

報 文

拮抗能を持つ放線菌を利用した
フザリウム病害の抑制
第1報：拮抗菌のスクリーニング高木 滋樹¹・北村 章¹・丸本 卓哉²¹フマキラー株式会社 (〒739-04 広島県佐伯郡大野町梅原 1-11-13)²山口大学農学部 (〒753 山口市吉田 1677-1)Control of Fusarium Disease Using Antagonistic Actinomycetes
I. Screening of Antagonistic Actinomycetes to *Fusarium oxysporum*Shigeki TAKAKI¹, Akira KITAMURA¹ and Takuya MARUMOTO²¹Fumakilla Ltd., 1-11-13 Umehara, Ohno, Hiroshima, 739-04 Japan²Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, 753 Japan

Antagonistic Actinomycetes to *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* and f. sp. *raphani* were screened for the control of Fusarium Disease.

1. Thirteen Actinomycetes which showed a high antagonistic activity to *F. oxysporum* were selected by 1st and 2nd screenings. No harmful effects on the germination and growth of radish was observed.
2. Five Actinomycetes selected from the 13 Actinomycetes suppressed the infection of radish yellows compared with untreated control.
3. The five Actinomycetes were identified as *Streptomyces achromogenes*, *S. phaeopurpureus*, *S. hygrosopicus*, *S. nitrosporeus* and *S. baarmensis*.
4. Antagonistic activity of Actinomycetes to *F. oxysporum* f. sp. *raphani* in laboratory experiments using petri dishes did not always coincide with the suppressive effect of Actinomycetes on radish yellows in soil infected with *F. oxysporum* f. sp. *raphani*.
5. These Actinomycetes showed an antagonistic activity to 7 strains of *F. oxysporum*. These antagonistic activities varied depending on the combination Actinomycetes and *F. oxysporum* used. The growth of the Actinomycetes selected by these screenings was different in media of pHs ranging from 5 to 8.

Key Words: antagonistic actinomycetes, *Fusarium oxysporum*, organic material, radish yellows

序 言

土壤病害の生態的防除は大きく分けて次の二つの方法が挙げられる。一つは輪作、深耕等による耕種的防除法であり、もう一つは堆肥等を含む有機物の施用と拮抗菌の導入による生物的防除法である。

生物的防除法の中で、有機物の施用技術及び有

機物の施用が土壤中の病原菌及び土壤微生物相に与える影響に関して多くの研究^{1,2)}が行われている。しかし、土壤病害と有機物施用の関連性については未だ明確な解答が得られていないのが現状である。その中でキチンはフザリウム病害に対して抑制的に働く有機物として防除例が報告されている³⁾。その作用機作については明確ではないが、キチンを土壤に施用すると土壤内の放線菌相が活性化し、この放線菌相のキチナーゼ活性が病害抑制に関与していると推察されている⁴⁾。

一方、土壌病原菌に対する拮抗菌を利用して土壌病害を防除しようとする試みも、現在盛んに行われている²⁾。

拮抗菌を用いた生物防除が成功するには、添加した拮抗菌が貧栄養条件下の土壌で定着して抗菌物質を生産すること、また抗菌物質の土壌への吸着や他の微生物による分解が少ないことなどが必要である³⁾。拮抗菌や抗菌物質の病害防除への実際的な利用については未解決な点が多いが、本間らの *Pseudomonas cepacia* の Pyrrolnitrin 生産株と非生産株の比較によるダイコン苗立枯病の抑制機構に関する研究⁴⁾や木嶋らによるニラとの混植と *Pseudomonas gladioli* 接種によるユウガオつる割病の防除試験⁵⁾は、拮抗菌の生産する抗菌物質が発病抑制に関与している可能性を示している。

本研究の目的は、病原性フザリウム菌による作物病害を土壌から分離した拮抗能を有する放線菌を利用して生物防除することである。そのためには、まず *Fusarium oxysporum* に対して抗菌活性を示す放線菌の検索、続いて、拮抗菌を土壌内で定着、活動させるための有機物の検討やそれらを用いた拮抗微生物資材の調製及び現地圃場での施用効果等数多くの試験が必要である。

まず、本報では、*F. oxysporum* に対する拮抗放線菌のスクリーニングについて報告する。

実験方法

1. 拮抗能を持つ放線菌のスクリーニング

広島県内の畑土壌と森林土壌より分離された放線菌について、*F. oxysporum* に対する抗菌活性(一次スクリーニング、二次スクリーニング)を持ち、植物の発芽と生育に対して悪影響を及ぼさず、かつダイコン萎黄病に対して抑制効果を持つ拮抗菌のスクリーニングを行った。

