

イネ種子伝染性病害用微生物農薬としての *Trichoderma asperelloides* SKT-1 株の企業化

Commercialization of *Trichoderma asperelloides* SKT-1 as a Microbial Pesticide to Control Rice Seedborne Diseases

渡邊 哲^{1*}, 三角 裕治²
SATOSHI WATANABE^{1*} and YUJI MISUMI²

¹クミアイ化学工業株式会社 生物科学研究所 東北研究センター 〒987-0003 宮城県遠田郡美里町南小牛田字山の神 100

²クミアイ化学工業株式会社 製剤技術研究所 〒424-0053 静岡県静岡市清水区渋川 100

* TEL: 0229-32-3304 * FAX: 0229-32-2171

* E-mail: s-watanabe@kumiai-chem.co.jp

¹ Kumiai Chemical Industry Co., Ltd. Tohoku Research center, Life Science Institute,
100, Yamanokami Minamikogota, Misato-Machi, Toda-Gun, Miyagi 987-0003, Japan

² Kumiai Chemical Industry Co., Ltd. Formulation Technology Institute,
100, Shibukawa, Shimizu-ku, Shizuoka-shi, Shizuoka 424-0053, Japan

キーワード: トリコデルマ, イネ種子伝染性病害, 培養, 製剤, GFP

Key words: *Trichoderma*, rice seedborne diseases, cultivation, formulation, GFP

(原稿受付 2017年3月28日/原稿受理 2017年4月26日)

1. はじめに

近年, 作物への安全性向上や環境に対する負担軽減を目指し, 化学農薬の使用回数を減らした病害虫防除への取り組みがなされている¹⁾。このような社会的ニーズを反映し, 微生物や天敵を利用した病害虫防除剤が上市されてきている^{2,3)}。これら微生物農薬には, 一般的に安全性が高い, 標的外生物への影響が少ない, 従来の化学農薬の病原菌を殺すというイメージから, 「病原菌と拮抗する」へのイメージ変化による安心感, 薬剤耐性(抵抗性)菌が発現しにくい, などの利点がある⁴⁾。また日本は世界でもトップレベルの微生物生産(発酵)に関わる技術を有していることや⁵⁾, アメリカ・ヨーロッパに比べて高価な生産物⁶⁾, 高価な化学農薬の使用が背景にあることから⁷⁾, 開発力に加えて, 市場性も望むことができる。更に, 日本の気候条件である高温多湿条件は微生物の繁殖好適条件であることから, 微生物農薬の成功しやすい環境であるとも想定される⁸⁾。

しかしながら, 一般に微生物農薬は, 1) 効果が緩慢である。2) 対象病害虫に限られる。3) 生きた生物を利用する点から, 保存安定性に欠けるため流通性に乏しい。4) 化学農薬に比べ値段が高い。5) 生物-生物間の現象であるため, 作用メカニズムが不明瞭である, などの問題点があるため, 企業による商品化には不向きであるとされてきた。そのため, 様々な病害に対して防除活性を有する有用微生物を見出すことはできても, 商品として農業生産現場で利用されることはほとんどなかっ

た。事実, 1990年以前に日本国内で農薬登録を有していた微生物農薬製剤はタバコ白絹病, 腰折病に対して有効な「トリコデルマ生菌」とバラ根頭がん腫病に対して有効な「バクテロズ」⁹⁾のみであった。

しかし, 1997年に野菜類・ばれいしょ軟腐病に対して有効な「バイオキーパー水和剤」¹⁰⁾が農薬登録を取得して以来, ここ20年間に20種類(有効成分として)以上の微生物農薬が農薬登録を取得し, 商品化されている¹¹⁾。この背景には, 農林水産省から, 1997年に微生物農薬の登録取得のために, 化学農薬とは別の「微生物農薬安全性評価ガイドライン」が新たに通達・制定されたことに加え, 2005年に食の安全や信頼確保, 環境問題などに配慮した農業生産を目的として「食料・農業・農村基本計画」が策定されたことに伴う, 化学農薬の使用回数削減に対する社会的なニーズの高まりがある。また, この社会的ニーズを満たした農作物が, 新たな商品価値を有することも, 微生物農薬の商品化にとって追い風となっている。

一方で, 水稻の機械移植とそれに伴う箱育苗の普及に伴って, 種子伝染性のイネばか苗病, イネいもち病, イネごま葉枯病などの糸状菌性病害およびイネもみ枯細菌病, イネ苗立枯細菌病, イネ褐条病などの細菌性病害等が育苗中に多発するようになった。これらの種子伝染性病害を防除するための種子消毒は, 水稻栽培において重要な作業の一つとなっている。化学農薬による種子消毒の普及率は極めて高いが, 近年, ベンズイミダゾール系薬剤耐性イネばか苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*)^{12,13)}の存

