

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 (11)

野菜類細菌病菌・コンニャク腐敗病菌

佐賀県農業試験研究センター
群馬県農政部農業技術課まつ
松
はやし
林ざき
崎まさ
正
のぶ
宣ふみ
文
お
夫

——野菜類細菌病——

は じ め に

ストレプトマイシン剤は銅剤とともに植物細菌病の重要な防除薬剤として使用されているが、銅剤に比べて適用範囲が狭く、野菜の細菌病ではハクサイ軟腐病とタマネギ軟腐病にのみ適用登録がなされている。キュウリ斑点細菌病の防除薬剤としてストレプトマイシン剤は使用されていないが、その病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* を全国から採集し、ストレプトマイシン剤に対する感受性を検定したところ、耐性菌がかなりの頻度で存在することが明らかにされた（向ら，1976；内藤・桜井，1978）。また、レタスにも同様にストレプトマイシン剤は使用されていないが、レタス腐敗病の病原細菌 *P. cichorii*, *P. viridiflava* やレタス軟腐病の病原細菌である *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* においても、本剤に対する耐性菌の存在が明らかにされている（松崎ら，1981）。

1 検定用細菌の採集と保存

常法に従い、病組織をすりつぶし、脇本処方¹の半合成培地（以下、PSA と略記する）（脇本，1955）で目的とする細菌を分離し、保存する。すなわち、単一集落培養を3回繰り返して菌の純粋性を確認した後、直ちに真空凍結乾燥法（向・草葉，1962）によってアンブルで保存するか、西山の凍結法（西山，1977）により小試験管に入れて冷凍庫内で凍結保存する。

2 検定用細菌の調製

真空凍結乾燥法または凍結法で保存した菌株を、PSA を分注した試験管の斜面培地上に移植し、28℃で2日間培養したのち、培地上に増殖した細菌を白金耳でかき取り、試験管に分注した滅菌水中に浮遊させ、それをサーモミキサー等でかくはんしながら、10 倍希釈法で必要に

応じ所定の細菌濃度に調整する。使用する試験管は 18 mm（直径）×180 mm（長さ）程度が望ましい。

3 培地の調製と検定方法

硫酸ストレプトマイシンを滅菌蒸留水に2倍段階希釈系列に溶解し、最終濃度が有効成分として 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 ppm になるように、殺菌した直径 9 cm のシャーレに 1 ml あて注入したのち、あらかじめ溶かして 50℃に保温した PSA 9 ml を注ぎ、よく混合して平板とする。

10⁴ 個/ml の濃度になるように細菌浮遊液を調整し、前記のようにストレプトマイシンの濃度を調整した PSA 平板培地の各平板を数分画にわけ、その1分画に内径 1 mm 前後の白金耳（ニクロム線の場合はなるべく細いもの）を用い、1 白金耳ずつ約 2 cm の長さに画線塗抹し、所定温度で一定時間培養したのち、接種した細菌の生育度から、それぞれの菌株の最小生育阻止濃度（MIC）を求める。なお、培養温度は検定に用いるその細菌の生育適温とし、培養時間は 24～48 時間程度である。例えば、*P. cichorii*, *P. marginalis* pv. *marginalis*, *P. viridiflava* 及び *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* では 24℃で 48 時間、*E. carotovora* subsp. *carotovora* では 28℃で 24 時間である。

4 判定基準

ストレプトマイシンの濃度を調整した PSA 平板培地上に 1 白金耳ずつ約 2 cm の長さに画線塗抹し、所定温度で一定時間培養したのち、接種した部分の細菌の生育温度を、＋，±，－に分類する（図-1）。

5 その他の留意点等

(1) 供試する菌株及び菌株数

検定に供試する菌株は単一集落培養を3回程度行ったものを用いる。また、MIC 値を調査し、感受性の頻度分布を求めるためには、一つの病原細菌で菌株数は 50 菌株以上あったほうが望ましい。

(2) 供試する試薬

培地調製の試薬から寒天に至るまで、一連の実験が終了するまで、同一製品で同一ロットのものを使用するこ

Methods for Monitoring Streptomycin Resistance —
Vegetables (Bacteria) and Konnyaku Soft rot (*Erwinia*
carotovora subsp. *carotovora*) By Masafumi MATSUZAKI and
Nobuo HAYASHI

