

植物病原菌に対する抗菌物質を生産する

微生物の利用に関する研究* (第2報)

無殺菌土壌で白絹病菌 *Corticium centrifugum* に有効な対抗放線菌 2 株

西門義一・井上忠男・岡本康博

土壌伝染性の植物病害に対抗微生物を用いて防除しようという試みは以前から行われ、また近年でも多くの研究がある^{1, 2, 3, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 16, 17, 18)}。対抗微生物のうち対抗放線菌についても数多く報告されている。これらの報告は殺菌土壌を用いた防除試験では効果がみられたものもあるが、無殺菌土壌では効果が認められていない場合が多いようである。筆者らは白絹病菌、菌核病菌などの土壌伝染性病原菌に有効な対抗放線菌の選出を行つてゐるが、無殺菌の自然土壌を用いたガラス室試験で *Corticium centrifugum* による白絹病を或程度防除できる菌株 2 種を選び出した。本報ではこの 2 株の放線菌の選出方法、ガラス室内での白絹病（ササゲの）防除試験の結果を報告する。これら放線菌が生産する抗生物質、土壌中での抗生物質生産とその消長などについては次報に報告するつもりである。

1. 対抗放線菌の選出

1. 放線菌の分離 1954 年 10 月から 1955 年 2 月までの間に岡山県南部、北九州、大阪府、奈良県その他の各地 58 ヶ所で集めた土から、starch nitrate agar を用いて 1,083 株の放線菌を分離し、glucose asparagin agar または potato sucrose agar に純粋培養した。

2. 選出方法 抗生物質生産菌株を選出する場合、細菌類や培養に胞子を形成する糸状菌を用いた screening test では cross streak method や agar disk method など能率のよい方法が用いられるが、*C. centrifugum* のような土壌伝染性病原菌でしかも培養基上に胞子を作らないものを用いて有効菌株を選出するには、能率は悪いが対峙培養法が一般に用いられる^{4, 10)}。放線菌分離株から目的とする有効株を選び出すには、最初の段階で多数の分離株をとりあつかひ、またなるべく短期間に全分離株をしらべることが望ましいので、より能率のよい方法を考える必要がある。筆者らは agar disk 変法や斜面培養法などを考案し、対峙培養法と併用して有効菌株を選出し、さらに土壌対抗法、植木鉢試験などによつて有効菌株の土中での効果をしらべた。有効菌株の選出にはこのようにいくつかの段階があるので、各段階にわけて選出方法をのべる。植木鉢試験での選出段階は植木鉢試験の実験結果の一部として別にしてのべる。最初の選出段階は本報では agar disk 変法によるものであり、斜面培養法については後報にゆずる。

(i) Agar disk 変法

Potato sucrose agar (pH7.0—7.2) 15ml を分注したシャーレの直径にそつて直線に放線菌を植え 30°C で培養した。4 日後にコロニーの近接部から径 19.5mm のコルクボーラーで切り抜いた寒天円板をあらかじめ殺菌してある別のシャーレに移した。この寒天円板の中央に *Corticium*

* 本研究は文部省科学試験研究費による成績の一部である。記して謝意をあらわす。

sasakii と *Pythium* sp. の 2—4 日培養からコルクボーラーで径 5.5mm に切りとった培養小片を置き、24°C で 2 日間培養して生育するかどうかをみた。この方法で試験菌の一方または両方の生育を抑制したものは放線菌分離 1,083 株のうち 213 株であつた。さらにこれら 213 株について同じ試験菌を用いて同様の方法で 5 日間培養して毎日抑制の様子をしらべた。

