

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(3)

イネばか苗病菌

兵庫県立中央農業技術センター 入江和己
 岡山県立農業試験場 いの井 うえ 幸 じ次

—ベンゾイミダゾール剤—

はじめに

イネの種子伝染性病害を対象にチウラム・ベノミルが1973年に農薬として登録され、ベンゾイミダゾール剤が全国的に使用されて以降、ばか苗病の発生は鎮静化した。しかし、1980年にベノミル耐性菌が小川・諏訪(1981)や北村ら(1982)によって発見されて間もなく、1984年にばか苗病が突如全国的に多発生した。その後、ベノミル耐性菌の発現がばか苗病の多発生の一因であることが明らかとなったが、1987年にはベノミル耐性菌が既に37道府県において認められ(吉野, 1988)、種子の流通が広域化、活発化した現在では、ベノミル耐性菌は普遍的に分布しているとみられる。

ベンゾイミダゾール剤にはベノミルのほかにチオファネートメチルやチアベンダゾールもあるが、いずれもベノミルと交差耐性が認められるので、ここではベノミルに対する感受性検定法について記載する。

1 検定材料の調製

ばか苗病菌の分離材料としては種子、苗、本田罹病株があるが、分離材料は目的や状況に応じて選択する。各分離材料ともエタノール70%液に数秒、アンチホルミン10倍液に2, 3分浸漬して表面消毒し、滅菌水で洗った後次の処理に移る。

高率に保菌していることがあらかじめわかっている種子であれば、種子を選択培地(駒田培地)に置いて直接分離する。しかし、保菌率が不明か低い種子を供試した場合、大型の容器に水を含ませた沓紙を敷いて種子を播き、種子の周囲に発育した菌を分離する。

苗からの分離は根や種子にばか苗病菌に特有の赤紫色の菌叢が認められる徒長苗を選び、葉鞘基部を供する。また、本田罹病株も同様に葉鞘基部を供するが、泥が付着しているのでよく水洗する。いずれも、表面消毒した

後、選択培地に置床するか温室に置いて組織上に形成させた菌を分離する。

組織分離あるいは孢子塊によって分離して得られた菌を検定に用いても実用上差つかえないと思われるが、これらの場合には感受性の違う菌株が混在している可能性があるため、できれば単孢子分離菌を使用する。単孢子分離は、顕微鏡下で直接釣り菌するか、常法に基づいて培地上の単孢子コロニーを移植する。

2 検定方法

検定は、分離菌の前培養→検定培地への移植→培養→調査の手順で行い、寒天希釈法によってMIC(最小生育阻止濃度)を求める。前培養及び検定の培地は、培地の成分による誤差を抑え、再現性を高めるために、市販のPDA培地(DIFCOかNissui)を使用し、pHを7に調整する。

① 分離菌の前培養：28℃前後で7~10日間培養する。長期間培養したものは活性が低下するおそれがあるので、使用は避ける。検定培地への移植は菌叢の周縁部分を炎熱滅菌し、冷却したコルクボーラーで打ち抜き、菌叢面を下にして検定培地と接するように置く。

② 検定培地の調製：市販のベノミル50%水和剤を蒸留水に懸濁させ、所定の検定濃度よりも10倍高い濃度の薬液を調製し、容量比で薬液の9倍量の培地に添加する。例えば、100 µg/mlの検定培地を作るには、1,000 µg/ml(水和剤500倍液)の薬液10 mlを培地90 mlに添加する。ベノミル水和剤は水への懸垂性がよくないので、薬液はスターラーでかくはんしながら、均一に拡散させる必要がある。薬液を添加した培地はよく混和し、120℃で15分間殺菌する。また、シャーレへ培地を流し込むときも十分にかくはんしながら行う。

③ 検定濃度：MICの頻度分布曲線を求める場合は、1,600 µg/mlを最高に2倍段階希釈で800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78(各 µg/ml)を設定する。検定作業の能率を高める目的であれば、10 µg/mlの1濃度だけ設定し、この濃度で菌糸が発育すれば耐性、発育しなければ感受性と判定する。なお、100 µg/mlと1,000 µg/mlを加えると耐性程度の判

Methods for Monitoring Fungicide Resistance—Rice “Bakanae” disease (*Gibberella fujikuroi*).

