

バリダマイシン A の茎葉散布による トマト萎凋病防除効果のメカニズム

住友化学株式会社農業化学品研究所 石川 亮
東京農工大学大学院共生科学技術研究部 有江 つとむ

はじめに

持続的農業生産を行うに当たり、土壌伝染性病害は、その大きな制限要因の一つとなっている。*Fusarium oxysporum* による導管病は、そ菜類などの生産において深刻な被害を与える土壌病害である。病原菌が生息する土壌環境が非常に複雑なために、土壌病害を化学農薬などを用いて効果的かつ安定的に防除することは難しい。そのため、臭化メチルやクロロピクリンなどの土壌くん蒸剤で「土壌消毒」を施してから栽培を行うことが通例となっていた。しかし、これらの薬剤や処理法は周辺環境や作業者と与える影響が大きい。特に臭化メチルは、オゾン層の破壊物質であるために、その使用は厳しく制限されている (World Meteorological Organization et al., 1998)。これらのことから、土壌病害の防除のための環境負荷が少ない新規薬剤および処理法の開発が望まれている。

バリダマイシン A (以下 VMA) は、*Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* によって生産されるアミノグルコシド系の非殺菌性の農業用病害防除薬剤である (WAKAE and MATSUURA, 1975)。VMA は *Rhizoctonia solani* によるイネ紋枯病に卓効を示し、30 年以上にわたって使用されてきているが、いまだ耐性菌の報告はない。VMA の脱グルコース体であるバリドキシルアミン A (以下 VAA) は、トレハロースと化学構造が類似しており、トレハロース分解酵素であるトレハラーゼに対する拮抗的阻害剤として知られている (ASANO et al., 1987; SHIGEMOTO et al., 1989)。トレハロースは植物、藻類、昆虫、真菌、細菌等広い範囲の体内で存在が報告されており、温度変化、乾燥等から酵素類を守る重要な機能を有している (MÜLLER et al., 1995)。また、昆虫においてトレハロースは体液中で大量に見出され、「血糖」としての役割を果たしている (KONO et al., 1999)。ゴキブリやクロキンバエでは、トレハロースは飛翔のためのエネルギー源として利用されている。一方、イネ紋枯病菌においては、トレハロースは転流糖として利用されている

(SHIGEMOTO et al., 1992)。イネ紋枯病菌は、イネ体内に侵入して吸器を形成する。吸器から吸収された植物の糖は、その大部分がトレハロースに変換される。トレハロースはイネ葉鞘上の菌糸生育部位 (菌糸先端) まで菌糸内を移動し、トレハラーゼによって 2 分子のグルコースに分解され、エネルギー源として利用される。VMA は菌糸先端付近においてトレハラーゼを阻害し、*R. solani* に栄養的な枯渇をもたらすことで菌糸伸長阻害効果を発揮する。そのため、トレハロース以外の糖を転流糖として利用し得る糸状菌や、単細胞であるため転流糖を必要としない細菌などに対しては抗菌性を示さず、これらが病原である病害に対する発病抑制効果は期待できなかった。

しかし、VMA が *Ralstonia solanacearum* による土壌伝染病であるナス科植物青枯病 (ISHIKAWA et al., 1996) や、*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* によるキャベツ黒腐病 (ISHIKAWA et al., 2004)、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* によるそ菜類軟腐病 (石川, 1996) 等の細菌病に対しても発病抑制効果をもつことが見出され、既にキャベツ黒腐病などの細菌病に対する防除薬剤として登録されている。これらの事実は、これまで *R. solani* で報告されてきた以外の作用メカニズムに基づく病害抑制効果を VMA がもつことを示唆するものである。

近年、筆者らは VMA のトマト茎葉散布処理で土壌伝染性糸状菌病である萎凋病 (*Fusarium wilt*, 病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) の発病を抑制できることを見出した (図-1; 有江ら, 2000)。VMA はトマトに対して生育抑制、壊死斑形成の薬害を生じる場合があるため、トマト病害に対して使用することは現時点ではできない。しかし、トマトはゲノム解析が進行中であり、農学研究におけるモデル植物として注目されている。そこで本稿では、原著論文 ISHIKAWA et al. (2005) 中の図や表の一部を改変し、トマトを用いた VMA の新たな作用機作の解析について紹介する。

