

## 抗菌微生物の利用に関する研究

木嶋利男・有江 力\*・木村 栄・峯岸長利  
手塚紳浩・橋田弘一・福田 充

### I 緒 言

野菜類は近年、周年供給されるようになり、それに伴い施設内で栽培されるようになってきた。施設は簡単に移動できないため、野菜類は連作されることが多くなってきた。この結果、土壌病害が多発するようになり、生産安定上問題となってきた。

野菜類の土壌病害は難防除病害の一つであり野菜類が土壌病害に感染すると防除法がなく、壊滅的な被害を受けることも少なくない。このため連作年数の長い圃場ではクロールピクリン剤やメチルプロマイド剤による土壌くん蒸が行われている。しかし、これらの土壌くん蒸剤は高価なうえ施用法も煩雑である。さらに人畜に対する安全性の面でも大きな問題になっておりこれに替わる防除法として、土壌病原菌に対して拮抗作用のある微生物（以下抗菌微生物と云う）の利用が考えられる。

抗菌微生物による土壌病害の防除は世界各国で多数試みられているが、実験室または室内試験での効果が圃場では殆ど発揮されず、実用性が認められない現状にある。従来、①抗菌微生物を直接土壌中に投入する方法、②抗菌微生物を対象作物に直接接種する方法、③土壌改良剤等を用いて土壌中に生息する抗菌微生物を活性化させる方法が試みられていた。これらの中で①の抗菌微生物を直接投入する方法は、自然汚染土壌を用いた場合は有効性が殆ど認められていない。これは、投入された抗菌微生物が土壌中で安定しないためと考えられている。②の抗

菌微生物を直接接種する方法は、キュウリつる割病、コムギ立枯病、ホウレンソウ立枯病、バラ根頭がんしゅ病等の防除が知られている。③の土壌改良剤等を用いる方法は、カニ殻、有機物、石炭等を混和する方法が知られている。しかし、これらの方法のうち②の方法は効果が安定せず、対象作物が限定されたり、対象作物ごとに抗菌微生物を選抜しなければならない等の問題点がある。また、③の方法は圃場によって効果が殆ど発揮されない場合や他の病害の発生を助長することもある。

そこで本研究では、抗菌微生物を土壌中で安定する方法として、日本や中国で昔から行われていた、混植、輪作、間作の伝承技術を応用して、抗菌微生物を定着性のある植物に接種し、この植物を対象作物の根圏に混植することで、抗菌微生物の土壌中での安定化をはかり、対象作物を限定せず、防除効果を安定させる方法を試みた。

栃木県にはユウガオ（かんびょう）が2,500ha前後栽培されている。そしてそのほとんどの圃場は長い間連作に近い状態で栽培されている。しかし、こうした場合、当然発生するであろうユウガオつる割病の発生はほとんど認められない現状にある。栽培面積が大きく、しかも広い地帯で栽培されているため、ユウガオつる割病の発生が少ない原因として、発病抑止型の土壌は考え難い。そこで、栽培の実態を調査したところ、ユウガオつる割病の発生が認められない圃場では、伝承的にタマネギとの輪作や株元にネギを混植して栽培している例が多かった。

\*東京大学農学部植物病理学研究室

発生実態調査の結果からタマネギとの輪作やネギの混植にはユウガオつる割病の発生を抑制する微生物が生息しているのではないかと想定し、ネギ属植物の根圏微生物の調査を行ったところ、ユウガオつる割病に強い抗菌活性を示す細菌がネギやタマネギの根圏及び鱗茎から分離され、これがユウガオつる割病の発病を抑制しているものと考えられ、この菌を用いて、伝承技術のようにネギに接種して混植する方法で防除試験を行ったところ、高い防除効果が認められた。しかし、この菌はネギ属植物にも強い病原性が認められたため、このまま防除に用いることはネギ属植物に病害を発生させるなどして、環境を汚染する恐れがあると考えられた。そこで、抗菌微生物を土壤中で安定させる方法としてネギ属植物への定着性を用いることとして、ネギ属植物に親和性があり、同属植物の鱗茎や根で増殖し、病気を起こさず、しかもユウガオつる割病に抗菌活性のある菌を各種植物から分離した菌株から選抜し、Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1のII群に類別される*Pseudomonas gladioli* 及び*P. cepacia* に属する優良系統を得た。

選抜された本微生物を用いたトマト萎ちょう病(J<sub>3</sub>)、ユウガオつる割病、ユニニャク乾腐病、トマト半身萎ちょう病等の防除試験を行ったところ高い効果が認められた。その結果は逐次報告してきたが、それらを取りまとめ、併せて総合的な考察を加えたので報告する。

## II 材料及び方法

### 1. 有用微生物の選抜

植物病原菌に抗菌活性のある有用微生物を各種作物から分離された細菌から選抜する。

#### 1) 抗菌活性

各種植物から分離し、第1表に示したG-0555～C-0557, V-0560～V-0569, C-0617～C-0626,

P-0531～P-0539, C-0751～C-0757, M-2196～M-2205, V-2396～V-2405, D-2243～D-2253, B-2258～B-2267, A-2243～A-2245, B-83, BC-1～BC-15, O-1000, G-2300～G-2309, S-2239～S-2243, C-0062～C-0065, C-0520～C-0587, B-10, B-11, B-12, B-mi, B-an, B-27, S-2111～S-2113, Z-2056～Z-2064, A-2354～A-2364を用い、PDA(Difco社製)のプレート上でユウガオつる割病菌 *Fusarium oxysporum f.sp. lagenariae* (栃木県農業試験場保存菌株)と25℃で1週間対じ培養し、検定菌との間に生じた生育阻止帯を調べた。

#### 2) ネギに対する親和性

抗菌活性の認められた菌株は $10^8$  cells/m 細菌浮遊液を針でネギに接種して親和性を調べた。

#### 3) 細菌学的性質

ユウガオつる割病菌に対して抗菌活性の認められた菌株は次の方法によって、細菌学的性質を調べた。

グラム反応はRyu<sup>20)</sup>の方法、形態は光学顕微鏡及び電子顕微鏡による観察、OF試験はDifco社製のOF basal medium(トリプトン2g, 塩化ナトリウム5g, リン酸2カリウム0.3g, BTB 0.08g, 寒天2g/1)に1%グルコースを加えた培地、デカルボキシラーゼはDifco社製のdecarboxylase base Moeller(ペプトン5g, 肉エキス5g, グルコース0.5g, BCP 0.01g, CR0.005g, ピリドキサル5mg/1), ウレアーゼはDifco社製のurea broth(酵母エキス0.1g, リン酸1カリウム9.1g, リン酸2カリウム9.5g, 尿素20g, フェノールレッド0.01g/1)を用いた。炭素源の利用はAyersの培地<sup>4)</sup>その他の性質はCowan<sup>6)</sup>によった。

#### 4) 各種病原菌に対する抗菌活性

抗菌活性の強かったM-2196, C-0556, V-0563, D-2251, V-2400菌株はさらに *Fusarium* 属菌の20病原型, *Verticillium dahliae*, *Macrophomina phaseoli*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria*

*alternata*, *Fusicularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Colletotrichum cyclamenae*, *Corticium rolfsii*, *Pythium sp* と PDA 培地上で対じ培養して活性を調べた。

## 2. 抗菌活性の機構

抗菌活性の認められた微生物について、その抗菌活性の諸条件について検討した。

### 1) 抗菌活性に及ぼす培養温度

抗菌活性の強かった M-2196 菌株を用い、*Fusarium oxysporum f.sp.lagenariae* と PDA 培地上で、4, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 23, 25, 28, 30, 33, 35, 38, 40℃の定温器で1週間対じ培養し、供試菌間に生じた生育阻止帯を調べた。

また、本菌を nutrient agar (Difco 社製) に接種し、4, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 23, 25, 28, 30, 33, 35, 38, 40℃の定温器で96時間培養し、これをクロロホルム蒸気で滅菌し、*Corynebacterium michiganense pv.michiganense* を浮遊させた nutrient agar を重層して25℃の定温器で96時間培養して、指示菌の周囲に生じた阻止円を調べた。

### 2) 抗菌活性に及ぼす培養時間

M-2196菌株を用い nutrient agar で *Fusarium oxysporum f.sp.lagenariae* と25℃で24, 48, 72, 96時間対じ培養し、供試菌間に生じた生育阻止帯を調べた。

### 3) 抗菌活性に及ぼす培地の組成

M-2196菌株を用い、nutrient agar にオルニチン、アルギニン、リシン、グルタミン、ホモセリン、ロイシン、バリン、プロリンを0.5% 加え、*Fusarium oxysporum f.sp.lagenariae* と25℃で96時間対じ培養し、供試菌株間に生じた生育阻止帯を調べた。

### 4) 抗菌活性に及ぼす培地の酸度

V-0563, D-2251, V-2400菌株を用い、酸度を5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0に調整した nutrient agar に *Fusarium oxysporum*

*f.sp.lycopersici* と25℃で96時間対じ培養した。

さらに、同じ3菌株を用い、酸度を5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0に調整した nutrient broth に96時間培養して供試菌の密度を希釈培養法で調べた。

### 5) 抗菌成分の抽出

Nutrient broth で96時間培養された M-2196 にクロロホルム、ブタノール、ベンゼン、アセトン、酢酸エチル、ヘキサン、活性炭をそれぞれ加え振とう後分液して溶媒部はエバポレーターで濃縮し、*Corynebacterium michiganense pv michiganense* を指示菌として活性を調べた。活性炭抽出の場合はさらにエタノールで抽出しこれをエバポレーターで濃縮して、同様に活性を調べた。

また、M-2196, C-0550, V-0560, C-0619, D-2243, B-2258, V-2396 菌株の培養抽出液についてフィルターろ過滅菌液の活性を調べた。

さらに、nutrient broth で96時間培養された M-2196菌株を第1図の方法によって純化した。

### 6) 選択培地

M-2196菌株の選択培地を検討した。Ayersの培地に抗菌剤としてトロポロン25, 50ppm, デオキシコール酸1000ppm, 炭素源としてm-ヒドロキシ安息香酸を加えて、M-2196を96時間培養し、M-2196菌株の生育状況を調べた。

## 3. 防除試験

抗菌活性の認められた菌株を、ネギ属植物に接種し、これを混植することによつた土壌病害の防除法を検討する。

### 1) 鉢試験

#### (1) ユウガオつる割病

Nutrient broth で培養されたM-2196菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液に予め水洗いしたニラ株(グリーンベルト種)及びネギ(長ネギ)を浸漬して接種し、これをユウガオつる割病菌で汚染された用土にユウガオとともに7号鉢に植え付けた。また、ユウガ

オを直接抗菌微生物に浸漬して植え付けた。調査は発病程度について行った。

(2) イチゴ萎黄病

(1) の実験と同様に M-2196 菌株を接種したネギをイチゴ萎黄病菌で汚染された用土にイチゴとともに7号鉢に植え付けた。また、イチゴを直接抗菌微生物に浸漬して植え付けた。調査は発病程度について行った。

(3) トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>)

(1) の実験と同様に M-2196 菌株を接種したニラをトマト萎ちょう病菌で汚染された用土にトマトとともに7号鉢に植え付けた。また、トマトを直接抗菌微生物に浸漬して植え付けた。調査は発病程度について行った。

(4) キュウリつる割病

(1) の実験と同様に M-2196 菌株を接種したネギをキュウリつる割病菌で汚染された用土にキュウリとともに7号鉢に植え付けた。また、キュウリを直接抗菌微生物に浸漬して植え付けた。調査は発病程度について行った。

(5) スイカつる割病

(1) の実験と同様に M-2196 菌株を接種したネギをスイカつる割病菌で汚染された用土にスイカとともに7号鉢に植え付けた。調査は発病程度について行った。

(6) ニラ白絹病

(1) の実験と同様に培養された M-2196 菌株をニラに $10^8$  cells/ml浮遊液を浸漬して接種し、ニラ白絹病菌に汚染された用土の入った7号鉢に植え付けた。調査は発病程度について行った。

(7) イネいもち病

Nutrient brothで培養された D-2251, V-0563, V-2400菌株の $10^8$  cells/ml浮遊液にイネ種子を1時間浸漬して播種し、発芽後にいもち病菌を接種した。また、播種14日後のイネに同様の細菌浮遊液を散布し、散布5日後にいもち病菌を接種した。調査は発病程度について行った。

2) 圃場試験

(1) ユウガオつる割病

Nutrient brothで培養された M-2196 菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液に予め水洗いしたネギ及びニラの株を浸漬して接種し、これをユウガオとともに1株につき2株ずつ、南河内町の一般栽培圃場に混植した。調査は発病程度について行った。

(2) トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>)

Nutrient brothで培養された M-2196 菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液に予め水洗いしたニラ株(グリーンベルト種)を浸漬して接種した。①効果試験では定植時にトマト1株につき M-2196 菌株が接種されたニラを1株ずつ、一般栽培の野木町2圃場、小山市4圃場に混植した②混植密度試験では同様に接種したニラをトマト1株につき1, 2, 3本ずつ、一般栽培の足利市1圃場、宇都宮市2圃場、小山市2圃場、芳賀町2圃場に混植した。調査は収穫終了後の抜根時に発病程度と維管束部の褐変程度について行った。

(3) イチゴ萎黄病

Nutrient brothで培養された M-2196 菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液に予め水洗いしたネギ株を浸漬して接種し、これをイチゴとともに採苗床では1株につき1, 2本、育苗床では1株につき3, 4本ずつ、足利市の一般栽培圃場に混植した。調査は発病程度について行った。