在や、オキシソニック酸に対して感受性の低下したイネもみ枯細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) やイネ褐条病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*)¹⁴⁾ の存在が明らかになっており、薬剤の選択に苦慮する場面が出てきている。更に、化学農薬の使用回数削減が求められていることや種子消毒剤の使用済廃液の処理が問題化していること等から¹⁵⁾、環境負荷の少ない防除方法や防除資材の開発が望まれていた。

このような背景の下、クミアイ化学工業株式会社と静岡県農業試験場は共同で、イネ種子伝染性病害に有効な微生物を探索するために、各種作物根圏、一般土壌から分離された糸状菌 872 菌株を対象に様々な検討を進め、イネばか苗病などに高い防除効果を有する *Fusarium* 及び *Trichoderma* 属菌を見出し、その中から特に安定した病害防除効果を示す *Trichoderma* 属糸状菌の一菌株、SKT-1 株を選抜した¹⁶⁾。本菌株はイネばか苗病などの糸状菌による病害だけでなく、細菌に起因するイネもみ枯細菌病等にも高い防除効果を示し、これら病害との同時防除においても実用性が高いことを確認した¹⁷⁾。

本稿ではバイオコントロール微生物 *Trichoderma* 属糸状菌 SKT-1 株が、イネ種子伝染性病害に対して化学農薬に匹敵する防除活性と適用病害の広さを有することに着目し、先に挙げた「生きた生物を利用する点から、保存安定性に欠けるため流通性に乏しい」、「化学農薬に比べ値段が高い」などの微生物農薬一般の問題点を解決するための商品化研究と、更なる普及と商品価値向上のための菌株同定、及び作用機構研究について記載する。

2. *Trichoderma* 属菌の分類と同定

Trichoderma 属糸状菌は植物病原菌に対する拮抗作用を利用して、微生物農薬として商品化、利用されているにもかかわらず¹⁸⁻²⁰⁾、分類同定が不十分であった^{21,22)}。これらの種レベルまでの同定は、安全性評価や環境中での消長や植物病原菌に対する作用の予測のために必要であり、それを明らかにすることは開発者の責務であると思われる。従来、*Trichoderma* 属の分類は形態学的特徴を基に行われてきたが²²⁻²⁷⁾、分子生物学の進歩に伴い、形態学に加えて分子生物学的手法も分類・同定に应用することが可能となってきた^{21,22,28-31)}。

Trichoderma sp. SKT-1 株は分生子表面の構造が、Meyer (1989) ら³²⁾ が示したグループ II と同じ構造であり、さらに、ITS 領域の塩基配列は、*T. asperellum* である NRRL 5242 株と一致し、標準菌株である ATCC 204424^T との比較では 1 塩基欠損している以外は一致していたことから、*Trichoderma* sp. SKT-1 株は *T. asperellum* であることを確認した (図 1)³³⁾。現在では *T. asperellum* はさらに 3 種類に類別されており³⁴⁾、この方法に従い、SKT-1 株は *T. asperelloides* と再同定されている。

Trichoderma 属糸状菌は一般的に、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) 等の栽培において有害菌として知られており、イギリスやイスラエルのマッシュルーム栽培では病原性 *T. harzianum* による緑かび病が問題となっている³⁵⁾。Hersoma ら²⁹⁾ は ITS の配列比較により、*T. asperelloides* を含む 17 種類の *Trichoderma* 属の有用微生物が、緑かび病を引き起こす *T. harzianum* biotype

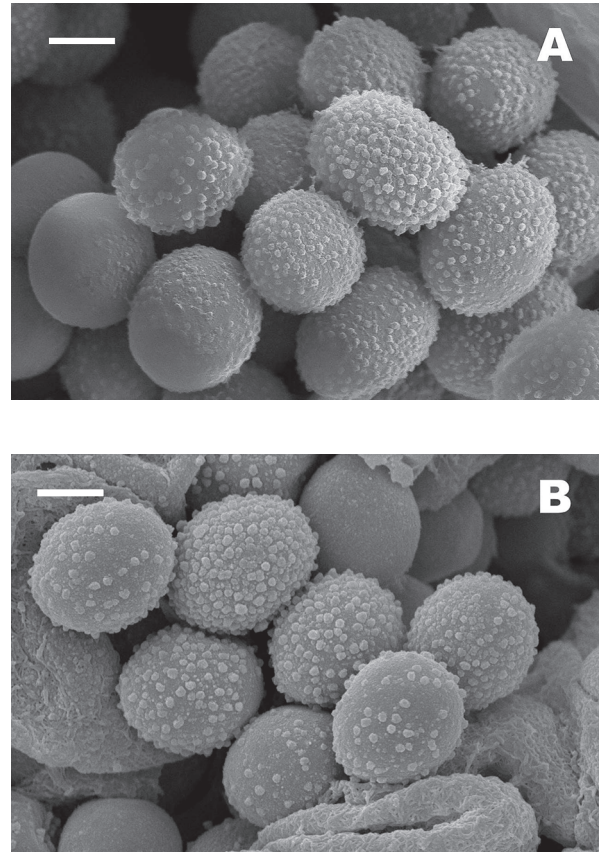


図 1. *Trichoderma* SKT-1 (A) 及び *T. asperellum* ATCC 204424^T (B) の分生子表面³³⁾
Bar は 2 μ m を表す。

