

Ralstonia solanacearum の表現型変異株を利用した青枯病の
生物的防除

中原 浩貴

2018

目次

| | |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 第1章 緒論 | 1 |
| 第2章 液体培地中における青枯病菌の野生株と表現型変異株の競合 | |
| 第1節 液体培地中における青枯病菌の野生株と表現型変異株の増殖特性 | |
| 緒言 | 10 |
| 材料および方法 | 11 |
| 結果 | 14 |
| 考察 | 20 |
| 摘要 | 28 |
| 第2節 青枯病菌の野生株の増殖抑制効果が高い表現型変異株培養ろ液の選抜 | |
| 緒言 | 29 |
| 材料および方法 | 30 |
| 結果および考察 | 33 |
| 摘要 | 47 |
| 第3章 <i>Ralstonia solanacearum</i> 表現型変異株を利用したトマト・ナス青枯病の防除効果 | |
| 緒言 | 48 |
| 材料および方法 | 49 |
| 結果 | 53 |
| 考察 | 61 |
| 摘要 | 67 |
| 第4章 土壌中・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 | |
| 第1節 表現型変異株の接種方法の違いが青枯病の防除効果と土壌中と植物内における青枯病の定着に及ぼす影響 | |
| 緒言 | 68 |
| 材料および方法 | 69 |
| 結果 | 71 |

| | | |
|-----------------------------------------|-----|-----|
| 考察 | 79 | |
| 摘要 | 84 | |
| 第2節 蛍光観察法を用いた植物組織内における青枯病菌の挙動観察 | | |
| 緒言 | 85 | |
| 材料および方法 | 86 | |
| 結果 | 91 | |
| 考察 | 97 | |
| 摘要 | 106 | |
| 第5章 表現型変異株接種による植物への抵抗性誘導と植物の生育・果実品質への影響 | | |
| 緒言 | 107 | |
| 材料および方法 | 108 | |
| 結果 | 112 | |
| 考察 | 112 | |
| 摘要 | 118 | |
| 第6章 総合考察 | | 120 |
| Summary | | 129 |
| 謝辞 | | 134 |
| 引用文献 | | 135 |

第1章 緒論

青枯病は、植物病原性細菌 *Ralstonia solanacearum* によって引き起こされる土壌伝染性病害である。本病害は、経済的に重要なナス、トマト、ジャガイモなどのナス科植物をはじめ、200 種以上の作物を侵し、熱帯、亜熱帯および温帯地域を中心に発生している (Hayward, 1991)。日本では、ナス科やウリ科など 22 科 42 種の植物で発生が確認されている (堀田・土屋, 2009)。青枯病菌は、宿主の違い (レース, 1-5) による分類 (Buddenhagen and Kelman, 1964 ; He et al., 1983b), 炭素源の代謝能 (biover, 1-5 および N2) に基づく分類 (Hayward, 1964, 1991), 16S rRNA や *hrpB*, *egl* 等の病原性関連遺伝子などの塩基配列情報に基づく分類 (phyloptype) が行われている (堀田・土屋, 2012)。また、日本では 4 種のナス属植物に対する病原性の違い (菌群, I-V) によって分類されている (尾崎・木村, 1992)。本細菌は、種々の分類によって系統が異なる菌株が多く存在している。

本細菌は、土壌中で根の傷口や自然開口部から植物に感染し、植物内に侵入した青枯病菌は茎内に移行し、菌の増殖に伴いシグナル物質 3-ヒドロキシパルミチン酸メチルエステル (3-OH PAME) や 3-ヒドロキシテトラデカン酸メチル (3-OH MAME) を生産し、その濃度が閾値に達することで病原性因子の発現に関わる遺伝子が連鎖的に活性化され、*phcA* 遺伝子の活性化によりエンドグルカナーゼ (*Egl*) やペクチンメチルエステラーゼ (*Pme*) などの植物細胞壁分解酵素や菌体外多糖類 (EPS) などの病原性因子を発現する (Fig. 1-1) (Clough et al., 1997 ; Flavier et al., 1997 ; Schell, 2000 ; Genin and Denny, 2012 ; Kai et al., 2015 ; Hikichi et al., 2017)。青枯病菌によって生産される EPS により植物の導管が閉塞し、植物体は萎凋・枯死する (Fig. 1-2) (Kao et al., 1992 ; Saile et al., 1997)。

青枯病の防除法として、主に化学農薬、太陽熱、熱水による土壌消毒や抵抗性品種の利用が行われている。しかし、本病害が一度発生すると、青枯病菌は土壌深部、植物残渣や雑草根域で生存し、



Fig. 1-2 Symptoms of bacterial wilt caused by *R. solanacearum*.

太陽熱や熱水による土壌消毒では、土壌深部における菌を十分に防除するのは困難である（山口ら，1987；大城ら，2009）。また，土壌消毒剤として使用される臭化メチルは，オゾン層破壊物質であることから全廃され，クロルピクリン燻蒸剤等の化学農薬は，第一種指定化学物質として規制されている。そのため，環境負荷や食の安全・安心の観点から環境負荷の少ない防除法の開発が求められている。ナスやトマトの青枯病防除法では，抵抗性台木植物を利用した接ぎ木による耕種的防除が普及しており，最も効果的な防除法となっている（山川，1981；Hayward, 1991）。しかし，抵抗性台木として用いられる抵抗性植物をも侵す菌群の存在（尾崎，1990）および栽培温度などによって抵抗性台木の罹病化すること（Krausz and Thurston, 1975；Date et al., 1994；Nakaho et al., 1996；伊達・那須，2004；中曽根，2008）が報告され，新たな防除法の確立が求められている。そこで環境保全型の新規防除法として，有用微生物を用いた生物的防除法への関心が高まっている。

環境保全型の防除技術として，いくつかの微生物資材が実用化されているが，その数は世界的にみても極めて少なく，化学農薬の約1%に過ぎない（Fravel, 2005）。日本においても，生物農薬として認可された資材は26剤があり，その内訳は，細菌製剤が15剤，糸状菌製剤が10剤，ウイルス製剤が1剤である（百町ら，2014）。そのほとんどが2000年代に開発されているが，化学農薬に比べて効果が安定しないことや資材コストが高いなどの理由から普及していない資材も多い（吉田・對馬，2013；百町ら，2014）。細菌を利用した製剤には，*Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属などの内生細菌や非病原性細菌の製剤が実用化されている（吉田・對馬，2013）。内生細菌の製剤には，灰色カビ病やうどんこ病の生物農薬として，*B. subtilis* を製剤化したボトキラー水和剤やバチスター水和剤などがあり（川根，2001；吉田・對馬，2013），レタス腐敗病，ハクサイ黒斑点細菌病やキャベツ黒腐病などの生物農薬として，*P. fluorescens* を製剤化したベジキーパー水和剤が市販されている（小木曾，2008）。非病原性細菌を利用した製剤では，軟腐病やカンキツかいよう病の防除剤とし

て軟腐病菌 *Erwinia carotovora* の非病原性株を製剤化したバイオキパー水和剤やエコメイトが普及している（高原，2001；吉田・對馬，2013）。青枯病に対応した生物農薬の開発に向けて，*Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属などの内生細菌を用いた研究が数多く行われているが（Jetiyanon, 2007; Ramesh et al., 2009; Vanitha and Umesha, 2011; Ramesh and Phadke, 2012; Hyakumachi et al., 2013; 相野，1995, 2016），実用化された例は少ない。これまでに *P. florecens* を有効成分とする資材が実用化されたが（相野，2008），現在では生物農薬として失効しており，青枯病に対応した生物農薬の開発は早急な課題である。

細菌を利用した青枯病防除法の一つとして，自発的突然変異による *R. solanacearum* の表現型変異株を利用した防除法が研究されている（Chen and Echandi, 1984；Trigalet and Trigalet-Demery, 1990；Hara and Ono, 1991；Arwiyanto et al., 1994a, b；巖原ら，2002；小川ら，2011，2012a, b；黒木ら，2016）。青枯病菌の野生株は，液体培地，土壌，植物内，植物の水抽出液などで，流動性の白色コロニーから非流動性の赤色コロニーに表現型変異（Fig. 1-3）を起こす（Kelman and Hruschka., 1973; Mori et al., 2007, 2011, 2012）。表現型変異株（以下，PC 株）は，EPS，Egl や Pme のような病原性因子の産生性が低下しているため，弱病原性もしくは非病原性を示す。PC 株は，ポリガラクトナーゼ（PehA）活性と運動性が増進しており，宿主組織内で増殖能を有するが，萎凋症状を示さない（Kelman, 1954; Husain and Kelman, 1958; Denny et al., 1988; Brumbley and Denny, 1990; Denny and Baek, 1991）。タバコ，トマト，ナスおよびジャガイモなどの植物では，PC 株を事前に接種することにより，病原菌感染後の青枯病の発病が抑制される（Fig. 1-4）ことが知られている（Chen and Echandi, 1984；Trigalet and Trigalet-Demery, 1990；Hara and Ono, 1991；Arwiyanto et al., 1994a, b；巖原ら，2002；小川ら，2011，2012a, b；黒木ら，2016）。タバコでは，PC 株の抗菌物質生産株の前接種によって発病が抑制されること（Chen and Echandi, 1984），PC 株の非病原性変異株よりも弱病原性変異株を

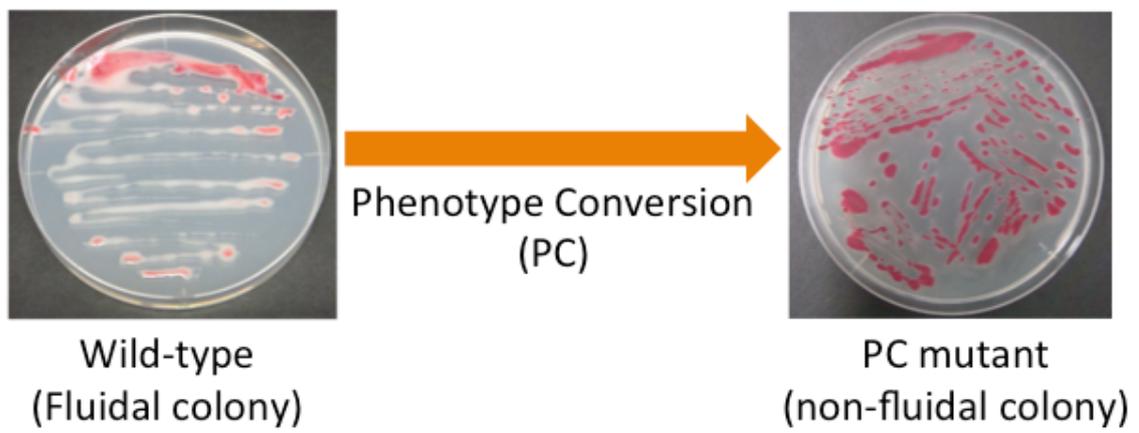


Fig. 1-3 Phenotype conversion (PC) of *R. solanacearum* wild-type strain to PC mutant.



Fig. 1-4 Biological control of bacterial wilt by PC mutant of *R. solanacearum*.

接種した場合において、効果的に発病が抑制されること (Hara and Ono, 1991), PC 株の熱処理死菌接種でも、発病が抑制されることが報告されている (Tanaka, 1983). 一方, トマトやナスでは, 加熱死菌の接種による防除効果は得られていない (Arwiyanto et al., 1994a; 小川ら, 2011, 2012a). トマトにおいては PC 株培養ろ液を利用した防除法が試みられているが, その防除効果は低く, PC 株生菌の接種では青枯病菌に対して静菌作用を示すトマチンの生成量が増加し, 発病が抑制されることが報告されている (Arwiyanto et al., 1994a, b). PC 株による青枯病防除効果は, 長期間の栽培によって低下すること, ナスにおいては PC 株による防除効果には品種間差があること, PC 株および野生株の系統によって防除効果に差異があることが明らかになっている (巖原ら, 2002; 小川ら, 2011; 2012a). このように, PC 株による防除効果は, 植物種および品種による差異, PC 株の生死, 青枯病菌の系統による差異などによって影響し, 防除効果が不安定であるといえる. また, PC 株による青枯病防除法は実用化に至っておらず, その課題として, 様々な系統の野生株や多くの植物種および品種に対して, 防除効果を有する PC 株の系統選抜および効果的な接種方法の確立が求められる. さらに, PC 株による青枯病防除機構には, PC 株が有する抗菌作用 (Chen and Echandi, 1984; Hara and Ono, 1991; Arwiyanto et al., 1994a; 小川ら, 2012a), PC 株と病原菌の植物内の定着場所や栄養をめぐる競合 (巖原ら, 2002; Trigalet and Trigalet-Demery, 1990), 植物内の PC 株の定着による病原菌の定着阻害 (Hara and Ono, 1991; Arwiyanto et al., 1994a; 小川ら, 2011, 2012b), 植物への抵抗性誘導 (Arwiyanto et al., 1994b, Chen et al., 2015) など複数の要因が考えられているが, 実用的かつ効果的な防除法の確立のためには, PC 株による青枯病発病抑制の主要因の解明が不可欠である.

そこで本論文では *R. solanacearum* の表現変異株 (PC 株) を利用した青枯病の生物的防除法の確立に向けて, 青枯病防除に効果的な PC 株接種技術と PC 株による青枯病の防除機構を明らかにすることを目的とし, 第 2 章では液体培地における PC 株と野生株の特性および PC 株培養ろ液にお

ける野生株の増殖抑制を明らかにし、野生株の増殖抑制効果が高い PC 株培養ろ液を選抜した。第 3 章では系統の異なる PC 株と PC 株培養ろ液を罹病性トマトと罹病性ナス数種類に接種し、高い防除効果を発揮する PC 株の選抜を行った。第 4 章では土壌中と植物内における野生株と PC 株の定着量を調査し、高い防除効果が得られる PC 株接種条件における植物内の PC 株と野生株の定着量を明らかにした。さらに植物組織内における PC 株の定着が野生株の定着抑制に及ぼす影響を調査するため、蛍光標識した青枯病菌を用いて植物組織内における菌の挙動を調査した。第 5 章では感染特異的タンパク質遺伝子の発現を半定量解析し、PC 株接種による植物への抵抗性誘導を調査した。さらに、PC 株を接種した植物の生育、果実収量および果実品質を調査した。第 6 章では青枯病防除に効果的な PC 株接種技術と PC 株による青枯病の防除機構について総合考察し、PC 株を利用した青枯病の生物的防除法の展望について総括した。

第 2 章 液体培地中における青枯病菌の野生株と表現型変異株の競合

第 1 節 液体培地中における青枯病菌の野生株と表現型変異株の増殖特性

緒言

青枯病菌は、表現型変異 (Phenotype conversion: PC 化) する特性を有し、表現型変異株 (PC 株) は、病原性因子の発現調節を司る *phcA* 遺伝子に変異しており (Brumbley and Denny, 1990 ; Poussier et al., 2003), 野生株に比べて菌体外多糖類, エンドグルカナーゼ, ペクチンメチルエステラーゼの生産能は低下する一方で, *phcA* 遺伝子により負に制御されているポリガラクトナーゼの活性や鉄獲得に関与する有機化合物シデロフォアの産生能は増加する (Kelman, 1954 ; Denny et al., 1988 ; Brumbley and Denny, 1990 ; Bhatt and Denny, 2004). PC 化は、培地中で長期間培養することで誘発されやすく、栄養飢餓、溶存酸素の減少による環境ストレスや外来 DNA の取り込みが引き金となると考えられている (横山・小川, 2005 ; Zhu et al., 2010 ; Genin and Denny, 2012, Mori et al., 2012).

青枯病菌の最少栄養培地で青枯病菌の PC 株と野生株を単独で培養した場合、PC 株が野生株よりも早期に増殖し、野生株は PC 株よりも増殖速度は遅いが、PC 株よりも高濃度に増殖することが報告されている (Khokhani et al., 2017). 一方、超純水中やナスの水抽出液中では、表現型に関係なく両菌株とも同様に増殖することが明らかになっている (Wakimoto et al., 1982 ; 小川ら, 2011). これらのことから、培地中における PC 株と野生株の増殖は、培地の種類によって異なるといえる. また、PC 株と野生株を混合培養し、それぞれの菌の増殖を調査された知見は少なく、PC 株が共存する培養条件における野生株の増殖や PC 化への影響について、複数の培地を用いて調査する必要がある.

そこで本研究では、液体培地中における野生株と PC 株の増殖特性を調査するため、異なる培地組

成の液体培地中で両菌株を混合培養し、菌の増殖量と野生株の PC 化を調査した。さらに、青枯病菌を培養した後の培養ろ液を培地として用いて、野生株と PC 株の増殖に及ぼす影響を調査した。

材料および方法

供試細菌

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の病原性株 (野生株) として、トマトより分離された 8238 (MAFF 301528, レース 1, biovar 4, phylotype I) の $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ リファンピシン自然耐性株である 8238rif を供試した。また、PC 株として、野生株 8238 に感染したナスより分離された PC 株の $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ストレプトマイシン自然耐性株である E-PCstr を供試した。供試菌株は 15%グリセロールを含んだ BG 液体培地 (蒸留水に 1%ペプトン, 0.1%カザミノ酸, 0.1%イーストエクストラクトおよび 0.5%グルコースを加え, pH 7.0 に調製後, 110°C 10 分オートクレーブしたもの) (Saile et al., 1997) 中に -80°C で保存した。

接種源の調製

凍結保存した菌株を BGT 培地 (BG 培地に 1.5%の寒天とメンブレンフィルター ($0.2 \mu\text{m}$) で滅菌した $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ テトラゾリウムクロライドを加えたもの) に画線塗抹し, 28°C で 48 時間培養した。形成した任意の形態の単コロニーを 4 mL BG 液体培地に接種し, 28°C , $130 \text{ stroke min}^{-1}$ で 24 時間振とう培養した。培養液 $40 \mu\text{L}$ を 4mL BG 液体培地に接種し, 28°C , $130 \text{ stroke min}^{-1}$ で 15 時間振とう培養した。培養液を, 分光光度計で 600 nm の波長の吸光度を測定し, 既知の検量線 (総菌数 = $(171160276 \times \text{吸光度} + 16614) \times \text{希釈倍数}$) により総菌数を推定した。培養液を遠沈管に移して $7500 \times g$, 4°C , 15 分間遠心分離した。上澄みを捨て, 滅菌水を加えて再度遠心分離し, 沈殿物を菌体とした。分光光学法により求めた総菌数をもとに, 野生株および PC 株の菌体を, 任意の濃度に滅菌

水で希釈し菌液とした。生菌数は、調製した菌液を段階的に希釈し、BGT 培地にプレーティングしてコロニー数を計数することにより測定した。

BG 液体培地中における PC 株と野生株の増殖

BG 液体培地 4 mL に PC 株と野生株を約 10^2 cfu mL⁻¹ になるように接種し、28°C で 24 日間静置培養した（混合培養区, Co-culture）。また、PC 株と野生株をそれぞれ単独で接種し、同様に培養した（単独培養区, Mono-culture）。培養後 24 日間の菌濃度は、経時的に希釈平板法により算出した。

PC 株の菌濃度は、50 µg mL⁻¹ ストレプトマイシン添加 BGT 培地にプレーティングし、野生株の菌濃度は、希釈液を 50 µg mL⁻¹ リファンピシン添加 BGT 培地にプレーティングすることで測定した。

菌濃度は各区 6 サンプルの平均とし、 $\log(\text{cfu mL}^{-1}+1)$ で表した。また、BG 液体培地を 100 倍希釈した 1/100BG 培地を用いて同様の実験を行った（n=3）。

異なる培地中における PC 株と野生株の増殖と野生株の PC 化

培地として、BG 液体培地、青枯病菌の最少栄養液体培地（MM 液体培地：10 mM K₂HPO₄, 5.5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 9.5 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 mM CaCl₂ · 2H₂O および 0.5% グルコースを添加したもの）（Bhatt and Denny, 2004）および超純水を用いて、各 4 mL の培地に PC 株と野生株を単独または混合で接種（ 10^2 - 10^3 cfu mL⁻¹）し、接種後 0, 2, 7, 14, 21 日目の菌の増殖を調査した。実験は、各区 3-6 サンプル用いて行い、各菌株の菌濃度を希釈平板法により調査した。また、野生株が PC 株に変異した PC 化率は、リファンピシン添加 BGT 培地上で顕著に流動性を失ったコロニーを PC 株コロニーとして計数し、以下の式により算出した。PC 化率（%）= 非流動性コロニー数 / 総コロニー数 × 100。

青枯病菌の培養ろ液が PC 株と野生株の増殖に及ぼす影響

青枯病菌の培養ろ液の調製

BG 液体培地 (pH 7.0) 4 mL に PC 株と野生株を約 10^2 cfu mL⁻¹ になるように単独または混合接種し、28°C で 24 日間静置培養した。それら培養液を 7500×g で遠心分離後、上澄みを 0.45 μm のメンブレンフィルター (DISMIC-25AS, 25AS045AS, Advantec) でろ過し、ろ液を試験管に 3 mL 分注したものを培養ろ液 (PC 株培養ろ液, 野生株培養ろ液, PC 株と野生株の混合培養ろ液) とし、各培養ろ液を BGT 培地に塗抹し、培養ろ液中に菌が残存していないことを確認して各実験に供試した。また、各培養ろ液の pH を測定した。

青枯病菌の培養ろ液における PC 株と野生株の増殖

PC 株と野生株の混合培養ろ液 3 mL を培地として、PC 株と野生株を単独または混合で約 10^4 cfu mL⁻¹ になるように接種した。菌接種後、28°C で 10 日間静置培養し、菌濃度を希釈平板法により算出した。各菌の培養ろ液が青枯病菌の増殖に及ぼす影響を調査するため、PC 株培養ろ液、野生株培養ろ液および PC 株と野生株の混合培養ろ液の各 3 mL に、PC 株または野生株を単独で約 10^4 cfu mL⁻¹ になるように接種後、28°C で静置培養し、接種後 0 日目と 10 日目の菌濃度を希釈平板法により調査した。また、培養期間中の菌液の濁度を吸光度法 (600 nm) により経時的に測定した。

PC 株培養ろ液への熱処理が野生株の増殖抑制に及ぼす影響

前述の方法で作製した PC 株の培養ろ液をオートクレーブ (110°C, 10 分) し、熱処理培養ろ液とした。対照として、BG 液体培地を熱処理した培養液を用いた。PC 株の培養ろ液、熱処理培養ろ液および BG 液体培地 3 mL に野生株を約 10^2 cfu mL⁻¹ になるように接種し、28°C で 10 日間静置培養後、野生株の菌濃度を希釈平板法により調査した。

青枯病菌培養ろ液の PC 株と野生株に対する抗菌作用

BGT 寒天培地上における野生株 8238rif に対する PC 株の抗菌活性をプレートコロホルム法 (Wakimoto et al., 1986) により調査した。PC 株の単コロニーを BGT 培地に 4 カ所植菌し、28°C で

48 時間培養した。培養後、9 cm シャーレの上蓋にクロロホルム 1.5 mL を染み込ませた 9 cm 濾紙を置き、2 時間燻蒸した。その後、BGT 培地に指標菌 8238rif の菌液 (約 10^8 cfu mL⁻¹) 40 μ L を 0.5% 寒天 BG 培地 4 mL とともに流し込み、28°C で 48 時間培養し、PC 株のコロニーの周囲における阻止円形成の有無を確認した。

PC 株と野生株に対する各培養ろ液の抗菌活性を Spot on lawn 法により調査した。指標菌として、PC 株 E-PCstr もしくは野生株 8238rif の菌液 (約 10^6 cfu mL⁻¹) を用いて、指標菌を含む 0.5% 寒天 BG 培地を BGT 培地に流し込み、凝固させた。指標菌を含む BGT 培地上に、PC 株培養ろ液、野生株培養ろ液および PC 株と野生株の混合培養ろ液を 10 μ L ずつ 4 カ所にスポットし、培地を 28°C で 48 時間培養後、阻止円形成の有無を確認した。

結果

BG 液体培地中における PC 株と野生株の増殖

本研究で供試した PC 株 E-PCsrt と野生株 8238rif は、両菌株間で抗菌作用はなかった (データ省略)。PC 株と野生株を BG 液体培地に単独接種した場合 (単独培養区) では、両菌株とも約 10^8 cfu mL⁻¹ まで増殖し、24 日目まで 10^6 - 10^7 cfu mL⁻¹ の菌濃度で推移した (Fig. 2-1A)。PC 株と野生株を混合接種した場合 (混合培養区) では、両菌株の増殖は異なり、混合培養区の PC 株は約 10^8 cfu mL⁻¹ まで増殖後、24 日目まで約 10^7 cfu mL⁻¹ の菌濃度で推移し、PC 株の単独接種との差はなかった。一方、混合培養区の野生株は培養 2 日目に約 10^8 cfu mL⁻¹ まで増殖したが、その後、菌濃度が次第に低下し、培養 24 日目には約 10^2 cfu mL⁻¹ まで菌濃度が低下した。

1/100BG 液体培地中では、単独培養区において PC 株と野生株は同様に増殖し、菌濃度は 10^5 - 10^6 cfu mL⁻¹ で推移した (Fig. 2-1B)。混合接種区において、野生株の増殖は培養 2-8 日目までは PC 株

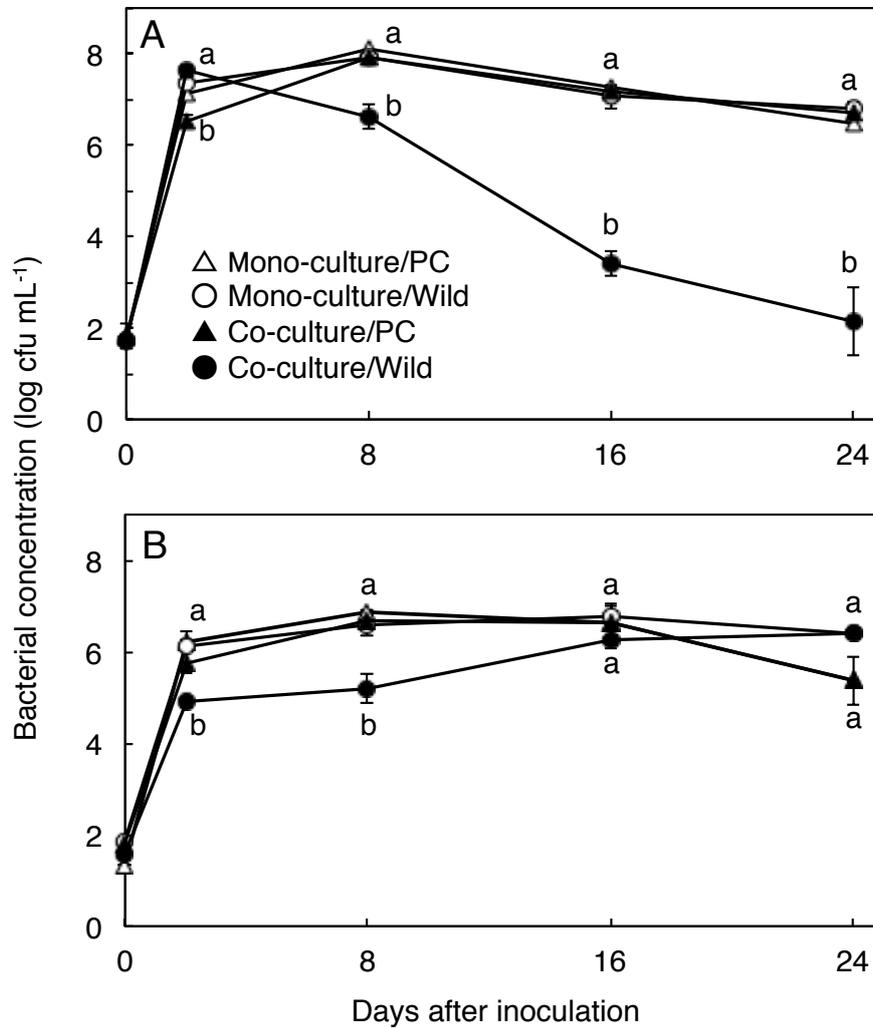


Fig. 2-1 Growth competition of the *R. solanacearum* wild-type and PC mutant strains in BG broth (A), and 100-fold diluted BG broth (B). The bacteria were suspended in cultures at ca. 10^2 cfu mL⁻¹, and then grown statically at 28°C. The bacterial concentrations were estimated at 0, 2, 8, 16 and 24 days after inoculation. Asterisks indicate a significantly difference ($P < 0.05$) according to a one-way ANOVA following the Tukey-Kramer test. Error bars show standard errors from the mean values of 3-6 samples.

に比べて有意に低かったが、その後、両菌株とも 10^5 – 10^6 cfu mL⁻¹ まで増殖し推移した。

異なる培地組成が PC 株と野生株の増殖と野生株の PC 化に及ぼす影響

培地として BG 液体培地、MM 液体培地および超純水を用いて PC 株と野生株の増殖を調査したところ、菌の増殖は、培地の種類、単独または混合培養、菌株によって異なった (Fig. 2-2)。BG 液体培地では、前述の実験結果と同様の菌の増殖がみられ、混合培養した場合、培養 7–21 日に野生株の増殖のみが低下した。MM 液体培地中では、単独培養区において培養 7 日目に PC 株に比べて野生株の菌濃度が高くなったが、それ以降の両菌株の菌濃度には違いはみられなかった。一方、混合培養区では PC 株に比べて野生株の増殖が低下する傾向がみられた。超純水中では、単独培養区において両菌株は約 10^5 cfu mL⁻¹ 程度まで増殖し、混合培養区では両菌株とも菌濃度 10^4 – 10^5 cfu mL⁻¹ で推移した。

各培地における野生株の PC 化率を Table 2-1 に示す。BG 液体培地で野生株を単独培養した場合には、培養日数の経過に伴い PC 化率が増加し、培養 21 日目には 96% であった。混合培養区の PC 化率は 13% と、単独培養区と比べて顕著に低かった。MM 液体培地中における PC 化率は、BG 液体培地と比べて低く、単独培養区よりも混合培養区で顕著に低かった。超純水中では、単独培養区と混合培養区の両方で、PC 化率は極めて低かった。

青枯病菌の培養ろ液における PC 株と野生株の増殖

PC 株と野生株の混合培養ろ液中で PC 株または野生株を単独培養すると、培養 10 日目に約 10^6 cfu mL⁻¹ 程度まで増殖した。混合接種区では、培養 10 日目に PC 株は約 10^6 cfu mL⁻¹ まで増殖したが、野生株の菌濃度は約 10^2 cfu mL⁻¹ まで低下した (Table 2-2)。

PC 株培養ろ液、野生株培養ろ液および混合培養ろ液を用いて、PC 株と野生株に対する各培養ろ液の抗菌作用を Spot on lawn 法により調査したところ、いずれも抗菌活性はみられなかった (デー

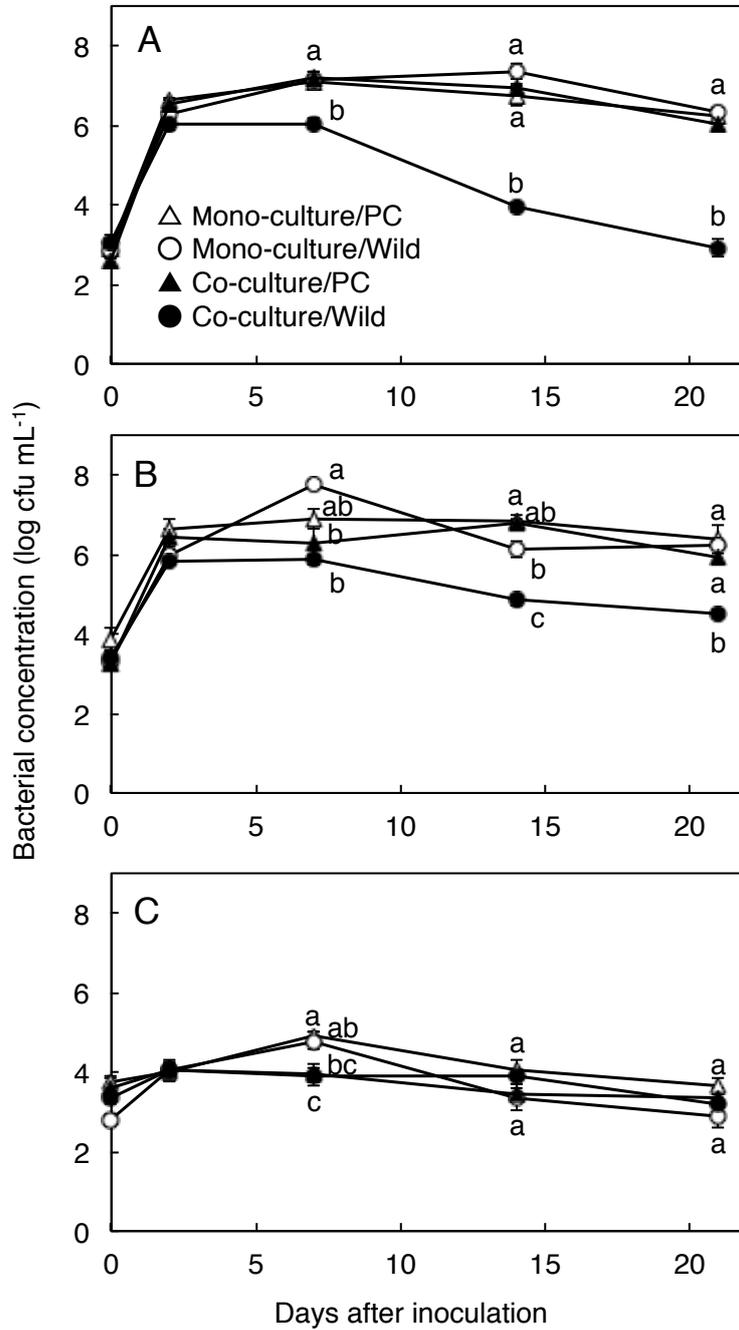


Fig. 2-2 Growth of the *R. solanacearum* wild-type and PC mutant strains in BG broth (A), MM medium (B), and pure water (C). The bacteria were suspended in cultures at ca. 10^2 cfu mL⁻¹, and then grown statically at 28°C. The bacterial concentrations were estimated at 0, 2, 7, 14 and 21 days after inoculation. Asterisks indicate a significantly difference ($P < 0.05$) according to a one-way ANOVA following the Tukey-Kramer test. Error bars show standard errors from the mean values of 3-6 samples.

Table 2-1 Frequency of PC (%) of wild-type strain of *R. solanacearum* in the liquid cultures.

| Cultures | Inoculations | Days after inoculation | | | | |
|------------|--------------|------------------------|------------|--------------|--------------|--------------|
| | | 0 d | 2 d | 7 d | 14 d | 21 d |
| BG broth | Mono-culture | 0.0±0.0 d | 5.6±13.6 d | 35.7±34.4 bc | 89.0±6.2 a | 96.4±5.3 a |
| | Co-culture | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 5.1±6.8 d | 3.6±2.6 d | 13.3±21.5 cd |
| MM broth | Mono-culture | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 11.6±20.0 cd | 44.4±41.2 bc | 45.9±34.1 b |
| | Co-culture | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 8.3±7.2 bcd |
| Pure water | Mono-culture | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 0.5±1.3 d | 0.0±0.0 d |
| | Co-culture | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d | 0.0±0.0 d |

^z Values represent the mean and standard error of 3–6 samples. Different letters indicate a significantly difference ($P<0.05$) according to one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test, and then the percentage values were underwent arc sine transformation.

Table 2-2 Growth of wild-type strain and PC mutant of *R. solanacearum* in the culture filtrates of the mixed culture of both strains ^z

| Inoculations ^y | Detected strains ^x | Bacterial concentration (log cfu mL ⁻¹ +1) ^w culture after | |
|----------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| | | 0 days | 10 days |
| PC mutant strain mono-culture | PC mutant | 2.87±0.25 | 5.91±0.32 a |
| Wild-type strain mono-culture | Wild-type | 3.48±0.24 | 5.79±0.37 a |
| PC mutant and wild-type strain co-culture | PC mutant | 2.30±0.16 | 6.26±0.21 a |
| | Wild-type | 3.55±0.12 | 2.08±0.14 b |

^z The culture filtrate was prepared from the mixed culture of the PC mutant and wild-type strain for 24 days.

^y Bacterial strains were inoculated at ca. 10⁴ cfu mL⁻¹ in the culture filtrate, and then grown statically at 28°C for 10 days.

^x Strains were detected using BGT medium with rifampicin (50 µg mL⁻¹) for the wild-type strain 8238rif or with streptomycin (50 µg mL⁻¹) for the PC mutant strain E-PCstr.

^w Values represent the mean and standard error of six samples. Different letters indicate a significantly difference ($P<0.05$) according to one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test.

タ省略). また, 培養ろ液の pH は 7.7~8.1 を示した (Table 2-3). PC 株培養ろ液, 野生株培養ろ液, PC 株と野生株の混合培養ろ液中に PC 株を単独で培養した場合, すべての培養ろ液中で PC 株は増殖し, 接種 10 日目における菌濃度は約 10^6 cfu mL⁻¹ であり, 対照区 (BG 液体培地) と比べて有意な差はなかった. 一方, 野生株は野生株培養ろ液と混合培養ろ液では, 菌濃度は約 10^6 cfu mL⁻¹ ままで増殖した. しかし, PC 株培養ろ液中では野生株の増殖が見られず, 菌濃度は 10^2 cfu mL⁻¹ 未満と有意に低く, 菌の検出率も他の区と比べて低かった (Table 2-3, Fig. 2-3). 野生株の PC 化率は, BG 液体培地は 91%, 混合培養ろ液で 33%, 野生株培養ろ液で 25%を示し, PC 株培養ろ液中では検出されなかった.

PC 株培養ろ液への熱処理が野生株の増殖抑制に及ぼす影響

PC 株培養ろ液を熱処理 (110°C, 10 分) したものに野生株を接種した場合, 熱処理していない PC 株培養ろ液と同様に野生株の増殖は抑制された (Table 2-4).

