

島根微生物ライブラリーを用いた

キュウリ病害の抑制に関する研究

**(Studies on the inhibition of cucumber diseases
by using Shimane microbial library)**

**Ganphung Rattrikorn
2021**

Doctor's THESIS

Studies on the inhibition of cucumber diseases by using Shimane microbial library

By

Ganphung Rattrikorn

**The United Graduated School of Agricultural Sciences Tottori University
(Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Life and Environmental
Science, Shimane University)**

March 2021

博士論文

島根微生物ライブラリーを用いた
キュウリ病害の抑制に関する研究

ガンブン ラットリーコーン

鳥取大学大学院 連合農学研究科
(島根大学 生物資源科学部 植物病理学研究室)

2021年3月

目次

目次	1
謝辞	4
第1章 緒言	5
第2章 STS1株によるキュウリうどんこ病の抑制効果	7
第1節 STS1株の培養液の前処理がキュウリうどんこ病の病斑形成に与える影響	7
1. 材料および方法	
2. 結果	
第2節 STS1株の培養液の前処理がキュウリうどんこ病菌の孢子発芽に与える影響	10
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第3節 STS1株の培養液の後処理がキュウリうどんこ病菌の生育に与える影響	12
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第4節 STS1株の培養液の前処理とキュウリうどんこ病の抑制の経時的変化	14
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第5節 ビニールハウスでのキュウリへの STS1株処理がキュウリうどんこ病の発病に与える影響	16
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第6節 各種農薬が STS1株の増殖に与える影響	18
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第7節 培養温度の違いが STS1株の増殖に与える影響	20
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第8節 考察	22
第3章 島根県内の土壌からの微生物の分離とスクリーニング	24
第1節 島根県江津市で採取した土壌からの分離菌がキュウリ炭疽病菌の菌糸生育に与える影響	24
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第2節 選抜した分離菌の培養液によるキュウリ炭疽病菌の抑制効果（孢子発芽）	28
1. 材料及び方法	
2. 結果	

第3節 選抜した分離菌培養液とキュウリ炭疽病菌胞子の混合接種によるキュウリ炭疽病菌の発病抑制効果	30
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第4節 選抜した分離菌の培養液の前処理によるキュウリ炭疽病発病抑制	33
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第5節 考察	35
第4章 GT1022株の培養液によるキュウリ炭疽病の抑制効果	36
第1節 GT1022株の培養液のキュウリ炭疽病に対する発病抑制効果の経時的変化	36
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第2節 ビニールハウスでのキュウリへのGT1022株処理がキュウリ炭疽病の発病に与える影響	40
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第3節 GT1022株の同定	42
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第4節 GT1022株の培養液のキュウリ炭疽病菌に対する殺菌活性	45
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第5節 GT1022株が培養液中に生産するキュウリ炭疽病菌に対する抑制物質の特徴	47
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第6節 GT1022株の培養液がキュウリ病原菌の菌糸生育に与える影響	51
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第7節 各種農薬がGT1022株の増殖に与える影響	53
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第8節 考察	55
第5章 GT1022株の培養液によるキュウリ立枯病の抑制効果	57
第1節 GT1022株の培養液がキュウリ立枯病菌の菌糸生育に与える影響	57
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第2節 GT1022株の培養液がキュウリ立枯病菌の遊走子発芽に与える影響	59

1. 材料及び方法	
2. 結果	
第3節 GT1022株の培養液がキュウリ立枯病の発病に与える影響	61
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第4節 GT1022株の培養液の各種酵素活性	64
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第5節 プロテアーゼがキュウリ立枯病の遊走子発芽に与える影響	66
1. 材料及び方法	
2. 結果	
第6節 考察	68
第6章 総合考察	69
摘要	72
Summary	75
引用文献	78
論文目録	83
学術論文	

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始適切なお助言と丁寧なご指導をして下さった島根大学植物病理学研究室指導教員 上野 誠教授に心より深謝申し上げます。多くのご協力とお助言を頂いた山口大学農学部 伊藤 真一教授、鳥取大学大学院連合農学研究科 児玉 基一郎教授ならびに島根大学生物資源学部 木原 淳一教授に心より御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、多大な御協力とお助言を頂き温かく見守ってくださった島根大学生物資源植物病理研究室内の横山 祐一郎、権藤 由理、井上 真稔の諸氏に厚く御礼申し上げます。

第1章 緒言

ウリ科 (Cucurbitaceae family) 植物にはキュウリ (*Cucumis sativus* L.)、メロン (*Cucumis melo* L.)、スイカ (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai)、カボチャ及びスクワッシュ (*Cucurbita*) などが含まれており、分類学的には、96 属、約 1000 種が存在する (Renner and Schaefer, 2016)。また、ウリ科植物は、世界中で食糧として利用されている。しかし、ウリ科植物には、糸状菌、細菌、ウイルスなどの病原菌が感染し、さまざまな病気が発生し、被害を引き起こすことが確認されている (Agrios, 2005)。

ウリ科植物の1つであるキュウリは、経済的に重要な野菜であり、日本では令和元年度の年間作付面積は 10,300ha、収穫量は 548,100t となっている (農林水産統計)。キュウリには、炭疽病、褐斑病、うどんこ病、立枯病など、50 種類以上の病害が発生することが報告されている (日本植物病名目録 : <https://www.ppsj.org/mokuroku.html>)。キュウリ病害の1つであるキュウリうどんこ病の 2016 年度における発生面積は、3,205ha であり、延防除面積も 27,955ha となっている。また、キュウリ炭疽病についても発生面積は、543ha であり、延防除面積が 8,380ha である。キュウリも含めて、農作物栽培における病害防除は、化学合成農薬の使用が一般的になっているが、過度な農薬使用による薬剤耐性菌の出現が問題となっている (Fungicide resistance action committee, 2018; Ishii et al., 2001; Lebeda et al., 2010; McGrath and Wyenandt, 2017; Miyamoto et al., 2010)。実際に、キュウリうどんこ病では、ストロビルリン系水和剤、チオファネートメチル水和剤、TPN 水和剤、トリフルミゾール水和剤、ペンチオピラド水和剤、ポリオキシシン水和剤等の農薬が使用されており、DMI 剤、SDHI 剤及び QoI 剤に対する薬剤耐性菌の出現が報告され (Ishii et al., 2001; Miyamoto et al., 2010)、キュウリ炭疽病でも、アゾキシストロビン水和剤、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤、チオファネートメチル水和剤、マンゼブ水和剤等の農薬が使用されており、ベノミル剤に対する薬剤耐性菌の出現が報告されている (Miura et al., 1994; Takamatsu et al., 1993)。一方で、近年、微生物を用いて、植物病原菌を抑制する微生物農薬の開発が進められており、インプレッションクリア (*Bacillus amyloliquefaciens* : AT-332)、エコホープ (*Trichoderma atroviride* : SKT-1)、「タフパール® (*Talaromyces flavus*) : SAY-Y-94-01、ボトキラー®水和剤 (*Bacillus subtilis*) などの商品がある。また、多く微生物による植物病害の生物防除に関する研究知見が報告されている (Chincholkar and Mukerji, 2007; 百町, 2003; Kim et al., 2011; Shimizu et al., 2000; Shimizu et al., 2009)。興味深いことに、これら微生物農薬による防除では、抵抗性の発達に関する報告がない。微生物は、同種であっても、異なる生理学的特性や物質生産を行うことが知られており、植物病害に対して有効な生物的防除剤を開発するために、多種多様な微生物を分離・同定し、調査する必要がある。様々な場所に存在する微生物であるが、土壌に豊富かつ多様に存在しており、土壌の種類と土壌の状態によって異なるが、 4×10^6 から 2×10^9 / g 乾燥土壌の範囲で存在することはよく知られている (Whitman et al., 1998)。これらの結果は、土壌微生物から植物病害に対する生物的防除の候補を発見できる可能性を示している。実際に、亜熱帯地域である沖縄県の土壌から分離された

微生物や微生物が生産する 2 次代謝産物が、植物病原菌に対して抑制効果を示すことが明らかになっている (Ueno et al., 2016; 2019; Tamura et al., 2019)。山陰地域にある島根県は、地理的に東西に長く、地域によって気象が異なることから多様な微生物が土壌中に存在する可能性がある。しかし、島根県内の土壌からの微生物の収集・保存やそれらの微生物を用いた植物病原菌の抑制に関する報告は少ない。近年、島根大学では、島根県内の土壌や植物等から微生物を分離し、保存するプロジェクトが実行され、これまでに糸状菌や細菌などを含む 1,800 以上の菌株が島根微生物ライブラリー (Shimane Microbial Library) として保存されている。多くの分離株が保存されており、これら分離株の中には、植物病原菌の防除に利用可能な微生物が存在している可能性がある。

そこで、本研究では島根県内で分離された微生物が保存されている島根微生物ライブラリーを活用して、キュウリ病害 (キュウリうどんこ病、キュウリ炭疽病、キュウリ立枯病) の防除に利用可能な微生物を探索する目的で研究を行った。得られた成果は学会誌などへ投稿 (Ganphung et al., 2019; Ganphung et al., 2020) すると共に、日本植物病理学会 (Ganphung ら 2017; 2018; 2019; 2020 a, 2020 b) で口頭及びポスター発表した。本論文はこれらに未発表の成果も加えてまとめたものである。

第2章 STS1株によるキュウリうどんこ病の抑制効果

これまでに *Streptomyces* 属菌による生物防除に関する研究や *Streptomyces* 属菌が生産する2次代謝産物に関する研究が多く行われている (Shimizu et al., 2000; Tamura et al., 2019; Ueno et al., 2019)。これまでに本研究室では、島根県松江市で分離された STS1 株 (*Streptomyces blastmyceticus*) が、実験室レベルで、イネいもち病、キュウリ炭疽病、キュウリ褐斑病を抑制することを明らかにしている。しかし、圃場レベルでの効果を明らかにできていない。そこで本章では、室内及び野外での STS1 株を用いたキュウリうどんこ病の抑制効果について述べる。

第1節 STS1株の培養液の前処理がキュウリうどんこ病の病斑形成に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌及び供試植物

供試植物として、キュウリ (品種: 北進、タキイ種苗株式会社) を用いた。北進の種子をニッピ園芸培土1号【日本肥糧株式会社、肥料成分: 窒素 (220 mg/kg)、リン酸 (2775 mg/kg)、カリウム (220 mg/kg)、苦土 (220 mg/kg)】を加えた直径9 cm のポリポットに1粒播種し、パーミキュライトで覆った。キュウリはガラス室内で生育させ、第1葉が完全展開するまで生育させ、実験に用いた。

供試菌として、キュウリうどんこ病菌 (*Podosphaera xanthii*) 及び STS1 株 (*S. blastmyceticus*) を用いた。キュウリうどんこ病菌は、予め圃場のキュウリ葉上に自然発生したキュウリうどんこ病菌をガラス室内で生育させたキュウリの葉上に移植し、インキュベーター (光照射下12時間、暗黒下12時間、20-25 °C) で増殖させ、実験に用いた。

STS1株は、予め試験管 (φ1.8×18 cm) に10 ml 分注したジャガイモ・スクロース寒天 (PSA) 斜面培地 (ジャガイモ煎汁 200 g、ショ糖 20 g、寒天 20 g/蒸留水 1 L) に植えて付けた。STS1株は直径7 cm のプラスチックシャーレに分注した PSA 培地に移植し、暗黒下、28 °C で培養した。1週間後に PSA 培地で培養した STS1 株をコルクボーラー (8 mm) でくり抜き、シャーレ中央に移植した後、暗黒下、28 °C で7日間培養した。7日間培養した STS1 株をコルクボーラー (8 mm) でくり抜き、試験管 (φ3.0×20 cm) に20 ml 分注した Luria-Bertani (LB) 液体培地 (NaCl 10 g、Bactotryptone 10 g、Yeast extract 5 g/蒸留水 1 L) に移植した。移植後、ロータリーシェーカー (MMS-3010, Tokyo rikakikai, Tokyo, Japan) を用いて、25-27 °C、130 rpm で7日間振盪培養し、増殖後に実験に用いた。

b) キュウリへの接種方法と病斑形成の観察

第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて、第1葉が完全展開するまで生育させたキュウリをプラスチックケース(10×20×5 cm)に1処理区5ポットずつ並べた。第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて準備した STS1 株の培養液をキュウリ葉に1ポットあたり、1 ml ずつ噴霧処理した。対照区として、LB 液体培地を同様の方法で処理した。処理したキュウリはインキュベーター (光照射下12時間、暗黒下12時間、20-25 °C) に24時間保持した。その後、キュウリうどんこ病菌 (1×10⁴ conidia/ml) を接種し、インキュベーター内に保持した。接種7日後に、1区あたり5ポッ

トのキュウリ葉の病斑形成を下記の方法によって調査し、発病度を算出した。実験は3回繰り返した。

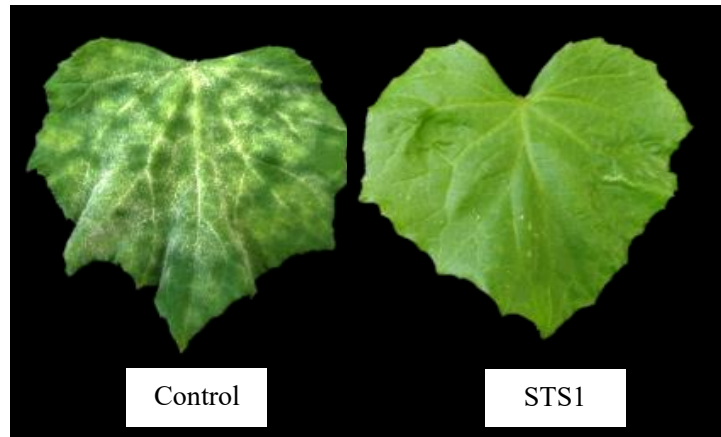
$$\text{発病度} = \{(4A \times 3B \times 2C \times D) / (4 \times 5)\} \times 100$$

- A: 病斑面積率 50%以上の個体数
- B: 病斑面積率 20%以上～50%以下の個体数
- C: 病斑面積率 10%以上～20%以下の個体数
- D: 病斑面積率 0.5%以上～10%以下の個体数
- E: 病斑なし

2. 結果

STS1株のキュウリうどんこ病に対する抑制効果を調査するために、STS1株の前処理24時間後にキュウリうどんこ病菌を接種した。その結果、STS1株を前処理したキュウリ葉では、対照区であるLB液体培地のみを前処理したキュウリ葉と比較して、著しく病斑形成が抑制された (Fig. 2-1A)。発病度は、STS1株処理区とLB液体培地処理区でそれぞれ、0%及び100%であった (Fig. 2-1B)。

(A)



(B)

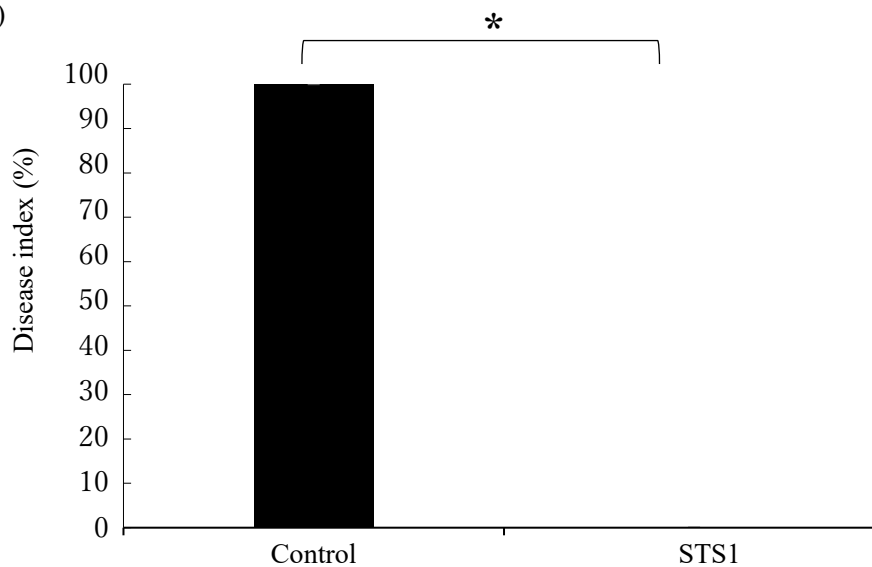


Fig. 2-1 Effects of pretreatment with strain STS1 on powdery mildew lesion-development in cucumber plants. The whole leaves of cucumber seedlings at the 1-leaf stage were pretreated once with strain STS1 suspension-culture or LB liquid medium (control) by using spray (1 ml/cucumber seedling) and then kept at natural conditions in the laboratory for 24 h. Plants were then inoculated with suspension of *Podosphaera xanthii* (1×10^4 conidia/ml). Disease incidence was investigated at 7 days after inoculation (A). [Disease index (%) = $\{(4A + 3B + 2C + D) / (\text{total plant leaves investigated} \times 4)\} \times 100$], A = number of leaves with and infected area > 50%, B = number of leaves with an infected area > 20%, C = number of leaves with an infected area > 10%, D = number of leaves with an infected area > 0.5%. (B). Three independent experiments were conducted, each with 10 plants. Bars represent means \pm SD. Asterisk indicates significant difference (t-test, $P < 0.05$).

第2節 STS1株の培養液の前処理がキュウリうどんこ病菌の孢子発芽に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌及び供試植物

供試植物として、キュウリ（品種：北進）を用いた。キュウリは第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

供試菌として、キュウリうどんこ病菌及びSTS1株を実験に用いた。それぞれの菌は、第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

b) キュウリの葉上へのSTS1株の前処理と病原菌の接種方法及び孢子発芽の観察

第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて、第1葉が完全展開するまで生育させたキュウリをプラスチックケース（10×20×5 cm）に1処理区5ポットずつ並べた。第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて準備したSTS1株の培養液をキュウリ葉に1ポットあたり、1 ml ずつ噴霧処理した。対照区として、LB培地を同様の方法で処理した。処理したキュウリはインキュベーター（光照射下12時間、暗黒下12時間、20-25℃）に24時間保持した。その後、キュウリうどんこ病菌（ 1×10^4 conidia/ml）を接種した。接種7日後に、キュウリ葉の切片（1×1 cm）を作成し、ラクトフェノール・アルコール（1:2 v/v）を加えて、室温で3日保持して、脱色した。脱色後、1%コトンプルーを加えて、1時間後に、染色したキュウリ葉上のキュウリうどんこ病の孢子発芽を光学顕微鏡（オリンパス BX50-33FLA-3、倍率：400倍）で観察した。対照区として、LB培地を同様の方法で前処理して、キュウリうどんこ病を接種したキュウリ葉を観察した。

2. 結果

STS1株のキュウリうどんこ病に対する抑制効果を調査するために、STS1株の前処理24時間後にキュウリうどんこ病菌を接種して、キュウリ葉上での孢子発芽を調査した。その結果、STS1株を前処理したキュウリ葉上では、対照区であるLB液体培地のみを前処理したキュウリ葉上と比較して、キュウリうどんこ病菌の孢子発芽が著しく抑制された（Fig. 2-2）。

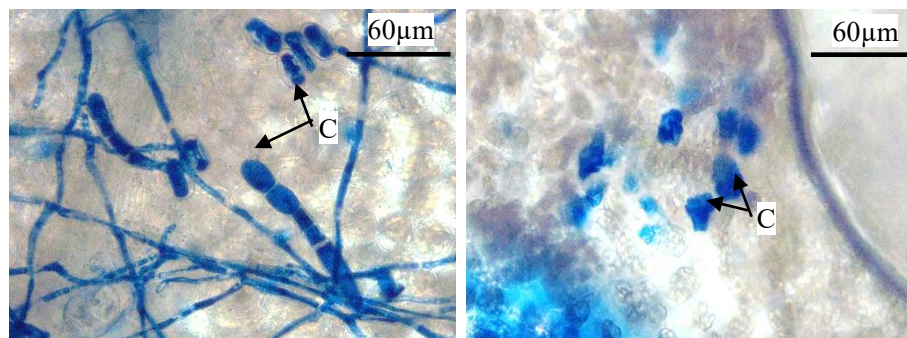


Fig. 2-2 Effects of pretreatment with strain STS1 on conidia germination and conidiation by *Podosphaera xanthii* in the cucumber leaves. The whole cucumber seedlings at the 1-leaf stage were pretreated once with strain STS1 suspension-culture or LB liquid medium (control) by using spray (1 ml/cucumber seedling) and then kept at natural conditions in the laboratory for 24 h. Plants were then inoculated with a suspension of *P. xanthii* (1×10^4 conidia/ml). After 7 days, leaves were cut into small disks and immersed in lactophenol-alcohol (1:2 v/v) until the chlorophyll was completely removed for 3 days. Discolored leaves were stained with 1% cotton blue in lactophenol for 1 h. Infection behaviors were monitored under a light microscope. C: Conidia

第3節 STS1株の培養液の後処理がキュウリうどんこ病菌の生育に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌及び供試植物

供試植物として、キュウリ（品種：北進）を用いた。キュウリは第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

供試菌として、キュウリうどんこ病菌及びSTS1株を実験に用いた。それぞれの菌は、第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

b) キュウリ葉上へのSTS1株の後処理と病原菌の接種方法及び観察

第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて、第1葉が完全展開するまで生育させたキュウリにキュウリうどんこ病菌 (1×10^4 conidia/ml) を接種した。接種10日後に第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて準備したSTS1株の培養液をキュウリ葉に後接種した。対照区として、LB液体培地を処理した。プラスチックケース (10×20×5 cm) に1処理区5ポットずつ並べた。第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて準備したSTS1株の培養液をキュウリ葉に1ポットあたり、1mlずつ噴霧処理した。対照区として、LB液体培地を同様の方法で処理した。処理したキュウリは実験室内の自然条件下に保持し、処理2日後に、各処理区のキュウリ葉の切片 (1×1 cm) を作成し、1%グルタルアルデヒドによる固定と脱水及び凍結乾燥を行い、電子顕微鏡 (Miniscope TM3000、HITACHI) を用いて観察した。

2. 結果

キュウリうどんこ病に対するSTS1株の抑制効果を調査するために、キュウリうどんこ病菌の前接種10日後にSTS1株を後処理した。その結果、STS1株を後処理したキュウリ葉では、キュウリうどんこ病菌の胞子の崩壊が確認された (Fig. 2-3 : STS1)。一方、対照区であるLB液体培地のみを後処理したキュウリ葉では、キュウリうどんこ病菌の胞子の崩壊は確認されなかった (Fig. 2-3 : Control)。

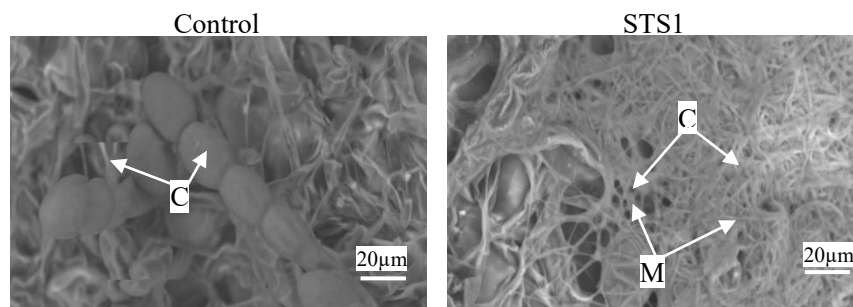


Fig. 2-3 Effects of strain STS1 treatment on the inhibition to powdery mildew in cucumber plants. The whole cucumber seedlings at the 1-leaf stage were pre-inoculated with a suspension of *Podosphaera xanthii* (1×10^4 conidia/ml). Ten days after inoculation, the leaves were treated with strain STS1 or LB liquid medium (Control) and then kept at natural conditions in the laboratory. Two days after treatment, mycelia growth of strain STS1 on the cucumber leaves was observed by scanning electron microscopy. C: Conidia of *P. xanthii*, M: Mycelia of strain STS1

第4節 STS1株の培養液の前処理とキュウリうどんこ病の抑制の経時的変化

1. 材料及び方法

a) 供試菌及び供試植物

供試植物として、キュウリ（品種：北進）を用いた。キュウリは第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

供試菌として、キュウリうどんこ病菌及びSTS1株を実験に用いた。それぞれの菌は、第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

b) キュウリの葉上へのSTS1株の前処理と病原菌の接種方法及び病斑形成の観察

第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて、第1葉が完全展開するまで生育させたキュウリをプラスチックケース（10×20×5 cm）に1処理区5ポットずつ並べた。第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて準備したSTS1株の培養液をキュウリ葉に1ポットあたり、1 ml ずつ噴霧処理した。対照区として、LB液体培地を同様の方法で処理した。処理したキュウリはインキュベーター（光照射下12時間、暗黒下12時間、20-25℃）に保持した。その後、キュウリうどんこ病菌（ 1×10^4 conidia/ml）を1、3、5及び7日後に接種し、インキュベーター内に保持した。キュウリうどんこ病菌を接種10日後に1区あたり5ポットずつ、1葉あたりのキュウリ葉上でのキュウリうどんこ病の病斑形成数を調査した。実験は3回繰り返した。

2. 結果

STS1株の培養液又は対照区としてLB液体培地をキュウリに前処理し、1、3、5、7及び9日後に、キュウリうどんこ病菌の胞子を接種し、接種10日間後にキュウリの葉上の病斑形成数を調査した。その結果、STS1株の培養液前処理1、3、5、7及び9日後での病斑数は、それぞれ、 14.9 ± 3.6 個、 15.5 ± 2.9 個、 2.8 ± 2.9 個、 34.6 ± 6.4 個及び 48.0 ± 7.9 個となり、対照区であるLB液体培地の 98.9 ± 19.6 個と比較して、キュウリ葉上でのキュウリうどんこ病菌による病斑形成数が抑制された (Fig. 2-4)。

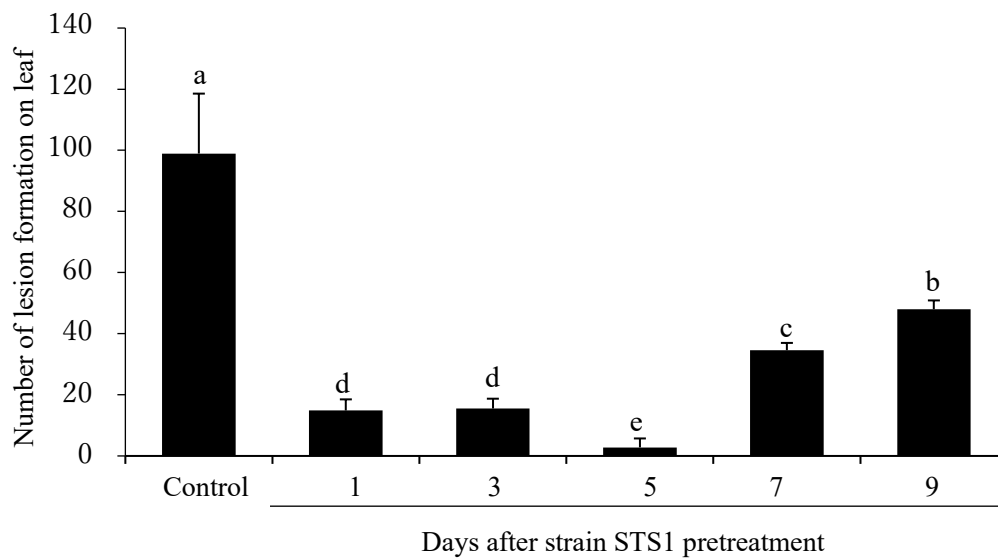


Fig. 2-4 Time course of the inhibitory activity of strain STS1 on lesion formation of powdery mildew in cucumber plants. The whole cucumber seedlings at the 1-leaf stage were inoculated with a *Podosphaera xanthii* conidia suspension (1×10^4 conidia/ml) after pretreatment with strain STS1 suspension-culture at 1, 3, 5, 7 and 9 days. Control plants were pretreated with LB (Control) liquid medium. Ten days after inoculation with *P. xanthii*, the number of powdery lesions formed was recorded. Experiments were repeated three times and five cucumber leaves were examined each experiment. Bars represent means \pm SD. Means followed by different letters indicate significant difference (Tukey-Kramer test, $P < 0.05$).

