

非病原性 *Fusarium* 属菌によるキュウリ灰色かび病の発病抑制

角田 巖*・中野 学**・近藤 篤***・日野 耕作****・湯浅 和宏

Control of Cucumber Gray Mold Caused by Non-pathogenic Fungi of the Genus *Fusarium*

Iwao KAKUDA, Manabu NAKANO, Atsushi KONDOU, Kousaku HINO and Kazuhiro YUASA

1. 緒 言

食品の安全性に対する消費者の強い危惧に対応した安全な農産物の生産、農業の環境負荷軽減が農政上の重要な課題となり、化学農薬への依存を可能な限り抑えた病害虫防除法の開発に対する期待が大きい。

このような中、野菜においても拮抗菌を利用した防除法が開発されている。本県内の生産現場でも、キュウリ灰色かび病の耕種的防除として、栽培施設内地表面に米ぬかを散布し、発病が少なくなる傾向がみられている。1998年、生産農家から、さらに効果的な方法を検討するよう要望があり、効果の確認、作用機作解明のための調査を実施した。その結果、ほ場観察において、*Fusarium*属菌の関与が推察され(図1)、この菌を利用した生物的防除の可能性を検討したので報告する。

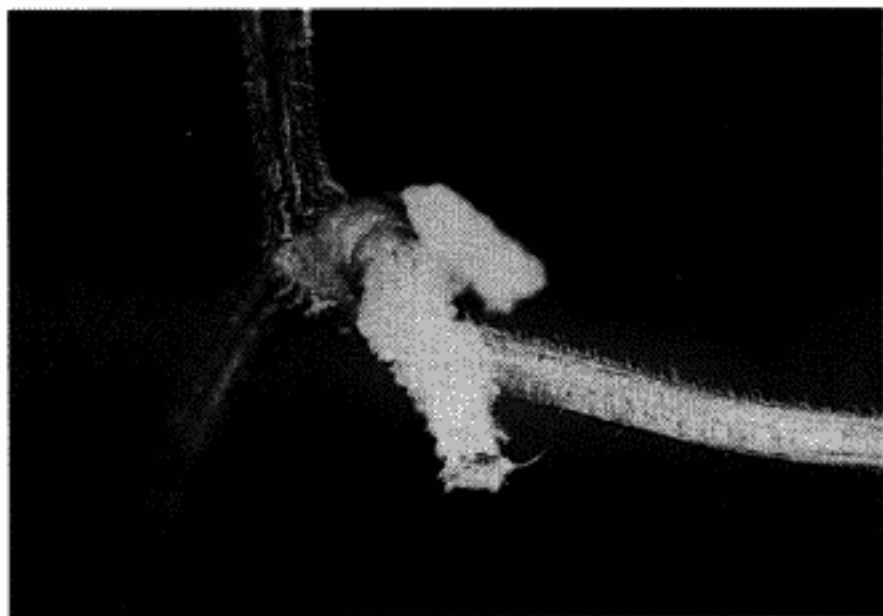


図1 キュウリの収穫後、果梗に認められる *Fusarium*属菌体。

2. 材料および方法

2. 1 *Fusarium*属供試菌の採取

滋賀県八日市市内のキュウリ生産農家で、米ぬかを

地表面に散布する栽培管理が実施されており、その4農家から花卉、果梗、葉柄および土壌(米ぬかを含む)を採取し、*Fusarium*属菌を分離するとともに、同施設のうね上に駒田培地を流し込んだシャーレを24時間暴露して、空気中からも*Fusarium*属菌を採取した。

2. 2 キュウリ灰色かび病菌に対する *Fusarium*属菌の抗菌反応

2. 2. 1 *Fusarium*属菌と灰色かび病菌の供試菌体の調製

2. 1の*Fusarium*属菌はP S液体培地で暗黒条件下30℃、7日間振とうし、振とう培養菌体を二重のペーパータオルで濾過して(以下、「懸濁培養液」)供試した。

