

イネ内穎褐変病の生態

鳥取県農業試験場環境研究室 長谷川 まさる

はじめに

イネ内穎褐変病は *Erwinia ananas* によって引き起こされる細菌性病害（口絵①）であり（畔上ら, 1983；畔上ら, 1994；吉田ら, 1982），玄米および種子の品質低下を引き起こす。イネの内穎褐変症状は古くから知られていたが、この症状が細菌によって引き起こされることが報告（吉田ら, 1980）され、イネ内穎褐変病と命名された（畔上ら, 1983）。しかし、本病は収量への影響が少ない病害であることから、これまでマイナー病害として扱われてきた。このため、本病に関する研究は少なく、また、病原細菌の検出技術も未確立であったことから、発生生態は解明されてこなかった。ところが、近年、夏期の高温などにより本病の発生が各地で顕在化し始め、有効な防除対策を立てるうえで、まず、本病の発生生態の解明が要望されていた。そこで、発光遺伝子をマーカーとした病原細菌を利用し、本病の発生生態の解明に取り組み、有益な知見を得たので紹介する。

I 発光遺伝子を利用した細菌の検出技術

本病の発生生態を解明するためには、まず、病原細菌の検出技術の確立が必要である。従来から最もよく使用される手法として、選択培地を用いた検出が挙げられる。本病の病原細菌は *E. ananas* であるが、*E. ananas* の選択培地は氷核細菌の検出を目的として既に報告されている（Goto et al., 1990）。しかし、本培地ではイネ体上に多数存在すると考えられる非病原性の *E. ananas*, *E. herbicola* 等も生育することから、イネ内穎褐変病菌への適用は困難であった。また、本選択培地ではごくわずかな部位しか検討できないため、病原細菌の動態の全体像をとらえる方法としては不適である。これらの問題を解決できる手法として、発光遺伝子の利用による細菌の検出技術が有効であると考えられる（SHAW and KADO, 1986；廣岡ら, 1988）。本技術は病原細菌の発生生態の

解明、遺伝子解析への利用等を目的として開発されたものであり、海洋細菌の発光遺伝子はクローニングされ、大腸菌で発現できる。したがって、病原細菌を発光遺伝子で形質転換することにより、発光する病原細菌の作出が可能であり、さらに二次ルミノメーターなどの高精度の検出装置を用いることによって、植物体における病原細菌の挙動をリアルタイムで追跡することができる。また、本技術は植物全体を同一サンプルとして連続的に観察できるとともに、病徵のみられない部位に生息する細菌の検出も可能であることから、各種細菌病の発生生態の解明に利用されている（畔上, 1997；HASEGAWA et al., 2003；HIKICHI et al., 1998；HIKICHI et al., 1999；PROSSER et al., 1996；SHAW and KADO, 1986；TSUGE et al., 1999）。

II 発光遺伝子が発現するイネ内穎褐変病菌の作出

発光遺伝子が発現する病原細菌の作出には、海洋細菌 *Vibrio fischeri* の生物発光遺伝子群を用いた。エレクトロポレーションによって発光遺伝子を病原細菌に導入後、形質転換体の中から安定した強い発光能力を有する菌株 *E. ananas* CTB 1009T2 を選抜した（HASEGAWA et al., 2003）。発光細菌 CTB 1009T2 は急激に増殖する場合のみに発光し、また、親株と同等の病原性を有することから、植物体上における病原細菌の動態を把握するうえで、本菌の利用が有効であると考えられた。

III 発光細菌の選択培地の作製

前述の発光細菌の発光を検出する方法では、細菌が急激に増殖する場合の検出は容易であるが、菌密度が低く増殖が緩慢な場合には、細菌は発光しないため検出できない。そこで、*E. ananas* 選択培地 (NSVC) (Goto et al., 1990) を用いて、イネ枯死葉身に接種した発光細菌の再分離を試みた。しかし、本培地では *E. ananas*, *E. herbicola* 等の野性株コロニーが多く出現するとともに発光程度も弱いことから、本菌の特異的検出は困難であった。