(4) ニラ白絹病

Nutrient brothで培養された M-2196 菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液にニラ苗を浸漬して一般栽培の鹿沼市の圃場に定植した。調査は発病程度について行った。

(5) コンニャク白絹病

Nutrient brothで培養された M-2196 菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液にエンバク種子を浸漬して一般栽培の粟野町の圃

場にコンニャクの定植時に畝間に混植した。調査は発病株率について行った。

(6) コンニャク乾腐病

Nutrient brothで培養されたM-2196菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液にエンバク種子を浸漬して一般栽培の粟野町及び市貝町の圃場にコンニャクの定植時に畝間に混播した。調査は収穫後に塊茎の発病程度を調べた。

(7) トマト半身萎ちょう病

Nutrient brothで培養されたM-2196菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液に予め水洗いしたニラ株を浸漬して接種し、これをトマトとともに1株につき1、3本ずつ、上河内町の土壌消毒と無消毒の一般栽培圃場に混植した。調査は発病程度について行った。

(8) キュウリつる割病

Nutrient brothで培養されたM-2196菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液に予め水洗いしたネギ株を浸漬して接種し、これをキュウリとともに1株につき2本ずつ、小山市の一般栽培圃場に混植した。調査は発病程度について行った。

(9) トマトかいよう病の防除

Nutrient brothで培養されたM-2196菌株を $10^8$  cells/mlの浮遊液に調整し、この細菌浮遊液をトマト茎葉に噴霧接種し、その後、トマトかいよう病菌を接種し、露地及び雨よけ栽培とした。調査は発病果率について行った。

### III 実験結果

#### 1. 有用微生物の選抜

##### 1) 抗菌活性

ネギの根や鱗茎からはBC-1～BC-15, A-2243～A-2245, B-83の細菌が分離され、抗菌活性を示した。その他ラン類から分離したC-0556～C-0557, V-0560～V-0569, M-2196, V-2396～

V-2405, D-2248～D-2253, B-2258～B-2267及びサトイモ科観葉植物から分離したZ-2056～Z-2064, A-2354～A-2361の菌に抗菌活性が認められた(第1表)。

##### 2) ネギに対する親和性

抗菌活性の認められた細菌の中で、ネギに対する親和性を示す菌株としてC-0556, V-0560～V-0569, V-2396～V-2405, M-2196, D-2244～D-2253, B-2258～B-2267, BC-1～BC-15, B-83が認められた。しかし、M-2196, D-2253, B-2258～B-2267系統以外の菌株は弱い病原性があった。M-2196系統はニラに親和性があり、しかも植物にはほとんど病原性のない菌と考えられたため本菌をその後の実験の中心菌株として用いることとした。また、D-2251, V-2400, V-0563菌株は弱い病原性があるが、強い抗菌活性が認められたため利用できる菌株として選抜した(第2表)。

##### 3) 細菌学的性質

抗菌微生物のうちBC1～BC15は*Pseudomonas* sp., B-83は*P. cepacia*, C-0556, V-0560～V-0569, V-2396～V-2405, D-2248～D-2252, B-2258～B-2264は*P. gladioli* Z-2056～Z-2065, A-2354～A-2361は*Xanthomonas campestris*と同定された、M-2196は*P. cepacia*及び*P. gladioli*双方に類似した(第3表)。

M-2196の細菌学的性質;本菌はランの一種ミルトニアから分離された細菌で、グラム陰性、 $1.0\sim 1.2\times 1.6\sim 2.2\mu$ の桿状で1～2本の極鞭毛を有する。OF試験はO, p-β-ヒドロキシ酪酸顆粒を集積し、蛍光色素は産生しない。硝酸塩の還元, カタラーゼ, エスクリンの加水分解, アルブチンの加水分解, レシチナーゼ, 綿実油の加水分解, ツィーン80の加水分解, カゼインの加水分解, 41℃での生育, ゼラチンの液化は陽性, インドール, チロシナーゼ, ウレアーゼ, レバン, タバコ過敏反応, ジガイモ

栃木県農業試験場研究報告第35号

第1表 各種植物から分離した細菌のユウガオつる割病菌に対する抗菌活性

| 番号     | 植物名     | 菌名                | 活性 | 番号     | 植物名     | 菌名                | 活性 |
|--------|---------|-------------------|----|--------|---------|-------------------|----|
| C-0555 | カトレア    | <i>P.gладиoli</i> | —  | M-2196 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| C-0551 | カトレア    | <i>P.gладиoli</i> | —  | M-2197 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0552 | カトレア    | <i>P.gладиoli</i> | —  | M-2198 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0553 | カトレア    | <i>P.gладиoli</i> | —  | M-2199 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0554 | カトレア    | <i>P.gладиoli</i> | —  | M-2200 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0555 | カトレア    | <i>P.gладиoli</i> | —  | M-2201 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0556 | カトレア    | <i>P.gладиoli</i> | +  | M-2202 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0557 | カトレア    | <i>P.gладиoli</i> | +  | M-2203 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| V-0560 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | ±  | M-2204 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| V-0561 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | +  | M-2205 | ミルトニア   | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| V-0562 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | +  | V-2396 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| V-0563 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | +  | V-2397 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| V-0564 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | +  | V-2398 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| V-0565 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | +  | V-2399 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| V-0566 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | +  | V-2400 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| V-0567 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | +  | V-2401 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| V-0568 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | +  | V-2402 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| V-0569 | ビルステケラ  | <i>P.gладиoli</i> | +  | V-2403 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| C-0617 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | V-2404 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| C-0618 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | V-2405 | バンダ     | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| C-0619 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | D-2243 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0620 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | D-2244 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0621 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | D-2245 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0622 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | D-2246 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0623 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | D-2247 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | —  |
| C-0624 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | D-2248 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| C-0625 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | D-2249 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| C-0626 | シンビジウム  | <i>P.gладиoli</i> | —  | D-2250 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| P-0530 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | D-2251 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| P-0531 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | D-2252 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| P-0532 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | D-2253 | デンドロビウム | <i>P.gладиoli</i> | +  |
| P-0533 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2258 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| P-0534 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2259 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| P-0535 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2260 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| P-0536 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2261 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| P-0537 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2262 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| P-0538 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2263 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| P-0539 | ファレノプシス | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2264 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| C-0751 | カトレア    | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2265 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| C-0752 | カトレア    | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2266 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| C-0753 | カトレア    | <i>Pavenae</i>    | —  | B-2267 | ボワノラ    | <i>P.gладиoli</i> | ±  |
| C-0754 | カトレア    | <i>Pavenae</i>    | —  |        |         |                   |    |

抗菌微生物の利用に関する研究

(第1表の続き)

| 番号     | 植物名  | 菌名                     | 活性 | 番号     | 植物名    | 菌名                  | 活性 |
|--------|------|------------------------|----|--------|--------|---------------------|----|
| C-0755 | カトレア | <i>Paveae</i>          | +  | C-0062 | シクラメン  | <i>E.herbicola</i>  | —  |
| C-0756 | カトレア | <i>Paveae</i>          | +  | C-0065 | シクラメン  | <i>E.herbicola</i>  | —  |
| C-0757 | カトレア | <i>Paveae</i>          | +  | C-0520 | シクラメン  | <i>E.herbicola</i>  | —  |
| A-2243 | ネギ   | <i>Pgladioli</i>       | +  | C-0521 | シクラメン  | <i>E.herbicola</i>  | —  |
| A-2244 | ネギ   | <i>Pgladioli</i>       | +  | C-0586 | シクラメン  | <i>E.herbicola</i>  | —  |
| A-2245 | ネギ   | <i>Pgladioli</i>       | +  | C-0587 | シクラメン  | <i>E.herbicola</i>  | —  |
| B-83   | ネギ   | <i>P.cepaia</i>        | +  | B-10   | ミカン    | <i>E.herbicola</i>  | —  |
| BC-1   | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | B-11   | ダイズ    | <i>E.herbicola</i>  | —  |
| BC-2   | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | B-12   | ダイコン   | <i>E.herbicola</i>  | —  |
| BC-3   | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | B-mi   | フジ     | <i>E.milletiae</i>  | —  |
| BC-4   | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | B-an   | アナナス   | <i>E.ananas</i>     | —  |
| BC-5   | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | B-27   | ダイコン   | <i>E.raponthisi</i> | —  |
| BC-6   | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | 2111   | アワ     | <i>Erwinia sp.</i>  | —  |
| BC-7   | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | 2112   | アワ     | <i>Erwinai sp.</i>  | —  |
| BC-8   | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | 2113   | アワ     | <i>Erwinia sp.</i>  | —  |
| BC-9   | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | Z-2056 | カラー    | <i>X.campestris</i> | ±  |
| BC-10  | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | Z-2057 | カラー    | <i>X.campestris</i> | ±  |
| BC-11  | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | Z-2058 | カラー    | <i>X.campestris</i> | ±  |
| BC-12  | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | Z-2059 | カラー    | <i>X.campestris</i> | ±  |
| BC-13  | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | Z-2060 | カラー    | <i>X.campestris</i> | ±  |
| BC-14  | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | Z-2061 | カラー    | <i>X.campestris</i> | ±  |
| BC-15  | ネギ   | <i>Pseudomonas sp.</i> | +  | Z-2062 | カラー    | <i>X.campestris</i> | ±  |
| O-1000 | イネ   | <i>P. glumae</i>       | +  | Z-2063 | カラー    | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2300 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | Z-2064 | カラー    | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2301 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2354 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2302 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2355 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2303 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2356 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2304 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2357 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2305 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2358 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2306 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2359 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2307 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2360 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2308 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2361 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| G-2309 | ニンニク | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2362 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| S-2239 | ナス   | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2363 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| S-2240 | ナス   | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  | A-2364 | アンズリウム | <i>X.campestris</i> | ±  |
| S-2241 | ナス   | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  |        |        |                     |    |
| S-2242 | ナス   | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  |        |        |                     |    |
| S-2243 | ナス   | <i>Pseudomonas sp.</i> | —  |        |        |                     |    |

注一：抗菌性は認められない。 ±：僅かに抗菌活性が認められる。

＋：抗菌活性が認められる。

第2表 ネギに対する親和性試験

| 番号     | 親和性 | 番号     | 親和性 | 番号     | 親和性 | 番号    | 親和性 | 番号     | 親和性 |
|--------|-----|--------|-----|--------|-----|-------|-----|--------|-----|
| C-0556 | +   | V-2399 | +   | B-2258 | ±   | BC- 1 | +   | Z-2060 | -   |
| V-0560 | +   | V-2400 | +   | B-2259 | ±   | BC- 2 | +   | Z-2061 | -   |
| V-0561 | +   | V-2401 | +   | B-2260 | ±   | BC- 3 | +   | Z-2062 | -   |
| V-0562 | +   | V-2402 | +   | B-2261 | ±   | BC- 4 | +   | Z-2063 | -   |
| V-0563 | +   | V-2403 | +   | B-2262 | ±   | BC- 5 | +   | Z-2064 | -   |
| V-0564 | +   | V-2404 | +   | B-2263 | ±   | BC- 6 | +   | A-2354 | -   |
| V-0565 | +   | V-2405 | +   | B-2264 | ±   | BC- 7 | +   | A-2354 | -   |
| V-0566 | +   | M-2196 | ±   | B-2265 | ±   | BC- 8 | +   | A-2355 | -   |
| V-0567 | +   | D-2244 | +   | B-2266 | ±   | BC- 9 | +   | A-2356 | -   |
| V-0568 | +   | D-2248 | +   | B-2267 | ±   | BC-10 | +   | A-2357 | -   |
| V-0569 | +   | D-2249 | +   | Z-2056 | -   | BC-11 | +   | A-2358 | -   |
| V-2396 | +   | D-2250 | +   | Z-2057 | -   | BC-12 | +   | A-2359 | -   |
| V-2397 | +   | D-2251 | +   | Z-2058 | -   | BC-13 | +   | A-2360 | -   |
| V-2398 | +   | D-2252 | +   | Z-2059 | -   | BC-14 | +   | A-2361 | -   |
|        |     | D-2253 | ±   |        |     | BC-15 | +   | B-83   | +   |

注. +弱い病原性を示す. ±:病徴を発見せず, 接種菌が再分離される.

-:病徴を発現せず, 接種菌は再分離されない(非親和性菌).

