

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：27401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07299

研究課題名(和文) ナスの難防除性土壌病害に対する新規の複合防除技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel composite control technology for serious soil-borne diseases of eggplant

研究代表者

松添 直隆 (MATSUZOE, NAOTAKA)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：50239018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、青枯病菌の表現型変異株をナスに前接種することで、青枯病と半身萎凋病の発病を抑制できることを明らかにした。本病害防除に最適なPC株処理方法を検討し、PC株接種から病原菌感染までの期間が短いほど、両病害に対して高い防除効果が得られた。さらに、PC株による病害防除効果が高い台木品種(*Solanum torvum* cv. Tonashimu)を明らかにし、抵抗性台木との接ぎ木ナスにPC株を接種することで、青枯病と半身萎凋病を効果的に防除できることを実証した。

研究成果の概要(英文)： In this study, we showed bacterial wilt and Verticillium wilt diseases of eggplants were suppressed by pre-inoculation with phenotype conversion (PC) mutants of *Ralstonia solanacearum*. As a result of investigating the optimal inoculation method of PC mutants for two diseases control, the shorter the period from inoculation of PC mutants to infection with pathogens, the higher control effect was obtained for both diseases. Furthermore, we showed the resistant cultivar (*Solanum torvum* cv. Tonashimu) with high control effect by PC strains. We demonstrated that inoculation of PC mutant with the seedlings that were grafted the resistant rootstock were effectively control against bacterial wilt and Verticillium wilt diseases.

研究分野：園芸学

キーワード：青枯病 半身萎凋病 ナス 生物的防除 土壌伝染性 非病原性株

## 1. 研究開始当初の背景

我が国におけるナス・トマト栽培において、土壌伝染性病害である半身萎凋病および青枯病による被害が増加しており、安定的な生産を脅かしている。半身萎凋病は植物病原糸状菌 *Verticillium dahliae* により引き起こされる。本菌の生育適温は 20~25°C で、種により宿主範囲が異なり、ナス、トマト、ピーマン、キャベツ、ダイコンなど 300 種以上の植物に対して萎凋症状を引き起こす。また、青枯病はナス以外に、トマト、ピーマン、ジャガイモなど経済的に重要な作物をはじめとして 200 種以上の植物に激しい萎凋症状を引き起こし、甚大な被害をもたらす。青枯病の病原細菌である *Ralstonia solanacearum* の生育適温は 27~37°C であり、地球温暖化の進行により青枯病の被害が深刻化することが危惧されている。両病原菌とも多犯性で極めて多くの作物、雑草に寄生して、導管病を起こすことが共通している。

土壌病害の一般的な対策として、土壌くん蒸剤などによる土壌消毒、湛水、輪作、並びに抵抗性植物を台木とした接ぎ木栽培などが行われている。しかし、土壌くん蒸剤による土壌消毒は、土壌中の有用微生物まで死滅させるため、環境負荷が大きい。現在、最も効果的な防除法である接ぎ木栽培において、半身萎凋病に対して完全に抵抗性を示す台木用品種なく、青枯病に対しても、菌の多様な遺伝的変異によって、台木植物の抵抗性崩壊が起きている。また、半身萎凋病(糸状菌)と青枯病(細菌)は生育適温(発病時期)、病原体の生態が異なることから、半身萎凋病と青枯病の発病を安定的に防除することは非常に困難である。これらのことから、半身萎凋病と青枯病を複合的に防除できる環境保全型の新規防除法の確立は急務の課題である。

環境保全型の防除法として、微生物を利用した防除法の研究が進められている。青枯病菌は、土壌、植物、液体培地中で表現型変異し、非病原性株(PC株)に変異することが知られている。また、ナス・トマト・ジャガイモなどのナス科植物にPC株を前接種すると、病原性株感染後の青枯病の発病が抑制されることが明らかになっている。本防除効果は、青枯病に対してはいくつかの研究例において調査されているが、他の病害に対する防除効果は不明である。そこで、PC株を利用して、青枯病だけでなく半身萎凋病を防除することが可能であれば、PC株を利用した環境保全型の新規防除法の開発に寄与すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、青枯病菌のPC株を利用してナスの難防除性土壌病害である半身萎凋病

