非病原性 *Xanthomonas* 属細菌を用いた ブロッコリー黒腐病の生物防除

永井裕史・三宅律幸・加藤晋朗・前川大輔*・井上康宏**

Hirofumi Nagai, Noriyuki Miyake, Shinro Kato, Daisuke Maekawa* and Yasuhiro Inoue**:
Biological control of broccoli black rot by a nonpathogenic *Xanthomonas* sp. strain

Summary

We examined the potential for biological control of broccoli black rot, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, using a stock solution of a nonpathogenic strain, *Xanthomonas* sp. 11-100-01. The results are based on four times of field experiment. Our results suggest effective disease control was achieved, but at levels inferior to those obtained using a basic copper sulfate wettable powder. However, control was equal to that obtained using the *Pseudomonas fluorescens* wettable powder and was significantly higher than in the non-treated plants. In addition, the basic copper sulfate wettable powder induced phytotoxicity symptoms such as black spots on the leaves, whereas the 11-100-01 stock solution produced no symptoms. This is the first report of the biological control of broccoli black rot using a nonpathogenic *Xanthomonas* strain.

緒 言

アブラナ科野菜黒腐病は、キャベツ、ハクサイ、ダイコン等のアブラナ科野菜に発生する多犯性病害である(岸, 1998; Paul, 1980)。病原体はグラム陰性の桿状細菌である *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939で、多くは葉縁水孔と傷、さらに気孔から感染発病し葉を腐敗させるが、ブロッコリーでは可食部である花蕾をも腐敗させる場合がある(岸, 1982; 酒井ら, 2006)。植物病原細菌によって引き起こされる病害に対しては、効果的な化学農薬が少なく、防除に有効な銅剤はアブラナ科野菜では葉害のため使用時期が制限される。筆者らは、病原細菌と同属の非病原性細菌を利用し、*Xanthomonas* 属細菌による病害全般を抑制できる微生物農薬の開発を目指している(井上ら, 2009; Kawaguchi et al., 2014)。その素材として、非病原性 *Xanthomonas* 属細菌11-100-01株を新たに分離し、微生物液剤を開発した。本研究では、試作した微生物液剤によるブロッコリー黒腐病に対する生物的防除効果について、既存の登録農薬と比較することでその実用性を検証した。なお、本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「主要作物をキサントモナス属病害から守る新規微生物農薬の開発」により実施した。

材料及び方法

試験は、愛知県農業総合試験場の露地圃場で、2012年春作, 同秋作, 2013年春作, 同秋作の4回行った(第1表)。供試作物はブロッコリー、品種はベルネを使用した。試験規模は作により異なるが、株間30~40 cm, 畝間80~120 cmで定植し、1区30~60株を供試した。微生物液剤には、(独)中央農業総合研究所が本研究で新たに分離した非病原性 *Xanthomonas* 属細菌11-100-01株を素材として用いた。防除試験には、クミアイ化学工業(株)が同株を培養精製後、AB塩溶液で菌数を 1×10^{10} cfu/mlに調整した試作液剤を用いた(Ghezzi・Steck, 1999)。試作液剤は冷蔵便で供給され、処理日まで5°Cで冷蔵保存し、散布直前に水道水で希釈して使用した。ブロッコリー黒腐病菌は、愛知県農業総合試験場保有のAXCB1201株を供試した。対照薬剤として、野菜類の黒腐病に農薬登録のあるシュードモナスフルオレッセンス水和剤(ベジキーパー水和剤: シュードモナスフルオレッセンスG7090株 1×10^{10} cfu/g)(以下「シュードモナス水和剤」と略す)および塩基性硫酸銅水和剤(Zボルドー: 塩基性硫酸銅58.0%)(以下「銅水和剤」と略す)を用いた。AXCB1201株の接種濃度は $2 \sim 3 \times 10^6$ cfu/mlで、10 a当たり50 Lを背負式動力噴霧機で噴霧接種した。各供試

