

## 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(14)

## ナシ黒星病菌

農林水産省果樹試験場 <sup>いし</sup>石 <sup>い</sup>井 <sup>ひで</sup>英 <sup>お</sup>夫

## —ナシ黒星病菌(ベンゾイミダゾール剤)—

## はじめに

ナシ黒星病の防除薬剤としては、チアジアジン、ジネブ、キャプタン、有機銅、有機銅・キャプタンなどの非選択的殺菌剤が古くから使用されていたが、1971年、チオファネートメチル、ペノミルのベンゾイミダゾール系殺菌剤が登録され、広く普及に移された。しかし、1975年には、いくつかのナシ産地で黒星病に対するベンゾイミダゾール系薬剤の効力不足が指摘され、また本病の多発が薬剤耐性菌の出現によることが明らかになった (ISHII and YAMAGUCHI, 1977)。

ナシ黒星病菌 (*Venturia nashicola*) のベンゾイミダゾール剤に対する耐性の検定法については種々検討され、簡易検定法 (梅本・長井, 1979) も含めて既に確立したものととなっているので、それらをここで紹介する。

## 1 検定用材料の採集

ナシ黒星病は、主として雨媒伝染により引き起こされ、病原菌の伝搬距離は短いといわれている。したがって、同一圃場であっても耐性菌が不均一に分布することもあり得る。事実、菌の採集方法によって耐性菌の検出割合に大きな違いがみられた (表-1, ISHII et al., 1985)。そこで、特に耐性菌の年次変動等の推移を調査する場合には、たとえ耐性菌が高率に分布する圃場であっても、1樹のみから材料を採集するのは適当ではなく、異なるいくつかの樹から材料を得ることが必要である。図-1は、ベンゾイミダゾール剤の使用中止後の耐性菌検出割合の推移を示している (ISHII et al., 1985) が、この場合は、計13の圃場ごとに特定の5樹 (中央及び4隅) を選んで罹病葉を採集、圃場全体で毎年130菌株を分離して、耐性の検定に供した。

## 2 菌の分離

ナシ黒星病菌は培地上での生育が遅いため、一般には分離が難しいとされているが、梅雨期ごろまでに新鮮な

病斑を材料に選べば、かなり高率に純粋培養を得ることができる。一方、盛夏季以降になるとナシの葉や果実の上のマイクロフロラが複雑になるほか、黒星病菌自体の活力も低下する傾向があるので、概して分離は難しい。

同一病斑上に本菌のベンゾイミダゾール耐性菌が感受性菌と混在したり、耐性程度の異なる菌が混在したりすることは少ない (石崎ら, 1983)。また、純粋分離した菌を用いる場合、後述するように容易に耐性の有無や耐性程度を判別することが可能である。したがって、ベンゾイミダゾール耐性の検定の場合には必ずしも菌を単孢子分離しなくてもよい。

乾燥アンズ果実 25 g をイオン交換水 200 ml 中で30分間煮沸、滷過した後、水を足して全量を 1 l とする。こ

表-1 ナシ黒星病菌の圃場からの採集方法及耐性菌の検出割合

方法	菌株数				計
	感受性	弱耐性	中等度耐性	強耐性	
1. 全部の樹より 1菌株ずつ	20	0	19	17	56
2. 中央の1樹より 50菌株	0	0	13	37	50
3. 任意の5樹より 10菌株ずつ	10	1	11	28	50
4. 任意の10樹より 5菌株ずつ	17	0	12	21	50

$$\chi^2 = 34.3 \quad (P < 0.001)$$

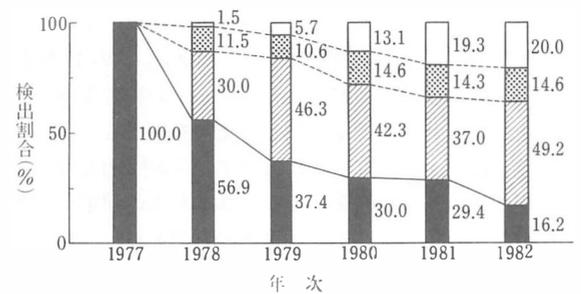


図-1 鳥取県果実連花粉事業所内圃場におけるナシ黒星病菌の耐性菌検出割合の推移

■ 強耐性菌, ▨ 中等度耐性菌, ▩ 弱耐性菌, □ 感受性菌

Methods for Monitoring Fungicide Resistance—Pear scab (*Venturia nashicola*). By Hideo Ishii