と青枯病を複合的に防除するシステムを確立するため、以下の3つの研究課題を重点的に進めた。

(1) 半身萎凋病防除に最適なPC株処理条件を検討するために、PC株による半身萎凋病防除に効果的な栽培温度、PC株の接種濃度および半身萎凋病菌の汚染濃度を明らかにし、さらに、PC株による防除効果が得られにくい条件でも高い防除効果を発揮するPC株をスクリーニングした。

(2) 微生物を利用した防除法では、多くの品種に対して防除効果を発揮することが望ましく、PC株による青枯病の防除効果には、ナス・トマト・ジャガイモにおいて品種間差異があること、ナス・トマト・ジャガイモに共通して高い防除効果を発揮するPC株を明らかにしており、本課題では、研究課題(1)で得られた効果的なPC株を用いて、半身萎凋病に対する防除効果のナス品種間差異の調査した。

(3) 実用化に向けたPC株処理技術の検討として、青枯病・半身萎凋病の防除に最適なPC株の処理時期の検討と、接ぎ木苗へのPC株処理による青枯病と半身萎凋病に対する防除効果を明らかにし、両病害を複合的に防除できるシステムを考察した。

## 3. 研究の方法

(1) 半身萎凋病防除に最適なPC株処理条件の検討

青枯病菌のPC株として、8103PC株を供試し、PC株の生菌液 ( $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>)、PC株の培養ろ液、PC株の熱処理死菌液、および滅菌水(対照区)をナス(*Solanum melongena* L.) '千両二号'の根部に30分間浸漬接種した。植物を半身萎凋病菌 ( $10^6$  孢子 g<sup>-1</sup>) の汚染土壌に移植後、28日後の病徴から発病度を評価した。病徴調査は、各葉における病徴の程度を「無病徴=0」、「黄化・黄変=1」、「萎凋=2」、「落葉=3」として評価し、発病度 [発病度 (%) =  $\sum$  (各葉における病徴の程度) / (3×展開葉数) × 100] を算出した。

また、PC株の生菌液を同様の方法でナス'千両二号'に接種し、PC処理後の栽培温度(20, 25, 30°C)、PC株菌液の接種濃度 ( $10^2$  ~  $10^9$  cfu mL<sup>-1</sup>)、土壌中の半身萎凋病菌の汚染濃度 ( $10^2$  ~  $10^8$  孢子 g<sup>-1</sup>) の差異が防除効果に及ぼす影響を調査した。さらに、系統の異なるPC株27菌株の菌液を供試し、ナス半身萎凋病防除に効果的なPC株をスクリーニングした。

(2) PC株による半身萎凋病防除効果のナス品種間差異

ナスの食用品種(*S. melongena*) 13品種とナス属台木用品種(*S. torvum*, *S. integrifolium*)、およびナス属交配品種) 6品種を供試した。8107PC株の菌液 ( $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>) を植物の根部に30分間浸漬接種し、半身萎凋病菌 ( $10^6$  孢子 g<sup>-1</sup>) の汚染土壌に移植後、防除効果を

調査した。

(3) 実用化に向けた PC 株処理技術の検討  
3-1. ナス種子への PC 株処理が発芽および生育に及ぼす影響

無菌条件下で、異なる濃度 ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>) の PC 株菌液を染み込ませたる紙上に、ナス‘千両二号’の種子を置床し、15 日後の発芽率 (幼根の出現)、幼根および胚軸の長さを調査した。また、滅菌水を染み込ませたる紙上にナス種子を置床し、4 日目 (幼根 2-3 mm) と 10 日目 (幼根 10-20 mm) の個体を異なる濃度の PC 株菌液を染み込ませたる紙上に移し、15 日後の幼根および胚軸の長さを調査した。さらに、異なる濃度の PC 株菌液と土壌 (バーミキュライトおよび培養土) を 2:1 (v/w) で混和した土壌にナス種子を播種し、14 日後の出芽率を調査した。

