



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Bacillus subtilis IK-1080 のマルハナバチへの付着方法とトマト灰色かび病の防除効果( 本文(Fulltext) )
Author(s)	田口, 義広; 百町, 満朗; 杖田, 浩二; 川根, 太
Citation	[日本植物病理學會報] vol.[69] no.[2] p.[94]-[101]
Issue Date	2003-05-25
Rights	The Phytopathological Society of Japan (日本植物病理学会)
Version	出版社版(publisher version)postprint
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/29668">http://hdl.handle.net/20.500.12099/29668</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

## *Bacillus subtilis* IK-1080 のマルハナバチへの付着方法とトマト灰色かび病の防除効果

田口 義広<sup>1\*</sup>・百町 満朗<sup>2</sup>・杖田 浩二<sup>3</sup>・川根 太<sup>4</sup>

### ABSTRACT

TAGUCHI, Y.<sup>1\*</sup>, HYAKUMACHI, M.<sup>2</sup>, TSUEDA, H.<sup>3</sup> and KAWANE, F.<sup>4</sup> (2003). Method for adhering *Bacillus subtilis* IK-1080 to bumblebees and control of gray mold disease of tomato. Jpn. J. Phytopathol. 69: 94-101.

When 1.0 ml of a suspension of *B. subtilis* IK-1080 at  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml was sprayed onto petals of a tomato plant at the same time as a hormone treatment to enhance fruiting, gray mold disease on petals was greatly suppressed. The number of the bacteria on the petals was  $1.9 \times 10^7$  cfu/g just after spraying and increased about 400 fold to  $7.8 \times 10^9$  cfu/g by 17 days after hormone treatment. More than 10 species of filamentous fungi, including species of *Botrytis*, were found on petals of tomato plants in the untreated plot, but only five were filamentous fungi and none were *Botrytis*, on petals of tomato plants that had been sprayed with a solution of IK-1080, indicating that this treatment resulted in a decrease in the number of species of fungi on the petals. Bumblebees, often used to pollinate tomato, were tested as a carrier for an inhibitor of gray mold, targeting tomato plant petals. We tested four types of insect vector adapter, three types that were constructed as part of the beehive and one type that could be attached to the entrance of a hive (detachable type). Many of the bees were reluctant to enter the former three types of adapter, and many pollen grains were dropped. In the case of the detachable adapter, both the number of bees leaving the hive per hour and the percentage of bees returning to the hive per hour were high (12 and 77.8%, respectively). Fruiting rates of the tomato plants visited by bees from the hive with the detachable adapter were also high (96-98%). When the detachable adapter was used,  $6.0 \times 10^4$  cfu of IK-1080 adhered to the body of each bee. The use of bumblebees as vectors to carry IK-1080 resulted in an increase in the number of the IK-1080 bacteria on the petals of tomato plants to  $10^6 \sim 10^7$  cfu/g at 20 days after the bees had visited the plants as well as a dramatic reduction in gray mold on petals.

(Received August 2, Accepted October 23, 2002)

**Key words:** adapter, antagonistic microorganism, *Bacillus subtilis* IK-1080, biological control, gray mold.

### 緒 言

灰色かび病はトマト栽培で最も重要な病害の1つであり、本病の防除には殺菌剤の散布やくん煙による方法が行われている<sup>10,13</sup>。近年、灰色かび病の微生物殺菌剤である *Bacillus subtilis* IK-1080 水和剤（ボトキラー水和剤<sup>®</sup>以下 IK-1080 という）が生物農薬として登録され、広く使用されるようになった<sup>7,14</sup>。

本研究では、着果促進のためホルモン剤処理を行う際に、IK-1080 を同時に花弁に散布したときの灰色かび病に対する発病抑制効果やその他の糸状菌の発生に与える影響を調べた。また、受粉に利用されている訪花昆虫マルハナ

バチをベクターとして IK-1080 を花弁に運ばせたときの花弁での IK-1080 の増殖や灰色かび病に対する発病抑制効果を調べた<sup>23</sup>。さらに、これまで拮抗微生物剤を訪花昆虫に付着させる媒介用のアダプターについての詳細な報告がないことから、マルハナバチの帰巢性やトマトの着果率に影響を与えないアダプターの作製を検討するとともに IK-1080 の花弁における増殖や花弁に発生する糸状菌の菌相の変化についても調べた。

### 実験材料および方法

**ホルモン剤処理と IK-1080 の同時処理による灰色かび病の抑制効果** 1999年に岐阜県内の雨よけ栽培トマト圃場

<sup>1</sup> 岐阜県農業技術研究所 (〒501-1152 岐阜市又丸729) Gifu Research Institute for Agricultural Sciences, 729 Matamaru, Gifu 501-1152, Japan

<sup>2</sup> 岐阜大学 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1) Faculty of Agriculture, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

<sup>3</sup> 岐阜県病害虫防除所 (〒501-1152 岐阜市又丸729) Gifu Plant Protection Center, 729 Matamaru, Gifu 501-1152, Japan

<sup>4</sup> 出光興産 (株) (〒107-0064 東京都港区北青山1-3-6) Idemitsu Kousan Co, LTD 1-3-6 Kita-aoyama, Minatoku, Tokyo, 107-0064, Japan

