

# 葉面菌によるイネいもち病の防除

茨城県農業総合センター生物工学研究所 かわ また ひとし  
河 又 仁

## はじめに

イネいもち病は *Magnaporth grisea* (HEBERT) BARR によって起こる病気で (分類については今なお議論されている (土佐, 2005)), 日本のみならず世界のイネ栽培地域における最重要病害の一つである。この病気はイネ生育の全期間を通じて発生し, 発病条件が整った場合, その拡散・進展は非常に早く, 適切な防除が行われなかった場合, 甚大な被害をもたらす。

現在, いもち病の防除は主として化学農薬の散布と抵抗性品種の利用に依存している。本病に対しては有効な薬剤が多数開発されているが, 環境問題などの面から減農薬への社会的要請が年々強まっている (FROYD et al., 1994)。一方, 抵抗性品種の利用では抵抗性品種を侵すいもち病菌の新レースが次々と出現し (浅賀, 1987; LEE, 1994), 抵抗性品種のみでの防除は難しい状況にある。また, 日本においては, ‘コシヒカリ’ のように食味は良いが, いもち病に対する抵抗性が弱い品種の作付けが増加している。

以上のような状況から, 化学農薬や抵抗性品種に代わる, あるいは補完する防除法として生物防除法の開発が期待されている。

微生物を利用した生物防除を行う場合, 利用しようとする微生物が対象植物に定着性を有することは重要な要因である。なぜなら植物に定着することにより, 感染から発病までの様々な段階に作用して病気を抑制することが期待され, 拮抗性を發揮できる期間・場面が多くなるからである (ANDREWS, 1992)。特にイネいもち病のように, 作物のほぼ全生育期間にわたって発生する病害の場合, このことはより重要な性質となってくる。実際, 植物の葉面上には各種微生物が互いに強く影響しあいながら定着, 生存している。そこで, 我々は, このイネ葉面に定着性を有する糸状菌をイネいもち病の生物防除に利用しようと考えた。また, なるべく多様な菌を分離することにより, 今までに生物防除試験に供試されたことのない菌を得ようとした。そして, このために, 生物防除資材を得るための分離法としては今までほとんど用いら

れたことのない釣餌法と洗浄法を組み合わせることで, これにより多様なイネの葉面菌を分離し, それらの中からいもち病防除に有用な菌を選び出した (KAWAMATA et al., 2004)。

## I 葉面菌の分離

植物の葉面上には様々な微生物が生育し, 植物の生育環境などによって微生物相は異なる。そこで, 通常, 水田には生息していなくてもイネに定着する能力はもっているような菌を得るため, 水田以外の環境でイネを栽培し, そのイネから葉面菌を分離した。すなわち, イネの葉を餌にしてそれに定着性のある菌を釣り上げる釣餌法を用いた。具体的には, ワグネルポットに植えたイネ苗を杉林の中やその周辺において2~3か月間育成後, 葉を採集し, 分離に用いた。また, 生育ステージや栽培地域によっても微生物相が異なることが予想されたため, 釣餌法とは別に, 苗やひこばえを含めた様々な生育ステージのイネ葉を, 茨城県岩間町と沖縄県石垣島という気候が異なる地域の水田から採集した。

採集したイネ葉から菌を分離する方法として, 徳増 (1978) の洗浄法に若干の改変を加えて用いた。なお, 洗浄法は生態研究によく用いられている方法で, 葉に生息する菌のかなり正確な情報が得られるとされている (椿, 1990) ので, 今回の試験でもイネ葉に定着性を有する菌が分離できたものと考えられる。

以上のような分離法によって1,923菌株の葉面菌を分離した。なお, 分離した菌のうち菌種を同定できた菌株では *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Pestalotiopsis* 属菌などが高い頻度で含まれていた。また, 分生子などを形成せず同定が困難な菌株については培地上でのコロニー形態で菌株をグループ分けした。同定した菌種および未同定菌株の形態グループについて水田とそれ以外の場所で比較すると, 分離された菌の種類や頻度に差が認められ, 菌類相が異なることが示唆された。また, 人工気象室や閉鎖系温室のような隔離された環境下で育成されたイネからは葉面菌がほとんど分離されなかった。このことは, これら葉面菌がいわゆるグラスエンドファイトのように種子伝染しているのではなく, 分生子のような散布体が葉面に落下し定着するといった空気伝染によって伝搬することを示しているものと考えられた。