第 1 表にその結果を示す。5 日目まで試験菌のどちらかを完全に抑制したものは 54 株であり、このうち 10 株は両方の試験菌の生育を抑制した。これら 54 株はさらに *Corticium centrifugum*, *C. gramineum*, *Rhizoctonia solani* および *Sclerotinia libertiana* の 4 菌の生育を抑制するかどうかをしらべた。前と同様にして 2—5 日まで毎日調査した結果を第 2 表に示す。これら試験菌のどれかに抑制効果のみられたものは 30 株であり、そのうち試験菌 3 種に効果のあつたものは 12 株、4 種に効果のあつたもの 3 株であつた。本法では A3-6, B12-2, C1-1, C1-2, C3-2, C10-9, E3-3, E6-81 などの放線菌株が強い抑制効果を示した。

(ii) 対峙培養法

Potato sucrose agar 平板の片側に約 3 cm の長さに真直ぐに放線菌を植え 30°C で 2 日間培養した後、コロニーの端から 5 cm はなれた平板の反対側に *C. sasakii*, *Pythium* sp. の培養片を置き 24°C で 6 日後に阻止帯の大きさを測つた。

第 3 表 対峙培養法

	20 mm 以 上	20-10 mm	10 mm 以 下
<i>Corticium sasakii</i>	11 菌株	4	0
<i>Pythium</i> sp.	3	7	5

(*C. centrifugum* など (i) にあげた病原菌は *C. sasakii* などで大體代用できるよである。)

C. centrifugum など 4 種の試験菌を用いた agar disk 変法で、3 種以上の試験菌の生育を抑制した 15 株についての結果を第 3 表に示す。本法で

は B12-2, C1-1, C1-2, C10-9, E3-3 などが大きい阻止帯を形成した。

(iii) 土壌対抗法 (殺菌土上での対抗)

Agar disk 変法で選り出した 30 株の放線菌のうち、“黴—土培地”(畑土 100 g, 黴 500 g, sucrose 5 g, 石灰 2 g, 水道水 350ml) によく生育するもの 23 株を三角フラスコで培養した。べつに“土—黴培地”(畑土 150 g, 黴 50 g, sucrose 10 g, 石灰 10 g, 水道水 380ml) をシャーレに入れて殺菌して置き、これに放線菌の黴—土培養約 1.5 g をよくまぜ土の表面を平にして、5.5mm のコルクボーラーで切りとつた試験菌の小片を 5—6 箇所土の表面に置き 24°C で 5 日後に生育状態をしらべた。試験菌には *C. centrifugum*, *C. gramineum*, *Pythium* sp. *R. solani* および *S. libertiana* を用いた。試験菌を全く生育させないかまたは強く抑制したものは、*C.*

第 1 表 Agar disk 変法第 1 次
(試験菌の生育を抑制した放線菌株数)

	培 養 日 数				
	1	2	3	4	5
<i>Corticium sasakii</i>	63	44	31	26	23
<i>Pythium</i> sp.	80	56	47	42	41
両方の試験菌を抑制した菌株数	35	21	12	10	10

第 2 表 Agar disk 変法第 2 次
(試験菌の生育を抑制した放線菌株数)

	培 養 日 数			
	2	3	4	5
<i>Corticium centrifugum</i>	13	8	8	7
<i>C. gramineum</i>	24	22	18	17
<i>Rhizoctonia solani</i>	17	15	12	11
<i>Sclerotinia libertiana</i>	37	33	29	27
全部の試験菌を抑制した菌株数	11	6	4	3

centrifugum に対して7株, *C. gramineum* に6株, *Pythium* sp. に2株, *R. solani* に2株, *S. libertiana* 13株であり, 抑制効果がないかまたは弱いものはそれぞれの試験菌に対して13, 0, 19, 15 および0株であつた。

以上室内実験による選出についてのべたが, 後にのべる植木鉢試験による選出で一応有効と認められた B 12-2, C 1-2, および C 10-9 の3菌株について室内実験での成績を第4表に示した。

第4表 放線菌 B 12-2, C 1-2 および C 10-9 株の各選出段階での成績

Cc=*Corticium centrifugum* Cg=*C. gramineum*

Cs=*C. sasakii*

P=*Pythium* sp.