発光遺伝子群にはテトラサイクリン耐性遺伝子がマ-

Ecology of *Erwinia ananas* Causing Bacterial Palea Browning of Rice. By Masaru HASEGAWA

(キーワード：イネ、内穎褐変病、発生生態、*Erwinia ananas*)

カー遺伝子として含まれていることから、NSVC 培地の選択性を向上するために、テトラサイクリンを培地に添加するとともに、NaCl の添加量を減量した結果、培地の選択性が向上し、肉眼観察により発光細菌の計数が可能となった。また、本改良培地における平板効率は、NSVC 培地および酵母・ペプトン培地と同等であった（長谷川ら、1999）。以上のことから、本改良培地を用いることにより、植物体などから低密度の発光細菌の検出が可能であり、イネ、畠畔雑草等における増殖能力を予備的に把握できるとともに、病原細菌の伝染経路、伝染機構等の解明も効率的に行うことができると考えられた。

IV 病原細菌のイネ体上における増殖部位

1 穂ばらみ期

穂ばらみ期初期のイネに発光細菌の菌液を噴霧接種し、二次元ルミノメーターを用いて発光観察を行った結果、イネの下位葉鞘、下位葉身、葉先等の枯死組織で強い発光が認められ（図②）、これらの枯死組織が病原細菌の増殖の場となることが示唆された（長谷川ら、2003）。一方、緑色健全組織では、このような発光は認められなかった。さらに、発光細菌の選択培地を用いた検討においても、発光観察と同様の結果が得られた（図-

1)。なお、健全葉に付傷処理を行った場合においても菌の増殖が認められたことから、枯死には至らないようなイネ組織の傷も病原細菌の増殖には重要であると考えられた。一方、穂ばらみ期に菌液を注入した葉鞘内部では、発光は全く認められなかった。また、葉鞘内の小穂内部へ菌液を注入した場合では、付傷処理を行った薬では発光が認められたが、無処理の薬では発光は認められなかった。これらのことから、病原細菌の薬への侵入力はないと考えられた。なお、イネもみ枯細菌病菌は開花前の薬にも感染することが報告されており（畔上、1997），イネ内穎褐変病菌は開花前の薬には感染できない点でイネもみ枯細菌病菌と異なっている。以上のことから、病原細菌はイネの枯死組織などで増殖を繰り返し、最終的に開花期の粉に到達するものと考えられた。また、葉身の枯れ上り、傷等の原因となる病害虫の発生、強風、老化等は病原細菌の増殖につながり、本病の発生を助長する可能性が示唆された。

2 出穂期から発病初期

出穂前日に発光細菌の菌液を噴霧接種した開花 12～24 時間後のイネでは、粉に付着している一部の薬で強い発光が認められた（図③）。続いて開花 2～3 日後の発病初期の粉では、粉内部の柱頭部分で強い発光が認められた（図④）。また、発病初期の一部の粉では、子房基部で発光する場合も認められた。柱頭には発病の有無に関係なく多量の花粉が付着しており、発病粉の柱頭は褐変していた（図⑤）。一方、健全粉の柱頭ではこのような褐変は認められなかった。また、発病粉では柱頭の褐変に併せて鱗被が褐変している粉も多く観察された。薬内部の顕微鏡下における発光観察では、花粉表面および薬内側組織で発光が認められたことから、柱頭における病原細菌の増殖には花粉が関与していることが示唆された。また、開花直後の薬では 20 cfu の発光細菌の接種によっても、24 時間後には強い発光が認められ、菌数は 5.9×10^4 cfu/薬 (4.5×10^8 cfu/g 薬) に達した。以上のことから、開花後の薬、柱頭、子房基部等が病原細菌の重要な増殖の場になると考えられた。

