

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

(5) イネいもち病菌

—QoI 剤（培地検定法）—

三重県農業研究所 ^{すずき}鈴木 ^{ひろふみ}啓史・^{かわかみ}川上 ^{たく}拓・^{くろだ}黒田 ^{かつとし}克利

はじめに

稲作において、中山間地などのイネいもち病常発地では殺菌剤によるいもち病防除は必須である。従来、いもち病の薬剤防除の適期は、イネの生育程度から判断されてきた。また、BLASTAM による環境要因の適合程度からも適期判断を行ってきた。これらの適期判断には経験と知識を要していたが、育苗箱散布粒剤等が開発されてからは、イネの生育程度や環境要因から防除適期を判断しなくても、育苗箱散布粒剤等を移植前に処理することで、簡単に安定した防除効果を得ることが可能となった。この育苗箱散布粒剤等の優れた使い易さと長期持続的な防除効果の反面、MBI-D 剤と QoI 剤において耐性菌が顕在化し、これらの薬剤の使用中止を余儀なくされている地域が少なくない（宮川・富士，2013；廣岡・石井，2014）。有効な殺菌剤を永続的に利用するためには、その病原菌の生態に基づく管理と、その殺菌剤の使用方法を工夫する必要がある。このような耐性菌対策の一つとして耐性菌がどこに存在するかの現状把握が重要である。ここでは、イネいもち病菌の QoI 剤耐性を培地を用いて検定する方法について、筆者らが実施している方法を紹介する。

I 検定用材料の調整

1 いもち病菌のサンプリング

葉いもち病斑を採取する場合、病斑部分だけでなく、その罹病葉を葉鞘の一部も含めて採取することで、葉巻をある程度抑制できる。採取した葉いもち病斑は、紙封筒に入れ実験室に持ち帰る。その際、紙封筒を厚い冊子の間に挟むことで葉巻を抑制できる。実験室に持ち帰ったあとは、紙封筒を新聞紙に挟み乾燥状態を保持する。

Methods for Detecting QoI Fungicide Resistance in Rice Blast Fungus on Culture Medium. By Hirofumi SUZUKI, Taku KAWAKAMI and Katsutoshi KURODA

(キーワード：QoI 剤耐性菌，イネいもち病菌，感受性検定法，寒天培地法)

乾燥後は、紙封筒のままビニル袋に入れ、冷蔵（4℃）で保存する。

2 いもち病菌の単胞子分離方法

胞子を形成した病斑であれば、白金鉤を火焰滅菌し Water Agar（以下 WA，18 g/l）平板で冷却した後に、その病斑に軽く触れ、単胞子分離用に準備した WA に 1 cm ほど画線する（図-1）。事前に、この WA の入ったシャーレの底中央部に 1 cm ほどマジックで線を引いておき、そこに画線することで、顕微鏡観察が容易になる。顕微鏡で胞子を確認し、虫ピン型後藤氏法（大畑，1995）で単胞子分離を行う（図-2）。

胞子が形成されていない場合として、中村（2009）は以下の方法を紹介している。病斑部を水道水で洗った後、十分に水滴を吸収・除去する。乾いたスライドガラスの上に置き、セロハンテープで固定する。シャーレにろ紙を敷き、蒸留水を十分含ませた後余剰水を除去し、そこに先のスライドガラスを置き、湿室シャーレにして 25℃で、1～2 日間保持し、胞子の形成を促す。それを上記の方法で単胞子分離する。

