

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 2016

(6) 野菜類灰色かび病菌

—SDHI 剤 (培地・生物検定法)—

三重県農業研究所 ^{すずき}鈴木 ^{ひろふみ}啓史・^{つじ}辻 ^{ともこ}朋子・^{かわかみ}川上 ^{たく}拓・^{くろだ}黒田 ^{かつとし}克利

はじめに

SDHI 剤は、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 II 蛋白質 (コハク酸脱水素酵素) を阻害する FRAC コード 7 の殺菌剤である (Japan FRAC, 2016)。SDHI 剤は世代分けがなされ、ボスカリドとベンチオピラドに続きイソフエタミド、フルオピラム、イソピラザム、フルキサピロキサド等といった第 3 世代と呼ばれる剤が、複数の企業から開発・販売されている (廣岡・石井, 2014)。これらの殺菌剤の耐性菌発生リスクは、日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会によれば中～高とされており、海外では、ブドウ・イチゴ・リンゴ・キウイフルーツ灰色かび病、ウリ類うどんこ病、ウリ類つる枯病、アブラナ科作物菌核病等で、また国内でも、キュウリ褐斑病、キュウリうどんこ病、イチゴ灰色かび病、ナスすすかび病で耐性菌が報告されている (廣岡・石井, 2014)。

有効な殺菌剤を永続的に利用するためには、対象とする病原菌の生態に基づく栽培管理と、その殺菌剤の使用方法を工夫する必要がある。また、耐性菌対策の一つとして殺菌剤に対する感受性の動向をモニタリングして現状を把握することが重要である。ここでは、灰色かび病菌の SDHI 剤 (ボスカリド、ベンチオピラド) に対する感受性低下菌を、培地を用いて検出し、その後、キュウリ子葉を用いて生物検定することで耐性菌かどうか判定する方法について、筆者らが実施している方法を紹介する。

I 検定用材料の調製

1 灰色かび病菌のサンプリング

Water Agar (以下 WA, 18 g/l) 平板, 金属鈎 (割り箸の先に鈎状に伸ばしたクリップを挟みテープで止めることで自作している), ガスバーナ (ライターでも可)

Methods for Detecting SDHI Fungicide Resistance in Vegetables Gray Mold Fungus on Culture Medium and Plants. By Hirofumi SUZUKI, Tomoko TSUJI, Taku KAWAKAMI and Katsutoshi KURODA

(キーワード: SDHI 剤耐性菌, 野菜類灰色かび病, 野菜類灰色かび病菌, 感受性検定法, 寒天培地法, キュウリ子葉法)

を持ち現場に向かう。現場で発病した葉, 茎, 果実上に胞子形成を確認したら, ライターで火焰滅菌した金属鈎を WA 平板で冷却後, その胞子に軽く触れ, 下向きにした WA 平板に画線する。シャーレの 4 隅に画線することで, 1 枚の WA 平板で 4 菌株採取できる。

2 灰色かび病菌の単菌糸分離方法

WA 平板上にサンプリングした灰色かび病菌は, 20℃で 2～3 日間培養する。灰色かび病菌は胞子発芽および菌糸伸長が速いので, 最も生育が速い菌糸はほぼ灰色かび病菌である。その菌糸の先端が位置するシャーレの裏ぶたにマジックで印をつけ, 寒天ごと切り抜いて, PDA (ニッスイ) の斜面培地に移植し, 菌叢を生育させて単菌糸分離株を得る。うまく灰色かび病菌を分離できると, 菌そうの外周にアワビに似た黒い帯ができる。

3 灰色かび病菌の保存法

菌叢を生育させた PDA 斜面培地を, ビニル袋に入れ乾燥を抑制し 20～25℃で保存することで, 2 年間は継代せずに利用できる。石井 (2009) は, QoI 剤耐性菌の検定のために, 継代せず冷凍保存することを勧めている。また, 間佐古 (2009) は, 5℃で冷蔵保存を紹介している。

