

イネ科雑草からのイネ苗立枯細菌病菌の分離

佐藤 陽子*・松田 泉**

Youko SATOU* and Izumi MATUDA** :
Isolation of *Pseudomonas plantarii*, pathogen of bacterial
seedling blight of rice, from gramineae weeds.

イネ苗立枯細菌病は、1982年に千葉県で始めて発生が確認された¹⁾。福井県では1994年に確認されて以来、毎年発生が認められている。本病は種子伝染することから、本病の罹病苗を移植することによる初感染の可能性が示唆されているが²⁾、そのほかの伝染源については明らかにされていない。1991年、山形県では苗床で発病頻度の高い農家の自家採種圃場周辺に自生する雑草を調査し、コウヤワラビの他3種の雑草から苗立枯細菌病菌(*Pseudomonas plantarii*)が分離されたことを報告している³⁾。しかし、本県の水田周辺にはコウヤワラビ等の自生は極めて少なく、伝染源となる可能性は低いと考えられる。

ここでは、本県の水田周辺に多く自生している雑草から*P. plantarii*の分離を試みるとともに、本県北部地域における水田周辺雑草からの*P. plantarii*分離状況を調査したので報告する。

材料および方法

1. 雑草からの結晶析出細菌の分離

1996年、福井市岡保地区において6月中旬と7月中旬に水田周辺に自生する10種の雑草を任意に採集した。さらに、7月中旬には福井市河合地区、一乗地区、吉田郡松岡町において同様に2種の雑草を採集した。

細菌の分離は、採集した各雑草を水道水で洗浄後、地際部1cm程度を切り取り表面殺菌後、滅菌水を加えて磨砕し、磨砕液を白金耳にとって、シクロヘキシミドを25ppm添加した*P. plantarii*の識別培地(AFG培地: 1%グルコース, 100ppm硫酸第一鉄加用Ayers培地)²⁾に塗付した。30°Cで10日間培養後、赤褐色の結晶(ト

ロポロン第二鉄錯塩)を析出したコロニーを分離菌とし、以下の実験に供した。

2. 分離菌の病原性

分離菌をPPGA培地で30°C48時間培養後、滅菌水に懸濁し約 10^8 cfu/mlに調整した。菌液にアンチホルミンで表面殺菌した種籾(コシヒカリ)を浸漬し、30分間減圧接種後風乾して接種籾を作成した。直径3cm、高さ5cmのプラスチックケースに7分目程度の育苗床土を詰め、接種籾を1ケース当たり10粒播種し、昼間28°C、夜間は15°Cに設定した人工気象器内で育苗した。対照には*P. plantarii*(MAFF301723)菌株を供試した。

3. 細菌学的性質

分離菌5菌株を用い細菌学的性質を主要な6項目について*P. plantarii*, *P. glumae*と比較した。

4. PCR法による*P. plantarii*との比較

*P. plantarii*の16S-23SリボソームRNA遺伝子間のスペーサーの塩基配列から作成した*P. plantarii*に特異的なプライマー⁴⁾を使って、各分離菌のPCRによる増幅産物の有無を検討した。テンプレートの調整にはインスタジーンキットを用いた。

5. 血清学的性質

寒天ゲル内二重拡散法によって*P. plantarii*の2種類の抗血清(免疫源: YNB9027, MAFF302907)との反応を調査した。また、血清型が明らかとなっているイネ分離菌(MAFF301723; PPA-1, MAFF302907; PPA-2, MAFF302936; PPA-3, TK2-1; PPA-4)⁵⁾抗原とのスパー形成によって分離菌の血清型を決定した。

6. *P. plantarii*が分離されるチガヤの分布状況

前述の調査において*P. plantarii*分離率はチガヤで最も高いことから、各地での分離調査にはチガヤを用いた。福井県北部の18地点から水田周辺に自生するチガヤを採集し、*P. plantarii*の分離状況を調査した。分離方法は1のとおりとした。

福井県農業試験場 Fukui Agricultural Experiment Station,
Ryo Fukui

* 現在 坂井農業改良普及センター Sakai Agricultural Extension
Center, Mikunityo Sakaigun Fukui

** 現在 農業研究センター National Agriculture Research
Center

結 果

1. 雑草からの結晶析出細菌の分離

供試雑草と AFG 培地上で赤褐色結晶を析出する細菌

第1表 水田周辺雑草からの赤色結晶析出菌の分離¹⁾

雑草名	採集地	供試数	結晶析出菌株数 ²⁾
エノコログサ	福井市岡保	32	1
スギナ	" "	14	0
ススキ	" "	29	5
	" 一乗	18	8
スズメノテッポウ	" 岡保	28	0
センダングサ	" "	5	0
チガヤ	" "	31	23
	" 一乗	15	10
	松岡町上吉野	11	5
ニガナ	福井市岡保	21	0
メヒシバ	" "	29	0
ヨシ	" "	8	5
	" 河合	13	0
ヨモギ	" 岡保	5	0
計		259	57

