

植物防疫基礎講座

植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(2)

イネいもち病菌

秋田県病害虫除除所 ^{ふか}深 ^や谷 ^{とみ}富 ^お夫

はじめに

我が国では1971年に山形県でカスガマイシン(以下、KSMと称す)耐性菌、1976年には新潟県でIBP耐性菌が初めて確認され(三浦, 1984; 矢尾板, 1978; KATAGIRI et al., 1980), KSMとプラストサイジンSの間に、また、IBPとEDDP, イソプロチオラン(以下、IPTと称す)の間にそれぞれ交差耐性の現象がみられることが明らかとなった(桜井, 1975; 中川・梅原, 1981; 飯島・寺沢, 1987; 深谷, 1987; 本蔵ら, 1987)。その後、各地でこれら耐性菌の出現による薬剤の防除効果の減退が問題となった。しかし、それにかかわる研究が進み、その成果が防除指導に浸透して、現在ではKSM, IBPの両剤やこれらと交差耐性の関係にある薬剤の再使用が可能となった地域がみられている。耐性菌に関しては多くの研究者が携わり、検定方法に関する成果も数多く報告されている。ここでは、検定の前処理と、簡易検定法をも含めた比較的操作の容易なKSM, IBP感受性の検定方法について紹介する。また、EDDP, IPTについても参考までに触れてみたい。

なお、ここで紹介する検定法とそれにかかわる操作方法は筆者の経験に基づくものであり、これまで報告されている検定方法などとは若干の違いがある。

1 標本の採集と保存

① 標本採集地点の選定は検定結果の利用目的によって異なるが、耐性菌対策のための分布調査は1,000 ha程の狭い面積を単位として、標本採集地点を抽出することが望ましい(深谷・小林, 1982)。

② 葉いもち病斑は急性型であるほど分生胞子の形成が良好である。病斑が拡大途中にある標本を採集するが、褐点型病斑や伸びきった古い病斑は避ける。採集したら葉が巻くれないよう、素早く適当な長さに切って、葉の両端をセロテープかホチキスなどで台紙に固定する。

③ 穂いもちでは、病斑の融合により耐性菌と感性菌が混在するおそれがあるので、採集にあたっては穂首節

位病斑と枝梗いもちが拡大して枯れ下がった病斑が融合しないものを選ぶ(深谷・小林, 1983)。罹病穂を採集する場合は発病して間もないものを選ぶ。

分生胞子を直接供試する検定には靱いもちや枝梗いもちよりも分生胞子形成量が多い穂首節位の病斑を用いる。

④ 採集した病斑は陰干した後、冷蔵庫で乾燥状態を保ち保存する。保存状態がよければ数年は使用に耐えうる。

2 病斑上での新たな分生胞子の形成方法

純粋培養のための単胞子分離や病斑上の分生胞子を直接感受性検定に用いる場合には、分生胞子の発芽揃が均一であることが必要である。

(1) 葉いもち病斑

切り取った病斑部の表面を1%素寒天の平板上に張り付け、容器はラップフィルムなどで覆いをする。ただし、病斑上に水滴がつかないように、3 cm間隔でフィルムに2~3 mmの穴をあける。これを、25°C、蛍光灯照射下に24~48時間保ち、分生胞子の形成を促す。

(2) 穂いもち病斑

病斑部位を適当な長さに切り取り、表面を流水で洗浄した後、30~60分間水道水に漬ける。その後、吸湿性の高い紙で手際よく水滴を拭き取り、湿室に並べ(標本は水滴がつかないように乾いたスライドグラスの上に並べる)、標本が乾燥しないようふたをして28°Cで48時間保つ。靱の場合水道水に漬ける時間を20~30分程度と短くする。

葉いもち、穂いもち共に病斑部位に水滴が付着すると分生胞子の形成が悪く、また、雑菌(特に細菌類)の繁殖がおお盛になるので注意する。

3 供試菌株の前培養

検定に菌糸を用いる場合は、単胞子分離(ミクロマニピュレータなどによる分離、また平板に分生胞子懸濁液を流し込み、発芽生長した単胞子由来のコロニーをかきとる方法などによる)した菌株を使用する。

