

Verticillium biguttatum によるテンサイ苗立枯病および根腐病の生物的防除*

長崎県総合農林試験場愛野馬铃薯支場環境科 佐 山 充

はじめに

テンサイは、砂糖の原料となる北海道における基幹作物の一つである。テンサイの土壤病害のうち、*Rhizoctonia solani* によって引き起こされるものに根腐病と苗立枯病があり、両者とも防除のために殺菌剤の使用が欠かせないものとなっている。一方、北海道農業研究センター内耕地土壤に *R. solani* 菌体の繰り返し接種を行ったところ、*R. solani* によるテンサイ苗立枯病に対する土壤の抑止性が誘導され、その抑止性には生物因子が関与していることが示唆された(佐山ら, 2001 b)。そこで、これらの土壤から *R. solani* に対する拮抗性糸状菌を探索したところ、本菌に顕著な寄生性を有する糸状菌が分離され、*Verticillium biguttatum* と同定された(佐山ら, 2001 a)。筆者らは、*V. biguttatum* を国内で初めて報告し、本菌を用いてテンサイの苗立枯病および根腐病の防除試験を行ったので、ここに紹介したい。

I *V. biguttatum* とは

Verticillium 属菌には、*V. dahliae* などの植物病原菌のほかに、線虫、昆虫、糸状菌などに寄生するものがある。*V. biguttatum* は、このうち糸状菌に寄生するもので(GAMS and ZAAYEN, 1982)、とりわけ *R. solani* に対する寄生性が高い(MORRIS et al., 1995 a)。*V. biguttatum* は、1979年にオランダのジャガイモ黒あざ病に抑止性を示す圃場で、ジャガイモ塊茎に着生していた *R. solani* の菌核から高頻度に検出された(JAGER and VELVIS, 1983)。ほかにもいくつかの菌寄生菌が分離されたが、*V. biguttatum* が最も拮抗微生物として重要であった。分離された *V. biguttatum* は分生子を種イモに粉衣することによって発病抑制効果が認められ(VELVIS and JAGER, 1983)、*R. solani* の菌核の形成も抑制された。この抑制効果は、*V. biguttatum* 菌株すべてに認められるのでは

なく、オランダで分離された M73 株で特に高い効果が認められている(BOOGERT and JAGER, 1984)。

II *V. biguttatum* による発病抑制試験

1 *V. biguttatum* の分離方法

筆者らは、*R. solani* AG2-2 IV に属する Pf-28 株の菌体を耕地土壤に5回繰り返し接種することにより、*R. solani* による苗立枯病に対する土壤の抑止性を誘導した。この土壤の希釈液をシャーレ内の *R. solani* の菌叢上に塗布し、数日間培養後に生じたコロニーを顕微鏡下で観察し、*R. solani* 菌糸に寄生している糸状菌を分離した。このうち *Verticillium* 属菌と思われるものが北海道札幌市の土壤から19菌株、芽室町から4菌株の計23菌株が分離され、原記載との比較によってこれらすべてが *V. biguttatum* と同定された(図-1)。

2 苗立枯病の防除効果

分離された *V. biguttatum* は、ふすま、パーミキュライトおよび Czapek-Dox 液体培地を体積比で3:3:1に混合した培地で、25℃、2週間培養し接種源として用いた。*R. solani* は、エンバク粒培地で25℃、2週間培養した菌体を室温で1晩通風乾燥後、粉碎器で粉碎し、1 mm のふるいを通したものを接種に用いた。

北海道農業研究センターの2 mm のふるいを通した耕

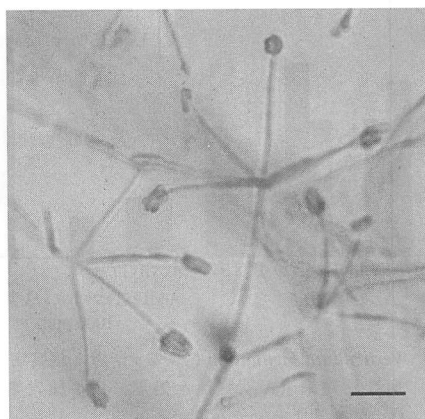


図-1 *Verticillium biguttatum* の分生子柄およびフィアライドの形態
スケールは10 μm.

