

## 非病原性イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病及びイネもみ枯細菌病の発病抑制効果とその機作に関する研究

古屋, 成人

<https://doi.org/10.11501/3054268>

---

出版情報 : 九州大学, 1990, 農学博士, 論文博士  
バージョン :  
権利関係 :

非病原性イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病及び  
イネもみ枯細菌病の発病抑制効果とその機作に関する研究

古 屋 成 人

1991

①

非病原性イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病及びイネもみ枯細菌病の  
発病抑制効果とその機作に関する研究

古 屋 成 人  
1991

## 目次

	頁
緒言	1
研究史	6
第1章 イネもみ枯細菌病菌が示す抗菌物質産生性	10
第1節 イネもみ枯細菌病菌が示す抗菌活性	11
第1項 各種重要植物病原細菌に対するイネもみ 枯細菌病菌抗菌活性の検定	11
第2項 イネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病菌株に 対する抗菌活性	17
第2節 イネもみ枯細菌病菌の抗菌物質産生性	22
第1項 液体培地における抗菌物質の産生	22
第2項 抗菌物質産生性に及ぼす寒天抽出液の効果	24
第3項 $Fe^{3+}$ の添加による阻止帯形成能の変化	27
第3節 考察	29

第2章	イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病の 発病抑制とその機構	3 1
第1節	トマト青枯病菌の接種法と発病条件	3 1
第1項	接種用強病原性菌株の選別	3 1
第2項	浸根接種法によるトマト青枯病の発病率 と菌濃度との関係	3 3
第2節	イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病 発病抑制効果	3 5
第1項	混合液の針接種法によるトマト青枯病 発病抑制効果	3 5
第2項	浸根処理による発病抑制効果	3 8
第3項	土壌の種類と発病抑制効果	4 3
第4項	トマト青枯病発病抑制効果の菌株間差異	4 5
第3節	イネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病の 各種条件下における競合	4 8
第1項	液体培地中、滅菌水中及び滅菌土壌中 における競合	4 8
第2項	トマト根組織上における競合	5 4
第4節	発病抑制効果における抗菌物質の関与	5 6
第1項	NTG処理による抗菌物質非産生性イネ	

	もみ枯細菌病菌株の作出	5 6
第 2 項	抗菌物質非産生株を用いたトマト青枯病 発病抑制効果	6 0
第 3 項	トマト根組織中における抗菌物質産生性 誘導の可能性	6 2
第 4 項	死菌によるトマト青枯病発病抑制効果	6 3
第 5 節	物理的閉塞の影響	6 7
第 1 項	パラフィン、メチルセルロース処理による 発病抑制効果	6 7
第 2 項	根切断が発病抑制効果に及ぼす影響	6 9
第 6 節	イネもみ枯細菌病菌の菌体リポ多糖 (LPS) 及び菌体外多糖 (EPS) による発病抑制効果	7 1
第 1 項	菌体リポ多糖 (LPS) による発病抑制効果	7 1
第 2 項	菌体外多糖 (EPS) による発病抑制効果	7 3
第 3 項	イネもみ枯細菌病菌の洗浄菌体及び培養 ろ液による発病抑制効果	7 5
第 7 節	イネもみ枯細菌病菌以外の各種細菌 による発病抑制効果	7 7
第 1 項	各種植物病原細菌及び腐生菌による発病 抑制効果	7 7
第 8 節	考察	8 2

第3章	非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗 腐敗症及びイネもみ枯細菌病菌の発病抑制と その機構	86
第1節	非病原性イネもみ枯細菌病菌の選別	88
第2節	非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗 腐敗症の発病抑制効果	91
第1項	発病抑制効果の菌株間差異	91
第2項	浸漬処理用の菌濃度と 発病抑制効果との関係	97
第3項	非病原性N7503菌株の各種病原性菌株 に対する発病抑制効果	99
第4項	カスガマイシン・キャプタン水和剤との 発病抑制効果の比較	100
第5項	発病抑制効果の品種間差異	102
第3節	非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ 幼苗腐敗症発病抑制機作	106
第1項	非病原性菌株の病原性菌株に対する抗菌 活性	106
第2項	他種細菌による発病抑制効果	109
第3項	非病原性菌株培養ろ液による発病抑制 効果	111

第4項	死菌による発病抑制効果	1 1 2
第5項	種子処理法及び接種法の違いが発病抑制効果に及ぼす影響	1 1 4
第6項	イネ発芽液中及び滅菌土壌中における競合	1 1 8
第7項	イネもみ上における競合	1 2 2
第8項	病原性菌株の産生する毒素と発病抑制効果との関係	1 2 5
第4節	非病原性イネもみ枯細菌病菌の穂に対する発病抑制効果	1 2 7
第5節	考察	1 2 9
第4章	総合考察	1 3 4
摘要		1 3 7
Summary		1 4 3
引用文献		1 4 6

## 緒言

植物の病害防除は従来、主に抵抗性品種の育成と利用、並びに農薬を利用することによって行われてきた。これらの防除方法が農作物の生産向上をもたらし、食料供給の安定化に大きな役割を果たしてきたことは周知の事実である。特に、1950年代から開発された多種類の新農薬が果たした役割は大きい。しかしながら、土壌病害の防除は農薬の使用によっても困難である場合が多い。特に細菌性の土壌伝染性病害に関しては的確な防除法がほとんどないのが現状である。しかも農薬の過剰使用は、水質、土壌及び大気等の環境を汚染させる危険性と食品に残留することによる人畜への影響が懸念されており、その上、薬剤耐性菌の出現、あるいは潜在的病害の顕在化等が問題になり、農薬の開発と使用には一層の配慮が必要になりつつある。このような背景から、耕地生態系を乱すことのない、より自然に立脚した防除法としての生物的防除法が重視されるようになり、世界各国でその研究が盛んに進められている。

生物的防除法<sup>3,2)</sup>とは、生物的手段、即ち、ある種の微生物、その産物、あるいはその遺伝子などを利用することによって病害の発生を制御する方法であり、これに類する方法は古くから行われてきた。既に17世紀に行われたリンゴ腐らん病(*Valsa ceratosperma*)に対する牛ふんの塗布<sup>3)</sup>にはじまり、今日も行われている輪作、残渣の焼却、有機質肥料多用等の耕種的防除法やある種の微生物製剤の利用などはすべて生物的防除法の中に含まれる。植物の病害を防除する上で今日考えなければならない問題は、近代農業の中で如何にして効果的でしかも安全な防除法を確立するかである。現在のところ

ろ、いずれの防除法も決して万能ではなく、各種の防除手段を互いに矛盾なく調和させながら、合理的に併用することによって被害を経済的許容水準以下に低下させることが必要である。特に生物的防除法においては病原菌を絶滅させることが目的ではなく、耕地生態系で機能している拮抗要因を最大限に利用し、その働きを保護、助長するように環境条件を積極的に変えていくことが重要である。即ち、自然界において植物病原菌の生存及び活動を妨害するものは全て生物的防除の目的で利用できる可能性がある。

植物の細菌病及び菌類病に対する生物的防除に関する研究は数多く報告されており、利用されている拮抗細菌としては *Actinoplanes*<sup>40, 156)</sup>, *Agrobacterium*<sup>80, 81, 82, 115, 165)</sup>, *Alcaligenes*<sup>36, 205, 204)</sup>, *Amorphosporangium*<sup>40)</sup>, *Arthrobacter*<sup>92, 112, 149)</sup>, *Azotobacter*<sup>109)</sup>, *Bacillus*<sup>107, 108, 164, 175, 178, 179)</sup>, *Cellulomonas*<sup>181)</sup>, *Enterobacter*<sup>61, 94, 117, 118, 150, 177, 178, 180)</sup>, *Erwinia*<sup>150)</sup>, *Flavobacterium*<sup>27, 94)</sup>, *Hafnia*<sup>149, 150, 151)</sup>, *Micromonospora*<sup>40)</sup>, *Pseudomonas*<sup>17, 19, 26, 28, 34, 35, 37, 47, 48, 49, 67, 68, 70, 74, 79, 84, 85, 86, 197, 199, 202, 204, 206)</sup>, *Pasteuria*<sup>14, 137, 138, 154)</sup>, *Rhizobium*<sup>21, 171, 172)</sup>, *Serratia*<sup>149, 150, 151)</sup>, *Streptomyces*<sup>13, 24, 107, 108, 131, 181)</sup> 及び *Xanthomonas*<sup>27, 94)</sup> 等が挙げられているが、中でも特に *Pseudomonas* 属細菌が最も多く利用されている。*Pseudomonas* 属細菌としては *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia* 等が用いられ、ジャガイモ、コムギ、キュウリ、ワタ、カーネーション等多くの作物を対象に研究がなされている。

ジャガイモの種イモに蛍光性の *Pseudomonas* 属菌を塗布すると生育が促進され収量が増加することが明らかとなり<sup>17)</sup>、その後、同

様な効果はサトウダイコン、ハツカダイコン等多くの作物で報告され<sup>83, 145)</sup>、Kloepper<sup>83, 84, 85)</sup>らはこのような細菌を植物成育促進性根圏細菌(Plant growth promoting rhizobacteria: PGPR)と呼称した。PGPRは根に定着し、Feキレート物質、すなわち、各種のsiderophore(pseudobactinなど)<sup>161, 162)</sup>を産生する。有害な根圏細菌(deleterious rhizobacteria: DRB)はこれによって鉄欠乏状態になってその生育と根への吸着が阻害され、DRBと置き換えることによって作物の成育が良好になると考えられている<sup>88, 89, 90)</sup>。

コムギ立枯病の抑止土壌は世界的に広く知られており、その機作については種々の仮説があるが、Cookらは蛍光性*Pseudomonas*が関与しているとし<sup>31)</sup>、その蛍光性*Pseudomonas*をコムギ種子にコーティング処理すると立枯病の発病を抑え、増収することを明らかにした<sup>192, 193)</sup>。そして、この発病抑制機構は抗生物質産生、siderophore産生、あるいはその両者の産生のいずれかによるものであり、これら産生性に関与する遺伝子を取り除くと発病抑制の機能がなくなると報告されている<sup>60)</sup>。

カリフォルニア州Salinas Valleyの土壌は、*Fusarium*萎ちよう病を抑止することが知られており、この抑止機構には*Pseudomonas* sp.を主体とする拮抗微生物が重要な役割をもち、siderophoreが関与していることが明らかにされている<sup>139, 140, 142, 150)</sup>。

また、Howellらはワタ幼苗の根圏から分離した*P. fluorescens*を種子に施すことによって*Pythium ultimum*及び*Rhizoctonia solani*によるワタ幼苗立枯病の発病が抑制され、この発病抑制機構はこの細菌が産生する2種類の抗生物質pyrrolnitrinとpyoluteorinで説明されている<sup>67, 68)</sup>。

さらにわが国においては、本間らは *P. cepacia* が pyrrolnitrin や pseudane 等の抗生物質を産生することを明らかにし、ダイコン苗立枯病やナス半身萎ちよう病を抑制することを示した。また、ニトロソグアニジン処理によって抗生物質産生能を消失した突然変異株は発病抑制能力を失うことから、これら抗生物質産生と発病抑制との関係を示唆した<sup>6)</sup>。有江及び木嶋らはユウガオつる割病の防除のためには、抗生物質産生性の *P. gladioli* で処理したネギ、ニラとの混植が有効であることを報告している<sup>2)</sup>。以上のように *Pseudomonas* を利用した生物的防除は多方面から研究が進められているが、**実用化の段階に至っているものは少なく、解決しなければならない問題が数多く残されているのが現状である。**

植物細菌病の生物的防除の中で最も代表的な例として根頭がんしゅ病の生物的防除がある。Kerr<sup>80, 81)</sup> 及び Htay<sup>71)</sup> らはモモの罹病部から根頭がんしゅ病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) に対して抗菌性を示す非病原性の変異株 *A. radiobacter* strain 84 を分離し、これを  $10^{7-8}$  cfu/ml の濃度でモモの幼苗または種子に接種して汚染土壤に栽培すると、発病が著しく抑えられることを示した。この効果は世界各国で確かめられ、世界的に広く普及している<sup>145)</sup>。この発病抑制の作用機作は、非病原性の *A. radiobacter* strain 84 が産生するアグロシン 84 の作用によるものであるとした<sup>81)</sup>。アグロシン 84 はバクテリオシンの一種であり、病原菌の DNA 合成、細胞壁合成の阻害による殺菌効果と、*A. tumefaciens* の植物受容体への吸着を阻害することにより発病を抑制すると考えられ、アグロシン 84 に対する病原菌の感受性と生物的防除効果は一致するものとされてきた<sup>82)</sup>。しかし、strain 84 による効果が地域や作物の種類によって

は十分でない事例<sup>82)</sup>やアグロシン 84に耐性あるいは弱感受性の病原菌に対しても高い防除効果を示す事例<sup>30, 104)</sup>もあり、これらの作用機作は必ずしも単純でないことが判明している。

以上述べたように植物細菌病の生物的防除において、拮抗菌処理が発病抑制効果を示し、その効果に抗生物質産生が関与している可能性を暗示した事例は多く報告されているが、その抑制機構について詳細に研究した例は少なく、今後生物的防除法を開発するためには発病抑制の機構を詳しく研究することが必要と思われる。

著者らは *Pseudomonas* 属細菌の中のイネもみ枯細菌病菌 (*P. glumae*) が各種重要植物病原細菌に対して幅広く、かつ、強い抗菌スペクトラムを有する細菌であることを発見し<sup>184)</sup>、本細菌を利用する生物的防除の可能性を検討した。すなわち、まず土壌伝染性細菌病菌の中、特に重要なトマト青枯病(病原菌: *P. solanacearum*)に対する利用の可能性を探る目的で、その発病抑制の効果と機構について検討し<sup>42, 43, 44, 45, 185)</sup>さらに、本菌の非病原性変異株を利用して病原性菌株によるイネ幼苗腐敗症の生物的防除効果を検討し<sup>46, 124)</sup>、両者に対する発病抑制機構の解明を試みた。

本研究を遂行するにあたって、終始懇篤なご指導とご鞭撻を賜わり、かつ本稿のご校閲をも賜わった九州大学農学部教授脇本 哲博士に衷心より感謝の意を表す。また、九州大学農学部助教授松山 宣明博士には本研究遂行上多大のご指導とご援助を頂いた。記して深謝の意を表す。なお、実験の遂行にあたり、多大のご協力を惜しまれなかった九州大学農学部植物学教室の諸氏に謝意を表す。

## 研究史

生物的防除に類する研究は古くから行われていたようである。Austein(1657)<sup>3)</sup>はリンゴのかいよう病の防除のために剪定した部位を牛ふんで処理する方法を提唱している。また、Forsyth(1791)<sup>4)</sup>はリンゴの木の傷口を牛ふん、石灰、木灰、砂等で処理することによりリンゴふらん病の防除が可能であることを示した。これら牛ふんあるいは土壌処理による発病抑制の機構については、Grosclaude(1970)<sup>5)</sup>によって拮抗微生物が関与していることが明らかにされた。

Roberts(1874)<sup>130)</sup>は微生物間の拮抗現象(antagonism)について初めて記述した。さらに、Waksman(1947)<sup>186)</sup>は抗生物質(antibiotic)について、「抗生物質とは微生物の産生する化学物質で他の微生物の増殖を阻害するもの」と定義した。一方、SanfordとBroadfoot(1931)<sup>135)</sup>はコムギ栽培圃場の土壌、根及び茎から各種の細菌、糸状菌及び放線菌を分離し、これら分離菌株を用いて土壌処理を行い *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* によるコムギの立枯病の抑制効果について調べた結果、いくつかの菌株で高い発病抑制効果を認め、植物病理学の分野に初めて生物的防除(biological control)及び抑制効果(suppressive effect)の用語を導入した。そして、微生物間の拮抗現象、特に抗生物質産生性を利用した植物病害の防除の試み、即ち、生物的防除に関する研究が様々な面から行われるようになった。

拮抗微生物を直接土壌に混入することによる植物病害防除の試みは1920~1940年の期間に盛んに行われた。Hartley(1921)<sup>62)</sup>は

*Pythium debaryanum*によるマツの幼苗の立枯病を防除するために13種類の拮抗糸状菌を用いて土壌処理を行い、その効果を認めている。また、MillardとTaylor(1927)<sup>111)</sup>は*Streptomyces scabies*によるジャガイモそうか病の発病が拮抗細菌*S. praecox*を用いることで抑制されることを示した。さらに、Henry(1931)<sup>63)</sup>は土壌から8種類の放線菌、糸状菌及び細菌を分離し、これらを用いて土壌処理した場合に*Helminthosporium sativum*による小麦の病気が抑制されることを報告している。

拮抗微生物による土壌中での抗菌物質産生性とそれによる病原菌の増殖と発病の抑制に関与する研究は抗生物質の発見以来精力的に行われている。

Weindling(1932, 1936)<sup>188, 189, 190)</sup>は*Trichoderma viride*が土壌伝染性病原菌の拮抗微生物であることを示し、それが*Rhizoctonia solani*に対して強い抗菌性を示す抗生物質gliotoxinを産生することを報告し、これを純化した。また、Grossbard(1948, 1952)<sup>さらに、</sup>は*Penicillium patulum*がグルコースと小麦の茎を添加した滅菌土壌中でclavacin(patulin)を産生することを証明した。そして、Wright(1956)<sup>200)</sup>は*Trichoderma viride* (*Gliocladium?*)が種子表面で抗生物質を産生することによって*Pythium* sp.による立枯病を抑制することを示した。一方、Bruehl(1969)<sup>15)</sup>は*Cephalosporium gramineum*が小麦の茎中で広い抗菌スペクトラムを持つ抗菌物質を産生し、基質の存在下で2~3年間生態的に優位な状態にあり、抗菌物質非産生株は数か月で腐生性の微生物によって駆逐されることを示した。さらに、KloepperとSchroth(1981)<sup>86, 87, 88)</sup>は広い抗菌スペクトラムを有す*Pseudomonas* spp.を作物の種子に接種して播種し

た場合には作物の生育が良好となり、抗生物質非産生性株ではその効果が認められないことを示した。

生物的防除法の成功例として特に注目されているのは、*Agrobacterium radiobacter* strain 84による根頭がんしゅ病の防除である。NewとKerr(1972)<sup>120)</sup>は根部に*A. radiobacter* 84を接種したモモの苗を、*A. tumefaciens*汚染土壌に移植したところ、3か月後に対照区の感染率79%に対し、処理区では31%と発病が著しく抑制されたことを報告した。その後、この細菌は世界各国で追試され、多数の植物で有効であることが証明され実用化されている。これらの研究をきっかけにバクテリゼーション(作物の根面あるいは土壌根圏から分離した細菌を種子や根に接種することにより病気を予防したり、生育を促進させようとする方法)を利用した土壌病害防除の研究が行われるようになり、近年、この方法による土壌病害の防除の研究例が数多く報告されている。バクテリゼーションの機作の一つに抗生物質の関与がある。しかし、培地上での抗菌性や抗菌物質産生性を認めただけで短絡的に生物的防除の機作に結びつけていることが多い。拮抗微生物による抗菌物質産生性が生物的防除に関与しているか否か、またそれを含めた発病抑制の機作について詳細に研究した例は多くない。さらに、わが国では、土壌伝染性細菌病は薬剤防除が困難で、種々の作物で深刻な問題となっているにもかかわらず、その生物的防除については殆ど研究の蓄積がなく、欧米諸国に比べかなり遅れているのが現状である。

バクテリゼーションが農業技術として利用されるには今後解決されなければならない多くの問題が残されている。今後の生物的防除の研究の一つの方向は、これまでに蓄積されてきた多数の有望な拮

抗微生物にいかにして圃場レベルにおいても安定した効果を示させるかにある。そのためには防除効果発現に及ぼす諸要因を拮抗菌、病原菌及び作物との関連において解析し、その機構を明らかにしていくことが重要である。

## 第1章 イネもみ枯細菌病菌が示す抗菌活性及び抗菌物質産生性

*Pseudomonas*属細菌が産生する抗菌物質としては、ジャガイモ塊茎から分離された *P. fluorescens* 及び *P. putida* が産生する pseudobactin<sup>85, 145, 161, 162</sup>、ワタの根圏から分離された *P. fluorescens* が産生する pyrrolnitrin<sup>67</sup> と pyoluteorin<sup>68</sup> 及びバーミュダグラスの葉から分離された *Pseudomonas* sp. が産生する syringomycin<sup>56, 57, 148</sup> と syringotoxin<sup>57</sup> などが報告されている。このように *Pseudomonas* 属細菌は生理的に多能な細菌であり、多種類の生理活性物質を産生する事が知られている。これら各種生理活性物質を産生する *Pseudomonas* 属細菌の内、*P. fluorescens* や *P. putida* 等は生物的防除の素材としてもその利用価値が高く評価されている。脇本・平八重らは生物的防除に有効な素材を得るために広く自然界から強い抗菌活性を有する細菌の探索を試みた結果、*P. gladioli* pv. *gladioli* E-14 を発見した<sup>65</sup>。 *P. gladioli* pv. *gladioli* とイネもみ枯細菌病菌 (*P. glumae*) は細菌学的に近縁細菌であることから、著者らはイネもみ枯細菌病菌の各種重要植物病原細菌に対する抗菌物質産生性について検討した。

## 第1節 イネもみ枯細菌病菌が示す抗菌活性

### 第1項 各種重要植物細菌病に対するイネもみ枯細菌病菌抗菌活性の検定

#### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌48菌株を用いてこれら菌株の各種重要植物病原細菌に対する抗菌活性の有無をプレートクロロホルム法<sup>184)</sup>により検討し、イネもみ枯細菌病菌が示す抗菌スペクトラムについて調べた。

#### 2. 材料と方法

##### 1) 供試細菌

供試したイネもみ枯細菌病菌の菌株及び指示菌として用いた各種重要植物病原細菌の来歴はTable 1,2に示した。これら菌株はすべて九州大学農学部植物病理学教室において凍結乾燥して長期保存したものである。これら菌体の入ったアンプルから常法により乾燥菌体を滅菌蒸留水に懸濁し、これをPSA<sup>184)</sup>斜面培地上に30℃で48～72時間培養後、10 mlの滅菌蒸留水の入った試験管に菌濃度が $10^7 \sim 10^8$  cfu/mlになるように懸濁して、25℃で保存するか、あるいはPSA高層培地に2～3日間培養後、流動パラフィンを重ねし、25℃で保存した。各試験に際しては、その都度これら保存菌をPSA斜面培地に移植し、30℃で2～3日間培養したものを供試した。

Table 1. Strains of *Pseudomonas glumae* used in this experiment

Strain	Isolated from	Variety	Origin	Strain	Isolated from	Variety	Origin
N7401	Rice seedling	Unknown	NIAES <sup>a)</sup>	8028	Rice grain	Unknown	KNAES
N7501	"	"	"	1	"	"	"
N7502	"	"	"	111	"	"	"
N7503	"	"	"	2	"	"	"
N7503	"	"	"	Ku8101	"	Koshihikari	KU <sup>d)</sup>
N7504	"	"	"	Ku8102	"	"	"
N7505	"	"	"	Ku8103	"	"	"
YN7805	Unknown	"	"	Ku8104	"	Hayahikari	"
YN7810	"	"	"	Ku8105	"	"	"
YN7825	"	"	"	Ku8106	"	"	"
742	"	"	"	Ku8111	"	Unknown	"
N750	"	"	"	Ku8112	"	"	"
752	"	"	"	Ku8113	"	"	"
805	"	"	"	Ku8114	"	"	"
806	"	"	"	Ku8115	"	"	"
P1-22-1	"	"	"	Ku8116	"	"	"
P1-22-2	"	"	"	Ku8117	"	"	"
P1-22-3	"	"	"	Ku8119	"	"	"
P1-22-4	"	"	"	Ku8120	"	Reihou	"
So-1	Rice grain	"	FARC <sup>b)</sup>	Ku8121	"	"	"
8001	"	Asominori	KNAES <sup>c)</sup>	Ku8122	"	"	"
8012	"	"	"	Ku8123	"	Nishihomare	"
8015	"	"	"	Ku8124	"	"	"
8017	"	Nagomasari	"	Kyu82-34-2	"	Reiho	KNAES
8020	"	"	"				

a) National Institute of Agro-Environmental Sciences.

b) Fukuoka Agricultural Research Center.

c) Kyushu National Agricultural Experiment Station.

d) Kyushu University.

Table 2. Phytopathogenic bacteria used as indicator for testing productivity of antibacterial substances

Indicator bacteria	Code	Origin <sup>a)</sup>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ku7411	A. t	KU
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> N6601	C. m	NIAES
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> N7129	E. c	/
<i>Pseudomonas solanacearum</i> C319	P. sol	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> l	P. syr	/
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> N6113-1	X. c	/
<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i> T7174SR(12) <sup>b)</sup>	X. o	HAES

- a) KU: Laboratory of Plant Pathology, Kyushu University.  
 NIAES: National Institute of Agro-Environmental Sciences.  
 HAES: Hokuriku Agricultural Experiment Station.  
 b) Streptomycin resistant mutant induced at KU.

## 2. 実験方法

各種重要植物病原細菌に対するイネもみ枯細菌病菌の抗菌活性の検定には、Fig. 1に示したプレートクロロホルム法を用いて行った。すなわち、寒天濃度1.5%のYPDA<sup>184)</sup>平板培地上にイネもみ枯細菌病菌の各菌株を点接種し、30℃で48時間培養してコロニーを形成させた後、ペトリ皿を逆さにし、上蓋にろ紙を置いてクロロホルムを約1.0 ml入れ2時間蒸気処理した。その後、ろ紙をとり除き、再びペトリ皿を逆さにし、その上層にPSA斜面培地に30℃で48~72時間培養したトマト青枯病菌の浮遊液(濃度: 約 $10^7$  cfu/ml)0.1 mlと、溶解して45~47℃に保った5 mlの素寒天培地(寒天濃度:0.5%)とを混合して重層した。これを30℃で48~72時間培養した後、コロニーの周囲に形成される阻止帯の有無、大きさによって抗菌活性の検定を行った。

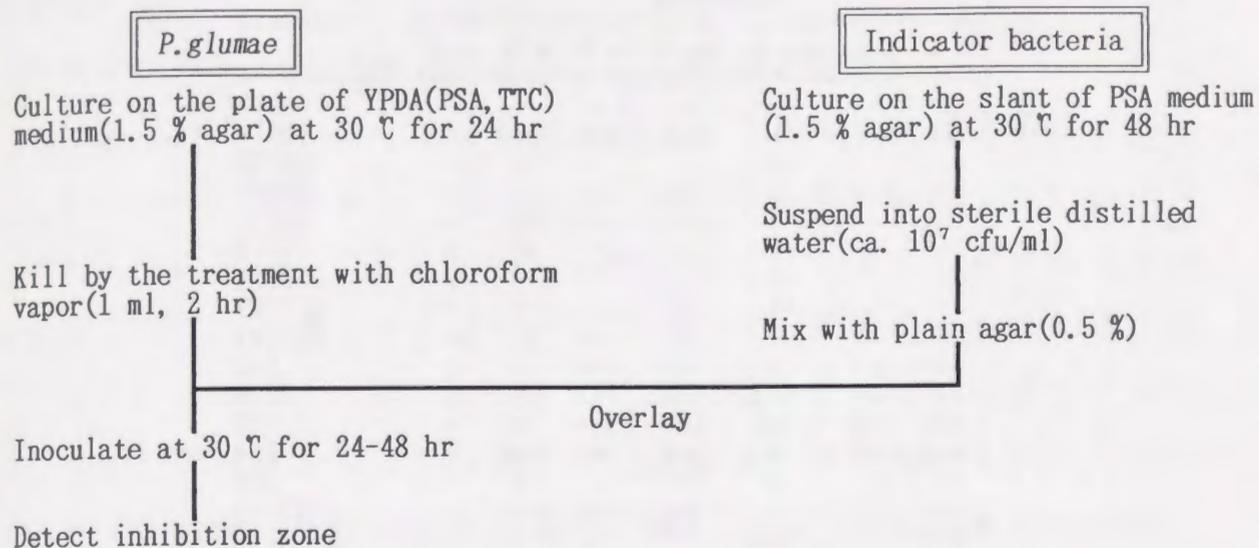


Fig. 1. Plate chloroform method for testing productivity of antibacterial substances.

### 3. 実験結果

結果はTable 3に要約した。Table 3から明らかなように、供試したイネもみ枯細菌病菌48菌株のうち、*Agrobacterium tumefaciens* (根頭癌腫病菌) に対しては7菌株、*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (トマトかいよう病菌) には22菌株、*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (カンキツかいよう病菌) には28菌株、*X.c.* pv. *oryzae* (イネ白葉枯病菌) に対しては27菌株、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (そ菜類軟腐病菌) に対しては19菌株、*Pseudomonas solanacearum* (トマト青枯病菌) に対し

Table 3. Production of antibacterial substances by *Pseudomonas glumae*

Isolate	Indicator						
	A. t	C. m	E. c	P. sol	P. syr	X. c	X. o
N7401	-	-	-	-	++	-	-
N7501	-	-	+++	+++	+	+++	+++
N7502	-	+	-	-	++	-	-
N7503	-	+	-	++	+	(+)	(+)
N7504	-	-	-	-	+	-	-
N7505	-	+	-	-	++	-	+
YN7805	-	-	-	-	++	-	-
YN7810	-	-	-	-	++	-	-
YN7825	-	-	-	-	+	-	-
742	-	-	+++	+++	+	+++	+++
N750	-	+++	+++	+++	(+)	+++	+++
752	-	++	+++	+++	(+)	+++	+++
805	-	+++	+++	+++	+	+++	+++
806	-	+	-	+	+	++	++
PI-22-1	-	+++	+++	+++	+	+++	+++
PI-22-2	-	-	-	-	(+)	-	(+)
PI-22-3	-	+	(+)	+++	(+)	+++	+++
PI-22-4	-	-	(+)	(+)	+	-	+
So 1	-	-	+++	+++	+	+++	+++
8001	-	+++	+++	+++	+	+++	+++
8012	-	-	-	-	+	-	(+)
8015	-	+	-	-	+	-	+
8017	++	+	++	+++	+	+++	+++
8020	++	+	++	+++	+	+++	+++
8028	-	+	-	-	+	-	-
I	++	-	+	+++	+	+++	++
II	++	-	++	+++	+	+++	+++
2	(+)	-	++	+++	+	+++	+++
Ku8101	-	-	-	-	+	-	-
Ku8102	-	+	-	-	+	-	-
Ku8103	-	-	-	-	++	-	-
Ku8104	-	+	-	+++	++	++	++
Ku8105	-	+	-	-	++	++	++
Ku8111	-	-	-	-	+	-	-
Ku8112	-	++	+++	-	+	+++	(+)
Ku8113	-	+++	+++	-	(+)	+++	+++
Ku8114	-	-	-	++	(+)	+	-
Ku8115	-	-	++	+++	+	+++	++
Ku8116	-	-	-	++	+	-	-
Ku8117	-	-	-	+	+	+	+++
Ku8119	-	+	-	+++	++	+++	+++
Ku8120	-	+	-	+++	++	+++	+++
Ku8121	-	+++	+++	+++	++	+	+++
Ku8122	+	-	-	++	+	+	+++
Ku8123	++	-	++	-	+	++	-
Ku8124	++	-	++	++	+	++	-

Activity: - not detected, (+) doubtful, + below 5mm, ++ 5-10mm, +++ above 10mm of the width of inhibition zone.

ては26菌株が、さらに *P. s. pv. syringae* に対してはイネもみ枯細菌病菌の全ての菌株が抗菌活性を示した。この結果、イネもみ枯細菌病菌は全ての菌株が供試したいずれかの指示菌（各種重要植物病原細菌）に対して抗菌活性を示すことが明らかとなった。この際、産生菌（イネもみ枯細菌病菌）と指示菌（各種重要植物病原細菌）との組み合わせによって形成される阻止帯の形状は異なり、明瞭かつ大きな阻止帯を形成する場合、輪郭の不鮮明な阻止帯を形成する場合、あるいは全く阻止帯を形成しない場合などが認められた。指示菌としてトマト青枯病菌を用いた場合に特に大形の阻止帯が形成された。これらの結果はイネもみ枯細菌病菌が質的あるいは量的に異なる多種類の抗菌物質を培地上に産生することを示唆するものである。

## 第2項 イネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病菌株に対する抗菌活性

### 1. 目的

前項でイネもみ枯細菌病菌がトマト青枯病菌に対して特に強い抗菌活性を示すことが明らかとなった。そこでこの抗菌活性の程度がトマト青枯病菌の菌株によって異なるか否かについて検討を行った。また生物的防除に本菌を供試して、その機構を明らかにするためには、本菌の栄養条件と抗菌活性との関係を明確にしておく必要がある。この目的のために、三種の異なる平板培地上における本菌のトマト青枯病菌に対する抗菌活性の程度を検討した。

### 2. 材料と方法

イネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病菌株に対する抗菌活性の検定のために、指示菌としてTable 4に示したトマト青枯病菌の6菌株を用いた。これらトマト青枯病菌6菌株に対する抗菌活性をYPDA平板培地を用いてプレートクロロホルム法 (Fig. 1) により検討した。産生菌はイネもみ枯細菌病菌 YN7805、YN7825、N750、805、N7504、752の6菌株を用いた。

Table 4. Strains of *Pseudomonas solanacearum* used in this experiment

Strain	Host plant	Locality	Pathogenicity	Origin
N6211	green pepper	Kochi	+	NIAES <sup>a)</sup>
N6275	potato	Hokkaido	+	!
C319	tobacco	Kagoshima	+	KTES <sup>b)</sup>
Ku7501-1	egg plant	Fukuoka	+	KU <sup>c)</sup>
Ku7502-1	tomato	Fukuoka	+	!
Ku7601-1	egg plant	Miyazaki	+	!

a) National Institute of Agro-Environmental Sciences.

b) Kagoshima Tobacco Experimental Station.

c) Kyushu University.

