
報 文 土壤中における *Ralstonia solanacearum* の菌体外多糖非生産株の
誘発と同変異株の発病抑制効果

嚴原美穂¹⁾・高木滋樹²⁾・横山和平¹⁾・丸本卓哉¹⁾

¹⁾山口大学農学部

〒753-8515 山口県山口市吉田 1677-1

²⁾フマキラー株式会社

〒739-0494 広島県佐伯郡大野町梅原 1-11-13

Induction of strains of *Ralstonia solanacearum* that do not produce extracellular polysaccharides (EPS) in soil and effect on disease suppressiveness

Miho Iduhara¹⁾, Shigeki Takaki²⁾, Kazuhira Yokoyama¹⁾ and Takuya Marumoto¹⁾

¹⁾ Faculty of Agriculture, Yamaguchi University,
Yoshida 1677-1, Yamaguchi, 753-8515 Japan

²⁾ Fumakilla Ltd., Umehara 1-11-13, Ohno-cho, Saeki-gun, 739-0494 Japan

Abstract

To suppress bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* with soil administration, soil conditions that influence the production of extracellular polysaccharides (EPS) in *R. solanacearum* were surveyed, and the prevention of this disease by strains that do not produce EPS (EPS⁻ strains) was investigated. The culture conditions, using either liquid medium or sterilized soil were investigated to induce the phenotype conversion (PC) in relation to the reduction or loss of EPS production in *R. solanacearum*. EPS⁻ colonies were frequently detected under unfavorable culture conditions, such the use of a rather alkaline medium (pH8 and pH8.5), higher temperature (37°C) or still culture rather than shaking culture. The culture conditions under which the EPS⁻ colonies were detected with a high frequency varied depending on the strains tested. In the case of culture conditions of the bacterium using either sterilized or non-sterilized soil, EPS⁻ colonies were also observed with a high frequency in all the cases, including, acidic soil, higher temperature, and soil moisture exceeding the maximum water holding capacity. Disease severity was evaluated after the EPS-producing strains were inoculated either alone or simultaneously with EPS-non-producing strains by mixing into soil where subsequently tomato was planted. When EPS-producing strains and EPS-non-producing strains were simultaneously inoculated, the damage was less serious than in the case of inoculation with EPS-producing strains alone. When the ratio of EPS-non-producing cells to EPS-producing cells increased, the effect on disease suppression was more pronounced. If the phenotype conversion of *R. solanacearum* living in soil could be induced with a high frequency by soil administration, bacterial wilt disease may be effectively suppressed.

Key Words : *Ralstonia solanacearum*, phenotype conversion, soil, tomato, bacterial wilt

はじめに

Ralstonia solanacearum は 50 科を超える植物に被害を及ぼす土壌伝染性の植物病原細菌である¹⁰⁾。本菌は菌体外に豊富な多糖類 (extracellular polysaccharide ; 以下, EPS と略す) を分泌し, この EPS は病原性と密接に関係している^{4,6,8,9,14,15)}。また, 本菌の特徴の一つとして純粋培養系において EPS 生産能に欠損をきたす phenotype conversion (PC 化) が知られている^{5,16,25)}。PC 化した本菌を種々の他の土壌細菌と区別することは容易ではないため, 土壌における PC 化については不明であったが, Shekhawat および Perombelon²⁴⁾は殺菌土壌に接種した本菌の EPS 生産性が変化することを報告した。この報告によれば, PC 化を誘発する土壌の要因は, pH, 温度および水分であった。この事実は, 圃場管理によって本菌の非病原性が促進される可能性をも示唆している。土壌における本菌の生態については岡部¹⁹⁾や田中^{25,26)}によって検討されており, 土壌環境が本菌の増殖性や生残性に与える影響は大きく, 病害の発生あるいは抑制に密接に関係していると考えられる。

土壌病害の発生は土壌中での病原菌密度が重要な因子であるために, 土壌病原菌密度を低下させる試みがなされているが, これらが病害防除に十分な効果を発揮しない場合も多い。そこで, 発病の要因となる病原菌密度を制御することに加えて, 病原菌の病原性を不活化する手法が開発できれば, さらに高い防除効果が期待できる。

R. solanacearum の場合, EPS 生産能欠損株は宿主植物に対する病原力が著しく弱いことが知られている^{4,5,8,9,14,15)}。さらに, EPS 生産能欠損株を前処理すると青枯病の発生を抑制するとの報告^{2,12,17)}もある。これらのことから, 土壌中に生育する *R. solanacearum* に対して EPS 生産能の欠損を人為的に誘導することができれば, 本菌の病原性が不活化され, その結果青枯病の発生が制御可能になると考えられる。

そこで, 本研究では, *R. solanacearum* が EPS 生産能に変異をきたし EPS⁻株となる土壌の条件, および EPS⁻株となった *R. solanacearum* が発病抑制に与える影響について検討したのでここ

に報告する。

材料および方法

1. 供試菌

EPS 生産株として, トマトおよびナスの青枯病罹病残渣から分離した *R. solanacearum* の野性株 (SL8¹⁸⁾, UBE, K2, YP8, YP12, YP14 および YP15), および SL8 株に発光クラゲ由来の green fluorescent protein (GFP) をコードする *gfp* 遺伝子を導入した 157E 株と 162E 株¹³⁾を供試した。EPS 非生産株として, 前述の菌株をそれぞれ継代培養し, EPS 生産能が顕著に低下した株 (SL8PC1, 157PC および 162PC) を供試した。*gfp* 遺伝子導入株は EPS 生産能の有無に関わらず, 紫外線照射下で緑色蛍光を発するため, 蛍光顕微鏡によって特異的に検出することが可能であった。

供試菌株を LB 培地で 25°C, 2 日間振とう培養後, さらに PCCG 培地¹¹⁾で 28°C, 3 日間培養した。集落の形態から EPS 生産の有無を判別し, 集落をかき取って滅菌水に懸濁した。顕微鏡下, トーマ血球計算盤から菌密度を算出し, その懸濁液を所定の密度に希釈して実験に用いた。

発病調査に供試した全ての EPS⁻株は, PCCG 培地と MM 培地⁸⁾の両培地上で EPS 生産が認められないことを確認した。また, コロニークロロホルム法³⁰⁾によって供試菌株間の抗菌活性を検定し, 全ての組み合わせで阻止帯を形成しないことを確認した。