本病の感染時期は開花期であり、出穂期から穂揃い期が高温で経過し降雨が伴うと、本病の発病が多くなることが報告されている（吉田、1987）。一般に、イネの大半の穂が出穂するには 4 日程度を要し、また、出穂した穂における開花は粉ごとで異なる。したがって、病原細菌の感染可能期間は粉単位でみると開花期のごく短い期

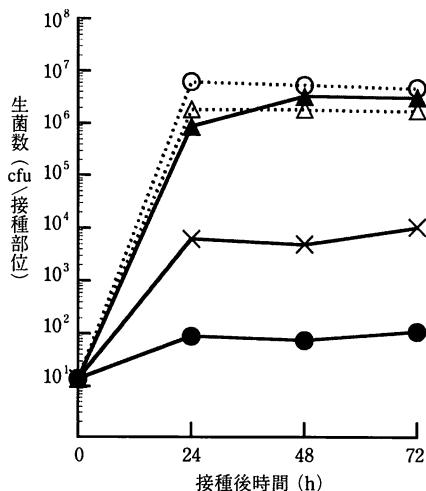


図-1 各種処理を行ったイネ葉身における発光細菌 CTB 1009T2 の増殖

注) コシヒカリの葉身に、発光細菌の菌液 (14 cfu/葉身) を接種し、本菌の選択培地を用いて生菌数を調査。●：健全葉、▲：枯死葉、○：オートクレーブ健全葉、△：オートクレーブ枯死葉、×：付傷健全葉。

間であるが、実際には粉ごとに開花する時期が異なることから、出穂期から5日間程度が感染可能時期と考えられる。薬における菌の増殖には25°C以上の高温と高湿度条件が必要であると考えられ、開花後も粉に付着している薬は病原細菌の増殖の場となると考えられる。さらに出穂期から穗揃い期の高温、降雨により、薬における病原細菌の増殖が活発となり、粉への感染場面が増加するものと考えられた。

3 穗揃い期以降

開花7日後に発光細菌の菌液を注入した粉内部では、付傷処理を行った胚乳で弱い発光が認められたものの、無処理の胚乳における発光は認められなかった。また、薬が付着している出穂20日後の穂では、発光細菌の菌液の噴霧接種により、薬における強い発光が認められた(HASEGAWA et al., 2003)。したがって、開花後の薬では長期間にわたり病原細菌の増殖が可能であると考えられた。

V 病原細菌の第一次伝染源

1 発光細菌の種子伝染

病原細菌の伝染経路を解明することは重要であり、イネの細菌病では、これまでの知見から種子、イネ株、畦畔雑草などが第一次伝染源として重要であると考えられる。本病は種子のみに病徵を示すことから、種子が第一次伝染源になると推定される。

発光細菌によって発病した種子を用いて検討した結果、苗地上部から本菌が検出され、本菌が種子から苗に移行することが証明された(表-1)。また、種子の浸種液および出芽後の育苗土隙間に含まれる水からも本菌が検出された(表-1, 2)ことから、病原細菌は浸種中あるいは育苗中に水で媒介され、健全種子あるいは健全苗に二次伝染する可能性が示唆された(長谷川ら, 1999)。一方、浸種期間中の菌の増殖はほとんど認められなかつたが、この要因として浸種液中における他の微生物の関与が考えられた。なお、苗葉身の一部を枯死させた場合では、検出される細菌数が著しく増加したことから、菌密度が低くても育苗中に苗の多くが病原細菌を保菌する可能性が高いと考えられた(表-1)。

2 数種畦畔雑草における発光細菌の増殖能力

一般に*E. ananas*は腐生性の強い細菌であることから、本病の病原細菌も雑草などに普遍的に存在し、風雨などによって出穂期の穂に運ばれ、発病に至ると考えられているが、これらを証明した報告はない。しかし、本

