

チンゲンサイ発芽時の根の伸長及び、野菜類育苗期に効果のある

植物生育促進根圏細菌(PGPR)の選抜^{†1}

小杉徹¹⁾・中村仁美²⁾・神谷径明³⁾・若澤秀幸⁴⁾・高橋和彦¹⁾

1) 農林技術研究所果樹研究センター, 2) 賀茂農林事務所, 3) 茶業農産課, 4) 農林技術研究所

A selection of the growth promotion bacteria which promotes root length at germination of Chinese-greens and selection of plant growth promotion bacteria which are effective during vegetable seedling period

Toru Kosugi¹⁾, Hitomi Nakamura²⁾, Michiaki Kamiya³⁾, Hideyuki Wakasawa⁴⁾ and Kazuhiko Takahashi¹⁾

¹⁾Fruits Research Center/Shizuoka Res. Inst. of Agri. And Forest., ²⁾Kamo Office of Agri. And Forest., ³⁾Tea and Agricultural Production Division, ⁴⁾Shizuoka Res. Inst. of Agri. And Forest.

Abstract

We inoculated 8896 strains of rhizosphere bacteria onto the seeds of Chinese-greens, and selected a growth promotion bacterium which promotes root length at the time of germination for Chinese-greens. Under a fixed environment, we selected a growth promotion bacteria which has efficacy in a raising seedlings. Nine strains which promote growth (both above-ground and root) of Chinese-greens by about 9%-22% was obtained. Nine strains which promote growth (both above-ground and root) of tomatoes by about 5%-33% was also obtained. We investigated the bacteria strains of the growth promotion bacteria from a total of 17 bacteria. Five strains were Pseudomonas, three strains of each of Stenotrophomonas and Agrobacterium, Enterobacter and two strains were Bacillus, and one strain each of Ralstonia and Streptomyces. Crown Gall and Hairy Root were not observed in these bacteria. The deterrent effect was observed in bacteria for radish wilt bacteria of the confrontation culture.

キーワード: PGPR, 植物生育促進根圏細菌, チンゲンサイ, トマト, 根圏細菌, 対峙培養

I 緒 言

静岡県は施設野菜が盛んな県であるが、過剰施肥による土壌養分の集積や偏りの事例がみられ²⁾、環境に配慮した農業が強く求められている。対策として、肥効調節型肥料を用いた局所施肥技術⁷⁾⁸⁾や堆肥の活用法¹⁸⁾等が開発されているが、有機農産物や食の安全・安心に対する関心の高まり等消費者の意識変化¹¹⁾により、化学肥料ではない新たな土壌管理法が求められている。

新たな土壌管理法として、本研究では、植物根の周りの根面や根内等の根圏細菌の中で、植物生育を促進する機能を持つ細菌群である植物生育促進根圏細菌(Plant Growth-

Promoting Rhizobacteria 以下、PGPR とする)⁹⁾に注目した。PGPR は、生態系を活用した新たな技術として利用が期待されている⁴⁾。PGPR の利用によって植物の成長が促進されれば、施肥効率が向上し¹⁰⁾、環境負荷が少ない土壌微生物を利用した新たな施肥管理法が確立することが期待される。

本試験では、チンゲンサイとトマトを研究材料とした。チンゲンサイは静岡県が全国第2位の出荷量を誇る主要野菜であるが¹²⁾、VA(vesicular-arbuscular)菌根菌等が共生できないアブラナ科であり¹⁶⁾、リン等の養分吸収を助ける菌根菌資材の利用は難しい。またトマトは、静岡県において、農業産出額が46億円の、メロン、イチゴに次ぐ第3位の主要野菜であり¹³⁾、波及効果は高い。

†1 本報告の一部は、平成12年度日本土壌肥科学会中部支部大会(2000年10月、浜松市)、平成16年度日本土壌肥科学会福岡大会(2004年9月、福岡市)、平成18年度日本土壌肥科学会中部支部大会(2006年11月、福井市)、平成19年度日本土壌肥科学会中部支部大会(2007年11月、津市)で発表した。

†2 平成11~14年度土壌機能実態モニタリング調査成績書 静岡県農業試験場土壌肥料部(2005)、資料第2052号、1~230p

そこで、チンゲンサイ及びキャベツの根部より得た約9千の根圏細菌から、チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進するPGPRの選抜を行った。これらの菌の中から、さらにチンゲンサイ、トマト育苗期に効果のあるPGPRを選抜し諸性質を検討した。以下に報告する。

なお、本研究は、地域基幹農業技術体系化促進研究(平成11年～15年)、及び放射線利用・原子力基盤技術試験研究事業(平成13年～17年)の中で実施した。

Ⅱ 材料及び方法

1 根圏細菌の採取と分離

根圏細菌は、静岡県磐田市内の農家のチンゲンサイ根部及び研究所堆肥連用圃場のキャベツ根部より採取した。根内細菌は、土壌を洗い落とした根部を、約1cmに切断してナイロンメッシュで包み、70%エタノールで1分間、2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で2分間滅菌後、滅菌水で洗浄し寒天培地に静置した。21℃で4週間培養後、検出した菌を分離した。根面細菌は、土壌を洗い落とした根部を滅菌水で30分間振とう後、YG(Yeast extract Glucose)寒天培地(寒天濃度1.5%)²⁾上に滴下し、21℃で2週間培養して分離した。これらの方法により根内細菌と根面細菌を合わせて、約9千株の根圏細菌を得た¹⁾。

