

種子バクテリアゼーションによるテンサイ苗立枯病の防除 —ペレット種子への拮抗細菌の導入—

農林水産省野菜・茶業試験場久留米支場 **ちく 築** **お 尾** **よし 嘉** **あき 章**

はじめに

テンサイ苗立枯病は育苗期に常発する重要病害で、*Pythium* spp., *Aphanomyces cochlioides*, *Rhizoctonia solani* 及び *Phoma betae* などの複数の病原菌が関与する。現在は薬剤による防除法がほぼ確立しているため、大発生はあまり認められないが、育苗期間の長期化に伴って、再び問題視されるようになった。

李・生越 (1986) はテンサイの根面からこれら病原菌に拮抗性を示す *Pseudomonas* 属菌などを数種分離し、テンサイ種子に塗布して播種(種子バクテリアゼーション)すると苗立枯病の発病が抑制されることを報告した。この際の種子処理は細菌けん濁液中に種子を浸漬し、そのまま播種するもので実用化の点で改善の余地があった。筆者はこれら北大分離株及び独自に選抜した拮抗性細菌を使って、当時実用化されつつあったペレット種子(不規則な形状をしたテンサイ種子を粘土鉱物などで球形に被覆したもの)への細菌の導入を試みたのでその概要について報告する。本試験は筆者が北海道農試畑病害研究室在動中に行われたものであり、その一部は日本植物病理学会において報告した(築尾ら, 1989 a; 1989 b; 1990; 1991)。なおペレット化を行うに当たり、日本甜菜製糖(株)(以下N)及びホクレン農業協同組合(以下H)の関係各位に多大な協力を賜った。また北海道大学生越明教授及び畑病害研究室長本間善久博士には実験遂行上、貴重な助言をいただいた。ここに記して謝意を表す。

I 拮抗細菌添加ペレット種子の製造

本試験で供試した細菌5種を表-1に示した。これらの菌のうち1218及びRB425は *Pseudomonas cepacia* とともにピロールニトリンを生産することが明らかになっている(長浜ら, 1988; 本間, 1989)。他はいずれも蛍光性 *Pseudomonas* である。実験に先だって、いずれの菌株もリファンピシン耐性菌を選抜した。細菌はKing B(以下KB)液体培地で28℃, 7~10日振とう培養し菌体を遠心分離によって回収後、0.1M硫酸マグネシウム液に100ml当たり1gの割合でけん濁させた。この液に種子

を加え30分振とう後、風乾させ、種子表面に菌体を付着させた。つぎに造粒機を用いてペレット化後、温風により乾燥させた(図-1, 2)。なおペレット化はN及びH両者の方法で行った。前者の製造技術はGermain社の、また後者のそれは独自開発技術とされる。資材等は両者からの提供であり、その詳細な記述はさける。

II 拮抗細菌添加ペレット種子中の細菌の生存期間

1 ペレット化前後の菌量の変化

まずペレット化が菌量に与える影響を調べた。細菌添加ペレット種子を殺菌乳鉢で磨砕し、リファンピシン

表-1 供試菌株

菌株	種名	由来
1218	<i>Pseudomonas cepacia</i>	テンサイ
87-45	蛍光性 <i>Pseudomonas</i>	テンサイ
25	蛍光性 <i>Pseudomonas</i>	テンサイ
21	蛍光性 <i>Pseudomonas</i>	テンサイ
RB425	<i>Pseudomonas cepacia</i>	レタス

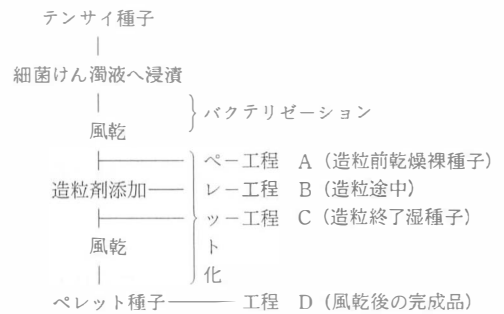


図-1 ペレット化工程の概要

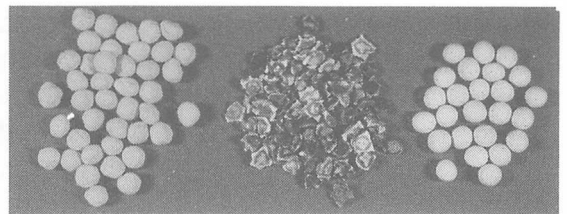


図-2 拮抗細菌を導入したテンサイペレット種子(左右)、裸種子(中央)

Incorporation of Antagonistic *Pseudomonas* spp. to Pelleted Seeds to Control Sugar Beet Damping-off. By Yoshiaki Chikuzo