考察

青枯病菌の野生株は液体培地中で長期間培養することで PC 化し, 菌液中の PC 株の割合が増加することが知られており, PC 化は, 対数増殖期を経て高い菌濃度を維持する定常期において誘発される (Zhu et al., 2010, Mori et al., 2012). 本研究では, BG 液体培地中と MM 液体培地中で, 野生株を単独培養した場合, PC 化は培養 14 日以降に高頻度で誘発され, PC 株と混合培養した場合は低頻度であった. 野生株が高頻度で PC 化した単独培養では, 野生株が 10^6 - 10^7 cfu mL⁻¹ の菌濃度を維持していた. それに対して, PC 化が低頻度であった混合培養では, 野生株は培養 2~7 日目まで 10^5 - 10^6 cfu mL⁻¹ の菌濃度を維持したが, その後の菌濃度は低下し, 10^2 - 10^4 cfu mL⁻¹ の菌濃度で推移した. また, 超純水中では, 野生株は 10^3 - 10^4 cfu mL⁻¹ の菌濃度で推移し, 野生株の PC 化はほ

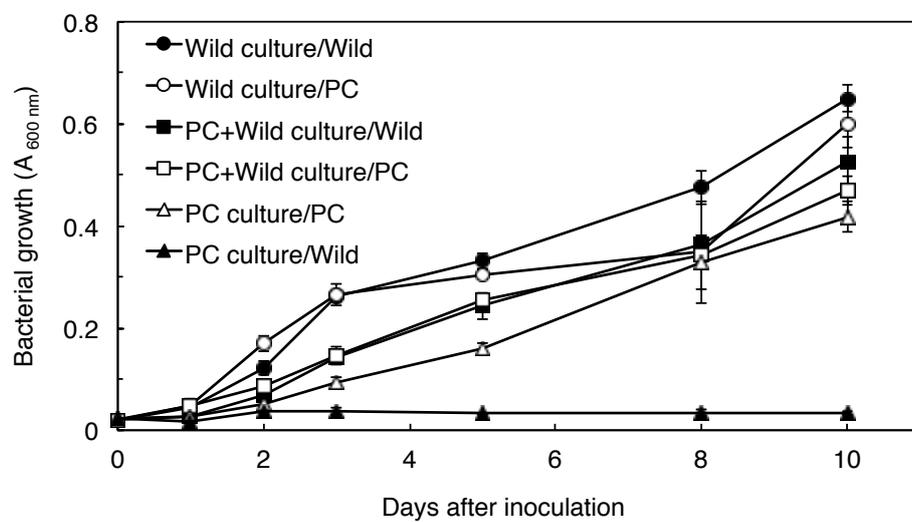


Fig. 2-3 Growth of wild-type and PC mutant strains of the *R. solanacearum* in culture filtrates. The explanatory chart shows the bacterial inoculation as the culture filtrate of bacterial strain/inoculated strains. The wild-type strain or PC mutant was inoculated individually in each culture filtrate at ca. 10^4 cfu mL⁻¹, and then grown statically at 28°C. Absorbance at 600 nm ($A_{600\text{ nm}}$) was measured at 0, 1, 2, 3, 5, 8 and 10 days after inoculation. Error bars: standard deviation from the mean values of three samples.

Table 2-3 Growth of the *R. solanacearum* wild-type strain and the PC mutant in bacterial culture filtrates

| Inoculated cultures ^z (pH) | Inoculated strains ^y | Bacterial concentration (log CFU mL ⁻¹ +1) ^x culture after | | Isolation rate (%) ^w | Frequency of PC (%) ^v |
|--------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | 0 days | 10 days | | |
| BG broth (7.0) | PC mutant | 3.68 ± 0.09 | 7.25 ± 0.09 a | 100 (3/3) | – |
| | Wild-type | 2.71 ± 0.44 | 6.92 ± 0.13 a | 100 (3/3) | 91.2 ± 13.8 |
| Culture filtrate of co-culture (7.9) | PC mutant | 3.06 ± 0.23 | 6.60 ± 0.15 a | 100 (3/3) | – |
| | Wild-type | 3.68 ± 0.16 | 6.39 ± 0.41 a | 100 (3/3) | 32.8 ± 30.2 |
| Culture filtrate of wild-type strain (7.7) | PC mutant | 3.18 ± 0.28 | 6.36 ± 0.25 a | 100 (3/3) | – |
| | Wild-type | 3.41 ± 0.27 | 6.68 ± 0.18 a | 100 (3/3) | 25.0 ± 31.0 |
| Culture filtrate of PC mutant strain (8.1) | PC mutant | 3.00 ± 0.25 | 6.47 ± 0.33 a | 100 (3/3) | – |
| | Wild-type | 3.38 ± 0.18 | 1.32 ± 0.85 b | 33 (2/6) | 0.0 ± 0.0 |

^z The culture filtrates were prepared from the PC mutant mono-culture, the wild-type strain mono-culture, and the co-culture of both strains for 24 days. Strains were cultured in BG broth as a control. Values in parentheses indicate the pH of the culture.

^y Bacterial strains were inoculated individually at ca. 10⁴ cfu mL⁻¹ in each culture filtrate, and then grown statically at 28°C for 10 days.

^x Values represent the mean and standard error of 3–6 samples. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) according to one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test.

^w Values indicate the percentage of isolation of bacteria. Values in parentheses indicate that (positive isolation/total samples).

^v Percentage of mutation from the wild-type to PC colonies in all colonies on the BGT medium with rifampicin. Values are the mean and standard deviation.

Table 2-4 Growth inhibition of wild-type strain of *R. solanacearum* in the heat-treated culture filtrate of the PC mutant.

| Inoculated cultures ^z | Bacterial concentration | | Positive isolations (%) |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------|-------------------------|
| | (log CFU mL ⁻¹ +1) ^y culture after | | |
| | 0 days | 10 days | |
| BG broth | 2.97 ± 0.21 | 7.41 ± 0.17 a | 100 (6/6) |
| Culture filtrate of PC mutant | 3.38 ± 0.18 | 1.32 ± 0.85 b | 33 (2/6) |
| Heat-treated culture filtrate of PC mutant | 3.57 ± 0.02 | 0.00 ± 0.00 b | 0 (0/6) |

^z The culture filtrate of the PC mutant strain was autoclaved at 110°C for 10 min and used as heat-treated culture filtrates. The re-autoclaved BG broth was used as a control. The wild-type strain was inoculated at ca. 10⁴ cfu mL⁻¹ and then grown statically at 28°C for 10 days.

^y Values are the mean and standard error of six samples. Different letters indicate a significantly difference ($P < 0.05$) according to one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test.

とんど起こらなかった。これらの結果から、PC 化は、野生株が高濃度で増殖し、その菌濃度を長期間維持することで誘発され、菌濃度は低い場合では、PC 化が生じにくいことが示唆された。

PC 株は、*phcA* 遺伝子に変異しており (Brumbley and Denny, 1990 ; Poussier et al., 2003), 野生株に比べて菌体外多糖類 (EPS), エンドグルカナーゼ, ペクチンメチルエステラーゼの生産能は低下している一方で、*phcA* 遺伝子により負に制御されているポリガラクトナーゼの活性や鉄獲得に関与する有機化合物シデロフォアの産生能は増加している (Kelman, 1954 ; Denny et al., 1988 ; Brumbley and Denny, 1990 ; Bhatt and Denny, 2004)。また、Khokhani et al. (2017) は、RNA-seq 解析により *R. solanacearum* GMI1000 株の野生株と $\Delta phcA$ 変異株の転写産物および推定転写産物を比較し、 $\Delta phcA$ 変異株は野生株に比べて、EPS や植物細胞壁分解酵素などの病原性因子の発現は低下する一方で、炭水化物, アミノ酸, ポリアミン, 鉄, 窒素, リン酸, 硫黄などの栄養の獲得に関与する約 56 種のタンパク質の発現は増加すると推定している。そのため、PC 株は野生株に比べて栄養獲得能が高いと考えられる。

本研究では、異なる液体培地で野生株と PC 株を培養し、菌の増殖特性の違いを調査した。BG 液体培地に PC 株 E-PCstr と野生株 8238rif を単独で培養した場合では、両菌株の増殖は同様であったが、両菌株を混合培養した場合では、両菌株とも培養 2 日目に 10^6 - 10^7 cfu mL⁻¹ に増殖し、その後は野生株のみ増殖が抑制され、培養後期には約 10^2 cfu mL⁻¹ まで菌濃度が低下した。青枯病菌の最少栄養培地 (MM 液体培地) では、培養後期に PC 株よりも野生株の菌濃度が低下する傾向にあった。また、PC 株と野生株を BG 液体培地中で混合培養し、その培養ろ液を培地として PC 株と野生株を混合培養した場合、PC 株は増殖したのに対して、野生株の増殖のみ抑制され、BG 液体培地でみられた現象が再現された。これらの結果から、BG 培地や MM 液体培地中では、菌の増殖に伴い培地中の栄養の競合が生じ、栄養獲得能の高い PC 株は増殖したが、野生株の増殖に必要な栄養

が欠乏することで野生株の増殖が抑制されたと考えられる。

PC 株を BG 液体培地で単独培養した培養ろ液（PC 株培養ろ液）を培地として用い、PC 株と野生株を単独で培養したところ、PC 株培養ろ液中で単独培養した場合には PC 株は正常に増殖したが、野生株の増殖は顕著に抑制された。すなわち、PC 株が共存していない培養条件においても、PC 株培養ろ液では野生株の増殖が抑制されることが確認され、PC 株による培養成分の変化が野生株の増殖抑制に関与していると示唆された。しかし、野生株を BG 液体培地で単独培養した場合、培養 14～21 日後の野生株は約 90%が PC 株に変異しており、その培養ろ液（野生株培養ろ液）中で野生株を単独培養した場合には、野生株の増殖は抑制されなかった。また、PC 株と野生株の混合培養した培養ろ液に、野生株を単独で培養した場合でも、野生株の増殖は抑制されなかった。すなわち、PC 株と野生株が共存する培養系で得られた培養ろ液では野生株の増殖は抑制されないことが明らかになり、この要因については今後の調査が必要である。

貧栄養な液体培地中に PC 株と野生株を混合培養した場合、菌の栄養をめぐる競争が生じやすいと推察されるが、本研究において 1/100BG 培地中に両菌株を混合培養した場合、培養後期における両菌株の菌濃度に差はなかった。小川ら（2011）は、ナス‘千両二号’の水抽出液を培地として、青枯病菌 8238 株の PC 株 E-PCstr と野生株 8238rif を混合培養した場合、両菌株の増殖に差はなく、菌株間で栄養の競争は生じないと述べている。さらに、Wakimoto et al.（1982）は、青枯病菌の表現型や病原性が異なる菌株を超純水中で単独培養した場合、菌の表現型や病原性に関係なく同様に増殖することを報告しており、本研究において超純水中で両菌株を混合培養した場合には、両菌株とも菌濃度 10^3 - 10^4 cfu mL⁻¹で推移し、既報の結果と類似した。これらの結果は、PC 株と野生株との栄養をめぐる競争が生じる可能性が低いことを示しており、BG 液体培地中でみられた PC 株と野生株との増殖競争には、栄養をめぐる競争だけでなく他の要因も関与すると考えられる。

Michel and Mew (1998) は、pH 3.0~11.0 の異なる液体培地中で青枯病菌を培養した場合、青枯病菌の最適 pH は 6.0 であり、pH 5.0~8.0 の範囲では菌の増殖にほとんど影響がないことと述べている。本研究において、BG 液体培地 (pH 7.0) で青枯病菌を培養した場合、培養ろ液では pH 7.7~8.1 とアルカリ側に変化したが、培養ろ液間の pH 変化量は 0.4 と小さく、野生株の増殖抑制は pH 変化によるものではないと考えられた。

青枯病菌の中には、系統の異なる菌株に対して抗菌性を有する株が存在することが知られている (Cuppels et al., 1978 ; Arwiyanto et al., 1993 ; Frey et al., 1996)。さらに、それらの抗菌物質生産性は青枯病菌の表現型や、寒天培地上と液体培地内とは異なることが報告されている (Arwiyanto et al., 1993)。本研究では、青枯病菌 8238 株から作出された野生株 8238rif と PC 株 E-PCstr を供試し、両菌株間に寒天培地上で抗菌作用はなく、培養ろ液中の抗菌作用もなかった。そのため、PC 株培養ろ液中の野生株の増殖抑制に、PC 株の抗菌物質生産は関与していないと考えられる。また、青枯病菌が生産する抗菌物質は、熱に不安定なタンパク質であり、60~100℃、10 分の熱処理で抗菌活性は容易に消失することが報告されている (Cuppels et al., 1978 ; Arwiyanto et al., 1993 ; Frey et al., 1996)。一方、本研究では、PC 株培養ろ液の熱処理物 (110℃、10 分) で野生株を単独培養した場合でも、野生株の増殖が抑制され、野生株はまったく検出されなかった。この要因は、PC 株培養ろ液中の成分が熱処理によって変性し、野生株の増殖抑制効果を高めているかもしれない。

本研究において、液体培地中における野生株の増殖抑制は、BG 液体培地などの栄養豊富な培地中で PC 株と野生株を混合培養し、対数増殖期以降に確認されたこと、PC 株と野生株の混合培養ろ液中で、両菌株を混合培養した場合、野生株のみ増殖が抑制されたこと、PC 株培養ろ液中では野生株の増殖が抑制されたことから、BG 液体培地中で PC 株が高濃度に増殖することで、野生株の増殖のみを特異的に抑制する培地成分に変化した可能性が考えられる。

青枯病菌の野生株は、クオラムセンシング (Quorum-sensing; QS) と呼ばれる菌体密度感知機構を有し、シグナル物質として N-オクタノールホモセリンラクトン, N-ヘキサノールホモセリンラクトンなどのアシルホモセリンラクトン (AHLs), 3-ヒドロキシパルミチン酸メチルエステル (3-OH PAME) を産生し、菌増殖に伴い増加するシグナル物質の濃度を感知することで菌密度を感知する (Flavier et al., 1997; Schell, 2000; Genin and Denny, 2012). QS によって一定濃度 (3-OH PAME 濃度が 5 nM, 菌密度にして約 10^6 cfu mL⁻¹) 以上のシグナル物質を感知すると増殖を停止し、植物細胞壁分解酵素や EPS などの病原性因子の生産に移行する (Schell, 2000; Flavier et al., 1997). シグナル物質 AHLs は、合成酵素 SolI によって生産され、AHLs の受容は SolR タンパク質が、SolI と SolR の発現を司る *solIR* 遺伝子は、PhcA タンパク質によって正に制御されている (Schell, 2000). PhcA タンパク質の活性は、通常、PhcR タンパク質によって抑制されている. 3-OH PAME のシグナル物質の生産には、PhcB タンパク質が関与し、シグナル物質を PhcS タンパク質が受容することで、PhcR タンパク質はリン酸化する. リン酸化された PhcR タンパク質はその機能を失い、PhcA タンパク質が活性化し、病原性因子が生産される (Schell, 2000; Genin and Denny, 2012). また近年、青枯病菌 OE1-1 株は、シグナル物質として 3-OH PAME ではなく 3-ヒドロキシテトラデカン酸メチル (3-OH MAME) を生産し、PhcS タンパク質が 3-OH MAME を受容する新たな QS 機構の存在が明らかにされた (Kai et al., 2015 ; Hikichi et al., 2017). 一方、PhcA タンパク質は PhcB の合成を制御していないが、PC 株は 3-OH PAME をほとんど生産しないことが報告されている (Genin and Denny, 2012). PC 株が他の QS シグナル物質を生産することは不明であるが、BG 液体培地における PC 株と野生株の混合培養時や PC 株の培養ろ液における野生株の増殖抑制に関わる一要因として、PC 株が特異的に生産する物質は、PhcA タンパク質の正常な機能を有する野生株のみに感知され、野生株の増殖を停止させる機構が存在しているかもしれない. 今後、PC 株培養ろ液に含まれる物質や PC 株が

特異的に生産する物質を調査し、野生株の増殖抑制との関係を明らかにする必要がある。

摘要

青枯病菌の野生株と PC 株を異なる液体培地（BG 液体培地，1/100BG 液体培地，MM 液体培地，超純水）中で混合培養し，両菌株の増殖を調査した．BG 液体培地と MM 液体培地中で両菌株を混合培養した場合には，PC 株は高濃度に増殖後一定に推移し，野生株は培養 2 日目には PC 株と同様に増殖したが，培養 14-21 日には野生株の菌濃度のみが顕著に低下した．一方，1/100 液体培地と超純水中ではこのような競合は観察されなかった．PC 株と野生株の混合培養ろ液中で両菌株を混合培養した場合には，野生株のみ増殖が抑制され，PC 株の単独培養ろ液中で両菌株を単独で培養した場合には，PC 株は増殖したが，野生株は増殖しなかった．以上の結果から，野生株の増殖抑制には菌株間の栄養をめぐる競合だけでなく，PC 株による培地成分の変化が関与すると推察された．

第 2 章 液体培地中における青枯病菌の野生株と表現型変異株の競合

第 2 節 青枯病菌の野生株の増殖抑制効果が高い表現型変異株培養ろ液の選抜

緒言

青枯病菌は、宿主植物の範囲（レース）、異なる炭素源からの有機酸産生能（biovar）、ナス属植物に対する病原性（菌群）に基づいて分類が行われ、近年では、16S rRNA や *hrpB*, *egl* 等の病原性関連遺伝子などの塩基配列情報の違い（phylotype）、*egl* 遺伝子の保存領域の塩基配列の違い（Sequevar）、ゲノム中の反復配列間に存在する領域の DNA パターン（rep-PCR group）に基づく分子生物学的な分析により様々な系統に分類されている（堀田・土屋，2012）。菌の系統により抗菌物質の産生能も異なることが報告されている（Cuppels et al., 1978 ; Arwiyanto et al., 1993 ; Frey et al., 1996）。また、青枯病菌の表現型の違いによって、いくつかの物質産生能が異なることも知られており、PC 株は野生株に比べて、ポリガラクトツロナーゼ活性やシデロフォア生産性が増加する（Bhatt and Denny, 2004 ; Genin and Denny, 2012）。そのため、青枯病菌の系統や表現型の違いにより特異的に生産される物質が存在する可能性がある。

第 2 章第 1 節において、PC 株培養ろ液は野生株の増殖を抑制することを明らかにしたが、青枯病菌の系統の異なる PC 株から得られた培養ろ液では、野生株の増殖抑制効果が異なることが考えられる。PC 株培養ろ液中における野生株の増殖抑制の要因を明らかにするためには、増殖抑制効果の異なる PC 株培養ろ液中の物質生産能を調査し比較することが有効である。そこで本研究では、青枯病菌の系統と表現型の違いによる物質産生能の差異を調査するため、系統の異なる青枯病菌 26 菌株の野生株と PC 株を用いて、抗菌物質の生産性とその抗菌物質の性状およびシデロフォア産生能の違いを調査した。さらに、系統の異なる PC 株の培養ろ液を用いて、野生株の増殖抑制効果を調査し、野生株の増殖抑制効果が高い培養ろ液を選抜した。

材料および方法

供試細菌

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、系統の異なる野生株 26 菌株を供試した (Table 2-5)。また、野生株として、青枯病菌 8238 (MAFF 301528, レース 1, biovar 4, 菌群 I, phylotype I) の $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ リファンピリン耐性株 8238rif を供試した。PC 株は、野生株 8238 に感染したナスより分離された PC 株の $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ストレプトマイシン耐性株である E-PCstr と、野生株 26 株から作出した PC 株の計 27 菌株を供試した。PC 株の作出は、以下の手順で行った。野生株を BG 液体培地に約 10^7 cfu mL^{-1} になるように接種し、 28°C で 14 日間静置培養後、菌液は BGT 培地上に塗抹し、 28°C で 48 時間培養後、非流動性のコロニーを形成した株を PC 株とした。供試菌株は、15%グリセロールを含んだ BG 液体培地中に -80°C で保存した。

野生株に対する表現型変異株の抗菌作用

寒天培地上における表現型変異株の抗菌物質生産

BGT 寒天培地上における野生株 8238rif に対する PC 株の抗菌活性をプレートクロロホルム法 (Wakimoto et al., 1986) により調査した。PC 株の単コロニーを BGT 培地に 4 カ所植菌し、 28°C で 48 時間培養した。培養後、9 cm シャーレの上蓋にクロロホルム 1.5 mL を染み込ませた 9 cm 濾紙を置き、2 時間燻蒸した。その後、BGT 培地に指標菌 8238rif の菌液 (約 10^8 cfu mL^{-1}) 40 μL を 0.5% 寒天 BG 培地 4 mL とともに流し込み、 28°C で 48 時間培養し、PC 株のコロニーの周囲における阻止円形成の有無を確認した。

青枯病菌の培養ろ液の調製

PC 株 27 菌株を BGT 培地に画線塗抹し、 28°C で 48 時間培養した。培地上の単コロニーを 4 mL BG 液体培地に接種し、 28°C 、130 stroke min^{-1} で 24 時間振とう培養した。培養液 300 μL を 100 mL 容三

Table 2-5 The *R. solanacearum* strains used in this study

| Strain | MAFF no. | Host of origin | Race | Biovar | Phylotype ^z | Bacterial group ^y |
|----------|-------------|-----------------------|------|--------|------------------------|------------------------------|
| 8101 | MAFF 301521 | Eggplant | 1 | 4 | I | IV |
| 8234 | MAFF 301523 | Eggplant | 1 | 4 | I | I |
| 8202 | MAFF 301524 | Potato | 1 | 4 | – | I |
| 8238 | MAFF 301528 | Tomato | 1 | 4 | I | I |
| 8105 | MAFF 730101 | Eggplant | 1 | 4 | – | IV |
| 8216 | MAFF 730103 | Tomato | 1 | 4 | I | II |
| 8232 | MAFF 730104 | Eggplant | 1 | 4 | – | IV |
| 8103 | MAFF 730126 | Eggplant | 1 | 4 | I | IV |
| 8109 | MAFF 730127 | Eggplant | 1 | 4 | – | V |
| 8224 | MAFF 730129 | Eggplant | 1 | 4 | I | IV |
| 8208 | MAFF 730130 | Eggplant | 1 | 4 | – | I |
| 8276 | MAFF 730132 | Tomato | 1 | 4 | I | I |
| 8266 | MAFF 730135 | Potato | 1 | 4 | I | I |
| 8350 | MAFF 730139 | Eggplant | 1 | 4 | I | V |
| 8433 | MAFF 730141 | Tomato | 1 | 4 | I | V |
| 8107 | – | Tomato | 1 | 4 | I | I |
| 8345 | MAFF 730138 | Tomato | 1 | 3 | IV | III |
| 8357 | MAFF 730140 | Eggplant | 1 | 3 | I | III |
| 105 | MAFF 211307 | Tomato | 1 | – | – | – |
| 8257 | MAFF 730131 | Tomato | 1 | – | – | – |
| 8252 | MAFF 301527 | Green pepper | 1 | N2 | – | II |
| 8214 | MAFF 730128 | Tomato | 1 | N2 | – | III |
| 101 | MAFF 211413 | Potato | 3 | N2 | IV | – |
| 82-1 | MAFF 301559 | Potato | 3 | N2 | IV | – |
| 970502-1 | MAFF 211471 | Ginger | 4 | 4 | I | – |
| Suzaki-5 | MAFF 211493 | <i>Zingiber mioga</i> | 4 | 4 | I | – |

^z Based on the reports (Liu et al., 2009; Horita and Tsuchiya, 2012; Kawasaki et al., 2016).

^y Bacterial group is classified into five groups based on differences in virulence on four *Solanum* species in Japan (Ozaki and Kimura, 1992; Waki and Horita, 2014).

角フラスコ中の 30 mL BG 液体培地に接種し、28°C、130 stroke min⁻¹で 48 時間振とう培養した。培養液を 7500×g で遠心分離後、上澄みを 0.20 μm のメンブレンフィルター (DISMIC-25AS, 25AS020AS, Advantec) でろ過したろ液を試験管に 3 mL 分注したものを培養ろ液とした。各培養ろ液を BGT 寒天培地に塗抹し、培養ろ液中に菌が残存していないことを確認して各実験に供試した。

表現型変異株の培養ろ液の抗菌物質生産

PC 株 27 菌株の各培養ろ液を用いて、野生株 8238rif に対する培養ろ液の抗菌活性を Spot on lawn 法により調査した。指標菌 8238rif の菌液 (約 10⁸ cfu mL⁻¹) 40 μL を 0.5%寒天 BG 培地 4 mL に添加後、BGT 培地に流し込み、凝固させた。指標菌 8238rif を含む BGT 培地上に、各 PC 株培養ろ液を 10 μL スポットし、培地を 28°C で 48 時間培養後、阻止円形成の有無を確認した。また、培養ろ液を希釈し、最大希釈液における抗菌活性値 (Arbitray unit (AU) mL⁻¹) を以下の式により算出した。

抗菌活性値 (AU mL⁻¹) = 1 / 抗菌活性を示す最大希釈率 / 滴下量 (mL)。

表現型変異株の培養ろ液中の抗菌物質の特性

指標菌 8238rif に対して抗菌活性が確認された PC 株培養ろ液の抗菌スペクトルを調査するため、指標菌として青枯病菌の野生株 26 菌株に対する抗菌活性を Spot on lawn 法により調査した。

培養液中に PC 株が生産する抗菌物質の特性を調査するため、培養ろ液を加熱処理 (40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C : 10 分)、限外ろ過 (Vivaspin 500 μL, Sartorius) による分画 (30 kDa, 100 kDa, 300 kDa, 1000 kDa)、プロテインナーゼ K 処理 (50 μg mL⁻¹, 100 μg mL⁻¹ : 37°C で 2 時間処理) を行い、Spot on lawn 法により指標菌 8238rif に対する抗菌活性を調査した。

PC 株と野生株の抗菌物質産生能の違いを調査するため、8238rif に対して抗菌活性が確認された PC 株とそれらの野生株から培養ろ液を調製し、PC 株と野生株に対する抗菌作用を Spot on lawn 法により調査した。

青枯病菌のシデロフォアの生産

青枯病菌の野生株 27 株と PC 株 27 株を供試して、CAS 法 (Schwyn and Nelds, 1987) によるシデロフォア生産性を調査した (Fig. 2-4)。BGT 寒天培地で培養した青枯病菌の単コロニーをクロムアズロール S (CAS) 寒天培地 (0.0605 ppm CAS, 0.0027 ppm $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0729 ppm HDTMA, 0.3% PIPES, 0.06% NaOH, 0.03% KH_2PO_4 , 0.1% NH_4Cl , 0.3% カザミノ酸, 0.1% ペプトン, 0.2% グルコース, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) に移植し、28°C で 48 時間培養後、コロニー周囲にクリアゾーンが形成された場合にシデロフォア生産有りと評価した。

野生株の増殖抑制効果が高い PC 株培養ろ液の選抜

PC 株 27 菌株の各培養ろ液 3 mL に野生株 8238rif の菌液 (約 10^6 cfu mL^{-1}) 30 μL 接種し、28°C で 7 日間静置培養後、吸光度計を用いて測定波長 600 nm における菌液の濁度 (A_{sample}) を測定した。また、ブランクとして、各 PC 株培養ろ液のみの吸光度 (A_{blank}) を測定し、菌の増殖量 ($A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}$) は、各菌液の濁度からブランクを引いて算出した。また、対照区として、野生株 8238rif の培養ろ液 (野生株培養ろ液) に 8238rif を接種し、同様に菌の増殖量を測定した。

結果および考察

野生株に対する表現型変異株の抗菌作用

寒天培地上と液体培地中における表現型変異株の抗菌物質生産

青枯病菌の中には他の系統の菌株に対して抗菌作用を示す菌株が存在するが知られており、青枯病菌による抗菌活性は寒天培地上と液体培地中で異なることが報告されている (Cuppels et al., 1978 ; Arwiyanto et al., 1993 ; Frey et al., 1996)。本研究においても、野生株 8238rif に対する PC 株の抗菌活性の有無は、寒天培地と液体培地で異なった (Table 2-6)。PC 株 27 菌株のうち、BGT 寒天

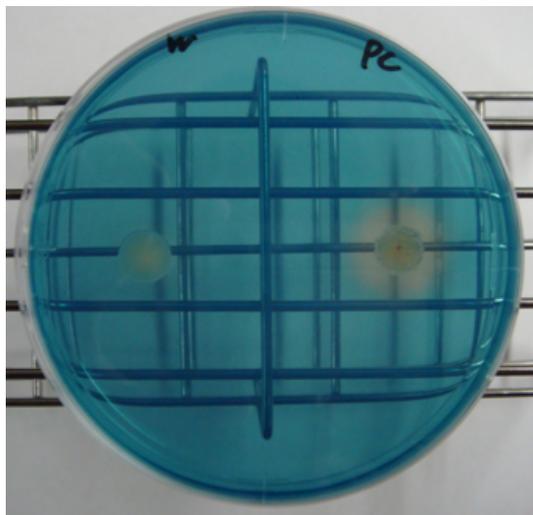


Fig. 2-4 Detection of siderophore of wild-type strain (W) and PC mutant (PC) of *R. solanacearum* 8238 strain by CAS assay.

Table 2-6 Antibacterial activity of PC mutants against wild-type strain 8238rif

| Producer strain | Agar plate ^z | Culture filtrate (AU mL ⁻¹) ^y |
|-----------------|-------------------------|------------------------------------------------------|
| E-PCstr | – | 0 |
| 8101PC | – | 0 |
| 8234PC | – | 0 |
| 8202PC | – | 0 |
| 8238PC | – | 0 |
| 8105PC | + | 25600 |
| 8216PC | + | 0 |
| 8232PC | + | 0 |
| 8103PC | + | 0 |
| 8109PC | + | 0 |
| 8224PC | + | 0 |
| 8208PC | – | 0 |
| 8276PC | – | 0 |
| 8266PC | – | 0 |
| 8350PC | + | 0 |
| 8433PC | – | 0 |
| 8107PC | + | 0 |
| 105PC | + | 400 |
| 8257PC | + | 0 |
| 8252PC | – | 0 |
| 8214PC | – | 0 |
| 82-1PC | + | 800 |
| 101PC | + | 800 |
| 8345PC | – | 0 |
| 8357PC | – | 0 |
| 970502-1PC | – | 0 |
| Suzaki-5PC | + | 1600 |

^z Antibacterial activity on BGT agar plate was tested by the plate-chloroform method. +: inhibition zone formed by producer strain, –: inhibition zone not formed.

^y Antibacterial activity in culture filtrate of PC mutant was measured in terms of arbitrary unit (AU mL⁻¹) by spot-on-lawn method.

培地上で抗菌活性を示した株は 13 菌株であり、培養ろ液中に抗菌活性がみられた株は 8105PC, 105PC, 82-1PC, 101PC および Suzaki-5PC の 5 菌株であり、いずれの株も寒天培地においても抗菌活性を示した。また、培養ろ液中の抗菌活性値は、 $400\sim 25600 \text{ AU mL}^{-1}$ を示し、8105PC の培養ろ液で最大となった。

表現型変異株の培養ろ液中の抗菌物質の特性

野生株 8238rif に対して抗菌活性を示した PC 株 5 菌株 (8105PC, 105PC, 82-1PC, 101PC および Suzaki-5PC) の培養ろ液を用いて、野生株 26 菌株に対する抗菌スペクトルを調査したところ、抗菌スペクトルは PC 株の種類によって異なり、101PC 株の培養ろ液では最も広い抗菌スペクトルを示し、野生株 26 菌株のうち 23 菌株に対して抗菌活性を示した (Table 2-7)。

PC 株が培養液中に生産する抗菌物質の性状を調査するため、PC 株 5 菌株の培養ろ液を加熱処理、限外ろ過による分画およびプロテイナーゼ K 処理を行った。PC 株 5 菌株の培養ろ液の抗菌活性は 70°C 、10 分の加熱処理で失われた (Table 2-8)。また、PC 株 5 菌株の培養ろ液において、限外ろ過による分子量約 $1000\sim 300 \text{ kDa}$ の分画液には抗菌活性がみられたが、約 100 kDa と 30 kDa 以下の分画液では抗菌活性はなかった。培養ろ液にプロテイナーゼ K を処理した結果、Suzaki-5PC の培養ろ液を除く 4 菌株では抗菌活性が失われた。これらの結果より、PC 株が生産する抗菌物質は、耐熱性がなく、分子量 $100\sim 300 \text{ kDa}$ の高分子量の物質であると推察された。また、Suzaki-5PC が生産する抗菌物質のみプロテイナーゼ K に感受性がなく、他の PC 株が生産するタンパク質性の物質とは異なる可能性が示唆された。既報において、青枯病菌が生産する抗菌物質は耐熱性がなく、タンパク質性の高分子物質であると推定されており (Cuppels et al., 1978 ; Arwiyanto et al., 1993 ; Frey et al., 1996)、本研究の結果と類似した。

青枯病菌が生産する抗菌物質は、菌の系統によって抗菌活性、抗菌スペクトル、タンパク質分解酵

Table 2-7 Antibacterial spectrum in culture filtrates of PC mutants against 26 wild-type strains

| Indicator strain | Culture filtrates of PC mutants | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|-------|--------|-------|------------|
| | 8105PC | 105PC | 82-1PC | 101PC | Suzaki-5PC |
| 8101 | - ^z | - | - | + | + |
| 8234 | + | + | + | + | + |
| 8202 | + | + | + | + | + |
| 8238 | + | + | + | + | + |
| 8105 | + | + | + | + | + |
| 8216 | + | + | + | + | + |
| 8232 | + | - | + | + | + |
| 8103 | + | + | + | + | + |
| 8109 | - | - | - | + | - |
| 8224 | + | + | + | + | + |
| 8208 | - | - | - | + | - |
| 8276 | - | - | - | + | - |
| 8266 | + | - | + | + | + |
| 8350 | + | + | + | + | + |
| 8433 | + | + | + | + | - |
| 8107 | + | + | + | + | - |
| 105 | - | - | - | - | + |
| 8257 | - | - | - | + | - |
| 8252 | - | - | - | + | - |
| 8214 | - | - | - | + | - |
| 82-1 | - | - | - | - | + |
| 101 | - | - | - | - | + |
| 8345 | - | - | + | + | - |
| 8357 | + | + | + | + | + |
| 970502-1 | + | + | + | + | + |
| Suzaki-5 | - | - | + | + | + |
| Number of inhibited indicator strains | 14 | 12 | 16 | 23 | 17 |

^z +: inhibition zone formed by producer strain, -: inhibition zone not formed.

Table 2-8 Effect of several treatments on the antibacterial activity of culture filtrates of five PC mutants against 8238rif

| Treatment | Culture filtrates of PC mutants | | | | |
|-------------------------|---------------------------------|-------|--------|-------|------------|
| | 8105PC | 105PC | 82-1PC | 101PC | Suzaki-5PC |
| Heat | | | | | |
| 50°C, 10 min | + | + | + | + | + |
| 60°C, 10 min | + | - | - | - | - |
| 70°C, 10 min | - | - | - | - | - |
| Ultrafiltration | | | | | |
| 300 kD cutoff | + | + | + | + | + |
| 100 kD cutoff | - | - | - | - | - |
| Proteinase K | | | | | |
| 100 µg mL ⁻¹ | - | - | - | - | + |
| 50 µg mL ⁻¹ | - | - | - | - | + |

^z +: inhibition zone formed by producer strain, -: inhibition zone not formed.

素への感受性などが異なることから同定には至っておらず、複数の物質が関与すると考えられている。また、青枯病菌の表現型によって、抗菌活性値や抗菌スペクトルが異なることが報告されている。Cuppels et al. (1978) は、野生株 K60 から作出された PC 株 B1 は、野生株のときよりも抗菌活性と抗菌スペクトルが増加すると述べている。一方、Arwiyanto et al. (1993) は、青枯病菌 POPS8409 の野生株と PC 株の抗菌活性の違いについて、青枯病菌や *Pseudomonas* 属, *Erwinia* 属, *Xanthomonas* 属細菌を指標菌に用いて調査しており、PC 株の抗菌活性の強さは野生株と同等あるいはそれ以下で、抗菌スペクトルも野生株と比べて狭いことを報告している。

本研究において、培養液中に抗菌活性がみられた PC 株 8105PC, 105PC, 82-1PC, 101PC および Suzaki-5PC の 5 菌株とそれらの野生株を用いて、培養液中における抗菌物質の生産性の違いを調査した (Table 2-9)。野生株 8238rif に対する抗菌性は、菌株 8105 の野生株を除くすべての野生株と PC 株において確認された。菌株 8105 は、野生株の状態では抗菌活性がみられず、PC 株の状態では抗菌活性があり、その抗菌活性は自身の野生株に対しても感受性を示した。また、菌株 Suzaki-5 の PC 株が生産する抗菌物質は、すべての野生株と PC 株に対して抗菌性を示し、野生株が生産する抗菌物質よりも広い抗菌スペクトルを示した。これらの結果から、青枯病菌の中には、野生株から PC 株へと変異することで、抗菌物質産生能とその抗菌物質に対する耐性を獲得する株 (8105PC) や、広い抗菌スペクトルを有する抗菌物質を生産する株 (Suzaki-5PC) が存在することが明らかになった。

青枯病菌のシデロフォアの生産

細菌の増殖には、糖、ビタミン、多量ミネラル、微量元素などの栄養源が必須であるが、その中でも微量元素である鉄は、DNA 合成に必須な元素であり、DNA 合成に関与するリボヌクレオチドリダクターゼの活性化には Fe^{2+} イオンを必要とする (森ら, 2010)。 *P. aeruginosa*, *P. cepacia* などの

Table 2-9 Antibacterial activity of *R. solanacearum* strains in culture filtrates.

| Indicator strains | | Producer strains | | | | | | | | | |
|-------------------|------|------------------|----|------|----|------|----|------|----|----------|----|
| | | 8105 | | 105 | | 82-1 | | 101 | | Suzaki-5 | |
| | | Wild | PC | Wild | PC | Wild | PC | Wild | PC | Wild | PC |
| 8105 | Wild | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | PC | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + |
| 105 | Wild | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | PC | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 82-1 | Wild | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | PC | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 101 | Wild | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| | PC | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Suzaki-5 | Wild | - | - | + | - | + | + | + | + | - | + |
| | PC | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + |
| 8238rif | Wild | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

^z+: inhibition zone formed by producer strain, -: inhibition zone not formed.

