

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(19)

テンサイ褐斑病菌, マメ類灰色かび病菌, ダイズ紫斑病菌

富山県農技センター野菜花き試験場

北海道立道南農業試験場

北海道病害虫防除所

京都府農業総合研究所

ちく
築
たに
谷
ほり
堀
ふく
福お
尾
い
井
た
田
にし
西よし
嘉
あき
昭
はる
治あき
章
お
夫
く
に
邦
つとむ
務

——テンサイ褐斑病菌——

はじめに

テンサイ褐斑病の防除薬剤は、薬剤耐性との“いたちごっこ”のような歴史を持っている。かつて本病の防除には有機スズ剤が使用されたが、ベンゾイミダゾール系薬剤の登場とともにこれに取って代わられた。しかし、1974~76年にかけてチオフアネートメチル耐性菌が出現したため(山口ら, 1975), 再び有機スズ剤に戻った。次に1983年にはカスガマイシン耐性菌が出現した(Chikuo et al., 1984)が、同剤は単剤で散布されることが少なかったため、耐性菌による被害は拡大しなかった。さらに1991年には有機スズ剤が環境問題のため製造中止となったが、チオフアネートメチル剤は耐性菌が依然として存在したため使用できず、現在はDMI剤や抗生物質剤などが使用されている。しかし、これらは常に薬剤耐性出現の危険性をはらんでいる。

なお、海外では有機スズ剤に対する耐性菌が報告された(Giannopolitis and Chrysayi-Tokousbalides, 1980)が、わが国では確認されていない。

そこで、本稿ではチオフアネートメチル剤およびカスガマイシン剤に対する耐性菌の検定法について述べる。

1 菌の分離方法

(1) 罹病葉の採集

調査圃場一筆当たり10~20枚程度の罹病葉を採集する(採集葉は比較的初期から病斑中央部に小黑点(菌糸塊)が形成されている中期のものがよく、病斑が融合しているようなものは避ける)。ここから直ちに、または葉を室内で自然乾燥してから菌を分離する。乾燥標本は数

か月間保存できる。

(2) 分離方法

罹病葉は約30分間流水で洗い、表面の薬剤等の汚れを落とす。次に病斑を含む切片を一枚当たり10個程度切り出す。これらを3%次亜塩素酸ナトリウム液に2分間程度浸漬して表面殺菌後、殺菌水で2回洗浄し、滅菌濾紙上で余分の水分を除去する。その後、乳酸でpHを4に修正したショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地(PSA)に置床し、25°Cで7日間程度培養する。新鮮な標本の場合はほとんどの病斑から、また乾燥標本からでもかなり高い確率で本菌が分離できる。本菌のPSA上での生育はやや遅く、*Alternaria* spp.などの雑菌の混入があると分離率が低下するので、置床4日程度のときに一度予備的に菌の生育を調査するとよい。本病の病斑は葉上に散在することと、同一病斑から耐性菌と感受性菌が共に分離されることがまれであることから、特に単孢子分離をしなくてもよいと思われる。

なおPSAでは分生胞子はほとんど形成されないの、胞子を大量に必要とする場合は酵母エキスを0.5%添加したV8ジュース寒天平板培地に本菌を移植し、BLBランプ照射下で14日間程度培養する。

2 感受性検定の方法と判定基準

(1) チオフアネートメチル耐性菌検定法

チオフアネートメチル(市販のトップジンM水和剤を培地に添加後オートクレーブする)を有効成分で1ppm添加したPSAまたはV8ジュース寒天平板培地に、薬剤無添加培地で生育させて得た菌叢片を生育面を下にして置床する(3か所程度/9cmペトリ皿)。25°Cで4~5日間培養し、生育の認められるものを耐性菌、認められないものを感受性菌とする(表-1, 山口ら, 1975, 口絵参照)。

平板希釈法でMIC値を測定すると耐性菌は100ppm, 感受性菌は0.1ppmであった。またチオフアネートメチル耐性菌はベノミルに交差耐性を示す。

(2) チオフアネートメチル耐性菌の発生推移

1974, 75年に行われた調査(山口ら, 1975; 菅原ら,

Methods for Monitoring Fungicide Resistance—Sugarbeet Leaf Spot (*Cercospora beticola*). By Yoshiaki CHIKUO, Beans Gray mold (*Botrytis cinerea*). By Akio TANII and Harukuni HORITA, Soybean Purple Stain (*Cercospora kikuchii*) By Tsutomu FUKUNISHI

