

## アズキ立枯病の生物防除に関する研究

Biological Control of *Fusarium* Wilt of Adzukibean  
Caused by *Fusarium oxysporum*

長谷川伸作 児玉不二雄\*  
金島 弘恭 赤井 純\*

Shinsaku Hasegawa, Fujio Kodama\*,  
Hiroyasu Kaneshima, Jun Akai\*

### 緒論

アズキ立枯病は、1906年、半沢が初めて本病の存在について報告したが<sup>1)</sup>、以降、大規模な本病発生は報告されていなかった。最近、1983年、新たに北海道空知地方のアズキ畑に発病が確認され<sup>2)</sup>、そして、児玉らは1985年空知、石狩地方の2,200haのアズキ畑で本病害が大規模に発生したと報告した<sup>3)</sup>。

本病は、土壤由来の *Fusarium oxysporum* によって引き起こされる導管病であるが、本菌には感染対象の違いによる分化型があり、本病を引き起こすのは、この菌種の中の特定の菌株と考えられる<sup>2,3)</sup>。本菌は、アズキの根部から導管部に侵入、増殖し、葉部に「えそ」、黄化、萎ちようを引き起こし、アズキ本体を枯死させる。6月中旬から7月中旬に発病した株は、アズキ種子の収穫期以前に枯死し、種子の収穫は皆無となるほか、8月以降の発病株でも大幅な収量低下をきたす<sup>3,4)</sup>。

*Fusarium* 属菌の導管病防除については多くの研究がなされているが、単純な輪作、既存の薬剤散布、有機物の施用によっては容易に防除のできない病害である<sup>5,6,7,8)</sup>。一方、拮抗微生物を用いた生物防除の報告は少なく、圃場で成功した例は2、3にすぎず<sup>9,10,11)</sup>、アズキ立枯病防除において、生物防除を試みた報告例はない。

今回、筆者らは、植物の根圈に存在する微生物が、植物病原菌の抑制に何らかの作用を及ぼしているのではないかという Baker および Cook の考え方<sup>12)</sup>に基づき、植物病原菌に対して拮抗性をもつ微生物による生物防除の可能性を検討した。すなわち、アズキ根圈からアズキ立枯病菌 *F.*

*oxysporum*, FA-3 に拮抗作用を示す微生物を捕捉し、これらを用いた種子がバクテリアゼーションによる本病発病抑制効果を検討した。その結果、分離菌株が、本病の発病を著しく抑制する現象を認めた。本報では、アズキ立枯病に対する拮抗微生物の検索および分離菌株のうち効果が顕著であった *Pseudomonas cepacia* B17 の本病抑制試験の結果と、さらに産生する抗菌性物質の単離・同定について報告する。また、本菌の種々植物病原菌に対する抑制効果についても検討したので報告する。

### 実験材料および方法

#### 1. アズキ立枯病菌

1984年北海道石狩郡新篠津村のアズキ立枯病罹病株の茎から分離した *Fusarium oxysporum* の FA-3 菌株<sup>3)</sup> をアズキ立枯病菌株として以下の試験に供した。

#### 2. 拮抗微生物の単離および同定

アズキ立枯病菌に対する拮抗微生物の検索を次のように行った。

鈴木らの土壤分画法<sup>13)</sup>に基づきアズキ根圈から土壤の一次希釀液 R<sub>0</sub> および R<sub>1</sub> を得た。次に Herr の方法<sup>14)</sup>を一部改変した改良三層法によりプレートを作成した。すなわち、直径 9 cm のプレートに、あらかじめ 1.5% 素寒天 10 ml を敷き、その上に一次希釀液の適当な濃度の希釀液 1 ml を混和した 1.0% 素寒天 9 ml を重層した。これらプレートを 30°C, 2 ~ 4 日間培養し、コロニーの形成を確認した後、*F. oxysporum*, FA-3 孢子液 (10<sup>8</sup> 個/ml) を 2% 加えた Potato dextrose broth (Potato infusion, 2.0 g; glucose, 2.0 g; 蒸留水 1000 ml) をプレート寒天表面に噴霧し、さらに 28°C, 2 ~ 4 日間培養した。プレート上で阻止ゾーンを形成したコロニーから、細菌は Bouillon agar に、また放線菌は

