

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(5)

ムギ眼紋病菌

北海道立中央農業試験場 ^{たけ}竹 ^{うち}内 ^{とおる}徹

はじめに

ムギ眼紋病は、ヨーロッパでは古くからみられている病害であるが、日本では1982年に秋田県で、1983年に北海道で発生が確認された比較的新しい病害である。世界的にみるとムギの主要病害の一つに挙げられるが、日本では本病が問題となっているのは北海道に限られているといつてよい。本病は伝染源が、土壌に残る罹病麦稈であることから、土壌病害的な性格を持つが、感染部位が根部ではなく茎基部であることから、薬剤散布による防除も可能である。そのため、ヨーロッパでは本病の対策として薬剤散布が広く取り入れられている。日本でも薬剤散布の検討がなされたが、その中でまずベンゾイミダゾール系薬剤であるベノミル剤及びチオファネートメチル剤が本病に対して有効であることが明らかにされ、チオファネートメチル水和剤の1,000倍液茎葉散布が実用化された。しかし、同剤の使用頻度の高い北海道の道東地方で、まもなく防除効果の低下がみられ、耐性菌の出現が確認された(清水・宮島, 1989)。その後、耐性菌の分布はかなり広範囲に及んでいることが明らかにされた(竹内ら, 1990)。

ベンゾイミダゾール系に替わる薬剤としてDMI剤であるプロピコナゾール剤が本病に有効であることが明らかとなり、実用化された。しかしプロピコナゾール剤は眼紋病菌のWタイプ菌に対しては効果を持つがRタイプ菌には効果が低いことが明らかとなった(眼紋病菌のタイプについては後述する)。

ここでは、本病原菌のベンゾイミダゾール剤感受性検定について解説するが、今後の対応のためDMI剤感受性についてもヨーロッパでの報告に私見を交えて解説したい。

I 病原菌

ムギ眼紋病の病原菌は、*Pseudocercospora herpotrichoides* (FRON) DEIGHTON (完全世代 *Tapesia yallundae* WALLWORK and SPOONER) である。本菌には、そ

Methods for Monitoring Fungicide Resistance-Cereal Eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*). By Toru TAKEUCHI

の培養形態から PDA 平板上で全縁平滑で生育が速い菌群 (fast-growing, even-edged: F/E) と、不定形羽毛状で生育の遅い菌群 (slow-growing, feathery-edged: S/F) との2菌群がある。SCOTT et al. (1975) はこれら培養形態とコムギ及びライムギに対する病原性からそれぞれ W タイプ (コムギに強, ライムギに弱) と, R タイプ (コムギに強, ライムギに強) との pathotype にしているが, NIRENBERG (1981) は培養形態と分生胞子の形態から, それぞれ var. *herpotrichoides* と var. *acuformis* との2変種に分類した。このように本菌には分類上の問題が残されているが, 多くの研究者は2菌群を培養形態から W タイプと R タイプに識別している。本稿における W タイプと R タイプの表記も培養形態によるものである。なお, 両タイプのコムギに対する病原性には差はない。

II 病原菌の分離方法

1 病原菌のサンプリング方法

本病の病斑の形成は地際部, せいぜい第2節間ぐらいまでの茎基部に限られる。病斑形成は既に根雪前の秋季に葉鞘にみられる。病斑は4月の雪解け後徐々に増加するが, この時期の葉鞘は *Microdochium nivale*, *Bipolaris* sp. などの寄生により褐変していることが多いため, 眼紋病による病斑を見分けるのは難しく, 病原菌の分離に適さない。その後, 病斑は節間伸長後期に葉鞘から稈に移行し, 出穂期ころには稈に特徴的な眼紋状の病斑を形成する。病原菌の分離はこの稈から行う。サンプリングの時期を遅くすると病斑の形成も増えるが, 病斑部が腐敗して雑菌の混入が増えたり, 成熟期近くになると稈が黄化して病斑がみづらくなる。したがって, 出穂期から乳熟期 (北海道では6月中旬から7月上旬) の間にサンプリングするのが適当である (この時期のサンプルはすでに当年の薬剤散布を受けていることを考慮しなければならない)。サンプリングは, 株ごとコムギを引き抜き, 茎ごとにばらして葉鞘をむくと稈に眼紋状の病斑が認められる。病斑の認められた稈は根をちぎり取り, 長さ20 cm ぐらいで切ると, 割り箸状のサンプルとなるので, これを圃場ごとに紙封筒に入れておく。一つの株から集

中することなく、圃場内数か所からまんべんなくサンプリングする。コムギが倒伏した圃場では倒伏部近くの倒伏していない株をみれば大抵病斑が見つかる。倒伏部の株は病斑部の腐敗が進行していることが多く、病原菌の分離には適さない。また、密植している部分や過繁茂となっているところで発病はみつけやすい。サンプルは独立した病斑のあるものが望ましい。このようにして紙封筒に入れたサンプルは、乾いていれば冷蔵庫内で長期間保存でき、数か月以上は病原菌の分離に支障はない。