表-1 発光細菌 CTB 1009T2 保菌発病種子を播種した場合の苗地上部および育苗土隙水における菌数

浸種液中の最終菌濃度 ^{a)} (cfu/ml)	本葉第1葉の付傷処理 ^{b)}	苗地上部の菌数 ^{c)} (cfu/苗)	育苗土隙水の菌数 ^{d)} (cfu/ml)
106.7	有	885.0	103.3
53.3	無	4.7	63.3
0	有	0	0
0	無	0	0

^{a)} 滅菌水1.0 mlを入れたマイクロチューブ(1.5 ml)に発病種子1粒を浸種し、20°Cで5日後に調査した3粒の平均。^{b)} 葉身の先端部分を金属針を用いて付傷。^{c)} 播種15日後に水面から2 cm以上の部分を磨碎し、CTB 1009T2の選択培地を用いて平板希釀法により調査。^{d)} 播種15日後に採水し、選択培地を用いて平板希釀法により調査。

表-2 発光細菌 CTB 1009T2 接種によって得た発病種子の浸種液中ににおける菌数

種子 No.	浸種液中の菌数 ^{a)} (cfu/ml)			
	浸種時	1日後	3日後	5日後
1	0	0	0	0
2	0	30	30	30
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	40
7	0	60	70	50
8	10	0	0	0
9	10	30	50	80
10	0	30	50	110
11	0	30	50	180
12	0	40	50	50
菌数合計	20	220	300	540
菌検出種子率 (%)	16.7	50.0	50.0	58.3

^{a)} CTB 1009T2の選択培地を用いて平板希釀法により調査。

病の発生は経験的に畦畔沿いに多い傾向があることから、種子以外にも畦畔雑草が伝染源となることが推定される。

7種類の畦畔雑草に発光細菌を接種し、24時間後の増殖を調査した結果、オオチドメ、ツユクサおよびメヒシバでは顕著な菌の増殖は認められなかつたが、アキノエノコログサ、カタバミ、スギナおよびヨモギで若干の増殖が認められた。しかし、これらの雑草における菌の増殖量は、イネ枯死葉身の増殖量に比較すると1/10以下

表-3 畦畔雑草の枯死葉身における発光細菌 CTB 1009T2 の増殖

雑草名	細菌数 ^{a)} (cfu/部位)
アキノエノコログサ	1.1×10^4
オオチドメ	6.5×10^2
カタバミ	2.6×10^3
スギナ	4.7×10^3
ツユクサ	1.5×10^2
メヒシバ	9.0×10^2
ヨモギ	7.0×10^3
イネ	8.5×10^5

注) a) 水稻本田期における畦畔雑草の枯死葉身 ($10 \times 10 \text{ mm}$) に、 $2.0 \times 10^2 \text{ cfu}$ を接種し、24 時間後に CTB 1009T2a 選択培地を用いて平板希釈法により調査。

であった（表-3）。これらのことから、イネに病原性を示す *E. ananas* はイネに対する寄生性が高く、畦畔雑草における増殖能力は低いことが示唆されたが、結論付けるにはより多くの畦畔雑草について調査する必要があると考えられた。なお、柴田ら（1998）は、本病の発生は畦畔に多い傾向を認めたが、調査圃場はコンクリート畦畔のため雑草の生息がほとんどなく、畦畔雑草が伝染源となった可能性は低いと結論付けている。*E. ananas* の病原性、寄生性に関する研究は十分ではないことから、今後これらを含めた検討が必要である。

VI イネ体における病原細菌の伝播

1 保菌組織の接触による伝播

野外のイネ体などにおける病原細菌の伝播については、様々な要因の関与が考えられる。移植後のイネでは、粉の発病までの数ヶ月間、病原細菌は枯死組織で増殖を繰り返し、保菌組織の接触、風雨、昆虫等によって出穂期の穂に伝播されると考えられる。ここでは、イネ体における上位あるいは他の健全株への保菌組織の接触による病原細菌の移行について述べる。

