

蛍光性*Pseudomonas*によるレタスの生育促進と病害防除

須永哲央・生井 潔・木嶋利男

摘要：ハルジオオンの根面及びレタスの根面から数菌株の蛍光性シュードモナスを分離した。分離した菌株のうちいくつかは*Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici race-2*及び*Rhizoctonia solani*に対し抗菌活性を示した。これらの菌株の細菌懸濁液にレタス種子を浸漬して接種したところ、無接種に比べてセル苗の地上部重及び草丈が増大した。細菌懸濁液をレタスが発芽したセルに灌注接種しても同様に生育が促進された。また、一部の菌株の灌注接種はレタスすそ枯病の発病を顕著に抑制した。

キーワード：レタス，生物防除，PGPR，蛍光性シュードモナス

Growth Promotion and Disease Control of Lettuce by the inoculation of fluorescent *Pseudomonas*

Tetsuo SUNAGA, Kiyoshi NAMAI, Toshio KIJIMA

Summary: The fluorescent *Pseudomonas* strains were isolated from the rhizoplane of Philadelphia fleabane (*Erigeron philadelphicus* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.) sampled in the field of Tochigi Prefectural Agriculture Experiment Station and the nineteen strains were used in this study. Some of the strains were confirmed to show antifungal activity to *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici race-2* or *Rhizoctonia solani*. (strain No.305220).

When lettuce seeds were inoculated with the antifungal strains, growth of the seedling, such as shoot weight and plant height, were promoted significantly. And also, injection of the bacteria suspension to the lettuce seedling planted in a cell-tray showed the promotion of growth similarly.

A fluorescent *Pseudomonas* strain, 6043, which was isolated from lettuce and had moderately antifungal activity to *Rhizoctonia solani*, showed the preventive effect against bottom rot of lettuce plants, when the seedling plants were transplanted into infested soil of the disease after the injection with the bacteria strain.

Key words: Lettuce, Biological control, PGPR, Fluorescent *Pseudomonas*

I 緒言

栃木県においてレタスは水田裏作として栽培できる数少ない野菜品目であるが、イネとの共通病原菌 (*Rhizoctonia solani*)によるレタスすそ枯病の発生が大きな問題になっている。

土壌病害の防除法としては輪作や土壌消毒、接木栽培などが行われている。しかし、レタスの接木栽培は実用上利用不可能である。土壌消毒剤も作業性やコスト面での使用が難しく、土壌の微生物相の単純化を招いて病害を再発しやすくする上、将来的には使用が規制される傾向にある。これらのことから、生物防除を含む新たな防除法の確立が要望されている。

生物防除に用いる微生物としてはトリコデルマ、VA菌根菌、バシラスなどがあるが、その中でも蛍光性シュードモナスは作物に対する定着性が高く抗菌活性を持つ系統が多いのでPGPR(Plant Growth Promoting Rhizobacteria; 植物生長促進根圏細菌)⁶⁾として有望とされている。

これまでの報告から、様々な植物の根面から蛍光性シュードモナスが分離されてきた⁷⁾。木嶋らは、ネギ属植物やランの根面からユウガオつる割病菌などに強い抗菌活性を示す細菌を分離している⁸⁾。これらの蛍光性シュードモナスの中には*Rhizoctonia*に対するピロールニトリン(pyrrrolnitrin)⁹⁾、*Pythium*に対するピオルテオリン(pyoluteorin)¹⁰⁾などを産生する菌株も含まれている。すでに蛍光性シュードモナスを用いたワタの苗立枯れの防除試験¹¹⁾が行われている。また、同じく蛍光性シュードモナスによる小麦立枯病防除の試験も行われている⁷⁻⁹⁾。

本研究は、レタスの根面に定着性が高く抗菌活性を持つ蛍光性シュードモナスを用いてレタスのセル苗の生育促進とレタスすそ枯病の病害防除を試験したところ、いくつかの知見が得られたので報告する。

II 材料及び方法

1. 根面細菌の分離

農業試験場の圃場の畦畔からキク科雑草であるハルジョオンの株を引き抜き、供試材料とした。

また、レタスに関しては農業試験場内の圃場に栽培した株(品種ハイルック)を引き抜き、供試材料とした。

根圏土壌の付いた根を滅菌水中に20分浸漬し、次に別の滅菌水中で緩やかに振とうして土壌粒子を落とし、さらに別の滅菌水中で激しく振とうし、10°~10°の希釈液をキングB平面培地上に0.5mlずつ塗布した。この