一方、検定に用いた灰色かび病菌は、場内で発病したキュウリ果実から分離した菌をPDA培地で暗黒条件下23℃、4日間培養し、菌叢の先端部付近を直径5mmのコルクボーラーで打ち抜いて供試した。

2. 2. 2 トマト小葉における抗菌効果の判定

〔試験I-1〕懸濁培養液の抗菌効果の判定

場内の施設から採取したトマト葉を小葉が2枚連なるように切り取り、蒸留水で洗浄し、水滴をペーパータオルで拭き取り、給水したペーパータオルを敷いた蓋付のプラスチックケースの底に置床した。処理は3反復とした。次に、一方の小葉に分生孢子濃度約 $1 \times 10^6 \sim 10^7$ 個/mLの*Fusarium*属菌懸濁培養液を50 μ L滴下し、その上にキュウリ灰色かび病菌のPDA切片を菌叢面を下にして置床した。対照として、他方の小葉に滅菌水を50 μ L滴下し、灰色かび病菌のPDA切片を置床した。その後、プラスチックケースの蓋を閉じて、十分な湿度を保ち暗黒条件下22℃の恒温器内で

* 現 東近江地域振興局環境農政部農業振興課
*** 現 農政水産部農産流通課

** 現 農業総合センター農業大学校
**** 現 湖北地域振興局環境農政部農業振興課

4日間静置した。灰色かび病の発病抑制程度はトマト小葉の褐変程度で判定した¹⁾。

〔試験Ⅰ-2〕分生胞子の抗菌効果の判定

試験Ⅰ-1で用いた懸濁培養液を遠心分離(2,500rpm/minの5分間処理を2~3回)し、液体培地を取り除いた。残った分生胞子に滅菌水を注入して、遠心分離機で同様の処理を2回繰り返す、分生胞子を洗浄した。その後、 5×10^5 個/mLに調整した分生胞子懸濁液をトマト小葉に50 μ L滴下し、試験Ⅰ-1と同じ処理を行い、発病抑制効果を確認した。

〔試験Ⅱ-1〕培養濾液の抗菌効果の判定

試験Ⅰ-1で灰色かび病の菌糸の伸長を抑制した菌株について、振とう培養後、試験Ⅰ-2と同様の方法で懸濁培養液を遠心分離し、さらに0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌した培養濾液をトマト小葉の一方に50 μ L滴下し、他方にPS液体培地を50 μ L滴下し、試験Ⅰ-1と同様の処理を行い発病抑制効果を確認した。さらに、発病抑制効果と光の関係を確認するため、23℃16時間照明下、4日間で同様の処理を行った。

〔試験Ⅱ-2〕菌濃度の違いによる抗菌効果の判定

試験Ⅱ-1と同一の菌株について試験Ⅰ-2と同じ処理により 1×10^7 個/mLに調整した分生胞子懸濁液をトマト小葉の一方に50 μ L滴下し、他方に滅菌水を50 μ L滴下し、試験Ⅰ-1と同様の処理を行い発病抑制効果を確認した。さらに、試験Ⅱ-1と同様、発病抑制効果と光の関係を確認した。

なお、有傷接種により、試験に供試した菌体の病原性についても確認した。

2. 3 キュウリ灰色かび病に対する*Fusarium*属菌の散布による発病抑制効果

2. 3. 1 耕種概要

試験は単棟ビニルハウス(間口5.4m、長さ20m)内で実施した。キュウリは穂木に「南極2号」、台木に「ニュースーパー雲竜」を接木した苗を供試した。2001年9月4日、うね幅200cm、株間35cm、1条振り分け植え(143本/a)で定植した。栽培管理は慣行に準じた。

