

イネいもち病菌のメラニン生合成阻害剤  
耐性菌の生態と防除に関する研究

木村 教男

2019 年 3 月

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤感受性菌と耐性菌の性質比較	18
緒言	18
材料および方法	18
1) 供試菌株	18
2) 病原性検定	18
① 供試植物	18
② 接種法	18
③ 評価法	20
3) 温度感受性検定	20
① 温度条件	20
② 評価法	20
4) 紫外線耐性検定	20
① 紫外線処理法	20
② 評価法	21
5) シタロン脱水酵素活性の測定	21
① MBI-D 剤感受性シタロン脱水酵素と耐性シタロン脱水酵素の調製と酵素活性の測定	21
i) 供試菌株	21
ii) ジクロシメットとシタロンの調製	21
iii) シタロン脱水酵素の調製	22
iv) シタロン脱水酵素の活性測定法	25
v) $K_m$ 値, $V_{max}$ , $K_{cat}$ の算出	25
② 異なる温度, pH におけるシタロン脱水酵素活性の測定	25
③ 複数の感受性菌株と耐性菌株のシタロン脱水酵素活性の測定	26

i) 供試菌株 -----	26
ii) 粗酵素液の調製 -----	26
iii) 酵素活性の測定法 -----	26
結果 -----	27
1) MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の病原性 -----	27
2) MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の温度感受性 -----	27
3) MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の紫外線耐性 -----	30
4) MBI-D 剤感受性菌と耐性菌のシタロン脱水酵素活性 -----	30
① 感受性と耐性シタロン脱水酵素活性の比較 -----	30
② 異なる温度条件下におけるシタロン脱水酵素活性の比較 ---	33
③ 異なる pH 条件下におけるシタロン脱水酵素活性の比較 ----	33
④ 感受性菌株群と耐性菌株群の粗酵素を用いたシタロン脱水 酵素活性の比較 -----	33
考察 -----	36
第3章 シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤耐性菌の生態 -----	39
緒言 -----	39
材料および方法 -----	39
1) MBI-D 剤耐性の安定性 -----	39
① 供試菌株および供試植物 -----	39
② 植物体上での継代 -----	39
③ MBI-D 剤感受性の検定法 -----	40
2) 感受性菌と耐性菌の競合試験 -----	41
① 供試菌株 -----	41
② 植物体上での継代および MBI-D 剤感受性の検定法 -----	41
3) イネ葉への感染成立時間の調査 -----	43
① 供試菌株 -----	43

② イネへの接種法 -----	43
③ 評価法 -----	45
4) MBI-D 剤の使用を中止した圃場における耐性菌の頻度推移 ---	45
① モニタリング圃場 -----	45
② 供試菌株の分離および MBI-D 剤感受性の検定法 -----	45
結果 -----	45
1) MBI-D 剤耐性の安定性 -----	46
2) MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の競合 -----	46
① 感受性菌 P-307 株と耐性菌 NH5-1 株の競合 -----	46
② 感受性菌 HT2-4 株と耐性菌 HK2-11 株の競合 -----	46
③ 感受性菌 P-1 株と耐性菌 P-1025 株の競合 -----	46
④ 感受性菌 PO26 株と耐性菌 9-1 株の競合 -----	46
3) イネ葉への感染成立時間 -----	49
4) MBI-D 剤の使用を中止した圃場における耐性菌の頻度推移 ---	51
① MBI-D 剤耐性菌頻度推移の単年度調査 -----	51
i) 宮崎県宮崎市圃場 -----	51
ii) 佐賀県武雄市圃場 -----	51
iii) 兵庫県宍粟市圃場 -----	51
iv) 兵庫県神戸市圃場 -----	54
② MBI-D 剤耐性菌頻度推移の経年調査 -----	54
i) 佐賀県唐津市圃場 -----	54
ii) 兵庫県加東市圃場 -----	54
iii) 兵庫県篠山市圃場 -----	54
iv) 兵庫県赤穂郡圃場 -----	57
v) 兵庫県姫路市圃場 -----	57
考察 -----	57

#### 第4章 シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤耐性菌管理対策

-----	61
緒言 -----	61
材料および方法 -----	63
1)ベノミルによる種子伝染性いもち病菌の防除 -----	63
①ベノミルの MBI-D 剤感受性菌と耐性菌に対する菌糸伸長阻害 活性の検定 -----	63
i)供試菌株 -----	63
ii)寒天平板希釈法 -----	63
②ベノミルの MBI-D 剤感受性菌と耐性菌に対する発芽管伸長阻 害活性の検定 -----	64
i)供試菌株 -----	64
ii)寒天平板希釈法 -----	64
③種子消毒による粃および玄米上の孢子形成抑制効果の検定 -----	64
i)供試粃 -----	64
ii)種子消毒および評価方法 -----	64
④種子消毒による苗いもち防除効果の検定 -----	65
i)供試粃 -----	65
ii)種子消毒，栽培および効果判定方法 -----	65
⑤育苗箱灌注による苗いもち防除効果の検定 -----	66
i)供試粃 -----	66
ii)育苗箱灌注，栽培および効果判定方法 -----	66
⑥育苗箱灌注による苗の葉いもち防除効果の検定 -----	66
i)供試粃 -----	67
ii)育苗箱灌注，栽培および効果判定方法 -----	67
⑦SBI 剤の種子消毒とベノミル育苗箱灌注との体系処理に よる育苗期のイネいもち病防除効果の検定 -----	68
i)供試粃 -----	68
ii)種子消毒，育苗箱灌注，栽培および効果判定方法 -----	68

2) ベノミル育苗箱灌注とジクロシメット箱施用を用いた防除体系による MBI-D 剤耐性菌の管理 (その 1)	69
① 試験圃場	69
② 供試植物	69
③ 供試化合物, 処理薬量および処理方法	69
④ MBI-D 剤感受性の検定法	69
⑤ 防除効果の評価法	71
3) ベノミル育苗箱灌注とジクロシメット箱施用を用いた防除体系による MBI-D 剤耐性菌の管理 (その 2)	71
① 試験圃場	71
② 供試植物	71
③ 供試化合物, 処理薬量および処理方法	71
④ MBI-D 剤感受性の検定法	72
⑤ 防除効果の評価法	72
4) 作用機作が異なる薬剤を用いた箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系による MBI-D 剤耐性菌の管理 (その 1)	72
① 試験圃場	72
② 供試植物	72
③ 供試化合物, 処理薬量および処理方法	74
④ MBI-D 剤感受性の検定法	74
⑤ 防除効果の評価法	74
5) 作用機作が異なる薬剤を用いた箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系による MBI-D 剤耐性菌の管理 (その 2)	74
① 試験圃場	76
② 供試植物	76

③ 供試化合物，処理薬量および処理方法 -----	76
④ MBI-D 剤感受性の検定法 -----	76
⑤ 防除効果の評価法 -----	78
結果 -----	78
1) ベノミルによる種子伝染性いもち病菌の防除 -----	78
① ベノミルの MBI-D 剤感受性菌と耐性菌に対する抗菌活性 ---	78
② 種子消毒による籾および玄米上の孢子形成抑制効果 -----	80
③ 種子消毒による苗いもち防除効果 -----	80
④ 育苗箱灌注による苗いもち防除効果 -----	85
⑤ 育苗箱灌注による苗の葉いもち防除効果 -----	85
⑥ SBI 剤の種子消毒とベノミル育苗箱灌注との体系処理による育苗期のいもち病防除効果 -----	85
2) ベノミル育苗箱灌注を用いた MBI-D 剤耐性菌管理対策 -----	88
① ベノミル育苗箱灌注とジクロシメット箱施用を組み合わせた防除体系による葉いもち防除効果 -----	88
② ベノミル育苗箱灌注とジクロシメット箱施用を組み合わせた防除体系による MBI-D 剤耐性菌頻度への影響 -----	93
3) 作用機作の異なる薬剤を用いた箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系による MBI-D 剤耐性菌管理対策 -----	95
① 箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系による穂いもち防除効果 -----	95
② 箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系による MBI-D 剤耐性菌頻度への影響 -----	99
考察 -----	107

第 5 章 総合考察	112
引用文献	125
要約	138
謝辞	143



## 第 1 章 緒言

*Pyricularia oryzae* Cavarra によって引き起こされるイネいもち病は、イネの最重要病害である。いもち病は葉や穂に病徴が発生するが (Fig. 1-1), 穂首に発病した場合には、被害穂は実に 80%の収量低下に陥る。世界的には、毎年 10~30%の収量低下が報告されており、30%の収量低下は、約 6000 万人分の食糧の損失に相当する

(Nalley *et al.*, 2016; Boddy, 2015)。イネいもち病が深刻な地域は、主に東アジアであり、日本の水稻栽培においても最重要病害として位置づけられている。特に最近では、いもち病が多発する年があり、その多発要因として、①箱育苗の普及、②イネいもち病弱抵抗性品種の作付面積の増加、③栽培者の高齢化による防除体制の弱体化などが挙げられている (内藤・越水, 1979; 内藤, 1994)。農林水産省公表の「平成 29 年産水稻の作付面積及び予想収穫量 (10 月 15 日現在)」の「水稻 (子実用) の年次別推移 (全国)」および日本植物防疫協会の「農薬要覧 2017」によると、2012 年~2016 年の水稻の作付面積が 1,478,000 ha~1,59700 ha で推移しているのに対して、いもち病の被害は葉いもちが 251,241 ha~364,357 ha, 穂いもちが 209,931 ha~399,389 ha でそれぞれ推移している (Fig. 1-2)。このいもち病による被害の数値は、作付面積の 13 %~23 %にものぼる。この被害面積が、いもち病防除を実施した上での数値であることを考慮すると、この統計資料は、日本の水稻栽培において、いもち病防除が必須であることを明確に示している。

イネいもち病の第一伝染源としては、保菌種子、室内外のイネわら、前作の刈り株の病斑などがあげられる。二期作、三期作などが行われる熱帯や亜熱帯地域では、刈り株などが伝染源になる可能性が高いと考えられている。しかしながら、温帯地域である日本では降雨などにより冷温下での乾燥と湿潤が繰り返されるため、このような環境条件への適応性の低いいもち病菌にとって、刈り株などの屋

外での越冬は屋内に比べ困難である．そのため，日本においては，保菌種子の他には，屋内に乾燥状態で置かれた稲わらや籾殻上で越冬した胞子や菌糸が伝染源になることは考えられる．しかしながら，近年，稲わらやその加工品が農作業に使用されることが少なくなっており，それらが恒常的な伝染源となるとは考え難い．したがって，日本の水稻栽培におけるいもち病の第一伝染源として最も重要視すべきはいもち病菌を保菌した種子である（吉野，2003）．

保菌種子は，育苗期間中のいもち病の伝染源となり，苗いもちや育苗期間中の葉いもちを引き起こす．育苗期間に発生するいもち病は，本田に持ち込まれるため，本田での接種源となり葉いもちを引き起こす．葉いもちは，その後の出穂期の伝染源となり穂いもちを引き起こし，減収の要因となるとともに，拡散した胞子が翌年の種籾に付着し，保菌籾の原因となる．したがって，種子消毒や葉いもち，穂いもち防除のために，農薬による防除が必要となる．

我が国においては，1950年代から防除を目的として，抗生物質を含め多くの種類の化学合成殺菌剤が開発・販売されている．主な本田のいもち病防除剤の例としては，抗生物質のカスガマイシン，リン酸生合成におけるメチルトランスフェラーゼの阻害剤であるイプロベンフォスやイソプロチオラン，イネの抵抗反応を誘導する抵抗性誘導剤（SAR剤）のプロベナゾール，チアジニルおよびイソチアニル，ミトコンドリアの電子伝達系を阻害するメトミノストロビン，アゾキシストロビン，オリサストロビン，作用機作は不明であるが主に散布剤として使用されるフェリムゾンやテブフロキン，メラニン生合成系における1,3,6,8-テトラヒドロキシナフタレン還元酵素（Fig.1-3）の阻害剤（MBI-R剤）のトリシクラゾール，ピロキロン，フサライド，同生合成系におけるシタロン脱水酵素の阻害剤（MBI-D剤）のカルプロパミド（Kurahashi *et al.*, 1996, 1997, 1998），ジクロシメット（Manabe *et al.*, 1999：小栗ら，1999：相馬ら，1999），フェノキサニル（西口ら，2001：山本ら，2001），同生合成系におけるポリケタイド合成酵素の阻害剤（MBI-

A



B



Fig. 1-1. Leaf blast (A) and panicle blast (B) occurred in paddy fields.

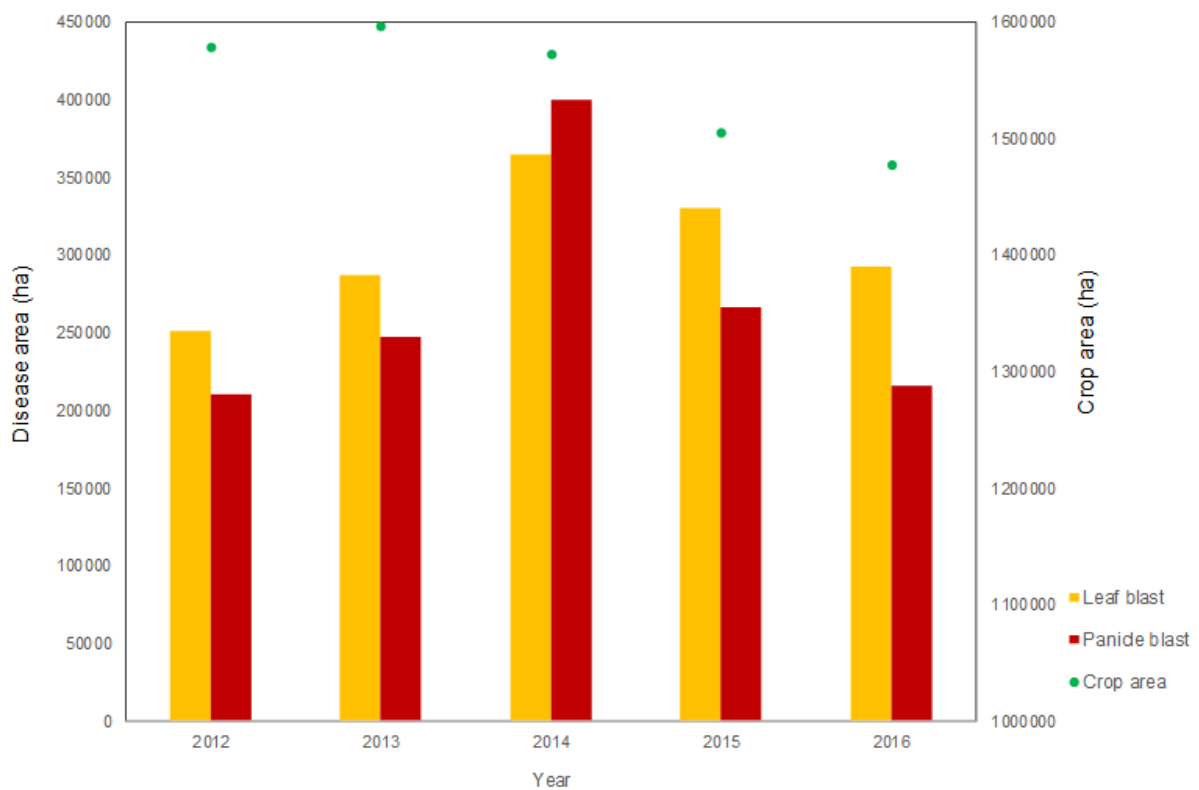


Fig. 1-2. Crop area of paddy rice and diseased area of rice blast from 2012 to 2016 in Japan. Green circle indicates rice planted area (ha) referred from Heisei 29 statistics of Agriculture, Forestry and Fisheries edited by Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Yellow and red bars indicate area (ha) of leaf blast and panicle blast, respectively, referred from pesticide manual (2017) edited by Japan Plant Protection Association.

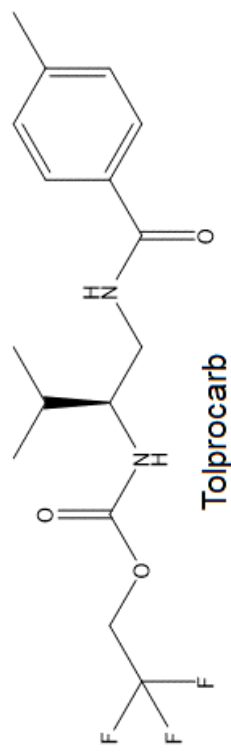
P 剤) のトルプロカルブなどがある (Fig. 1-3 および 1-4) (Banba *et al.*, 2017). また, 種子に感染しているいもち病菌を防除する剤としては, 細胞分裂を阻害するベンゾイミダゾール系のベノミル, 細胞膜成分であるエルゴステロールの生合成を阻害する Sterol Biosynthesis Inhibitor (SBI 剤), シグナル伝達を攪乱するフルジオキシニル, 多作用点のチウラム等がある.

いもち病防除剤のうちメラニン生合成阻害剤 (MBI 剤) は, 他の病害の防除には使用されない, 主にいもち病防除に特化した剤である. MBI 剤は, メラニン生合成を阻害するため培養コロニーの黒色化を阻害するが, いもち病菌に対する殺菌作用は示さない

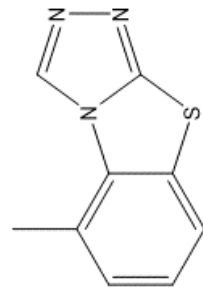
(Fig. 1-5). いもち病菌はイネの感染過程において, 胞子発芽管の先端に感染器官の付着器を形成する. 成熟した付着器の細胞壁の内側にはメラニンが沈着し黒色を呈する (Fig. 1-6). また, 付着器には 3 M にものぼるグリセロールが蓄積され (de Jong *et al.*, 1997), 浸透圧によって付着器外から水が流入し, 8 MPa という高い膨圧が発生する (Howard *et al.*, 1991). この膨圧を利用して, 構造的に最も弱い付着器直下に侵入糸を形成し, イネ表面を貫通して侵入する (Money and Howasrd, 1996). 付着器に沈着するメラニンは, 高い膨圧を生み出すためにグリセロールの細胞外への漏出を防ぐとともに, 細胞壁の強度を高めるために不可欠である. したがって, いもち病菌は, メラニン合成が阻害されると, 付着器におけるこの高い膨圧を生み出すことが出来ず, イネへの侵入能力を失う (Chida and Sisler, 1987; Howard and Ferrari, 1989). これが MBI 剤の作用機構である.

MBI 剤のうち最初に開発されたトリシクラゾール, ピロキロン, フサライドに代表される MBI-R 剤は, 1970 年以降我が国で広く使用されている. これらの剤は, 30 年以上にわたり使用され続けているにも関わらず, 耐性菌株は未だ検出されていない. したがって, MBI 剤では耐性菌選抜のリスクは非常に低いと推察されていた. 耐性菌が出現しない理由として, MBI 剤がいもち病菌に対し

1. Polyketide synthase inhibitor (MBI-P)



2. Reductase inhibitor (MBI-R)



Pyroquilon

3. Dehydratase inhibitor (MBI-D)

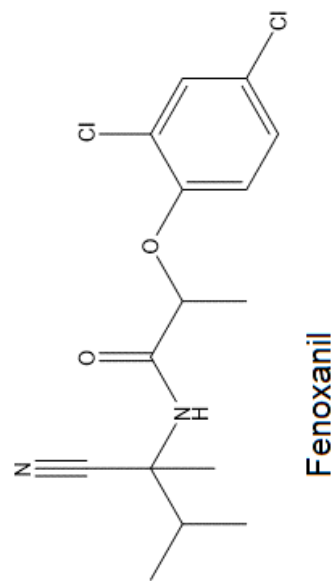
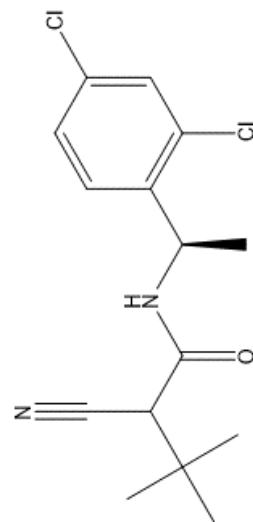
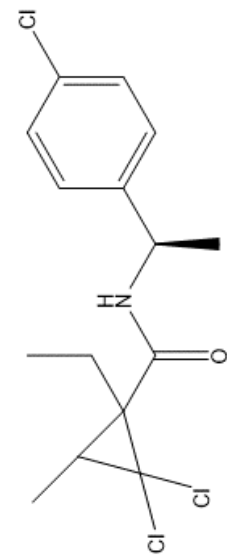


Fig. 1-3. Melanin biosynthesis inhibitors that have been used for rice blast control.

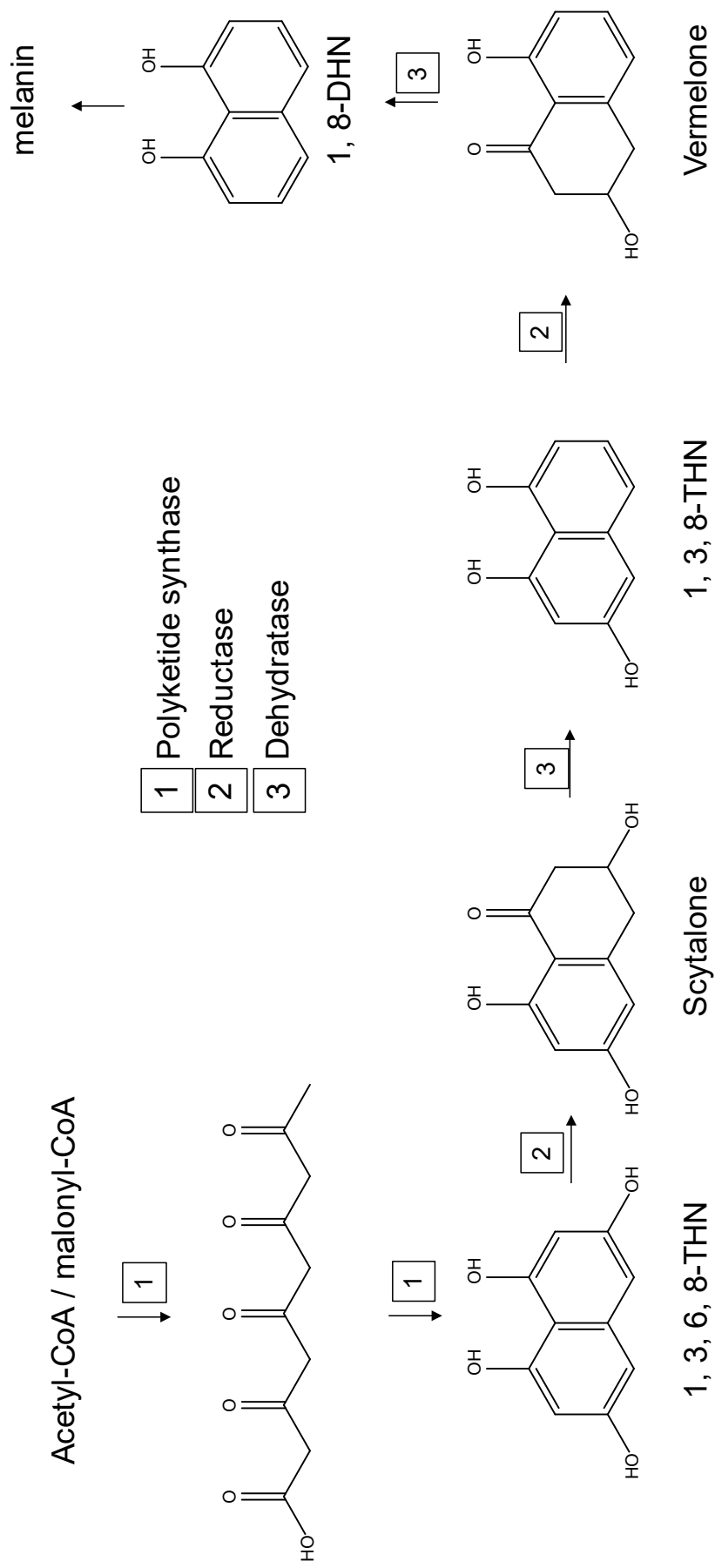


Fig.1-4. Key enzymes in melanin biosynthesis pathway of *Pyricularia oryzae*.



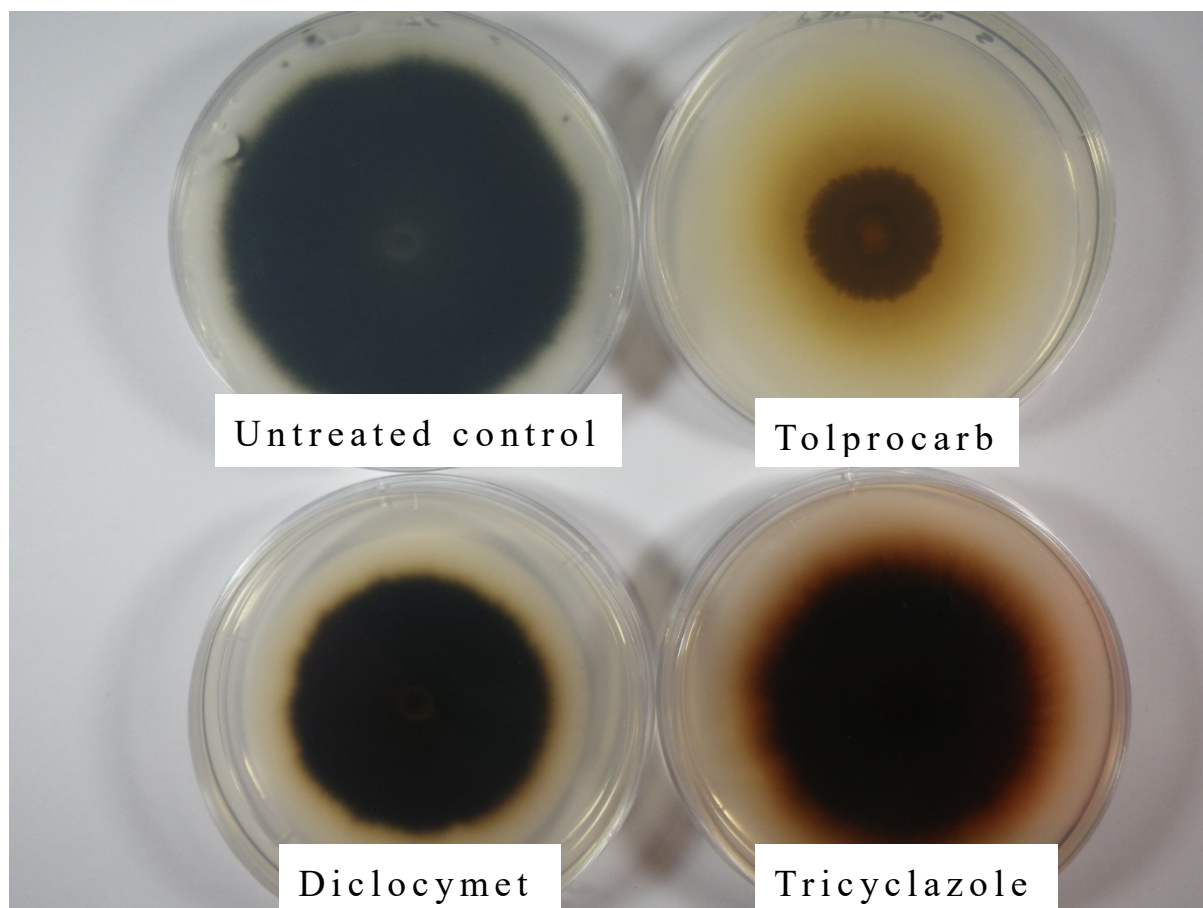


Fig. 1-5 Color changes of mycelia of *Pyricularia oryzae* treated with melanin biosynthesis inhibitors (MBI). *P. oryzae* isolate sensitive to MBI was grown on media supplemented with MBI at 10 mg/l for 10 days at 27°C.





Fig. 1-6. Appressorium pigmentation of *Pyricularia oryzae*. Conidial suspension was placed on Teflon membranes and incubated at 25°C for 20 hr (Kawamura *et al.*, 1997).

て殺菌作用を示さず，その感染過程を特異的に阻害するという，菌の生死を左右するような高い選択圧要因にならないことが考えられていた．

いもち病の防除方法は，本田における茎葉散布が主流であった．しかしながら，いもち病菌に対して長期の残効を有する MBI-D 剤のカルプロパミド（Kurahashi *et al.*, 1996, 1997, 1998：山下，1999）が，育苗箱施用によるいもち病防除に有効であることが確認され，技術的に育苗箱施用が確立された．育苗箱施用は，労力削減の観点からも画期的であり，いもち病防除法として広く普及し，現在では主要な処理方法として定着している．カルプロパミドが上市されたのは 1998 年であるが，その後，他の MBI-D 剤として，ジクロシメット（Manabe *et al.*, 1999：小栗ら，1999：相馬ら，1999），フェノキサニル（西口ら，2001：山本ら，2001）が 2000 年，2001 年にそれぞれ上市された．カルプロパミドを含むこれら 3 剤は，上市後は日本全国広範囲で使用された．その中でも，カルプロパミドとジクロシメットは，前出のように農家の労力削減や処理回数削減のために，主として長期残効型の育苗箱施用剤として使用された．単一作用点の剤を，単剤でかつ長期残効的に使用することは，一般的には耐性菌発達リスクを高める使用法である．しかしながら，MBI-D 剤が上市された頃は，耐性菌研究会シンポジウム（倉橋・山口，1999 年）で「メラニン生合成阻害剤はなぜ耐性菌を生じないのか？」と題した講演が取り上げられるほど，メラニン生合成阻害は，耐性菌の出にくい作用機作と考えられていた．そのため，MBI-D 剤の育苗箱施用は急速に日本全国に広まった．

カルプロパミドは，シタロン脱水酵素と強く結合する阻害剤である．カルプロパミドの阻害定数（ $K_i$  値）は 0.13 nmol であり，シタロン脱水酵素のミカエリス定数（ $K_m$  値，31  $\mu$ mol）の約 2 万分の 1 であることが報告されている（Motoyama *et al.*, 1998）．また，結晶構造解析によって，カルプロパミドのシタロン脱水酵素への強い結合力は，水和水と酵素の活性中心のアミノ酸残基が関与した酵素

とカルプロパミド間の水素結合とファンデルワールス力によりもたらされることが示された (Nakasako *et al.*, 1998; Wawrzak *et al.*, 1999). 一方で, Motoyama *et al.* (2002) は, カルプロパミドがシタロン脱水酵素に強く結合しない変異株を作出し, その変異株のシタロン脱水酵素活性が, 親株の酵素活性の 1/10 以下に低下していることを報告した. これらの知見から, MBI-D 剤であるカルプロパミドは, 強いシタロン脱水酵素阻害活性を有し, 高いいもち病防除効果を示すが, 耐性菌が選抜されるリスクは低いと考えられていた.

しかしながら, このような予測に反して, 2001 年に佐賀県松浦川流域において, カルプロパミドの防除効果の低下を疑わせる現象が確認された. この地区から分離されたいもち病菌株から, カルプロパミド感受性が低下している株が分離され, カルプロパミド耐性菌と同定された. さらに, カルプロパミドと他の MBI-D 剤の間で交差耐性が認められた. これら耐性菌は, 感受性菌のメラニン合成が阻害される MBI-D 剤の濃度でも, 培養コロニーに, メラニンが沈着し黒色を呈する. 2003 年には, 同様な耐性菌が九州全域 (Sawada *et al.*, 2004), さらに兵庫県や愛媛県でも検出された (Ishii, 2011).

耐性菌の耐性機構について解析され, MBI-D 剤耐性は, シタロン脱水酵素遺伝子の一塩基置換により, 75 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに変化すること (V75M) によりもたらされることが明らかとなった (Takagaki *et al.*, 2004).