By Kazumi IRIE and Kouji INOUE

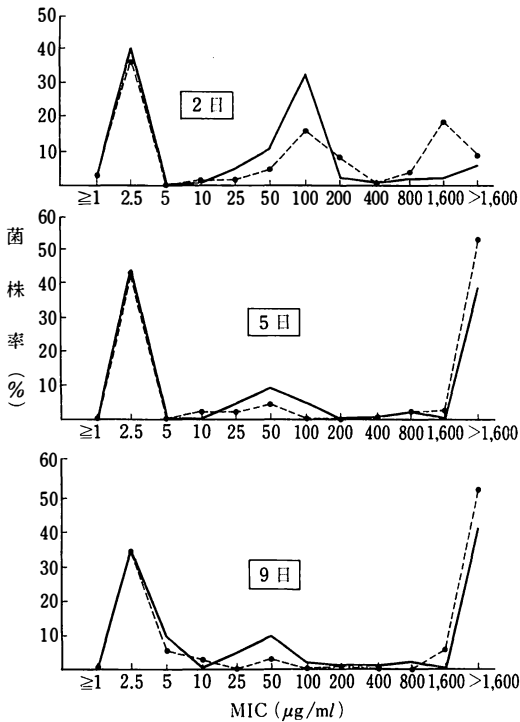


図-1 培養日数と MIC の頻度分布の変化

—：菌糸の発育がきわめてわずかな状態(±)と判定した MIC，……：±を+と判定した MIC

別に利用でき、精度も向上する。

④ 検定培地での培養日数：培養は 28°Cで行う。MIC は培養日数によって大きく変動し、培養 2 日後と 5 日後では大きな差が認められる(図-1)。したがって、感受性と判定される MIC・2.5 μg/ml のピークが変動しないで、頻度分布のパターンが安定した時期、すなわち培養 5 日後に MIC を判定するのが適当である。また、培養期間が短いと菌糸の発育がきわめてわずかで+か-か判定に迷うような微妙な状態(±：口絵写真 A)がみられるが、5 日間培養すると発育の有無は明りょうとなって誤差が少なくなる(口絵写真 B)。特に、ベノミル 100 μg/ml 以上の培地では、培養 2 日後に判定すると、耐性菌であっても菌糸の発育が不明りょう(口絵写真 C)で感受性菌と見誤るおそれがあるので、判定は培養 5 日後に行う。なお、薬液の濃度や培養日数による菌糸の発育程度の詳細については入江(1988 b)を参照されたい。

⑤ 判定基準：MIC と種子消毒効果との関係から、感受性菌と耐性菌の判別境界濃度は MIC 2.5 μg/ml と 25 μg/ml の間にあると考えられ、2.5 μg/ml 以下を感受性、25 μg/ml 以上を耐性と判定する。しかし、一般に

MIC の頻度分布曲線のピークは 2.5 μg/ml 以下か 1,600 μg/ml 以上に局在化することが多く、耐性か感受性かの判別は比較的容易にできる。また、25 μg/ml～1,600 μg/ml の中間値を示す菌株については MIC の高低と消毒効果との間で一定の傾向が認められず、実際に耐性程度の異なる菌株が存在するか否かは明らかではない。

3 その他の留意点

(1) 分離菌の病原性

分離した菌株が形態的に *Gibberella fujikuroi* の特徴を備えていたとしても、病原性を示さない菌株がみられる。耐性菌の分布調査などの結果を防除対策上さらに有意義なものとするには、できるだけ病原性の確認を行う必要がある。調査方法の一例を示すと、まず PDA 培地などで平板培養したものに滅菌水を注いで筆で菌体をかき混ぜて懸濁状とする。そこにばか苗病菌を保菌していない種子を 20～30 粒浸漬して 25°C 前後で 1～2 日間放置する。種子を引き上げてパーミキュライトを床土とした小型の容器に播き、2～3 週間育苗して徒長の有無を調査する。