純粋培養した菌株はペトリ皿に2 mmの厚さに流し込んだイネ生葉煎汁寒天培地で1週間程培養する。ここで使用する培地のpHは調整する必要がない。

検定には先端部の新しい菌叢を供試し、菌叢ディスクを移植する場合は、直径4～5mmのコルクボーラで抜き取ったものを用いる。

4 検定培地の調製方法

(1) イネ生葉煎汁寒天培地の調製方法

PDA培地での検定では感受性が鈍くなる場合があるので、検定にはイネ生葉煎汁寒天培地を用いる(山村ら, 1975)。

薬剤散布されていない若いイネ葉(この場合、イネ苗葉を用いてもよい)を用い、蒸留水で2時間煮沸し、生葉100g当たり2,000mlの煎汁をつくる。これにサッカロース2%、寒天2%になるように添加するが、「2次分枝法」や「分枝法」で検定する場合は、サッカロース1%、寒天1%とする。

(2) pHの調整

供試薬剤によって検定培地の至適pHが異なるが、これについては検定方法の項で述べる。おのおのpHは緩衝液(McIlvaine氏緩衝液pH6.0:M/5 NaHPO₄ 12.63ml, M/10クエン酸7.37ml; pH5.0:M/5 NaHPO₄ 10.30ml, M/10クエン酸9.70ml)によって調整する。しかし、pHが低い場合は培地の殺菌や溶かす際の加熱で、平板の作製のためにペトリ皿に流し込んだ培地が固まり難くなるので注意する。pH4.0の場合は乳酸水溶液を用い、ペトリ皿に流し込む直前に培地に添加して調整する。

(3) 薬剤の調製と培地への添加

おのおの供試薬剤は原体を用いる。

KSMの原体は殺菌水を用いて水溶液を調製する。

IBPの原体はアセトンに溶解させる(EDDP, IPTも同様)。アセトンには殺菌作用があるので、分生胞子の発芽や菌糸の生育に支障をきたすことがないように添加は培地容量の1%とする。

薬液は培地の温度が60°C以下になってから添加するが、薬剤がよく混ざるようにコルペンで混合してからペトリ皿に流し込む。

5 検定方法

検定の基本的操作はKSM, IBPとも同じであるが、培地のpH, 接種(移植), 培養時間などが若干異なる。

(1) KSM

① 菌叢生育抑制法

pH5.0調整した培地にKSM原体を0μg/ml及び10μg/ml添加した平板を作製する。前培養で得た寒天ディスクの菌叢面を平板上に接するように移植し、28°Cで5日間培養する(桜井, 1975)。

② 平板希釈法(MIC法)

pH5.0に調整した培地にKSM原体を、0μg/ml及び12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800μg/mlとなるように添加し、平板を作製する。これに前培養して形成させた菌叢を1～2mm程の塊になるようにかき取って移植し、28°Cで24時間培養する。

なお、前培養した菌叢をかき取る際、寒天片が入らないように注意する。寒天片上で菌糸が伸長し、培地上での菌糸の伸長の識別が困難となる場合があるためである。したがって、ここでは菌叢寒天ディスクは使用しない(桜井, 1975)。

③ 「2次分枝法」(簡易検定法)

pH4.0に調整した培地にKSM原体を、0μg/ml及び12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800μg/mlとなるように添加し、平板を作製する。これに、病斑上に形成させた新鮮な分生胞子を塗抹接種し、28°Cで20時間培養する。本検定法は全期間を通じて無菌的操作を必要としない(深谷・小林, 1983)。

(2) IBP

① 菌叢生育抑制法

pH6.0に調整した培地にIBP原体が0μg/ml及び10μg/mlになるように添加した平板を作製する(EDDP, IPTの場合の添加量は0μg/ml及び5μg/mlとする)。前培養で得た寒天ディスクの菌叢面を平板上に接するように移植し、28°Cで5日間培養する。

