

圃場より分離したイネ紋枯病菌のバリダ マイシン A 感受性検定法の一事例¹⁾

末富敬止郎・片山俊郎・吉見里子

(武田薬品工業株・農薬研究所)

大原一能

(香川県病害虫防除所)

緒 言

バリダシン(有効成分バリダマイシン A)は、1972年に登録され、有効かつ安全な農薬として広く使用されている。バリダマイシン A (VM-A)は、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* nov. var. *limoneus* が産生する抗生物質で、Iwasaら(1971)によって *Rhizoctonia* 属菌に対する作用が明らかにされた。

野中(1978)は3ヶ年にわたり、全国から分離した紋枯病菌、338菌株を供試して試験し、本剤に対するイネ紋枯病菌の耐性菌出現の可能性が少ないと考察した。しかしながら、最近栃木県、富山県、香川県および他の数県からイネ紋枯病菌のVM-Aに対する薬剤耐性の有無に関する問題提起があった。それらについては、その都度検討した結果、検定方法上の問題、あるいは疑似紋枯症の多発などが関与しており紋枯病菌の感受性低下は認められなかった(片山・大西、未発表)。

1987年に香川県で分離したイネ紋枯病菌について、VM-A感受性検定の方法および感受性低下の有無について検討したので、その結果を報告する。また、検定方法について2,3の考察を行い、若干の提案を行った。

材料および方法

1. 供試菌

1987年9月~10月に香川県各地の20圃場から分離したイネ紋枯病菌(*Rhizoctonia solani* kuhn (IA)), 138菌株を用いた。菌の分類は渡辺・松田(1966)の方法に準じ培養型によって行った。比較対照には武田薬品農薬研究所常用の *Rhizoctonia solani* (菌株番号: TFF-101; バリダマイシン感受性菌)を用いた。

2. 供試薬剤

バリダシン液剤(Lot No. AB334光, VM-A 3%)あるいはバリダシン標準品(VM-A 91.5%)を用いた。

1) A method for the evaluation of the sensitivity to validamycin A of *Rhizoctonia solani* isolated from paddy field rice plant.

By Keishiro SUTOMI, Toshiro KATAYAMA, Satoko YOSHIMI and Kazutaka OHHARA.
Proc. Assoc. Pl. Protec. Shikoku, No. 23 : 7 ~ 14 (1988).

3. 供試培地

イネ紋枯病菌の分離にはPSA培地（ジャガイモ300 g，しょ糖20 g，粉末酵母エキス2 g，寒天20 g，井水1 ℓ）を，抗菌力試験（*in vitro* 検定）には，PSA培地；Czapek 培地あるいは素寒天培地（寒天20 g，井水1 ℓ）を用いた。その他の実験条件は結果の表に付記した。

4. 供試作物

紋枯病防除効果試験（*in vivo* 検定）には，イネ（品種：フクヒカリ，a/10,000 ポット植，50 - 60 日苗）を用いた。

5. 抗菌力試験（*in vitro* 検定）

第1回検定：素寒天培地に，VM-A 終末濃度がそれぞれ0，0.47，0.94，1.88，3.75，7.5，15，30，60 ppmとなるようバリダシン液剤を加え，120℃ 15 分間加圧殺菌後，1 シャーレ（9 cm）当り10 ml 分注し検定培地とした。この中央に素寒天培地で1代培養した菌叢の周縁部から打ち抜いた菌叢ディスク（ ϕ 4 mm）を置き，32℃で2日間培養後，菌叢直径を測定した。菌糸伸長阻害率は，次式（式1）によって求めた。菌糸伸長阻害率（%）= $(1 - L_t / L_c) \times 100$ ；（式1）。但し， L_t ：薬剤添加区菌叢直径（mm）， L_c ：薬剤無添加区菌叢直径（mm）。

第2回検定：PSA培地で数代継代培養した菌叢の周縁部から打ち抜いた菌叢ディスク（ ϕ 6 mm）を検定培地（素寒天培地，Czapek 培地，PSA 培地；それぞれバリダマイシン標準品をVM-Aとして0，0.47，1.88，7.5，30 ppm添加）の中央に置き28℃で2日間培養後，菌叢直径を測定し，式1により菌糸伸長阻害率（%）を算出した。

