

化学農薬を用いない水稻種子消毒法の普及による 諸問題とその対策

秋田県立大学 生物資源科学部 ^{ふじ}藤 ^{しん}晋 ^{いち}一

はじめに

米生産においては、種子伝染性病害の発生を回避するために化学合成農薬による種子消毒が一般に行われてきた。しかしながら、今から10数年前に、減農薬や無農薬栽培に対応できる技術としての、温湯消毒や生物農薬（微生物防除資材）を利用した実用的な種子消毒技術（早坂ら，2001；熊倉ら，2003）が開発されると、減農薬特別栽培や有機栽培を先駆的に取り入れた農家、グループ等では、この開発直後の温湯消毒や生物農薬を積極的に取り入れた栽培体系を構築した。その一方で、これら消毒技術の効果が、化学合成農薬に比べて不十分なため、しばしば、育苗施設において種子伝染性病害が多発し、大きな問題を引き起こしてきた。当初は、「米生産農家」が自家採種した種子など、病原菌に高度に汚染された種子の利用が原因である事例がそのほとんどであったが、これら技術が一般的な農家にも広く利用される技術となったことから、東北地域を中心とした各県では、これらの発生を回避するために、種子更新によりクリーンな種子を利用するよう、各都道府県で作成している農作物病害虫防除指針などへの記載や、生産者や関係機関を対象とした説明会などで指導を行ってきた。その結果、多くの種子伝染性病害の発生は減少したが、ばか苗病の発生は依然として深刻な状況が続いている。

これら化学合成農薬に依存しない種子消毒法は、現在では宮城県を筆頭に、東北地域の多くの県で普及が進んでおり、多くの生産団体、JA、さらには個人でも温湯消毒機の導入が進んでいる。生物農薬についても、従来の化学合成農薬のように消毒済み種子として個々の農家に配布可能な製剤が開発され、普及に向けた実証が進められている。

これまで、ばか苗病の発生抑止のために、様々な技術の検討が東北地域を中心に行われてきた。本稿では、まず本病の発生生態をこれまでの報告や試験事例にふれながら、これら知見に基づいた本病多発の原因解明とその

対策についての研究状況を紹介する。

I イネばか苗病の発生生態

本病に関する発生生態については、佐々木（1987）が詳細な研究を報告している。本病の発生生態を知るうえで、極めて参考になる報告であるが、研究当時の育苗体系が苗代であることをはじめとして、現在の栽培体系とは異なる点が背景にある。また、機械移植の普及に伴った育苗箱内における本病の発生の特徴について、渡部（1980）が詳細な試験結果を報告している。これについても現在とは異なる育苗箱での試験結果であることから、上記研究報告を参考にした追試験を含めて発生生態を紹介する。

1 本田での発生生態

ばか苗病は種子伝染性の病害であるが、本病の発生による減収率は少ないとされている（鈴木ら，1987）。本病の問題は、出穂（開花）期を中心に飛散した胞子が感染、翌年使用する種子に潜伏することにある。したがって、主要農作物種子法に基づいた健全種子を確保するために、採種圃場周辺では発病苗の抜き取りなどによる物理的防除が行われている。

ばか苗病の本田での発病は、本菌に感染した苗が移植されることによって起こる。佐々木（1987）によれば、本田に移植された徒長苗は移植後10日ごろから枯死が始まり、漸次増加する。また外観健全苗を移植した場合の本田での徒長苗の発生は、移植後2週間までに増加し、以後発生が低下すると報告している。近年の発生消長が必ずしもこれに合致しないことから、2011年と2012年に自然感染種子などを用いて本田における発病推移を調査した。その結果、移植直後の徒長苗の急激な増加は認められず、移植3週間後まで増加を続け、枯死苗の発生は、移植およそ1か月後から認められるようになった（図-1）。7月以降の幼穂形成期を迎えると草丈が高くなるため、徒長苗の識別が困難になるが、穂ばらみ期に徒長が認められないまま枯死し、胞子を形成している株も確認されている（口絵①）。このような本田発病の遅れや見逃しが、近年の健全種子の確保を難しくしている原因の一つと考えられる。

一方、健全種子を確保するための発病苗の抜き取り範

Problems with Spread of the Rice Seed Disinfection Methods not-using Chemical Fungicides and Its Countermeasures. By Shin-ichi FUJI