薬剤の上市から MBI-D 剤耐性菌の出現までの期間は, わずか 3 ~ 4 年と非常に短かったこと, 前述のようにメラニン生合成阻害剤は, 耐性菌が出現しにくいと考えられていたことから, 耐性菌出現時には有効な耐性菌対応策がなかった. そのため, MBI-D 剤耐性菌が検出された多くの県においては, 県の防除指針から MBI-D 剤を削除することが唯一の耐性菌管理対策として, そのような措置が取られた. このような状況から, 各社にとっても MBI-D 剤耐性菌

管理対策の検討が急務となった。

水稻分野に関わらず，殺菌剤の多くは耐性菌が出現しており，その研究事例も多い．耐性菌管理対策の研究は大別すると以下の３段階がある．第１段階は耐性機構の解明，第２段階は耐性菌のフィットネスクストに関する研究，第３段階は実場面における当該作用機作の剤を用いた耐性菌防除である．前述のように，MBI-D 剤耐性菌については，第１段階は既に解明されており，点突然変異の型も既報の１種類しかなかった．このような状況を考慮し，本研究では，第２段階と第３段階の検討に注力した．

薬剤耐性菌研究において，フィットネスクストに関する研究は非常に重要である．フィットネスクストとは，病原菌が薬剤に耐性を獲得することで，そのトレードオフとして生育や環境適合性に関する何らかの性質において，感受性菌と比較して不利益を被ることである．したがって，フィットネスクストの研究対象は多岐にわたる．例をあげると，生育，病原性，温度感受性（耐高温，耐低温，耐凍性），紫外線耐性，競合条件における生存能力等である．本研究でも，これらの項目について検討した．薬剤耐性菌が，フィットネスクストを負っていることは，その耐性菌は，薬剤淘汰圧のない条件では，感受性菌に比べ，生育や環境下における生存能力が劣ることを意味する．この場合，薬剤淘汰圧がない条件下では，耐性菌は感受性菌との生存競争に負けるため，最終的には耐性菌は淘汰され，感受性菌が優占集団になり，殺菌剤の効果も回復する．薬剤の効果が発現した時点で，その薬剤を組み込んだ防除体系（ローテーション防除），他の作用機作との混合剤使用等，適切な耐性菌管理対策が策定されていれば，再度その薬剤を使用することが可能となる．一方，耐性菌がフィットネスクストを負っていない場合，当該薬剤の使用を中止したとしても，何年にもわたり耐性菌頻度が減少することではなく，薬剤の効果が発現しない状態が続くことが想定される．その場合，当該薬剤は市場から撤退せざるを得なくなる．したがって，耐性菌がフィットネスクストを負っているか否かは，当

該薬剤が耐性菌検出後であっても，まだ市場に残るチャンスがあるか，撤退せざるを得ないかを定める極めて重要な要素となる．

例えば，過去における耐性菌のフィットネスクストに関する研究は以下のものがある．ベンゾイミダゾール系薬剤（ $\beta$ -チューブリン重合阻害）であるカルベンダジムやベノミルの耐性菌については，コムギ眼紋病菌（*Oculimacula* sp.）（Brown *et al.*, 1984），チューリップ灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*）（Hsiang and Chastager, 1990），モモ灰星病菌（*Monilinia fructicola*）（Chen *et al.*, 2014），ナシ青かび病菌（*Penicillium expansum*）（Baraldi *et al.*, 2003），バナナ black sigatoka 病菌（*Pseudocercospora fijiensis*）（Romero and Sutton, 1998），ウリ科作物つる枯病菌（*Didymella bryoniae*）

（Keinath and Zitter, 1998）の耐性菌は感受性菌と同等の生育や病原性であることが確認されており，耐性菌はフィットネスクストを負っていないか，ごく小さいと推察されている．実際，ベンゾイミダゾール系薬剤では，耐性菌が出現した病害における単剤の使用は不可とされている事例がほとんどである．また，電子伝達系阻害剤の複合体 III ユビキノール酸化酵素阻害剤（QoI 剤）では，ライグラスいもち病菌（*Magnaporthe oryzae*）（Ma and Uddin, 2009）の事例のように，耐性菌が孢子の生産量においてフィットネスクストを負っているとの報告もあるが，ブドウべと病菌（*Plasmopara viticola*）（Delmas *et al.*, 2017），コムギうどんこ病菌（*Blumeria graminis*）（Chin *et al.*, 2001），芝のいもち病菌（*Magnaporthe grisea*）（Avila-Adame and Koller, 2003），ダイズさび病菌

（*Phakopsora pachyrhizi*）（Klosowski *et al.*, 2016），ブドウうどんこ病菌（*Erysiphe necator*）（Rallos *et al.*, 2014），ピスタチオ Alternaria late blight 病菌（*Alternaria alternata*）（Karaoglanidis *et al.*, 2011）など多くの病原菌で検出された QoI 剤耐性菌は，フィットネスクストを負っていないか，ごく小さいと推察されている．これらの QoI 剤耐性菌が出現した病害では，単剤の使用は控えている事例がほとんどである．

一方，*Raposo et al.*（2000）は，灰色かび病菌のジカルボキシイミド系殺菌剤（浸透圧シグナル伝達攪乱）耐性菌では，圃場における菌核の生存力についてフィットネスクストを負っているとする結果を報告している．また，*Walker et al.*（2013）は，フランスのブドウ畑における灰色かび病菌の各種薬剤耐性菌の頻度推移を調査し，ジカルボキシイミド系殺菌剤の耐性菌が2000年以降低頻度になっていることを報告している．この結果は，圃場における当該耐性菌の生存能力が感受性菌より劣っていることを示すものであり，耐性菌がフィットネスクストを負っていることを示唆している．ジカルボキシイミド系薬剤耐性菌では，30年以上前から報告事例があるが，日本やブラジルなどジカルボキシイミド系薬剤の登録がある地域では，今でもローテーション散布等を推奨することで灰色かび病や菌核病の防除に用いられている．また，*Walker et al.*（2013）は，ジェトフェンカルブとカルベンダジムの両剤耐性のフィットネスクストにも言及している．ジェトフェンカルブは，カルベンダジム等のベンゾイミダゾール系殺菌剤の感受性菌には効果を示さないが，耐性菌には効果を示す剤として開発上市された剤である．したがって，製品としては，カルベンダジム等のベンゾイミダゾール系薬剤の混合剤として市場に投入された．ベンゾイミダゾール系薬剤の耐性菌が蔓延していた当初は広く使用されたが，ベンゾイミダゾール系薬剤とジェトフェンカルブの両方に耐性の両剤耐性菌が出現している．*Walker et al.*（2013）の報告では，ベンゾイミダゾール系殺菌剤にのみ耐性の灰色かび病菌は2006年以降もブドウ畑から検出されるのに対して，両剤耐性菌は2006年以降評価した菌株からは検出されていない．この結果は，ベンゾイミダゾール系殺菌剤の耐性菌は，前述のように大きなフィットネスクストを負っていないが，両剤耐性菌はフィットネスクストを負っていることを示唆している．日本などでは，ベンゾイミダゾール系殺菌剤とジェトフェンカルブの混合剤は，ローテーション防除の中で現在でも病害防除に寄与している．

日本の水稻分野の殺菌剤に関しても，1970年代から耐性菌研究に関する報告事例がある．例えば，Katagiri *et al.* (1980) は，イプロベンフォスのイネいもち病耐性菌を報告している．Miyagi *et al.* (1986) は，イプロベンフォスのイネいもち病室内耐性菌は，高度耐性菌であるが，フィットネスクストを負っていること，一方，水田から分離された中等度耐性菌は，大きなフィットネスクストを負っていないことを報告している．廣岡ら (1999) は，1993年～1996年に圃場におけるイプロベンフォス耐性菌の年次推移を調査したところ，中等度耐性菌の頻度は1977年～1983年の調査結果と大きな変化はなく，Miyagi *et al.* (1986) の研究結果を支持する結果となった．ただし，1993～1996年に分離された中等度耐性菌の薬剤感受性は，1977年～1983年に分離された菌株と比べ，やや感受性側（薬剤が効く側）に振れていた．高度耐性菌がフィットネスクストを負っていることは，この系統の薬剤にとっては，耐性菌管理対策の観点から，望ましい結果であった．また，1977年には，カスガマイシン耐性イネいもち病菌が報告されている（伊藤・山口，1977）．さらに，伊藤・山口 (1979) は，この耐性菌については，薬剤淘汰圧のない水田では速やかに耐性菌頻度が減少することを報告した．また，実験室内においても，耐性菌と感受性菌を1:1に混合してイネ植物体に接種後，罹病したイネにおける耐性菌の比率を調査すると1:1で混合接種したにも関わらず，耐性菌頻度が50%未満になることを報告している．さらに，伊藤・三浦

(1974)，三浦・高橋 (1977) も，実圃場において，カスガマイシン耐性菌の頻度が低下していくことを報告した．これらの結果は，カスガマイシン耐性イネいもち病菌は，大きなフィットネスクストを負っていることを示している．これら2剤の耐性菌検出の報告は，1970年代から1980年代であったにも関わらず，これら2剤は現在でも水田で使用されている．特に，カスガマイシンは，他の作用機作剤との混合剤で散布剤として使用され続けている．

以上の事例のように，薬剤耐性菌が，フィットネスクストを負っ

ているか否か，そのフィットネスクストが大きい小さいかは，耐性菌が検出された後でも，有効な耐性菌管理対策が講じられるか否か，当該薬剤が混合剤等で病害防除に寄与し続けられるか否かに大きく関わってくる．MBI-D 剤耐性菌の事例についても，耐性菌のフィットネスクストに関する研究は，この系統の薬剤の今後の有効性を考える上でも非常に重要である．

Suzuki *et al.* (2010) は，九州地区において，MBI-D 剤の使用中止後，実圃場における MBI-D 剤耐性菌の頻度が減少することを報告した．この知見は，MBI-D 剤耐性菌が感受性菌に比べ，フィットネスクストを負っていることを示唆するものであり，興味深い知見であった．しかし，Suzuki *et al.* (2010) の報告は，感受性菌と耐性菌の競合実験など，具体的なフィットネスクストについて検討したものでなかった．

MBI-D 剤では，薬剤上市から非常に早いタイミングで耐性菌が出現したことは，農薬開発会社にとっては大きな打撃であった．しかしながら，Suzuki *et al.* (2010) の報告から，薬剤淘汰圧のない状況では，薬剤の効果が復帰する可能性も示された．本研究では，MBI-D 剤耐性菌が感受性菌に比べ，フィットネスクストを負っているか否かを明らかにすると共に，いもち病菌の薬剤感受性が回復した地区における MBI-D 剤の有効な使用方法について検討した．

具体的には，第 2 章で，いもち病菌の MBI-D 剤感受性菌と耐性菌について，病原性，温度感受性，紫外線耐性およびシタロン脱水酵素活性を比較検討した．第 3 章では，MBI-D 剤耐性の安定性，感受性菌と耐性菌のイネ体上での競合，両菌のイネ葉への感染成立時間および実圃場における MBI-D 剤使用中止後の耐性菌の頻度推移について検討した．第 4 章では，MBI-D 剤の有効な使用方法を提案するために，ベノミル剤を用いた防除体系の有用性および散布混合剤として MBI-D 剤を使用する有効性について検討した．

耐性菌管理対策に関しては，Fungicide resistance action committee（以下，FRAC と略する）のホームページの Publications



内で公開されているモノグラフ 1「Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed ?」(Brent and Hollomon, 2007)の中で、異なる作用機作の剤との混合剤の使用、異なる作用機作の剤と組み合わせた防除体系（ローテーション防除）を採用することが大切であると述べられている。しかしながら、この総説でも述べられている通り、耐性菌管理対策の検討については、数学的な手法を用いたシミュレーションの検討事例はあるが、実際の実験データに基づく検討事例は意外と少ない。混合剤の検討事例としては、ジカルボキシイミド系薬剤とマルチサイトの作用点を有する剤との混用で、耐性灰色かび病菌を防除する事例（Löcher *et al.*, 1987）、圃場試験ではないが、QoI 剤とマルチサイトの作用点を有する剤との混用が耐性ブドウベと病菌の選抜を遅らせることを報告した事例（Genet *et al.*, 2006）等がある。また、ローテーション散布の検討事例としては、殺菌剤ではないが、カーバメート系の殺虫剤とピレスロイド系の殺虫剤の交互散布が、対象害虫の感受性低下を単用や半薬量の混合処理よりも抑制することが報告されている（Immaraju *et al.*, 1990）。しかしながら、殺菌剤の耐性菌管理対策の対象病害に対する防除効果と耐性菌の選抜リスク低減の両立を圃場レベルで示した事例はほとんどない。そこで本研究では、検討対象とする防除体系（ローテーション防除や混合剤）のイネいもち病防除効果と、MBI-D 剤耐性菌の再選抜リスクを同時に圃場レベルで検討することを試みた。耐性菌管理対策を考える上では、防除体系の病害抑制効果だけではなく、MBI-D 剤耐性菌選抜リスクが低いことを示すことで、その防除体系が、より実場面に受け入れられやすくなると考えた。また本研究では、主に水稻箱施用剤として使用された MBI-D 剤の箱施用以外の施用方法での有効な使用方法についても検討した。

## 第 2 章 シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤 感受性菌と耐性菌の性質比較

### 緒言

耐性菌管理対策を検討するためには，耐性菌がフィットネスクストを負っているか否かを明らかにすることが重要である．*Suzuki et al.*（2010）の報告は，MBI-D 剤耐性菌がフィットネスクストを負っている可能性を示すものであった．本章では，MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の種々の性質について比較検討した．

### 材料および方法

#### 1) 供試菌株

Table 2-1 に示した MBI-D 剤感受性菌 4 菌株と MBI-D 剤耐性菌 4 菌株を用いた．

#### 2) 病原性検定

##### ① 供試植物

イネ（品種日本晴）をポット（直径 5 cm）あたり 20 粒播種し，24℃ のガラス温室で 3 葉期まで栽培した．1 菌株あたり，5 ポットを接種試験に使用した．

##### ② 接種法

供試菌株を見里一原培地 [1 g/l 酵母エキス（Bacton Dicknson and Company），10 g/l スターチ（和光純薬），15 g/l 寒天粉末（和光純薬）] に接種した．ブラックライトブルーランプ（BLB，Panasonic）下，27℃ で培養し，胞子形成を誘導した．胞子懸濁液

Table 2-1. *Pyricularia oryzae* isolates used in this study

Isolate	MBI-D sensitivity	Prefecture	Year
P-1	Sensitive	Aichi	1986
P-307	Sensitive	Aichi	1986
PO26	Sensitive	Yamagata	2002
HT2-4	Sensitive	Hyogo	2003
P-1025	Resistant	Saga	2001
NH5-1	Resistant	Nagasaki	2002
9-1	Resistant	Fukuoka	2002
HK2-11	Resistant	Hyogo	2004

( $1 \times 10^5$  孢子/ml) を調製し，供試イネに噴霧接種した．接種イネを  $24^\circ\text{C}$  のガラス温室内で，多湿条件（相対湿度約 100%）下で栽培した．

### ③ 評価法

接種 7 日後に，供試イネの 3 葉の病斑面積率を「作物病原菌研究技法の基礎（八重樫，1995）」に記載の葉いもち病斑面積率の基準を参考に調査した．調査は，1 ポットあたりランダムに選抜した 10 葉について行い，1 菌株あたり 5 ポット，5 反復の平均と標準偏差を算出した．なお，8 菌株間の病斑面積の差異について，Tukey-Kramer の多重比較法（有意水準 5%）で統計処理を行った．

## 3) 温度感受性検定

### ① 温度条件

供試菌の培養には， $12^\circ\text{C}$ ， $18^\circ\text{C}$ ， $23^\circ\text{C}$ ， $27^\circ\text{C}$ ， $32^\circ\text{C}$ ， $37^\circ\text{C}$  の培養室または恒温器を用いた．

### ② 評価法

ジャガイモせん汁寒天培地（PDA）上で， $27^\circ\text{C}$  下で前培養した供試菌株の菌そうを直径 5 mm のコルクボーラーで切り取り，菌糸面が培地に接するように新たな PDA に接種した．なお，1 菌株あたり 3 反復接種した．

各温度条件下で 12 日間培養した後，生育した菌そうの半径を測定し，MBI-D 剤感受性 4 菌株と耐性 4 菌株の平均をそれぞれ算出した．各温度における感受性菌株群と耐性菌株群の平均値を t-検定（有意水準 5%）を用いて統計処理し，有意差を判定した．

## 4) 紫外線耐性検定

### ① 紫外線処理法

紫外線ランプ GL-15(254nm,  $51 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，東芝) を用いた．供試

菌株を見里培地に接種し，BLBランプ下で27℃下10日間培養し，胞子形成を誘導した．胞子形成後にシャーレの蓋を開けた状態で，クリーンベンチ内の紫外線ランプを10分，20分，40分，60分間照射した．

## ② 評価法

紫外線照射処理後，見里培地上の胞子を滅菌蒸留水に懸濁し，胞子懸濁液をPDAに接種した．27℃下で24時間培養した後，顕微鏡下で胞子の発芽の有無を観察した．各菌株の各処理時間あたり200個の胞子の発芽率，さらにMBI-D剤感受性4菌株と耐性4菌株の発芽率の平均をそれぞれ算出した．各紫外線照射時間における感受性菌株群と耐性菌株群の平均値をt-検定（有意水準5%）を用いて統計処理し，有意差を判定した．

## 5) シタロン脱水酵素活性の測定

### ① MBI-D 剤感受性シタロン脱水酵素と耐性シタロン脱水酵素の調製と酵素活性の測定

#### i) 供試菌株

MBI-D 剤感受性 P-307 株，耐性 HK-2-11 株を酵素調製にそれぞれ用いた（Table 2-1）．

#### ii) ジクロシメットとシタロンの調製

住友化学株式会社で合成されたジクロシメット原体を用いた．シタロンは，Kubo *et al.*（1983）の方法を参考に以下の手順で調製した．

MBI-D 剤感受性いもち病菌を10 ppmのジクロシメット含有完全培地（500 ml）で培養後，ブフナーロートを用いて，培養ろ液を回収した．培養ろ液に塩酸を添加し，pH2に調整した後，等量の酢酸エチルで3回抽出した．酢酸エチル画分に硫酸ナトリウムを添加し，脱水した後，エバポレータを用いて酢酸エチルを除去した．抽

出物を 2 ml のアセトンに再溶解し，アセトン：ヘキサン：酢酸エチル混合液（10:30:60, v/v/v）を用いてシリカゲル 60（カラム直径 2 cm，長さ 30 cm）で分画し，シタロンを含む画分を回収した．エバポレータを用いて再度溶媒を除去した後，2 ml のエタノールに溶解した．エタノール溶解物をアセトン：ヘキサン：酢酸エチル混合液（10:30:60, v/v/v）を溶媒として TLC（シリカゲル 60 F254，メルク）で展開し，シタロンの画分を回収した．回収した画分を 20 ml の *t*-ブチルメチルエーテルに懸濁し，ろ紙を用いてろ過した後，等量のヘキサンを添加，溶媒を乾固し，シタロンを得た．

完全培地組成（1 リットルあたり）

ボーゲル N 培地（Vogel, 1956），20 g スクロース，10 ml ビタミン液，2.5 g 酵母エキス，1 g カザミノ酸，5 g 麦芽エキス

ビタミン液組成（1 リットル あたり）

10 mg チアミン塩酸塩，5 mg リボフラビン，5 mg ピリドキシン塩酸塩，50 mg パントテン酸カルシウム，5 mg *p*-アミノベンゾニク酸，50 mg ニコチンアミド，100 mg コリン塩酸塩，1 mg 葉酸，100 mg イノシトール

### iii) シタロン脱水酵素の調製

Lundqvist *et al.*（1993）の方法を参考に以下の手順でシタロン脱水酵素を調製した．供試菌株を完全培地で黒色を呈するまで培養し，菌体を回収，凍結した．凍結菌体（新鮮重約 15 g），等量の抽出緩衝液（50 mM Tris・HCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM ジチオスレイトール(pH7.5)），海砂 A（10～15 メッシュ）を乳鉢に入れ，乳棒で磨砕した．磨砕液から遠心分離（5000 g，5 分間，4℃）によって上清を回収した．上清を pH7.5 に調整した後，50%硫酸入り緩衝液を倍量添加し，20～30 分間攪拌後，遠心分離（5000 g，15 分間）によって上清を回収した．上清をフィルターろ過（0.45  $\mu$  m

DISMIS 25CS045AS, ADVANTEC) し, HiLoad 16/10 Phenyl-Sepharose カラム (GE ヘルスケアジャパン) を用いて, 以下の条件で疎水クロマトグラフィーを行った. カラムを 25%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  緩衝液で平衡化した後, 25%から 0%のグラジエントを 3 カラム分を行った後,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含まない緩衝液で 3 カラム分溶出した. なお, 流速 2 ml/分で溶出し, 2 ml ずつ分取した.

分取した活性画分について, HiTrap Q Sepharose HP カラム (GE ヘルスケアジャパン) を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを以下の条件で行った. 0 M から 0.25 M NaCl 緩衝液のグラジエントを 3 カラム分を行った後, 0.25 M NaCl 緩衝液でさらに 3 カラム分溶出した. 流速 2 ml/分で溶出し, 1 ml ずつ分取した.

活性画分を PD10 カラム (GE ヘルスケアジャパン) で脱塩後, Mono-Q 5/50GL (GE ヘルスケアジャパン) カラムを用いて, 陰イオン交換クロマトグラフィーを以下の条件で行った. 0 M から 0.25 M NaCl 緩衝液のグラジエントを 20 カラム分を行った後, 0.25 M NaCl 緩衝液でさらに 10 カラム分溶出した. なお, 流速 2 ml/分で溶出し, 1 ml ずつ分取した. 得られた活性画分を, Vivaspin 500-10K (NMWL 10,000, GE ヘルスケアジャパン) を用いて脱塩 (緩衝液置換) した.

活性画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画, 銀染色したところ, 最終画分で約 23 kDa の 1 本のバンドが確認できた (Fig.2-1). そこで, 以下の実験には, この酵素液をシタロン脱水酵素液として用いた. なお, 一連の調製過程で, 約 70 倍に活性が濃縮され, 回収率は約 12%であった. なお, タンパク濃度の測定には Bio-Rad の Protein assay kit (Bradford 法) を用いた.

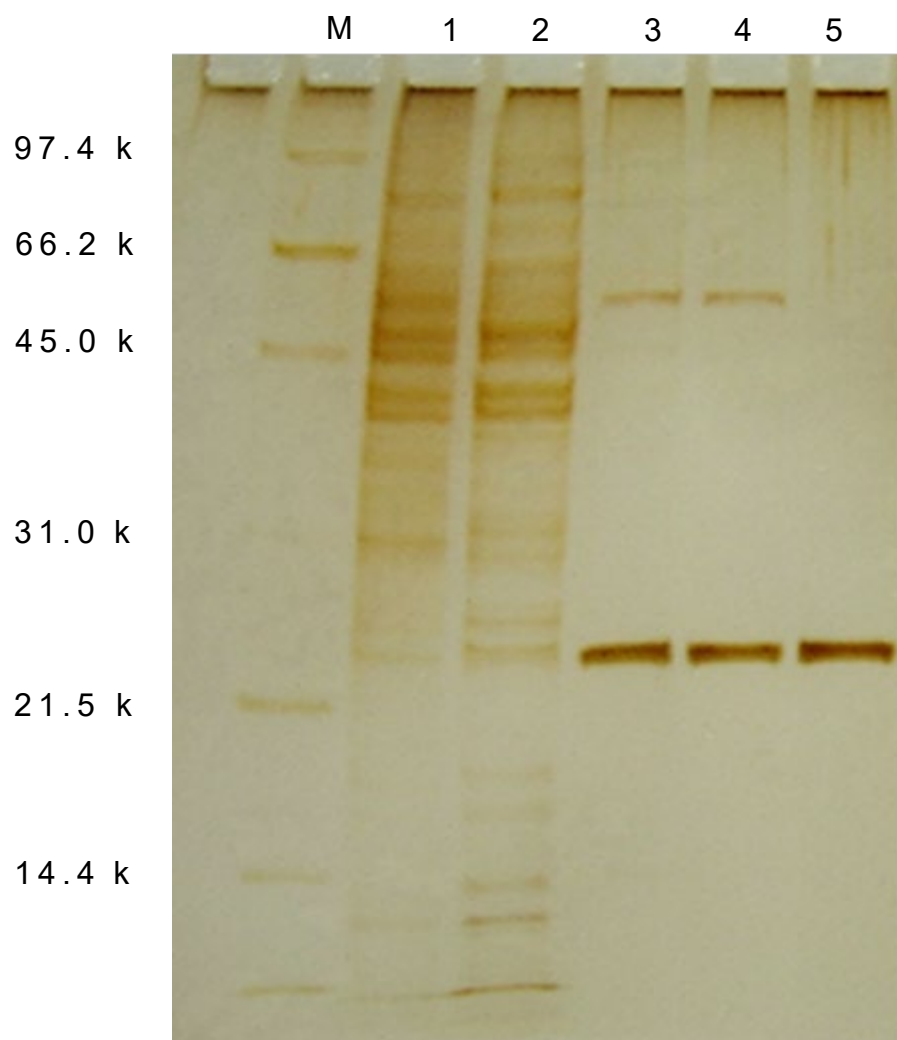


Fig. 2-1. Preparation of scytalone dehydratase from mycelia of *Pyricularia oryzae*. Scytalone dehydratase was prepared from mycelia of MBI-D sensitive isolate P-307, electrophoresed on a 10%–20% SDS-polyacrylamide gel and stained with 2D-silver stain reagent II (Cosmo Bio). Lanes M, SDS-PAGE standards (Bio-Rad), 1, crude enzyme fraction; 2, ammonium sulfate fraction; 3, hydrophobic chromatography fraction; 4, anion exchange chromatography fraction; 5, high resolution anion exchange chromatography fraction.



#### iv) シタロン脱水酵素の活性測定法

Tsuji *et al.* (1989) の方法を参考に以下の手順で酵素活性を測定した。シタロン脱水酵素の終濃度が  $0.2 \mu\text{g/ml}$  になるように MBI-D 剤感受性菌または耐性菌の酵素液を  $20 \text{ mM Tris} \cdot \text{HCl}$  緩衝液 (pH 8.0) に添加し、 $998 \mu\text{l}$  とした。各種濃度 ( $5 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ , 5 濃度) の DMSO に溶解したシタロンを  $2 \mu\text{l}$  添加し、 $25^\circ\text{C}$  で反応を開始した。反応開始 120 秒後に、 $150 \mu\text{l}$  の 10% リン酸液を添加し、反応を停止した。反応液に  $850 \mu\text{l}$  のメタノールを添加し、ボルテックスで攪拌後、以下の条件で HPLC によって反応液中のシタロンを検出・定量した。反応液中のシタロン残量を算出し、初期の添加量との差として、シタロンの消失量を算出、酵素活性とした。

#### HPLC 分析条件

カラム : SumiPax ODS A212

( $5 \mu\text{m}$ ,  $6 \text{ mm} \times 15 \text{ cm}$ , 株式会社住化分析センター)

液相 : メタノール:水:酢酸 ( $48:50:2$ , v/v/v)

流速 :  $1 \text{ ml/分}$

検出波長 :  $300 \text{ nm}$

カラム温度 :  $40^\circ\text{C}$

測定時間 : 15 分

#### v) $K_m$ 値, $V_{\text{max}}$ , $K_{\text{cat}}$ の算出

各 5 濃度のシタロン添加区における感受性菌および耐性菌のシタロン脱水酵素活性から、Lineweaver-Burk plots を作成し、 $K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) と  $V_{\text{max}}$  ( $\mu\text{M/分}$ ) を算出した。また、 $V_{\text{max}}$  と酵素濃度から  $K_{\text{cat}}$  (/秒) を算出した。なお、実験は 3 回行い、それら平均値と標準偏差を算出した。

#### ② 異なる温度, pH におけるシタロン脱水酵素活性の測定

温度条件としていもち病菌の生育温度を考慮し，15℃，20℃，25℃，30℃，35℃の5条件で，pHはpH6.0，7.0，8.0，9.0の4条件でそれぞれ活性を測定した．前述の方法によって酵素活性を測定，各区のシタロン消失量を算出した．なお，本実験ではシタロン脱水酵素濃度を5  $\mu$ g/mlとした．実験は3回行い，平均値と標準偏差を算出した．また，各温度条件，pH条件における感受性酵素と耐性酵素の実験結果についてt-検定（有意水準5%）を用いて統計処理し，有意差を判定した．

### ③ 複数の感受性菌株と耐性菌株のシタロン脱水酵素活性の測定

#### i) 供試菌株

Table 2-1 に示した MBI-D 剤感受性菌 4 菌株と耐性菌 4 菌株を用いた．

#### ii) 粗酵素液の調製

完全培地で黒色を呈するまで培養した菌体を回収し，凍結した．凍結菌体（新鮮重約 15 g），等量の Tris・HCl（pH9.0），海砂 A（10～15 メッシュ）を乳鉢内で混和した後，乳棒を用いて磨砕した．磨砕液を遠心分離（3000 g，5 分間，4℃）し，上清を回収した．上清を pH8.0 に調整後，PD10 カラム（GE ヘルスケアジャパン）を用いて脱塩，タンパク濃度を約 1.0 mg/ml に調整し，粗酵素液とした．

#### iii) 酵素活性の測定法

粗酵素液 998  $\mu$ l に終濃度 0.5 mM となるように DMSO に溶解したシタロンを 2  $\mu$ l 添加し，25℃で反応を開始した．反応開始 30 秒，60 秒，90 秒，120 秒後に，150  $\mu$ l の 10%リン酸を添加して反応を停止させた．反応液に，2 倍量～3 倍量の酢酸エチルを添加し，3 回抽出した．酢酸エチルをエバポレータで除去した後，2 ml のメタノールに溶解した．前述の HPLC を条件用いて，反応液中のシタ

ロンを分析・定量し，初期添加量との比較から，シタロンの消失量を算出した．各菌株について別々に調製した粗酵素液を用いて3反復の実験を行い，それらの平均値を算出した．さらに，MBI-D剤感受性4菌株または耐性4菌株の平均と標準偏差を算出し，t-検定（有意水準5%）を用いて統計処理し，有意差を判定した．

## 結果

### 1) MBI-D剤感受性菌と耐性菌の病原性

MBI-D剤感受性菌と耐性菌のイネに対する病原性を検定したところ，感受性P-1株の病斑面積率は22.0%，PO26株は20.5%，P307株は23.9%，HT2-4株は24.0%であり，耐性NH5-1株は23.4%，P-1025株は17.4%，9-1株は22.4%，HK2-11株は22.7%であった（Fig. 2-2）．菌株間で若干の差異は認められたが，Tukey-Kramerの多重比較検定では8菌株の病原性に有意差は認められなかった．したがって，MBI-D剤耐性を獲得したことによって，病原性が低下することはないと考えられた．

### 2) MBI-D剤感受性菌と耐性菌の温度感受性

MBI-D剤感受性菌と耐性菌の生育の温度感受性を検定した．その結果，感受性4株の各温度条件における菌糸生育（コロニー半径）の平均は，12℃で9.3 mm，18℃で22.3 mm，23℃で33.2 mm，27℃で39.3 mm，32℃で29.7 mm，35℃で6.6 mm，37℃で0 mm，耐性4株の菌糸生育の平均は，12℃で9.3 mm，18℃で22.3 mm，23℃で33.2 mm，27℃で39.3 mm，32℃で29.7 mm，35℃で6.6 mm，37℃で0 mmであった（Fig. 2-3）．両菌群ともに27℃の生育が最も速く，27℃を境に温度の上下によって，生育は遅くなった．

各温度区における感受性菌群と耐性菌群の菌糸生育について，t-検定による有意差検定を行ったが，いずれの温度区においても，両菌群間で有意差は認められなかった（Fig.2-3）．したがって，MBI

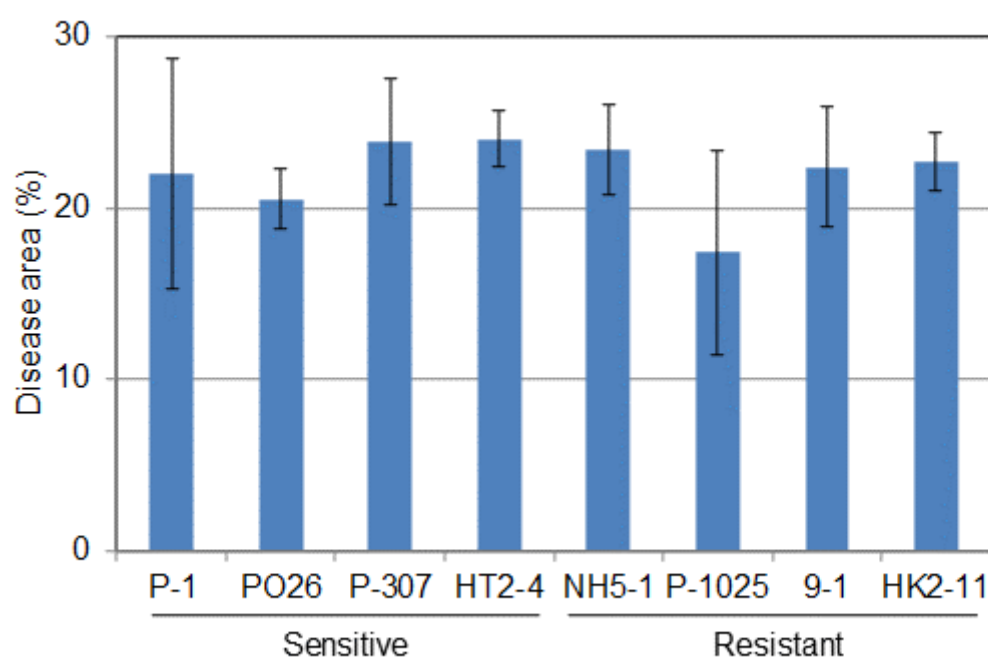


Fig. 2-2. Pathogenicity of isolates sensitive or resistant to MBI-D. Conidial suspensions of tested isolates ( $1 \times 10^5$  conidia/ml) were inoculated onto rice seedlings, and seedlings were incubated in a greenhouse at 24°C under high humidity condition. Diseased leaf area was assessed 7 days after inoculation. Error bars indicate the standard deviation. Differences in pathogenicity among isolates were determined based on Tukey multiple comparison testing ( $p < 0.05$ ).

