

非病原性フザリウム菌によるラッキョウ乾腐病の 発病抑制要因

本多範行*・川久保幸雄**

Factors Affecting Disease Prevention of *Fusarium* Basal rot of Rakkyo by Non-pathogenic *Fusarium moniliforme* and *Fusarium oxysporum*

Noriyuki HONDA* and Yukio KAWAKUBO**

非病原性*Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*の前接種によるラッキョウ乾腐病の発病抑制機作について検討した。非病原性*F. moniliforme*, *F. oxysporum*とラッキョウ乾腐病菌の対峙培養において、非病原菌と病原菌との間に抗生は認められなかった。発病抑制効果は生菌で高かったが、死菌体、培養ろ液ではほとんど見られなかった。非病原菌を接種した種球内に病原菌を接種しても発病が抑制された。また、病原菌を表面に接種した種球に対しても非病原菌の発病抑制効果が認められた。

前接種した非病原菌は収穫期の6月まで長期間ラッキョウの植物体に感染していたが、6月の植物体からの分離率は11月に比べ低かった。土壌灌注処理に比べ種球浸漬処理の分離率は高かった。病原菌と同時に非病原菌を土壌に接種すると、ラッキョウからの非病原菌の分離率は病原菌に比べ低かった。

これらのことから本交叉防御は、ラッキョウ種球に接種された非病原菌の感染による全身的抵抗性誘導と植物体における病原菌との競合によって生じると考えられる。

Key Words : 交叉防御, 抵抗性誘導, 競合, ラッキョウ乾腐病

I. 緒言

ラッキョウ (*Allium chinense* G. Don) から分離される *Fusarium* 菌として、乾腐病を引き起こす *F. oxysporum* f. sp. *allii* Matuo, Tooyama et Isaka¹⁹⁾ と *F. solani* f. sp. *radicicola* Snyder et Hansen²⁰⁾ がある。しかし、上記病原菌以外の *Fusarium* 菌が分離されたことがある^{8) 11) 17) 32)}。筆者らはラッキョウの根から分離した非病原性の *F. moniliforme* と *F. oxysporum* をラッキョウ種球に前接種すると、*F. oxysporum* f. sp. *allii* による乾腐病の発病を抑制することを報告した⁹⁾。

各種作物における *F. oxysporum* による導管病は土壌伝染性の難防除病害である。防除は化学薬剤による土壌消毒や種苗消毒によっているが、効果の持続性、環境への影響および農産物の安全志向から生物的防除への期待が大きい。サツマイモつる割病に対して非病原性 *F. oxysporum* の前接種は圃場規模でも高い防除効果を示した²⁴⁾ ことから、非病原性 *F. oxysporum* を用いた *Fusarium* 病防除の試験例は多い^{2) 22) 27)}。

非病原性あるいは弱病原性系統の前接種によって、後

から感染する強病原性系統の発病が抑制される現象は交叉防御と呼ばれている。交叉防御の機構は⁷⁾、前接種によって誘導される宿主の抵抗応答や前接種菌の強毒菌に対する抗生や競合などが考えられている。

そこで、非病原性 *Fusarium* 菌によるラッキョウ乾腐病における交叉防御の機構を明らかにするため試験を行ったので、その結果を報告する。

II. 試験方法

1. 非病原性 *Fusarium* 菌の性質

1) 供試菌株

前接種菌として用いた非病原性 *Fusarium* 菌は前報⁹⁾ で用いたラッキョウの組織から分離した AR1073 菌株と AR4312 菌株を、病原菌としてラッキョウ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *allii*, 福井農試保存菌株) を供試した。

2) 形態の観察

ジャガイモ・デキストロース寒天 (PDA) 培地と Carnation Leaf Agar (CLA) 培地²⁰⁾ に AR1073 菌株、AR4312 菌株を移植し、25°C で培養後、菌叢、胞子の形態を観察した。

3) 生育適温

直径 9 cm シャーレに PDA 培地を 10ml 分注し、供試菌

* 福井県農業試験場 生産環境部 病理研究グループ

** 福井県農業試験場 作物・経営部

株の菌叢ディスクを移植後、19, 23.5, 28.5, 30°Cで5日間培養し、菌叢直径を測定した。

4) ペノミル剤感受性

ペノミル剤が所定濃度になるように添加したPDA培地を高圧蒸気滅菌(121°C, 20分間)後、直径9cmシャーレに10ml分注し、供試菌株の菌叢ディスクを移植した。25°Cで3日間培養後、菌叢直径を測定し、次式から菌糸生育阻止率を算出した。

$$\text{菌糸生育阻止率 (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A: 無添加培地の菌叢直径

B: 薬剤添加培地の菌叢直径

5) 病原菌に対する抗生

直径9cmのシャーレのPDA培地で、AR1073菌株とAR4312菌株をそれぞれ乾腐病菌と対峙培養した。

2. 供試植物、接種源および汚染土壌

ラッキョウの品種は、福井農試内の圃場で増殖させた「ラクダ系福井在来」を用いた。ラッキョウ種球は、根と葉を切除し次亜塩素酸ナトリウム400倍液で30分間表面殺菌後、流水で洗浄して用いた。

しょ糖加用ジャガイモ煎汁液体(PSB)培地で、25°C、5日間振とう培養した*Fusarium*菌を2重のガーゼでろ過して菌糸片を除き、さらに遠心分離機(4,000rpm, 5分間)で菌体を沈降させ、上澄の培養ろ液を除去し、再度殺菌水に懸濁させた。遠沈、懸濁を2回繰り返し、洗浄した菌体懸濁液を接種源として用いた。

汚染土は約500mlの殺菌土(121°C, 1時間)を詰めたシードリングケース(8×15×5.5cm)に10⁸個/mlの乾腐病菌菌体懸濁液を10ml灌注して作成した。

3. 各種*Fusarium*菌による発病抑制効果

非病原性*Fusarium*菌としてAR1073菌株、AR4312菌株を、病原菌としてイネばか苗病菌(*Gibberella fujikuroi* (*F. moniliforme*), 福井農試保存菌)、メロンつる割病菌(*F. oxysporum* f. sp. *melonis*, 福井農試保存菌)を前接種菌として用いた。

