

はじめに

植物の生育を促進し、増収をもたらすような根圏着生能を持った細菌群に対して名付けられたのが植物生育促進性根圏細菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria: PGPR) であり、この分野での研究は拮抗微生物利用による病害防除研究と密接な関係を保ちながら、地球規模での環境保全そして生態系活用型農業指向の高まりのなか国内外で活発に行われようとしている。

このような背景下、兵庫県では産官学共同研究の農業関連課題の一つとして平成4年度から3ヵ年計画で神戸大学、兵庫県立中央農業技術センター、多木化学の三者による推進体制で『植物生育促進性根圏細菌 (PGPR) の多面的機能と生態特性に関する研究』が実施された。この共同研究の成果として約3万菌株にもおよぶPGPRライブラリーが完成したことにより、根圏細菌の有する多機能性に関するデータや、特定の菌株での抗菌活性物質産生能と発病抑制との関連などの学術的な成果が得られ、相野 (兵庫中央農技)、真山 (神戸大学) らにより学会発表も行われている。また、これら基礎研究レベルでの成果のなかには、トマト根内で生息する蛍光性細菌の存在¹⁾や、その存在を共生植物体からの代謝物質により明らかにしたこと等も含まれている。これら研究成果は、PGPRの実用化研究において、これまでの拮抗微生物の特定機能を活かす生物工学的手法による利用研究だけでなく、根圏細菌が自然生態系で有する多機能を活かした生物学的手法による新たな展開をもたらした。

本報告では、共同研究の成果のなかから、応用研究に関する内容即ち、植物根内部に共生することによって、発病抑制機能あるいは植物生育促進機能の認められた蛍光性細菌 (植物内生型蛍光性細菌) とそれを利用したバイオプラグ培土の開発に至った経緯について述べる。

基礎研究について

兵庫県立中央農業技術センターを中心に行われた根圏細菌の検索において、県内の作物根圏から約3万菌株が分離された。そして、機能検定によりこれらの分離菌が抗菌活性物質の産生能、植物生育促進能、リン溶解能、農薬 (シマジン) 分解能等の多面的機能を有することが明らかとなった。また、シードリングチャンバー法による青枯病発病抑制機能の検定において顕著な発病抑制効果を示す菌株が、タイプ培養では青枯病菌に対して全く抗菌性を示さないケースや鉄イオンの存在の有無で発病抑制効果が大きく変化する等、*in vitro*での抗菌活性試験の結果では説明できない事例も多く認められた。一方、作物根より分離した抗菌活性物質産生菌のなかで、モニタリングが可能な菌株 (*Pseudomonas putida* FP-16) をトマト種子に接種し、育苗後に根面及び根内から接種菌を検索した結果、根皮相細胞間で接種菌が生息していることが確認された。このことは、以後の植物内生型蛍光性細菌の利用への大きな指針となった。

また、神戸大学を中心に青枯病発病抑制効果を有する分離菌株が産生した抗菌活性物質の同定が行われた。同定は、*Pseudomonas putida* FP-16の産生する水溶性の抗菌活性物質と

Pseudomonas fluorescens T-32 が産生する非水溶性の抗菌活性物質²⁾の2物質について行われた。これらの抗菌活性物質は分離精製の過程において、通常の条件下では酸化もしくは加水分解等により構造が変化するとともに活性の低下が認められた。このような変化が活性構造を決定する上で障害となったが、最終的に前者は分解物相互の解析結果から糖構造を有するペプチド化合物と推定し、後者は全構造を2,4-Diacetylphloroglucinol (以下、2,4-DAPhI と略す)と同定した。しかし、2,4-DAPhI (結晶状)は、通常の雰囲気下では空気酸化により透明の針状結晶が暴露時間とともに白色から褐色へと変化し、UV_{365nm} 照射下の蛍光色も青白色から黄緑色に変化した。この変化により、グラム陰性細菌に対する抗菌活性が顕著に低下することが確認された。さらに、青白色蛍光を有する非酸化状態の2,4-DAPhI は、植物由来のパロオキシダーゼあるいは無機酸化触媒の基質として作用し、グラム陰性細菌に対する抗菌活性が2,4-DAPhI よりも高い物質に変換された。一方、酸化状態の2,4-DAPhI は両触媒に対して基質として作用しなかった。しかし、現在の精密機器分析においては、非酸化状態の2,4-DAPhI も酸化状態の2,4-DAPhI と同一の物性データしか得られず、活性構造を言及できるまでには至らなかった。ただ、容易に酸化される構造である非酸化状態の2,4-DAPhI そのものが自然生態系において抗菌活性物質として作用するかどうかは不明である。

