

灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の選択分離培地を用いた 空中孢子密度測定法

大阪府立農林技術センター **お** **だ** **きよ** **つぐ**
岡 **田** **清** **嗣**

はじめに

灰色かび病は、施設栽培の増加に伴い、多くの作物に被害をもたらすようになった。被害が、果実や花弁など商品となる部位に生ずるため、多発すると農家に著しい損失をもたらす。本病は空気伝染性であり、罹病組織上に形成された多量の分生孢子が、空气中に飛散し茎葉に附着して新たな感染・発病を繰り返す。このため、空气中の飛散孢子密度が二次伝染時の伝染源密度と密接に関連し、本病による被害の多少に影響する。そこで、飛散孢子密度を迅速に把握できれば、的確な発生予測が可能となる。特に施設栽培では、分生孢子形成に好適で孢子的飛散が施設内に限定されるので、飛散孢子密度は露地栽培に比べ当然高くなる。また、感染発病に好適な条件が得られやすいことから、飛散孢子密度が発病に及ぼす影響は大きくなると考えられる。

一方、本病の防除においては、殺菌剤の散布による化学的防除が主要な位置を占めている。しかし、薬剤耐性菌の発生による効力の低下という問題を生じている。薬剤耐性は、新たに開発された効果の高い薬剤に次々と発達した。作用点の異なる複数の薬剤に耐性を有する、いわゆる多剤耐性菌の発生も確認されている。薬剤耐性の発達を助長する同一薬剤の連用をさけるために、作用点の異なる薬剤のローテーション散布が推奨されている。防除薬剤の選択に当たっては、圃場に分布する耐性菌の種類とその比率を把握することが不可欠である。これまで薬剤耐性菌の種類は、罹病組織から分離した菌株の検定培地上での菌糸伸長によって判別してきた。この方法は、菌株分離から培地検定まで長い時間と多大な労力を要するため、農家段階での薬剤選定には利用できなかった。

さて、今後の本病の防除に当たっては、環境保全型の防除の視点が望まれており、薬剤以外の防除技術も開発されつつある。将来的には各種防除技術を有機的に組み合わせた総合防除体系の確立が必要である。その中でも、効果の著しい薬剤防除は重要な位置を占めるで

あろう。薬剤防除を必要最小限とするためには、迅速かつ精細な発病予測に基づいて適切な防除技術が選択され、実施されなければならない。本病においては、分布する薬剤耐性菌の種類と空气中の病原菌密度の、迅速な把握が発生予測と防除薬剤選定に有効である。

今回、灰色かび病菌の選択分離培地および、これを利用した空中飛散孢子密度の推定法、薬剤耐性菌の種類別の判定法を開発したので、それらについて紹介する。

I 選択分離培地の処方と特性

1 培地の処方

Czapek 寒天培地を用いて、灰色かび病菌の基本培地の検討を行った。その結果、炭素源はフラクトース、窒素源はL-グルタミンが有効であった。また無機塩類については、KCl および $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を除いたほうが孢子的発芽および菌糸生育が良好であった。

次に、施設内の空气中に存在する、*Alternaria* 属菌、*Cladosporium* 属菌、*Aspergillus* 属菌、*Penicillium* 属菌、*Trichoderma* 属菌等の孢子由来の菌叢形成の阻害を目的に抗菌物質の検討を行った。その結果、酢酸トリフェニル錫は、*B. cinerea* 以外の糸状菌に対し 1 ppm 以下で強い静・殺菌効果を示したが、*B. cinerea* に対しては 3 ppm 以上で静菌作用を示した。また、*Cladosporium* 属菌や *Alternaria* 属菌の生育は、塩基性塩化銅の 25 ppm 添加によって抑制された。以上のことから、選択分離培地 (SBc 培地) の組成を表-1 に示す処方とした (岡田ら、

