

水耕ハーブの根ならびに根の分泌物が 青枯病菌に及ぼす影響

竹井かおり*・市村匡史**

(平成 24 年 2 月 2 日受付/平成 24 年 6 月 8 日受理)

要約：本試験では、ハーブ類が青枯病菌に対して示す発病抑制の作用機構の解明を目的に、ハーブ根の抗菌活性を検討すると共に、ハーブを水耕した培養液を分析して、根からの抗菌物質の溶出の可能性について検討した。抗菌活性試験の結果、ハーブ根の基部、中間部では主にハーブ根圏微生物によるものと考えられる阻止帯が形成され、先端部では主にハーブ分泌物によるものと考えられる阻止帯が形成された。また、ハーブ根圏微生物由来阻止帯から分離した根圏微生物は、青枯病菌に対して抗菌効果を示すことを確認した。さらに、7 種のハーブを水耕した培養液では、スイートバジルからオイゲノールを、タイムからチモールを検出したが、これらの精油成分は様々な微生物に抗菌効果を示すことが知られている。以上のことから、今回供試した 7 種のハーブは、根からの分泌物の抗菌性だけでなく、基部から中間部の発育の進んだ部位の根で青枯病菌に抗菌作用を持つ微生物と共存するなど、複合的に青枯病への抵抗性を有している可能性が考えられた。

キーワード：青枯病，ハーブ，精油成分，アレロパシー

緒 言

青枯病は、植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* によって引き起こされる難防除の土壌伝染性病害の一つである。様々な防除法が現在も検討されているが、生物的防除法の一つとして、ハーブの抗菌性を利用した発病抑制が検討されている。

PRADHANANG ら (2003) は、トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.) のポット試験において、*R. solanacearum* 汚染土壌にチモールや精油を燻蒸処理することで *R. solanacearum* の密度が低下し、発病抑制が可能であること、またチモールは合成が可能であるため、天然の精油より安価に農業利用が可能であることを報告している。しかし、多量施用した合成チモールは毒性を示す可能性もあることから、合成精油成分を農薬的に施用するよりも、ハーブの混植など植物体を利用することが望ましいと考えられる。

また、養液栽培では土耕に比べて、栽培後の培養液や根部を用いての解析が比較的容易であることから、ハーブ類の示す土壌伝染性病害に対する発病抑制の作用機構解明を目的とした試験も行われている。中林ら (1999) は、水耕でメロンと数種類のハーブを混植して、フザリウム菌の増殖抑制効果を認め、さらにタイム (*Thymus vulgaris*) 混植区において培養液中から精油成分のチモールを検出した。中林らは、このタイム根部から放出されたであろうチモールが抗菌性を示した可能性を示唆している。チモールはタイムの主要精油成分であり、多くの微生物に対して高

い抗菌活性を持つことが知られていることから、タイムの混植によってフザリウム菌以外の病原菌に対しても増殖抑制効果が得られる可能性がある。

さらに竹井ら (2011) は、6 種のハーブを水耕し、ハーブ根ならびに精油成分を含む根の分泌物の *R. solanacearum* に対する抗菌性を検討した。その結果、フェンネル (*Foeniculum vulgare*) とジャーマンカモミール (*Matricaria recutita*) の根で *R. solanacearum* に対するハーブ分泌物由来と考えられる阻止帯を観察している。しかし、形成された阻止帯は狭く、また阻止帯を形成した根片は 3 反復中 1~3 反復と、試験によって結果にばらつきがあったことを報告している。

以上のことから、ハーブが青枯病菌に対して抗菌効果を有していると考えられるが、その効果は安定的とはいえない。しかし、ハーブの青枯病に対する発病抑制の作用機構を解明することができれば、より効率的な混植方法や処理方法の開発に繋がり、長年青枯病の発生が続いてきた圃場においてもハーブの混植によって発病抑制が可能となることが期待される。