供試菌株は全て, 25%グリセロール溶液に懸濁して, 実験に使用するまで -80°C で凍結保存した。

2. 供試植物

トマト (品種: 桃太郎) 種子を 0.1%過酸化水素水に一晩浸漬後, 滅菌水で充分水洗した。これらの種子をスクロース培地上で 25°C, 暗黒条件で 3 日間催芽させ, 無菌的に発芽した種子を選択した。これらをパーミキュライトの入った育苗パレットに移し, 人工気象器内で 30°C, 16 時間光照射下 (照度: 平均 20 Wm⁻²) で本葉が展開するまで栽培した。菌液接種後, 人工気象器内で前述条件で栽培した。

3. 蛍光顕微鏡による GFP の観察条件

顕微鏡システムは OLYMPUS 社製 BX40, 落射蛍光装置は同社の BX-FLA を使用した。GFP は IB 励起法で観察した。ダイクロックミラー: DM505, 励起フィルタ: BP460-490, 吸収フィルタ: BA515IF を使用した。集落の GFP 発現については, 直径 9 cm のプレート を 1 cm 方眼紙上に置き, 区画ごと に寒天培地上に形成された集落を倍率 40 倍で観察した。

4. EPS⁻ 集落の検出

PCCG 培地を用いて, 接種菌液, 一定期間培養した各培養液および土壤中の生菌数を希釈平板法によって測定し, EPS⁺ 集落数と EPS⁻ 集落数を目視によって計数した。非滅菌土壌の場合は, 集落形態と GFP の緑色蛍光を指標として *R. solanacearum* を判別し, それぞれの集落数を計数した。このとき, 集落周縁部における EPS の顕著な減少もしくは欠損をきたしているものを EPS⁻ と判定した。EPS⁻ 集落の検出率は, 全集落数に対する EPS⁻ 集落数の割合 (%) で示した。

5. EPS⁻ 化を誘発する培養条件

EPS⁺ 株菌液を接種 (接種源濃度 1×10^4 cells ml⁻¹) し, 定期的に EPS⁻ 集落を検出し, pH, 培養温度および振とう培養と静置培養による通気の影響を調査した。

(1) pH LB 培地をクエン酸, リン酸水素二ナトリウムまたは水酸化ナトリウムで所定の pH に調整し, それぞれの培地で各菌株を 28°C で振とう培養した。

(2) 培養温度 pH7 に調整した LB 培地を使用し, 17, 28, 35 および 37°C で振とう培養した。

(3) 振とう培養と静置培養 pH7 に調整した LB 培地あるいはジャガイモ半合成 (PS) 培地を使用し, 28°C で振とう培養および静置培養した。

6. 土壌に接種した *R. solanacearum* の EPS 生産能の変化

大隅黒ボク土 (pH6.3, 最大容水量: 35.0%, 採取場所: 鹿児島県農業試験場大隅支場) および知覧黒ボク土 (pH3.3, 最大容水量: 57.3%, 採取場所: 鹿児島県茶業試験場) を混合し, その懸濁液 (土壌とイオン交換水を 1:2.5 の重量比で混合) について pH を測定し, pH6.3, 5.5 および 4.5 の土壌を調製した。これらを菌液接種後に最大容水量の 30, 50, 100 および 130% となるように土壌水分を調整した。殺菌 (121°C, 20 分) した各土壌に EPS⁺ 株菌液を接種 (接種菌密度 1×10^7 cells g⁻¹

土壌) し, 25°C で培養した。定期的に EPS⁻ 集落を検出し, 土壌 pH と水分が本菌の EPS 生産能に与える影響を調査した。

前述の黒ボク土を用いて, pH を 4.5, 菌液接種後の土壌水分が最大容水量の 100% または 130% となるように調整した。これらに EPS⁺ 株菌液を接種 (接種菌密度 1×10^7 cells g⁻¹ 土壌) し, 28, 33 および 37°C の温度条件下で培養した。定期的に EPS⁻ 集落を検出し, これらの条件が EPS 生産能に与える影響を調査した。

次に, トマト栽培圃場 (福島県民間圃場) の青枯病未発生土 (灰色低地土, pH5.9, 最大容水量: 35.9%), クレハ園芸培土 (pH6.9, 最大容水量: 42.8%), 大隅黒ボク土を使用した。菌液接種後の土壌水分が最大容水量になるように調整し, EPS⁺ 株菌液を各土壌に接種 (接種菌密度 1×10^4 cells g⁻¹ 土壌) し, 28, 33 および 37°C で培養した。定期的に EPS⁻ 集落を検出し, 非滅菌土壌における本菌の EPS⁻ 化を検討した。

7. EPS⁻ 株と発病との関係

9 号黒ビニルポットに約 200 g のクレハ園芸培土を入れ, 所定濃度に調製した菌液を土壌に混合し, トマト幼苗の根部を水洗後, 定植した。

試験 1 では, 土壌に接種する全菌数を一定 (土壌菌密度として 1×10^6 cells g⁻¹ 土壌) とし, EPS⁺ 株と EPS⁻ 株の割合を変えた場合のトマトの発病に与える影響を調査した。また, トマト幼苗を EPS⁻ 株の菌液 (1×10^7 cells ml⁻¹) に一晩浸漬した後, EPS⁺ 株を前述の密度で接種した土壌に定植した場合の発病についても調査した。なお, トマト幼苗への EPS⁻ 株の感染の有無は, 菌液に浸漬した苗の内 5 本を抜き取って調査した。すなわち, 根部を 70% エタノールに 1 分間浸漬後, 滅菌水で洗浄した。根部を磨砕し, 磨砕液を PCCG 培地で培養した。生育した集落について, PCR で *R. solanacearum* に特異的な DNA 断片が増幅される²²⁾ことを確認するか, または集落の GFP 発現を蛍光顕微鏡下で確認した。

試験 2 では, 土壌に接種する EPS⁺ 株の密度を一定 (1×10^5 cells g⁻¹ 土壌) とし, EPS⁻ 株の接種濃度を変化させて実験を行った。試験はいずれも 3 連で行い, 定植後 1 日おきに Winstead および Kelman の方法²⁹⁾に準じて発病調査を行った。

結果

1. EPS⁻ 化を誘発する培養条件

野生株 SL8 とこれにトランスポゾン挿入変異法で *gfp* 遺伝子を導入した 157E 株について EPS 生産に及ぼす pH, 温度および振とう培養と静置培養による通気の影響を調査した (図 1, 2 および 3)。なお, 接種源菌液 (無処理) からは EPS-

集落は検出されなかった。

(1) pH 培養液の pH は培養が進むにつれ, アルカリ性に変化した。pH5, 6, 7 および 8 に調整した培地で SL8 株を 4 日培養した際の各培養液の pH は, 順に pH8.35, 8.67, 8.76 および 8.52 で