I トマト萎凋病防除効果

土壌中に病原が生息する土壌伝染病を茎葉散布で防除できれば、簡便であり、かつ環境負荷の低減も期待できる。そこで、茎葉散布型土壌病害防除資材のスクリーニングを行った。その結果、VMA と VAA の 100 μ g/ml 散

Mode of Action of Validamycin A Against Tomato Fusarium wilt by Foliar Spray. By Ryo ISHIKAWA and Tsutomu ARIE

(キーワード: バリダマイシン A, トマト萎凋病, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 全身獲得抵抗性, SAR)

布処理が、散布1週間後あるいは3週間後の接種においても80%以上の高いトマト萎凋病防除効果を示した(図-2A, B)。これらの効果は、既報の抵抗性誘導剤(プロベナゾール：以下PBZ, アシベンゾラルS-メチル：以下ASM)あるいは、萎凋病に対して生物防除活性が報告されている非病原性フザリウム菌の事前灌注処理よりも高かった。一方、VMAあるいはVAAは、散布42日後でトマトの草丈を約20%程度低くし、生育を抑制することが認められた(図-2C)。これは、他の抵抗性誘導剤散布および非病原性フザリウム菌処理でも同様であった。

トマト数品種を用いてVMAとVAAのトマト萎凋病防除効果を調べたところ、品種によって防除効果に差が認められ、またその傾向がVMAとVAAでほぼ同様であることが明らかとなった(表-1)。つまり、‘おどりこ’、‘木熟桃玉2号’等では高い防除効果を示したが、‘桃太郎’等では効果はやや低かった。これらの結果は、VMAとVAAによる萎凋病防除効果の発現に植物側要因が関与していることを示唆した。

II 作用メカニズム

1 抗菌活性

病原菌への直接的な作用の有無を調べるために、VMA, VAAが*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*の生育に与える影響を各種培地を用いて調べた。その結果、ポテトデキストロース寒天培地、素寒天、ツァペック寒天培地(完全合成培地)で糖源としてスクロース、グルコース、トレハロースを加えた培地のいずれにおいても、100 $\mu\text{g/ml}$ のVMA, VAAは菌糸伸長抑制およびその他の生育異常を引き起こさず、抗菌活性を示さなかった。イネ紋枯病菌は、素寒天およびトレハロース加用ツァペック寒天培地でVMA, VAAによって菌糸伸長が抑制されることを考え合わせると、VMA, VAAのトマト萎凋病の作用メ

カニズムはトレハラーゼ阻害ではないと考えられた。

2 サリチル酸の蓄積

VMAおよびVAAが*F. oxysporum*に対する抗菌活性をもたないことから、これらの物質が植物に、病害に対する全身抵抗性を誘導していることが示唆された。植物で誘導される全身抵抗性のうち、そのシグナル伝達経路の解析が最も進んでいるのが全身獲得抵抗性(systemic acquired resistance, SAR)である(図-3)。SARが誘導された植物組織内では、サリチル酸が蓄積される(図-3)。そこで、100 $\mu\text{g/ml}$ のVMAあるいはVAAを散布したトマト葉組織内のサリチル酸を定量した。その結果、VMA, VAA散布葉では、散布3日後からサリチル酸の蓄積が認められ、4日後にピークを迎えた。その後は比較的高濃度で維持されていた(図-4)。また、VMA,