培地を35℃で7日間培養し、黄緑色の蛍光を発するコロニーを分離した。

2. 糸状菌に対する抗菌活性の調査

分離した菌株をキングB培地上(直径9cm)の中心と縁の間に3点植えた。同時に径5mmに打ち抜いた*Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici race-2*及び*Rhizoctonia solani*の含菌寒天円盤をペトリ皿中央に植えた。25℃で対峙培養し、抗菌活性を調査した。この実験に用いた*Rhizoctonia solani*は農業生物資源研究所から分譲された菌株(菌株番号305220)を用いた。

3. 種子浸漬接種によるレタスセル苗の生育促進

ハルジョオンの根面から分離した5168, 5171, 5174菌株及びレタスの根面から分離した6035, 6036, 6037, 6038, 6039, 6040, 6041, 6042, 6043, 6044菌株を供試した。

Nutrient agar (Difco社)の斜面培地で培養した菌株を10mlの滅菌水中に懸濁(10⁸cfu/ml)し、この懸濁液中にレタス(品種ハイルック)の種子を30時間浸漬し、発根した状態でメトロミックス350を詰めた128穴セルトレーに1粒ずつ播種した。対照区として滅菌水に30時間浸漬した区を無接種区とした。その後は温室(昼温25℃, 夜温20℃)で1日2回かん水しながら生育させた。

4. 灌注接種によるレタスセル苗の生育促進

ハルジョオンの根面から分離した5168, 5171, 5172, 5174菌株を供試した。

メトロミックス350を詰めた128穴セルトレーにレタスの種子を播種した。13日後にnutrient broth (Difco社)で48時間培養して遠心分離で集菌し、滅菌水に懸濁した菌株の懸濁液(10⁸cfu/ml, 200mlに調製)を、セルトレーの苗の上から灌注した。対照区として、滅菌水を灌注した区を無接種区とした。その後は温室(昼温20℃, 夜温15℃)で底面給水しながら生育させた。

5. 灌注接種によるレタスすそ枯病防除

ハルジョオンの根面から分離した5168, 5171, 5172, 5174菌株及びレタスの根面から分離した6035, 6038, 6043菌株を供試した。

メトロミックス350を詰めた128穴セルトレーにレタスの種子を播種し、2日後に菌株の懸濁液(10⁸cfu/ml, 200mlに調製)を灌注した。その後は温室(昼温20℃, 夜温15℃)で底面給水しながら生育させた。播種後28日目にセル苗を*Rhizoctonia solani*(菌株番号305220)で汚染した土壌を詰めた12cm黒ビニールポットに鉢上げし、1日2回かん水しながら生育させた。鉢

上げ後87日目に発病程度を調査した。

Ⅲ 結果

1. 根面細菌の分離

ハルジョオン根面からキングB培地で蛍光を発する5168, 5169, 5170, 5171, 5172, 5173, 5174, 5175, 5176の9菌株が分離された。また、レタスの根面からは6035, 6036, 6037, 6038, 6039, 6040, 6041, 6042, 6043, 6044の10菌株が分離された。

第1表 分離菌株の植物病原菌に対する抗菌活性

供試菌株	分離植物	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>
5168	ハルジョオン	強	中
5169	"	中	中
5170	"	弱	弱
5171	"	強	中
5172	"	強	強
5173	"	弱	弱
5174	"	弱	弱
5175	"	弱	弱
5176	"	弱	弱
6035	レタス	無	弱
6036	"		弱
6037	"		弱
6038	"	無	弱
6039	"		弱
6040	"		弱
6041	"		弱
6042	"		弱
6043	"	無	中
6044	"		中

無：細菌のコロニーが糸状菌の菌そうに完全に包まれた。

弱：糸状菌は、細菌のコロニーの前半分と接しているが反対側までは伸長せず、糸状菌の菌そうの形が糸状菌と細菌を結ぶ線に対して垂直な直線を形成した。

中：糸状菌は細菌のコロニーの直前までしか伸長せず、コロニーに接触しなかった。

強：糸状菌は細菌のコロニーのかなり離れた部分までしか伸びられなかった。

2. 糸状菌に対する抗菌活性の調査

5168～5176菌株は*Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici race-2* 及び *Rhizoctonia solani* に対して抗菌活性があった。特に5168, 5171, 5172菌株は*Fusarium* に対して強い抗菌活性を示した。

6035～6044菌株には*Rhizoctonia solani* に対して抗菌活性があった。このうち、6043, 6044菌株は中程度の抗菌活性を示したが、他の菌株は弱い抗菌活性しかなかった（第1表）。