腐敗, 5%塩化ナトリウムでの生育, スターチの加水分解, 硫化水素の産生は陰性・デカルボキシラーゼはオルニチン及びリジンで擬陽性. アラビノース, グルコース, マンノース, リボース, サッカロース, ラクトース, マルトース, セロビオース, メリビオース, トレファース, マンニトール, ソルビトール, キシロース, イノシトール, ラフィノース, グリセロール, ズルシトール, アドニトール, サリシン, ガラクトース, フラクトースから酸を産生し, メレジトース, デキストリン, エリスリトール, イヌリン, プロピレングリコール, エタノール, ラムノース,  $\alpha$ -メチル-D-グルコシッドから酸を産生しない. サッカリン酸, レブリン酸, 酢酸, クエン酸, ギ酸, フマル酸, リンゴ酸, マロン酸, プロピオン酸, コハク酸, 乳酸, グルコン酸, 馬尿酸, 酪酸, ガラクツロン酸, ミリスチン酸, ソルビン酸, マレイン酸, アントラニル酸, n-カプリル酸, グルタル酸, バリ

ン, シトルリン, ベタイン, D-酒石酸, アルギン酸, アスパラギン酸, グルタミン酸, パルミチン酸, デカン酸,  $\beta$ -アラニン, オルニチン, ヘプタン酸, ホモセリン, ペラルゴン酸, アゼライン酸, ピメリン酸,  $\alpha$ -アミルアミン, アジピン酸, トリゴネリン, スベリン酸, m-ヒドロキシ安息香酸, イソロイシン, ブタジオール, シトラコン酸, プトレスシン, スベルミン, ニコチン酸を利用し, メサコン酸, シュウ酸, パントテン酸, 安息香酸, 拮草酸, p-アミノ安息香酸, L-酒石酸, 葉酸, プチルアミン, トリプタミン, イタコン酸, 2-メルカプトエタノールを利用しない. グラジオラス, イリス, ネギ, タマネギ, ニラ, トウモロコシ, イネ, エンバク, シンビジウム, デンドロビウム, バンダ, カトレア, ボワノラ, ビルステケラ, ミルトニア, ファレノブシス, パフィオペディウムに親和性があった.

C-0555~C-0557の細菌学的性質:これらの



抗菌微生物の利用に関する研究

第3表 抗菌微生物と対象の *Pseudomonas* 属細菌, Bergey's manual of systematic bacteriology Vol.1の *P. gladioli*, *P. cepacia* との細菌学的性質の比較

| 細菌学的性質           | ラン類からの分離細菌 |   |    |    |   |   | 対象の <i>Pseudomonas</i> Bergey'sの記載 |      |      |      |      |
|------------------|------------|---|----|----|---|---|------------------------------------|------|------|------|------|
|                  | Cy         | D | Vy | Ca | M | B | Va                                 | Glad | Glum | Glad | Cepa |
| 利用能試験            |            |   |    |    |   |   |                                    |      |      |      |      |
| ブチルアミン           | +          | - | V  | +  | - | - | -                                  | -    | -    | -    | +    |
| トリプタミン           | -          | - | -  | -  | - | - | -                                  | -    | -    | -    | +    |
| ピメリン酸            | +          | + | +  | +  | + | - | -                                  | +    | +    | -    | +    |
| $\alpha$ -アミルアミン | +          | - | +  | +  | + | - | -                                  | -    | -    | -    | +    |
| スベリン酸            | +          | + | +  | +  | + | + | +                                  | +    | +    | -    | +    |
| m-ヒドロキシ安息香酸      | -          | - | V  | +  | + | - | -                                  | -    | -    | -    | +    |
| ブタジオール           | V          | - | V  | +  | + | + | V                                  | -    | -    | -    | +    |
| プトレスシン           | -          | - | V  | +  | + | - | -                                  | -    | -    | -    | +    |
| スベルミン            | -          | - | -  | -  | - | - | -                                  | -    | -    | -    | +    |
| レブリン酸            | +          | + | +  | +  | + | - | -                                  | +    | +    | -    | +    |
| D-酒石酸            | -          | + | -  | +  | + | - | -                                  | +    | +    | +    | -    |
| メサコン酸            | +          | + | +  | -  | - | - | -                                  | +    | -    | +    | -    |

注. Cy: シンビジウムからの分離細菌, D: デンドロビウムからの分離細菌, Vy: ビルステケラからの分離細菌, Ca: カトレアからの分離細菌, M: ミルトニアからの分離細菌, B: ボワノラからの分離細菌, Va: バンダからの分離細菌. Glad: 農業環境研究所の保存菌株 *P. gladioli* pv. *gladioli* (NIAES 1141). Glum: 栃木農業試験場保存菌株 *P. glumae*. Glad-Cepa: Bergey's manual of systematic bacteriology Vol.1. 記載の *P. gladioli* 及び *P. cepacia*.  
 V: 菌株によって差が認められた. W: 弱陽性.  
 +: 陽性, -: 陰性.

菌はランの一種カトレアから分離された細菌で、グラム陰性で、 $1.0\sim 1.2\times 1.6\sim 2.2\mu$  の桿状で1~2本の極鞭毛を有するOF試験はO,  $p-\beta$ -ヒドロキシ酪酸顆粒を集積し、蛍光色素は産生しない。カタラーゼ、エスクリンの加水分解、アルブチンの加水分解、レシチナーゼ、綿実油の加水分解、ツイーン80の加水分解、カゼインの加水分解、41℃での生育、ゼラチンの液化は陽性。硝酸塩の還元、インドール、チロシナーゼ、ウレアーゼ、レバン、タバコ過敏感反応、ジャガイモ腐敗、5%塩化ナトリウムでの生育、スターチの加水分解、硫化水素の産生は陰性。デカルボキシラーゼはオルニチン及びリジンで擬

陽性。アラビノース、グルコース、マンノース、リボース、サッカロース、ラクトース、マルトース、セロビオース、メリビオース、トレファース、マンニトール、ソルビトール、キシロース、イノシトール、ラフィノース、グリセロール、ズルシトール、アドニトール、サリシン、ガラクトース、フラクトース、エタノールから酸を産生し、メレジトース、デキストリン、エスリストール、イヌリン、プロピレングリコール、ラムノース、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシッドから酸を産生しない。安息香酸、パントテン酸、イソ拮草酸、ブチルアミン、サッカリン酸、レブリン酸、酢酸、クエン酸、ギ酸、フマル酸、

リンゴ酸, マロン酸, プロピオン酸, コハク酸, 乳酸, グルコン酸, 馬尿酸, 酪酸, ガラクツロン酸, ミリスチン酸, ソルビン酸, マレイン酸, アントラニル酸, n-カプリル酸, グルタル酸, バリン, シトルリン, ベタイン, D-酒石酸, アルギン酸, アスバラギン酸, グルタミン酸, パルミチン酸, デカン酸,  $\beta$ -アラニン, オルニチン, ヘプタン酸, ホモセリン, ベラルゴン酸, スペリン酸, アゼライン酸, ピメリン酸,  $\alpha$ -アミルアミン, アジピン酸, トリゴネリン, スペリン酸, m-ヒドロキシ安息香酸, イソロイシン, ブタジオール, シトラコン酸, プトレスシン, スペルミン, ニコチン酸を利用し, メサコン酸, シュウ酸, p-アミノ安息香酸, L-酒石酸, 葉酸, トリプタミン, イタコン酸, 2-メルカプトエタノール, トリゴネリンを利用しない. グラジオラス, イリス, ネギ, タマネギ, ニラ, トウモロコシ, イネ, エンバク, シンビジウム, デンドロビウム, バンダ, カトレア, ボワノラ, ビルスステケラ, ミルトニア, ファレノプシス, パフィオペディルムに親和性があった.

V-0561~V-0569の細菌学的性質:これらの菌はランの一種ビルステケラから分離された細菌で, グラム陰性で,  $1.0\sim 1.2\times 1.6\sim 2.2\mu$ の桿状で1~2本の極鞭毛を有する. OF試験はO, p- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸顆粒を集積し, 蛍光色素は産生しない. カタラーゼ, エスクリンの加水分解, アルブチンの加水分解, レシチナーゼ, 綿実油の加水分解, ツイーン80の加水分解, カゼインの加水分解, 41°Cでの生育, ゼラチンの液化は陽性. 硝酸塩の還元, インドール, チロシナーゼ, ウレアーゼ, レバン, タバコ過敏反応, ジャガイモ腐敗, 5%塩化ナトリウムでの生育, スターチの加水分解, 硫化水素の産生は陰性. デカルボキシラーゼはオルニチン及びリジンで擬陽性, アラビノース, グルコース, マンノース, リボース, ラクトース, セロビオ

ース, メリビオース, トレファース, マンニトール, ソルビトール, キシロース, イノシトール, グリセロール, ズルシトール, アドニトール, サリシン, ガラクトース, フラクトースから酸を産生し, メレジットース, デキストリン, エリスリトール, イヌリン, ラムノース,  $\alpha$ -メチル-D-グルコシッドから酸を産生しない. サッカロース, マルトース, ラフィノース, プロピレングリコール, エタノールは菌株により異なった. サッカリン酸, レブリン酸, 酢酸, クエン酸, ギ酸, フマル酸, リンゴ酸, マロン酸, プロピオン酸, コハク酸, 乳酸, グルコン酸, 馬尿酸, 酪酸, ガラクツロン酸, ミリスチン酸, マレイン酸, アントラニル酸, n-カプリル酸, グルタル酸, バリン, シトルリン, ベタイン, L-酒石酸, アルギン酸, アスバラギン酸, グルタミン酸, パルミチン酸, デカン酸,  $\beta$ -アラニン, オルニチン, ヘプタン酸, ホモセリン, スペリン酸, アゼライン酸, ピメリン酸,  $\alpha$ -アミルアミン, アジピン酸, スペリン酸, イソロイシン, シトラコン酸, ニコチン酸を利用し, メサコン酸, シュウ酸, パントテン酸, p-アミノ安息香酸, D-酒石酸, 葉酸, プチルアミン, トリプタミン, イタコン酸, 2-メルカプトエタノールを利用しない. 安息香酸, ソルビン酸, イソ枯草酸, プチルアミン, ベラルゴン酸, トリゴネリン, m-ヒドロキシ安息香酸, イタコン酸, ブタジオール, プトレスシン, スペルミンは菌株により異なった. グラジオラス, イリス, ネギ, タマネギ, ニラ, トウモロコシ, イネ, エンバク, シンビジウム, デンドロビウム, バンダ, カトレア, ボワノラ, ビルスステケラ, ミルトニア, ファレノプシス, パフィオペディルムに親和性があった.

V-2396~V-2405の細菌学的性質:これらの菌はランの一種バンダから分離された細菌で, グラム陰性で,  $1.0\sim 1.2\times 1.6\sim 2.2\mu$ の桿状で1~2本の極鞭毛を有する. OF試験はO, p-

## 抗菌微生物の利用に関する研究

$\beta$ -ヒドロキシ酪酸顆粒を集積し、蛍光色素は産生しない。硝酸塩の還元、カタラーゼ、エスクリンの加水分解、アルブチンの加水分解、レシチナーゼ、綿実油の加水分解、ツィーン80の加水分解、カゼインの加水分解、41℃での生育、ゼラチンの液化は陽性。インドール、チロシナーゼ、ウレアーゼ、レバン、タバコ過敏反応ジャガイモ腐敗、5%塩化ナトリウムでの生育、スターチの加水分解、硫化水素の産生、デカルボキラーゼは陰性。アラビノース、グルコース、マンノース、リボース、サッカロース、ラクトース、セロビオース、メリビオース、トレファース、マンニトール、ソルビトール、キシロース、イノシトール、グリセロール、ズルシトール、アドニトール、サリシン、ガラクトース、フラクトース、エタノールから酸を産生し、メレジトース、デキストリン、エリスリトール、イヌリン、プロピレングリコール、ラムノース、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシッド、マルトース、ラフィノースから酸を産生しない。サッカロースは菌株により異なった。サッカリン酸、酢酸、クエン酸、ギ酸、フマル酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、乳酸、グルコン酸、馬尿酸、酪酸、ガラクトツロン酸、ミリスチン酸、ソルビン酸、マレイン酸、n-カプリル酸、グルタル酸、ベタイン、L-酒石酸、アルギン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、パルミチン酸、オルニチン、ヘプタン酸、ホモセリン、スベリン酸、アゼライン酸、アジピン酸、シトラコン酸を利用し、レブリン酸、プロピオン酸、アントラニル酸、デカン酸、バリン、シトルリン、 $\beta$ -アラニン、ペラルゴン酸、ピメリン酸、 $\alpha$ -アミルアミン、トリゴネリン、m-ヒドロキシ安息香酸、イタコン酸、イソロイシン、プトレスシン、スベルミン、ニコチン酸、メサコン酸、シュウ酸、パントテン酸、安息香酸、拮草酸、p-アミノ安息香酸、D-酒石酸、葉酸、ブチルアミン、トリプタミン、イタコン酸、2-メ

ルカプトエタノールを利用しない。ブタジオールは菌株により異った。グラジオラス、イリス、ネギ、タマネギ、ニラ、トウモロコシ、イネ、エンバク、シンビジウム、デンドロビウム、バンダ、カトレア、ボワノラ、ピルステケラ、ミルトニア、ファレノプシス、パフィオデイルムに親和性があった。

D-2248~D-2252の細菌学的性質：これらの菌はランの一種デンドロビウムから分離された細菌で、グラム陰性で、1.0~1.2×1.6~2.2 $\mu$ の桿状で1~2本の極鞭毛を有する。OF試験はO、p-B-ヒドロキシ酪酸顆粒を集積し、蛍光色素は産生しない。硝酸塩の還元、カタラーゼ、エスクリンの加水分解、アルブチンの加水分解、レシチナーゼ、綿実油の加水分解、ツィーン80の加水分解、カゼインの加水分解、41℃での生育、ゼラチンの液化は陽性。インドール、チロシナーゼ、ウレアーゼ、レバン、タバコ過敏反応、ジャガイモ腐敗、5%塩化ナトリウムでの生育、スターチの加水分解、硫化水素の産生、デカルボキラーゼは陰性、アラビノース、グルコース、マンノース、リボース、ラクトース、セロビオース、メリビオース、トレファース、マンニトール、ソルビトール、キシロース、イノシトール、グリセロール、ズルシトール、アドニトール、サリシン、ガラクトース、フラクトース、プロピレングリコール、エタノールから酸を産生し、サッカロース、マルトース、ラフィノース、メレジトース、デキストリン、エリスリトール、イヌリン、ラムノース、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシッドから酸を産生しない、メサコン酸、サッカリン酸、レブリン酸、クエン酸、ギ酸、フマル酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、乳酸、グルコン酸、馬尿酸、酪酸、ガラクトツロン酸、ミリスチン酸、ソルビン酸、マレイン酸、アントラニル酸、n-カプリル酸、グルタル酸、バリン、シトルリン、ベタイン、L-酒石酸、D-酒石酸、アル