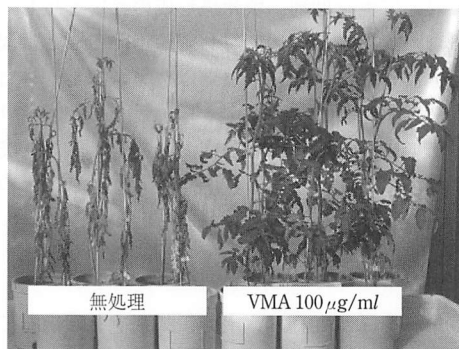


図-1 バリダマイシン A (VMA, 100 $\mu\text{g/ml}$) 茎葉散布(右)によるトマト萎凋病防除効果
トマト品種‘おどりこ’を用いた。

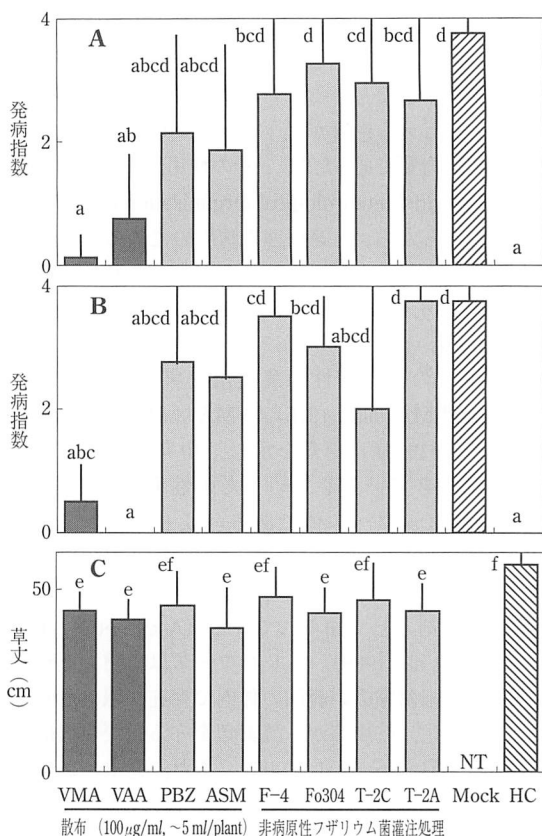


図-2 バリダマイシン A (VMA) およびバリドキシルアミン A (VAA) 茎葉散布の、トマト萎凋病発病抑制効果とトマト草丈に与える影響

A: 薬剤など処理7日後に病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*を土壌灌注接種、その28日後に各個体の発病度を0~4で評価した。発病指数はその平均値を示す。B: 処理21日後に接種。C: 処理42日後の草丈(病原菌は接種せず)。ISHIKAWA et al. (2005) 中の図を改変した。

表-1 トマト各品種におけるバリダマイシン A (VMA) とバリドキシルアミン A (VAA) の萎凋病防除効果

トマト			接種した <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> レース ^{c)}	導管褐変					
品 種	抵抗性 遺伝子 ^{a)}	購入 種子会社 ^{b)}		発病指数 ^{d)} ± SE				防除価 (％)	
				無処理 無接種	水	VMA	VAA	VMA	VAA
ボンデローザ	<i>ii-2</i>	1	2	0.0 ± 0.0	2.7 ± 1.2 b ^{e)}	0.8 ± 0.7 a	0.0 ± 0.0 a	70.4	100
桃太郎	<i>Ii-2</i>	2	2	0.0 ± 0.0	3.6 ± 0.7 b	2.3 ± 1.1 a	1.4 ± 0.7 a	36.1	61.1
おどりこ	<i>Ii-2</i>	3	2	0.0 ± 0.0	2.7 ± 1.4 b	0.0 ± 0.0 a	0.5 ± 0.8 a	100	81.5
サンロード	<i>Ii-2</i>	3	2	0.0 ± 0.0	3.2 ± 1.2 b	0.7 ± 0.7 a	0.7 ± 1.0 a	78.1	78.1
木熟桃玉 2 号	<i>II-2</i>	4	3	0.0 ± 0.0	3.3 ± 1.3 b	0.2 ± 0.4 a	0.0 ± 0.0 a	93.9	100
スクラム	<i>II-2</i>	2	3	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.6 b	0.2 ± 0.4 a	0.0 ± 0.0 a	81.8	100