各*Fusarium*菌の菌体懸濁液(10⁸個/ml)に種球を30分間浸漬し、汚染土に植え付けた。28°C, 42日間栽培し、発病株数を調査した。また、植付け20日後に草丈を調査した。

4. 非病原性*Fusarium*菌の発病抑制効果に及ぼす熱処理、培養ろ液の影響

熱処理はAR1073菌株、AR4312菌株の菌体懸濁液(10⁸個/ml)を100°C, 5分間熱処理した。処理後ただちに水道水で冷却した液に種球を30分間浸漬し、汚染土に植え付けた。

培養ろ液はAR1073菌株、AR4312菌株をPSB培地で、25°C, 5日間振とう培養後、遠心分離機(10,000rpm, 10分間)で沈降させた上清を孔径0.45μmのミリポアフィルターでろ過した液を、汚染土を詰めたシードリングケースに200ml灌注し、種球を植え付けた。

5. 病原菌接種種球に対する非病原性*Fusarium*菌の発病抑制効果

種球を乾腐病菌菌体懸濁液(10⁸個/ml)に30分間浸漬後、風乾して病原菌接種種球を作成した。AR1073菌株、AR4312菌株の菌体懸濁液に接種種球を30分間浸漬し、殺菌土に植え付け、63日間栽培し、発病株率を調査した。

6. りん茎内接種種球に対する非病原性*Fusarium*菌の発病抑制効果

種球をAR1073菌株、AR4312菌株の菌体懸濁液(10⁸個/ml)に、2~3秒間、30分間および24時間浸漬した。その後、乾腐病菌菌体懸濁液(10⁷個/ml)を種球当たり約0.5ml、りん茎内部に注射器(テルモシリンジ, テルモ製)で注入接種し、殺菌土に植え付け、28°Cで49日間栽培し、発病株率を調査した。

7. 非病原性*Fusarium*菌密度と発病抑制効果

前接種したAR1073菌株、AR4312菌株を特異的に分離するために、Puhalla²⁶⁾の方法に準じて*Fusarium*菌から表現型⁵⁾の異なる*nit*変異菌株を作出した。つまりAR1073菌株は*nit3*の、AR4312菌株は*nitM*の表現型の菌株を用いた。

プラスチックケース(17×58×10cm)に詰めた殺菌土に野生型の乾腐病菌菌体懸濁液(8×10⁸個/ml)を110ml灌注して、汚染土を作成した。土壌灌注区は、AR1073菌株とAR4312菌株の*nit*変異菌株の菌体懸濁液(10⁸個/ml)を110mlづつ灌注して接種し、種球を植え付けた。種球浸漬区は、AR1073菌株とAR4312菌株の*nit*変異菌株を等量づつ混合した菌体懸濁液に種球を30分間浸漬接種してから植え付けた。また、対照として無接種区を設けた。

*nit*変異菌株の再分離にはMMCPA培地³⁰⁾を用いた。生育してきた*nit*変異菌株は、ヒポキサンチン培地に移植し*nitM*の分離菌株数を調査した。

野生型の*Fusarium*菌はMMPA培地³⁰⁾を用いた。植え付け後、経時的にラッキョウ株間の土壌の*Fusarium*菌密度を、また、39日後にラッキョウの根圏土壌、植物体における*Fusarium*菌密度を調査した。

8. ラッキョウ根圏土壌と植物体における*Fusarium*菌密度

AR1073菌株は*nitM*の、AR4312菌株は*nit3*の、そして乾腐病菌は*nit1*の表現型の*nit*変異菌株を用いた。

土壌は福井農試内のラッキョウ栽培圃場の砂土を用い、1/2000aフグネルポットに詰めた。

土壌灌注接種区は菌体懸濁液(5×10⁸個/ml)をポット当たり80mlづつ、土壌に灌注して接種した。種球浸漬接種区は各*Fusarium*菌の単独、または等量づつ混合した菌体懸濁液(5×10⁸個/ml)に種球を30分間浸漬して、ただちに植え付けた。

1997年8月20日に1ポット当たり50球植え付け、1998年6月12日の収穫期まで根圏土壌と植物体の*Fusarium*菌密度を調査した。土壌は希釈平板法で、植物体は常法に

より表面殺菌し、*nit*変異菌株は改変MMCP A培地¹⁵⁾を、全*Fusarium*菌量は駒田培地¹⁴⁾を、細菌はTryptic Soy Agar培地を、糸状菌はローズベンガル寒天培地を用いて調査した。

III. 試験結果

1. 非病原性*Fusarium*菌の形態

AR1073菌株はPDA培地で、白色～白紫色の気中菌糸を生じ、培地は白色～赤紫色を呈した。分生子はモノフィアライドまたはポリフィアライドに擬頭状と長い連鎖状の小型分生子を形成した。小型分生子柄は分枝し輪生していた。厚膜胞子は形成しなかった。CLA培地で、小型分生子は0隔膜、卵型、大きさは8～22×2.5～3μmであった。大型分生子は1～6隔膜の三日月形で、大きさは1隔膜のものが16～40×2～3μm、2隔膜のものが30～50×2～4μm、3隔膜のものが42～76×3～4μm、4隔膜のものが64～92×2～5μm、5隔膜のものが72～100×3～5μm、6隔膜のものが84×4μmであった。松尾¹⁶⁾の検索表に従い、本菌は*F.moniliforme* Schld.と同定した。

AR4312菌株はPDA培地で、白色～白紫色の気中菌糸を生じ、培地は白色～紫色を呈した。小型分生子柄は短く、モノフィアライドに擬頭状の小型分生子と培養後期に菌糸上に厚膜胞子を形成した。ポリフィアライドは見られなかった。CLA培地で、小型分生子は0隔膜、卵型、大きさは10～26×2.0～3.0μmであった。大型分生子は1～3隔膜の三日月形で、大きさは1隔膜のものが14～30×2～4μm、2隔膜のものが30～40×2～5μm、3隔膜のものが34～56×2～6μmであった。松尾¹⁶⁾の検索表に従い、本菌を*F.oxysporum* Schlcht.と同定した。