表-1 テンサイ褐斑病菌のチオファネートメチル添加培地上での生育 (山口ら, 1975)

供試菌株の由来 ^{a)}	培地の種類	検定菌株数	培地中のチオファネートメチル濃度 (ppm) ^{a)}						
			0	0.1	0.5	1	10	100	1000
チオファネートメチル (TM) 感受性菌	V 8 ^{b)}	10	19 ^{c)}	± ^{d)}	0	0	0	0	0
同上菌接種無散布	V 8	6	21	±	0	0	0	0	0
TM 耐性菌	V 8	6	19	19	18	16	12	±	0
同上菌接種無散布	V 8	9	14	13	12	12	8	0	0
同上菌接種無散布	PSA	8	20	18	18	18	10	±	0
同上菌接種 TM 散布	V 8	10	17	16	15	14	14	±	0
同上菌接種 TM 散布	PSA	10	23	21	21	19	12	±	0

^{a)}：各区の罹病葉から採取した分生孢子を素寒天培地上で発芽させ、進展した菌叢を直接薬剤添加培地に移植した。

^{b)}：薬剤を添加後オートクレープした。

^{c)}：V 8 ジュース寒天培地

^{d)}：22～25℃、5日間培養後の菌叢直径 (mm)、値は供試菌株の平均値

^{e)}：ごくわずかに菌糸生育の見られたもの

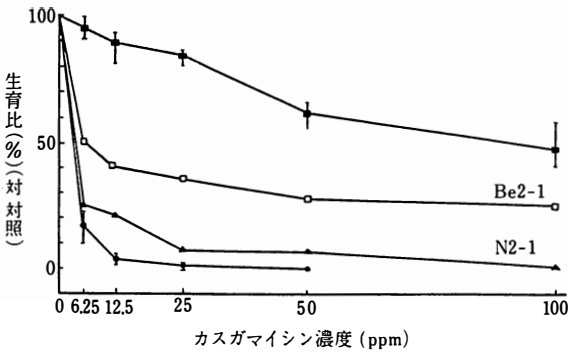


図-1 テンサイ褐斑病菌のカスガマイシン強耐性、弱耐性及び感受性菌の薬剤添加培地での生育 (築尾, 1984)

■：強耐性菌 (12 菌株の平均)
□：弱耐性菌
●、▲：感受性菌 (●=8 菌株の平均)

1975；神沢・森, 1976) では北海道内のほとんどの地域で耐性菌が検出され、主要栽培地である十勝、北見地域では検出率が非常に高かった。その後二度にわたって本菌の耐性菌検定が行われた。それによると、本剤耐性菌はチオファネートメチルの使用中止が続いているにもかかわらず、依然として高い頻度で存在していることが明らかになっている(菅原・藤井, 1979；成田ら, 1991)。

(3) カスガマイシン耐性菌検定法

本剤耐性菌もチオファネートメチル耐性菌と同様の方法で検定できるが、耐性の程度により 3 種類に分かれる。本菌の培養菌叢片を菌叢面を下にしてカスガマイシン (市販のカスミン液剤を殺菌蒸留水に溶解させ、オートクレープ後の培地に添加する) を有効成分で 25 ppm となるように添加した PSA に置床し、25℃で 5 日間培

表-2 テンサイ褐斑病に対するカスガマイシン剤の防除効果 (築尾, 1984)

接種菌株	発病指数 ^{a)}	
	カスガマイシン散布区	無散布区
KSM 1-1 強耐性菌	3.0	3.8
KSM 2-4 強耐性菌	2.2	2.8
Be-2-1 弱耐性菌	0.3	2.5
N 1-1 感受性菌	0.1	3.1
対照・菌無接種	0.0	0.0

^{a)} 発病指数：0 (健全)～5 (枯死) の平均値

養する。薬剤添加培地でも無添加培地と同様に生育するものを強耐性菌、生育抑制が見られるが生育するものを弱耐性菌、ほとんど全く生育できないものを感受性菌とする (口絵参照)。平板希釈法で MIC 値を調査すると強耐性菌は 1,600～3,200 ppm、感受性菌は 12.5～100 ppm で弱耐性菌はその中間に位置した (図-1)。

(4) カスガマイシン耐性菌に対する薬剤の防除効果
テンサイの茎葉に強耐性菌、弱耐性菌及び感受性菌を接種後、カスガマイシン液剤を散布したところ、強耐性菌接種区では発病程度が薬剤無散布区並に高く、防除効果はほとんど認められなかった。また弱耐性菌の場合はやや劣るものの防除効果が見られた (表-2)。