\*北海道立中央農業試験場

Yeast extract-malt extract (YM) agar (Yeast extract, 4.0 g; Malt extract, 10.0 g; glucose, 4.0 g; 蒸留水, 1000 ml; pH 7.3; agar, 15.0 g)に釣菌し、保存するとともに、アズキ立枯病菌 *F. oxysporum*, FA-3に対する拮抗性を試験した。

分離菌株の細菌学的性状の試験は、主として Laboratory Methods in Microbiology<sup>15)</sup> に記載の方法に準拠して行った。菌株の同定は Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8 版<sup>16)</sup>、および 9 版<sup>17)</sup> に従って行った。

### 3. 抗菌活性試験

#### 1) 逆層法

分離菌株の含菌寒天プラグおよび単離抗菌性物質の抗菌活性は、岩佐らの方法<sup>18)</sup> に従い、下層にアズキ立枯病菌 *F. oxysporum*, FA-3 の胞子液 ( $10^8$  個/ml) を 2% シードした逆層プレートを用いて測定した。抗菌性物質の力価は、Abraham<sup>19)</sup> および Heatley<sup>20)</sup> の円筒平板法および Masuyama<sup>21)</sup> の検定法に準じて算出した。

#### 2) 対峙培養法

Potato dextrose agar (PDA, Difco 社製) 平板の中央およびその周縁に 15 mm 等間隔に 3 カ所、計 4 カ所へ、先に PDA 平板で 28°C, 7 日間培養の病原菌の菌そからコルクボーラーで打ち抜いた直径 8 mm 寒天プラグを移植した。同時に、あらかじめ、細菌は Brucella agar (Difco 社製) または Bouillon agar, 放線菌は YM agar 上で、30°C または 37°C, 4 日間培養しておき、コルクボーラーで打ち抜いた直径 8 mm の含菌寒天プラグを、植物病原菌の寒天プラグに対し 15 mm の位置へ 3 カ所移植し、28°C で培養した。この対峙培養で病原菌と分離拮抗微生物との間に形成された阻止帯の幅を  $+++ \geq 9.0$  mm,  $9.0 > ++ \geq 5.0$ ,  $5.0 > + \geq 2.0$ ,  $2.0 > (+) > 0.0$ ,  $- = 0.0$  と表示し、拮抗作用を評価した。

また、分離菌株の含菌寒天プラグのかわりに PDA 平板上に直径 8 mm の穴をあけ、抗菌性物質の溶解液 0.15 ml を添加し、対峙培養を行い、抗菌活性を評価した。

#### 3) 最小発育阻止濃度

抗菌性物質の種々植物病原菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、日本化学療法学会標準法<sup>22)</sup> に準拠して実施した。

2 倍希釈系列の濃度の抗菌性物質を含む PDA 平板を作製し、これに、あらかじめ PDA で 28°C, 7 日間培養の病原菌の菌そから画線接種した。これを、28°C, 7 日間培養し、肉眼的に病原菌の生育の有無を判定し、完全に発育が阻止された最低濃度をもって MIC とした。

#### 4. 抗菌性物質の単離と同定

アズキ立枯病菌 *F. oxysporum*, FA-3 に対し、強い拮抗

性を示した B17 菌株の産生する抗菌性物質の単離・同定を行った。

B17 菌株を Brucella agar 平板上で、30°C, 4 日間培養後、平板 1 枚あたり 15 ml のクロロホルムを寒天上に加え、計 64 枚の平板培養菌体から抗菌性物質の抽出を行った。同操作を 3 回繰り返した。抽出液から菌体を濾別し、濾液を減圧濃縮した。次に、濃縮液をシリカゲル薄層プレート (5% 酢酸エチル-ベンゼン) で展開した。この薄層プレートの一部を縦に細く切断し、FA-3 菌株の胞子をシードした逆層プレート上に静置して、28°C, 48 時間培養した。生じた発育阻止帯を確認し、残りの薄層プレートから、その部分のシリカゲルをかき取った。このシリカゲルをクロロホルムに懸濁し、シリカゲルカラムに負荷し、10% アセトン-クロロホルムで溶出させた。ペーパーディスク法で溶出分画の FA-3 菌株に対する抗菌活性を確認し、その分画を集めた。この分画の溶媒を留去し、粗結晶を得た。粗結晶に、シクロヘキサンを加えて、繰り返し再結晶を行った。

精製した結晶の融点および UV, IR, Mass, NMR スペクトラムを測定した。これら結果との類似が認められた Pyrrolnitrin (藤沢薬品社製) について比較検討を行った。