第5節 ビニールハウスでのキュウリへの STS1 株処理がキュウリうどんこ病の発病に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌及び供試植物

供試植物として、キュウリ（品種：北進）を用いた。キュウリは第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

供試菌として、キュウリうどんこ病菌及び STS1 株を実験に用いた。それぞれの菌は、第2章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

b) ビニールハウスでのキュウリ栽培の方法

圃場試験は、2016年9月と11月に島根大学内のビニールハウス（幅3m×奥行5m×高さ2.4m）で実施した。キュウリは、一般的な栽培管理方法により栽培した。10号のプラスチックポットに一般園芸培土（スーパーミックス A：窒素 150-260 mg/L、リン酸 70-160 mg/L、カリウム 190-320 mg/L）を加えて、第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備したキュウリを1ポットに1個体ずつ定植した。また、追肥として、マグアンプ K 中粒（成分：窒素 6-リン酸 40-カリウム 6-マグネシウム 15）及び500倍に希釈したハイポネックス（成分：窒素 6-リン酸 10-カリウム 5）を定期的に施肥した。温度の調整は行わず、灌水は適宜行い、60日間栽培した。

c) ビニールハウスにおけるキュウリうどんこ病の発生調査

上記の方法で栽培したキュウリに第2章、第1節、1a)の方法で準備した STS1 株の培養液を5日ごと処理した。処理量は1葉あたりに1 ml となるように噴霧処理した。定植15、20、30及び60日後にキュウリうどんこ病の発生を調査した。対照区として、LB 液体培地を同様の方法で処理した。

2. 結果

ビニールハウスでのキュウリ栽培時に自然発生するうどんこ病に対する STS1 株の抑制効果を調査した。STS1 株を栽培期間中に5日ごとにキュウリ葉上に前噴霧処理し、定植15、20、30及び60日後にキュウリうどんこ病の発生を観察した。その結果、STS1 株処理区と対照区では大きな違いが観察された (Fig. 2-5)。定植15日後に対照区でうどんこ病の発生が観察され始め、定植20及び30日には、大きな違いは観察されなかった (Fig. 2-5)。その後、対照区でのうどんこ病の発生は、定植60日までに増加した。一方、STS1 株の処理葉では、対照区と比較して、うどんこ病の発生は著しく抑制されていた (Fig. 2-5)。

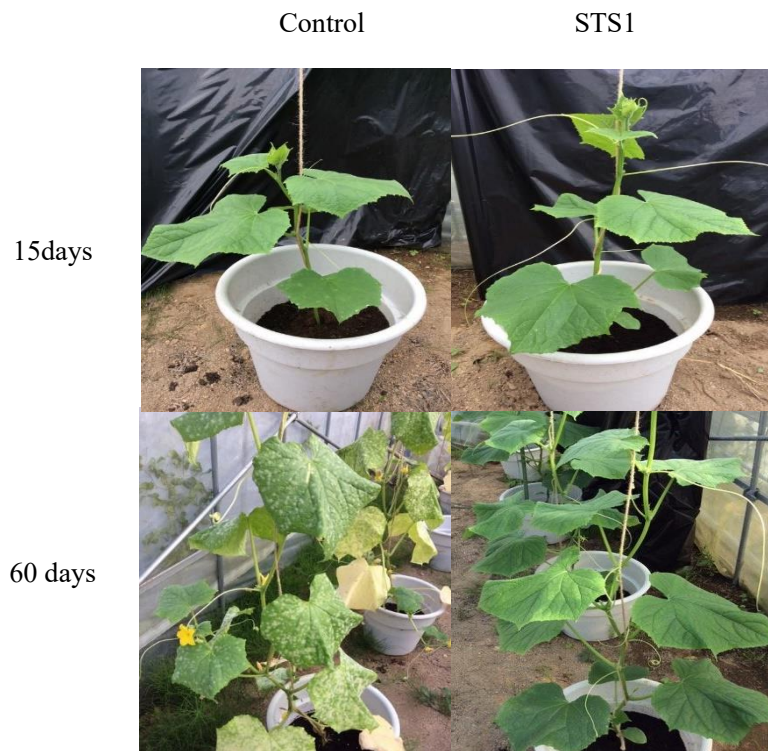


Fig. 2-5 Effects of strain STS1 on natural powdery mildew infection in the greenhouse cucumber. Cucumber plants were treated with a suspension culture of strain STS1 at every five days. As a control, cucumber plants were treated with LB liquid medium. Lesion formation was observed at 15 and 60 days after transplanting.

第6節 各種農薬が STS1 株の増殖に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、STS1 株を実験に用いた。STS1 株は、第2章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

b) 供試農薬

供試農薬として、ガッテン乳剤 (OAT アグリオ株式会社、成分：フルチアニル)、トリフミン水和剤 (石原産業株式会社、成分：トリフルミゾール) 3,000 倍希釈及びモレスタン水和剤 (住友化学園芸株式会社、成分：キノキサリン) 2,000 倍希釈を実験に用いた。

c) 培地の調整及び培養条件

オートクレーブ (121°C、20 分間) した LB 寒天培地 (200 ml) にガッテン乳剤、トリフミン水和剤及びモレスタン水和剤が、2,000 倍希釈、3,000 倍希釈及び 5,000 倍希釈となるように添加した。各農薬を添加した LB 培地を 7 cm のプラスチックシャーレに分注した。十分に培地表面が乾燥した後に、第2章、第1節、1a) で述べた方法により準備した STS1 株の培養液を 30 µl ずつ塗布し、28 °C のインキュベーター内で培養した。対照区として LB 寒天培地のみ STS1 株を塗布した区を用いた。培養 2 日後にシャーレ 1 枚あたりのコロニー数を計数した。各処理区 5 枚のプラスチックシャーレを用いて、実験は 3 回繰り返した。

2. 結果

各種農薬が STS1 株の増殖に与える影響を調査した。その結果、ガッテン乳剤、トリフミン水和剤及びモレスタン水和剤を添加した LB 寒天培地では、STS1 株の培養 2 日目の平均コロニー数が対照区と比較して抑制された (Table 2-1)。しかし、トリフミン以外の農薬については、その抑制は、小さかった。各シャーレ 1 枚あたりのコロニー数は、対照区、ガッテン乳剤、トリフミン水和剤及びモレスタン水和剤で、 254.5 ± 31.5 個、 213.6 ± 30.0 個、 196.1 ± 29.6 個、及び 22.2 ± 7.3 個であった (Table 2-1)。

Table 2-1 Effect of fungicides on growth of strain STS1 on LB agar medium

Fungicide	Number of colony per Petri dish	
Control	254.5±31.5 ^Z	a ^y
Gatten	213.6±30.0	b
Moresutan	196.1±29.6	c
Torifumin	22.2±7.3	d

^Z Values represent were mean ± SD

^y Different letters within a column indicate significant differences by Tukey-Kramer test at P<0.05.

第7節 培養温度の違いが STS1 株の増殖に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、STS1 株を実験に用いた。STS1 株は、第2章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

b) 培地の調整及び培養条件

オートクレーブ (121 °C、20 分間) した LB 寒天培地 (200 ml) を 7 cm のプラスチックシャーレに分注した。十分に培地表面が乾燥した後に、第2章、第1節、1a) で述べた方法により準備した STS1 株の培養液を 30 µl ずつ塗布し、4 °C、20 °C、28 °C 及び 37 °C のインキュベーター内で培養した。培養 2 日後にシャーレ 1 枚あたりのコロニー数を計数した。各処理区 5 枚のプラスチックシャーレを用いて、実験は 3 回繰り返した。

2. 結果

培養温度条件が STS1 株の増殖に与える影響を調査した。その結果、20 °C、28 °C 及び 37 °C で STS1 株の増殖が観察されたが、4 °C では、STS1 株の増殖は確認されなかった。各シャーレ 1 枚あたりのコロニー数は、4 °C、20 °C、28 °C 及び 37 °C で、0 個、142.1±43.0 個、199.5±45.4 個及び 91.0±28.0 個であった (Table 2-2)。

Table 2-2 Effect of temperature on growth of strain STS1 on LB agar medium

Temperature (°C)	Number of colony per Petri dish	
4	0 ^z	a ^y
20	142.1±43.0	c
28	199.5±45.4	d
37	91.0±28.0	b

^z Values represent were mean ± SD

^y Different letters within a column indicate significant differences by Tukey-Kramer test at P<0.05.

第8節 考察

植物病原菌に対する防除戦略は、主に化学合成された農薬であるが、過度な使用が農薬に対する抵抗性の発達をもたらしている。そのため、作用点のことなる農薬の開発や新しい微生物農薬の開発が必要である。これまでに Ueno et al. (2012) は、STS1 株が *Colletotrichum orbiculare* によって引き起こされるキュウリ炭疽病を抑制できることを報告している。また、STS1 株は、培地上でウリ科植物に感染する病原菌の菌糸生育を抑制できることを明らかにした (Ganphung et al., 2018)。本研究では、STS1 株を前処理したキュウリ葉上では、うどんこ病の病斑形成が顕著に抑制されていることが明らかにされた (Fig. 2-1)。同様に、STS1 株で前処理したキュウリ葉上では、うどんこ病の孢子発芽が抑制された (Fig. 2-2)。さらに、STS1 株の培養液の経時的な前処理では、前処理後 1-9 日間に後接種した *Podosphaera xanthii* によるうどんこ病の発生が抑制された (Fig. 2-4)。特に前処理 5 日間までは、高い抑制効果を示した。インプレッションクリアー (*Bacillus amyloliquefaciens*, SDS Biotech K.K.) やボトキラー® (*Bacillus subtilis*, 出光興産株式会社) などの *Bacillus* 属菌を用いた生物的防除剤がうどんこ病を抑制することはよく知られている。しかし、うどんこ病に対する *Streptomyces* 属菌の生物的防除剤は開発されていない。今回の結果では、STS1 株の培養液は、キュウリ葉に対して植物毒性効果を示さなかった。しかし、キュウリの花と果実に対する植物毒性は、STS1 株では調査されていない。したがって、今後、実用化するためには、STS1 株の培養液のキュウリの花や果実に対する植物毒性を調査する必要がある。本研究で、キュウリ葉に発生したキュウリうどんこ病菌に STS1 株の培養液を処理した結果、STS1 株が *P. xanthii* の孢子に付着し、崩壊している様子が観察された (Fig. 2-3)。一般的に、孢子発芽阻害には、キチナーゼや β -1,3-グルカナーゼなど、植物病原菌の細胞壁および細胞膜を損傷させる酵素 (Fridlender et al., 1993; Zhang and Yuen, 2000) や低分子の化合物 (Kim et al., 2011; Lee et al., 2005; Park et al., 2006) が関与している可能性がある。また、Kim et al. (2019) は、*S. blastmyceticus* 12-6 株が生産する cyclo-(Leu-Pro) 及び 9-octadecenamide によって、*C. acutatum* 及び *Fusarium oxysporum* の孢子及び菌糸の形態の維持が阻害されたことを報告した (Kim et al., 2019)。さらに、Kang et al. (2020) は、*S. blastmyceticus* が植物病原菌を抑制だけでなく、害虫を抑制できることを報告した。最近、Nguyen et al. (2016) は、STS1 株の培養液中に植物病原菌を抑制する熱不安定な化合物が生成されている可能性を示した。さらに、STS1 株が、培地上でキチナーゼを生産できることを明らかにした (データなし)。ブドウ及びコムギにおけるキチナーゼ遺伝子の発現は、うどんこ病に対して耐性を示すことが報告されている (Nirala et al., 2010; Yamamoto et al., 2000)。これらの結果は、STS1 株によるキチナーゼ生産がキュウリうどんこ病を防除するための重要な要因の 1 つであることを示唆した。一方、Ni et al. (2019) は、*S. blastmyceticus* JZB130180 がプロテアーゼ及びセルラーゼを生産することを報告した。今後、STS1 株のセルラーゼ活性及びプロテアーゼ活性について調査し、病害抑制との関係を明らかにする必要がある。*Streptomyces* 属菌は、さまざまな植物病原菌に対して抑制効果を示す物質を生産することが報告されている (Shimizu et al., 2000; Shimizu et al., 2009; Kim et al., 2011)。しかし、STS1 株では抑制物質を完全には、明らかにできていない。したがって、今後、STS1 株の培養液中に存在する抑制物質を明らかにする必要がある。

本研究では、STS1 株が、ビニールハウス内で栽培されたキュウリでのうどんこ病の発生を抑制できることを明らかにした (Fig. 2-5)。STS1 株の培地上での増殖は、20 °C から 37 °C の間で観察され (Table 2-2)、STS1 株は、キュウリうどんこ病菌の防除に利用されているいくつかの殺菌剤の存在下で増殖可能であった (Table 2-1)。一般的に、キュウリの成長に最適な温度は 25-30 °C であり、*P. xanthii* の孢子発芽は、20-30 °C で観察される。これらの結果は、STS1 株がキュウリ栽培環境で、防除に利用できる可能性を示した。しかし、実際の栽培環境においては、多くの細菌、糸状菌、ウイルス病が発生するため、今後、うどんこ病菌以外の病原菌に対する STS1 株の抑制効果を圃場レベルで調査する必要がある。本研究では、*S. blastmyceticus* STS1 株が、キュウリで発生する *P. xanthii* によるうどんこ病を抑制できることを明らかにし、STS1 株がキュウリ病害の発生を抑制するための新しい微生物農薬の開発に利用できる可能性を示した。

第3章 島根県内の土壌からの微生物の分離とスクリーニング

土壌には、豊富かつ多様な微生物が存在しており、土壌の種類と土壌の状態によって異なるが、 4×10^6 から 2×10^9 /g 乾燥土壌の範囲で存在することがよく知られている (Whitman et al., 1998)。これらの結果は、土壌微生物から植物病害に対する生物的防除の候補を発見できる可能性を示している。これまでに島根県内の土壌からの微生物の収集・保存やそれらの微生物を用いた植物病原菌の抑制に関する研究の報告は少なく、植物病原菌の防除に利用可能な微生物が存在している可能性がある。そこで本章では、島根県内で分離された微生物が保存されている島根微生物ライブラリーを活用したキュウリ炭疽病の抑制に利用可能な菌の探索について述べる。

第1節 島根県江津市で採取した土壌からの分離菌がキュウリ炭疽病菌の菌糸生育に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx [syn. *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis & Halst.] を用いた。キュウリ炭疽病菌は、予め実験管 ($\phi 1.8 \times 18$ cm) に 10 ml 分注した PSA 斜面培地に植えて付けた。その後、約 20 ml ずつプラスチックシャーレ (直径 7 cm) に分注して固めた PSA 培地に移植し、25-27 °C で 7 日間培養し、実験に用いた。

また、分離菌として、島根県江津市で採取した土壌から分離された分離菌 165 株を用いた。土壌からの微生物の分離は、Lemtukei et al. (2016) の方法を用いて、グリセロールストックとして、保存されている分離菌を、LB 寒天培地で増殖させた。その後、PC-1 液体培地 (スターチ 10 g、ポロペプトン 10 g、モラセス 10 g、肉エキス 10 g/蒸留水 1 L、pH 7.2) 又は PS 液体培地 3 ml に移植し、暗黒下、25-27 °C で 7 日間振盪培養し、実験に用いた。

b) 対峙培養法

PSA 培地を用いて、分離菌とキュウリ炭疽病菌の対峙培養を行った。予め PSA 培地で培養したキュウリ炭疽病菌を直径 8 mm のコルクボーラーでくり抜き、PSA 培地に移植した。その後、4.5 cm 離して、抗菌検定用ペーパーディスク (直径 8 mm) (Advantec® Filter paper) を置床した。その後、抗菌検定用ペーパーディスクに上記の方法で PC-1 液体培地を用いて、培養した分離菌を 30 μ l ずつ処理した。その後、暗黒下、25-27 °C で 10 日間培養した。対照区として、PC-1 液体培地を処理した。165 株のスクリーニングでは、各株で 2 枚のシャーレを用いた。選抜された株では、各株で 10 枚のシャーレを用いた。実験は 2 回繰り返した。

c) 菌叢面積の測定法及び電子顕微鏡での観察

トレーシングペーパーにマーカーで菌叢を写し、菌叢部分を黒く塗りつぶした。その後、トレーシングペーパーをスキャナーで読み込み、Lia32 ソフトを用いて菌叢面積を測定した。菌糸は、走査型電子顕微鏡 (Miniscope TM3000、HITACHI) を用いて、観察した。

2. 結果

島根県江津市の土壌から分離された分離菌 165 株とキュウリ炭疽病菌の対峙培養を行った。その結果、対照区と比較して、キュウリ炭疽病菌の菌叢面積が、統計的に優位に抑制された菌株は、39 株 (GT1008、GT1013、GT1014、GT1019、GT1020、GT1022、GT1023、GT1024、GT1031、GT1036、GT2003、GT2018、GT2022、GT2026、GT2037、GT3001、GT3012、GT3020、GT3020、GT3023、GT3024、GT3030、GT3033、GT3035、GT3039、GT3042、GT3043、GT3044、GT4001、GT4005、GT4010、GT4012、GT4023、GT4024、GT4025、GT4027、GT4028、GT4029、GT4035) であった (Fig. 3-1)。また、その中で、対照区と比較して、キュウリ炭疽病菌の菌叢面積が、50%以上抑制された菌株は、4 株 (GT1022、GT1023、GT4027、GT4028) であった (Fig. 3-1)。GT1022、GT1023、GT4027 及び GT4028 では、対照区と比較して、菌糸生育が著しく抑制された (Fig. 3-2 A)。GT1022、GT1023、GT4027 及び GT4028 の存在下でのキュウリ炭疽病菌の菌叢面積は、 $1542.0 \pm 310.6 \text{ mm}^2$ 、 $1684.8 \pm 137.2 \text{ mm}^2$ 、 $1418 \pm 169.3 \text{ mm}^2$ 及び $1651.6 \pm 89.0 \text{ mm}^2$ であった (Fig. 3-2 C)。一方、対照区でのキュウリ炭疽病菌の菌叢面積は、 $2488.7 \pm 209.0 \text{ mm}^2$ あった (Fig. 3-2 C)。また、GT1022、GT1023、GT4027 及び GT4028 存在下では、対峙培養上でキュウリ炭疽病菌の菌糸先端の崩壊させた株が観察された (Fig. 3-2 B)。

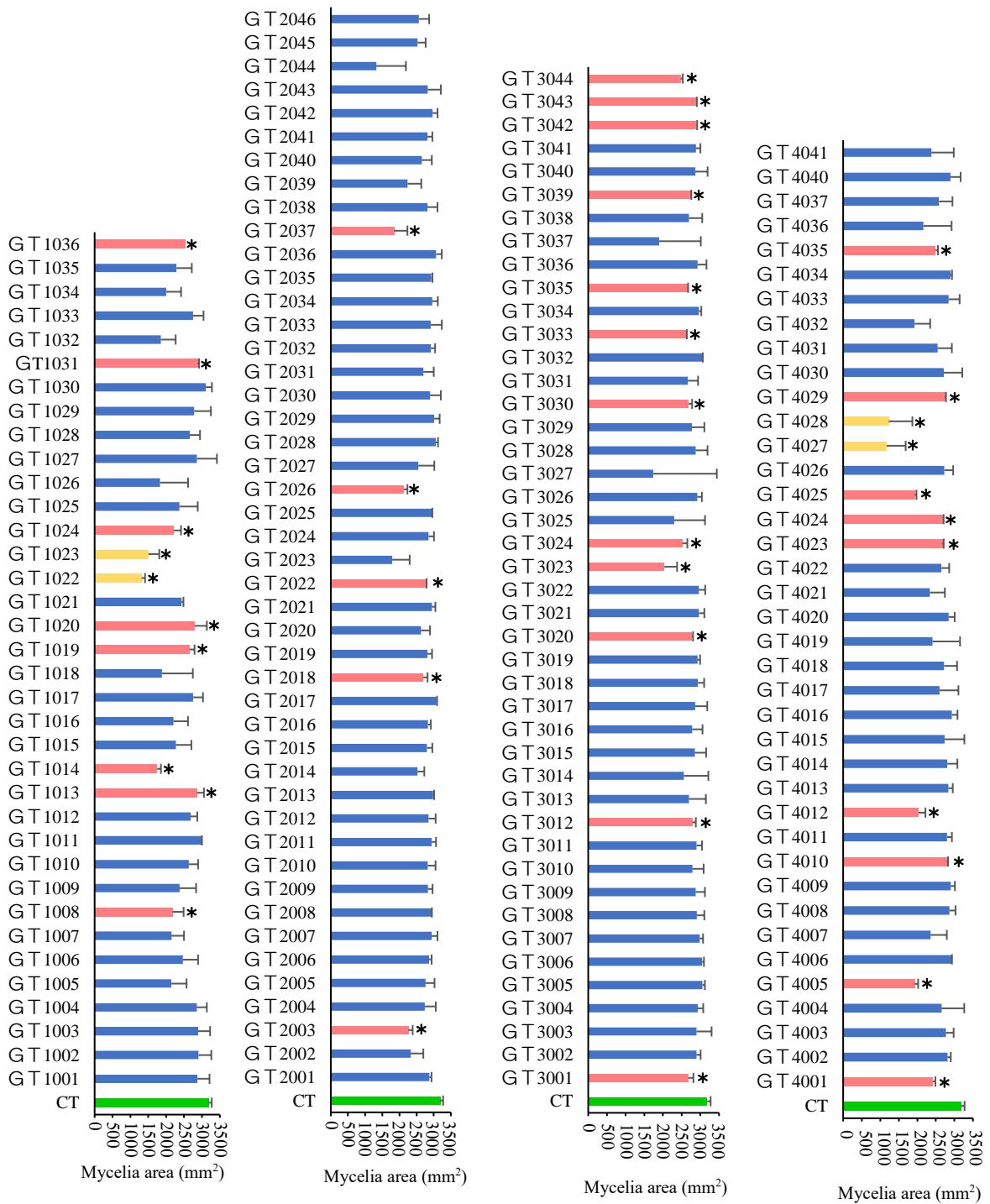


Fig. 3-1 Antagonistic potential of isolated microorganisms from soil in Gotsu city (Shimane prefecture) to the growth of *C. orbicular* observed by dual culture on potato sucrose agar plate. GT×××× is sample code. Bar: represents ± SD. Asterisk indicate the significant different compare with the result of the control (PC-1) (t-test, P < 0.05).

