

## 新潟県におけるイネ褐条病、もみ枯細菌病の薬剤耐性菌の発生およびその防除法の検討

堀 武志・小瀧慶司\*・原澤良栄\*\*

Takeshi HORI, Keiji OGATA and Ryoei HARASAWA :

Occurrence of bactericide-resistant *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* and *Burkholderia glumae* in Niigata Prefecture, and the control of them

新潟県内で1997年に生産されたイネ種子および1998年に採取したイネ育苗期細菌病の発病苗から褐条病菌およびもみ枯細菌病菌を分離し、オキシリニック酸とカスガマイシンに対する感受性検定と、薬剤耐性菌の感染種子を用いた薬剤効果試験を行った。褐条病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) についてはオキシリニック酸耐性菌およびカスガマイシン耐性菌、もみ枯細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) についてはオキシリニック酸耐性菌の新潟県における発生が認められた。薬剤耐性菌の減圧接種種子および自然感染種子を用いた薬剤効果試験では、オキシリニック酸やカスガマイシン剤の防除効果の著しい減退が認められた。種子における薬剤耐性菌の出現には採種までの本田期薬剤散布が関与したと推察された。これらの薬剤耐性菌に対する防除対策としては、それぞれ銅剤による種子消毒とカスガマイシン剤の育苗箱処理が有効であった。

Key words : 薬剤耐性菌, イネ褐条病, イネもみ枯細菌病, オキシリニック酸, カスガマイシン, resistance to bactericides, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Burkholderia glumae*, oxolinic acid, kasugamycin

### 緒 言

新潟県において水稻の育苗期に発生する細菌性病害には褐条病、もみ枯細菌病 (苗腐敗症)、苗立枯細菌病があり、特に褐条病およびもみ枯細菌病の発生が多い。これらの細菌性病害は苗質の低下<sup>1)</sup>や枯死、腐敗等を引き起こすことから、健苗育成の阻害要因として大きな問題となっている。育苗期細菌性病害は種子伝染性のため、種子消毒や催芽時・播種時の薬剤処理による防除が広く普及している。従来はカスガマイシン剤やオキシリニック酸剤の使用により安定した防除効果が得られていたが、近年、薬剤耐性菌の出現による防除効果の減退事例が報告されている<sup>2,3)</sup>。本県においても1998年の育苗期に、薬剤防除を適正に実施したにも関わらず防除効果の劣る事例が認められた。この要因として薬剤耐性菌の関与が考えられたため、薬剤耐性菌の出現状況を調査し、薬剤防除効果への影響を検討したので報告する。

なお、本試験の実施にあたり、県内の各農業改良普及

センターおよび病害虫防除所の方々には発病苗の収集および実態調査にご協力頂いた。また、富山県農業技術センター野菜花き試験場守川俊幸博士には菌株の分譲ならびに薬剤感受性検定方法についてご指導頂いた。また、独立行政法人農業環境技術研究所西山幸司博士には結果の解析にあたり有益なご助言を頂いた。ここに記して謝意を表する。

### 材料および方法

#### 1. 分離菌株

##### (1) 種子からの分離

1997年に新潟県内の採種ほ17地点で生産された種子 (品種: コシヒカリ) 15gを三角フラスコに計り取り、浴比を約2倍容とし15℃で5日間浸種した。次に、32℃, 125rpmで24時間振とうして催芽させた。催芽種子を育苗箱の約1/10容量のプラスチックケースに播種し、32℃, 2日間出芽処理後、15~32℃のガラス温室内で育苗した。約2週間後に苗の葉鞘褐色病斑部もしくは葉鞘

新潟県農業総合研究所作物研究センター Crop Research Center, Niigata Agricultural Research Institute, Nagakura-cho, Nagaoka, Niigata 940-0826

<sup>1)</sup>現在, 新潟県農業総合研究所 Niigata Agricultural Research Institute, Nagakura-cho, Nagaoka, Niigata 940-0826

<sup>2)</sup>現在, 新潟県農林水産部経営普及課 Agricultural Management Extension Division, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Shinko-cho, Niigata, Niigata 950-8570