100 ppm を添加した KB 培地を用いた希釈平板法で菌量を測定した。ペレット化前の種子付着菌量は種子 1g 当たり $10^5 \sim 10^6$ cfu であったが、ペレット化直後にいずれの菌株も当初の菌量より大きく減少した。その減少程度は菌株によって、また製造方法によっても異なり、 $10^3 \sim 10^5$ cfu またはそれ以上減少した菌株もあった (図-3)。

2 ペレット種子における細菌の保存性

細菌添加ペレットを室温及び 4°C に所定期間保った後、同様の希釈平板法で菌量を測定した。この結果も菌株間また製造方法でかなり異なったが、4°C 保存では菌量の減少はおおむねゆるやかで、157 日後でもペレット化直後の菌量を維持していた。しかし、室温保存では全菌株とも菌量が急激に減少し、30 日～121 日で検出されなくなり、室温保存は困難と考えられた (図-3)。

III 拮抗細菌添加ペレット種子の苗立枯病抑制効果

N 及び H の 2 種類のペレット種子を自然汚染土、*Pythium ultimum* 接種土、*Aphanomyces cochlioides* 接種土、*R. solani* 接種土を詰めたペーパーポットに播種し、その効果を検討した。

1 自然汚染土における発病抑制効果

図-4, 5 に示したように細菌添加 N ペレットの出芽は細菌無添加のペレット種子の出芽に比べ早く、かつ出芽率も 85～95% と高く、出芽前の苗立枯病抑制効果が認め

られた。なかでも 21, 87-45 及び 1218 菌株添加区の出芽は良好であった。裸種子では 9 日目以降、出芽後苗立枯病が発生し、20% 近く発病したが、細菌添加ペレット種子ではその発病率が少なく、出芽後の苗立枯病に対しても効果が認められた。また裸種子と無添加ペレット種子を比較すると、無添加ペレット種子のほうが出芽率が高く、ペレット化だけでも苗立枯病の発生は減少した。

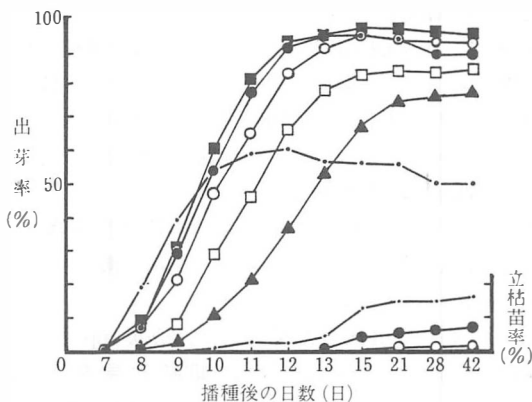


図-4 自然汚染土における拮抗細菌導入ペレット種子の出芽率及び立枯苗率 (N ペレット)

- 1218
- 87-45
- 25
- 21
- ▲ 对照ペレット
- ・ 裸種子

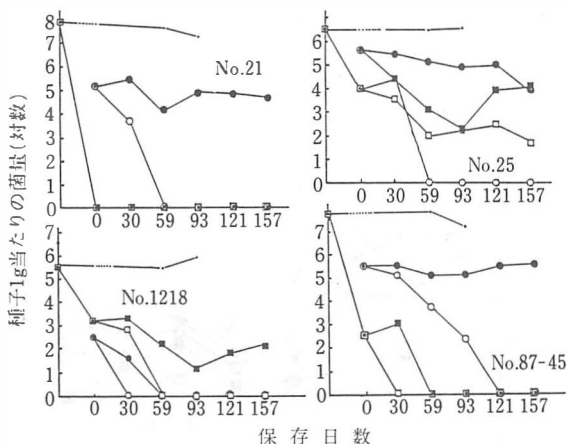


図-3 ペレット種子中での拮抗細菌の生存

- ペレット種子 (N 社) 4°C 保存
- ペレット種子 (〃) 室温保存
- ペレット種子 (H) 4°C 保存
- ペレット種子 (H) 室温保存
- ・ 裸種子 4°C 保存

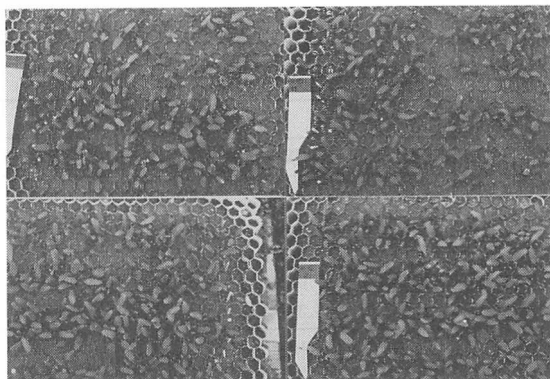


図-5 自然土における拮抗細菌添加ペレット種子 (N 社) の出芽状況 (播種後 21 日目)

