

数種の植物病原菌に対する拮抗菌の検索と 植物への接種試験

池田健太郎・斎藤英毅・佐藤俊一・柳沢勝人
茅野誠司・児玉 徹

信州大学繊維学部附属農場

緒 論

Fusarium 菌, *Verticillium* 菌 及び *Rhizoctonia* 菌は, 重要な土壌病原菌として知られている。これらの病原菌は, 1度発病すると, 防除が非常に困難であり, 長期間にわたって農作物に大きな被害を与えている。このような土壌病害に対し, 現在実施されている防除方法はクロルピクリンなどによる土壌消毒が主である。しかしこの方法は, 土壌中の微生物を有用菌を含めて, 無差別に殺傷し, 微生物相を単純化させることが指摘されている。微生物相が単純化した土壌では, 土壌静菌作用が衰退しており, 逆に病原菌の繁殖を招く恐れもある。また周辺住民に対する公害など, 様々な意味で環境に重大な問題を与えている。このような諸問題を解決するために, 近年, 土壌微生物の利用が注目されている。

土壌中には多くの微生物が生息しているが, そのほとんどは機能や働きがよく知られていないものが多い。この土壌微生物の中には, 土壌病害の原因となる植物病原菌に拮抗作用を示すものもある。このような拮抗菌が利用できれば, 病原菌以外の生物に対しては影響の少ない, 土壌病害の防除手段の一つとなる可能性がある。

そこで本研究では, その第一歩として土壌中から拮抗菌を検索し, 植物に対し接種試験を行った。

1 土壌からの拮抗菌の検索

長野, 群馬, 栃木, 東京, 埼玉など19カ所から土壌を採取し, Herrの3重培地法¹⁾によって, *Fusarium* 菌, *Verticillium* 菌及び*Rhizoctonia* 菌などの植物病原菌に対する拮抗菌を検索した。

実験方法

1層目: 殺菌したの1.5% water agar 10mlを滅菌し

たシャーレに分注した後, 1日間静置した。

2層目: ①49°Cに保温した1.0% water agar 6 ml中に 10^{-4} に希釈した土壌懸濁液 1 mlを添加して1層目培地上に分注した。

②培地が固まった後, シャーレを倒置して25°Cで2日間培養した。

3層目: ①49°Cに保温した Czapek 培地 7 ml中に供試菌株の孢子懸濁液 1 mlを添加して2層目培地上に分注した。

②培地が固まった後, シャーレを倒置して25°Cで4日間培養した。

調 査: コロニーの周辺に形成された阻止円の直径を測定した。

菌株の保存: 15mm以上の阻止円や, 明瞭な阻止円を形成したものはPSA 斜面培地に植菌し, 25°Cで培養し, 保存した。

供試菌株

<i>Fusarium lateritium</i> f. sp. <i>mori</i>	クワ芽枯病
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	アマ立枯病
<i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i>	カボチャ立枯病
<i>Verticillium dahliae</i>	トマト半身萎ちよう病
<i>Rhizoctonia solani</i>	レタスすそ枯病

実験結果

各地より, 19の土壌サンプルを採取し, Herrの3重培地法により拮抗菌を検索した。その結果, 600菌株が採取された。阻止円の直径別分離菌株数を図2-1に, 境界の明瞭度別分離菌株数を図2-2に示した。

使用した供試菌株の中で, *F. lateritium*, *V. dahliae*, *R. solani* に対する拮抗菌数は, *F. lateritium* の81菌株, *V. dahliae* の37菌株, *R. solani* の20菌株と, 採取された拮抗菌株数は *F. oxysporum*, *F.*