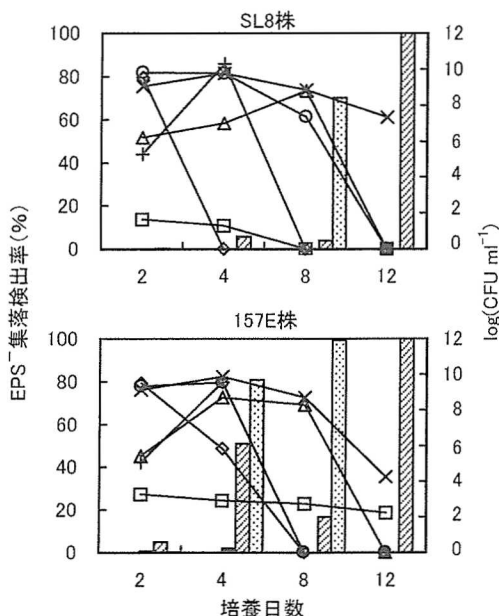


図 1 *R. solanacearum* SL8 株と 157E 株の EPS 生産能に及ぼす pH の影響

EPS-集落検出率 ■ : pH7
 ▨ : pH8
 ▩ : pH8.5
 全菌密度 □ : pH4.7, + : pH5, ◇ : pH6,
 ○ : pH7, × : pH8, △ : pH8.5

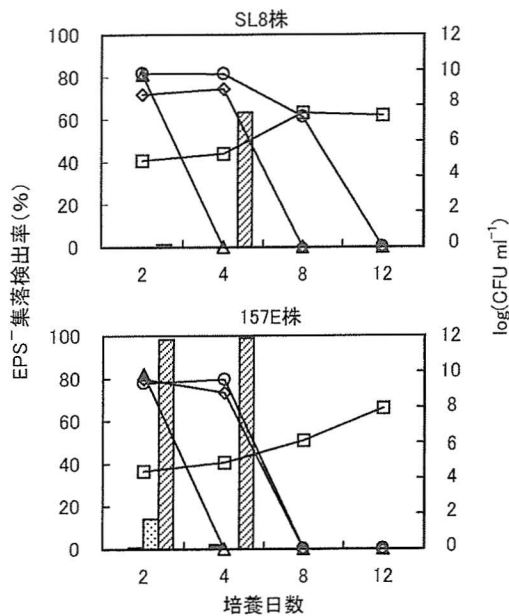


図 2 *R. solanacearum* SL8 株と 157E 株の EPS 生産能に及ぼす培養温度の影響

EPS-集落検出率 ■ : 28°C
 ▨ : 35°C
 ▩ : 37°C
 全菌密度 □ : 17°C, ○ : 28°C, △ : 35°C,
 ◇ : 37°C

表 1 各種培養条件における野生株の EPS-集落検出率と全菌密度

菌株	分離源	生理型 biovar	培養条件					
			37°C		pH8.5		静置培養 (PS 培地)	
			pH7, 2 日, 振盪培養		28°C, 4 日, 振盪培養		pH7, 28°C, 4 日	
			(%)*	(CFU ml ⁻¹)**	(%)	(CFU ml ⁻¹)	(%)	(CFU ml ⁻¹)
SL8	トマト	IV	2.82	1.89×10 ⁸	0.00	1.19×10 ⁷	11.11	7.80×10 ⁹
UBE	トマト	II	0.11	6.54×10 ⁸	0.00	2.07×10 ⁷	0.14	4.61×10 ⁹
K2	ナス	IV	6.75	1.68×10 ⁷	0.00	5.80×10 ⁶	19.23	6.93×10 ⁹
YP8	ナス	IV	0.16	2.14×10 ⁶	16.67	2.88×10 ⁹	19.79	7.65×10 ⁹
YP12	トマト	IV	5.20	7.95×10 ⁸	90.46	4.05×10 ⁹	7.78	6.00×10 ⁹
YP14	トマト	IV	0.17	3.87×10 ⁹	5.09	2.88×10 ⁹	0.35	1.71×10 ⁹
YP15	トマト	IV	0.44	2.21×10 ⁶	5.33	1.13×10 ⁸	0.00	2.60×10 ⁷

* : EPS-集落検出率

** : 全菌密度

あった。EPS⁻集落の検出率は、いずれの菌株においても pH8 と pH8.5 で高かった。なお、いずれの菌株も pH4 および pH4.5 では生育せず、弱酸性では菌密度が極端に低かったため、EPS 生産の変化を確認することができなかった。

(2) 温度 EPS⁻集落の検出率は、低温よりも高温で高かった。

(3) 振とう培養と静置培養 EPS⁻集落の検出率は全ての菌株が静置培養で高く、振とう培養で低かった。また、LB 培地よりもジャガイモ半合成培地 (PSB) の方が供試菌の増殖が旺盛で、短期間で高い EPS⁻集落検出率を示した。

EPS⁻集落検出率が高かった条件 (pH8.5, 37℃, 振とう培養) の内、いずれかひとつのストレスを与え、SL8 株および SL8 株とは分離源の異なる野性株 (UBE, K2, YP8, YP12, YP14 および YP15) を用いて同様の調査を行った (表 1)。変異の主たる誘導要因は菌株によって異なり、SL8 株, K2 株および YP8 株では静置培養, YP12

株, YP14 株および YP15 株では pH8.5 で培養した場合にそれぞれ EPS⁻集落検出率が最も高かった。UBE 株では、37℃ 培養よりも静置培養した場合の EPS⁻集落検出率が若干高かった。

2. 土壌に接種した *R. solanacearum* の EPS 生産能の変化

土壌 pH や土壌水分が本菌の EPS 生産能に与える影響を調査した (図 4)。157E 株では、土壌 pH が低く土壌水分が最大容水量以上の場合に EPS⁻集落検出率が高かった。SL8 株においてもその傾向は認められたが、EPS⁻集落検出率は 157E 株に比べて低かった。

前述の調査から、SL8 株とこれに *gfp* 遺伝子を導入した 157E 株の EPS 生産性に影響を与える土壌条件は、pH4.5, 土壌水分を最大容水量に対して 130%にした場合であった。そこで、この条件が SL8 株とは系統の異なる *R. solanacearum* の EPS 生産性に与える影響を調査した。前述の土壌を用いて 25℃, 84 日間培養後の EPS⁻集落検

