

特集：芝草病害

ベントグラス雪腐小粒菌核病の生物的防除の試み

住友林業(株)筑波研究所 おお し まん こう いち
大 志 万 浩 一

は じ め に

北海道や東北地方の積雪地帯では、ムギやシバが根雪下で、雪腐病により大きな被害を被っている。シバに発生する雪腐病は、症状や病原菌が形成する菌核の形状によってそれぞれ別名で細分化されているが、いずれの病害も芝地がほぼ円形または不整形に枯死状態になることから、雪腐病と総称されている。我が国では病原菌の違いによって、次のように区分されている。1. 雪腐小粒菌核病 [(1) 黒色小粒菌核病 (*Typhula ishikariensis*), (2) 褐色小粒菌核病 (*Typhula incarnata*)], 2. 紅色雪腐病 (*Microdochium nivale*), 3. 雪腐大粒菌核病 (*Sclerotinia borealis*), 4. 褐色雪腐病 (*Pythium* spp.)。

本病の防除には、主に化学農薬が用いられているが IPM (Integrated Pest Management) の観点より、生物的防除が期待されている。SMITH and DAVIDSON (1979) は、*Acronium boreale* が *Typhula* 属菌を含む低温性菌に対して -3°C でも拮抗すると報告している。MATSUMOTO and TAJIMI (1992) は *T. phacorrhiza* で根圏処理したペレニアルライグラスの収量は 127% に有意に増加すると報告している。BURPEE et al. (1987) は、コムギ穀粒で培養した *T. phacorrhiza* を土壌に 200 g/m^2 混入させ雪腐病の被害を 70% 軽減させた。また、LAWTON and BURPEE (1990) は、同様のコムギ穀粒で処理した土壌では雪腐小粒菌核病の菌核数が低下し、罹病株が回復する時間が短縮されると報告している。

本稿では北海道で広く分布し、経済的に重要である黒色小粒菌核病菌 (*Typhula ishikariensis*) を対象とした筆者らの生物的防除の試みを紹介する。

I 積雪条件下のゴルフ場における黒色小粒菌核病菌の動静

本病菌の活動環境である根雪下では、温度・湿度などの環境条件が比較的安定している。ほかの微生物による干渉という不確定要因が少ないので、ほかの病害の生物

的防除よりも有利であると考えられる。そこで、根雪下の本病菌の動静を調査して生物的防除の基盤とした。

根雪下における雪腐病菌の動静については、サンプル採取が困難なために報告は少ないが、ライグラスとメドウフェスクで *Sclerotinia borealis* が根雪直後に上位葉から分離され、*Typhula incarnata* が根雪後半に下位葉から分離された報告がある (MATSUMOTO and ARAKI, 1982)。

札幌近郊のゴルフ場の西洋シバの一種であるベントグラス (品種：ペンクロス, *Agrostis palustris* Huds. cv. Pennecross) 茎葉から *T. ishikariensis* の分離を試みたところ、根雪前には分離されなかったが、12 月から 1 月にかけての根雪前半に 20 ~ 53% の頻度で分離され、2 ~ 3 月の根雪後半には 82 ~ 88% と高頻度で分離され、融雪後には分離されなくなった (OSHIMAN, 1999)。菌糸伸長速度が極めて遅い本病菌が、根雪の早い時期から茎葉に付着していることから、本病菌の感染源はベントグラス茎葉の至近距離に存在していたことが示唆された。

一方、本病菌を人工的にベントグラス葉に接触させた後、侵入・感染過程を観察したところ、菌糸は気孔副細胞およびその周辺細胞に優先的に侵入し、葉に接触後 10 日目には表皮細胞の 30% 以上に菌糸がまん延した (OSHIMAN et al., 1995)。

II ベントグラスへの *T. ishikariensis* 人工接種系の確立

T. ishikariensis に対する拮抗微生物の効力検定を行うために、人工接種系 (ソッド・カップテスト法) の確立を試みた。接種源の種類、接種方法、ベントグラスの育成期間、加湿方法等を検討した結果、反復による再現性が良く、腐生菌の混入が少ない方法として「ソッド・カップテスト法」を確立した (図-1; 大志万ら, 1993)。まず、フスマ・バーミキュライト培地で固体培養した本病菌を円筒型プラスチック容器に詰め、市販のベントグラスソッドを詰めた角型ケース内のシバ中央部 1 箇所に培地面が接するように設置して、ケースを合成繊維の布で覆い、さらにその上に吸水させた脱脂綿をのせて密閉し、 $0 \sim 1^{\circ}\text{C}$ で培養後、菌叢伸展量を測定した。

本法は、培養ケースを冷蔵庫から取り出して菌叢伸展量を測定することによって、いつでも本病菌の活動状況

Biological Control of Typhula Snow Blight on Bentgrass with an Antagonistic Bacterium. By Ko-ichi OSHIMAN

(キーワード：西洋シバ、ベントグラス、雪腐小粒菌核病、生物的防除)

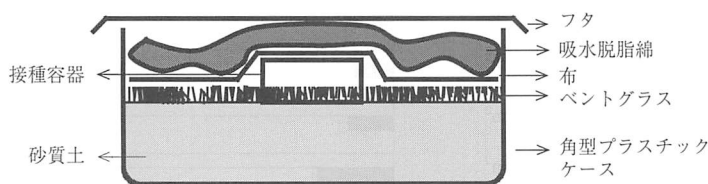


図-1 ベントグラスへの *T. ishikariensis* 人工接種系（ソッド・カップテスト）

を定量的に把握することができる利点がある。

III 拮抗微生物の選抜

札幌市近郊の複数のゴルフ場において、融雪後に枯死したベントグラス茎葉の表面に形成された *T. ishikariensis* の菌核を採取し、無殺菌のまま PDA 培地上に静置・培養すると、菌核に付着していた細菌が繁殖し、菌核は全く発芽しなかった。したがって、菌核の発芽抑制には、菌核に付着している細菌が重要な役割を担っていると推測し、本菌核を重要な拮抗菌の分離源の一つとした。

本病菌の菌核から分離した約 300 株、シバ茎葉から分離した約 200 株、土壌から分離した約 1,500 株、合計約 2,000 株の細菌を拮抗菌候補株として、寒天培地を用いた対峙培養、滅菌シバ茎葉培地を用いた方法、ソッド・カップテスト法の三段階の方法により、最終的に 5 株を選抜した。このうち 4 株が菌核由来であり、菌核由来の株に拮抗菌を期待できるという推測と一致した。また、この 5 株の中で最も本病菌の抑制率が高かった A11 株は、性状調査および各種の資化性試験などから *Pseudomonas fluorescens* と同定された（大志万ら、1996）。

IV 拮抗微生物が生産する抗菌性物質の同定とその作用

A11 株の培養ろ液に、*T. ishikariensis* の菌糸伸長を抑制する活性が認められたため、本抗菌活性成分を同定した。培養液の酢酸エチル抽出物を分子ふるいクロマトグラフィー・シリカゲル吸着クロマトグラフィー・高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し、IR, UV, MASS, NMR 等のスペクトル分析により、抗菌活性成分はフェナジン-1-カルボン酸と同定した。本物質は、培養液 1 ml 当たり約 100 μ g 存在するメジャー生成物であった。

ソッド・カップテスト法において、フェナジン-1-カルボン酸溶液は、本病菌の菌叢伸展量を抑制した。した

がって、A11 株培養液および滅菌ろ液による圃場での本病菌の罹病度抑制にはフェナジン-1-カルボン酸が関与していることが強く示唆された（大志万ら、1996）。フェナジン-1-カルボン酸が生物的防除において関与する例として、*P. fluorescens* 2-79 株によるコムギ立枯病（*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*）の抑制が報告されている（THOMASHOW and WELLER, 1988; 1990）。

V 圃場での防除効果

圃場に散布した拮抗微生物の効果を検証するためには、拮抗微生物を土壌から再分離して、定着性を確認する必要がある。A11 株を土壌や水中で生息している一般的な腐生細菌である *P. fluorescens* と区別するため、KLOEPPER et al. (1980) の方法に従って、本菌株のリファンピシンおよびナリジキシン酸耐性変異株（A11RN 株）を作出した。A11RN 株は、拮抗力、生育温度、pH、殺菌剤耐性、フェナジン-1-カルボン酸産生量などの性質は、親株である A11 株とほぼ同等であった。また、ソッド・カップテスト法により、A11RN 株の散布濃度は 1×10^8 cfu/cm² 程度が適当であることを確認し、圃場試験に臨んだ。

A11RN 株の培養液はそのまま、あるいは散布直前に井戸水で希釈して用いた。また、培養ろ液として、培養液から菌体を遠心して回収した上清を高圧滅菌して用いた。散布液量は 1,000 ml/m² としたが、最も高濃度の菌体を散布した区は 3,000 ml/m² とした。試験圃場は、ベントグラスが育成されている 2 圃場で、1 区画の面積を 2.5 ~ 10 m² とし、試験区をランダムに 3 区画設定し、根雪前に散布した。融雪後、複数回観察し、症状部を重症部と軽症部に分類し、それぞれの症状部面積率から罹病度指数を 0（無病徴）~ 100（全面重症型の症状）で算出した。

圃場で融雪後に結果を調査したところ、最も高濃度の菌体（ 3×10^8 cfu/cm²）の培養液散布区では、罹病度指数が 37 および 6 と、対照区の 99 および 19 より有意に（ $P < 0.05$ ）低く、両圃場において罹病度抑制効果が明

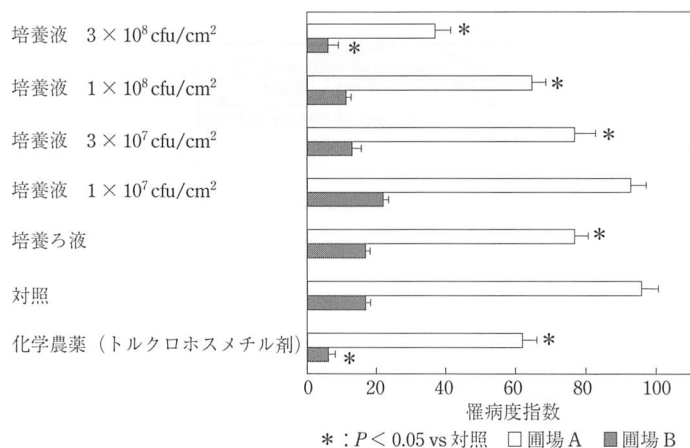


図-2 圃場における雪腐病拮抗菌 A11RN 株培養液・培養ろ液散布による罹病度指数抑制効果
トルクロホスメチル剤散布量は 1 g/m^2 。

確に認められた。これよりも培養液の散布濃度が低い場合 (1×10^8 , 3×10^7 cfu/cm²) でも、圃場 A では有意な抑制効果が得られた (図-2; 大志万ら, 1998)。

最も高濃度の菌体を散布した区の根雪下から芝草ソッドを掘り出し、選択培地上で A11RN 株菌の分離頻度を調査した結果、散布直後には 5×10^7 cfu/cm³ 存在し、漸次減少後、融雪時には散布直後の 2% に低下した。すなわち、A11RN 株は圃場で定着したが、土着細菌の駆逐は難しかった。反面、本菌株は土着微生物の生態系をかく乱する可能性が少ないと考えられる (大志万ら, 1998)。

VI アジュバントとしてのアルギン酸ナトリウムの利用

圃場試験において A11RN 株の散布直前にアジュバントとして、アルギン酸ナトリウムを 20 g/m^2 散布すると防除効果が高まった (OSHIMAN, 2000)。対照区の罹病度指数を 100 とした場合、アルギン酸ナトリウムと本菌の併用区で 53 ~ 61、本菌の単独処理区で 69 ~ 77 であった。融雪後に圃場ターフより分離された本菌の生菌数は、アルギン酸ナトリウムを併用散布することにより約 5 倍になった。防除効果の発現には、本拮抗菌が芝草根圏に 1×10^7 cfu/cm³ 以上の密度で定着することが必要であった。アルギン酸ナトリウム単独散布区では防除効果がなかったため、アルギン酸ナトリウムは A11RN 株の減少を防ぐことにより、間接的に防除効果を増強したことが示唆された。

おわりに

積雪地方のゴルフ場の芝草病害として非常に重要なベントグラス黒色小粒菌核病菌の生物的防除を試み、約 2,000 株の候補株よりスクリーニングされた拮抗性細菌 *Pseudomonas fluorescens* A11RN 株を圃場に散布することにより、本病の罹病度が有意に抑制された。拮抗作用は、本菌株が産生する抗生物質・フェナジン-1-カルボン酸によることが示唆された。さらに、アジュバントとしてアルギン酸ナトリウムを用いて本菌の防除効果を高めることができた。

上述のような生物的防除の効果にもかかわらず、望まれている防除効果のレベルが高いため、実用化にはさらに多くの問題を解決しなければならない。例えば、生物農薬は生きた生物を用いるので、製剤化が化学農薬よりも難しい。この点については、拮抗菌をアルギン酸ソーダとスキムミルクの乾燥製剤にする方法 (BASHAN, 1986)、ゼンサンガムとタルクで乾燥製剤にする方法 (KLOEPPER and SCHROTH, 1981)、あらかじめ糊化させた澱粉および多糖類を用いて細菌の貯蔵性および効果を改善する方法 (BOTHAST et al., 1993) などがある。ほかに散布適期が化学農薬より厳密であることが予想されるため、病害の発生予察能力や発生した病害の早期診断能力が化学農薬による管理の場合以上に求められる。さらに、拮抗微生物の導入部位についても工夫が必要であろう。

拮抗微生物を散布した後に、これを環境中に定着させることは生物的防除の最も重要な課題である。上記の例では、アルギン酸ナトリウムをアジュバントとして用い

で、防除効果を高めたが、他の生物的防除例では、拮抗菌をパーライトに吸着させて施用することにより定着密度を高めたり (BAHME et al., 1988)、拮抗菌の定着しやすい土質をあらかじめ調査したり (Van ELsas et al., 1986)、土壤にベントナイトを投入して土壤中に導入した *Rhizobium* の生存性を改良したり (HEYNEN et al., 1988) している。このように、拮抗微生物のすみかとなる資材を併用したり、原生動物などによる食害などから拮抗微生物を保護する資材を用いたりすることにより、拮抗微生物の定着を促進し、防除効果の改善が期待できる。また、根圏に定着する能力を遺伝的手法により改良したりする方法も考えられる。

近年、作物生産の分野に限らず芝草の管理においても、ますます環境保全に配慮する必要性が増大しており、殺菌剤だけではなく殺虫剤や除草剤を必要とする場面においても、持続的に環境負荷を低減する IPM の概念に則り生物的防除や耕種的方法を十分に活用する必要がある。

引用文献

- 1) BAHME, J. B. et al. (1988): *Phytopathology* 78: 534 ~ 542.
- 2) BASHAN, Y. (1986): *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1089 ~ 1098.
- 3) BOTHAST, R. J. et al. (1993): *ASTM Spec. Tech. Publ.* 1183: 45 ~ 56.
- 4) BURPEE, L. L. et al. (1987): *Plant Dis.* 71: 97 ~ 100.
- 5) HEYNEN, C. E. et al. (1988): *Soil. Biol. Biochem.* 20: 483 ~ 488.
- 6) KLOPPER, J. W. et al. (1980): *Phytopathology* 70: 1078 ~ 1082.
- 7) ——— and M. N. SCHROTH (1981): *ibid.* 71: 590 ~ 592.
- 8) LAWTON, M. B. and L. L. BURPEE (1990): *ibid.* 80: 70 ~ 73.
- 9) MATSUMOTO, N. and T. ARAKI (1982): *Res. Bull. Hokkaido Natl. Agr. Exp. Stn.* 135: 1 ~ 10.
- 10) ——— and A. TAJIMI (1992): *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 741 ~ 751.
- 11) 大志万浩一ら (1993): *芝草研究* 22: 21 ~ 28.
- 12) ———ら (1996): 同上 24: 21 ~ 30.
- 13) ———ら (1998): 同上 26: 97 ~ 112.
- 14) OSHIMAN, K. et al. (1995): *Mycoscience* 36: 179 ~ 185.
- 15) ——— (1999): *ibid.* 40: 373 ~ 375.
- 16) ——— (2000): *J. Gen. Plant Pathol.* 66: 258 ~ 263.
- 17) SMITH, J. D. and J. G. N. DAVIDSON (1979): *Can. J. Bot.* 57: 2122 ~ 139.
- 18) THOMASHOW, L. S. and D. M. WELLER (1988): *J. Bacteriol.* 170: 3499 ~ 3508.
- 19) ——— et al. (1990): *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 908 ~ 912.
- 20) Van ELsas, J. D. et al. (1986): *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 151 ~ 160.

(登録が失効した農薬 37 ページからの続き)

●エトフェンプロックス乳剤

17170: トモノトレボン乳剤 (シンジェンタ ジャパン) 07/1/19

●エトフェンプロックス粒剤

16986: トモノトレボン粒剤 (シンジェンタ ジャパン) 07/1/30

●DEP 水溶剤

3869: ディブテレックス水溶剤 80 (ユーピーエルジ ヤパン) 07/1/31

●ピリダフェンチオン粒剤

16259: オフナック粒剤 (三井化学) 07/1/31

「殺虫殺菌剤」

●BPMC・イミノクタジン酢酸塩・フサライド粉剤

17184: ヤシマラブサイドベフランバッサ粉剤 DL (協友アグリ) 07/1/19

「殺菌剤」

●オキサジキシル・銅水和剤

16579: ホクコーサンドファン C 水和剤 (北興化学工業) 07/1/9

●有機銅水和剤

18510: オキシンドーフロアブル (日本農薬) 07/1/11

●アゾキシストロピン水和剤

20575: クミアイアミスター 20 フロアブル (クミアイ化学工業) 07/1/30

「除草剤」

●ブタミホス・DBN 粒剤

15349: ホクコークレバー粒剤 (北興化学工業) 07/1/13

●テニルクロール・ベンスルフロンメチル粒剤

18883: ホクコークサメツ 1 キロ粒剤 75 (北興化学工業) 07/1/25

18885: クサメツ 1 キロ粒剤 75 (トクヤマ) 07/1/25

18886: ホクコークサメツ 1 キロ粒剤 51 (北興化学工業) 07/1/25

18888: クサメツ 1 キロ粒剤 51 (トクヤマ) 07/1/25

●ビフェノックス・プレチラクロール乳剤

18891: 日産ブローダックス乳剤 (日産化学工業) 07/1/25

18892: ホクコーブローダックス乳剤 (北興化学工業) 07/1/25

●ピラゾスルフロンエチル・プレチラクロール粒剤

18040: 大塚ライザー粒剤 20 (大塚化学) 07/1/27

●アジメスルフロン・シハロホップブチル・ピリミノバックメチル・プレチラクロール・ベンスルフロンメチル粒剤

19904: 田美人 A1 キロ粒剤 36 (クミアイ化学工業) 07/1/28

19905: デュボン田美人 A1 キロ粒剤 36 (デュボン) 07/1/28

●ハロスルフロンメチル・プロピザミド水和剤

19906: クサゴーン水和剤 (ダウ・ケミカル日本) 07/1/28

19907: 日産クサゴーン水和剤 (日産化学工業) 07/1/28

「植物成長調整剤」

●クロキシホナック液剤

14251: トマトラン液剤 (バイエルクロップサイエンス) 07/1/16

●イナベンフィド粒剤

17181: セリタード粒剤 5 (住友化学) 07/1/19