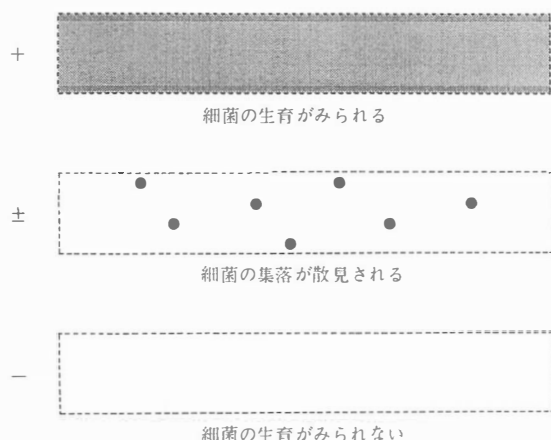


図-1 画線塗抹し、接種した細菌の生育状況

とが、実験誤差を少なくする要因となっている場合が多い。

参 考 文 献

- 1) 松崎正文ら (1981) : 日植病報 47 : 297~300.
- 2) 向 秀夫・草葉敏彦 (1962) : 明日山秀文・向 秀夫・鈴木直治 (編) 植物病理実験法 . p. 78~82, 日本植物防疫協会.
- 3) ———ら (1976) : 日植病報 42 : 61 (講要).
- 4) 内藤 久・桜井 寿 (1978) : 同上 44 : 405 (講要).
- 5) 西山幸司 (1977) : 植物防疫 31 (11) : 465~467.
- 6) 脇本 哲 (1955) : 九大農芸誌 15 : 151~160.

(松崎正文)

——コンニャク腐敗病菌——

は じ め に

コンニャク腐敗病の防除は、植え付け前の罹病種球の選別・除去と植え付け後のストレプトマイシン (以下、SM という) 剤やボルドー液の散布等により行われている。病原細菌である *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* については、田部井・向 (1955) と国枝 (1962) が培地上で SM 耐性菌が出現することを、また、桜井ら (1976) が全国各地からの採集菌の中に SM 耐性菌が存在していたことをそれぞれ報告している。1977~78 年に群馬県内の主要コンニャク栽培地帯から採集したコンニャク腐敗病菌でも SM 耐性菌の発生が確認されている (林・賛田, 1981)。

そこで、本病原細菌の SM に対する感受性の検定法について記載する。

1 病原細菌の分離方法

分離用培地には通常、変法ドリガルスキー培地等本病

原細菌の選択培地を用いる。分離源は、小葉、葉柄、球茎のいずれの部位でもよい。現地の圃場で小葉、葉柄の罹病標本を採集する場合は、殺菌した試験管を準備し、殺菌した爪楊枝で軟腐状態になっている病斑部を少量かきとり、爪楊枝ごと試験管に入れて持ち帰る。その試験管に殺菌水を入れて懸濁し、希釈平板法により菌を分離すると効率的である。球茎の場合、罹病球茎を採集し、軟腐状態になっている病斑部を白金耳あるいは殺菌した爪楊枝でかきとり同様に分離する。

2 病原細菌の同定

本病原細菌を正確に同定するには、所定の同定手順により細菌学的性質を調査することが必要であるが、試験の目的により簡略化できる。簡易な方法としては、変法ドリガルスキー培地上に出現したコロニーの色、形状等で判別する方法がある。また、西山 (1978) の簡易同定法によってもよい。すなわち、病原性、グラム反応、発酵性、オキシダーゼ活性、黄色色素の産生、硝酸塩の還元、スクロース及びラクトースからの酸の産生、36℃における生育、 α -メチルグルコシドからの酸の産生等について調査し、本病菌とみなされた菌株を検定用菌株とする。

なお、病原性は厚さ 1 cm に輪切りしたコンニャク球茎のスライスに、供試菌を接種し、腐敗の有無により確認できる。

3 検定方法と判定基準

日本化学療法学会 (1975) が定めた最小生育阻止濃度測定法に準じて行う。その要旨は、以下のとおりである。

(1) 感受性測定用培地はいずれの会社の製品でもよいが、検定結果の報告には製造会社名を記す。筆者は通常、菌増殖用培地として Trypticase Soy Broth (BBL)、感受性検定用培地として Hert Infusion Agar (BBL) を使用している。

(2) SM の濃度段階は 2 倍段階希釈法を使用し、最高は 1,600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とする。

検定作業を効率的に行うには、0, 25, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の培地での生育の有無を調査し、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育しない菌株を感性菌、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育し、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育しない菌株を中等度耐性菌、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育する菌株を高度耐性菌とすることができる。

(3) 接種用菌液は約 10^8 cfu/ml に増殖したものを、100 倍に希釈して用いる。培養後長期間保存してある菌株を試験する場合は、少なくとも 1 回以上継代培養し、継代培養後の菌を使用する。