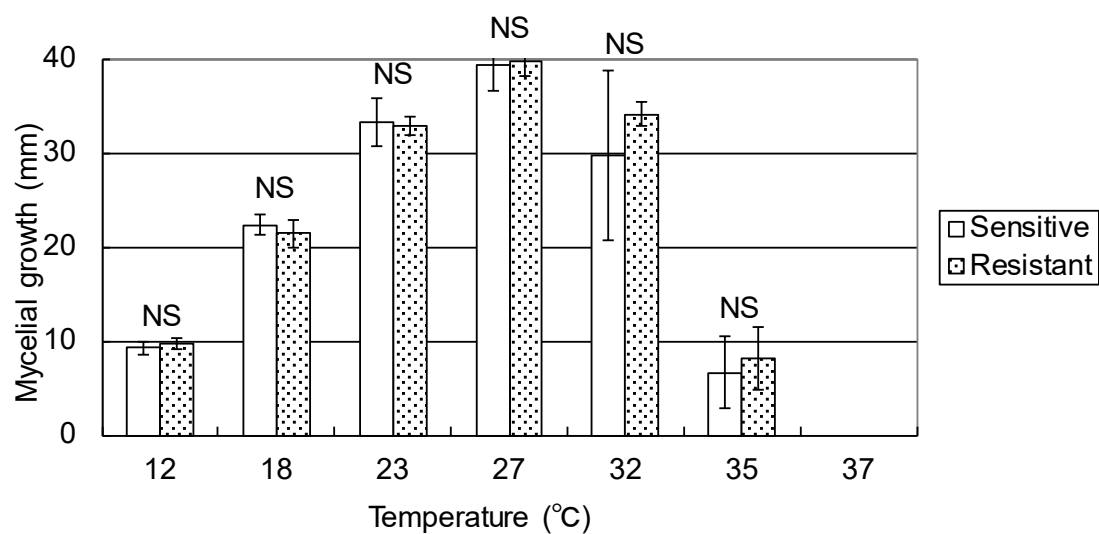


Fig. 2-3. Temperature sensitivity of isolates sensitive or resistant to MBI-D. Mycelia of tested isolates was inoculated on PDA and incubated at various temperatures for 12 days. After incubation, mycelial growth (colony radius) was measured. Error bars indicates the standard deviation. Differences in mycelial growth between sensitive and resistant isolates were determined based on *t*-test ( $p < 0.05$ ). NS, not significant.

-D 剤耐性の獲得が，菌株の温度感受性には影響しないと考えられた．

### 3) MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の紫外線耐性

MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の紫外線耐性を検定した．その結果，感受性 4 株の各紫外線照射時間における孢子発芽率の平均は，10 分間で 76.6%，20 分間で 42.7%，40 分間で 21.2%，60 分間で 7.8%，耐性 4 株の孢子発芽率の平均は，10 分間で 72.1%，20 分間で 41.3%，40 分間で 22.8%，60 分間で 8.4%であった（Fig. 2-4）．感受性菌群，耐性菌群ともに，紫外線照射時間が長くなるにつれて孢子発芽率は低下し，その低下の程度に顕著な差はなかった．

各紫外線照射時間における感受性菌群と耐性菌群の孢子発芽率について，t-検定による有意差検定を行ったが，有意差は認められなかった（Fig.2-4）．したがって，MBI-D 剤耐性の獲得が，孢子の紫外線耐性に影響することはないと考えられた．

### 4) MBI-D 剤感受性菌と耐性菌のシタロン脱水酵素活性

#### ① 感受性と耐性シタロン脱水酵素の酵素活性の比較

MBI-D 剤感受性 P-307 株，耐性 HK2-11 株の菌体からそれぞれ精製したシタロン脱水酵素のミカエリス定数（ $K_m$  値）は，それぞれ  $53.2 \pm 14.6 \mu M$ ， $44.3 \pm 9.9 \mu M$  で，感受性菌と耐性菌のシタロン脱水酵素と基質との親和性には顕著な差がないと考えられた．

一方，感受性株，耐性株のシタロン脱水酵素の最大反応速度（ $V_{max}$ ）は，それぞれ  $20.0 \pm 2.1 \mu M/\text{分}$ ， $10.2 \pm 0.9 \mu M/\text{分}$  であり，感受性株と耐性株のシタロン脱水酵素の  $V_{max}$  には約 2 倍の差があった．さらに，分子活性（ $K_{cat}$ ）を算出したところ，感受性株と耐性株の  $K_{cat}$  は，それぞれ  $38.2 \pm 4.1 / \text{秒}$ ， $19.6 \pm 1.7 / \text{秒}$  であった（Table 2-2）．以上の結果は，感受性株のシタロン脱水酵素活性が耐性株の約 2 倍であることを示しており，イネいもち病菌では，MBI-D 剤耐性化によって，シタロン脱水酵素活性が低下すること

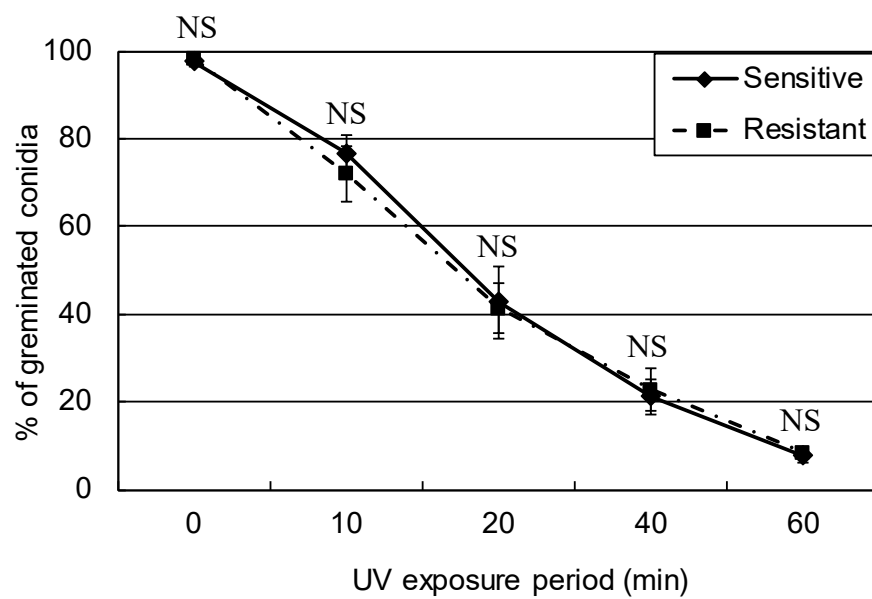


Fig. 2-4. UV sensitivity of isolates sensitive or resistant to MBI-D. Conidia of tested isolates formed on Misato-Hara medium were exposed under UV light for various times. After UV exposure, conidia were collected in sterile distilled water, inoculated on PDA and incubated at 27°C for 24 hr. After inoculation, 200 conidia were observed, and number of germinated conidia was counted. Error bars indicate the standard deviation. Differences between sensitive and resistant isolates were determined using *t*-test ( $p < 0.05$ ). NS, not significant.

Table 2-2. Kinetic studies of scytalone dehydratases prepared from mycelia of *Pyricularia oryzae* isolates sensitive (P-307) or resistant (HK2-11) to MBI-D<sup>a</sup>

Enzyme type	K <sub>m</sub> ( $\mu$ M)	V <sub>max</sub> ( $\mu$ M/min)	K <sub>cat</sub> (/s)
Sensitive	53.2 $\pm$ 14.6	20.0 $\pm$ 2.1	38.2 $\pm$ 4.1
Resistant	44.3 $\pm$ 9.9	10.2 $\pm$ 0.9	19.6 $\pm$ 1.7

<sup>a</sup> Scytalone dehydratase activity was assayed by measuring disappearance of scytalone during 120-sec reaction (pH8.0). Values are means of three experiments  $\pm$  standard deviation.



が示唆された。

#### ②異なる温度条件下におけるシタロン脱水酵素活性の比較

15℃，20℃，25℃，30℃，35℃の反応温度で，MBI-D 剤感受性と耐性のシタロン脱水酵素の活性を測定したところ，どちらも，反応温度の上昇にともない酵素活性が上昇した（Fig. 2-5）．感受性酵素によるシタロン消失率は，15℃から35℃の各温度でそれぞれ42.3%，52.3%，66.6%，79.9%，84.3%，一方，耐性酵素によるシタロン消失率は，それぞれ17.0%，23.9%，35.6%，52.0%，60.5%であり，どの反応温度でも，感受性酵素の活性が耐性酵素の活性より統計学的に有意に高かった（Fig. 2-5）．

#### ③異なる pH 条件下におけるシタロン脱水酵素活性の比較

pH6.0，pH7.0，pH8.0，pH9.0の反応条件で，MBI-D 剤感受性と耐性のシタロン脱水酵素の活性を測定したところ，どちらも，中性付近（pH7.0およびpH8.0）が至適 pH であった（Fig. 2-6）．感受性酵素によるシタロン消失率は，pH6.0～pH9.0でそれぞれ47.1%，69.3%，67.1%，40.4%，一方，耐性酵素によるシタロン消失率は，それぞれ28.0%，40.4%，46.3%，27.6%であり，どの pH でも，感受性酵素の活性が耐性酵素の活性より統計学的に有意に高かった（Fig. 2-6）．

#### ④感受性菌株群と耐性菌株群の粗酵素を用いたシタロン脱水酵素活性の比較

MBI-D 剤感受性 4 菌株と耐性 4 菌株から調製したシタロン粗酵素の酵素活性を比較した．反応温度 25℃，反応 pH8.0，反応時間 30 秒，60 秒，90 秒，120 秒の条件で酵素活性を測定した．

その結果，感受性 4 菌株の粗酵素のシタロン消失率の平均値は，30 秒～120 秒でそれぞれ 61.0%，86.1%，94.1%，97.8%，一方耐性菌 4 菌株の粗酵素のシタロン消失率の平均値は，それぞれ

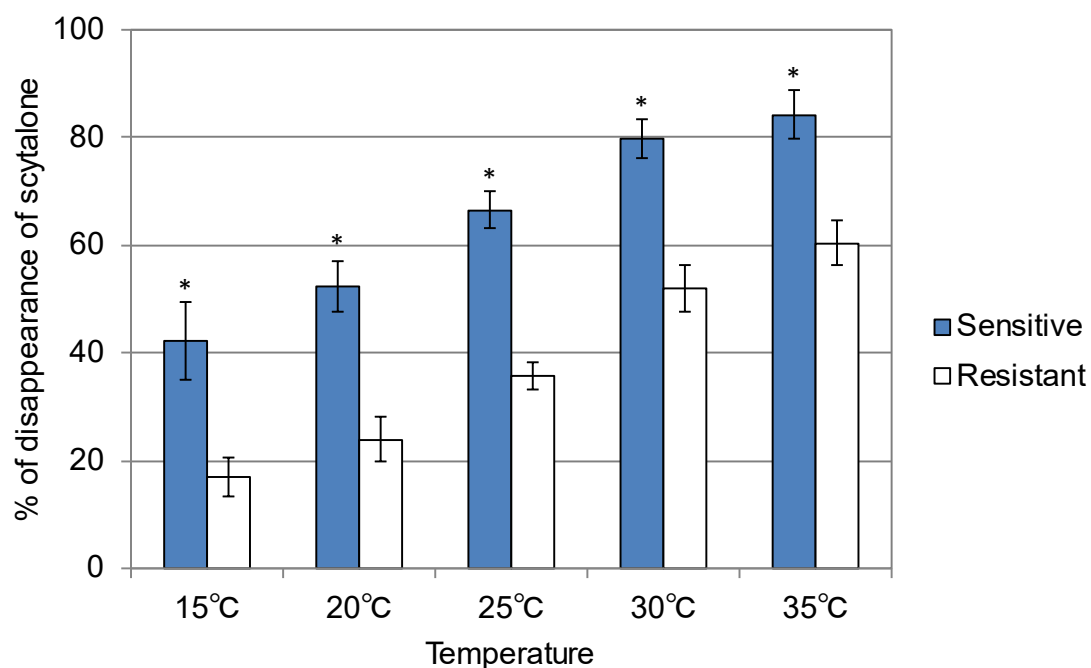


Fig. 2-5. Activity of scytalone dehydratase prepared from mycelia of *Pyricularia oryzae* isolates sensitive or resistant to MBI-D at various temperatures. The activity was assayed by measuring disappearance of scytalone during 120-sec reaction at pH7.0 at temperatures ranging from 15°C to 35°C. Values are means of three experiments  $\pm$  SD, and asterisk indicates statistically significant difference between sensitive and resistant enzymes (*t*-test,  $p < 0.05$ ).

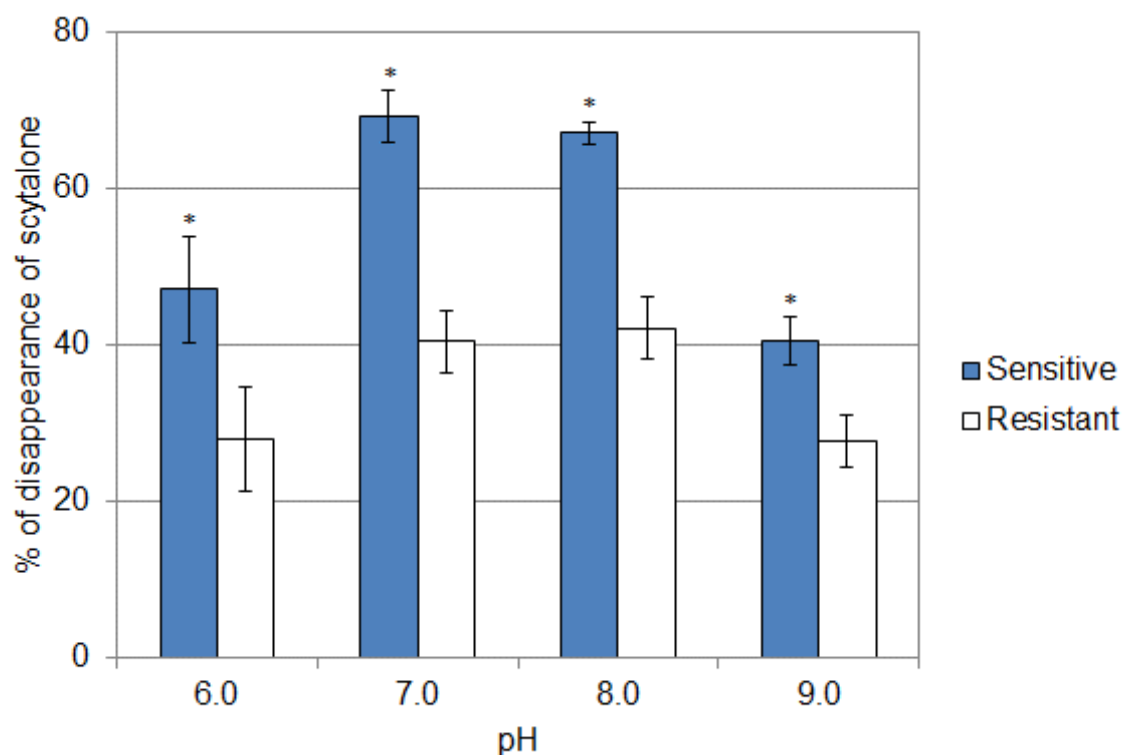


Fig. 2-6. Activity of scytalone dehydratase prepared from mycelia of *Pyricularia oryzae* isolates sensitive or resistant to MBI-D at various pH. The activity was assayed by measuring disappearance of scytalone during 120-sec reaction at 25°C at pH ranging from 6.0 to 9.0. Values are means of three experiments  $\pm$  SD, and asterisk indicates statistically significant difference between sensitive and resistant enzymes (*t*-test,  $p < 0.05$ ).

34.0%, 57.2%, 70.2%, 79.4%であり, 感受性菌群の酵素活性が耐性菌群の酵素活性よりも統計学的に有意に高かった (Table 2-3)。

## 考 察

MBI-D 剤耐性化によるフィットネスクストの有無を検証するために, MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の病原性, 温度感受性, 紫外線耐性, シタロン脱水酵素活性を比較した。その結果, 病原性, 温度感受性, 紫外線耐性については, 感受性菌と耐性菌で有意な差は認められなかった。一方, 感受性菌と耐性菌のシタロン脱水酵素活性を比較したところ,  $K_m$  値は感受性酵素と耐性酵素で有意な差は認められなかったが, 感受性酵素の  $V_{max}$  と  $K_{cat}$  は耐性酵素の約 2 倍であった。この結果は, Yamada *et al.* (2004) の大腸菌発現系を用いて調製した組換えシタロン脱水酵素の活性検定の結果と同様な傾向であった。したがって, シタロン脱水酵素遺伝子の変異による MBI-D 剤耐性の獲得は, シタロン脱水酵素活性の低下を招くことが明らかとなった。さらに, 15℃ ~ 35℃ の温度域, pH6.0 ~ pH9.0 の pH 域での, 感受性と耐性の酵素活性を比較したところ, 全ての条件下で, 感受性酵素が耐性酵素よりも有意に活性が高かった。この結果から, いもち病菌がイネに感染する環境条件では, 感受性菌のシタロン脱水酵素活性が耐性菌のシタロン脱水酵素活性よりも高く, 感受性菌がより安定したメラニン生合成能を有していると推定された。また, 感受性菌 4 菌株と耐性菌 4 菌株から調製した粗酵素を用いてシタロン脱水酵素活性を比較したところ, 感受性菌群の粗酵素の活性が耐性菌群の粗酵素の活性よりも有意に高かった。この結果は, 耐性酵素における活性の低下が MBI-D 剤耐性菌群に共通した特徴であることを示唆した。

シタロン脱水酵素は, メラニン生合成系における重要な酵素であ

Table 2-3. Scytalone dehydratase activity in crude enzyme solutions prepared from mycelia of *Pyricularia oryzae* isolates sensitive or resistant to MBI-D

Reaction time (sec)	Sensitive isolate group <sup>a</sup>	Resistant isolate group <sup>a</sup>
30	61.0 ± 11.2	34.0 ± 5.0 *
60	86.1 ± 7.4	57.2 ± 5.7 *
90	94.1 ± 3.5	70.2 ± 6.5 *
120	97.8 ± 1.9	79.4 ± 5.7 *

<sup>a</sup> Each value represents percentage of scytalone consumed in reaction. Four sensitive and four resistant isolates were tested, and values are means of the four isolates of each group ± SD. Asterisk indicates statistically significant difference between sensitive and resistant groups at each time point (*t*-test, *p* < 0.05).

る (Fig.1-4). また, イネいもち病菌のイネへの感染には, 付着器のメラニン化が必須である. MBI-D 剤耐性菌のシタロン脱水酵素の活性が, 感受性菌と比較して低下していることは, MBI-D 剤耐性菌では, イネへの感染過程において感受性菌に比べ不利益を被っていることを示唆した.

### 第 3 章 シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤 耐性菌の生態

#### 緒言

MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の諸性質を比較したところ，病原性，温度感受性，紫外線耐性には有意な差は認められなかった．一方，MBI-D 剤の標的酵素であるシタロン脱水酵素活性については，感受性菌の酵素の分子活性（ $K_{cat}$ ）が，耐性菌の活性の約 2 倍であることが明らかとなった．シタロン脱水酵素は，いもち病菌のメラニン生合成経路の重要な酵素のひとつである．また，いもち病菌のイネ体への感染には付着器のメラニン化が不可欠である．耐性菌のシタロン脱水酵素の  $K_{cat}$  が感受性菌より低いことが，イネの感染過程においてフィットネスコストにつながっている可能性が考えられた．本章では，MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の生態的特性を比較解析した．

#### 材料および方法

##### 1) MBI-D 剤耐性の安定性

###### ① 供試菌株および供試植物

Table 2-1 に示した MBI-D 剤耐性菌 4 菌株を用いた．イネ（品種 日本晴）をポット（直径 5 cm）あたり 20 粒播種し，24℃ のガラス温室で 3 葉期まで栽培し，使用した．

###### ② 植物体上での継代

第 2 章材料および方法に記載した方法によって，各菌株の孢子懸濁液（ $5 \times 10^5$  孢子/ml）を調製した．孢子懸濁液を 1 菌株あたり 10 ポットのイネに接種し，20℃～24℃ 下で，1 日あたり 16 時間ポリエチレンバックでイネを覆い，多湿状態にした．本条件で接種 7～

10 日後には病斑の出現が認められた．これらを第 1 世代の病斑として，それらのポットの横に健全なイネポットを設置した．上述と同様な多湿条件下で，第 1 世代の病斑から健全イネへの感染を促し，健全イネに新たに出現した病斑を第 2 世代の病斑とした．以上の方法によって，植物上での 10 世代の病斑まで継代操作を繰り返した．各世代から 20 病斑を採取し，後述の方法で MBI-D 剤に対する感受性を検定した．

### ③ MBI-D 剤感受性の検定法

MBI-D 剤の感受性検定は，Kaku *et al.* (2003) の primer-introduced restriction enzyme analysis PCR (PIRA-PCR)法を参考に，以下の手順で行った．

各世代の病斑の一部を 5 mm 角に切り取り，1.5 ml のエッペンドルフチューブに採取した．各チューブを電子レンジ内で円上に設置し，中央にピーカーに入れた水を準備した．電子レンジ（約 700W）で，7 分間マイクロ波処理を行った後，TE 緩衝液（pH8.0）を 30  $\mu$ l 添加し，ボルテックスで激しく攪拌した．遠心分離（17800 g，4℃，5 分間）によって上清を回収し，シタロン脱水酵素遺伝子の変異点を含む断片を増幅するための 2 回の PCR 反応の鋳型 DNA として使用した．

#### 1 回目の PCR

Takara *EX Taq* (Takara)を使用し，容量 25  $\mu$ l となるように，鋳型 DNA 2  $\mu$ l，センスプライマー Sense-1（5'-ATGGGTTCGCAAGTTCAAAAG-3'）（25  $\mu$ M）1  $\mu$ l，アンチセンスプライマー Anti-sense-2（5'-TTATTTGTCGCCAAAGGTCTCC-3'）（25  $\mu$ M）1  $\mu$ l，Takara *EX-Taq* 0.25  $\mu$ l，10×*Ex Taq* 緩衝液（Mg<sup>2+</sup>）2.5  $\mu$ l，dNTPs (2.5 mM each) 2  $\mu$ l，滅菌蒸留水 16.25  $\mu$ lを混合した．PCR 反応は，95℃-30 秒間，55℃-1 分間，72℃-2 分間を 40 サイクル繰り返し，72℃-7 分間で反応を完結させた．



## 2 回目の PCR

puRe Taq Ready-To -Go PCR Beads (GE ヘルスケアジャパン) を使用し, 容量 25  $\mu$ l となるように, 鋳型 DNA 2  $\mu$ l, センスプライマー Sense-2 (5'-TTCGTCGGCATGGTCTCGAGCATCTAG-3') (25  $\mu$ M) 1  $\mu$ l, アンチセンスプライマー Anti-sense-2 (5'-GACGCCGTCGATCTTCTT-3') (25  $\mu$ M) 1  $\mu$ l, 滅菌蒸留水 21  $\mu$ l を混合した. 鋳型 DNA には, 1 回目の PCR 産物を 1/20 に希釈したものを用いた. PCR 反応は, 95°C -30 秒間, 60°C -1 分間, 72°C -2 分間を 40 サイクル繰り返し, 72°C -7 分間で反応を完結させた.

2 回目の PCR 産物 10  $\mu$ l を, 制限酵素 *Xba*I (Takara) で処理し, 3% Nusieve 3:1 Agarose (Takara) ゲルを用いて電気泳動を行った. *Xba*I 処理で PCR 産物が消化される場合には MBI-D 耐性, 消化されない場合には感受性と判定した. この方法では, 制限酵素認識部位がセンスプライマー Sense-2 内にあるため, 制限酵素で消化された場合と消化されなかった場合で, 検出されるバンドに 25 bp のサイズの違いが生じる. 本実験では, 既知の MBI-D 感受性菌と耐性菌を同時に電子泳動することによって, *Xba*I によって消化されたか否かを判定した (Fig. 3-1).

## 2) 感受性菌と耐性菌の競合試験

### ① 供試菌株

Table 2-1 に示した MBI-D 剤感受性菌 4 菌株と MBI-D 剤耐性菌 4 菌株を用いた.

### ② 植物体上での継代および MBI-D 剤感受性の検定法

Fig. 3-2 に示すように MBI-D 剤耐性菌と感受性菌の胞子を所定の比率で混合した胞子懸濁液を 1 ペアあたり 10 ポット接種し, 20°C

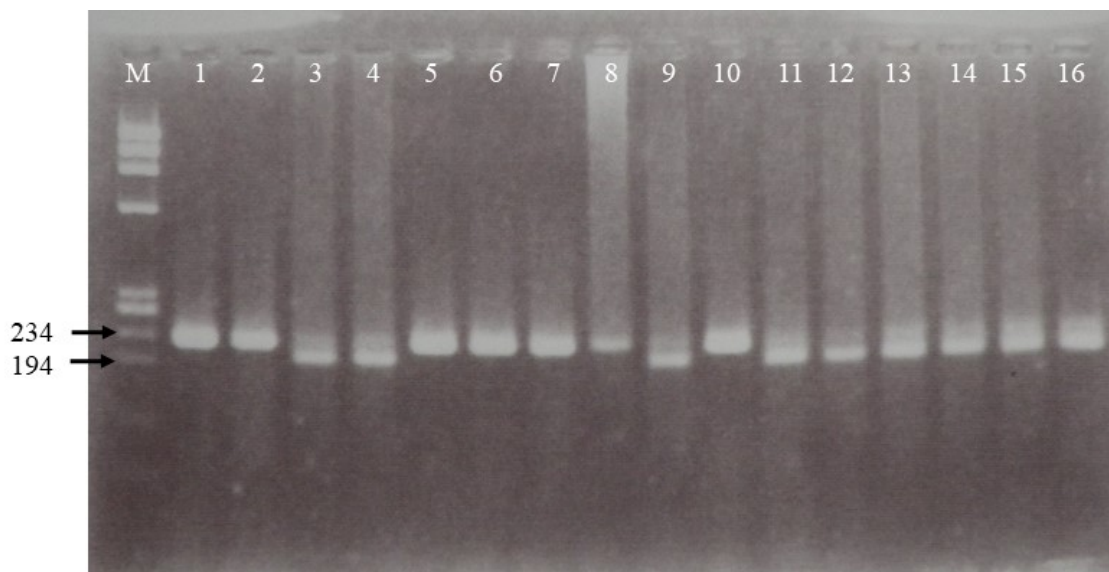


Fig. 3-1. Primer-introduced restriction enzyme analysis PCR (PIRA-PCR) of scytalone dehydratase genes of *Pyricularia oryzae* isolates sensitive or resistant to MBI-Ds. PCR products of scytalone dehydratase gene fragments were digested with *Xba* I and electrophoresed on 3% Nusieve agarose gel. Lanes M, DNA size marker ( $\phi$ 174/ *Hae* III digest); 1, 2, 5 to 8 and 10, sensitive isolates; 3, 4, 9 and 11 to 16, resistant isolates; 8, sensitive isolate for reference; 9, resistant isolate for reference.

～24℃下で，1日あたり16時間ポリエチレンバックでイネを覆い，多湿状態にした．本条件下で，接種7～10日後に，病斑の出現が認められた．これらを第1世代の病斑として，それらのポットの横に健全なイネポットを設置した．上述と同様な多湿条件下で，第1世代の病斑から健全イネへの感染を促し，健全イネに新たに出現した病斑を第2世代の病斑とした．以上の方法によって，植物上での継代操作を5または6世代繰り返した．各世代から20病斑を採取し，MBI-D感受性を上記と同様にPIRA-PCR法によって検定した．

### 3) イネ葉への感染成立時間の調査

#### ① 供試菌株

MBI-D剤感受性菌株としてP-307株とP-1株，耐性菌株としてHK2-11株と9-1株をそれぞれ用いた（Table 2-1）．

本試験では，接種源として罹病イネ葉を用いた．第2章材料および方法に記載した方法によって，孢子懸濁液（ $5 \times 10^5$  孢子/ml）を調製し，イネ葉に接種した．多湿下で発病させた罹病イネを接種源として用いた．

#### ② イネへの接種法

イネ（品種日本晴）をポット（直径5 cm）あたり20粒播種し，24℃のガラス温室で3葉期まで栽培した．供試イネを，水道水を入れた衣装ケース内に設置し，罹病イネ接種源をイネの上に敷き詰めた．霧吹きで濡らした後，衣装ケースの蓋をして多湿を保った．接種したイネを23℃多湿下に連続10時間，12時間および14時間静置した後，各イネを乾燥状態で2日間置き，感染が未成立のいもち病菌の感染を遮断した．乾燥後，20℃～24℃下で，1日あたり6時間ポリエチレンバックでイネを覆い，感染が成立したいもち病菌による発病を促した．本条件下で，感染が成立したいもち病菌は，接種8～10日後に病斑を形成した．なお，実験を5反復で行った．

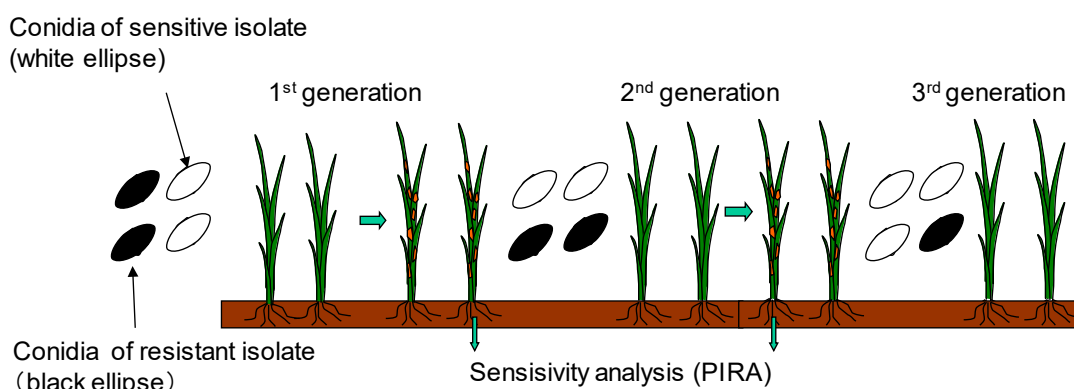


Fig. 3-2. Method for competition study of *Pyricularia oryzae* isolates sensitive and resistant to MBI-D. Suspensions of mixed conidia from sensitive and resistant isolates were inoculated onto rice seedlings. Seedlings were covered by a polyethylene bag for 16 hr per day and maintained in a greenhouse at 20 to 24°C for 7 to 10 days (1<sup>st</sup> generation). Healthy seedlings were then placed near the 1<sup>st</sup> generation seedlings to provide a pathogen source and maintained in the above mentioned conditions (2<sup>nd</sup> generation). This procedure was conducted several times to repeat infection from the previous generation. The MBI-D sensitivity of isolates infecting the lesions of each generation was analyzed by PIRA-PCR.