6. 紋枯病防除効果試験（*in vivo* 検定）

供試水稻の株元（地上5 cm）に，PSA 培地で数代継代した菌叢ディスク（ ϕ 8 mm）を接種し，28℃，100% R.H.の湿室に2日間保ち稲体に一次病斑を形成させた。接種2日後にバリダシン液剤の1,000倍液（30 ppm，展着剤シ نداイン0.03%添加）を7.5 ml/ポットの割合でスプレーガン（圧力0.6 kg/cm²）で散布した。その後，28℃，80-100% R.H.の湿室に保ち，散布12日後に全茎について病斑高を調査した。防除価は次式（式2）により算出した。区制は2連制（1ポットあたり9茎接種）とした。防除価 = $(1 - H_t / H_c) \times 100$ ；（式2）。但し， H_t ：薬剤区の病斑高（cm）， H_c ：無散布区の病斑高（cm）。

結 果

1. 抗菌力試験（*in vitro* 検定）

第1回検定：VM-A 添加素寒天培地上の菌糸伸長阻害率は30 - 100%にわたって分布した（第1表）。VM-A 30 ppm以上で菌糸伸長阻害の不十分な菌株（阻害率60%以下）は供試138菌株中23菌株であった。VM-Aの紋枯病菌に対する特異的な作用である菌糸の異常分岐（Iwasaら，1971；石崎ら，1979；若江・松浦，1973）は，全ての菌株に認められた。70%以上の菌糸伸長阻害率が認められた菌株数は，0.47 ppmでは49，0.94~15 ppmでは60~75，30，60 ppmではそれぞれ99，113であり，VM-Aの濃度上昇にほぼ比例して増加する傾向がみられた。

第2回検定：第1回検定においてVM-A 30 ppmで伸長した23菌株について3種類の培地により検定した（第2表，第3表）。その結果，素寒天地およびCzapek 培地では，いずれの菌株にも強い菌糸伸長阻害と異常分岐が認められた。これら菌株の*in vitro*におけるVM-A感受性は高かった。しかしながら，検定培地がPSA培地（富栄養培地）の場合には，菌糸伸長阻害および菌糸異常分岐は，高濃度（VM-A 30 ppm）においてもほとんど認められなかった。

2. 紋枯病防除効果試験（*in vivo* 検定）

第1表 菌糸伸長阻害率を指標とした*R. solani*(IA)菌のVM-A感受性の*in vitro*検定結果(第1回検定)¹⁾

VM-A 供試濃度	菌 株 数										合 計
	菌 糸 伸 長 阻 害 率 (%)										
	0-10	-20	-30	-40	-50	-60	-70	-80	-90	-100	
0.47 ppm	0	0	0	1	9	21	58	17	4	28	138
0.94	0	0	0	1	9	16	47	29	5	31	138
1.88	0	0	0	1	14	25	38	23	5	32	138
3.75	0	0	0	7	11	20	39	24	9	28	138
7.5	0	0	0	3	13	20	27	26	11	38	138
15.0	0	0	0	5	24	22	24	19	10	34	138
30.0	0	0	0	0	9 ²⁾	15 ²⁾	15	11	8	80	138
60.0	0	0	0	0	4	5	16	8	5	100	138

- 1) 菌株分離培地：PSA培地。検定前培養培地：素寒天培地。検定培地：素寒天培地。
培養温度：32℃。培養時間：48hr。
2) 第2回検定および薬効検定供試菌株(内1菌株は褐色紋枯病菌につき除外した)