(5) カスガマイシン耐性菌の発生推移

上記検定法によって行われた 1984 年の調査では、同剤強耐性菌は北海道内の 105 圃場中 3 圃場から、また 1985 年には 39 圃場中 5 圃場からそれぞれ検出された。一方、弱耐性菌は 2 年ともほとんどの圃場で高頻度で検出された (築尾・杉本, 1985, 1986)。1990 年の調査では強耐性菌は全く検出されなくなったが、弱耐性菌は依然として

かなりの頻度で検出されており(成田ら, 1991), その後の動向が注目される。

引 用 文 献

- 1) CHIKUO, Y. et al. (1984): Ann. Phytopath. Soc. Japan 50: 637~640.
- 2) 築尾嘉章・杉本利哉 (1985): てん菜研究会報 27: 80~85.
- 3) ——— (1986): 同上 28: 160~165.
- 4) GIANNOPOLITIS, C. N. and M. CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES (1980): Plant Disease 64: 940~942.
- 5) 神沢克一・森 信道 (1976): てん菜研究会報 18: 105~112.
- 6) 成田正孝ら (1991): 同上 33: 82~87.
- 7) 菅原寿一ら (1975): 同上 17: 81~90.
- 8) ———・藤井勝敏 (1979): 同上 21: 39~45.
- 9) 山口武夫ら (1975): 同上 17: 71~78.

(築尾嘉章)

——マメ類灰色かび病菌——

は じ め に

Botrytis cinerea PERSOON: FRIESによって起こるマメ類灰色かび病は、北海道における重要病害で、インゲンマメ及びアズキにしばしば多発生し、被害を与えてきた。本病の防除にはジクロロゾリン剤(残留毒性の問題で1973年製造中止), チオファネートメチル剤が広く使用されたが、後者については耐性菌の発生(青田ら, 1978)で、ときとして被害を受けている。1982年からは卓効を有するジカルボキシイミド系薬剤が登場してマメ類の生産が安定したかに見えたが、1987年十勝地方のアズキ栽培圃場で本薬剤の灰色かび病に対する防除効果の低下現象が広範囲に認められ、問題化した。以下、ベンゾイミダゾール及びジカルボキシイミド系薬剤に耐性のマメ類灰色かび病菌について、北海道における発生経過、分布、検定法及び諸性質など(堀田・谷井, 1991)を述べる。なお、検定法に関しては、木曾(1994)が本誌に詳細に記しているので参照されたい。

1 耐性菌発生の経過

1986~87年, ビンクロゾリン剤を用いた十勝農試圃場内におけるマメ類灰色かび病の防除試験結果を表-1に示す。1986年のビンクロゾリン剤の防除効果は無散布に比較して統計的には有意に認められるものの、既に効果の低下が示唆され、翌1987年には無効となっている。本薬剤に対する耐性菌の発生については1985年に既に知られていた(佐々木, 1987)ことから、十勝地方で1982年以降広範囲に本薬剤が使用されてわずか2年余りで耐性菌が顕在化したことになる。一方、ベンゾイミダゾール系薬剤については、1977年十勝地方のアズキでチオフ

ァネートメチル剤耐性菌の発生に伴って灰色かび病が多発生した。このため、1978年には感染種子による立枯症の発生が目立った。なお、菌核病に対する両系統の薬剤の防除効果の低下現象は現在でも認められていない。

2 菌の分離方法

被検菌は単孢子から分離することが、検定上効率的である。花卉、葉、莖、莢の罹病組織上に形成された分生子を、1% Tween 20を含む殺菌水中に懸濁し、表面をよく乾燥させたストレプトマイシン硫酸塩(約100 ppm)含有ポテトデキストロース寒天(PDA)平板培地に画線した後、25℃で培養して単孢子より伸長した菌糸を純粋分離する。罹病組織上に分生子の形成がない場合は、罹病組織を湿室に入れて孢子形成を促し、分離に供する。

