④　トマト根腐萎凋病に対する *Paenibacillus* sp. 42NP7 株と菌根菌 *Glomus mosseae* の併用処理の利用

1）*Paenibacillus* sp. 42NP7 株について

Paenibacillus 属細菌は、グラム陽性の芽胞を形成する桿菌で、*Bacillus* 属細菌に非常に近縁の性質を持ちますが、そのリボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の違いに基づき、*Bacillus* 属の一部細菌が本属に転属されました[7)]。*Paenibacillus* 属細菌は、土壌をはじめとした様々な環境中に生息しますが、42NP7 株は、Enya et al.[8)] により、健全トマト植物の葉圏に生息している微生物の一つとして分離されたものです（図２９）。本菌株は、（独）農業環境技術研究所で保存管理されています。

2）菌根菌（*Glomus mosseae*）について

菌根菌 *Glomus mosseae* は、アーバスキュラー菌根菌（VA 菌根菌と呼ばれることもある）という菌根菌の一種です。アーバスキュラー菌根菌は植物の根に共生して、土壌から吸収したリンを供給することで植物の生育を改善することが知られており、地力増進法に定める政令指定土壌改良資材に認定されています。またある種の病害に対して抑制効果を示すこともあります。菌根菌資材は、無機質多孔質資材等の担体に *G.mosseae* の胞子を保持したもので、播種時あるいは鉢上げ時に培土に 1～10%混合します。あるいは定植時に、植え穴に施用する方法もあります。施用量は資材の特徴や栽培条件に合わせて調整します。なお、本試験で用いた *G.mosseae* 菌株の胞子（図３０）は、出光興産（株）から分譲されています。

図２９． *Paenibacillus* sp. 42NP7 株の R2A 平板上のコロニー形態
（（独）農業環境技術研究所）

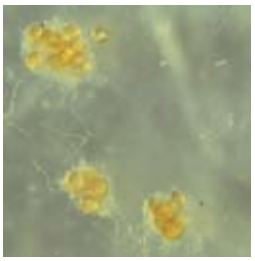

図３０． 培土中で増殖・形成された *Glomus mosseae* の胞子
（東北大学）

3）42NP7 株の培養条件・接種源の調製法

42NP7 株の培養は、以下のとおり行います。

・500ml 容三角フラスコに入れた 100ml の R2A 液体培地（組成：酵母エキス、0.5g；トリプトン、0.25g；ペプトン、0.75g；ブドウ糖、0.5g；デンプン、0.5g；リン酸水素二カリウム、0.3g；硫酸マグネシウム、0.024g；ピルビン酸ナトリウム、0.3g；蒸留水 1000ml）に細菌を移植する。

・2 日間 28℃振とう培養（120rpm）後、培養液を回収し、遠心分離（6,000x g、10 分）により滅菌水で菌体を 2 回洗浄後、上清を棄て、ペレットを滅菌水で 2 回洗浄し、分光光度計で OD_{600}=0.3 に調製したものを接種源とする。

（（独）農業環境技術研究所）

4）菌根菌（*G. mosseae*）の増殖・接種源の調製法

絶対共生微生物である菌根菌 *Glomus mosseae* の増殖・接種源の調製は、以下のとおり行います。

・細粒赤玉土、川砂、リン酸肥沃度の低い畑土壌を２：１の比率で混合し、オートクレーブ滅菌して培土を作成する。培土の可給態リンが 30～60mgP_2O_5/l となるようにリン酸肥料を混和する。

・直径 6cm のビニルポットに 250ml の培土を充填し、植え穴の底へ *G. mosseae* 胞子（胞子約 100～500 個）を施用し、あらかじめ表面殺菌して発芽させた植物（バヒアグラス、白クローバ等）を移植する。リン酸を除いた液肥（ホーグランド水耕液等）を約 5ml 添加する。液肥は、植物の生育に応じて適宜追加する。

・移植後、人工気象機内で（明 14 時間、25～30℃：暗 10 時間、20～25℃）2-3 ヶ月育成後、給水を停止して植物を枯死させ、根を除いた培土に *G.mosseae* 胞子が形成されていることを実体顕微鏡等で確認し、培土をそのまま接種源として用いる。胞子密度が低い場合は、培土から湿式篩別法で胞子を濃縮し、川砂等と混和して接種源とする。

（東北大学）

5）植物体への処理法

42NP7 株および *G. mosseae* の苗への処理は、次の手順で行うのが効果的です。

・*G. mosseae* の接種源は、トマト種子の播種時に、セル苗用培土（リン酸成分濃度約 0.2%）に 4%（w/w）の割合で混合してセルトレイに充填、種子を播種する（図３１）。