また、各種培地上におけるイネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病菌に対する抗菌活性の検定は以下の方法で行った。培地はジャガイモ半合成培地(PSA)、YPD培地、及びKelmanによってナス科植物青枯病菌の病原性識別のために開発されたテトラゾリウム培地(TTC)の3種類を用いた(Table 5)。これら培地をペトリ皿に15 mlずつ分注して固化した後、培地の中央部にPSA斜面培地に30℃で48~72時間培養したイネもみ枯細菌病菌の各菌株を移植し、プレートクロロホルム法(Fig. 1)によって、抗菌活性の程度を検討した。指示菌としてトマト青枯病菌C319を供試した。

Table 5. Media used in this experiment

1) PSA medium	
Potato 300g decoction	1,000 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5 "
Peptone	5 "
Sucrose	15 "
Agar	15 "
pH	7.0
2) YPDA medium	
Peptone	0.6 g
Dextrose	3 "
Yeast extract	3 "
Agar	15 "
Water	1,000 ml
pH	7.2
3) TTC medium	
Peptone	10 g
Dextrose	5 "
Casein hydrolysate	1 "
Triphenyltetrazolium Chloride	5 ml
Water	1,000 "
Agar	17 g

### 3 実験結果

実験の結果はTable 6及び7に示した。Table 6から明らかなようにYN7805、N750、805の3菌株はいずれのトマト青枯病菌の菌株に対しても同様に強い抗菌活性を示したのに対して、YN7825及び752は一部のトマト青枯病菌菌株に対してのみ弱い抗菌活性を示し、さらにN7504は供試した全てのトマト青枯病菌の菌株に対して抗菌活性を示さなかった。このようにイネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病菌に対する抗菌活性は菌株によって著しく異なるが、トマト青枯病菌の感受性には菌株間差異が殆ど認められないことが明らかとなった。

Table 6. Antibiotic spectra of *Pseudomonas glumae* shown by the plate-chloroform method

Producer ( <i>P. glumae</i> )	Indicator ( <i>P. solanacearum</i> )					
	C319	N6275	7601-1	N6211	7502-1	7501-1
YN7805	+++ <sup>a)</sup>	+++	++	++	++	++
YN7825	+	+	+	-	-	+
N7504	-	-	-	-	-	-
N750	+++	+++	+++	+++	+++	+++
752	+	+	-	-	+	-
805	+++	+++	+++	+++	+++	+++

a) Width of inhibition zone, -: not detected, +: below 5 mm, ++: 5-10 mm, +++: above 10 mm  
 b) Bacteria were cultured on YPDA plates at 30 °C for 48 hr and treated with chloroform.

イネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病菌に対する各種培地上における抗菌スペクトラムは、Table 7に示したように供試した培地の種類によって著しく変化した。このことは栄養条件の違いにより産生される抗菌物質が量的あるいは質的に変化するものであることを

Table 7. Effect of the media on the formation of growth inhibition zone by *Pseudomonas glumae* strains on the lawn of *P. solanacearum*

<i>P. glumae</i>	YPDA	PSA	TTC	<i>P. glumae</i>	YPDA	PSA	TTC
N7401	- a)	-	+	8028	+++	-	+
N7501	++	-	+	1	+++	++	+
N7502	-	+	+++	111	++	++	+++
N7503	+	-	++	2	+++	+	++
N7504	-	-	++	Ku8101	+	+	++
N7505	++	++	+++	Ku8102	+	+	+
YN7805	+++	-	++	Ku8103	++	-	++
YN7810	-	++	++	Ku8104	+	-	+
YN7825	-	+	++	Ku8105	++	++	++
742	+++	-	+++	Ku8106	+++	+	++
N750	+++	-	+++	Ku8111	+	+	+++
752	+	++	+++	Ku8112	++	+++	+
805	+++	+++	+++	Ku8113	+++	+	+++
806	+	++	++	Ku8114	+++	++	++
P1-22-1	+++	-	+++	Ku8115	+	-	+
P1-22-2	+	-	++	Ku8116	+	++	+
P1-22-3	+	-	+	Ku8117	+	-	+
P1-22-4	+	-	+	Ku8119	++	-	+
So-1	+++	-	++	Ku8120	+++	-	+++
8001	+	-	+	Ku8121	+++	+++	+++
8012	+	+	+	Ku8122	+++	++	++
8015	-	-	++	Ku8123	++	+	++
8017	+++	-	+	Ku8124	+++	+	++
8020	+	-	++				

a) Width of inhibition zone : -not detected, + below 5 mm, ++ 5-10 mm, +++ above 10 mm.

示すものである。特にTTC培地上では強弱の違いがあるものの全てのイネもみ枯細菌病菌の菌株が抗菌活性を示した(Fig. 2)のに対し、逆にPSA培地上では抗菌活性が認められなくなる菌株が多くなり、YPDA培地上では両培地の中間的な産生性を示した。これらの結果から、供試したイネもみ枯細菌病菌の全ての菌株がトマト青枯病菌に対して抗菌活性能を有する細菌であることが明らかとなった。



Fig. 2. Inhibition zone formed on the lawn of *Pseudomonas solanacearum* by *P. glumae*.

## 第2節 イネもみ枯細菌病菌の抗菌物質産生性

### 第1項 液体培地における抗菌物質の産生

#### 1. 目的

前項に記載したように供試した全てのイネもみ枯細菌病菌は寒天平板培地上においてトマト青枯病菌に対して抗菌活性を示す事が明らかとなった。そこでこの抗菌物質が液体培地中においても同様に産生されるか否かについて検討を行った。

#### 2. 材料と方法

PSA斜面培地上で30℃、48時間培養したイネもみ枯細菌病菌N750及び805をYPD、PS、TTC(組成はTable 5に示したのものから寒天のみを除いたもの)各液体培地が50 mlずつ入った三角フラスコに菌濃度約 $10^6$  cfu/mlになるように接種し、30℃で静置培養を行い、24時間おきに120時間まで経時的に培養菌液を分取した。分取した培養菌液は10,000 × gで10分間の遠心を行ったのち、その上清を孔径0.2 μmのメンブランフィルターを通すことによって完全に除菌し、供試試料とした。試料の抗菌活性はペーパーディスク法によって検定した。すなわち、予め15 mlのYPDA(寒天濃度1.5%)培地を流して固化させたペトリ皿(直径9 cm)に指示菌約 $10^6$  cfu/mlを含むYPDA(寒天濃度: 0.5%)培地5 mlを重層したのち、各試料を約0.7 mlしみ込ませたペーパーディスク(直径8 mm)を置き、30℃で24~48時間培養後、各ディスクの周囲に形成される阻止帯の有無及び大きさによって抗菌物質の産生性を検討した。

さらに、寒天濃度を0、0.1、0.5及び1.5%と4段階に変えたTTC液体培地を作成し、これにPSA斜面培地に30℃で48時間培養したイネもみ枯細菌病菌株N750、805、Ku8121をそれぞれ濃度約 $10^8$  cfu/mlになるように接種し、30℃で5日間培養した後、これらの各培地中における抗菌物質の産生性をペーパーディスク法を用いて調べた。

### 3 実験結果

供試した全ての液体培地で抗菌物質の産生は認められなかった。また、Table 8から明らかのように、イネもみ枯細菌病菌の抗菌物質産生性は寒天濃度の影響を受けることが明らかとなった。すなわち、TTC培地においては寒天濃度が0.5%以上の場合に抗菌物質の産生性が認められた。

Table 8. Effect of agar concentration of TTC medium on production of anti-*Pseudomonas solanacearum* substances by *P. glumae*

Strain	Agar concentration (%)			
	0	0.1	0.5	1.5
N750	-	-	+	+
805	-	-	+	+
Ku8121	-	-	+	+

## 第2項 抗菌物質産生性に及ぼす寒天抽出液の効果

### 1. 目的

培地中の寒天濃度がイネもみ枯細菌病菌の抗菌物質産生性に関与する事が明らかとなった。そこで寒天中に含まれる微量成分が抗菌物質の産生性に関与する可能性を考え、その成分を明らかにする目的で実験を行った。

### 2. 材料と方法

蒸留水1,000 mlに対して30 gの寒天粉末(片山化学)を溶かし、暫らく攪拌した後、4℃で一昼夜静置し、濾過によって寒天の水抽出液を得、この液にペプトン 10 g、D-グルコース 5 g、カゼイン 1 gを添加して加圧滅菌を行い、寒天抽出液体培地を作成した。この培地にPSA斜面培地に30℃で48時間培養したイネもみ枯細菌病菌N750を約 $10^7$  cfu/mlになるように接種し、30℃で培養し、産生される抗菌物質と菌数の変動及びpHの変化を経時的(0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30日)に調べた。またこの抗菌物質の抗菌スペクトラムをペーパードイスク法によって調べた。

### 3. 実験結果

実験の結果はFig. 3に示した。Fig. 3から明らかのように寒天抽出液体培地中において抗菌物質の産生性が認められた。すなわち培地中の菌数が最大( $7 \times 10^8$  cfu/ml)に達した培養4日後において抗菌活性は最も高くなり、この活性は16日後まで維持され、培養開始から19日目には活性は全く認められなくなった。菌数は培養4日

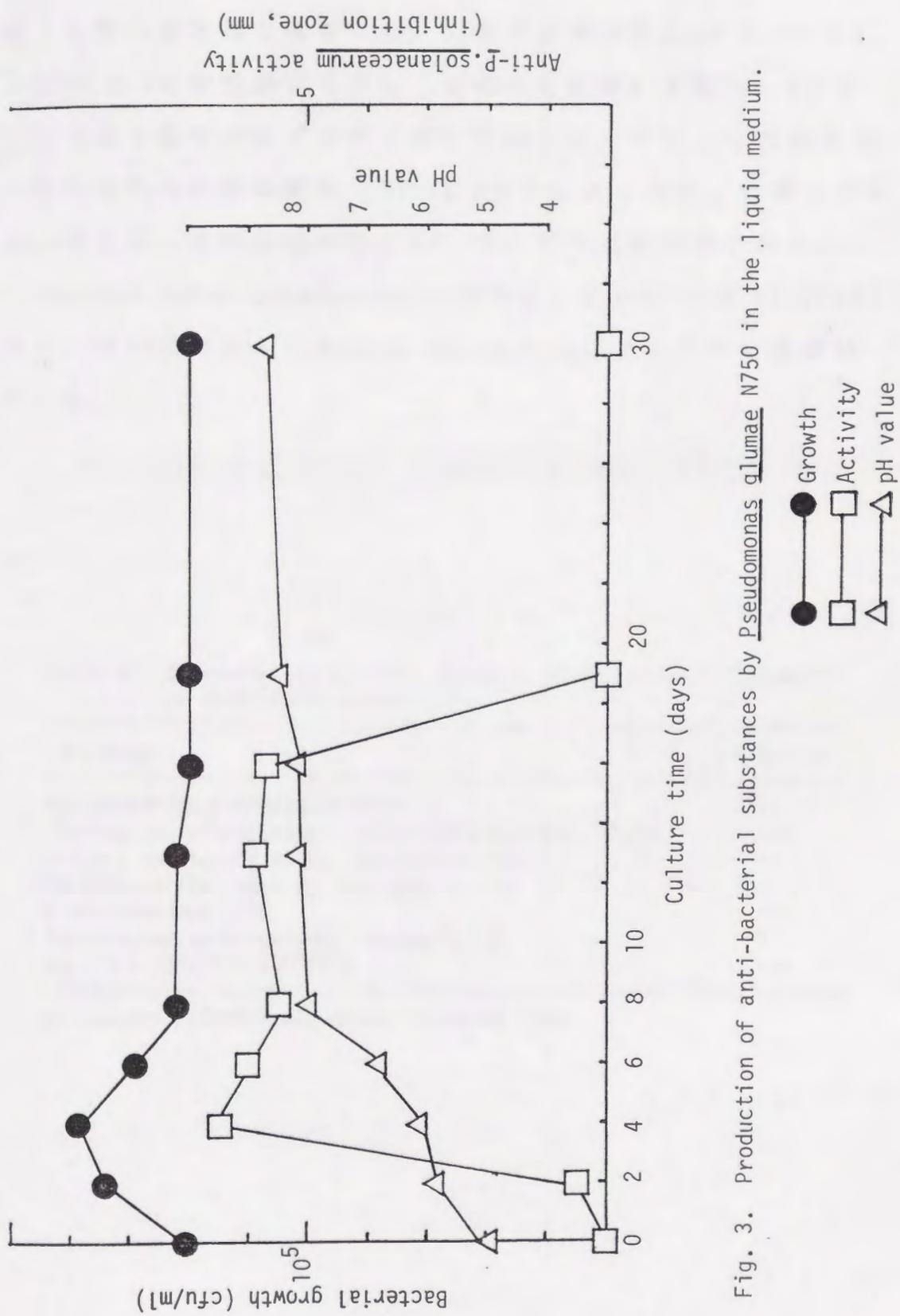


Fig. 3. Production of anti-bacterial substances by *Pseudomonas glumae* N750 in the liquid medium.

目以降から徐々に減少し、8日目以降から30日目まで約 $10^7$  cfu/mlの濃度で安定した状態で生存した。pH値は培養開始のpH 5.0から8日目までpH 8.0と酸性側からアルカリ側へと急激に変動し、8日目以降30日目まで緩やかにアルカリ側に変動した。また、この液体培地中で産生される抗菌物質は、Table 9に示したように、供試した5種の指示菌に対して抗菌活性を示し、特にグラム陽性菌である*C. michiganensis* subsp. *michiganensis* N6601、*B. subtilis* ATCC6633及びグラム陰性菌である*P. solanacearum* C319に対して強い抗菌活性を示した。

Table 9. Antibacterial activity shown by of the culture filtrate<sup>a)</sup> of *Pseudomonas glumae* N750

Indicator	Activity
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ku7411	++
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> N6601	+++
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> N7129	++
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> I	+
<i>P. solanacearum</i> C319	+++
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> T7174	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	+++

a) Culture filtrate was concentrated 10 times.

### 第3項 Fe<sup>3+</sup>の添加による阻止帯形成能の変化

#### 1. 目的

コムギ立枯病の生物的防除に、あるいはジャガイモ、サトウダイコン等多くの作物の収量を増加させる細菌として *P. fluorescens*<sup>173, 175, 176, 184, 186, 189</sup>、あるいは *P. putida*<sup>17, 28, 110, 140</sup> が知られている。この機作の一つとしてシデロフォア- (siderophore) の産生性が報告されている<sup>85, 150, 161, 162</sup>。シデロフォア-の産生性を検定するためには FeCl<sub>3</sub> を添加した培地を使用することによって阻止帯の形成が抑制されるか否かによる<sup>5, 6, 48, 49, 140</sup>。そこでイネもみ枯細菌病菌の形成する阻止帯はこのようなシデロフォア-の産生性によるものか或いは一般的な抗菌物質によるものかを明らかにする目的で以下の実験を行った。

#### 2. 材料と方法

供試菌株として、イネもみ枯細菌病菌5菌株 (N750, Ku8112, 805, Ku8121, N7504) 及びトマト青枯病菌 C319 を用いた。供試培地としては、シデロフォア-の産生性を調べるために一般に用いられている King's B 培地 (Proteose Peptone No. 3 (Difco) 20 g, リン酸一水素カリウム 1.5 g, 硫酸マグネシウム 1.5 g, グリセリン 10 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.2) に、FeCl<sub>3</sub> 無添加、及び培地中の濃度が 50、150 μmol/l となるように FeCl<sub>3</sub> を加えた培地を使用した。検定法は Fig. 1 に示した方法に従い行った。

### 3 実験結果

実験の結果はTable 10に示した。Table 10から明らかなように供試した全ての菌株はいずれの濃度の鉄を添加することによっても阻止帯の形成に変化は認められなかった。すなわち、イネもみ枯細菌病菌による阻止帯形成にシデロフォア-は関与していないことが明らかとなった。

Table 10. Effect of the addition of  $\text{Fe}^{3+}$  to King's B medium on the antibacterial activity

<i>Pseudomonas glumae</i>	Amount of $\text{Fe}^{3+}$ added to medium ( $\mu\text{mol/l}$ )		
	0	50	150
N750	+ <sup>a)</sup>	+	+
805	+	+	+
N7504	+	+	+
Ku8112	+	+	+
Ku8121	+	+	+

a) Activity, +: Inhibition zone was formed.

### 第3節 考察

本実験に供試したイネもみ枯細菌病菌は各種重要植物病原細菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを示す細菌であることが明らかとなった。抗菌活性の強さ及びそのスペクトラムは菌株により異なっていた。すなわち、産生菌と指示菌との組み合わせにより、明瞭かつ大きな阻止帯を形成する場合と、全く形成しない場合とがあり、菌株間に著しい差異が存在することが認められ、本供試菌は多種類の抗菌物質を産生する能力を有するものと推察された。

培地上で阻止帯を形成する原因物質として、従来、バクテリオシン、バクテリオファージ、シデロフォア一等が知られている。

*Pseudomonas*属細菌にはバクテリオシンについての報告が多数あり<sup>25, 26, 159)</sup>、イネもみ枯細菌病菌にもその産生能が認められた。しかし、供試した7種類の重要植物病原細菌はイネもみ枯細菌病とは遠縁であることから、これに対して示す抗菌活性は、バクテリオシンによるものとは考えられない。またGeels<sup>48, 49)</sup>らは $Fe^{3+}$ の少ない培地中で $Fe^{3+}$ の競合が起こり阻止帯が形成されること、その要因が培地中に産生されるシデロフォアーによることを報告している。しかし、イネもみ枯細菌病菌の示す抗菌活性は、King's B培地に $Fe^{3+}$ を加用しても全く影響を受けない事からシデロフォアーとは異なるものと考えられた。また畔上<sup>5, 6)</sup>ら、Lindberg<sup>97)</sup>らによって*Pseudomonas*属細菌のトロポロン(Tropolone)産生性が報告されている。特に畔上らは、苗立枯症を起こしたイネ幼苗からイネもみ枯細菌病菌に近縁の細菌*P. plantarii*<sup>5, 6)</sup>を分離し、本菌の産生するトロポロンによる発根抑制の結果苗立枯症が発生するものとしている<sup>5)</sup>。

一方、Lindberg<sup>97)</sup>らはトロポロンが多くの糸状菌に対して殺菌作用を有する事を報告している。しかし、イネもみ枯細菌病菌の産生する抗菌物質は酢酸エチルで抽出されないこと、及び320 nmの特異吸収が認められないことなどからトロポロンとは異なるものである。

イネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病菌に対して示す抗菌活性は供試した培地の種類によってその産生が大きく異なることから、栄養条件の違いにより産生される抗菌物質が質的あるいは量的に変化する可能性が推察された。供試したイネもみ枯細菌病菌47菌株は3種類(YPDA, PSA, TTC)の培地を用いれば、全ての菌株がトマト青枯病菌に対して抗菌活性を示した。また、イネもみ枯細菌病菌の産生する抗菌物質は寒天平板培地上では産生されるが、液体培地中では産生されない事が明らかとなり、特に培地中の寒天濃度が重要な要因の一つである事が認められた。即ち、イネもみ枯細菌病菌は寒天中に含まれるある微量成分を栄養源として利用した場合に抗菌物質を産生するものと考えられた。そして、イネもみ枯細菌病菌の抗菌活性に対するトマト青枯病菌の感受性には菌株間差異は認められなかった。

以上、イネもみ枯細菌病菌は多種類と思われる抗菌物質を *in vitro* で産生する細菌である事が明らかとなり、これら産生性を利用することによる生物的防除材としての利用の可能性が示唆された。

## 第2章 イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病の発病抑制とその機構

ナス科植物青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) によって引き起こされる各種野菜類の青枯病は最も重要な土壌伝染性細菌病である。本菌はトマトの他、33科100余種にわたる多くの作物に寄生し世界各国で激しい被害をもたらしている<sup>76)</sup>。

本病の防除には、抵抗性品種の利用<sup>106)</sup>、輪作、土壌消毒等の方法が従来からとられているが、それらの効果は充分ではなく、新しい防除法の開発が望まれている。

第1章において、イネもみ枯細菌病菌は各種重要植物病原細菌に対して *in vitro* で幅広い抗菌スペクトラムを持つ細菌である事が明らかとなり、生物的防除材としての本菌の利用の可能性が考えられた。そこで本菌によるトマト青枯病発病抑制効果について調べ、更にその機作について検討を行った。

### 第1節 トマト青枯病菌の接種法と発病条件

#### 第1項 接種用強病原性菌株の選別

##### 1. 目的

トマト幼苗に対して強い病原性を示す菌株を選別するために針接種により各菌株の病原力を比較した。

## 2. 材料と方法

Table 4に示した6菌株を供試した。これら菌株は実験の度に水保存菌をTTC培地に画線し、30℃で48時間培養し、出現した乳白色で流動性のコロニーを多針でかき取りこれを、予め70%エタノールで表面殺菌した播種後20日目(約20cm)のトマト(品種:東光)幼苗の茎に刺すことによって接種した。接種後5日目に病徴の程度を0:健全、1:本葉の1~50%が萎凋、2:本葉の50%以上が萎凋、3:枯死の4段階に分けて調査した。

## 3. 実験結果

Table 11に示したように、菌株C319がトマト幼苗に対して強い病原性を示したため、実験には主として本菌株を供試した。

Table 11. Comparison of virulence to tomato plant among *Pseudomonas solanacearum* strains

Strain	Disease severity
N6211	0.2
N6275	0.9
C319	1.0
Ku7501-1	0.3
Ku7502-1	0.1
Ku7601-1	0.3
Control	0.0

$$\text{a) Disease severity} = \frac{1 \times A + 2 \times B + 3 \times C}{3 \times (\text{number of plants used})}$$

Disease index was ranged to 0 (no visible wilting), 1 (1-50% leaves wilted), 2 (more than 50% leaves wilted) and 3 (completely wilted or dead). The number of the plant fell into each range was A, B, and C, respectively.

## 第2項 浸根接種法によるトマト青枯病の発病率と菌濃度との関係

### 1. 目的

トマト青枯病を人工接種によって発病させるには、各種の条件が必要である。つまり、トマト青枯病菌は *in vitro* で病原性菌株から弱病原性菌株への変異が起こり易いために、速かに病原性が低下したりまたは喪失することが多く、人工接種によりトマトを発病させるためには病原性菌株の分離が重要となる<sup>75, 78)</sup>。また、土壌中へ灌注して接種する場合には、温度条件が大きく影響し、30℃前後の高い温度が必要である。しかし、浸根接種を行うと比較的に高い発病率が得られたために、この接種法を用いてまずトマト青枯病菌の菌濃度と発病率との関係を検討した。

### 2. 材料と方法

供試菌株としてトマト青枯病菌C319を用いた。実験の度に水保存<sup>182)</sup>のトマト青枯病菌をTTC培地上<sup>77)</sup>に白金耳で画線し、30℃で48時間培養後、出現した乳白色で流動性の大型コロニーを白金耳で少量かきとり、200 mlのPS液体培地に接種し、30℃で24~48時間振とう培養後、遠心(10,000 × g、20分)によって菌体を集め、これを滅菌水に懸濁し、10倍段階に希釈して約 $10^8 \sim 10^3$  cfu/ml程度の細菌懸濁液を作り接種源とした。各希釈液中に含まれる正確な菌数は常法に従って希釈平板法により求めた。トマト苗(品種: 東光)は滅菌土壌に播種した、播種後約2週間目のもの(約10~15 cm)を実験に供試した。苗はポットから根部を傷つけないように注意深く抜き、水道水で十分に水洗して土壌を落とし、この根部を上述の方法で作成

した濃度約 $10^8 \sim 10^3$  cfu/mlの細菌懸濁液に浸根することにより病原菌を接種した。浸根接種時間は室温で約10分間とした。接種後は直ちに100 gの滅菌土壌の入った60 × 60 × 45 mmの容器に1本ずつ定植し、25～30 ℃の空調温室に置き、5日間隔で発病率を調査した。

### 3. 実験結果

結果はTable 12に示した。Table 12から明らかのように、接種菌濃度の増加に伴い、発病率は高くなる傾向が認められた。約 $10^8$ 及び $10^7$  cfu/mlの細菌懸濁液で浸根接種した場合、接種後30日目にはともに発病率が100 %となり、供試した全ての個体が完全に萎凋、枯死した。しかし、 $10^6$  cfu/mlで浸根接種した場合には、発病率は30日目においても高まらず、感染・発病の認められない個体が多くなる傾向にあった。さらに、 $10^3$  cfu/mlの細菌懸濁液で浸根接種した場合には、発病率は0であり、発病は全く認められなかった。この結果から、10分間の浸根接種法を用いて高い発病率を得るためには少なくとも $10^7$  cfu/ml以上の細菌懸濁液に浸根接種する必要がある、またこの接種法による最低発病濃度は、 $10^4$  cfu/mlであった。

Table 12. Relationship between inoculum concentration and disease appearance

<i>P. solanacearum</i> <sup>a)</sup> (conc. cfu/ml)	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
		5	15	30 days
10 <sup>8</sup>	24	75	100	100
10 <sup>7</sup>	24	17	83	100
10 <sup>6</sup>	24	8	67	67
10 <sup>5</sup>	24	0	50	58
10 <sup>4</sup>	24	0	17	17
10 <sup>3</sup>	24	0	0	0

a) Dip treatment for 10 min.

## 第2節 イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病発病抑制効果

### 第1項 混合液の針接種法によるトマト青枯病発病抑制効果

#### 1. 目的

Lincoln<sup>9,6)</sup>は *Xanthomonas stewartii* の病原性菌株と非病原性菌株の混合液をトウモロコシに接種した場合に発病が抑制される事を示し、また、Averre及びKelman<sup>4)</sup>らはトマト青枯病菌の病原性菌株と非病原性菌株の濃度比の異なる混合液をタバコ、トマト、ナスの茎に針接種する場合、非病原性菌株の濃度が病原性菌株のそれよりも高いと発病抑制効果が認められる事を示した。このようなトマト青枯病に対する発病抑制がイネもみ枯細菌病菌をトマト青枯病菌に

混合して接種した場合にも認められるか否かについて検討した。

## 2 材料と方法

空調温室内(温度: 25~30 ℃)で生育した播種後3週間目のトマト苗(約 20 cm)を供試した。PSA斜面培地に30 ℃で48時間培養したイネもみ枯細菌病菌N750とトマト青枯病菌C319をそれぞれ滅菌水に懸濁し、10段階希釈によって各濃度(N750:  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ , C319:  $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  cfu/ml)に調整し、両者を等量混合した菌液を、予め70 %エタノールで表面殺菌したトマトの茎に多針接種を行った。対照としては、トマト青枯病菌の菌液を滅菌水で2倍に希釈したものを接種した。発病率を接種後5、8日目に調査した。

## 3 実験結果

実験結果はTable 13に要約した。Table 13から明らかのように接種後5日目においてトマト青枯病菌を単独接種した対照区の $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$  cfu/mlでは100 %、 $10^3$  cfu/mlでは83 %の発病率が認められたのに対し、イネもみ枯細菌病菌を混合して接種した場合、イネもみ枯細菌病菌の菌濃度がトマト青枯病菌の菌濃度よりも高い場合には全て発病を抑制した。しかし、8日目にはトマト青枯病菌の菌濃度が $10^3$  cfu/ml区を除くと大部分の区で発病率が高まり、対照区の発病率とほぼ同じ値を示した。これらの結果から、混合液中のイネもみ枯細菌病菌の菌濃度がトマト青枯病菌の菌濃度よりも高い場合にトマト青枯病の初期の発病を抑える傾向が認められたが、その効果はほとんど持続性のないものであった。

Table 13. Protection of tomato seedlings from *Pseudomonas solanacearum* infection by mixed inoculation with *P. glumae* at different concentrations

Concentration (cfu/ml)		No. of test plants	Percentage of wilted plants	
<i>P. g</i> <sup>a)</sup>	<i>P. s</i> <sup>b)</sup>		5	8 days
10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	9	89	89
10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	9	44	100
10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup>	9	11	11
10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	9	0	0
-----				
10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	9	100	100
10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	9	78	89
10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	9	78	100
10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>	9	0	22
-----				
10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	9	100	100
10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	9	78	89
10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	9	67	78
10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	9	22	67
-----				
10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	9	100	100
10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	9	78	78
10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	9	100	100
10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	9	11	56
-----				
0	10 <sup>6</sup>	6	100	100
0	10 <sup>5</sup>	6	100	100
0	10 <sup>4</sup>	6	100	100
0	10 <sup>3</sup>	6	83	83

a) *P. glumae* N750

b) *P. solanacearum* C319

## 第2項 浸根処理による発病抑制効果

### 1. 目的

前項でイネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌との混合液をトマト幼苗の茎に接種した場合に発病の進展が抑制されたが、その効果は著しいものではなかった。そこで、トマト幼苗の根部をイネもみ枯細菌病菌の細菌懸濁液で浸根処理(バクテリゼーション)<sup>11)</sup>することによる発病抑制効果について検討した。

### 2. 材料と方法

トマト青枯病菌に対して強い抗菌活性の認められたイネもみ枯細菌病菌N750及びトマト幼苗に対して強い病原性を示したトマト青枯病菌C319を供試した。トマト青枯病菌の細菌懸濁液は、第1節、第2項に記した方法に従って作成し、菌濃度 $10^{10}$  cfu/mlに調節した。イネもみ枯細菌病菌は、水保存菌をPSA斜面培地に植え、30℃で48～72時間培養したものを供試した。これを滅菌蒸留水10 mlに懸濁(菌濃度: 約 $10^8$  cfu/ml)し、これを200 mlのPS液体培地に加え、30℃で48時間振盪培養し、遠心(8,000 × g、20分)で菌体を集め、これを滅菌水に懸濁し、約 $10^{10}$  cfu/mlの細菌懸濁液を作成した。浸根処理及び浸根接種はFig. 4に示した方法で行った。すなわち、播種後2週間目のトマト幼苗を土壌から注意深く抜き取り、根部を水道水で十分に洗浄後、その根部を、上述の方法で作成したイネもみ枯細菌病菌の細菌懸濁液に種々の時間(10分、1、12、24時間)浸漬した。イネもみ枯細菌病菌の細菌懸濁液の代わりに滅菌水に浸根したものを対照とした。浸根処理したトマト幼苗の根部は、直ちにトマト青

枯病菌の細菌懸濁液(菌濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)に10分間浸根接種後100 gの滅菌土壌の入った60 × 60 × 45 mmの容器に1本ずつ移植し25~30 ℃の空調温室内に置き、発病株を経時的に調査した。また、イネもみ枯細菌病菌の処理濃度及びトマト青枯病菌の接種菌濃度の違いが発病抑制効果に及ぼす影響について検討するために、イネもみ枯細菌病菌の菌濃度を約 $10^{10}$ 、 $10^9$ 、 $10^8$  cfu/ml、トマト青枯病菌の菌濃度約 $10^{10}$ 、 $10^8$  cfu/mlで同様な実験を行った。

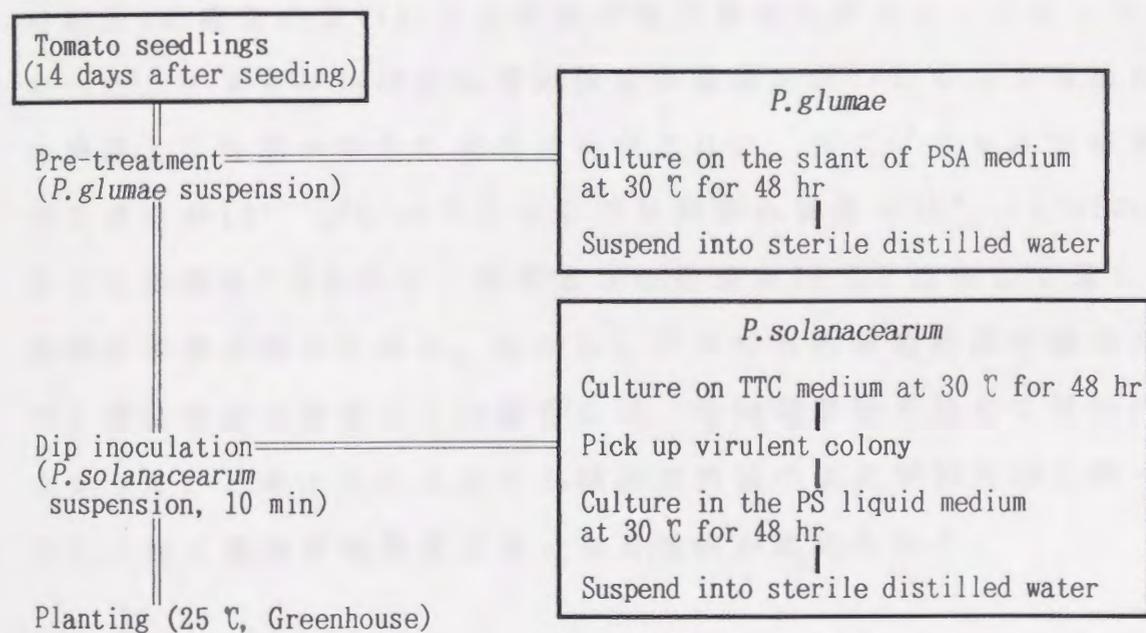


Fig. 4. Method for testing protection effect of *Pseudomonas glumae* on tomato seedlings from infection with bacterial wilt.

### 3 実験結果

結果はFig. 5及びTable 14、15に示した。イネもみ枯細菌病菌 N750の細菌懸濁液(菌濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)で浸根処理することによりトマト青枯病の発病が抑制されることが明らかとなった(Fig. 5)。しかし、この効果は浸根処理時間に影響された。すなわち、10分間、1時間の浸根処理では無処理区との間に発病率の差はなく、発病抑制効果は認められなかった。しかし、12時間以上の浸根処理により発病個体数が無処理区の場合と比較して著しく少なくなり、発病が抑制されることが明らかとなった。特に24時間の浸根処理ではほぼ完全に発病を抑制することができた(Table 14)。また、Table 15に示すように、処理菌(イネもみ枯細菌病菌)と接種菌(トマト青枯病菌)の濃度の違いにより発病抑制効果が異なることが明らかとなった。イネもみ枯細菌病菌の濃度が接種に用いたトマト青枯病菌の濃度よりも高い場合に発病は抑制された。特にイネもみ枯細菌病菌の濃度が $10^{10}$  cfu/mlでトマト青枯病菌の濃度が $10^8$  cfu/mlの場合には発病率5%となり、無処理区の発病率70%と比較して著しい発病の抑制が認められた。しかし、イネもみ枯細菌病菌の濃度がトマト青枯病菌の濃度以下の場合には、発病抑制効果は全く認められなかった。このようにイネもみ枯細菌病菌の濃度が相対的に高くなるにつれて発病抑制効果は高くなる傾向が認められた。

Table 14. Protection of tomato seedlings from bacterial wilt<sup>a)</sup> by pre-treatment with the suspension of avirulent *Pseudomonas glumae* strain N750

Time of pre-treatment (dipping)		No. of test plants	Percentage of wilted plants		
			10	20	30 days
10 min	Treated <sup>a)</sup>	20	30	60	60
	Control <sup>b)</sup>	20	30	70	70
60 min	Treated	20	50	60	60
	Control	20	70	70	70
12 hr	Treated	20	5	5	5
	Control	20	60	70	70
24 hr	Treated	20	0	0	0
	Control	20	10	40	70

a) Tomato seedlings were pre-treated with *P. glumae* N750 suspension (conc. ca.  $10^{10}$  cfu/ml) and inoculated with *P. solanacearum* strain C319 (conc. ca.  $10^8$  cfu/ml) by dipping their roots just after pre-treatment.

b) Sterile distilled water was used instead of *P. glumae* suspension.