\* Corresponding author (E-mail: yos\_taguchi@ybb.ne.jp)

(品種桃太郎 8, 施設面積 10 a) を用いて試験を行った。トマトの着果促進ホルモンである 4-CPA (トマトーン®) の濃度を 150 ppm に調整した液 400 ml を作製し, この液に IK-1080 を  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml となるように懸濁させた。トマト株の第 1 段花房にハンドスプレーを用いて 1 花房当たり約 1.0 ml を噴霧処理した。また, 同時にホルモン処理のみの区と無処理区を設置した。処理 17 日後に各区から花卉をそれぞれ 100 個ずつ採取し, 乾燥花卉 1 g 当たりの IK-1080 の菌量を調べた。すなわち, 花卉を乳鉢内で殺菌水を入れて粉碎後, 全量を 100 ml として,  $70^\circ\text{C}$  で 10 分間加熱した。この液をペプトン・肉エキス寒天 (Nutrient Agar, 以下 NA という) 平板に加え, 希釈平板法により出現した IK-1080 のコロニーを数えた。試験は 3 反復行った。

また, IK-1080 とホルモンを同時に処理した花卉については, さらに 100 個採取し糸状菌の発生を調べた。すなわち, 花卉はいずれもトマト果実の先端あるいは萼と果実の間に付着していたものを採取し, 直径 15 cm のペトリ皿内の予め 8 ml の殺菌水で湿らせた濾紙上に置床し,  $25^\circ\text{C}$  の恒温室に 5 日間静置した。1 花卉毎に出現した糸状菌の孢子および分生子柄の形態を光学顕微鏡下で観察し, 属レベルの発生頻度を調べた。

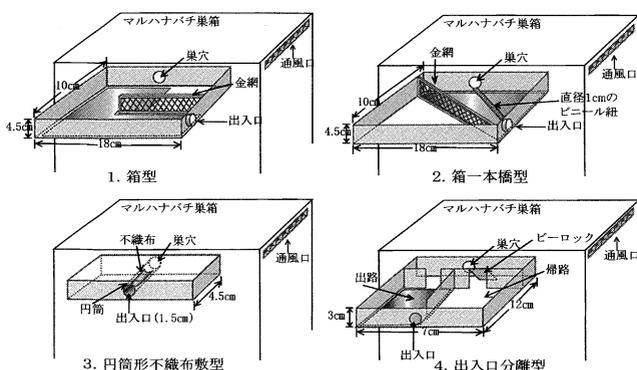
**IK-1080 をマルハナバチに運搬させるアダプターの作製**  
第 1 図に示すような 4 種類のアダプターを試作して, マルハナバチの巣箱の出入口に取り付けた。このアダプターの中に IK-1080 を入れてマルハナバチを放飼した。第 1 図-1 のアダプターは箱型で, 10 cm (縦)  $\times$  18 cm (横)  $\times$  4 cm (高さ) の箱の中央に 4 分の 3 まで仕切りを入れてコの字型にし, 箱内でマルハナバチが歩行する距離を 27 cm と長くした。この箱の中に IK-1080 を約 2 cm の厚さに敷き詰めた。第 1 図-2 は箱一本橋型で, 第 1 図-1 に

示したと同じ箱型のアダプターを改造して作製した。すなわち, 10 cm (縦)  $\times$  18 cm (横)  $\times$  4 cm (高さ) の木箱を金網で斜め半分にし切り, 巣箱の巣穴とアダプターの出入口との間に直径 10 mm, 長さ 12 cm のビニール紐を張り, マルハナバチがこの紐の上を歩けるようにした。箱の中には IK-1080 を約 2 cm の厚さに敷き詰め, ビニール紐にも IK-1080 を塗した。第 1 図-3 は円筒形不織布敷型で, マルハナバチの巣箱の出入口に長さ 4.5 cm, 直径 1.5 cm のプラスチック製の円筒を取り付け, 長さ 4.0 cm  $\times$  幅 1.5 cm に整形した不織布に IK-1080 を塗し, 両面テープで円筒内の下部に貼り付けた。この不織布の上をマルハナバチが歩行すると脚および腹部に IK-1080 が付着するようにした。また, この円筒を段ボールで覆って出入口だけが見えるようにし, アダプターと巣箱を一体化した。第 1 図-4 は出入口分離型で, 12 cm (長さ)  $\times$  7 cm (幅)  $\times$  3 cm (高さ) の箱の中で出路と帰路を分け, 巣箱から出るときには IK-1080 をマルハナバチに付着させるが, 帰巣するときは付着しないようにした。出路の途中には 3 cm (長さ)  $\times$  3 cm (幅)  $\times$  0.5 cm (高さ) の小さな箱を張り付けて 3 g の IK-1080 を入れる場所を設けた。この上にマルハナバチが歩行しやすいようにプラスチック製の 1 mm 目の網をのせた。帰路はプラスチック板でビーロックを取り付け, 出巣するときはここを通ることができないようにした。

