

非病原性イネもみ枯細菌病菌によるイネ苗腐敗症の 発病抑制効果とその機作

古屋 成人・松尾 弘敏・古賀 一治¹⁾・松山 宣明
(九州大学農学部・¹⁾日本たばこ産業(株))

Control of bacterial seedling rot of rice by pretreatment with avirulent strains of *Pseudomonas glumae* and its mechanisms. Naruto FURUYA, Hirotoshi MATSUO, Kazuharu KOGA and Nobuaki MATSUYAMA (Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812. ¹⁾Leaf Tobacco Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., 1990 Idei, Oyama, Tochigi 323)

イネもみ枯細菌病菌 (*Pseudomonas glumae*) によって引き起こされるイネもみ枯細菌病およびイネ苗腐敗症は日本・韓国・中国などのイネ栽培地域に広く分布し重大な被害を与えており^{2,5,7,9,11)}。本細菌病についてはこれまで発生生態の解明^{3,10,12-14)}・栽培法と発病との関係⁸⁾および防除法の開発^{4,6)}など広範囲な研究が実施されている。しかしながら、今なお伝染経路や侵入感染機構に不明な部分もあり、いまだ適確な防除法は確立されていない。近年、植物病害を防除する手段の一つとして、より自然のバランスに立脚した生物的防除の研究が盛んに行なわれている。先に著者らは、イネもみ枯細菌病菌の非病原性菌株でイネ種子を処理するとイネ苗腐敗症の発病が顕著に抑制されることを明らかにした¹⁾。今回その発病抑制の機作についていくつかの知見を得たのでここに報告する。

材料および方法

1. 供試菌株および前接種方法

実験には、イネもみ枯細菌病菌の病原性菌株としてKyu82-34-2, 2, M1, TR199の4菌株を、非病原性菌株としてNT I, NT II, NT III, N7503, TR220, TR221の6菌株を、またイネもみ枯細菌病菌以外の菌株として *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens* を各1菌株づつ供試した (Table 1)。これら菌株をYPD液体培地 (ペプトン10g, D-グルコース3g, 粉末酵母エキス3g, 蒸留水1,000ml, pH 7.2) 200mlに30°Cで48時間培養後、遠沈 (3,000×g, 20分間) により菌体を集め約10⁹⁻¹⁰cfu/mlになるように滅菌蒸留水に懸濁し、この細菌懸濁液に表面殺菌したイネ種子 (品種: あそみのり) を30°Cで24時間浸漬した。対照としては滅菌蒸留水

に浸漬したもの用いた。これら浸漬処理したイネ種子は、滅菌したくみあい培土 (三井東圧製) 80gの入った60×60×45mmの容器に60粒づつ播種し、病原性菌株の細菌懸濁液 (濃度: 約10⁷⁻⁸cfu/ml) を10mlずつ灌注接種した。処理した容器は、32°Cで48時間接種箱 (湿度: 100%) に入れて催芽させた後、30°Cの植物育成チャンバー内に置き緑化させた。発病度の判定は接種15日後に実行なった。発病度の検定は、病徵の激しさの度合いによって、0~5の6段階 (発病度 0: 健全苗, 1: 健全苗と背丈は変わらないが葉身にクロロシスが現れたもの, 2: 健全苗より背丈が低く、葉鞘基部のネクロシスが見

Table 1. Bacterial strains used in this experiment

Bacteria	Characteristics
<i>Pseudomonas glumae</i> (Virulent strains) Kyu82-34-2, 2	Wild-type strains isolated from rice grains.
M1	UV-induced mutant from Kyu82-34-2 (Sm ^R).
TR199	Tn5-inserted strain of M1 (Sm ^R , Km ^R).
(Avirulent strains) NT I, NT II, NT III	Mutant strains induced from M1 by NTG treatment (Sm ^R).
TR5, TR220, TR221	Tn5-induced mutants of M1 (Sm ^R , Km ^R).
N7503, YN7810	Spontaneous avirulent mutant strains.
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> N6601	Wild-type strain isolated from tomato.
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 493-1	Wild-type strain isolated from potato.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ku7411	Wild-type strain isolated from tomato.

