

チューリップの細菌性ポストハーベスト病害の生物防除と薬剤防除

守川 俊幸・野村 良邦*・築尾 嘉章

Toshiyuki MORIKAWA, Yoshikuni NOMURA* and Yoshiaki CHIKUO :
Biological and chemical control of bacterial post-harvest diseases of tulip.

Summary

Two post-harvest diseases on tulip bulbs, bacterial black rot caused by *Pseudomonas andropogonis* and brown rot caused by *P. gladioli*, were reduced by post-harvest treatment with some strains of *P. gladioli* and *P. cepacia* isolated from rhizosphere of tulip and welsh onion. While, treatment with *P. gladioli* strain BRA4, the pathogen of bacterial brown rot, showed more strongly reduction of disease development of bacterial black rot than that with antagonists from rhizosphere. Therefore, some weak- or non- pathogenic mutants obtained from strain BRA4 using as wild strain by NTG treatment or UV irradiation. A mutant-strain N74, having highly protective ability against bacterial black rot, was selected. Also, post-harvest dipping of bulb with copper fungicide showed effective results to control both diseases.

チューリップの黒腐病（病原：*Pseudomonas andropogonis*）と褐色腐敗病（病原：*P. gladioli*）は、貯蔵中あるいは流通段階で球根に発生するポストハーベスト病害である^{18,20}。両病害とも球根伝染¹³、収穫後の水洗や薬剤浸漬時に水を介して感染することが知られている¹⁶。

近年、消費者の環境保全や食品の安全性に対する関心の高まりから、化学農薬の使用量を減らすための病害防除の研究が、抵抗性品種の利用や育成、微生物を用いた防除（生物防除）、物理的環境制御による生態系調和型病害防除などの種々の観点から行われている。拮抗細菌を用いた病害防除の試みは、根頭がんしゅ病に対する *Agrobacterium radiobacter* strain 84 を用いた例¹² が世界的に有名であり、我が国においても農薬登録されている。また、*Pseudomonas* 属細菌のなかには抗生物質の産生能を有し、かつ、植物に親和性が高いものが多いことから、これらを用いた病害防除試験が数多くなされている^{1,2,3,6,8,10,11,23,25,28}。褐色腐敗病の病原細菌である *P. gladioli* は、いくつかの土壌病害に対して、有効性が示されている⁹。そこで、褐色腐敗病細菌とその変異株および根面土壌などから分離した、*P. gladioli* やその近縁細菌を用いた、黒腐病および褐色腐敗病の生物防

除の可能性について試験した。さらに、収穫後の球根消毒に有効な防除薬剤の選定を行った。ここに、その結果を取りまとめたので報告する。なお、本研究を行うにあたり、農業環境技術研究所西山幸司博士には有益なご助言を頂いた。また、北海道立中央農業試験場田中民夫博士には、タマネギリん片腐敗病細菌を分譲頂いた。ここに厚く感謝の意を表する。

材料および方法

1. 拮抗細菌の収集と細菌学的性質の調査

収集する拮抗細菌は、チューリップの最重要病害である球根腐敗病に対しても、防除効果を有することが望ましいことから、球根腐敗病菌と黒腐病細菌の両者に対して拮抗作用を有するものを選抜した。

富山県内 16 カ所の圃場（水稲、チューリップ、ネギ、アスパラガス、ソバおよびサトイモ）から土壌を採集してビニールポットに充填し、チューリップ球根（品種：'Rose Beauty'）を植え付けた。約 1 カ月間 20℃ で栽培した後、チューリップの根を回収し、滅菌水中で懸濁して根面土壌懸濁液を得た。また、ネギ圃場からはネギの根を採集し、同様に処理をして根面土壌懸濁液を得た。次に、これら懸濁液を希釈平板法によって SMG-4 培地（SMG-5 培地¹⁵）の栄養源をキング B 培地の組成に置き換えたもの上に塗抹し、25℃ で 4 日間培養し、生じた青紫色コロニーを釣菌して、PPGA¹⁹ 培地上にスポット培養した（20 菌株/シャーレ）。培養 4 日後に 50℃ に保温した CMA 培地に球根腐敗病菌 *Fusarium oxys-*

富山県農業技術センター野菜花き試験場 Toyama Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station, Agricultural Research Center, Tonami, Toyama 939-13.

* 東北農業試験場 Tohoku National Agricultural Experiment Station, Fukushima, Fukushima 960-21.

porum f.sp. *tulipae* Gom - 1株の小型分生子を懸濁 (10^4 conidia/ml) し、直ちにスポット培養したシャーレに静かに重層した (約 5 ml/シャーレ)。さらに 4 日間培養し、球根腐敗病菌に対して生育阻止円を形成したコロニーを釣菌し、PPGA 培地上で 1~2 回の単コロニー分離を行い、第 1 次選抜菌とした。次に、第 1 次選抜菌をスポット培養した PPGA 培地をクロロホルムで滅菌し²⁶⁾、黒腐病細菌 *Pseudomonas andropogonis* Qn21 株を懸濁 (10^7 CFU/ml) した PPGA 培地を重層し、黒腐病細菌の生育阻止円を生じた菌株を最終選抜菌 (以下、拮抗細菌) とした。得られた拮抗細菌について 92 項目の細菌学的性質を西山¹⁹⁾あるいは後藤・瀧川^{4,5)}の方法に従って調査した。

