

ナス科作物の土壌病害に対する *Bacillus*、*Paenibacillus*、*Paecilomyces* 属微生物株の効果的活用マニュアルの作成

Development of Manual for Effective Use of Microbial Strains of the Genera *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Paecilomyces* Showing Suppressive Activities against Soilborne Diseases of Solanaceae Plants

吉田重信*・對馬誠也**

Shigenobu Yoshida and Seiya Tsushima

1. マニュアル作成の背景・目的

微生物を利用した植物病害の防除は生物的防除と呼ばれ、そうした働きを持つ微生物の幾つかは微生物農薬として上市されている。微生物農薬は環境保全型農業の実現や IPM（総合的病害虫・雑草管理：Integrated Pest Management）の推進に役立つものとして、今後更に普及が期待されているが、一般に防除が困難とされ、多くの現場での被害が深刻となっている土壌伝染性病害に対しては、開発が遅れているのが現状である。こうした状況の下、我々は、農林水産省の支援を受け、土壌病害を対象とした新たな生物的防除資材の開発に関するプロジェクト研究「低投入型農業のための生物農薬等新資材及びその利用技術の開発」を平成 23-25 年度にかけて行った。

このプロジェクト研究では、生産地で深刻な被害をもたらし、防除が困難とされるトマトおよびナスの青枯病、トマト萎凋病および根腐萎凋病を対象に、将来的に新たな微生物農薬として利用可能な微生物株を選抜し、その効果的な処理法を開発するという最終目標の達成に向け、三つの大きな研究戦略に基づいて取り組んだ。

一つ目の研究戦略として、微生物株の選抜については、従来多くの微生物農薬の作用機作である病原菌に対する養分競合作用や抗生作用が膨大な数の微生物や夾雑物が存在する土壌では働きにくいと考えられたことと、植物の抵抗性誘導に基づく発病抑制が土壌病害に対しては比較的安定的に作用すると考えられたことから、「植物の抵抗力を高度に発揮させる新たな微生物」を見出すことを目指すこととした。

二つ目は、「低コストの製剤開発に繋がりうる微生物」を主たる選抜対象のターゲットにしたことである。これまでは、高い防除効果を示す微生物を選抜できても、製造コストが制限要因となり、結果的に製品化に至らない事例が多くあったため、製造コストに直結する微生物の増殖性と保存性の優れた性質を持つものに着眼して開発することを目指した。具体的には、これらの点で優れた性質を持つ *Bacillus* 属細菌を微生物の選抜対象の中心に位置づけて研究を行った。

*生物生態機能研究領域、 **農業環境インベントリーセンター

Environmental Biofunction Division, Natural Resources Inventory Center

インベントリー, 第 12 号, p28-31 (2014)

三つ目の研究戦略としては、選抜した微生物の「効果が期待できる利用場面」を提示できるようにすることを目指した。微生物農薬は必ずしも万能ではなく、効果が期待できる利用場面と期待できない利用場面がある。すなわち、微生物農薬の効果の信頼性向上と利用拡大を図るためには、効果が期待できる利用場面を明らかにし、その利用場面での使用を徹底することで、効果の安定性を確保することが大切である。

以上の戦略に基づき研究を実施した結果、上記の各種土壌病害に対して微生物殺虫剤として既に多数利用されている *Bacillus thuringiensis* 等の微生物が効果的であることを明らかにした。具体的には、*Bacillus thuringiensis* serovar *sotto* RG1-6 株、*Bacillus thuringiensis* serovar *fukuokaensis* B88-82 株や既上市 *Paecilomyces* 製剤、さらに *Paenibacillus* sp. 42NP7 株と菌根菌(*Glomus mosseae*)資材の併用処理が、上記ナス科作物の土壌病害に対する微生物農薬として有望であることを明らかにした。しかし、これまでにプロジェクト研究の中で実施したこれら微生物の効果の検討事例は、まだ限られており、今後、選抜した微生物株が微生物農薬として開発されるためには、より多くの地域や作型での適用性や効果の実証が必要である。

そこで、これらの選抜した微生物株の発病抑制効果の更なる検討が円滑に行えるようにすることを目的に、これまでに明らかにした効果的な微生物の処理方法等に関する情報と共に、実際の圃場試験での有効性や効果の適用範囲等について実例を盛り込んだ「ナス科作物の土壌病害に対する *Bacillus* 属等微生物の効果的活用マニュアル」を作成した(図1)。