Biological Control of Rhizoctonia Damping-Off and Root Rot of Sugar Beet by *Verticillium biguttatum*. By Mitsuru SAYAMA

(キーワード: 生物的防除, テンサイ, 苗立枯病, 根腐病)

* 本研究は、筆者が独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構北海道農業研究センター畑作研究部に籍時に行われた。

地土壤 (埴壤土, pH 5.5) に *R. solani* の培養菌体を 1% (v/v) の濃度で接種した後, *V. biguttatum* の分離菌株の培養菌体を 1% 濃度で接種した。これらの土壤を径 9 cm の素焼鉢にそれぞれ詰め, テンサイ種子 (品種: モノエース S) を 1 鉢当たり 13 粒播種した。1 区 3 鉢を用いて温室内で栽培し, 播種 2 週間後に苗立枯病の発生程度を調査して立枯指数を算出した。23 菌株の *V. biguttatum* の間で苗立枯病の抑制程度に差異が認められ, 無処理区に比べて苗立枯病の発生を有意に抑制したのは 18 菌株であった (図-2)。

3 根腐病の防除効果

苗立枯病に効果の高かった 2 菌株 (HV8, HV10) を用いて, 根腐病の防除試験を北海道農業研究センター内 (札幌市) の圃場で行った。*V. biguttatum* の接種源の調

製は苗立枯病の場合と同様で, 処理方法は, (1) 育苗紙筒 (ペーパーポット) に土を詰めるときに培養菌体を育苗土に 3% (v/v) 混合 (育苗土処理), (2) 移植時に培養菌体 20 ml を植穴土壤に施用 (植穴処理), (3) *R. solani* の接種前日に培養菌体 20 ml をテンサイの株元土壤に施用 (株元処理), (4) 以上の 3 処理をすべて行う (3 回処理) の 4 方法を行った。*R. solani* の接種は, エンバク粒培養菌体 10 粒をテンサイの株元土壤に処理した。試験の結果, HV8 株は, 植穴処理, 株元処理, 3 回処理で, HV10 株は, 育苗土処理, 3 回処理で無処理対照区より有意に低い発病となった (図-3)。3 回処理は, その後同様に行った試験並びに芽室町で行った試験においても安定した効果を示した (図-4)。

III *V. biguttatum* と *R. solani* の相互作用

以上のように *V. biguttatum* は, *R. solani* によるテンサイの病害を抑制するが, その機作を知ることは, より有効な菌株の探索や施用法の改善のために必要である。

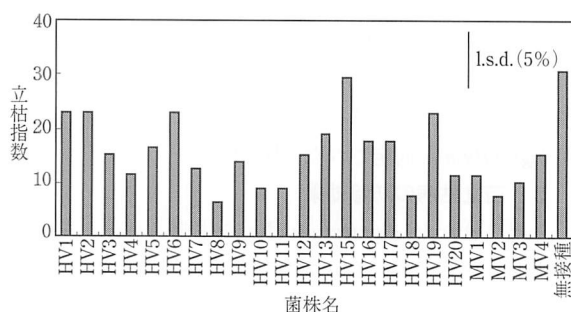


図-2 *Verticillium biguttatum* 菌株の *Rhizoctonia solani*

AG2-2 による苗立枯病に対する抑制効果

立枯指数 = $[(2A + 1B + 0.5C) / 2T] \times 100$. A は出芽前苗立枯数, B は出芽後苗立枯数, C は病徴はあるが枯死しなかった苗数, T は調査個体数。

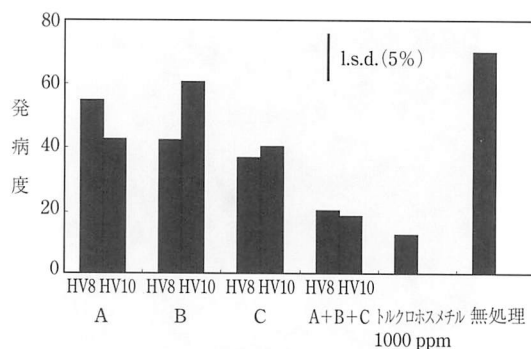


図-3 *Verticillium biguttatum* によるテンサイ根腐病の発病抑制効果 (A: 育苗土処理, B: 植穴処理, C: 株元処理)

