



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	テンサイ種子のバクテリアゼーションに関する研究 : Ⅰ. 異なる土壌に生育するテンサイ根面微生物相の比較
Author(s)	李, 玉休; Lee, Wang Hyu; 生越, 明 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 14(4), 409-415
Issue Date	1985-12-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12041
Type	departmental bulletin paper
File Information	14(4)_p409-415.pdf



テンサイ種子のバクテリゼーションに関する研究

I. 異なる土壤に生育するテンサイ根面微生物相の比較*

李 王 休・生 越 明・杉 本 利 哉**

(北海道大学農学部農業生物学科植物寄生病学・樹病学講座,

**北海道農業試験場てん菜部)

(昭和60年6月6日受理)

Studies on the Seed Bacterization of Sugar Beets

I. Comparative Studies on the Rhizoplane Microfloras of Sugar Beets Grown in Different Soils

Wang Hyu LEE, Akira OGOSHI
and Toshiya SUGIMOTO**

(Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University,
Sapporo, Japan. **Department of Sugar Beet, Hokkaido National
Agricultural Experiment Station, Sapporo, Japan)

緒 論

ある種の細菌を接種した作物種子を畑に播種すると、細菌の菌株によっては作物の生育が促進され、収量も増加する例が知られている。この目的で細菌を種子に接種する手法をバクテリゼーションという。バクテリゼーションに関する研究は古くから行なわれているが、BROWN¹⁾はその効果は接種細菌による土壤伝染性病原菌の抑制、植物生長促進物質の生産、土壤中のリン酸の可溶性などによるものであるとした。テンサイにおいても、SUSLOW と SCHROTH¹⁵⁾の研究などがあり、バクテリゼーションを行なうことにより、13%の増収があったと報告されている。

本研究はテンサイを材料として、異なる土壤に生育したテンサイについてその根面微生物を分離し、これを用いたバクテリゼーションにより、テンサイの生育を促進させるとともに各種土壤伝染性病害の発生を抑制することを目的としたものである。その一段階として北海道大学農場土と北海道農業試験場圃場土の間では、テンサイ立枯病菌のうち *Aphanomyces cochlioides* による立枯病の発生程度に差があると報告されていること²⁰⁾に注目し、現在でもその差が存在しているか、また両土壤間に根面微生物相の差異があるかどうかを調査し、バクテ

リゼーションのための有用微生物の分離のための基礎資料とすることを目的とした。

材料および方法

供試土壤：土壤は北海道大学農学部農場土（沖積土の植壤土，pH 4.7，以下北大土とする）および農林水産省北海道農業試験場てん菜部圃場土（湿性黒色火山性土，pH 5.3，以下農試土とする）を使用した。北大土は1983年4月表層より10 cm までの土壤を5~6カ所から採取、よく混和した。農試土は育苗用として採取したものを供用した。土壤はいずれも5 mmのフルイを通した。

テンサイの栽培：テンサイの品種はモノミドリ（一部カーベメガモノ）を用いた。栽培は一般の育苗方式に従った。

病原菌の接種：*Aphanomyces cochlioides*の接種は実験室で形成させた遊走子を用いて、行なった。

根面微生物の測定：根面微生物の測定は鈴木・石沢¹⁶⁾の水中分画法に準じて行なった。分離培地は、糸状菌は Martin's rose bengal agar, 放線菌ならびに細菌は 1/10 希釈 Tryptic soy agar, *Bacillus* は 1/10 希釈 Tryptic soy agar (60°C 30分温湯処理), *Pseudomonas* は Difco の *Pseudomonas* agar F^{12,13)}, *Agrobacterium* は KADO と HESKETT⁹⁾ の medium D₁, *Erwinia* は同じく

* 本研究は文部省科学研究費補助金 No. 58860011 (1983) によるものである。

medium D₃ を用いた。菌数はテンサイ乾根 1g 当りに換算した。

実験結果

1) 北大土および農試土におけるテンサイの発芽率と苗立枯率

両土壌を素焼鉢 (径 15 cm) につめテンサイ種子 10 粒を播種した。温室の実験は 3 反復で 3 回実施した。その他は 1 回ずつ実施した。その結果は Table 1 のように、発芽率はいずれの試験区においても、北大土で高く、苗立枯率は農試土で高かった。農試土で発芽率が悪いのは土性 (排水不良) と発芽前立枯があったためと考えられる。のちの実験から、発芽前立枯に関与している主な病原菌は *Pythium* 属菌であると考えられる。

Table 1. The germination and damping-off percentage of sugar beet seeds in A soil and B soil

Culture	Germination (%)		Damping-off (%)**	
	A soil	B soil	A soil	B soil
Greenhouse*	78.7	68.0	10.2	22.5
Phytotron (20°C)	95.0	68.3	0.0	9.0
Soil incubator (20°C)	90.5	76.2	21.1	25.0

A soil: Hokkaido University field soil.

