イネ葉上および組織内におけるフェニルヒドラジンアシル 誘導体のいもち病菌に対する作用*

角 名 郁 郎**・松 浦 一 穂**

Ikuko SUMINA** and Kazuho MATSUURA**: Effect of β -acylphenylhydrazine
Derivatives on Blast Fungus upon Leaves and in
Tissues of Rice Plant*

Abstract

Studies were carried out with the efficacy of 1-(3, 4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine (I) and 1-(4-chlorophenyl)-2-acetylhydrazine (II), which showed the strongest and the most consistent effect on rice blast control among β -acylchlorophenylhydrazine derivatives, in suppressing developing mycelia and germination of spores of *Pyricularia oryzae* *in vitro*, on leaves and in tissues of rice plant.

Compounds I and II were found to possess complete sporostatic property at 125 ppm on the slide glass, and both I and II at 175 ppm and above prevented the mycelial growth in shaking culture. While mycocidal action of these compounds were stronger than sporocidal action.

On the leaves of rice plant, both I and II at 1000 ppm did not prevent sufficiently spore germination and appressorium formation, but suppressed markedly the mycelial development in the host tissues as well as blasticidin S, a therapeutic agent.

These results suggested that the principal locus of inhibition of β -acylchlorophenylhydrazines against rice blast fungus in the protective and the therapeutic tests was at the stage of mycelial development in the tissues, and not at the stage of spore germination and appressorium formation upon leaves of rice plant.

(Received July 18, 1966)

前報³⁾で β -アシルクロフェニルヒドラジン誘導体がイネいもち病に対して強い防除効果を示すことを報告した。その防除作用の特徴はいもち病に予防ならびに治療効果を有する点にあり、また病斑は褐点型で止める場合が多く認められた。

本報では代表化合物として、1-(3, 4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine および 1-(4-chlorophenyl)-2-acetylhydrazine を選び、それらの *in vitro* なら

びにイネ葉上、組織内におけるいもち病菌に対する作用を検討したところ、既存の抗いもち病剤と作用を異にする点があることが分ったのでここに報告する。

本研究を行なうにあたり、終始御鞭撻を賜った当社顧問田中一郎博士、農園長八田亮三氏、主任研究員小林忠之博士、また供試化合物の合成を担当され、種々有益なる御助言、御指導を頂いた農業技術部主任研究員衣川二郎博士ならびに碓井義郎研究員に深謝する。また本稿を草するにあたり御校閲を賜った京大教授赤井重恭博士に対し感謝の意を表する。

実験材料および方法

1. 分生胞子発芽試験 いもち病菌 *Pyricularia*

* 農業用殺菌剤に関する研究 第9報
Studies on agricultural fungicides. IX.

** 武田薬品研究開発本部京都試験農園
Kyoto Herbal Garden, Research and Development Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.

oryzae (p-18) はイネわら煎汁液体培地を用いて、スポンジマトリックス法¹⁾により、28°Cで4日間振盪培養し、その後菌糸の十分生育したスポンジマトリックスをとり出し、水洗後湿室(28°C)に24時間保ち同調胞子を形成させる。こうして得られた同調胞子を洗浄後、0.3Mの蔗糖を含む1/15Mリン酸緩衝液(pH 6.4)に再懸濁し試験胞子液(胞子濃度約 5×10^5 /ml)とした。発芽試験は試験管希釈法に準拠した。なお1処理に約300個の胞子数を調べ、無処理に対する比率から阻害率を算出した。

2. 菌糸生育阻害試験 300ml容の振盪コルベンに50mlのイネわら煎汁液体培地を入れ、滅菌後2mlの胞子浮遊液(胞子濃度約 5×10^5 /ml)を接種し、28°Cで振盪培養した。24または48時間後所定の濃度になるように薬液を添加し、さらに3日または2日間(接種後4日間)培養した。その後菌糸を水洗、乾燥し、薬剤無添加区との重量比により阻害率を算出した。なお1処理2コルベンを使用し反復試験した。

3. 菌糸、分生胞子および分生胞子形成に対する殺菌試験 sporocidal, mycocidal な作用は柳田ら⁵⁾の方法を用いて試験した。すなわち、胞子、菌糸片ともに遠心分離による時間も含めて正確に20分薬液と接触させた後水洗し、1ペトリ皿あたり200~300個のコロニー数になるような濃度(菌糸の場合はワーリングブレンダーで細片にする。分生胞子の場合は胞子数約 8×10^3 個)に調整し、イネわら寒天培地を流したペトリ皿に移し、28°Cで24時間培養した。菌の生死の判別は無処理に対するコロニー数から行ない、その比率から阻害率を算出した。なお1処理2ペトリ皿で反復試験した。

