

氏 名(本籍)	ふく 福	はら 原	せい 誠	じ 司
学位の種類	博 士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 8 2 8 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	根内共生糸状菌 <i>Heteroconium chaetospira</i> による根こぶ病 の効果的な防除法の確立			
論文審査委員	(主 査)	教 授	羽 柴 輝 良	
	(副 査)	教 授	松 田 一 寛	
		教 授	菅 原 和 夫	

# 論文内容要旨

## 緒言

根こぶ病は、根こぶ病菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) により引き起こされる難防除土壌病害で、ハクサイやキャベツ、ブロッコリーなどのアブラナ科野菜に甚大な被害をもたらす。現在最も有効な防除法は、臭化メチルなどによる薬剤の使用となっているが、臭化メチルはオゾン層を破壊することが指摘され、2005年に全廃が決定されている。また、薬剤の使用は環境汚染や人体への影響が懸念されているため、土壌消毒に替わる防除法の開発が急務となっている。

このため薬剤に替わる新たな防除法として、生物防除に期待が高まっている。このような中で、根内共生糸状菌、*Heteroconium chaetospira* が単離された。*H. chaetospira* の定着により、根こぶ病をはじめとするハクサイの主要病害に対して抑制効果を示すことが明らかになってきた。

本研究では、ハクサイの根こぶ病を圃場試験レベルで効果的に抑制した根内共生糸状菌 *H. chaetospira* を供試し、微生物農薬の実用化を旨として、根こぶ病抑制に有効な菌株の選定、菌株の長期保存法、ポット試験及び圃場試験での根こぶ病抑制条件を検討し、本菌による根こぶ病の効果的防除法を確立した。

## 1 根内共生糸状菌の選定と長期保存法

環境の変化の激しい根圏ではなくハクサイの根内に着目し、ハクサイ根こぶ病防除に有効な糸状菌の探索が行われ、ハクサイの根内に定着できる 322 菌株の糸状菌が単離された。これらの菌株から、根こぶ病の抑制に最適な菌株を絞り込むとともに、保存法の検討を行った。

322 菌株の糸状菌のうち、コムギ畑土壌からの 14 菌株、牧草地からの 2 菌株の計 16 菌株をハクサイ根内に定着させ、殺菌土壌に根こぶ病休眠胞子を混合したポットに移植して検定したところ、根こぶ病抵抗性品種とほぼ同等の発病指数 20 以下を示し、根こぶ病の発病を抑えた (第 1 表)。さらに、非殺菌土壌では、2 菌株、*H. chaetospira* (H4007) と dark-septate fungus (DSF) (OGR3) が発病指数 21 および 27 を示し、根こぶ病を効果的に抑制した (第 1 表)。DSF

は、隔壁を有し、黒～暗褐色の糸状菌で、通常の培養では分生子を形成しないため、未同定菌株であった。*H. chaetospira* (H4007)と DSF (OGR3)株の、ITS を含む rDNA 領域の塩基配列を比較したところ、637bp について 100%一致を見たことから、OGR3 は *H. chaetospira* であると同定した (第 1 図)。菌株の変異を抑え、生理学的性質を安定した状態で保存するため、プログラムフリーザによる凍結保存法の検討を行った (第 2 図)。冷却速度は、+4°C まで 3°C/min、+4°C で 5 分間保持、+4°C から -50°C まで 1°C/min、-50°C 以下では 5°C/min に設定し、-60°C まで冷却し、以後液体窒素に保存する条件が最適であった。凍結保護剤は、10% DMSO (ジメチルスルフォキシド) 単独、あるいは 10% DMSO と 10% スキムミルクの混合液が適していた。これらの結果から、*H. chaetospira* H4007 と OGR3 の 2 菌株を、ハクサイ根こぶ病の生物防除に最適な菌株として選定した。

## 2 ハクサイ根への *Heteroconium chaetospira* の効果的定着法

*H. chaetospira* H4007 あるいは OGR3 菌株がハクサイ根に定着するには、宿主との親和性が高いこと、接種後すみやかに定着すること、菌株の取り扱いが簡便で、均一に保存できること、定着能が安定していること、などが求められる。これらのことを踏まえ、以下に示す 5 つの方法で、ハクサイ根への *H. chaetospira* の効果的定着法を検討した。