II 殺菌剤感受性の培地検定法

1 検定用菌株の前培養

PDA 斜面培地上の保存菌株の一部を PDA 平板培地に移植し, 20℃で 3 日間生育させた後, Black Light Blue (BLB) を 20℃で 3～4 日間照射 (高さ: 35～40 cm) して, 胞子を形成させる。

2 検定培地の調製

YBA 寒天培地 (酵母エキス 10 g, ペプトン 10 g, 酢酸ナトリウム 20 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 l) を用いて, 殺菌剤添加培地および無添加培地を作製する。殺菌剤添加培地は, YBA 寒天培地をオートクレーブ滅菌 (120℃, 20 分) し, 55℃程度まで冷却後に, 最終濃度でボスカリド 1 ppm, ベンチオピラド 1 ppm となるように調整する (石井・西村, 2007)。具体的には, 市販の製剤と滅菌水を用いて 100 ppm になるようにボスカリド (カン

タス®ドライフロアブル：0.02 g/滅菌蒸留水：100 ml) およびペンチオピラド (アフエット®フロアブル：50 µl/滅菌蒸留水：100 ml) の懸濁液を作製する。次に、滅菌後の YBA 寒天培地 198 ml に、殺菌剤添加培地には 100 ppm の各殺菌剤懸濁液 2 ml を、殺菌剤無添加培地には滅菌水 2 ml を別々に無菌的に添加する。

検定用の YBA 寒天培地は、滅菌 1 号角シャーレ (栄研化学) に 1 枚当たり約 30 ml 流し込む。このシャーレは 1 枚当たり 20 菌株を置床することができる。前述のように培地 200 ml を作製した場合、角シャーレ 6 枚分を作製することができ、120 菌株の検定が可能である。

3 検定方法

15 ml 容の遠沈管に、乾熱滅菌したペーパーディスク (東洋ろ紙 薄手 径 6 mm) を 3 枚入れる (ボスカリド添加区、ペンチオピラド添加区、無添加区の計 3 区)。こ

の遠沈管に、滅菌水 1 ml を入れる。そして、前培養で孢子形成した部位を、直径 6 mm のコルクボーラで打ち抜き、この滅菌水中に入れることで、懸濁液中の孢子濃度をほぼ $10^4 \sim 10^6$ 個/ml に調整できる (高垣, 2009)。

孢子懸濁液に浸漬したペーパーディスクを取り出し、滅菌ろ紙上で余分な水分を取り除いた後、速やかに殺菌剤含有 YBA 寒天培地上に置床し、暗黒下、20℃ で 7 日間培養後、菌糸生育の有無を観察する。

4 判定基準

最終濃度が 1 ppm となる各殺菌剤添加培地において、20℃、7 日間培養後に、菌糸の生育が認められないものを感受性菌と判定する。一方、生育が認められたものについては、後述する生物検定を行い、耐性菌か否かを判定する (図-1, 2)。