本研究では、ハーブ類が青枯病菌に対して示す発病抑制の作用機構の解明を目的とし、ハーブ根の抗菌活性の検討、ハーブを水耕した培養液の分析による抗菌物質の検索を行った。

* 東京農業大学大学院農学研究科農学専攻

** 東京農業大学農学部農学科

材料および方法

1. 供試ハーブ

シソ科のオオバ (*Perilla frutescens* var. *acuta*), スイートバジル (*Ocimum basilicum*, 以下バジル), オレガノ (*Origanum vulgare*), コモンタイム (*T. vulgaris*, 以下タイム), キク科のジャーマンカモミール (*M. recutita*, 以下ジャーマン), ローマンカモミール (*Anthemis nobilis*, 以下ローマン), セリ科のフローレンスフェンネル (*F. vulgare*, 以下フェンネル) の3科7種, 対照作物として, 水耕での栽培が普及しているアブラナ科のコマツナ (*Brassica rapa* var. *perviridis*), セリ科のミツバ (*Cryptotaenia japonica*) の2科2種を供試した。

2. 供試病原菌

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* (MAFF302745)
(東京農業大学農学部農学科植物病理学学研究室より分譲)

3. *R. solanacearum* 混和平板培地

脇本培地で25℃, 24時間培養した *R. solanacearum* を菌密度が約 1×10^8 cfu/mL になるように1白金耳採取し, 10 mL の滅菌水に混和攪拌した懸濁液を作成した。この懸濁液を1 mL ずつシャーレに分注し, ウォーターバスで50℃に調整した脇本培地10 mL を流し込み, よく攪拌させて固め, *R. solanacearum* 混和平板培地とした。

4. 栽培

夏季試験を2010年, 2011年に1回ずつ, 冬季試験を2010年に1回の計3回行った。

ハーブ類はバーミキュライトに播種し, 根長が3~5 cm 程度になった時点でバーミキュライトを洗い流し, 湛液水耕育苗 (大塚 A 処方 1/4 培養液, pH 5.0~6.0, EC 0.60~0.80 dS/m) に移行した。その後35 L 容コンテナに, 夏季試験では12株, 冬季試験では24株を定植し, 非循環式湛液水耕 (大塚 A 処方 1/2 培養液, pH 5.0~6.0, EC 1.30~1.60 dS/m), 連続通気で8週間栽培した。植物体は4, 8週目に3株採取して実験1に供試し, 培養液は2, 4, 6, 8週目に各500 mL 採取して実験2に供試した。各ハーブとも, それぞれ1コンテナを用い, 反復はしなかった。

実験1 ハーブ根の抗菌活性の検討

各ハーブ3個体から採取した根を水道水, 純水で洗浄後, 根の基部, 中間部, 先端部の3ヶ所から約2 cm ずつ根を切り取った。それらを70% エタノールと1% 次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した。表面殺菌では1% 次亜塩素酸ナトリウムへの浸漬時間を1分, 5分とする2処理区を設けた。根は表面殺菌後, 滅菌水で2回よくすすぎ, 青枯病菌混和平板培地に置床した。25℃のインキュベーターで2日間培養後, 根の外縁にそって形成された阻止帯の大きさを測定した。

実験2 ハーブ根からの分泌物の分析とその抗菌性の検討

1) 培養液の分析

採取したハーブ水耕培養液の滲出成分をジエチルエーテルに転溶させ, ロータリーエヴァポレーターで濃縮後, ガスクロマトグラフ (SHIMADZU GC-14A) で分析した。定量には絶対検量線法を用いた。

2) 培養液中の分泌物の抗菌活性

採取したハーブ水耕培養液をミリポアフィルター (0.22 μ m) で濾過滅菌したもの, 熱処理 (50℃, 10分) をしたもの, 無処理のものをそれぞれ直径8 mm のろ紙片に20 μ L 染み込ませ, 実験1と同様に置床・培養した。その後, 阻止帯の大きさを測定し, 分泌物の抗菌性について検討した。測定は各ハーブの培養液について3回行った。