2. マニュアルの構成・内容

本マニュアルでは、プロジェクト研究により見出された微生物株毎に、その利用法および効果の実例等についてまとめられている。すなわち、1) その微生物株の由来や特性、2) 微生物株の培養条件、接種源の調製法、3) 植物体への処理法、4) 圃場での防除効果の検討、5) 防除効果が期待できる使用場面、6) 防除効果の作用メカニズムが、微生物株毎にまとめられている(図2)。

具体例として、当研究所の微生物インベントリー(*microForce*)から見出し、トマト根腐萎凋病に対する防除効果が明らかとなった *Paenibacillus* sp. 42NP7 株¹⁾と菌根菌(*Glomus mosseae*)の併用処理について解説すると、それぞれの微生物株の来歴や特性につい

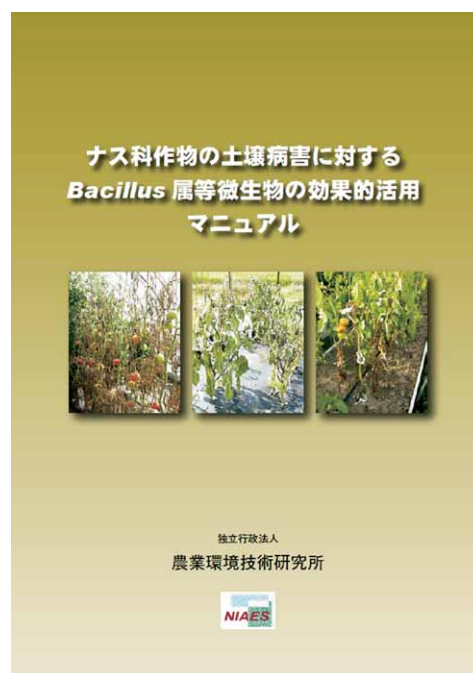


図1. マニュアルの表紙

目次	
1. はじめに	・ ・ 1
2. 有望微生物ごとの利用法、効果の実例	・ ・ 3
① トマト青枯病に対する <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>sotto</i> RG1-6 株の利用	・ ・ 3
1) <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>sotto</i> RG1-6 株について	・ ・ 4
2) RG1-6 株の培養条件、接種源の調製法	・ ・ 4
3) 植物体への処理法	・ ・ 4
4) 圃場での防除効果の検討	・ ・ 5
5) 防除効果が期待できる使用場面	・ ・ 6
6) 防除効果の作用メカニズム	・ ・ 8
② トマト萎凋病・ナス青枯病に対する <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>fukuokaensis</i> B88-82 株の利用	・ ・ 9
1) <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>fukuokaensis</i> B88-82 株について	・ ・ 10
2) B88-82 株の培養条件、接種源の調製法	・ ・ 10
3) 植物体への処理法	・ ・ 10
4) 圃場での防除効果の検討	・ ・ 11
5) 防除効果が期待できる使用場面	・ ・ 12
6) 防除効果の作用メカニズム	・ ・ 13
③ トマト青枯病・トマト萎凋病に対する <i>Paecilomyces</i> 製剤の利用	・ ・ 15
1) <i>Paecilomyces</i> 製剤について	・ ・ 16
2) 植物体への処理法	・ ・ 16
3) 圃場での防除効果の検討	・ ・ 16
4) 防除効果が期待できる使用場面	・ ・ 19
5) 防除効果の作用メカニズム	・ ・ 21
④ トマト根腐萎凋病に対する <i>Paenibacillus</i> sp. 42NP7 株と菌根菌 <i>Glomus mosseae</i> の併用処理の利用	・ ・ 22
1) <i>Paenibacillus</i> sp. 42NP7 株について	・ ・ 23
2) 菌根菌 (<i>Glomus mosseae</i>) について	・ ・ 23
3) 42NP7 株の培養条件・接種源の調製法	・ ・ 23
4) 菌根菌の増殖・接種源の調製法	・ ・ 24
5) 植物体への処理法	・ ・ 24
6) 圃場での防除効果の検討	・ ・ 25
7) 防除効果が期待できる使用場面	・ ・ 26
8) 防除効果の作用メカニズム	・ ・ 26
3. 引用文献	・ ・ 28