B soil: Hokkaido National Agricultural Experiment Station sugar beet field soil.

* Average of three times.

** Damping-off (%) = $\frac{\text{No. of damped off}}{\text{No. of germinated}} \times 100$

2) *Aphanomyces cochlioides* の遊走子接種による両土壌のテンサイ苗立枯病発病率

北大土および農試土にテンサイを播種し、発芽後 7~10 日目に、実験室で形成させた *A. cochlioides* の遊走子を 1 子苗当り、10⁵、5×10⁴、10⁴ 個灌注接種し、テンサイ子苗の立枯率を調べた結果を Table 2 に示した。両土壌とも、菌量 (遊走子数) が多くなれば立枯率も増加する傾向があった。10⁵ の接種では農試土の発病率が高かったが、他の菌量では両土壌間には大差がないと考えられる。

立枯病調査後、そのまま 15 日間おいて、再びテンサイを播種して立枯病を調査した。この時は、土壌に潜在していたと考えられる菌による立枯病が発生し、*A.*

Table 2. Damping-off of sugar beet seedling by inoculation of *Aphanomyces cochlioides* zoospores

No. of zoospores inoculated	Damping-off (%)	
	A soil	B soil
10 ⁵	19.7	32.2
5×10 ⁴	19.1	15.0
10 ⁴	18.2	15.6
0 (control)	0.0	0.0

Average of two times.

Table 3. Damping-off of sugar beet seedlings replanted in artificially inoculated soils with *Aphanomyces cochlioides*

No. of zoospores inoculated	Damping-off (%)	
	A soil	B soil
10 ⁵	40.0	100.0
5×10 ⁴	75.0	100.0
10 ⁴	80.0	88.9
0 (control)	66.0	75.0

Average of two times.

cochlioides による立枯が明らかでなかった。しかし、どの区でも農試土で立枯が多く、一般に農試土は立枯病の発生しやすい土壌と考えられる (Table 3)。

3) 両土壌に生育したテンサイの根面微生物数の比較
テンサイの栽培方式は次の 4 種によって行ない、それぞれについて根面微生物を測定した。① 両土壌をポット (径 15 cm) につめ、播種後 5、10 週目の苗を供試した。栽培は温室で行なった。② 地下室の土壌恒温槽 (温度 20°C) にテンサイを播種し、3 週目の苗を供試した。③ 北大土を温室の大型ポット (径 37 cm) につめ、播種後 7、10、13、16 週目のテンサイの細根を供試した。④ 北大圃場と農試圃場に栽培されたテンサイについて、収穫時の細根を供試した。

両土壌で生育したテンサイの根面微生物相およびその数には Table 4 のように大差はなかった。いずれにおいても、細菌 > 放射菌 > 糸状菌であった。細菌のなかでは *Bacillus* および *Pseudomonas* の比率が高かった。経時的にみると播種後 3~5 週に比べ、10 週目には *Pseudomonas* が激増しているのが注目される。

大型ポットの北大土に生育したテンサイの根面微生物も、やはり 10 週目に *Pseudomonas* が増加しているの

Table 4. Population of microflora on sugar beet roots (1)
(cfu/g dry root, $\times 10^4$)

Microflora	Clay pot (15 cm, in greenhouse)				Soil incubator	
	A soil		B soil		A soil	B soil
	5 W	10 W	5 W	10 W	3 W	3 W
Fungi	3.6	1.0	0.1	1.6	0.3	1.4
Actinomycetes	3.2		2.8			
Bacteria	736.0		1488.0		584.0	628.0
<i>Bacillus</i>	69.0	8.7	4.2	21.5	67.4	78.1
<i>Pseudomonas</i>	4.5	533.0	3.0	188.2	41.6	11.7
<i>Agrobacterium</i>	3.9	9.3	0.3	11.6	4.6	0.0
<i>Erwinia</i>	3.7		1.7		6.8	1.1

