

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(6)

野菜類灰色かび病菌

社団法人日本植物防疫協会研究所 木 曾 あきら
皓

はじめに

現在、我が国では灰色かび病に対して多くの薬剤に登録がある。しかし、これらの薬剤の中には、既に薬効の減退(感受性低下菌の出現)や薬剤間での交差耐性の関係で防除上問題を起こしているものがある(木曾, 1988)。また、新しいところでは、*N*-フェニルカーバメート系剤(ジエトフェンカルブ)と他剤との混合剤が使用されるに至って、ベンズイミダゾール中等度耐性菌の増加に伴う混合剤の効力減退が認められた報告が外国であり(LEROUX, 1992; ELAD, et al., 1992), 我が国でもジエトフェンカルブ・チオファネートメチル剤耐性灰色かび病菌の発生が確認されている(竹内, 1987; 野村・小林, 1990)。そのため、今後、同様の事態の発生が我が国でも懸念される。そこで、灰色かび病菌の感受性検定に際しては *N*-フェニルカーバメート系剤も合わせて検定する必要がある。本号では、野菜類の灰色かび病菌について今までに報告された殺菌剤感受性の検定法と合わせて、検定に際して注意すべき点などを記載して参考に供する。

I 検定用材料の調製

1 検定用病原菌の採集

病原菌の採集には、被害部分からの組織分離法と菌の繁殖体をかきとって採集する方法及び *Botrytis cinerea* の選択培地を用いる方法がある。

(1) 被害部分から直接病原菌を分離する方法

1) 繁殖体が見られない病斑部からの採集(組織分離)
葉、茎、花卉及び果実などの被害部分を5mm四方に切り取って70%アルコールに数秒間、その後直ちに2%アンチホルミン液で2, 3分間表面消毒を行い、続いて殺菌水で十分洗浄し、300ppmのストレプトマイシン硫酸塩を含むブドウ糖加用ジャガイモ寒天(PDA)平板培地に置床する。20°Cで数日間培養すると切片の周囲に病原菌の菌糸が生育するので、早い時期にPDA培地に移植して保存する。果実(トマト、ナス、キュウリ、イチゴなど)の場合は果肉の部分から直接組織分離すると雑菌の汚染が防げる。

2) 標徴(繁殖体が被害部にみられる)部からの採集
被害部上の繁殖体(菌糸及び胞子を含めて)を白金針でかきとって1)と同じ培地に移植する。この場合胞子の飛散によって菌株が互いに汚染する危険性があるので、白金針のひとかきごとに(一菌塊ごと)培地を変えて個別の菌株ごとに隔離分離を行うのが望ましい。また、接種部分に菌糸の生育がみられたら、早い時期に1)と同様のPDA培地に移植する。

(2) 胞子トラップ法(暴露法)による病原菌の分離(口絵)

本採集法は空中を浮遊している胞子を選択培地で直接トラップする方法である。本法に使用できるものとして岡田ら(1992)の選択培地がある。直径9cmのシャーレにやや厚めに(25ml)培地を流し込んで平板を作る。この培地を灰色かび病菌を採集しようとする場所に設置する。一定の間隔をおいてできれば10枚くらいのシャーレを設置する。このトラップ法は作物が栽培されて発病がみられるとき、栽培されているが発病がみられないとき、作物が栽培されていないときなど、すなわち、条件によって灰色かび病菌のトラップ数に違いが生じる。しかし、いずれの場合でも病原菌がトラップできるので優れる。発病後は、作物の株間、畝間あるいは株もと付近に地表面から50cmくらいの高さにシャーレを設置すればよい。暴露する時間は空中を浮遊する胞子密度、あるいは発病状況などによって決めることになるので、あらかじめトラップする時間について予備試験をしておくことが望ましい。岡田(1992), JARVIS(1962)によると、胞子は午前中(8~10時)の急激な湿度変化が起こる時間帯に最も多くトラップされるという。また、選択培地に当該農薬を通常の感(受)性菌に対するMICよりも高い濃度で加えておくことで、感受性が低下している菌を直接トラップすることができる。

2 検定用菌の調製

1-(1)-1), 2)及び(2)の方法で分離した菌株は、単胞子から得られたものであればそのまま検定に使用できる。トラップ法で分離した菌株は単胞子由来である確率がきわめて高い。しかし、その他のものでは薬剤に対する感受性を異にする菌株が混合している危険性が高い(氏家ら, 1992)。そこで、被害部から分離した菌は、単

