

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(16)

カンキツ青かび病菌・緑かび病菌，ブドウ灰色かび病菌

静岡県中部病害虫防除所 と がわ まさ ゆき  
外 側 正 之  
 秋田県果樹試験場天王分場 ふ か ま こ  
深 谷 ま 子

——カンキツ青かび病菌・緑かび病菌——

はじめに

青かび病(病原菌：*Penicillium italicum*)，緑かび病(*P. digitatum*)はカンキツにおける貯蔵病害の中で最も被害が大きい。これらの病原菌が，各種薬剤に対して耐性となりやすいことは，諸外国でも報告されており，今までにSOPP，ピフェニール，2-アミノブタン及び本稿で取り上げるベンゾイミダゾール系薬剤(チアベンダゾール，ベノミルなど)で耐性菌が知られている(深見ら，1983)。

わが国では，諸外国とは異なり，収穫後の果実への薬剤処理は行っていないが，ベンゾイミダゾール系薬剤の収穫前立木散布は，1971年以降広く行われている。わが国における，ベンゾイミダゾール系薬剤耐性青かび，緑

かび病菌は1974年に静岡，神奈川の両県で初めて確認されて以来，各地で検出，報告されている。その1例を表-1に示すが，菌の分離法を含めて耐性の検定方法が統一されていないため，試験結果の解釈や比較が容易ではなく，十分にデータが生かされていない。そこで，平成5年度の果樹課題別研究会での討議も踏まえ，現時点で妥当と考えられる耐性の検定方法について以下に述べる。

I 検 定 方 法

1 菌の分離方法

(1) 果実の採集

薬剤散布後に発病した果実に由来する菌は，薬剤による淘汰を受けた後に残った菌である可能性が大きい。したがって，こうした菌を調査に用いた場合，耐性菌の比率は必然的に高くなるので，調査年度の耐性菌の発生状況を代表しているとは言い難い。また，本来は薬剤散布

表-1 静岡県における耐性菌分布の年次別調査結果(静岡県柑橘試験場，1992)\*)

調査年月	調査地区	分離菌株数	耐性菌株数			
			Th-M <sup>a)</sup>		Benomyl <sup>b)</sup>	
			1~5ppm <sup>c)</sup>	350ppm	1ppm	83ppm
1975.10	西部防除所管内	22	0	0	0	0
1976.10	〃	25	0	0	0	0
1977.10	〃	22	0	0	0	0
1988.12 <sup>d)</sup>	〃	33	30	11	—	—
1989.11	〃	32	25	5	—	—
1990.12	〃(都田)	20	20	2	—	—
〃	中部防除所管内	22	22	0	—	—
1991.11	〃	13	13	4	—	—
〃	東部防除所管内	20	20	1	—	—
1992.12	東部防除所管内	31	26	14	—	—
〃	中部防除所管内	20	8	2	—	—

a) チオファネートメチル水和剤

b) ベノミル水和剤

c) 1975年は有効成分2ppm，1976~1989年は1ppm，1990年・1991年は2.5ppm，1992年は5ppmで検定した。

d) 1988年は腐敗防止剤散布後の果実から菌を分離・検定した。

\*) 静岡県柑橘試験場編：平成4年度果樹に関する試験成績書(病害虫・発生予察編)，31~32，より引用

後に残った耐性菌の次年度以降における蓄積についても考慮すべきではあるが、青かび病菌・緑かび病菌の年度を越えた生存についてはいまだに不明の点が多い。以上のことから、ここでは調査年度に限った場合の検定について記すこととし、薬剤散布前の果実を採集するようにする。次に、地上に落ちている果実は *Rhizopus* 等の生育の速い藻菌類が付着していることが多く、青かび病菌、緑かび病菌の分離に支障を来たしやすいため、なるべく樹上の発病果実を採集する。発病果実には多量の孢子が付着しているため、手に孢子がつかないように注意しながらビニル1袋に発病果実を1個ずつ入れて持ち帰る。