2 チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進するPGPRの選抜

(1) 培養条件の検討

堆肥の簡易腐熟度検定法³⁾を元に、チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進するPGPR選抜の培養条件を検討した。70%エタノールで2分間、2.5%次亜塩素酸ナトリウムで3分間滅菌したチンゲンサイ‘青帝’種子を、シャーレ内の滅菌ろ紙上に8粒静置して、根の伸長が良好な上位5株の根長を調査した。培養条件は、測定部位(主根長測定、側根長測定)、栽培日数(5日間、7日間)、照明(照明あり:28℃14時間明照明(20000 lux) 21℃10時間暗照明(0 lux)、照明なし:28℃暗所で栽培)、培養液(1/10 ホーグランド培地¹⁹⁾10ml、滅菌水10ml)で、3連で行った。

(2) チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進するPGPRの選抜

検討した条件下で、チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進するPGPRの選抜を行った。シャーレ内の滅菌ろ紙上に、1/10 ホーグランド培地10mlを添加し、さらに70%エタノールと2.5%次亜塩素酸ナトリウムで滅菌したチンゲンサイ‘青帝’種子6粒を静置した。根圏細菌をスパーテルで掻き取り、滅菌水1mlに懸濁後、シャーレ中に添加した。温度28℃、5日間暗

所栽培後、主根が最も伸長した上位3株の主根長を調査した。滅菌水1ml添加した区を対照として、8896菌株を調査した。

3 育苗期に効果のあるPGPRの選抜

(1) チンゲンサイにおける選抜

チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進するPGPRとして選抜した81菌株中、継代培養可能な74菌株に対して、2.(2)の根の伸長を促進する菌の選抜を再度行った。伸長促進効果の高い上位10菌株を、さらに2回繰り返して、予備選抜をした。

予備選抜した菌等から9菌株を実験に供試して、以下に示す方法で、育苗期に効果のある菌の選抜を行った。供試作物は、チンゲンサイ‘青帝’とした。

120℃1.2気圧30分でオートクレーブ滅菌したバーミキュライトを、連結ポット(1ポット6cm×6cm×5cmのキャネロン化工製の16連結ポットを4連結になるように切って使用)に充填し、下部から水が漏れない飽和状態まで蒸留水を添加した。供試菌株をYG液体培地(無機態窒素を6mg/L含む)で、28℃で一晩振とう培養し菌液を準備した。菌浸漬時間と根の伸長の関係を調査した予備試験の結果、種子の菌液浸漬時間は1-2時間で効果があることが認められていたため²⁾、菌液にチンゲンサイ種子を1時間浸漬した。その後、4連結のポット1トレイに対して、同種の菌液に浸漬した種子を1ポットあたり1粒ずつ、合計4粒播種し、さらに菌液を1ポットあたり各々5ml添加した。対照区は、菌を入れないYG液体培地に浸漬した種子を播種した。28℃14時間明照明(20000 lux)、21℃10時間暗照明で、21～22日間栽培した。灌水は二日に一回、減少した重量を蒸留水で補うようにして行った。試験は6反復で行った(連結ポット4連結4株のうち、最大、最小株を除く2株の平均値を1反復とした)。栽培終了後の植物体の地上部重(新鮮重)と根重(洗浄乾燥後の乾物重)を測定した。

(2) トマトにおける選抜

チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進するPGPRとして選抜した81菌株中、継代培養可能な74菌株に対して、2.(2)の根の伸長を促進する菌の選抜を、トマト‘ハウス桃太郎’種子に置き換えて試験した。伸長促進効果の効果の高い上位10菌株を、さらに2回繰り返して、菌の予備選抜をした。

予備選抜した菌等から15菌株を実験に供試した。供試作物は、トマト‘ハウス桃太郎’とした。3.(1)チンゲンサイにおける選抜と同じ育苗条件で、24～27日間栽培し、6反復で行った(連結ポット4連結4株のうち、最大、最小株は除いた)。

4 育苗期に効果のあるPGPRの諸性質

(1) 菌名等の検討

選抜された菌はrDNA領域の上流側約500bpの部分解析による菌の同定を行った。グラム染色、オキシダーゼ活性、カタ

†1 平成8年度・平成9年度土壌肥料に関する試験成績書(静岡県農業試験場土壌肥料部(1998)、資料1970号、p23)

†2 平成12年度土壌肥料に関する試験成績書(静岡県農業試験場土壌肥料部(2001)、資料第2004号、22p)

ラーゼ活性を調査した。

(2) 植物に対する病原性の検定

太田¹⁵⁾に準じて、スライスディスク法により、選抜した PGPR の根頭がんしゅ病と毛根病の病原性の検定を行った。滅菌水を 5ml 入れたシャーレ内の滅菌ろ紙上に、滅菌水で洗浄し厚さ 5mm にスライスしたニンジン及びカブを静置した。菌液 0.5ml を切片中心部に滴下し、白金耳で全面に塗布後、パラフィルムでシールした。25℃、85%湿度の恒温器で培養し、24 日後に観察した。異常なカルスや発根が見られた場合は+とし、見られない場合は、-とした。1 菌株 3 反復で行った。また、菌液を付けた竹ぐしを、トマト苗の地際部を 2 カ所刺して 10 日後に病徴を観察する、鉢植え苗による検定を 3 反復で行った。各々の試験に菌無接種の対照を設けた。

(3) 対峙培養による病害菌との拮抗作用

病原菌に対する拮抗作用を明らかにするために対峙培養を実施した。2%PSA 培地上に、PGPR と病原菌を対峙培養し、コロニーの生育状況から、“明瞭な阻止円あり”、“阻止円あり”、“効果なし”に分類した。病原菌は、東京農工大学から譲渡されたダイコン萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum f.sp. raphani* TI93 株、宮崎県綾町有機栽培圃場から分離したニンジン白絹病菌 (*Sclerotium rolfsii*)、九州沖縄農研センター畑作研究領域試験圃場から分離したダイコン菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum* 様菌) の 3 種類を用いた。