菌糸及び単胞子を用いて純粋分離する。

(1) 菌の純粋分離法

1) 単胞子分離法：前述の方法で分離、PDA で保存した菌株を PDA 平板培地に移植し、20°C で培養して菌糸先端がシャーレの壁面から 1 cm 近くまで生育した時点で BLB を照射（培地面までの高さ 35~40 cm, 23°C, 72~96 時間）する。この処理で分生胞子が作られるので、殺菌水で孢子濃度 $5 \times 10^2 / \text{ml}$ まで希釈する。この孢子液の 100~200 μl をストレプトマイシン硫酸塩加用 PDA 平板培地に滴下し、表面に均一に分散させたあとクリーンベンチで培地表面を乾燥させる。次いで顕微鏡下で単胞子部分のシャーレの底にマークをつけて 20°C で培養する。マークをした単胞子から生育したコロニーを純粋分離菌とする。

2) 単菌糸分離法：1) と同じ様に PDA で保存した菌株を PDA 平板培地で前培養（20°C, 72 時間）する。生育した菌糸先端を直径 4 mm のコルクボーラーで打ち抜き、このディスクを再び PDA 培地で培養する。この状態で新鮮な生育菌糸の先端を顕微鏡で観察しながら長刀型メスで切り取り単菌糸を得る。切断する菌糸は、培養時間が長くなると菌糸が絡み合いメスで切り取ることが難しくなるので 20°C, 72 時間培養を厳守する。

(2) 純粋分離菌の保存

純粋分離した菌株は、PDA 斜面培地にテフロンキャップをして 20°C で保存すれば 3~6 か月は十分保存できる。

3 検定用培地の調製

(1) 培地の種類と平板培地作製法：培地の種類は特に選ばないが、人為的誤差を小さくし、結果の再現性を高める意味であれば、DIFCO Lab. などから市販されている Potato dextrose agar (PDA) の平板培地を使用するのがよい。培地は処方通り調製し、滅菌プラスチックシャーレ（浅型 90×15 mm）に平板の厚さが 2 mm になるように流し込む。平板の厚さが 2 mm 以上になると、薬剤加用培地で検定する際、薬剤と直接触れないディスク面に菌が生育するために、薬剤含有平板培地上での生育かどうかの判断に悩まされる場合がある。

(2) 薬剤加用平板培地の作製法：使用する薬剤は水和剤がよい。フロアブル剤は検定する薬剤濃度を作製するための計量に不都合である。入手が可能であれば当該農薬の抗菌活性の本体を用いるとよい（例えば、ベンズイミダゾール系剤であればカルベンダジム (MBC)）。PDA と薬液（水和剤を殺菌蒸留水に懸濁）を 9:1 の割合に混ぜて、薬剤加用後の有効成分が所定の濃度になる様に平板を作製する。したがって、10 倍濃い薬剤の原液

を PDA に加える。対照として薬剤無加用区を設ける。なお、ベンズイミダゾール系薬剤（チオファネートメチルやベノミル）は、培地に加用後オートクレーブで殺菌しても、その抗菌活性の保持に実用上大きな支障はない（かえってこの方が検定によいこともある）。しかし、薬剤の種類によってはオートクレーブで殺菌することで薬剤が変性するものもあるので、その場合は培地をシャーレに分注する直前に薬剤を無菌的に加用するほうがよい。使用するシャーレは無分画のものでよいが、検定する濃度が 3 段階あるときには、市販の 4 分画の滅菌済みプラスチックシャーレを使用して、1 枚に 20 ml 流し込む。また、1 分画を対照用とする。

この平板培地で検定の対象となるのは菌糸と胞子である。しかし、胞子を対象とするときには、スライドカルチャー法を使用する方が胞子の発芽状況などを写真撮影するには都合がよい。スライドグラスを中性洗剤、次いでアセトンで洗浄したあと、十分に水洗して乾燥させる。このスライドグラスの表面に薬剤入りの PDA (2 ml) を流し、スライドグラスの四隅に均一に PDA が行きわたった時点で滴下をとめると厚さ 1 mm の培地ができる。これをスライドカルチャー用とする。