れに寒天粉末を 35～40 g 加えて、100℃で 30 分間殺菌する。乾アンズが入手困難なときは、「DMI 剤」の項で述べる抗生物質入りの PDA 培地を用いてもよいが、どちらの培地も細菌の繁殖を抑える目的で pH を低くしてあるので、加圧殺菌はしてはならない。培地を強酸性条件下で加圧殺菌すると寒天が分解し、冷えても固まらなくなる。

このように調製した培地に病斑上の分生孢子塊を白金かぎで移植する(高梨, 未発表)。その際、分生孢子を多く採ると、それだけコンタミネーションも起こりやすいので、なるべく小さな分生孢子塊を採り、これが附着した白金かぎの先端を培地表面に突き刺すようにする。また、黒星病菌の培地上での生育適温は 20℃であるが、雑菌、特に細菌の繁殖を少なくするために分離用の培養は初め 15℃で行うほうがよい(梅本, 私信)。

### 3 検定方法と判定基準

市販のチオファネートメチル 70%水和剤やベノミル 50%水和剤を用いてもよいが、筆者はカルベンダジムの 60%水和剤または純品をメーカーから入手して供試している。水和剤の場合は殺菌蒸留水に懸濁させ、また純品はアセトンに溶解させて PDA 培地に混ぜる。前者では培地と薬液を 9:1 に、また後者では 49:1 の割合に混ぜて、添加後の薬剤の有効成分濃度がおおの 0, 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるようにして平板を作製する。ペクtonディッキンソン社製のファルコン インテグリティッドペトリ皿(注文番号 1012, 100×15 mm, 1 ケース 500 組入り)を使うと、1 枚に 36 菌株を培養することができて大変便利である(口絵写真参照)。その場合は、1 枚につき薬剤添加培地を 30 ml 分注する。なお、上記のベンゾイミダゾール剤の抗菌活性はいずれも熱に安定なので、培地に添加後、オートクレーブで殺菌しても問題はない。チオファネートメチルの場合はオートクレーブ処理したほうがむしろ抗菌活性が高くなるが、これはカルベンダジムへの変換が起こりやすいためである(石井・柳瀬, 1983)。

純粋分離した供試菌株の菌叢片を PDA 平板培地上に接種、20℃で 45 日間前培養した後、菌叢の周縁部からコルクボーラー(直径 4 mm)でディスクを打ち抜く。これを裏返しにして、菌叢面が直接薬剤と接触するように検定培地上に接種、20℃で 3 週間培養する。

ベンゾイミダゾール系薬剤を全く使用したことのない圃場から分離されたナシ黒星病菌の菌糸生育は通常、同薬剤 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で完全に抑制され、これが薬剤感受性のベースラインと考えられる。耐性判定の指標として MIC (最小生育阻止濃度) と  $\text{EC}_{50}$  (50%生育阻止濃度) のどちらが適当か、しばしば論議されるところであるが、本菌

とベンゾイミダゾール剤の組み合わせにおいては、MIC を採用して全く問題はない。すなわち、カルベンダジム 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加培地上で菌糸生育が認められれば耐性菌、認められなければ感受性菌ということになる。これは、チオファネートメチルやベノミルを供試しても同様である。また、 $\text{EC}_{50}$  を算出する必要がないことから、菌叢直径を測定することも不要である。そこで、病斑から菌を純粋分離し、菌叢が直径 1 cm ぐらいになったら、そこから菌叢片をとり直接検定培地に接種してもよい。これによって PDA 平板培地での前培養に要する時間と労力等が省ける。