Th2/4 とはっきり区別できることを示している。また、*T. viride* はイネ苗立枯病の病原菌として知られているが³⁶⁾、*T. asperelloides* には植物病原菌としての報告はない。さらに、*Trichoderma* 属糸状菌がいくつかの抗菌物質を算出することが報告されているが³⁷⁻³⁹⁾、*T. asperelloides* の抗菌物質生産の報告はない。これらのことから、*T. asperelloides* は環境に対しても、植物に対しても安全性が高い菌種であることが示唆される。有用微生物の正確な分類・同定は、その有用微生物の特性・特徴を正確に認識し、その能力を施用場面に活かすことによって、有用微生物の効果的で確実な利用に繋がる。

3. 培養と製剤化

実験室レベルでの微生物防除の研究には、寒天培地上で形成される糸状菌の気中胞子が用いられる場合が多い⁴⁰⁻⁴²⁾。しかしながら、寒天培地を用いた気中胞子生産法は、商品化するための大量生産には不向きである。一方、液体培養はスケールアップが容易で、雑菌混入が起き難いことから、大量生産に好適な方法である。また、液体培養用培地はグルコースやデンプン、ペプトン、脱脂大豆及び無機塩等から成る一般的な原料を用いることが可能である⁴³⁻⁴⁵⁾。興味深いことに *T. asperelloides* SKT-1 株は寒天静置培養だけでなく、液体振とう培養でも旺盛に胞子を形成した。液体振とう培養によって得られた *T. asperelloides* SKT-1 株の水中胞子の細胞壁は薄

く、乾燥条件下での胞子の生存性は低かったが、水中胞子は水中で数か月保存した後でも、高い生菌数と病害防除効果を維持していた⁴⁶⁾。ゆえに、我々は発酵槽を用いた発酵生産によって得られる *T. asperelloides* SKT-1 株の水中胞子に、経済的な優位性を見出し、2003年に国内で商品名「エコホープ®」(登録番号 21009号, 有効期限 8ヶ月, 10°C以下保存)として上市した。エコホープはイネ育苗時に発生する種子伝染性病害を防ぐ微生物農薬として利用されている。日本国内では、イネ種籾の浸種による消毒作業は、一般的に3月~6月までの約3ヶ月間に行われることから、この期間中に保存可能であれば、商品の性能を維持・保証することができる。

一方で、SKT-1株の気中胞子をイネ種籾浸種時に水に懸濁して処理すると、気中胞子はイネ種子表面に付着する。その後、催芽時にイネ種子上の気中胞子も発芽し、菌糸を伸長する。伸長した菌糸はイネ胚部分で病原菌に作用し、防除効果を発現する⁴⁷⁾。しかしながら、SKT-1株をはじめとする *Trichoderma* 属糸状菌の気中胞子は通常、疎水性であるため、水に対するなじみが低い。従って、均一な気中胞子の水懸濁液を得ることが困難であるため、イネ種子表面に気中胞子を均一に付着させるべく、結果的に、安定した防除効果を得られない可能性があった。そこで、均一な気中胞子の水懸濁液を得るために、化学農薬で一般的に行われている製剤化技術を応用することを検討した。本剤はイネ種子を浸漬処理するため、浸漬液に気中胞子が均一に分散し、安定した懸濁状態を維持できる農薬製剤の剤型として水和剤を選択し、検討を行った。最初に調製した水和剤試作品の分散、懸濁状態は良好であったが、27°C(室温)での保存安定性は4ヶ月であり、十分な保存安定性が得られなかった。本水和剤は、疎水性の気中胞子を水に懸濁させるために必要な界面活性剤を配合し、組成物全体を親水性とするため、製剤中に比較的多量の水分を含有していた。十分な保存安定性が得られない原因として、この水分の

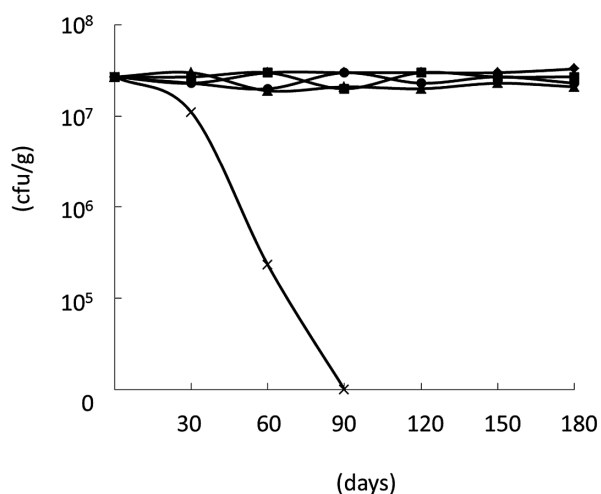


図2. 製剤中のSKT-1株の保存安定性
製剤(4% パールレックス CP, 84%昭和微粉クレー, 10%合成ゼオライト, 2%SKT-1株気中胞子)をアルミ袋に入れ、各温度(◆: -25°C, ■: 4°C, ▲: 15°C, ●: 27°C, ×: 37°C)に保存したときのSKT-1株の生存菌数の推移を示す。