実験3 ハーブ根周辺から分離された根圏微生物の抗菌活性の検討

実験1のハーブ根, 実験2-2の培養液を染み込ませたろ紙片から青枯病菌に対して阻止帯を形成する根圏微生物を観察された。これらの微生物を普通寒天培地 (以下 NA 培地) に画線して単離し, NA 培地で25℃, 24時間培養した菌株を青枯病菌混和平板培地に1白金耳置床し, 実験1と同様に培養後, 抗菌活性の有無を調査した。

結果および考察

実験1 ハーブ根の抗菌活性の検討

2010年夏季試験の結果を表1に示した。

いずれのハーブ根においても, 主に基部, 中間部では置床した根の外縁に沿って不定形な阻止帯が形成された。この阻止帯の形状ならびにこの阻止帯から青枯病菌に対して抗菌活性を持つ微生物が多く分離されたことから (データ略), 根圏微生物由来の阻止帯であると考えられた (以下根圏微生物由来阻止帯)。また, 主に先端部では根の形状に沿って狭小な阻止帯が形成された。この狭小な阻止帯からは微生物が分離できなかったことや, 竹井ら (2011) がオレガノ根, ジャーマン根のアセトン抽出液において, ハーブ分泌物によるものと考えられる阻止帯を観察していることから, ハーブ分泌物由来の阻止帯であると考えられた (以下ハーブ分泌物由来阻止帯)。

ローマン, オレガノの8週目試験では1-5区より1-1区でより大きい根圏微生物由来阻止帯が形成されており, 1% 次亜塩素酸ナトリウムへの浸漬時間が長いほど, 根圏微生物が減少した可能性がある。しかし, ハーブの種類やサンプル採取時期によって浸漬時間の影響は異なり, 明確な傾向は見られなかった。

また, 植物体の採取時期による差はフェンネル, ジャーマンでは見られなかったが, その他のハーブとコマツナにおいては4週目より8週目でより大きい阻止帯の形成が観察された。このことから, ハーブは生育が進むにつれて, 青枯病菌に対する抗菌効果が強まる可能性がある。

冬季試験, 2011年夏季試験においても, 根圏微生物由来阻止帯が基部, 中間部で, ハーブ分泌物由来阻止帯が先端部で多く観察された点や, 滅菌時間, 植物体採取時期による差がハーブによって異なる点は同様であったが, 冬季試験においては夏季試験に比べて形成された阻止帯が全体的に小さくなる傾向が見られた。

表 1 *R. solanacearum* に対するハーブ根片の抗菌活性^z (2010 年夏季試験)