1) 一次スクリーニング

広島県内120箇所の圃場及び森林土壌より1,380株の放線菌をアルブミン寒天培地とデンブ寒天培地、グルコースブイオン寒天培地を用いて分離した。この分離された菌株から *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* IFO 6531 株に拮抗する菌を一次スクリーニングした。ペトリ皿中のグルコースブイオン寒天培地の周辺部8箇所に、中央を除いて放射線状にそれぞれの分離菌を白金耳で接種して1週間培養後、あらかじめPDA培地上に生育した *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* 菌叢を5mm径の

コルクボーラーで打ち抜き、放線菌が生育したペトリ皿中の培地中央に置いた。そして、*F. oxysporum* f. sp. *licopersici* の菌糸が培地全面に広がるまで培養した。形成された阻止帯の幅が1~5mmの場合+、5~10mmの場合++、10mm以上の場合+++として抗菌活性を評価した。

2) 二次スクリーニング

一次スクリーニングにおいて抗菌活性が認められた菌株について、検定菌として2種類の *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* を用いて抗菌活性を再度測定し、二次スクリーニングとした。

検定菌は *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* IFO 6531 株及び岡山県で採取されたダイコン萎黄病罹病ダイコンより分離した病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* である。

拮抗菌を5日間培養したグルコースブイオン液体培地に乾熱滅菌した濾紙(80mm×10mm、東洋濾紙5A)を浸漬した後、グルコースブイオン寒天培地上で7日間培養を行い、濾紙上に拮抗菌を生育させた。次に、検定菌を培養した麦芽エキス液体培地0.1mlとPDA培地20mlをペトリ皿中で混合し、拮抗菌が生育した濾紙をペトリ皿中央に置き、25°Cで5日間培養を行った。濾紙周辺部の阻止帯の長さを抗菌活性とした(Fig. 1)。

3) 選抜菌がダイコン種子の発芽と生育に及ぼす影響

抗菌活性が確認された菌株について、ダイコン

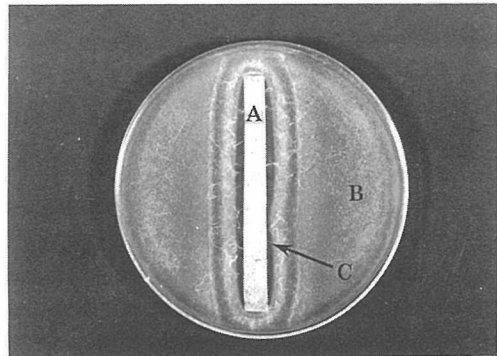


Fig. 1 Growth of *Fusarium oxysporum* with antagonistic Actinomycetes on PDA agar
A: *Streptomyces achromogenes* subsp. *rubradivis* (15-1-2)
B: *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* isolated in Hiroshima)
C: Inhibition area

種子の発芽と生育に与える影響を調査した。直径 30 mm, 長さ 200 mm の試験管に, 殺菌した 1.5 % 寒天 20 ml を入れ, グルコースブイヨン液体培地で 5 日間培養した各菌株の培養液 0.5 ml を添加した。菌が生育後, 70 % エタノールに浸漬したのち滅菌水で洗浄したダイコン種子 (タキイ種苗, 耐病総取り, 以下同じものを使用) を播種し, 25°C で 2 週間培養を行った。ダイコンの発芽及び生育に対する選抜菌株の影響を菌株無添加の素寒天上のダイコン種子の発芽, 生育と比較し, ダイコンの発芽と生育に悪影響を及ぼさない菌株を選抜した。

4) 発病抑制効果

F. oxysporum に対する抗菌活性とダイコン発芽生育試験によって選抜された菌株について, ダイコン萎黄病に対する抑制効果を発病土壌を用い検討した。

ポットに詰め殺菌土壌に二次スクリーニングで使用した岡山県の萎黄病罹病ダイコンより分離し, フスマ培養した *F. oxysporum* f. sp. *raphani* を添加してダイコンを連作した。発病したダイコンの根部を土壌と混和して, ダイコン萎黄病の発病土を作成した。この発病土と殺菌した土壌を 1 : 5 の比率で混合し, a/5,000 ワグネルポットに詰め供試土壌とした。使用した土壌は広島県大野町の砂壤土で, pH (H₂O) : 6.80, 全窒素 : 0.169 %, 有機態炭素 : 2.036 % であった。この時の *F. oxysporum* 密度は 2.82×10^3 CFU/g 乾土であった。供試土壌にグルコースブイヨン液体培地で培養した各菌株の培養液をポットあたり 50 ml 混合し, 1 週間後にダイコン種子をポットあたり 12 粒播種した。播種後 2 週間目に 3 株残して間引きを行い, 播種 4 週間後に収穫した。発病程度は, 間引き時及び収穫時にダイコン根部を切断し, 導管部の褐変の割合により判断した。枯死を +++, 明確に褐変しているものを ++, 不明瞭ではあるが褐変が認められるものを + として評価し, 発病度と防除価を以下の式を使って算出した。

