層: DNA, 下層: フェノールを含むクロロホルム) に分離させ、上層液 200 μ l を新しいエッペンドルフチューブに移し取った。これに 3M 酢酸ナトリウム 20 μ l (1/10 量)、99.5%エタノール 500 μ l (2.5 倍量) を加えた後、-80°C で 15 分間凍結させた。この凍結液を遠心分離 (15000rpm、5 分) し、上清を除去した後、70%冷却エタノール 500 μ l をチューブ壁面に沿うように流し入れ、沈殿した DNA を吸い込まないように留意しながら直ちにエタノールを除去した。これを

DNA Speed Vac で 3 分間減圧乾燥した後、沈殿物を TE 緩衝液 50 μ l に溶解させ、ゲノム抽出液とした。

(2)PCR 増幅とシーケンス解析

PCR には *TaKaRa Taq* (タカラバイオ(株)) を用いた。0.2ml の PCR チューブに超純水 38 μ l、MBCN152-1 のゲノム抽出液 1 μ l、10 \times PCR Buffer 5 μ l (同キット付属)、1mM dNTP Mixture 4 μ l (同キット付属)、DNA 増幅用の 50 μ M 27f プライマー 1 μ l (フォワードプライマー) および 50 μ M 1492r プライマー 1 μ l (リバースプライマー) を加え、タッピングにより溶液をよく混合した後、rTaq DNA Polymerase 0.25 μ l (同キット付属) を加えて全量 50 μ l の PCR 反応液を調製した。直ちにサーマルサイクラー (PCR-Syste2700; Applied Biosystems) で PCR 反応 (ホットスタート法を採用。反応条件: 96 $^{\circ}$ C 1 分を 1 サイクル、96 $^{\circ}$ C 10 秒・52 $^{\circ}$ C 10 秒・72 $^{\circ}$ C 1 分を 35 サイクル、20 $^{\circ}$ C で保存) を行った。DNA 電気泳動装置に泳動用緩衝液 [TAE 溶液: 40mM Tris (Invitrogen), 40mM 酢酸 (Wako), 0.1mM EDTA (pH8.0) (同仁科学(株))] を入れ、この液中にエチジウムブロマイド (1 μ g/ml; Wako) を含む 0.8% アガロースゲル (Agarose S; Wako) を沈めた。MBCN152-1 の DNA サンプル 10 μ l とマーカー 6 (0.5 μ g/ μ l; 日本ジーン) 1 μ l をそれぞれ 6 \times ローディング緩衝液 (0.25% ブロモフェノールブルー (ナカライ)、0.25% キシレンシアノール FF (Wako)、15% グリセロール (Wako)) 10 μ l および 1 μ l と混合した後、アガロースゲルに注入して 100V で 20 分間電気泳動した。その後、紫外線 (365nm) 照射下でバンドを確認し、目的の DNA 断片を切り出してエッペンドルフチューブに移して -20 $^{\circ}$ C で一晩保存した。これを室温で解凍し、遠心分離 (15000rpm、3 分) した後、DNA を含む液 100 μ l を新しいエッペンドルフチューブに移し取った。さらに、チューブ内に残ったゲルに TE 緩衝液を加え、遠心分離してゲル中の DNA を完全に回収した。つぎに、得られた DNA 液に 3M 酢酸ナトリウム 10 μ l (1/10 量) および 99.5% エタノール 250 μ l (2.5 倍量) を加え、-80 $^{\circ}$ C で 15 分間凍結させた。これを遠心分離 (15000rpm、5 分) し、上清を除去した後、70% 冷却エタノール 500 μ l を壁面に沿うように流し入れ、沈殿した DNA を吸い込まないように留意しながら直ちにエタノールを除去した。これを DNA Speed Vac で 3 分間減圧乾燥した後、沈殿物を超純水 50 μ l に溶解し、シーケンス用 DNA 液とした。DNA 電気泳動装置に泳動用緩衝液を入れ、そこにエチジウムブロマイドを含む 0.8% アガロースゲル (INA agar; Wako) をセットし、パラフィルム上で MBCN152-1 の DNA サンプル 1 μ l とマーカー 6 (0.5 μ g/ μ l; 日本ジーン) 1 μ l をそれぞれ 6 \times ローディング緩衝液 4 μ l と混合した後、アガロースゲルに注入して 100V で 20 分間電気泳動した。ゲ

ル中の DNA 量を Printgraph において確認した。0.2 ml の PCR チューブに pre mix 8 μ l、シーケンス用 DNA 液 1.5 μ l にそれぞれ 27f プライマー 1 μ l (フォワードプライマー、50 μ M)、357f (フォワードプライマー、50 μ M)、1000- (フォワードプライマー、50 μ M)、517r (リバースプライマー、50 μ M)、-1000 (リバースプライマー、50 μ M)、1492r プライマー 1 μ l (リバースプライマー、50 μ M) を入れ、超純水を加えて全量 20 μ l の PCR 反応液を調製した。直ちにサーマルサイクラーでシーケンス反応 (ホットスタート法を採用。反応条件: 95°C 3 分を 1 サイクル、95°C 20 秒、50°C 10 秒、60°C 1 分を 35 サイクル、20°C で保存) を行った。シーケンス反応産物に 3M 酢酸ナトリウム 10 μ l (1/10 量) および 99.5% エタノール 250 μ l (2.5 倍量) を加え、-80°C で 15 分間凍結させた。これを遠心分離 (15000rpm、5 分) し、上清を除去した後、70% 冷却エタノール 500 μ l を壁面に沿うように流し入れ、沈殿した DNA を吸い込まないように留意しながら直ちにエタノールを除去した。これを DNA Speed Vac で 3 分間減圧乾燥した後、シーケンサー (CEQ2000XL) により塩基配列波形パターンを読み取った。

得られた波形パターンから塩基配列を読みとり、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の Blast プログラム (Altschul *et al.* 1990) を用いて MBCN152-1 と相同性の高い配列を検索した。さらに、DDBJ 登録菌株である *Streptomyces* 属 27 菌株とともに、Clustal W 解析 (Thompson *et al.* 1994) により系統樹を作成した。系統樹は、*Bacillus subtilis* を外群として設定し、Kimura-2-parameter (Kimura 1980) の方法に従い近隣結合 (NJ) 法で作成した。枝の信頼性は、ブートストラップ 1000 回の処理により推定し、ブートストラップ値が 50% 以上のものはその数値を表記した。

第二項 結果

1. MBCN152-1 のコロニー性状および形態

ISP-2~5 で培養した MBCN152-1 の培養性状を表 1 にとりまとめた。いずれの培地上においても基生菌糸および気菌糸生長は旺盛であり、表面が平坦なコロニーを形成した。また、基生菌糸の色調は、表面および裏面ともに黄または茶系であった。気菌糸は灰色を呈しており、粉状であった。可溶性色素は、いずれの培地でも観察されなかった。

表1MBCN152-1 培養性状			
	菌体	培養性状	
ISP-2	気菌糸	生育良好	olive gray (411) オリーブ灰色
	基生菌糸		light reddish yellow(131) 浅い赤みの黄
	基生菌糸裏面	粉状	light reddish yellow(131) 浅い赤みの黄
	拡散性色素	なし	
ISP-3	気菌糸	生育良好	medium gray(407) 灰色
	基生菌糸		yellowish brown(99) 黄みの茶色
	基生菌糸裏面	粉状	light grayish brown(111) 明るい灰みの茶色
	拡散性色素	なし	
ISP-4	気菌糸	生育良好	medium gray(407) 灰色
	基生菌糸		light reddish yellow(131) 浅い赤みの黄
	基生菌糸裏面	粉状	light reddish yellow(131) 浅い赤みの黄
	拡散性色素	なし	
ISP-5	気菌糸	生育良好	purplish gray(414) 紫みのグレイ
	基生菌糸		pale reddish yellow(130) 薄い赤みの黄
	基生菌糸裏面	粉状	pale reddish yellow(130) 薄い赤みの黄
	拡散性色素	なし	

括弧内の数字は、新色名事典の標準色片番号を示す。

2. MBCN152-1 の形態

ISP-2～5 培地で培養した MBCN152-1 を光学顕微鏡観察した。その結果、培地によって MBCN152-1 孢子鎖の形態が異なっていた。ISP-2 培地では、孢子が直線～僅かに曲がって連鎖していた(図 20-A)。ISP-3 および ISP-4 培地では、連鎖した孢子の先端がループ状～フック状になっており、一部はらせん状孢子鎖を形成していた(図 20-B, C)。対して、ISP-5 培地では、他の培地と比較すると、らせん状孢子鎖が多く観察された(図 20-D)。

さらに、ISP-5 培地上の MBCN152-1 を SEM で詳細に観察したところ、表面が不規則なトゲ状の楕円形孢子(長径約 $1.5\mu\text{m}$ × 短径約 $0.8\mu\text{m}$)が多数(平均約 30 個)連なってらせん状孢子鎖を形成していることが明らかとなった(図 21)。このようならせん状孢子鎖は *Streptomyces* 属菌の特徴である(日本放線菌学会 2001)。また、孢子嚢や特徴的なその他の器官および構造は認められなかった。

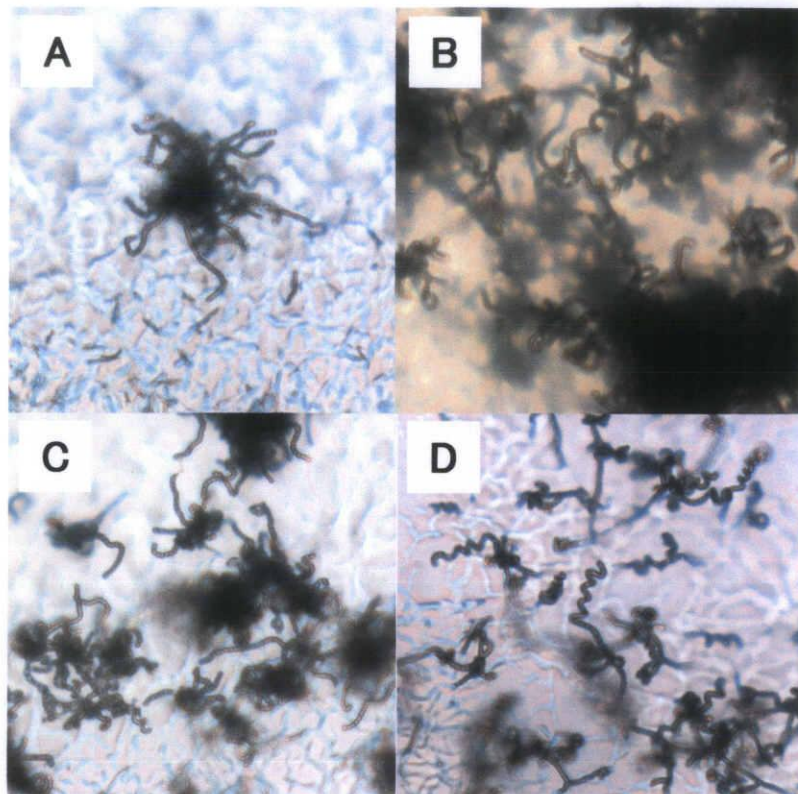


図 20 MBCN152-1 孢子鎖の光学顕微鏡像

A:ISP-2 上の孢子鎖, B:ISP-3 上の孢子鎖, C:ISP-4 上の孢子鎖, D:ISP-5 上の孢子鎖

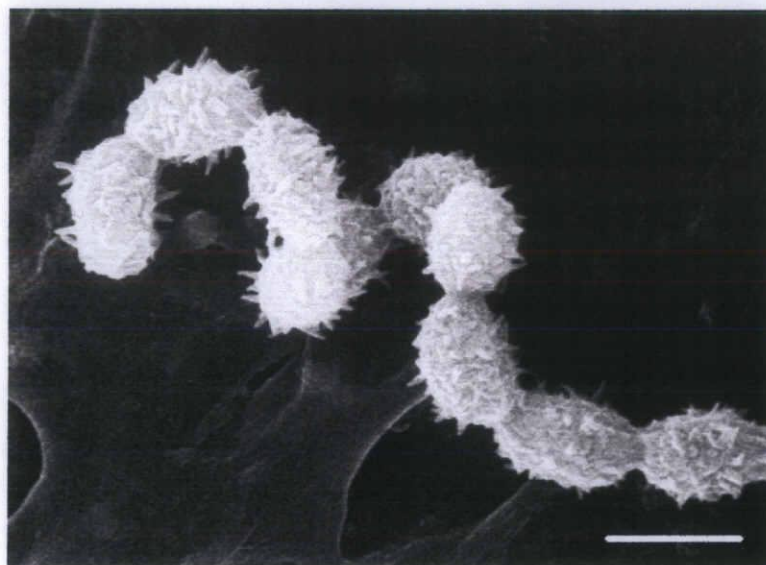


図 21 MBCN152-1 孢子鎖の SEM 像(スケール=1 μ m)

3. MBCN152-1 の 16S rDNA 塩基配列

MBCN152-1 の 16S rDNA をシーケンス解析し、約 1300bp の塩基配列を決定した(表 2)。この塩基配列を既知の放線菌とデータベース上で比較した結果、*Streptomyces humidus*、*S. albogriseolus*、*S. thermoluteus*、*S. viridodiatstaticus*、*S. atrovirens*、*S. macrosporeus* の 6 種と高い相同性(97%)を示した。さらに、上記 6 種を含む 27 種の *Streptomyces* 属菌と MBCN152-1 の 16S rDNA 塩基配列を基に分子系統樹を作成したところ、本菌株は *S. humidus* と最も近縁(ブートストラップ値 50%未満)であることが明らかとなった(図 22)。また、植物病原性の *Streptomyces* 属菌 4 種(*S. scabies*、*S. turgidiscabies*、*S. acidiscabies*、*S. ipomeae*)は 1 つのクラスターにまとまったが、本菌株はこのクラスターには属さなかったことから、これらとは近縁ではないことがわかった。さらに、海外で市販されている放線菌殺菌剤 2 剤(Actinovate、Mycostop)の有効成分である *S. lydicus* および *S. griseoviridis* と分子系統的には近縁でないことが確認された。

表 2 MBCN152-1 の 16S rDNA 塩基配列

1	ACTTCGGTGG GGATTAGTGG CGAACGGGTG AGTAACACGT GGGCAATCTG CCCTGCACTC	60
61	TGGGACAAGC CCTGGAACG GGGTCTAATA CCGGATACTG ACCCGCTTGG GCATCCAAGC	120
121	GGTTCGAAAG CTCCGGCGGT GCAGGATGAG CCCGCGGCCCT ATCAGCTTGT TGGTGAGGTA	180
181	ATGGCTCACC AAGGCGACGA CGGGTAGCCG GCCTGAGAGG GCGACCGGCC AACTGGGAC	240
241	TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGCAC AATGGGCGAA	300
301	AGCCTGATGC AGCGACGCCG CGTGAGGGAT GACGGCCTTC GGGTTGTAAA CCTCTTTCAG	360
361	CAGGGAAGAA GCGAAAGTGA CGGTACCTGC AGAAGAAGCG CCGGCTAACT ACGTGCCAGC	420
421	AGCCGCGGTA ATACGTAGGG CGCGAGCGTT GTCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGAGCTCGT	480
481	AGGCGGCTTG TCACGTCCGT TGTGAAAGCC CGGGGCTTAA CCCCGGGTCT GCAGTCGATA	540
541	CGGGCAGGCT AGAGTTCGGT AGGGGAGATC CGAATTCCTG GTGTAGCGGT GAAATGCCGA	600
601	GATATCAGGA GGAACACCGG TGGCGAAGGC GGATCTCTGG GCCGATACTG ACGCTGAGGA	660
661	GCGAAAGCGT GGGGAGCGAA CAGGATTAGA TACCCTGGTT AGTCCACGCC GTAAACGGTG	720
721	GGCACTAGGT GTGGGCGACA TTCCACGTCG TCCGTGCCGC AGCTAACGCA TTAAGTGCCC	780
781	CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGCTTAAA ACTCAAAGGA ATTGACCGGG GGCCCGCACA	840
841	AGCGGCGGAG CATGTGGCTT AATTCGACGC AACGCGAAGA ACCTTACCCA AGGCTTGACA	900
901	TACACCGGAA ACGTCTGGAG ACAGGCGCCC CCTTGTGGTC GGTGTACAGG TGGTGCATGG	960
961	CTGTCGTGAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCTTGT	1020
1021	CCCGTGTTC CAGCAAGCCC TTCGGGGTGT TGGGGACTCA CGGGAGACCG CCGGGGTCAA	1080
1081	CTCGGAGGAA GGTGGGGACG ACGTCAAGTC ATCATGCCCC TTATGTCTTG GGCTGCACAC	1140
1141	GTGCTACAAT GGCCGGTACA ATGAGCTGCG ATACCGCGAG GTGGAGCGAA TCTCAAAAAG	1200
1201	CCGGTCTCAG TTCGTGAAGT CGGAGTCGCT AGTAATCGCA GATCAGCATT GCTGCGGTGA	1260
1261	ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACGTCAG AAAGTCGGTA ACACCCGAAG	1320
1321	CCGGTGGCCC AAC	1333

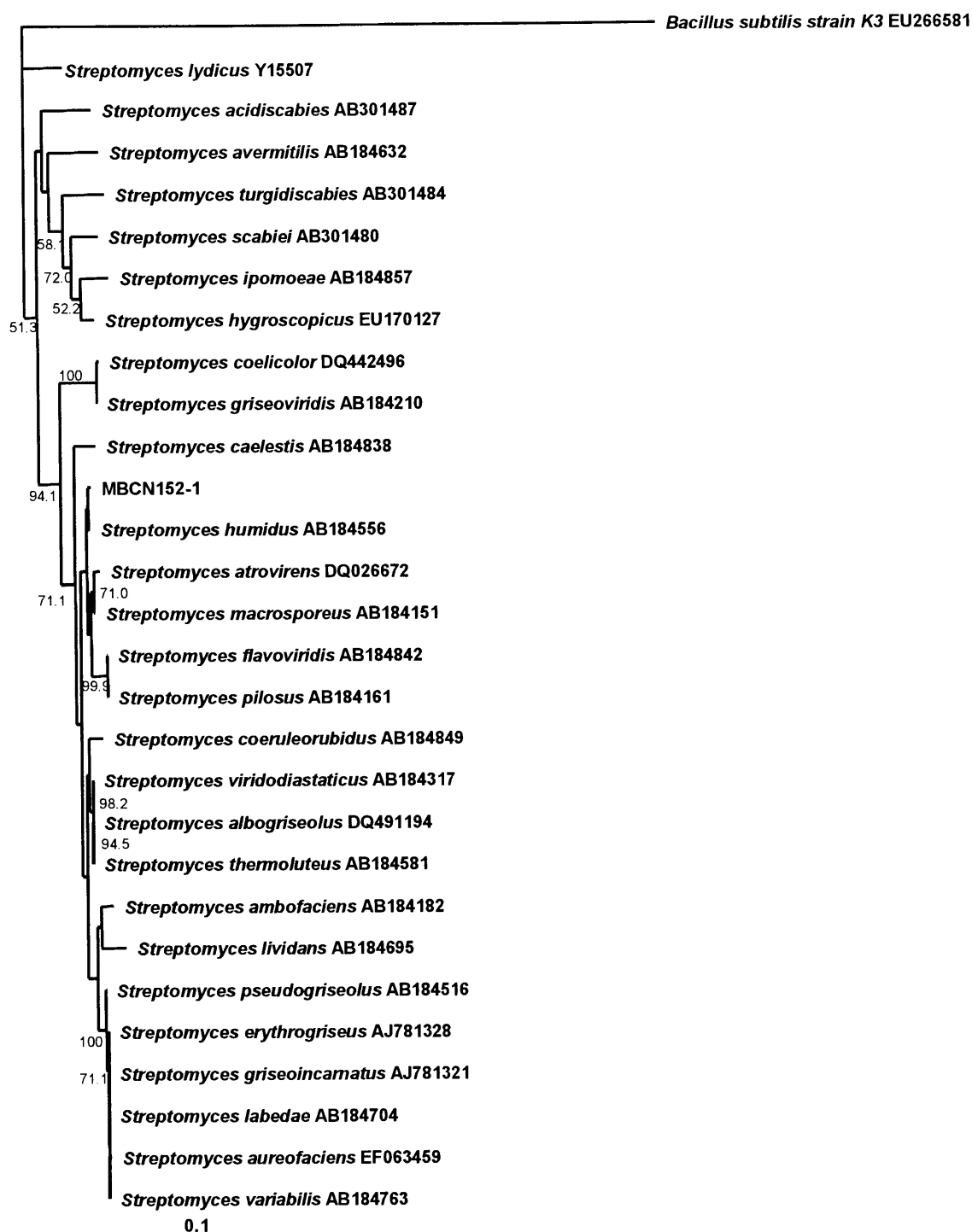


図 22 16S rDNA 遺伝子配列から得られた有根系統樹

分岐点の数値はブートストラップ確率を示す。

DDBJ/GenBank の accession number を菌名の後に示した。

第四節 考察

本章第一項でも述べたように、キャベツセル成型苗に深刻な被害をもたらす黒すす病に対処する新たな防除策が求められている。そこで、セル成型苗黒すす病の生物防除技術を開発することを最終目標として、本章では、まず生物防除エージェントとなる内生放線菌を圃場生育の健全キャベツから分離することとした。

