

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 2016

(2) QoI 剤耐性赤かび病菌 (*Microdochium nivale*)

地独 北海道立総合研究機構 中央農業試験場 小 澤 徹^{とある}

はじめに

コムギ赤かび病は、多発すると減収被害や品質の低下を招くだけでなく、本病菌の一部が産生する人畜に有害なかび毒に汚染されるため、コムギ栽培において重要な病害である。本病には数種の病原菌が関与しており、北海道では、*Fusarium graminearum* 種複合体、*F. avenaceum*、*F. culmorum* および *Microdochium nivale* の発生が認められる。このうち防除対象として重要視されている菌種は、デオキシニバレノール (DON) 汚染に関与する主要菌種である *F. graminearum* と、DON を産生しないが (NAKAJIMA, 1995) 秋まきコムギの主産地である道東地方で多発して減収被害をもたらす *M. nivale* である (安岡, 1994)。

M. nivale は、我が国では 1928 年にコムギの紅色雪腐病の病原菌として初めて報告され、本菌は越冬後も発生し、穂の赤かび病のほか葉身に斑紋を形成し葉枯症状を引き起こす (斎藤ら, 1982; 坪木, 1984)。2009 年の十勝地方、翌 2010 年にはオホーツク地方で本菌による赤かび病とともに葉枯症状が多発し大きな問題となった (小澤ら, 2011)。

なお、*M. nivale* には二つの亜種 var. *majus* と var. *nivale* が存在することが知られている。近年海外ではこれら亜種を *M. majus* と *M. nivale* と別種として扱うようになってきた (SIMPSON et al., 2000)。本稿では従来の標記方法に従って、両菌種を *M. nivale* として記載した。

QoI 剤は赤かび病防除薬剤として海外でも広く用いられてきた。赤かび病菌の QoI 剤に対する感受性は菌種によって異なることが知られており、*F. graminearum* では QoI 剤の一種であるトリフロキシストロビンに対して元々耐性を持っていることが報告されている (DUBOS et al., 2011)。一方、*M. nivale* は *F. graminearum* に比べて QoI 剤に対する感受性が高い (KANeko and ISHII, 2009)。

QoI 剤に耐性を示す *M. nivale* は 2009 年にフランスで

報告され (WALKER et al., 2009)、その後ポーランド、スウェーデンおよびデンマークで発生が確認されている (FRAC QoI Working Group, 2012)。我が国では 2010 年に北海道で QoI 剤の一種であるクレソキシムメチル剤に対する耐性菌が確認された (小澤ら, 2012)。本稿では、QoI 剤に対するコムギ赤かび病菌 (*M. nivale*) の感受性検定法と北海道における耐性菌の実態について述べる。

I 検定材料の調整方法

本菌は種子、罹病葉および罹病穂から比較的容易に分離することができる。また、罹病組織上に大型分生子を形成するので単胞子を直接分離することも可能である。

1 罹病組織からの菌の分離

罹病組織を流水で洗浄し、70%エタノールに瞬間浸漬した後、アンチホルミン溶液 (有効塩素 0.5 ~ 1%) で 1 ~ 3 分程度表面殺菌し、PDA 培地または素寒天培地に置床して、20℃の暗黒下で培養する。培養後、伸長した菌糸の先端を切り取り PDA 培地などに移植し、培養する。種子から分離する際、培地上で種子が発芽して分離しにくくなる場合がある。このようなときには表面殺菌後に 3 ~ 4 時間滅菌水に浸して吸水させた後、冷凍庫で一晩凍結させてから培地に置床すると発芽を抑制させることができる。

また本菌の選択培地として Latts 培地がある (HAYASHI et al., 2014) (表-1)。この培地は圃場で飛散している胞子をトラップするために開発されたものであるが、組織からの分離にも使うことができる。ただし、通常、本培地には *Fusarium* 属菌による赤かび病菌を抑制するためにチオファネートメチル水和剤が添加されるので、ベンズイミダゾール系薬剤感受性菌を分離することはできない。QoI 剤耐性とベンズイミダゾール系薬剤耐性は交差しないが、ベンズイミダゾール系薬剤感受性菌も含めて QoI 剤感受性検定を実施するためにはチオファネートメチル水和剤を添加しないほうがよい。

2 単胞子分離

組織上に分生子を形成している場合は単胞子を直接分離することができる。また、分生子を形成していない場合には、罹病組織を湿らせたろ紙の上に置き、ラップな

QoI Fungicide-resistant Strains of *Microdochium nivale* on Wheat.

