

# 水稻の種子予措をおこなう作業場環境からの イネばか苗病菌の検出

鈴木智貴<sup>1)</sup>, 宮野法近

## Detection of the Rice Bakanae Disease Fungus in Rice Pretreatment Workspace

Tomotaka SUZUKI, Norichika MIYANO

### 抄 録

水稻の種子予措をおこなう生産者の作業場環境においてイネばか苗病菌が存在しているかを確認した。宮城県内のイネばか苗病の発生地域で、本病の発生経験の有無に関わらず、水稻生産者の作業場環境から、育苗作業の開始前あるいは開始直後にあたる3月下旬から4月上旬にかけてイネ残渣(籾殻、稲わら)、乾燥機周辺の粉じん、育苗ハウスの土壌などを回収し、リアルタイムPCRによる本病原菌の検出を試みた。その結果、籾殻、稲わらあるいはイネ残渣を含む粉じんのいくつかから、本病原菌が検出された。これらは生産者の本病の発生経験の有無に関わらず認められた。一方、育苗ハウスから採取した土壌からは検出されなかった。

〔キーワード〕 イネばか苗病菌, 作業場環境, リアルタイムPCR, 感染源

Key words : Bakanae disease fungus, seed pretreatment workspace, real-time PCR, a source of infection

### 緒 言

宮城県では温湯浸漬による種子消毒が普及するにつれて、イネばか苗病の発生が増加している(中畑ら, 2012)。病原菌は *Fusarium fujikuroi* (入江, 2012; Nirenberg and O'Donnell, 1998) であり、水稻種子を介して次年度育苗時および発病苗の移植で本田に発生する典型的な種子伝染性病害である。本県では発生の増加に伴い、まず種子生産ほ場の審査における対策として、発生ほ場からの胞子の飛散距離を明らかにし、種子生産ほ場周辺で本病が発生した場合、採種してはならない範囲を設定している(畑中ら, 2007; 畑中, 2009)。一方、生産者の育苗時に発生する本病防除技術として、温湯浸漬法の防除効果の安定化を図るための微生物農薬との体系処理(畑中・笹原, 2008)や、育苗工程や育苗様式における本病発生を抑制する管理方法(笹原, 2013)を生産者に指導している。

このように、県内生産者にばか苗病対策を周知した結果、本病の発生は抑えられつつあるものの、未だに問題の収束には至っていない。

本病の伝染源は前述のとおり保菌種子が最も重要とされているが、藤(2013)は本病が多発している近年の状況から、種子予措を行う生産者の作業場に存在す

る籾殻や乾燥調整後に排出される米ぬか、粉じんなどが感染源となる可能性を指摘している。実際、宮城県でも一度ばか苗病を発生させてしまった生産者がその後も毎年発生させてしまう事例や、育苗ハウス内の全ての苗箱にばか苗病が均一に発生してしまう事例、温湯浸漬による種子消毒をした種子が無消毒の種子よりも多発してしまう事例など、種子消毒後の再感染が疑われる発生事例が認められている。

そこで本研究では、生産者の種子予措を行う作業場環境における、イネばか苗病菌の存在の有無をリアルタイムPCRの手法を用いて検討したので、その結果を報告する。

本研究を行うにあたり、登米地域、大崎地域、栗原地域の生産者の方々ならびに各地域農協の担当者の方々には、種子予措を行う作業場環境を種籾の移動経路に沿って見せていただいた。また、宮城県登米農業改良普及センターの佐藤啓一氏(現在、宮城県農業大学校)、庄司正秀氏(現在、宮城県農業大学校)、石森裕貴氏(現在、宮城県古川農業試験場)、酒井球絵氏、宮城県大崎農業改良普及センターの山家いずみ氏(現在、宮城県農産園芸環境課)、田村亘氏(現在、宮城県農産園芸環境課)、佐藤直紀氏、宮城県栗原農業改良普