## (2) 菌の分離

発病果実は、外見上1種類の *Penicillium* 属菌のみが感染しているようであっても、実際には複数の *Penicillium* 属菌が分離されてくることが多い。特に、まだ果汁を沢山含んだ柔らかい果実ではこの傾向が大きい。したがって、果実上の孢子を直接、保存用培地に移植することは避けるべきである。果実上の孢子はまず滅菌した白金耳でかき取って、滅菌水中に移す。*Penicillium* 属菌の孢子は撓水性に富み、そのままでは水面に浮遊するので、Tween 20 を数滴加え、水中に均一に懸濁させる。この懸濁液を1白金耳取り、ストレプトマイシン、クロラムフェニコールといった細菌用抗生物質を加えた PDA 培地上で荒く画線培養する。糸状菌の場合、細かく画線すると単コロニーを得るのが難しくなる。28°C で 24~36 時間培養後、単コロニーを保存用培地に移植する。培養時間が長すぎると他のコロニー由来の孢子に汚染される場合があるので、遅くとも 48 時間以内にこの作業に移る。接近したコロニーから釣菌する場合には、ルーペ等で単一コロニーに由来する菌糸部分を確認してからその部分を移植する。

## 2 検定方法

### (1) 検定用培地の調製

PDA または PSA 培地に、所定の濃度になるように薬剤を加えるが、チオファネートメチルは培地と混ぜた後オートクレーブ処理(5分程度)することが望ましい。これは水に加えただけでは実際の作用成分である MBC への変換が不十分なため、オートクレーブ処理によって MBC への変換がほぼ完全に行われる。これに対して、ペノミルは水中で速やかに MBC に変換するため、オートクレーブ処理の有無による菌糸伸長抑制効果に差はほとんど認められない(宮本ら, 1983)。また、オートクレーブ処理の有無によって、特に中等度耐性菌の検定結果に差が出るというデータもある(安達喜——私信)。したがって、検定結果の記載とあわせて薬剤のオートクレーブ

処理の有無を記すなどの工夫が必要であろう。

チオファネートメチルを用いた場合、その抗菌活性が培地の pH の影響を大きく受けるとする説と、あまり影響を受けないとする説がある。どちらが適切かを明確にしたデータは現在ないが、薬剤の濃度以外の条件が試験ごとに異なるのは望ましくないため、筆者は Difco 社製の PDA を用いている。この場合、オートクレーブ後の培地の pH は  $5.6 \pm 0.2$  となる。

### (2) 供試菌の移植と培養

直径 9 cm のシャーレ 1 枚で、通常 7~10 菌株の耐性検定が可能である。しかし、*Penicillium* 属菌は孢子の形成・飛散が急速なので、コンタミネーションを起こしやすく、判定を誤りやすい。しかし、1 菌株につき 1 枚使用するのでは膨大な数のシャーレが必要となる。

そこで、4 区画に区切られたシャーレを使用し、各区画に異なる濃度の薬剤を添加した PDA を流し込む。こうすれば、8 濃度で調べてもシャーレは 1 菌株当たり 2 枚で済む。さらに、仮に孢子が形成されて飛散しても、1 枚のシャーレ内には同一の菌株しか培養されていないので、他の菌株の判定に混乱を生じることもない。なお、ベクトンディッキンソン社製の使い捨てシャーレは各区画に I~IV まで数字が刻印されていて使いやすい。

濃度については、感受性菌と耐性菌の区別が  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  における菌糸生育の有無で判別可能とする点は倉本(1981)、宮本ら(1983)ともに一致する。より高い濃度については、 $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上で生育する高度耐性菌以外に、中等度耐性菌が見られるが、その耐性程度は報告によって異なり一定していない。したがって、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  と  $1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$  における検定は必ず行う必要があるが、その間の検定濃度について、現時点ではその時々の方力や時間に応じて判断すべきものと考えられる。今後、中等度耐性菌についての調査が進み、検定濃度を統一することが望まれる。

培地が固まったら、純粋培養上の孢子をそのまま移すのではなく、Tween 20 を数滴(滅菌水 10 ml 当たり 4~5 白金耳量)加えた孢子懸濁液(滅菌水 10 ml あたり孢子を 1 白金耳量)の 1 白金耳量を画線する。次いで、28°C で 60~72 時間培養後、菌の生育を観察する。