Pseudomonas 属細菌や大腸菌の中には、鉄欠乏時の生存戦略として難水溶性の Fe^{3+} と強い結合性を有するシデロフォアを生産し、 Fe^{3+} -シデロフォア結合分子として体内に取り込み、 Fe^{2+} に還元して増殖に利用する機構を有し、効率のよい鉄イオンの吸収を行う細菌が存在する (山本・篠田, 1996). 青枯病菌の場合、シデロフォア産生能は病原性因子の発現調節を司る *phcA* 遺伝子によって負に制御されている (Bhatt and Denny, 2004 ; Genin and Denny, 2012). *phcA* 遺伝子の変異した PC 株ではシデロフォアの生産性が高まり、ポリカルボン酸塩シデロフォアのスタフィロフェリン B (staphyloferrin B) が生産される (Bhatt and Denny, 2004). その他にも青枯病菌の phylotype I, III, IV 株はヘテロ環式シデロフォアのみカコジジン (micacocidin) やエルシニアバクチン (yersiniabactin) を生産することが報告されている (Kreutzer et al., 2011 ; Genin and Denny, 2012).

本研究において、青枯病菌 27 菌株の野生株と PC 株のシデロフォア生産性について、CAS 寒天培地を用いて調査したところ、野生株では供試した 27 菌株のうち 8345 と 82-1 の 2 菌株でのみ、シデロフォア生産が確認され、両野生株は phylotype IV に属する株であった (Table 2-10). 一方、PC 株では供試した 27 菌株のうち、8101PC を除く 26 菌株でシデロフォア生産が確認され、野生株から PC 株に変異した場合にシデロフォア生産能が高まる傾向にあった.

PC 株培養による寒天培地と液体培地における褐変

PC 株を BG 液体培地中で培養し、培養ろ液を調製した後に数時間から一晩静置すると、培養ろ液が茶褐色に変色するものと変色しないものがあった (Fig. 2-5, Table 2-11). 寒天培地中でも同様の現象がみられ、培地の褐変の程度は PC 株の種類によって異なった. 岡部 (1965) は、青枯病菌の中には肉汁寒天培地を褐変させる株が存在し、ラクトース非分解株にその傾向があると述べている. 本研究で供試した菌株の biovar と培地の褐変との関係を比較したところ、ラクトース非分解性の biovar 4 の菌株は 18 菌株中 17 菌株が寒天培地または液体培地のいずれかを褐変させ、ラクトース

Table 2-10 Siderophore production of *R. solanacearum*

| Strain | CAS activity ^z | |
|----------|---------------------------|---------|
| | Wild-type | PC-type |
| 8101 | – | – |
| 8234 | – | + |
| 8202 | – | + |
| 8238 | – | + |
| 8105 | – | + |
| 8216 | – | + |
| 8232 | – | + |
| 8103 | – | + |
| 8109 | – | + |
| 8224 | – | + |
| 8208 | – | + |
| 8276 | – | + |
| 8266 | – | + |
| 8350 | – | + |
| 8433 | – | + |
| 8107 | – | + |
| 105 | – | + |
| 8257 | – | + |
| 8252 | – | + |
| 8214 | – | + |
| 101 | – | + |
| 82-1 | + | + |
| 8345 | + | + |
| 8357 | – | + |
| 970502-1 | – | + |
| Suzaki-5 | – | + |

^z(+): CAS activity positive, (–): CAS activity negative.

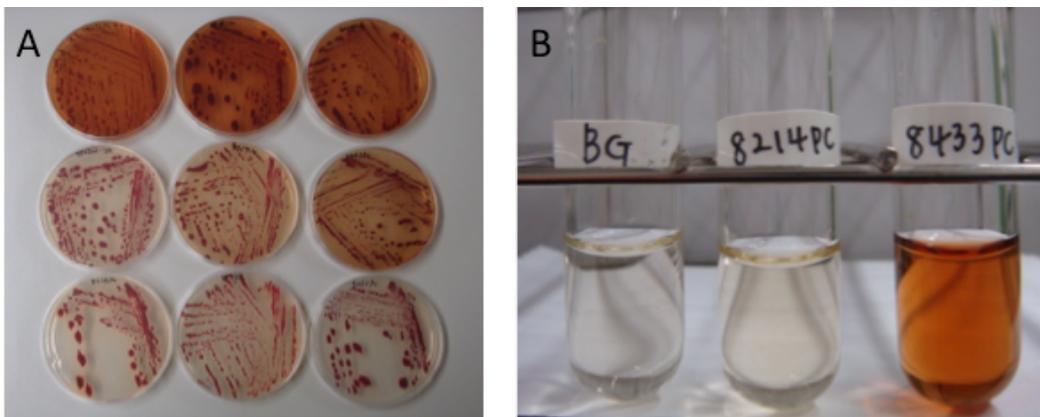


Fig. 2-5 Browning of BGT mediums by PC mutants at three days after inoculation (A), and the filtered liquid after culture PC mutants in BG broth for 48 h (B).

Table 2-11 Browning of the medium by PC mutants

| PC mutants | BGT medium ^z | BG broth ^y |
|------------|-------------------------|-----------------------|
| 8101PC | + | + |
| 8234PC | + | - |
| 8202PC | ++ | ++ |
| 8238PC | ++ | ++ |
| E-PCstr | ++ | + |
| 8105PC | + | ++ |
| 8216PC | ++ | ++ |
| 8232PC | ++ | ++ |
| 8103PC | ++ | ++ |
| 8109PC | ++ | ++ |
| 8224PC | ++ | ++ |
| 8208PC | ++ | ++ |
| 8276PC | ++ | ++ |
| 8266PC | - | - |
| 8350PC | ++ | ++ |
| 8433PC | + | ++ |
| 8107PC | ++ | ++ |
| 105PC | - | - |
| 8257PC | ++ | - |
| 8252PC | - | - |
| 8214PC | - | - |
| 101PC | - | - |
| 82-1PC | - | - |
| 8345PC | + | - |
| 8357PC | + | + |
| 970502-1 | + | - |
| Suzaki-5 | ++ | ++ |

^z ++: browning occurred, +: slight browning, -: no browning in BGT medium.

^y Absorbance ranges at 600 nm as blank (A_{blank}), ++: >0.09, +: from 0.09 to 0.03, -: < 0.03 in BG broth.

分解性の biovar N2 のすべての菌株（4 菌株）は寒天培地と液体培地の両方を褐変させず、ラクトース分解性の biovar 3 の菌株には弱い褐変がみられる株もあった。

野生株の増殖抑制効果が高い PC 株培養ろ液の選抜

本研究では、培養ろ液の褐変により吸光度への影響がみられたため、PC 株培養ろ液を調製後 7 日間静置した培養ろ液の吸光度をブランク (A_{blank}) として測定した (Table 2-11)。PC 株培養ろ液に野生株を接種後 7 日目の濁度 (A_{sample}) からブランクの値を差し引いて菌の増殖量 ($A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}$) とした。PC 株 27 菌株の培養ろ液における野生株 8238rif の増殖量は、培養ろ液の種類によって異なった (Fig. 2-6)。5 種 (8350PC, 8105PC, 8107PC, 8238PC および 8208PC) の PC 株培養ろ液では、野生株 8238rif の培養ろ液 (野生株培養ろ液) 中で 8238rif を培養した場合よりも高い増殖量を示した。一方、野生株培養ろ液と比べて増殖が抑制された PC 株培養ろ液は 22 種存在した。

PC 株培養ろ液の野生株の増殖抑制効果と各種 PC 株の生理活性物質産生性との関係

PC 株培養ろ液中における病原性の増殖抑制効果と PC 株の抗菌活性との関係を比較したところ、培養ろ液中に抗菌活性がみられた PC 株培養ろ液では、他の培養ろ液と比べて増殖抑制能が低く、抗菌活性を示さない培養ろ液でも野生株の増殖が抑制された。この結果から、培養ろ液中における野生株の増殖抑制には培養ろ液の抗菌活性だけでなく他の要因の関与も示唆された。

一般的な細菌増殖には $0.05\sim 0.5 \mu\text{M}$ の遊離鉄が必要であり、他の栄養源が豊富な場合でも鉄が欠乏した培地では細菌増殖が阻害されることが報告されている (Waring and Werkman, 1944 ; 山本・篠田, 1996)。PC 株が生産したシデロフォアに結合した鉄を野生株が吸収できるかについては不明であるが、野生株の増殖抑制へのシデロフォアの間接的な関与として、シデロフォア生産株の培養ろ液中では、鉄はシデロフォアに捕捉され、その分子を野生株が吸収できない場合は鉄欠乏により増殖が阻害されることも考えられる。一方で、供試した PC 株の中で 8101PC のみがシデロフォア非

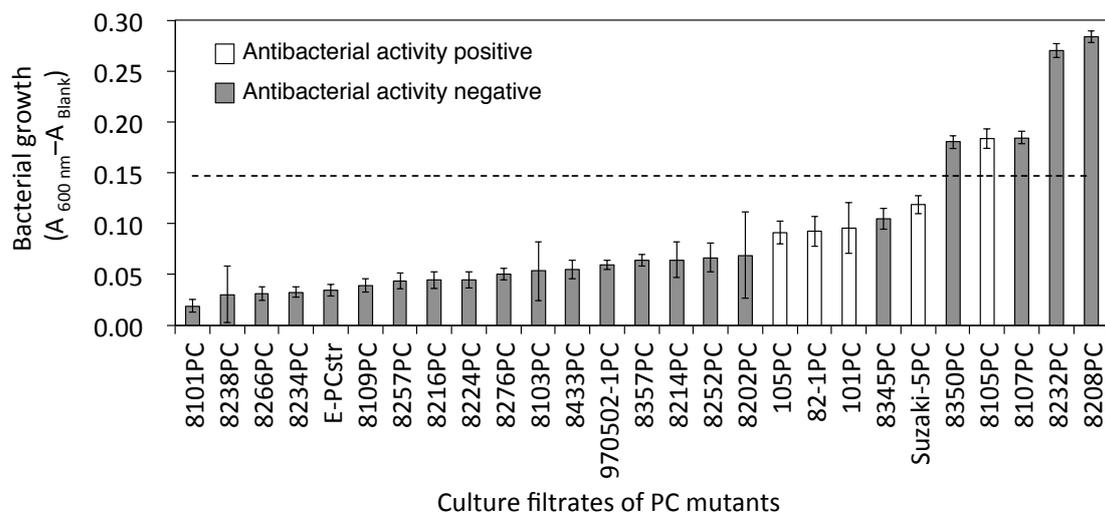


Fig. 2-6 Growth inhibition of 8238rif wild-type strain in the culture filtrates of PC mutants. The dotted line indicates the bacterial growth of 8238rif in the culture filtrate of 8238rif. Antibacterial activity against 8238rif in culture filtrate of PC mutant was tested by spot-on-lawn method. Values show means \pm SE (n=6).

生産株であり、本 PC 株培養ろ液中における野生株の増殖抑制効果は高かった。今後、野生株の増殖抑制と PC 株のシデロフォアとの関連性を明らかにするため、シデロフォア生産能が異なる PC 株の培養ろ液を用いて、培養ろ液の鉄イオン濃度とシデロフォア濃度を定量し、増殖抑制効果との関係を調査する必要がある。

PC 株培養ろ液の野生株の増殖抑制効果と培地の褐変および biovar との関係を比較したが、関連性はみられなかった。また、その他の分類群（レース、菌群、phylotype）においても関係性はみられなかった。本研究では、PC 株培養ろ液における野生株の増殖抑制効果と、菌の系統、PC 株による抗菌物質およびシデロフォア生産等の生理活性物質産生性との関係性を調査したが、明確な関係性が得られるものはなかったため、今後は他の物質や要因を対象として調査する必要がある。

摘要

野生株の増殖抑制効果が高い PC 株培養ろ液を選抜するため、系統の異なる PC 株 27 株の培養ろ液中における野生株の増殖量を調査した。また、PC 株培養ろ液中における野生株の増殖抑制の要因を調査するため、PC 株による抗菌物質生産とシデロフォア生産について調査した。野生株の増殖量は PC 株培養ろ液の種類によって異なり、22 種の PC 株培養ろ液では野生株の増殖抑制が認められた。PC 株による抗菌物質生産を調査したところ、PC 株 5 菌株は培養ろ液中に抗菌物質を生産し、その性状は耐熱性のない高分子量のタンパク質であると推察された。また、PC 株に変異することで抗菌活性が高まる株も存在した。シデロフォア生産は、PC 株に変異した場合で生産能が高くなる傾向にあった。しかし、PC 株培養ろ液中の野生株の増殖抑制効果と PC 株による抗菌物質・シデロフォア生産との関連性はなく、野生株の増殖抑制には他の物質や要因の関与が推察された。

第3章 *Ralstonia solanacearum* 表現型変異株を利用したトマト・ナス青枯病の

防除効果

緒言

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の PC 株を利用した青枯病の防除効果は、タバコ、トマト、ナスおよびジャガイモにおいて確認されている (Hara and Ono, 1991 ; Arwiyanto et al., 1994a ; 小川ら, 2011 ; 黒木ら, 2016). Arwiyanto et al. (1994a) は、PC 株の培養ろ液をトマトに接種すると、PC 株生菌による防除効果には劣るが、培養ろ液処理でもわずかに発病が抑制されることを報告している。しかし、PC 株による防除効果は、接種方法、接種する PC 株の種類、植物の品種によって異なることが報告されている (小川ら, 2011, 2012a, b). そのため、PC 株を利用した効果的な青枯病防除技術の確立には、複数の品種に対して防除効果を発揮する PC 株の接種技術の開発が重要である。第2章第2節では、系統の異なる PC 株培養ろ液を用いて、野生株の増殖抑制効果を調査した結果、野生株の増殖抑制効果が高い PC 株培養ろ液が得られた。そこで本研究では、系統の異なる PC 株と PC 株培養ろ液を用いてトマトとナスにおける青枯病防除効果を調査し、トマトとナスに共通して高い防除効果を発揮する PC 株の選抜した。

また、青枯病菌の中には、青枯病菌の他の菌株に対して抗菌作用を示す菌株が存在する (Cuppels et al., 1978 ; Arwiyanto et al., 1993 ; Frey et al., 1996). PC 株の抗菌作用は植物内における野生株の増殖抑制に関与すると考えられ、PC 株による青枯病防除機構の一要因となっている (Chen and Echandi, 1984; Hara and Ono, 1991). 本研究では、第2章第2節で明らかにした野生株に対する PC 株の抗菌作用と PC 株による青枯病防除効果との関連を調査した。

材料および方法

供試細菌

青枯病菌は、系統の異なる野生株 26 菌株を供試した (Table 2-5, 第 2 章 第 2 節参照). PC 株として, 野生株 8238 に感染したナスより分離された PC 株の $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ストレプトマイシン自然耐性株である E-PCstr と, 野生株 26 菌株からそれぞれ EPS 生産能が顕著に低下した PC 株の計 27 菌株とした. PC 株の作出は, 以下の手順で行った. 野生株を BG 液体培地に約 10^7 cfu mL^{-1} になるように接種し, 28°C で 14 日間静置培養後, 菌液は BGT 培地上に塗抹し, 28°C で 48 時間培養後, 非流動性のコロニーを形成した株を PC 株とした. 供試菌株は, 15%グリセロールを含んだ BG 液体培地中に -80°C で保存した.

PC 株培養ろ液を利用した青枯病防除効果の調査では, 第 2 章第 2 節の結果をもとに PC 株培養ろ液中における野生株の増殖抑制効果が異なる PC 株の 6 菌株 (8101PC, Suzaki-5PC, 8238PC, 8105PC, 8208PC および 8103PC) を選抜した. 野生株としてトマトより分離された 8238 (MAFF 301528, レース 1, biovar 4, 菌群 I) の $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ リファンピシン自然耐性株である 8238rif を供試した.

PC 株培養ろ液の調製

PC 株培養ろ液中における野生株の増殖抑制効果が異なる PC 株 8101PC, 8238PC, 8105PC, 8208PC, 8103PC, Suzaki-5PC の 6 菌株の培養ろ液を選抜し, 実験に供試した. PC 株 6 菌株を BGT 培地に画線塗抹し, 28°C で 48 時間培養した. 培地上の単コロニーを 4 mL BG 液体培地に接種し, 28°C , 130 stroke min^{-1} で 24 時間振とう培養した. 培養液 300 mL を 100 mL 容三角フラスコ中の 30 mL BG 液体培地に接種し, 28°C , 130 stroke min^{-1} で 48 時間振とう培養した. 培養液を $7500 \times g$ で遠心分離後, 上澄みを $0.20 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルター (DISMIC-25AS, 25AS020AS, Advantec) でろ過したろ液

を培養ろ液とした。各培養ろ液を BGT 寒天培地に塗抹し、培養ろ液中に菌が残存していないことを確認して各実験に供試した。

土壌への PC 株培養ろ液の接種が青枯病菌の増殖に及ぼす影響

滅菌したタネまき培土（タキイ種苗）に野生株 8238rif の菌液（約 10^4 cfu mL⁻¹）を土等量（w/v）混和し、55 穴セルトレイに充填後、1 セルに PC 株培養ろ液を 20 mL 灌注し、人工気象器内（12 時間 30°C/12 時間 28°C）で静置し、毎日一定量の水を与えて管理した。対照として、滅菌水を接種した区を設けた。接種 0 日目と接種 7 日目の土壌 5 g を採取し、滅菌水 45 mL に懸濁後、懸濁液を段階的に希釈し、青枯病菌の選択培地（原・小野培地：BG 培地に 1.5% の寒天、メンブレンフィルター（0.2 μm）滅菌した 5 μg mL⁻¹ クリスタルバイオレット、50 μg mL⁻¹ シクロヘキシミド、50 μg mL⁻¹ ポリミキシン B 硫酸塩、10 μg mL⁻¹ クロラムフェニコールおよび 25 μg mL⁻¹ テトラゾリウムクロライドを加えたもの）（原・小野，1984）に、50 μg mL⁻¹ リファンピリンを添加した培地に塗抹した。培地は 28°C で 72 時間培養し、コロニー数を計数した。また、別に採取した土壌の乾燥重量を測定し、野生株の菌密度は cfu g⁻¹ soil DW（dry wight）で表した。実験は各区 4 サンプルとし、2 反復行った（n=8）。

植物への PC 株培養ろ液の接種による青枯病の防除効果

罹病性トマト（*S. lycopersicum* L.）‘Micro-Tom’（Tomato growers supply company, USA）と罹病性ナス（*S. melongena* L.）‘千両二号’、（タキイ種苗）の本葉 1-2 葉齢の個体を供試した。トマトとナスの根部を約 3 分の 1 切除し、PC 株培養ろ液 20 mL に 30 分浸漬接種した。対照として、滅菌水に浸漬した区を設けた。植物は、野生株 8238rif の汚染土壌（約 10^6 cfu g⁻¹）を充填した 128 穴セルトレイに移植し、人工気象器内（12 時間 30°C/12 時間 28°C）で管理し、2 週間後の発病率を調査した。実験は各区 12 個体を用いて、2 反復行った。

PC 株生菌を利用したトマト・ナスの青枯病防除効果

供試植物

罹病性トマト (*Solanum lycopersicum* L.) ‘Micro-Tom’ (Tomato growers supply company, USA) と罹病性ナス (*S. melongena* L.) の中でも抵抗性が異なる 5 品種 ‘千両二号’, ‘筑陽’ (以上, タキイ種苗), ‘佐土原’, ‘久留米長’ (以上, アサヒ農園) および ‘Black Beauty’ (福種) を供試した. 種子を 70%エタノールに 10 秒間浸漬後, 有効塩素 1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で, 10 分間攪拌して表面殺菌を行った. その後, 滅菌水で 1 分間, 別の滅菌水で 3 分間洗浄し, バーミキュライト (中粒) を敷き詰めたバットに播種した. 播種後, 暗黒条件下の人工気象器内 (12 時間 28°C /12 時間 22°C) で発芽させた. 発芽後, OAT ハウス B 処方 1 単位 (OAT アグリオ) を液肥として適宜与えた. 育苗は, 明期 12 時間 28°C, 暗期 12 時間 22°Cで行い, 本葉 1-2 葉齢の個体を供試した.

接種源の調製

PC 株生菌によるトマト青枯病防除に有効な PC 株の選抜では, PC 株は 27 菌株 (Table 2-5, 第 2 章 第 2 節参照), 野生株は 8238rif を供試した. PC 株生菌を利用したナス青枯病防除に有効な PC 株の選抜では, PC 株は菌群 (尾崎・木村, 1992) とトマト青枯病に対する防除効果とをもとに 10 菌株 (E-PCstr, 8266PC, 8252PC, 8345PC, 8214PC, 8224PC, 8103PC, 8109PC, 82-1PC および 101PC) を選抜して供試した. また, 野生株は 8238rifに加えて, 小川ら (2011) の結果よりナス ‘千両二号’ に対して強い病原性を示した青枯病菌野生株 8266 (MAFF 730135, レース 1, biovar 4, 菌群 I, phylotype I) の 2 菌株を供試した.

凍結保存した菌株を BGT 培地に画線塗抹し, 28°Cで 48 時間培養した. 形成した任意の形態の単コロニーを 4 mL BG 液体培地に接種し, 28°C, 130 stroke min⁻¹で 24 時間振とう培養した. 培養液 1 mL を 500 mL 容坂口フラスコ中の 100 mL BG 液体培地に接種し, 28°C, 130 stroke min⁻¹で 15 時間

振とう培養した。培養液を、分光光度計で 600 nm の波長の吸光度を測定し、既知の検量線（総菌数 = $(171160276 \times \text{吸光度} + 16614) \times \text{希釈倍数}$ ）により総菌数を推定した。培養液を遠沈管に移して 7500×g, 4°C, 15 分間遠心分離した。上澄みを捨て、滅菌水を加えて再度遠心分離し、沈殿物を菌体とした。分光光学法により求めた総菌数をもとに、野生株および PC 株の菌体を、任意の濃度に滅菌水で希釈し菌液とした。生菌数は、調製した菌液を段階的に希釈し、原・小野培地に塗抹し、コロニー形成数を計数することにより測定した。

接種方法

青枯病菌汚染土壌の調製として、タネまき培土（タキイ種苗）を詰めた 128 穴セルトレイに、菌密度を約 10^7 cfu mL⁻¹ に調製した野生株の菌液を 5 mL ずつ灌注し、野生株汚染土壌とした。本葉 1-2 葉齢の植物の根をハサミで 1/3 程度切断し、菌密度を約 10^8 cfu mL⁻¹ に調製したそれぞれの PC 株の菌液 20 mL に 30 分間浸漬した（処理区）。また、対照として滅菌水 20 mL に 30 分間浸漬した。PC 株の菌液もしくは滅菌水に浸漬した幼苗を野生株汚染土壌に移植し、人工気象器内（明期 12 時間 30°C, 暗期 12 時間 28°C）で管理し、21 日間の発病率を調査した。また、21 日目の発病率から以下の式を用いて防除価を算出した。防除価 = $[(\text{対照区} - \text{処理区}) / \text{対照区}] \times 100$ 。実験は各区 12 個体を用いて行い、トマトを用いた実験では 3-5 反復、ナスを用いた実験では 2 反復を行った。

抗菌活性の調査

野生株 8238rif と 8266 に対する PC 株の抗菌活性をプレートクロロホルム法 (Wakimoto et al., 1986) により調査した。抗菌物質生産能の検定菌として、各供試 PC 株をそれぞれ BGT 培地に画線塗抹し、28°C で 48 時間培養した。形成した単コロニーを別の BGT 培地に 4 カ所植菌し、28°C で 48 時間培養した。培養後、9 cm シャーレの上蓋にクロロホルム 2 mL を染み込ませた 9 cm 濾紙を置き、検定菌のコロニーを 2 時間燻蒸した。その後、BGT 培地に、菌密度を約 10^6 cfu mL⁻¹ に調製した指標菌

(8238rif または 8266) の菌液 1 mL を BG 0.5%寒天培地 4 mL とともに流し込み、28℃で 48 時間培養した。培養後、PC 株の周りに阻止円が形成された場合、抗菌活性を有すると評価した。

結果

土壌への PC 株培養ろ液の接種が青枯病菌の増殖に及ぼす影響

PC 株培養ろ液中における野生株の増殖抑制効果が異なる PC 株 8101PC, 8238PC, 8105PC, 8208PC, 8103PC, Suzaki-5PC の培養ろ液を青枯病菌汚染土壌 ($3.4 \log \text{cfu g}^{-1}$ 乾土) に処理し、7 日後の土壌中の菌密度を調査した (Fig. 3-1)。その結果、いずれの処理区においても、土壌中における野生株は、菌密度 $7.5\text{--}8.1 \log \text{cfu g}^{-1}$ 乾土まで増殖し、対照区 ($7.6 \log \text{cfu g}^{-1}$ 乾土) との差はなく、PC 株培養ろ液接種による青枯病菌の増殖抑制は認められなかった。

植物への PC 株培養ろ液の接種による青枯病の防除効果

PC 株培養ろ液による青枯病防除効果は、PC 株培養ろ液と植物種 (トマトとナス) との組み合わせにより異なった (Fig. 3-2)。PC 株培養ろ液によるトマト青枯病の防除効果は、8238PC と Suzaki-5PC の培養ろ液処理により発病が抑制され、それぞれの防除価は 37%と 32%であった。8101PC の培養ろ液処理では、対照区と比べてわずかに発病が抑制された (防除価 16%)。その他の PC 株培養ろ液では、対照区と比べて発病が 1~2 日程度遅延する場合もあったが、防除効果はなかった。

一方、ナス青枯病防除においては、野生株 8238rif に対して抗菌活性を有する 8105PC の培養ろ液処理が最も効果的であり、防除価は 48%であった。トマト青枯病に比較的高い防除効果を示した 8238PC と Suzaki-5PC の培養ろ液処理は、ナスでは防除価 22~26%と低下した。また、その他の区では対照区と比べて発病が遅延する場合もあったが、防除効果は低かった (防除価 13~17%)。

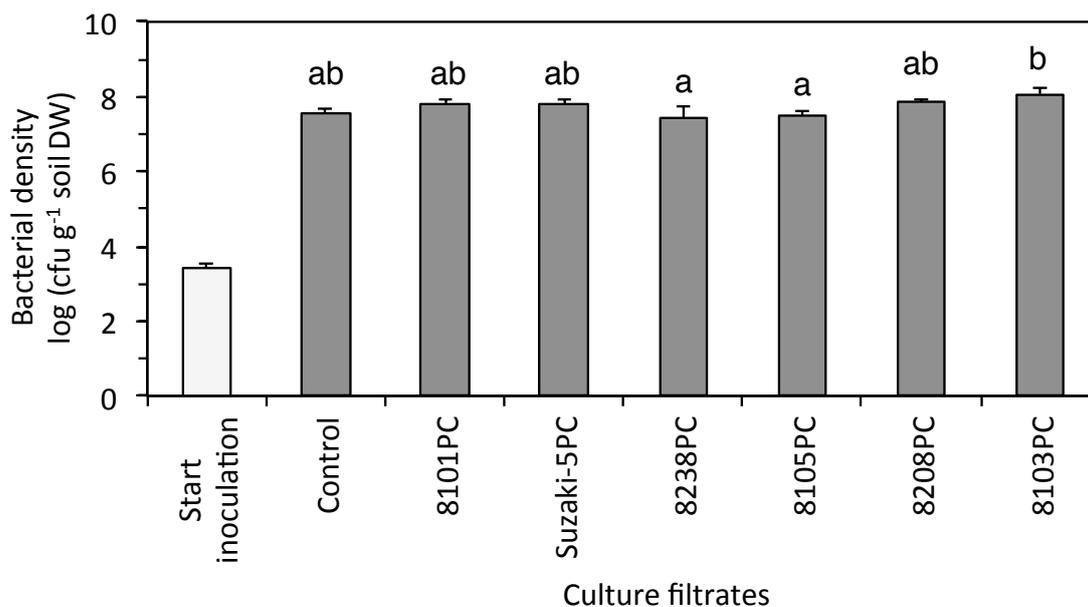


Fig. 3-1 Growth of wild-type strain 8238rif of *R. solanacearum* by inoculation of culture filtrates of PC mutants in soil. Culture filtrates of PC mutants were treated in soil containing 8238rif (ca. 10^3 cfu g⁻¹ DW). Mock-treatment with SDW served as the control. The graph shows the results of mean and standard errors from eight samples for each inoculation (n=8). The white bar shows bacterial density of 8238rif in soil at 0 days (start inoculation), and gray bars show bacterial density of 8238rif in soil at seven days after treatment. The different letters above bars indicate significant differences ($P < 0.05$) in soil at seven days after treatment according to one-way ANOVA following the Tukey-Kramer test.

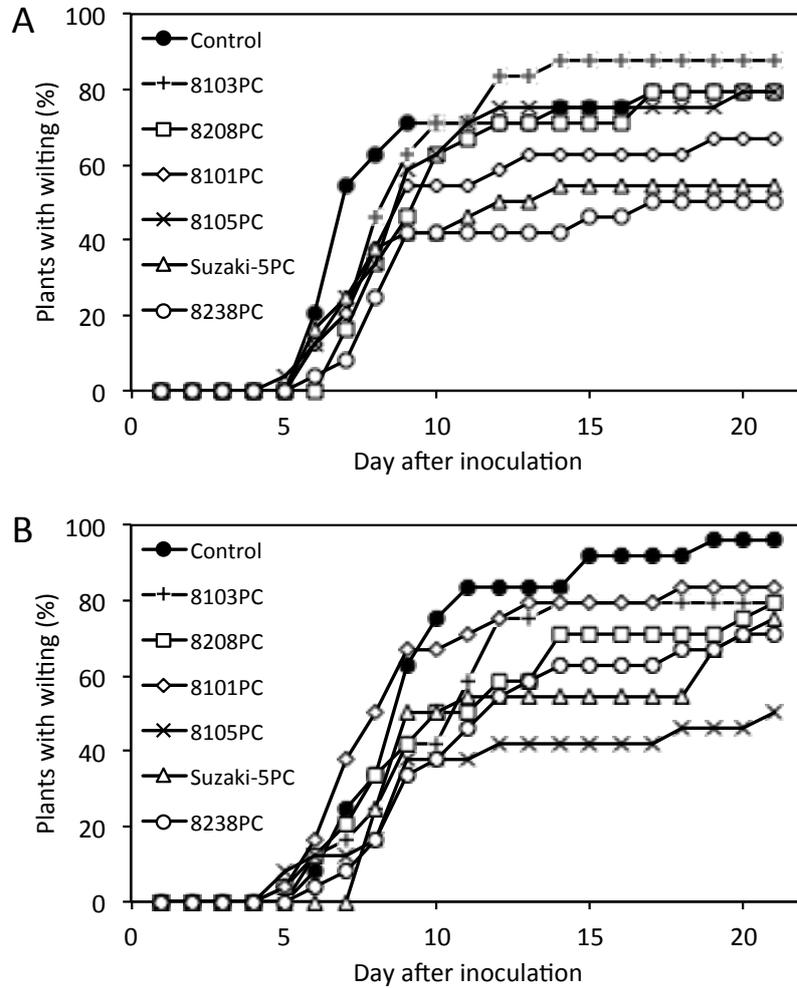


Fig. 3-2 Disease severity of bacterial wilt in tomato 'Micro-Tom' (A), and eggplant 'Senryo nigo' (B) treated with culture filtrates of PC mutant. Seedlings treatment with culture filtrates of PC mutants and SDW (control) for 30 min, and then transplanted into soil containing wild-type strain 8238rif (ca. 10^6 cfu g^{-1} FM). Experiments were performed with 12 plants in each treatment and repeated twice in successive trials.

PC 株生菌を利用したトマト・ナスの青枯病防除効果

トマト青枯病防除に有効な PC 株の選抜

本実験で供試した PC 株をトマトとナスに単独で接種した場合、植物の萎凋症状はみられなかった (データ省略)。トマト ‘Micro-Tom’ における青枯病の防除効果は、接種する PC 株の種類によって異なった (Fig. 3-3)。トマト青枯病に対して、8103PC, 8214PC, および 8224PC の接種では 80% 以上の防除価を示した。防除効果が高かった 8103PC と 8224PC は、野生株 8238rif に対する抗菌作用が確認された。一方で、8214PC 等の抗菌作用を示さない PC 株の接種でも青枯病の防除効果が高かった。

ナス青枯病防除に有効な PC 株の選抜

野生株 8238rif と 8266 接種によるナスの発病度は品種によって異なった (Fig. 3-4)。「Black Beauty」と「筑陽」では、ほぼすべての個体が枯死したのに対して、「千両二号」、「佐土原」、および「久留米長」ではわずかに発病率が低かった。

PC 株による青枯病の防除効果は、接種する PC 株と品種との組み合わせによって異なった (Table 3-1)。野生株 8238rif に対する防除効果は、E-PCstr を接種した「Black Beauty」と「筑陽」では確認されず、その他の区では 18.8~100%の防除価を示した。70%以上の防除価を示した PC 株処理区は、「千両二号」と「佐土原」で各 5 処理区、「久留米長」で 6 処理区あったのに対して、「Black Beauty」と「筑陽」では各 1 処理区であった。また、野生株 8266 に対する防除効果においても同様の傾向がみられた。ナス 5 品種における萎凋率と PC 株による防除効果との間に有意な負の相関 ($r = -0.8617$) があった (Fig. 3-5)。

PC 株処理区間で比較すると、E-PCstr 処理区では野生株 8238rif に対する防除価は 0.0~66.7%、野生株 8266 に対する防除価は 20.8~52.6%を示し、複数のナス品種に共通して防除価が低かった。

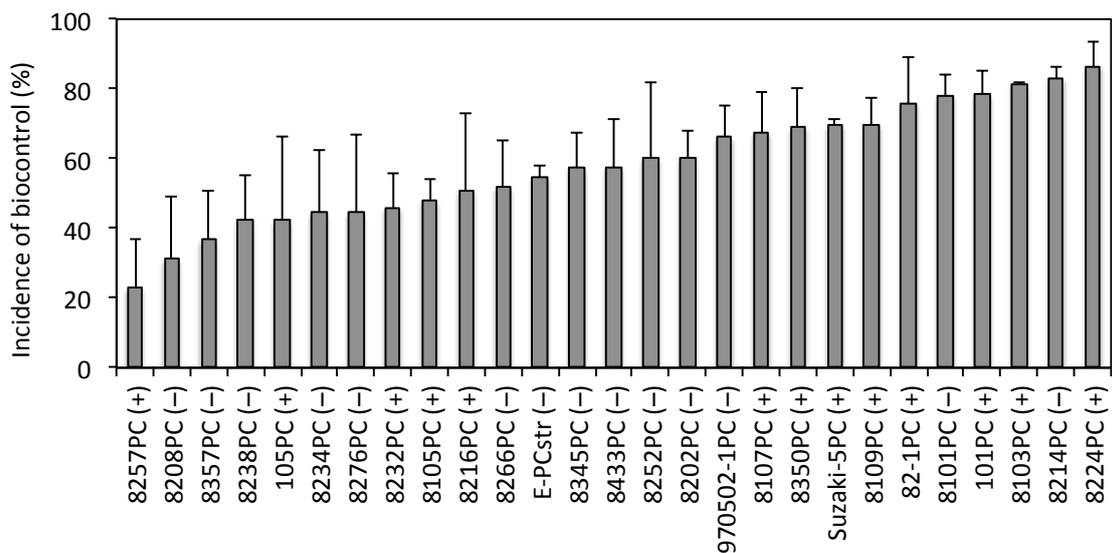


Fig. 3-3 PC mutant differences in suppression of bacterial wilt in tomato. The biocontrol effects of bacterial wilt in tomato ‘Micro-Tom’ by PC mutants were investigated in the soil-test using 27 PC mutants. Mock-inoculation with SDW served as the control. The signs above PC strain names indicate antibacterial activity against wild-type strain 8238rif, (+): antibacterial activity positive, (-): antibacterial activity negative. Inoculated seedlings were evaluated as the percentage of wilted plants at 21 days after inoculation. Biological control incidence (%) = $[(A-B)/A] \times 100$, where: A = percentage of wilted plants in control, B = percentage of wilted plants in PC treatment. The graph was expressed as the average of the percentage in three independent experiments 12 plants for each treatment.

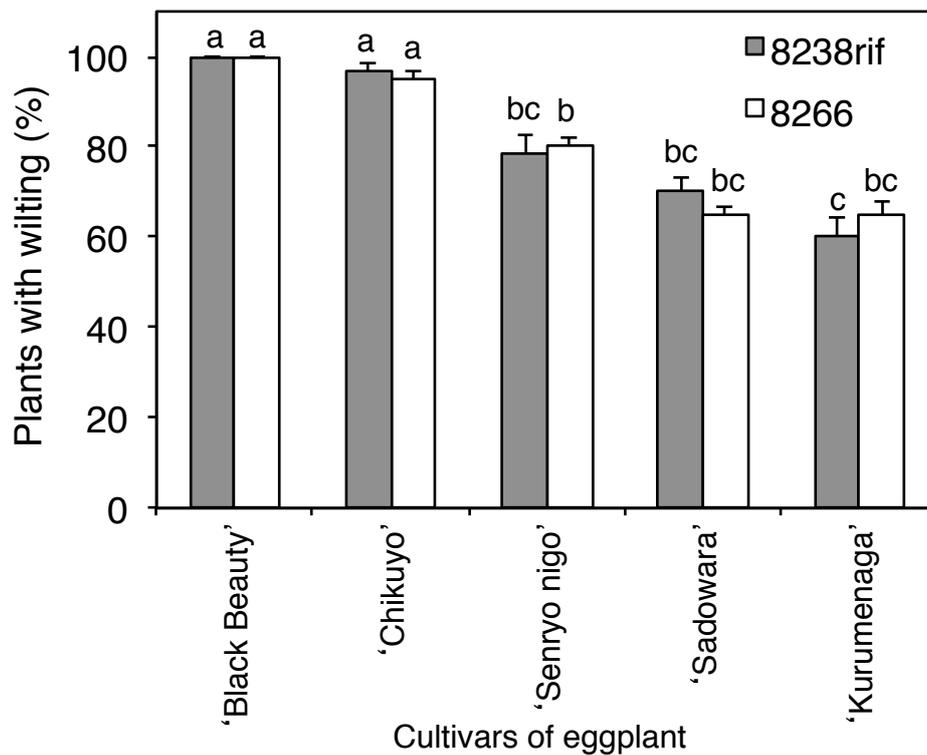


Fig. 3-4 Varietal differences in resistance to bacterial wilt in five eggplant cultivars. Seedlings (21–28 days old) of five eggplant cultivars were transplanted into soil containing 8238rif or 8266 wild-type strain (10^7 cfu g^{-1} FM). The percentage of wilted plants was evaluated at 21 days after inoculation. The graph shows the results of mean and standard errors from five replicates using 12 plants for each inoculation. The different letters above bars indicate significant differences ($P < 0.05$) in virulent strain-inoculated eggplants according to one-way ANOVA following the Tukey-Kramer test; the values of percentage were obtained through arcsine transformation.