このようなアダプターの中をマルハナバチが通過するときには脚部や腹部に, IK-1080 が付着するようにして, 以下に示す調査を行った。はじめにマルハナバチは花粉を集めて小さな球を作り (花粉球という), 帰巣して餌とするので, 花粉球がアダプター内に落ちていないかを調べた。実験は, 1998 年 9 月に定植した促成栽培ミニトマト (品種サンチェリーエクストラ, 面積 10 a) を供試し, 3 月下旬から行った。それぞれのアダプターを巣箱に取り付けた後, 数日間順化させてから IK-1080 を入れ, 8 日間マルハナバチを訪花させた。この間にアダプター内に落ちていた花粉球の数と重量を 2 日間ずつ 3 回調べた。

次に, マルハナバチが 1 時間の内に巣出した個体数と帰巣した個体数の比率 (帰巣率), 帰巣時にアダプターの中に入ろうとせず他の開口部から巣箱に入ろうとしたが最終的に巣箱に入った個体数 (異常行動個体), および帰巣したが巣箱に入らなかった個体数の比率を, 午前 10 時から午後 1 時までの 3 時間に 3 回調べた。

これらの試験結果から, 訪花活動に影響がないと判断した出入口分離型 (第 1 図-4) のアダプターを用いて, マルハナバチに IK-1080 を運搬させ花卉における IK-1080 の



第 1 図 各アダプターの概略図

■印の場所は *Bacillus subtilis* IK-1080 を設置した部位を示す。

菌量とトマトの着果率を調べた。すなわち、出入口分離型のアダプターを巣箱に取り付け、マルハナバチの訪花開始4日後にIK-1080を出路に入れて花卉へ運搬させた。運搬開始11日後に巣箱から半径2m以内の場所（以下N区という）、2mから15mまでの場所（以下M区という）および巣箱から半径15m以上の場所（以下F区という）から、バイトマーク（マルハナバチが訪花した際に薬につく傷痕）の付いた花卉を各区の3カ所からそれぞれ100花卉ずつ採集した。これらの花卉を乳鉢に殺菌水とともに入れて粉碎し、上述の希釈平板法により花卉1g当たりのIK-1080の菌量を調べた。また、マルハナバチによるIK-1080の運搬開始日に開花していない各区の20花房に白いテープで目印を付け、14日後に着果率を調べた。

**マルハナバチに付着したIK-1080の菌量** 出入口分離型のアダプターの出路にIK-1080を3g入れて、マルハナバチを放飼した。巣箱からアダプターを通過して出てきたマルハナバチを捕獲し、6脚すべてをNA平板に押し付けて接触させた後、25°Cに4日間保ちIK-1080が分離されるか否かを調べた。調査はマルハナバチ8頭を用いて行った。次に、同様にしてアダプターを通過させたマルハナバチ10頭を、100mlの殺菌水を入れた三角フラスコに入れた後、70°Cで10分間処理した。この液の中のIK-1080の菌量をNA平板を用いて希釈平板法により調べ、マルハナバチ1頭当たりの身体に付着した菌量に換算した。実験は3回反復した。

**花卉に運搬されたIK-1080の増殖** 1999年10月に定植した促成栽培トマト（品種ハウス桃太郎、施設面積10a）を供試した。2000年4月にマルハナバチの巣箱にIK-1080を3g入れた出入口分離型のアダプターを取り付けて訪花させた。訪花を確認した花房に白いテープで目印を付け7日、14日および21日後の花卉を採取しIK-1080の菌量を調べた。菌量の調査には25花を供試し、NA平板を用いて上述の希釈平板法で行い、3回反復した。

次に、訪花21日後の花卉に1花当たり0.3mlの殺菌水を午後5時にハンドスプレーで噴霧し、2日後に花卉を採取してIK-1080の菌量を調べ、散水しなかった花卉との菌量の差を比較した。供試花数は、それぞれ25花卉とし、3回反復した。

**IK-1080による花卉の灰色かび病の防除効果** 1999年に岐阜県内の雨よけトマト栽培ハウス15棟（約30a）を用いて試験を行った。なお、栽培圃場は間口6m、長さ30mの単棟ハウスが集合したところを用いた。トマトの品種は桃太郎8を用い、5月下旬に4条、条間1.8m、株間55cmで定植した。マルハナバチを放飼したA区とB区

は、おのおのハウス5棟（約10a）を用い、マルハナバチが外に出ないように目合い4mmの防虫ネットでハウスの妻面と外側のハウスの側面を覆った。また、ハウスとハウスの間は肩のところをネットで繋いで5棟のハウスが1つになるようにした。A区では、出入口分離型のアダプターを着けたマルハナバチの巣箱をハウス内に置き管理した。B区ではIK-1080を使用せずマルハナバチのみを放飼し、C区（ネットで囲わなかった5棟、10a）はマルハナバチを放飼しなかった。マルハナバチの放飼期間はA、B区とも6月12日から8月30日までとし、A区はIK-1080をアダプターに入れトマト花卉に運搬させた。なお、IK-1080は3gをアダプター内の出路部に入れ、7日間隔で取り替えた。

7月15日にA区からマルハナバチ放飼後に開花しバイトマークが着いた5段目の花卉を、8月23日には8段目の花卉をそれぞれ100個ずつ採取し、花卉におけるIK-1080の菌量を調べた。また、B区およびC区からも同様に5および8段目の100花卉を採取しIK-1080の菌量を調べた。調査は上述の希釈平板法により3回反復した。

