

クワ炭疽病の発生生態と拮抗細菌による発病抑制

独立行政法人 農業環境技術研究所
農業環境インベントリーセンター

よし だ しげ のぶ
吉 田 重 信

はじめに

クワは、蚕の給餌用植物として、古くから日本各地で栽培されている木本性植物である。近年は、蚕糸業の低迷に加えてクワに代わる人工飼料の実用化等により、その栽培面積は減少してきている。しかし、良質の繭を生産するためにはクワは必要不可欠とされ、養蚕業におけるその重要性は今日でも変わっていない。

クワ炭疽病は、葉に赤褐色～褐色あるいは灰白色の病斑を引き起こす葉枯性の病害として古くから知られていたが、本病は甚大な被害を及ぼすことは稀であった。しかし近年、密植栽培・機械収穫および多回育養蚕用のローリング収穫法の普及とともに、その発生が目立つようになった。また、養蚕農家の高齢化および後継者不足等による桑園管理の不徹底等から、発生とその被害は今後さらに増加することが予想されている。しかしながら、本病の生態・発病機構および防除法等に関する報告としては、若干の記載（原，1925；木村，1979）があるだけで、効果的な防除法の確立に結びつくような詳細な研究は行われていない。

そこで筆者らは、クワ炭疽病の病原菌の再分類を行うとともに、国内における主要な病原菌であることが明らかになった *Colletotrichum dematium* による本病の発生生態、感染機構、拮抗微生物による発病抑制効果について検討した。さらに、得られた結果をもとに、本病の効果的な防除手法について検討・考察を行った。以下にその概要を紹介したい。

I クワ炭疽病菌の種類と病原性

これまで、クワ炭疽病菌には *Colletotrichum morifolium* および *C. morina* の2種が知られていた（原，1925）。しかし、これらの記載は古く、ARX (1957) による炭疽病菌の新分類体系に基づく種名の再検討が必要であった。

筆者らは、全国から採取した罹病クワ葉から *C.*

dematium, *C. acutatum* および *G. cingulata* (*C. gloeosporioides*) の3種の炭疽病菌を分離した（吉田ら，1995 b）。これら3種はクワ葉に病原性を示し、特に *C. dematium* は強い病原力を示した。また、これまで病原菌として記載されていた *C. morifolium* は、その形態比較により、*C. dematium* の異名とすることを提案した。これにより、クワ炭疽病菌は *C. dematium*, *C. acutatum*, *G. cingulata* (*C. gloeosporioides*)、および筆者らは未確認であるが *C. morina* の4種が存在することが明らかになった。*C. dematium*, *C. acutatum*, *G. cingulata* は、クワ以外のさまざまな植物葉に対して病原性を示し、幅広い宿主範囲を持っていた（吉田・白田，1996）。これらの中で特に *C. dematium* は、全国各地に幅広く分布して分離頻度も高いこと、さらに他菌種よりもクワに対し強い病原力を示すことから、国内では *C. dematium* が本病の主要な病原菌であると考えられた（吉田ら，1995 b）。さらに、*C. dematium* を260品種のクワ葉に接種し、感受性および抵抗性品種の選抜を行ったところ、感受性品種は‘長沙’、‘彦次郎’等、抵抗性品種は‘群馬赤木’、‘大和早生’等であることが明らかとなった（吉田ら，1995 a）。

II *C. dematium* によるクワ炭疽病の発生生態

1 桑園における発病とその拡大

C. dematium による本病の詳細な発生推移については不明であった。筆者らは、農業生物資源研究所内の桑園圃場において本病の発生を調査した。また、クワ葉の時期別および葉位別での本菌に対する感受性について検討し、自然発病との関連について考察した。

圃場内の本病の発生推移を、6月から11月にかけて3年間にわたり定点調査した結果、本病の初発はいずれの年も梅雨期にあたる6月下旬～7月上旬であり、発生の多くは、地際部に着生している成葉で見られた（YOSHIDA and SHIRATA, 1998 a）。発病葉の総数は各年とも8月には少なく、その後しだいに増加し11月に最大となった。発病葉数を着生位置別に3段階に分けて調べた結果、いずれの月も発病は地表面に近い部位が多かったが、11月には中間および上部の葉での発病も多くなる傾向が見られた（図-1）。また、発病部位と葉位との