2 病斑部からの病原菌の分離

なるべく独立した病斑をカミソリで切り取るか輪切りにして、常法にしたがってアンチホルミンで表面殺菌した後、ストレプトマイシン加用 PDA 平板に静置する。培養は 22°C で 2 週間程度かかる。特に R タイプ菌の生育は遅い。培養日数を短縮すると、比較的生育の速い W タイプ菌を優占的に分離することになりかねないので気をつける。

また、分離には硫酸銅 800 ppm をストレプトマイシン加用 PDA に添加した選択培地が便利である(角野ら, 1991)。この選択培地上では病原菌は、茶褐色の特徴的な培養形態を示す。選択培地では菌の生育がさらに遅くなるので、培養日数をさらに延長する必要がある。

分離後の病原菌は PDA 斜面で室温で 1 年間は保存できる。

III ベンゾイミダゾール剤に対する感受性検定

1 判定基準

眼紋病菌のベンゾイミダゾール剤(ペノミル剤及びチオファネートメチル剤)に対する感受性検定は最低生育阻止濃度(MIC)法が使われている。

日本で分離された眼紋病菌のベンゾイミダゾール剤に対する感受性をペノミル剤及びチオファネートメチル剤を用いて調査した結果を図-1及び図-2に示した。それによると、いずれの薬剤についても三峰性の分布を示し、ペノミル剤では 2 ppm 以下、200 ppm 以上及びその中間にそれぞれピークが認められた。

ベンゾイミダゾール剤に対する眼紋病菌の感受性は、カーペンダジム 1 ppm (BROWN et al., 1984; COSKUN et al., 1987) またはペノミル 2 ppm (GRIFFIN and KING, 1985; HOLLINS et al., 1985; KING and GRIFFIN, 1985) における生育の有無によって判定されている。そこで、ペノミル 2 ppm を感受性菌と耐性菌との境界となる MIC 値とし、ペノミル剤を 2 ppm 添加した培地によって耐性検定を行うのが適当であると判断した。さらに、ペノミル剤

を 200 ppm 添加した培地での生育の有無も併せて調査すれば、中度耐性菌と高度耐性菌の識別も可能である。ここで、実際の薬剤散布に使われているのがチオファネートメチル剤で、感受性検定に使われるのがペノミル剤となるが、諸外国の成績との比較のためには検定方法を統一することが望ましいと考えた。当然のことながら両剤に対する耐性は交差する。また、本基準による検定結果とチオファネートメチル剤の圃場における防除効果とは高い相関が認められている(竹内ら, 1990, 表-1)。

なお、病原菌の W 及び R タイプとベンゾイミダゾール感受性とは無関係で、それぞれのタイプに耐性菌が存在する。

表-1 コムギ眼紋病に対するチオファネートメチル水和剤(70%)の防除効果(1989)

病原菌 耐性菌株率 (%)	発病度		防除価
	チオファネートメチル 水和剤(70%)*	無散布	
7.4	25.1	82.0	69.4
26.1	43.2	94.2	54.1
100.0	42.8	41.0	0

*: 1,000 倍液を 2 回散布

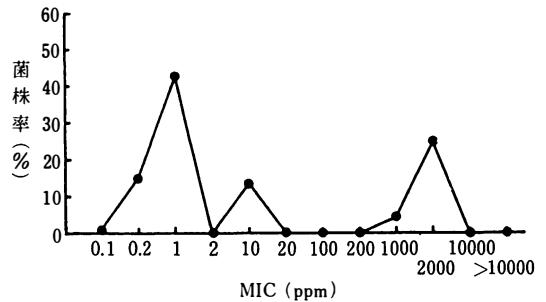


図-1 コムギ眼紋病菌のペノミル感受性の頻度分布 (n=120)

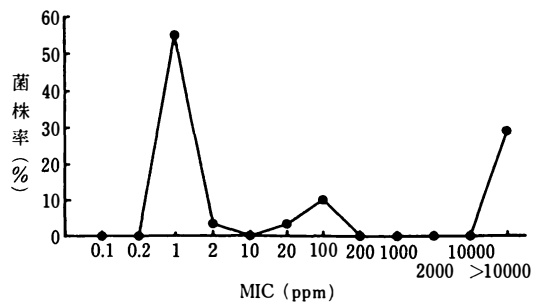


図-2 コムギ眼紋病菌のチオファネートメチル感受性の頻度分布 (n=120)