#### 5. 種子バクテリゼーションによるアズキ立枯病発病抑制試験

分離した拮抗微生物のうち、含菌寒天プラグの逆層法および対峙培養法で顕著な抗菌活性が認められた B-17 菌株を本病発病抑制試験に供した。アズキ立枯病菌 *F. oxysporum*, FA-3 を園芸作物用人工培土「クレハ園芸培土 (吳羽化学社製)」に乾土 1 g 当り  $10^8$  胞子濃度で混和し病土を作成し、別に Brucella broth (Difco 社製) で培養した B17 菌株の  $10^8$  個/ml 培養液に浸漬したアズキ種子 (品種: ハヤテショウズ) を播種した。1 ポットあたり 20 粒で、4 反復試験した。播種後 36 日後に葉部に「えそ」を生じたものを発病株と判定し、発病率を算出した。また、葉部に生じた「えそ」の程度に健全 0, ~ 全面黄化、萎ちよう 4 とした発病指数を与え、発病の度合について評価した。

## 結果および考察

### 1. 拮抗微生物の分離

1985 年 8 月および 9 月、北海道石狩および空知地方のアズキ立枯病発生畑の 3 カ所および十勝地方の未発生畑の 5 カ所、計 8 カ所のアズキ根巻土壌を採取した。これら土壌から改良三層法を用いてアズキ立枯病菌 *F. oxysporum*, FA-3 に対する拮抗微生物の分離を行った。実際に発病を抑制している拮抗微生物が生存している場所は植物根の表面付近と考え<sup>12)</sup>、アズキ根の土壌分画 R<sub>0</sub> または R<sub>1</sub><sup>13)</sup> に限定し、ここからの拮抗微生物分離を試みた。分離菌株のうち

含菌寒天プラグの逆層法または対峙培養法で活性が示されたものを拮抗微生物として扱った。その結果、アズキ畑8カ所のうち7カ所からアズキ立枯病菌に対して拮抗性を示す微生物18菌株を分離した。これら分離拮抗微生物をTable

1に示した。即ち、*Streptomyces* 属7株、*Pseudomonas* 属5株、*Flavobacterium* 属1株、*Acinetobacter* 属1株、未同定4株である。なお、これら拮抗微生物の検出頻度とアズキ立枯病の発生の有無とに関連は認められなかった。

Table 1 Isolated antagonistic microorganisms and their growth inhibition against *Fusarium oxysporum* FA-3

Sample source*	Strain No.		Inhibition zone (mm)				
			Reversed layer method**	Agar spot inoculation method*** (4days)	(7days)		
1 Ishikari Shinshinotsu	(R <sub>o</sub> )	No isolation					
2 Ishikari Shinshinotsu	(R <sub>o</sub> )	No. 2 <i>Streptomyces</i> sp.	24.0	11.2	+++	9.5	+++*†
3 Sorachi Bibai	(R <sub>o</sub> )	B28 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	trace	0.0	-	0.0	-
		B 2 <i>Streptomyces</i> sp.	19.0	5.0	++	5.0	++
		B 3 <i>Streptomyces</i> sp.	20.0	7.0	++	7.0	++
		B 6 <i>Streptomyces</i> sp.	25.0	9.0	+++	8.2	++
	(R <sub>i</sub> )	B17 <i>Pseudomonas cepacia</i>	33.8	7.0	++	3.5	+
4 Tokachi Memuro Sakae	(R <sub>o</sub> )	S-21 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	19.0	2.0	+	0.0	-
		AB 8	19.0	2.0	+	0.0	-
5 Tokachi Memuro Sakae	(R <sub>o</sub> )	AB59	trace	0.0	-	0.0	-
		AB60 <i>Streptomyces</i> sp.	trace	0.0	-	0.0	-
6 Tokachi Memuro Kitafushiko	(R <sub>o</sub> )	S-63 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	19.0	6.0	++	5.0	++
		AB 1 <i>Pseudomonas maltophilia</i>	19.0	4.0	+	4.0	+
		AB 4	22.5	5.0	++	2.3	+
		AB 7 <i>Flavovacterium</i> sp.	21.0	7.0	++	3.5	+
		AB 3 <i>Streptomyces</i> sp.	trace	5.0	++	5.0	++
		AB 5 <i>Streptomyces</i> sp.	trace	4.0	+	3.2	+
7 Tokachi Memuro (Noshi)	(R <sub>o</sub> )	AB58	trace	0.0	-	0.0	-
8 Tokachi Shimizu	(R <sub>o</sub> )	S-7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30.0	9.5	++	9.5	++

\* 1 Sample source : (R<sub>o</sub>) : Rhizoplane, (R<sub>i</sub>) : Inner rizosphere

\* 2 Reversed layer method : *Fusarium oxysporum* FA-3 spore seeding plates and 4days culture agar discs of isolated microorganisms were used.