$$\text{発病度} = \{ (+++ \text{株数} \times 3) + (++ \text{株数} \times 2) + (+ \text{株数} \times 1) \} / (\text{調査株数} \times 3) \times 100$$

$$\text{防除価} (\%) = (\text{無処理区発病度} - \text{菌株処理区発病度}) / (\text{無処理区発病度}) \times 100$$

なお, 実験は 1 区 3 ポット合計 9 植物個体で行い, 全平均値を算出した。

2. 選抜菌株の性質

実験 1. によって選抜された拮抗菌についてその性質を調査した。

1) 選抜菌株の同定

選抜された菌株について放線菌の同定実験法⁹⁾及び Bergie's manual⁹⁾に従い, 各培地上での生育及び形態, 細胞壁組成, 色素の生産, 及び生理学的性質により同定を行った。

生理学的性質として, ゼラチンの液化, デンプンの加水分解, ミルクの凝固, メラニン色素の生成, 及び糖の同化 (アラビノース, キシロース, グルコース, フラクトース, シュクロース, イノシトール, ラムノース, ラフィノース, マンニット) について調査した。

2) 各種 *F. oxysporum* に対する抗菌活性

F. oxysporum f. sp. *licopersici* IFO 6351 株, ダイコン萎黄病菌 4 種 (広島県で分離された菌株 1 株, 岡山県で分離された菌株 1 株, 住友化学㈱により分譲された菌株 2 株) 及び高知大学より分譲されたキュウリつる割病菌 2 株, 計 7 種類の *F. oxysporum* に対する抗菌活性を調査した。方法は二次スクリーニングと同様である。この時, 培地上の *F. oxysporum* の菌糸の状況を顕微鏡で観察した。

3) pH による拮抗菌の生育と抗菌活性

各菌株を pH 5 ~ 8 に調製したグルコースブイヨン寒天培地に植菌し, 生育を観察した。生育した菌株については一次スクリーニングと同様に *F. oxysporum* のアガーピースを培地上に置き, 抗菌活性の調査を行った。被検菌として岡山県から分離されたダイコン萎黄病 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* を使用した。

結果及び考察

1. 拮抗能を持つ放線菌のスクリーニング

一次スクリーニングにおいて 1,380 株中 98 株 (7.1 %) の拮抗能を持つ放線菌が得られた (Table 1)。このうち, 二次スクリーニングにおいて, 33 菌株の拮抗放線菌が得られた。これらの菌株のうち, ダイコン種子の発芽率と発芽後の生育が菌を添加しても変代しなかった菌株として 13 株が選抜された。

選抜された 13 株についてダイコン萎黄病に対する発病抑制効果を発病土を用いて調査した結果, Table 2 に示すように, 分離 No. 15-1-2, 15-1-4, 66-1-1, 67-1-4, 83-2-3 の 5 株について発病抑

Table 1 Isolation of antagonistic Actinomycetes in the first screening

	Antagonistic activity			Antagonistic strains	Total
	+++	++	+		
Number	13	75	10	98	1,380
Percentage	0.9	5.4	0.7	7.1	100

Table 2 Control of radish yellows by selected antagonistic Actinomycetes in the experiment using infected soil

Number	Degree of infection	Suppression (%)
No treatment	66.7± 6.4*	—
15-1-2	59.3± 6.4	11.1
15-1-4	37.0±17.0	44.5
66-1-1	55.6±19.2	16.7
67-1-4	51.9± 6.4	22.2
83-2-3	37.0±17.0	44.5

*S.D.

