

根内定着性*Pseudomonas fluorescens*による サラダナ根腐病の発病抑制効果

成山 秀樹・山村 裕一郎・渡邊 敏朗
(生産環境研究所)

病原性糸状菌*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* により発生するサラダナ根腐病の生物的防除法を確立するため、当場で分離、選抜した微生物*Pseudomonas fluorescens* 060株がサラダナ根腐病の発病を抑制する効果について検討した。

060株を播種前の育苗培土、定植前の苗、定植前の栽培土壤に接種すると、株重が無接種区に比べて増加し、また、発病も抑制された。060株の発病抑制効果は、プランターとほ場の両方で認められた。発病抑制効果は根腐病菌密度が低い条件では高かったが、根腐病菌密度が高い条件では十分ではなかった。060株は、サラダナの根圏や根内に定着し、PGPRとして抵抗性誘導や競合作用をしていると推測された。060株の発病抑制効果を安定させるためには、土壤や根内への定着効率の向上が必要と考えられた。

[キーワード：サラダナ、サラダナ根腐病、生物的防除資材、*Pseudomonas fluorescens*、発病抑制、PGPR]

The Suppressive Effect against Root Rot Disease on Butter Head Type Lettuce by *Pseudomonas fluorescens* Cultured in the Root. NARIYAMA Hideki, Yuichiro YAMAMURA, Toshiro WATANABE (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549 Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 22 : 48-51 (2003)

To establish microbial control of root rot disease on butter head type lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, the suppressive effect of *Pseudomonas fluorescens* 060 was studied.

060 was inoculated on soil medium (before seeding), on root boll (before rooting), and on soil (before rooting). Inoculated lettuce grew larger than non-inoculated lettuce, and symptoms were suppressed.

The suppressive effect of 060 was recognized both in culture containers and in the field. The inoculated 060 settled around and inside the roots of the lettuce, and appeared to function as a PGPR to increase its resistance to pathogen. The suppressive effect of the 060 weakened in proportion to the population density of pathogens. To improve the suppressive effect, it is necessary to maintain a high population density of 060 in soil and root.

[Key words : butter head type lettuce, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, microbial control, *Pseudomonas fluorescens*, PGPR]

結 言

サラダナは、本県では久留米市や三井郡などで栽培されている。1980年に久留米地域に導入され、1980年代末期には年6~7作の周年栽培が行われるようになった。しかし、その頃からサラダナ根腐病が発生し始め、1992年以降大発生し、現在では栽培面積18haのほぼ全域で被害を及ぼしている。根腐病はサラダナ根腐病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*)による土壤病害であり、根の維管束が侵され、地上部の生育が抑制され、生育初期に感染すると株が枯死し、著しい減収となる。

根腐病の防除対策として、4月にクロルピクリン剤やダゾメット剤による土壤消毒が行われている。しかし、根腐病菌は作を重ねるごとに急速に増殖する⁹⁾ため、土壤消毒直後の1作目では発病しないが、夏期にかかる2~3作目から急激に発病する。このため、年間2~3回の土壤消毒が必要となっている。

近年、人体や環境への配慮、薬剤耐性菌の発生に対する懸念から、薬剤によらない微生物を利用した生物的防除法が注目を集めており、各方面で研究が進められている。

本報告では、サラダナの根から分離した細菌*Pseudomonas fluorescens* 060株の根腐病に対する発病抑

制効果について検討したので、報告する。

材料及び方法

1 供試微生物

福岡県久留米市のサラダナ根腐病発生ほ場において健全に生育している株の根から97菌株の細菌を分離した。根腐病の発病抑制効果について幼苗検定、ビニールポットの栽培試験によって検定し、97菌株の中から選抜した060株を供試した。供試菌060株は、細菌同定検査キットAPI20NE(日本ビオメリー株式会社、東京)を用いて*Pseudomonas fluorescens*と同定した。同定に際しては、農業生物資源研究所から分譲された*Pseudomonas fluorescens*(MAFF番号520005及び520007)を標準菌株として用いた。

根腐病菌は、久留米市大橋地区の根腐病発生ほ場から採取された風乾土壤を接種源として用いた。処理前にGMBP培地⁹⁾を用いた希釈平板法により風乾土壤中の根腐病菌密度を測定し、以下の試験には、所定の菌密度となるように混合接種した。