第4表 抗菌活性

| 供 試 菌 名  | M-2196 | C-0556 | V-0563 | D-2251 | V-2400 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lagenariae</i>   | +      | +      | +++    | +      | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>  | +++    | +++    | +++    | +++    | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>  | +      | +      | +      | +      | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>       | +++    | +++    | +++    | +      | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>      | +++    | +      | +      | +++    | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepaе</i>        | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>allii</i>        | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>     | +      | +++    | +++    | +      | +      |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i>    | +      | +      | +++    | +      | +      |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>    | +      | +      | +++    | +      | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>   | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>garlic</i>       | +++    | +++    | +++    | +      | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lilii</i>        | +++    | +      | +++    | +++    | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> | +      | +      | +      | +      | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>arctii</i>       | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. (Cymbidium)         | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. (Chinese chive)     | +++    | +      | +++    | +++    | +++    |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. (Zygocactus)        | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>Fusarium moniliforme</i>                          | +++    | +      | +++    | +++    | +      |
| <i>Fusarium solani</i>                               | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>Verticillium dahliae</i>                          | +++    | +++    | +++    | +++    | +++    |
| <i>Macrophomina phaseoli</i>                         | +      | -      | +      | +      | +++    |
| <i>Botrytis cinerea</i>                              | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>Alternaria alternata</i>                          | +++    | +++    | +++    | +++    | +++    |
| <i>Pyricularia oryzae</i>                            | +++    | +++    | +++    | +++    | +++    |
| <i>Rhizoctonia solani</i>                            | +      | -      | +      | +      | +      |
| <i>Sclerotium cepivorum</i>                          | +      | +      | +      | +      | +      |
| <i>Colletotrichum cyclamenae</i>                     | +++    | +++    | +++    | +++    | +++    |
| <i>Corticium rolfsii</i>                             | +++    | -      | +++    | +++    | -      |
| <i>Pythium</i> sp.                                   | +      | -      | +      | +      | +++    |

注. PDA 培地で対じ培養した.

ギン酸, アスパラギン酸, グルタミン酸, パルミチン酸, デカン酸,  $\beta$ -アラニン, オルニチン, ヘプタン酸, ホモセリン, スベリン酸, アゼライン酸, ピメリン酸, アジピン酸, トリゴネリン, スベリン酸, イソロイシン, シトラコン酸, ニコチン酸, 安息香酸を利用し, 酢酸, プロピオン酸, ソルビン酸, ペラルゴン酸,  $\alpha$ -アミルアミン, m-ヒドロキシ安息香酸, イタコン酸, ブタジオール, プトレスシン, スベルミン, シュウ酸, パントテン酸, 拮草酸, p

ーアミノ安息香酸, 葉酸, ブチルアミン, トリプタミン, イタコン酸, 2-メルカプトエタノールを利用しない. グラジオラス, イリス, ネギ, タマネギ, ニラ, トウモロコシ, イネ, エンバク, シンビジウム, デンドロビウム, バンダ, カトレア, ボワノラ, ビルスステケラ, ミルトニア, ファレノプシス, パフィオペディルムに親和性があった.

4) 各種病原菌に対する抗菌活性

抗菌活性の強かったM-2196, C-0556, V-0563

第5表 M-2196の抗菌活性に及ぼす温度の影響

| 温度 °C | 抗菌活性 | 温度 °C | 抗菌活性 |
|-------|------|-------|------|
| 4     | —    | 25    | +++  |
| 8     | ±    | 28    | + +  |
| 10    | +    | 30    | + +  |
| 12    | +    | 33    | +    |
| 15    | +    | 35    | +    |
| 18    | + +  | 38    | ±    |
| 20    | + +  | 40    | —    |
| 23    | +++  |       |      |

注. —: 抗菌活性は認められない. ±: 僅かに抗菌活性が認められる. ++: やや強く抗菌活性が認められる. +++: 強く抗菌活性が認められる.

*Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* は PDA 培地で対じ培養した. *Corynebacterium michiganense pv. michiganense* は M-2196 を培養してクロロホルム滅菌後に nutrient agar に浮遊してプレートに流して検定した.

第6表 M-2196の抗菌活性に及ぼす培養時間の影響

| 培養時間培 | 24 | 48 | 72 | 96  | 120 |
|-------|----|----|----|-----|-----|
| 抗菌活性  | —  | +  | ++ | +++ | +++ |

注. —: 抗菌活性は認められない. +: 僅かに抗菌活性は認められる. ++: やや強く抗菌活性が認められる. +++: 強い抗菌活性が認められる.

*Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* と PDA 培地で対じ培養した.

D-2251, V-2400 菌株は抗菌スペクトラムに差は認められたが, *Fusarium* 属菌20病原型, *Verticillium dahliae*, *Macrophomina phaseoli*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Colletotrichum cyclamenae*, *Corticium rolfsii*, *Pythium sp.* に活性が認められた(第4表).

## 2. 抗菌活性の機構

### 1) 抗菌活性に及ぼす培養温度

*Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* に対する M-2196 菌株の抗菌活性は8~38°C 間で認められ, その適温は18~30°C 間であった. また, *Corynebacterium michiganense pv. michiganense* に対する抗菌活性も同様であった.(第5表)

### 2) 抗菌活性に及ぼす培養時間

*Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* に対する

M-2196 菌株の活性は48時間から認められ, 96時間でその活性は安定した(第6表)

### 3) 抗菌活性に及ぼす培地の組成

*Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* に対する M-2196 菌株の活性は PGA 培地で最も高く次いで nutrient agar であり, オルニチン, アルギニン, リシン, グルタミン, ホモセリン, ロイシン, ベタイン, プロリンを0.5%添加してもその活性は変化しなかった. しかし, バリンを0.5%添加すると, その活性は著しく減少した.(第7表)

### 4) 抗菌活性に及ぼす培地の酸度

V-0563 菌株では PH5.5~9.0間は *Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* に対する抗菌活性には殆ど差は認められず, いずれも高かった. D-2251 菌株では PH5.5~9.0間は V-0563 菌株

第7表 M-2196の抗菌活性に及ぼす培地の影響

| 培 地                |          | 抗 菌 活 性 |   |
|--------------------|----------|---------|---|
| オルニチン              | 添加ブイヨン寒天 | +       | + |
| アルギニン              | 添加ブイヨン寒天 | +       | + |
| リシン                | 添加ブイヨン寒天 | +       | + |
| グルタミン              | 添加ブイヨン寒天 | +       | + |
| ホモセリン              | 添加ブイヨン寒天 | +       | + |
| ロイシン               | 添加ブイヨン寒天 | +       | + |
| バリン                | 添加ブイヨン寒天 |         | ± |
| ベタイン               | 添加ブイヨン寒天 | +       | + |
| プロリン               | 添加ブイヨン寒天 | +       | + |
| PPGA (対象)          |          | +       | + |
| nutrient agar (対象) |          | +       | + |

注. 一：抗菌活性は認められない. ±：僅かに抗菌活性が認められる. ++：やや強く抗菌活性が認められる. +++：強く抗菌活性が認められる.  
指示菌として *Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* を用いた.

第8表 抗菌活性に及ぼす培地酸度の影響

| 微生物の系統 | 培地酸度別抗菌活性 (阻止帯mm) |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        | 5.5               | 6.0 | 6.5 | 7.0 | 7.5 | 8.0 | 8.5 | 9.0 |
| V-0563 | 3                 | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   |
| V-2400 | 2                 | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   |
| D-2251 | 4                 | 4   | 4   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   |

注. *Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* と nutrient agar で対じ培養した.

と同様抗菌活性には殆ど差は認められず、いずれも高かった。V-2400菌株では、V-0563及びD-2251菌株に較べて若干抗菌活性は低下したが、PH5.5～9.0間に抗菌活性には殆ど差は認められなかった(第8表)。

また、nutrient brothでの96時間後の細菌密度はV-0563菌株ではPH5.5～8.0間は殆ど差は認められず、いずれも高く、8.5でやや減少し、9.5以上では著しく減少した。D-2251菌株ではPH5.5～6.5間では細菌密度には殆ど差は認められず、いずれも高く、7.0でやや減少し、8.5でさらに減少し、9.5以上では著しく減少した。

V-2400菌株ではPH5.5～7.0間は細菌密度に差は認められず、いずれも高く、7.5でさらに増加し、8.0で再び減少し、8.5以上では著しく減少し、9.0以上では増殖は殆ど認められなかった(第9表)。

5) 抗菌成分の抽出

M-2196菌株の *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* に対する抗菌活性は、酢酸エチル及び活性炭+エタノールの分画で認められ、クロロホルム、ブタノール、ベンゼン、アセトン及びヘキサンの分画では認められなかった(第10表)

抗菌微生物の利用に関する研究

第9表 培養菌数に及ぼす培地酸度の影響

| 微生物の系統 | 培地酸度別菌密度           |                    |                    |                    |                    |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|        | 5.5                | 6.0                | 6.5                | 7.0                | 7.5                |
| V-0563 | $8 \times 10^{12}$ | $8 \times 10^{12}$ | $2 \times 10^{12}$ | $2 \times 10^{12}$ | $1 \times 10^{12}$ |
| V-2400 | $9 \times 10^{11}$ | $2 \times 10^{11}$ | $4 \times 10^{11}$ | $6 \times 10^{11}$ | $1 \times 10^{13}$ |
| D-2251 | $1 \times 10^{13}$ | $1 \times 10^{13}$ | $1 \times 10^{13}$ | $4 \times 10^{12}$ | $5 \times 10^{11}$ |

(第9表の続き)

| 微生物の系統 | 培地酸度別菌密度           |                    |                    |                 |                 |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
|        | 8.0                | 8.5                | 9.0                | 9.5             | 10              |
| V-0563 | $9 \times 10^{11}$ | $1 \times 10^{11}$ | $5 \times 10^{10}$ | $5 \times 10^6$ | $3 \times 10^5$ |
| V-2400 | $3 \times 10^{12}$ | $2 \times 10^4$    | 0                  | 0               | 0               |
| D-2251 | $7 \times 10^{11}$ | $2 \times 10^{10}$ | $3 \times 10^{10}$ | $6 \times 10^4$ | $3 \times 10^4$ |

注. nutrient brothに96時間培養し, nutrient agarで希積分離した.

第10表 抽出溶媒と抗菌活性

| 有機溶媒の種類   | 抗菌活性 |
|-----------|------|
| クロロホルム    | —    |
| ブタノール     | —    |
| ベンゼン      | —    |
| 酢酸エチル     | +    |
| ヘキサン      | —    |
| 活性炭+エタノール | +    |
| アセトン      | —    |
| アセトニトリル   | —    |

注. *corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* を指示菌とした.

M-2196, C-0560, D-2243, B-2258, V-2396菌株の0.22  $\mu$ mフィルターろ過滅菌液は *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* に対して抗菌活性が認められた, しかし, C-0550, C-0619菌株は認められなかった. M-2196菌株の酢酸エチル抽出ベンゼン, アセトン展開によるシリカゲル薄層クロマトグラフィーは蛍光発色

分画に活性が認められた(第11表).

6) 選択培地

M-2196菌株の生育は Ayers の培地に m-ヒドロキシ安息香酸を加えた培地で良好に生育した. これにトロポロンを50ppm 添加すると殆ど生育せず, 25ppm であると良好に生育した. また, デオキシコール酸1000ppm を添加しても良好な生育をしたが, 本培地はデオキシコーレート酸が析出し, M-2196菌株のコロニーが判別しづらかった(第12表).