さらに、8月23日にA区とC区で、トマト果実の先端に付着していた花卉をそれぞれ100個採取した。これらの花卉を上述と同じ方法で直径15cmのペトリ皿内の濾紙上に置床して25°Cの恒温室に5日間静置し、出現した糸状菌の孢子および分生子柄の形態から属レベルの発生頻度を調べた。

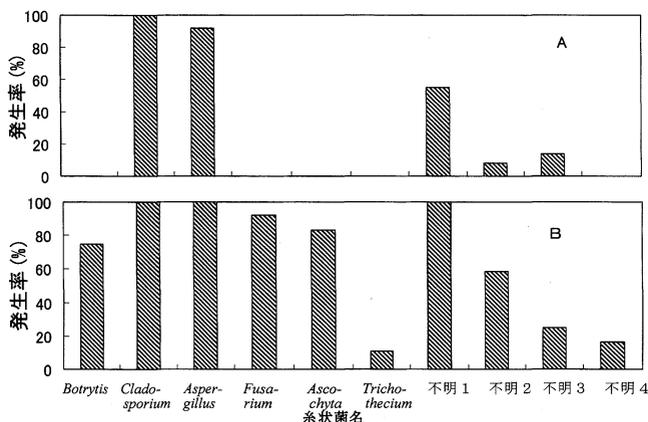
次に、7月10日、17日および24日（実験1）と9月1日、7日および14日（実験2）に、A区とC区でトマト果実の先端または萼と果実の間に付着して褐変した花卉200個、および果実200個を観察し、灰色かび病の発生率を調べた。

## 実験結果

### ホルモン剤処理とIK-1080の同時処理による灰色かび病の抑制効果

無処理区およびホルモンのみを処理した区の花弁からはIK-1080は分離されなかった。一方、IK-1080をホルモン同時処理した区では、花卉1g当たり $7.8 \times 10^9$  ( $\pm 10.4$ ) cfuが分離された。なお、ホルモン同時処理区から分離された細菌のコロニーは色が白く、中央が膨れ、外周がめくれ上がる典型的なIK-1080の形態（川根ら、未発表）を示した。

無処理区の花弁に発生した糸状菌は*Cladosporium*属菌、*Aspergillus*属菌、および不明菌1がともに100%と多く、*Fusarium*属菌、*Ascochyta*属菌および*Botrytis*属菌が



第2図 *B. subtilis* IK-1080 のホルモン剤同時処理によるトマト花弁上の各種糸状菌の発生率  
 試験は雨よけトマト栽培ハウスを用いて行った。4-CPAの150 ppmの溶液にIK-1080を菌濃度 $1.0 \times 10^8$  cfu/mlになるように懸濁し、花房散布18日後の花弁を採取し25°Cの湿室に5日間静置して調べた。A：ホルモン同時処理区の各種糸状菌の発生率、B：無処理区の発生率を示す。

75~90%であった。このように1つの花弁に10種類の糸状菌が発生していた。一方、IK-1080をホルモンと同時に処理した花弁は *Cladosporium* 属菌と *Aspergillus* 属菌の発生が著しく多かったものの、無処理区に比べ出現する菌種は5種類と半減し、灰色かび病菌は検出されなかった(第2図)。

IK-1080をマルハナバチに運搬させるアダプターの作製  
 マルハナバチを放飼した後に、アダプター内に落ちていた花粉球の1日当たり平均数量と重量は、出入口分離型がそれぞれ0.8個と0.03gで最も少なく、円筒形不織布敷型はその3倍、箱一本橋型は4倍以上であった(第1表)。また、箱型アダプターはマルハナバチの身体全体にIK-1080を多量に付着して出巢するが、まったく帰巢しなくなるた

第1表 4種類のアダプターの中に落下した花粉球の数量と重量

アダプターの形状	落下した花粉球 <sup>a)</sup>	
	数量(個)	重量(g) <sup>b)</sup>
箱型	—	—
箱一本橋型	3.7	0.13 a
円筒形不織布敷型	3.1	0.11 a
出入口分離型	0.8	0.03 b

a) 花粉球とはマルハナバチが花から集めて帰巣するときに持帰る花粉の固まり。  
 b) a, bの異なった文字間には  $p < 0.01$  で有意差がある。

め調査不能であった。このようにアダプターの形によってはマルハナバチの活動に著しい影響を与えた。

次に、午前10時~午後1時の間に1時間毎に出巢および帰巢したマルハナバチの個体数を調べた(第2表)。出巢個体数は、出入口分離型と円筒形不織布敷型では、アダプターを着けない巣箱と差がなかったが、箱一本橋型は4.7頭と少なく影響が認められた。1時間当たりの出巢個体数に対する帰巢個体数の比率は、出入口分離型が最も高く、次いでアダプターなし、箱一本橋型、円筒形不織布敷型の順であった。また、帰巢したときにアダプターを通らず、巣箱の上部にある開口部から侵入しようとする異常行動個体は、出入口分離型では認められなかったが、円筒形不織布敷型と箱一本橋型ではおのおの18.1および33.3%認められた。さらに、箱一本橋型では巣箱に入らない個体も認められた。これらのことから、マルハナバチにIK-1080を運搬させるためのアダプターとして、出入口分離型が適することが明らかとなった。