（キーワード：ばか苗病，発生生態，検定法）

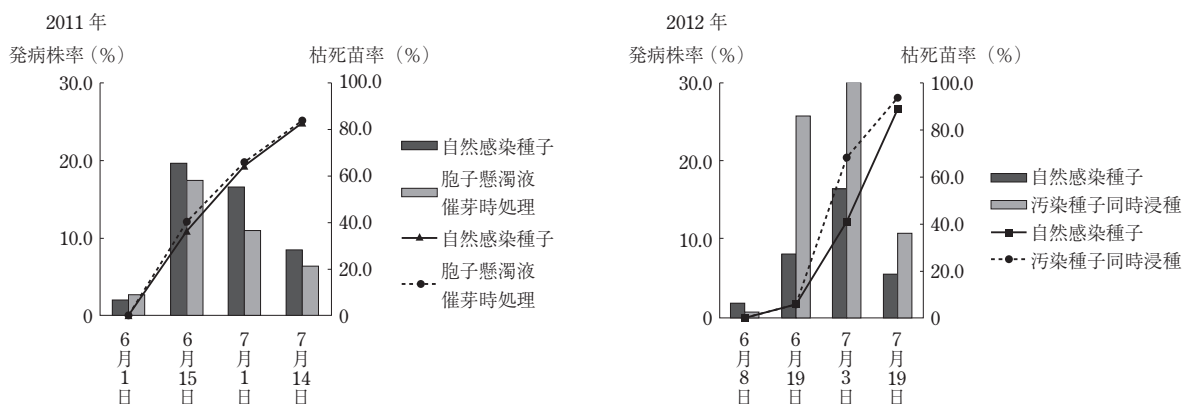


図-1 本田におけるばか苗病の発病推移

2011年は5月24日、2012年は5月31日に機械移植した。

棒グラフは発病株率、折れ線グラフは発病株当たりの枯死苗率を示す。

胞子懸濁液催芽時処理は、 5×10^5 個/mlの胞子懸濁液を用い30℃ 24時間処理により行った。

圃は各県において個別に定められている。秋田県においては、ベノミル耐性ばか苗病菌が多発圃場から500 m離れた地点から確認されたことから、その範囲を500 mと定めている。しかしながら、畑中ら(2007)によれば種子への本菌の汚染は、多発圃場から100 mまでの間で急激な減少が見られること、伝染源が少ない場合の周辺圃場における保菌状況は半径2 mの間で大きく減少することを報告している。この結果から判断すると、胞子の飛散距離はそれほど長距離ではないことが考えられる。

枯死苗からの胞子の飛散は主に夜間に行われるとされている(佐々木, 1987; 山下ら, 1993)。また、ばか苗病菌に感染した種子は塩水選によって選別できないことから(早坂, 2004)、本菌感染の稔実への影響はほとんどないと考えられる。多発圃場においては、刈り取り時期の倒伏や、収穫後の乾燥条件が悪いと、外穎と内穎の間に分生胞子塊(スポロドキア)を形成した粉がしばしば観察される(口絵②)。もし収穫した種子の中に胞子塊が形成された種子が存在すれば、乾燥調製される際に健全種子の表面にも胞子が粉衣されることとなる。

2 育苗期の発生病態

育苗期における本病の発生は、種子予措中の感染が中心である。筆者らは、このことを証明するために、ハイグロマイシン耐性を付与した組み換え菌を作成、その胞子懸濁液を浸種液として、種子予措から育苗期間中の本菌の動態を調査した(金田ら, 2011)。その結果、浸種(15℃)開始6時間後には健全種子の穎と玄米の間に侵入できるが、主な侵入行動は催芽処理時(30℃ 24時間)に起こっていることを明らかにした。一方、渡部(1980)は、健全種子を播種した育苗箱中に人工的に胞子形成し

た培養粉あるいは胞子塊を形成した自然感染種子を置床したところ、播種後の健全粉に感染したことを報告している。しかしながら組み換え菌が感染した種子の近くに健全種子を播種しても、筆者らの実験では発病は見られていない。種子予措中の伝染は浸種から催芽(出芽)の時期に限られており、その後の育苗箱中の二次伝染やブール育苗による伝染は起こらないものと考えている。