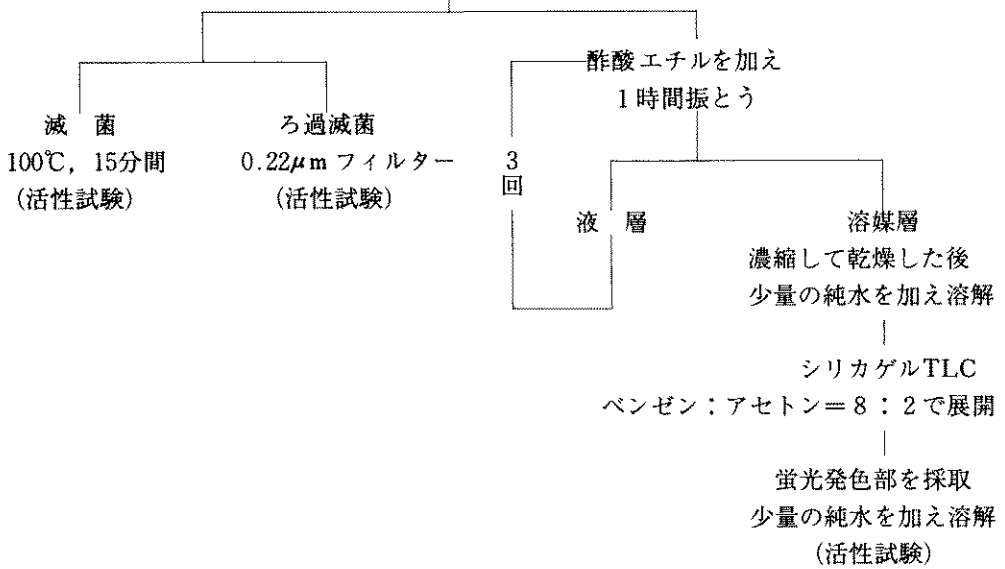
3. 防除試験

1) 鉢試験

(1) ユウガオつる割病

M-2196菌株を直接ユウガオに接種した場合には, 浸漬時間に関係なくまったく効果が認められなかった. 微生物を接種しないニラ及びネギを混植した場合には67~50%の防除効果が認められた. これに較べて, M-2196菌株を接種したニラ及びネギを混植した場合には, 本病を

M-2196の培養液  
Nutrient broth (28℃, 96時間培養)  
(菌体を含む)



第1図 M-2196の抗菌活性成分抽出の実験方法

第11表 M-2196の抗菌活性成分の抽出法試験

| 供試菌株    | 抽出及び滅菌方法         | 活性 |
|---------|------------------|----|
| M-2196  | 溶媒抽出, TLC 分画     | +  |
| (M)2196 | 0.22μm フィルターろ過滅菌 | +  |
| M-2196  | 100℃15分間滅菌       | +  |
| M-2196  | 生菌を含む培養液         | +  |
| C-0550  | 0.22μm フィルターろ過滅菌 | -  |
| V-0560  | 0.22μm フィルターろ過滅菌 | +  |
| C-0619  | 0.22μm フィルターろ過滅菌 | -  |
| D-2243  | 0.22μm フィルターろ過滅菌 | +  |
| B-2258  | 0.22μm フィルターろ過滅菌 | +  |
| V-2396  | 0.22μm フィルターろ過滅菌 | +  |
| 滅菌水     |                  | -  |

注. *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* を指示菌とした。



抗菌微生物の利用に関する研究

第12表 M-2196の選択培地

| Ayers に添加した物質 |             |          |         | 菌の生育 |
|---------------|-------------|----------|---------|------|
| 0.5%          | m-ヒドロキシ安息香酸 | トロポロン    | 25ppm   | +    |
| 0.5%          | m-ヒドロキシ安息香酸 | トロポロン    | 50ppm   | ±    |
| 0.5%          | m-ヒドロキシ安息香酸 | デオキシコール酸 | 1000ppm | +    |

第13表 M-2196を用いたユウガオつる割病の防除

| 処 理 方 法                | 発 病 株 率 (%) |     |     |     |     |
|------------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|
|                        | 15日         | 20日 | 30日 | 60日 | 90日 |
| ユウガオの根に M-2196を 5 分間浸漬 | 100         |     |     |     |     |
| 〃 10 〃                 | 100         |     |     |     |     |
| 〃 30 〃                 | 100         |     |     |     |     |
| 〃 1 時間浸漬               | 100         |     |     |     |     |
| 〃 3 〃                  | 100         |     |     |     |     |
| 〃 10 〃                 | 100         |     |     |     |     |
| 〃 20 〃                 | 100         |     |     |     |     |
| ユウガオにニラ混植              | 0           | 50  | 50  | 50  | 50  |
| ユウガオにネギ混植              | 0           | 33  | 33  | 33  | 33  |
| ユウガオに M-2196を接種したニラ混植  | 0           | 0   | 0   | 0   | 0   |
| ユウガオに M-2196を接種したネギを混植 | 0           |     |     |     |     |
| 病 土                    | 100         |     |     |     |     |
| 滅 菌 土                  | 0           | 0   | 0   | 0   | 0   |

第14表 M-2196を用いたイチゴ萎黄病の防除

| 処 理 方 法                 | 導管及び根褐変 |
|-------------------------|---------|
| 病土にイチゴを定植               | +       |
| イチゴを M-2196に10分間浸根後定植   | +       |
| イチゴを M-2196に30分間浸根後定植   | +       |
| イチゴを M-2196に1 時間浸根後定植   | +       |
| イチゴを M-2196に3 時間浸根後定植   | +       |
| イチゴを M-2196に5 時間浸根後定植   | +       |
| イチゴを M-2196に20時間浸根後定植   | +       |
| ネギに M-2196を接種後イチゴの株元に混植 | -       |
| ニラに M-2196を接種後イチゴの株元に混植 | -       |
| 殺菌土にイチゴを定植              | -       |

注. 6月17日 定植 1区5株 5号鉢植え

第15表 M-2196を用いたトマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>) の防除

| 処 理 方 法                 | 草丈cm | 導管及び根褐変 |
|-------------------------|------|---------|
| 病土にトマトを定植               | 65   | +++     |
| トマトを M-2196に10分間浸根後定植   | 63   | +++     |
| トマトを M-2196に30分間浸根後定植   | 68   | +       |
| トマトを M-2196に1時間浸根後定植    | 68   | +++     |
| トマトを M-2196に3時間浸根後定植    | 68   | ++      |
| トマトを M-2196に5時間浸根後定植    | 67   | +++     |
| トマトを M-2196に20時間浸根後定植   | 68   | +       |
| ネギに M-2196を接種後トマトの株元に混植 | 73   | ±       |
| ニラに M-2196を接種後トマトの株元に混植 | 75   | ±       |
| 殺菌土にトマトを定植              | 74   | —       |

注. 5月27日 定植 1区3株7号鉢植え

完全に防除した(第13表).

(2) イチゴ萎黄病

イチゴ萎黄病の発生は病土(無処理区)においても認められなかった。しかし、維管束の褐変は認められた。

M-2196菌株を直接イチゴに接種した場合には浸漬時間に関係なく維管束の褐変がみられ、まったく効果が認められなかった。これに較べてM-2196菌株を接種したニラ及びネギを混植した場合には維管束に褐変は認められず明らかな防除効果が認められた(第14表)。

(3) トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>)

トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>) の発生は病土(無処理区)においても認められなかった。しかし維管束の褐変は認められた。

M-2196菌株を直接トマトに接種した場合には浸漬時間に関係なく維管束の褐変がみられ、まったく効果が認められなかった。これに較べてM-2196菌株を接種したニラ及びネギを混植した場合には、僅かな維管束の褐変にとどまり明らかな防除効果が認められた(第15表)。

(4) キュウリつる割病

M-2196菌株を直接キュウリに接種した場合には浸漬時間に関係なくまったく効果が認められなかった。これに較べて、M-2196菌株を接

種したニラ及びネギを混植した場合には、本病を完全に防除した(第16表)。

(5) スイカつる割病

病土に直接スイカを植え付けた場合は100%枯死した。これに較べて、M-2196菌株を接種したニラ及びネギを混植した場合には、本病を完全に防除した(第17表)。

(6) ニラ白絹病

ニラを直接病土に植え付けた場合は100%発病したが、これに較べて、M-2196菌株を接種した場合まったく発病せず、本病を完全に防除した(第18表)。

(7) イネいもち病

抗菌微生物を接種せず、イネいもち病菌を接種した場合100%発病した。これに較べて、V-2400, V-0563, D-2251菌株を種子に接種し、播種14日後、いもち病菌を接種した場合とV-2400, V-0563, D-2251菌株を茎葉に接種し、5日後にいもち病菌を接種した場合まったく発病せず、本病を完全に防除した(第19表)。

2) 圃場試験

(1) ユウガオつる割病

対象の一般栽培の区では18.9%発病した。それに較べて、V-0563菌株を接種したニラ及びネギを1株あたり2株混植した場合には、まっ

抗菌微生物の利用に関する研究

第16表 M-2196を用いたキュウリつる割病の防除

| 処 理 方 法                | 発病株率% |
|------------------------|-------|
| キュウリの根に M-2196を 5 分間浸漬 | 100   |
| 〃 10 〃                 | 100   |
| 〃 30 〃                 | 100   |
| 〃 1 時間浸漬               | 100   |
| 〃 3 〃                  | 100   |
| 〃 5 〃                  | 100   |
| 〃 10 〃                 | 100   |
| 〃 20 〃                 | 100   |
| キュウリに M-2196を接種したニラを混植 | 0     |
| キュウリに M-2196を接種したネギを混植 | 0     |
| 病 土                    | 100   |

第17表 M-2196を用いたスイカつる割病の防除

| 処 理 方 法               | 発病株率% |
|-----------------------|-------|
| スイカに M-2196を接種したニラを混植 | 0     |
| スイカに M-2196を接種したネギを混植 | 0     |
| 病 土                   | 100   |

第18表 M-2196を用いたニラ白絹病の防除

| 処 理 方 法          | 発病株率% |
|------------------|-------|
| M-2196を接種したニラを定植 | 0     |
| 無病土にニラ定植         | 0     |
| 病土にニラ定植          | 100   |

第19表 D-2251, V-0563, V-2400を用いたイネいもち病の防除

| 処 理 方 法     | 接種菌密度             | 発病株率% |
|-------------|-------------------|-------|
| D-2251を種子接種 | $10^8$ cells / ml | 0     |
| V-0563を種子接種 | $10^8$ cells / ml | 0     |
| V-2400を種子接種 | $10^8$ cells / ml | 0     |
| D-2251を茎葉接種 | $10^7$ cells / ml | 0     |
| V-0563を茎葉接種 | $10^7$ cells / ml | 0     |
| V-2400を茎葉接種 | $10^7$ cells / ml | 0     |
| 抗菌微生物無接種    |                   | 100   |

注. いもち病菌は抗菌微生物接種後 5 日後に接種した.

栃木県農業試験場研究報告第35号

第20表 V-0563を用いたユウガオつる割病の防除

| 処 理 方 法          | 発病株率% |
|------------------|-------|
| V-0563を接種したネギを混植 | 0     |
| V-0563を接種したニラを混植 | 0     |
| 無 処 理            | 18.9  |

注. 南河内町, 4月23日定植

第21表 トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>) の防除 (接種したニラを1本混植)

| 処 理 方 法         | 試験の場所別発病株率 (%) |       |        |       |        |       |
|-----------------|----------------|-------|--------|-------|--------|-------|
|                 | 野木 I           | 野木 II | 小山 I   | 小山 II | 小山 III | 小山 IV |
| M-2196を接種したニラ混植 | 35.0           | 37.5  | 80.9   | 72.0  | 23.7   | 35.2  |
| ニラだけ混植          | 54.5           | 52.3  | (93.8) | —     | —      | —     |
| 無 処 理           | 61.7           | 78.1  | 100    | 90.3  | 65.2   | 77.8  |

注1. 維管束の褐変を発病とした。( )はKNVFに接木.

注2. 野木 I 及び野木 II は11月12日, 小山 I 及び小山 II は11月29日, 小山 III 及び小山 IV は12月4日に定植した.

第22表 トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>) の防除 (ニラの混植密度)

| 処 理 方 法              | 試験の場所別発病株率 (%) |      |      |        |        |      |       |
|----------------------|----------------|------|------|--------|--------|------|-------|
|                      | 足利             | 宇都宮  | 宇都宮  | 芳賀 I   | 芳賀 II  | 小山 I | 小山 II |
| 無 処 理                | 75             | (46) | 22.2 | (48.3) | (21.7) | 3.7  | 9.2   |
| M-2196を接種したニラを1本混植   | 85             | (25) | —    | (11.7) | (5.0)  | 8.4  | —     |
| M-2196を接種したニラを2本混植   | 20             | (13) | 1.6  | —      | (1.7)  | 0.9  | 3.7   |
| M-2196を接種したニラを3本混植   | 0              | —    | —    | (6.7)  | —      | —    | —     |
| M-2196を接種したタマネギを2本混植 | 55             | (13) | —    | —      | —      | —    | —     |

注1. ( )内の数字は病徴が認められなかったため, 維管束の褐変を発病率(感染率)とし他は病徴の発現した株(枯死株)を発病率とした.

注2. 足利は11月14日, 宇都宮は11月11日, 宇都宮は11月12日, 芳賀 I は11月10日, 芳賀 II は11月10日, 小山 I は11月23日, 小山 II は11月23日に定植した.