### ③ 評価法

連続多湿 14 時間区で病斑が出現した時期に，各区の 2 葉と 3 葉について，各ポット 20 苗（1 ポットあたり 40 葉）の病斑数を調査した．各菌株の 10 時間，12 時間，14 時間多湿下における病斑数について，Tukey-Kramer の多重比較法（有意水準 5%）によって有意差を検定した．

## 4) MBI-D 剤の使用を中止した圃場における耐性菌の頻度推移

### ① モニタリング圃場

MBI-D 剤の使用中止後の耐性菌の頻度推移を調査するために，単年での耐性菌の頻度推移と数年にわたる耐性菌の頻度推移を調査する圃場をそれぞれ選定した．

単年度の頻度推移を調査する圃場として，2003 年は宮崎県と佐賀県の各 1 圃場，2006 年は兵庫県の 2 圃場を選定した．数年わたる頻度推移を調査する圃場として，佐賀県の 1 圃場（2003 年～2006 年）と兵庫県の 4 圃場（2004 年～2006 年 1 圃場，2003 年と 2006 年 2 圃場，2003 年～2006 年 1 圃場）をそれぞれ選定した．

### ② 供試菌株の分離および MBI-D 剤感受性の検定法

各圃場において，種籾，葉いもち病斑および穂いもち病斑を採取した．

種籾および穂いもち病斑をシャーレ（直径 9 cm）に設置した滅菌蒸留水で湿らせたろ紙上に置き，27℃ 下で BLB ランプを照射して孢子形成を誘導した．孢子が形成されたサンプルから，いもち病菌を分離，MBI-D 感受性検定に用いた．葉いもち病斑は，菌を分離せずに病斑を直接感受性検定に用いた．MBI-D 感受性検定には，上記と同様に PIRA-PCR 法を用いた．

## 結果

## 1) MBI-D 剤 耐 性 の 安 定 性

供試した MBI-D 剤 耐 性 4 株をイネ体上で継代を繰り返したところ，10 回の継代後も病斑を形成した菌株のシタロン脱水酵素遺伝子はすべて耐性型であった (Table 3-1)．この結果は，MBI-D 剤 耐 性 菌では耐性型遺伝子が安定して継代されることを示唆した．

## 2) MBI-D 剤 感 受 性 菌 と 耐 性 菌 の 競 合

### ① 感 受 性 菌 P-307 株 と 耐 性 菌 NH5-1 株 の 競 合

耐 性 NH5-1 株 60%，感受性 P-307 株 40%の比率で接種したところ，第 3 世代から耐性株の比率が急激に減少し，耐性株が 10%まで減少した (Fig.3-3A)．さらに，第 4 世代，第 5 世代では採取した 20 病斑から耐性株は検出されなかった (Fig.3-3A)．

### ② 感 受 性 菌 HT2-4 株 と 耐 性 菌 HK2-11 株 の 競 合

耐 性 HK2-11 菌株 75%，感受性 HT2-4 株 25%の比率で接種したところ，第 2 世代から耐性株の比率が減少し始め，第 3 世代では耐性株が 35%に減少した (Fig.3-3B)．さらに，第 4 世代，第 5 世代では採取した 20 病斑から耐性株は検出されなかった (Fig.3-3B)．

### ③ 感 受 性 菌 P-1 株 と 耐 性 菌 P-1025 株 の 競 合

耐 性 P1025 株 75%，感受性 P-1 株 25%の比率で接種したところ，第 3 世代から耐性株の比率が急激に減少し，第 5 世代では耐性株が 15%まで減少した (Fig.3-3C)．さらに，第 6 世代では採取した 20 病斑から耐性株は検出されなかった (Fig.3-3C)．

### ④ 感 受 性 菌 PO26 株 と 耐 性 菌 9-1 株 の 競 合

耐 性 9-1 株 90%，感受性 PO26 株 10%の比率で接種したところ，第 3 世代から耐性株の比率が急激に減少し，第 4 世代では耐性株が 5%まで減少した (Fig.3-3D)．さらに，第 5 世代，第 6 世代では採

Table 3-1. Stability of MBI-D resistance of *Pyricularia oryzae*

No. of transfer times	No. of lesions <sup>a</sup>			
	P1025	NH5-1	9-1	HK2-11
	R / S	R / S	R / S	R / S
1	20/0*	20/0	20/0	20/0
3	20/0	20/0	20/0	20/0
5	20/0	20/0	20/0	20/0
7	20/0	20/0	20/0	20/0
10	20/0	20/0	20/0	20/0

<sup>a</sup> MBI-D sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.

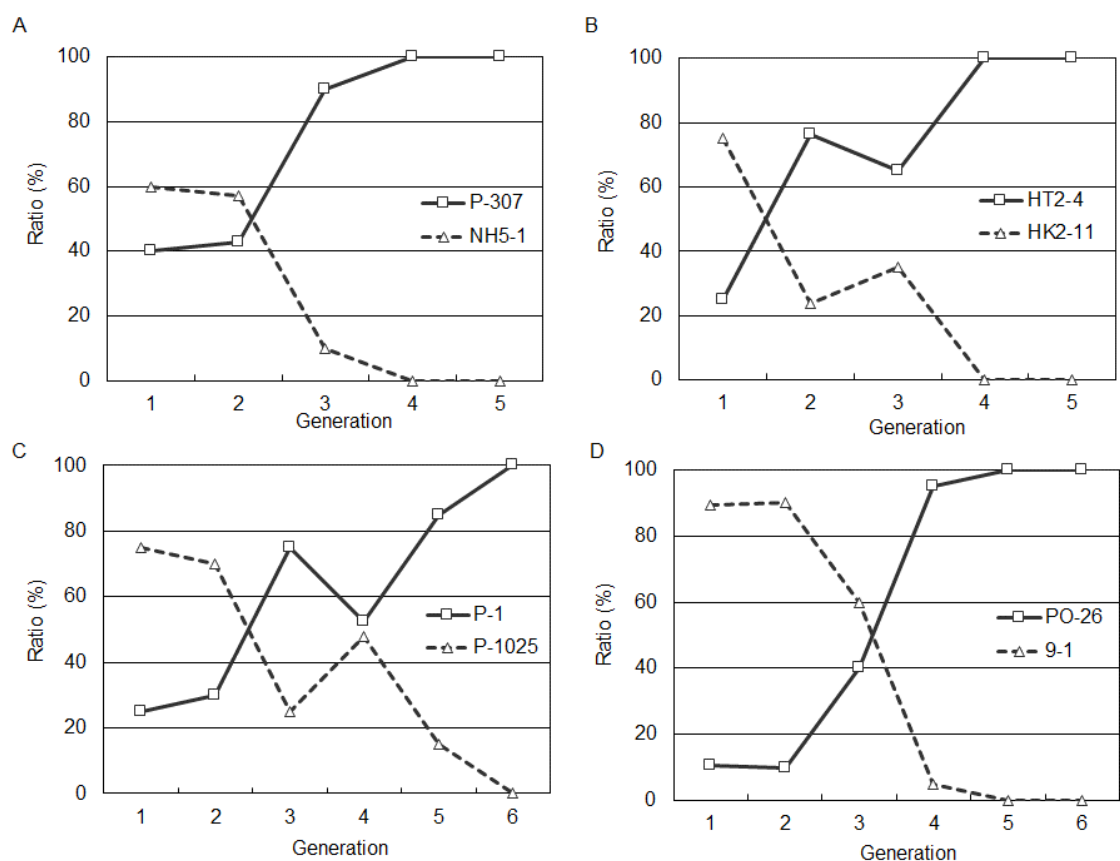


Fig. 3-3. Competition between *Pyricularia oryzae* isolates sensitive and resistant to MBI-Ds under the fungicide-free condition. Approximately 20 rice blast lesions were collected from each generation. The MBI-D sensitivity of isolates forming the lesions from each generation was analyzed by PIRA-PCR. P-307, HT2-4, P-1 and PO26, MBI-D sensitive isolates; NH5-1, HK2-11, P-1025 and 9-1, MBI-D resistant isolates.



取した 20 病斑から耐性株は検出されなかった (Fig.3-3D).

### 3) イネ葉への感染成立時間

MBI-D 剤感受性 P-307 株は，連続多湿 12 時間，14 時間の条件で，それぞれ平均 9.6 個/苗，11.3 個/苗の病斑を形成し，両区の病斑数に統計学的な有意差は認められなかった (Fig. 3-4). 一方，10 時間多湿区の平均病斑数は 0.8 個/苗であり，12 時間または 14 時間多湿区と比べて有意に病斑数が減少した (Fig. 3-4). また，MBI-D 剤感受性 P-1 菌株は，連続多湿 12 時間，14 時間の条件で，それぞれ平均 8.1 個/苗，8.5 個/苗の病斑を形成し，両区の病斑数に統計学的な有意差は認められなかった (Fig. 3-4). 一方，10 時間多湿区の平均病斑数は 1.9 個/苗であり，12 時間または 14 時間多湿区と比べて有意に病斑数が減少した (Fig. 3-4). 以上の結果は，これら感受性菌株のイネ体感染には，10 時間連続多湿条件では十分でなく，12 時間以上の連続多湿条件が必要であることを示唆した.

MBI-D 剤耐性 HK2-11 株は，連続多湿 14 時間の条件で平均 9.1 個/苗の病斑を形成したが，連続多湿時間 12 時間では平均病斑数が 2.3 個/苗に減少し，両区の病斑数には統計学的な有意差が認められた (Fig. 3-4). 10 時間多湿区の平均病斑数は 0.1 個/苗であり，ほとんど病斑が形成されなかった (Fig. 3-4). また，MBI-D 剤耐性 9-1 株は，連続多湿 14 時間の条件で，平均 5.3 個/苗の病斑を形成したが，連続多湿時間 12 時間では平均病斑数が 1.6 個/苗に減少し，両区の病斑数には統計学的な有意差が認められた (Fig. 3-4). 10 時間多湿区の平均病斑数は 0.2 個/苗であり，HK2-11 株と同様にほとんど病斑が形成されなかった (Fig. 3-4). 以上の結果は，これら MBI-D 耐性菌株のイネ体感染には，12 時間連続多湿条件でも十分でなく，連続 14 時間以上の多湿条件が必要であることを示唆した.

以上の結果は，MBI-D 耐性菌では，感受性菌に比べてイネ体に感染するために必要な連続多湿時間が少なくとも 2 時間長く必要で

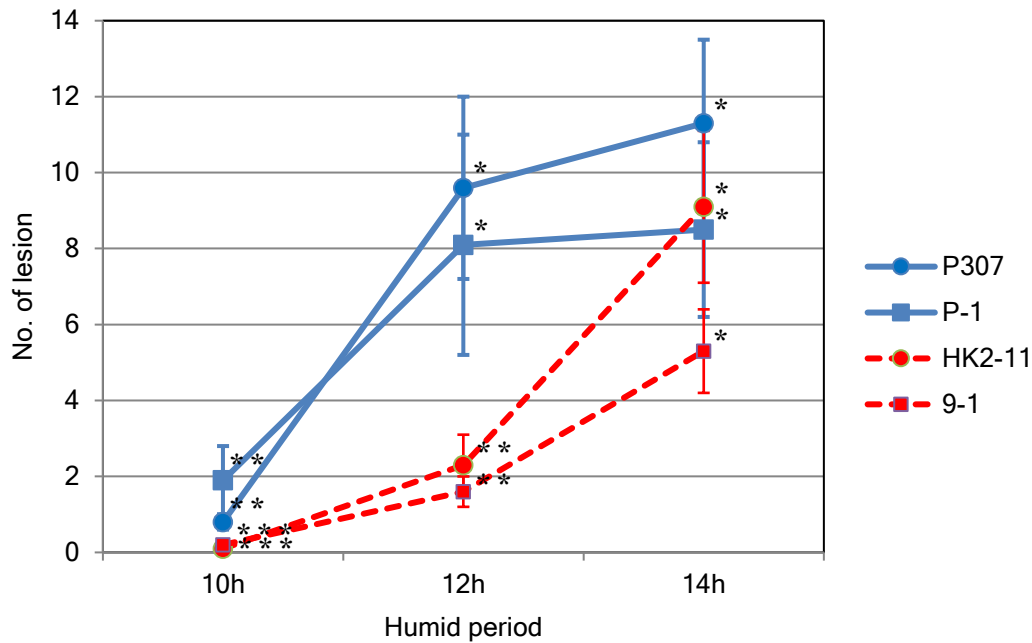


Fig. 3-4. Humid periods required for infection of *Pyricularia oryzae* isolates sensitive or resistant to MBI-D. Diseased leaves were placed as inocula on healthy rice seedlings (third leaf stage) under 100% relative humidity for 10, 12 or 14 hr. Then, the inocula were removed, and inoculated seedlings were kept under dry conditions for 2 days to stop infection process. The seedlings were then kept under cycles of dry (18 hr) and humid (6 hr) conditions at 23°C to induce rice blast lesions. Number of rice blast lesions on second and third leaves was assessed 8 to 10 days after inoculation. 20 leaves from 10 seedlings were assessed per replication (five replicates per isolate). Two sensitive isolates P-307 and P-1 (solid line) and two resistant isolates HK2-11 and 9-1 (dashed line) were tested. Different number of asterisk indicates statistically significant difference in lesion numbers among time points for each isolate (Tukey–Kramer multiple comparison analysis;  $p < 0.05$ ).

あること，すなわち耐性菌のイネ体感染能力が低下していることを示した．

#### 4) MBI-D 剤の使用を中止した圃場における耐性菌の頻度推移

MBI-D 剤の使用中止後の耐性菌の頻度推移について，単年度内での推移と数年にわたる推移を複数の圃場を用いて調査した．

##### ① MBI-D 剤耐性菌頻度推移の単年度調査

###### i) 宮崎県宮崎市圃場

2002 年採取した種粃が保菌していたいもち病菌の耐性菌頻度は 66.7%であった（Table 3-2）．一方，2003 年に発生した葉いもち、穂いもちの耐性菌頻度はそれぞれ 42.3%，0%，さらに 2003 年収穫の種粃の保菌耐性菌の頻度も 0%であり，耐性菌頻度の著しい低下が認められた（Table 3-2）．

###### ii) 佐賀県武雄市圃場

2002 年採取した種粃が保菌していたいもち病菌と葉いもちの耐性菌頻度は 100%であった（Table 3-3）．一方，2003 年に発生した穂いもちの耐性菌頻度は 53.6%で，2003 年収穫の種粃の保菌耐性菌の頻度は 36.7%であった（Table 3-3）．なお，2002 年の種粃の保菌耐性菌の頻度（100%）と 2003 年収穫の種粃の保菌耐性菌の頻度（36.7%）では，統計学的に有意な差が認められ，耐性菌密度の低下が示された（Table 3-3）．

###### iii) 兵庫県宍粟市圃場

2006 年の葉いもちの耐性菌頻度は 84.6%であったが，穂いもちの耐性菌頻度は 55.6%であり，穂いもちでは耐性菌頻度が有意に低下した（Table 3-4）．

Table 3-2. Changes of frequency of MBI-D resistant isolates in a field in Miyazaki Prefecture in 2003

Sampling part	No. of isolates	No. of resistant isolates <sup>d</sup>	% of resistant isolates <sup>e</sup>
Harvested Seed 1 <sup>a</sup>	6	4	66.7
Leaf <sup>b</sup>	26	11	42.3
Panicle <sup>c</sup>	6	0	0*
Harvested Seed 2 <sup>a</sup>	9	0	0*

<sup>a</sup> Harvested Seed 1 and Seed 2 were harvested in 2002 and 2003, respectively.

<sup>b</sup> Leaf blast lesions were directly used for the MBI-D sensitivity tests.

<sup>c</sup> Isolates were isolated from panicle blast and subjected to the sensitivity tests.

<sup>d</sup> The sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.

<sup>e</sup> Asterisk indicates statistically significant difference from Seed 1 according to Fisher's exact test ( $p < 0.05$ ).

Table 3-3. Changes of frequency of MBI-D resistant isolates in a field in Saga Prefecture in 2003

Sampling part	No. of isolates	No. of resistant isolates <sup>d</sup>	% of resistant isolates <sup>e</sup>
Harvested Seed 1 <sup>a</sup>	13	13	100
Leaf <sup>b</sup>	7	7	100
Panicle <sup>c</sup>	28	15	53.6*
Harvested Seed 2 <sup>a</sup>	30	11	36.7*

<sup>a</sup> Harvested Seed 1 and Seed 2 were harvested in 2002 and 2003, respectively.

<sup>b</sup> Leaf blast lesions were directly used for the MBI-D sensitivity tests.

<sup>c</sup> Isolates were isolated from panicle blast and subjected to the sensitivity tests.

<sup>d</sup> The sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.

<sup>e</sup> Asterisk indicates statistically significant difference from Seed 1 according to Fisher's exact test ( $p < 0.05$ ).

iv) 兵庫県神戸市圃場

2006年の葉いもちの耐性菌頻度は58.7%であったが、穂いもちの耐性頻度は0%であり、穂いもちでは耐性菌頻度が有意に低下した（Table 3-4）.

② MBI-D 剤耐性菌頻度推移の経年調査

i) 佐賀県唐津市圃場

本圃場では、種籾が保菌していたいもち病菌のみについて、それらの MBI-D 剤感受性を検定した。MBI-D 剤を最後に使用した 2002 年では耐性頻度が 100%であったが、翌 2003 年には耐性菌頻度が 22.9%まで激減した（Table 3-5）。さらに、2004 年の耐性菌頻度は 4%とさらに減少し、2005 年には 174 菌株中耐性菌は 2 株（1.1%）のみであった（Table 3-5）。2002 年と 2005 年の耐性菌頻度には、統計学的に有意な差が認められた（Table 3-5）.

ii) 兵庫県加東市圃場

本圃場では、葉いもち病斑について、MBI-D 剤耐性菌頻度の推移を調査した。2003 年と 2005 年の葉いもちの耐性菌頻度は 98.0%、92.9%とほぼ同様であったが、2006 年の葉いもちの耐性菌頻度は 21.9%に減少した。2003 年と 2006 年の耐性菌頻度には、統計学的に有意な差が認められた（Table 3-6）.

iii) 兵庫県篠山市圃場

本圃場では、葉いもち病斑について、MBI-D 剤耐性菌頻度の推移を調査した。2003 年の葉いもちの耐性菌頻度は 16.7%であったが、2006 年の耐性菌頻度は 0%であった（Table 3-6）。2003 年の耐性菌頻度が他の地域に比べて低かったため、2003 年と 2006 年の耐性頻度には、統計学的な有意差は認められなかった（Table 3-6）.

Table 3-4. Changes of frequency of MBI-D resistant isolates in two fields in Hyogo Prefecture in 2006

Sampling part	No. of isolates	No. of resistant isolates <sup>c</sup>	% of resistant isolates <sup>d</sup>
Shiso City			
Leaf <sup>a</sup>	52	44	84.6
Panicle <sup>b</sup>	27	15	55.6*
Kobe City			
Leaf <sup>a</sup>	46	27	58.7
Panicle <sup>b</sup>	5	0	0*

<sup>a</sup> Leaf blast lesions were directly used for the MBI-D sensitivity tests

<sup>b</sup> Isolates were isolated from panicle blast and subjected to the sensitivity tests.

<sup>c</sup> The sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.

<sup>d</sup> Asterisk indicates statistically significant difference from leaf blast according to Fisher's exact test ( $p < 0.05$ ).

Table 3-5. Changes of frequency of MBI-D resistant isolates in a field in Saga Prefecture

Year <sup>a</sup>	No. of isolates <sup>b</sup>	No. of resistant isolates <sup>c</sup>	% of resistant isolates <sup>d</sup>
2002	11	11	100
2003	48	11	22.9*
2004	25	1	4.0*
2005	174	2	1.1*

<sup>a</sup> 2002 was the last year of MBI-D application, and the use of MBI-D was stopped from 2003.

<sup>b</sup> Isolates were isolated from harvested seeds and subjected to the sensitivity tests.

<sup>c</sup> The sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.

<sup>d</sup> Asterisk indicates statistically significant difference from the 2002 sample according to Fisher's exact test ( $p < 0.05$ ).



#### iv) 兵庫県赤穂郡圃場

本圃場では、葉いもち病斑について、MBI-D 剤耐性菌頻度の推移を調査した。2003 年の葉いもちの耐性菌頻度は 100%であったが、2006 年の耐性菌頻度は 44%であり、両者間で統計学的に有意な差が認められた (Table 3-6)。

#### v) 兵庫県姫路市圃場

本圃場では、葉いもち病斑について、MBI-D 剤耐性菌頻度の推移を調査した。2003 年と 2004 年の葉いもちの耐性菌頻度は、それぞれ 100%、96.4%とほぼ同等であった (Table 3-6)。一方、2005 年と 2006 年の耐性菌頻度は 78.4%、70.0%とやや減少した (Table 3-6)。2003 年と 2006 年の耐性菌頻度には、統計学的に有意な差が認められた (Table 3-6)。

### 考察

MBI-D 剤耐性菌をイネ体上で 10 回継代した実験から、MBI-D 剤耐性菌の耐性型シタロン脱水酵素遺伝子は継代によっても安定して保持され、容易には復帰突然変異は起こらないことが示唆された。このような耐性菌を用いて、感受性菌との競合試験を実施した。その結果、供試した 4 組の耐性菌と感受性菌の競合試験すべてにおいて、数世代継代を繰り返すと感受性菌が優占化し、最終的には感受性菌のみが残ることが明らかとなった。この結果は、耐性菌が、感受性菌に比べて、フィットネスクストを負っていることを強く示唆している。また、第 2 章において、耐性菌のシタロン脱水酵素活性が、感受性の同酵素活性に劣ることが示された。シタロン脱水酵素は、いもち病菌がイネに感染するために必須なメラニン生合成経路の重要な酵素であることから、耐性菌では感受性菌に比べてイネへの感染過程において、フィットネスクストを負うことになったと推

Table 3-6. Changes of frequency of MBI-D resistant isolates in four fields in Hyogo Prefecture

Year <sup>a</sup>	No. of isolates <sup>b</sup>	No. of resistant isolates <sup>c</sup>	% of resistant isolates <sup>d</sup>
Kato City			
2004	50	49	98.0
2005	14	13	92.9
2006	32	7	21.9*
Sasayama city			
2003	24	4	16.7
2006	14	0	0
Ako-Gun			
2003	8	8	100
2006	16	7	44.0*
Himeji City			
2003	20	20	100
2004	28	27	96.4
2005	37	29	78.4*
2006	50	35	70.0*

<sup>a</sup> The use of MBI-D was stopped from 2004 in Kato City and from 2003 in Sasayama City, Ako-gun and Himeji City, respectively.

<sup>b</sup> Leaf blast lesions were directly used for the MBI-D sensitivity tests.

<sup>c</sup> The sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.

<sup>d</sup> Asterisk indicates statistically significant difference from the first year in each field according to Fisher's exact test ( $p < 0.05$ ).

察された。

さらに，MBI-D 剤感受性菌と耐性菌を 2 菌株ずつ用いて，それぞれの菌株がイネに感染するために必要な多湿時間について検討した。その結果，感受性 2 菌株では，接種から 12 時間連続多湿状態が続けばイネへの感染が成立するが，耐性 2 菌株では，14 時間の連続多湿が感染に必要であった。この結果は，薬剤淘汰圧がない条件では，感受性菌が耐性菌より，迅速にイネに感染することができることを示している。したがって，感受性菌は耐性菌に比べより感染機会が確保されるため，圃場で感受性菌の割合が増えていくことを示唆しており，先の競合試験の結果と矛盾しない。耐性化によるフィットネスクストは，シタロン脱水酵素活性の低下により，イネ体感染により長時間の連続多湿時間が必要となったことに起因すると推察された。

室内試験によって，耐性菌がフィットネスクストを負っていることが示されたため，MBI-D 剤の淘汰圧のない圃場（MBI-D 剤の使用を中止した圃場）において，単年度内と経年的な MBI-D 剤耐性菌の頻度推移を調査した。単年度内で耐性頻度が変化するか否かを調査するために，宮崎県，佐賀県，兵庫県の 4 圃場を選定した。それらのうち 2 圃場では評価開始年に播種した種籾と 1 シーズン後に収穫した種籾の保菌耐性菌頻度を比較した。残りの 2 圃場では，葉いもちと穂いもちの耐性菌頻度を比較した。その結果，すべての圃場で程度に差はあるものの，単年度内で耐性菌頻度の低下が確認された。さらに，3～4 年間の耐性菌頻度の推移を調査するために，佐賀県の 1 圃場と兵庫県の 4 圃場を選定した。この場合にも，すべての圃場で，調査開始年の耐性菌頻度に比べ，3～4 年後の耐性菌頻度が顕著に減少した。

圃場によって，耐性菌頻度の減少スピードには差があったが，その原因については不明である。耐性菌のフィットネスクストが，イネに感染するために必要な多湿時間が長くなったことであることから，圃場や調査年ごとの気候条件の違いによって，調査圃場が多湿

に保たれる時間に差があった可能性が考えられた。

以上の結果は，一旦 MBI-D 剤耐性菌が蔓延した圃場でも，MBI-D 剤の使用を中止すれば，数年後には感受性菌が優占化し，MBI-D 剤の効果が回復することを示唆している．次章では，MBI-D 剤の効果が回復した圃場において，耐性菌管理対策を考慮しながら，MBI-D 剤を使用する方法について検討した．

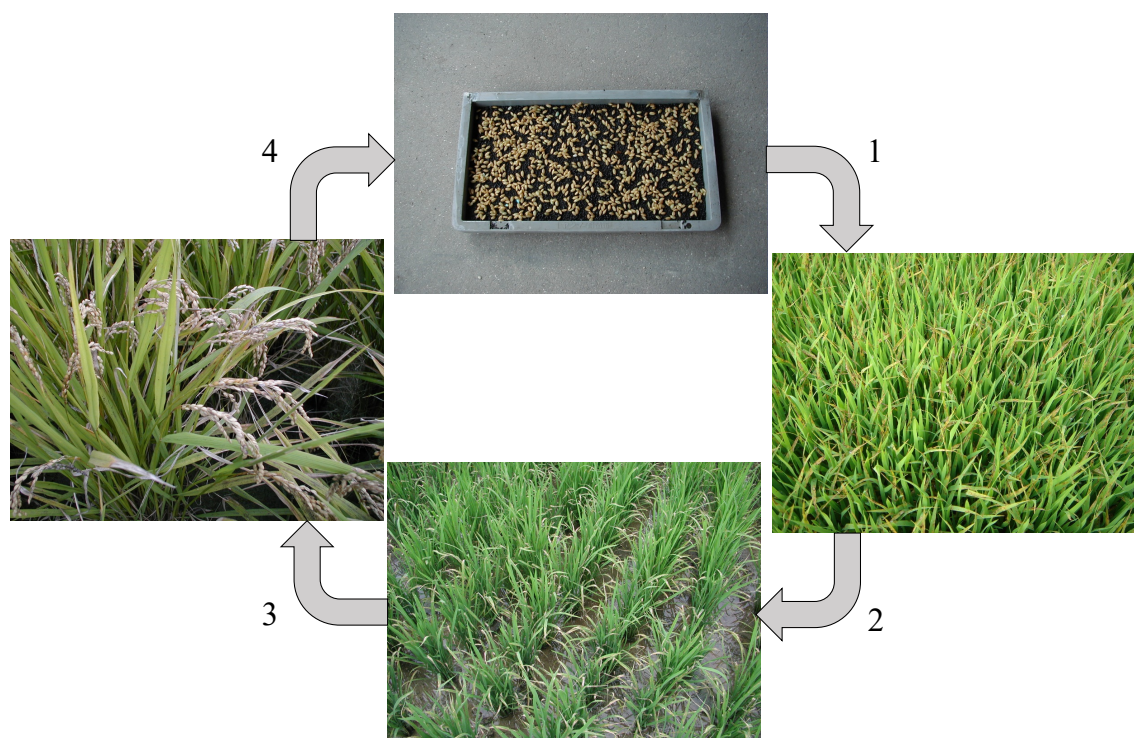
## 第 4 章 シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤 耐性菌管理対策

### 緒言

第 2 章と第 3 章において、イネいもち病菌の MBI-D 剤耐性化は、フィットネスクストを負っていることを示した。この結果は、第 1 章でも述べたように、MBI-D 剤では有効な耐性菌管理対策を講じることが可能であることを示している。本章では、耐性菌管理対策を考慮した防除体系について検討した。耐性菌管理対策として検討すべきは、異なる作用機作の剤を組み合わせたローテーション防除と混合剤の利用である。

ローテーション防除を策定する場合には、当該病原菌の伝搬経路（disease cycle）と防除時期を考慮する必要がある。イネいもち病菌の伝搬経路は、Fig. 4-1 に示すように、「種子→苗→本田の葉いもち→穂いもち→種子」というサイクルである。主な防除タイミングは、①種子伝染性のいもち病を防除する時期（種子処理，育苗箱灌注処理など）、②本田の葉いもちを防除する時期（育苗箱施用，水面処理，茎葉散布など）および③穂いもちを防除する時期（育苗箱施用，水面処理，茎葉散布など）である。

①の種子伝染性のイネいもち病菌を防除する手段としては、化学農薬の種子処理，微生物農薬（熊倉ら，2003），温湯消毒（早坂ら，2001）等がある。しかしながら，微生物農薬や温湯消毒は，防除効果の安定性では化学農薬に劣る。そこで本研究では，種子消毒剤として化学農薬を用いた。本研究に着手した 2000 年代初頭は，Sterol Biosynthesis Inhibitor（SBI 剤）が種子消毒剤の主流であった。しかし，SBI 剤は，玄米感染したいもち病菌に対する効果がベノミルに劣るという報告があった（早坂ら，2002）。そこで本



Type of application	Target of disease stage			
Seed treatment	1	2	3	4
Nursery box application	1	2	3	4
Foliar application	1	2	3	4

Fig. 4-1. Disease cycle of rice blast and application of fungicide to control rice blast. 1, seed to seedling; 2, seedling to leaf on paddy; 3, leaf to panicle; 4, panicle to seed. Yellow color in lower panel indicates target disease stages of each application.

研究では，ベノミルの適用可能性について検討した．検討を開始した当時は，50%ベノミル水和剤による種子伝染性いもち病防除の農薬登録については種子消毒のみが対象であった．しかしながら，トリコデルマ病害防除には，ベノミル水和剤の育苗箱灌注処理の登録があることに着目し，ベノミル水和剤の育苗箱灌注処理による種子伝染性のいもち病防除の可能性も検討した．

②の本田の葉いもちを防除する資材については，育苗箱施用剤を対象とした．検討した資材としては，MBI-D 剤としてジクロシメット，その混合剤としてジクロシメットとチアジニルの混合剤，MBI-D 剤以外では，抵抗性誘導剤（SAR 剤）のチアジニル，電子伝達系複合体 III ユビキノール酸化酵素阻害剤（QoI 剤）のオリサストロビン，MBI-R 剤のトリシクラゾールを用いた．

③の穂いもち防除剤としては，MBI-D 剤のジクロシメットと MBI-R 剤フサライドの混合剤の利用について検討した．

## 材料および方法

### 1) ベノミルによる種子伝染性いもち病の防除

#### ① ベノミルの MBI-D 剤感受性菌と耐性菌に対する菌糸伸長阻害活性の検定

##### i) 供試菌株

1986 年に愛知県農業総合試験場より分譲され当社で保存中の MBI-D 剤感受性 19 菌株と，2002 年に全国から採取したいもち病斑から単孢子分離した 41 菌株を供試した．なお，2002 年採取・分離の 41 菌株のうち 30 菌株が MBI-D 剤耐性，11 菌株が感受性であった．

##### ii) 寒天平板希釈法

PDA 培地で生育させた供試菌の菌糸の先端を直径 5 mm のコルクボーラーで切り取り，0.31，1.25，5.00 ppm のベノミル含有 PDA

培地に，菌糸面が培地と接するように移植した．27℃下で7～10日間培養した後，生育した菌糸の長さを測定し，50%菌糸伸長阻害濃度（EC<sub>50</sub> 値）を算出した．

## ② ベノミルの MBI-D 剤感受性と耐性菌に対する発芽管伸長阻害活性の検定

### i) 供試菌株

上述の菌株から MBI-D 剤感受性菌と耐性菌を 10 菌株ずつ任意に選抜し，供試菌株とした．

### ii) 寒天平板希釈法

第 2 章材料および方法に記載した方法によって，各菌株の孢子懸濁液（ $2 \sim 3 \times 10^5$  孢子/ml）を調製した．0.31，1.25，5.00 ppm のベノミル含有 PDA 培地に孢子懸濁液を画線接種し，27℃下で 24 時間培養した後，光学顕微鏡下で発芽管の伸長程度を観察した．

## ③ 種子消毒による粃および玄米上の孢子形成抑制効果の検定

### i) 供試粃

2002 年にいもち病が多発した佐賀県相知町の圃場より採取した汚染種子（品種ヒノヒカリ，保菌粃率約 18%）を使用した．

### ii) 種子消毒および評価方法

種子消毒は，浴比 1:3，室温条件（24℃～28℃）で，ベノミル水和剤を所定濃度に希釈した薬液に 24 時間浸漬し，24 時間風乾後，湿らせたろ紙上に処理後の粃を置床した．BLB 照射下で 27℃下 3 日間置いた後，孢子形成粃率をブロッター法（君島，1999）によって調査した．供試玄米は粃を種子消毒，風乾した後，脱ぶして調製し，前述のブロッター法に準じて玄米上の孢子形成率を調査した．供試粃および玄米粒数は各 50 粒の 4 反復とした．なお，統計処理は，粃上および玄米上の孢子形成率に対して，Tukey-Kramer の多



重比較法（有意水準 5%）で行った．

#### ④ 種子消毒による苗いもち防除効果の検定

##### i) 供試籾

供試籾は前述の種子消毒実験に用いた籾を使用した．

##### ii) 種子消毒，栽培および効果判定方法

種子消毒，風乾は前記実験と同様に行い，風乾後の種子を 18℃ 下で 5 日間浸種した後，32℃ 下で催芽し，催芽種子を育苗培土（ボンソル，住友化学）を充填したプラスチックポット（直径 9 cm）に 1 ポットあたり 4 g（約 150 粒）播種した．播種した籾上にろ紙を 1 枚置き，その上から軽く覆土し，8 時～19 時は 24℃，19 時～8 時は 20℃ の加湿条件（相対湿度 90%以上）で 3 日間保ち出芽を促した．出芽後，ろ紙を取り除き完全無覆土にし，8 時～19 時は 24℃，19 時～8 時は 20℃，また 8 時～16 時は無加湿，16 時～8 時は加湿条件（相対湿度 90%以上）で 19 日間（播種 22 日後）栽培した．栽培後，枯死苗（病斑または形成胞子からいもち病による枯死と断定できるもののみ対象）および第 1 本葉葉鞘に病斑を形成しているものを苗いもち罹病苗として全株を調査し，発病苗率を算出した．なお，対照剤として SBI 剤のプロクロラズ 25% 乳剤を使用した．本実験を 3 反復で行った．