Table 3-1 Biological control incidence of PC mutants against bacterial wilt in eggplant

| Wild-type strains | Cultivars | Biological control incidence (%) ^z | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|----------------|-----------------------------------------------|----------|----------|----------|---------|---------|--------|---------|----------|--------|---------|----------|----------|
| | | E-PCstr | 8266PC | 8252PC | 8345PC | 8214PC | 8224PC | 8103PC | 8109PC | 82-IPC | 10IPC | | | |
| 8238rif | 'Black Beauty' | 0.0 | 43.5 | 34.8 | 45.8 | 29.2 | 62.5 | 82.6 | 29.2 | 62.5 | 82.6 | 29.2 | 62.5 | 33.3 |
| | 'Chikuyo' | 0.0 | 29.2 | 50.0 | 57.9 | 36.8 | 59.1 | 77.3 | 45.5 | 39.1 | 77.3 | 45.5 | 39.1 | 65.0 |
| | 'Senryo nigo' | 18.8 | 52.6 | 89.5 | 77.8 | 44.4 | 81.8 | 87.5 | 59.1 | 73.3 | 87.5 | 59.1 | 73.3 | 60.0 |
| | 'Sadowara' | 42.9 | 78.9 | 78.9 | 68.8 | 50.0 | 77.8 | 78.6 | 61.1 | 66.7 | 78.6 | 61.1 | 66.7 | 83.3 |
| | 'Kurume naga' | 66.7 | 62.5 | 56.3 | 76.9 | 69.2 | 100.0 | 77.8 | 73.3 | 100.0 | 77.8 | 73.3 | 100.0 | 83.3 |
| 8266 | 'Black Beauty' | 20.8 | 25.0 | 4.2 | 37.5 | 25.0 | 54.2 | 58.3 | 20.8 | 33.3 | 58.3 | 20.8 | 33.3 | 33.3 |
| | 'Chikuyo' | 34.8 | 69.6 | 17.4 | 20.0 | 45.0 | 43.5 | 69.6 | 47.8 | 26.1 | 69.6 | 47.8 | 26.1 | 33.3 |
| | 'Senryo nigo' | 52.6 | 85.7 | 57.1 | 83.3 | 91.7 | 78.9 | 85.7 | 42.1 | 66.7 | 85.7 | 42.1 | 66.7 | 66.7 |
| | 'Sadowara' | 40.0 | 66.7 | 80.0 | 75.0 | 31.3 | 66.7 | 93.3 | 60.0 | 84.2 | 93.3 | 60.0 | 84.2 | 26.3 |
| Average ^y | | 31.7 c | 56.9 abc | 52.4 abc | 59.7 abc | 46.1 bc | 68.5 ab | 80.0 a | 49.2 bc | 58.8 abc | 80.0 a | 49.2 bc | 58.8 abc | 55.6 abc |

^z Seedlings (21–28 days old) of five eggplant cultivars were inoculated with ca. 10^8 cfu mL^{-1} of PC mutants (PC treatment) and SDW (control) for 30 min. Inoculated plants were transplanted into soil containing ca. 10^7 cfu g^{-1} FM of wild-type strains (8238rif or 8266). Seedlings were determined the percentage of wilted plants at 21 days after inoculation. Biological control incidence was calculated using the following formula: Biological control incidence (%) = $[(A-B)/A] \times 100$, where: A = percentage of wilted plants in control, B = percentage of wilted plants in PC treatment. Experiments were performed with 12 plants in each treatment and repeated twice in successive trials.

^y The values show average of biocontrol incidence of five eggplant cultivars against two wild-type strains in each PC mutant treatment (n=10). The different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to one-way ANOVA following the Tukey-Kramer test; the values of percentage were obtained through arcsine transformation.

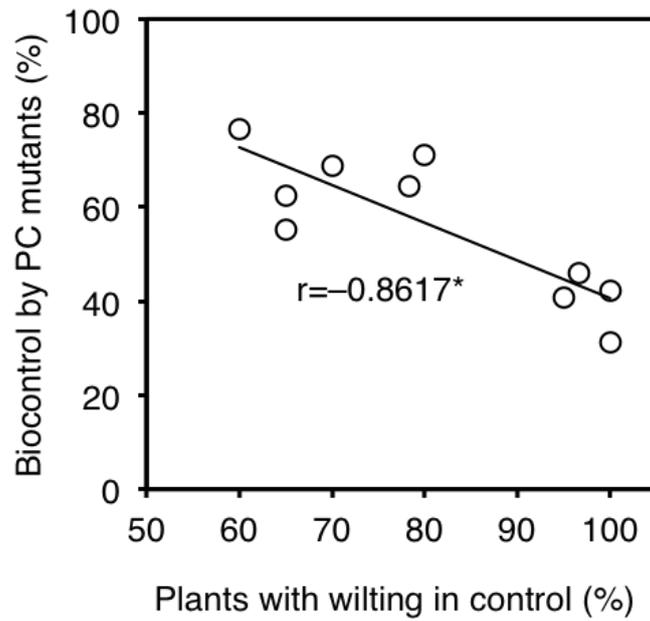


Fig. 3-4 Relationship between the biocontrol incidence by the PC mutant treatments and percentage of plants with wilting by inoculated with wild-type strains 8238rif and 8266 among the five eggplant cultivars. The biocontrol incidences show average of 10 PC mutant treatments, and the plants with wilting in control show average of five replicates, using 12 plants for each inoculation. Correlation (r) with $P < 0.05$ was indicated as * by the Pearson's correlation coefficient; the values of percentage were obtained through arcsine transformation.

一方で、8224PC 処理区と 8103PC 処理区では、E-PCstr 処理区と比べて有意に高い防除価を示し、複数のナス品種に対して高い防除価を示す傾向にあった。特に、8103PC 処理区では、野生株 8238rif に対して 77.3～87.5%、野生株 8266 に対して 58.3～93.3%の高い防除価が得られた。

野生株 8238rif と 8266 に対する PC 株の抗菌作用を Table 3-2 に示す。複数のナス品種に共通して防除価が高かった 8103PC は、両野生株に抗菌作用を示したが、抗菌作用を示さない PC 株接種でも青枯病の防除効果が確認された。

考察

PC 株生菌を利用した青枯病の防除効果は、タバコ、トマト、ナスおよびジャガイモにおいて確認されている (Hara and Ono, 1991 ; Arwiyanto et al., 1994a ; 小川ら, 2011 ; 黒木ら, 2016)。PC 株生菌を利用した青枯病の防除効果は、PC 株の種類と植物・品種によって異なることが報告されており (小川ら, 2011, 2012a), 複数の植物種・品種に対して高い防除効果を発揮する PC 株接種技術の確立が求められている。しかし、Poussier et al. (2003) は、*phcA* 変異株をトマト滲出液中で培養すると野生株に変異復帰することを報告しており、PC 株の生菌を接種したトマトでは、植物内で PC 株が野生株に変異復帰し、発病を助長させることが危惧される。PC 株を利用した青枯病防除法の確立において、PC 株の生菌を利用した防除法だけでなく、それに替わる新規防除法の開発を早急に進めることが重要である。

Pseudomonas 属や *Bacillus* 属などの有用細菌を利用した病害の生物的防除法では、菌液や菌体を用いた防除法について多くの研究が行われてきたが (Jetiyanon, 2007 ; Ramesh et al., 2009 ; Ramesh and Phadke, 2012), 近年、*Bacillus* 属細菌を利用した病害防除法において、菌の培養ろ液による病害防除効果の再検討が進められている。その例として、*B. megaterium* L2 株の培養ろ液によるタバコ赤

Table 3-2 Antibacterial activity against wild-type strains 8238rif and 8266.

| Producer strains | Indicator strains | |
|------------------|-------------------|------|
| | 8238rif | 8266 |
| E-PCstr | - ^z | + |
| 8266PC | - | - |
| 8252PC | - | - |
| 8345PC | - | - |
| 8214PC | - | - |
| 8224PC | + | - |
| 8103PC | + | + |
| 8109PC | + | + |
| 82-1PC | + | + |
| 101PC | + | + |

^z+: Inhibition zone formed by producer strain, -: Inhibition zone not formed.

星病菌（糸状菌 *Alternaria alternata*）の孢子発芽の阻害効果を有すること（Li et al., 2015）や *B. amyloguefaciens* KB3 株と *B. subtilis* Qst-713 株の培養ろ液は、トウガラシ炭疽病やイネいもち病などの複数の病害に対して防除効果を有すること（Nam et al., 2016）が明らかにされており、*Bacillus* 属細菌が生産する物質を利用して、抗菌剤や抵抗性誘導剤への応用が考えられている。

一方で、PC 株の培養ろ液を用いた青枯病防除に関する研究は極めて少なく、本研究では、PC 株を利用した防除技術の検討として、第 2 章第 2 節において野生株の増殖抑制効果が異なる PC 株培養ろ液 6 種を供試して、PC 株培養ろ液の処理による土壌中の青枯病菌の増殖抑制効果と植物の発病抑制効果を調査した。青枯病菌の汚染土壌に PC 株培養ろ液を処理した場合には、いずれの処理区においても土壌中の野生株の増殖は抑制されず、PC 株培養ろ液中で確認された野生株の増殖抑制は土壌中では確認されなかった。この要因として、*In vitro* な実験系では、PC 株培養ろ液の流出や拡散がないが、土壌中に PC 株培養ろ液を処理した場合には、培養ろ液が浸透や蒸発により系外に流出することや灌漑水によって希釈されるため、野生株の増殖抑制効果が失われたと推察される。一方、PC 株培養ろ液を植物根部に浸漬処理することで青枯病の防除効果が得られる場合があった。しかし、その防除効果は、トマトとナスで異なり、トマトに対しては Suzaki-5PC と 8238PC の培養ろ液処理で防除効果があり、ナスでは 8105PC の培養ろ液処理で比較的高い防除効果が得られた。これら PC 株培養ろ液と PC 株生菌によるトマト青枯病の防除効果を比較したところ、PC 株培養ろ液による防除効果は、いずれも PC 株生菌による防除効果よりも低かった。Arwiyanto et al. (1994a) は、PC 株 Str-10op の培養ろ液をトマトの根圏に灌注接種した場合、青枯病の防除効果は生菌よりも劣ることを報告しており、本研究でも同様の結果であった。PC 株による青枯病の防除効果の発揮には、植物への PC 株定着による野生株の定着抑制が関与することが報告されており（小川ら, 2012b）、PC 株が存在しない培養ろ液処理では、PC 株の定着による野生株の定着抑制効果は

期待できないため、防除効果が低かったと考えられる。第2章第2節において野生株の増殖抑制効果が高かった8101PCの培養ろ液処理では、トマトとナスの青枯病防除効果が低く、野生株の増殖抑制効果と青枯病の防除効果は一致していなかった。野生株に対して抗菌活性のない8238PCの培養ろ液処理でも、青枯病の発病がわずかに抑制されたことから、PC株培養ろ液による青枯病防除の要因には、PC株の抗菌作用以外の要因も関与すると考えられる。

Hyakumachi et al. (2013) は、*B. thuringensis* の培養ろ液を処理したトマトでは、感染特異的 (PR) タンパク質である *PR-1*、キチナーゼ、 β -1,3-グルカナーゼの遺伝子発現が誘導され、植物への抵抗性誘導により青枯病の発病が抑制されることを報告している。本研究においても、同様の機構が働き、PC株の培養ろ液を処理した植物では、わずかに抵抗性が誘導され、発病の遅延や抑制が起きた可能性がある。今後、PC株培養ろ液による植物への抵抗性誘導を明らかにし、PC株培養ろ液から抵抗性誘導に関わる物質を抽出することで、抵抗性誘導剤を開発することが可能であると考える。

さらに、PC株を利用した効果的かつ実用的な防除法を開発するためには、青枯病防除に有効なPC株を明らかにし、その青枯病防除機構の主要因を解明することが重要である。そこで本研究では、系統の異なるPC株を供試して、トマトとナスの数品種に対して共通して高い青枯病の防除効果を発揮するPC株を選抜した。小川ら (2011, 2012a) は、PC株生菌による青枯病の防除効果は、PC株の種類と植物・品種によって異なることを報告しており、本研究において、PC株による防除効果はPC株と植物種・品種との組み合わせによって異なった。その中でも、8224PCと8103PCの接種は、野生株8238rifによる青枯病に対して、トマト‘Micro-Tom’とナス‘千両二号’、‘筑陽’、‘佐土原’、‘久留米長’および‘Black Beauty’に共通して高い防除効果 (防除価59~100%) を発揮した。

Pseudomonas 属細菌や *Bacillus* 属細菌の中には、青枯病菌に対して抗菌作用を有する株があり、

有用細菌による抗菌作用は高い防除効果が得られる一要因として考えられている (Ramesh et al., 2009 ; Ramesh and Phadke, 2012). 本研究では, 青枯病菌の防除効果が高かった 8224PC と 8103PC は, 野生株 8238rif に対して抗菌作用を示したが, 抗菌作用を示さない PC 株の接種でも高い防除効果が得られる場合があった. また, PC 株の培養ろ液処理による青枯病防除効果は, 野生株に対して抗菌活性を有する Suzaki-5PC や 8105PC の培養ろ液で防除効果を示す場合もあったが, 抗菌活性のない 8238PC の培養ろ液処理でも, トマトでは発病が抑制された. これらの結果から, PC 株による青枯病防除機構には, PC 株の抗菌作用だけでなく他の要因の関与が示唆された.

青枯病への抵抗性は, トマトやナスの品種によって異なることが報告されており (Nakaho et al., 2004 ; Vanitha and Umesha, 2008 ; Vanitha et al., 2009 ; 小川ら, 2011), 本研究では, 青枯病に対して罹病性ナス品種の中でも, 潜在的な抵抗性が異なる 5 品種を用いて, PC 株による青枯病防除効果を調査した. 品種の発病率と PC 株による防除効果には有意な負の相関があり, 青枯病に対して潜在的な抵抗性が低い品種‘Black Beauty’と‘筑陽’では, PC 株による青枯病防除効果が低い傾向にあり, ‘Black Beauty’と‘筑陽’と比べてわずかに抵抗性が高い品種‘千両二号’, ‘佐土原’, および‘久留米長’では, PC 株による防除効果が高い傾向にあった. 罹病性トマト品種の中でも抵抗性が高い品種に青枯病菌を接種した場合, 抵抗性が低い品種と比べて, 病害防除関連酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ, ポリフェノールオキシダーゼ, ペルオキシダーゼ, およびリポキシゲナーゼの活性が有意に高まることが報告されている (Vanitha and Umesha, 2008 ; Vanitha et al., 2009). 本研究においても同様の機構が働き, 品種の持つ抵抗性が PC 株による青枯病防除効果に影響を及ぼしたと考えられる. 一方で, PC 株による青枯病防除効果は発揮されにくいナス‘Black Beauty’と‘筑陽’において, 8224PC と 8103PC の接種では青枯病の防除効果が高く, 野生株 8238rif と 8266 の異なる菌株による青枯病に対しても, 高い防除効果を発揮した. また, 吉川ら (2016) は, 系統の異

なる PC 株を用いて、ジャガイモ青枯病（野生株 8266）に対する防除効果を調査した結果、8224PC と 8103PC の接種で高い防除効果を示したと述べている。そのため、PC 株の中には複数の植物種・品種に共通して高い防除効果を発揮しやすい PC 株が存在することが示唆された。

尾崎・木村（1992）は、青枯病菌を複数のナス属植物（*Solanum melongena* ‘千両二号’、*S. mammosum*（ツノナス）、*S. integrifolium* ‘ヒラナス’、*S. torvum* ‘トルバムビガー’）に対する病原性の違いに基づいて 5 つのグループ（菌群）に分類した。菌群 I は *S. melongena* のみに、菌群 II は *S. melongena* と *S. mammosum* に、菌群 III は *S. melongena*、*S. mammosum*、および *S. integrifolium* に、菌群 IV は 4 種のナス属植物すべてに病原性を示し、菌群 V は *S. melongena* と *S. integrifolium* に病原性を示す。本研究において複数の植物種・品種に共通して高い防除効果を発揮した 8224PC と 8103PC は、菌群 IV の青枯病菌から作出された PC 株である。菌群 IV の青枯病菌は、4 種のナス属植物すべてに病原性を示すことから広い宿主範囲を有すると考えられ、本菌が PC 株に変異した場合でも複数の植物種に定着でき、高い防除効果を発揮すると推察された。今後、これらの要因を調査するため、菌群 IV の PC 株と他の PC 株接種による植物への定着能と抵抗性誘導能の違いを調査する必要がある。

摘要

PC 株生菌または PC 株培養ろ液を利用し、トマト・ナスの青枯病防除効果を調査した。野生株の増殖抑制効果が異なる PC 株培養ろ液 6 種を供試して、PC 株培養ろ液を青枯病菌の汚染土壤に灌注処理し、青枯病菌の増殖量を調査した結果、いずれの区においても土壤中の野生株の増殖抑制効果は認められなかった。また、PC 株培養ろ液をトマト ‘Micro-Tom’ とナス ‘千両二号’ の根部に浸漬処理し、青枯病の防除効果を調査したところ、防除効果は PC 株培養ろ液の種類と植物種との組み合わせによって異なり、PC 株培養ろ液処理により青枯病の発病が抑制される場合があった。系

統の異なる PC 株 27 菌株の菌液を、トマト ‘Micro-Tom’ の根部に浸漬接種し、青枯病防除効果を調査したところ、防除効果は PC 株の種類によって異なった。さらにトマト青枯病の防除効果が異なる PC 株 10 菌株を供試して、罹病性ナス 5 品種（‘Black Beauty’、‘筑陽’、‘千両二号’、‘佐土原’、および ‘久留米長’）の青枯病防除効果を調査したところ、8224PC または 8103PC の接種は複数の植物種・品種に共通した高い防除効果を示した。これらの結果から、青枯病防除効果は PC 株生菌を利用した場合で高い傾向があり、防除に効果的な PC 株が選抜された。また、青枯病の防除効果は、抗菌活性を持たない PC 株や PC 株培養ろ液の処理においても確認されたことから、PC 株の抗菌活性は、青枯病防除機構の主要因ではないことが示唆された。

第4章 土壌中・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

第1節 表現型変異株の接種方法の違いが青枯病の防除効果と土壌中と

植物内における青枯病菌の定着に及ぼす影響

緒言

PC株による青枯病発病抑制の要因として、植物内におけるPC株と野生株の定着場所をめぐる競合が考えられている(Chen and Echandi, 1984; Trigalet and Trigalet-Demery, 1990; Hara and Ono, 1991; 巖原ら, 2002; 小川ら, 2012b)。しかし、植物内におけるPC株と野生株の競合を明らかにするには、両菌株の菌密度の把握が必要であるが、そのような調査が行われた研究例は極めて少ない。また、植物内の菌密度は、菌の接種濃度、接種期間、植物部位や発病の有無などによって変動し、PC株による青枯病防除効果も異なる(Chen and Echandi, 1984; Hara and Ono, 1991; Arwiyanto et al., 1994a; Saile et al., 1997; Mori et al., 2011; 小川ら, 2012b)。そのため、これらの違いを考慮して調査することが重要であり、PC株による青枯病防除効果と野生株およびPC株の定着量との関係を明らかにする必要がある。

小川ら(2012b)は、植物上部にPC株を接種後、同部位に野生株を接種すると青枯病の発病が抑制され、この発病抑制には、高密度で確実なPC株の定着が重要と報告している。しかし、青枯病菌は主に根組織から感染するため、地下部へのPC株接種を想定し、高密度かつ確実なPC株定着が図れる接種方法や接種濃度の検討が必要である。さらに、安定したPC株定着を実現させるためには、土壌中や植物内におけるPC株と野生株の増殖特性の違いや両菌株の存在が増殖に及ぼす影響について明らかにする必要がある。

そこで本研究では、PC株と野生株を同濃度で混合接種し、土壌中と植物内におけるPC株と野生

株の増殖特性の違いと両菌株の増殖競合について調査した。次に、植物内における PC 株の菌密度が野生株の定着抑制と青枯病の発病抑制に及ぼす影響を調査するため、PC 株の接種後日数が異なる個体を用いて、PC 株の菌密度と青枯病発病抑制効果との関係を調査した。また、植物の根、茎および葉における PC 株と野生株の菌密度を調査し、両菌株の菌密度の関係が PC 株による青枯病発病抑制に及ぼす影響を評価した。

材料および方法

供試細菌

青枯病菌の野生株として、8238 (MAFF 301528, レース 1, biovar 4, 菌群 I, phylotype I) の $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ リファンピシン自然耐性株である 8238rif を供試した。表現型変異株 (PC 株) として、野生株 8238 に感染したナスより分離された PC 株の $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ストレプトマイシン自然耐性株である E-PCstr を供試した。接種源の菌調製は第 2 章と同様の方法で行った。

供試植物

ナス ‘千両二号’ (タキイ種苗) を供試した。種子は 70% エタノールと有効塩素 1% の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて消毒後、バーミキュライトに播種した。播種後、人工気象器内 (暗黒条件下, 12 時間 28°C , 12 時間 22°C) で発芽させた。育苗は明期 12 時間 28°C , 暗期 12 時間 22°C で行い、液肥として OAT ハウス B 処方 (OAT アグリオ) 1 単位を適宜与えた。実験には播種後 21–28 日間育苗した本葉 1–2 葉齢の個体を供試した。

土壌中における PC 株と野生株の増殖

タネまき培土 (タキイ種苗) に PC 株と野生株を菌密度が約 10^6 cfu g^{-1} 乾土になるように混合し、128 穴セルトレイに充填後、人工気象器内 (明期 12 時間 30°C , 暗期 12 時間 28°C) で 24 日間管理

した（混合接種区）。また、培土内の菌密度が約 10^6 cfu g⁻¹ 乾土になるように PC 株と野生株を単独で接種し、同様に管理した（単独接種区）。菌接種後 24 日間の土壌中の菌密度を希釈平板法により算出した。土壌 5 g を採取し、滅菌水 45 mL に懸濁後、さらに滅菌水で段階的に希釈した。希釈液を各菌株に相応した抗生物質を添加した原・小野培地（原・小野，1984）に塗抹し、28°C で 72 時間培養後、菌密度を算出した。土壌中の菌密度は各区 6 サンプルの平均とし、別に測定した乾土重をもとに $\log(\text{cfu g}^{-1}\text{soil DW (dry wight)} + 1)$ で表した。

植物内における PC 株と野生株の増殖

PC 株と野生株を混合接種したタネまき培土（約 10^6 cfu g⁻¹ 乾土）を 128 穴セルトレイに充填後、根の 1/3 を切除したナスを移植し、人工気象器内（明期 12 時間 30°C，暗期 12 時間 28°C）で 7 日間栽培した（混合接種区）。また、PC 株と野生株を単独で接種し、同様に移植後 7 日間栽培した（単独接種区）。接種後 7 日目に萎凋した個体と無病徴の個体とに分けて茎を採取し、70%エタノールで茎表面を消毒した。茎の重量を測定後、試験管内で滅菌水 1 mL とともに磨碎し、約 10°C で 15 時間静置した。磨碎液を滅菌水で段階的に希釈し、各菌株に相応した抗生物質を添加した原・小野培地を用いて、各菌株の菌密度を希釈平板法により求めた。植物茎内の菌密度は、サンプル数 7-16 の平均とし、 $\log(\text{cfu g}^{-1}\text{FM (fresh matter)} + 1)$ で表した。

PC 株の接種後日数の違いが植物内における PC 株の菌密度と青枯病の発病抑制効果に及ぼす影響

上記の方法で作製した PC 株接種土壌（約 10^6 cfu g⁻¹ 乾土と約 10^8 cfu g⁻¹ 乾土）に断根した 1-2 葉齢のナスを移植し、PC 株の前接種とした。移植後、人工気象器内（明期 12 時間 30°C，暗期 12 時間 28°C）で管理し、PC 株接種後 7，14，21 日目に茎内の PC 株の菌密度を調査した。なお、茎内の菌密度は 10-12 個体の平均とし、 $\log(\text{cfu g}^{-1}\text{FM} + 1)$ で表した。

また、PC 株接種後 7, 14, 21 日目のナスを断根後、野生株の汚染土壌（約 10^7 cfu g⁻¹ 乾土）を充填した 55 穴セルトレイに移植し、野生株の再接種とした。対照として、滅菌水を混和したタネまき培土にナスを移植し、同様の期間栽培した個体を野生株の汚染土壌に移植した。移植後、人工気象器内（明期 12 時間 30°C, 暗期 12 時間 28°C）で管理し、再接種後 14 日間の発病率を調査した。発病率の調査は各区 12 個体を用いて 3 反復行った。また、発病率から防除価 [防除価(%)={ (対照区 - 処理区) / 対照区 } × 100] を算出した。

植物体の各組織内における PC 株と病原菌株の菌密度と青枯病の発病抑制効果との関係

ナスの根の 1/3 を切除し、根部を PC 株の菌液（約 10^6 cfu mL⁻¹ もしくは約 10^8 cfu mL⁻¹）20 mL に 30 分間浸漬後、植物を野生株の汚染土壌（約 10^7 cfu g⁻¹ 乾土）に移植した。対照として、滅菌水 20 mL に浸漬したナスを野生株汚染土壌に移植した。菌接種後、人工気象器内（明期 12 時間 30°C, 暗期 12 時間 28°C）で管理し、接種後 14 日間の発病率を調査した。実験は各区 12 個体を用いて 3 反復行い、発病率と防除価を算出した。さらに、菌接種後 7 日目に萎凋した個体と無病徴の個体とに分けて、植物の根、茎および葉を採取した。その際、根は滅菌水で 2 回洗浄後、十分に水気を拭き取り、茎と葉は表面を 70%エタノールで消毒した。各組織内の PC 株と野生株の菌密度を希釈平板法により調査し、菌密度は $\log(\text{cfu g}^{-1}\text{FM}+1)$ で表した。

結 果

土壌中と植物内における PC 株と野生株の増殖

土壌中における PC 株と野生株の増殖を Fig. 4-1 に示す。PC 株と野生株を混合接種した土壌（混合接種区）では、両菌株とも菌密度 10^5 – 10^6 cfu g⁻¹ 乾土で一定に推移し、PC 株と野生株を単独で接種した土壌（単独接種区）と同等の菌密度であった。

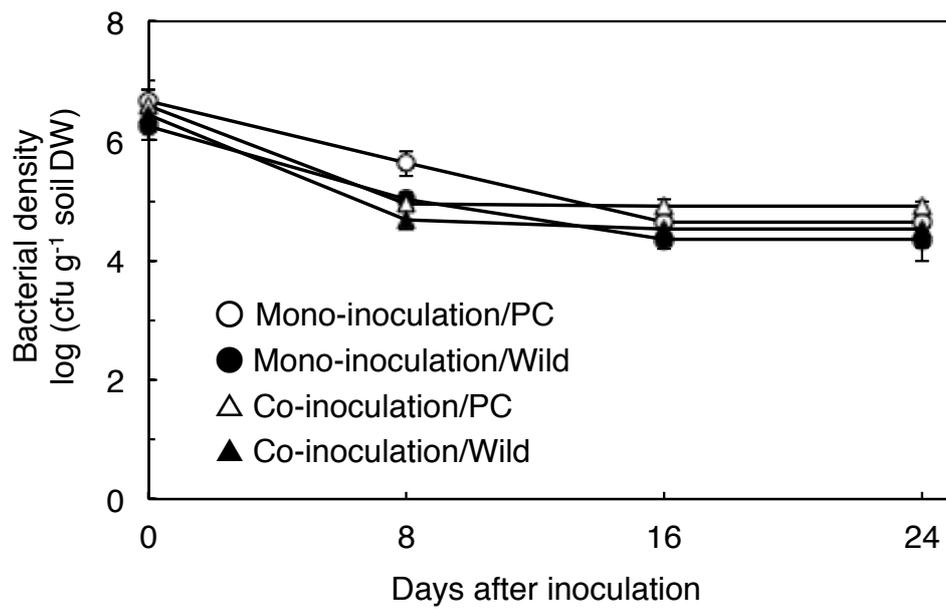


Fig. 4-1 Multiplication of the wild-type strain and the PC mutant of *R. solanacearum* in the soil. Bacterial suspensions of the PC mutant and wild-type strains were inoculated individually or collectively in the soil (ca. 10^6 cfu g⁻¹ soil DW). The samples were incubated at 30°C for 12 h and 28°C for 12 h. The bacterial density is expressed as log (cfu g soil⁻¹DW). Bars indicate the standard errors (SE) of six samples.

植物内における PC 株と野生株の菌密度を Table 4-1 に示す。PC 株を単独で接種した植物では、植物体の萎凋は見られず、茎組織内における PC 株の菌密度は約 10^2 cfu g^{-1} と低かった。野生株を単独で接種した植物では、無病徴個体と萎凋個体が観察され、植物内の野生株の菌密度は、無病徴個体では約 10^4 cfu g^{-1} 、萎凋個体では約 10^9 cfu g^{-1} であった。また、混合接種区の植物においても、無病徴個体と萎凋個体が観察された。野生株の菌密度は無病徴個体では約 10^4 cfu g^{-1} と低く、萎凋個体では約 10^8 cfu g^{-1} と高かった。一方、PC 株の菌密度は、無病徴個体と萎凋個体で 10^2 – 10^3 cfu g^{-1} と低密度で存在した。

PC 株の接種後日数の違いが植物内における PC 株の菌密度と青枯病の発病抑制効果に及ぼす影響

PC 株の接種後日数が異なる植物の青枯病発病率の推移を Fig. 4-2 に、PC 株の接種後日数が異なる植物内における PC 株の組織内の菌密度の変化を Table 4-2 に示す。高濃度（約 10^8 cfu g^{-1} 乾土）の PC 株を接種した場合、接種後 7 日目の植物では、青枯病の発病抑制効果が認められ (Fig. 4-2A)、PC 株の菌密度は約 10^5 cfu g^{-1} であった (Table 4-2)。しかし、PC 株接種後 14 日目と 21 日目の植物では、発病抑制効果は認められず (Fig. 4-2B,C)、PC 株の菌密度は約 10^3 cfu g^{-1} と低かった。低濃度（約 10^6 cfu g^{-1} 乾土）の PC 株を接種した場合、すべての処理区において発病抑制効果は認められず、PC 株の菌密度は約 10^3 cfu g^{-1} 以下と低かった。

植物体の各組織内における PC 株と病原菌株の菌密度と青枯病の発病抑制効果との関係

PC 株を植物根部に浸漬接種した場合の青枯病発病率の推移を Fig. 4-3 に示す。PC 株接種による青枯病の発病抑制効果は、対照区と低濃度（約 10^6 cfu mL^{-1} ）の PC 株接種区では認められず、高濃度（約 10^8 cfu mL^{-1} ）の PC 株接種区において、防除価 64% の高い発病抑制効果が認められた。

植物内（根、茎および葉）における野生株と PC 株の菌密度を Table 4-3 に示す。萎凋した植物に

Table 4-1 Multiplication of wild-type and PC mutant strains of *R. solanacearum* in the eggplant ‘Senryo nigo’.

| Inoculations | Symptoms | Bacterial density ^z | |
|-----------------------|------------|--------------------------------|----------------|
| | | Wild-type | PC mutant |
| Mono-inoculation/PC | Non wilted | – | 1.95 ± 0.43 c |
| Mono-inoculation/Wild | Non wilted | 4.20 ± 0.64 b | – |
| | Wilted | 9.46 ± 0.39 a | – |
| Co-inoculation | Non wilted | 3.90 ± 0.73 bc | 2.51 ± 0.48 bc |
| | Wilted | 8.82 ± 0.25 a | 3.12 ± 0.37 bc |

^z Bacterial density expressed as log (cfu g⁻¹ stem FM+1). Values are the mean and standard error (SE) of 7–16 plants at seven days after inoculation. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) by the Tukey-Kramer test.

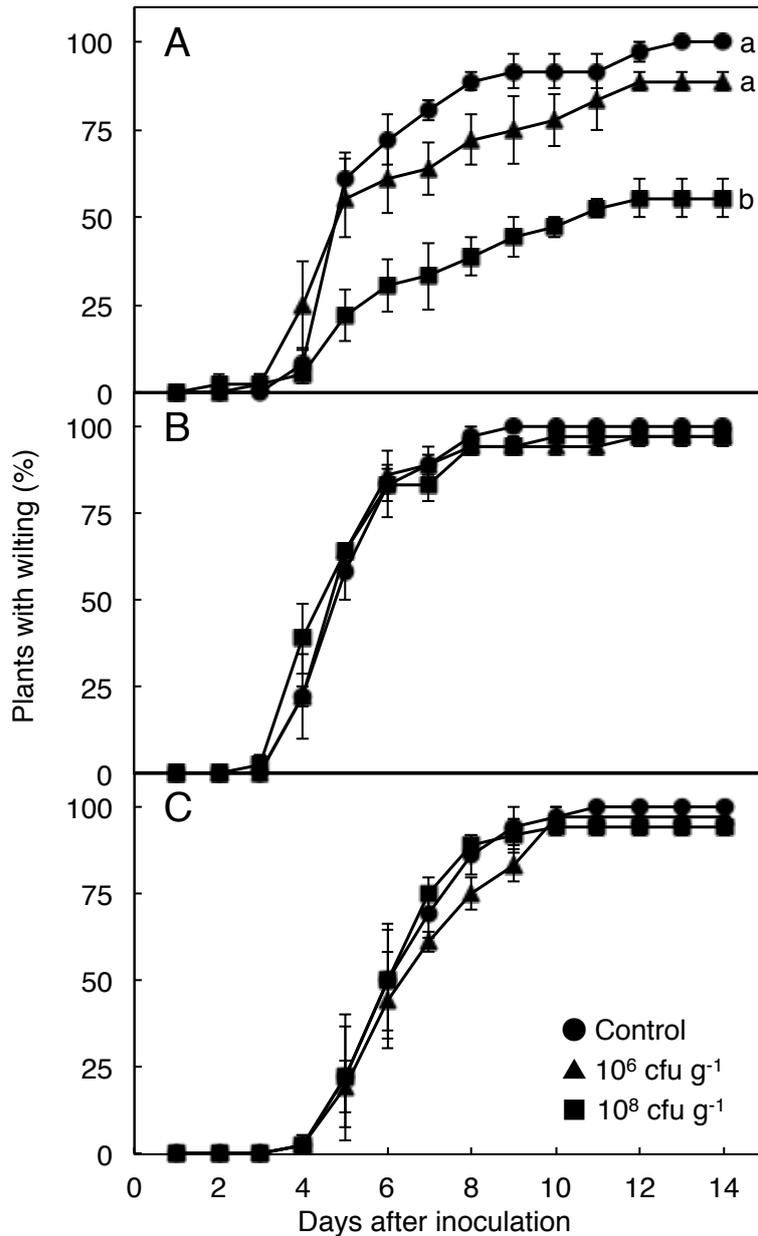


Fig. 4-2 Effect of the pre-inoculation period of the PC mutant on the suppression of bacterial wilt. Eggplant seedlings were transplanted into soil containing ca. 10^6 cfu g^{-1} or ca. 10^8 cfu g^{-1} of PC mutants (PC treatment) or SDW (Control), as the pre-inoculation. At various periods after the pre-inoculation, the plants were transplanted into soil containing ca. 10^7 cfu g^{-1} of the wild-type strain. The periods of pre-inoculation with the PC mutant were 7 days (A), 14 days (B), and 21 days (C). The graph shows the results of three replicates using 12 plants for each inoculation. Points marked with different letters were significantly different ($P < 0.05$) at day 14 according to the Tukey-Kramer test, and then the percentage values were underwent arc sine transformation. Bars indicate SE.

Table 4-2 Effect of the bacterial density of the PC mutant of *R. solanacearum* in eggplants on the suppression of bacterial wilt.

| Inoculum concentration ^z | Days after pre-inoculation ^y | Bacterial density ^x | Biological control incidence (%) ^w |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| 10 ⁸ cfu g ⁻¹ | 7 days | 5.27 ± 0.13 a | 44.4 ± 5.5 a |
| | 14 days | 2.70 ± 0.63 bc | 2.8 ± 2.8 b |
| | 21 days | 2.83 ± 0.20 b | 5.6 ± 2.8 b |
| 10 ⁶ cfu g ⁻¹ | 7 days | 1.83 ± 0.44 bc | 11.1 ± 2.8 ab |
| | 14 days | 1.24 ± 0.43 c | 2.8 ± 2.8 b |
| | 21 days | 2.91 ± 0.41 b | 2.8 ± 2.8 b |

^z PC mutant were inoculated in the soil at initial concentrations of ca. 10⁶ cfu g⁻¹ or ca. 10⁸ cfu g⁻¹.

^y Bacterial inoculation was performed as described in the Figure 4-2 legend.

^x Bacterial density is expressed as in Table 4-1. Values are the mean and SE of 10–12 plants. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) by the Tukey-Kramer test.

^w Biological control incidence was calculated using the following formula: biological control incidence (%) = [(A–B)/A]×100, where: A is the percentage of wilted plants in the control, B is the percentage of wilted plants in the PC treatment. Experiments were performed with three replicates using 12 plants of each treatment. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) according to the Tukey-Kramer test, and then the percentage values were underwent arc sine transformation.