表-1 灰色かび病菌選択分離培地 (SBc 培地) の組成

基本培地 ^{a)}		抗菌物質 ^{b)}	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5 g	硫酸ストレプトマイシン	300 ppm
NaNO ₃	2.0	酢酸トリフェニル錫 ^{c)}	1.5
K ₂ HPO ₄	1.0	塩基性塩化銅	25
L-グルタミン	2.0	ローズベンガル	25
フラクトース	10.0		
寒天	15.0		
蒸留水	1,000 ml		

a) : 基本培地は 121°C, 10 分加圧蒸気滅菌する。

b) : 抗菌物質は加熱融解後、50°C まで冷ました基本培地に添加する。

c) : 本剤 150 mg を DMSO 100 ml に溶解し、1 ml を添加する。

Selective Medium for Detecting Air Borne Spore of *Botrytis cinerea* PERSOON. By Kiyotsugu OKADA

1992)。

基本培地は 121°C10 分間加圧蒸気滅菌すれば、長期間保存可能である。酢酸トリフェニル錫は 150 mg をジメチルスルホキシド (DMSO) 100 ml に溶解し、その他の抗菌物質とともに基本培地が約 50°C に冷めた後に添加する。pH の調製は特に必要なく、分注後の培地の pH は 5.8 ± 0.2 を示す。

2 培養条件とコロニーの形状

本選択分離培地での灰色かび病菌の培養は、20~25°C、暗黒条件で行う。明条件下では、ローズベンガルの赤色が脱色しやすく、また *B. cinerea* の発芽および菌糸伸長が悪くなることがある。*B. cinerea* の菌叢は培養 4 日目から、肉眼で観察可能となり、7 日後にはマゼンタ色で大きさ 0.5~2 mm の不整形のコロニーとなる (図-1, 2)。なお、本培地では *Penicillium* 属菌の抑制が不完全でありコロニーを形成するが、*B. cinerea* との識別は容易である。すなわち、培養 4 日後には、*Penicillium* 属菌のコ

ロニーは緑色の孢子形成が認められ、培地裏面の色は暗赤色~黒色に変色するが、*B. cinerea* 菌では表面が灰白~マゼンタ色、培地裏面もマゼンタ色を呈することから両者の識別は容易である。

3 既往の選択分離培地との比較

LORBEER and TICHELAR (1970) や KRITZMAN and NETZER (1978) は、タマネギ灰色腐敗病菌 *B. allii* を土壌および種子から検出するための選択分離培地を報告した。その後、KERSSIES (1990) は KRITZMAN らの培地を一部改変して

表-2 各種選択分離培地における *B. cinerea* のコロニー数の比較

培地の種類	<i>B. cinerea</i> のコロニー数
SBC 培地	87.5 (83.3)
BARDINELL 氏培地	6.5 (6.2)
KERSSIES 氏培地	0.0 (0.0)
PDA 培地	105.0 (100.0)

() 内の数値は PDA 培地に対する相対値を示す。

表-3 孢子トラップ法によって各種選択分離培地に生じた *B. cinerea* のコロニー数の比較

孢子採集場所	作動 ^{a)} 時間	培地の種類		
		SBC 培地	BARDINELL 氏培地	KERSSIES 氏培地
ハウス 1	3 分	190 ^{b)}	NC ^{c)}	11
	5	612	NC	17
ハウス 2	3	734	NC	23
ハウス 3	3	760	NC	31
平均 ^{d)}	1	164	—	5.9

a) : 吸引式孢子採集器の作動時間を示す。

b) : CFU/シャーレ。

c) : コロニー判別および計数不能。

d) : シャーレ 1 枚当たり 1 分間にトラップされたコロニー数。

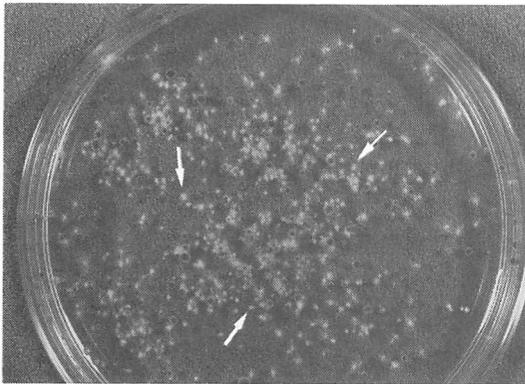


図-1 選択分離培地上における灰色かび病菌コロニーの様子 (表面: 白矢印)