発光細菌を保菌した枯死葉身を健全葉身に接触させた場合、接触の直後および 2 日後では、すべての接触部位から本菌が検出された。また、出穂 4 日前、出穂前日の止葉葉鞘あるいは出穂期の穂に保菌組織を接触させたイネでは、いずれも発病が認められ、発病粉から本菌が高率に検出された。一方、出穂 4 日前の上位第 3 葉のみに接触させたイネでは発病が認められなかった（長谷川ら、2000）。以上のことから、病原細菌は保菌組織の接触によって伝播されるとともに、止葉葉鞘および開花中の穂

への保菌組織の接触は、発病に大きく関与することが示唆された。

2 高湿度条件下のイネ下位葉鞘における移行

イネの葉鞘は茎に密着しているが、イネ移植後の下位葉鞘ではイネの生育とともに高湿度条件となり、葉鞘と茎との間には水が存在する。この水は毛管現象などによってイネの上位に移動すると考えられることから、イネ組織表面に存在する病原細菌も水とともに上位に移行することが推定される。そこで、下位葉鞘に発光細菌を接種して本菌の上位への移行について経時的に調査した結果、イネの下位葉鞘では、病原細菌は上位に移行することが明らかとなった（長谷川ら、2000）。

3 ツマグロヨコバイによる伝播

水田内には多くの昆虫などが生息していることから、病原細菌は昆虫などによって上位あるいは他のイネに伝播されると推定される。そこで、イネに比較的長期間寄生しているツマグロヨコバイを用い、昆虫による病原細菌の伝播について検討した。

イネの下位枯死組織に発光細菌を接種し、ツマグロヨコバイを放飼した結果、上位枯死組織および他の健全イネの枯死組織から本菌が検出された。さらに、菌接種イネから回収したツマグロヨコバイの 10 頭中 2 頭から本菌が検出された（長谷川ら、2000）。以上のことから、病原細菌はツマグロヨコバイなどの昆虫によって上位組織および他の健全イネに伝播されることが示唆された。また、昆虫などはイネに寄生することにより、菌の伝播だけでなく吸汁などによって小さな傷も付けると考えられ、病原細菌の増殖の場を増加させている可能性も示唆された。

VII 発 病 機 構

病原細菌の接種時期と病徵発現との関係から、病原細菌の感染時期は開花期であることが報告されている（吉田、1986）。また、発光観察の結果もこれを支持している。本病は粉の開花の 2~4 日後に発病する場合が多く、この期間の粉内部における病原細菌の増殖が発病に大きく関与していると考えられる。病原細菌は出穂後の粉の開花とともに、まず、薬で爆発的に増殖する。また、最初の開花粉からは大量の花粉が飛散して未開花粉にも付着する。花粉も病原細菌の増殖の場となると推定されることから、これらによって粉周辺の菌密度が高まるものと考えられる。

粉（小穂）の形態と病原細菌の所在に関するこれまでの研究において、病原細菌は内穎および外穎の主として下表皮の気孔から侵入し、柔組織の細胞間隙中で増殖することが報告されている（田部井ら、1988）。したがって、枯死葉身などで増殖を繰り返した病原細菌が出穂期の粉に到達し、粉に付着する薬で急激に増殖することにより、粉表面には伝染源が爆発的に増加すると考えられる。続いて気孔などから侵入した病原細菌は主に柱頭、あるいは内穎内部に存在する子房基部などで再び増殖し、これが引き金になって病徵発現に至るものと考えられる。一方、田部井らは病原細菌の小穂への侵入・増殖に関しては、内穎も外穎も同じであり、特に内穎のみが侵されるのではなく、内穎のみが褐変する病徵は内穎のみが示す抵抗反応の一種であると推論している（田部井ら、1988）。本病の病徵発現をよく観察すると、内穎の褐変は内穎と外穎の縫合部近辺、あるいは内穎基部から始まることが多い（吉田、1983）。これらの部位は、病原細菌の増殖の場である柱頭および子房基部とよく一致している。また、柱頭への病原細菌の接種試験において、柱頭に花粉が付着している粉では発病が認められたが、花粉を付着させなかった粉では発病が認められなかつた（筆者、未発表）。