\* 3 Agar spot inoculation method : 7days culture agar discs of *Fusarium oxysporum* FA-3 and 4days culture agar discs of isolated microorganisms.

\* 4 Inhibition zone between *Fusarium oxysporum* FA-3(pathogen) and the isolate : +++≥9.0mm, 9.0>++≥5.0, 5.0>+≥2.0, 2.0>(+)>0.0, - = 0.0

分離菌株のうち、B17 菌株は、その含菌寒天プラグを用いた逆層法の検定で、*F. oxysporum*, FA-3に対して、分離菌株中最大の生育阻止帯（直径 33.8 mm）を示し、また対峙培養でも強い阻止帯（7.0 mm, 4 日目）を示した。このことから本菌をアズキ立枯病発病抑制試験に供するとともにその產生する抗菌性物質の単離同定を行った。

## 2. 拮抗微生物 B17 菌株の微生物学的性状

拮抗微生物 B17 菌株の微生物学的性状を Table 2 に示した。

拮抗微生物 B17 菌株は、MacConkey agar (Difco 社製) および NAC agar (栄研化学社製) で生育した。また、Brucella agar および Bouillon agar 上で黄色ないしは茶褐色

Table 2 Microbial characteristics of Strain B17

Cell morphology	Short rods, 1.0 by 1.7 to 2.0 $\mu\text{m}$
Spore formation	Negative
Number of flagella	>1
Motility	Motile
Gram-stain	Negative
Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation	Positive
Fluorescent pigment	Negative
Diffusible pigment	Positive
Oxidase reaction	Positive
Catalase reaction	Positive
OF-glucose test	Oxidative
Denitrification	Negative
Reduction of nitrate to nitrite	Positive
Gelatin liquefaction	Positive
Starch hydrolysis	Negative
Lipase (Tween 80 hydrolysis)	Positive
Arginine dihydrolase	Negative
Lysine decarboxylase	Positive
Ornithine decarboxylase	Positive
Urease	Negative
Acid production from:	
[D-ribose, D-fructose, D-glucose, Lactose, Maltose, D-mannose, Sucrose, Salicin, Mannitol]	Positive
[D-xylose]	Negative
Utilization of:	
Citrate, Gluconate, Caprate, Adipate, Malate, Phenyl acetate	Positive
Protocatechuate, <i>ortho</i> cleavage	Positive
Mol% G+C of DNA	67.1

色、光沢、凸状のコロニーを形成した。本菌は $1.0 \times 1.7 \sim 2.0 \mu\text{m}$ の短桿菌で、グラム陰性、べん毛を持ち、運動性を有し、細胞内に Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate の蓄積を認めた。チトクロームオキシダーゼテスト陽性、カタラーゼテスト陽性、また、黄色～茶褐色の水溶性色素の産生を示した。硝酸塩から亜硝酸塩への還元陽性、亜硝酸塩から窒素ガスへの還元陰性、アルギニンジヒドロラーゼ陰性、酸化によって糖を分解した。DNAのGC含量は67.1 mol%を示した。これらの結果から、本B17菌株を *Pseudomonas cepacia* (ex Burkholder) Polleroni and Holmes<sup>17</sup> と同定した。

### 3. 抗菌性物質の単離と同定

*P. cepacia* B17 が産生する抗菌性物質は Brucella agar 上に生育させた細菌細胞から抽出した。64枚の培養寒天プレートから 11.5 mg の pale yellow の結晶を得た。この結晶は、融点 125°C を示し、エタノール、ブタノール、アセトン、クロロホルムに可溶、水、石油エーテル、シクロヘキサンにわずかに溶けた。UV, IR, Mass および NMR スペクトルが完全に一致することから、本品を分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_2\text{N}_2\text{Cl}_2$  を示す Pyrrolnitrin (3-chloro-4-[2'-nitro-3'-chlorophenyl]-pyrrole)<sup>23</sup> と同定した。Pyrrolnitrin の NMR スペクトルと構造式を Fig. 1 に示した。

