

# 根圏細菌 SB-K88 株がコムギ縞萎縮病媒介者 *Polymyxa graminis* のコムギへの感染に及ぼす影響

佐山 充<sup>a)</sup>・大木 健広

農研機構 北海道農業研究センター

[〒062-8555 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 1]

## Effect of a strain of rhizobacteria SB-K88 for the infection of *Polymyxa graminis* as a vector of yellow mosaic on wheat

Mitsuru SAYAMA<sup>a)</sup> and Takehiro OHKI

Hokkaido agricultural research center, NARO

### 1. 目的

コムギ縞萎縮病は *Wheat yellow mosaic virus* (WYMV) によって生じるウイルス病で、ネコブカビ科に属する絶対寄生性の *Polymyxa graminis* が媒介する土壤伝染性病害である (Usugi et al., 1989). 本病は全国的に発生しておりコムギの収量が減少するが (御子柴ら, 1988), 北海道内でも感受性品種の栽培面積増加により発生が増加している (堀田ら, 2011). 現在の主力品種には抵抗性品種はなく, 防除薬剤はクロルピクリンや D-D 剤など土壌処理剤の効果が認められているが (斉藤ら, 1964), 環境にかかる負荷や経済性により一般圃場での利用は困難とされている (西尾ら, 2014). そのため著者らは, コムギ縞萎縮病の生物防除法の開発を目的として, 媒介微生物である *P. graminis* の感染を抑制する可能性がある根圏細菌の施用法と培養法の検討を室内試験で行ったので報告する. なお, 本成果の一部はすでに原著論文で発表している (佐山・大木, 2014).

### 2. 材料および方法

#### 1) 供試菌株

テンサイの細根から分離された農研機構北海道農業研究センターの保存菌株である SB-K88 株 (MAFF 140101) (佐山ら, 1994) を用いた. 本菌株は, *Lysobacter* 属細菌であり (Islam, 2010), テンサイそう根病の病原ウイルスを媒介する *Polymyxa betae* の感染や *Pythium* 属菌と *Rhizoctonia solani* によるテンサイ苗立枯病の発病を抑制することがすでに明らかになっている

---

a) (現所属) 農研機構 北海道農業研究センター Hokkaido Agricultural Research Center, NARO

[〒082-0081 北海道河西郡芽室町新生南 9 線 4]

(本間ら, 1993; 佐山ら, 1994).

## 2) コムギの栽培方法

試験管育苗法(阿部・玉田, 1987)を一部改変した砂耕または土耕栽培を行った。砂耕栽培の場合は、底部に穴の開いた直径25mmのガラス管に20~30メッシュの石英砂を詰め、1本にコムギ種子1粒を約1cmの深さに播種し、一部改変したHoagland and Arnon液(浅川, 1985)を毎日5ml灌水した。土耕栽培の場合は、2mmのふるいを通した圃場土と育苗用培土を3:7に混合したものを詰め1cmの深さに播種した。播種後、出芽までは16°Cの暗黒の定温室に置き、出芽後は11°Cに設定された陽光定温器内で合計2ヶ月間栽培した。コムギは、品種「ホクシン」、または「きたほなみ」を使用した。

## 3) *Polymyxa graminis* の接種方法

接種源は、北海道伊達市または夕張郡長沼町の本病発生圃場から採取した土壌で栽培したコムギ根から分離し、コムギ根により継代している菌株を用いた。感染コムギ根をFujisawa and Sugimoto (1976)の方法に準じて、磨砕、ふるいによる濾過、遠心分離による洗浄濃縮を行い、休眠孢子塊懸濁液を作成した。試験管育苗法のコムギ苗1本に対して、土耕の場合は $7 \times 10^3$ 個の休眠孢子塊を含む懸濁液を、砂耕の場合は $3.5 \sim 7.0 \times 10^2$ 個を含む懸濁液を播種時に種子の下に灌注接種した。

## 4) 評価方法

播種2ヶ月後に根を回収し、*P. graminis*の感染根率によって評価した。感染根率は、佐山・本間(1993)に準じた以下の方法によって調査した。1個体ごとに水洗したコムギの根を2mm程度に切り、ビーカー内の水中で良く攪拌した。この根の一部を取り、ラクトグリセロールで固定したのち100片を検鏡し、*P. graminis*の感染の有無を調べ、感染した根の断片の割合を感染根率とした。