2,4-DAPhI については、*Pseudomonas fluorescens* が産生する抗生物質であり、グラム陽性細菌、放線菌、糸状菌に対して抗菌活性を示すことが明らかにされており³⁾、最近では土壌伝染性糸状菌に対する抗菌活性⁴⁾やグラム陰性菌に対する抗菌活性⁵⁾も報告されている。これらの抗菌活性機能を利用して糸状菌病害に対する拮抗微生物として、2,4-DAPhI等の抗菌活性物質産生能を有する当該菌の利用が図られようとしている⁵⁾。

そこで、*Ps. fluorescens* T-32についてタイプ培養及び共生培養下での2,4-DAPhI の産生挙動と青枯病発病モデル系での物質代謝について検討を行った。2,4-DAPhI は増殖の抑制される貧栄養培地では微細な結晶(青白色蛍光物質)として産生が認められたが、富栄養培地では同物質の産生は認められず酸化物(黄色蛍光性物質)がわずかに確認された。一方、植物体の存在下即ち、bacteria-freeのトマト根端に接種した後に根端培養を行うと、根表面に数mmの結晶として2,4-DAPhI の産生が認められ、根端の断面をレプリカするとグラム陰性細菌の分布が認められた。しかし、トマト bacteria-free苗に接種した場合には、根外に構造相関を示さない褐変物質(青枯病菌を抵抗性品種に接種した際にも代謝される糖構造を有すると推定される物質)の代謝は認められたが、2,4-DAPhI と構造相関を有する物質は根外では検出されなかった。さらに、この系に青枯病菌を後接種すると再び根外に褐変物質の代謝が認められた。この物質は2,4-DAPhI と構造相関を有する物質であることが核磁気共鳴分析の結果により確認された。このモデル系では、青枯病菌による発病が接種後1か月間認められなかった。発病の認められなかったトマト苗を表面殺菌後に根部を切り離し、平板培養基に置床すると2,4-DAPhI の大型結晶が、増殖したコロニーの周辺で認められた。

一連の検討は、植物内生型蛍光性細菌の存在を、物質レベルで裏付ける結果となっただけでなく、根内部共生能を有する蛍光性細菌等では、植物体との共生下において、両者の相互作用により、微生物のタイプ培養とは異なる物質の産生あるいは植物起源の物質の微生物変換の可能性も示唆した。

開発研究への移行

基礎研究の成果をもとに、より生態系に調和した微生物資材として、根圏細菌を利用することも共同研究における重要な目的であった。そこで、拮抗微生物を利用した病害防除研究における問題点として指摘されている効果の再現性と効果の持続を、改善することも視野にいれながら、根圏細菌の生態系での動態を解明しつつ、自然生態系に存在しているときに根圏細菌が獲得していた有用な機能を利用する途を探る方向で開発研究を行った。まず、移行に必要な要件である①利用しようとする微生物の機能の特定と、②その機能を保持させるための技術開発について検討が必要となった。企業においては、前者は品質管理の指標であり、後者は製造技術そのものに置きかえることができる。3年間という研究期間、これまでの知見及び現有の技術レベルを総合的に判断し、基礎研究において存在が明確になってきた植物内生型蛍光性細菌に的を絞ることにした。特に、②の技術開発の可能性において、根内環境であれば自然生態系と類似の外部培養系を植物体を利用して構築することが可能と判断したからである。従って、①の機能については、まず作物根内での生息能から次第に利用機能の特定へと検討を進めることにした。作物根内部での共生能は、効果の再現性と持続性においても重要な生育特性と判断した。また、植物内生型蛍光性細菌に関する一連の研究は、植物生理あるいは植物病理と微生物生理の相互の学術境界領域での検討となったことから、応用微生物学の分野における新たな微生物源としての可能性を探る貴重な機会にもなった。