### 4. *Pseudomonas cepacia*, B-17 と産生する抗菌性物質 Pyrrolnitrin の種々植物病原菌に対する抗菌活性

種々の植物病原菌21菌株に対する *P. cepacia* B17 の含菌寒天プラグを用いた対峙培養の結果および本菌の産生する抗菌性物質 Pyrrolnitrin の最小発育阻止濃度 (MIC) を Table 3 に示した。

B17 菌株は、対峙培養において、アズキ立枯病菌 *F. oxysporum*, FA-3 をはじめとする *Fusarium* 属菌に対し、4 日培養で++の活性を示した。しかし、7 日目ではその

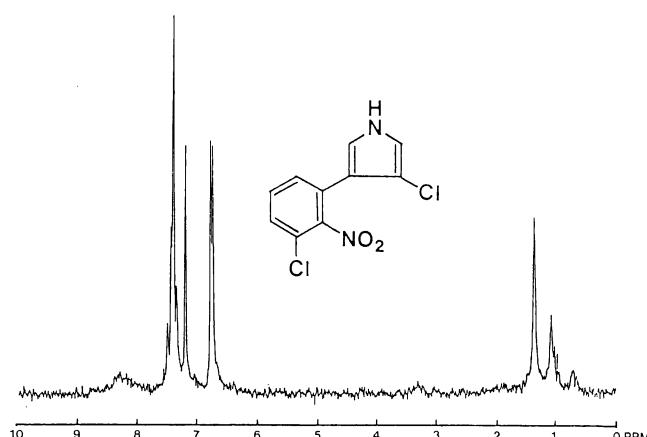
Fig. 1 Chemical structure and  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (in  $\text{CDCl}_3$ ) of pyrrolnitrin.

Table 3 Growth inhibition of the plant pathogens by the bacterial culture of *Pseudomonas cepacia* B17 and its antibiotic Pyrrolnitrin.

Phytopathogenic fungi	(Source)	Agar spot inoculation method <sup>*1</sup> (Inhibition zone(mm) <sup>*2</sup> )		MIC of Pyrrolnitrin <sup>*3</sup> (μg/ml)
		(4days)	(7days)	
38 <i>Fusarium oxysporum</i> FA-3	Adzuki bean	7.0 ++	3.5 +	3.13
19 <i>Fusarium</i> sp. FGH	Adzuki bean	5.0 ++	2.0 +	3.13
17 <i>Fusarium oxysporum</i> F-1	Adzuki bean	6.0 ++	0.0 -	3.13
18 <i>Fusarium oxysporum</i> Fsp-1	Spinach	8.2 ++	6.2 ++	3.13
29 <i>Fusarium oxysporum</i>	Spinach	6.2 ++	3.5 +	3.13
32 <i>Fusarium oxysporum</i>	Green pepper	5.8 ++	3.5 +	3.13
33 <i>Fusarium oxysporum</i>	Strawberry	7.2 ++	4.7 +	6.25
34 <i>Fusarium oxysporum</i>	Melon	4.8 +	2.0 +	6.25
39 <i>Fusarium oxysporum</i> KF-244	Tomato	5.8 ++	0.0 -	6.25
40 <i>Fusarium oxysporum</i> KF-228	Onion	0.0 -	0.0 -	200
41 <i>Fusarium solani</i>	Rice	5.0 ++	0.0 -	25
24 <i>Fusarium moniliforme</i> 17-1	Rice	7.0 ++	0.0 -	25
36 <i>Fusarium moniliforme</i> 4-4	Rice	8.5 ++	3.2 +	3.13
35 <i>Fusarium roseum</i>	Wheat	9.0 +++	0.0 -	3.13
21 <i>Biporialis sorokiniana</i> Hel-2	Rice	9.5 +++	9.5 +++	0.78
25 <i>Alternaria alternata</i>	Rice	11.0 +++	11.0 +++	0.78
23 <i>Cladosporium cucumerinum</i> Se-2	Melon	10.0 +++	10.0 +++	0.78
22 <i>Pyricularia oryzae</i>	Rice	9.0 +++	8.0 ++	0.78
31 <i>Rhizoctonia solani</i> KF-269	Potato	12.5 +++	8.5 ++	0.39
30 <i>Pythium graminicolum</i> Py82-S	Rice	N.D. <sup>*4</sup>	12.0 +++	3.13
28 <i>Verticillium dahliae</i>	Strawberry	13.0 +++	11.9 +++	0.78

\* 1 Agar spot inoculation method : 7days culture agar discs of phytopathogenic fungi and 4 days culture agar discs of *Pseudomonas cepacia* B17.