(3) 濃度別薬剤液の調製：ベンズイミダゾール系、ジカルボキシイミド系、N-フェニルカーバメート系の薬剤の種類によって検定濃度の取りかたが違ふ。また、ただ単に菌の感受性の違いを試験する場合と、MIC や EC_{50} を求める場合とで濃度設定を変えることが一般に行われる。

1) ベンズイミダゾール系薬剤の場合（口絵）：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。この両者の間では通常交差耐性がみられるため（図-1）、いずれか一つの薬剤を選択すればよい。筆者はチオファネートメチル 70% 水和剤を使用している。前記したように、PDA と薬液を 9:1 に混ぜて、薬剤加用後の有効成分 (a. i.) 濃度が 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように平板を作る。MIC, EC_{50} を求める場合は、2,048 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から順次 2 倍段階希釈して 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの 15 段階濃度を設ける。

2) ジカルボキシイミド系薬剤の場合（口絵）：このグループの薬剤間でも通常交差耐性が見られるので（図-1）、市販のイプロジオン、ピンクロゾリンまたはプロシミドンの各 50% 水和剤のいずれか一つを用いればよい。しかし、一般にはプロシミドン（50% 水和剤）を用いる場合が多い。薬剤は有効成分濃度で 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように PDA に加用して検定用の平板培地を作る。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で菌糸の生育が認められたとき

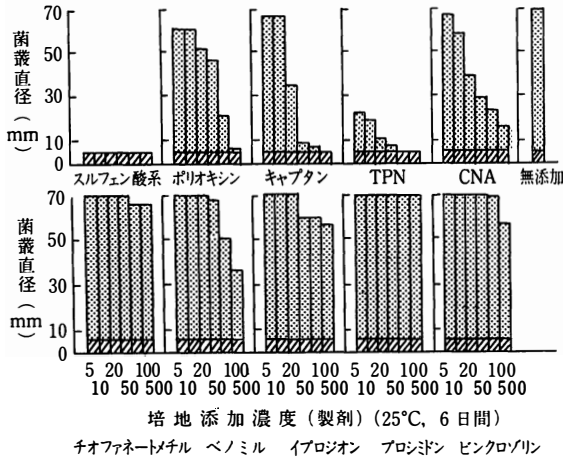


図-1 薬剤添加PSA培地上でのイプロジオン剤高度耐性灰色かび病菌の発育 (No.60 菌)

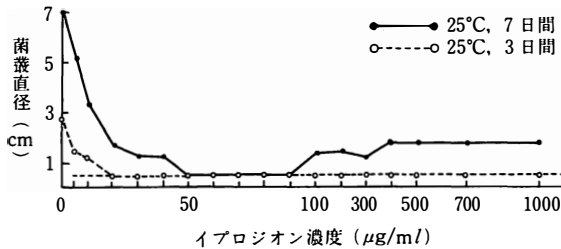


図-2 イプロジオン剤耐性灰色かび病菌が示す薬剤含有培地上での発育特性 (供試菌株数 No.74) (木曾ら, 1982)

には、さらに成分濃度を上げて検定する。

なお、イプロジオンに対する耐性菌は同薬剤有効成分の 25~100 µg/ml ではいったん生育抑制を受け、より高濃度の薬剤存在下では生育が回復するというポリモーダル生育 (図-2, 口絵) を示す (木曾ら, 1982)。したがって、普通 25~100 µg/ml 前後で生育抑制がみられるので、検定濃度の設定には注意し、25 µg/ml 以下に設定することが望ましい。この検定で菌糸の生育が認められた場合には検定濃度を更に 50, 100 µg/ml と上げて検定し、高い濃度で菌の生育を確認する。ピンクロゾリンやプロシミドンではこのような生育特性はみられないから検定濃度の設定に制限はない。しかし、これら両剤を高濃度に設定すると、その有効成分が水に溶けないで成分量が不正確となるので注意する。

3) *N*-フェニルカーバメート系薬剤の場合：本系統の薬剤で現在登録があるのはジエトフェンカルブである。本剤には単剤と、混合剤 (チオファネートメチルとジエトフェンカルブの混合剤及びプロシミドンとジエトフェンカルブの混合剤) がある。ジエトフェンカルブ感