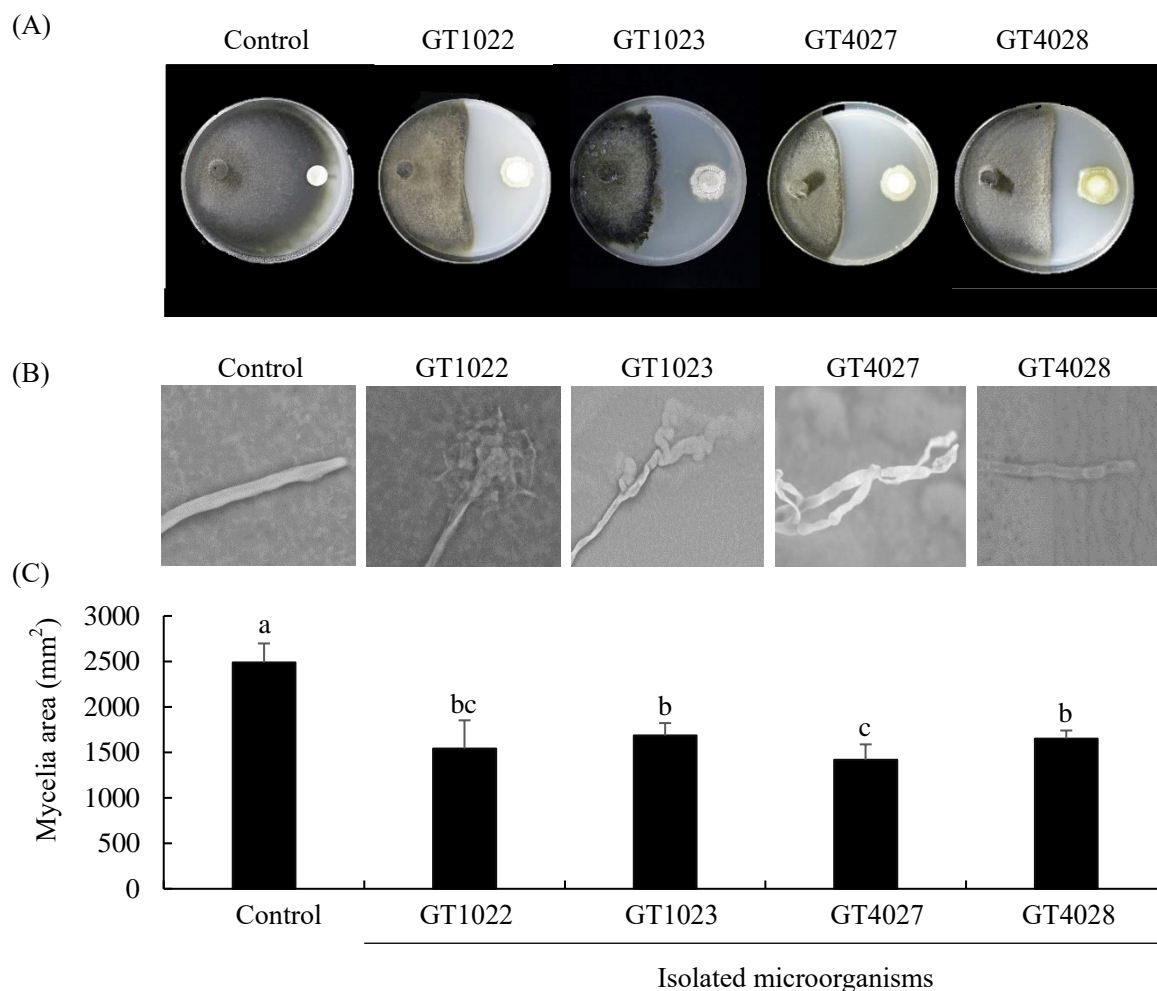


Fig. 3-2 Dual culture assay for *in vitro* inhibition of the growth of *Colletotrichum orbiculare* mycelia by the isolates GT1022, GT1023, GT4027 and GT4028 on potato sucrose agar (PSA) medium. Mycelial plugs (8 mm) of *C. orbiculare* and paper disks, were placed on PSA plates, 4.5 cm apart from each other. The paper disks were inoculated with a suspension (30 μ l) of the isolates GT1022, GT1023, GT4027 and GT4028 cultured in PC-1 liquid medium. PC-1 liquid medium was inoculated on the paper disks as a control. All petri dishes were incubated at 25-27 °C for 10 days (A) and then a mycelial tip of *C. orbiculare* near the GT1022 colony was observed under scanning electron microscopes (B). The areas of *C. orbiculare* mycelial growth were measured using LIA 32 software. Experiments were repeated two times and 10 petri dishes were examined for each experiment. The bar at the top of each column represents the standard deviation of the mean. Means followed by different letters are significantly different according to the Tukey-Kramer test ($P < 0.05$).

第2節 選抜した分離菌の培養液によるキュウリ炭疽病菌の抑制効果（孢子発芽）

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ炭疽病菌及び分離菌 GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株を用いた。それぞれの菌は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

b) 孢子懸濁液の調製

キュウリ炭疽病菌は、約 20 ml のずつプラスチックシャーレ（直径 7 cm）に分注して固めた米ぬか寒天培地（米ぬか 50 g、ショ糖 20 g、寒天 20 g/蒸留水 1 L）に移植し、暗黒下で約 7 日間培養し、孢子を形成させた。孢子形成後に、シャーレに滅菌水を注ぎ、孢子を滅菌水に懸濁させた。この懸濁液を 2 重のティッシュペーパーでろ過し、菌糸片等を除去後、遠心分離（1,600×g、10 分間）（テーブルトップ遠心機 4,000、久保田商事株式会社）し、孢子を回収後に生物検定に用いた。

c) 生物検定法

分離菌の懸濁液は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。分離菌の生物活性は、キュウリ炭疽病菌の孢子発芽の抑制により調査した。上記の方法で調製したキュウリ炭疽病菌の孢子を各分離菌の培養液に 8×10^4 conidia/ml となるように懸濁させた。対照区として、PS 液体培地にキュウリ炭疽病菌の孢子を懸濁させたものを用いた。調製した懸濁液は、湿室にしたプラスチックケース（17×25 cm）内に並べたスライドガラスに滴下した。スライドガラスには、30 μ l ずつ 3 か所に滴下した。滴下後、暗黒下、25-27 °C のインキュベーター内で培養した。培養 24 時間後、光学顕微鏡下でキュウリ炭疽病菌の孢子発芽を調査した。孢子発芽数は、1 か所あたり孢子 50 個中の孢子発芽数を計数し、孢子発芽を算出した。実験は 3 回繰り返した。合計 900 個の孢子を観察した。

2. 結果

分離菌（GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株）の培養液とキュウリ炭疽病菌の孢子を混合し、スライドガラスに滴下して、キュウリ炭疽病菌の孢子発芽率を調査した。その結果、対照区と比較して、4 株の培養液存在下では、キュウリ炭疽病菌の孢子発芽が著しく抑制された（Fig. 3-3）。4 株中では、GT1023 株の抑制効果は、GT1022、GT4027 及び GT4028 株と比較すると低かった。GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株の培養液の存在下でのキュウリ炭疽病菌の孢子発芽率は、それぞれ、0%、 $33.3 \pm 10.0\%$ 、0%及び 0%であった（Fig. 3-3）。

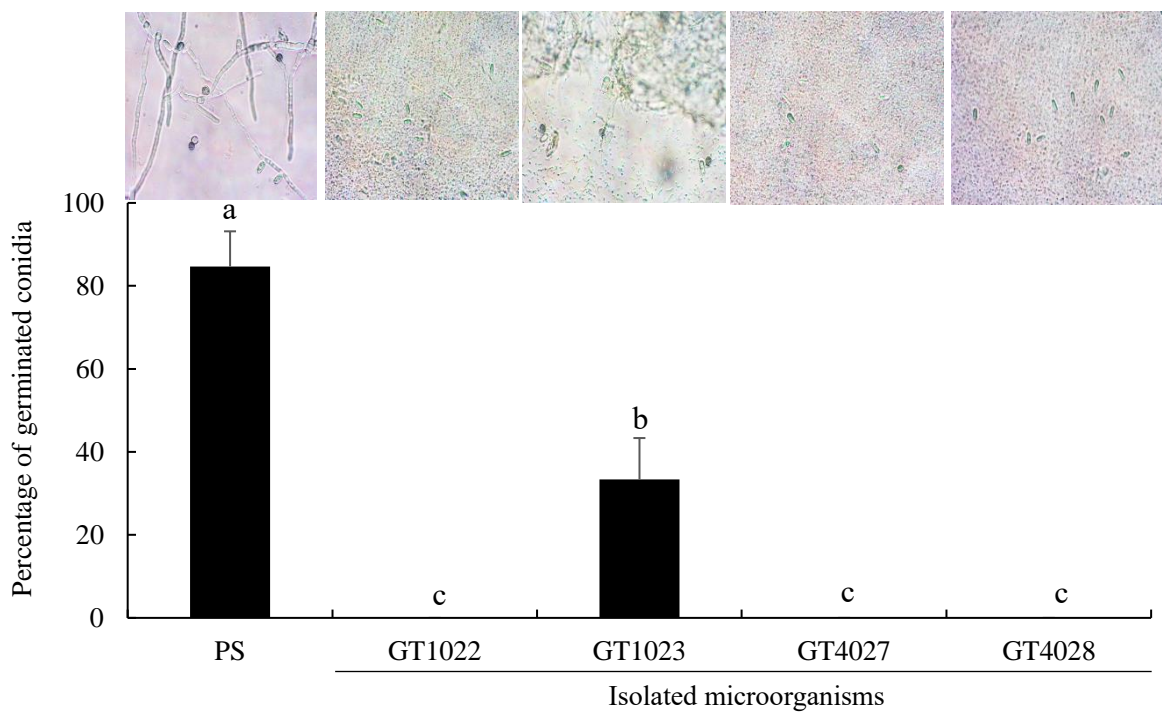


Fig. 3-3 Inhibitory activities of the isolated microorganisms on the germination of *Colletotrichum orbiculare* conidia (8×10^4 conidia/ml). Experiments were repeated three times and a total of 300 conidia per experiment were examined. The bar at the top of each column represents the standard deviation of the mean. Asterisk indicates a significant difference (t-test, $P < 0.05$) microscopes.

第3節 選抜した分離菌培養液とキュウリ炭疽病菌胞子の混合接種によるキュウリ炭疽病菌の発病抑制効果

1. 材料及び方法

a) 供試菌及び供試植物

供試菌として、キュウリ炭疽病菌及び分離菌 GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株を用いた。それぞれの菌は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

供試植物として、キュウリ（品種：北進）を用いた。キュウリは第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

b) 胞子懸濁液の調製

キュウリ炭疽病菌の胞子懸濁液は、第3章、第1節、1b)で述べた方法により準備した。

c) キュウリへの接種方法及び観察

第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて、第1葉が完全展開するまで生育させたキュウリをプラスチックケース（10×20×5 cm）に1処理区5ポットずつ並べた。第3章、第1節、1b)で述べた方法を用いて準備したキュウリ炭疽病菌の胞子を第3章、第1節、1a)で述べた方法を用いて準備した GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株の培養液に 8×10^4 conidia/ml となるように懸濁させた。対照区として、蒸留水及び PS 液体培地にキュウリ炭疽病菌の胞子を懸濁させたものを用いた。調製した懸濁液は、プラスチックケース（17×25 cm）内に並べたキュウリに滴下した。懸濁液は、キュウリ1葉あたり 10 µl ずつ 10 か所に滴下した。滴下後、暗黒・温室条件下、25-27 °C のインキュベーター内で培養した。接種7日後、滴下した場所の病斑面積を測定し、その後、光学顕微鏡下でキュウリ炭疽病菌の胞子の様子を観察した。病斑面積は、トレーシングペーパーにマーカーで病斑部を写し、病斑部分を黒く塗りつぶした。その後、トレーシングペーパーをスキャナーで読み込み、Lia32 ソフトを用いて病斑面積を測定した。キュウリ葉上のキュウリ炭疽病の様子は、以下の方法で観察した。キュウリ葉の切片（1×1 cm）を作成し、ラクトフェノール・アルコール（1:2 v/v）を加えて、室温で3日保持して、脱色し、1%コットンブルーを加えて、1時間後に、染色したキュウリ葉上のキュウリ炭疽病菌の胞子を光学顕微鏡で観察した。

2. 結果

分離菌（GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株）の培養液とキュウリ炭疽病菌の胞子を混合し、キュウリ葉上に滴下して、キュウリ炭疽病の病斑面積を調査した。その結果、対照区と比較して、3株（GT1022 株、GT4027 株及び GT4028 株）の培養液存在下では、キュウリ炭疽病菌による病斑形成が抑制された（Fig. 3-4 A）。一方、GT1023 株の培養液では、病斑形成は抑制されなかった（Fig. 3-4 A）。GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株の培養液の存在下でのキュウリ炭疽病菌の病斑面積は、それぞれ、 $5.9 \pm 11.6 \text{ mm}^2$ 、 $92.1 \pm 42.6 \text{ mm}^2$ 、 $5.2 \pm 7.8 \text{ mm}^2$ 及び $2.6 \pm 2.5 \text{ mm}^2$ であった（Fig. 3-4 C）。対照区である蒸留水及び PS 液体培地での病斑面積は、 $109.7 \pm 39.1 \text{ mm}^2$ 及び $87.6 \pm 49.1 \text{ mm}^2$ であった（Fig. 3-4 C）。また、キュウリ葉上でのキュウリ炭疽病菌胞子の

感染行動を観察した結果、GT1022 株、GT4027 株及び GT4028 株では、胞子発芽が抑制されていたのに対して、GT1023 株では、胞子発芽が、対照区と同様に観察された (Fig. 3-4 B)。

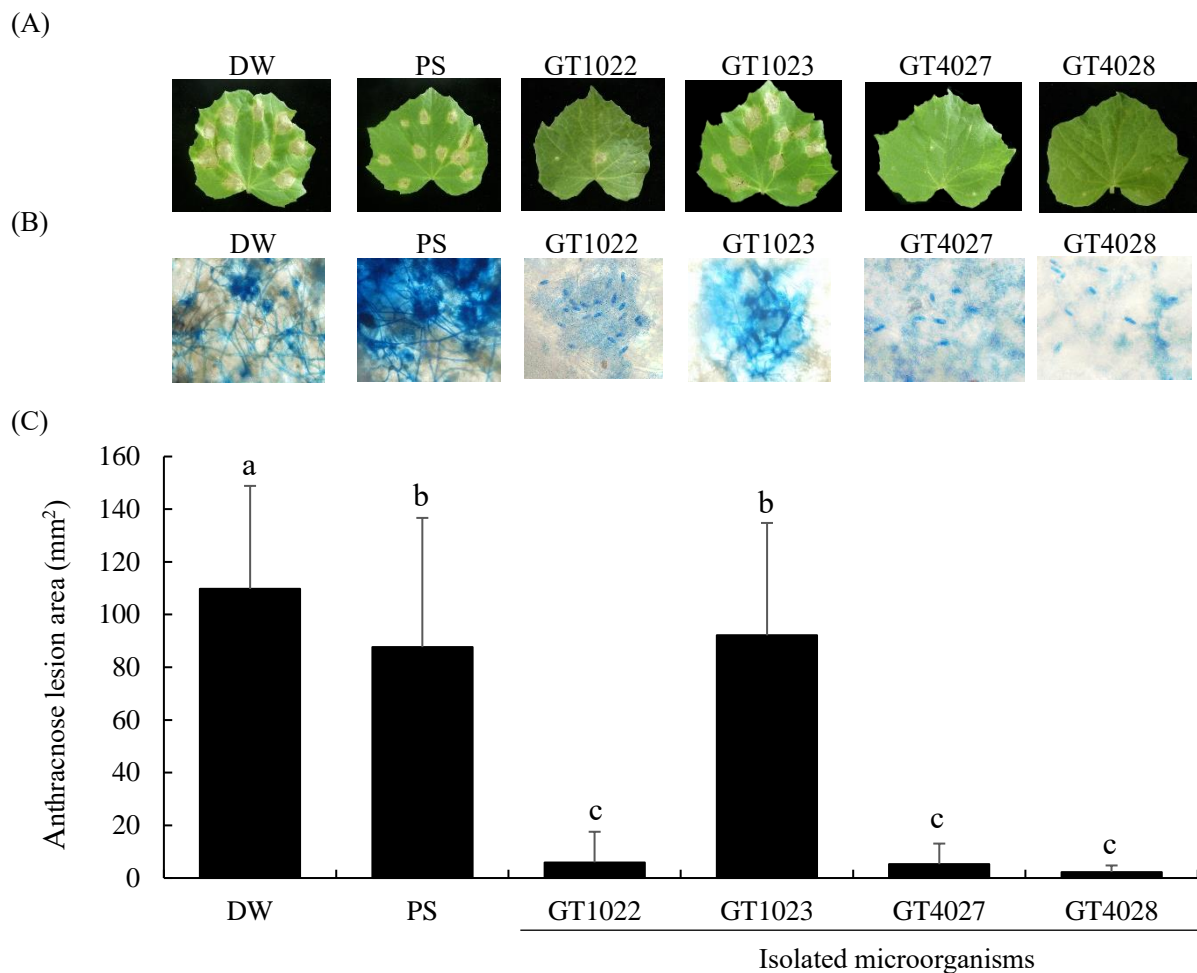


Fig. 3-4 Inhibitory activity of the isolated microorganisms on the germination of *Colletotrichum orbiculare* conidia and formation of anthracnose lesion in cucumber plants. Suspension of *C. orbiculare* conidia (8×10^4 conidia/ml) in the presence (GT1022, GT1023, GT4027 and GT4028) or absence (Distilled water: DW and Potato sucrose broth: PS) was applied with a dropper (10 μ l/drop) at 10 different positions on the cucumber leaves and incubated in a moist chamber at 20-25 °C. Seven days after the inoculation, anthracnose lesions formed (A), germinated conidia (B) and the lesion areas (C) were recorded. Experiments were repeated three times and five cucumber leaves were examined for each experiment. The bar at the top of each column represents the standard deviation of the mean. Means followed by different letters are significantly different according to the Tukey-Kramer test ($P < 0.05$).

第4節 選抜した分離菌の培養液の前処理によるキュウリ炭疽病発病抑制

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ炭疽病菌及び分離菌 GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株を用いた。それぞれの菌は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

供試植物として、キュウリ（品種：北進）を用いた。キュウリは第2章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

b) 孢子懸濁液の調製

キュウリ炭疽病菌の孢子懸濁液は、第3章、第1節、1b) で述べた方法により準備した。

c) キュウリへの接種方法及び観察

第2章、第1節、1a) で述べた方法を用いて、第1葉が完全展開するまで生育させたキュウリをプラスチックケース（10×20×5 cm）に1処理区5ポットずつ並べた。第3章、第1節、1a) で述べた方法を用いて準備した GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株の培養液を上記のキュウリ葉に1ポットあたり、1 ml ずつ噴霧処理した。対照区として、PS 液体培地を同様の方法で処理した。処理したキュウリはインキュベーター（光照射下 12 時間、暗黒下 12 時間、20-25 °C）に3日間保持した。その後、キュウリ炭疽病菌孢子懸濁液（ 8×10^4 conidia/ml）をキュウリに滴下接種した。懸濁液は、キュウリ1葉あたり 10 μ l ずつ 10 か所に滴下した。滴下後、暗黒・湿室条件下、25-27 °C のインキュベーター内で培養した。接種7日後、滴下した場所の病斑面積を測定し、その後、光学顕微鏡下でキュウリ炭疽病菌の胞子の様子を観察した。病斑面積は、トレーシングペーパーにマーカーで病斑部を写し、病斑部分を黒く塗りつぶした。その後、トレーシングペーパーをスキャナーで読み込み、Lia32 ソフトを用いて病斑面積を測定した。キュウリ葉上のキュウリ炭疽病の様子は、以下の方法で観察した。キュウリ葉の切片（1×1 cm）を作成し、ラクトフェノール・アルコール（1:2 v/v）を加えて、室温で3日保持して、脱色し、1%コットンブルーを加えて、1時間後に、染色したキュウリ葉上のキュウリ炭疽病菌の胞子を光学顕微鏡で観察した。

2. 結果

分離菌（GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株）の培養液をキュウリ葉に前処理し、その後、キュウリ炭疽病菌の胞子を滴下して、キュウリ炭疽病の病斑面積を調査した。その結果、対照区と比較して、2株（GT1022 株及び GT4028 株）の培養液存在下では、キュウリ炭疽病菌による病斑形成が抑制された（Fig. 3-5 A）。一方、GT1023 及び GT4027 株の培養液では、病斑形成は抑制されなかった（Fig. 3-5 A）。GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株の培養液の存在下でのキュウリ炭疽病菌の病斑面積は、それぞれ、0 mm²、65.8±40.9 mm²、51.4±51.4 mm² 及び 6.5±21.8 mm² であった（Fig. 3-5 C）。対照区である PS 液体培地での病斑面積は、72.3±38.9 mm² であった（Fig. 3-5 C）。また、キュウリ葉上でのキュウリ炭疽病菌胞子の感染行動を観察した結果、GT1022 株及び GT4028 株では、孢子発芽が抑制されていたのに対して、GT1023 株及び GT4027 株では、孢子発芽及び付着器形成が、対照区と同様に観察された（Fig. 3-5 B）。

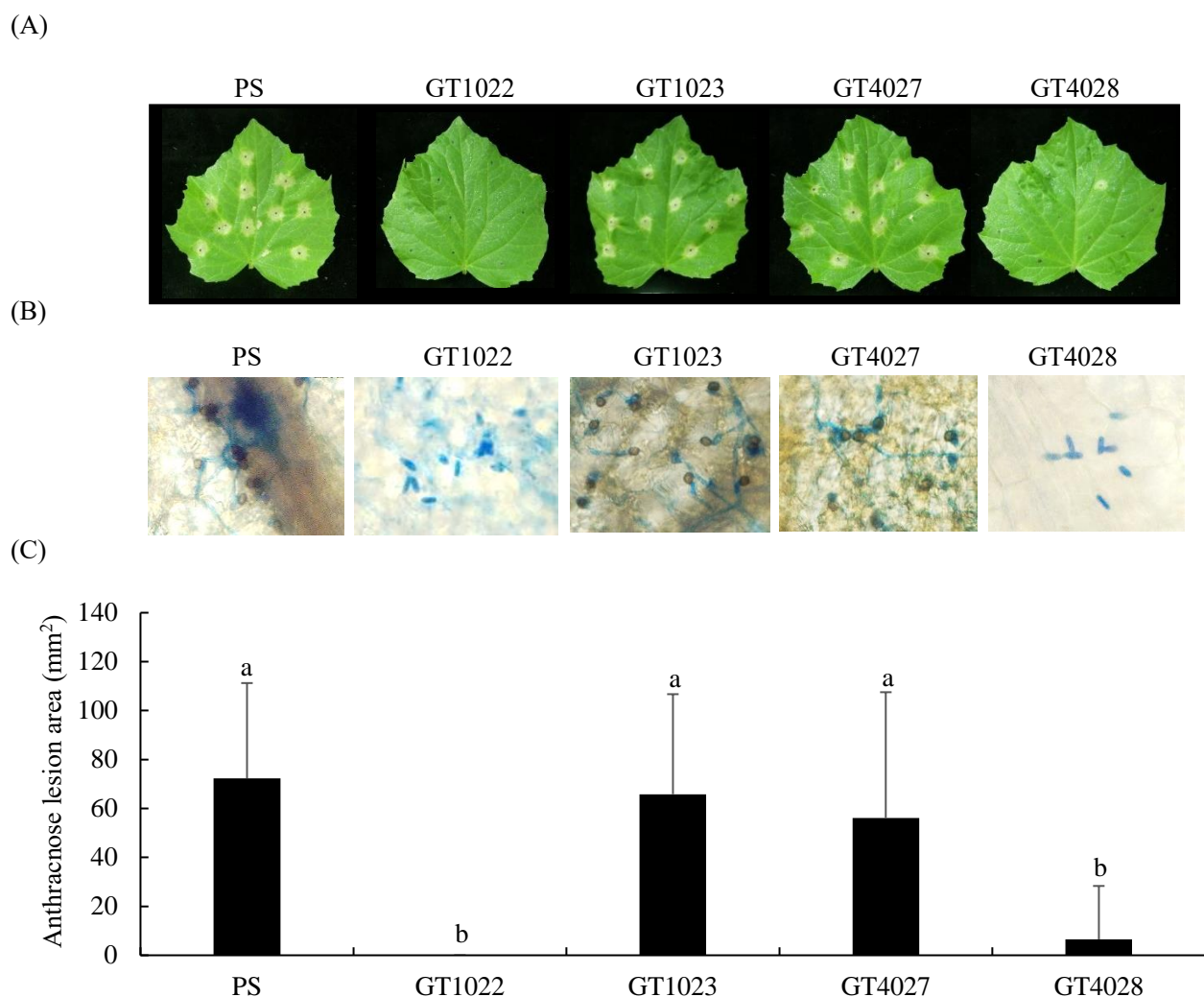


Fig. 3-5 Effect of isolated microorganisms on anthracnose lesion formation in cucumber leaves. Whole cucumber seedlings at the one-leaf stage were treated once by spraying the isolated microorganisms (GT1022, GT1023, GT4027 and GT4028) suspension-culture (1 ml per cucumber seedling). Potato sucrose (PS) liquid medium was used as the control treatment. Treated cucumber plants were maintained at room temperature (20-25 °C) for 3 days, and then a suspension of *Colletotrichum orbiculare* conidia (8×10^4 conidia/ml) was applied with a dropper (10 μ l/drop) at 10 different positions on the isolated microorganisms suspension-culture-treated leaves. Seven days after the inoculation, anthracnose lesions formed (A), germinated conidia (B) and the lesion areas (C) were recorded. Experiments were repeated three times and five cucumber leaves were examined for each experiment. The bar at the top of each column represents the standard deviation of the mean. Means followed by different letters are significantly different according to the Tukey-Kramer test ($P < 0.05$).

