

薬剤耐性イネいもち病菌に関する研究
第7報 培地上における IBP, EDDP, isoprothiolane に耐性を示す
変異菌の取得と変異菌の3剤に対する感受性

飯島章彦

Akihiko IJIMA: Studies on drug-resistant strains of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara 7. Selection of resistant mutants to IBP, EDDP and isoprothiolane on agar medium containing these fungicides and their fungicide sensitivity

薬剤耐性菌が実際圃場で問題となる以前から、実験室内において耐性菌取得が試みられていた。その方法としては大別して二つの方法が用いられ^{4,5,6,8,10,11)}ており、一つは培地中の薬剤含有濃度を順次高めて継代培養するいわゆる馴致法で、もう一つは突然変異個体取得法である。後者の方法は分生孢子または菌糸に由来する変異個体を取得するもので、この手法を用いて薬剤に対する耐性化の難易や圃場出現の予測についての研究がなされている¹⁾。

いもち病菌の場合、馴致法で水銀剤耐性菌、銅剤耐性菌、Blasticidin S 耐性菌が、突然変異個体取得法でKasugamycin, Blasticidin S, 有機リン剤の各耐性菌が得られており、これらの耐性菌を用いて、多賀⁷⁾はシコクビエいもち病菌の薬剤耐性遺伝機構を、上杉⁹⁾はその耐性メカニズムの生化学的機構を明らかにしつつある。

筆者はいもち病菌のIBP感受性検定を平板希釈法で行なう際、含菌ディスクの一部からセクター状に旺盛な生育を示す変異菌の出現をしばしば観察した。このようなセクターの出現は、菌株の感受性値の判定を困難にさせることもあるため、培地上での変異菌出現の実態を明らかにするとともに、変異菌の2, 3の薬剤に対する感受性について調査したのでここに報告する。

試験方法

1 変異菌出現の経時変化

IBP, EDDP, isoprothiolane のいずれかを含有するイネ生葉煎汁寒天培地上に、見里培地で前培養した菌そう周辺部を径4mmのコルクポーターで打ち抜いた含菌ディスクをシャーレ当り10~12コ植え付けた。28°Cで培養し、移植6日目から14日目まで経時的にセクターの出現状況を肉眼観察した。供試菌株は分離直後のIBP感性菌6株と中等度耐性菌4株を用い、供試薬剤の淘汰濃度は最低生育阻止濃度よりやや高い濃度とした。

2 出現した変異菌の薬剤感受性

上記方法によって得られた変異株のIBP, EDDP, isoprothiolane に対する感受性を調査した。すなわち、出現したセクターの先端部を少量鈎菌分離し、ただちに見里培地に移植して4~5日間前培養を行い、コルクポーターで打ち抜いた含菌ディスクを3剤の所定濃度含有イネ生葉煎汁寒天培地に移植してMIC値および菌そう生育阻止率を求め、得られた感受性値から3剤に対する耐性パターンを検討した。

3 変異菌に対する薬剤の防除効果

母株およびそれから得られた耐性変異株に対するIBP, EDDP, isoprothiolane, BcSの防除効果を鉢試験により検討した。供試品種は「信濃籾3号」で7葉期苗を用い、接種は噴霧接種とし、薬剤散布は接種1日前(予防的散布)または1日後(治療的散布)に行った。

