

イネ苗の種子伝染性細菌病に効果を示す 細菌 CAB-02 株について

元 中国農業試験場 ^{すみ} 角 ^だ 田 ^{よし} 佳 ^{のり} 則*
元 中国農業試験場 ^{たか} 高 ^や 屋 ^{しげ} 茂 ^お 雄

はじめに

我が国の水稲栽培では1960年代後半以降、機械による移植栽培が定着し、催芽方法も電熱育苗器等を用いる加温育苗が一般的となった。移植栽培は多くの点で農家にメリットをもたらした。が、一方で育苗は高温・多湿条件下で行われるため、それまでには問題にならなかったいくつかの病害の発生を引き起こした。1974年にはイネもみ枯細菌病菌 *Burkholderia glumae* [*Pseudomonas glumae*] による苗腐敗症(植松ら, 1976)が、1982年には *Burkholderia plantarii* [*Pseudomonas plantarii*] によるイネ苗立枯細菌病(AZEGAMI et al., 1987)が発見され、現在では糸状菌病であるイネばか苗病と並んで育苗期の重要病害の位置を占めるに至っている。育苗期の病害防除では、糸状菌病害に対する有効な薬剤は多く存在するものの、細菌病の防除剤は少なく、発生も日和見的事であることから、現場では対策に苦慮しているのが現状である。また、近年は種子消毒後の廃液処理が問題となるなど環境汚染への対策も重視されるようになってきている。

こうした背景のもとに、筆者らは中国農試(現 近畿中国四国農業研究センター)において、農水省の大型別枠研究プロジェクト「農林水産系生態秩序の解明と最適制御に関する総合研究」のなかで、「葉上微生物の機能を利用したもみ枯細菌病の制御技術の開発」のテーマで環境に優しい病害防除技術の開発に取り組み、1996年までにイネもみ枯細菌病、苗立枯細菌病、ばか苗病の3病害に対して発病抑制能を持つ細菌 CAB-02 株を見出した。本菌株はその後、セントラル硝子(株)との共同研究により製剤化され、2001年10月にモミゲンキ水和剤として農業登録された。本稿では、拮抗微生物の探索を行った立場から、探索の方法、本菌株の特性、病原菌に

対する効果について紹介する。

I 探索の方法

1 微生物の収集

微生物の収集は1991~93年に、中国農試圃場内の水稲を対象に実施した。植物体上での定着性を考え、生育期のイネまたは収穫籾から、検体の洗い出しによる細菌の分離を行った。アルブミン寒天培地ほか数種の培地を使用し、常法によって分離を行い、平板上に形成されたコロニーは無作為に斜面培地に移植・培養した後、凍結保存した。

2 病原菌に対する拮抗能力の検定

拮抗微生物の探索を行う場合、一般的には、対峙培養法や阻止円法といった方法がよく用いられる。これらは病原菌と被検定菌を人工培地上で同時に培養し、病原菌の生育の有無で選抜を行う方法で、現在知られている拮抗微生物の多くが、こうした方法で見出されている。これらの方法は比較的簡易に拮抗微生物を選抜できるが、得られた微生物が既知のものである可能性の高いことが知らされている。また、培地上での拮抗力と、圃場での発病抑制力は一致しない例が多い。

そこで筆者らは、微生物の選抜に当たって、実際場面での効果の安定性に優れた菌株を得るため、最初から植物の生体上での拮抗力あるいは立枯れ抑制能を基準として選抜することにした。すなわち、植物体上での拮抗力については、供試細菌株の懸濁液と一定濃度のイネもみ枯細菌病菌を生育期のイネの葉鞘内に接種し、1~2週間後の病原細菌の密度を、脱脂綿擦り取り法(宮川ら, 1991)で調査した。立枯れ抑制能については、小規模実験系(高屋ら, 1993)を用い、供試細菌株と病原細菌の混合液中に種籾を浸漬し、播種生育させた後、2週間後に調査して発病の少ないものを抑制能ありとした。試験は正確を期するため、3回以上反復した。

