

生物防除素材としての非病原性 *Fusarium oxysporum* 利用の将来

独立行政法人農業技術研究機構 お が わ けい
小 川 奎

非病原性 *F. oxysporum* は一般的に自然土壤中に腐生的に生息する。また、エンドファイトに属するものもあり、その生息範囲は広い。それらのなかには病原性 *F. oxysporum* に対して拮抗作用を示すものはないものの、①病原菌との土壌および根圏での栄養分や、根の感染部位を巡る競合に強い優位性を発揮する、②植物にフザリウム病抵抗性を誘導する、また、③植物の生育を促進するものなど多様な機能が見いだされている。

欧米では、フザリウム病抑止土壌から分離された菌株の競合作用をベースにした野菜および花きのフザリウム病に対する生物防除、我が国では、健全な作物体から分離した菌株による誘導抵抗性をベースにしたサツマイモつる割病、トマト根腐萎凋病・萎凋病、ラッキョウ乾腐病などの生物防除、の研究が展開されている。これらは、生物農薬としての期待が高まっているが、今後、その防除効果の安定性と信頼性を高めるために、本菌の生態や植物抵抗性の機作に基づいた本菌利用の新たな工夫が必要である。

I 病原性フザリウム菌との競合

1 根圏・根面における競合

非病原性 *F. oxysporum* を接種したキュウリ根圏土壌では、キュウリつる割病菌の厚膜胞子の発芽が抑制される。フランスのフザリウム病抑止土壌から分離された非病原性 *F. oxysporum* Fo 47 の有効な処理量は、病原菌より高い拮抗菌密度であること、すなわち病原菌の 10~100 倍の接種菌密度 ($10^4 \sim 10^5$ /g) が必要であるとされている。

gusA リポーター遺伝子を導入したアマ萎凋病菌 FoIn 3 GUS を用いて、炭素代謝と関係のある β -glucuronidase 活性を測定し、アマ根面における非病原性 Fo 47 との競合を調べると、病原菌に対する非病原性菌の接種割合が 100 倍と高い場合には、根面での病原菌密度は減少し、アマ萎凋病は抑制される。ところが、非病原性菌の接種割合が 10 倍と先程よりも低い場合には、

根面での病原菌密度は著しく減少しないにもかかわらず、発病程度は軽減される。この場合に、 β -glucuronidase 活性の低下は見られるので、根面における病原菌の活動が抑制されている。非病原性 Fo 47 は、病原菌に必要な炭素源の競合で優位に立ち、病原菌の厚膜胞子発芽を抑制し、根への菌糸の侵入を阻止すると思われる。

2 感染部位における競合

トマト萎凋病に発病抑制効果を示す非病原性 *F. oxysporum* 70 T 01 は、トマトの根の表皮や皮層細胞層に定着する。病原菌と同時に接種された場合、病原菌の菌糸は非病原性 70 T 01 が観察されない切片でのみ存在し、非病原性 70 T 01 が観察される部位では病原菌はほとんど見られないことから、お互いにニッチェを排除し合っている。非病原性 70 T 01 の菌糸が観察される近傍細胞では、細胞壁の肥厚あるいはパピラの沈着といった宿主の防御反応が見られる。

しかし、非病原性 70 T 01 は、新たな根にまでは伸長しないので、長期間にわたって十分な防除効果が期待できない一因となっている。発病抑制を確実なものにするには、土壌中で病原菌の密度に応じた非病原性 *F. oxysporum* の適切な密度を明らかにし、そのレベルに維持・管理することが重要である。

II 抵抗性の誘導

1 誘導抵抗性の証明

トマト萎凋病に対する誘導抵抗性は次の四つの生物検定法で実証されている。① Benomyl system: 非病原性 *F. oxysporum* Fo 47 をトマト根に前接種した苗をベノミル剤で殺菌後、ベノミル耐性の病原菌を接種、② Split root system: 根を二分割して、それぞれに接種、③ Cutting system: 非病原性菌を接種したロックウール培地で育苗した苗の切り穂を、病原菌汚染土壌に植え付ける、④ Layering system: 二重ポット方式で根系を分け、上部のポットに非病原性菌、下部のポットに病原菌を接種。いずれの生物検定法でも、トマトの茎から非病原性菌は分離できないにもかかわらず、発病抑制が認められている。