出入口分離型のアダプターを用いてマルハナバチにIK-1080を運搬させ、訪花開始11日後の花弁を採取し、花弁1g当たりのIK-1080の菌量を調べた(第3表)。巣箱

第2表 アダプターの形状の違いによるマルハナバチ<sup>a)</sup>の出巢及び帰巢数

アダプターの形状	出巢個体数(頭/時間)	帰巢率 <sup>b)</sup> (%)	異常行動個体率 <sup>c)</sup> (%)	入巢しなかった個体率 <sup>d)</sup> (%)
箱型	4.3	0.0	0.0	100.0
箱一本橋型	4.7	63.8	18.1	18.1
円筒形不織布敷型	9.0	66.7	33.3	0.0
出入口分離型	12.0	77.8	0.0	0.0
アダプターなし	8.3	75.0	0.0	0.0

a) マルハナバチはツチマルハナバチ(ナチュポール<sup>®</sup>)を用いた。  
 b) 午前10時~午後1時の間の1時間当たりに出巢した個体数に対する帰巢し巣箱に入った個体の比率。  
 c) 帰巢した個体の中で、直接アダプターに入らず、他の開口部から巣箱に入ろうとした個体で最終的には巣箱に入った比率。  
 d) 帰巢したが巣箱に入らなかった個体比率。

第3表 巣箱からの距離とマルハナバチが訪花したミニトマト花弁の *B. subtilis* IK-1080 の菌量および着果率<sup>a)</sup>

巣箱からの距離区分 <sup>b)</sup>	花弁の菌量 <sup>c)</sup> (cfu/花弁 1g)	着果率 (%)
N区	$1.3 \times 10^6$	97.8 a <sup>d)</sup>
M区	$1.4 \times 10^6$	95.7 a
F区	$1.4 \times 10^6$	96.6 a

a) 花弁は訪花11日後のものを採取した。調査果数は順に355, 340, 347個体。

b) N区は巣箱から0~2mの範囲, M区は2~15m, F区は15m以上の範囲を示す。

c) 採取した花弁を粉碎しNA平板を用いて希釈平板によって調べた。

d) aは有意差がない。

からの距離が異なるN区, M区およびF区ともに同程度の菌量で, 巣箱からの距離による差はなかった。このことから巣箱から出るときにマルハナバチの身体に付着したIK-1080は巣箱からの距離と関係なく, 栽培施設内のトマト花弁にはほぼ均一に運搬されていることが確認された。

また, 巣箱に出入口分離型のアダプターを取り付けてマルハナバチにIK-1080を運搬させ, 訪花開始15日後にトマトの着果率を調べた。N区, M区およびF区ともに95%以上の高い着果率が認められた。このように出入口分離型のアダプターを用いてマルハナバチを訪花させても, 高いトマトの着果率が維持された(第3表)。

#### マルハナバチに付着したIK-1080の菌量

アダプターの出路を通過したすべてのマルハナバチの脚部からIK-1080が分離された。また, アダプターを出るときにマルハナバチの身体に付着したIK-1080の菌量は, 1頭当たり $6.0 \times 10^4$  cfuであった。

#### 運搬されたIK-1080の花弁における増殖

マルハナバチの訪花7日後に採取した花弁から分離されたIK-1080は $1.3 \times 10^3$  cfu/gと僅かだったが, 14日後の花弁では $1.5 \times 10^5$  cfu/g, 21日後には $4.6 \times 10^6$  cfu/gと増加していた。また, 21日後に花弁に散水処理すると, 散水2日後の無散水区では $2.1 \times 10^6$  cfu/gだったのに対し, 散水区では $7.6 \times 10^7$  cfu/gとなった。このようにマルハナ

バチ訪花後, 日数が経過するに従い花弁のIK-1080の菌量は増加し, 花弁の水分によっても菌量が影響されることが判明した。

#### IK-1080による花弁の灰色かび病の防除効果

マルハナバチにIK-1080を運搬させたA区において, 7月15日に採取した花弁のIK-1080の菌量は $6.0 \times 10^3$  cfu/gと少なかったが, 8月23日に採取した花弁では $4.8 \times 10^6$  cfu/gと多かった。一方, IK-1080を処理しなかったB区とC区の花弁からは, いずれもIK-1080はまったく分離されなかった。

採取した花弁を湿室に静置しておく, 無処理区C区の花弁には*Botrytis*属菌の発生が認められたが(第4表), IK-1080を運搬させたA区の花弁には発生しなかった。また, 両区とも*Cladosporium*属菌, *Alternaria*属菌, *Fusarium*属菌および不明3の糸状菌が多く認められた。

次に, 実験1の7月の灰色かび病の発生は, A区では花弁および果実での発生は認められなかったが, 無処理のC区では花弁のみ僅かに発生が認められた(第5表)。また, 実験2の9月はA区で花弁および果実に灰色かび病の発生が認められたものの発生率は低かった。しかし, C区の花弁の灰色かび病の発生率は著しく, 果実でも2~8%の発生が見られた。

このようにマルハナバチを用いてIK-1080を花弁に運搬させると花弁で増加し, 花弁に発生する糸状菌の菌種が少なくなると同時に, 灰色かび病の発生も抑制され, これによって果実での発生も少なくなることが明らかとなった。

