

# 揮発性抗菌物質生産糸状菌 *Irpex lacteus* による 地上部病害の生物防除

農業環境技術研究所 微生物分類研究室 小 板 橋 基 夫

## はじめに

植物の葉面は土壤中の根圏 (rhizosphere) に対して葉圏 (phyllosphere) とも呼ばれ、そこに存在する微生物の相互関係は従来から着目され研究が行われている。近年、地上部の病害防除を考える場合に葉圏に関する情報が重要であることが再認識され、葉面微生物に関する数多くの研究が行われている。葉面微生物の一種であるうどんこ病菌は、その生育場所が主として葉面であることが特徴的で、空気伝染性で各種作物に常発を繰り返して農業現場に深刻な被害を与えている。地上部病害に対する生物防除試験は従来から行われているが、その中でもうどんこ病を対象とした研究は数多い。それはうどんこ病菌類の生育する場所が作物の表皮上であるため、病原菌に対する葉面微生物による影響が他の病害に比べて大きいと考えられることも要因の一つであろう。

筆者らは、従来の手法によらない、うどんこ病の生物防除技術を開発するために拮抗微生物の選抜を行い、揮発性の抗菌物質を生産する糸状菌を見出した (KOITABASHI et al., 2002)。本稿では、筆者らの行った新しい拮抗微生物の分離法の開発、抑制効果の要因の解明、抗菌物質の構造決定、菌株の同定、圃場における生物防除試験等の一連の研究 (KOITABASHI et al., 2004 ; KOITABASHI, 2005) の概要を紹介したい。

## I 拮抗微生物の選抜と抑制要因の解明

### 1 コムギ葉からの拮抗微生物の選抜

福岡県筑後市に栽培されていたコムギ葉から 1989 年から 91 年の 3 年間に 1,808 菌株の糸状菌と 37 菌株の酵母を分離した。それらのうち菌叢形状の異なる 371 の糸状菌と 37 の酵母、計 408 菌株からコムギうどんこ病に対する拮抗菌の選抜を行った。播種 7 日後のコムギの子葉を 5 ~ 6 cm に切断して実験に供試した。湿らせたろ紙を敷いた直径 9 cm のペトリ皿に 5 枚の葉片の裏面を上にして並べ、うどんこ病に感染したコムギ葉を切り葉

の上で激しく振って分生子を落下させて接種を行った。うどんこ病菌を接種したコムギ葉の上に PDA 平板培地に 10 日間培養した供試菌株をかぶせ、パラフィルムで密封して 20℃ の室内でうどんこ病の発病を調査した。

その結果、接種 8 日後においてもほとんどうどんこ病菌の菌叢や分生子形成が認められない、発病を強く抑える菌株が見いだされた (図-1)。この菌株は PDA 平板培地の培養条件で白色の菌叢を示し、強い芳香性の臭気を発生させた。本菌は隔壁のある菌糸体のみを形成し、種々の孢子形成誘引試験においても孢子形成は認められず、種の同定ができなかったため菌株名を Kyu-W63 とした。

### 2 うどんこ病発病抑制要因の解析

本菌のうどんこ病発病抑制効果の要因を検討した。先の選抜試験と同じ条件下で、菌叢と葉片の間に孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターを挿入し、うどんこ病の発病をみたところ、完全に発病を抑制した。しかし、菌体とコムギ葉の間に活性炭を挿入したところ抑制効果は認められなかった。また、培養 30 日後の臭気発生の認められなくなった菌叢でも、抑制効果は認められなかった。以上の結果から、本菌のうどんこ病発病抑制には臭気性の何らかの化学物質が関与していると考えられた。なお、培養が古くなった Kyu-W63 の菌体においても、PDA 培地に再移植すると臭気発生が再度認めら

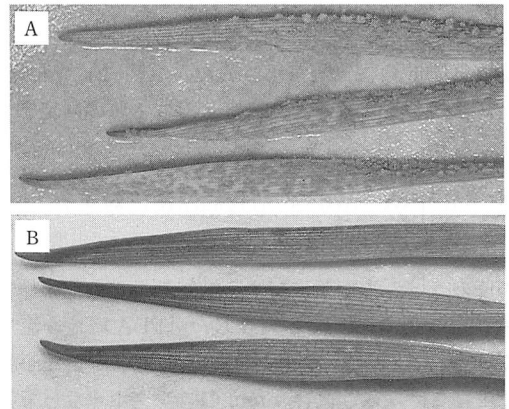


図-1 A : 葉面微生物 Kyu-W63 菌で処理したコムギ葉、  
B : うどんこ病菌のみ接種したコムギ葉 (対照)

Biocontrol of Air-borne Disease by *Irpex lacteus* which Produces Antifungal Volatiles. By Motoo KOITABASHI