第5節 考察

島根県江津市で採取した土壌（4地点）から分離された165株を用いて、キュウリ炭疽病菌の防除に利用可能な微生物の探索を行った。その結果、対峙培養では、39株が対照区と比較して、抑制効果を示した。また、4株が対照区と比較して、50%以上の抑制効果を示した。これら4株がキュウリ炭疽病菌の菌糸に与える影響を電子顕微鏡で観察した結果、菌糸先端の崩壊が確認された。第2章にも記載したように、菌の生育阻害には、キチナーゼや β -1,3-グルカナーゼなど、植物病原菌の細胞壁および細胞膜を損傷させる酵素（Fridlender et al., 1993; Zhang and Yuen, 2000）や低分子の化合物（Kim et al., 2011; Lee et al., 2005; Park et al., 2006）が関与している可能性がある。第1章では、STS1株がキチナーゼを生産していることを示した。今後、これらの菌株が生産する抑制物質についても詳しく調査する必要がある。選抜した4株について、培養液による孢子発芽抑制を調査した。その結果、4株（GT1022株、GT1023株、GT4027株及びGT4028株）の培養液は孢子発芽を著しく抑制した。一方で、植物体上での病斑形成抑制効果を調査した結果、孢子発芽や菌糸生育が抑制されたGT1023やGT4027株は、キュウリ葉上での前処理では、病斑形成を抑制できなかった。このことは、GT1023やGT4027株は、キュウリ炭疽病菌を抑制する物質を生産する能力を持っているが、キュウリ葉上では、それらの物質を生産できない可能性や生産された物質が植物により、分解又は吸収された可能性が考えられた。また、GT1023やGT4027株がキュウリ葉上で生存できない可能性も考えられ、今後、詳しく調査する必要がある。最終的に、本研究でキュウリ炭疽病菌の孢子発芽、植物体上での病斑形成阻害効果が最も高かった株は、GT1022株であった。インプレッションクリアー（*Bacillus amyloliquefaciens*、SDS Biotech K.K.）やボトキラー®（*Bacillus subtilis*、出光興産株式会社）などの生物的防除剤が良く知られているが、炭疽病菌を抑制する生物的防除剤は少ない。今回の結果により、土壌から分離された株のスクリーニングが、植物病原菌の防除に利用可能な微生物の探索に有効である可能性が示された。一方で、GT1022株については、防除に利用するために詳しい調査が必要となる。第4章では、本実験でキュウリ炭疽病菌に対して抑制効果を示したGT1022株を用いて、GT1022株の特徴、室内及び野外での抑制効果について調査した結果を述べる。

第4章 GT1022株の培養液によるキュウリ炭疽病の抑制効果

第3章では、島根県内の土壌から分離された微生物による病害防除の可能性を検証するために、キュウリ炭疽病菌を用いて、実験室レベルでのスクリーニングを行った。その結果、島根県江津市の土壌から分離されたGT1022株により、キュウリ炭疽病を抑制できる可能性を明らかにした。そこで、本章では、GT1022株によるキュウリ炭疽病の抑制効果について詳しく述べる。

第1節 GT1022株の培養液のキュウリ炭疽病に対する発病抑制効果の経時的変化

1. 材料及び方法

a) 供試菌及び供試植物

供試菌として、キュウリ炭疽病菌及び分離菌GT1022株を用いた。それぞれの菌は、第3章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

供試植物として、キュウリ（品種：北進）を用いた。キュウリは第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

b) 孢子懸濁液の調製

キュウリ炭疽病菌の孢子懸濁液は、第3章、第2節、1b)で述べた方法により準備した。

c) キュウリへの接種方法及び観察

第2章、第1節、1a)で述べた方法を用いて、第1葉が完全展開するまで生育させたキュウリをプラスチックケース（10×20×5 cm）に1処理区5ポットずつ並べた。第3章、第1節、1a)で述べた方法を用いて準備したGT1022株の培養液を上記のキュウリ葉に1ポットあたり、1 ml ずつ噴霧処理した。対照区として、PS液体培地を同様の方法で処理した。処理したキュウリはインキュベーター（光照射下12時間、暗黒下12時間、20-25℃）に3、5、7及び9日間保持した。その後、キュウリ炭疽病菌孢子懸濁液（ 8×10^4 conidia/ml）をキュウリに滴下接種した。懸濁液は、キュウリ1葉あたり10 µl ずつ10か所に滴下した。滴下後、暗黒・湿室条件下、25-27℃のインキュベーター内で培養した。接種7日後、滴下した場所の病斑面積を測定し、その後、光学顕微鏡下でキュウリ炭疽病菌の孢子的様子を観察した。病斑面積は、トレーシングペーパーにマーカーで病斑部を写し、病斑部分を黒く塗りつぶした。その後、トレーシングペーパーをスキャナーで読み込み、Lia32ソフトを用いて病斑面積を測定した。キュウリ葉上のキュウリ炭疽病の様子は、以下の方法で観察した。キュウリ葉の切片（1×1 cm）を作成し、ラクトフェノール・アルコール（1:2 v/v）を加えて、室温で3日保持して、脱色し、1%コットンブルーを加えて、1時間後に、染色したキュウリ葉上のキュウリ炭疽病菌の孢子を光学顕微鏡で観察した。

2. 結果

GT1022株の培養液をキュウリ葉に前処理し、その後、経時的にキュウリ炭疽病菌の孢子を滴下して、キュウリ炭疽病の病斑面積を調査した。その結果、対照区と比較して、キュウリ炭疽病菌を接種する3-9日前にGT1022株の培養液を処理したキュウリ葉上では、いずれもキュウリ炭疽病菌による病斑形成が抑制された（Fig. 4-1 A）。GT1022株の培養液を3、5、7及び9日前に処理

したキュウリ葉上でのキュウリ炭疽病菌の病斑面積は、それぞれ、 0 mm^2 、 $7.3\pm 15.9\text{ mm}^2$ 、 $7.1\pm 27.4\text{ mm}^2$ 及び $11.5\pm 25.9\text{ mm}^2$ であった (Fig. 4-1 B)。対照区である PS 液体培地を 3、5、7 及び 9 日前に処理したキュウリ葉上でのキュウリ炭疽病菌の病斑面積は、それぞれ、 $72.3\pm 38.9\text{ mm}^2$ 、 $71.4\pm 39.5\text{ mm}^2$ 、 $128.1\pm 33.6\text{ mm}^2$ 及び $98.6\pm 41.7\text{ mm}^2$ であった (Fig. 4-1 B)。また、病斑部分の切片を作成し、胞子発芽を調査した。その結果、キュウリ炭疽病菌を接種する 3-9 日前に GT1022 株の培養液を処理したキュウリ葉上では、対照区と比較して、いずれもキュウリ炭疽病菌の胞子発芽が抑制された (Fig. 4-2 A)。しかし、3-7 日前と比較して、9 日前では、胞子発芽の抑制は低く、付着器形成も観察された (Fig. 4-2 A)。GT1022 株の培養液を 3、5、7 及び 9 日前に処理したキュウリ葉上でのキュウリ炭疽病菌の胞子発率は、それぞれ、0%、 $9.4\pm 21.1\%$ 、 $7.5\pm 24.1\%$ 及び $70.1\pm 24.2\%$ であった (Fig. 4-1 B)。一方、対照区である PS 液体培地を 3、5、7 及び 9 日前に処理したキュウリ葉上でのキュウリ炭疽病菌の胞子発芽率は、いずれも 100%であった (Fig. 4-2 B)。

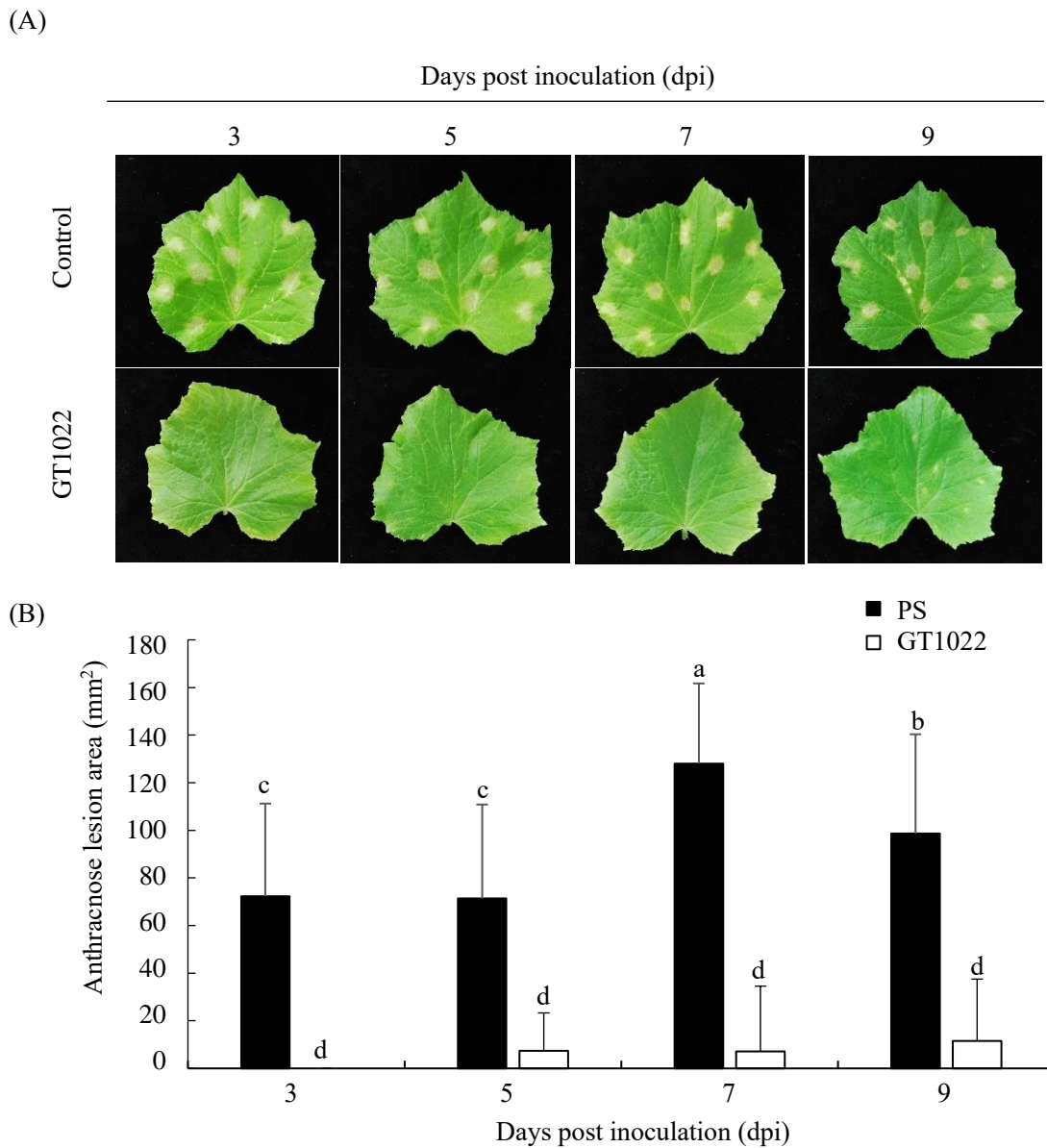


Fig. 4-1 Durability of the inhibitory activity of the isolate GT1022 on the formation of anthracnose lesion in cucumber plants. Whole cucumber seedlings at the one-leaf stage were treated once by spraying the isolate GT1022 suspension-culture (1 ml per cucumber seedling). Potato sucrose (PS) liquid medium was used as the control treatment. Treated cucumber plants were maintained at room temperature (20-25 °C) for 3, 5, 7, and 9 days, and then a suspension of *Colletotrichum orbiculare* conidia (8×10^4 conidia/ml) was applied with a dropper (10 μ l/drop) at 10 different positions on the isolate GT1022 suspension-culture-treated leaves. Seven days after the inoculation, anthracnose lesions formed (a) and the lesion areas (b) were recorded. Experiments were repeated three times and five cucumber leaves were examined for each experiment. The bar at the top of each column represents the standard deviation of the mean. Means followed by different letters are significantly different according to the Tukey-Kramer test ($P < 0.05$).

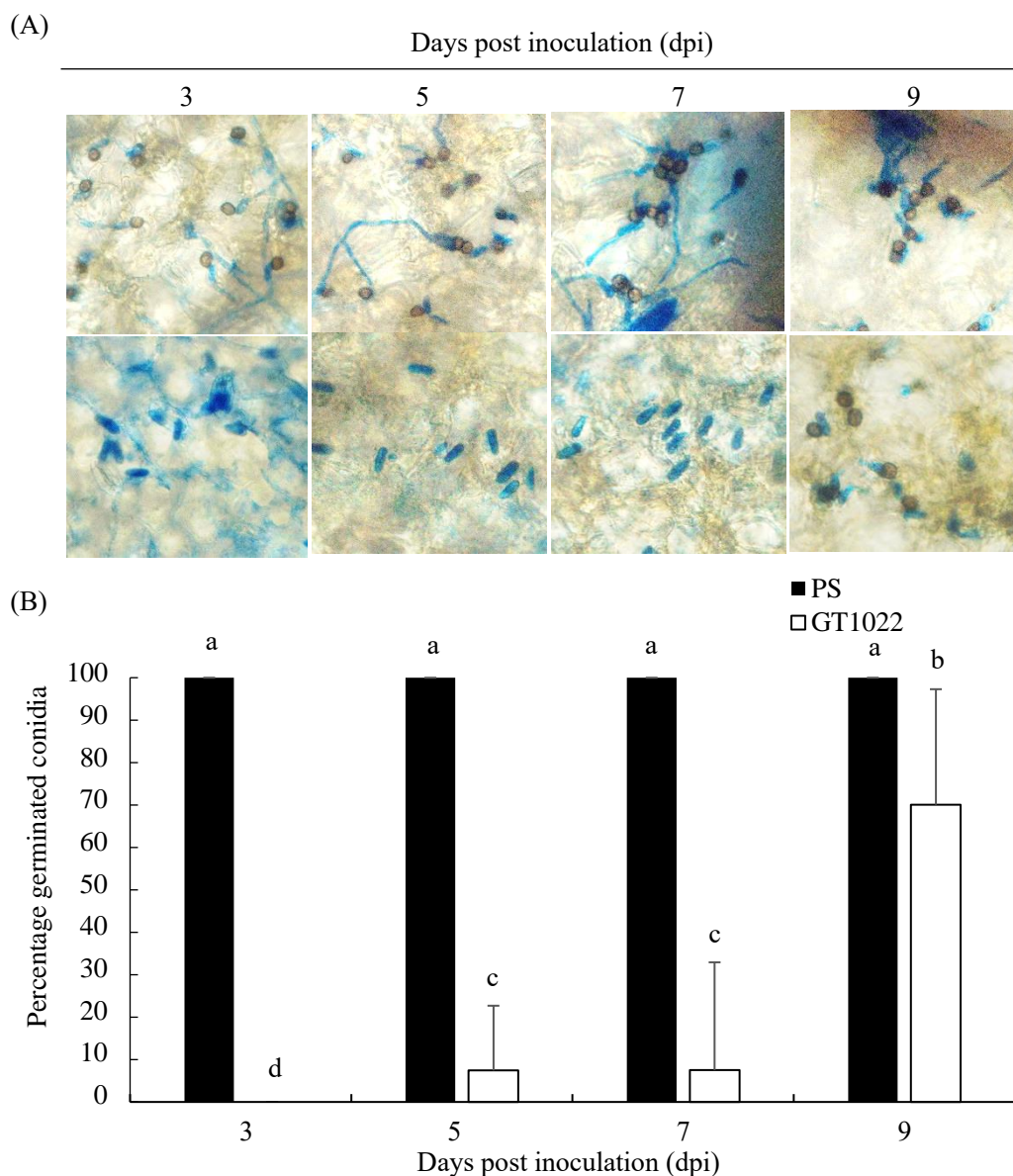


Fig. 4-2 Durability of the inhibitory activity of the isolate GT1022 on the germination of *Colletotrichum orbiculare* conidia in cucumber plants. Whole cucumber seedlings at the one-leaf stage were treated once by spraying the isolate GT1022 suspension-culture (1 ml per cucumber seedling). Potato sucrose (PS) liquid medium was used as the control treatment. Treated cucumber plants were maintained at room temperature (20-25 °C) for 3, 5, 7, and 9 days, and then a suspension of *C. orbiculare* conidia (8×10^4 conidia/ml) was applied with a dropper (10 μ l/drop) at 10 different positions on the isolate GT1022 suspension-culture-treated leaves. Seven days after inoculation with *C. orbiculare*, the percentage of germinated conidia was measured. Experiments were repeated three times and a total of 1,000 conidia per experiment were examined. The bar at the top of each column represents the standard deviation of the mean. Means followed by different letters were significantly different according to the Tukey-Kramer test ($P < 0.05$).

第2節 ビニールハウスでのキュウリへのGT1022株処理がキュウリ炭疽病の発病に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌及び供試植物

供試菌として、キュウリ炭疽病菌及び分離菌 GT1022 株を用いた。それぞれの菌は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

供試植物として、キュウリ（品種：北進）を用いた。キュウリは第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

b) 孢子懸濁液の調製

キュウリ炭疽病菌の孢子懸濁液は、第3章、第2節、1b)で述べた方法により準備した。

c) ビニールハウスでのキュウリ栽培の方法

圃場試験は、2019年5月と7月に島根大学内のビニールハウス(幅3m×奥行5m×高さ2.4m)で実施した。キュウリは、一般的な栽培管理方法により栽培した。10号のプラスチックポットに一般園芸培土（スーパーミックスA：窒素150-260 mg/L、リン酸70-160 mg/L、カリウム190-320 mg/L）を加えて、第2章、第1節、1a)で述べた方法により準備したキュウリを1ポットに1個体ずつ定植した。また、追肥として、マグアンプK中粒（成分：窒素6-リン酸40-カリウム6-マクネシウム15）及び500倍に希釈したハイポネックス（成分：窒素6-リン酸10-カリウム5）を定期的に施肥した。温度の調整は行わず、灌水は適宜行い、30日間栽培した。

d) ビニールハウスにおけるキュウリ炭疽病の発病調査

上記の方法で栽培したキュウリ植物体に第3章、第1節、1a)の方法で準備したGT1022株の培養液を7日ごと処理した。処理量は1葉あたりに1mlとなるように噴霧処理した。定植30日後にキュウリ炭疽病菌（ 8×10^4 conidia/ml）を噴霧接種し、接種7日後に病斑形成面積を調査し、病斑面積率を算出した。病斑面積の測定には、Lia32ソフトを用いた。対照区として、PS液体培地を同様の方法で処理後にキュウリ炭疽病菌の孢子を接種した。

2. 結果

ビニールハウスで栽培したキュウリ植物体でのキュウリ炭疽病に対するGT1022株の抑制効果を調査した。GT1022株を栽培期間中に7日ごとにキュウリ葉上に前噴霧処理し、定植30日後にキュウリ炭疽病菌を接種した。その結果、GT1022株処理区では、対照区と比較して、病斑形成の抑制が観察された（Fig. 4-3 A）。対照区及びGT1022株の植物体あたりの病斑面積率は、それぞれ、 $69.4 \pm 5.6\%$ 及び $14.5 \pm 7.9\%$ であった（Fig. 4-3 B）。

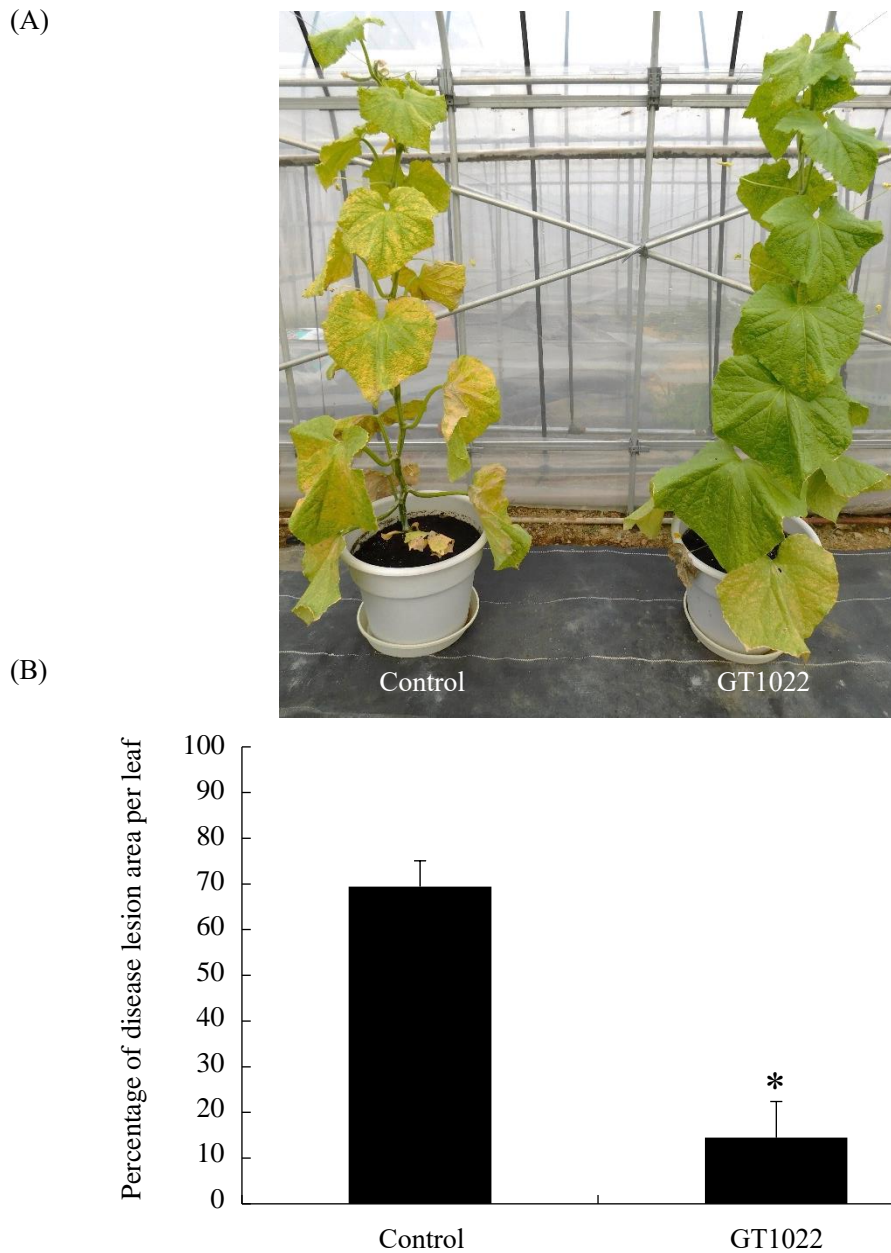


Fig. 4-3 Effects of the isolate GT1022 on anthracnose infection in greenhouse-grown cucumber. The greenhouse experiment was conducted at Shimane University between May 2019 and July 2019. Cucumber seeds were sown in plastic pots (9 cm diameter), and seedlings at the one-leaf stage were transplanted to 10-liter pots (30 cm diameter). Whole leaves of cucumber plants were spray treated (1 ml per cucumber leaf) every 7 days with a suspension culture of the isolate GT1022. As a control, cucumber plants were treated with potato sucrose liquid medium. Whole leaves of cucumber plants at 30 days after transplanting were inoculated with the suspension of *Colletotrichum orbiculare* (8×10^4 conidia/ml) using a hand sprayer. Development of anthracnose lesions (A) and the percentage of anthracnose lesions per plant (B) were measured 7 days after inoculation. Asterisk indicates a significant difference (t-test, $P < 0.05$).

