

## 拮抗細菌あるいは土壤懸濁液を用いたイネもみ枯細菌病苗腐敗症の防除効果

関原順子・守川俊幸\*

Junko SEKIHARA and Toshiyuki MORIKAWA :

Effectiveness of seed treatment with antagonistic bacteria and field-soil suspension against bacterial seedling rot caused by *Burkholderia glumae*

催芽時施用でイネもみ枯細菌病苗腐敗症発病抑制効果のある細菌および土壤の選抜を行った。イネまたは園芸作物から分離された40菌株のうち、14菌株に明らかな防除効果が認められた。また、富山県内47地点から採集した耕地土壤のうち8地点の土壤懸濁液は催芽時処理でイネもみ枯細菌病の発生を著しく抑制した。しかし、これら効果の認められた細菌や土壤も、浸種前の薬剤種子消毒と組み合わせるとその防除効果が減退することがあった。また、多くの土壤で乾燥や滅菌することにより防除効果が低下した。

Key words : 拮抗細菌, 土壤懸濁液, イネもみ枯細菌病, 苗腐敗症, antagonistic bacteria, field-soil suspension, *Burkholderia glumae*, bacterial seedling rot, rice

### 緒 言

イネもみ枯細菌病 (病原: *Burkholderia glumae*) は本田において出穂後にもみ枯症を生じて玄米の収量・品質を低下させるばかりでなく、種子伝染して育苗期に苗腐敗症を発生させて大きな被害をもたらすことが知られている<sup>9)</sup>。本病は、富山県では褐条病 (病原: *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) とならんで最も被害の大きい育苗期病害である。両病害を防除するために、各種薬剤を用いた種子消毒が広く実施されているが、*B. glumae* と *A. avenae* subsp. *avenae* においてオキシリニック酸耐性菌が、さらに *A. avenae* subsp. *avenae* ではカスガマイシン耐性菌も発生し、薬剤防除の効果を不安定なものとしている<sup>2,4,10)</sup>。化学薬剤に依存した防除はこのような薬剤耐性菌の発生の危険性をはらんでいることから、薬剤に頼らない防除技術の開発が望まれている。

イネもみ枯細菌病の発生には、種子予措中の微生物環境が強く影響することが知られており<sup>8)</sup>、種籾あるいはイネ苗上で常在菌あるいは拮抗菌が優勢な場合は本病の発生が抑制されるものと推察される。そこで、本研究では籾や土壤などから分離された細菌や多様な微生物を大量に含んでいる土壤を催芽時に加えることによって、本

病の防除が可能かどうかを調査したので報告する。

なお、本研究を行うにあたり、当技術センター病害虫防除所の各位には耕地土壤の収集に協力いただいた。また、中央農業総合研究センターの畔上耕児博士には苗立枯細菌病菌を分譲いただいた。この場を借りて厚く感謝の意を表する。

### 材料および方法

#### 1. 有望菌株の選抜

一次選抜試験にはイネ苗およびネギ根、チューリップほかから分離された病原細菌を含む40菌株を用い (第1表)、二次選抜試験には、第2表に示した17菌株を用い、それぞれ苗腐敗症に対する防除効果を検定した。試験に供試したこれら細菌およびもみ枯細菌病菌は、PPGA斜面培地上で28℃、1~2日間培養したものをを用いた。供試籾は平成9年度産「コシヒカリ」にもみ枯細菌病菌 *B. glumae* T9154 株を減圧接種 (20分、 $5 \times 10^7$  cfu/ml) したものをを使用した。試験規模はポリ塩化ビニル製カップ (直径65mm、高さ37mm) に1区あたり乾籾2gは種し、各区3反復行った。浸種は6.3℃で4日間処理した後、20℃で3日間行った。次に、各供試細菌の懸濁液 (一次選抜では培養菌体2白金耳、二次選抜では

1 白金耳を20mlの蒸留水に懸濁)に入れて30℃で24時間、振とう(150rpm)して催芽し、いなほ化工(株)製加工床土には種した。出芽は30℃で2日間行い、グロスキャビネット(コイトトロンS-153A)に搬入して昼温30℃、夜温10℃で管理した。は種15日後に発病程度別に苗数を調査し、下式によって発病度を算出した。発病度 =  $\Sigma$ (発病程度×発病苗数)×100/調査苗数/5, [発病程度: 5 = 腐敗枯死, 4 = 葉鞘基部腐敗もしくは極端な萎ちょう, 3 = 第3葉白化, 2 = 葉鞘基部白化] (本研究では不完全葉を第1葉として計測)。なお、二次選抜試験では、浸種前にイプロナゾール・銅水和剤200倍液またはオキシリニック酸・プロクロラズ水和剤200倍液の24時間浸漬処理を行った場合の防除効果に及ぼす影響を調査した。