次亜塩素酸ナトリウムとエタノールで表面殺菌したキャベツの組織片を寒天培地上で培養したところ、約 1 ヶ月後に試料表面に放線菌のコロニーが出現してきた(図 6)。これを分離・純化し、2004~2005 年の 2 年間で合計 129 菌株を得た。他の研究グループも同様に表面殺菌した植物試料から数週間かけて放線菌を分離し、これらを植物体内に内生するエンドファイトであるとしている(Cao *et al.* 2004; Coombs *et al.* 2003; Castillo *et al.* 2002; Sardi *et al.* 1992)。このことから、本研究で分離した放線菌もエンドファイトと考えて差し支えないだろう。

これら 129 菌株のうちの 51 菌株は、寒天培地上での生育と孢子形成が不良であった。微生物殺菌剤の実用化には、乗り越えなければならない様々な障害が立ちはだかる。その一つが製造コストである。微生物を大量培養し、これを生きた状態で製剤化しなくてはならない微生物農薬は、化学農薬と比較すると製造コストが高く、このことが実際の現場への普及を難しくさせている(和田 2004)。製造コストの低い微生物農薬を開発するためには、まず大量培養が容易な微生物菌株の中から生物防除エージェントを選抜する必要があると考えられる。このことから、生育と孢子形成が不良な 51 菌株を選抜対象から外し、残りの 78 菌株の中から有望菌株を選抜することにした。

多くの研究者が、培地上での拮抗性を基準に選抜した微生物を用いて生物防除試験を行っている(Li *et al.* 2002; Folman *et al.* 2004)。しかし、*in vitro* での拮抗性と生物防除活性が必ずしも一致しない場合がある。例えば、Kilic-Ekici *et al.* (2003)は、熱処理を施して抗菌物質生産能を失わせ、*Lysobacter enzymogenes* C3 株が、*Bipolaris Solokiniana* によって引き起こされるトールフェスク斑点病に対して無処理の C3 株と同レベルの防除効果を示したと報告している。このことから本研究では、*in vitro* での拮抗性よりも、むしろ実際の黒すす病防除活性を基準に有望菌株を選抜すべきであると考えた。そこで、本研究では、分離放線菌株の黒すす病防除活性を検定し、2005 年度および 2006 年度には、それぞれ MBCY58-1 株および MBCN152-1 株を選抜した。これら 2 菌株を用いて最終選抜を行った結果、防除活性が高い MBCN152-1 を最終候補株として選抜した。この MBCN152-1 を混和した育苗培土で育成した苗では、噴霧接種した黒すす病菌による病徴の進展

が抑制された(図 14)。また、MBCN152-1 混和育苗培土に黒すす病菌汚染種子を播種して育成すると、発芽した苗の発病と病徴進展が顕著に抑制された(図 16)。本章第二節で述べたように、セル成型苗黒すす病を効率的に防除するためには、汚染種子からの子苗感染(一次伝染)と発病苗からの二次伝染を抑制することが重要である。このことから、上述のように一次・二次伝染を顕著に抑制する MBCN152-1 は、セル成型苗黒すす病の生物防除エージェントとして極めて有望な菌株であると考えられる。

データは示していないが、秋～春栽培(11～3 月)と比べると夏栽培(7～10 月)のキャベツの方が内生放線菌の分離率が高かったことから、気温が高くなると内生放線菌の活動が活発化し、植物体内の菌密度が上昇すると推察される。実際、MBCN152-1 も比較的気温の高い 9 月に採取したキャベツから分離された。一方、*A. brassicicola* は高温性で、種子伝染による苗立枯れの適温は 30℃であるという報告もある(Bassey, *et al.* 1983)。我々の調査でも、キャベツセル成型苗の黒すす病は、育苗温室内の気温が高い 8～11 月に多発することが明らかとなっている(窪田ら 2006; 中筋 2006)。これらのことを併せ考えると、黒すす病が多発する高温期に活動が活発化するであろう MCN152-1 は、本病の生物防除エージェントとして最適であると言える。

MBCN152-1 は、らせん状孢子鎖を形成することから *Streptomyces* 属菌であることが明らかとなった。さらに、本菌株と既知種の 16S rDNA 塩基配列をデータベース上で既知種のそれと比較するとともに、分子系統樹を作成した結果、本菌株は *S. humerus* と近縁であることが明らかとなった(図 22)。しかし、*S. humerus* の孢子は表面が平滑であるが(Shirling and Gottlieb 1968)、MBCN152-1 の孢子表面は棘状であったことから(図 21)、明らかに形態が異なる。また、*S. humerus* は ISP 培地上で黄色の拡散性色素を生産するのに対して(Shirling and Gottlieb 1968)、MBCN152-1 は拡散性色素を全く生産しない(表 1)。さらに、*S. humerus* は培地上で糸状菌および細菌に対して拮抗性を示すが(中沢ら 1957)、第四章の拮抗性検定で MBCN152-1 はキャベツ病原糸状菌 6 菌株に対して拮抗性を全く示さなかった(表 3)。以上の相違点から、MBCN152-1 は *S. humerus* と遺伝的に近縁であるが同一種とは言えず、新規の放線菌ではないかと考えられる。また、海外で市販されている放線菌殺菌剤 2 剤(Actinovate および Mycostop)の有効成分である *S. lydicus* および *S. griseoviridis* と全く異なる種であることが明らかとなった。Coombs *et al.* (2003)は、コムギ根から分離した内生放線菌 19 菌株の 16S rDNA 塩基配列を基に系統解析を行っている。興味深いことに、彼らが分離した内生放線菌の多くが植物病原性の *S. scabiei* および *S. caviscabiei* と極めて近縁であったと報告している。このことから、本研究でキャベツから分離し

た MBCN152-1 も病原性放線菌と近縁である可能性が考えられた。そこで、MBCN152-1 と病原性放線菌の系統関係を解析したところ、MBCN152-1 は植物病原性の *Streptomyces* 属菌 4 種 (*S. scabies*、*S. turgidiscabies*、*S. acidiscabies*、*S. ipomeae*) が含まれるクラスターには属さず、これらとは近縁でないことが明らかとなった(図 22)。本菌株が偶然にも病原性 *Streptomyces* spp. と近縁な種ではなかったのか、あるいはキャベツには病原性 *Streptomyces* spp. とは遠縁なグループが内生するのかは定かではない。この点を明らかにするには、本研究で分離した他の放線菌についても分子系統解析を行う必要がある。しかしながら、本解析結果は、MBCN152-1 を微生物殺菌剤として実用化しても他の作物に病気を引き起こす危険性が低いことを示唆している。

第三章 実用化に向けた *Streptomyces* sp. MBCN152-1 の特性の解析

第一節 序

近年、生物源農薬の利用や耕種的防除、抵抗性品種の開発などによって、化学物質の使用を最小限に抑えた防除体系を組み立てようとする総合防除 (IPM) が注目されており、その中でも微生物等を利用した生物農薬は重要な地位を占めている (鈴井ら 2000)。日本でも微生物殺菌剤としてボトキラー水和剤やバイオキパー水和剤などの 16 剤が登録されている。微生物殺菌剤には、1) 安全性が高い、2) 自ら繁殖して作用する、3) 耐性菌が出現しにくい、4) 天敵昆虫などとの親和性が高いなどの利点がある (山田 2000; 和田ら 2005)。しかし、世界における微生物農薬のマーケットは極めて小さく、*Bacillus thuringiensis* を有効成分とする BT 剤以外ではほとんどがマイナー製品となっている。2004 年発刊の *Agrow* 誌によると、世界の微生物農薬のマーケットサイズは 150 億円前後となっており、そのうち 100 億円程度が BT 剤と推定されている。残りの約 50 億円のうち、10-20 億円は微生物殺菌剤と推定されるが、これは大型化学農薬 1 剤の売り上げにも到底及ばない (和田 2005)。このように微生物農薬が普及しない理由として、1) スペクトラムが狭い、2) 流通・保存の性能に乏しい、3) 環境の影響を受けやすい、4) 効果の発現が遅いなどが挙げられる (和田 2005)。すなわち、市場性の高い微生物殺菌剤を開発するには、経済性を考慮しながらこれらの技術的課題をクリアしなくてはならない。第一の課題は、大量培養が容易な微生物を得ることであろう。例えば防除活性が高くても、培養困難な微生物では製剤化コストがかかるため、製品価格が上昇してしまう。さらに、流通・保存コスト低減の観点からすると、軽量の乾燥状態で常温長期保存が可能な、つまり孢子や芽胞を形成する微生物であることが望ましい。実際、既に市販されている微生物殺菌剤のボトキラー水和剤やバイオトラスト水和剤は、それぞれ *Bacillus subtilis* の芽胞や *Talaromyces flavus* の孢子を有効成分として含有する粉状水和剤である。これらのように、微生物の孢子 (芽胞含む) を用いる理由は、孢子が微生物にとって好適ではない環境条件や土壌中の他の微生物由来の抗菌物質に対する耐性を有しているからである (El-Hassan *et al.* 2006)。一般的に、*Streptomyces* 属放線菌の孢子も乾燥や高温などの外的ストレスに対して耐性であると言われている (McBride and Ensign 1987)。このことから、有望菌株 *Streptomyces* sp. MBCN152-1 を製剤化する場面では、本菌株の孢子を利用することとなるが、前章では培養液 (= 菌糸) を用いた生物防除活性の検定を中心に行ったため、本菌株孢子の防除活性について再度確認する必要がある。また、本菌株孢子が乾燥状態で保存可能か否かについても検討していない。

第二の課題は、最適な施用方法の確立であろう。微生物農薬は植物に施用後、速やかに植物体に着生・増殖し、効果を発揮することが重要である(土屋 2000)。このため、微生物殺菌剤を実用化するためには、効果的な施用方法を確立する必要がある。前章では、MBCN152-1 を育苗培土に混和する方法でしか防除活性の検定を行っていない。前述した通り、本法は黒すす病菌汚染種子に対して高い防除効果を発揮した。しかし、罹病苗からの飛散分生子による二次感染を防ぐには、この育苗培土混和が必ずしも最適な施用方法とは言えないことから、他の方法についても検討を要する。

海外では、Actinovate (Natural Industries Inc., USA) と Mycostop (Verdera Oy, Finland) の 2 剤が放線菌殺菌剤として既に販売されている。Actinovate のファクトシートによると、本剤は *Pythium*、*Rhizoctonia*、*Fusarium*、*Phytophthora* 属菌などの糸状菌類により引き起こされる各種の土壌病害に防除効果があるとされている (Natural Industries, Inc. のホームページ; <http://www.naturalindustries.com/actinovateAG.htm>)。また、本剤は、*Alternaria* や *Botrytis* 属菌などによる地上部病害に対しても有効性が認められている。本剤の有効成分は、MBCN152-1 と同じ *Streptomyces* 属に属する *S. lydicus* WYEC108 株(以下、WYEC108 と略記) (Tokala et al. 2002) である。MBCN152-1 の実用化にあたっては、このような市販剤との効果比較によって市場性を評価する必要がある。

そこで本章では、①MBCN152-1 胞子の黒すす病防除効果、②MBCN152-1 胞子の葉面散布による防除効果、③MBCN152-1 凍結乾燥胞子の長期保存性を検討するとともに、④市販剤 Actinovate との防除効果の比較を行うこととした。

第二節 MBCN152-1 の処理方法の検討

第一項 材料と方法

1. MBCN152-1 胞子の育苗培土混和による黒すす病防除効果の検討

(1) 噴霧接種した黒すす病菌に対する効果

滅菌育苗培土 320g(乾土)に適量の水道を灌水した。 2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 胞子/g (乾土)となるように、滅菌水で 10^6 、 10^7 、 10^8 胞子/ml に調整した MBCN152-1 胞子懸濁液 64ml を育苗培土に滴下して十分混和した後、128 穴セルトレイに充填した。これらのセルトレイに表面殺菌キャベツ種子を播種し、滅菌バーミキュライトで覆土した後、温室で 1 週間育苗した。対照区として、胞子懸濁液と同量の滅菌水を混和した育苗培土でキャベツ苗を育苗した。各処理区の苗に黒す

す病菌接種源を噴霧接種(1苗当り約 312 μ l)し、接種槽(26℃、相対湿度 100%、12 時間光照射)で 1 日間培養した後、温室内(平均気温 27℃)でさらに 6 日間培養した。これらの苗を肉眼観察し、第二章第一項 4-(1)-③と同様に罹病度を 4 段階に分類し、平均罹病度を算出した。さらに、次式に従って防除価を算出した。なお、本実験では、各処理区につき 64 苗を供試し、3 反復の試験を行った。また、平均罹病度については、ウィリアムズの多重比較検定により解析した。

$$\text{防除価} = \{ (1 - \text{平均罹病度}[\text{処理区}]) / \text{平均罹病度}[\text{対照区}] \} \times 100$$

(2) 黒すす病菌汚染種子に対する効果

まず、上記と同様にして 1.5×10^6 、 1.5×10^7 、 1.5×10^8 孢子/g(乾土)の MBCN152-1 孢子混和育苗培土を調製した。つぎに、これらの育苗培土をそれぞれ 20g ずつ滅菌ガラスシャーレに充填した。ここに、汚染種子 30 粒を播種して培養を行った。また、孢子懸濁液と同量の滅菌水を混和した育苗培土に汚染種子を播種したものを対照区とした。各処理区の苗を肉眼観察し、罹病度を 4 段階[0: 病徴なし、1: 軽症(子葉に黒色小斑点または胚軸に黒い筋が認められる)、2: 重症(子葉に灰色～黒色の大型病斑または胚軸の腐敗が認められる)、3: 枯死]に分類し、平均発病度および防除価を算出した。なお、本実験では、各処理区につき 3 反復の試験を行った。また、平均発病度については、シャーリー・ウィリアムズの多重比較検定により解析した。

2. MBCN152-1 孢子葉面散布による黒すす病防除効果の検討

滅菌育苗培土を 128 穴セルトレイに充填し、適量の水道水を灌水した。ここに表面殺菌キャベツ種子を播種し、滅菌バーミキュライトで覆土した後、温室で 1 週間育苗した。霧吹きで MBCN152-1 孢子懸濁液(10^8 孢子/ml)を苗に葉面散布(312 μ l/苗)し、さらに 3 日間育苗した。また、同量の滅菌水を葉面散布し、対照区とした。その後、黒すす病菌接種源を苗に噴霧接種(312 μ l/苗)し、接種槽(26℃、相対湿度 100%、12 時間光照射)で 1 日間培養した後、さらに温室内で 6 日間培養した。これらの苗を、第二章第二節第一項 4-(1)-③と同様に罹病度を 4 段階に分類し、平均罹病度および防除価を算出した。なお、本実験では、各処理区につき 64 本のキャベツ苗を供試し、3 反復の検定を行った。また、平均罹病度については、 t 検定(片側検定)により解析した。

第二項 結果

1. MBCN152-1 胞子の育苗培土混和による黒すす病防除効果

(1) 噴霧接種した黒すす病菌に対する効果

2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 胞子/g (乾土)となるように MBCN152-1 胞子を混和した育苗培土で育苗したキャベツ苗に黒すす病菌分生子を噴霧接種した。その結果、対照区では、接種 1 週間後には 32%の苗の子葉に黒色斑点や子葉斑(小型の壊死斑)といった軽度の病徴が生じており、35%の苗は子葉の大部分が壊死していた(重症症状)。さらに、31%は苗全体が腐敗し、枯死していた(図 23-A)。一方、MBCN152-1 胞子処理区では病徴進展が抑制され(図 24)、平均罹病度が対照区よりも有意に低下していた(図 25)。また、混和した MBCN152-1 胞子濃度が高くなるに従い、病徴進展抑制効果が上昇する傾向が認められた(図 25)。枯死苗の割合に注目すると、 2×10^5 胞子/g 処理区では 17%、 2×10^6 胞子/g 処理区では 13%、 2×10^7 胞子/g 処理区では 5%となっており、処理濃度依存的に枯死苗率が低下していることがわかる(図 24)。最も処理濃度の高い 2×10^7 胞子/g 処理区では、重症苗も対照区の半分程度しか存在せず、ほとんどの苗がその後の生存には支障のない程度の軽症症状を示しただけであった。また、各処理区の防除価を算出したところ、 2×10^5 胞子/g 処理区で 13、 2×10^6 胞子/g 処理区で 20、 2×10^7 胞子/g 処理区で 38 となった。

以上の結果から、MBCN152-1 の胞子を育苗培土に混和することにより、噴霧接種した黒すす病菌による発病を抑制できることを確認した。また、その効果は胞子濃度依存的に増加することが明らかとなった。