第3節 GT1022 株の同定

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、GT1022 株を用いた。GT1022 株は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

b) DNA 抽出・精製及びシーケンス解析

DNA の増幅には、PCR enzymekit: KOD FX (TOYOBO) を用いた。LB 寒天培地で培養した GT1022 株を滅菌したチップで少量かき取り、200 μ l チューブの内壁面に塗布後、500 W、30 秒間 (2 回) 電子レンジを用いて加熱処理した。その後、チューブに滅菌水 11 μ l、2 \times PCR Buffer for KOD FX Neo 25 μ l、2 mM dNTPs 10 μ l (PCR キット KOD FX (東洋紡株式会社)) 及び KOD FX Neo 1 μ l を添加し、16S rDNA を増幅させた。プライマーは fD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 1.5 μ l 及び rP2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) 1.5 μ l を用いた。PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C、30 秒間熱処理後、95 $^{\circ}$ C、30 秒間、53 $^{\circ}$ C、30 秒間、及び 72 $^{\circ}$ C、1 分 27 秒間を 30 サイクル繰り返し、72 $^{\circ}$ C、10 分間の熱処理後 10 $^{\circ}$ C に保持し、実験に用いた。調製したサンプル 50 μ l ごとに、ローディング Buffer 3 μ l を添加し、アガロースゲルに 25 μ l ずつ分注後、135 V で 20 分間電気泳動 (COSMO BIO、MyRun) した。アガロースゲルは 200 ml 容三角フラスコにアガロース 0.5 g に TAE 50 ml を添加し、電子レンジを用いて溶解させた。ミドリグリーン 2 μ l を添加後、実験に用いた。次に、DNA 抽出を行った。DNA 抽出には Gel/PCR Fragments Extraction Kit (HiYield) を用いた。電気泳動後、アガロースゲルに紫外線を照射し、増幅された 16S rDNA を含むゲルを切り取り、DF Buffer を 500 μ l 添加した。55 $^{\circ}$ C のお湯でゲルを完全に溶解させた後、13,000 \times g、30 秒間遠心分離し、DF Buffer 及び寒天部分を除去後、Wash Buffer 600 μ l を添加し、13,000 \times g、30 秒間遠心分離した。その後再び 13,000 \times g、2 分間遠心分離し、水分を除去した後、Elution Buffer を 30 μ l 添加した。2 分間保持後、20,600 \times g で 2 分間遠心分離し、DNA を抽出した。DNA 抽出液 4 μ l ごとに、Big Dye Terminator v1.1 2 μ l、5 \times sequence Buffer 1 μ l、プライマー (3.2 μ M) 2 μ l、及び滅菌水を 1 μ l 添加した。プライマーは、11f(TGRGTTTGATCMTGGCTYAG) 、 514f(GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) 、 532r(TTACCGCGGCKGCTGGCAC) 、 536R(GTATTACCGCGGCTGCTG) 、 785F(GGATTAGATACCCTGGTAGTC) 、 802r(TACCAGGGTATCTAATCC) 、 906f(AAACTCAAAGGAATTGRCGG) 、 920r(CCGYCAATTCCTTTGAGTTT) 、 926f(AAACTCAAAGGAATTGACGG) 及び 1511f(TGGHTACCTTGTTACGACTT) を実験に用いた。その後、96 $^{\circ}$ C、1 分間熱処理後、96 $^{\circ}$ C、10 秒間、50 $^{\circ}$ C、5 秒間、及び 60 $^{\circ}$ C、4 分間の熱処理を 25 サイクル繰り返し、4 $^{\circ}$ C に保持した。その後、DNA を精製するため、4 M 酢酸ナトリウム 1 μ l 及び 99.5% エタノール 25 μ l を添加し、15 分間保持した後、20,600 \times g、15 分間遠心分離した。上清を除去後、70% エタノールを 25 μ l 加え、20,600 \times g、15 分間遠心分離し、上清を完全に除去した。その後、HiDi ホルムアミド (Thermo Fisher Scientific) 20 μ l を添加し、溶解させた。その後、95 $^{\circ}$ C、10 分間熱処理後、5 分間水中で保持した。調製したサンプル 20 μ l をサンプルプレート (株式会社イナ・オプティカ) に移し、プレートセプタで蓋をして、シーケンス解析 (Applied Biosystems 3130

ジェネティックアナライザ)した。その後、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)を用いて blast 検索し、ClustalW 及び MEGA-X を用いて系統樹を作製した。比較する株の配列データは、データベースから入手した。

2. 結果

GT1022 株の 16S rDNA 領域のシーケンス解析を行った。その結果、GT1022 株の 16S rDNA の全長は 1554 bp であり、*Burkholderia ambifaria* strain AMMD (AF043302) と 99%以上の相同性を示した (Fig. 4-4)。GT1022 株の 16S rDNA の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに LC496395 で登録された。

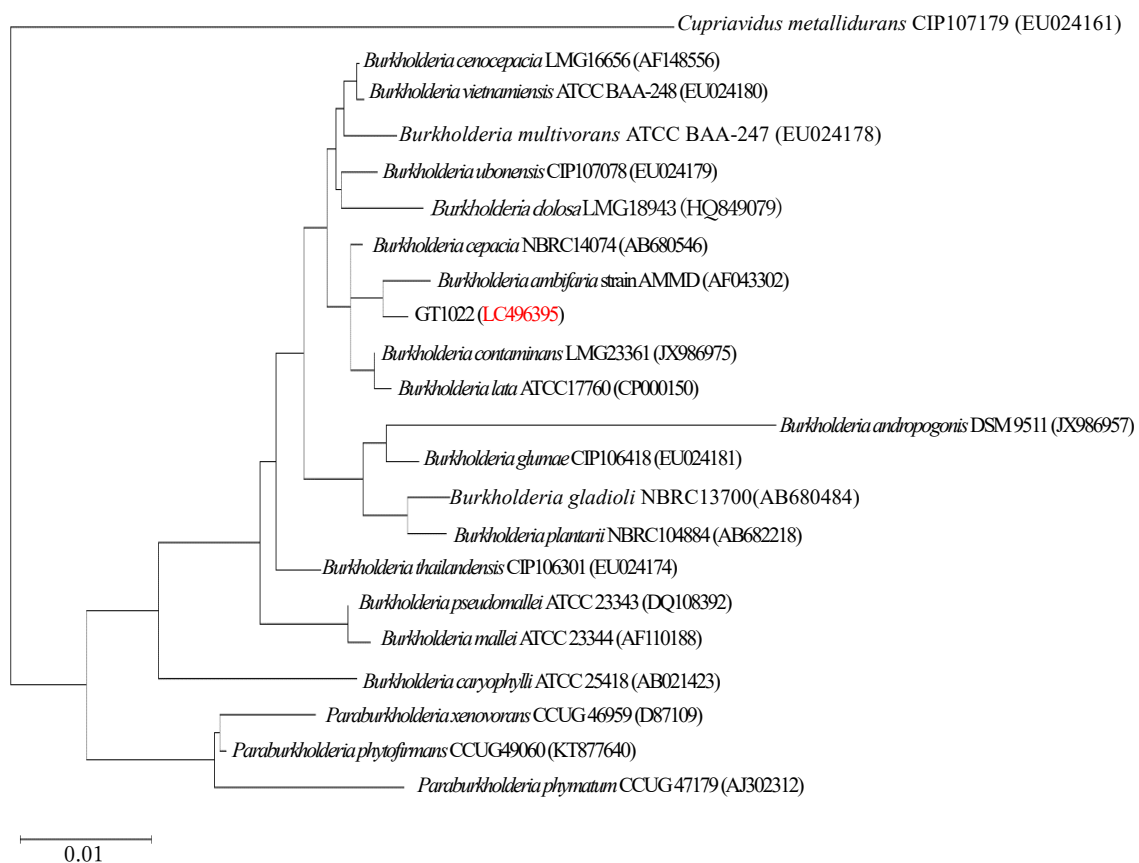


Fig. 4-4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the isolate GT1022. A bootstrap consensus neighbor-joining tree for the isolate GT1022 was created based on the Kimura 2-parameter distance matrix (1000 replicates). *Cupriavidus metallidurans* CIP107179 (EU024161) was used as the outgroup. The scale bar represents 1% sequence dissimilarity.

第4節 GT1022株の培養液のキュウリ炭疽病菌に対する殺菌活性

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ炭疽病菌及び分離菌 GT1022 株を用いた。それぞれの菌は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

b) 孢子懸濁液の調製

キュウリ炭疽病菌の孢子懸濁液は、第3章、第1節、1b)で述べた方法により準備した。

c) 殺菌活性の測定法

第3章、第1節、1a) の方法で準備した GT1022 株の培養液 (1 ml) にキュウリ炭疽病菌を 1×10^5 conidia/ml の濃度で懸濁させ、25-27 °C に保持した。対照区として、PS 液体培地に同様にキュウリ炭疽病菌の孢子を懸濁させたものを用いた。24時間後にそれぞれの懸濁液を遠心分離 (1600×g、10 分間) し、上清を除去した。その後、沈殿物に滅菌水 (1 ml) を加え、懸濁液を作成した。作成した懸濁液 (50 µl) をクロラムフェニコール (20 ppm) 添加の PSA 培地に塗布した。塗布後、25-27 °C で培養し、4 日後にキュウリ炭疽病菌のコロニー数を測定した。実験では、各処理区で 10 枚のシャーレを用いた。実験は 3 回繰り返した。

2. 結果

GT1022 株のキュウリ炭疽病菌に対する殺菌活性を調査した。その結果、GT1022 株を処理し、その後、キュウリ炭疽病菌を処理し、GT1022 株を除去後も菌糸生育が抑制され、GT1022 株は、キュウリ炭疽病菌に対して、殺菌活性を示した (Fig. 4-5 A)。対照区及び GT1022 株処理区のそれぞれのシャーレ 1 枚あたりのコロニー数は、 83.8 ± 7.9 個及び 0 個であった (Fig. 4-5 B)。

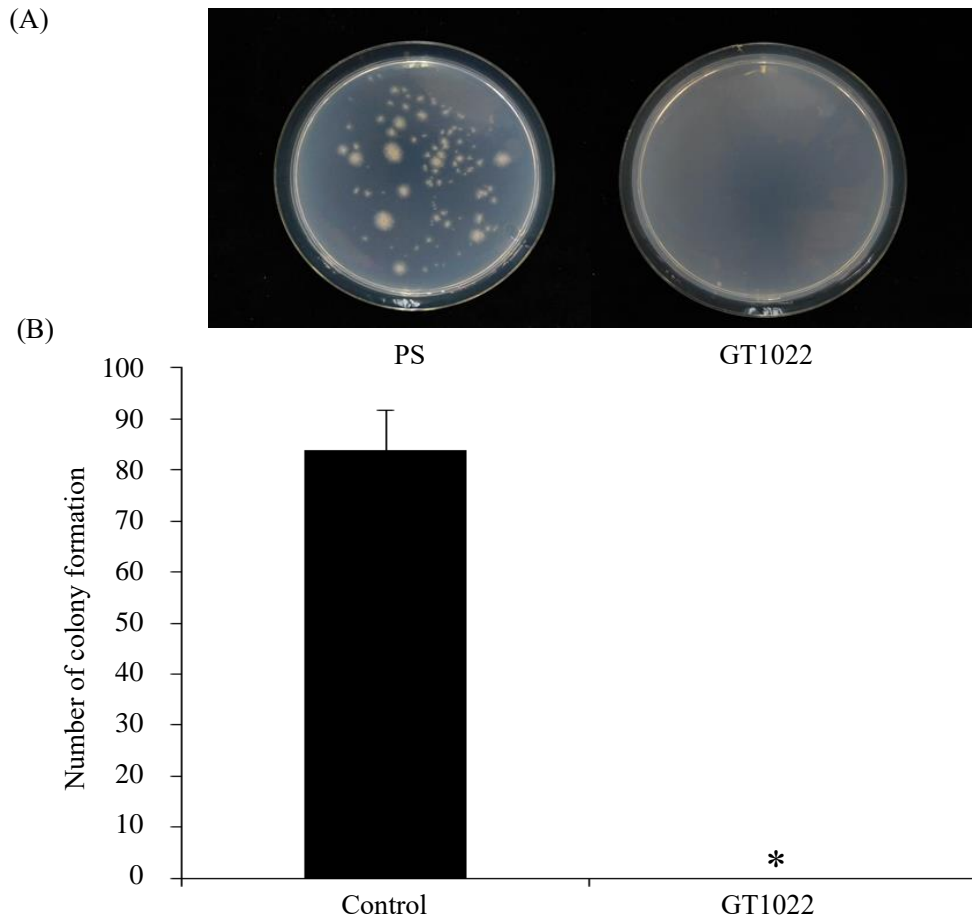


Fig. 4-5 Antifungal activity of the culture suspension of *Burkholderia* sp. isolate GT1022. Conidial suspension (1×10^5 conidia/ml) of *Colletotrichum orbiculare* were treated with the culture suspension of *Burkholderia* sp. isolate GT1022 at 25-27 °C. As a control, potato sucrose (PS) liquid medium was used. After 24 h, the supernatant was removed by centrifugation and then added distilled water. Each conidia suspension was inoculated on PS agar medium with chloramphenicol. The inoculated plates were incubated at 25-27 °C for 4 days and the number of colony formation of the *C. orbiculare* was measured. Experiments were repeated three times and 10 petri dish per experiment were examined. The bar at the top of each column represents the standard deviation of the mean. Asterisk indicates significant difference (t-test, $P < 0.05$).

第5節 GT1022株が培養液中に生産するキュウリ炭疽病菌に対する抑制物質の特徴

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ炭疽病菌及び分離菌 GT1022 株を用いた。それぞれの菌は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

b) 孢子懸濁液の調製

キュウリ炭疽病菌の孢子懸濁液は、第3章、第2節、1b)で述べた方法により準備した。

c) GT1022 の培養濾液 (GT1022CF) の調製

GT1022 株の培養濾液の調製にはジャガイモ・スクロース (PS) 液体培地を用いた。PS 液体培地は試験管に 2 ml ずつ分注し、121°C・20 分間オートクレーブ滅菌後に実験に用いた。第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した GT1022 を PS 液体培地 (2 ml) に移植した。移植後、7 日間、130 回転/分で振盪培養した。振盪培養後、培養液は滅菌ろ過フィルター (0.22 μm) (RephiLe Bioscience, Boston, USA) でろ過した。これを培養濾液として、実験に用いた。対照区として、無接種の PS 液体培地を同様の方法で調製したものをを用いた。

d) 透析膜を用いた培養濾液の分離

スペクトラ/ポア CE 透析用チューブ MWCO500 (SPECTRUM) を用いて、GT1022 株の培養濾液を分離した。GT1022 株の培養濾液 2 ml をスペクトラ/ポア CE 透析用チューブ MWCO500 に入れ、密封した。その後、800 ml の滅菌水を加えたビーカー中でマグネチックスターラーを用いて、攪拌しながら、透析チューブを 4°C に一晩保持した。その後、透析チューブの内液及び外液をそれぞれ、2 ml までエバポレーター (NA-1 SGS、アズワン株式会社) で濃縮した。透析チューブの内液を MWCO (>500)、透析チューブの外液を MWCO (<500) として実験に用いた。

e) 生物検定法

生物活性は、キュウリ炭疽病菌の孢子発芽の抑制により調査した。上記の方法で調製したキュウリ炭疽病菌の孢子を培養濾液に 8×10^4 conidia/ml となるように懸濁させた。対照区として、PS 液体培地にキュウリ炭疽病菌の孢子を懸濁させたものをを用いた。調製した懸濁液は、湿室にしたプラスチックケース (17×25 cm) 内に並べたスライドガラスに滴下した。スライドガラスには、30 μl ずつ 3 か所に滴下した。滴下後、暗黒下、25-27°C のインキュベーター内で培養した。培養 24 時間後、光学顕微鏡下でキュウリ炭疽病菌の孢子発芽を調査した。孢子発芽数は、1 か所あたり孢子 50 個中の孢子発芽数を計数し、孢子発芽を算出した。実験は 3 回繰り返した。合計 900 個の孢子を観察した。

f) 酢酸エチルを用いた培養濾液の分離

GT1022 株の培養濾液 2 ml に同量の酢酸エチルを加えて分配抽出した。この抽出操作を 2 回繰り返した。得られた酢酸エチル可溶部 (約 4 ml) には滅菌水を加え、梨型フラスコを用いて、エバポレーターにより減圧下で 2 ml まで濃縮した。酢酸エチルを除去した水溶液を調製し、培養濾液酢酸エチル可溶部水溶液として実験に用いた。また、酢酸エチル不溶部も同様にエバポレーターにより減圧下で 2 ml まで濃縮した。酢酸エチルを除去した水溶液を調製し、培養濾液酢酸エチル不溶部水溶液として実験に用いた。

g) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による検出

Choma and Grzelak (2011) の方法を用いて、TLC 上での抑制活性を調査した。GT1022 株の培養濾液(100 µl)を薄層クロマトグラフィー用プレート (TLC) (Silica gel 60, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にスポットし、トルエン：酢酸エチル=1：1 (v/v) の展開溶媒を用いて展開させた。展開後、TLC プレートに溶解した PSA 培地 (クロラムフェニコール 20 ppm 添加) に懸濁させた炭疽病菌孢子 (> 1×10^6 conidia/ml 以上) を噴霧した。プレートは湿室にしたプラスチックケース内に納めた後、アルミ缶で覆い、25-27 °C、暗黒条件下で培養し、プレート上の生育阻止帯の有無を調査した。

2. 結果

GT1022 株の培養濾液を調製し、キュウリ炭疽病菌の孢子発芽を調査した。その結果、GT1022 株の培養濾液は、キュウリ炭疽病菌の孢子発芽を著しく抑制した (Fig. 4-6)。また、培養濾液を MW500 以上と以下の画分に分離し、キュウリ炭疽病菌の孢子発芽を調査した。その結果、いずれの画分でも対照区と比較すると抑制効果が確認された。しかし、MW500 以下の画分と比較して、MW500 以上の画分で高い孢子発芽抑制が確認された (Fig. 4-6)。対照区、GT102 株培養濾液、MW500 以上及び MW500 以下の孢子発芽は、それぞれ $88.0 \pm 4.3\%$ 、 $8.1 \pm 4.1\%$ 、 $8.6 \pm 3.2\%$ 及び $41.1 \pm 5.0\%$ であった (Fig. 4-6)。また、GT1022 株の培養濾液を酢酸エチルで分配抽出し、TLC を用いて、生育阻止帯の有無を調査した。その結果、GT1022 株が生産するキュウリ炭疽病菌に対して、抑制効果を示す物質は、酢酸エチル不溶であった (Fig. 4-7)。さらに抑制物質は、熱 (121 °C、20 分間) に安定であり、用いた溶媒では、展開されず、生育阻止帯は原点で確認された (Fig. 4-7)。

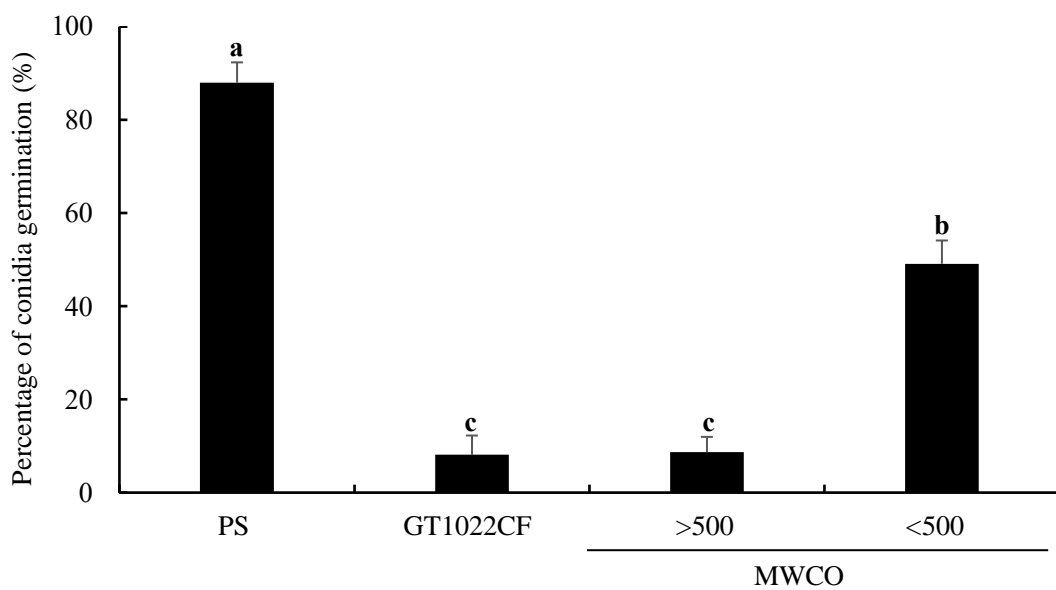


Fig. 4-6 Inhibitory activity of culture filtrates (CF) of *Burkholderia* sp. isolate GT1022 on the conidial germination of *Colletotrichum orbiculare*. Experiments were repeated three times and a total of 300 conidia per experiment were examined. The bar at the top of each column represents the standard deviation of the mean. <500: fraction with molecular weights of <500 of CF, >500: fraction with molecular weights of >500 of CF. PS: potato sucrose broth.



Fig. 4-7 Thin layer chromatography (TLC) bioautography of the culture filtrates of *Burkholderia* sp. isolate GT1022. Samples were spotted onto a TLC plate was sprayed with a concentrated conidial suspension ($>1 \times 10^6$ conidia/ml) of *Colletotrichum orbiculare* in potato sucrose agar medium. The inoculated plate was kept in a moist chamber at 25-27 °C for 7 days. CF, culture filtrate of *Burkholderia* sp. GT1022; Insoluble, ethyl acetate insoluble fraction of the culture filtrate of *Burkholderia* sp. isolate GT1022; Soluble, ethyl acetate soluble fraction of the culture filtrate of *Burkholderia* sp. isolate GT1022; C, culture of *Burkholderia* sp. isolate GT1022; Heat treatment, autoclaved at 121 °C for 20 min

第6節 GT1022株の培養液がキュウリ病原菌の菌糸生育に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、キュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*)、キュウリホモプシス根腐病菌 (*Phomopsis sclerotioides*) 及びキュウリつる枯病菌 (*Stagonosporopsis cucurbitacearum*) と分離菌 GT1022 株を用いた。GT1022 株は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。キュウリ褐斑病菌 (*C. cassiicola*)、キュウリ灰色かび病菌 (*B. cinerea*)、キュウリホモプシス根腐病菌 (*P. sclerotioides*) 及びキュウリつる枯病菌 (*S. cucurbitacearum*) は、予め実験管 (φ1.8×18 cm) に 10 ml 分注した PSA 斜面培地に植えて付けた。その後、約 20 ml ずつプラスチックシャーレ (直径 7 cm) に分注して固めた PSA 培地に移植し、25-27 °C で 7 日間培養し、実験に用いた。

b) 対峙培養法

PSA 培地を用いて、GT1022 株とキュウリ病原菌の対峙培養を行った。予め PSA 培地で培養したキュウリ病原菌を直径 8 mm のコルクボーラーでくり抜き、PSA 培地に移植した。その後、4.5 cm 離して、抗菌検定用ペーパーディスク (直径 8 mm) (Advantec® Filter paper) を置床した。その後、抗菌検定用ペーパーディスクに上記の方法で PS 液体培地を用いて、培養した GT1022 株を 30 µl ずつ処理し、暗黒下、25-27 °C で 7 日間培養した。対照区として、PS 液体培地を処理した。実験では、各区で 5 枚のシャーレを用いた。実験は 3 回繰り返した。

c) 菌叢面積の測定法

トレーシングペーパーにマーカーで菌叢を写し、菌叢部分を黒く塗りつぶした。その後、トレーシングペーパーをスキャナーで読み込み、Lia32 ソフトを用いて菌叢面積を測定した。

2. 結果

島根県江津市の土壌から分離された GT1022 株とキュウリ病原菌の対峙培養を PSA 培地を用いて、行った。その結果、対照区と比較して、GT1022 株は、いずれのキュウリ病原菌の菌叢生育を抑制した (Table 4-1)。対照区におけるキュウリ灰色かび病菌、キュウリ褐斑病菌、キュウリホモプシス根腐病菌及びキュウリつる枯病菌の菌叢面積は、それぞれ、 $2962.0 \pm 341.0 \text{ mm}^2$ 、 $2874.3 \pm 338.5 \text{ mm}^2$ 、 $2647.3 \pm 233.0 \text{ mm}^2$ 及び $3224.3 \pm 108.0 \text{ mm}^2$ であった。一方、GT1022 株の存在下におけるキュウリ灰色かび病菌、キュウリ褐斑病菌、キュウリホモプシス根腐病菌及びキュウリつる枯病菌の菌叢面積は、 $1859.0 \pm 197.7 \text{ mm}^2$ 、 $1646.4 \pm 209.0 \text{ mm}^2$ 、 $1670.5 \pm 265.2 \text{ mm}^2$ 及び $2166.3 \pm 391.5 \text{ mm}^2$ であった (Table 4-1)。

Table 4-1 *In vitro* inhibitory activity to plant pathogens without (a) or with (b) the *Burkholderia* sp. isolate GT1022 in a dual culture on potato scouse agar media.

Plant Pathogens	Mycelia area (mm ²)	
	PSB (Control)	GT1022
<i>Botrytis cinerea</i>	2962.0±341.0	1859.0±197.7*
<i>Corynespora cassiicola</i>	2874.3±338.5	1646.4±209.0*
<i>Phomopsis sclerotioides</i>	2647.3±233.0	1670.5±265.2*
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	3224.3±108.0	2166.3±391.5*

Asterisk indicates significant difference compared with the control (t-test, P < 0.05).

第7節 各種農薬が GT1022 株の増殖に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ炭疽病菌及び分離菌 GT1022 株を用いた。それぞれの菌は、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。

b) 供試農薬

供試農薬として、オーソサイド水和剤 80 (サンケイ化学株式会社、成分：キャプタン) 800 倍希釈、トリフミン水和剤 (石原産業株式会社、成分：トリフルミゾール) 3,000 倍希釈、トップジン M 水和剤 (日本曹達株式会社、成分：チオファネートメチル) 1,500 倍希釈、モレスタン水和剤 (住友化学園芸株式会社、成分：キノキサリン) 2,000 倍希釈、リゾレックス水和剤 (住友化学株式会社、成分：トルクロホスメチル) 500 倍希釈及びシヨウチノスケフロアブル (OAT アグリオ株式会社、成分：フルチアニル、メパニピリム) 2,000 倍希釈を実験に用いた。

c) 培地の調整及び培養条件

オートクレーブ (121 °C、20 分間) した LB 寒天培地 (200 ml) にオーソサイド水和剤 80、トリフミン水和剤、トップジン M 水和剤、モレスタン水和剤、リゾレックス水和剤及びシヨウチノスケフロアブルが、800 倍希釈、3,000 倍希釈、1,500 倍希釈、2,000 倍希釈及び 5,000 倍希釈となるように添加した。各農薬を添加した LB 寒天培地を 7 cm のプラスチックシャーレに分注した。十分に培地表面が乾燥した後に、第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した GT1022 株の培養液を 50 μ l ずつ塗布し、28 °C のインキュベーター内で培養した。対照区として LB 培地のみに GT1022 株を塗布した区を用いた。培養 2 日後にシャーレ 1 枚あたりのコロニー数を計数した。各処理区 5 枚のプラスチックシャーレを用いて、実験は 3 回繰り返した。

2. 結果

各種農薬が GT1022 株の増殖に与える影響を調査した。その結果、オーソサイド水和剤 80 を添加した培地では、GT1022 株のコロニー形成が抑制された。しかし、トリフミン水和剤、トップジン M 水和剤及びシヨウチノスケフロアブルでは、その抑制は小さく、モレスタン水和剤では、抑制は確認されなかった。また、リゾレックス水和剤の存在下では、GT1022 株のコロニー数は対照区と比較して、増加していた (Table 4-2)。対照区でのシャーレ 1 枚あたりのコロニー数は、 202.4 ± 22.6 個であった。オーソサイド水和剤 80、トリフミン水和剤、トップジン M 水和剤、モレスタン水和剤、リゾレックス水和剤及びシヨウチノスケフロアブルでは、0 個、 131.9 ± 32.0 個、 161.4 ± 17.5 個、 190.4 ± 19.9 個、 320.3 ± 26.1 個及び 159.1 ± 23.8 個であった (Table 4-2)。

Table 4-2 Effect of fungicides on growth of isolate GT1022 on LB agar medium

Fungicide	Number of colony per Petri dish	
Control	202.4±22.6 ^Z	b ^y
Morestan	190.4±19.9	b
Osoaide	0	e
Rizorekusu	320.3±26.1	a
Shochinisuke	159.1±23.8	c
Torifumin	131.9±32.0	c
Topgin M	161.4±17.5	d

^Z Values represent were mean ± SD

^y Different letters within a column indicate significant differences by Tukey-Kramer test at P<0.05.