及センターの渡邊真紀子氏には生産者の紹介選定ならびにサンプリングに同行していただいた。秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学学科教授の藤晋一博士には、イネばか苗病菌の遺伝子解析手法全般にわたり、懇切丁寧なご指導とご助言をいただいた。ここに感謝の意を表する。

## 材料および方法

### I. 開花期接種種籾からのイネばか苗病菌の検出

イネばか苗病菌を検出できるかを確認するため、水稻の開花期（出穂期）にイネばか苗病菌（古川農業試験場保存菌株）の分生子懸濁液を背負い式動力噴霧器で噴霧接種して作成した開花期接種種籾を用いて検討した。種籾を枝梗から脱穀後、2重のビニール袋に入れて手もみで脱芒処理をおこなった。種子と脱穀後の枝梗をコーヒーマイルで粉砕して供試した。加えて、脱芒後の残渣も回収して供試した。

DNAの抽出は、市販のDNA抽出キット（DNAすいすいW、リーゾ社製）を用い、マニュアルに従っておこなった。イネばか苗病菌の検出はリアルタイムPCRシステム（Mx3005P、アジレントテクノロジー社製）を用いてSYBRGreen法によりおこなった。藤（2013）が設計したイネばか苗病菌を特異的に検出するプライマーである Ff-S（5'-CGTGTCAAACCTAAACATTCGA-3'）、Ff-R（5'-AATGACACACATGAGCGCAAC-5'）を用いて、以下の方法でPCR反応をおこなった。1 サンプルあたり 2×Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix を 10  $\mu$ l、20  $\mu$ M の上記プライマーを各 0.25  $\mu$ l、滅菌蒸留水を 8.2  $\mu$ l、ROXを 0.3  $\mu$ l、鋳型DNAを 1  $\mu$ lの計 20  $\mu$ l系とした。鋳型DNAは抽出濃度を 10 倍に希釈して用いた。反応サイクルは、最初の熱変性を 95°C30 秒、95°C5 秒と 62°C20 秒のサイクルを 30 回とした。

### II. 作業場環境からのサンプル回収とイネばか苗病菌の検出

サンプルは 2014 年に 12 人、2015 年は 17 人の生産者の種子予措をおこなう作業場環境から回収した。作業場環境からのサンプル回収は、農協から配送された種籾を保管する場所から、育苗ハウスへ播種後の育苗箱を持ち込むまでの経路上において、3 月下旬から 4 月上旬にかけて生産者ととも回収した。回収は絵筆やプラスプーンでかき集めて紙封筒に回収し、混ざら

ないようにサンプル毎に用具を交換した。サンプルは DNA を抽出するまで回収したままの状態を 10°C の恒温室に保管し、DNA 抽出の前にコーヒーマイルでできる限り粉砕し、50ml のコニカルチューブに入れて保管した。

DNA の抽出は前述の DNA 抽出キット（DNA すいすい W、リーゾ社製）を用い、マニュアルに従っておこなったが、土壌サンプルについては Kageyama et al. (2003) に準じて抽出した。イネばか苗病菌の検出はリアルタイム PCR システム（LightCycler 480 System II、ロシュダイアグノスティックス社製）を用いて SYBRGreen 法によりおこなった。使用するプライマーは同様とし、PCR 反応は ROX を除いて滅菌蒸留水を 8.5  $\mu$ l とした反応系に修正し、反応サイクルは、同様であるが、サイクル数を最大 45 回とした。各サンプルは、少なくとも 3 回 DNA 抽出から PCR 反応までおこなった。

## 結果

### I. 開花期接種種籾からのイネばか苗病菌の検出

イネばか苗病菌を開花期に接種した種籾とその枝梗、脱芒後残渣からリアルタイム PCR により検出を試みたところ、増幅産物にイネばか苗病菌の特徴が認められ、検出が可能であった。（データ省略）。