^{a)} *ii-2*: 抵抗性遺伝子をもたない, *Ii-2*: 抵抗性遺伝子 *I* をもつ, *II-2*: 抵抗性遺伝子 *I* と *I-2* をもつ. ^{b)} 1: タカヤマシード, 2: タキイ種苗, 3: サカタのタネ, 4: むさし育種農場. ^{c)} トマト萎凋病菌 レース 2 は, 抵抗性遺伝子 *I-2* をもたないトマト品種に感染・発病するが, *I-2* をもつ品種には感染しない. レース 3 は供試トマト品種すべてに病原性をもつ. ^{d)} 維管束部の褐変程度を指数により調査した. 0: 褐変なし, 1: 25% が褐変, 2: 50% が褐変, 3: 75% が褐変, 4: 100% 褐変. ^{e)} 発病度欄の同一英字は Tukey の HSD テストにより, 統計的な差が認められないことを示す ($p < 0.05$).

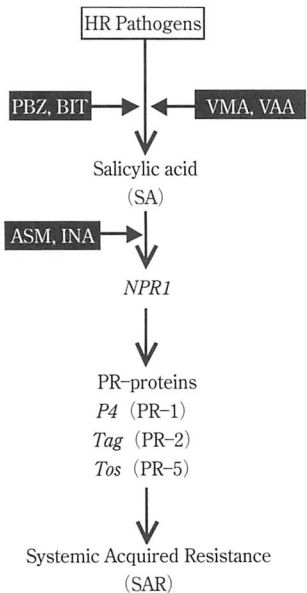


図-3 全身獲得抵抗性 (SAR) におけるシグナル伝達系
白抜き文字はプラントアクチベーターを示す. PBZ, プロベナゾール; BIT, サッカリン (PBZ の活性本体); VMA, バリダマイシン A; VAA, バリドキシルアミン A; ASM, アシベンゾラル S-メチル; NCI, N-シアノメチル-2-クロロイソニコチン酸アミド.

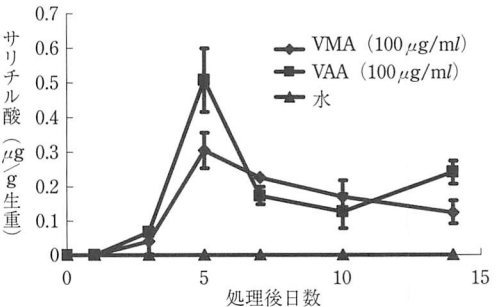


図-4 バリダマイシン A (VMA) およびバリドキシルアミン A (VAA) 散布トマト葉中のサリチル酸量の経時変化
ISHIKAWA et al. (2005) 中の図を改変した.

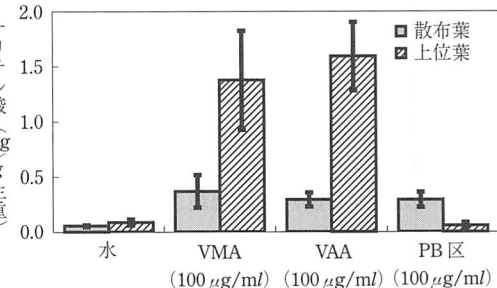


図-5 バリダマイシン A (VMA) およびバリドキシルアミン A (VAA) 散布葉および上位葉中のサリチル酸量
トマト (7.5 葉期) の第 3, 4 葉 (散布葉) に薬剤を散布し, 薬剤散布 5 日後に散布葉および第 6, 7 葉 (上位葉) をサンプリングし, 測定に供した.
ISHIKAWA et al. (2005) 中の図を改変した.