サツマイモつる割病に対する非病原性 *F. oxysporum* 101-2 の場合も、苗基部に非病原性 101-2 を接種し、本

菌が接種部位に局在している状態の苗について、①接種部位を空中に持ち上げる船底植え方式で汚染土壌に植え付け、土壌中に埋没した茎部に切れ込みを入れ病原菌の感染を促す、および②接種苗を水耕栽培し、上方の茎部へ病原菌を注射接種した場合の発病を、また③サツマイモ茎組織の下部に非病原性菌を接種した上部組織上の病原菌の発芽を調べた。①、②では発病が、③では発芽が抑制され、全身的な抵抗性の誘導が認められる。

水耕栽培のトマト萎凋病については、①水耕トマトの根をプラスチック板で二分割し、それぞれに非病原性 *F. oxysporum* F 13 と病原菌とを灌注接種、②トマト根にまえて非病原性菌を灌注接種し、1週間後に子葉節直下の茎に病原菌を針接種の実験系のいずれでも発病が抑制される。また、非病原性 *Fusarium* 菌の2系統を浸漬処理したラッキョウ種球の鱗茎内に、ラッキョウ乾腐病菌を注入接種した場合にも、発病抑制が認められ、広範な作物のフザリウム病に全身的な誘導抵抗性が確認されている。

2 抵抗性反応の始動

抵抗性の誘導には生きた菌体が必要である。サツマイモつる割病の場合、非病原性 *F. oxysporum* がサツマイモの導管中に共生している状態では、抵抗性を誘導しない。苗の切口という傷ついた柔組織に接種することによって抵抗性が誘導される。傷組織では活発に発芽、伸長し、非病原性であってもその一部は切口の傷ついた柔組織に侵入する。この組織は壊死する。このような弱い感染刺激をきっかけに植物組織の防御反応が生じる。

キュウリつる割病に発病抑制効果のある非病原性 *F. oxysporum* C5 と C14 を比較した場合、根に侵入できる C14 は有傷、無傷接種にかかわらず発病抑制するが、侵入能力に欠ける C5 は有傷接種の場合のみ発病を抑制する。また、抵抗性誘導能が強い非病原性 *F. oryzae* CS-20 は発病抑制効果も高いが、抵抗性誘導能が弱い *F. solani* CS-1 は低い病原菌密度での発病軽減には有効であるが、高病原菌密度では有効でない。ラッキョウ乾腐病では、非病原性 *F. oxysporum* 以外に、*F. fujikuroi* にも発病抑制効果が認められているが、この *F. fujikuroi* は大量接種すると、ラッキョウに根腐れを引き起こす。このように、感染刺激を与える能力をもった菌株が、抵抗性誘導能が高いと考える。

多くの糸状菌の細胞壁成分であるキチンおよびキトサンのオリゴ糖に強いエリシター活性が認められるが、キュウリつる割病抵抗性の誘導は菌体細胞壁成分によって起こる。サツマイモの場合は、非病原性菌の胞子発芽液でも抵抗性が誘導されるので、胞子発芽の際に、菌体外

に分泌される物質と思われる。この活性は熱処理で失活する不安定なものである。

3 誘導抵抗性の機作

(1) フェノール性成分の蓄積

ソライロアサガオはサツマイモつる割病菌に罹病するが、非病原性 *F. oxysporum* を前接種すると、病原菌による子葉の黄化が抑制される。このような植物組織内では、傷害や病原の侵入などのストレスによって誘導される Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 活性の急激な増加が見られ、フェノール性成分の蓄積や細胞壁のリグニン化の物理的な防御が働いている可能性がある。

(2) 酵素活性の増高

非病原性 *F. oxysporum* Fo 47 によって、トマト萎凋病に対する抵抗性が誘導されたトマトの茎および葉では、接種3週間後に菌体壁分解酵素である chitinase, β -1,3-glucosidase, β -1,4-glucosidase 活性の増加が見られるのに対して、発病抑制効果を示さない非病原性菌では、このような酵素活性が増加しない。