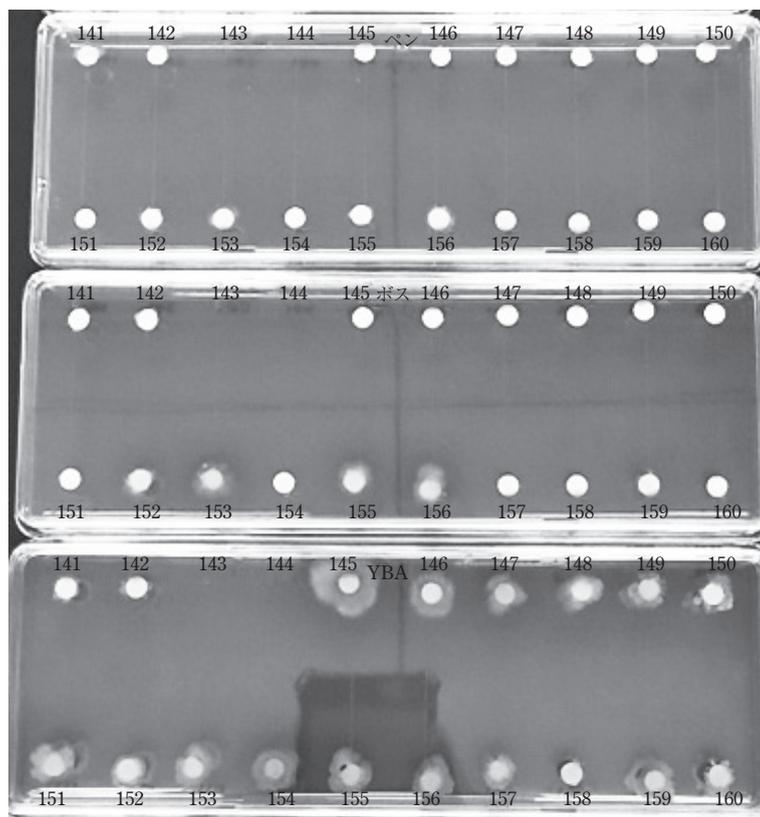


図-1 滅菌 1 号角シャーレを用いた SDHI 剤感受性検定結果
 上段：ペンチオピラド 1 ppm (最終濃度) 添加 YBA 寒天培地。
 中段：ボスカリド 1 ppm (最終濃度) 添加 YBA 寒天培地。
 下段：YBA 寒天培地。
 141, 142, 152, 153, 155, 156 で生育。
 159 はボスカリドのみ生育。143, 144 は欠番。

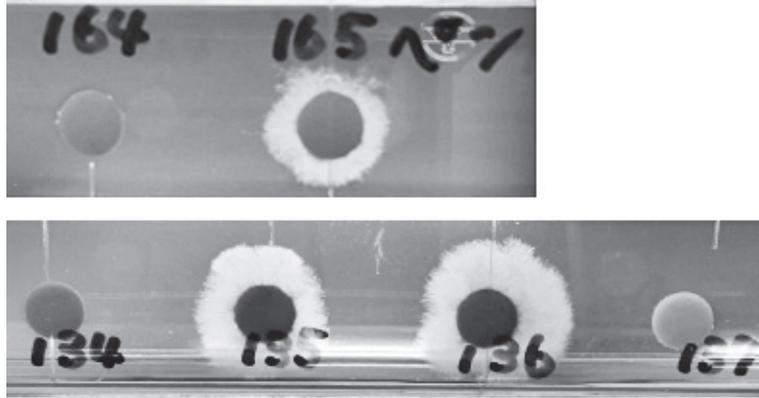


図-2 YBA 寒天培地ペーパーディスク法による菌糸生育
 上段：ベンチオピラド 1 ppm (最終濃度) 添加 YBA 寒天培地 164：感受性菌，
 165：感受性低下菌。
 下段：ボスカリド 1 ppm (最終濃度) 添加 YBA 寒天培地 135, 136：感受性
 低下菌，134, 137：感受性菌。

III 殺菌剤感受性の生物検定法 (キュウリ子葉法)

ここでは、ボスカリドまたはベンチオピラドに対する感受性を評価する場合を想定して説明する。また、検定菌株に加え、ポジティブコントロールとして SDHI 剤耐性菌を、ネガティブコントロールとして SDHI 剤感受性菌を加えることで評価の信頼性が高まる。

1 検定用菌株の前培養

II 章の殺菌剤感受性の培地検定法と同様の方法で、孢子を形成させる。

2 供試キュウリ

キュウリ (品種例：'北進'，タキイ) 種子を、育苗培土を詰めた直径 6 cm ポットに 2 粒を向きを揃え、さらに 3 cm 程離して播く (子葉の向きを揃え、ペーパーディスクを置きやすくするため)。ハウス内の平均気温が 25℃ 程度であれば、1 週間で子葉の展開が揃うことから、検定実施 1 週間前に播種する。検定には本葉が展開する前の若い子葉を用いる。一つの殺菌剤に対する 1 菌株の判定のために、殺菌剤散布区と無散布区の 2 ポットを準備する。