各接種法は、ポリ製のポットで発芽させたハクサイの基部に *H. chaetospira* の懸濁液を接種する、懸濁液による接種法、ペトリ皿内の 1/2 濃度の CMMY 培地 (滅菌水 1L にモルトエキストラクト 10g、コーンミール 8.5g、寒天 7.5g、イーストエキストラクト 1g を加える) 上で生育させた *H. chaetospira* の菌叢上にハクサイ種子を直接播種する、平板培地上のコロニーによる接種法、ピートモスを圧縮、固化したペレットの中心部に 1/2 濃度の CMMY 培地上で生育させた *H. chaetospira* を接種し、これにハクサイを播種する、ピートモスペレットによる接種法、ペトリ皿内にろ紙を敷きその上にハクサイ種子を載せ、*H. chaetospira* の分生子の懸濁液を接種し、ろ紙で覆う、ペーパーサンドイッチ法、そして、薄の液体培地 (滅菌水 1L に NaNO<sub>3</sub> 1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>・

7H<sub>2</sub>O 0.2g、KCl 0.2g、グルコース 1g) で培養した *H. chaetospira* の分生子をピートモスに添加し、均一になるようによく混和する。*H. chaetospira* を混和したピートモスは、2 週間室温で培養後セルトレーに移し、その上に滅菌したハクサイ種子を播種し 2 週間育苗したピートモスによる接種法である (第 3 図)。

懸濁液による接種法では、*H. chaetospira* のハクサイ根への定着が 4.8% と低く、*H. chaetospira* は根内に確認されなかった。また平板培地上のコロニーによる接種法、ピートモスペレットを用いた方法では、定着率は 20-30% と低く、ハクサイの生育も良好でなかった。ペーパーサンドイッチ法では、定着率は 66.4% と高いが、ハクサイの生育は良好とは言えなかった。これらと比較し、ピートモス法は定着率が 78.0% と高く、またハクサイの生育も良好であり、根圏での *H. chaetospira* の定着が、他の接種法に比べ、均一であった (第 2 表、第 3 図)。ピートモス法は、根が伸長する領域に予め安定して菌を生育させておくことができること、供試する微生物以外の微生物から根部が比較的保護されやすいこと、また植物自体の生育も良好なことから最適と判定した。

### 3 ポット試験による *Heteroconium chaetospira* の根こぶ病抑制

根こぶ病の発病および防除には、土壤水分量、土壤 pH、土壤の種類によって影響を受ける。そこで、構築したピートモス法を用いて *H. chaetospira* を接種し、ハクサイ根こぶ病の抑制効果を土壤水分量、土壤 pH、土壤の種類と、病原菌密度との関係を検討した。

土壤中の水分量が 40-60% の間では、休眠孢子密度が 10<sup>5</sup> 個/g 乾土と高濃度でも、*H. chaetospira* の接種により発病を効果的に抑制した。しかし、土壤中の水分量が 80% になると *H. chaetospira* を接種しても、コントロールと同等に著しく発病した。土壤中の水分量が多くなるほど、*H. chaetospira* による病害抑制効果は低下することを認めた (第 4 図)。一方、*H. chaetospira* 無接種区で根こぶ病が抑制されたのは土壤水分が 40%、休眠孢子密度 10<sup>4</sup> 個/g 乾土のときのみであった。

*H. chaetospira* を接種することによって、土壤 pH5.5-7.2 の広い範囲で根こ

ぶ病が抑制された。*H. chaetospira* 無接種区で根こぶ病が抑制されたのは、pH7.2の時だけであった(第5図)。

土壌の種類では、黒ボク土と沖積土で *H. chaetospira* の定着により、発病が抑制された。黄色土では抑制効果は認められなかった(第6図)。これは各土壌の排水性、保水性に関係していることが示唆され、排水性不良の黄色土では、*H. chaetospira* の抑制効果が低下したと思われる。

*H. chaetospira* を用いてハクサイ根こぶ病の生物防除を行うには、土壌条件、土壌中の病原菌密度を考慮することによって高い防除効果が得られることが示された。