Table 5. Population of microflora on sugar beet roots (2)
(cfu/g dry root, $\times 10^4$)

Microflora	A soil (weeks)			
	7	10	13	16
Fungi	5.2	17.3	9.6	6.2
<i>Bacillus</i>	6.3	10.5	7.5	7.2
<i>Pseudomonas</i>	147.6	837.9	101.1	151.7
<i>Agrobacterium</i>	3.1	5.8	2.8	0.7

Table 6. Population of rhizoplane microflora of sugar beet in various cropping system (cfu/g dry root, $\times 10^4$)

Microflora	Cropping system and variety			
	B soil, monoculture	B soil, rotation		A soil, rotation
	Kawemegamono	Kawemegamono	Monomidori	Monomidori
Fungi	0.9	0.8	0.0	5.3
<i>Bacillus</i>	9.4	9.0	12.4	34.2
<i>Pseudomonas</i>	454.0	419.0	243.0	936.0
<i>Agrobacterium</i>	21.8	18.0	1.2	19.3

が注目される (Table 5)。細菌の内訳をみると一般に *Pseudomonas* > *Bacillus* > *Agrobacterium* であった。

次いで、作付体系、品種を異にするテンサイを圃場から採取し、その根面微生物を調べた。

圃場で作付体系を異にしたテンサイの収穫時における根面微生物相をみても、Table 6 のように *Pseudomonas* が顕著に多かった。品種、土壌によって若干の違いがあった。

4) 温室実験におけるテンサイ根面微生物の経時的

変化

北大土および農試土を用いて、テンサイ (品種: モノミドリ) をペーパーポットで育苗した。土壌は pH を 6.0 に矯正して使用し、育苗は慣行に従った。4 週間育苗した苗を北大土の入った大型ポット (径 37 cm) に移植して、温室栽培した。収穫期まで経時的に根を取り、根面の微生物数を測定した。

調査対象としたすべての菌は発芽後 3 週目まで増加しつつ、その後は菌数はほぼ一定に保たれた (Fig. 1)。

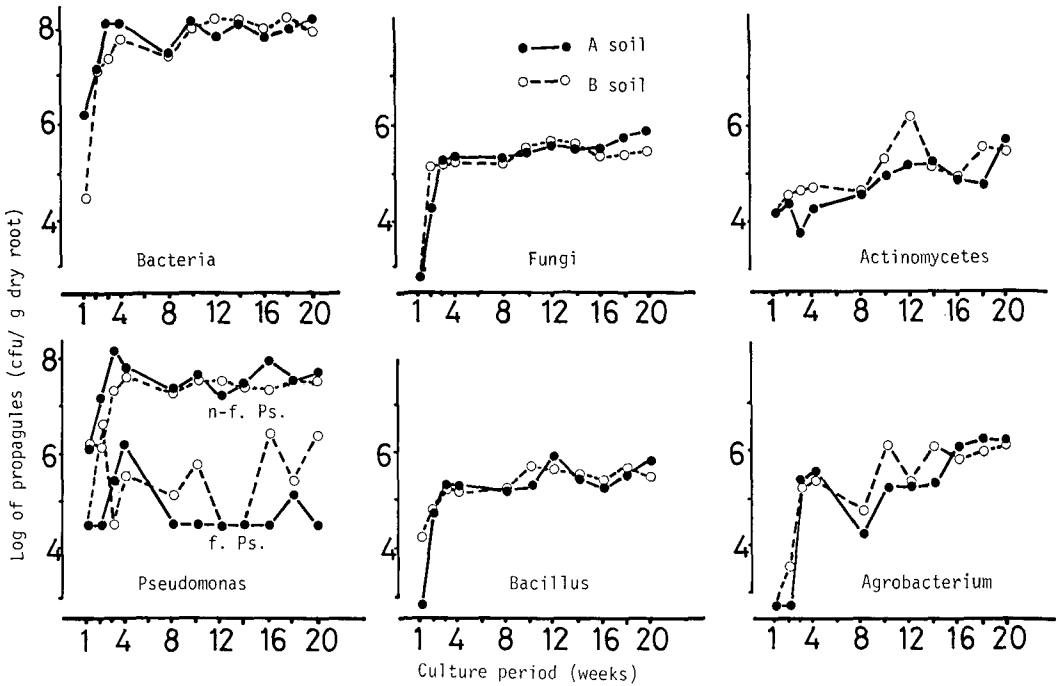


Fig. 1. Population of microflora on sugar beet roots grown in A soil and B soil (in greenhouse).