後述の方法では、雑菌（主に細菌）の繁殖に注意が必要であるので、WA にごく少量の乳酸を加えるなどの工夫をしてもよい。

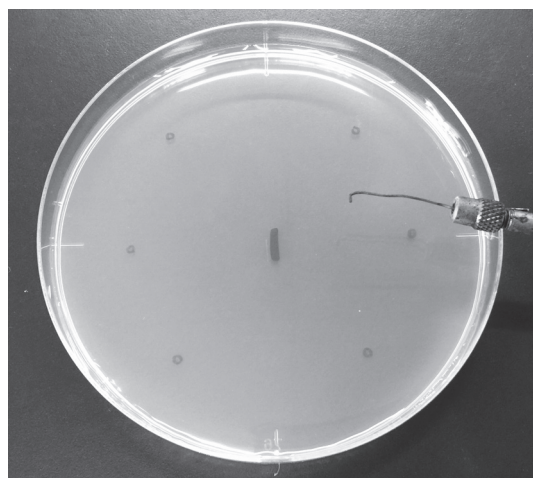


図-1 シャーレ中央にマジックで線を引いた WA と白金鉤

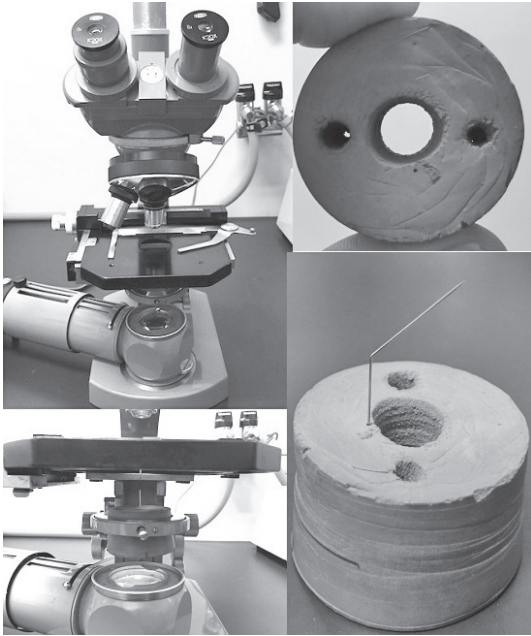


図-2 虫ピン型後藤氏法に用いる顕微鏡
 接眼レンズ×10, 対物レンズ×20.
 中心をくりぬいたゴム栓に曲げた(130°)虫ピン(志賀
 昆虫針00号)を差し込み、コンデンサー部に挿入する。

3 いもち病菌の保存法

単胞子分離後、WA平板で25℃、2日間培養して、顕微鏡で発芽が確認できた胞子を寒天ごと切り抜いて、オートミール平板培地の中央に移植する。このオートミール培地には、事前に乾熱滅菌したペーパーディスク(薄手φ6mm)を、中央部に12枚四角に並べておく。置床後、25℃で7~10日間培養するとペーパーディスク上にいもち病菌が生育する(図-3)。それを滅菌した2mlのスクリーキャップチューブに12枚すべて移し、菌株間のコンタミを防ぐため乾熱滅菌したガラスシャーレに、キャップを閉めずに個々に入れ、デシケーター内で7日間乾燥後、乾熱滅菌したシリカゲルをチューブ内に

適量入れ、キャップを閉めて冷蔵(4℃)保存する。

II 薬剤感受性の検定方法

植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアルIIのキュウリ褐斑病菌 QoI 剤(石井, 2009)を参考に, Wei et al. (2009)の報告に基づきいもち病菌用に改変した。

1 検定用菌株の前培養

保存してあったペーパーディスクをPDA平板に置床し、25℃で7日間生育させたものを利用する。また、菌の分離と薬剤感受性検定を続けて行う場合は、単胞子分離後、いもち病菌を繁殖させたペーパーディスクを検定用と保存用に使うことができる。この場合、以下に述べるいもち病菌の前培養とコルクボーラによる菌叢の打ち抜きが省略できる(なお、このことはG143A変異菌では確認しているが、F129L変異菌は存在未確認のため検証していない)。

2 検定培地の調製

PDAにQoI剤、例えばアゾキシストロピンを添加して培養すると、感受性菌でも菌糸生育が見られ、菌糸生育の有無で感受性菌と耐性菌を区別することは難しい。これは、ミトコンドリア電子伝達系の複合体IIIタンパク質を阻害すると、代替呼吸経路が働き始めるからと考えられている(石井, 2009)。そこで、代替経路のalternative oxidase (AOX, 代替酸化酵素)の阻害剤であるサリチルヒドロキサム酸(SHAM)などを添加することにより、感受性菌の生育を完全に阻止することができる。