4 母株と変異株の諸性質の比較

培地上における気中菌糸量、菌そう色、孢子形成量および判別品種に対する病原性について両者の比較を行った。

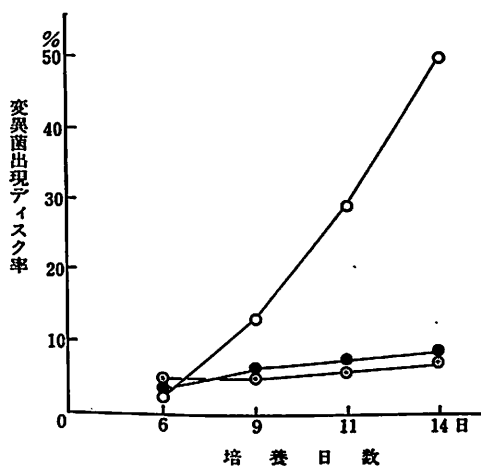
5 変異菌の感受性変化

変異菌を薬剤無添加PSA培地で継代培養し、感受性の復帰が起こるか否かを調査した。

結果

セクターの経時的出現率は第1図に示すように淘汰薬剤によってその出現頻度および様相が異なった。IBP, EDDPを用いた場合には変異菌出現ディスク率が低く、培養日数が長くなっても出現率はほとんど増加しなかったが、isoprothiolaneでは培養日数を経るにしたがってセクター出現ディスク率が急速に増加し、移植14日後の出現率は50%を越え、その後もなお増加する傾向を示した。

このようにしてIBP感性母株からの変異によって取得された変異株の一部を供試して3剤に対する感受性を調査したところ、第1表のように菌そう生育阻止率は多様な値をとり、耐性度の低いものから高いものまで変化



第1図 薬剤含有培地上における変異菌出現ディスク率の経時変化

○: IBP含有培地(324ディスク当り), ●: EDDP含有培地(360ディスク当り), ○: isoprothiolane含有培地(360ディスク当り)

に富んだ変異が認められた。

次に変異株の IBP, EDDP, isoprothiolane に対する耐性パターンを第2表に示した。パターンは6つに大別され、母株がIBP感性菌の場合には、IBPで淘汰した場合、3剤に対して同時に強度に耐性化するもの(表中a)が圧倒的に多かったが、3剤に対し中等度に耐性化する場合(表中b)も比較的多く認められた。EDDPで淘汰した場合もIBPで淘汰した場合と同様の傾向が認められた。isoprothiolaneの場合も上記2剤とほぼ同じ傾向を示したが、isoprothiolaneのみに耐性化する株も得られた(表中e, f)。次に、母株がIBPの中等度耐性菌の場合についてみると、IBPが淘汰薬剤の場合には3剤に対し強度に耐性化するものが多く(表中a)、つづいて主にIBPとEDDPのみに母株よりわずかに耐性化した菌株(表中c)が多くみられた。EDDPで淘汰した場合には、3剤に対し強度に耐性化した菌株(表中a)に比べ、母株よりIBP, EDDPにやや強く耐性化するパターンの菌株(表中c)

第1表 取得された変異株の3剤に対する感受性(感性母株からの変異の場合)

変異菌の淘汰薬剤	検定薬剤と濃度 (ppm)	菌その生育阻止率区分に該当する菌株数											
		0	~ 10	~ 20	~ 30	~ 40	~ 50	~ 60	~ 70	~ 80	~ 90	~ 100	
IBP	IBP 25	46	4	1	1						*		
	" 50	9	29	1	1		4	2	3			3*	
	EDDP 10		2	25	11	8		4		1*		1	
	" 20					1	15	20	9			7*	
	isoprothiolane 10	7	22	6	1	1		3	10	2*			
" 20			3	17	17	1	3					11*	
EDDP	IBP 25	15	6	3	1								
	" 50	4	5	1		2	1	4	5	1		2	
	EDDP 10	1	2	5	2	4	10	1					
	" 20						4	4	6	9		2	
	isoprothiolane 10	5		2	2		1	4	10	1			
" 20		1		3	1	2	1					17	
isoprothiolane	IBP 25	46	6	1		1	1	1					
	" 50	17	33	2	1	1						6	
	EDDP 10	1	7	26	16	2	1		1	2		4	
	" 20						13	38	1	1		7	
	isoprothiolane 10	11	20	17	4		3	1			4		
" 20			5	23	19	4	1	2	1		5		

1) *印の区分に母株の感受性が含まれる。
2) 供試した変異株の数は IBP で淘汰したもの52株, EDDP で淘汰したもの25株, isoprothiolane で淘汰したもの56株。

