

微生物を生きのまま種子にコーティングする技術： ライブコート

株式会社サカタのタネ ^{はし}橋 ^{もと}本 ^{よし}好 ^{ひろ}弘
 兵庫県農林水産技術総合センター農業技術センター ^{あい}相 ^の野 ^{まさ}公 ^{たか}孝

はじめに

1980年代の初め、微生物を用いた画期的な防除技術が、世界の一流科学雑誌 Science (SCHROTH et al., 1982) や Nature (KLOEPPER et al., 1980) に次々と掲載された。このころから微生物を利用した病害防除の試みが注目され、実用化に向けて多くの報告がなされてきた。そして近年になり、生物農薬の登録が増加してきている。

しかしながら、農業便覧(平成19年度)によると、農薬の市場における、生物農薬の出荷割合は、殺虫剤を含めても、金額ベースで0.5%、数量ベースで0.1%以下であり、生物農薬の現場への普及が進んでいるとはいえない。その原因は、資材の効果の振れが大きく安定した結果が得られないこと、および価格面で割高であり、費用対効果のバランスが悪い点にあると考えられる。

(以下、著者の専門である土壤微生物を中心とした説明となる点、ご容赦ください)

一方、研究開発の面でこの間に明らかとなってきたことがある。実験系における成功事例が、単純に現場に適応できるわけではないということ。土壤環境は、非常に複雑・多様であり、その中でも特に土壤微生物は、その数・種類が膨大であり、その全体像や動態を把握することが困難であるということ。また、微生物を投入してから、植物体の病徴進展までの間には、土壤微生物の変動、土壤の理化学性の変化、植物根・組織の変化、気象条件の変化など様々な要因が複雑に絡み合ってくる。このように複雑で解析の困難な課題に対して多くの研究者が立ち向かってきた。その結果、従来の単純な微生物投入とは異なる新たな三つの道が見いだされつつある。

1番目の道は、特定の微生物利用ではなく、既に現場土壤環境に適応している土着の微生物を活性化し、有効利用しようとする試みである。すなわち、篤農家といわれる人たちが経験的に知っている「土づくり」を、より

科学的な裏付けに基づいて進めていこうとする方法である。その中には、堆肥などの有機物資材投入、緑肥や輪作、熱水消毒、土壤還元処理等による土壤微生物の多様性や抑止力を高めようとする試み(横山, 1996)や、CDU(竹下ら, 1977)、尿素ポリマー配合品(橋本, 2005)など選択的な微生物の餌となる資材を開発して利用しようとする試みなどがある。

2番目の道は、現場土壤環境の生物性診断を行い、病原菌の侵入状況の把握による病害発生予測に基づいて様々な対策を検討しようというものである。この中には、遺伝子や抗体を用いた診断技術(TSUCHIYA et al., 1991; 境, 2005)のほかに、土壤の複雑系全体を捉えるバイオリログシステム(YOKOYAMA, 1993)やバイオセンサーを用いた技術(橋本ら, 2010)も注目されている。

3番目の道は、複雑で環境変化の大きい土壤環境ではなく、より安定した環境(種子、育苗培土、あるいは植物根内)に微生物を導入し、植物の根圏や根内により早く定着させ、安定した防除効果を出させる試みである。

これらの三つの道は、総合的病害虫・雑草管理(IPM)の推進において欠かすことのできない技術と期待されているが、個々の技術が単独で成立するのではなく、相互に補完しあうことにより、より完成度の高いものとなっていくものと考えている。

I 微生物コーティング種子製造技術： ライブコートとは

今回の微生物コーティング種子の製造技術(橋本ら, 2006)は、この中の3番目の道の中にある。すなわち、微生物を種子に付着させることにより、発芽・育苗段階で植物根圏や根内、育苗培土中へ他の土壤微生物よりも早く定着させることにより、より安定した効果を出させようとする方法である。