第8節 考察

本研究では、*Burkholderia ambifaria* と高い相同性を示す *Burkholderia* 属である GT1022 株が、キュウリ炭疽病菌の菌糸生育、孢子発芽発芽を抑制し、野外においてもキュウリ炭疽病の発病を抑制することを明らかにした。さらに、キュウリ炭疽病菌の菌糸の形態は、GT1022 株の存在によって影響を受けることを明らかにした。これまでに *Burkholderia* 属による植物病原菌の生物的防除については、いくつかの報告がある (Elshafie et al., 2012; Ho et al., 2014; Miyagawa, 2000; Tagele et al., 2018; Tenorio-Salgado et al., 2013)。 *B. ambifaria* についても *Pythium ultimum* や *Rhizoctonia solani* などのいくつかの土壌伝染性植物病害に対する抑制効果が報告されている (Li et al., 2002; Parikh and Adesemoye, 2018; Roberts et al., 2005; 2014)。また、Tsuchiya et al. (1995) は、*Pseudomonas cepacia* (*B. cepacia*) が、*in vitro* および *in vivo* で抑制効果を示したことを報告した。しかし、*C. orbiculare* によって引き起こされる炭疽病に対する *B. ambifaria* の抑制効果に関する報告はない。*B. ambifaria* は、cepacins (Parker et al., 1984)、bactobolins (Seyedsayamdost et al., 2010)、burkholdines (Tawfik et al., 2010)、enacyloxin IIa (Mahenthiralingam et al., 2011) hydroxyquinolines (Mullins et al., 2019) 及び pyrrolnitrin (Schmidt et al., 2009) などの抗菌物質を生成することが報告されている。また、Mullins et al. (2019) は、*B. ambifaria* が菌株ごとに異なる抗菌物質の生成経路を持つことを報告した。さらに、Groenhagen et al. (2013) は、*B. ambifaria* が *Rhizoctonia solani* 及び *Alternaria alternata* に対して阻害効果を持つ揮発性物質を生産することを報告した。本研究では、GT1022 株は、炭疽病菌の菌糸を崩壊し、孢子発芽も抑制した (Fig. 3-2, 3-3)。また、培養濾液中に分子量 500 以上の酢酸エチルに不溶な熱安定な抑制物質が存在していることを明らかにした (Fig. 4-6, 4-7)。したがって、今後、GT1022 株の培養濾液に存在する抑制物質を特定することで、GT1022 株によるキュウリ炭疽病菌の抑制機構を明らかにできる可能性がある。また、キュウリ植物体での GT1022 株のキュウリ炭疽病の発病抑制効果を調査した。その結果、病斑形成は、GT1022 株を前処理して 3-9 日後にキュウリ炭疽病菌を接種した場合にも抑制された (Fig. 4-1)。さらに、分離株 GT1022 は、キュウリ植物に対して植物毒性効果を示さなかった。一方で、キュウリ葉上でのキュウリ炭疽病菌の孢子発芽率は、GT1022 株を接種する 3、5、及び 7 日間に処理した場合には、30%未満であったが、9 日間の処理後の接種では、70%以上に増加し、付着形成も観察された (Fig. 4-2)。これらの結果は、圃場試験においては、7 日ごとに GT1022 株をキュウリ植物体に処理することが効果的であることを示唆した。実際、本研究では、ビニールハウス内で栽培したキュウリに 7 日ごとに GT1022 株を処理するとキュウリ炭疽病の発生は、著しく抑制された (Fig. 4-3)。一般的に、キュウリの生育に最適な温度範囲は 28-35 °C であることが明らかになっている (Grimstad and Frimanslund, 1993)。また、キュウリ病害の発生に最適な温度は 20-30°C である (Kishi, 1998)。本研究では、GT1022 は 20-37°C でキュウリ炭疽病菌に対して効果を示す抑制物質を生産することを明らかにしている。これらの結果は、GT1022 株がキュウリの栽培条件下でさまざまなキュウリ病害を抑制できる可能を示した。さらに、GT1022 株は、キュウリ病害の防除に利用されているいくつかの殺菌剤の存在下でも増殖可能であった (Table 4-2)。これらの結果は、GT1022 株が、キュウリの防除に通常使用されるいくつかの殺菌剤と組み合わせて使用できることを示した。加え

て、GT1022 株は、*Botrytis cinerea*、*Corynespora cassiicola*、*Phomopsis sclerotioides*、および *Stagonosporopsis cucurbitacearum* の菌叢生育も阻害した (Table 4-1)。*B. ambifaria* は、多種多様な生態学的ニッチで自然に発生し、非常に用途の広い代謝を有する細菌のグループである *B. cepacia* 複合体の一部である (Coenye et al., 2001)。系統樹解析では、GT1022 株は、人間、動物及び植物の病原体である *Burkholderia* 属の種とは異なるクレードに位置していた (Fig. 4-4)。今後、系統発生的、メタボロミクスの、および機能的アプローチを用いて、生物的防除剤として使用するために GT1022 株の安全性を調査する必要がある。

本章では、*Burkholderia* 属である GT1022 株がキュウリ炭疽病などのキュウリの病害を防除するための新しい生物的防除剤の開発に貢献できる可能性を示した。

第5章 GT1022株の培養液によるキュウリ立枯病の抑制効果

第4章では、島根県江津市の土壌から分離されたGT1022株が、圃場レベルでもキュウリ炭疽病を抑制できることを明らかにし、他のキュウリ病害についても抑制できる可能性を示唆した。植物病害には、地上病害と土壌病害があり、いずれも収量に大きな影響を与える。土壌病害の中で収量に大きな影響を与える病原菌に*Pythium*属がある。そこで、本章では、GT1022株によるキュウリ立枯病菌 (*Pythium aphanidermatum*) の抑制効果について詳しく述べる。

第1節 GT1022株の培養液がキュウリ立枯病菌の菌糸生育に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ立枯病菌 (*P. aphanidermatum*) と分離菌GT1022株を用いた。GT1022株は、グリセロールストックとして保存されているものを、LB寒天培地で増殖させた。その後、LB液体培地3mlに移植し、暗黒下、25-27℃で7日間振盪培養し、実験に用いた。

第3章、第1節、1a) で述べた方法により準備した。キュウリ立枯病菌は、2019年に島根大学内の圃場のキュウリから分離した。キュウリ立枯病菌は、予め実験管 (φ1.8×18 cm) に10ml分注したPSA斜面培地に植えて付けた。その後、約20mlずつプラスチックシャーレ (直径7 cm) に分注して固めたPSA培地に移植し、25-27℃で2日間培養し、実験に用いた。

b) 対峙培養法

LB寒天培地を用いて、GT1022株とキュウリ立枯病菌の対峙培養を行った。LB寒天培地の端に抗菌検定用ペーパーディスク (直径8 mm) (Advantec® Filter paper) を置床した。その後、抗菌検定用ペーパーディスクに培養したGT1022株を30 μl処理し、暗黒下、28℃で培養した。培養3日後に、予めPSA培地で培養したキュウリ病原菌を直径8 mmのコルクボーラーでくり抜き、抗菌検定用ペーパーディスクから4.5 cm離して、培地に移植した。移植後、暗黒下、28℃で3日間培養した。対照区として、LB液体培地を抗菌検定用ペーパーディスクに処理した。実験では、各区で5枚のシャーレを用いた。実験は3回繰り返した。

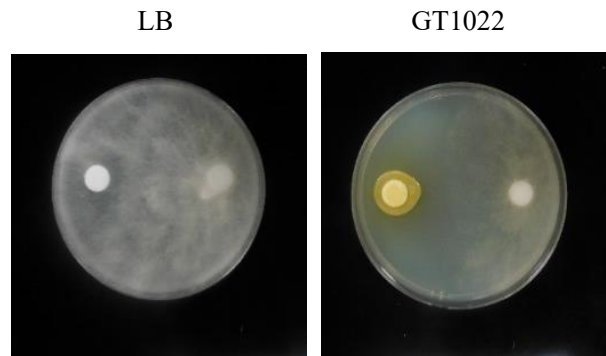
c) 菌叢面積の測定法

トレーシングペーパーにマーカーで菌叢を写し、菌叢部分を黒く塗りつぶした。その後、トレーシングペーパーをスキャナーで読み込み、Lia32ソフトを用いて菌叢面積を測定した。

2. 結果

島根県江津市の土壌から分離されたGT1022株とキュウリ立枯病菌をLB寒天培地で対峙培養し、キュウリ立枯病菌の菌叢面積を測定した。その結果、対照区と比較して、GT1022株の存在下では、キュウリ立枯病菌の菌糸生育が抑制された (Fig. 5-1 A)。対照区及びGT1022株処理区におけるキュウリ立枯病菌の菌叢面積は、それぞれ、 $3034.8 \pm 202.2 \text{ mm}^2$ 及び $1626.6 \pm 296.8 \text{ mm}^2$ であった (Fig. 5-1 B)。

(A)



(B)

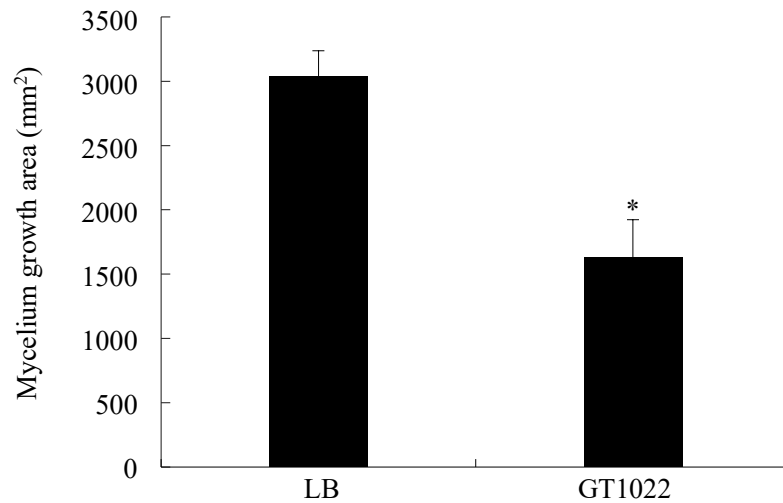


Fig. 5-1 Antagonistic effects of *Burkholderia ambifaria* isolate GT1022, on the growth of *Pythium aphanidermatum* (A). Antimicrobial activity of the isolate GT1022 on the growth of *P. aphanidermatum*, observed in a dual culture assay with (LB) and without (GT1022) the GT1022. (B) The mycelium growth area (mm²) of *P. aphanidermatum* with (LB) or without (GT1022) the GT1022. The asterisk indicates a significant difference compared to the control (t-test, $P < 0.05$).

第2節 GT1022株の培養液がキュウリ立枯病菌の遊走子発芽に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ立枯病菌 (*P. aphanidermatum*) と分離菌 GT1022 株を用いた。キュウリ立枯病菌及び GT1022 株は、第5章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

b) 培地調製と培養条件

V8 ジュース寒天培地 (10% V8 ジュース、0.02% CaCO₃、1.5%寒天) は、121 °C、20 分間オートクレーブ滅菌した後、実験に用いた。

c) 遊走子懸濁液の調製

約 30 ml ずつプラスチックシャーレ (直径 9 cm) に分注して固めた V8 ジュース寒天培地 (10% V8 ジュース、0.02% CaCO₃、1.5%寒天) に予め PSA 培地で培養しておいたキュウリ立枯病菌を移植して、25-27 °C で暗黒下、4 日間培養した。培養後、菌叢をコルクボーラー (8 mm) でくり抜き、滅菌水に入った直径 9 cm のガラスシャーレの中に浸漬し、インキュベーター (光照射下 12 時間、暗黒下 12 時間、28-30 °C) に 24 時間保持した。その後、2 ml の滅菌水を加えた 1.5 ml チューブに菌糸を入れ、4 °C 暗黒下で 1 時間保持後、25 °C 暗黒下で 1 時間保持し、遊走子を形成させた。

d) 生物検定法

分離菌の生物活性は、キュウリ立枯病菌の遊走子発芽の抑制により調査した。上記の方法で調製したキュウリ立枯病菌の遊走子 (5×10^4 zoospores/ml) と GT1022 株の培養液を 1:1 で混合した。対照区として、LB 液体培地にキュウリ立枯病菌の遊走子を懸濁させたものを用いた。調製した懸濁液は、湿室にしたプラスチックケース (17×25 cm) 内に並べたスライドガラスに滴下した。スライドガラスには、30 µl ずつ 3 か所に滴下した。滴下後、暗黒下、25-27 °C のインキュベーター内で培養した。培養 2 時間後、光学顕微鏡下でキュウリ立枯病菌の遊走子発芽を調査した。遊走子発芽数は、1 か所あたり遊走子 50 個中の遊走子発芽数を計数し、遊走子発芽率を算出した。実験は 3 回繰り返した。合計 450 個の遊走子を観察した。

2. 結果

GT1022 株の培養液とキュウリ立枯病菌の遊走子を混合し、スライドガラスに滴下して、キュウリ立枯病菌の遊走子発芽率を調査した。その結果、対照区と比較して、GT1022 株の培養液存在下では、キュウリ立枯病菌の遊走子発芽が著しく抑制された (Fig. 5-2 A)。対照区及び GT1022 株の培養液の存在下でのキュウリ立枯病菌の遊走子発芽率は、それぞれ、100%及び 0%であった (Fig. 5-2 B)。

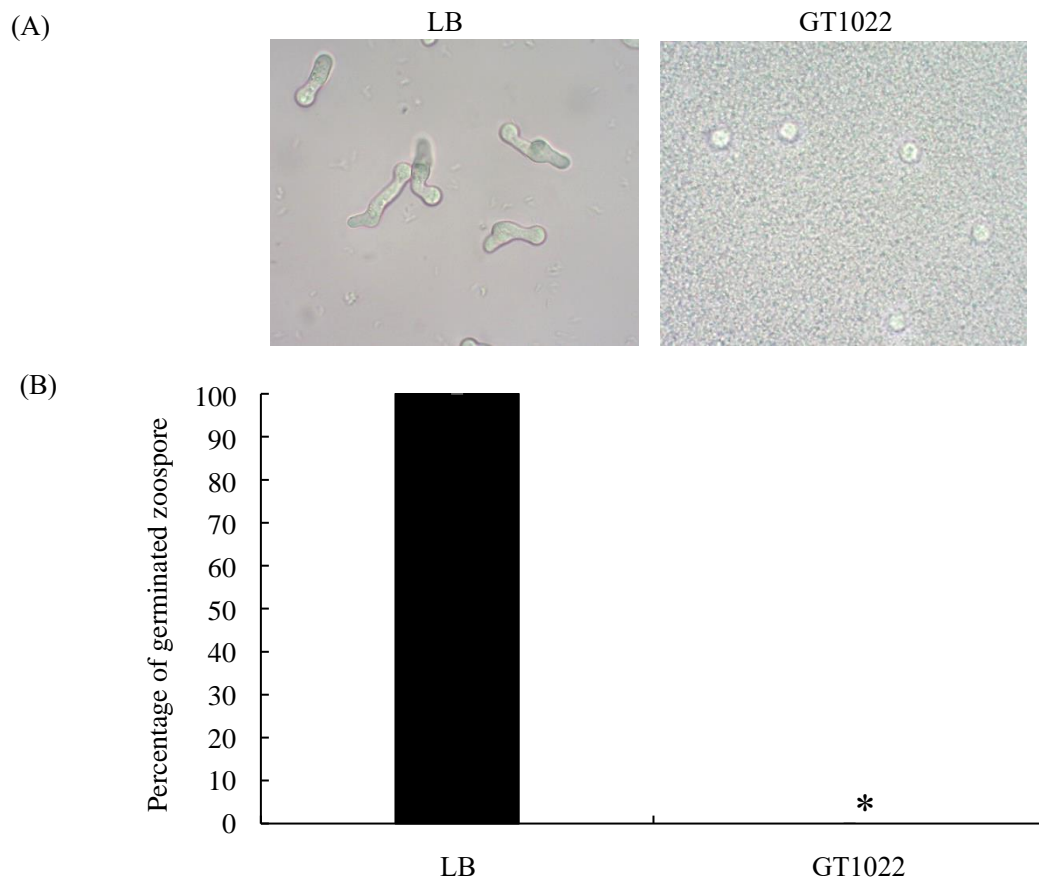


Fig. 5-2 Suppressive effect of *Burkholderia ambifaria* isolate, GT1022, culture on *Pythium aphanidermatum* zoospore germination. (A) *P. aphanidermatum* zoospore germination on a slide glass in the absence (LB) or presence (GT1022) of the GT1022. (B) Percentage of germination of *P. aphanidermatum* zoospores in the absence (LB) or presence (GT1022) of the GT1022. A *P. aphanidermatum* zoospore suspension was dropped onto slides in the absence (LB only) or presence of the GT1022 and incubated in a moist chamber at 28-30 °C in the dark. After 2 h, the percentage of zoospore germination was determined under light microscopy. Experiments were repeated three times and a total number of 150 conidia per experiment were examined. The asterisk indicates a significant difference compared to the control (t-test, $P < 0.05$).

第3節 GT1022株の培養液がキュウリ立枯病の発病に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ立枯病菌 (*P. aphanidermatum*) と分離菌 GT1022 株を用いた。キュウリ立枯病菌は、You et al. (2019) の方法に従って培養した。ベントグラスの種子 2 g に 1 ml の蒸留水を加えて、オートクレーブ (121 °C、20 分間) した培地に予め PSA 培地で培養したキュウリ立枯病菌を移植し、25-27 °C で 4 日間培養した。GT1022 株は、第 5 章、第 1 節、1a) で述べた方法により準備した。

b) 供試植物

供試植物として、キュウリ (品種: 北進、タキイ種苗株式会社) を用いた。北進の種子をニッピ園芸培土 1 号【日本肥糧株式会社、肥料成分: 窒素 (220 mg/kg)、リン酸 (2775 mg/kg)、カリウム (220 mg/kg)、苦土 (220 mg/kg)】を加えたプラスチックチューブ (30×200 mm) に 1 粒播種し、バーミキュライトで覆った。キュウリはインキュベーター (光照射下 12 時間、暗黒下 12 時間、28-30 °C) で生育させ、双葉が展開するまで生育させ、実験に用いた。

c) キュウリへの接種方法及び観察

上記で述べた方法を用いて、双葉が展開するまで生育させたキュウリをプラスチックケース (10×20×5 cm) に 1 処理区 5 個ずつ並べた。上記で述べた方法を用いて、キュウリ立枯病菌を培養したベントグラスの種子 0.1 g を 0.2% の寒天培地 (50 ml) に懸濁させた。懸濁液 (1 ml) と GT1022 株の培養液 (3 ml) を混合した。対照区として、LB 液体培地にキュウリ立枯病菌の懸濁液を混合したものをを用いた。調製した懸濁液は、プラスチックケース (17×25 cm) 内に並べたキュウリに滴下した。懸濁液は、キュウリ 1 個体あたり 4 ml ずつ根元に接種した。接種後、光照射下 12 時間、暗黒下 12 時間、28-30 °C で培養した。接種 1、2、3、4 及び 5 日後に生存率を調査した。生存率は、(健全な個体数/キュウリ 5 個体) × 100 で算出した。キュウリの根での感染の様子は、以下の方法で観察した。実験に用いたキュウリの根を洗浄し、1% コットンブルーを加えて、1 時間後に、染色したキュウリの根を光学顕微鏡で観察した。

2. 結果

キュウリ立枯病の発病に対する GT1022 株の抑制効果をキュウリ植物体で経時的に調査した。対照区でのキュウリ立枯病菌の高い発病は 2 日までに観察され、5 日後にはすべてのキュウリが枯死した。一方、GT1022 株の培養液の存在下では、接種 5 日後でも 80% 近い生存率であった (Fig. 5-3)。また、接種 5 日後のキュウリの根を観察した結果、対照区では、多数の卵胞子が観察されたが、GT1022 株の存在下では、根でのキュウリ立枯病菌の感染が抑制され、卵胞子形成も観察されなかった (Fig. 5-4)。

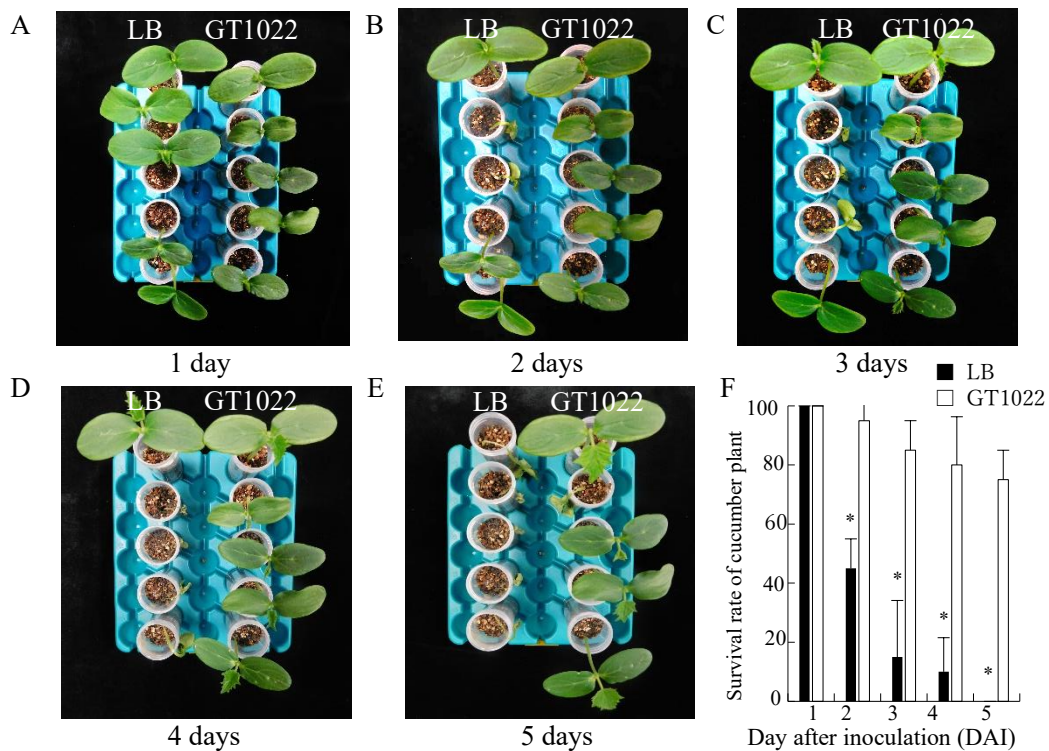


Fig. 5-3 Suppression over time of *Pythium* damping-off disease of cucumber plants by application of suspension culture of *Burkholderia ambifaria* isolate, GT1022. (A)-(E) suppression of *Pythium* damping-off disease on (A) one, (B) two, (C) three, (D) four, and (E) five days following inoculation. (F) Chronological change of survival rate of cucumber plants with (LB) or without (GT1022) application of suspension culture of the GT1022. Entire cucumber seedlings at the seed leaf stage were inoculated with *P. aphanidermatum* in the absence (LB) or presence (GT1022) of the GT1022 and incubated in a moist chamber at 28-30 °C. Experiments were repeated three times and five cucumber leaves were examined for each experiment. Bars at the top of each column in (F) represents the standard deviation of the mean. Means followed by different letters are significantly different according to t-test ($P < 0.05$).