受性は、有効成分濃度で 1 及び 5 µg/ml 加用 PDA 培地で検定する (氏家ら, 1992)。ジエトフェンカルブは平板培地を作る直前に無菌的に培地に加用する。

II 感受性検定方法

1 具体的な検定方法

(1) 菌糸を用いる検定のための純粋分離菌の前培養：供試菌の菌糸片を PDA 平板培地に接種 (置床), (長時間保存した菌は移植後生育のスタートが遅れるので、前培養を 2 回行い、2 回目の新鮮で活力のある前培養菌を用いる), 20°C, 1~2 日間前培養した後、生育菌糸の周辺部分からコルクボーラー (直径 4 mm) で菌そう片 (ディスク) を打ち抜く。前培養が長くなるとディスクが打ち抜きにくくなるので 1~2 日以内に前培養を終える。打ち抜いたディスクを薬剤加用 PDA 検定培地に接種源として用いる。

(2) 検定培地での菌の培養と調査法：前培養培地から打ち抜いたディスクは菌糸面を下にして、菌糸面が直接検定培地に接触するように置床する。直径 9 cm のシャーレを使用すれば 1 枚のシャーレでディスクは 10 個置床できる。ベンズイミダゾール系薬剤に関する検定では、接種後 20°C で培養し、24 時間後に 1 回、次いで 48 時間後に 2 回目を、ジカルボキシイミド系の薬剤では、接種 48 時間後に 1 回、次いで 96 時間後に 2 回目、120 時間後に 3 回目を、*N*-フェニルカーバメート系の薬剤では接種 24, 48, 72, 96 及び 120 時間後にそれぞれ生育した菌そうの直径を測定する。なお、ジエトフェンカルブ剤を含む培地にディスクを置床すると感菌であっても菌糸が 1~2 mm は伸長する (氏家ら, 1992)。しかし、この菌糸の伸長をもって感受性低下菌 (耐性菌) と判定してはならない。耐性菌はその後も生育を続けるが、感菌はそのまま菌糸伸長が停止する (口絵)。いずれの検定でも菌そう直径から接種源の直径 4 mm を差し引いて生育量とする。ジカルボキシイミド系と *N*-フェニルカーバメート系の両薬剤では、上記の調査以外にその後もしばらくの間生育状況を観察することが望ましい。しかし、ジカルボキシイミド系薬剤ではあまり長い間薬剤加用培地で培養を続けていると変異により菌が耐性を獲得し、隔膜を形成してくることがあるので注意する。

このほか、液体培地法 (桜井, 1975) による検定法があるが、この方法は実際に使用されることが少ないので (参考) 文献を参照されたい。

(3) スライドカルチャー法：本法は胞子の発芽状態 (発芽管の異常, 発芽管の隔膜の形成など) で薬剤感受性を検定できる (桜井, 1975) が、そのためには供試菌の

胞子を多量に作る必要がある。この方法は2-(1)-1)に準じればよい。すなわち、透明なガラスシャーレまたはプラスチックシャーレで前培養した菌そうにBLBを照射する。シャーレのフタをしたままで、BLB (20W, FL20S・BLB 東芝蛍光灯) の光源から35~40 cm下に並べて72~96時間照射することで、菌そう表面に多量の胞子が作られる。これを明所に移してシャーレ内が多湿にならないように保管して使用まで保存する。この方法で作った新鮮な胞子を殺菌水に懸濁して、原液の胞子濃度を 5×10^8 個/mlに調整する。この胞子液をスライドグラス上の薬剤加用培地面に $10 \mu\text{l}$ (胞子数でおよそ50個)を1滴として等間隔で10か所に滴下する。胞子液がスライド面に均一になるように塗抹して表面を軽く乾燥し、湿度を保持したプラスチック箱に入れて 20°C で培養する。24時間後に胞子の発芽状況を調査し、またカラーフィルムで顕微鏡撮影して記録する。

(4) 感受性検定結果の表記方法：菌糸生育試験では前記したとおり検定培地での菌糸生育量を求める。次いで、各供試菌の生育に対する薬剤の50%生育阻止濃度、 EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$ 、薬剤無添加における生育量と比較して、その50%を阻止するのに必要な薬剤の濃度) を作図 (FINNEY, 1952) もしくはパソコンソフトの利用 (SOKAL, 1958) により求める。