VAA では, 上位葉 (薬剤未散布) 中に散布葉よりも高濃度でサリチル酸が蓄積された。サリチル酸蓄積誘導活性が報告されている PBZ (YOSHIOKA et al., 2001 ; NAKASHITA et al., 2002) は, VMA, VAA と同様に散布葉におけるサリチル酸濃度を高めたが, 上位葉での濃度上昇は見られなかった (図-5)。これは, VMA と VAA が水溶性が高く散布葉から植物体内に吸収され, 蒸散流に

乗って上位葉へ容易に移行し、上位葉でもサリチル酸の蓄積を誘導したためと考えられた。

3 PR タンパク質遺伝子の発現

植物体における SAR 誘導の検定に、PR (pathogenesis-related) タンパク質の発現を指標として用いることができる (図-3; KESSMANN et al., 1994)。そこで、薬剤散布 7 日後のトマト茎葉部から全 RNA を抽出し、ノーザンブロッティングにより PR タンパク質遺伝子の発現誘導について調べた。その結果、100 $\mu\text{g/ml}$ VMA, VAA は SAR 誘導剤である ASM と同様に、SAR マーカー遺伝子である *P4* (PR-1), *Tag* (PR-2), *Tos* (PR-5) の発現を誘導し、VMA, VAA が SAR 誘導剤として機能することが示された。

4 トマトのその他病害に対する防除効果

SAR の特徴の一つとして、比較的広い範囲の病害に対する抵抗性を誘導することがあげられる (KESSMANN et al., 1994)。このことから、萎凋病以外のトマトの病害に対する VMA の防除効果を調査した。

まず、トマトうどんこ病 (*Oidium* spp.) に対する防除効果をハウス内で試験した。VMA 10 $\mu\text{g/ml}$ を 14 日間隔で 2 回茎葉部に散布し、最終散布 50 日後に自然感染によって発病したうどんこ病の病斑面積率を調査した。その結果、水散布区の病斑面積率が 9.4% の少発生条件の試験ではあったが、VMA は発病を完全に抑え、最終散布後も長期間にわたって高い防除効果を持続した。

次に、*Phytophthora infestans* による疫病に対する防除効果をポット試験で調べた。試験は薬剤散布 7 日後に、*P. infestans* 遊走子の懸濁液 (1 $\times 10^4$ 遊走子のう/ml) を第一葉上に 1 滴置き、20 $^{\circ}\text{C}$ 、16 時間光-8 時間暗黒、湿度 90 ~ 100% の過湿条件下で 14 日間栽培し、その間の発病を調査することで行った。接種した第一葉では、接種 5 日後には病斑が見られ、病斑上には遊走子のうが形成された。結露落下の跳ね返りなどによって、疫病は接種葉から上位葉へ緩やかに進展した。その結果、無処理の平均病斑面積率が 48 ~ 87% と試験によって振れが認められたものの、100 $\mu\text{g/ml}$ VMA, VAA 散布区では病斑面積率が 12 ~ 27% で、防除効果は 60 ~ 76% を示した。

5 薬剤処理から防除効果発現までの期間

SAR による全身抵抗性では、植物が微生物や化合物を認識してから実際に抵抗性を獲得するまでに数日のタイムラグが存在することが知られている (KESSMANN et al., 1994)。図-3 で示したように、VMA あるいは VAA の散布からサリチル酸蓄積には 3 日程度のタイムラグがある。ここでは、VMA を散布してから防除効果が発現するまでの時間について調査した。土壌伝染病であるトマト萎凋病の試験系では、病原菌を土壌に灌注接種して

から病徴の発現まで 3 ~ 4 週間を要し、実際の感染時期の特定が困難である。そこで、接種から病徴発現までの期間が短く、感染時期の推定が比較的容易なうどんこ病を対象に実験を行った。薬剤散布時期をずらしたトマトを準備し、これらにうどんこ病菌分生子を同時に接種することで防除効果を調べた。その結果、VMA の 100 $\mu\text{g/ml}$ 茎葉散布 1 ~ 3 日後に接種した場合は防除効果がほとんど見られなかったのに対し、散布 4 日後以降に接種した場合は 90% 以上の高い防除効果を示した (表-2)。以上の結果から、VMA 茎葉散布での防除効果発現には 4 日程度の時間が必要であることが明らかとなり、サリチル酸蓄積の誘導までの期間が 3 日であることと矛盾しなかった。