#### 考 察

トマトの灰色かび病は, 花弁, 葉, 果実, 萼, 茎および摘葉後の葉柄の傷痕等に発生する<sup>6)</sup>。また, 灰色かび病菌の胞子が原因となって発生するゴーストスポット果は, 商品価値を著しく失わせるため栽培上大きな問題になっている<sup>8)</sup>。これらの中で花弁は灰色かび病の発生が最も早く, 開花後徐々に褐変し, 湿度が93%以上になると発生するようになる<sup>24)</sup>。このため花弁の灰色かび病の発生を抑制する

第4表 マルハナバチで *B. subtilis* IK-1080 を花弁に運搬させた後に発生した糸状菌の比率<sup>a)</sup>

区 分 <sup>b)</sup>	花弁の糸状菌の発生比率 (%)									
	<i>Botrytis</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Ascochyta</i>	<i>Trichothecium</i>	不明1	不明2	不明3	不明4
A区	0	100	100	0	0	0	0	3	50	4
C区	17	100	100	65	42	10	17	25	50	40

a) 調査した花弁数は各区100個で, 湿室にしたペトリ皿に5日間静置した後調べた。

b) A区はマルハナバチでIK-1080を花弁に運搬させた。C区はマルハナバチを使用しなかった。

第5表 *B. subtilis* IK-1080 をマルハナバチで運搬したトマト花弁と果実における灰色かび病の発生率

実験	処理区分 <sup>a)</sup>	調査月日	灰色かび病の発生率 (%) <sup>b)</sup>	
			花 弁	果 実
実験 1	無処理区 (C 区)	7月10日	1.0 a	0.0
		17日	1.0 a	0.0
		24日	4.0 b	0.0
	IK-1080 処理 (A 区)	7月10日	0.0 a	0.0
		17日	0.0 a	0.0
		24日	0.0 a	0.0
実験 2	無処理区 (C 区)	9月1日	35.0	2.0
		7日	58.0	3.5
		14日	60.0	8.0
	IK-1080 処理 (A 区)	9月1日	4.0	1.0
		7日	4.0	1.5
		14日	8.0	1.0

a) IK-1080 処理区では、1999年、雨よけ栽培トマトで、6月16日～8月30日までマルハナバチに IK-1080 を運搬させた。無処理区は IK-1080 を運搬させなかった。

b) 各々の区から褐変した花弁と果実をそれぞれ200個採取し灰色かび病の発生率を調べた。

ことは、菌密度を低下させ、圃場全体の発生を遅延させる効果があると考えられている<sup>4,6,15,26</sup>。

本試験において、無処理区のトマトの花弁には10種類の糸状菌の発生が認められた。一方、IK-1080 をホルモン同時処理したトマトの花弁上では、IK-1080 の菌濃度が  $10^9$  cfu/g 以上に増加し、*Alternaria* 属菌、*Cladosporium* 属菌を主とし、少数の糸状菌のみが認められた。また、灰色かび病菌をはじめとして多くの種類の糸状菌の発生が抑制された。これらのことは *B. subtilis* が多くの糸状菌に対し抗生的に働いているとの報告と一致する<sup>1,2,7,17,19</sup>。また、自然環境下においては普遍的に存在する細菌として知られ、灰色かび病菌ばかりでなく、他の多くの糸状菌に対して影響を与えていることを示唆する。

マルハナバチに IK-1080 を運搬させて花弁に付着させると、ホルモン同時処理と同様に灰色かび病の発生が抑制された。マルハナバチによって運搬された IK-1080 の花弁の菌量は、ホルモン同時処理と比べ少なかったが、日数の経過とともに徐々に増加して訪花21日後には  $10^6 \sim 10^7$  cfu/g に達していた。このことは花弁では IK-1080 が容易に増加することを示唆している。マルハナバチは花粉が形成されている間は同じ花に複数回訪花するので<sup>3,12</sup>、IK-1080 は確実に花に運搬されていると考えられた。開花した後に花弁が褐変するまでの期間は10～15日間である。本試験の結果は、この間に IK-1080 が抗生作用により、花弁上に定着して灰色かび病菌を完全に抑え込むことができる菌量に達

したと考えられた。

マルハナバチを使用すると化学農薬の使用が著しく制限される<sup>10</sup> が、マルハナバチを使用する利点として省力化<sup>20</sup> や果実の品質向上<sup>3,11</sup> の他に、次の点を挙げることができる。すなわち、マルハナバチ処理はホルモン処理のように花弁を濡らさないため、空気が乾燥していれば果実の肥大が始まる前に花弁が収縮し、落弁を促進することができ、灰色かび病菌の感染する期間を短縮できる点にある。しかし、マルハナバチにより花弁の葯に付けられた傷痕には灰色かび病が発生しやすく、また、マルハナバチを使用することで開花したばかりの花弁にも灰色かび病菌の胞子が確認されるなど<sup>22</sup>、マルハナバチが灰色かび病菌胞子を伝搬することが知られている<sup>15</sup>。マルハナバチに予め IK-1080 を付着させることで灰色かび病菌をマルハナバチに媒介させるにくくさせることも、このようなマルハナバチの利用にかかわる問題を解決するものと考えられる。