1) 感性菌に対するカルベンダジムの EC_{50} は $1 \mu\text{g/ml}$ 以下である。我が国に分布する耐性菌の多くは強(高度)耐性菌(口絵)で、薬剤の EC_{50} は $100 \mu\text{g/ml}$ 以上であり、菌の薬剤感受性に関する頻度分布曲線は通常、感性菌と耐性菌が示す2峰性(図-3)である(手塚・木曾, 1977; 山本, 1976)。しかし、報告例は少ないが桜井・藤田(1976)によればMICが $1.56 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ の弱~中等度耐性(図-4)を示す菌株が確認されている。

2) ジカルボキシイミド系薬剤では、その EC_{50} が有効成分量で $1 \mu\text{g/ml}$ 以下のものを感性菌、 $3 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上のものをそれぞれ弱耐性菌、強耐性菌と判定する (FARETRA and POLLASTRO, 1991)。

3) *N*-フェニルカーバメート系薬剤のジエトフェンカルブでは、感性菌に対する EC_{50} は $1 \mu\text{g/ml}$ 以下である。我が国では今のところ本剤に対する中等度及び高度耐性菌の報告は少ないが、 EC_{50} が $100 \mu\text{g/ml}$ 以上を示す菌株の存在が報告されている(野村・小林, 1990)。筆者らは本剤に対する感受性検定の際、有効成分濃度として $5 \mu\text{g/ml}$ を用いている。この濃度で生育した菌については、10, 20, 40, 60及び $100 \mu\text{g/ml}$ でさらに検定を行う。また、本剤による検定に合わせてジエトフェンカルブ・チオファネートメチル混合剤(ゲッター水和剤)

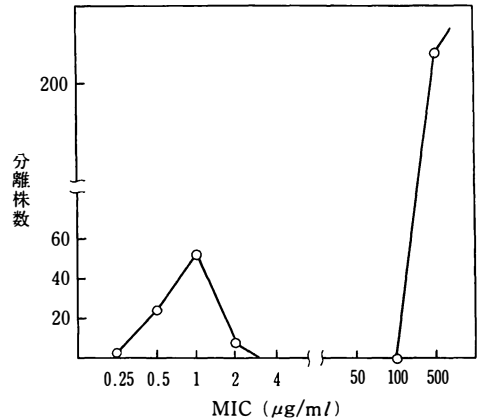


図-3 PSA培地上における灰色かび病菌のチオファネートメチル剤に対する感受性頻度分布曲線(手塚・木曾, 1977)

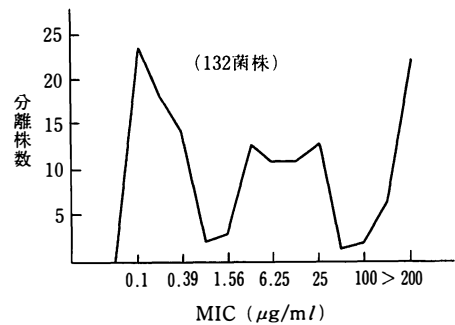


図-4 花卉・野菜から分離した灰色かび病菌のMBC感受性頻度分布曲線(桜井・藤田, 1976)

で、ジエトフェンカルブの有効成分濃度を単剤による検定時に設定する濃度、すなわち、 $5 \mu\text{g/ml}$ として検定培地を作り同時に検定している。当然のことながら、ジエトフェンカルブ単剤で感受性の低減が確認された菌株は、必ずジエトフェンカルブ・チオファネートメチル混合剤に対しても同じ有効成分量で感受性の低減が観察され、両者の間には正の相関が認められる。

なお、耐性検定の指標に、薬剤の最低生育阻止濃度、MIC ($\mu\text{g/ml}$ 、菌の生育を完全に阻止するのに必要な最小濃度) もしばしば用いられるが、生育の速い灰色かび病菌では、薬剤加用培地上で菌糸がわずかに生育することが多いため、本菌の厳密な感受性検定にはMICよりも EC_{50} のほうがよい。また、耐性菌検定用培地調製時のミスなどをチェックする目的で、対照の標準菌株として感性菌及び感受性低下菌(耐性菌)を用意し、比較検討することが望ましい。