第2表 菌糸伸長阻害率を指標とした*R. solani*(IA)菌のVM-A感受性の*in vitro*検定結果(第2回検定)¹⁾

菌株No.	菌 糸 伸 長 阻 害 率 (%)											
	P S A培地				Czapek培地				素寒天培地			
	30	7.5	1.88	0.47ppm	30	7.5	1.88	0.47ppm	30	7.5	1.88	0.47ppm
9	0	0	0	0	85.3	76.2	64.3	41.0	78.6	79.1	75.5	67.6
21	0	0	0	0	86.5	86.0	83.7	43.9	86.7	83.4	81.7	74.7
58	1.4	0	0	0	85.4	77.1	73.2	13.9	90.5	86.3	80.2	75.3
69	0	0	0	0	86.6	81.1	71.5	38.7	89.5	85.9	81.6	74.4
71	0	0	0	0	85.9	74.7	65.8	30.6	84.7	80.9	77.8	71.4
72	0	0	0	0	84.6	76.8	53.3	21.7	81.4	79.9	71.4	67.4
81	12.3	0	0	0	85.0	83.1	76.2	47.3	79.3	83.3	83.6	70.6
96	18.9	0	0	0	87.4	83.8	72.0	44.4	81.4	84.6	75.7	73.1
99	0	0	0	0	84.9	79.3	65.9	41.0	87.0	84.3	83.8	71.1
102	7.1	0	0	0	90.1	86.7	83.1	48.3	90.0	86.0	82.7	77.3
107	0	0	0	0	87.3	87.9	83.7	63.0	87.4	87.7	82.1	77.5
108	2.1	0	0	0	86.1	78.1	70.8	45.9	81.6	81.1	76.1	69.8
116	0	0	0	0	86.8	81.1	57.4	33.0	86.8	81.4	78.7	72.8
122	13.7	0	0	0	83.9	76.4	77.7	36.4	79.3	81.2	80.6	80.2
127	2.7	0	0	0	87.9	84.6	80.0	47.5	90.0	89.9	82.6	71.4
128	15.0	0	0	0	86.2	85.5	77.7	41.3	82.9	76.0	81.0	70.9
137	0.9	0	0	0	90.0	87.4	73.5	20.1	83.0	91.3	82.1	77.6
138	58.7	31.9	13.7	13.8	86.5	87.5	78.7	73.3	87.9	85.1	82.5	82.7
140	0	0	0	0	83.2	68.5	63.1	6.5	88.7	78.7	80.9	71.4
141	0	0	0	0	83.1	77.8	46.1	8.4	87.4	86.0	74.2	70.1
155	0	0	0	0	86.6	84.9	76.8	36.4	86.6	84.2	79.5	69.6
169	0	0	0	0	86.5	73.5	56.2	15.1	86.2	81.2	77.7	64.2
171	0	0	0	0	81.4	70.5	55.2	18.8	89.4	81.2	75.0	62.3
TFF- 101 ²⁾	0	0	0	0	85.8	83.0	73.7	29.9	84.8	81.0	84.6	74.9

- 1) 検定前培養培地：PSA培地。検定培地：素寒天培地，Czapek培地，PSA培地。
培養温度：28℃。培養時間：48hr。
2) 対照菌株(バリダマイシン感受性菌株)

第3表 菌糸異常分岐を指標とした *R. solani* (IA) 菌のVM-A感受性の *in vitro* 検定結果(第2回検定)¹⁾

菌株No.	P・S A 培地				Czapek 培地				素寒天培地			
	30	7.5	1.88	0.47ppm	30	7.5	1.88	0.47ppm	30	7.5	1.88	0.47ppm
9	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
21	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
58	+	—	—	—	++	++	++	±	++	++	++	++
69	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
71	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
72	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
81	+	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
96	+	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
99	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
102	+	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
107	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++
108	+	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
116	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
122	+	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
127	+	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
128	+	—	—	—	++	++	++	±	++	++	++	++
137	+	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
138	+	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++
140	—	—	—	—	++	++	++	—	++	++	++	++
141	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
155	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
169	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
171	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++
TF F— 101 ²⁾	—	—	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++

- 1) ++: 菌糸先端の異常分岐が顕著に認められ、かつ菌糸伸長は強く抑制される。
 +: 菌糸先端の異常分岐が肉眼で認められる。±: 菌糸先端の異常分岐は肉眼では認められないが実体顕微鏡では認められる。—: 菌糸先端の異常分岐が認められない。
- 2) 対照菌株(パリダマイシン感受性菌株)

抗菌力試験の第1回検定でVM-Aの30 ppmで伸長した23菌株を供試した。VM-Aの効果は、防除価75~87であり、いずれの菌株に対しても高かった(第4表)。

考 察

VM-Aのイネ紋枯病菌に対する作用は静菌的である(若江・藤森, 1971; 若江, 1981; Nioh and Mizushima, 1974)。その作用の強弱は、検定培地の栄養条件によって異なり、貧栄養下ではVM-Aの作用は顕著に認められる(Iwasaら, 1971; Nioh and Mizushima, 1974)。また、著者らは抗菌力試験(*in vitro*検定)で供試菌の培養歴、特に前培養の条件によって、検定時の菌生育の勢いに強弱を生じることを観察した(未発表)。これに加えて菌株個有の薬剤感受性の変動も当然存在する。