## 2. 抗菌性物質の産生と細菌学的性質

拮抗細菌を用いた防除試験の結果から選定した17菌株(防除効果のないものも含む)ともみ枯細菌病菌T9154株、褐条病菌T9020株をそれぞれYPDA培地上(9cmペトリ皿)の3カ所に28℃で2日間スポット培養し(3ペトリ皿/菌株)、クロロホルムで30分間くん蒸殺菌した後、指示菌であるもみ枯細菌病菌T9154株、褐条病菌T9020株、苗立枯細菌病菌AZ8201株<sup>1)</sup>をそれぞれ $10^7$ cfu/mlとなるようにYPDA培地に懸濁してくん蒸処理した培地上に重層した。重層後は28℃で2日間培養後、生育阻止円の形成程度を観察した。

また、未同定の14菌株についてグラム反応、運動性、形状、O-Fテスト、カタラーゼ反応、抗*B. gladioli*血清との凝集反応から簡易同定を試みた。

## 3. 各種土壌懸濁液の防除効果

第4表に示した県内の47地点から土壌を採集した。試験の直前に土壌と滅菌水を1:10の重量比で混合し、土壌懸濁液を調整した。供試糶は平成9年度産「コシヒカリ」にもみ枯細菌病菌T9154株を減圧接種(20分、 $10^7$ cfu/ml)したものを用いた。試験規模は1区あたりポリ塩化ビニル製カップ(直径65mm, 高さ37mm)に乾糶で2gをは種し、各区3反復とした。浸種は15℃、6日間行い(途中、浸種開始3日後に水交換)、催芽は土壌懸濁液中で30℃、24時間、振とう(150rpm)して行った。は種、出芽、搬出後の条件は先述のとおりに行った。発病調査は以下の基準で行い、発病度を算出した。発病度 =  $\Sigma$ (発病程度×発病苗数)×100/調査苗数/5, [発病程度: 5 = 腐敗枯死, 4 = 葉鞘基部腐敗もしくは極端な萎ちょう, 3 = 第3葉白化+葉鞘基部白化]。

## 結 果

### 1. 拮抗細菌を用いたもみ枯細菌病の防除効果

無処理区の発病度が39の発病条件下で一次選抜を行った結果、供試した40菌株のうち約半数の17菌株で明らかな発病抑制効果が認められ、発病度が5以下に抑制された(第1図)。次に行った二次選抜試験において、供試した17菌株のうち14菌株で明らかな防除効果が認められ、その防除効果は、浸種前の種子消毒処理の有無によって大きな差が認められた。すなわち、T9139, T0101, T9170株は薬剤無処理区あるいはイプロナゾール・銅水和剤処理区では防除効果が認められたのに対し、オキシリニック酸・プロクロラズ水和剤処理区では防除効果が十分ではなかった。一方、オキシリニック酸耐性菌であるT0119および馬3-1株は、オキシリニック

第1表 供試細菌の来歴と所属

菌 株	来 歴	所 属
T9036, T9037, T9078, T9129, T9130, T9131, T9138, T9139, T9162, T9163, T9164, T9170, T9171, T9172, T9178, T9180, T9181, T9182, T9184, T9185, T0100, T0101, T0111, T0113, T0114, T0117, T0119, T0120, T0121, T0179, T0180, 馬3-1	イネ苗	
BRA4*	チューリップ褐色腐敗病菌	<i>Burkholderia gladioli</i>
N74*, N74A*	BRA4株由来の病原性喪失株	<i>Burkholderia gladioli</i>
TM8001*, TM8023*, TM8029*	ネギ根面から分離	<i>Burkholderia cepacia</i>
Nias*	アスパラガス腐敗茎から分離	<i>Burkholderia gladioli</i>
Pgg-1*	グラジオラス首腐病菌	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>

注) \*は富山県農業技術センター野菜花き試験場保存菌株

酸・プロクロラズ水和剤処理区においても高い防除効果が認められた(第2表)。特に、馬3-1, N74, T0111, T0117, T0119, T0121, T0180株は上記2薬剤と併用した場合においても高い防除効果が得られた。