ベンゾイミダゾール剤の使用経歴のある各地のナシ圃場から黒星病菌を分離して検定すると、多くの場合耐性菌が検出され、しかも耐性の程度は菌株によって大きく異なる(Ishii et al., 1992: 図-2)。このため、菌を以下のように類別する、強耐性菌: カルベンダジムの MIC が 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上, 中等度耐性菌: MIC が 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上で 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下, 弱耐性菌: MIC が 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上で 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下, 感受性菌: MIC が 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下(口絵写真参照)。これは当初、便宜的なものであったが、その後の遺伝学的あるいは生化学的研究によって、その妥当性が裏づけられている(Ishii et al., 1984; Ishii and DAVIDSE, 1986)\*。

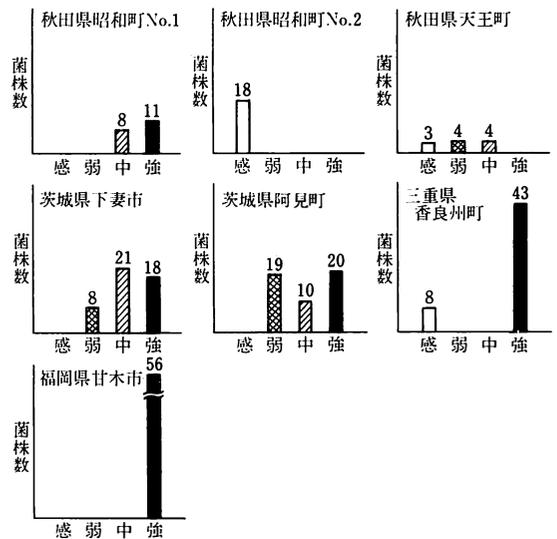


図-2 各地の圃場におけるベンゾイミダゾール系薬剤耐性ナシ黒星病菌の分布 (1987)<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup>強: 強耐性菌, 中: 中等度耐性菌 弱: 弱耐性菌, 感: 感受性菌

\*ナシ黒星病菌の染色体上にはベンゾイミダゾール感受性をコードする1個の主働遺伝子 *BenI* が存在し、その突然変異によって同薬剤に対する耐性が発現する。また、強耐性、中等度耐性、弱耐性はそれぞれ同じ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。

#### 4 簡易検定法

純粋分離菌を用いる上記の検定法は、精度、再現性の点で優れるが、検定までに長い期間を要するという問題がある。そこで考案されたのが「発芽管隔膜法」である(梅本・長井, 1979)。

採集した単一病斑上の分生孢子塊を純粋分離することなく、直接検定用培地上に塗沫接種する。その際、同じ病斑上の孢子塊を薬剤無添加の対照区から1, 10, 100 µg/ml 添加区へと順に白金かぎで培地面になすり付けるが、孢子をあまり多く採ると雑菌の混入が起りやすくなるので注意する。次いで、15°Cで2~3日間培養後、孢子発芽管の隔膜形成の有無を光学顕微鏡(100~200倍)で観察する。

ベンゾイミダゾール系薬剤は一般に、低濃度で菌の孢子発芽を抑える作用が弱い。しかし、感受性菌の孢子は1 µg/mlの薬剤存在下で発芽管の伸長が強く抑えられ、孢子の長径(15~20 µm)の長さ以上にはならず、しばしば発芽管先端の湾曲や奇形化が観察される(口絵写真参照)。また、発芽管に隔膜を形成しない。一方、耐性菌は1 µg/ml区でも薬剤無添加区と同様に孢子発芽管をおう盛に伸長させ、発芽管中に隔膜を形成する。そこで、この隔膜形成の有無を指標として耐性の判定を行う。発芽管の長さや隔膜数との間には高い相関が認められるので、少し慣れれば顕微鏡の視野を一目みて、それらの孢子群が耐性か感受性かを判定することは比較的容易である。また、100 µg/ml, 10 µg/ml, 及び1 µg/ml区での隔膜形成の状況に基づいて、耐性菌を強耐性菌、中等度耐性菌、弱耐性菌に区別する。