分生胞子形成に対する試験は、スポンジマトリックス法¹⁾により、スポンジマトリックス(1処理10個)に生育した子梗形成前の菌糸を正確に20分間薬液と接触させ、水洗後湿室(28°C)に保ち、24時間後に形成された胞子数を無処理の胞子数と比較し阻害率を求めた。

4. イネ葉上の分生胞子発芽および葉鞘組織内菌糸に対する阻害試験 温室内ポットおよびベッド試験³⁾において、薬剤散布2日後に接種した場合のイネ葉上の分生胞子発芽の状態をつぎの方法で調べた。すなわち接種後約16または18時間経過後、葉を4~5cmの長さに切り取り、アルブミンをぬったカバーガラスにこれを貼りつけ固定し²⁾、カバーガラスに付着した胞子を1処理あたり約100個検鏡する(1処理5~6

葉、ベッド試験の場合)かあるいは以下に記す手順により固定、染色し観察した(ポット試験の場合)。まず上記イネ葉をカルノアの固定液(6:3:1)で固定し、95%、75%エタノールおよび水までのアルコールシリーズを通す。水洗後アエリンブルー染色液で5分間染色する⁴⁾。その後スライド上において5%乳酸液中で2~3分間加温し、水洗後検鏡し1処理あたり約60個の胞子数(5~6葉)を調査した。阻害率は無処理に対する比率から求めた。

組織内の菌糸に対する作用は葉鞘接種法により観察した。すなわち常法によりいもち病菌胞子浮遊液(胞子濃度約 5×10^5 /ml)を葉鞘内に接種し、湿室(28°C)に24時間保ち、その後薬液に10分間浸漬処理した。さらに24ならびに48時間湿室に保った後、葉鞘内壁をはがし、前記の手順により固定、染色し、顕微鏡(600倍)下で観察した。1処理あたり5~6葉鞘を供試し、約30の侵入菌糸による感染の状態を細胞数から調べた。

5. 供試薬剤 1-(3,4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine (I), 1-(4-chlorophenyl)-2-acetylhydrazine (II), phenylmercuric acetate (PMA), Blasticidin S·HCl (BcS), phenylmercuric iodide (PMI) の5薬剤を使用した。I, II は結晶をエタノールに溶かし水で希釈し、その他はそのまま水に溶解し用いた。PMAならびに PMI は水銀濃度に換算して用いた。なおイネを用いた各試験では展着剤を0.02%の割合に加え使用した。

実験結果および考察

1. 分生胞子発芽阻害作用

各薬剤は倍数希釈により7段階の濃度を設け試験した。結果は第1図に示したが、無処理区における発芽率は平均90%であった。I および II はともに125 ppmの濃度で胞子発芽を完全に抑制したが、その作用はIにくらべてIIの方が強く、62.5 ppmでIの阻害率が12%に対し、IIは86%であった。一方PMAは0.13 ppm, BcSは0.4 ppmの濃度で胞子発芽を完全に抑制し、実用濃度の1/20以下で強い作用が認められた。

2. 菌糸生育阻害作用

菌糸生育の誘導期(接種24時間後、図左)または対数初期(接種48時間後、図右)に所定の濃度になるように薬液を添加し、菌糸の生育に与える影響をみた結果が第2図である。接種24時間後の薬剤添加では、Iは350 ppmで完全阻害、175 ppm以上で高い

Fig. 1 Effect of β -acetylchlorophenylhydrazines, phenylmercuric acetate and blasticidin S on spore germination of *Pyricularia oryzae*.

I: 1-(3,4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine

II: 1-(4-chlorophenyl)-2-acetylhydrazine

PMA: phenylmercuric acetate

BcS: blasticidin S

Fig. 2 Inhibitory effect of β -acetylchlorophenylhydrazines, PMA and BcS on the mycelial development of *P. oryzae*. Chemicals were added 24 (left) or 48 (right) hours after inoculation.

阻害を示した。87 ppm ではかなり作用が低下し、50%程度の阻害を示すに過ぎなかった。BcS, PMA はともに菌糸生育に対する作用は著しく強く、供試濃度範囲ではほぼ完全に阻害した。一方接種 48 時間後の薬剤添加では、BcS および PMA の阻害作用には誘導期添加とくらべて著しい低下が認められたが、化合物 I の場合は誘導期添加とはほぼ同じ程度の阻害作用を示した。また化合物 II には I とほとんど同程度の菌糸生育阻害作用が認められた。

以上の実験結果から、化合物 I および II はともに菌糸生育阻害作用より胞子発芽に対する阻害作用がやや強いようであり、ともにより低濃度で完全阻害が認められた。しかし以上の 2 種類の試験は方法も異なる

Fig. 3 Comparison of sporocidal (a), mycicidal (b) and sporulation inhibitory (c) activities of 1-(3,4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine, BcS and PMA on *P. oryzae*.