2. 拮抗細菌を用いた黒腐病と褐色腐敗病の防除試験

前項で分離同定した拮抗細菌のうち代表的な 5 菌株 (TM8001, TM8013, TM8033, TM8040, TM8047) を選定し、黒腐病と褐色腐敗病に対する防除効果を検定した。まず、1992 年 6 月に収穫した球根の古皮や根を除去した後、水洗し、黒腐病細菌 *P. andropogonis* Qn21 株、または褐色腐敗病細菌 *P. gladioli* BRA4 株の各細菌懸濁液 (2×10^7 CFU/ml) に 5 分間前接種した後、直ちに各拮抗細菌の懸濁液 (10^8 CFU/ml) に 30 分間浸漬した (30 球/区、3 反復)。処理後の球根は 1 晩通風乾燥した後、貯蔵庫で保存し、8 月中旬に発病調査を行った。なお、対照にはストレプトマイシン含有製剤、

褐色腐敗病細菌 BRA4 株と同非病原性変異株 (継代培養中に病原性消失したもの) KK10S1 株、12 コープ S1 株を用いた。なお、本試験以降に用いた細菌株の所属と来歴を第 1 表に示した。

3. 褐色腐敗病細菌の変異源処理と同処理株を用いた黒腐病防除試験

前項で黒腐病に対して最も防除効果が高かった褐色腐敗病細菌 BRA4 株を野生株とし、土屋の方法²⁰⁾に従ってニトロソグアニジン (NTG) の処理または紫外線 (UV) 照射を行い、得られた変異源処理株をそれぞれ NTG 処理株、UV 処理株とし、黒腐病に対する防除効果を調べた。すなわち、収穫後古皮や根を除去した球根を水洗し、黒腐病細菌 Qn21 株の細菌懸濁液 (5×10^7 CFU/ml) に 10 分間浸漬して前接種した後、各変異源処理株の細菌懸濁液 (10^8 CFU/ml) に 15 分間浸漬後、一晩通風乾燥して貯蔵した (各区 30 球、3 反復)。1993 年度の試験では、NTG 処理 27 菌株、UV 処理 5 菌株を供試した。対照には野生株である BRA4 株と褐色腐敗病細菌 13MW 株、KK18 株およびアスパラガス腐敗茎からの分離株 Nias 株を用いた。1994 年度の試験では、変異源処理株をタマネギ鱗茎に針接種してタマネギに対する腐敗能を接種 3 日後に調査し、野生株 BRA4 株に比べて明らかに腐敗能が低下したと判定された NTG 処理株 16 菌株、UV 処理株 6 菌株を供試した。また、対照には野生株 BRA4 株を用いた。さらに、供試菌株を

第 1 表 供試細菌の来歴と所属

菌 株	来 歴	所 属
BRA4, KK10, KK18, 13MW, 37-4	チューリップ褐色腐敗病細菌	<i>Pseudomonas gladioli</i>
N02, N03, N10, N15, N19, N27, N29, N32, N33, N34, N42, N45, N48, N52, N53, N56, N59, N62, N72, N73, N74, N75, N85, N110	BRA4株の NTG 処理株	<i>Pseudomonas gladioli</i>
U218	BRA4株の UV 処理株	<i>Pseudomonas gladioli</i>
KK10S1, 12コープS1	チューリップ褐色腐敗病細菌 (非病原性変異株: 継代中変異)	<i>Pseudomonas gladioli</i>
Pgg-1	グラジオラス首腐病細菌	<i>Pseudomonas gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>
To8701	タマネギりん片腐敗病細菌 (道立道南農試からの分離菌株)	<i>Pseudomonas gladioli</i>
Nias	アスパラガス腐敗茎から分離	<i>Pseudomonas gladioli</i>
TM8001	ネギ根面から分離	<i>Pseudomonas cepacia</i>
TM8013	ネギ根面から分離	<i>Pseudomonas gladioli</i>
TM8033, TM8040, TM8041, TM8047	チューリップ根面から分離	<i>Pseudomonas cepacia</i>
Qn21	チューリップ黒腐病細菌	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
UD01	ウドから分離	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
EN1	サトイモ軟腐病細菌	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>
KA11	チューリップかいよう病細菌	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>

黒腐病細菌 Qn21 株と各々 10^8 CFU/ml になるよう混合し、球根（品種：'Rose Beauty'）の背部に針（20 本束）で付傷接種し、室温で静置して形成された黒腐病病斑の直径（mm）=（長径+短径）/2 を接種 40 日後に計測し、対照の黒腐病細菌 Qn21 株の単独接種区との病斑径の対比から、黒腐病の病斑拡大抑制率を以下の式により算出した。

病斑拡大抑制率 = $100 - (\text{供試細菌と黒腐病細菌の混合接種で形成された黒腐病病斑径}) \times 100 / (\text{黒腐病細菌の単独接種で形成された黒腐病病斑径})$ 。

4. 抗菌性物質の産生

第 4 表に示した細菌株を YPDA 培地上（9 cm シャーレ）で 28°C 2 日間スポット培養し、クロロホルムで滅菌した²⁶⁾後、*P. andropogonis* Qn21 株、*P. solanacearum* UDO1 株、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* EN1 株、*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii* KAI1 株の培養菌体を懸濁した YPDA 培地（約 10^7 CFU/ml）を重層した（5 ml/シャーレ）。それらを 28°C 2 日間培養して、生育阻止円の程度を観察した。

5. 球根上での対峙接種

7 月下旬に黒腐病細菌 Qn21 株と第 5 表に示した細菌株を各々 10^8 CFU/ml に調整し、チューリップ球根（品種：'Rose Beauty'、'Merry Widow'、各 10 球）の背部に 10mm の間隔で針（20 本束）による対峙接種（付傷接種）を行った。対照には蒸留水区と無傷区を設けた。接種した球根は、 25°C 温室に 24 時間置いた後、紙袋に移して風乾し、室温で静置した。8 月下旬に黒腐病病斑の直径と対峙接種痕との間の拮抗幅を計測した。