本研究の目的は、生物農薬中の成分微生物を、種子という最小空間へ高菌密度でパッケージし、長期保存可能な微生物コーティング種子を製造するライブコート技術を実用化する。これにより、誰もが、簡単に、安価に、種子を播くだけで植物病害の防除と環境保全を両立できる生物農薬の新施用技術を開発することにある。しか

Development of Seed Coating Technology with Living Microorganism (Live Coat). By Yoshihiro HASHIMOTO and Masataka AINO

(キーワード: 微生物コーティング種子, ライブコート技術, 減圧接種, コニカルドライヤー)

し、あらかじめ知っておいてほしいことは、種子が、様々な形態変化を行う植物体においての出発点であり、最小の体積しかもっていないこと、しかも乾燥状態で保存されるという制約がある点である。

Ⅱ 原 理

本製造技術は、微生物を種子に付着させる工程と種子を乾燥させる工程の二つに分けられる。

最初に行うのが、微生物を種子に付着させる工程である。種子は基本的に乾燥状態で保管されている。そのため乾燥した種子を水に浸すと、初期は水をはじく性質がある。そのため、水と種子表面の間の空間には空気の泡が入る。このことが微生物と種子との接触を大きく妨げることになる。そこで減圧処理により、種子と微生物の間に存在する空気を取り除くことにより、種子と微生物との接触をよくすることができる。

種子の形状や構造の違いにより異なるが、稲モミの場合には、モミと玄米の間にスペースがあるが、単に水に浸しただけでは、その中に空気が入っているため水は素直に入っていない。そこで、減圧処理により、空気を除去することで単に水に浸した場合と比較して2倍以上の水を導入することができる(図-1)。トマトの種子の場合には、表面に細かいじゅうたんのような毛(毛じ)が生えているので、減圧処理により、毛じの隙間の空気を除去してから微生物を潜り込ませることにより、多量の微生物を導入することができる。ハクサイの種子の場合には、種子表面が滑らかであるため、減圧接種の際に糊材を併用することで種皮表面への微生物の付着率を高めることができる。

次に微生物でコーティングした種子の乾燥工程であ

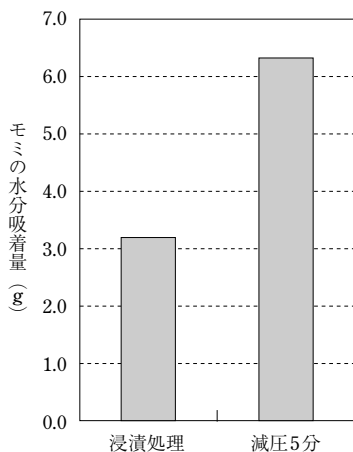


図-1 減圧処理がモミの水分吸着量に与える影響

る。種子は、ぬれた状態に長期間放置すると吸水し、発芽したり、腐り始めたりする。そのため、減圧接種により微生物をコーティングした後は、速やかに乾燥させる必要がある。しかしながら、微生物は乾燥には非常に弱いいため、低温・低湿条件で乾燥させることにより、付着した微生物の死滅を少なくする。減圧接種後、そのまま減圧乾燥に移行することにより、一つの容器内でロスなく処理することができる。特に休眠体をもたない細菌の場合には、保護剤を添加することで菌の死滅を軽減することができる。

装置は、コニカルドライヤーという減圧乾燥する際に使用する機器に、薬液を噴霧するノズルなどを付けたものであり(図-2c)、本装置1台で、種子に微生物を付着させる工程とその次の乾燥工程を処理することができる。

Ⅲ 適用事例

(1) 水稻・種子伝染性病害(ばか苗病・もみ枯細菌病)防除

用いた生物農薬は、トリコデルマ・アトロピリデ水和剤である。

水稻における実用化においては、他の種子と比較して、処理量が格段に多いためスケールアップをいかに進めるかが最重要課題であった。当初は、ピーカーに生物農薬を希釈して入れ、網袋に入れた種モミを浸し、真空デシケーターと真空ポンプを連結した減圧装置(図-2a)を用いて微生物を減圧接種し、その後、脱水、通風乾燥を行った。製造工程を見直し、一つの回転容器内で減圧接種から減圧乾燥までを一貫して行えるエバポレーター法を考案した(図-2b)。しかし、ガラスのフラスコ容器サイズにより処理量が制限されるため、スケールアップの容易なコニカルドライヤーを設計・試作機を作成した(図-2c)。また、添加する水の量を少なくすることにより、乾燥時間の短縮を図った。