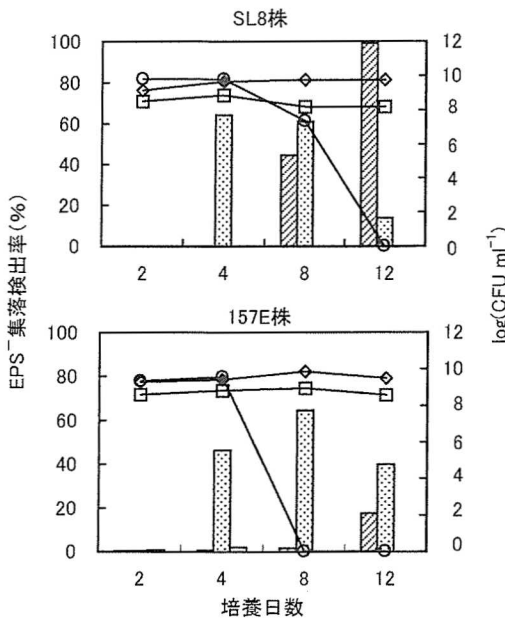


図 3 *R. solanacearum* SL8 株と 157E 株の EPS 生産能に及ぼす静置培養温度の影響

EPS⁻集落検出率 □: 静置培養 (LB 培地)
 ■: 静置培養 (PS 培地)
 □: 振盪培養 (LB 培地)
 全菌密度 □: 静置培養 (LB 培地),
 ◇: 静置培養 (PS 培地),
 ○: 振盪培養 (LB 培地)

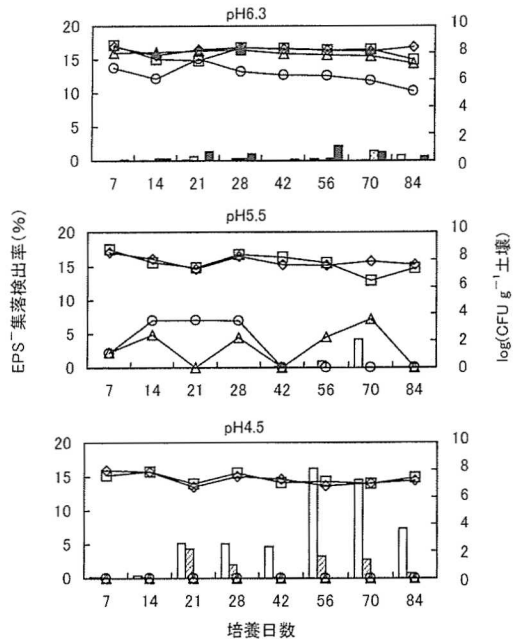


図 4 土壌の pH と水分が *R. solanacearum* EPS⁺ 株 (157E) に与える影響

EPS⁻集落検出率 □: 130%, ■: 100%
 ■: 50%, ■: 30%
 全菌密度 □: 130%, ◇: 100%,
 △: 50%, ○: 30%
 (最大容水量に対する水分量で表示)

出率は YP12 で 60.4% と最も高く、次いで YP8 が 6% であった。その他の菌株 (UBE, K2, YP14 および YP15) の EPS⁻ 集落検出率はいずれも 1% 未満であった。

pH4.5, 最大容水量の 100% および 130% の水分条件に調整した土壌に SL8 株と 157E 株をそれぞれ接種し, 25°C から 33°C までの各温度条件で 84 日間培養したところ, EPS 生産性の変異は高温培養によって促進された (図 5)。SL8 株は土壌水分条件がいずれの場合にも 28°C で最も高い EPS⁻ 集落検出率を示した。殊に, 土壌水分が最大容水量の 130% の土壌では形成された集落の約 6 割が EPS⁻ 集落と判別された。157E 株は, 土壌水分を最大容水量に調整した場合に 33°C で EPS⁻ 集落検出率が最も高かった。しかし, 土壌水分が最大容水量の 130% の場合には高温培養によって EPS⁻ 化の促進は認められず, 25°C 培養において最も高い EPS⁻ 集落検出率を示した。各要因の変異率に対する分散分析の結果を示した (表 2)。要因において, 培養温度, 土壌水分, 接種菌の単独, および以下の組み合わせ, 培養温度と土壌水分, 培

養温度と接種菌, 土壌水分と接種菌, 培養温度と土壌水分と接種菌の全てが変異率に対して危険率 5% の水準で影響を及ぼした。これについて, post hoc test を行ったところ, Games-Howell 以外の検定において, 接種菌および土壌水分の効果の群間には危険率 5% で有意差があった。しかし, 培養温度において, 25°C と 33°C の間に有意差はなかった。なお, 培養温度を 37°C にした場合, 接種 1 週間後で菌密度は検出限界以下となった。

非滅菌土壌の土壌水分を最大容水量になるように調整し 157E 株を接種して, 28, 33 および 37°C で 3 日間培養した場合, 3 種類の供試土壌のいずれにおいても EPS⁻ 集落が確認された。福島県民間圃場から採取した土壌で, 33°C, 3 日間培養した場合の EPS 生産能の変化を示した (図 6)。上段に示した GFP を発現している集落は周縁部が透明化しており, 下段の EPS を豊富に生産している集落とは明らかに形態が異なった。なお, 37°C, 3 日培養後に GFP の発現が確認された全ての集落は EPS⁻ であった。また, 37°C, 1 週間培養後には GFP 発現集落は検出されなかった。