第1表 防除効果試験の各作業日

	2012年		2013年	
	春作	秋作	春作	秋作
播種	4月12日	8月10日	4月10日	8月8日
定植	5月9日	9月6日	5月10日	9月6日
供試剤散布①	6月26日	10月9日	6月10日	10月2日
病原菌接種①	6月29日	10月10日	6月11日	10月3日
供試剤散布②	7月5日	10月16日	6月17日	10月9日
病原菌接種②	7月6日	10月19日	6月18日	10月10日
供試剤散布③	—	10月24日	6月24日	10月17日
調査	7月9日	11月2日	6月27日	10月24日

剤も同様に10a当たり200L散布した。全供試剤には展着剤(ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル20.0%, ポリナフチルメタンスルホン酸ナトリウム6.0%)を10L当たり3ml加用した。発病は、下記基準で程度別に調査し、発病度の平均値から各区の防除価を算出した。発病度 $=\Sigma(\text{指数} \times \text{発病程度別葉数}) / (5 \times \text{調査葉数}) \times 100$ 。指数は0:発病を認めない, 1:外葉1枚のみに発病, 3:外葉の2~3枚に発病, 5:外葉の4枚以上または花蕾近傍の上位葉に発病。防除価 $= (1 - \text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}) \times 100$ 。各供試剤の濃度は表中に記載した。各処理日は第1表を参照。程度別発病株率の統計処理は、エクセルアドインソフト Statcel 3 (オーエムエス出版)を用いた。メタアナリシスによる統合解析は、R Version 3.0.2及びEZR on R commander Version 1.20を用いた (Kanda, 2013)。

結 果

2012年春作は無処理区の発病株率80.0%, 発病度42.7で多発生であった。11-100-01株液剤 (以下「試作液剤」と略す) の100倍と200倍液散布は、防除価がそれぞれ56.3と51.6であり、シュードモナス水和剤1000倍液散布の防除価56.3と比較してほぼ同等、程度別発病株数も

同等であった。しかし、銅水和剤500倍液散布の防除価85.9と比較すると低く、程度別発病株数も多かった。よって、試作液剤の100倍と200倍は、銅水和剤500倍より劣るがシュードモナス水和剤1000倍と同等の防除効果を示した。また、銅水和剤500倍は葉に黒点状の葉害を生じたが、試作液剤では葉害はなかった (第2表)。

2012年秋作は無処理区の発病株率73.3%, 発病度27.5で中発生であった。試作液剤100倍は防除価が74.1であり、シュードモナス水和剤1000倍の防除価60.2, 銅水和剤500倍の防除価60.2と比較して高く、程度別発病株数は同等であった。試作液剤100倍は無処理区と比較して程度別発病株数が有意に少なかった。よって、試作液剤100倍は、シュードモナス水和剤1000倍, 銅水和剤500倍と同等の防除効果を示した。一方試作液剤200倍は防除価が43.6であり、シュードモナス水和剤1000倍, 銅水和剤500倍と比較して防除価が低かった。程度別発病株数は対照剤と有意差はないが、無処理区との間にも有意差はなく、防除効果が不十分であった (第3表)。

2013年春作は無処理区の発病株率92.2%, 発病度34.1で多発生であった。試作液剤100倍は防除価が57.5であり、シュードモナス水和剤1000倍の防除価71.3, 銅水和剤500倍の防除価82.8と比較して低かった程度別発病株数はシュードモナス水和剤1000倍と差がなく、銅水和剤500倍より多いが、無処理区より少なかった (第4表)。

2013年秋作は無処理区の発病株率86.7%, 発病度37.3で多発生であった。試作液剤100倍は防除価が61.6であり、シュードモナス水和剤1000倍の防除価49.1より高いが、銅水和剤500倍の防除価83.9より低かった。試作液剤100倍の程度別発病株数は、シュードモナス水和剤1000倍と同等、銅水和剤500倍より多いが、無処理区と比較して有意に少なかった (第5表)。よって、試作液剤100倍は、銅水和剤500倍より劣るがシュードモナス水和剤1000倍と同等の防除効果が認められた。

2年4回の試験結果を、メタアナリシスにより統合評

第2表 11-100-01株液剤のプロッコリー黒腐病抑制効果 (2012年春作)