(3) ファイトアレキシン

ファイトアレキシンは、病原菌の感染後に植物に新たに生成蓄積する抗菌性物質で、フラボノイドとテルペノイド化合物が多い。非病原性 *F. oxysporum* 101-2 を接種したサツマイモ組織では、病原菌の胞子発芽が抑制されるが、この発芽抑制作用は寒素天中を移行し、植物組織のアセトン抽出物中にも認められ、誘導抵抗性の発現に抗菌性物質の産生の関与が示唆される。しかし、サツマイモのファイトアレキシンである ipomeamarone は、病原菌の胞子発芽を抑制するが、サツマイモに非病原性菌を接種した場合、根部ではその蓄積が見られるが、地上部からは検出されず、この誘導抵抗性においては ipomeamarone の関与は否定的で、今後の課題である。

(4) フザリウム毒素の解毒

病原性 *F. oxysporum* はフザリン酸などの萎凋毒素を産生し、葉の黄変、壊死や萎凋を引き起こす。サツマイモつる割病の誘導抵抗性は、病原菌の胞子発芽を抑制する抗菌性物質を産生して感染を阻止する作用と、病原菌の産生するフザリウム毒素を解毒して抵抗力の低下を防ぐ作用が複合的に機能し合っている。植物ホルモン abscisic acid は、タバコで葉の葉緑素含量を上昇させる活性が認められているが、ソライロアサガオに処理すると、病原菌接種による葉の黄化を抑える。誘導抵抗性の一つとして、abscisic acid に応答する経路が発現し、病原菌毒素による葉緑素の減退を抑えているものと考えられる。

(5) 前接種における有効接種菌濃度

抵抗性誘導の場合、非病原性 *F. oxysporum* を直接植物体に接種するため、他の微生物の影響を受けずに、より低い接種量で確実に抵抗性を誘導できる。発病抑制は、接種数時間後から数日の比較的短期間に生じ、病原菌との同時接種でも十分効果があるが、病原菌の接種を非病原性菌接種よりも2日前に行った場合には発病は抑制されないため、病原菌に感染する前に接種する必要がある。そのため、土壌処理に比べて、苗あるいは種球処理が適している。また、サツマイモの場合、非病原性菌の接種濃度が低くても、苗の浸漬接種時間を長くすると、発病抑制効果は高まるので、接種菌濃度の高低よりも、確実に非病原性菌を接種することが重要である。

4 非病原性フザリウム菌による生育促進効果

健全なシンビジウムの根内部に共生する *F. oxysporum* は、フザリウム病抑制効果は認められないが、ホウレンソウ、トマト、キュウリ、キクの根に接種すると、各作物の根組織内に定着し、発根を促進し、根重を増加させ、現在、微生物資材として市販されている。一方、発病抑制効果を有する非病原性菌のなかにも生育促進効果を示すものもある。サラダナ根腐病抑制効果をもつ非病原性菌は水耕液中で、サラダナ、ネギ、ミツバ、トマトの根量を増加させ、褐色を呈する根が少なくなる。植物生長ホルモンの産生あるいは有害微生物の排除などが作用機作として考えられる。

5 実用的な効果が高めるための工夫

(1) 有効な初期感染の防止

非病原性 *F. oxysporum* 101-2 によるサツマイモつる割病における誘導抵抗性では、抵抗性の誘導は一過性で、本菌が植物組織に刺激を与えている期間のみに限られ、5日後までが限界で、その持続性が短い。その防除効果が収穫期にまで及ぶのは、①誘導された抵抗性の初期感染阻止作用が極めて高く、最も感染しやすい植付け直後の苗を完全に保護できること、②本病の土壌伝染と種苗伝染の双方に有効であることによって、実用的な防除効果がある。本菌は生物農薬として登録申請中である。

(2) 養液栽培への導入

養液栽培では、作物根が養液中に露出しているため、栽培期間中の任意の時期に非病原性 *F. oxysporum* を根部に直接接種することができる。水耕栽培のサラダナ根腐病やロックウール栽培のトマト根腐萎凋病に対して、実効が上がっている。養液中の微生物相は単純かつ貧困であるうえ、ロックウールは非病原性菌の定着に好適な素材であるため、4か月にわたって、ロックウール中で高い密度が維持される。非病原性菌を前接種し乾燥させた