発病苗率については，播種 14 日後にも調査したが，その時点で明確な発病が認められなかった．そこで，さらに 8 日間栽培を続けて苗いもちの発病を促した後，調査した．通常の試験より調査時期は遅いが，播種 14 日後の発病状況と，本実験の実施が外部からの伝染が考えにくい条件であったことから，発病株は種子由来の苗いもちであると判断した．

なお，統計処理は，苗いもち発生率に対して，Tukey-Kramer の多重比較法（有意水準 5%）で行った．

## ⑤ 育苗箱灌注による苗いもち防除効果の検定

### i) 供試粃

住友化学工業株式会社農業化学品研究所（現 住友化学株式会社健康・農業関連事業研究所）加西試験圃場（兵庫県加西市）内で、2002年にいもち病が多発した圃場から採取した汚染種子（品種ヒノヒカリ，保菌率約9%）を供試した。

### ii) 育苗箱灌注，栽培および効果判定方法

供試粃を18℃で5日間浸種した後，32℃で催芽させ，催芽種子を育苗培土（ボンソル）を充填したプラスチックポット（直径9 cm）に1ポットあたり3 g（約110粒）播種した。ベノミル水和剤の灌注処理は，播種時（播種直前処理）または緑化期（播種7日後処理）の各々1回処理で，500倍，1000倍に希釈した薬液を1ポットあたり約18 ml（育苗箱あたり500 ml換算量）灌注した。播種後の栽培管理は前述の苗いもちの実験と同様に行った。播種27日後に，前述の苗いもちの実験と同様に発病苗率を算出した。なお，対照として，ベノミル水和剤50倍希釈液への10分間浸漬処理（風乾あり）と乾燥粃あたり0.5%の種子粉衣処理（風乾あり）を行った。本実験を3反復で行った。

発病苗率については，播種14日後と20日後にも調査したが，その時点で明確な発病が認められなかった。そこで，さらに7日間栽培を続けて苗いもちの発病を促した後，調査した。通常の実験より調査時期は遅いが，播種14日後および20日後の発病状況と前述のように他からの伝染が考えにくい試験条件であったことから，本実験における発病株は種子由来の苗いもちであると判断した。

なお，統計処理は，苗いもち発生率に対して，Tukey-Kramerの多重比較法（有意水準5%）で行った。

## ⑥ 育苗箱灌注による苗の葉いもち防除効果の検定

本実験では，外部から飛散した胞子による発病に対するベノミル

の育苗箱灌注処理の効果を検討するために，苗に胞子を接種し，葉いもちの発生状況を調査した．

#### i) 供試籾

供試籾は 2002 年新潟県産種籾（品種コシヒカリ）を用いた．なお，本供試籾 500 粒についてブロッター法（君島，1999）によりいもち病保菌籾率を調査したところ，保菌率は 0%であり，供試籾からの種子伝染による苗いもち発病の可能性は低いと考えた．

#### ii) 育苗箱灌注，栽培および効果判定方法

薬剤処理には 500 倍希釈ベノミル水和剤を用いて，上記⑤と同じ方法で播種時灌注（播種直前処理）した．播種時灌注は緑化期灌注と比べて，播種機を用いた効率的な処理が可能であるという長所があるため，以降の実験でのベノミル水和剤の育苗箱灌注には播種時処理を用いた．供試籾を 18℃下で 5 日間浸種した後，32℃下で催芽した．育苗培土（ボンソル）をプラスチックポット（直径 9 cm）に充填し，上記の方法で薬液灌注した後，1 ポットあたり 4 g（約 150 粒）を播種した．播種後，覆土し，8 時～19 時は 24℃，19 時～8 時は 20℃の加湿条件で 3 日間保ち出芽を促した．出芽後は，8 時～19 時は 24℃，19 時～8 時は 20℃のガラス温室で栽培し，播種 15 日後に MBI-D 剤感受性いもち病菌の胞子懸濁液（ $5 \times 10^3$  胞子/ml）を噴霧接種した．接種後約 18 時間，20～24℃の加湿条件に静置した後，8 時～19 時は 24℃，19 時～8 時は 20℃また 8 時～16 時は無加湿，16 時～8 時は加湿条件で栽培し，接種 13 日後に全株について発病苗率を調査した．本実験では，イネの葉鞘または葉身にいもち病病斑が形成されている苗を発病苗とした．なお，対照としてベノミル水和剤の 10 分間種子浸漬処理，プロクロラズ乳剤（プロクロラズ 25%）の高濃度 10 分間種子浸漬処理と播種直前育苗箱灌注処理，イプコナゾール・銅水和剤（イプコナゾール 5%，銅 3%）の高濃度 10 分間種子浸漬処理と播種直前育苗箱灌注処理，ジクロシメット・フィプロニル粒剤（ジクロシメット 3%，

フィプロニル 1%) の播種時覆土前処理を行った。なお、SBI 剤の育苗箱灌注処理は農薬登録がないため、ベノミル水和剤と同様の方法で行ない、24 時間種子浸漬処理の登録濃度を供試濃度〔プロクロラズ乳剤の供試濃度は有効成分で 250 ppm (1000 倍希釈)、イプコナゾール・銅水和剤の供試濃度はイプコナゾールが 250 ppm、銅が 150 ppm (200 倍希釈)〕とした。本実験を 2 反復で行った。

#### ⑦ SBI 剤の種子消毒とベノミル育苗箱灌注との体系処理による育苗期のイネいもち病防除効果の検定

##### i) 供試籾

前述⑤と同様に 2002 年産住友化学工業株式会社農業化学品研究所（現 住友化学株式会社健康・農業関連事業研究所）加西試験圃場内より採取した汚染種子（品種ヒノヒカリ，保菌率，約 9%）を用いた。

##### ii) 種子消毒，育苗箱灌注，栽培および効果判定方法

ベノミル水和剤の播種時育苗箱灌注処理は前述⑤の方法と同様に行い，SBI 剤の 24 時間種子浸漬処理は④と同様の方法で行った。

プロクロラズ乳剤またはイプコナゾール・銅水和剤により種子消毒した供試籾を 18℃ 下で 5 日間浸種した後，32℃ 下で催芽した。育苗培土（ボンソル）をプラスチックポット（直径 9 cm）に充填し，上記の方法で播種直前に薬剤の育苗箱灌注した後，1 ポットあたり催芽種子 4 g（約 150 粒）を播種した。播種後の栽培管理は前述④の「種子消毒による苗いもち防除効果」実験と同様に行った。播種 27 日後に⑤の実験と同様に苗いもちの発病苗率を算出した。苗いもち調査後，さらに同様の条件で 10 日間栽培を続けて葉いもち発病を促した。1 ポットあたり 20 苗を任意に選抜して第 3 本葉に形成された二次伝染による葉いもち病斑数を調査し，体系処理の苗いもちおよび葉いもちに対する防除効果と各剤単用の効果を比較した。本実験を 3 反復で行った。

なお，統計処理は，苗いもちの発生率および葉いもち病斑数に対して，Tukey-Kramer 多重比較法（有意水準 5%）で行った．

## 2) ベノミル育苗箱灌注とジクロシメット箱施用を用いた防除体系による MBI-D 剤耐性菌の管理（その 1）

### ① 試験圃場

2007 年に，愛媛県西予市の水田を使用した．この地区は，2003 年には MBI-D 耐性菌の頻度が 100%となった地域であるが，その後，MBI-D 剤の使用を中止し，2006 年には耐性菌の頻度がほぼ 0%になった（Ishii, 2011）．したがって，MBI-D 剤の効果が回復した後に，MBI-D 剤による耐性菌の再選抜リスクも含めた評価には適した水田であると考えた．

### ② 供試植物

イネ品種キヌヒカリを使用した．育苗箱で育苗した苗をクボタ製田植え機で移植した．1 防除体系あたりのプロットの広さを 3 m × 40 m とした．

### ③ 供試化合物，処理薬量および処理方法

Table 4-1 に記載の薬剤を使用した．すべての薬剤を農業協同組合から購入した．

ベノミル水和剤を有効成分が 1 g/l となるように調製し，希釈液を播種時に育苗箱あたり 500 ml 灌注処理した．その他の薬剤については，移植時に各製剤を育苗箱あたり 50 g 散粒した．処理後に上述のようにイネを機械移植した．

### ④ MBI-D 剤感受性の検定法

移植 57 日後にいもち病病斑を採取し，感染菌の MBI-D 感受性を前述の PIRA-PCR 法で検定した．

Table 4-1. Chemical products used in a paddy field in Ehime Prefecture in 2007

Chemical product <sup>a</sup>	Active ingredient for blast control	Content (%) <sup>b</sup>	Target site <sup>c</sup>
Benomyl (WP)	Benomyl	50	$\beta$ -tubulin
Diclocymet / tiadinil / furametpyr / chlothianidin (G)	Diclocymet	1.5	MBI-D
	Tiadinil	6	SAR
Diclocymet / furametpyr / fipronil (G)	Diclocymet	3	MBI-D
Probenazole / fipronil (G)	Probenazole	24	SAR

<sup>a</sup> WP, wettable powder; G, granule. Furametpyr is a fungicide to control rice sheath blight.

Chlothianidin and fipronil are insecticides.

<sup>b</sup> Content of active ingredient for blast control.

<sup>c</sup> Target site of active ingredient for blast control. MBI-D, melanin biosynthesis inhibitor-dehydratase; SAR, systemic acquired resistance.

## ⑤ 防除効果の評価法

各プロット内の3か所，1か所あたり100株，合計300株について発病株数を調査し，各プロットの発病株率を算出した．無処理区または対照区（プロベナゾール単独処理区）と試験区の発病株数と健全株数の差異について， $\chi^2$ 乗検定（有意水準5%）によって有意差を検定した．

## 3) ベノミル育苗箱灌注とジクロシメット箱施用を用いた防除体系による MBI-D 剤耐性菌の管理（その2）

### ① 試験圃場

兵庫県加西市の住友化学株式会社の試験農場内の水田を用いた．この地区は，2003年にはMBI-D耐性菌の頻度が98%となった地域であるが，その後，MBI-D剤の使用を中止し，2006年には耐性菌の頻度が約37%になった（岩本ら，2007）．したがって，前述の愛媛県西予市の圃場と同様にMBI-D剤の効果が回復した後に，MBI-D剤による耐性菌の再選抜リスクも含めた評価には適した水田であると考えた．

### ② 供試植物

イネ品種はくひょうもちを使用した．MBI-D剤耐性菌を保菌している種粃1090 gと感受性菌を保菌している種粃2418 gを均一に混合し，試験に用いた．なおこの混合種粃の保菌率は2.3%，種粃が保菌していたMBI-D剤耐性菌の比率は5.5%であった．育苗箱で育苗した苗を試験圃場に田植え機（ヤンマー製）を用いて移植し，試験圃場とした．1防除体系あたりのプロットの広さを4.8 m × 22 mとした．

### ③ 供試化合物，処理薬量および処理方法

Table 4-2に記載の薬剤を使用した．プロベナゾール・フィプロニル混合箱粒剤（プロベナゾール24%，フィプロニル1%）は農業

協同組合から購入し，ベノミル水和剤とジクロシメット顆粒水和剤（ジクロシメット 60%）は住友化学株式会社の薬剤を用いた．

ベノミル水和剤を有効成分が 1 g/l となるように調製し，希釈液を播種時に育苗箱あたり 500 ml 灌注処理した．ジクロシメット顆粒水和剤を 3 g/l となるように調整し，希釈液を播種時に育苗箱あたり 500 ml 灌注処理した．プロベナゾール・フィプロニル混合箱粒剤について，移植時に各製剤を育苗箱あたり 50 g 処理した．処理後に上述のようにイネを機械移植した．

#### ④ MBI-D 剤感受性の検定法

移植 53 日後にいもち病病斑を採取し，感染菌の MBI-D 感受性を前述の PIRA-PCR 法で検定した．

#### ⑤ 防除効果の評価法

各プロット内の 3 か所、1 か所あたり 50 株，合計 150 株について上位 3 葉の病斑数を調査し，各プロットの発病株率を算出した．調査は移植 53 日後に行った．

### 4) 作用機作が異なる薬剤を用いた箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系による MBI-D 剤耐性菌の管理（その 1）

#### ① 試験圃場

2007 年に「2）ベノミル育苗箱灌注とジクロシメット箱施用を用いた防除体系による MBI-D 剤耐性菌の管理（その 1）」で用いた愛媛県西予市の水田を使用した．

#### ② 供試植物

イネ品種キヌヒカリを使用した．育苗箱で育苗した苗をクボタ製



Table 4-2. Chemical products used in a paddy field in Hyogo Prefecture in 2011

Chemical product <sup>a</sup>	Active ingredient for blast control	Content (%) <sup>b</sup>	Target site <sup>c</sup>
Benomyl (WP)	Benomyl	50	$\beta$ -tubulin
Diclocymet (WDG)	Diclocymet	60	MBI-D
Probenazole / fipronil (G)	Probenazole	24	SAR

<sup>a</sup> WP, wettable powder; WDG, water dispersible granule; G, granule. Fipronil is an insecticide.

<sup>b</sup> Content of active ingredient for blast control.

<sup>c</sup> Target site of active ingredient for blast control. MBI-D, melanin biosynthesis inhibitor-dehydratase; SAR, systemic acquired resistance.

田植え機で移植した。1防除体系たりのプロットの広さを6 m × 13 mとした。

### ③ 供試化合物，処理薬量および処理方法

Table 4-3 に記載の薬剤を使用した。すべての薬剤は農業協同組合から購入した。

ジクロシメット，オリサストロビンまたはチアジニルを含有する粒剤は，苗の移植時に，農薬登録薬量である育苗箱当たり 50 g を育苗箱に散粒した。

ジクロシメット・フェリムゾンまたはフェリムゾン・フサライドの両剤を含有する粉剤は，穂揃期に農薬の登録薬量である 10 a あたり粉剤 4 kg を処理した。

### ④ MBI-D 剤感受性の検定法

粉剤処理の 31 日後に穂いもち病斑を採取し，前述の方法で，罹病部位からいもち病菌を分離した。分離菌株の MBI-D 剤感受性を前述の PIRA-PCR 法で検定した。

### ⑤ 防除効果の評価法

粉剤処理の 31 日後に，各プロット内の 3 か所，1 か所あたり 500 穂（25 株，20 穂/株），合計 1500 穂について罹病穂数を調査し，各プロットの発病穂率を算出した。無処理区または対照区（オリサストロビン箱施用とフェリムゾン・フサライド茎葉散布の防除体系）と試験区の発病穂数と健全穂数の差異について， $\chi^2$  乗検定（有意水準 5%）によって有意差の有無を検定した。

5) 作用機作が異なる薬剤を用いた箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系による MBI-D 剤耐性菌の管理  
（その 2）

Table 4-3. Chemical products used in a paddy field in Ehime Prefecture in 2008

Chemical product <sup>a</sup>	Active ingredient for blast control	Content (%) <sup>b</sup>	Target site <sup>c</sup>
Diclocymet / ferimzone / chlothianidin (D)	Diclocymet	0.2	MBI-D
	Ferimzone	2	Unknown
Ferimzone / phthalide / chlothianidin (D)	Ferimzone	2	Unknown
	Phthalide	1.5	MBI-R
Diclocymet / furametpyr / fipronil (G)	Diclocymet	3	MBI-D
Orysastrobin / chlothianidin (G)	Orysastrobin	7	Qol
Tiadinil / furametpyr / fipronil (G)	Tiadinil	6	SAR

<sup>a</sup> D, dust ; G, granule. Chlothianidin and fipronil are insecticides. Furametpyr is a fungicide to control rice sheath blight.

<sup>b</sup> Content of active ingredient for blast control.

<sup>c</sup> Target site of active ingredient for blast control. MBI-D, melanin biosynthesis inhibitor-dehydratase; MBI-R, melanin biosynthesis inhibitor-reductase; Qol, quinone outside inhibitor; SAR, systemic acquired resistance..

#### ① 試験圃場

第 3 章 4) ② i) で数年間の MBI-D 剤耐性菌株の頻度推移を調査した佐賀県唐津市の水田を使用した。第 3 章に記載のように、この水田では 2002 年は耐性頻度が 100%であったが、2005 年には耐性菌頻度が 1.1%になった。したがって、前述の愛媛県西予市の圃場と同様に、MBI-D 剤の効果が回復した後に、MBI-D 剤による耐性菌の再選抜リスクも含めた評価には適した水田であると考えた。

#### ② 供試植物

イネ品種ヒノヒカリを使用した。育苗箱で育苗した苗をヤンマー製田植え機で移植した。

2008 年の試験では、育苗箱施用無処理区用の 1 プロットを 1.5 m × 6 m とし、1 防除体系あたり 3 プロット使用した。また、育苗箱施用区用の 1 プロットを 4 m × 6 m とし、ひとつの防除体系あたり 3 プロット使用した。

2009 年の試験では、ひとつの防除体系あたり 3 m × 6 m のプロットを 3 プロット使用した。

#### ③ 供試化合物、処理薬量および処理方法

Table 4-4 に記載の薬剤を用いた。すべての薬剤は農業協同組合から購入した。

トリシクラゾールを含有する粒剤は、苗の移植時に、農薬登録薬量である育苗箱当たり 50 g の粒剤を育苗箱に散粒した。

ジクロシメット・フェリムゾン混合フロアブル剤は、出穂初めおよび穂揃期に、農薬登録薬量である水で 1000 倍に希釈した希釈液を背負い式動噴で処理した。

フェリムゾン・トリシクラゾール混合粉剤は、出穂初めおよび穂揃期に、農薬の登録薬量である 10 a あたり粉剤 4 kg を処理した。

#### ④ MBI-D 剤感受性の検定法

Table 4-4. Chemical products used in a paddy field in Saga Prefecture in 2008 and 2009

Chemical product <sup>a</sup>	Active ingredient for blast control	Content (%) <sup>b</sup>	Target site <sup>c</sup>
Diclocymet / ferimzone (FL)	Diclocymet	3	MBI-D
	Ferimzone	15	Unknown
Ferimzone / tricyclazole (D)	Ferimzone	2	Unknown
	Tricyclazole	0.5	MBI-R
Tricyclazole / thifluzamide / imidacloprid / spinosad (G)	Tricyclazole	4	MBI-R

<sup>a</sup> FL, flowable; D, dust; G, granule. Thifluzamide is a fungicide to control rice sheath blight. Imidacloprid and spinosad are insecticides.

<sup>b</sup> Content of active ingredient for blast control.

<sup>c</sup> Target site of active ingredient for blast control. MBI-D, melanin biosynthesis inhibitor-dehydratase; MBI-R, melanin biosynthesis inhibitor-reductase.

2008 年は最終散布 21 日後，2009 年は最終散布 17 日後にそれぞれ罹病穂を採取し，前述の方法で罹病部位からいもち病菌を分離した．分離菌株の MBI-D 感受性を前述の PIRA-PCR 法で検定した．

#### ⑤ 防除効果の評価法

2008 年は最終散布 21 日後，2009 年は最終散布 17 日後にそれぞれ 1 処理あたり 3 か所で罹病穂と未罹病穂の数を調査した．2008 年は 1 か所あたり 600 穂（30 株，20 穂/株），合計 1800 穂について，2009 年は 1 か所あたり 1000 穂（50 株，20 穂/株），合計 3000 穂について罹病穂数を調子し，各防除体系の発病穂率を算出した．無処理区または対照区（トリシクラゾールの箱施用とフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤の 2 回の茎葉散布の防除体系）と試験区の発病穂数と健全穂数の差異について， $\chi^2$  乗検定（有意水準 5%）により有意差を検定した．

## 結果

### 1) ベノミルによる種子伝染性いもち病の防除

#### ① ベノミルの MBI-D 剤感受性菌と耐性菌に対する抗菌活性

イネいもち病菌の MBI-D 剤感受性菌と耐性菌に対するベノミルの抗菌活性を調査するために，菌糸伸長と発芽管伸長の阻害活性を検定した．菌糸伸長阻害の  $EC_{50}$  値を算出したところ，MBI-D 剤感受性菌 30 菌株の平均値が 0.62 ppm，30 菌株の平均値が 0.67 ppm であり，両者間で有意差は認められなかった（Table 4-5）．また，供試した 60 菌株を 5 ppm ベノミル含有 PDA 上で培養したところ，全ての菌株の菌糸伸長が 95%以上阻害され，すべてベノミル感受性と判定された．

MBI-D 剤感受性 10 菌株と耐性 10 菌株の胞子を 0.34，1.25，5.00 ppm ベノミル含有 PDA に画線接種した．その結果，0.34 ppm ベノ

Table 4-5. Inhibition of mycelial growth of *Pyricularia oryzae* by benomyl

MBI-D sensitivity	No. of isolates	EC <sub>50</sub> (mg/l) <sup>a</sup>
Sensitive	30	0.62 ± 0.022
Resistant	30	0.67 ± 0.032

<sup>a</sup> Mean ± S.E. Statistical difference between sensitive and resistant isolates was not detected according to a *t*-test (*p* < 0.05).

ミル培地では，すべての菌株が正常に発芽・伸長したが，1.25 または 5.00 ppm ベノミル培地では，すべての菌株の発芽管伸長が著しく阻害された．なお，感受性菌株と耐性菌株の間に差は認められなかった（Table 4-6）．伸長が阻害された発芽管の中には湾曲しているものが多数認められた（Fig. 4-2）．ベンゾイミダゾール系薬剤については，*Aspergillus nidulans*（Davidse, 1973），灰色かび病菌（Suzuki *et al.*, 1984）で発芽管の湾曲現象が観察されており，その原因が菌の細胞分裂阻害であることが推定されている．ベノミルが，いもち病菌に対しても同様な作用を示すことが推察された（Table 4-6 および Fig. 4-2）．

#### ② 種子消毒による粃および玄米上の孢子形成抑制効果

いもち病が多発した佐賀県唐津市相知町の圃場から採取した種子（保菌粃率 18%）をベノミル水和剤により種子消毒し，粃または玄米上の孢子形成率を調査した．その結果，無処理の粃上，玄米上の孢子形成率がそれぞれ 18.5%，5.5%であったのに対して，ベノミル水和剤による消毒種子では，粃，玄米ともに孢子形成が完全に阻害された（Fig. 4-3）．一方，対照として用いたプロクロラズ乳剤による種子消毒では，粃上の孢子形成は強く阻害されたが，低率ながら 2%の玄米で孢子形成が確認された（Fig. 4-3）．以上の結果から，ベノミルは，粃殻を通過する浸透移行性がプロクロラズより優れていると推察された．

#### ③ 種子消毒による苗いもち防除効果

上記の汚染種子をベノミル水和剤またはプロクロラズ乳剤により種子消毒，播種し，苗いもちの発病を観察した．その結果，無処理区の発病苗率が 8.3%であったのに対して，ベノミル水和剤区では 0.26%と顕著な防除効果が確認された（Fig. 4-4）．なお，プロクロラズ乳剤区の発病苗率は 2.3%であり，ベノミルの方が高い防除効果を示した（Fig. 4-4）．



Table 4-6. Inhibition of germ tube elongation of *Pyricularia oryzae* conidia by benomyl

Isolates	MBI-D sensitivity	Germ tube elongation <sup>a</sup>		
		0.34 <sup>b</sup>	1.25	5.00
PO-1	Sensitive	+	-+	-+
PO-3	Sensitive	+	-+	-+
PO-6	Sensitive	+	-+	-+
PO-26	Sensitive	+	-+	-+
PO-41	Sensitive	+	-+	-+
PO-46	Sensitive	+	-+	-+
PO-66	Sensitive	+	-+	-+
PO-76	Sensitive	+	-+	-+
PO-111	Sensitive	+	-+	-+
83-102B	Sensitive	+	-+	-+
Dien 1-1	Resistant	+	-+	-+
Dien 1-3	Resistant	+	-+	-+
Oogami 3	Resistant	+	-+	-+
Ski 1-1	Resistant	+	-+	-+
Ski 1-2	Resistant	+	-+	-+
Ski 2-1	Resistant	+	-+	-+
Ski 2-3	Resistant	+	-+	-+
Ski 3-1	Resistant	+	-+	-+
Ski 4-3	Resistant	+	-+	-+
Ski 5-3	Resistant	+	-+	-+

<sup>a</sup> -, The length of germ tubes of benomyl-treated conidia was much shorter than that of untreated conidia.

+, The length of germ tube of benomyl-treated conidia was as long as that of untreated conidia.

<sup>b</sup> Concentration of benomyl (mg/l).

A



B



Fig. 4-2. Morphological changes of germ tubes caused by benomyl. Conidial suspension was inoculated on PDA and incubated for 24 h. A, PDA; B, PDA containing 5 mg/l benomyl.

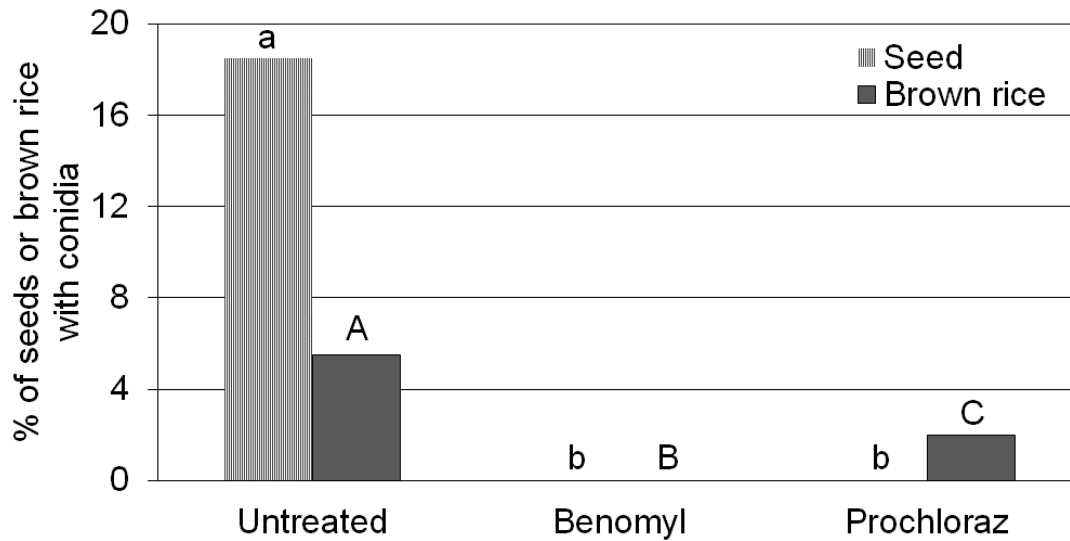


Fig. 4-3. Inhibition of conidial formation on seeds or brown rice by seed treatment with benomyl. Seeds were immersed in chemical solution at the concentration of 1000 mg/l benomyl or 250 mg/l prochloraz for 24 hr. Percentage of seeds or brown seed with conidia was assessed by the blotter method (Kimijima, 1999). Different letters mean statistical difference according to Tukey–Kramer multiple comparison analysis ( $p < 0.05$ ).

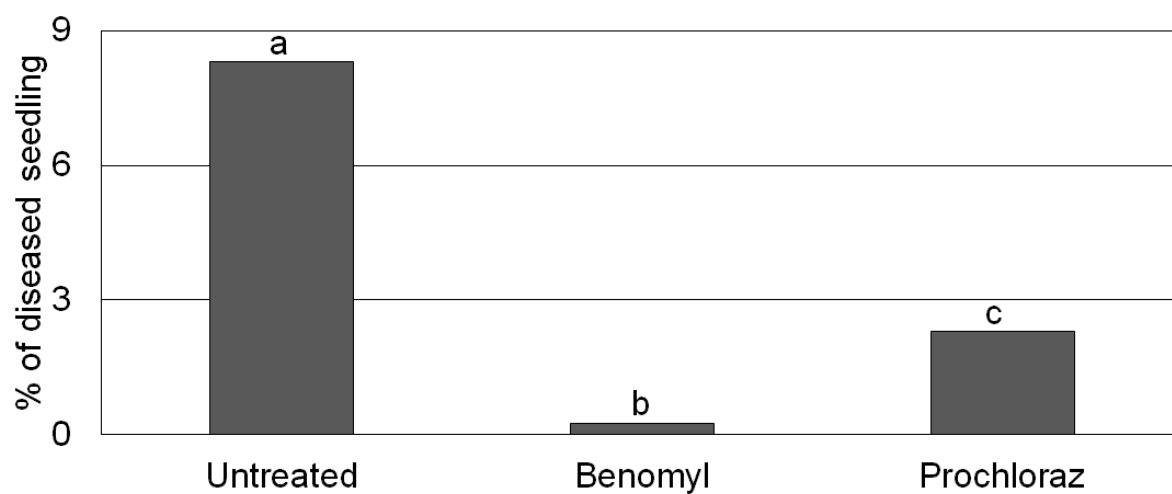


Fig.4-4. Inhibition of seedling blast by seed treatment with benomyl. Seeds were immersed in chemical solution at the concentration of 1000 mg/l benomyl or 250 mg/l prochloraz for 24 hr. Percentage of diseased seedling was assessed 22 days after sowing. Different letters mean statistical difference according to Tukey–Kramer multiple comparison analysis ( $p < 0.05$ ).

#### ④ 育苗箱灌注による苗いもち防除効果

住友化学工業株式会社（現 住友化学株式会社）のいもち病多発圃場で採取した汚染種子の播種時と播種 7 日後にベノミル水和剤を育苗箱に施用し，苗いもちの発病を調査した．その結果，無処理区の発病苗率が 9.7%であったのに対して，ベノミル水和剤播種時または緑化期（播種 7 日後）に 500 倍希釈液を育苗箱灌注処理した場合の発病苗率はそれぞれ 0.3%と 0.9%，1000 倍希釈液処理区ではそれぞれ 0.6%と 0.3%であった．ベノミルの育苗箱灌注による防除効果は，種子浸漬処理や種子粉衣処理とほぼ同等であり，高い苗いもち防除効果が認められた（Fig.4-5）．

#### ⑤ 育苗箱灌注による苗の葉いもち防除効果

保菌率 0%の種子を，ベノミル水和剤を灌注した土壤に播種，栽培した後，MBI-D 感受性菌株の孢子懸濁液を苗に噴霧接種し，葉いもちの発病を観察した．その結果，無処理区の発病苗率が 44%であったのに対して，ベノミル水和剤の播種時育苗箱灌注処理区では 3.3%であり，ジクロシメット・フィプロニル粒剤の播種時覆土前処理（3.7%）とほぼ同程度の高いいもち病防除効果が認められた（Table 4-7）．一方，ベノミル水和剤の種子浸漬処理，プロクロラズ乳剤またはイプコナゾール・銅水和剤の種子浸漬処理および育苗箱灌注処理はいずれも発病苗率が 15%以上と防除効果が低かった（Table 4-7）．

#### ⑥ SBI 剤の種子消毒とベノミル育苗箱灌注との体系処理による育苗期のいもち病防除効果

ベノミルのイネ病害に対する耐性菌としては、種子伝染性のばか苗病菌の事例がある（北村ら，1982；小川ら，1982）．したがって，ベノミル水和剤の育苗箱灌注によるいもち病防除を実用化するためには，ばか苗病防除に使用されている SBI 剤などとの併用を検討する必要がある．

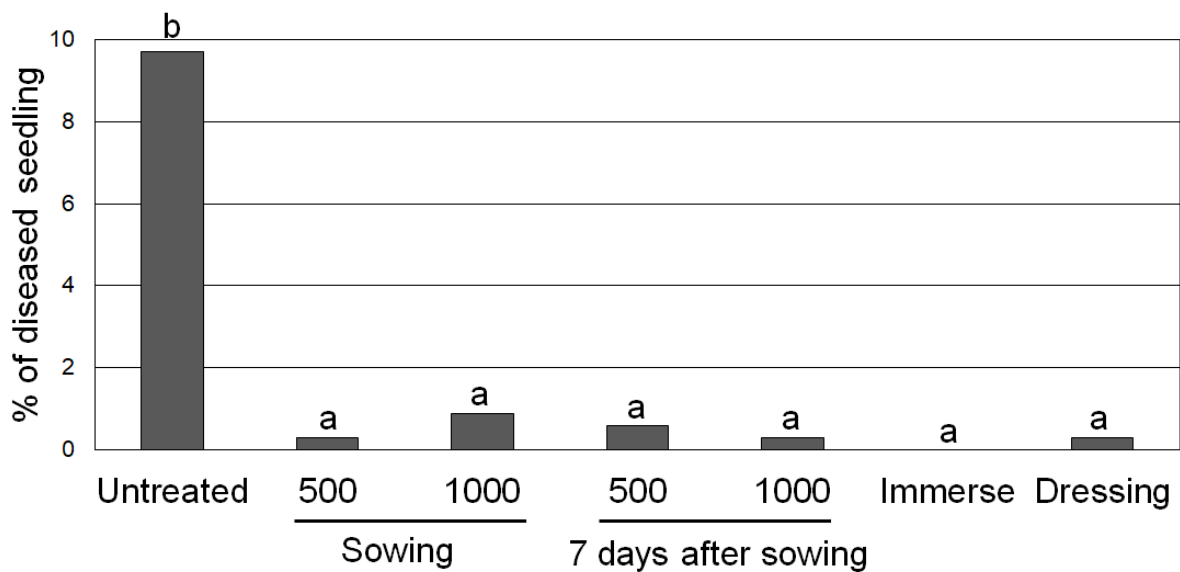


Fig. 4-5. Inhibition of rice blast of seedling by soil drench of benomyl. Diluted benomyl solution (dilution rate 500 or 1000) was drenched to soil prior to sowing or 7 days after sowing. Volume of drenched solution was 500 ml per a nursery box. Immerse means that seeds were immersed in benomyl solution (dilution rate 50) for 10 min. Dressing means that seeds were dressed with benomyl (0.5% of weight of dry seed). Percentage of diseased seedling was assessed 27 days after sowing. Different letters mean statistical difference based on Tukey–Kramer multiple comparison analysis ( $p < 0.05$ ).