2. 抗菌性物質の産生と細菌学的性質

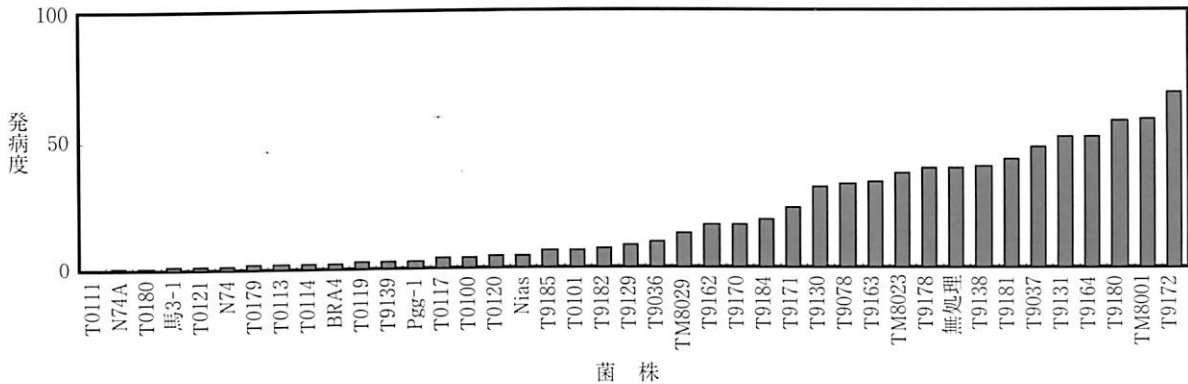
培地上での抗菌活性は、菌株間で差があった。防除試験で効果の高かった菌株のうち、T0111株の産生する生理活性物質は3種の指示菌に対して抗菌性を示したが、馬3-1, Pgg-1, N74株はもみ枯細菌病菌に対して抗菌性を示さなかった。一方、防除効果の無かったT9162株の産生する生理活性物質は3種の指示菌に対して抗菌性を

示した(第3表)。

次に、二次選抜に供試した菌の培養性状、細菌学的性質および抗血清との凝集反応から7菌株(T0111, T0113, T0117, T0119, T0121, T0180, 馬3-1)を *Burkholderia gladioli* と同定した(データ不掲載)。残りの7株(T9036, T9139, T9162, T9170, T9172, T0100, T0101)についてはいずれも運動性を有するグラム陰性細菌と考えられたが、同定までには至らなかった。

3. 土壌懸濁液を用いたもみ枯細菌病の防除効果

県内47地点の圃場から採集して供試した土壌の多くが



第1図 供試菌株のイネもみ枯細菌病抑制効果

第2表 浸種前の薬剤処理と拮抗細菌の催芽時処理を組み合わせたイネもみ枯細菌病の防除効果

菌株	浸種前の薬剤処理 (発病度)		
	対照 (水)	イブコナゾール・銅水和剤	オキシリニック酸・プロクロラズ水和剤
T0119*	0	0	0
馬3-1*	0	0	0
Pgg-1	0	0	14.9
N74	0	0.9	0.3
T0117	0	1.1	1.8
T0180	0	1.8	1.6
T9139	0	5.4	65.5
T9036	0	14.4	1.3
T0111	0.3	0.7	1.3
T0121	0.3	0.3	0.4
T0101*	0.6	0	23.2
T9170	0.8	3.7	29.5
T0113	1.0	0	14.2
Nisa	1.3	1.5	2.7
T9172	5.1	10.1	30.4
T0100*	7.9	7.7	16.8
T9162	12.2	17.4	37.4
無処理	4.5	11.4	42.4

注1) \*はオキシリニック酸耐性菌

2) 供試根はオキシリニック酸耐性もみ枯細菌病菌を減圧接種 (T9154株)

第3表 もみ枯細菌病菌, 褐条病菌, 苗立枯細菌病菌に対する抗菌性物質の産生能

菌 株	指示菌		
	<i>Burkholderia glumae</i> T9154株	<i>Acidovorax avenae</i> T9020菌	<i>Burkholderia plantarii</i> AZ8201株
T0113, T0117	+++	+	+++
T0111	+++	+	++
T9162, T0180	++	±	++
Nias	+	±	++
T9172	±	-	-
Pgg-1, 馬3-1	-	+	+++
N74, T0119	-	±	++
T0100	-	++	+
T0121	-	-	+
T9036, T9139, T9170, T0101	-	-	-
<i>B. glumae</i> T9154	-	+	+++
<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i> T9020	-	-	-