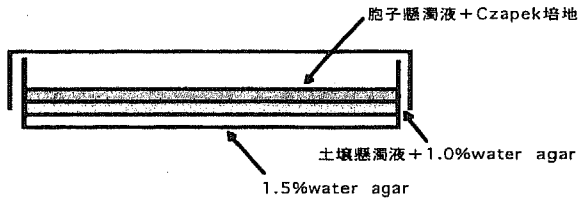


図1. Herrの3重培地法

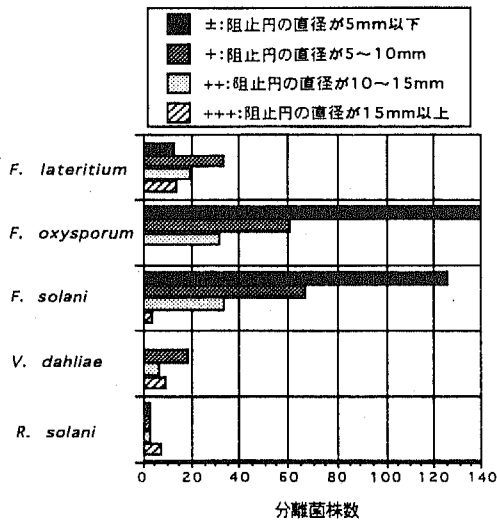


図2-1 阻止円直径別分離菌株数

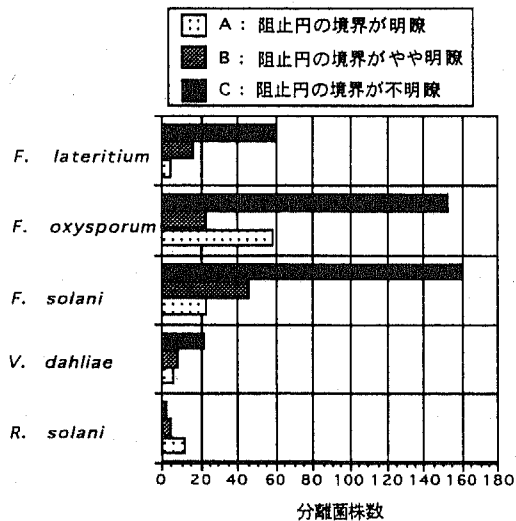


図2-2 阻止円境界明瞭度別分離菌株数

solani に比べて少なかったが、15mm以上の阻止円を形成する菌株も多く採取された。*F. oxysporum*, *F. solani* に対する拮抗菌は、231菌株と最も多く採取されたが、大半は5mm以下の阻止円を形成するもので、その割合は*F. oxysporum*では60.2%、*F. solani*では54.5%を占めた。

阻止円の境界の明瞭度は、A、B、Cの3段階で評価し、明瞭なものをA、やや明瞭なものをB、不

明瞭なものをCとした。使用した供試菌株の中では、*R. solani*を除いて、阻止円の境界が不明瞭なCが圧倒的に多かった。しかし*R. solani*に関してはその逆で、阻止円が明瞭なAが最も多かった。

保存した菌株は、全部で71菌株で、その内訳はbacteriaが2菌株、糸状菌が4菌株で、他は全て放線菌であった。

採取した拮抗菌の中で、最も大きく、かつ明瞭な阻止円を形成した菌株は*R. solani*に対して30mmの阻止円を形成した7 R30A菌株であった。

2 抗菌スペクトルの検定

土壌より分離した7 R30A菌株について純粋培養を行い5菌株に分け、それぞれS-1～S-5とした。これらの菌株の*R. solani*以外の、植物病原菌に対する拮抗作用があるか否かを対峙培養によって調査した。

実験方法

- 滅菌したシャーレにPSA培地10mlを分注し、培地が固まった後、シャーレを倒置した。
- 7 R30A菌株及びS-1～S-5菌株を植菌し、25°Cで2日間培養した。
- 拮抗菌がはっきりと生育した後、供試菌株を植菌し、25°Cで4日間培養した。
- 拮抗菌と供試菌株との間の距離を測定し、阻止帯とした。