供試剤	希釈倍数	調査株数	程度別発病株数 ^{x)}				発病株率 (%)	発病度	防除価	葉害	
			0	1	3	5					
11-100-01株液剤 ^{y)}	100倍	30	10	17	2	1	bc	66.7	18.7	56.3	—
	200倍	30	7	19	4	0	bc	76.7	20.7	51.6	—
シュードモナス フルオレッセンス水和剤	1000倍	30	12	13	5	0	ab	60.0	18.7	56.3	—
塩基性硫酸銅水和剤	500倍	30	21	9	0	0	a	30.0	6.0	85.9	+
無処理		30	6	9	10	5	c	80.0	42.7		—

x) Steel-Dwass 法において、異英字間には有意差あり (危険率5%)

y) 液剤の菌濃度は 1×10^{10} cfu/ml

第3表 11-100-01株液剤のブロッコリー黒腐病抑制効果（2012年秋作）

供試剤	希釈倍数	調査株数	程度別発病株数 ^{x)}				発病株率 (%)	発病度	防除値	葉害	
			0	1	3	5					
11-100-01株液剤 ^{y)}	100倍	42	29	12	1	0	a	31.0	7.1	74.1	—
	200倍	43	20	18	5	0	ab	53.8	15.5	43.6	—
シュードモナス フルオレッセンス水和剤	1000倍	42	25	14	3	0	a	40.5	11.0	60.2	—
塩基性硫酸銅水和剤	500倍	42	25	14	3	0	a	40.5	11.0	60.2	+
無処理		41	11	20	7	3	b	73.3	27.5		—

x) Steel-Dwass 法において，異英字間には有意差あり（危険率5%）

y) 液剤の菌濃度は 1×10^{10} cfu/ml

第4表 11-100-01株液剤のブロッコリー黒腐病抑制効果（2013年春作）

供試剤	希釈倍数	調査株数	程度別発病株数 ^{x)}				発病株率 (%)	発病度	防除価	葉害	
			0	1	3	5					
11-100-01株液剤 ^{y)}	100倍	51	22	25	4	0	b	56.9	14.5	57.5	—
シュードモナス フルオレッセンス水和剤	1000倍	51	32	16	3	0	ab	37.3	9.8	71.3	—
塩基性硫酸銅水和剤	500倍	51	36	15	0	0	a	29.4	5.9	82.8	+
無処理		51	4	30	14	3	c	92.2	34.1		—

x) Steel-Dwass 法において，異英字間には有意差あり（危険率5%）

y) 液剤の菌濃度は 1×10^{10} cfu/ml

第5表 11-100-01株液剤のブロッコリー黒腐病抑制効果（2013年秋作）

供試剤	希釈倍数	調査株数	程度別発病株数 ^{x)}					発病株率 (%)	発病度	防除価	葉害
			0	1	3	5					
11-100-01株液剤 ^{y)}	100倍	60	29	25	6	0	b	51.7	14.3	61.6	—
シュードモナス フルオレッセンス水和剤	1000倍	60	27	22	10	1	b	55.0	19.0	49.1	—
塩基性硫酸銅水和剤	500倍	60	42	18	0	0	a	30.0	6.0	83.9	+
無処理		60	8	28	18	6	c	86.7	37.3		—

x) Steel-Dwass 法において，異英字間には有意差あり（危険率5%）

y) 液剤の菌濃度は 1×10^{10} cfu/ml

価したところ，試作液剤100倍は無処理に比べ有意に発病株率が少なかった（第1図）。また，春作と秋作に分けて防除効果を比較したところ，試作液剤100倍は秋作の発病株率が春作より有意に少なかった（第2図）。

考 察

試作液剤のブロッコリー黒腐病に対する防除効果を検証するために，2012年と2013年に，春作と秋作で計4回，既存の登録農薬と病害抑制能を比較する試験を実施した。2012年春作では，試作液剤は100倍液と200倍液はともに，ブロッコリー黒腐病に対して同等の防除効果を示した（第2表）。一方同年秋作では，試作液剤100倍は，無処理と比較して有意に程度別発病株数が少なく防除効果が高かったが，200倍は無処理区と有意差はなかった（第3表）。この結果から，試作液剤100倍は実用性が高