3. 種子浸漬接種によるレタスセル苗の生育促進

5168, 5171, 5174菌株を接種後41日目で無接種区に比べて地上部重、草丈とも1パーセント水準で有意に増加した。特に、5168, 5174菌株接種区は地上部重が無接種区のそれぞれ1.8倍、1.7倍になった。展開葉数に関しては処理区間に大きな差は無かった。セル内土壌の菌定着密度は $10^4 \sim 10^6$ cfu/gであった（第2表）。

6035, 6036, 6037, 6038, 6043, 6044菌株を種子浸漬接種した苗は播種後44日目で地上部重が無接種区に比べて促進された。これに対し、6039, 6042接種区は無接種区に比べて地上部重に有意な差が認められなかった。また、6040, 6041接種区は、無接種区に比べて地上部重、草丈とも有意に抑制された（第3表）。

4. 灌注接種によるレタスセル苗の生育促進

5168, 5171, 5172, 5174菌株接種区のいずれも地上部重は1%水準で有意に大きかった。特に5171, 5172菌株接種区で地上部重が無接種区の2倍以上になり、顕著な生育促進効果を示した。草丈についても無接種区より有意に生育が促進された（第4表、第5表）。また、乾物重も5171, 5172接種区で顕著に増加した（第6表）。

5. 灌注接種によるレタスすそ枯病防除

6043接種区が定植後87日目に発病度が1.40と無接種区に比べ病徴がかなり軽微だった。他の接種区の発病度は無接種区よりは若干良い程度で大きな差は無かった（第7表）。

第2表 蛍光性シュードモナスの種子浸漬摂取による生育促進効果

処理菌株	供試個体数	地上部重mg	草丈cm	展開葉数	菌定着密度cfu/g
5168	25	973±46	10.0±0.25	5.2±0.03	6.6×104
5171	25	718±30	8.8±0.23	5.3±0.07	1.8×104
5174	25	920±58	9.6±0.31	5.4±0.09	6.0×106
無処理区	25	538±25	7.5±0.23	4.9±0.08	N. D.

注) ±の後の数字は標準誤差

第3表 レタス根面から分離した蛍光性シュードモナスによるレタスの生育促進効果

接種菌株	供試株数	地上部重mg	草丈cm	展開葉数
6035	20	561.5±15.3	5.35±0.10	3.79±0.04
6036	20	466.9±10.2	4.40±0.05	3.69±0.04
6037	20	463.7±14.1	4.64±0.08	3.55±0.07
6038	20	586.1±23.0	5.19±0.14	3.89±0.05
6039	20	420.0±12.6	4.34±0.05	3.42±0.03
6040	20	378.6±11.3	4.14±0.06	3.47±0.06
6041	20	359.8± 9.9	3.92±0.06	3.49±0.05
6042	20	446.5±25.5	4.48±0.07	3.72±0.05
6043	20	531.9±16.0	4.74±0.09	3.94±0.05
6044	20	453.8±11.4	4.46±0.06	3.68±0.05
無接種区	20	415.9±12.0	4.53±0.18	3.51±0.04

注) ±の後の数字は標準誤差

第4表 蛍光性シュードモナスを灌注接種したレタスの生育(播種後25日目)

供試菌株	供試株数	地上部重mg	草丈cm	展開葉数
5168	20	345±14	6.86±0.18	2.70
5171	20	391±12	7.46±0.14	2.63
5172	20	394±12	7.35±0.19	2.56
5174	20	287± 9	6.60±0.14	2.30
無接種区	20	241±11	5.78±0.10	2.39

注) ±の後の数字は標準誤差

第6表 蛍光性シュードモナスの灌注接種による乾物重の増大

接種菌株	供試株数	総乾物重mg	平均乾物重mg
5168	21	1178	84.6
5171	23	2386	103.7
5172	20	2150	107.5
5174	20	1428	71.4
無接種区	22	1283	58.3

第5表 蛍光性シュードモナスを灌注接種したレタスの生育(播種後41日目)

供試菌株 ²⁾	地上部重mg	草丈cm	展開葉数	最大葉身長cm	最大葉幅cm	葉形比
5168	968±42 ¹⁾	9.16±0.21	4.39±0.05	6.00±0.15	3.48±0.08	1.73±0.03
5171	1159±62	8.68±0.50	4.54±0.06	6.43±0.21	3.68±0.11	1.75±0.04
5172	1104±36	9.12±0.16	4.54±0.05	6.40±0.18	3.52±0.07	1.82±0.04
5174	750±35	7.21±0.36	4.23±0.04	5.09±0.15	3.01±0.07	1.69±0.03
無接種区	535±18	6.15±0.11	3.94±0.07	3.66±0.08	2.32±0.04	1.59±0.04