2009年秋のイネばか苗病に対するライブコート処理粉の防除検定を兵庫県、高知県、日植防において実施した。結果は、いずれも非常に高い防除効果(99.2~100)が得られた(表-1)。2009年春のイネもみ枯細菌病に対するライブコート処理粉の防除検定結果を兵庫県、高知県および日植防にて実施した。結果は、いずれも高い防除効果(85.7~100)が得られた(表-2)。

保存安定性試験の結果は、4℃保存では3か月間安定した生存菌数と防除価が得られたが、10℃、15℃では、菌数および防除価の低下が認められた。

(2) トマト・青枯病防除

用いた微生物は、シュードモナス・フルオレッセンス

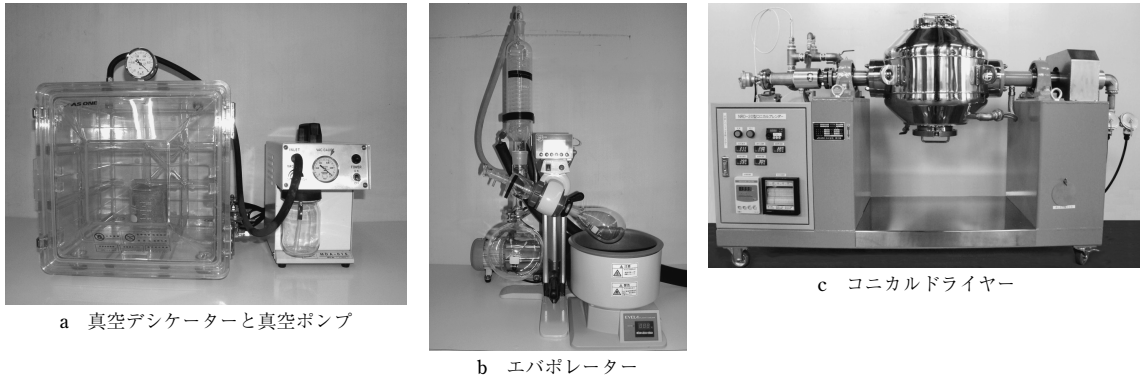


図-2 ライブコート処理装置の変遷

表-1 イネばか苗病に対するライブコート試作品の防除効果

		日植防	兵庫県	高知県
2009年秋	湿式コンカル法	100	100	99.8
	無処理発病苗率	11	2.9	64.9
	対照薬剤(生/化)*	100/99.1	90.0/100.0	99.8/-

*対照薬剤(生/化)：生は、対照薬剤として生物農薬製剤(トリコデルマ・アトロピリデ水和剤)を使用、化は、対照薬剤として化学農薬製剤(イブコナゾール・銅水和剤(フロアブル))を使用した。

表-2 イネもみ枯細菌病に対するライブコート試作品の防除効果

		日植防	兵庫県	高知県
2009年春	湿式コンカル法	85.7	100	89.5
	無処理発病苗率	8.4	0.2	3.2
	対照薬剤(生/化)*	69.0/73.8	100/100	52.6/-

*対照薬剤(生/化)：生は、対照薬剤として生物農薬製剤(トリコデルマ・アトロピリデ水和剤)を使用、化は、対照薬剤として化学農薬製剤(イブコナゾール・銅水和剤(フロアブル))を使用した。

剤に含まれる成分微生物2菌株である(口絵①)。

トマト・ライブコート種子製造工程においては、乾燥時の菌の死滅をいかに少なくできるかが最重要課題であった。成分微生物の生存性に関係の深いと考えられる要因を抽出し、その影響を調べた。その結果、成分微生物の生存には、保護剤の添加が必須であること、温度条件が重要であることが明らかとなった(図-3)。そこで、保護剤のスクリーニングを行い、より安定した新規処方の開発に成功した。さらに減圧乾燥工程における温度制