HV8 および HV10 は, *V. biguttatum* の菌株名。トルクロホスメチル 1,000 ppm は, 薬剤対照区として, 10 a 当たり 200 l の割合で株元散布した。

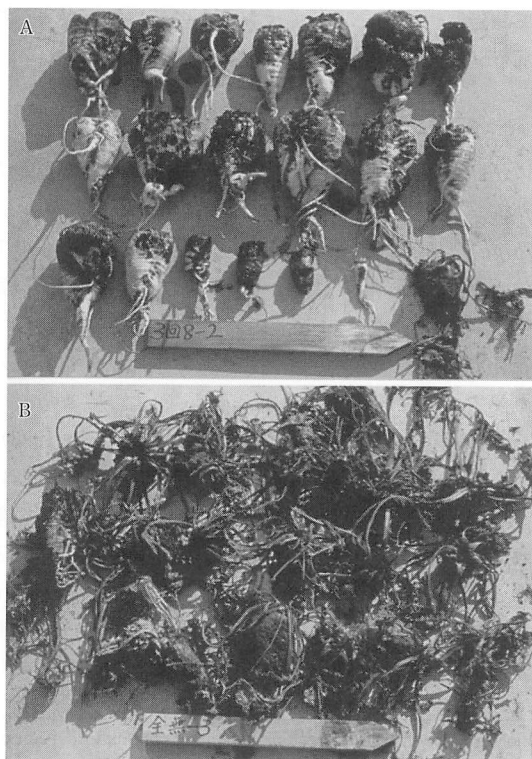


図-4 *Verticillium biguttatum* によるテンサイ根腐病の抑制効果

A: 3 回処理, B: 無処理。

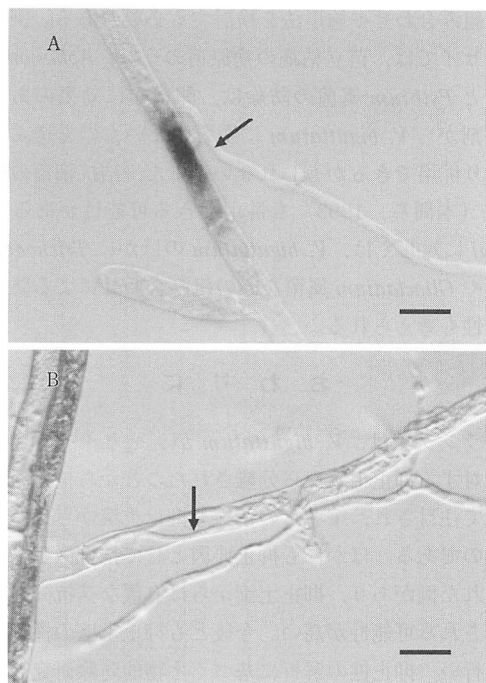


図-5 *Verticillium biguttatum* の *Rhizoctonia solani* AG2-2 に対する寄生

A : 菌糸の着生, INT 染色, スケールは 10 μ m. B : *R. solani* 菌糸内の *V. biguttatum* 菌糸, スケールは 10 μ m.

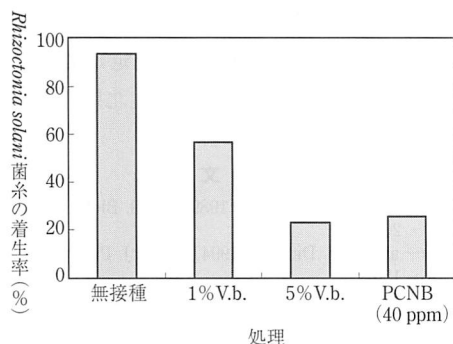


図-6 *Verticillium biguttatum* による *Rhizoctonia solani* AG2-2 のテンサイ種子への着生に対する抑制効果

V. biguttatum の発病抑制の機作として、寄生と抗菌性物質生産の関与が報告されている。BOOGERT and DEACON (1994) は *V. biguttatum* の *R. solani* に対する培地上での寄生様式を観察し、*V. biguttatum* の菌糸は、*R. solani* 菌糸の細胞壁を貫通して菌糸細胞内に侵入し、伸長することを報告している。また、*V. biguttatum* は生きた細胞