いと考えられたが，同200倍の効果は不十分であると考えられた。そのため，2013年の試験では100倍のみを供試した。

2013年春作では，程度別発病株数で比較すると，試作液剤100倍のブロッコリー黒腐病に対する防除効果は，無処理に比べ有意に高く，シュードモナス水和剤と同等だが，銅水和剤には劣った（第4表）。同年秋作においても同様の結果であった（第5表）。

全試験をメタアナリシスに基づき統合評価すると，試作液剤100倍は無処理に比べ有意に発病株率が少なかった（第1図）。以上のことから，試作液剤100倍はブロッコリー黒腐病の防除薬剤として実用性が高いと考えられた。

ブロッコリー黒腐病菌の接種濃度 $2 \sim 3 \times 10^6$ cfu/ml は，露地接種試験において中程度の病害発生を得るため

第1図 11-100-01株液剤によるブロッコリー黒腐病抑制効果のメタアナリシスに基づく統合評価

四角の中心はリスク比の値，四角の大きさは各試験の比重，横線は95%信頼区間。菱形の中心は統合リスク比の値

第2図 作型による11-100-01株液剤のブロッコリー黒腐病抑制効果の差

四角の中心はリスク比の値，四角の大きさは各試験の比重，横線は95%信頼区間。菱形の中心は統合リスク比の値

に適した濃度だが，防除効果を示す11-100-01株の濃度は 1×10^8 cfu/ml であり相対的に11-100-01株の濃度が高い。11-100-01株は非病原性の *Xanthomonas* 属細菌であり，本剤の開発思想は「同属病原細菌に起因する全病害を競合作用により抑制する」ことである。非病原性の *Xanthomonas* 属細菌は広範囲の病害に防除効果を示すが，有効な菌密度が高い（井上ら，2009；Kawaguchi et al., 2014）。シュードモナス水和剤1000倍液は，G7090株の濃度が 1×10^7 cfu/ml である。同程度の防除効果を示す試作液剤100倍液では，11-100-01株の濃度が 1×10^8 cfu/ml であり，シュードモナス水和剤1000倍液の10倍濃度である。この点で，シュードモナス水和剤は試作液剤より優れた。シュードモナス水和剤の病害抑制機構は競合とされるが，抗菌性物質産生の可能性が指摘されている（独立行政法人農業検査所，2006）。また，*Pseudomonas fluorescens* の他の菌株の多くは，抗菌物質とシデロフォアを産生する（Mulya et al., 1996）。11-100-01株の抗菌物質産生は不明であるが，防除効果を示す濃度が高いことから，主たる病害抑制機構は競合作用であると考えられた。

試作液剤は生菌の濃縮保存液であり，植物体上の菌密度は散布直後が最も高く，経時的に減少すると考えられた。そのため防除効果は，散布間隔が広がれば下がり，試作液剤散布から病原菌接種までの間が長くなるほど下がると考えられた。しかし，春作同士で試作液剤100倍の防除価を比較すると，散布間隔が9日で且つ散布

3日後に病原菌接種日がある2012年が56.3であるのに対し，散布間隔が7日で且つ全病原菌接種日が散布翌日の2013年は57.5であり，防除価に差はない（第1，2，4表）。このことから，ブロッコリー上の11-100-01株の菌密度は3日程度では急速には減少せず，ブロッコリーへの定着性が高い可能性が示唆された。

試作液剤のブロッコリー黒腐病に対する防除効果を，発病株率について春作と秋作で比較したところ，秋作が春作より有意に低かった（第2図）。愛知県におけるブロッコリーの主要な作型は，8月から9月に播種し，9月から10月に定植し，年内から翌年4月まで収穫を行う秋作（夏まき秋冬どり）である。秋作主体の理由は，春作では収穫期が梅雨期と重なり，また，近年の気温の高温傾向から，軟腐病が発生し収量が激減するためである。本研究においても，2回の春作試験でいずれも軟腐病が発生し，当初計画より早く試験を終了している（第1表）。その際試作液剤は，軟腐病の抑制効果は認められなかった（データ省略）。春作と秋作の試験期間中の平均気温の差は，2012年は 6.9°C ，2013年は 3.0°C で，いずれも春作が高かった（第6表）。これらのことから，試作液剤は軟腐病が多発するような高温条件下では，ブロッコリー黒腐病に対する発病抑制効果がやや低くなると考えられた。そのため本剤は，実用場面では作型と対象病害を考慮し，盛夏期を避けて使用する必要があると考えられる。