Fig. 5. Protection of tomato seedlings from bacterial wilt by pre-treatment with the suspension of *Pseudomonas glumae*.

A: Control

B: Pre-treatment

Table 15. Protection of tomato seedlings from infection of *Pseudomonas solanacearum* by pre-treatment with different concentrations of *P. glumae* suspension

<i>P. glumae</i> <sup>a)</sup> (cfu/ml)	<i>P. solanacearum</i> <sup>b)</sup> (cfu/ml)	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
			10	20	30 days
10 <sup>10</sup>	10 <sup>8</sup>	20	5	5	5
10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	20	20	30	35
10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	20	25	25	25
0	10 <sup>8</sup>	20	60	70	70
-----					
10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	20	35	40	40
10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	20	45	60	60
10 <sup>8</sup>	10 <sup>10</sup>	20	60	65	65
0	10 <sup>10</sup>	20	65	70	70

a) Pre-treatment for 24 hr.

b) Dip inoculation for 10 min.

### 第3項 土壌の種類と発病抑制効果

#### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病の発病抑制効果が土壌の種類により影響を受けるか否かについて検討した。

#### 2. 材料と方法

福岡県瀬高市において青枯病が多発した圃場から採取した粘土質土壌を瀬高土壌とした。また九大農学部貝塚温室において常時植物育成のために用いている土壌を九大土壌とした。更に園芸用に調節した土壌(中原採種場株式会社から購入)を培養土とし、これら3種類の土壌を実験に供試した。これらの土壌は、40 × 40 × 65 mmの容器に約100 gずつ入れ、121 ℃、1.5 気圧で20分間の高圧滅菌処理

を施した。Fig. 4に示した方法に従って処理したトマト幼苗をこれらの土壌に移植し、25~30℃の空調温室内に置き、経時的(移植後10、15、20日)に発病株の調査を行った。

### 3 実験結果

実験の結果はTable 16に要約した。Table 16から明らかなように供試した3種類の土壌のいずれにおいても処理区での発病は全く認められず、対照区の発病率と比較して明らかな発病抑制効果が認められた。この結果から、イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病の発病抑制効果は土壌の物理化学的な影響は受けないものと推察した。

Table 16. Suppression of tomato bacterial wilt expressed in different soils by pre-treatment with *Pseudomonas glumae*

Soil <sup>a)</sup>		No. of test plants	Percentage of wilted plants		
			10	15	20 days
Setaka	Control	21	29	33	33
	Treatment	21	0	0	0
Kyushu Univ.	Control	19	11	16	21
	Treatment	21	0	0	0
Baiyoudo	Control	21	25	43	43
	Treatment	19	0	0	0

a) Setaka: Paddy soil of Setaka, Fukuoka Prefecture.  
 Kyushu Univ.: Paddy soil of the University Farm.  
 Baiyoudo: Fertilized soil purchased from Nakahara Seed Products Co. Ltd.

#### 第4項 トマト青枯病発病抑制効果の菌株間差異

##### 1. 目的

前項までの結果から抗菌物質産生能を有する、イネもみ枯細菌病菌 N750 菌株でトマト幼苗の根部を浸根処理することによりトマト青枯病の発病が抑制されることが明らかとなった。この発病抑制効果のイネもみ枯細菌病菌菌株間差異及びトマト青枯病菌菌株間差異について検討を行った。

##### 2. 材料と方法

浸根処理に用いたイネもみ枯細菌病菌の菌株として 805、YN7825、752、Ku8117、P1-22-4 の計 5 菌株を供試した。また、トマト青枯病菌の病原性菌株として Table 4 に示した計 6 菌株を供試した。発病抑制効果の検討は Fig. 4 に示した方法で行った。

##### 3. 実験結果

実験の結果は Table 17 及び Table 18 に要約した。Table 17 に示したようにイネもみ枯細菌病菌 N750 以外の菌株 805、YN7825、752、Ku8117、P1-22-4 でトマト幼苗の根部を浸根処理した場合、トマト青枯病菌の接種菌濃度が  $10^{10}$  cfu/ml においては、接種後 30 日目に 805、P1-22-4 では発病率がそれぞれ 87 %、72 % であるのに対して 752、Ku8117 ではそれぞれ 44 %、56 % と低く、菌株間により発病抑制効果の程度に若干の差異が認められた。しかし、接種菌濃度が  $10^8$  cfu/ml の場合、供試した全ての菌株が高い発病抑制効果を示し、菌株間差異は殆ど認められなかった。また、Table 18 に示したよう

に、供試した全てのトマト青枯病菌による発病が抑制された。特に Ku7502-1、N6275、C319による発病を顕著に抑制したが、Ku7601-1 及びN6211に対する効果は劣り、トマト青枯病菌の菌株によって発病抑制効果の程度に若干の差異が認められることが明らかとなった。

Table 17. Comparison of *Pseudomonas glumae* strains on the protection of tomato seedlings from bacterial wilt infection

<i>P. glumae</i> <sup>a)</sup> (strain)	<i>P. solanacearum</i> <sup>b)</sup> (cfu/ml)	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
			5	15	30 days
Ku8117	10 <sup>10</sup>	18	6	56	56
	10 <sup>8</sup>	18	0	17	17
752	10 <sup>10</sup>	18	11	44	44
	10 <sup>8</sup>	18	0	17	22
P1-22-4	10 <sup>10</sup>	18	17	72	72
	10 <sup>8</sup>	18	0	17	17
Control	10 <sup>10</sup>	18	83	100	100
	10 <sup>8</sup>	18	44	89	89
805	10 <sup>10</sup>	15	0	80	87
	10 <sup>8</sup>	15	0	33	33
YN7825	10 <sup>10</sup>	15	0	60	60
	10 <sup>8</sup>	15	0	33	33
Control	10 <sup>10</sup>	15	0	100	100
	10 <sup>8</sup>	15	0	93	93

a) Conc. ca. 10<sup>10</sup> cfu/ml, dip the roots for 24 hr.

b) Dip inoculation, 10 min.

Table 18. Protection of tomato seedlings from different strains of *Pseudomonas solanacearum* by pre-treatment with *P. glumae* N750

Inoculum ( <i>P. solanacearum</i> )		No. of test plants	Percentage of wilted plants		
			10	20	30 (days)
Ku7601-1	Treated	18	33.3	44.4	55.6
	Control	18	66.7	83.3	83.3
Ku7501-1	Treated	15	40.0	46.7	46.7
	Control	15	93.3	93.3	93.3
Ku7502-1	Treated	18	5.6	5.6	27.8
	Control	18	61.1	66.7	72.2
N6275	Treated	18	20.0	26.7	26.7
	Control	18	93.3	93.3	93.3
N6211	Treated	18	22.2	33.3	55.6
	Control	18	55.6	61.1	72.2
C319	Treated	18	13.3	20.0	20.0
	Control	18	93.3	93.3	93.3

### 第3節 イネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌の 各種条件下における競合

#### 第1項 液体培地中、滅菌水中及び滅菌土壌中における競合

##### 1. 目的

液体培地中、栄養分の極端に限られている滅菌水中及び滅菌土壌中におけるイネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌との競合関係について検討した。また、各種条件下におけるイネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌との競合関係を明らかにするためには、混合培養中の両菌を経時的に定量しなければならない。その定量を容易に行うためにストレプトマイシン耐性菌を作出して利用した。

##### 2. 材料と方法

イネもみ枯細菌病菌N750とそれから得られたストレプトマイシン耐性菌(N750-SR)及びトマト青枯病菌C319を供試した。耐性菌の分離のためには、PSA斜面培地で48~72時間培養したイネもみ枯細菌病菌N750をストレプトマイシン硫酸塩1~5 ppm含有YPDA培地に移植し、30℃で72~96時間培養後、ストレプトマイシン耐性変異株を選抜した後、次第にストレプトマイシンの濃度を上げて培養し、より強度の耐性変異株を選抜することにより、500 ppm耐性の菌株を得た。このようにして得られた耐性菌株は滅菌蒸留水10 mlに懸濁し、25℃で保存した。各菌株はPSA斜面培地に30℃で48~72時間培養後、所定の濃度になるように滅菌水に懸濁し、イネもみ枯細菌病菌N750-SRとトマト青枯病菌C319の混合液を作成して接種源とした。拮抗

性を検討するための培地としてはYPD液体培地の原液とその100倍希釈液を用いた。これらの培地に両菌の混合液を移植した後、30℃で静置培養した。試験区の構成及び細菌濃度はTable 19に示した通りである。ストレプトマイシン耐性菌の定量用培地としてはストレプトマイシン500 ppm含有YPD平板培地を使用した。

イネもみ枯細菌病菌及びトマト青枯病菌は両菌とも滅菌水中で増殖することが知られているので、滅菌水中における競合関係についても同様の方法で検討した。また、滅菌土壌中における競合関係について検討するために、試験管に培養土5 gを入れ加圧滅菌後、この土壌にTable 20に示した構成に基づいて細菌液を添加し、経時的(0、1、3、5、10、15、20、25日)にこれら接種源から一定量の試料を取り出し、10 mlの滅菌水に懸濁し、十分に振とう後、YPD平板培地及びストレプトマイシン500 ppm含有YPD平板培地を用いて希釈平板法により菌の定量を行った。

Table 19. Scheme for testing growth competition between *Pseudomonas glumae* and *P. solanacearum* in YPD medium

Code	Bacteria	YPD (ml)	Water (ml)	Bacterial suspension	
				N750-SR (ml)	C319 (ml)
A	N750-SR	50	5	5	
B	C319	50	5		5
C	N750-SR+C319	50		5	5
D	N750-SR	0.5	54.5	5	
E	C319	0.5	54.5		5
F	N750-SR+C319	0.5	49.5	5	5

Concentration of bacterial suspension.

N750-SR:  $4.5 \times 10^2$  cfu/ml, C319:  $1.8 \times 10^2$  cfu/ml

Table 20. Scheme for testing growth competition between *Pseudomonas glumae* and *P. solanacearum* in soil

Code	Bacteria	Soil (g)	Water (ml)	Bacterial suspension (ml)			
				N750	N750-SR	C319	C319-SR
A	N750-SR+C319	5	3		0.5	0.5	
B	N750+C319-SR	5	3	0.5			0.5
C	N750-SR	5	3.5		0.5		
D	C319-SR	5	3.5				0.5

### 3. 実験結果

実験結果はFig. 6、7、8に要約した。Fig. 6に示したようにトマト青枯病菌C319を濃度の異なるYPD液体培地に $3.0 \times 10^8$  cfu/mlになるように接種し、単独培養した場合、その細菌数は時間の経過とともに増加し、54時間後にはYPD培地原液中で $2.0 \times 10^8$  cfu/ml、100倍希釈培地では $1.3 \times 10^8$  cfu/mlに達した。イネもみ枯細菌病菌N750-SRと混合培養した場合、トマト青枯病菌C319の増殖は抑制されず単独培養した場合と比較して差は認められなかった。イネもみ枯細菌病菌N750-SRの増殖は、トマト青枯病菌C319との混合によって抑制される傾向が認められ、その抑制の程度はYPD原液中よりも100倍希釈培地中において低い傾向を示した。

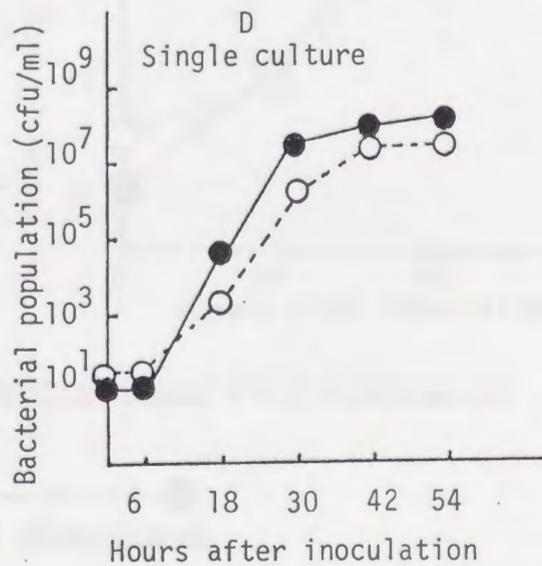
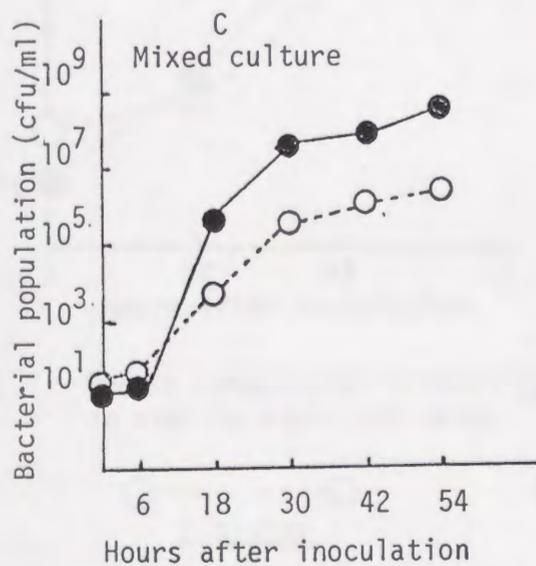
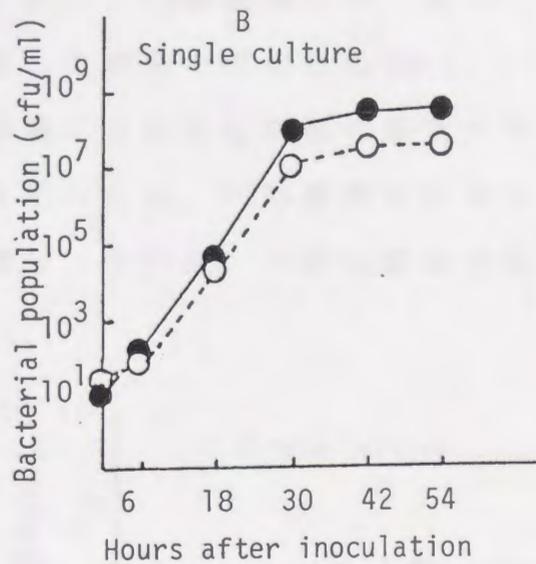
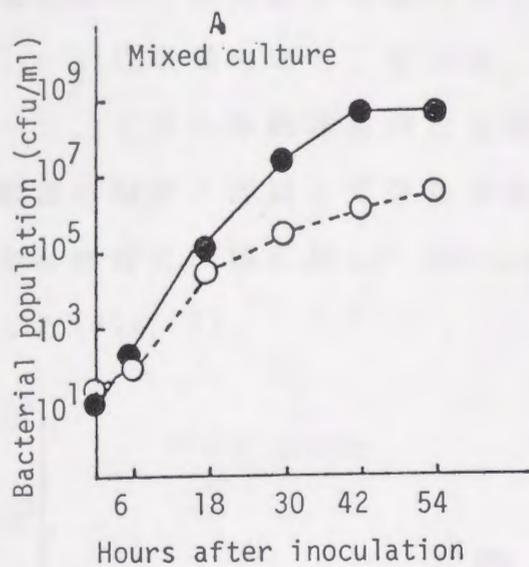


Fig. 6. Growth competition between *Pseudomonas glumae* and *P. solanacearum* in YPD medium.

○ — — — ○  
*P. glumae*

● — — — ●  
*P. solanacearum*

A,B: YPD medium

C,D: Hundred times diluted YPD medium

また、滅菌蒸留水中においてトマト青枯病菌は単独、混合両培養法においてほぼ同じ増殖パターンを示し、72時間後には一旦 $10^6$  cfu/mlに増殖ののち、その後、安定した状態で生存した(Fig. 7)。一方、イネもみ枯細菌病菌は混合培養においては増殖の速度が単独培養の場合と比較して遅れる傾向を示したが、72時間後にはトマト青枯病菌と同様に約 $10^6$  cfu/mlに達し、その後、一定の濃度で生存した(Fig. 7)。

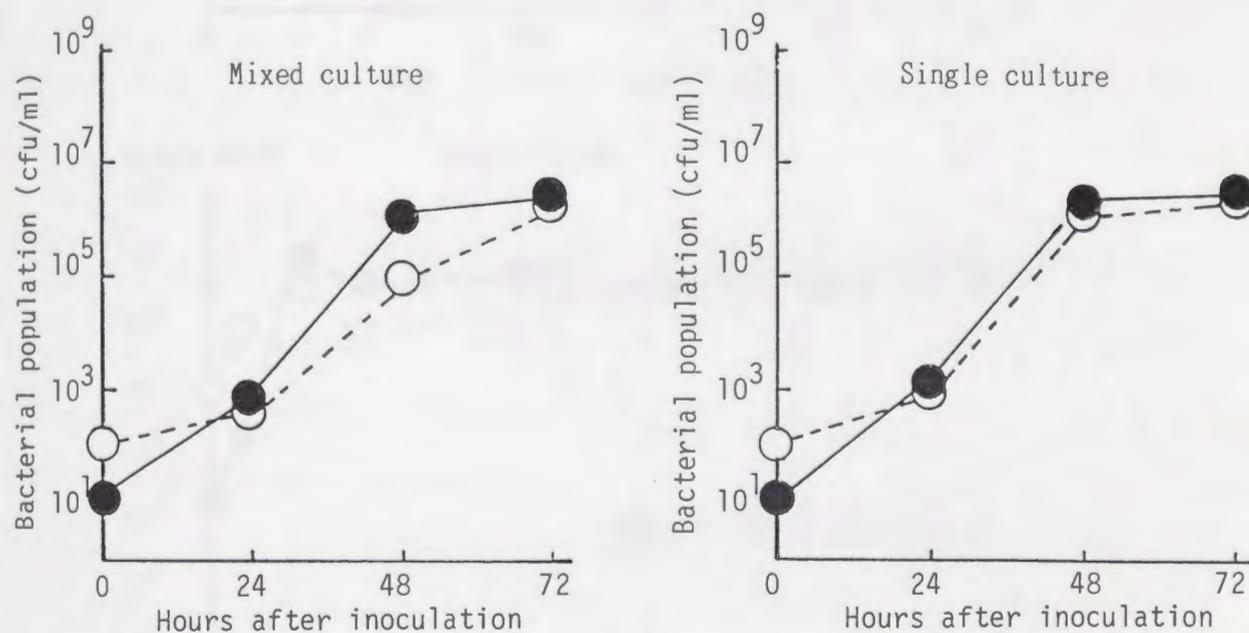


Fig. 7. Growth competition between *Pseudomonas glumae* and *P. solanacearum* in sterile distilled water.



Fig. 8に示したように、滅菌土壌中においては、イネもみ枯細菌病菌及びトマト青枯病菌の両菌ともに、単独、混合の両培養においてほぼ同様の増殖パターンを示し、両菌とも $10^5 \sim 10^6$  cfu/gの濃度範囲で安定して生存した。

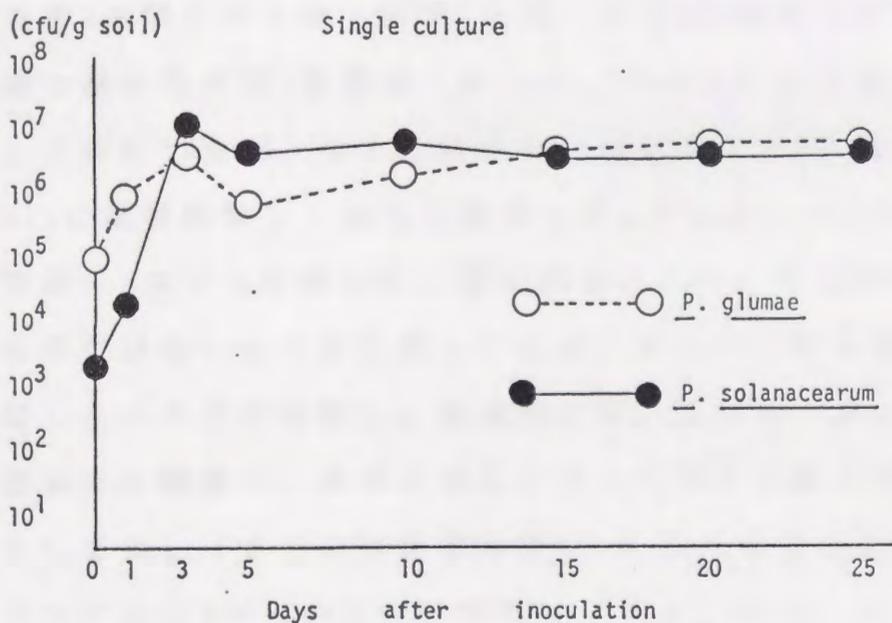
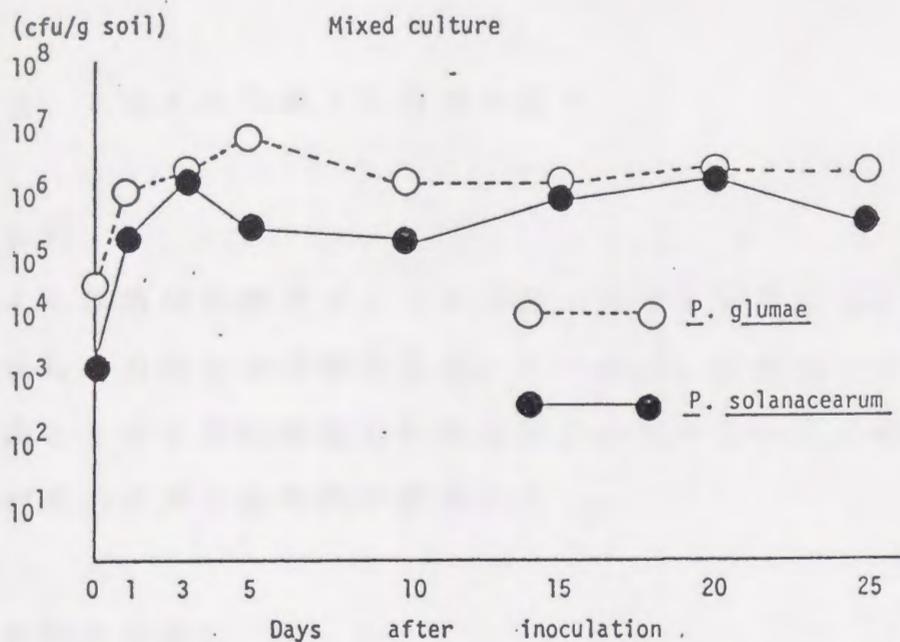


Fig. 8. Growth competition between *Pseudomonas glumae* and *P. solanacearum* in soil.

これらの結果から、イネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌とは実験条件下においては抗菌性及び栄養分の摂取などにおいて競合関係にはないものと推察した。

## 第2項 トマト根組織上における競合

### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌でトマト幼苗の根部を処理することによりトマト青枯病の発病が抑制される。この場合における、イネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌との競合関係の有無を知る目的で根組織中での両菌の消長を経時的に調査した。

### 2. 材料と方法

播種後2週間目のトマト幼苗(品種: 東光)の根部をイネもみ枯細菌病菌の細菌懸濁液(菌濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)に24時間浸根し、その後、さらに10分間トマト青枯病菌の細菌懸濁液(菌濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)に浸根接種し、直ちに滅菌土壌100 gの入った40 × 40 × 60 mmの容器に1本ずつ移植した。菌の定量のために経時的(5、10、15日)に根を傷付けないように注意して抜き、滅菌水で軽く洗根後、根部を滅菌したハサミで切断し、重量測定後、乳鉢で十分に磨碎し、10 mlの滅菌水に懸濁し、希釈平板法によって菌の定量を行った。供試培地としては、イネもみ枯細菌病菌N750-SRの定量のためにはストレプトマイシン500 ppm含有S-PG培地<sup>169)</sup>を、また、トマト青枯病菌C319-SR定量のためにはストレプトマイシン500 ppm含有TTC培地を用いた。

### 3 実験結果

実験の結果はFig. 9に示した。Fig. 9から明らかなように、トマト幼苗の根部を濃度約 $10^{10}$  cfu/mlのイネもみ枯細菌病菌液に24時間浸根処理することにより、根1 g当たり約 $10^8$  cfuの細菌が根に吸着することが明らかとなった。また、その後細菌濃度約 $10^{10}$  cfu/mlのトマト青枯病菌懸濁液中に10分間浸漬した場合、イネもみ枯細菌病菌で処理した区の根で $4 \times 10^8$  cfu/g検出したのに対し、無処理区での検出量は $1 \times 10^9$  cfu/gであった。このようにイネもみ枯細菌病菌が先に多量に存在する根(処理区)においては、イネもみ枯細菌病菌が存在していない根(無処理区)と比較してトマト青枯病菌の吸着がかなり低いことが明らかとなった。イネもみ枯細菌病菌はトマト幼苗の根部で接種後15日目まで $10^6 \sim 10^7$  cfu/gの菌量で生存し、一方、トマト青枯病菌はイネもみ枯細菌病菌で処理された根において $10^7$  cfu/g、無処理区ではそれより10倍高い $10^8$  cfu/gの菌量で生存した。接種後15日目以降は無処理区の個体が大部分発病枯死したのに対し、処理区の個体はその根組織に高濃度のトマト青枯病菌が存在するにもかかわらず発病する個体数が少なく、発病が抑制されていることが明らかとなった。

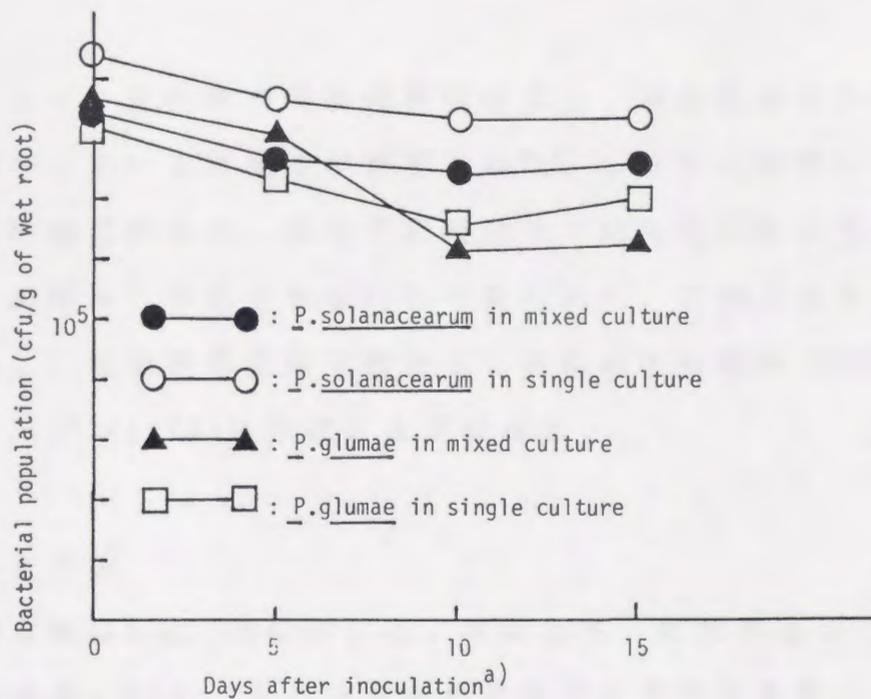


Fig. 9. Growth competition between *Pseudomonas glumae* and *P. solanacearum* on/in roots of tomato seedlings.

a) Tomato roots were dipped in the suspension of *P. glumae* ( $7 \times 10^9$  cfu/ml) for 24 hr and followed by *P. solanacearum* ( $1 \times 10^{10}$  cfu/ml) for 10 min.

#### 第4節 発病抑制効果における抗菌物質の関与

##### 第1項 NTG処理による抗菌物質非産生性イネもみ枯細菌病菌株の作出

###### 1. 目的

第1章でイネもみ枯細菌病菌はトマト青枯病菌に対して強い抗菌活性を示すことが明らかとなったが、液体培地中、滅菌土壤中及びトマト根組織中ではイネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌とは競合関係にはなく、これら条件下でイネもみ枯細菌病菌はトマト青枯病菌の増殖を抑制しなかった。これらの結果から、イネもみ枯細菌病

菌によるトマト青枯病の発病抑制機構には、抗菌物質以外の要因が大きく関与している可能性が推察された。しかし、供試した全てのイネもみ枯細菌病菌は、寒天平板培地上で抗菌活性を示すことから抗菌物質の関与も否定できないと考えられた。この点をさらに検討するために、抗菌物質非産生性イネもみ枯細菌病菌株の作出をニトロソグアニジン(NTG)処理法により試みた。

## 2. 材料と方法

実験の方法はFig. 10に示した。すなわち、野性株としてイネもみ枯細菌病菌N750を、また誘発突然変異株を選抜する際のマーカーとして、ストレプトマイシン耐性株を利用し、第1項で述べた方法でストレプトマイシン耐性株(N750-SR)を作出し、これを親株とした。この親株をYPD斜面培地上に30℃で48時間培養し、1/15 Mのりん酸緩衝液10 ml(pH 7.0)に懸濁し、遠心(5,000 × g、20分)を2回繰り返して洗浄後、菌体を同緩衝液に懸濁し、ニトロソグアニジンを50 µg/mlになるように加え、恒温水槽中30℃で20分間処理した。その後直ちに遠心(5,000 × g、20分)を2回行い、ニトロソグアニジンを除去後、YPD液体培地に移植し、30℃で24時間振とう培養を行い、ストレプトマイシン500 ppm含有のYPD平板培地に広げ、30℃で72~96時間培養後、出現したコロニーを分離・保存した。これら分離菌のトマト青枯病菌に対する抗菌活性を、PSA、YPD、TTCの3種類の培地を用いて、第1章、第1項で述べたプレートコロロホルム法(Fig. 1)で検定し、抗菌活性を示さない変異菌の選抜を行った。

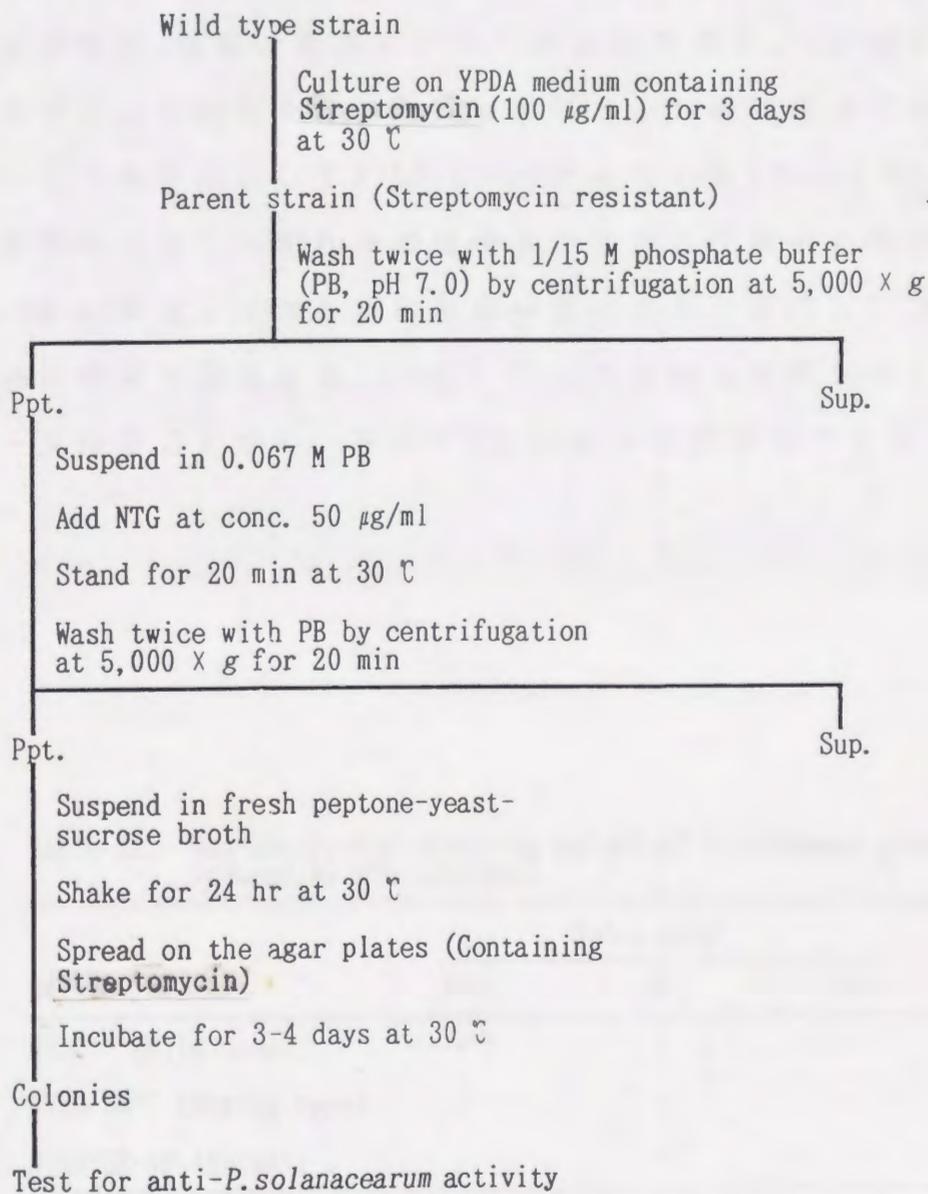


Fig. 10. Flowchart for induction of antibiotic-non-producing mutants of *P. solanacearum* by NTG treatment.

