

植物防疫基礎講座

植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(12)

モモせん孔細菌病菌・カンキツかいよう病菌・ キウイフルーツかいよう病菌

福島県果樹試験場 お 尾 小
農林水産省果樹試験場興津支場
がた 形 いずみ 泉
めい 銘
ただし 正 さく 册

——モモせん孔細菌病菌——

は じ め に

モモでは、リングやナシなど他の果樹とは異なり、病害に対する品種の感受性に違いが認められないことが多い。ため、耐病性品種によって被害軽減を図ることは現状では難しい。モモに発生するせん孔細菌病は、産地を形成する上できわめて影響の大きい病害であり、本病を克服できなければ産地化は困難であるといってもよい。

モモせん孔細菌病の病原菌は *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (SMITH) DYE であるとされていたが、高梨 (1985) はこのほかに *Erwinia nigrifluense* WILSON, STARR and BERGER と *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* VAN HALL の 2 種も病原性を有しており、区別し難い病徴を呈するとし、これら 3 種の病原細菌が関与すると報告している。また本病原細菌はモモだけではなく、他の核果類にも寄生し、モモ、ニホンズモモ、アンズが共通宿主になりうる。

本病は難防除病害であるといわれているが、この最大の理由は、本病に対して有効な防除薬剤がないことによる。本病の防除には開花前または収穫後にボルドー液や無機銅剤が使用されるが、これらは生育期には銅による薬害を生ずるため使用できない。このため生育期には硫酸亜鉛石灰液、ジチアノン剤、ジラム・チウラム剤、ストレプトマイシン剤 (SM)、テラマイシン剤 (TM) または SM と TM の混合剤に農薬登録があり使用される。なかでも本病原細菌に対する殺菌効果は、抗生物質である SM や TM が優れている。しかし、SM についてはモモせん孔細菌病で 1970 年代後半にはすでに耐性菌の存在が報告されており (1979)、福島果試の調査では、TM についても耐性菌と考えられる菌株の存在が認められている (1987) (図-1)。

Methods for Monitoring Fungicide Resistance—Peach bacterial shot-hole (*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*), Citrus canker (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) and Bacterial canker of Kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*).
By Tadashi OGATA and Meisaku KOIZUMI

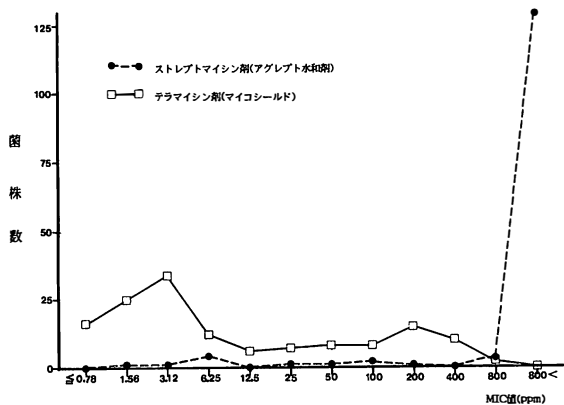


図-1 モモせん孔細菌病菌に対する抗生物質剤の MIC 値の頻度分布 (福島果試, 1987)

福島県においては SM による防除効果の低下が指摘されるとともに、1987 年、高頻度に耐性菌出現の実態が明らかになったため、その後、同薬剤を県の病害虫防除基準から削除した経緯がある。本病原細菌の抗生物質に対する感受性についてモニタリングした例は非常に少ないが、本稿では *in vitro* における抗生物質感受性の検定法について解説したい。

I 検定用材料の調整

1 病原細菌のサンプリング法

モモせん孔細菌病は枝、葉及び果実に発生する。枝では春先から前年生育した越冬枝上に形成される春型枝病斑と、生育中の新梢上に形成される夏型枝病斑がある。いずれからでも病原細菌の分離は可能であるが、耐性菌分布のモニタリングのためには、新梢における罹病葉から採取するのが容易で、必要な菌株数も得られやすい。