2 プランター試験

試験は福岡県農業総合試験場の加温ガラス室内で行い、

市販くみあい園芸培土を充填した 650号プランター (60cm×20cm×深さ15cm) でサラダナを栽培した。2002年 5月1日に、くみあい園芸培土を充填した 406穴ペーパーポットSME2406に播種し、加温ガラス室内で育苗した。5月26日に苗を定植し、7月 2日に収穫した。サラダナの品種は、久留米地域で栽培されている 'LT-25' を供試し、プランター当たり 3株ずつ、1区9株を定植した。試験区は 060株のみ接種、菌無接種、060株と根腐病菌接種、根腐病菌のみ接種の4区とした。060株の接種は、①播種前に、培養菌液を、育苗培土中の菌密度が $10^5 \sim 10^7$ CFU/cm³となるように混合 ②定植前日に、苗の根鉢を培養菌液 ($10^5 \sim 10^6$ CFU/ml) に24時間浸漬 ③定植前日に、培養菌液を、プランターの培土中の菌密度が $10^5 \sim 10^6$ CFU/cm³となるように混合の3回行った。培養菌液はいずれもPS液体培地の培養液から遠心分離により菌体を回収し、蒸留水で希釈して用いた。根腐病菌は、定植前日に汚染土壌をプランターの培土に10CFU/cm³の密度になるように混合接種した。肥料は窒素、リン酸、加里それぞれ10a当たり10.8kgを、くみあい苦土有機入り化成により全量基肥で施用した。

収穫後、株重、発病株率及び発病度を調査した。発病度は維管束の褐変程度に基づき、以下の式により算出した。

$$\text{発病度} = \frac{\sum (\text{褐変程度別株数} \times \text{指数})}{(\text{調査株数} \times 4)} \times 100$$

褐変程度の指数

- 0: 側根、主根に褐変が認められない
- 1: 側根、主根下部が細い褐変が認められる
- 2: 主根に太い褐変が認められる
- 3: 胚軸に褐変が認められる
- 4: 株全体が萎凋、枯死している

また、非根圏、根圏土壌の根腐病菌密度、非根圏と根圏土壌、根内、葉内の 060株密度を希釈平板法により測定した²⁾。非根圏土壌は空中振とう法²⁾によって、根圏土壌は水中分画法²⁾によって採取した。根及び葉は、重量を測定し、2%アンチホルミン溶液で表面殺菌した後、粉碎、希釈、接種に供試した。根腐病菌密度はGMBP培地²⁾を用いて計測した。060株密度はKing'sB培地²⁾及びP-4培地³⁾を用いて計測した後、

細菌同定検査キットAPI20NEにより確認した。

3 ほ場試験

試験は福岡県農業総合試験場のコンクリート枠ほ場に立地する無加温ハウス内で、2作にわたって行った。1作目は2001年7月4日に播種した苗を7月25日に定植し、8月20日に収穫した。2作目は9月20日に播種した苗を10月12日に定植し、11月16日に収穫した。品種は 'LT-25' を用い、1区2.7m² (1.3m×2.1m) に条間15cm、株間22cmの 6条千鳥植えとし、48株を反復なしで定植した。

第1表 プランター試験におけるサラダナの生育及び発病状況 (2002年)

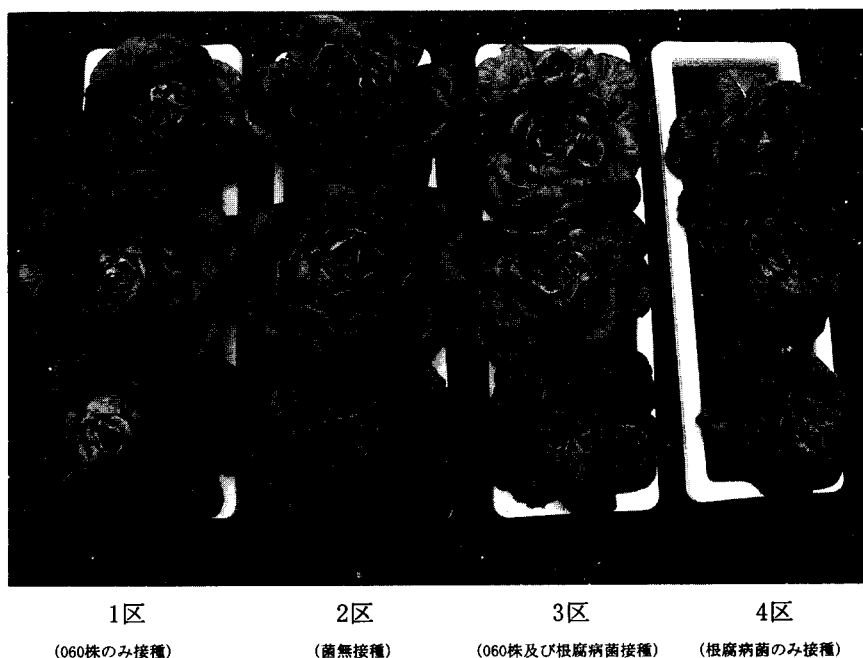
試験区	接種菌株		株重	発病株率	発病度
	060株	根腐病菌			
			g	%	
1区	○	×	163.2(113)	0	0
2区	×	×	144.9(100)	0	0
3区	○	○	90.8(63)	89	39
4区	×	○	75.8(52)	89	50