Ecology of Mulberry Anthracnose and Its Suppression by Antagonistic Bacterium. By Shigenobu YOSHIDA

（キーワード：桑，炭疽病，*Colletotrichum dematium*，発生生態，拮抗細菌）

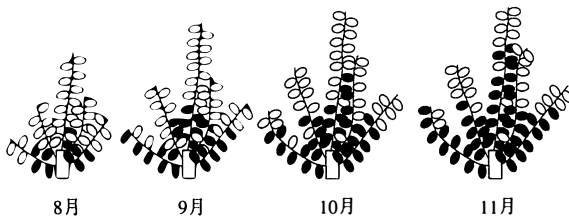


図-1 *C. dematium* による炭疽病のクワ株における発病推移 (模式図)
白塗は健全葉, 黒塗は罹病葉を示す。

間には一定の関係は見られず、発病は葉の着生位置が地面に近いほど多くなる傾向が認められた (YOSHIDA and SHIRATA, 1998 a)。一方、葉位別に個々の感受性を調べたところ、自然発病があまり見られない上位葉の方が下位葉よりも感受性が高かった (YOSHIDA and SHIRATA, 1998 a)。このことから、本病の初期の発生およびその後の病勢進展には、各葉の感受性の差異よりも圃場表面からの距離という物理的条件がより大きく関与していると考えられた。なお病勢進展に及ぼす要因として、本病の発生はクワの施肥管理によっても大きく影響されることが明らかになった (YOSHIDA and SHIRATA, 1998 b, 2000 b)。

2 病原菌の越冬

上述の発生消長の調査結果から、本菌は桑園土壌で越冬し、翌年の第一次伝染源となっていることが推察された。そこで、本菌の冬期土壌における生存性および生存形態について検討した。

12月に本菌の分生子を混和した土壌を野外に設置後、経時的に回収した土壌から本菌を分離し、生存の有無を確認した。その結果、本菌は設置後約2か月までしか検出されなかったことから、本菌の分生子が桑園土壌で越冬し、翌年の伝染源となっている可能性は小さいと考えられた (YOSHIDA and SHIRATA, 1999 a)。

一方、冬期の桑園圃場には多くのクワの落葉を目にすることができる。そこで、罹病落葉中での越冬についても検討を行った。12月に野外に設置した罹病葉において経時的に菌の生存を調べた結果、本菌は最低でも5か月間は生存していた (YOSHIDA and SHIRATA, 1999 a)。また、本菌は葉で潜在感染する (白田, 1993) が、こうした潜在感染葉でも本菌は長期間生存し、さらに室内試験の結果では、特に低温条件下で長期間生存できることが明らかになった (YOSHIDA and SHIRATA, 1999 a)。以上の結果から、本菌は、晩秋期に落葉した罹病葉等の残渣で主に越冬し、それが翌年の第1次伝染源となっていることが示唆された。

なお、別種のクワ炭疽病菌 *C. acutatum* は、桑樹体上 (枝の皮部および冬芽の鱗片) で越冬し、*C. dematium* とは異なる生存戦略を持っていることが明らかになった (YOSHIDA and SHIRATA, 1999 b)。

III *C. dematium* の植物毒素の生産性

本菌の感染機構の解明は、効率的な防除のための基礎的情報となる。そこで、本菌の毒素生産性について調べ、毒素と病徴発現との関連について検討を行った。

本菌の接種により形成させた病斑褐変部のアセトン抽出液を感受性品種‘落井’に有傷滴下した結果、葉脈に沿って顕著な壊死斑が形成され、抽出液中には植物毒素の存在が示唆された (YOSHIDA et al., 2000 a)。毒素活性は、本菌を PDA 等の各種固体・液体培地中で培養しても認められなかったが、オートクレーブ処理したクワ葉で培養した場合には認められた。このことから、感染葉から抽出される毒素は、クワ葉の病斑部で生産されていると考えられる。本毒素は接種2日後から検出されはじめ、褐変程度が大きくなるとともに活性も高まる傾向が見られた。一方、本菌は接種1日後で葉内に侵入を完了していると考えられる (吉田・白田, 1997)。このことから本毒素は、菌が葉内へ侵入して増殖し、病斑を形成する時に多く生産され、病斑の拡大とともに生産されつづけるものと推察される。