2 病原細菌の分離方法

採取した罹病葉から分離する場合、材料はできるだけ被害初期の新鮮なものを供試する。また 1 葉から 1 病斑を原則として病斑部を切り取り、切片を 70% エタノールで数秒、2% アンチホルミン液で 2、3 分間表面殺菌、続いて殺菌水で十分洗浄し、ブドウ糖加用ジャガイモ寒天

培地 (PDA) 平板上に置き、25℃で培養して発育した菌叢の一部を PDA 斜面培地に移植する。

II 薬剤感受性の検定方法

本病原細菌の薬剤に対する感受性を検定する方法としては、細菌の増殖を測定する方法は行われず、もっぱら対象薬剤の濃度を変えて、菌叢の生育状況によって最小生育阻止濃度 (MIC) を求める方法が用いられる。ここでは、固体培地希釈法 (画線塗抹法) と水平拡散法 (阻止円法) について解説したい。

1 検定培地と作製上の留意点

培地の組成と pH が薬剤感受性に及ぼす影響は大きいと考えられる。本病のように細菌が対象となる場合には pH 7 で薬剤感受性が高くなるので、特殊な場合を除いて pH 6.8~7.2 に調整する必要がある。モモセン孔細菌病菌の SM に対する耐性菌検定において、落合ら (1979) は PDA 培地を用い、高梨ら (1979) はトリプトソイブイオン (栄研) に寒天 2% を加用したものをを用いている。このほか、日本化学療法学会では MIC 測定用として、Mueller-Hinton broth (Difco) が採用されている (1981)。一連の実験を継続している間は同一材料が使用可能である必要があり、試験時期を隔てて反復する場合には、同一製品の同一ロットの感受性検定用培地を使用することが、実験誤差を少なくする意味から重要である。

(1) 画線塗抹法

寒天平板の作製に当たって、供試薬剤を検定培地に加える場合は、培地の温度が 45~50℃前後のなるべく有効成分の分解等のない条件下で、最終濃度の 10 倍濃度の液を 9 倍量の培地に添加し、十分かくはんしてシャーレに流し込む。

(2) 阻止円法

この方法を用いる場合、平板は常に水平に保ち、種層の菌数を均一に保つ必要がある。検定用平板の厚さも 2 mm 程度になるよう一定にする。

2 供試薬剤と濃度

薬剤に対する感受性のみを検定する場合には、その薬剤の純品を殺菌水で所定濃度に溶解、希釈して用いるが、対象とする薬剤が水溶性とは限らないので、水中で懸濁が容易な製剤を用いたほうがよい場合もある。この場合には目的とする主成分だけではなく、副成分の影響も同時にみることになるので、成績書には供試薬剤の剤型について記載する必要がある。

供試濃度は有効成分で 100 ppm ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を最高として、2 倍段階希釈法により殺菌水で希釈して調整する。すなわち 100, 50, 25, 12.5, 6.25, ……と希釈し、対照と

して 0 ppm も必ず用意する。また 100 ppm 以上の濃度を使用する場合は、200, 400, 800, 1600 ppm とする。抗生物質のように力価として unit を用いる場合でも ppm を使用する。

3 検定方法

画線塗抹法と阻止円法のいずれを用いた場合にも、薬剤感受性に関する結果に違いがないが、3 回以上の反復試験が必要である。また、菌を分離培養後、長期間保存してある場合には、少なくとも 1 回以上継代培養し、培養直後の菌を使用する。

(1) 画線塗抹法

供試薬剤を所定の濃度に調整した検定用培地に、分離した菌株を白金耳にて画線塗抹するが、菌の突然変異の影響を少なくするために菌液は $10^6/\text{ml}$ 程度に調整するのが望ましい。細菌数の定量にはいろいろな方法が開発されているが、これに関する記述はここでは割愛させていただく。

標準のニクロム線ループ (内径 1 mm 前後) は市販されているが、 $10^6/\text{ml}$ の菌液をこの標準ループで 1 スポット接種した場合、約 2,000 個の細菌が接種されることになる。この場合 mutant の出現は極めて低い確率である。1 白金耳ずつ約 2 cm の長さに画線塗抹するが、1 枚のシャーレで 10 菌株程度は同時に画線塗抹が可能である。その後 25℃で 24~48 時間インキュベートし、菌叢の発育状況により MIC 値を求める。