II 健全種子の確保に向けた取り組み

1 本田でのばか苗病防除による健全種子の確保

ばか苗病は、その発病によって収量が著しく減少することがなく(鈴木ら, 1987)、ベノミル耐性菌が流行した後に登場したEBI剤が卓効を示したことにより、育苗期および本田での被害が見られなくなり、本田防除剤の開発は行われていない。そこで畑中・笹原(2010)、倉内ら(2011)および鈴木ら(2011)はフェリムゾン・フサライド水和剤をはじめとした薬剤の効果を調査した。試験によってはその効果が認められているものの、安定した効果が認められた薬剤は、現在までにまだ見いだされていないのが現状である。

2 種子検査法

収穫した種子が健全であるかどうかを検査する方法について、これまでいくつかの検討を重ねてきた。一つは遺伝子検査法である。この方法は、種子からDNAを抽出し、その中にごく微量に含まれる病原菌の遺伝子を増幅して検出する方法である。近年、Amatulli et al. (2012)はリアルタイムPCRによる罹病植物からの検出方法を報告しているが、種子からの検出には成功していない。筆者らも同様の検出法について検討してきたのでその詳

細を紹介する。

AMATULLI et al. (2012) と同様に、イネから分離される *Fusarium* 菌の translation elongation factor 遺伝子の配列をマルチプルアライメント解析した結果、ばか苗病菌である *Fusarium fujikuroi* に特有の配列が見いだされた。そこで、この配列を利用して一組のプライマー Ff-S (5'-CGTGTCAAACCTAAACATTCGA-3') と Ff-R (5'-AATGACACATGAGCGACAAC-3') を設計した。このプライマーを用いて *F. fujikuroi* とイネ種子からよく分離される *F. equiseti*, *F. graminearum*-complex の2種のフザリウム菌体から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは10 × buffer 1.25 μ l, 2 mM dNTP mix 1.25 μ l, BSA (1 mg/ml) 0.1 μ l, 20 μ M プライマー各0.125 μ l, Ampli Taq Gold DNA polymerase (5 U/ μ l) (Applied Biosystems 社) 0.125 μ l, 鋳型 DNA 2.5 μ l の12.5 μ l 反応系とした。反応サイクルは95℃ 10分の熱変性の後、93℃ 30秒, 62℃ 1分, 72℃ 1分を35サイクル, 72℃ 10分を1サイクルとした。PCR産物を2%アガロースゲル電気泳動したところ、*F. fujikuroi* においてのみ189 bpの特異的な増幅産物が認められた(図-2)。一方、種子からばか苗病菌を検出するためのDNA抽出は以下のように行った。まず、5 gの種子を50 mlの遠心チューブに計り取り、メタルコーン(MC-5030PP, 安井器械社)を入れ、マルチビーズショッカー(安井器械社)で2,500 rpmで6分間を2回行い粉碎した。破碎粉末から0.5 gをジルコニアビーズ入り2 ml 破碎チューブに計り取り、DNA抽出液(500 mM Tris (pH8.0), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% SDS)と300 mM リン酸ナトリウム(pH8.0)を500 μ lずつ加え、マルチビーズショッカー(安井器械社)で2,500 rpm 60秒間破碎した。5分間の遠心処理(19,000 × g 25℃)により得られた上清に0.2倍量の8 M 酢酸カリウムを加え、反転混合した後、再度同様の遠心を行った。得られた上清に0.6倍量の2プロパノールを加え、室温で5分間静置した後、同様の遠心処理を行い、粗核酸を回収した。回収した粗核酸は70%エタノール洗浄の後、カラム精製(illustra GFX PCR Purification Kit, GE Healthcare 社)を行いPCRの鋳型DNAとした。PCRの結果、汚染種子から特異的にばか苗病菌を検出することができた。本方法をより高感度な検出法にするため、Ff-Rプライマーを蛍光色素FAMで標識し、ジェネティックアナライザーを用いたFluorescent PCRを行ったところ、より正確かつ高感度に本菌を検出することができた(図-3)。本方法の検出限界は、反応液中のDNA濃度2 pg/ μ lであった。加えて、健全種子に汚染種子を混入させ、生物検定と比較