6. 薬剤防除試験

1992~1994 年度の 3 カ年にわたって薬剤による黒腐

病と褐色腐敗病の防除試験を行った。いずれの試験においても、まず、収穫した球根（品種：'Merry Widow'）の根や古皮を除去してから水洗し、黒腐病細菌 Qn21 株、あるいは褐色腐敗病細菌 BRA4 株の各細菌懸濁液（1992 年は 2×10^7 、1993 年と 1994 年は 10^8 CFU/ml）に 5 分間浸漬して前接種した後、第 6~8 表に示した所定の濃度の薬剤に 15 分間浸漬し（30 球/区、3 反復）、通風乾燥して貯蔵した。発病調査は 8 月上~中旬に行った。

結 果

1. 拮抗細菌の同定

第 1 次選抜で 105 菌株の細菌株を選抜し、最終選抜によって 25 菌株を拮抗細菌として選定した。これら、拮抗細菌は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.1²⁷⁾の記載に準じて同定すると、第 2 表に示すように *Pseudomonas cepacia* (20 菌株) と *P. gladioli* (5 菌株) に類別された。

2. 拮抗細菌を用いた黒腐病と褐色腐敗病の防除試験

いずれの拮抗細菌 *Pseudomonas* spp. も、'Merry Widow' では黒腐病に対して薬剤と同程度の防除効果が認められたが、'Rose Beauty' では *P. gladioli* 12 コープ S1 株、*P. cepacia* TM8001 株、TM8033 株で効果が低かった。褐色腐敗病に対しては全体に防除効果は低かったが、TM8001 株、TM8040 株および TM8047 株で対照の薬剤と同程度の効果が認められた（第 3 表）。なお、黒腐病に対して最も防除効果が高かったのは対照に用いた褐色腐敗病細菌 BRA4 株であり、薬剤に優る効果が認められた。'Merry Widow' では BRA4 株は病原性を示して褐色腐敗病が発生したが、その他の供試細菌には病原性は認められなかった。褐色腐敗病抵抗性の 'Rose

第 2 表 拮抗細菌を用いた黒腐病と褐色腐敗病の防除試験（1992年）

菌 株	発病球率 (%)		
	黒腐病		褐色腐敗病
	'Merry Widow'	'Rose Beauty'	'Merry Widow'
KK10S1	35.6 bc	35.6 bcd	46.9 ab
12コープS1	24.4 c	40.0 cd	37.8 abc
BRA4	8.9 d	15.6 e	NT
TM8001	36.7 bc	66.7 a	26.7 c
TM8013	42.2 b	36.7 c	37.8 abc
TM8033	34.4 bc	52.2 abcd	34.4 b
TM8040	35.6 bc	38.3 cd	25.6 c
TM8047	27.8 bc	54.4 abc	28.9 bc
St. TM水和剤 (250倍)	44.4 b	36.7 bcd	30.0 bc
無処理	68.9 a	63.3 ab	43.3 ab

注) 同一英文字を伴う値の間には Duncan's multiple-range test ($p=0.05$) による有意差が無いことを示す。St. TM 水和剤：ストレプトマイシン・チオファネートメチル水和剤

第3表 チューリップとネギの根面土壌から分離された拮抗細菌の細菌学的性質

	<i>Pseudomonas cepacia</i> (20菌株) ^{a)}	<i>P. gladioli</i> (5菌株) ^{b)}
グラム反応, 硝酸呼吸, チロシナーゼ, VP反応, MP反応, インドール産生, 硫化水素の産生, グルコン酸酸化, デンプン加水分解, アルギニン加水分解, 3-ケトラクトース産生, 尿素試験, アンモニア産生	- ^{c)}	-
運動性, ペプトン水発育, ブイヨン発育, カゼイン加水分解, Tween 80加水分解	+	+
オキシターゼ	+	W
O-F試験	O	O
エスクリン加水分解	+12(W6)/-2	W
アルブチン加水分解	-	+
ムコイド発育	+16/-4	-
硝酸塩還元	+5/-15	-
40℃発育, 41℃発育	+	-
ゼラチン液化	+16/-4	+
ジャガイモ腐敗	W	W
利用性		
グルコース, フルクトース, キシロース, L-アラビノース, D-アラビノース, ガラクトース, D-マンノース, リボース, ラクトース, トレハロース, セロビオース, グリセリン, マンニトール, ソルビトール, イノシトール, ズルシトール, アドニトール, サリシン, β-アラニン, L-アルギニン, チロシン, トリプタミン, ヒスチジン, n-プロパノール, D-酒石酸, m-酒石酸, L-酒石酸, 乳酸, クエン酸, マロン酸, 馬尿酸, フマル酸, シトラコン酸, レブリン酸, キナ酸, サッカリク酸, 安息香酸, アントラニル酸, プロピオン酸, n-酪酸, グルコン酸, 酢酸, ギ酸, 粘液酸, カラグルコン酸, リンゴ酸	+	+
メレジトース, m-エリトリトール, デンプン, イヌリン, α-メチル-D-グルコシド, ゲラニオール, シュウ酸	-	-
ラムノース	-	(+)
メリビオース, メサコン酸, ニコチン酸	-	+
スクロース, マルトース, ラフィノース, トリプトファン, 2, 3-ブタンジオール, m-ヒドロキシ安息香酸	+	-
グリシン	(+14)/-6	(+)

