

植物病原細菌に対するバリダマイシン A の活性

武田薬品工業株式会社農業科学研究所 石川 亮

はじめに

バリダマイシン A (VM-A, バリダシンの有効成分) は *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* の生産する疑似オリゴ糖で、アミノ配糖体に属する抗生物質である。VM-A は *Rhizoctonia solani* によるイネ紋枯病に卓効を示し、*R. solani* とその近縁の菌による病害の防除薬剤として開発された。VM-A は *R. solani* に対して、PSA や PDA 培地など、栄養が豊富な培地上では抗菌活性を示さないが、トレハロースを唯一の糖源としたときに抗菌活性を示す (SHIGEMOTO, et al., 1992)。

最近、VM-A が数種植物病原細菌に対してトレハロースを唯一の糖源としたときに抗菌活性を示すことが判明した。さらにこれらの中の一部の細菌による病害に対して、VM-A が防除効果を示すことが判明したので、ここで述べたい。

I 抗菌活性

Pseudomonas solanacearum を用いて糖源を変えて VM-A の抗菌活性を調べた。培地は *R. solani* のときと同様に、完全合成寒天培地であるツアベック寒天培地を用い、これに数種の糖源をそれぞれ加え、VM-A 添加による菌の増殖の影響を調べた。しかし、グルコース、ガラクトース、マンノース、サッカロース、マンニトール、イノシトール、グリセロール、ピルビン酸を唯一の糖源としたときには、VM-A は菌の増殖に影響を与えなかったが、トレハロースのときのみ、VM-A は菌の増殖を抑制した。

そこで数種植物病原細菌についてトレハロースを唯一の糖源 (一部菌株については、生育因子としてメチオニン、ニコチンなどを混入) としたときの VM-A の抗菌活性を調べた。試験は培地上に菌を塗り付け、30°C で 4~7 日間培養し、生育状況を調べた。その結果、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *P. glumae*, *P. solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *oryzae*, *X. campestris* pv. *pruni* において、VM-A による増殖の抑

制が認められた。しかし、グルコースを糖源としたときには、VM-A はこれらの菌株に対して全く抗菌活性を示さなかった。

P. solanacearum について、トレハロース液体培地での VM-A の増殖抑制効果を経時的に観察した。試験は糖源を加えていない培地、トレハロースを 0.5% 加えた培地、トレハロース 0.5% に VM-A を 50 $\mu\text{g/ml}$ 加えた培地にそれぞれ病原菌を接種し、30°C で静置培養した。菌数は、病原菌接種直後、1, 3, 5, 8 日後に希釈平板法により、病原菌数を計測した。その結果、*P. solanacearum* は糖源がなくても培養 3 日後まで約 10^6 cfu/ml まで増殖を続けた後、増殖スピードが遅くなり、その後の増殖はほとんど認められなかった (図-1)。糖源としてトレハロースを加えた培地では、試験最終の培養 8 日後まで菌は対数的に増殖し続けた。これに対して、トレハロースに VM-A を加えた培地では、培養 3 日後までは糖源なしの培地やトレハロースを加えた培地とほぼ同様に、菌は対数的に増殖を行ったものの、その後は増殖スピードが遅くなり、糖源がない培地での増殖スピードとほぼ同じ程度の緩やかな増殖曲線を示した。以上のように、トレハロースを唯一の糖源としたときの