影響が考えられたため、製剤中の水分をさらに低下させることを検討した。一般に、化学農薬製剤中の水分を低下させる際には、100°C前後の空気による熱風乾燥法などが採られるが⁴⁸⁾、微生物を有効成分とする本剤では、有効成分が死滅してしまうことが想定されるため不適である。また、微生物の長期乾燥保存方法として用いられるシリカゲルを同封する保存法や凍結乾燥法は有効な保存方法ではあるが⁴⁹⁾、生存率100%を期待できるものではなく、加えて、一般に大量生産には不向きである。そこでSKT-1株を含む製剤には、乾燥剤を製剤内に配合することとし、製剤組成物中での最適濃度を求めた。これによって、27°C(室温)で半年間安定して保存可能な製剤を調整することに成功した(図2)。この製剤は物理化学的性質の評価結果からも、水和性粉末組成物として十分な品質を有していると考えられた⁵⁰⁾。また、製剤組成物中で保存されたSKT-1株の気中胞子は、培養直後のSKT-1株の気中胞子とほぼ同等の防除効果をイネばか苗病に示し、防除活性も維持しながら製剤保存されていることがわかった(表1)。

今回得られた水和剤は、疎水性に富む *Trichoderma* 属糸状菌の気中胞子を均一に水中にて分散することができ、さらに室温にて半年間、生菌数及び生物活性を維持しながら保存できる性能を有するものであった。これらの性能は微生物農薬の商品性としては充分であると判断できるものであった。

4. 作用機構

微生物農薬として利用されている *Trichoderma* 属糸状菌の標的微生物に対する作用機作は、それぞれの株によって異なり、抗生⁵¹⁾、菌寄生⁵²⁾、栄養や生活場所の競合^{53,54)}及び、植物への抵抗性誘導⁵⁵⁾などが想定されている。病原菌と有用微生物の植物組織や植物器官上でのモニタリングは、作用機作を明らかにすることに加えて、更なる効果的な施用法の確立や安全性の確認など、微生物農薬を商品化するための礎のひとつになると考え

表1. 製剤のイネばか苗病に対する防除効果

薬剤	濃度 (cfu/ml) ^{a)}	発病苗率 ^{d)} (%)
無処理		100.0 a ^{e)}
水和剤	1.5 × 10 ⁶ (×200) ^{b)}	0.5 b
	1.5 × 10 ⁵ (×2000)	1.5 b
	1.5 × 10 ⁴ (×20000)	2.2 b
気中胞子	1.5 × 10 ⁶	0.5 b
	1.5 × 10 ⁵	1.1 b
	1.5 × 10 ⁴	2.8 b
イブコナゾール	250 mg/l イブコナゾール	0.5 b
水酸化第二銅	150 mg/l 水酸化第二銅 ^{c)}	

^{a)} cfu (=colony forming unit)

^{b)} 水和剤を200, 2000, 20000倍に滅菌水で希釈して使用した。

^{c)} テクリードCフロアブル(クミアイ化学工業株式会社東京)を200倍に滅菌水で希釈して使用した。

^{d)} 温室で18日間緑化を行い、イネばか苗病の発病の有無を調査し、発病苗率で表した。

^{e)} 発病苗率はTukey's multiple range testによって、有意差検定を行った。同一の英文字間では有意差(P<0.05)がないことを示す。

られる。植物病原性糸状菌に対する *Trichoderma* 属菌の微生物防除の作用機構は、レポーター遺伝子を組み込んだ菌株を利用し、*in vitro* や *in situ* のアプローチで解析が行われている^{56,57)}。我々は、*T. asperelloides* SKT-1 株と、イネばか苗病菌 *G. fujikuroi* N-68 株の *in vitro* 及び *in situ* での相互作用解析を、それぞれの GFP 導入株を用いて行った。GFP を導入した *G. fujikuroi* N-68 株の植物病原性と、GFP を導入した *T. asperelloides* SKT-1 株の生物防除活性は、それぞれの野生株と同等であった⁴⁷⁾。これは GFP の導入が、病原性と生物防除活性に影響を及ぼさないこと、GFP 導入した糸状菌が、植物組織等での病原菌と有用微生物間の相互作用解析やモニタリングに用いることができることを示している。*T. asperelloides* SKT-1 株、*G. fujikuroi* N-68 株のどちらも GFP によってラベルしたため、蛍光の違いでは識別できないが、*G. fujikuroi* N-68 株の菌糸幅は約 10~25 μm であるのに対し、*T. asperelloides* SKT-1 株の菌糸幅は約 3~5 μm であったことから、菌糸幅によって識別が可能であった⁴⁷⁾。

