人工汚染圃場における拮抗放線菌の導入と ナス半身萎ちょう病の抑制効果について

草刈眞一**・岡田清嗣**・瓦谷光男**・
嘉儀 隆**・田中 寛**

Shin'ich KUSAKARI**, Kiyotugu OKADA**, Mituo KAWARATANI**,
Takashi KAGI** and Yutaka TANAKA** :
Suppression of Verticillium wilt of egg plants
by *Streptomyces* sp. (C-26) in infested soil*

Summary

Verticillium wilt disease of eggplants was decreased by the addition of antagonistic actinomycetes strain C-26 (*Streptomyces* sp.) with crab shell meal in infested greenhouse soil. The addition of crab shell meal in soil (1t/10a) increased the population density of actinomycetes. Density of actinomycetes strain C-26 was maintained above 10^7 cfu/g soil for 47 days by the addition of crab shell meal in soil. Verticillium disease of eggplants was reduced 79 % with addition of antagonistic actinomycetes and crab shell meal, and 12 % with the addition of crab shell meal only.

緒 言

拮抗微生物を土壤に導入し発病を抑制しようとする試みは古くから知られているが、土壤中における拮抗菌の密度維持が難しく成功した例は少ない。しかし、土壤に有機質資材を施用し、土壤中に生存する拮抗微生物数を増加させ防除に成功した例や、特定の有機質資材の施用によって発病抑制する報告は認められる^{1,2,3)}。筆者らは、土壤中より *Verticillium dahliae* に対し拮抗性を有する放線菌を数種分離した。これらの拮抗菌のうちオガクズなど有機質資材で培養可能な菌株を増殖し土壤に導入したところ、土壤中で短期間の密度維持が可能で、この期間中においてナス半身萎凋病の発病が抑制された。拮抗微生物による防除では、土壤中における微生物の増殖が重要であるが、本研究では、土壤中での放線菌密度変化と発病の抑制効果についての知見が得られたので報告する。

実験材料および方法

放線菌の分離

土壤からの放線菌分離は、 $10^5 \sim 10^6$ 希釈による希釈平板法により行った。分離用培地としてアルブミン寒天培地を用いた。*V. dahliae* に対する拮抗性検定は、*V. dahliae* の分生胞子を懸濁した PDA 平板培地に分離菌株を接種し、25°C で 5 日間培養後、放線菌コロニー周辺の生育阻止帯形成により行った。

放線菌の大量培養

V. dahliae に対して拮抗力が認められた放線菌のうち最も拮抗力が強く、米ぬか・オガクズ培地で増殖する C-26 菌 (第 1 図) の大量増殖をおこなった。大量増殖用の培地は、オガクズ：米ぬかを 3 : 1 の混合したものを用いた。培養は、500 ml の培養コルペンを用いて 28°C で 60 日間行い、培地上が小豆色の胞子で覆われる程度増殖したものを供試した。

放線菌密度の測定

土壤中の放線菌密度は、放線菌に対して選択性をも

* 本論文の一部は、日本植物病理学会関西西部会 (1989.10.27 富山市) で発表した。

** 大阪府農林技術センター

1990 年 1 月 25 日受理

第1図 走査電子顕微鏡による拮抗放線菌C-26 (*Streptomyces* sp.)の形態

オガクズ培養菌をオスミウム酸2%で蒸気固定、金蒸着後、日立S-530型走査電子顕微鏡により観察した。

たせるためアルブミン培地にシクロヘキシミド50 ppm添加したものを用いて、希釈平板法により調査した。また、土壌に導入した放線菌C-26の密度は、アルブミン寒天培地にシクロヘキシミド100 ppmセファロスポリン50 ppmを添加したものを分離培地とした希釈平板法により分離し、コロニー数を測定した。放線菌C-26は、分離培地で黄色の色素を生じ、コロニー周辺が黄色となることを利用し、他の放線菌から識別した。

土壌中への有機物施用と放線菌密度の変動

土壌へ混和する有機質資材としてカニガラ、乾燥牛糞、大豆カス肥料を供試し、土壌(農林技術センター圃場より採取)に所定量を混和後、ワグナーポット(1/5,000 a)に入れ、温室内において灌水管理(2日おきに100 ml/ポットを灌水)を行った。

圃場試験は、泉佐野市上之郷のナス栽培農家圃場(施設栽培)で行った。圃場へは、カニガラ、牛糞を所定量施用し、慣行によるナス栽培を行い、経時的にナス根圏より土壌を採取、微生物分離を行った。