Rs=*Rhizoctonia solani*

Sl=*Sclerotinia libertiana*

Agar disk 変法 (試験菌に対する生育抑制日数)

	Cc	Cg	Cs	P	Rs	Sl
B 12-2	2-5	4-5	>5	>5	<2	>5
C 1-2	3-5	>5	3-5	<1	>5	>5
C 10-9	0	>5	>5	>5	3-4	>5

対 峙 培 養 法 (阻止帯の巾)

	Cs	P
B 12-2	22.5	8.5
C 1-2	24.0	11.0
C 10-9	31.0	22.0

土 壤 対 抗 法 (試験菌の生育抑制程度)

	Cc	Cg	P	Rs	Sl
B 12-2	冊	冊	—	±	冊
C 1-2	冊	冊	—	冊	冊
C 10-9	±	冊	冊	冊	冊

II. 植 木 鉢 試 験

室内実験で *C. centrifugum* などに対する有効菌株として選出された放線菌が, 無殺菌自然土壌中で白絹病に有効かどうかをしらべた。

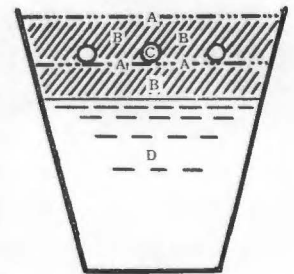
用いた放線菌は土壌対抗法で主に *C. centrifugum* に効果のあつた B 12-2, C 1-1, C 1-2, C 10-9, D 11-3, D 11-4, E 5-80, E 6-81 の8株であるが, さらに実験の途中あまり有効でないものは除いて実験をくりかえした。放線菌は“土—黴培地”を用いてシャーレで培養した。5寸鉢には1鉢当りシャーレー杯 (約30g——培養の水分含量により多少重量の変化はある), 約40×50×15cm の木箱を用いた実験では1箱当り約100gの放線菌培養を用いた。病原菌の接種源としては黴に *C. centrifugum* を純粋培養したもの, またはあらかじめ自然土壌に病原菌の黴培養をまぜ, 十分に灌水を続けて病土にしたもの (ササゲを植えて病原性は確かめてある) を用いた。試

験植物にはタキイ種苗会社の十八ササゲを用いた。5寸鉢または木箱の7分目まで自然土を入れた後、第1図に示すような方法で病原菌培養（または病土）と放線菌培養を施した。ササゲは5寸鉢で10粒、木箱では120粒または100粒をまきつけた。実験期間中は毎日充分に灌水し、ことに夏季の実験ではガラス室をヨシズで日覆いして極端な気温の上昇を防ぎ、多湿の状態を保つようにした。実験区は3連または4連制で健全株数をしらべ、調査の結果はすべて分散分析して検討した。

実験1. 有効菌株の選出。 B12-2, C1-1, C1-2, C10-9, D11-3, D11-4, E5-80, E6-81の8株を用いて実験した。健全株数は播種後5日、7日および10日目に調査し第2図のような結果をえた。10日目の健全株数で病土区に比べ1%水準で有意差のみられるのは B12-2 と C1-2 株を用いた区であり、C10-9 株区と無処理自然土区は5%水準の有意差がある。B12-2, C1-2 株でもそうであったが、とくに C1-1, E5-80 および E6-81 株を入れた区ではササゲの発芽や生育に影響があり、前者では発芽がおくれ、子葉や初生葉に褐色斑がみられたが発芽率にはさほど影響しなかった。しかし後者を入れた区ではササゲの発芽率が非常に低く、発芽後の生育も悪かった。C10-9 など他の菌株はササゲの発芽や生育には悪影響はみられなかった。

実験2. 実験1で有効だった3菌株の効果の再確認。 B12-2, C1-2 および C10-9 の3菌株を用い、3連制で木箱に120粒のササゲをまきつけ10日後の健全植物数をしらべた結果が第5表である。B12-2 株区が5%水準で、C1-2 株区が1%水準で病土区に対し有意差があるが、