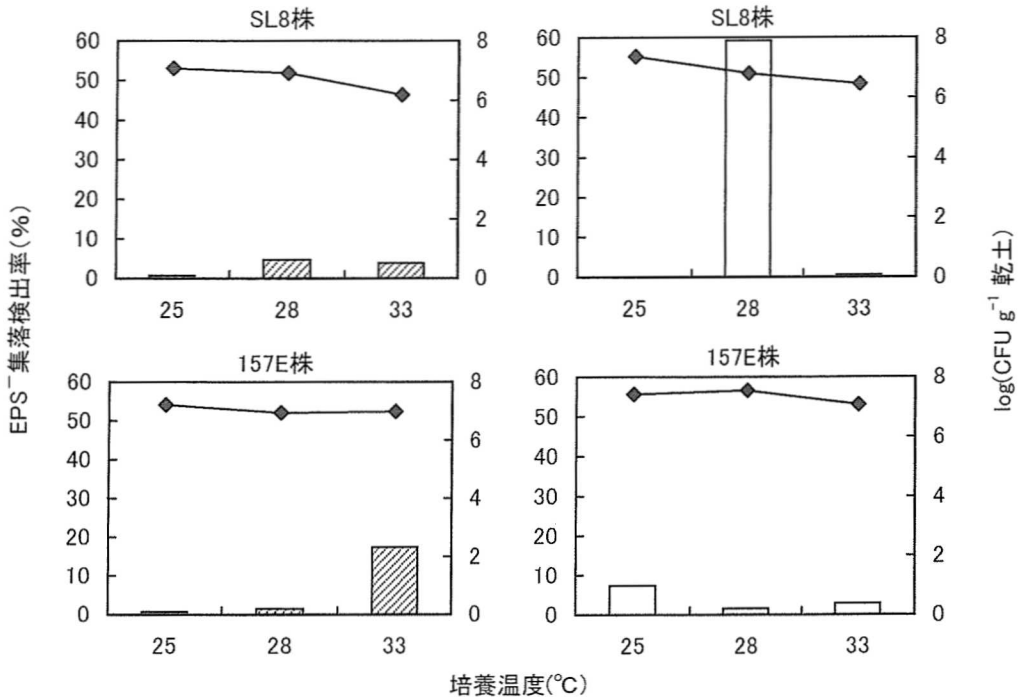


図5 土壌水分と温度が *R. solanacearum* SL8 株の EPS 生産に与える影響
 EPS⁻ 集落検出率 ■: 100% □: 130% (最大容水量に対する水分量で表示)
 ◆: 全菌密度

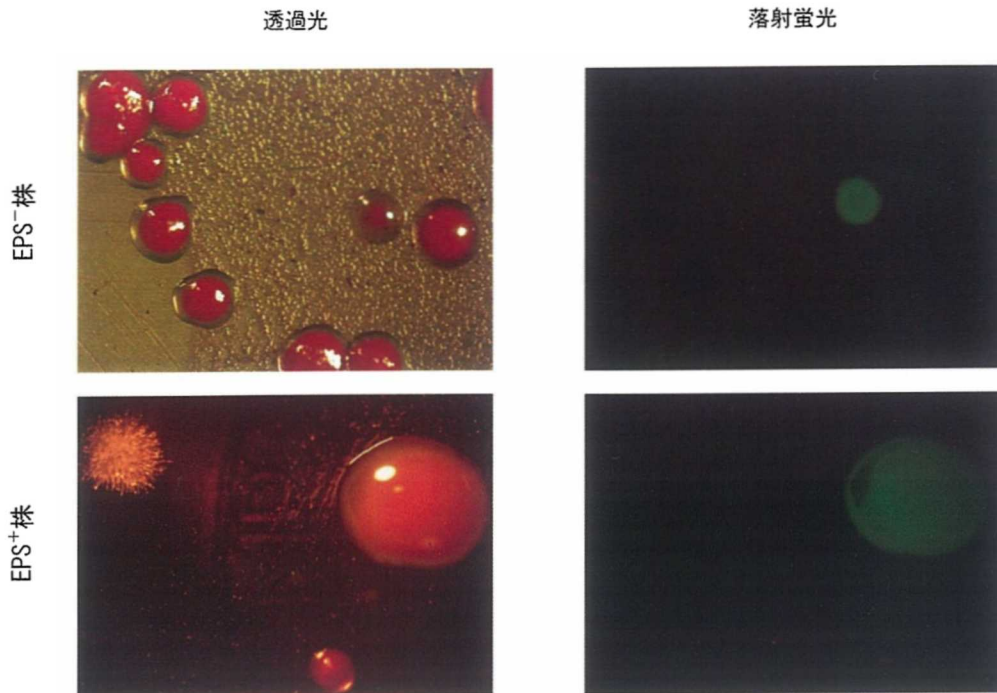


図6 非滅菌土壌（トマト栽培圃場青枯病未発生土壌）に接種した *R. solanacearum* 157E 株の EPS 生産に及ぼす温度と水分の影響（最大容水量，33°C，3日間培養）

表2 *R. solanacearum* SL8 株と 157E 株の EPS 生産性を变化させる各要因に関する分散分析

要因	自由度	平方和	平均平方	F 値	p 値
培養温度	2	1143.079	571.540	21.959	<.0001
土壤水分	1	588.224	588.224	22.600	<.0001
接種菌	1	292.296	292.296	11.230	.0027
培養温度×土壤水分	2	2173.430	1086.715	41.752	<.0001
培養温度×接種菌	2	2271.250	1135.625	43.631	<.0001
土壤水分×接種菌	1	891.222	891.222	34.241	<.0001
培養温度×土壤水分×接種菌	2	1662.588	831.294	31.939	<.0001
残差	24	624.666	26.028		

3. EPS⁻ 株と発病との関係

試験1では、EPS⁺株とEPS⁻株をそれぞれ単独で、または異なる割合で土壌に混合してトマト植物体に接種した場合の発病度を接種後100日間調査した(図7)。EPS⁺株であるSL8株を単独接種した場合、 1×10^6 cells g^{-1} 土壌の密度では接種16日後に、また 1×10^5 cells g^{-1} 土壌では接種49日後に、それぞれ発病度が100となったが、 1×10^4 cells g^{-1} 土壌の密度では接種100日後でさえ

発病度は40にとどまった。これに対して、総接種菌密度を 1×10^6 cells g^{-1} 土壌とし、EPS⁻株(SL8PC1)とEPS⁺株(SL8)との混合割合を99:1(9.9×10^5 cells g^{-1} 土壌: 1×10^4 cells g^{-1} 土壌)で接種した場合は全く発病しなかった。また、同様にEPS⁻株(SL8PC1)とEPS⁺株(SL8)との混合割合を90:10(9×10^5 cells g^{-1} 土壌: 1×10^5 cells g^{-1} 土壌)で接種した場合は、同一密度のEPS⁺株を接種した場合に比較して、発病の遅延

と発病度の低下が確認された。また、トマト幼苗を予め EPS⁻ 株 (SL8PC1) で処理した後、EPS⁺ 株 (SL8) を 1×10^4 cells g⁻¹ 土壌で接種した土壌に定植すると、無処理苗を定植した場合と比較して発病が遅延した。しかし、無処理苗の発病度は接種 100 日後でさえ 40 であつたにも関わらず、EPS⁻ 株浸漬処理苗の発病度は接種 51 日後には 100 に達した。また、EPS⁺ 株 (SL8) が 1×10^4 cells g⁻¹ 土壌、EPS⁻ 株 (SL8PC1) が 9.9×10^5 cells g⁻¹ 土壌の密度で混合された土壌に無処理苗を移植した場合と比較して、EPS⁻ 株を浸漬処理した苗の発病は激しかった (図 8)。EPS⁺ 株 (157E) と