汚染圃場の作成

ナス半身萎凋病汚染圃場は、1.5 m×2.0 mのコンクリート枠内に作成した。接種源は、PDA平板培地に接種後30°C14日間培養し、培地上で十分菌核を形成した菌そうを用いた。コンクリート試験枠へは、枠あたりペトリ皿20枚分の菌そうをミキサーにより摩砕したものを10 lのイオン交換水に懸濁し、接種した。

拮抗菌の土壌導入と半身萎凋病の発病率

放線菌C-26の半身萎凋病抑制効果は、汚染圃場にオガクズ・米ぬか培養したC-26、カニガラを添加し、経時的に発病率を調べる方法によって検討した。

土壌へのカニガラ添加は、拮抗菌の導入と同時にを行った。汚染圃場へのナスの移植は、拮抗菌導入4日後に行い、本葉5葉の接ぎ木(ヒラナス台)苗を供試した。

実験結果

1. 土壌中への有機質施用と土壌放線菌密度の変動

ワグナーポットを用いて有機質資材の土壌施用と微生物変動を調査した。供試した有機質資材いずれについても施用後、土壌微生物数(全微生物数)の増加が認められた。放線菌については、カニガラ1 t/10 aで施用14日後に 6.5×10^7 個/g soilに達し、最も密度が高くなった。しかし、カニガラ2 t/10 a区では、一次的に 8.0×10^6 個/g soil程度まで増加が認められたが、その後 1.8×10^6 個/g soilに減少した。大豆かす肥料施用区(300 kg/10 a)、乾燥牛糞施用区(1 t/10 a)は、いずれも全微生物数の増加傾向を示したが、放線菌の顕著な増加傾向は認められなかった(第2図)。

現地のナス栽培圃場においてカニガラを10 aあたり1 t, 2 t施用し微生物数の変化を調べたところ、施用後35日後で1 t区では、全微生物数 3.85×10^8 /g soilに対して、放線菌数 7.5×10^7 , 2 t区で全微生物数

第2図 土壌中への有機質資材の施用と放線菌密度
ポット内の土壌に供試有機質資材を施用、所定の期間経過後に土壌を採取し、希釈平板法により放線菌数を測定した。

1.42×10⁷/g soil に対して 9.2×10⁷/g soil となったのに比較し、無処理区では 2.40×10⁷/g soil に対して、放線菌数は 1.3×10⁷/g soil と低くなった。

2. 放線菌 C-26 の土壌導入と土壌中での増加

ナス半身萎ちょう病菌に対して拮抗性を示す放線菌 C-26 (*Streptomyces* sp.) を培養し、土壌中に導入後の密度変化を調査した。放線菌 C-26 は、オガクズ・米ヌカ (3:1) 培地で 90 日間培養したものを供試した。土壌にオガクズ培養菌を (300 g/m²) 導入 10 日後には、2.3×10⁷/g soil の密度であったが、その後、密度は減少し、24 日後では 9.6×10⁵/g soil に減少した。しかし、カニガラを施用 (1 t/10 a) 施用した区では、土壌導入後の放線菌 C-26 密度は上昇し、20 日後では 7.8×10⁷/g soil まで上昇が認められ、47 日後において 3.2×10⁶/g soil の密度を維持した (第 3 図)。

第 3 図 試験圃場における放線菌 (C-26) の密度
土壌に放線菌を導入後経時的に土壌を採種し、放線菌密度を調査した。放線菌 C-26 の計数は、シクロヘキシミド 100ppm、セファロスポリン 50ppm。添加アルブミン寒天培地で行った。

■■■■■：オガクズ培養菌・カニガラ添加 (ナス定植状態)
-----：オガクズ培養菌のみ
———：液体培養菌

3. ナス半身萎ちょう病汚染土壌への放線菌 C-26 導入と発病率の変動

コンクリート枠内の汚染圃場にオガクズ・米ヌカ培養した放線菌 C-26 を接種、カニガラを 10 a あたり 1 t となるよう施用したのち、ナスを移植し、その後の発病株率を調査した。対照区 (カニガラ、拮抗菌を無添加) では、ナス移植 22 日後から発病が認められ、47 日後には 100% に達したのに比較し、カニガラを施用した区では、32 日後で初発を認め、36 日後の発病株率で 71%、60 日後には 100% としだいに増加した。

カニガラと拮抗菌を導入した区では、ナス移植 36 日後に初発を認めたが、47 日後の発病株率は 21.0% と最も低く、その後 60 日後の発病率も平均 64% と低くなった。栽培 47 日後の発病株率は、無添加区およびカニガラのみ施用区で 93% であったのに比較し、拮抗菌導入区では 21% と低い発病株率を維持した。しかし、拮抗菌導入区でもその後発病株率は上昇し、60 日後で 71% に達した (第 4、5 図)。