2. 3. 2 試験区の構成

試験は1区3.5 m^2 (1m $\times$ 3.5m)、5株/区の3反復で実施した。*Fusarium*属菌は2. 2でキュウリ灰色かび病に対し抗菌反応を示した1菌株を供試した。菌体培養は2. 2に準じて行い、培養液を取り除いた後、2%シロ糖液にTween20を0.05%になるよう添加し、分生胞子濃度が $3 \sim 8 \times 10^6$ 個/mLになるよう懸濁液を調製した。この分生胞子懸濁液95L/10a相当量を11月16、23、30日、12月4、10日の5回、ハンドスプレーにより散布した。対照として、Tween20を0.05%になるよう添加した2%シロ糖液を同量散布した。

2. 3. 3 灰色かび病の接種

灰色かび病の発病を促し、しかも均一な発病となるよう、施設内で発病した灰色かび病被害果実、茎葉を通路に配置するとともに、灰色かび病菌を1%ペプトン液にTween20を0.05%になるよう添加し、 2×10^6 個/mLに調製した胞子懸濁液を12月6、10日にハンドスプレーにより噴霧した。

2. 3. 4 調査方法

*Fusarium*属菌4回目散布の7日後と5回目散布の10日後に各区開花後の全果実について発病果実数を調査した。発病した果実および茎葉は調査後に摘除し、通路に配置した。発病果実数調査時に、*Fusarium*属菌のキュウリ植物体への付着状況を調査するため、各区より開花後の花卉を採取し、駒田培地上で28℃暗黒条件下で4日間静置後、*Fusarium*属菌が検出された花卉数を調査した。

3. 結 果

3. 1 キュウリ灰色かび病菌に対する*Fusarium*属菌の抗菌反応

〔試験Ⅰ-1, 2〕

キュウリ栽培農家から採取した58菌株の懸濁培養液(約 $10^6 \sim 10^7$ 個/mL)の試験からは、キュウリ花卉から分離した菌株では2菌株、土壌(米ぬかを含む)から分離した菌株では1菌株が、トマト小葉上で、灰色かび病菌の菌糸伸長を阻害した。しかし、分生胞子濃度を 5×10^5 個/mLに調整した分生胞子懸濁液では、供試したいずれの菌株もトマト小葉上で灰色かび病菌の菌糸伸長阻害は認められなかった(表1、図2)。

表1 *Fusarium*属菌の採取箇所と灰色かび病菌菌糸伸長阻害菌株数

菌採取箇所	供試菌株数	懸濁液 ¹⁾ 培養液	分生孢子懸濁液 ²⁾ (菌濃度調整)
花 弁	27	2	0
果 梗	2	0	0
葉 柄	5	0	0
空気中	12	0	0
土 壤	12	1	0
計	58	3	0

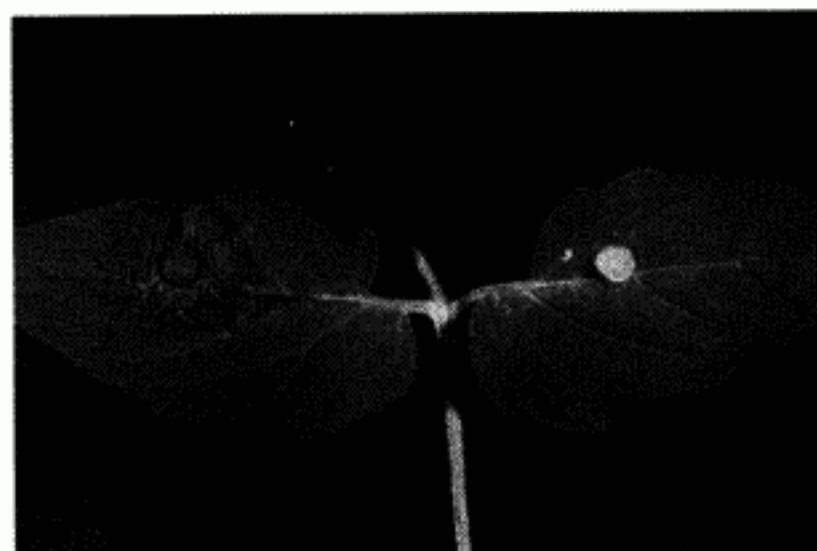
注) 1) 約 $10^6 \sim 10^7$ 個/mL, PS液体培地を含む.2) 5×10^6 個/mL, PS液体培地を含まない.