これらの試験の結果、供試した約700菌株の細菌の中から、生育期の植物体上でイネもみ枯細菌病菌の増殖を抑制し、苗腐敗症に対し無処理区との比較で90%以上の高い発病抑制率を示す細菌が4菌株(CAB-01~04)見出された。これらの菌株は、イネ苗立枯細菌病および

Antagonistic Bacteria CAB-02 Suppressing Seedborne Bacterial Diseases of Rice Seedling. By Yoshinori SUMIDA and Shigeo TAKAYA

(キーワード: イネもみ枯細菌病, 苗腐敗症, イネ苗立枯細菌病, イネばか苗病, 拮抗微生物, CAB-02 株)

* 現 山口県農業試験場

イネばか苗病に対しても高い発病抑制能力を有していたが、中でも CAB-02 株は各病害に対して発病抑制力が安定して高かった。

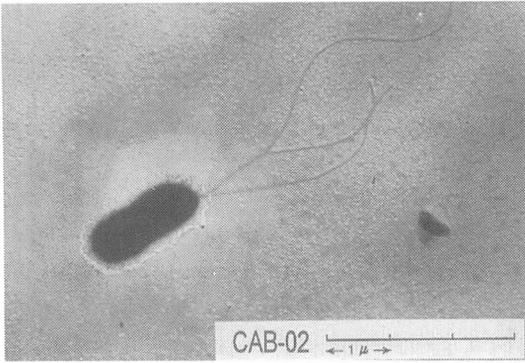


図-1 CAB-02 株の電子顕微鏡写真

表-1 CAB-02 株の一般的性質および炭素源の利用性

一般的性質		スクロース	+
酸素との関係	好気性	マルトース	+
非水溶性色素の産生	-	ラクトース	+
黄緑色蛍光色素の産生	-	トレハロース	+
ピオシアニンの産生	-	D-マンニトール	+
ゼラチンの液化	-	D-ソルビトール	+
カタラーゼ活性	+	イノシトール	+
オキシダーゼ活性	+	エリトリトール	-
ウレアーゼ活性	+	ガラクトース	+
硝酸塩の還元	+	アドニトール	-
硝酸呼吸能	-	エタノール	-
レバンの産生	-	2,3-ブチレングリコール	+
デンプンの加水分解	-	プロピレングリコール	-
クエン酸の利用	+	ゲラニオール	-
乳酸の利用	+	ベタイン	+
グルコン酸の酸化	-	β-アラニン	+
エクスリンの加水分解	-	L-アルギニン	+
アルギニンの加水分解	-	L-バリン	+
pH 3.5 での生育	-	トリプタミン塩酸塩	-
生長素要求性	なし	L-酒石酸	+
生育速度	速い	D-酒石酸	+
ジャガイモ塊茎の腐敗	-	m-酒石酸	+
各種炭素源の利用性		マロン酸	+
グルコース	+	メサコン酸	+
フルクトース	+	シトラコン酸	+
キシロース	+	レブリン酸	+
L-アラビノース	+	安息香酸	-
ガラクトース	+	ヒドロキシ安息香酸	+
マンノース	+	プロピオン酸	-
ラムノース	-	n-酪酸	-
D-リボース	+	グリコール酸	+
		dI-リンゴ酸	+
		n-カプリン酸	+
		アジピン酸	+

注) 28°C 3 日間培養後に判定。

II CAB-02 株の特性

1 細菌学的性質および分類学的位置

CAB-02 株は、細胞の大きさ 1~4 μm の桿菌で、細胞の多形性はなく、数本以上の極鞭毛を有し、運動性を有した (図-1)。また、グラム反応は陰性で、内生孢子を形成しなかった。PHB 顆粒の蓄積はマイナスであった。