(2) 阻止円法

本法は薬剤の抗菌力を定量化することに優れている。本法ではステンレス製円筒 (日本抗生物質学術協議会規格、外径 8 mm、内径 6 mm、高さ 10 mm) を用いるカップ法や、汚紙円盤 (市販の抗生物質検定用ペーパーディスク、直径 8 mm または 6 mm、厚さ 1.5 mm または 0.7 mm) を用いるペーパーディスク法などがある。いずれも同一平板内で薬剤間の比較を行うには便利な方法といえるが、1 シャーレで 1 菌株しか検定できない欠点がある。この中では後者のほうが実験操作が簡便であり、試料水溶液中の有機溶媒の高い濃度にも耐え得る利点がある (梅澤, 1955) ので、以後、ペーパーディスク法について説明する。

検定用培地に細菌浮遊液 ($10^6/\text{ml}$) を 9:1 の割合で加えて、泡のできないように軽く振りながら均一に混ぜてシャーレに流し込み、厚さ 2 mm 程度の平板を作製する。一方、所定濃度になるように調整した各供試薬剤の液に数分間浸漬したペーパーディスクは、別の殺菌汚紙で余分な薬液を吸い取り、あらかじめ作製した検定用平板上に適当な間隔で置床し、25℃で 24~48 時間インキュ

ベートする。なお大量の試料を同時に検定する場合には、シャーレの代わりにバットなどを利用する場合もある。また SM について検定する場合には問題はないが、薬剤によっては検定用平板の寒天中における拡散が悪いために、阻止円形成に影響する場合がある。このような場合には平板を薄くしたり、場合によってはペーパーディスクを検定用平板に置床する直前に、メタノールあるいはジメチルスルホキシドとの 1:1 混合溶媒を 30~40 μ l シリンジで加えて、あらかじめ濾紙に吸着した試料を溶解させると感度が高まる (小林・小清水, 1981)。

4 検定結果の判定と留意点

(1) 画線塗抹法

菌の発育が完全に阻止された最低濃度をもって MIC 値とする。シャーレ 1 枚当たりの集落が 5 個以内の場合、それらは変異菌 (Variant) であって、全体としては発育が阻止されたとみなしてもよい。しかし、小さな集落が多数認められる場合には、これらを耐性菌と判断する。

(2) 阻止円法

阻止円の形成の有無及び阻止円の大小や鮮明さによって薬剤感受性を判定する。阻止円は縦横 2 方向の直径を測定して平均値を求める。対象とする薬剤に対して感受性の菌であれば、感受性の程度に比例して大きな阻止円が形成され、耐性菌であれば阻止円は形成されない。

引 用 文 献

- 1) Chemotherapy (1981): 29 (1): 76~79.
- 2) 小林昭雄, 小清水弘一 (1981): 農薬実験法 (殺菌剤編) ソフトサイエンス社: 394.
- 3) 落合政文ら (1979): 昭和 53 年度落葉果樹に関する試験研究打ち合わせ会議資料: 176~177.
- 4) 桜井 寿 (1975): 植物防疫 29 (5): 206~212.
- 5) 昭和 62 年度福島県果樹試験場業務報告 (1987): 150~151.
- 6) 高梨和雄 (1985): 植物防疫 39 (2): 57~60.
- 7) ———ら (1979): 昭和 53 年度落葉果樹に関する試験研究打ち合わせ会議資料: 180~181.
- 8) 梅澤純夫 (1955): 抗菌性物質, 培風館: 178.