Ⅲ 結果及び考察

1 チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進する PGPR の選抜

植物の発芽時の伸長を判断する検定は堆肥の優劣の評価にも使われており³⁾、発芽時の根の伸長が促進すれば、後の生育も良好となると判断し、チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進する PGPR を探索した。

当初行っていた方法では、調査項目、培養日数が多く 1 週間で数十菌株しか調査できなかった[†]。そこで、チンゲンサイ発芽時の根の伸長が良好な培養条件を検討し、結果を表 1 に示

した。根の伸長に最も関与するのは、根の測定部位で、側根より主根の伸長が良好だった。また、栄養条件の有無である培養液の種類(ホーグランド培地>蒸留水)も、根の伸長に関与した。培養日数(7 日>5 日)と照明(なし>あり)の影響は小さかった。この結果から、チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進する培養時間が短い条件は、温度 28℃、5 日間暗所栽培後の主根長の測定と判断し、以下の実験の条件とした。本方法は、シャーレとろ紙だけで検定できるため、低コストである。この方法により培養日数 5 日で 200~300 株の根圏細菌の調査が可能となった。

根圏細菌 8896 菌株から選抜した結果を表 2 に示した。8896 菌株の平均主根長は 47.4mm であった。根の形状を観察すると、主根の伸長を促進し無接種より根が太い菌、主根の伸長は抑制するが根毛の多い菌、主根の伸長を促進する菌、根が稠変するが主根の伸長は無接種と同程度の菌、発芽を阻害する菌、無接種と変わらない菌、の 6 タイプに分けられた。主根の伸長を促進し、無接種より根が太いタイプの根圏細菌 A を 30 菌株、主根の伸長は抑制するが根毛の多いタイプの根圏細菌 B を 25 菌株、主根の伸長を促進するタイプの根圏細菌 C を 26 菌株、合計 81 菌株、さらにこれに次ぐ菌株各々 50 菌株を分離し、チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進する PGPR として選抜した。

表 1 培養条件の違いによるチンゲンサイ発芽時の根の伸張

| 要因 | 水準 | 根長 (mm) |
|-----------|------------------------------------|-----------------------|
| A: 測定部位 | A ₁ 主根 | 35.2 |
| | A ₂ 側根 | 10.1 |
| B: 栽培日数 | B ₁ 5日 | 19.4 |
| | B ₂ 7日 | 25.9 |
| C: 照明 | C ₁ あり ¹⁾ | 20.5 |
| | C ₂ なし ²⁾ | 24.8 |
| D: 培養液 | D ₁ ホーグランド [*] | 29.4 |
| | D ₂ 滅菌水 | 15.9 |
| 分散分析 (F値) | A | 997.4 * ³⁾ |
| | B | 67.8 * |
| | C | 29.2 * |
| | D | 292.0 * |

1) 14時間照明(28℃), 10時間暗照明(21℃)
2) 暗照明(28℃) 3) *は5%で有意

表 2 チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進する生育促進細菌の選抜

| 選抜菌 | 選抜菌数 ²⁾ | 根長 (mm) ¹⁾ | 根長等の伸び、及び形状 |
|-------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| 根圏細菌A | 30 | 79.5 ± 5.2 | 主根の伸長を促進し、菌無接種より太い |
| 根圏細菌B | 25 | 22.9 ± 4.5 | 主根の伸長を抑制するが、根毛が多い |
| 根圏細菌C | 26 | 89.5 ± 5.9 | 主根の伸長を促進する |

1) 菌接種後5日目の主根の長さの平均値±標準偏差
菌無接種 (対照) の主根の長さは、45.8mm±7.8
全調査菌数(8896株)の主根長さの平均は、47.4mm±7.8
2) これらに次ぐ予備候補として、各々50菌株選抜した

† 平成 11 年度土壌肥料に関する試験成績書 (静岡県農業試験場土壌肥料部 (2000) , 資料 1993 号, 13 p

2 育苗期に効果のある PGPR の選抜

(1) チンゲンサイにおける選抜

チンゲンサイ根の伸長を促進する菌の選抜を繰り返すことによる予備選抜の結果を、表 3 に示した。継代培養可能な 74 菌株のうち、根長の伸長を促進する上位 10 菌株は、繰り返し試験を行っても、対照区より 37%~89%根の伸長が促進した。

表 3 根の伸長を促進する菌の選抜を繰り返したときのチンゲンサイの根の伸長

| 菌名 | 根長 ¹⁾ (mm) | 相対指数 ²⁾ |
|-----|--------------------------|--------------------|
| A30 | 74.0 * ³⁾ | 160 |
| A31 | 79.4 * | 173 |
| A40 | 81.1 * | 175 |
| A54 | 81.2 * | 176 |
| A65 | 72.3 * | 157 |
| A75 | 61.3 | 137 |
| C38 | 62.7 * | 137 |
| C51 | 71.6 * | 156 |
| C52 | 73.4 * | 158 |
| C69 | 82.8 * | 189 |
| 対照 | 46.9 | 100 |

- 1) 菌接種後、5日目のチンゲンサイ主根の長さ、3回試験を繰り返したときの平均値
- 2) 対照(菌無接種区)を100としたときの相対値
- 3) *は対照と比較して5%で有意差あり



写真1 PGPRによるチンゲンサイ苗の生育促進 (接種21日後 左:対照 右:C47-1)

予備選抜をした菌を中心に、菌接種後のチンゲンサイ育苗を、温度条件、灌水条件、日照条件を制御した恒温器内で行った。結果を表 4、写真1に示した。A30, A40 白, A40 黄, A54, C24-1, C47-1, C52, C69, C83-1 の 9 菌株を接種することにより、地上部重が 9%~19%、根重が 12%~22%増加したこれら 9 菌株をチンゲンサイ育苗期に効果のある菌とした。