(2) チウラム・ベノミルの種子消毒効果

いもち病やごま葉枯病の同時防除剤として多く使用されているチウラム・ベノミルについて、薬剤感受性と実用面での種子消毒効果の関係について要約する。

耐性菌を保菌した種子に対する防除効果は、接種種子を使用した場合は低濃度液・長時間浸漬消毒及び湿粉衣消毒とも劣るが、自然感染種子には高い防除効果を示す。特に、湿粉衣、吹き付けあるいは高濃度液・短時間浸漬の各消毒処理は、一般に流通しているような保菌率の低い種子に対して、実用的には支障のない程度に発病を抑制する。一方、感受性菌保菌種子に対しては接種によって高率に保菌した種子であっても消毒方法や消毒条件(薬液温度など)に関係なくきわめて高い防除効果を発揮する(入江・二井, 1987; 入江・前川, 1989)。

また、育苗センターなどでは種子消毒、浸種に続いて催芽機処理や脱水機による水切りが行われていることが多い。低濃度液・長時間浸漬消毒あるいは湿粉衣消毒した後にこれらの処理を行うと、感受性菌保菌種子であれば防除効果への影響はほとんどみられないが、耐性菌保菌種子では薬剤の防除効果がかかなり低下する(入江, 1988 a; 入江ら, 1990)。

引用文献

- 1) 入江和己・二井清友(1987)：関西病虫研報 29：65。
- 2) ———(1988 a)：同上 30：82。
- 3) ———(1988 b)：植物防疫 42：326～330。

- 4) ———・前川和正 (1989) : 日植病報 55 : 106 (講要).
 5) ———ら (1990) : 同上 56 : 134 (講要).
 6) 北村義男ら (1982) : 同上 48 : 380 (講要).
 7) 小川勝美・諏訪正義 (1981) : 北日本病虫研報 32 : 160 (講要).
 8) 吉野嶺一 (1988) : 植物防疫 42 : 321~325.

(入江和己)

——DMI 剤——

はじめに

近年、イネの種子消毒剤として数種の DMI 剤が開発され、これらはベンゾイミダゾール系剤耐性のばか苗病菌にも効果が高いことから、現在では全国的に広く普及している。

DMI 剤のうち、トリフルミゾールでは、MIC (最小生育阻止濃度) が $1,000 \mu\text{g/ml}$ を超えるばか苗病菌の存在が知られているが、これらの低感受性菌はイネに対する病原性がきわめて低いと報告されている (HAMAMURA, 1989)。一方、MIC $3.12 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の菌ではトリフルミゾールの効果がやや劣ることが筆者ら (井上ら, 1991, 92) によって明らかとなり、鳥取県ではトリフルミゾール消毒種子でばか苗病の多発した圃場から、同様の菌が高率に検出されている (長谷川・吉田, 1992)。ペフラゼート、プロクロラズでは現在まで、防除効果の劣るような感受性低下菌の報告はみられない。しかし、今後も当面は DMI 剤の使用が続くと思われるので、年 1 回の使用といえども、薬剤感受性の低下が懸念される。ここでは、トリフルミゾールを中心に感受性の検定方法を説明して参考に供したい。

1 菌の分離方法

ばか苗病菌の採集には、罹病籾、罹病苗、本田の罹病株から分離する方法と駒田培地を用いて水田に飛散する菌をトラップする方法とがある。これらは試験の目的に応じて使い分ければよいが、薬剤感受性のモニタリングには一般に前者が適しており、罹病苗、罹病株から分離するのがよい。種籾の保菌状況をあらかじめ知るために、種籾からばか苗病菌を分離することもあるが、この場合、ばか苗病菌以外の *Fusarium* 属菌が混入しやすいので注意する。罹病苗や罹病株のサンプリングは育苗箱や圃場の広範囲から行う。菌の分離は、苗の場合は鞘葉や不完全葉を取り除いた茎の基部、移植後の株では外側の葉鞘を剥いだ稈の基部から行うとよい。これらを 2% アンチホルミンで表面殺菌後、殺菌水で洗浄して、PSA 平板培地に置床し、 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ で培養する。約 1 週間後に伸長したばか苗病菌を PSA 斜面培地に移植して保存す

る。なお、分離用の培地には、PCNB 水和剤 $1,000 \mu\text{g/ml}$ 、ストレプトマイシン硫酸塩 $1,000 \mu\text{g/ml}$ を添加しておく、ばか苗病菌の生育はやや緩慢になるものの、*Trichoderma* 属菌や細菌などの雑菌がよく抑えられて分離率が高まる。枯死茎からの分離も可能だが、他の *Fusarium* 属菌が混入しやすいので注意する。