基部腐敗部を切断し、常法により表面殺菌後、2～3 mlの滅菌水中で磨砕した。この磨砕液をNA培地（普通寒天培地）、AFG培地<sup>11</sup>、松田培地<sup>7</sup>、およびS-PG培地<sup>14</sup>に画線塗抹し、28℃、3～4日培養後に出現したコロニーを釣菌した。1地点当たりの分離菌株数は1～5菌株とした。分離した菌株は、イネ種子への浸漬接種による幼苗への病原性とその病徴、*A. avenae* subsp. *avenae* H8301 (MAFF301505) 抗血清<sup>5</sup>または新潟大学保存の*B. glumae* AS-1抗血清との凝集反応、および上記選択培地上での性状等に基づき同定した。分離菌株は褐条病菌が18菌株、もみ枯細菌病菌が6菌株であった。

## (2) 現地発病苗からの分離

1998年に県内各地から細菌病発病苗を採取し、苗の発症部から上記と同様に病原細菌を分離した。分離菌株は褐条病菌が40菌株、もみ枯細菌病菌が27菌株、また、苗立枯細菌病菌が9菌株であった。

## 2. 最小生育阻止濃度の測定

薬剤感受性検定は守川ら<sup>8,9)</sup> および竹内<sup>12)</sup>の方法に準じ以下の方法で行った。オキシリニック酸は0.1N NaOHに溶解し、培地中の有効成分が0.2, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100ppmとなるようにNA培地 (pH6.8) に添加した。カスガマイシンはカスガマイシン液剤（北興化学工業株式会社製）を滅菌水で希釈後、有効成分が12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600ppmとなるようにNA培地に添加した。供試菌株はPPGA培地<sup>10</sup>で28℃、1日間培養後に菌体を滅菌水に懸濁し、細菌濃度を約 $10^5$ cfu/mlとなるように調整した。この細菌懸濁液を各濃度の薬剤添加培地に1白金耳量ずつ、1シャーレ当たり8菌株となるように移植し、28℃、2日間培養後の生育の有無から最小生育阻止濃度（以下、MIC）を判定した。なお、MICの判定には富山県で分離された褐条病菌*A. avenae* subsp. *avenae* T9020（オキシリニック酸に対するMIC50ppm、カスガマイシンに対するMIC1600ppm以上）、同T9014（オキシリニック酸に対するMIC50ppm、カスガマイシンに対するMIC25ppm）および同T9160（オキシリニック酸に対するMIC0.2ppm、カスガマイシンに対するMIC25ppm）の各菌株を基準として用いた。

## 3. 減圧接種種子を用いた防除効果

分離した褐条病菌およびもみ枯細菌病菌をPPGA培地で培養し、菌体を滅菌水に懸濁した。約 $10^8$ cfu/mlに調

整した細菌懸濁液中に健全種子（品種：新潟早生）を浸漬し、10分間真空減圧後一晩室温で風乾し、減圧接種種子を作製した。この減圧接種種子が25～50%の割合となるよう健全種子と混合し、以下の薬剤試験に供試した。種子消毒剤処理区の薬剤としてはオキシリニック酸・ペフラゾエートフロアブル、チウラム・ペフラゾエートフロアブルおよびイプコナゾール・銅フロアブルを供試した。混合した種子5.6gを200倍に希釈した各薬剤で24時間浸漬処理後、浴比を約2倍容とし15℃、4～5日間浸種した。催芽は30℃、1日間静置条件で行い、催芽種子を育苗箱の約1/28容量の塩ビカップに播種した。催芽時薬剤処理区では、混合種子5.6gを水道水中で浸種後、カスガマイシン液剤の1,000倍希釈液に30℃、1日間静置条件で種子を浸漬後に上記と同様に播種した。育苗箱薬剤処理区では、同様に水道水中で浸種・催芽した種子を播種後、薬剤処理を行った。薬剤および薬剤処理量・方法は、カスガマイシン液剤4倍液の50ml/箱（通常育苗箱換算値、以下同じ）播種後覆土前散布、同粒剤の30g/箱培土全層混和、同粒剤の20g/箱覆土混和あるいは同粒剤の20g/箱播種後覆土前散布とした。上記の薬剤処理および播種を行った後、32℃、2日間出芽処理し、15～28℃のガラス室で育苗した。調査は播種20日後頃に行い、褐条病については棚橋ら<sup>13)</sup>の基準に従い6段階（発病程度別指数＝4：枯死、同3：萎ちょう・生育異常、同2：第2本葉まで病徴が見られるもの、同1：第1本葉まで病徴が見られるもの、同0.1：不完全葉に病徴が見られるもの、同0：無病徴）の基準で、また、もみ枯細菌病については守川ら<sup>8)</sup>の調査基準を改変し4段階（発病程度別指数＝5：腐敗枯死、同4：発病程度別指数3を満たし生育が1/2以下に抑制されたもの、同3：葉身基部黄化または第2本葉の奇形的出葉、同0：無病徴）の基準で発病苗数を調査し、以下の式で発病度を算出した。褐条病発病度＝ $\Sigma$  (指数×発病程度別苗数) / (4×調査苗数)、もみ枯細菌病発病度＝ $\Sigma$  (指数×発病程度別苗数) / (5×調査苗数)