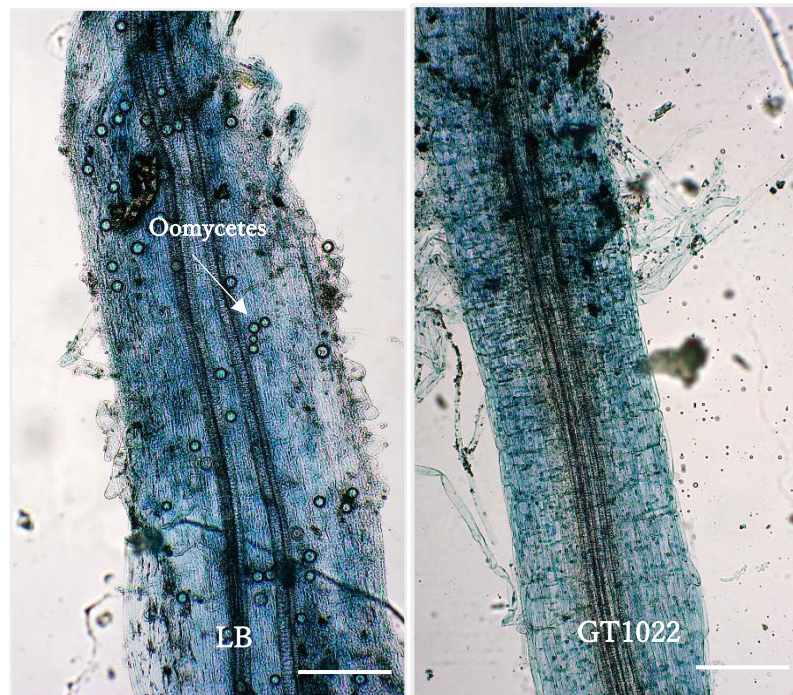


Fig. 5-4 Effect of a suspension culture of *Burkholderia ambifaria* isolate, GT1022, on the oomycete formation of *Pythium aphanidermatum* on cucumber roots of cucumber seedlings at the seed leaf stage inoculated with *P. aphanidermatum* in the absence (LB) or presence (GT1022) of the GT1022. Inoculated cucumber plants were incubated in a moist chamber at 28-30 °C with a photo period of 12 h. After 5 days, the cucumber roots were stained with 1% cotton blue in lactophenol for 1 h. Oomycete formation was observed under a light microscope. Arrows represent oomycetes of *P. aphanidermatum*. Scale bars are 150 μ m in length.

第4節 GT1022株の培養液の各種酵素活性

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌として、キュウリ立枯病菌 (*P. aphanidermatum*) と分離菌 GT1022 株を用いた。

b) 活性測定法

キチナーゼ活性を調査するためにキチン含有培地 (コロイド化キチン 60 ml、Na₂HPO₄ 1.2 g、KH₂PO₄ 0.6 g、(NH₄)₂SO₄ 0.2 g、NaCl 0.1 g、Yest Extract 0.1 g、寒天 3.0 g、蒸留水 140 ml) を用いた。プロテアーゼ活性を調査するために 1% スキムミルク寒天培地は (スキムミルク 2 g、寒天 3 g、蒸留水 200 ml) を用いた。グルカナーゼ活性を調査するためにラミナリン含有の LB 寒天培地 (LB 寒天培地 200 ml、ラミナリン 0.01%) を用いた。すべての培地は、オートクレーブ (121 °C、20 分間) 後にプラスチックシャーレに分注し、実験に用いた。上記の方法で準備した各培地の中央に抗菌検定用ペーパーディスク (直径 8 mm) (Advantec® Filter paper) を置床した。その後、第 5 章、第 1 節、1a) で述べた方法により準備した GT1022 株の培養液 30 µl を抗菌検定用ペーパーディスクに接種した。接種後、暗黒下、28 °C で 2 日間培養した。培養後、キチナーゼ活性及びプロテアーゼ活性は、培地に形成されるクリアゾーンの有無で調査した。グルカナーゼ活性は、培養した培地を 1% コンゴレッドで染色し、蒸留水で 3 回を洗浄し、クリアゾーンの有無を調査した。いずれの実験においても対照区として、LB 液体培地のみを処理したものをを用いた。

2. 結果

GT1022 株のキチナーゼ活性、プロテアーゼ活性、グルカナーゼ活性を調査した。その結果、GT1022 株では、プロテアーゼ活性が観察されたが、キチナーゼ活性及びグルカナーゼ活性は観察されなかった (Fig. 5-5)。

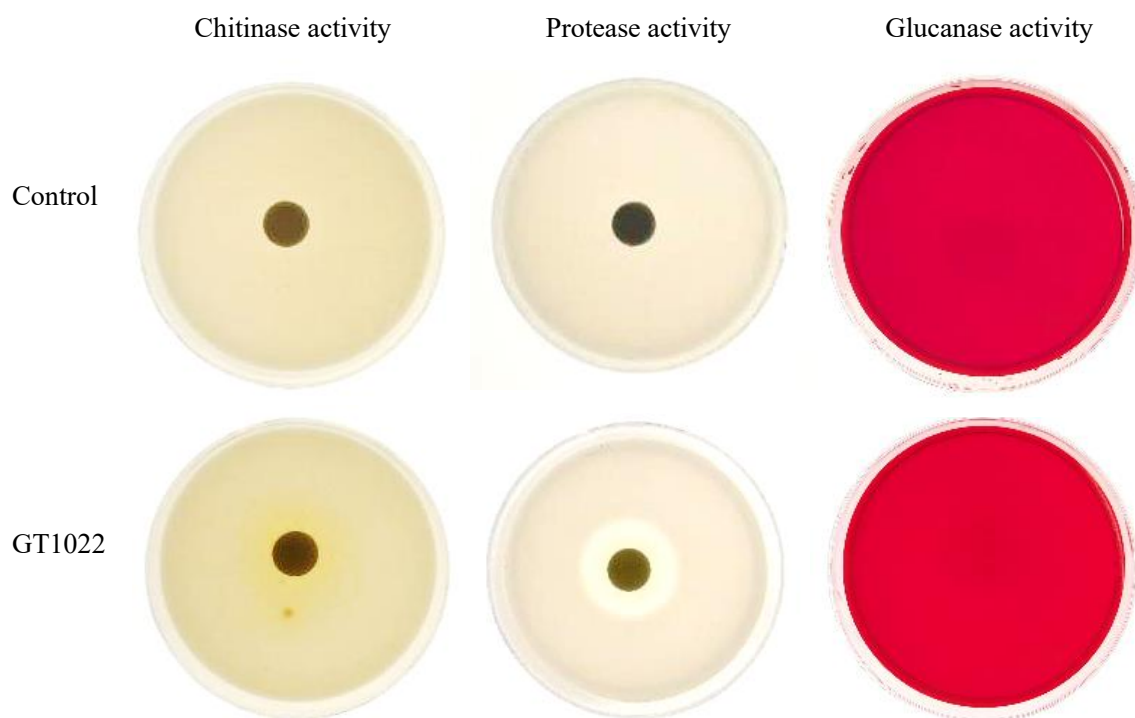


Fig. 5-5 Enzymatic (Chitinase, Protease and Glucanase) activities of *Burkholderia ambifaria* GT1022.

第5節 プロテアーゼがキュウリ立枯病の遊走子発芽に与える影響

1. 材料及び方法

a) 供試菌

供試菌はキュウリ立枯病(*Pythium aphanidermatum*)を用いた。キュウリ立枯病菌は、第5章、第1節、1a)で述べた方法により準備した。

b) 遊走子懸濁液の調製

キュウリ立枯菌の遊走子懸濁液は、第5章、第2節、1c)で述べた方法により準備した。

c) 生物検定法

生物活性は、キュウリ立枯病菌の遊走子発芽の抑制により調査した。第5章、第2節、1c)で述べた方法により準備したキュウリ立枯病菌の遊走子 (5×10^4 zoospores/ml) 500 μ l を 1.5 ml のマイクロチューブに添加して、遠心分離 (1,600 \times g、10 分間) (テーブルトップ遠心機 4,000、久保田商事株式会社) した。遠心後、上清を除去し、プロテアーゼ(*Aspergillus oryzae* 由来、CAS No. 9001-92-7、力価 50,000 unit/g、東京化成工業株式会社) (0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、25、50、100 ppm) 溶液を 500 μ l 加えて、懸濁液を作成した。調製した懸濁液は、湿室にしたプラスチックケース (17 \times 25 cm) 内に並べたスライドガラスに滴下した。スライドガラスには、30 μ l ずつ 3 か所に滴下した。滴下後、暗黒下、25-27 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で培養した。培養 2 時間後、光学顕微鏡下でキュウリ立枯病菌の遊走子発芽を調査した。遊走子発芽数は、1 か所あたり遊走子 50 個中の遊走子発芽数を計数し、遊走子発芽率を算出した。実験は 3 回繰り返した。合計 450 個の遊走子を観察した。

2. 結果

GT1022 株の培養液にプロテアーゼを混合し、スライドガラスに滴下して、キュウリ立枯病菌の遊走子発芽率を調査した。その結果、対照区での遊走子発芽率は、 $89.1 \pm 4.3\%$ であった。一方、プロテアーゼを 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、25、50、100 ppm 添加した区では、遊走子発芽率は、それぞれ、 $78.4 \pm 1.3\%$ 、 $77.1 \pm 3.5\%$ 、 $79.1 \pm 4.3\%$ 、 $76.9 \pm 3.0\%$ 、 $73.5 \pm 6.1\%$ 、 $59.3 \pm 9.5\%$ 、 $57.6 \pm 9.9\%$ 及び $26.4 \pm 9.8\%$ であった。キュウリ立枯病菌の遊走子発芽はプロテアーゼ濃度依存的に抑制された (Table 5-1)。

Table 5-1 Effect of protease on *Pythium aphanidermatum* zoospore germination

Concentration of protease (ppm)	Percentage of germinated zoospore (%)	
Distilled water	89.1±4.3 ^Z	a ^y
0.1	78.4±1.3	b
0.5	77.1±3.5	b
1.0	79.1±4.3	b
2.5	76.9±3.0	b
5	73.5±6.1	b
25	59.3±9.5	c
50	57.6±9.9	c
100	26.4±9.8	d

^Z Values represent were mean ± SD

^y Different letters within a column indicate significant differences by Tukey-Kramer test at P<0.05.

第6節 考察

P. aphanidermatum は、キュウリの収量に大きな影響を与える土壌伝染性の病原体の1つである。Stanghellini and Phillips (1975) は、農薬を施用していない土壌に移植した場合にキュウリが87%の枯死したことを報告した。しかし、化学農薬の施用にはいくつかの欠点があることが知られている。たとえば、生態系と人間の健康への悪影、使用コスト、耐性菌の出現などである (Sigee, 1993)。一方で微生物殺菌剤などの生物的防除では、耐性菌のリスクが低いことが知られている。また、環境に優しいアプローチであると考えられている。

これまでにいくつかの微生物殺菌剤が開発されてきたが、使用されている属の多様性は低い。したがって、植物病害防除におけるそれらの有効性について、より広範囲の分類群で調べる必要がある。本研究では、島根県の土壌から分離された微生物をライブラリー化した島根微生物ライブラリーを用いた微生物の探索を行った。前章では、島根県江津市の土壌から分離された GT1022 株 (*B. ambifaria*) が、キュウリ炭疽病菌 (*C. orbiculare*) の菌糸生育、胞子発芽、キュウリ葉での病斑形成を抑制することを報告した。しかし、*P. aphanidermatum* によって引き起こされるキュウリ立枯病に対する GT1022 株の抑制効果はまだ明らかにされていなかった。そこで、本研究では、*P. aphanidermatum* によって引き起こされるキュウリ立枯病に対する GT1022 株の抑制効果を調査した。GT1022 株の培養液は、キュウリ立枯病菌の菌糸生育と遊走子発芽を著しく抑制した。これらの結果は、GT1022 株がキュウリ立枯病菌に対する抑制物質を生産していることを示した。本実験において、GT1022 株は、キチナーゼ活性及び β -1,3-グルカナーゼ活性などの酵素活性を示さなかった。しかし、GT1022 株は、高いプロテアーゼ活性を示した。また、Tagele et al. (2018) は、*B. contaminans* KNU17B11 が *Rhizoctonia solani* の菌糸成長を抑制し、skim milk 培地上でプロテアーゼを生産することを報告した。実際に、本研究では、プロテアーゼが濃度依存的にキュウリ立枯病菌の遊走子発芽を抑制したことを明らかにした。今後、詳しい抑制機構を明らかにする必要がある。GT1022 株の効果をキュウリ植物体上で調査した結果、GT1022 株は植物毒性を示すことなく、キュウリ立枯病の発病を抑制した。さらに、GT1022 株を処理したキュウリの根では、キュウリ立枯病菌の卵胞子形成も確認されなかった。結論として、GT1022 株は、キュウリ炭疽病菌だけでなく、キュウリ立枯病菌に対しても植物体レベルで抑制効果を示すことが明らかになった。今後、圃場レベルでさまざまなキュウリ病害に対する抑制効果を明らかにする必要があると考えられる。

第6章 総合考察

植物病原菌に対する防除戦略は、主に化学合成された農薬であるが、過度な使用が農薬に対する抵抗性の発達をもたらしている。そのため、作用点のことなる農薬の開発や新しい微生物農薬の開発が必要である。微生物は、同種であっても、異なる生理学的特性や物質生産を行うことが知られており、多種多様な微生物を分離・同定し、調査することは、植物病害に対して有効な農薬や生物的防除剤を開発するために貢献できると考えられる。実際に、亜熱帯地域である沖縄県の土壌から分離された微生物や微生物が生産する2次代謝産物が、植物病原菌に対して抑制効果を示すことが明らかになっている (Ueno et al., 2016; 2019; Tamura et al., 2019)。近年、耐性菌出現のリスクが少ない防除剤として、微生物農薬が開発・利用されている。しかし、化学合成農薬と比較すると防除範囲や種類が少ないのが現状である。山陰地域にある島根県は、地理的に東西に長く、地域によって気象が異なることから多様な微生物が土壌中に存在する可能性がある。しかし、島根県内の土壌からの微生物の収集・保存やそれらの微生物を用いた植物病原菌の抑制に関する研究に関する報告は皆無である。近年、島根大学では、島根県内の土壌や植物等から微生物を分離し、保存するプロジェクトが実行され、これまでに糸状菌や細菌などを含む1,800株以上が島根微生物ライブラリー (Shimane Microbial Library) として保存されている。多くの分離株が保存されており、これら分離株の中には、植物病原菌の防除に利用可能な微生物が存在している可能性がある。

そこで、本研究では島根県内で分離された微生物が保存されている島根微生物ライブラリーを活用して、キュウリ病害 (キュウリうどんこ病、キュウリ炭疽病及びキュウリ立枯病) に利用可能な微生物のスクリーニングを行い、防除への利用について考察した。

これまでに Ueno et al. (2012) は、島根県内で分離した STS1 株が *Colletotrichum orbiculare* によって引き起こされるキュウリ炭疽病を抑制できることを報告している。また、STS1 株は、培地上でウリ科植物に感染する病原菌の菌糸生育を抑制できることを明らかにした (Ganphung et al., 2018)。本研究では、STS1 株を前処理したキュウリ葉上では、植物毒性を示すことなく、うどんこ病菌の孢子発芽や病斑形成が顕著に抑制された。STS1 株の培養液の経時的な前処理では、前処理後 1-9 日間に後接種した *Podosphaera xanthii* によるうどんこ病の発生が抑制され、特に前処理 5 日間 までは、高い抑制効果を示した。また、STS1 株が、ビニールハウス内で栽培されたキュウリでのうどんこ病の発生を抑制できることを明らかにし、STS1 株が栽培環境でも抑制効果を示す可能性が示唆された。本研究で、キュウリ葉に発生したキュウリうどんこ病菌に STS1 株の培養液を処理した結果、STS1 株が *P. xanthii* の孢子に付着し、崩壊している様子が観察された。一般的に、孢子発芽阻害には、キチナーゼや β -1,3-グルカナーゼなど、植物病原菌の細胞壁および細胞膜を損傷させる酵素 (Fridlender et al., 1993; Zhang and Yuen, 2000) や低分子の化合物 (Kim et al., 2011; Lee et al., 2005; Park et al., 2006) が関与している可能性がある。最近、Nguyen et al. (2016) は、STS1 株の培養液中に植物病原菌を抑制する熱不安定な化合物が生成されている可能性を示した。さらに、STS1 株が、培地上でキチナーゼを生産できることを明らかにした (データなし)。ブドウ及びコムギにおけるキチナーゼ遺伝子の発現は、うどんこ病に対して耐性を示すことが報

告されている (Nirala et al., 2010; Yamamoto et al., 2000)。これらの結果は、STS1 株によるキチナーゼ生産がキュウリうどんこ病を防除するための重要な要因の 1 つであることを示唆した。一方、*Streptomyces* 属菌は、さまざまな植物病原菌に対する抑制効果を示す物質が報告されている (Shimizu et al., 2000; Shimizu et al., 2009; Kim et al., 2011)。しかし、STS1 株では抑制物質を完全には、明らかにできていない。したがって、今後、STS1 株の培養液に存在する抑制物質を明らかにする必要がある。インプレッションクリアー (*Bacillus amyloliquefaciens*, SDS Biotech K.K.) やボトキラー® (*Bacillus subtilis*, 出光興産株式会社) などの *Bacillus* 属菌を用いた生物的防除剤がうどんこ病を抑制することはよく知られているが、うどんこ病に対する *Streptomyces* 属菌の生物的防除剤は開発されていない。今後、実用化するためには、うどんこ病菌以外の病原菌に対する STS1 株の抑制効果を圃場レベルで調査する必要がある。本研究では、*Streptomyces blastmyceticus* STS1 株が、キュウリで発生する *P. xanthii* によるうどんこ病を抑制できることを明らかにし、STS1 株がキュウリ病害の発生を抑制するための新しい微生物農薬の開発のための利用できる可能性を示した。

一方で、本研究では、植物病原菌を抑制できる新たな微生物のスクリーニングも試みた。まず、島根県江津市で採取した土壌 (4 地点) から分離された 165 株を用いて、キュウリ炭疽病菌の防除に利用可能な微生物の探索を行った。その結果、対峙培養では、39 株が対照区と比較して、抑制効果を示し、その内の 4 株が対照区と比較して、50%以上の抑制効果を示した。また、選抜した 4 株 (GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株) の培養液は胞子発芽を著しく抑制した。一方で、植物体上での病斑形成抑制効果を調査した結果、胞子発芽や菌糸生育が抑制された GT1023 や GT4027 株は、キュウリ葉上での前処理では、病斑形成を抑制できなかった。このことは、GT1023 や GT4027 株は、キュウリ炭疽病菌を抑制する物質を生産する能力を持っているが、キュウリ葉上では、それらの物質を生産できない可能性や生産された物質が植物により、分解又は吸収された可能性が考えられた。また、GT1023 や GT4027 株がキュウリ葉上で生存できない可能性も考えられ、今後、詳しく調査する必要がある。最終的に、本研究でキュウリ炭疽病菌の胞子発芽、植物体上での病斑形成阻害効果が最も高い株は、GT1022 株であった。16S rDNA のシーケンス解析の結果、GT1022 株は、*Burkholderia ambifaria* と高い相同性を示した。これまでに *Burkholderia* 属による植物病原菌の生物的防除については、いくつかの報告がある (Elshafie et al., 2012; Ho et al., 2014; Miyagawa, 2000; Tägele et al., 2018; Tenorio-Salgado et al., 2013)。 *B. ambifaria* についても *Pythium ultimum* や *Rhizoctonia solani* などのいくつかの土壌伝染性植物病害に対する抑制効果が報告されている (Li et al., 2002; Parikh and Adesemoye, 2018; Roberts et al., 2005; 2014)。また、Tsuchiya et al. (1995) は、*Pseudomonas cepacia* (*B. cepacia*) が、*in vitro* および *in vivo* で抑制効果を示したことを報告した。しかし、*C. orbiculare* によって引き起こされるキュウリ炭疽病に対する *B. ambifaria* の抑制効果に関する報告はない。*B. ambifaria* は、cepacins (Parker et al., 1984)、bactobolins (Seyedsayamdost et al., 2010)、burkholdines (Tawfik et al., 2010)、enacyloxin IIa (Mahenthalingam et al., 2011) hydroxyquinolines (Mullins et al., 2019) 及び pyrrolnitrin (Schmidt et al., 2009) などの抗菌物質を生成することが報告されている。また、Mullins et al. (2019) は、*B.*

ambifaria が菌株ごとに異なる抗菌物質の生成経路を持つことを報告した。さらに、Groenhagen et al. (2013)は、*B. ambifaria* が *R. solani* 及び *Alternaria alternata* に対して阻害効果を持つ揮発性物質を生産することを報告した。本研究では、GT1022 株は、培養濾液中に分子量 500 以上の酢酸エチルに不溶な熱安定な抑制物質が存在していることを明らかにした。また、キチナーゼ活性やグルカナーゼ活性は確認されず、プロテアーゼ活性が確認された。Tagele et al. (2018) は、*R. solani* の菌糸成長が、*B. contaminans* KNU17B11 によって産生されるプロテアーゼによって阻害されたことを報告しており、本研究では、プロテアーゼが濃度依存的にキュウリ立枯病菌の遊走子発芽を抑制した。したがって、今後、GT1022 株の培養濾液に存在する抑制物質を特定することで、GT1022 株によるキュウリ炭疽病菌やキュウリ立枯病菌に対する抑制機構を明らかにできる可能性がある。また、キュウリ植物体での GT1022 株のキュウリ炭疽病の発病抑制効果を調査した。その結果、病斑形成は、GT1022 株を前処理して 3-9 日後にキュウリ炭疽病菌を接種した場合にも抑制され、GT1022 株は、キュウリ植物に対して植物毒性効果を示さなかった。一方で、キュウリ葉上でのキュウリ炭疽病菌の孢子発芽率は、GT1022 株を接種する 3、5、及び 7 日間に処理した場合には、30%未満であったが、9 日間の処理後の接種では、70%以上に増加し、付着形成も観察された。これらの結果は、圃場試験においては、7 日ごとに GT1022 株をキュウリ植物体に処理することが効果的であることを示唆した。実際、本研究では、ビニールハウス内で栽培したキュウリに 7 日ごとに GT1022 株を処理するとキュウリ炭疽病の発生は、著しく抑制された。さらに、GT1022 株は、キュウリ病害の防除に利用されているいくつかの殺菌剤の存在下でも増殖可能であった。これらの結果は、GT1022 株が、キュウリの防除に通常使用されるいくつかの殺菌剤と組み合わせて使用できることを示した。加えて、GT1022 株は、*Botrytis cinerea*、*Corynespora cassiicola*、*Phomopsis sclerotioides*、および *Stagonosporopsis cucurbitacearum* の菌糸生育も阻害し、キュウリ立枯病菌である *P. aphanidermatum* を用いた実験では、GT1022 株は、菌糸生育だけでなく、キュウリ体上でも感染を抑制した。*B. ambifaria* は、多種多様な生態学的ニッチで自然に発生し、非常に用途の広い代謝を有する細菌のグループである *B. cepacia* 複合体の一部である (Coenye et al., 2001)。系統樹解析では、GT1022 株は、人間、動物及び植物の病原体である *Burkholderia* 属の種とは異なるクレードに位置していた。今後、系統発生的、メタボロミクスの、および機能的アプローチを用いて、生物的防除剤として使用するために GT1022 株の安全性を調査する必要がある。本研究により、*Burkholderia* 属である GT1022 株がキュウリ炭疽病などのキュウリの病害を防除するための新しい生物的防除剤の開発における貢献できる可能性を示した。

これらの研究結果から、島根微生物ライブラリーに保存されている微生物がキュウリ病害などの植物病原菌を抑制でき、ライブラリーに保存されている微生物が植物病害の防除に利用できる微生物のスクリーニングに有用なツールとなる可能性を示した。

摘要

キュウリは日本の主要な農作物の1つであり、うどんこ病、褐斑病、炭疽病、つる枯病、斑点細菌病、べと病など、さまざまな病害が発生し、収量を低下させる。病気の防除には、抵抗性・耐病性品種の利用や化学合成農薬の使用が一般的であるが、過度な農薬使用による薬剤耐性菌の出現が問題となっている。一方で、生きた微生物を用いた微生物農薬では、耐性菌の出現リスクが少ないと考えられている。そのため、微生物を利用した生物防除に関する研究が盛んに行われている。我々は、島根県内に生息する微生物に注目し、植物及び土壌から分離した微生物を保存して、島根微生物ライブラリーを構築した。

本研究は島根県内で分離された微生物が保存されている島根微生物ライブラリーを用いて、キュウリ病害の抑制について調査したものである。得られた結果は以下のように要約される。

1. STS1 株によるキュウリうどんこ病の抑制効果

島根県松江市で分離された *Streptomyces blastmyceticus* である STS1 株によるキュウリうどんこ病に対する抑制効果を調査した。まず、室内実験における STS1 株の培養液の効果を調査した。うどんこ病菌 (*Podosphaera xanthii*) を接種する 24 時間前に STS1 株の培養液をキュウリに前処理した。その後、うどんこ病菌を接種し、7 日後に病害指数を調査した。その結果、室内実験において、STS1 株は、うどんこ病の発生を抑制した。また、STS1 株を前処理したキュウリ葉上では、後接種した *P. xanthii* の分生子の発芽が抑制された。そこで、うどんこ病が発病したキュウリ葉上に STS1 株を後処理して、電子顕微鏡による観察を行った。その結果、キュウリ葉上では、STS1 株の菌糸が生育して、*P. xanthii* の分生子を崩壊している様子が観察された。STS1 株はキチナーゼを生産することが確認されており、キチナーゼより、*P. xanthii* の分生子が溶解された可能性が示唆された。そこで、STS1 株によるうどんこ病に対する抑制効果を野外試験により調査した。STS1 株を栽培期間中に 5 日間ごとに処理し、経時的にうどんこ病の発生を調査した。その結果、対照区では、定植 15 日からうどんこ病の発生が確認され、定植 60 日後には、植物体全体にうどんこ病の発生が確認された。一方、STS1 株を処理したキュウリでは、定植 60 日後でもうどんこ病の発生はほとんど確認されなかった。また、STS1 株は、LB 寒天培地上において、少なくとも 20-37 °C では生育可能であり、複数の農薬に対して、耐性を示した。これらの結果より、STS1 株は、野外でのキュウリうどんこ病の防除に利用できる可能が示唆された。

2. 島根県内の土壌からの微生物の分離とスクリーニング

島根県江津市で採取した土壌 (4 地点) から分離された 165 株を用いて、キュウリ炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) の防除に利用可能な微生物の探索を行った。その結果、対峙培養では、39 株が対照区と比較して、抑制効果を示した。また、4 株が対照区と比較して、50%以上の抑制効果を示した。これら 4 株がキュウリ炭疽病菌の菌糸に与える影響を電子顕微鏡で観察した結果、