(2) トマトにおける選抜

トマト根の伸長を促進する菌の選抜を繰り返すことによる予備選抜の結果を表 5 に示した。根の伸長を促進する上位 10 菌株は、繰り返し試験を行っても、根の伸長は、菌無接種より 7~17%促進した。予備選抜をした菌を中心に、菌接種後のトマトの育苗を、温度条件、灌水条件、日照条件を制御した恒温器内で行い、その結果を表 6 に示した。A24, A40, A42, A68, B16, C25, C30, C31, C59 の 9 菌株を接種することにより、地上部重が 8%~33%、根重が 5%~19%増加した。これら 9 菌株をトマト育苗期に効果のある菌とした。

表 5 根の伸長を促進する菌の選抜を繰り返したときのトマトの根の伸長

| 菌名 | 根長 ¹⁾ (mm) | 相対指数 ²⁾ |
|-----|--------------------------|--------------------|
| A24 | 62.9 | 110 |
| A40 | 67.2 | 117 |
| A42 | 61.3 | 107 |
| A47 | 65.7 * ³⁾ | 115 |
| A54 | 67.0 * | 117 |
| A68 | 66.4 * | 116 |
| C25 | 66.6 * | 116 |
| C30 | 63.1 | 110 |
| C31 | 64.3 | 112 |
| C59 | 64.8 | 113 |
| 対照 | 57.3 | 100 |

- 1) 菌接種後、5日目のトマト主根長、3回試験を繰り返したときの平均値
- 2) 対照(菌無接種区)を100としたときの相対値
- 3) *は対照と比較して5%で有意差あり

表 4 菌の接種がチンゲンサイ育苗期の地上部重及び根重に与える影響¹⁾

| 菌名 | 1回目 | | 2回目 | | 3回目 | | 4回目 | | 5回目 | | 6回目 | | 平均 | |
|------------------|-----------------------|------------------|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|--------------------|
| | mg | 指数 ⁴⁾ | mg | 指数 | mg | 指数 | mg | 指数 | mg | 指数 | mg | 指数 | mg | 指数平均 ⁵⁾ |
| 1) 地上部重 (新鮮重) | | | | | | | | | | | | | | |
| A30 | 172.6 * | 127 | 115.8 | 91 | - | - | 217.5 * | 133 | 124.6 | 87 | - | - | 157.6 | 109 |
| A40白 | 169.0 * ³⁾ | 111 | 136.8 | 104 | 126.9 * | 117 | - | - | - | - | - | - | 144.2 | 111 |
| A40黄 | 151.6 | 124 | 132.7 | 107 | 129.6 * | 115 | - | - | - | - | - | - | 138.0 | 115 |
| A54 | 157.1 | 115 | - | - | 125.6 | 114 | 174.0 * | 106 | 119.0 * | 83 | 188.3 * | 125 | 152.8 | 109 |
| C24-1 | 167.3 * | 123 | 131.8 | 103 | - | - | 191.0 * | 117 | 137.8 | 96 | - | - | 157.0 | 110 |
| C47-1 | 191.4 * | 141 | 149.0 * | 117 | - | - | 195.1 * | 119 | 148.5 | 104 | 176.6 * | 117 | 172.1 * | 119 |
| C52 | 173.8 | 128 | - | - | 123.8 | 112 | 164.4 | 100 | - | - | - | - | 154.0 | 113 |
| C69 | 181.0 * | 133 | 135.8 | 106 | 145.7 * | 132 | - | - | 141.3 | 99 | 185.6 * | 123 | 157.9 | 119 |
| C83-1 | 160.2 | 118 | - | - | 142.0 * | 129 | 169.4 | 103 | 129.3 | 90 | - | - | 150.2 | 110 |
| 対照 ⁴⁾ | 136.1 | 100 | 127.8 | 100 | 110.5 | 100 | 163.8 | 100 | 143.3 | 100 | 150.7 | 100 | 138.7 | 100 |
| 2) 根重 (乾物重) | | | | | | | | | | | | | | |
| A30 | 4.7 * | 132 | 3.0 | 109 | - | - | 5.0 * | 144 | 3.5 | 100 | - | - | 4.0 | 121 |
| A40白 | 4.0 | 123 | 3.3 * | 120 | 2.7 | 117 | - | - | - | - | - | - | 3.4 | 120 |
| A40黄 | 4.4 * | 115 | 3.3 * | 122 | 3.1 | 102 | - | - | - | - | - | - | 3.6 | 113 |
| A54 | 4.2 | 120 | - | - | 2.9 | 109 | 4.3 | 123 | 3.2 | 93 | 4.0 | 119 | 3.7 | 113 |
| C24-1 | 4.1 | 115 | 3.1 | 113 | - | - | 4.6 * | 132 | 3.6 | 104 | - | - | 3.8 | 116 |
| C47-1 | 4.7 * | 132 | 3.1 | 116 | - | - | 4.4 * | 126 | 4.0 | 114 | 3.9 | 115 | 4.0 * | 120 |
| C52 | 3.8 | 109 | - | - | 3.1 | 116 | 3.8 | 110 | - | - | - | - | 3.6 | 112 |
| C69 | 4.5 * | 126 | 3.2 * | 119 | 3.5 * | 132 | - | - | 3.2 | 91 | 4.2 * | 126 | 3.7 | 119 |
| C83-1 | 4.5 | 126 | - | - | 3.4 * | 128 | 4.7 | 133 | 3.4 | 99 | - | - | 4.0 * | 122 |
| 対照 | 3.5 | 100 | 2.7 | 100 | 2.7 | 100 | 3.5 | 100 | 3.5 | 100 | 3.3 | 100 | 3.2 | 100 |