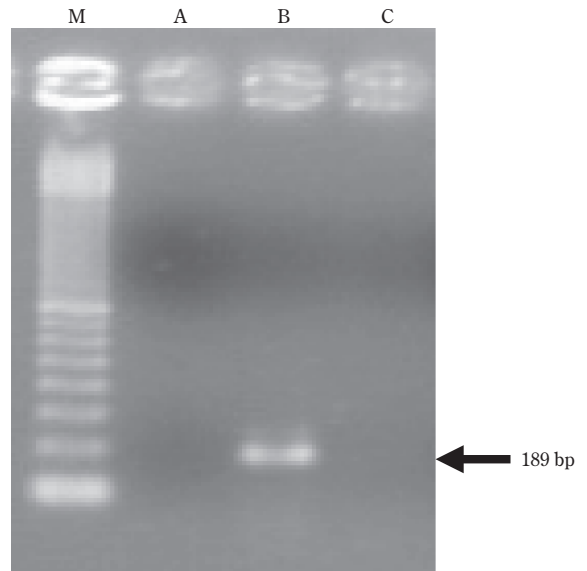


図-2 培養菌体DNAを用いたPCRによるばか苗病菌の特異的検出

lane M, 100 base Ladder Marker; lane A, *Fusarium equiseti*; lane B, *Fusarium fujikuroi*; lane C, *Fusarium graminearum*-complex

しながら、その精度・感度を検証した。その結果、0.1%の汚染種子混入率(発病苗率0.1~0.5%)においても確実に検出することが可能であった。

本方法についてはこれまで自然感染種子や一般農家が使用して発病が認められた種子を用いてその実用性の検証を積み重ねてきた。その結果、高度汚染種子かどうかは、この方法で十分検定が可能であるが、発病が認められたロットの種子(発病苗率2%)を用いても検出できない事例もあった。これは、検査に供する種子が5 g(<200粒以下)で、粉碎後のわずか0.5 gの試料からDNAを抽出する方法をとっているため、その中に汚染種子が混じっていない限り検出はできないことに起因すると思われる。極低濃度の汚染の検査に対応するためには、検査するDNAを得る方法についてのさらなる検討が必要である。

一方、種子の一部を用いて育苗する検定(生物検定)にも取り組んでいるが、発病が認められたロットの種子を用いても、高度汚染種子でない限り、発病することは極めてまれで、農家ででの発生を再現できないことが多い。この要因には、もともと種子が、今できる技術上極めてクリーンであり、人工気象器や温室で検査できる規模には限界があるため、農家で発病した時の規模(種子量)での検定ができないことが大きな要因であると思わ