3 検定方法と判定基準

検定培地としてPDA培地を用いる。供試薬剤はビンクロゾリン, プロシミドン, チオファネートメチルで、それぞれ原体を少量のアセトンに溶解し、250 ppm, 50 ppm, 5 ppm及び最少生育阻止濃度(MIC: ビンクロゾリン3.1 ppm, プロシミドン1.56 ppm, チオファネートメチル1.0 ppm)となるように無菌的に加用して平板を作製する。原体が入手困難な場合は、水和剤を用いてもよい。25℃, 4~5日間PDA平板培地で培養した被検菌の菌糸の先端近くをコルクボーラで直径5 mmに打ち抜き、ディスクは菌糸面が直接検定培地に接触するように置床する。25℃, 2~3日間培養後、各薬剤5 ppm以上で菌糸生育の認められるものを耐性菌と判定し、各薬剤250 ppm以上で生育するものを強耐性菌、それ以下(チオファネートメチル剤及びビンクロゾリン剤5~250 ppm, プロシミドン剤5~50 ppm)で生育するものを弱~中等度耐性菌とした。

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わずかに生育し、MICの判定に苦慮する場合があるので、厳密な耐性検定にはMICより、EC₅₀(50%生育阻止濃度)によるほうがよい(木

表-1 マメ類灰色かび病, 菌核病に対するビンクロゾリン剤の防除効果
(十勝農試 1986~87年)

	灰色かび病発病度			菌核病発病度
	1986	1987	1987	1987
	インゲンマメ	インゲンマメ	アズキ	インゲンマメ
供試薬剤・希釈倍数				
ビンクロゾリン(50%)				
水和剤・1000倍 ^{a)}	24.1*	23.6	12.7	0.5**
無散布	31.4	26.9	17.0	67.8