(キーワード: 生物防除, 揮発性抗菌物質, *Irpex lacteus*, パセリ-うどんこ病)

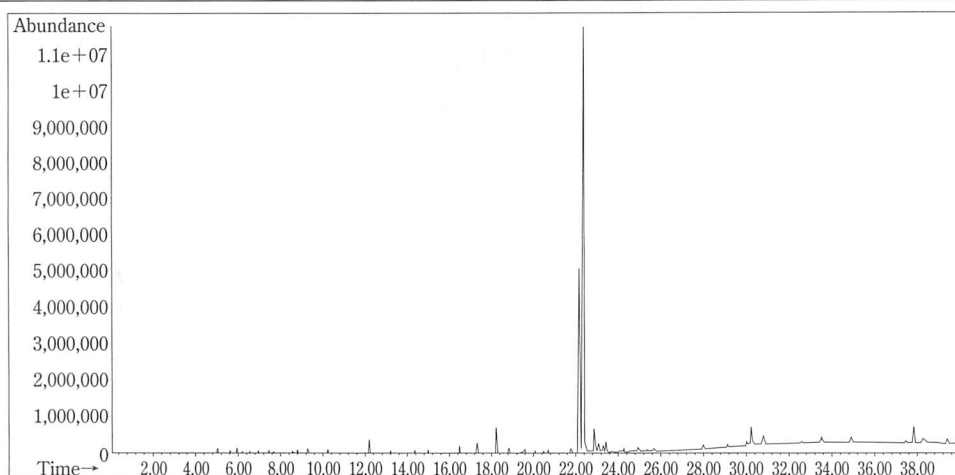


図-2 抑制物質のヘッドスペースのガスクロマトグラム

れるようになった。

次に、うどんこ病発病抑制効果がどのような機作によって引き起こされるのかを知るために、うどんこ病菌の分生子の発芽率を調査した。素寒天上にコムギうどんこ病菌の分生子を散布した後、Kyu-W63を培養したペトリ皿をかぶせ、48時間後に発芽率を調査した。対照区のPDA培地をかぶせた場合には、時間の経過とともに発芽率が高くなり61.6%の分生子が発芽したが、本菌処理では発芽率が0.2%で、ほとんど発芽が認められなかった。この結果から、本菌により分生子の発芽が阻害されるためうどんこ病の発病が抑制されることが明らかになった。

### 3 うどんこ病発病抑制物質の分析

Kyu-W63の培養中に発生する臭気成分について、コールドトラップ装置により成分濃縮が可能なガスクロマトグラフ-マススペクトロメトリー装置(GC-MS)による分析を行った。Kyu-W63をPDA平板培地で培養したものからヘッドスペースの分析を行ったところ、分子量164と166の物質が検出されたが(図-2)、ライブラリーに該当する物質がなく、本法では物質の同定までには至らなかった。

## II Kyu-W63の植物病原菌に対する生育抑制効果

本菌のうどんこ病菌に対する抑制効果が、他の植物病原菌にも有効であるかを調査した。PDA培地を流し込んだ9cmペトリ皿に、Kyu-W63の菌叢が全面を覆うまで生育させた後、直径4mmのコルクボーラーで打ち抜いたイネいもち病菌、イネ紋枯病菌、コムギ赤かび病菌、メロンつる割病菌、トマト灰色かび病菌、キュウリ

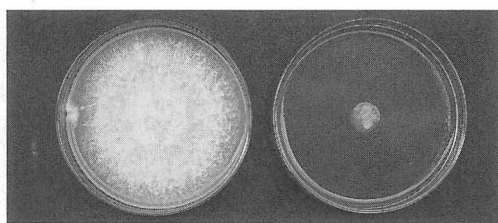


図-3 右:Kyu-W63菌により生育が抑制されたコムギ赤かび病菌,左:コムギ赤かび病菌のみ培養したもの(対照)

つる枯病菌、イチゴ炭そ病菌(*Glomerella cingulata*および*C. acutatum*)の8種類の病原菌を置床したペトリ皿に上からかぶせて密封し、25℃の恒温器に置いて経時的に菌叢の直径を測定した。その結果、本菌は8種類の植物病原菌の培地上における生育を強く抑制した。コムギ赤かび病菌の抑制効果について図-3に示した。生育が抑制されている8種類の病原糸状菌の形態を光学顕微鏡で観察した結果、溶菌や菌糸の変形が認められたものはなかった。また、すべての病原菌において、本菌のペトリ皿を除去すると、菌糸の伸長が始まったことから、本菌のもつ抑制作用は殺菌的ではなく静菌的であり、その抗菌スペクトラムが幅広いことが推測された。

## III 抑制物質の単離と構造決定

I章の3節で述べたように、各種作物の病原菌に対して生育抑制効果をもつKyu-W63は、2種類(A成分:分子量166, B成分:分子量164)の揮発性の物質を生産していることがGC-MSを用いた分析により解明されていた。そこで、Kyu-W63の大量の培養物から本物質の分取を行い、A成分およびB成分の単離精製と構