② 平板希釈法(MIC法)

pH6.0に調整した培地にIBP原体を、0μg/ml及び5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100μg/ml添加した平板を作製する(EDDP, IPTの場合の添加量は0及び2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24μg/mlとする)。前培養して得た寒天ディスクの菌叢面を平板上に接するように移植し、28°Cで五日間培養する。

③ 「分枝法」(簡易検定法)

硫酸ストレプトマイシン5,000μg/mlを添加し、pH6.0に調整した培地を直径9cmのペトリ皿に10ml分注し、平板を作製する。これに、病斑上の分生胞子を塗抹接種し、28°Cで3時間培養して発芽を促す。この前培養したものを、IBP原体が0μg/ml及び2, 4, 6, 8, 10, 14, 16μg/mlになるように添加して直径9cmのペトリ皿に10ml分注した平板上に、分生胞子面が接するように寒天ディスクを移植して28°Cで21時間培養する。本検定法は全期間を通じて無菌的操作を必要としない(深谷, 1992)。

6 耐性菌の判定基準

平板希釈法や「2次分枝法」及び「分枝法」において

はおのおの、菌株の薬剤感受性値の濃度別分布状態、また、菌叢生育抑制法においては各菌株の菌叢生育抑制率の分布状態が耐性菌と感性菌の2群に大別されることが前提条件となる。

(1) 菌叢生育抑制法

生育した菌叢の直径から移植に用いた菌叢ディスクの直径を差し引いた長さを求め、各菌株について薬剤無添加培地上での菌叢の伸長と対比し薬剤添加培地上での菌叢生育抑制率を算出する。これにより、分布曲線を描き耐性菌群と感性菌群を区分する。

表-1には、1988年に秋田県全域から系統抽出により採集したいもち病罹病穂から分離した菌株に対するIBPの菌叢生育抑制率を示した。供試菌株は表のように2群に分かれ、耐性菌群に区分される菌株は抑制率が10%以下に存在した。また、KSMにおいてはさらに明りょうな2峰性となり、IBPの場合と同様に、耐性菌群に対するKSMの抑制率は10%以下であった。

(2) 平板希釈法 (MIC法)

検定平板培地上において各菌株の新たな菌糸の伸長が認められなくなる最小の濃度を求め、感受性の分布曲線を描き耐性菌と感性菌を区分する。

図-1は1986年に秋田県全域から系統抽出により採集したいもち病罹病穂から分離した菌株について検定した結果である。これに示すように、KSM, IBP, EDDP, IPTに対する反応からいずれも耐性菌群と感性菌群の2群に分けられた。KSM, IBP, EDDPは耐性菌群と感性菌群の境界の濃度幅が広く、各薬剤のMIC値がKSMは400 $\mu\text{g/ml}$, IBPは75 $\mu\text{g/ml}$, EDDPは22 $\mu\text{g/ml}$ 以上の菌株を耐性菌と判断できた。したがって、耐性の検定に

は、薬剤を段階的に希釈して濃度区をいくつか設けることが望ましいが、止むを得ず一濃度で耐性菌と感性菌を識別する場合には、その境界の濃度としてKSMは100 $\mu\text{g/ml}$, IBPは40 $\mu\text{g/ml}$, EDDPは18 $\mu\text{g/ml}$ の各一濃度の培地で検定し、本培地上で新たに菌糸の伸長が認められる菌株を耐性菌と判定することができる。しかし、IPTにおいては感受性が中間型の菌株も認められたことから、一濃度による検定は適当ではなく、数濃度の培地で検定する。この結果を基に感受性分布曲線を描き、耐性菌を判定する。検定結果を防除対策上の資料とする場合には中間型の菌株を耐性菌と判定するのが無難であろう。ただし、圃場分離株のIPT感受性については筆者らの見解とは異なり、一群に収れんするという報告もある(Miyagi et al., 1983)。

(3) 「2次分枝法」

検鏡により、各菌株の2次分枝(発芽管から分岐した菌糸を1次分枝、1次分枝から分岐した菌糸を2次分枝とする)をもつ分生孢子がまったく認められない濃度(MICsb)を求め、感受性の分布曲線を描き耐性菌と感性菌を区分する。