やむを得ず、1 枚のシャーレで複数の菌株を培養する際には、孢子の形成・飛散を防ぐ工夫が必要となる。この場合、培養は暗黒下で 2 日程度とする。培養期間が長すぎると、幾つかの菌株が孢子を形成・飛散させることがあるため望ましくない。また、暗黒条件は孢子の形成をある程度抑える。

### (3) 判定

菌糸の生育程度から、薬剤のMAC(最大生育許容濃度、対照の薬剤無添加区と同程度に菌の生育が認められる最高濃度)またはMIC(最小生育阻止濃度、コロニーの生育が認められなくなる最小の濃度)を求めるが、MICの場合、画線する孢子濃度が高いと微小なコロニーが数～十個程度出現して判定を混乱させる。そこでこれを防ぐためには、(2)で述べた孢子濃度を守ることが必要となる。

## II 問題点

青かび病菌や緑かび病菌の耐性検定で問題になる点は、既述したように検定法が統一されていないことに加え、耐性菌の検出率と薬剤の防除効果との関連が明らかになっていない点が挙げられる。今後、こうした問題点の解決が望まれる。

### 参考文献

- 1) 深見順一ら編(1983): 薬剤抵抗性—新しい農薬開発と総合防除の指針, ソフトサイエンス社, 東京, 223~225.
- 2) 倉本孟(1981): 果樹試報 B 8: 69~138.
- 3) 宮本久美ら(1983): 和歌山県果樹園芸試験場研究報告 7: 51~65.
- 4) 静岡県柑橘試験場編: 平成4年度果樹に関する試験成績書(病害虫・発生予察編), 31~32.

(外側正之)

## —ブドウ灰色かび病菌—

### はじめに

現在、果樹の灰色かび病には種々の登録薬剤がある。その中でベンズイミダゾール系薬剤及びジカルボキシイミド系薬剤では耐性菌の出現により、防除効果が低下し問題となっている。ベンズイミダゾール系薬剤耐性灰色かび病菌はブドウ、ウメ、カンキツ、カキ及びキウイフルーツで、またジカルボキシイミド系薬剤耐性灰色かび病菌はブドウ、カンキツ、カキ、及びウメでの発生が報告されている。

わが国のブドウにおけるベンズイミダゾール系薬剤耐性菌は、野菜類(山本, 1975; 竹内, 1976)より数年遅れて1970年代後半に出現し(深谷ら, 1979)、以来その代替薬剤として主にジカルボキシイミド系薬剤が使用されてきた。しかし近年、一部の地域で本剤の効力低下が見られるようになり、今後さらに耐性菌発生の拡大が懸念される。1993年からはジエトフェンカルブとチオファネートメチルの混合剤も防除薬剤に取り入れられているが、本剤についてはすでに野菜類で耐性菌の出現が報告

されており(野村・小林, 1990)、その使用方法についても十分な注意が必要である。

ここでは、著者がこれまで行ってきたベンズイミダゾール及びジカルボキシイミド系薬剤に対するブドウ灰色かび病菌の感受性検定法と、検定用標本の採集方法等について紹介したい。

なお、野菜類灰色かび病菌の薬剤耐性検定法については、既に木曾(1994)が詳しく述べている。ブドウ灰色かび病菌の検定法についても基本的には野菜類灰色かび病菌の方法と同じであるので本紙第48巻第1号を参照されたい。

### I 検定用標本の採集方法

耐性菌の混在率は樹園地ごとに異なる場合が多いので、地域を対象とした耐性菌調査は、抽出した樹園地ごとに標本数を一定にする必要がある。さらに、採集する樹が一か所に偏らないように樹園地内全体から標本を採集する。採集する樹が近いと伝染源が同一の場合があるので注意する。

本病は開花期頃から葉や花穂に発生するので、この時期に材料を採集すると新鮮な病斑を得ることができる。落花後には発病した花蕾や支梗は、房から離脱しやすくなるので、採集する果房の直下に受け皿になるものを置いて切り取るとよい。葉に発生している場合は、これを採集する。後に孢子を再形成させる時に、花穂よりも葉のほうが扱いやすいためである。