供試植物	定植後日数	消毒時間	基部	中間部	先端部
フェンネル	4週	1-1 ^y	2.47 ± 0.76	1.60 ± 1.04	0.47 ± 0.16
		1-5 ^x	4.23 ± 3.46	2.20 ± 1.30	0.40 ± 0.23
	8週	1-1	1.00 ± 1.13	0.83 ± 0.59	0.00 ± 0.00
		1-5	3.07 ± 1.90	2.73 ± 2.49	0.27 ± 0.30
ジャーマン	4週	1-1	1.60 ± 0.57	1.13 ± 0.82	0.47 ± 0.15
		1-5	1.20 ± 0.34	1.50 ± 0.17	0.37 ± 0.10
	8週	1-1	0.90 ± 0.52	0.93 ± 0.74	0.33 ± 0.19
		1-5	1.03 ± 0.63	0.60 ± 0.34	0.13 ± 0.15
ローマン	4週	1-1	1.10 ± 0.28	0.77 ± 0.43	0.00 ± 0.00
		1-5	0.30 ± 0.20	0.67 ± 0.04	0.20 ± 0.11
	8週	1-1	3.60 ± 2.31	2.03 ± 1.15	1.73 ± 1.11
		1-5	2.70 ± 0.75	0.47 ± 0.53	0.00 ± 0.00
タイム	4週	1-1	0.27 ± 0.30	0.33 ± 0.32	0.00 ± 0.00
		1-5	0.40 ± 0.45	0.03 ± 0.04	0.00 ± 0.00
	8週	1-1	4.87 ± 0.65	2.17 ± 2.44	2.50 ± 0.56
		1-5	0.70 ± 0.79	2.80 ± 0.51	2.43 ± 0.36
オレガノ	4週	1-1	0.70 ± 0.53	0.23 ± 0.15	0.00 ± 0.00
		1-5	0.67 ± 0.38	1.63 ± 1.46	0.00 ± 0.00
	8週	1-1	3.77 ± 1.69	1.53 ± 1.21	1.27 ± 0.72
		1-5	1.70 ± 1.92	0.00 ± 0.00	0.67 ± 0.31
オオバ	4週	1-1	0.53 ± 0.33	0.50 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1-5	0.80 ± 0.46	0.97 ± 0.55	0.23 ± 0.26
	8週	1-1	2.27 ± 1.97	7.23 ± 4.68	4.50 ± 0.94
		1-5	1.23 ± 0.70	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
バジル	4週	1-1	0.40 ± 0.23	0.77 ± 0.44	0.53 ± 0.60
		1-5	0.73 ± 0.15	0.07 ± 0.08	0.00 ± 0.00
	8週	1-1	2.47 ± 0.89	1.37 ± 0.78	0.00 ± 0.00
		1-5	1.10 ± 1.24	0.20 ± 0.23	3.77 ± 3.34
コマツナ	4週	1-1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1-5	0.03 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	8週	1-1	0.40 ± 0.23	0.70 ± 0.13	5.63 ± 2.74
		1-5	4.23 ± 3.61	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

z: 3反復の阻止円(mm)の平均値±標準誤差

y: 70%エタノール1分-1%次亜塩素酸ナトリウム1分区

x: 70%エタノール1分-1%次亜塩素酸ナトリウム5分区

以上、今回供試した7種のハーブは、いずれもハーブ分泌物に由来すると思われる阻止帯を形成したことから、根から抗菌成分を分泌していると考えられた。また、根圏微生物由来阻止帯がいずれの栽培時期においても観察されたことから、これらのハーブの根の基部～中間部には青枯病菌に対して抗菌作用を持つ微生物が生息している可能性が考えられた。

実験2 ハーブ根からの分泌物の分析とその抗菌性の検討

1) 培養液の分析

バジル培養液からオイゲノールを、タイム、オレガノ培養液からチモールを検出した。しかし、いずれの試験においてもそれらの濃度は0.23～1.70ppm程度と、ごく微量の

検出にとどまった。

バジル、タイム、オレガノ以外の培養液からもガスクロマトグラムにピークが現れたが、それぞれの主要精油成分のピークとは一致せず、今回は成分を特定することができなかった。

2) 培養液中の分泌物の抗菌活性

冬季試験の結果を表2に示した。

いずれのハーブ培養液についても、濾過滅菌区では阻止帯は形成されず、無処理区と熱処理区では根圏微生物由来阻止帯が形成された。この傾向はいずれの栽培時期や培養液の採取時期でも、共通して観察された。

また、ジャーマン、ローマン、オレガノは2～8週目、タ

イムは6~8週目、バジルは4~8週目の培養液で、それぞれ連続して根圏微生物由来阻止帯が観察された。一方、コマツナ、ミツバでも根圏微生物由来阻止帯が形成されたが、一時的な形成で、ハーブとは異なった。

以上、バジル培養液、タイム培養液については抗菌作用を持つことが知られている精油成分が検出されたが、検出された精油成分は微量であったことや、培養液の抗菌活性試験で、濾過滅菌区では阻止帯が形成されず、実験1同様、根圏微生物由来阻止帯が形成されたことから、培養液中に