***: 無散布に比較して、それぞれ5%, 1%水準で有意差あり, ^{a)}: 3回散布

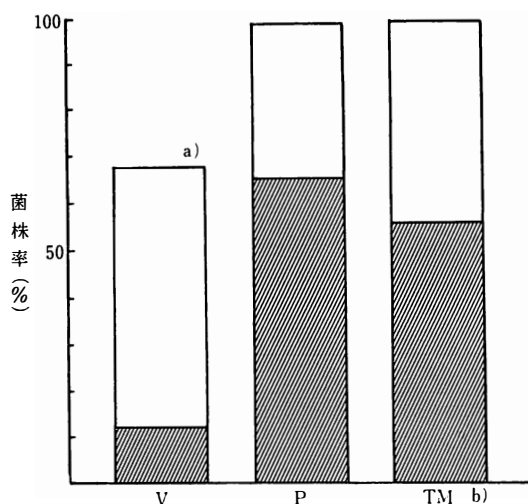


図-1 十勝地方におけるインゲンマメ灰色かび病菌 314 株のジカルボキシイミド系薬剤及びチオファネートメチル剤耐性菌率

a) : 強耐性菌, 弱～中等度耐性菌

b) : V=ピンクロゾリン剤, P=プロシミドン剤, TM=チオファネートメチル剤

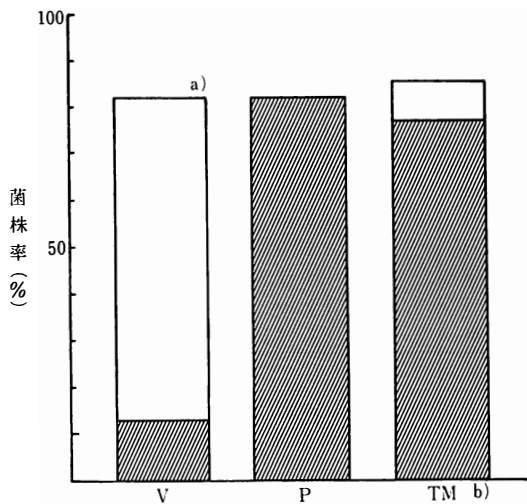


図-2 十勝地方におけるアズキ灰色かび病菌 137 株のジカルボキシイミド系薬剤及びチオファネートメチル剤耐性菌率

a) : 強耐性菌, 弱～中等度耐性菌

b) : V=ピンクロゾリン剤, P=プロシミドン剤, TM=チオファネートメチル剤

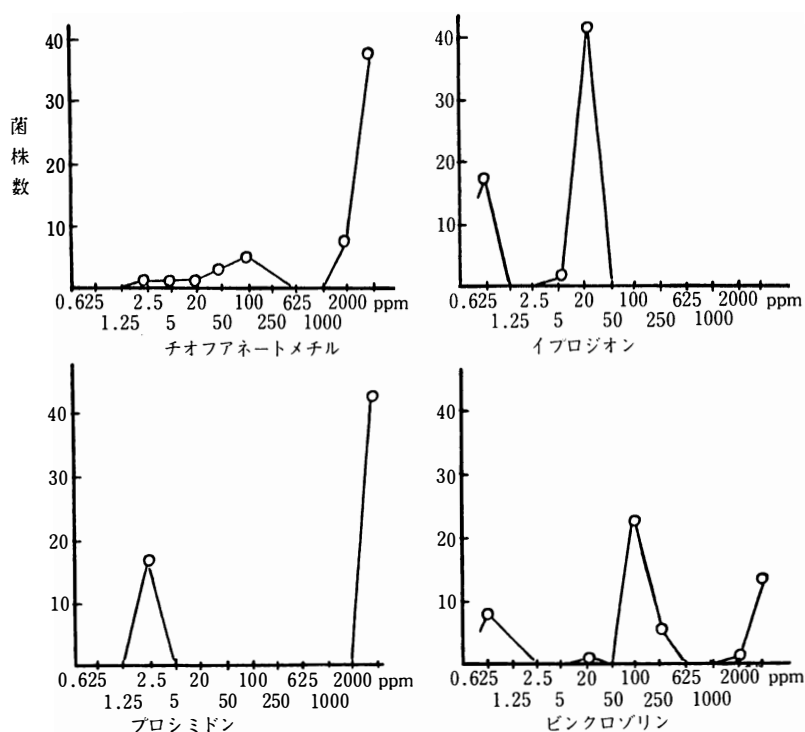


図-3 ジカルボキシイミド系薬剤及びチオファネートメチル剤に対するインゲンマメ灰色かび病菌 60 株の感受性頻度分布曲線

表-2 マメ類灰色かび病に対する薬剤のローテーション散布後の防除効果とピンクロゾリン剤耐性菌率 (長浜, 1992)

散布組み合わせ	1990 年 (インゲンマメ)		1991 年 (インゲンマメ)		1991 年 (アズキ)	
	発病度	耐性菌率 (%) ^{a)}	発病度	耐性菌率 (%) ^{a)}	発病度	耐性菌率 (%) ^{a)}
V-F-F	2.9 (0)	68.8	18.1 (3.9)	70.0	0.5 (0.0)	83.3
F-V-F	5.4 (0)	61.9	18.0 (3.6)	66.7	0.8 (0.0)	50.0
F-F-V	3.9 (0.3)	13.6	13.1 (5.3)	26.7	0.3 (0.0)	36.4
V-F-V	5.0 (0)	100	— (—)	—	— (—)	—
V-V-F	6.1 (0)	100	— (—)	—	— (—)	—
F-V-V	3.9 (0)	71.4	— (—)	—	— (—)	—
V-V-V	8.1 (0)	86.7	24.7 (2.2)	100	3.9 (0.0)	86.7
F-F-F	1.8 (1.3)	16.7	12.5 (5.8)	16.7	0.0 (0.0)	33.3
V/F-V/F-V/F	3.1 (0)	42.9	15.3 (2.8)	48.3	0.0 (0.0)	50.0
無散布	17.1 (4.9)	5.9	24.7 (26.4)	23.3	3.9 (0.3)	28.0
散布前	—		46.5		82.3	

V: ピンクロゾリン (50%) 水和剤 1,000 倍, P: プロシミドン (50%) 水和剤 1,000 倍, F: フルアジナム (50%) 水和剤 1,000 倍, V/F: 各 2,000 倍混用, (): 菌核病発病度, ^{a)}: 弱～中等度および強耐性菌の合計

曾, 1994)。なお, ベンゾイミダゾール系薬剤に関しては, わが国で検出される耐性菌の多くは EC_{50} が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の強耐性菌であるが, EC_{50} が $5 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の弱～中等度耐性菌が検出されることもある (深谷, 1995)。ジカルボキシイミド系薬剤のピンクロゾリンでは, EC_{50} が $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のものを感受性菌, $3 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を弱耐性菌, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のものを強耐性菌と判定している (FARETRA and POLLASTRO, 1991)。