## 5) 異なる処理方法によるSB-K88株の*P. graminis*感染抑制効果の比較

### (1) 灌注処理(土耕栽培)

凍結保存されたSB-K88株をミクロスパーテルで1さじかき取り、これを100ml容のフラスコに入れたブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地(PDB培地, Difco社)に接種し、25°C, 120rpmで9日間振とう培養した。培養液または培養液を遠心分離して得た上澄み液又は処理液の蒸留水による1/10希釈液を、播種時に覆土した土壌の上から6mlずつ灌注処理した。検定は、1処理につき5個体を供試した。以下のすべての処理を含め、細菌懸濁液の細菌密度は、King's B寒天培地を用いた希釈平板法によって測定した。

### (2) 担体覆土処理(土耕栽培)

SB-K88株をKing's B液体培地(KB液体培地)で灌注処理と同様の条件で3および5日、PDB培地で7または12日間振とう培養後、担体として用いたバーミキュライトと混合し、通風乾燥機で乾燥させることによって吸着させた。SB-K88株が吸着したバーミキュライトを栽培用の混合土

壤に 20%または 40%の割合で混合し、種子の上に 1cm の厚さに覆土した。処理は、培地と培養日数、土壌へのバーミキュライトの混合割合を組み合わせ、培地・日数・混合割合で本文と表中に示した。無処理は 4 個体、その他の処理は 3 個体を用いた。対照区には無処理のほかに、無処理のバーミキュライトを 40%混合した「バーミキュライト 40%のみ」区を設けた。バーミキュライトに付着した細菌数は、バーミキュライト 1ml を 20ml の滅菌蒸留水を入れた 100ml 容のフラスコに入れ、120rpm で 30 分間振とう後 10 秒間静置し、上澄み液を用いて測定した。

### (3) 種子コーティング処理

#### a) 砂耕栽培

KB 液体培地で 3 日間、又は PDB 培地で 7 日間培養した SB-K88 株の培養液を用いた。各培養液に 2 時間浸漬処理した種子を砂耕栽培した。各処理とも 5 個体を用いた。

#### b) 土耕栽培

SB-K88 株を PDB 培地で 3, 5, 7, 9 日間培養し、それぞれの培養液で 2 時間浸漬処理した種子を播種し土耕栽培した。処理ごとに 3 個体用いた。種子に付着した細菌数は、処理した種子を滅菌水入り試験管中で 30 秒間攪拌し、得られた細菌懸濁液を用いて測定した。

## 3. 結果

### 1) 灌注処理（土耕栽培）による感染抑制効果

培養後の細菌密度は、 $4.1 \times 10^9$  cfu/ml であった。*P. graminis* の感染根率は、無処理が 12.4%に対して PDB 培養液、PDB 培養上澄み液処理ともに 0.0%となり、灌注処理した根部では *P. graminis* は観察されなかった（表 1）。一方、1/10 濃度の培養液処理の感染根率は 7.2%、1/10 濃度の培養上澄み液処理は 5.0%で、無処理と有意な差はなかった。

表 1. 根圏細菌 SB-K88 株 PDB 培養液の灌注処理による *P. graminis* 感染抑制効果（土耕栽培）

処理区	感染根率	標準誤差
蒸留水	12.4	3.25
PDB	20.4	2.80
PDB 培養液	0.0	0.00 * <sup>1)</sup>
PDB 培養液 1/10 濃度	7.2	1.83
PDB 培養液上澄み液	0.0	0.00 *
PDB 培養液上澄み液 1/10 濃度	5.0	2.43

1) \* は、Tukey の多重比較により、5% 水準で無処理との間に有意な差があることを示す。

### 2) 担体覆土処理（土耕栽培）による感染抑制効果

担体 1ml に付着した細菌数は、KB 培地 3 日間培養が  $8.5 \times 10^9$  cfu、5 日間培養は  $10^6$  cfu 以下、PDB 培地 7 日間培養が  $3.5 \times 10^9$  cfu、12 日間培養が  $4.5 \times 10^9$  cfu であった。*P. graminis* の感染根率は、無処理が 11.0%、バーミキュライト 40%のみの覆土が 16.0%であった。無処理に対して有意に感染根率が低かったのは、PDB・7 日・40%で 2.0%だった。バーミキュライト 40%のみに対して有意に感染根率が低くなったのは、PDB・7 日・20% (3.3%)、KB・5 日・20% (5.7%)、PDB・

7日・40% (2.0%), PDB・12日・40% (4.0%) であった (表2).