GFP 導入した *G. fujikuroi* N-68 株を単独で PDA 培地上で培養した場合、*G. fujikuroi* の菌糸の全ての細胞で GFP の発現が観察された。しかしながら、*T. asperelloides* SKT-1 株と対峙培養すると、*G. fujikuroi* の菌糸中の幾つかの細胞で GFP が消失しているのが観察された⁴⁷⁾。これは両菌の菌糸が接触した部分で、*G. fujikuroi* の菌糸中の GFP が不活化もしくは分解されたこと、すなわち *G. fujikuroi* の細胞が不活化あるいは死滅したことが示唆された。生体細胞において GFP がその細胞の活性状態の指標になるという報告があり⁵⁸⁻⁶¹⁾、本結果はそれと矛盾しない。さらに *in situ* での *G. fujikuroi* と SKT-1 株の相互作用を観察した。GFP 導入した *G. fujikuroi* をイネ種籾に接種して汚染籾を作製し、この汚染籾を浸種、浸漬、催芽、緑化を行うことによって、イネばか苗病菌の挙動を Confocal scanning laser microscope (CSLM) 下で観察した。催芽処理 16 時間後 (温度は 32°C) に、*G.*

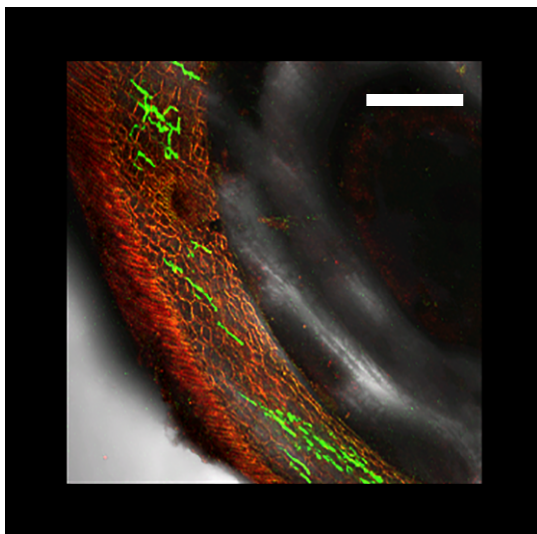


図3. *Trichoderma asperelloides* SKT-1 無処理時の罹病種籾 (播種 5 日後) 上の GFP 導入した *Gibberella fujikuroi* の CSLM 画像⁴⁷⁾。イネ子葉鞘組織中に *Gibberella fujikuroi* の伸長した菌糸が観察された。Bar は 200 μm を表す。

fujikuroi の菌糸がイネ胚上を伸長している様子が観察され、緑化期には菌糸がイネ子葉鞘組織中に侵入しているのが観察された (図 3)⁴⁷⁾。次に、GFP 導入した *G. fujikuroi* を接種した汚染籾に GFP 導入した *T. asperelloides* SKT-1 株を処理し、両菌の相互作用について観察を行った。その結果、催芽処理 16 時間後 (温度は 32°C) に、*G. fujikuroi* 及び SKT-1 株がともに菌糸をイネ胚上で伸張している様子が観察された (図 4)⁴⁷⁾。催芽処理 24 時間後には両菌の菌糸の接触が観察され、この接触した部分で、上述の対峙培養でも観察された *G. fujikuroi* の菌糸の一部の細胞で GFP の消失が観察された (図 5)⁴⁷⁾。この現象は催芽処理によって発芽したイネ胚上において、*G. fujikuroi* が SKT-1 株によって致死したことを示すと考えられた。さらに、この種籾を緑化期まで育苗を行ったところ、*G. fujikuroi* と思われる菌糸は、イネ子葉鞘組織中などのイネ植物体組織中には一切観察されず、代わって、SKT-1 株の菌糸及び分生子がイネ子葉鞘上に観察された。さらに対峙培養の SEM (scanning electron microscope) による観察では、*G. fujikuroi* の菌糸が SKT-1 株の菌糸によって貫通され、さらには *G. fujikuroi* の細胞壁が溶解している様子が観察された (図 6A, 6B)⁴⁷⁾。これらの結果から *T. asperelloides* SKT-1 株の作用により *G. fujikuroi* が溶菌し致死することが示唆された。

T. asperelloides SKT-1 株による溶菌は、キチナーゼや β -1,3-グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素によるものであると想定される^{18,19,62-67)}。細胞壁溶解酵素をはじめとする酵素活性は温度に影響される。注目すべき点として、SKT-1 株の生育適温 (27-30°C)³³⁾ とイネの発芽適温⁶⁸⁾ がほぼ一致している。これは *T. asperelloides* SKT-1 株がイネ種子処理用の微生物農薬として理想的であることを示唆している⁴⁶⁾。