#### 4 圃場における *Heteroconium chaetospira* の根こぶ病抑制

*H. chaetospira* 接種ハクサイでは、中汚染圃場(病原菌密度： $5 \times 10^5$ 個/g 乾土)および重汚染圃場(病原菌密度： $3 \times 10^6$ 個/g 乾土)とも、*H. chaetospira* 接種によって根こぶ病が抑制された(第3表)。また、pF2.0-2.2では、*H. chaetospira* 接種によって根こぶ病の抑制が認められ、生重量が約500g増加した。一方、pF1.6-1.8では、*H. chaetospira* 接種によって根こぶ病の抑制効果は認められず、生長促進効果も見られなかった(第4表)。一般の圃場で高い発病が見られる土壌中の休眠孢子密度は $10^4$ 個/g 乾土程度とされていることから、土壌中の休眠孢子密度が $10^4$ 個/g 乾土以下で、pF2.0以下の水分条件であれば、*H. chaetospira* を利用することによって、根こぶ病の防除が可能であることを立証した。

#### まとめ

微生物を用いてハクサイ根こぶ病を防除するには、根内共生糸状菌 *Heteroconium chaetospira* の H4007 菌株または OGR3 菌株を用いる。両菌株は凍結保護剤として10%DMSO単独、あるいは10%DMSOと10%スキムミルクの混合液を添加して、プログラムフリーザで使用時まで凍結保存する。凍結保存した菌株は使用時、急速融解し、ピートモス法によってハクサイ根内にを

接種する。ピートモス法によるハクサイ根内への *H. chaetospira* の定着は次のようにして行う。薄の液体培地（滅菌水 1L に  $\text{NaNO}_3$  1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g、 $\text{KCl}$  0.2g、グルコース 1g）で培養した分生子の懸濁液をピートモスに混和させ、2週間培養する。培養後、ピートモスの上にハクサイを播種して2週間育苗し、ピートモスごと定植する。*H. chaetospira* を定着させたハクサイは、土壤水分が最大容水量で 60%以下、土壤中の休眠孢子密度が  $10^5$  個/g 乾土以下の圃場で、しかも、土壤 pH は 5.5-7.2 の範囲であれば高い防除効果が得られる。黒ボク土の圃場では更に防除効果が高まる。以上の防除手順によって、根内共生糸状菌 *H. chaetospira* による、難防除土壤病害であるハクサイ根こぶ病が防除できることを立証した。

第1表 根こぶ病抑制に有効な菌株の抑制効果試験

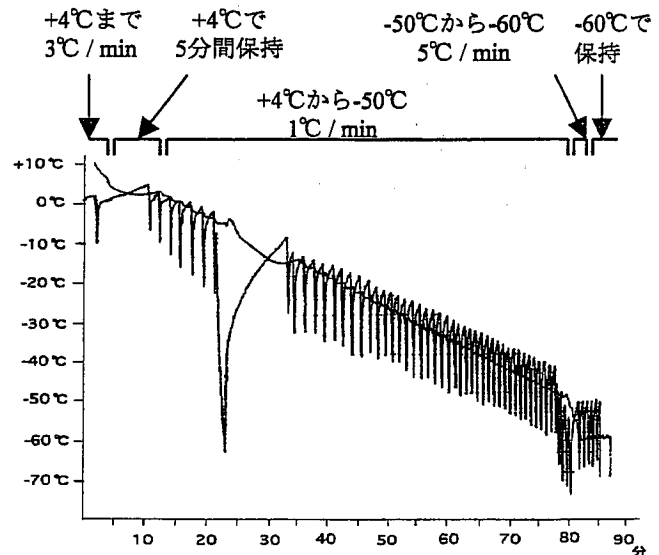
分離菌株 (菌株番号)	発病指数	
	殺菌土	非殺菌土
Hyaline-septate fungus (HSF) (H2015)	0	84
HSF (H2022)	0	100
<i>Westerdykella</i> sp. (H4027)	0	71.8
Dark-septate fungus (DSF) (M5016)	0	80
<i>Mortierella elongata</i> (M5056)	0	60
<i>Heteroconium chaetospora</i> (H4007)	1.1	21
DSF (M4005)	3.3	80
DSF (OGR3)	3.3	27
<i>M. elongata</i> (H4032)	6.7	100
DSF (M5009)	6.7	60
DSF (M5018)	6.7	40
DSF (M5019)	6.7	47.3
DSF (IM1005)	6.7	80
<i>H. chaetospora</i> (M4006)	10	15
HSF (H4023)	10	100
DSF (M5010)	20	100
コントロール	100	100

DSF: dark-septate fungus.