供試菌株

- Fusarium lateritium* f. sp. *mori*
- F. lateritium* f. sp. *celosiae*
- F. lateritium* f. sp. *crotalariae*
- F. lateritium* f. sp. *xylarioides*
- F. oxysporum* f. sp. *lini*
- F. solani* f. sp. *cucurbitae*
- F. solani* f. sp. *mori*
- F. solani* f. sp. *psi*
- Verticillium dahliae*
- Rhizoctonia solani*
- Colletotrichum cyclamenae*
- Helicobasidium mompa*

実験結果

12種の供試糸状菌に対する対峙培養の結果を表1に示した。7 R30A菌株は5種の植物病原菌(*F.*

表1 7 R30A 菌株及び S-1~S-5 菌株の抗菌スペクトル

供試菌株	拮抗菌					
	7R30A	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5
<i>Fusarium lateritium</i> f. sp. <i>mori</i>	++	++	+	++	++	++
<i>F. lateritium</i> f. sp. <i>celosiae</i>	±	±	±	±	±	±
<i>F. lateritium</i> f. sp. <i>crotalariae</i>	++	+	±	+	±	±
<i>F. lateritium</i> f. sp. <i>xylarioides</i>	+	+	±	+	±	±
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	-	-	-	-	-	-
<i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i>	-	-	-	-	-	-
<i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Verticillium dahliae</i>	++	+++	++	++	+++	+++
<i>Rhizoctonia solani</i>	++	+++	++	++	+++	+++
<i>Colletotrichum cyclamenae</i>	±	±	±	±	-	±
<i>Helicobasidium mompa</i>	++	++	±	+	-	++

- : 拮抗せず ± : ~5mm ++ : 10~15mm +++ : 15mm~

lateritium f. sp. *mori*, *F. lateritium* f. sp. *crotalariae*, *H. mompa*, *V. dahliae*) に対し拮抗作用を示した。*F. lateritium* f. sp. *mori* には S-2 菌株を除く 5 菌株が 10mm を超える阻止帯を形成したのに対して, *F. lateritium* f. sp. *celosiae* では 6 菌株全てが 5mm 以下の阻止帯を形成したにとどまった。*F. lateritium* f. sp. *crotalariae*, *F. lateritium* f. sp. *xylarioides* では 7 R30A 菌株が最も拮抗力が強く, 純粋培養して得た S-1~S-5 菌株では逆に拮抗力が低下した。この 2 種の糸状菌には, S-1, S-3 菌株が他の 3 菌株よりやや強い拮抗力を示した。また *F. oxysporum* f. sp. *lini*, *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, *F. solani* f. sp. *mori*, *F. solani* f. sp. *pisi* には 6 菌株全てが全く拮抗力を示さなかった。*C. cyclamenae* に対しては, S-4 菌株が全く拮抗作用を見せず, また他の菌株も 5mm の阻止帯を形成したにすぎなかった。*H. mompa* では, 各菌株間で拮抗力に大きく差がでた。7 R30A 菌株では, 12.7mm の阻止帯が見られたにも関わらず, S-2, S-3 菌株では拮抗力の低下が見られ, S-4 菌株に至っては, 拮抗作用が全くなくなった。一方, *R. solani*, *V. dahliae* には, 純粋培養することによって, 拮抗力が強くなる現象が見られた。特に S-1, S-4, S-5 菌株は 15mm 以上の阻止帯を形成した。

最も高い拮抗力を見せたのは, *V. dahliae* に対する S-1 菌株で, 平均 18.0mm の阻止帯を形成した。

3 *V. dahliae* に対する拮抗菌 (S-1 菌株) の発病抑制効果

V. dahliae は, ハクサイ黄化病, トマト半身萎

ちょう病の病原菌である。先に行った抗菌スペクトルの検定で S-1 菌株は *V. dahliae* に対し特に高い拮抗力を示した。この菌株が発病を抑制する効果があるかどうかを知るために, *V. dahliae* と S-1 菌株とともにハクサイ, トマトの栽培土壌中に混入し, 生育状況及び根部の褐変の調査を行った。