検定用のPDAはオートクレープ滅菌(120℃, 20分)し、55℃程度まで冷却後、最終濃度でアゾキシストロピン100ppmとSHAM1mMになるように調整する。具体的には、市販の薬剤(アミスター20フロアブル)と滅菌水を用いて1,000ppmのアゾキシストロピン懸濁液を作製し、SHAMはアセトンを溶媒として100mM溶液を作製する。次に、滅菌後のPDA178mlに、殺菌剤添加培地には1,000ppmのアゾキシストロピン懸濁液

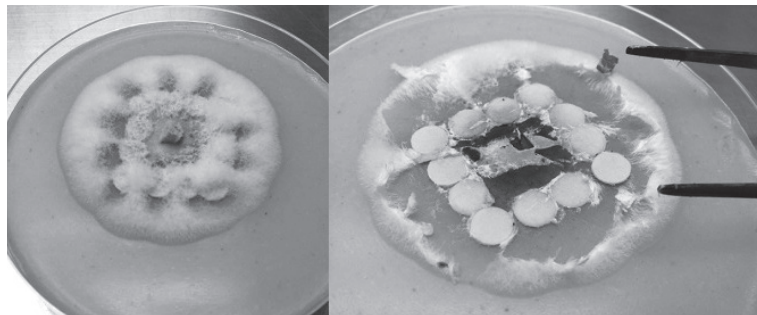


図-3 オートミール培地上で7日間生育したいもち病菌

20 ml を、殺菌剤無添加培地には滅菌水 20 ml をそれぞれ無菌的に添加し、さらに、100 mM の SHAM 溶液 2 ml をそれぞれに添加することで最終濃度を調整する。SHAM 溶液は 50 ml 容の遠慮管に入れて、蓋を固く閉めることでアセトンの揮発を防いでいる。

なお、研究者によって、検定用培地に加えるアゾキストロピンや SHAM の濃度が異なるが、これまでのところ相互の結果に矛盾は生じていない。

検定用に調製した培地は、滅菌 1 号角シャーレ（栄研化学）に 1 枚当たり約 30 ml 流し込む。このシャーレは 1 枚当たり 20 菌株を置床することができる。前述のように 200 ml を作製した場合、角シャーレ 6 枚分を作製することができ、120 菌株の検定が可能である。

3 検定方法

供試菌株を PDA で 25℃、7 日間前培養する。次いで、形成した菌叢の周縁部を直径 4 mm のコルクボーラで打ち抜き、菌叢ディスクとする。菌叢面が培地に接触するように裏返して検定用培地に置床し、25℃で 3 日間培養後、菌糸生育の有無を観察する。

4 判定基準

100 ppm のアゾキストロピン添加培地において、25℃、3 日間培養後に菌糸の生育が認められたものを耐性菌、生育が認められないものを感受性菌とする（図-4）。

なお、3 日間より長く培養すると、感受性菌であっても生育することがあることから、判定は、必ず 3 日目に行う。また検定する際、QoI 剤耐性イネいもち病菌をポジティブコントロールとして加え、迷いが生じたときは、これとの比較で判断する。

5 接種試験による薬効低下との関係

2014～15 年に三重県で採取し、上記の培地検定で QoI 耐性と判定された菌株を用い、あらかじめアゾキストロピン（1,000 倍）を散布したイネ苗に、その孢子懸濁液を噴霧接種したところ、いずれの菌株においても薬効の低下が確認された（表-1）。このことから、上述のアゾキストロピン 100 ppm と SHAM 1 mM を添加する方法は、イネいもち病菌の QoI 剤耐性菌の検定に有効である。なお、アゾキストロピン耐性菌が同系統のオリサストロピンやメトミノストロピンに交差耐性を示すことは、宮川・富士（2013）により確認されている。

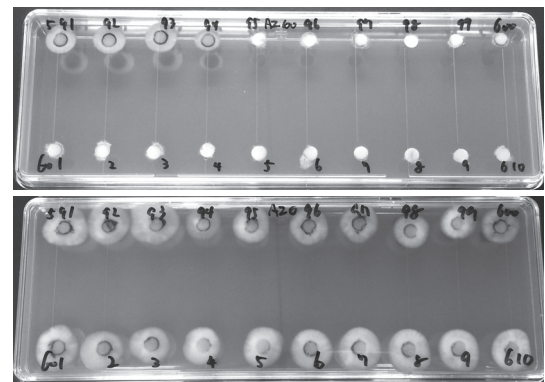


図-4 滅菌 1 号角シャーレを用いた QoI 剤感受性検定結果
上段：PDA、アゾキストロピン 100 ppm、SHAM 1 mM（終濃度）。
下段：PDA、SHAM 1 mM（終濃度）。
各シャーレの左上の 4 菌株が QoI 剤耐性イネいもち病菌。