### II 菌の分離方法

発病花穂または葉の被害部を流水で洗い、ろ紙等で水滴を取る。病斑部に水滴が付いていると分生孢子の形成が抑えられるので注意する。これを、3~4日間湿室に置き、新たに形成された分生孢子を単孢子分離する。一つの病斑は同一の菌株に由来するとみなし、一病斑一菌株として単孢子分離して検定に使用する。また病斑部からかき取った孢子塊を素寒天培地上に接種し、生育した菌叢の先端から単菌糸分離した菌株を検定してもよい。

なお、簡易検定を行う場合には病斑上で再形成させた分生孢子を直接検定してもよい。この場合には形成間もない新鮮な孢子を使用する。

### III 検定方法

#### 1 平板希釈法

(1) ベンズイミダゾール系薬剤について

市販のチオファネートメチル70%水和剤かベノミル50%水和剤を用いる。両剤間では交差耐性が認められる

のでいずれか一つの薬剤で検定する。

1) 検定用培地の調製：ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 培地に薬剤を有効成分が  $3,200 \mu\text{g/ml}$  から  $0.19 \mu\text{g/ml}$  までになるように 2 倍段階希釈して添加した平板を作製する。対照として薬剤無添加区を設ける。

2) 検定操作：各菌株を PDA 平板培地で  $20^\circ\text{C}$ 、3~4 日間前培養した後、菌叢の周縁部をコルクボーラー (径 4 mm) で打ちぬいたディスクを、菌叢面が培地に接するように置床する。次いで、これを  $20^\circ\text{C}$  で 48 時間培養する。

### 3) 耐性菌の判定方法

(i) 最小生育阻止濃度 (MIC) による判定：48 時間培養後、各濃度における菌叢の新たな生育の有無を調べ、菌糸がまったく伸びなくなる濃度を求める。これまでの著者の検定結果では、ブドウ灰色かび病菌の本剤に対する感受性値の頻度分布曲線は図-1 に示すように 2 峰性となり、MIC 値が  $800 \mu\text{g/ml}$  以上の菌群に属する菌株を耐性菌、 $12.5 \mu\text{g/ml}$  以下の菌群に属する菌株を感受性菌とみなした。

しかし、灰色かび病菌は生育が速く、時間の経過とともに薬剤添加培地上で菌糸が僅かに生育し、時には MIC の判定に苦慮する場合があるので培養時間が長くないように注意する。

(ii)  $\text{EC}_{50}$  による判定：本菌の厳密な耐性検定は MIC よりも  $\text{EC}_{50}$  (50% 生育阻止濃度) による方がよい。これは、MIC がともすれば遠観的な判定となるのに対し、 $\text{EC}_{50}$  は定量的に判定できるためである。すなわち、菌叢の直径を測定し、薬剤無添加培地上での菌叢生育量に対する各薬剤添加培地上での菌叢の生育比を算出し、

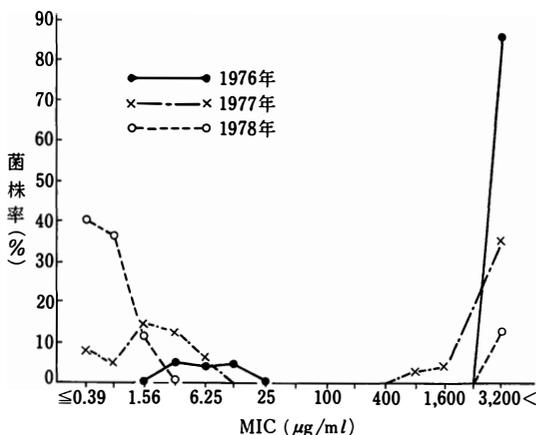


図-1 ブドウ灰色かび病菌のチオファネートメチル剤に対する感受性の頻度分布曲線 (深谷ら, 1979)