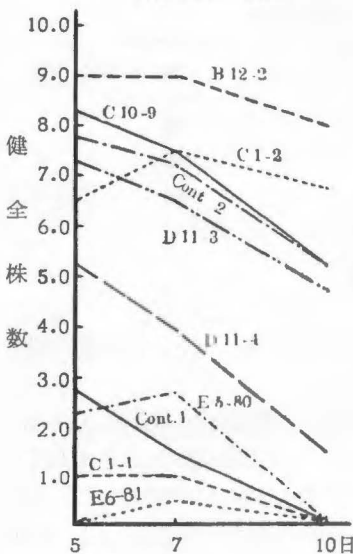
C10-9 株区と病土区の差は有意でない。実験1の場合と同様に C10-9 株区の健全植物数は、実験の後期に急速に減少する傾向がみられ、C10-9 株の防除効果は他の2菌株に比べておとるようである。また B12-2, C1-2 株区を含めて全実験区は調査時には健全植物数は急速に減少する様子が認められ、実験期間を永くすれば防除効果はいつれなくなるものと思われた。白絹病の蔓延に好条件を与えた本実験で、B12-2 と C1-2 の2菌株は少なくとも10日間は防除効果が



第1図 対抗菌培養施用方法

- A: 放線菌土一被培養
B: 病原菌混入土または病土
C: ササゲ種子
D: 畑土

第2図 植木鉢試験
(有効菌株の選出)



播種後日数
Cont. 1: 同 上+病土
Cont. 2: 無処理自然土

第5表 植木鉢試験 実験2

	健 全 植 物			
	総数	%	θ	
(1) 無 处 理 自 然 土	207	57.5	49.33	
(2) (1)+病 土	135	37.5	37.53	
(3)	{ B 12-2株 C 1-2株 C 10-9株	236	65.5	54.03*
(4) (2)+		255	70.8	57.57**
(5)		183	50.8	45.47

$$\% = \sin^2 \theta$$

θ についての $\text{LSD} (0.05) = 11.924$

$\text{LSD} (0.01) = 17.344$

期待できるが、C 10-9 株では防除できないようなので以後 B 12-2 と C 1-2 の 2 菌株についてしらべることにした。

実験 3. 以上実験 1 と 2 は 1955 年夏白絹病がよく発生する時期の実験であるが、白絹病があまり蔓延しない秋季に前と同様な実験をした。4 連制で木箱にササゲ 100 粒をまきつけ（1955 年 10 月 19 日）、その後 10、15、20 および 25 日目に健全植物数をしらべた。第 3 図に調査結果を示す。B 12-2、C 1-2 株区とも実験の最後まで病土区に比べ 1 % 水準で有意差が認められた。