注1) AFG培地上

2) 試料当たり1菌株とした

の分離状況を第1表に示した。供試した雑草のうち、エノコログサ、ススキ、チガヤ、ヨシの4種から結晶を析出する細菌57菌株が分離された。供試した雑草はいずれも見かけ上健全であり、病徴と思われる症状は認められなかった。

2. 分離菌のイネへの病原性

雑草からの分離菌57菌株についてイネ苗への病原性を検討した結果、分離菌を接種した初は、発芽後0.5~1cm程度で生育が止まり、苗は白化状態から褐色になって枯死するか、または第2葉葉身基部が白化し、後に枯死するなどイネ分離菌と同様の病徴を呈した。これらの病徴は供試した57菌株すべてで認められた。

3. 細菌学的性質の検討

分離菌は40°Cで生育せず、アルギニンジヒドロラーゼ活性陰性、スクロース、トレハロースを利用しないなど主な点で*P. plantarii*と一致した。

4. PCR法による*P. plantarii*との比較

イネ苗枯細菌病菌に特異的なプライマーを用いてPCR法を行った結果、分離菌57菌株からは、イネ分離菌と同サイズの増幅産物が得られた。

5. 血清学的性質の検討

イネ分離菌を免疫源とする抗血清を使って血清学的性質を検討した結果、すべての供試菌が2種の*P. plantarii*

第2表 雑草分離菌の細菌学的性質

	雑草分離菌	<i>P. plantarii</i>	<i>P. glumae</i>
40°Cにおける生育	-	-	+
アルギニンジヒドロラーゼ活性	-	-	-
ゼラチンの液化	±	+	+
スクロースの利用	-	-	-
トレハロースの利用	-	-	+
オキシダーゼ活性	±	+	-

第3表 雑草分離菌の血清型

雑草名	採集地	血 清 型				
		PPA-1	PPA-2	PPA-3	PPA-4	PPA-5
エノコログサ	福井市岡保	1	0	0	0	0
ススキ	" "	4	0	0	0	1
	" 一乗	8	0	0	0	0
チガヤ	" 岡保	23	0	0	0	0
	" 一乗	0	0	10	0	0
	松岡町上吉野	1	0	4	0	0
ヨシ	福井市岡保	5	0	0	0	0
	" 河合	0	0	0	0	0
計		42	0	14	0	1

抗血清と沈降帯を形成した。また、血清型が明らかとなっているイネ分離菌を指標として雑草分離菌の血清型を検討した結果、雑草分離菌は3種類の血清型に分類された。雑草分離菌はイネ分離菌で分類された血清型のPPA-1, PPA-3の血清型と、イネでは確認されなかった血清型PPA-5に分類された。血清型のうちPPA-1に分類される菌がもっとも多く、これはイネ分離菌と同じ傾向であった。PPA-3は福井県で分離されたイネ分離菌にはみられなかった血清型であった。

以上の結果から、雑草から分離されたAFG培地上で赤褐色の結晶を析出した菌は、すべて*P. plantarii*であると同定された。また、*P. plantarii*はススキ、チガヤ、ヨシのイネ科多年生雑草で高い分離率であった。

6. *P. plantarii* が分離されるチガヤの分布状況

雑草の*P. plantarii*分離状況から、最も分離率の高かったチガヤを採集して、さらに広い地域の水田周辺における*P. plantarii*の分離状況を調査した。その結果、採集を行った18地点中、11地点のチガヤから*P. plantarii*

が分離された(第1図)。各地点での*P. plantarii*分離率は1.9~27.3%であった(第5表)。また、水田周辺雑草の管理状況とチガヤからの分離率をみると、水田周辺の草刈りが稲作期間中常時行われている4地点から採集したチガヤでは、*P. plantarii*は分離されなかった。しかし、雑草が繁茂状態であった14地点の水田周辺から採集したチガヤからは11地点で*P. plantarii*が分離された。

考 察

水田周辺に自生する10種類の雑草を採集してAFG培地で分離したところ、エノコログサ、ススキ、チガヤ、ヨシの4種から赤褐色の結晶を析出する細菌が分離された。これらの菌のイネに対する病原性を検討した結果、イネから分離された*P. plantarii*と同様にイネ苗の褐変枯死、葉身基部の白化、生育抑制などの病徴が認められた。細菌学的性質は、主要な点で*P. plantarii*に一致し、PCR法によるイネから分離された*P. plantarii*との比較では、イネ分離菌と同サイズのDNA増幅産物が得られた。これらのことから、雑草から分離されたAFG培地上で赤褐色の結晶を析出する細菌が*P. plantarii*としての特性を具備していると断定した。今回*P. plantarii*が分離されたのはいずれもイネ科雑草であり、これらの