発病指数はYoshikawa *et al.*, (1977)の方法を改変し算出

No.	Target file	Definition	Match%	Over.	INIT	DPT
1	OGR3	ITS.A	100.0	537	2548	2548
Re6	ITS.As	ATTTAGAGGAGTAAAGTCTACACAGGTTCCGTAGGTGACCTCCGAGAGGATCATTT				
OGR3	ITS.A	ATTTAGAGGAGTAAAGTCTACACAGGTTCCGTAGGTGACCTCCGAGAGGATCATTT				
Re6	ITS.As	ACCGAGTTAGGGTCTTCTAGGCCGACCTCCGACCCATATTTATTGACCTCTGTTC				
OGR3	ITS.A	ACCGAGTTAGGGTCTTCTAGGCCGACCTCCGACCCATATTTATTGACCTCTGTTC				
Re6	ITS.As	TTCCGCGACCCGCTCAGCGCCGCGGAGGACCCCTGCAAGGCGTCTCTGGCCAGCGT				
OGR3	ITS.A	TTCCGCGACCCGCTCAGCGCCGCGGAGGACCCCTGCAAGGCGTCTCTGGCCAGCGT				
Re6	ITS.As	CCGCCGATGGCCAGCCCTTAACTCTGATGATGATCGTGTTCATATGCTTAGGTCTATGAT				
OGR3	ITS.A	CCGCCGATGGCCAGCCCTTAACTCTGATGATGATCGTGTTCATATGCTTAGGTCTATGAT				
Re6	ITS.As	TAAATTAAGCCAAACTTTCAACACGCGATCTCTTGGTTCTGGCCTCAGTAAAGACGCA				
OGR3	ITS.A	TAAATTAAGCCAAACTTTCAACACGCGATCTCTTGGTTCTGGCCTCAGTAAAGACGCA				
Re6	ITS.As	GCGAATGCGATTAAGTATGCGAATTCGCAATTCGAGTCACTGATCTTTGACCG				
OGR3	ITS.A	GCGAATGCGATTAAGTATGCGAATTCGCAATTCGAGTCACTGATCTTTGACCG				
Re6	ITS.As	CACATTCGCGCCTTTGGTATTCGAGAGGCGATGCGCTGTTCCAGCGTCAATTCACCCCTC				
OGR3	ITS.A	CACATTCGCGCCTTTGGTATTCGAGAGGCGATGCGCTGTTCCAGCGTCAATTCACCCCTC				
Re6	ITS.As	AGCCCTGTGCTTGGTGTGGACCGCTGGTCCAGCGATCGACCCCTCTTAAGACATGA				
OGR3	ITS.A	AGCCCTGTGCTTGGTGTGGACCGCTGGTCCAGCGATCGACCCCTCTTAAGACATGA				
Re6	ITS.As	CGGCGCCTGTGGTTCGCGGAGTACCTGAGCTTTACTGAGCAGCTATCGACAGAGGG				
OGR3	ITS.A	CGGCGCCTGTGGTTCGCGGAGTACCTGAGCTTTACTGAGCAGCTATCGACAGAGGG				
Re6	ITS.As	CACCCAGACCCGCTCTCTCTTACCTAGGAGACTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGG				
OGR3	ITS.A	CACCCAGACCCGCTCTCTCTTACCTAGGAGACTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGG				
Re6	ITS.As	TAGGATACCCGCTGACTTACGATATCATAGCG				
OGR3	ITS.A	TAGGATACCCGCTGACTTACGATATCATAGCG				