られるもの、3：葉身のクロロシスおよび葉鞘基部のネクロシスに加えて、全身が異常形態を呈しているもの、4：本葉第1葉しか展開しておらず全体的に退緑したものの、5：腐敗枯死したもの)に分けて調査し、発病度は各区60粒の平均値をもって示した。

2. 各種細菌の培養ろ液における病原性菌株の増殖

各菌株をYPD液体培地(200ml)に30°Cで72時間振とう培養し、遠沈(3,000×g, 20分間)により得た上清を滅菌したミリポアフィルター(孔径:0.2μm)でろ過し、完全に除菌したものを培養ろ液とした。この培養ろ液(5ml)に病原性菌株を約10²cfu/mlになるよう接種し、30°Cで48時間培養後、平板希釈法により病原性菌株の菌数を計測した。

結果および考察

1. 非病原性菌株による発病抑制効果

自然突然変異株N7503は供試した全ての病原性菌株による発病を抑制した。一方、ニトロソグアニジン処理により得られたNTⅠおよびNTⅢでは発病抑制効果は全く認められなかった。またNTⅡ、TR5、TR220およ

Table 2. Suppression of bacterial seedling rot of rice by pretreatment with avirulent strains of *Pseudomonas glumae*

Pretreated ^{a)} with	Inoculated with ^{b)}			
	Kyu82-34-2	M1	2	water
NT I	4.2 ^{e)}	3.2	3.9	0.5
NT II	4.3	2.5	1.2	0.8
NT III	3.1	3.1	4.5	0.2
TR5	3.7	2.6	4.3	0.2
TR220	2.1	2.2	3.0	0.1
TR221	1.4	1.9	3.8	0.3
N7503	0.7	0.9	0.9	0.2
YN7810	4.8	NT ^{e)}	4.6	0.2
Check ^{d)}	4.9	4.5	5.0	0.0

a) Concentration: ca. 10¹⁰ cfu/ml (avirulent strain)
b) Concentration of challenge inoculum: ca. 10⁸ cfu/ml (virulent strain)

c) Disease severity was designated with a rating scale ranging from 0-5, where 0=symptomless, 1=only slight chlorosis without growth inhibition, 2=slight growth inhibition accompanied with slight necrosis, curling with slight chlorosis, 3=moderate growth inhibition accompanied with some degree of necrosis, deformation and chlorosis, 4=severe growth inhibition accompanied with severe necrosis, deformation and severe chlorosis on the primary leaf, only, 5=complete withering. Disease severity was calculated with the following formula;

Disease severity = Σ (number of samples per each rating × rating value) / N. N is number of seeds per treatment. Thus, maximum disease severity=5

d) Pretreated with water.

e) NT: not tested.

Table 3. Relationship between the growth of *Pseudomonas glumae* virulent strain Kyu82-34-2 in various culture filtrates and efficacy on disease suppression

Culture filtrate ^{a)}	Growth ^{b)} of <i>P. glumae</i> virulent strains in the culture filtrate			
	Kyu82-34-2	M1	2	
<i>Pseudomonas glumae</i> -Avirulent strains-				
NTI	1.1×10 ⁴ (-)	5.4×10 ⁷ (+) 7.5×10 ⁷ (-)		
NT II	1.1×10 ⁵ (-)	1.5×10 ² (+) 1.8×10 ⁴ (+)		
NT III	4.6×10 ⁴ (-)	5.4×10 ⁷ (-) 3.8×10 ⁷ (-)		
TR220	8.1×10 ⁴ (+)	1.5×10 ³ (+) 5.2×10 ⁷ (-)		
TR221	5.5×10 ² (+)	1.7×10 ³ (+) 6.4×10 ⁷ (-)		
N7503	0.5×10 ⁴ (+)	1.2×10 ² (+) 1.5×10 ⁴ (+)		
YN7810	5.3×10 ⁵ (-)		2.6×10 ⁷ (-)	
<i>Virulent strains-</i>				
Kyu82-34-2	3.5×10 ⁶ (-)			
TR199	1.2×10 ⁶ (-)			
2	3.6×10 ⁵ (-)			
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> N6601				
	6.1×10 ⁶ (-)			
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 493-1				
	1.2×10 ⁵ (-)			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ku7411				
	6.5×10 ⁶ (-)			
Check (YPD broth)				
	7.5×10 ⁷ (-)	6.2×10 ⁷ (+) 8.5×10 ⁷ (-)		