肉汁寒天平板培養での集落の性状は、白色、円形、全縁丘状、表面平滑で、湿光を有し、バター質である。水溶性の色素は産生しない。また、肉汁液体培養での混濁は、白色で全面濁り、上部に皮膜を形成した。

生理・生化学的性質 (一般的性質) については、本菌は酸素との関係において好気性であり、水溶性黄色色素および黄緑色蛍光色素を産生せず、酸化的にのみグルコースを分解し、カタラーゼ活性が陽性、オキシダーゼ活性が陽性、pH 3.6 で生育しなかった (表-1~4)。これらの特徴から、本菌株は色素非産生の *Pseudomonas* 属細菌の一種と考えられた。また、各種炭素源の利用性等から「Bergey's Manual of Determinative Bacteriology」第9版により検索した結果、記載されている *Pseudomonas* 属細菌の中には本菌株と類似の性質を持つ種は認められなかった。

そこで、本菌株を新規の微生物として *Pseudomonas* sp. CAB-02 と命名し、工業技術院生命工学工業技術研

表-2 CAB-02 株のグルコースの分解様式

条 件	生育	酸の生成
嫌気的条件	-	-
好気的条件	+	+

注) Hugh-Laifson 法, 30°C, 7 日間。

表-3 CAB-02 株の生育温度

温度	生育
4°C	-
10°C	+
15°C	+
20°C	+
25°C	+
30°C	+
40°C	+
41°C	+
42°C	+

注) 肉汁液体培地, 7 日間。

表-4 CAB-02 株の耐食塩性

濃度	生育
5%	+
7%	+
9%	+
11%	-
13%	-

究所に FERM P-15237 号として寄託するとともに、特許を取得した (角田ら, 1999)。本菌株は、その後 16 S rRNA 遺伝子塩基配列の解析が行われ、*Burkholderia* 属細菌に属することが明らかになった (奥田ら, 2000)。

2 その他の特性

CAB-02 株は、イネに病原性を示さないのももちろんであるが、グラジオラス、タマネギ、トウモロコシ、トマト、イタリアンライグラス等の植物に接種した結果、病原性を示さなかった。さらに、その後の試験で 25 種の作物に病原性のないことが確認されている (奥田, 1999; 宮川, 2001)。

また本菌は、増殖能力に優れている。振とう温度勾配培養装置を用いて YPGS 液体培地中での 24~44°C の増殖速度を計測し、もみ枯細菌病菌 *B. glumae* (MAFF 301441) と比較した結果、本菌株はいずれの温度でも、増殖の立ち上がり (対数増殖の開始) が極めて早かった (図-2)。図中には示さないが、増殖が早いとされる大腸菌 *Escherichia coli* と比較して、ほぼ同等であった。*B.*

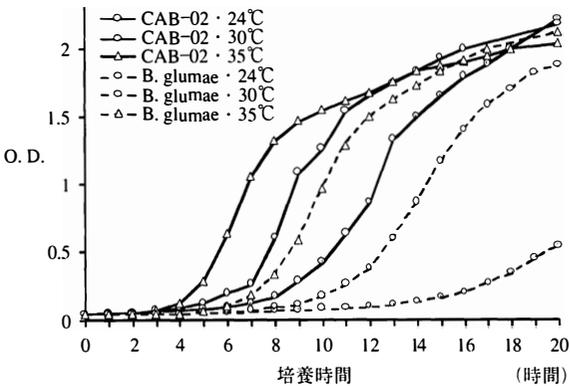


図-2 CAB-02 株とイネもみ枯細菌の培養温度と増殖の関係

glumae との増殖速度の開きは、試験した範囲の温度では低温ほど大きく、培養開始から 15 時間後には O.D. 値で 1.5 以上の差が認められた。このことから、発病抑制には、増殖能力の違いによる競合が大きく関与していると考えられた。