## 4. 自然感染種子を用いた防除効果

試験薬剤にはオキシリニック酸水和剤、イプコナゾール・銅フロアブルおよびフルジオキシニル・ペフラゾエート・銅水和剤を用いた。薬剤の濃度・処理方法は7.5倍液、3%種子塗抹、20倍液、10分間浸漬あるいは200倍液、24時間浸漬とした。種子にはオキシリニック酸・カスガマイシン両剤耐性褐条病菌が分離された自然

感染種子(採種ほ産コシヒカリ)3種類,およびオキシリニック酸・カスガマイシン両剤耐性褐条病菌とオキシリニック酸耐性もみ枯細菌病菌の両方が分離された自然感染種子(採種ほ産コシヒカリ)2種類を用いた。これらの種子が少量であったことから,5種類の種子を等量ずつ混合し試験に供試した。種子15gを所定の濃度・方法で処理後,200ml容の三角フラスコに入れ,浴比を約2倍容とし15℃,5日間浸種した。次に,30℃,125rpmで24時間振とうして催芽させ,催芽種子を育苗箱の約1/10容量のプラスチックケースに播種した。32℃,2日間出芽処理後,15~28℃のガラス室で育苗した。調査および発病度の算出は前述のとおりとした。

## 結 果

### 1. 薬剤感受性検定

種子および発病苗から分離した菌株のオキシリニック酸およびカスガマイシンに対する感受性分布を第1表に示した。褐条病菌については,7地点の種子から分離した18菌株のうち,8菌株はオキシリニック酸に対するMICが12.5~100ppmであり10菌株はMICが0.39ppm以下であった。また,8菌株はカスガマイシンに対するMICが400ppm以上であり,10菌株はMICが25ppmであった。オキシリニック酸およびカスガマイシンに対するMICの分布は明瞭な二峰性を示しており,守川ら<sup>8,9)</sup>の結果および後述の種子消毒試験結果からオキシリニック酸に対するMICが12.5ppm以上の菌株はオキシリニック酸耐性菌, MICが0.39ppm以下の菌株は感受性菌と判断した。同様にカスガマイシンに対するMICが400ppm以上の菌株はカスガマイシン耐性菌, MICが25ppmの菌株は感受性菌と判断した。18菌株のうち,オキシリニック酸とカスガマイシンの両剤に対し耐性を示す菌株は4菌株あった。12地点の発病苗から分離した褐条病菌40菌株のうち,21菌株はオキシリニック酸に対するMICが12.5~

100ppmのオキシリニック酸耐性菌であり,19菌株は感受性菌であった。また,25菌株はカスガマイシンに対するMICが400ppm以上のカスガマイシン耐性菌であり,15菌株は感受性菌であった。さらに,オキシリニック酸とカスガマイシンの両剤に対し耐性を示す菌株は16菌株であった。これらの耐性菌が分離された地点の分布に偏りは見られず,県内の広範囲の採種ほまたは一般ほにおける耐性菌の出現が認められた。