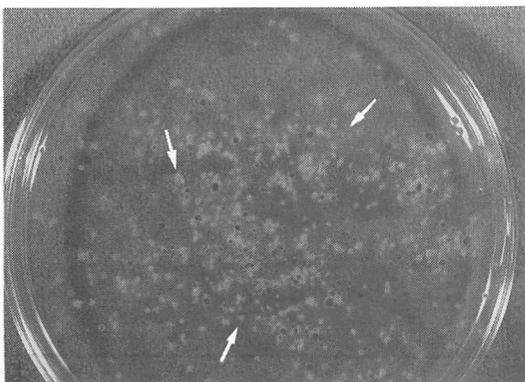


図-2 選択分離培地上における灰色かび病菌コロニーの様子 (裏面: 白矢印)

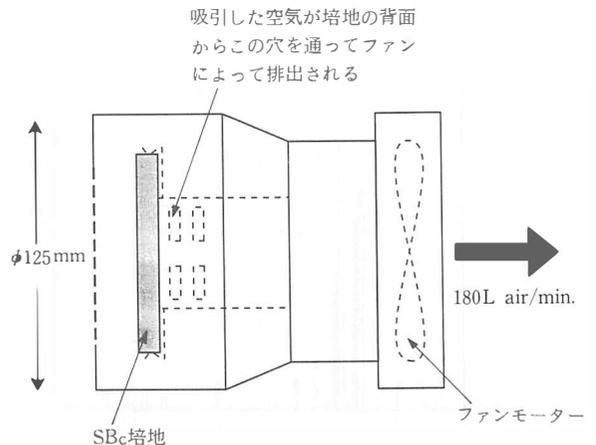


図-3 吸引式孢子採集器模式図

B. cinerea の孢子トラップ用の選択培地 (KERSSIES 氏培地) を開発し, BARDINELL et al. (1989) は薬剤耐性菌診断のための選択培地 (BARDINELL 氏培地) を発表した。

そこで上記二つの培地と SBc 培地の分離精度を, 孢子懸濁液を培地表面に展開する方法と, ハウス内で孢子を吸引式孢子採集器(図-3, 大阪府立農林技術センター製)で吸引トラップする方法の2とおりで比較検討した。BARDINELL 氏培地および KERSSIES 氏培地に比べ, SBc 培地は病原菌の回収率が高かった(表-2)。飛散孢子密度の測定に使用した場合においても, KERSSIES 氏培地に比べ約28倍も精度が高く, 孢子採取にも適していることがわかった(表-3)。また, BARDINELL 氏培地では, *B. cinerea* が菌糸伸長した部分の培地色が紫から黄色に変色するが, 変色部分の重なりや *B. cinerea* 以外の糸状菌による変色も認められたため, コロニー数の計数は困難であった。これらのことから, *B. cinerea* の選択分離培地として SBc 培地が優れていると考えられた。

II SBc 培地の利用

本病の防除には, 施設環境制御による発病抑制対策が有効であることを実証した(入江ら, 1993)。しかし, 本病の発生後においては耕種的な対策を図りつつ, 薬剤主体の防除体系にならざるを得ない。効率的な防除を行うには, 発病の進展を予測して防除の要否を判断し, 最も効果的な薬剤を散布する必要がある。そのためには現状の発病が, 今後どのように影響するかを見極め, 圃場内の薬剤耐性菌の構成割合がどうなっているのかを迅速・的確に把握しなければならない。そこで, 二次伝染時の飛散孢子密度とその後の発病との関係について検討し, 同時にその耐性菌の種類判別を試みた。