1 本の罹病茎から薬剤感受性の異なる菌が分離されることもあるので、厳密な試験には単孢子分離が必要である。なお、PSA 斜面培地の器壁内に伸長した菌叢を試験管の外側から直接 $100 \sim 150$ 倍で検鏡すると、小型分生子の連鎖の有無が容易に観察できるので、ばか苗病菌かどうかの目安になる。

2 検定方法

MIC を求める方法：検定に用いる薬剤は、市販品でよい。薬剤の有効成分濃度が $1,600 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ になるように 2 段階階希釈 (場合によっては 4 段階階希釈) して PSA 培地に加用する。この際、薬剤の希釈は殺菌蒸留水で行い、PSA 培地はオートクレープで滅菌後、やや冷めたものに薬剤の希釈液を無菌的に加え、よく混ぜながらシャーレに 15 ml あて分注する。

分離菌の前培養は、菌叢片を PSA 平板培地に接種後、 25°C 、暗黒下で、 $7 \sim 10$ 日行う。菌叢の周辺部分からコルクボーラー (直径 4 mm) でディスクを打ち抜き、菌叢面が検定用培地と接するように各濃度の検定用培地に置床する。実際には直径 9 cm のシャーレに $20 \sim 30$ 個の菌叢片を置床すると実用的で判定しやすい。

検定用培地へ移植後、 25°C 、暗黒下で 5 日間培養し、検定用培地への菌糸の生育の有無を調査して、MIC を求める。菌株と薬剤の濃度によっては、ごくわずか (約 1 mm 以下) ながら伸長しているものがしばしばみられるが、筆者はこれらを (±) と記録しておき、結果の集計には (−: 生育なし) として処理している。

検定条件と MIC の変動については、トリフルミゾールでいくつか検討されている。入江 (1992) は、①長期間 (29 日間) 前培養すると MIC がやや高くなる、②水和剤と乳剤の剤型による MIC の差はほとんど認められない、③検定用培地に移植して (25°C)、 $4 \sim 5$ 日後までは、MIC $0.78 \mu\text{g/ml}$ 以下の菌株の明瞭なピークはほとんど変化しない。しかし、 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以上でピークを示す MIC は培養期間が長くなるにつれて連続的に上昇し、 $4 \sim 5$ 日後には全体の頻度分布曲線が、 3.12 か $6.25 \mu\text{g/ml}$ を境界にした 2 山型に落ち着く、④検定用培地移植後 (5 日間培養) の培養温度については、 23°C で $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以上の菌株を、 27°C で検定すると 1~2 段階高い MIC を示す、などの点を明らかにしている。

EC₅₀, EC₉₀ を求める方法：薬剤添加検定用培地の調製方法、前培養の方法は MIC 法に準じるが、薬剤の有効成分濃度は 50~0.1 µg/ml の 2 倍段階希釈濃度 (10 段階) でよい。同時に、薬剤無添加 PSA 培地も必ず用意する。菌叢ディスクの菌叢面を下にして、検定用培地の中央に置床する。使用するシャーレは無分画のものでもよいが、市販の 4 分画の滅菌済みプラスチックシャーレも利用できる。検定は 1 濃度につき 3 反覆以上が望ましい。

検定用培地への移植後は、25°C、暗黒下で、無分画シャーレでは 5~6 日間、4 分画シャーレでは 2~3 日間培養し、菌叢直径を測定して、接種源の直径 (4 mm) を差し引いた値を菌糸生育量とする。各菌株の薬剤無添加培地の菌糸生育量に対する薬剤の 50%、及び 90% 生育阻止濃度 (EC₅₀, EC₉₀: µg/ml) をパソコン用ソフトなどによって求める。

DMI 剤感受性検定用の全国的な標準菌株はないが、検定のたびに、それまでの検定で感受性が明らかになっている代表的な菌株を供試菌株に加えておいて、実験上のエラーがなかったか否かを確認することが必要である。手持ちの菌株がなければ、他の研究機関に分譲を依頼するとよい。