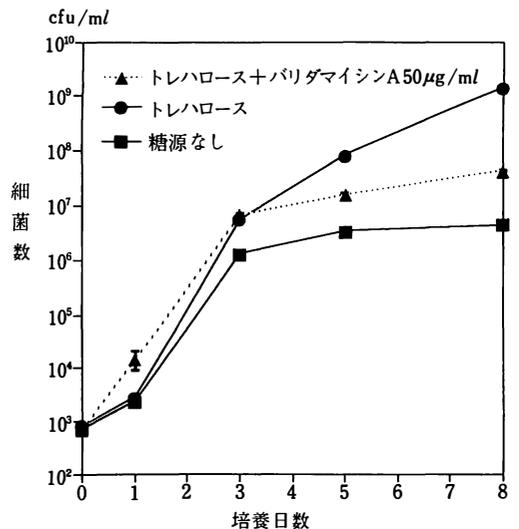


図-1 液体培地中でのバリダマイシン A の *Pseudomonas solanacearum* に対する増殖抑制効果

図中の棒線は標準誤差を表す。

in vitro での *P. solanacearum* に対する VM-A の抗菌活性は、増殖抑制効果であることが判明した。

次に、抗菌活性の認められた菌株の一部について、*in vivo* で防除試験を行った。

II ナス科植物青枯病

トマト、ナス、ジャガイモなどのナス科植物青枯病は、*P. solanacearum* による土壌伝染性の難防除病害である。これら病害の防除薬剤としては、土壌滅菌を目的とした、クロルピクリンや臭化メチルなどの土壌くん蒸剤が用いられている。しかし、これらの薬剤は処理後の十分なガス抜きが必要であり、また植物栽培中の使用は不可能である。現在のところ、植物の栽培中に青枯病が発生した場合には、その発病植物を廃棄し、周辺植物への病気の拡大を抑えるのが唯一の防除法である。

1 トマト青枯病ポット試験

トマト（品種：大型福寿）を用いた温室内のポット試験を行った。試験は 1/5,000 a のワグネルポットにトマトを栽培し、炭酸カルシウムと水で調整した VM-A の 5%ペースト剤をトマト茎にミニドリルで穴をあけ、約 0.2 ml 充填した。処理部位は、病原菌の増殖が著しい地際部、およびそこからやや離れた部位である第一花房直下（地際部から約 30 cm の高さの部位）に処理した。その 7 日後に *P. solanacearum* 懸濁液（約 10^8 cfu/ml）をポット当たり 500 ml 灌注接種し、温室内で栽培し、発病株率を調査した。その結果、接種 20 日後に無処理が 91.7% の発病株率のときに VM-A 処理は地際部処理で 33.3%、第一花房直下処理で 25% の発病株率であっ

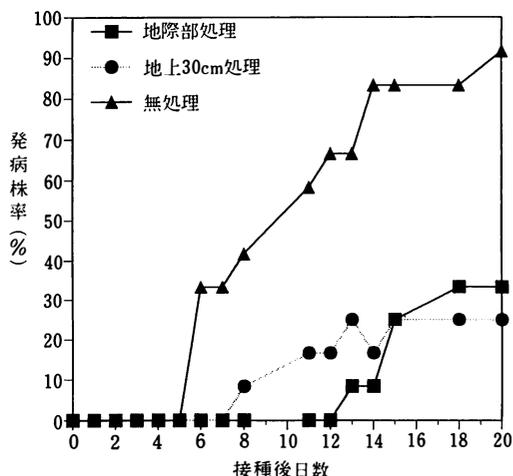


図-2 バリダマイシン A によるトマト青枯病防除試験 (温室内ポット試験)

た (図-2)。この結果より、処理部位が地際部から 30 cm 高の部位であっても VM-A は防除効果を示すことが判明した。

2 トマト青枯病圃場試験

次にトマト青枯病防除の圃場試験を行った。VM-A は原体を用い、1994年7月29日、8月5日の2回 250, 500 μ g/ml の濃度を茎葉に散布した。接種は8月3日に 1.8×10^8 cfu/ml の濃度の菌液を1株当たり 100 ml 灌注して接種し、その後、日本植物防疫協会の調査基準に基づいて発病度を調査した。その結果、接種 28 日後には無処理は 95% の発病度とほとんどすべての株が枯死してしまった (図-3)。しかし、VM-A 処理では 250, 500 μ g/ml でそれぞれ 51, 45% の発病度であった。VM-A は圃場試験の茎葉散布で、トマト青枯病の