$\text{EC}_{50}$  を求める。わが国で検出される耐性菌のほとんどは、 $\text{EC}_{50}$  が  $100 \mu\text{g/ml}$  以上の強 (高度) 耐性菌であるが、 $\text{EC}_{50}$  が  $5\sim 10 \mu\text{g/ml}$  の弱 (中等度) 耐性菌が検出されることもある。また感受性菌に対する薬剤の  $\text{EC}_{50}$  は  $1 \mu\text{g/ml}$  以下である。

### (2) ジカルボキシイミド系薬剤について

1) 培地の調製と検定方法：市販のイプロジオン 50% 水和剤、ピンクロゾリン 50% 水和剤またはプロシミドン 50% 水和剤を用いる。これらの薬剤間でも交差耐性が認められるのでいずれか一つの薬剤を使用すればよい。ただしイプロジオン剤に対して菌は特異な生育 (ポリモーダル生育) を示す (木曾ら, 1982) ので注意が必要である。薬剤を有効成分濃度が 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50,  $100 \mu\text{g/ml}$  となるように PDA 培地に添加して検定用培地を作製する。この場合、PDA 培地をオートクレーブで滅菌処理した後、殺菌水に懸濁した薬液を添加する。その他の検定操作はベンズイミダゾール剤と同様である。

2) 耐性の判定方法：本剤においても耐性菌と感受性菌の判別は MIC よりも  $\text{EC}_{50}$  によるのが望ましい。

$\text{EC}_{50}$  が  $1 \mu\text{g/ml}$  以下のものを感受性菌、 $3\sim 10 \mu\text{g/ml}$  を弱耐性菌、 $100 \mu\text{g/ml}$  以上を強耐性菌と判定する。

### 2 簡易検定法

簡易な検定法については、これまでいくつかの報告がある (竹内, 1987; 田中・木曾, 1991)。ここでは王・深谷の検定法 (1989) について紹介する。本検定法に供試した菌株は著者が 1985 年に秋田県のブドウ栽培圃場から採集し、平板希釈法によりベンズイミダゾール感受性を検定したものである。この菌株の菌叢をナスの果実に接種して得られた分生胞子を直接検定に供しているが、実際の検定に当たっては、ブドウの花穂や葉の病斑上に形成された分生胞子を使用してもさしつかえない。

培養基はシヨ糖加用ジャガイモ煎汁寒天 (PSA) 培地で、寒天及びシヨ糖を各々 1% 加え、 $\text{pH}4.0$  に調整したものである。これにチオファネートメチル製剤を有効成分で  $200 \mu\text{g/ml}$  になるように加えた平板を作製する。

この平板上に病斑上の分生胞子を直接塗抹し、 $20^\circ\text{C}$  で 22 時間培養したのち検鏡する。この際、発芽して  $200 \mu\text{m}$  以上の菌糸を伸長させた分生胞子が存在する場合は、その菌株を耐性菌と判定する (表-1)。また、発芽しなかったり、発芽しても発芽管の形態が異常でその後の生育を停止するものを感受性菌とする。

本検定にあたっては次のことに注意する必要がある。早期に培地の  $\text{pH}$  を調整すると加熱により固化が阻害されるので、培地をペトリ皿に注入する直前に行う。 $\text{pH}$  の

表-1 ブドウ灰色かび病菌株の最長菌糸長が200 μm以上となるのを抑制するチオファネートメチルの最低濃度 (MIC200 μm) と最小生育阻止濃度 (MIC) の頻度分布

(王・深谷, 1989)

MIC (200 μm)	MIC						合計
	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	
12.5							
25	20						20
50	2	5	3				10
100	2	7	4				13
200						6	6
400<						6	6
μg/ml							
合計	24	12	7			12	55

注) ナスの果実に菌叢を接種して形成させた分生胞子を供試。

\* : 表中の数字は菌株数を示す。

調整はPSA培地100 mlに対して5%乳酸溶液を1.5 ml添加して行う。供試する分生胞子は前述した要領で再形成させた新鮮なものを使用する。

病斑上の分生胞子を直接使用する場合は雑菌の混入を避けられない場合がある。しかし、本検定では培地をpH4.0に調整することで細菌の繁殖を抑え、また、培養時間を22時間とすることによって、他の糸状菌が混入しても識別が可能なことから無菌的操作を必要としない。