菌株の保存は、PSA 斜面培地にシリコン栓をして 10~15°C におくと、半年~年 1 回の植継ぎで長期間保存できる。保存時の DMI 剤感受性の変動については詳しい報告はないが、これまでの経験からほとんど変動しないと思われる。

3 検定結果と薬剤の防除効果との関連

鳥取県、兵庫県、岡山県などの中国地域でトリフルミゾール感受性を検定した結果では、MIC の頻度分布は、MIC 1.56 µg/ml 以下の感受性の高い菌株 (S 菌)、6.25~100 µg/ml の感受性のやや低い菌株 (WR 菌)、400 µg/ml 以上の低感受性菌の 3 山型かこれに類似している (井上ら, 1991; 長谷川・吉田, 1992; 兵庫県立中央農業技術センター, 1993) (図-2)。そして、トリフルミゾールの防除効果は、S 菌には非常に高いが、WR 菌には効果が劣ることが明らかになっている (井上ら, 1991, 1992; 長谷川・吉田, 1992) ので、MIC 検定による感受性の差は防除効果とよく符合している。しかし、EC₅₀ では S 菌と WR 菌の感受性の差が MIC より小さくなり、それらの区別は容易ではない。また、MIC 検定のほうが多数の菌株を扱うことができるので、両者のモニタリング調査を目的とする場合には、EC₅₀ より MIC を求める方法が適している。

WADA, et al (1990) は、ペフラゾエートの MIC (24°C, 3 日間培養) は 1.56 µg/ml をピークとする 1 山型の頻度

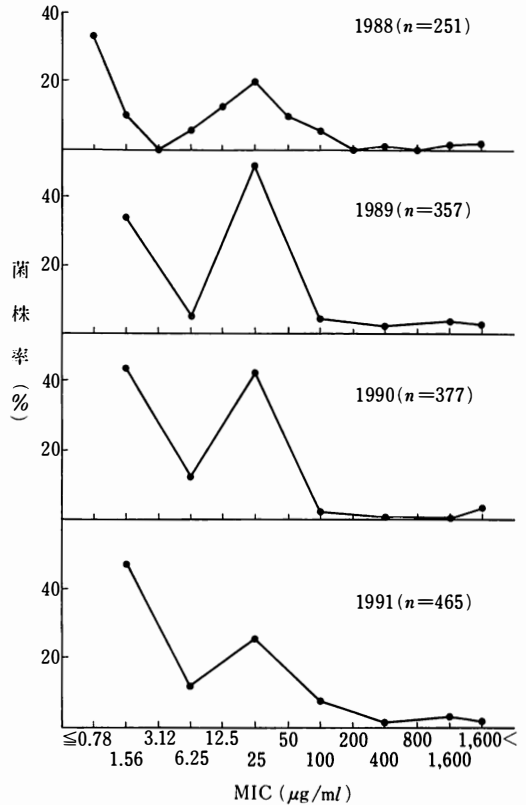


図-2 岡山県におけるイネばか苗病菌のトリフルミゾールに対する感受性の頻度分布 (MIC)

分布で、0.78~12.5 µg/ml の範囲にあり、ペフラゾエートの種子消毒効果は、MIC 検定による感受性差と相関がなく、いずれの菌株でも効果が高いとしている。プロクロラズ MIC の頻度分布は 1.0 µg/ml をピークとし、いずれも 10 µg/ml 以下であり (全農農業技術センター農業研究部, 1985)、これまで、防除効果の劣るような感受性を示す菌の存在は報告されていない。

DMI 剤は、一般に培地上での菌糸生育抑制作用があまり強くなく、薬剤含有培地上でも緩やかに生育する場合があることや、調査方法の客観性 (MIC では検定培地上での菌糸生育の有無の判定に個人差が生じやすい) を考慮すると、感受性検定の指標に MIC は適当でないと考えられる。しかし、トリフルミゾールに対する検定のような事例もあるので、現時点では目的に応じて使い分けるか、両者を併用するのがよいと思われる。

4 今後の問題点

ばか苗病菌を採集していると、罹病苗や罹病株から分離したにもかかわらず、病原性がきわめて低く、形態的には小型分生子を連鎖状に形成して *F. moniliforme* と

みられる菌がしばしば分離される。そして、これらの菌はDMI剤感受性が低いことが多いだけに、ばか苗病菌として取り扱うか否かは大きな問題である。今後、簡易で確実なばか苗病菌の同定法の確立が強く望まれる。

ある病原菌が薬剤耐性菌か否かは、野生型の集団が示す感受性のベースラインを基準にして論じるのが妥当であるとの指摘がなされている(石井, 1993)。イネばか苗病菌のDMI剤に対する感受性のベースラインデータは、まだ不十分なので、今後明らかにしていく必要がある。

引用文献

1) HAMAMURA, H. (1989): 日植病報 55(3): 275~280.