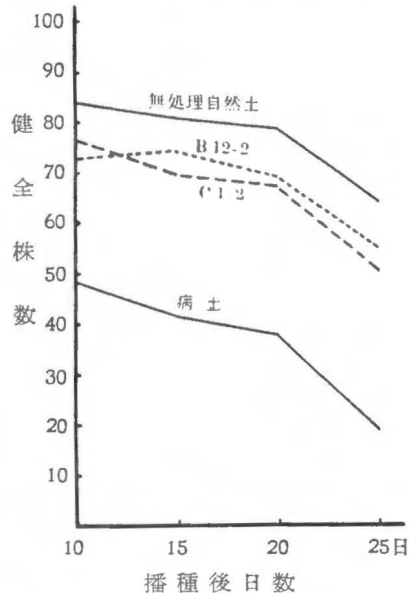
III. 考 察

白絹病菌や菌核病菌を直接試験菌に用いてこれらに有効な対抗微生物を選び出す方法が、他の試験菌を用いて抗植物病原菌物質を生産する微生物を先ず選び、その中から白絹、菌核病菌に有効なものを選び出す方法に比べて有利であるかどうかは不明である。筆者らは一応これらの病原菌を直接に用いて選び出す方法をとった。土壤放線菌がこれらの病原菌に有効に働くためには、抗生物質の生産能力が重要な条件であるという考えからすれば、通常用いられる対峙培養法より筆者らの agar disk 変法の方が適当なように思われる。しかし、agar disk 変法で選出したものの一部について対峙培養法を行つたところでは、両法で選出結果が著しくちがう様子はみられなかった。数多くの土壤放線菌分離株をとりあつかう能率の面からは agar disk 変法には次のような利点があつた。（1）シャーレの数が比較的少なくてすみ、（2）雑菌混入の機会が少かつた。欠点としては、（1）agar disk が乾燥するため長期間の観察ができず、（2）agar disk を切りとつた場所がコロニーに近すぎ、したがって比較的效果の弱いものもとる結果になつた。このような欠点は agar disk の切りとり位置を考慮すれば或程度補うことができる。agar disk 変法は対抗菌の選出、選出能率などの点で必ずしも満足すべき方法とは云いきれないので、本報以後さらに“斜面培養法”など考案して検討し、選出方法の確立につとめている。

有機質を加えた殺菌土壌を用いた土壌対抗法は殺菌土壌を用いた植木鉢試験に代りうるものかどうか実験していないが、この点さらに今後確かめたいと考える。また土壌対抗法に無殺菌土壌を用いた実験についてはとくにのべなかつたが、有機質に黴を用いたため *Mucor*, *Rhizopus* などの雑菌が多く増殖して満足な結果をえなかつた。しかし、B 12-2 と C 1-2 の両菌株の場合には或程度の抑制効果が *C. centrifugum* に対してみられた。無殺菌土を用いた“土壌対抗法”は有機質を色々変えて適当な培地組成をみつけないと考える。本報の“土壌対抗法”では放線菌の増殖程度が病原菌の生育にかなり影響をもつようである。しかし培地全面に増殖しても病原菌の生長をほとんど抑制しないものもある。多くの場合、本法でみられた抑制効果は前の agar disk 変法や対峙培養法での効果と大体平行するようであつた。

対抗放線菌を用いた土壌伝染性病害の防除試験は今までも多く行われているが、まだ植木鉢

第 3 図 植木鉢試験
(1955 秋の試験)



試験の段階を出ないようであり、しかも殺菌土壌を用いた実験が主であり、殺菌土壌で有効に仿いても無殺菌自然土では効果がほとんど認められないという報告が多い。またいくつかの抗生物質（主に antibacterial）の土壌中での生産と役割についての Gottlieb などの研究では、種々の抗生物質の無殺菌土壌中での生産量は色々な有機質を土に混ぜた場合にも多くは期待できず、無殺菌土壌ではさらに少なく、抗生物質も土壌中では多くは不安定（土壌への吸着、微生物による分解などのため）であるといわれる。本報の結果では放線菌 B 12-2 と C 1-2 の 2 菌株は *C. centrifugum* によるササゲの白絹病を無殺菌自然土で或程度、また或期間抑制したが、この効果が放線菌の生産する抗生物質によるものかどうかについては次報で検討するつもりである。対抗放線菌の施用方法で筆者らが用いた方法の特徴は、（１）放線菌は“土一壺培地”に培養したものを、（２）放線菌培養で植木鉢の土の表面を覆うようにし、さらに（３）種子のまわりにも放線菌培養があるようにしたことであろう。実験成績はあげていないが、放線菌培養を土の表面から約 6 cm までの深さの土全体によくまぜた試験では白絹病抑制効果はみられなかつた。一方種子のまわりを放線菌培養で包むようにした場合には効果がみられた。しかしこの場合放線菌の量が多すぎたため B 12-2 や C 1-2 では白絹病は抑制したがササゲの発芽を害し、幼植物に褐色斑がみられた。このように放線菌培養の施用量や施用方法により白絹病抑制効果、植物に対する影響などが変わるとされる。今後さらに施用量、施用方法の外に培養の形態、施用回数、防除可能期間などについて実験するつもりである。