表-1 2次分枝形成抑制最低濃度(MICsb)と最小生育阻止濃度(MIC)によるカスガマイシン感受性の頻度分布

MIC	MICsb					
	12 $\mu\text{g/ml} \geq$	25	50	100	200 \leq	合計
12 $\mu\text{g/ml} \geq$	71	17	1			89
25	21	5				26
50	2	1	2			5
100						
200					6	6
400					18	18
800						
合計	94	23	3		24	144

- 1) 1981年に秋田県全域から系統抽出して採集した穂いもち病罹病上の分生孢子を単孢子分離して培養した菌株を供試。
- 2) 表中の数値は菌株数を示す。

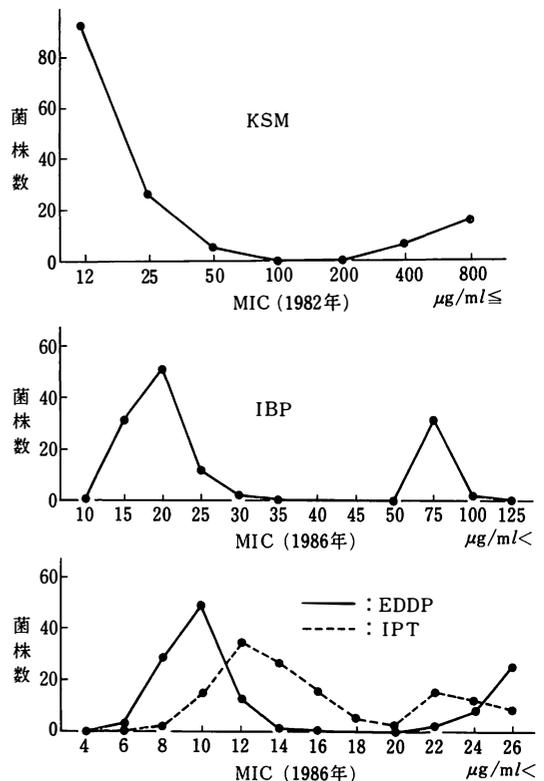


図-1 秋田県全域から系統抽出により採集した穂いもち病罹病から分離した菌株の平板希釈法によるMIC値の分布

表-2 各菌株の分枝をもつ分生胞子が50%未満となる最低濃度(MIC b50)と10 µg/ml添加培地上での菌叢生育抑制率によるIBP感受性の頻度分布

抑制率	MICsb						合計
	4 µg/ml ≥	6	8	10	12	14	
0~10%					24	5	29
11~20							
21~30		6	1				7
31~40	1	22	10				33
41~50	1	29	9				39
51~100		31	6				37
合計	2	88	26		24	5	145

- 1) 1988年に秋田県全域から系統抽出して採集した穂いもち病斑上の分生胞子を分離して培養した菌株を供試。
- 2) 表中の数値は菌株数を示す。

表-1には1981年に秋田県全域から系統抽出により採集したいもち病罹病穂から分離した菌株のMICsbと平板希釈法によるMIC値とを対比して示した。両者は耐性菌と感性菌が交わることなく、いずれも2峰性の分布曲線が得られ、2次分枝法においてはMICsbが400 µg/ml以上の菌株が耐性菌となる。したがって、耐性菌、感菌のみの識別の場合は、その境界となるKSM濃度が100 µg/mlの培地で検定し、2次分枝をもつ分生胞子が存在すれば、その菌株は耐性菌と判定する。

(4) 「分枝法」

鏡検により、各菌株の分枝をもつ分生胞子が50%未満になるIBP濃度(MICb50)を求め、感受性の分布曲線を描き、耐性菌、感性菌を判定する。

表-2には1988年に秋田県全域から系統抽出により採集したいもち病罹病穂から分離した菌株のMICb50と菌叢生育抑制率を対比して示した。ここでも両者は耐性菌と感性菌が交わることなく、いずれも2峰性の分布曲線が得られ、分枝法ではMICb50が12 µg/ml以上の菌株が耐性菌と判定できた。したがって、耐性菌、感性菌のみの識別であれば、その境界としてIBP濃度が10 µg/mlの培地で検定し、分枝をもつ分生胞子が50%以上存在すれば、その菌株を耐性菌と判定する。