A soil: Hokkaido University soil, B soil: Hokkaido Nat. Agric. Exp. Stn. soil
n-f. Ps.: non-fluorescent *Pseudomonas*, f. Ps.: fluorescent *Pseudomonas*.

育苗時の土壌が異なっても、ほとんどの菌は両土壌間に差がなかった。*Pseudomonas* は fluorescent *Pseudomonas* (Difco *Pseudomonas* agar F 上で蛍光色素を生産するもの) と non-fluorescent *Pseudomonas* (同じく蛍光色素を生産しないもの) に分けられるが、前者は菌数に大きな変動があるものの、一般に農試土で育苗したテンサイで多かった。移植後の土壌は北大土であるため、これは育苗時に着生した fluorescent *Pseudomonas* が、栽培後期まで生存増殖しているものと考えられる。このことは育苗土壌が重要であることを示唆するものである。

5) 圃場におけるテンサイ根面微生物の経時的変化

農試土で1カ月育苗したテンサイ(モノミドリ)を北大農場および農試圃場に移植し、慣行に従って栽培した。1カ月毎にテンサイを抜き取り、水分の損失を防止するため、ビニール袋につめ実験室に持ち帰り、根の細根を用いて根面微生物の測定を行なった。測定は播種後1カ月から6カ月まで行なった。

菌数およびその経時的変化は、温室の実験結果とほぼ同様であった。すなわち、両土壌間の差は Fig. 2 に示

すようにほとんどなかった。ただし、収穫期を過ぎた6カ月目では、気温の低下のためか全体に菌数が減少した。この場合には fluorescent *Pseudomonas* の菌数にも両土壌間に差がなかった。この理由は両圃場とも同じ育苗土(農試土)を用いたことと関係があると考えられる。菌数も温室実験の農試土のそれに近かった。

考 察

テンサイの根圏、根面微生物に関する研究はあまりない。北大土と農試土では *Aphanomyces cochlioides* による立枯病の発生程度に差があり、北大土で激しいと報告されているが²⁰⁾、その原因は不明である。本実験ではこの再確認と、原因解明の1つとして根面微生物相を調べた。しかし、今回の実験では農試土は必ずしも、発病程度の低い土壌ではなく、逆に北大土より発病が若干多い結果になった。この変化の原因は不明であるが、農試土はもともと草地であったものを畑作に転換して20年近く経過したこと、北大土は永年にわたる輪作によって変化したことなどとの関係があるかも知れない。テンサイ、その他の作物を栽培することによって、また熟畑化