第1図 *H. chaetospora* (H4007)とOGR3のrDNA領域の塩基配列の比較

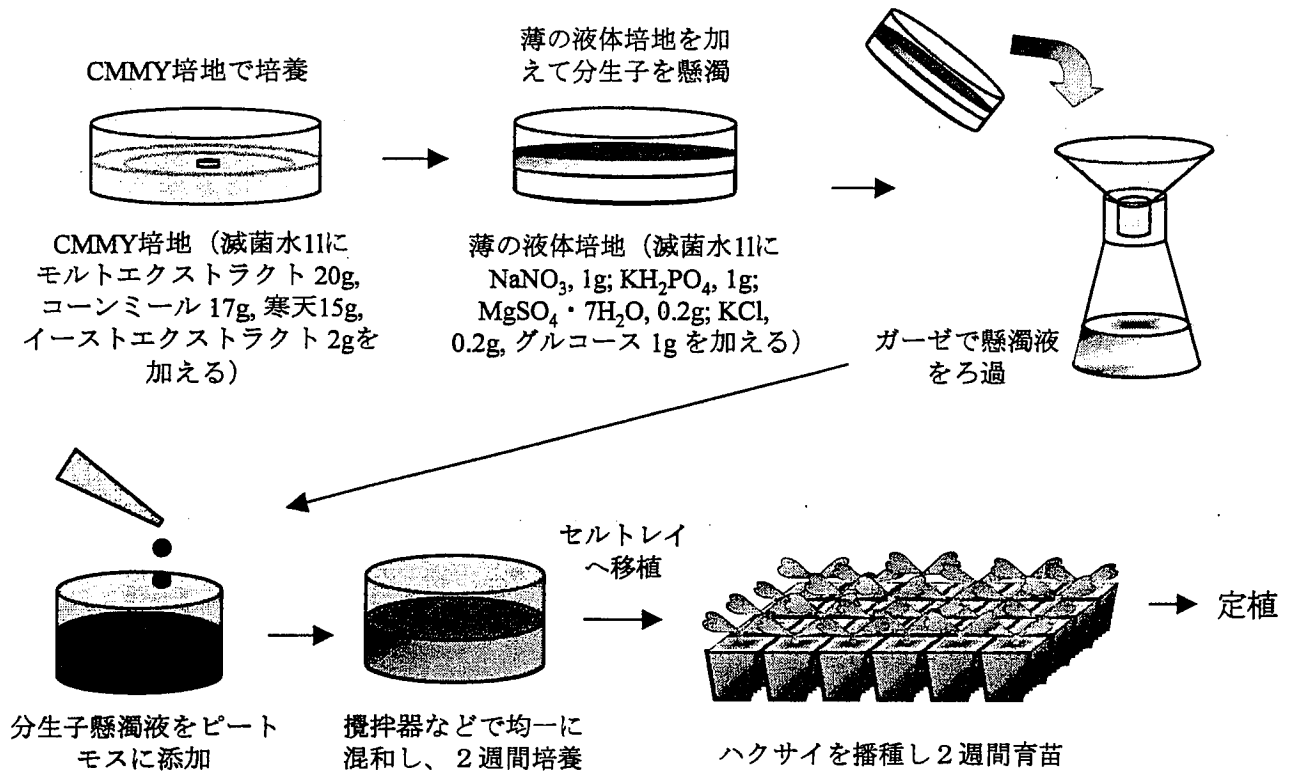


第2図 プログラムフリーザの冷却速度

第2表 *H. chaetospira*の根内定着法と定着率

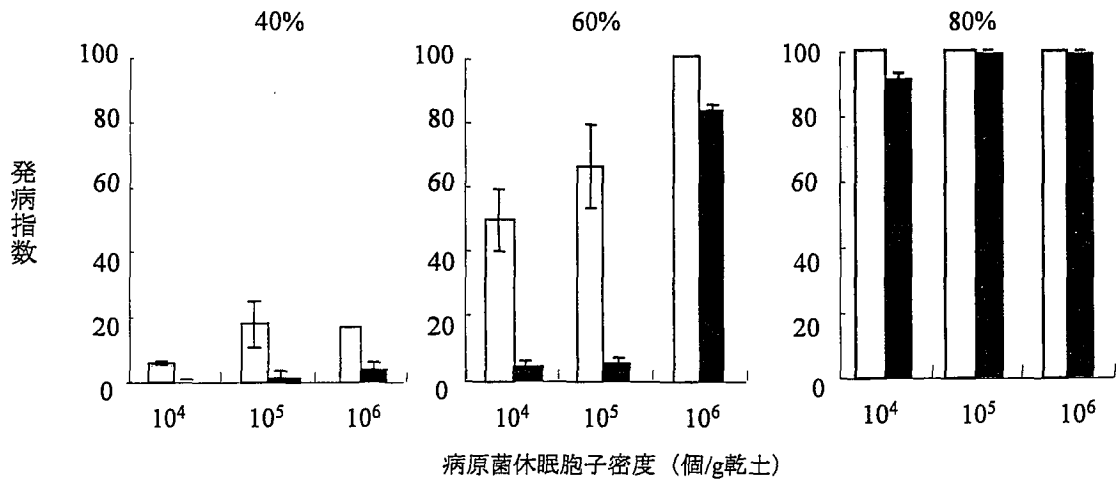
定着法	定着率 (%) a)
平板培地	19.7
ピートモスペレット	27.3
懸濁液	4.7
ペーパーサンドイッチ	66.7
ピートモス	78.0