図2 トマト小葉上における灰色かび病菌糸伸長阻害

左：無処理；滅菌水またはPS液体培地を $50 \mu\text{L}$ 滴下
右：処理；懸濁培養液，分生孢子懸濁液または培養濾液を $50 \mu\text{L}$ 滴下暗黒条件または16時間照明下で 23°C ，4日間表2 暗黒条件下における*Fusarium*属菌のキュウリ灰色かび病に対する菌糸伸長阻害

供試菌株	懸濁培養液 ¹⁾		分生孢子懸濁液 ²⁾		培養濾液		病原性
	処 理	無処理	処 理	無処理	処 理	無処理	
a 菌株(花弁)	3.3	28.3	25.0	20.0	6.7	28.3	—
b 菌株(花弁)	0.0	31.7	3.3	28.3	0.0	25.0	—
c 菌株(土壌) ³⁾	0.0	23.3	5.0	16.7	5.0	25.0	—

注) 数値は病斑長径(mm)，3区の平均値.

1) a菌株： 4×10^7 個/mL，b菌株： 1×10^7 個/mL，c菌株： 2×10^7 個/mL.2) 各菌株 1×10^7 個/mL.

3) 米ぬかを含む土壌.

暗黒条件下 23°C ，4日間表3 照明下における*Fusarium*属菌のキュウリ灰色かび病に対する菌糸伸長阻害

供試菌株	懸濁培養液 ¹⁾		分生孢子懸濁液 ²⁾		培養濾液	
	処 理	無処理	処 理	無処理	処 理	無処理
b 菌株(花弁)	0.0	23.3	0.0	21.7	0.0	23.3
c 菌株(土壌) ³⁾	0.0	25.0	0.0	16.7	0.0	23.3

注) 数値は病斑長径(mm)，3区の平均値.

1) b菌株： 3×10^7 個/mL，c菌株： 2×10^7 個/mL.2) 各菌株 1×10^7 個/mL.

3) 米ぬかを含む土壌.

16時間照明下 23°C ，4日間

[試験Ⅱ-1, 2]

試験Ⅰ-1で灰色かび病菌の菌糸の伸長を阻害した菌株について，暗黒条件下において，懸濁培養液（約 1×10^7 個/mL），分生孢子濃度 1×10^7 個/mLに調整した分生孢子懸濁液，および培養濾液を供試したところ，トマト小葉上で灰色かび病菌の菌糸伸長をいずれも阻害した。また，供試した菌株の病原性は認められなかった（表2，図2）。さらに，16時間照明下においても同様に灰色かび病菌の菌糸伸長を阻害した（表3，図2）。

3. 2 キュウリ灰色かび病に対する*Fusarium*属菌の散布による発病抑制効果の検討

*Fusarium*属菌の4回目散布の7日後にあたる12月11日，散布5回目の10日後にあたる12月20日の調査とも菌の散布区は無散布区に比べ発病果率は低かった（表4）。

菌の散布によるキュウリ花弁への*Fusarium*属菌の付着程度を調査した結果，散布区は12月11日，12月20日の調査ともに供試したすべての花弁で*Fusarium*属菌が検出された。しかし，無散布区は*Fusarium*属菌が検出される花弁の割合が低かった（表5）。

表4 *Fusarium*属菌分生孢子懸濁液散布によるキュウリ灰色かび病の発病抑制

調 査 日	試験区	調査果数(個)	発病果数(個)	発病果率(%)
12 月 11 日	散 布 区	80.3	6.3	7.8
	無 散 布 区	90.0	20.3	22.5
12 月 20 日	散 布 区	108.3	13.0	11.9
	無 散 布 区	93.3	23.3	24.9