### 3 実験結果

抗菌物質産性株 N750-SR をニトロソグアニジンで処理することにより 111 の菌株を分離した。これらの菌株のトマト青枯病菌に対する抗菌活性を 3 種類の培地を用いて検討した結果、1 菌株だけが供試したいずれの培地上でも抗菌活性を示さない変異菌株であることを確認し、これを選抜して N750-SR-NP と命名した (Table 21, Fig. 11)。他の分離株は全ていずれかの培地上で抗菌活性を示した。選抜した N750-SR-NP 株は、イネもみ枯細菌病菌の血清と反応し、またイネもみ枯細菌病菌の選択培地 (S-PG)<sup>170)</sup> 上で親株及び野性株と同様のコロニーを作ることから、親株 N750-SR からの変異株であると判断した。

Table 21. Non-antibiotic-producing mutant of *Pseudomonas glumae* induced by NTG treatment

Strain	Media used		
	YPDA	PSA	TTC
N750 <sup>a)</sup> (Wild type)	+ <sup>c)</sup>	-	+
N750-SR <sup>b)</sup> (Parent type)	+	-	+
N750-SR-NP (Mutant)	-	-	-

- a) *P. glumae* strain N750                      b) Streptomycin resistant mutant  
c) Activity, +: formed inhibition zone, -: not detected.  
*P. solanacearum* C319 was used as indicator.

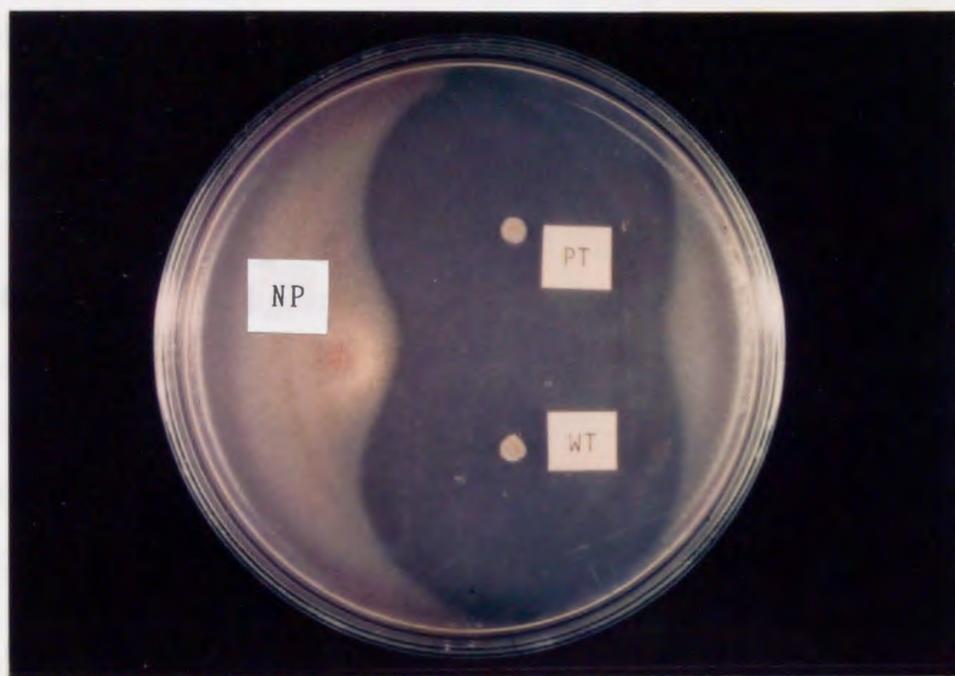


Fig. 11. Inhibition zone formed by wild type, parent type and mutant of *Pseudomonas glumae* on the lawn of *P. solanacearum*.

## 第2項 抗菌物質非産生株を用いたトマト青枯病発病抑制効果

### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病発病抑制効果と抗菌物質産生性との関係を明らかにする目的で、前項で作出した抗菌物質非産生株 N750-SR-NP を用いてトマト青枯病の発病抑制効果を調べた。

## 2 材料と方法

供試菌株としてはイネもみ枯細菌病菌の野性株 N750 及び抗菌物質非産生変異株 N750-SR-NP を用い、Fig. 4 に示した方法によってトマト青枯病 (病原菌株: C319) に対する発病抑制効果を調べた。

## 3 実験結果

実験の結果は Table 22 に示した。即ち、接種後 5 日目に無処理区で 85 % の発病が認められたのに対し、野性株 (N750) 及び変異株 (N750-SR-NP) とともに発病株は全く認められず、発病を抑制した。接種後 15 日目には野性株で 10 % の発病率を示したのに対して、変異株では 30 % の発病率を示し、若干変異株の方が抑制効果が劣った。しかし、接種後 30 日目には無処理区で全ての供試個体が発病枯死したのに対して、野性株では 20 %、また変異菌株では 30 % と、両菌共に高い発病抑制効果が得られた。このことから、抗菌物質非産生性の変異株でも発病抑制効果を示すことが明らかとなった。

Table 22. Effect of the non-antibiotic-producing mutant (N750-SR-NP) of *Pseudomonas glumae* on the protection of tomato seedlings from bacterial wilt

Strain <sup>a)</sup>	Antibiotic productivity	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
			5	15	30 days
N750	+	20	0	10	20
N750-SR-NP	-	20	0	30	30
Control		20	85	95	100

a) Dipped the roots into the suspension of ca.  $10^{10}$  cfu /ml for 24 hr.

### 第3項 トマト根組織中における抗菌物質産生性誘導の可能性

#### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌の細菌懸濁液中で浸根処理することによりトマト根組織中にトマト青枯病菌に対する抗菌性の物質が産生されているか否かについて調べた。

#### 2. 材料と方法

トマト幼苗(品種: 東光)の根部をイネもみ枯細菌病菌N750の細菌懸濁液(濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)に24時間、室温で浸根処理後、根重の1/10の滅菌水を加え乳鉢で十分に磨碎し、遠心(8,000 × g、30分)によって残渣を除き、得られた上清をメンブランフィルター(孔径: 0.2 μm)でろ過滅菌した。対照としては滅菌水に浸漬した根を用いた。このようにして得られた根からの水抽出液を100 mlの滅菌三角フラスコに50 ml入れ、これにトマト青枯病菌C319の細菌懸濁液を $8.5 \times 10$  cfu/mlになるように接種し、その後、30℃で静置培養し経時的(0、24、48、72、120時間)に菌の定量を希釈平板法により行った。また、この時滅菌水中におけるトマト青枯病菌の増殖も同時に定量した。

#### 3. 実験結果

実験の結果はTable 23に示した。即ち、処理根及び無処理根からの水抽出液中におけるトマト青枯病菌の増殖は培養後24時間目で両区ともに約 $10^6$  cfu/mlの菌量に達した。この時、滅菌水中では $3.3 \times 10^5$  cfu/mlの菌濃度であり滅菌水中における増殖よりも約10倍高

い菌量を示した。その後、根抽出液中における増殖は処理、無処理両区ともに約 $10^8$  cfu/mlの菌量にまで達したことから、処理した根組織中には抗菌性の物質は産生されていないものと推察した。

Table 23. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in the extract solution from tomato roots pre-treated with *P. glumae* suspension

Extract solution <sup>a)</sup>	Culture period (hr)				
	0	24	48	72	120
Pre-treated tomato roots	$8.5 \times 10^{1b)}$	$1.8 \times 10^6$	$3.5 \times 10^8$	$5.3 \times 10^8$	$6.0 \times 10^8$
Non-treated tomato roots (control)	$8.5 \times 10^1$	$1.7 \times 10^6$	$2.3 \times 10^8$	$4.1 \times 10^8$	$1.0 \times 10^9$
Water control	$8.5 \times 10^1$	$3.3 \times 10^5$	$6.0 \times 10^6$	$1.6 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$

a) 1/10 dilution of fresh weight .

Treated tomato roots : Tomato seedlings were dipped in a suspension of *P. glumae* N750 (ca.  $10^{10}$  cfu/ml) for 24hr.

Non-treated tomato roots (control): tomato seedlings were dipped in sterile distilled water for 24hr.

b) cfu/ml.

#### 第4項 死菌によるトマト青枯病発病抑制効果

##### 1. 目的

液体培地中、滅菌土壤中及びトマト根組織中ではイネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌とは競合関係にはなく、さらに、*in vitro*で抗菌活性を示さない変異菌も抗菌活性を示す野性株と同様に発病を抑制した。このことから、イネもみ枯病細菌によるトマト青枯病の発病抑制効果の機構には、抗菌物質以外の要因が大きく関与してい

るものと考えられた。本実験では死菌を用いて発病抑制効果の検討を行った。

## 2 材料と方法

イネもみ枯細菌病菌 N750 及び トマト青枯病菌 C319 を用いた。PSA 斜面培地に 30℃ で 48～72 時間培養したイネもみ枯細菌病菌 N750 を滅菌水に懸濁して濃度約  $10^{10}$  cfu/ml になるように調節した後、次に示す 3 通りの方法によって死菌液を作成した。① 100℃、10 分間の熱処理 ② 滅菌ペトリ皿に細菌懸濁液を 2～3 ml ずつ分配し、15 W の殺菌ランプ(東芝 GL-15)で 30 cm の高さから 4 時間照射 ③ 細菌懸濁液約 10 ml をビーカーに取り、クロロホルム約 200 ml の入った 2,000 ml 容ビーカーに入れ、アルミニウム箔で密封し、スターラーで攪拌しながら 4 時間の蒸気処理を行った。これら 3 種類の方法によって作成した死菌液を実験に供試した。トマト根部の処理及び接種は Fig. 4 に示した方法で行った。すなわち、上記の死菌液にトマト幼苗の根部を 24 時間浸根処理した。熱処理死菌で処理したトマトの一部のものは処理後根部を水道水で十分に洗った。対比のためには死菌液の代わりに生菌液でトマト根部を処理した。これらトマト根部をトマト青枯病菌の菌液(濃度: 約  $10^{10}$  cfu/ml)に 10 分間浸根接種した後、直ちに滅菌土壌に移植し、発病株を経時的に調査した。

## 3 実験結果

Table 24 に示したように、3 種類の死菌液でトマト幼苗の根部を処理した場合、いずれの死菌液においても発病抑制効果が得られることが明らかとなった。特に接種後 5 日目には対照区において 50 %

の発病率が認められたのに対して、処理区においては発病が全く認められず、初期の発病抑制効果は生菌液で処理した場合と同様に高いものであった。UV処理死菌液では59%の発病率で、他の死菌液による発病率と比較すると高い傾向であった。また、この死菌による効果は、熱処理死菌液で浸根処理した直後、水道水で十分に洗浄した場合にも認められた (Table 24, Fig. 12)。

Table 24. Effect of the killed *Pseudomonas glumae* cell suspension on the protection of tomato seedlings from infection with *P. solanacearum*

Pre-treatment <sup>a)</sup>	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
		5	15	30 days
Exp. 1				
Control	22	50	91	95
Living bacteria	22	0	32	36
Heated bacteria <sup>b)</sup>	22	0	36	36
UV irradiated bacteria <sup>c)</sup>	22	0	59	59
Chloroform treated bacteria <sup>d)</sup>	22	0	27	32
Exp. 2				
Control	20	80	100	100
Living bacteria	20	0	10	10
Heated bacteria	20	0	10	10
Heated bacteria + washing	20	0	30	30

a) Dipping tomato roots for 24 hr.

c) UV irradiated for 4 hr.

b) Heat treatment at 100 C for 10 min. d) Treated with chloroform vapor for 4 hr.



Fig. 12. Effect of the killed *Pseudomonas glumae* cells on the protection of tomato seedlings from infection of *P. solanacearum*.

A: Water control

B: Heated bacteria + washing

C: Heated bacteria

D: Living bacteria

## 第5節 物理的閉塞の影響

### 第1項 パラフィン、メチルセルロース処理による発病抑制効果

#### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病の発病抑制効果は高濃度の細菌懸濁液で処理した場合に顕著であることから、この効果は根の表面にイネもみ枯細菌病菌が吸着し、根表面の物理的な閉塞によって発病が抑制されたとも考えられる。そこで、パラフィン、メチルセルロースで根をコーティングした場合の影響について検討した。

#### 2. 材料と方法

トマト根部の物理的閉塞には流動パラフィン、固形パラフィン、及び2%メチルセルロースを供試した。すなわち、流動パラフィンと2%メチルセルロース溶液中にはトマト幼苗の根部を約1時間浸漬し、固形パラフィンでは、50~60℃に融解した液中にトマト幼苗の根部を数秒間浸漬し、直ちに引き上げ根の周囲をパラフィンで固めた。これら3種類の閉塞液でトマト幼苗の根部を物理的に処理後、トマト青枯病菌の懸濁液(濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)に10分間浸根接種し、直ちに滅菌土壌100 gの入った容器に1本ずつ移植し、30℃で1日12時間照明の植物育成チャンバー内に置き、10日間隔で30日間発病の有無を調査した。

### 3. 実験結果

Table 25に示したように流動パラフィン、固形パラフィン、及び2%メチルセルロースで処理した場合、その発病は無処理区の発病と比較して差は認められなかった。流動パラフィンで処理した場合、無処理区の発病率100%に対して81%と若干発病を抑制しているようにもみえるが、接種後10日目に既に81%と高い発病率を示したことから発病抑制効果はないものと考えられる。また、これら溶液で処理した場合のトマトの生育に及ぼす影響は全く認められなかった。

Table 25. Effect of the plugging of tomato roots with paraffin and methyl cellulose on the bacterial wilt

Treatment	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
		10	20	30 days
Plugging with liquid paraffin	16	81	81	81
Water control	15	100	100	100
Plugging with solid paraffin	15	67	73	73
Water control	15	53	73	73
Plugging with 2% methylcellulose	20	40	50	50
Water control	20	60	60	60

## 第2項 根切断が発病抑制効果に及ぼす影響

### 1. 目的

前項の結果からメチルセルロース、パラフィンで根の処理を行っても発病抑制効果は認められなかった。しかし、死菌で処理した場合には発病が抑制されることから、根の傷口を菌体が覆い、トマト青枯病菌の根部感染が低下することにより発病が抑制されることも考えられる。細菌懸濁液で処理する前に根を切断すると、傷口はその後の浸根処理により菌体で覆われる。しかし、処理後に切断した場合には傷口への付着菌量は少ないはずである。そこで処理前及び処理後の根の切断が発病抑制効果に及ぼす影響について検討した。

### 2. 材料と方法

播種後2週間目のトマト幼苗をポットから根を傷付けないように抜きとり、水道水で十分に洗浄後、一部の幼苗についてはその根を地際部から3~4 cm残して切断した。その後直ちにイネもみ枯細菌病菌N750の懸濁液(濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)で24時間浸根処理を行った。対照としては、切断した根を滅菌水に24時間浸漬した。また、水道水で洗浄した残りのトマト幼苗は、根を切断することなく、イネもみ枯細菌病菌N750の懸濁液で24時間浸根処理し、その後、滅菌ハサミで上記と同様に根を切断した。滅菌水に24時間浸漬した後、根を切断したものを対照として用いた。これらの処理後直ちにトマト青枯病菌C319の細菌懸濁液(濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)で浸漬接種を10分間行い、滅菌土壌100 gの入った容器に移植した。移植後は30

7、1日12時間照明に調節した植物育成チャンパー内に置き経時的に発病の有無を調査した。

### 3 実験結果

実験の結果はTable 26に要約した。イネもみ枯細菌病菌の懸濁液で浸根処理する前に根を切断した場合、接種後15日目に7%、30日目に13%と対照区の発病率と比較して高い発病抑制効果が得られた。また、浸根処理後に切断した場合には30日目に40%と対照区の80%と比較して発病抑制効果は認められたものの、浸根処理前に切断したものと比較して発病抑制効果が低くなる傾向が認められた。

Table 26. Effect of root cutting before or after pre-treatment with *Pseudomonas glumae* suspension on *P. solanacearum* infection of tomato seedling roots

Root cutting	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
		5	15	30 days
Before pre-treatment <sup>a)</sup>	15	0	7	13
Control <sup>b)</sup>	15	27	80	87
After pre-treatment	15	0	40	40
Control	15	33	80	80

a) *P. glumae* N750 (conc. ca.  $10^{10}$  cfu/ml, 24 hr).

b) Cut the root without pre-treatment.

## 第6節 イネもみ枯細菌病菌の菌体リポ多糖(LPS)及び菌体外多糖(EPS)による発病抑制効果

### 目的

イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病の発病抑制効果は死菌でも認められることから、菌体表面に存在する菌体リポ多糖(LPS)及び菌体外多糖(EPS)が発病の抑制に関与している可能性を考え、これら両多糖の発病抑制効果について検討した。

### 第1項 菌体リポ多糖(LPS)による発病抑制効果

#### 1. 材料と方法

LPSの抽出は遠心洗浄菌体からLucasおよびGrogan<sup>103)</sup>の方法に準拠して水-フェノール法により行なった。洗浄菌体を65℃に保った20倍量(w/v)の蒸留水に懸濁し、それに90%フェノールを等量加え時々攪拌しながら65℃の恒温水槽中で30分間保った。生じた乳濁液を氷水中で急冷して遠心分離(8,000 × g、30分)し、上部の水層を駒込ピペットで吸い上げ回収した。また、遠心管内に残った沈殿およびフェノール層に同量の蒸留水を加え、65℃で再度抽出を繰り返した。二度の抽出で回収された水層を蒸留水に対して48時間透析したのち、6倍量(v/v)の95%冷エタノールを加え、4℃に一晩静置した。生じた沈殿を遠心により集め、一連のエタノール洗浄を繰り返したのち凍結乾燥して白色のLPSを得た。このようにして抽出したLPSは蒸留水で10,000、5,000、2,500 ppmの濃度になるように溶解した。これらの液でトマト幼苗を24時間浸根処理し、その後、トマ

ト青枯病菌(濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)の細菌懸濁液に10分間浸漬し、滅菌土壌に移植後、発病株の有無を経時的に調査した。また濃度10,000、5,000 ppmのLPS水溶液中でのトマト青枯病菌の増殖性についても検討を行った。

### 3 実験結果

Table 27に示したように、接種後5日目では対照区の発病率74%と比較して、LPS水溶液で処理した場合、発病率が著しく低くなり、発病抑制効果が認められた。しかし接種後30日目では10,000 ppmのLPS水溶液で処理した区において発病率が58%、2,500 ppmのLPS水溶液で処理した区においては71%の発病率を示し、LPSによる発病抑制効果は時間の経過とともに低下した。このようにLPS水溶液10,000 ppmの濃度で処理を行っても発病抑制効果は顕著なものではなかった。また、Table 28に示したように、LPS水溶液中におけるトマト青枯病菌の増殖は、滅菌水中における増殖と同じであり、培養72時間後には約 $10^7$  cfu/mlにまで増殖した。

Table 27. Protection of tomato seedlings from bacterial wilt<sup>a)</sup> by lipopolysaccharide(LPS) from *Pseudomonas glumae* N750

Concentration of LPS(ppm) <sup>b)</sup>	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
		5	15	30 days
10,000	19	11	53	58
5,000	17	12	65	65
2,500	17	18	65	71
Water control	19	74	95	95

a) Dip inoculation with *P. solanacearum* C319 (ca.  $10^{10}$  cfu/ml, 10 min).

b) Tomato seedlings were dipped in each concentration of LPS for 24 hr.

Table 28. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in LPS solution obtained from *P. glumae* cells

Concentration of LPS(ppm)	Culture period (hr)		
	0	48	72
10,000	$2.0 \times 10^3$ <sup>a)</sup>	$1.4 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$
5,000	$2.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$
Water control	$2.0 \times 10^3$	$8.8 \times 10^6$	$2.2 \times 10^7$

a) cfu/ml.

## 第2項 菌体外多糖(EPS)による発病抑制効果

### 1. 材料と方法

EPSの抽出はEvansとLinker<sup>3,8)</sup>の方法に準拠して行なった。すなわち、イネもみ枯細菌病菌N750をPSA培地30 mlを入れたナス型フラスコに30℃で72時間培養後、滅菌蒸留水40 mlに懸濁、遠心(15,000 × g、30分)により菌体を除去した上清に3倍量(v/v)の冷エタノールを攪拌しながら少量ずつ添加、4℃で一晩静置、生じた沈殿を遠心(8,000 × g、20分)により回収、95%エタノールで2回、さらに無水エタノールで1回洗浄したのち真空凍結乾燥した。抽出したEPSは蒸留水に溶解して10,000、5,000、及び2,500 ppmの3段階濃度のEPS水溶液を作成して供試した。これらの液にトマト幼苗の根を24時間浸漬し、その後、トマト青枯病菌(濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)の懸濁液に10分間浸漬し、滅菌土壌に移植後、発病株の調査を経時的に行った。また、濃度10,000、5,000 ppmのEPS水溶液中でのトマト青枯病菌の増殖性についても検討を行った。

## 2 実験結果

実験の結果はTable 29及びTable 30に示した。移植後5日目において対照区の発病率が47%を示したのに対して、濃度10,000 ppm、5,000 ppm及び2,500 ppmのEPSで処理した区とも全く発病が認められなかった。さらに、移植後30日目では対照区の発病率が73%であるのに対して、10,000 ppm、5,000 ppm及び2,500 ppmの濃度のEPSで処理した区における発病率はそれぞれ0%、13%及び33%で、高い発病抑制効果を示した。特に、10,000 ppmのEPS水溶液で処理した場合に顕著な発病抑制効果を示すことが明らかとなった。しかし、Table 30に示したように、10,000 ppm及び5,000 ppmのEPS水溶液中におけるトマト青枯病菌の増殖は培養72時間後には約 $10^8$  cfu/mlにまで増殖し、滅菌水中における増殖量よりも約10倍高くなった。このように、EPS水溶液にはトマト青枯病菌の増殖を阻害する作用はなく、むしろ増殖を促進させる傾向が認められた。

Table 29. Protection of tomato seedlings from bacterial wilt<sup>a)</sup> by extracellular polysaccharide(EPS) from *Pseudomonas glumae* N750

Concentration of EPS(ppm) <sup>a)</sup>	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
		5	15	30 days
EPS 10,000	15	0	0	0
5,000	15	0	13	13
2,500	15	0	27	33
Water control	15	53	60	73

a) Dip inoculation with *P. solanacearum* C319 (conc. ca.  $10^{10}$  cfu/ml, 10 min).

b) Tomato seedlings were dipped in each concentration of EPS for 24 hr.

Table 30. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in EPS solution obtained from *P. glumae* cells

Concentration of EPS(ppm)	Culture period (hr)		
	0	48	72
10,000	$1.3 \times 10^{10}$ <sup>a)</sup>	$6.3 \times 10^7$	$1.3 \times 10^8$
5,000	$1.3 \times 10^{10}$	$5.4 \times 10^7$	$2.4 \times 10^8$
Water control	$1.3 \times 10^{10}$	$8.8 \times 10^6$	$2.2 \times 10^7$

a) cfu/ml.

### 第3項 イネもみ枯細菌病菌の洗浄菌体及び培養ろ液による発病抑制効果

#### 1. 目的

前項までの結果から、発病抑制効果の機作には菌体外多糖(EPS)が深く関与しているものと推察された。もし、EPSが関与しているならば培養ろ液によってもある程度の抑制効果は得られるものと考えられる。さらに、培養菌体を洗浄しEPSを除いた菌体で処理すれば発病抑制効果は低下するのではないかと考え、以下の実験を行った。

#### 2. 材料と方法

イネもみ枯細菌病菌 N750 を YPD 液体培地 250 ml の入った坂口フラ

スコで30℃で48時間振とう培養後、遠心(8,000 × g、20分)し、得られた上清をメンブランフィルター(孔径: 0.2 μm)で完全に除菌したものを培養ろ液とした。YPDA斜面培地に30℃で48時間培養し、菌体を滅菌蒸留水に約 $10^{10}$  cfu/mlになるように懸濁したものを完全菌体区とした。滅菌蒸留水で遠心(8,000 × g、20分)洗浄を3回繰り返したものを洗浄菌体(濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)区とした。このようにして調節した完全菌体、洗浄菌体、培養ろ液の他、対照として滅菌蒸留水を用いた。これらの溶液にトマト幼苗根を24時間浸漬後、トマト青枯病菌(濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)の細菌懸濁液で10分間の浸根接種を行ない、滅菌土壌に移植後、30℃で1日12時間照明の植物育成チャンバー内に置き、発病の有無を経時的に調査した。

### 3. 実験結果

実験の結果はTable 31に示した。移植後5日目に対照区で70%の発病率が認められたのに対し、完全菌体、洗浄菌体で処理した区においては全く発病が認められず、また培養ろ液処理区でも20%の発病率を示し、対照区の発病率と比較して明らかな発病抑制効果が認められた。移植後30日目においては、対照区で100%と全ての個体が萎凋枯死したのに対して、完全菌体で処理した区においては発病率が15%と高い発病抑制効果を示した。また、洗浄菌体で処理した区においても30%の発病率を示し、比較的高い発病抑制効果が認められた。しかし、完全菌体で処理した区と比較すると抑制効果は低い傾向であった。さらに、培養ろ液で処理した区では50%の発病率となり、発病抑制効果はあるものの、対照区の発病率と比較してかなり低いものであった。

Table 31. Effect of the cell components of *Pseudomonas glumae* on the protection of tomato seedlings from infection with *P. solanacearum*<sup>a)</sup>

Bacterial cell component used for pre-treatment <sup>b)</sup>	No. of test plants	Percentage of wilted plants		
		5	15	30 days
Suspension of intact bacterial cells <sup>c)</sup>	20	0	15	15
Suspension of washed bacterial cells	20	0	25	30
Culture filtrate <sup>d)</sup>	20	20	40	50
Water control	20	70	100	100

a) Dip inoculation with *P. solanacearum* C319 (conc. ca.  $10^{10}$  cfu/ml, 10 min).

b) Tomato seedlings were dipped in each component for 24 hr just before inoculation with *P. solanacearum*.

c) *P. glumae* N750 (conc. ca.  $10^{10}$  cfu/ml)

d) Obtained from YPD broth culture of *P. glumae* N750 incubated at 30 °C for 48 hr.

## 第7節 イネもみ枯細菌病菌以外の各種細菌による発病抑制効果

### 第1項 各種植物病原細菌及び腐生菌による発病抑制効果

#### 1. 目的

イネもみ枯病細菌によって示されたトマト青枯病の発病抑制効果がイネもみ枯病細菌以外の細菌によっても得られるか否かを知る目的で、既知の植物病原細菌と腐生菌を用いてトマト青枯病の発病抑制効果について検討した。

#### 2. 材料と方法

供試菌株の来歴はTable 32に示した通りである。これら各種菌株のトマト青枯病菌に対する抗菌活性についてPSA、YPDA、King's B、

TTCの各培地を用いてプレートクロロホルム法 (Fig. 1) によって検討した。これらの細菌をそれぞれPSA斜面培地に30℃で48時間培養し、滅菌蒸留水10 mlに懸濁し、PSA培地100 mlの入ったナス型培養瓶に注ぎ込み、30℃で48時間培養した。培養後、細菌懸濁液の濃度が約 $10^{10}$  cfu/mlになるように調節してトマト苗の前処理に用いた。また、*P. g. pv. gladioli* NIAES 1065-1、*P. mildenbergii* IAM 1505の2菌株については100℃で10分間の熱処理死菌による発病抑制効果も検討した。前処理及びトマト青枯病菌による接種はFig. 4に示した方法で行った。

Table 32. Bacteria used in this experiment

Genus	Species	Strain	Origin
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. g. pv. gladioli</i>	NIAES1065-1	NIAES <sup>a)</sup>
	"	NIAES1065-3	"
	<i>P. putida</i>	IAM1506	"
	<i>P. aeruginosa</i>	IAM1054	NIAES
	<i>P. azotoformans</i>	IAM1603	"
	<i>P. diminuta</i>	IAM1513	"
	<i>P. fragi</i>	IAM1650	"
	<i>P. fluorescens</i>		"
	<i>P. iodinum</i>	IF03558	"
	<i>P. mildenbergii</i>	IAM1505	"
	<i>P. pavonaceae</i>	IAM1155	"
	<i>P. putrefaciens</i>	IAM1509	"
	<i>P. saccharophila</i>	IAM1504	"
	<i>P. smaragdina</i>		"
	<i>P. synxantha</i>	IF03906	"
	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. c. pv. campestris</i>	I
<i>Clavibacter</i>	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	N6601	NIAES
<i>Agrobacterium</i>	<i>A. tumefaciens</i>	1-SKRb	"
	<i>A. radiobacter</i>	84	AU <sup>c)</sup>
<i>Erwinia</i>	<i>E. c. subsp. carotovora</i>	N7129	NIAES

a) National Institute of Agro-Environmental Sciences

b) Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

c) Adelaide University

### 3 実験結果

各種植物病原細菌及び腐生菌のトマト青枯病菌に対する抗菌活性をTable 33に示した。*P. g. pv. gladioli*は供試したいずれの培地上においても抗菌活性を示し、特にTTC培地上で強い活性が認められた。供試した20菌株中いずれかの培地上で抗菌活性が認められたものは7菌株、また、抗菌活性が全く認められなかったものは13菌株あった。

Table 33. Formation of inhibition zone by various bacteria on the lawn of *Pseudomonas solanacearum* strain C319 grown on various media

Genus	Species	Strain	Media			
			YPDA	King's B	PSA	TTC
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. g. pv. gladioli</i>	NIAES1065-1	++ <sup>a)</sup>	++	+	+++
	"	NIAES1065-3	++	+	++	+++
	<i>P. putida</i>	IAM1506	-	++	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	IAM1054	-	-	-	-
	<i>P. azotoformans</i>	IAM1603	-	++	-	-
	<i>P. diminuta</i>	IAM1513	-	-	-	-
	<i>P. fragi</i>	IAM1650	-	-	-	-
	<i>P. fluorescens</i>		-	++	-	-
	<i>P. iodinum</i>	IF03558	-	-	-	-
	<i>P. mildenbergii</i>	IAM1505	-	-	-	-
	<i>P. pavonaceae</i>	IAM1155	-	-	-	-
	<i>P. putrefaciens</i>	IAM1509	-	-	-	-
	<i>P. saccharophila</i>	IAM1504	-	-	-	-
	<i>P. smaragdina</i>		-	-	-	-
	<i>P. synxantha</i>	IF03906	-	+	-	+
	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. c. pv. campestris</i>	I	-	-	-
<i>Clavibacter</i>	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	NG601	-	-	-	-
<i>Agrobacterium</i>	<i>A. tumefaciens</i>	1-SKRb	-	-	-	-
	<i>A. radiobacter</i>	84	-	-	-	+
<i>Erwinia</i>	<i>E. c. subsp. carotovora</i>	N7129	-	-	-	-

a) Activity index, -: not detected, +: < 5mm, ++: 5-10mm, +++: > 10mm

また、Table 34に示したようにいずれの菌株でトマト幼苗を処理した場合にも青枯病の発病は抑制されることが明らかとなり、培地上における抗菌活性の有無、強弱と発病抑制効果との間に関連性は認められなかった。また、Table 35に示したように、死菌で処理した場合にも生菌で処理した場合と同様に発病は抑制された。

Table 34. Effect of pre-treatment with bacterial suspension on the protection of tomato seedlings from infection of *Pseudomonas solanacearum*

Genus	Species	Strain	No. of test plants	Percentage of wilted plants <sup>a)</sup>	
				Treated	Control
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. g. pv. gladioli</i>	NIAES1065-3	30	33	97
	<i>P. putida</i>	IAM1506	30	17	97
	<i>P. aeruginosa</i>	IAM1054	20	45	80
	<i>P. azotoformans</i>	IAM1603	20	65	95
	<i>P. diminuta</i>	IAM1513	20	40	95
	<i>P. fragi</i>	IAM1650	20	35	85
	<i>P. fluorescens</i>		15	27	73
	<i>P. iodinum</i>	IF03558	20	30	85
	<i>P. mildenbergii</i>	IAM1505	20	20	90
	<i>P. pavonaceae</i>	IAM1155	20	10	60
	<i>P. putrefaciens</i>	IAM1509	20	20	60
	<i>P. saccharophila</i>	IAM1504	20	10	65
	<i>P. smaragdina</i>		20	45	65
	<i>P. synxantha</i>	IF03906	20	35	65
	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. c. pv. campestris</i>	I	15	20
<i>Clavibacter</i>	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	N6601	20	25	95
<i>Agrobacterium</i>	<i>A. tumefaciens</i>	1-SKRb	30	37	77
	<i>A. radiobacter</i>	84	20	45	80
<i>Erwinia</i>	<i>E. c. subsp. carotovora</i>	N7129	18	22	61

a) 30 days after inoculation.

Table 35. Effect of heated bacteria on the protection of tomato seedlings from infection of *Pseudomonas solanacearum*<sup>a)</sup>

Bacteria	Pre-treatment	No. of test plants	Percentage of wilted plants			
			5	10	20	30 days
<i>P. g. pv. gladioli</i> NIAES 1065-1	Living bacteria <sup>b)</sup>	15	7	7	20	20
	Heated bacteria <sup>c)</sup>	15	0	7	7	13
<i>P. mildenbergii</i> IAM 1505	Living bacteria	15	0	7	7	27
	Heated bacteria	15	0	0	0	27
	Water control	15	0	47	73	73

a) *P. solanacearum* C319 (conc.  $4 \times 10^9$  cfu/ml, 10 min)

b) *P. g. pv. gladioli* NIAES 1065-1 (conc.  $3 \times 10^9$  cfu/ml, 24 hr)

*P. mildenbergii* IAM 1505 (conc.  $1 \times 10^{10}$  cfu/ml, 24 hr)

c) Heat treatment at 100 °C for 10 min.