に寄生し生育することによって、コロニー全体を衰弱させ、着生部位から離れた位置の菌核の形成も抑制することができ、その影響は、菌糸融合する他のコロニーにも及ぶ。

筆者らは、素寒天上に *R. solani* を生育させ、その上に *V. biguttatum* の分生子懸濁液を塗布し相互作用を観察した。素寒天上の *V. biguttatum* の分生子は、接種翌日には発芽し、菌糸を伸ばして *R. solani* の菌糸に接近し、さらに同菌糸に沿って伸長した後、かぎ状の菌糸を形成して *R. solani* 菌糸に付着した (図-5 A)。そして、その3日後には *V. biguttatum* の菌糸が *R. solani* の菌糸細胞内に侵入している様子が観察された。*R. solani* 菌糸へのこのような着生の過程は、すべての分離菌株で確認され、また各菌株による着生程度には差異が認められなかった。また、生細胞のみに赤色色素の沈着を生ずる 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride (INT) による染色では、*V. biguttatum* が着生している *R. solani* の菌糸細胞内に高い頻度で色素の沈着がみられ、生きた *R. solani* 細胞への着生が確認された。しかし、既に侵入を受けていた *R. solani* の菌糸細胞には色素の沈着はほとんどみられず、内部は細胞質を失って空洞化していた (図-5 B)。*R. solani* を接種した土壤にテンサイの種子を埋め、数日後に回収し水洗後選択培地上に置床すると、種子に寄生した *R. solani* の菌糸が培地上に生育してくるが、*V. biguttatum* の培養菌体を土壤に混合することにより、回収した種子から *R. solani* が生育してくる割合が減少した (図-6)。このことから、*V. biguttatum* は、土壤中でも *R. solani* 菌糸の生育を抑制し、テンサイ種子への寄生を抑制していることが推察された。また、*V. biguttatum* は菌核に寄生するだけでなく、生育中の菌糸にも寄生し影響を及ぼすことができると考えられる。

一方、*V. biguttatum* は寄生のほか抗菌性物質を生産することが報告されており、生物的防除において一定の役割をもっていることが示唆されている (MORRIS et al., 1995 b)。筆者らの分離菌株も PDA などの培地上で *R. solani* と対峙培養すると、あまり大きくはないが阻止円を形成したり、*R. solani* の生育が不良になる現象が観察された。

IV 今後の課題

オランダの試験例では、ジャガイモ塊茎へのカルボキ

シメチルセルロースを助剤とした分生子の処理によって発病抑制効果が認められている。しかし、筆者らの行った試験ではテンサイ種子への分生子の処理では効果が認められておらず、培養菌体の土壌あるいは株元への処理が必要である。この違いは、一つには黒あざ病の発生には種子伝染が重要な役割を果たしているため、種子に直接処理することにより着生している菌核に影響を及ぼしやすく、発病を抑制しやすいことが考えられる。さらに、*V. biguttatum* の作物に対する定着性の差異による影響も考えられる。ジャガイモの黒あざ病に対して高い効果が認められる原因として、ジャガイモの根やストロンでの定着性の高さが指摘されているが、ジャガイモに比較して、テンサイの根では低いとされている (BOOGERT, 1989)。ジャガイモ以外では、イギリスでオオムギの stunt disease (MORRIS et al., 1993), イタリアでタバコ腰折病 (NICOLETTI and LAHOZ, 1998) で *V. biguttatum* による生物防除の報告があるが、いずれも種子処理ではなく土壌あるいは株元処理であり、効果もジャガイモの場合に比べるとやや低いようである。筆者らのテンサイ根腐病の防除試験において、3回処理で効果が安定していたのは、複数回の接種により定着性の低さを補っていたのかもしれない。