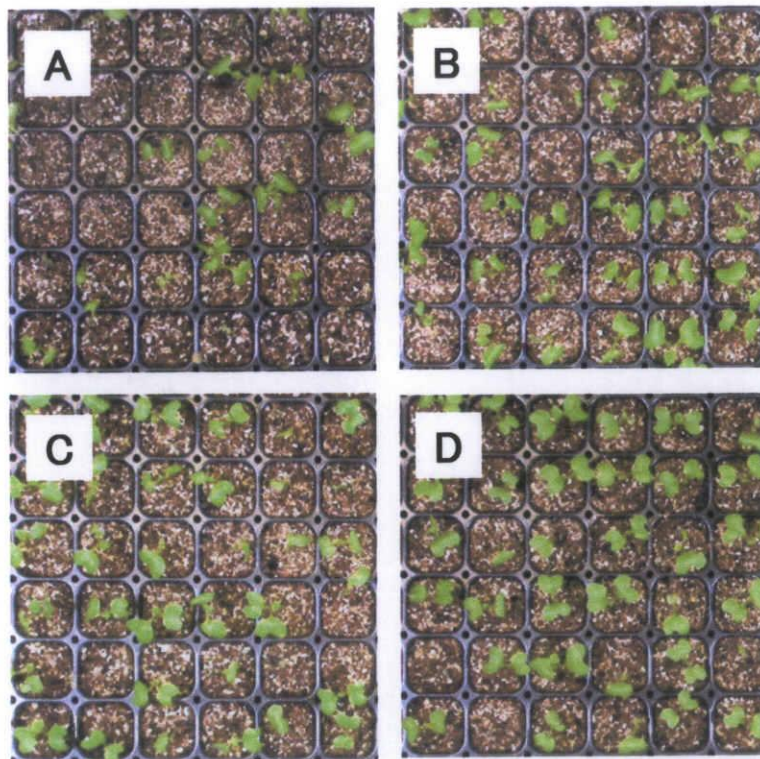


図 23 MBCN152-1 胞子を培土混和して育苗した黒すす病菌接種苗

A: 対照区, B: 2×10^5 胞子/g 処理区

C: 2×10^6 胞子/g 処理区, D: 2×10^7 胞子/g 処理区

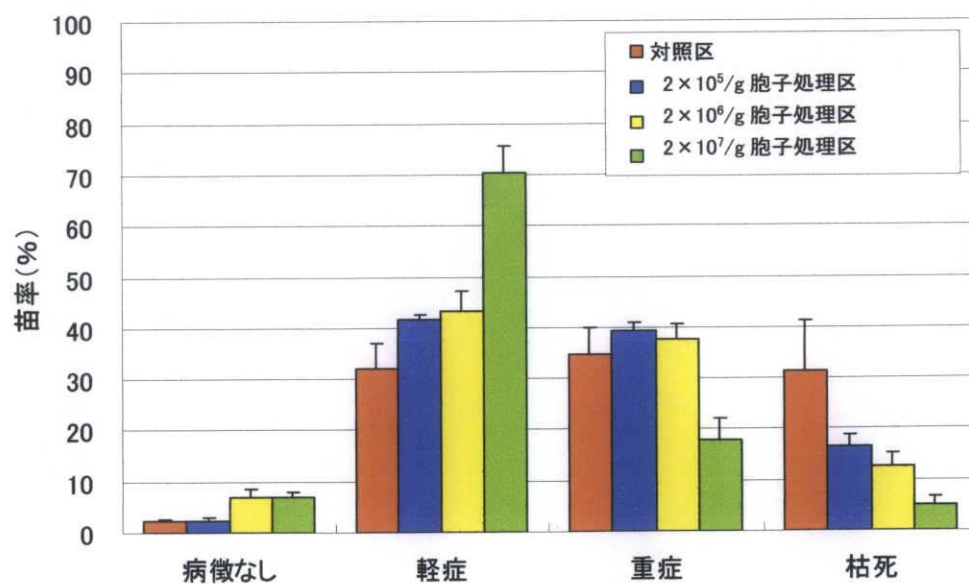


図 24 黒すす病菌接種した各処理区の苗の罹病度分布

バーは標準誤差を示す

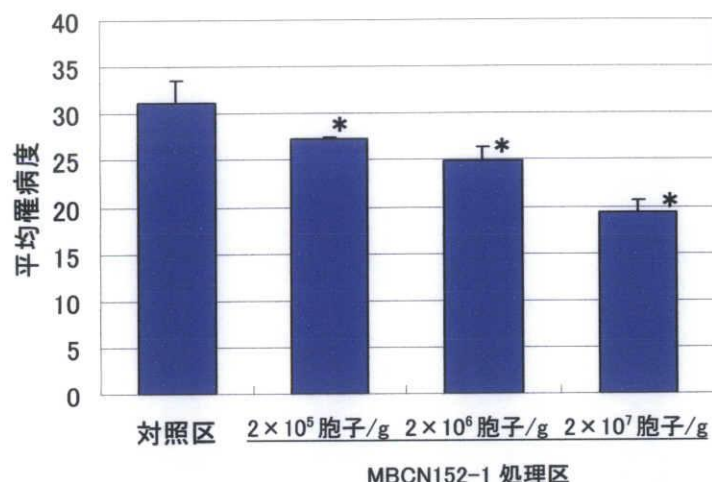


図 25 MBCN152-1 孢子処理区における黒すす病菌接種苗の平均罹病度

*ウィリアムズの多重比較検定の結果、5%水準で有意差があることを示す。

バーは標準誤差を示す。

(2) 黒すす病菌汚染種子に対する効果

MBCN152-1 孢子混和育苗培土に汚染種子を播種して2週間育成した。その結果、対照区では、播種 1 週間目頃から胚軸の地際部に黒筋が現れ始め、2 週間目には多数の苗の子葉や胚軸に病徴が認められた(図 26)。一方、MBCN152-1 処理区では明らかに発病が抑制されており、ほとんどの苗が健全に生育を続けていた(図 26)。各処理区の発病苗率を算出した結果、対照区が 46%であったのに対して、MBCN152-1 処理区では 5%以下と有意に低いことが明らかとなった(図 27)。この結果は、MBCN152-1 孢子の培土混和处理に発病抑制効果があることを示唆している。また、対照区では 8%の苗が腐敗枯死したが、MBCN152-1 処理区の苗は全く枯死しなかったことから、病徴進展も抑制されていることがわかった(図 27)。本試験においても、上記の噴霧接種試験と同様に、MBCN152-1 孢子の処理濃度が高いほど発病抑制効果が上昇する傾向が認められた(図 27)。特に、 1.5×10^8 孢子/g 処理区では発病が完全に抑制され、発病率が 0%となった。各処理区の防除価を求めたところ、 10^6 孢子/g 処理区で 90、 10^7 孢子/g 処理区で 98、 10^8 孢子/g 処理区で 100 と極めて高かった。

以上の結果から、MBCN152-1 の孢子を育苗培土に混和することにより、汚染種子から発芽した苗の発病と病徴進展を抑制できることを確認した。また、その効果は孢子濃度依存的に増加することが明らかとなった。

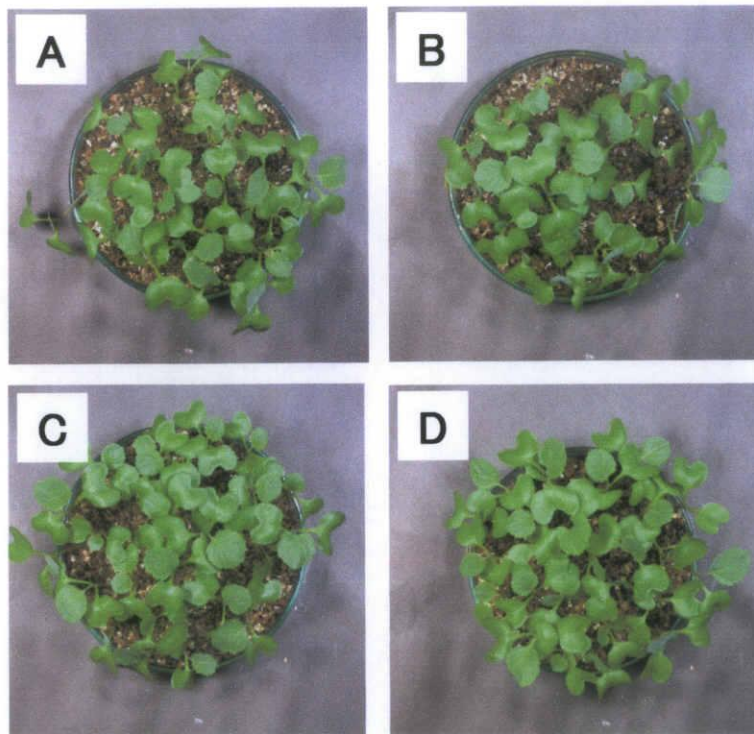


図 26 MBCN152-1 孢子混和培土で育成した汚染種子から発芽した苗

A: 対照区, B: 1.5×10^6 孢子/g 処理区

C: 1.5×10^6 孢子/g 処理区, D: 1.5×10^6 孢子/g 処理区

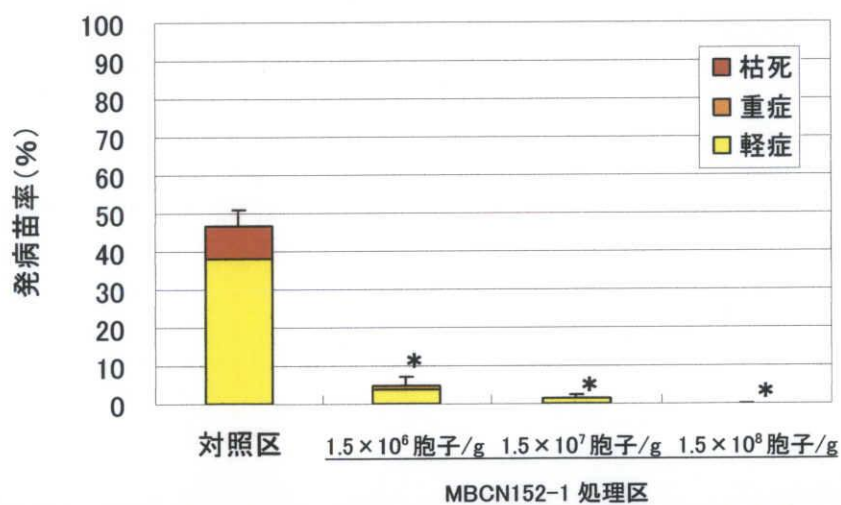


図 27 MBCN152-1 孢子混和育苗培土に播種した汚染種子から発芽した苗の発病率と罹病程度

*シャーリー・ウィリアムズの多重比較検定の結果、5%水準で有意差があることを示す。

バーは標準誤差を示す。

2. MBCN152-1 孢子葉面散布による黒すす病防除効果

MBCN152-1 孢子懸濁液(10^8 孢子/ml)を葉面散布して 3 日後のキャベツ苗に黒すす病菌胞子を噴霧接種し、2 週間後に発病を調査した。その結果、図 28 に示したように、MBCN152-1 処理区では対照区よりも腐敗枯死する苗が明らかに少なく、多くの苗が本葉 2 枚を展開するまでに生長していた。対照区では、接種3日目頃から子葉に黒色の小斑点が現れ始め、2週間後には病徴が進展して 58%の苗が重症化・枯死していた(図 29)。MBCN152-1 処理苗の子葉にも 3 日目頃から黒色小斑点が現れ始め、1 週間後にはほとんどの苗の子葉に病斑が形成された。しかし、その後の病徴進展は顕著に抑制され、2 週間後においても 77%の苗は軽症症状のままで、枯死した苗はわずか 1%であった(図 29)。平均罹病度を比較すると、対照区が 28 であったのに対して、MBCN152-1 処理区では 19 と有意に低いことが明らかとなった(図 30)。また、MBCN152-1 処理区の防除価を算出したところ、34 であった。以上の結果から、キャベツ苗への MBCN152-1 胞子の葉面散布でも、黒すす病徴の進展を有意に抑制できることが明らかとなった。



図 28 MBCN152-1 胞子を葉面散布したキャベツ苗における黒すす病徴の進展

A:対照区 B:MBCN152-1 処理区

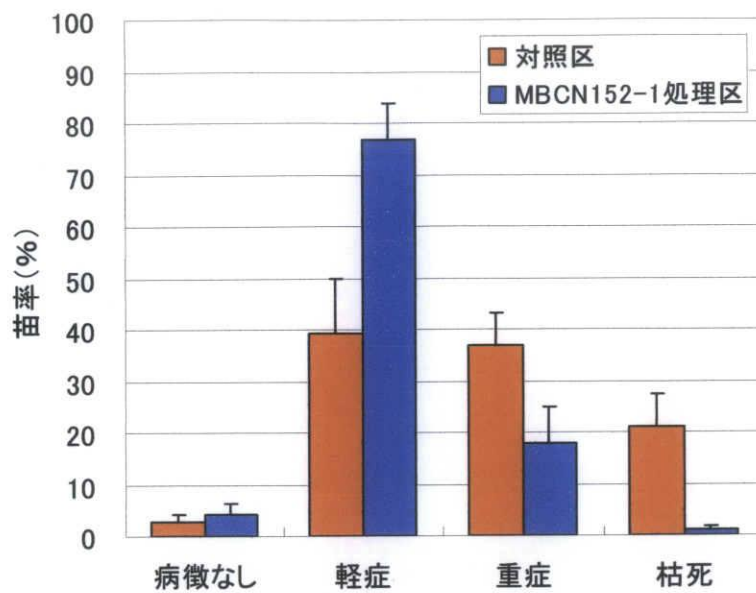


図 29 MBCN152-1 孢子葉面散布による発病抑制試験での発病苗率
バーは標準誤差を示す

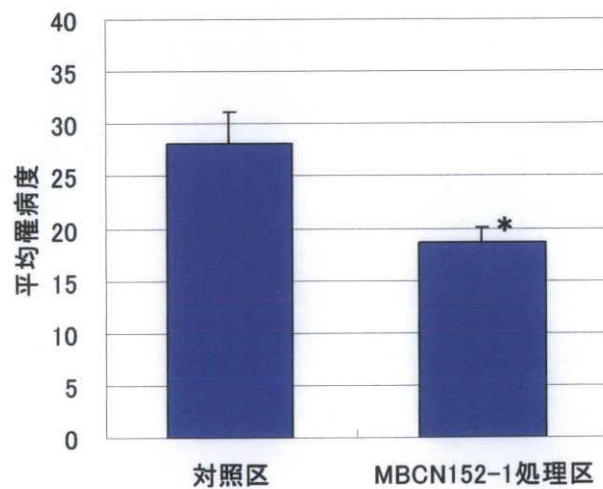


図 30 MBCN152-1 孢子を葉面散布した苗の平均罹病度

*t 検定の結果、5%水準で有意差があることを示す。

バーは標準誤差を示す。

第三節 MBCN152-1 のキャベツ苗への定着性の検定

第一項 材料と方法

本節では、育苗培土に処理した MBCN152-1 がキャベツ苗へ定着するか否かを検討することとした。培養ボトル(サイズ:100×110×100, アズワン)に滅菌育苗培土 50g を入れ、シリコンフィルターを取り付けたフタを閉めて高圧滅菌(121℃・20 分間)した。ここに、 10^8 孢子/g (乾土)となるように、MBCN152-1 孢子懸濁液(10^8 孢子/ml)50ml を育苗培土に滴下して十分混和した。つぎに、表面殺菌キャベツ種子 10 粒を播種し、高圧滅菌したバーミキュライトで覆土した後、人工気象器(25℃、12 時間光照射)で 1 週間培養した。これらの苗を抜き取って葉を細断し、第二章第一節第一項 2 の手順で表面殺菌した後、素寒天培地に置床して 30℃で培養した。

第二項 結果

MBCN152-1 のキャベツ苗への定着性を明らかにするため、MBCN152-1 処理して 1 週間培養した苗からの再分離試験を行った。その結果、培養 3 週間後には、子葉から放線菌菌体が試料表面に出現してきたことを光学顕微鏡で確認した(図 31)。第二章で観察した MBCN152-1 の培養性状と同じ灰色の菌体であったため、子葉から出現した放線菌は MBCN152-1 であると判断した。さらに、MBCN152-1 の再分離率を算出したところ、33%であった。以上の結果から、MBCN152-1 は 1 週間以内にキャベツ子葉に定着していることが明らかとなった。

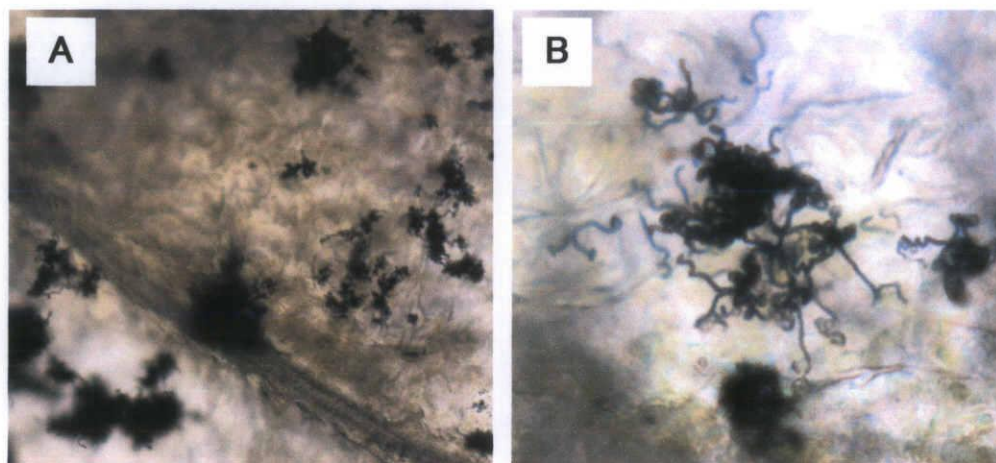


図 31 キャベツ子葉上に出現した MBCN152-1

A:倍率 200 倍 B:倍率 400 倍

第四節 黒すす病に対する *Streptomyces lydicus* WYEC108 株および MBCN152-1 株の防除効果の比較

第一項 材料と方法

本章第一節でも述べたように、*Alternaria* 病害に防除活性のある放線菌殺菌剤 Actinovate (有効成分 *Streptomyces lydicus* WYEC108 株) が海外では既に市販されている。

そこで本節では、MBCN152-1 の市場性を評価する目的で、MBCN152-1 と WYEC108 の黒すす病防除活性を比較することとした。

1. *Streptomyces lydicus* WYEC108 孢子懸濁液の調製法

予備試験的に、Actinovate 混和育苗培土でキャベツを育苗したところ、苗に奇形が生じることが明らかとなった。正確な原因は不明であるが、本剤に添加されている保護剤などの成分が影響したものと考えられたため、有効成分である WYEC108 を本剤から分離し、純粋培養して試験に供試することとした。

まず、無菌的に計り取った 0.1g の Actinovate を滅菌水 0.9ml に懸濁した後、滅菌水で段階希釈した。Bennet 寒天培地上に適当倍率の希釈液 100 μ l を滴下し、コンラージュ棒で均一に塗布した後、30°C で約 2 週間培養した。培地上に出現したコロニーの中から 1 コロニーだけを白金耳でかき取り、Bennet 寒天培地に移植して孢子形成するまで培養した。ここに 10% グリセリン・10% DMSO 溶液を流し入れ、白金耳で孢子を懸濁した後、プラスチックチューブに分注して -80°C で保存した (以下、WYEC108 孢子懸濁液と称する)。

2. 噴霧接種した黒すす病菌に対する MBCN152-1 および WYEC108 の防除効果の比較

滅菌育苗培土 320g (乾土) に適量の水道を灌水した。2 \times 10⁷ 孢子/g (乾土) となるように、10⁸ 孢子/ml に調整した MBCN152-1 および WYEC108 の孢子懸濁液 64ml をそれぞれ育苗培土に滴下して十分混和した後、128 穴セルトレイに充填した。これらのセルトレイに表面殺菌キャベツ種子を播種し、滅菌バーミキュライトで覆土した後、温室で 1 週間育苗した。また、孢子懸濁液と同量の滅菌水を混和した育苗培土で育苗し、対照区とした。その後、霧吹きで MBCN152-1 および WYEC108 の孢子懸濁液 (10⁸ 孢子/ml) を各処理区の苗にそれぞれ散布 (312 μ l/苗) し、さらに 3 日間育苗した。放線菌無処理の育苗培土で育苗し、孢子懸濁液と同量の滅菌水を散布したものを対照区とした。つぎに、黒すす病菌接種源を苗に噴霧接種 (312 μ l/苗) し、接種槽内 (26°C、相

対湿度 100%、12 時間光照射)で 1 日間培養した後、さらに温室内で 6 日間培養した。これらの苗を、第二章第二節第一項 4-(1)-①と同様に罹病度に従って 4 段階に分類し、平均罹病度および防除価を算出した。なお、本実験では、各処理区につき 64 本のキャベツ苗を供試し、3 反復の検定を行った。また、平均罹病度については、フィッシャーの最小有意差検定(LSD 検定)により検定した。