本毒素はモモ、ダイコン葉等の各種植物葉に対しても壊死斑を形成した。しかし、このスペクトルは本菌の宿主範囲とは必ずしも一致しなかったことから、宿主非特異的毒素 (host-nonspecific toxin) であると判断した。一方、本毒素の活性はクワの感受性品種には強く、抵抗

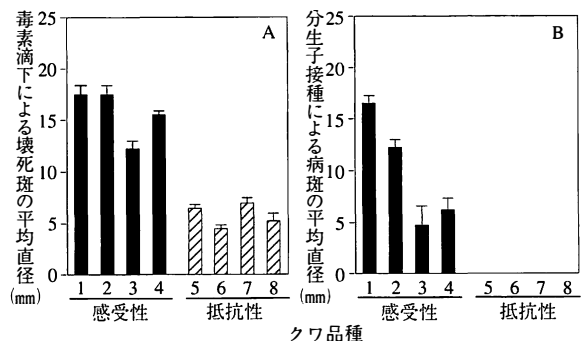


図-2 クワ各品種における *C. dematium* の毒素滴下による壊死斑形成 (A) および分生子接種による病斑形成 (B)

クワ品種: 1, 落井; 2, 長沙; 3, 彦次郎; 4, 竜川
雨秋; 5, 金子; 6, 群馬赤木; 7, 柳田; 8, 大和早生
バーは標準誤差。

性品種には弱いことが明らかになった (図-2) (YOSHIDA et al., 2000 a)。この結果から、本毒素はクワ葉に対する病原因子として重要な役割を持つものと考えられた。なお本毒素は、特徴的な UV 吸収スペクトルを持つ 4 種類の蛍光化合物であった (YOSHIDA et al., 2000 a)。

IV 拮抗細菌による発病抑制

本病菌の防除手段には、他の葉枯性病害との同時防除を兼ねたチオファネートメチル剤が用いられる (木村, 1979)。しかし、化学薬剤だけに頼らない環境に優しい防除技術の確立への期待から、微生物の拮抗現象を利用した生物的防除が要請されている。そこで、本病の生物防除法を確立するための基礎的な取り組みとして、拮抗細菌を分離し、その発病抑制機構ならびに生物防除資材としての可能性について検討した。

本病菌に対する拮抗細菌を得るために、健全なクワ葉から細菌を分離し、その中から、クワの実生苗を用いた発病試験で強い抑制効果を示した細菌 RC-2 株を得た (YOSHIDA et al., 2001 a)。RC-2 株はグラム陽性細菌の *Bacillus amyloliquefaciens* と同定された。次に、RC-2 株の菌体および培養上清をそれぞれクワ葉に処理して発病抑制活性を調べた。その結果、発病は培養上清の処理によって顕著に抑制されたことから (図-3)、発病抑制は RC-2 株が菌体外に分泌する抗菌成分によって起きていることが明らかになった (YOSHIDA et al., 2001 a)。ま