4 耐性菌の分布

1987 年に十勝地方から採取した罹病アズキから, 137 菌株を分離して検定したところ, 耐性菌の発生は調査した 15 市町村の全域に及び, 耐性菌検出率も $60 \sim 100\%$ と高かった。このことはインゲンマメから分離した 314 菌株の検定結果でも同様であった。ジカルボキシイミド系薬剤及びチオファネートメチル剤に対する耐性の内訳をみると, インゲンマメ分離株の場合, ピンクロゾリン剤 67.2% , プロシミドン剤 98.4% , チオファネートメチル剤 98.7% の耐性菌検出率で, それぞれ耐性強度の異なる菌が含まれていた。また, ピンクロゾリン剤とプロシミドン剤に対する耐性菌の検出率が異なったが, ピンクロゾリン剤耐性菌とプロシミドン剤強耐性菌の検出率はほぼ同水準であった (図-1)。アズキ分離株では, ピンクロゾリン剤とプロシミドン剤ともに 81.8% , チオファネートメチル剤 84.7% の耐性菌検出率で, プロシミドン剤耐性菌のすべてが強耐性であったのに対し, ピンクロゾリン剤では強及び弱～中等度耐性菌が存在した (図-2)。1988～91 年, 主としてアズキについて全道を対象に耐性菌率を調査した結果 (長浜, 1992) によると, ジカルボキシイミド系薬剤耐性菌の分布はマメ類栽培地域のほぼ全域に及んでおり, 耐性菌のすべてはピンクロゾリン剤

とプロシミドン剤に強耐性であった。

5 耐性菌の諸性質

1988 年, 十勝農試圃場でピンクロゾリン剤を散布したインゲンマメから採取した灰色かび病菌 60 株の各薬剤に対する感受性の分布をみると (図-3), イプロジオン剤では 2 峰性, ピンクロゾリン剤とチオファネートメチル剤に対しては 3 峰性を示した。プロシミドン剤の場合, 既に述べた耐性菌の分布調査の結果から, 基本的には 3 峰性とみられるが, 図-3 に示した調査では 2 峰性であった。この検定結果から菌株ごとにジカルボキシイミド系薬剤とチオファネートメチル剤に対する耐性を比較してみると, ジカルボキシイミド系の 3 薬剤間で交差耐性, ジカルボキシイミド系薬剤とチオファネートメチル剤間では多剤耐性の関係にあった。また, ジカルボキシイミド系薬剤間でもピンクロゾリン剤やイプロジオン剤に対する弱～中等度耐性菌がプロシミドン剤に強耐性を示すことなどは, これらの薬剤の作用特性がいくらか異なることを示唆するものかもしれない。

6 薬剤による防除効果と耐性菌率の関係

ジカルボキシイミド系薬剤耐性菌の存在下でも, 本系統の薬剤が使用可能となるような防除体系を確立することは, 耐性菌発生の危惧されている病害対策にきわめて有益な情報を与えるものであろう。薬剤の散布組み合わせが検討され (長浜, 1992), 菌核病を含む病害防除効果と耐性菌の密度抑制の点から, フルアジナム剤を前半 2 回散布し, ピンクロゾリン剤を後半 1 回散布するか, あるいはフルアジナム剤とピンクロゾリン剤を混用して 3 回散布する体系が推奨された (表-2)。

以上のように北海道では迅速な対応によって, マメ類のジカルボキシイミド系薬剤耐性の灰色かび病菌に対す

るピンクロゾリン剤を用いた防除対策が確立された。なお、現在はプロシモン剤にも適用拡大した防除体系が指導されている(上川・十勝農試, 1994)。

引用文献

- 1) 青田盾彦ら (1978) : 日植病報 44 : 72 (講要)。
- 2) FARETRA, F and S. POLLASTRO (1991) : Mycol. Res. 95 : 943~951.
- 3) 深谷雅子 (1995) : 植物防疫 49 : 41~43.
- 4) 堀田治邦・谷井昭夫 (1991) : 道立農試集報 63 : 53~60.
- 5) 木曾 皓 (1994) : 植物防疫 48 : 42~46.
- 6) 長浜 恵 (1992) : 平成3年度北海道農業試験会議 (成績会議) 資料, pp. 21.
- 7) 佐々木正人 (1987) : 北海三共研究部研究報告書, pp. 10.
- 8) 上川・十勝農試 (1994) : 平成5年度北海道農業試験会議 (成績会議) 資料, pp. 3.