石川ら<sup>4</sup>) はミツバチを薬剤キャリアとして用いることで、イチゴの花弁に殺菌剤を運ばせ果実の灰色かび病に対して高い防除効果を得ている。また、マルハナバチやミツバチを用いてラズベリーフルーツやイチゴの花弁に拮抗微生物を運ばせ灰色かび病や、*Erwinia amylovora* を防除したという報告もある<sup>16,25,27</sup>。これらの訪花昆虫を利用した防除では、効果を高めるためできるだけ多量に拮抗微生物を訪花昆虫に運搬させる必要があったが<sup>22,25</sup>、余り多量の拮抗微生物を運搬させると訪花昆虫の帰巢率が悪くなり、マルハナバチの訪花機能に影響を与える。一方、本試験で供試した IK-1080 は花弁への付着量が僅かであっても、花弁上で徐々に増殖するため、マルハナバチに運ばせる菌量が少なくてもよく、そのためマルハナバチの訪花昆虫としての機能に悪影響を及ぼすことはない。

次に、マルハナバチを IK-1080 のベクターとして利用するには、果実の着果率および帰巢性を考慮する必要がある。本試験では IK-1080 を付着させる4種類のアダプターを試作したが、中にはまったく帰巢しなくなったり、餌としての花粉球が落下したり、あるいは巣箱内へ戻ることを拒むなどし、マルハナバチの営巣に影響を及ぼすものがあった。しかし、出入口分離型のアダプターを用いると、2～3日間マルハナバチを慣れさせた後に IK-1080 を運搬させれば、マルハナバチの帰巢率がほとんど低下しないことが判明した。

マルハナバチを用いて受粉させた場合、大玉トマト栽培での着果率は93%<sup>3</sup>) であり、ミニトマト栽培では98～100%<sup>9,12</sup>) であると報告されている。本試験結果からも、出入口分離型のアダプターを供試してマルハナバチに IK-1080

を運搬させた場合、96~98%の着果率が認められた。また、マルハナバチは巣箱から数百メートルの範囲を活動域にする<sup>12)</sup>ことが明らかにされているが、トマト栽培施設内に置いた巣箱から2mのトマト株と15m以上離れたトマト株で着果率や花卉におけるIK-1080の菌量に差がなかった。このように本試験で供試した出入口分離型のアダプターは、マルハナバチの訪花活動を阻害するような影響は殆どなく、実用性が高いと考えられた。

1999年と2000年の両年にわたり、無処理区のトマトの褐変した花卉には、灰色かび病の発生が多く、果実の果頂部にも発生が認められた。一方、IK-1080が分離された花卉では灰色かび病の発生は殆ど認められず、また、果実の果頂部における発生も極めて少なかった。入江ら<sup>5)</sup>はトマトの花卉を除去すると、果実の灰色かび病が著しく抑制できると報告したが、花卉にIK-1080が付着し、増加していれば花卉を除去しなくとも果実の灰色かび病の発生が著しく抑制されることが明らかになった。IK-1080を花卉に付着させることで、これまで灰色かび病の多発生圃場でしばしば行われてきた花取り作業を省略できる可能性も考えられる。

トマトばかりでなくイチゴ、キュウリおよびシクラメンなどの施設で栽培されている植物では、花卉の灰色かび病の発生が大きな問題となっているが<sup>4,16,18,24,26)</sup>、花卉に発生する灰色かび病の発生をピンポイント的に抑制する本法の技術は、これらの植物に対しても効果的に利用できるものと思われる。今後は、環境への負荷を軽減した農業を確立する上でも、他の果菜類に発生する各種の地上病害に対して、訪花昆虫と拮抗微生物を組み合わせた本法のような防除技術の確立が重要な課題となろう。

### 摘 要

IK-1080の菌濃度を $1.0 \times 10^8$  cfu/mlとした懸濁液1.0 mlを、トマト果実の着果促進を目的としたホルモン処理と同時に花卉に散布すると、花卉における灰色かび病の発生は著しく抑制された。散布直後の花卉におけるIK-1080の菌量は $1.9 \times 10^7$  cfu/gだったが、処理後の花卉の菌量は $7.9 \times 10^9$  cfu/gとなり約400倍増加していた。無処理区の花弁上には*Botrytis*属菌を含む10種類以上の糸状菌が認められたが、IK-1080を散布した花卉では5種類に減少し、*Botrytis*属菌は出現しなかった。このように菌相の単純化が認められた。トマト栽培では受粉に訪花昆虫のマルハナバチがよく用いられている。そこで、マルハナバチに、灰色かび病菌に拮抗的なIK-1080を運ばせることで花卉の灰色かび病が防除できるかを検討した。はじめに媒介

用のアダプターを4種類試作した。箱型のアダプターは出巢したマルハナバチが帰巢しなくなった。箱内に1本の紐を渡した型と円筒の中にパフを敷いた型のアダプターは、帰巢しても巣に入りたがらない行動が認められ、花粉球の落下も多かった。一方、出入口分離型はマルハナバチの出巢個体数が1時間当たり12頭と多く、時間当たりの帰巢率も77.8%と高かった。また、マルハナバチの運んできた花粉球の落下が最も少なく、果実の着果率も96~98%と高かった。この出入口分離型のアダプターを用いるとマルハナバチの身体に1頭当たり $6.0 \times 10^4$  cfuのIK-1080が付着していた。マルハナバチにIK-1080を運搬させると、訪花2日後の花弁の菌量は $10^6 \sim 10^7$  cfu/gと増加した。また、灰色かび病の発生は著しく抑制された。マルハナバチにIK-1080を運搬した花卉でも、ホルモンと同時処理の時と同じように*Botrytis*属菌の出現は認められなかった。本法は著しく省力的で、アダプターに入れるIK-1080の量は1回当たり(7日間分)3gと少なかった。