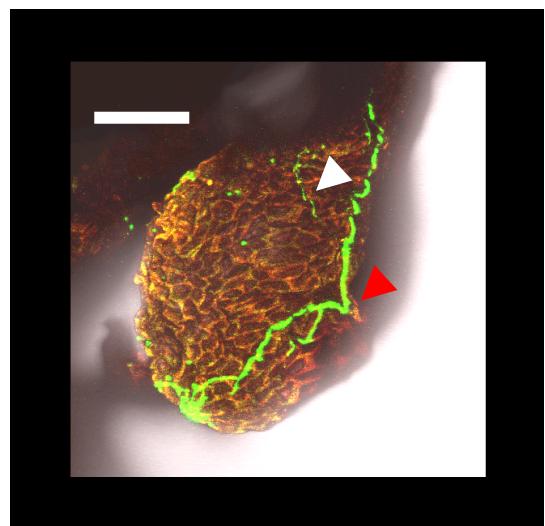


図4. *Trichoderma asperelloides* SKT-1 を処理したときの罹病催芽籾上の GFP 導入した *Gibberella fujikuroi* の CSLM 画像⁴⁷⁾。催芽 16 時間後、イネ (短銀坊主) の胚上に菌糸を伸長している SKT-1 株と *G. fujikuroi* の菌糸の様子。SKT-1 株と *G. fujikuroi* はまだ接触していなかった。太い *G. fujikuroi* の菌糸は赤い矢印で、細い SKT-1 株の菌糸は白い矢印で示した。Bar は 200 μm を表す。

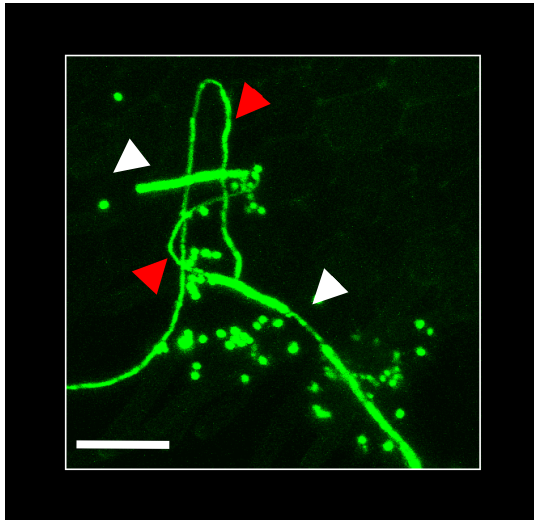


図5. イネ（短銀坊主）の胚上及び子葉鞘での GFP 導入した *Trichoderma asperelloides* SKT-1 と GFP 導入した *Gibberella fujikuroi* の相互作用を示す CSLM 画像⁴⁷⁾
SKT-1 株の GFP は連続して観察される（赤い矢印）が、*G. fujikuroi* 中の GFP は所々、消滅している（白い矢印）。Bar は 100 μm を表す。

5. おわりに

限られた耕地面積から農作物を得るため、効率的な農業生産は現在の人口を維持していくための重要な課題である。2005年には農水省より、食の安全や信頼確保、環境問題などに配慮した農業生産を目的として「食料・農業・農村基本計画」が策定された。このような社会情勢の中、環境汚染や環境負荷を低減し、かつ効率的な農業生産を行うための一手段として、自然界に存在する微生物を利用した病害虫防除、すなわち微生物農薬が着目されている。現在、クミアイ化学ではエコホープ[®]、エコホープドライ[®]に続く微生物農薬を「エコシリーズ」として、エコホープDJ[®]、エコショット[®]、エコメイト[®]、エコマスターBT[®]を継続的に商品化しており、今後も、社会的ニーズに合致した商品を拡充すべく鋭意、開発研究を進めている。

文 献

- 1) 農林水産省. 2005. 「平成17年度 食料・農業・農村の動向」及び「平成18年度 食料・農業・農村施策」.
- 2) 国見裕久. 2006. 今月の農業. 50: 13-18.
- 3) 有江 力. 2006. 今月の農業. 50: 20-24.
- 4) 亀谷満明. 1992. 病害防除の新戦略, p. 143. 駒田 旦, 稲葉忠興編, (株)全国農村教育協会.
- 5) 相田 浩. 1986. アミノ酸発酵, pp. 3-12. 相田 浩, 滝波弘一, 千畑一郎, 中山 清, 山田秀明編, (株)学会出版センター.
- 6) 農林水産省. 2000. 東京及び海外主要5都市における食料品の小売価格調査.
- 7) 農林水産省. 1997. 食料・農業・農村白書.
- 8) 和田哲夫. 2005. 微生物の生物防除剤としての機能開発と普及課題, pp. 1-15. 日本植物病理学会 バイオコントロール研究会編.
- 9) 牧野孝宏. 1993. 静岡農業試験場 特別報告. 17: 49-79.
- 10) 高原吉幸, 岩瀬哲哉, 塩田正幸, 木村俊夫, 菊本敏男.