既知の拮抗微生物では、何らかの抗菌物質を産生し、発病抑制能を発揮する場合が多い。CAB-02 株の場合は、糖を加えない普通寒天培地上では、もみ枯細菌病菌や苗立枯細菌病菌に対して阻止円を形成しなかったが、グルコース等を培地に添加することによって明瞭な阻止円を形成し、抗菌物質を産生していることが示唆された。奥田ら (1999) は、この抗菌物質がシデロフォア様物質であることを明らかにした。さらに、培地上で抗菌物質を産生しない突然変異株 (Δ che-1 株) を作出して、もみ枯細菌病、苗立枯細菌病に対する発病抑制能を検定した結果、親株と同等の発病抑制が認められたことから、この抗菌物質は発病抑制に関与しないとしている。CAB-02 株のイネ苗での存在部位についても調査し、CAB-02 株は播種後、籾、根、根圏で対数的に増殖し、特に籾に局在することが確認されている。

III イネ苗の立枯性病害に対する効果

製剤化された CAB-02 株の立枯性病害に対する効果については、すでに日本植物防疫協会の委託試験が実施され、イネもみ枯細菌病、イネ苗立枯細菌病について「実用性有り」の評価が得られている。本稿では、選抜段階での検定の結果の一部を紹介し、参考に供したい。

1 イネもみ枯細菌病菌による苗腐敗症に対する発病抑制効果

CAB-02 株はイネもみ枯細菌病菌を対象にイネ葉鞘内での増殖抑制能の優れた菌株を選抜した結果得られたものであり、苗腐敗症に対する効果は未知数であった。ま

表-5 水稲育苗期の病害に対する CAB-02 株の防除効果

処 理	もみ枯細菌病		苗立枯細菌病		ばか苗病		
	発病苗率 (%)	防除価	発病苗率 (%)	防除価	発病苗率 (%)	防除価	
3 日間浸漬	CAB-02 株 (10 ⁸ cfu/ml)	0	100	N.T.		5.3	94.3
	無 処 理	84.3		N.T.		93	
播種直前 1 時間浸漬	CAB-02 株 (10 ⁸ cfu/ml)	0	100	0	100	N.T.	
	無 処 理	86.3		100		N.T.	

1) 発病条件: イネもみ枯細菌病菌による苗腐敗症 (P. g. 苗腐敗症) は自然感染籾 (金南風, 保菌率 20%) 使用, 苗立枯細菌病は 10⁸ cfu/ml の病原菌液に浸漬接種, イネばか苗病は自然感染籾 (岡山農試分譲, 吉備の華, ベノミル耐性菌率約 11%) 使用, 2) 防除価 = ((A - B) / A) × 100 [A: 病原細菌のみ処理した区の発病度, B: 混合細菌液を処理した区の発病度], 3) N. T. = 試験なし。

た、当時はまだ実験的に苗腐敗症を安定して発病させることは困難であった。この問題については、出芽時の温度を32~34°Cまで高め、小規模実験系を用いることによって解決できた。データの信頼度の確認のため、CAB-02株については多数の実験を繰り返したが、いずれの試験でも無処理区では本症が多発したものの、本菌株を添加した区ではほとんど発病せず、高い抑制効果が認められた(表-5)。

2 イネ苗立枯細菌病に対する発病抑制効果

実際の水稲育苗では、1種の病害のみが発生するとは限らないため、拮抗微生物も多種の病害に効果があることが望ましい。そこで、イネ苗立枯細菌病についても効果検定を実施した。その結果、病原細菌(MAFF 301723)液のみに浸漬した籾では本病が激発したが、CAB-02株を添加すると全く発病が認められず、高い抑制効果が認められた(表-5)。