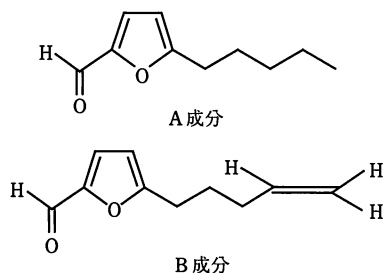


図-4 2種の物質の化学構造式

造決定を行った。

Kyu-W63 を培養した PDA 平板培地 3.5 kg に 9 l の精製水を加え 1 時間かくはんした後、吸引ろ過を行った。ろ液を 18 l の酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層に脱水触媒の硫酸マグネシウムを加えてエバポレーターで濃縮物を回収した。同様な操作を 10 回行い、寒天培地 35 kg から 4.97 g の油状濃縮物を得た。この濃縮物をシリカゲルを充てんしたカラムを用い、高速液体クロマトグラフィー装置で分離精製した。移動層は *n*-ヘキサンと酢酸エチルで順次溶出させて成分の分取を行った。A 成分および B 成分を、核磁気共鳴装置 (NMR) を用いた  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  および C-H 相関二次元 NMR の解析により構造決定を行った結果、A 成分の構造については 5-pentyl-2-furaldehyde と同定した (図-4)。B 成分の構造は、A 成分の *n*-ペンチル基の代わりに末端に二重結合の入ったペンテニル基をもつフラン化合物と推定され、5-(4-pentenyl)-2-furaldehyde と同定した (図-4)。以下、A 成分の 5-pentyl-2-furaldehyde を PTF、また B 成分の 5-(4-pentenyl)-2-furaldehyde を PNF と略称する。

Kyu-W63 の生産する揮発性の抗菌物質は、NMR の解析により PTF と PNF であることが明らかになった。両物質は 1981 年に HAYASHI et al. によって担子菌の一種である *Irpex lacteus* NBRC 5367 株 (和名: ウ斯巴タケ) から生産される抗線虫物質として報告されていたが、抗菌性についてはほとんど知られていなかった。特に PNF の抗菌性については、筆者らによって初めて報告された (KOITABASHI et al., 2004)。

#### IV 抑制物質生産糸状菌の同定と他菌株との比較

微生物を利用した生物防除を行う場合、使用する微生物の人間に対する病原性や環境に及ぼす影響を知るために、微生物の所属が明らかにされていることは不可欠である。Kyu-W63 は孢子形成が認められず未同定のまま

となっていた。しかし、本菌の生産する物質の構造を決定したところ、担子菌の一種 *I. lacteus* が同物質を生産することが報告されていた。そこで、両菌間の rDNA の ITS 領域の比較により、両菌の解析を行った。シーケンスは ITS1 と ITS4 の両ストランドについて解析した。4 菌株のシーケンスの結果、Kyu-W63 と *I. lacteus* NBRC 5367 株の塩基配列は完全に一致したことから、両菌はほぼ同一種と考えていほど遺伝的に近縁な菌株であることが推測された。*I. lacteus* は北海道や長野県などの高冷地での採集記録があり、農業生物資源ジーンバンクに複数の菌株が保存されていた。そこでこれらの *I. lacteus* の各種菌株の揮発物質生産能や植物病原菌に対する抑制効果について調査した。その結果、MAFF 420021 株から FTP と FNP の生産が確認され、*I. lacteus* には PTF と PNF の生産能のある菌株が複数あることが明らかになった。それらの菌株のうちトマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) に対する抗菌活性が高かったのは Kyu-W63 で、次いで NBRC 5367 株、MAFF 42021 株の順であった。

#### V 圃場におけるパセリーうどんこ病の抑制試験

従来より地上部病害に対する生物防除の研究は数多く行われてきたが、近年はそれらの成果によりバチルス・ズブチリス水和剤やタラロマイセスフラバス水和剤などが農業現場で使用されるようになった。これら生物農薬の作用機作は競合や拮抗作用によるものであり、本菌の生産するような揮発性静菌物質を利用した生物防除に関しては現在までほとんど研究が行われていない。本菌は抗菌成分が拡散してしまう野外の圃場より、施設内における防除に適していると考えられた。そこで、本菌を用いた地上部病害の生物防除法の開発を目的とし、施設内のパセリーうどんこ病の防除試験を実施した。パセリーは久留米市周辺において施設内で周期的に栽培されている重要な作目であるが、うどんこ病の発生が近年増加しており、登録農薬の少ないことや抵抗性のある品種がないことから難防除病害となっている (小板橋, 2002)。