まず、スクリーニング法から検討を開始した。自然界でも作物根内といった特殊な生態系から微生物を分離し、再び根内へ『社会復帰』させることを手段とした資材の開発であることから、新たに分離する菌株については、自然生態系での機能を失活させないように自然界における栄養条件と生息温度に注意を払って、分離作物根に由来する栄養源のみの貧栄養培地を用いて作物採取時の地温に近い温度で分離培養を行い、約 800 菌株を分離した。また、すでに兵庫県立中央農業技術センターで分離・検索された約 3 万菌株の根圏細菌については、青枯病発病抑制機能の検索により選抜された 17 菌株を対象としてトマト根内部での共生機能を保持している菌株を選抜することにした。この選抜方法には、自然界から分離した菌株の活性を維持させるために考案した『社会復帰』法を用いた。

『社会復帰』法には、bacteria-free のトマト根端培養根及びトマト苗との共生培養系を用いた⁶⁾。この共生培養系を用いて、根断面のレプリカあるいは表面殺菌根からのコロニー形成等によって根内で生息する能力を有する菌株を選抜した。さらに、選抜したトマト根内生型細菌の中から再び発根促進機能と青枯病発病抑制機能を bacteria-free 苗及びその断根苗を用いた系で検定し、これらの機能を有する非病原性の植物内生型蛍光性細菌 8 菌株を選んだ。最終的に、これら 8 菌株について詳細な機能解明と資材化に関する検討を開始した。

植物通過を利用した『社会復帰』株の保存

選抜した菌株の機能維持には『社会復帰』法で用いた植物通過を利用し、また bacteria-free の植物培養細胞と栽培植物との反復往復運動を行うことにより菌株の形質を揃えた。この段階で、4 菌株の植物通過には、通常の栽培条件下でモニタリングが可能であったことから、栽培植物には通常のセル成型育苗に近い条件で育苗した苗を用いた。他の 4 菌株は bacteria-free 苗を用いた。これらの方法によりトマト幼苗への『社会復帰』が可能と

考えられる植物内生型蛍光性細菌の保存を行った。保存後の植物通過株とタイプ培養株の生育特性を *in vitro* で同時検定を行った結果、両者の増殖特性と物質産生に顕著な相違が認められた。しかし、この植物通過株を通常の継代培養等により培養を繰り返すと増殖及び二次代謝機能に変異を生じ、次第にタイプ培養株と同特性に変化することが明らかとなった。このことは、品質管理指標として植物通過株の生育特性を明確にしておくことと、大量培養法の開発においても植物通過が内部共生時の生育特性を維持させるために必要であることを示唆するものであった。

固定化資材の製造

そこで、試作品製造工程における大量培養でも植物通過法を用いることにした。試作品製造の概略は、以下の通りである。

- ① seed culture を製造する第一工程では、植物根との片利共生培養により接種菌を根内で増殖させた後に、植物根内に存在するフェノール物質を酸化させないように根細胞とともに固定化微生物調製法によりゲル内の塩類濃度を 1% 以上 2% 未満で外径 3 mm ~ 5 mm の球状の固定化複合細胞とした。
- ② この固定化複合細胞を seed culture として培養液に対して 0.1 ~ 0.5 v/v% 接種し、培養系を低溶存酸素、低有機物条件に制御して $10^8 \sim 10^9$ cells/ml の菌体を製造した（大量培養工程）。
- ③ このようにして得た菌体を最終の資材化工程でバクテリゼーション用の固定化資材（液剤、粉剤、セル成型苗用培土）に調製した。