第4表 VM-Aの紋枯病防除効果 (*in vivo*検定の結果)¹⁾

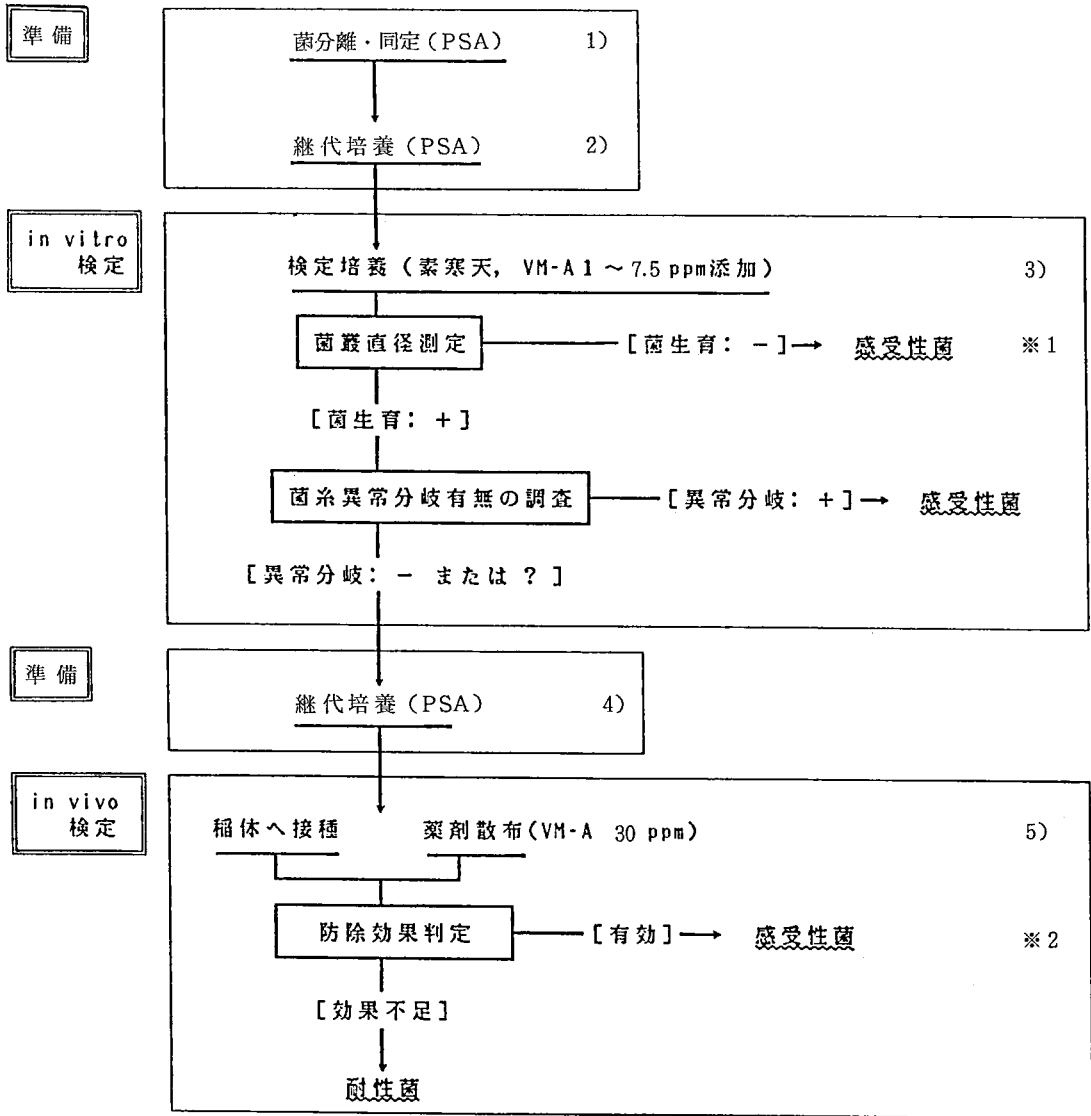
2 反復の平均値

菌株No. ²⁾	病斑高 (cm) (接種14日後調査)		防 除 価
	バリダジン液剤 1,000倍散布区	無 散 布 区	
9	3.4	25.0	86.4
21	3.5	25.5	86.3
58	3.7	23.4	84.2
69	3.5	21.6	83.8
71	4.2	26.3	84.0
72	4.0	20.4	80.4
81	4.6	20.8	77.9
96	4.1	18.8	78.2
99	3.3	24.7	86.6
102	4.4	17.9	75.4
107	3.6	17.9	79.9
108	3.9	17.6	77.8
116	2.9	21.4	86.4
122	3.2	17.2	81.4
127	4.0	19.6	79.6
128	4.1	26.8	84.7
137	3.2	20.9	84.7
138	2.5	13.0	80.8
140	3.3	25.1	86.9
141	3.5	25.5	86.3
155	3.1	18.7	83.4
169	4.0	21.9	81.7
171	4.0	16.7	76.0
TFF- 101 ³⁾	3.7	24.2	84.7