3. 黒すす病菌汚染種子に対する MBCN152-1 および WYEC108 の防除効果の比較

まず、上記と同様にして 1.5×10^8 孢子/g(乾土)の MBCN152-1 および WYEC108 孢子混和育苗培土を調製した。つぎに、これらの育苗培土をそれぞれ 20g ずつ滅菌ガラスシャーレに充填し、黒すす病菌汚染種子を播種して人工気象器内(26℃、12 時間光照射)で 14 日間培養した。また、滅菌水を混和した育苗培土に汚染種子を播種したものを対照区とした。各処理区の苗を肉眼観察し、第二章第二節 4-(2)と同様に 4 段階の罹病度分類し、平均発病率および防除価を算出した。また、発病率についてはフィッシャーの最小有意差検定(LSD 検定)により解析した。なお、本実験では、各処理区につき 3 反復の試験を行った。

第二項 結果

1. 噴霧接種した黒すす病菌に対する MBCN152-1 と WYEC108 の防除効果

対照区では、黒すす病菌接種後 3 日目頃には子葉が壊死し始め、接種 1 週間後の枯死苗率は 12%に達していた。それに対して、MBCN152-1 処理区および WYEC108 処理区では、発病はしたものの病徴は進展せず、軽症苗が 80%以上を占めており、枯死苗は両処理区とも 1%以下であった(図 32, 33)。平均罹病度を算出した結果、対照区(24)と比べて、MBCN152-1 および WYEC108 処理区の平均罹病度はそれぞれ 16 および 17 と有意に低かった(図 34)。また、MBCN152-1 処理区と WYEC108 処理区の間では有意差は認められなかった。しかし、重症苗に注目してみると、MBCN152-1 処理区および WYEC108 処理区の重症苗率はそれぞれ 7%および 12%であったことから、WYEC108 処理区の方が防除活性は若干低いと考えられた(図 33)。防除価で比較すると、WYEC108 処理区の防除価は 29 であったのに対し、MBCN152-1 処理区では 35 であったことから、MBCN152-1 処理は市販剤 Actinovate より同程度以上の黒すす病防除効果を有すると判断した。

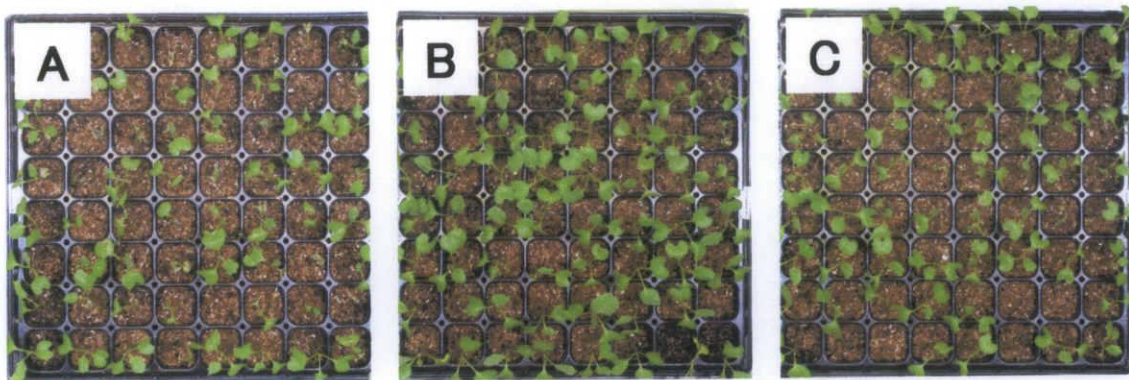


図 32 黒すす病菌を噴霧接種した各処理苗の発病状況

A: 対照区 B: MBCN152-1 処理区 C: WYEC108 処理区

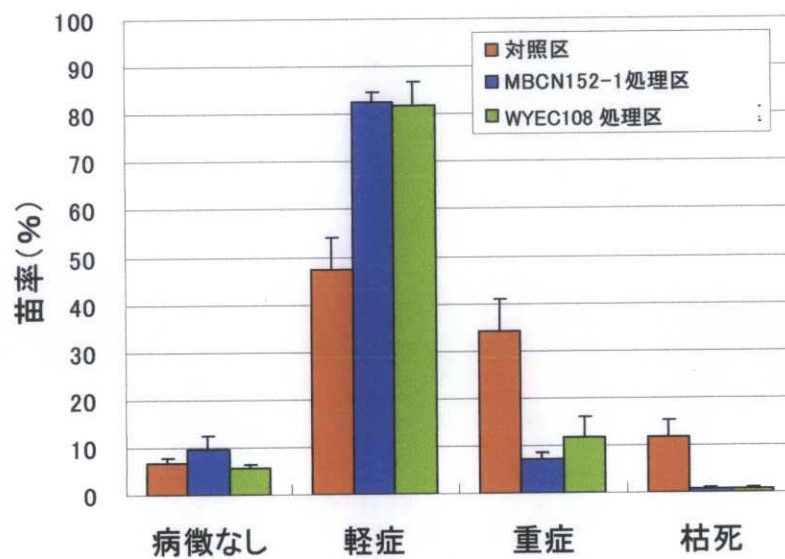


図 33 黒すす病菌を噴霧接種した各処理苗の罹病度分布

バーは標準誤差を示す

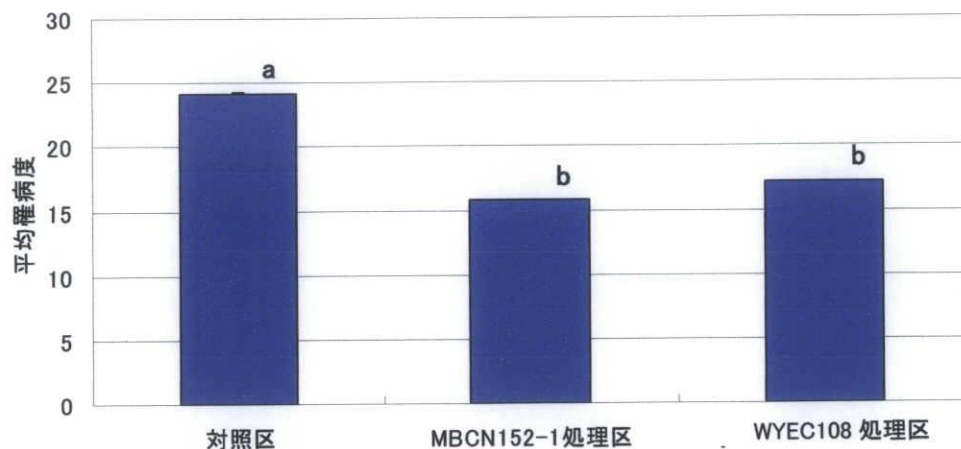


図 34 黒すす病菌を噴霧接種した MBCN152-1 および WYEC108 処理苗の平均罹病度

フィッシャーの最小有意差検定 (LSD 検定) の結果、異なる文字間では 5%水準で有意差があることを示す

バーは標準誤差を示す。

2. 黒すす病菌汚染種子に対する MBCN152-1 および WYEC108 の防除効果

対照区では、13%の苗で胚軸全体に黒筋が形成または子葉の大部分に壊死が生じており(重症症状)、6%の苗が腐敗枯死していた(図 35, 36)。WYEC108 処理区では、23%が重症化、8%が枯死しており、対照区よりも病徴が進展していた。また、WYEC108 処理区の苗には、子葉の外縁部に黄化が生じる一種の葉害症状が観察された(図 35, 36)。それに対して MBCN152-1 処理区では、わずか 1%の苗が枯死しただけで、他の苗は胚軸の地際部にわずかな黒筋が認められるか子葉に微小な病斑が生じる程度の軽症症状であり、明らかに病徴進展が抑制されていた(図 35)。各処理区の発病苗率を算出したところ、対照区が 46%であったのに対して WYEC108 処理区は 47%であったことから、WYEC108 は汚染種子由来苗の発病を全く抑制しないことが明らかとなった(図 36)。一方で、MBCN152-1 処理区の発病苗率は 11%で、対照区および WYEC108 処理区と比べて有意に発病が抑制されていた(図 36)。さらに、各処理区の防除価を算出した結果、MBCN152-1 処理区および WYEC108 処理区の防除価は、それぞれ 81 および 21 となった。この結果から、WYEC108 は黒すす病菌汚染種子に対して防除効果を全く示さないと判断した。

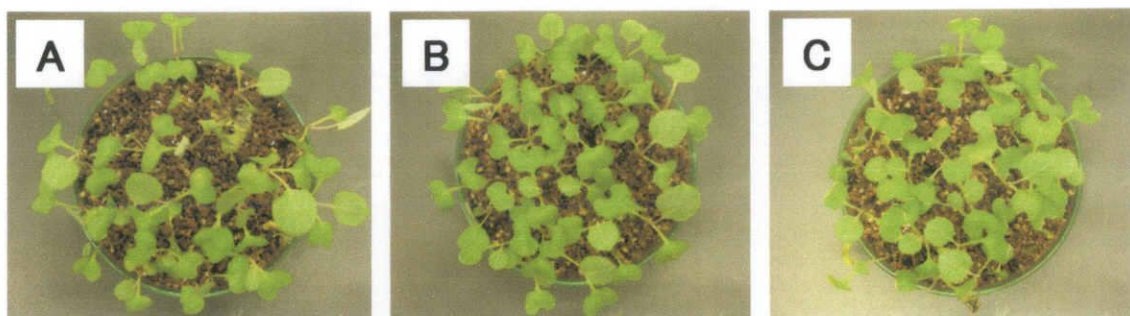


図 35 各処理区の汚染種子由来の発病状況

A: 対照区 B: MBCN152-1 処理区 C: WYEC108 処理区

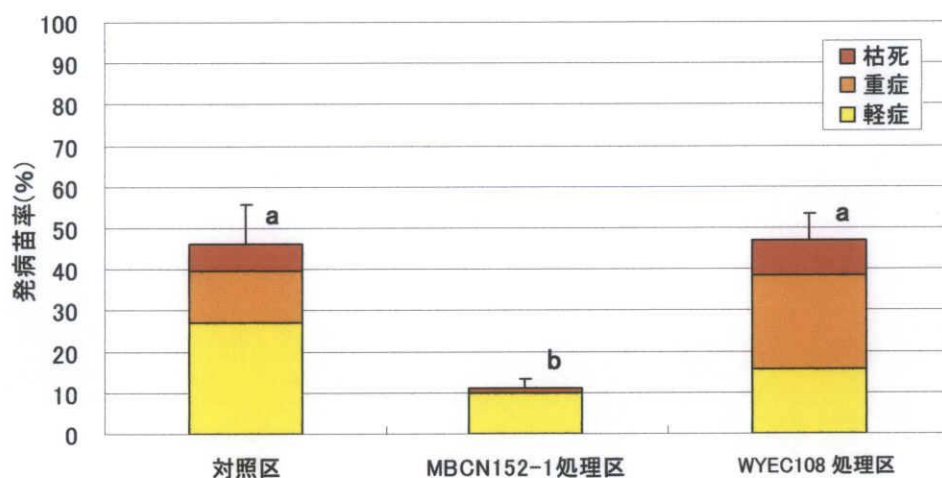


図 36 各処理区に播種した汚染種子から発芽した苗の発病率と罹病程度

フィッシャーの最小有意差検定 (LSD 検定) の結果、異なる文字間では 5%水準で有意差があることを示す

バーは標準誤差を示す。

第五節 MBCN152-1 胞子の長期保存性の検討

第一項 材料と方法

1. MBCN152-1 凍結乾燥胞子の調製

MS 培地で 2 週間培養した MBCN152-1 コロニーから滅菌した葉サジで菌体を擦り取り、プラスチックチューブに回収した。これに分散媒(スキムミルク 10g、グルタミン酸ナトリウム 1g をイオン交換水 100ml に溶解して高圧滅菌した)を加えよく攪拌した後、超音波破碎機を用いて懸濁液中の

胞子鎖を 10 分間破碎した。この菌液を滅菌綿でろ過した後、ろ液(胞子懸濁液)を凍結乾燥瓶に移し入れた。この凍結乾燥瓶をアセトンと水、ドライアイスを混合して作成したゲルに漬け、菌体を急速凍結させた。これを凍結乾燥機で一晩凍結乾燥し、得られた乾燥胞子を滅菌した薬サジを用いて粉末状にした。その後、乾燥胞子とカオリン(Wako)、タルク(Wako)を 10:10:80(w:w:w)の割合で混合し、保存用乾燥胞子とした。

2. 異なる温度条件下での MBCN152-1 凍結乾燥胞子の保存性の検討

上記の手順で調製した MBCN152-1 の保存用乾燥胞子を 3 等分(約 10g)して滅菌バッグ(滅菌サンプルバッグ, Fisher Scientific)に入れ、温度を 5、25、40℃に設定した恒温培養器内で保存し、1 ヶ月ごとに希釈平板法を用いて生菌数を調査した。

第二項 結果

1. 保存温度が MBCN152-1 凍結乾燥胞子生存率に及ぼす影響

MBCN152-1 の胞子を凍結乾燥し、5、25、40℃で 6 ヶ月間保存した。その結果、保存開始時の生菌数は 7×10^{12} cfu/g であったが、2 ヶ月後の各区の生菌数はそれぞれ 4×10^{11} cfu/g (5℃)、 10^{11} cfu/g (25℃)、 4×10^{12} cfu/g (40℃)となり、25℃区で最も生菌数が減少していた(図 37)。3 ヶ月目以降、5℃、25℃区と比較して 40℃区の生菌数が急激に減少したが、6 ヶ月後でも 7×10^7 cfu/g の MBCN152-1 が生存していた(図 37)。続いて、25℃の区の生菌数が 2×10^8 cfu/ml で、最も生菌数が多かったのは保存温度 5℃区の 2×10^9 cfu/ml であった(図 37)。これは、40℃区の生菌数の約 28 倍となる。以上の結果から、40℃という高温で 6 ヶ月間保存を行っても MBCN152-1 胞子は生存可能であることが判明した。しかし、MBCN152-1 は保存温度が高くなるにつれ、生菌数が減少することが明らかとなった。

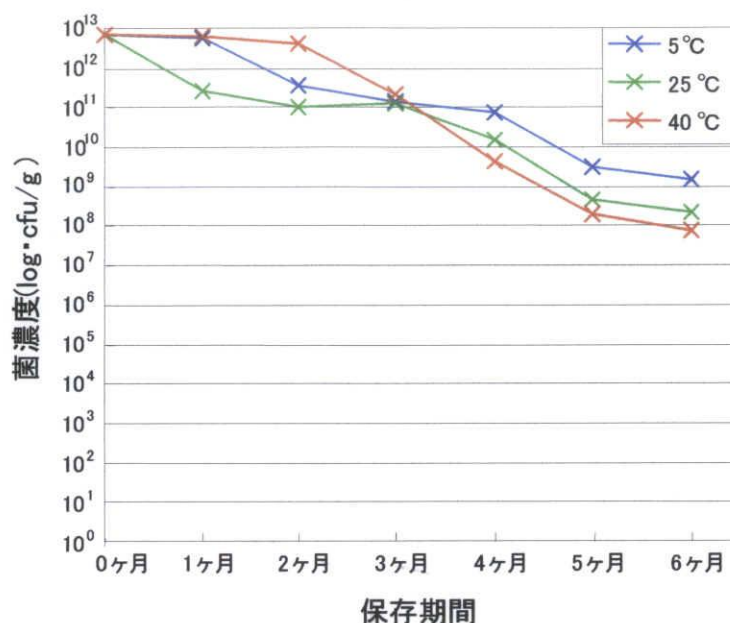


図 37 MBCN152-1 凍結乾燥胞子中の生菌数の推移

第六節 考察

微生物農薬の施用方法には、作物への直接散布、作物根の浸漬処理や土壌灌注、種子粉衣などが考えられる。このような施用方法の中から、またはこれらを組み合わせることによって、微生物農薬の持つ潜在的効果を最大限に引き出す方法を開発していかなければならない(田口 2003)。微生物の処理方法によって生育促進や病害防除の効果が異なる事例は幾つか報告されている。例えば、Ciccillo *et al.* (2002) は、PGPR である *Burkholderia ambifaria* MCI 7 の処理方法について検討し、種子粉衣法ではトウモロコシの根および茎の生重量が増加したが、土壌処理法ではむしろ生長を抑制したことを報告している。前章では、MBCN152-1 の育苗培土混和による黒すす病防除効果を検定した。しかし、セル成型育苗施設内では、通常、高圧噴霧装置を用いた農薬の葉面散布が行われている(窪田と我孫子 1998)。このことから、MBCN152-1 を微生物殺菌剤として実用化するためには、利便性・効率性に優れる葉面散布による防除効果についても検討する必要があると考えた。

MBCN152-1 胞子育苗培土混和して育成した苗では、噴霧接種による発病および汚染種子由来の発病が抑制された。このことから、MBCN152-1 を製剤化する場面で、本菌株の胞子を利用

することが可能であると実証された。また、その効果は MBCN152-1 胞子濃度依存的に増加することが明らかとなった。つぎに、MBCN152-1 胞子を葉面散布した苗では、対照区と比較して黒すす病が有意に抑制される。育苗培土混和处理と葉面散布処理での各試験での防除価を比較すると、育苗培土混和处理で、より防除効果が高かった。

以上の結果から、MBCN152-1 を育苗施設で実用化する場合、 $10^7 \sim 10^8$ 胞子/g の濃度で育苗培土混和することが、黒すす病病害を防除するために最も効果的な処理方法であることが考えられた。しかし、鈴井ら(2000)は、微生物資材をセル成型育苗に導入する場合、培土混和处理よりも少量の接種菌量で大量に処理できる種子コーティングの方が環境面やコスト面などから、優れていると述べている。このことから、MBCN152-1 胞子の種子コーティングの防除効果についても今後検討する必要がある。

つぎに、黒すす病に対する効果を放線菌殺菌剤 Actinovate と比較した結果、苗への黒すす病菌噴霧接種による発病に対する MBCN152-1 処理区の防除活性は、*S. lydicus* WYEC108 処理区と同程度であった。一方、汚染種子由来の発病に対しては、*S. lydicus* WYEC108 処理区では全く防除活性は認められなかった。本章第一項でも述べたように、Actinovate は、葉面散布処理することで、*Alternaria* 病害に防除効果を示すとされている。苗への噴霧接種試験では、育苗培土混和に併せて葉面散布も行なったため *S. lydicus* WYEC108 の効果が発揮されたが、汚染種子を用いた試験では育苗培土混和处理しか行っていないため、防除効果を示さなかった可能性がある。第二章でも述べたが、一次伝染および二次伝染の両方を抑制すれば黒すす病被害を大幅に軽減できると考えられる。このことから MBCN152-1 は WYEC108 よりもセル成型苗黒すす病の防除に適した菌株であると言える。

微生物農薬の最も大きな特徴は、有効成分が生き物であることである。この特徴は利点と欠点を併せ持つ。まず、利点として植物体上もしくは土壌中で生息し増殖することが可能であるため、散布後は微生物の定着が良ければ防除効果の持続性が期待できる。一方、欠点として、製剤の保存安定性が低く、多くの微生物農薬が冷蔵保存を原則とし、保存・流通面ではマイナス要因となっていることである(永山 2003)。このような欠点を克服するために、MBCN152-1 にとって最も適している製剤化の方法を検討する必要がある。*Streptomyces* 属放線菌の胞子は乾燥や高温などの外的ストレスに対して耐性であると言われている(McBride and Ensign 1987)。そこで、*Streptomyces* 属である MBCN152-1 胞子の保存性を調査した結果、保存温度 5℃と比較すると生菌数は減少したものの、保存温度 40℃という微生物にとっては過酷な条件においても

MBCN152-1 凍結乾燥胞子は半年間生存し続けていた。このことから、MBCN152-1 凍結乾燥胞子は、長期保存性を有すると考えられる。今後は、さらに保存性を向上させるために、保護剤の添加量や種類を検討する必要がある。また、MBCN152-1 凍結乾燥胞子の保存に利用した滅菌バッグは、透明な薄手のビニル素材であったため、熱を直接伝えやすく、さらに光を通してしまう。そこで、保存する容器を改善することでさらに保存性を向上できることが考えられた。