(尾形 正)

——カンキツかいよう病菌・ キウイフルーツかいよう病菌——

は じ め に

カンキツかいよう病は *Xanthomonas campestris* pv. *citri* によって起こり、その防除には無機銅剤が使われている。我が国ではストレプトマイシン剤及びカスガマイシン銅製剤も使われる。無機銅剤については現在まで、効果の減退は認められていない。ストレプトマイシンの

場合、1 年に 3 回ずつ連用した園で、2 年目、通算 6 回散布後に耐性菌の比率が増加した。しかし、3 年目でも防除効果の減退は明らかではなかった (小泉・山田, 1972)。1979 年、長崎県下 3 か所から病原菌を分離してストレプトマイシン及びオキシテトラサイクリン感受性を調べた結果、ストレプトマイシン常用地区から同薬剤に強い耐性を示す分離株が見いだされた (小泉, 未発表)。

キウイフルーツかいよう病は *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* によって起こる。防除にはカンキツかいよう病とほぼ同様な薬剤が用いられているが、主な被害部位が枝幹部であることから、抗生物質の主幹部注入も行われた。ストレプトマイシン及びカスガマイシン処理区から採取した菌株の中には、それぞれに対する耐性菌が認められた (牛山, 1993)。一方、本菌には銅剤に対して耐性を示す系統もあり、その性質はプラスミド依存性であることが明らかにされた (後藤・藤田, 1992)。

植物病原細菌の中では、アメリカやメキシコでトウガラシやトマトの斑点病を起こす *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* が、銅剤及びストレプトマイシン剤に対して耐性を発達させ、問題になっている (RICHIE and DITTAPONGPITCH, 1991)。また、これら耐性に関する遺伝子はプラスミドにコードされている。したがって、わが国においても銅剤の連用によって圃場において耐性の発達する可能性がある。

I 病原細菌の分離、培養、保存

1 カンキツかいよう病菌

培地: *Xanthomonas* 属細菌の培養には GYCA 培地 (1% (W/V) D-glucose, 0.5% 酵母エキス, 3% CaCO₃, 2% 寒天) が最も広く使われている。ほかに、GPPYA 培地 (1% D-glucose, 0.5% proteose peptone, 0.5% 酵母エキス, 2% 寒天) や、SPA 培地 (2% sucrose, 0.5% proteose peptone, 0.05% K₂HPO₄, 0.025% MgSO₄, 1.5% 寒天) 等も用いられる。いずれも pH は 7.0 に調整する。

分離法: 分離に用いる組織は、できるだけ新鮮な病斑が望ましい。古い病斑には雑菌が多いため、病原細菌を分離するのは難しい。古い病組織を使う場合、少量の滅菌水とともに磨砕後、ナツミカンの新葉などに穿刺接種し、あるいは懸濁液の上清を取って着生葉に葉肉注射接種し、1~2 週間後に形成された新しい病組織から分離するほうがよい。

このような病斑の水浸状部分を切り取り、少量の滅菌水とともに乳鉢で磨砕、滅菌水で段階希釈する。ペトリ皿中の GYCA 平面培地に 1 滴置き、滅菌したガラス棒

で拡げた後、28°Cに保つ。培養3日後に観察し、小型、単生のコロニーで黄色色素を産生、多糖質で表面が平滑・凸面、周縁も平滑なものを選び、白金線でかき取って斜面培地に画線する。1試料から少なくとも3コロニーを選び分離株を得る。

病原性の確認：斜面培地より1白金耳かき取り、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁する。ナツミカン（オレンジでもよい、ただしウンシュウミカンは不可）の新葉（発芽後約1か月）を葉柄を付けて切り取り、針で穿刺した後に先の懸濁液を脱脂綿で塗り、温室中で葉柄を水に漬け、全体をポリエチレン袋で覆って28°Cの暗黒条件に保つ。病原菌の場合には5～6日目ごろから接種部が白く盛り上がり、透過光でみると傷の周辺部に鮮明な輪郭を持った病変組織が認められる。

保存：常時使う場合には、斜面培地を5°Cの冷蔵庫に保ち、月1回、新しい培地に移植すればよい。長期保存には、真空凍結乾燥か乾燥がよい。流動パラフィンで封入したものは、病原性の変異が起こりやすい。

2 キウイフルーツかいよう病菌

培地：*Pseudomonas* 属細菌の分離には緑色蛍光色素の産生を調べるためにキングB培地が用いられるが、キウイフルーツかいよう病菌には本色色素を産生しないものがあるため、普通寒天培地（0.5%肉エキス、1%proteose peptone、0.25%NaCl、1%glucose、1.5%寒天、pH7.0）でよい。牛山（1993）はPPGA（ジャガイモ・ペプトン・グルコース・寒天）培地を用いた。