ここで紹介したテンサイへの *V. biguttatum* の利用は、慣行の化学薬剤処理法に比べて施用方法が煩雑であり、また病害抑制効果もやや劣るため、現段階での実用化は難しい。しかし、テンサイの生産においても薬剤使用量の削減が求められていることから、今後は *V. biguttatum* を含めた生物防除も活用する必要がある。*V. biguttatum* をより有効に利用するために、ほかの手法との組み合わせも検討されている。例えば、*V. biguttatum* は、10℃程度の低温では効果が劣るため、低温でも *R. solani* に対して生育を抑制する *Hormiactis fimicola* などの菌との組み合わせによって、より広範囲の環境条件で利用できる可能性が指摘されている (BOOGERT and JAGER, 1984)。また、エンバクの栽培は *R. solani* にとって好ましくない環境を作るとされ、エンバク栽培との組み合わせも利用できる可能性がある (JAGER and VELVIS, 1985)。化学薬剤との併用によるほかの病害との同時防除も検討され、卵菌類に効果はあるが *V. biguttatum* には影響の少ない薬剤あるいはほかの拮抗微生物との併用は可能とされている (BOOGERT and LUTTIKHOLT, 2004)。今後は、*V. biguttatum* を総合防除の中に組み込むことができるよう

に、組み合わせや施用法を検討する必要がある。例えばテンサイでは、苗立枯病の病原菌のうち、*Aphanomyces* 属菌と *Pythium* 属菌の防除は、卵菌類に効果のある化学薬剤から *V. biguttatum* に影響のないものを選ぶことにより併用できるかもしれない。また、拮抗細菌の種子粉衣 (本間ら, 1993) も併用できる可能性がある。*R. solani* に対しては、*V. biguttatum* のほかに *Trichoderma* 属菌や *Gliocladium* 属菌などの組み合わせによる防除の可能性も考えられる。

おわりに

オランダでは、*V. biguttatum* がジャガイモの黒あざ病に対する抑止土壌から分離されたことから拮抗微生物として注目され、筆者らの菌株も抑止土壌から分離されたものである。ほかにも抑止要因として拮抗微生物が分離された例があり、抑止土壌からは有望な拮抗微生物が分離される可能性が高い。今後とも抑止土壌の探索や誘導を行い、抑止性の解析に基づく生物防除研究も進められるべきと考える。

謝辞 *V. biguttatum* の生物防除に関する試験のご指導をたまわった竹中重仁氏 (独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構北海道農業研究センター) ならびに本間善久氏 (独立行政法人国際農林水産業研究センター) に謝意を表する。竹中氏には、本稿の校閲もたまわった。また、*Verticillium* 属菌の同定に関してご教示をいただいた、田村修氏 (元北海道立北見農業試験場生産研究部長) に謝意を表する。

引用文献

- 1) BOOGERT, P. H. J. F. van den (1989) : Soil. Biol. Biochem. 21 : 255 ~ 262.
- 2) ——— and J. W. DEACON (1994) : Eur. J. Plant Pathol. 100 : 137 ~ 156.
- 3) ——— and G. JAGER (1984) : Neth. J. Pl. Path. 90 : 117 ~ 126.
- 4) ——— and A. J. G. LUTTIKHOLT (2004) : Eur. J. Plant Pathol. 110 : 111 ~ 118.
- 5) GAMS, W. and A. van ZAAYEN (1982) : Neth. J. Pl. Path. 88 : 57 ~ 78.
- 6) 本間善久ら (1993) : 日植病報 59 : 282.
- 7) JAGER G. and H. VELVIS (1983) : Neth. J. Pl. Path. 89 : 21 ~ 29.
- 8) ——— (1985) : ibid. 91 : 49 ~ 63.
- 9) MORRIS, R. A. C. et al. (1993) : Plant Pathology 42 : 915 ~ 922.
- 10) ——— et al. (1995 a) : Mycol. Res. 99 : 997 ~ 1003.
- 11) ——— et al. (1995 b) : Phytochemistry 39 : 1043 ~ 1048.
- 12) NICOLETTI, R. and E. LAHOZ (1998) : Petria 8 : 145 ~ 150.
- 13) 佐山 充ら (2001 a) : 日植病報 67 : 12 ~ 18.
- 14) ———ら (2001 b) : 土と微生物 55 : 37 ~ 44.
- 15) VELVIS, H. and G. JAGER (1983) : Neth. J. Pl. Path. 89 : 113 ~ 123.