各工程において植物通過株の特性（主に代謝物質）を指標に品質管理を行った。例えば、*Pseudomonas fluorescens* T-32 の場合には 2,4-DAPhI 結晶の産生を *in vitro* で検定し、品質管理指標とした。

固定化資材による『社会復帰』の確認と問題点

人工気象器内で育苗したトマト幼苗の根内での固定化資材中の植物内生型蛍光性細菌の定着状態及び本圃定植後の生育調査及び青枯病発病抑制試験の結果から、セル成型苗用培土に植物内生型蛍光性細菌を固定化した培土（バイオプラグ培土）が安定した定着株率及び根内定着率を示し、青枯病重汚染土壌において最も高い発病抑制効果を示した。また、根内定着率と防除価に正の相関が認められた。

しかし、農家段階でバイオプラグ培土をトマト抑制栽培でのセル成型育苗に適用する際の問題点も明らかとなってきた。固定化資材中の微生物の生育温度域の上限を栽培時の環境温度が上回っていることが大きな障害となってきた。資材に使用した植物内生型蛍光性細菌のタイプ培養下での生育特性の検討では、生育上限は 40°C 前後であり 40°C で培養した場合には増殖後ただちに菌体が凝集し、凝集した菌体は培養を継続しても増殖機能は回復せず、35~37°C では二次代謝物の生産能あるいは物質変換能が消失が認められていた。現地試験では、施設内温度は日中は 40°C 以上で夜間でも 40°C に近い状態で推移した。この期間中に施設内で播種・育苗したセル成型苗の根内からは当該菌は再分離されなかった。ところが、30°C 以下でバイオプラグ培土によりセル成型育苗を行い、根内定着させた苗を同施設内に定植し、数週間後に根内定着状況の調査を実施したところ、定植株の約 30%（罹病及び高温障害による萎凋株を除く）の根内から当該菌が再分離された。この再分離株は、

35℃以上の培養で認められた代謝機能及び増殖能の消失は認められなかった。このことは、予め植物内生型蛍光性細菌を根内に潜伏寄生させることにより、施設内温度が生育限界を越える高温条件であっても、当該菌が根内で生息できることを示すものである。かかる状態で当該菌が生育するのは、植物体の恒常性維持機能と密接な関連があるものと推定される。

限界はあるが、資材の適用範囲を抑制栽培期の施設栽培にまで広げることが実用化には不可欠であることから、ある程度の栽培管理が可能な播種から育苗の段階で、当該菌を潜伏寄生させることに的を絞り、固定化に使用する微生物の改良と受け入れる植物側の制御を品種特性も含めて検討を行うことにした。

以下に、潜伏寄生を可能にするための対応策と対応に目処がたったいくつかの技術を紹介する。

- ①固定化に使用する微生物の改良として、植物内部共生能を有する菌株を用いて作型に応じた高温適応株を作出し資材化する。
- ②植物体を制御することにより迅速かつ確実に資材中の微生物を根内に定着させる資材（根内定着補助資材）の開発及び育苗技術を確立する。
- ③さらに、トマト抑制栽培での施設栽培用品種への対応と根圏微生物環境の変化に対応させるため、相互に排他性を示さない複数の内生型蛍光性細菌固定化資材の開発と組合せ技術を確立する。

①については、植物通過（バイオプラグ培土での高温育苗）により適応株を作出した。②については播種・育苗時の栽培条件の検討と、後述する根内定着補助資材で対応した。③については、まず*in vitro*における植物内生型蛍光性細菌相互の排他性と植物体根内での相互定着の結果等により組合せが可能な菌株を検索した。次ぎに、個々に固定化した資材を混合してセル成型育苗を行い、根内定着能、発病抑制効果及び植物生育に与える影響を調査して単独時の効果よりも優れている2菌株と3菌株からなる二組の組合せを見いだした。