分離法：春先、2月ごろに枝幹部の皮目、枝分岐部あるいは切り口から溢出する白濁菌液を直接採取し、滅菌水で段階希釈して平板培地に塗り付け、培養する。溢液が褐色になった場合には雑菌が多く、分離は難しい。枝幹部から直接分離するには、病組織の皮層部を切り取り、ベトリ皿中で軽くエタノールで表面消毒する。葉の病斑は、径2～3mmで不整形、褐色斑点で周囲に黄色のかさを持った新鮮な病斑を選び、エタノールで軽く表面消毒する。これらの小片を少量の滅菌水中で磨砕、その1白金耳を取って前記と同様、平板培地に塗り付け、培養する。培養温度は15～25°Cとし、24～48時間後にコロニーを観察、単生、白色で多糖質、表面が凸面で平滑、周縁が丸く平滑なものを選び、白金耳でかき取って斜面培地取る。1試料から少なくとも3集落ずつ分離株を得る。病原細菌の長期保存は真空凍結乾燥か乾燥で行う。

病原性の確認：培養24～48時間の新鮮な細菌を生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水に懸濁（コロニー形成数（cfu）で 10^8 /ml）、あらかじめ用意したキウイフルーツ実生苗の若葉に針で穿刺し、懸濁液を滴下、2個のゴ

ム栓で滴下部分を軽く圧迫して接種後、48時間、ポリエチレン袋で覆い、ガラス室内に保つ。発病適温は15°C、発病限界温度は28°Cである。適温では7日後に発病する。

II 感受性検定法

1 生育阻止円法

滅菌ベトリ皿中にそれぞれ前記の寒天培地10mlを流し込み、固化させる。次いで培養24～48時間の新鮮な病原細菌懸濁液（滅菌水で 1×10^8 cfu/mlに調整：分光光度計を用い波長540nm光の透過率70%がほぼ、これにあたる）0.1mlを平面培地に滴下、滅菌ガラス棒で培地一面に拡げ、表面を乾かす。

供試薬剤はあらかじめ滅菌水で1,000ないし1,500mg/lに溶解する。完全に溶けない場合には適当な溶媒を用いて溶かす。銅剤ではpHを7.0以下にすれば溶ける。完全に溶けたら滅菌水で段階希釈する。検定用汚紙円板（直径1.27cm）に希釈液0.1mlを吸収させ、風乾する。1枚の平板培地に3枚ずつ、先に用意した薬剤吸着汚紙円板を置き、ガラス棒で表面をよく押さえる。そして、培養適温に2日間保ち、円板の周囲に現れた阻止円の直径を測定する。対照には薬剤を含まない滅菌水を用いる。

2 殺菌率調査法

滅菌試験管中に供試薬剤の滅菌水による段階希釈液を作る。一方、培養24～48時間の病原細菌懸濁液（ 1×10^8 cfu/ml）を用意する。滅菌試験管に薬剤希釈液を1ml、細菌懸濁液を1ml取り、混合する。対照には滅菌水を用いる。室温で2時間保った後、あらかじめ用意したベトリ皿中の平板培地に前記混合液0.1mlを滴下し、培地全面に拡げて培養適温に保つ。各区少なくとも3反復とする。2日後、培地に形成されたコロニー数を計数する。この方法では耐性菌と感受性菌の比率がわかる。

カンキツかいよう病菌の場合、この混合液をナツミカン切り取り葉に穿刺接種し、その発病率から生存している病原細菌数を算出して耐性菌の濃度を推定した（小泉、1972）。

3 留意点

薬剤耐性を示した菌株は、再度、病原性を調べておく。

参 考 文 献

- 1) 後藤正夫・藤田陽子（1992）：日植病報 58：103～104（講要）。
- 2) 小泉銘冊・山田峻一（1972）：園試報 B 12：245～256。
- 3) RITCHIE, D. F. and V. DITTAPONGPITCH（1991）：Plant Dis. 75：733～736。
- 4) 牛山欽司（1993）：神奈川県園試報 43：1～73。

（小泉銘冊）