表-1 感受性検定結果の違うイネいもち病菌に対する QoI 剤の防除効果

感受性 検定結果	供試菌株	アゾキストロピン 水和剤 1,000 倍		フェリムゾン・フサライド 水和剤 1,000 倍		無散布
		苗当たり 発病葉数 (枚/苗)	防除価	苗当たり 発病葉数 (枚/苗)	防除価	苗当たり 発病葉数 (枚/苗)
R	14-370	8.3	0	1.9	72.0	6.8
	15-99	7.2	7.5	2.1	73.1	7.8
	15-164	8.3	2.0	2.4	71.6	8.5
S	14-42	1.7	71.4	1.6	72.9	5.8
	15-1	2.6	70.5	1.6	81.9	8.8
	15-22	2.8	60.2	2.2	68.7	6.9

注) 供試品種：コシヒカリ，クリーン 2 号をつめたシードリングケースに播種し約 2 週間育成した 3 葉期の苗を各区 12 苗供試（追肥 N0.2 g/ケース）。6 月 28 日に所定濃度に調整した各薬剤を、ハンドスプレーを用いて苗に散布。翌日イネいもち病菌孢子（平均 3.3×10^5 個/ml，Tween20 を 1 万倍で添加）を噴霧接種，25℃の温室に一晩置き，その後 7 日間ガラス温室で管理。調査は入り込んだ葉も見られたため，発病葉数を調査。防除価は，次式により算出。防除価 = $(1 - \text{散布区の苗当たり発病葉数} / \text{無散布区の苗当たり発病葉数}) \times 100$ 。

III 検定上の留意点

筆者らは、アゾキシストロピン 100 ppm に加え、1 ppm でも検定を実施している。シバいもち病菌の場合、QoI 剤高度耐性の主な原因となる作用点タンパク質チトクローム *b* の F129L 変異菌に比べ、G143A 変異菌は QoI 剤に高度耐性を示すことが明らかになっている (Kim et al., 2003)。そこで、F129L 変異菌がアゾキシストロピン 1 ppm 添加培地で検出できるのではないかとこの仮説を立てている。

ただし、2014～15年に三重県で採取した 1,097 菌株の培地検定では、QoI 剤耐性の程度に差は確認されていない。また、1-sec PCR法 (早野ら、一部未発表; 林ら, 2015) を用いて、これらの菌株について遺伝子検定を行ったところ、培地検定の結果とすべて一致した (鈴木啓史ら, 2016)。この遺伝子検定は 143 番目のアミノ酸変異をターゲットにしていることから、三重県で確認された QoI 剤耐性イネいもち病菌は、143 番目のアミノ酸変異株と考えられる。

なお、佐賀県の 2014 年の調査において、10 ppm のアゾキシストロピンを添加した検定培地上で、わずかに生育するイネいもち病菌が検出されている (図-5)。菖蒲は、このときアゾキシストロピン (1,000 倍) を散布した生物試験において、病斑数に基づく発病抑制率が耐性菌で 32% 以下と低い条件で、このわずかに生育する菌に対する発病抑制率は 83% 以上であることから、10 ppm でわずかに生育する菌株は、現段階で感受性菌として整理することが妥当と考えられている (菖蒲, 未発表)。

今後、F129L 変異菌の発生も調査しながら、検定する薬剤濃度について、改めて議論する必要がある。

IV 耐性菌対策としての防除法

殺菌剤に依存した防除体系では、耐性菌の顕在化は多

くの場合時間の問題である。そのため、殺菌剤防除だけでなく、いもち病菌の生態に基づく管理を併せて実施する必要がある。いもち病は種子伝染性病害であることから、①耐性菌汚染のない採種圃産の種子に更新すること、②塩水選を実施し不良なもみを除去すること、③効果の高い種子消毒を実施することが、重要である。また、飼料用イネやマイナー品種等で採種圃産種子が手に入らない場合、ベノミル水和剤による追加防除 (種子浸漬または育苗箱灌注) でいもち病に対する防除対策を強化する (鈴木ら, 2014)。