ロックウールキューブを商品とするアイデアが提案されている。

(3) 反復接種で効果の持続

水耕栽培のサラダナ根腐病では、非病原性 *F. oxysporum* SK-102 を5日間隔で数回養液中に反復灌注接種すると、1回処理に比べて発病抑制効果が高まる。ハウス栽培では、非病原性菌を床土接種し育苗した苗を、さらに本菌を土壌混和接種した本圃に定植するという二重接種を行うことによって、苗接種単独よりも防除効果を高めている。

ラッキョウ乾腐病は植付け時と収穫時の夏期に発病するので、防除効果を高めるには、植付け時に非病原性菌の種球浸漬処理を行うとともに、収穫前の夏期に、一定の発病抑制効果が認められる土壌灌注処理を組み合わせる。また、2年掘り栽培では、植付け翌年に本菌の土壌灌注を反復処理することが有効である。

抵抗性を持続させるには、生育期間中に、地上部に抵抗性誘導菌を追加接種し、抵抗性を再誘導できれば、好都合である。トマト根腐萎凋病において、非病原性菌をトマト子葉節直下の茎に針接種した場合にも発病抑制を認めており、地上部への二次接種の応用の可能性はあると考える。

6 効果を安定させるための他処理との組み合わせ

(1) 土壌消毒効果の補完と安定化

土壌消毒は、汚染された土壌中の病原菌を一挙に除去できるが、消毒後の土壌中は一時的に微生物相の空白が生じ、病原菌の再汚染や復活に対しての拮抗力が弱まっている。競合能の高い非病原性 *F. oxysporum* の施用は、病原菌の急速な復活を防ぎ、土壌消毒の有効期間を長く維持できる。ハウス栽培のサラダナ根腐病では、クロルピクリンで土壌消毒したハウスに、非病原性菌を毎作付け直前に土壌混和接種し、4連作したところ、土壌中の非病原性菌密度が高く維持され、病原菌密度は低く抑えられて、発病の増加が抑制される。イチゴ萎黄病では、非病原性菌の浸根接種と圃場施用の組み合わせが有効であるが、土壌中の病原菌密度が高い場合には効果が劣る。メチルイソチオシアネート油剤などの土壌消毒を併用すると効果は安定する。

(2) 薬剤との併用・ベノミル耐性菌株の利用

定植時のトマト根へ非病原性 *F. oxysporum* のベノミル耐性変異株を接種し、ベノミル剤1,000倍液の灌注を組み合わせると、発病抑制効果はそれぞれの単独処理に比べてより高くなる。サラダナ根腐病においても、定植前のタチガレン液剤苗処理と非病原性菌の土壌接種を組み合わせると、防除効果を高めている。

(3) 他の拮抗微生物との相互作用による効果の向上

1) 蛍光性 *Pseudomonas* と組み合わせ

フザリウム病抑止土壌に関係している蛍光性の *Pseudomonas* および非病原性 *F. oxysporum* の組み合わせで、生物防除効果の増強に成功している。キュウリつる割病を単独で抑制する *Pseudomonas putida* と非病原性 *F. oxysporum* の組み合わせの効果は、中性～アルカリ性で顕著に現れる。*P. putida* は、病原菌および非病原性菌双方の厚膜胞子の発芽をともに抑制する。ところが、非病原性菌密度を高めると、キュウリ根からの滲出物が増え、これを利用する *P. putida* の siderophore (pyoverdine) 生産が活発化する。これによって、キュウリ根圏での鉄を巡る競争力が高まり、病原菌の発芽や宿主への侵入が阻害される。このことは、pyoverdine 欠の Sid-mutant *P. putida* を組み合わせると生物防除効果は増強しないこと、一方、純化された pyoverdine は病原性 *F. oxysporum* の菌糸体の成長を抑制することからも実証される。土壌条件と非病原性 *F. oxysporum* の働きかけが *P. putida* の siderophore 生産を助けたといえる。

2) 他のフザリウム属菌との混合接種

ラッキョウ乾腐病では、病原菌と種の異なる *F. fujikuroi* と同種の *F. oxysporum* の混合接種では、各菌株の単独接種に比べて発病抑制効果が高まる。しかし、それぞれ単独接種での効果が高い菌株を単純に組み合わせても、必ずしも混合接種で効果が高くならず、菌株の組み合わせによる相互作用の発現は複雑である。