3 イネばか苗病に対する発病抑制効果

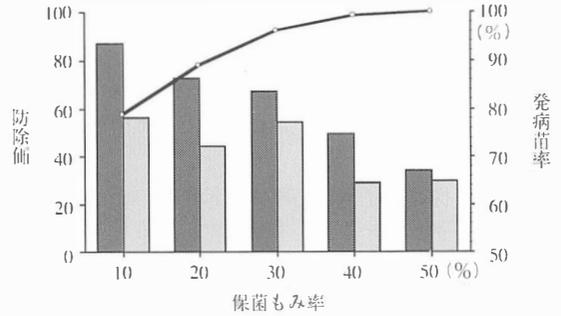
本病についても上記と同様の理由で試験を行った。その結果、無処理区では本病が多発したが、CAB-02株を処理した区では発病率が減少し、本菌株はイネばか苗病に対しても抑制効果のあることが確認された(表-5)。

なお、上記3病害の試験においては、苗の生育障害等の悪影響は認められなかった。

おわりに

CAB-02株については、その後の製剤を用いた試験で、上記の細菌による2病害については十分な効果があることが確認された。しかしイネばか苗病については現行の化学農薬と比べた場合に効果が劣り、化学農薬との混用および近接処理が検討されている(井上ら, 2000)。イネばか苗病については、保菌密度の低下によって防除効果が向上する結果もあり(図-3)、環境保全型防除を重視する場面では活用も可能と考えているが、この点についてはさらに検討を要する。なお、立枯性病害の一つであるイネ褐条病については、効果が不十分な場合が多いことが、日本植物防疫協会の委託試験で明らかにされており、筆者らも確認している。また、CAB-02株は苗の病害だけでなく、もみ枯細菌病に関しては、出穂後のもみ枯症にも効果のあることが確認されており(中保ら, 1997)、採種圃等での利用が想定される。

冒頭にも述べたように、CAB-02株の探索は自然や人



■10g/100g湿分衣の防除値、□100×24時間浸漬の防除値、○無処理区の発病苗率。

図-3 ばか苗病の保菌もみ率とCAB-02剤の効果との関係

に優しい環境保全型の作物病害防除を目指して開始された。幸いにして本菌株は多くの研究者やメーカーの努力によって製剤化され、微生物農薬として世に出ることになった。この背景には、使用場面が浸種時という限られた範囲であり、雑多な微生物が関与しにくい条件がある。そうした意味では、本菌株は必ずしも強力な微生物とは言えず、特徴を理解した上で微生物が増殖しやすい環境を形づくることによって初めて効果を引き出し得ると考える。本菌株はその性質上、数多くの病害に適用できるとは考えにくいだが、もみ枯細菌病に関しては微生物剤である故に化学農薬の耐性菌にも効果が高いことが確認されている。今後、本菌株の特徴が広く理解され、環境保全型防除の実現に向けて利用されれば嬉しい限りである。

研究の遂行に当たっては元 農業環境技術研究所の大内昭博士に、また菌株の分類に当たっては農業環境技術研究所の西山幸司博士に多大なるご教示を頂いた。ここに付記し感謝の意を表する。

引用文献

- 1) AZEGAMI K. et al. (1987): Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 144~152.
- 2) 井上博喜ら (2000): 日植病報 66: 188, 304.
- 3) 宮川久義・高屋茂雄 (1991): 同上 57: 438.
- 4) ——— (2001): 「シンポジウム 種子消毒をめぐる諸問題と今後の展開」講演要旨集, 日本植物防疫協会, 39~49.
- 5) 中保一浩ら (1997): 日植病報 63: 252.
- 6) 奥田 充ら (1999): バイオコントロール研究会レポート 6: 56~60.
- 7) ——— (2000): 九病虫研究会報 46: 11~14.
- 8) ———・宮川久義 (1998): 日植病報 64: 384.
- 9) 角田佳則ら (1999): 日本国特許第2884487号.
- 10) 高屋茂雄・角田佳則 (1993): 日植病報 59: 78.
- 11) 植松 勉ら (1976): 同上 42: 464~471.