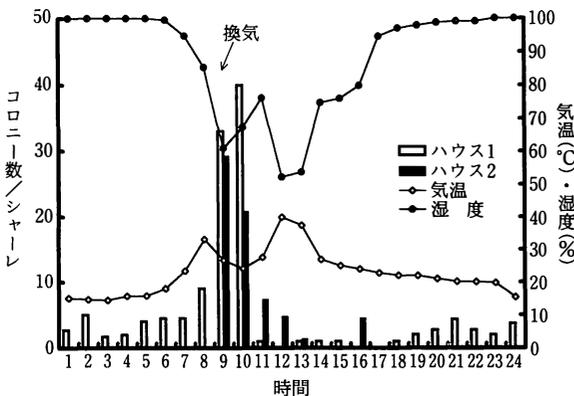


図-4 ハウス内の温湿度変化と飛散孢子量 (1990.5.2)

1 飛散孢子のトラップ

飛散孢子を効率的にトラップするためには, その飛散消長を把握する必要がある。ラズベリー畑においては午前11時前後と午後4時前後 (British summer time) の2回, 相対湿度が急変する時に飛散が起りやすく, 午前中のピークのほうが大きいとした(JAVIS, 1962)。ナス栽培ハウスにおける孢子的時間別飛散量については, 当センター内で1990年4月下旬から5月上旬にSBc培地を用いて調べた。培地は1時間ごとに畝間に設置し, シャーレのふたを5~10分間開放して孢子をトラップした後, 20℃, 5日間培養して生じたコロニー数を計数した。その結果, 午前8時から11時の間はシャーレ当たり10~40個認められたが, 7時以前および12時以降の飛散はシャーレ当たり数個以下であった(図-2)。このことはJAVISの結果と一致し, 本培地によってハウス内の飛散孢子量を把握できると考えられ, 孢子トラップは午前10時前後で実施することが効率的であると思われた。

次に, 飛散孢子密度とその後の灰色かび病の発生との関係について検討を行った。SBc培地と吸引式孢子採集器を用いて, 空気1m³当たりの飛散孢子密度を測定した(岡田ら, 1993)。本採集器は1分間当たり180lの空気を吸引する能力を有し, 約5分間の作動で1m³の空気を選択分離培地表面へ直接触れさせることができるように設計してある。

調査は発病程度が異なるハウス3棟(発病果率0~11%)で, 3~6月までの栽培期間中, 7~10日間隔で8回空気中の飛散孢子密度の測定を行い, 同時にハウス内の発病果率を調査した。その結果, ハウス内の飛散孢子密度は2~734 CFU/m³ airであった。飛散孢子密度(x)と, その時点の発病果率(y)の間には, $y = 1.3607 \ln(x) - 0.5392$ ($R^2 = 0.72$) の回帰式が得られ, 両者の相関関

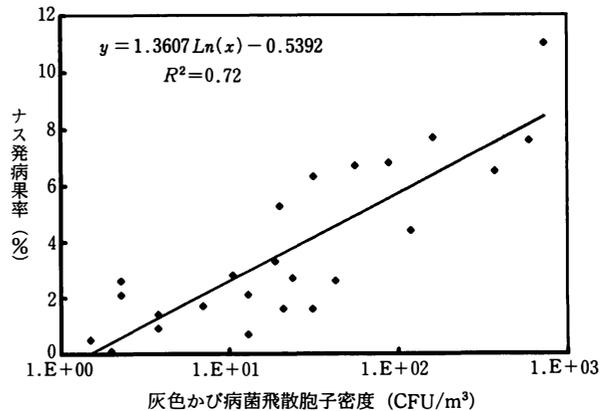


図-5 ナス灰色かび病の発病果率と飛散孢子密度

係は高かった(図-5)。このことは、SBc 培地を用いて飛散孢子密度を調べることにより、その時点の発病程度を推測することが可能なことを示している。しかし、7~10日後の発病果率とは、有為な相関は見いだせず7~10日後の発病程度を孢子密度だけで予測することは困難であった。今後は、病原菌密度とともにハウス内外の気象と発病との関係を解明してゆく必要がある。ともあれ、SBc 培地により病原菌密度を定量的に知る技術が確立されたことは、発病予測法を開発するに際しての有力な武器となるものと思われる。