2 検定方法

PDA 平板で 18~22°C, 14 日間培養した検定菌株を直径 5mm のコルクボーラで打ち抜き、ペノミル水和剤を有効成分で 0.2, 200 ppm の濃度になるように加えた PDA 平板に接種する。接種後 18~22°C で 14 日間培養し、菌の生育の有無を調査し、感受性菌、中度耐性菌、高度耐性菌の判定をする。中度耐性菌と高度耐性菌の区別の必要がないときはペノミル 200 ppm 添加培地を省いてもよい。また、R タイプ菌は生育が密となってコルクボーラで打ち抜きづらいことがあるので、前培養を CMA (Corn meal agar) で代替してもよい。また、R タイプ菌の中には生育がかなり遅いものもあるので必ず対照のペノミル無添加培地における生育と比較しないと、判定を誤る可能性があるので注意する。

3 検定結果

1 圃場当たり 20 菌株程度分離すればその圃場におけるベンゾイミダゾール剤の防除効果がおおよそ推定できる。耐性菌率が 30% 以下であればベンゾイミダゾール剤の散布が有効であるとされる (GRIFFIN and KING, 1985; 竹内ら, 1990)。また、広い地域を対象に耐性菌の分布を調査する場合には、1 圃場当たりの病原菌の分離は数菌株程度にとどめ、調査圃場筆数を増やしたほうがよい。

IV DMI 剤に対する感受性

1 病原菌のタイプと DMI 剤感受性

病原菌の W タイプと R タイプの DMI 剤に対する感受性には明らかな差異が認められる。北海道産の菌株について、トリアジメホン及びプロピコナゾール剤 (両剤は現在北海道のコムギに広く使われている) に対する感受性をみると、プロピコナゾール剤に対する MIC は W タイプ菌が 1.56~6.25 ppm, R タイプ菌が 12.5~100 ppm であり、トリアジメホン剤に対する MIC は W タイプ菌が 25~100 ppm, R タイプ菌が 6,400 ppm 以上であった。すなわち、R タイプ菌の MIC は W タイプ菌より明らかに高かった。圃場におけるプロピコナゾール剤散布による眼紋病の防除効果も、W タイプ菌の優占する圃場で認められたが、R タイプ菌が優占する圃場では認められなかった (竹内ら, 1991; なお、本剤はヨーロッパでは眼紋病を対象には使われていない)。

ここで問題になるのは、果たして R タイプ菌を耐性菌あるいは低感受性菌と呼ぶか否かということである。圃場における DMI 剤耐性菌の出現様式やその遺伝的背景については、必ずしも一様ではないことが最近しだいに明らかになってきた。しかし、これまで DMI 剤感受性は病原菌のポリジーンによるもので、低感受性化は連続的

に推移するとされてきた。したがって、このような W 及び R タイプ菌の DMI 剤に対する感受性の明確な差異は、W 及び R タイプ菌本来の遺伝的な差異と考えるのが妥当である。事実、両者は遺伝的に隔離されていることが最近明らかにされた (竹内・国永, 1993)。

以上のことから、眼紋病菌の DMI 剤感受性の検定を行う際には、菌のタイプによって感受性のベースラインが異なるので、検定する菌株が W タイプ菌か R タイプ菌かを明確にしておくことが前提条件となる。

LEROUX et al. (1988) は眼紋病菌の DMI 剤に対する感受性を多くの剤について検討している (表-2)。その中でトリアゾール系など多くの DMI 剤では、R タイプ菌が W タイプ菌より感受性が低かった。しかし、W タイプ菌の中に感受性が低下した系統の存在が認められている (日本ではまだこのような例は確認されていない)。また、ピペリジン系のフェンプロピジン及びモルホリン系のフェンプロピモルフに対する感受性では W タイプ菌と R タイプ菌の関係が逆転しているが、これらの剤はトリアゾール系の DMI 剤と菌の感受性に関して負の交差関係があるとされている。

2 供試 DMI 剤の選定

眼紋病菌の DMI 剤感受性の検定には、その地域で一般に使われている DMI 剤を供試する例が多く、剤の特定はない。プロピコナゾール剤は、W 及び R タイプ菌の

表-2 ムギ眼紋病菌の DMI 剤及びモルホリン関連薬剤に対する感受性

薬 剤	EC ₅₀ (ppm)		
	W タイプ		R タイプ
	a	b	
イマザリル	1.0	6.7	8.3
プロクロラズ	0.05	1.2	0.4
トリフミン	0.4	40	125
ピリフェノックス	0.04	140	100
フェナリモル	0.7	3.1	7.1
シプロコナゾール	0.3	20	26
ジニコナゾール	0.6	4.5	14
テブコナゾール	0.3	11	14
ヘキサコナゾール	0.05	28	32
ペンコナゾール	0.04	105	250
プロピコナゾール	0.2	14	10
トリアジメホン	3.8	26	>26
トリアジメノール	1.2	83	>83
フェンプロピジン	22	1.1	0.2
フェンプロピモルフ	11	1.1	0.1
トリデモルフ	0.2	2.5	16.5