表2. 根圏細菌SB-K88の担体覆土処理による*P. graminis* 感染抑制効果 (土耕栽培)

### 3) 種子処理による感染抑制効果

#### (1) 砂耕栽培

処理に使用した KB 液体培地の細菌密度は 1ml 当たり  $5.1 \times 10^9$ cfu, PDB 培地の細菌密度は  $3.4 \times 10^8$ cfu であった. 蒸留水処理の感染根率が 32.4% に対して, KB 液体培養液処理では 25.2% で効果が無かったが, PDB 培養液処理では 0.0% で有意に感染根率が低くなり, 効果が認められた (表3).

#### (2) 土耕栽培

種子 1 粒に付着した細菌数は,  $1.7 \times 10^6 \sim 9.3 \times 10^6$ cfu であった. 蒸留水処理の感染根率が 25.3% に対して PDB 培養液処理区は 16.7~34.3% となり, 培養液処理による感染抑制効果は, どの培養日数でも認められなかった (表4).

培地・培養日数・混合割合	感染根率	標準誤差	対無処理	対パーミキュライト
無処理	11.0	1.47		
パーミキュライト40%のみ	16.0	2.08		
PDB <sup>1)</sup> ・7日・20% <sup>2), 3)</sup>	3.3	1.86		* <sup>4)</sup>
PDB・12日・20%	7.0	1.73		
KB液体・3日・20%	10.0	2.89		
KB液体・5日・20%	5.7	2.19		*
PDB・7日・40%	2.0	1.53	*	*
PDB・12日・40%	4.0	1.00		*
KB液体・3日・40%	8.7	1.86		
KB液体・5日・40%	7.7	1.86		

1) PDB: ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地, KB液体: King's B液体培地.

2) 表中でPDB・7日・20%は, PDB培地で7日間培養した細菌液を吸着させたパーミキュライトを覆土に20%の割合で混合した処理を示す.

3) PDB・7日・20%の付着細菌数は $3.5 \times 10^9$ cfu/ml, PDB・12日・20%は $4.5 \times 10^9$ cfu/ml, KB液体・3日・20%は $8.5 \times 10^9$ cfu/ml, KB液体・5日・20%は $10^6$ cfu/ml以下.

4) \*は, Tukeyの多重比較により, 5%水準で無処理あるいはパーミキュライトのみ処理との間に有意な差があることを示す.

## 4. 考察

本試験で供試した SB-K88 株はテンサイ根圏から分離された細菌で, *P. betae* の感染を抑制することが明らかになっているが, 本試験からコムギに感染する *P. graminis* の感染も抑制することが示された. 土壌を用いた栽培では, 培養液の灌注処理とパーミキュライトを担体に用いた覆土処理で感染抑制効果が認められた. 灌注処理では, 培養液の上澄み液のみでも効果が認められた

表3. 異なる培地で培養した根圏細菌SB-K88株の種子処理による*P. graminis* 感染抑制効果 (砂耕栽培)

処理区	感染根率	標準誤差
蒸留水	32.4	2.31
King's B液体培養液	25.2	1.66
PDB培養液 <sup>1)</sup>	0.0	0.00 * <sup>2)</sup>

1) PDB培地: ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地.

2) \*は, Tukeyの多重比較により, 5%水準で無処理との間に有意な差があることを示す.