もみ枯細菌病菌については,3地点の種子から分離した6菌株の全てと,12地点の発病苗より分離した27菌株のうちの6菌株はオキシリニック酸に対してMIC50ppmで耐性菌<sup>8,9)</sup>であった。カスガマイシンに対しては今回分離したもみ枯細菌病菌は全て感受性菌であった。耐性菌が分離された地点の分布に偏りは見られず,県内の広範囲の採種ほまたは一般ほにおける耐性菌の出現が認められた。

苗立枯細菌病菌については,4地点の発病苗より分離した9菌株はオキシリニック酸に対するMICが0.39~0.78ppmで,カスガマイシンに対するMICは25ppmであり,両剤に対する感受性菌であった。

### 2. 減圧接種種子を用いた薬剤防除試験

オキシリニック酸に対して感受性の異なる褐条病菌7菌株の減圧接種種子を用いた種子消毒試験の結果を第1図に示した。感受性菌ではオキシリニック酸・ペフラゾエート剤処理により発病が抑制されたが,耐性菌では同剤による防除効果は全く認められず,無処理より発病が増加する場合も認められた。しかし,イブコナゾール・銅剤処理のオキシリニック酸耐性菌に対する防除効果は高かった。

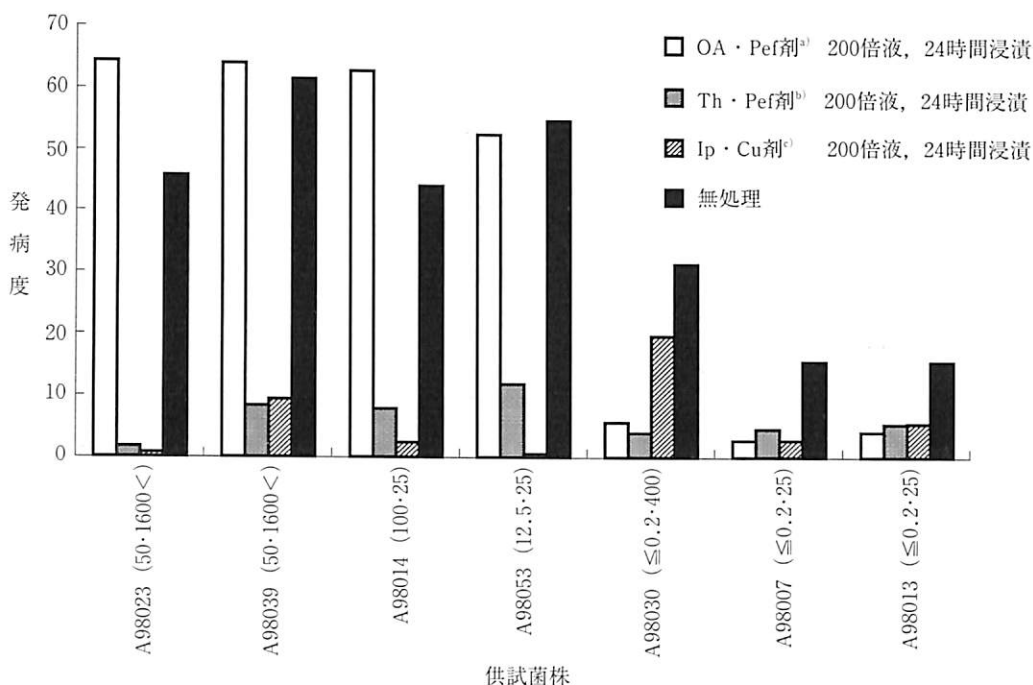
カスガマイシンに対して感受性の異なる褐条病菌4菌株を用い,カスガマイシン剤処理を行った結果を第2図に示した。感受性菌に対して,カスガマイシン液剤およ