(谷井昭夫・堀田治邦)

——ダイズ紫斑病菌——

はじめに

Cercospora 属菌は多種の農作物に寄生し、被害を及ぼしている。これに対してはベンゾイミダゾール系薬剤が有効であり、本系統の薬剤の一つチオファネートメチル剤は現在本菌による病害8種に登録があり、幅広く使われている。当初、*Cercospora* 属菌に効果の高い薬剤がなく防除に苦慮していたが、ベンゾイミダゾール系薬剤が登場して顕著な防除効果を発揮したため、今日まで長年にわたって多用されてきた。このような状況下で、近年各地で本菌による病害に対して薬剤の防除効果の減退が指摘されるようになった。

京都府では6~7年位前から、適期に散布しているにもかかわらずダイズ紫斑病(*Cercospora kikuchii*)の多発する事例が相次いだ。そこで、1990年秋に府内全域を対象に本菌の薬剤感受性調査を行ったところ、チオファネートメチル耐性菌の発生していることが判明した(福西ら, 1991)。これ以前に、酒井(1988)は本剤を意図的に多数回散布し耐性菌出現の可能性を示唆している。その後、福井県(山本ら, 1992)、滋賀県(1992)、鳥取県(1992)でも紫斑病菌のチオファネートメチル剤への耐性化を明らかにしている。

今後も本耐性菌が確認される地域が現れてくると考えられるので、ここに筆者の体験に基づいて紫斑病菌における薬剤感受性検定の方法を記し、参考に供したい。

1 菌の分離方法

(1) 標本の採集

紫斑病はダイズの葉・茎・莢・子実に発生するが、どの部位からでも病原菌を分離できる。しかし、葉・茎・莢

では類似の他病害も発生して見分けにくいので、通常は病斑が明瞭な子実を採集して用いる。圃場一筆ごとに収穫、調製された種子の中から罹病種子を選び出し菌を分離する。調査対象が広域に及ぶ場合は一筆の圃場からの菌株数を減らし、検定用菌株数が多過ぎないようにする。

(2) 菌の調製

罹病種子を1,2時間吸水させて病斑部分の種皮をはぎ取り、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌し、水洗後PSA培地に置く。多数の標本を扱う場合は、種子ごと昇汞アルコール液または1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で同様に消毒・水洗し、培地に置床してもよい。その後、26℃で4~5日間培養し、生育した菌叢をPSA斜面培地に移植し、15~20℃にいったん保存する。薬剤感受性検定のためには、単孢子または単菌糸で分離した菌株を得る必要があり、次のような方法で行う。

① 単孢子分離法

鈴木ら(1979)が考案した方法で孢子を作らせる。すなわち、PSA培地で白色蛍光灯を照明しながら菌を前培養し、引き続き暗黒下で培養して多量の孢子を形成させる。筆者は罹病種子からはぎ取った種皮を軽く表面殺菌し、素寒天培地に置き照明・暗黒の両処理をする簡易かつ直接的な方法で、少量ながら孢子を作らせた。このようにして得た孢子を殺菌水に懸濁して濃度のごく薄い液を作り、これを素寒天培地上に少量滴下し、コンラージ棒で拡げる。次いで顕微鏡下で孢子を見付け、針の先端で寒天ごと拾い上げてPSA斜面培地に植えつける。時間があれば、2~3日間定温器に入れておくと単コロニーができるのでこれを移植してもよい。

② 単菌糸分離法

保存した菌株を素寒天培地に植えつけ、4,5日間26℃で培養する。次いで、まばらに伸びた菌糸の先端を顕微鏡下で観察し、細長い鋭利な長刀のナイフで寒天ごと切り取ってPSA斜面培地に移植する。

2 検定方法と判定基準

(1) 平板希釈法

① 検定用菌株の前培養

菌株の斜面培養の一部をPSA培地に移し変え、26℃で7日間培養する。生育した菌叢の周辺部を直径5mmのコルクボーラで打ち抜いたディスクを検定に用いる。

② 検定培地の調製

チオファネートメチル水和剤を20mlのアセトンに溶解後、蒸留水80mlを加えて所定の高濃度懸濁液を作る。これをPSA培地に加え、2倍段階希釈で有効成分が3.12~1,600ppmの間になるように10段階濃度の薬剤添加培地を作製してシャーレに流し込む。このとき培地