御の重要性を明らかにし、気化熱による温度低下をモニタリングし、凍結しない温度制御下で減圧乾燥を行うことにより、 $10^5 \sim 10^6$ cfu/種子の高密度ライブコート種子の製造に成功した。

ライブコート種子を乾燥剤と酸素吸収剤を入れた保存袋に入れ、 4°C で保存した。その結果、9か月でも 10^4 cfu/種子以上の菌数を安定して保持できていることがわかった。トマト・ライブコート種子を播種し、その生育と成分微生物の定着率から、最適培土を選定した。2009年度、接ぎ木苗を用い、トマト青枯病汚染圃場における防除検定試験を日植防(牛久, 高知), 兵庫県, 高知県, サカタのタネの5箇所で行った。その結果、防除率は0~48とやや低い結果となったものの、各試験担当者は、明らかに発病遅延効果があることを認めた(表-3)。

(3) ハクサイ・根こぶ病防除

用いた生物農薬は、バリオボラックス・パラドクス水和剤である。

ハクサイ・ライブコート種子製造工程においては、基本的に種子が吸水しやすく、種皮が弱く破損しやすいこと、処理後の発芽率の低下、試作サンプルの防除検定結果が明確にならないことなど諸問題が明らかとなり、実用化は困難と判断した。

(4) レタス・ビッグバイン病防除

用いた微生物は、シュードモナス・フルオレッセンスに属する内生細菌である。

本件は、2003~05年までの先端技術を活用した農林水産研究高度化事業の中で行われ、総合的な防除体系の中の一つとして検討を行った(相野ら, 2006)。しかしながら、生物農薬登録にかかるコストと期待される効果、およびレタス種子の価格・市場規模等について検討

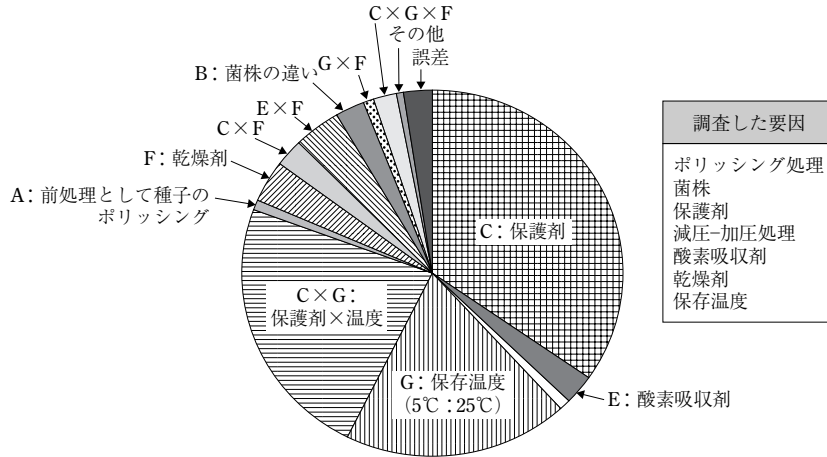


図-3 成分微生物の生存に及ぼす製造工程の要因解析（全変動に占める各要因変動の％）
ライブコート種子の製造工程中、成分微生物の生存に影響を及ぼす可能性のある要因を取り上げ、直交表を用いた要因配置によって統計的手法で要因効果を明らかにした。

表-3 2009年度ライブコート接ぎ木苗の防除価一覧

	日植防牛久	日植防高知	兵庫	高知	サカタ
定植日	7月7日	5月19日	5月31日	6月10日	5月29日
調査日	9月24日	9月7日	8月24日	9月29日	8月4日
ライブコート処理区 ^{*1}	0	42.3	15.9	47.6	21.0
対照薬剤区 ^{*2}	19.7	21.4	2.7	28.5	49.7
無処理区発病度	41.7 ^{*3}	19.6	84.5 ^{*4}	63.6	34.8