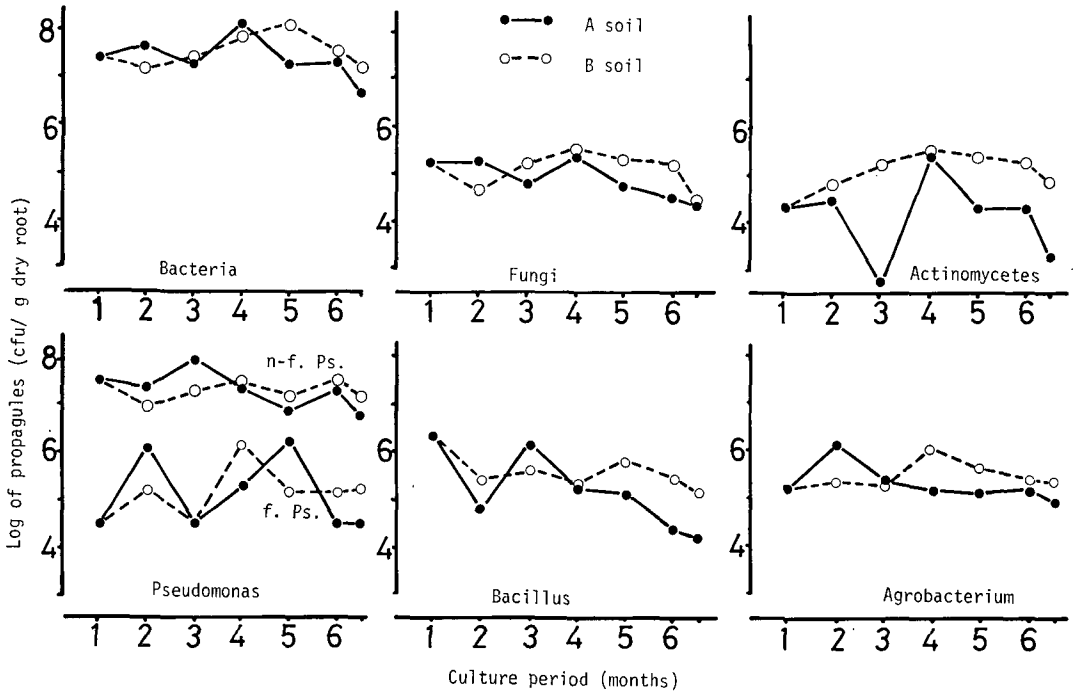


Fig. 2. Population of microflora on sugar beet roots grown in A soil and B soil (in field).

n-f. Ps.: non-fluorescent *Pseudomonas*, f. Ps.: fluorescent *Pseudomonas*.

することによって、土性に変化が生じたことが考えられる。いずれにしても、両者の発病の差の原因は不明であるが、根面あるいは根圏微生物相の差異が考え方の1つとしてあった。しかし、今回の実験から、根面微生物相には両土壌間では大差がないことが判明した。根面微生物相はテンサイの全栽培期間を通じて、比較的一定しており、菌数の変化は小さい。

両土壌間で唯一の差は fluorescent *Pseudomonas* であった。Fluorescent *Pseudomonas* はバクテリゼーションにもっとも使われ、研究されている菌である^{2-8,10,11,14,15,17-19}。本研究においてもこれに注目していたが、両土壌で顕著な差があったのが注目される。温室、圃場の実験から fluorescent *Pseudomonas* は比較的初期から根面に定着し、収穫期まで存在している。すなわち、子苗時の育苗土壌が重要である。農試土で育苗したものは本菌の菌数は高く維持され、逆に北大土で育苗したものは低いままであった。これらのことは、種子に細菌を接種するバクテリゼーションの有効性をうらづけるものである。

また、本実験の結果から、バクテリゼーションに最も

よく用いられている fluorescent *Pseudomonas* および *Bacillus* が、テンサイの全生育期間を通じて、その根から分離できることが判明した。

要 約

テンサイを材料として、異なる土壌に生育した苗の根面微生物相に差異があるかどうかを調査し、バクテリゼーションのための有効微生物分離のための基礎資料とした。得られた結果は次の通りである。

1. 北大土および農試土間において、テンサイの発芽率は北大土で高く、立枯率は農試土で高かった。
2. *Aphanomyces cochlioides* の遊走子接種の結果、農試土で発病が若干多かった。
3. 両土壌で生育したテンサイの根面微生物相には大差はなかった。菌数は細菌>放線菌≒糸状菌であった。細菌では *Pseudomonas*>*Bacillus*>*Agrobacterium* の順であった。
4. 温室実験では、両土壌に生育したテンサイの生育初期から末期までの微生物相にはあまり差がなかった。しかし、fluorescent *Pseudomonas* の数は農試土の方

で多かった。

5. 農試土で育苗したテンサイの苗を両土壤に移植、1カ月毎に根面微生物を測定した結果は温室の結果とほぼ同じであったが、テンサイの収穫期以降には菌数が減少する傾向であった。

6. バクテリアゼーションに最もよく用いられている fluorescent *Pseudomonas* および *Bacillus* がテンサイの全生育期間を通じて、その根から分離できることが判明した。

謝辞： この研究を行なうに当り、終始御指導御鞭撻いただいた北海道大学名誉教授宇井格生博士に感謝の意を表す。また、北海道農業試験場てん菜部内藤繁男技官、築尾嘉章技官、日本甜菜製糖株式会社総合研究所神沢克一氏、内野浩克氏には、土壤ならびに資材の提供、テンサイ栽培、管理に関する詳細にわたる御助言など、種々お世話になった。深く感謝の意を表す。