3 殺菌剤希釈液の調製

カンタス®ドライフロアブル (ボスカリド 50%) またはアフエット®フロアブル (ベンチオピラド 20%) を水道水でそれぞれ 1,000 倍 (ボスカリド 500 ppm：実用濃度)，2,000 倍 (ベンチオピラド 100 ppm：実用濃度) に希釈する。なお、展着剤は加用しない。

4 各菌株の接種源調製

15 ml 容の遠沈管に、乾熱滅菌したペーパーディスク

(東洋ろ紙 薄手 径 6 mm) を 8 枚入れる (殺菌剤散布区：4 子葉，無散布区：4 子葉，計 8 子葉分)。この遠沈管に、1/2 濃度の PDB (Becton, Dickinson and Company) 1 ml を入れる。そして前培養により孢子形成した部位を、直径 6 mm のコルクボーラで培地ごと打ち抜き、この 1/2 濃度の PDB に懸濁することで、ほぼ $10^4 \sim 10^6$ 個/ml の孢子濃度に調整できる (高垣, 2009)。菌株ごとに同様の操作を行い、菌液に浸漬したペーパーディスクを接種に用いる。

菌液調製後は、孢子が発芽しない 2 時間以内に接種を終える。時間がかかる場合は、15℃ 程度の定温器に入れ孢子の発芽を遅延させる。この場合も 5 時間以内に接種を終える。

5 殺菌剤散布および菌株接種

あらかじめ、育苗したキュウリポットに、殺菌剤の供試濃度と接種する菌株番号を記載したタグを挿しておく。接種日の午前中に、所定濃度に調整した各殺菌剤希釈液を、ハンドスプレーを用いてキュウリ子葉に十分量散布する (液が滴り落ちない程度)。なお、無散布区も設ける。散布後は菌株番号ごとに、床面に薄く水を張ったコンテナ (キュウリが収まるコンテナの深さが必要) にポットを並べ、風乾する。

同日の午後から菌液を調製し、15 時までには調製を終了する。キュウリ子葉の風乾を確認後、先の孢子懸濁液に浸漬したペーパーディスクを菌株番号ごとに、子葉の中央に 1 枚ずつ技工ピンセット (先直型、長さ 30 cm) を用いて置床する。扱う菌株を変えるときには、ライターで火焰滅菌し、滅菌水で冷却する。



図-3 キュウリポットを並べたコンテナ
胞子懸濁ペーパーディスクをキュウリ子葉に置いた後は、乾かないようにビニル袋で覆う。



図-4 キュウリ子葉を用いた生物検定
左および中央のキュウリ子葉に病斑が見られる。
一方右の列の子葉には病斑が見られない。

接種後、湿度を保つためコンテナを90l容のビニル袋で覆い、20℃、12時間日照条件で、人工気象室内に3日間静置する(図-3)。

6 判定基準

人工気象室内に3日間静置した後、キュウリ子葉に発生した病斑の直径を計測し、次式により各殺菌剤の病斑形成抑制率を算出する(図-4)。

$$\text{病斑形成抑制率} = (\text{無散布区病斑直径} - \text{殺菌剤散布区病斑直径}) / \text{無散布区病斑直径} \times 100 (\%)$$

病斑形成抑制率が60%未満の菌株を耐性菌、60%以上の場合は感受性菌と判断する(鈴木・黒田, 2011)。

IV 検定上の留意点

ボスカリドとペンチオピラドについて、このような検定法に至った経緯を以下に紹介する。

灰色かび病菌のボスカリド感受性検定法として、YBA液体培地で胞子懸濁液を作製し、さらにボスカリドを濃度別に調製した液をマイクロプレートに入れ、培養後にマイクロプレートリーダーで菌の生育を吸光度の値で読み取る方法が提案された(STAMMLER and SPEAKMAN, 2006)。本法により求めたベースライン感受性はMIC 3 ppm以下であることが報告されている。しかし、本法は吸光度計を必要とすることから、石井・西村(2007)はキュウリ褐斑病菌を対象に菌叢ディスクを用いたYBA寒天培地法を提案し、以後キュウリ褐斑病菌ではこの方法が定着している(MIYAMOTO et al., 2009)。そこで、鈴木・黒田(2010)は、灰色かび病菌の菌叢ディスクを用いてこのYBA寒天培地法を検討したが、生物検定(キュウリ子葉法)と一致しないことを確認している。