試験方法

1. 試験区の構成

殺菌土と無殺菌土を用いて調査した。殺菌土壌区, 無殺菌土壌区とも, Control (無処理), *Verticillium* 菌混入区, S-1 菌株混入区, *Verticillium* 菌+S-1 菌株混入区の合計 8 区を設け, 1 区区当たり植木鉢 (φ16cm) は 3 つとした。

2. 耕種方法

ハクサイは 9 月 22 日, トマトは 10 月 2 日に一鉢につき, 10 粒を播種した。肥料となる有機物は一切使用していない。給水は午前 8 時, 午後 4 時の 1 日 2 回とした。

3. 供試菌株の混入

以下の濃度の懸濁液を, 播種前の植木鉢に混入した。

Verticillium 菌 : 2.4×10^5 cell/ml の孢子懸濁液

S-1 菌株 : 1.3×10^5 cell/ml の菌懸濁液

4. 調査

生育調査 : ハクサイ, トマトともに播種後 5 週間の不発芽, 枯死, 生育個体数の調査を行った。

根部褐変度 : ハクサイは 12 月 4 日, トマトは 12 月 12 日に根部の切断面の褐変度を調査した。

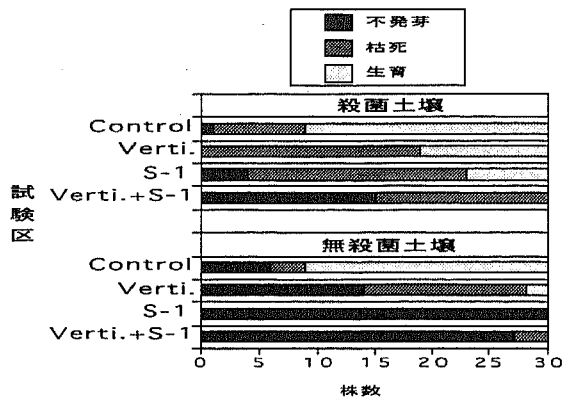


図4-1 ハクサイの生育調査

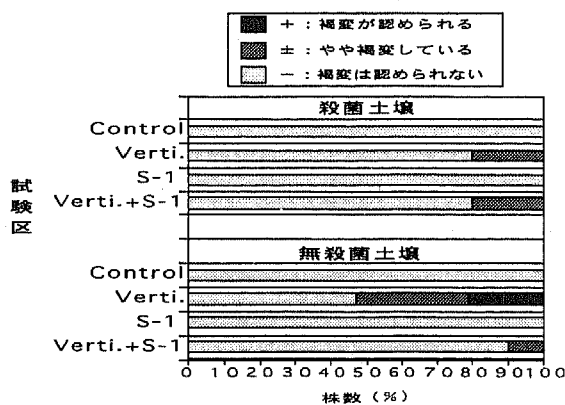


図4-2 *Verticillium*菌によるトマトの根部褐変度

供試品種

ハクサイ (無双) トマト (瑞光)

実験結果

ハクサイの生育調査の結果を、図4-1に示した。殺菌土壌区、無殺菌土壌区ともに、Control以外の生育が著しく悪かった。S-1菌株を混入した4つの区では合計120粒の種子を播種したにも関わらず、正常に発芽、生育したのは殺菌土壌のS-1菌株混入区の7株のみであった。特に殺菌土壌のS-1菌株混入区、*Verticillium*菌+S-1菌株混入区においては合計60粒の種子を播種したのに対し、正常に発芽、生育したのは1株もなかった。このようなことから、S-1菌株はハクサイの発芽、生育を阻害することも考えられる。また*Verticillium*菌を混入した区でも、正常に育つ株は少なかった。生育した株の根部の褐変を調査したところ、殺菌土壌区、無殺菌土壌区の*Verticillium*菌混入区において*Verticillium*菌によると思われる褐変が認められた。