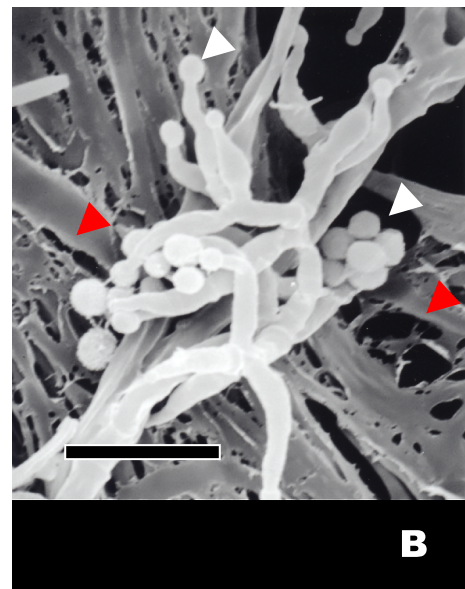


図6. *Gibberella fujikuroi* と *Trichoderma asperelloides* SKT-1 との対峙培養時の SEM 画像⁴⁷⁾

A. *G. fujikuroi* の太い菌糸が SKT-1 株の細い菌糸によって貫通されている様子（矢印部分）。

B. 赤い矢印は SKT-1 株が *G. fujikuroi* の細胞壁を溶解している様子。白い矢印は *G. fujikuroi* の溶解した菌糸上に SKT-1 株が分生子を再形成している様子。Bar は 10 μm を表す。

1993. 日植病報. 59: 581-586.
- 11) (社)日本植物防疫協会. 2016, 農薬要覧. 87-89.
- 12) 北村義男, 保積隆夫, 田中徳己. 1982. 日植病報. 48: 380.
- 13) 小川勝美, 諏訪正義, 渡部 茂. 1982. 日植病報. 48: 379-380.
- 14) 守川俊幸, 松崎卓志, 西山幸司, 宮川久義, 向島博行. 1997. 日植病報. 48: 516.
- 15) 熊倉和夫, 渡辺 哲, 豊島 淳, 牧野孝宏, 市川 健, 伊代住浩幸, 永山孝三. 2003. 日植病報. 69: 384-392.
- 16) 熊倉和夫, 渡辺 哲, 豊島 淳, 牧野孝宏, 市川 健, 伊代住浩幸, 永山孝三. 2003. 日植病報. 69: 393-402.
- 17) 永山孝三. 2003. 植物防疫. 57: 472-475.
- 18) Chet, I. 1987. *Trichoderma*; Innovative approaches to plant