お わ り に

植物に病害に対する抵抗性を誘導することで、発病を抑制する薬剤が最近注目を集めている (RYALS et al., 1996; OOSTENDORP et al., 2001)。このような作用機構をもつ薬剤を、プラントアクチベーター (plant activator) と呼ぶ。プラントアクチベーターは、① *in vitro* で病原菌に対する直接的抗菌性を示さないにもかかわらず発病抑制効果を示す、②薬剤を処理してから植物が病害に対して抵抗性を獲得するまでにタイムラグが存在する、③効果が長期間維持される、④広範囲の病害に対して効果を示すといった特徴をもつ (KESSMANN et al., 1994)。プラントアクチベーターのうち、情報伝達物質であるサリチル酸の蓄積を誘導して酸性 PR タンパク質の発現を誘導するものは SAR の活性化を機作すると考えられる

表-2 バリダマイシン A (VMA) 茎葉散布によるトマトうどんこ病防除効果発現までの時間

	散布後接種 までの日数	病斑面積率 (%)	防除価
無処理		84.2 b	—
VMA (100 $\mu\text{g/ml}$)	7	3.4 a	96.0
	5	6.3 a	92.5
	4	3.8 a	95.4
	3	51.5 b	38.8
	2	54.3 b	35.5
	1	70.0 b	16.8
トレハロース (100 $\mu\text{g/ml}$)	7	56.5 b	32.9
	5	77.3 b	8.1
	2	70.2 b	16.6
	1	77.9 b	7.5

調査は第 1 葉 ~ 第 5 葉の病斑面積率を調査した。1 区 4 植物を用いた。表の値は 2 回の試験の平均値を表す。病斑面積率欄の同一英字は Tukey の HSD テストにより、有意差が認められないことを示す ($p < 0.05$)。

(STICHER et al., 1997, 図-3)。VMA および VAA はこれらの特徴を満たしていることから、SAR を誘導するプラントアクチベーターであることが明らかとなった。

しかし、本研究におけるサリチル酸蓄積および PR タンパク質遺伝子発現誘導は VMA を散布したトマト茎葉における観察結果であり、トマト萎凋病菌のような土壌病原菌に対しては SAR と異なる抵抗性誘導シグナル伝達経路が関与している可能性は否定できない。そのため、VMA を茎葉散布処理したトマト根からのサリチル酸および PR タンパク質遺伝子の定量、検出を現在試みている。また、VMA を処理したトマトの根における病原菌の侵入阻害様式の可視化も試みている。

VMA および VAA はトレハラーゼを阻害し、生体内にトレハロースを蓄積させる (SHIGEMOTO et al., 1992)。トレハロースの高濃度での蓄積は、植物や病原菌などの生育に影響を与えることが報告されている (GODDUN et al., 1997; EASTMOND and GRAHAM 2003; SCHLUEPMANN et al., 2003)。VMA が *X. campestris* pv. *campestris* の細胞外多糖質 (EPS) の量を減少させ、その EPS の病原性も減少させるのはその一例であると考えられる (ISHIKAWA et al., 2004)。一方、トレハロースの茎葉散布によってコムギうどんこ病の発病を抑制できることが報告されており、その機作は全身抵抗性の誘導であると考えられている (REIGNANT et al., 2001)。したがって、VMA あるいは VAA を茎葉散布したトマト組織中でトレハロースが蓄積し、間接的に全身抵抗性が誘導された可能性も想定された。しかし、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トレハロースの茎葉散布はトマト萎凋病、うどんこ病 (表-2)、疫病の発病抑制を示さなかった。

以上のように、本研究では、VMA がトレハラーゼ阻害に基づく抗菌活性とは別の新たな作用機作を有することを示すとともに、土壤中に病原が生息する土壌伝染病を茎葉散布で防除するという新たな施用法を提示した。