ことから、抑制効果には本細菌の生産物が関与している可能性が考えられる。SB-K88株は、テンサイ苗立枯病の発病抑制に関与していると考えられている抗生物質 xanthobaccin を産生することが知られている (Nakayama et al., 1999)。本物質の水溶液の種子処理によって砂耕栽培のコムギへの *P. graminis* の感染が抑制されたことから (データ未掲載)、*P. graminis* の感染に対しても影響を与えている可能性

がある。KB培養液に比べてPDB培養液の効果が高いが、これはPDBによる培養が本物質の生産に適しているとされていることが関係している可能性がある。施用法の簡便さから最も実用性が高いと考えられる種子処理では、砂耕栽培では効果が認められたものの土耕栽培では認められなかった。これは拮抗作用に関与する物質が土壌中で吸着や分解されることにより、種子処理では施用量が不足した可能性がある。今後は、処理細菌の十分な施用量を確保するために、コーティング方法の改良などを試験する必要があると思われる。

## 5. 謝辞

北海道農業研究センターの中山尊登博士には、有益なご助言を賜った。ここに記して深謝の意を表す。

## 6. 参考文献

- 阿部秀夫・玉田哲男 (1987). *Polymyxa betae* Keskin (テンサイそう根病のウイルス媒介者) の簡易接種・増殖法. てん菜研究会報 29 : 34-38.
- 浅川征男 (1985). 最新作物生理実験法 (北條良夫・石塚潤爾編). pp.388-389, 農業技術協会, 東京.
- Fujisawa, I. and Sugimoto, T. (1976). Transmission of beet necrotic yellow vein virus by *Polymyxa betae*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 43: 583-586.
- 本間善久・内野浩克・神沢克一・中山尊登・佐山 充 (1993). 根圏細菌によるテンサイ苗立枯病の抑制と拮抗物質生産. 日植病報 59 : 282 (講要).
- 堀田治邦・竹内 徹・佐々木純・鈴木孝子・木口忠彦 (2011). 北海道におけるコムギ縮萎病の発生分布. 北日本病虫研報 62 : 47-49.
- Islam, T. (2010). Mode of antagonism of a biocontrol bacterium *Lysobacter* sp. SB-K88 toward a damping-off pathogen *Aphanomyces cochlioides*. World J. Microbiol. Biotechnol. 26:629-637.

表4. 異なる期間培養した根圏細菌SB-K88株の種子処理による *P. graminis* 感染抑制効果 (土耕栽培)

培養日数	感染根率	標準誤差	付着細菌数
蒸留水	25.3 <sup>1)</sup>	4.70	—
0	17.3	4.06	—
3	34.3	4.33	3.9×10 <sup>6</sup>
5	17.3	5.24	9.3×10 <sup>6</sup>
7	23.3	3.48	1.7×10 <sup>6</sup>
9	16.7	5.36	6.2×10 <sup>6</sup>

1) 処理間に有意差なし。

- 御子柴義郎・藤澤一郎・赤坂安盛・田野崎真吾 (1988). 岩手県内におけるコムギ萎縮病及びコムギ縞萎縮病の発生. 東北農業研究 41 : 143-144.
- Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J. and Tahara, S. (1999). Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. Strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4334-4339.
- 西尾善太 (2014). コムギ縞萎縮病抵抗性品種‘ゆめちから’の育成と抵抗性品種の由来. 植物防疫 68 : 134-137.
- 齊藤康夫・高梨和雄・岩田吉人・岡本 弘 (1964). 土壌伝染性ムギウイルス病に関する研究. I 薬剤処理が病土およびウイルスに及ぼす影響. 農技研報告 C17 : 41-60.
- 佐山 充・本間善久 (1993). テンサイ罹病細根および土壌からの *Polymyxa betae* の休眠胞子塊の検出評価および部分純化法. 北日本病虫研報 44 : 24-27.
- 佐山 充・内野浩克・神沢克一・本間善久 (1994). 根圏細菌のバクテリゼーションによるテンサイそう根病の抑制. てん菜研究会報 36 : 202-209.
- 佐山 充・大木健広 (2014). コムギ縞萎縮ウイルス媒介者 *Polymyxa graminis* の感染を抑制する根圏細菌の選抜. 北日本病虫研報 65 : 19-23.
- Usugi, T., Kashiwazaki, S., Omura, T. and Tsuchizaki, T. (1989). Some properties of nucleic acids and coat proteins of soil-borne filamentous viruses. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55:26-31.