たく発病せず、本病を完全に防除した(第20表)。

(2) トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>)

①効果試験; 各実施場所のそれぞれの処理の発病株率は次のとおりであった。すなわち野木Ⅰの試験圃場ではM-2196菌株を接種したニラ混植区で35.0%, ニラのみ混植区で54.5%, 無処理区61.7%, 野木Ⅱの試験圃場ではM-2196菌株を接種したニラ混植区で37.5%, ニラのみ混植区で93.8%, 無処理区78.1%。小山Ⅰの試験圃場ではM-2196菌株を接種したニラ混植区で80.9%, ニラのみ混植区で52.3%, 無処理区100%。小山Ⅱの試験圃場ではM-2196菌株を接種したニラ混植区で72.0%, 無処理区90.3%, 小山Ⅲの試験圃場ではM-2196菌株を接種したニラ混植区で23.7%, 無処理区65.2%, 小山Ⅳの試験圃場ではM-2196菌株を接種したニラ混植区で35.2%, 無処理区77.8%であった(第21表)。

②混植密度試験; 試験を実施した7圃場での発病株率は次のようであった。すなわち足利の試験圃では、M-2196菌株を接種したニラを1株混植区で85%, ニラを2株混植区で20%, ニラを3本混植区で0%, 無処理区で75%, 宇時宮Ⅰの試験圃ではM-2196菌株を接種したニラを1株混植区で25%, ニラを2株混植区で13%, 無処理区で46%。宇都宮Ⅱの試験圃ではM-2196菌株を接種したニラを1株混植区で1.6%, 無処理区で48.3%。芳賀Ⅰの試験圃ではM-2196菌株を接種したニラを1株混植区で11.7%, ニラを2株混植区で6.7%, 無処理区で22.2%。芳賀Ⅱの試験圃ではM-2196菌株を接種したニラを1株混植区で5.0%, ニラを2株混植区で1.7%, 無処理区で21.7%。小山Ⅰの試験圃ではM-2196菌株を接種したニラを1株混植区で8.4%, ニラを2株混植区で0.9%, 無処理区で3.7%。小山Ⅱの試験圃ではM-2196菌株を接種したニラを2株混植区で3.7%, 無処理区で9.2%であった(第22表)

(3) イチゴ萎黄病

処理Ⅰの採穂床の土壤消毒, M-2196菌株を接種したネギ1本混植及び育苗床の土壤消毒, M-2196菌株を接種したネギ3本混植区では発病株率70.4%, 処理Ⅱの採穂床の土壤消毒, M-2196菌株を接種したネギ2本混植及び育苗床の土壤消毒, M-2196菌株を接種したネギ4本混植区では75.5%, 処理Ⅲの採穂床及び育苗床の土壤消毒のみの区では62.5%, 処理Ⅳの採穂床のM-2196菌株を採種したネギ1本混植及び育苗床の土壤消毒, M-2196菌株を接種したネギ3本混植区では74.1%, 処理Ⅴの採穂床のM-2196菌株を接種したネギ2本混植及び育苗床の土壤消毒, M-2196菌株を接種したネギ4本混植区では74.5%, 育苗床の土壤消毒区では73.1%の発病株率であり, 防除効果は認められなかった(第23表)。

(4) ニラ白絹病

M-2196菌株を接種した区の発病株率は5.5%対象区では25.0%であった。なお、微生物を接種したことによる薬害, 生育障害等は認められなかった(第24表)

(5) コンニャク白絹病

M-2196菌株を接種したエンバクを混播した区では0%, 対象のワラマルチ区では6%の発病株率であった(第25表)。

(6) コンニャク乾腐病

M-2196菌株を接種したエンバクを混播及びパンソイル土壤混和区では12.7%, 無接種のエンバクを混播及びパンソイル土壤混和区では12.3%, 無接種のエンバク混播区では31.7%の発病塊茎率であった(第26表)。

また, M-2196菌株を接種したエンバクを混播区では6.8%, 無接種のエンバク混播区では6.1%, 対象のワラマルチ区では12.5%の発病塊茎率であった(第27表)。

(7) トマト半身萎ちょう病

3月5日での発病株率は, M-2196菌株を接種したニラ1株混植及び土壤消毒区では11.7%,

第23表 M-2196によるイチゴ萎黄病の防除

| 処理  | 採 苗 床 防 除 |            |            | 育 苗 床 防 除 |            |            | 発病株率 (%) |
|-----|-----------|------------|------------|-----------|------------|------------|----------|
|     | 土壌消毒      | 接種したネギ1本混植 | 接種したネギ2本混植 | 土壌消毒      | 接種したネギ3本混植 | 接種したネギ4本混植 |          |
| I   | ○         | ○          |            | ○         | ○          |            | 70.4     |
| II  | ○         |            | ○          | ○         |            | ○          | 75.5     |
| III | ○         |            |            | ○         |            |            | 62.5     |
| IV  |           | ○          |            | ○         | ○          |            | 74.1     |
| V   |           |            | ○          | ○         |            | ○          | 74.5     |
| VI  |           |            |            | ○         |            |            | 73.1     |

注. 足利市, 5月22日親株植え付け, 7月27日仮植, 8月25日調査

第24表 M-2196を用いたニラ白絹病の防除

| 処 理 方 法          | 発病株率% |
|------------------|-------|
| M-2196を接種したニラを定植 | 5.5   |
| 対 象              | 25.0  |

注. 鹿沼市

M-2196菌株を接種したニラ3株混植及び土壌消毒区では8.7%, 土壌消毒のみの区では16.7%であった。しかし, 3月22日での発病株率は, M-2196菌株を接種したニラ1株混植及び土壌消毒区では38.3%, M-2196菌株を接種したニラ3株混植及び土壌消毒区では30.0%, 土壌消毒のみの区では35.0%と発病率は増加した。

また, 土壌消毒をしなかった区での発病株率は, M-2196菌株を接種したニラ1株混植区では40.0%, M-2196菌株を接種したニラ3株混植区では25.5%, 無処理区では45.0%であった。しかし, 3月22日での発病株率は, M-2196菌株を接種したニラ1株混植区では56.7%, M-2196菌株を接種したニラ3株混植区では50.0%, 無処理区では65.0%と発病率は増加した(第28表)。

(8) キュウリつる割病

M-2196菌株を接種したネギ2本混植区では2.0%, 対象の自根区では14.0%の発病率であった(第29表)。

(9) トマトかいよう病の防除

雨よけ栽培でM-2196菌株をトマト茎葉に接

種した区では4.3%, 雨よけ栽培の対象区では10.7%の発病率であった。また, 露地栽培でM-2196菌株をトマト茎葉に接種した区では31.2%, 露地栽培の対象区では28.5%発病率であった(第30表)。また, 雨よけ露地の両栽培とも無接種区に発病は認められなかった。

IV 考 察

抗菌微生物による土壌病害の防除は世界各国で色々試みられているが, 実験室の効果が圃場では殆ど発揮されず, 実用性が認められない現状にある。従来, ①抗菌微生物を直接土壌中に投入する方法, ②抗菌微生物を対象作物に直接接種する方法, ③土壌改良剤等を用いて土壌中に生息する抗菌微生物を活性化させる方法が試みられていた。しかし, これら方法は, 自然汚染土壌を用いた場合は有効性が殆ど認められなかったり, 場合によっては, 他の病害の発生を助長することもある。また, 対象作物が限定されたり, 対象作物ごとに抗菌微生物を選抜しなければならぬ等の問題点があった。

抗菌微生物の利用に関する研究

第25表 M-2196を用いたコンニャク白絹病の防除

| 処 理 方 法               | 発病株率% |
|-----------------------|-------|
| M-2196を接種したエンバクを畦間に混植 | 0     |
| 慣行栽培 (ワラマルチ)          | 6     |

注. 栗野町.

第26表 M-2196を用いたコンニャク乾腐病の防除

| 処 理 方 法                       | 発病塊莖率% |
|-------------------------------|--------|
| M-2196を接種したエンバクを混播及びバンソイル土壌混和 | 12.7   |
| 無接種のエンバクを混播及びバンソイル土壌混和        | 12.3   |
| 無接種のエンバクを混播                   | 31.7   |

注. 栗野町, 6月2日植え付け, 11月9日調査.

第27表 M-2196を用いたコンニャク乾腐病の防除

| 処 理 方 法            | 発病塊莖率% |
|--------------------|--------|
| M-2196を接種したエンバクを混播 | 6.8    |
| 無接種のエンバクを混播        | 6.1    |
| 慣行栽培 (ワラマルチ)       | 12.5   |

注. 市貝町, 5月29日植え付け, 11月9日調査.

第28表 M-2196を用いたトマト半身萎ちょう病の防除

| 土壌消毒<br>の有無 | M-2196を接<br>種したニラ<br>の混植密度 | 発病株率の推移 % |       |        |       |        |              |
|-------------|----------------------------|-----------|-------|--------|-------|--------|--------------|
|             |                            | 1 / 22    | 2 / 5 | 2 / 20 | 3 / 5 | 3 / 22 | 6 / 30       |
| 有           | 1株混植                       | 0.0       | 1.7   | 6.7    | 11.7  | 38.3   | (61.7) 6.6*  |
| 有           | 3株混植                       | 0.0       | 0.0   | 1.7    | 8.7   | 30.0   | (35.0) 6.6*  |
| 有           | 無                          | 0.0       | 3.3   | 13.3   | 16.7  | 35.0   | (63.3) 11.7* |
| 無           | 1株混植                       | 1.7       | 18.3  | 28.3   | 40.0  | 56.7   | (90.0) 11.7* |
| 無           | 3株混植                       | 0.0       | 11.6  | 20.0   | 25.5  | 50.0   | (90.0) 3.3*  |
| 無           | 無                          | 1.7       | 13.3  | 35.0   | 45.0  | 65.0   | (100) 3.3*   |

注. ( )は導管の褐変の認められた株率, ( )外の値は, 枯死株率. 土壌消毒; クロールピクリン30kg / 10a. 試験場所; 上河内町, 10月31日定植.

第29表 M-2196を用いたキュウリつる割病の防除

| 処 理 方 法          | 発病株率% |
|------------------|-------|
| M-2196を接種したネギを混植 | 2.0   |
| 対 照 (自根)         | 14.0  |

注. 小山市.

第30表 M-2196を用いたトマトかいよう病の防除

| 栽培方法 | 処 理 方 法             | 果実の発病率% | 導管及び根褐変 |
|------|---------------------|---------|---------|
| 雨よけ  | M-2196を接種後かいよう病菌を接種 | 4.3     | —       |
|      | かいよう病菌を接種           | 10.7    | +++     |
|      | 無 接 種               | 0       | —       |
| 露 地  | M-2196を接種後かいよう病菌を接種 | 31.2    | —       |
|      | かいよう病菌を接種           | 28.5    | +++     |
|      | 無 接 種               | 0       | —       |

注. M-2196は5月24日及び6月6日に接種, かいよう病菌6月8日に接種  
果実の発病率は7月9日, 7月19日及び8月3日に調査したものの平均値.

そこで本研究では, 抗菌微生物を土壤中で安定する方法として, 日本や中国で昔から行われていた, 混植, 輪植, 間作の伝承技術を応用して, 抗菌微生物を定着性のある植物に接種し, この植物を対象作物の根圏に混植することで, 抗菌微生物の土壤中での安定化をはかり, 対象作物を限定せず, 防除効果を安定させる方法を検討した. 以下, 本研究で得られた成果をもとに若干の考察を加えたい.

土壤中で微生物を安定させる方法として, ユウガオ栽培で伝承的に行われているネギ属植物の混植を用いることを考えた. そこで微生物の選抜には次の条件で行った. ①ネギ属植物に親和性があり, 同属植物の鱗茎や根で増殖する. ②病原性がないか, もしくは弱病原性である. ③ユウガオつる割病菌に抗菌活性がある.

その結果, 抗菌活性のある菌株として, ネギの根や鱗茎からは BC1~BC15, A-2243~A-2245, B-83の細菌, ラン類からは (C-0556~C-

0557, V-0560~V-0569, M-2196, V-2396~V-2405, D-2248~D-2252, B-2258~B-2264). サトイモ科観葉植物からは (Z-2056~Z-2064, A-2354~A-2361) が選抜された. これら抗菌活性の認められた細菌の中で, ネギに対する親和性を示す菌株は認められたが, M-2196, D-2253, B-2258~B-2267以外の菌株は弱い病原性があった. M-2196菌株はニラに親和性があり, しかも植物にはほとんど病原性のない菌と考えられたため, 本菌をその後の実験の中心菌株として用いることとした. また, D-2251, V-0563, V-2400, C-0556菌株は弱い病原性があり, 安全性に若干の問題点があったが, 抗菌活性が極めて強いため, 一部の実験に用いることとした. 選抜された微生物は細菌学的性質から, D-2251, V-0563, V-2400, C-0556菌株は *Pseudomonas gladioli* と同定された<sup>5,19)</sup>. M-2196菌株は *P. cepacia* 及び *P. gladioli* 双方に類似するが, ピメリン酸,  $\alpha$ -アミルアミン, アジピン酸, ト



リゴネリン, スペリン酸, m-ヒドロキシ安息香酸, イソロイシン, ブタジオール, シトラコン酸, プトレスシン, D-酒石酸を利用し, ブチルアミン, トリプタミン, メサコン酸, スベルミンを利用しない点から *Pseudomonas cepacia* と同定するのが適当と考えられた<sup>5-19)</sup>。しかし, 同定については, 細菌学的性質のほかさらに脂肪酸組成, DNAのホモロジー, 抗性物質の感受性等を検討したうえで決めたい。

M-2196, D-2251, V-0563, V-2400, C-0556 菌株は抗菌スペクトラムに差は認められたが, *Fusarium* 属菌20病原型, *Verticillium dahliae*, *Macrophomina phaseoli*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Colletotrichum cyclamenae*, *Corticium rolfsii*, *Pythium sp.* に抗菌活性が認められたことからこれら病原菌によって生じる病害の防除に用いられる可能性が示唆された。

次にM-2196菌株の抗菌活性に及ぼす諸条件について検討した。まず温度, 培養時間及び培地の組成については *Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae* を指示菌として検討した。温度との関係では8~38℃間で抗菌活性が認められ, その適温は18~30℃間であった。培養時間との関係では48時間から抗菌活性が認められ, 96時間でその活性は安定した。培地の組成との関係ではPPGA培地で抗菌活性が最も高く, 次いでnutrient agarであり, バタイン, オルニチン, アルギニン, リシン, グルタミン, ホモセリン, ロイシン, プロリンを0.5%添加してもその活性は変化しなかった。しかし, バリンを0.5%添加すると, その活性は著しく減少した。この現象はバリンが抗菌成分の産生にマイナスに働くことを示すものであり, 抗菌成分の一つにペプチドがあることが推察された。