第四章 MBCN152-1 の黒すす病防除メカニズムの解析

第一節 序

これまで述べたように、選抜した *Streptomyces* sp. MBCN152-1 は黒すす病菌に強い防除活性を示す。その防除メカニズムには、これまでの生物防除に関する研究報告などから多くの可能性が考えられる。一般的に、微生物による植物病害の生物防除のメカニズムとしては、抗生作用や病原菌への寄生、抵抗性誘導、栄養や生育場所の競合などが知られている(百町 2003)。

微生物の抗生作用を利用した生物防除に関する研究事例は極めて多い(Li *et al.* 2002; Samac *et al.* 2003; Folman *et al.* 2004; Rubini *et al.* 2005)。Hill *et al.* (2005) は、抗生物質ピロールニトリンを生産する *Pseudomonas fluorescens* BL915 をワタ種子に処理することで、*Rhizoctonia solani* による苗立枯病の防除に成功している。また、Bulbiformin、Mycobacillin、IturinA などの多様な抗菌性物質を生産し、広範な細菌や糸状菌に抗生作用を示す *Bacillus subtilis* は、既に微生物農薬として数多く実用化されている(田口ら 2003)。放線菌においても抗生物質生産能を利用して生物防除を行った事例が幾つか報告されている。例えば、Xiao *et al.* (2002) は、アルファルファ根腐病を引き起こす *Phytophthora medicaginis* に対して強い拮抗性を示す *Streptomyces* sp. GS93-23 を有望な生物防除エージェントとして紹介している。

さらに、Matthijs *et al.* (2007) は、ピシウム苗立枯病を抑制する *P. fluorescens* ATCC17400 が生産する Thioquinolobactin は、病原菌 *Pythium debaryanum* に対する抗生作用だけでなく、シデロフォアとしての機能も持つことを明らかにしている。シデロフォアは、鉄イオンと複合体を作る低分子キレート物質で、病原菌の生育環境から鉄イオンを効率的に奪うことによって、病原菌に鉄欠乏をもたらして生育を抑制する(百町 2003)。このようなシデロフォアによる栄養競合を作用機作とする生物防除エージェントとしては、*Pseudomonas* 属菌がよく知られている(百町 2003)。

病原菌に付着して栄養分を搾取する寄生(重複寄生)も、病害防除に利用可能な機能の一つである。*Trichoderma* 属菌、*Gliocladium* 属菌、*Pythium oligandrum* などの糸状菌は病原糸状菌の菌糸や菌核に寄生して、溶菌したり崩壊させ、病原菌の活性を低下させたり死滅させることが知られている(百町 2003)。土壌病原菌 *Pythium ultimum* や *Pythium aphanidermathum* は、寄生菌 *Pythium oligandrum* と接触するとすぐに構造変化を起こし、原形質が凝集して、その後、壊死を起こして細胞内容物が押し出される(竹中 2005)。また、細菌が病原糸状菌に寄生する場合もある。*Pseudomonas* 属菌は、キチナーゼ、 β 1,3-グルカナーゼ、セルラーゼなどの加水分解酵素を産出し、病原糸状菌の細胞壁成分であるキチンやグルカン、セルロースを分解して死滅させ、栄養分

として利用する(竹中 2005)。

上述したような病原菌に対する生物防除エージェントの直接的な作用の他に、生物防除エージェントによる抵抗性誘導も重要な防除メカニズムの一つである。植物生育促進根圏細菌(plant growth promoting rhizobacteria: PGPR)や植物生育促進菌類(plant growth promoting fungi: PGPF)と呼ばれる微生物が植物根圏から数多く分離されている(百町 2003)。これらの微生物は植物生育促進効果を示すとともに病害に対する発病抑制効果を併せ持つことから、生物防除エージェントとして近年注目を集めている。また、その発病抑制機構には、病害抵抗性の誘導が関わっていることが知られている(百町 2003)。例えば、Meera *et al.*(1995)は、ゾイシアグラスから分離した *Phoma* 属菌などの PGPF を混和した土壌でキュウリを育成すると、キュウリ植物体に全身抵抗性が誘導されて炭疽病に耐病性化することを明らかにしている。このような全身的に誘導される病害抵抗性は、Systemic acquired resistance(SAR)または Induced systemic resistance (ISR)と呼ばれ、SAR や ISR が誘導された植物体内では PR タンパク質などの抗菌性タンパク質やリグニン、フェノール化合物の集積、活性酸素種の生成など各種抵抗性反応が起こる(久能ら 1998)。さらに、エンドファイトが宿主植物に抵抗性を誘導し、耐病性や対虫性を付与することが知られている。Morita *et al.* (2002)は、ハクサイの根部に定着するエンドファイト *Heteroconium chaetospora* がハクサイに抵抗性を誘導し、地上部病害である *Alteraria brassicae* による黒斑病を抑制することに報告している。また、清水ら(2003)は、内生放線菌 *Streptomyces galbus* MBR-5 株をシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)に処理すると、エチレン・ジャスモンサン依存型の全身抵抗性が誘導され、処理シロイヌナズナが炭疽病(病原菌 *Colletotrichum higginsianum*)に耐病性化することを明らかにしている。

このような防除メカニズムを解明することで得られる知見が、新規化学農薬の開発や生物防除資材そのものの効果の向上に繋がる可能性もある。実際、上述した生物防除エージェント *P. fluorescens* BL915 が産生するピロールニトリンに関する一連の研究で、ムギ類赤かび病の防除に有効なフェンピクロニルが発見され、既に種子消毒剤として実用化されている(福井 2003)。また、微生物農薬は化学物質を使用しないからと言って必ずしも安全であるとは限らないため、微生物農薬の安全性を評価するという観点からも防除メカニズムの解明は極めて重要である。

そこで本章では、MBCN152-1 の黒すす病防除メカニズムを解明するための基礎的データを収集することを目的として、本菌株が黒すす病菌の形態形成に与える影響を観察した。

第二節 キャベツ病原糸状菌に対する MBCN152-1 の拮抗性の検定

第一項 材料と方法

拮抗性検定には、野菜茶業研究所 窪田昌春氏から分譲された *Alternaria brassicicola* (Schweinitz) Wiltshire(黒すす病菌)、*Alternaria brassicae* (Berkeley) Saccardo(黒斑病菌)、*Rhizoctonia solani* Kühn(苗立枯病菌)、*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick(ピシウム腐敗病菌)、*Fusarium avenaceum* (Corda:Fries) Saccardo(先枯病菌)、*Phoma lingam* (Tode:Fries) Desmazières(根朽病菌)の6種類のキャベツ病原糸状菌を供試した。

A. brassicicola と *A. brassicae* は PDA に接種して 25℃で約 2 週間培養後、*R. solani* と *Py. aphanidermatum* は、PDA に接種して 25℃で 3 日間培養した後、それぞれの菌叢周縁部から直径 8mm のコルクボーラーで含菌ディスクを打ち抜き、接種源とした。*A. brassicicola* および *A. brassicae* の接種源を IMA-2 寒天培地の一端に菌叢面が下になるように置床し、これから 3cm 離れた位置に放線菌分離株の孢子懸濁液 5μl を画線接種して 25℃で 10 日間培養した。なお、*A. brassicicola* については、PDA 培地、Bennet 培地、1.5%素寒天培地上でも同様の検定を行った。菌系生長の速い *R. solani* および *Py. aphanidermatum* は、まず、MBCN152-1 孢子懸濁液 5μl を画線接種し 25℃で 3 日間培養した後、病原菌接種源を置床して 25℃で 3 日間培養した。

PDA 培地上での生育が遅い *F. avenaceum* と *Ph. lingam* に対する拮抗性は、以下の方法で検定した。まず、PDA に接種して 25℃で 2 週間前培養した両病原菌の菌叢周縁部から白金耳で菌系片をかき取り、ジャガイモ・グルコース液体培地に接種して 1 週間振とう培養(100rpm、25℃)した。それぞれの菌体を含む培養液を約 40℃の 1.5%素寒天に 25%の割合で懸濁し、角シャーレ(11cm×14cm)に分注・固化した(以下、病原菌含有培地と称す)。つぎに、IMA-2 寒天培地に接種して 30℃で 1 週間培養した MBCN152-1 のコロニーから、直径 8mm のコルクボーラーで含菌ディスクを打ち抜いた。このディスクをコロニー面が上になるように上述の病原菌含有培地上に置き、25℃で 1 週間培養した。*A. brassicicola* および *A. brassicae*、*R. solani*、*Py. aphanidermatum* については、病原菌菌叢の生長阻止帯が形成された場合を分離株に拮抗性ありと判断した。*F. avenaceum* および *Ph. lingam* については、MBCN152-1 ディスク周囲の病原菌含有培地に生長阻止円が形成された場合を拮抗性ありと判断した。

第二項 結果

6 種のキャベツ病原糸状菌に対する MBCN152-1 の拮抗性を検定した。その結果、MBCN152-1

は検定した全ての病原菌に対して拮抗性を示さなかった(表 3)。このことから、IMA-2 寒天培地上では、MBCN152-1 はこれら病原菌の菌糸生長を阻害する抗菌性物質を生産しないことが明らかとなった。さらに、PDA、Bennet 培地、素寒天培地上でも *A. brassicicola* と対峙培養したが、いずれの培地上でも *A. brassicicola* の菌糸生長を阻害しなかった(表 3)。

表 3 キャベツ病原糸状菌に対する MBCN152-1 の拮抗性

培地	検定菌					
	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria brassicae</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Phoma lingam</i>
IMA-2	-	-	-	-	-	-
PDA	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Bennet	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
素寒天	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: 未検定

第三節 MBCN152-1 が IMA-2 寒天上で黒すす病菌に及ぼす影響の解析

第一項 材料と方法

1. MBCN152-1 が黒すす病菌の分生子発芽および発芽管伸長に及ぼす影響の解析

IMA-2 寒天培地上に MBCN152-1 孢子懸濁液 50 μ l を滴下し、白金耳で円形に画線して孢子が形成するまで恒温培養器内(30°C、暗所)で 2 週間培養した。その後、円形に形成された MBCN152-1 コロニーの中央に位置する培地上に黒すす病菌分生子懸濁液(10⁴ 分生子/ml) 50 μ l を滴下し、さらに恒温培養器内(25°C、暗所)で培養した(図 35)。分生子懸濁液を滴下して 3、6、9、12 時間後に、光学顕微鏡で黒すす病菌分生子 100 個を観察し、発芽率を算出した。さらに、分生子 30 個を経時的に定点観察して発芽管長を測定するとともに、発芽管伸長速度(μ m/時間)を算出した。なお、MBCN152-1 無接種の培地上で黒すす病菌分生子を培養し、対照区とした。



図 38 IMA-2 寒天培地上での MBCN152-1 と黒すす病菌分生子の共培養試験

第二項 結果

1. MBCN152-1 が黒すす病菌の分生子発芽および発芽管伸長に及ぼす影響

MBCN152-1 を接種した IMA-2 寒天培地上での黒すす病菌の分生子発芽および発芽管伸長を調査した。対照区では、培地上に滴下して 3 時間後には 35% の分生子が発芽し、6 時間後には発芽率が 98% に達した(図 39, 40)。それに対して、MBCN152-1 処理区では、3 時間後にはわずか 2% の分生子しか発芽しておらず、明らかに発芽が抑制されていた。その後、時間の経過とともに比例的に発芽率は増加したが、12 時間後においても 60% の分生子しか発芽していなかった。

発芽管長を測定したところ、3 時間後では差は認められなかったが、6 時間後では対照区の発芽管長が平均 $21\mu\text{m}$ であったのに対して、MBCN152-1 処理区は平均 $4\mu\text{m}$ と明らかに短かった(図 41)。その後、12 時間後には対照区で平均 $99\mu\text{m}$ に達していたが、MBCN152-1 処理区では平均 $24\mu\text{m}$ と対照区の $1/4$ 程度しか伸長していなかった。

上記のように MBCN152-1 処理区で発芽管長が短くなった原因が、MBCN152-1 による発芽管伸長の抑制あるいは分生子発芽の遅延のいずれに因るものなのかを明らかにするため、発芽管伸長速度を算出した。その結果、対照区の培地上では、滴下後 3~6 時間は $6\mu\text{m/h}$ 、6~9 時間は $7\mu\text{m/h}$ 、9~12 時間は $19\mu\text{m/h}$ の速度で発芽管が伸長していた(図 42)。一方、MBCN152-1 処理区の発芽管伸長速度は、滴下後 3~6 時間は $1\mu\text{m/h}$ 、6~9 時間は $2\mu\text{m/h}$ 、9~12 時間は $5\mu\text{m/h}$ であった(図 42)。このことから、MBCN152-1 処理区では黒すす病菌分生子の発芽管伸長も抑制されることが明らかとなった。

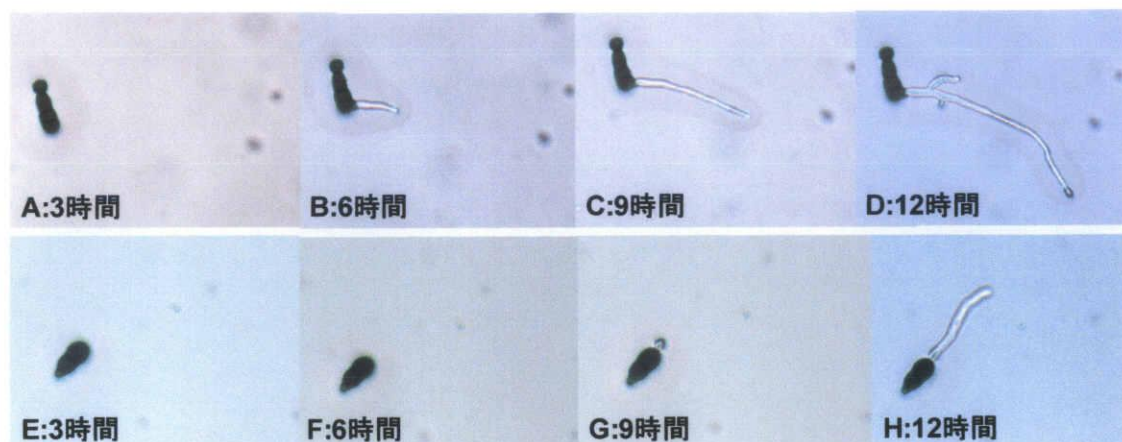


図 39 IMA-2 寒天培地上での黒すす病菌分生子発芽の様子

A-D: 対照区 E-H: MBCN152-1 処理区

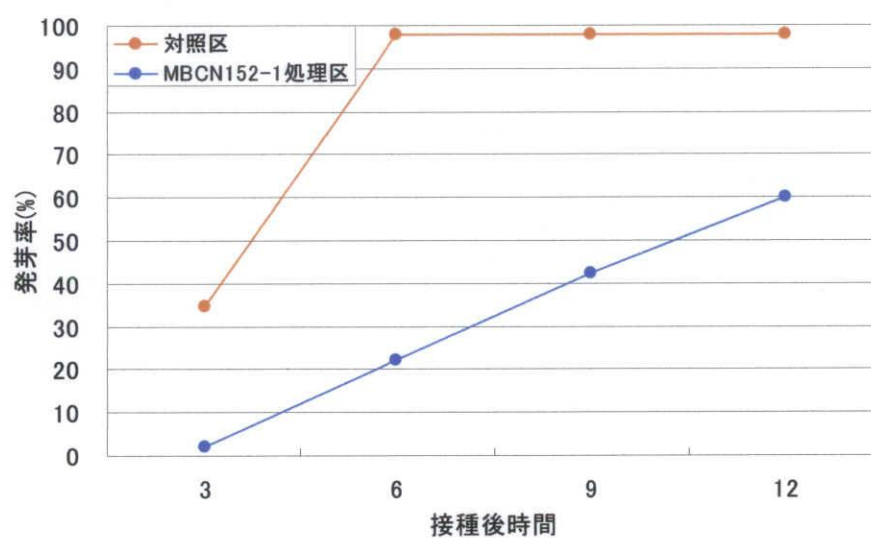


図 40 IMA-2 寒天培地上での黒すす病菌の分生子発芽率

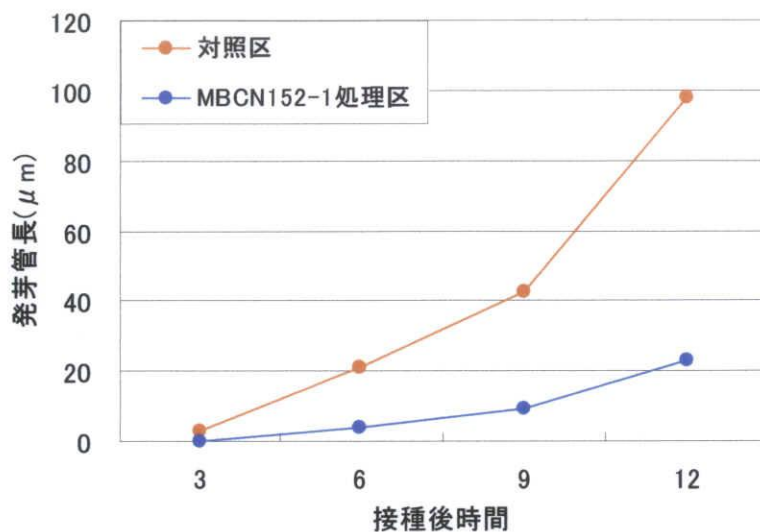


図 41 IMA-2 寒天培地上における黒すす病菌の発芽管伸長

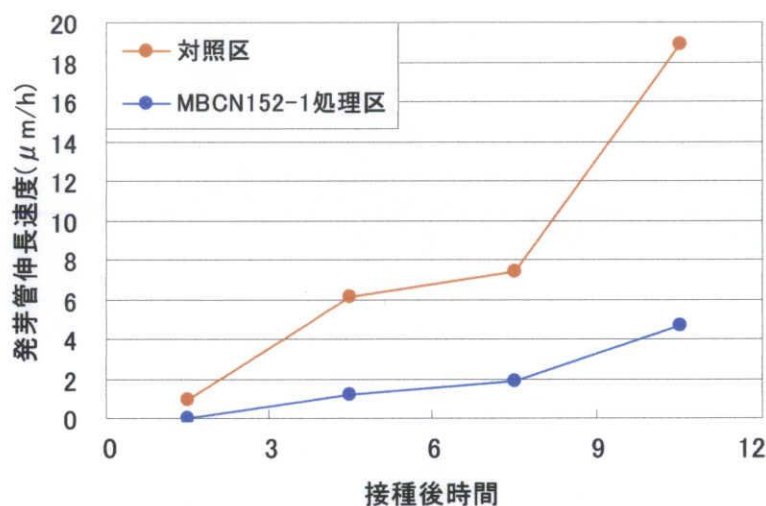


図 42 IMA-2 寒天培地上における黒すす病菌の菌糸伸長速度

第四節 黒すす病菌接種した MBCN152-1 処理苗の光学顕微鏡観察

第一項 材料と方法

1. MBCN152-1 処理苗上における黒すす病菌の感染行動の観察

適量の水道を水に漬けた滅菌育苗培土に MBCN152-1 胞子懸濁液 (10^8 cfu/ml) を 1ml/セルとなるように混和し、128 穴セルトレイに充填した。つぎに、表面殺菌キャベツ種子を播種し、滅菌バーミキュライトで覆土した後、人工気象器内 (25℃、12 時間光照射) で 1 週間育苗した。滅菌水を混