\* 2 Inhibition zone between the pathogen and *Pseudomonas cepacia* B17 : +++ $\geq$ 9.0mm, 9.0>++ $\geq$ 5.0, 5.0>+ $\geq$ 2.0, 2.0>(+)>0.0, - = 0.0

\* 3 MIC : Minimum inhibitory concentration (μg/ml)

\* 4 N.D. : not detected.

活性が低下する傾向を示した。プレート上の対峙培養では *Fusarium* 属菌に対する活性が持続しなかった。一方、*Fusarium* 属菌株以外の *Biporialis sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium graminicola*, *Verticillium dahliae* では 7 日目でも阻止帯を維持し, +++ または ++ の強い活性を示した。

Pyrrolnitrin の MIC は, *F. oxysporum*, FA-3 で 3.13 μg/ml, 他の *Fusarium* 属菌で 3.13 ~ 25 μg/ml を示した。これに対し, *Fusarium* 属菌以外では 0.39 ~ 3.13 μg/ml とさらに低い MIC を示し, 種々植物病原菌に対し, 強い抗菌活性が認められた。

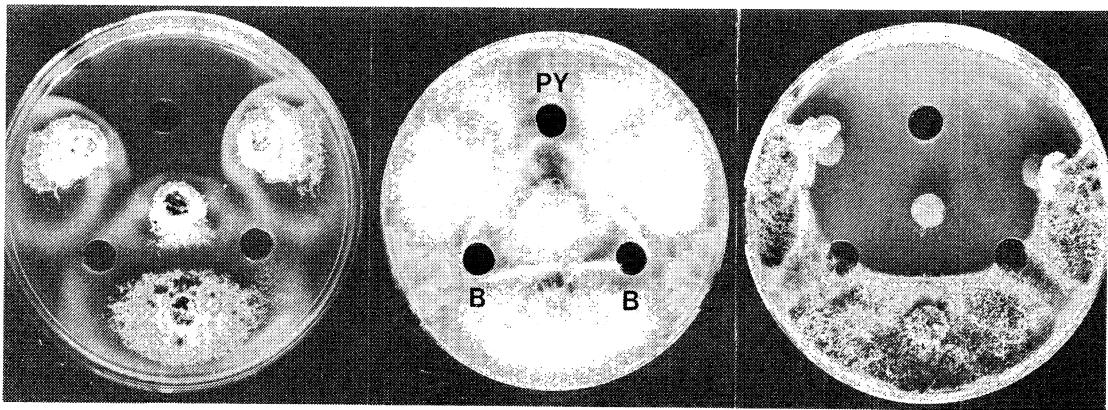
なお, Table 3 および Fig. 2 から明らかなように, タマネギ由来の *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, KF228 は,

*P. cepacia*, B17 の含菌寒天プラグおよびその產生する Pyrrolnitrin に感受性を示さなかった。*F. oxysporum* の分化型の違いによって Pyrrolnitrin の感受性に差が認められた。

以上, *P. cepacia*, B17 および本菌の產生する Pyrrolnitrin は, アズキ立枯病菌 *F. oxysporum*, FA-3 をはじめとする *Fusarium* 属菌に抗菌活性を示した。さらに, *Fusarium* 属菌以外の植物病原菌に対し強い抗菌活性を示す傾向が認められた。しかし, *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, KF228 は, 本抗菌性物質に感受性を示さなかった。

5. *Pseudomonas cepacia*, B17 の種子バクテリゼーションによるアズキ立枯病抑制効果

*P. cepacia*, B17 の種子バクテリゼーションによるアズキ立枯病抑制試験の結果を Table 4 に示した。



*Fusarium oxysporum*  
FA-3  
(adzuki-bean)

*Fusarium oxysporum*  
KF-228  
(onion)

*Rhizoctonia solani*  
KF-269  
(potato)

Fig. 2 Antibiotic effect on *Fusarium oxysporum* FA-3, *F. oxysporum* KF-228 and *Rhizoctonia solani* KF-269 of pyrrolnitrin.