第1表 種子および発病苗から分離した各種細菌病菌のオキシリニック酸,カスガマイシンに対する感受性

分離病原菌	由来	採取地点数	菌株数	最小生育阻止濃度 (MIC)										
				オキシリニック酸						カスガマイシン				
				≤0.2	0.39	0.78	12.5	25	50	100	25	400	800	1600<
褐条病菌	種子	7	18	9 <sup>a)</sup>	1		1		5	2	10	3	1	4
	苗 <sup>b)</sup>	12	40	19			8	1	12		15	8		17
もみ枯細菌病菌	種子	3	6						6		6			
	苗	12	27	21					6		27			
苗立枯細菌病菌	苗	4	9		7	2					9			

a) 菌株数

b) 現地栽培の発病苗から分離

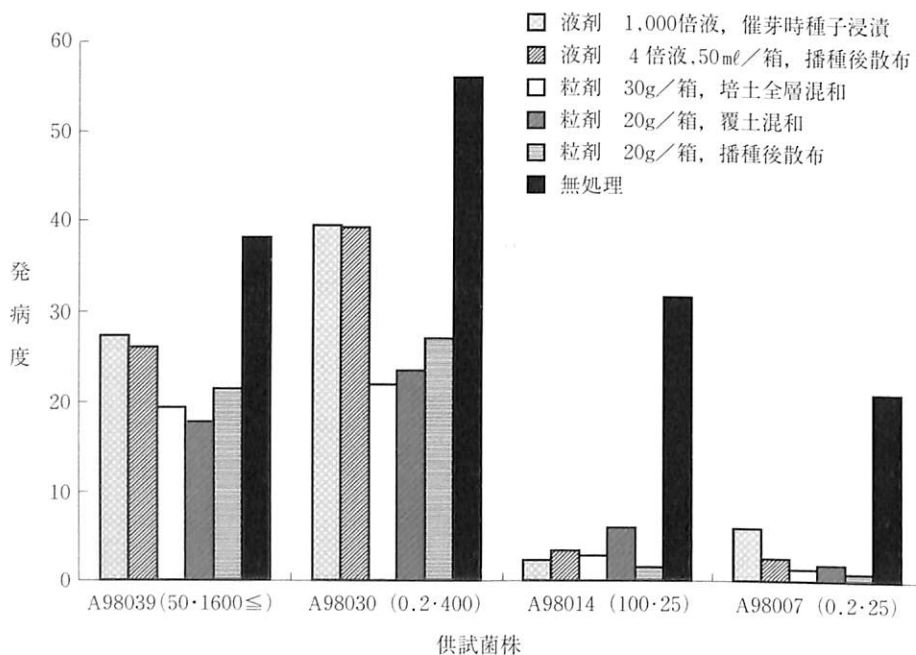


第1図 薬剤感受性の異なる褐条病菌に対する種子消毒剤の防除効果

- a) OA・Pef剤：オキシリニック酸・ペフラゾエートフロアブル
- b) Th・Pef剤：チウラム・ペフラゾエートフロアブル
- c) Ip・Cu剤：イブコナゾール・銅フロアブル

注1) 減圧接種種子を供試

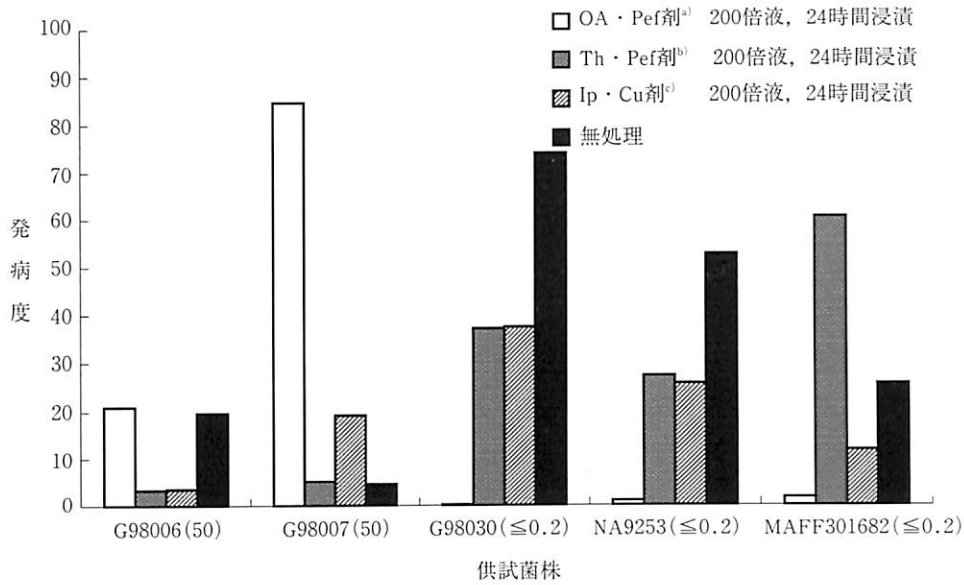
2) 菌株名の ( )内はオキシリニック酸(左)およびカスガマイシン(右)に対するMIC (ppm)を示す。