第1表 供試した*Fusarium*菌の生育温度

菌 株	菌叢直径 (mm)			
	19°C ^{a)}	23.5°C	28.5°C	30°C
AR1073菌株	39.0	51.8	57.5	57.7
AR4312菌株	40.5	55.8	61.5	56.3
乾腐病菌	42.3	57.0	63.7	54.8

a)培養温度

第2表 供試した*Fusarium*菌のベノミル剤感受性

菌 株	菌糸生育阻止率 (%)										
	0.05 ^{a)}	0.10	0.19	0.38	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	100
AR1073菌株	9	12	11	8	0	26	65	87	92	93	98
AR4312菌株	0	0	0	0	1	78	100	100	100	100	100
乾腐病菌	2	0	3	2	20	98	100	100	100	100	100

a)ベノミル剤濃度 (ppm)

2. 非病原性*Fusarium*菌の生育適温

AR1073菌株とAR4312菌株は19°C～30°Cでよく生育した。AR4312菌株の生育適温は、乾腐病菌と同じ28.5°C前後であったが、AR1073菌株はやや高い30°C付近であった(第1表)。

3. ベノミル剤に対する非病原性*Fusarium*菌の感受性

AR4312菌株のベノミル剤に対するMIC(最少生育阻止濃度)は3.13ppmで、EC₅₀(生長率の50%減少濃度)は0.78ppmと1.56ppmの間にあり、乾腐病菌と同じであった。しかし、AR1073菌株は100ppm濃度でもわずかに生育し、EC₅₀は1.56ppmと3.13ppmの間にあり、前者2菌株に比べ感受性程度が低かった(第2表)。

4. 病原菌に対する非病原性*Fusarium*菌の抗生

AR1073菌株、AR4312菌株と乾腐病菌を対峙培養した結果、菌叢間に生育阻止帯は形成されず、菌叢境界部では相互に菌糸が交錯しているのが観察され、抗生は認められなかった。

5. 各種*Fusarium*菌の前接種による発病抑制効果

イネばか苗病菌、メロンつる割病菌、AR1073菌株およびAR4312菌株の菌体懸濁液に浸漬接種すると、いずれも42日後の発病株は少なく、発病抑制効果が認められた。

植付け22日後のラッキョウの草丈は、殺菌土に比べ汚染土に植え付けると短くなる傾向にあった。また、AR4312菌株に比べ、AR1073菌株、ばか苗病菌を種球に前接種した区では、草丈が短くなる傾向にあった(第3表)。

6. 非病原性*Fusarium*菌の熱処理、培養液の発病抑制効果

AR1073菌株の生菌の種球接種の防除価は90と高く、AR4312菌株の防除価は42と低かった。AR1073菌株の熱処理

第3表 各種*Fusarium*菌の前接種による乾腐病発病抑制効果

菌 株	供 試 個体数	発病株率 (%)			草丈 ^{b)} (cm)
		24日 ^{a)}	35日	42日	
AR1073菌株	50	0	2	4	18.8
AR4312菌株	50	0	0	0	23.8
イネばか苗病菌	50	0	2	2	17.7
メロンつる割病菌	50	4	4	4	22.8
無処理	50	12	18	24	21.5
殺菌土	50	0	0	0	25.4

a)植え付け後日数。b)植え付け20日後の草丈。

第4表 非病原性*Fusarium*菌の熱処理、培養ろ液が
発病抑制効果に及ぼす影響^{a)}

浸漬液	供試	発病	発病率	防除 価
	個体数	個体数	(%)	
殺菌水	32.5	20.5	73.5	—
AR1073菌株	32.5	2.5	7.5	90
AR1073菌株熱処理	32.5	13.0	51.5	30
AR1073菌株培養ろ液	32.5	11.5	39.5	46
AR4312菌株	32.5	13.0	42.5	42
AR4312菌株熱処理	32.5	17.0	61.5	16
AR4312菌株培養ろ液	32.5	19.0	66.0	10

a) 2回試験した平均、28°Cで44日間栽培

第5表 病原菌接種種球に対する非病原性*Fusarium*菌
の発病抑制効果

菌株	供試 個体数	発病株率(%)			
		20日 ^{a)}	34日	44日	63日
AR1073菌株	40	3	5	5	5
AR4312菌株	40	0	3	3	3
無処理	35	6	20	23	31

a) 植え付け後日数

第6表 非病原性*Fusarium*菌の前接種時間と病原菌のりん茎内接種種球の発病
との関係

菌株	前接種 時間	供試 個体数	発病株数				
			20日 ^{a)}	27日	34日	41日	49日
AR1073菌株	数秒間	10	1	1	1	1	2
	30分間	10	0	0	0	0	0
	24時間	10	0	0	1	1	2
AR4312菌株	数秒間	10	0	0	0	0	0
	30分間	10	2	3	3	4	4
	24時間	10	0	0	1	1	2
無処理		10	1	3	3	5	8

a) 植え付け後日数

した菌体懸濁液の防除価は30、培養ろ液の防除価は46で、発病抑制効果が認められたものの、その効果は生菌に比べて低かった。また、AR4312菌株の熱処理菌の防除価は16、培養ろ液の防除価は10で、ほとんど発病抑制効果が認められなかった(第4表)。

7. 病原菌接種種球に対する発病抑制効果

病原菌を接種した種球をAR1073菌株、AR4312菌株の菌体懸濁液に浸漬することによって、処理63日後の発病株率は、それぞれ5%、3%と少なく、無処理区の31%に比べ発病抑止効果が認められた(第5表)。