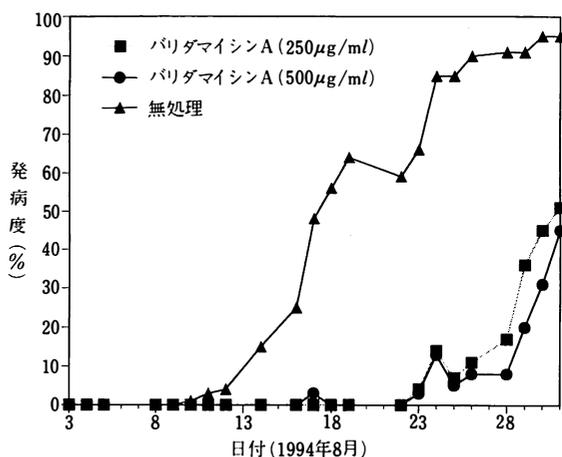


図-3 バリダマイシン A によるトマト青枯病防除試験 (圃場試験)

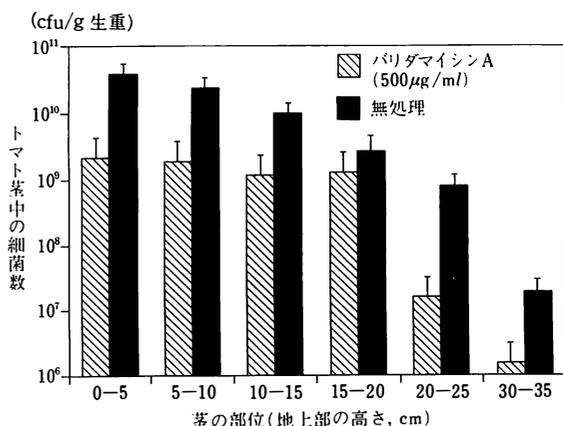


図-4 バリダマイシン A 処理のトマト茎からの青枯病菌の検出
図中の棒線は標準誤差を表す。

病徴の進展を10~14日遅らせる効果があることが判明した。

3 トマト茎内の青枯病菌量

トマト茎内での青枯病菌を選択培地を用いて検出した。VM-Aは原体を500 µg/mlを茎葉に散布し、1週間後に青枯病菌を接種した。その10日後にトマト茎を地際部から5 cm 間隔で切り取り、100 mlの蒸留水に数mmの厚さに切って入れ、一晚茎から菌を流出させた。菌の懸濁液は選択培地を用いた希釈平板法により菌数を計測した。その結果、無処理のトマト茎からは、地上0~5 cmの部分からは 3.8×10^{10} cfu/g 生重が検出されたが、VM-A処理トマト茎からは 2.1×10^9 cfu/g 生重と約1/18の量しか検出されなかった(図-4)。これらのことから、VM-Aはトマト茎内での青枯病菌の増殖を抑えることにより、発病を遅延させるものと考えられた。

III キャベツ黒腐病

キャベツ黒腐病は *X. campestris* pv. *campestris* による病害で、連作地では土壤中にすき込まれた被害植物で伝染する、土壤伝染性の細菌病である。土壤中の病原菌は雨粒などで跳ね上がり、葉縁の水孔や傷口から感染する。感染した病原菌は導管を伝わって組織に広がる(木曾, 1984)。この病害の防除薬剤としては、銅剤や抗生物質剤などが一般的に用いられている。

1 キャベツ黒腐病ポット試験

VM-Aはトレハロースを唯一の糖源とする培地で *X. campestris* pv. *campestris* に対して抗菌活性を示したの

で、キャベツ黒腐病ポット試験を行った。薬剤は、15.6, 62.5, 250 µg/mlの濃度のVM-A液を茎葉に散布した。風乾後に病原菌懸濁液を注射器で葉の中肋部に注入した。接種後24時間24°Cの湿室に置き、その後は23°Cで栽培し、病斑面積率を調べた。その結果、接種12日後に無処理は約23%の病斑面積率となり、このときVM-Aは15.6 µg/ml処理で12%の病斑面積率であった(図-5)。また、VM-Aの62.5, 250 µg/mlはほとんど病斑の進展は認められなかった。このときのキャベツ葉内の細菌量を、選択培地を用いて希釈平板法で調べた。その結果、無処理では約 10^9 cfu/g 生重であったが、15.6 ppm処理では無処理と菌量は差はなかったものの、62.5, 250 µg/ml処理では約 10^7 cfu/g 生重と、1/100の量であった(図-6)。