・播種後、苗を温室内等で育成、鉢上げ後、定植 5 日前に、42NP7 株の細菌懸濁液（OD_{600} = 0.3）（図３２）を、ポットサイズの 1/12 量分を灌注する（例：直径 9cm ポット［360 ml 容量］の場合は 30ml 灌注）。

（（独）農業環境技術研究所）

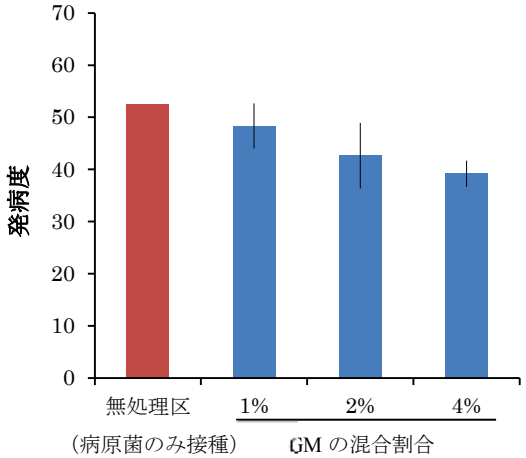

図３１．トマトセル苗における *G. mosseae* 資材（GM）の培土への混合割合（w/w）別の発病抑制効果（バーは標準誤差）

（（独）農業環境技術研究所）

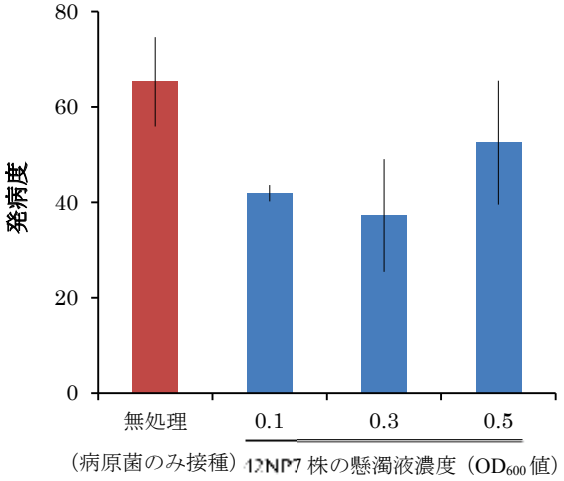

図３２．汚染土壌に移植されたトマトポット苗における 42NP7 株懸濁液の処理濃度別の発病抑制効果（バーは標準誤差）

（（独）農業環境技術研究所）

６）圃場での防除効果の検討

42NP7 株および *G. mosseae* の併用処理によるトマト根腐萎凋病菌に対する防除効果を圃場で検討した事例を紹介します。圃場試験例の概要は以下の通りです[9)]。

・試験場所、作型：兵庫県立農林水産技術総合センター内ビニルハウス（黄色土壌）、無加温半促成栽培

・供試品種：ハウス桃太郎

・区制：3 汚染程度（高汚染・中汚染・低汚染）の各圃場区を設定　1 区（2.0 ㎡）9 株（畝幅 120cm×株間 30cm、2 条植）、3 反復

・耕種概要：11 月に培土（スミソイル）を充填したセルトレイに播種、20 日間育成後に 9cm ポットに鉢上げし、約 70 日後に圃場に定植。

・42NP7 株および *G. mosseae* の苗へ処理：上記５）に準じて処理。

・発病調査：岩本ら（2008）の方法に準じて、地上部の葉の黄化・萎凋程度、根の腐敗程度により発病度を算出。

（兵庫県立農林水産技術総合センター）

試験の結果、42NP7 株および *G. mosseae* の併用処理によって、対照試験区のトマト地上部および根部の発病度が、中程度の発病条件下において、防除価 71（2012 年）、59（2013 年）の防除効果が見られました（図３３）。