が多く取得された。淘汰薬剤が isoprothiolane の場合には IBP, EDDP の場合と異なり、isoprothiolane のみに強度に耐性化する場合(表中e)が圧倒的に多くみられた。このように母株のIBP感受性、また淘汰する薬剤によって得られた変異株の耐性パターンには微妙な違いが認められた。

さらに、淘汰濃度によって出現する耐性パターンが異なるかを調査した。その結果、第3表に示すように、低濃度で淘汰した場合にはパターンが多様化しており、高

濃度になるにしたがって単純化した。圃場から分離される耐性菌と同程度の耐性度を示す中等度耐性株(表中b)は、いずれの薬剤で淘汰した場合でも、最低生育阻止濃度付近の低濃度で処理した場合に得られた。

3剤に対し強度に耐性化した変異株、中等度に耐性化した変異株、およびその感性母株に対するIBP, EDDP, isoprothiolane, BcSの防除効果の検討結果を第4表に示した。母株に対してはいずれの薬剤も高い防除効果を示したが、耐性変異株に対しては効果減退が認められた。

第2表 IBP感性母株および耐性母株から得られた変異株の耐性パターン

母株 ¹⁾	淘汰薬剤 ²⁾	供試変異 菌株数	パターンの別菌株数 ³⁾					
			a	b	c	d	e	f
IBP 感性菌	IBP	88	77	11				
	EDDP	71	50	19	2			
	isoprothiolane	129	113	5	5	1	2	3
IBP中等度耐性菌	IBP	44	30			13	1	
	EDDP	54	15			39		
	isoprothiolane	113	18				3	92

- 1) 感性菌：MIC 25 ppm 15株供試，耐性菌：MIC 50~100ppm 17株供試
- 2) 淘汰濃度：IBP 20~80ppm, EDDP 15~45ppm, isoprothiolane 20~65ppm
- 3) a：IBP, EDDP, isoprothiolane に対し強度に耐性化したもの。
 b： " " 中等度 " (園場分離の耐性菌と同程度)。
 c：主に IBP と EDDP に対し母株よりわずかに耐性化したもの。
 d：主にIBP と isoprothiolane に対し母株よりわずかに耐性化したもの。
 e：isoprothiolane のみに強度に耐性化したもの。
 f：isoprothiolane のみに中等度に耐性化したもの。

第3表 淘汰濃度別に得られた変異株の耐性パターン (感性母株からの変異の場合)

変異菌の淘汰薬剤	淘汰濃度 (ppm)	供試変異 菌株数	パターンの別菌株数 ¹⁾					
			a	b	c	d	e	f
IBP	20	13	3	10				
	35	10	10					
	50	5	5					
	65	7	7					
	80	9	9					
	95	7	7					
EDDP	15	22	4	16	2			
	25	5	5					
	35<	0						
isoprothiolane	20	15	8	2	3			2
	35	23	21			1		1
	50	22	22					
	65<	0						

1) 第2表参照。

中等度耐性変異株に対してはIBPでは予防，治療の両散布で，EDDP, isoprothiolane では治療散布のみで減退がみられ，強度耐性変異株に対してはこれら3剤のいずれの散布の効果も認められなかった。BcS散布ではいずれの菌株に対しても高い防除効果が認められた。

次に，母株と変異株の培養性質および病原性の比較を行った結果を第5表に示した。少数の菌株で気中菌糸，菌そう色，孢子形成が母株と異なった性質を示したが，大部分の変異株は母株の性質を受け継いでいた。病原性の変化は全く認められなかった。

さらに，本試験でみられた変異が適応によるものか，遺伝子支配によるものかを推測するため，変異株を薬剤無添加培地で継代培養したところ，第6表のとおり6回継代しても感受性の復帰は起こらず，当初の耐性を維持していた。