7 in vitroにおける感受性の判定結果と防除効果との関係

飯島・寺沢(1987)はイネ幼苗での防除試験で、平板希釈法によってMIC100 µg/ml以上と判定されたKSM耐性菌群に属する菌株に対してはKSM剤の予防及び治療効果が著しく低下し、また、MIC40 µg/ml以上のIBP耐性菌群に属する菌株に対してはIBP剤の予防及び治療効果が著しく低下することを報告している。筆

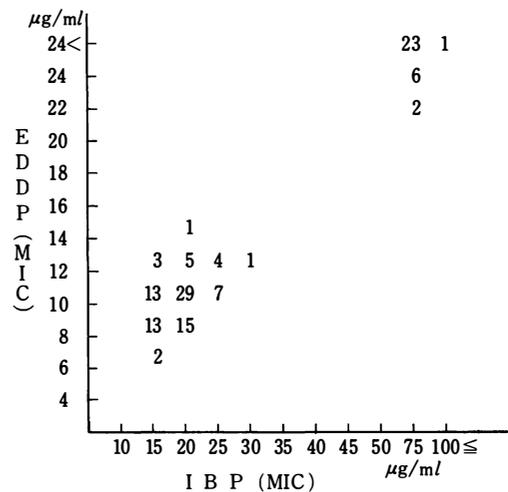
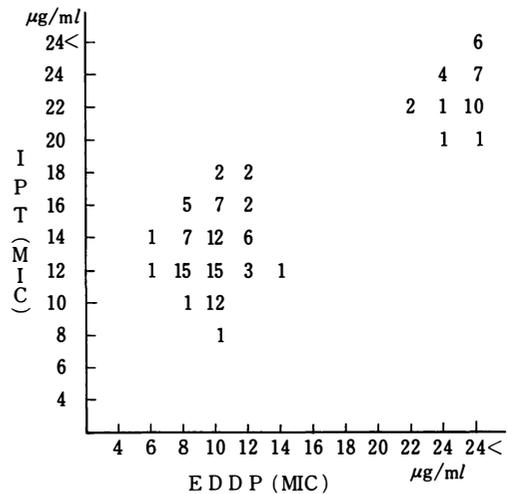
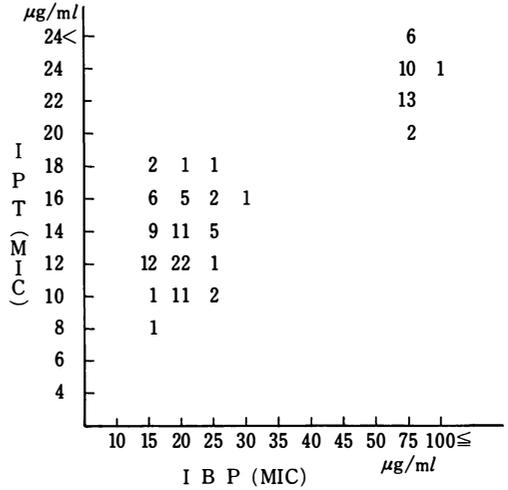


図-2 IBP, EDDP及びIPTのいもち病菌に対するMIC値の相互関係図中の数字は菌株を示す。

者らも供試菌株が少ない試験ではあるが、ほぼ同様の結果を得ている。

以上のことから、KSM 及び IBP に対する感受性検定法としての平板希釈法の結果はこれらの薬剤の防除効果を反映するものといえる。さらに、これと、各検定法による判定結果とを対比したところ、耐性菌と感性菌が交わることはなかった。しかし、平板希釈法や菌叢生育抑制法で同一の感受性値を示す菌株は、簡易検定法である「2次分枝法」や「分枝法」においては広い薬剤濃度域に存在し、これらの検定法の間で直線的な関係が得られなかった。未発表ではあるが、平板希釈法や菌叢生育抑制法の関係も同様であった。このことは、飯島・寺沢 (1987) の IBP における平板希釈法と防除試験結果の関係にもみられており、検定の精度についてはいまだ不明な点がある。