3-2. 青枯病防除に最適な PC 株の処理時期の検討

培養土を充填したセルトレイにナスを播種し、ビニルハウスで育苗した。播種後 0 (種子)、16 (子葉)、33 (1-2 葉齢)、56 (3-4 葉齢)、63 (3-5 葉齢、本接種 7 日前)、69 (4-5 葉齢、本接種 1 日前) 日目に  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup> に調製した PC 株の菌液を 1 個体あたり 12 mL 灌注接種した (前接種)。また、PC 株を接種しない無接種区、毎回 PC 株を接種する毎回接種区を設けた。4-5 葉齢に生長した苗を、培養土を充填した 9 cm ビニルポットに移植し、 $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup> に調製した病原性株の菌液を 20 mL 灌注接種した。ビニルハウスで 21 日間管理し、病徴を 0 (無病徴) ~ 4 (76% 以上の葉が萎凋または枯死) で評価した。

3-3. 半身萎凋病防除に最適な PC 株の処理時期の検討

PC 株の前接種は、以下の方法を行った。

1) 灌注接種法: ナス‘千両二号’の 5 葉齢ポットをメスで断根し、PC 株菌液 ( $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>) を 20 mL 灌注し、7 日後に半身萎凋病菌の菌液 ( $10^6$  孢子 mL<sup>-1</sup>) を 20 mL 灌注接種した。2) 浸漬接種法: セルトレイで育苗した 5 葉齢苗の下部 5 mm の根を断根し、PC 株菌液に 30 分浸漬接種し、半身萎凋病菌の菌液 ( $10^6$  孢子 mL<sup>-1</sup>) を 20 mL 灌注接種したポットに移植した。3) 幼苗時接種法: 約 1/3 の根を切除したナス幼苗に PC 株を浸漬接種し、セルトレイに移植し、5 葉齢苗まで育苗後、半身萎凋病菌の菌液 ( $10^6$  孢子 mL<sup>-1</sup>) を 20 mL 灌注接種したポットに移植した。対照区として、滅菌水を各方法と同様に処理し、半身萎凋病菌を接種した区を設けた。

(4) 接ぎ木苗への PC 株処理による青枯病と半身萎凋病に対する防除効果

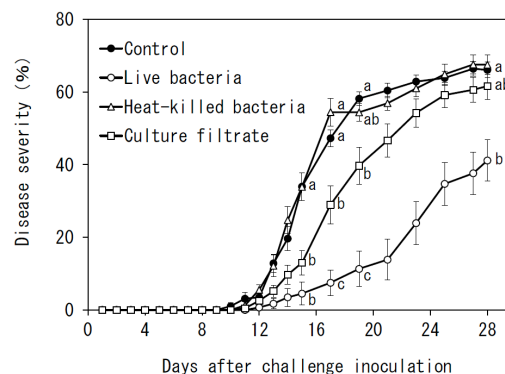
青枯病と半身萎凋病に効果的な台木として‘トナシム’を選定し、穂木として、‘千両二号’と接ぎ木した苗 (接ぎ木苗) と、接

ぎ木を行わない‘千両二号’の苗 (自根苗) を供試し、滅菌水または PC 株を浸漬接種した。すなわち、自根苗への滅菌水接種区 (対照区)、自根苗への PC 株接種区、接ぎ木苗への滅菌水接種区、接ぎ木への PC 株接種区を設け、青枯病と半身萎凋病のそれぞれの病害防除効果を調査した。

#### 4. 研究成果

(1) 半身萎凋病防除に最適な PC 株処理条件の検討

28 日後の半身萎凋病の発病度は、PC 株の死菌液や培養液を処理したナスでは、対照区との有意な差はなく、防除効果は認められなかった。一方、PC 株の生菌液を接種した半身萎凋病の発病度は、対照区と比べて有意に低く、防除効果が認められた (第 1 図)。