考 察

本報告では，薬剤に1代のみ接触して得られるセクタ

ー由来の耐性変異菌の諸性質について検討した。IBP EDDP, isoprothiolane 含有培地におけるセクター出現状況を見ると，培養4日目ころ，ディスクの一点から菌糸が伸長し，以後旺盛に生育し，6日目を過ぎる頃からあたかもディスク全体から均一に生育したような生育様相を示した。このようなことから，薬剤感受性検定に際しては，変異菌由来の菌糸を明らかに識別できる早い時期に調査を終えるか，もしくは長時間の培養を必要とする場合には，事前のチェックが必要と思われる。変異菌(セクター)出現率を3剤間で比較するとIBP, EDDPで低く，isoprothiolaneで高かった。このように薬剤間差が認められた原因としては，淘汰濃度が供試薬剤によって異なること，あるいは薬剤の菌糸に対する殺菌または拮菌作用程度が異なることなどが考えられる。いずれにせよ，感受性検定時には変異個体出現による感受性値の誤判定に留意する必要がある。

セクター由来の変異個体のIBP, EDDP, isoprothiolane に対する感受性程度は多様であったが(第1表)，

第4表 母株と変異株に対する各種薬剤の防除効果 (鉢試験)

供試菌株 ¹⁾	MIC (IBP) (ppm)	防 除 価 ²⁾							
		IBP		EDDP		isoprothiolane		B c S	
		予	治	予	治	予	治	予	治
Ho-8 (母株)	20	97	93	95	88	86	88	87	93
Ho-8-MRm	60	13	27	86	37	80	44	80	91
Ho-8-HRm	120 \leq	0	6	18	5	5	0	93	90
Ho-40 (母株)	25	93	93	98	92	85	92	91	85
Ho-40-MRm	60	27	33	95	21	83	58	96	88
Ho-40-HRm	120 \leq	6	15	0	0	10	14	92	92

- 1) MRmは3剤に対し中等度に耐性化した株 (IBP, MIC 60ppm),
HRmは " 強度 " (IBP, MIC 120ppm).
2) 予:予防的散布, 治:治療的散布.

第5表 母株と変異株の培養性質およびレースの比較 ()内は菌株数

感性母株 No	供試した 変異株数	気中菌糸 ¹⁾		菌そう色 ²⁾		胞子形成 ³⁾		レ ー ス ⁴⁾	
		母 株	変 異 株	母 株	変 異 株	母 株	変 異 株	母 株	変 異 株
1	14	+	+(14)	BL	BL(12) BL~BR(2)	良	良(14)	007	007(14)
2	15	+	+(15)	BL	BL(15)	良	良(15)	007	007(15)
3	13	+	+(12) +(1)	BL	BL(9) BR(4)	良	良(13)	007	007(13)
4	7	+	+(5) +(1)±(1)	BL	BL(4) BR(1), W(2)	良	良(6) 不良(1)	007	007(6)
5	4	+	+(4)	BL	BL(4)	良	良(4)	007	007(4)

- 1) 気中菌糸 +:やや多い, +:少ない, ±:わずか
2) 菌そう色 BL:黒, BR:褐色, W:白
3) 胞子形成 オートミル培地上, 遠鏡調査
4) レ ー ス 判別9品種に対する接種結果から判定

第6表 変異株の薬剤無添加培地における継代培養回数と感受性値の変化

供試菌株 ¹⁾	IBPのMIC(ppm) ²⁾		
	0	3回継代	6回継代 ³⁾
Ho-8-MRm	60	60	60
-HRm	120	120	120
Ho-40-MRm	60	60	60
-HRm	120	120	120<

- 1) MRm:中等度耐性変異株, HRm:強度耐性変異株.
2) 20ppmきざみの希釈列.
3) PSA 斜面培養, ほぼ10日おきに継代培養した.