4) スライドカルチャー法では、胞子の発芽率、発芽管の異常及び発芽管の隔膜の形成状況を感性菌との比較

によって観察, または数値化して求める。桜井 (1977) はカスガマイシン耐性イネいもち病菌がプラストサイジンSに示す耐性の表記方法を, その孢子発芽阻害度を定量的に求め(ED), 感性菌と比較して数式で示している。この表記法が利用できる。

(5) その他感受性検定に当たっての注意事項

1) 単孢子 (もしくは単菌糸) によらずに, 組織分離や病斑部分から菌糸や孢子を一括菌塊として分離した場合には, 分離材料を採集した圃場に SSR 菌 (記号については付記参照) が高率に存在している条件下では RSS 菌との混在が起こり, RSR 菌と誤認されやすい (氏家ら, 1992)。例えば, このような分離菌をベンズイミダゾール系薬剤で検定したとき耐性, ジェトフェンカルブで検定したとき耐性で, ジカルボキシイミド系薬剤では感受性と判定される。ところが, この検定でベンズイミダゾール系薬剤加用培地で生育した菌をジェトフェンカルブ加用培地に移して検定すると生育しない場合がある。すなわち, ジェトフェンカルブに対しては感受性が高い。この結果, ベンズイミダゾール系薬剤加用培地で生育した菌は RSS と判定される。一方, ジェトフェンカルブ存在下で生育した菌をベンズイミダゾール系薬剤加用培地で検定すると生育しない場合がある。すなわち, ベンズイミダゾール系薬剤に対して感受性が高い。この結果からジェトフェンカルブ培地で生育した菌は SSR と判定される。このことは単孢子や単菌糸で純粋分離しなかった菌を検定した場合には, RSS や SSR を見かけ上 RSR と誤って判別することがあるということである。この誤判別を防ぐためには, ジェトフェンカルブ・チオファネートメチルの混合剤を培地に加えて検定に用いればよい。このときの有効成分濃度はジェトフェンカルブ単剤での検定濃度に合わせて $5 \mu\text{g/ml}$ とする。

2) 灰色かび病菌は菌糸が多核であるため, ヘテロカリオシスによってジカルボキシイミド系薬剤耐性が不安定であるという報告があるので (LORENZ and EICHHORN, 1982) 感受性検定のときには注意する。

3) 検定を行う場合に, 供試薬剤の1濃度のみで感受性を検定している場合がしばしば見受けられる。しかし, 灰色かび病菌のベンズイミダゾール感受性 (耐性) やジカルボキシイミド感受性 (耐性) はそれぞれ, 染色体の主働遺伝子の変異によること, 強耐性や中等度耐性は同一遺伝子座を占める複対立遺伝子の一つによって支配されることが, 最近の交雑試験で明らかになっている (FARETRA and POLLASTRO, 1991)。このように, 強耐性菌と中等度耐性菌は遺伝的に異なるほか, 他剤に対する反応など生理生態的性質にも違いがみられる。したがって, 上

述のように薬剤濃度区をいくつか設けて検定し, それぞれの菌について感受性の程度を区別することが望ましい。

4) 感受性低下菌 (耐性菌) としての判断のよりどころは石井 (1993) を参照。

5) 耐性菌でありながら病原性がないか, さもなければ極度に低下している菌株が採集されることがある。そこで, 宿主を使用した感受性検定や圃場での薬剤防除効果と耐性菌との関連を簡単に調べたい場合には, 手塚・木曾 (1976) のキュウリ果実法及び田中・木曾 (1991) のキュウリ子葉・ペーパーディスク法で検定すればよい。

(付記) 耐性菌の表記方法

第3回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウムで竹内 (1993) がベンズイミダゾール, ジカルボキシイミド及びジェトフェンカルブの3薬剤に対して灰色かび病菌が示す感受性の程度により, その表記方法を次の8種類に類別した。すなわち, SSS, SSR (従来のSS菌), SRR, SRS(SR), RSS(RS), RSR, RRS(RR), RRRである。この記載順序は, 左がベンズイミダゾールに対する感受性, 中がジカルボキシイミドに対する感受性, 右がジェトフェンカルブに対する感受性である。今後この表記法を使用すれば記載に混乱が起こらない (この方法は日本植物防疫協会殺菌剤分科会で殺菌剤の試験委員の間でも申し合わせた)。