(4) 発病回避効果のある移植栽培との組み合わせ

ハウレンソウ萎凋病に対して非病原性 *F. oxysporum* は、土壌施用でも発病抑制効果が認められるが、その効果は収穫期まで持続しない。効果を高めるために、発病回避効果のある移植栽培と組み合わせる。非病原性菌をセル育苗の床土に土壌混和し、育苗しその苗を定植すると、直播栽培に比べて明らかに発病開始が遅れ、発病は収穫期まで低く推移し、太陽熱消毒並みの防除効果が得られ、増収する。

(5) 定着性の高いラッキョウとの混植

ラッキョウ乾腐病に発病抑制効果を示した非病原性 *F. oxysporum* はラッキョウでの定着性が高いので、本菌を浸根接種したラッキョウを、同じく非病原性菌接種床土で育苗したトマト苗と混植すると、単独処理に比べてトマト根腐萎凋病抑制効果が高まり、根の発達も促進される。

III 今後の可能性について

1 全身的抵抗性誘導の他の病害に対する効果

多くの作物について非病原性 *F. oxysporum* を接種すると、フザリウム病抵抗性が全身的に誘導される。この反応が、他の病害に対して有効かどうか興味がある。スイカの根部に、病原性のないキュウリつる割病菌を接種すると、地上部の葉に炭そ病抵抗性が誘導されるという報告や、トマト萎凋病に有効な非病原性 *F. oxysporum* Fo 47 は、*Phytophthora infestans*, *Cladosporium fulvum* に対しても有効という報告があり、非特異的な抵抗性の誘導が期待できる。今後、非病原性 *F. oxysporum* 利用の新たな展開として期待したい。

2 多様なフザリウム属菌の機能の解明と活用

F. oxysporum の病原性分化に見られるように、非病原性グループにも多様な機能が分化している可能性が高い。抵抗性誘導の宿主特異性について、非病原性 *F. oxysporum* の 124 菌株を供試し、ハウレンソウ萎凋病、トマト根腐萎凋病、イチゴ萎黄病に対する発病抑制効果の違いを調べたところ、発病抑制効果の大きさには差が見られ、菌株間に特異性があることをうかがわせる。このような菌株による抵抗性誘導能の特異性の解明は残された課題であるが、人工培養で一度失活した菌株の抵抗性誘導能は、植物体を通過させることによって回復する点は、病原菌の病原性回復と共通しており、植物との相互関係は無視できない。この抵抗性誘導能の特異性が明らかにされれば、スーパー非病原性 *F. oxysporum* 探索のきっかけが得られるかもしれない。

また、土壌中あるいは根面、根圏での他の微生物や植物との相互関係では、発病や病原菌の活性の抑制にプラスに働く作用についての研究に偏りがちになりやすいが、マイナスに働く作用や要因に関しても軽視してはいけない。これらトータルとしての知見は、圃場規模で最良の防除効果を実証するうえで重要な意義をもつ。

参考文献

- 1) BAO J. et al. (2001): *Phytopathology* 91: 449~456.
- 2) DUIJFF B. et al. (1999): *ibid.* 89: 1073~1079.
- 3) FUCHS J. et al. (1997): *Plant Dis.* 81: 492~496.
- 4) 本多範行 (2000): 福井県農試特別報告 12: 1~63.
- 5) 勝部和則 (1997): 日植病報 63: 389~394.
- 6) 駒田 旦ら (1944): 島根病虫研報 19: 5~12.
- 7) 黒田克利 (2001): 今月の農業 1: 90~93.
- 8) LARKIN R. et al. (1999): *Phytopathology* 89: 1152~1161.
- 9) MANDEEL Q. et al. (1991): *ibid.* 81: 462~469.
- 10) 西村範夫 (2000): 土壌伝染病談話会レポート 20: 180~189.
- 11) 小川 奎ら (1986): 日植病報 52: 15~21.
- 12) ——— (1988): 農研センター報告 10: 1~125.
- 13) PARK C. et al. (1988): *Phytopathology* 78: 190~194.
- 14) SHIMUZU B. et al. (2000): *J. Pesticide Sci.* 25: 365~372.