おいてはハーブ分泌物による抗菌効果よりも、ハーブ根圏に生息する青枯病拮抗微生物による抗菌効果が高いと考えられた。

実験3 ハーブ根周辺からの根圏微生物の分離とその抗菌活性の検討

青枯病菌に対して抗菌活性を示した根圏微生物数を分離元別に表3に示した。

2010年夏季試験ではローマン、ジャーマン、オオバ、バジルから得られた微生物が、冬季試験、2011年夏季試

表2 *R. solanacearum* に対するハーブ水耕培養液の抗菌活性^z (冬季試験)

供試植物	定植後日数	無処理	熱処理	濾過滅菌
ジャーマン	2週	0.47 ± 0.37	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	4週	0.50 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	6週	5.90 ± 0.79	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	8週	0.87 ± 0.30	0.27 ± 0.30	0.00 ± 0.00
ローマン	2週	0.40 ± 0.45	0.50 ± 0.46	0.00 ± 0.00
	4週	0.50 ± 0.17	0.37 ± 0.36	0.00 ± 0.00
	6週	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.10	0.00 ± 0.00
	8週	0.50 ± 0.33	0.57 ± 0.10	0.00 ± 0.00
タイム	2週	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	4週	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	6週	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.23	0.00 ± 0.00
	8週	6.13 ± 3.23	0.10 ± 0.00	0.00 ± 0.00
オレガノ	2週	0.30 ± 0.07	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	4週	7.37 ± 0.40	1.23 ± 0.14	0.00 ± 0.00
	6週	0.77 ± 0.19	0.23 ± 0.26	0.00 ± 0.00
	8週	7.00 ± 5.76	0.70 ± 0.11	0.00 ± 0.00
バジル	2週	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	4週	0.80 ± 0.11	0.43 ± 0.10	0.00 ± 0.00
	6週	6.43 ± 0.26	2.83 ± 0.87	0.00 ± 0.00
	8週	0.63 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
コマツナ	2週	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	4週	0.43 ± 0.04	0.67 ± 0.08	0.00 ± 0.00
	6週	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	8週	1.87 ± 0.27	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ミツバ	2週	1.00 ± 0.62	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	4週	0.00 ± 0.00	0.17 ± 0.08	0.00 ± 0.00
	6週	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.23	0.00 ± 0.00
	8週	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

z: 3反復の阻止円(mm)の平均値±標準誤差

表3 *R. solanacearum* に抗菌活性を示した根圏菌数^z

分離元ハーブ	2010年夏季		2010年冬季		2011年夏季	
	根	培養液	根	培養液	根	培養液
フェンネル	5 (1)	3 (1)			0 (0)	3 (2)
ローマン	14 (1)	3 (0)	1 (1)	9 (3)	3 (3)	1 (0)
ジャーマン	10 (4)	5 (3)	1 (0)	8 (2)	3 (0)	1 (0)
オオバ	15 (2)	2 (0)			4 (0)	0 (0)
バジル	12 (0)	4 (2)	5 (3)	7 (2)	3 (1)	2 (0)
タイム	10 (4)	0 (0)	10 (10)	4 (1)	6 (2)	2 (0)
オレガノ	6 (0)	0 (0)	10 (6)	16 (11)	9 (0)	6 (3)
コマツナ	4 (1)	2 (0)	7 (1)	7 (0)	0 (0)	4 (4)
ミツバ			6 (6)	5 (5)	3 (3)	0 (0)

z: ()内は高い抗菌活性を示した有望菌株数

験ではタイム、オレガノから得られた微生物が多かった。

2010年夏季試験、冬季試験で培養液中から得られた有望菌株(阻止帯が大きかったもの、透明度が高かったもの)20菌株をそれぞれ 10^8 cfu/mLに調整した菌液に、幼苗トマトの根部を24時間浸漬処理し、1L容プラントボックスで水耕して、青枯病発病への影響を確認したが、いずれも安定した発病抑制効果は得られなかった(データ略)。したがって、これらのハーブ根圏微生物は、シャーレ上では単独で青枯病菌へ強い抗菌作用を示すが、栽培条件下においては抗菌作用を発揮することができないものと考えられる。この原因としては、根圏微生物の生育にハーブが必要である可能性が考えられる。近年、植物体表面には様々な微生物が植物体—微生物間、微生物—微生物間で相互に共生、共存関係を結ぶ複雑なバイオフィームを形成していることが明らかとなってきた(百町ら, 2009)。今回分離、検定したハーブ根圏微生物は、ハーブ根に形成されるバイオフィーム上で、ハーブ根圏やその他の微生物との共生、共存関係が無ければ抗菌作用を示すことが困難である可能性が考えられた。