本研究を行うに当たり、菌株を分譲いただいた細淵勇治氏 (サカタのタネ)、諏訪澄長博士 (群馬県蚕業試験場)、雨宮良幹教授 (千葉大)、渡邊健博士 (茨城県農業総合センター)、共同研究者である山口勇博士、仲下英雄博士、本山高幸博士、Han-Young LEE 博士 (以上、理研)、寺岡 徹教授、白水健太郎氏 (東京農工大)、旧武田薬品農業科学研究所員に御礼申し上げる。また、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費基盤研究 B の補助金 (有江) によって行われた。

引用文献

- 1) 有江 力ら (2000): 日植病報 66: 276 (講要)。
- 2) ASANO, N. et al. (1987): J. Antibiotics 40: 526 ~ 532.
- 3) EASTMOND, P. J. and I. A. GRAHAM (2003): Current Opinion in Plant Biology 6: 231 ~ 235.
- 4) GODDUN, O. J. M. et al. (1997): Plant Physiology 113: 181 ~ 190.
- 5) 石川 亮 (1996): 植物防疫 50: 24 ~ 27.
- 6) ISHIKAWA, R. et al. (1996): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62: 478 ~ 482.
- 7) ——— et al. (2004): J. Pestic. Sci. 29: 209 ~ 213.
- 8) ——— et al. (2005): Phytopathology 95: 1209 ~ 1216.
- 9) KESSMANN, H. et al. (1994): Annu. Rev. Phytopathol. 32: 439 ~ 459.
- 10) KONO, Y. et al. (1999): Entomological Science 2: 449 ~ 456.
- 11) MÜLLER, J. et al. (1995): Plant Science 112: 1 ~ 9.
- 12) NAKASHITA, H. et al. (2002): Physiol. Mol. Plant Pathol. 61: 197 ~ 203.
- 13) OOSTENDORP, M. et al. (2001): Euro. J. Plant Pathol. 107: 19 ~ 28.
- 14) RYALS, J. A. et al. (1996): Plant Cell 8: 1809 ~ 1819.
- 15) SCHLUEPMANN, H. et al. (2003): PNAS 100: 6849 ~ 6854.
- 16) SHIGEMOTO, R. et al. (1989): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 55: 238 ~ 241.
- 17) ——— et al. (1992): ibid. 58: 685 ~ 690.
- 18) STICHER, L. et al. (1997): Annu. Rev. Phytopathol. 35: 235 ~ 270.
- 19) WAKAE, O. and K. MATSUURA (1975): Rev. Plant Protec. Res. 8: 81 ~ 92.
- 20) World Meteorological Organization with National Oceanic and Atmospheric Administration, National Aeronautics and Space Administration, United Nations Environment Program, and the European Commission (1998): Scientific assessment of ozone depletion, World meteorological organization global ozone research and monitoring project-report 44.
- 21) YOSHIOKA, K. et al. (2001): Plant J. 25: 149 ~ 158.

新しく登録された農薬 18 ページより

●チアクロプリド・フィプロニル・チアジニル粒剤
21661: ブイゲットプリンスバリアード L 粒剤 (日本農業)
2006/3/22
チアクロプリド: 1.0%, フィプロニル: 1.0%, チアジニル: 6.0%
稲 (箱育苗): いもち病, イネミズゾウムシ, イネドロオウムシ, ウンカ類, ツマグロヨコバイ, コブノメイガ, ニカメイチュウ, イナゴ類: 育苗箱中の苗の上から均一に散布する。

「除草剤」

●グリホサートイソプロピルアミン塩・ピラフルフェンエチル水和剤
21656: サンダーボルト 007AL (日本農業) 2006/3/8
グリホサートイソプロピルアミン塩: 1.2%, ピラフルフェンエチル: 0.01%
樹木等 (宅地, 駐車場, 道路等): 一年生及び多年生雑草 (スギナを除く)
●DCBN 粒剤
21660: GF ベンポール粒剤: (住化タケダ園芸) 2006/3/8
DCBN: 4.0%
日本芝: ヒメクゲ, スギナ, 畑地多年生広葉雑草, 畑地一年生広葉雑草, 畑地一年生雑草, 樹木等 (家の周り): スギナ