- 左上: 1218 菌株
- 左下: RB 425 菌株
- 右上: 对照
- 右下: 21 菌株

なお本土壤で発生した立枯苗から病原菌を検出した結果、*Pythium* spp.による苗立枯病が主であった。

2 人工汚染土における発病抑制効果 (表-2)

(1) *Pythium* 接種土

フスマ培養した *P. ultimum* を殺菌した覆土に10% (容積比)になるように混合した。対照無添加ペレット種子の発病度が37.0であったのに対し、1218, 21菌株添加ペレット種子ではそれぞれ15.2及び18.5で有意に低く、苗立枯病抑制効果が認められた。

(2) *Aphanomyces* 接種土

殺菌土に *A. cochlioides* 卵胞子けん濁液を播種と同時に土壤に灌注して汚染土とした。無添加ペレット種子の発病度に対し、RB 425, 1218 及び 21 菌株添加ペレットはかなり低くなったが、有意差は認められなかった。

(3) *Rhizoctonia* 接種土

フスマ培養した本菌の菌糸融合群第4群を覆土の0.1%添加して汚染土としたが、苗立枯病が激発し、そのために細菌の効果は認められなかった。

以上のように供試した菌株は *Pythium* spp. 及び *A. cochlioides* による苗立枯病に抑制効果を示し、*Rhizoctonia solani* による苗立枯病には効果が確認できなかった。

IV ペレット種子播種後のテンサイ根面での拮抗菌の菌量

N, H 両ペレット種子をペーパーポットで育苗後、本圃へ定植し、栽培期間中の根面での菌量を経時的に測定した。なお育苗期は根部全体の、本圃定植後は側根のそ

れぞれ表面菌量を測定し、乾根1g当たりの菌量で表示した。図-6にHペレットの結果を示した。拮抗細菌は製造過程で菌量がいったん減少したが、テンサイの発芽に伴って、根面に移行・増殖し、発芽直後の7日目(本葉未展開)で乾根1g当たり $10^7 \sim 10^9$ cfuとなり、播種後35日までの育苗期間中も増減するが $10^4 \sim 10^7$ cfuの菌量を維持した。本圃に定植後、菌量はいずれの菌株も徐々に減少したが、6~7月の根部肥大期(播種後70~100日)に $10^4 \sim 10^5$ cfuとなり、10月の収穫期(同160日頃)には、さらに減少し、 $10^3 \sim 10^5$ cfuとなった。生育期後半からは肥大した主根の表皮と側根の両者の表面菌量を測定したが、両者とも同程度に付着していた。また本試験ではモノヒカリ及びダイヒルの2品種を供試したが、同時期の根面付着量に品種間で大きな差はなかった。

V 製造工程での菌量の減少時期

ペレット種子製造後に拮抗細菌の菌量を測定したところ、著しく減少することが明らかになったが、減少がどの段階で起こるのかをつぎに調べた。ペレット化は造粒過程と乾燥過程に分かれる(図-1)。この中の4時期(A~D)にサンプリングして菌量を測定したところ、減少は造粒時及び乾燥時の両者で起こることが明らかになった(表-3)。

乾燥時の温度が菌量減少に関与するかどうかを、拮抗菌の代わりに耐熱性の高い *Bacillus subtilis* を用いたNペレットで調べたところ、菌量の減少は見られなかった(表-3)ことから乾燥時の温風も菌量減少に関与していると考えられた。

表-2 ペレット種子(N社)に導入した拮抗細菌の各種病原菌による苗立枯病に対する効果

細菌	発病度 ^{a)}			
	自然土	Py.接種土 ^{b)}	Ap.接種土 ^{c)}	Rh.接種土 ^{d)}
RB425	1.2 d ^{e)}	31.0abc	3.3 cd	48.8NS
1218	6.5 bcd	15.2 c	0.7 cd	48.8NS
21	0.7 d	18.5 bc	1.1 cd	51.0NS
対照	13.6abc	37.0a	13.3 bc	48.8NS
裸種子対照	31.9a	33.3ab	34.2a	62.2NS