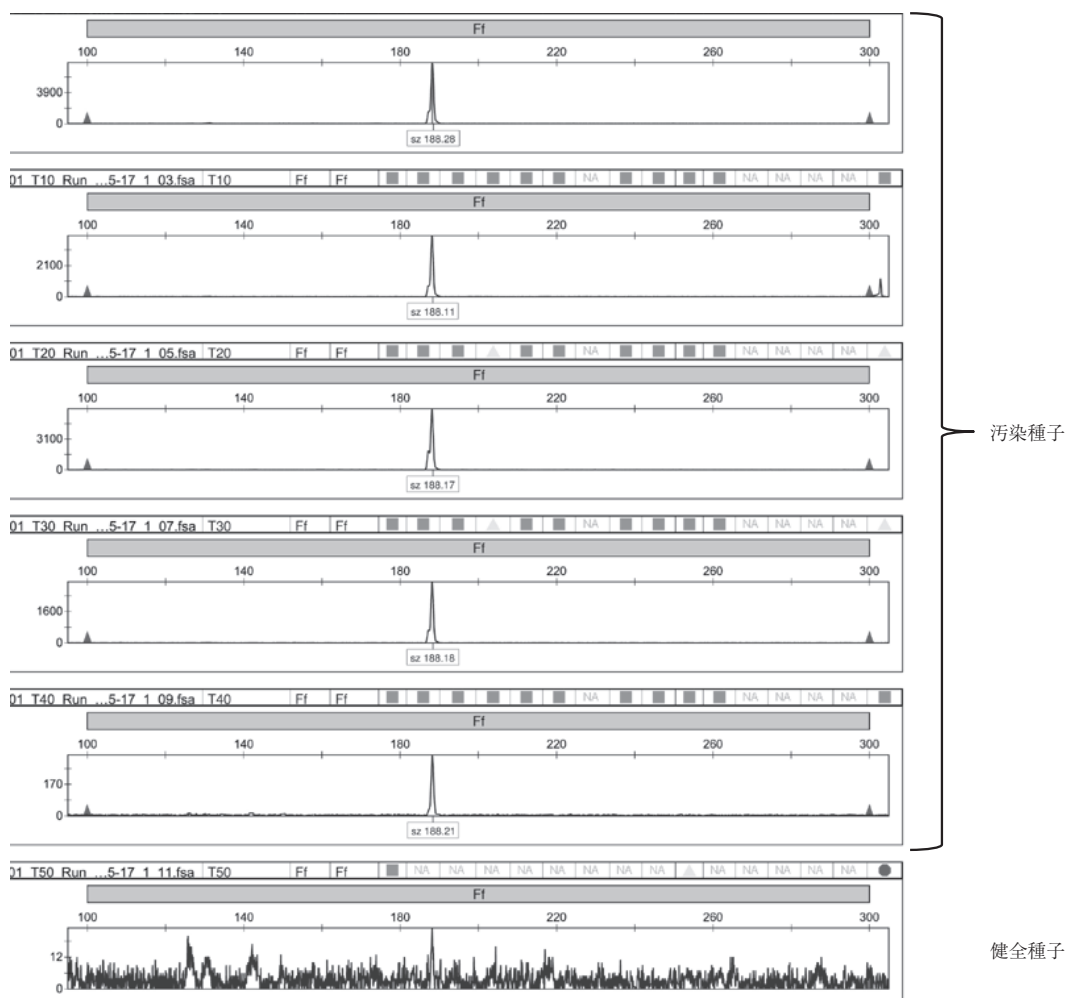


図-3 ジェネティックアナライザーを利用した Fluorescent PCR による種子からのばか苗病菌の検出

れる。加えて、温室や人工気象器での試験では光量不足や温度との関係から苗全体が徒長する傾向にあり、ばか苗病による徒長かどうかの判定が難しい場合がある。それを克服するために、矮化剤（ユニコナゾール P 液剤）を使用した方法（園田，2000）や、グロースキャビネットの温度制御を育苗期間に近い温度設定とした育苗方法（藤・茂木，2007）が報告されている。室内型の人工気象器でも 12 時間日長で昼温 20℃，夜温 15℃ に設定することで判定は可能であるが、その判定にはある程度の経験が必要である。

3 農家の発生事例から推測される伝染源

ばか苗病が発生する農家は、毎年発生し、年ごとに被害が拡大している農家が多い。本病の伝染環から、一つの可能性が考えられたので、ここに紹介する。種子予措は、屋内で行われることが多く、比較的スペースのある

乾燥機が近くに置かれた場所で行われることが多い。本田でばか苗病が発生した農家の乾燥機では、ばか苗病菌に罹病したもみが乾燥調製・脱ぶされる。したがって、周辺にはばか苗病菌が感染した粃殻や米ぬか、粉じんが存在することになる。これらを早期に取り除き、処分（掃除）していれば可能性は低くなるが、暗渠資材や、育苗資材等へ利用するために残っていた場合、それらが伝染源（湿潤していれば再度孢子塊を形成）となり、そこから浸種から催芽中の水の中に孢子が飛散し汚染する可能性は極めて高くなる。特に温湯消毒では、種子表面に存在する微生物相をいったんなくしているため、ばか苗病菌が外部から侵入した場合、競合相手が存在せず、かえってばか苗病の発生が多くなることがある。また、高濃度の孢子を接種した土壌において発病が認められることから、育苗土の軽量化をはじめとして利用されてい