制効果が確認された。しかし、これらの菌株の発病抑制効果はいずれの菌株もあまり大きくなかった。

2. 選抜菌株の性質

1) 選抜菌株の同定

いずれの菌株も細胞壁に LL-DAP (LL-ジアミノピメリン酸) を含むため *Streptomyces* 属に属すると推定された。15-1-2 株は菌叢は灰色でメラニン色素を生産し、胞子鎖は螺旋状で表面は滑らかである。糖の同化性はイノシトール、ラフィノース以外で認められた。15-1-4 株は菌叢が灰色、メラニン色素を生産し、胞子鎖は直状で表面は滑らかである。デンプンの水解活性がなく、シュクロース以外の糖に同化性を有した。66-1-1 株は菌叢が灰色でメラニン色素及び拡散色素の生産がなく胞子鎖は螺旋状で表面は滑らかである。すべての糖に同化作用を有し、コロニー表面に水滴を作るという特長があった。67-1-4 株は菌叢が灰色でメラニン色素を生産せず、胞子鎖が曲状で表面は滑らかである。ゼラチン、デンプンの水解活性、ミルクの凝固活性がありシュクロース、イノシトール、ラフィノースについては弱い全ての糖を同化した。83-2-3 株は菌叢が白色でメラニン色素の生産がなく、胞子鎖は曲状で表面は滑らかである。

デンプンの水解活性がなく、ゼラチンの液化、ミルクの凝固活性が認められ、全ての糖を同化した。

以上の結果から、選抜された放線菌 5 株は以下のように同定された。

15-1-2 *Streptomyces achromogenes* subsp. *rubradiris*

15-1-4 *Streptomyces phaeopurpureus*

66-1-1 *Streptomyces hygrosopicus*

67-1-4 *Streptomyces nitrosporeus*

83-2-3 *Streptomyces baarnensis*

これらの菌株のうち *S. hygrosopicus* はクリ、ナシ、クワ等の白紋羽病を抑制するとの報告がある¹⁰⁾。また、Bergie's manual¹⁰⁾によると抗生物質として *S. achromogenes* subsp. *rubradiris* は rubradirin を、*S. hygrosopicus* は angustmycin, glebomycin 及び hygromycin を、*S. nitrosporeus* は nitrosporin を生産することが報告されている。しかし、*F. oxysporum* による病害の抑制に関しては、いずれの菌株についても報告されていない。また、いずれの菌株も人体及び植物に対する病原性の報告はない。

2) 各種 *F. oxysporum* に対する抗菌活性

選抜された放線菌 5 株について *F. oxysporum* に対する抗菌活性を IFO 6531 株、ダイコン萎黄病菌 4 株及びキュウリつる割病菌 2 株を検定菌として測定した。

選抜した 5 菌株は個々の検定菌に対して抗菌活性に差が認められたが、5 菌株ともいずれの *F. oxysporum* に対しても抗菌活性を示した (Table 3)。

66-1-1 株において、放線菌の菌糸が *F. oxysporum* の菌糸にからみついて阻止帯を形成している状況が観察された (Fig. 2)。67-1-4、83-2-3 株でも同様の状況が観察された。

拮抗菌の抗菌活性 (Table 3) とダイコン萎黄病抑制効果 (Table 2) を比較した場合、培地上での拮抗能の高い 15-1-2 株の発病抑制効果は低いなど、培地上での抗菌活性の大きさは発病土壌を用いた場合の発病抑制効果と必ずしも一致しなかった。しかし、菌株の土壌への定着等の条件の改善により発病抑制効果を高め得るのではないかと推察された。

3) pH による拮抗菌の生育と抗菌活性

83-2-3 株以外の 4 菌株は pH 5、もしくは pH 8 では生育せず、pH 7 で生育を示し、抗菌活性を有した。83-2-3 株においては pH 6~pH 8 で生育を

示し、pH 7 において最も生育が良好であった。しかし pH 6 ~ pH 8 では、抗菌活性の差は観察されなかった。

ここで選抜された拮抗放線菌は pH 中性付近でその活性が高かった。しかしながら、現実の圃場は常に中性付近であるとは限らず、中性以外の土壌でその拮抗能が制約されるかもしれない。これら放線菌の拮抗能を発揮させるためには、複数菌株

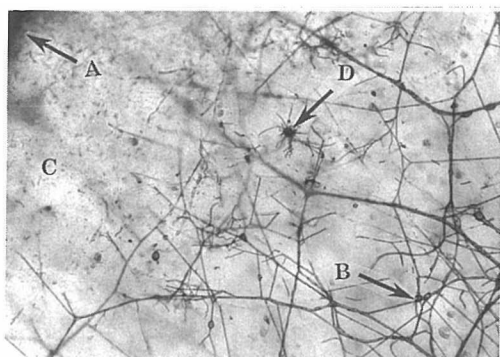


Fig. 2 Growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* with an antagonistic Actinomycetes on PDA agar ($\times 600$)