^{*1} 台木に処理, ^{*2} セル苗元気, ^{*3} 導管褐変率, ^{*4} 発病株率。

し、事業化は困難と判断した。

IV 品質管理技術

ライブコート処理した種子を製造し、実用化を考えるうえで、その品質管理は非常に重要な問題である。種子の品質管理においては、従来からの種子の粒数という数量管理から、発芽率、発芽勢といった質的管理へと、顧客の求める要求レベルは高まっている。今後、同様に微生物に関しても単なる菌数管理だけでなく、微生物の活性を評価する指標を示すことが求められるようになると考えている。特に実用化を目指すライブコート技術においては、製造後、一定期間種子を保存する必要がある。この保存期間中の菌数低下だけでなく、微生物活性の低下が懸念される。そこで、かなり基礎的なデータも含めてライブコート種子の性質・特徴を明らかにし、微生物の量的把握だけでなく、質的な変化（微生物活性）を捉えることを重視した。

(1) 水稻

種子への成分微生物の付着菌量は、選択培地を用いた通常の希釈平板法で検出した。さらに、モミの内側（玄米部）まで成分微生物が入り込んでいることを確認した。成分微生物の根圏定着能力を調べ、播種7日の稲において、1～8cmの深度まで根圏への定着が確認できた。FDA染色法により生きている成分微生物を選択的に染色することができ、蛍光強度による定量化が可能となった。25～100℃の温度処理により、成分微生物の胞子発芽率は低下し、FDA染色の強度も低下した。さらに温度処理した成分微生物を種モミにライブコート処理して植物側の反応を調査した。イネばか苗病汚染種子を用いた場合に、イネばか苗病に対する防除効果の低下が確認された。健全モミを用い、防御関連遺伝子の発現を調査した（図-4 a）。その結果、ライブコート処理により、防御関連遺伝子の発現が増強されることが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子発現レベルは、熱処理する

ことにより失活すること, その中でも PR-10 遺伝子の発現量と蛍光強度の間で高い相関が得られることが明らかとなった (図-4 b)。

このように, 熱処理による, ①微生物活性の低下 (発芽率の低下), ②成分微生物のもつ薬効の低下, ③植物側の防御関連遺伝子 (PR10) の発現低下が, いずれも FDA 染色による蛍光強度と高い相関が得られ, 微生物活性の簡易検査法として利用できる可能性が示唆された。

(2) トマト

成分微生物 (シュードモナス・フルオレッセンス FPH9601) の 16SrDNA 塩基配列を元に, 特異性の高いプライマーを選抜した。リアルタイム PCR により定量的な成分微生物の検出が可能となった (図-5)。さらに

土壌試料からの直接検出にも成功した。

顕微鏡観察により, ライブコート種子上の成分微生物が, 発芽の際に種子内部に侵入し, 増殖していることが観察された (図-6)。

既に, 本菌の誘導抵抗性については, 報告がある (相野ら, 2009) が, シロイヌナズナを用いたマイクロアレイ解析により, 発現上昇程度の高い遺伝子 30 個を選抜し, トマト遺伝子とのホモロジーサーチを行った。その結果, PR 蛋白やエチレンシグナル伝達系に属する遺伝子が含まれていることが明らかとなった。トマト幼植物において 30 個の遺伝子の発現レベルをスクリーニングにかけた。その結果, PR4 遺伝子の発現上昇が確認された。そこで, ET・JA 系関連遺伝子群の動向を調査し,