Suppression of Rice Blast by Phylloplane Fungi Isolated from Rice Plants. By Hitoshi KAWAMATA

(キーワード: イネ, 葉面菌, いもち病, 生物防除)

## II 葉面菌によるいもち病発病抑制

分離した葉面菌のいもち病に対する影響を、生物検定によって評価した。分離した葉面菌を CMMY 培地 (corn meal agar + malt extract + yeast extract) 上で 2～4 週間培養後、0.25%ゼラチン溶液を加えてスパチュラで菌体をかき取り、ガーゼでろ過して分生子または菌糸懸濁液を調製した。この懸濁液といもち病菌の分生子懸濁液 ( $1 \times 10^5$  個/ml) を、4～5 葉期のイネ (品種：コシヒカリ) に同時噴霧接種した。発病調査は接種葉の病斑面積率を調査し、対照区の発病面積率を 100 としたときの葉面菌処理区の病斑面積率の比を発病指数として算出した。生物検定の結果、9 菌株が発病指数 20 以下の高い発病抑制効果を示した (口絵①, 表-1)。これらの菌株は、ITS 領域の配列に基づく菌種特異的なプライマーを用いた PCR や顕微鏡観察によって 1～2 か月間は葉上で存在することが確認され、定着性が示唆された。これら 9 菌株中 5 菌株はポット, すなわち釣餌法で得られた菌株であり, 4 菌株は石垣島の水田で採集したイネ葉から分離した菌株であった (表-1)。このことは、釣餌法や気候の異なる場所から採集する方法が生物防除のための菌株を得るのに有効であることを示している。

## III 作用機作

### 1 抵抗性誘導

抑制効果の高かった 9 菌株の葉面菌を第 4 葉が展開中のイネに処理し、その後 (7～10 日後), 第 5 葉が展開してからいもち病菌を接種した。すると、釣餌法で得られた 5 菌株および J2JMR3-2 菌株処理区では、第 5 葉における病斑数あるいは病斑面積が対照区に比較して減少した (図-1)。また、これら菌株を苗に処理すると 30 日

後でも発病抑制効果が発揮された。いずれの場合も葉面菌の上位葉への移行・進展は顕微鏡観察や菌種特異的なプライマーを用いた PCR で認められなかったことから、葉面菌処理によってイネ葉に抵抗性が誘導されている可能性が示唆された。

### 2 抗菌活性物質

釣餌法で得られた 5 菌株の菌糸懸濁液をいもち病菌分生子と混合後、スライドガラス上の素寒天培地上に適量滴下し、24 時間後の分生子発芽率を調査した。すると、いずれの菌株も 95%以上の強い発芽抑制効果を示した。さらに、CMMY 培地上での対峙培養において菌糸生育抑制効果も認められたことから、これら 5 菌株が、何らかの抗菌活性物質を産生していることが予想された (表-1, 口絵②)。そこで、5 菌株の中から MKP5111B 菌株を供試して菌体のメタノール抽出物を解析したところ、*Anguillosporal* という抗菌活性物質が確認された。そして、この *Anguillosporal* の粗精製物を 100 ppm 濃度でイ

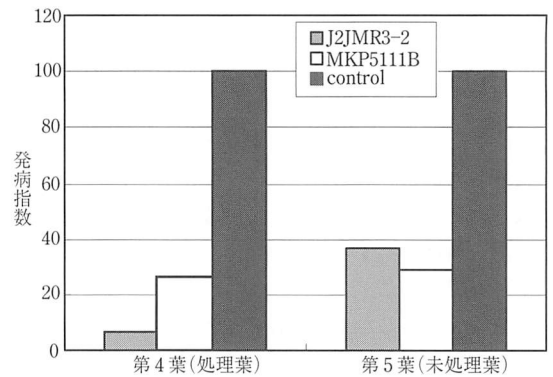


図-1 葉面菌処理葉および未処理葉におけるいもち病発病抑制効果

表-1 葉面菌によるイネいもち病発病抑制試験結果

菌種 No. <sup>a)</sup>	菌種 <sup>b)</sup>	発病指数	いもち病菌 分生子発芽 抑制率 (%)	阻止帯 形成	分離源
MKP33222	—	0	100	+	岩間 (ポット)
MKP5111B	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	0.3	97.1	+	岩間 (ポット)
MKP5112	—	5.1	96.7	+	岩間 (ポット)
J2JMR3-2	<i>Fusarium</i> sp.	8.6	8.1	—	石垣島
K2J131-2	—	9.2	8.5	—	石垣島
I5R3-1	<i>Penicillium</i> sp.	11.6	7.8	—	石垣島
NOP5-4-1	—	12.1	97.1	+	岩間 (ポット)
K1KM134-1	—	14.6	6.4	—	石垣島
NOP5112B	—	14.8	97.1	+	岩間 (ポット)
CONTROL	—	100	0	—	—

a) 発病指数 20 以下の菌株のみを記載した。 b) —は未同定。

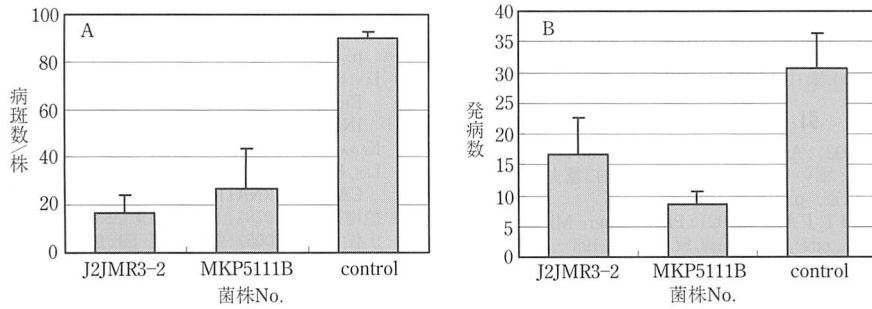


図-2 圃場での葉面菌によるいもち病発病抑制試験 (A: 葉いもち, B: 穂いもち)

ネに噴霧処理すると処理葉で葉いもちの発病が抑制された (発病指数 3.6)。Anguillosporal 単独では抵抗性誘導は認められなかったが、Anguillosporal はこの葉面菌が發揮する抑制要因の一つであると考えられる。

#### IV 圃場試験

生物検定において、イネいもち病抑制効果を示した葉面菌 2 菌株の菌糸懸濁液を水田に移植したイネ (品種: コシヒカリ) に噴霧処理した結果 (6 月下旬, 7 月下旬の 2 回処理), 葉いもち, 穂いもちとも葉面菌処理区において対照区に比較して発病が軽減された (図-2)。また, MKP5111B 菌株は, 屋外に設置したコンクリート枠 (75 cm × 75 cm) を用いた試験で, 移植前の苗処理のみでも葉いもち, 穂いもちに対する発病抑制効果を示し, 長期間発病抑制効果を維持していることが示唆された (図-3)。以上のように, 圃場レベルでも葉面菌によるいもち病防除の有効性が示された。しかし, この防除効果は試験年や圃場によって変動したため, 葉面菌によるいもち病防除の実用化に向けては施用法などに関して一層の検討が必要である。

#### おわりに

釣餌法と洗浄法を組み合わせることで分離することにより, いもち病の生物防除に有望な葉面菌を得ることができた。現在, 葉面菌のイネ体上での動態や圃場において安定した効果を得るための条件を検討中である。なお, この手法は様々な作物に適用可能で, 今後, 有望な葉面菌のスクリーニングに役立つものと期待される。

これまで有用菌を生物防除に利用しようという試みは数多くされてきたが, 実用化された例は少ない。この理由として, (1) 葉面菌のもつ競合, 寄生あるいは抗菌物質の産生等は葉面菌にとって必要な特性で, 他の菌の根絶を目的としたものではないこと, (2) 葉面菌間の相互作用を単一の要因に絞ることは, コミュニティ内の