Plates were 7days culture. 0.15 ml of 16 µg/ml pyrrolnitrin was used.

PY : pyrrolnitrin

B : blank (no drug)

Table 4 Effect of seed bacterization with *Pseudomonas cepacia* B17 on the control of Adzukibean wilt caused by *Fusarium oxy sporum* FA-3<sup>\*1</sup>

F.oxy. FA-3 <sup>*2</sup>	P.cepa. B17 <sup>*3</sup>	Diease incidence(%)					Disease severity index <sup>*5</sup>
		I	II	III	IV	Avr.	
1	+	—	60	85	85	75	76.3
2	+	+	10	0	15	10	8.8
3	—	+	0	0	0	0	0.0
4	—	—	0	0	0	0	0.0

\* 1 Adzukibean: Hayate-syozu was used.

\* 2 Pathogenic Fungi : *Fusarium oxysporum* FA-3

\* 3 Antagonistic microorganism : *Pseudomonas cepacia* B17

\* 4 + : treatment, — : no treatment

\* 5 Disease severity index : 0 : No necrotic lesion on the leaf, ~4 : Necrotic lesion appeared on all of the leaf and yellowing, wilt

B17 菌株の培養液は、その粘度が高く、十分に種子に付着することから、一般に種子バクテリゼーションで用いるメチルセルロースなどのコーティング剤は使用しなかった。アズキ種子を播種して36日後に発病抑制効果を観察した。その結果、*F. oxysporum*, FA-3 混入の病土で発病率は 76.3%と高い値を示した。これに対し、B17 菌株を種子コーティング処理した場合では、8.8%まで低下し、明ら

かな発病抑制効果が認められた。発病指数でも、2.14から0.17への低下が示され、B17 菌株の種子バクテリゼーションによるアズキ立枯病抑制効果が顕著に認められた。

この発病抑制機作は明らかではないが、*P. cepacia* の產生する Pyrrolnitrin が関与している可能性が極めて高いと考える。さらに、*P. cepacia* の実用化にあたっては、実際の圃場における実証試験が不可欠である。自然条件下で

の発病抑制機作の解明にあたっては、アズキ根面における *P. cepacia* およびアズキ立枯病菌、*F. oxysporum* の増殖、生存消長、拮抗関係などを詳しく調査する必要がある。

なお、*P. cepacia*、B17 およびこの細菌の產生する Pyrrolnitrin の植物病原菌に対する抗菌スペクトラムはかなり広範である (Table 3)。

したがって、作物の病害のなかでも最も防除しにくいとされる各種作物の *Fusarium* 病など土壤伝染性病害の生物防除への利用が期待される。

本研究は、昭和60年度からスタートした道立試験研究機関共同研究の一課題である「生物農薬の探索とその利用による農作物病害防除に関する研究」の一環として道立中央農業試験場と共同で行ったものである。

終わりに、抗菌性物質の分析に御支援賜わった北海道大学理学部白浜晴久教授に深謝いたします。また、Pyrrolnitrin を供与いただきました藤沢薬品工業に厚く御礼申し上げます。

## 要 約

1. 北海道石狩、空知および十勝地方のアズキ畑のアズキ根圈土壤から、改良三層法を用いてアズキ立枯病菌 *Fusarium oxysporum*, FA-3 に対する拮抗微生物の検索を試み、18菌株の微生物を分離した。*Streptomyces* 属 7 株、*Pseudomonas* 属 5 株、*Flavobacterium* 属 1 株、*Acinetobacter* 属 1 株、未同定 4 株であった。

2. 分離菌株のうち、B17 菌株はアズキ立枯病菌 *Fusarium oxysporum*, FA-3 に対し、強い抗菌活性を示した。

3. B17 菌株を、*Pseudomonas cepacia* (*ex* Burkholder) Palleroni and Holmes と同定した。

4. *P. cepacia*、B17 の產生する抗菌性物質を Pyrrolnitrin (3-chloro-4-[2'-nitro-3'-chlorophenyl]-pyrrole) と同定した。本抗菌性物質はアズキ立枯病菌 *F. oxysporum*, FA-3 に対し、3.13 μg/ml の最小発育阻止濃度を示した。