根内定着補助資材

生物学的手法で微生物の植物内部共生能及び高温耐性能を高めることには限界があり、農家での育苗における物理的（温度、湿度）制御にも限界がある。そこで、農家での栽培管理が比較的容易に行える播種から催芽までの短期間に植物側を制御し、その間に微生物を根内に潜伏させることを試みた。

植物体を制御する物質として、過去の検討において検索した天然物質の中から『下肥』由来の嫌気発酵生産物（HPP：N-[3-(4-Hydroxyphenyl)propionyl]piperidin-2-one）を選んだ。この物質は、低濃度（5 mg/ℓ以下）においては放線菌、根粒菌、ビフィズス菌等の細胞分化能を有する原核細胞微生物に対して、形態分化を誘導する作用を有しており⁷⁾、高濃度域（20mg/ℓ以上）においてはナス科作物の根外への物質代謝を誘導し、かつ根内のフェノール物質の代謝及び抵抗性誘導に関与する酵素（パーオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、グルコシダーゼ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ）系を制御する作用が、トマト幼苗を使用した試験における処理後の植物体分析の結果から明らかとなった^{8) 9)}。この高濃度域でのHPPの作用をセル成型育苗の段階で応用し、培土に固定化した植物内生型蛍光性細菌を根内に侵入させる試験を行った。この試験で、HPPを

バイオプラグ培土と併用することによりトマト抑制栽培期の農技センター試験及び農家試験でのセル成型育苗段階で、当該菌の根内定着率が高くなることが確認された。HPPによる根内定着促進作用は、当該菌に対する特異的な作用ではなく、グラム陰性細菌の根内への侵入を容易にすることにより相対的に根内定着を促進したことが明らかとなってきた。また、HPPが前述の植物生体内酵素に対し賦活剤としての作用することも明らかとなってきた。

バイオプラグ培土と根内定着補助資材による効果確認試験

平成6年度には、これら一連の共同研究から得られた基盤技術をもとに、バイオプラグ培土（植物内生型蛍光性細菌固定化資材）及び根内定着補助資材の製造と効果確認試験（兵庫県立中央農業技術センター内青枯病発病圃場及び県内トマト栽培農家の施設栽培圃場を使用）を実施した。いずれの試験もバイオプラグ培土（培土1gからの植物内生型蛍光性細菌の分離頻度は 10^7 cfu～ 10^8 cfu）を使用してセル成型育苗を行った。セル成型育苗後の幼苗では当該菌が全根長に対して%オーダーで根内定着することを確認した。

定着苗の本圃定植後の発病抑制効果については、兵庫県立中央農業技術センター内青枯病発病圃場では約40%の防除価を示し、作期を通しての発病率が20%程度の抑制栽培農家においては、試験区での発病株は認められなかった。

また、作型の異なるトマト促成栽培農家試験（トマト根腐萎凋病及び根腐疫病による被害程度が50%前後）では、植物通過により改良した低温型の菌株を固定化したバイオプラグ培土を用いて、抑制栽培と同様の検討を行った。根内定着率は抑制栽培よりも高い値となった。前年度の発病区に定植した定着苗の定植後4か月の罹病調査では発病株は認められなかった。収量調査では6段までは完全収穫であったが、収穫終了期の1ヵ月間（7段、8段）に発病が認められ、この期間の収穫量は40%程度減少した。しかし、通期では前年と比較して約2倍の収穫量であった。

バイオプラグ培土でセル成型育苗を行った苗は、セル育苗時は地上部で矮化傾向が認められたが根部では生育促進効果が認められた。従って、苗が徒長しやすい抑制栽培期においては節間の詰まった苗として、促成・半促成栽培においては吸肥力の高い苗として本圃に定植することが可能で、本圃定植後は活着も良好で生育ステージの遅れもなく栽培できることから、育苗資材として農家に普及させることも可能と考えている。