第 1 図. PC 株によるナス半身萎凋病菌の発病抑制効果。

図中のバーは標準誤差を示し、異なる英字は、Tukey-Kramer test による有意差 ( $p < 0.05$ ) を示す。n=24。

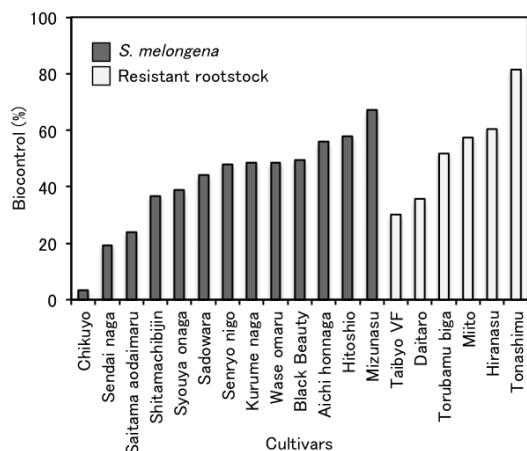
PC 株による防除効果は、PC 株接種後の栽培温度が 30°C 区では 83% と高く、25°C 区と 20°C 区では 32~38% と低かった。PC 株の接種濃度が高いほど、防除効果は高くなり、 $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup> では防除効果 54%、 $10^9$  cfu mL<sup>-1</sup> では防除効果 64% であった。一方で、土壌における半身萎凋病菌の汚染濃度が  $10^6$  孢子 g<sup>-1</sup> 以上では、PC 株 (接種濃度:  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup>) による防除効果が 30% 以下と低かった。

PC 株による半身萎凋病の防除効果が得られにくい接種条件 (温度 25°C、半身萎凋病菌の汚染濃度  $10^6$  孢子 mL<sup>-1</sup>) において、系統の異なる PC 株 27 菌株の防除効果を調査したところ、防除効果 60% 以上の高い防除効果を示す PC 株が 5 菌株得られた。その中でも 8107PC 株は、防除効果 70% 以上の最も高い防除効果を示した。

(2) PC 株による半身萎凋病防除効果のナス品種間差異

半身萎凋病に対する防除効果が高かった 8107PC 株を用いて、複数の食用ナス品種における防除効果を調査したところ、PC 株による防除効果は、ナスの品種によって異なり、

防除価 3~81%の範囲で品種間差異が確認された(第2図). また, 供試した台木用品種の中で完全に半身萎凋病の発病を抑制する品種はなく, 台木用品種に PC 株を接種することで, 防除効果が高まった.



第2図. PC株接種による半身萎凋病菌の防除効果のナス品種間差異. n=24-36.

### (3) 実用化に向けた PC 株処理技術の検討 3-1. ナス種子への PC 株処理が発芽および生育に及ぼす影響

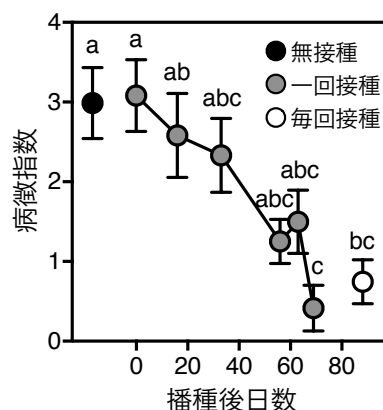
ろ紙上で種子に PC 株を接種すると, 菌濃度に依らず高い発芽率であったが, 幼根と胚軸の伸長は抑制された. また, 発芽後の個体に PC 株を感染させても幼根と胚軸の伸長は抑制された. このことから, ナス種子への PC 株感染は, 発芽に影響しないが, その後の生長を抑制することが明らかになった. また, PC 株を混和したバーミキュライトでは, 菌濃度依存的に出芽率が低下したが, 培養土では高い出芽率であったことから, 土壌の緩衝能で PC 株による生長への影響は抑えられ, その緩衝能はバーミキュライトより培養土の方が大きいと考えられた.