「発芽管隔膜法」は優れた方法で、簡易かつ迅速に耐性を検定できるため、耐性菌検定事業などに広く用いられているが、いくつかの問題点もある。病斑上の孢子を直接薬剤添加培地へ塗沫接種して培養するため、しばしばコンタミネーションが起り、孢子の発芽や発芽管伸長、さらには隔膜形成にその影響が出ることも、また同じサンプルを用いた追試験が行えないことなどである。このほか、菌の耐性と感受性の判別は容易であっても、耐性菌の耐性程度の判定が必ずしも簡単ではない。したがって、検定の目的やサンプルの量などに応じて、純粋分離した菌を用いるか、あるいはこの簡易検定法を用いるかを判断し、適宜両者の方法を使い分けるのが望ましい。

#### 5 防除効果との関係

実験室内で培地を用いて行われる耐性検定の結果から、薬剤の圃場における効果を予測することは必ずしも容易ではない。菌の絶対量(密度)やナシの栽培条件、気象条件などが地域や圃場によって異なり、これが発病

表-2 チオファネートメチル剤(467 ppm)を散布したナシ葉にナシ黒星病菌の耐性菌と感受性菌を混合接種して得られる防除価と接種源中の耐性菌比率との関係

比率	防除価*	
	中等度耐性菌：感受性菌	弱耐性菌：感受性菌
1：0	-62	-11
3：1	-20	39
1：1	21	35
1：3	20	45
0：1		100

$$* \text{防除価} = \frac{\text{薬剤無散布区の発病率} - \text{薬剤散布区の発病率}}{\text{薬剤無散布区の発病率}} \times 100$$

のしやすさ(disease pressure)に、ひいては薬剤の効果にも影響を及ぼすからである。そこで多くの場合、ポット植えの植物等を用いた菌の接種試験によって薬剤の効果を調べ、圃場における効果を予測するに留まっている。

ナシ黒星病菌では、耐性菌の孢子を感受性菌の孢子と種々の割合で混ぜ、これを、あらかじめチオファネートメチル剤を実用濃度で処理したポット植えのナシ(品種：長十郎)の葉に噴霧接種して、薬剤の効果を調べた。その結果(表-2)、中等度耐性菌と感受性菌の組み合わせのみならず、弱耐性菌と感受性菌の組み合わせにおいても、薬剤による防除価の低下が観察された。このモデル試験の結果から、耐性程度の低い弱耐性菌であっても、発病に好適な条件下では薬剤の防除効果の低下を引き起こすこともあり得ると判断された。

#### 6 残された問題点

耐性菌のモニタリングデータを有効に利用して的確な防除を行うためには、圃場における菌の絶対量や耐性菌の割合、disease pressureと薬剤の効果との関係が明らかになっていなければならない。しかし、黒星病の発生予察法自体が確立されていない現状では、きめ細かな防除指針の策定には至っていない。

#### 引用文献

- 1) ISHII, H. and A. YAMAGUCHI (1977): Ann. Phytopath. Soc. Japan 43:557~561.
- 2) 梅本清作・長井雄治(1979): 日植病報 45: 430~435.
- 3) ISHII, H. et al. (1985): Plant Pathology 34: 363~368.
- 4) 石崎 寛ら(1983): 日植病報 49: 347~351.
- 5) 石井英夫・柳瀬春夫(1983): 同上 49: 134 (講要).
- 6) ———— et al. (1992): Plant Pathology 41: 543~553.
- 7) ———— et al. (1984): Meded. Fac. L and bouww. Rijksuniv. Gent. 49/2a: 163~172.
- 8) ———— and DAVIDSE, L. C. (1986): In: Proc. 1986 Br. Crop Prot. Conf. pp. 567~573.