菌糸先端の崩壊が確認された。選抜した 4 株について、培養液による胞子発芽抑制を調査した。その結果、4 株 (GT1022 株、GT1023 株、GT4027 株及び GT4028 株) の培養液は胞子発芽を著しく抑制した。また、植物体上での病斑形成抑制効果を調査した結果、胞子発芽や菌糸生育が抑制された GT1023 株や GT4027 株は、キュウリ葉上での前処理では、病斑形成を抑制できなかったが、GT1022 株及び GT4028 株は、病斑形成をキュウリ葉上でも抑制できた。これらの結果は、島根微生物ライブラリーに保存されている微生物が植物病原菌の防除に利用できる微生物のスクリーニングに利用できる可能性を示した。

3. GT1022 株の培養液によるキュウリ炭疽病の抑制効果

島根県江津市の土壌から分離した GT1022 株によるキュウリ炭疽病菌 (*C. orbiculare*) に対する抑制効果を調査した。まず、GT1022 株と炭疽病菌を対峙培養した。その結果、GT1022 株の存在下では、炭疽病菌の菌糸生育は、著しく抑制され、菌糸先端の崩壊が観察された。また、GT1022 株の培養液により、分生子の発芽も抑制された。そこで、GT1022 株の培養液を前処理し、後接種した炭疽病菌によるキュウリ葉上での病斑形成面積を調査した。その結果、GT1022 株の培養液の前処理では、炭疽病菌による病斑形成は抑制され、キュウリ葉上での分生子の発芽も抑制されていた。そこで、GT1022 株による炭疽病菌に対する抑制効果を野外試験により調査した。GT1022 株は、栽培期間中に 7 日間ごとに処理し、定植 30 日後に炭疽病菌を人工接種して、発病を調査した。その結果、植物体上での炭疽病の発生面積は、1/5 以下に抑制された。16S rDNA のシーケンス解析では、GT1022 は、*Burkholderia ambifaria* と 99% の相同性を示した。これらの結果より、GT1022 菌株は、*C. orbiculare* によって引き起こされる炭疽病を抑制できる可能性が示唆された。

4. GT1022 株の培養液によるキュウリ立枯病の抑制効果

GT1022 株によるキュウリ立枯病菌 (*Pythium aphanidermatum*) に対する抑制効果を調査した。GT1022 株は LB 培地を用いた対峙培養法により、立枯病菌の菌糸生育を著しく抑制した。さらに、GT1022 株の培養液は、立枯病菌の遊走子の発芽を著しく抑制した。そこで、GT1022 株の経時的な抑制効果を調査するために、キュウリ植物体上に GT1022 株の培養液と立枯病菌を接種して、1-5 日間のキュウリの生存率を調査した。その結果、GT1022 株の存在下では、接種 5 日間でも高いキュウリ植物体の生存率が観察された。一方、対照区では、接種 2 日後から高い発病が観察された。さらに、キュウリ根での卵胞子形成は対照区と比較して、GT1022 株の存在下で抑制された。GT1022 株の性状解析を行った結果、プロテアーゼ活性が観察され、濃度依存的に遊走子の発芽を抑制した。これらの結果より、GT1022 株が、*P. aphanidermatum* によって引き起こされる立枯病を抑制できる可能性が示唆された。

島根微生物ライブラリーに保存されている *S. blastmyceticus* である STS1 株は、キュウリうどんこ病を抑制できることが明らかになった。また、島根県江津市の土壌から分離された *B. ambifaria*

である GT1022 株の培養液は、キュウリ炭疽病及びキュウリ立枯病を抑制できることが明らかになった。本研究の結果から、島根微生物ライブラリーに保存されている微生物がキュウリ病害などの植物病原菌の防除に利用できる可能性が示唆された。

Summary

Cucumber is one of the major crops in Japan. However, cucumber is subject to damage that can further lead to several diseases such as Powdery mildew, *Corynespora* leaf spot, Anthracnose, Gummy stem blight, Bacterial spot, Downy mildew and so on. Common control strategies applied for plant diseases mainly involve mainly the use of chemical fungicides. However, over time, these strategies have led to the development of resistance towards some chemicals. Conversely, development of resistance to microbial fungicides has not been reported. Therefore, it is necessary to examine a microbial collection with wide biological diversity to find new microorganisms with potential for control of plant diseases. We, therefore, initiated the construction of a microorganism library [Shimane Microbial Library (SML)] to catalog the microbes originally isolated from soils and plants in Shimane.

In this study, we report the potential of the microorganisms from the soil of Shimane Prefecture, Japan.

1. Suppressive effect of isolate STS1 on powdery mildew disease of cucumber

Powdery mildew, one of the most important diseases of worldwide vegetable crops under field and greenhouse conditions, is caused mainly by *Podosphaera xanthii*. Common control strategies applied for powdery mildew disease mainly involve mainly the use of chemical fungicides. However, over time, this has led to the development of resistance towards some chemicals. We isolated strain STS1 of *Streptomyces blastmyceticus* from a contaminated potato-sucrose-agar culture exposed in the open field in Shimane Prefecture and identified the antifungal activity of strain STS1 against anthracnose. In laboratory experiments, when cucumber leaves were sprayed suspension culture of strain STS1 by using spray, and after 24 h inoculated with *P. xanthii*, powdery mildew caused by *P. xanthii* was effectively suppressed by strain STS1 in pretreated cucumber plants. Furthermore, *P. xanthii* conidia germination on cucumber leaves was inhibited by pretreatment with a suspension culture of strain STS1. In diseased leaves treated with the same strain STS1 suspension-culture, mycelia of strain STS1 enveloped conidia of *P. xanthii* causing them to burst. Successful growth of strain STS1 on LB agar medium was observed at 20°C, 28°C and 37°C, but not at 4°C. In greenhouse experiment, there was a significant difference in disease development between control and strain STS1-treated cucumber plants. Lesion formation of powdery mildew caused by *P. xanthii* appeared on control cucumber leaves 15 days after transplanting. Furthermore, lesion formation in control cucumber plants increased at 60 days after transplanting. On the other hand, lesion formation in cucumber plants treated with strain STS1 was significantly suppressed. Taken together, our results suggest that strain STS1 might contribute to the development of a new effective agent for biocontrol of powdery mildew in greenhouse-cultivated cucumber.

2. Isolation of microorganisms from soil in Shimane prefecture and screening

In this study, preliminary experiments were carried out to evaluate the inhibitory potential of soil microbial isolates against *Colletotrichum orbiculare* using dual culture. Isolates (165) were obtained from the soil in Gotsu City (four locations), Shimane prefecture. Thirty-four of the 165 isolated microorganisms inhibited mycelial growth of *C. orbiculare* relative to growth of the control. Furthermore, 4 (GT1022, GT1023, GT4027 and GT4028) of the 165 isolated microorganisms inhibited *C. orbiculare* mycelial growth by more than 50 % compare to growth of the control. The presence of the isolate GT1022 was confirmed to induce disruption of the hyphal tip of *C. orbicular*. We also investigated the influence of the isolates on the morphology of the *C. orbiculare* hyphae using scanning electron microscopy. The presence of the isolates was confirmed to induce disruption of the hyphal tip of *C. orbiculare*. Conidia germination of *C. orbiculare* and development of lesion formation on the cucumber were significantly inhibited in the presence of a culture suspension of the GT1022 and GT4028 isolates. This result suggested that our research about the construction of a microorganism library may contribute to the development of a new biological agent that controls plant diseases, thereby reducing the need for chemical control.

3. Suppressive effect of isolate GT1022 on anthracnose disease of cucumber

Anthracnose, caused by the hemibiotrophic fungal pathogen, *C. orbiculare*, is a major disease of cucumber and other cucurbit crops. The control strategies applied for the diseases of cucumber mainly involve the use of chemical fungicides, which over time, lead to the development of resistance to some of these chemicals. Therefore, there is a pressing need to identify natural compounds or microorganisms for the development of new agents for the chemical and biological control of fungal pathogens. Recently, we obtained an isolate, GT1022, from soil samples collected from a field in Shimane Prefecture, Japan. The presence of this isolate inhibited the growth of the hyphal tip of *C. orbiculare*. The germination of conidia of *C. orbiculare* was inhibited in the presence of a suspension of the isolate on a glass slide. Furthermore, these phenomena and the suppression of anthracnose were also confirmed on cucumber leaves. Sequence analysis of the 16S rDNA region of the isolate indicated 99% similarity with a *Burkholderia ambifaria*. In a greenhouse experiment, a significant difference in the development of disease was observed between the control and isolate GT1022-treated cucumber plants, whereby anthracnose lesions were caused by *C. orbiculare* on control cucumber leaves but were significantly suppressed on those of plants treated with the isolate. In conclusion, the isolate GT1022 can potentially be used for the development of a new biological agent against anthracnose caused by *C. orbiculare*.

4. Suppressive effect of isolate GT1022 on damping-off disease of cucumber

Damping-off, caused by *Pythium aphanidermatum*, is a major disease in cucumbers (*Cucumis sativus* L.) and other vegetables. Strategies applied to control the diseases in cucumbers mainly involve the use of chemical and biological fungicides. We isolated *B. ambifaria* GT1022 from soil samples collected in an agricultural field in Shimane Prefecture, Japan. The GT1022 significantly inhibited the mycelial growth of *P.*

aphanidermatum compared to the control in a dual culture assay on a Luria-Bertani medium. Additionally, zoospore germination of *P. aphanidermatum* was significantly inhibited in the presence of a culture suspension of the GT1022 isolate. When cucumber plants were inoculated with *P. aphanidermatum* in the presence of the GT1022, a high survival rate was observed five days following inoculation and oomycete formation of *P. aphanidermatum* on cucumber roots was also inhibited. These results, therefore, suggest that the *B. ambifaria*, isolate GT1022 is a promising source of materials in the development of new biological fungicides for the prevention of damping-off disease of cucumber caused by *P. aphanidermatum*.

The STS1 might contribute to the development of a new effective agent for biocontrol of powdery mildew in greenhouse-cultivated cucumber. Also, our results demonstrate the potential use of GT1022 in the development of a new biocontrol agent to improve the control of diseases in cucumber, such as anthracnose and damping-off disease. In conclusion, SML with an adequate containing good diversity was constructed for bioprospecting research, and the possibility of biocontrol of plant diseases such as cucumber diseases was demonstrated.

引用文献

- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5th edition. Academic Press Ltd, San Diego, California, USA. pp. 428-685.
- Chincholkar, S. B. and Mukerji, K. G. (2007). Biological control of plant diseases. The Haworth Press Inc., Binghamton, New York. pp.1-447.
- Choma, I. M. and Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A. 19: 2684-2691.
- Coenye, T., Severine, L., Anne, W., Maria, O., Wendy, H., John, R. W. G., Monique, G., Enevold, F. and Peter V. (2001). *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 1481-1490.
- Elshafie, H. S., Camele, I., Racioppi, R., Scrano, L., Iacobellis, N. S. and Bufo, S. A. (2012). *In vitro* antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against some phytopathogenic fungi. International Journal of Molecular Sciences. 13: 16291-16302.
- Fridlender, M., Inbar, J. and Chet, I. (1993). Biological control of soil-borne plant pathogens by a β -1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. Soil Biology and Biochemistry 25:1211-1221.
- Fungicide resistance action committee (FRAC) 2018. <http://www.frac.info/publications/downloads>.
- Ganphung Rattrikorn・田村朋子・木原淳一・上野誠.(2017). *Streptomyces* 属菌 STS1 株によるキュウリ病害の抑制について. 日本植物病理学会報 (講要). 84(1): 39.
- Ganphung Rattrikorn・木原淳一・上野誠.(2018). 島根微生物ライブラリーを用いたキュウリ炭疽病菌の抑制に関する研究.日本植物病理学会報 (講要). 85(1): 75.
- Ganphung Rattrikorn・木原淳一・上野誠.(2019). 島根微生物ライブラリーを用いたキュウリ炭疽病菌の抑制に関する研究 (2). 日本植物病理学会報 (講要). 86(1): 62.
- Ganphung, R., Kihara, J. and Ueno, M. (2019). Biological control of powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii* in cucumber by *Streptomyces blastmyceticus* strain STS1 isolated in Shimane prefecture. Journal of Japanese Society of Agricultural Technology Management. 26(2): 61-68.
- Ganphung Rattrikorn・権藤由理・木原淳一・上野誠.(2020 a). 島根微生物ライブラリーを用いたキュウリ病害の抑制に関する研究 (2). 日本植物病理学会報 (講要).
- Ganphung Rattrikorn・権藤由理・木原淳一・上野誠.(2020 b). 島根微生物ライブラリーを用いたキュウリ立枯病の抑制に関する研究 (2). 日本植物病理学会報 (講要).
- Ganphung, R., Kihara, J. and Ueno, M. (2020). Suppressive effect of *Burkholderia* sp. GT1022 isolated from soil against anthracnose disease caused by *Colletotrichum orbiculare*. Journal of Japanese Society of Agricultural Technology Management. (In press).

- Grimstad, S. and Frimanslund, E. (1993). Effect of different day and night temperature regimes on greenhouse cucumber young plant production, flower bud formation and early yield. *Scientia Horticulturae*. 53(3): 191-204.
- Groenhagen, U., Baumgartner, R., Bailly, A., Gardiner, A., Eberl, L., Schulz, S. and Weisskopf, L. (2013). Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *Journal of Chemical Ecology*. 39: 892-906.
- Ho, Y. N., Chiang, H. M., Chao, C. P. Su., C. C. Hsu., H. F., Guo, C. T., Hsien, J. L. and Huang, C. C. (2014). In planta biocontrol of soilborne Fusarium wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant Soil*. 387: 295-306.
- 百町満朗(2003). 拮抗微生物による作物病害の生物防除-我が国における研究事例・実用化事例-. クミアイ化学工業株式会社. pp.1-245.
- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T. and Hollomon, D. W. (2001). Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*. 91: 1166-1171.
- Kang, M-K., Min-Hee, K., Min-Jiao, L., Chun, Z. J., So, H. P., Jong, M. L., Junheon, K., Dong-Jin, P., Hae-Ryong, P., Young, H. K. and Chang-Jin, K. (2020). Nematicidal activity of teleocidin B4 isolated from *Streptomyces* sp. against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.6095>.
- Kim, J. Yeon., Jae, H. K. and Jae, Y. R. (2019). Antifungal Activity of *Streptomyces blastmyceticus* strain 12-6 against plant pathogenic fungi. *Mycobiological*. 47: 329-334.
- Kishi, K. (1998). Plant diseases in Japan (in Japanese). Zenkoku Nôson Kyoiku Kyokai, Tokyo.
- Kim, J. D., Jae, W. S., Sung, C. L., Dongho, L., In, C. H. and Beom, S. K. (2011). Disease control effect of streptocenes produced by *Streptomyces psammoticus* against Tomato fusarium wilt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 1893-1899.
- Lee, J.Y., Jung, Y. L., Surk, S. M. and Byung, K. H. (2005). Isolation and antifungal activity of 4-phenyl-3-butenic acid from *Streptomyces koyangensis* strain VK-A60. *Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7696-7700.
- Lebeda, A., McGrath, M. T. and Sedláková, B. (2010). Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew fungi. *Fungicides (Carisse, O. ed.)*. In Tech China. pp. 221-246.
- Lemtukei, D., Tamura, T., Nguyen, Q. T., Kihara, J. and Ueno, M. (2016). Antagonistic potential of isolated microorganisms from soil in Shimane prefecture against rice blast disease cause by *Maganporthe oryzae*. *Bulletin of the Faculty of Life and Environmental Sciences Shimane University*. 21: 9-12.
- Li, W., Roberts, D. P., Dery, P. D., Meyer, S. L. F., Lohrke, S., Lumsden, R. D. and Hebbbar, K. P. (2002). Broad spectrum anti-biotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. *Crop Protection*. 21: 129-135.

- Mahenthiralingam, E., L. Song, A. Sass, J. White, C. Wilmot, A. Marchbank, O. Boaisa, J. Paine, D. Knight and G. L. Challis. (2011). Enacyloxins are products of an unusual hybrid modular polyketide synthase encoded by a cryptic *Burkholderia ambifaria* genomic island. *Chemistry & Biology*. 27: 665-677.
- McGrath, M.T. and Shishko, N. (1999). Evaluation of biocompatible products for managing cucurbit powdery mildew. *Crop Protection*. 18: 471-478.
- McGrath, M. T. and Wyenandt, C. A. (2017). First detection of boscalid resistance in *Podosphaera xanthii* in the United States associated with failure to control cucurbit powdery mildew in New York and New Jersey in 2009. *Plant. Health. Progress*. Online publication. doi: 10.1094/PHP-03-17-0014-BR.
- Miura, Y., Kusunoki, M. and Sogou, K. (1994). Occurrence of benomyl-resistant strains of cucumber "anthracnose" and "corynespora leaf spot" fungi, and control of the both diseases by diethofencarb. *Bulletin of the Kagawa Prefectural Livestock Experiment Station*. 45: 59-62.
- Miyagawa, H. (2000). Biocontrol of bacterial seedling blight of rice caused by *Burkholderia gladioli* using with its avirulent isolate. *Japanese Journal of Phytopathology*. 66:232-238. (In Japanese with an English summary).
- Miyamoto, T., Ishii, H. and Tomita, Y. (2010). Occurrence of boscalid resistance in cucumber powdery mildew in Japan and molecular characterization of the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase of the causal fungus. *Journal of General Plant Pathology*. 76: 261-267.
- Mullins, A. J., James, A. H. M., Matthew, J. B., Matthew, J., Cerith, J., Gordon, W., Angharad, E G., Daniel, R. N., Thomas, R. C., Julian, P., Gregory, L. C. and Eshwar, M. (2019). Genome mining identifies cepacin as a plant-protective metabolite of the biopesticidal bacterium *Burkholderia ambifaria*. *Nature Microbiology*. 4(6): 996-1005.
- 日本植物病名目録 2020. <https://www.ppsj.org/mokuroku.html>.
- 農林水産統計: <https://www.maff.go.jp/j/tokei/>
- Ni, Mi., Qiong, W., Hong-li, W., Wei-cheng, L., Bin, H., Dian-peng, Z., Juan, Z., De-wen, L. and Cai-ge, L. (2019). Identification of novel strain, *Streptomyces blastmyceticus* JZB130180, and evaluation of its biocontrol efficacy against *Monilinia fructicola*. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*. 20: 84-94.
- Nirala, N. K., Das, D. K., Srivastava, P. S., Sopory, S. K. and Upadhyaya, K. C. (2010). Expression of a rice chitinase gene enhances antifungal potential in transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*. 49: 181-187.
- Nguyen, Q. T., Tamura, T., Kihara, J., Ueno, M. and Itoh, K. (2016). Inhibition of Corynespora leaf spot of cucumber by *Streptomyces* strain STS1. *Japanese Journal of Phytopathology*. 82(1): 54.
- Park, H. J., Jung, Y. L., In, S. H., Bong, S. Y., Beom, S. K. (2006). Isolation and antifungal and antioomycete activities of staurosporine from *Streptomyces roseoflavus* strain LS-A24. *Agricultural and Food Chemistry*. 54: 3041-3048.

- Parikh, L. and Adesemoye, A. O. (2018). Impact of delivery method on the efficacy of biological control agents and the virulence of *Fusarium* root rot pathogens in the greenhouse. *Biocontrol Science and Technology*. 28: 1191-202.
- Parker, W. L., Marlene, L. R., Seiner, V., Trejo, W. H., Principe, P. A. and Sykes, R. B. (1984). Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *The Journal of Antibiotics*. 37: 431-440.
- Renner, S. S. and Schaefer, H. (2016). Phylogeny and evolution of the cucurbitaceae. In: Grumet R, Katzir N, Garcia-Mas J (eds) *Genetics and genomics of cucurbitaceae*. *Plant genetics and genomics: Crops and models*, 20. Springer, Cham, Switzerland. pp.13-23.
- Robert, D. P., Scott, M. L., Susan, L. F. M., Jeffrey, S. B., John, H. B., John, H. B., C. J. B., Wei, L., Jorge, T. de S., Jack, A. L. and Soohie, C. (2005). Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection*. 24: 141-155.
- Roberts, D. P., Dilip, K. L., Jude, E. M., Laurie, F. M., Jeffrey, S. B. and Bingquan, F. (2012). Control of damping-off of organic and conventional cucumber with extracts from a plant-associated bacterium rivals a seed treatment pesticide. *Crop Protection*. 65: 86-94.
- Schmidt, S., Blom, J. F., Pernthaler, J., Berg, G., Baldwin, A., Mahenthiralingam, E. and Eberl, L. (2009). Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Environmental Microbiology*. 11: 1422-1437.
- Seyedsayamdost, M. R., Chandler, J. R., Blodgett, J. A., Lima, P. S., Duerkop, B. A., Oinuma, K. E., Greenberg, P. and Clardy, J. (2010). Quorum-sensing-regulated bactobolin production by *Burkholderia thailandensis* E264. *Organic Letters*. 19: 716-719.
- Shimizu, M., Sachiko, Y. and Yusuke, U. (2009). A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. *Journal of General Plant Pathology*. 75: 27-36.
- Shimizu, M., Yoshiko, N., Yukio, S., Tamotsu, F., Yasuhiro, I., Hiroyasu, O., Ryoji, Y. and Hitoshi, K. (2000). Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from *Rhododendron* and its antifungal activity. *Journal of General Plant Pathology*. 66: 360-366.
- Sigee, D. C. (1993). *Bacterial Plant Pathology*. The Press Syndicate of the University of Cambridge, New York, USA. pp. 126-145.
- Stanghellini, M. E. and Phillips, J. M. (1975). *Pythium aphanidermatum*: its occurrence and control with pyroxychlor in the Arabian desert at Abu Dhabi. *Plant Disease Reporter*. 59: 559-563.
- Takamatsu, S., Honda, N. and Kawakubo, Y. (1993). Occurrence of benomyl-resistant strains of the watermelon anthracnose fungus, *Colletotrichum lagenarium*, in Fukui prefecture. *The Association for Plant Protection of Hokuriku*. 41: 67-70.
- Tagele, S. B., Kim, S. W., Lee, H. G., Kim, H. S. and Lee, Y. S. (2018). Effectiveness of multi-trait *Burkholderia contaminans* KNU17BI1 in growth promotion and management of banded leaf and sheath blight in maize seedling. *Microbiological Research*. 214: 8-18.

- Tamura, T., Shinzato, N., Ito, M. and Ueno, M. (2019). Microbial secondary metabolite induction of abnormal appressoria formation mediates control of rice blast disease caused by *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Phytopathology* 167: 156-162.
- Tawfik, K. A., Jeffs, P., Bray, B., Dubay, G., Falkinham, J. O., Mesbah, M., Youssef, D., Khalifa, S. and Schmidt, E. W. (2010). Burkholdines 1097 and 1229, potent antifungal peptides from *Burkholderia ambifaria* 2.2N. *Organic Letters*. 12: 664-666.
- Tenorio-Salgado, S., Raunel, T., Rafael, V. D., Jesus, C. M. and Ernesto, P. R. (2013). Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*. 4(4): 236-243.
- Tsuchiya, K., Homma, Y., Komoto, Y. and Suzui, T. (1995). Practical detection of *Pseudomonas cepacia* from rhizosphere antagonistic to plant pathogens with a combination of selective medium and ELISA. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 61:318-324.
- Ueno, M., Suzuki, Y., Kumura, Y., Ueda, K., Quyet, N. T., Kihara, J., Arae, S. and Oshima, A. (2012). Isolation of *Streptomyces* strain STS1 that inhibition the growth of *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of Japanese Society of Agricultural Technology Management*. 18: 191-194.
- Ueno, M., Nguyen, T. Q., Shinzato, N. and Matsui, T. (2016). Antifungal activity of collected in subtropical region, Okinawa, against *Magnaporthe oryzae*. *Tropical Agriculture and Development*. 60: 48-52.
- Ueno, M., Tamura, T., Yano, Y., Ito, M. and Shinzato, N. (2019). *Streptomyces* strain 5-94, obtained from the subtropical region in Okinawa, has inhibitory activity against *Colletotrichum orbiculare*. *Tropical Agriculture and Development*. 63: 192-197.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. and Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 6578-6583.
- Yamamoto, T., Iketani, H., Ieki, H., Nishizawa, Y., Notsuka, K., Hibi, T., Hayashi, T. and Matsuta, N. (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports*. 19: 639-646.
- You, X., Naohiro, K., Teppei, O., Shinpei, M., Ryoichi, O., Yukihiro, H., Atsushi, M., Hayato, T., Yoshiyuki, O. and Motoaki, T. (2019). Suppressive effects of vermicomposted-bamboo powder on cucumber damping-off. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 53(1): 13-19.
- Zhang, Z. and Yuen, G. Y. (2000). Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of bipolaris leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Biological Control*. 18: 277-286.

論文目録

学術論文

Ganphung, R., Kihara, J. and Ueno, M. (2019). Biological control of powdery mildew caused by *Podosphaera xanthii* in cucumber by *Streptomyces blastmyceticus* strain STS1 isolated in Shimane prefecture. *Journal of Japanese Society of Agricultural Technology Management* 26(2), 61-68. (第2章に記述)

Ganphung, R., Kihara, J. and Ueno, M. (2021). Suppressive effect of *Burkholderia* sp. GT1022 isolated from soil against anthracnose disease caused by *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of Japanese Society of Agricultural Technology Management* (*In press*). (第3、4章に記述)