2 孢子トラップ法による薬剤耐性菌検出・定量

本病の防除においては、殺菌剤の散布が主要な位置を占めているが、薬剤耐性菌の発生による効力の低下という問題を生じている。農家段階において、圃場に分布する耐性菌の種類とその割合を把握することができれば、防除薬剤の選択に非常に有効である。しかし、実際の灰色かび病の薬剤耐性菌検定は、罹病組織や標徴部から得られた病原菌を単菌糸または単孢子分離した後、検定培地へ置床し、生育した菌叢の直径を測定して検定する方法が一般的に用いられている(木曾, 1994)。単菌糸や単孢子分離は非常に操作が煩雑で、被検試料の調製に多くの時間を要する。これに対して孢子トラップ法は、前述のような調整作業を必要とせず、直接、検定培地に分生孢子をトラップし、検定することができる。そこで、胞

子トラップ法によって得られる菌叢の薬剤耐性菌の種類構成、および、孢子トラップに用いる培地として薬剤を添加したSBc 培地が有効であるか否かを検討した。

まず被検菌株が、罹病組織由来の場合と圃場内に飛散する孢子由来の場合とで耐性菌検定の結果に違いが生じるか否かを検討した。すなわち、SBc 培地を吸引式孢子採集器に取り付けて3~5分間ハウス内を通常の歩く速度(0.8 m/sec)で採集し、生じたコロニーを鈎菌した菌株と、常法により罹病組織から分離した菌株における耐性菌検定結果を比較した。その結果、孢子トラップ由来の菌株と罹病組織由来の菌株において、各種耐性菌の種類構成は大きな相違はなく、ほぼ同様であった(表-4)。

次に、防除薬剤を添加したSBc 培地に生じたコロニー数が、各種薬剤耐性菌のコロニー数を反映するか否かを検討した。培地はベノミル 10 ppm, プロシミドン 5 ppm, ジェトフェンカルブ 5 ppm をそれぞれ組み合わせて添加したSBc 培地と、薬剤無添加のSBc 培地を用意し、それぞれの培地に孢子懸濁液(SSR, SRR, RSS, RRS, RSR, RRR)を塗抹して生じたコロニー数を計数することにより比較した。その結果、SBc 培地に防除薬剤を単独または混合して添加しても、それぞれの薬剤耐性菌は無添加とほぼ同様にコロニーを形成した(表-5)。すなわち、添加する薬剤の種類に応じて各種薬剤耐性菌のコロニー数を計測できるので、薬剤耐性菌密度の測定に利用可能であると考えられた。ただし負の交叉耐性を打破する菌株(RSR, RRR)では、無添加に比べ薬剤を添加したSBc 培地でコロニー数がやや少なくなる傾向を示した。

さらにハウスにおいて、ベノミル剤 10 ppm またはプロシミドン剤 5 ppm を添加したSBc 培地で孢子トラップを行い、ベノミル耐性菌とプロシミドン耐性菌の割合

表-4 孢子トラップ由来および罹病組織由来菌株の薬剤耐性菌の種類構成

分離由来	検定菌株数	耐性菌の種類(%)			
		SSR	SRR	RSS	RRS
孢子トラップ	24	0.0	91.7	0.0	8.3
罹病組織	27	14.8	81.5	0.0	3.7

表-5 各種薬剤耐性菌分生孢子の薬剤添加SBc 培地上におけるコロニー形成率

培地の種類	薬剤耐性菌の種類					
	SSR	SRR	RSS	RRS	RSR	RRR
SBc 培地のみ	100 ^{b)}	100	100	100	100	100
SBc+D 5 ^{a)}	100	100	0	0	100	100
SBc+P 5+D 5	0	100	0	0	0	95
SBc+B 10	0	0	100	100	100	100
SBc+B 10+P 5	0	0	0	91	0	100
SBc+P 5	0	100	0	100	0	95
SBc+B 10+D 5	0	0	0	0	85	95
SBc+B 10+P 5+D 5	0	0	0	0	0	77

a) : B 10 : ベノミル 10 ppm, P 5 : プロシミドン 5 ppm, D 5 : ジェトフェンカルブ 5 ppm をそれぞれ添加したことを示す。