長期残効型の育苗箱散布粒剤等では、MBI-D 剤、QoI 剤の 2 系統で続けて耐性菌が顕在化したことから、育苗箱散布粒剤等の耐性菌顕在化リスクの高さが憂慮される。廣岡・石井 (2014) は、QoI 剤の使用が約 20 万 ha まで拡大した 2012 年に、オリサストロピンの効果低下を最初に確認したことから、この普及面積が耐性の顕在化に強く作用していると推定している。また、同様に鈴木文彦ら (2016) は、使用面積率が耐性菌管理の要点であることを指摘している。これらのことから、育苗箱散布粒剤等の使用にあたって、使用面積率を考慮して年次ローテーションを実行し、さらにその年内も作用機構の異なる系統の殺菌剤による体系防除の実施が必要である (宗・山口, 2008; 石井, 2014; 2015)。地域でこのことが確実に実行できないのであれば、育苗箱散布粒剤等には、耐性菌の発生リスクが低いとされる抵抗性誘導剤などを利用することが望ましいと考える。

おわりに

薬剤感受性モニタリングは、耐性菌顕在化のリスクが高いと考えられる薬剤の使用法や使用場所に絞って実施することで、時間と労力を軽減できる (鈴木ら, 2014)。また、耐性菌を確認した場合は、それが顕在化した背景を調査し、その背景に応じた対策を実行する。さらに、

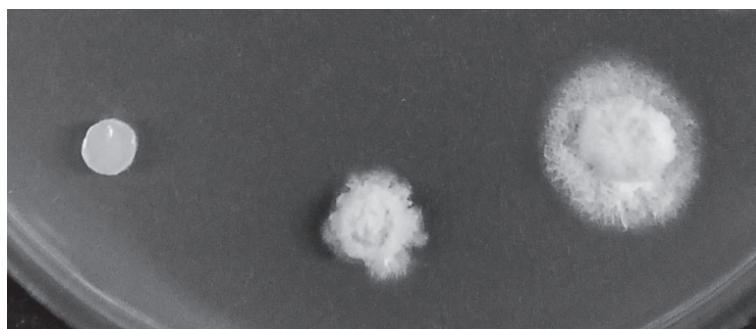


図-5 アゾキシストロピン添加培地におけるいもち病菌の生育
左：感受性菌，中：わずかに生育した菌，右：耐性菌。

これを未確認地においても展開することで、耐性菌の顕在化を未然に防ぐことが望まれる。

なお、本研究は「農林水産省 ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発プロジェクト (PRM08)」により実施した。

引用文献

- 1) 林 敬子ら (2015): 植物防疫 69(3): 558 ~ 562.
- 2) 廣岡 卓・石井英夫 (2014): 日植病報 80 特集号: p.172 ~ 178.
- 3) 石井英夫 (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II, 日本植物防疫協会, 東京, p.69 ~ 71.
- 4) ——— (2014): 植物防疫 68(5): 274 ~ 279.
- 5) ——— (2015): 植物防疫 69(8): 469 ~ 474.
- 6) KIM, Y. et al. (2003): Phytopathology 93(7): 891 ~ 900.
- 7) 宮川典子・富士 真 (2013): 第 23 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: p.25 ~ 36.
- 8) 中村亘宏 (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II, 日本植物防疫協会, 東京, p.14 ~ 16.
- 9) 大畑貫一 (1995): 作物病原菌研究技法の基礎, 日本植物防疫協会, 東京, p.7 ~ 8.
- 10) 宗 和弘・山口純一郎 (2008): 第 18 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 70 ~ 80.
- 11) 鈴木文彦ら (2016): 平成 28 年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集, 日本植物病理学会, p.118.
- 12) 鈴木啓史ら (2014): 第 24 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: p.52 ~ 63.
- 13) ———ら (2016): 平成 28 年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集, 日本植物病理学会, p.112.
- 14) WEI, C.-Z. et al. (2009): Pest Manag Sci. 65: 1344 ~ 1351.