注) -, ±, +, ++, +++ (直径9 cmペトリ皿全面生育阻止) : 生育阻止円の程度

もみ枯細菌病に対して高い防除効果を示し、それらのうち8地点から採集した土壤は防除価90以上であった(第4表)。

次に、土壤の滅菌や風乾の有無が、防除効果に及ぼす影響を調査したところ、ほとんどの土壤において原土(生土)に防除効果が認められたのに対し、これを高圧滅菌処理(115℃, 15分)あるいは乾燥処理することにより、その防除効果が低下した。また、浸種前にイプロナゾール・銅水和剤200倍液またはオキシソニック酸・プロクロラズ水和剤200倍液に24時間浸漬処理を施した粃を用いた場合、防除効果が低下する土壤も認められた(第5表)。

### 考 察

イネ苗や数種の植物から分離された細菌の中から、イネもみ枯細菌病に対して高い防除効果を有する菌株を選抜した。微生物を用いた病害防除の作用機作としては、抗菌物質の産生による病原菌の殺菌および静菌作用<sup>3</sup>、菌寄生<sup>11</sup>、宿主の抵抗性反応の誘導<sup>6</sup>、感染部位での競合作用<sup>6</sup>などが知られている。本試験の結果、供試細菌の中には培地上で抗菌物質の産生が認められたが、防除効果と抗菌活性の間には直接的な関係は認められなかったことから、その防除効果には様々な作用機作が関与しているものと推察された。なお、二次選抜試験により有望株として選抜した14菌株中10菌株は*B. gladioli*と同定された。*B. gladioli*ではいくつかの植物病害に対して発病抑制効果を示す菌株が知られており<sup>3,5</sup>、もみ枯細菌病に対して防除効果を有する菌株も報告されている<sup>7</sup>。ただし、植物に病原性を示す系統を含むこと、また生産

する抗菌性物質については自然環境および人体等へ与える影響も考慮する必要があることなどから、直ちにこれらを実用化することは困難であると判断している。また、本県のように褐条病も問題となる地域では、褐条病に対しても防除効果を有することが望まれるが、本試験で選抜された菌株はいずれも褐条病に対する防除効果が低かった(データ不掲載)。次に、県内各地で採取したいくつかの耕地土壤を懸濁液として催芽時処理すると、もみ枯細菌病の発病を抑制する効果が認められた。土壤の中には多くの微生物種が認められており、これらの中にもみ枯細菌病菌に拮抗性を示す菌あるいは菌群が含まれていると考えられる。この土壤懸濁液の防除効果は、土壤の滅菌処理や乾燥処理、予め種粃を化学農薬処理すると発病抑制効果が低下することと矛盾しない。しかし、一部の土壤では各処理においても効果が低下しないことから、土壤中の微生物群だけではなく、土壤成分構成やpHなどの化学的性質による可能性も考えられる。なお、本法を実用化するにあたっては、育苗期間中の床土表面に*Trichoderma*属菌等の土壤常在菌の増殖が認められたり、粃が紅変したりする場合があることから(データ不掲載)、土壤の使用法や保存法、その他病害の発生などにも留意する必要があると考えられた。

もみ枯細菌病菌による苗腐敗病は畑苗代では問題とならず、稚苗移植のための箱育苗で問題となっている。箱育苗は、一般に清潔な加工床土を用いるため、少なくとも育苗初期はもみ枯細菌病菌などの病原細菌も含めた種粃由来の微生物がイネ体上で優勢な微生物相になると推察される。このことが箱育苗において本病が問題となる要因の一つだと考えられる。そして、本研究の結果