- A: *Streptomyces hygrosopicus*
 B: *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* isolated in Hiroshima)
 C: Inhibition area of *Fusarium oxysporum*
 D: *Fusarium* hyphae coiled by Actinomycetes hyphae

の組み合わせや圃場への施用法などに工夫が必要であると思われる。また、シャーレ培養実験で得られた放線菌の抗菌活性と発病土壌を用いて行った発病抑制効果は認ずしも一致せず、その効果も大きくなかったことから、放線菌の生育と拮抗能を高めるために有効な有機物の選抜と菌株との組み合わせなどの検討が必要である推察された。

第 2 報においては、有機物が土壤微生物相に与える影響について検討し、拮抗菌を定着、活動させるのに適した有機物の選抜と拮抗放線菌を組み合わせた時の効果について報告する。

要 旨

Fusarium oxysporum に抗菌活性を有する拮抗菌の選択を行った。

- 1) 培地上での抗菌活性が大きく、ダイコンの発芽と生育に悪影響を与えない菌株として 13 株の拮抗放線菌が選抜された。
- 2) 13 株のうちダイコン萎黄病に対する発病抑制効果を持つものは 5 株であった。
- 3) これらの菌株はそれぞれ *Streptomyces achromogenes*, *S. phaeopurpureus*, *S. hygrosopicus*, *S. nitrosporeus*, *S. baarnensis* と同定された。
- 4) これらの菌株は、異なる抗菌活性を示したが、いずれの菌株も培地上で 7 種類の *F. oxysporum* に対する抗菌活性を有していた。また、いずれも pH 中性付近でその生育が良かった。
- 5) シャーレ培養実験で得られた拮抗能を持つ放線菌の抗菌活性と発病土壌を用いた発病抑制効果

Table 3 Antifungal activity to selected Actinomycetes of *Fusarium oxysporum*

Antagonist	Pathgen						
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ¹⁾	<i>F.o. f. sp.</i> <i>raphani</i> ²⁾	<i>F. o. f. sp.</i> <i>raphani</i> ³⁾	<i>F. o. f. sp.</i> <i>raphani</i> ⁴⁾	<i>F.o. f. sp.</i> <i>raphani</i> ⁵⁾	<i>F.o. f. sp.</i> <i>cucumerinum</i> ⁶⁾	<i>F. o. f. sp.</i> <i>cucumerinum</i> ⁷⁾
15-1-2	13 ⁸⁾	8	13	12	20	15	12
15-1-4	15	12	10	14	17	12	12
66-1-1	6	6	6	6	6	6	6
67-1-4	7	6	15	6	6	6	6
83-2-3	7	7	6	6	7	7	7

1 : IFT 6531

2 : Isolated in Hiroshima

3 : Isolated in Okayama (used as infection source of radish yellows)

4, 5 : Provided by Sumitomo Chemical Ltd.

6, 7 : Provided by Kochi Univ.

8 : Inhibition zone (mm)

とは必ずしも一致しなかった。

謝 辞

本研究において終始ご指導を頂いた京都大学小林達治博士、元高知大学小倉寛典博士及び菌株の同定を行って頂いた住友化学株式会社宝塚総合研究所生命工学研究室の方々に深く感謝の意を表します。

なお、本報告の一部は有機質肥料生物活性利用技術研究組合での研究として行ったものであり、関係各位に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 松田 明 (1981) 土壤伝染病の生態的防除手段としての輪作と有機物施用, 植物防疫, **35**, 108-114
- 2) 松尾卓見ら (1980) 作物のフザリウム病, 338-358, 全国農村教育協会, 東京
- 3) 駒田 且 (1971) 土壤病害の生物的防除法の現状と問題点, 農業及び園芸, **46**, 1137-1142
- 4) MITCHELL, R. and ALEXANDER, M. (1962) Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **26**, 556-558
- 5) 洪 春洋・上山昭則 (1976) 土壤病害の微生物生態学的防除, 農業及び園芸, **51**, 729-734
- 6) 本間善久 (1990) ダイコン苗立枯病を抑制する *Pseudomonas cepacia* の拮抗機構, 植物防疫, **44**, 442-445
- 7) 木嶋利夫・有江 力・木村 栄・峰岸長利・手塚 紳浩・橋田弘一・福田 充 (1988) 抗菌微生物の利用に関する研究, 栃木農試研報, **35**, 95-128
- 8) 日本放線菌学会編 (1985) 放線菌の同定法, 5-196, 日本学会事務センター, 東京
- 9) BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N. E. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th Ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore
- 10) 鈴木孝仁 (1986) 微生物による土壤病害の制御, 研究ジャーナル, **9**, 17-21