- disease control, pp. 137–160. Wiley, New York.
- 19) Chet, I., N. Benhamoum, and S. Haran. 1988. *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 2. pp. 153–171. Taylor & Francis. London.
 - 20) Harman, G.E. and T. Bjorkman. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 2. pp. 229–265. Taylor & Francis. London.
 - 21) Lieckfeldt, E., G.J. Samuels, H.I. Nirenberg, and O. Petrini. 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2418–2428.
 - 22) Gams, W. and J. Bissett. 1998 *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 1. pp. 3–34. Taylor & Francis. London.
 - 23) Bissett, J. 1984. *Can. J. Bot.* 62: 924–931.
 - 24) Bissett, J. 1991. *Can. J. Bot.* 69: 2357–2372.
 - 25) Bissett, J. 1991. *Can. J. Bot.* 69: 2373–2417.
 - 26) Bissett, J. 1991. *Can. J. Bot.* 69: 2418–2420.
 - 27) Bissett, J. 1992. *Can. J. Bot.* 70: 639–641.
 - 28) Hermosa, M.R. and I. Grondona. 2001. *Curr. Genet.* 38: 343–350.
 - 29) Hermosa, M.R., I. Grondona, E.A. Iturriaga, J.M. Diaz-Minguez, C. Catro, E. Monte, and I. Garcia-Acha. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1890–1898.
 - 30) Meyer, R.J. 1991 *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2269–2276.
 - 31) Ospina-Giraldo, M.D., D.J. Royse, X. Chen, and C.P. Romaine. 1999. *Phytopathology.* 89: 308–313.
 - 32) Meyer, R.J. and J.S. Plaskowitz. 1989. *Mycologia.* 81: 312–317.
 - 33) Watanabe, S., K. Kumakura, H. Kato, H. Iyozumi, M. Togawa, and K. Nagayama. 2005. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 351–356.
 - 34) Samuels, G.J., A. Ismaiel, M.C. Bon, S.D. Respinis and O. Petrini. 2010. *Mycologia.* 102: 944–966.
 - 35) Seaby, D.A. 1987. *Mushroom J.* 179: 355–361.
 - 36) 大畑貫一. 1989. 稲の病害—診断・生態・防除, pp. 278–280. 全国農村教育協会 編.
 - 37) Fujiwara, A., T. Okuda, S. Masuda, Y. Shiomi, C. Miyamoto, Y. Sekine, M. Tazoe, and M. Fujiwara. 1982. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1803–1809.
 - 38) Faull, J.L., K.A. Graeme-Cook, and B.L. Pilkington. 1994. *Phytochemistry.* 36: 1273–1276.
 - 39) Watts, R., J. Dahiya, K. Chaudhary, and P. Tauro. 1988. *Plant and Soil.* 107: 81–84.
 - 40) Papavizas, G.C. 1985. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 23–54.
 - 41) Elad, T., G. Zimmand, Y. Zaps, S. Zuriel, and I. Chet. 1993. *Plant Pathol.* 42: 324–332.
 - 42) Nelson, E.B., G.E. Harman, and G.T. Nash. 1988. *Soil Biol. Biochem.* 20: 145–150.
 - 43) Kenney, D.S. and T.L. Couch. 1981. *Biological Control in Crop Protection*, pp. 143–150. G.C. Papavizas (ed.), Allanheld, Osmun & Co., Totowa, New Jersey.
 - 44) Soper, R.S. and M.G. Ward. 1981. *Biological Control in Crop Protection*, pp. 161–180. G.C. Papavizas (ed.), Allanheld, Osmun & Co., Totowa, New Jersey.
 - 45) Watanabe, S., H. Kato, K. Nagayama, and H. Abe. 1995. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 936–937.
 - 46) Watanabe, S., H. Kato, K. Kumakura, E. Ishibashi, and K. Nagayama. 2006. *J. Pest. Sci.* 31: 375–379.
 - 47) Watanabe, S., K. Kumakura, N. Izawa, K. Nagayama, T. Mitachi, M. Kanamori, T. Teraoka, and T. Arie. 2007. *J. Pest. Sci.* 32: 222–228.
 - 48) 日本農薬学会. 1997. 農薬製剤ガイド, pp. 136–139. 農薬製剤・施用法研究会 編.
 - 49) 根井外喜男. 1977. 微生物の保存法. 東京大学出版会.
 - 50) 近藤俊夫. 1982. 農薬誌. 7: 403–408.
 - 51) Ghisalberti, E.L. and G.Y. Rowland. 1993. *J. Nat. Prod.* 56: 1799–1804.
 - 52) Haran, S., H. Schickler, and I. Chet. 1996. *Microbiol.* 142: 2321–2331.
 - 53) Simon, A. and K. Sivasithamparam. 1989. *Soil Biol. Biochem.* 21: 331–337.
 - 54) Inbar, J., D. Abramshy, D. Cohen, and I. Chet. 1994. *J. Plant Pathol.* 100: 337–346.
 - 55) Yedidia, I., I.N. Benhamou, and I. Chet. 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061–1070.
 - 56) Orr, K.A. and G.R. Knudsen. 2004. *Phytopathology.* 94: 1383–1389.
 - 57) Lu, Z., R. Tombolini, S. Woo, S. Zeilinger, M. Lorito, and J.K. Jansson. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3073–3081.
 - 58) Huang, Y.-S., T. Karashima, M. Yamamoto, and H. Hamaguchi. 2003. *J. Raman Spectrosc.* 34: 1–3.
 - 59) Huang, Y.-S., T. Karashima, M. Yamamoto, T. Ogura, and H. Hamaguchi. 2004. *J. Raman Spectrosc.* 35: 525–526.
 - 60) Huang, Y.-S., T. Karashima, M. Yamamoto, and H. Hamaguchi. 2005. *Biochemistry.* 44: 10009–10019.
 - 61) Naito, Y., A. Toh-e, and H. Hamaguchi. 2005. *J. Raman Spectrosc.* 36: 837.
 - 62) Chet, I., A. Viterbo, M. Shores, and M. Harel. 2004. http://www.weizmann.ac.il/Biology/open_day/book/author/i_chet.pdf.
 - 63) Lima, L.H.C., C.J. Ulho, A.P. Fernandes, and C.R. Felix. 1997. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 31–37.
 - 64) Bara, M.T.F., A.L. Lima, and C.J. Ulhoa. 2003. *FEMS Microbiol. Lett.* 219: 81–85.
 - 65) Elad, Y., I. Chet, and Y. Henis. 1982. *Can. J. Microbiol.* 28: 719–725.
 - 66) Cortes, C., A. Gutierrez, V. Olmedo, J. Inbar, I. Chet, and A. Herrera-Estrella. 1998. *Mol. Gen. Genet.* 260: 218–225.
 - 67) Inbar, J. and I. Chet. 1995. *Microbiology.* 141: 2823–2829.
 - 68) 星川清親. 1975. イネの生長. (社) 農山漁村文化協会.