Table 4-7. Efficacy of benomyl against leaf blast on rice seedling

Chemical	Dilution rate	Application method	Dosage or time	Incidence (%) <sup>b</sup>
None				44.0
Benomyl (WP)	500	Soil drench prior to sowing	500 ml/box	3.3
	50	Immerse of seeds	10 min	16.5
Prochloraz (EC)	1000	Soil drench prior to sowing	500 ml/box	22.9
	100	Immerse of seeds	10 min	36.2
Ipconazole • Copper (FL)	200	Soil drench prior to sowing	500 ml/box	18.0
	20	Immerse of seeds	10 min	17.3
Diclocymet • Fipronil (G)		Nursery box application just after sowing	50 g/box	3.7

<sup>a</sup>WP, wettable powder; EC, emulsifiable concentrate; FL, flowable; G, granule.

<sup>b</sup> Conidial suspension ( $5 \times 10^3$  conidia/ml) was inoculated on rice seedlings 15 days after sowing. Assessment was conducted 13 days after inoculation.

そこで、前述の 2002 年に住友化学工業株式会社（現 住友化学株式会社）の圃場より採取した汚染粃（保菌率約 9%）を用いて、ベノミル水和剤を灌注処理した培土に、SBI 剤で消毒した種子を播種、栽培し、育苗期間中に発生する苗いもちと葉いもちの発病を調査した。

その結果、無処理区の苗いもち発病苗率は 8.3%、1 ポットあたり 20 苗について調査した第 3 本葉の葉いもち病斑数は 2.1 個/葉であった（Table 4-8）。ベノミル水和剤の灌注処理単独の苗いもち発病苗率 0%、第 3 本葉の葉いもち病斑数は 0.17 個/葉、プロクロラズ乳剤またはイプコナゾール・銅水和剤の種子消毒単独による苗いもち発病苗率と第 3 本葉の葉いもち病斑数はそれぞれ 5.3%と 2.1 個/葉、3.8%と 1.4 個/葉であった（Table 4-8）。一方、プロクロラズ乳剤またはイプコナゾール・銅水和剤による種子消毒とベノミル水和剤の育苗箱灌注処理の体系処理では、苗いもち発病苗率と第 3 本葉の葉いもち病斑数はそれぞれ 0%と 0.033 個/葉、0.75%と 0.20 個/葉であり、育苗期のいもち病（苗いもちと苗の葉いもち）に対して SBI 剤種子消毒とベノミル水和剤灌注処理を組み合わせることによって、高い防除効果が認められた（Table 4-8）。この結果は、ベノミル水和剤灌注処理単独でも育苗期のいもち病を防除できるが、ベノミル水和剤灌注処理と SBI 剤種子消毒には拮抗作用がなく、これらの併用によって育苗期のイネいもち病に対して高い防除効果が期待できることを示した。なお、ベノミル水和剤と SBI 剤の併用による薬害は認められなかった。

## 2) ベノミル育苗箱灌注を用いた MBI-D 剤耐性菌管理対策

### ① ベノミル育苗箱灌注とジクロシメット箱施用を組み合わせた防除体系による葉いもち防除効果

本試験では、MBI-D 剤耐性菌蔓延後、数年間の MBI-D 剤使用中止により MBI-D 剤の効果が回復したと思われる愛媛県と兵庫県の水田において、ベノミル水和剤育苗箱灌注処理と MBI-D 剤育苗箱



Table 4-8. Efficacy of application program composed of benomyl and sterol biosynthesis inhibitor against rice seedling blast

Seed treatment <sup>a</sup>			Soil drench <sup>b</sup>		Incidence (%) <sup>c</sup>	No. of lesions / leaf <sup>d</sup>
Chemical	Dilution rate	Chemical	Dilution rate			
None		None			8.3a	2.1a
Prochloraz	(EC) 1000	None			5.3a	2.1a
Ipconazole Copper	(FL) 200	None			3.8ab	1.4ab
None		Benomyl	(WP) 500		0b	0.17bc
Prochloraz	(EC) 1000	Benomyl	(WP) 500		0b	0.033c
Ipconazole Copper	(FL) 200	Benomyl	(WP) 500		0.75b	0.20bc

<sup>a</sup> EC, emulsifiable concentrate; FL, flowable.

<sup>b</sup> WP, wettable powder.

<sup>c</sup> Incidence of seedling blast was assessed 27 days after sowing. Different letters mean statistical difference according to Tukey–Kramer multiple comparison analysis ( $p < 0.05$ ).

<sup>d</sup> No. of lesions on leaves was counted 37 days after sowing. Different letters mean statistical difference according to Tukey–Kramer multiple comparison analysis ( $p < 0.05$ ).

施用を組み合わせた防除体系について，本田定植後の葉いもちの防除効果を調査した．

2007年に実施した愛媛県西予市の水田での試験では，無処理区の発病株率が93.3%であり，効力評価には十分な発病が得られた（Table 4-9）．MBI-D剤ジクロシメット単用区の発病株率は32.0%，ジクロシメットとチアジニルの混合区の発病株率は24.7%であった．これらは，対照剤として用いたSAR剤プロベナゾール単用区の発病株率44.3%と比較して有意に低い発病株率であった（Table 4-9）．プロベナゾールは，葉いもちに対して防除効果の高い対照剤である．MBI-D剤ジクロシメット単用の効果が，プロベナゾールを上回ったことは，2007年の愛媛県西予市の試験圃場では，MBI-D剤耐性菌の頻度がMBI-D剤の効果に影響を及ぼさない程度に低下していたことを示唆した．この圃場で，播種時にベノミル、移植時にジクロシメット併用区またはジクロシメット・チアジニル混合剤の併用区の発病株率を調査したところ，それぞれ28.0%，22.2%であり，それぞれの単用区の効果と同等であった（Table 4-9）．この結果は，ベノミルの併用は，それぞれの剤の育苗箱施用の効果に悪影響を及ぼさないことを示している．なお，ベノミル単用区の発病株率は，99.7%と無処理区と同程度であった．この結果は，調査時期までベノミルの残効が継続しなかったためと推察した（Table 4-9）．

2011年に実施した兵庫県加西市の水田での試験では，無処理区の株あたり上位3葉の平均病斑数が平均で22.8個と多発生となった．そこで，本試験では，各試験区の上位3葉の病斑数を調査した．ベノミル単用区の平均病斑数は，6.38個と無処理区に比べ顕著に減少した（Table 4-10）．一方，ジクロシメット単用区の平均病斑数は0.0033個であり，対照のプロベナゾール単用区0.006個と同等の高い防除効果を示した（Table 4-10）．さらに，ベノミルとジクロシメットの併行区の病斑数も0.002個と高い防除効果が認められた（Table 4-10）．以上の結果は，2011年の兵庫県加西市の

Table 4-9. Disease incidence of leaf blast in plots different in chemical treatments in Ehime Prefecture

Applied product <sup>a</sup>		Incidence (%) <sup>b</sup>
Sowing	Planting	
None	None	93.3 #
None	Probenazole	44.3 *
None	Diclocymet	32.0 * #
None	Diclocymet + tiadinil	24.7 * #
Benomyl	None	99.7 #
Benomyl	Probenazole	43.0 *
Benomyl	Diclocymet	28.0 * #
Benomyl	Diclocymet + tiadinil	22.2 * #

<sup>a</sup> Sowing, planting and assessment dates, May 21, June 13 and August 10, 2007, respectively. Sowing and planting mean the chemical application timings.

<sup>b</sup> Percentage of diseased plants among 300 plants.

\*Statistically different from the untreated (none–none) plot according to  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ). #Statistically different from the reference (none–probenazole) plot according to  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ).

Table 4-10. Number of lesions of leaf blast in plots different in chemical treatments in Hyogo Prefecture

Applied product <sup>a</sup>		No. of lesions /3 leaves
Sowing	Planting	
None	None	22.8 ± 2.4
None	Probenazole	0.060 ± 0.040
None	Diclocymet	0.033 ± 0.031
Benomyl	None	6.38 ± 2.6
Benomyl	Diclocymet	0.020 ± 0.030

<sup>a</sup> Sowing, planting and assessment dates, May 17, June 6 and July 29, 2011, respectively. Sowing and planting mean the chemical application timings.

試験圃場における MBI-D 剤耐性菌の頻度が MBI-D 剤の効果に影響を及ぼさない程度に低下したこと，ベノミルの併用がジクロシメットの育苗箱施用の効果に悪影響を及ぼさないことを示した（Table 4-10）.

## ②ベノミル育苗箱灌注とジクロシメット箱施用を組み合わせた防除体系による MBI-D 剤耐性菌頻度への影響

本試験では，数年間の MBI-D 剤使用中止により MBI-D 剤の効果が回復したと思われる愛媛県と兵庫県水田において，ベノミル水和剤灌注処理と MBI-D 剤の育苗箱施用を組み合わせた防除体系区における耐性菌頻度の変動について調査した.

2007 年に実施した兵庫県西予市の水田での試験では，MBI-D 剤を処理していない区の MBI-D 剤耐性菌頻度は，無処理区 4.0%（耐性数/試験数=1/25），ベノミル単用区 7.1%（2/28），プロベナゾール単用区 0%（0/27），ベノミルとプロベナゾール併用区 0%（0/20）であった（Table 4-11）. 一方，MBI-D 関連剤処理区の MBI-D 剤耐性菌頻度は，ジクロシメット単用区 25.0%（4/16），ジクロシメット・チアジニル混合剤区 23.8%（5/21）であり，対照剤のプロベナゾール単用区に比べ，有意に高かった（Table 4-11）. この結果は，MBI-D 剤単用，混合剤ともに，耐性菌再選抜のリスクが高いことを示唆した. 一方，ベノミルと MBI-D 剤の併用区の MBI-D 剤耐性菌頻度は，ジクロシメットとの併用区が 11.1%（2/18），ジクロシメット・チアジニル混合剤との併用区が 3.7%（1/27）であった（Table 4-11）. この結果は，2 種の MBI-D 剤単用区の耐性菌頻度に比べると顕著に低く，プロベナゾール単用区の耐性菌頻度と統計学的な有意差は認められなかった（Table 4-11）. 特に，ベノミルとジクロシメット・チアジニル混合剤との併用区の MBI-D 剤耐性菌頻度では，無処理区やベノミル単用区と同様に MBI-D 剤耐性菌はほとんど検出されなかった（Table 4-11）.

2011 年に実施した兵庫県加西市の水田での試験では，無処理区

Table 4-11. Frequency of the MBI-D-resistant isolates of *Pyricularia oryzae* infecting in lesions in plots different in chemical treatments in Ehime Prefecture

Applied product <sup>a</sup>		No. of lesions <sup>b</sup>		% of resistance <sup>c</sup>
Sowing	Planting	Tested	Resistant	
None	None	25	1	4.0
None	Probenazole	27	0	0
None	Diclocymet	16	4	25.0 *
None	Diclocymet + tiadinil	21	5	23.8 *
Benomyl	None	28	2	7.1
Benomyl	Probenazole	20	0	0
Benomyl	Diclocymet	18	2	11.1
Benomyl	Diclocymet + tiadinil	27	1	3.7

<sup>a</sup> Sowing, planting and sampling dates, May 21, June 13 and August 10, 2007, respectively. Sowing and planting mean the chemical application timings.

<sup>b</sup> MBI-D sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.

<sup>c</sup> Asterisk indicates statistical difference from the reference plot (none-probenazole) according to Fisher's exact test ( $p < 0.05$ ).

の MBI-D 剤耐性菌頻度は 5.1% (12/232), ベノミル単用区の耐性菌頻度は 1.8% (1/57) であり, ベノミル単用区の耐性菌頻度が, 無処理区の耐性菌頻度より低い傾向が認められた (Table 4-12). また, ジクロシメット単用区の耐性菌頻度は 7.7% (1/13) であり, MBI-D 剤による耐性菌の再選抜が起きたと断定するには至らなかった. この地域は, MBI-D 剤の使用を中止してから 5 年以上が経過しており, MBI-D 剤耐性菌頻度がかなり低下していたため, ジクロシメットの 1 回の使用では, 耐性菌の再選抜が引き起こされなかったと考えた. 一方, ベノミルとジクロシメットの併用区の耐性菌頻度は, プロベナゾール単用区の耐性菌頻度と同様に 0% (0/16) であった (Table 4-12).

3) 作用機作が異なる薬剤を用いた箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系による MBI-D 剤耐性菌管理対策  
①箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系による穂いもち防除効果

本試験では, 数年間の MBI-D 剤使用中止により MBI-D 剤の効果が回復したと思われる愛媛県と佐賀県の水田において, MBI-D 剤以外の箱施用と MBI-D 剤 (ジクロシメット・フェリムゾン混合剤) 茎葉散布を組み合わせた防除体系による穂いもち防除効果を調査した.

2008 年に実施した愛媛県西予市の水田での試験では, 無処理区の発病穂率が 16.5%であり, 多発生ではなかったが, 効力の評価ができるレベルの発病であった. 対照剤として用いたオリサストロビン単用箱施用区, オリサストロビン箱施用とフェリムゾン・フサライド混合剤茎葉散布区, チアジニル単用箱施用とチアジニル箱施用とフェリムゾン・フサライド混合剤茎葉散布区の発病穂率は, それぞれ 2.2%, 1.0%, 2.0%, 1.4%と無処理区に比べ高い防除効果が認められた (Table 4-13). また, 育苗箱施用剤を使用せずフェリム

Table 4-12. Frequency of the MBI-D-resistant isolates of *Pyricularia oryzae* infecting in lesions in plots different in chemical treatments in Hyogo Prefecture

Applied product <sup>a</sup>		No. of lesions <sup>b</sup>		% of resistance
Sowing	Planting	Tested	Resistant	
None	None	232	12	5.1
None	Probenazole	19	0	0
None	Diclocymet	13	1	7.7
Benomyl	None	57	1	1.8
Benomyl	Diclocymet	16	0	0

<sup>a</sup> Sowing, planting and sampling dates, May 17, June 6 and July 29, 2011, respectively. Sowing and planting mean the chemical application timings.

<sup>b</sup> MBI-D sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.



ゾン・フサライド混合剤を茎葉散布した区の発病穂率は 7.7%であり，育苗箱施用剤を併用した区には劣るが，有意な防除効果が認められた（Table 4-13）．育苗箱施用に MBI-D 剤ジクロシメットを使用した場合には，ジクロシメット単用箱施用区の発病穂率が 1.0%，ジクロシメット箱施用に加え，フェリムゾン・フサライド混合剤またはジクロシメット・フェリムゾン混合剤を茎葉散布した場合の発病穂率は，それぞれ 1.3%，1.1%であり，どれも高い防除効果が認められた（Table 4-13）．また，育苗箱施用に MBI-D 剤以外のオリサストロビンまたはチアジニルを使用し，茎葉散布剤に MBI-D 剤ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤を用いた場合の発病穂率はそれぞれ 0.5%，0.7%であり，これらの区でも高い防除効果が認められた（Table 4-13）．また，育苗箱施用剤を使用せず，ジクロシメット・フェリムゾン混合剤を茎葉散布した区の発病穂率は 3.9%であり，フェリムゾン・フサライド混合剤茎葉散布区（発病穂率 7.5%）より高い防除効果が認められた（Table 4-13）．以上の結果は，2008 年の愛媛県西予市の試験圃場においては，MBI-D 剤耐性菌の頻度が，MBI-D 剤の効果に影響を及ぼさない程度に低下していたことを示した．

2008 年に実施した佐賀県唐津市の水田での試験では，無処理区の発病穂率が 50.3%であり，多発生であった．対照剤として用いた，MBI-R 剤トリシクラゾール箱施用とフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤の 2 回の茎葉散布併用区の発病穂率は 7.8%と無処理区に比べ高い防除効果が認められた（Table 4-14）．また，育苗箱施用剤を使用せずフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤を 2 回茎葉散布した区の発病穂率は 14.1%であり，育苗箱施用剤を併用した区には劣るが，有意な防除効果が認められた（Table 4-14）．育苗箱施用に MBI-R 剤トリシクラゾールを使用し，さらに茎葉散布に MBI-D 剤ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤を用いた場合，ジクロシメット・フェリムゾン混合剤を 2 回茎葉散布した区，ジクロシメット・フェリムゾン混合剤とフェリムゾン・トリシクラ

Table 4-13. Disease incidence of panicle blast in plots different in chemical treatments in Ehime Prefecture

Applied product <sup>a</sup>		Disease incidence (%) <sup>b</sup>
Nursery box	Foliar application	
None	None	16.5#
None	Ferimzone + phthalide	7.7*#
None	Diclocymet + ferimzone	3.9*#
Diclocymet	None	1.0*
Diclocymet	Ferimzone + phthalide	1.3*
Diclocymet	Diclocymet + ferimzone	1.1*
Orysastrobin	None	2.2*#
Orysastrobin	Ferimzone + phthalide	1.0*
Orysastrobin	Diclocymet + ferimzone	0.5*
Tiadinil	None	2.0*#
Tiadinil	Ferimzone + phthalide	1.4*
Tiadinil	Diclocymet + ferimzone	0.7*

<sup>a</sup> Application dates, June 12 (nursery box application), August 17 (foliar application), 2008.

<sup>b</sup> Assessment date, September 17. \* Statistical difference from the none-none plot according to  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ). # Statistical difference from the orysastrobin–ferimzone+phthalide plot according to  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ).

ゾール混合剤を1回ずつ茎葉散布した区の発病穂率はそれぞれ5.8%、6.8%であり、より高い防除効果が認められた（Table 4-14）。また、育苗箱施用剤を使用せずジクロシメット・フェリムゾン混合剤を2回茎葉散布した区、ジクロシメット・フェリムゾン混合剤とフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤を1回ずつ茎葉散布した区の発病穂率はそれぞれ14.0%、13.0%であり、フェリムゾン・トリシクラゾール混合剤を2回茎葉散布した区（発病穂率14.1%）と同程度の防除効果であった（Table 4-14）。以上の結果は、2008年の佐賀県唐津市の試験圃場においては、MBI-D剤耐性菌の頻度が、MBI-D剤の効果に影響を及ぼさない程度に低下していたことを示した。

翌年2009年に同じ水田で実施した試験では、無処理区の発病穂率が6.8%と少発生であったが、効力を評価できるレベルの発病であった。対照剤として用いたトリシクラゾール箱施用とフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤の2回の茎葉散布併用区の発病穂率は1.5%と高い防除効果が認められた（Table 4-15）。育苗箱施用にはMBI-R剤トリシクラゾールを使用し、茎葉散布剤にMBI-D剤ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤を用いた場合、トリシクラゾールの箱施用に加えジクロシメット・フェリムゾン混合剤を2回茎葉散布した区、トリシクラゾールの箱施用に加えジクロシメット・フェリムゾン混合剤とフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤を1回ずつ茎葉散布した区の発病穂率はそれぞれ2.0%と1.8%であり、高い防除効果が認められた（Table 4-15）。

以上の結果は、MBI-D剤の効果回復した水田では、MBI-D剤以外の育苗箱施用剤とMBI-D剤混合剤（ジクロシメット・フェリムゾン混合剤）を組み合わせた防除体系によって、高い穂いもち防除効果が期待できることを示した。

②箱施用とジクロシメット混合剤茎葉散布を組み合わせた防除体系によるMBI-D剤耐性菌頻度への影響

Table 4-14. Disease incidence of panicle blast in plots different in chemical treatments in Saga

Prefecture	Applied product <sup>a</sup>		Disease incidence (%) <sup>b</sup>
	Nursery box	1 <sup>st</sup> foliar application	2 <sup>nd</sup> foliar application
None	None	None	50.3#
None	None	Ferimzone + tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole
None	None	Diclocymet + ferimzone	Diclocymet + ferimzone
None	None	Diclocymet + ferimzone	Ferimzone + tricyclazole
Tricyclazole	None	None	32.1*#
Tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole	7.8*
Tricyclazole	Diclocymet + ferimzone	Diclocymet + ferimzone	5.8*#
Tricyclazole	Diclocymet + ferimzone	Ferimzone + tricyclazole	6.8*

<sup>a</sup> Application dates, June 17 (nursery box application), August 21 (1<sup>st</sup> foliar application) and August 28 (2<sup>nd</sup> foliar application), 2008.

<sup>b</sup> Assessment date, September 21. \* Statistical difference from the none–none–none plot according to  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ). # Statistical difference from the tricyclazole–ferimzone+tricyclazole–ferimzone+tricyclazole plot according to  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ).

Table 4-15. Disease incidence of panicle blast in plots different in chemical treatments in Saga

Prefecture	Applied product <sup>a</sup>		Disease incidence (%) <sup>b</sup>
	1 <sup>st</sup> foliar application	2 <sup>nd</sup> foliar application	
Nursery box			
None	None	None	6.8#
Tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole	1.5*
Tricyclazole	Ferimzone + diclocymet	Ferimzone + diclocymet	2.0*#
Tricyclazole	Ferimzone + diclocymet	Ferimzone + tricyclazole	1.8*

<sup>a</sup> Application dates, June 18 (nursery box application), August 20 (1<sup>st</sup> foliar application) and August 30 (2<sup>nd</sup> foliar application), 2009.

<sup>b</sup> Assessment date: September 16. \* Statistical difference from the none–none–none plot according to  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ). # Statistical difference from the tricyclazole–ferimzone+tricyclazole–ferimzone+tricyclazole plot according to  $\chi^2$  test ( $p < 0.05$ ).

本試験では、数年間の MBI-D 剤使用中止により MBI-D 剤の効果が回復したと思われる愛媛県と佐賀県の水田において、MBI-D 剤以外の箱施用と MBI-D 剤茎葉散布を組み合わせた防除体系区における穂いもちの耐性菌頻度を調査した。

2008 年に愛媛県西予市の水田で実施した試験では、無処理区から分離した 39 菌株はすべて MBI-D 剤感受性菌であった。他の MBI-D 剤を処理していない区の耐性菌頻度は、オリサストロビン単用箱施用区が 0%（耐性菌数/検定菌株=0/16）、オリサストロビン箱施用－フェリムゾン・フサライド混合剤茎葉散布区が 10%

（1/10）、チアジニル単用箱施用区が 0%（0/19）、チアジニル箱施用－フェリムゾン・フサライド混合剤茎葉散布区が 0%（0/17）、育苗箱施用を行っていないフェリムゾン・フサライド混合剤茎葉散布区が 0%（0/33）であり、いずれの区でも耐性菌頻度は低かった（Table 4-16）。一方、MBI-D 関連剤のみを処理した区における耐性菌頻度は、ジクロシメット単用箱施用区が 20%（4/20）、ジクロシメット箱施用－ジクロシメット・フェリムゾン混合剤茎葉散布区が 47.4%（9/20）であった（Table 4-16）。これらの区の耐性菌頻度は MBI-D 剤無処理区と比較して有意に高く、MBI-D 剤箱施用によって、耐性菌が再選抜されたと考えられた。また、育苗箱施用を行わずジクロシメット・フェリムゾン混合剤茎葉散布を行った区の耐性菌頻度は、9.4%（3/32）と上述の 2 種の防除体系よりは低い頻度であった（Table 4-16）。オリサストロビンまたはチアジニル箱施用とジクロシメット・フェリムゾン混合剤茎葉散布を組み合わせた場合の耐性菌頻度はそれぞれ 14.2%（2/14）、0%（0/19）、ジクロシメット箱施用とフェリムゾン・フサライド混合剤茎葉散布区を組み合わせた区は 8.3%（1/12）であった（Table 4-16）。以上の結果は、育苗箱施用と茎葉散布に用いる薬剤の組み合わせによって、MBI-D 剤耐性菌の再選抜を抑制できる可能性を示した。特に、チアジニル箱施用とジクロシメット・フェリムゾン混合剤茎葉散布の組み合わせでは、耐性菌が検出されておらず（Table 4-16）、防除

Table 4-16. Frequency of the MBI-D-resistant isolates of *Pyricularia oryzae* infecting in lesions in plots different in chemical treatments in Ehime Prefecture

Applied product <sup>a</sup>		No. of lesions <sup>b</sup>		% of resistance
Nursery box	Foliar application	Tested	Resistant	
None	None	39	0	0
None	Ferimzone + phthalide	33	0	0
None	Diclocymet + ferimzone	32	3	9.4
Diclocymet	None	20	4	20.0*
Diclocymet	Ferimzone + phthalide	12	1	8.3
Diclocymet	Diclocymet + ferimzone	20	9	47.4*
Orysastrobin	None	16	0	0
Orysastrobin	Ferimzone + phthalide	10	1	10
Orysastrobin	Diclocymet + ferimzone	14	2	14.3
Tiadinil	None	19	0	0
Tiadinil	Ferimzone + phthalide	17	0	0
Tiadinil	Diclocymet + ferimzone	19	0	0

<sup>a</sup> Application dates, June 12 (nursery box application), August 17 (foliar application), 2008.

<sup>b</sup> Sampling date, September 17. *P. oryzae* isolates were isolated from panicle blast, and the MBI-D sensitivity was analyzed by PIRA-PCR. \* Statistical difference from the none–none plot according to Fisher's exact test ( $p < 0.05$ ).

効果 (Table 4-13) から有望な防除体系と考えられた。

2008 年に佐賀県唐津市の水田で実施した試験では，無処理区から分離した 45 菌株の耐性菌頻度は 2.2% (耐性菌株数/検定菌株数=1/45) であった (Table 4-17)。MBI-D 剤を処理していない区の耐性菌頻度は，トリシクラゾール単用箱施用区が 2.6% (1/37)，フェリムゾン・トリシクラゾール混合剤の 2 回茎葉散布区が 0%

(0/38)，トリシクラゾールの育苗箱施用とフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤の 2 回茎葉散布区が 0% (0/37) であり，いずれの区も耐性菌頻度が低かった (Table 4-17)。MBI-D 剤ジクロシメット・フェリムゾン混合剤の 2 回茎葉散布区の耐性菌頻度は 6.1% (2/33) であり (Table 4-17)，この耐性菌頻度は，他の区と比較して，統計学的な有意差は認められなかった。この結果は，本試験圃場がジクロシメット・フェリムゾン混合剤の 2 回茎葉散布では，耐性菌の再選抜が起きない状況であったことを示唆している。また，育苗箱施用にトリシクラゾールを使用し，茎葉散布に MBI-D 剤の混合剤 (ジクロシメット・フェリムゾン混合剤) を組み合わせた場合，茎葉散布にジクロシメット・フェリムゾン混合剤を 2 回処理した区，ジクロシメット・フェリムゾン混合剤とフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤を 1 回ずつ処理した区の耐性菌頻度は，いずれも 0%であった (Table 4-17)。

さらに，2009 年に同じ水田で実施した試験では，無処理区，トリシクラゾール箱施用とジクロシメット・フェリムゾン混合剤の 2 回茎葉散布区，トリシクラゾール箱施用とジクロシメット・フェリムゾン混合剤およびフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤を 1 回ずつ茎葉散布した区，対照のトリシクラゾール箱施用とフェリムゾン・トリシクラゾール混合剤の 2 回茎葉散布区のすべてで，耐性菌は検出されなかった (Table 4-18)。

以上の結果から，トリシクラゾール箱施用とジクロシメット・フェリムゾン混合剤茎葉散布の組み合わせもまた防除効果も高く有望な防除体系と考えられた (Table 4-14)。



Table 4-17. Frequency of the MBI-D-resistant isolates of *Pyricularia oryzae* infecting in lesions in plots different in chemical treatments in Saga Prefecture

Applied product <sup>a</sup>			% of resistance <sup>b</sup>
Nursery box	1 <sup>st</sup> foliar application	2 <sup>nd</sup> foliar application	(No. of isolates tested)
None	None	None	2.2 (45)
None	Ferimzone + tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole	0 (38)
None	Diclocymet + ferimzone	Diclocymet + ferimzone	6.1 (33)
None	Diclocymet + ferimzone	Ferimzone + tricyclazole	0 (39)
Tricyclazole	None	none	2.6 (37)
Tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole	0 (37)
Tricyclazole	Diclocymet + ferimzone	Diclocymet + ferimzone	0 (31)
Tricyclazole	Diclocymet + ferimzone	Ferimzone + tricyclazole	0 (40)

<sup>a</sup> Application dates, June 17 (nursery box application), August 21 (1<sup>st</sup> foliar application) and August 28 (2<sup>nd</sup> foliar application), 2008.

<sup>b</sup> Sampling date, September 21. *P. oryzae* isolates were isolated from panicle blast, and the MBI-D sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.

Table 4-18. Frequency of the MBI-D-resistant isolates of *Pyricularia oryzae* infecting in lesions in plots different in chemical treatments in Saga Prefecture

Applied product <sup>a</sup>		% of resistance <sup>b</sup>
Nursery box	1 <sup>st</sup> foliar application	2 <sup>nd</sup> foliar application (No. of tested isolate)
None	None	None 0 (30)
Tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole	Ferimzone + tricyclazole 0 (30)
Tricyclazole	Diclocymet + ferimzone	Diclocymet + ferimzone 0 (30)
Tricyclazole	Diclocymet + ferimzone	Ferimzone + tricyclazole 0 (30)

<sup>a</sup> Application dates, June 18 (nursery box), August 20 (1<sup>st</sup> foliar application) and August 30 (2<sup>nd</sup> foliar application), 2009

<sup>b</sup> Sampling date, September 16. *P. oryzae* isolates were isolated from panicle blast, and the MBI-D sensitivity was analyzed by PIRA-PCR.