図2. マニュアルの目次

ては、図3のように記されており、その接種源の調製法や植物体への処理法については、実際の作成や処理の参考となるように、具体的数字が明示された内容となっている(図4)。

1) *Paenibacillus* sp. 42NP7 株について
Paenibacillus 属細菌は、グラム陽性の芽胞を形成する桿菌で、*Bacillus* 属細菌に非常に近縁の性質を持ちますが、そのリボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の違いに基づき、*Bacillus* 属の一部細菌が本属に転属されました。*Paenibacillus* 属細菌は、土壌をはじめとした様々な環境中に生息しますが、42NP7 株は、Enya et al.⁹⁾ により、健全トマト植物の葉面に生息している微生物の一つとして分離されたものです(図28)。本菌株は、(独)農業環境技術研究所で保存管理されています。

2) 菌根菌 (*Glomus mosseae*) について
 菌根菌 *Glomus mosseae* は、アーバスキュラー菌根菌 (VA 菌根菌と呼ばれることもある) という菌根菌の一種です。アーバスキュラー菌根菌は植物の根に共生して、土壌から吸収したリンを供給することで植物の生育を改善することが知られており、地力増進法に定める政令指定土壌改良資材に認定されています。またある種の病害に対して抑制効果を示すこともあります。菌根菌資材は、無機質多孔質資材等の担体に *G. mosseae* の胞子を保持したもので、播種時あるいは鉢上げ時に培土に1~10%混合します。あるいは定植時に、植え穴に施用する方法もあります。施用量は資材の特徴や栽培条件に合わせて調整します。なお、本試験で用いた *G. mosseae* 菌株の胞子(図29)は、出光興産(株)から分離されています。

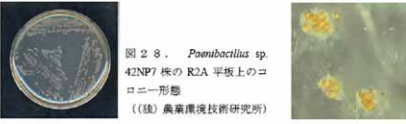


図28. *Paenibacillus* sp. 42NP7 株の R2A 平板上のコロニー形態 (独)農業環境技術研究所

図29. 培土中で増殖・形成された *Glomus mosseae* の胞子 (東北大学)

図3. 微生物株の来歴や特性の説明

4) 菌根菌 (*G. mosseae*) の増殖・接種源の調製法
 絶対共生微生物である菌根菌 *Glomus mosseae* の増殖・接種源の調製は、以下のとおり行います。

- ・細粒赤玉土、川砂、リン酸肥沃度の低い畑土壌を2:1の比率で混合し、オートクレーブ滅菌して培土を作成する。培土の可給リンが30~60mgP₂O₅/tとなるようにリン酸肥料を混和する。
- ・直径6cmのビニルポットに250mlの培土を充填し、植え穴の底へ *G. mosseae* 胞子(胞子約100~500個)を施用し、あらかじめ表面殺菌して発芽させた植物(パヒアグラス、白クローバ等)を移植する。リン酸を除いた液肥(ホーランド水耕液等)を約5ml添加する。液肥は、植物の生育に応じて適宜追加する。
- ・移植後、人工気象機内で(明14時間、26~30℃; 暗10時間、20~25℃)2-3ヶ月育成後、給水を停止して植物を枯死させ、根を除いた培土に *G. mosseae* 胞子が形成されていることを実体顕微鏡等で確認し、培土をそのまま接種源として用いる。胞子密度が低い場合は、培土から液状菌液法で胞子を濃縮し、川砂等と混和して接種源とする。

(東北大学)

5) 植物体への処理法
 42NP7 株および *G. mosseae* の苗への処理は、次の手順で行うのが効果的です。

- ・*G. mosseae* の接種源は、トマト種子の播種時に、セル育苗培土(リン酸成分濃度約0.2%)に4%(w/w)の割合で混合してセルトレイに充填、種子を播種する(図30)。
- ・播種後、苗を温室などで育成、鉢上げ後、定植5日前に、42NP7 株の細菌懸濁液 (OD₆₀₀=0.3)(図31)を、ポットサイズの1/12量分を灌注する(例:直径9cmポット[360ml容量]の場合は30ml灌注)。