5. *P. cepacia*、B17 およびその產生する抗菌性物質の Pyrrolnitrin は、*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliiforme*, *F. roseum*, *Biporalis sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium graminicolum*, *Verticillium dahliae* に強い抗菌活性を示した。しかし、タマネギ由来の *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, KF-228 にはほとんど活性を示さなかった。

6. *P. cepacia*、B17 を用いたアズキ種子バクテリゼーション

によるアズキ立枯病発病抑制試験の結果、アズキ立枯病発度病率は76.3から8.8%に低下した。発病指数でも 2.14から0.17への低下が示され、本菌のアズキ立枯病抑制効果が認められた。

## 文 献

- 1) 半沢 淳：興農雑誌，14，176(1906)
- 2) 北沢健治、柳田駿策：日植病報，50，643(1984)
- 3) 児玉不二雄、五十嵐文雄、赤井 純、長谷川伸作：日本植物病理学会北海道部会要旨集（札幌）(1985)
- 4) 児玉不二雄、長谷川伸作：今月の農薬，30(3)，22(1986)
- 5) 駒田 旦：松尾卓見ら編、作物のフザリウム病，p. 88, 137, 全国農村教育協会、東京(1980)
- 6) 駒田 旦：新版土壤病害の手引編集委員会編、新版土壤病害の手引, p. 134, 日本植物防疫協会、東京(1984)
- 7) 小林達治：根の活力と根圈微生物, p. 178, 農山漁村文化協会、東京(1986)
- 8) Baker, K. F. and Cook, R. J.: Biological control of plant pathogens, Freeman, San Francisco (1974)
- 9) Brown, M. E.: Ann. Rev. Microbiol., 28, 181 (1974)
- 10) Schroth, M. N. and Hancock, J. G.: Ann. Rev. Microbiol., 35, 453 (1981)
- 11) 切貫武代司、尾藤博道、鈴木直治：神戸大農学研報 12(1), 41(1976)
- 12) Baker, K. F. and Cook, R. J.: Biological control of plant pathogens, p. 292, Freeman, San Francisco (1974)
- 13) 鈴木達彦、石沢修一：農技研報 B15, 91, (1965)
- 14) Herr, L. J.: Phytopathology, 49, 270 (1959)
- 15) Harrigam, W. F. and McCance, M. E.: Laboratory methods in microbiology. Academic Press, London (1966)
- 16) Buchaman, R. E. et al.: Bergey's manual of determinative bacteriology (8th. ed.), The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1974)
- 17) Krieg, N. R. (ed.) : Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1, (9th. ed.) The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1984)
- 18) Iwasa, T., Kameda, Y., Asai, M., Horii, S. and Mizuno, K.: J. Antibiotics, 24, 119 (1971)
- 19) Abraham, E. P. et al.: Lancet, 24, 177 (1941)

- 20) Heatley, N. G. : Biochem. J., 38, 61 (1944)
- 21) Masuyama, M. J. : Penicillin. I, 209 (1948)
- 22) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度測定法(1980)
- 23) Arima, K. et. al. : Agr. Biol. Chem. 28, 575 (1964)

### 英 文 要 約

During a study on biological control for *Fusarium* wilt of adzuki bean caused by *Fusarium oxysporum*, we isolated the 18 antagonistic microorganisms from the rhizosphere soil of adzuki bean by the improved triple layers method. They were 7 strains of *Streptomyces*, 5 of *Pseudomonas*, 1 of *Flavobacterium*, 1 of *Acinetobacter* and 4 of unknowns. Isolated strain B17 antagonistic to *F. oxysporum* was identified as *Pseudomonas cepacia* (*ex* Burkholder) Palleroni and Holmes. An antibiotic strongly inhibitory to *F. oxysporum* FA-3 was isolated from *P. cepacia* (B17) cultures and identified as pyrrolnitrin (3-chloro-4-2'-nitro-3'-chlorophenyl-pyrrole). The *P. cepacia* (B17) cultures and pyrrolnitrin also inhibited growth of many other plant pathogenic fungi: *F. solani*, *F. moliniforme*, *F. roseum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium graminicolum*, *Verticillium dahliae*, but did not *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. The minimum inhibitory concentration against the causal fungus (*F. oxysporum*, FA-3) of *Fusarium* wilt of adzukibean was 3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Treatment of adzukibean with *P. cepacia* B17 at the time of seeding in *F. oxysporum* FA-3-infested soil decreased the disease incidence from 76.3 to 8.8% and the disease severity index from 2.14 to 0.17.