注 a) *P. cepacia*: TM8001, TM8002, TM8003, TM8004, TM8005, TM8006, TM8007, TM8008, TM8009, TM8010, TM8011, TM8012, TM8027, TM8028, TM8033, TM8035, TM8040, TM8041, TM8049, TM8054

b) *P. gladioli*: TM8013, TM8014, TM8015, TM8016, TM8036

c) +: 陽性, -: 陰性, W: 弱い陽性, (+): 遅れて陽性, O: 酸化型

Beauty' ではいずれの処理区とも褐色腐敗病の発生は全く認められなかった。

3. 褐色腐敗病細菌の変異源処理株を用いた黒腐病の防除

1993年度試験: 黒腐病に対して, 変異源処理株のほとんどが対照の薬剤に比べて, 優れた防除効果を示したが, ほとんどの菌株は病原性を有し, 褐色腐敗病が発生した。供試した変異源処理株32菌株のうち病原性が著しく低下した3菌株の黒腐病に対する防除効果の例を第1図に示した。これらN32株, N42株, N74株のうち,

N74株は病原性が極めて弱く, 形成された病斑は径1mm程度の小さなものであり, かつ, 黒腐病に対する防除効果は高かった。また, 対照に用いた褐色腐敗病細菌の4菌株(37-4株, 13MW株, KK18株, BRA4株)は, 菌株間に病原性や黒腐病の防除効果に差が認められ, 病原性が高い(褐色腐敗病の発病球率が高い)菌株ほど黒腐病に対する防除効果が高い傾向が認められた。なお, NTG処理によって, コロニーの形状や色素産生能などの培養性状で変異を生じたのは90菌株中6菌株であり, 病原性が著しく低下したものは90菌株中11菌株(防除

試験に供試していない菌株を含む)であった。培養性状の変異と病原性の低下には直接的な関係は認められなかった。

1994年度試験：1993年度試験に比べて褐色腐敗病の発病球率が低く、黒腐病に対する防除効果は薬剤処理区も含めて全体に低かった。N74株を含む変異源処理株22菌株のうち、病原性が著しく低い5菌株(N42株, N56株, N74株, N110株, U218株)を用いた防除試験の例を第2図に示した。前年と同様に、N74株の効果が認められたが、本年は病原性が認められず、全く褐色腐敗病は発生しなかった。N42株やN110株は病原性は認められなかったが、黒腐病に対する防除効果が認められなかった。また、変異源処理株で褐色腐敗病の発生が5%を超える菌株(病原性中～強)は、0～2%の菌株(病原性無～弱)に比べて混合接種における黒腐病病斑抑制効果が高いものが多かったが、黒腐病に対する防除効果との関係は判然としなかった(第3図)。さらに、タマネギ病斑径率が50%以下の菌株は褐色腐敗病の発生が0%であった(第4図)。

4. 抗菌性物質の産生

培地上での抗菌スペクトルは、菌株によって異なったが、すべての菌株で黒腐病細菌 Qn21 株に対する抗菌活性が認められた。NTG 処理によって作出された培養性

状や病原性低下などの変異あるいは黒腐病に対する防除効果と抗菌スペクトルに関係は認められなかった(第4表)。

5. 球根上での対峙接種

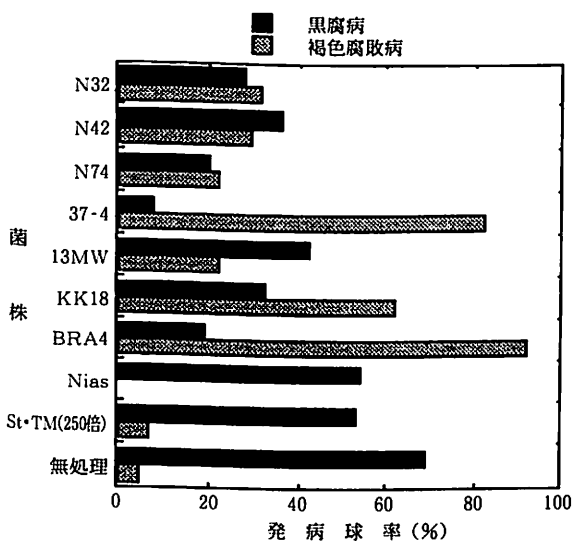
BRA4株は'Merry Widow'に感染して褐色腐敗病病斑を形成したが、'Rose Beauty'には感染しなかった。その他の供試細菌の病原性は認められなかった。拮抗幅にはあまり差が認められなかったが、BRA4株は両品種で、TM8013株とTM8017株は'Merry Widow'で黒腐病の病斑直径が小さくなる傾向が認められた(第5表)。

6. 薬剤防除試験

1992年度試験：両病害に対して銅水和剤(水酸化第二銅)と次亜塩素酸カルシウム剤の効果が安定して高く、次いでストレプトマイシン・チオファネートメチル水和剤、オキシロニック酸水和剤、チウラム・ペノミル水和剤で効果が認められた。チモールは黒腐病に対しては効果が認められたが、褐色腐敗病に対しては効果が認められなかった(第6表)。

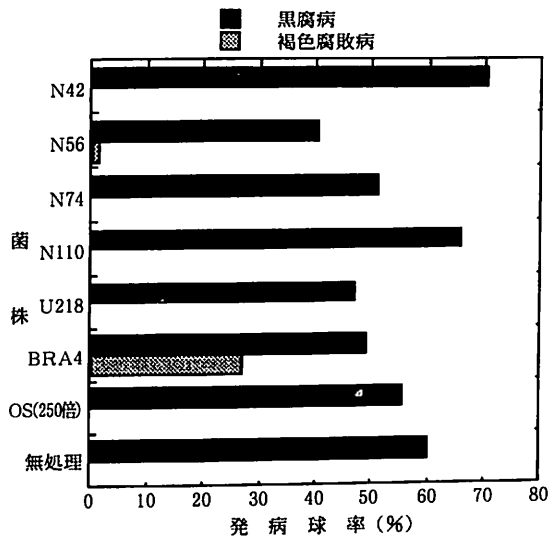
1993年度試験：両病害に対して銅水和剤(水酸化第二銅)の250倍、500倍液、およびカスガマイシン・銅水和剤250倍液に効果が認められた。いずれの薬剤も1,000倍液では防除効果は低かった(第7表)。