銅水和剤500倍は，ブロッコリー黒腐病に対し安定し

第6表 試験期間中の気象

	試験期間	日数	平均気温 ℃	降水量合計 mm	日平均降水量 mm/日
2012年春作	6月26日～7月9日	14	22.9	125.0	8.9
2012年秋作	10月9日～11月2日	25	16.0	88.0	3.5
2013年春作	6月10日～6月27日	18	23.0	148.0	8.2
2013年秋作	10月2日～10月24日	23	20.0	200.0	8.7

て高い防除効果を示したが、4回の試験全てで葉害が発生した。高温時にアブラナ科野菜に銅水和剤を使用すると、葉害が発生する場合がある（JA全農肥料農業部農業課，2010）。そこで、本研究で開発している微生物農薬は、ローテーション防除において銅水和剤が使用できない時期に、その代替剤となると考えている。試作液剤は、高温期にはブロッコリー黒腐病に対し防除効果がやや落ちるが、秋作では高い防除効果を示している。そのため本剤は、秋作定植直後の9月から10月の使用を想定している。

食の安全への消費者ニーズは高まっており、微生物農薬は化学農薬と比べ安全なものとの消費者の認識がある。また、一部の農業生産者は所得安定のため、「特別栽培農産物」や「有機農産物」、「エコファーマー」等の各種認証取得を行っており、微生物農薬は農薬の使用成分回数にカウントされない農薬としての需要が高い。著者らはこれに応えるため、安定した防除効果を示しかつ安全な、非病原性細菌を用いた微生物農薬の開発を目指し、本研究を行った。試作液剤はブロッコリー黒腐病に対し、既存農薬と同等の発病抑制効果を示したことから、同病に対する生物的防除の実用性は十分にあると考えられた。

摘 要

非病原性 *Xanthomonas* 属細菌11-100-01株液剤の、ブロッコリー黒腐病に対する発病抑制効果について、4回の圃場試験により検証した。その結果、発病抑制効果が認められた。その効果は、塩基性硫酸銅水和剤に

はやや劣るが、シュードモナスフルオレッセンス水和剤と同等であり、無処理に比べ有意に高かった。また、塩基性硫酸銅水和剤は葉に黒点状の葉害を生じたが、11-100-01株液剤は葉害を生じなかった。これは、非病原性 *Xanthomonas* 属細菌による、ブロッコリー黒腐病の生物防除における初報告である。

引用文献

- 独立行政法人農業検査所（2006）農業検査所報告．独立行政法人農業検査所，46：6-7.
- Ghezzi, J. I. and T. R. Steck (1999) FEMS Microbiol. Ecol. 30: 203-208.
- 井上康宏・松浦貴之・畔上耕児（2009）生物機能を活用した病害虫・雑草管理と肥料削減最新技術集．農研機構，pp. 125-128.
- JA全農肥料農業部農業課編（2010）クミアイ農業総覧2011．全国農村教育協会，pp. 2271-2275.
- Kanda, Y. (2013) Bone Marrow Transplant 48: 452-458.
- Kawaguchi, A., K. Inoue and Y. Inoue (2014) J. Gen. Plant Pathol. 79 (in press)
- 岸 國平編（1982）新版野菜の病害虫—診断と防除．全国農村教育協会，pp. 274-275.
- 岸 國平編（1998）日本植物病害大辞典．全国農村教育協会，pp. 342, 349.
- Mulya, K., M. Watanabe., M. Goto., Y. Takikawa and S. Tsuyumu (1996) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62: 134-140.
- Paul, H. W. (1980) Plant Disease 64: 736-742.
- 酒井 宏・池田健太郎・漆原寿彦・白石俊昌（2006）日植病報 72：116-119.