る米ぬかが汚染されていたり、ばか苗病菌が死滅しなかった未熟燻タンを利用した結果、発病する可能性も考えられる。

おわりに

ばか苗病の多発を受けて、種子消毒に温湯消毒や微生物農薬の利用をやめ、化学合成農薬の利用に戻る生産団体もある。しかしながら、化学合成農薬を用いても、ばか苗病が発生した事例も報告されている。現在普及している化学合成種子消毒剤の多くはエルゴステロール生合成阻害 (EBI) 剤である。これら製剤のうちプロクロラズ乳剤については、韓国において耐性菌が発生したとの報告がある (PARK et al., 2009)。前述した本田での発病推移が以前の報告と異なっていることに加えて、近年のばか苗病の発生状況は、以前と比べていくつか異なる点がある。一つは、発生した苗が、比較的頑丈であり、移植後もすぐには枯死しないことがあげられる。また、これまでは育苗箱に発生した苗を抜き取ることで、本田での発生を回避できたが、育苗期間中から本田にかけて、次々と発生し、抜き取っても、また発生する状況が続いている。これらの現象は、当初、生物農薬を用いた場合に特有の現象と思われていたが、EBI 剤を使用した農家においても確認されている。WADA et al. (1990) は薬剤の効果に影響しない程度であるが、ペフラゾエート剤に対して感受性の低い菌株の野外での存在を明らかにしており、TAKENAKA et al. (1992) はペフラゾエートを含む培地上から病原性とジベレリン生合成能が低下した菌株の分離を報告している。加えて、近年、堅石ら (2011) は徒長苗からイプコナゾール剤に対して感受性が低く、ジベレリンを生産しない、ばか苗病菌あるいは近縁種の *F. proliferatum* の存在を報告している。しかしながら、韓国の事例も含めて化学合成農薬を使用した種子から分離したばか苗病菌について薬剤耐性検定が各農薬企業で行われているが、耐性菌が検出されたとの報告

は今のところはない。いずれにせよ、ばか苗病の近年の増加は、単純に化学合成農薬に戻ることによって解決できる問題でもないようである。

一方、莫大な投資を行って温湯消毒機を購入した地域もあり、より安定的な温湯消毒技術や微生物農薬の利用方法を引き続いて検討していく必要がある。各都道府県ではこれまでの温湯消毒あるいは微生物農薬の単独での利用ではなく、より安定的な効果が期待できる併用を推奨している。特に温湯消毒では、消毒後の感染の恐れがあるため、個人的には微生物農薬との併用を強く勧めたい。昨年、これまでのタラロマイセス フラバス水和剤 (タフブロック) を改良してタフブロック SP として、化学合成農薬のように大量種子消毒が可能な製剤が開発 (2012 年 3 月新規登録) され、現在、様々な地域で実証試験が行われている。ばか苗病の発生が深刻化する中、まずはばか苗病の発生を繰り返さないような、誰もが失敗しない種子消毒技術と種子予措 (浸種から催芽・播種) 環境衛生の指導力が公的機関、および生産団体に必要であると感じている。

引用文献

- 1) AMATULLI, M. T. et al. (2012): Eur. J. Plant Pathol. **134**: 401 ~ 408.
- 2) 藤 晋一・茂木貴恵 (2007): 植物防疫 **61**: 475 ~ 480.
- 3) 畑中教子ら (2007): 北日本病虫研報 **58**: 25 ~ 29.
- 4) ———・笹原 剛 (2010): 同上 **61**: 263 (講要).
- 5) 早坂 剛ら (2001): 日植病報 **67**: 26 ~ 32.
- 6) ——— (2004): 北日本病虫研報 **55**: 43 ~ 44.
- 7) 金田尚也ら (2011): 日植病報 **77**: 209 (講要).
- 8) 熊倉和夫ら (2003): 同上 **69**: 393 ~ 402.
- 9) 倉内賢一ら (2011): 北日本病虫研報 **62**: 205 (講要).
- 10) PARK, W. S. et al. (2009): Res. Plant Dis. **15**: 94 ~ 100.
- 11) 佐々木次雄 (1987): 東北農試研報 **74**: 1 ~ 47.
- 12) 園田亮一 (2000): 2000 年研究成果情報, 中央農業総合研究センター.
<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2000/narc00-219.html>
- 13) 鈴木穂積ら (1987): 北日本病虫研報 **38**: 26 ~ 28.
- 14) 鈴木智貴ら (2011): 同上 **62**: 206 (講要).
- 15) TAKENAKA, M. et al. (1992): J. Pesticide Sci. **17**: 213 ~ 220.
- 16) 堅石秀明ら (2011): 日植病報 **77**: 207 ~ 208 (講要).
- 17) WADA, et al. (1990): Ann. Phytopath. Soc. Japan **56**: 449 ~ 456.
- 18) 渡部 茂 (1980): 岩手農試研報 **22**: 31 ~ 54.
- 19) 山下 亨ら (1993): 関東東山病虫研報 **40**: 23 ~ 31.