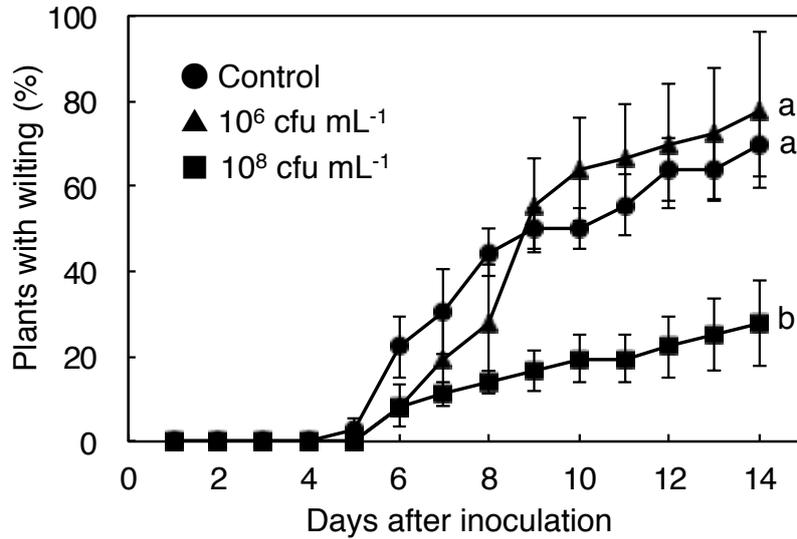


Fig. 4-3 Influence of the inoculum concentrations of the PC mutant on the suppression of bacterial wilt in the eggplant ‘Senryo nigo’. The roots were soaked with 20 mL of the bacterial suspension of the PC mutant (ca. 10^6 cfu mL⁻¹ or ca. 10^8 cfu mL⁻¹) or SDW (Control) for 30 min. Inoculated plants were transplanted into the soil contaminated with the wild-type strain (ca. 10^7 cfu g⁻¹ soil FM). The graph shows the results of three replicates using 12 plants for each inoculation. Points marked with different letters were significantly different ($P < 0.05$) at day 14 according to the Tukey-Kramer test, and then the percentage values were underwent arc sine transformation. Bars indicate SE.

Table 4-3 Population of the wild-type strain and the PC mutant of *R. solanacearum* in tissues of the eggplant ‘Senryo nigo’.

| Plant tissue | Inoculated concentration of PC mutant ^z | Bacterial density [log (cfu g ⁻¹ FM+1)] ^y | | | |
|--------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------|---------------|-----------|
| | | Non wilted sample | | Wilted sample | |
| | | Wild-type | PC mutant | Wild-type | PC mutant |
| Leaf | Control | 2.0 | – | 7.1 | – |
| | 10 ⁶ cfu mL ⁻¹ | 1.0 | 1.1 | 6.9 | 2.1 |
| | 10 ⁸ cfu mL ⁻¹ | 0.4 | 1.2 | 6.3 | 1.0 |
| Stem | Control | 6.6 | – | 8.7 | – |
| | 10 ⁶ cfu mL ⁻¹ | 4.4 | 2.8 | 8.3 | 5.0 |
| | 10 ⁸ cfu mL ⁻¹ | 4.8 | 4.6 | 7.2 | 5.4 |
| Root | Control | 8.6 | – | 8.3 | – |
| | 10 ⁶ cfu mL ⁻¹ | 8.2 | 7.0 | 8.0 | 6.8 |
| | 10 ⁸ cfu mL ⁻¹ | 6.3 | 8.2 | 8.3 | 8.3 |

^z Bacterial inoculation was performed as described in the Fig 4-3 legend.

^y Bacterial density was determined using plant tissues (leaf, stem, and root) isolated from wilted and non-wilted plants at seven days after inoculation. Values are the mean of each sample.

における野生株の菌密度は、すべての植物組織内で高かった。一方、無病徴個体における野生株は、根では高密度に検出されたが、上部組織ほど低密度で検出された。各組織内の PC 株の菌密度は、萎凋個体と無病徴個体に関わらず、根では高く、上部組織ほど低かった。

PC 株を接種した植物組織内における PC 株と野生株の菌密度の関係を Fig. 4-4 に示す。葉における野生株の菌密度は、無病徴個体ではより低く、萎凋個体ではより高い傾向が見られた (Fig. 4-4A)。茎内の野生株の菌密度は、無病徴個体で比較的 low、萎凋個体で比較的高かった (Fig. 4-4B)。葉と茎内の PC 株の菌密度には、植物の萎凋の有無と PC 株の接種濃度区で明確な違いは見られなかった (Fig. 4-4A, B)。すなわち、葉と茎内では PC 株の菌密度はばらつきが大きく、野生株と PC 株の菌密度に明確な関係性は見られなかった。高濃度の PC 株接種区の根では PC 株は約 10^7 cfu g^{-1} 以上の高密度に安定して検出され、野生株の密度は約 10^7 cfu g^{-1} 以下であった (Fig. 4-4C)。一方、低濃度接種区の根では、PC 株の菌密度は 10^5 – 10^8 cfu g^{-1} とばらつきがあり、野生株の菌密度は 10^7 – 10^9 cfu g^{-1} と高かった。

さらに、萎凋した植物内の野生株の菌密度をもとに萎凋症状が現れる病原菌密度の範囲（萎凋菌密度域）を推定した。その結果、低濃度区の無病徴個体では、根と茎内における野生株の菌密度値は、萎凋菌密度域に多く存在した (Fig. 4-4B, C)。一方、高濃度区の無病徴個体では、すべての組織において、野生株の菌密度値は萎凋菌密度域より低密度側に多く分布した。

考 察

土壌中と植物内での PC 株と野生株の増殖特性の違いを明らかにするため、土壌と植物に PC 株と野生株を混合接種し、両菌株の菌密度を調査した。その結果、土壌中の PC 株と野生株の菌密度には違いは見られず、両菌株間の競合はなかった。一方、植物内における野生株の菌密度は、萎凋

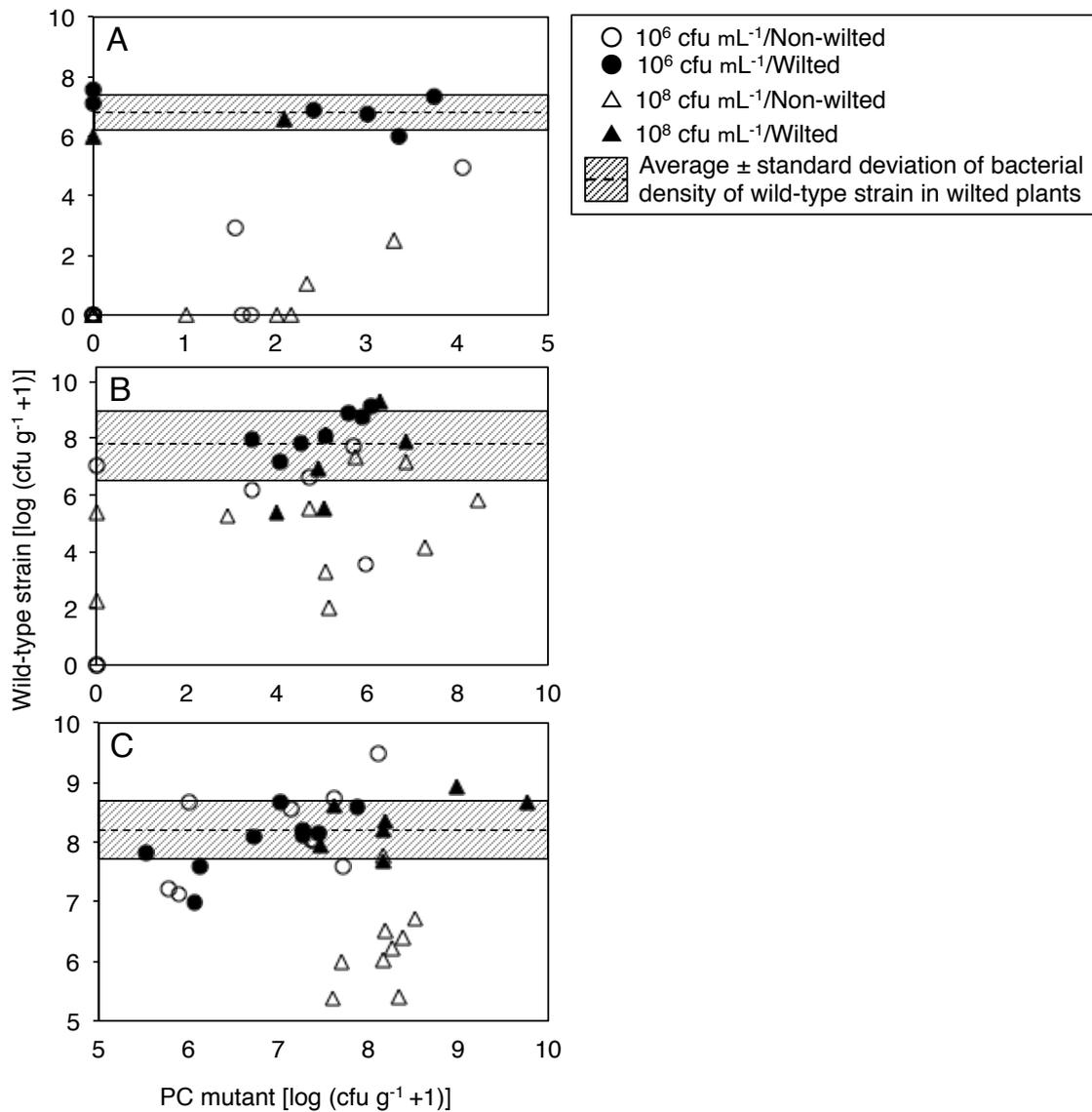


Fig. 4-4 Relationship between the colonization of the wild-type strain and the PC mutant of *R. solanacearum* in plant tissues of the eggplant 'Senryo nigo'. The roots were soaked with 20 mL of the bacterial suspension of the PC mutant (ca. 10⁶ cfu mL⁻¹ or ca. 10⁸ cfu mL⁻¹) for 30 min. Inoculated plants were transplanted into the soil contaminated with the wild-type strain (ca. 10⁷ cfu g⁻¹ soil FM). The bacterial densities were determined using plant tissues of leaf (A), stem (B), and root (C), isolated from wilted and non-wilted plants at 7 days after inoculation.

個体では高く、無病徴個体では低く、植物内における PC 株の菌密度は、発病の有無に関わらず低かった。さらに、萎凋した植物内の野生株の菌密度は、地上部においても高かったのに対し、PC 株の菌密度は、上部組織ほど低下する傾向が見られた。これらの結果から、土壌中と植物内における青枯病菌の増殖特性は異なり、植物内の PC 株は野生株に比べて増殖が抑制されたと考えられる。植物内に侵入した野生株は、細胞壁を溶解しながら植物組織内で活発に移行し増殖する (Vasse et al., 1995 ; Saile et al., 1997)。一方、PC 株は野生株に比べて、エンドグルカナーゼ活性やペクチンメチルエステラーゼ活性などの植物細胞壁の溶解に関与する酵素産生能が著しく低下している (Kelman, 1954 ; Denny et al., 1988 ; Brumbley and Denny, 1990)。このため、PC 株は野生株に比べて、植物組織内での移行能や増殖能が劣り、植物内での PC 株の菌密度が低くなったと考えられる。

PC 株の菌密度と青枯病の発病抑制効果との関係を明らかにするために、PC 株接種後日数が異なる植物を用いて、植物内における PC 株の菌密度と青枯病の発病抑制効果を調査した。高濃度の PC 株を接種した植物では、接種 7 日目において PC 株は高密度で存在したが、接種 14 日目以降の PC 株の菌密度は低下した。また、低濃度の PC 株を接種した場合、植物内の PC 株の菌密度は低く、接種後日数の経過による PC 株菌密度の増加は見られなかった。これらの結果から、PC 株は植物内への定着に一度成功しても、植物内における増殖能が低いため、栽培日数の経過により菌密度が低下することが推察された。さらに、PC 株による青枯病防除効果は、高密度で PC 株が定着した植物でのみ確認された。小川ら (2012b) は、PC 株を植物上部に接種し、同接種部位に野生株を接種した場合、顕著に発病が抑制されると報告している。また、発病が抑制されたすべての植物から PC 株が高密度に検出されたことから、高密度かつ確実な PC 株定着が発病抑制の重要な要因であると考えられている。本研究の結果は、小川ら (2012b) の報告と整合し、植物地下部から菌を接種した場合でも、PC 株による青枯病の発病抑制効果が発揮されるためには、植物内に PC 株が高密度で

定着することが重要と示唆された。

PC 株による青枯病の発病抑制効果は、野生株の接種濃度より高濃度の PC 株を接種した場合で顕著に発揮される (Chen and Echandi, 1984 ; Arwiyanto et al., 1994a ; 巖原ら, 2002 ; 小川ら, 2011) . 本研究においても、野生株の接種濃度 (約 10^7 cfu g⁻¹) より低濃度 (約 10^6 cfu mL⁻¹) の PC 株を接種した場合には青枯病の発病は抑制されず、高濃度 (約 10^8 cfu mL⁻¹) の PC 株を接種した場合に発病は抑制された。さらに、萎凋した植物内における野生株の菌密度から植物体の萎凋症状が現れる病原菌密度 (萎凋菌密度域) を推定したところ、根では約 $8.2 \log \text{cfu g}^{-1}$ 、茎内では約 $7.8 \log \text{cfu g}^{-1}$ 、葉では約 $6.8 \log \text{cfu g}^{-1}$ 程度が植物体の萎凋発現に必要であると推定された。

青枯病菌は、シグナル物質として 3-OH PAME または 3-OH MAME を生産し、菌の増殖に伴い増加するシグナル物質の濃度を感知し、その濃度が閾値に達することで病原性因子を発現するクオラムセンシング (QS) 機構を有する (Flavier et al., 1997 ; Kai et al., 2015 ; Hikichi et al., 2017) . 植物内の青枯病菌密度が約 10^6 cfu mL⁻¹ (3-OH PAME 濃度が約 5 nM) 以上になると、病原性因子の発現に関わる遺伝子群が連鎖的に活性化され、*phcA* 遺伝子の活性化によりエンドグルカナーゼやペクチンメチルエステラーゼなどの植物細胞壁分解酵素や菌体外多糖類を生産する (Clough et al., 1997 ; Flavier et al., 1997 ; Schell, 2000 ; Genin and Denny, 2012) . 低濃度の PC 株接種区では、無病徴個体における根と茎における野生株の菌密度値の多くが、萎凋菌密度域内あるいはそれに近い値に多く分布しており、QS により病原性因子が発現し、無病徴の個体でも直に萎凋症状を示すものと推測された。

青枯病の発病には、根の細胞間隙内における野生株のコロニー化が重要であり、病原性の発現は、根内への野生株の侵入後の増殖によってすでに決定されると考えられている (Hikichi et al., 2017) . 高濃度の PC 株接種区の無病徴個体では、野生株の菌密度値のほとんどが、萎凋菌密度域より低か

った。特に、根における野生株の菌密度は、 10^5 – 10^6 cfu g⁻¹ の範囲に高頻度で検出され、対照区と比較して低密度であった。これらの結果から、青枯病の発病には根における野生株の定着が密接に関与しており、PC 株による防除効果の発現には野生株の定着抑制が重要であると推察された。

PC 株による青枯病の発病抑制要因の一つとして、PC 株の定着による野生株の定着阻害が考えられている (Chen and Echandi, 1984 ; Hara and Ono, 1991 ; 巖原ら, 2002 ; 小川ら, 2011, 2012b)。高濃度の PC 株を接種した場合、発病が抑制されたすべての植物の根組織から、PC 株が約 10^7 cfu g⁻¹ 以上の高密度で検出された。一方、低濃度の PC 株接種区では、PC 株はすべての個体から検出されたものの、菌密度は 10^5 – 10^8 cfu g⁻¹ とばらつきがみられた。野生株の菌密度は、PC 株の低濃度接種区よりも高濃度接種区で顕著に低下し、このような傾向は根以外の部位 (茎と葉) ではみられなかった。一方で、PC 株が高密度で検出された植物でも、野生株が高密度で存在し、萎凋症状を示した個体もあった。Chen and Echandi (1984) は、根中の PC 株は接種初期の部位に高密度で存在するが、新しく伸長した部位では低密度で存在するため、伸長部位に感染した野生株は容易に増殖すると述べている。また、萎凋した個体では、PC 株の菌密度が無病徴個体よりも高密度で検出される場合もあった。Macho et al. (2010) は、病原性野生株と病原性因子変異株を混合接種した植物では、野生株の存在により変異株の植物内への侵入や拡散が助長され、増殖が促進されること報告している。本研究でもこれらの要因により PC 株と野生株が高密度で検出された可能性があり、植物内における PC 株と野生株との定着競合を詳細に明らかにするためには、植物組織内の PC 株と野生株の定着を顕鏡観察することが有効であると考えられる。

本研究において、PC 株は野生株に比べて植物内での増殖能と上部組織への移行能が低く、土壌への PC 株接種や低濃度の PC 株を植物根部に浸漬接種では、植物内の野生株定着を抑制できないことが明らかになった。高濃度の PC 株を植物根部に浸漬接種した場合では、根における野生株の

定着が抑制され、高い防除効果が得られたことから、植物根部への高濃度の PC 株接種が青枯病防除に有効な接種方法であると考えられる。今後は、実際の栽培現場における青枯病防除を想定し、植物内に PC 株を高濃度かつ長期間定着させる接種技術の確立が必要である。

摘要

土壌中と植物内での青枯病菌の野生株と PC 株の増殖特性の相違を明らかにするため、土壌とナス‘千両二号’に両菌株を同濃度かつ同時に混合接種し、菌密度を調査した。土壌中では両菌株とも同様に増殖したが、植物内では PC 株より野生株の方が高密度に増殖した。植物内における PC 株の定着量が青枯病発病抑制に及ぼす影響を調査するため、PC 株の接種日数が異なるナスの PC 株定着量と青枯病防除効果との関係を調査した。その結果、PC 株を高濃度で接種した初期の植物でのみ、PC 株の高濃度の定着が確認され、青枯病の防除効果が確認された。さらに、野生株の接種濃度よりも低濃度の PC 株接種区と高濃度の接種区を設け、青枯病防除効果と根、茎および葉における両菌株の定着量を調査し、それらの関係を比較した。その結果、高濃度の PC 株接種区では対照区と低濃度の PC 株接種区と比べて、根における野生株の定着量が有意に低下し、高い青枯病防除効果を示した。

第4章 土壌中・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

第2節 蛍光観察法を用いた植物組織内における青枯病菌の挙動観察

緒言

第3章第1節において、PC株による高い青枯病防除効果が得られるためには、高濃度のPC株を植物根部に浸漬接種することが重要であり、本接種法により植物根部にPC株が高密度で定着し、野生株の定着が抑制されることを明らかにした。しかし、PC株が高密度で定着した個体でも野生株が高密度に定着し、発病する個体があった。そのため、PC株による青枯病防除の要因として、PC株の植物内定着の関与を明らかにするためには、植物組織内のPC株と野生株の挙動を観察することが有効であると考えられる。

従来の菌密度測定法は、採取した組織の磨砕液を用いて、希釈平板法により菌密度を定量するため、組織全体の菌密度を把握する方法として有効である。一方で、自然状態での菌の定着やより詳細な定着組織・部位を明らかにするためには、顕微鏡を用いた観察が有効であるが、本研究では青枯病菌のPC株と野生株を用いるため、検鏡下において菌株を識別する必要がある。そこで本研究では、カナマイシン耐性遺伝子 (Km^r) と緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) を付与した組換えプラスミドを導入した青枯病菌の緑色蛍光菌株 (Wild-type 株) と、ゲンタマイシン耐性遺伝子 (Gm^r) と赤色蛍光タンパク質遺伝子 (*DsRed2*) を付与した組換えプラスミドを導入した赤色蛍光菌株 (PC-type 株) を作製した。植物内におけるPC株と病原性株の定着場所をめぐる競合を明らかにするため、それら組換え菌を利用して、各菌株に対応した抗生物質添加培地を用いた菌の定量と蛍光顕微鏡下における蛍光菌の発光を観察することで、植物組織内における各菌株の定着について調査した。

材料および方法

青枯病菌の蛍光標識株の作出

緑色蛍光菌株の作出：伝達因子 *mob*, 複製に関する *rep* 領域, MCS 領域を有する広宿主プラスミド pBBR1MCS-2 (Km^r) (Kovach et al., 1995) に緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) を導入したプラスミド pRKmGreen を構築し (Fig. 4-5A), 大腸菌 *Escherichia coli* S17-1 株 (Simon et al., 1983) に形質転換した。pRKmGreen を保持した株 (*E. coli* S17-1/ pRKmGreen) を Km 添加 LB 液体培地 (1% トリプトンペプトン, 0.5% イーストエキストラクト, 0.5% NaCl) に接種し, 37°C で一晩振とう培養した。青枯病菌 8238 (MAFF 301528, レース 1, biovar 4, phylotype I) を BG 液体培地に接種し, 28°C で一晩振とう培養した。それぞれの培養液 100 μ L ずつをマイクロチューブに混合し, 28°C で一晩培養した。Km 添加シモンズクエン酸寒天培地 (0.4% クエン酸ナトリウム, 1% NaCl, 0.04% MgSO₄, 0.2% NH₄H₂PO₄, 0.2% K₂HPO₄, 3% 寒天, pH 6.9) に塗抹し, 28°C で 48 時間培養した。培地上のコロニーをランダムに選抜し, Km 添加 BGT 培地にストリークした。その後, 培地上で流動性を示すコロニーを Km 添加 BG 液体培地に接種後, 28°C で一晩振とう培養した菌液にグリセロールを 15% になるように添加し -80°C で保存した。各培地の Km の添加濃度は 50 μ g mL⁻¹ とした。

赤色蛍光菌株の作出：プラスミド pDsRed2 (Clontech) 由来の赤色蛍光タンパク質遺伝子 (*DsRed2*) を推定生合成遺伝子 *phbCAB* の PHA 重酵素遺伝子 *phbC* 部分を置換したプラスミド pBSHX-DsRed2dCAB からプロモーター部分 (PRs) -*DsRed2* 遺伝子および *phbA* 遺伝子の一部を PCR で増幅させ, pMD20-T ベクターとライゲーションして pMDHX-DsRed2dC を構築した。また, 角谷 (1995) の報告をもとに *R. solanacearum* GMI1000 のゲノム DNA を鋳型として PCR で増幅した強力なプロモーター領域 (約 400 bp) を含むプラスミド pMDBX-R.sol Pro を構築し, 制限酵素処理 (*Bgl* II および *Xho* I) 後, 約 400 bp の断片を切り出し, pMDHX-DsRed2dC の PHA 生合成遺伝子 *phbCAB*

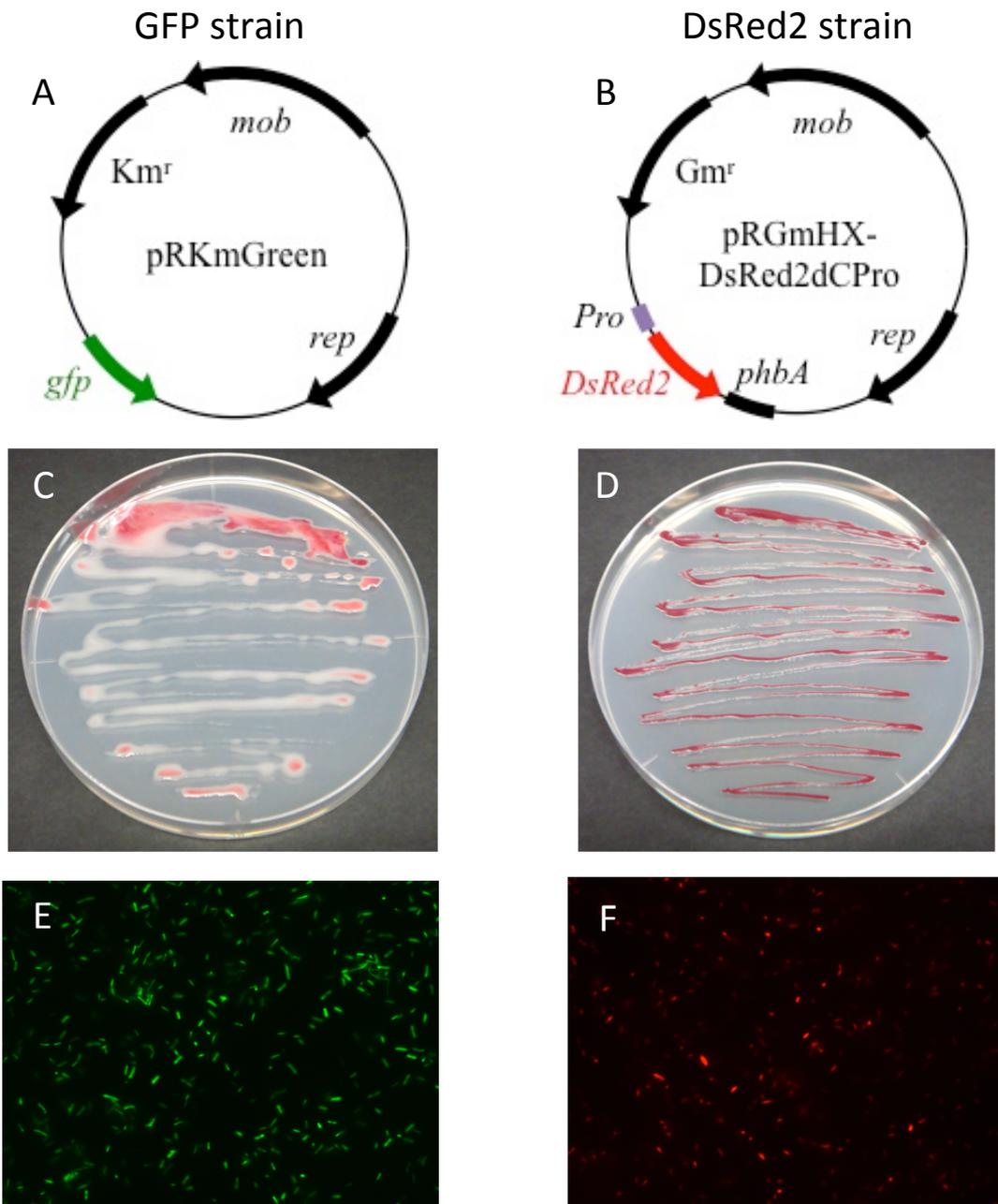


Fig. 4-5 Construction of plasmid of pRKmGreen (A) and pRGmHX-DsRed2dCPro (B). The colony of green fluorescent protein gene (*gfp*) tagged fluidal (wild-type) strain (C), and red fluorescent protein gene (*DsRed2*) tagged non-fluidal (PC-type) strain of *R. solanacearum* in BGT medium (D). The *gfp*-tagged wild-type strain (E) and *DsRed2*-tagged PC-type strain (F).

の推定プロモーター領域の下流に挿入したプラスミド pMDBX-DsRed2dCPro を構築した。pMDBX-DsRed2dCPro から制限酵素 (*Hind*III および *Xba* I) 処理により *DsRed2* を含む目的遺伝子を切り出し、伝達因子 *mob*, 複製に関する *rep* 領域, MCS 領域を有する広宿主プラスミド pBBR1MCS-5 (*Gm^r*) (Kovach et al., 1995) にライゲーションし、プラスミド pRGm-DsRed2dCPro を構築した (Fig. 4-5B)。それを *E. coli* S17-1 に形質転換した *E. coli* S17-1/ pRGm-DsRed2dCPro を Gm 添加 LB 液体培地に接種し、37°C で一晩振とう培養した。青枯病菌 8238 を BG 液体培地に接種し、28°C で一晩振とう培養した。それぞれの培養液をマイクロチューブに移し、遠心分離 (6000 rpm, 3 分間) 後、上清を除去して沈殿物を 1 mL の 10 mM MgSO₄ で懸濁した。これを再度繰り返し、大腸菌懸濁液 100 μL と青枯病菌懸濁液 300 μL を BG 液体培地に混合し、28°C で一晩培養した。培養液を遠心分離 (6000 rpm, 3 分間) 後、300 μL の 10 mM MgSO₄ で懸濁し、懸濁液を Gm 添加シモンズクエン酸寒天培地に塗抹し、28°C で 3 日間培養後、コロニーをランダムに分離した。コロニーを Gm 添加 BGT 培地にストリーク後、非流動性を示すコロニーを分離し、Gm を添加した原・小野培地 (原・小野, 1984) に再ストリークした。培地上のコロニーを Gm 添加 BG 液体培地に接種後、28°C で一晩振とう培養した。菌液にグリセロールを 15% になるように添加して -80°C で保存した。なお、各培地の Gm の添加濃度は 10 μg mL⁻¹ とした。

接種源の調製

緑色蛍光菌株および赤色蛍光菌株は、それぞれ Km と Gm を添加した BGT 寒天培地に画線塗抹し、28°C で 3 日間培養した。菌のコロニーを新しい各抗生物質添加 BGT 寒天培地にストリークし、2~3 日間再培養した。培養上に増殖した菌体を滅菌水に懸濁し、菌液とした。菌液の菌濃度は、各抗生物質添加 BGT 培地を用いた希釈平板法により測定した。また、菌液のプレパラートを作製し、落射型蛍光顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE) を用いて菌体の発光を観察した。

供試植物

罹病性トマト (*Solanum lycopersicum* L.) ‘Micro-Tom’ (Tomato growers supply company, USA) を供試した。種子を 70%エタノールに 10 秒間浸漬後、有効塩素 1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で、10 分間攪拌して表面殺菌を行った。その後、滅菌水で 1 分間、別の滅菌水で 3 分間洗浄した。種子は、ろ紙を敷いた滅菌シャーレ上に播種し、人工気象器内 (12 時間 28°C/12 時間 22°C) で発芽させた。発芽苗は石英砂を詰めた 128 穴セルトレイに移植し、人工気象器内 (12 時間 28°C/12 時間 22°C) で本葉 4-5 葉齢まで育苗した。移植後、OAT ハウス B 処方 1 単位 (OAT アグリオ) を液肥として適宜与えた。

蛍光標識した青枯病菌の病原性検定

トマトに対する病原性検定は、トマトを青枯病菌汚染土壌に移植する方法と菌液に浸漬接種する方法で行った。青枯病菌汚染土壌への接種は、滅菌したタネまき培土を充填した 128 穴セルトレイの各セルに、緑色蛍光菌株または赤色蛍光菌株の菌液 (約 10^8 cfu mL⁻¹) を 5 mL 添加した青枯病菌汚染土壌に、根を約 1/3 切除したトマト苗を移植し、人工気象器内 (12 時間 30°C/12 時間 28°C) で 15 日間の萎凋率 (萎凋率 (%) = (萎凋葉数 / 総葉数) × 100) を調査した。菌液への浸漬接種は、各蛍光菌株の菌液 (約 10^8 cfu mL⁻¹) 15 mL を入れた 15 mL 容試験チューブに、根を約 1/3 切除したトマトを移植し、人工気象器内 (12 時間 30°C/12 時間 28°C) で 15 日間の萎凋率を調査した。移植後、OAT ハウス B 処方 1 単位 (OAT アグリオ) を液肥として適宜与えた。実験は各区 12 個体を用いて行った。

植物内から蛍光菌株の検出と組換えプラスミドの脱落

各蛍光菌株の菌液 (約 10^6 cfu mL⁻¹) 15 mL を入れた 15 mL 容試験チューブに、根を約 1/3 切除したトマトを移植し、人工気象器内 (12 時間 30°C/12 時間 28°C) で管理した。菌接種後 7 日目にトマ

トの茎を採取後、70%エタノールを染み込ませたキムワイプで茎表面を消毒し、滅菌水 1 mL とともに磨砕した磨砕液を段階的に希釈して培地に塗抹した。プラスミドの脱落を確認するため、培地には、原・小野培地、各菌株に相応した抗生物質 (Km もしくは Gm) 添加原・小野培地、各抗生物質添加 BGT 培地を用いた。原・小野培地では、青枯病菌を選択的に分離でき、抗生物質に対する耐性遺伝子が付与された組換えプラスミドが脱落し、抗生物質に対する耐性を失った菌を含むすべての青枯病菌が生育可能である。各抗生物質添加原・小野培地と各抗生物質添加 BGT 培地では、組換えプラスミドが脱落して抗生物質に対する耐性を失った菌は生育できず、抗生物質に対する耐性遺伝子が付与された組換えプラスミドを保持している菌のみ生育可能であるため、プラスミドを保持している菌を定量化できる。実験は各区 10-12 個体を用いて行った。

赤色蛍光菌株による青枯病防除効果

赤色蛍光菌株の菌液 (10^6 - 10^7 cfu mL⁻¹) 15 mL を入れた 15 mL 容試験チューブ内に、根を約 1/3 断根したトマト苗の根部を浸漬し、人工気象器内 (12 時間 30°C/12 時間 28°C) で 24 時間接種した。対照として、滅菌水を浸漬接種した。その後、植物は緑色蛍光株の菌液 (10^5 - 10^6 cfu mL⁻¹) 15 mL を入れた 15 mL 容試験チューブ内に移植し、人工気象器内 (12 時間 30°C/12 時間 28°C) で 21 日間の萎凋率を調査した。実験は各区 9 個体を用いて、2 反復行った。

植物組織内における赤色蛍光菌株と緑色蛍光菌株の定着

緑色蛍光菌株のみを接種した対照区と、赤色蛍光菌株を前接種後、緑色蛍光菌株を接種した処理区を用いて、菌接種 7 日目に試験チューブ内から無病徴の植物体を抜き取り、根と茎を採取した。根は、根に付着した菌液を十分に落とした後、滅菌水 50 mL 中で 1 分間静かに振り動かして洗浄し、根サンプルとした。根の洗浄液は、根面の菌回収液として使用した。茎は葉を落とし、70%エタノールを染み込ませたキムワイプで茎表面を拭いて消毒し、茎サンプルとした。根と茎を滅菌水 1 mL

中で磨砕した磨砕液を段階的に希釈し、各抗生物質添加 BGT 培地に塗抹し、28°Cで 72 時間培養した。赤色蛍光菌株の菌密度は、Gm 添加 BGT 培地上に増殖したコロニー数を、緑色蛍光菌株の菌密度は、Km 添加 BGT 培地上に増殖したコロニー数を計数し、菌密度は $\log(\text{cfu g}^{-1} \text{FM})$ として表した。根面の菌回収液中の菌密度は同様に算出し、 $\log(\text{cfu mL}^{-1})$ として表した。各サンプルの菌密度は、各区 9-10 個体の平均を算出した。

蛍光顕微鏡による赤色蛍光菌株と緑色蛍光菌株の植物組織内定着の観察

対照区と処理区における発病個体と無病徴個体の植物根を同様にサンプリングした。サンプリングは、接種後 10 日間行い、切片プレパラートを作製し、落射型蛍光顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE) を用いて植物組織内の菌の定着を観察した。植物組織内における緑色蛍光菌株は GFP フィルタ (OP-66836, 励起波長 470/40 nm, 吸収波長 535/50 nm, ダイクロイックミラー波長 495 nm) で、赤色蛍光菌株は TexasRed フィルタ (OP-66838, 励起波長 560/40 nm, 吸収波長 630/60 nm, ダイクロイックミラー波長 595 nm) で識別して観察した。

結果

蛍光標識した青枯病菌の病原性検定

各抗生物質添加 BGT 寒天培地上では、緑色蛍光菌株は流動性コロニーを呈し、赤色蛍光菌株は非流動性のコロニーを呈した (Fig. 4-5C, D)。また、蛍光顕微鏡下では、緑色蛍光菌株は緑色に発光し、赤色蛍光菌株は赤色に発光した (Fig. 4-5E, F)。トマトに対する各菌株の病原性を菌の汚染土壌への接種と菌液への接種により確認したところ、両接種法において緑色蛍光菌株を接種したトマトでは萎凋し、病原性を示し、赤色蛍光菌株を接種したトマトでは、まったく発病せず非病原性であった (Fig. 4-6)。

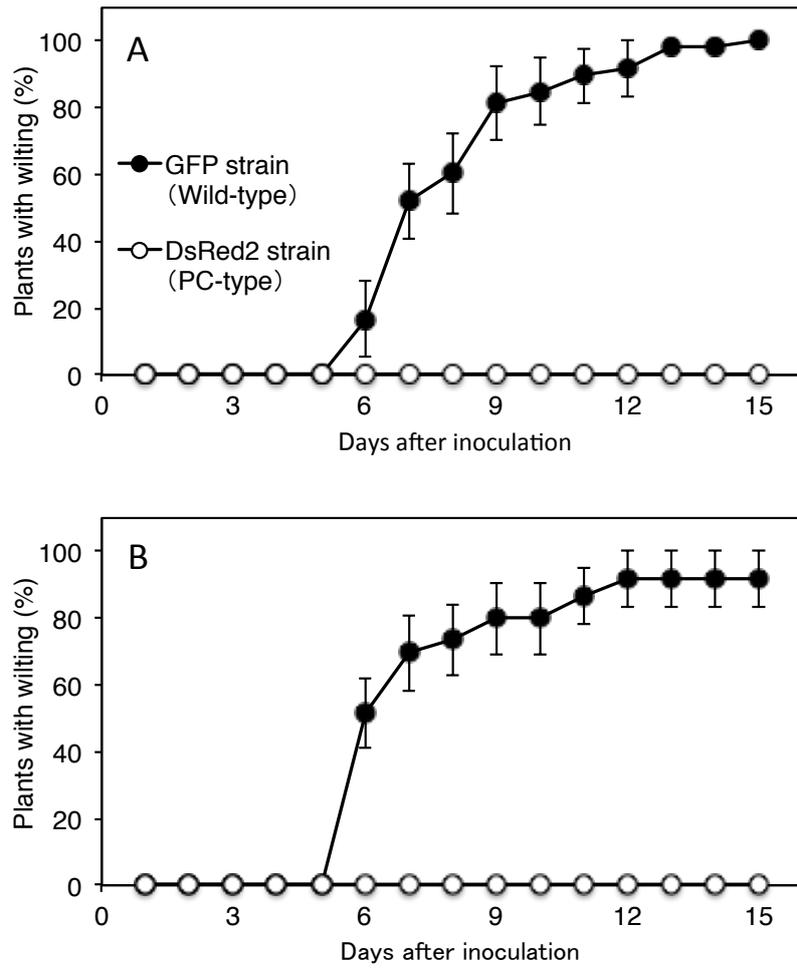


Fig. 4-6 The pathogenesis of *gfp*-tagged wild-type strain and *DsRed2*-tagged PC-type strain of *R. solanacearum* in the soil-inoculations (A) and in the bacterial suspensions (B).