ほぼ6つの耐性パターンに大別された(第2表,第3表)。IBP感性母株から比較的高濃度で淘汰して得られた株は総じて3剤に同様に強度耐性化している場合が多かったが, 淘汰濃度が最低生育阻止濃度付近の低濃度の場合には, 中等度耐性株が得られた。一方, IBP耐性菌を母株として用いた場合には, 淘汰薬剤がIBP, EDDPの場合に3剤強度耐性化および両剤にやや耐性が增強される2つのパターンが多くみられた。これに比較し, isoprothiolaneが淘汰薬剤の場合にはisoprothiolaneのみに強度耐性化する場合が多く, 前2剤とは異なる様相を示した。この他のパターンを示した菌株はきわめて少なかった。

多賀⁷⁾はシコクビエいもち病菌の耐性機構の遺伝学的解析において高度に耐性化した菌株の耐性遺伝子を*ibp*と同定し, 3剤の高度耐性は同一遺伝子支配の交さ耐性であることを明らかにしている。本報告でのパターンaは多賀の同定した*ibp*にあたる遺伝子に支配されているものと考えられる。また, 多賀⁷⁾はisoprothiolaneのみに耐性化する事例も観察しており, IBP, EDDPとisoprothiolaneは交さしない場合のあることを示唆している。本報告においても, 感性母株からisoprothiolaneで淘汰して得られた菌株の中にisoprothiolaneのみに単独に耐性化した事例(パターンe, f)が少数ではあるがみられ, また耐性母株を用いた場合にはisoprothiolaneに対してのみ強度耐性化した事例(パターンe)が多くみられた。この結果は多賀の観察結果を裏付けているものと考えられる。

一方, 中等度耐性菌の耐性に関して, 多賀⁷⁾は複数の遺伝子の存在を想定しているが, 本結果をみても, (1)3剤に同時に中等度に耐性化するもの, (2)主に2剤に耐性化するもの, (3)1剤に耐性化するものなどがみられることから, 中等度耐性は遺伝的に単純でないことがうかがわれた。

以上のように種々の変異菌が取得されたが, これらは

薬剤無添加培地で継代培養しても感受性の復帰はみられず安定しており(第6表), また培養性質も感性母株と大差なく(第5表), イネに対する病原性も保持している(第4表)ことから, イネ体上で同様の変異が起これば, *in vivo* で定着する可能性があるものと考えられる。そこで, 圃場から分離される自然耐性菌と *in vitro* で得られた変異耐性菌の耐性度, 耐性パターンを比較してみると, 自然耐性菌は主としてパターンbに当る中等度耐性菌であり, パターンaの強度耐性菌は極めて稀にしか採集されないが, 人為耐性菌の多くはパターンaの変異を示している。この相違については, 次のようなことが原因として考えられる。第3表では, IBP 20ppm のような低濃度で処理した場合に中等度耐性株(パターンb)の取得率が強度耐性株(パターンa)より高いが, それ以上の濃度になるとすべて強度耐性株が得られている。一般にIBP粒剤を水面施用した場合のイネ体中のIBP濃度は, 最高値が20ppm前後であることが知られており³⁾, このような濃度下では強耐性株より中等度耐性株の方が出現しやすいのではないかと推測される。また, 強耐性菌はイネ体上の生存能力が感性菌や中等度耐性菌(自然および人為)に比較して著しく劣勢である²⁾ことから, イネ体上に出現しても, 生存, 増殖が困難であると考えられ, これらが自然環境下で強耐性菌が稀である一要因となっているものと考えられる。なお, 本試験で得られたisoprothiolaneのみに強度に耐性化した株(パターンe)の自然環境下での採集事例は報告されていないが, これもパターンaの耐性を持つ菌株と同様の理由によるのではないかと考えられる。

以上, 述べてきたように, 薬剤含有培地上でIBP, EDDP, isoprothiolane に対する変異耐性株は容易に得られる。得られた耐性株の耐性度および3剤に対する耐性パターンは微妙に異なったが, 圃場から一般的に採集分離されるIBP中等度耐性変異株も得られた。このようにして得られたIBP中等度耐性変異株の3剤に対する耐性パターンは少数の例外事例は認められるものの, 大多数は3剤耐性菌であった。このことから実際のIBP耐性菌対策においては3剤を同一グループとして扱い, 防除指導を行うことが適当であるように考えられた。ただし, isoprothiolaneで淘汰した場合にはisoprothiolaneのみに耐性化する事例もみられたので, 本剤が主因となって耐性化が生じるような場合には, 必ずしも3剤間の交差耐性が成立しない場合もあるものと推測される。