○—○—○ Sporocidal

●—●—● Mycicidal

●—●—● Sporulation inhibition

ため、その結果から菌糸および胞子のどちらに対する作用が強いかは論じられないと思われ、つぎの実験を行なった。

3. 分生胞子、菌糸ならびに胞子形成における薬剤感受性 いもち病菌分生胞子、菌糸および分生胞子形成前の菌糸（スポンジマトリックス中菌糸）などを薬剤と 20 分間接触させ、どのステージに最も強く薬剤が反応するかを実験した。第 3 図がその結果であるが、I はかなり特異的な作用を示した。すなわちこの化合物は分生胞子発芽および胞子形成に対する阻害作用は弱い、菌糸生育に対する阻害が強かった。BcS は胞子形成阻害作用が強いのに比べ、胞子発芽、菌糸生育阻害作用はやや低く、また PMA は胞子発芽および菌糸生育阻害作用が強く、胞子形成に対する阻害作用はやや低かった。

以上の結果のように分生胞子、菌糸および分生胞子形成などに対して、各薬剤はそれぞれ三様の相違する薬剤感受性を示した。化合物 I はいもち病菌分生胞子および胞子形成に対するよりも菌糸に対して阻害が強いことが特徴であると考えられる。

4. イネ葉上の分生胞子発芽および葉鞘組織内の菌糸に対する阻害作用 まずイネ葉上の胞子発芽に対する阻害を観察した（第 1, 2 表）。薬剤はおのの接種 2 日前に散布した。第 1 表はポット試験による結果で、接種約 18 時間後の状態を調べた。無散布における胞子発芽率は 91% であった。化合物 I では発芽阻害がやや認められる程度であったが、II の阻害作用はほとんどなかった。一方 PMI は 20 ppm で発芽をほ

Table 1. Inhibitory effect of β -acetylchlorophenylhydrazines on spore germination and appressorium formation upon rice leaves in the pot test^{a)} in greenhouse.

Code no.	Chemicals	Concentration (ppm)	Inhibition of spore germination	Inhibition of appressorium formation	Percent disease control
I	1-(3,4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine	1000	20%	56%	96
II	1-(4-chlorophenyl)-2-acetylhydrazine	1000	3	6	80
	PMA	20 ^{b)}	100	—	98
	Blasticidin S	20	6	6	69
	Check	—	0 ^{c)}	0 ^{d)}	0

^{a)} Chemicals were sprayed 2 days before inoculation.^{b)} Concentration as mercury.^{c)} Spore germination percentage: 91%^{d)} Percent of appressorium formation: 74%Table 2. Inhibitory effect of 1-(3,4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine on spore germination upon rice leaves in the seedling bed test^{a)} in greenhouse

Chemicals	Concentration (ppm)	Percent inhibition of spore germination	Percent disease control	
			6 ^{b)}	9
1-(3,4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine	1000	64	95	90.1
PMI ^{c)}	20	97	100	98.6
Blasticidin S	20	72	95	88.7
Check	—	0 ^{d)}	0 ^{e)}	0 ^{f)}

^{a)} Chemicals were sprayed 2 days before inoculation.^{b)} Days elapsed after inoculation.^{c)} Phenylmercuric iodide, concentration as mercury.^{d)} Spore germination percentage: 78%^{e)} Percent area of spots: 57%^{f)} " " " : 71%

ほとんど完全に阻害したが、BcS は 20 ppm でも発芽阻害をほとんど示さなかった。また付着器形成に対する阻害作用をみると、II および BcS 処理では無処理とほとんど同じくらい付着器を形成するのに対し、I の処理ではその形成がやや抑制されるようであった。なお無散布の付着器形成率は 74%。この試験で同一処理した他のポットで発病程度を調査したが、胞子の発芽を強く抑制した PMA 処理区は病斑をほとんど形成

しなかった。化合物 I も発芽阻害率が PMA に比しかなり低いにもかかわらず、防除効果はほぼ同等であった。化合物 II を処理したイネでは I にくらべて発病が多かったが、BcS の効果に優っていた。つぎに第 2 表のベッド試験における結果であるが、第 1 表の結果とはほぼ同様の知見を得た。すなわち調査は接種後約 16 時間目に行なったが、化合物 I の発芽阻害率は BcS よりもやや低かった。なお無散布の発芽率は 78% であった。しかし防除効果は数字にはっきりと現われる程ではないが、傾向的に BcS の効果よりやや優っていた。一方 PMI は発芽阻害効果が高く、発病をほとんど完全に抑制した。発芽阻害率がポット試験の場合とやや違うのは試験方法および調査方法の違いが関係していると思う。