注1) ±の後の数字は標準誤差 2) 供試株数は20株

IV 考察

ハルジョオンはレタスと同じキク科植物であり、レタスの根面に対する親和性の高い菌株の分離が期待できることから、今回拮抗菌の分離源植物として用いた。ハルジョオンから分離された蛍光性シュードモナスのレタスへの定着性に関しては問題がないことが確認された。

ハルジョオン及びレタスの根面から数菌株の蛍光性

シュードモナスが分離されたが、*Rhizoctonia*に対する強い抗菌活性を示すものは少なかった。

今回選抜した菌株はレタスの初期生育を顕著に促進したが、同様な結果はPGPRを使ったジャガイモの生育促進の例⁹⁾などが報告されており、バクテリアゼイション(bacterization)と呼ばれている。その作用機作としては種々の生理活性物質による植物の生育促進や、シデロフ

第7表 蛍光性シュードモナスの灌注接種によるレタスすそ枯れ病の発病抑制

供試菌株	供試株数	発病程度別株数 ¹⁾					発病指数 ²⁾
		0	1	2	3	4	
5168	15	0	0	4	8	3	2.93
5171	15	0	2	2	10	1	2.67
5172	15	0	1	7	6	1	2.46
5174	15	0	3	7	5	1	2.40
6035	15	0	2	2	11	0	2.60
6038	15	0	1	3	11	0	2.67
6043	15	0	10	4	1	0	1.40
無接種区	15	0	0	1	10	4	3.20

注1) 発病程度 0:無発病, 1:軽度, 2:中程度, 3:重度, 4:枯死

2) 発病指数

$$\text{発病指数} = \frac{\sum(\text{発病程度} \times \text{その発病程度の株数})}{\text{供試株数}}$$

ォアによる病原菌とのFeイオンの競合¹⁾あるいは抗生物質による抗菌作用により病原菌の生育が抑えられるためと考えられている。

接種方法については、種子を30時間浸漬接種することにより、発根した根に接種菌株が定着したのと思われる。これに対し、播種後13日目に細菌懸濁液をセルトレーの上から灌注接種しても生育促進が確認されたのは、セル内に伸びた根に細菌が到達して定着したのと思われる。発根したレタス種子を播種するのはかなり手間がかかるので、セル苗に灌注接種することにより生育が促進されるならばセル苗の生育促進が容易になると思われる。菌株により生育を促進されたセル苗は定植後も無接種区に比べ生育が進んでいた。

6043菌株はレタスすそ枯れ病の発病をかなり抑制する。本菌株はリゾクトニアに対して比較的強い抗菌活性を持ち、かつレタスに対する親和性が高いため、レタスすそ枯れ病の生物防除用拮抗細菌として活用が可能と考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、農林水産省農業生物資源研究所からレタスすそ枯れ病菌 (*Rhizoctonia solani*, 菌株番号305220) を分譲していただいた。ここに期して厚く感謝の意を表する。

引用文献

1. Elad, Y. and Baker, R. (1985) The Role of Competition for Iron and Carbon in Suppression of Clamydospore Germination of *Fusarium* spp. and *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 75:1053-1059.
2. 長谷川伸作・近藤則夫・児玉不二夫(1989) 作物根圏におけるPseudomonas属菌の分布とその産生する抗菌物質. 日植病大会講演要旨, 149.
3. Howell, C. R. and R. D. Stipanovic(1979) Control of *Rhizoctonia solani* on Cotton Seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and With Antibiotic Produced by the Bacterium. *Phytopathology*, 69:480-482.
4. Howell, C. R. and R. D. Stipanovic(1980) Suppression of *Pythium ultimum*-Induced Damping-off Cotton Seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its Antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathology*, 70:712-715.
5. 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(1988) 抗菌微生物の利用に関する研究. 栃木農試研報, 35:95-128.
6. Klopper, 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.
7. 宮島邦之(1988) Pseudomonas属細菌によるコムギ立枯病の防除. 植物防疫, 42: 227-230.
8. Weller, D. M. (1983) Colonization of Wheat Roots by a Fluorescent *Pseudomonas* Suppressive to Take-All. *Phytopathology*, 73:1548-1553.
9. Weller, D. M. and Cook, R. J. (1983) Suppression of Take-All of Wheat by Seed Treatments with Fluorescent *Pseudomonads*. *Phytopathology*, 73:463-4.