培地の酸度との関係ではV-0563, D-2251, V-2400菌株について *Fusarium oxysporum f. sp.*

*lagenariae* を指示菌として検討した。その結果, 供試した菌株はいずれもPH5.5~9.0間では抗菌活性に差は認められなかった。しかし, 菌の密度はPH8.5以上ではいずれの菌株とも減少した, このことから, 抗菌活性は菌の密度とは直接関係ないものと思われた。

M-2196, C-0560, D-2243, B-2258, V-2396菌の0.22 $\mu$ mフィルターろ過滅菌は *Corynebacterium michiganense pv. michiganense* に対して抗菌活性が認められたことから, 抗菌活性は物質によることが明らかになったためM-2196菌株の抗菌成分の抽出を試みた。その結果酢酸エチル抽出ベンゼン, アセトン展開によるシリカゲル薄層クロマトグラフィーの蛍光発色分画に活性が認められ, 抗菌活性物質の一つが純化され本物質はピロルニトルリンと同定された。しかし, 本抗菌物質はエンド型であるため, 菌体外に代謝されるエクソ型の抗菌物質についてはさらに検討する必要がある。

M-2196菌株の防除試験の際, 本微生物を追跡調査するための選択培地について検討し, Ayersの培地に炭素源としてm-ヒドロキシ安息香酸を0.5%, 抗菌物質としてトロポロンを25ppmを添加した培地が選択性が良好なため, その後の実験の選択培地とした。

次にM-2196菌株を接種したネギ属植物の混植による土壌病害等の防除法を鉢試験によって検討した。まず, ユウガオつる割病の防除ではM-2196菌株を直接ユウガオに接種した場合には, 浸漬時間に関係なくまったく効果が認められなかったが, これは本微生物がユウガオに親和性がないため定着せず, 急激に密度が低下するためと思われた。微生物を接種しないニラ及びネギを混植した場合には67~45%の防除効果が認められたが, これはネギ属植物が持っているアリシン等の抗菌成分によるものと考えられた。これに較べて, M-2196を接種したニラ及びネギを混植した場合には, 本病は完全に防除さ

れ、伝承技術のユウガオとネギの混植はその一つに抗菌微生物が関与していることが明らかになった。

イチゴ萎黄病、トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>) 及びキュウリつる割病の防除では、M-2196菌株を直接イチゴ、トマト及びキュウリに接種した場合には、浸漬時間に関係なく維管束の褐変がみられ、まったく効果が認められなかったが、これは本微生物がユウガオの場合と同様イチゴ、トマト及びキュウリに親和性がないためと考えられる。これに較べて、M-2196菌株を接種したニラ及びネギを混植した場合には、僅かに維管束が褐変したが、明らかな防除効果が認められた。また、スイカつる割病においても同様に本病を完全に防除した。このことからM-2196菌株を接種したネギ属植物の混植でイチゴ萎黄病、トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>)、キュウリつる割病及びスイカつる割病が防除されることが明らかとなった。

M-2196菌株がニラに親和性を有することからニラ自身の病害について検討した。その結果、ニラ白絹病の防除では、前5者の場合と処理方法がことなるが、ニラにM-2196菌株を接種した場合本病がまったく発病せず、M-2196菌株の直接の接種によってニラ自身の病害も防除されることが明らかになった。

イネいもち病の防除では、前6者の場合と処理及び微生物の種類が異なるが、V-2400、V-0563、D-2251菌株がイネに親和性を有することからイネの地上部の病害について検討した。その結果、V-2400、V-0563、D-2251菌株を種子に接種し、播種14日後、いもち病菌を接種した場合と本菌を茎葉に接種し、5日後にいもち病菌を接種した場合まったく発病せず、M-2196菌株以外の抗菌微生物であるV-2400、V-0563、D-2251菌株の直接の接種によっても防除されることが明らかとなった。このように、ニラやイネのように抗菌微生物に親和性のある植物の場合

は微生物の直接の接種によって防除されることが考えられた。

次に鉢試験で防除効果の認められた植物の防除について、一般栽培圃場を用いて検討した。

ユウガオつる割病の防除では一般栽培の区で18.9%発病し、それに較べて、V-0563菌株を接種したニラ及びネギを1株あたり2株混植した場合には、まったく発病せず、鉢試験と同様本病が防除され、ユウガオつる割病の場合には一般栽培圃場においても十分実用可能な防除法と考えられた。

トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>) の防除は、効果試験では、試験圃ごとに防除効果に差がみられたが、M-2196菌株を接種したニラを混植した場合いずれの圃場においても明らかな防除効果が認められた。また、混植密度の試験では、M-2196菌株を接種したニラの混植密度を1、2、3株と上げていくと、それに伴って防除効果も上がった。とくに足利の場合、M-2196菌株を接種したニラを3株混植した場合本病を完全に防除した。このように、トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>) はM-2196菌株を接種したニラの混植で防除され、一般栽培圃場においても、対象作物の根圏を混植植物の根が十分にカバーすることで実用可能な防除法と考えられた。

イチゴ萎黄病の防除は、M-2196菌株を接種したネギを採穂床に混植、採穂床の土壤消毒、M-2196菌株を接種したネギを育苗床に混植、育苗床の土壤消毒及びそれぞれの組合せのいずれもまったく効果が認められなかった。しかし、鉢試験の場合は明らかな防除効果がみられるため一般栽培圃場での本方法による防除の可否についてはさらに検討する必要がある。

ニラ白絹病の防除は、M-2196菌株を接種した場合鉢試験と同様高い防除効果が認められ、本菌はニラ自身の病害にも一般栽培圃場において十分実用可能な防除法と考えられた。

コンニャク白絹病及び乾腐病の防除は、M-

2196菌株がエンバクに親和性を有することから、混植植物をネギ属植物からエンバクに替えて検討した。その結果、M-2196菌株を接種したエンバクを混播した場合、いずれも高い防除効果が認められ、一般栽培圃においても十分実用可能な防除法と考えられた。しかし、乾腐病の場合無接種のエンバクを混播した場合においても高い防除効果が見られたため、抗菌微生物とエンバク自身の防除効果については今後検討する必要がある。

トマト半身萎ちょう病の防除は、3月5日での発病株率は、M-2196菌株を接種したニラ1株混植及び土壤消毒区では11.7%、M-2196菌株を接種したニラ3株混植及び土壤消毒区では8.7%、土壤消毒のみの区では16.7%であった。しかし、3月22日での発病株率は、M-2196菌株を接種したニラ1株混植及び土壤消毒区では38.3%、M-2196菌株を接種したニラ3株混植及び土壤消毒区では30.0%、土壤消毒のみの区では35.0%と発病率は増加した。また、土壤消毒をしなかった区での発病株率は、M-2196菌株を接種したニラ1株混植区では40.0%、M-2196菌株を接種したニラ3株混植区では25.5%、無処理区では45.0%であった。しかし、3月22日での発病株率は、M-2196菌株を接種したニラ1株混植区では56.7%、M-2196菌株を接種したニラ3株混植区では50.0%、無処理区では65.0%と発病率は増加した。このようなことから、M-2196菌株を接種したニラを3株混植すれば土壤消毒と同等の効果が期待されるが、この効果は発病遅延効果と考えられる。

キュウリつる割病の防除は、M-2196菌株と接種したネギを2本混植した場合、鉢試験と同様高い防除効果が認められ、一般栽培圃においても十分実用可能な防除法と考えられた。

トマトかいよう病の防除は、雨よけ栽培でM-2196菌株をトマト茎葉に直接接種した場合高い効果が認められ、雨よけを併用すれば一般栽培圃においても十分実用可能な防除法と考えられた。

本抗菌微生物を用い、本方法で土壤病害を防除する場合には、対象作物の根圏とネギ属植物等の混植植物の根圏が一致することが重要と考えられる。すなわち、本抗菌微生物はネギ属植物等の親和性植物の根圏では増殖することができ、この結果抗菌微生物が産生する抗菌成分が菌の増殖に伴って土壤中に拡散され、これが病原菌に働き防除効果を発揮するものと考えられる。しかし、親和性植物以外の植物あるいは土壤中では増殖することができないため、親和性植物の根圏から対象作物が出た場合には防除効果が期待できなくなるとされる。また、混植によって土壤病害を防除する本方法は、使用する抗菌微生物の菌株がV-2400、V-0563、D-2251のように替わったり、微生物の種類が替わっても、その微生物が親和性を有する植物を用いれば応用できるものと考えられる。

以上のように本研究は、栃木県内のユウガオ栽培で伝行的に行われているネギ属植物の混植栽培技術を応用することを考え、ネギ属植物に親和性のある抗菌微生物としてM-2196菌株を選抜した。本微生物をネギ属植物等に接種して、これを対象植物の根圏に混植することで土壤中での安定化を計り、*Fusarium*属菌等によって生ずる土壤病害の防除法を開発したものである。本研究のヒントとなった混植、輪作、間作と云った伝承技術は他にもあろうと思われ、今後このような研究の参考になれば幸いである。

## V 摘 要

- ①ネギの根や鱗茎からはBC1～BC15、A-2243～A-2245、B-85の細菌が分離され、その他ラン類から分離したC-0556～C-0557、V-0560～V-0569、M-2196、V-2396～V-2404、D-2248～D-2252、B-2258～B-2264及びサトイモ科観葉植物から分離したZ-2056～Z-

- 2064, A-2354, A-2361で抗菌活性が認められた。
- ②ネギ属植物に親和性があり、しかも植物にはほとんど病原性のない菌として M-2196 菌株を選抜した。
- ③抗菌微生物のうち BC 1 ~ BC 15 菌株は *Pseudomonas* sp. B-83 菌株は *P. cepacia*, C-0556, V-0560 ~ V-0569, V-2396 ~ V-2405, D-2248 ~ D-2252, B-2258 ~ B-2264 菌株は *P. gladioli*, Z-2056 ~ Z-2065, A-2354 ~ A-2361 菌株は *Xanthomonas campestris* と同定された。M-2196 菌株は *P. cepacia* 及び *P. gladioli* 双方に類似した。
- ④M-2196, C-0556, V-0563, D-2251, V-2400 菌株は *Fusarium* 属菌 20 病原型, *Verticillium dahliae*, *Macrophomina phaseoli*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Colletotrichum cyclamenae*, *Corticium rolfsii*, *Pythium* sp. に活性が認められた。
- ⑤ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lagenariae* に対する M-2196 菌株の抗菌活性は 8 ~ 38°C 間で認められ、その適温は 18 ~ 30°C 間であり、その活性は 48 時間から認められ、96 時間でその活性は安定し、培地は PPGA 培地で最も高く、次いで nutrient agar であり、オルニチン、アルギニン、リシン、グルタミン、ホモセリン、ロイシン、プロリン、ベタインを 0.5% 添加してもその活性は変化しなかった。しかし、バリンを 0.5% 添加すると、その活性は著しく減少した。
- ⑥ V-0563, D-2251, V-2400 菌株は PH 5.5 ~ 9.0 間で抗菌活性には殆ど差は認められなかった。しかし、菌密度は PH が高くなると減少した。
- ⑦ M-2196 菌株の *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* に対する抗菌活性は、酢酸エチル及び活性炭 + エタノールの分画で認められ、クロロホルム、ブタノール、ベンゼン、アセトン及びヘキサンの分画では認められなかった。
- ⑧ M-2196, C-0560, D-2243, B-2258, V-2396 菌株の 0.22  $\mu$ m フィルターろ過滅菌液には抗菌活性が認められ、M-2196 の酢酸エチル抽出ベンゼン、アセトン展開によるシリカゲル薄層クロマトグラフィーは蛍光発色分画に活性が認められた、これはピロルニトルリンと同定された。
- ⑨ Ayers の培地に m-ヒドロキシ安息香酸 0.5%, トロポロンを 25 ppm 添加した M-2196 菌株の選択培地を開発した。
- ⑩ M-2196 菌株をニラ及びネギに接種し、これを混植する防除法の鉢試験で、ユウガオつる割病、イチゴ萎黄病、トマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>)、キュウリつる割病、スイカつる割病が防除された。
- ⑪ M-2196 菌株を直接接種する鉢試験でニラ白絹病が防除された。
- ⑫ V-2400, V-0563, D-2251 菌株を直接接種する方法の鉢試験でイネいもち病が防除された。
- ⑬ M-2196 菌株をニラ及びネギに接種し、これを混植する防除法の圃場試験で、ユウガオつる割病が防除された。
- ⑭ M-2196 菌株をニラに接種し、これを混植する防除法の圃場試験でトマト萎ちょう病 (J<sub>3</sub>) が防除された。この効果は混植密度が上がるのと防除効果も上がった。
- ⑮ M-2196 菌株をネギに接種し、これを混植する防除法の圃場試験でイチゴ萎黄病の防除効果は認められなかった。
- ⑯ M-2196 菌株を直接接種する方法の圃場試験でニラ白絹病が防除された。
- ⑰ M-2196 菌株を接種したエンバクを混播する方法の圃場試験でコンニャク白絹病及び乾腐病が防除された。
- ⑱ M-2196 菌株をニラに接種し、これを混植す