a) Each bacterial strain was shake-cultured with YPD broth in Sakaguchi flasks at 30°C for 72 hr. The culture fluid was centrifuged at 3,000×g for 20 min and the supernatant was aseptically filtered through a membrane filter.

b) Bacterial population was measured after 48 hr incubation under still condition at 30°C (inoculum population: 2.5×10² cfu/ml).

c) Disease suppression on rice seedling; -: negative, +: positive.

びTR221においては親株(M1)による発病を抑制した(Table 2)。このように、発病抑制効果は病原性菌株と非病原性菌株との組み合わせにより異なり菌株間差異が認められた。

2. 各種細菌の培養ろ液における病原性菌株の増殖

幼苗に発病抑制効果を示す非病原性菌株の培養ろ液においては、発病抑制効果を示さない菌株の培養ろ液に比較して、病原性菌株の増殖が1/1000以下に抑制され、発病抑制効果との間に相関が認められた(Table 3)。この結果、ニトロソグアニジン処理あるいはトランスポゾン挿入等により得られた非病原性菌株は病原性を有する親株あるいは野生株に対してその増殖抑制を示す何らかの抗菌物質を産生しており、イネ苗腐敗症の発病抑制効果には抗菌物質産生性が密接に関与しているものと考えられた。なお本抗菌物質の諸性質については現在検討中である。

引 用 文 献

1) FURUYA, N., OKAMOTO, T., KORI, Y., MATSUYAMA, N. and WAKIMOTO, S. (1991) Ann. Phytopath. Soc. Japan **57** : 371-376. 2) 後藤和夫・大畠貢一 (1958) 日植病報 **21** : 46-47. 3) GOTO, T. (1980) Ann. Rept. Plant Prot. North Japan **31** : 58-59. 4) GOTO, T. (1980) Ann. Rept. Plant Prot. North Japan **34** : 107-108. 5) 栗田年代・田部井英夫 (1967) 日植病報 **33** : 111. 6) MOGI, S., NAITO, H. and TSUSHIMA, S. (1981) Proc. Assoc. Pl. Prot. Kyushu **27** : 9-11. 7) MOGI, S., NAITO, H. and TSUSHIMA, S. (1986) Proc. Assoc.

Pl. Prot. Kyushu **32** : 11-13. 8) SOGOU, K., UEHARA, H. and TUZAKI, Y. (1973) Proc. Assoc. Pl. Prot. Sikoku **8** : 9-12. 9) SOGOU, K. and TUZAKI, Y. (1979) Bull. Kagawa Agr. Exp. Sta. **31** : 32-36. 10) TABEI, H., AZEGAMI, K., FUKUDA, T. and GOTO, T. (1989) Ann. Phytopath. Soc. Japan **55** : 224-228. 11) 富永時任 (1971) 農技研報告 C **25** : 237-240. 12) TSUSHIMA, S., WAKIMOTO, S. and MOGI, S. (1986) Ann. Phytopath. Soc. Japan **52** : 253-259. 13) TSUSHIMA, S., MOGI, S., NAITO, H. and SAITO, H. (1991) Ann. Phytopath. Soc. Japan **57** : 145-152. 14) TSUSHIMA, S. and NAITO, H. (1991) Ann. Phytopath. Soc. Japan **57** : 180-187.

(1992年5月6日 受領)