By Toru KOZAWA

(キーワード: コムギ, クレソキシムメチル)

表-1 Latts 培地の組成

K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
Fe-EDTA	0.01 g
ラクトース	20 g
L-アスパラギン	2 g
チアミン塩酸塩	500 μg
チオファネートメチル水和剤	10 ppm (有効成分)
スピロキサミン	80 ppm (分注前に添加)
硫酸ストレプトマイシン	300 ppm (分注前に添加)
寒天	15 g
水	1 l
pH 6.8	

どで密封して多湿条件にし、20℃、BLB 連続照射下で培養すると数日で分生子を形成する。なお、種子上に分生子を形成させる場合には1週間以上かかることがある。分生子を白金耳または滅菌した綿棒で取り素寒天培地に画線し、20℃暗黒下で12～24時間程度培養し、発芽している分生子を釣菌する。組織上の分生子から直接単孢子分離する場合は誤って雑菌を分離することがある。顕微鏡で発芽している分生子の形を観察してから釣菌することで目的とした菌の分離率が高まる。培養期間が長くなると分生子の形を確認できなくなるので画線後は、なるべく早めの釣菌を心がける。

II 感受性検定方法

1 寒天希釈平板法

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、薬剤のMIC(最小生育阻止濃度)を求め評価する。なお、検定に供試する菌はなるべく単孢子分離した菌株を用いる。

(1) 分離菌の前培養

PDA培地に移植し、20℃、暗黒下で5日間培養する。菌そうの周縁部分を直径4mmのコルクボーラーで打ち抜き、菌そう面を下にして検定培地に接するように置床する。

(2) 検定培地

PDA培地(DIFCO社製など)を基本培地とし、滅菌後、培地の温度が50℃程度に下がったところに、没食子酸 *n*-プロピルを最終濃度が2mMになるように添加し、次いでクレソキシムメチル懸濁液を最終濃度が有効成分

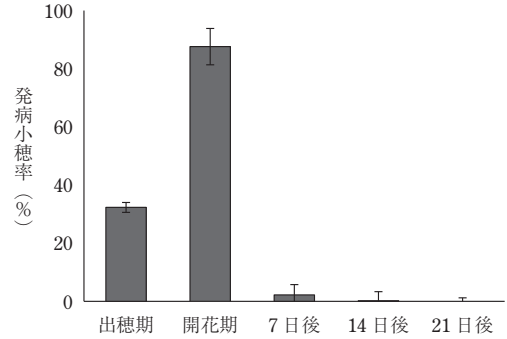


図-1 穂の生育ステージごとの *M. nivale* に対する感受性の違い

注) 品種「きたほなみ」を1/5,000 a ワグネルポットに播種し、各処理4ポットを供試。各時期に *M. nivale* の孢子懸濁液 (5×10^5 spores/ml) を噴霧接種した。発病を促すため接種翌日から7日間6時間おきに2分間散水し、開花期の33日後に発病小穂率(%)を調査した。

図中のバーは標準誤差を示す。

で0 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm となるように添加する。添加後はよく攪拌し、培地が冷めて固まる前に直径9cmのシャーレに流し込む。なお、没食子酸 *n*-プロピルは水に溶解しにくいいため、あらかじめジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解しておくとうい。また、クレソキシムメチルは市販されている製剤を使用し、滅菌水に懸濁する。

(3) 判定

20℃、暗黒下で5日間培養し、MICを求め判定する。耐性菌はMICが100 ppm以上となるため判定は容易にできる。感受性菌は1 ppmでも生育が認められないことからMIC 1 ppm以上を耐性菌とする。

2 生物検定

ポットで生育させたコムギの開花時期に所定の濃度に希釈した農薬を噴霧する。翌日(薬液が乾いた後)病原菌を接種し発病程度を調査する。*M. nivale* は開花時期に最も感染しやすく、開花から日数が経過すると発病が少なくなる(図-1)。このため開花時期の揃った穂で試験することが重要となる。