(独)農業環境技術研究所

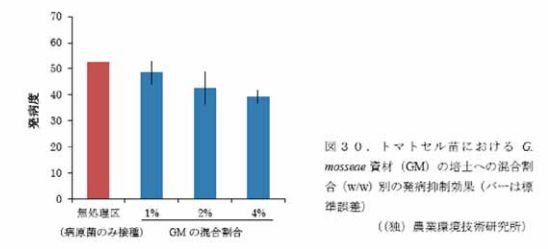


図4. 接種源の調製法や植物体への処理法の説明

また、こうした処理法が有効であることの科学的根拠を示すデータも併せて紹介されている。

次に圃場での防除効果については、公設試験研究機関で実際に行った圃場試験の概要およびその結果が実例として紹介されている(図5)。また、防除効果が期待できる使用場面については、試験圃場における根腐萎凋病の発病程度(発病度)と42NP7株+*G. mosseae*の併用処理の効果(防除値)との関係性をグラフ化(図6)し、これにより、防除効果が期待できる圃場の条件(想定発病程度)が推定できるようになっている。

6) 圃場での防除効果の検討
 42NP7 株および *G. mosseae* の併用処理によるトマト根腐萎凋病菌に対する防除効果を圃場で検討した事例を紹介します。圃場試験例の概要は以下の通りです。

- ・試験場所、作型: 兵庫県立農林水産技術総合センター内ビニルハウス(黄色土壌)、無加温半促成栽培
- ・供試品種: ハウス桃太郎
- ・区割: 3汚染程度(高汚染・中汚染・低汚染)の各圃場区を設定 1区(2.0㎡)9株(畝幅120cm×株間30cm、2条植)、3反復
- ・播種概要: 11月に培土(スミソイル)を充填したセルトレイに播種、20日間育成後に9cmポットに鉢上げし、約70日後に圃場に定植
- ・42NP7株および *G. mosseae* の苗へ処理: 上記5)に準じて処理
- ・発病調査: 岩本ら(2008)の方法に準じて、地上部の葉の黄化・萎凋程度、根の腐敗程度により発病度を算出

(兵庫県立農林水産技術総合センター)

試験の結果、42NP7株および *G. mosseae* の併用処理によって、対照試験区のトマト地上部および根部の発病度が、中程度の発病条件下において、防除値71(2012年)、59(2013年)の防除効果が見られました(図32)。

図5. 圃場での防除効果の説明

7) 防除効果が期待できる使用場面
 試験圃場における根腐萎凋病の発病程度(発病度)と42NP7株+*G. mosseae*の併用処理の効果(防除値)との関係を見ると、これら微生物の併用処理の効果は、発病度がおよそ60未満までの発生程度と想定される圃場条件では、防除値が50以上となり、一定の効果が期待できます。しかし、それ以上の発病程度と想定される圃場条件では、高い防除効果は期待できないと予想されます(図33)。

図33. 圃場における根腐萎凋病の発病度と42NP7株+*G. mosseae*の併用処理による防除値の関係 (兵庫県立農林水産技術総合センター)

回帰式: $y = -0.75x + 96.37$
 $R^2 = 0.63$

図6. 防除効果が期待できる使用場面の説明

さらに、防除効果の作用メカニズムについては、これら微生物株が直接的に根腐萎凋病菌の生育を阻害はしない一方で、根の表面に定着あるいは根部に共生し、植物体に作用して病害に対する抵抗性を高めている可能性が明らかとなったが、こうした知見について具体的試験データを示しながら解説されている。

3. おわりに

以上のように、本マニュアルでは、プロジェクト研究で対象としたナス科作物の土壌病害に対して有効性が解明された微生物株の取り扱いや、その効果に関する情報が記載されている。このマニュアルを活用することで、これらの微生物株を用いた防除効果の実証例が蓄積され、将来的な微生物農薬の開発につながることを期待できる。さらに、国内で開発されている土壌病害に対する微生物農薬は、現状ではその種類がまだ少なく、様々な作物や病害に対応するためには、その種類を増やす必要がある。本マニュアルが、ナス科作物病害に限らず、様々な土壌病害に対する微生物農薬の開発の推進に役立てられれば幸いである。

引用文献

1) Sato, I., S. Yoshida, Y. Iwamoto, M. Aino, M. Hyakumachi, M. Shimizu, H. Takahashi, S. Ando, and S. Tsushima (2014) Suppressive potential of *Paenibacillus* strains isolated from the tomato phyllosphere against *Fusarium* crown and root rot of tomato. *Microbes Environ.* 29: 168-177.

問い合わせ先

生物生態機能研究領域 吉田 重信

電話：029-838-8355 e-mail：yoshige@affrc.go.jp