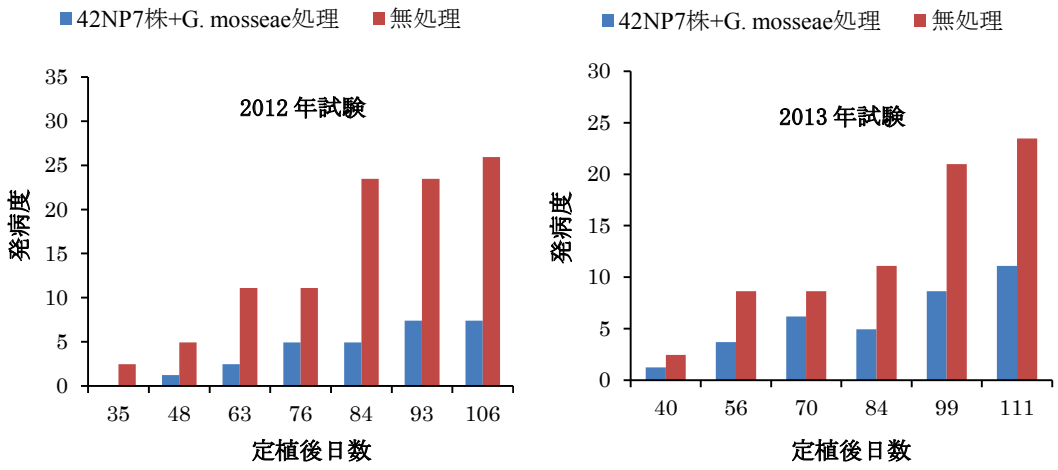

図３３．圃場における 42NP7 株および *G. mosseae* の併用処理による根腐萎凋病発病抑制効果
（兵庫県立農林水産技術総合センター）

7）防除効果が期待できる使用場面

試験圃場における根腐萎凋病の発病程度（発病度）と 42NP7 株＋*G. mosseae* の併用処理の効果（防除価）との関係を見ると、これら微生物の併用処理の効果は、発病度がおよそ 60 未満までの発生程度と想定される圃場条件では、防除価が 50 以上となり、一定の効果が期待できます。しかし、それ以上の発病程度と想定される圃場条件では、高い防除効果は期待できないと予想されます（図３４）。

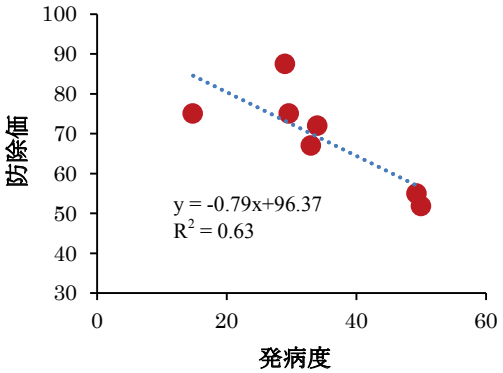

図３４．圃場における根腐萎凋病の発病度と 42NP7 株＋*G.mosseae* の併用処理による防除価の関係
（兵庫県立農林水産技術総合センター）

8）防除効果の作用メカニズム

５）の方法に準じて苗に処理した 42NP7 株および *G. mosseae* 資材は、直接的に根腐萎凋病菌の生育を阻害はしない一方で、根の表面に定着あるいは根部に共生していることがわかりました（図３５、３６）。さらに、これら両微生物を処理したトマト苗の根部や葉にお

いては、病害抵抗性関連タンパク遺伝子の発現が確認されるとともに、根においては抗菌物質の蓄積が認められました。このことから、これら両微生物は植物体に作用して病害に対する抵抗性を高めていると考えられます。

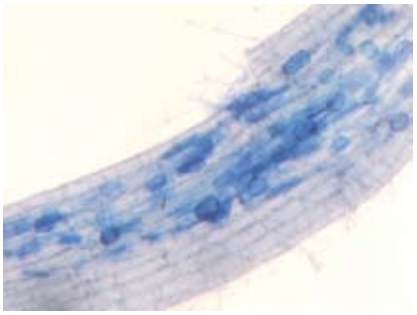

図３５．培土中に混和した *G.mosseae* のトマト根組織における定着状態
（（独）農業環境技術研究所）

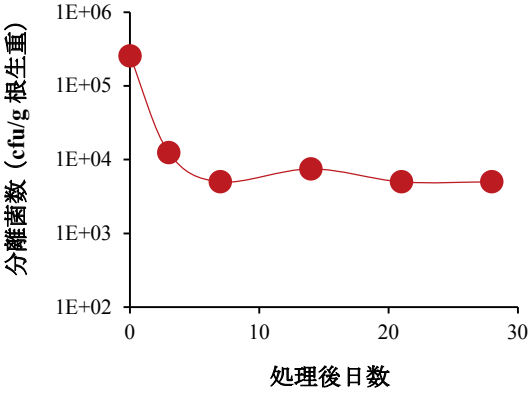

図３６．42NP7 株を根部に処理したトマトセル苗における根部からの再分離菌数の経時変化
（（独）農業環境技術研究所）