LEROUX et al. (1988) より作成。

感受性の差異も明らかで、いずれのタイプの菌についても感受性の幅がその推移をひろえる薬剤濃度の範囲内にあるので、DMI 剤感受性の検定に適当である。

前述した眼紋病菌のプロピコナゾール剤に対する感受性値は、本剤が実用化される以前に得られ、うどんこ病を対象としたトリアジメホン剤をも含む DMI 剤の使用歴が全くない圃場から分離された病原菌も含んでいることから、眼紋病菌のプロピコナゾール剤に対する感受性のベースラインは MIC で W タイプは 1.56~3.13 ppm, R タイプは 12.5~50 ppm の範囲内にあると考えられる。

しかし、菌の DMI の感受性の変動は連続的なものが多く、また、ベースラインデータの信頼性の高さからも、感受性の推移を調査するには MIC 法より、EC₅₀ による検定のほうがより適当である。LEROUX et al. (1988) の報告からすると、眼紋病菌のプロピコナゾール剤に対する EC₅₀ のベースラインは W タイプ菌が 0.2 ppm 以下、R タイプ菌が 10 ppm 以下と推定されるが、供試株を本当に野生型とみなせるかどうかについてなお検討を要する。

3 検定方法

検定方法はベンゾイミダゾール剤の場合に準じる。しかし、EC₅₀ を求める場合には PDA を用いると、R タイプ菌の生育が不定形羽毛状になり、菌叢直径の計測がしづらくなることがあるので、不適當である。ここでは LEROUX et al. (1988) の方法を紹介する。検定には合成培地 (KH₂PO₄, 2 g ; K₂HPO₄, 1.5 g ; (NH₄)₂SO₄, 1 g ; MgSO₄·7H₂O, 0.5g ; グルコース, 10 g ; 酵母エキス, 2 g ; 寒天, 15 g ; 蒸留水, 1l) を用いる。培養は 20°C で行い、平板上の菌叢の直径を 3~4 週間 7 日間おきに計測する。試験は薬剤無添加の対照のほかに、少なくとも 4 濃度設定し、各処理は 3~4 反復行う。EC₅₀ の算出は常法による。

V 今後の問題点

現在、ヨーロッパでは DMI 剤の中で R タイプ菌にも

活性を持つプロクロラズ剤もしくはその混合剤が眼紋病菌の防除に使われている。しかし、北海道ではコムギ病害に対する薬剤防除は DMI 剤偏重の傾向にある。DMI 剤の過用は病原菌の低感受性化を招く可能性があるため、今後は W 及び R タイプの菌構成の推移のみならず、それぞれの菌の DMI 剤感受性の変動にも留意しなければならない。実際、W タイプ菌の中にプロクロラズ剤に対する感受性が低下した系統の出現が認められている (LEROUX et al., 1988)。また、本剤の使用により眼紋病菌の感受性に変動がみられなかったとする報告 (GALLIMORE et al., 1987) と、感受性が低下したとする報告 (KING et al., 1986) とがあるが、いずれにしても DMI 剤偏重の中で今後どのように病原菌の感受性が推移するか観察していく必要がある。

引用文献

- 1) BROWN, M. C. et al. (1984) : Plant Pathology 33 : 101~111.
- 2) COSKUN, H. et al. (1987) : Trans. Br. Mycol. Soc. 88 : 117~119.
- 3) GALLIMORE, K. et al. (1987) : Plant Pathology 36 : 290~296.
- 4) GRIFFIN, M. J. and J. E. KING (1985) : EPPO Bulletin 15 : 485~494.
- 5) HOLLINS, T. W. et al. (1985) : Plant Pathology 34 : 369~379.
- 6) KING, A. C. et al. (1986) : Australasian Plant Pathology 15 : 22~23.
- 7) KING, J. E. and M. J. GRIFFIN (1985) : Plant Pathology 34 : 272~283.
- 8) LEROUX, P. et al. (1988) : Pestic. Sci. 23 : 119~129.
- 9) NIRENBERG, H. I. (1981) : Z. Pfl Krankh. Pfl Schutz 88 : 241~248.
- 10) SCOTT, P. R. et al. (1975) : Trans. Br. Mycol. Soc. 65 : 529~538.
- 11) 清水基滋・宮島邦之 (1989) : 日植病報 55 : 503 (講要).
- 12) 角野晶大ら (1991) : 同上 57 : 485~491.
- 13) 竹内 徹ら (1990) : 北日本病虫研報 41 : 53~57.
- 14) ———ら (1991) : 日植病報 57 : 402~403 (講要).
- 15) ———ら (1992) : 同上 58 : 543 (講要).
- 16) ———・国永史朗 (1993) : 同上 59 : 269~270 (講要).
- 17) ——— (1993) : 第 3 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要.