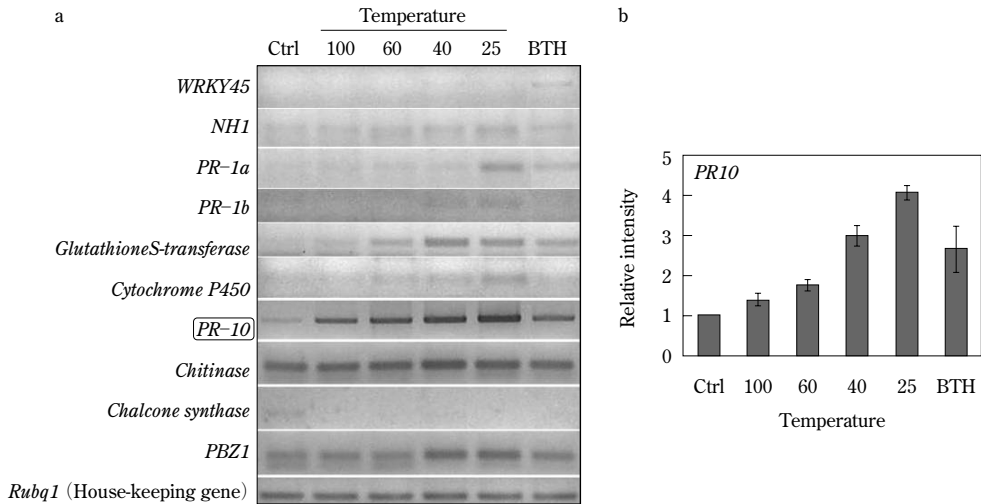


図-4 イネ・ライブコート種子における防御関連遺伝子の発現増強と熱処理による失活 (百町満朗原図)

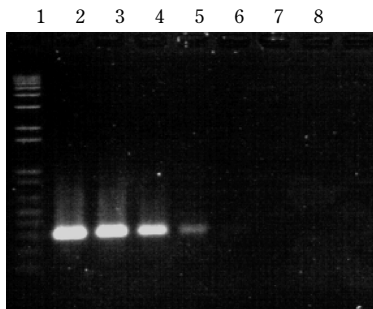


図-5 PCR 法による成分微生物 (シュードモナス・フルオレッセンス FPH9601) の検出 (中屋敷均原図)
各レーンの説明 左から 1: 分子量マーカー, 2: 10^{-1} , 3: 10^{-2} , 4: 10^{-3} , 5: 10^{-4} , 6: 10^{-5} , 7: 10^{-6} , 8: 10^{-7} の各希釈サンプル。

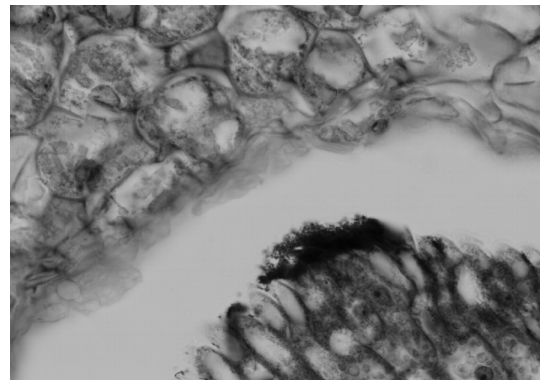


図-6 発芽中のライブコート種子内部 (子葉および第 1 本葉) における成分微生物の増殖 (Stoughton 法により成分微生物を紫色に染色) (加来久敏原図)

PR3, PDF1, 4, ACS2 等の遺伝子発現上昇が確認された。特にライブコート処理した接ぎ木苗において ACS2 遺伝子の発現が 50 倍もの顕著な増加を示した。

PCR 法では、活性を失った微生物や死滅した微生物も含めて検出することになる。しかし、ACS2 などのマーカー遺伝子の発現を調べることにより、ライブコート種子上の微生物活性を評価できると考えられた。

(3) 抗体を用いた品質管理(イネ・トマト・ハクサイ)

各成分微生物を抗原として、ウサギを用いて抗血清を作成した。得られた抗血清は、いずれも反応陽性の希釈段階が 1 万～100 万倍と ELISA 検定に十分な力価を示した。各血清から IgG を精製し、標識抗体を作成した。各抗体の特異性を確認した後、間接 ELISA により植物体からの迅速・簡易検出に用いた。さらに蛍光抗体を用いることにより、植物根圏における成分微生物の動態観察が可能となった(口絵③)。