(1) 接種植物

コムギには秋まきと春まきがある。秋まきコムギは花芽形成に低温を必要とするため、低温を必要としない春まきコムギのほうが容易に試験することができる。秋まきコムギで試験する場合には、種子由来の紅色雪腐病を防除するためイミノクタジン酢酸塩液剤などにより消毒した種子を播種し、野外で越冬させる。1/5000 a ワグネルポットに麦用の化成肥料を窒素で1g程度になるよう

に施肥し、12粒程度を播種する。秋まきコムギの場合は、越冬後に硫酸か尿素を窒素で1g程度追肥する。出芽が不揃いとなると穂揃いが悪くなるため注意が必要である。湿らせたろ紙を敷いたシャーレに播種し、発芽直前のいわゆる鳩胸の状態になった種子を播種することで出芽を揃えることができる。また、出穂後に節間伸長が始まったら、生育の揃った穂を10本選び穂首に印を付けておくことで、遅れて開花した穂と区別することができる。なお、印を付ける際には書類の端に貼るタックインデックスが便利である。

(2) 薬剤散布

印を付けた穂が開花したら検定薬剤をハンドスプレーなどを用いて散布する。散布むらがあると防除効果が不安定となる場合があるので十分量散布するのがよい。1/5,000 a ワグネルポットの場合はポット当たり20ml程度散布するとむらなく散布することができる。

(3) 胞子形成方法

PDA培地でも胞子を形成させることができるが、大量に胞子を形成させる場合にはオートミール寒天培地(OMA:市販のオートミール粉砕物40g,寒天12.5g,蒸留水1l)が適している。OMAはオートクレープで滅菌するときに吹きこぼれることがあるため、三角フラスコの1/3程度の量にするのがよい。PDA培地で前培養した検定菌株をOMA平板培地に移植し、20℃、暗黒下で7日間培養した後、コンラージ棒を用いて気中菌糸を除去し、20℃、BLB連続照射下で培養すると7~10日程度で胞子を形成する。シャーレ内の湿度が高い場合には再び気中菌糸を形成することがあるが、この場合には再度気中菌糸を除去し、クリーンベンチ内で培地表面を風乾してからBLB照射下で培養する。

(4) 病原菌の接種

薬剤散布翌日にTween20を5,000倍で添加した病原菌の分生子懸濁液を穂に噴霧接種する。接種量は、*M. nivale*の場合 5×10^5 spores/mlの分生子懸濁液をポット当たり5mlがよい。赤かび病菌を穂に感染させるためには、穂が濡れた状態を維持する必要がある。筆者は接種翌日から6時間おきに2分間頭上からミスト散水し、5日間濡れた状態を維持している。また、感染後発病を促すために3~4日おきに接種後と同様に散水し穂を濡らすと接種2週間後から病徴が現れる。

(5) 判定方法

開花3~4週間後に、接種時に印をつけた穂の小穂数と発病した小穂数を調査し、発病小穂率を求める。防除効果の判定は無散布区に対する防除価を算出し評価する。*M. nivale*はクレソキシムメチル剤に対する感受性

が高く、感受性菌に対しては通常防除価80以上の高い防除効果を示す。これに対し、耐性菌の場合はほとんど防除効果が認められないため判定は容易にできる。

III 耐性菌の現状

1 北海道における赤かび病防除薬剤

*F. graminearum*と*M. nivale*では効果の高い薬剤が異なる。*F. graminearum*に対しては、テブコナゾール水和剤およびチオファネートメチル水和剤が高い効果を示すが、*M. nivale*に対しては、テブコナゾール水和剤の防除効果はやや低く、チオファネートメチル水和剤は耐性菌(田中ら,1983)が広く発生しているため防除効果が期待できない。一方、*M. nivale*に対しては、QoI剤の一種であるクレソキシムメチル水和剤の効果が高く、次いでイミノクタジン酢酸塩液剤の効果が高い(小澤ら,2008)。このため、*M. nivale*による赤かび病の発生が問題となる地域では、DON汚染低減とともに、本菌に対する効果を考慮し散布薬剤を選択する必要がある。