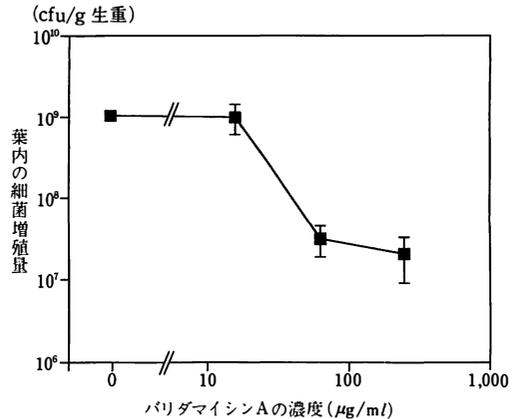


図-6 パリダマイシン A 処理のキャベツ葉内の細菌増殖量

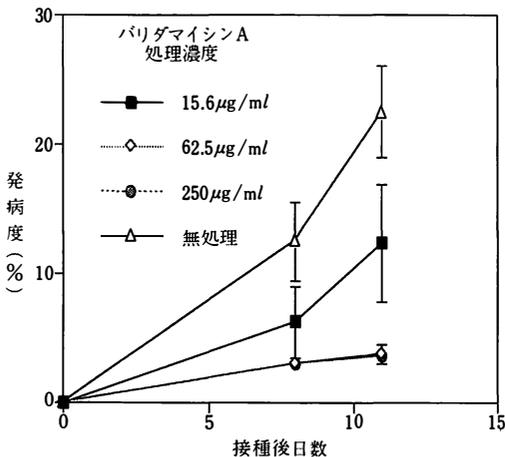


図-5 パリダマイシン A によるキャベツ黒腐病防除効果試験(温室内ポット試験)
図中の棒線は標準誤差を表す。

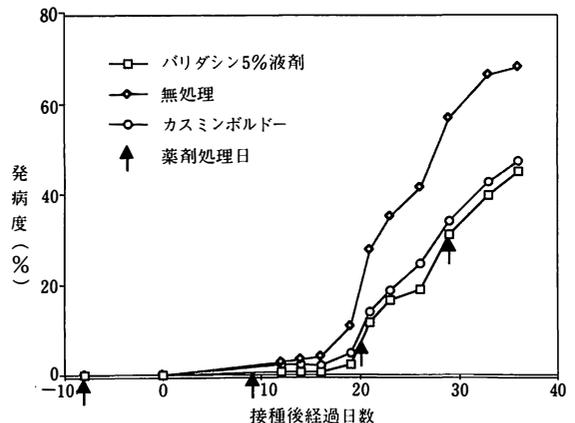


図-7 パリダマイシン A によるキャベツ黒腐病防除試験(小規模圃場試験)

2 キャベツ黒腐病小規模圃場試験

キャベツ黒腐病防除の小規模な圃場試験をファイロンハウス内で行った。バリダシン液剤 (5%, 800 倍液) を茎葉に散布し、接種は 1×10^6 cfu/ml の病原菌懸濁液を植物当たり 10 ml 噴霧し、その後ビニルシートで覆いをして 24 時間多湿状態とし、その後発病度を調査した。その結果、無処理で接種 12 日後に初発が認められた (図-7)。VM-A 処理区は無処理と比較して病徴の進展が遅く、また、接種 36 日後に対照薬剤のカスミンボルドー 1,000 倍液とほぼ同等の防除効果を示した。