参考文献

- 1) ELAD, Y. *et al.* (1992): Plant pathology 41: 41-46.
- 2) FARETRA, F. and S. POLLASTRO (1991): Mycol. Res. 95: 943-951.
- 3) FINNEY, D. J. (1952): Probit analysis, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 4) 石井英夫 (1993): 植物防疫 47: 279-281.
- 5) JARVIS, W. R. (1962): Trans. Br. Mycol. Soc. 45: 549-559.
- 6) 木曾 皓 (1988) 薬剤抵抗性, 深見順一他編, ソフトサイエンス社, 東京, pp.180-214.
- 7) ————ら (1982): 日植病報 48: 90 (講要).
- 8) LEROUX, P. (1992): In Resistance '91: Achievements and developments in combating pesticide resistance, I. Denholm, A. L. Devonshire and D. W. Hollomon (eds.), pp. 179-189.
- 9) LORENZ, D. H. and K. M. EICHHORN (1982): EPPO Bull. 12: 125-129.
- 10) 野村良邦・小林紀彦 (1990): 日植病報 56: 105 (講要).
- 11) 岡田清嗣ら (1992): 日植病報 58: 554 (講要).
- 12) 桜井 寿 (1975): 植物防疫 29: 206-212.
- 13) ————・藤田肖子 (1976): 昭和51年度薬剤耐性菌に関するシンポジウム講演要旨, 日植防協会, 東京, p.41-53.
- 14) ———— (1977): 農薬誌 2: 177-186.
- 15) SOKAL, R. R. (1958): J. Econ. Ent. 51: 738.
- 16) 竹内妙子 (1987): 千葉農試特報 14: 1-75.
- 17) ———— (1993): 第3回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨.
- 18) 田中 薫・木曾 皓 (1991): 日植防報告 5: 17-22.
- 19) 手塚信夫・——— (1977): 農水省野菜試験報告 C3号 p. 51.
- 20) ———— (1976): 農薬誌 1: 321-324.
- 21) 氏家 敬ら (1992): 日植病報 58: 608 (講要).
- 22) 山本 盤 (1975): 植物防疫 29: 194-196.
- 23) ———— (1976): 昭和51年度薬剤耐性菌に関するシンポジウム講演要旨, 日植防協会, 東京, pp.17-22.

によって観察, または数値化して求める。桜井 (1977) はカスガマイシン耐性イネいもち病菌がプラストサイジンSに示す耐性の表記方法を, その孢子発芽阻害度を定量的に求め(ED), 感性菌と比較して数式で示している。この表記法が利用できる。

(5) その他感受性検定に当たっての注意事項

1) 単孢子 (もしくは単菌糸) によらずに, 組織分離や病斑部分から菌糸や孢子を一括菌塊として分離した場合には, 分離材料を採集した圃場に SSR 菌 (記号については付記参照) が高率に存在している条件下では RSS 菌との混在が起り, RSR 菌と誤認されやすい (氏家ら, 1992)。例えば, このような分離菌をベンズイミダゾール系薬剤で検定したとき耐性, ジェトフェンカルブで検定したとき耐性で, ジカルボキシイミド系薬剤では感受性と判定される。ところが, この検定でベンズイミダゾール系薬剤加用培地で生育した菌をジェトフェンカルブ加用培地に移して検定すると生育しない場合がある。すなわち, ジェトフェンカルブに対しては感受性が高い。この結果, ベンズイミダゾール系薬剤加用培地で生育した菌は RSS と判定される。一方, ジェトフェンカルブ存在下で生育した菌をベンズイミダゾール系薬剤加用培地で検定すると生育しない場合がある。すなわち, ベンズイミダゾール系薬剤に対して感受性が高い。この結果からジェトフェンカルブ培地で生育した菌は SSR と判定される。このことは単孢子や単菌糸で純粋分離しなかった菌を検定した場合には, RSS や SSR を見かけ上 RSR と誤って判別することがあるということである。この誤判別を防ぐためには, ジェトフェンカルブ・チオファネートメチルの混合剤を培地に加えて検定に用いればよい。このときの有効成分濃度はジェトフェンカルブ単剤での検定濃度に合わせて $5 \mu\text{g/ml}$ とする。

2) 灰色かび病菌は菌糸が多核であるため, ヘテロカリオシスによってジカルボキシイミド系薬剤耐性が不安定であるという報告があるので (LORENZ and EICHHORN, 1982) 感受性検定のときには注意する。