トマトにおける接種試験結果を図4-2に示した。発芽率はほぼ100%であった。枯死個体は少なく、

その後の生育も順調であった。殺菌土壌の*Verticillium*菌混入区において巻葉や、葉のくさび形模様といった半身萎ちょう病の症状が確認されたものもあった。根部の褐変度を調査した結果、殺菌土壌区では*Verticillium*菌混入区と*Verticillium*菌+S-1菌株混入区の間で褐変の程度に差は見られなかった。無殺菌土壌区ではわずかに*Verticillium*菌+S-1菌株混入区の方が*Verticillium*菌混入区よりも褐変した株数が少なかった。

考察

*Fusarium*菌、*Verticillium*菌及び*Rhizoctonia*菌などの土壌病原菌は、一度発病すると、防除が非常に困難であることが知られている。このような土壌病害に対して現在行われている防除方法は、クロルピクリンなどによる土壌消毒が主である。しかしこの方法は、微生物への非選択性、周辺住民に対する公害など、環境に重大な影響を与えている。このような諸問題を解決するために、近年、土壌微生物の利用が注目されている。既に拮抗微生物を利用した生物的防除はいくつか報告されている。非病原性の*F. oxysporum*を前接種することにより全身の抵抗性を誘導し、サツマイモつる割れ病を防除した例²⁾や、コンポストから分離した*Bacillus subtilis* NB22が、トマト根腐萎ちょう病、青枯病に対し高い防除効果を示したことも報告³⁾されている。これらの報告は、自然界から分離した拮抗菌の中には、土壌病害の防除にも有効な菌株が存在することを示唆している。

本研究では、各地より土壌を採取し、Herrの3重培地法により拮抗菌を検索した。その結果、600菌株の拮抗菌が分離された。

抗菌スペクトルの検定、*V. dahliae*による発病抑制効果などの実験に使用した7 R30A菌株は、*R. solani*の拮抗菌として分離されたが、対峙培養によって、他の菌株(*V. dahliae*など)への拮抗作用も明らかになった。先に述べたコンポストより分離した*Bacillus subtilis* NB22も幅広い抗菌スペクトルを持つことが報告されている。これらのことから拮抗作用は、1種類の菌株に作用する特異的なものだけでなく、数種類の菌株に作用するものも存在することが分かった。

*V. dahliae*に対する発病抑制効果の調査では、拮抗菌のS-1菌株は直接土壌に混入したが、無殺菌土を用いた場合は、外来菌が定着しにくいと言う

結果が報告されている。拮抗菌の根圏への定着を助ける意味で、イナワラやもみがら、パーミキュライト、ゼオライトなどのキャリアーの併用も考える必要がある。

いずれにしろ今回使用したS-1菌株はハクサイの発芽及び生育を阻害するという現象が見られたので、土壤病害の防除手段としては利用できないと考えられる。しかし自然界には土壤病原菌に対し、拮抗力のある菌株は数多く存在することも分かった。今後はさらに、拮抗力や、植物への適応性などの点で優良な菌株を検索し、最も適した植物への処理方法を検討することで、土壤病害の防除手段の1つとなる可能性は十分あると考えられる。

引用文献

- 1) Leonard J. HERR (1959): A Method Of Assaying Soils For Numbers Of Actinomycetes Antagonistic To Fungal Pathogens. *Phytopathology* 49: 270-273
- 2) Kei OGAWA and Hajimu KOMADA (1984): Biological Control of Fusarium Wilt of Sweet potato by Non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 50: 1-9
- 3) Chea Gun PHAE, Makoto SHODA, Nobuhiro KITA, Mituyuki NAKANO and Kinji USHIYAMA (1992): Biological Control of Crown and Root Rot and Bacterial Wilt of Tomato by *Bacillus subtilis* NB22. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 329-339