- 1) 菌を培養したYG液体培地に種子を1時間浸漬後播種し、21日~22日栽培。1菌6反復。ただし1回目は4反復
- 2) 菌の入っていないYG液体培地に種子を浸漬した。
- 3) *は対照と比較して5%有意差あり
- 4) 対照(菌無接種区)を100としたときの相対値
- 5) 指数の平均値

3 育苗期に効果のある PGPR の諸性質

(1) 選抜した菌の同定と生化学的性質

選抜したPGPRについて、16S rDNAの解析により最も相同性が高かった菌名とその生化学的性質を表7に示した。A40白とA40黄は、チンゲンサイとトマトの両方に効果があつた。

同定の結果、候補となつた17菌のうち、*Pseudomonas*属が5菌株、*Stenotrophomonas*属、*Agrobacterium*属が3菌株、*Enterobacter*属、*Bacillus*属が2菌株、*Ralstonia*属、

*Streptomyces*属が1菌株であつた。また、根内細菌が5菌株、根面細菌が15菌株であつた。

本試験では選択培地で*Pseudomonas*属の菌を選抜したわけではないが、育苗期に効果のある菌の同定の結果、17菌株中、5菌株が*Pseudomonas*属であり、多数を占めた。*Pseudomonas*属の生育促進効果に関しては、植物ホルモンの、抗生物質、抵抗性誘導物質等が明らかにされている事例もある²⁾。今回選抜された菌の生育促進機構を明らかにすることが、今後の課題であ

表6 菌の接種がトマト育苗期の地上部重及び根重に与える影響¹⁾

| 菌名 | 1回目 | | 2回目 | | 3回目 | | 4回目 | | 5回目 | | 平均 | |
|------------------|-------|------------------|-----------------------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|---------|--------------------|
| | mg | 指数 ²⁾ | mg | 指数 | mg | 指数 | mg | 指数 | mg | 指数 | mg | 指数平均 ⁵⁾ |
| 1) 地上部重 (新鮮重) | | | | | | | | | | | | |
| A24 | - | - | 105.4 * ⁴⁾ | 136 | - | - | 62.9 | 83 | - | - | 84.1 | 110 |
| A40 | 75.2 | 114 | - | - | - | - | 77.6 | 102 | - | - | 76.4 | 108 |
| A42 | - | - | 104.1 * | 135 | - | - | 77.0 | 102 | - | - | 90.6 | 118 |
| A68 | - | - | 125.4 * | 162 | - | - | 94.1 | 124 | 107.9 | 113 | 109.1 * | 133 |
| B16 | - | - | - | - | 83.7 | 108 | 83.8 | 111 | - | - | 83.7 | 109 |
| C25 | - | - | 99.9 * | 129 | - | - | 70.1 | 93 | - | - | 85.0 | 111 |
| C30 | - | - | 105.8 * | 137 | - | - | 84.0 | 111 | - | - | 94.9 | 124 |
| C31 | - | - | 106.5 * | 138 | - | - | 77.1 | 103 | - | - | 91.8 | 120 |
| C59 | - | - | 93.3 * | 121 | - | - | - | - | 99.3 | 104 | 96.3 | 112 |
| 対照 ²⁾ | 65.7 | 100 | 77.4 | 100 | 77.4 | 100 | 75.8 | 100 | 95.3 | 100 | 78.3 | 100 |
| 2) 根重 (乾物重) | | | | | | | | | | | | |
| A24 | - | - | 5.7 | 120 | - | - | 4.5 | 101 | - | - | 5.1 | 110 |
| A40 | 5.8 * | 108 | - | - | - | - | 5.1 * | 115 | - | - | 5.5 | 112 |
| A42 | - | - | 5.5 | 116 | - | - | 5.1 * | 115 | - | - | 5.3 | 115 |
| A68 | - | - | 6.3 * | 134 | - | - | 5.3 * | 118 | 5.8 | 105 | 5.8 | 119 |
| B16 | - | - | - | - | 5.2 | 103 | 5.3 * | 119 | - | - | 5.2 | 111 |
| C25 | - | - | 5.8 | 123 | - | - | 4.9 | 110 | - | - | 5.3 | 116 |
| C30 | - | - | 5.3 | 112 | - | - | 4.8 | 109 | - | - | 5.1 | 110 |
| C31 | - | - | 5.8 | 124 | - | - | 4.5 | 101 | - | - | 5.2 | 112 |
| C59 | - | - | 5.4 | 114 | - | - | - | - | 5.3 | 95 | 5.3 | 105 |
| 対照 ²⁾ | 5.4 | 100 | 4.7 | 100 | 5.0 | 100 | 4.5 | 100 | 5.5 | 100 | 5.0 | 100 |

1) 菌を培養したYG液体培地に種子を1時間浸漬後播種し、24日~27日栽培。1菌6反復、ただし4回目は8反復、5回目は12反復。
 2) 菌の入っていないYG液体培地に種子を浸漬した。 3) 対照 (菌無接種区) を100としたときの相対値
 4) *は対照と比較して5%有意差あり 5) 指数の平均値