第2図 薬剤感受性の異なる褐条病菌に対するカスガマイシン剤の防除効果

注1) 減圧接種種子を供試

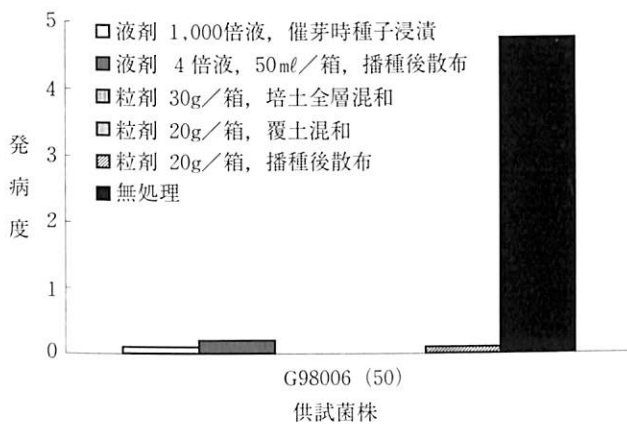
2) 菌株名の ( )内はオキシリニック酸(左)およびカスガマイシン(右)に対するMIC (ppm)を示す。



第3図 オキシリニック酸感受性が異なるもみ枯細菌病菌に対する種子消毒剤の防除効果

- a) OA・Pef剤：オキシリニック酸・ペフラゾエートフロアブル
- b) Th・Pef剤：チウラム・ペフラゾエートフロアブル
- c) Ip・Cu剤：イブコナゾール・銅フロアブル

注1) 減圧接種種子を供試  
 2) 菌株名の ( ) 内はオキシリニック酸に対するMIC (ppm) を示す。



第4図 オキシリニック酸耐性もみ枯細菌病菌に対するカスガマイシン剤の防除効果

注1) 減圧接種種子を供試  
 2) 菌株名の ( ) 内はオキシリニック酸に対するMIC (ppm) を示す。

理より発病が増加する場合も認められた。これに対し、カスガマイシン液剤および同粒剤処理のオキシリニック酸耐性菌に対する防除効果は高かった。

### 3. 自然感染種子を用いた種子消毒試験

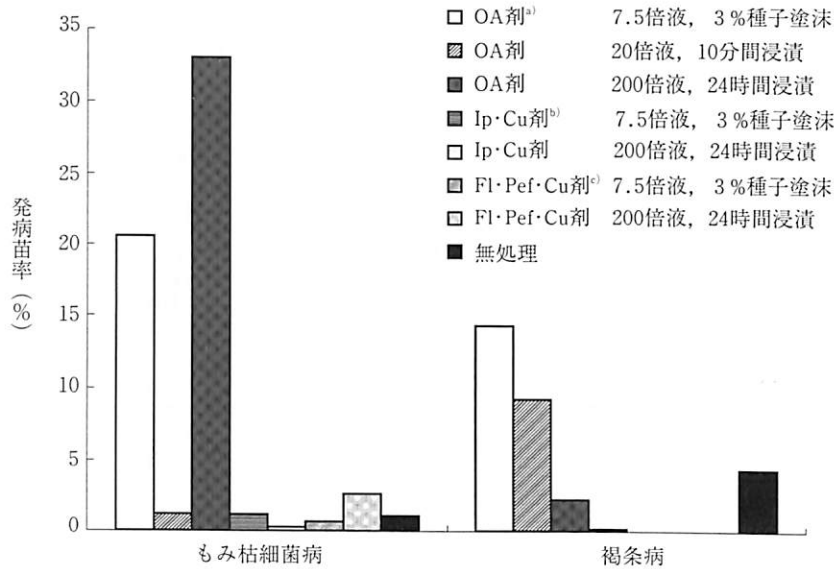
オキシリニック酸・カスガマイシン耐性褐条病菌およびオキシリニック酸耐性もみ枯細菌病菌の自然感染種子を用いた薬剤試験結果を第5図に示した。本試験では褐条病ともみ枯細菌病が混発する条件であったが、病徴での識別が容易であったため、両病害の発病苗を区別して計数した。病害により発病の傾向はやや異なったが、もみ枯細菌病および褐条病ともオキシリニック酸剤処理による防除効果は低く、無処理より発病が増加する場合も認められた。