福岡県久留米市の九州沖縄農研センター内の縦 17 m、横 5.4 m、高さ 3.2 m のパイプハウス施設を用いて、1998 年に試験を行った。Kyu-W63 は 100 ml の PDA 培地を入れたポリカーボネート製ポット (100 × 110 × 100 mm) に培養した菌体で施用した。ポットは 1 畝当たり畝の中央部に一列にアルミホイルのみを除去して 15 個設置し、2 週間に一度すべて新しく培養したポットと交換した。区間は横 8 m、縦 4 m の厚さ 0.05 mm の

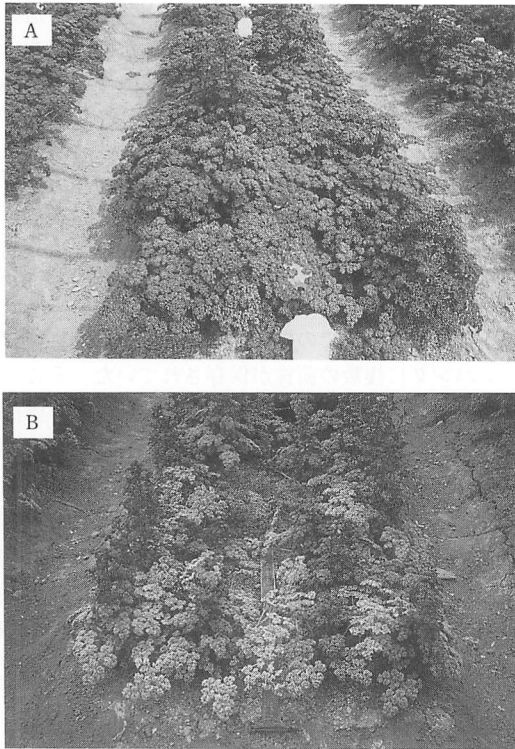


図-5 施設栽培条件のパセリー圃場における試験状況  
(1998年4月24日)

A: Kyu-W63 菌処理区, B: 無処理区.

農業用多層ポリエチレンフィルムでハウス天井から完全に仕切り、フィルム下部は30 cmほど地下に埋め込んで区間の空気が流通しないようにした。施設の換気は慣行栽培と同様に昼は開放し、夜間には閉鎖した。うどんこ病の発病調査は処理開始後に各畝30株の出荷対象になる成葉10葉について次の調査基準により調査し(各区300葉)、発病葉率および発病度を算出し、防除価を求めた。

発病度 =  $\frac{\sum(\text{発病指数} \times \text{葉数})}{\text{調査葉数} \times 4} \times 100$

発病指数は、0: 病斑を認めない、1: 病斑が葉の1~5%未満を占める、2: 病斑が葉面積の5~25%未満を

占める、3: 病斑が葉面積の25~50%未満を占める、4: 病斑が葉面積の50%以上。

パセリーうどんこ病の初発生は、1998年4月3日に確認された。その後各区においてうどんこ病が急速にまん延したが、処理区間では発病の様相は明らかに異なった(図-5)。Kyu-W63処理区では4月17日には明らかに発病が抑えられ、無処理区との発病度間に有意差が認められた。4月24日の発病度は、Kyu-W63処理区で32.9となり(防除価60.4)、無処理区(発病度83.1)に比べて顕著に低かった。

同様の試験を2年間を行ったが、同様な効果が認められた。今回の試験ではうどんこ病の発病を完全に抑えることはできなかったが、その原因としてポットの設置数や設置方法が考えられた。しかし、本試験により、出荷圃場栽培条件においてもパセリーうどんこ病の防除を行うことができることが示された。

### おわりに

圃場のコムギ葉面より分離した微生物の中から、コムギうどんこ病に対して強い発病抑制効果をもつ糸状菌が選抜された。その抑制効果には、2種類の抗菌物質が関与していた。このような糸状菌が生産する物質による病害の発病抑制の報告は極めて少ない。本手法は外界と隔離条件で培養された糸状菌が生産する物質によるものため、植物体への定着性が問題となる他の微生物製剤と比較して効果が安定していると推測される。施設圃場での使用に限定されるが、農薬散布に比べれば省力的であり、PDA培地での増殖が容易であるため低コストである利点もある。今後は、本物質の圃場における有効濃度の測定や、簡便で効果的な本菌の施用法を検討し、本菌を用いた地上部病害の生物防除技術の開発を行いたい。

### 引用文献

- 1) HAYASHI, M. et al. (1981): *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1527 ~ 1529.
- 2) 小坂橋基夫 (2002): *植物防疫* **56**: 251 ~ 254.
- 3) KOITABASHI, M. et al. (2002): *J. Gen. Plant. Pathol.* **68**: 183 ~ 188.
- 4) ——— et al. (2004): *ibid.* **70**: 124 ~ 130.
- 5) ——— (2005): *ibid.* **71**: 280 ~ 284.