a) 発病度 = (0×A + 1×B + 2×C + 3×D + 4×E) × 100 / 4 × 調査株数

0: 無発病, 1: 軽症, 2: 中症, 3: 重症, 4: 枯死

b) *Pythium ultimum* 接種土

c) *Aphanomyces cochlioides* 接種土

d) *Rhizoctonia solani* 接種土

e) 同一英文字を付した数値の間にはダンカンの多重検定で有意差がないことを示す。NSは有意差がない。

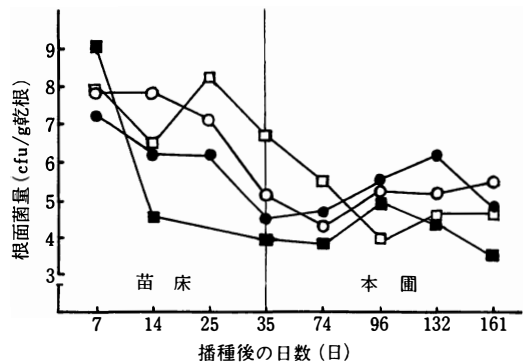


図-6 テンサイ根面での拮抗細菌の菌量の変化 (Hペレット)

● 1218 □ 25
○ 87-45 ■ 21

表-3 ペレット化工程 (H及びN) における菌量の変化

菌株	工程と菌量 (cfu/種子1g)			
	A ^{a)}	B	C	D
1218(H) ^{b)}	5.3×10 ⁶	4.3×10 ²	0.2×10 ²	ND
(N)	2.6×10 ⁴			3.0×10
21 (H)	1.2×10 ⁸	1.7×10 ⁷	5.3×10 ⁶	1.6×10 ⁶
(N)	9.5×10 ⁷			1.4×10 ⁶
RB425(H)	3.3×10 ³	ND	ND	ND
(N)	1.7×10 ²			ND
558 ^{c)} (N)	1.4×10 ⁴			1.5×10 ⁴
対照	0			0

a) A: バクテリアゼーション後の乾燥種子 B: 造粒中の湿種子

C: 造粒後の湿種子 D: 乾燥後のペレット種子

b) H: ホクレンペレット, N: 日甜ペレット

c) *Bacillus subtilis*: 拮抗作用はない。

おわりに

以上、拮抗根圏細菌のペレット種子への導入によるテンサイ苗立枯病の生物防除について紹介した。本試験は3年間行ったが、試験結果に年次間のふれを生じたり、ペレット化時に菌量が減少するなど、実用化までには解決しなければならない問題がいくつかある。

生物防除は各種作物の様々な病害を標的に研究が行われているが、実用化までたどり着いたものは非常に少ない。

いのが現状である。その原因の一つには農業などに比べ、効果が劣ることが多いのと同時に取扱の困難さがあげられる。その点、ペレット種子は取扱の容易さで優れている。ペレット種子への拮抗微生物の導入はニンジン及びテンサイ種子に *Pythium oligandrum* の卵胞子を入れた例 (LUTCHMEAH and COOKE, 1985) があるだけで細菌の導入例はない。種子に導入した細菌はペレット化によっていったん、菌量が減少するものの、残存した細菌は種子の発芽に伴って幼根・胚軸に移行・増殖することが明らかになっており、ペレット化時に菌量をいかに低下させないかが今後の検討課題となる。

ペレット種子は元来機械播種への適合や発芽率の向上などを目的に開発されたもので、その工程には微生物にとって必ずしも好適でない条件が含まれる。したがって種子の発芽率、発芽勢を損なわず、拮抗微生物の活性も維持できるような条件の設定が必要である。

引用文献

- 1) 築尾嘉章ら (1989a): 日植病報 55: 112 (講要).
- 2) ———ら (1989b): 同上 55: 507 (講要).
- 3) ———ら (1990): 同上 56: 406 (講要).
- 4) ———ら (1991): 同上 57: 424 (講要).
- 5) 本間善久 (1989): 植物防疫 43: 18~22.
- 6) 李王休・生越 明 (1986): 日植病報 52: 175~183.
- 7) LUTCHMEAH, R. S. and COOKE, R. C. (1985): Plant Path. 34: 528~531.
- 8) 長浜 恵ら (1988): 日植病報 54: 116 (講要).

本会発行図書

『応用植物病理学用語集』

濱屋悦次 (前農林水産省農業環境技術研究所微生物管理科長) 編著 B6判 506ページ

定価 4,800円 (本体4,660円) 送料 380円

植物病理学研究に必要な用語について、植物病理学はもちろん、農薬、防除、生化学、分子生物学などについても取り上げ(約6,800語)、紛らわしい用語には簡単な説明を付けそれぞれを英和、和英に分けてアルファベット順に掲載し、また、付録には植物のウイルス、細菌、線虫の分類表を付した用語集です。植物病理学の専門家はもちろん広く植物防疫の関係者にとってご活用いただきたい用語集です。

お申し込みは前金 (現金書留・郵便振替・小為替など) で直接本会までお申し込み下さい。