a) 播種後2週間後、根への*H. chaetospira*定着の有無をグリッドシート法により計測

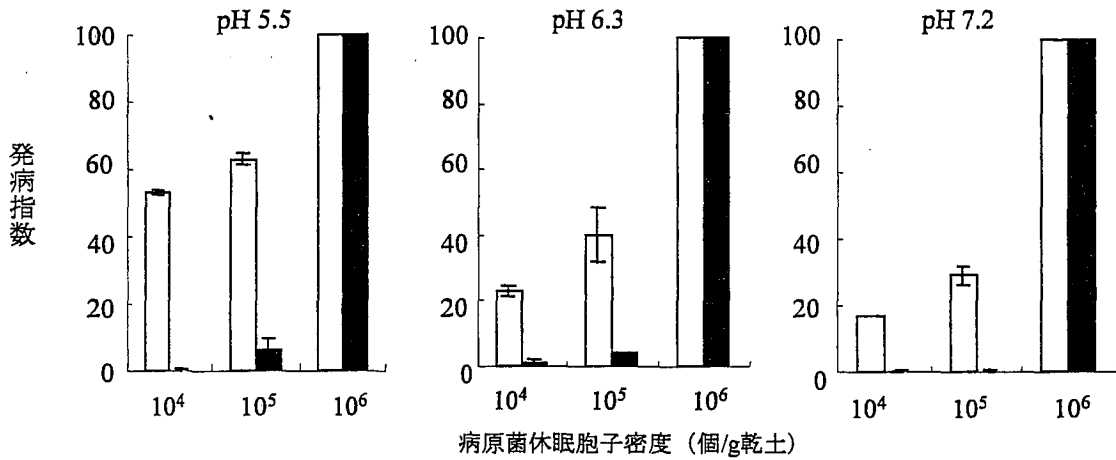


第3図 ピートモス法による接種法

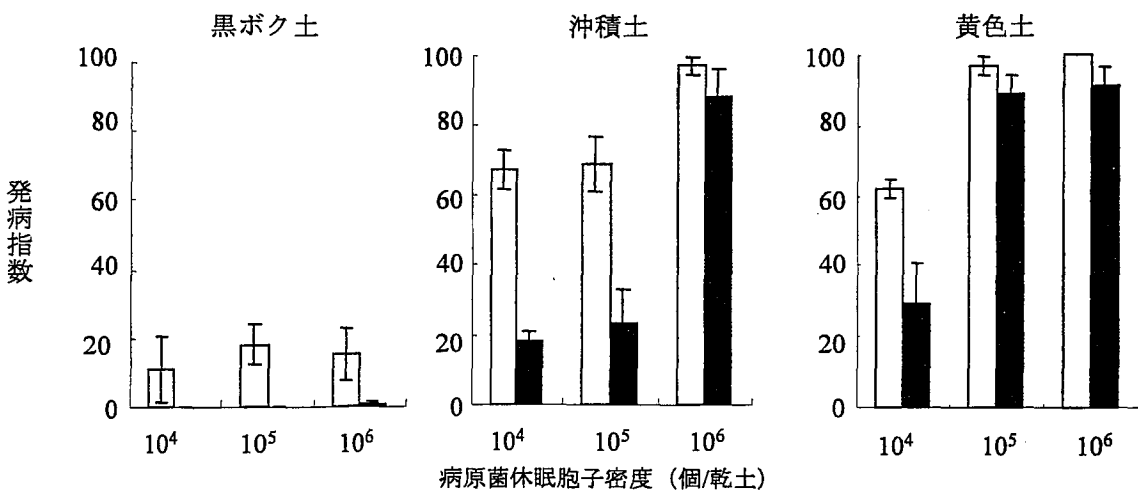




病原菌休眠孢子密度 (個/g乾土)  
 第4図 土壤水分量と根こぶ病抑制  
 □ 対照区 ■ *H. chaetospira*接種区



病原菌休眠孢子密度 (個/g乾土)  
 第5図 土壤pHと根こぶ病抑制  
 □ 対照区 ■ *H. chaetospira*接種区



病原菌休眠孢子密度 (個/乾土)  
 第6図 土壤の種類と根こぶ病抑制  
 □ 対照区 ■ *H. chaetospira*接種区

第3表 異なる菌密度下での*H. chaetospira*による根こぶ病の抑制

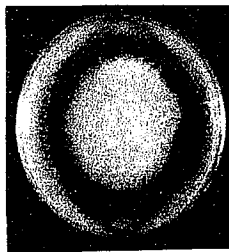
供試菌株	発病指数	
	中汚染圃場 ( $5 \times 10^5$ 個/g乾土)	重汚染圃場 ( $3 \times 10^6$ 個/g乾土)
<i>H. chaetospira</i> (H4007)	4	21
<i>H. chaetospira</i> (OGR3)	10	32