なお、飯島・寺沢 (1987) は、EDDP や IPT 感受性の検定においては感性菌群に存在しているにもかかわらず、IBP には耐性菌群に属する菌株があるとし、これに対する EDDP 剤や IPT 剤の治療効果が低いことを報告している。これに関しては、本蔵ら (1987) の試験結果とも一致している。しかし、このように数種の薬剤に異なった感受性を示す菌株は非常に少ない (図-2) ことから、IBP の代わりに仮に EDDP や IPT で検定しても防除対策上、大きな支障はないものと考えられる。

8 検定における留意点

(1) 検定培地の組成のいかんによって菌の薬剤感受性値が異なってくる。特に pH の調整には注意する。

KSM の検定において、「2次分枝法」では pH4.0 に、その他の方法では pH5.0 に調整する。pH が高いと薬剤感受性が鈍くなる。

一方、IBP, EDDP, IPT の検定では pH6.0 に調整する。pH が低いと薬剤感受性が鈍る傾向がみられるためである。飯島・寺沢 (1987) の IBP における菌叢生育抑制法や平板希釈法での検定結果によれば、感性菌群や耐性菌群の感受性値の幅が筆者らの検定結果よりも広く、しかも感性菌群と耐性菌群の境界濃度域が狭かった。これは、pH5.0 に調整した培地の使用が関係しているものと考えられる。

(2) KSM 感受性検定を平板希釈法で行う際、菌叢寒天ディスクを使用すると感性菌の感受性が鈍くなり、2峰性の分布曲線を描かない場合があり、片桐・上杉 (1974) や三浦 (1984) が本検定法が不適であると指摘しているのはこのためであると推測される。したがって、接種には菌叢のみかき取って使用するが、この場合、若干の練習と経験が必要である。

(3) 移植培養後は速やかに調査、判定する。時間の経過とともに菌糸が伸長するので注意する。KSM 検定の平板希釈法や2次分枝法ではラクトフェノールで固定する。しかし、寒天ディスクを用いる検定の場合は固定液が中まで浸透しないので、冷蔵庫などで冷蔵保存する。

(4) 検鏡で判定する分枝法や2次分枝法ではペトリ皿の裏面や移植したディスクの上から観察できるように対物レンズの作動距離の長い顕微鏡が必要である。

おわりに

薬剤の防除効果の減退は、主として耐性菌株率に負うといわれており (伊藤ら, 1974), 耐性菌対策のための検定は統計的に信頼性の高い結果が求められる。いきおい、耐性菌分布調査においては多数の標本の検定が必要となる。したがって、ここで求められる精度の高い検定法は、耐性菌と感性菌とを明確に識別でき、しかも簡便で能率的な方法といえよう。

引用文献

- 1) 深谷富夫 (1987): 日植病報 53: 400 (講要).
- 2) ——— (1992): 北日本病虫研報 43: 21~23.
- 3) ———・小林次郎 (1982): 同上 33: 25~28.
- 4) ——— (1983): 同上 34: 91~94.
- 5) 本蔵良三ら (1987): 同上 38: 19~22.
- 6) 飯島章彦・寺沢 租 (1987): 長野農事試報 44: 39~94.
- 7) 伊藤 弘ら (1974): 日植病報 40: 220 (講要).
- 8) 片桐政子・上杉康彦 (1974): 同上 40: 106~107.
- 9) KATAGIRI, M. et al. (1980): J. Pesticide Sci. 5: 417~421.
- 10) 三浦春夫 (1984): 山形農試特別研報 14: 1~44.
- 11) Miyagi, Y. et al. (1983): J. Pesticide Sci. 8: 81~86.
- 12) 中川俊昭・梅原吉広 (1981): 北陸病虫研報 29: 60~63.
- 13) 桜井 寿 (1975): 植物防疫 29(5): 206~212.
- 14) 山村宏志ら (1975): 日植病報 41: 303 (講要).
- 15) 矢尾板恒雄ら (1978): 同上 4: 401~402 (講要).