## 第8節 考察

イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病の発病抑制効果を針接種及び浸漬接種の2種類の接種法によって検討したところ、発病抑制効果は認められたが、効果の程度は用いる接種法により異なった。針接種法では、効果の持続期間が短い傾向が認められた。一方、浸漬接種の場合にはその効果は1か月以上持続した。

イネもみ枯細菌病菌でトマト幼苗の根部を浸漬処理(バクテリゼーション)する場合、発病抑制効果の程度は浸漬処理時間と菌濃度の違いによって大きく異なることが明らかとなった。即ち、高濃度(約 $10^{10}$  cfu/ml)の菌液に12時間以上浸漬した場合に顕著な発病抑制効果が得られた。このことは、イネもみ枯細菌病菌が何らかの原因でトマト青枯病の発病を抑制するためにはある程度の時間を必要とするものと考えられ、根への強固な吸着、あるいはそれによる植物体の抵抗性誘導などの機作が推察された。また、トマト青枯病菌の接種菌量がイネもみ枯細菌病菌の接種菌量よりも高い場合には発病抑制効果は認められなかった。このように発病抑制効果の強さはイネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌の菌数の相互関係によって決まり、イネもみ枯細菌病菌の菌数が多くトマト青枯病菌の菌数が少ない程発病抑制効果は高かった。これらの結果は非病原性のタバコ立枯病菌でタバコ立枯病を抑制するAverre<sup>4)</sup>らの実験結果に似ている。さらに、Trigalet<sup>169)</sup>らはTn-5挿入の非病原性トマト青枯病菌がトマト植物体内で病原性菌株と競合して、発病抑制効果を示す事を報告し、この場合も、非病原性菌株の濃度が高い程その競合の程度は強まり、発病抑制効果も高まることを明らかにした。また、一

般にバクテリゼーションによる発病抑制効果は、病原菌の濃度よりも高い濃度の拮抗菌で処理した場合に得られる例が多い<sup>25, 26, 80, 81, 104, 121, 159, 169</sup>。

トマト青枯病菌の接種濃度が低い場合には、全てのイネもみ枯細菌病菌が同程度の発病抑制効果を示した。しかし、トマト青枯病菌の接種菌量が高くなるとイネもみ枯細菌病菌の菌株間に効果の強弱がみられた。さらに、トマト青枯病菌の菌株が変わることによっても効果に差異が認められた。これらのことから、イネもみ枯細菌病菌が示す発病抑制効果には若干の菌株間差異が存在するものと思われる。この菌株間差異とトマト青枯病菌に対して示す抗菌活性との間には関連性は認められなかった。また、滅菌土壌を供試する限り発病抑制効果には土壌の種類は影響しない事が明らかとなった。このことから発病抑制効果は、イネもみ枯細菌病菌、トマト青枯病菌及びトマト植物の3者間の相互作用の結果である事を示すものであり、それらが置かれた土壌の物理的・化学的環境の直接的影響は少ないものと考えられた。

イネもみ枯細菌病菌の示すトマト青枯病発病抑制効果を十分に発揮させ実用化を指向するためには、その発病抑制効果の作用機作を解明することが重要である。そこで、各種条件下におけるイネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌との競合関係について検討した。YPD液体培地中、滅菌水中、滅菌土壌中及びトマト根組織中においてトマト青枯病菌はイネもみ枯細菌病菌と混在する場合も単独の場合と同様に増殖した。このことから、イネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病に対する発病抑制は細菌の競合に基づくものとは考えられない。

イネもみ枯細菌病菌の産生する抗菌物質が発病抑制に関与してい

るか否かを知る目的で野性株のNTG処理により抗菌物質非産生変異株を作出し、この変異株を用いて発病抑制効果を調べた結果、変異株も抗菌物質産生性の野性株と同様に発病を抑制することが明らかとなった。従って、イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病発病抑制効果には本菌の産生する抗菌物質の直接的な関与は少ないものと推察された。

発病抑制効果は熱処理死菌、UV照射死菌及びクロロホルム蒸気処理死菌のいずれにおいても生菌と同様に認められた。さらに、培養液でも若干の発病抑制効果が認めれること、及び遠心により洗浄した菌体で処理した場合には、培養菌体そのもので処理した場合と比較して発病抑制効果が劣ることから、発病抑制効果には菌体外多糖(EPS)が関与している可能性が推察された。事実、菌体表層に存在するEPSを集め、その効果を調べた結果、高い発病抑制効果を示した。

タバコ葉に植物病原細菌の熱処理死菌を注入した場合に抵抗性が誘導され、発病が抑制されることが知られている<sup>101, 102, 146, 147)</sup>。Graham及びSequeiraらはタバコ葉において菌体多糖(LPS)が誘導抵抗性の重要な要因であると述べている<sup>54)</sup>。また、田中らも、トマト青枯病菌の加熱死菌でタバコ根部を処理した場合に発病抑制効果が得られることを示し、その原因の一つとして、LPSの関与による植物体の誘導抵抗反応の可能性を報告している<sup>158)</sup>。しかし、Chenらは非病原性トマト青枯病菌のLPSでは、10,000 ppmの濃度で植物を処理しても発病抑制効果は認められなかったという<sup>26)</sup>。イネもみ枯細菌病菌を用いた著者らの結果では、LPSよりもむしろEPSが深く関与していることが示唆された。おそらくEPSが根に吸着される

ことにより、トマト青枯病菌のトマト根への吸着・侵入の機会が低下することによりトマト青枯病菌の侵入および感染が妨げられるという物理的な閉塞が発病抑制の一つの原因と考えられる。

一般に植物が病原菌の侵入などのような外部からのストレスを受けると、侵入前には検出されなかったファイトアレキシンと呼ばれる抗菌物質が植物体に生成され、発病が抑制されることが知られている<sup>116)</sup>。イネもみ枯細菌病菌の細菌懸濁液で処理することによりトマト根組織中にファイトアレキシン様物質が産生され、それによって発病が抑制されていることも考えられる。そこで処理したトマト根部から水抽出によって得た水溶液中におけるトマト青枯病菌の増殖を調べた結果、トマト青枯病菌の増殖は抑制されず抗菌性物質の産生性は認められなかった。このことから、イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病発病抑制にはファイトアレキシン様物質の関与はないものと推察した。

トマト青枯病の発病抑制効果は、強弱の違いはあるもののイネもみ枯細菌病菌以外の菌株で処理した場合にも発病抑制効果が認められた。このことから、イネもみ枯細菌病菌によって生じるトマト青枯病の発病抑制効果はイネもみ枯細菌病菌に特異的なものではなく、構造のいかんにかかわらず細菌のEPSの大部分によって示されるむしろ非特異的な現象と考えられる。

### 第3章 非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症及びイネもみ枯細菌病の発病抑制とその機構

イネもみ枯細菌病菌 (*Pseudomonas glumae*) によって引き起こされる病気であるイネもみ枯細菌病は、日本、韓国、中国などの他、東南アジアのイネ栽培地域に広く分布し、イネの収量に重大な被害を与えている<sup>50, 93, 114, 153, 167</sup>)。当初、本病原細菌は、イネの穂のみに病気を起こす細菌であると考えられていたが<sup>50, 93</sup>)、その後、植松らの研究により本細菌はイネの幼苗に対しても病原性を示すことが明らかにされた<sup>173, 174</sup>)。幼苗に対する被害は、水稻栽培の特殊性に基づく育苗箱の普及に伴ってわが国の重大な問題となっている<sup>152</sup>)。従って、イネもみ枯細菌病菌についてはこれまで発生生態の解明<sup>52, 157, 170</sup>)、栽培法と発病との関係<sup>152</sup>)及び防除法<sup>53, 113</sup>)の開発など広範囲な研究が実施されている。しかしながら、今なお伝染経路や侵入感染機構に不明な部分もあって、まだ的確な防除法は確立されていない。現在、防除対策としては塩水選による罹病もみの除去、各種薬剤による種子消毒、及びカスガマイシン・キャプタン水和剤、ポリカーバメイト水和剤などの育苗箱施用等が挙げられている<sup>52, 53, 113, 122, 203</sup>)。しかしこれらの薬剤は、効果の不安定なこと、接種菌株によって効果の異なること、及び生育抑制の薬害が現れるなどのことから、実用化にあたっては、さらに検討しなければならないのが現状である。また抵抗性品種の利用も考えられているが、本細菌病に対する抵抗性遺伝子がイネに存在するか否かも明確ではない<sup>51, 64, 72</sup>)。このように現在までに行われている防除法は、十分な効果を挙げていないのが現状であり、新しい防除法

の開発が望まれている。

近年、土壌伝染性の植物病害を防除する手段の一つとして、生態系の生物間相互作用に立脚した生物的防除法の開発が重要視されている<sup>11, 32)</sup>。中でも各種抗菌物質産生性の根圏微生物の利用に関する研究は世界各国で進められており、幾つかの成功例が報告されている。また病原性細菌から病原性を喪失あるいは除去した非病原性変異菌株を利用した研究も多い<sup>25, 26, 66, 74, 80, 81, 159, 169)</sup>。これら非病原性菌株の中には病原性菌株と同様に宿主内で増殖し、生態学的に病原性菌株とほぼ同様な挙動を示すものも存在する<sup>168)</sup>。このような非病原性菌株で予め宿主植物体を前処理することにより、その後接種した病原性細菌の侵入を防ぎ、或いは増殖を抑制することにより、発病を抑制する可能性が考えられる。このような考えに基づいて、非病原性イネもみ枯細菌病菌を利用することによってイネもみ枯細菌病を生物的に防除する方法の開発を試みた。

## 第1節 非病原性イネもみ枯細菌病菌の選抜

### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌はイネの幼苗及び穂を侵す病原細菌であるため、本菌にたとえ発病抑制効果が認められても、これをそのまま生物的防除に利用することは危険である。しかし、本菌は *in vitro* において病原性を喪失し易い性質をもっており、当研究室においてもイネに対する病原性を保存中あるいは継代培養中に喪失したと思われる菌株が多数存在する。また本菌はイネに対する病原性の他、ジャガイモ、ニンジン、ダイコン等の組織切片を腐敗させる性質を有する事を見出した。そこで全ての作物に対して非病原性の菌株を選抜する目的で本菌の各種作物に対する病原性を検討した。

### 2. 材料と方法

植物材料としては、ジャガイモ(メークイン)、ニンジン(品種不明)及びダイコン(青首)の切片、トマト苗(東光)、イネ種子(あそみのり)を実験に供試した。各種野菜組織に対する腐敗能の検定は次の方法で行った。各種野菜組織を3%次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)に15分間浸漬することによって表面殺菌を行い、その後滅菌水で十分に水洗して滅菌メスで厚さ約5 mmに切断し、これをろ紙を敷いた直径9 cmの滅菌ペトリ皿に置き、滅菌水を5 ml入れ、PSA斜面培地に30℃で48時間培養したイネもみ枯細菌病菌を切断面の中央部に1白金耳量接種した後、30℃に48時間静置し、腐敗能の有無を検討した。

トマトに対する病原性の検討は、PSA斜面培地に30℃で48時間培

養したイネもみ枯細菌病菌の各菌株を滅菌した白金耳で斜面からかきとり、これを予め70 %エタノールで表面殺菌したトマト(播種後3週間)の茎に多針接種することにより行った。

イネに対する病原性の検討は次のように行った。すなわち、供試品種あそみのりの種子を3 %次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)で30分間消毒後、充分水洗し、25 ℃で2日間浸種した。この種子60粒を直径9 cmの滅菌ペトリ皿にとり、これに濃度約 $10^9$  cfu/mlの細菌懸濁液15 mlを注入し、30 ℃で24時間浸漬接種した。その後、オートクレーブで滅菌したくみあい培土(三井東圧製)80 gを入れ、滅菌蒸留水30 mlを灌水した、60 × 60 × 45 mmのプラスチック製容器に播種し、種子がかくれる程度に滅菌くみあい培土で覆土し、32 ℃の接種箱中(湿度100 %)で2日間育苗した。さらに、25 ℃の空調温室で緑化した後接種15日目に発病の有無と程度を調査した。

### 3. 実験結果

結果はTable 36に示した通りである。イネに対して病原性を示さない菌株が15菌株存在した。トマトに対する病原性は供試した全ての菌株で認められなかった。各種野菜組織に対して腐敗能を示さずかつトマト、イネに対しても病原性を示さない菌株8菌株、即ち、N7504、N7503、YN7810、YN7805、YN7825、N750、752、805が選抜できた。また、ジャガイモに対する腐敗能とイネに対する病原性との間には供試した47菌株において高い関連性が認められた。

Table 36. Pathogenicity or rotting activity of *Pseudomonas glumae* strains to various plants

Strain				Rice	Potato	Carrot	Radish	Tomato seedling
N7504	N7503	YN7805	YN7810	-	-	-	-	-
YN7825	750	752	805					
N7501	N7505	So-1	8001					
8012	8015	8028	1					
111	2	Ku8101	Ku8102					
Ku8103	Ku8104	Ku8105	Ku8106	+	+	+	+	-
Ku8111	Ku8112	Ku8113	Ku8114					
Ku8115	Ku8116	Ku8117	Ku8119					
Ku8120	Ku8121	Ku8122	Ku8123					
N7502	P1-22-1	P1-22-3		-	-	+	+	-
P1-22-4								
N7401	8020			-	+	+	+	-
742				-	-	-	+	-
806	P1-22-2			+	-	+	+	-

## 第2節 非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果

### 第1項 発病抑制効果の菌株間差異

#### 1. 目的

前節においてイネもみ枯細菌病菌47株の病原性について検討した結果、継代培養あるいは保存中に病原性を喪失したと考えられる非病原性菌株を選抜することができた。そこで、これら非病原性細菌がイネもみ枯細菌病菌で起こるイネ幼苗腐敗症に対する発病抑制効果を有するか否かについて検討した。

#### 2. 材料と方法

病原性菌株4菌株(Ku8111、2、So-1、Kyu82-34-2)及び非病原性菌株5菌株(N7503、N750、YN7810、YN7825、805)を実験に供試した。イネ品種はあそみのりを用いた。非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果の検定はFig. 13に示した方法で行った。すなわち、水保存菌をYPDA斜面培地に移植し、30℃で48時間培養後、滅菌蒸留水10 mlに懸濁(濃度: 約 $10^9$  cfu/ml)、これをYPD液体培地200 mlに加え、30℃で48時間振とう培養した。その後、 $3,600 \times g$ で20分間遠心を行い、得られた菌体を滅菌蒸留水に約 $10^{10}$  cfu/mlになるように懸濁し、これにメチルセルロースを1.5%になるように加えた。イネ種子は3%次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)で30分間表面殺菌した後、滅菌水で十分に洗浄し、メチルセルロー

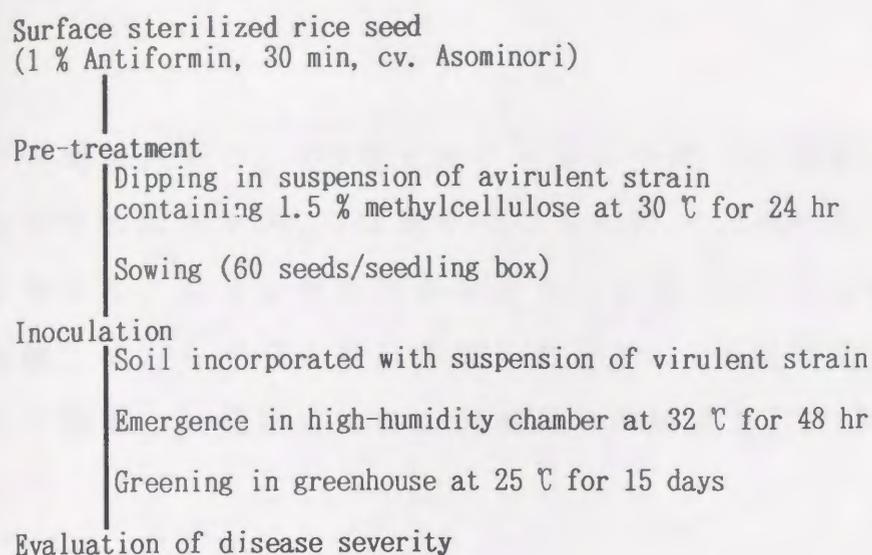


Fig. 13. Method for testing the effect of avirulent strain on the control of bacterial seedling rot of rice.

スを含む細菌懸濁液に30 °Cで24時間浸漬処理した。対照として細菌を含まない1.5 %メチルセルロース液に浸漬した種子を用いた。病原性菌株は、非病原性菌株と同様に培養後、約 $10^8$  cfu/mlの濃度になるように滅菌水で調節し、これを接種源とした。非病原性菌株及び病原性菌株の菌濃度は実験の度にYPDA平板培地を用い、希釈平板法に従って求めた。非病原性菌株液に浸漬したイネ種子は、滅菌したくみあい培土(三井東圧製)約80 gの入った60 × 60 × 45 mmのプラスチック製容器に60粒ずつ播種し、覆土(20 g)した後、接種源である病原性菌株の細菌懸濁液を10 mlずつ灌注接種した。処理した容器は、32 °Cで48時間接種箱(湿度: 100 %)に入れて催芽させた後、25~30 °Cの空調温室あるいは28 °Cの植物育成チャンパー内に置き、緑化させた。灌水は1日1回行った。発病度の判定は接種後15日目に行った。全ての実験は2回以上反復した。発病度の検定は、Fig. 14、15に示したように、病徴の激しさの度合いによって、0~5の6段階(発病度0は健全苗、1は健全苗と背丈は変わらないが葉身にクロロシ

スが現れたもの、2は健全苗より背丈が低く、葉鞘基部のネクロシスが見られるもの、3は葉身のクロロシス、葉鞘基部にネクロシスに加えて、全身が異常形態を呈しているもの、4は本葉第1葉しか展開しておらず全体的に退緑したもの、5は腐敗枯死したもの)に分けて調査し、発病度は各区60粒の平均値をもって示した。

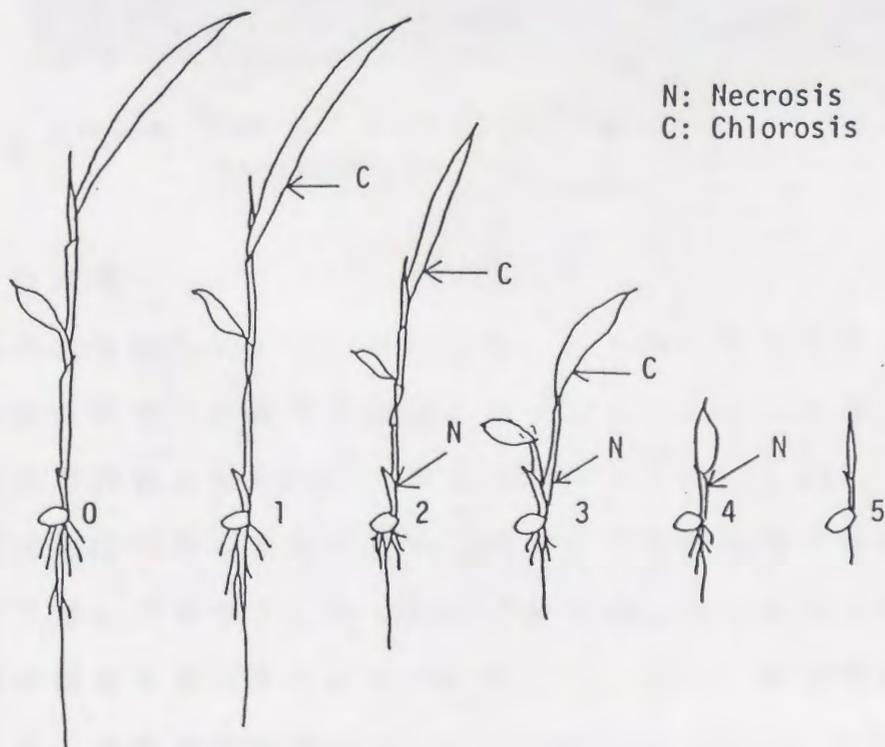


Fig. 14. Disease index of bacterial seedling rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*.



Fig. 15. Symptom of bacterial seedling rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*.

### 3. 実験結果

実験の結果はTable 37に要約した。この表から明らかなように、非病原性菌株でイネ種子を浸漬処理することによってイネ幼苗腐敗症の発病が抑制されることが明らかとなった(Fig. 16)。しかし、その発病抑制効果の程度は非病原性菌株-病原性菌株の組み合わせによって著しく異なり、全く発病抑制効果の見られないものから高い発病抑制効果を示すものまで存在した。即ち、病原性菌株So-1に対しては、非病原性菌株N7503、N750、YN7825、805によって発病が抑制された。他方、YN7810で処理しても抑制効果は得られなかった。病原性菌株2に対しては、N7503、805で発病抑制効果が認められたが、N750、YN7810、YN7825では全く抑制されなかった。病原性菌株Kyu82-34-2に対しては、非病原性菌株N7503で処理した場合だけに発病抑

制効果が認められ、非病原性菌株N750、YN7810、YN7825、805で処理しても発病は抑制されなかった。さらに病原性菌株Ku8111に対しては、N7503、YN7810、805で発病抑制効果が認められ、N750では弱く、YN7825では効果は得られなかった。



Fig. 16. Suppression of bacterial seedling rot of rice by pre-treatment with avirulent strain of *Pseudomonas glumae*.

A: Non-treatment (control)	B: Virulent strain alone
C: Pre-treatment	D: Avirulent strain alone

Table 37. Suppression of bacterial seedling rot of rice by pre-treatment with avirulent strains of *Pseudomonas glumae*

Pre-treatment <sup>a)</sup>	Inoculation <sup>b)</sup>	Disease severity
N7503	So-1	0.2
	2	0.0
	Kyu82-34-2	0.2
	Ku8111	0.9
N750	So-1	0.3
	2	4.2
	Kyu82-34-2	4.8
	Ku8111	3.4
YN7810	So-1	0.6
	2	4.6
	Kyu82-34-2	4.8
	Ku8111	1.2
YN7825	So-1	0.3
	2	4.7
	Kyu82-34-2	4.6
	Ku8111	4.4
805	So-1	0.6
	2	0.3
	Kyu82-34-2	4.1
	Ku8111	1.1
Control	So-1	4.9
	2	5.0
	Kyu82-34-2	4.9
	Ku8111	4.9

a) Concentration; N7503:  $3.8 \times 10^{10}$ , N750:  $7.4 \times 10^{10}$   
 YN7810:  $3.1 \times 10^{10}$ , YN7825:  $2.4 \times 10^{10}$ ,  
 805:  $6.0 \times 10^{10}$ , cfu/ml, respectively.

b) Concentration; So-1:  $2.6 \times 10^7$ , 2:  $0.9 \times 10^7$ , Kyu82-34-2:  $1.2 \times 10^7$   
 Ku8111:  $1.3 \times 10^7$ , cfu/g of soil, respectively.

## 第2項 浸漬処理用の菌濃度と発病抑制効果との関係

### 1. 目的

前項の結果から非病原性菌株でイネ種子を処理することによりイネ幼苗腐敗症の発病が抑制されることが明らかとなった。そこで、この発病抑制効果と菌濃度との関係について検討を行った。

### 2. 材料と方法

非病原性菌株としてN7503を、また病原性菌株としてSo-1を供試した。発病抑制効果の検定はFig. 13に示した方法に従って行った。水保存してある各菌株をYPD平板培地に広げて単一コロニー分離を行い、これを200 mlのYPD液体培地の入った坂口フラスコに接種し、30℃で48時間振とう培養を行い、遠心(8,000 × g、20分間)によって得られた菌体を滅菌蒸留水に約 $10^{10}$  cfu/mlになるように懸濁し、これを10倍段階希釈することにより約 $10^{10}$ 、 $10^8$ 、 $10^6$  cfu/mlの細菌懸濁液を作成した。この各濃度の非病原性菌株N7503の懸濁液にメチルセルロースを1.5%になるように加え、これに3%次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)で表面殺菌を行ったイネ種子を浸漬し、30℃で24時間静置後、滅菌したくみあい培土80 gの入った容器に60粒ずつ播種し、20 gのくみあい培土で覆土した後、各濃度の病原性菌株So-1の細菌懸濁液を10 mlずつ灌注接種を行い、30℃で48時間接種箱に置き、28℃で1日12時間照明に調節した植物育成チャンバ-内に入れ、15日目に発病度の検定を行った。

### 3 実験結果

結果はTable 38に示した。Table 38から明らかなように、非病原性菌株の濃度が $10^{10}$  cfu/mlの細菌懸濁液でイネ種子を処理した場合、土壌中の病原性菌株の菌濃度が $10^9$  cfu/gと高濃度であっても高い発病抑制効果が示された。しかし、非病原性菌株の菌濃度が $10^8$  cfu/ml以下になり、さらに、病原性菌株の菌濃度が $10^{5.5}$  cfu/gと低くなると発病抑制効果は得られず、効果を得るためには高濃度( $10^{10}$  cfu/ml)の非病原性菌株の懸濁液で処理する必要があることが明らかとなった。

Table 38. Suppression of bacterial seedling rot at different concentrations of avirulent and virulent bacterial suspensions used for pre-treatment and inoculation, respectively

Avirulent strain N7503 (cfu/ml)	Virulent strain So-1 (cfu/g of soil)	Disease severity
$10^{10}$	$10^9$	0.2
$10^{10}$	$10^7$	0.1
$10^{10}$	$10^5$	0.0
$10^8$	$10^9$	4.8
$10^8$	$10^7$	4.5
$10^8$	$10^5$	3.8
$10^6$	$10^9$	5.0
$10^6$	$10^7$	5.0
$10^6$	$10^5$	4.5
	$10^9$	5.0
	$10^7$	5.0
	$10^5$	4.7

### 第3項 非病原性N7503菌株の各種病原性菌株 に対する発病抑制効果

#### 1. 目的

第1項の結果から、非病原性菌株N7503は供試した4種類の病原性菌株(So-1、2、Kyu82-34-2、Ku8111)全てに対して高い発病抑制効果を示す菌株であることが明らかとなった。この非病原性菌株N7503の持つ発病抑制効果が、さらに多くの他の病原性菌株に対しても同様に高い発病抑制効果を示すか否かについて検討を行った。

#### 2. 材料と方法

九州大学植物病理学教室保存のイネもみ枯細菌病菌の菌株の内、強い病原性を示すKu8106、Ku8121、Ⅲ、8001、8017、I、Ku8105の計5菌株を供試し、N7503菌株の発病抑制効果を検討した。浸漬処理及び接種法はFig. 13に記した方法で行った。

#### 3. 実験結果

Table 39に示したように非病原性菌株N7503は供試した全ての病原性菌株に対して強い発病抑制効果を持つ菌株である事が明らかとなった。

Table 39. Effect of avirulent strain N7503 on the suppression of bacterial seedling rot of rice by various virulent strains of *Pseudomonas glumae*

Dipped rice seeds in the suspension of	Virulent strains <sup>a)</sup>						
	Ku8106	Ku8121	II	8001	8017	I	Ku8105
N7503 <sup>b)</sup>	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.3	0.0
1.5% methylcellulose	4.6	4.2	3.8	3.6	4.1	3.9	3.9

a) Concentration ; Ku8106:  $1.9 \times 10^7$ , Ku8121:  $7.4 \times 10^6$ , II:  $2.1 \times 10^7$ , 8001:  $6.1 \times 10^6$   
8017:  $1.6 \times 10^7$ , I:  $6.5 \times 10^7$ , Ku8105:  $6.4 \times 10^6$ , cfu/g of soil,  
respectively.

a) Concentration ; N7503:  $4.1 \times 10^{10}$  cfu/ml.

#### 第4項 カスガマイシン・キャプタン水和剤との発病抑制効果の比較

##### 1. 目的

イネ幼苗腐敗症の防除に有効なイネ育苗箱施用剤として報告されているカスガマイシン・キャプタン水和剤<sup>1,2)</sup>の防除効果と非病原性菌株による防除効果とを比較した。

##### 2. 材料と方法

病原性菌株 So-1 と非病原性菌株 N7503 との組み合わせで、イネ品種としてはあそみのりを用いて実験を行った。非病原性菌株による処理法、病原性菌株の接種法は Fig. 13 に示した方法に従った。カスガマイシン・キャプタン水和剤は、1 容器当たり 200 倍希釈液（原体換算でカスガマイシン 1.2 g + キャプタン 1.2 mg）10 ml を、播種後覆土前に滅菌土壌に灌注することにより処理した。

### 3 実験結果

実験の結果はTable 40に要約した。N7503でイネ種子を前処理することにより得られる発病抑制効果は、カスガマイシン・キャプタン水和剤を土壌1 g当たり0.4 mgで施用した場合に得られる発病抑制効果とほぼ同程度のものではあった。しかし、カスガマイシン・キャプタン水和剤で処理した区では、N7503の前処理または1.5 %メチルセルロースのみで処理した区と比べて、イネ幼苗の苗丈が低いなど、若干の成育抑制が見られる場合があった。非病原性菌株で前処理したものは、防除薬剤とほぼ同程度の効果が得られ、その生育は無処理区との間に殆ど差は認められなかった。

Table 40. Comparison between biological and chemical methods in the suppression of bacterial seedling rot of rice<sup>a)</sup>

Treatment	Concentration	Disease severity
Seeds were treated with avirulent strain N7503	$10^{10}$ cfu/ml	0.5
Soil was incorporated with Kasugamycin · captan WP	0.4 mg/g of soil	0.0
Untreated		4.2

a) Inoculum : *Pseudomonas glumae* strain So-1 at the concentration of  $1.9 \times 10^7$  cfu/g of soil.

## 第5項 発病抑制効果の品種間差異

### 1. 目的

非病原性菌株の示すイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果がイネの品種によって異なるか否かについて検討を行った。

### 2. 材料と方法

イネ品種として、あそみのり、太刀風、黄玉、中国45号、クジユウ、愛知旭、農林29号、IR64、イナバワセの計9品種を供試した。細菌は非病原性菌株としてN7503、YN7810及び805を、また病原性菌株としてSo-1、Kyu82-34-2及び2を用いた。非病原性菌株による種子処理、病原性菌株の接種及び効果の検定はFig. 13に示した方法で行った。

### 3. 実験結果

Table 41に要約したように、実験結果から非病原性菌株による発病抑制効果には品種間差異が存在することが明らかとなった。非病原性菌株805と病原性菌株Kyu82-34-2の組み合わせにおいては、太刀風、黄玉、中国45号及びクジユウで発病抑制効果が認められたが、他の品種(あそみのり、愛知旭、農林29号、IR64、イナバワセ)においては全く発病は抑制されなかった。非病原性菌株805と病原性菌株2の組み合わせでは、愛知旭、中国45号で発病抑制効果は認められず、農林29号において若干の発病抑制が認められ、他の6品種(あそみのり、太刀風、黄玉、クジユウ、IR64、イナバワセ)においては高い発病抑制効果を示した。また、非病原性菌株YN7810と病原性

菌株So-1の組み合わせでは、太刀風、クジユウ、イナバワセにおいては全く発病抑制効果は得られず、他の品種(あそみのり、黄玉、中国45号、愛知旭、農林29号、IR64)では高い発病抑制効果が得られた。非病原性菌株N7503と病原性菌株So-1の組み合わせでは、全ての品種において発病を抑制することが明らかとなった。以上のことから発病抑制効果発現には非病原性菌株、病原性菌株及びイネ品種の3者の間の特異的な関係が関与することが示唆された。

Table 41-1. Suppression of bacterial seedling rot with avirulent strains of *Pseudomonas glumae* on various rice varieties

Seed pre-treatment and inoculation		Rice variety				
		Asominori	Tachikaze	Kujyu	Chugoku 45	Kogyoku
Virulent strain (Control)	So-1	3.7	2.7	0.9	4.9	1.0
	Kyu82-34-2	3.4	4.4	1.4	0.4	4.3
	2	4.9	5.0	4.9	4.9	4.9
Avirulent strain +	N7503 + So-1	0.3	0.1	0.0	0.1	0.1
	YN7810 + So-1	0.4	2.0	1.5	0.4	0.3
Virulent strain (Treatment)	805 + Kyu82-34-2	2.5	0.6	0.7	1.5	0.2
	805 + 2	0.1	0.3	0.2	3.6	0.1
Avirulent strain (Control)	N7503	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1
	YN7810	0.3	0.1	0.1	0.0	0.2
	805	0.2	0.3	0.2	0.0	0.1

Concentration; So-1:  $3.0 \times 10^7$ , 2:  $2.6 \times 10^7$ , Kyu82-34-2:  $1.2 \times 10^7$ , cfu/g of soil, respectively.

N7503:  $4.0 \times 10^{10}$ , YN7810:  $4.1 \times 10^{10}$ , 805:  $3.7 \times 10^{10}$ , cfu/ml, respectively.

Table 41-2. Suppression of bacterial seedling rot with avirulent strains of *Pseudomonas glumae* on various rice varieties

Seed treatment and inoculation		Rice variety			
		Inabawase	Aichiasahi	Nourin 29	IR 64
Virulent strain (Control)	So-1	3.4	2.4	1.3	2.8
	Kyu82-34-2	4.5	4.5	4.3	5.0
	2	4.6	4.1	4.5	4.8
Avirulent strain +	N7503 + So-1	1.0	0.8	0.4	0.9
	YN7810 + So-1	2.3	0.6	0.2	0.3
Virulent strain (Treatment)	805 + Kyu82-34-2	4.5	3.3	5.0	5.0
	805 + 2	0.4	3.9	2.8	0.5
Avirulent strain (Control)	N7503	0.0	0.0	0.0	0.4
	YN7810	0.1	0.2	0.3	0.4
	805	0.0	0.0	0.0	0.0

Concentration; So-1:  $3.3 \times 10^7$ , 2:  $2.3 \times 10^7$ , Kyu82-34-2:  $8.1 \times 10^6$ , cfu/g of soil, respectively. N7503:  $3.8 \times 10^{10}$ , YN7810:  $3.3 \times 10^{10}$ , 805:  $3.9 \times 10^{10}$ , cfu/ml, N7503:  $3.8 \times 10^{10}$ , YN7810:  $3.3 \times 10^{10}$ , 805:  $3.9 \times 10^{10}$ , cfu/ml, respectively.

### 第3節 非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症発病抑制機作

#### 第1項 非病原性菌株の病原性菌株に対する抗菌活性

##### 1. 目的

病原性菌株に対する非病原性菌株の抗菌活性を検定し、発病抑制効果との関連性を検討した。

##### 2. 材料と方法

非病原性菌株 N7503、N750、805、YN7810、YN7825 及び病原性菌株 Ku8111、2、So-1、Kyu82-34-2 を供試した。抗菌物質の産生性及び活性の検定には YPDA 平板培地を用い、プレートクロロホルム法 (Fig. 1) 及び UV 照射の 2通りの方法で行った。UV 照射は、培養後コロニーの形成が認められた ペトリ皿 の上蓋を外し、15 W の殺菌ランプ (東芝 GL-15) で高さ 30 cm から 3 時間行った。その後、30 ℃ で 24 時間静置し、指示菌である病原性菌株を重層し、30 ℃ で培養後コロニーの周囲に形成される阻止帯の有無により抗菌物質産生性を検討した。

##### 3. 実験結果

実験の結果は Table 42、43 に要約した。Table 42 から明らかなように、供試した非病原性菌株 N7503 及び N750 において抗菌活性が認められた。これらの菌株が形成した阻止帯の中は数 mm 程度の小さなものであった。これらの抗菌活性と発病抑制効果との関係を Table 43 に示した。抗菌活性の認められた菌株において発病抑制効果が認

められる組み合わせ (N7503と2, N750とSo-1) の他、抗菌活性があっても発病抑制効果のない組み合わせ (N750と2)、抗菌活性がなくても発病抑制効果のある組み合わせ (N7503とKu8111, N7503とSo-1, N7503とKyu82-34-2, 805とKu8111, 805と2, 805とSo-1, YN7810とKu8111, YN7810とSo-1, YN7825とSo-1) があり、非病原性菌株が病原性菌株に対して培地上で示す抗菌活性と発病抑制効果との間には直接的な関連性は認められなかった。

Table 42. Sensitivity of virulent *Pseudomonas glumae* strains to antibacterial substances produced by avirulent strains of the same bacterium

Indicator (virulent strain)	Producer (avirulent strain)									
	N7503		N750		805		YN7810		YN7825	
	UV <sup>a)</sup>	Chlo. <sup>b)</sup>	UV	Chlo.	UV	Chlo.	UV	Chlo.	UV	Chlo.
Ku8111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
So-1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Kyu82-34-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) UV irradiated for 2hr.

b) Chloroform vapor treatment for 3hr.