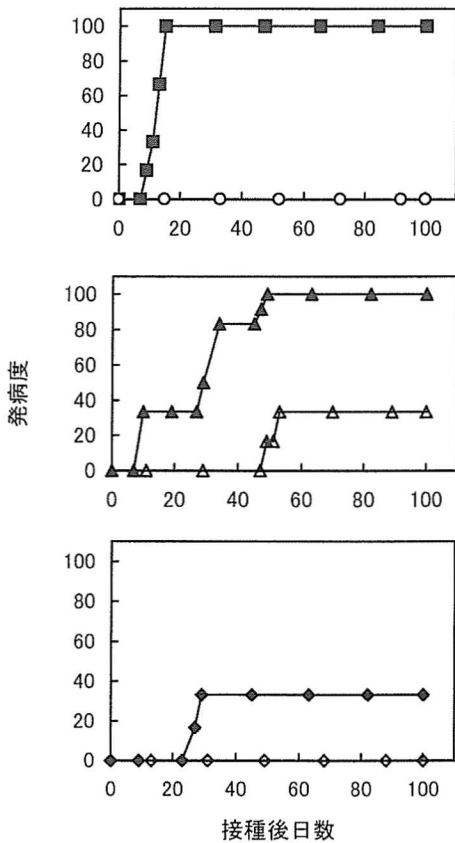


図 7 *R. solanacearum* EPS⁺ 株 (SL8) と EPS⁻ 株 (SL8PC1) の混合比とトマト植物体の発病度
 ■ : EPS⁺ 株単独 (100×10^4 cells g⁻¹ 土壌),
 ○ : EPS⁻ 株単独 (100×10^4 cells g⁻¹ 土壌),
 ▲ : EPS⁺ 株単独 (10×10^4 cells g⁻¹ 土壌),
 △ : EPS⁺ 株 (10×10^4 cells g⁻¹ 土壌) + EPS⁻ 株 (90×10^4 cells g⁻¹ 土壌),
 ◆ : EPS⁺ 株単独 (1×10^4 cells g⁻¹ 土壌),
 ◇ : EPS⁺ 株 (1×10^4 cells g⁻¹ 土壌) + EPS⁻ 株 (99×10^4 cells g⁻¹ 土壌)

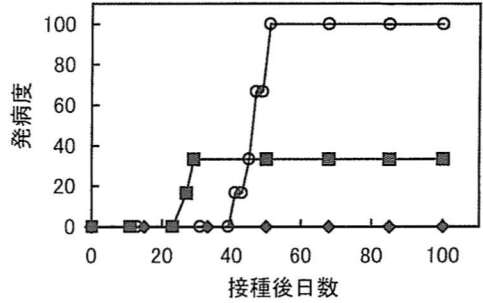


図 8 *R. solanacearum* EPS⁻ 株の接種方法の違いによるトマト植物体の発病度
 ○ : EPS⁻ 株 (SL8PC1, 1×10^7 cells ml⁻¹) 浸漬処理苗を EPS⁺ 株 (SL8, 1×10^4 cells g⁻¹ 土壌) 混合土壌へ移植
 ◆ : 無処理苗を EPS⁻ 株 (SL8PC1, 99×10^4 cells g⁻¹ 土壌) と EPS⁺ 株 (SL8, 1×10^4 cells g⁻¹ 土壌) 混合土壌へ移植
 ■ : 無処理苗を EPS⁺ 株 (SL8, 1×10^4 cells g⁻¹ 土壌) 混合土壌へ移植

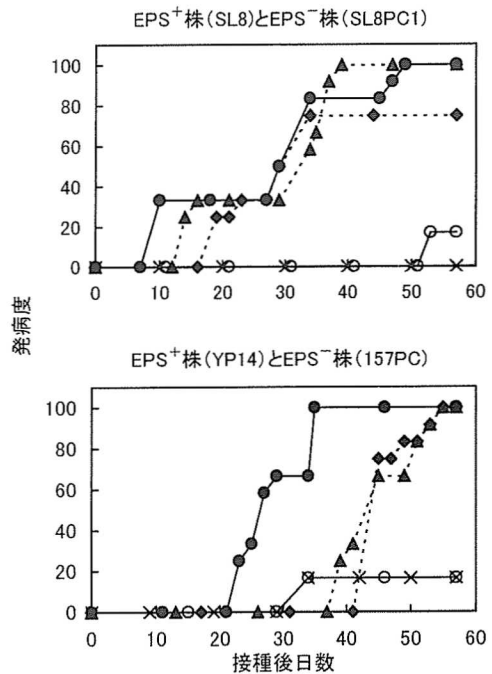


図 9 *R. solanacearum* EPS⁻ 株がトマト植物体と与える影響
 ○ : EPS⁻ 株単独 (10×10^4 cells g⁻¹ 土壌),
 × : EPS⁻ 株単独 (100×10^4 cells g⁻¹ 土壌),
 ● : EPS⁺ 株単独 (10×10^4 cells g⁻¹ 土壌),
 ▲ : EPS⁺ 株 (10×10^4 cells g⁻¹ 土壌) + EPS⁻ 株 (10×10^4 cells g⁻¹ 土壌),
 ◆ : EPS⁺ 株 (10×10^4 cells g⁻¹ 土壌) + EPS⁻ 株 (100×10^4 cells g⁻¹ 土壌)

EPS⁻株(157PC)およびEPS⁺株(162E)とEPS⁻株(162PC)の組み合わせにおいても同様の効果が認められた。

試験2では、EPS⁺株の接種密度を一定(1×10⁵ cells g⁻¹ 土壌)とし、EPS⁻株の接種密度を変化させて発病度を調査した(図9)。EPS⁺株(SL8)とEPS⁻株(SL8PC1)の組み合わせでは、EPS⁻株の密度がEPS⁺株の密度を上回った場合に発病の遅延と軽減の効果が認められた。EPS⁺株(157E)とEPS⁻株(157PC)の組み合わせにおいてこの傾向は顕著であり、全てのEPS⁻株添加区で発病遅延と軽減効果が認められた(データ示さず)。EPS⁺株(YP14)とEPS⁻株(157PC)の組み合わせでは、EPS⁻株の密度が1×10⁴ cells g⁻¹ 土壌以上の場合に発病遅延効果が認められた。EPS⁺株(YP8)とEPS⁻株(157PC)の組み合わせにおいても発病遅延効果が認められた(データ示さず)。