### II. 作業場環境からのイネばか苗病菌の検出

協力いただいた生産者の作業場環境、具体的には種子保管庫、脱穀舎、浸種場所、催芽場所、家畜を飼養している場合は畜舎、育苗ハウスから、籾殻、稲わら、穀類乾燥機周辺の粉じん、稲体を含んだ残渣、籾殻くん炭および播種後に残った種籾、ハウスの土壌が回収できた。これらからリアルタイム PCR によりイネばか苗病菌を検出した結果を第 1 表に示した。

回収したサンプルの中ではばか苗病菌の検出頻度が最も高かったのは、調査した 2 年間の合計で籾殻であった（18 サンプル中 11 サンプル）。稲わら（28 サンプル中 3 サンプル）、稲体を含んでいる残渣（20 サンプル中 1 サンプル）、粉じん（15 サンプル中 2 サンプル）、籾殻くん炭（4 サンプル中 1 サンプル）からも検出されたが、育苗ハウスの土壌や育苗ハウスの外の稲わらからは検出されなかった。

作業場環境から検出される事例は、は、育苗時にばか苗病を発生させた経験がある生産者に多く見られる

第1表 作業場環境から採集したイネばか苗病菌のリアルタイムPCRによる検出結果

A:2014

調査地域	調査農家	2013年 ばか苗 発生歴	採集した作業場環境								
			浸種/催芽/保管庫/脱穀舎/牛舎					育苗ハウス			
			稲わら	粉じん	残渣(イネ含む)	籾殻	くん炭	残り種子	稲わら(内)	稲わら(外)	籾殻
大崎	A	有	-	-	-	+		+++	-	-	-
	B	無	-/-	-				-	-	-	-
	C	無	-	-							-/-
	D	無		-	-	+++					-
登米	E	有		-/-	-		-				-
	F	有	-			+++					-
	G	無	-	-/-/-							
	H	有	-		-/-	+		-			
	I	有	++		-/-	++/+++	+				-/-/-
	J	有	+	+	+++	-		+++		+++	-
	K	無	-			+++					
	L	有						-		-	-

B:2015

調査地域	調査農家	2014年 ばか苗 発生歴	採集した作業場環境							
			浸種/催芽/保管庫/脱穀舎/牛舎							
			稲わら	粉じん(ぬか)	残渣(イネ含む)	籾殻	くん炭	残り種子		
栗原	A	有	-		-/-	-/+++				
	B	有			-					
	C	無	-							-
	D	無								-/-
大崎	E	無	-		-/-					
	F	無	-	-	-	-				
	G	有	-		-/-					
	H	無	-							
登米	I	無				-				
	J	無	-/-							-
	K	無	-							+
	L	有	-		-					
	M	無	-		-					-
	N	有	-		-	+++				
	O	有	-			++				
	P	有	-/-							
Q	有	-	-/-/-/++	-					-	+

注1) 浸種/催芽/保管倉庫/脱穀舎/牛舎は、いずれかの作業場において採集したサンプルを解析した。

いずれも温湯浸漬済みの種子が播種されるまでの工程で通る場所を選定した。

注2) サンプルの解析は3回おこなった。-は1回も検出されなかったことを示す。+は付された回数分検出されたことを示す。/で区切られたものは、サンプルが2つ以上あることを示す。

と感じたが、発生させた経験が無い生産者の作業場環境からも検出される場合があり、本病の発病経験の有無との関係は判然としなかった。

### 考 察

イネばか苗病の防除は化学農薬による種子消毒が最も有効な手段であるが、ベノミル剤に対する耐性菌の出現(小川・武田, 1988; 高橋ら, 1986 など)や、現在の主要な種子消毒剤のEBI系薬剤に対する耐性の発達が懸念されており、化学農薬に依存しない種子消毒法が求められている。温湯浸漬法による種子消毒は、一般に60~62°C10分の処理が有効な温度とされ(金子, 2008)、農薬節減栽培において全国的にも注目される技術となっている。しかしながら本技術の普及に伴い本病の発生も全国的に増加している。著者は、温湯浸漬による種子消毒普及後の本病多発の原因の一つ