### 3-2. 青枯病防除に最適な PC 株の処理時期の検討

青枯病の発病は, PC 株の前接種から青枯病菌の病原性株の本接種までの期間が短い方で抑制される傾向にあった(第3図). また, 本接種前日に1回接種した区と定期的に6回接種した区の発病抑制効果は同等であった. PC 株接種の労力と発病抑制効果を考え合わせると, ナスの苗生産において出荷直前に PC 株を一度だけ接種することが, 定植直後の青枯病の発病抑制に有効であると考えられた.

### 3-3. 半身萎凋病防除に最適な PC 株の処理時期の検討

それぞれの方法で PC 株を前接種後, 半身萎凋病菌を本接種してから 28 日目の防除効果を調査したところ, 5 葉齢苗ポットに PC 株菌液を灌注する方法(灌注接種法)では,



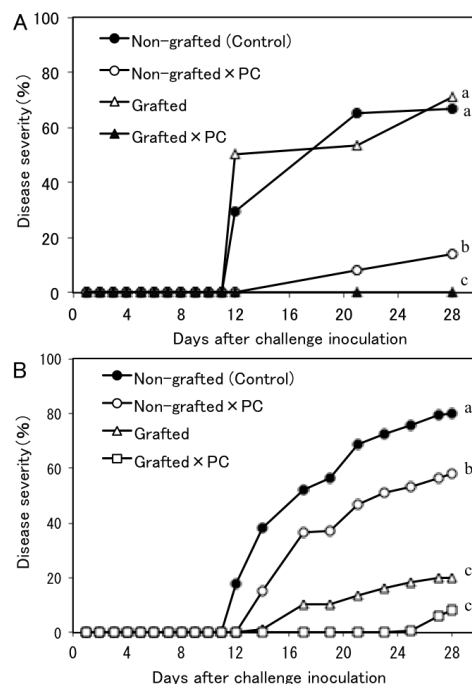
第3図. ナス育苗における PC 株接種時期が青枯病発病抑制に及ぼす影響.

図中のバーは標準偏差を示す. 異なる英字には Dunn's multiple comparisons test により有意差があることを示す ( $p < 0.05$ ). n=10-12.

防除価 25%, PC 株を浸漬接種した幼苗をポットに移植し 5 葉齢苗まで育苗する方法(幼苗時接種法)では, 防除価 16%であったのに対して, 苗を半身萎凋病菌汚染土壌に移植する直前に PC 株菌液を浸漬する方法(浸漬接種法)では, 防除価 42%と高かった.

### (4) 接ぎ木苗への PC 株処理による青枯病と半身萎凋病に対する防除効果

青枯病の防除効果は, 自根苗/無接種区 < 接ぎ木苗/無接種区 ≤ 自根苗/PC 接種区 < 接ぎ木苗/PC 接種区の順であった(第4図A). 半身萎凋病の防除効果は, 自根苗/無接種区 < 自根



第4図. 接ぎ木苗への PC 株接種によるナス半身萎凋病菌の発病抑制効果.

図中の異なる英字は, Tukey-Kramer test による有意差 ( $p < 0.05$ ) を示す. n=24.

苗/PC接種区<接ぎ木苗/無接種区<接ぎ木苗/PC接種区の順であった(第4図B)。

接ぎ木苗では供試した苗の約半数で各病害の発病がみられたが、接ぎ木苗にPC株を接種した場合には、半身萎凋病の発病を約90%抑制でき、青枯病に対しては発病を完全に抑制することができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

①前原祥大, 中原浩貴, 森 太郎, 松添直隆, *Ralstonia solanacearum* 非病原性変異菌株を利用したナス半身萎凋病の生物的防除, 園芸学研究, 16(4), 497-502, 2017, 査読有.  
DOI : 10.2503/hrj.16.497

②中原浩貴, 森 太郎, 松崎弘美, 松添直隆, 土壤中と植物内における青枯病菌の野生株と表現型変異株との競合, 植物環境工学, 28(3), 133-141, 2016, 査読有.  
DOI : 10.2525/shita.28.133