る防除法の圃場試験でトマト半身萎ちょう病が防除された。この効果は発病遅延効果であった。

⑲M-2196菌株をネギに接種し、これを混植する防除法の圃場試験でキュウリつる割病が防除された。

⑳M-2196菌株をトマト茎葉に接種し、雨よけ栽培のと併用する方法の圃場試験でトマトかいよう病が防除された。

本研究を行うにあたり、格別なる御指導を賜った東京大学農学部植物病理学研究室教授土居養二博士（現玉川大学農学部教授）、同助教授山下修一博士に心から感謝の意を表する次第である。

また、栃木県病害虫防除所長尾田啓一氏はじめ、同病害虫防除所、農業試験場病理昆虫部長手塚徳弥氏（現農業大学校主任教授）はじめ、同病理昆虫部、同生物工学部長米内貞夫氏はじめ、同生物工学部の皆様には有益な御助言、御指導を賜った。

さらに、宇都宮、鹿沼、今市、市貝、栃木、小山、氏家及び足利農業改善普及所の皆様、県内各地の生産者の皆様には実験圃場の提供や現地の案内、実験材料の収集に便宜を賜った。

ここに記して、各位に厚く感謝の意を表する次第である。

## VI 引用文献

1. 有江力・木嶋利男・難波成任・山下修一・土居養二（1986）. 日植病報. 52: 542.
2. 有江力・難波成任・山下修一・土居養二・木嶋利男（1987）. 日植病報. 53: 531-539
3. 有江力・難波成任・山下修一・土居養二・木嶋利男（1988）. 日植病報. 54: 128
4. Ayers, S.H., Rupp, P. and Jphnon, W.T. (1919). A study of the alkali-forming bacteria found in milk. Bull. U.S. Dep. Agric. 782: 1-38
5. Ballard W.R., Palleroni J.N., Doudroff M. and Stanier Y.R. (1970) Taxonomy of the aerobic Pseudomonas; Pseudomonas cepacia, P. marginata, P. alliicola and P. caryophylli. J. Gen. Microbiol. 60: 199-214.
6. Cowan S.T. (1974). Manual for the identification of medical bacteria. Cam. Uni. Press., 2nd ed. 22-122.
7. 木嶋利男（1987）. 現代農業. 66: 275-283.
8. 木嶋利男（1987）. 現代農業. 66: 216-221.
9. 木嶋利男（1987）. 植物防疫. 41: 129-133.
10. 木嶋利男（1987）. 現代農業. 4: 270
11. 木嶋利男（1987）. 植物細菌病談話会講演要旨集. 日植病理学会. 32-39.
21. 木嶋利男（1987）. 先端技術に関する講演会とシンポジウム記録集. 宇都宮大学. 110-117.
13. 木嶋利男（1987）. 今月の農業. 31: 88-92.
14. 木嶋利男（1988）. ハイテク農業情報. 化学工業日報. 218-219.
15. 木嶋利男（1988）. 現代農業. 670-273.
16. 木嶋利男（1988）. 化学と生物. 26: 284-285
17. 木嶋利男・手塚徳弥・有江力・難波成任・山下修一・土居養二（1986）日植病報. 52: 542.
18. 木嶋利男・木村栄・相田竜太・石原良行（1988）日植病報. 54: 70.
19. Palleroni. N.J. (1984). Genus of Pseudomonas. In Bergey's manual of systematic bacteriology. vol.1. Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 141-199.
20. Ryu E. (1940). A simple method of differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. Kitasato Arch Exp. Med. 17: 58-63.

Biological control of soil-borne diseases by mixed-cropping with associate  
crops inoculated with *Pseudomonas gladioli* strain M-2196

Toshio KIJIMA, Tsutomu ARIE, Sakae KIMURA, Nagatoshi MINEGISHI,  
Nobuhiro TEZUKA, Kouichi HASHIDA, and Takashi HUKUDA

Summary

Soil-borne diseases caused by *Fusarium* spp. are serious over successive years in several vegetable crops in Japan, including for example bottle gourd and tomato. Bottle gourd, a *cucurbitaceae* plant, is used for root stock and food.

The plant has been cultivated for 300 years, and is planted on 2,500ha. annually in Tochigi prefecture. *Fusarium* wilt of bottle gourd caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* is serious, and also wide-spread in Tochigi Pref. In many commercial fields of Tochigi prefecture, welsh onion, a *Allium fistulosum* has been mixed-cropped, customarily, as an associated crop with bottle gourd. These commercial fields showed little occurrence of the disease in spite of continuous cropping. In these case, it is suggested that there is some relationship between mixed-cropping and disease suppression. So, we studied the possible role of microorganisms associated with welsh onion, especially bacteria.

*Pseudomonas gladioli* was isolated frequently in association with roots of welsh onion. These bacterial isolates showed antifungal activity to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* on nutrient agar plates. But they were usually pathogenic to welsh onion bulbs.

For practical use, beneficial isolates, of the bacterium that strongly antagonized *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae*, should not be pathogenic to welsh onion. We screened a large number of isolates in search of nonpathogenic strains. After screening more than 300 isolates, we selected *Pseudomonas gladioli* strain M-2196 for practical use.

Strain M-2196, had strong antifungal activity, colonized welsh onion roots but was not pathogenic to welsh onion. An isolate that colonizes but is not pathogenic, we say, has good affinity. Strain M-2196 has no pathogenicity to many kinds of plants, but can multiply on *Allium* spp. In other words, This isolate good affinity to welsh onion and other *Allium* spp. by our definition.

Strain M-2196 was investigated for antifungal activity against several *Fusarium* species, and many *Fusarium oxysporum* forma specialis.

Based on antifungal activity, strain M-2196 was antagonistic to 3 species of *Fusarium*, and also was antagonistic to 24 forma specialis of *Fusarium oxysporum* and 3 specialis of *Fusarium solani*.

We next tried strain M-2196 as abiological control agent against *Fusarium* wilt of bottle gourd. We cultured strain M-2196 on nutrient broth and dipped the roots of welsh onion and chinese chive in the culture suspension for 5 min. And mixed-cropped them as companion crops with bottletgourd infested soil. With this treatment, occurrence of *Fusarium* wilt was suppressed in pot and commercial field tests. Only 25% of the plants were diseased in the mixed-cropping with chinese chive inoculated with M-2196. The control is 100%.

And also, we tried to apply the technique to other soil-borne *Fusarium* diseases. We tested M-2196 as a control for root and crown rot of tomato which is a serious disease problem under greenhouse in many fields in Japan, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* J<sub>3</sub>. Strain M-2196 was cultured on nutrient broth up to 108 CFU/ml in the laboratory and diluted to 107 CFU/ml in the field. Then, roots of chinese chive were dipped in the suspension for about 5 min. We selected chinese chive as an associated crop, because the root zone of chinese chive overlaps with that of tomato. Commercial field tests were carried out in Oyama, Utsunomiya and other cities in Tochigi prefecture in 1986~1988. The treated tomatoes are non-symptomatic but non-treated ones are wilted or dead. The non-treated tomatoes showed symptoms of root and crown rot, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* J<sub>3</sub> was isolated from the phloem. On the other hand, from the phloem of mixed-cropped and non-symptomatic tomatoes, no *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* J<sub>3</sub> was isolated. On the commercial field of Oyama city, diseases appearance was 23.7% in the mixed-cropping with chinese chive inoculated with strain M-2196, while the non-treated control was 65.2%. At Ashikaga city, in the mixed-cropping with chinese chive inoculated with strain M-2196, disease was 20%, while the non-treated control was 75%. The other data were similar result.

We also tested M-2196 as a control for the *Fusarium* wilt of Strawberry, *Fusarium* wilt of Cucumber and Dry rot of Konnyaku. The results were similar to Crown and root rot of Tomato.

In order to examine the movement of strain M-2196 along roots of chinese chive, we observed the treated roots by scanning electron microscopy. We discovered strain M-2196 near the root tip in 10 to 90 days after dipping. These are the colonies of strain M-2196. Also, strain M-2196 was re-isolated from the roots of chinese chive more frequently than other bacteria. We developed a selective medium for the isolation of strain M2196.

We screened substances for antifungal activity in culture. We observed a substance with the characteristics of Pyrrolnitrin, and subsequently discovered that strain M-2196 produced Pyrrolnitrin which was shown to have antifungal activity.

Based on our research, we propose the mechanism of biological control. The Anti-

fungal bacterium, strain M-2196, grows on the roots of welsh onion or chinese chive, and produces antifungal substances which are spread into the soil. Pathogens which cause soil-borne diseases are antagonized by the antifungal substance. So, pathogens can not infect plants, such as bottle gourd and tomato grown in association with treated plants.

We, a joint team of Tochigi Agricultural Experimental Station and Tokyo University, are striving to make this technique more practical by applying the method to other diseases and by isolating better bacterial strains.

( Bull. Tochigi Agr  
Exp. Stn. No.35 : 95~128 )



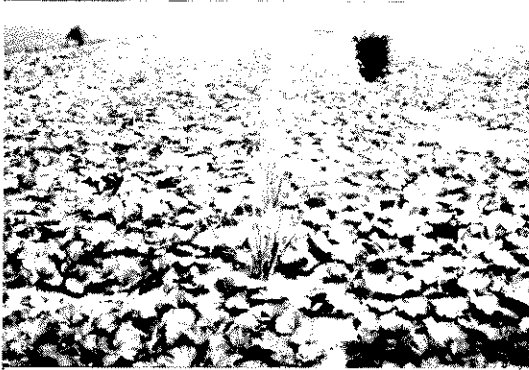


写真-1 ユウガオの栽培状況



写真-4 ユウガオのタマネギとの間作状況



写真-2 ユウガオのネギとの混植状況

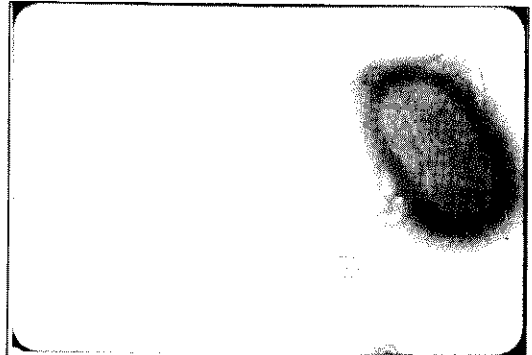


写真-5 *Pseudomonas gladioli* M-2196の電顕写真



写真-3 ユウガオの麦との間作状況

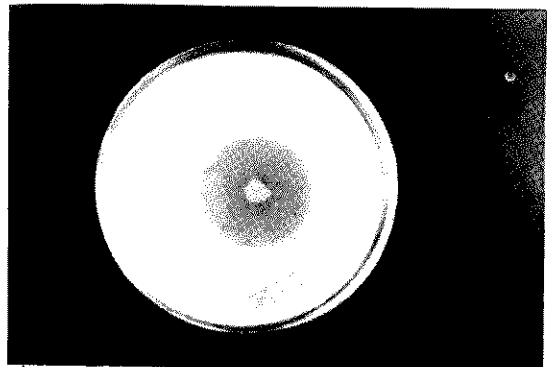


写真-6 *Corynebacterium michiganense* pv *michiganense*に対する抗菌活性

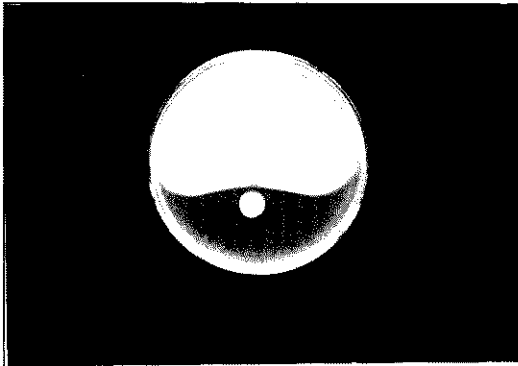


写真-7 *Fusarium oxysporum f.sp.lagenariae*  
に対する抗菌活性



写真-10 ユウガオつる割病の防除 (M-2196  
を接種したニラを混植)



写真-8 *Pythium sp.*に対する抗菌活性



写真-11 ユウガオつる割病の防除 (M-2196  
を接種したネギを混植)



写真-9 ユウガオつる割病の防除 (無処理)



トマト萎ちょう病<sub>J</sub>の防除 (M-2196  
を接種したニラを混植) 中央の枯死  
株; 無処理, 正状に生育している部  
分; 混植区.

栃木県農業試験場研究報告第35号正誤表

| 頁  | 行           | 誤           | 正            |
|----|-------------|-------------|--------------|
| 31 | 下 2         | 7)現栃木県畜糸農蚕課 | 7)現栃木県畜糸農蚕産課 |
| 32 | 上 4         | アズマゴールデン    | アズマゴールド      |
| 33 | 第 2 表上 3    | 11          | 1            |
| 34 | 第 2 表上 12   | 9           | 10           |
| 38 | 下 6         | 粒の重さで       | 粒の重さ。        |
| 39 | 上 6-7       | ウイエット       | ウエイト         |
| 40 | 第 9 表上 3    | 月、日         | 月 日          |
| 41 | 第 10 表上 2-4 | 摘萎綿病        | 摘萎縮病         |
| 44 | 第 14 表上 17  | 干葉          | 干葉           |
| 46 | 下 2         | Barley      | Barley       |
| 47 | 上 16        | Fishery     | Fisheries    |
| 47 | 下 11        | denes.      | dense        |
| 48 | 付表下 11      | 現栃木県畜糸農蚕課   | 現栃木県畜糸農蚕産課   |