和した育苗培土で育苗したものを対照区とした。その後、子葉上に黒すす病菌接種源(10^5 分生子/ml)を 10 μ l ずつ点滴接種し、人工気象器内に設置した半透明のプラスチックケース内(相対湿度 100%)で培養した。接種 6、9、12、24、36 時間後に子葉を採取し、酢酸エタノール(酢酸:エタノール=4:96)溶液に 6 時間浸漬して脱色固定した。その後、0.5%アニリンブルーで 15 分間染色した後、滅菌水で洗浄して観察試料とした。光学顕微鏡で接種 6、9、12 時間後の試料上の黒すす病菌分生子 30 個を観察し、発芽率と発芽管長を算出した。また、接種 12、24、36 時間後の試料を観察し、付着器形成率を算出した。

第二項 結果

1. MBCN152-1 処理苗上における黒すす病菌の感染行動

MBCN152-1 孢子混和育苗培土で育苗した苗に黒すす病菌を接種し、分生子の発芽および発芽管伸長、付着器形成を経時的に光学顕微鏡観察した。子葉上の分生子は、接種後 4~5 時間から発芽し始め、6 時間後には MBCN152-1 処理の有無に関わらず発芽率が約 88%に達しており、さらに、12 時間後には両処理区で 99%の分生子が発芽し、発芽管を伸張させていた(図 44)。

また、発芽管長を測定したところ、接種 6 時間後では両処理間にほとんど差はなく、対照区および MBCN152-1 処理区でそれぞれ平均 45 μ m と 38 μ m であった(図 45)。しかし、12 時間後の発芽管長は対照区で 121 μ m であったのに対し、MBCN152-1 処理区では 87 μ m となり、対照区よりも発芽管伸長が抑制されていた(図 45)。

接種から 12 時間ほど経過すると、黒すす病菌は発芽管の先端に付着器を形成し、植物内への侵入を開始した。接種 12 時間後、対照区では約 12%の黒すす病菌が付着器を形成していたが、MBCN152-1 処理区では付着器形成は観察されなかった。MBCN152-1 処理区の付着器形成は、24 時間後には観察されたが、明らかに対照区よりも付着器形成率は低かった(図 46)。36 時間後には、対照区で約 60%の黒すす病菌が付着器を形成しており、子葉を肉眼で観察すると、小さな黒色病斑が観察された。対して、MBCN152-1 処理区では全体の 25%ほどしか付着器を形成しておらず、病斑が観察される子葉も少なかった。このことから、対照区と比較して MBCN152-1 処理区の子葉では黒すす病菌の侵入が抑制されている可能性が示された。また、図 43-J に示したように、黒すす病菌接種 36 時間後の MBCN152-1 処理区では、黒すす病菌分生子の周囲に微小な菌糸や孢子が集積している様子が観察された。その中には、発芽管が分解され崩壊している黒すす病菌もあった。

以上の結果から、MBCN152-1 を培土混和した苗の葉面上では、黒すす病菌の分生子発芽は抑制されないが、発芽管伸長、付着器形成は抑制されることが明らかとなった。

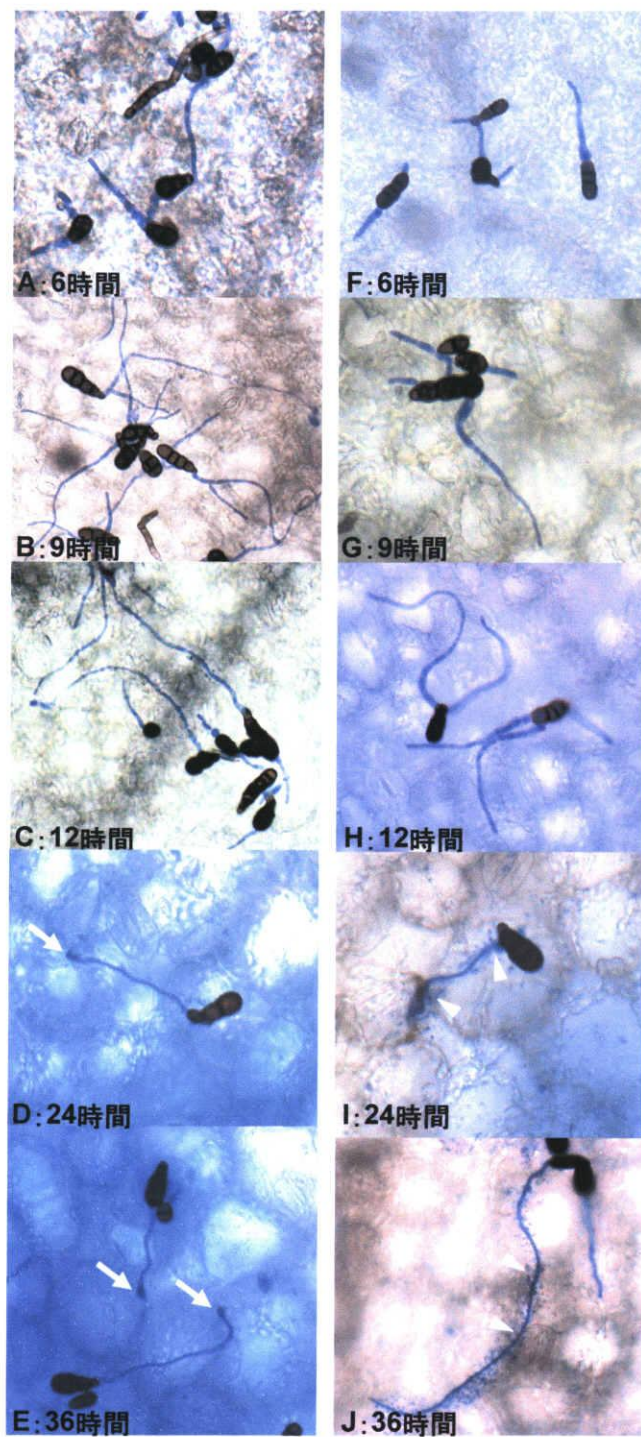


図 43 黒すす病菌接種した各処理区の様子

A-E: 対照区 F—J: MBCN152-1 処理区

矢印: 黒すす病菌付着器, 矢頭: MBCN152-1 胞子および菌糸

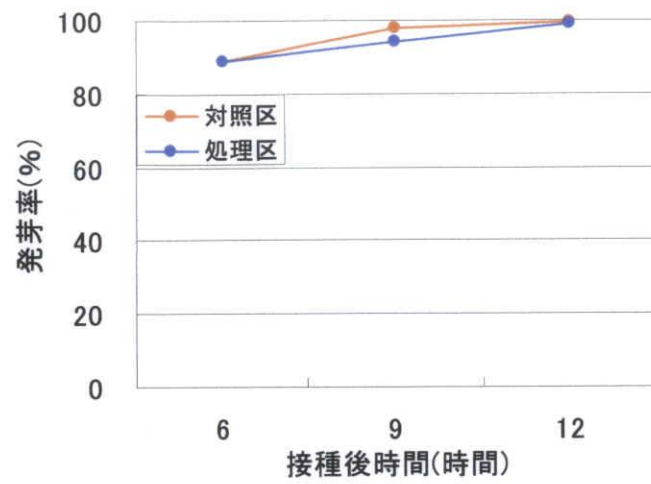


図 44 子葉上での黒すす病菌の分生子発芽率

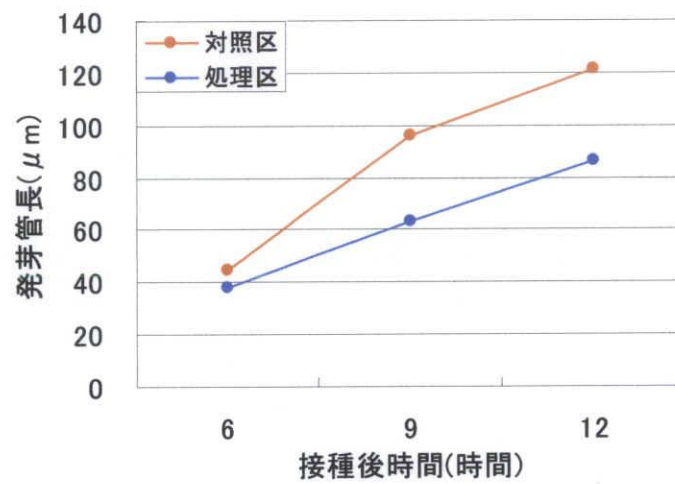


図 45 子葉上での黒すす病菌の発芽管伸長

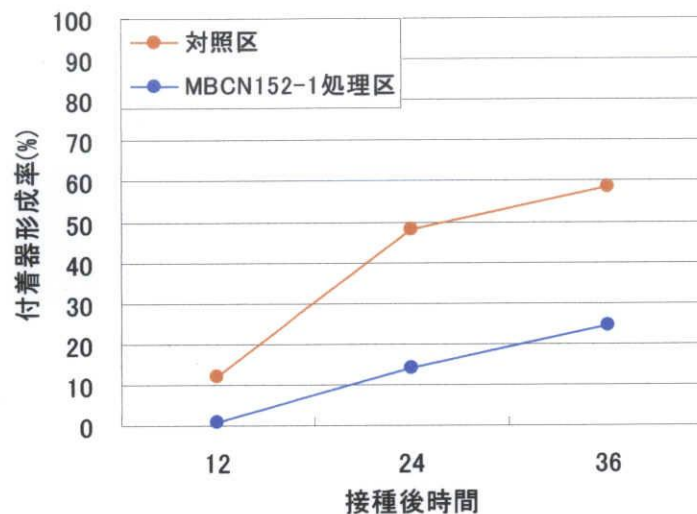


図 46 子葉上での黒すす病菌の付着器形成率

第五節 黒すす病菌を接種した MBCN152-1 処理苗の走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

第一項 材料と方法

第三章第三節第一項と同様の手順で培養ボトルに表面殺菌キャベツ種子を播種し、6 日間培養した。その後、MBCN152-1 孢子懸濁液 (10^8 cfu/ml) を子葉に適量噴霧接種し、さらに同人工気象器内で培養した。翌日、子葉に黒すす病菌接種源 (10^5 孢子/ml) を $10 \mu\text{l}$ ずつ点滴接種し、同条件で培養した。なお、本実験では、MBCN152-1 と黒すす病菌のどちらも接種していない苗を対照区、黒すす病菌のみを接種した苗を接種対照区とした。黒すす病菌接種 36 時間後に胚軸および子葉を採取し、プラスチックシャーレ内の寒天片 (約 2cm^2) の上に置いた。この寒天片の周囲に数滴の 4% オスミウム酸 (OsO_4) を滴下した後、密閉して一晚蒸気固定を行った。固定後、ドラフト内で開封し、15 分間放置して余分なオスミウムガスを散逸させた。このディスクを小型のステンレス製金属カゴに移し、凍結乾燥瓶に入れた後、液体窒素を直接注ぎ入れて急速凍結させた。つぎに、瓶内部に少量の液体窒素が残った状態で凍結乾燥器に装着し、一晚凍結乾燥した。得られた試料を電子顕微鏡専用の試料台に載せ、イオンスパッターで金コーティングした後、10.0kV で観察した。

第二項 結果

黒すす病菌を点滴接種した MBCN152-1 処理苗を SEM 観察した。まず、放線菌無処理苗 (対照

区)の胚軸上には微生物が全く存在しないことを確認した(図 47-A)。MBCN152-1 処理苗の胚軸では、図 47-B のように多くの MBCN152-1 菌糸が胚軸表面を伸長している様子が観察された。また、胚軸表面の至るところで菌糸から MBCN152-1 孢子鎖が形成していた(図 47-C)。孢子の表面が、ISP 培地上の MBCN152-1 の形態と同じように棘状であったため、苗上の放線菌は MBCN152-1 であると判断した。さらに図 47-D(矢印)で示した部分の菌糸は輪郭が不明瞭になっており、明らかに胚軸表面ではなく、クチン層に潜って菌糸を伸長させていた。

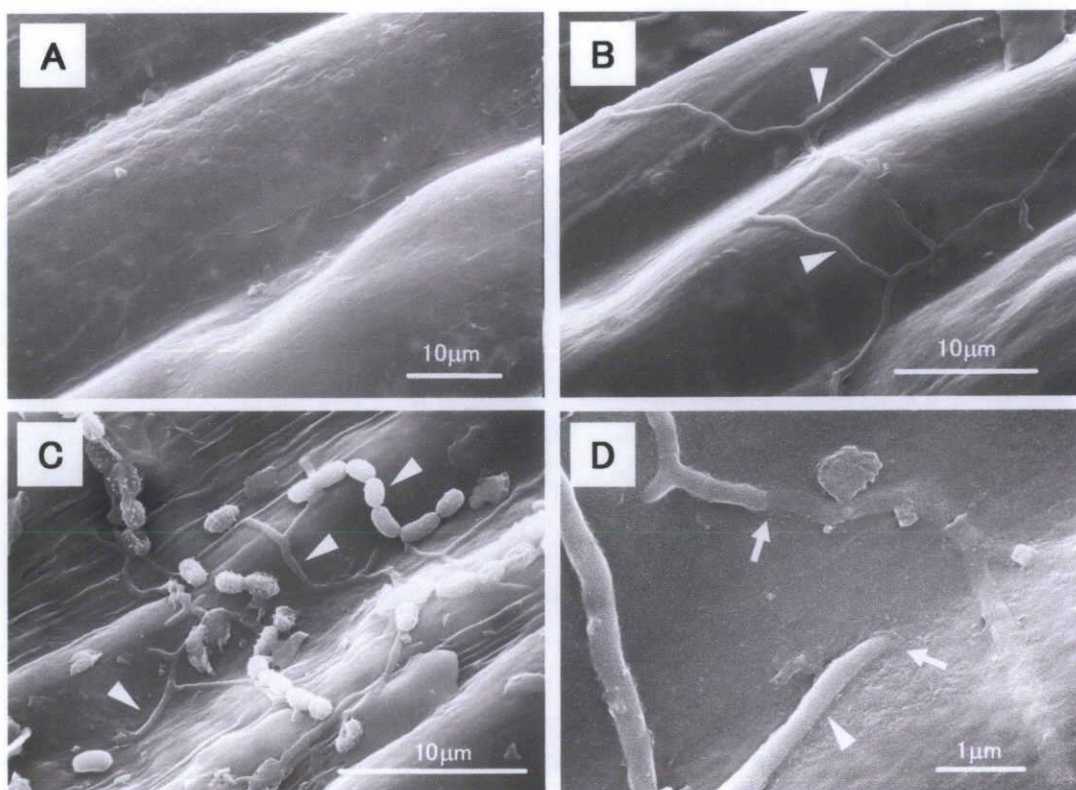


図 47 MBCN152-1 処理苗(胚軸)の SEM 写真

A: 対照区 B-D: MBCN152-1 処理区

矢頭: MBCN152-1 菌糸および孢子

矢印: クチクラ層への侵入部位

胚軸と同様に、対照区の子葉上には微生物は全く観察されなかった(図 48-A)。一方で、MBCN152-1 処理区では、子葉全体に MBCN152-1 菌糸が伸長しており、孢子を形成している様子も確認された(図 48-B)。さらに詳細に観察すると、気孔の周囲で MBCN152-1 菌糸が伸長して

いたが、気孔から植物体内部へは侵入している様子は認められなかった(図 48-C)。MBCN152-1 処理区の子葉の多数の気孔を観察したが、いずれの場所においても MBCN152-1 菌糸が気孔内部に侵入する様子は観察されなかった。このことから、MBCN152-1 は気孔を介して植物体内に侵入しない可能性がある。

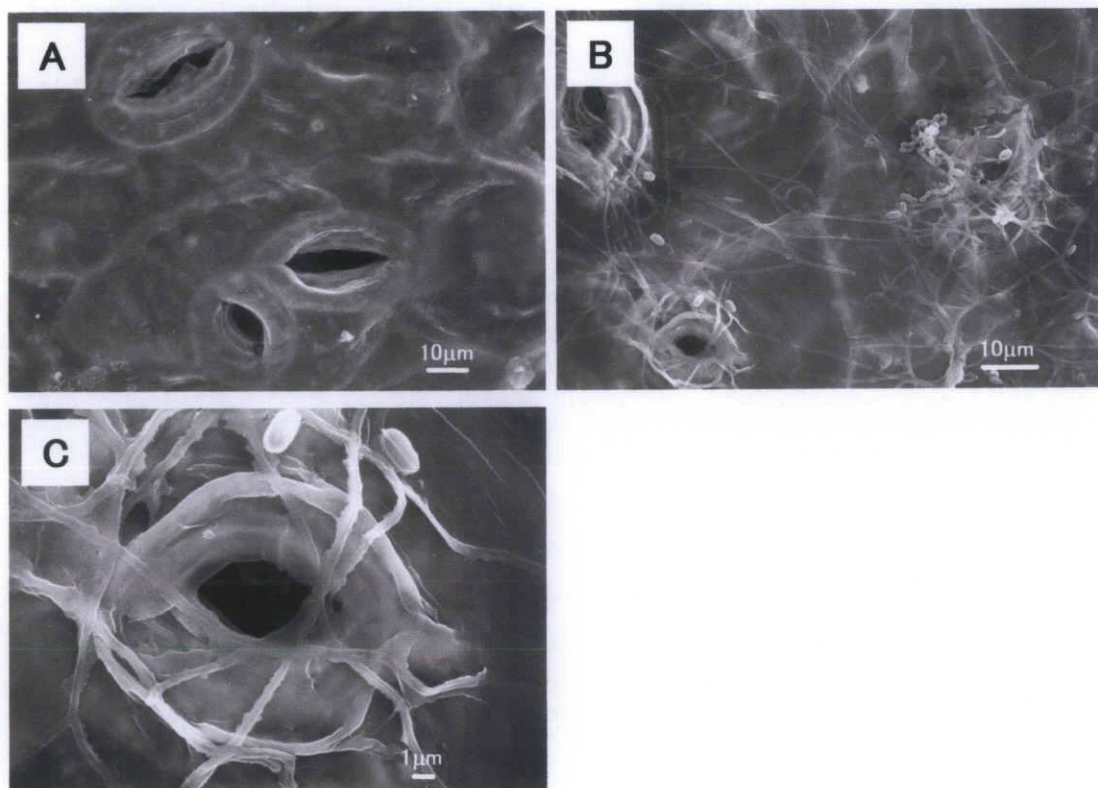


図 48 MBCN152-1 処理苗の子葉の SEM 像

A: 無接種対照区 B-C: MBCN152-1 処理区

つぎに子葉上の MBCN152-1 が黒すす病菌に与える影響を観察した。接種 36 時間後の対照区の子葉上では、黒すす病菌分生子から発芽管が伸長し、その先端に付着器を形成している様子が観察された(図 49-A)。MBCN152-1 処理区でも同様に、黒すす病菌分生子が発芽し、発芽管を伸長させている様子は観察されたが、その分生子には MBCN152-1 菌糸が網目状に伸長していた(図 49-B)。さらに、多くの MBCN152-1 菌糸が絡みついている黒すす病菌分生子は、図 49-C に示したように原型をとどめないほど潰れ、明らかに病原菌としての機能を失っているようであった。