b) : SBc 培地上におけるコロニー数を 100 としたときの相対値を示す。

表-6 胞子トラップ法と寒天ディスク法による薬剤耐性菌率の比較

調査圃場	ペノミル剤耐性菌率		プロシミドン剤耐性菌率	
	胞子トラップ法	寒天ディスク法	胞子トラップ法	寒天ディスク法
No. 1	62.4%	71.4%	92.9%	77.1%
No. 2	100	100	93.4	75.0
No. 3-1	98.3	93.3	100	80.0
No. 3-2	97.9	100	99.2	80.8
No. 4-1	75.0	80.6	100	55.6
No. 4-2	77.8	71.4	80.6	78.6

No. 1, 3, 4, はナス, No. 2 はキュウリを対象に調査した

ペノミル(プロシミドン)添加 SBc 培地

$$\text{ペノミル耐性菌率} = \frac{\text{上のコロニー数}}{\text{SBc 培地上のコロニー数}} \times 100$$

(プロシミドン)

を調べた。調査の結果、供試したナスおよびキュウリ栽培ハウスにおける耐性菌率は、胞子トラップ法と慣行の寒天ディスク法においてほぼ同様の結果が得られた(表-6)。なお、プロシミドン耐性菌については、胞子トラップ法が寒天ディスク法に比較し、やや高い割合が得られた。

SBc 培地では、灰色かび病菌のコロニーが 2 mm 程度で生育が止まり、かつ、マゼンタ色を呈しコロニー計数が容易である。また、圃場内を移動してサンプリングできるので、均一な試料採集が可能で、シャーレの使用枚数が少なく済み、採集時間が短いので多数の圃場を短時間で調査できる。また胞子トラップで分離した菌株は、単胞子由来である確率が高く、胞子からの生育の可否によって薬剤耐性を検定しているので、罹病組織中に複数の耐性菌が混在していてもその割合を明らかにすることができる。

以上のことから、空中に飛散する胞子を対象に SBc 培地と吸引式胞子採集器を利用すれば簡便、迅速な耐性菌率の把握が可能であると考えられる。

おわりに

灰色かび病の防除の主体が農薬であることから、必ず薬剤耐性菌の問題が付きまとうことになる。農家においても耐性菌問題に対する認識が高まりつつあり、耐性菌対策としてローテーション散布による薬剤散布が実施さ

れている。しかし、このような散布方法が、果たして耐性菌抑制対策になっているか否かは明りょうではない。

今回、紹介した選択分離培地は胞子採集器との併用により空気中の飛散胞子密度を比較的簡便に測定でき、本培地に防除薬剤を添加することによって薬剤耐性菌の種類構成とその密度を把握できるという利点を有している。これらを実際の農家あるいは普及センター、営農指導員等が利用することにより、防除適期に最も効果的な防除薬剤を選定できる可能性が高い。今後も培地の改良、サンプリングの手法等について検討を重ねて、適期適剤防除の推進を図っていきたい。

なお、本稿のご校閲をいただいた農業研究センター病害虫防除部土壌病害研究室 萩原 廣室長に感謝の意を表する。

参 考 文 献

- 1) BARDINELL, T. R. et al. (1989): *Phytopathology* 79: 1213 (Abstr.).
- 2) 入江和己ら (1993): *植物防疫* 47: 433~437.
- 3) JAVIS, W. R. (1962): *Trans. Br. mycol. Soc.* 45: 549~559.
- 4) KERSSIES, A. (1990): *Neth. J. Pl. Path.* 96: 247~250.
- 5) 木曾 皓 (1994): *植物防疫* 48: 42~46.
- 6) KRITZMAN, G. and D. NETZER (1978): *Phytoparasitica* 6(1): 3~7.
- 7) LORBEER, J. W. and G. M. TICHELAR (1970): *Phytopathology* 60: 1301 (Abstr.).
- 8) 岡田清嗣ら (1992): *日植病報* 58: 554 (講要).
- 9) ———ら (1993): *関西病虫研報* 35: 101~102.