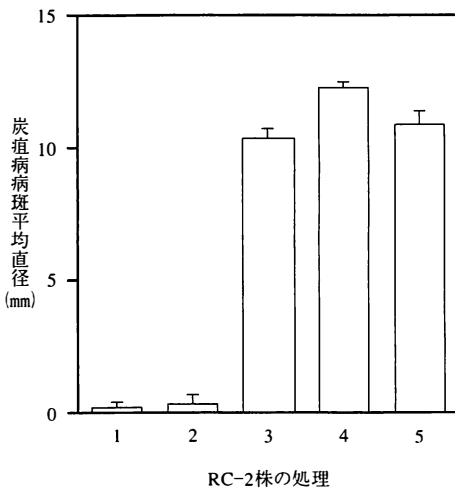


図-3 *B. amyloliquefaciens* RC-2 株のクワ葉面への処理による炭疽病の発病抑制

処理：1, 振とう培養液；2, 培養上清；3, 洗浄菌体；4, 液体培地のみ (control)；5, 無処理 (control), バーは標準誤差。

た、処理時期別による本抗菌成分の発病抑制を調べた結果、抑制は病原菌接種前の処理で見られ、病原菌接種後の処理では見られなかった。これにより、本抗菌成分は宿主へ侵入する以前、すなわち感染初期段階の病原菌に対しては強い活性を示すが、葉中に侵入した菌には効かないことが示唆された。一般に病原菌の最初の感染行動には、胞子の発芽が挙げられる。そこで、本抗菌成分の本菌分生子の発芽に対する影響を調べた結果、抗菌成分により発芽は顕著に阻害された (YOSHIDA et al., 2001 a)。

本抗菌成分は、イネいもち病菌等の多くの病原糸状菌および細菌に対して生育阻害効果を示した。こうした幅広い抗菌スペクトルを有する抗菌成分を同定するため、各種カラムクロマトグラフィーおよび HPLC 解析により抗菌物質を単離・精製した。その結果、7 種の抗菌物質が単離され、それらはいずれも 8 個のアミノ酸が環状に結合している構造を基本骨格とする iturin 誘導体であった。これら 7 種の誘導体は、 β アミノ酸のアルキル側鎖の違いにより、それぞれ iturin A 2, A 3, A 4, A 5, A 6, A 7 および A 8 と同定された (YOSHIDA et al., 2001 b) (HIRADATE et al., 2002) (図-4)。以上の結果より、*C. dematium* の拮抗細菌として分離された *B. amyloliquefaciens* RC-2 株は、抗菌成分として iturin 誘導体を菌体外に分泌し、これにより本病の発生を抑制していると考えられた。

本試験の結果から、本病は、分生子が葉上に飛散・定着し、感染するというサイクルを繰り返すことで発生を拡大するため、分生子の飛散・定着前にあらかじめ本細菌を葉面に散布することにより大きな防除効果が期待される。したがって、実用化のためには、本細菌の葉上での定着性や抗菌成分の生産性、および効果の持続期間等

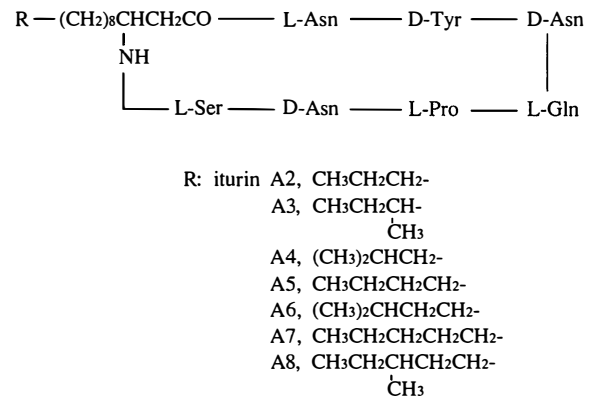


図-4 *B. amyloliquefaciens* RC-2 株の生産する抗菌成分 iturin A 誘導体 (iturin A 2~A 8) の化学構造

の検討を加えて、最適な防除時期・回数を明らかにすることが重要と思われる。

おわりに

筆者らの研究により、国内で主要なクワ炭疽病菌である *C. dematium* による本病の発生生態、発病機構および拮抗細菌による発病抑制効果が明らかにされた。本菌は以下のような生活環を持つことが考えられた。

すなわち、本菌は秋季に地面に落ちた罹病葉で主に越冬し、翌春、葉上で形成された分生子が、雨滴等により地際部の健全葉に跳ね上がり、梅雨期頃に一次感染を起こし、この地際部の罹病葉中の本菌がさらに二次感染源となって桑樹の上部葉に拡大する。その後の発生推移から判断して、この地際部の発生程度が桑園内のまん延に最も大きく関与している。その後、本菌は秋期に落葉した罹病葉・潜在感染葉で越冬し、再び翌年の伝染源になると考えられる (図-5)。