- 1) 供試作物：水稻 (品種・フクヒカリ)。規模：a/10,000ポット，2連制。接種日：昭和62年5月27日 (∅8mmPSAディスク)。散布日・量：昭和62年5月29日，7.5ml/ポット。調査日：昭和62年6月10日。
- 2) 第1回抗菌力検定でVM-A 60 ppmおよび30 ppm添加培地で菌糸伸長阻害率が60%以下の菌株
- 3) 対照菌株 (バリダマイシン感受性菌株)

従来一般にVM-A感受性検定法では、菌糸伸長阻害率を指標として、あわせて菌糸の異常分岐の有無も観察する方法がとられてきた。これらの方法では前培養条件を規定しておく必要がある。また、菌糸伸長阻害率は菌叢直径の対無処理比で算出される (式1) が、無処理区の菌糸伸長速度によっては抑制率が低く表現される場合 (無処理区の菌生育が不十分な場合) があるので注意すべきである。このように、菌糸伸長阻害の程度を指標として行われる抗菌力試験 (*in vitro* 検定) の結果は、検定条件によって変動するおそれがある。

今回は、素寒天培地上で2回の抗菌力試験 (*in vitro* 検定) を行った。第1回検定では供試138菌株中23菌株に対する菌糸伸長阻害が不十分であった。しかし第2回検定では上記23菌株は、0.47 ppmでほとんど生育せず低感受性菌株は検出されなかった。一方、同時に実施したPSA培



第1図 紋枯病菌のVM-A感受性検定法(試案)

- 1) 培養型で同定(場合により菌糸融合で同定)。雑菌を除去する。
- 2) 1~2代培養する(28℃)。菌生育を旺盛にする。
- 3) 28℃, 48時間培養。無処理の菌糸がシャーレ内に充満した時点で調査する。
- 4) 1~数代培養する(28℃)。菌生育を旺盛にし,病原性を高める。
- 5) 接種2日後散布(治療効果)あるいは接種直前散布(予防効果)。
接種後28℃, 100% R.H. に48時間保つ。接種7~10日後調査。

- ※1 菌生育の判定基準 + : 菌叢直径比率 \geq 無処理の30%
 - : 菌叢直径比率 < 無処理の30%
- ※2 防除効果の判定基準 有 効 : 予防-防除値 \geq 80 治療-防除値 \geq 70
 効果不足 : 予防-防除値 < 80 治療-防除値 < 70

地（富栄養培地）上の検定では菌糸伸長阻害はほとんど認められず、Czapek培地上の検定では1.88 ppmで生育する菌株（菌糸伸長阻害率60%以下）が5菌株認められた。このように、菌糸伸長阻害を指標とした耐性検定の結果は検定条件（前培養、検定等の培地、培養温度）によって変動する。若江・松浦（1973）はVM-Aが作用すると紋枯病菌菌糸が異常分岐することを報告している。今回の検定では、菌糸異常分岐は2回の検定のいずれにおいても供試菌23菌株に対して薬剤処理区のみ認められたことから、VM-Aに特異的な反応として感受性検定における有効な指標たり得ると考えられた。しかし、通常は菌糸伸長阻害を指標とした判定方法が採用されていることから、低い菌糸伸長阻害率が得られた場合には菌糸の異常分岐が同時に認められた場合でも菌糸長に基づいて“耐性菌の可能性あり”と判定され得る。そこで、より普遍的な手段として、紋枯病防除効果試験（*in vivo*検定）を行い、23菌株に対するVM-Aの効果を検討した。その結果、VM-Aの効果は高く、いずれの菌株も感受性と判定され、耐性菌は検出されなかった。これらのことから菌糸伸長阻害率が低い検定結果が得られた場合は異常分岐による検定、紋枯病防除効果試験（*in vivo*検定）の手順で感受性の判定をすることが適切であると考えられた。