考 察

Shekhawat および Perombelon²⁴⁾によると、純粋培養系において本菌を弱酸性(pH4.5)、高温(35°C)および低温(5°C)、嫌気条件のいずれかで培養した場合に、EPS⁻集落の検出率が高い傾向にあった。しかし、本研究において野性株SL8とその*gfp* 遺伝子導入株である157E株を弱酸性で培養した場合には、EPS生産よりも菌の生存に与える影響が大きく、EPS⁻集落の検出率は低かった。また、培養温度が5°Cおよび10°Cでは供試菌の増殖が認められず、1週間培養後には検出限界以下となった。157E株および162E株は、SL8株由来の同一系統の菌株であるため、分離源や生理型(biovar)²⁰⁾の異なる他系統の*R. solanacearum*を用いて試験を行ったところ、菌株によってEPS⁻集落を誘発する主たる要因が異なり、またその検出率にも差違があった。しかし、弱アルカリ性、高温および低酸素条件は、いずれも共通したPC化誘発の要因になり得ると判断された。純粋培養系における、EPS生産能の変異は各種ストレス下で普遍的に認められる現象と考えられた。また、Shekhawat および Perombelon は、滅菌土壌中の*R. solanacearum*は、土壌水分を最大含水量とし低温(5°C)下に置いた場合にEPS⁻集落の検出率が高く、またpH4.5の土壌では病原性を完全に喪失したことを報告している²⁴⁾。しかし、本研

究において、低温培養下ではEPS⁻集落は認められず、菌密度が低下し培養3週目には検出限界以下となった。図4が示すように、EPS生産能の変異は、酸性土壌や水分が高い土壌で起こりやすいと考えられたが、EPS⁻集落の検出率は上記の報告と比較して明らかに低かった。試験結果のこのような差違は、供試土壌の違いによるほか、本研究では前培養などの培養過程でEPS生産能を欠損しにくい形質的に安定した菌株を用いたことも関係していると考えられる。なお、純粋培養系の実験結果から、本菌のEPS生産能はpHがアルカリ性の場合にも影響を受けることが示された(図1)。日本の畑土壌の多くは弱酸性であるが、アルカリ性土壌の影響についても今後さらに検討する必要がある。弱酸性土壌条件は*R. solanacearum*のEPS生産能ばかりでなく生存力そのものにも影響を及ぼすので、発病抑制には有利であると考えられた。PC化は異なる系統の菌株にも共通して認められたことから、わが国の土壌中において普遍的に起こっている現象であると考えられた。また、非滅菌土壌においてもPC化が確認されたことから、PC化は単一菌が高密度で生息する特殊な実験条件下でのみ起こる現象ではないことが明らかとなった。圃場管理によって土壌中の*R. solanacearum*のPC化を誘導することは可能であると考えられる。

純粋培養系で高温培養を行うと短期間で高率にEPS⁻集落が検出された。このことから、地温の上昇がPC化を促進することが推測された。地温25°Cと比べ、28°Cおよび33°CでPC化がより促進された。高温条件と高い土壌水分は本菌のPC化の促進に相加的もしくは相乗的な効果があると考えられた。土壌の太陽熱消毒⁷⁾や湛水処理²¹⁾に病害抑制効果があることは良く知られているが、これらの処理は*R. solanacearum*自体の密度を低下させるばかりでなく、PC化を誘導し病原性株の密度低下にも寄与している可能性がある。

EPS生産能欠損・非病原性株の青枯病防除効果については、Kempe および Sequeira¹⁷⁾、Arwiyantoら^{1,2,3)}、Hara および Ono¹²⁾および Trigalet および Trigalet²⁸⁾の報告がある。この内、ArwiyantoらとHara および Onoが供試した非病原性株はいずれもバクテリオシン生産能を有する。これらの菌株は、バクテリオシンの作用に加え、誘導抵抗性によって発病抑制効果を示すと考えられている。また、Trigalet および Tri-

galet の報告によると, *R. solanacearum* において病原性と過敏反応に関与する *hrp* 遺伝子をトランスポゾン挿入変異法で破壊した非病原性株は発病抑制効果を示したが, 自然突然変異によって得た PC 株は抑制効果を示さなかった。しかし, これまで土着 *R. solanacearum* の PC 化の促進による青枯病の抑制に着目した研究報告はなかった。本研究では, EPS⁺ 株と EPS⁻ 株を添加した土壌において, EPS⁻ 株が病害に及ぼす影響を調査した結果, 土壌中の EPS⁻ 株の菌密度が EPS⁺ 株のそれよりも高い場合に, 病害抑制効果が認められることを示した。

EPS⁺ 株の土壌菌密度が同じであっても, EPS⁻ 株が存在した場合に発病度が軽減された機構を論ずるには詳細な検討が必要とされる。人為的に土着の *R. solanacearum* を PC 化させた場合には, 病原性を有する EPS⁺ 株の土壌菌密度を下げるばかりでなく, EPS⁺ 株と PC 株間の栄養競争や生息場所の競争等により病害の軽減に寄与すると考えられる。高率に PC 化が促進された場合には, 後から持ちこまれた病原性株の増殖は PC 株の先住効果²⁷⁾により抑制される可能性も高く, 誘導抵抗性による青枯病の防除効果も期待できる。ただし, PC 株の復帰変異の頻度は非常に低いと考えられる²³⁾が, PC 化が可逆的な形質である可能性は否定できない。

青枯病の防除において病原性株の土壌菌密度を低下させることは必要不可欠であるが, *R. solanacearum* の土壌における生態には不明な点が多く現実には困難が多い。この様な状況では, 土壌に生息する *R. solanacearum* の病原性が発揮されないような土壌環境を形成することも重要な要因になると考えられる。本菌を死滅させるには大きなエネルギーを要すると推測されるが, 限られた形質を変化させる場合には前述よりも平易な方法で充分に対応できる可能性がある。PC 化誘発要因の法則性を明確にすることは防除の上で非常に有益であると考えられる。

今後, 土壌中の *R. solanacearum* の EPS 生産能を評価する実験系を確立し, 種々の環境要因や化合物が EPS 生産能に与える影響を調査することが必要である。さらに, PC 化を高頻度で誘発する条件を明確にし, 土壌に定着した *R. solanacearum* を PC 化した場合のトマトに対する病原性を確認するとともに, 防除への応用が望まれる。

要 旨

土壌管理によるナス科植物青枯病の防除を目的として, *Ralstonia solanacearum* の菌体外多糖 (EPS) 生産性に影響を及ぼす外的要因と EPS 非生産株 (EPS⁻ 株) の病害抑制効果を調査した。