バイオプラグ培土でセル成型育苗を行った植物内生型蛍光性細菌定着苗の抵抗性

兵庫県内における抑制栽培期の施設栽培用トマト（品種：桃太郎、桃太郎8、ハウス桃太郎、メリーロード、甘太郎ジュニア等）のバイオプラグ培土によるセル成型育苗では、いずれの品種も地際を中心に植物内生型蛍光性細菌の定着が認められた。

この定着苗を表面殺菌後、茎部を切り離し根部を微生物培養用培地を用いて、*in vitro*で青枯病菌に対する抵抗性を検定した。圃場において青枯病に罹病したトマト株の茎部から浸出した細菌汁を検定菌液として、寒天培地と混釈して平板培養基とした。この平板上に置床した定着根は、根周辺に植物内生型蛍光性細菌のコロニーを形成し、青枯病菌に対して強い抗菌性を示した。また、定着苗と非定着苗（対照）の表面殺菌根をポテト・デキストロース寒天平板に置床すると対照苗の根部では糸状菌（主に、*Fusarium* sp.）が増殖してくるのに対して、定着苗では根周辺に植物内生型蛍光性細菌のコロニーを形成し土着性

糸状菌の根内侵入を阻止していることが明らかとなった。

おわりに

本年度は、高温適応株を固定化したバイオプラグ培土によるセル成型育苗段階での根内定着技術を確立するため、農家試験を実施している。これまでの経過では、6～7月播種・育苗のトマトでの根内定着の状況は良好であり、高温型資材の使用、補助資材の併用及び播種・催芽技術の改良等により根内定着技術の確立に目処がたってきた。しかし、夜間においても施設内の温度が40℃前後で推移した8月期の播種・育苗では、植物体そのものの生育が不良となり、定着株率、根内定着率共に低い値となった。根内定着した苗の本圃での効果については、9月現在では定着株率と根内定着率に応じた生育と青枯病発病抑制効果を示している。但し、栽培期間中に通気不良等で高温障害によるダメージを受けた植物体は、セル育苗段階での根内定着率と本圃での生育促進及び発病抑制効果とに相関が認められなくなるケースも僅かであるが出てきている。これまでの経過から、8月期の播種・育苗における根内定着技術の改良と定着維持に関する検討を、今後に残してはいるが、商品化に向けての基盤技術は整ってきたと判断している。そして、基礎研究の成果が現状の基盤技術そのものであることに驚きを感じるとともに、2,4-DAPhI 結晶¹⁰⁾の産生能や植物起源の物質の変換能を有する植物内生型蛍光性細菌の存在を知り得たことは、農業分野以外での利用にもつながり、基礎研究の重要性を再認識する貴重な機会となった。末尾ながら、本共同研究において御指導をいただいた加藤肇先生（元神戸大学）、真山滋志先生（神戸大学）、兵庫県立中央農業技術センターの研究員の方々並びに運営等に御助力をいただいた兵庫県企画部、農林水産部の関係各位に厚くお礼を申し上げる。

参考文献

- 1)牛尾、秋山、前川、相野、真山、加藤(1994). 1994年度日本植物病理学会大会（講要）
- 2)秋山、林、前川、相野、真山、加藤(1994). 1994年度日本植物病理学会大会（講要）
- 3)Reddi, T. K., Borovkov, A. V. (1970) : Antibiot ki (Moscow), USSR
- 4)Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D., Defago G(1992) : Phytopathology, 82(2), Switz.
- 5)Levy, E., Gough, F. J., Berlin, K. D., Guiana, P. W., Smith, J. T. (1992) : Plant Pathol., 41 (3), USA
- 6)特開平 7-163334
- 7)中山、前川、磯田、泉、吉見(1991). 1991年度日本農芸化学会大会（講要）
- 8)奥村、藤田、谷森、林、中山(1993～1995). 大阪府立大学付属研究所生物資源開発センタープロジェクト研究報告
- 9)奥村、藤田、中山(1994). 1994年度日本植物病理学会大会（講要）
- 10) 特開平 7-187938