2 北海道におけるQoI剤耐性*M. nivale*の発生

クレソキシムメチル水和剤は*M. nivale*に対して卓効を示す薬剤であったが、2009年および10年に、*M. nivale*による赤かび病に対して期待する防除効果が発揮されない事例が十勝地方の圃場で見られ、本剤に対する感受性の低下が疑われた。2010年に十勝地方の現地圃場2地点から分離した5菌株を供試し、生物検定とクレソキシムメチルを用いた寒天平板法により薬剤感受性の

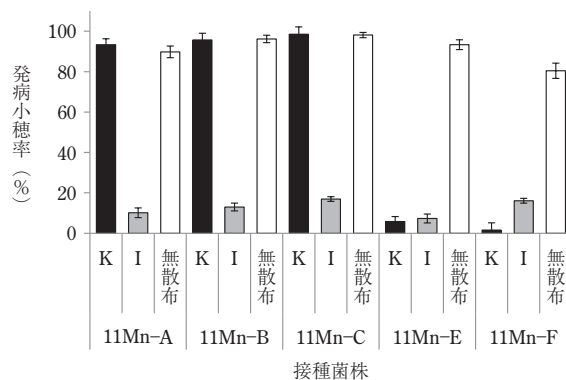


図-2 *M. nivale* 5菌株に対する生物検定の結果(2011年)

注) 品種‘春よ恋’を1/5,000 a ワグネルポットに播種し、各処理4ポットを供試。開花期および1週間後にクレソキシムメチル水和剤(2,000倍)(K)、イミノクタジン酢酸塩液剤(1,000倍)(I)を散布し、薬剤散布の翌日に*M. nivale*の分生子懸濁液(5×10^5 spores/ml)を噴霧接種した。発病を促すため接種翌日から5日間6時間おきに2分間散水し、開花期の22日後に発病小穂率(%)を調査した。図中のバーは標準誤差を示す。

表-2 クレソキシムメチル水和剤添加培地における *M. nivale* の生育 (2011年)

供試菌株	クレソキシムメチル添加 PDA 培地上での菌糸生育量 (mm) ^{a)}			
	0 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm
11Mn-A	25	29(116) ^{b)}	27(108)	26(104)
11Mn-B	27	32(119)	25(93)	22(81)
11Mn-C	17	22(129)	18(106)	14(82)
11Mn-E	18	0(0)	0(0)	0(0)
11Mn-F	19	0(0)	0(0)	0(0)

^{a)} 没食子酸 *n*-プロピル 2 mM を添加した PDA 培地を用い、20℃、暗黒下で 5 日間培養後コロニー直径を計測し、菌糸直径から移植した菌糸ディスクの直径 4 mm を引いた値を菌糸生育量とした。

^{b)} 括弧内の数値は無添加培地の菌糸生育量に対する割合を示す。

表-3 道内のコムギより分離した *M. nivale* のクレソキシムメチルに対する感受性検定結果 (2011年)

振興局	検定圃場数	耐性菌検出圃場数 (圃場割合%)	検定菌株数	耐性菌菌株数 (菌株率%)
十勝	14	11 (78.6)	130	61(46.9)
オホーツク	7	5 (71.4)	35	29(82.9)
胆振	2	1 (50.0)	13	2(15.4)
後志	1	1(100.0)	8	1(12.5)
空知	4	2(50.0)	13	4(20.0)
石狩	2	0(0.0)	8	0(0.0)
合計	30	20(66.7)	207	97(46.9)

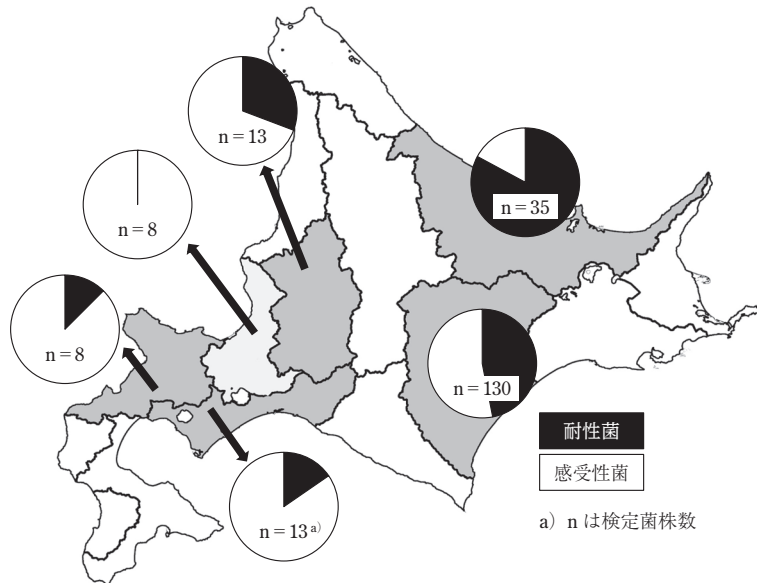


図-3 北海道における QoI 耐性 *M. nivale* の分布 (2011年)