## 考 察

び同粒剤処理による防除効果は認められたが、耐性菌では防除効果が低下した。

オキシリニック酸に対して感受性の異なるもみ枯細菌病菌5菌株の減圧接種種子を用いた薬剤試験の結果を第3図、第4図に示した。感受性菌ではオキシリニック酸・ペフラゾエート剤処理により発病が抑制されたが、耐性菌では同剤による防除効果は全く認められず、無処

イネの育苗期に発生する細菌性病害の薬剤防除効果不良事例を受けて実施した本試験の結果から、新潟県においてオキシリニック酸耐性 (MIC12.5ppm以上) およびカスガマイシン耐性 (MIC400ppm以上) のイネ褐条病菌、ならびにオキシリニック酸耐性 (MIC50ppm) のイネもみ枯細菌病菌の発生が確認された (第1表)。これら薬剤耐性菌の種類および耐性の程度は、MICがわずか



第5図 オキシリニック酸に耐性の褐条病菌およびもみ枯細菌病菌の自然感染種子に対する種子消毒剤の防除効果

a) OA剤：オキシリニック酸水和剤

b) Ip·Cu剤：イブコナゾール・銅フロアブル

c) Fl·Pef·Cu剤：フルジオキシニル・ペフラゾエート・銅水和剤

異なる菌株があるものの、守川らの報告<sup>8,9)</sup>と概ね一致した。

梅沢ら<sup>15)</sup>は、富山県における褐条病発生量の変動には、種子消毒剤の変遷や循環式催芽機の普及に加え、薬剤耐性菌の発生も関与すると報告している。本県産種子から薬剤耐性の褐条病菌、もみ枯細菌病菌が分離され、さらにこれらの種子を用いた種子消毒試験では、オキシリニック酸剤に対する著しい防除効果の減退が認められた(第5図)。したがって、本県においても褐条病、もみ枯細菌病菌の発生量の変動に、薬剤耐性菌の発生が関与していたと考えられる。

県内各地より採取した発病苗の薬剤使用歴を調査したところ、オキシリニック酸に耐性の褐条病菌またはもみ枯細菌病菌が分離された苗では、種子消毒剤にオキシリニック酸含有剤を使用していた事例が多かった。また、カスガマイシン耐性褐条病菌が分離された苗ではカスガマイシン剤を催芽時もしくは播種時に使用していた事例が多く、薬剤使用歴と薬剤耐性菌の出現状況には関連が認められた(データ略)。これらの結果から、種子消毒や催芽時・育苗箱での薬剤使用が、育苗時における薬剤耐性菌の出現や増殖を助長したと考えられる。Hikichi et al.<sup>3)</sup>は、育苗時のオキシリニック酸処理により出現したオキシリニック酸耐性もみ枯細菌病菌のほ場にお

ける生存は困難であると報告している。これに対し、守川<sup>9)</sup>はオキシリニック酸の使用量が減少してもオキシリニック酸に耐性の褐条病菌、もみ枯細菌病菌の分離率が低下しないことから、これらの薬剤耐性菌が本田において生存し、穂に到達する可能性を指摘している。本県では、1994年から採種ほにおいてオキシリニック酸剤およびいもち病防除薬剤としてのカスガマイシン剤がそれぞれ年1回は本田散布されてきた。本田での耐性菌出現の淘汰圧<sup>12)</sup>は十分にあったと推察される。しかし、育苗時に出現した薬剤耐性の褐条病菌、もみ枯細菌病菌の本田における動態については未だ不明な点が多く、種子への保菌に至る過程については、今後検討が必要であろう。