対照区 (無接種)	30	68

第4表 異なる土壤水分条件下での*H. chaetospira*によるハクサイ根こぶ病の防除

	高水分区 (pF 1.6-1.8)		中程度水分区 (pF 2.0-2.2)	
	対照区 (無接種)	<i>H. chaetospira</i> 接種区	対照区 (無接種)	<i>H. chaetospira</i> 接種区
発病指数	72.2	86.3	72.2	59.6
生重量 (g)	618.1	340.1	1090	1581

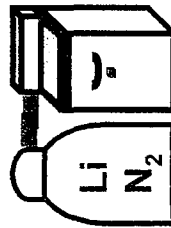
# まとめ

菌株の選定  
と同定



*H. chaetospira*  
(H4007 = OGR3)

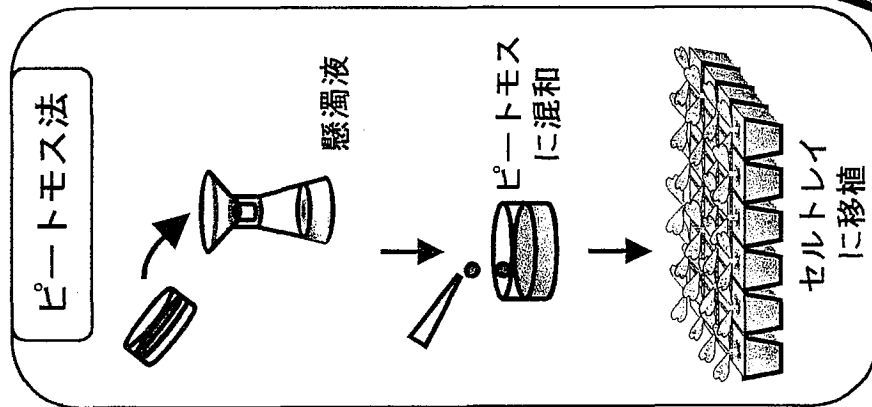
長期保存法  
の決定



凍結速度の決定

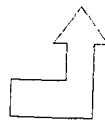
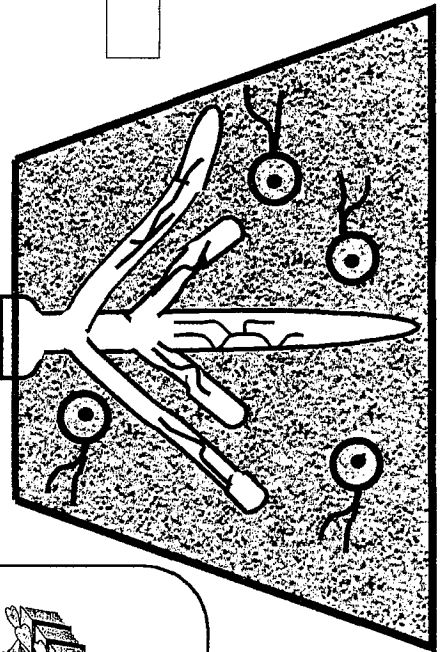
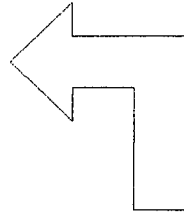
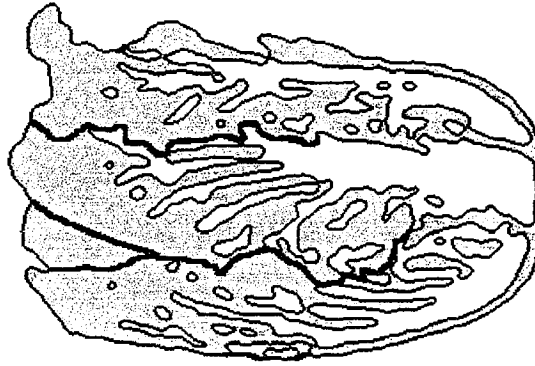
凍結保護剤：  
10% DMSO または  
10% DMSO +  
10% スキムミルク