検定を行った。その結果、生物検定において、5 菌株中 3 菌株に対しては防除効果が認められなかった (図-2)。さらに、これらの菌株は本剤 100 ppm を添加した培地検定でも菌糸伸長は抑制されず (表-2)、生物検定と培地検定の結果が一致したことからクレソキシムメチル耐性菌であることを確認した。

これを受け、道内の 23 市町村 30 地点の秋まきコムギおよび春まきコムギから 207 菌株を分離し、培地検定によるモニタリング調査を行った結果、20 地点 (66.7%) からクレソキシムメチル耐性菌が検出され、供試菌株の

うち 97 菌株 (46.9%) が耐性菌であった (表-3, 図-3)。

クレソキシムメチル耐性菌に対して本剤の防除効果が認められなかったこと、耐性菌が北海道内に広く分布していることから、北海道では現在、本剤を *M. nivale* の防除に使用することは避けるように指導されている。

IV 今後の課題

QoI 剤に耐性菌が発生したことで、*M. nivale* に対して効果の高い薬剤はイミノクタジン酢酸塩とその混合剤のみとなり、生産現場では大きな混乱が生じた。その後

本菌に対して有効な薬剤の探索を行ったところ、キャブタン水和剤およびジエトフェンカルブ・ベノミル水和剤が高い効果を示すことが明らかとなった。しかし、薬剤の探索を始めてから生産現場で使用できるようになるまでには数年かかるため、この間生産現場では限られた薬剤で対応しなくてはならない。耐性菌が出現した際の混乱を最小限にとどめるため、また耐性菌の発生を遅らせるためにも、事前に既存の薬剤の中で有効な薬剤の探索を行い、防除薬剤の選択肢を増やしておくことは重要であると考えられる。

引用文献

- 1) DUBOS, T. et al. (2011): Eur. J. Plant Pathol. **130**: 239 ~ 248.
- 2) FRAC QoI Working Group 2011 Minutes (Updated Sep. 2012). <http://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/qol-fungicides/archiv/qoi-fungicides-2010-minutes-of-annual-meeting.pdf?sfvrsn=8>
- 3) HAYASHI, Y. et al. (2014): Eur. J. Plant Pathol. **138**: 247 ~ 256.
- 4) KANEKO, I. and H. ISHII (2009): J. Gen. Plant Pathol. **75**: 388 ~ 398.
- 5) 小澤 徹ら (2008): 北日本病虫研報 **59**: 26 ~ 29.
- 6) ———ら (2011): 同上 **62**: 26 ~ 29.
- 7) ———ら (2012): 日植病報 **78**: 241 (講要).
- 8) NAKAJIMA, T. (1995): Phytopathol. Soc. Jpn **61**: 357 ~ 361.
- 9) 斎藤 泉ら (1982): 日植病報 **48**: 124 (講要).
- 10) SIMPSON, D. R. et al. (2000): Plant Pathol. **49**: 261 ~ 268.
- 11) 田中文夫ら (1983): 日植病報 **49**: 565 ~ 566.
- 12) 坪木和男 (1984): 同上 **50**: 97 (講要).
- 13) WALKER, A. S. et al. (2009): Pest Manag. Sci. **65**: 906 ~ 915.
- 14) 安岡眞二 (1994): 北日本病虫研報 **45**: 35 ~ 37.

農林水産省プレスリリース (28.6.16 ~ 7.12)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。

<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

◆ 「平成 28 年度病害虫発生予報第 3 号」の発表について
(6/21) /syokubo/160621.html

◆ 蜜蜂被害事例調査 (平成 25 年度 ~ 27 年度) の結果及び今後の取組について (7/7) /nouyaku/160707.html