1994年度試験：黒腐病に対してオキシテトラサイク



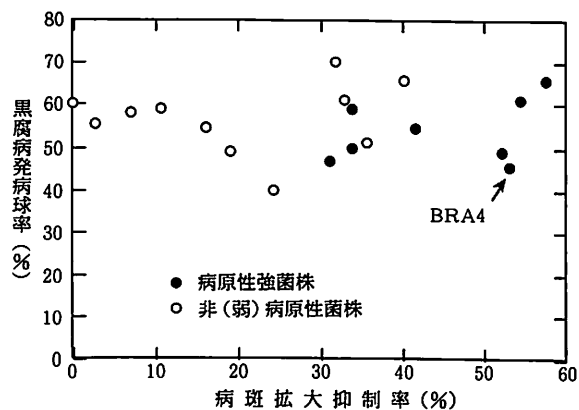
第1図 変異源処理株と褐色腐敗病細菌の菌株ごとの病原性と黒腐病の発生に及ぼす影響(1993年)

注) N32, N42, N74: NTG 処理によって病原性が低下した株, 37-4, 13MW, KK18, BRA4: 野生株, Nias: アスパラガスから分離した非病原性株, St*TM: ストレプトマイシン・チオファネートメチル水和剤 250 倍液



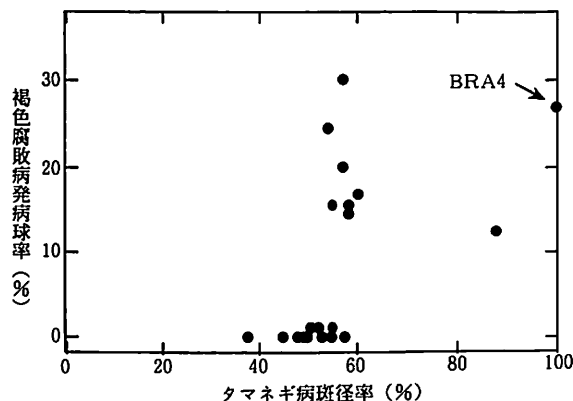
第2図 変異源処理株の病原性と黒腐病の発生に及ぼす影響(1994年)

注) N42, N56, N74, N110: NTG 処理株, U218: UV 処理株, BRA4: 野生株, OS: オキシテトラサイクリン・ストレプトマイシン剤 250 倍液



第3図 変異源処理株と黒腐病細菌の混合接種試験における黒腐病斑拡大抑制率と同処理株の病原性および黒腐病に対する防除効果との関係(1994年)

注) 病斑拡大抑制率 = $100 - (\text{供試細菌と黒腐病細菌の混合接種で形成された黒腐病病斑径} \times 100 / (\text{黒腐病細菌の単独接種で形成された黒腐病病斑径}))$



第4図 変異源処理株のタマネギ鱗茎腐敗能とチューリップに対する病原性の関係(1994年)

注) タマネギ病斑径率 = $\frac{\text{タマネギ鱗茎に形成された野生株 BRA4 株の病斑径を 100 とした場合の変異源処理株の病斑径}}{100}$

第4表 数種細菌に対する抗菌性物質の産生能

菌 株 ^{b)}	被検菌 ^{a)}			
	Pa	Ps	Ec	Co
BRA4, Nias, KK10, To8701, 37-4, N02, N03, N10, N15, N19, N27, N29, N32, N33, N42, N48, N53, N56, N59, N62, N72, N73, N74, N75, N85, 13MW, TM8033	++ ^{c)}	++	++	+
13MW, TM8033	++	+	-	-
Pgg-1	++	++	++	-
TM8001	++	++	++	++
TM8013	++	++	++	+++
TM8040, TM8049	++	++	+	-
N34	++	+	+	+
KK10S1	+	++	-	+

注 a) Pa : *Pseudomonas andropogonis* Qn21 株, Ps : *Pseudomonas solanacearum* UD01 株, Ec : *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* EN1 株, Co : *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii* KAI1 株

b) 菌株番号に付したアンダーラインは、変異源処理によって培養性状に変異が生じた株、病原性が低下した株、両変異が生じた株を示す

c) -~+++ : 生育阻止の程度

第5表 黒腐病細菌と拮抗細菌の対峙接種(付傷)で形成された黒腐病病斑の直径と拮抗幅

	無傷区	蒸溜水	菌 株									
			BRA4	KK10S1	12コープS1	Pgg-1	Nias	To8701	TM8001	TM8025	TM8033	TM8041
'Rose Beauty'												
病斑直径 (mm)	19.8	18.8	16.4	19.0	19.6	17.7	19.5	19.1	19.0	20.9	18.5	18.4
拮抗幅 (mm)		1.0	1.2	0.4	-0.5	0.6	0.6	0.3	0.0	0.4	1.5	-0.1
'Merry Widow'												
病斑直径 (mm)	16.5	15.2	12.5	16.2	14.8	16.7	16.1	18.5	12.8	12.7	15.7	13.9
拮抗幅 (mm)		2.2	2.2	1.5	1.8	1.5	1.8	1.5	2.3	3.0	2.1	2.0

第6表 黒腐病と褐色腐敗病に対する薬剤の防除効果 (1992年)

供試薬剤 (成分量)	希釈倍率	発病球率 (%)	
		黒腐病	褐色腐敗病
ストレプトマイシン・チオファネート	250倍	44.4 bc	30.0 bcd
メチル水和剤 (18.8%・50%)			
オキシリニック酸水和剤 (20.0%)	250	37.8 bc	34.4 bcd
銅水和剤 (水酸化第二銅: 76.8%)	250	22.2 c	14.4 d
次亜塩素酸カルシウム剤 (有効塩素70.0%)	250	35.6 bc	20.0 cd
チウラム・ベノミル水和剤 (20%・20%)	250	46.7 abc	32.2 bcd
チモール	500	35.6 bc	39.6 abc
カビ止め剤 (アビオンM)	250	57.8 ab	56.7 a
無処理	—	68.9 a	43.3 ab