注) 数値は3区の平均値。

分生孢子懸濁液の分生孢子濃度は $3 \sim 8 \times 10^6$ 個/mL。表5 *Fusarium*属菌分生孢子懸濁液散布によるキュウリ花弁への付着

調 査 日	試験区	調査花弁数(個)	付着花弁数(個)	付着花弁率(%)
12 月 11 日	散 布 区	15	15	100
	無 散 布 区	15	2	13.3
12 月 20 日	散 布 区	30	30	100
	無 散 布 区	30	12	40.0

4. 考 察

米ぬかを栽培施設内地表面に散布した場合の灰色かび病発病抑制の作用機作について、宮田²⁾は疫病菌を病原としてキュウリ幼苗で検討した結果、*Trichoderma*属菌による抵抗性誘導の可能性を指摘している。本試験では、ほ場観察で確認された*Fusarium*属菌に着目し、キュウリ植物体の各部位、栽培施設内の空气中、および栽培施設土壌表面から採取した菌株の抗菌活性を検討した。その結果、採取した58菌株中、花弁から2菌株、表層土壌から1菌株という高い頻度で灰色かび病菌の菌糸伸長を阻害する菌株が確認された。このことにより、栽培施設内において、灰色かび病に対し抗菌活性を有する*Fusarium*属菌が高い頻度で存在することが推察された。

次に、抗菌活性を示すメカニズムを明らかにするために検討を行った。その結果、 1×10^5 個/mLの分生孢子懸濁液では灰色かび病菌の菌糸伸長が認められたが、 1×10^7 個/mLに菌濃度を高めると菌糸伸長が阻害された。さらに、昼色光照射条件下においても同様の結果が認められ、ほ場条件においても効果が期待できると考えられた。その場合、菌糸伸長を阻害するために、一定以上の菌濃度を必要としたことは、ほ場において、灰色かび病菌が寄生する前に寄生部位で*Fusarium*属菌が増殖していることが必要条件になると考えられた。なお、濾過滅菌した培養濾液も灰色かび病菌の菌糸伸長を阻害したことは、*Fusarium*属

菌が生成する何らかの物質が菌糸伸長を阻害したと考えられたが、この物質は特定できていない。物質の特定と灰色かび病菌の菌糸伸長阻害のメカニズムの解明が今後の課題である。

さらに、室内試験で灰色かび病菌の菌糸伸長を阻害した菌株を供試して、ほ場における灰色かび病の発病抑制効果について検討した。室内試験の結果から、灰色かび病菌が寄生する前にキュウリ植物体上に*Fusarium*属菌を充分量定着させておく方法をとった。その結果、菌の散布区は灰色かび病の発病を抑え、しかも*Fusarium*属菌のキュウリ花弁への付着程度は著しく高かった。このことから、菌の散布により、キュウリ植物体上での*Fusarium*属菌の菌密度が高まり、その後接種した灰色かび病菌の侵入を阻害したと考えられた。国内で空気伝染性病害を対象としたものではトマト、ナスの灰色かび病に対し、*Bacillus subtilis*を製剤化したボトキラー水和剤³⁾が、防除効果の高さと安定性から広く利用されている。ボトキラー水和剤も予防的に散布し、植物体における菌密度を高めて病原菌の侵入を阻害することから、本報告で扱った*Fusarium*属菌も生物農薬としての利用が期待できる。

謝 辞

本試験の遂行に当たり、八日市市内のキュウリ生産農家の方々にご協力を賜った。ここに深謝の意を表す。

引用文献

- 1) 作物病原菌研究技法の基礎, 1995. 日本植物防疫協会編, 135-137.
- 2) 宮田善雄, 2001. 米ぬか散布による灰色かび病発病メカニズムの考察, 農業技術体系土壌施肥編 5 -, 農山漁村文化協会編, 64の 8 -64の16.
- 3) 生物農薬ガイドブック, 1999. 日本植物防疫協会編, 26-33.