以上のことから、内穎のみが褐変する原因は明らかにできなかったが、少なくとも開花から発病に至るまでの約2~4日間の病原細菌の増殖が重要であると考えられた。今後は、柱頭あるいは子房基部に多量に付着している花粉が発病に大きく関与することが示唆されたことから、花粉の役割を解明する必要があると考えられる。

おわりに

イネ内穎褐変病菌の発生生態の解明に取り組み、病原細菌の種子伝染、イネ上位への伝播方法、イネ開花期前後のイネ体における病原細菌の動態等について多くの知見を得ることができた。これら以外にも、病原細菌の選択培地（長谷川ら、2003）を用いて、イネ刈り株における病原細菌の越冬（長谷川ら、2002）、花粉における病原細菌の増殖（筆者、未発表）も明らかにされている。本病の発生生態については、今後も解明すべき点があるが、これまでに明らかにされた知見は、今後の研究発展および防除対策に役立つものと考えられる。

引用文献

- 1) 畑上耕児 (1994) : 農技研報 11: 1 ~ 80.
- 2) _____ (1997) : 日植病報 63: 254.
- 3) _____ (1983) : 農技研報 C37: 1 ~ 12.
- 4) Goro, M. et al. (1990) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 56: 515 ~ 522.
- 5) 長谷川優ら (1999) : 日植病報 65: 365.
- 6) _____ (2000) : 同上 66: 186.
- 7) _____ (2002) : 同上 68: 259.
- 8) _____ (2003) : 同上 69: 224 ~ 228.
- 9) HASEGAWA, M. et al. (2003) : J. Gen. Plant. Pathol. 69: 267 ~ 270.
- 10) HIKICHI, Y. et al. (1998) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 519 ~ 525.
- 11) _____ (1999) : ibid. 65: 597 ~ 603.
- 12) 廣岡 卓ら (1988) : 植物防疫 42: 469 ~ 474.
- 13) PROSSER, J.I. et al. (1996) : Crit. Rev. Biotechnol. 16: 157 ~ 183.
- 14) SHAW, J. J. and C. I. KADO (1986) : Bio/Technology 4: 560 ~ 564.
- 15) 柴田 聰ら (1998) : 群馬農試研報 4: 29 ~ 38.
- 16) 田部井英夫ら (1988) : 日植病報 54: 637 ~ 639.
- 17) TSUGE, S. et al. (1999) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 65: 93 ~ 99.
- 18) 吉田浩之 (1983) : 近中農研 65: 8 ~ 11.
- 19) _____ (1986) : 鳥取農試研報 22: 31 ~ 40.
- 20) _____ (1987) : 同上 23: 27 ~ 33.
- 21) _____ (1982) : 植物防疫 36: 122 ~ 126.
- 22) _____ 安木睦夫 (1980) : 日植病報 46: 81.

！日本産植物細菌病の図鑑／目録／分離・同定法！

CD-ROM版 作物の細菌病

(for Windows)

2004年追補3版

—病徵診断と病原の同定—

西山幸司・高橋幸吉・高梨和雄 編
定価2,100円（税込み）送料200円

2001年追補版に①病徵写真370余枚 ②2000年以降発表の新病害 ③初心者向け推奨分離法 ④非病原細菌のプロフィールインデックスを新たに追加しました。

お申し込みは直接当協会へ、前金（現金書留・郵便振替）で申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11
郵便振替口座 00110-7-177867 TEL(03)3944-1561(代) FAX(03)3944-2103 メール:order@jppa.or.jp