注) 同一英文字を伴う値の間には Duncan's multiple-range test (p=0.05) による有意差が無いことを示す

第7表 黒腐病と褐色腐敗病に対する薬剤の防除効果 (1993年)

供試薬剤 (成分量)	希釈倍率	発病球率 (%)	
		黒腐病	褐色腐敗病
ストレプトマイシン・チオファネート	1,000倍	75.5 cd	58.8 c
メチル水和剤 (18.8%・50%)	500	65.9 cd	43.3 abc
	250	61.1 bc	52.2 bc
銅水和剤 (水酸化第二銅: 76.8%)	1,000	73.3 cd	41.1 abc
	500	45.4 a	42.2 abc
	250	44.7 a	33.5 ab
カスガマイシン液剤 (2.3%)	1,000	78.3 cd	51.7 bc
	500	81.8 d	41.1 abc
	250	70.0 cd	42.2 abc
カスガマイシン・銅水和剤 (5.7%・75.6%)	1,000	72.2 cd	47.2 abc
	500	75.5 cd	54.4 c
	250	50.6 ab	52.2 bc
無処理	—	73.1 cd	60.4 c

注) 同一英文字を伴う値の間には Duncan's multiple-range test (p=0.05) による有意差が無いことを示す

リン・ストレプトマイシン剤, 銅・ストレプトマイシン剤および銅水和剤 (水酸化第二銅あるいは塩基性硫酸銅) の 250 倍, 500 倍液, オキシリニック酸・有機銅水和剤や有機銅水和剤の 250 倍液に防除効果が認められた。ノニルフェノールスルホン酸銅剤の効果は低かった。褐色腐敗病に対しては, 処理区間に有意な差が認められなかった (第8表)。

以上の3年間の試験結果から, ノニルフェノールスルホン酸銅剤を除く銅含有剤は安定した防除効果があると考えられた。なお, 薬剤処理した球根を植え付けたところ, いずれの処理も生育期間中の薬害は認められなかった。1994年度に用いたいずれの薬剤も, チューリップサビダニ防除に用いられているピリミホスメチル乳剤と

の混和によって, 沈殿は生じなかった。

考 察

チューリップ根面土壌から分離された *P. gladioli* や *P. cepacia* などの拮抗細菌株のいくつかは, 黒腐病や褐色腐敗病に対して薬剤と同程度の防除効果が認められたが, 黒腐病に対しては対照に用いた褐色腐敗病細菌 *P. gladioli* BRA4 株の防除効果が最も高かった。*P. gladioli* や *P. cepacia* は, 他の植物の病害においても有効な拮抗細菌であることが知られている^{5,23,24,26)}。ただし, *P. cepacia* は人の日和見感染菌として分離されることが知られており²⁵⁾, 環境由来と臨床由来では系統が異なることが示されているが, 現時点で本細菌を防

第8表 黒腐病と褐色腐敗病に対する薬剤の防除効果 (1994年)

供試薬剤 (成分量)	希釈倍率	発病球率 (%)	
		黒腐病	褐色腐敗病
ノニルフェノールスルホン酸銅剤 (40%)	500倍	70.0 d	17.8 n.s.
	250	56.9 bcd	3.3
有機銅水和剤 (80%)	500	52.2 abc	6.7
	250	49.4 abc	11.1
有機銅水和剤 (フロアブル: 35%)	500	50.5 abc	14.7
	250	44.4 ab	14.4
オキシロニック酸・有機銅水和剤 (10%・50%)	500	52.8 abc	6.7
	250	38.7 ab	16.7
銅水和剤 (水酸化第二銅: 76.8%)	500	43.6 ab	16.5
	250	34.4 a	7.1
銅水和剤 (塩基性硫酸銅: 58%)	500	38.9 ab	11.1
	250	45.6 ab	11.1
銅・ストレプトマイシン剤 (58%・10%)	500	38.3 a	16.7
	250	42.2 a	5.6
オキシテトラサイクリン・ストレプトマイシン剤 (1.5%・18.8%)	500	37.1 a	14.4
	250	51.6 ab	11.1
無処理	—	64.8 cd	21.1

注) いずれの処理区もピリミホスメチル乳剤500倍液 (チューリップサビダニ防除用) を含む。同一英文字を伴う値の間には Duncan's multiple-range test ($p=0.05$) による有意差が無いことを示す。なお、褐色腐敗病の発病球率にはいずれの処理区においても有意差 ($p=0.05$) は認められなかった

除剤とし実用化するには越えるべき課題が多いと考え、以降の試験からは除外した。

褐色腐敗病細菌 BRA4 株の黒腐病防除効果が供試した拮抗細菌に比べて飛躍的に高く、この有用な形質を活用する手段の開発が望まれた。チューリップ栽培品種の約半数は褐色腐敗病に対して抵抗性である¹⁷⁾ ことから、栽培される品種を全て抵抗性の品種に限定すれば、BRA4 株をそのまま黒腐病防除に用いることが可能であると考えられる。しかしながら、このような品種の操作は極めて困難であり、現実的な方法とは言えない。そこで、BRA4 株を野生株として変異源処理を行った結果、得られた処理株の中から、病原性が著しく低下し、かつ、黒腐病に対して高い防除効果を有する N74 株を選抜することができた。