表7 育苗期に効果のある生育促進菌の菌名 (候補) , 生化学的性質, 及び菌採取場所

| 菌株名 | 候補種 | 相同性 ¹⁾ (%) | グラム | ネグターゼ | カタラーゼ | 菌採取場所 | 備考 |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------|-----|-------|-------|----------|-------------------------|
| | | | 染色 | 活性 | 活性 | | |
| a) チンゲンサイに効果のある菌 | | | | | | | |
| A30白 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 100.0 | - | + | + | チンゲンサイ根内 | 純化過程で2菌に分離 |
| A30黄 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 98.7 | - | - | + | チンゲンサイ根内 | 純化過程で2菌に分離 |
| A40白 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 99.5 | - | + | + | チンゲンサイ根面 | トマトで効果あり |
| A40黄 | <i>Pseudomonas fulva</i> | 99.9 | - | - | + | チンゲンサイ根面 | トマトで効果あり |
| A54 | <i>Streptomyces antibioticus</i> | 100.0 | + | - | + | キャベツ根面 | |
| C24-1 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 97.4 | - | - | + | チンゲンサイ根面 | |
| C47-1 | <i>Enterobacter sp.</i> | 98.3 | - | - | + | チンゲンサイ根面 | |
| C52 | <i>Ralstonia eutropha</i> | 98.6 | - | + | + | チンゲンサイ根面 | |
| C69 | <i>Pseudomonas fulva</i> | 98.9 | - | + | + | キャベツ根内 | |
| C83-1 | 未調査 | | | | | キク根面 | |
| b) トマトに効果のある菌 | | | | | | | |
| A24 | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | 99.3 | - | + | + | チンゲンサイ根内 | |
| A40白 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 99.5 | - | + | + | チンゲンサイ根面 | 純化過程で2菌に分離, チンゲンサイで効果あり |
| A40黄 | <i>Pseudomonas fulva</i> | 99.9 | - | - | + | チンゲンサイ根面 | 純化過程で2菌に分離, チンゲンサイで効果あり |
| A42 | <i>Pseudomonas fulva</i> | 99.6 | - | + | + | チンゲンサイ根面 | |
| A68 | <i>Pseudomonas veronii</i> | 99.4 | - | + | + | キャベツ根面 | |
| B16 | <i>Enterobacter dissolvens</i> | 99.4 | - | - | + | チンゲンサイ根内 | |
| C25-1 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 97.4 | - | - | + | チンゲンサイ根面 | 純化過程で2菌に分離 |
| C25-2 | <i>Bacillus megaterium</i> | 99.7 | + | - | + | チンゲンサイ根面 | 純化過程で2菌に分離 |
| C30白 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 99.0 | - | ± | + | チンゲンサイ根面 | 純化過程で2菌に分離 |
| C30クレーム | <i>Bacillus megaterium</i> | 99.8 | + | - | + | チンゲンサイ根面 | 純化過程で2菌に分離 |
| C31 | 未調査 | | | | | チンゲンサイ根面 | |
| C59 | 未調査 | | | | | キャベツ根面 | |

1) 16S r DNA部分塩基配列による

表8 菌のスライスディスク法及び鉢植え苗による根頭がんしゅ病と毛根病の検定

| 菌名 | スライスディスク法による検定 ¹⁾ | | | | 鉢植え苗による検定 ²⁾ | |
|-----------------------|------------------------------|-------------------|--------|-----|-------------------------|-----|
| | ニンジン | | カブ | | トマト | |
| | 根頭がんしゅ ⁴⁾ | 毛根病 ⁵⁾ | 根頭がんしゅ | 毛根病 | 根頭がんしゅ | 毛根病 |
| a) チンゲンサイに 効果のある9菌 | - | - | - | - | - | - |
| b) トマトに 効果のある9菌 | - | - | - | - | - | - |
| 対照 ³⁾ | - | - | - | - | - | - |

1) 菌接種後24日目の観察 2) 菌接種後10日目の観察 3) 菌無接種
4) -は、瘤、カルスの形成なし 5) -は、異常な発根なし

る。 *Bacillus*属や *Streptomyces*属に属する菌は、グラム陽性菌であり、内生孢子を形成したり¹⁴⁾、抗生物質を産生したりする¹⁷⁾ことが知られている。このような性質は、資材化するとき、有利に働く可能性がある。一方、 *Ralstonia* 属は、拮抗菌としての利用も多いが植物病原性の系統を含み²⁴⁾、 *Enterobacter*属は、腸内細菌から分離されることも多い¹⁴⁾ので、注意を要する。

なお、PGPRを同定する過程で、菌の純化が必要であったが、チンゲンサイでは1菌株が、トマトでは3菌株が、同定する段階での純化過程で2種の菌が混在していることが判明した。これらの菌に関しては、それぞれ単独で生育促進効果があるのか、あるいは、混合時に生育促進効果があるのか明らかでないため、今後検討する必要がある。

(2) 植物に対する病原性の検定

選抜した菌の根頭がんしゅ病、毛根病に対する病原性検定結果を表8及び写真2に示したが、いずれの菌も病原性は認められなかった。選抜菌の中に根頭がんしゅ病を引き起こすとして広く知られている菌¹⁵⁾を含む *Agrobacterium* 属が3菌株

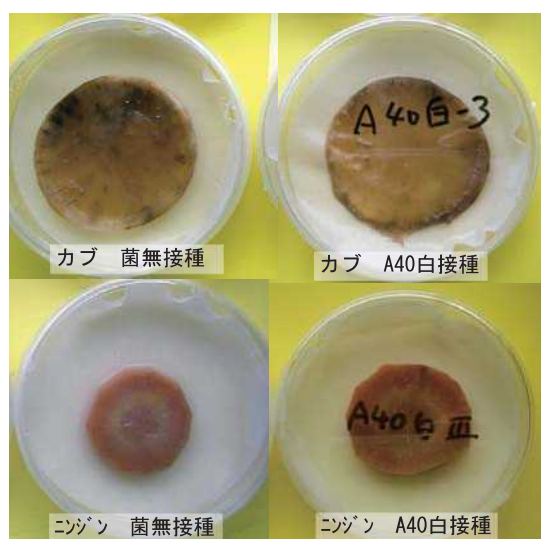


写真2 菌のスライスディスク法による
根頭がん腫病と毛根病の検定

(カブ 右上: A40白接種, 左上: 無接種, ニンジン 右下: A40白接種, 左下: 無接種)