## 考 察

耐性菌管理対策を策定する際には，①異なる作用機作の剤を組み合わせた防除体系，②混合剤の活用について検討することが一般的である．本研究では，①と②を組み合わせた対策について検討した．①に関しては，イネいもち病の伝染経路と防除時期（Fig. 4-1）を考慮した防除タイミングごとに作用機作の異なる剤を組み合わせることを検討した．

本田葉いもちと穂いもちを対象とした育苗箱施用剤，穂いもち防除を対象とした本田散布剤としては，多くの殺菌剤が開発されているが，種粳に感染しているいもち病を防除対象とした剤は，新規剤の開発が盛んでなく，10年来の種子消毒剤が使用されている場面が多い．現在では，種子消毒にSBI剤が主に使用され，ばか苗病，いもち病などの防除が行われている．しかしながら，SBI剤はばか苗病菌には高い効果を示すが，種粳に感染しているいもち病菌の防除には，ばか苗病菌ほどの効果は期待できない．これは，SBI剤が玄米にまで感染したいもち病菌を抑制しきれないことに起因する（早坂ら，2002）．

そこで本研究では，早坂ら（2002）の報告の中で，ベノミルがいもち病菌の玄米感染も防除できることが記載されていたことに注目し，種粳に感染しているいもち病菌防除へのベノミルの有効性について再検討した．その結果，ベノミルによる種子消毒によって，種粳に感染したいもち病菌が原因となる苗いもちを防除できることを確認した（Fig. 4-3 および Fig. 4-4）．さらに本研究では，ベノミルが育苗箱灌注処理でトリコデルマ病を防除するための農薬登録を取得していることに着目し，ベノミルの育苗箱灌注による苗いもち病防除効果についても検討した．その結果，ベノミルは，育苗箱灌注処理でも苗いもちを防除できることが明らかとなった（Fig. 4-5）．さらに，ベノミルの育苗箱灌注処理は，種子消毒では防除しきれない，育苗期の葉いもちに対しても高い防除効果を示すことを見出し

た (Table 4-7). これらの結果から、ベノミルが、種籾に感染していたいもち病菌によって引き起こされる育苗期のいもち病を抑制する有用な剤であると考えられた。育苗期の苗いもちは、本田における葉いもちの重要な伝染源になる (安達ら, 1979: 原澤, 2001: 内藤・越水, 1979: 鈴木・藤田, 1985: 田中ら, 1982). また, 「イネ苗からの伝染がなければ, いもち病に対する本田防除を省略できる (深谷ら, 2002)」という報告があるほどに, 種子伝染性の育苗期のいもち病を防除することは, 1年を通じた防除体系を策定する上で重要である。したがって, 本研究で明らかにしたベノミルの防除効果は, 新たな防除体系の提案につながることを期待される。

ベノミルは, 過去に種子消毒剤として使用され, ベノミル耐性ばか苗病菌が出現したために, その後, イネの種子消毒剤としては使用されなくなった経緯がある (北村ら, 1982: 小川ら, 1982). したがって, ベノミルをいもち病防除に使用する場合にも, 単用ではなく, 他剤との混用か併用を想定する必要がある。そこで本研究では, SBI 剤との併用について検討した。SBI 剤との併用の有用性については, 育苗期の葉いもちまで含めた残効を期待する場合, 育苗箱灌注処理の方が種子消毒より有用と考え, SBI 剤による種子消毒とベノミルによる育苗箱灌注を併用する防除体系について検討した。その結果, SBI 剤とベノミルの併用において悪影響は認められず, 苗いもちや育苗期の葉いもちの防除に有効であることが明らかとなった (Table 4-8). これらの結果から, ベノミルが MBI-D 剤耐性菌管理対策を考慮した防除体系の候補剤になり得ることが示唆された。そこで, ベノミルを用いた圃場における実証試験を実施した。

圃場における実証試験では, 一度 MBI-D 剤耐性菌が蔓延した後に, MBI-D 剤の使用を数年間中止したことで, 耐性菌の頻度が下がり, MBI-D 剤の防除効果が回復したと思われた圃場を 2 圃場選定した。当該圃場において, 播種時のベノミル育苗箱灌注処理と移植時の MBI-D 剤育苗箱施用を組み合わせた防除体系による葉いも

ち防除効果と、MBI-D 剤耐性菌の再選抜リスクについて検討した。その結果、2007 年の愛媛県西予市水田での試験では、MBI-D 剤ジクロシメットの単用箱施用では、MBI-D 剤耐性菌の再選抜が認められた。一方、ベノミルとジクロシメットの併用区では、高い防除効果に加え、MBI-D 剤耐性頻度がジクロシメット単用区に比べ明らかに低くかった。また、ジクロシメット・チアジニル混合剤も、ジクロシメット単剤と同様に耐性菌再選抜の傾向が認められ、混合剤だけの処理区では、葉いもち防除効果は高いが、MBI-D 剤耐性の再選抜が起こることが示唆された。一方、ベノミルとジクロシメット・チアジニル混合剤の併用区は、高い防除効果に加え、MBI-D 剤耐性菌頻度が、ジクロシメット単用やジクロシメット・チアジニル混合剤のみの処理区に比べ明らかに低くかった（Table 4-9, Table 4-11）。以上の結果から、ベノミルの併用によって、MBI-D 関連剤による耐性菌の再選抜を抑制できることが示された。ベノミルは、種籾のいもち病菌が伝染源である育苗期のいもち病を防除することによって、葉いもちの伝染源を減らし、ごく僅かに残る耐性菌による葉いもちが顕在化することを抑制していると推察した。

2011 年の兵庫県加西市での試験でも、ベノミルが MBI-D 剤耐性菌再選抜を抑制することが示唆された。なお、本圃場での試験ではジクロシメット単用区、ベノミルとジクロシメット併用区ともに、対照剤のプロベナゾール単用区と同等かそれ以上の高いいもち病防除効果が認められた（Table 4-10）。これらの結果から、ベノミルは MBI-D 剤耐性菌管理対策を考慮した防除体系において、その防除効果と耐性菌再選抜抑制効果から、育苗期のいもち病を抑制するための有効な剤であると考えられた。

2008 年から 2009 年には、育苗箱施用剤と茎葉散布剤の各種組み合わせによる穂いもち防除効果と MBI-D 剤耐性菌の再選抜抑制効果について検討した。2008 年の愛媛県西予市での試験では、育苗箱施用剤として、MBI-D 剤ジクロシメットの他に、Fungicide

Resistance Action Committee (FRAC と略すことがある) の耐性菌発生リスク評価 (FRAC code list および pathogen risk list) で、耐性菌リスクが高リスクに分類される QoI 剤のオリサストロビン、低リスクに分類される SAR 剤のチアジニルを使用した。また、茎葉散布剤には、MBI-D 剤混合剤として、ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤と、低リスクに分類される MBI-R 剤フサライドとフェリムゾンの混合剤を用いた。フェリムズンは、FRAC の公表資料では、「耐性菌が検出されていない。」と記載があり、リスク評価の表記はないが、長期間いもち病防除剤として使用されてきた実績があり、耐性菌リスクは低いと推察される。評価した防除体系ではどれも発病穂率を顕著に低下させ、明確な防除効果が確認された (Table 4-13)。この結果は、本試験圃場では、既に MBI-D 剤の効果が回復していることを示した。

この圃場の穂いもちから分離した菌株の MBI-D 剤耐性菌頻度を調査したところ、無処理区では評価した 39 菌株すべてが感受性であり、耐性菌頻度がかなり低下していることが確認された。しかしながら、この圃場における MBI-D 剤ジクロシメットの単用箱施用区では耐性菌頻度が 20%、ジクロシメット箱施用と MBI-D 剤混合剤 (ジクロシメット・フェリムゾン混合剤) の茎葉散布を組み合わせた区では約 47% であり、無処理区に比べ有意に高い頻度となった。この結果は、防除効果が一旦回復しても、MBI-D 剤またはその混合剤のみを使用した場合には耐性菌の再選抜が起こり、再び防除効果が低下していくことを示唆している。一方、「MBI-D 剤ジクロシメット→フェリムゾン・フサライド混合剤」および「オリサストロビンまたはチアジニル→MBI-D 剤混合剤 (ジクロシメット・フェリムゾン混合剤)」の防除体系区における MBI-D 剤耐性菌頻度は、無処理区と統計学的に有意差が認められない程度の低さであった (Table 4-16)。これらの結果は、防除体系に、MBI-D 剤とは作用機作が異なる薬剤を組み入れることによって、耐性菌の再選抜を抑制できることを示している。また、ジクロシメットを箱施用に使

用せず，ジクロシメット・フェリムゾン混合剤を茎葉散布のみに使用した場合には，耐性菌頻度は，無処理区と同レベルに抑制された．この結果は，育苗箱施用と茎葉散布という施用方法の違いによって，耐性菌選抜リスクが異なることを示唆している．ジクロシメットのような育苗箱施用剤は，薬剤の残効期間が移植時から葉いもちさらに穂いもちの時期まで，数十日継続するように設計されている．したがって，それらを箱施用した場合には，薬剤による淘汰圧のかかる期間が長く，耐性菌の選抜リスクを高めると推定された．

2008年と2009年の佐賀県唐津市の試験では，MBI-R剤トリシクラゾールの育苗箱施用と茎葉散布剤を組み合わせた防除体系による穂いもち防除効果とMBI-D剤耐性菌の選抜リスクについて検討した．なお，本試験における茎葉散布剤は，愛媛県の試験と同じMBI-D剤ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤を用い，対照にはMBI-R剤トリシクラゾールとフェリムゾンの混合剤を用いた．この試験では，MBI-D剤混合剤のみを処理した区でも，明確な耐性菌の再選抜は認められなかった(Table 4-17および Table 4-18)．この結果から，MBI-D剤を茎葉散布剤として用いることによって，耐性菌再選抜のリスクを軽減できることがさらに示唆された．この圃場では，「MBI-R剤トリシクラゾール育苗箱施用→ジクロシメット・フェリムゾン混合剤茎葉散布区」は，高い穂いもち防除効果（Table 4-14, Table 4-15）に加え，分離した131菌株からMBI-D剤耐性菌は全く検出されなかった(Table 4-17, Table 4-18)．以上の結果は，MBI-D剤以外の薬剤による育苗箱施用とMBI-D剤を含む混合剤による茎葉散布の防除体系が，高い穂いもち防除効果を維持しつつ，MBI-D剤耐性菌の再選抜を抑制できることを強く示唆した．

## 第 5 章 総合考察

本研究では，MBI-D 剤耐性菌の有効な管理技術の確立を目的とした．農薬耐性菌管理対策に関する研究は，以下の 3 段階に大別される．第 1 段階は耐性機構の解明，第 2 段階は耐性菌のフィットネスクストの検証，第 3 段階は実場面における当該作用機作の薬剤の有効利用についての検証も含めた耐性菌管理法の確立である．

MBI-D 剤耐性菌については，第 1 段階は既に解明済みであり，ターゲットであるシタロン脱水酵素の遺伝子における耐性化の点突然変異は V75M の 1 パターンである (Takagaki *et al.*, 2004)．本研究では，第 2，第 3 段階を研究対象とした．

フィットネスクストの研究対象は多岐にわたるが，本研究では，病原性，温度感受性，紫外線耐性，シタロン脱水酵素活性，MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の競合，MBI-D 剤感受性菌と耐性菌のイネへの感染時間について検討した．その結果，病原性，温度感受性および紫外線耐性については，MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の間に有意な差は認められなかった．一方，シタロン脱水酵素活性については，感受性菌の  $K_{cat}$  が  $38.2 \pm 4.1$  /秒であるのに対して，耐性菌の  $K_{cat}$  は  $19.6 \pm 1.7$  /秒であり，耐性菌のシタロン脱水酵素活性が感受性菌より低下していた (Table 2-2)．Basarab *et al.* (1999) は，シタロン脱水酵素の 10 か所に人工的な変異を導入し，それらの酵素活性を野生型と比較したが，圃場で検出された V75M 変異は含まれていなかった．なお，Basarab *et al.* (1999) が報告した 10 の変異の中で，K73A と K73Q は  $K_{cat}$  に影響しなかったが，D31N，H110A，H110N，N131A，Y30F，Y50F，S129A および S129T は酵素活性の顕著な低下を引き起こした．V75M 変異の酵素活性への影響については，Yamada *et al.* (2004) が大腸菌発現系を用いて調製した組換え酵素について野生型と変異型の酵素活性を比較し，両酵素の  $K_m$  値には顕著な差はないが，野生型酵素の  $K_{cat}$  が変異型酵素の約 2 倍であることを報告している．本研究では，イネいもち病菌



の MBI-D 感受性菌と耐性菌からシタロン脱水酵素を調製し，それらの酵素活性を比較した．その結果，Yamada *et al.* (2004) の報告と同様に，V75M 変異型酵素の  $K_{cat}$  が，野生型と比較して有意に低下し，この酵素活性の差が，耐性菌のフィットネスクストにつながる可能性が示された．なお，反応温度や反応 pH を変化させても，常に感受性菌の酵素活性の方が高かった．また，複数の菌株から抽出した粗酵素液のシタロン脱水酵素活性の比較でも，耐性菌の酵素活性は感受性菌の酵素活性より有意に低かった (Fig. 2-5, Fig. 2-6, Table 2-3)．以上の結果から，いもち病菌が感染する温度域や pH 域では，耐性菌のシタロン脱水酵素活性が感受性菌より劣り，この傾向は耐性菌に共通した性質であることを示した．

シタロン脱水酵素は，いもち病菌のメラニン生合成経路に不可欠な酵素のひとつである (Fig. 1-4)．メラニン生合成が，いもち病菌のイネへの感染に必須な形質のひとつであることから，MBI-D 剤耐性菌のシタロン脱水酵素活性の低下は，イネへの感染過程に何らかの不利益をもたらす可能性が考えられた．そこで，感受性菌 4 株と耐性菌 4 株について任意のペアを 4 組つくり，MBI-D 剤を処理しない条件で競合試験を実施した．なお，本試験では第 1 世代は耐性菌頻度が高くなるように孢子濃度を調整し，噴霧接種を行った．第 2 世代以降は第 1 世代で発生した病斑から隣接する健全植物に空気感染する条件で検討した．その結果，検討した 4 組すべてについて，4～6 世代後には感受性菌のみが残った (Fig. 3-3)．競合試験を開始して 1～3 世代では耐性菌も検出されたが，さらに世代が重なることによって，耐性菌は顕著に減少し，最終的に感受性菌のみが残った．この結果は，MBI-D 剤耐性をもたらすフィットネスクストは，圃場で速やかに淘汰されるような大きなコストではないが，徐々に確実に淘汰されるレベルであること，すなわち薬剤淘汰圧がない条件下では，確実に耐性菌頻度が低下することを示している．

耐性菌におけるシタロン脱水酵素活性の低下が，感染のどの過程

に影響するのかを検討するために，感受性菌 2 株と耐性菌 2 株を用いて，イネ体への感染に必要な保湿時間を調査した．その結果，感受性菌 2 株は，どちらも感染に必要な保湿時間が 12 時間であったのに対して，耐性菌 2 株では 14 時間の保湿時間が必要であった（Fig. 3-4）．感染成立に必要な保湿時間に 2 時間の差があることは，MBI-D 剤耐性菌ではシタロン脱水酵素遺伝子の点突然変異によって酵素活性が低下し，イネ体への感染能力が低下すること，すなわち薬剤淘汰圧のない条件では，耐性菌の頻度が低下することをさらに示唆した．本研究で使用した菌株は，感受性菌，耐性菌のそれぞれ 2 菌株のみであったため，今後，より多くの菌株を用いた確認が必要である．

耐性菌が負うフィットネスクスについては，いくつか報告がある．例えば，カスガマイシン耐性イネいもち病菌（伊藤・山口，1979），ジカルボキシイミド耐性灰色かび病菌（Raposo *et al.*, 2000；Walker *et al.*, 2013），ジカルボキイミド耐性アブラナ科作物黒斑病菌（Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2008），SBI 剤耐性カンキツ緑かび病菌（Holmes *et al.*, 1995），SBI 剤耐性テンサイ褐斑病菌（Karaoglanidis *et al.*, 2001），エルゴステロール生合成系 3-ケト還元酵素阻害剤耐性灰色かび病菌（Billard *et al.*, 2012），diethofencarb と carbendazim の両剤耐性灰色かび病菌（Walker *et al.*, 2013）などである．これらの報告の多くが，実験室内または圃場における競合試験や経時的なモニタリング調査によって，耐性菌頻度が低下するか否かに基づき，耐性菌のフィットネスクストについて考察している．さらに，SBI 剤耐性カンキツ緑かび病菌やエルゴステロール生合成系 3-ケト還元酵素阻害剤耐性灰色かび病菌では孢子形成能の低下，SBI 耐性テンサイ褐斑病菌では孢子形成能に加え，病原性の低下についても観察されている（Karaoglanidis *et al.*, 2001）．一方，ジカルボキイミド耐性アブラナ科作物黒斑病菌では，孢子形成能や病原性への影響は認められないが，競合試験で耐性菌が淘汰されることが確認され，耐性菌のフィットネスクスト

がシグナル伝達に関与する AbNIK1p が産生されないことに起因する可能性が示されている (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2008). また, カスガマイシン耐性イネいもち病菌では, 感受性菌と耐性菌のイネ体への感染時間の差異について調査され, 耐性菌のほとんどが感受性菌よりイネ体への感染が遅い傾向が認められた. さらに, 病斑を多数形成する病原力の強い耐性菌の感染時間は, 感受性菌と同様であり, 病原力の強弱によってフィットネスクストの程度が異なることが示唆されている (伊藤・山口, 1979). このように, 各種殺菌剤の耐性菌のフィットネスクストを明らかにしようとする研究が多数報告されているが, 薬剤耐性獲得のメカニズムと耐性菌のフィットネスクストとの関連について, 分子レベルで検証した報告は意外と少ない.

本研究では, ①耐性型のシタロン脱水酵素活性が野生型の酵素活性より低い, ②本酵素はイネいもち病菌のイネ体への感染に必須なメラニン生合成に関与する, ③感受性菌と耐性菌の競合試験では, 耐性菌は淘汰される, ④イネ体への感染に耐性菌の方が感受性菌より長い時間が必要である (=フィットネスクスト) という, MBI-D 剤耐性がフィットネスクストを負うことの根拠を実験的に検証することができたと考えている.

さらに本研究では, MBI-D 剤の使用を中止した実圃場において, 薬剤による淘汰圧のない条件での耐性菌の頻度低下について検証した. Suzuki *et al.* (2010) は, 佐賀県の実圃場において, MBI-D 剤の使用中止後, MBI-D 剤耐性菌の頻度が減少することを報告した. しかしながら, この報告では, 同じ圃場から経時的にサンプリングしているか否かの表記はなかった. そこで本研究では, サンプリング圃場を固定し, MBI-D 剤耐性菌の頻度推移を調査した. 調査圃場として, 宮崎県の 1 か所, 佐賀県の 2 か所, 兵庫県の 6 か所の合計 9 圃場を選定し, 単年度内での変化をモニタリングする圃場と 3~4 年の年次変動をモニタリングする圃場をそれぞれ設定した. その結果, 耐性菌頻度の低下速度に差はあるものの, 例外なく

すべての圃場で，耐性菌の頻度が低下し（Table 3-2～Table 3-6），実圃場でも MBI-D 剤の使用中止によって耐性菌頻度が低下することが示された．この結果は，耐性菌発生後 MBI-D 剤の使用をある期間中止し，耐性菌頻度を顕著に低下させることによって，MBI-D 剤の効果が回復，再度防除剤としての使用が可能となることを示唆した．そこで本研究では，耐性菌の再選抜を防ぐために有効な防除体系について検討した．

耐性菌管理対策については，FRAC のホームページの publications 内で公開されているモノグラフ 1「Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?」（Brent and Hollomon, 2007）の中で，異なる作用機作の剤との混合剤の使用，異なる作用機作の剤と組み合わせた防除体系（ローテーション散布）の採用などが有効であると推奨されている．本研究では，主に混合剤を利用した防除体系の確立について検討した．防除体系を検討する上で重要なことは，防除時期ごとに作用性の異なる剤を組み合わせること，耐性リスクの高い同じ作用機作の剤を連用しないことである．そこで，イネいもち病の防除時期（Fig. 4-1）を考慮し，それぞれに異なる作用機作の剤を使用することを検討した．近年，種子伝染性のイネいもち病菌の防除には，温湯処理（物理的防除）や拮抗微生物（生物的防除）も利用されているが，本研究ではより効果が安定している化学農薬を用いた．本研究に着手した 2000 年代初頭は SBI 剤が種子消毒剤の主流であったが，SBI 剤は，玄米感染したいもち病菌に対する効果がベノミルに劣るという報告があった（早坂ら，2002）．そこで本研究では，ベノミルの適用可能性について検討した．その結果，ベノミルによる種子消毒によって種子伝染性の苗いもちを防除できることが再確認できた（Fig. 4-3 および Fig. 4-4）．さらに，試験開始時には，ベノミル水和剤の育苗箱灌注処理の適用病害にイもち病の農薬登録はなかったが，本研究において，ベノミルの育苗箱灌注処理によって苗いもちを防除できることを明らかにした（Fig.4-5）．また，ベノミルの育苗箱灌注処理は，育苗期

の葉いもちに対して，種子消毒より防除効果が高いことを見出した（Table 4-7）．これらの結果は，種子伝染性いもち病の防除手段として，ベノミルの育苗箱灌注が種子消毒より種子発芽後の残効性に優れ，より有効であることを示した．また，育苗箱灌注処理は灌水も兼ねるため，種子消毒後の廃液処理についても問題がない．

実圃場における実証試験では，ベノミルの育苗箱灌注処理と MBI-D 剤の移植時育苗箱施用を組み合わせた防除体系による葉いもち防除効果と MBI-D 剤耐性菌の再選抜抑制効果について検討した．その結果，2007 年の愛媛県西予市での試験では，MBI-D 剤ジクロシメットまたはジクロシメット・チアジニル混合剤の単用箱施用は葉いもちの防除効果は高いが，明確な MBI-D 剤耐性菌の再選抜も確認された（Table 4-9 および Table 4-11）．一方，ベノミル育苗箱灌注処理とそれぞれの MBI-D 剤箱施用の組み合わせは，葉いもちに対する高い防除効果を示すとともに，対照区（プロベナゾール箱施用）や無処理区とほぼ同じ程度まで耐性菌頻度が抑制された（Table 4-9，Table 4-11）．以上の結果は，ベノミルの育苗箱灌注処理が，MBI-D 剤によって再選抜される耐性菌の出現を抑制したことを示している．耐性菌管理対策に関する報告では，異なる作用機作の剤を組み合わせた防除体系よりも混合剤の使用の方が，耐性菌管理対策には優れるとの報告もある（Hobbelen *et al.*, 2013；Elderfield *et al.*, 2018）．しかしながら，本研究の結果は，葉いもち防除効果と耐性菌再選抜抑制という点では，異なる作用機作の剤を組み合わせた防除体系の方が，混合剤の使用よりも耐性菌管理対策に適していることを示唆した．

植物病害が顕在化するためにはある一定数以上の接種源（孢子数など）が必要である．例えば，鈴木（1974）は，水田 1.3 m の高さで採取されるいもち病菌の孢子数から，いもち病の発病程度の予測を試みた．その中で，連続して孢子が採取される日の初日が 7 月第 2 半旬以降となり，その後の 1 日に採取される孢子数が 30 個以下 / カバーガラス（18×24 mm<sup>2</sup>），葉上の水滴が午前 7 時に消失，さら

に雨天日数の比率が 7%以下の場合には，穂いもちの発病穂率が 5%以下になると予測した．この結果は，飛散する胞子数が少なければ，病害として顕在化する可能性が低くなることを示している．

本研究で見出したベノミル育苗箱灌注処理の耐性菌再選抜リスク抑制効果については，MBI-D 剤耐性菌頻度がかなり低くなった条件下でベノミルを処理したことによって，耐性菌，感受性菌のどちらも胞子数がさらに減少し，MBI-D 関連剤処理後に，僅かに耐性菌が生存したとしても，その胞子数が病害を顕在するには充分ではなく，耐性菌の再選抜が起きなかったと推察された．一方，ベノミル処理を実施しなかった場合には，育苗段階で胞子数を減少させることができず，MBI-D 関連剤処理で選抜された耐性菌胞子によって病害が顕在化し，耐性菌の再選抜が起きたと推察された．

諸条件をかなり簡素化した条件下であるが，以下を前提条件として，Fig. 5-1 に MBI-D 以外の剤（ベノミル）の使用の有無による MBI-D 剤（ジクロシメット）耐性菌再選抜の抑制効果について模式化した．

#### 前提条件

- ① 胞子 5 個に対して病斑 1 個が形成される．
- ② MBI-D 剤ジクロシメットと作用機作が異なる薬剤ベノミルは全体の胞子の 90%を死滅させる．
- ③ 最初のジクロシメット感受性菌と耐性菌数は感受性菌 100 個と耐性菌 10 個とする．
- ④ ジクロシメットは耐性菌胞子を死滅させないが、感受性菌胞子は 90%死滅させる．

どちらの薬剤も処理しない場合には，胞子 5 個に対して 1 個の病斑を形成するため，感受性病斑が 20 個，耐性病斑が 2 個形成され，病斑の耐性菌頻度は，存在する胞子の耐性菌頻度と等しくなる（Fig.5-1, case 1）．

ジクロシメットのみ処理した場合には，感受性菌胞子は 100 個か

ら 10 個に減少するが，耐性菌胞子は 10 個のままである．胞子 5 個に対して 1 個の病斑を形成するため、病斑数としては，感受性病斑が 2 個，耐性病斑が 2 個となり耐性頻度は 50%となる．病斑数は無処理の 22 個から 4 個に減少するために，防除効果は 80%以上であるが，病斑の耐性菌頻度が 50%であるために，耐性菌の再選抜が起きている（Fig.5-1, case 2）．

ベノミルのみを処理した場合には，感受性菌胞子は 100 個から 10 個，耐性菌胞子は 10 個から 1 個にそれぞれ減少する．前提条件①より，これら胞子が形成する病斑は感受性病斑のみ 2 個となり，耐性頻度が無処理に比べて減少する．存在する胞子数の比率は無処理と同様に耐性菌が感受性菌の 1/10 であるが，接種源となる胞子数の減少により病斑数では感受性菌と耐性菌の比率に差が生じる（Fig.5-1, case3）．以上が，耐性菌管理対策のために異なる作用機作の剤を用いるメリットと考える．

また，ベノミルによって胞子数を減少させた後に，MBI-D 剤ジクロシメットを処理した場合には，感受性の胞子がさらに 1/10 に減少するため，感受性菌胞子 1 個，耐性菌胞子 1 個となり，病斑を形成することができない（Fig.5-1, case4）．両剤の使用によって耐性菌の再選抜を抑制するとともに，高い防除効果も期待できる．

2011 年に実施した兵庫県加西市の試験では，ベノミルのみの区の耐性菌頻度（1.8%）が，無処理区の 5.1%と比べて低い結果となった（Table 4-12）．また，ベノミルとジクロシメット両剤を使用した防除体系区では，耐性菌は検出されなかった（Table 4-12）．この試験圃場でも，Fig.5-1 の case3, case4 が起きていると推察された．以上の結果から，ベノミルの育苗箱灌注を防除体系に組み入れることで，MBI-D 剤耐性菌の再選抜を抑制することができると考えた．

2008 年から 2009 年には，実圃場において育苗箱施用剤と茎葉散布剤の各種組みわせによる穂いもち防除効果と MBI-D 剤耐性菌の

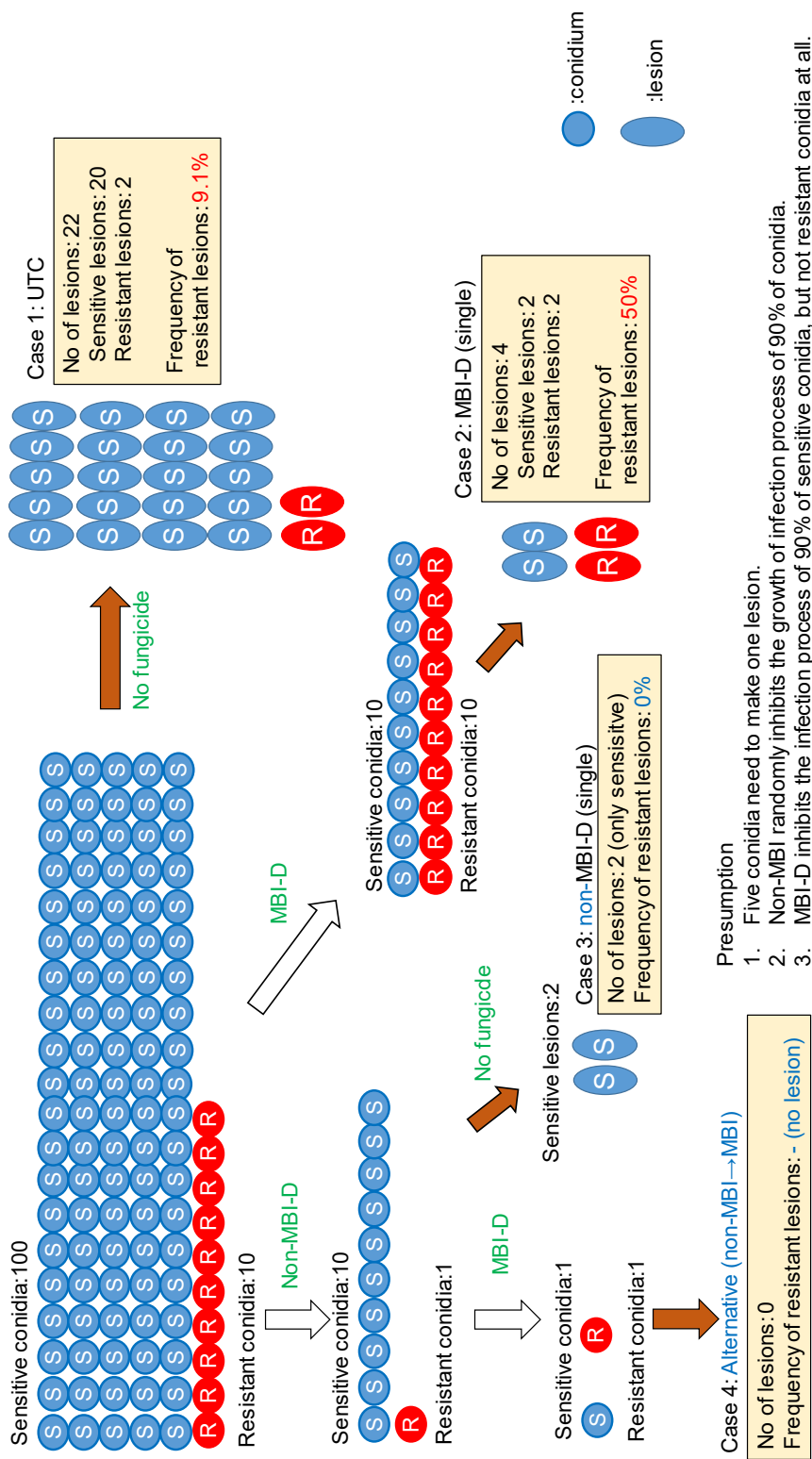


Fig. 5-1. Conceptual diagram of contribution of fungicides other than MBI-D (non-MBI-D) to reduce frequency of MBI-D resistant lesions. White arrow, fungicide application; brown arrow, no application; small circle, conidium; ellipse, lesion. In case 1, 22 lesions are formed, and frequency of resistance is 9.1%. In case 2, number of lesions is decreased to four by MBI-D application, and frequency of resistance is 50% (selection of resistance). In case 3, number of lesions is decreased to two by non-MBI-D application, and frequency of resistance is 0% (reduction of frequency of resistance). In case 4, no lesion is caused by non-MBI-D and MBI-D applications.