以上の結果から考えて、 β -アシルクロフェニルヒドラジン誘導体のイネ葉上でのいもち菌に対する阻害作用は胞子発芽、付着器形成のいずれにも弱い。しかし防除効果が高く現われるという事実から、葉内の侵入菌糸に対して強い阻害作用を示すことが予測される。

つぎに葉鞘接種法によって、イネ幼苗葉鞘組織内の菌糸に対する作用につき実験した(第 4 図、第 3 表)。その結果化合物 I および II はともに組織内菌糸の伸長を強く阻害し、BcS とほぼ同等の作用が認められた。BcS は予防効果は高くないが、治療効果が著しく、その阻害は組織内の菌糸に対して強い。第 3 表には組織内菌糸の伸長阻害について、1 侵入菌糸から侵害を受けた細胞数の経時的变化を調べて示した。化合物 I および II は接種後 48 時間(薬剤処理後 24 時間)の

Table 3. Inhibitory effect of β -acetylchlorophenylhydrazines, PMI and BcS on the mycelial development in leaf sheath tissues of rice seedlings.

Code no.	Chemicals	Concentration (ppm)	Number of cells invaded by infection hyphae		
			24 ^{a)}	48	72
I	1-(3,4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine	1000	1.27	1.73	2.33
II	1-(4-chlorophenyl)-2-acetylhydrazine	1000	1.27	2.00	2.17
	PMI	20 ^{b)}	1.27	1.75	3.09
	Blasticidin S	20	1.27	1.63	2.00
	Check	—	1.27	2.62	6.60

a) Hours after inoculation. Leaf sheath tissues were dipped 10 minutes in each chemical solution 24 hours after inoculation.

b) Concentration as mercury.

1-(2-chlorophenyl)-2-acetylhydrazine

1-(3,4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine

BcS

PMI

Control

Fig. 4 Effect of β -acetylchlorophenylhydrazines, BcS and PMI on mycelial development in leaf sheath of rice seedling 48 hours after inoculation (24 hours after chemical treatment).

経過で、組織内部の菌糸に対してかなり強い作用を示し、さらに 24 時間後では PMI よりもその阻害が強く現われ、BcS の効果にほぼ匹敵した。経時変化からみると BcS にくらべてやや遅効的であるように思われる。

以上の結果から β -アシルククロフェニルヒドラジン誘導体は、予防散布の場合でも葉上での分生孢子発芽、付着器形成などを強く抑えないが、組織内に侵入した菌糸に対し強い阻害作用を示すと思われる。さきの *in vitro* の結果からも、これらの誘導体は菌糸に対してもっとも強い殺菌力を示し、*in vivo* の結果との関連が認められた。また前報³⁾で、これらの化合物を散布した場合、褐点型病斑で止める場合が多く観察されたが、この現象は以上に述べた侵入後の菌糸に対してやや強く作用する特性からよく説明できると思われる。

摘 要

β -アシルククロ置換フェニルヒドラジン誘導体の中で特に高いもち病防除効果を示した 1-(3,4-dichlorophenyl)-2-acetylhydrazine (I) および 1-(4-chlorophenyl)-2-acetylhydrazine (II) につき *in vitro* およびイネ葉上、組織内におけるもち病菌分生孢子発芽および菌糸生育に対する阻害作用について検討した。

I は *in vitro* において孢子発芽、菌糸生育に対し、おのおの 125 および 175 ppm 以上で強い静菌作用を示した。一方殺菌的には孢子より菌糸に対し強い阻害を示した。

イネ葉上においては 1000 ppm の薬液を散布し 2

日後に接種した場合, I および II は孢子発芽, 付着器形成に対して十分な阻害を示さなかった。ところがイネ葉鞘組織内においてはともに侵入菌糸の伸長を強く抑制し, プラストサイジン S とほぼ同程度の作用であった。

以上の結果から β -アシルフェニルヒドラジン誘導体は予防あるいは治療散布のいずれの場合でも, 組織内侵入菌糸に対してもっとも強く作用すると思われる。

引用文献

1. Matsuura, K. (1965). Ann. Rept. Takeda Res. Lab. 24: 266-272.
2. 西山市三 (1961). 細胞遺伝学研究法 (西山市三編). 東京. pp. 48, 180.
3. 角名郁郎・松浦一穂・北村吉覇・碓井義郎 (1967). 日植病報 33: 132-137.
4. 瀧元清透 (1958). 微生物学および植物病理学実験法. 東京. pp. 198-199.
5. Yanagita, T. and Yamagishi, S. (1958). Appl. Microbiol. 6: 375-381.

1. Matsuura, K. (1965). Ann. Rept. Takeda