として、温湯浸漬した種子がばか苗病菌に再感染し、発病苗が多くなることを明らかにした(鈴木, 2017)。そこで本研究では、再感染の場面がどこであるかを明らかにすることを目的に、温湯浸漬済みの種子が生産者の手にわたり、は種されて育苗ハウスに行き着くまでの作業場環境における伝染源となりうるものの探索を試みた。

まず、作業場環境においてばか苗病菌の検出が可能かどうかを確認するため、保菌している有機物、すなわち開花期接種種籾と種籾調整時に出てくる枝梗、芒からの検出を試みた。その結果、藤(2013)が設計したイネばか苗病菌を検出する特異的プライマーを用い、リアルタイムPCRでこれらからの検出が可能であった。

次に、生産者の作業場環境から実際にイネばか苗病菌を保菌しているようなイネの残渣を回収し、同様にリ

アルタイム PCR による検出を試みた。その結果、籾殻から高い頻度でばか苗病菌が検出された。また、頻度は低くなるものの、稲わらや稲体を含む残渣、籾殻くん炭からも検出された。一方、は種後に育苗箱を運び込むハウスの土壌ではばか苗病菌が検出されなかったことから、生産者が懸念している育苗ハウスの土壌からの伝染はほとんどないと考えられる。実際には、これらのイネの残渣が直接温湯消毒済みの種子と接触することはほとんどないと思われ、これらの残渣からばか苗病菌が種子に伝染するためには空气中を移動する必要がある。藤ら (2015) はこの点に関して、生産者施設内に薬剤添加培地を設置することで空气中のばか苗病菌の捕捉に成功しており、施設内では空气中にも浮遊していることを明らかにしている。宮城県でも同様の現象は起きていることが推察される。

以上の結果から、温湯浸漬済みの種子が移動する作業場環境では、ばか苗病菌を保菌しているイネの残渣が普通に存在していること、籾殻と稲わらが重要であることが明らかとなった。本病を発生させていない生産者は、作業場の資材や育苗に用いる浸種桶や催芽器等の機材が整理して保管されていて、籾殻や稲わらなども種子予措作業をおこなう場所と区別して保管されていることが多かった。作業場の清掃もされていた。このことから、ばか苗病の発生を抑制するためには、種子消毒だけでなく作業場環境の衛生管理を徹底することが必要であると考えられる。

今回の結果は、温湯浸漬済みの種子を扱う生産者に対し、種子の発病リスク (鈴木, 2017) とともに作業場環境の衛生管理を徹底することを情報として提供しているが、生産現場での防除対策情報としては不十分と考えている。温湯浸漬法はお湯に一定温度・時間に浸漬するだけで複数の種子伝染性病害を同時に防除できる非常に優れた技術である。また、加熱水蒸気や高温加湿空気を利用した新たな種子消毒法 (越智ら, 2013; 前田ら, 2014) も防除効果は優れている。しかしながら、これらの技術は熱で種子を消毒する点で殺菌の原理は同じであり、ばか苗病菌が存在する環境下に置かれれば、再感染や発病するリスクは変わらないと考えられる。温湯消毒済みの種子でイネばか苗病を発生させないいくつかの管理方法 (笹原, 2013; 井田・北澤, 2015) が示されているものの、本病がたびたび多発していることを考えると、作業場環境で種子伝染以外の伝染経路が存在する可能性は否定できない。病

害防除の基本は伝染源の遮断であり、仮に種子以外の伝染経路が存在し、それが今回示した作業場環境の籾殻等のイネ残渣であれば、これらを持ち込まないことが最も重要となる。すなわち、本田での発病をできる限り抑えることが必要であり、そのためには処理後も残効性を有する化学農薬による種子消毒を実施し、育苗時の発病と本田への持ち込みを徹底的に防ぐことが重要と考えられる。健全種子生産においてばか苗病問題が必ずセットとなることを考えると、岩手県のように複数年化学農薬による種子消毒に戻し、全県的にばか苗病の密度を下げるような対策を打つ時期にきているのかもしれない。