分類されているが、今回の病原性の検定では、病原菌のみを接種する陽性対照(ポジティブコントロール)を準備しなかったため、実用化に際しては、さらに詳しい検討する必要がある。

(3) 対峙培養による病害菌との拮抗作用

PGPRの対峙培養による病原菌の生育抑制効果を表9、写真3に示した。ダイコン萎凋病菌に対して明瞭な阻止円を形成した菌株は15菌株中14菌株(93%)、ニンジン白絹病菌に対して、阻止円を形成した菌株は18菌株中1菌株(6%)、ダイコン菌核病菌について、阻止円を形成した菌株は18菌株中5菌株(28%)であった。一般にPGPRは、病原菌の発病を抑制する事例がある²⁰⁾²⁴⁾が、本試験でもその可能性が示唆された。

表9 生育促進菌の対峙培養による病害抑制効果

| 試験菌株名 | ダイコン 萎黄病菌 | ニンジン 白絹病菌 | ダイコン 菌核病菌 |
|-----------------------------|---------------------------|--------------|--------------|
| a) チンゲンサイに効果のある菌 | | | |
| A30 | ++ ^{注1)} | - | - |
| A40白 | 未調査 | - | - |
| A40黄 | 未調査 | - | - |
| A54 | + | + | - |
| C24-1 | ++ | - | - |
| C47-1 | ++ | - | + |
| C52 | ++ | - | - |
| C69 | ++ | - | - |
| C83-1 | ++ | - | + |
| b) トマトに効果のある菌 | | | |
| A24 | ++ | - | - |
| A40白 | 上記チンゲンサイ (A40白, A40黄) を参照 | | |
| A40黄 | 上記チンゲンサイ (A40白, A40黄) を参照 | | |
| A42 | 未調査 | - | - |
| A68 | ++ | - | + |
| B16 | ++ | - | + |
| C25 | - | - | - |
| C30白 | ++ | - | - |
| C30クリーム | ++ | - | - |
| C31 | ++ | - | - |
| C59 | ++ | - | + |
| 阻止円形成 菌株率 ^{注2)} | 93% | 6% | 28% |

注1) ++: 明瞭な阻止円あり, +: 阻止円あり, -: 効果なし
注2) 阻止円形成菌株数/調査菌株数



写真3 対峙培養によるダイコン萎黄病菌の生育抑制
生育抑制 (左: C69 阻止円形成あり、右: C25 阻止円形成なし)

IV 総 合 考 察

PGPRは、蛍光性*Pseudomonas*属菌が分離・利用されている事例が多い^{9) 10) 20) 21) 23) 25)}が、新規性を考慮して、*Pseudomonas*属に限定せず、現地農家のチンゲンサイ根と農林技術研究所堆きゅう肥連用圃場キャベツ根を中心に、約9千の根圏細菌を収集し、チンゲンサイ種子に接種して根の伸長を調査した。

根の伸長を促進するPGPRの選抜について、約9千の根圏細菌から、81菌株(表2)と、これらに次ぐ予備候補として150菌株を、チンゲンサイ発芽時の根の伸長を促進するPGPRとして選抜した。相野が提案するPGPRライブラリー¹⁾より数は少ないが、静岡県の土壤微生物研究において、自前の根圏細菌ライブラリーを得たことは、今後の有用根圏細菌探索の効率化に寄与する。

育苗期に効果のある菌の選抜に関して、温度条件、灌水条件、日照条件を制御した恒温器内で選抜を行うことで、チンゲンサイ、トマトの各々の育苗期に効果のある菌を選抜できた。

この試験を行う前に、市販培土を用いた育苗試験による予備選抜¹⁾、温室内での育苗試験による予備選抜²⁾を行った。しかし市販培土の均一性の問題や温室内での季節ごとの気温の変化や灌水等の不均一性等の問題から、結果が一定せず、PGPRの候補となる菌は選び出すことができたが、安定的なPGPRを選抜することは難しかった。一方、発芽時の根長を促進する菌の選抜を繰り返すことによる予備選抜(表3, 表5)を行うことで、短時間で候補菌を絞り込めた。細菌の効果を確認する育苗試験を多数行うには限界があるため、発芽時の根の伸長を促進する菌の選抜を繰り返す方法は、育苗期の生育促進菌の選抜における菌の絞り込みに有効な方法であった。

今回の育苗期での選抜は、無肥料の条件下で行った結果である。生育促進の作用機作や育苗期以降の生育が調査できなかった。これらの菌を利用した施肥体系構築のためには、施肥条件下や育苗期以降の試験や生育促進効果の作用機作の解明が今後必要と考える。

なお、温室メロンの育苗期の根重に効果のある菌、A54菌、C30菌も選抜した¹³⁾が、地上部重には効果が認められなかったため、PGPRからは除外した。ただし、A54菌はチンゲンサイ苗に、C30菌はトマト苗に効果のある菌としても選抜されていた。

菌の今後の利用について、選抜された細菌のうち、5菌株が根内細菌由来だった。植物の組織や細胞内に共生的、または害を与えずに共存している微生物であるエンドファイト(endophyte)は、環境への負荷を抑えた生物防除微生物として注目されている⁶⁾。今回選抜された根内細菌の由来の菌も対峙培養による病害抑制効果が認められ、エンドファイト的な働きをしている可能性があることが推察された。肥料削減できる可能性がある生育促進効果に加え、病害抑制という複合的効果があれば、PGPRの利用範囲の拡大が期待できると考えられた。