1) 株重は7月2日に、発病株率及び発病度は7月3日に調査。

2) 調査株数は1区当たり9株。

3) 発病株は、褐変程度の指数が1以上の株。

4) ()内は2区を100とした場合の相対比。



第1図 プランター試験におけるサラダナの生育状況

1) 7月1日 (定植36日後) に撮影。

試験区は060株と根腐病菌接種、根腐病菌接種、菌無接種の3区とした。060株と根腐病菌の接種はプランター試験に準じた。肥料は窒素、リン酸、加里それぞれ10a当たり21.6kg, 5.4kg, 5.4kgを、有機入り博多サラダナ配合により全量基肥で施用した。

収穫後、平均株重、発病株率、発病度をプランター試験に準じて調査した。また、株間土壌の根腐病菌密度を希釈平板法により計測した。

結果及び考察

プランター試験におけるサラダナの生育及び発病状況を第1表、第1図に示した。根腐病菌を接種しなかった1, 2区の株重は145g~163gであったのに対し、根腐病菌を接種した3, 4区の株重は76g~91gであった。根腐病菌のみ接種した4区は、菌を接種しない2区に比べて株重が48%減少した。しかし060株と根腐病菌を接種した3区では、株重の減少は37%となり、発病度は4区より低く、発病抑制効果が見られた。060株を接種した1, 3区の株重は、それぞれ060株を接種しなかった2, 4区の株重を上回る傾向であった。

第2表に示したほ場試験におけるサラダナの生育及び発病状況においても、1作目では同様の傾向が見られた。1作目において、060接種区は非接種区に比べて有意に発

病度が低く、平均株重も増加し、顕著な発病抑制効果が見られた。

プランター試験の根腐病菌、060株の菌密度を第3表に示した。1区では葉内、根内から060株が検出され、060株はサラダナの株内に定着していた。しかし、3区では葉内からは検出されたが根内からは検出されなかった。葉内に定着していることから根内にも存在すると推測されるが、菌密度は極めて低いと考えられる。060株は、全区とも単コロニーの識別が可能な希釈倍率では、根圏、非根圏土壌からはともに検出されなかった。しかし060株を接種した1, 3区と接種しなかった2, 4区とでは、分離された細菌集落に、*Pseudomonas fluorescens* 特有の蛍光性色素の明らかな差が認められたことから、060株は低密度で土壌に定着していると考えられる。3区と4区の間根腐病菌密度の差はなかった。

ほ場試験の根腐病菌密度を第4表に示した。1作目前は10CFU/g乾土であったが、2作目前には約100CFU/g乾土以上に増加し、2作目後は200~500CFU/g乾土となった。

060株はサラダナの根に定着し、根面や根内において発病抑制効果を発揮していると推察されるが、本試験ではその作用機構は判然としなかった。060株は根腐病菌との対峙培養⁹⁾において阻止円を形成しなかった(データ略)ことから、根腐病菌に対する抗菌物質等の産出等

第2表 ほ場試験におけるサラダナの生育及び発病状況 (2001年)

試験区	接種菌株		1作目			2作目		
	060株	根腐病菌	株重	発病株率	発病度	株重	発病株率	発病度
			g	%		g	%	
1区	○	○	73.4 (86) a	20	13 a	38.1 (44) a	86	56 a
2区	×	○	38.2 (45) b	91	68 b	21.0 (24) a	86	64 a
3区	×	×	84.9 (100) a	0	0 a	86.3 (100) b	0	0 b

1) 1作目では、株重は8月20日に、発病株率及び発病度は8月20日に調査。2作目では、株重は11月16日に、発病株率及び発病度は11月18日に調査。

2) 調査株数は1区当たり20~22株。

3) ()内は3区を100とした場合の相対比。

4) 異文字間は5%水準で有意差あり (Sheffe's Ftest)。

第3表 プランター試験における菌密度 (2002年)

試験区	接種菌株		根腐病菌密度		060株密度			
	060株	根腐病菌	非根圏	根圏	非根圏	根圏	根内	葉内
1区	○	×	0	0	—	—	8.9×10^4	3.4×10^3
2区	×	×	0	0	—	—	—	—
3区	○	○	2.0×10^3	5.2×10^4	—	—	—	2.2×10^3
4区	×	○	1.6×10^3	4.3×10^4	—	—	—	—