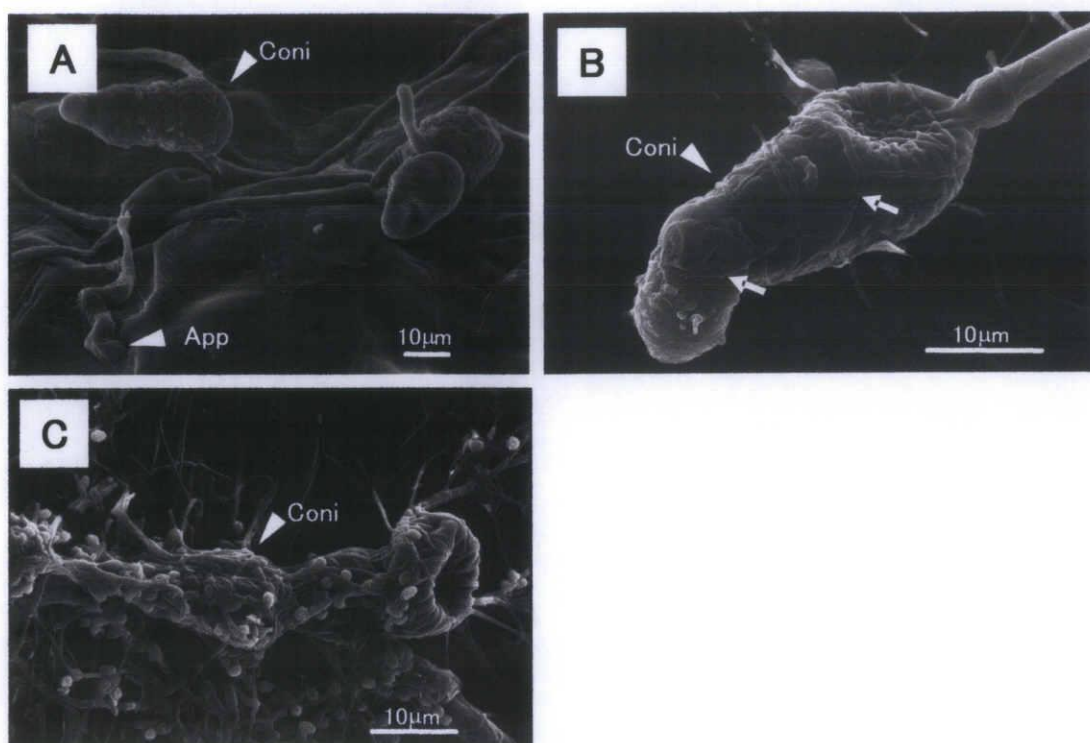


図 49 MBCN152-1 処理苗上の黒すす病菌分生子および菌糸の様子

A:無処理対照区 B-C:MBCN152-1 処理区

矢頭:黒すす病菌分生子(Coni), 付着器(App)

矢印:MBCN152-1 菌糸

MBCN152-1 処理区では、黒すす病菌発芽管上に MBCN152-1 菌糸が沿うようにして伸長していた(図 50-A)。さらに、黒すす病菌菌糸に沿って伸長した MBCN152-1 菌糸は、図 50-C に示したような付着器様構造を形成しているところが多数観察された。図 50-B では、MBCN152-1 菌糸が黒すす病菌菌糸を圧迫し、黒すす病菌菌糸にしっかりと付着している様子が観察された。

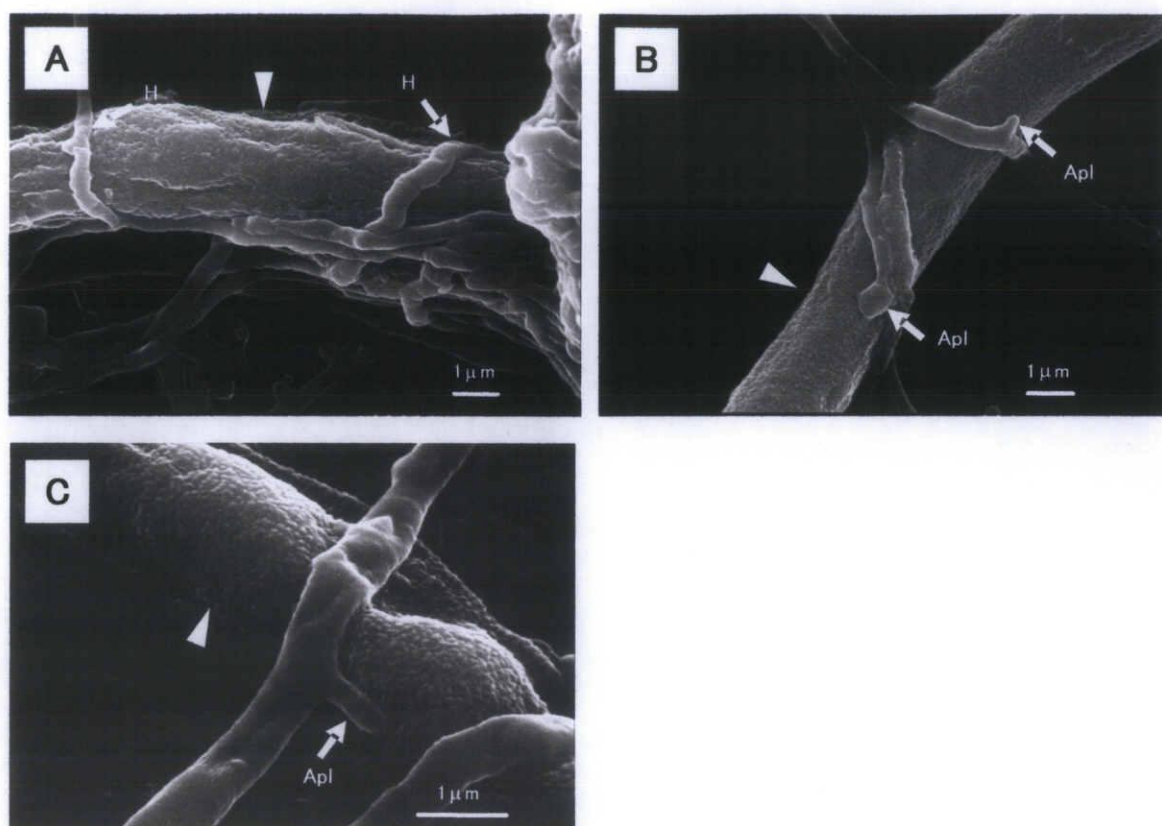


図 50 MBCN152-1 処理苗上の黒すす病菌菌糸の様子

矢頭:黒すす病菌発芽管, 矢印:MBCN152-1 菌糸(H), 付着器様構造(Apl)

第六節 考察

IMA-2 寒天培地上で MBCN152-1 が黒すす病菌の生長に与える影響を調査したところ、分生子発芽および発芽管伸長ともに著しく抑制された。このように、培地上で病原菌の生長抑制が引き起こされる原因として、Kexiang *et al.*(2002)は、微生物による培地中への抗菌性物質生産を挙げている。また、田口ら(2003)は、いもち病防除活性を有する *Bacillus subtilis* IK1080 といういもち病菌を共培養したところ、溶液中に IturinA 類似抗菌性物質が生産されていもち病菌胞子の発芽率が低下したことを報告している。このような報告から、MBCN152-1 も IMA-2 寒天培地中に黒すす病菌の生長を抑制する物質を生産した可能性が高いと考えられた。しかし、IMA-2 寒天培地やその他の寒天培地上で MBCN152-1 と黒すす病菌を対峙培養したところ、黒すす病菌の菌糸生長は全く抑制されなかった(表 3)。この結果から、MBCN152-1 が培地中に生産する抗菌性物質は、黒すす病菌の分生子と発芽管にのみ特異的に作用することが推察された。

MBCN152-1 胞子混和育苗培土で育成した苗の子葉に接種した黒すす病菌を経時的に観察し

た結果、分生子は無処理苗上と同様に発芽していたが、発芽管伸長と付着器形成が抑制されていることが判明した。これは、IMA-2 寒天培地上で黒すす病菌の分生子発芽が MBCN152-1 によって著しく抑制された結果と異なる。このように、子葉上で分生子発芽が抑制されなかった原因として 2 つの可能性が考えられる。1 つ目は、培地中で生産されるものとは作用点の異なる抗菌性物質が子葉上で生産されている可能性である。これを証明するためには、培地中および子葉上で生産される抗菌性物質を単離し、その活性等を解析しなければならない。しかし、本研究では時間的制約から解析できなかったため、今後検討する必要がある。2 つ目は、MBCN152-1 が黒すす病菌周囲で十分に増殖していなかった可能性である。この仮説を支持する興味深い現象を光学顕微鏡観察により見出している。黒すす病菌接種 24 および 36 時間後の MBCN152-1 処理苗上では、周囲に微小な菌糸や胞子が集積している黒すす病菌分生子が多数認められた(図 43)。このような分生子は、発芽管の伸長と付着器形成が抑制され、中には発芽管が分解されているものもあった(データ不掲載)。この現象は、接種後 12 時間までは観察されなかった。対照区の苗上では全く観察されなかったことから、黒すす病菌分生子の周囲に集積していたのは MBCN152-1 の菌体であると考えられた。そこで、SEM で詳細に観察した結果、黒すす病菌分生子および菌糸の表面および周囲で MBCN152-1 菌糸が増殖し、胞子を形成している様子が確認された(図 49, 50)。このことから、光学顕微鏡で観察された黒すす病菌周囲の菌糸や胞子は MBCN152-1 であることが明らかとなった。MBCN152-1 菌糸は、黒すす病菌の分生子を網目状に包み込み、発芽管に沿うようにして伸長していた。(図 49)。さらに、MBCN152-1 菌糸が黒すす病菌の菌糸上で付着器様構造を形成している様子も観察された(図 50)。多量の MBCN152-1 菌糸が絡みついた分生子は、細胞が潰れて完全に變形していた。これまでに、数種の *Streptomyces* 属菌が病原糸状菌に寄生することが報告されている(Tapio *et al.* 1991; Tu, J. C. 1988; Sutherland *et al.* 1984)。これらの *Streptomyces* 属菌は、病原糸状菌の菌糸や胞子に巻き付く様に付着して増殖するとともに、病原菌菌糸表面で付着器様構造を形成して菌糸内へ侵入し、細胞を破壊する。このような糸状菌寄生性 *Streptomyces* 属菌の寄生行動と黒すす病菌上での MBCN152-1 の行動とが酷似していることから、本菌株も糸状菌寄生性の放線菌である可能性が高い。上述のように、光学顕微鏡で接種後 12 時間までは分生子周囲に MBCN152-1 が確認できなかったことからすると、分生子が発芽する時間帯(～12 時間)には MBCN152-1 が寄生していなかったと推察される。

しかし、全ての黒すす病菌分生子上に MBCN152-1 が認められたわけではない。それにも関わらず、接種後 12 時間目で付着器形成が完全に抑制されていたことを考慮すると、MBCN152-1 に

よる寄生だけで防除メカニズムを説明することは難しい。また、MBCN152-1 処理苗では病徴進展が有意に抑制されるが、この原因も寄生で説明するのは困難である。黒すす病菌は、付着器を形成して宿主植物体内に侵入した後、感染菌糸を形成する。この感染菌糸が組織内で宿主特異的毒素 (AB-toxin) を分泌しながら蔓延するため、多数の宿主細胞が壊死して黒色の病斑が生じる (Otani *et al.* 1998)。このことから、病徴進展を抑制するためには、子葉組織内部での感染菌糸の蔓延を抑えなければならないと考えられるが、宿主体内で MBCN152-1 が感染菌糸に寄生などの直接的な影響を及ぼしたとは考え難い。そこで、上述した抗菌性物質の関与の可能性について再考してみることにする。MBCN152-1 由来の抗菌性物質が関与する可能性は上で考察した通りである。しかし、抗菌性物質の起源は、必ずしも MBCN152-1 とは限らない。すなわち、キャベツ苗自体が抗菌性物質を生産している可能性もある。百町ら (2003) は、病害抵抗性が誘導された植物では、ある種の抗菌性物質が生産され、病原菌の孢子発芽や感染菌糸の形成が阻害されると述べている。このことから、MBCN152-1 によってキャベツ苗に病害抵抗性が誘導され、抗菌性物質が生産された可能性は十分にあり得る。Ongena *et al.* (2000) は、PGPR である *Pseudomonas putida* BTP1 をキュウリの根部に処理すると、葉や根で抗菌性フェノール化合物が生成され、耐病化すると述べている。また、Yedidia *et al.* (2003) は、*Trichoderma asperellum* (T-203) をキュウリ根部処理すると、キュウリ植物体内で病原菌の生長を阻害する抗菌性二次代謝物が生産され、*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* による斑点細菌病が抑制されることを明らかにした。また、内生放線菌やその他のエンドファイトが宿主植物に抵抗性を誘導することが近年明らかになっている。このことから、MBCN152-1 がキャベツ苗へ定着することで、苗に抵抗性が誘導された可能性は十分に考えられる。清水と久能 (2003) は、拮抗性内生放線菌 *Streptomyces galbus* MBR-5 株をシロイヌナズナに定着させると、エチレン・ジャスモン酸依存型の抵抗性が誘導され、炭疽病に耐病性を示すことを明らかにしている。また、Vidhyasekaran *et al.* (2001) は、内生細菌 *Pseudomonas fluorescens* Pf1 をイネ種子または葉に処理することで、イネ葉にフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性やパーオキシダーゼ活性の上昇、リグニン蓄積といった抵抗性反応が誘導され、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* によるイネ白葉枯病を抑制できると報告した。今後、MBCN152-1 処理苗で誘導抵抗性が発現しているか否かを明らかとするためには、抵抗性誘導のマーカーとなる *PR* 遺伝子などの発現や抗菌性フェノール化合物、リグニン、活性酸素種の蓄積などを解析する必要がある。第三章で述べたように、MBCN152-1 処理により汚染種子からの子苗感染が極めて強く抑制されたが、本章ではその防除メカニズムについては検討していない。今後

は、汚染種子に対する防除メカニズムについても併せて解析する必要がある。

SEM 観察の結果、MBCN152-1 は苗表面で旺盛に増殖し、クチクラ層内に侵入して菌糸を伸展させていることが明らかとなった(図 47)。Minamiyama *et al.*(2003)も同様に、内生放線菌 *S. galbus* MBR-5 株が宿主であるシャクナゲ苗の葉上で菌糸を伸長させ、クチクラ層内に侵入している様子を確認している。さらに、*S. galbus* MBR-5 株が気孔を通して葉内の細胞間隙に侵入することも明らかにしている。しかし、観察した限りでは、MBCN152-1 菌糸が気孔から子葉内へ侵入している様子は確認できなかった。第三章で示したように、表面殺菌した MBCN152-1 処理苗から3週間かけて本菌株が再分離されたことから、本菌株がキャベツ苗に内生していることは明らかである。今後、MBCN152-1 のキャベツ苗内への侵入様式を明らかにするためには、透過型電子顕微鏡などを駆使して詳細に観察しなければならない。

第五章 総合考察

本研究の最終目標は、植物内生放線菌を用いたキャベツセル成型苗黒すす病の新規生物防除技術を開発することである。

そこで、本研究ではまず、生物防除エージェントとして用いる内生放線菌をキャベツから分離することとした。圃場生育の健全なキャベツの根、茎、葉を表面殺菌して寒天培地上で培養したところ、試料表面に多数の放線菌のコロニーが出現してきた(図 6)。仮に、試料の表層に生息するエピファイト(植物表生菌)であれば、培養1週間程度で出現してくるはずである。しかし、分離した放線菌株はいずれも培養開始から約1ヶ月が経過してようやく出現してきたことから、キャベツ体内深部に存在していたエンドファイト(植物内生菌)であると推測された。

本研究は育苗現場での実用化に主眼を置いているため、生物防除エージェントの候補となる放線菌株は、①大量培養が容易である、②一次伝染(黒すす病菌汚染種子からの子苗感染)と二次伝染(飛散分生子による健全苗への感染)の両方を防ぐ能力を有している、という2つ条件を満たしていなければならなかった。第二章で示したように、本研究で選抜した MBCN152-1 はこの2条件をクリアした有望な菌株である。MBCN152-1 孢子混和育苗培土で1週間育苗したキャベツ苗の子葉を表面殺菌し、寒天培地上で培養したところ、本菌株が再分離された(図 31)。MBCN152-1 が試料表面に出現するまでに約3週間を要したことから、本菌株はキャベツ苗内に侵入し定着していたものと考えられる。第三章第一節で述べたように、拮抗微生物を植物体へ定着させなければ十分な生物防除の効果は得られない。わずか1週間育苗した苗から MBCN152-1 が再分離されたことは、本菌株が育苗培土からキャベツ苗へ速やかに移行して定着する能力を有していることを示唆している。この点からも、MBCN152-1 は優れた生物防除エージェントであると言える。SEM 観察では MBCN152-1 が苗内部へ侵入しているか否かは確認できなかったが、少なくとも苗表面では旺盛に増殖していることが明らかとなった。胚軸や子葉上では、MBCN152-1 がクチクラ層内に侵入して菌糸を伸展させていた(図 47)。土壌中の放線菌は、有機物を分解して炭素源を得るために、キチナーゼやセルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなどの多様な加水分解酵素を生産することが知られている(Tesch *et al.* 1996)。このことから、MBCN152-1 もクチナーゼなどの酵素を分泌し、クチクラ層などの細胞成分を分解・利用している可能性がある。Suzuki *et al.*(2005)は、内生放線菌 *Streptomyces galbus* MBR-5 株が宿主であるシャクナゲ苗の葉内へ気孔から侵入していると報告している。しかし、観察した限りでは MBCN152-1 菌糸が気孔から子葉内へ侵入している様子は認められなかった。MBCN152-1 のキャベツ苗内への侵入様式

および定着場所を明らかにするには、透過型電子顕微鏡を用いて詳細に観察しなければならないが、これについては今後の検討課題として残された。

上述したように、育苗培土へ混和した MBCN152-1 はキャベツ苗に定着する。この苗に黒すす病菌を噴霧接種したところ、病徴の進展が顕著に抑制された(図 14)。さらに、MBCN152-1 混和育苗培土では汚染種子からの子苗感染も著しく抑制された(図 16)。海外では、*Alternaria* 病害に防除効果のある放線菌殺菌剤 Actinovate(有効成分 *Streptomyces lydicus* WYEC108)が既に市販されている。そこで、本剤の有効成分である *S. lydicus* WYEC108 と MBCN152-1 の防除効果を比較したところ、黒すす病菌噴霧接種試験および汚染種子試験のいずれにおいても MBCN152-1 の方が高い効果を示した(図 32、35)。このことから、MBCN152-1 の黒すす病に対する防除活性の高さが実証された。

一般的な微生物殺菌剤の処理方法として、土壌混和や葉面散布、種子コーティング、根部浸漬処理などが考えられるが、本研究はセル成型苗を対象としているため、根部浸漬処理は適用できない。第三章でも述べたように、育苗施設内では高圧噴霧装置を用いた農薬の葉面散布が行われている。罹病苗からの飛散分生子による二次感染を防ぐためには、この装置を活用した葉面散布が最も効果的であると考えられた。そこで、MBCN152-1 胞子の葉面散布の防除効果を検討したが、育苗培土混和处理と同程度の効果しか得られなかった。この結果からすると、汚染種子に対する防除効果も併せ持つ育苗培土混和の方が、葉面散布よりも効率的・経済的であると言える。今後は、種子コーティングによる防除効果についても検討し、最良な処理方法を確立する必要がある。

MBCN152-1 の保存性を検討したところ、MBCN152-1 の凍結乾燥胞子は 40℃という過酷な条件下でも、半年以上は生存することが確認された。微生物農薬は生きた微生物を使用しているため一般の化学合成農薬と比較して保存安定性に劣ることが多い(永山 2003)。山田(2000)は、微生物を製剤化する場合には、保存期間中の微生物の生存率を 90%以上に保たなければならないと述べている。第三章の保存性試験では、この生存率を達成することはできなかった。このことから、MBCN152-1 を製剤化するためには、さらに保存性を向上させる工夫が必要であると考えられた。根井(1972)は、微生物を凍結乾燥する場合、保護剤や凍結処理、処理前の培養条件、乾燥条件、保存条件などを工夫することで、微生物の生存率を上げることが可能であると述べている。本研究では、スキムミルクとグルタミン酸ナトリウムを分散媒(保護剤)として添加したのみで、保存性を向上させるための他の工夫は凝らしていない。例えば、放線菌胞子内に含まれているト