植物内から蛍光菌株の検出と組換えプラスミドの脱落

各蛍光菌株の菌液を接種したトマトの茎内から菌を分離したところ、菌の検出率は培地の種類によって異なった (Fig. 4-7)。緑色蛍光菌株の検出率は、原・小野培地とカナマイシン (Km) 添加 BGT 培地では 100%であったのに対して、Km 添加原・小野培地では 17%と低かった。赤色蛍光菌株の検出率は、原・小野培地とゲンタマイシン (Gm) 添加 BGT 培地では 100%であったが、Gm 添加原・小野培地では 90%とわずかに低下した。茎内における緑色蛍光菌株の菌密度は、Km 添加 BGT 培地では約 10^7 cfu g⁻¹ FM と原・小野培地と同等の菌密度であった。赤色蛍光菌株の菌密度は、Gm 添加 BGT 培地では約 10^7 cfu g⁻¹ FM, 原・小野培地では約 10^5 cfu g⁻¹ FM と、原・小野培地の方で菌密度が低かった。また、各抗生物質添加 BGT 培地上に分離された菌の発光を確認したところ、両菌株で蛍光発光が確認された (データ省略)。

赤色蛍光菌株による青枯病防除効果

緑色蛍光菌株は流動性コロニーを呈し、トマトに対して病原性であったことから病原性株 (Wild-type 株) として利用し、赤色蛍光菌株は非流動性コロニーを呈し、トマトに対して非病原性であったことから表現型変異株 (PC-type 株) として利用し、緑色蛍光菌株に対する赤色蛍光菌株の防除効果を調査した。赤色蛍光菌株を前接種したトマトでは、緑色蛍光菌株のみを接種した対照区と比べて有意に発病が抑制され、防除価 60%以上の防除効果が確認された (Fig. 4-8)。

植物組織内における赤色蛍光菌株と緑色蛍光菌株の定着

緑色蛍光菌株のみを接種した対照区では、緑色蛍光株は根内において約 10^7 cfu g⁻¹ FM と高密度で定着した。赤色蛍光菌株を前接種したトマトでは、赤色蛍光菌株は根内で約 10^7 cfu g⁻¹ FM と高密度に定着し、緑色蛍光菌株の定着量は約 10^6 cfu g⁻¹ FM 以下と有意に抑制された。一方、茎内と根面における菌密度は、処理区間および菌株間で有意な差はなかった (Fig. 4-9)。

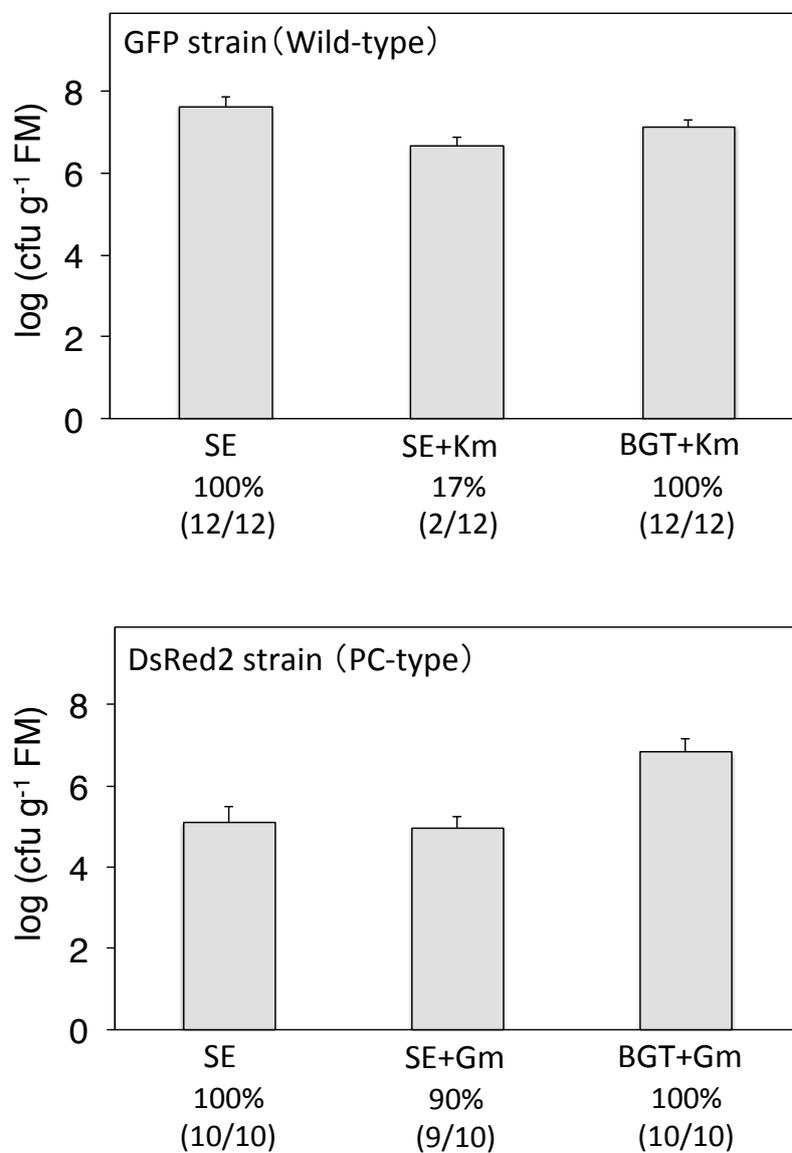


Fig. 4-7 Stability of the plasmid in *gfp*-tagged wild-type strain and *DsRed2*-tagged PC-type strain of *R. solanacearum* isolated from stem in tomato plants. SE: selection medium, SE+Km: kanamycin (Km)-containing selection medium, BGT+Km: Km-containing BGT medium SE+Gm: gentamicin (Gm)-containing selection medium, BGT+Gm: Gm-containing BGT medium. Percentage indicates detection rate of bacteria and value in parentheses show the detected samples/total samples. Bars show standard error.

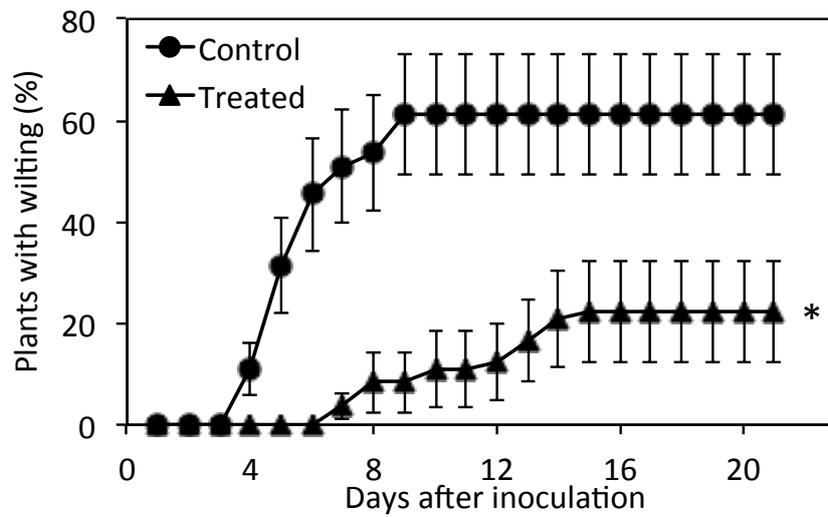


Fig. 4-8 Suppression of bacterial wilt caused by *gfp*-tagged wild-type strain in tomato inoculated with *DsRed2*-tagged PC-type strain. Asterisk shows significantly different ($P < 0.05$) at day 21 according to the t-test, and then the percentage values were underwent arc sine transformation. Bars indicate SE. (n=18).

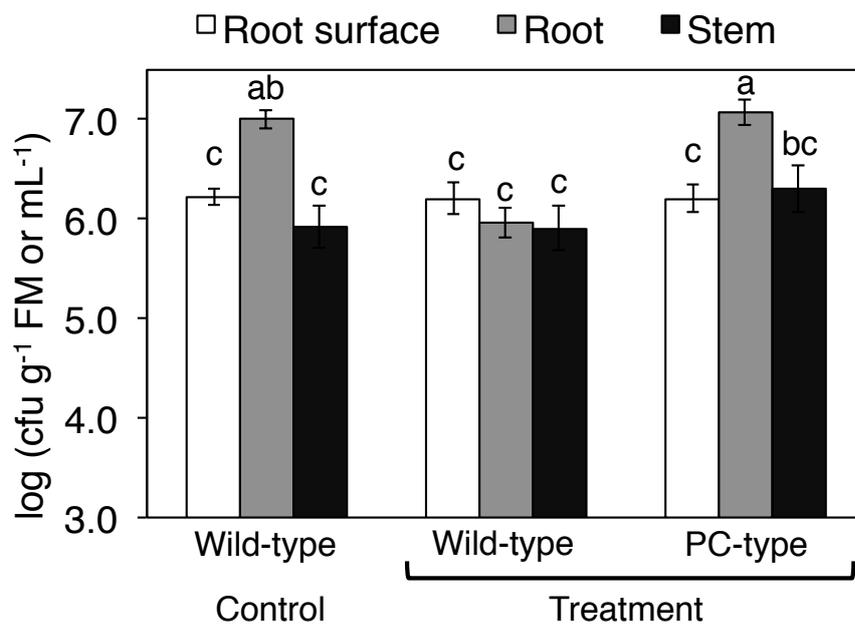


Fig. 4-9 Colonization of *gfp*-tagged wild-type strain and *DsRed2*-tagged PC-type strain in tomato tissues at 7 days after inoculation. Densities of bacteria in root and stem calculate as log (cfu g⁻¹FM) and that in the root-surface calculate as log (cfu mL⁻¹). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$) according to the Tukey-Kramer test. Bars indicate SE (n=9-10).

蛍光顕微鏡による赤色蛍光菌株と緑色蛍光菌株の植物組織内定着の観察

対照区の根における緑色蛍光菌株は、発病の有無に関わらず根毛、皮層、皮層の細胞間隙に高密度で定着した (Fig. 4-10A, B, C, D). 導管および導管周辺細胞内における緑色蛍光菌株の定着は、無病徴個体ではみられず、発病個体でのみ高密度で観察された (Fig. 4-10E, F). 処理区の根における赤色蛍光菌株は、根毛、皮層、皮層の細胞間隙を含む根の広範囲に高密度で定着し、緑色蛍光菌株の定着は低密度であった (Fig. 4-11). 導管内における赤色蛍光菌株の定着は、菌接種時の断根部で観察され、その上部の根では導管内よりも導管周辺細胞に高密度な定着が観察された (Fig. 4-12 A-1, B-1). また、そのような組織では、緑色蛍光菌株の導管内への侵入は確認されなかった (Fig. 4-12 A-2, B-2). 赤色蛍光菌株が高密度で定着した組織内 (Fig. 4-13 A-1, B-1) では、緑色蛍光菌株の定着は低密度であった (Fig. 4-13 A-2, B-2). 一方、処理区の発病個体では赤色蛍光菌株の組織内定着はみられず (Fig. 4-13 C-1, D-1), 緑色蛍光菌株は無病徴個体よりも高密度な組織内定着が観察された (Fig. 4-13 C-2, D-2).

考察

本研究において、作出された青枯病菌の蛍光菌株は、緑色蛍光菌株は培地上で流動性を呈し、トマトに対して病原性を示したため、病原性株 (Wild-type 株) として利用した。赤色蛍光菌株は培地上で非流動性を示し、トマトに対して非病原性であり、赤色蛍光菌株を前接種後、緑色蛍光菌株を接種した植物では青枯病菌の発病が抑制されたことから表現型変異株 (PC-type) として利用した。

菌の定量方法は、培地を用いたコロニー計数や顕微鏡による細胞数の計数が一般的であるが、2種類の菌が共存する実験系で菌を定量する場合には、菌の識別が重要である。本研究で作出した青枯病菌の緑色蛍光菌株には、カナマイシン耐性遺伝子と *gfp* 遺伝子を付与した組換えプラスミドを

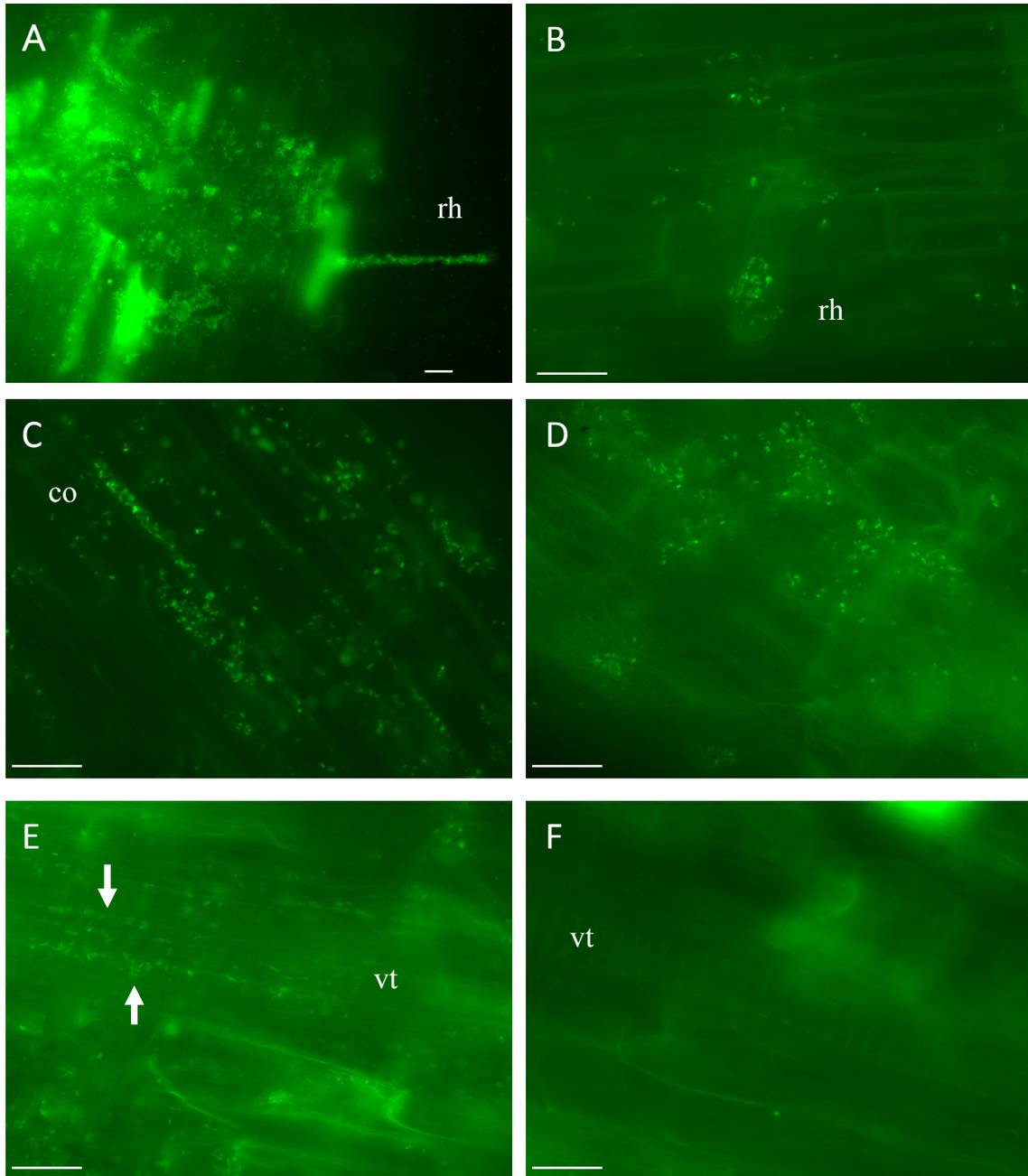


Fig. 4-10 Fluorescent images showing colonization of *gfp*-tagged wild-type strain of *R. solanacearum* in tomato roots of control. (A, C, and E) wilting plants at 6 days after inoculation; (B, D, and F) non-wilting plants at 6 days after inoculation; rh - root hair; co - cortical cells; vt - vascular tissue. Arrows show colonization in vascular tissues. Bars show 20 μ m.

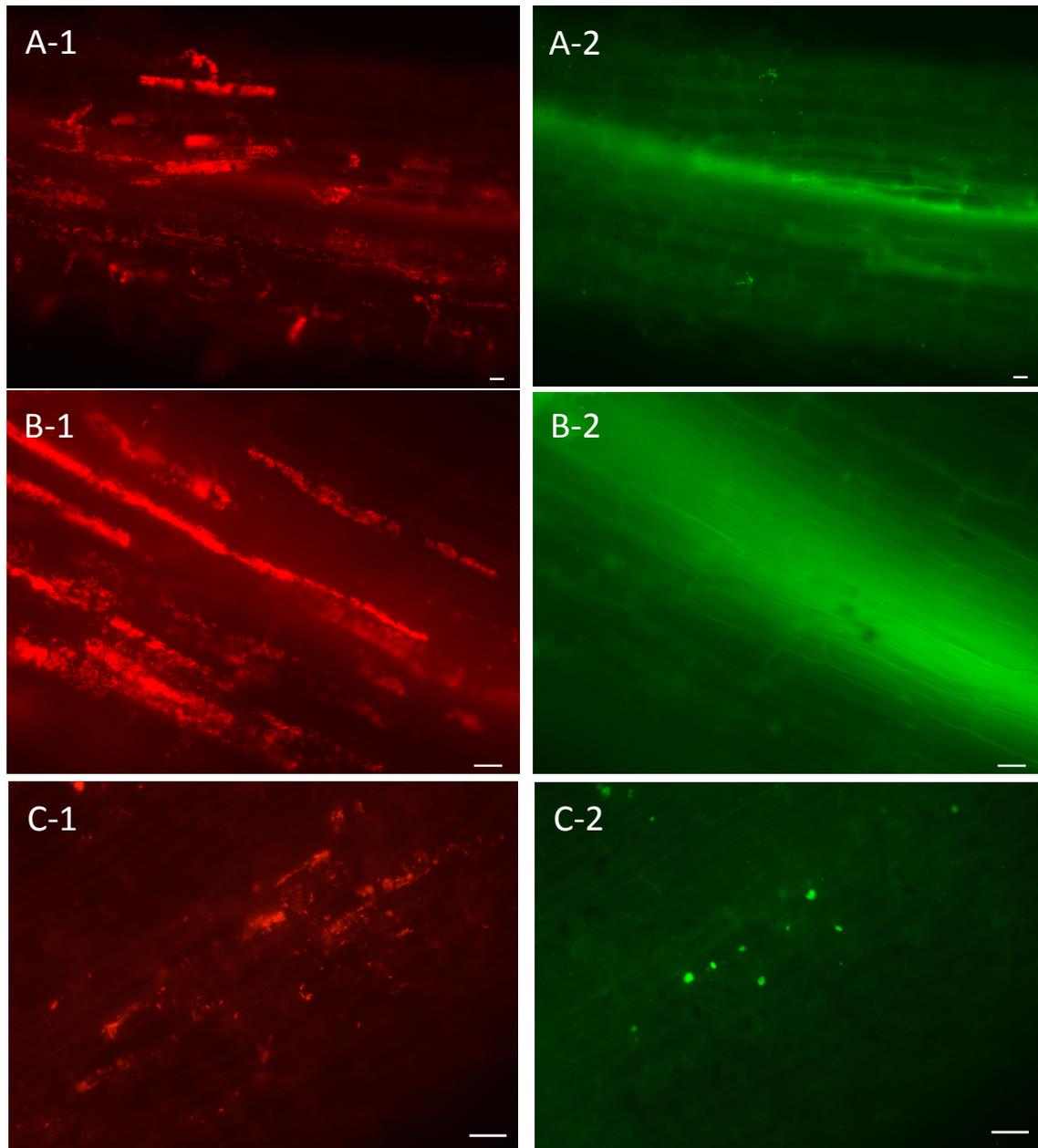


Fig. 4-11 Fluorescent images showing colonization of *DsRed2*-tagged PC-type strain (A-1, B-1, and C-1), and *gfp*-tagged wild-type strain (A-2, B-2, and C-2) of *R. solanacearum* in roots of non-wilting tomato of treatment at 4 days after inoculation. Bars show 20 μm .

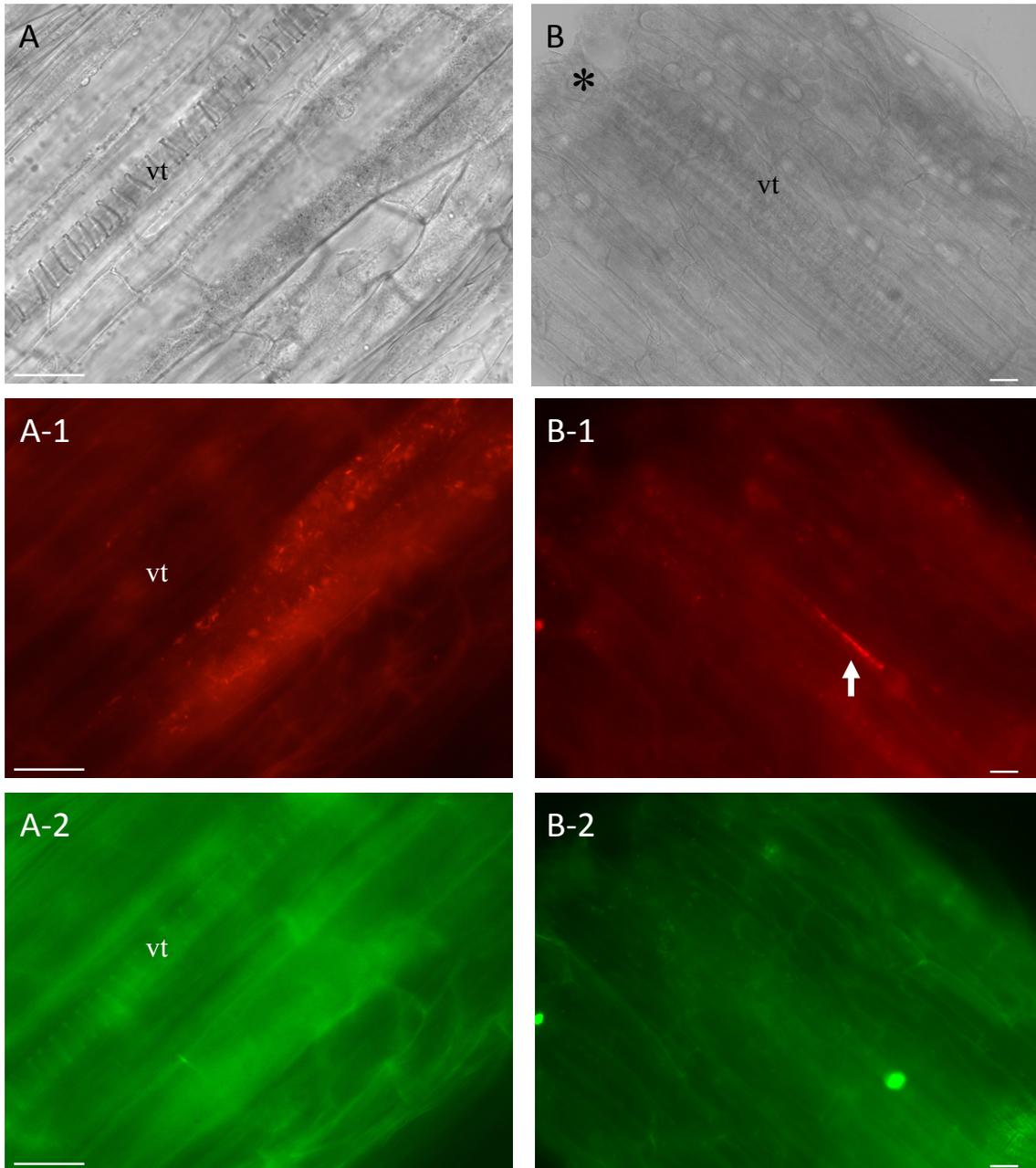


Fig. 4-12 Microscopy images showing colonization of *DsRed2*-tagged PC-type strain (A-1 and B-1), and *gfp*-tagged wild-type strain (A-2 and B-2) of *R. solanacearum* in vascular tissues (vt) of non-wilting tomato roots of treatment at 2 days after inoculation. A and B show light microscopy images of tomato roots and the asterisk shows cutting zone at the inoculation. The arrow shows colonization in vascular tissues. Bars show 20 μ m.

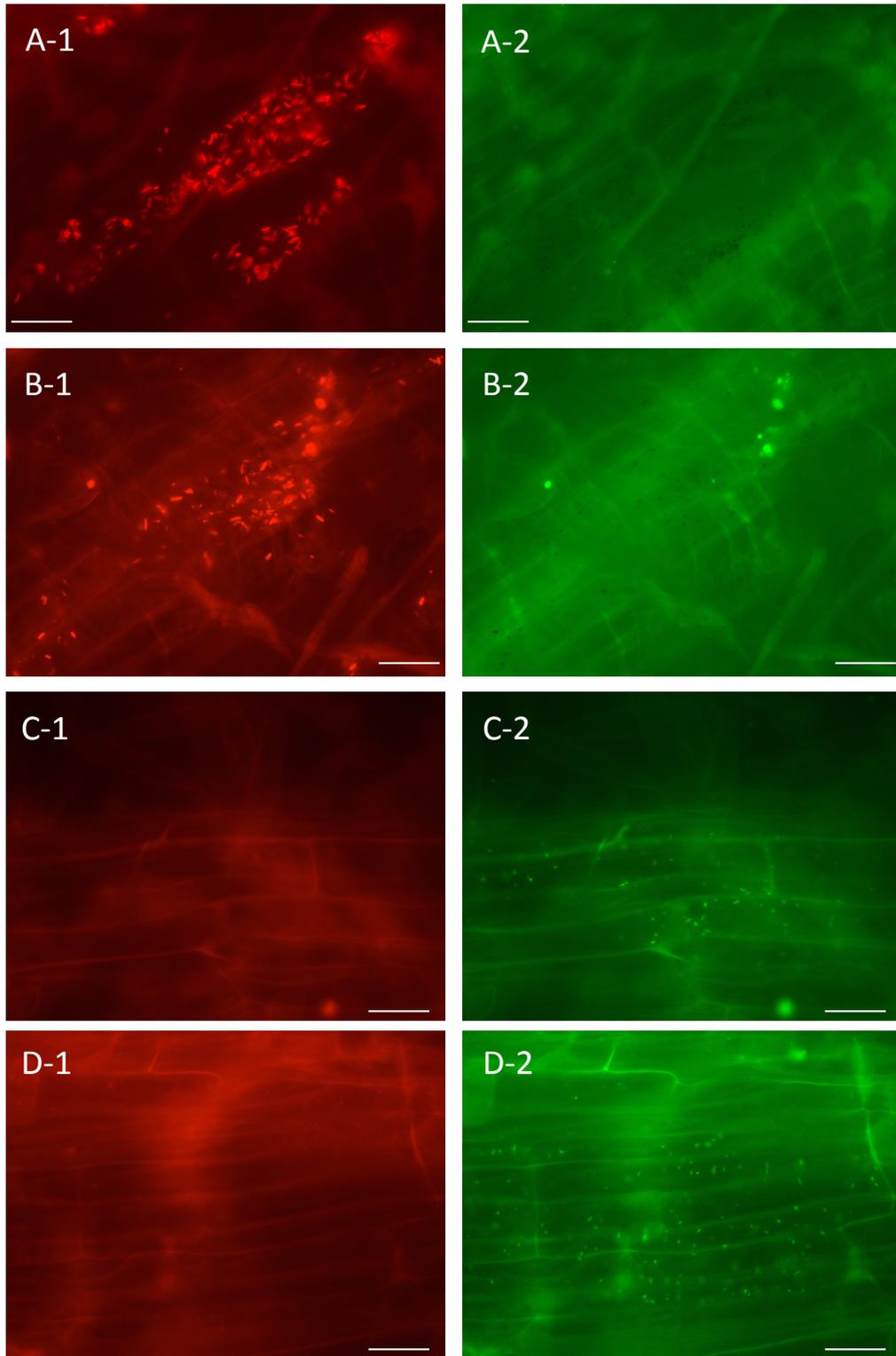


Fig. 4-13 Fluorescent images showing colonization of *DsRed2*-tagged PC-type strain (A-1, B-1, C-1, and D-1), and *gfp*-tagged wild-type strain (A-2, B-2, C-2, and D-2) of *R. solanacearum* in tomato roots of treatment at 6 days after inoculation. Samples of A and B are non-wilting plants. Samples of C and D are wilting plant. Bars show 20 μm .

導入し、赤色蛍光菌株には、ゲンタマイシン耐性遺伝子と *DsRed2* 遺伝子を付与した組換えプラスミドを導入した。そのため、培地による定量では、各菌の耐性に対応した抗生物質を添加した培地で定量が可能であり、カナマイシン添加培地では緑色蛍光菌株を、ゲンタマイシン添加培地では赤色蛍光菌株を定量することができる。また、蛍光顕微鏡下では緑色蛍光菌株は緑色に発光し、赤色蛍光菌株は赤色に発光するため、検鏡下における菌株の識別にも有効な菌株である。

青枯病菌と他の細菌が共存する場合、青枯病菌のみの検出には原・小野培地が有効である（原・小野，1984）。植物内からの菌を分離した場合、原・小野培地における両菌株の検出率は100%であったが、各抗生物質を添加した原・小野培地では緑色蛍光菌株の検出率は著しく低下し、赤色蛍光菌株の検出率もわずかに低下し、両菌株の菌密度は抗生物質添加 BGT 寒天培地よりも低下した。このことから、抗生物質を添加した原・小野培地では、蛍光菌株の生育阻害やプラスミドの脱落が誘発されることが考えられた。

一方、BGT 寒天培地に各抗生物質を添加した場合では、両菌株の検出率は100%であり、緑色蛍光菌株の菌密度は原・小野培地と同等の菌密度であった。また、赤色蛍光菌株の菌密度は、原・小野培地とゲンタマイシン添加原・小野培地の値よりも高かった。これらの結果より、抗生物質添加 BGT 培地で両蛍光菌株が高濃度で検出されたことから、両蛍光菌株は植物内での増殖が可能であり、プラスミドの脱落は少ないと考えられた。また、蛍光菌株の正確な定量には抗生物質を添加した BGT 寒天培地が適することが明らかになった。

本研究において、赤色蛍光菌株（PC-type 株）を接種した植物では、緑色蛍光菌株（Wild-type 株）感染後の青枯病の発病が対照区に比べて抑制された。植物内の菌の定着量を調査したところ、根面と茎内の緑色蛍光菌株の定着量は、対照区と処理区間に有意な差はなかったが、対照区の植物では根内において緑色蛍光菌株の高密度な定着が確認され、処理区の植物では、赤色蛍光菌株が高密度

で定着し、緑色蛍光菌株の定着量は有意に低下した。青枯病の発病には、根の細胞間隙内における病原菌の増殖が関与することが考えられている (Hikichi et al., 2017)。本研究の結果は既報を支持するものと考えられ、PC 株による青枯病の発病抑制には、根内における野生株の増殖抑制が関与すると推察された。

トマトの根の組織は、外側から根毛を発生する表皮細胞、皮層、導管を含む維管束組織を形成している (鈴木, 2010)。また、植物細胞壁は、セミロース、ヘミセルロース、ペクチン、リグニンから構成される。植物細胞壁はセルロース (β -1, 4-D-グルカン) が主要な構成要素とし、ヘミセルロースやペクチンはセルロースの直鎖状骨格に網状に結合することで、細胞強度を高めている。導管等の維管束組織は、ペクチン含量は少ないのに対して、セルロースと直鎖状のヘミセルロースの割合が多く、さらにフェノール化合物であるリグニンが蓄積することで強度を高めている (大内, 1990 ; 西谷, 2011)。導管内における緑色蛍光菌株と赤色蛍光菌株の定着性には違いがみられ、緑色蛍光菌株は導管内に定着したのに対して、赤色蛍光菌株は接種時に断根した部分の導管でのみ定着が観察され、その上部組織の導管内では低密度であった。その要因として、青枯病菌の野生株は、セルロースとヘミセルロースのキシログルカンの β -(1-4)-グルコシド結合をエンド型で加水分解する β -1,4-エンドグルカナーゼ (Egl) とペクチン中のメチルエステルをカルボキシル基部分で加水分解するペクチンメチルエステラーゼ (Pme) を生産するため (Roberts et al., 1988 ; Denny et al., 1988 ; Denny and Baek, 1991 ; Spok et al., 1991), 緑色蛍光菌株は Egl と Pme によってセルロース、ヘミセルロース、ペクチンを分解することで、根の広範囲に定着でき、導管内まで侵入したと考えられる。一方、PC 株はペクチンの α -(1-4)-グリコシド結合をランダムに加水分解するポリガラクトナーゼ (PehA) の活性が野生株よりも増加しており (Kelman, 1954 ; Denny et al., 1988 ; Schell et al., 1988 ; Brumbley and Denny, 1990), PehA により植物細胞壁のペクチンを分解することで、皮層細胞には侵

入できるが、導管などのペクチン含量が少ない組織は分解することができないため、導管内での定着が低かったと考えられる。また、断根部の導管内でのみ赤色蛍光菌株の定着がみられた要因は、上部組織の導管内では赤色蛍光菌株の定着がみられなかったことから、赤色蛍光菌株の自発的な定着ではなく根の毛細血管現象による侵入が考えられる。

蛍光顕微鏡を用いて植物根内での赤色蛍光菌株の定着による緑色蛍光菌株の定着抑制について調査した結果をもとに、各処理区における菌の定着パターンを作成した (Fig. 4-14)。対照区の根内では、緑色蛍光菌株は根毛、皮層、皮層の細胞間隙中、導管および導管周辺細胞に高密度で定着した。一方、処理区では、根毛、皮層、皮層の細胞間隙中および導管周辺細胞に赤色蛍光菌株が高密度で定着し、そのような組織では緑色蛍光菌株の定着は低密度であった。また、対照的に発病個体の根では、赤色蛍光菌株の定着が極めて低く、緑色蛍光菌株の広範囲な定着が観察された。この結果から、菌の定着場所をめぐる競合が生じることが推察され、根内における野生株の定着抑制には、PC 株の高密度な組織内定着が重要であると推察された。しかし、処理区の根の導管内に赤色蛍光菌株がほとんど定着していなかったにも関わらず、導管内での緑色蛍光菌株の定着がみられなかった。その要因として、根の表皮、皮層、維管束へと向かう水平方向からの緑色蛍光菌株の侵入・定着に対しては、表皮、皮層、細胞間隙および導管周辺細胞に赤色蛍光菌株が高密度で定着することで障壁となり、緑色蛍光菌株の定着が抑制されたと考えられる。一方、赤色蛍光菌株を接種した植物では、上部組織の茎内でも対照区と同等の緑色蛍光菌株の移行が確認されたため、導管流に沿った垂直方向への緑色蛍光菌株の移行に対しては、赤色蛍光菌株による緑色蛍光菌株の定着阻害は確認できなかった。また、蛍光顕微鏡を用いて植物茎内の緑色蛍光菌株の定着を観察したが、茎の自家蛍光が強く、菌の発光が弱まるため、植物細胞と菌との識別が困難であった (データ省略)。そのため、垂直方向 (茎内) への菌の移行を明らかにするためには、共焦点レーザー顕微鏡や電子顕

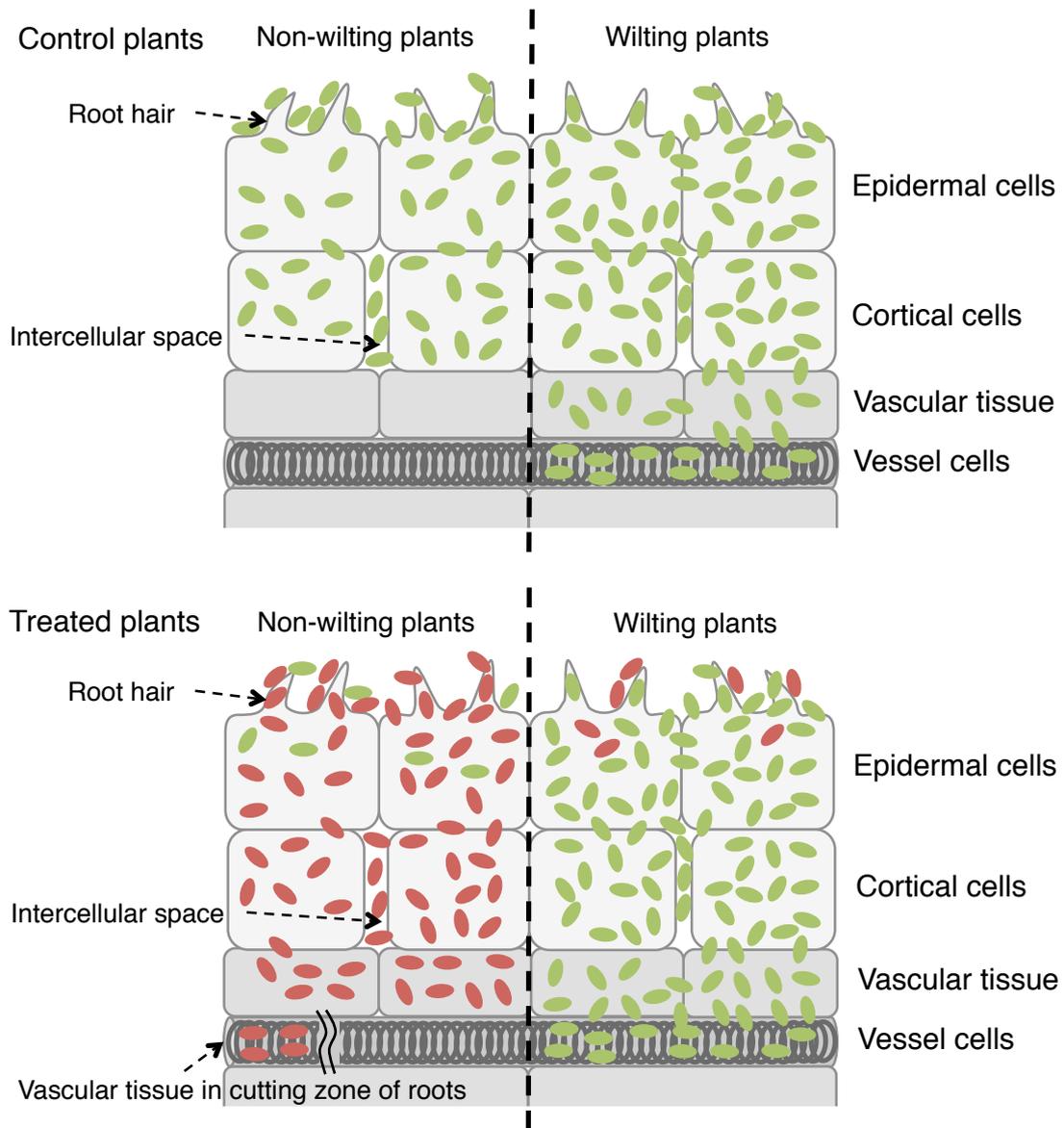


Fig. 4-14 Colonization pattern of wild-type strain (Green colony) and PC mutant (Red colony) in plant roots.