Table 43. Relationship between antibiotic productivity of avirulent *Pseudomonas glumae* strains and their suppressive effect against bacterial seedling rot of rice

Avirulent strain		Virulent strain			
		Ku8111	2	So-1	Kyu82-34-2
N7503	Antibiotic activity	-	+	-	-
	Disease suppression	+	+	+	+
N750	Antibiotic activity	-	+	+	-
	Disease suppression	-	-	+	-
805	Antibiotic activity	-	-	-	-
	Disease suppression	+	+	+	-
YN7810	Antibiotic activity	-	-	-	-
	Disease suppression	+	-	+	-
YN7825	Antibiotic activity	-	-	-	-
	Disease suppression	-	-	+	-

## 第2項 他種細菌による発病抑制効果

### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌以外の既知植物病原細菌及び腐生菌についてイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果を検討した。

### 2. 材料と方法

九州大学植物病理学教室において保存してある植物病原細菌 *Agrobacterium tumefaciens* Ku7411、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* N7129、*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* N6601、*Bacillus subtilis* ATCC6633、*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 1、及び *Pseudomonas fluorescense* p-15を供試した。これらの細菌はそれぞれPSA斜面培地上に30℃で48時間培養後、200 mlのYPD液体培地の入った坂口フラスコに移植し、30℃で48時間培養し、遠心(8,000 × g、20分)によって菌体を集め、これを約 $10^{10}$  cfu/mlになるように滅菌水に懸濁し、前処理に用いた。前処理及び病原性菌株の接種はFig. 13に示した方法で行った。

### 3. 実験結果

結果はTable 44に示した。イネ幼苗腐敗症の発病抑制効果は、非病原性イネもみ枯細菌病菌のみによって示された。供試したその他全ての細菌では発病抑制効果が全く認められないことが明らかとなった。

Table 44. Suppression of bacterial seedling rot of rice<sup>a)</sup> by various bacteria

Bacteria	Disease severity
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ku7411	5.0
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> N7129	5.0
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> N6601	5.0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	5.0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> I	5.0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> p-15	5.0
<i>Pseudomonas glumae</i> N7503	0.4
Control (1.5% methylcellulose)	5.0

a) Virulent strain So-1 was added to the oven-dried soil at the concentration of  $3.5 \times 10^7$  cfu/g.

### 第3項 非病原性菌株培養ろ液による発病抑制効果

#### 1. 目的

非病原性菌株の培養ろ液でイネ種子を処理した場合の発病抑制効果について検討した。

#### 2. 材料と方法

非病原性菌株 N7503 を YPD 液体培地 (200 ml) に接種し、30 ℃ で 4 日間振とう培養後、遠心 (8,000 × g、20 分) し、上清を孔径 0.2 μm のメンブランフィルターを通し完全に除菌することにより非病原性菌株培養ろ液を得た。この培養ろ液に表面殺菌したイネ種子を 24 時間浸漬し、これを病原性菌株 So-1 が土壌 1 g 当たり  $2.6 \times 10^7$  cfu になるように接種した汚染土壌に播種し、15 日目に発病度を調査した。

#### 3. 実験結果

Table 45 に示すように、培養ろ液の原液を用いた場合も、1/100 希釈した場合も殆ど差のない発病度を示し、培養ろ液による発病抑制効果は全く認められなかった。

Table 45. Effect of culture filtrate of avirulent strain N7503 on the protection of rice seedlings from bacterial seedling rot of rice caused by virulent strain So-1<sup>a)</sup>

Pre-treatment	Disease severity
Culture filtrate <sup>b)</sup> (Original conc.)	5.0
Culture filtrate (100 times dilution)	4.8
Control	5.0

a) Concentration :  $2.59 \times 10^7$  cfu/g of soil

b) Culture filtrate was obtained from shake culture suspension for 4 days at 30 ℃.

#### 第4項 死菌による発病抑制効果

##### 1. 目的

非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果が死菌によっても認められるか否かについて検討した。

##### 2. 材料と方法

供試菌株として非病原性菌株N7503、及び病原性菌株So-1を用いた。PSA斜面培地上に30℃で48時間培養した非病原性菌株N7503を約 $10^{10}$  cfu/mlになるように滅菌蒸留水に懸濁した後、次に示す3通りの方法によって死菌の作成を行った。① 100℃で10分間の熱処理 ② 滅菌ペトリ皿に細菌懸濁液を2~3 mlずつ入れ、15 Wの殺菌ランプ(東芝 GL-15)で30 cmの高さから4時間照射 ③ 細菌懸濁液約10 mlを50 mlのビーカーに取り、これをクロロホルム約200 mlの入った2,000 mlのビーカーに入れアルミニウム箔で密封し、スターラーで攪拌しながら4時間の蒸気処理を行った。死菌による前処理、病原性菌株の接種及び検定はFig. 13に示した方法で行った。

##### 3. 実験結果

Table 46に示したように、生菌で処理した場合は全く発病が認められず高い発病抑制効果を示すのに対して、作成した3種類の死菌液で処理した場合は、熱処理死菌区で4.8、UV照射処理死菌区で4.4、クロロホルム蒸気処理死菌区で4.9の発病度を示し、発病抑制効果が全く認められなかった。このことから非病原性菌株による発病抑制効果は生菌によってのみ示される事が明らかとなった。

Table 46. Suppression of bacterial seedling rot of rice by living and killed cells of avirulent *Pseudomonas glumae* strain N7503

Strain	Dipped rice seeds <sup>a)</sup> in the suspension of	Disease severity
N7503 <sup>b)</sup>	Living bacteria <sup>c)</sup>	0.0
	Heated bacteria <sup>d)</sup>	4.8
	UV irradiated bacteria <sup>e)</sup>	4.4
	Chloroform treated bacteria <sup>f)</sup>	4.9
Control	1.5% methylcellulose	5.0

a) Rice seeds were dipped in each suspension for 24 hr prior to sowing.

b) Concentration:  $1.4 \times 10^9$  cfu/ml

c) Soil was incorporated with So-1 ( $3.5 \times 10^6$  cfu/g).

d) Heat treatment at 100 °C for 15 min.

e) UV irradiated with Toshiba GL 15 at the distance of 30 cm for 4 hr.

f) Chloroform vapor treatment for 4 hr.

## 第5項 種子処理法及び接種法の違いが発病抑制効果に及ぼす影響

### 1. 目的

イネ種子を非病原性菌株でコーティングして汚染土壤に播種した場合に高い発病抑制効果が得られることが明らかとなった。そこで、病原性菌株で同時接種した場合、あるいは非病原性菌株で予め土壤を処理した場合の発病抑制効果について検討した。

### 2. 材料と方法

高い発病抑制効果の認められる非病原性菌株 N7503 と病原性菌株 So-1 の組み合わせを用いて行った。非病原性菌株と病原性菌株の混合液（濃度 N7503:  $6.3 \times 10^9$  cfu/ml、So-1:  $2.3 \times 10^7$  cfu/ml）及び非病原性菌株、病原性菌株の単独液にメチルセルロースを1.5%になるように加え、これらの液に表面殺菌したイネ種子を浸漬し、30℃で24時間保った。処理した種子を、100gのくみあい培土の入った容器に60粒づつ播種し、32℃で湿度100%の接種箱に48時間保った後、28℃、1日12時間照明の植物育成チャンバー内に置き、播種後15日目に発病度の検定を行った。

また、濃度  $6.3 \times 10^9$  cfu/ml の非病原性菌株懸濁液及び濃度  $2.7 \times 10^7$  cfu/ml の病原性菌株懸濁液を1容器（100gのくみあい培土）当たり10mlずつ混合し、この土壤に表面殺菌した種子を播種した後、上記と同様に播種15日目に発病度の調査を行った。

さらに、病原性菌株接種後に非病原性菌株で処理した場合の発病抑制効果の検定を以下の方法で行った。表面殺菌を行ったイネ種子を病原性菌株 So-1 の細菌懸濁液（濃度:  $2.3 \times 10^8$  cfu/ml）で種々の

時間(10分、24、48、72、96、120時間)浸漬接種後、100 gのくみあい培土の入った容器に60粒ずつ播種し、非病原性菌株N7503の細菌懸濁液(濃度: 約 $10^{9-10}$  cfu/ml)を10 mlずつ灌注し、32℃で湿度100%に保った接種箱に48時間入れ、その後28℃で1日12時間照明の植物育成チャンパー内に置き、育苗した。発病度の検定は播種後15日目に行った。

### 3 実験結果

実験の結果はTable 47及び48に要約した。Table 47に示したように、病原性菌株を単独でイネ種子にコーティングした区では全ての個体が完全に腐敗・枯死したのに対し、非病原性菌株と病原性菌株の混合液でイネ種子をコーティングした場合、発病度1.3を示し、高い発病抑制効果が認められた。また、濃度 $2.3 \times 10^6$  cfu/gの病原性菌株で汚染した土壤に播種した場合には3.6の発病度を示したのに対して、この土壤に非病原性菌株が $6.3 \times 10^8$  cfu/gの濃度で存在した場合には発病度が0.3と顕著な抑制効果を示した。

また、Table 48から明らかのように、先に病原性菌株So-1をイネ種子に浸漬接種し、非病原性菌株N7503が土壤1 g当たり約 $10^9$  cfuの菌量で存在している土壤に播種した場合にも発病は顕著に抑制された。さらに、イネ種子を病原性菌株の細菌懸濁液に120時間浸漬接種した場合でも非病原性菌株を添加した土壤に播種すれば発病が抑制されることが明らかとなった。

Table 47. Suppression of the bacterial seedling rot of rice by avirulent *Pseudomonas glumae* strain N7503 with various methods of application

Treatment	Concentration		Disease severity <sup>a)</sup>
	N7503(avirulent)	So-1(virulent)	
Seed dipping <sup>b)</sup>		2.3x10 <sup>7</sup> cfu/ml	5.0
	6.3x10 <sup>9</sup> cfu/ml		0.7
	6.3x10 <sup>9</sup> cfu/ml	2.3x10 <sup>7</sup> cfu/ml	1.3
Soil application		2.3x10 <sup>6</sup> cfu/g of soil	3.6
	6.3x10 <sup>8</sup> cfu/g of soil		0.6
	6.3x10 <sup>8</sup> cfu/g of soil	2.3x10 <sup>6</sup> cfu/g of soil	0.3
Seed dipping + soil application <sup>c)</sup>	6.3x10 <sup>9</sup> cfu/ml	2.3x10 <sup>6</sup> cfu/g of soil	0.8

a) Based on a scale from 0 (no visible symptom) to 5 (entire withering)

Figures are the average of 120 plants, 15 days after sowing.

b) Dipped in a suspension of *P. glumae* containing 1.5 % methylcellulose for 24 hr before sowing.

c) Dipped in a suspension of avirulent strain N7503 for 24 hr followed by sowing in the soil infested with avirulent strain So-1.

Table 48. Suppression of bacterial seedling rot of rice by avirulent strain expressed on the seedlings pre-inoculated with virulent strain

Dipped the seeds in virulent strain <sup>a)</sup>	Avirulent strain <sup>b)</sup> added to soil	Disease severity					
		Time of pre-inoculation (dipping)					
		10 min	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
So-1	None	5.0	4.3	3.8	5.0	4.7	5.0
So-1	N7503	0.4	0.5	0.1	0.2	0.5	0.3
None	N7503	0.3	0.5	0.5	0.4	0.5	0.2

a) Rice seeds were dipped in bacterial suspension of So-1 at  $2.3 \times 10^8$  cfu/ml for various period.

Soil was incorporated with N7503 (conc. ca.; 10min:  $6.0 \times 10^9$ , 24 hr:  $3.7 \times 10^9$ , 48 hr:  $4.2 \times 10^9$ , 72 hr:  $3.1 \times 10^9$ , 96 hr:  $3.3 \times 10^9$ , 120 hr:  $3.8 \times 10^9$  cfu/g of oven-dried soil, respectively).

## 第6項 イネ発芽液中及び滅菌水中における競合

### 1. 目的

非病原性菌株によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果の機作を明らかにする目的で、イネ発芽液中及び栄養分の極端に限られている滅菌水中における非病原性菌株と病原性菌株との競合関係について検討を行った。

### 2. 材料と方法

非病原性菌株としてN7503、病原性菌株としてストレプトマイシン耐性のSo-1-SRを用いた。イネ発芽液は次のようにして調整した。即ち、3%次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)で90分間表面殺菌した種子を滅菌水で十分に洗浄後、滅菌水50 mlの入った100 mlの三角フラスコに10粒ずつ入れ、30℃で1日12時間照明の植物育成チャンバー内に7日間置き、その後滅菌ピンセットでイネ植物体を除去、メンブランフィルター(孔径0.2 μm)を通すことにより完全に除菌した液をイネ発芽液とした。この発芽液を100 mlの三角フラスコに28 mlずつ入れ、これに供試菌を所定の濃度(N7503:  $1 \times 10^6$  cfu/ml、So-1-SR:  $3 \times 10^6$  cfu/ml)になるように接種した後、30℃で静置培養し、経時的にYPDA及びストレプトマイシン500 ppm含有YPDA培地を使用する希釈平板法により細菌の定量を行った。イネ発芽液の代わりに滅菌蒸留水を用いたものを対照とした。

### 3. 実験結果

実験の結果はFig. 17、18に要約した。病原性菌株So-1-SRをイネ

発芽液中に  $3 \times 10^7$  cfu/ml になるように単独接種して培養した場合、その菌数は培養2日目に  $1 \times 10^7$  cfu/ml に達し、その後若干の減少が見られたが、培養15日目まで約  $10^6$  cfu/ml のほぼ一定の菌量で生存した。非病原性菌株 N7503 と混合培養した場合、病原性菌株 So-1-SR の増殖は著しく抑制され、培養2日目に単独培養の菌数に比べて約  $1/100$ 、培養5日目には約  $1/10$  となり、その後15日目まで約  $1/10$  の濃度で推移した。非病原性菌株 N7503 の増殖は病原性菌株 So-1-SR との混合培養によっても減少せず、単独培養の場合とほぼ同様の増殖パターンを示した。また、Fig. 18 に示したように、滅菌蒸留水中においてもイネ発芽液中の増殖パターンと同様の傾向が認められた。すなわち、混合培養において病原性菌株 So-1-SR の増殖は抑制され、培養2日目から15日目まで単独培養の場合と比べて約  $1/10$  の菌量で推移した。

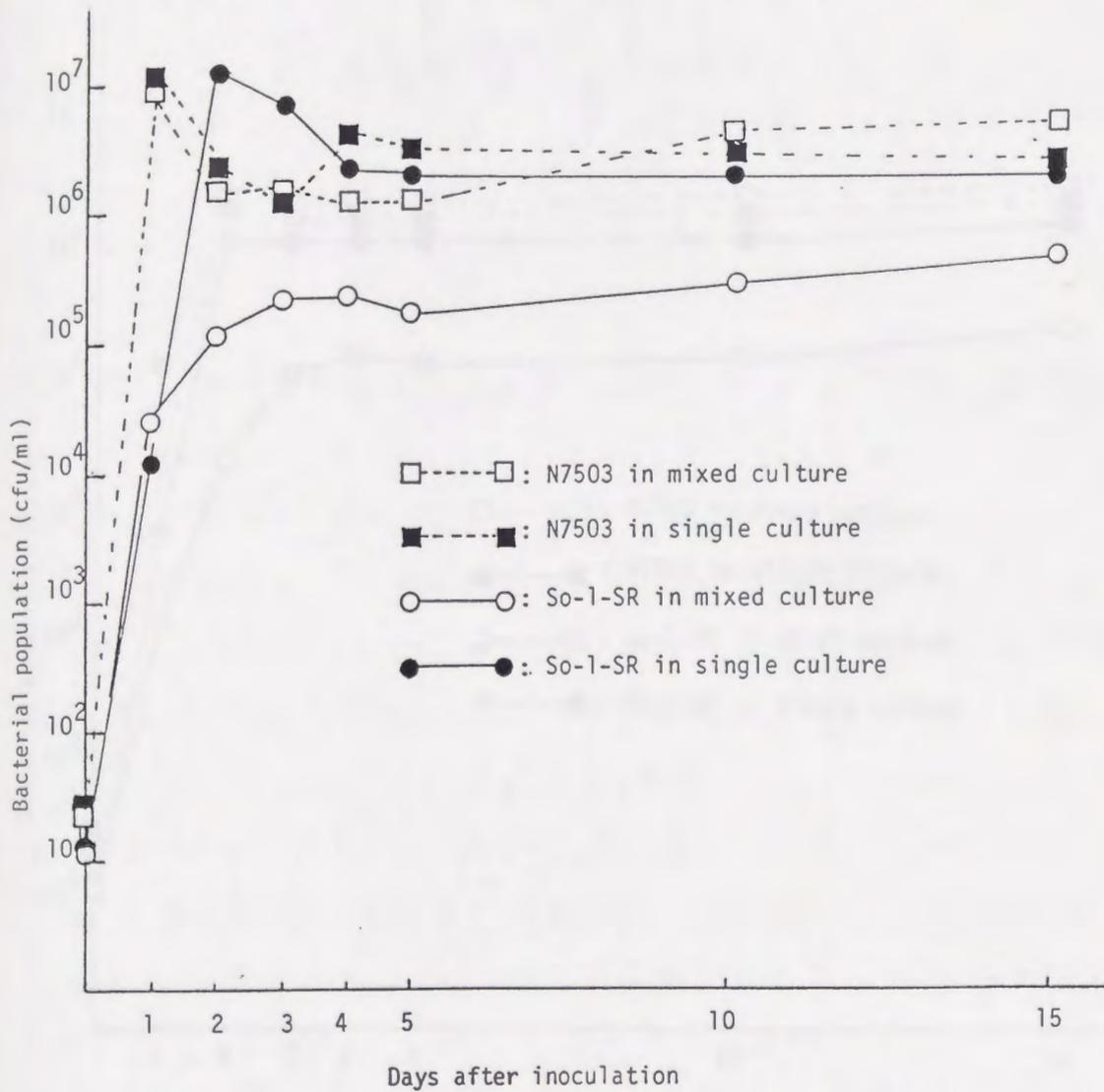


Fig. 17. Growth competition between avirulent and virulent strains of *Pseudomonas glumae* in the water in which rice seeds were germinated.

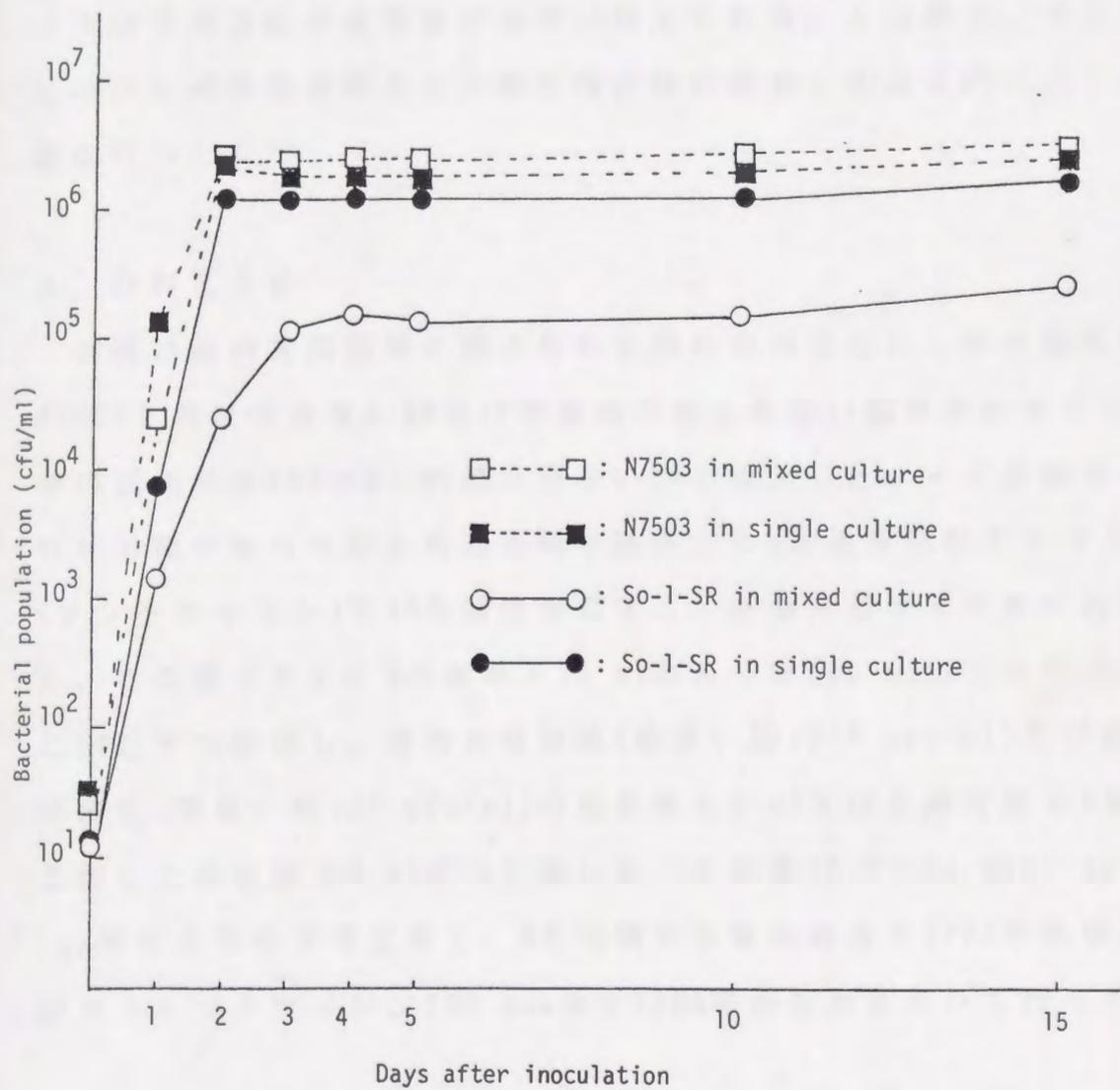


Fig. 18. Growth competition between avirulent and virulent strains of *Pseudomonas glumae* in sterilized water.

## 第7項 イネもみ上における競合

### 1. 目的

非病原性菌株でイネ種子を処理することにより病原性菌株によるイネ幼苗腐敗症の感染及び発病が抑えられる。この場合、イネもみにおける病原性菌株及び非病原性菌株の消長を知る目的で以下の実験を行った。

### 2. 材料と方法

菌株は発病抑制効果の認められる組み合わせとして非病原性菌株 N7503と病原性菌株 2-SR及び効果の認められない組み合わせとして非病原性菌株 YN7810と病原性菌株 2-SRを供試した。イネ品種あそみのりの種子から外穎と内穎を取り除き、3%次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)で90分間表面殺菌し、滅菌蒸留水で十分に洗浄した。この種子を0.5%の素寒天20 mlの入った100 mlの三角フラスコに10粒ずつ播種し、非病原性菌株(濃度: 約 $10^{10}$  cfu/ml)及び病原性菌株(濃度: 約 $10^8$  cfu/ml)の混合液を2 ml及び各細菌液を2倍に希釈した単独液を2 mlずつ接種した。その後25℃で34,000~40,000 lux照明の条件下で育苗し、2日間隔で各菌の定量をYPDA平板培地及びストレプトマイシン100 ppm含有YPDA平板培地を用いて行った。

### 3. 実験結果

Fig. 19に示したように、病原性菌 2-SRを単独で接種した区においては、時間の経過とともに増殖し、接種後10日目には1種子当たり約 $10^7$  cfuの菌量に達した。しかし、発病抑制効果を示す非病原

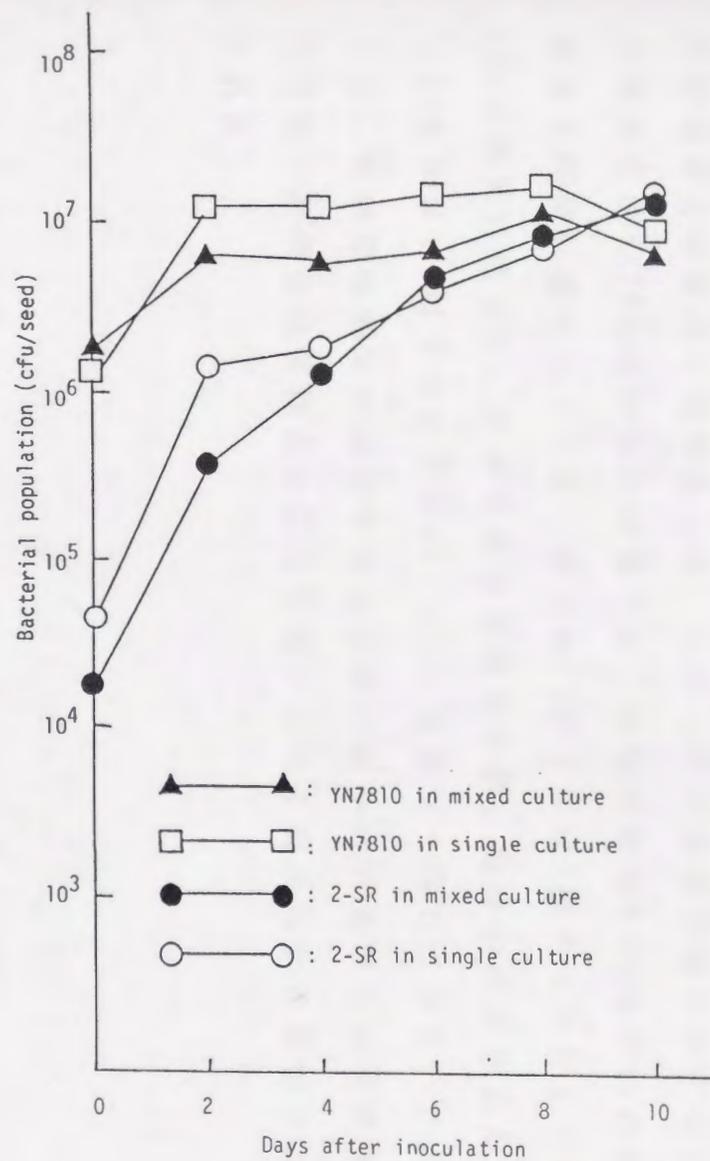
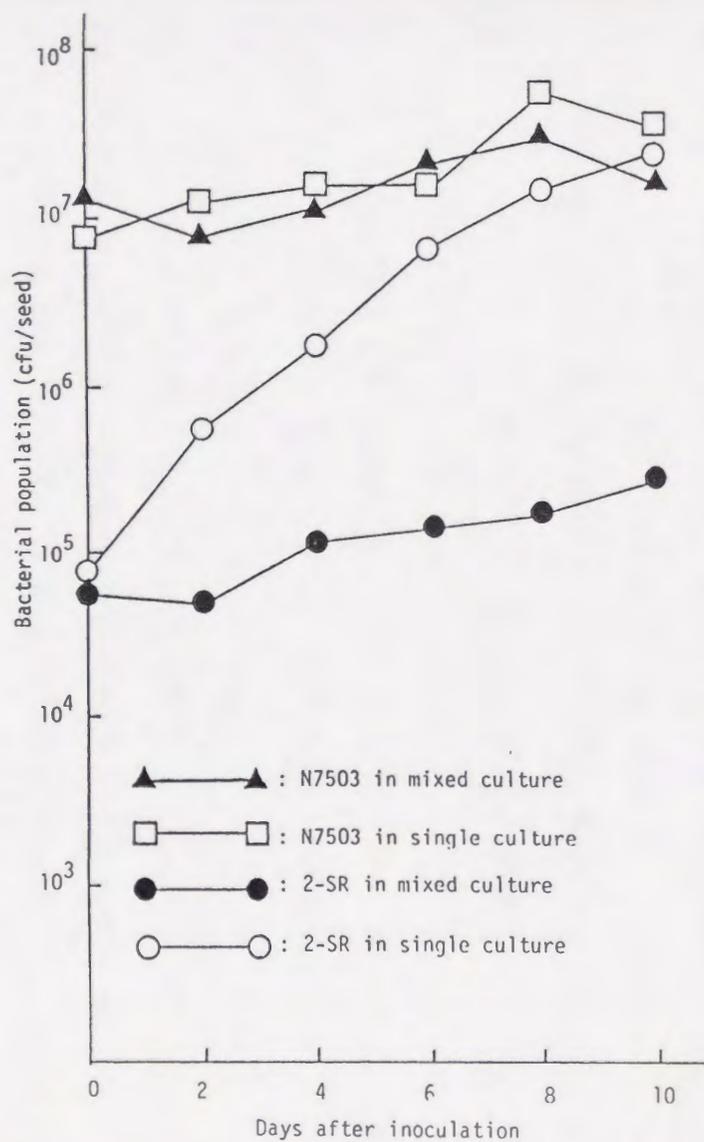


Fig. 19. Growth competition between avirulent and virulent strains of *Pseudomonas glumae* on/in rice seeds.

性菌株 N7503 との混合培養においては、病原性菌株 2-SR は接種後 10 日目においても 1 種子当たり  $1 \times 10^5$  cfu/ml の値にとどまり、接種時の菌量とほぼ同じ値であった。また、発病抑制効果を示さない非病原性菌株 YN7810 との混合培養では、病原性菌株 2-SR は単独培養の場合と同様に増殖していき、接種後 10 日目には 1 種子当たり  $1 \times 10^7$  cfu の菌量に達した。両非病原性菌株は単独、混合の両培養において 10 日目まで 1 種子当たり約  $10^7$  cfu の菌量で一定していた。このように、発病抑制効果の認められる菌株の組み合わせでは病原性菌株の増殖が非病原性菌株との混合培養によって抑えられる傾向が認められた。

## 第8項 病原性菌株の産生する毒素と発病抑制効果との関係

### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌は培地中で毒素を産生することが報告されている<sup>136)</sup>。しかし、PS液体培地中では病原性の有無にかかわらず毒性物質を産生することが明らかとなった。一方、非病原性菌株は土壌中ではイネに対する生育抑制を示さないことから、このイネ及び土壌が関与した条件下で病原性菌株が産生する毒素を非病原性菌株が中和あるいは解毒することにより発病が抑制される可能性も十分に考えられる。このことを明らかにする目的で以下の実験を行った

### 2. 実験方法

非病原性菌株による毒素の解毒は次の方法により検討した。すなわち、くみあい培土500 gに対して蒸留水1,000 mlを加え、時々攪拌しながら24時間静置し、吸引濾過によりくみあい培土の水抽出液を得た。これを100 mlの三角プラスチックに18 mlずつ分注し加圧滅菌した。これに3%次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)で表面殺菌した無菌のイネ種子を20粒ずつ加え、病原性菌株2(菌濃度: 約 $10^9$  cfu/ml)の細菌懸濁液を2 mlずつ接種し、25℃で34,000~40,000 lux照明下で10日間育苗した。その後イネ種子を取り除き、 $10,000 \times g$ 、20分間の遠心を行い、得られた上清を0.2  $\mu$ mのメンブランフィルターで処理し、完全に除菌した病原性菌株2の培養ろ液を得た。この培養ろ液を2 mlずつ滅菌試験管に入れ、これにYPDA斜面培地で30℃、48時間培養した非病原性菌株N7503を約 $10^9$  cfu/mlになるように接種し、25℃で培養した。培養10日目に、 $10,000 \times g$

20分間の遠心により培養ろ液からの菌体を除き、0.2  $\mu$ mのメンブロンフィルターを通すことにより完全に除菌し、得られたろ液を2 mlずつ滅菌試験管に分注、これに表面殺菌したイネ種子を2粒ずつ入れ、25  $^{\circ}$ C、34,000~40,000 luxの条件下で育苗し、10日目に幼苗長及び根長を測定し、解毒の有無を調べた。

### 3 実験結果

結果はTable 49に示した。Table 49から明らかなように病原性菌株2の培養ろ液では幼苗長6.8mm、根長1.0 mmと強い生育阻害が認められたのに対して、これに非病原性菌株N7503を接種し10日間培養したろ液では幼苗長91.6 mm、根長83.0 mmと、対照区とほぼ同様の生育を示し、毒素の活性が著しく低下している事が明かとなった。

Table 49. Detoxification of crude toxins produced by virulent *Pseudomonas glumae* strain 2 by avirulent strain N7503

Solution	Length of leaf (mm)	Length of root (mm)
Water control	89.0 <sup>c)</sup>	33.3
Culture filtrate of <i>P. glumae</i> strain 2 (Crude toxin solution) <sup>a)</sup>	6.8	1.0
The above additionally cultured with avirulent strain N7503 <sup>b)</sup>	91.6	83.0

a) Virulent strain 2 was cultured in soil extract medium with rice seedlings at 25  $^{\circ}$ C for 10 days under light condition of 34,000~40,000 lux.

b) Avirulent strain N7503 was cultured at 25  $^{\circ}$ C for 10 days in the above described culture filtrate.

c) Means of 10 seedlings, Two rice seeds were sown in test tube containing 2 ml of each solution. The length of the above-ground parts and the roots was measured 14th day of incubation at 25  $^{\circ}$ C under 34,000~40,000 lux after sawing.