1) 菌密度の単位は、非根圏、根圏土壌中はCFU/g乾土、根内、葉内はCFU/g生重。

2) —は、単コロニーの識別ができる希釈倍率では060株は未検出。

第4表 ほ場試験における根腐病菌密度の推移 (2001年)

試験区	接種菌株		1作目前	2作目前	2作目後
	060株	根腐病菌			
1区	○	○	1.0×10^2	1.1×10^2	5.0×10^2
2区	×	○	1.0×10^2	1.4×10^2	2.0×10^2
3区	×	×	0	0	0

- 1) 1作目前の菌密度は、接種による理論上の値。2作目前の土壌は 8月23日に採土。2作目後の土壌は11月18日に採土。
 2) 株間土壌の深さ10cmを採土。
 3) 単位はCFU/g乾土。

は考えられない。また、プランター試験において土壌中の060株は低密度であり、根腐病菌密度にも区間の差が見られないことから、土壌中での競合作用によって根腐病菌を抑制している可能性も低い。根腐病菌を接種しない場合でも、060株を接種すると平均株重が増加する傾向があること、また、根内に定着した060株は根腐病菌が根内に侵入すると密度が低くなることから、060株はサラダナの生育促進、抵抗性誘導、根圏や根内での根腐病菌との競合をしているのではないかと推測される。*Pseudomonas fluorescens*を初めとする蛍光性*Pseudomonas*には、PGPR (植物生育促進性根圏細菌)⁴⁾として、根圏や根内に定着し、生育促進や病原菌に対する拮抗作用を示す菌株が多い。これまでに、根面定着性の蛍光性*Pseudomonas*によるレタスの生育促進やすそ枯病の抑制⁵⁾、アブラナ科根こぶ病の抑制¹⁾などの事例が報告されている。

しかし、レタスすそ枯病については、対峙培養⁶⁾では抑制するが栽培試験では抑制しない菌株が多く、また、アブラナ科根こぶ病についても、ほ場での防除価は不安定であった。第2, 4表に示すとおり、本試験でも同様の傾向が見られた。060株は作付前の根腐病菌が10CFU/g乾土の1作目では顕著な発病抑制効果を示したが、100CFU/g乾土以上の2作目では効果が低下し、発病度、平均株重とも、1区2区の間には差は認められなかった。これは、供試菌の土壌への定着が不安定で、病原菌に対する競合が弱いためと考えられる。松崎ら⁷⁾は*P. putida*を用いたトマト根腐萎凋病の抑制試験において、パーライトを利用して*P. putida*を資材化することにより、*P. putida*の土壌や根内への定着と発病抑制効果の向上に成功しており、060株に安定した発病抑制効果を発揮させるためには、このような土壌や根内への定着効率を高める手段が必要と考えられる。

なお、*P. fluorescens*は一般的に人体に対して直接の害はないが、このような作物内に定着する菌株を利用する場合には、発病抑制等の効果と同時に人体に対する安全性を十分に確認する必要がある。

謝 辞

本試験の実施にあたり、根腐病汚染土壌及びご助言をいただいた九州沖縄農業研究センターの西村範夫博士に深謝する。

引用文献

- 1) 相野公孝, 前川和正 (1998) Endophytic pseudomonads を用いたアブラナ科根こぶ病の生物的防除. 日植病報 64 : 337
- 2) 土壤微生物研究会編 (1992) 土壤微生物実験法, 東京 : 養賢堂
- 3) Kato, K. Itoh, K. (1983) NEW SELECTIVE MEDIA FOR *Pseudomonas* STRAINS PRODUCING FLUORESCENT PIGMENT. Soil Sci. Plant Nutr. 29 : 525-532
- 4) Klopfer, J. W., M. N. Schroth and T. D. Miller (1980) Effect of Rhizosphere Colonization by Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Potato Development and Yield. Phytopathology. 70 : 1078-1082
- 5) 松崎聖史, 山田真人 (1997) 微生物資材利用によるトマト根腐萎凋病の発病抑制効果. 愛知農総試研報29 : 145-149
- 6) 西村範夫 (1998) サラダナ根腐病菌の選択培地上での識別と発病ハウス土壌中の密度. 九農研60 : 75
- 7) 須永哲央, 生井潔, 木嶋利男 (1997) 蛍光性 *Pseudomonas* によるレタスの生育促進と病害防除. 栃木農試研報 46 : 37-41
- 8) 竹原利明, 萩原廣, 国安克人 (1995) *Fusarium oxysporum* の *nit* 変異菌株と野生菌株の土壌からの分別定量法. 日植病報 61 : 606
- 9) 吉川正己 (1996) アスパラガス株腐病およびその生物防除に関する研究. 京都府農研研報 18 : 1-38