以上の結果からVM-Aのイネ紋枯病菌に対する感受性検定は、第一段階として（1）抗菌力試験（*in vitro*検定）による菌糸伸長阻害率の測定と菌糸異常分岐の出現の有無による判定を行う。菌糸伸長阻害率が低く、かつ菌糸異常分岐がないか又は明瞭でない菌株については、さらに（2）紋枯病防除効果試験（*in vivo*検定）を行うことが実用的見地から最も適切であると結論した。検定の手順および方法の詳細を第1図に示した。

本研究にあたり、紋枯病の判定及び検定方法について種々助言をいただいた香川農試・都崎主席研究員に感謝申しあげる。

摘 要

香川県各地の圃場から分離したイネ紋枯病菌138菌株のバリダマイシンA（VM-A）感受性を検定した。菌糸伸長阻害および菌糸異常分岐による抗菌力試験（*in vitro*検定）および紋枯病防除効果試験（*in vivo*検定）の結果、耐性菌は検出されなかった。菌糸伸長阻害を指標とした抗菌力試験（*in vitro*検定）検定の結果は、検定時あるいは前培養時の培地の組成、培養条件（培養温度）などにより変動したが、紋枯病防除効果試験（*in vivo*検定）の結果と一致する培養条件を設定することができた。菌糸異常分岐の有無を指標とした検定の結果は、素寒天培地、あるいはCzapek培地を用いることにより紋枯病防除効果試験（*in vivo*検定）の結果と一致した。イネ紋枯病菌菌株のVM-A感受性検定において抗菌力試験（*in vitro*検定）の結果で判定しにくい場合には、紋枯病防除効果試験（*in vivo*検定）による必要があると考えられた。

引 用 文 献

IWASA, T., E. HIGASHIDE, H. YAMAMOTO and M. SHIBATA (1971) : Studies on validamycins, new antibiotics. II, Production and biological properties of validamycins A and B, *J. Antibiotics*, 24 : 107 - 113.

野中福次（1978）：イネ紋枯病菌のバリダマイシン耐性検定試験，バリダシン普及会発行：PP. 1 - 23.

渡辺文吉郎・松田明（1966）：畑作物に寄生する *Rhizoctonia solani* Kuhn の類別に関する研究，指定試験（病害虫），第7号：PP. 118.

- 石崎寛・藤野正人・河野満・久能均(1979) : 三重大学農学部学術報告, 59 : 1 - 32.
- 若江治・松浦一穂(1973) : バリダマイシンのイネ紋枯病防除作用に関する研究第5報薬剤処理菌糸の細胞学的観察, 日植病報, 39 : 130. (講演要旨)
- 若江治・藤森健一(1971) : バリダマイシンのイネ紋枯病防除作用に関する研究第4報防除効果発現の機作(Ⅱ), 日植病報, 27 : 389. (講演要旨)
- 若江治(1981) : バリダマイシンの作用点と作用機作, *J. Pestic. Sci.*, 6 : 455 - 456.
- NIHO, Y. and S. MIZUSHIMA. (1974) : Effect of validamycin on the growth and morphology of *pellicularia sasakii*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20 : 373 - 383.

S u m m a r y

The sensitivity of *Rhizoctonia solani* to Validamycin A (VM-A) was evaluated *in vitro* and *in vivo* and some consideration was made to simplify the test methods.

In the first *in vitro* test, 23 out of 138 isolates of *R. solani* showed considerable growth on Water Agar (WA) containing 30 ppm of VM-A. While, in the second *in vitro* test these 23 isolates showed poor growth on WA containing 0.47 ppm of VM-A, and were shown to be sensitive to VM-A.

The results of the *in vitro* test varied depending on the nutritional content of the medium used, variations between individual isolates and the cultural conditions of the fungi prior to the test (medium, temperature, period, etc.).

Thus the degree of the inhibition of hyphal growth *in vitro* is considered not to be satisfactory to determine the sensitivity of the isolate of *R. solani* to VM-A.

Abnormal branching of hyphae, a typical fungal reaction to VM-A, was observed with all of 23 isolates in the *in vitro* test, agreeing with the results of an *in vivo* test.

Authors propose the preferable evaluation system : Conduct an *in vitro* test using WA medium with 1 to 7.5 ppm of VM-A, measure colony diameter to compute growth inhibition rate and observe the abnormal branching of the hyphae.

Conduct *in vivo* test when abnormal branching is not observed or obscure. In such a case the use of an *in vivo* test for the final judgement of sensitivity will be preferable and appropriate.