耐性菌のモニタリング調査では、変法ドリガルスキー

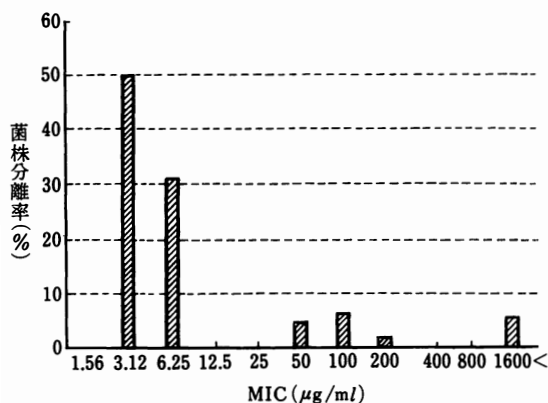


図-1 コンニャク腐敗病菌の SM 感受性の頻度分布
(1977~'78)

培地に出現したコロニーを1個、白金耳あるいは殺菌爪楊枝で5mlの殺菌水に懸濁し、それを検定用の菌液として利用することもできる。

(4) 菌の生育を完全に阻止する薬剤の最低濃度をもって感受性を判定する。通常の薬剤では、コロニーが1個でも生育した場合、またはきわめてうすい菌苔が生育した場合「生育」とみなすが、SMについては、耐性変異率が高いため、対照区(薬剤を含まない培地)の生育と比べて明らかに生育が抑制された濃度以上の高濃度において、2,3のコロニーが認められることがあるが、これは除外する。

(5) 培養温度は28℃、培養時間は20~24時間とする。

4 MICによる耐性菌の類別

MIC 3.12~6.25 μg/mlの菌株を感性菌、50~200 μg/mlの菌株を中等度耐性菌、1,600 μg/ml以上の菌株を高度耐性菌とする(図-1)。

5 菌株の保存方法

一般の植物病原細菌の保存法である凍結保存、凍結乾燥等で行う。

6 その他の留意点

(1) MICと防除効果

MIC 3.12~6.25 μg/mlの感性菌に対しては、SM 20%水和剤1,000倍液の防除価は100で、十分な防除効果が認められる(表-1)。MIC 50~200 μg/mlの中等度耐性菌に対しては、防除価の平均は22.4と感性菌に比較して著しく低下する。1,600 μg/ml以上の高度耐性菌に対

表-1 菌株のMIC値とSM剤の防除効果の関係(ポット試験)
(1979)

供試菌株	小葉の発病か所率				防除価 ^{a)}	
	無処理		SM剤処理		2日後	3日後
	2日後	3日後	2日後	3日後		
7932E (S ₁) ^{b)}	88	96	0	0	100	100
7933E (S ₂)	100	100	0	0	100	100
7935E (R ₁)	100	100	48	72	52.0	28.0
7936E (R ₂)	96	96	76	80	20.8	16.7
7937E (RR ₁)	100	100	92	100	8.0	0
7938E (RR ₂)	100	100	100	100	0	0

^{a)} 防除価 = $\frac{\text{無処理の発病か所率} - \text{SM剤処理の発病か所率}}{\text{無処理の発病か所率}}$

×100.

^{b)} Sは感性菌, Rは中等度耐性菌, RRは高度耐性菌を示す。

しては、防除価はさらに低下し、どの菌に対しても薬剤の防除効果はほとんど認められない。

(2) 耐性菌と感性菌の競合

本病菌の場合、SM剤の淘汰圧の存在下ではしだいに耐性菌が優勢になるが、淘汰圧のない状態では耐性菌の感性菌に対する競合力が弱いために感性菌が優勢になる(林・賛田, 1985)。

(3) SM剤の使用法

コンニャク腐敗病防除におけるSM剤の使用については、次のような注意が必要である。すなわち、耐性菌の発生を未然に防止するためにはSM剤の連用を避け、使用回数も年2~3回程度とし、ボルドー液との混用あるいは交互使用を行う。また、耐性菌が高率に発生した場合はSM剤の使用を2~3年間中止し圃場における耐性菌の割合を低下させてから使用する。

引用文献

- 1) 田部井英夫・向秀夫(1955): 日植病報 20: 42(講要)。
- 2) 国枝鋤造(1962): 兵庫農科大学加古川農場植物病理学研究室業績。特別報告第1号: 1~42。
- 3) 桜井 寿ら(1976): 日植病報 42: 107(講要)。
- 4) 林 宣夫・賛田裕行(1981): 群馬農試報 21: 25~36。
- 5) 西山幸司(1978): 植物防疫 32: 283~288。
- 6) 日本化学療法学会(1975): Chemotherapy 23(8): 1~2。
- 7) 林 宣夫・賛田裕行(1985): 群馬農業研究 A 総合2: 15~26。

(林 宣夫)