効果的な定着法  
の決定



*H. chaetospira*による根こぶ病の  
効果的抑制条件

	ポット	圃場
根こぶ病菌 (個/g 乾土)	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> (無接種：10 <sup>4</sup> 以下)	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>
土壌水分	60%以下 (無接種：40%以下)	pF 2.0-2.2 (pF 1.6-1.8： 抑制効果ない)
土壌pH	5.5-7.2 (無接種：7.2)	—
土壌	黒ぼく土、沖積土 (黄色土：抑制効果ない)	—



定植

## 論文審査結果要旨

作物の多くは連作すると生育不良、収量低下、品質悪化等の連作障害を引き起こす。ハクサイの場合でも、日本各地の生産地で連作に伴い、難防除土壌病害であるアブラナ科根こぶ病が多発しており、大きな問題となっている。現在有効な防除法は薬剤の使用による土壌消毒となっているが、環境汚染や人体への影響が懸念されている。このため、土壌消毒に替わる防除法として、生物防除に期待が高まっている。このような中で、根内糸状菌 *Heteroconium chaetospira* が単離された。

本研究では、ハクサイの根こぶ病を圃場試験レベルで効果的に抑制した根内共生糸状菌 *H.chaetospira* を供試し、微生物農薬の実用化を旨とし、本菌による根こぶ病の効果的防除法を確立した。

ハクサイ根こぶ病の防除に最適な糸状菌として、根内共生糸状菌 *Heteroconium chaetospira* の H4007 菌株または OGR3 菌株が選定された。両菌株の保存には、凍結保護剤として 10% DMSO 単独、あるいは 10% DMSO と 10% スキムミルクの混合液を添加して、プログラムフリーザで使用時まで凍結保存する条件が適していた。凍結保存した菌株は使用時、急速融解してハクサイ根内に接種した。

*H.chaetospira* をピートモス法によりハクサイ根に接種した。ピーモス法は、Usuki の液体培地で培養した分生子の懸濁液をピートモスに混和させ 2 週間培養した。培養後、ピートモス上にハクサイを播種して 2 週間育苗し、ピートモスごと定植した。これにより、78.0% と高い定着率が得られた。ピートモス法は、根の伸長する領域に予め安定して菌を生育させておくことが出来ること、供試する微生物以外の微生物から根部が比較的保護されやすいこと、また植物自体の生育も良好なことから最適と判定した。

ピートモス法により *H.chaetospira* を接種したハクサイは、根こぶ病菌 *Plasmodiophora brassicae* の休眠孢子密度が  $10^5$  個/g 乾土以下、土壌水分が最大容水量で pF2.0 (水分含量約 60%) 以下、しかも土壌 pH は 5.5-7.2 の範囲で高い防除効果が得られた。土壌の種類では、黒ボク土で防除効果が高かった。また、*H.chaetospira* 接種により、生長促進効果も認められた。このことから、ハクサイ根こぶ病の生物防除を行うには、土壌条件、土壌中の病原菌密度を考慮することによって高い防除効果が得られることが示された。一般の圃場で高い発病が見られる土壌中の休眠孢子密度は  $10^4$  個/g 乾土程度とされていることから、土壌中の休眠孢子密度が  $10^4$  個/g 乾土以下で、pF2.0 以下の水分条件であれば、*H.chaetospira* を利用することによって、根こぶ病の防除が可能であることを立証した。

以上のように本研究は、根内共生糸状菌 *H.chaetospira* をハクサイに接種することで、難防除土壌病害であるハクサイ根こぶ病の防除手段の確立に寄与したと認められる。よって、審査員一同は、本論文は博士（農学）の学位を授与するに値する内容であると判定した。