③ Nakahara H., T. Mori, N. Sadakari, H. Matsusaki, N. Matsuzoe, Selection of effective non-pathogenic *Ralstonia solanacearum* as biocontrol agents against bacterial wilt in eggplant, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123(3), 119-124, 2016, 査読有.  
DOI : 10.1007/s41348-016-0019-y

④ Nakahara H., T. Mori, N. Sadakari, H. Matsusaki, N. Matsuzoe, Biological control of the bacterial wilt of the tomato 'Micro-Tom' by phenotypic conversion mutants of *Ralstonia solanacearum*, *Environmental Control in Biology*, 54(3), 139-145, 2016, 査読有.  
DOI : 10.2525/ecb.54.139

⑤ Nakahara H., T. Mori, H. Matsusaki, N. Matsuzoe, Growth inhibition of the *Ralstonia solanacearum* wild-type strain in a culture filtrate of phenotypic conversion mutant strain, *Environmental Control in Biology*, 54(3), 133-138, 2016, 査読有.  
DOI : 10.2525/ecb.54.133

[学会発表] (計9件)

① Nakahara H., T. Mori, H. Matsusaki, N. Matsuzoe, Inhibition of *Ralstonia solanacearum* wild-type strains and production of antibacterial substances in culture filtrates of phenotype conversion mutants, 2017 Asian Conference on Plant Pathology, Jeju, Korea, September 13-16 2017.

②中原浩貴, 勝野英美, 松崎弘美, 森 太郎, 桐村聡子, 松添直隆, 青枯病菌の表現型変異株が培養液中に生産する抗菌物質の特性, 日本農業気象学会九州支部・日本生物環境工学会九州支部 2017年合同大会, 北九州, 2017

年11月24~25日.

③森 太郎, 林 優花, 中原浩貴, 松添直隆, ナス種子への青枯病菌表現型変異株の感染が発芽および生長に及ぼす影響, 園芸学会近畿支部滋賀大会, 滋賀, 2017年9月20日.

④吉川麻璃萌, 中原浩貴, 鶴田純子, 森 太郎, 松添直隆, ナス科植物(ジャガイモ・ナス・トマト)における青枯病発病抑制効果の高い非病原性 *Ralstonia solanacearum* の選抜, 日本農業気象学会九州支部・日本生物環境工学会九州支部 2016 合同大会, 鹿児島, 2016年11月25~26日.

⑤前原祥大, 中原浩貴, 森 太郎, 松添直隆, 非病原性 *Ralstonia solanacearum* によるナス半身萎凋病防除効果の品種間差, 平成28年度日本植物病理学会九州部会, 佐賀, 2016年11月9~10日.

⑥中原浩貴, 森 太郎, 松崎弘美, 松添直隆, 非病原性 *Ralstonia solanacearum* の植物内定着が青枯病菌の定着に及ぼす影響, 平成28年度日本植物病理学会九州部会, 佐賀, 2016年11月9~10日.

⑦中原浩貴, 小松亜璃沙, 松崎弘美, 森 太郎, 松添直隆, トマト植物内における蛍光標識した青枯病菌の挙動観察, 日本土壌微生物学会2016年度大会, 岐阜, 2016年6月11~12日.

⑧中原浩貴, 前原祥大, 森 太郎, 松崎弘美, 松添直隆, 青枯病菌の表現型変異株によるナス半身萎凋病の防除, 平成28年度日本植物病理学会本大会, 岡山, 2016年3月21~23日.

⑨前原祥大, 中原浩貴, 森 太郎, 松崎弘美, 松添直隆, 非病原性 *Ralstonia solanacearum* によるナス半身萎凋病の生物的防除, 平成27年度日本植物病理学会九州部会, 長崎, 2015年11月11~12日.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松添直隆 (MATSUZOE, Naotaka)  
熊本県立大学・環境共生学部・教授  
研究者番号 : 50239018

### (2)研究分担者

森 太郎 (MORI, Taro)  
滋賀大学・教育学部・准教授  
研究者番号 : 90725053