第4表 供試土壌の採集地と土壌懸濁液を用いたもみ枯細菌病の防除効果

土壌番号	採集地区	圃場	発病度	防除価
1	朝日町泊	水田	4.3	82
2	入善町梶山	水田	5.1	79
3	新屋	畑/ハクサイ	16.6	31
4	黒部市浦山	水田	4.4	82
5	若栗	水田	3.2	87
6	大布施	畑/ダイズ	0.0	100
7	魚津市吉野	畑/ハクサイ	0.0	100
8	天神	水田	6.9	71
9	富山市三郷	水田	10.3	57
10	浜黒崎	水田	5.2	78
11	月岡	水田	4.9	79
12	古沢	水田	8.4	65
13	呉羽	果樹園/ナシ	1.3	95
14	大庄	水田	3.8	84
15	大久保	水田	13.5	44
16	細入	水田	4.5	81
17	速星	水田	5.3	78
18	山田	水田	2.3	90
19	杉原	水田	2.5	90
20	滑川市早月加積	水田	4.0	83
21	上市町相ノ木	水田	13.4	44
22	立山町五百石	水田	11.2	53
23	立山	水田	17.8	26
24	舟橋村舟橋	水田	2.8	88
25	高岡市高岡東部	水田	5.1	79
26	戸出	水田	32.7	0
27	高岡太田	水田	17.0	29
36	西五位	水田	14.5	40
28	射水市作道	水田	0.0	100
29	下村	水田	3.5	85
30	橋下条	水田	10.5	56
31	櫛田	水田	4.1	83
32	大島町	水田	0.8	97
33	小矢部市若林	水田	5.2	78
34	東蟹谷	水田	3.3	86
35	水島	水田	2.0	92
37	氷見市氷見	畑/ネギ	1.4	94
38	八代	水田	3.5	86
39	砺波市油田	水田	5.4	77
40	東般若	水田	20.1	16
41	青島	水田	32.0	0
42	南砺市山野	水田	2.5	89
43	野尻	水田	5.4	77
44	糞谷	水田	34.8	0
45	井口	水田	13.7	43
46	広瀬	畑/オオムギ	5.5	77
47	北山田	水田	5.8	76
無処理			24.0	-

注) 土壌は1998年に採集

第5表 土壌の乾燥・減菌および種子消毒の併用がイネもみ枯細菌の発病度に及ぼす影響

土壌番号	浸種前種子消毒 (A) と供試土壌の状態 (B)					
	A:	無し			I・Cu 生土	OA・Pu・SE 生土
		B:	生土	減菌土		
2		1.0	14.8	1.2	11.6	2.5
6		0.0	0.0	48.1	0.0	0.8
7		0.0	6.7	7.7	6.8	0.0
13		0.0	24.1	3.6	15.6	0.0
22		3.8	0.0	17.4	7.5	2.2
25		0.0	16.8	3.1	7.3	3.2
28		1.1	49.5	11.8	4.1	0.0
32		4.0	29.0	0.0	31.4	0.0
44		0.7	5.6	0.9	0.0	1.0
46		1.1	7.1	2.7	3.7	4.2
対照 (水)		21.6			6.8	1.4

注) I・Cuはイブコナゾール銅水和剤, OA・Pu・SEはオキシリニック酸プロクロラズ水和剤で各々200倍液24時間浸漬処理

から、もみ枯細菌病の発生には催芽時以降におけるイネ体表面の微生物群集の構造が強く影響し、特定の微生物の優先化あるいは微生物相全体の多様化あるいはその個体群の増大を促すことで本病を防除できると考えられた。

### 引用文献

- 1) Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuchi, A. and Fukazawa, C. (1987) *Pseudomonas plantarii* sp.nov., the causal agent of seedling blight. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 144~152.
- 2) 堀 武志・小湊慶司・原澤良栄 (2004) 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. *北陸病虫研報* 53: 5~11.
- 3) 木嶋利男・有江 力・木村 栄・峯岸長利・手塚伸治・橋田宏一・福田 充 (1988) 抗菌微生物の利用に関する研究. *栃木農試研報* 35: 95~128.
- 4) 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.
- 5) 守川俊幸・野村良邦・築尾嘉章 (1996) チューリップの細菌性ポストハーベスト病害の生物防除と薬剤防除. *北陸病虫研報* 44: 51~60.
- 6) 小川 奎 (1988) サツマイモつる割病に関する研究. *農研センター研報* 10: 1~125.
- 7) 角田佳則・高屋茂雄・西山幸司 (1995) イネもみ枯細菌病苗腐敗症発病抑制能を持つ4細菌株の分類学的位置とイネ苗立枯細菌病, イネばか苗病に対する発病抑制能. *日植病報* 61: 623~624 (講要).
- 8) 高屋茂雄・角田佳則 (1995) 別々に浸種したイネもみ枯細菌病汚染糞の, 浸種液を含めた播種前の混合が, 苗腐敗病の発生に及ぼす影響. *日植病報* 61: 624 (講要).
- 9) 植松 勉・吉村大三郎・西山幸司・茨木忠雄・藤井溥 (1976) イネもみ枯細菌病菌による育苗箱の幼苗腐敗症の発生. *日植病報* 42: 310~312.
- 10) 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.
- 11) 渡辺 哲・熊倉和夫・豊島 淳・牧野孝宏・市川健・永山考三 (2002) *Trichoderma atroviride* SKT-1株によるイネ種子伝染性病害の生物防除(4) *Trichoderma atroviride* SKT-1株によるイネ種子伝染性病害防除の作用機構(1). *日植病報* 68: 205-206 (講要).

(2006年10月31日受領)