微生物を用いた病害防除の作用として、抗菌性物質の産生による病原菌の殺菌あるいは静菌作用^{18,9)}、菌寄生、宿主の抵抗性反応の誘導^{8,21)}、進入門戸での競合作用²¹⁾ あるいは hypovirulence⁷⁾ による病原菌の病原性の低下などがある。本試験において認められた *P. gladioli* による黒腐病防除のメカニズムについては、本細菌の産生する抗菌性物質による作用がまず考えられるが、抗菌性物質を産生する細菌株でも黒腐病に対する防除効果が低い菌株があることや、進入門戸において黒腐病の増殖を

抑制するに十分な抗菌性物質が産生されているかは明らかでないことなどから、それ以外の要因の関与も考慮する必要がある。

褐色腐敗病細菌 BRA4 株は根面から分離された非病原性の *P. gladioli* に比べて、黒腐病に対する防除効果が高く、褐色腐敗病細菌の4菌株のうち病原性が高い菌株ほど、黒腐病に対する防除効果が高かった。また、変異源処理株のうち、病原性が著しく低下した株は、黒腐病細菌との混合接種試験で、黒腐病病斑の拡大を抑制する能力が低い場合が多かったことから、病原性と防除効果の連鎖が想像された。しかし、ここでも N74 株のような例外があり、防除効果の機作あるいはチューリップに対する病原性は多数の要因によって構成されているものと推察された。黒腐病に対する防除効果や病原性の程度が異なる菌株間に培地上における抗菌性物質の産生能に差は認められなかった。この病原性や防除効果の差が、進入門戸での増殖能力の差によって生ずるものと仮定すれば、進入門戸での競合作用が防除機構の重要な要因となるものと考えられた。今後は、進入門戸での抗菌性物質の産生能や増殖能力などについて、比較する必要があると考えられた。なお、BRA4 株と黒腐病細菌を球根上で対峙接種すると、黒腐病病斑の拡大が抑制されたことから、BRA4 株の接種によって黒腐病に対する抵抗性

反応が誘導される可能性が示唆された。

有用な拮抗細菌株を選抜するには、数多くの細菌株を選抜し、その防除効果を判定する必要がある。チューリップの場合、試験を行う時期が制約され、かつ供試できる細菌株の数は限られることから、防除試験に供する候補株を効率的に選抜する必要がある。まず、病原性を検定するには、チューリップ球根に接種することが望ましいが、本法は期間が限定されるので、周年的に行える簡易な病原性検定方法の確立が望まれる。イネもみ枯細菌病では、NTG処理によって培養性状に変異を起こした菌株に非病原性の株が多いことが報告されている²⁾が、本試験では培養性状の変異と病原性の低下との間には直接的な関係は認められなかった。一方、*P. gladioli* はタマネギ鱗茎を腐敗させることから、タマネギ鱗茎に対する腐敗能と病原性の関係を調査したところ、タマネギ腐敗能の低い菌株はチューリップに対する病原性が低かった。よって、非病原性の菌株はタマネギ腐敗能によって選抜することが可能であると考えられた。ただし、病原性を構成する複数の要因のうち、いくつかは防除効果と強く関連している可能性があることを念頭において、タマネギを用いた非病原性株のスクリーニングを行う必要があると考えられた。

今後、本研究で選抜された N74 株を用いた効率的な接種方法あるいは大量培養法について検討するとともに、さらに効果の高い菌株の選抜を行う必要があると考えられた。また、褐色腐敗病細菌は球根腐敗病の貯蔵中の発生を抑制する傾向が認められる¹⁾ことから、黒腐病のみならず球根腐敗病などのその他のポストハーベスト病害の生物防除の可能性についても検討する必要があると考えられた。

生物防除と薬剤防除の両試験を行った3カ年のうち、1993年と1994年は、1992年に比べて全体に防除効果は低かった。これは、前接種菌の接種濃度が1992年は 2×10^7 CFU/mlであったのに対し、1993年と1994年は 5×10^7 CFU/mlとやや高濃度であったため、生物防除と薬剤防除の効果が低かったものと推察された。褐色腐敗病の場合、自然条件下での薬液中の接種濃度は $10^3 \sim 10^6$ CFU/ml程度と推察される¹⁾。黒腐病細菌の場合も同程度の接種濃度であると仮定すると、本研究で行った前接種の濃度はそれに比べてかなり高く、自然発病条件下での生物防除と薬剤防除の効果は、本研究での防除結果に比べて高いものと推察された。

両病害の薬剤による防除には、収穫・水洗後の球根をオキシテトラサイクリン・ストレプトマイシン剤、銅・ストレプトマイシン剤および銅水和剤(水酸化第二銅もしくは塩基性硫酸銅)のいずれかの250~500倍液に15分間浸漬することが有効と考えられた。銅水和剤含有劑

の250倍液処理では、球根表面に薬剤の汚れが顕著であり、球根販売では支障があると考えられたが、種球根に用いる限りにおいては問題が無いと考えられた。なお、いずれの薬剤もチューリップに未登録であることから、早期の登録が望まれる。

以上、黒腐病と褐色腐敗病に対して拮抗細菌を用いた生物防除法や薬剤による防除法が明らかとなったが、種球根の選別の重要性和収穫後の調整時の発病要因¹⁾および品種の抵抗性²⁾を考慮して、総合的な防除対策を講じることが重要である。