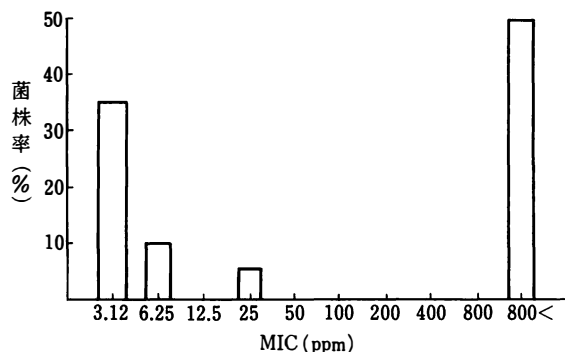


図-1 ダイズ紫斑病菌のチオファネートメチル感受性の頻度分布

中でのアセトンの最終濃度は1%以下となるようにする。

③ 調査と判定

供試菌株の菌叢ディスクを検定培地に菌叢面が接するように置床し、25°C、暗黒下で培養する。4日後に取り出し、菌叢または菌糸生育の有無から薬剤のMIC（最小生育阻止濃度）値を求める。図-1は1990年に京都府内から集めた紫斑病菌に対するMIC値を調べた結果である。これではMIC値6.25 ppm以下の菌群とMIC値800 ppm以上の菌群に大きく分かれ、わずかではあるが、MIC値25 ppmの中等度耐性菌と思われる菌群も認められた。表-1は同年府内の5市5町から集めた303菌株を、3.12 ppmと1,600 ppmの薬剤を添加したPSA培地に植えつけ、各地区のチオファネートメチル耐性菌率を算出した結果である。

④ 判定基準

前記の図-1、表-1から、中等度耐性菌の存在は今後さらに検討を要するとして、感性菌はMIC値6.25 ppm以下、耐性菌は800 ppm以上にピークがあり、薬剤耐性化した菌は50 ppm以上の薬剤を含む培地で生育すると考えられる。従って、紫斑病菌のチオファネートメチル剤に対する感受性検定では、50～100 ppm以上の薬剤添加培地を用い、この培地で菌叢または菌糸が生育したものを耐性菌と判定する。

(2) 孢子発芽試験法

① 検定方法

チオファネートメチル剤の1,600, 50, 6.25 ppm(有効成分)の懸濁液を調製し、これに前述した方法で作った孢子懸濁液(約 10^5 個/ml)を等量ずつ混合して800, 25, 3.12 ppmの3濃度とする。さらにこれを26°Cに24時間置き、孢子発芽率と孢子発芽管長を調べ、あわせて形状観察を行う。なお、紫斑病菌の薬剤感受性検定については実施例が少ないので、検定濃度については検討を要する。

表-1 京都府内におけるダイズ紫斑病菌のチオファネートメチル耐性菌分布

採集場所	供試菌株数	MIC 値*		耐性菌率 (%)
		3.12 ppm	1,600 ppm<	
宇治田原町	22	15	7	31.8
亀岡市	18	7	11	61.1
京北町	35	8	27	77.1
八木町	36	3	33	91.7
綾部市	49	4	45	91.8
福知山市	30	17	13	43.3
舞鶴市	17	7	10	58.8
宮津市	28	22	6	21.4
加悦町	19	0	19	100.0
野田川町	31	10	21	67.7
その他	18	1	17	94.4
合計	303	94	209	
比率 (%)		31.0	69.0	

* 2 濃度の MIC 値に属する菌株数の対比

② 判定

チオファネートメチル剤存在下では感性菌胞子は形態異常を呈し、発芽管の肥大短小、湾曲等の奇形となる。一方、耐性菌は各濃度区のいずれにおいても薬剤無添加の場合と殆ど変わらない発芽状態である。

3 薬剤の防除効果

チオファネートメチル剤の効力低下が疑われているところでは、これに代わる薬剤を用いた防除試験が実施されており、ジェトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤(滋賀県・京都府)、ピリフェノックス水和剤(鳥取県)などの有効性が確認されている。挾間(1991, 1993)はキュウリ褐斑病菌(*Cercospora melonis*)のベンゾイミダゾール系薬剤(BI)に対して、ジェトフェンカルブ剤(NPC)が高い効果を有し負相関交差耐性を示すことを明らかにしている。このことから、BI耐性菌に対するいわゆる「負相関剤」としてのNPC含有製剤を、キュウリ以外の他寄主からの*Cercospora*属菌にも幅広く適用できる可能性が示唆されている。近い将来、紫斑病の薬剤耐性菌対策として本剤が登録され使えるようになるものと期待される。

引 用 文 献

- 1) 挾間 渉ら(1991): 日植病報 57: 319～325.
- 2) 挾間 渉ら(1993): 大分農技セ特別研報 2: 1～105.
- 3) 福西 務ら(1991): 関西病虫研報 33: 55～56.
- 4) 酒井泰文(1988): 同上 42: 304～308.
- 5) 滋賀防除所・鳥取農試環境研(1992): 平成4年度近畿中国農試研成績: 1-1-14, 7-1-8.
- 6) 鈴木穂積ら(1979): 植物防疫 33: 443～446.
- 7) 山本陽子ら(1992): 平成4年度病害虫に関する試験成績(福井農試): 42～44.

(福西 務)