#### 第4節 非病原性イネもみ枯細菌病菌の穂に対する発病抑制効果

##### 1. 目的

イネもみ枯細菌病菌はイネ幼苗の他、穂に対しても病原性を示すことが知られている。非病原性菌株がもみ枯症状に対しても発病抑制効果を示すか否かについて検討を行った。

##### 2. 材料と方法

イネ品種あそみのりを供試した。4月6日に播種し5月2日にワグネルポットに5株ずつ移植して生育させ、7月26日の開花期に非病原性菌株による発病抑制効果の検討を行った。供試細菌は非病原性菌株としてYN7810、YN7825を、病原性菌株としてSo-1、Ku8111を用いた。これら菌株をYPD液体培地に30℃で48時間培養後、遠心(3,600 × g、20分)により菌体を集め、これを滅菌水に懸濁し、病原性菌株の懸濁液(濃度; So-1:  $2.5 \times 10^8$ 、Ku8111:  $1.7 \times 10^8$  cfu/ml)及び非病原性菌株の懸濁液(濃度; YN7810:  $2.4 \times 10^{10}$ 、YN7825:  $2.5 \times 10^{10}$  cfu/ml)を作成し、病原性菌株と非病原性菌株との混合液(1:1)を作成し、また、単独の場合は2倍希釈液とし、これを1ポット当たりそれぞれ50 mlずつ噴霧接種した。接種後3日間保湿のためビニール袋で被覆した。20日目に穂の発病の有無を調査し、罹病株率、罹病穂率及び1穂平均罹病度を算出した。

##### 3. 実験結果

実験の結果はTable 50に要約した。Table 50から明らかなように、病原性菌株So-1を単独で接種した場合、罹病株率 90.0%、罹病度

20の発病を示したのに対し、非病原性菌株 YN7810、YN7825との混合液を接種した場合には、罹病度でそれぞれ7及び5と明らかな発病抑制効果が認められた。また病原性菌株 Ku8111の単独接種では、罹病度が38であったのに対し、非病原性菌株 YN7810との混合液の接種では16と発病抑制効果が認められた。しかし、非病原性菌株 YN7825の場合には発病度30を示し、発病抑制効果は顕著ではなく、病原性菌株と非病原性菌株との組み合わせにより発病抑制効果に違いがみられた。

Table 50. Protection of rice grains by avirulent strain from infection of bacterial grain rot caused by virulent strain of *Pseudomonas glumae*

Avirulent strain	Virulent strain	Percentage of diseased stock (%)	Percentage of diseased panicle (%)	Disease severity of average per one panicle
YN7825	-	0.0	0.0	0
YN7810	-	0.0	0.0	0
-	So-1	90.0	39.0	20
YN7825	So-1	60.0	24.4	7
YN7810	So-1	70.0	17.8	5
-	Ku8111	90.0	58.5	38
YN7825	Ku8111	90.0	51.8	30
YN7810	Ku8111	70.0	40.0	16

$$\text{Disease severity} = \frac{4a + 3b + 2c + 1d}{4 \times \text{Number of total panicle used}} \times 100$$

a : Percentage of diseased grain per one panicle 86-100 %

b : Do. 60-85 %

c : Do. 31-59 %

d : Do. 1-30 %

e : Do. 0 %

## 第5節 考察

イネもみ枯細菌病菌は *in vitro* において継代培養保存中にイネに対する病原性の低下または喪失が認められる。当研究室保存菌株の中にもイネの幼苗及び穂に対して全く病徴を示さず完全に病原性を喪失したと思われる菌株が多数存在する。上運天らはイネもみ枯細菌病菌のプラスミドを検出し、そのプラスミドパターンと病原性との関連性について検討した結果、両者間に関連性は認められず、病原性発現に対してプラスミドは直接的には関与していないと報告している<sup>73)</sup>。

著者らはイネもみ枯細菌病菌の病理学的性質として、本菌はイネに対する病原性の他に各種野菜組織を腐敗させる能力を有することを発見した<sup>183)</sup>。特にジャガイモ塊茎腐敗能とイネに対する病原性との間に高い相関が存在することを認めた。

イネもみ枯細菌病菌が各種野菜組織に対して腐敗能を有する細菌であることが明らかとなったため、生物的防除として利用する細菌はイネ及び各種野菜組織に対して病原性及び腐敗能を全く持たない菌株であることが必要であると考えられた。この目的に副うものとしてN7504、N7503、YN7810、YN7805、YN7825、N750、752及び805の計8菌株の非病原性菌株を選抜することができた。

非病原性菌株を利用した生物的防除の成功例は数多く報告されており、最も有名な成功例の一つとして *Agrobacterium radiobacter* K84による根頭癌腫病の生物的防除が挙げられる<sup>71, 80, 120)</sup>。非病原性菌株の中には病原性菌株に対して拮抗的に作用する菌株の存在も知られており、一般的にはバクテリオシンの産生性に基づくもの

が多い<sup>25, 81)</sup>。また植物体表面あるいは組織中などで病原性菌株と同様に増殖・定着可能な非病原性菌株は、特に感染部位等において拮抗がおこることも十分に考えられる<sup>168)</sup>。著者らはこのような考えに基づいて、イネもみ枯細菌病菌の非病原性菌株を利用し、病原性菌株による感染あるいは発病を抑制することを試みた。

非病原性菌株でコーティングしたイネ種子を病原性菌による汚染土壌に播種した場合、発病はほとんど認められず、この方法によるイネ幼苗腐敗症の生物的防除の可能性が示唆された。しかしながら、この非病原性菌株による発病抑制効果は、用いる非病原性菌株と病原性菌株との組み合わせによって異なり、全く発病抑制効果の認められない組み合わせから高い発病抑制効果の認められる組み合わせまで存在することが明らかとなり、病原性菌株と非病原性菌株との間に特異性があることが認められた。しかし、非病原性菌株 N7503 は供試した全ての病原性菌株による発病を抑制し、本病の生物的防除材として最も有望な菌株と思われた。

非病原性菌株による発病抑制効果は、イネもみの前処理に用いる非病原性菌株の濃度に依存することが明らかとなった。即ち、濃度約  $10^{10}$  cfu/ml の非病原性菌株の細菌懸濁液でイネ種子を処理した場合には、病原性菌株の接種濃度に関係なく高い発病抑制効果が認められた。この発病抑制効果はカスガマイシン・キャプタン水和剤 (土壌 1 g 当たり 0.4 mg) で処理した場合と同程度で、幼苗箱施用剤としての本菌の利用の可能性が示唆された。

非病原性菌株による発病抑制効果の機作を知る目的で、まず非病原性菌株の病原性菌株に対する抗菌活性について調べた結果、供試した非病原性菌株中の数菌株は病原性菌株に対して抗菌活性を示し、

半径 1~2 mm 程度の阻止帯を形成し、この抗菌活性はバクテリオシン様物質によるものと考えられた。しかし、この非病原性菌株が病原性菌株に対して示す抗菌活性と発病抑制効果との間には直接的な関連性は認められなかった。また、非病原性菌株の培養ろ液で処理した場合にも発病抑制効果は全く示されなかった。さらに、非病原性菌株による発病抑制効果は死菌では全く認められず、生菌が示す活性であることが明らかとなった。そしてこの効果は非病原性イネもみ枯細菌病菌以外の供試した植物病原細菌や腐生細菌では全く認められず、特異性の高い生理活性であることが明らかとなった。

非病原性菌株による発病抑制効果は病原性菌株との同時接種によっても示され、また、非病原性菌株を滅菌土壌に添加した場合にも認められた。さらに、この効果は病原性菌株を接種後に非病原性菌株で処理した場合、即ち、病原性菌株の細菌懸濁液に120時間浸漬接種後、非病原性菌株で処理した滅菌土壌に播種した場合にも認められた。このことは、感染部位における競合は発病抑制効果の機作にとって重要な要因ではないことを示唆するものである。

イネ発芽液、滅菌蒸留水中における非病原性菌株と病原性菌株の競合関係を知る目的で両菌の定量を経時的に行った結果、いずれの条件下でも、混合培養液中では病原性菌株の増殖が単独培養の場合と比較して1/10~1/100に抑えられる傾向が認められた。この混合培養液中における病原性菌株の増殖の抑制の原因は明らかでないがこの傾向はイネ種子においても認められた。すなわち、非病原性菌株で処理したイネ種子における病原性菌株の増殖は無処理のイネ種子における増殖と比較すると、1/10~1/100に抑えられており、これが発病抑制効果と密接に関わっている可能性が推察された。

非病原性菌株による発病抑制効果は病原性菌株との組み合わせにより異なることから、その抑制効果の機作には複雑な要因が関与するものと考えられる。イネもみ枯細菌病菌は比較的新しく発見された病原菌<sup>50, 93, 167)</sup>であるため、まだレースの存在の有無は明らかにされていない<sup>51, 64, 72)</sup>。非病原性菌株による発病抑制効果に品種間差異が存在するか否かについて検討した結果、イネ品種間に明かな差異が認められた。この原因については明かではないが、おそらく非病原性菌株、病原性菌株及びイネ品種の3者間の複雑な親和性に基づく現象と考えられる。

佐藤らはイネもみ枯細菌病菌が数種の毒素を産生することを報告している<sup>136)</sup>。しかし、これら毒素と病原性との関係は明らかにされていない。そこでイネ種子及び土壌が関与した条件下で病原性菌株の産生する毒素を非病原性菌株が中和、解毒することにより発病が抑制される可能性を想定し、毒素を含む病原性菌株の培養ろ液で非病原性菌株を培養したところ毒素の活性が著しく低下した。このことから、病原性菌株の産生する毒素は非病原性菌株によって解毒されることが示唆された。

以上の点から非病原性菌株によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果の機作は、イネ種子圏における非病原性菌株の競合により病原性菌株の増殖が抑制され、毒素の産生量が低下すると共に、産生された毒素を非病原性菌株が解毒することにより発病が抑制されるものと推察した。しかし、発病抑制効果には非病原性菌株と病原性菌株との組み合わせによる菌株間差異、あるいはイネにおける品種間差異があり、上記の機作によって全ての場合を説明できるか否かについては今後更に検討する必要がある。

非病原性菌株による穂に対する発病抑制効果と幼苗に対する抑制効果との間には相関が認められた。すなわち、幼苗に対して発病を抑制する菌株の組み合わせは穂に対しても発病を抑制し、幼苗に対して発病抑制効果の認められない組み合わせでは穂に対しても発病を抑制しなかった。このことから非病原性菌株による穂に対する発病抑制効果の機作は幼苗に対する発病抑制効果の機作と類似したものであることが推察された。

非病原性菌株 N7503 は供試した全ての病原性菌株に対して高い発病抑制効果を示し、また、この発病抑制効果はイネ品種による影響も受けないことから、本菌のイネもみ枯細菌による幼苗腐敗症の生物的防除材としての利用の可能性が示唆された。

#### 第4章 総合考察

イネもみ枯細菌病菌は寒天培地上において各種重要植物病原細菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを示すことが明らかとなった。イネもみ枯細菌病菌の示す抗菌活性は、トマト青枯病菌に対して特に強く、供試した全ての菌株がその抗菌活性を示した。拮抗微生物を利用した生物的防除に関する研究は、抗菌性あるいは抗菌物質産生性を発病抑制効果に結びつけている例が多い<sup>25, 49, 66, 71, 82, 88, 166, 191)</sup>ことから、もし、イネもみ枯細菌病菌がトマト根圏に定着し抗菌物質を産生するならば、トマト青枯病菌はトマト根に接近できず根部感染の機会が低下し、青枯病の発病が抑制されるものと考えられた。

バクテリゼーションの手法<sup>11)</sup>により、トマト幼苗の根部をイネもみ枯細菌病菌で処理すると、その後トマト青枯病菌を接種しても20～30日の期間、発病が抑制された。この発病抑制効果と抗菌物質産生性との関係について検討した結果、下記の点からイネもみ枯細菌病菌の産生する抗菌物質は発病抑制効果には関与していないものと推察した。すなわち、① イネもみ枯細菌病菌の抗菌物質産生性は不安定であり、寒天中に含まれる微量成分などのような特殊な条件が必要である。② 滅菌土壌中あるいはトマト根圏においてイネもみ枯細菌病菌はトマト青枯病菌の増殖を抑制しなかった。③ 培地上で抗菌活性を示さない変異菌株によっても発病が顕著に抑制された。④ 死菌で処理した場合にも発病が抑制された。⑤ 菌体外多糖(EPS)で処理した場合に高い発病抑制効果が得られた。このEPS水溶液はトマト青枯病菌に対して抗菌活性は示さなかった。従って

イネもみ枯細菌病菌によって示されたトマト青枯病の発病抑制効果には、抗菌物質産生性以外の要因が深く関与しているものと思われる。死菌及びEPSによっても発病が抑制されることから、物理的閉塞、誘導抵抗性あるいはそれらの両方の機作が関与しているものと考えられる。Kempeらは、各種腐生菌及び植物病原菌を用いて、ジャガイモ青枯病の発病抑制効果について検討した結果、発病抑制効果と抗菌活性との間には何ら関連性のない事を認め、これら細菌で処理することにより植物体に抵抗性が誘導された結果、発病が抑制されるものと推察している<sup>79)</sup>。本実験において、イネもみ枯細菌病菌以外の細菌によってもトマト青枯病の発病が抑制されたことは、この発病抑制機作はむしろ非特異的な性格の強いものと思われる。

一方、土壌病害の生物的防除の成功例としては、非病原性菌株を用いて病原性菌株の感染、発病を抑制したものが多い<sup>25, 26, 71, 80, 81, 121, 159, 169)</sup>。イネもみ枯細菌病菌では病原性を喪失した非病原性菌株を保存菌の中から容易に分離することができる。これらの非病原性菌株を用いてイネ種子を前処理した場合、その後接種した病原性菌株による発病を顕著に抑制した。この発病抑制効果の機構をトマト青枯病の発病抑制効果の場合と比較した結果、以下の点で異なっていた。すなわち、① 供試する病原性菌株と非病原性菌株との組み合わせの違いにより発病抑制効果に差異が認められた。また、供試するイネ品種によっても効果が異なった。② 各種条件下において、非病原性菌株は病原性菌株に対して拮抗し、その増殖を抑制した。③ 発病抑制効果は生菌でのみ認められ、死菌及び培養ろ液では認められなかった。④ イネもみ枯細菌病菌以外の他属他種細菌で処理しても発病抑制効果は示されなかった。⑤ 非病原性

菌株による処理と病原性菌株接種の順序を逆にした場合でも発病抑制効果は認められた。

以上述べたように、同一拮抗菌(イネもみ枯細菌病菌)でトマトあるいはイネ種子を処理することにより、トマト青枯病及びイネ幼苗腐敗症の発病が抑制された。しかし、それら発病抑制の機構は全く異質のものであることが示された。有江らは、イネもみ枯細菌病菌に近縁の細菌である *P. gladioli* を用いてニラ、ネギと混植した場合に、各種作物の病害が抑制されることを示し、この機構には本菌の産生する抗菌物質が関与しているものと推察している<sup>2)</sup>。しかし、本実験において、発病抑制の機構は同一拮抗菌を用いても対象となる植物あるいは病原菌の組み合わせにより異なることが明らかとなった。すなわち、*P. gladioli* の場合に示される発病抑制効果の機構も宿主植物の違いによって異なる可能性があると思われる。

非病原性イネもみ枯細菌病菌によってトマト青枯病、イネ幼苗腐敗症及びイネもみ枯細菌病の発病が抑制されることが明らかとなり、中でも特に非病原性イネもみ枯細菌病菌株 N7503 が示すイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果は高く、実用化が期待される。

## 摘要

### 1 イネもみ枯細菌病菌の示す抗菌活性と抗菌物質産生性

(1) イネもみ枯細菌病菌の各種重要植物病原細菌に対する抗菌活性をYPDA平板培地を用いてプレートクロロホルム法によって検討した結果、全ての菌株がいずれかの指示菌に対して抗菌活性を示し、阻止帯を形成した。阻止帯の大きさ及び形状は産性菌と指示菌の組み合わせにより異なっていた。この結果からイネもみ枯細菌病菌は培地上において複数の種類の抗菌物質を産生することが示唆された。

(2) トマト青枯病菌に対するイネもみ枯細菌病菌の抗菌活性を各種培地上において検討した結果、活性の有無・強弱は供試する培地の種類によって著しく変化した。TTC培地上においては供試した全てのイネもみ枯細菌病菌株がトマト青枯病菌に対して抗菌活性を示した。トマト青枯病菌の菌株間にはこの抗菌活性に対する感受性に差異はなく、強い抗菌活性を示すイネもみ枯細菌病菌の菌株は全てのトマト青枯病菌の菌株に対して同様に強い活性を示した。

(3) イネもみ枯細菌病菌の抗菌物質産生性には、寒天の存在が必要で、寒天を含まない各種液体培地中ではその産生が認められなかった。しかし、寒天粉末水抽出液を用いて作製した液体培地中においては抗菌物質の産生が認められ、イネもみ枯細菌病菌の抗菌物質産生性には寒天中に含まれる水溶性の微量成分が重要な要因であることが推察された。また、イネもみ枯細菌病菌の産生する抗菌物質は

培地中に $\text{Fe}^{3+}$ を添加してもその産生性に変化は認められないことから、阻止帯の形成はシデロフォア-の産生によるものではないことが明らかとなった。

## 2 イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病の発病抑制効果とその機作

(1) イネもみ枯細菌病菌が示すトマト青枯病発病抑制効果は、浸漬処理時間及び菌濃度の影響を受けた。即ち、イネもみ枯細菌病菌の懸濁液に長時間(12時間以上)浸漬した場合により顕著な発病抑制効果が得られ、また、その菌濃度がトマト青枯病菌の菌濃度よりも相対的に高い場合にのみ発病が抑制された。この発病抑制効果には若干の菌株間差異が認められた。また、発病抑制効果は土壌の種類を変えても影響を受けないことが明らかとなった。

(2) 液体培地、滅菌蒸留水、滅菌土壌及び根組織中におけるイネもみ枯細菌病菌とトマト青枯病菌との競合関係について検討した結果、トマト青枯病菌は単独培養の場合とほぼ同様に増殖し、これらの条件下ではイネもみ枯細菌病菌がトマト青枯病菌に拮抗的に作用しているとは考えられなかった。

(3) ニトロソグアニジン(NTG)処理により抗菌物質非産生株を作出し、この抗菌物質非産生株のトマト青枯病発病抑制効果について検討した結果、抗菌物質産生性の野性株と同様に発病を抑制した。さ

らに、抗菌物質産生株の死菌で処理した場合にも発病を抑制した。これらの結果から、イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病発病抑制の機作の内に占める抗菌物質の関与は低いものと考えられた。

(4) イネもみ枯細菌病菌の懸濁液で処理した根組織中からトマト青枯病菌の増殖を抑制する物質を検出することはできなかつた。一方、パラフィン、メチルセルロースでトマト幼苗の根部を処理しても全く発病抑制効果は認められなかつた。またイネもみ枯細菌病菌の懸濁液で処理する前及び後にトマトの根を切断した場合、共に高い発病抑制効果を示した。

(5) イネもみ枯細菌病菌菌体のリポ多糖(LPS)及び菌体外多糖(EPS)のうち、特にEPSでトマト幼苗の根部を処理した場合に高い発病抑制効果が得られ、イネもみ枯細菌病菌によるトマト青枯病の発病抑制効果の機作にはEPSが重要な役割を演じていることが示された。

(6) イネもみ枯細菌病菌以外の植物病原細菌及び腐生性細菌で処理した場合にも、効果に違いはあるものの全ての菌株で発病抑制効果が得られた。このことは、イネもみ枯細菌病菌によって示される発病抑制効果は非特異的な性格の強い現象であると考えられた。

### 3 非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症及びイネもみ枯病の発病抑制とその機作

(1) イネもみ枯細菌病菌はイネに対して病原性を示す他に、各種野菜組織に対する腐敗能を有する細菌であることを発見した。特にジャガイモ腐敗能とイネに対する病原性との間に高い相関が認められた。各種野菜組織に対する腐敗能を持たず、かつ、イネに対して病原性を示さない8菌株を選抜することができ、これらを非病原性菌株と判断した。

(2) 予めイネ種子を非病原性菌株の懸濁液に浸漬することにより、病原性イネもみ枯細菌病菌の汚染土壌に播種しても、イネ幼苗腐敗症の発病を顕著に抑制することを発見した。しかし、この効果は供試する非病原性菌株と病原性菌株との組み合わせによって著しく異なり、菌株間の特異性が認められた。また、非病原性菌株によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果は処理に用いる非病原性菌株の菌濃度の影響を強く受け、約 $10^{10}$  cfu/mlの細菌懸濁液で処理した場合に顕著に発病を抑制し、この場合、病原性菌株の菌濃度の影響は受けなかったことが明らかとなった。

(3) 非病原性菌株N7503は、供試した全ての病原性菌株に対して高い発病抑制効果を示し、その効果はカスガマイシン・キャプタン水和剤とほぼ同程度のものであった。

(4) 非病原性菌株が示す発病抑制効果は、供試するイネ品種の影響を受け、発病抑制効果の認められる菌株の組み合わせでも品種を変えると効果の認められなくなる場合があり、発病抑制効果に品種間差異が存在する事が示唆された。しかし、非病原性菌株N7503の示す発病抑制効果は全ての品種において認められた。

(5) 非病原性菌株の病原性菌株に対する抗菌活性と発病抑制効果との間には、直接的な関係は認められず、抗菌活性を示す菌株の組み合わせが必ずしも発病抑制効果を示さず、抗菌活性を示さない菌株の組み合わせでも発病抑制効果を示すものが存在した。

(6) 発病抑制効果は非病原性菌株の生菌においてのみ認められ、培養ろ液及び死菌では全く認められず、また非病原性イネのみ枯細菌病菌以外の細菌では全く認められなかった。

(7) 非病原性菌株によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制効果は、病原性菌株との同時接種の場合、非病原性菌株を土壌に混入した場合、また病原性菌株を前接種した場合にも認められた。更に、この効果はイネ種子を5日間病原性菌株懸濁液に浸漬後、非病原性菌株を含む土壌に播種した場合にも認められた。

(8) 病原性菌株と非病原性菌株との競合関係を各種条件下で検討した結果、イネ発芽液中及び滅菌蒸留水中における混合培養では病原性菌株の増殖が単独培養の場合と比較して約1/10に低下した。さらに、非病原性菌株で処理したイネ種子組織中では、病原性菌株の増

殖が無処理のイネ種子組織中での増殖と比較して約1/10~1/100に低下することが明らかとなった。

(9) 病原性菌株が産生する毒素を含む培養ろ液中で非病原性菌株を培養したところ、ろ液中の毒素の活性が著しく低下した。このことから、非病原性菌株は病原性菌株の産生する毒素を解毒、中和するものと考え、これが非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ幼苗腐敗症の発病抑制機作に関与しているものと推察した。

(10) 非病原性菌株と病原性菌株の混合液を開花期の穂に接種した場合、発病抑制効果を示す組み合わせと示さない組み合わせが存在し、イネ幼苗に対して発病抑制効果の認められる組み合わせでは穂においても同様に発病を抑制した。また、イネ幼苗に対して発病抑制効果のない組み合わせでは穂においても発病抑制効果は認められなかった。

## Abstract

### 1 Production of antibiotics by *Pseudomonas glumae*.

- 1 *Pseudomonas glumae*, the causal agent of bacterial grain rot or seedling rot of rice, formed growth inhibition zone around the colony on the lawn of plant pathogenic bacteria. The activity spectra shown on the indicator bacteria were much varied depending upon strains of *P. glumae*, suggesting that various antibiotics participated in the formation of inhibition zone.
- 2 *P. glumae* strains showed different degree of antibiotic activity against *P. solanacearum* depending upon kind of media used. When triphenyltetrazolium chloride medium (TTC medium) was used, all strains of *P. glumae* formed inhibition zone on the lawn of *P. solanacearum*. The antibiotic activity against *P. solanacearum* was not different among strains of *P. solanacearum* used as indicator.
- 3 Antibacterial substance(s) was not produced in various liquid media, but produced when water extract from agar was added. The substance(s) causing inhibition zone which produced by *P. glumae* is not considered to be siderophores because the inhibition zone appeared regardless of the concentrations of  $Fe^{3+}$  in the medium.

### 2 Suppression of bacterial wilt of tomato by *P. glumae* and its mechanisms.

- 1 Suppression of bacterial wilt of tomato by application of *P. glumae* was varied depending upon length of dipping time and bacterial concentration used for pre-treatment. The effect was remarkable when tomato roots were dipped for 12 or 24 hr in the suspension of *P. glumae* at the concentration of ca.  $10^{10}$  cfu/ml. When inoculum concentration was low, the disease suppression was high. The suppressive effect was not varied depending upon type of soil if sterilized, and the effect was continued approximately 30 days after treatment.
- 2 The growth of *P. solanacearum* was not inhibited by *P. glumae* in liquid medium, sterile distilled water, heat-sterilized soil and root tissues of tomato, when both bacteria were simultaneously introduced. The results suggested that bacterial competition did not occur between *P. glumae* and *P. solanacearum* under these culture conditions.

- 3 Non-antibiotic producing strain (N750-SR-NP) which was induced from N750-SR by *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitroso-guanidine (NTG) treatment also suppressed bacterial wilt almost the same degree as compared to that shown by antibiotic producing wild strain (N750). Furthermore, the killed cells suspension of *P. glumae* N750 also showed protection effect as in the case of living cells. These results suggested that the role of antibiotics produced by *P. glumae* was insignificant in the mechanisms of this disease suppression.
- 4 The substances which inhibited the growth of *P. solanacearum* were not detected from root tissues of tomato treated with *P. glumae*. When the roots of tomato seedlings were treated with liquid parafin or methylcellulose before dipping into *P. solanacearum* suspension, the disease suppression was not observed. However, the high suppression of the disease was observed in both case of root cutting before or after the treatment with *P. glumae*.
- 5 When the roots of tomato seedlings were treated with lipopolysaccharide (LPS) or extracellular polysaccharide (EPS) obtained from *P. glumae* before inoculation with *P. solanacearum*, the disease suppression was remarkable. Especially, disease occurrence was suppressed significantly by application of EPS solution. This result indicated that EPS was involved in the mechanisms of disease suppression.
- 6 The disease suppression was also observed with saprophytic or plant pathogenic bacteria as in the case of *P. glumae*. Thus, the effect of disease suppression was not specific for *P. glumae*.

### 3 Control of bacterial seedling rot of rice by avirulent strains of *P. glumae*

- 1 It was found that *P. glumae* has an ability of rotting slices of vegetables such as potato, carrot and radish. High correlation was found between pathogenicity to rice grains and rice seedlings and activity of rotting potato slices. Eight non-pathogenic strains both to rice plants and vegetables were selected.
- 2 Rice seeds treated with avirulent strains of *P. glumae* was significantly reduced the bacterial seedling rot of rice caused by the virulent strains. However, the degree of disease suppression by avirulent strains was varied depending upon combinations of the avirulent and the virulent strains used. When the concentration of avirulent strain applied for pre-treatment was as high as ca.  $10^{10}$  cfu/ml, the effect of disease suppression was remarkable.

- 3 Among five avirulent strains of *P. glumae* used, the strain N7503 was the highest in the efficacy of the disease suppression against all virulent strains used. The effect of the strain N7503 was comparable to that obtained by soil-treatment with Kasugamycin-captan WP at the concentration of 0.4 mg/g of dried soil.
- 4 The disease suppression expressed by avirulent strains was variable depending upon variety of rice. However, the strain N7503 was effective on all rice varieties used.
- 5 The correlation between antibacterial activity and efficacy of disease suppression was not clear. The productivity of bacteriocin-like substances by avirulent strain may be playing some roles in the mechanisms of disease suppression. However, some avirulent strains which showed antibacterial activity against virulent strain not always suppressed disease occurrence, and vice versa.
- 6 The killed cells or culture filtrate of avirulent strains of *P. glumae*, or other bacteria belonging to the genus *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Bacillus* and *Clavibacter* tested did not suppress disease occurrence.
- 7 The disease suppression was shown by avirulent *P. glumae*, even if the bacterium was applied after inoculation with the virulent strain.
- 8 In the solution containing extract from germinating rice seeds or in sterile distilled water, the growth of virulent strain was slightly inhibited by avirulent strain, when both bacteria were simultaneously inoculated. In the rice seed pre-treated with avirulent strain, the growth of virulent strain was suppressed to 1/10~1/100 times as compared to that in the seed tissues without pre-treatment.
- 9 The toxins produced by the pathogenic *P. glumae* were detoxified by the avirulent strain suggesting that detoxification was considered to be one of the important mechanisms of the disease suppression.
- 10 When the rice ears were co-inoculated with virulent and avirulent strains at the flowering stage in greenhouse, the occurrence of bacterial grain rot was suppressed by avirulent strain, showing correlation with disease suppression against seedlings rot.

### 引用文献

- 1) Anwar, A. A. (1949). Factors affecting the survival of *Helminthosporium sativum* and *Fusarium lini* in soil. *Phytopathology* 77: 1005-19.
- 2) Arie, T., Namba, S., Yamashita, S., Doi, Y. and Kijima, T. (1987). Biological control of Fusarium wilt of bottle gourd by mix-cropping welsh onion or chinese chive inoculated with *Pseudomonas gladioli*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 53: 531-539.
- 3) Austen, R. A. (1657). *A treatise of Fruit-Trees*. Henry Hall, Oxford.
- 4) Averre, C. W. II and Kelman, A. (1964). Severity of bacterial wilt as influenced by ratio of virulent cells of *Pseudomonas solanacearum* in inoculum. *Phytopathology* 54: 779-783.
- 5) Azegami, K., Nishijima, K., Watanabe, Y., Suzuki, T., Yoshida, M., Nose, K. and Toda, S. (1985). Tropolone as a root growth-inhibitor produced by plant pathogenic *Pseudomonas* sp. causing seedling blight of rice. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 51: 315-317.
- 6) Azegami, K., Nishijima, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuchi, A. and Fukazawa, C. (1987). *Pseudomonas plantarii* sp. nov. the causal agent of rice seedling blight. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 144-152.
- 7) Azegami, K., Nishiyama, K. and Tabei, H. (1988). Infection courts of rice seedlings with *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 337-341.
- 8) Becker, J. O., Hedges, R. W. and Messens, E. (1985). Inhibitory effect of Pseudobactin on the uptake of iron by higher plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1090-1093.
- 9) Blakeman, J. P. and Brodie, I. D. S. (1976). Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Academic Press London. 529-557.
- 10) Blakeman, J. P. and Fokkema, N. J. (1982). Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:167-192.
- 11) Brown, M. E. (1974). Seed and root bacterization. *Ann. Rev. Phytopathol.* 12: 181-197.
- 12) Broadbent, P., Baker, K. F. and Waterworth, Y. (1971). Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 925-44.
- 13) Broadbent, P., Baker, K. F., Franks, N. and Holland, J. (1977). Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. *Phytopathology* 67: 1027-34.
- 14) Brown, S. M., Kepner, J. L. and Smart, G. C. Jr. (1985). Increased crop yields following applications of *Bacillus penetrans* to field plots infested with *Meloidogyne incognita*. *Soil. Biol. Biochem.* 17: 483-486.
- 15) Bruehl, G. W., Millar, R. L. and Cunfer, B. (1969). Significance of antibiotic Production by *Cephalosporium gramineum* to its saprophytic survival. *Can. Jour. Plant Sci.* 49: 235-246.
- 16) Buddenhagen, I. W. and Kelman, A. (1964). Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 203-230.

- 17) Burr, T.J., Schroth, M.N. and Suslow, T. (1978). Increased potato yield by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* 68: 1377-1383.
- 18) Carroll, R.B. and Lukezic, F.L. (1971). Induced resistance in alfalfa to *Corynebacterium insidiosum* by prior treatment with avirulent cells. *Phytopathology* 62:555-564.
- 19) Caesar, A.J. and Burr, T.J. (1987). Growth promotion of apple seedlings and root-stocks by specific strains of bacteria. *Phytopathology* 77: 1583-1588.
- 20) Capper, A.L. and Campbell, R. (1986). The effect of artificially inoculated antagonistic bacteria on the prevalence of take-all disease of wheat in the field of experiments. *J. Appl. Bacteriol.* 60: 155-160.
- 21) Chakraborty, U. and Purkayastha, R.P. (1984). Role of rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection. *Can. J. Microbiol.* 30: 285-289.
- 22) Chang, I. and Kommedahl, T. (1968). Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology* 58: 1395-1401.
- 23) Chao, W.L., Nelson, E.B., Harman, G.E. and Hoch, H.C. (1986). Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology* 76: 60-65.
- 24) Chattopadhyay, S.K. and Nandi, B. (1982). Inhibition of *Helminthosporium oryzae* and *Alternaria solani* by *Streptomyces longisporus* (Krasil'nikov) Waksman. *Plant and Soil* 69: 171-175.
- 25) Chen, W., Echandi, E. and Spurr, H.W. Jr. (1981). Protection of tobacco plants from bacterial wilt with avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Proc. Fifth. Int. Cont. Plant Path. Bact., Cali.* 482-492.
- 26) Chen, W.Y. and Echandi, E. (1984). Effect of avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tobacco. *Plant Pathology* 33: 245-253.
- 27) Chen, W., Hoitink, H.A.J. and Schmitthenner, A.F. (1987). Factors affecting suppression of *Pythium* damping-off in container media amended with compost. *Phytopathology* 77: 755-760.
- 28) Colyer, P.D. and Mount, M.S. (1984). Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases. *Plant Dis.* 68: 703-706.
- 29) Cooksey, D.A. and Moore, L.W. (1980). Biological control of crown gall with fungal and bacterial antagonist. *Phytopathology* 70: 506-509.
- 30) Cooksey, D.A. and Moore, L.W. (1982). Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. *Phytopathology* 72: 919-921.
- 31) Cook, R.J. and Rovira, A.D. (1976). The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. *Soil Biol. Bio-chem.* 8: 269-273.
- 32) Cook, R.J. (1985). Biological control of plant pathogens: theory to application. *Phytopathology* 75: 25-29.
- 33) Dunleavy, J. (1955). Control of damping-off sugarbeet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 45: 252-258.