V 摘 要

有機物連用圃場や現地農家圃場から集めた 8896 株の根圏細菌を、チンゲンサイ種子に接種し、チンゲンサイ発芽時の根長を促進する約 80 菌株の PGPR を得た。これらの PGPR をさらに予備選抜を行った後、栽培条件が制御された環境下で、育苗期に効果のある PGPR の選抜を行った。チンゲンサイ育苗期において、地上部重で 9%~20%、根重

†1 平成 14 年度土壤肥料に関する試験成績書 (静岡県農業試験場土壤肥料部 (2003), 資料第 2034 号, 14-15 p)

†2 平成 15 年度土壤肥料に関する試験成績書 (静岡県農業試験場土壤肥料部 (2004), 資料第 2041 号, 17-18 p)

†3 平成 15 年度土壤肥料に関する試験成績書 (静岡県農業試験場土壤肥料部 (2004), 資料第 2041 号, 21 p)

が12%~22%増加する9菌株を選抜した。また、トマト育苗期において、地上部重で8%~33%、根重が5%~19%増加する9菌株を選抜した。菌の同定を検討した17菌のうち、*Pseudomonas*属が5菌株、*Stenotrophomonas*属、*Agrobacterium*属が3菌株、*Enterobacter*属、*Bacillus*属が2菌株、*Ralstonia*属、*Streptomyces*属が1菌株だった。根頭がんしゅ病と毛根病の検定に関して、病徴は認められなかった。PGPRの対峙培養による病害抑制効果を調査したところ、ダイコン萎凋病菌について効果を示した菌が多く、ダイコン菌核病菌についても、阻止円を形成した菌株があった。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、病害の検定に関するご助言をいただいた静岡県農業試験場元病害虫部長太田光輝氏、病害菌の提供とともに対峙培養に関する技術・指導をいただいた独立行政法人九州沖縄研究センター畑作研究領域安達克樹氏に厚く御礼申し上げます。また、根圏細菌収集を精力的に協力いただいた研修生(現ホーチアグリコ(株))山下雄氏、諸調査に協力いただいた農林大学の学生諸君に感謝する。

引用文献

- 1) 相野公孝(1996):PGPRライブラリー-蛍光性シュードモナスの利用. 農業技術体系, 農文協, 東京, 5巻, 160の1の31~35
- 2) 土壤微生物研究会編(1992):新編 土壤微生物実験法. 養賢堂, 東京, 379
- 3) 藤原俊六郎(1985):シャーレを使った堆肥の簡易腐熟度検定法. 土肥誌, 56, 251~252
- 4) 百町満朗・対島誠也編(2009):微生物と植物の相互作用:病害と生物防除. ソフトサイエンス社, 東京, 153~230
- 5) Kloepper, J.W., Leong, J., Teinze, M. and Schroth, M. N. (1980): Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885~886
- 6) 古賀博則(2001):エンドファイトの農業利用の現状と展望. 植物防疫, 55, 475~478
- 7) 小杉徹・中村仁美・若澤秀幸(2007):肥効調節型肥料を用いたトマト育苗鉢内全量施肥. 土肥誌, 78, 207~211.
- 8) 小杉徹、高橋和彦、鈴木則夫(2004):肥効調節型肥料を用いたセルリー鉢上げ時施肥による施肥量削減. 土肥誌, 75, 373~376.
- 9) 牧浩之・清水克彦(1997):レタス・チンゲンサイに対する蛍光性 *Pseudomonas* の生育調節能. 土肥誌講演集 43, 51
- 10) 松本静治(2006):PGPR製剤を利用したトウガラシ栽培. 季刊雑誌「肥料」, 103, 66~71
- 11) 中川孝俊(2010):有機農産物のマーケティング. 圃場と土壌, 42, 104~108.
- 12) 農林水産省(2011):平成21年度 野菜生産出荷統計. 農林水産省大臣官房統計部, 東京, 7013)
- 13) 農林水産省(2009):平成19年度 生産農業所得統計. 農林水産省大臣官房統計部, 東京, 76
- 14) 太田寛行(2000):新・土の微生物(6)系統分類からみた土の細菌. 博友社, 東京, 60~8115)
- 15) 太田光輝(1993):花き類の根頭がんしゅ病および毛根病に関する研究. 静岡特別研報 16, 1~63
- 16) 岡部宏秋(1997):新・土の微生物(2)植物の生育と微生物. 博友社, 東京, 75~111
- 17) 岡村幸治・豊田剛己(2000):新・土の微生物(7)系統分類からみた土の細菌. 博友社, 東京, 82~101
- 18) 小柳渉(2009):家畜ふん堆肥の特性の実用的評価方法の開発とその活用. 土肥誌, 80, 454~457
- 19) 植物栄養実験法編集委員会(2007):植物栄養実験法. 博友社, 東京, 1~7
- 20) 須永哲央・生井潔・木嶋利男(1997):蛍光性 *Pseudomonas* におけるレタスの生育促進と病害防除. 栃木農試研報, 46, 37~41
- 21) Suslow, T. V. and Schroth, M. N. (1982): Role of deleterious bacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology*, 72, 111~115
- 22) 豊田剛己(2000):新・土の微生物(5)系統分類からみた土の細菌. 博友社, 東京, 139~152
- 23) 浦嶋泰文(2007):ハウレンソウにおける植物生育促進根圏細菌利用法の開発. 近中四農研報, 6, 71~111
- 24) 横山和平(2000):新・土の微生物(5)系統分類からみた土の細菌. 博友社, 東京, 119~138
- 25) 吉川正巳・松本静治(1999):蛍光性 *Pseudomonas* によるトウガラシ苗に対する生育促進および青枯病発病抑制効果. 日植病会報, 65, 375