3) 検定を行う場合に, 供試薬剤の1濃度のみで感受性を検定している場合がしばしば見受けられる。しかし, 灰色かび病菌のベンズイミダゾール感受性 (耐性) やジカルボキシイミド感受性 (耐性) はそれぞれ, 染色体の主働遺伝子の変異によること, 強耐性や中等度耐性は同一遺伝子座を占める複対立遺伝子の一つによって支配されることが, 最近の交雑試験で明らかになっている (FARETRA and POLLASTRO, 1991)。このように, 強耐性菌と中等度耐性菌は遺伝的に異なるほか, 他剤に対する反応など生理生態的性質にも違いがみられる。したがって, 上

述のように薬剤濃度区をいくつか設けて検定し, それぞれの菌について感受性の程度を区別することが望ましい。

4) 感受性低下菌 (耐性菌) としての判断のよりどころは石井 (1993) を参照。

5) 耐性菌でありながら病原性がないか, さもなければ極度に低下している菌株が採集されることがある。そこで, 宿主を使用した感受性検定や圃場での薬剤防除効果と耐性菌との関連を簡単に調べたい場合には, 手塚・木曾 (1976) のキュウリ果実法及び田中・木曾 (1991) のキュウリ子葉・ペーパーディスク法で検定すればよい。

(付記) 耐性菌の表記方法

第3回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウムで竹内 (1993) がベンズイミダゾール, ジカルボキシイミド及びジェトフェンカルブの3薬剤に対して灰色かび病菌が示す感受性の程度により, その表記方法を次の8種類に類別した。すなわち, SSS, SSR (従来のSS菌), SRR, SRS(SR), RSS(RS), RSR, RRS(RR), RRRである。この記載順序は, 左がベンズイミダゾールに対する感受性, 中がジカルボキシイミドに対する感受性, 右がジェトフェンカルブに対する感受性である。今後この表記法を使用すれば記載に混乱が起らない (この方法は日本植物防疫協会殺菌剤分科会で殺菌剤の試験委員の間でも申し合わせた)。

参考文献

- 1) ELAD, Y. *et al.* (1992): Plant pathology 41: 41-46.
- 2) FARETRA, F. and S. POLLASTRO (1991): Mycol. Res. 95: 943-951.
- 3) FINNEY, D. J. (1952): Probit analysis, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 4) 石井英夫 (1993): 植物防疫 47: 279-281.
- 5) JARVIS, W. R. (1962): Trans. Br. Mycol. Soc. 45: 549-559.
- 6) 木曾 皓 (1988) 薬剤抵抗性, 深見順一他編, ソフトサイエンス社, 東京, pp.180-214.
- 7) ————ら (1982): 日植病報 48: 90 (講要).
- 8) LEROUX, P. (1992): In Resistance '91: Achievements and developments in combating pesticide resistance, I. Denholm, A. L. Devonshire and D. W. Hollomon (eds.), pp. 179-189.
- 9) LORENZ, D. H. and K. M. EICHHORN (1982): EPPO Bull. 12: 125-129.
- 10) 野村良邦・小林紀彦 (1990): 日植病報 56: 105 (講要).
- 11) 岡田清嗣ら (1992): 日植病報 58: 554 (講要).
- 12) 桜井 寿 (1975): 植物防疫 29: 206-212.
- 13) ————・藤田肖子 (1976): 昭和51年度薬剤耐性菌に関するシンポジウム講演要旨, 日植防協会, 東京, p.41-53.
- 14) ———— (1977): 農薬誌 2: 177-186.
- 15) SOKAL, R. R. (1958): J. Econ. Ent. 51: 738.
- 16) 竹内妙子 (1987): 千葉農試特報 14: 1-75.
- 17) ———— (1993): 第3回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨.
- 18) 田中 薫・木曾 皓 (1991): 日植防報告 5: 17-22.
- 19) 手塚信夫・——— (1977): 農水省野菜試験報告 C3号 p. 51.
- 20) ———— (1976): 農薬誌 1: 321-324.
- 21) 氏家 敬ら (1992): 日植病報 58: 608 (講要).
- 22) 山本 盤 (1975): 植物防疫 29: 194-196.
- 23) ———— (1976): 昭和51年度薬剤耐性菌に関するシンポジウム講演要旨, 日植防協会, 東京, pp.17-22.