第 4 図 拮抗放線菌の土壌導入とナス半身萎ちょう病の発病率 (人工汚染圃場試験)

ナス苗を定植後、14、22、32、36、47、60 日に発病株率を調査した。

第 5 図 試験区におけるナス半身萎ちょう病の発生状況
写真左側の列が拮抗菌導入区、右側の列は無処理区 (葉が黄化萎凋している)。

考 察

拮抗菌を土壤に導入して発病抑制効果を検討する場合、土壤への拮抗菌の処理方法、拮抗菌の土壤定着とその後の増殖が問題となることが指摘されている^{4,5)} Mitchell, R.¹⁾は、土壤にキチンを添加することにより土壤中の拮抗放線菌を増殖させ、*Fusarium* 属菌による病害の抑制に成功している。駒田²⁾は土壤にカニガラを添加することにより、キュウリの割病が抑制できるとしている。筆者らの試験結果から、ポットおよび圃場においてカニガラを施用したところ土壤中の放線菌密度が増加することが確認され、Mitchell らの報告同様、キチン質を含むカニガラ施用が土壤中の放線菌増殖に効果のあることがわかった。とくに、10 a あたり 1 t 施用した場合にその増加が著しく、施用 20 日後に 10^7 の密度に達していた。また、土壤へのカニガラ施用は土壤中に生息する放線菌同様、人工的に導入した放線菌 (C-26) についても増殖効果のあることがわかった。オガクズ培養した拮抗放線菌 C-26 は、 7.8×10^7 個/g soil まで増殖しており、試験を実施した 47 日間にわたって 10^6 の密度維持が可能であった。

カニガラを施用して導入した放線菌の密度維持をはかった土壤にナスを定植しナス半身萎ちょう病の発生状況を調査したところ、無処理区に比べ初発が 14 日遅く 47 日後の発病株率も 21% と低くなった。カニガラのみを施用した区における発病株率についても、無処理区よりやや低くなっており、カニガラ施用が本病の発病をやや抑制すること、拮抗菌の添加がさらに発病抑制に効果的であることがわかった。

土壤伝染性病害では、土壤中の微生物の密度を高めることによって発病抑制効果のあることが知られている。導入した放線菌 C-26 によるナス半身萎ちょう病の発病抑制効果が拮抗菌のどのような作用によるのかは今後の検討課題である。

土壤中に放線菌を導入し病害防除する試みは、Ebben ら⁶⁾の報告、中国の事例⁷⁾が知られている。Marois ら⁸⁾は、ナス苗の根圏に拮抗菌を導入することで半身萎ちょう病の防除が可能であると報告している。拮抗菌の土壤導入は長期間の密度維持など問題のあることが指摘されているが、本研究の結果から適当な有機

資材を組み合わせることによって比較的短期間であれば導入した拮抗菌の密度維持が可能であることが確認された。今後、密度を更に長期間維持できる方法、および、土壤への導入方法の検討が課題であると考えられる。

摘 要

V. *dahliae* に対して拮抗性のある放線菌 C-26 (*Streptomyces* sp.) をオガクズ・米ぬか培地で培養し、カニガラとともに人工汚染土壤中に導入したところ、ナス半身萎ちょう病の発病抑制効果が認められた。試験圃場に導入した放線菌の増殖は、カニガラを施用した区において認められ、導入後 28 日において 10^7 個/g soil の密度に達し、47 日後においても 10^6 個/g soil の密度維持が可能であった。カニガラのみを施用した区において発病抑制効果が認められたが、拮抗菌を導入した区ではさらに発病抑制効果が高く、ナス定植後 47 日後で対照、無添加区の発病株率 93% に対し、21% の低率に抑制した。

引 用 文 献

- 1) Mitchell, R. (1963) *Phytopathology* 53: 1068—1071.
- 2) 松田 明 (1978) 関東東山病虫研報 25: 1—4.
- 3) 松田 明 (1981) 植物防疫 32: 231—237.
- 4) Cook, R.J. and Baker, K.F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens, APS, Minnesota, USA pp. 299—300.
- 5) 鈴木直治 (1966) 土と微生物 (土壤微生物研究会編), 岩波書店 東京 pp 201.
- 6) Ebben, M.H. and Spencer, D.M. (1978). *Ann. Appl. Biol.* 89: 103—106.
- 7) Cook, R.J. and Baker, K.F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens, APS, Minnesota, USA. PP. 50—51.
- 8) Marois, J.J., Johnston, S.A., Dunn, M.T. and Papavizas, G.C. (1982). *Plant Disease* 66: 1166—1168.