ま と め

以上のことから、今回供試した7種のハーブは、根からの分泌物の抗菌活性だけでなく、基部から中間部の発育の進んだ部位の根で青枯病菌と拮抗作用を持つ微生物と共生するなど、複合的に青枯病への抵抗性を有している可能性が考えられた。

謝辞: 本研究を行うに当たり、ご指導・ご鞭撻いただきました本学植物病理学研究室、篠原弘亮准教授、室員の皆様、故・陶山一雄元教授に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 安藤昭一(2003)微生物実験マニュアル(第2版). P.27. 技報堂出版. 東京.
- 2) 陽川昌範(1998)ハーブの科学. 賢堂, pp.155-158, pp.164-167, pp.188-193, pp.212-216.
- 3) 堀田光生・土屋健一(2002)微生物遺伝資源利用マニュアル(12). 農業生物資源研究所.
- 4) 百町満朗・對馬誠也(2009)微生物と植物の相互作用. ソフトサイエンス社
- 5) 亀岡 弘(1990)エッセンシャルオイルの化学. 裳華房, 東京, pp.69-70, pp.82, pp.84, pp.90, pp.98.
- 6) KHALEQUZZAMAN, K.M., M.A. JINNAH, M.A.A.M. RASHID, M.N.A. CHOWDHURY and Md. Masud ALAM (2002) Effect of *Pseudomonas fluorescens* in controlling bacterial wilt of tomato. *Pakistan Journal of Plant Pathology*, 1, 71-73.
- 7) 森田泰彰・土屋健一・川田洋一(1997)ナス青枯病菌に対して拮抗性を示す細菌の検出. 高知農業技術センター研究報告, 6, 1-7.
- 8) 中林和重・福田琢也(1999)ハーブ根からの分泌成分が養液栽培におけるフザリウム菌増殖に及ぼす影響. 明治大学農学部研究報告, 119: 9-20.
- 9) PRADHANANG P.M., M.T. MOMOL and S.M. OLSON (2003) Effect of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Disease*, 87: 423-427.
- 10) 竹井かおり・篠原弘亮・市村匡史. 2011. ハーブの根とその分泌精油成分が青枯病菌に及ぼす影響. 園芸学研究, 10(2): 500.

Effect of Roots and Essential Oil Components Secreted from Herb Roots on *Ralstonia solanacearum* under Hydroponic Conditions

By

Kaori TAKEI* and Masashi ICHIMURA**

(Received February 2, 2012/Accepted June 8, 2012)

Summary : In order to determine how herbs showed antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum*, inhibition zone by excised herb roots was measured and secreted essential oil components in the nutrient solutions were detected by gas chromatograph. The herbs used in this study were sweet basil, perilla, oregano, thyme, roman chamomile, german chamomile and fennel. The roots of these herbs showed antibacterial activity. The basal part of herb roots produced an inhibition zone by the action of microbes in the rhizosphere environment. These microbes showed antibacterial activity in vitro. On the other hand, the distal part of roots produced an inhibition zone by the action of secretion of essential oils. In addition, essential oil components with antibacterial activity, i.e., eugenol and thymol, were detected in the nutrient solutions grown with basil and thyme, respectively. These results indicate that the herbs used in this experiment show antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum*, possibly because of the presence of microbes in rhizosphere conditions and secretion of essential oils.

Key words : bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*, essential oil components, herb, allelopathy

* Department of Agriculture, Graduate school of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture