ノ ー ト

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 72, No. 6, pp. 763~765, 1998]

Aspergillus melleus を用いた松枯れの
生物的防除

天野義文, 黒澤 尋, 堀内 勲*,
須山 建*, 小原 賢*
(山梨大学工学部, *株式会社応微研)

平成9年12月1日受理

Biological Control of Pine Wilt Disease Using
Aspergillus melleus YUKAWA IAM2064

Yoshifumi AMANO, Hiroshi KUROSAWA,
Isao HORIUCHI,* Takeru SUYAMA,*
and Satoshi OHARA*
Yamanashi University, 4-3-11 Kofu,
Yamanashi 400-8511

*Japan Applied Microbiology Research Institute Ltd.,
242 Ido, Isawa, Higashiyatsushiro,
Yamanashi 406-0045

The effects of biological control using *Aspergillus melleus* YUKAWA IAM2064 were investigated with a view to protecting pine trees from serious wilt disease. To observe the effects of the mycelium on control of the pine wilt disease in the natural world, a mycelium preparation was inoculated around the roots of pine trees in a golf links. Ninety-eight percent of the pine trees survived for two years after the mycelium inoculation, while the survival rate of untreated pine trees was 90%.

(Received December 1, 1997)

Key words: pine wood nematode; biological control; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Aspergillus melleus*; aspyrone

激害型の松枯損病の主因はマツノザイセンチュウであることが明らかにされ、このセンチュウはマツノマダラカミキリによって伝播されることが知られている。このことに基づいて松枯れ防止のために多大な経費の支出と政策努力が行われている。その結果、ある程度の松枯れ防止効果は得られているが、全国的に見ると松枯れ病が鎮静化の方向に向かっているとは言い

がたい。したがって、薬剤散布などの継続的努力なしには現状の維持さえ困難な状況であることは明らかである。松枯れは山野における自然環境の保持と森林造成に不都合であるばかりでなく、名勝地やゴルフ場などの景観を維持し、観光・レジャー産業を振興する観点からも極めて深刻な問題である。松枯れ防止対策として農薬の空中散布による方法が実施されている。しかし、この方法に関しては国連 (FAO, WHO) によって当該農薬の発ガン性に関するデータの提出が求められ、また一方では市民グループによる反対もある。このような状況下で、松枯れ病の発病機構のさらなる究明^(1, 2)と同時に、農薬散布に代わる防除方法が検討されてきた。従来の化学合成農薬による防除は散布地域一帯の生物全般を殺滅ないしは衰弱させ、地域生物相を破壊してしまう危険性がある。また、効果を上げるために高濃度散布となりがちであるが、このことにより残留ならびに生物濃縮が生じ、大型動物や人間への間接的な影響も無視しえないところまできている。近年、化学合成農薬ほど即効性はないが、環境に対する負荷が少なく攻撃対象特異性の高い生物農薬が注目されている。すでに数種の微生物がセンチュウを特異的に防除する事が知られているが^(3, 4)、その内 *Aspergillus melleus* は植物病害センチュウの防除に効果があり⁽⁵⁾、その有効成分は Aspyrone であることが知られている^(6, 7)。この化合物は比較的不安定で長期残留性はない⁽⁶⁾。

本研究では松枯れ防止のために *Aspergillus melleus* YUKAWA IAM2064 (以下、*Asp. melleus* Y. と略記) を応用した結果、フィールド試験において十分な防除効果をもつことを確認したので報告する。

まず最初に *Asp. melleus* Y. がマツノザイセンチュウの増殖に及ぼす影響を確認するため以下のような室内試験を行った。シャーレに Potato Dextrose 寒天培地を調製し、培地平面の両端の相対する位置に *Asp. melleus* Y. と *Botrytis cinerea* を離して接種し、25℃で6日間静置培養して増殖させた。その後、*B. cinerea* が生育している中心部にマツノザイセンチュウを接種した。被試験センチュウには農林水産省林野庁林木育種センター九州育種場より分与されたマツノザイセンチュウ「島原」個体群⁽⁸⁾を使用した。センチュウは既報⁽⁹⁾に従って培養後、センチュウ懸濁液 (3,000 ~ 10,000 頭/ml) を調製した。この懸濁液 0.1 ml を上記

Table I. Biocontrol Effect of *Aspergillus melleus* YUKAWA IAM2064 on the Pine Wilt Disease

1) Control

Test period			Number of pine trees			Survival ratio (%)
Beginning	Inspection	Time elapsed (months)	Tested	Survived	Diseased	
1990. 2	1991. 11	21	1310	1181	129	90.15
1991. 2	1992. 11	21	1607	1365	242	84.94
1992. 2	1993. 10	20	1409	1276	133	90.56
1993. 2	1994. 10	20	1409	1276	133	90.56
1994. 2	1995. 10	20	1503	1394	109	92.75
1995. 2	1996. 10	20	1264	1190	74	94.15
						Av. 90.52

2) Inoculated by the mycerium preparation of *Aspergillus melleus* YUKAWA IAM2064

Test period			Number of pine trees			Survival ratio (%)
Beginning	Inspection	Time elapsed (months)	Tested	Survived	Diseased	
1990. 2	1991. 11	21	4513	4381	132	97.08
1991. 2	1992. 11	21	4017	3940	77	98.08
1992. 2	1993. 10	20	4164	4136	28	99.33
1993. 2	1994. 10	20	3779	3761	18	99.52
1994. 2	1995. 10	20	4020	3996	24	99.40
1995. 2	1996. 10	20	3322	3287	35	98.95
						Av. 98.73

のように接種した。 *Asp. melleus* Y. を接種していないものをコントロールとした。センチウを接種してから 25℃ で 7 日間培養した後ベールマン法によりセンチウの生残数を計数した。その結果、コントロールではセンチウ数が平均 14 倍に増加したが、 *Asp. melleus* Y. を接種してある区分のセンチウ生残数は平均 15% に減少していた。この結果より、 *Asp. melleus* Y. はマツノザイセンチュウに対し増殖抑制的に作用することが推定された。

自然界は多種多様な生物の共存によって構成されており、実験室内の単純な試験系による結果がそのまま自然界にも適用されるとは限らない。このような観点から、千葉県内にあるゴルフ場の協力を得て、6 年間にわたりフィールド試験を実施した。Potato Dextrose 培地成分をキャリア（バーライト）にしみこませた培養基を用い、 *Asp. melleus* Y. を 30 日間培養したものを試験試料とした。この試料には *Asp. melleus* Y. の胞子が 10^6 (個/g) 以上と若干の菌糸体が含まれている。被試験木とする赤松の根本に近接して周囲 5

カ所に深さ 15 cm の穴を掘り、1 カ所当たり試験試料 20 g を投入した後覆土した。施工時期は毎年 2 月を目安とし、松枯れ状況の調査確認は 10~11 月に実施した。調査は短期（施工後 9~10 カ月経過）と長期（20~21 カ月経過）の 2 回実施した。試験試料を処理しない松をコントロール区とした。予備的な試験を数年間に渡って行ったところ、施工後 2 年以上経過した場合、松枯れの防除効果に低下が見られた。このことより、施工後 2 年間に調査期間を目安として試験を行った。本研究では、1990 年より施工ならびに調査を開始し、以来 6 年間に渡る調査結果を示した (Table I)。試験は現在も継続している。

Table I に示した正常木数は調査時点で外見上マツノザイセンチュウによる病状がないものの数を示し、伐倒・枯死数としては松枯れにより伐採したものおよび立ち枯れ状態にある松の合計数を表示した。また、対象木数に対する正常木数を生木維持率で示した。伐倒・枯死数の中にはマツノザイセンチュウによらない、その年の乾燥あるいは高温気象の影響による枯死

も含まれているが、これらは明確に区別できないため合計数で表示した。

Table I には施工後 20~21 カ月経過後の松の生育状況を施工区とコントロール区とで比較して示した。表から明らかなように、*Asp. melleus* Y. 施工区では枯死した松の数が極めて少ない。1990~1991 年はマツノマダラカミキリが多数発生した年で、試験地近隣のゴルフ場では被害が多発した。本試験地においてもその影響が見られ、生木維持率は低かった。1992 年 11 月に調査した区分ではコントロール区の生木維持率が極端に低いが、当年が高温乾燥気象であったので、このことが相乗的に作用し枯死を加速させたことが考えられる。これに対し施工区分でも被害は認められたが僅少であった。1994, 1995 年の夏は記録的な猛暑で全国的にマツノザイセンチュウの被害が甚大であった年であるが、本試験地の施工区分での被害は僅少であった。気象条件の影響も含め、施工初期(1990, 1991 年 2 月に試験を開始した区分)を除き、その後は 5 年間に渡り施工区では 99% 以上の生木維持率が得られている。(ただし、1995 年 2 月に施工の試験区では 98.95% であった。)また、表には示していないが施工区に関する短期調査(9~10 カ月経過)では生木維持率の平均値が 99.51% であった。以上のように、施工区の生木維持率は短期・長期の両調査において高い値を示した。一方、処理を行っていないコントロール区の生木維持率は調査年ごとによる変動が大きく不安定であった。また、6 年間の調査におけるコントロールの生木維持率の平均値は 90.52% となり、施工区の 98.73% に比較し低かった。生木維持率の平均値の *F* 検定を行った結果、*F* 値は 37.37 となり有意水準 1% における棄却値 10.04 より大きくなったことから、コントロール区と施工区の生木維持率の差は有

意であることが認められた。

以上のことから、*Asp. melleus* Y. は松枯れの防除に効果があることが認められた。室内試験で示されたように *Asp. melleus* Y. はマツノザイセンチュウの増殖抑制に効果があることから、そのことがフィールド試験における松枯れ防除に有効に作用しているものと考えられる。しかし、室内試験の結果とフィールド試験の結果とを結びつけるにはさらなる検討が必要である。また、この試験はゴルフ場を試験地として行っているが、異なる環境条件における、松枯れ防除効果および効力持続性、*Asp. melleus* Y. の Aspyrone 生産能については引き続き検討中である。

本研究を行うに当たり、マツノザイセンチュウ「島原」個体群を分与いただいた林木育種センター九州育種場育種研究室長戸田忠雄氏に深謝します。

- (1) 真宮靖治: 農化, 64, 1243-1246 (1990).
- (2) K. Kawazu, H. Zhang, H. Yamashita, and H. Kanzaki: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 1413-1415 (1996).
- (3) H. Iizuka, K. Komagata, T. Kawamura, Y. Kunii, and M. Shibuya: *Agric. Biol. Chem.*, 26, 199-200 (1962).
- (4) 牧 孝昭: 特許公開, 昭 55-92304 (7 月 12 日, 1980).
- (5) 堀内 勲: 特許公開, 昭 61-231933 (10 月 16 日, 1986).
- (6) S. D. Mills and W. B. Turner: *J. Chem. Soc. (C)*, 2242-2244 (1967).
- (7) Y. Kimura, S. Nakahara, and S. Fujioka: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 1375-1376 (1996).
- (8) 藤本吉幸, 戸田忠雄, 西村慶二, 山手廣太, 冬野召一: 林木育種場研究報告, 7, 1-84 (1989).
- (9) 河津一儀: 「生理活性物質のバイオアッセイ」, 池川信夫ら編, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1985, pp. 500-502.