なお細菌の繁殖を抑えるには、ストレプトマイシン硫酸塩200~300 μg/ml添加培地で検定する方法もある。

#### IV 圃場における薬剤の防除効果

ベンズイミダゾール系薬剤耐性菌が出現している圃場において各種薬剤の防除効果を検討した結果を表-2に示した。(深谷, 未発表)。この圃場での同剤耐性菌の検出割合は1988年には94.9%,1991年から93年の各年は約80%であり、チオファネートメチル剤の防除価は低く効果が認められなかった。しかし、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル剤散布区では高い防除価が得られた。また、イプロジオン剤は1992年までは効果が高かったが、1993年にはやや劣る傾向が見られた。そこで同剤に対する菌の感受性検定を行った結果、EC<sub>50</sub>が3~5 μg/mlの弱耐性菌が6.9%検出され(図-2)、本剤に対する感受性の低下が徐々に進んでいるものと考えられた。

また、現在卓効を示しているジエトフェンカルブ・チオファネートメチル剤に対する耐性菌(ベンズイミダゾール強耐性、ジエトフェンカルブ耐性)も低率ながら確認された。したがって、本剤の使用に当たっては、灰色

表-2 チオファネートメチル耐性ブドウ灰色かび病菌が発生した圃場における数種薬剤の防除効果と耐性菌の分離率(深谷, 未発表)

年次	チオファネートメチル水和剤		イプロジオン水和剤		ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤	
	耐性菌株率(%)	防除価	耐性菌株率(%)	防除価	耐性菌株率(%)	防除価
1988	— <sup>a)</sup>	—	—	94.9	—	97.7
1991	80.8	—	0.0	72.9	1.0	83.3
1992	80.0	—	0.0	80.4	0.0	96.2
1993	79.3	58.7	6.9	64.3	1.7	82.4

注) 薬剤の希釈倍数はチオファネートメチル水和剤及びイプロジオン水和剤が1500倍、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤が1000倍

a) 未調査

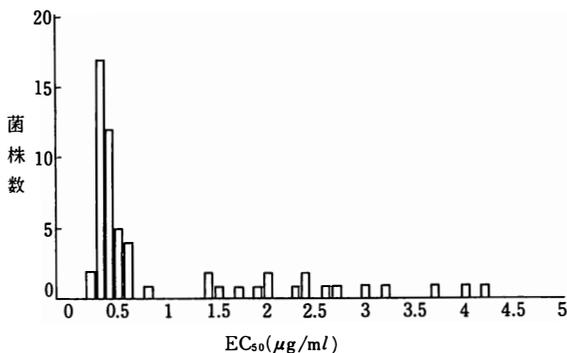


図-2 ブドウ灰色かび病菌のピンクロズリン剤に対する感受性分布(深谷, 未発表)

かび病の重点防除時期である開花前または落花期のいずれか一回の使用にとどめ、さらに他剤との体系防除によって耐性菌の出現を回避することが重要である。

今後、ブドウにおいてもジエトフェンカルブ・チオファネートメチル混合剤の使用場面が増えるのに伴い、同剤感受性の検定も耐性菌対策の一環として必要と考えられる。

#### 参考文献

- 1) 深谷雅子ら (1979): 秋田果試研報 11: 33~38.
- 2) 木曾 皓 (1994): 植物防疫 48: 42~46.
- 3) ———ら (1982): 日植病報 48: 90 (講要).
- 4) 野村良邦・小林紀彦 (1990): 日植病報 56: 105 (講要).
- 5) 王 健・深谷富夫 (1989): 東北農業研究 42: 313~314.
- 6) 竹内妙子 (1987): 千葉農試特報 14: 1~75.
- 7) 田中 薫・木曾 皓 (1991): 日植防研報 5: 17~22.
- 8) 山本 馨 (1975): 植物防疫 29: 194~196.

(深谷雅子)