摘 要

1 IBP, EDDP, isoprothiolane のいずれかを含有

した培地上に供試菌株の含菌ディスクを植え付けると, いずれの薬剤においても比較的容易に耐性変異株が得られた。

2 耐性変異株の出現状況と供試薬剤との関係をみると, IBP, EDDP では出現率が低く, isoprothiolane では高かった。

3 得られた耐性変異株の3剤に対する感受性程度は, 変異幅が大きく, 多岐にわたったが, 耐性パターンでは6つに類別された。

4 IBP感性母株を用いた場合には, いずれの薬剤で淘汰しても3剤に対し同様に強度耐性化するものが多く得られた。また淘汰濃度の低い場合には, 3剤に対し中等度に耐性化するものもみられた。またisoprothiolaneのみに耐性化する事例も少数ではあるが認められた。

5 IBP中等度耐性菌を母株に用いた場合には, IBP, EDDPで淘汰した場合に3剤強度耐性化, またはIBPとEDDPにやや耐性が増強される変異が多かったが, isoprothiolaneで淘汰した場合にはisoprothiolaneのみに強度に耐性化するものが圧倒的に多く得られた。

6 以上のことから, 3剤は交差耐性の関係にあることが推測された。しかし, isoprothiolaneのみに耐性化する事例が認められたことから, 交差耐性の認められない場合のあることも示唆された。

7 変異耐性株に対するIBP, EDDP, isoprothiolaneの防除効果は減退した。

8 耐性変異株の培養性質(気中菌糸量, 菌そう色, 孢子形成量)は母株のそれとほぼ同等であり, 薬剤感受性変化に伴う病原性の変化もなかった。

9 変異株の耐性度は薬剤無添加培地で継代培養しても安定していた。

引用文献

- 1) Georgopoulos, S. C., Kappas, A. and Hastic, A. C. (1976) Induced Sectoring in Diploid *Aspergillus nidulans* as a Criterion of Fungitoxicity by Interference with Hereditary Processes. *Phytopathology* 66: 217~220.
- 2) 飯島章彦(1985) 薬剤耐性イネいもち病菌に関する研究 第8報 室内取得のIBP耐性変異菌の圃場における動態. 北陸病虫害研究会報 33: 投稿中.
- 3) クミアイ化学工業株式会社(1976) キタジンP粒剤の安全性と多目的利用. 技術普及解説書 No. 221.
- 4) 中村広明・桜井 寿(1968) いもち病菌のプラストサイジンSに対する耐性. 農薬検査所報告 No. 8: 21~25.
- 5) Ohmori, K. (1987)

Studies on characters of *Pyricularia oryzae* made resisant to Kasugamycin. J. Antibiotics A 20: 109~114. 6) 鈴木穂積 (1962) いもち病の薬剤耐性. 日植病報 27: 85. 7) 多賀正節 (1981) 薬剤耐性いもち病菌の遺伝学的研究. 農業生物学報 1: 1~75. 8) 上杉康彦・片桐政子・福永一夫 (1969) いもち病菌の抗生物質および有機磷剤に対する耐性. 農技研報 C

23: 93~112. 9) 上杉康彦 (1981) イネいもち病菌の薬剤耐性. 日農薬会誌 6: 239~246. 10) 山崎義人・土屋 茂・新関宏夫・諏訪隆之 (1964) いもち病の薬剤抵抗性に関する研究. 農技研報 D11: 1~110. 11) 吉井 啓・浅田泰次・木曾 皓・田辺 昇 (1958) フェニル酢酸水銀に対する稻熱病菌の耐性. 日植病報 23: 215~218. (1985年9月7日受領)