引用文献

- BROWN, M. E.: Seed and root bacterization, *Ann. Rev. Phytopath.*, **12**: 181-197. 1974
- BURR, T. J., SCHROTH, M. N. and SUSLOW, T.: Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*, *Phytopathology*, **68**: 1377-1383. 1978
- COLYER, P. D. and MOUNT, M. S.: Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases, *Plant Dis.*, **68**: 703-706. 1984
- COOK, R. J. and ROVIRA, A. D.: The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils, *Soil Biol. Biochem.*, **8**: 269-273. 1976
- GEELS, F. P. and SCHIPPERS, B.: Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping by fluorescent *Pseudomonas* spp, *4th ICPP Abst. of Paper* No. 631. 1983
- HOWELL, C. R. and STIPANOVIC, R. D.: Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescences* and with an antibiotic produced by the bacterium, *Phytopathology*, **69**: 480-482. 1979
- HOWIE, W. J. and ECHANDI, E.: Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato, *Soil Biol. Biochem.*, **15**: 127-132. 1983
- HUBBARD, J. P., HARMAN, G. E. and HARDAR, Y.: Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds, *Phytopathology*, **73**: 655-659. 1983
- KADO, C. I. and HESKETT, M. G.: Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*, *Phytopathology*, **60**: 969-976. 1970
- KAVIMANDAN, S. K. and GAUR, A. C.: Effect of seed inoculation with *Pseudomonas* sp. on phosphate uptake and yield of maize, *Current Science*, **40**: 439-440. 1971
- KLOPPER, J. W., SCHROTH, M. N. and MILLER, T. D.: Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant develop and yield, *Phytopathology*, **70**: 1078-1082. 1980
- SANDS, D. C. and HANKIN, L.: Ecology and physiology of fluorescent pectolytic pseudomonads, *Phytopathology*, **65**: 921-924. 1975
- SCHADD, N. W.: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 72 pp, American Phytopathological Society. 1980
- SMILEY, R. W.: Wheat rhizosphere pseudomonads as antagonists of *Gaeumannomyces graminis*, *Soil Biol. Biochem.*, **11**: 371-376. 1979
- SUSLOW, T. V. and SCHROTH, M. N.: Rhizobacteria of sugar beet: Effect of seed application and root colonization on yield, *Phytopathology*, **72**: 199-206. 1982
- 鈴木達彦・石沢修一: 畑土壤の微生物およびその活性と肥よく度, 農業技術研究所報告, **B 15**: 91-186. 1965
- VRANY, J., VANCURA, V. and STANEK, M.: Control of microorganisms in the rhizosphere of wheat by inoculation of seed with *Pseudomonas putida* and by foliar application of urea, *Folia. Microbiol.*, **26**: 45-51. 1981
- WADI, J. A. and EASTON, G. D.: Control of *Verticillium dahliae* on potato by coating seed pieces with antagonistic bacteria, *4th ICPP Abst. of Paper* No. 688. 1983
- WELLER, D. M. and COOK, R. J.: Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads, *Phytopathology*, **73**: 463-469. 1983
- 横沢菱三・宇井格生: 土壤のちがいによる *Aphanomyces* 立枯病発生のちがいとそれに関与する土

壤条件について検討, てん菜研究報告補巻, 11: 160-164. 1970

Summary

In order to obtain the information for seed bacterization of sugar beets, the population of microflora on sugar beet roots grown in different soils was investigated. The results obtained were summarized as follows.

1. Germination percentage of sugar beet seeds in Hokkaido University field soil (A soil) was higher than that in Hokkaido Nat. Agric. Exp. Stn. field soil (B soil), while damping-off percentage in B soil was higher.

2. When the soils were artificially inoculated by zoospores of *Aphanomyces cochlioides*, the damping-off of sugar beet seedlings in B soil was severer slightly than that in A soil.

3. There was not noticeable difference between A and B soils in regard to the rhizoplane microflora of sugar beets grown in clay pots. Number of microorganisms was the most abundant in bacteria, followed by the Actinomycetes and fungi, and within the bacteria *Pseudomonas* was the most abundant, followed by *Bacillus* and then *Agrobac-*

terium.

4. As the result of greenhouse experiment that was conducted from the first week of seeding of sugar beet to the harvest time, the number of microorganisms on roots continued to increase to 3 weeks after sowing and kept constant level to harvest time. There were almost no differences of numbers and groups of microorganisms between both soils except fluorescent *Pseudomonas*, which was abundant in B soil.

5. The seedling which were raised in paper pots with B soil were transplanted to A and B soil fields, and were investigated about their rhizoplane microflora monthly. The results were almost the same with the former greenhouse experiment. However, in this case number of fluorescent *Pseudomonas* was not different between both soils. After the suitable harvesting time, number of microorganisms decreased.

6. The results indicate that fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* which have been used frequently for seed bacterization of various crops are able to be isolated from the sugar beet roots of the whole growing season.