8. 病原菌接種種球に対する発病抑制効果

前接種菌の菌体懸濁液に種球を浸漬後、その種球内に病原菌を注射接種すると、無処理区の発病株率が80%で

第7表 非病原性*Fusarium*菌の*nit*変異菌株
による発病抑制効果

処理	供試 個体数	発病株率(%)		
		12日 ^{c)}	25日	39日
種球浸漬 ^{a)}	20	0	25	70
土壤灌注 ^{b)}	20	40	75	90
無処理	20	65	90	100

a) AR1073菌株とAR4312菌株の混合した菌体懸濁液に浸漬接種

b) AR1073菌株とAR4312菌株の菌体懸濁液を土壌に同時接種

c) 植え付け後日数

あったのに対して、AR1073菌株の発病株率は0~20%、AR4312菌株の発病株率は0~40%と、発病抑制効果が認められ、AR1073菌株でその効果は高い傾向にあった。

種球の浸漬時間と発病抑制効果とは、大きな差は認められなかった(第6表)。

9. 非病原性*Fusarium*菌密度と発病抑制効果

AR1073菌株、AR4312菌株から作出した*nit*変異菌株の菌体懸濁液に種球を浸漬処理、または土壌に灌注処理すると、処理25日後に無処理区で発病株率が90%であったの

に対して種球浸漬処理区、土壤灌注処理区はそれぞれ25%、75%と*nit*変異菌株を用いても発病抑止効果が認められた(第7表)。

MMP A培地上で、AR1073菌株の*nit*変異菌株は白色~ピンク色で綿毛状のコロニーを形成し、AR4312菌株の*nit*変異菌株は気中菌糸の

少ない赤紫色でしわのあるコロニーを形成した。また、MMP A培地上で*nit*変異菌株は薄い菌叢を示し、乾腐病菌を含む野生型の*Fusarium*菌は菌叢の濃いコロニーを形成した。

土壤灌注処理区の株間土壌における*nit*変異菌株密度は、接種後急速に減少した。種球浸漬処理区の*nit*変異菌株は株間土壌で増殖しなかった。野生型の*Fusarium*菌の株間土壌における処理3日後の密度は $10^5 \sim 10^6$ cfuであった。土壤灌注処理区の密度は処理直後から減少したが、無処理区、種球浸漬処理区の密度は処理12日後に増加し、その後減少した(第8表)。

処理39日後の生根1g当たり根圏土壌の*nit*変異菌株密度は $10^4 \sim 10^5$ cfuであった。*nit*変異菌株の種球浸漬処理、

第8表 ラッキョウ株間土壌における *Fusarium* 菌密度の推移

処 理	分離菌	<i>Fusarium</i> 菌密度 ($\times 10^4$ CFU/乾土g)			
		3日	12日	31日	39日
種球浸漬	AR1073菌株	0.3	0.2	0.07	0.03
	AR4312菌株	0	0.1	0	0
	その他の <i>Fusarium</i> 菌	59	72	30	12
土壌灌注	AR1073菌株	312	96	13	4
	AR4312菌株	194	89	8	5
	その他の <i>Fusarium</i> 菌	136	28	11	6
無処理	その他の <i>Fusarium</i> 菌	41	100	15	5

第9表 ラッキョウ根圏土壌における前接種した *Fusarium* 菌密度^{a)}

処 理	分離部位	<i>Fusarium</i> 菌密度 ($\times 10^4$ CFU/生根g)		
		AR1073菌株	AR4312菌株	その他 <i>Fusarium</i> 菌
種球浸漬	根圏土壌	8.0	8.3	4.6
土壌灌注	根圏土壌	3.3	8.7	3.6
無処理	根圏土壌	0.0	0.0	176.0

a) 処理39日後の密度

第10表 ラッキョウ組織における前接種した *Fusarium* 菌の分離率^{a)}

処 理	根 部		茎 盤 部	
	AR1073菌株	AR4312菌株	AR1073菌株	AR4312菌株
種球浸漬	2/6 ^{b)}	4/6	2/6	0/6
土壌灌注	1/3	2/3	2/3	3/3

a) 処理39日後の分離率。b) 分離個体数/供試個体数。

第11表 収穫時のラッキョウ各部位からの *Fusarium* 菌分離率

接 種 菌	分離切片数/供試切片数 (%)			
	葉	根	りん片	茎盤
AR1073菌株	6/101(6)	5/126(4)	18/155(12)	30/155(19)
AR4312菌株	2/118(3)	5/130(4)	14/151(9)	56/151(37)
乾腐病菌	2/47(4)	1/58(2)	2/73(3)	15/73(21)

第12表 時期別ラッキョウ茎盤部からの *Fusarium* 菌分離率

処 理 ^{a)}	分 離 菌	分離切片数/供試切片数 (%)			
		10月5日	11月28日	3月24日	6月12日
単独土壌	AR1073菌株	20/20(100)	3/4	2/4	12/58(21)
灌注接種	AR4312菌株	19/20(95)	3/4	2/4	15/54(28)
	乾腐病菌	20/20(100)	2/4	1/4	6/28(21)
混合土壌	AR1073菌株	18/20(90)	1/4	1/4	5/36(14)
灌注接種①	AR4312菌株	18/20(90)	2/4	4/4	17/36(47)
混合土壌	AR1073菌株	5/20(25)	2/4	1/4	3/33(9)
	AR4312菌株	8/20(40)	2/4	1/4	5/33(15)
灌注接種②	乾腐病菌	18/20(90)	1/4	2/4	4/33(12)
	AR1073菌株	17/20(85)	3/4	1/4	10/31(32)
浸漬接種①	AR4312菌株	18/20(90)	3/4	2/4	19/31(61)
単独種球浸漬接種	乾腐病菌	20/20(100)	2/4	3/4	5/12(42)

a) 混合接種①はAR1073菌株とAR4312菌株を同時接種した。

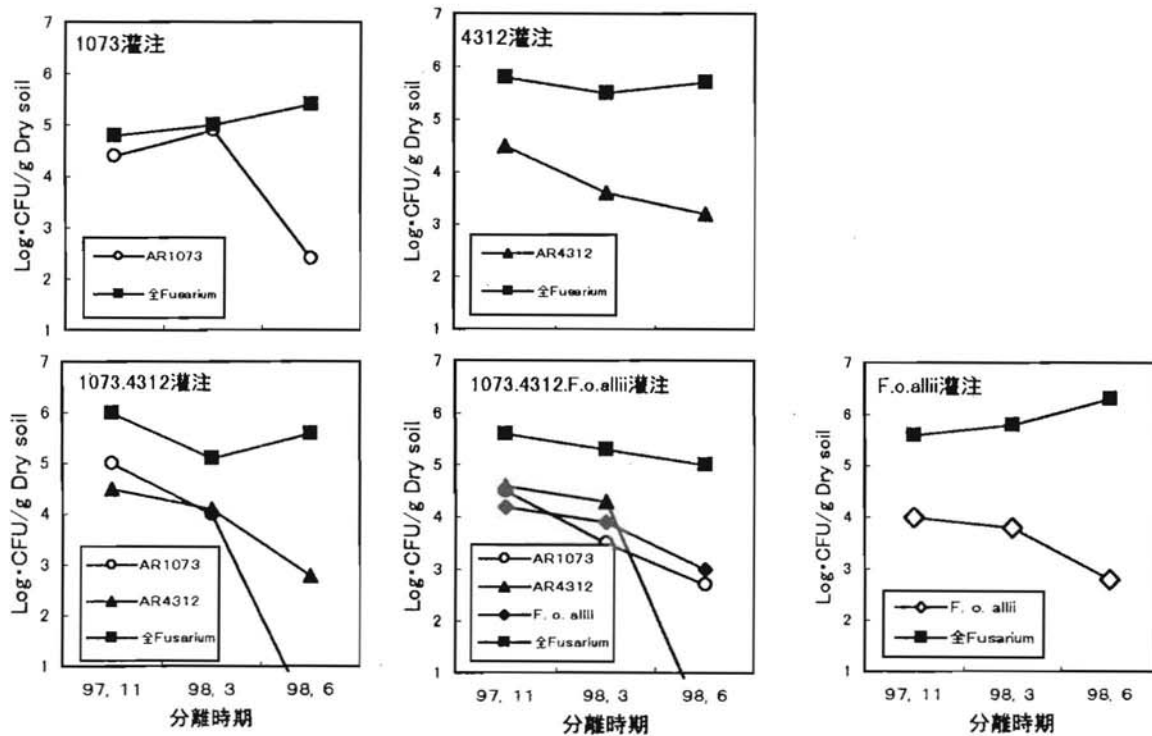
混合接種②はAR1073菌株、AR4312菌株、乾腐病菌を同時接種した。

土壌灌注処理区における密度に大きな差は見られなかったが、野生型の *Fusarium* 菌密度は無処理区に比べ種球浸漬処理、土壌灌注処理区では明らかに低かった(第9表)。また、根盤部やりん茎基部の根からは土壌灌注処理、種球浸漬処理ともに *nit* 変異菌株が再分離された(第10表)。

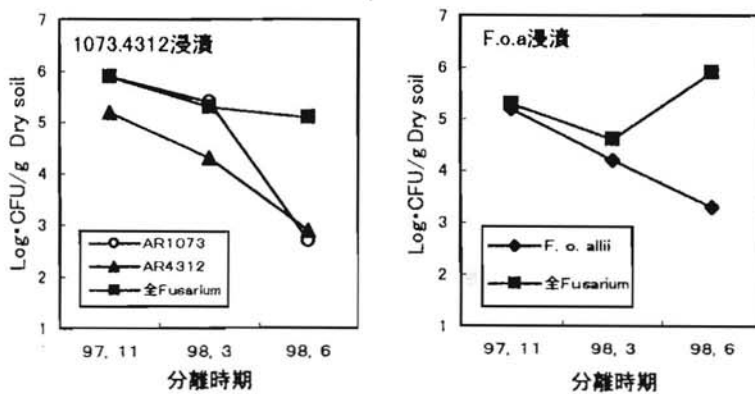
10. ラッキョウ根圏土壌と植物体における *Fusarium* 菌密度

改変MMCPA培地上でAR1073菌株は白色～ピンク色で綿毛状のコロニーを、AR4312菌株は気中菌糸の少ない赤紫色でしわのあるコロニーを、乾腐病菌は紅色で綿毛状のコロニーを形成した。駒田培地では *nit* 変異菌株をはじめ、全ての *Fusarium* 菌が菌叢の濃いコロニーを形成した。また、用いたAR1073菌株とAR4312菌株の *nit* 変異菌株の発病抑制効果は野生株と変わらず、乾腐病菌の *nit* 変異菌株の病原力は野生株と同じであった。

nit 変異菌株をそれぞれ単独で土壌灌注処理すると、AR1073菌株の根圏土壌密度は11月、3月に 10^4 cfu と高かったが、6月には 10^2 cfu に減少した。AR4312菌株、乾腐病菌では11月から 10^3 cfu に漸減し6月にはAR1073菌株より高くなった。全 *Fusarium* 菌密度は栽培期間を通して $10^5 \sim 10^6$ cfu で経過し、大きな変動はなかった。AR1073菌株とAR4312菌株を混合して土壌灌注処理しても、それぞれの菌株は単独接種とほぼ同様に減少し、菌密



第1図 土壌に接種したnit変異菌株と全Fusarium菌のラッキョウ根圏土壌における菌密度の推移



第2図 ラッキョウ種球に接種したnit変異菌株と全Fusarium菌のラッキョウ根圏土壌における菌密度の推移

度に大きな差は見られなかった。乾腐病汚染土壌へAR1073菌株とAR4312菌株を混合して土壌灌注処理すると、6月の乾腐病菌密度は、単独処理区と大きな差は見られなかったが、AR4312菌株の密度はAR1073菌株、乾腐病菌に比べて減少した(第1図)。

AR1073菌株、AR4312菌株懸濁液の混合液に種球浸漬処理するとAR1073菌株、AR4312菌株の11月、3月の菌密度は $10^5 \sim 10^6$ cfuで、土壌灌注処理に比べて高く、全*Fusarium*菌のほとんどを占めたが、6月には 10^2 cfuに減少した。乾腐病菌密度は3月までは $10^4 \sim 10^5$ cfuと高く、*Fusarium*菌のほとんどを占めたが、6月には 10^3 cfuに減少した。(第2図)。

6月の根圏土壌の糸状菌密度は 10^7 cfu前後、細菌密度は $10^8 \sim 10^9$ cfuで処理区の差はほとんど見られなかった。

収穫時のラッキョウの葉、根、りん片、莖盤から、接種した*nit*変異菌株が分離され、莖盤部からの分離率は19~37%と高った(第11表)。

莖盤部からの接種菌の分離率を第12表に示した。単独で土壌灌注処理接種すると、10月の分離率はほぼ100%と高く、6月の分離率は21~28%に低下した。AR1073菌株とAR4312菌株を混合して土壌灌注処理すると、単独接種と同様に10月には分離率は90%と高く、6月にはAR1073菌株が14%、AR4312菌株は47%に低下した。しかし、乾腐病菌、AR1073菌株およびAR4312菌株を土壌に混合して接種すると、10月の乾腐病菌分離率は90%と高いが、AR1073菌株が25%、AR4312菌株が40%と低かった。また、6月の分離率もそれぞれの単独接種に比べ低下した。

AR1073菌株とAR4312菌株の混合液に種球を浸漬接種すると、6月の分離率は土壌接種より高かった。乾腐病菌も種球に浸漬接種すると、6月の分離率は高かった。

IV. 考 察

*Fusarium*属菌の分類体系は、現在、根幹から再検討されつつある。特に、*F.moniliforme* Schld.については、長らく多くの種を含む分類群として扱われてきたが、Nirenbergは形態学的に7種3変種に、Kuhlmannは4交配群に類別した。両者の種の概念が概ね一致したことから、現在では本種を細分化する考え方は支持されており、混乱をさけるためにも、*F.moniliforme*の保存名は使用を中止する方向にある²⁾。

ラッキョウから分離されている長い連鎖状の小型分生子をつくる*Fusarium*菌については、これまで*F.moniliforme*と報告されてきた^{1) 17) 32)}。本報で用いた乾腐病発病抑制効果を示す*F.moniliforme*のAR1073菌株は、Nirenbergら²¹⁾の検索表によれば、形態学的にイネばか苗病菌と同じ*F.fujikuroi* Nirenbergに分類される。

しかし、AR1073菌株はイネばか苗活性を示さない⁹⁾。

伊阪ら¹¹⁾もラッキョウから分離した*F.moniliforme*のばか苗活性を認めていないが、松尾ら¹⁸⁾はラッキョウ分離菌でもばか苗活性を認めている。菌株の差があるにせよ、今後、*F.moniliforme*と*F.fujikuroi*の異同が明らかにされるまでは、従来の*F.moniliforme* Schld.を使用したい。

非病原性あるいは弱病原性系統の前接種によって、後からの強毒系統の感染あるいは発病が抑制される現象は、交叉防御(cross-protection)、抵抗性誘導(induced resistance)と呼ばれ、ウイルス病をはじめ、フザリウム病およびパーティシリウム病の土壌伝染性の導管病でも認められている。

国内でも、化学農薬で防除が困難な土壌伝染性病害において非病原性フザリウム菌を用いた防除試験がおこなわれており、なかでも小川ら²⁴⁾が開発したサツマイモつる割病の防除法は実用化した技術である。

筆者ら⁹⁾もラッキョウの根から分離した*F.oxysporum*や*F.moniliforme*を種球や土壌に前接種することによって*F.oxysporum* f.sp. *allii*によるラッキョウ乾腐病の発生が抑制されることを報告した。百町¹⁰⁾は自然土壌で育てた植物は殺菌した土壌で育てたものに比べて病気に対してより抵抗的であり、交叉防御に関わる微生物が自然土壌中に存在するとしている。Davis⁷⁾は*Fusarium wilt*の防除では*F.oxysporum*が最も効果的であり、また小川ら²⁴⁾はサツマイモつる割病に対して*Fusarium*属菌7種のうち*F.oxysporum*の効果が高く、病原菌に近縁な系統の方が*Fusarium wilt*に対する発病抑制効果は高いとしている。しかし、雨宮ら²⁾は、トマト萎ちよう病に対して*F.oxysporum*だけでなく、*V.dahliae*でも発病抑制効果を認めた。本試験で用いた*F.moniliforme*はラッキョウ乾腐病に対して、*F.oxysporum*と同等の発病抑制効果を示したことから前接種菌の類縁性だけでなく、植物体における行動性など、他の要因も考えられる。

*F.moniliforme*であるイネばか苗病菌やAR1073菌株をラッキョウに接種すると地上部の生育が抑制された。伊阪ら¹¹⁾はラッキョウから分離した*F.moniliforme*はラッキョウの生育を抑制しなかったが、イネばか苗病菌は生育を抑制し、Gibberellin、Fusaric acidをりん茎に処理すると、同様に草丈、根の生育を阻害することを報告した。特に、Fusaric acidの影響が大きいことから、AR1073菌株の生育抑制もFusaric acidによるものと推定される。

Davis⁷⁾は交叉防御の誘導抵抗性の機構には、導管閉塞物質の集積、ファイトアレキシンの生産、宿主の代謝変動、菌由来の抗生物質などが関与していると推定した。根頭がんしゅ病やハクサイ軟腐病に対する非病原性系統は、産生する抗生物質(バクテリオシン)によることが明らかにされている^{12) 23)}。しかし、サツマイモつる割病の場合²⁵⁾は、非病原性系統と病原菌とに抗生関係はなく、ラッキョウ乾腐病においても非病原性の2系統は病原菌と対峙培養しても、両者の間に抗生関係はなかった。

物理的防御機構として前接種菌の傷口および導管の閉塞などがある。ラッキョウ乾腐病の交叉防御では、非病原菌懸濁液に浸漬処理したりん茎内に病原菌を注入接種した種球でも発病が抑制された。したがって、この発病抑制は、前接種菌によって宿主に誘導された全身的な抵抗性に基づくものと考えられる

小川ら²⁵⁾、手塚ら²⁷⁾は抵抗性の誘導には熱死細胞ではなく、生きた細胞が必要であると報告した。小川ら²⁵⁾、雨宮ら²⁾は孢子発芽液によっても抵抗性は誘導されるとしている。本試験では*F. oxysporum*のAR4312菌株の培養ろ液、熱処理菌では発病抑制効果が見られなかったが、*F. moniliforme*であるAR1073菌株では、培養ろ液でわずかながら発病抑制効果がみられた。このことからAR1073菌株の培養ろ液に含まれる物質によっても、ラッキョウが刺激を受け、抵抗性が誘導されると考えられる。

百町¹⁰⁾は、土壤中の多くの糸状菌が抵抗性を誘導するとし、根への着生率が高いほど誘導抵抗性の割合が高く、両者の間に正の相関が見られるとした。植物からは一般的に非病原性の*Fusarium*菌が分離され、*F. oxysporum*の分化型が宿主以外の根に侵入し、導管内で生育することが認められている¹⁾。しかし、サツマイモつる割病の場合、非病原性*F. oxysporum*はサツマイモの導管内に潜在している状態では抵抗性は誘導せず、抵抗性を誘導する場合は苗基部に局在しているとしている²⁵⁾。手塚ら²⁷⁾はイチゴ萎黄病の防除で、前接種した非病原性*F. oxysporum*は2ヶ月後に高率に分離されたが、7ヶ月後には分離されなかったと報告している。また、西村²²⁾は非病原性*Fusarium*菌を連続して、多量に土壤に接種すると病原菌密度が低くなり、サラダナ根腐病の発病が少なり、これを土壤中での競合によるものとした。

ラッキョウの組織からは*Fusarium*菌が頻繁に分離される⁹⁾。種球や土壤に接種した*Fusarium*菌はラッキョウの株間土壤より根圏土壤で生育する。接種した*Fusarium*菌は収穫期に莖盤部だけでなく、りん茎、根、葉から分離できたことからことから、植物体にも定着し、増殖すると考えられる。種球浸漬処理区は土壤灌注処理に比べ発病抑制効果が高い。また、種球浸漬処理区の前接種菌の分離率は収穫期にあたる6月でも高かった。

AR1073菌株とAR4312菌株を単独または混合して土壤に接種すると、両菌の分離率は高い。しかし、AR1073菌株とAR4312菌株を乾腐病菌と混合して接種すると乾腐病菌の分離率に比べ、AR1073菌株、AR4312菌株の分離率は低下する傾向にある。このことから乾腐病菌とAR1073菌株、AR4312菌株との間に植物体における感染や増殖の過程において競合があったと考えられる。また、乾腐病菌はAR1073菌株やAR4312菌株よりラッキョウに感染しやすい系統とも考えられる。

これらのことから前接種菌のラッキョウ乾腐病発病抑制効果を高めるためには、病原菌が感染する前に非病原

性系統を高濃度で感染させるような、種球浸漬処理が適していると考えられる。また、AR1073菌株はペノミル剤に対する感受性が低いことから、ペノミル剤の種球処理、土壤処理を組み合わせることによって、より効果の高いラッキョウ乾腐病防除体系が可能と考えられる。

本試験ではAR1073菌株、AR4312菌株の接種によって、土壤中の乾腐病菌密度が低下する明らかな結果は得られなかった。しかし、非病原性*Fusarium*菌の*nit*変異菌株を汚染土壤に灌注接種すると、発病抑制効果が認められ、土壤灌注処理区の野生型の*Fusarium*菌密度は無処理区や種球浸漬処理区に比べ、処理直後から減少する傾向が見られたことから、今後、非病原菌の接種量を変えて発病抑制効果、病原菌の密度低下について、検討する必要がある。

本試験では、ラッキョウ根圏土壤の全*Fusarium*菌密度は栽培期間を通して $10^5 \sim 10^6$ cfuで大きな変化はなかった。8月に接種したAR1073菌株の根圏土壤の密度は、7ヶ月後の翌年の3月頃まで定着し増殖していたが、翌年の6月の収穫期には急激に減少し、AR4312菌株より低かった。また、莖盤からの分離率は10月にはほぼ100%であったが、6月には明らかに分離率は低くなった。

*F. oxysporum*であるAR4312菌株の生育適温は28.5°C前後で、*F. moniliforme*であるAR1073菌株はやや高い30°Cであった。ラッキョウ根圏土壤の*Fusarium*菌密度の時期別変化を*F. moniliforme*、*F. oxysporum*の生育適温から説明するのは困難で、今後検討する必要がある。

Correllら⁹⁾は健全なセルリーから分離した非病原性*F. oxysporum*の体細胞和合性群は14群に、また、近藤ら¹³⁾はダイズ畑の非病原性*F. oxysporum*を25群に分けている。ラッキョウの組織や根圏土壤から*F. moniliforme*と*F. oxysporum*が頻繁に分離される⁹⁾ことから、今後、ラッキョウの*Fusarium*菌の体細胞和合性群を明らかにすることが課題である。また、体細胞和合性群の研究はより発病抑制効果の高い菌株を探索する手段となるとも考えられる。

引用文献

- 1) 雨宮良幹・小池正徳・平野和弥(1989). 非病原性*Fusarium oxysporum*によるトマト半身萎ちよう病の発病抑制. 土と微生物 33:27-34.
- 2) 雨宮良幹・山口健一・平野和弥・飯田 格(1986). 交叉防御によるトマト萎ちよう病の発病抑制. 千葉大園学報 37:79-83.
- 3) 青木孝之(1998). フザリウム属菌における分類学の現況. 土と微生物 52:73-83.
- 4) Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. (1948). Non-susceptible host as carrier of wilt Fusaria.

- Phytopathology 38:808-826.
- 5)Correll,J.C., Klittich,C.J.R. and Leslie,J.F. (1987). Nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. Phytopathology 77:1640-1646.
 - 6)Correll,J.C. and Puhalla,J.E.(1986). Vegetative compatibility groups among nonpathogenic root-colonizing strain of *Fusarium oxysporum*. Can.J. Bot., 64:62-68.
 - 7)Davis,D.(1967). Cross-protection in *Fusarium* wilt Diseases. Phytopathology 57:311-314.
 - 8)道家剛三郎(1956). *Fusarium*によるラッキョウの腐敗について. 鳥取農試研報 1:62-68.
 - 9)本多範行・川久保幸雄(1998). 非病原性フザリウム菌によるラッキョウ乾腐病の生物的防除. 土と微生物 50:13-18.
 - 10)百町満朗(1998). 有用根圏微生物により誘導される植物の全身抵抗性. 日本農業雑誌 23:422-426.
 - 11)伊阪実人・岡本 博(1977). *Fusarium*菌の寄生によっておこるラッキョウの腐敗について. 福井県立短大農紀要 2:19-52.
 - 12)菊本敏雄(1998). ハクサイ軟腐病の生態と生物防除の機構. 土壤伝染病談話会レポート 19:87-98.
 - 13)Kondo, N., Kodama, F. and Ogosi, A.(1997) Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *adzukicola* and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* on adzuki bean isolated from adzuki bean field in Hokkaido. Ann. Phytopatho. Soc. Japan 63:8-12.
 - 14)駒田 旦(1976). 野菜のフザリウム病菌. *Fusarium oxysporum*の土壤中における活性評価技術に関する研究. 東海近畿農試研報 29:132-269.
 - 15)駒田 旦・上田真也・山本広基(1995). *Fusarium*菌の硝酸塩利用能欠損変異株分離培地の選択性の向上. 植物防疫 49:163-166.
 - 16)松尾卓見(1980). 作物のフザリウム病. 全国農村教育協会, 東京. pp.17-59.
 - 17)松尾卓見・桜井義雄・道家剛三郎(1961). ラッキョウ腐敗病を基因する*Fusarium*菌について. 日植病報 26:239.
 - 18)松尾卓見・遠藤敏夫・吉井幸子(1976). 日本産*Fusarium moniliforme* Sheldon菌株の性状. 日菌報 17:295-395.
 - 19)Matuo,T., Tooyama,A. and Isaka,M.(1979). *Fusarium* basal rot of *Allium bakeri* Regal and its causal fungus, *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *allii* n.f.. Ann.Phytopath.Soc.Japan 45:305-312.
 - 20)Nelson,P.E., Toussoun,T.A. and Marasas,W.F.O. (1983). *Fusarium* species, An Illustrated Manual for Identification. Academic Press,Pennsylvania. 193p.
 - 21)Nirenberg,H.I. and O'Donnell,K.(1998). New *Fusarium* species and combination within the *Gibberella fujikuroi* species complex.Mycologia 90:434-458.
 - 22)西村範夫(1998). 非病原菌の土壌接種によるサラダナ根腐病の発病抑制. 日植病報 64:338.
 - 23)牧野孝弘(1993). 花き類根頭がんしゅ病およびメロン毛根病・つる枯病の生物的防除に関する研究. 静岡農試特別報 17:1-100.
 - 24)小川 奎・駒田 旦 (1984). 非病原性*Fusarium oxysporum*によるサツマイモつる割病の生物的防除. 日植病報 50:1-9.
 - 25)小川 奎・駒田 旦 (1986). 非病原性*Fusarium oxysporum*によるサツマイモつる割病に対する全身的な抵抗性の誘導. 日植病報 52:15-21.
 - 26)Puhalla,J.E.(1985). Classification of strain of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Can.J.Bot. 63:179-183.
 - 27)手塚信夫・牧野孝弘(1991). 非病原性*Fusarium oxysporum*によるイチゴ萎黄病の生物的防除. 日植病報 57:506-511.
 - 28)遠山 明(1980). ラッキョウ乾腐病に関する研究. 鳥取野菜試特別報告 1:1-56.
 - 29)Schneider,R.W.(1984). Effect of nonpathogenic strain of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F.oxysporum* f.sp. *apii* and a novel use of the line-weave-bark double reciprocal plot technique. Phytopathology 74:646-653.
 - 30)竹原利明・國安克人(1994). *nit*変異菌株を用いたフザリウム病の発生生態解明II, *Fusarium oxysporum*の*nit*変異菌株の選択分離培地を用いた分離. 日植病報 60:705-710.
 - 32)渡辺竜雄・若井田正義(1955). ラッキョウのフザリウム病. 日植病報 20:112-113.

Factors Affecting Disease Prevention of *Fusarium* Basal rot of Rakkyo by Non-pathogenic *Fusarium moniliforme* and *Fusarium oxysporum*

Noriyuki HONDA and Yukio KAWAKUBO

Summary

Preinoculation treatment of rakkyo (*Allium chinense*) bulbs by dipping them in the bud-cell suspension of the nonpathogenic isolates of *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum* reduced the disease incidence. No antibiosis were observed in confronting plate culture between nonpathogenic isolates, cross-protection agents, and *F. oxysporum* f. sp. *allii*, pathogen of Fusarium basal rot of rakkyo. Preinoculation with live bud-cells of the agent led to a higher disease suppression than heat-killed or filtrated bud-cells of agent. Artificial inoculation with the pathogen at the distance portion into bulb from the preinoculated bulbs, brought about decrease of the disease incidence, suggesting induction of systemic resistance. The agents were effective against the disease caused not only by soil-borne but also by the pathogen preinoculated bulbs.

The isolation rate of agents from rakkyo plants was higher with the dipping method than with the drenching method at the harvest time. When rakkyo plants were inoculated with nonpathogenic *F. moniliforme*, *F. oxysporum* and pathogen before planting with the drenching method, the isolation rate of nonpathogenic *Fusarium* from rakkyo plants was lower than pathogen. This result indicated that nonpathogenic *Fusarium* were in parasitic competition with pathogen in the rakkyo plants.