純粋培養および土壌で, *R. solanacearum* の EPS 生産能が低下あるいは欠損 (EPS⁻ 化) する条件を調査した。液体培養では, pH8 および 8.5, 高温 (37°C), および静置培養において EPS⁻ 集落が高頻度で検出された。また, 菌株により EPS⁻ 集落が高頻度で検出される条件は異なった。滅菌および非滅菌土壌においても, 弱酸性, 高温および土壌水分が最大容水量以上の場合に EPS⁻ 集落の検出率が高かった。

次に, *R. solanacearum* の EPS 生産株 (EPS⁺ 株) と非生産株 (EPS⁻ 株) を土壌に単独または同時に灌注接種し, トマト幼苗に与える影響を調査した。EPS⁻ 株を混合接種した場合, EPS⁺ 株単独接種と比較してトマト幼苗に対する病害軽減効果が認められた。土壌中の EPS⁻ 株の密度が EPS⁺ 株の密度より高いほど, 抑制効果も高まった。

以上の結果より, 土壌に生息する *R. solanacearum* の EPS 生産性を土壌管理によって EPS⁻ 化させた場合, 発病が抑制される可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり, 研究試料を提供いただいた, 東京大学 西山雅也先生, 山口大学 伊藤真一先生, 鹿児島県農業試験場大隅支場および鹿児島県茶業試験場の関係各位に謝意を表す。また, 貴重なご助言を賜った広島大学 新川英典先生に御礼を申し上げる。

最後に, 論文作成にあたり御指導を賜った山口大学 田中秀平先生に深謝致します。

引用文献

- 1) Arwiyanto, T., Goto, M. and Takikawa, Y. (1993) Characterization of bacteriocins produced by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 59, 114-122
- 2) Arwiyanto, T., Goto, M., Tsuyumu, S. and

- Takikawa, Y. (1994) Biological control of bacterial wilt of tomato by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Strelitzia reginae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **60**, 421-430
- 3) Arwiyanto T., Sakata, K., Goto, M., Tsuyumu, S. and Takikawa, Y. (1994) Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **60**, 288-294
 - 4) Boucher, C. A., Barberis, P. A., Trigalet, A. P. and Demery, D. A. (1985) Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: Isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 2449-2457
 - 5) Brumbley, S. M. and Denny, T. P. (1990) Cloning of the wild-type *Pseudomonas solanacearum* *phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. *J. Bacteriol.*, **172**, 5677-5685
 - 6) Cook, D. and Sequeira, L. (1991) Genetic and biochemical characterization of a *Pseudomonas solanacearum* gene cluster required for extracellular polysaccharide productivity and for virulence. *J. Bacteriol.*, **173**, 1654-1662
 - 7) 伊達寛敬・那須英夫・畑本 求 (1990) 促成栽培ナスの青枯病に対する太陽熱消毒および抵抗性台木などとの組み合わせ効果, 岡山農研試報, **8**, 25~30
 - 8) Denny, T. P. and Beak, S. R. (1991) Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **4**, 198-206
 - 9) Denny, T. P., Makini, F. W. and Brumbley, S. (1988) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum* Tn5 mutants defective in extracellular polysaccharide. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1**, 215-223
 - 10) Hayward, A. C. (1995) volume 1 Prokaryotes: *Pseudomonas solanacearum* In Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, Ed. U. S. Singh, R. P. Singh and K. Kohmoto, p. 139-148, Elsevier Science Ltd, Oxford
 - 11) 原 秀紀・古賀一浩・田中 博 (1995) タバコ立枯病菌分離定量用培地の改良, *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **61**, 255
 - 12) Hara, H. and Ono, K. (1991) Effect of weakly-virulent bacteriocin-producing strain of *Pseudomonas solanacearum* on the protection of tobacco plant from bacterial wilt. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **57**, 24-31
 - 13) 巖原美穂・境 雅夫・高木滋樹・横山和平・丸本卓哉, ナス科植物青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) の土壌中での動態解析を目的とした生態マーカーの導入, 土と微生物, 投稿中
 - 14) Kao, C. C., Barlow, E. and Sequeira L. (1992) Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.*, **174**, 1068-1071
 - 15) Kao, C. C. and Sequeira, L. (1991) A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.*, **173**, 7841-7848
 - 16) Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology*, **44**, 693-695
 - 17) 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
 - 18) Nishiyama, M., Shiomi, Y., Suzuki, S. and Marumoto, T. (1999) Suppression of growth of *Ralstonia solanacearum*, tomato bacterial wilt agent, on/in tomato seedlings cultivated in suppressive soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **45**, 79- 87
 - 19) 岡部徳夫 (1969) *Pseudomonas solanacearum* の土壌中における増殖性について, 静大農研報告, **19**, 1-29
 - 20) 尾崎克巳・木村俊彦 (1992) ナス科野菜青枯病細菌の生理型 (biovar) とその特徴, 中国農研報, **10**, 41-48
 - 21) 小野邦明 (1991) 拮抗細菌によるタバコ立枯病の防除, 植物防疫, **45**, 96-100
 - 22) Opina, N., Tavner, F., Hollway, G., Wang, J. -F., Li, T. -H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A. C., Krishnapillai, V., Hong, W. F., Holloway, B. W. and Timmis, J. N. (1997) A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, **5**, 19-33
 - 23) Shekhawat, G. S., Gadewar, A. V. and Chakrabarti, S. K. (1992) Spontaneous phenotypic reversion from afluoid to fluoid state in strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsl.*, **8**, 5-6
 - 24) Shekhawat, G. S. and Perombelon, M. C. M. (1991) Factors affecting survival in soil and

- virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Plant Dis. Prot.*, **98**, 258-267
- 25) 田中行久 (1979) タバコ立枯病菌の生態学的研究, 鹿児島たばこ試報, **22**, 1-82
- 26) 田中行久・野田二郎 (1973) タバコ立枯病菌の生存を支配する要因に関する研究, 岡試報告, **32**, 81-95
- 27) Toyota, K. and Kimura, M. (1996) Growth of the bacterial wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum* introduced into soil colonized by individual soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, **28**, 1489-1494
- 28) Trigalet, A. and Trigalet, D. D. (1990) Use of avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum* for biological control of bacteria wilt of tomato plants. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, **36**, 27-38
- 29) Winstead, N. N. and Kelman, A. (1952) Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, **42**, 628-634
- 30) 脇本 哲 (1993) 植物病原性微生物研究法, p. 459~460, ソフトサイエンス社, 東京