レハロースに着目して、培養条件を改良することができる。トレハロースは糸状菌の休眠孢子や下等真核生物の細胞に存在するありふれた貯蓄物質で、耐乾性を寄与する (McBride *et al.* 1987)。McBride *et al.* (1987) は、グルコース濃度の高い培地で *S. griseus* を培養すると、孢子内のトレハロース含有量が増加し、孢子の耐熱性および耐乾燥性が増強することを報告している。同じ *Streptomyces* 属である MBCN152-1 においても培地中のグルコース濃度を上げることで孢子内トレハロース量が上昇する可能性が高い。これについては、今後検討する必要があるだろう。また、本研究では孢子を凍結乾燥しているが、その他の乾燥法についても検討すべきであろう。Larena *et al.* (2003) は、トマト萎凋病に防除活性を示す *Penicillium oxalicum* を、凍結乾燥法および噴霧乾燥法、流動層乾燥法の 3 通りの方法で乾燥し、得られた乾燥菌体の生存率と防除効果を比較している。彼らは、流動層乾燥法で得られた乾燥菌体が最も保存安定性と防除効果が高かったと述べている。本研究では凍結乾燥法で MBCN152-1 孢子を乾燥したが、乾燥法を変えることで安定的に長期間保存できる乾燥菌体が作製できる可能性がある。また、凍結乾燥法は時間とコストがかかるという欠点があるため、製剤化時のコストダウンを図るためにも別の乾燥方法を検討すべきであろう。

第二章で述べたように、16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析の結果、MBCN152-1 は *S. humidus* と最も近縁であることが明らかとなった。しかし、形態および培養性状が *S. humidus* とは全く異なっていたことから、新種であると考えられた。MBCN152-1 を新種として提案するためには、既に検討した形態や培養性状、16S rDNA 塩基配列の他に、生理生化学的性状やメナキノン組成、細胞壁のアミノ酸組成などの化学分類学的性状についても解析する必要がある。*S. scabies* や *S. turgidiscabies*、*S. acidiscabies*、*S. ipomoeae* など極少数の放線菌がジャガイモやサツマイモ、メロンに病害を引き起こすことが知られている (Tashiro *et al.* 1990)。MBCN152-1 と上記の病原性放線菌の系統関係を解析したところ、MBCN152-1 は病原性放線菌が含まれるクラスターには属さなかったことから、これらとは遠縁であることが明らかとなった (図 22)。この結果から、MBCN152-1 はキャベツを含む作物に病気を引き起こす危険性はないと考えられる。ところで、病原菌とは遠縁の MBCN152-1 がなぜキャベツ体内に定着できるのか？これは大変興味深い疑問である。Coombs *et al.* (2003) は、オーストラリア各地のコムギから分離した 6 菌株の内生 *Streptomyces* sp. が特異的なプラスミド pEN2701 を保有することを明らかにしている。このプラスミド上には植物の情報伝達を活性化する転写因子と相同性の高い遺伝子が存在する。さらに、これら遺伝子にはシグナル配列も存在することから、翻訳産物は菌体外へ分泌されると推定される。

この結果から彼らは、pEN2701 由来のタンパク質を分泌して宿主植物の情報伝達経路を制御することで、本来は土壤中で生育する *Streptomyces* sp. が植物に内生するようになったと考察している。このことから、MBCN152-1 も pEN2701 あるいは類似の機能を持つプラスミドを保有している可能性が考えられる。上述の疑問を解き明かす端緒として、MBCN152-1 や他のキャベツ由来放線菌のプラスミドを解析する必要があるだろう。

本研究によって、セル成型苗黒すす病の生物防除に利用できる *Streptomyces* sp. MBCN152-1 を獲得することができた。今後、本菌を実用化するためには、最適な処理方法および長期保存性に優れた製剤化技術を確立するとともに、防除メカニズムの解明などを行う必要がある。これらを解決することによって、*Streptomyces* sp. MBCN152-1 を用いたセル成型苗黒すす病の新規生物防除技術が実用化できるであろう。

摘要

キャベツセル成型苗に深刻な黒すす病被害が発生しているが、防除策に乏しいのが現状である。そこで、本研究では、内生放線菌を用いたキャベツセル成型苗黒すす病の生物防除技術の開発を最終目標とした。

1. 植物内生放線菌の分離および有望菌株の選抜と同定

園場生育の健全なキャベツから孢子形成の良好な内生放線菌 78 菌株を分離した。これらの中から、噴霧接種した黒すす病菌による苗の発病と汚染種子からの子苗感染を顕著に抑制する MBCN152-1 を選抜した。本菌株の 16S rDNA の塩基配列を解析した結果、*Streptomyces humicus* に最も近縁であることが明らかとなった。しかし、形態および培養性状の相違点から、MBCN152-1 は新種であることが明らかとなった。

2. *Streptomyces* sp. MBCN152-1 の実用化に向けた基礎実験

MBCN152-1 孢子混和育苗培土で育成した苗では、噴霧接種した黒すす病菌による発病が抑制されることを確認した。さらに、同培土では、汚染種子からの子苗感染も顕著に抑制された。これらの効果は、処理する MBCN152-1 孢子の濃度に依存して増加することが明らかとなった。MBCN152-1 孢子混和育苗培土で1週間育成した苗を表面殺菌し、素寒天培地上で3週間培養したところ、MBCN152-1 が再分離された。この結果から、育苗培土へ処理した MBCN152-1 は、播種後 1 週間以内にキャベツ苗へ移行し、子葉内部に定着すると判断した。MBCN152-1 孢子の葉面散布の防除効果を検討し、育苗培土混和と同程度の防除効果が得られることを確認した。*S. lydicus* WYEC108(市販の放線菌殺菌剤 Actinovate の活性成分)と MBCN152-1 の黒すす病防除活性を比較したところ、黒すす病菌噴霧接種試験では両菌株とも同程度の防除効果を示したが、汚染種子に対しては WYEC108 は防除効果を示さなかった。このことから、MBCN152-1 の防除活性の高さが実証された。さらに、凍結乾燥した本菌株孢子は、5~40℃で 6 ヶ月以上保存できることを確認した。

3. MBCN152-1 の黒すす病防除メカニズムの解析

MBCN152-1 を接種した IMA-2 寒天培地上では、黒すす病菌分生子の発芽および発芽管伸長

が顕著に抑制されたが、菌糸伸長は抑制されなかった。このことから、MBCN152-1 は培地中に黒すす病菌分生子の発芽および発芽管伸長のみを特異的に抑制する物質を生産していると考えられた。MBCN152-1 処理苗上では、黒すす病菌分生子の発芽は抑制されないが、発芽管伸長と付着器形成が抑制されることを確認した。また、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡観察により、本菌株が黒すす病菌の分生子や菌糸に寄生あるいは分解作用を示すことを見出した。本菌株は、苗のクチクラ層上および層内で菌糸生長するとともに、苗上で孢子形成することを確認した。しかし、子葉内部にまで侵入するか否かは明らかにできなかった。

本研究により、セル成型苗黒すす病の防除に有効かつ市場性の高い MBCN152-1 を獲得することに成功した。今後は、MBCN152-1 の実用化に向けて、最適な処理方法の検討、長期保存性の検討、防除メカニズムの解明などを行う必要がある。

引用文献

Bassey, E. O. and Gabrieson, R. L. (1983) The effects of humidity, seed infection level, temperature and nutrient stress on cabbage seedling disease caused by *Alternaria brassicicola*. Seed Sci. and Technol. 11:403–411

Cao, L., Qiu, Z., Dai, X., Lin, T. Y. and Zhou, S. (2004) Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. World J. Microbiol. Biotechnol. 20: 501–504

Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., Albert, H., Robison, R., Condrón, M. A. M., Teplow, D. B., Stevens, D. and Yaver, D. (2002) Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. Microbiology 148: 2675–2685

Ciccillo, F., Fiore, A., Bevivino, A., Dalmastri, C., Tabacchioni, S. and Chiarini, L. (2002) Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. Environ. Microbiol. 4: 238–245

Coombs, J. T. and Franco, C. M. M. (2003) Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5603–5608

Coombs, J. T., Franco, C. M. M. and Loria, R. (2003) Complete sequencing and analysis of pEN2701, a novel 13-kb plasmid from an endophytic *Streptomyces* sp. Plasmid 49: 86–92

Coombs, J. T., Michelen, P. P. and Franco C. M. M. (2004) Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. Biol. Cont. 29: 359–366

El-Hassan, S. E. and Gowen, S. R. (2006) Formulation and Delivery of the Bacterial Antagonist *Bacillus subtilis* for Management of Lentil Vascular Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. J. Phytopathol. 154: 148–155

Folman, L. B., DeKlein, M. J. E. M., Postma, J. and van Veen, J. A. (2004) Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber. Biol. Control 31:145–154

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. and Geneve, R. L. (1995) Techniques of propagation by seed. In: Plant propagation: principles and practices. Prentice-Hall, Inc. New jersey, USA. 216–237 pp.

Ishii H. (1997) Resistance management in disease of top fruit in Japan. Pestic. Sci. 51: 383–386

Hill, D. S., Stein, J. I., Torkewitz, N. R., Morse, A. M., Howell, C. R., Pachlatko, J. P., Becker, J. O. and Ligon, J. M. (1994) Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. Appl. Environ. Microbiol. 60: 78–85

Hobbs, G., Frazer, C. M., Grandner, D. C. J., Cullum, J. A. and Oliver, S. G. (1989) Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 272–277

Jarvis, W. R. (1992) Managing diseases in greenhouse crops. APS Press. USA. 130–131 pp.

Kexiang, G., Xiaoguang, L., Yonghong, L., Tianbo, Z. and Shuliang, W. (2002) Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to Control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. piricola, the Cause of Apple Ring Rot. J. Phytopathol. 150: 271–276

Kilic-Ekici, O. and Yuen, G. Y. (2003) Induced resistance as a mechanism of biological control by *Lysobacter enzymogenes* strain C3. Biol. Control 93: 1103–1110

Larena, I., Melgarejo, P. and De Cal, A. (2003) Drying of Conidia of *Penicillium oxalicum*, a Biological Control Agent against Fusarium Wilt of Tomato. J. Phytopathol. 151: 600–606

Li, W., Rovers, D. P., Dery, P. D., Meyer, S. L. F., Lohrke, S., Lumsden, R. D. and Hebbar, K. P. (2002) Broad spectrum anti-biotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. Crop Production 21:129–135

Matthijs, S., Tehrani, K. A., Laus, G., Jackson, R. W., Cooper, R. M. and Cornelis, P. (2007) Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. Environ. Microbiol. 9: 425–434

Minamiyama, H., Shimizu, M., Kunoh, H., Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H. and Yoshida, R. (2003) Multiplication of isolate R-5 of *Streptomyces galbus* on rhododendron leaves and its production of

cell wall-degrading enzymes. J. Gen. Plant Pathol. 69: 65–70

McBride, M. J. and Ensign, J. C. (1987) Effect of Intercellular Trehalose Content on *Streptomyces griseus* Spores. J. Bacteriol. 169: 4995–5001

Meera, M. S., Shivanna, M. B., Kageyama, K. and Hyakumachi, M. (1995) Responses of cucumber cultivars to induction of systemic resistance against anthracnose by plant growth promoting fungi. Euro. J. Plant Pathol. 101: 421–430

Morita, S., Azuma, M., Aoba, T., Satou, H., Narisawa, K. and Hashiba, T. (2003) Induced systemic resistance of Chinese cabbage to bacterial leaf spot and *Alternaria* leaf spot by the root endophytic fungal, *Heteroconium chaetospora*. J. Gen Plant Pathol. 69: 71–75

Ongena, M., Daayf, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T. C. and Belanger, R. R. (2000) Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescens pseudomonads. Plant Pathol. 49: 523–530

Otani, H., Kohnobe, A., Kodama, M. and Kohmoto, K. (1998) Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 52: 285–295

Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W., Maki, C. S., Araujo, W. L., dos Santos, D. R. and Azevedo, J. A. (2005) Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosus*, causal agent of Witches' Broom Disease. Int. J. Biol. Sci. 1: 24–33

Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, G. E. and Merli, S. (1992) Isolation of endophytic *Streptomyces* strain from surface-sterilized roots. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2691–2693

Shimizu, M., Nakagawa, Y., Sato, Y., Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H., Yoshida, R. and Kunoh, H. (2000) Studies on Endophytic Actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. Isolation from Rhododendron and Its Antifungal Activity. J. Gen. Plant Pathol. 66: 360–366

Shirling, E. B. and Gottlieb, D. (1968) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* III. Additional species descriptions from first and second studies. International J. Systemic Bacteriol. 18: 279–392pp

Sutherland, E. D. and Lockwood, J. L. (1984) Hyperparasitism of oospores of some Peronosporales by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other Actinomycetes and fungi. J. Plant. Pathol. 6: 139–145

Suzuki, T., Shimizu, M., Meguro, A., Hasegawa, S., Nishimura, T. and Kunoh, H. (2005) Visualization of infection of an endophytic actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured rhododendron. Actinomycetologica 19: 7–12

Tashiro, N., Miyashita, K. and Suzui, T. (1990) Taxonomy Studies on the *Streptomyces* Species, Isolated as Causal Organisms of Potato Common Scab. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56: 73–82

Tapio, E. and Pohto-Lahdenpera, A. (1991) Scanning electron microscopy of hyphal interaction between *Streptomyces griseoviridis* and some plant pathogenic fungi. J. Agri. Sci. in Fin. 63: 435–441

Tesch, C., Nikoleit, K., Gnau, V., Gotz, F. and Bormann, C. (1996) Biochemical and Molecular Characterization of the Extracellular Esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. J. Bacteriol. 178: 1858–1865

Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung, C. M., Crawford, D. L., Salove, M. H., Deobald, L. A., Bailey, J. F. and Morra, M. J. (2002) Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC 108 and the Pea Plant (*Pisum sativus*). Appl. Environ. Microbiol. 68: 2161–2171

Tu, J. C. (1988) Antibiosis of *Streptomyces griseus* against *Colletotrichum lindemuthianum*. J. Phytopathol. 121: 97–102

Vidhyasekaran, P., Kamala, N., Ramanathan, A., Rajappan, K., Paranidharan, V. and Velazhahan, R. (2001) Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pf1 against *Xanthmonas oryzae* pv. *oryzae* in rice leaves. Phytoparasitica 29

Xiao, K., Kinkel, L. L. and Samac, D. A. (2002) Biological Control of Phytophthora Root Rots on Alfalfa and Soybean with Streptomyces. Biol. Control 23: 285–295

Xiaohua, L., Xiufen, Z. and Zixin, D. (2004) Isolation and characterization of *Micromonospora* phage development into a phasmid. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3893–3897

Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. and Chet, I. (2003) Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7343-7353

梅津憲治 (2004) 農薬と食:安全と安心, ソフトサイエンス社, 東京, 58-132p.

大畑貫一, 國安克人, 高橋廣治, 栃原比呂志, 長尾紀明 (1999) 種子伝染病の生態と防除-健全種子生産をめざして- 日本植物防疫協会, 東京, 237-242p.

窪田昌春、我孫子和雄 (1998) キャベツのセル成型苗に発生した病害. 関西病虫研報 40: 55-63

窪田昌春 (2000) 育苗施設のキャベツのセル成型苗における病害の発生実態, 野菜茶研研報 15:1-10

窪田昌春, 我孫子和雄, 西 和文 (2003) キャベツセル成型苗の育苗条件が黒すす病の発生に及ぼす影響, 野菜茶研研報, 2:1-8

窪田昌春, 中筋智子, 清水将文, 西 和文 (2006) 2004 年 8 月～2005 年 3 月に見え県内の野菜育苗施設でキャベツセル成型苗に発生した病害. 関西病虫研報 48:41-43

久能 均, 白石友紀, 高橋 壮, 露無慎二, 眞山滋志 (1998) 植物病理学概論, 養賢堂, 東京, 149-199, 274p.

黒田克利, 富川章 (1998) キャベツのセル成型苗に発生した黒すす病の種子消毒による防除. 関西病虫研報 41:121-122

小林光, 西川潤, 宇沢弘文, 幸田シャーミン, 高見邦雄, 中川光弘, 浅岡美恵, 星寛治 (1999) 食糧と地球環境, 家の光協会, 東京, 27-52p.

清水将文、久能 均 (2003) 内生放線菌を用いた病害耐性組織培養苗の作出. 拮抗微生物による作物病害の防除-我が国における研究事例・実用化事例-, 百町満朗 監修, クミアイ化学工業, 東京, 97-104p.

鈴木孝仁、岡田齋夫、国見裕久、牧野考宏、斉藤雅典、宮下清貴（2000）微生物の資材化：研究の最前線，ソフトサイエンス社，東京，1-17 p.

竹中重仁（2005）微生物を用いた病害の防除（生物防除）．新しい作物保護の展開－バイオサイエンスへのかけはし－（羽柴輝良 編），ソフトサイエンス社，東京，165-173 pp.

田口義広（2003）*Bacillus subtilis* による作物病害の防除．拮抗微生物による作物病害の防除－我が国における研究事例・実用化事例－，百町満朗 監修，クミアイ化学工業，東京，29-41 p.

土屋健一（2000）拮抗微生物の利用と資材化．微生物の資材化：研究の最前線，鈴木孝仁 監修，ソフトサイエンス社，東京，128-142p.

中沢鴻一、柴田元雄、田辺一雄、山本弘一（1957）放線状菌に関する研究：ジヒドロストレプトマイシンを生産する *Streptomyces humidus* nov. sp. について．Proc. Jap. Acad., Tokyo, 32: 648-653

永山孝三（2003）微生物農薬の開発．拮抗微生物による作物病害の防除－我が国における研究事例・実用化事例－，百町満朗 監修，クミアイ化学工業，東京，215-224p.

西 和文（2002）熱水土壤消毒：その原理と実践の記録，社団法人 日本施設園芸協会，東京，1-2p.

日本植物防疫協会（2002）生物農薬ガイドブック，東京，156-160p.

日本放線菌学会（2000）放線菌の分類と同定，日本学会事務センター，東京，3-19, 23-55, 249-258p.

根井 外喜男（1972）凍結・乾燥と保護物質．東京大学出版会，東京，78-113p.

梅津憲治（2004）農薬と食：安全と安心，ソフトサイエンス社，東京，58-61, 132p.

百町満朗（2003）拮抗微生物による作物病害の防除－我が国における研究事例・実用化事例－，クミアイ化学工業，東京，19-41p.

福井 糧（2003）拮抗微生物利用による生物防除の将来展望．拮抗微生物による作物病害の防除－我が国における研究事例・実用化事例－，百町満朗 監修，クミアイ化学工業，東京，

225-237p.

山田昌雄（2000）微生物農薬-環境保全型農業をめざして-, 全国農村教育協会, 東京, 1-214p.

若尾忠幸（2003）野菜生産の低コスト・省力化技術, 農林統計協会, 東京, 1-17p.

和田哲夫（2005）微生物農薬について 開発と普及に関する考察. 微生物の生物防除剤としての機能開発と普及課題, バイオコントロール研究会レポート第9号, 東京, pp.1-15
財団法人日本色彩研究所編（1987）新色名事典, 日本色研事業株式会社, 東京, 146p.

謝辞

本研究を遂行するにあたって数々の御指導賜り、本稿校閲に労をとられました三重大大学生物資源学部助教 清水将文博士、同教授 江原宏博士に厚く謝意を表します。また、綿密な御高閲を頂きました同大学教授 小畑 仁博士に感謝致します。また、綿密な御高閲と遺伝子実験の御指導を賜った同大学准教授 苅田修一博士に感謝致します。実験に供試した病原菌を提供して下さい、多くの助言、ご指導を頂きました独立法人野菜茶業研究所の窪田昌春氏に感謝の意を表します。最後に、本研究を遂行するにあたり、苦楽を共にした生態循環学研究室諸氏に感謝致します。