### 引用文献

- 1) 藤 晋一. 2013. 化学農薬を用いない水稲種子消毒法の普及による諸問題とその対策. 植物防疫 67 : 223-227.
- 2) 藤 晋一, 工藤 学, 佐々木南海. 2015. イネばか苗病制御技術の開発(1) イネばか苗病菌の薬剤感受性が種子消毒の効果に及ぼす影響と農家施設のモニタリング. 秋田県立大学ウェブジャーナル B 2 : 181-186.
- 3) 畑中教子. 2009. イネばか苗病の多発圃場が周辺圃場の保菌率に与える影響. 植物防疫 63 (3) : 131-134.
- 4) 畑中教子, 笹原剛志. 2008. イネばか苗病潜伏感染苗の移植後の発病について. 北日本病虫研報 59 : 226 (講要).
- 5) 畑中教子, 畑谷みどり, 笹原剛志. 2007. イネばか苗病の多発圃場が周辺圃場の種子保菌率に及ぼす影響. 北日本病虫研報 58 : 25-29.
- 6) 早坂 剛, 石黒清秀, 渋谷圭治, 生井恒雄. 2001. 数種のイネ種子伝染性病害を対象とした温湯種子消毒. 日植病報 67 : 26-32.
- 7) 井田 陽介, 北澤 健. 2015. 滋賀県における育苗時のイネばか苗病多発の原因と対策. 日本農薬学会誌 40 : 8-11.
- 8) 入江和己. 2011. フザリウム分類と生態・防除 - (駒田 亘, 小川 奎, 青木孝之編). 東京. 全国農村教育協会. p676-677.
- 9) 小川勝美, 武田真一. 1988. ベノミル耐性ばか苗病菌の出現と防除法. 岩手農試研報 27 : 52-67.
- 10) Kageyama, K., Komatsu, T., Suga, H.. 2003.

Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. JGPP 63: 153-160.

- 11) 金子 誠. 2008. 水稻種子消毒における温湯浸漬処理技術の変遷. 関西病虫研報 50 : 29-31.
  - 12) 高橋昭二, 田中 孝, 佐久間比路子. 1986. ベノミル耐性イネばか苗病菌の発生実態と防除対策. 山形農試研報 21 : 27-44.
  - 13) 中畑庸子, 渡邊真紀子, 辻 英明, 鈴木智貴. 2012. 宮城県における近年の種子消毒の変遷とイネばか苗病発生の関係. 北日本病虫研報 63:239 (講要).
  - 14) Nirenberg, H. I. and O'Donnell, K.. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 434-458.
  - 15) 前田勝行, 宮川典子, 坂田智子, 松尾多恵子, 富士 真. 2014. 水稻種子伝染性病害に対する高温加湿空気の防除効果. 日植病報 80 : 19 (講要).
  - 16) 越智昭彦, 野田崇啓, 日高靖之, 伊興田浩志, 中村 透. 2013. 過熱水蒸気を利用したイネいもち病およびばか苗病の種子消毒効果. 北日本病虫研報 64 : 29-34.
  - 17) 笹原教子. 2013. 育苗管理方法がイネばか苗病の発生に及ぼす影響. 宮城古川農試報 11 : 85-92.
  - 18) 鈴木智貴. 2017. 温湯浸漬処理後の水稻種子におけるイネばか苗病菌感受性と育苗工程のリスク評価. 宮城古川農試報 12 : 73-80.
-

## Detection of the Rice Bakanae Disease Fungus in Rice Pretreatment Workspace

Tomotaka SUZUKI, Norichika MIYANO

### Summary

This study was investigated the existence of the rice bakanae disease fungus in rice seed pretreatment workspace used by rice producer before the seedlings are raised between March and the beginning of April. The fungus was detected by real-time PCR from residual substance of the rice, such as the husk, rice straw and dust in conjunction with the rice in workspace, but not in the soil in greenhouse nurseries. The results of this investigation were not observed to have a link to producers' experience with the occurrence of the bakanae disease. The results suggest the aforementioned residue is potentially a source of infection.