ELISA 検定により、種子上の成分微生物の簡易・迅速な検出が可能であるものの、単純な抗体検査では、死滅した微生物の表面抗体も含めて検出してしまう。そのために、幼植物体上で成分微生物が増殖していることを確認することが必要であり、蛍光抗体は、有効な手段となると考えられた。

V 問題点と想定される解決策

本ライブコート技術は、種子の形状や大きさ、微生物の種類、両者の組合せに大きく影響されることがわかってきた。

イネ・ライブコートの場合には、技術的には十分に可能性があるものと判断している。残された問題は、微生物の寿命(保存安定性)、装置導入のための初期設備投資が市場に受け入れられるか、そして農薬登録の問題がある。

トマト・ライブコートの場合にも、技術的には十分に可能性があるものと判断している。残された問題として、実際の生産者や苗生産現場への適応性とコストおよび市場規模など、より詳細な検討を行う必要がある。今後、原料メーカーと協力しながら自社製品としての事業化を目指した検討を進めていく。

ハクサイ・ライブコートは、技術的な複数の問題を克服できず、断念した。

レタス・ライブコートは、費用対効果のバランスに問題があり、事業化は難しいと判断した。

VI 今後の展望

これまでの検討結果から、現在技術的に可能なレベルにあるものとしては、稲とトマトに対するライブコート

処理と考えている。

稲モミへライブコートを行うことにより、メリットとしては、冬場の農閑期にまとめて多量の種モミの処理を行うことができるようになり、廃液も大幅に削減できた。イネばか苗病、イネもみ枯細菌病に対して安定した防除効果が得られるようになった。したがって、今後の実用化に向けては、上記の残された問題点を解決しながら、種モミの生産・流通システムにいかのせることができるかを調査しておく必要があり、稲作関係の農業機械メーカーなどを探索し、協議しながら事業展開の可能性を模索していきたい。

トマト種子へライブコート処理を行うことにより、メリットとしては、トマト種子に青枯病に対する発病抑制効果を付与する新たな技術ができた。今後は、上記の残された問題を解決しながら、原料メーカーと協力し、自社製品としての事業化を目指した検討を進めていきたい。

品質管理技術においては、遺伝子や抗体を用いた利用技術を開発し、簡単・迅速で精度の高い検査が可能となった。特に重要なのは、製造直後の微生物の菌数と活性を確認するだけでなく、出荷までの保存期間中の成分微生物の活性低下をモニタリングするための手法が開発できたことにある。また、イネおよびトマトにおいて成分微生物が植物側の誘導抵抗性のシグナル伝達系遺伝子の発現増強を起こしているという知見が得られた。このような基礎的な技術や知見を今後の実用化に向けて大いに役立てていきたい。

謝辞 本研究開発は、産学官連携による食糧産業活性化のための新技術開発事業より援助をいただきました。研究推進にあたりご協力いただきました岐阜大学 百町満朗教授、九州大学 土屋健一教授、神戸大学 中屋敷均准教授、その他、本プロジェクトに参画し、協力していただきました関係企業、並びに多くの関係者の方々に心よりお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 相野公孝ら (2006): 日植病報 72: 256.
- 2) ———ら (2009): 微生物と植物の相互作用, ソフトサ社, 東京, p. 178 ~ 183.
- 3) 橋本好弘 (2005): 特許 3665267.
- 4) ———ら (2006): バイオインダストリー 11: 67 ~ 74.
- 5) ———ら (2010): 特許 4528939.
- 6) KLOPPER, J. W. et al. (1980): Nature 286: 885 ~ 886.
- 7) 境 雅夫 (2005): 土と微生物 59: 63 ~ 72.
- 8) SCHROTH, M. N. et al. (1982): Science 216: 1376 ~ 1381.
- 9) 竹下純則ら (1977): 土と微生物 19: 19 ~ 28.
- 10) TSUCHIYA, K. et al. (1991): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 57: 196 ~ 202.
- 11) YOKOYAMA, K. (1993): Boil. Intl. Special Issue-29, Intl. Union Biol. Sci. 74 ~ 78.
- 12) 横山和成 (1996): 土と微生物 47: 1 ~ 7.