一方、薬剤防除試験の結果では、オキシリニック酸およびカスガマイシン耐性褐条病菌に対しては銅含有種子消毒剤による防除効果が高く(第1図)、オキシリニック酸耐性もみ枯細菌病菌に対してはカスガマイシン剤の育苗箱処理による防除効果が高かった(第4図)。このことから、両病害の薬剤耐性菌による被害を回避するには、銅剤を用いた種子消毒とカスガマイシン剤の育苗箱処理を組み合わせる体系防除が有効と考えられた。

以上の結果を受け、新潟県では1999年より育苗期細菌病に対する防除体系を見直した。採種ほでは出穂期のオ

キソリニック酸剤の散布を中止し、また、採種ほと一般ほでは銅剤による種子消毒とカスガマイシン剤の育苗箱処理を組み合わせた体系防除となった。しかし、現在使用できる薬剤はその種類が限られていることから、新たな薬剤耐性菌の出現が危惧される状況にある。既存の薬剤による防除効果を安定的に維持するには、薬剤耐性菌の出現を抑制しつつ種子保菌量の低減を図ることが重要である<sup>2,6,13)</sup>。採種ほにおいては種子消毒剤と本田散布薬剤の作用機構を考慮に入れて使用薬剤を選択する必要がある。また、採種ほと一般ほにおける薬剤のローテーション使用を進めることも重要であり、その実現には代替薬剤の検索が課題となる。同時に、種子の熱処理等の物理的防除方法、耕種的防除方法や拮抗微生物等を用いた生物的防除方法等、薬剤のみに頼らない防除方法の開発・普及も急務であろう。

#### 引用文献

- 1) 畔上耕児 (1994) イネ苗立枯細菌病に関する研究. 農環研報 11: 1~80
- 2) 曳地康史・江上 浩 (1995) オキシリニック酸と種子の塩水選を用いたイネもみ枯細菌病に対する防除体系の確立. 日植病報 61: 405~409.
- 3) Hikichi, Y., Egami, H., Oguri, Y. and Okuno, T. (1998) Fitness for survival of *Burkholderia glumae* resisitant to oxolinic acid in rice plants. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 147~152.
- 4) 門田育生・金 忠男 (1991) イネ褐条病の発生が苗質、本田における生育および種子での保菌に及ぼす影響. 北陸病虫研報 39: 1~5.
- 5) Kadota, I., Ohuchi, A. and Nishiyama, K. (1991) Serological properties and specificity of *Pseudomonas avenae* Manns 1909, the causal agent of bacterial brown stripe of rice. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 57: 268~273.
- 6) 門田育生 (1996) イネ褐条病の病原と発生生態に関する研究. 北陸農試報告 38: 113-171
- 7) 松田 泉 (1990) イネもみ枯細菌病菌 (*Pseudomonas glumae*) の迅速検出法. 植物防疫 44: 461~464.
- 8) 守川俊幸・松崎卓志・西山幸司・宮川久義・向畑博行 (1997) イネ褐条病菌ともみ枯細菌病菌のオキシリニック酸とカスガマイシンに対する感受性. 日植病報 63: 516.
- 9) 守川俊幸 (1999) イネもみ枯細菌病菌および褐条病菌の薬剤耐性. 第9回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 27~34.
- 10) 西山幸司 (1978) 植物病原細菌簡易同定法の試案. 植物防疫 32: 283~288.
- 11) 竹内 徹・田村 修 (1991) カスガマイシン耐性イネ褐条病菌の出現. 日植病報 57: 117~118.
- 12) 竹内 徹 (1995) 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(21) イネ褐条病菌. 植物防疫 49: 39~40.
- 13) 棚橋 恵・原澤良栄・藤巻雄一 (1999) 出穂期前後の薬剤散布によるイネ褐条病菌の種子保菌抑制. 新潟農総研報 1: 29~32.
- 14) 対馬誠也・脇本 哲・茂木静夫 (1986) イネもみ枯細菌病菌検出のための選択培地. 日植病報 52: 253~259.
- 15) 梅沢順子・守川俊幸 (2000) 富山県における育苗期のイネ褐条病の発生変動要因の解析. 北陸病虫研報 48: 15~18.

(2004年11月17日受領)