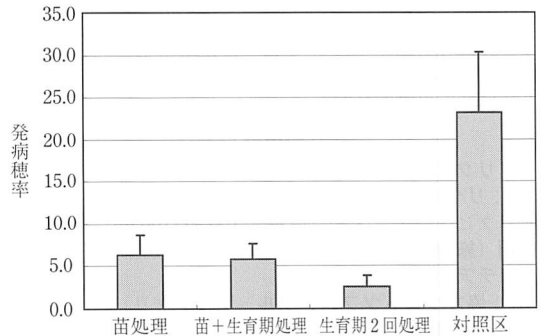


図-3 葉面菌 (MKP5111B) 処理による穂いもち発病抑制効果

屋外に設置したコンクリート枠を使用。苗処理: コンクリート枠への移植前日に葉面菌液を噴霧処理。苗+生育期処理: 苗処理および6月24日に葉面菌液を噴霧処理。生育期2回処理: 6月24日および8月11日に葉面菌液を噴霧処理。

菌のヒエラルキーを過度に単純化してしまうことが挙げられる (BÉLANGER and AVIS, 2002)。葉面菌のもつ様々な性質は, 基本的には他の菌と共存するために獲得されたものと考えられ, これらの競合, 寄生, 抗生といった特性を活用するためには, 葉面菌の動態の中でそれらがどのように制御されているのかを理解することが必要となる。葉面上での病原菌を減少させるには拮抗作用とともに, 生態的な面からも適した特性をもつ葉面菌を用いることが生物防除を成功させる鍵となる。さらに, 葉面菌を単独ではなく組み合わせることで, すなわち単独の抑制能に頼るのではなく微生物相を豊かにする組み合わせや, 発病抑制効果に関して相加的・相互依存的に増強するような組み合わせを見いだすことによって, より安定した, かつ高い発病抑制効果が得られる可能性がある (JANISIEWICZ, 1998; HANDELSMAN, 2002)。

本研究を推進するに当たり, 農業生物資源研究所の林長夫氏にはいもち病菌の分譲や多くの有益なご助言をい

ただいた。また、北興化学工業開発研究所の手塚保行氏、高橋篤氏には、抗菌活性物質の解析にご尽力いただいた。ここに心より感謝申し上げる。

### 引用文献

- ANDREWS, J. H. (1992): *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 603 ~ 635.
- 浅賀宏一 (1987): 稲いもち病 (山中 達・山口富夫編), 第2版, 養賢堂, 東京, p. 216 ~ 249.
- BÉLANGER, R. R. and T. J. AVIS (2002): *Phyllosphere Microbiology* (LINDOW, E. et al., eds), APS press, St. Paul, p. 193 ~ 207.
- FROYD, J. D. et al. (1994): *Rice Blast Disease* (ZEIGLER, R. S. et al., eds), CAB INTERNATIONAL, Wallingford, p. 501 ~ 520.
- HANDELSMAN, J. (2002): *Biological Control of Crop Disease* (GNANAMANICKAM, S. S., ed), Marcel Dekker, INC, New York, p. 443 ~ 448.
- JANISIEWICZ, W. J. (1998): *Plant-Microbe Interactions and Biological Control* (BOLAND, G. J. et al., eds), Marcel Dekker, INC, New York, p. 171 ~ 198.
- KAWAMATA, H. et al. (2004): *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 131 ~ 138.
- LEE, F. N. (1994): *Rice Blast Disease* (ZEIGLER, R. S. et al., eds), CAB INTERNATIONAL, Wallingford, p. 489 ~ 500.
- 徳増征二 (1978): 日菌報 19: 383 ~ 390.
- 土佐幸夫 (2005): 植物防疫 59: 97 ~ 100.
- 椿 啓介 (1990): 防菌防黴誌 18: 235 ~ 241.

## 新しく登録された農薬 (17.8.1 ~ 8.30)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造業者又は輸入業者）登録年月日、有効成分：含有量、対象作物：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、適用作物、適用雑草等を記載。（登録番号：21528 ~ 21547）下線付きは新規成分。

### 「殺虫剤」

- **タイリクヒメハナカメムシ剤**  
21545: リクトップ (キャッツ) 2005/08/31  
タイリクヒメハナカメムシ成虫: 100頭/100ml  
野菜類 (施設栽培): アザミウマ類: 発生初期
- **クロチアニジン水和剤**  
21547: 協友ダントツフロアブル (協友アグリ) 2005/08/31  
クロチアニジン: 20.0%  
稲: イナゴ類, ウンカ類, ツマグロヨコバイ, カメムシ類: 収穫14日前まで: 散布, ウンカ, ツマグロヨコバイ, カメムシ類: 収穫14日前まで: 空中散布, 無人ヘリコプターによる散布

### 「殺菌剤」

- **メタラキシル・TPN水和剤**  
21529: プラスタ顆粒水和剤 (シンジェンタ ジャパン) 2005/08/17  
メタラキシル: 10.0%, TPN: 65.0%  
芝 (ベントグラス): 赤焼病, 葉腐病 (ブラウンパッチ): 発病初期
- **シュードモナス フルオレッセンス水和剤**  
21546: ベジキーパー水和剤 (セントラル硝子) 2005/08/31  
シュードモナス・フルオレッセンス G7090株:  $1 \times 10^{10}$  cfu/g  
レタス: 腐敗病: 発病前 ~ 発病初期: 散布

### 「除草剤」

- **ピリブチカルブ水和剤**  
21528: エイゲン水和剤: (日本曹達) 2005/08/03  
ピリブチカルブ: 470%  
芝 (日本芝): 疑似葉腐病 (春はげ症): 休眠期前, 葉腐病 (ラージパッチ), ヘルミントスポリウム葉枯病, カーブラリア葉枯病, 芝 (ベントグラス): ヘルミントスポリウム葉枯病, カーブラリア葉枯病, 葉腐病 (ブラウンパッチ), グラースポット病: 発病初期, 雪腐小粒菌核病: 根雪前  
日本芝, 西洋芝 (ブルーグラス), 西洋芝 (ベントグラス): 畑地一年生イネ科雑草
- **インダノファン・ピラゾスルフロンエチル・ベンゾビシクロン粒剤**  
21530: 協友ボス1キログラム (協友アグリ) 2005/08/17  
インダノファン: 1.2%, ピラゾスルフロンエチル: 0.30%,

- ベンゾビシクロン: 2.0%
- **移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道), ヒルムシロ, セリ, アオミドロ (北陸を除く), 藻類による表層はく離 (北陸を除く)**
- **カフェンストロール・ダイムロン・ベンスルフロンメチル・ベンゾビシクロン粒剤**  
21531: 三共シロノック L ジャンボ (三共アグロ) 2005/08/31  
21532: シロノック L ジャンボ (デュボン) 2005/08/31  
21533: SDS シロノック L ジャンボ (エス・ディー・エスパイオテック) 2005/08/31  
カフェンストロール: 7.1%, ダイムロン: 14.3%, ベンスルフロンメチル: 1.5%, ベンゾビシクロン: 5.7%
- **移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ミズガヤツリ, ウリカワ, ヒルムシロ, セリ, アオミドロ (関東・東山・東海を除く), 藻類による表層はく離 (関東・東山・東海を除く)**
- **フェントラザミド・プロモブチド・ベンスルフロンメチル水和剤**  
21534: 三共クサトリー DX フロアブル H (三共アグロ) 2005/08/31  
21535: クサトリー DX フロアブル H (デュボン) 2005/08/31  
フェントラザミド: 6.0%, プロモブチド: 18.0%, ベンスルフロンメチル: 1.4%
- **移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ, ミズガヤツリ (東北), ウリカワ (北海道), ヒルムシロ, セリ, アオミドロ, 藻類による表層はく離**
- **フェントラザミド・プロモブチド・ベンスルフロンメチル水和剤**  
21536: 三共クサトリー DX フロアブル L (三共アグロ) 2005/08/31  
21537: クサトリー DX フロアブル L (デュボン) 2005/08/31  
フェントラザミド: 6.0%, プロモブチド: 18.0%, ベンスルフロンメチル: 1.0%
- **移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ミズガヤツリ, ウリカワ, ヒルムシロ, セリ (北陸を除く), アオミドロ (関東・東山・東海・九州), 藻類による表層はく離 (関東・東山・東海・九州)**

(38ページへ続く)