再選抜抑制効果について検討した。防除体系としては、「MBI-D 剤以外の育苗箱施用→MBI-D 剤ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤の茎葉散布」または「MBI-D 剤ジクロシメットの育苗箱施用→MBI-D 剤以外の剤の茎葉散布」について検討した。

2008 年に愛媛県西予市で実施した試験では、MBI-D 剤以外の育苗箱施用剤として QoI 剤オリサストロビン、SAR 剤チアジニルを使用した。MBI-D 剤以外の茎葉散布剤としては、フェリムゾン・フサライド混合剤を用いた。その結果、MBI-D 剤ジクロシメット単用またはジクロシメット箱施用とジクロシメット・フェリムゾン混合剤の防除体系では、高い穂いもち防除効果が認められたが、MBI-D 剤耐性菌の再選抜も確認された（Table 4-13 および Table 4-16）。この結果は、MBI-D 剤を過度に使用した場合、耐性菌の再選抜リスクが高まることを示している。一方、育苗箱施用剤は使用せず、茎葉散布剤でジクロシメット・フェリムゾン混合剤のみを使用した場合には、耐性菌は検出されるが、その頻度は、育苗箱施用剤にジクロシメットを使用した区に比べると低かった（Table 4-16）。混合剤の使用によって耐性菌再選抜リスクが低下した可能性もあるが、2007 年の試験では、ジクロシメット単剤、混合剤の育苗箱施用によって、どちらも耐性菌が再選抜された（Table 4-11）。したがって、箱施用による耐性菌の再選抜は、箱施用と茎葉散布の薬剤の残効期間（いもち病菌が薬剤淘汰を受ける期間）の差に起因すると推察された。

「MBI-D 剤以外の剤の育苗箱施用→MBI-D 剤ジクロシメットとフェリムゾン混合剤茎葉散布」の防除体系は、高い穂いもち防除効果を示すとともに、穂いもちにおける MBI-D 剤耐性菌の再選抜を抑制した（Table 4-13 および Table 4-16）。特に、SAR 剤チアジニル箱施用とジクロシメット・フェリムゾン混合剤茎葉散布の組み合わせでは、耐性菌は検出されなかった（Table 4-16）。この結果は、育苗箱施用に MBI-D 剤以外の剤を用いることによって、MBI-D 剤感受性、耐性どちらの孢子数も減少させ、ベノミルによる

MBI-D 剤の耐性菌再選抜抑制と同様な効果を示したものと推察された。さらに、「MBI-D 剤ジクロシメット育苗箱施用→MBI-D 剤以外の剤の茎葉散布」の防除体系区も、高い穂いもち防除効果と穂いもちにおける MBI-D 剤耐性再選抜抑制効果が認められた (Table 4-13 および Table 4-16)。この防除体系では、ジクロシメットによって耐性菌の再選抜が起こる可能性があるが、茎葉散布剤に MBI-D 剤以外の剤を用いることによって、箱施用では防除できなかった耐性菌の密度を下げ、穂いもちとして顕在化するリスクを低下させたためと推察された。しかしながら、MBI-D 剤の箱施用は、耐性菌を再選抜するリスクがある (Table 4-11)。

2008 年と 2009 年に佐賀県唐津市で実施した試験では、「作用機作が異なるメラニン生合成阻害剤である MBI-R 剤トリシクラゾールの箱施用→MBI-D 剤ジクロシメットとフェリムゾン混合剤の茎葉散布」の防除体系でも、高い穂いもち防除効果と MBI-D 剤耐性菌再選抜抑制効果が認められた (Table 4-14, Table 4-15, Table 4-17 および Table 4-18)。この試験では、MBI-D 剤混合剤茎葉散布による耐性菌再選抜リスクを高めることを意図して、あえて茎葉散布を 2 回実施する区を設定したが、2 回散布区でも、2 年間の試験を通して耐性菌は検出されなかった (Table 4-17 および Table 4-18)。この結果は、「MBI-D 剤以外の剤の育苗箱施用→MBI-D 剤ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤茎葉散布」が有効な耐性菌管理対策になることを示している。なお、耐性菌再選抜リスクを少しでも軽減する観点からは、MBI-D 剤混合剤の使用はシーズン 1 回にとどめるのが望ましいと考える。

以上の研究結果に基づき、感受性イネいもち病菌に対して高い防除効果を持つ MBI-D 剤を有効利用した MBI-D 剤耐性菌管理対策について以下を提案する。

MBI-D 剤耐性菌管理対策 (Fig. 5-2)

1. 種子伝染性のいもち病防除にはベノミルを使用する．残効を考慮すると育苗箱灌注処理が望ましい．
2. 育苗箱施用には，MBI-D 剤以外の剤（SAR 剤，MBI-R 剤等）を使用する．
3. 茎葉散布には，MBI-D 剤ジクロシメット・フェリムゾン混合剤を使用する．ただし，使用は 1 年に 1 回にとどめる．

なお，MBI-D 剤耐性菌出現以降，各県において以下のことが，いもち病の総合的防除として指導されるようになった．

1. 必ず種子を更新する（自家採種しない）．
2. 種子消毒を必ず実施する．
3. 採種圃では，耐性菌が検出された作用機作の剤や耐性菌出現リスクが高い剤は使用しない．

これらのことも，MBI-D 剤耐性菌管理対策の一環として実施すべきである．なお本研究では，種子消毒剤としてベノミルの効果について検討したが，イネいもち病の種子伝染を抑止する農薬としては，SBI 剤，フルジオキシニル，カスガマイシンなどの他の作用機作の剤も有望な候補である．これらの剤の有効性については，今後の検討課題である．

本研究では，主に水稻育苗箱施用剤として使用された MBI-D 剤に耐性菌が出現した事例を対象として，MBI-D 剤の箱施用以外の施用方法での有効な使用方法について検討した．近年，QoI 剤の育苗箱施用剤に対する耐性菌も報告され（石井ら，2013；宮川ら，2013），また，育苗箱施用剤として，新たな作用機作の剤も上市されている（Banba *et al.*, 2017）．今後，本研究の成果が，MBI-D 剤のみならず，QoI 剤，新規剤などの耐性菌管理対策の一助となることを期待する．

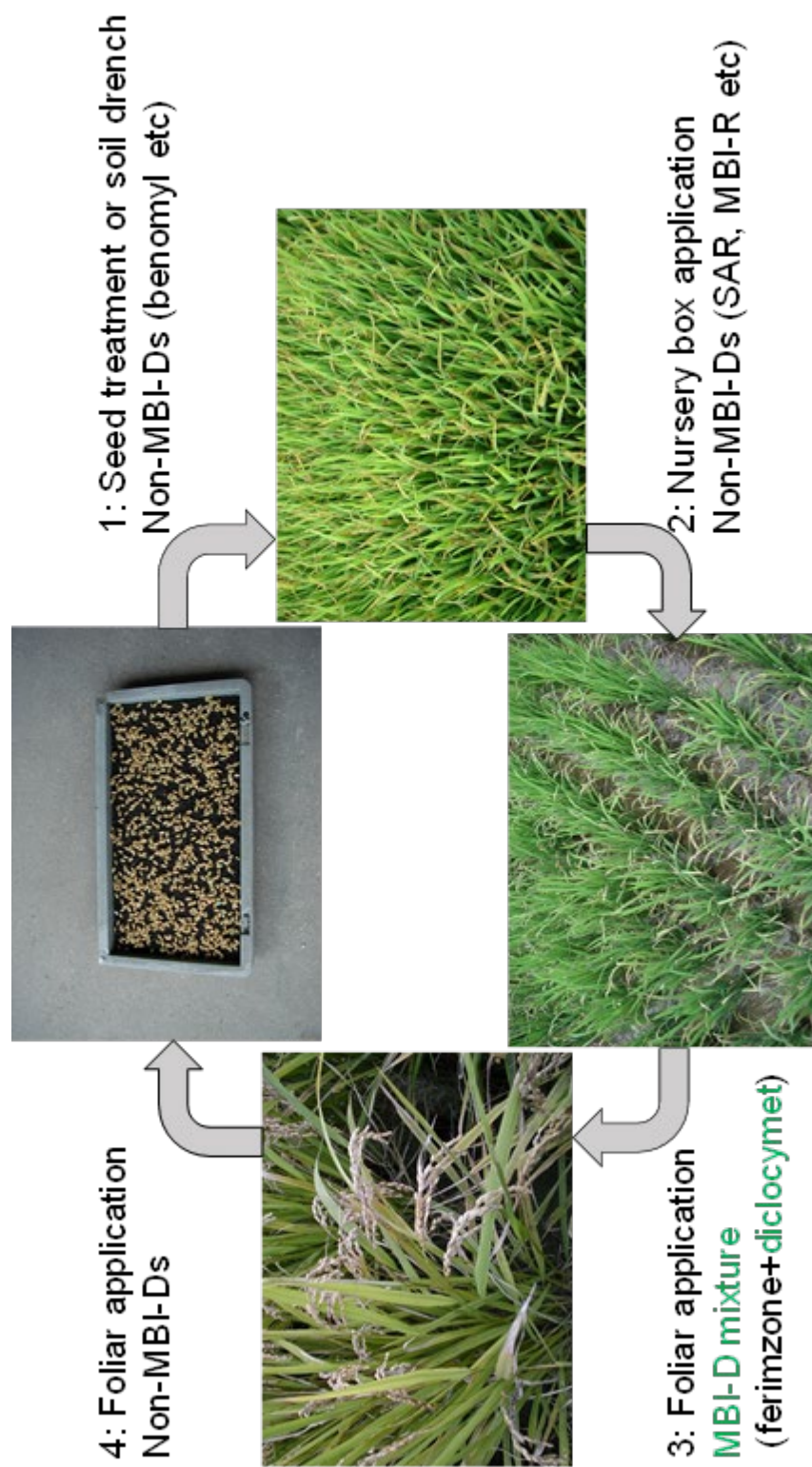


Fig. 5-2. Fungicide application program for MBI-D resistant management to control rice blast. Fungicides other than MBI-D (non-MBI-D) are used for “seed treatment or soil drench” and “nursery box application”. A mixture of MBI-D and another fungicide is used for foliar application once per year.

## 引用文献

安達忠衛，橋本 晃，遠藤頼嗣，平野喜代人（1979）水稻栽培におけるいもち病の発生経過とその防除について．福島県農業試験場研究報告 18: 11-22.

Avila-Adame C, Koller W (2003) Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Current Genetics* 42: 332-338.

Banba S, Hamada T, Araki N, Ebihara K (2017) Synthesis and activities of tolprocarb derivatives against *Pyricularia oryzae*: relationships among the activities for polyketide synthase, melanin biosynthesis, and rice blast. *Journal of Pesticide Science* 42: 25-31.

Baraldi E, Mari M, Chierci E, Pondrelli M, Bertolini P, Pratella GC (2003) Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genric characterization. *Plant Pathology* 52: 362-370.

Basarb GS, Steffens JJ, Wawrzak Z, Schwartz RS, Lundqvist T, Jordan DB (1999) Catalytic mechanism of scytalone dehydratase: site-directed mutagenesis, kinetic isotope effects, and alternate substrates. *Biochemistry* 38: 6012-6024.

Billard A, Fillinger S, Leroux P, Lachaise H, Beffa R, Debieu D (2012) Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea* as, shown by comparison of isogenic strains. *Pest Management Science* 68: 684-691.

Boddy L (2015) The Fungi 3<sup>rd</sup> edition: 265-267.

Brend KJ, Hollomon DW (2007) Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC publications.

[http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf?sfvrsn=769d419a\\_8](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf?sfvrsn=769d419a_8)

Brown MC, Taylor GS, Epton HAS (1984) Carbendazim resistance in the eyespot pathogen *Pseudocercospora herpotrichoides*. Plant Pathology 33: 101-111.

Chen SN, Shang Y, Wang Y, Schnabel G, Lin Y, Yin LF, Luo CX (2014) Sensitivity of *Monilinia fructicola* from peach farm in China to four fungicides and characterization of isolates resistant to carbendazim and azoxystrobin. Plant Disease 98: 1555-1560.

Chida T, Sisler HD (1987) Restoration of appressorial penetration ability by melanin precursor in *Pyricularia oryzae* treated with antipenetrants and in melanin-deficient mutants. Journal of Pesticide Science 12: 49-55.

Chin KM, Chavailal D, Kaebobhrer M, Staub T, Felsenstein FG (2001) Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* to strobilurins. Crop Protection 20: 87-96.

Davidse LC (1973) Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. Pesticide Biochemistry and Physiology 3: 317-325.

de Jong JC, McCormack BJ, Sminoff N, Talbot NJ (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389: 244-245.

Delmas CEL, Dussert Y, Delière L, Couture C, Mazet ID, Cervera SR , Delmotte F (2017) Soft selective sweeps in fungicide resistance evolution: recurrent mutations without fitness costs in grapevine downy mildew. *Molecular Ecology* 26: 1936-1951.

Elderfield JAD, Lopez-Ruiz FJ, van den Bosch F, Cunniffe NJ (2018) Using epidemiological principles to explain fungicide resistance management tactics: Why do mixtures outperform alternations? *Phytopathology* 108: 803-817.

深谷 富夫，保坂 学，佐山 玲，藤井直哉（2002）イネ残さ・苗からの伝染がなければいもち病に対する本田防除が省略できる．日本植物病理学会報 68: 209（講要）．

FRAC code list (2018) FRAC publications.

[http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac\\_code\\_list\\_2018-final.pdf?sfvrsn=6144b9a\\_2](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac_code_list_2018-final.pdf?sfvrsn=6144b9a_2)

FRAC pathogen risk list (2013) FRAC publications.

[http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=669d419a\\_8](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=669d419a_8)

FRAC recommendations for fungicide mixtures (2010) FRAC publications.

[http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures---january-2010.pdf?sfvrsn=7e9d419a\\_4](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures---january-2010.pdf?sfvrsn=7e9d419a_4)

Genet J-L, Jaworska G, Deparis F (2006) Effect of dose rate and mixtures of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. Pest Management Science 62: 188-194.

原澤良栄 (2001) 補植苗の葉いもち病勢進展過程からみた全般発生開始期の予測. 日本植物病理学会報 67: 87-96.

早坂 剛, 石黒清秀, 渋谷圭治, 生井恒雄 (2001) 数種のイネ種子伝染性病害を対象とした温湯種子消毒. 日本植物病理学会報 67: 26-32.

早坂 剛, 松浦孝幸, 生井恒雄 (2002) イネ種子玄米における侵入いもち病菌の動態と防除. 日本植物病理学会報 68: 297-304.

廣岡 卓, 内黒羽徹, 西口 勉 (1999) 1993 年～1996 年における圃場分離イネいもち病菌のイソプロチオラン, IBP および EDDP に対する感受性モニタリング. 日本植物病理学会報 65: 61-66.

Hobbelen PHF, Paveley ND, Oliver RP, van den Bosch F (2013) The usefulness of fungicide mixture and alternation for delaying the selection for resistance in populations of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat: a modeling analysis. Phytopathology 103: 690-707.

Howard RJ, Ferrari MA (1989) Role of melanin in appresorium function. Experimental Mycology 13: 403-418.

Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. Proceedings of the Natural Academy of Science of the United States of America 88: 11281-11284.



Hsiang T, Chastagner GA (1990) Parasitic fitness of benzimidazole and dicarboximide resistant isolates of *Botrytis cinerea*, *B. elliptica* and *B. tulipae*. *Phytopathology* 80: 978 (abs).

Iacomi-Vasileseu B, Batalille-Simoneau N, Campion C, Dongo A, Laurent E, Serandat I, Hamon B, Simoneau P (2008) Effect of null mutations in the *AbNIK1* gene on saprophytic and parasitic fitness of *Alternaria brassicicola* isolates highly resistant to dicarboximide fungicides. *Plant Pathology* 57: 937-947.

Immaraju JA, Morse JG, Hobza RF (1990) Field evaluation of insecticide rotation and mixtures as strategies for Citrus Thrips (Thysanoptera: Thripidae) resistance management in California. *Journal of Economic Entomology* 83: 306-314.

伊藤 弘，三浦春夫，高橋昭二（1974）いもち病菌のカスガマイシン耐性第2報山形県庄内地方におけるカスミシンの効果の推移．日本植物病理学会報 40: 220（講要）．

伊藤征男，山口富夫（1977）農薬の使用状況とカスガマイシン耐性いもち病菌の発生．日本植物病理学会報 43: 301-303．

伊藤征男，山口富夫（1979）いもち病菌のカスガマイシン耐性菌と感性菌の競合．日本植物病理学会報 45: 40-46．

Ishii H (2011) Fungicide resistance in rice. *Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Reinhardtsbrunn Symposium*: 35-40 (Abs).

石井貴明，富士 真（2013）福岡県におけるQoI 剤耐性イネいもち病菌の発生．日本植物病理学会報 79: 197（講要）．

岩本 豊, 長田靖之, 木村教男 (2007) 兵庫県における MBI-D 剤耐性いもち病菌の発生状況. 関西病害虫研究会報 49: 17-18.

Kaku K, Takagaki M, Shimizu T, Nagayama K (2003) Diagnosis of dehydratase inhibitors in melanin biosynthesis inhibitor (MBI-D) resistance by primer-introduced restriction enzyme analysis in scytalone dehydratase gene of *Magnaporthe grisea*. Pest Management Science 59: 843-846.

Karaoglanidis GS, Luo Y, Michailides TJ (2011) Competitive ability and fitness of *Alternaria alternata* isolates resistant to QoI fungicides. Plant Disease 95: 178-182.

Karaoglanidis GS, Thanassouloupoulos CC, Ioannidis PM (2001) Fitness of *Cercospora biticola* field isolates-resistant and -sensitive to demethylation inhibitor fungicides. European Journal of Plant Pathology 107: 337-347.

Katagiri M, Uesugi Y, Umehara, Y (1980) Development of resistance to organophosphorus fungicides in *Pyricularia oryzae* in the field. Journal of Pesticide Science 5: 417-421.

Kawamura C, Moriwaki J, Kimura N, Fujita Y, Fuji S, Hirano K, Koizumi S, Tsuge T (1997) The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin-deficient mutants of *Magnaporthe grisea*. Molecular Plant-Microbe Interactions 10: 446-453.

Keinath AP, Zitter TA (1998) Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South California and New York. Plant Disease 82: 479-484.

君島悦夫（1999）種子伝染性病原体の検出法1. 病原糸状菌．種子伝染病の生態と防除－健全種子生産をめざして－: 101-102.

北村義男，穂積隆夫，田中徳己（1982）ベノミル剤耐性イネばか苗病菌の出現．日本植物病理学会報 48: 380（講要）．

Klosowski AC, Brahm L, Stammler G, De Mio LLM (2016) Competitive fitness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates with mutations in the *CYP 51* and *CYTB* genes. Phytopathology 106: 1278-1284.

Kubo Y, Suzuki K, Furusawa I, Yamamoto M (1983) Scytalone as a natural intermediate of melanin biosynthesis in appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. Experimental Mycology 7: 208-215.

熊倉和夫，渡辺 哲，豊島 淳，牧野孝宏，市川 健，伊代住浩幸，永山孝三（2003）*Trichoderma* sp. SKT-1 株による 6 種のイネ種子伝染性病害の発病抑制効果．日本植物病理学会報 69: 393-402.

Kurahashi Y, Araki Y, Kinbara T, Pontzen R, Yamaguchi I (1998) Intermediates accumulation and inhibition sites of carpropamid in the melanin biosynthesis pathway of *Pyricularia oryzae*. Journal of Pesticide Science 23: 22-28.

Kurahashi Y, Hattori T, Kagabu S, Pontzen R (1996) Mode of action of the novel rice blast fungicide KTU 3616. Pesticide Science 47: 199-202.

Kurahashi Y, Sakawa S, Kinbara T, Tanaka K, Kagabu S (1997)  
Biological activity of carpropamid (KTU 3616): a new fungicide for  
rice blast disease. *Journal of Pesticide Science* 22: 108-112.

倉橋良雄, 山口 勇 (1999) メラニン生合成阻害剤はなぜ耐性菌を生  
じないのか? 耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 9: 35-45.

Löcher FJ, Lorenz G, Beetz K-J (1987) Resistance management  
strategies for dicarboximide fungicides in grapes: results of six years'  
trial work. *Crop Protection* 6: 139-147.

Lundqvist T, Weber PC, Hodge CN, Braswell EH, Rice J, Pierce J (1993)  
Preliminary crystallographic studies on scytalone dehydratase from  
*Magnaporthe grisea*. *Journal of Molecular Biology* 232: 999-1002.

Manabe A, Enomoto M, Yamada Y, Oguri Y, Sasaki M (1999) Steric  
structure-activity relationships of the rice blasticide, S-2900  
(diclocymet). *Pesticide Science* 55: 649-650.

Ma B, Uddin W (2009) Fitness and competitive ability of an  
azoxystrobin-resistant G143A mutation of *Magnaporthe oryzae* from  
perennial ryegrass. *Plant Disease* 93: 1044-1049.

三浦春夫, 高橋昭二 (1977) いもち病菌のカスガマイシン耐性第5報  
カスミンの効果推移と耐性菌の分布推移. *日本植物病理学会報* 42:  
372 (講要) .

宮川典子, 富士 真, 川幡 寛 (2013) オリサストロビン剤耐性イネ  
いもち病菌の発生. *日本植物病理学会報* 79: 197 (講要) .

Miyagi Y, Hirooka T, Araki F (1986) Relative parasitic fitness of isolates of *Pyricularia oryzae* Cav. with different sensitivities to fungicides. *Pesticide Science* 17: 653-658.

Money NP, Howard RJ (1996) Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genetics and Biology* 20: 217-227.

Motoyama T, Arie T, Kamakura T, Yamaguchi I (2002) Isolation and analysis of gene from phytopathogenic fungi. *Molecular Anatomy of Cellular Systems*: 61-74.

Motoyama T, Imanishi K, Kinbara T, Kurahashi Y, Yamaguchi I (1998) Inhibition of scytalone dehydratase in melanin biosynthesis by carpropamid, a novel rice blast controlling agent. *Journal of Pesticide Science* 23: 58-61.

内藤秀樹，越水幸男（1979）イネ機械移植栽培におけるいもち病罹病苗の移植と本田葉いもち発生との関係．東北農業試験場研究会報 61: 39-57.

内藤秀樹（1994）平成5年のいもち病多発生要因の解析．植物防疫48: 93-97.

Nakasako M, Motoyama T, Kurahashi Y, Yamaguchi I (1998) Cryogenic X-ray crystal structure analysis for the complex of scytalone dehydratase of a rice blast fungus and its tight-binding inhibitor, carpropamid: structural basis of tight-binding inhibition. *Biochemistry* 37: 9931-9939.

Nalley L, Tsiboe F, Durand-Morat A, Shew A, Thoma G (2016)  
Economic and environmental impact of rice blast pathogen  
(*Magnaporthe oryzae*) alleviation in the United States PLoS ONE  
11(12): e0167295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167295>

西口 勉，田嶋崇吉，山本好伸，廣岡 卓，日野 勲（2001）新規殺菌  
剤 NNF-9425（フェノキサニル，ISO 申請中，AC382042）のイネいも  
ち病生活環に及ぼす影響．日本植物病理学会報 66: 182-183（講要）．

小川勝美，諏訪正義，渡辺 茂（1982）イネばか苗病菌のベンズイミ  
ダゾール系薬剤に対する感受性について．日本植物病理学会報 48:  
379-380（講要）．

小栗幸男，相馬聖人，佐原政志（1999）新規いもち剤ジクロシメッ  
ト（デラウス）の作用機作第2報 圃場におけるイネいもち病菌に対  
する効力．日本植物病理学会報 65: 402（講要）．

Pathogen risk list (2013) FRAC publications.  
[http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-  
risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=669d419a\\_8](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=669d419a_8)

Rallos LEE, Johnson NG, Schmale DG, Prussin AJ, Baudoin AB (2014)  
Fitness of *Erysiphe necator* with G143A-based resistance to quinone  
outside inhibitors. Plant Disease 98: 1494-1502.

Raposp R, Gomez V, Urrutia T, Melgarejo P (2000) Fitness of *Botrytis  
cinerea* associated with dicarboximide resistance. Phytopathology 90:  
1246-1249.

Romero RA, Sutton TB (1998) Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. Plant Disease 98: 233-240.

Sawada H, Sugihara M, Takagaki M, Nagayama K (2004) Monitoring and characterization of *Magnaporthe grisea* isolates with decreased sensitivity to scytalone dehydratase inhibitors. Pest Management Science 60: 777-785.

相馬聖人，佐原政志，小栗幸男（1999）新規いもち剤ジクロシメット（デラウス）の作用機作 第1報 いもち病菌に対する活性．日本植物病理学会報 65: 401（講要）．

Suzuki F, Yamaguchi J, Koba A, Nakajima T, Arai M (2010) Changes in Fungicide Resistance Frequency and Population Structure of *Pyricularia oryzae* after Discontinuance of MBI-D Fungicides. Plant Disease 94: 329-334.

鈴木穂積（1974）いもち病菌胞子の動態およびそれによる発生予察法．日本植物病理学会報 40: 165-167.

鈴木穂積，藤田佳克（1985）機械移植栽培イネにおけるいもち病の発生生態と防除．東北農業試験場研究会報 71: 59-74.

Suzuki K, Kato T, Takahashi J, Kamoshita K (1984) Mode of action of methyl N- (3, 5-dichlorophenyl)-carbamate in the benzimidazole-resistant isolate of *Botrytis cinerea*. Journal of Pesticide Science 9: 497-501.

Takagaki M, Kaku K, Watanabe S, Kawai K, Shimizu T, Sawada H, Kumakura K, Nagayama K (2004) Mechanism of resistance to carpropamid in *Magnaporthe grisea*. Pest Management Science 60: 921-926.

田中 孝, 木村和夫, 東海林久雄, 平山成一 (1982) 水稻箱育苗におけるいもち病の発生と本田葉いもち発生との関係. 山形農業試験場研究会報 16: 91-105.

Tsuji G, Takeda T, Furusawa I, Horino O, Kubo Y (1997) Carpropamid, an anti-rice blast fungicide, inhibits scytalone dehydratase activity and appressorial penetration in *Colletotrichum lagenarium*. Pesticide Biochemistry and Physiology 57: 211-219.

Vogel HJ (1956) A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). Microbial Genetics Bulletin 13: 42-43.

Walker A-S, Micoud A, Rémuson F, Grosman J, Gredt M, Leroux P (2013) French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). Pest Management Science 69: 667-678.

Wawrzak Z, Sandalova T, Steffens JJ, Basarab GS, Lundqvist Y, Jordan DB (1999) High-resolution structures of scytalone dehydratase-inhibitor complexes crystallized at physiological pH. Proteins: Structure, Function and Genetics 35: 425-439.

八重樫博志 (1995) イネいもち病. 作物病原菌研究技法の基礎—分離・培養・接種—: 37-41.



Yamada N, Motoyama T, Nakasako M, Kagabu S, Kudo T, Yamaguchi, I (2004) Enzymatic characterization of scytalone dehydratase Val75Met variant found in melanin biosynthesis dehydratase inhibitor (MBI-D) resistant strains of the rice blast fungus. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68: 615-621.

山本好伸，西口 勉，内黒羽子徹，廣岡 卓，日野 勲（2001）新規殺菌剤 NNF-9425（フェノキサニル，ISO 申請中，AC382042）の圃場におけるイネいもち病防除効果．日本植物病理学会報 66: 183（講要）．

山下 享（1999）育苗箱の播種時処理におけるいもち病防除とウィン箱粒剤の効果．農薬研究 177: 40-46．

吉野 嶺一（2003）2 生活環・被害．世界におけるいもち病研究の軌跡—21 世紀の研究発展をめざして—: 45-48．

## 要約

*Pyricularia oryzae* Cavarra によって引き起こされるイネいもち病は、イネの最重要病害である。我が国においては、1950年代からその防除を目的として、抗生物質を含め多くの種類の化学合成殺菌剤が開発・販売されている。そのひとつが、イネいもち病菌の防除を主目的として開発されたメラニン生合成阻害剤（MBI 剤）である。MBI 剤は抗菌性を示さないが、イネいもち病菌ではメラニン生合成が阻害されるとイネに対する感染能力を失うため、いもち病菌の非殺菌性防除剤として広く使用されている。メラニン生合成酵素のうちシタロン脱水酵素の阻害剤である MBI-D 剤は、長期の残効を有するという特徴から広く利用されていたが、2001 年に耐性菌の発生が確認された。MBI-D 剤耐性菌の耐性機構については、シタロン脱水酵素遺伝子の点突然変異による V75M のアミノ酸置換に起因することが明らかにされている。本研究では、イネいもち病菌の MBI-D 剤耐性菌の生理学的・生態学的特性の解明に基づく実圃場における耐性菌管理対策の策定を目的として、以下の研究を行った。

### 1. MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の生理学的性質とシタロン脱水酵素活性の比較

MBI-D 剤感受性 4 株と耐性 4 株のイネに対する病原性、生育における温度感受性、胞子の紫外線耐性および MBI-D 剤の標的酵素であるシタロン脱水酵素の活性を比較した。その結果、病原性、温度感受性および紫外線耐性については、感受性株と耐性株で有意な差は認められなかった。感受性と耐性それぞれ 1 株からシタロン脱水酵素を精製し、酵素活性を測定したところ、感受性菌酵素の分子活性が 38.2 /s であったのに対して、耐性菌酵素の活性は 19.6 /s であり、耐性菌の酵素活性が約 1/2 に低下していることが明らかとなった。また、感受性 4 株と耐性 4 株からそれぞれ粗酵素液を調製し、シタロン脱水酵素活性を比較したところ、耐性菌群の酵素活性が感受性

菌群の酵素活性より有意に低かった．以上の結果は，イネいもち病菌のシタロン脱水酵素遺伝子における MBI-D 剤耐性化変異によって，その酵素活性が低下することを示した．

## 2. MBI-D 剤感受性菌と耐性菌のフィットネスの比較

耐性菌のシタロン脱水酵素活性が感受性菌の酵素活性より低いことから，耐性菌ではメラニン生合成能、さらにイネへの感染能力が低下していることが予想された．そこで，感受性菌と耐性菌の胞子を混合接種し，MBI-D 剤を処理しない条件下で両者の競合試験を実施した．感受性菌と耐性菌のペアを 4 組設定し，耐性菌の比率の方が感受性菌より高くなるように混合した胞子懸濁液をイネ体に接種した後，植物体上での継代を繰り返した．その結果，3～5 回の継代によって，すべての組合せで発生病斑から感受性菌のみが検出されるようになった．この結果は，薬剤淘汰圧のない条件下では，耐性菌の頻度が速やかに減少し，感受性菌が優占化することを示した．その原因を探るために，感受性 2 株と耐性 2 株を用いてイネ体への感染に必要な加湿時間を比較した．その結果，感受性 2 株ではイネ体への感染成立に必要な加湿時間が 12 時間であったのに対して，耐性 2 株では 2 時間長い 14 時間であった．この結果は，耐性菌ではイネ体への感染能力が低下していること，さらに MBI-D 剤を処理しない条件下での感受性菌の優占化には感受性菌と耐性菌の感染能力の差が関与することを示唆した．

MBI-D 剤の使用を中止した実圃場における耐性菌の頻度推移を調査するために，単年度内の推移を調査する 4 圃場と数年間の経年推移を調査する 5 圃場を設定した．その結果，調査した 9 圃場すべてにおいて，調査開始時に比べ最終調査時の耐性菌頻度は顕著に低下した．以上の結果は，実圃場においても，MBI-D 剤の使用中止によって，耐性菌頻度が低下し，数年後には感受性菌が優占化すること，すなわちシタロン脱水酵素遺伝子における MBI-D 剤耐性化変異がフィットネスクストを負うことを示した．

### 3. MBI-D 剤耐性菌管理対策の策定

イネいもち病菌の防除対象としては、①種子伝染性のいもち病（種子消毒）、②葉いもち（育苗箱施用）、③穂いもち（茎葉散布）の 3 段階があり、耐性菌管理対策を策定する際には、それぞれの防除対象に対して異なる作用機作の剤を用いることが望ましい。MBI-D 剤耐性菌頻度が低下し、MBI-D 剤の効果が回復した圃場では、MBI-D 剤と他剤を組み合わせた防除体系によって、高いいもち病防除効果に加え、MBI-D 剤耐性菌の再選抜の抑制が可能と考えた。そこで、MBI-D 剤を有効利用した耐性菌管理対策の策定を目的として、以下の研究を行った。

#### (1) ベノミルを用いた種子伝染性いもち病菌の防除

ベノミルによる種子消毒と育苗箱灌注処理の効果を評価したところ、種子伝染性のいもち病菌による苗いもちに対しては、種子消毒、育苗箱灌注処理のどちらも高い防除効果が認められた。さらに、育苗箱灌注処理は、イネの育苗期中に飛び込んでくるいもち病菌による葉いもちにも高い防除効果を示し、残効性も有することが明らかとなった。以上の結果は、ベノミルの育苗箱灌注処理が、育苗期のいもち病防除に有効であることを示した。

#### (2) ベノミルと MBI-D 剤を組み合わせた防除体系による耐性菌管理

MBI-D 剤耐性菌頻度がほぼ 0%にまで低下した愛媛県西予市の水田を用いて、「ベノミル育苗箱灌注と MBI-D 剤を含む混合剤箱施用の組み合わせ」と「MBI-D 剤を含む混合剤箱施用のみ」の防除体系について、葉いもち防除効果と耐性菌頻度を比較した。その結果、どちらの防除体系も葉いもちに対して高い防除効果を示し、この水田では、MBI-D 剤耐性菌頻度の低下によって、MBI-D 剤の効果が回復していることが確認された。しかしながら、「MBI-D 剤混合剤箱施用のみ」区の耐性菌頻度は 23.8%であり、無処理区の 4.0%、対照区

の抵抗性誘導剤プロベナゾール箱施用区の 0%と比べて顕著に上昇し、耐性菌の再選抜が確認された。一方、「ベノミル育苗箱灌注と MBI-D 剤混合剤箱施用の組み合わせ」区の耐性菌頻度は 3.7%であり、無処理区と同程度に抑制されていた。以上の結果は、ベノミル育苗箱灌注処理には MBI-D 剤耐性菌の再選抜を抑制する効果があり、耐性菌管理対策の有効な手段であることを示した。

### (3) 異なる作用機作の剤の箱施用と MBI-D 剤混合剤の茎葉散布を組み合わせた防除体系による耐性菌管理

上記試験の翌年に、愛媛県西予市の同じ水田で試験を実施した。箱施用剤として電子伝達系阻害剤オリサストロビンまたは抵抗性誘導剤チアジニルを、茎葉散布混合剤として MBI-D 剤ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤をそれぞれ用いて、穂いもち防除効果と耐性菌頻度について、MBI-D 剤ジクロシメット箱施用のみの区と比較した。その結果、「他の作用機作の剤の箱施用と MBI-D 剤混合剤の茎葉散布」区、「ジクロシメット箱施用のみ」区のどちらも高い穂いもち防除効果が認められ、この水田では前年と同様に MBI-D 剤の効果の回復が維持されていることが示唆された。しかしながら、「ジクロシメット箱施用のみ」区の耐性菌頻度は 20%に上昇し、無処理区（0%）と比べ顕著に高く、耐性菌の再選抜が認められた。一方、「オリサストロビン箱施用と MBI-D 混合剤茎葉散布」、「チアジニル箱施用と MBI-D 剤混合剤茎葉散布」の両区の耐性菌頻度はそれぞれ 14.3%、0%であり、特に後者では無処理と同程度に抑制された。以上の結果は、「他の作用機作の剤の箱施用と MBI-D 剤ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤茎葉散布」の防除体系には、穂いもち防除と MBI-D 剤耐性菌再選抜抑制の両効果があり、有効な耐性菌管理対策であることを示した。

以上の研究によって、シタロン脱水酵素遺伝子における MBI-D 剤耐性化変異がフィットネスクスト（感染能力の低下）を負うため、

MBI-D 剤の使用中止によって、速やかに耐性菌頻度が低下することを明らかにした。さらに、その特徴に基づき、MBI-D 剤を有効利用した MBI-D 剤耐性菌管理対策として、①ベノミルによる種子消毒、② MBI-D 剤以外の剤による育苗箱施用、③ MBI-D 剤ジクロシメット・フェリムゾン混合剤の茎葉散布（年 1 回限定）を組み合わせた防除体系を策定した。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり，佐賀県および愛媛県の現地試験を実施するための圃場の紹介ならびに圃場における定点モニタリングの現地調査にご協力頂いた佐賀県農業試験研究センター山口純一郎博士，元愛媛県中予産業振興課安永忠道氏に感謝致します．また，兵庫県圃場における定点モニタリングを行うにあたり，現地調査にご協力いただいた兵庫県農林水産技術総合センターの岩本豊博士，長田靖之氏に感謝致します．佐賀県および愛媛県において圃場の借用でご尽力いただいた住友化学株式会社の営業部員に感謝致します．苗いもち等の試験方法についてご助言頂いた元住友化学株式会社堀真雄博士に感謝いたします．また，本研究を進めるにあたり，感受性検定や生物試験等でご協力いただいた，住友化学株式会社の研究員に感謝いたします．

最後になりましたが，本論文を執筆するにあたり，多大なご指導を頂いた名古屋大学大学院生命農学研究科川北一人教授，肘井直樹教授，浅川晋教授，吉岡博文准教授，中部大学応用生物学部柘植尚志教授に深謝致します．