微鏡を用いた観察法を用いるなど検討が必要である。

摘要

植物組織内における野生株と PC 株の挙動を調査するため、*gfp* 遺伝子で標識した緑色蛍光菌株 (Wild-type 株) と、*DsRed2* 遺伝子で標識した赤色蛍光菌株 (PC-type 株) を作出し、トマト 'Micro-Tom' に菌を接種後、根内における両菌株の定着を蛍光顕微鏡下で観察した。緑色蛍光菌株を単独で接種した対照区では、緑色蛍光菌株は根毛、皮層、皮層の細胞間隙に高密度で定着し、導管内では発病個体において高密度であった。赤色蛍光菌株を前接種後、緑色蛍光菌株を接種したトマトでは、青枯病の発病が抑制された。赤色蛍光菌株は根毛、皮層、皮層の細胞間隙および導管周辺の細胞内に高密度かつ広範囲に定着したが、導管内では低密度かつ局在的に存在した。また、赤色蛍光菌株が高密度で定着した根内では、皮層および皮層細胞間隙における緑色蛍光菌株の定着は抑制され、導管内での定着もみられなかった。以上より、PC 株による青枯病の防除機構には、根における PC 株の高密度な定着による野生株の根組織内への侵入抑制が関与すると推察された。

第5章 表現型変異株接種による植物への抵抗性誘導と

植物の生育・果実品質への影響

緒言

Pseudomonas 属や *Bacillus* 属細菌などの有用微生物による病害防除機構には、有用細菌による植物への抵抗性誘導が関与すると考えられおり、抵抗性誘導について広い微生物-植物間で研究が行われている (Jetiyanon, 2007 ; Vanitha and Umesha, 2011 ; Hyakumachi et al., 2013). 微生物が感染した植物内では、感染特異的 (PR) タンパク質が発現する 경우가多く、アミノ酸配列や生化学的機能性の違いに基づいて 17 種の PR タンパク質が特定されており、それらは抵抗性誘導の指標として用いられている. (van Loon et al., 2006). 糸状菌 *Pythium oligandrum* を接種したトマトでは、植物内に β -1,3-グルカナーゼ (PR-2)、キチナーゼ (PR-3)、ソーマチン様タンパク質 (PR-5) およびプロテイナーゼインヒビター (PR-6) 遺伝子が誘導されることが報告されている (Hase et al., 2006, 2008) また、Hyakumachi et al (2013) は、*B. thuringiensis* を接種したトマトでは、PR-1、 β -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼ遺伝子の発現が誘導されることを報告している. 一方で、青枯病菌の PC 株を接種した植物では、PR タンパク質遺伝子の発現は解析されておらず、PC 株による病害防除機構に抵抗性誘導が関与するかは明らかでない. そこで本研究では、PC 株を接種したトマトの PR タンパク質遺伝子の発現誘導を調査した.

植物への *Pseudomonas* 属や *Bacillus* 属細菌の接種は、植物内の抵抗性を誘導するだけでなく、植物の生長を促進することから、植物生長促進根圏細菌 (PGPR) として知られている (Jetiyanon., 2007, Vanitha and Umesha, 2011). トマトへの PGPR の接種は、植物新鮮重の増加、葉中の葉緑素の増加、果実の肥大などの植物の生育にとって良い効果をもたらすことが報告されている (Thanh et al.,

2009). 一方で, Maurhofer et al. (1995) は, PGPR に属する *P. fluorescens* をトマトに接種した場合では, 植物の生長が抑制されると述べている. これまでに PC 株接種が植物の生長に及ぼす影響を調査された研究例はなく, PC 株を利用した病害防除法を確立するためには, PC 株接種が作物の生育, 収量および品質に悪影響を及ぼさないことが重要となる. そこで, PC 株を接種したトマトを栽培し, トマトの生育, 果実収量および果実品質を調査した.

材料および方法

供試植物

罹病性トマト (*Solanum lycopersicum* L.) ‘Micro-Tom’ (Tomato growers supply company, USA) を供試した. 種子を 70%エタノールに 10 秒間浸漬後, 有効塩素 1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で, 10 分間攪拌して表面殺菌を行った. その後, 滅菌水で 1 分間, 別の滅菌水で 3 分間洗浄し, バーミキュライト (中粒) もしくは石英砂を詰めた 72 穴セルトレイに播種した. 播種後, 暗黒条件下の人工気象器内 (12 時間 25°C/12 時間 20°C) で発芽させた. 発芽後, OAT ハウス B 処方 1 単位 (OAT アグリオ) を液肥として適宜与えた.

供試細菌

青枯病菌の野生株として, トマトより分離された野生株 8238 (MAFF 301528, レース 1, biovar 4, phylotype I) の 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ リファンピシン自然耐性株である 8238rif を供試し, PC 株は野生株 8238 に感染したナスより分離された PC 株の 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ストレプトマイシン自然耐性株である E-PCstr を供試した.

トマトへの PC 株接種による青枯病防除効果

PC 株接種によるトマト青枯病防除効果の調査は, 土耕栽培を想定して青枯病菌を含む汚染土壌に

トマトを移植する方法と、養液栽培を想定して青枯病菌を含む養液にトマトを移植する方法の2つの方法で行った。

土耕栽培を想定した PC 株による青枯病防除効果の調査は以下の方法で行った。パーミキュライトに播種後 21 日齢の植物の根をハサミで 1/3 程度切断し、菌密度を約 10^8 cfu mL⁻¹ に調製した PC 株の菌液 20 mL に 30 分間浸漬した。また、対照として滅菌水 20 mL に 30 分間浸漬した。青枯病菌汚染土壌の調製として、タネまき培土（タキイ種苗）を詰めた 128 穴セルトレイに、菌密度を約 10^7 cfu mL⁻¹ に調製した野生株の菌液を 5 mL ずつ灌注し、野生株汚染土壌とした。PC 株の菌液もしくは滅菌水に浸漬した幼苗を野生株汚染土壌に移植し、人工気象器内（明期 12 時間 30℃，暗期 12 時間 28℃）で管理し、14 日間の発病率を調査した。なお、灌漑水として水道水を与え、実験は各区 12 個体を用いて 3 反復を行った。

養液栽培を想定した PC 株による青枯病防除効果の調査は以下の方法で行なった。石英砂に播種後 20 日齢の植物を供試し、根に付着した石英砂を取り除くため、滅菌水で 3 回洗浄した。PC 株の接種は、15 mL 容チューブ内で行い、菌密度を約 10^8 cfu mL⁻¹ に調製した E-PCstr の菌液 14 mL に植物根部を浸漬し、対照として滅菌水 14 mL に浸漬し、人工気象器内（明期 12 時間 28℃，暗期 12 時間 28℃）で 24 時間浸漬接種した。その後、植物を液肥（OAT ハウス B 処方）40 mL を入れた 50 mL 容チューブ内に移植し、5 日間管理した。野生株の接種は、50 mL 容チューブ内で行い、菌密度を約 10^7 cfu mL⁻¹ に調製した野生株 8238rif の菌液 40 mL に、根の先端から上部 1 cm を切断した植物根部を浸漬し、人工気象器内（明期 12 時間 30℃，暗期 12 時間 28℃）で 14 日間の発病率を調査した。なお、灌漑水として水道水もしくは液肥（OAT ハウス B 処方 1 単位）を適宜与え、実験は各区 15 個体を用いて 3 反復行った。

トマトへの PC 株接種による感染特異的タンパク質遺伝子の発現誘導

石英砂に播種後 20 日齢の植物を供試し、植物根部を滅菌水で 3 回洗浄後、E-PCstr の菌液（約 10^8 cfu mL⁻¹）14 mL に 24 時間浸漬し、対照として滅菌水 14 mL に 24 時間浸漬した。植物根部を採取し、RNAzol RT Reagent kit（コスモバイオ）を用いて Total RNA を抽出した。RT-PCR は、Prime Script One Step RT-PCR kit ver. 2（タカラバイオ）を用いて行い、Total RNA は、反応系全量 50 μ L 中に 0.02 μ g μ L⁻¹ の濃度になるように添加した。トマト感染特異的（PR）タンパク質遺伝子のプライマーには、酸性 PR-1 タンパク質（PR-1a）、酸性 β -1,3-グルカナーゼ（PR-2a）、塩基性 β -1,3-グルカナーゼ（PR-2b）、塩基性キチナーゼ（PR-3b）、塩基性ソーマチン様タンパク質（PR-5b）およびプロテイナーゼインヒビター II（PR-6）の各フォワードプライマーとリバースプライマーを用いた（Table 5-1）。逆転写反応は 50°C : 30 分、94°C : 2 分で行い、PCR 反応は 94°C : 1 分、55°C : 1 分、73°C : 1 分で 20 サイクル行った。PCR 産物 5 μ L に対して、6 \times Loding Dye（TOYOBO）2 μ L を添加し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動した。ゲルは、エチジウムブロマイドで 15 分染色後、蒸留水で 15 分洗浄し、UV 照射下でバンドの有無を確認した。なお、DNA サイズマーカーとして、 ϕ X174/HaeIII マーカー（TOYOBO）を用いた。

トマトへの PC 株接種によるトマトの生育、果実収量および果実品質に及ぼす影響

バーミキュライトに播種後 30 日齢の植物を供試し、植物の根部に E-PCstr の菌液（ 10^8 cfu mL⁻¹）を浸漬し、対照として滅菌水に浸漬し、人工気象器内（明期 12 時間 28°C、暗期 12 時間 28°C）で 24 時間静置した。その後、植物はバーミキュライトを詰めた 12 cm ポットに移植し、人工気象器内（明期 12 時間 25°C、暗期 12 時間 20°C）で管理し、1 日おきに液肥（OAT ハウス B 処方）200 mL を与え、80 日間栽培した。なお、実験は各区 9 個体を用いて行った。

果実は、1 株あたり 8-10 個着果するように管理し、赤色に成熟した果実を収穫し、果実重を測定した。果実品質として果実の糖度と酸度を測定した。果実を磨砕後、2600 \times g で遠心し、上澄み 1 mL

Table 5-1 List of primers for tomato *PR* genes

| PR protein genes | Primer | Primer sequence | References |
|-------------------------------------------------|--------|-----------------------------------|---------------------------------------------------|
| <i>PR-1a</i> (Acidic <i>PR-1</i>) | PR1a-F | 5'-CATAACGATGCCCCGTGCCCAAGTCGG-3' | van Kan et al., 1992; Kawamura et al., 2009 |
| | PR1a-R | 5'-GTAAGGACGTTGTCCGATCCAGTTGCC-3' | |
| <i>PR-2a</i> (Acidic β -1,3 glucanase) | PR2a-F | 5'-CAGGAGCGCAGCCTATCGGAGTATG-3' | van Kan et al., 1992; Kawamura et al., 2009 |
| | PR2a-R | 5'-GGCCTCTGGTCAGGTTTAAAGAGTC-3' | |
| <i>PR-2b</i> (Basic β -1,3 glucanase) | PR2b-F | 5'-GTGCTTCTAGGATTACTTGTCGCCACC-3' | van Kan et al., 1992; Hase et al., 2006 |
| | PR2b-R | 5'-CTCACTAGTGAGTGAAGAAGCAGTGC-3' | |
| <i>PR-3b</i> (Basic chinase) | PR3b-F | 5'-TTCTGTGCTTTTGCTGTCTGCCTCTG-3' | Danhash et al., 1993; Hase et al., 2006 |
| | PR3b-R | 5'-TCCAAAAGACCTCTGATTGCCACAA-3' | |
| <i>PR-5b</i> (Basic thaumatin-like protein) | PR5b-F | 5'-TCCATACACCGTCTGGGCGGCGTCG-3' | Rodrigo et al., 1993; Hase et al., 2006 |
| | PR5b-R | 5'-TTCATCACTTGAGGGCATCTCCAAG-3' | |
| <i>PR-6</i> (Proteinase inhibitor II) | PR6-F | 5'-TCCTTGCTCACCTACTTGTCTTGG-3' | Gadea et al., 1996; Hase et al., 2008 |
| | PR6-R | 5'-TTCCTTATGCTGTGGAAATACTTTG-3' | |

をマイクロチューブに移し、15,000 × g で再度遠心した。遠心後の上清を試料液とし、糖度はデジタル糖度計（アタゴ）、酸度はフルーツテスターFT-1 プラス（東京硝子器械）を用いて測定した。また、果実を除く植物体は地際部から切断し、地上部と地下部の新鮮重を測定した。

結果

トマトへの PC 株接種による青枯病防除効果

土耕栽培を想定し、青枯病菌汚染土壌にトマトを移植した場合と、養液栽培を想定し、青枯病菌を含む溶液中にトマトを移植した場合とでは、トマトの発病率に有意な差はなく、70～80%の発病率を示した（Fig. 5-1）。一方、PC 株を前接種した植物を移植した場合では、トマトの発病率は10～20%と有意に低下し、土耕と水耕の両試験区間で有意な差はなかった。

トマトへの PC 株接種による感染特異的タンパク質遺伝子の発現誘導

PC 株を接種したトマトの根において、*PR-2b*、*PR-3b*、*PR-5b* および *PR-6* の塩基性 PR タンパク質遺伝子が発現し、対照区と比べて強い発現が確認された（Fig. 5-2）。一方、*PR-1a* と *PR-2a* の酸性 PR タンパク質遺伝子の発現は、対照区と PC 株接種区の両区でみられなかった。

トマトへの PC 株接種によるトマトの生育、果実収量および果実品質に及ぼす影響

PC 株を前接種し、トマトを栽培した場合、植物の地上部・地下部新鮮重、果実収量、果実重および果実の糖度・酸度は、対照区と比べて有意な差はなかった（Table 5-2）。

考察

本研究では、PC 株接種によるトマトへの抵抗性誘導を明らかにするため、トマト感染特異的 (PR) タンパク質遺伝子を指標として、6 種の PR タンパク質遺伝子を半定量解析した。PC 株を接種した

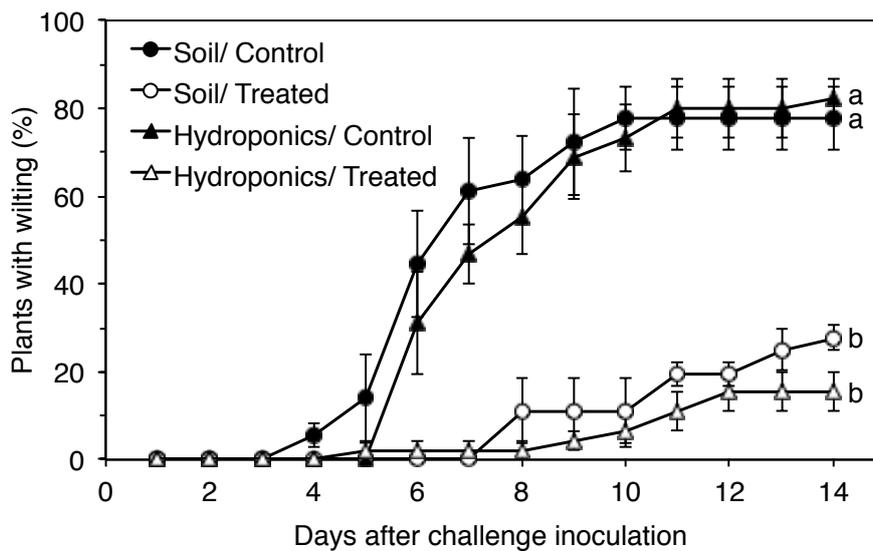


Fig. 5-1 Disease severity of bacterial wilt in tomato plants pre-inoculated with E-PCstr followed by challenge inoculation with 8238rif in the soil and the hydroponics-tests. The plants were pre-inoculated with bacterial suspension of E-PCstr (Treated) or SDW (Control). The seedlings were challenge-inoculated with 8238rif. The graph was expressed as the average of percentage of wilted plants in three independent experiments with 15 plants (Hydroponic-test) or 12 plants (Soil-test) for each treatment. The different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in the inoculated tomatoes according to one-way ANOVA following the Tukey-Kramer test; the values of percentage were obtained through arcsine transformation. Bars show the standard errors.

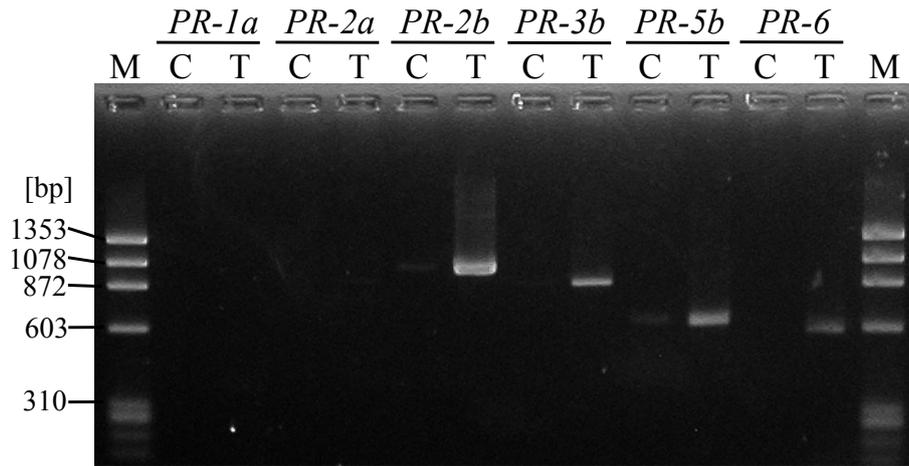


Fig. 5-2 Expression of pathogenesis-related protein genes in tomato plants inoculated with E-PCstr of *R. solanacearum*. Total RNA was extracted from roots of plants at 24 h after inoculation with SDW (C: Control) or E-PCstr (T: Treated). Transcripts of *PR* genes (*PR-1a*, *2a*, *2b*, *3b*, *5b*, *6*) in the root tissues of inoculated tomato plants were detected by RT-PCR. ϕ X174/*Hae* III-digest was used as DNA size marker (M: Marker).

Table 5-2 Effect of inoculation with the PC mutant of *R. solanacearum* on growth, yield and fruit qualities in tomato ‘Micro-Tom’.

| | Root fresh mass (g) | Shoot fresh mass (g) | Yield (g/plant) | Fruit weight (g) | Brix (%) | Acidity (%) |
|----------------|------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|-------------|----------------|
| Control | 6.2 ± 0.6 ^z | 25.4 ± 1.0 | 40.1 ± 1.3 | 4.4 ± 0.2 | 6.7 ± 0.4 | 1.17 ± 0.06 |
| Treated | 5.5 ± 0.9 | 25.1 ± 1.7 | 38.5 ± 2.1 | 4.2 ± 0.2 | 6.6 ± 0.3 | 1.15 ± 0.07 |
| <i>t</i> -test | ns ^y | ns | ns | ns | ns | ns |

^z The values expressed as mean ± standard error of 9 plants for each treatment.

^y The letter shows not significantly different according to the Student’s *t*-test ($P < 0.05$).

トマトの根部では、*PR-1* と *PR-2a* の酸性 PR タンパク質遺伝子の発現誘導は起こらず、対照区の植物には発現がみられなかった *PR-2b*, *PR-3b*, *PR-5b* および *PR-6* の塩基性 PR タンパク質遺伝子が発現したことから、PC 株による青枯病防除機構には、植物への抵抗性誘導が関与すると考えられた。植物への抵抗性誘導は、シグナル伝達経路の違いにより、全身獲得抵抗性と誘導全身抵抗性に大別される (Pieterse et al., 1998)。全身獲得抵抗性は、シグナル伝達物質としてサリチル酸が関与し、植物の過敏感反応によって誘導される抵抗性である (Yalpani et al., 1991 ; Pieterse and van Loon, 1999)。一方、誘導全身抵抗性は、シグナル伝達物質としてジャスモン酸とエチレンが関与し、塩基性 PR タンパク質を誘導する経路であり (Niki et al., 1998 ; Ohtsubo et al., 1999)、PGPR などの非病原性微生物が感染した植物の根では、誘導全身抵抗性が生じることが報告されている (van Loon, 2007)。土壌生息性の非病原性卵菌 *Pythium oligandrum* を接種したトマトでは、サリチル酸依存性のシグナル伝達経路である *PR-1* と *PR-2a* の酸性 PR タンパク質遺伝子の誘導は起こらず、ジャスモン酸依存性のシグナル伝達経路である *PR-2b*, *PR-3b* および *PR-5b* とエチレン依存性のシグナル伝達経路である *PR-6* の塩基性 PR タンパク質遺伝子の発現が誘導されることが報告されている (Hase et al., 2006, 2008 ; Takenaka et al., 2008)。本研究の結果は既報と類似していたことから、PC 株による抵抗性誘導には、ジャスモン酸・エチレンがシグナル伝達物質となる誘導全身抵抗性が関与すると推察された。

Kiba et al. (2003) は、タバコには非病原性であるがトマトには病原性を有する青枯病菌 8107 株をタバコ葉に接種した場合、接種部では過敏感反応が誘導され、その周辺組織に *PR-1a* と *PR-1b* の発現が誘導されることを報告している。本研究では、青枯病菌 8238 株由来の PC 株である E-PCstr をトマト葉やナス葉に接種した場合、過敏感反応が誘導されたが (データ省略)、本 PC 株を接種したトマトの根系では *PR-1a* の発現はみられなかったことから、植物への抵抗性誘導は、接種する青

枯病菌の種類や植物組織によって異なることが予想される。今後は、異なる PC 株を接種した植物の根と葉における抵抗性誘導について調査する必要がある。

植物はエリシター（抵抗性誘導因子）と呼ばれる菌が生産する物質や菌体組織を認識し、抵抗性誘導を引き起こすことが知られている。エリシターとして、細菌性のタンパク質、ペプチド、糖タンパク質、多糖類、脂肪酸、抗生物質、シデロフォアなど様々な物質が関与すると考えられている。また、細菌が直接生産する物質だけでなく、菌によって分解された植物細胞壁のペクチン断片や糖ペプチドなどもエリシターとなり、それらは内生エリシターと呼ばれる（吉川，1990）。青枯病菌のエリシターに関する研究では、青枯病菌が生産する菌体外多糖類（EPS）（Milling et al., 2011）、青枯病菌の培養物に含まれる分子量 10 kDa 以上の熱安定性のタンパク質（Takabatake and Mukaiharu, 2011）、青枯病菌を含むグラム陰性細菌が生産する N-アシルホモセリンラクトン（AHLs）（Jayanna and Umesha, 2017）がエリシターとして機能することが報告されている。EPS や AHLs の合成に関与する遺伝子は PhcA タンパク質によって正に制御されており、PC 株は *phcA* 遺伝子の変異を受けていることから（Poussier et al., 2003; Genin and Denny, 2012）、PC 株によるトマトへの抵抗性誘導因子として、EPS や AHLs の関与は低いと考えられる。一方で、PC 株は *phcA* 遺伝子の変異により鞭毛の形成が促進され、運動性が向上するが（Denny et al., 1988; Brumbley and Denny, 1990）、青枯病菌の鞭毛タンパク質フラジェリンは、エリシターとして機能しないことが報告されている（Pfund et al., 2004）。GMI1000 株の $\Delta phcA$ 変異株は、野生株よりもアドヘシタンパク質遺伝子 3 種の発現量が増加しており、これらのタンパク質は細菌の付着因子として関与している（Khokhani et al., 2017）。この知見から、青枯病菌の野生株接種と PC 株接種では、植物に認識されるエリシターが異なることが予想され、PC 株が特異的に生産する物質がエリシターとして機能する可能性があり、今後検討する必要がある。

トマトの栽培は、土耕栽培のみならず養液栽培が普及しており、養液栽培においても青枯病の発生が問題となっている (Jenkins and Averre, 1983 ; 森田・手塚, 1986). これまで、PC 株を利用した青枯病防除法は、土耕栽培を想定しており (Hara and Ono, 1991 ; Arwiyanto et al., 1994a ; 巖原ら, 2002 ; 小川ら, 2011, 2012a), 養液栽培を想定した防除効果の調査は行われていない. そこで本研究では、土耕栽培と養液栽培を想定し、PC 株を前接種したトマトを青枯病菌汚染土壌と青枯病菌を含む水溶液に移植し、PC 株による青枯病防除効果を比較した. PC 株を前接種したトマトでは、両試験区で青枯病の発病が有意に低下し、養液栽培を想定した簡易的な試験においても PC 株による青枯病防除効果が確認された. このことから、PC 株を利用した青枯病防除法は、養液栽培においても適用できることが示唆された. また、本研究において、トマトに PC 株を接種した場合には、植物の生育、果実収量および品質には対照区との差はなく、植物への PC 株接種は植物生長に悪影響を及ぼさなかったことから、PC 株は青枯病防除資材として十分に利用可能であると考えられる. 今後は、実際のトマト栽培を想定し、様々なトマト品種を用いて土耕栽培と養液栽培における PC 株による防除効果と植物の生育への影響を調査し、本防除技術の実用性を高める必要がある.

摘要

PC 株による植物への抵抗性誘導を明らかにするため、PC 株を接種したトマト 'Micro-Tom' の根における感染特異的 (PR) タンパク質遺伝子の発現を半定量解析した. PC 株を接種したトマトでは、無接種の植物には発現がみられなかった *PR-2b* (β -1,3 グルカナーゼ), *PR-3b* (キチナーゼ), *PR-5b* (ソーマチン様タンパク質), *PR-6* (プロテイナーゼインヒビター II) の塩基性 PR 遺伝子の発現が誘導された. この結果から、PC 株による青枯病防除には植物への抵抗性誘導が関与するこ

とが示唆された。また、PC 株を接種したトマトの生育、果実収量および果実品質を調査した結果、無接種の植物と比べて有意な差はなく、PC 株接種による植物への悪影響はなかった。

第6章 総合考察

トマト、ナスなどのナス科植物の栽培において、土壌伝染性細菌 *Ralstonia solanacearum* による青枯病の発生は、作物の安定生産を脅かす深刻な問題となっている。本病害は、熱帯・亜熱帯・温帯地域の温暖な気候で発生しやすく、ナス科植物をはじめ 200 種以上の植物で発生が確認されている (Hayward, 1991)。今後、地球温暖化の進行により被害が拡大し、作物生産に甚大な損害を及ぼすことが危惧される。本病害の防除法として、化学農薬による土壌燻蒸消毒と抵抗性台木植物を利用した接木栽培が普及している。しかし、環境負荷の低減や食品の安全・安心の観点から、化学農薬を用いない有機的な防除法の開発が求められている (Fravel, 2005)。また、台木植物を利用した接木栽培でも青枯病の発生が問題となっており (Krausz and Thurston, 1975 ; Date et al., 1994 ; Nakaho et al., 1996 ; 伊達・那須, 2004 ; 中曽根, 2008)、環境保全型の新たな防除法の確立が急務の課題となっている。環境保全型の防除技術として、有用微生物を用いた生物的防除法への関心が高まり、いくつかの微生物資材が実用化されている。しかし、その数は世界的にみても極めて少なく、化学農薬の約 1% に過ぎない (Fravel, 2005)。また、日本においても、生物農薬として認可された資材は 26 剤と少なく、そのほとんどが 2000 年代に開発されているが、化学農薬に比べて効果が安定しないことや資材コストが高いなどの理由から普及していない資材も多い。(吉田・對馬, 2013 ; 百町ら, 2014)。現在、青枯病防除に有効な生物農薬はないのが現状であり、青枯病に対応した生物的防除技術の開発は早急な課題である。

これまでに青枯病菌の表現型変異株 (PC 株) を用いた青枯病の生物的防除法の研究が行われており、トマト、ナス、ジャガイモ、タバコなどのナス科植物に PC 株を前接種することで、発病が抑制されることが報告されている (Chen et al., 1984 ; Trigalet and Trigalet-Demery, 1990 ; Hara and Ono, 1991 ; Arwiyanto et al., 1994a, b ; 巖原ら, 2002 ; 小川ら, 2011, 2012a, b ; 黒木ら, 2016)。PC 株に

よる防除効果は、植物種、PC 株の系統、接種方法によって異なり、効果が不安定である。また、PC 株を利用した効果的な防除法の開発には、PC 株による病害防除機構の解明が不可欠である。そこで本論文では *R. solanacearum* の表現変異株 (PC 株) を利用した青枯病の生物的防除法の確立に向けて、青枯病防除に効果的な PC 株接種技術と PC 株による青枯病の発病抑制機構を明らかにすることを目的とした。第 2 章では培地中における PC 株と野生株の増殖特性と PC 株の培養ろ液による野生株の増殖抑制について、第 3 章ではトマト・ナス青枯病防除に有効な PC 株接種技術について、第 4 章では土壌・植物内における PC 株と野生株の定着特性と PC 株定着による野生株の定着抑制機構について、第 5 章では PC 株接種による植物への抵抗性誘導および植物の生育・果実品質に及ぼす影響について明らかにした。本章では、本研究の結果から PC 株による青枯病の発病抑制機構、効果的な PC 株接種技術および PC 株を利用した防除法開発の展望について総括する。

PC 株による防除効果は、土壌や植物への PC 株の接種方法や接種濃度、PC 株の菌株および植物種・品種によって異なることが報告されている (Chen and Echandi, 1984 ; Hara and Ono, 1991 ; Arwiyanto et al.,1994a ; 巖原ら, 2002 ; 小川ら, 2011)。PC 株を利用した防除技術を確立するためには、多くの品種に対して安定した防除効果を発揮する接種法の開発が必要である。本研究においても PC 株による防除効果は PC 株の接種方法、PC 株の接種濃度、PC 株の種類および植物種によって異なった。PC 株を混和した土壌でナスを育苗後、青枯病菌汚染土壌に移植した場合 (土壌混和接種法) では、PC 株接種から野生株の感染までの期間が短い場合でのみ、組織内に PC 株が高密度で定着し防除効果が得られた。また、ナス根部に PC 株菌液を浸漬接種後、青枯病菌汚染土壌に移植した場合 (浸漬接種法) では、土壌混和法よりも高い防除効果が得られる傾向にあった。また、発病が抑制された植物根部では、PC 株が高密度かつ高頻度で検出された (第 4 章第 1 節)。PC 株の防除効果は、野生株の接種濃度よりも高濃度の PC 株を接種した場合で顕著に発揮されることが報

告されている (Chen and Ehandi, 1984 ; Arwiyanto et al., 1994a ; 巖原ら, 2002 ; 小川ら, 2011). 本研究においても同様の結果が得られ, 両接種方法において低濃度の PC 株を接種した場合では防除効果は発揮されなかった. これらの結果から, PC 株による防除効果の発揮には, PC 株を植物内に高密度で定着させることが重要であると考えられる.

PC 株による防除効果は PC 株の種類と植物の品種によって異なることが報告されており (小川ら, 2011; 2012a), 実用的な防除技術の確立には, 複数の植物種・品種の青枯病防除に有効な PC 株を選抜する必要がある. 本研究において系統の異なる野生株から PC 株を作出し, 浸漬接種法によりトマトとナス 5 品種における青枯病防除効果を調査した結果, 防除効果は PC 株と植物種・品種との組み合わせにより異なった. その中でも菌群Ⅳの青枯病菌から作出された 8224PC や 8103PC の接種は, トマトと複数のナス品種に共通した高い防除効果を示した (第 3 章). これら PC 株はジャガイモ青枯病に対しても高い防除効果を示すことが明らかになっている (吉川ら, 2016), 菌群Ⅳの青枯病菌は, 複数のナス属植物に病原性を示し広い宿主範囲を有するため (尾崎・木村, 1992), PC 株に変異した場合でも複数の植物種に定着でき, 高い防除効果が発揮されると推察された. さらに, 8103PC を接種したナスでは, 糸状菌 *Verticillium dahliae* による半身萎凋病に対しても防除効果を発揮することが報告されており (前原ら, 2017), 本 PC 株接種はナス科植物における細菌病害や糸状菌病害を複合的に防除できる可能性がある.

PC 株による青枯病抑制機構として, PC 株が有する抗菌作用 (Hara and Ono, 1991; Arwiyanto et al., 1994a ; 小川ら, 2012a), PC 株と病原菌の植物内の定着場所や栄養をめぐる競合 (巖原ら, 2002 ; Trigalet and Trigalet-Demery, 1990), 植物内の PC 株の定着による病原菌の定着阻害 (小川ら, 2011, 2012b), 植物への抵抗性誘導 (Arwiyanto et al., 1994b) など複数の要因が考えられている. それらの要因の中でも, 青枯病防除に関わる主要因の特定ができれば, PC 株による効果的な防除法の開発

につながる期待できる。

本研究において、野生株に対して抗菌作用を示さない PC 株や抗菌活性のない PC 株の培養ろ液を接種した植物でも、青枯病の発病が抑制される場合があったことから、野生株に対する抗菌作用は、PC 株による青枯病の発病抑制機構の主要因ではないことが示唆された（第 3 章）。

PC 株と野生株の栄養をめぐる競合を明らかにするには、両菌株を混合培養し、菌の増殖を調査することが有効であると考えられる。小川ら（2011）は、ナス水抽出液を培地として用いて PC 株と野生株の混合培養した結果、菌株間に増殖の差は認められず、両菌株間に栄養の競合は生じないと述べている。本研究では、PC 株と病原性を同濃度で混合接種した液体培地、土壌、植物中における両菌株の増殖特性を調査した。BG 液体培地などの富栄養培地中で PC 株と野生株を混合接種し静置培養すると、培養後期に野生株のみ増殖が抑制されることが明らかになった。その現象は、1/100BG 液体培地や超純水中などの栄養の競合が生じやすい貧栄養培地中ではみられないことから、液体培地中における菌の増殖競合は、栄養の競合だけでなく他の要因の関与が示唆された（第 2 章第 1 節）。また、土壌中に両菌株を接種した場合においても、菌の増殖競合はみられなかった（第 4 章第 1 節）。一方、植物内においては、発病個体では野生株が優占し、無病徴個体でも PC 株と比べて野生株の菌密度が高い傾向にあった（第 4 章第 1 節）。これらの結果から、PC 株による青枯病の防除機構には、PC 株と野生株との栄養の競合よりも他の要因が関与していると考えられる。

青枯病菌はクオラムセンシング（QS）機構により菌の増殖に伴い増加する 3-OH PAME や 3-OH MAME の濃度を感知することで病原性因子の発現を調節している（Flavier et al., 1997 ; Kai et al., 2015 ; Hikichi et al., 2017）。植物内の青枯病菌密度が低密度な場合では、病原性因子の発現は抑えられ、高密度になると病原性因子の発現に関わる *phcA* 遺伝子が活性し、エンドグルカナーゼやペクチンメチルエステラーゼなどの植物細胞壁分解酵素や菌体外多糖類を生産する（Clough et al.,

1997 ; Flavier et al., 1997 ; Schell, 2000 ; Genin and Denny, 2012). また, 植物内における青枯病菌の病原性因子の発現には, 根内に感染した野生株の高密度な増殖が重要であることから (Hikichi et al., 2017), PC 株による安定した防除効果が発揮されるためには, いかに野生株の感染と増殖を防ぐかが重要になる.

本研究では, 植物内における PC 株と野生株の定着について, 培地を用いた菌密度測定と蛍光顕微鏡を用いた検鏡観察により調査した. その結果, 高い防除効果が得られた個体では, 高密度な PC 株定着がみられ, 根内への野生株の侵入と上部組織への病原菌の移行が抑制されており (第 4 章第 1 節, 第 2 節), 蛍光観察により調査した結果において, PC 株が皮層細胞や導管周辺の細胞に高密度に定着した植物根では, 野生株の定着が抑制され, 導管内への侵入はみられなかった (第 4 章第 2 節). これらの結果から, 根内に PC 株が高密度で定着することで, 野生株の侵入や定着が物理的に阻害され, 発病が抑制されることが示唆された. 植物内における野生株の定着を効果的に阻害するためには, 野生株が感染する前に, PC 株が高密度で根内に定着する必要がある. 本研究で用いた浸漬接種法は, 植物根部に高濃度の PC 株菌液を直に接種するため, PC 株定着に有効な接種方法であると考えられる.

また本研究において, 植物内における菌の定着性には PC 株と野生株とで違いがみられた. 野生株と PC 株を接種した植物では, 野生株は根, 茎, 葉において高密度に増殖したが, PC 株は接種部位の根において高い定着が見られたが, 根, 茎, 葉へと上部組織に向かうほど菌密度が低下したことから, PC 株は野生株に比べて上部組織への移行能は劣ると考えられる (第 4 章第 1 節). さらに根内では, 野生株は導管内に定着可能であったが, PC 株は導管の周辺細胞では高密度な定着が観察されたが, 導管内での定着はほとんど観察されなかった (第 4 章第 2 節). PC 株は, 野生株に比べて植物細胞壁の溶解酵素であるエンドグルカナーゼやペクチンメチルエステラーゼの活性が低

下する一方で、ポリガラクトナーゼ活性は増加している (Kelman, 1954; Denny et al., 1988; Brumbley and Denny, 1990). 植物導管を含む維管束組織は、セルロースとヘミセルロース、リグニンから形成され、ポリガラクトナーゼによって溶解されるペクチン含量は少ない (大内, 1990; 西谷, 2011). そのため、PC 株は、ペクチン含量が比較的多い表皮や皮層の細胞壁は分解できるが、ペクチン含量の少ない維管束組織は分解されにくいいため、PC 株は植物組織内での移行や導管内での定着が制限されていると推察された. すなわち、PC 株の組織内定着は広範囲に及ぶが、PC 株はすべての細胞内に高密度で存在することはなく、導管や上部組織などの一部組織では定着量が低く、そのような組織では、野生株が容易に感染すると考えられる. 本研究において、PC 株を接種したナスやトマトの根内では、低密度であるが野生株が検出され、上部組織の茎や葉への移行が確認された (第 4 章第 1 節, 第 2 節). PC 株を接種した植物では、導管内に野生株がわずかに侵入し、導管流によって上部組織に移行するが、植物内では抵抗性誘導などの機構が働いており、野生株の増殖が抑制されることで病原性因子の発現が起こらず、発病が抑制されると推察された.