- 2) 井上幸次ら (1991): 日植病報 57(3): 432 (講要).
- 3) ——— (1992): 日植病報 58(4): 581 (講要).
- 4) 長谷川優・吉田浩之 (1992): 日植病報 58(1): 133 (講要).
- 5) 入江和己 (1992): 第2回殺菌剤耐性菌研究会講要.
- 6) 兵庫県立中央農業技術センター(1993): 平成4年度近畿中国農業試験研究成績・計画概要集—病害—(謄写).
- 7) WADA, T. et al. (1990): 日植病報 56(4): 449~456.
- 8) 全農農業技術センター農薬研究部 (1985): 昭和60年度農薬試験成績: 37~48(謄写).
- 9) 石井英夫(1993): 第3回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要.

(井上幸次)

新刊紹介

『熱帯の雑草』(熱帯農業要覧 No. 19)

A5版, 318ページ, 1993年5月

(社)国際農林業協力協会編集・刊行

国際農林業協力協会が、途上国で活躍する農業協力専門家の要望に応えるための文献、資料として、熱帯農業要覧が刊行されている。この中でこれまでに熱帯野菜作の病害、熱帯野菜作の害虫が刊行されたが、いずれもカラー写真を主体として、専門外の人でも容易に病害虫の診断・同定が可能のように工夫され、関係者の好評を博した。本書はそのシリーズとして熱帯の雑草について解説されたものである。

雑草の防除は、病害虫の防除とともに作物保護の重要な柱である。とくに東南アジアのような湿潤熱帯では、雑草の生育も早く、作物に対する影響も極めて大きい。除草は、以前は手作業で農家に重労働を強いる最大の要因になっていたが、除草剤が開発され、有力かつ効果的に防除ができるようになり、生産の向上に貢献したことは周知のとおりである。

途上国においても、近年労働力を軽減するため除草剤が使用され、年々その使用量は増加している。とくに最近、特定の雑草にのみ有効な薬剤が主流を占めるようになってきた。このようになると、先づ各国、各地域に分布する雑草の種類を明らかにするとともに、その生態を熟知することが、的確に除草剤を使用するための前提

条件となる。わ国では、このよう目的のために関係の機関からカラー写真を主体とした解説書が刊行されているが、国内の雑草に限られ、東南アジアなどの湿潤熱帯を対象にしたものは、未だ見当たらない。

これに応えるため、本書は長年雑草の研究に従事し、東南アジア諸国に長期滞在された農業環境技術研究所衛生管理科長原田二郎氏を主査に、同様の経験をもつ芝山秀次郎、森田弘彦両氏が協力して執筆されたものである。

内容は、I. 雑草の種類と防除、II. 主要草種の解説の2部から成っている。Iでは、水田雑草、畑地雑草、非農耕地雑草、水生雑草、高地雑草について、東南アジアにおける生態的な特長および防除法について概説してある。

IIは本書の主体をなすもので、主要な草種63科約300種について、右側ページカラー写真(約400枚)、左側ページにそれぞれの草種の学名、和名、各国名、形態が記載されている。配列は名草種の科名(ラテン名)のアルファベット順、とくに各国での一般名を丹念に調べ記載してあり、現地では大変役に役立つと思われる。写真も1ページ2~4枚にまとめられているので鮮明で迫力があり、草種の同定には大いに参考になる。

東南アジア各国で技術協力に従事する専門家もちろん、国内の関係者にも手許に置いておけば大変役立つと思われるので、是非購入することをおすすめしたい。

(社)国際農林業協力協会(〒102 東京都千代田区一番町19, 全国農業共済会館, Tel 03-3263-7377)に申し込めば実費(5,000円)で入手できる。

(梶原敏宏)