- 34) Elad, Y. and Baker, R. (1985). Influence of trace amount of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 75: 1047-1052.
- 35) Elad, Y. and Baker, R. (1985). The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamyospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75: 1053-1059.
- 36) Elad, Y. and Chet, I. (1987). Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77: 190-195.
- 37) Elad, Y., Chet, I. and Baker, R. (1987). Increased growth response of plants induced by rhizobacteria antagonistic to soilborne pathogenic fungi. *Plant and Soil* 98: 325-330.
- 38) Evans, L. R. and Linker, A. (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 116: 915-924.
- 39) Faull, J. and Campbell, R. (1979). Ultrastructure of the interaction between the take-all fungus and antagonistic bacteria. *Can. J. Bot.* 57: 1800-1808.
- 40) Filonow, A. B. and Lockwood, J. L. (1985). Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hyphochrytrium catenoides* as biocontrol agents for *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis.* 69: 1033-1036.
- 41) Forsyth, W. (1791). *Observations on the diseases, Defects, and Injuries in all Kinds of Fruit and Forest Trees.* London. 71pp.
- 42) 古屋成人, 土屋健一, 松山宣明, 脇本哲 (1987) 非病原性 *Pseudomonas glumae* による トマト青枯病発病抑制の機作 *日植病報* 53: 412-413.
- 43) Furuya, N., Matuyama, N. and Wakimoto, S. (1988). Suppression of the occurrence of bacterial wilt of tomato by *Pseudomonas glumae* strains. 5th International Congress of Plant Pathology. Abstracts of papers 108.
- 44) 古屋成人. (1989). イネもみ枯細菌病菌のトマト青枯病に対する発病抑制効果とその機作 第1回バイオコントロール研究会 講演要旨 31-39.
- 45) Furuya, N., Kushima, Y., Tsuchiya, K., Matuyama, N. and Wakimoto, S. Protection of tomato seedlings by pre-treatment with *Pseudomonas glumae* from infection with *Pseudomonas solanacearum* and its mechanisms. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* (In press).
- 46) Furuya, N., Okamoto, T., Kori, Y. and Wakimoto, S. Control of bacterial seedling rot of rice by avirulent strains of *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* (In press).
- 47) Ganesan, P. and Gnanamanickam, S. S. (1987). Biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. in peanut by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* 19: 35-38.
- 48) Geels, F. P. and Schippers, B. (1983). Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathol. Z.* 108: 193-206.
- 49) Geels, F. P. and Schippers, B. (1983). Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol. Z.* 108: 207-214.
- 50) 後藤和夫, 大畑貫一 (1958). 稲の新しい細菌病. *日植病報* 21: 46-47. (講要)
- 51) 後藤孝雄, 渡辺文吉郎 (1975). イネもみ枯細菌病に対する品種間差異について. *九病虫研報* 21: 141-143.

- 52) Goto, T. (1980). Ecology and control of bacterial grain rot of rice. Ann. Rept. Plant Prot. North Japan 31: 58-59.
- 53) Goto, T. (1983). Effect of thiram seed protection on bacterial seedling rot of rice by *Pseudomonas glumae*. Ann. Rept. Plant Prot. North Japan 34: 107-108.
- 54) Graham, T.L., Sequeira, L. and Huang, T.R. (1977). Bacterial lipopolysaccharides as inducers of disease resistance in tobacco. Appl. Environ. Microbiol. 34: 424-432.
- 55) Grosclaude, C. (1970). Premiers essais de protection biologique des blessures de taille vis-a-vis due *Stereum purpureum* Pers. Ann. Phytopathol. 2: 507-516.
- 56) Gross, D.C. and Devay, J.E. (1977). Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. Physiol. Plant Pathol. 11: 13-28.
- 57) Gross, D.C., Devay, J.E. and Stadtman, F.H. (1977). Chemical properties of syringomycin and syringotoxin: toxigenic peptides produced by *Pseudomonas syringae*. J. Appl. Bacteriol. 43: 453-463.
- 58) Grossbard, E. (1948). Production of an antibiotic substance on wheat straw and other organic material and in the soil. Nature 161: 25-28.
- 59) Grossbard, E. (1952). Antibiotic production of fungi on organic manures and in soil. Jour. Gen. Microbiol. 6: 295-310.
- 60) Gurussiddaiah, S., Weller, D.M., Sarkar, A. and Cook, R.J. (1986). Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. Antim. Ag. Chemot. 29: 488-495.
- 61) Hadar, Y., Harman, G.E., Taylor, A.G. and Norton, J.M. (1983). Effect of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. Phytopathology 73: 1322-1325.
- 62) Hartley, C. (1921). Damping-off in forest nurseries. U.S. Dept. Agric. Bull. 934: 1-99.
- 63) Henry, A. W. (1931). The natural microflora of the soil in relation to the foot-rot problem of wheat. Can. Jour. Res., C. 4: 69-77.
- 64) 平島公平, 脇本哲 (1983). イネもみ枯細菌病菌に対するイネ幼苗抵抗性の品種間差異. 日植病報 49: 411. (講要)
- 65) Hirayae, K. and Wakimoto, S. (1987). Production of antibacterial substance(s) by a bacterial strain, E-14, isolated from rice phylloplane. Ann. Phytopath. Soc. Japan 53: 364-367.
- 66) Homma, Y. and Suzui, T. (1989). Role of antibiotic production in suppression of radish damping-off by seed bacterization with *Pseudomonas cepacia*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55: 643-652.
- 67) Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. (1979). Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69: 480-482.
- 68) Howell, C.R., Stipanovic, R.D. (1980). Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. Phytopathology 70: 712-715.

- 69) Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. (1983). Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimu* Can. J. Microbiol. 29: 321-324.
- 70) Howie, W.J. and Echandi, E. (1983). Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. Soil Biol. Biochem. 15: 127-132.
- 71) Htay, K. and Kerr, A. (1974). Biological control of crown gall: seed and root inoculation. J. Appl. Bact. 37: 525-530.
- 72) Imbe, T., Tsushima, S. and Nishiyama, H. (1986). Varietal resistance of rice to bacterial grain rot and screening method. Proc. Assoc. Pl. Prot. Kyushu 32: 17-19.
- 73) Kamiunten, H., Yamaguchi, J. and Wakimoto, S. (1985). Plasmids of *Pseudomonas glumae*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 51: 506-508.
- 74) Kawamoto, S.O. and Lorbeer, J.W. (1976). Protection of onion seedlings from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia*. Pl. Dis. Repr. 60: 189-191.
- 75) Kelman, A. and Jensen, J.H. (1951). Maintaining virulence in isolates of *P. solanacearum*. Phytopathology 41: 185-187.
- 76) Kelman, A. (1953). The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. 99:1-194.
- 77) Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44: 693-695.
- 78) Kelman, A. (1956). Factors influencing viability and variation in cultures of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 46: 16-17.
- 79) Kempe, J. and Sequeira, L. (1983). Biological control of bacterial wilt of potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. Plant Disease 67: 499-503.
- 80) Kerr, A. (1972). Biological control of crown gall: seed inoculation. J. Appl. Bacteriol. 35: 493-497.
- 81) Kerr, A. and Htay, K. (1974). Biological control of crown gall through bacteriocin production. Physiol. Plant Pathol. 4: 37-44.
- 82) Kerr, A. and Panagopoulos, C.G. (1977). Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. Phytopath. Z. 90: 172-179.
- 83) Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radish. Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bacteria. Vol. 1: 879-82. Tours: Gilbert-Clarey. 979 pp.
- 84) Kloepper, J.W., Schroth, M.N. and Miller, T.D. (1980). Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology 70: 1078-1082.
- 85) Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze M. and Schroth, M.N. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature 286: 885-886.
- 86) Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. (1981). Development of a powder formation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. Phytopathology 71: 590-592.

- 87) Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. (1981). Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 71: 642-644.
- 88) Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. (1981). Relationship of in vitro antibiotics of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71: 1020-1024.
- 89) Kloepper, J.W. (1983). Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. *Phytopathology* 73: 217-219.
- 90) Kloepper, J.W., Scher, F.M., Lariberte M. and Zaleska, I. (1985). Measuring the spermosphere colonizing capacity (spermosphere competence) of bacterial inoculants. *Can. J. Microbiol.* 31: 926-929.
- 91) Kommedahl, T. and Mew, I.C. (1975). Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. *Phytopathology* 65: 296-300.
- 92) Koth, J.S. and Gunner, H.B. (1967). Establishment of a rhizosphere microflora on carnation as a mean of plant protection in steamed greenhouse soils. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 91: 617-626.
- 93) 栗田年代, 田部井英夫 (1967). イネもみ枯細菌病の病原細菌について. *日植病報* 33: 111. (講要).
- 94) Kwok, O.C.H., Fahy, P.C., Hoitink, H.A.J. and Kutter, G.A. (1987). Interaction between bacteria and *Trichoderma* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology* 77: 1206-1212.
- 95) Leben, C. (1983). Association of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* and other bacterial pathogens roots. *Phytopathology* 71: 577-581.
- 96) Lincoln, R.E. (1940). Bacterial wilt resistance and genetic host parasite interactions in maize. *J. Agr. Research* 60: 217-240.
- 97) Lindberg, G.D. (1981). An antibiotic lethal to fungi. *Plant Disease* 65: 680-683.
- 98) Lindow, S.E., Arny, D.C. and Upper, C.D. (1983). Biological control of frost injury an isolate of *Erwinia herbicola* antagonistic to ice nucleation active bacteria. *Phytopathology* 73: 1097-1102.
- 99) Lindow, S.E. (1985). Integrated control and role of antibiosis in biological control of fire blight and frost injury. In *Biological Control of the Phylloplane*. Windels C.E., and Lindow S.E., eds. American Phytopathological Society, St. Paul. MN. pp. 83-115.
- 100) Liu, S. and Baker, R. (1980). Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 404-412.
- 101) Lovrekovich, L. and Farkas, G.L. (1965). Induced protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. *Nature (London)* 205: 823-824.
- 102) Lozano, J.C. and Sequeira, L. (1970). Prevention of the hypersensitive reaction in tobacco leaves by heat-killed cells. *Phytopathology*. 60: 875-879.
- 103) Lucas, L.T. and Grogan, R.G. (1969). Serological variation and identification of *Pseudomonas lachrymans* and other phytopathogenic *Pseudomonas* nomenspecies. *Phytopathology* 59: 1908-1912.
- 104) 牧野孝宏, 森田壽 (1985). *Agrobacterium radiobacter* strain 84によるバラ根頭がんしゅ病の生物防除. *静岡農試研報*. 30: 53-59.

- 105) Marugg, J.D., Spanje, M., Hoekstra, W.P.M., Schippers, B. and Weisbeek, P.J. (1985). Isolation and analysis of genes involved in siderophore biosynthesis in plant-growth-stimulating *Pseudomonas putida* WCS358. *J. Bacteriol.* 164:563-570.
- 106) Matsuda, T. (1977). Fundamental studies on the breeding of bacterial wilt resistant varieties in tobacco. *Bull. Utsunomiya Tobacco Expt. Sta.* 15: 1-90
- 107) Merriman, P.R., Price, R.D. and Baker, K.F. (1974). The effect of inoculation of seed with antagonists of *Rhizoctonia solani* on the growth of wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 25: 213-18.
- 108) Merriman, P.R., Price, R.D., Kollmorgen, J.F., Piggott, T. and Ridge, E.H. (1974). Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Aust. J. Agric. Res.* 25: 219-226.
- 109) Meshram, S.U. and Jager, G. (1983). Antagonism of *Azotobacter chroococcum* isolates to *Rhizoctonia solani*. *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 191-197.
- 110) Meyer, J.R. and Linderman, R.G. (1986). Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant-growth promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 185-190.
- 111) Millard, W.A. and Taylor, C.B. (1927). Antagonism of micro-organisms as the controlling factor in the inhibition of scab by green-manuring. *Ann. Appl. Biol.* 14: 202-216.
- 112) Mitchell, R. Hurwitz, E. (1965). Suppression of *Pythium debaryanum* by lytic rhizosphere bacteria. *Phytopathology* 55: 156-158.
- 113) Mogi, S., Naito, H. and Tsushima, S. (1981). Effects of some chemical treatments on bacterial grain rot of rice. *Proc. Assoc. Pl. Prot. Kyushu.* 27: 9-11.
- 114) Mogi, S., Naito, H. and Tsushima, S. (1986). Relationship between the development of symptoms on panicles and the degree of damage caused by bacterial grain rot, *Pseudomonas glumae* in brown rice. *Proc. Assoc. Pl. Prot. Kyushu* 32: 11-13.
- 115) Moore, L.W. (1979). Practical use and success of *Agrobacterium radiobacter* strain 84 for crown gall control. *See. Ref.* 36, pp. 553-568.
- 116) Muller, K.O. (1956). Einige einfach Versuche zum Nachweiss von Phytoalexinen. *Phytopathol. Z.* 27: 237-254.
- 117) Nair, N.G. and Fahy, P.C. (1972). Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bact.* 35: 439-442.
- 118) Nelson, E.B., Chao, W.L., Norton, J.M., Nash, G.T. and Harman, G.E. (1986). Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: Possible role of biological control of *Pythium preemergence* damping-off. *Phytopathology* 76: 327-335.
- 119) Nesmith, W.C. and Jenkins, Jr, S.F. (1985). Influence of antagonist and controlled matric potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. *Phytopathology* 75: 1182-1187.
- 120) New, P.B. and Kerr, A. (1972). Biological control of crown gall field measurements and glasshouse experiments. *J. App. Bact.* 35: 279-287.
- 121) Ogawa, K. and Kodama, H. (1986). Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52: 15-21.

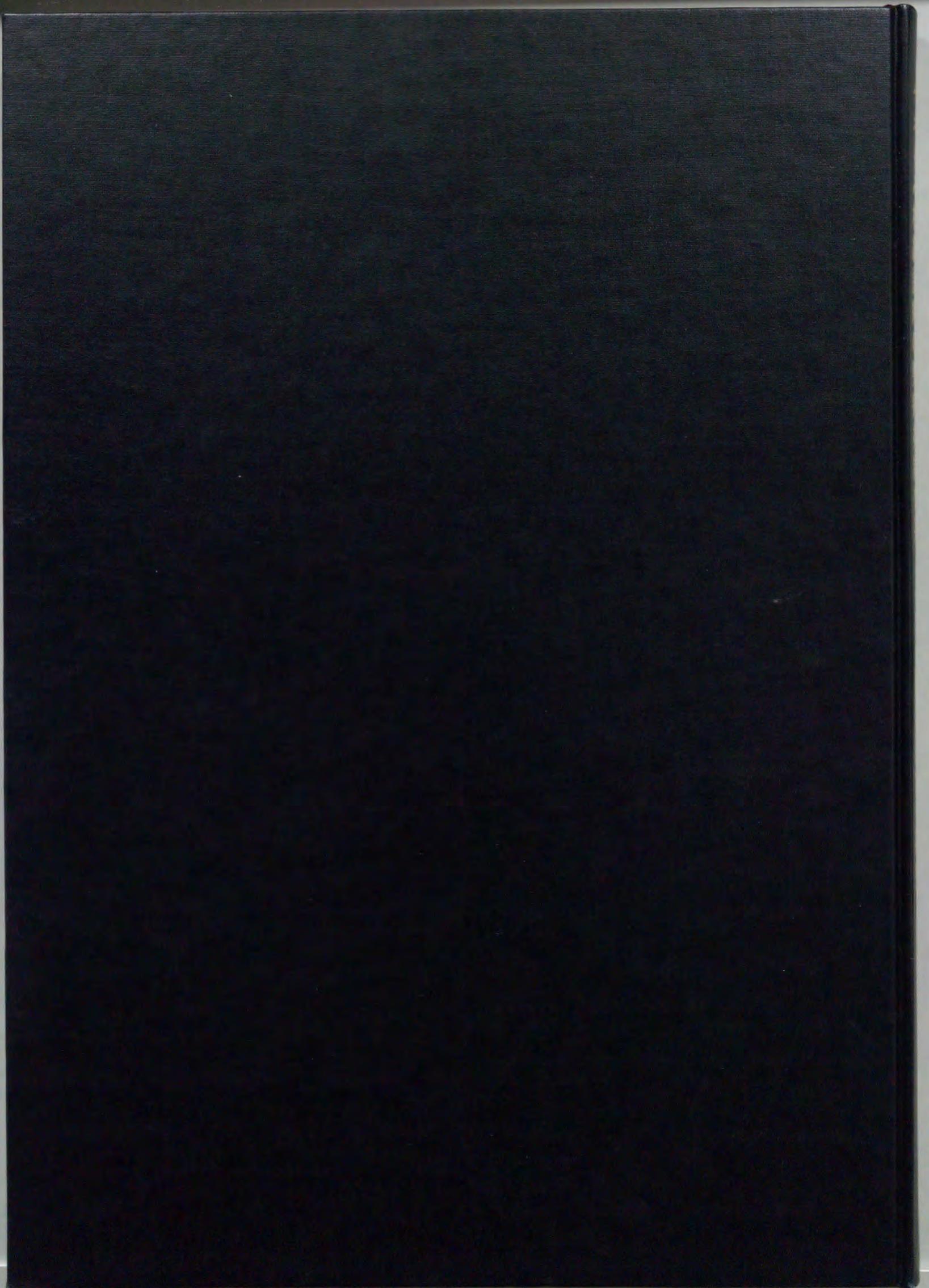
- 122) Ohmori, K. and Watanabe, Y. (1986). Efficacy of S-(4-methylsulfonyloxyphenyl) N-methylthiocarbamate (Methasulfocarb) for control of bacterial seedling rot of rice caused by *Pseudomonas glumae* Kurita et Tabei. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52: 78-81.
- 123) Okabe, N. (1971). Population changes of *Pseudomonas solanacearum* and soil microorganisms in artificially infested natural soil. Rev. Plant Protec. Res. 4. 105-108.
- 124) 岡本知子, 古屋成人, 脇本哲 (1990). イネ幼苗腐敗症に対する非病原性イネもみ枯細菌病菌の発病抑制効果 九病虫研報 36: 198.
- 125) Olsen, M.W. and Misaghi, I.J. (1984). Responses of guayule (*Parthenium argentatum*) seedlings to plant growth promoting fluorescent pseudomonads. Plant and Soil 77:97-101.
- 126) Patel, J.J. (1969). Microorganisms in the rhizosphere of plants inoculated with *Azotobacter chroococcum*. Plant soil 31: 209-223.
- 127) Pusey, P.L. and Wilson, C.L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant disease 68: 753-756.
- 128) Randhawa, P.S. and Schoad, N.W. (1985). A seedling chamber for determining bacterial colonization and antagonism on plant roots. Phytopathology 75:254-259.
- 129) Rathmell, W.G. and Sequeira, L. (1975). Induced resistance in tobacco leaves: The role of inhibitors of bacterial growth in the intercellular fluid. Physiol. Plant Pathol. 5: 65-73.
- 130) Roberts, W. (1874). Studies on biogenesis. Phil. Trans. Roy. Soc. London 164: 457-477.
- 131) Rothrock, C.S. and Gottlieb, D. (1984). Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. Can. J. Microbiol. 30: 1440-1447.
- 132) Rouatt, J.W. and Katznelson, H. (1961). A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. J. Appl. Bacteriol. 24: 164-171.
- 133) Rouatt, J.W., Peterson, E.A. and Katznelson, H.V.E. (1963). Microorganisms in the rootzone in relation to temperature. Can. J. Microbiol. 9: 227-236.
- 134) Rovira, A.D. and Wildermuth, G.B. (1981). The nature and mechanisms of suppression. In Biology and Control of Take-All. M.J.C. Asher and P.J. Shipton, eds. Academic Press, London. pp. 385-415.
- 135) Sanford, G.B. and Broadfoot, W.C. (1931). A note on the biological control of root rots of cereals. Studies of the effects of other soil-inhabiting microorganisms on the virulence of *Ophiobolus graminis* Sacc. Sci. Agric. 11: 460, 512-528.
- 136) Sato, Z., Koiso, Y., Iwasaki, S., Matsuda, I. and Shirata, A. (1989). Toxins produced by *Pseudomonas glumae*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55: 353-356.
- 137) Sayre, R.M., Gherna, R.L. and Wergin, W.P. (1983). Morphological and taxonomic reevaluation of *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1888 and "*Bacillus penetrans*" Mankav 1975. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 636-649.
- 138) Sayre, R.M. and Starr, M.P. (1985). *Pasteuria penetrans* (ex Throne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endspore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 52: 149-165.

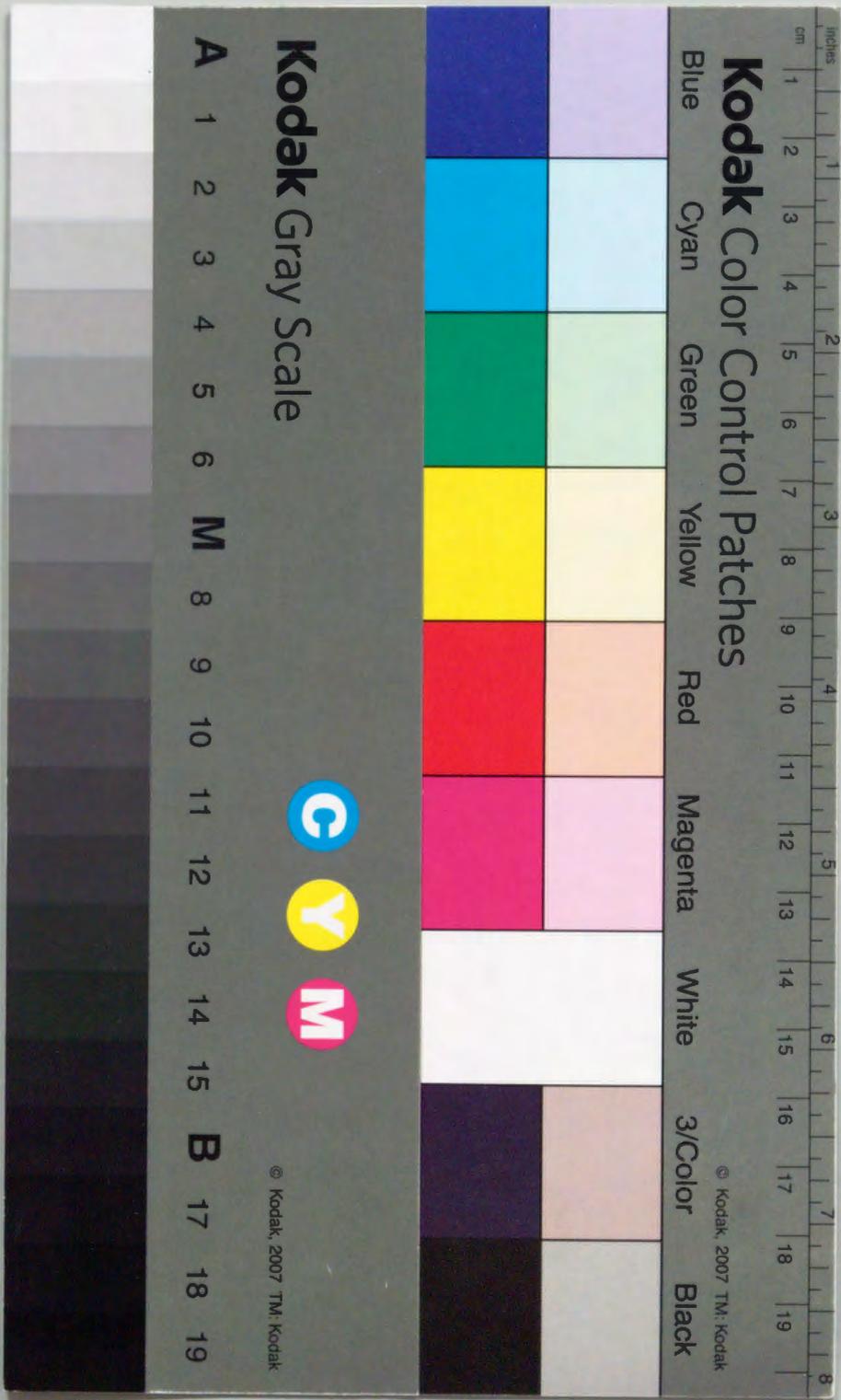
- 139) Scher, F.M. and Baker, R. (1980). Mechanism of biological control in a Fusarium-suppressive soil. *Phytopathology* 70: 412-417.
- 140) Scher, F.M. and Baker, R. (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens *Phytopathology* 72: 1567-1573.
- 141) Scher, F.M., Ziegler, J.S. and Klopper, J.W. (1984). A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. *Can. J. Microbiol.* 30: 151-157.
- 142) Scher, F.M., Dupler, M. and Baker, R. (1984). Effect of synthetic iron chelates on population densities of *Fusarium oxysporum* and the biological control agent *Pseudomonas putida* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30: 1271-1275.
- 143) Scher, F.M., Klopper, J.W. and Singleton, C.A. (1985). Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates in vitro and in soil. *Can. J. Microbiol.* 31: 570-574.
- 144) Scherff, R.H., Devay, J.E. and Carroll, T.W. (1966). Ultrastructure of host-parasite relationships involving reproduction of *Bdellovibrio bacteriovorus* in host bacteria. *Phytopathology* 56: 627-632.
- 145) Schroth, M.N. and Hancock, J.G. (1982). Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 26: 1376-1381.
- 146) Sequeira, L. and Hill, L.M. (1974). Induced resistance in tobacco leaves: The growth of *Pseudomonas solanacearum* in protected tissues. *Physiol. Plant Pathol.* 4: 447-455.
- 147) Sequeira, L., Gaard, G. and DeZoeten, G.A. (1977). Interaction of bacteria and host cell walls: its relationship to mechanisms of induced resistance. *Physiol. Plant Pathol.* 10: 43-50.
- 148) Sinden, S.L., Devay, J.E. and Backman, P.A. (1971). Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*, and its role in the bacterial canker disease of peach trees. *Physiol. Plant Pathol.* 1: 199-213.
- 149) Sneh, B. (1981). Use of rhizosphere chitinolytic bacteria for biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in carnation. *Phytopathol. Z.* 100: 251-256.
- 150) Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y. and Baker, R. (1984). Chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from Fusarium-suppressive soil. *Phytopathology* 74: 1115-1124.
- 151) Sneh, B., Agami, O. and Baker, R. (1985). Biological control of Fusarium-wilt in carnation with *Serratia liquefaciens* and *Hafnia alvei* isolated from rhizosphere of carnation. *Phytopathol. Z.* 113: 271-276.
- 152) Sogou, K., Uehara, H. and Tuzaki, Y. (1973). Relationship between cultivation types of rice plant and occurrence of the bacterial grain rot. *Proc. Assoc. Pl. Prot. Sikoku* 8: 9-12.
- 153) Sogou, K. and Tuzaki, Y. (1979). Effect of yield of rice due to bacterial grain rot. *Bull. Kagawa Agr. Exp. Sta.* 31: 32-36.
- 154) Stirling, G.R. (1984). Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology* 74: 55-60.
- 155) Stutz, E.W. and Defago, G. and Kern, H. (1986). Naturally occurring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology* 76: 181-185.

- 156) Sutherland, E.D. and Lockwood, J.L. (1984). Hyperparasitism of oospores of some Peronosporales by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other Actinomycetes and fungi. *Can. J. Plant Pathol.* 6: 139-145.
- 157) Tabei, H., Azegami, K., Kukuda, T. and Goto, T. (1989). Stomatal infection of rice grain with *Pseudomonas glumae*, the causal agent of the bacterial grain rot of rice. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 224-228.
- 158) Tanaka, H. (1983). Protection of tobacco and tomato against root infection of *Pseudomonas solanacearum* by heat-killed bacterial cells. *Soc. Japan* 49: 66-68.
- 159) Tanaka, H. (1990). Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 243-246.
- 160) Tanaka, Y. (1979). Ecological studies on *Pseudomonas solanacearum*, the pathogen of bacterial wilt of tobacco. *Bull. Kagoshima Tobacco Expt. Sta.* 22: 1-82.
- 161) Teinze, M., Hossain, M.B., Barnes, C.L., Leong, J. and van der Helm, D. (1981). Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* 20: 6446-6457.
- 162) Teinze, M. and Leong, J. (1981). Structure of pseudobactin A, a second siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas* B10. *Biochemistry*: 20 6457-6462.
- 163) Teliz-Ortiz, M. and Burkholder, W.H. (1960). A strain of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Pseudomonas phaseolicola* and other bacterial plant pathogens. *Phytopathology* 50: 119-123.
- 164) Thirumalachar, M.J. and O'Brien, M.J. (1977). Suppression of charcoalrot in potato with a bacterial antagonist. *Plant Dis. Repr.* 61: 543-546.
- 165) Thomson, S.V., Schroth, M.N., Moller, W.J. and Reil, W.O. (1976). Efficacy of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pear flowers by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 66: 1457-1459.
- 166) Thomashow, L.S. and Weller, D.M. (1987). Role of a phenazine antibiotic in disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology* 77: 1724
- 167) 富永時任 (1971). 日本における牧草および飼料作物の病害に関する研究. 農技研報告C第25号: 237-240.
- 168) Trigalet, A. and Trigalet-Demery, D. (1986). Invasiveness in tomato plants of Tn5-induced avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 28: 423-430
- 169) Trigalet, A. and Trigalet-Demery, D. (1990). Use of avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum* for the biological control of bacterial wilt of tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 27-38.
- 170) Tsushima, S., Wakimoto, S. and Mogi, S. (1986). Selective medium for detecting *Pseudomonas glumae* Kurita et Tabei, the causal bacterium of grain rot of rice. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52: 253-259.
- 171) Tu, J.C. (1978). Protection of soybean from severe Phytophthora root rot by *Rhizobium*. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 233-240.
- 172) Tu, J.C. (1980). Incidence of root rot and overwintering of alfalfa as influenced by rhizobia. *Phytopathol. Z.* 97: 97-108.

- 173) Uematsu, T., Yoshimura, D., Nishiyama, K., Ibaraki, T. and Fujii, H. (1976). Occurrence of bacterial seedling rot in nursery flat, caused by grain rot bacterium *Pseudomonas glumae*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42: 310-312.
- 174) Uematsu, T., Yoshimura, D., Nishiyama, K., Ibaraki, T. and Fujii, H. (1976). Pathogenic bacterium causing seedling rot of rice. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42: 464-471.
- 175) Utkhede, R. S. and Rahe, J. E. (1980). Biological control of onion white rot. Soil Biol. Biochem. 12:101-104.
- 176) Utkhede, R. S. and Rahe, J. E. (1983). Interaction of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. Phytopathology 73: 890-893.
- 177) Utkhede, R. S. and Gaunce, A. P. (1983). Inhibition of *Phytophthora cactorum* by a bacterial. Can. J. Bot. 61: 3343-3348.
- 178) Utkhede, R. S. (1984). Effect of bacterial antagonist on *Phytophthora cactorum* and apple crown rot. Phytopathol. Z. 109: 169-175.
- 179) Utkhede, R. S. (1984). Antagonism of isolates of *Bacillus subtilis* to *Phytophthora cactorum*. Can. J. Bot. 62: 1032-1035.
- 180) Utkhede, R. S. (1986). Biology and control of apple crown rot caused by *Phytophthora cactorum*: a review. Phytoprotection. 67: 1-13.
- 181) Wadi, J. A. and Easton, G. D. (1985). Control of *Verticillium dahliae* by coating seed pieces with antagonistic bacteria. In Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. ed. C. A. Parker, A. d. Rovira, K. J. Moore, P. T. W. Wong, J. F. Kollmorgen. St. Paul: Am. Phytopathol. Soc. 171, pp.134-368.
- 182) Wakimoto, S., Utazu, I., Matsuo, N. and Hayashi, N. (1982). Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. Ann. Phytopath. Soc. Japan 48: 620-627.
- 183) 脇本哲, 古屋成人, 佐藤公治, 山口純一郎, 平八重一之, 松山宣明 (1985). イネもみ枯細菌病菌のイネに対する病原性と野菜組織に対する腐敗能との関連性 九病虫研報 31: 226.
- 184) Wakimoto, S., Hirayae, K., Tsuchiya, K., Kushima, Y., Furuya, N., and Matsuyama, N. (1986). Production of antibiotics by plant pathogenic pseudomonads. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52: 835-842.
- 185) 脇本哲, 古屋成人, 榎間義幸, 土屋健一 (1987). *Pseudomonas glumae*によるトマト青枯病の生物的防除 日植病報 53: 412.
- 186) Waksman, S. A. (1947). What is an antibiotic or an antibiotic substance? Mycologia 39: 565-569.
- 187) Weger, L. A., Boxtel, R., Burg, B., Gruters, R. A., Geels, F. P., Schippers, B. and Lugtenberg, G. (1986). Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. J. Bacteriol. 165: 585-594.
- 188) Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology 22: 837-845.
- 189) Weindling, R. and Emerson, O. H. (1936). The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. Phytopathology 26: 1068-1070.
- 190) Weindling, R. and Fawcett, H. S. (1936). Experiments in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedlings. Hilgardia 10: 1-16.

- 191) Weinhold, A.R. and Bowman, T. (1968). Selective inhibition of the potato scab pathogen by antagonistic bacteria and substrate influence on antibiotic production. *Plant soil* 28: 12-24.
- 192) Weller, D.M. and Cook, R.J. (1982). Pseudomonads from take-all conducive and suppressive soils. *Phytopathology* 72: 264.
- 193) Weller, D.M. and Cook, R.J. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73: 463-469.
- 194) Weller, D.M. (1983). Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* 73: 1548-1553.
- 195) Weller, D.M. (1984). Distribution of a take-all suppressive strain of *Pseudomonas fluorescens* on seminal roots of winter wheat. *App. Environ. Microbiol.* 48: 897-899.
- 196) Weller, D.M., Zhang, B.X. and Cook, R.J. (1985). Application of a rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. *Plant Dis.* 69: 710-713.
- 197) Weller, D.M., and Cook, R.J. (1986). Increased growth of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads, and implications of *Pythium* control. *Can. J. Plant Pathol.* 8: 328-334.
- 198) Winstead, N.N. and Kelman, A. (1952). Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42: 628-634.
- 199) Wong, P.T.W. and Baker, R. (1984). Suppression of wheat take-all and *Ophiobolus patch* by fluorescent pseudomonads from Fusarium-suppressive soil. *Soil Biol. Biochem.* 16: 397-403.
- 200) Wright, J.M. (1956). The production of antibiotics in soil. III. Production of gliotoxin in wheatstraw buried in soil. *Ann. Appl. Biol.* 44: 461-466.
- 201) Xu, G.W. and Gross, D.C. (1986). Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathology* 76: 414-422.
- 202) Xu, G.W. and Gross, D.C. (1986). Field evaluations of the interactions among fluorescent pseudomonads, *Erwinia carotovora*, and potato yields. *Phytopathology* 76: 423-430.
- 203) Yasunaga, T., Matsumoto, H. and Shigematsu, Y. (1982). Effect of S-0208 wettable powder on bacterial grain rot of rice. *Proc. Assoc. Plant Protec. Shikoku* 17: 35-40.
- 204) Yuen, G.Y., Schroth, M.N. and McCain, A.H. (1985). Reduction Fusarium wilt of carnation with suppressive soils and antagonistic bacteris. *Plant Dis.* 69: 1071-1075
- 205) Yuen, G.Y., and Schroth, M.N. (1986). Inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* by iron competition with *Alcaligenes* sp. *Phytopathology* 76: 171-176.
- 206) Yuen, G.Y. and Schroth, M.N. (1986). Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora. *Phytopathology* 76: 176-180.
- 207) Zeller, W. and Xie, Y. (1985). Studies on diagnosis of bacterial ring rot of potatoes. *Phytopath. Z.* 112: 198-206.





**Kodak Color Control Patches**

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

**Kodak Gray Scale**

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

G Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak