

植物生育促進菌類 *Fusarium equiseti* によるトマトおよびホウレンソウのフザリウム病害に対する生物防除に関する研究

堀之内 勇人

岐阜県農業技術センター 501-1152 岐阜市又丸

Studies on Biological Control of Fusarium Diseases of Tomato and Spinach by Plant Growth Promoting Fungus, *Fusarium equiseti*

Hayato Horinouchi

Gifu Prefectural Agricultural Technology Center, Matamaru, Gifu, 501-1152

Synopsis

Tomato and spinach are economically important vegetable crops in Gifu prefecture. Although the continuous commercial production of tomato and spinach has been developed, soil-borne diseases such as Fusarium crown and root rot of tomato (FCRR) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) and Fusarium wilt of spinach (FWS) caused by *F. oxysporum* f. sp. *spinacisae* (FOS) are appeared and become the main limiting factor for their production. In recent years, as for the greenhouse tomatoes, the production has begun to shift from soil cultivation to various hydroponic culture systems such as rock wool system. However, a severe outbreak of FCRR was also occurred in the rock wool system. The most effective method of control Fusarium diseases has been soil disinfection using methyl bromide, but since that caused severe environmental problems its use was outlawed in 2005. Thus, further alternative control measures need to be made available as soon as possible. The objective of this study was to control FCRR and FWS throughout the growing period by plant growth promoting fungus (PGPF), *Fusarium equiseti*.

キーワード：トマト、ホウレンソウ、フザリウム病害、植物生育促進菌類、*Fusarium equiseti*、生物防除

目 次

緒 言	62	緒言	71
第一章 養液栽培のトマト根腐萎凋病防除に有効な拮抗微生物の選抜		2. 材料および方法	72
1. 緒言	63	3. 試験結果	74
2. 材料および方法	63	4. 考察	75
3. 試験結果	66	第四章 <i>F. equiseti</i> によるホウレンソウ萎凋病の防除	
4. 考察	67	1. 緒言	76
第二章 <i>F. equiseti</i> の根腐萎凋病に対する発病抑制機構		2. 材料および方法	77
1. 緒言	69	3. 試験結果	78
2. 材料および方法	69	4. 考察	79
3. 試験結果	70	第五章 総合考察	80
4. 考察	70	摘 要	82
第三章 <i>F. equiseti</i> と生分解性ポットを用いた土耕栽培のトマト根腐萎凋病の防除		謝 辞	83
		引用文献	83
		Summary	87

本論文は岐阜大学大学院連合農学研究科学学位審査論文（平成22年1月）に一部追加、修正をしたものである。本論文の一部は、Crop Prot. 26:1514-1523 (2007); 27:859-864 (2008)、J. Plant Pathol. 92:251-256 (2010)において発表した。

緒 言

トマトおよびホウレンソウは日本各地で栽培されており、経済的に最も重要な野菜品目である。岐阜県においては美濃平地域では冬春トマトおよび冬どりホウレンソウ、飛騨地域は標高 400~1,200m の夏期の冷涼な気候を活かした夏秋トマトおよび夏どりホウレンソウの生産が盛んである。岐阜県のトマトは 40 年余の古い歴史を持ち、ホウレンソウは昭和 42 年から高山市において全国に先駆けて雨よけ栽培技術が確立した歴史ある産地である。トマトおよびホウレンソウは施設および雨よけ栽培技術の普及により生産が安定し、栽培面積はそれぞれ 332ha、1,220ha (岐阜県農政部「平成 20 年度岐阜県農業の動き」) と県内の重要な品目となっている。

しかし、野菜産地も古くなってくると様々な土壌病害が発生し、それらが農業経営上で大きな不安定要因となっている。産地ではこれまで幾度となく、トマトでは根腐萎凋病が、ホウレンソウでは萎凋病が多発して問題となった。

トマト根腐萎凋病およびホウレンソウ萎凋病は土壌病害の一種で、病原菌はそれぞれ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*、*F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* であることから、一般にフザリウム病とも呼ばれている。トマト根腐萎凋病は 1969 年に高知県で初めて報告され、北海道と高知県の産地でそれぞれ 33%、44% の生産物の損失が認められた (Ogura and Ban, 1971; Sato and Araki, 1974)。その後、根腐萎凋病は日本全国のトマト栽培地域に広がり、被害をもたらしている。ホウレンソウ萎凋病は 1964 年に初めて発生が報告され (Okuda and Furuta, 1964)、1977 年に岐阜県高冷地の夏どり産地でもその発生が報告され (Naiki and Kano, 1977)、それ以降、日本各地の産地で発生が広がっている。

土壌病害をはじめ各種病害に対して、抵抗性品種の利用は有効な対策の一つである。しかし、トマト根腐萎凋病およびホウレンソウ萎凋病に対する抵抗性品種は無く、耐病性を持つ品種はその防除効果が不十分であった (Elgersma et al., 1972; Scott and Jones, 2000)。最も有効な防除対策は臭化メチル、メタムソジウム剤 (McGovern et al., 1998)、ベノミル剤 (Mihuta-Grimm et al., 1990) など化学農薬を用いた防除法であるが、臭化メチルは環境への影響が大きいことから、2005 年に使用が禁止された。また、化学農薬も繰り返し使用することで環境への影響や薬剤耐性菌の発生など問題が生じている (Dekker, 1979)。そこで、これらの病害に対する対策として、新しい防除法である生物防除技術の開発が要望されている。

また、近年、連作障害や土壌病害の回避などを目的にトマトでは養液栽培方式の生産技術が普及しつつある。しかし、養液栽培では、土壌病害に対して利用できる農薬が全く無いため、一度、病害が発生すると大きな問題

となる。実際、1997 年に岐阜県海津市において、ロックウールを使用した養液栽培温室で根腐萎凋病が大発生 (発病株率 63%) し、大きな問題となった (加藤ら, 1997)。そのため養液栽培では、新しい防除法、特に生物防除法の開発が急務であった。

今回、土壌の多様性などを活用した広義の生物防除ではなく、拮抗微生物を用いた狭義の生物防除研究を進めることとした。拮抗微生物を用いた植物病害の生物防除には、以下の 5 つの異なるアプローチ (Cook, 1989) から多くの研究が進められている。(1)病原菌密度の低下; 拮抗微生物の菌寄生、抗生などの働きにより対象とする病原菌の密度を低下させる、(2)病原菌と腐生菌への置き換え; 植物残渣に最初に寄生する病原菌を速やかに腐生菌に置き換える、(3)病原菌の発芽および生育抑制、病原性への干渉; 競合、抗生、バクテリオシン産生菌類ウイルスなどの働きにより、病原菌の孢子発芽や生育を抑制し、病原性を弱める、(4)感染の場の保護; 非病原菌又は弱病原菌をあらかじめ処理することで病原菌が宿主に寄生・感染できなくする、(5)宿主の抵抗性誘導と交差防除; 非病原菌や弱病原菌をあらかじめ接種して宿主に病原菌に対する抵抗性を付与することである。研究を開始するにあたり、最初にこれらの働きを持つ拮抗微生物の探索が必要となった。

多種の作物で発生するフザリウム病に対して、様々な土壌生息菌が拮抗菌としての可能性を有することが報告されている。その中でも、非病原性 *Fusarium oxysporum* はトマト萎凋病および根腐萎凋病、ナス半身萎凋病に対して防除効果を示し、さらにキュウリ、スイカ、サツマイモ、ホウレンソウのフザリウム病の防除に有効であることが報告されている (Amemiya et al., 1989; Katsube and Akasaka, 1997; Larkin et al., 1996; Ogawa and Komada, 1984; Paulits et al., 1987; Yamaguchi et al., 1992)。また、*Trichoderma harzianum*、*Penicillium* spp.、*Pythium oligandrum*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas fluorescence* などの拮抗微生物も様々な作物のフザリウム病害の防除に用いられている (Benhamou et al., 1997; Duffy and Defago, 1997; De Cal et al., 1995; Marois et al., 1981; Piga et al., 1997; Phae et al., 1992; Sivan et al., 1987)。これら拮抗微生物のフザリウム病害に対する生物防除メカニズムは様々であるが、多くは栄養競合、感染場の競合および抗菌物質生産で、その他は抵抗性誘導に関する研究が報告されている。

岐阜大学植物病理学研究室では、これまで各種土壌病害に対する生物防除研究が活発に行われ、植物生育促進菌類 (*Fusarium equiseti*, *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. and *Phoma* sp.) がコムギ、キュウリなどの植物の生育を促進するとともに各種土壌病害 (*Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Cochliobolus sativus*) に対する防除効果を示す

ことが報告されていた (Hyakumachi, 1994; Hyakumachi and Kubota, 2004)。また、その発病抑制機構として抵抗性誘導の関与が報告されていた (Koike et al., 2001; Meera et al., 1995a; Meera et al., 1995b; Shivanna et al., 1996)。抵抗性が誘導された植物は、様々な病害に対して発病抑制効果を示すことから、植物生育促進菌類は有望な生物防除エージェントとしてその利用が期待されている。

これらのことから、今回、植物生育促進菌類を用いてトマト根腐萎凋病に対して高い防除効果を示す拮抗微生物を探索するとともに、選抜された *Fusarium equiseti* を用いた土耕栽培におけるトマト根腐萎凋病、ホウレンソウ萎凋病に対する生物防除の研究を行った。また、*F. equiseti* の発病抑制機構に関する研究も併せて行った。

本研究は、1999~2007 年にかけて岐阜大学応用生物科学部および岐阜県農業技術センター(南濃試験地を含む)において実施した。

第一章. 養液栽培のトマト根腐萎凋病防除に有効な拮抗微生物の選抜

1. 緒言

トマト根腐萎凋病は *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *radicis-lycopersici* (Javis&Schemaker) によって引き起こされる土壌病害の 1 種である (Jarvis and Shoemaker, 1978)。本病に発病したトマトは、下葉の黄化、株の萎凋、枯死症状を示し、また、根の腐敗、茎内の導管褐変の症状を示す。本病の対策として、耐病性台木を利用した接ぎ木栽培技術が取り入れられている。この技術は土壌病害に対して有効な技術であるが、苗の生産コストの増加が問題となっている。また、養液栽培技術は、土壌病害の回避を目的に開発されたため、多くは接ぎ木をせず自根のトマトが栽培されることが多い。

根腐萎凋病に対する生物防除の研究では、非病原性 *Fusarium oxysporum* を用いた研究が数多く行われ、トマト根腐萎凋病に対して有効であることが報告されている (Komada, 1994; Louter and Edgington, 1990)。本研究では、非病原性 *F. oxysporum* を比較として用い、高い防除効果を示す拮抗微生物の選抜を目指した。

そこで、植物生育促進菌類 (以下、PGPF)、非病原性 *F. oxysporum* と各種拮抗細菌を用いて、養液栽培でのトマト根腐萎凋病に対して高い発病抑制効果を示す菌株の選抜を行った。

2. 材料および方法

供試植物

トマトは県内の冬春栽培で使用され、根腐萎凋病に対して感受性の品種である「ハウス桃太郎」を供試した。トマト種子は 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 5 分間浸漬し、その後滅菌水で 3 回洗浄することで表面殺菌を行った後、試験に用いた。

供試微生物

試験では糸状菌と細菌の拮抗微生物を用いた。糸状菌は PGPF の *Trichoderma harzianum* (GT31), *Penicillium simplicissimum* (GP172), *Phoma* sp. (GS81, GS122), *Fusarium equiseti* (GF191) と、非病原性 *Fusarium oxysporum* (F13、元島根大学駒田旦博士から分譲) を用いた。細菌は岐阜大学保存菌株の *Pseudomonas fluorescens* (F-2), *Xanthomonas campestris* (K-3), *Bacillus subtilis* (B-1, B-2), *Bacillus amyloliquefaciens* (B-3) を用いた。トマト根腐萎凋病菌は岐阜県海津市の罹病株から分離した *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) の RJN1 菌株を用いた。

供試微生物の培養

(1) 糸状菌の拮抗微生物

T. harzianum と *P. simplicissimum* は、9cm シャーレに広げたジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 培地上で 25℃、暗黒下、7 日間培養した後、滅菌水を培地に加え、培地表面の胞子を滅菌した筆で回収した。その後、2 重のガーゼで濾過し、胞子懸濁液を 10^7 spores/ml に調製した後、試験に用いた。*F. equiseti*、非病原性 *F. oxysporum* と 2 種の *Phoma* sp. は、9cm シャーレ上の PDA 培地上で 25℃、暗黒下、7 日間培養した後、径 5mm の菌そう片を 300ml フラスコ中の PD 液体培地 (100ml) に移植した。振とう培養器 (タイテック製、NR-150) を用い、25℃、7 日間振とう培養 (120rpm) した。その後、*F. equiseti* および非病原性 *Fusarium* は、2 重のガーゼで濾過した胞子懸濁液を 10^7 budding-cells/ml に調製した後、試験に用いた。2 種の *Phoma* sp. は菌体を含む培養液を、ホモジナイザー (日本精機製エースホモジナイザー、モデル AM) で 8,000rpm、5 分間磨砕した。そこに 3 倍量の滅菌水を加え得られた菌体懸濁液を試験に使用した。

(2) 拮抗細菌

P. fluorescens、*X. campestris*、*B. subtilis*、*B. amyloliquefaciens* は、300ml のフラスコ内の King B 液体培地 (100ml) で 25℃、2 日間振とう培養 (120rpm) し、得られた細菌懸濁液を約 10^8 cells/ml に調整して用いた。

(3) トマト根腐萎凋病菌 RJN1 菌株

RJN1 菌株は、*F. equiseti* および非病原性 *Fusarium* と同様の方法で培養し、得られた胞子懸濁液を 10^5 budding-cells/ml に調製した後、試験に用いた。

トマト根腐萎凋病に対する発病抑制効果

トマトを 36×36×45mm の小型ロックウールキューブ (グロダン製、GrodaniaA/S) に播種した後、拮抗微生物を 20ml 処理し、25 日間温室内で育苗した。トマト苗は 65×65×75mm の大型ロックウールキューブに移植した後、再度拮抗微生物を 200ml 処理した (Fig. 1)。試験 1、2 お

よび4は、プラスチック容器(50×50×50cm)内に設置したロックウールスラブ(グロダン製、15×45×7.5cm)上に4つの大型ロックウールキューブを置き、トマトを栽培した。給液は底面給水方式で行った。プラスチック容器内にプラスチックかご(15×45×7.5cm)を設置し、底上げたそのかごの上にロックウールスラブを設置した。容器内に緩効性肥料A(NPKCa=12-0-0-23)と緩効性肥料B(NPK=13-11-13)をそれぞれ4.3g、19.2gを施用し、ロックウールスラブの上面まで水道水を加えた。それぞれの容器に20cm間隔で2株の苗が置かれたロックウールスラブ2つを設置した(Fig. 2)。定植7日後に根腐萎凋病菌の孢子懸濁液(1.0×10^5 budding-cells/ml) 100mlを大型ロックウールキューブに接種した後、発病状況を継続的に調査した。比較として、病原菌のみ接種した区(Pathogen)、拮抗微生物無処理および病原菌無接種の区(Control)を設定した。

試験3は、栽培現場で用いられている給液方式で試験を行った。前述と同様に処理したトマト苗4株(大型ロ

ックウールキューブ)をガラス温室内に設置されたロックウールスラブ(20×91×7.5cm)上に20cm間隔に定植した(Fig. 3)。養液は、液肥A(NPK=7.3-0-3)と液肥B(NPK=1-4.5-6.5)を用い、それぞれを1:2の比率で混和した養液を定期的に給水した。

試験1は1999年1～5月、試験2は2000年12月～2001年4月、試験3は2000年10月～2001年1月、試験4は2001年12月～2002年5月にそれぞれガラス温室内で行った。外観の発病は継続的に指数0～4の5段階(指数0:発病が認められない、1:下葉が黄化、2:株が軽く萎凋、3:株が激しく萎凋、4:株が枯死)で調査を行い、発病度を算出した。導管褐変はそれぞれ病原菌接種71日後、117日後、96日後、140日後に地際部の茎を切断し、指数0～4の4段階(指数0:導管に褐変が見られない、1:導管の1/3以下が褐変、2:導管の1/3～2/3が褐変、3:導管の2/3以上が褐変)で調査を行い、導管褐変度を算出した。なお、試験は1区4株の4反復で行った。

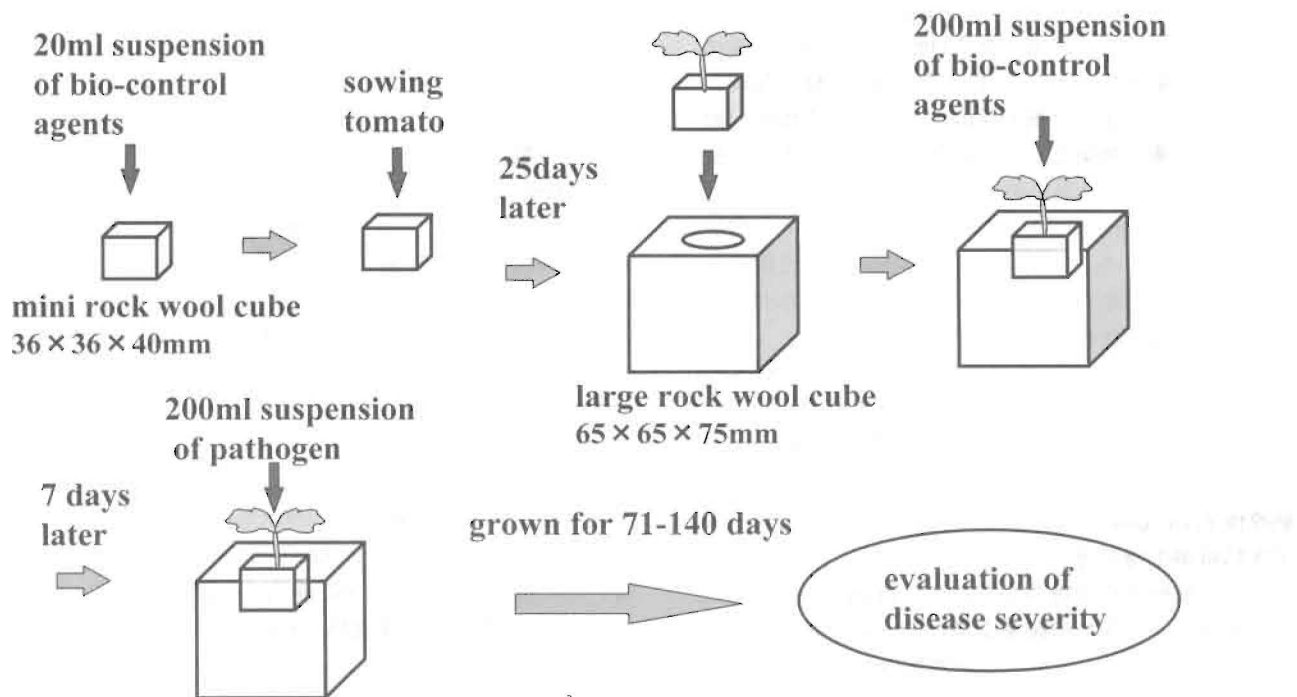


Fig. 1. Experimental design for controlling crown and root rot of tomato using bio-control agents in rock wool system

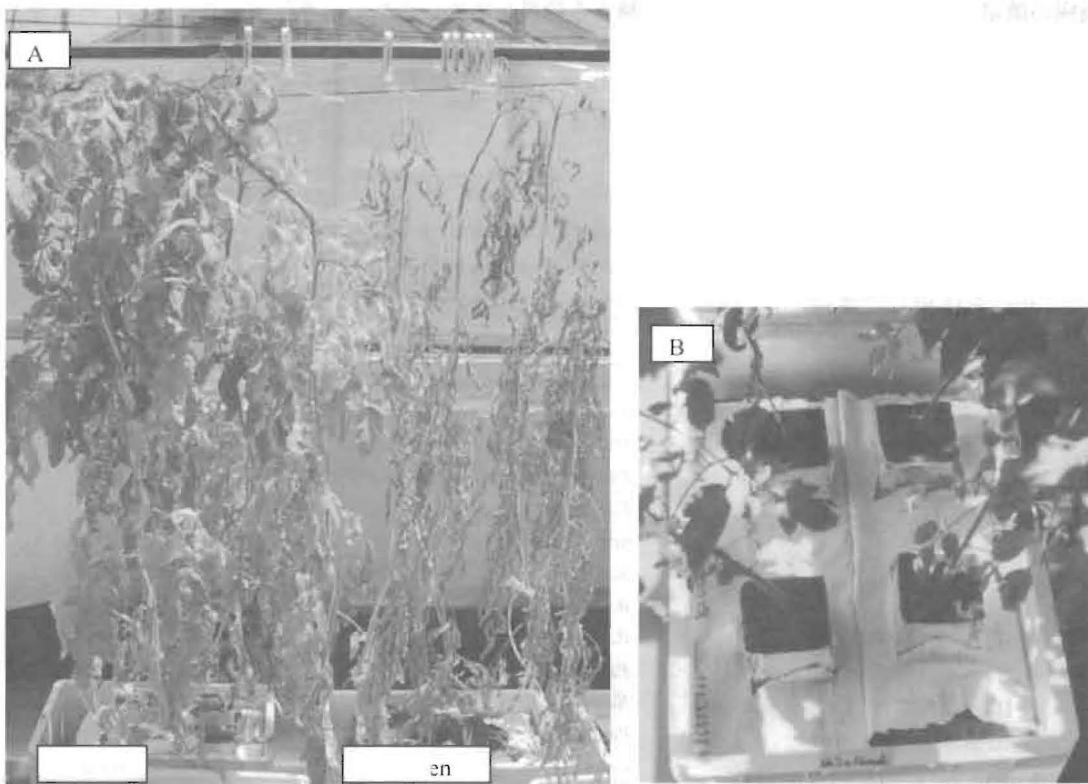


Fig. 2. Effects of *Fusarium equiseti* GF191 against Fusarium crown and root rot of tomato in experiment 2

- (A) Tomaro plants treated with GF191 or not
- (B) A rock wool system in experiment 2



Fig. 3. Effect of *F. equiseti* GF191 against Fusarium crown and root rot of tomato in experiment 3

- (A) Tomaro plants treated with GF191 or not
- (B) A manner similar to that used in a standard commercial rock wool system

トマト茎内の根腐萎凋病の菌量

試験 1、2、3 の終了後、トマト茎内の病原菌の菌量を調べた。試験 1 では地際から上部へ 5cm 間隔に切断し、4 つの部位別 (0~5cm、5~10cm、10~15cm、15~20cm の 4 つの部位) にトマト茎を採取した。試験 2 および 3 は、導管褐変指数別にトマト茎を採取した後、地際部から上部 20cm の茎を試験に用いた。採取した茎は、それぞれ水道水で水洗した後、それぞれ生体重の 10 倍量の滅菌水を加え、ホモジナイザーを使用して磨砕した (約 8,000rpm、10 分間)。磨砕液は 2 重のガーゼを用いて濾過した後、滅菌水を用いて 10~1,000 倍に希釈して駒田培地 (*F. oxysporum* 選択培地) 6 枚にそれぞれ 0.5ml を流し込み、25℃、暗黒下で培養した。培養 6 日後、培地上に形成された *F. oxysporum* のコロニーを計測し、茎 1g 当たりの菌量を算出した。試験 1 では 5cm 長の切片中の菌量を算出した後、下記の式を用いて処理区の茎内の平均病原菌量を算出した。

茎内の平均病原菌量 (Average FORL population)

$$= (P_{0-5}A + P_{5-10}B + P_{10-15}C + P_{15-20}D) / N \times 100$$

 P_{0-5} : 0~5cm 部茎、 P_{5-10} : 5~10cm 部茎、 P_{10-15} : 10~15cm 部茎、 P_{15-20} : 15~20cm 部茎の病原菌量を示す。
 A : 0~5cm 部茎、 B : 5~10cm 部茎、 C : 10~15cm 部茎、 D : 15~20cm 部茎、 N : 0~20cm 部全体の茎の生体重(g)を示す。

試験 2 および 3 では導管褐変指数別の茎中の菌量を算出した後、下記の式を用いて処理区の茎内の平均病原菌量は、下記の式を用いて算出した。

茎内の平均病原菌量 (Average FORL population)

$$= (P_0A + P_1B + P_2C + P_3D) / N \times 100$$

 P_0 : 導管褐変指数 0 の茎、 P_1 : 指数 1 の茎、 P_2 : 指数 2 の茎、 P_3 : 指数 3 の茎の病原菌量を示す。
 A : 指数 0 の茎、 B : 指数 1 の茎、 C : 指数 2 の茎、 D : 指数 3 の茎、 N : 全ての茎の生体重(g)を示す。

3. 試験結果

発病抑制効果

試験 1 では、根腐萎凋病接種 71 日後に発病を調査した結果、無処理区では外観の発病度は 59.3 であった (Table 1)。*F. equiseti* GF191、*Phoma* sp. GS81、GS122、*B. subtilis* B-2、*B. amyloliquefaciens* B-3 および非病原性 *Fusarium* F13 処理区では発病抑制効果が認められ、発病度から算出した防除価はそれぞれ 100、94、94、87、87、87 と高かった。一方、*P. simplicissimum* GP172、*B. subtilis* B-1、*P. fluorescens* F-2、*X. campestris* K-3 処理区ではやや発病が見られ、防除価はそれぞれ 31、50、38、50 とやや低かった。GF191 処理区は導管褐変度も 3.7 と低く、導管褐変度から算出した防除価も 96 と著しく高かった。また、GS81 と F13 処理区も防除価はそれぞれ 56、60 と高かった。しかし、GS122、B-2、B-3 処理区は外観の発病を抑

制する効果が認められたが、導管褐変度は高く、無処理区と有意な差は認められなかった。これらの結果から、GF191、GS81、F13 および B-2 を選抜して、その後の試験を行った。

Table 1. Effect of biocontrol agents on disease and discoloration severity of crown and root rot of tomato in rockwool system in Experiment 1

Treatment		Disease severity ¹⁾ of foliar symptom	Discoloration ²⁾ severity
<i>Trichoderma harzianum</i>	GT31	14.8 ab ³⁾	81.5 c
<i>Phoma</i> sp.	GS81	3.7 a	40.7 ab
<i>Phoma</i> sp.	GS122	3.7 a	70.4 bc
<i>Penicillium simplicissimum</i>	GP172	40.7 c	81.5 bc
<i>Fusarium equiseti</i>	GF191	0.0 a	3.7 a
non- <i>P. Fusarium</i>	F13	7.4 a	37.0 ab
<i>Bacillus subtilis</i>	B-1	29.6 bc	77.8 bc
<i>Bacillus subtilis</i>	B-2	7.4 a	70.4 bc
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	B-3	7.4 a	81.5 c
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	F-2	37.0 c	85.2 c
<i>Xanthomonas campestris</i>	K-3	29.6 bc	74.1 bc
Pathogen		59.3 d	92.6 c
Control		0.0 a	0.0 a

1) Disease severity = $(4A + 3B + 2C + D) / 4N \times 100$. A: number of plants on index 4; B: number of plants on index 3; C: number of plants on index 2; D: number of plants on index 1; N: total number of plants. Disease index; 0: no disease; 1: yellowing; 2: slight wilt; 3: heavy wilt; and 4: dead.

2) Discoloration severity = $(3A + 2B + C) / 3N \times 100$. A: number of plants on scale 3; B: number of plants on scale 2; C: number of plants on scale 1; and N: total number of plants. Discoloration scale; 0: no vascular discoloration; 1: <33%; 2: >33 to 67%; 3: >67 to 100% discoloration of vascular tissue/cortex/xylem.

3) Values with same letter in each column are not significantly different ($P=0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test.

試験 2 では、GF191 および B-2 は外観の発病が少なく、防除価 85、78 と高い防除効果が認められた (Fig. 4-A)。GS81 は病原菌接種 103 日後までは有意に発病を抑制したものの、接種 110~117 日後には発病抑制効果が低くなり、防除価は 22 であった。F13 は GF191 および B-2 より発病が認められるものの、防除価は 52 であった。導管褐変度から算出した防除価は、GF191、B-2、F13 とともに低く、それぞれ 34、30、20 であった (Table 2)。

試験 3 は、南濃試験地の栽培施設 (給液方式) で試験を行った結果、GF191、F13 および B-2 は発病を有意に抑制し、防除価はそれぞれ 88、92、81 と高かった (Fig. 4-B)。また、GF191 および F13 は導管褐変度も低く、防除価はそれぞれ 58、67 であった (Table 2)。

Table 2. Effect of biocontrol agents on severity of discoloration inside stems of crown and root rot of tomato in rockwool system

Treatment		Discoloration severity ¹⁾		
		Exp. 2 (117 days) ²⁾	Exp. 3 (96 days)	Exp. 4 (140 days)
<i>Fusarium equiseti</i>	GF191	60.4 b ³⁾	41.7 b	81.3 b
non-P <i>Fusarium</i>	F13	72.9 b	33.3 ab	93.8 c
<i>Phoma</i> sp.	GS81	93.8 c	ND ⁴⁾	ND
<i>Bacillus subtilis</i>	B-2	64.6 b	79.2 c	85.4 b
Pathogen		91.7 c	100 d	95.8 c
Control		0.0 a	0.0 a	0.0 a

1) Discoloration severity = $(3A+2B+C)/3N \times 100$. A: number of plants on scale 3; B: number of plants on scale 2; C: number of plants on scale 1; and N: total number of plants. Discoloration scale; 0: no vascular discoloration; 1: <33%; 2: >33 to 67%; 3: >67 to 100% discoloration of vascular tissue/cortex/xylem.

2) days after inoculation of pathogen.

3) Means of four replications with four plants per replication; values with same letter in each column are not significantly ($P=0.05$) different according to Fisher's protected least significant difference test.

4) not done.

試験4は、病原菌接種後140日間トマトを栽培して、長期間の防除効果について検討した。その結果、GF191は試験期間を通じて発病が抑制され、140日後の発病度は29.7、防除価63と高い発病抑制効果が認められた(Fig. 4-C)。F13は病原菌接種120日後までは防除価67と有意に発病を抑制したが、その後、発病が進展し、140日後には発病度60.9となった。B-2は、試験期間を通じて高い発病度であった。茎内の導管褐変に関しては、全ての処理区で抑制効果は見られず、高い導管褐変度を示した(Table 2)。

トマト茎内 *Fusarium oxysporum* 菌量

試験1では、GF191処理区の茎内の病原菌量は全ての部位で、F13処理区も10~15cm部を除く部位で有意に低かった(Table 3)。また、GF191およびF13処理区の平均の病原菌量も有意に低く、病原菌のみ処理区(Pathogen)と比較して、それぞれ94%、91%低かった。

試験2では、GF191処理区の病原菌量は導管褐変指数0、2および3の茎内で有意に低く、病原菌のみ接種区と比較してそれぞれ98%、100%、97%低かった(Table 4)。さらに、GF191処理区の平均の病原菌量は、病原菌のみ処理区と比較して99.9%低かった。F13、GS81およびB-2処理区の茎内の平均病原菌量も、病原菌接種区と比較してそれぞれ26%、75%、68%と有意に低かった。

試験3では、GF191およびF13処理区の茎内の平均病

原菌量は、病原菌接種区と比較してそれぞれ93%、41%と有意に低かった(Table 5)。一方、GS81処理区の平均病原菌量は、病原菌接種区と比較して267%増加した。

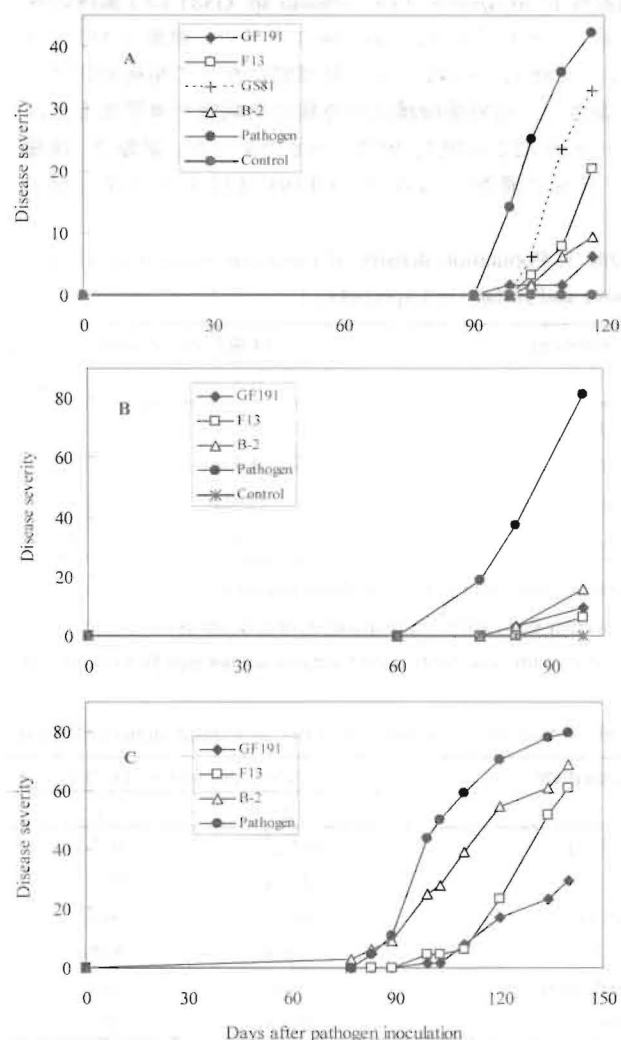


Fig. 4. Progress of disease severity of foliar symptoms caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radialis-lycopersici* on tomato treated with biocontrol agents in A, experiment 2, B, experiment 3 and C, experiment 4.

4. 考察

本研究において、*F. equiseti*は4回の全ての試験で根腐萎凋病の発病を抑制し、外観の発病度から算出した防除価は63~100と高かった。

トマト根腐萎凋病の発病は、外観の発病程度と茎内の導管褐変程度の2種類の基準を用いて調査され、多くの場合で導管褐変度と外観の発病度は相関することが報告されている(Mihuta-Grimm et al., 1990)。試験1は短期間の試験(病原菌接種71日後に調査)であったが、病原菌処理区の外観の発病度および導管褐変度はそれぞれ59.3、

92.6 であった。発病度から算出した防除価は 7 菌株の拮抗微生物処理区で 75~100 と高い防除効果が認められたが、管褐変度から算出した防除価は *F. equiseti* GF191、非病原性 *F. oxysporum* F13、*Phoma* sp. GS81 の 3 菌株のみで高く、それぞれ 96、60、56 であった。試験 2 および 4 では、接種 117~140 日後と長期間に渡って発病抑制効果を調査し、病原菌接種区の外観の発病度と導管褐変度はそれぞれ 42.2~79.7、91.7~95.8 であった。試験 2 (接種 117 日後に調査) において、GF191、F13 および *B. subtilis*

B-2 は外観の発病度が低く、防除価 52~85 と防除効果が認められたが、導管褐変度は全ての処理区で高かった。試験 4 (接種 140 日後に調査) において、GF191 のみが外観の発病度が低く、防除価 63 と高い防除効果が認められたが、導管褐変度は 81.3 と高かった。これらのことから、短期間の試験においては茎内の導管褐変を調査する方が、長期間の試験においては外観の発病を調査する方が拮抗微生物の選抜に適していることが示唆された。

Table 3. Population density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) in tomato stems collected from 0-20 cm above soil surface in Experiment 1

Treatment	FORL Population ($\times 10^2$ cfu/g) in different portion of tomato stems ¹⁾				Average FORL population ²⁾ ($\times 10^2$ cfu/g)
	0-5 cm	5-10 cm	10-15 cm	15-20 cm	
<i>F. equiseti</i> GF191	0.1 a ³⁾	0.4 ab	0.2 ab	0.1 a	0.2 a
non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> F13	0.3 a	0.0 a	0.6 b	0.1 a	0.3 a
Pathogen	12.0 b	2.6 b	0.3 ab	0.3 a	3.5 b
Control	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a

1) Stems taken from 0 to 20 cm above soil surface, and cut into segments 5 cm long 0-5, 5-10, 10-15 and 15-20 cm above soil surface.

2) Average population = Σ (population of different portion of tomato stem $\times$ weight) / total weight.

3) Values with same letter in each column are not significantly different ($P=0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test.

Table 4. Population density of FORL in tomato stems collected from 0-20 cm above soil surface in Experiment 2

Treatment	FORL population ($\times 10^2$ cfu/g) in different discoloration scale ¹⁾				Average FORL population ²⁾ ($\times 10^2$ cfu/g)
	0	1	2	3	
GF191	0.5 a ⁴⁾	0.7 a	0.0 a	16.7 a	0.8 a
F13	0.2 a	31.3 b	833.3 c	370.0 c	433.7 d
GS81	n.s. ³⁾	n.s.	0.0 a	186.7 b	146.6 b
B-2	0.4 a	8.0 a	298.3 b	915.0 e	188.7 c
Pathogen	25.0 b	n.s.	58.4 a	653.3 d	582.2 c
Control	0.0 a	n.s.	n.s.	n.s.	0.0 a

1) Discoloration scale; 0: no vascular discoloration; 1: <33%; 2: >33 to 67%; 3: >67 to 100% discoloration vascular tissue/cortex/xylem.

2) Average population = Σ (population of different discoloration score $\times$ weight) / total weight.

3) no sample.

4) Values with same letter in each column are not significantly different ($P=0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test.

Table 5. Population density of FORL in tomato stems collected from 0-20 cm above soil surface in Experiment 3

Treatment	FORL population ($\times 10^2$ cfu/g) in different discoloration scale ¹⁾				Average FORL population ²⁾ ($\times 10^2$ cfu/g)
	0	1	2	3	
GF191	0.3 a ⁴⁾	36.7 a	14.0 a	13.3 a	14.4 a
F13	137.0 b	129.0 b	1.7 a	155.3 ab	124.0 b
B-2	n.s. ³⁾	165.0 c	343.7 b	1326.7 c	776.8 d
Pathogen	n.s.	n.s.	n.s.	211.7 b	211.7 c
Control	0.0 a	n.s.	n.s.	n.s.	0.0 a

1) Discoloration scale; 0: no vascular discoloration; 1: <33%; 2: >33 to 67%; 3: >67 to 100% discoloration vascular tissue/cortex/xylem.

2) Average population = Σ (population of different discoloration score $\times$ weight) / total weight.

3) no sample.

4) Values with same letter in each column are not significantly different ($P=0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test.

Larkin and Fravel (1998) の報告によると多くの細菌および糸状菌の拮抗微生物を用いてトマト萎凋病の発病抑制効果を調査した結果、非病原性 *F. oxysporum* と *F. solani* は、*Pseudomonas fluorescens* や *Burkholderia cepacia* と比較して高い発病抑制効果を示した。本研究においても、糸状菌6菌株、細菌5菌株を試験に用いたが、糸状菌の拮抗微生物は拮抗細菌と比較して高い発病抑制効果が認められた。これらのことから、トマト根腐萎凋病に対しては、糸状菌の拮抗微生物は生物防除エージェントとして有効であることが示唆された。

F. equiseti GF191 を処理したトマト茎内の病原菌量は、病原菌のみ接種区と比較して 93~100% と有意に低かった (Tables 3~5)。同様の現象は試験1における F13 処理区で認められるものの、試験2、3ではその抑制割合は低く、また、試験3において B-2 処理区の菌量は病原菌処理区と比較して多くなる場合もあった。これらの結果から、*F. equiseti* を処理したトマトでは根腐萎凋病の発病が抑制されるのみならず、茎内の病原菌量が低くなることが示された。このことは、*F. equiseti* が根腐萎凋病に対して有望な拮抗微生物であることを支持するものであると考えられた。

以上の結果、養液栽培トマトにおいて *F. equiseti* が根腐萎凋病の発病を安定して抑制する拮抗微生物として選抜された。また、*F. equiseti* は病原菌接種 140 日後に渡り発病抑制効果を示したことから、*F. equiseti* を使用した生物防除は栽培期間が長い養液栽培トマトにおいても有望な防除技術と考えられる。

第二章 植物生育促進菌類 *F. equiseti* の根腐萎凋病に対する発病抑制機構

1. 緒言

第一章で選抜された *Fusarium equiseti* は、Section Gibbosum に属するフザリウム菌で、大型分生子のみを形成する。大型分生子はフィアライド型の分生子形成細胞から形成され、3~5 隔膜、先端の細胞が細長い特徴を有する (Fig. 5)。GF191 は PDA 上で培養すると初め白色で、後に黄褐色~淡褐色のコロニーを呈する。また、GF191 は、フザリウム半選択培地の 1 つのペプトン・PCNB 培地上で *F. oxysporum* と明確に異なるコロニーを形成する (Fig. 6)。そのため、本研究では *F. equiseti* の動態 (植物からの再分離、菌量調査など) を調べる際には、ペプトン・PCNB 培地を用いて試験を行った。

F. equiseti はコムギ赤かび病、ウリ科果実に腐敗を引き起こす病原菌として知られているが (Burgess et al., 1988)、あまり重要でない、もしくは日和見感染をする病原菌として認識されている。一方、*F. equiseti* は植物の根に寄生するエンドファイトとしての特徴を持ち、土壌病害やセンチュウに対する拮抗微生物として働きを有することが報告されている (Maciá-Vicente et al., 2008; Nitao et al.,

2001)。

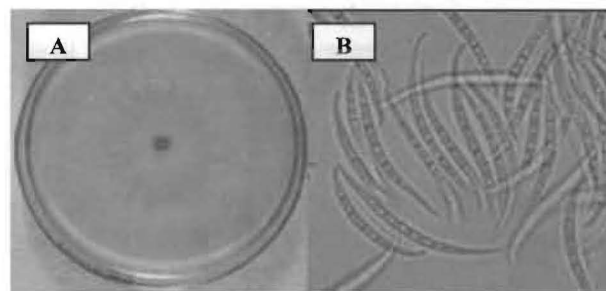


Fig. 5. Conony on (A) PDA plate and macroconidia on (B) synthetic nutrient agar (SNA) medium (1 g KH_2PO_4 , 1 g KNO_3 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g KCl , 0.2 g glucose, 0.2 g sucrose and 23.0 g agar/liter distilled water) of *Fusarium equiseti* (GF191)

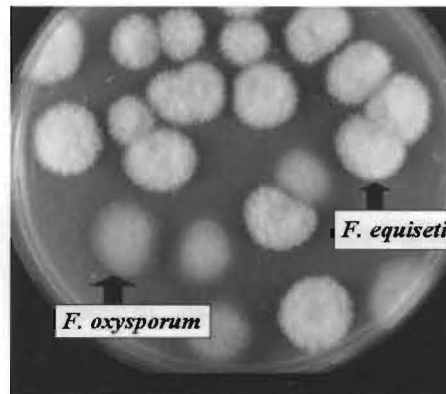


Fig. 6. Cononies of *Fusarium equiseti* (GF191) and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (RJN1) on peptone-PCNB agar

F. equiseti GF191 は、根腐萎凋病菌に対して抗菌活性、菌寄生などの働きは認められない。そこで、ここでは *F. equiseti* のトマト根腐萎凋病に対する発病抑制機構についての検討を行った。

2. 材料および方法

供試植物および供試微生物

トマトは「ハウス桃太郎」を用いた。拮抗微生物は *F. equiseti* GF191 を、根腐萎凋病菌は RJN1 菌株を用いた。詳細は、第一章を参照。

トマト根と茎からの *F. equiseti* の再分離

GF191 の胞子懸濁液 (10^7 budding-cells/ml) をトマト播種時に小型ロックウール (36×36×40mm) に 20ml 処理した後、前述と同様に温室内で栽培した。播種 25 日および 45 日後にロックウール内のトマトの根と地際部から上部 10cm 部分の茎を採取し、試験に用いた。対照として、GF191 無処理のトマトの根と茎を使用した。根は丁寧にロックウールを除去した後、根と茎を別々にして水道水

で洗浄した後、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に3分間浸漬し、その後滅菌水で3回洗浄することで表面殺菌を行った。根は1cm長に、茎は厚さ約3mmの輪切りに切断した後、それぞれの切片をペプトン・PCNB培地 (Content; Difco Bacto Peptone 15.0g, KH_2PO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, Streptomycin 0.3g, PCNB75%WP 1.0g, Agar 25.0g, Distilled Water 1000ml) に置床した。1反復あたり10枚の培地を用い、1シャーレあたりそれぞれ10切片を置床した。さらに、トマトの根と茎に生体重の10倍量の滅菌水を加え、ホモジナイザーで磨砕した (8,000rpm、10分間処理)。磨砕液を滅菌水で100~1,000倍に希釈し、ペプトン・PCNB培地に0.5mlを流し込み、25℃、暗黒下で培養した。培養6日後に培地上に形成したGF191のコロニーを計測して、茎および根の *F. equiseti* 菌量を算出した。

F. equiseti を処理したトマト茎抽出液内での病原菌の孢子発芽および増殖

第一章の試験2の終了時に、GF191処理区、病原菌のみ接種区 (Pathogen) の導管褐変指数1の茎を採取した。また、対照としてGF191無処理および病原菌無接種区 (Control) の茎も採取した。採取した茎はそれぞれを水道水で洗浄した後、ホモジナイザーで磨砕した (8000rpm、10分間)。磨砕液は遠心分離器で3,000rpm、10分間処理し、得られた上清を0.45μmのミリポアフィルターで濾過した。この濾液をトマト抽出液として試験に用いた。小型シャーレ (φ40mm×20mm) に2mlの抽出液を入れ、抽出液の表面にセロファンを浮かべ、その上にトマト根腐萎凋病菌の孢子懸濁液 (5×10^5 budding-cells/ml) 40μlを接種した。25℃、暗黒下で12時間培養した後、1シャーレあたり400個の孢子について発芽の有無を、40個の孢子について発芽管の長さを計測した。試験は4反復で行った。さらに、GF191のみを処理したトマト茎を別途準備して、根腐萎凋病菌の孢子発芽および増殖試験を行った。GF191を播種時および大型ロックウールキューブ移植時に前述と同様に処理した後、温室内で栽培管理した。対照としてGF191および病原菌無処理 (Control) を設定した。トマトの茎は播種75日後に採取し、地際部から上部20cm部分を試験に用いた。前述と同様に抽出液を作成した後、孢子発芽と孢子増殖に関する試験を行った。孢子増殖は、100mlのフラスコに9mlの抽出液を入れ、根腐萎凋病菌 (1×10^6 budding-cells/ml) 1mlを加え、振とう培養器 (25℃、120rpm) で培養した。培養1、3、5、7、14および21日後に培養液を採取し、血球計算盤を用いて新しく形成された孢子の濃度を調査した。試験はそれぞれ4反復で行った。

3. 試験結果

トマト根と茎からの *F. equiseti* の再分離

GF191は播種25日後と45日後のトマト根からそれぞれ94.3%、97.1%と高い頻度で再分離された (Table 6)。また、根でのGF191の菌量は25日後に 6.7×10^3 cfu/g、45日後には 16.7×10^3 cfu/gと2.5倍まで増加した。一方、茎からは25日後および45日後においていずれもGF191は再分離されなかった。

Table 6. Re-isolation and population of *Fusarium equiseti* (GF191) from roots and stems of tomato after seeding

Treatment		% re-isolation of GF191		Population of GF191 ($\times 10^3$ cfu/g)	
		25 days	45 days	25 days	45 days
GF191	roots	94.3	97.1	6.7	16.7
	stems	0	0	0	0

F. equiseti を処理したトマト体内での病原菌の孢子発芽および増殖

GF191を処理した後に根腐萎凋病菌を接種したトマト茎抽出液中では、12時間後の根腐萎凋病菌の孢子発芽率と発芽管長が有意に抑制された (Table 7)。GF191のみを処理したトマト茎抽出液中においても、同様に8、10、12時間後に根腐萎凋病菌の孢子発芽が有意に抑制された (Fig. 7)。さらに茎抽出液中の根腐萎凋病菌の孢子増殖を調査した結果、GF191処理区の菌量は無処理区と比較して培養3日後から21日後まで無処理区の約1/3と有意に抑制された (Fig. 8)。

Table 7. Effect of stem extracts from plants treated with *Fusarium equiseti* on spore germination and germling length of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Treatments	Discoloration severity	Germination (%)	Germling length (μm)
GF191+Pathogen	1	70.0 a ²⁾	11.4 a
Pathogen	1	85.5 b	14.8 b
Control	0	85.0 b	14.8 b

1) Stem and root samples were collected 117 days after inoculation of FORL from experiment 2. Germination and germling length determined 12 hours after incubation. Data are means of four replications with 200 and 40 spores per replication for germination and germling length, respectively.

2) Values with same letter in each column are not significantly different ($P=0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test.

4. 考察

F. equiseti はコウライシバ根圏土壌から分離した植物生育促進菌類 (PGPF) で、ベントグラス、コムギ、トマトおよびキュウリの生育を促進し、キュウリ立枯病

(*Pythium irregulare*)、コムギ立枯病 (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) などの土壌病害に対して発病抑制効果を示すことが報告されている (Hyakumachi, 1994)。また、PGPF は根の表皮や皮層外部に定着することが示され (Hyakumachi, 1994; Shivanna et al., 1996)、植物の根内部又は外部に PGPF が継続的に存在することが植物の抵抗性を誘導していることが示唆された (Meera et al., 1995b)。GF191 はトマト根から頻りに分離され、その菌量も播種 25 日後より播種 45 日後には増加することが示された (Table 6)。この結果から、GF191 が持つトマトの根での高い定着能力が病害抑制効果に関与することが示唆された。

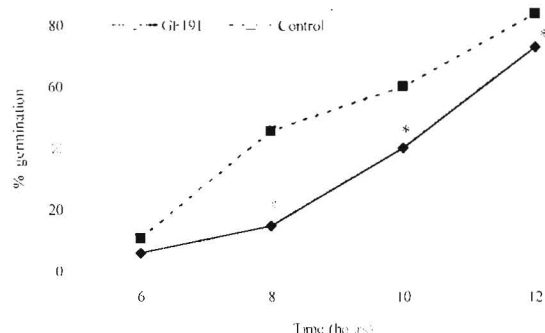


Fig. 7. Suppression of spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stem extracts of tomato treated with GF191. Asterisk denotes significant difference according to Student *t*-test at $P = 0.05$.

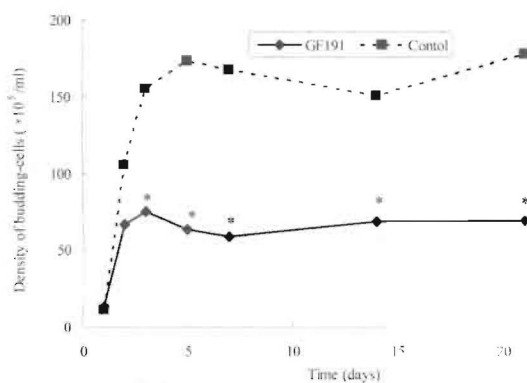


Fig. 8. Suppression of production of new budding-cells of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in extracts of stem of tomato treated with *F. equiseti* GF191. Asterisk denotes significant difference according to Student *t*-test at $P = 0.05$.

生物防除に用いられる拮抗微生物の病害防除機構は大きく2つ(直接的に病原菌に作用、宿主植物を介して病

害抑制が作用)に分類される (Mandeel and Baker, 1991, Postma and Rattink, 1992)。*F. equiseti* を処理したトマトは、根腐萎凋病の発病を抑制するだけでなくトマトの茎内の病原菌の菌量を抑制した。この結果は、Nelson ら (1992) の非病原性 *Fusarium* を処理したトマトおよびキュウリは植物内で病原菌の増殖を抑制する報告と同じであった。また、トマト萎凋病に対する抵抗性品種では、感受性品種と比較して茎や根内の病原菌量が減少することが報告されている (Elgersma et al., 1972; Stromberg and Corden, 1977)。本研究において、GF191 を処理したトマトは、茎内の病原菌量が低くなること、茎磨砕液中では病原菌の胞子発芽と増殖が抑制されることが示された。このことから、GF191 を処理したトマト内では、病原菌は感染するものの増殖できないことが示唆された。

Benhamou ら (1997) は、*Pythium oligandrum* がトマト根腐萎凋病菌に対して抗菌作用をもたらすフェノール物質の蓄積を誘導することを報告している。さらに、Stromberg and Corden (1997) はトマト萎凋病菌を接種した抵抗性品種の茎抽出物は病原菌の生育に対して高い抗菌活性を示すことを報告している。これまで、トマト茎や根でのトマト萎凋病菌の抑制効果は、トマチンやリシチンの蓄積と関係することが報告されている (Furui et al., 1998; Hammerchlag and Mace, 1975; Langcake et al., 1972; MacCane and Drysdale, 1975)。本研究においても、*F. equiseti* を処理したトマト茎抽出物で病原菌の発芽や増殖が抑制され (Table 7, Fig. 7~8)、*F. equiseti* は植物内成分に何らかの生理的な変化を誘導したことが示唆された。さらに、根に処理した *F. equiseti* は茎に移行しないこと、*F. equiseti* は根腐萎凋病菌に対して抗生、寄生などの直接的な作用は示さないことから、*F. equiseti* はの病害抑制機構には抵抗性誘導が関与していることが示唆された。

第三章 *F. equiseti* と生分解性ポットを用いた土耕栽培トマト根腐萎凋病の生物防除

1. 緒言

ここでは、植物生育促進菌類 *Fusarium equiseti* GF191 を用いて土耕栽培トマトにおける根腐萎凋病に対する防除効果を検討した。トマト根腐萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) は、土壌病原菌の一つで、厚膜胞子の形態で長期間土壌中に生存することが知られている。岐阜県においてトマト栽培はその多くが土耕で栽培されているため、根腐萎凋病が発生した圃場は土壌消毒を行う必要がある。しかし、クロロピクリンを用いた土壌消毒は高い殺菌効果が期待できるものの、作業が困難である、消毒後に作付けするトマトの生育が過繁茂になる等の問題が発生する。そのため、化学農薬を用いた土壌消毒に変わる新たな防除技術の開発が必要不可欠となっている。

土耕で栽培される作物の土壌病害に対して拮抗微生物を用いた生物防除では、その防除効果が不安定になる場合がある。その要因としては、土壌中の病原菌密度が高いこと、土壌へ処理した拮抗微生物が作物に定着しないことが挙げられる。そのため生物防除の効果の安定のために、拮抗微生物と化学的または物理的防除法を組み合わせた研究が行われ、土壌消毒と *Trichoderma harzianum*、亜鉛と *Pseudomonas. Fluorescence*、ペーパーポットと非病原性 *Fusarium oxysporum* を組み合わせることでフザリウム病害に対して高い防除効果が得られることが報告されている (Katsube and Akasaka, 1997; Duffy and Defago, 1997; Sivan et al., 1987)。

一般にトマトはビニールポットを用いて育苗した苗を圃場に定植する方式で栽培されている。現在、農業生産場面で発生する廃棄物の削減を目的にビニール資材の代替として生分解性資材を用いる動きが見られ、生分解性マルチ、生分解性ポットなどが生産、販売されている。生分解性ポットはトウモロコシなどの穀物を原料として形成され、土壌中の微生物の働きで水と二酸化炭素に分解される。ペーパーポットを用いた移植栽培が、ホウレンソウ萎凋病、ジャガイモそうか病などの土壌病害を抑制することが報告されたことから (Katsube and Akasaka, 1997; Naito et al., 1998)、ペーパーポットと同様の病害抑制効果を期待して生分解性ポットを試験に用いた。

本研究では、*F. equiseti* と生分解性ポットを組み合わせ処理することで、土耕栽培のトマト根腐萎凋病に対して安定して高い防除効果が得られるかを検討した。

2. 材料および方法

供試植物

トマトは全ての試験で、品種「ハウス桃太郎」を用いた。種子は前述 (第一章-2) のとおりに表面殺菌を行った後、試験に用いた。

供試微生物および培養

拮抗微生物は、*Fusarium equiseti* GF191 を用い、病原菌は *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) の RJN1 菌株を用いた。GF191 と FORL は前述のとおりに培養して得られた孢子懸濁液を用いた。

トマト根腐萎凋病の防除効果試験

培養土 (スターベツト) を入れた 128 穴セルトレイに GF191 の孢子懸濁液 (濃度 10^7 budding-cells/ml) を 10ml 処理した後、トマトを播種した。温室内で 19~25 日間育苗した後、径 12cm のポットへ移植するとともに、再度 GF191 孢子懸濁液 (濃度 10^7 budding-cells/ml) を 100ml 処理した。試験 1 では、生分解性ポット (以降 BP と称す) は移植時から用い、試験 2 および 3 では、移植時に

はビニールポットを用い、病原菌汚染土への定植前日に径 12cm の BP へ苗を移し替え、BP とともに病原菌汚染圃場に定植した (Fig. 9, 10- B)。圃場の病原菌密度は、試験 1 では 5×10^3 cfu/g、試験 2 と 3 は 10^4 cfu/g であった。その後、根腐萎凋病の発病を調べるとともに、試験 1 では定植 131 日後、試験 2 では定植 149 日後、試験 3 では定植 135 日後にそれぞれトマトを引き抜き、導管褐変の程度を調査した (Fig. 9)。なお、発病調査基準は前述のとおりである。栽培期間は、試験 1 では 2001 年 9 月 7 日~2002 年 1 月 16 日、試験 2 では 2002 年 1 月 22 日~4 月 12 日、試験 3 では 2002 年 10 月 21 日~2003 年 3 月 5 日であり、それぞれ暖房機で加温したビニールハウス内で行った。また、試験 1 は 1 区 3 株の 3 反復、試験 2 および 3 は 1 区 10 株の 3 反復で行った。

なお、生分解性ポットは東海化成(株)の径 12cm のポット (商品名: To 生分解ポット) を用いた。

トマト茎内 *Fusarium oxysporum* 菌量

試験 3 の終了後にそれぞれの処理区のトマト茎内の病原菌の菌量を調べた。調査方法は前述 (第一章-2) のとおりである。

トマト根と根圏土壌中の病原菌および *F. equiseti* の推移

試験 3 において、トマトの根と根圏土壌中の病原菌 (FORL) の菌量を調査した。トマトの根と土は病原菌汚染圃場へ定植 15、45、60、90 および 120 日後に採取した。トマトの根と土は、生分解性ポット (BP、径 12cm) の内側から採取し、BP 未使用区は BP 区と同様の部位から採取した。採取した根は、水道水で水洗した後、生体重の 10 倍量の滅菌水を加え、ホモジナイザーを使用して磨砕した (約 8,000rpm、10 分間)。磨砕液は 2 重のガーゼを用いて濾過した後、滅菌水を用いて 10~1,000 倍に希釈して駒田培地 (*F. oxysporum* 選択培地) に 0.5ml を流し込み、25°C、暗黒下、6 日間培養後、培地上に形成された *F. oxysporum* のコロニーを計測し、根 1g 当たりの菌量を算出した。採取した土は、滅菌水を用いて 10~1,000 倍に希釈した後、駒田培地を用いて同様に調査して、土 1g 当たりの菌量を算出した。駒田培地はそれぞれ反復あたり 6 枚使用した。

トマトの根と根圏土壌中の *F. equiseti* 菌量は、駒田培地に代わりペプトン・PCNB 培地 (Content; Difco Bacto Peptone 15.0g, KH_2PO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, Streptomycin 0.3g, PCNB75%WP 1.0g, Agar 25.0g, Distilled Water 1000ml) を用いて上記と同様に調査した。

試験はそれぞれ 1 区 3 株からトマトの根および土を採取し、3 反復で行った。

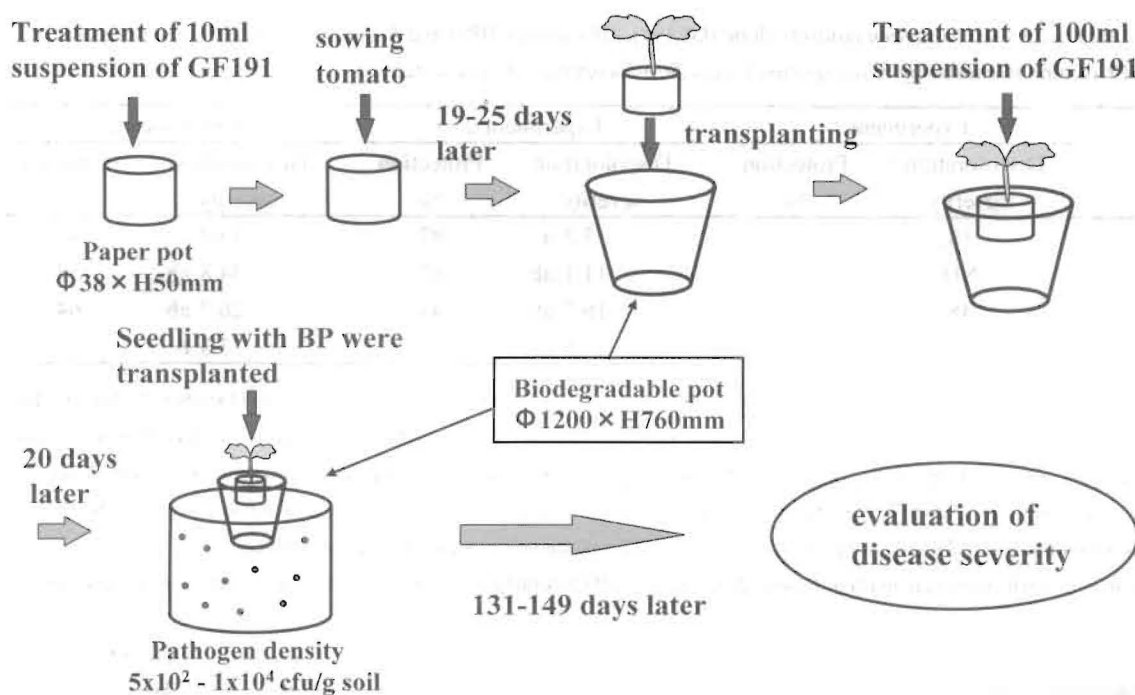


Fig. 9. Experimental design for controlling crown and root rot of tomato using *F. equiseti* (GF191) and biodegradable pots (BP) in a soil system

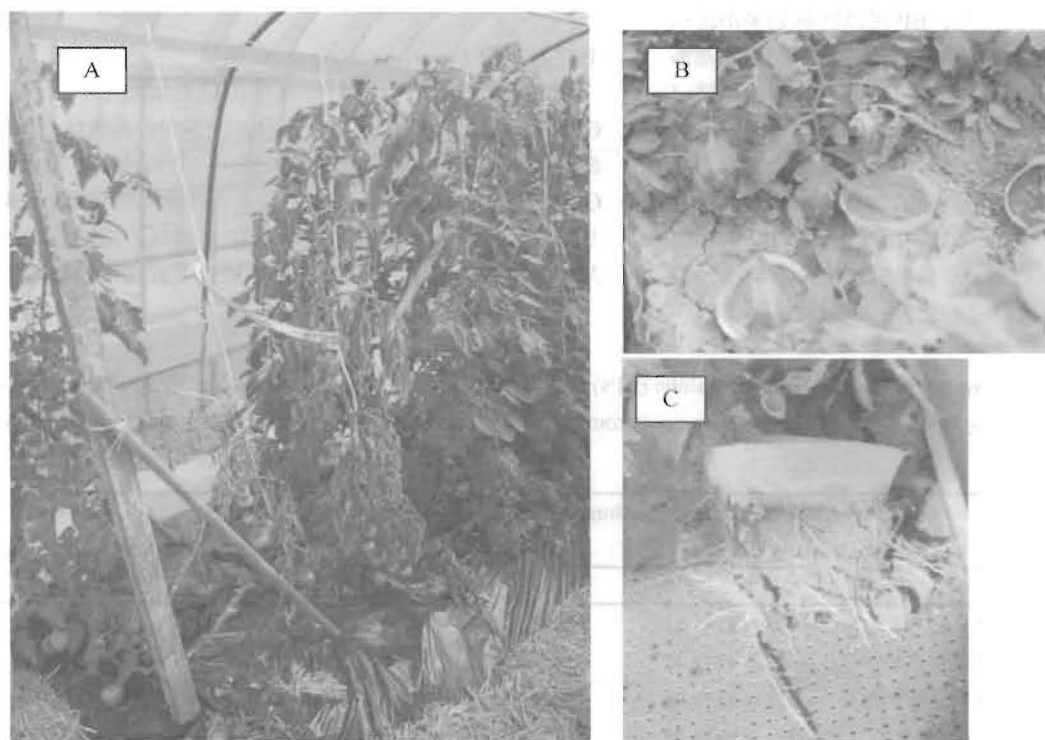


Fig. 10. Control against *Fusarium* crown and root rot of tomato in a soil system by combination of a plant growth promoting fungus, *Fusarium equiseti*, and biodegradable pots (BPs).

(A) Experiments were conducted in greenhouses. Although control plants (not inoculated with *F. equiseti* and BPs not used) were wilted by FCRR, treated plants were healthy.

(B) The seedlings with the BPs were transplanted into artificially pathogen-infested soil.

(C) The BPs was decomposed at end of the experiment.

Table 8. Effects of treatment with *Fusarium equiseti* alone (GF191), BPs alone (BPs) and *F. equiseti* combined with BPs (GF191 + BPs), against FCRR of tomato caused by *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in soil system

Treatment	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
	Discoloration ¹⁾	Protection	Discoloration	Protection	Discoloration	Protection
	severity	%	severity	%	severity	%
GF191+BPs	18.5 a ²⁾	58	3.7 a	87	13.7 a	81
GF191	ND ³⁾		11.1 ab	62	34.8 ab	53
BPs	48.1 b	-8	16.7 ab	44	26.7 ab	64
Pathogen	44.4 b		29.6 b		73.3 b	

Experiments 1, 2 and 3 were conducted from September 7, 2001 to January 16, 2002; January 22 to April 12, 2002; and October 21, 2002 to March 5, 2003, respectively. The data were taken 131 days, 149 days and 135 days after transplanting to pathogen-infested soil in experiments 1, 2 and 3, respectively. BPs were used while seedlings in experiment 1, and while transplanting seedlings to pathogen-infested field in experiments 2 and 3.

1) Discoloration severity = $(3A+2B+C)/3N \times 100$. Number of plants on A: scale 3; B: scale 2; C: scale 1; and N: total number of plants. Discoloration scale: 0: no vascular discoloration; 1: <33%; 2: >33 to 67%; 3: >67 to 100% discoloration of vascular tissue/cortex/xylem.

2) Values with same letter in each column are not significantly different ($P=0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test.

3. 試験結果

トマト根腐萎凋病の防除効果

試験 1 において、*Fusarium equiseti* (GF191) と生分解性ポット (BP) の組み合わせ処理区は、導管褐変度から算出した防除価 58 とトマト根腐萎凋病の発病を抑制することができた (Table 8)。一方、BP 区は防除効果が認められなかった。BP は、植物の根と病原菌を物理的に遮断することで防除効果を得るものと考えられるが、試験 1 では育苗時の温度が高く、育苗時にも一部の BP で分解が観察された。そのため、病原菌汚染圃場に定植した後の BP による遮断効果が低く、防除効果が認められなかったと考えられた。そこで、試験 2、3 では、BP を圃場定植直前に用いることで、より長期間に渡りトマトの根と病原菌の遮断を図った。その結果、試験 2、3 では、

GF191 と BP の組み合わせ処理区の発病は低く推移し (Fig. 11)、試験終了時の導管褐変度から算出した防除価はそれぞれ 88、81 と高い防除効果が認められた (Table 8)。また、試験 2、3 では、GF191 および BP 単独処理でもそれぞれ防除効果が認められた。

トマト茎内 *Fusarium oxysporum* 菌量

試験 3 でトマト茎内の病原菌量を調査した結果、GF191 処理区の指数 1、2、3 および平均の菌量は、無処理 (Pathogen) と比較して有意に低かった (Table 9)。また、GF191 と BP 組み合わせ区の平均の菌量も無処理と比較して約 1/33 と低かった。また、BP 処理区の指数 1、2、3 および平均の菌量の、無処理と比較して有意に低かった。

Table 9. Effects of *Fusarium equiseti* alone (GF191), BPs alone (BPs) and *F. equiseti* combined with BPs (GF191 + BPs) treatments on population density of *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato stems collected 0-20 cm above soil surface in Experiment 3

Treatment	FORL population in different discoloration scale ($\times 10^2$ cfu/g fresh weight)				Average FORL ¹⁾ population ($\times 10^2$ cfu/g fresh weight)
	0	1	2	3	
GF191 + BPs	12.8 b ²⁾ (58.6) ³⁾	5.1 a (41.4)	n.s. ⁴⁾ (0.0)	n.s. (0.0)	9.1 a
GF191	0.1 a (31.0)	1.5 a (41.4)	3.2 a (17.2)	12.4 a (10.3)	3.7 a
BPs	18.8 b (45.0)	21.3 a (35.0)	28.6 a (15.0)	56.7 b (5.0)	30.0 a
Pathogen	n.s. (0.0)	373.6 b (26.7)	333.8 b (26.7)	264.3 c (46.7)	306.1 b

Data were recorded at end of experiment 3 (135 days after transplanting to artificially pathogen-infested soil).

1) Average FORL population = Σ (population of different discoloration scale of tomato's stem $\times$ weight) / total weight.

2) Values with same letter in each column are not significantly different ($P=0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test.

3) % of plants in discoloration scale.

4) no sample.

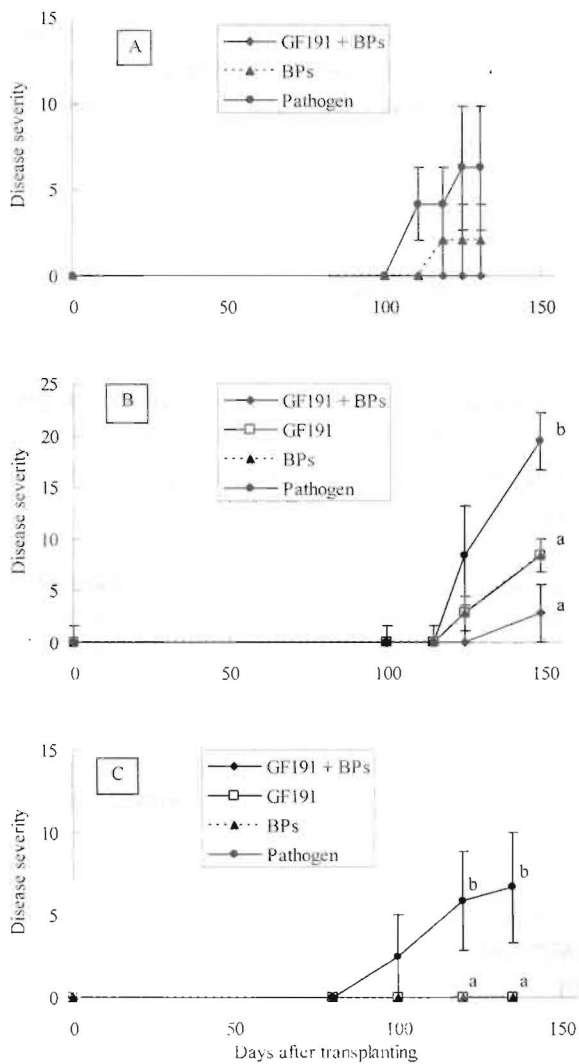


Fig. 11. Progress of disease severity of foliar symptoms caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomato treated with *F. equiseti* alone (GF191), BPs alone (BPs) and *F. equiseti* combined with BPs (GF191 + BPs) in A, experiment 1; B, experiment 2; and C, experiment 3. Data are the means of three replications with ten plants per replications. Values with same letter in each column are not significantly different ($P=0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test. Bars, standard error of means.

トマト根と根圏土壤中の病原菌および *F. equiseti* の推移

根圏土壤中の病原菌量は、無処理区（Pathogen）では定植 45 日後から急速に増加し、定植 90 日後には 1.4×10^4 cfu/g と高かった（Fig. 12）。一方、GF191 と BP の組み合わせ処理区（GF191+BP）の病原菌量は、試験期間を通じて有意に低く、無処理区の菌量の 4.3～16.7% であった。また、GF191 単独、BP 単独処理区でも病原菌量は低く推移した。トマトの根の病原菌量は、無処理区

では定植 15 日後から急速に増加し、定植 60 日後には最大 2.7×10^4 cfu/g であった。一方、GF191 と BP の組み合わせ処理区の病原菌量は試験期間を通じて有意に低く、無処理区の菌量の 0.6～31.9% であった。

トマト根の *F. equiseti* 菌量は、BP の有無に関わらず高く推移した（Fig. 13）。GF191 はトマト根に対して定着性が高いため、BP 使用の効果が表れなかったと思われる。また、根圏土壤中の *F. equiseti* 菌量は、BP との組み合わせ処理区は GF191 単独処理区と比較して試験期間を通じて高く推移した。

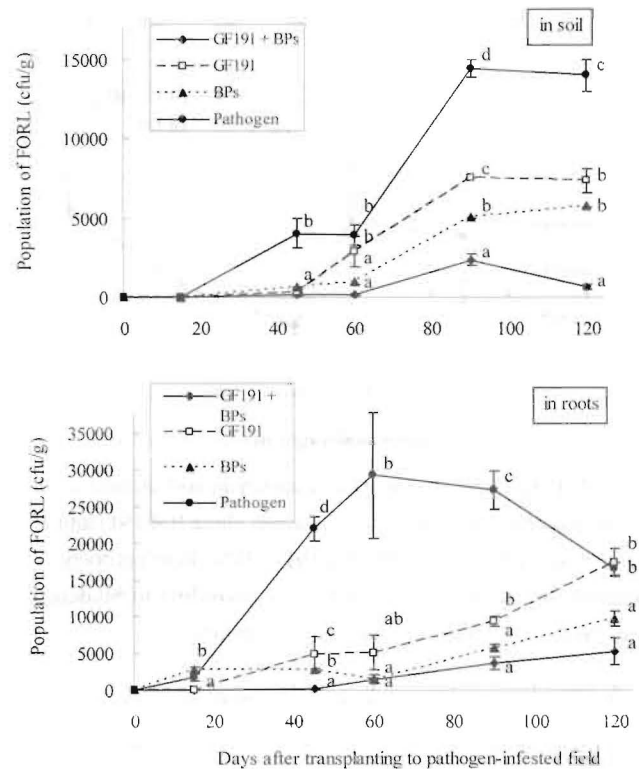


Fig. 12. Population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in soil around roots and tomato roots treated with *F. equiseti* alone (GF191), BPs alone (BPs) and *F. equiseti* combined with BPs (GF191 + BPs) in experiment 3. Values with same letter in each column are not significantly different ($P=0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test. Bars, standard error of means.

4. 考察

Sivan ら（1987）は、土耕栽培トマトの根腐萎凋病に対して、*Trichoderma harzianum* のみでは不十分で、臭化メチルを用いた土壌消毒との組み合わせ処理で十分な防除効果が得られたことを報告している。一般に、土壌中の根腐萎凋病菌の菌量が高い場合は土壌消毒を行い、菌密度を下げる必要がある。しかし本研究では、試験 2、3 のように土壌中の根腐萎凋病菌の密度が高い圃場

(10^4 cfu/g) においても、*F. equiseti* と生分解性ポットを組み合わせ処理することで根腐萎凋病の発病を抑制することが可能であった。

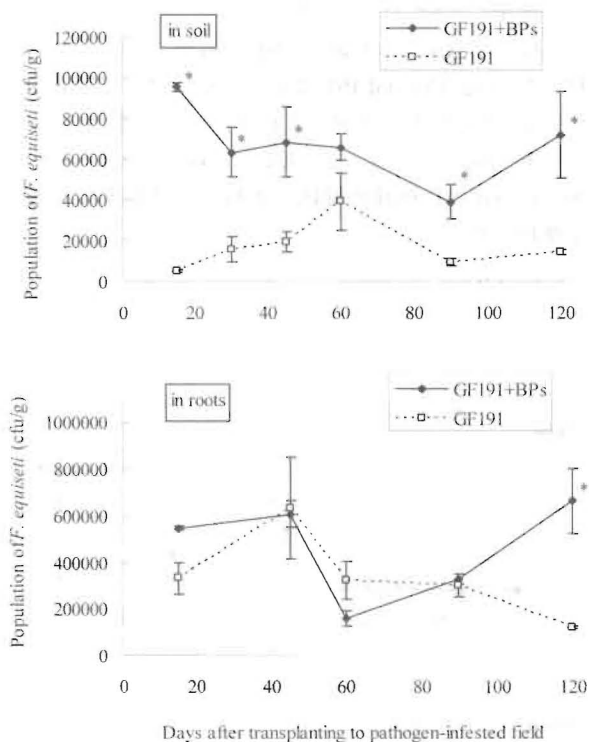


Fig. 13. Population of *Fusarium equiseti* in soil around roots and tomato roots treated with *F. equiseti* alone (GF191) and *F. equiseti* combined with BPs (GF191 + BPs) in experiment 3. Asterisk denotes significant difference according to Student's t-test at $P=0.05$. Bars, standard error of means.

養液栽培でのトマト根腐萎凋病の試験では、*F. equiseti* は発病抑制効果とともにトマト茎内での病原菌の増殖抑制効果を示した。土耕栽培の試験でも同様に、GF191 処理は発病抑制効果とトマト茎内の病原菌量の抑制効果を示した。このことから、*F. equiseti* は植物内成分に何らかの生理的な変化を誘導し、それは栽培方式（養液、土耕）にかかわらず発生することが示唆された。この発病抑制機構の解明は今後の課題となっている。

一般に、拮抗微生物を用いた生物防除を土壌病害の防除に用いると防除効果が不安定になる場合がある。この防除効果の不安定の原因には、次の要因が挙げられる。①微生物が土壌中の環境ストレス（他の微生物との競合、温度、湿度条件など）により植物に定着しない、②植物を定植した後、植物体上で病原菌が急速に増殖する。その結果、拮抗微生物を処理しても発病抑制効果が不十分になると考えられている。今回、GF191 単独処理区は定植 90 日までのトマトの根、根圏土壌の病原菌量の低下を示した。また、BP も試験期間を通じてトマトの根、根圏

土壌中の病原菌量は無処理と比較して低く推移した。さらに、BP と GF191 を組み合わせることで、根圏土壌中の *F. equiseti* 菌量は高く推移し、病原菌量は無処理と比較して顕著に低く推移した。これらのことから、BP は土壌中とトマト根での病原菌密度の増加を抑制し、拮抗微生物の定着を促進する効果があることが示された。このことが、拮抗微生物と生分解性ポットを組み合わせ処理すると防除効果が向上した要因と考えられる。

これまでの研究で、*Fusarium equiseti* と生分解性ポットの組み合わせ処理はトマト根腐萎凋病のみならず、トマト萎凋病および褐色根腐病に対しても高い防除効果を示した (Horinouchi et al., 2002; Miyake et al., 2008)。生分解性ポットは、移植栽培を行うキュウリ、イチゴなどの作物で使用可能であるため、本技術は拮抗微生物を用いた生物防除の実用化に貢献できると思われる。

しかし、分解性ポットを用いる場合に幾つかの注意点と課題がある。一つは、圃場への定植初期に植物の根が生分解性ポットの内側でしか伸長しないため、水管理には十分な注意が必要なことである。この点は、灌水方法を改善することで容易に解決する。次に、生分解性ポットの分解速度は定植時の地温、土壌水分、製品の種類によって異なることである。分解速度は防除効果へ及ぼす影響が強い。現在、生分解性ポットの分解時間と発病抑制効果の関係は不明であるため、今後、さらなる研究が必要である。また、生分解性ポットは現在、材料や分解時間が異なる製品が販売されている。病害防除に有効な生分解性資材の探索も今後の課題である。実用上の大きな問題として、生分解性ポットの価格がビニールポットと比較して高いことである。しかし、生分解性ポットはビニールポットと違い産業廃棄物にならないため、環境負荷軽減に有効な手段として期待されている。実際、造園、鉢花分野において生分解性ポットの利用が広がりを見せている。今後は、幅広い分野で利用され、その価格も下がることが期待される。

第四章. *F. equiseti* によるホウレンソウ萎凋病の生物防除 1. 緒言

ホウレンソウ萎凋病は *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. f. sp. *spinaciae* (Sherb) W.C. Snyder & H.N. Hans (FOS) によって引き起こされる病害である。本病に発病したホウレンソウは、発芽初期の立枯れ、葉の黄化、株の萎凋、枯死の症状と根内部の導管褐変症状を示す (Fig. 14)。 *F. oxysporum* は特徴的な大型分生子、小型分生子および厚膜胞子を作ることが知られているが、厚膜胞子は長期間土壌中で生存するため、連作障害の一因にもなっている。対策は化学農薬を使用した土壌消毒が有効で、夏どりホウレンソウ産地ではクロルピクリンを用いた土壌消毒が行われている。

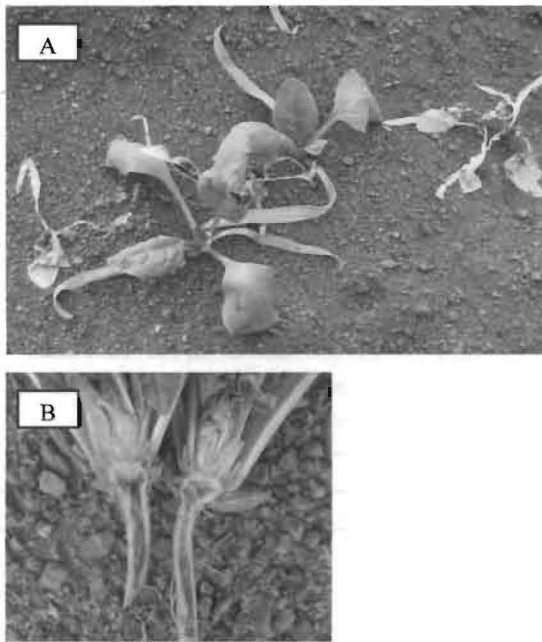


Fig. 14. Symptoms of (A) foliar and (B) root inside of *Fusarium* wilt of spinach

これまで、ハウレンソウ萎凋病に対する生物防除に関する研究の報告は少なく、非病原性 *Fusarium oxysporum* (Katsube and Akasaka, 1997)、弱病原性 2 核 *Rhizoctonia* (Muslim et al., 2003)、*Enterobacter cloacae* (Tsuda et al., 2001) と僅かである。勝部・赤坂 (1997) は、ペーパーポットを用いた移植栽培技術がハウレンソウ萎凋病に対して有効で、非病原性 *F. oxysporum* とペーパーポットを組み合わせることで高い防除効果が得られることを報告した。

そこで、ここでは *Fusarium equiseti* とペーパーポットを用いた移植栽培技術を組み合わせハウレンソウ萎凋病に対する発病抑制効果を検討した。

2. 材料および方法

供試植物

全ての試験において、ハウレンソウは品種「サンライト」を使用した。サンライトはハウレンソウ萎凋病に対して感受性の品種である。試験前には、ハウレンソウ種子は 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15 分間浸漬し、その後滅菌水で 3 回洗浄することで表面殺菌を行った。

供試微生物

拮抗微生物は、*Fusarium equiseti* (GF183) を試験に用いた。GF191 はトマト根腐萎凋病で高い発病抑制効果を示したが、GF183 はハウレンソウ根に GF191 より高い定着性を示したことから、GF183 を選定した。萎凋病菌は岩手県農業試験場から分譲された *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* (FOS) の SIHI-4 菌株を用いた。

GF183 と FOS は、前述（第一章-2）のとおり培養し

て得られた胞子懸濁液を試験に用いた。

ハウレンソウ萎凋病の防除効果

試験 1～3 は、培養土（スターベット、全農岐阜）を入れた 28.0×58.0mm のペーパーポット（規格 V4、日本甜菜製糖（株））に、GF183 の胞子懸濁液（濃度 10^7 budding-cells/ml）を 10ml 処理した後、ハウレンソウを播種した。温室内で約 14 日間育苗した後、ペーパーポット苗を雨よけハウス内のコンクリートブロック（50×100×80cm）内の病原菌汚染土（病原菌密度 1×10^4 cfu/g）に定植した（Fig. 15、16）。試験 4 および 5 は、GF183 の 3 つの処理方法による発病抑制効果を検討した。GF183 を播種時に 1 回、移植前日に 1 回、播種時と移植時の 2 回処理する区を、試験 5 では、さらに汚染土に種子を直播する区を設定した。

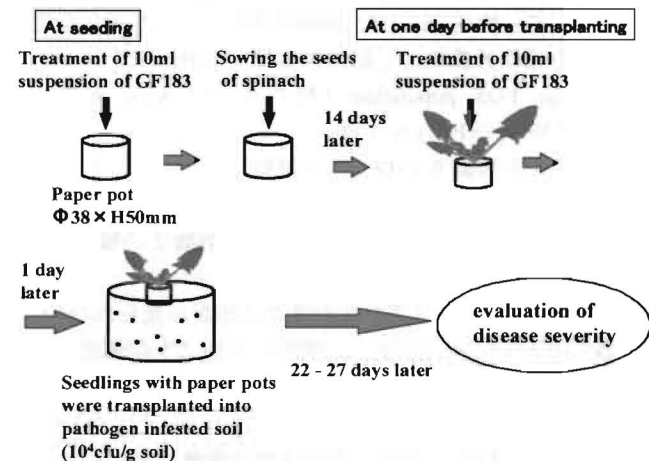


Fig. 15. Experimental design for controlling *Fusarium* wilt of spinach using *Fusarium equiseti* GF183 and paper pots

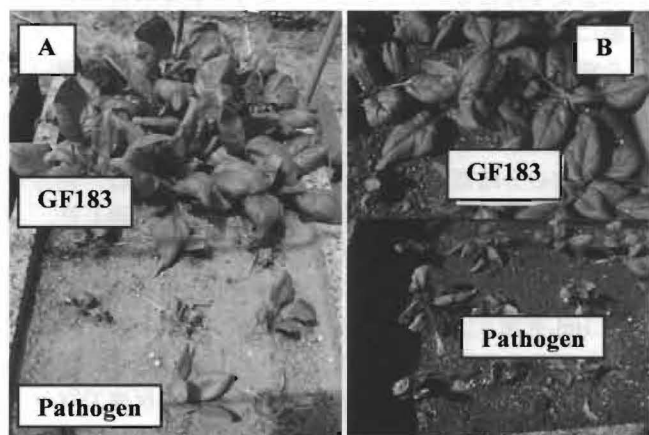


Fig. 16. Effects of PGPF *Fusarium equiseti* GF183 against *Fusarium* wilt of spinach in (A) experiment 4 and (B) experiment 5.

試験 1 は 1999 年 5 月 18 日～6 月 9 日、試験 2 は 2000 年 6 月 4 日～28 日、試験 3 は 2003 年 6 月 28 日～7 月 28 日、試験 4 は 2004 年 5 月 26 日～6 月 18 日、試験 5 は 2006

年6月6日～7月5日に雨よけハウス内で行い、それぞれ汚染土定植22日、24日、27日、22日、26日後に発病を調査した。外観の発病は指数0～4（指数0：発病が認められない、1：下葉が黄化、2：株が軽く萎凋、3：株が激しく萎凋、4：株が枯死）の5段階で調査し、発病度を算出した。

ハウレンソウ根内 *Fusarium oxysporum* 菌量

試験4の終了後、ペーパーポット内の根を導管褐変指数別に採取した。その後、水道水で水洗し、それぞれ生体重の10倍量の滅菌水を加え、ホモジナイザーを使用し磨砕した（8,000rpm、5分間）。磨砕液は2重のカーゼを用いて濾過した後、滅菌水を用いて10～1,000倍に希釈して駒田培地に0.5mlを流し込み、25℃、暗黒下で6日間培養後、培地上に形成された *F. oxysporum* のコロニーを計測して、根1g当たりの菌量を算出した。処理区の根内の平均病原菌量は、下記の式を用いて算出した。

Average FOS population（根内の平均病原菌量）

$$=(P_0A+P_1B+P_2C+P_3D)/N \times 100$$

 P_0 ：導管褐変指数0の根、 P_1 ：指数1の根、 P_2 ：指数2の根、 P_3 ：指数3の根の病原菌量を示す。
 A ：指数0の根、 B ：指数1の根、 C ：指数2の根、 D ：指数3の根、 N ：全ての根の生体重(g)を示す。
 導管褐変指数0：地際部の根の導管に褐変が見られない、1：導管の1/3以下が褐変、2：導管の1/3～2/3が褐変、3：導管の2/3以上が褐変。

ハウレンソウ根抽出液中の萎凋病菌の増殖

試験4の終了時に、GF183の播種時1回処理区、病原菌接種区(Pathogen)の導管褐変指数3、無処理区(Control)の導管褐変指数0のハウレンソウ根をそれぞれ採取して試験に用いた。また、GF183のみを処理したハウレンソウを別途栽培し、播種30日後に根を採取して試験に用いた。ハウレンソウ根に生体重の10倍量の滅菌水を加え、ホモジナイザーで磨砕した（8,000rpm、5分間処理）。磨砕液を遠心分離器で処理し（3,000rpm、10分間）、得られた上清を0.45μmのミリポアフィルターで濾過した。この濾液をハウレンソウ根抽出液とした。9mlの抽出液を入れた100mlフラスコに 1×10^6 budding-cells/mlの萎凋病菌1mlを加え、振とう培養器で培養した。培養1、3、5および7日後に培養液を採取し、新しく形成された胞子を血球計算盤を用いて調査した。試験は4反復で行った。

3. 試験結果 発病抑制効果

試験1、2および3において、*F. equiseti* GF183処理区は萎凋病の発病を有意に抑制し、防除価はそれぞれ91.8、

51.5、79.9であった（Table 10）。試験4では、GF183の播種時1回処理、播種および移植前日の2回処理は、防除価52.5、58.1と発病抑制効果が認められたが、移植前日1回処理は発病抑制効果が認められなかった（Table 11）。試験5では、GF183の播種および移植前日の2回処理は、播種時1回処理より高い防除効果を示し、直播区と比較するとGF183の2回処理区は高い防除効果であった（防除価94.8）。

Table 10. Effects of *Fusarium equiseti* GF183 on disease severity of *Fusarium wilt* of spinach caused by *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* under polytunnel conditions.

Treatment	Disease severity		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
GF183 + Pathogen	3.4 b	22.9 b	6.3 b
Pathogen only	41.7 c	47.2 c	31.3 c
Control	0.0 a	0.0 a	0.0 a

Disease severity = $(4A+3B+2C+D)/4N \times 100$. A: number of plants on scale 4; B: number of plants on scale 3; C: number of plants on scale 2; D: number of plants on scale 1; N: total number of plants. Disease scale; 0: no disease; 1: yellowing; 2: slight wilt; 3: heavy wilt; and 4: dead.

Values with the same letter in each column are not significantly different ($P < 0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test.

ハウレンソウ根内 *Fusarium oxysporum* 菌量

試験4において、GF183播種時1回処理区、GF183播種および移植前日の2回処理区のハウレンソウ根内の平均の病原菌量は病原菌処理区と比較してそれぞれ約1/7と有意に少なかった（Table 12）。また、GF183を処理した区では、導管褐変指数が3と発病が激しい個体でも根内の病原菌量が有意に少なかった。

ハウレンソウ根抽出液中の萎凋病菌の増殖

試験4から得られたGF183を処理したハウレンソウ根抽出液での萎凋病菌の胞子濃度は、培養3、5および7日後で無処理区の約1/3と有意に抑制された（Fig. 17-A）。また、病原菌処理区と比較しても培養3および7日後は有意に低かった。

GF183のみを処理した（病原菌は無接種）のハウレンソウの根抽出液中においても、萎凋病菌の胞子濃度は無処理と比較して培養3日後から有意に抑制され、無処理と比較して約1/4～1/3と低かった（Fig. 17-B）。

Table 11. Effects of single and double application of *Fusarium equiseti* GF183 on disease severity of Fusarium wilt of spinach caused by *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* under polytunnel conditions.

Treatment	Disease severity	
	Exp. 4	Exp. 5
GF183 single application at seeding + Pathogen	41.6 b	20.4 bc
GF183 single application one day before transplanting + Pathogen	71.3 bc	ND
GF183 double application at both seeding and one day before transplanting + Pathogen	36.7 ab	4.6 b
Pathogen only	87.5 c	36.1 c
Direct sowing + Pathogen	ND	89.8 d
Control	0.0 a	0.0 a

ND: Not done. Values with the same letter in each column are not significantly different ($P<0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test.

Table 12. Effects of *Fusarium equiseti* GF183 treatments on population density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* in roots of spinach in experiment 4.

Treatment	FOS populations in different discoloration scores ($\times 10^2$ cfu g ⁻¹ fresh weight)				Average population of FOS ($\times 10^2$ cfu g ⁻¹ fresh weight)
	0	1	2	3	
GF183 single application at seeding + Pathogen	7.9 b	21.3	43.3 a	353.3 a	98.9 b
GF183 double application + Pathogen	7.3 b	55.0	73.3 ab	264.0 a	96.5 b
Pathogen only	n.s.	n.s.	95.3 b	1453.3 b	673.0 c
Control	0.0 a	n.s.	n.s.	n.s.	0.0 a

n.s.: No sample.

Values with the same letter in each column are not significantly different ($P<0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test

4. 考察

F. equiseti GF183は5回の試験を通じてハウレンソウ萎凋病の発病を抑制し、その防除価は43.5~91.8であった。GF183による防除効果は、処理方法が若干異なるものの非病原性 *F. oxysporum* による防除効果 (Katsube and Akasaka, 1997) とほぼ同じ結果であった。

GF183の処理時期を検討した結果、移植前日1回処理では防除効果が認められなかったが、播種時1回処理、播種時および移植前日の2回処理は防除効果を示した。このことから、GF183の処理は移植前日より播種時が適すると考えられた。また、2つ処理の間で有意な差は見られなかったが、GF183の2回処理は播種1回処理と比較して高い防除効果が得られたことから、GF183の定着を促進する2回処理は有効であると考えられた。

ハウレンソウ根内の病原菌量を調査した結果、GF183を処理したハウレンソウの根では病原菌の菌量が有意に低かった (Table 12)。このことから、病原菌はGF183を処理したハウレンソウ根内へ侵入するものの、根内で増殖できないことが示唆された。また、GF183を処理し、その後病原菌汚染土で生育したハウレンソウの根の抽出液中では、病原菌の増殖を顕著に抑制し (Fig. 17- A)、GF183のみを処理したハウレンソウの根抽出液でも同様に病原菌の増殖抑制効果が認められた (Fig. 17- B)。このことは、GF183を処理することでハウレンソウ体内で病原菌に対する何らかの抗菌物質が生産され、それによって病原菌の進展や増殖が抑制されると考えられた。今後、GF183処理によりハウレンソウ植物体内で抗菌物質の生産が誘導されるかを調べる必要がある。このハウレ

ンソウ体内での病原菌の増殖抑制は、トマト根腐萎凋病の試験と同様の結果を示したことから、*F. equiseti* は様々な植物に同様の現象を引き起こす可能性が示唆された。

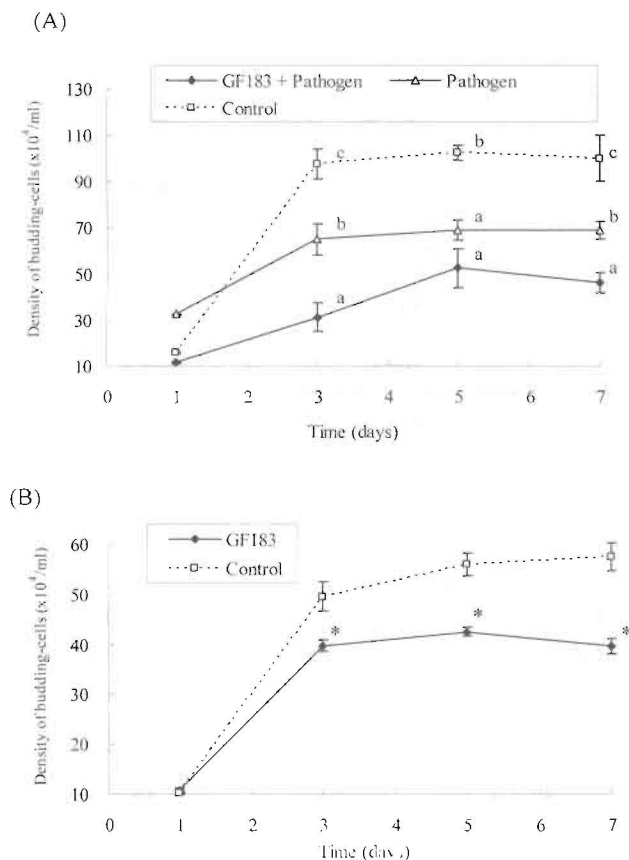


Fig. 17. Suppression of production of new budding-cells of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* in extracts of root of spinach (A) treated with *F. equiseti*-GF183 and pathogen, (B) treated with *F. equiseti*-GF183 and unchallenged with pathogen. Values with the same letter in each column are not significantly different ($P < 0.05$) according to Fisher's protected least significant difference test. An asterisk denotes a significant difference according to Student's t-test at $P < 0.05$. Bars indicate standard error of means.

萎凋病に罹病したホウレンソウの根圏土壌では、病原菌量が高いことが報告されている (Naiki and Morita, 1983)。今回の試験で、萎凋病に罹病したホウレンソウの根内の病原菌量は 1.5×10^5 cfu/g と高かった (Table 12)。ホウレンソウは地上部のみを収穫して、根は圃場に残す。そのため、罹病した根が圃場に残されると土壌中の病原菌密度は急速に高くなることが示唆された。岐阜県高冷地のホウレンソウは年に 4~5 回連続して栽培されている。そのため、2 作目の播種前に土壌消毒を行っても、その後の栽培期間中に土壌中の病原菌密度が高まり、次年度の萎凋病を誘発する悪循環が続いている。萎凋病の

発病を抑制するためには、罹病根の除去が必要と考えられた。

今回、ペーパーポットを用いた移植栽培技術と *F. equiseti* を用いた生物防除技術を組み合わせることでホウレンソウ萎凋病の防除効果が可能であった。しかし、移植栽培技術がホウレンソウ栽培では導入されていない点を考慮すると、今後、*F. equiseti* の処理方法の検討が必要である。

第五章 総合考察

岐阜県において、トマトとホウレンソウは、それぞれの産地において病害対策 (土壌病害、葉かび病等) を含めた品種の選定や栽培時期、栽培法などの改良を行うことで主要な野菜栽培品目の地位を維持している。実際に冬春トマト産地では、栽培品種が根腐萎凋病に罹病性の「ハウス桃太郎」から耐病性を持つ「桃太郎 J」に変わったことから、根腐萎凋病の発生は減少している。しかし、産地では青枯病および褐色根腐病が引き続き発生し、土壌病害に対する対策は必要不可欠となっている。また、トマト萎凋病 (病原菌: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) は、研究開始時には岐阜県ではレース 1 および 2 抵抗性品種を用いることで、その発生は抑制されていた。しかし、1997 年に福岡県でトマト萎凋病菌レース 3 の発生が報告されて以降、その発生は各地に拡大し、岐阜県でも 2009 年に西濃地域の施設栽培トマトでレース 3 による萎凋病が発生した。このことは抵抗性品種のみでは病害抑制が困難であることを改めて認識させられることであった。

ホウレンソウ栽培では、萎凋病に対する耐病性品種がいくつか市販されるものの、その発病抑制効果は不十分である。また、化学農薬 (クロルピクリン) を用いた土壌消毒法にかわる新たな土壌消毒法の取り組みが行われているが (熱水土壌消毒、還元土壌消毒など)、その技術には機材コスト、効果が不安定である点など解決すべき問題が残されている。夏どり産地では、ホウレンソウは年 4~5 作と連続して栽培されている。同様に連作されるサラダナでは、萎凋病汚染圃場でクロルピクリンを用いた土壌消毒を行った後、サラダナを 1 作栽培することで病原菌量が作付け前の 100 倍に増えることが報告されている (西村, 2006)。夏どりホウレンソウの萎凋病が発病した圃場の土壌中では病原菌量が高いことが報告された (Naiki and Morita, 1983)、本研究においても、発病したホウレンソウの根内の萎凋病菌量は高かった。これらのことから、萎凋病菌汚染圃場では土壌消毒を行ってもその後ホウレンソウを作付けすることで、病原菌量は容易に高くなることが示唆される。そのため、夏どりホウレンソウ産地では毎年の土壌消毒は必要不可欠な状況にある。

トマト根腐萎凋病の生物防除試験では、非病原性

Fusarium oxysporum は高い防除効果を示すことが報告されている。本研究でも非病原性 *F. oxysporum* F13 菌株は、これまでの報告と同様に高い防除効果を示し、試験1~3での防除価(外観の発病度から算出)は52~81であった。試験4においてもF13は病原菌接種120日後には防除価67と高い防除効果が認められたが、試験終了時(接種140日後)の防除効果は防除価24と低かった。一方、植物生育促進菌類 *Fusarium equiseti* は養液栽培のトマト根腐萎凋病に対して安定して高い防除効果を示し、その防除効果は防除価63~100と高かった。このことから、*F. equiseti* はトマト根腐萎凋病に対して有望な生物防除エージェンツであることが示された。*F. equiseti* を播種時および移植時の2回処理することで、その発病抑制効果は病原菌接種後140日間と長期に渡り持続した。今後、*F. equiseti* の処理時期、処理回数を検討することで防除効果はさらに長期間持続可能と考えられる。これらのことから、養液栽培では *F. equiseti* を用いた生物防除は現場で利用可能であることが示唆された。

土耕栽培の根腐萎凋病に対しては、*F. equiseti* 単独処理でも防除価53~62と防除効果が認められた。しかし、トマト栽培では病害による枯死株は収量の減少に直結するため、より高い防除効果を得る必要があった。そこで、*F. equiseti* を処理して育苗したトマト苗を生分解性ポットと一緒に汚染圃場に定植した結果、防除価87と高い防除効果を得ることができた。生分解性ポットはその物理的遮断効果で定植作業や灌水による病原菌の根圏汚染を防ぐ効果があることが示唆された。実際に、生分解性ポットの中の病原菌量は未使用の場合と比較して有意に低く、*F. equiseti* と生分解性ポットを組み合わせることで顕著に低かった。また、トマトの根での病原菌量も同様に *F. equiseti* と生分解性ポットの組み合わせ処理区では顕著に低かった。さらに、生分解性ポットは根圏土壌中の *F. equiseti* 菌量を高い状態で維持する働きがあった。これは、生分解性ポットによって培養土で定着した *F. equiseti* が土壌中(圃場)の他の微生物との競合の影響を受けにくくなったものと考えられた。これらのことから、生分解性ポットを用いることで、これまで拮抗微生物を用いた生物防除の弱点である効果の不安定を解決することが可能であると考えられた。

ハウレンソウ萎凋病は、根の導管内で増殖して、通水機能を低下させるため、葉の黄化、萎れ、枯死症状を引き起こす。ハウレンソウは葉部を出荷するため、萎凋病に対しては高い防除効果が求められている。すなわち、トマトでは発病初期の症状である葉の黄化は、ハウレンソウでは収穫不可能な状態を示す。本研究で *F. equiseti* はハウレンソウ萎凋病に対しても防除効果が認められた。しかし、その防除効果はペーパーポットを用いた移植栽培技術との組み合わせ効果であった。研究開始当初、ペーパーポットを用いた移植栽培法の試験が日本各地で行

われていた。そこで、トマトと同様に *F. equiseti* を処理したハウレンソウ苗を移植して萎凋病に対する生物防除試験を行った。しかし、ハウレンソウの10a当たりの栽培株数は約80,000株とトマト(約2,000株/10a)と比較して多くの苗が必要となる。また、ハウレンソウは年4~5作行われることから移植栽培を行うに当たり必要な苗を確保する場所と手間が必要となる。このことから、ハウレンソウ移植栽培は普及していない。拮抗微生物の処理方法として、*Trichoderma* 菌を用いた水稻種子への処理(熊倉ら, 2003)をはじめワタ、コムギ、エンドウ、キュウリ、トマトなど様々な植物への研究事例がある。そこで、*F. equiseti* の孢子懸濁液へ浸漬したハウレンソウ種子を用いて萎凋病の防除試験を行った結果、防除効果は不十分であった。これはハウレンソウ種子に付着した *F. equiseti* のみでは、播種後に発芽したハウレンソウ根が病原菌の感染、増殖を抑制することが出来なかったためと示唆された。また、移植前日に *F. equiseti* を処理したハウレンソウ苗では、萎凋病の発病抑制効果が低かったことから、*F. equiseti* の定着はハウレンソウに対しては時間が必要であることが示唆された。現在、ハウレンソウ萎凋病の生物防除に関しては、拮抗微生物の処理方法が大きな課題となっている。

本研究では、最初にロックウールを用いた養液栽培の中でトマト根腐萎凋病の拮抗微生物の選抜を行った。ロックウールはフザリウム菌の定着性が高い資材であることが示唆されたため(黒田・富川, 2004)、根腐萎凋病は接種後から速やかに発病することが期待された。実際、養液栽培では土耕栽培と比較して、根腐萎凋病は試験開始後早くから発病し、試験終了時の発病程度も高かった。そのため、試験期間は短期(接種後71日)から長期(接種後140日)、根腐萎凋病の発病は軽度(発病度42.2)から重度(発病度81.3)と様々な条件下で試験を行うことができ、有望な生物防除エージェンツの選抜が可能であった。また、本研究では *F. equiseti* を処理したトマトの茎およびハウレンソウの根の抽出液中で、それぞれ根腐萎凋病菌、萎凋病菌の増殖抑制効果が見られた。この植物体内での病原菌の増殖抑制を調べることで拮抗微生物の選抜が可能となることが示唆された。*F. equiseti* は病原菌に直接的に拮抗・抗生する働きは無く、病害抑制機構として抵抗性誘導の関与が示唆されている。このように微生物を処理した植物抽出液を用い病原菌増殖抑制効果を調べることで、病原菌に対して直接的な働きを持たない拮抗微生物の簡易な選抜が可能であると思われた。

F. oxysporum が起因する病害は非常に多く、岐阜県の野菜作付け面積の40%を占める6品目でも、トマト萎凋病および根腐萎凋病、ハウレンソウ萎凋病、イチゴ萎黄病、キュウリつる割病、ダイコン萎黄病、エダマメ立枯病が発生して問題となっている。本研究において、トマト根腐萎凋病、ハウレンソウ萎凋病に対して有望な生物

防除エージェントである *F. equiseti* は、他のフザリウム病害に対しても防除効果を示すことが期待される。実際に、*F. equiseti* はトマト萎凋病 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*)、イチゴ萎凋病 (*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*)、ペゴニア株腐病 (*Fusarium foetens*) に対して発病抑制効果を示した。しかし、現場で *F. equiseti* を用いた生物防除を行うためには、*F. equiseti* の資材化が必要である。

現在、日本では拮抗微生物を用いた生物農薬(殺菌剤)が次々と登録され使用されている。しかし、水稻の種子消毒剤や灰色かび病など地上部病害を対象とする剤が主体で、土壌病害に対する生物農薬は、非病原性 *F. oxysporum* 菌(対象: サツマイモつる割病、商品名: マルカライト)と *Pseudomonas fluorescens* 剤(対象: トマト青枯病、根腐萎凋病など、商品名: セル苗元気)の2種のみである。さらに、非病原性 *F. oxysporum* 剤は、現在、市販されていないため現場での使用は不可能となっている。日本では、非病原性 *F. oxysporum* による生物防除研究は活発に行われたが、製剤化・市販に繋がったものは一つのみである。これは、*F. oxysporum* の孢子生産性が *Bacillus subtilis* などの細菌と比較して低く、製剤化が困難となっているためである。*F. equiseti* は微生物資材として試作品が作られ、その微生物資材は乾燥したビール粕(大麦穀皮)を圧縮成型し、700℃以上の高温で焼成した炭化物に *F. equiseti* を担持させたものであった (Fig. 18)。この微生物資材はトマト萎凋病、ホウレンソウ萎凋病 (Horinouchi et al. 2008) およびペゴニア株腐病に対して防除効果を示し (Fig. 19)、有望な生物防除資材の可能性が示された。しかし、本微生物資材は資材化コスト等の問題から市販化には至っていない。この資材・製剤化コスト削減のためには、フザリウム菌の孢子生産性を高める培養方法の研究が今後の課題である。

拮抗微生物を用いた生物防除法は、薬剤耐性菌の発生リスク回避、抵抗性品種を犯す新レースへの対応、そして環境負荷軽減が可能な新しい防除法である。実際、様々な生物農薬が市販され、現場の病害防除に活躍している。しかし、化学農薬が非常に高い防除効果を示す中では、生物農薬は①使用場面が限定される、②防除効果が低いまたは不安定、③販売価格が高いといくつかの課題が残されている。①の点は、水稻の育苗技術、トマトなどの移植栽培技術に適用することで拮抗微生物の働きを最大限に活用できる利点にもなっている。一方、栽培環境(冬期の低温時、夏期の高温時など)の点では、生物農薬の効果が期待できない場合がある。②および③の点は、生産者に直結する重要な事項である。現在、生産現場では低コストの生産が必要不可欠な状況で、病害防除に対して薬剤散布回数の低減を進めている。価格が高い生物農薬を使用しても防除効果が低い場合は、生産物の収穫量、労力、経費の面から問題がある。そのため、今後も高い防除効果を示す拮抗微生物の探索や処理方法の

検討が必要となっている。

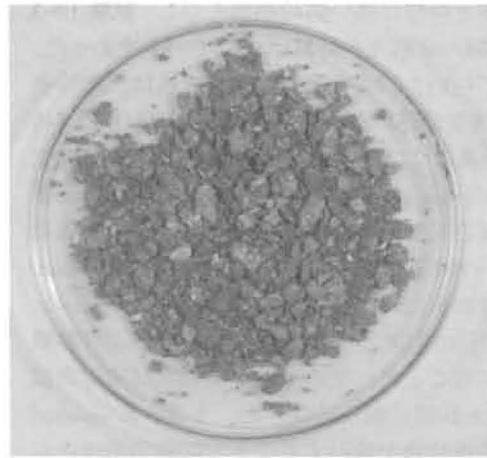


Fig. 18. Spent grain charcoal infested with *F. equiseti*



Fig. 19. Effect of spent grain charcoal infested with *F. equiseti* on disease suppression against leaf and stem rot of begonia caused by *F. foetens*

摘 要

トマトおよびホウレンソウは、岐阜県で生産される主要な野菜品目である。しかし、それらの栽培現場では、土壌病害の1種であるフザリウム病害の発生が大きな問題となっている。トマトでは萎凋病および根腐萎凋病が、ホウレンソウでは萎凋病が発生し、それぞれ甚大な被害を及ぼしている。また、トマトでは栽培方式として養液栽培が普及しつつあるが、そこでも根腐萎凋病の発生が問題となっている。フザリウム病害の対策として、化学農薬による土壌消毒が有効な手段であるが、環境保全型農業が推進される中で新しい防除技術の開発が急務となっている。そこで、トマトとホウレンソウのフザリウム病害に対して植物生育促進菌類 *Fusarium equiseti* を用いた生物防除に関する研究を実施した。

最初に6種類の植物生育促進菌類、1種類の非病原性 *Fusarium* 菌、5種類の有用細菌を用い、養液栽培におけ

るトマト根腐萎凋病に対する発病抑制効果を調べ、有用な生物防除エージェンツの選抜を行った。その結果、植物生育促進菌類の *F. equiseti* GF191 菌株が有望な生物防除エージェンツとして選抜され、その発病抑制効果は短期間の試験（病原菌接種後 71 日）では防除価 100（防除価 100 の場合、発病は全く無いことを示す）と高かった。また、実際の圃場での利用を考慮し長期間の試験（病原菌接種後 117~140 日）を実施した場合でも *F. equiseti* の発病抑制効果は防除価 63~85 と安定して高かった。

次に *F. equiseti* と近年ポリボットの代替として普及が進む生分解性ボットを組み合わせて用いることで、土耕栽培におけるトマト根腐萎凋病の発病抑制効果を検討した。試験は *F. equiseti* を処理したトマト苗と生分解性ボットを共に病原菌汚染圃場に定植することで行った。*F. equiseti* と生分解性ボットの組み合わせ処理の発病抑制効果は、汚染土定植 131 日後に調査した結果、防除価 58 であった。この試験では生分解性ボットを鉢上げ時に使用したため、汚染土に定植した初期から、生分解性ボットの分解が進んでいた。そこで、より高い防除効果を得るために、生分解性ボットを汚染土定植直前に用い生分解性ボットによるトマト根と病原菌の遮断期間を長くなるようにした。根腐萎凋病が中発生試験では、*F. equiseti* と生分解性ボットの組み合わせ処理は、*F. equiseti* 単独処理、生分解性ボット単独処理と比較して高い防除効果が得られ、汚染土定植 149 日後の発病抑制効果は防除価 87 と高かった。さらに根腐萎凋病が多発生の場合においても、*F. equiseti* と生分解性ボットの組み合わせ処理は汚染圃場定植 135 日後に防除価 81 と高い発病抑制効果が得られた。

定植 15 日~120 日後の無処理の土壌中とトマト根での病原菌量は、それぞれ $0.02 \sim 14.4 \times 10^3 \text{cfu/g}$ 、 $1.7 \sim 27.2 \times 10^3 \text{cfu/g}$ であったのに対し、*F. equiseti* と生分解性ボットの組み合わせ処理における生分解性ボット内の土壌中と根の病原菌量は、無処理と比較してそれぞれ 4.3~16.3%、0.6~31.9%と少なく推移した。また、試験期間中の生分解性ボット内の土壌中の *F. equiseti* 菌量は $3.9 \sim 9.5 \times 10^4 \text{cfu/g}$ と、生分解性ボットを使用しない時と比較して 1.7~19.1 倍高く推移した。これらのことから、生分解性ボットはトマト根圏において病原菌の増殖を抑制し、*F. equiseti* の菌量を高く維持する働きがあることが明らかになった。

養液栽培のトマト根腐萎凋病の試験において、病原菌接種 117 日後にトマト茎内の病原菌の菌量を調査した結果、*F. equiseti* を処理したトマト茎内の病原菌量は、病原菌のみ接種の菌量が $5.8 \times 10^4 \text{cfu/g}$ であったのに対し 80cfu/g と約 1/700 であった。この現象は他の養液栽培および土耕栽培の試験でも見られ、それぞれ病原菌接種 97 日後、135 日後の病原菌のみ接種の菌量が 2.1×10^5 、 $3.1 \times 10^4 \text{cfu/g}$ であったのに対し *F. equiseti* 処理区の茎内の

病原菌量は $1.4 \times 10^3 \text{cfu/g}$ 、 $9.1 \times 10^2 \text{cfu/g}$ と約 1/150、1/30 であった。*F. equiseti* を処理したトマト茎の磨砕液中では病原菌の胞子の発芽率が接種 8~12 時間後に無処理区と比較して 13~68%低く推移した。また、*F. equiseti* を処理したトマト茎の磨砕液中での胞子増殖も無処理区と比較して試験期間（接種 1~21 日後）を通じて約 33%低かった。

ハウレンソウ萎凋病に対しては、ハウレンソウ根での定着が高い *F. equiseti* GF183 菌株を用いて試験を行った。試験は、播種時に *F. equiseti* を処理した後、ペーパーボットで育苗した苗を汚染圃場に移植に行った。移植 22~27 日後の *F. equiseti* 処理の防除価は 51.5~91.8 と高かった。また、*F. equiseti* を播種時 1 回、移植前日 1 回、播種時および移植時前日の 2 回の 3 種類の処理による発病抑制効果を検討した。萎凋病が多発生条件で試験を行った結果、播種時 1 回と播種時および移植前日の 2 回処理では防除価がそれぞれ 52.8、58.1 と高い発病抑制効果が認められた。一方、移植前日処理では防除価が 18.1 と発病抑制効果は認められなかった。また萎凋病が中発生試験では、*F. equiseti* の播種時および移植時前日の 2 回処理は、播種時 1 回処理の防除価 43.5 と比べ防除価 87.3 と高かった。

F. equiseti を処理したハウレンソウ根内の病原菌量は、無処理の菌量 $6.7 \times 10^5 \text{cfu/g}$ に対し $9.9 \times 10^3 \text{cfu/g}$ と約 1/70 であった。また、*F. equiseti* を処理したハウレンソウの根磨砕液中において、病原菌の胞子増殖は無処理と比較して低く推移し、接種 3、5 および 7 日後の胞子濃度は 19.7%、24.1%、30.9%低かった。さらに、*F. equiseti* を処理した後に病原菌を接種したハウレンソウ根の磨砕液中では増殖抑制効果が高くなり、接種 3、5 および 7 日後の胞子濃度は無処理と比較して 67.9%、48.8%、53.8%低かった。

以上のように、*F. equiseti* を処理したトマトとハウレンソウは発病が少なくなるだけでなく、トマト茎とハウレンソウ根内においてそれぞれ病原菌の菌量が少なくなることが明らかになった。また、*F. equiseti* を処理したトマト茎、ハウレンソウ根の磨砕液中では病原菌の増殖が抑制された。これらのことから、*F. equiseti* を処理することで植物体内において病原菌の発芽や増殖を抑える何らかの抗菌成分が生産されていることが示唆された。

本研究において、植物生育促進菌類の *F. equiseti* は長期間に渡り養液栽培トマトの根腐萎凋病の発病を抑制した。さらに、*F. equiseti* と生分解性ボットやペーパーボットを組み合わせることで土耕栽培のトマト根腐萎凋病とハウレンソウ萎凋病に対して栽培期間中、高い防除効果を示した。これらのことから、*F. equiseti* は生物防除エージェンツとして有望であるとともに、*F. equiseti* を用いた生物防除法と病原菌の遮断を目的とした生分解性ボットやペーパーボットを用いた物理的防除法を組み合わせた

技術はトマトおよびホウレンソウの栽培現場で有望な防除技術となることが示された。

謝 辞

本研究のとりまとめにご指導していただいた岐阜大学教授 百町満朗博士に厚くお礼を申し上げる。本研究の取りかかの際に、非病原性 *Fusarium oxysporum* F13 菌株を快く分譲していただき、また様々なご助言をいただいた元島根大学 駒田旦博士、出光興産(株) 田口義広博士にお礼を申し上げる。研究実施の際には実験手法に関して様々な助言をいただいた岐阜大学教授 景山幸二博士、岐阜大学准教授 須賀晴久博士に、本研究を進めるに当たりご助言・ご協力をいただいた岐阜県農業技術センター、岐阜大学、その他様々な大学および試験研究機関の皆様にお礼を申し上げます。

引用文献

- Amemiya, Y., Koike, M., Hirano, K., 1989. Suppression of Verticillium wilt in tomato by non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Soil Microb. 33, 27-34.
- Beckman C.H., 1987. The nature of wilt disease of plants. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Benhamou, N., Rey, P., Cherif, M., Hockenhull, J., Tirilly, Y., 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reaction in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology 87, 108-122.
- Biles, C.L. and Martyn, R.D., 1989. Local and systemic resistance induced in watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 79, 856-860.
- Burgess L.W., Liddell C.M., Summerell B.A., 1988. Laboratory manual for Fusarium research. 2nd Ed. The nature of wilt disease of plants. Fusarium Research Laboratory Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology, University of Sydney.
- Cook, R.J., 1979. Antagonism and biological control: concluding remarks. In: Shippers, B. and Gams, W. [eds] Soil-borne Plant Pathogens. pp. 653-657. Academic Press, London, New York, San Francisco.
- Correll, J.C., Morelock T.E., Black M.C., Koike S.T., Brandenberger L.P., Dainello F.J., 1994. Economically important diseases of spinach. Plant Dis. 78, 653-660.
- De Cal A., Pascual, S., Melgarejo, P., 1995. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plant Pathol. 44, 909-917.
- De Cal A., Pascual, S., Melgarejo, P., 1997. Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt. Plant Pathol. 46, 72-79.
- Dekker, J., 1979. Acquired resistance to fungicides. Ann. Rev. Phytopathology. 14, 405-428.
- Dekkers, L.C., Mulders, I.H.M., Phoelich, C.C., Chin-A-Woeng, T.F.C., Wijffes, A.H.M., Lugtenberg, B.J.J. 2002. The sss colonization gene of tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. Molecular Plant-Microbe Interaction 13, 1175-1183.
- Duffy, B.K., Defago, G., 1997. Zinc improves biocontrol of Fusarium crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. Phytopathology 87, 1250-1257.
- Elad, Y., Baker, R., 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydo-spore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. Phytopathology 75, 1053-1059.
- Elgersma, D.M., MacHardy, W.E., Beckman, C.H., 1972. Growth and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in near-isogenic lines of tomato resistant and susceptible to wilt. Phytopathology 62, 1232-1237.
- Fuchs, J.-G., Moënné-Loccoz, Y., Défago, G., 1997. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to Fusarium wilt of tomato. Plant Dis. 81, 492-496.
- Furui, H., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Kiso, M., 1998. Tomatine content in host and transgenic tomatoes by absorptiometric measurement. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 556-557.
- Hammerchlag, F., Mace, M.E., 1975. Antifungal activity of extracts from fusarium wilt-susceptible and -resistant tomato plants. Phytopathology 65, 93-94.
- Horinouchi H., Hyakumachi M. 2002. Control of Fusarium wilt of tomato in soil system by combination of *Fusarium equiseti* (plant growth promoting fungus) and biodegradable pots. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 68, 85 (Abst.).
- Horinouchi, H., Muslim, A., Suzuki, T., Hyakumachi, M., 2007. *Fusarium equiseti* GF191 as an effective biocontrol agent against Fusarium crown and root rot of tomato in rock wool systems. Crop Prot. 26, 1514-1523.
- Horinouchi H., Katsuyama N., Taguchi Y., Hyakumachi M., 2008. Control of Fusarium crown and root rot of tomato in a soil system by combination of a plant growth-promoting fungus, *Fusarium equiseti*, and biodegradable pots. Crop Prot. 27, 859-864.
- Horinouchi H., Takasaki S., Miyahara T., Hyakumachi M. 2008. Effect of spent grain charcoal infested with PGPF

- Fusarium equiseti* on disease suppression against Fusarium wilt of tomato and spinach. Jpn. J. Plantpathol. 74, 189-190. (Abst.)
- Hyakumachi, M., 1994. Plant growth-promoting fungi from turfgrass rhizosphere with potential for disease suppression. Soil Microorg. 44, 53-68.
- Hyakumachi, M., Kubota, M., 2004. Fungi as plant growth promoter and disease suppressor. Mycology Series. Volume 21. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications, 101-110.
- Jarvis, W.R., Shoemaker, R.A., 1978. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. Phytopathology 68, 1679-1680.
- Kato, M., Amano, S., Taguchi, Y., 1998. Research of tomato soil-borne diseases in hydroponic culture. Proc. Kansai Plant Prot. 40, 97-98.
- Katsube, K., Akasaka, Y., 1997. Control of Fusarium wilt of spinach by transplanting seedlings pretreated with non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63, 389-394.
- Kauss H., Franke R., Krause K., Conrath U., Jeblick W., Grimmig B., Matern U., 1993. Conditioning of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cells increases elicitor-induced incorporation of cell wall phenolics. Plant Physiol. 102, 459-466.
- Kessmann H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T., Herzog J., and E., Uknes S., Ryals J., 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63, 389-394.
- Koike, N., Hyakumachi, M., Kageyama, K., Tsuyumu, S., Doke, N., 2001. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. Eur. J. Plant Pathol. 107, 23-533.
- Komada, H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. Plant Prot. Res. (Tokyo) 8, 114-125.
- Komada, H., 1994. Strategies and prospects on biocontrol of soilborne diseases in soilless culture. Plant Protection 48, 413-417.
- Kumakura, K., Watanabe, S., Toyoshima, J., Makino, T., Ichikawa, K., Iyozumi, H., Nagashima, K. 2003. Effect of *Trichoderma* sp. SKT-1 on suppression of six seedborne diseases of rice. Jpn. J. Phytopathol. 69, 393-402.
- 黒田克利, 富川章, 2004. 非病原性フザリウム菌によるトマト根腐萎凋病の生物防除. 三重県科学技術振興センター農業研究部報告第30号別刷.
- Larkin, R.P., Hopkins, D.L., Martin, F.N., 1996. Suppression of Fusarium wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. Phytopathology 86, 812-819.
- Larkin, R.P., Fravel, D.R., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. Plant Dis. 82, 1022-1028.
- Larkin, R.P., Fravel, D.R., 1999. Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. Phytopathology 89, 1152-1161.
- Larsson M., Gerhardson B., 1992. Disease progression and yield losses from root diseases caused by soilborne pathogens of spinach. Phytopathology 82, 403-406.
- Louter, J.H., Edgington, L.V., 1990. Indication of cross-protection against fusarium crown and root rot of tomato. Can. J. Plant Pathol. 12, 283-288.
- MacCane, D.J., Drysdale, R.B., 1975. Production of tomatine and rishitin in tomato plants inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Physiol. Plant Pathol. 7, 221-230.
- Maciá-Vicente J.G., Jansson H-B., Talbot N.J., Lopez-Llorca L.V., 2009. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. New Phytologist 182, 213-228.
- Marois, J.J., Mitchell, D.J., Sonoda, R.M., 1981. Biological control of Fusarium crown rot of tomato under field condition. Phytopathology 71, 1257-1260.
- Mandeel, Q., Baker, R., 1991. Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 81, 462-669.
- McGovern, R.J., Vavrina, C.S., Noling, J.W., Datnoff, L.A., Yonce, H.D., 1998. Evaluation of application methods of metam sodium for management of Fusarium crown and root rot in tomato in southwest Florida. Plant Dis. 82, 919-923.
- Meera, M.S., Shivanna, M.B., Kageyama, K., Hyakumachi, M., 1995a. Responses of cucumber cultivars to induction of systemic resistance against anthracnose by plant growth promoting fungi. Eur. J. Plant Pathol. 101, 421-430.
- Meera, M.S., Shivanna, M.B., Kageyama, K., Hyakumachi, M., 1995b. Persistence of induced systemic resistance in cucumber in relation to root colonization by plant growth promoting fungal isolates. Crop Prot. 14, 23-130.
- Mihuta-Grimm, L., Erb, W.A., Rowe, R.C., 1990. Fusarium crown and root rot of tomato in greenhouse rock wool systems: Sources of inoculum and disease management with benomyl. Plant Dis. 74, 996-1002.

- Miyake T., Horinouchi H., Takasaki S., Mori T., Kubota M., Hyakumachi M. 2008. Control of corky root disease of tomato by combination of biodegradable pot and PGPF *Fusarium equiseti*. Jpn. J. Phytopathol. 74, 71 (Abst.).
- Muslim, A., Horinouchi, H., Hyakumachi, M., 2003. Control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia* in soil and rock wool systems. Plant Dis. 87, 739-747.
- Muslim A., Horinouchi H., Hyakumachi M., 2003. Suppression of *Fusarium* wilt of spinach with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia*. J. Gen. Plant Pathol. 69, 143-150.
- Naiki, T., Kano, M. 1977. On *Fusarium* wilt of spinach and its causal fungus. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 43, 297-300.
- Naiki, T., Morita, Y. 1983. The population of spinach wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*, and the wilt incidence in soil. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 49, 539-544.
- Nelson, H., Ouchi, S., Shiraishi, T., Oku, H., 1992. Induced resistance to *Fusarium* wilt of tomato and cucumber: symptoms and pathogen proliferation. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 58, 659-663.
- Naito, S., Kato, M., Sato, A., 1998. The probability of escaping potato tubers from scab disease by paper-pot transplanting method. (Abstr.) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64, 580.
- 西村範夫. 2006. 壤燻蒸消毒後のサラダナ根腐病の再発と生物防除 (有用微生物を利用した病害防除). 土壤伝染病談話会レポート 23, 24-39.
- Nitao J.K., Meyer S.L.F., Schmidt W.F., Fettingner J.C., Chitwood D.J., 2001. Nematoda-antagonistic trichothecenes from *Fusarium equiseti*. J. Chem. Ecol. 27, 859-868.
- O'Brien, M.J., Winter, H.F., 1977. Evaluation of spinach accessions and cultivars for resistance to *Fusarium* wilt. I. Greenhouse-bench method. J. Am. Soc. Hort. Sci. 102, 424-426.
- Ogawa, K., Komada, H., 1984. Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato By non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 50, 1-9.
- Ogura, H., Ban, M., 1971. *Fusarium oxysporum* caused tomato wilt disease. II. Existence of *F. oxysporum* causes tomato wilt disease attended with root rot. Res. Rep. of Kochi University, Agric. Sci. 20, 71-77.
- 奥田純一郎、古田力 1964. ホウレンソウ立枯病の病徴と病原菌について. 日植病報 29, 89(講要).
- Omori, M. 1998. Safe use of agricultural chemicals: Agricultural chemicals safety precaution campaign. Plant Protection 52, 284-285.
- Paulitz, T.C., Park, C.S., Baker, R., 1987. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. Can. J. Microbiol. 33, 349-353.
- Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M., Ushiyama, K., 1992. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58, 329-339.
- Piga, P.M., Belanger, R.R., Paulitz, T.C., Benhamou, N., 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopescici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. Physiol. Mol. Plant Pathol. 50, 301-320.
- Postma, J., Rattink, H. 1992. Biological control of *Fusarium* wilt of carnation with a nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Botany 70, 1199-1205.
- Rowe, R.C., Farley, J.D., 1977. New greenhouse tomato disease can be controlled. Ohio Rep. 62, 41-43.
- Sato, R., Araki, T., 1974. On the tomato root-rot disease occurred under vinyl-house conditions in southern Hokkaido. Ann. Rep. Soc. Plant Protect. N. Jpn. 25, 5-13.
- Scott, J.W., Jones, J.P., 2000. Fla. 7775 and Fla. 7781: tomato breeding lines resistant to *Fusarium* crown and root rot. HortScience 35(6), 1183-1184.
- Shivanna, M.B., Meera, M.S., Hyakumachi, M., 1996. Role of root colonization ability of plant growth promoting fungi in the suppression of take-all and common root rot of wheat. Crop Protection 15, 497-504.
- Sivan, A., Ucko, O., Chet, I., 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field condition. Plant Dis. 71, 587-592.
- Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y., Baker, R., 1984. Clamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium*-suppressive soil. Phytopathology. 74, 1115-1124.
- Stromberg, E.L., Corden, M.E., 1977. Fungitoxicity of xylem extracts from tomato plants resistant or susceptible to *Fusarium* wilt. Phytopathology 67, 693-697.
- Tsuda K., Kosaka Y., Tsuge S., Kubo Y., Horino O., 2001. Evaluation of the endophyte *Enterobacter cloacae* SM10 isolate from spinach roots for biological control against *Fusarium* wilt of spinach. J. Gen. Plant Pathol. 67, 78-84.

Summary

Tomato and spinach are economically important vegetable crops in Japan. Although the continuous commercial production of tomato and spinach has been developed, soil-borne diseases such as Fusarium crown and root rot of tomato (FCRR) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) and Fusarium wilt of spinach (FWS) caused by *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* (FOS) are appeared and become the main limiting factor for their production. In recent years, as for the greenhouse tomatoes, the production has begun to shift from soil cultivation to various hydroponic culture systems such as rock wool system. However, a severe outbreak of FCRR was also occurred in the rock wool system. The most effective method of control Fusarium diseases has been soil disinfection using methyl bromide, but since that caused severe environmental problems its use was outlawed in 2005. Thus, further alternative control measures need to be made available as soon as possible. The objective of this study was to control FCRR and FWS throughout the growing period by plant growth promoting fungus (PGPF), *Fusarium equiseti*.

Six isolates of PGPF, non-pathogenic *Fusarium oxysporum*, and five isolates of bacteria were tested in hydroponic rock wool systems as potential biocontrol agents of FCRR. PGPF *F. equiseti* GF191 proved the most effective organism in controlling FCRR. In short-term experiment (71 days after pathogen inoculation), the protection effect of *F. equiseti* was 100%, higher than those of other antagonists. In long-term experiments (117-140 days after pathogen inoculation), the protection effects of *F. equiseti* were also high (63-85%).

A combination of *F. equiseti* and biodegradable pots (BPs) was tested for its ability to control FCRR in soil during long-term cultivation. The protection effect of *F. equiseti* with BPs was 58% 131 days after transplanting when using BPs to grow seedlings. When BPs were used at the time of transplanting to pathogen-infested soil in order to extend the separation time of tomato roots from the pathogen, the protection effects of *F. equiseti* and BPs further increased, reaching 81 and 87% 149 and 135 days after transplanting, respectively. FORL populations in soil and roots treated with *F. equiseti* with BPs were lowered during the 135 days after transplanting, being only 0.6 - 31.9% and 4.3 - 16.7%, respectively, compared to those of control. Populations of *F. equiseti* in soil treated with *F. equiseti* in BPs were higher than those in soil treated with *F. equiseti* alone throughout the experiment. BPs were effective in maintaining the population of *F. equiseti* in rhizosphere soil and in suppressing the multiplication of FORL in roots and soil as they were able to shield plant roots from the pathogen during the early stage of transplanting. FORL populations in stems treated with *F. equiseti* were reduced by 93.2-99.9% relative to the pathogen-infested control in rock wool system 97-117 days after pathogen inoculation. FORL populations in stems treated with *F. equiseti* with BPs and *F. equiseti* only, were reduced by 97.0% and 98.9%, respectively, relative to the pathogen-infested control in soil system 135 days after transplanting. Spore germination was inhibited in stem extracts of *F. equiseti*-treated plants compared with those of untreated plants. The stem extracts treated with *F. equiseti* and unchallenged with pathogen inhibited the production of new budding-cells of FORL compared with those of untreated and unchallenged plants, and the rates of budding-cell formation were reduced by 33% throughout the experiment.

F. equiseti GF183 was tested for its ability to control FWS in transplanting systems. Spinach plants treated with *F. equiseti* had less disease than pathogen-control plants in three experiments, and the protection effects were 51.5 - 91.8%. Three applications of *F. equiseti* which were single application at seeding, single application one day before transplanting, and double application at both seeding and one day before transplanting, were tested to compare the effectiveness against FWS. The single application at seeding and double application at both seeding and one day before transplanting significantly ($P<0.05$) reduced disease severity by 52.5% and 58.1%, respectively, compared to the pathogen control. The single application one day before transplanting was not effective for controlling FWS. In another experiment, the protective effect of the double application was higher than that of the single application at seeding and the protection effect was 87.3% compared to the pathogen control.

FOS populations in roots treated with the *F. equiseti* were reduced by 85.3%, relative to the pathogen control. The root extracts from spinach plants treated with *F. equiseti* and unchallenged with pathogen inhibited the production of new budding-cells of FOS compared with those of untreated and unchallenged plants, and the rates of budding-cell formation 3, 5 and 7 days after inoculation were reduced by 19.7%, 24.1% and 30.9%, respectively. Furthermore, the root extracts from spinach plants treated with *F. equiseti* and challenged with pathogen also inhibited the production of new budding-cells of FOS compared with that of untreated and unchallenged plants 3, 5 and 7 days after inoculation,

and the rates of budding-cell formation were reduced by 67.9%, 48.8% and 53.8%, respectively.

In the present study, pre-inoculation of tomato and spinach seedlings with *F. equiseti* not only suppressed the diseases but also reduced pathogen populations in the stems of tomato and roots of spinach. We also observed such inhibitory effects of stem or root extracts from *F. equiseti* - treated plants on pathogen germination and proliferation, suggesting that *F. equiseti* might induce physiological changes in the composition of plant extracts.

In this study, PGPF *F. equiseti* could effectively control FCRR both in hydroponic and soil systems and FWS in soil system. Furthermore, combinations of *F. equiseti* and BPs or paper pots were more effective for control FCRR and FWS throughout the growing periods of tomato and spinach in field.