### 謝 辞

本研究を進めるに当たり、現地調査に協力をいただいた岐阜県農業技術研究所 勝山直樹専門研究員、マルハナバチの提供と使用方法についてご指示いただいたアリスト・ライフサイエンス(株)加藤修平氏、および東海物産(株)近藤正弘氏に深甚なる感謝の意を表する。

### 引用文献

1. Aldrich, J. and Baker, R. (1970). Biological control of *Fusarium roseum* f. sp. dianthi by *Bacillus subtilis*. Plant Dis. 54: 446-448.
2. Dunleavy, J. (1955). Control of damping off sugar beet by *Bacillus subtilis*. Phytopathology 45: 252-258.
3. 池田二三高・忠内雄次 (1992). わが国へのツチマルハナバチの導入経緯と果菜類のポリネーターとしての実用性. 農業および園芸 67: 1213-1216.
4. 石川成寿・鈴木 聡・中山喜一 (1992). ミツバチを薬剤キャリアとしたイチゴ灰色かび病防除の試み. 植物防疫 46: 253-255.
5. 入江和己・坂本 庵 (1994). 花卉の除去によるトマト灰色かび病の防除. 関西病虫研報 36: 87-88.
6. 加藤喜重郎 (1982). 野菜の病害虫 (岸 国平編). pp. 127-128, 全農協, 東京.
7. 川根 太 (2000). 微生物農薬 (山田昌雄編). pp. 136-146, 全農協, 東京.
8. 岸 国平 (1970). トマト灰色かび病の一病斑型としてのghost spotに関する観察. 日植病報 36: 334 (講要).
9. 小出哲也 (1992). トマト・ミニトマトの省力マルハナバチの農家の取り扱い要点. 施設園芸 10: 42-45.
10. 松浦 誠 (1990). 農薬の有用昆虫に対する影響. 植物防疫 44: 498-500.

11. 松浦 誠 (1992). 花粉媒介昆虫としてのハナバチの生態と利用. 農薬 39: 6-8.
12. 松浦 誠 (1993). マルハナバチによるトマトの花粉媒介. 植物防疫 47: 17-20.
13. 村井敏信 (1998). 農薬散布技術 (農薬散布技術編集委員会編). pp. 25-35, 日本植物防疫協会, 東京.
14. 日本植物防疫協会 (2001). 農薬要覧農薬種類別出荷量. p. 387, 日本植物防疫協会, 東京.
15. 岡田清嗣・瓦谷光男・草刈真一・中曽根渡 (2001). 灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) に汚染されたマルハナバチ (*Bombus terrestris* L.) とその発病助長. 日植病報 67: 197 (講要).
16. Peng, G., Sutton, J.C. and Kevan, P.G. (1991). Effectiveness of honeybees for applying the biological agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. Can. J. Plant Pathol. 14: 117-129.
17. Phae, C.G., Shoda, M., Kita, M., Nakano, M. and Ushiyama, K. (1992). Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58: 329-339.
18. Powelson, R.L. (1960). Initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea*. Phytopathology 50: 491-494.
19. 正田 誠 (1998). 枯草菌による生物防除のメカニズム. 植物防疫 49: 178-183.
20. 菅原真治 (1992). 施設栽培トマトの省力技術としてのマルハナバチによる受粉. 施設園芸 6: 54-57.
21. 大司さえき・獄崎 研・野島秀伸・和泉勝一・川根太・平岡行夫 (1999). マルハナバチを利用した拮抗微生物によるトマト灰色かび病の生物的防除. 日植病報 65: 354 (講要).
22. 大司さえき・獄崎 研・野島秀伸・和泉勝一・平岡行夫 (2000). *Bacillus subtilis* の媒介法と散布法におけるトマト花房での菌量と灰色かび病発病の関係. 日植病報 66: 178 (講要).
23. 田口義広・杖田浩二・勝山直樹・山本芳徳 (2000). 夏秋トマトにおけるマルハナバチを利用した拮抗菌処理による灰色かび病防除. 関西病虫研報 42: 67-68.
24. 手塚信夫・石井正義・渡辺康正 (1983). 施設栽培におけるトマト灰色かび病の発生に及ぼす空気湿度の影響. 野菜試報 A.11: 105-111.
25. Thomson, S.V., Hansen, D.R., Flint, K.M. and Vandenberg, J.D. (1992). Dissemination of bacteria antagonistic to *Erwinia amylovora* by honeybees. Plant Dis. 76: 1052-1056.
26. 山川哲弘 (1966). イチゴ灰色かび病の発病生態について. 日植病報 32: 299 (講要).
27. Yu, H. and Sutton, J.C. (1997). Effectiveness of bumblebees and honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. Biol. Control 10: 113-122.