第1図 福井県北部地方の水田周辺チガヤからの*P. plantarii*分離状況

第5表 各地点におけるチガヤからの*P. plantarii*分離状況

採集地	供試数	結晶析出菌株数 ¹⁾	分離率(%)
福井市岡保	27	4	14.8
“ 一乗	11	3	27.3
“ 棗	17	1	5.9
“ 本郷	27	1	3.7
“ 中藤	42	0	0
“ 河合	6	0	0
“ 上文殊	26	0	0
“ 麻生津	57	6	10.5
丸岡町鳴鹿	60	6	10.0
“ “	52	1	1.9
金津町鋸岳	35	5	14.3
勝山市平泉寺	32	2	6.3
“ 村岡	45	0	0
大野市乾側	13	0	0
“ “	8	0	0
“ 下庄	12	0	0
“ “	46	2	4.3
武生市北日野	68	6	8.8

注1) AFG培地上で試料当たり1菌株を分離した

第4表 水田周辺イネ科雑草からの*P. plantarii*分離率

雑草名	採集地	分離率(%)
エノコログサ	福井市岡保	3.1
ス ス キ	“ “	17.2
	“ 一乗	44.4
チ ガ ヤ	“ 岡保	74.2
	“ 一乗	66.7
	松岡町上吉野	45.4
ヨ シ	福井市岡保	62.5
	“ 河合	0

イネ科雑草が *P. plantarii* の伝染源となっている可能性が示唆された。山形県では、苗立枯細菌病常発地の水田周辺に自生する雑草の葉あるいは茎を分離することによって、コウヤワラビ、キツネノボタン、ゲンノショウコ、ヘビイチゴから *P. plantarii* が検出されたが、イネ科の7種からは検出されなかった。本県では水田周辺にコウヤワラビの自生はほとんど認められない。しかし発病は毎年見られることから本県の水田周辺に一般的に生育が見られる雑草を中心に分離を行った。今回地際部を分離することにより *P. plantarii* が分離されたが、同時に行った茎や地下茎からは分離されなかった。これらのことから *P. plantarii* は地際部周辺に多く生息している可能性が考えられる。また、中国農試の試験結果から、水田が近くにない湖沼のヨシなどからも *P. plantarii* が分離されることが報告されており、伝染源としてのイネ科雑草の関わりについて今後の研究が待たれる。また、血清型がわかっているイネから分離された *P. plantarii* を用いて血清型を検討した結果、今回雑草から分離された *P. plantarii* は3つの血清型に分類されたが、そのうちの1つは、イネ分離菌では確認されなかった血清型であった。このことは、たまたまイネ分離菌では確認されなかったものなのか、もともと *P. plantarii* はイネに病原性を示す以前から自然界で生息していたものであることを示すものなのか興味をもたれるところである。さらに、福井県北部地方の18地点の水田周辺に自生するチガヤを用いて *P. plantarii* の分離状況を検討した結果、18地点中11地点から *P. plantarii* が分離され、県内の広い地域に *P. plantarii* が分布していると考えられた。また、常に草刈りが行われ、雑草を繁茂させない管理を行っている圃場周辺で検出されないことは、本菌が植物体表面および、枯死植物体で増殖することが知られているが、草刈りによって増殖の場が減少することから増殖が妨げ

られるものと考えられ、圃場衛生の観点から注目すべきことである。

摘 要

1. 水田周辺に自生するイネ科雑草のエノコログサ、ススキ、チガヤ、ヨシから *P. plantarii* が分離されることが明らかとなった。
2. 福井県北部地方の18地点中11地点で *P. plantarii* が分離されたことから、広い地域に *P. plantarii* が分布していると考えられた。

引用文献

- 1) 畔上耕児・西山幸司・渡辺康正 (1983) イネ苗立枯症を起こす *Pseudomonas* 属菌. 日植病報 49 : 411 (講要)
- 2) Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuchi, A. and Fukuzawa, C. (1987) *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. Int. J. Syst. Bacteriol. 37 : 144-152
- 3) 井口慶三 (1991) イネ細菌病罹病苗の移植後における生育と菌密度. 関東東山病虫研報 38 : 23-24
- 4) 佐藤陽子・竹内 徹・澤田宏之・鈴木文彦・松田泉 (1996) イネ苗立枯細菌病菌の抗血清と16S-23S スペーサーに基づく種内変異の解析. 日植病報 62 : 305 (講要)
- 5) 佐藤陽子・松田 泉 (1997) イネ苗立枯細菌病菌の血清学的性質の解析. 福井農試報 34 : 43-46
- 6) 田中 孝・加藤智弘・藤田靖久 (1994) 水田周辺の雑草からのイネ苗立枯細菌病菌の分離. 日植病報 60 : 640-643

(1998年6月30日受領)