植物は病原菌の感染に反応して、フェニルアラニンアンモニアリアーゼやポリフェノールオキシダーゼなどの病害防御関連酵素の活性化が起こることが知られている (Vanitha and Umesha, 2008; Vanitha et al., 2009). それらの酵素活性の増加は、病原菌の感染に限らず、非病原菌や内生細菌の感染でも確認されている (Jetiyanon, 2007; Vanitha and Umesha, 2011). Arwiyanto et al. (1994b) は、PC 株を接種したトマトでは、青枯病菌に対して静菌作用を示すトマチンの生成が誘導されることを報告している. 本研究では、PC 株を接種したトマトでは、キチナーゼ、 β -1, 3 グルカナーゼ、ソーマチン様タンパク質などの塩基性の感染特異的 (PR) タンパク質の発現が誘導されることが確認されたことから (第 5 章)、PC 株による青枯病防除機構には、病害防御関連酵素や PR タンパク質の発現による抵抗性誘導が関与すると考えられた.

病害防御関連酵素の発現量は品種によって異なり、抵抗性が高い品種ほど病害防御関連酵素の発現量が高いことが報告されている (Vanitha and Umesha, 2008; Vanitha et al., 2009). 青枯病に対して抵抗性が低い品種では、PC 株による防除効果が低く、抵抗性が比較的高い品種では、PC 株による防除効果が高い傾向にあることが報告されている (小川ら, 2011). 本研究において、抵抗性の異なるナスに PC 株を接種した場合でも同様の傾向がみられた。また、抵抗性が低い品種に対しても高い防除効果が発揮される PC 株があった (第 3 章). そのため、PC 株接種によって誘導される病害防御関連酵素や PR タンパク質の発現量は、品種の持つ潜在的な抵抗性や PC 株の種類によって異なる可能性がある。今後、PC 株の菌株、植物品種および接種方法の違いが、植物への抵抗性誘導に及ぼす影響を調査する必要がある。さらに、PC 株接種によって植物に誘導される遺伝子を幅広く調査し、それらが青枯病防除機構にどのように関わっているのかを明らかにする必要がある。PC 株による抵抗性誘導の機構を明らかにするためには、防除効果が異なる接種条件において、誘導される遺伝子の発現量を比較することが有効であると考えられる。本研究では、青枯病の防除効果が異なる PC 株、品種および接種方法が明らかになり、今後の防除機構の解明に寄与する知見が得られた。

PC 株の実用化に向けて問題点として、PC 株が元の病原菌に戻る変異復帰が起こることが危惧されており、Poussier et al. (2003) は、トマトの根の浸出物の存在によって PC 株の病原性が復帰することを報告している。一方、PC 株による青枯病防除効果は、生菌を用いた接種法で多く確認されているが、PC 株の病原性復帰は確認されていない (Trigalet and Trigalet-Demery, 1990; Hara and Ono, 1991; Arwiyanto et al., 1994a; 巖原ら, 2002 小川ら 2011, 2012b). 本研究でも、PC 株のみを接種した植物では萎凋症状は観察されなかった (第 3 章, 第 4 章). また、液体培地、土壌および植物組織内から PC 株を分離したところ、野生株のように流動性を示すコロニーは分離されなかった。さ

らに、ナス組織内から分離された PC 株をナスやトマトに再接種しても病原性の復帰は確認されなかった（データ省略）。PC 株は、通常、病原菌を長期間液体培養することで、菌の自発的な突然変異によって作出できる。しかし、青枯病菌のレース 3 菌株（82-1 と 101）に限っては、長期的な培養や継代培養を繰り返しても、得られた PC 株は完全に流動性を消失することはなく、トマトとナスには非病原性であったが、ジャガイモには病原性を示した（データ省略）。そのため、PC 株の変異復帰についてはさらなる検証が必要であり、PC 株が野生株に変異復帰しにくい条件を明らかにすることが必要である。一方で、PC 株による青枯病防除法の確立には、PC 株菌体の一部組織や培養ろ液などの非生菌を利用した防除法の検討も重要であると考えられる。

これまでに PC 株の生菌を用いない防除法も検討されており、植物への PC 株の加熱死菌や培養ろ液の接種が試みられている。PC 株の加熱死菌をタバコに接種した場合、青枯病の発病が抑制されることが報告されている（Tanaka, 1983）。しかし、ナスやトマトにおいては、PC 株の加熱死菌では、発病抑制効果はないことが明らかになっている（Arwiyanto et al., 1994a, 小川ら 2011, 2012b）。青枯病菌の野生株を熱処理した抽出液を接種したシロイヌナズナでは、PR タンパク質の発現が増加し、熱処理抽出液に含まれる熱安定的なタンパク質がエリシターとなることが示唆されている（Takabatake and Mukaiharu, 2011）。Arwiyanto et al. (1994a) は、PC 株培養ろ液をトマトに接種した場合、わずかに発病が抑制されると述べている。本研究において、PC 株を長期間培養した培養ろ液中では、PC 株は増殖したが、野生株の増殖を特異的に抑制されることが明らかになった（第 2 章第 2 節）。PC 株培養ろ液による防除効果を高めるため、系統の異なる PC 株から野生株の増殖抑制効果が高い PC 株培養ろ液を選抜し（第 2 章第 2 節）、それら培養ろ液を接種した土壤中の青枯病菌の増殖抑制効果と培養ろ液を処理した植物の青枯病防除効果を調査した（第 3 章）。しかし、PC 株培養ろ液を土壌に処理した場合では青枯病菌の増殖を抑制できず、植物に処理した場合は、青

枯病の防除効果が得られる場合もあったが、PC 株生菌による防除効果の方が高かったため、PC 株培養ろ液を用いた防除法の開発にはさらなる検討が必要である。本研究において、PC 株による培地内の成分変化が野生株の増殖阻害に関与することが示唆され、PC 株の培養ろ液中に含まれる野生株の増殖抑制に関わる物質を明らかにできれば、増殖阻害剤の開発が可能であると考えられた。

PC 株は *phcA* 遺伝子の変異しており、野生株とは表現型が異なるため (Brumbley and Denny, 1990; Poussier et al., 2003)、PC 株と野生株では細胞を構成する生体物質が異なることや PC 株に特異的な産生物質が存在することが考えられる。本研究において PC 株を利用した防除効果は、PC 株生菌を用いた場合で高く、PC 株接種によって植物への抵抗性が誘導されたことから (第 5 章)、PC 株由来の一部の菌体物質を利用することで防除効果が発揮される可能性もある。PC 株培養ろ液による野生株の増殖抑制の要因を調査した過程で、野生株よりも PC 株で顕著に生産される物質 (抗菌性物質、シデロフォア) の存在が明らかになり、その物質産生能は PC 株の種類によって異なることも明らかになった (第 2 章第 2 節)。その他にも PC 株が特異的に生産する物質が存在する可能性が考えられる。今後、青枯病菌の一部生体組織や産生物質を分離・精製し、青枯病菌の増殖抑制能や植物への抵抗性誘導能を明らかにすることで、青枯病菌の増殖阻害剤や抵抗性誘導剤としての利用法を検討することが重要である。

本論文では、液体培地・土壌・植物内における青枯病菌の野生株と PC 株との競合および増殖特性の違いを明らかにした。PC 株による高い青枯病防除効果が発揮されるためには、植物根内における高密度な PC 株定着が重要であり、PC 株による青枯病防除機構の主な要因として、植物根内における菌の定着競合と抵抗性誘導が示唆された。本研究により複数の植物種・品種に共通して高い防除効果を発揮する有用な PC 株が得られた。本研究で得られたこれらの知見は、PC 株による青枯病防除機構の解明および PC 株を利用した実用的な生物的防除技術の確立に寄与すると考えられる。

Biological control of the bacterial wilt using phenotype conversion mutants of *Ralstonia solanacearum*

Summary

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is a soil-borne bacterial plant pathogen. The pathogen is widely distributed in tropical, subtropical, and warm temperate regions, and has a wide range of hosts in more than 200 species, including eggplant, tomato, potato, tobacco, and other cash crops. This pathogen infects the wounded root cortex, invades the vascular system, rapidly multiplies and produces extracellular polysaccharides in the plant, clogging vessels and leading to wilting symptoms and plant death. To control this disease, cultivation of host plants has been managed by soil fumigants and grafting onto resistant rootstocks. However, soil fumigants have a harmful effect on the environment and human health. Furthermore, breakdown of resistance in rootstock cultivars has occurred due to new virulent strains of *R. solanacearum*, and increments of temperature in the culture conditions. Therefore, new stable management approaches to bacterial wilt disease are urgently needed. Recently, beneficial microorganisms have attracted attention as ecofriendly biological control agents to plant disease.

The *R. solanacearum* pathogenic strain (wild-type strain) spontaneously undergoes a phenotype conversion (PC) after prolonged culture in plants, water extract of plants, soil or broth culture. PC mutants are either weak pathogenic or non-pathogenic, but these mutants are still able to colonize host tissue without causing symptoms. The bacterial wilt diseases of tomato and tobacco were suppressed by pre-inoculation with PC mutants. For the mechanism for suppressing bacterial wilt by PC mutants, multiple factors such as production of antibacterial substances, competition for nutrition and bacterial colonization and resistance induction in plants are presumed. To develop a practical biological control method using the PC mutants, it is necessary to identify the main factors of the mechanism. In this study, effective PC mutant inoculation technology for bacterial wilt control was examined. Furthermore, the biological control mechanism by inoculation of PC mutant was investigated.

1. Competition of wild-type strain and PC mutant of *Ralstonia solanacearum* in liquid medium

1-1. Behavior of wild-type strain and PC mutant of *Ralstonia solanacearum* in liquid medium

There are still uncertainties about the growth behavior of the wild-type strain (8238rif; race 1, biovar 4, phylotype I) and PC mutant (E-PCstr; the mutant was isolated from 8238 strain-infected eggplant) when both strains are mixed in cultures. The bacterial competition between both strains in liquid medium was investigated. When bacteria were mixed and cultured statically in BG broth and MM broth, the growth of only the wild-type strain was reduced at the later period of culture. However, this bacterial competition was not observed in pure water and 100-fold diluted BG broth, suggesting that there are factors other than competition for nutrients. When each strain was individually inoculated in bacterial culture filtrates, the PC mutant could grow in the culture filtrates. However, the wild-type strain could not grow only in the culture filtrate of the PC mutant. The growth inhibition of the wild-type strain was also observed in the heat-treated culture filtrate of the PC mutant. These results indicate that the bacterial competition between the wild-type strain and the PC mutant in BG broth was due to changes in the culture components by the PC mutant.

1-2. Selection of effective culture filtrates of PC mutants for growth inhibition of wild-type strain of *Ralstonia solanacearum*

Production of the antibacterial substances and siderophores and growth inhibition of wild-type strain were tested using culture filtration of 27 PC mutants. Growth inhibition of a wild-type strain 8238rif in the culture filtrations were observed in that of 22 PC mutants. Production of siderophores was tested by CAS assay, two wild-type strains and 26 PC mutants produced siderophores. Production of antibacterial substances of PC mutants against a wild-type strain 8238rif was tested. Eleven PC mutants indicated the antibacterial activities on BGT agar medium and five PC mutants produced the antibacterial substances in culture filtrates. The antibacterial activities in culture filtrates of PC mutants were 400-25600 AU/mL, and the highest activity was indicated in the culture filtrate of 8105PC (race 1, biovar 4). The widest of antibacterial spectrum was indicated in the culture filtrate of 101PC (race 3, biovar N2, phylotype IV) that inhibited 24 strains within 27 wild-type strains. Their antibacterial activities were lost after heat-treatment at 60-70°C for 10 min. The molecular weight of antibacterial substances were estimated 100 to <300 kDa by

ultrafiltration. However, the most growth inhibition of a wild-type strain was observed in culture filtration of 8101PC (race 1, biovar 4) that non-production of siderophores and antibacterial substances. Those results suggest that there are factors other than siderophores and antibacterial substances involved in the inhibition of wild-type strains by the culture filtrations of PC mutants.

2. Biological control of bacterial wilt in tomato and eggplant by PC mutant and the culture filtrates of PC mutants

Biological control of bacterial wilt in tomato and eggplant were investigated using six culture filtrates of PC mutants. In the soil inoculated with culture filtrates of PC mutants, colonization of wild-type strain 8238rif was not suppressed. In plants, control effects against bacterial wilt caused by 8238rif differed depending on culture filtrates of PC mutants and plants species, tomato (*Solanum lycopersicum* L.) 'Micro-Tom' and susceptible eggplant (*S. melongena* L.) 'Senryo nigo'. To select effective PC mutants as biological control agents against bacterial wilt disease in tomato and eggplant, the control effect was investigated using tomato 'Micro-Tom', and five susceptible eggplant cultivars ('Black Beauty', 'Chikuyo', 'Senryo nigo', 'Sadowara', and 'Kurumenaga'). PC mutants were used 27 PC mutants against tomato bacterial wilt caused by 8238rif and 10 PC mutants against eggplant bacterial wilt caused by 8238rif or 8266. Some mutants showed effective suppression against bacterial wilt. Two PC mutants (8224PC and 8103PC) showed highly suppressive effects in tomato and many eggplant cultivars, and are anticipated to be practicable biological control agents. Furthermore, the antibacterial activities of PC mutants against the wild-type pathogen were tested to elucidate the relation between antibacterial activity of PC mutants and the culture filtrates and protective effect against bacterial wilt by PC mutant. Even the PC mutants and the culture filtrates that did not indicate antibacterial activity showed suppression of bacterial wilt, suggesting that there are factors other than antibacterial activity involved in the suppression of bacterial wilt by PC mutant.

3. Competition of wild-type strain and PC mutant of *Ralstonia solanacearum* in the soil and plants

3-1. Effects of inoculation method of PC mutant on the biological control of bacterial wilt and on

bacterial colonization of wild-type strain and PC mutant in soil and plants

To define the bacterial behavior of wild-type strain 8238rif and PC mutant E-PCstr, the bacterial colonization in soil and eggplant co-inoculated with both strains were investigated. The wild-type and PC mutant strains behaved similarly in soil, but the wild-type strain multiplied more than the PC mutant in eggplant. To investigate the influence of colonization with the PC mutant on suppression of the wild-type strain and bacterial wilt in plants, the relation between colonization with the PC mutant and suppression of bacterial wilt using different periods of PC mutant inoculation was investigated. The suppression of bacterial wilt by the PC mutant was confirmed in plants during the early inoculation period when the colonization of the PC mutant in the plants was higher than the inoculations of the long period. Furthermore, the colonization of the PC mutant and wild-type strain in plant tissues of co-inoculated plants and the suppression of bacterial wilt in plants by the PC mutant were investigated. The colonization of the wild-type strain in the roots and bacterial wilt were suppressed in the plants that were inoculated with a high concentration of PC mutant. These results suggest that the control of the colonization of the wild-type strain in eggplant roots by the PC mutant was involved in the suppression of bacterial wilt disease.

3-2. Observation of behavior of fluorescent protein genes-tagged *R. solanacearum* in plant tissues using fluorescence microscope

To investigate that bacterial colonization and movement of wild-type strain and PC mutant of *R. solanacearum* in plant tissues, green fluorescent protein *gfp* gene tagged wild-type strain of 8238 and red fluorescent protein *DsRed2* gene tagged PC mutant were created. Therefore, each strain was distinguishable in plants co-inoculated with wild-type strain and PC strain under a microscope. The luminosity of fluorescence of recombination strains, virulence against tomato 'Micro-Tom', and colonization in tomato tissue were investigated. The *gfp*-tagged wild-type strain was pathogenic strain and *DsRed2*-tagged PC mutant was non-pathogenic strain. Bacterial wilt and colonization of *gfp*-tagged wild-type strain in tomato roots was suppressed by pre-inoculation with *DsRed2*-tagged PC mutant. The fluorescent protein genes tagged *R. solanacearum* were detected by the real-time monitoring method using fluorescence microscope. Colonization of PC mutant was observed epidermal cells including root hair, intra- and intercellular cortical

cells and peripheral cells of vessel cells, but the colonization of PC mutant at vessel cells was low density. Wild-type strain was colonized over root systems including vessel cells. However, wild-type strain was low density in root tissue where PC mutant colonization was high density. These results suggest that the competition for bacterial colonization of the wild-type strain and PC mutant in root was involved in biological control of bacterial wilt.

4. Induction of resistance to plants and influence on plant growth and fruits quality by inoculation with PC mutant

The molecular mechanisms underlying the induction of resistance are still unknown. In studies of the suppression of plant diseases by beneficial microorganisms, the plant disease severity was reduced because of the expression and accumulation of the pathogenesis-related (PR) proteins that inhibit infection of pathogen and have an antibacterial activity. In the present study, the expression of *PR* genes in tomato 'Micro-Tom', a model cultivar of tomato suitable for genetic analysis, after inoculation with PC mutant E-PCstr was investigated. The expressions of basic *PR* genes were induced in tomato roots by inoculation with the PC mutant. The results suggested that an induced defense response is involved in the biological control of bacterial wilt in tomato by the PC mutant. The negative impacts on the growth, yield and fruit qualities of plants inoculated PC mutant may be determined. In the present study the effects on the growth, yield, and fruit qualities in tomato 'Micro-Tom' after inoculation with PC mutant were identified. There was no effect on the growth, yield or quality of the tomato plants inoculated with the PC mutant. The results of the present study demonstrated that pre-inoculation with the PC mutant did not reduce the plant growth, and *PR* genes were induced in the plant, suggesting that PC mutants can be used as biological control agent.

In this study, for effective biological control of bacterial wilt in tomato and eggplant, it is important to inoculate high concentration of PC mutant into plants and colonization of PC mutant in roots. Furthermore, it was revealed that competition for bacterial colonization and induction of resistance in plant roots involved as the main mechanisms of suppressing bacterial wilt by PC mutant inoculation. These results of this study will contribute to development of effective disease control technique using PC mutants.

謝辞

本研究の遂行および本論文の取りまとめにあたり、懇切丁寧なご指導、ご助言とご高閲を賜り、終始ご鞭撻と激励を頂いた熊本県立大学 環境共生学部 植物資源学研究室の松添直隆 教授に心より感謝の意を表す。本研究の遂行にあたり、終始丁寧なご指導、ご助言とご高閲を賜った熊本県立大学 環境共生学部 食品バイオ工学研究室の松崎弘美 教授に深謝の意を表す。さらに、本論文をまとめるにあたり、丁寧なご指導、ご助言とご高閲を賜った九州大学大学院 農学研究院の古屋成人 教授に深謝の意を表す。本研究にあたり多大なご協力とご助言をいただきました滋賀大学 教育学部 環境教育講座の森 太郎 准教授に感謝の意を表す。さらに、多くのご高配、激励をいただきました熊本県立大学 環境共生学部 植物資源学研究室の皆様、食品バイオ工学研究室の皆様から心から御礼申し上げます。

引用文献

- 相野公孝. 1995. 蛍光性 *Pseudomonas* を用いたトマト青枯病の生物的防除に関する研究. 土肥誌. 66: 211-212.
- 相野公孝. 2008. 生物農薬（殺菌剤）の現状. 関西病虫研報. 50: 33-34.
- 相野公孝. 2016. 植物内生細菌を利用したナス科青枯病の生物防除に関する研究. 日植病報. 82: 153-155.
- Álvarez B., Biosca E.G., López M.M. 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. In Méndez-Vilas A. (ed). Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. pp. 267-279. Formatex, Badajoz, Spain.
- Arwiyanto T., Goto M., Takikawa Y. 1993. Characterization of bacteriocins produced by *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 59: 114-122.
- Arwiyanto T., Goto M., Tsuyumu S., Takikawa Y. 1994a. Biological control of bacterial wilt of tomato by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Strelitzia reginae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 60: 421-430.
- Arwiyanto T., Sakata K., Goto M., Tsuyumu S., Takikawa Y. 1994b. Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 60: 288-294.
- Bhatt G., Denny T.P. 2004. *Ralstonia solanacearum* iron scavenging by the siderophore staphyloferrin B is controlled by *phcA*, the global virulence regulator. J. Bacteriol. 186: 7896-7904.
- Buddenhagen I., Kelman A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 2: 203-230.
- Brumbley S.M., Denny T.P. 1990. Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits contribute to virulence. J. Bacteriol. 172: 5667-5685.
- Chen W.Y., Echandi E. 1984. Effects of avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tobacco. Plant Pathology 33: 245-253.
- Clough S.J., Lee K.E., Schell M.A., Denny T.P. 1997. A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. J. Bacteriol. 179: 3638-3648.
- Cuppels D.A., Hanson R.S., Kelman A. 1978. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. J. Gen. Microbiol. 109: 295-303.
- Danhash N., Wagemakers C.A.M., van Kan J.A.L., de Wit P.J.G.M. 1993. Molecular characterization of four

- chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. *Plant Mol. Biol.* 22: 1017-1029.
- 伊達寛敬・那須英夫. 2004. 岡山県の促成栽培ナスにおける青枯病菌の菌群分布の変遷と抵抗性台木ドルバム・ビガー及びびトレロの罹病化. *岡山農試研報.* 22: 35-41.
- Date H., Nasu H., Hatamoto M. 1994. Breakdown of resistance of eggplant rootstock (*Solanum torvum* Swartz) to bacterial wilt by high ambient temperature. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 60: 483-486.
- Denny T.P., Makini F.W., Brumbley S.M. 1988. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* Tn5 mutants deficient in extracellular polysaccharide. *Mol. Plant-Microbe. In.* 1: 215-223.
- Denny T.P., Baek S.R. 1991. Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe In,* 4: 198-206.
- Flavier B.A., Ganova-Raeva L.M., Schell M.A., Denny T.P. 1997. Hierarchical auto-induction in *Ralstonia solanacearum*: control of Acyl-homoserin lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J. Bacteriol.* 179: 7089-7097.
- Fravel D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:337-59
- Frey P., Smith J.J., Albar L., Prior P., Saddler G.S., Trigalet-Demery D., Trigalet A. 1996. Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race 1 of the french west indies and correlation with genomic variation of the pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 473-479.
- Gadea J., Mayda M.E., Conejero V., Vera P. 1996. Characterization of defense related genes ectopically expressed in viroid infected tomato plants. *Mol. Plant-Microbe In.* 9: 409-415.
- Genin S., Denny T.P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50: 67-89.
- 原 秀紀・小野邦明. 1984. タバコ立枯病菌の新しい原・小野培地による検出定量法. *植物防疫* 38: 76-79.
- Hara H., Ono K. 1991. Effect of weakly-virulent bacteriocin-producing strain of *Pseudomonas solanacearum* on the protection of tobacco plant from bacterial wilt. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 57: 24-31.
- Hase S., Shimizu A., Nakaho K., Takenaka S., Takahashi H. 2006. Induction of transient ethylene and reduction in severity of tomato bacterial wilt by *Pythium oligandrum*. *Plant Pathology* 55: 537-543.
- Hase S., Takahashi S., Takenaka S., Nakaho K., Arie T., Seo S., Ohashi Y., Takahashi H. 2008. Involvement of jasmonic acid signaling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology* 57: 870-876.
- Hayward A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27:265-277.
- Hayward A.C, 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*.

- Annu. Rev, Phytopathol. 29: 65-87.
- He L.Y., Sequeira L., Kelman A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Dis. 67: 1357-1361.
- Hikichi Y., Mori Y., Ishikawa S., Hayashi K., Ohnishi K., Kiba A., Kai K. 2017. Regulation involved in colonization of intercellular spaces of host plants in *Ralstonia solanacearum*. Front. Plant Sci. 8: article 967. 1-6.
- 堀田光生・土屋健一. 2009. 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の分類の現状と課題. 日植病報. 75: 297-306.
- 堀田光生・土屋健一. 2012. 微生物遺伝資源利用マニュアル (12) 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 改訂第2版. 農業生物資源研究所. pp 32.
- Husain A., Kelman. A. 1958. Relation of slime production to mechanisms of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathol. 48: 693-695.
- Hyakumachi M., Nishimura M., Arakawa T., Asano S., Yoshida S., Tsushima S., Takahashi H., 2013. *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato. Microbe. Environ. 28: 128-134.
- 百町満朗・高橋英樹・松原陽一・染谷信孝・清水将文・小林括平・西口正通. 2014. 最近のわが国における植物病害の生物防除研究. 日本植物病理学会報. 80: 179-187.
- 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.
- Jayanna S.K., Umesha S. 2017. Enhancement of the expression of defense genes in tomato against *Ralstonia solanacearum* by N-octanoyl-L-homoserine lactone. Afr. J. Microbiol. Res. 11: 194-203.
- Jenkins S.F.Jr., Averre C.W. 1983. Root disease of vegetables in hydroponic culture systems in North Carolina greenhouse. Plant. Dis. 67: 968-970.
- Jetiyanon K. 2007. Defensive related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. Biological Control. 42: 178-185.
- Kai K., Ohnishi H., Shimatani M., Ishikawa S., Mori Y., Kiba A., Ohnishi K., Tabuchi M., Hikichi Y. 2015. Methyl 3-hydroxymyristate a diffusible signal mediating the *phc* quorum sensing in *Ralstonia solanacearum*. Chembiochem. 16: 2309-2318.
- 角谷晃司 1995. 遺伝子工学的手法を用いた植物病原細菌および土壌細菌のモニタリングシステムの確立. 近畿大学大学院博士学位論文.
- Kao C.C., Barlow E., Sequeira L. 1992. Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of

- Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol. 174: 1068-1071.
- Kawamura Y., Hase S., Takenaka S., Kanayama Y., Yoshika H., Kamoun S., Takahashi H. 2009. INF1 elicitor activates jasmonic acid- and ethylene-mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. J. Phytopathol. 157: 287-297.
- 川根 太. 2001. 灰色カビ病防除剤 –ボトキラー水和剤の開発と応用–. 植物防疫. 76: 208-213.
- Kawasaki T., Narulita E., Matsunami M., Ishikawa H., Shimizu M., Fujie M., Bhunchoth A., Phironrit N., Chatchawankanphanich O., Yamada T. 2016. Genomic diversity of large-plaque-forming podoviruses infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. Virology 49: 73-81.
- Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathol. 44: 693-695.
- Kelman A. Hruschka J. 1973. The role of motility and aerotaxis in the selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of *Pseudomonas solanacearum*. J. Gen. Microbiol. 76: 177-188.
- Khokhani D., Lowe-Power T.M., Tran T.M., Allen C. 2017. A single regulator mediates strategic switching between attachment/spread and growth/virulence in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. mBio. 8:e00895-17
- Kiba A., Tomiyama H., Takahashi H., Hamada H., Ohnishi K., Okuno T., Hikichi Y. 2003. Induction of resistance and expression of defense-related genes in tobacco leaves infiltrated with *Ralstonia solanacearum*. Plant Cell Physiol. 44: 287-295.
- Kovach M.E., Elzer P.H., Hill D.S., Robertson G.T., Farris M.A., Roop II R.M., Peterson K.M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166: 175-176.
- Krausz J.P., Thurston H.D. 1975. Breakdown of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tomato. Phytopathology 65: 1272-1274.
- Kreutzer F.M., Kage H., Gebhardt P., Wackler B., Saluz H.P., Hoffmeister D., Nett M. 2011. Biosynthesis of a complex yersiniabactin-like natural product via the microshikimate pathway in phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. Appl. Environ. Microbiol. 77: 6117-6124.
- 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. 園学研. 15 : 207-212.
- Li Z., Guo B., Wan K., Cong M., Huang H., Ge Y. 2015. Effects of bacteria-free filtrate from *Bacillus megaterium* strain L2 on the mycelium growth and spore germination of *Alternaria alternata*.

- Biotechnol. Biotec. Eq. 29: 1062-1068.
- Liu Y., Kanda A., Kiba A., Hikichi Y., Ohnishi K. 2009. Distribution of avirulence genes *avrA* and *popPI* in 22 Japanese phylotype I strains of *Ralstonia solanacearum*. J. Gen. Plant Pathol. 75: 362-368.
- Macho P.A., Guidot A., Barberis P., Beuzón C.R., Genin S. 2010. A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. Mol. Plant-Microbe In. 23: 1197-1205.
- 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. 園学研. 16 : 497-502.
- Maurhofer M., Keel C., Haas D., Defago G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. Plant Pathology 44: 40-50.
- Michel V.V., Mew T.W. 1998. Effect of a soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils. Phytopathol. 88: 300-305.
- Milling A., Babujee L., Allen C. 2011. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. Plos One 6: e15853.
- 森 潔・向山政志・中尾一和. 2010. 微生物の鉄捕捉分子と生体の防御機構. 日本内科学会雑誌. 99: 18-23
- Mori T., Fujiyoshi T., Inada T., Matsusaki H., Ogawa K., Matsuzoe N. 2011. Phenotypic conversion of *Ralstonia solanacearum* in susceptible and resistant *Solanum* plants. Environ. Control Biol. 49: 165-176.
- Mori T., Inada T., Ogawa K., Matsusaki H., Matsuzoe N. 2012. Phenotypic conversion of *Ralstonia solanacearum* in water extract of *Solanum toxicarium*. J. Plant Pathol. 94: 535-542.
- Mori T., Ozaki K., Matsusaki H., Matsuzoe N. 2007. Behavior and mutation of *Ralstonia solanacearum* in *Solanum toxicarium* grown in aseptic culture. J. Gen. Plant Pathol. 73: 142-146.
- 森田 儔・手塚信夫. 1986. 養液栽培における病害と対策. 農業および園芸. 61: 229-235.
- Nakaho K., Inoue H., Takayama T., Miyagawa H. 2004. Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants with resistance derived from different origins. J. Gen. Plant Pathol. 70: 115-119.
- Nakaho K., Takaya S., Sumida Y. 1996. Conditions that increase latent infection of grafted or non-grafted tomatoes with *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62: 234-239.
- 中曽根 渡. 2008. 施設栽培ナスの青枯病の発生生態と防除. 植物防疫 62: 80-84.
- Nam H.S., Yang H.J., Oh B.J., Anderson A.J., Kim Y.C. 2016. Biological control potential of *Bacillus*

- amyliquefaciens* KB3 isolated from the feces of *Allomyrina dichatoma* larvae. *Plant Pathol. J.* 32: 273-280.
- Niki T., Mitsuhashi I., Seo S., Ohtsubo N., Ohashi Y. 1998. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 39: 500-507.
- 西谷和彦. 2011. 細胞壁と細胞成長. 新・生命科学シリーズ“植物の成長” (太田次郎・赤坂甲治・浅島 誠・長田敏行 編), 裳華房. 東京. pp. 58-73.
- 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. *園学研.* 10 : 581-587.
- 小川晃一郎・森 太郎・松崎弘美・松添直隆. 2012a. 非病原性 *Ralstonia solanacearum* によるナス青枯病発病抑制効果の簡易検定法. *園学研.* 11 : 393-398.
- 小川晃一郎・森 太郎・松崎弘美・松添直隆. 2012b. 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. *園学研.* 11 : 399-403.
- 小木曾秀紀. 2008. シュードモナス フルオレッセンス水和剤 (ベジキーパー水和剤) によるレタス腐敗病・キャベツ黒腐病の防除. *植物防疫.* 62: 281-285.
- 大城 篤・照屋寛由・河野伸二・仲村伸次・仲里富雄. 2009. 雑草根域土壌での青枯病菌の生存. *雑草研究.* 54 : 249-251.
- Ohtsubo N., Mitsuhashi I., Koga M., Seo S., Ohashi Y. 1999. Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic PR gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiol.* 40: 808-817.
- 大内成志. 1990. 病原菌・宿主相互識別の特異性と遺伝子発現. “植物感染生理学” (西村正暘・大内成志 編), 文永堂出版. 東京. pp. 18-47.
- 岡部徳夫. 1965. ナス科植物青枯病菌の系統. *日植病報.* XXXI: 152-158.
- 尾崎克己. 1990. ナス科野菜の青枯病菌の病原性の分化. *植物防疫.* 44 : 291-294
- 尾崎克己・木村俊彦. 1992. 病原性に基づくナス科野菜青枯病細菌の分類. *中国農研報.* 10: 49-58.
- Pfund C., Tans-Kersten J., Dunning F.M., Alonso A.M., Ecker J.R., Allen C., Bent A.F. 2004. Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe In.* 17: 696-706.
- Pieterse C.M.J., van Loon L.C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4: 52-58.
- Pieterse C.M.J., van Wees S.C.M., van Pelt J.A., Knoester M., Laan R., Gerrits H., Weisbeek P.J., van Loon L.C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*

10: 1571-1580.

- Poussier S., Thoquet P., Trigalet-Demery D., Barthet S., Meyer D., Arlat M., 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.
- Ramesh R., Joshi A.A., Ghanekar M.P. 2009. Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 47-55
- Ramesh R., Phadke G.S. 2012. Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Crop protection* 37: 35-41.
- Rodrigo I., Vera P., Tornero P., Hernandez-Yago J., Conejero V. 1993. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23. *Plant Physiol.* 102: 939-945.
- Roberts D.P., Denny T.P., Schell M.A. 1988. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 170: 1445-1451.
- Saile E., McGarvey J.A., Schell M.A., Denny T.P. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 87: 1264-1271.
- Schell M.A. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 263-292.
- Schell M.A., Roberts D.P., Denny T.P. 1988. Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 170: 4501-4508.
- Schwyn B., Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56.
- Simon R., Priefer U., Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat. Biotechnol.* 1: 784-791.
- Spok A., Stubenrauch G., Schorgendorfer K., Schwab H. 1991. Molecular cloning and sequencing of a pectinmethylesterase gene from *Pseudomonas solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 131-140.
- 鈴木克己. 2010. 形態的特性. トマト. 野菜編. 農業技術大系. 第2巻: 基11-17.
- Takabatake R., Mukaiharu T. 2011. Extracts from *Ralstonia solanacearum* induce effective resistance to the pathogen in both *Arabidopsis* and solanaceous plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 77: 33-42.
- 高原吉幸. 2001. 野菜類軟腐病防除剤 -バイオキーパー水和剤の開発と応用-. 植物防疫. 76: 201-207.
- Takenaka S., Sekiguchi H., Nakaho K., Tojo M., Masunaka A., Takahashi H. 2008. Colonization of *Pythium*

- oligandrum* in the tomato rhizosphere for biological control of bacterial wilt disease analyzed by real-time PCR and confocal laser-scanning microscopy. *Phytopathology* 98: 187-195.
- Tanaka H. 1983. Protection of tobacco and tomato against root infection of *Pseudomonas solanacearum* by heat-killed bacterial cells. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49: 66-68.
- Thanh D.T., Tarn, L.T.T., Hanh, N.T., Tuyen, N.H., Srinivasan B., Lee S.S., Park K.S. 2009. Biological control of soilborne diseases on tomato, potato and black pepper by selected PGPR in the greenhouse and field in Vietnam. *Plant Pathol. J.* 25: 263-269.
- Trigalet A., 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.
- Vanitha S.C., Niranjana S.R., Umesha S. 2009. Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. *J. Phytopathol.* 157: 552-557.
- Vanitha S.C., Umesha S. 2008. Variations in defense related enzyme activities in tomato during the infection with bacterial wilt pathogen. *J. Plant Interactions.* 3: 245-253
- Vanitha S.C., Umesha S. 2011. *Pseudomonas fluorescens* mediated systemic resistance in tomato is driven through an elevated synthesis of defense enzymes. *Biological Plantarum* 55: 317-322
- van Kan J.A.L., Joosten M.H.A.J., Wagemakers C.A.M., van den Berg-Velthuis G.C.M., de Wit P.J.G.M. 1992. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Mol. Biol.* 20: 513-527.
- van Loon L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.
- van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- Vasse J., Frey P., Trigalet A. 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe In.* 8: 241-251.
- 和氣貴光・堀田光生. 2014. 栃木県産ナス科青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* のナス属植物に対する病原性と PCR 法による菌群判別の可能性と検討. *日植病報* 80: 229-234.
- Wakimoto S., Hirayae K., Tsuchiya K., Kushima Y., Furuya N., Matsuyama N. 1986. Production of antibiotics by plant pathogenic *Pseudomonads*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 52: 835-842.
- Wakimoto S., Utatsu I., Matsuo N., Hayashi N. 1982. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 48: 620-627.
- Waring W.S., Werkman C.H. 1944. Iron deficiency in bacterial metabolism. *Arch. Biochem.* 4: 75-87.

- 山口純一郎・浦田丈一・菅 正道. 1987. 施設栽培のナス青枯病に対する太陽熱利用の防除効果. 九病虫研会報. 33 : 45-47.
- 山川邦夫. 1981. ナスの新台木トルバム・ビガアの導入. 農業技術 36 : 461-464.
- Yalpani N., Silverman P., Wilson T.M.A., Kleier D.A., Raskin L. 1991. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3: 809-818.
- 山本重雄・篠田純男. 1996. 病原菌の鉄獲得機構. 日本細菌学雑誌. 51: 523-547.
- 横山和平・小川孝行. 2005. 非流動性コロニー形成が誘導される条件下での*Ralstonia solanacearum* のコンピテント化. 土と微生物. 59: 35-39.
- 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.
- 吉川麻璃萌・中原浩貴・鶴田純子・森 太郎・松添直隆. 2016. ナス科植物（ジャガイモ・ナス・トマト）における青枯病発病抑制効果の高い非病原性 *Ralstonia solanacearum* の選抜. 九州の農業気象. 25: 84-85（講要）.
- 吉川正明. 1990. 病原菌の生産する宿主抵抗性誘導因子. “植物感染生理学”（西村正暘・大内成志 編）, 文永堂出版. 東京. pp. 134-171.
- Zhu Y.J., Xiao R.F., Liu B. 2010. Growth and pathogenicity characteristics of *Ralstonia solanacearum* strain RS1100 in long-term stationary phase culture. *J. Plant Dis. Protect.* 117: 156-161.