現在バリダシン液剤 5 の、キャベツ黒腐病に対する適用拡大の登録を申請中である。

IV その他の細菌病害

現在、その他の細菌病害として、トレハロース培地で抗菌活性が認められた菌による病害のうち、モモせん孔細菌病 (*X. campestris* pv. *pruni*)、イネもみ枯細菌病 (*P. glumae*) などについて、圃場での防除効果を検討中である。

おわりに

VM-A は永年にわたって、糸状菌である *Rhizoctonia solani* とその近縁の菌による病害の防除薬剤として用いられてきた。しかし、トレハロースを唯一の糖源とする培地で抗菌活性の認められた細菌による病害の一部に対して、ポット試験、圃場試験で VM-A は防除効果を示した。また、植物体からの細菌数を計測したところ、VM-A は植物体内での細菌の増殖を抑制していた。これらのことから、キャベツ黒腐病、トマト青枯病の病徴

発現は、植物体内での病原細菌の数と関係していることが考えられた。

VM-A のキャベツ黒腐病、トマト青枯病の防除効果は発病遅延効果であった。ナス科植物青枯病のように、植物栽培中の防除法のない土壤病害を、散布処理で防除することは、処理法が簡単であり、しかも土壤灌注処理のように薬効が複雑な土壤環境に左右されることのない、有用な防除法であると考えられる。

VM-A の作用機作は *R. solani* のトレハロース分解酵素であるトレハラゼを阻害することが明らかにされている (ASANO et al., 1987; SHIGEMOTO et al., 1989)。また、VM-A は *P. solanacearum* 由来のトレハロース分解酵素も阻害することが確認されている (石川ら, 1996)。トレハロースは *R. solani* においては転流糖として (SHIGEMOTO et al., 1992)、昆虫においては血糖として用いられている (河野, 1995)。トレハロースの役割は、一般的には熱、低温、乾燥などから、酵素などのタンパクや核酸の立体構造を保護するものと考えられている。しかし、植物病原細菌におけるトレハロース、トレハラゼの役割は依然として不明である。現在のところ、これらを含めて、VM-A の細菌病に対する作用機作の解明のための研究を行っている。

引用文献

- 1) ASANO, N. et al. (1987): J. Antibiotics 40: 526~532.
- 2) 石川 亮ら (1996): 平成 8 年度日本植物病理学会大会講演要旨集. p. 107.
- 3) 木曾 皓 (1984): 野菜病害の診断技術, タキイ種苗, 京都, p. 90.
- 4) 河野義明 (1995): 化学と生物 33: 259~261.
- 5) SHIGEMOTO, R. et al. (1989): 日植病報 55: 238~241.
- 6) ——— (1992): 同上 58: 685~690.

新刊紹介

(このほど、下記の図書を寄贈いただきましたので、ご紹介します。)

「寄生虫放飼による害虫防除法の原理」

E. F. ニップリング 著

小山重郎・小山晴子 訳

B5 判・上製, 224 ページ・図表 40 枚

定価 10,300 円

東海大学出版会 1996 年発行

不妊虫放飼法の創始者としてわが国でも名高く、1995 年度の「日本国際賞」の受賞者である、E. F. ニップリング氏が、寄生虫の大量放飼による害虫防除に関する理

論を展開された書。著者と旧知の小山重郎・小山晴子氏が、著者の前書「害虫総合防除の原理」(東海大学出版会刊)に続いて共訳された。

害虫の寄生虫が自然の状態で共存している場合には、その害虫を、目的とするレベルまで防除することは難しいが、この寄生虫を大量に増殖し、害虫と寄生虫の移動範囲を超えるような広い地球に放飼すれば、きわめて効果的にこの害虫を防除することができる。本書は、寄生虫の大量放飼による害虫防除に関する理論を、アメリカの重要害虫についての豊富なデータに基づくシミュレーションモデルを通して解説したものである。

わが国においても、寄生虫など天敵利用による害虫防除法に強い関心が寄せられている折り、格好の道案内の書といえる。