IV. 摘

要

1. 白絹病や菌核病菌などに対し有効な対抗放線菌の選出方法として agar disk 変法、および土壌対抗法を考案した。各地で集めた土から分離した 1,083 株の放線菌を agar disk 変法でしらべた後、対峙培養法、土壌対抗法、植木鉢試験の選出過程を通じて白絹病菌 *Corticium centrifugum* に有効な 2 菌株を選出した。

2. 無殺菌自然土壌を用いた植木鉢試験をくりかえして行つたところ、B 12-2, C 1-2 の 2 菌株は常にササゲの白絹病を抑制した。1955 年夏の実験では少くとも 10 日間、秋の実験では 25 日間は明かに防除効果が認められた。

文

献

- (1) Allen, M. C. & C. M. Haensler (1935) Antagonistic action of *Trichoderma* on *Rhizoctonia* and other soil fungi. *Phytopath.* 25: 244—252.
- (2) Bega, Robert (1954) Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato. *Phytopath.* 44: 482.
- (3) Celino, M. S. & D. Gittlieb (1952) Control of bacterial wilt of tomatoes by *Bacillus polymyxa*. *Phytopath.* 42: 4.
- (4) Cooper, W. E. & S. J. P. Chilton (1950) Studies on antibiotic soil organisms. I. Actinomycetes antibiotic to *Pythium arrhenomanes* in sugarcane soils of Louisiana. *Phytopath.* 40: 544—552.
- (5) Dunleavy, J. M. (1955) Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. *Phytopath.* 45: 252—258.
- (6) Freeman, T. E. & E. C. Tims (1955) Antibiosis in relation to pink root of shallots. *Phytopath.* 45: 440—442.
- (7) Gregory, K. F., O. N. Allen, A. J. Riker, & W. H. Peterson (1952) Antibiotics and antagonistic microorganisms as control agents against damping-off of alfalfa. *Phytopath.* 42: 613—622.
- (8) Grossbard, Erna (1951) Antibiotics and microbial antagonism in

plant pathology. Endeavour 10 : 145—150. (9) Lachance, René-O & C. Perrault (1953) Antagonisme des microorganismes du sol envers *Fusarium oxysporum* f. *lini*, agent de la flettrissure du lin. Canad. J. Bot. 31 : 515—521. (10) Morton, D. J. & W. H. Stroube (1955) Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. Phytopath. 45 : 417—420. (11) 向秀夫 (1955) 植物病害に対する抗生物質と対抗微生物の作用 [3] [4] 農業及園芸 30 : 516—518, 775—778. (12) Newhook, F. J. (1951) Microbial control of *Botrytis cinerea* Pers. I. The role of pH changes and bacterial antagonism. II. Antaganism by fungi and actinomycetes. Ann. Appl. Biol. 38 : 169—184, 185—202. (13) 西門義一 その他 (1949, 1950) 拮抗微生物による作物病害防除の研究 第1—3報 農学研究 38 : 46—50, 121—123 ; 39 : 1—4. 西門義一, 渡辺清志 (1955) 同上 第9, 10報 農学研究 43 : 126—143. (14) 大島俊市, 野田二郎 (1952, 1953) *Trichoderma* 菌による白絹病防除の研究 第1—3報 日植病報 16 : 162 ; 17 : 44 ; 18 : 63. (15) Vasudeva, R. S., A. C. Jain & K. G. Nema (1952) Investigations of the inhibitory action of *Bacillus subtilis* on *Fusarium udum* Butl., the fungus causing wilt of pigeon-pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). Ann. Appl. Biol. 39 : 229—238. (16) Weindling, R. (1932) *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopath. 22 : 837—845. (17) Wood, R. K. S. (1951) The control of disease of lettuce by the use of antagonistic organisms. I. The control of *Botrytis cinerea* Pers. II. The control of *Rhizoctonia solani* Kühn. Ann. Appl. Biol. 38 : 203—216, 217—230. (18) Wright, J. M. (1954) The production of antibiotics in soil. I. Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol. 41 : 280—289.