摘 要

チューリップの細菌性ポストハーベスト病害である黒腐病と褐色腐敗病の防除に有効な拮抗細菌の選抜と薬剤の選定を行った。チューリップやネギ根面から分離された *Pseudomonas gladioli* や *P. cepacia* などの拮抗細菌の中に、黒腐病や褐色腐敗病に対して薬剤と同程度の防除効果を有するものが認められた。黒腐病に対しては、これら拮抗細菌よりも褐色腐敗病細菌 *P. gladioli* BRA4 株の効果が高かった。そこで、BRA4 株を野生株とし、変異源処理を行ったところ、ニトロソグアニジン (NTG) 処理株の中から病原性が著しく低く、黒腐病に対して防除効果の高い N74 株が選抜された。変異源処理によって病原性が低下した株は、タマネギ鱗茎に対する腐敗能も低下したことから、タマネギを用いて、病原性低下変異株の選抜が可能であると考えた。本研究に供試した拮抗細菌は、全て培地上で黒腐病細菌の生育を抑制する抗菌性物質を産生した。薬剤防除試験の結果から、黒腐病と褐色腐敗病に対して、銅水和剤の防除効果が安定して高いことが明らかとなった。

引用文献

- 1) Brisbane, P. G. and Rovira, A. D. (1988) Mechanisms of inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by fluorescent pseudomonads. *Plant Path.* 37: 104-111.
- 2) 築尾嘉章 (1993) 種子バクテリアゼーションによるテンサイ苗立枯病の防除—ベレット種子への拮抗細菌の導入—. *植物防疫* 47: 130-133.
- 3) Furuya, N., Okamoto, T., Kori, Y., Matsuyama, N. and Wakimoto, S. (1991) Control of bacterial seedling rot of rice by avirulent strains of *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 57: 371-376.
- 4) 後藤正夫・瀧川雄一 (1984) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた(3). *植物防疫* 38: 432-437.

- 5) 後藤正夫・龍川雄一(1984)植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた(4). 植物防疫 38 : 479-484.
- 6) Homma, Y. and Suzui, T. (1989) Role of antibiotic production in suppression of radish damping-off by seed bacterization with *Pseudomonas cepacia*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 55 : 643-652.
- 7) Jaynes, R. A. and Elliston, J. E. (1982) Hypovirulent isolates of *Endothia parasitica* associated with large American chestnut trees. Plant Dis. 99 : 769-772.
- 8) Kempe, J. and Sequeria, L. (1983) Biological control of bacterial wilt of potatoes : Attempts of induce resistance by treating tubers with bacteria. Plant Dis. 67 : 499-503.
- 9) 木嶋利男・有江 力・木村 栄・峯岸長利・手塚伸浩・橋田宏一・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.
- 10) Koomen, I. and Jeffries, P. (1993) Effects of antagonistic microorganisms on post-harvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. Plant Path. 42 : 230-237.
- 11) Leben, S. D., Wadi, J. A. and Easton, G. D. (1987) Effect of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 77 : 1592-1595.
- 12) 牧野孝宏(1993)花き類の根頭がんしゅ病およびメロン毛根病・つる枯病の生物防除に関する研究. 静岡農試特別報告 17 : 1-100.
- 13) 守川俊幸(1993)チューリップ褐色腐敗病の発生と防除. 植物防疫 47 : 76-78.
- 14) Morikawa, T., Chikuo, Y. and Nomura, Y. (1996) Influence of inoculation with *Pseudomonas andropogonis* or *P. gladioli* on occurrence of post-harvest diseases of tulip bulbs : bulb rot, bacterial black rot and bacterial brown rot. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62 : 505-507.
- 15) 守川俊幸・野村良邦(1994)チューリップ褐色腐敗病細菌 *Pseudomonas gladioli* の選択培地. 北陸病害虫研報 42 : 57-61.
- 16) 守川俊幸・野村良邦・築尾嘉章(1996)チューリップ球根の調整過程における黒腐病と褐色腐敗病の発生要因. 日植病報 62 : 429-432.
- 17) 守川俊幸・野村良邦・大浦佳世子(1993)黒腐病と褐色腐敗病に対するチューリップの品種間差異. 北陸病害虫研報 41 : 57-61.
- 18) 守川俊幸・山本孝彗・福田徳治・野村良邦・稲垣佳世子(1993)収穫後のチューリップ球根に黒褐色病斑を形成させる細菌病. 日植病報 59 : 10-17.
- 19) 西山幸司(1978)植物病原細菌簡易同定法の試案. 植物防疫 32 : 283-288.
- 20) 西山幸司・草葉敏彦・太田光輝・名畑清信・江塚昭典(1979) *Pseudomonas andropogonis* によるチューリップ黒腐病. 日植病報 45 : 688-694.
- 21) 小川 奎(1988)サツマイモつる割病に関する研究. 農研センター研報 10 : 1-125.
- 22) Palleroni, N. J. (1984) Family I. Pseudomonadaceae. In Bergey's manual of systematic bacteriology vol.1 (Krieg, N. R. et al. eds.), 141-218, Williams & Wilkins, Baltimore.
- 23) Smilanick, J. L. and Denis-Arrue, R. (1992) Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. Plant Dis. 76 : 481-485.
- 24) 土屋健一(1993)9. 変異体誘発法 9-1 細菌. 植物病原性微生物研究法(脇本 哲監修), 331-337, ソフトサイエンス社, 東京.
- 25) 土屋健一(1994)生物防除利用微生物の効能とリスクアセスメント-*Pseudomonas cepacia* の例を中心として-. バイオコントロール研究会レポート 4 : 35-44.
- 26) Wakimoto, S., Hirayae, K., Tsuchiya, K., Kushima, Y., Furuya, N. and Matsuyama, N. (1986) Production of antibiotics by plant pathogenic pseudomonads. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 52 : 835-842.
- 27) Wang, Z., Yanagita, R., Tsuchiya, K., Matsuyama, N. and Wakimoto, S. (1991) Relationship between pigment productivity and some other bacteriological properties in mutant strains of *Pseudomonas glumae* induced by nitrosoguanidine-treatment. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 57 : 219-224.
- 28) Wilson, C.L. and Chalutz, E. (1989) Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. Scientia Horticulture 40 : 105-112.

(1996年5月1日受領)