以上から、冬期に落葉を圃場から除去することは、生活環を効果的に断ち切る耕種的手法の一つとして重要である。また、今回明らかとなった抵抗性品種の活用や、適正な肥培管理も本病の防除のためには必要と考えられた。

C. dematium の分生子は、葉上で発芽して付着器を形成後、侵入菌糸を形成して葉内に侵入する (吉田・白田, 1997) が、上記試験の結果から本菌は侵入後に毒素を生産することが明らかになった。本毒素は病斑の形成・拡大因子として機能すると考えられることから、感染場面においては、本毒素が分泌される前の感染初期段階、すなわち葉内侵入以前に防除手段を講じるのが効果的であると思われる。

健全葉から分離した拮抗細菌 *B. amyloliquefaciens* RC-2 株は、あらかじめ葉面に処理しておくことにより抗菌成分 iturin 誘導体を菌体外に分泌して葉面に付着した分生子の発芽を阻害し、結果的に本病の発生を顕著に抑制した。この結果から、RC-2 株および iturin 誘導体は本病の新規の防除資材として利用できる可能性があり、上述の耕種的手法と併用することで、本病の効果的

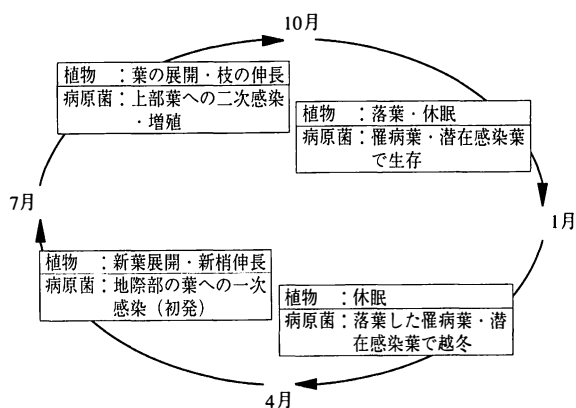


図-5 クワ炭疽病菌 (*C. dematium*) の生活環

な発病抑制が期待される。

最後に、これら一連の研究を遂行するに当たり、終始懇切丁寧な御指導を頂いた農業生物資源研究所・白田昭博士に対し、厚く御礼申し上げます。また、研究遂行に多大な御支援を頂いた農業環境技術研究所平舘俊太郎博士、東京農業大学教授小林享夫博士、ならびに前蚕糸・昆虫農業技術研究所の関係諸氏に、心から感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Arx, J. A. von (1957): *Phytopathol. Z.* **29**: 413~468.
- 2) 木村勝太郎 (1979): 原色日本桑樹病害図説, 建帛社, 東京, 163 pp.
- 3) 原 摂祐 (1925): 実用作物病理学, 養賢堂, 東京, pp. 148~149.
- 4) HIRADATE, S. et al. (2002): 投稿中.
- 5) 白田 昭 (1993): *日植病報* **59**: 259~262.
- 6) 吉田滋実ら (1995 a): *蚕糸昆虫研報* **12**: 13~30.
- 7) 吉田重信ら (1995 b): *日植病報* **61**: 75~81.
- 8) ———・白田 昭 (1996): *日蚕雑* **65**: 86~93.
- 9) ——— (1997): *蚕糸昆虫研報* **18**: 79~96.
- 10) YOSHIDA, S. and A. SHIRATA (1998 a): *J. Seric. Sci. Jpn.* **67**: 327~332.
- 11) ——— (1998 b): *ibid.* **67**: 373~379.
- 12) ——— (1999 a): *Plant Dis.* **83**: 465~468.
- 13) ——— (1999 b): *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **65**: 274~280.
- 14) ——— et al. (2000 a): *Phytopathology* **90**: 285~291.
- 15) ——— et al. (2000 b): *J. Seric. Sci. Jpn.* **69**: 305~311.
- 16) ——— et al. (2001 a): *Phytopathology* **91**: 181~187.
- 17) ——— et al. (2001 b): APPS 13th biennial conference abstract 341.