次に、灰色かび病菌のペンチオピラド感受性検定法としてペーパーディスクを用いたGLYE培地法が提案され、本法によるEC90値に基づく感受性ベースラインは3 ppm以下と報告されている(櫻井ら, 2007)。しかし、三重県において2005～09年に採取した479菌株を用いて検討した結果、GLYE培地法でEC50値が3 ppmより高い菌株が、ペンチオピラド(100 ppm)散布区で発病しないことを確認している(鈴木・黒田, 2010)。

また、他のSDHI剤の感受性を調べる場合は、各メーカーからの情報に留意する。

灰色かび病菌のイソフェタミド(ケンジャ®)の感受性検定法について、本稿で紹介したYBA寒天培地ペーパーディスク法とマイクロプレート法(FRAC, 2009)では感受性検定結果に大きな差は認められず、EC95値は< 0.01 ppm～2.19 ppmに分布し、平均値が0.45 ppmであったとしている(佃, 2015)。また、この報告の中で、sdhB H272R変異のボスカリド耐性菌について交差耐性が認められないとしている。

フルオピラム(オルフィン®フロアブル)について、灰色かび病菌を対象にYBA寒天培地ペーパーディスク法を用いて検出したボスカリド耐性菌(sdhB H272R/Y変異)が、フルオピラムとの交差耐性がないことを、キュウリ子葉法を用いて確認している(Ishii et al., 2013)。また、ヨーロッパにおけるブドウ灰色かび病菌のフルオピラムに対するマイクロプレート法(FRAC, 2009)による感受性モニタリングの結果では、sdhB遺伝子に変異がない感受性菌株に対するEC50は1.1 ppmであった。

もっとも多かった H272R 変異菌株では 0.9 ppm であり、ボスカリドとの間で交差耐性が見られなかった。一方で、P225H/F/L の変異菌株はボスカリドのみならずフルオピラムにも耐性を示し、両殺菌剤間で交差耐性を示した (佐瀬, 2016)。

V 三重県内のモニタリング結果

三重県ではボスカリドが灰色かび病に登録された 2005 年から感受性検定を行っており、登録 6 年目の 2010 年に、ボスカリド感受性の低下した灰色かび病菌を検出した (鈴木ら, 2012)。これらの菌について、sdhB のコドン 272 の塩基が、CGC (アルギニン) へ変異していたが (石井ら, 2012)、ベンチオピラドとフルオピラムに対する交差耐性は見られなかった (石井ら, 2012; 鈴木ら, 2012)。しかし、その後 2012 年には、ベンチオピラド感受性の低下した灰色かび病菌も検出した。

三重県における培地検定によるボスカリドおよびベンチオピラド感受性低下菌株数と、それらについてキュウリ子葉法による生物検定を行い耐性菌と判断した菌株数の推移を示した (表-1)。培地検定による感受性低下菌株数より生物検定菌株数が少ないのは、孢子形成が不良であったり、殺菌剤無散布区の病斑直径が 12 mm 未満の菌株を判定不能としたりして扱ったためである。孢子形成能や病原力の低下の原因が、fitness penalty によるものか否かは不明であるが、現場で問題にならないと考えられる。

キュウリ褐斑病菌やうどんこ病菌では、ボスカリドとベンチオピラド間の交差耐性菌が確認されている (Ishii et al., 2011; 石井, 2012)。一方、灰色かび病菌においても、今回検出されたベンチオピラド耐性菌のほとんど

がボスカリド耐性菌であることから、これらの 2 剤に対する感受性程度の差は殺菌剤の基礎活性の差と推定される。今後、sdhB ほかの遺伝子変異も含めた詳細な解析が必要と考える。

おわりに

施設園芸作物の病原菌における耐性菌の場合、その分布が特定の施設に限られる場合がある。このような事例では、その施設に限って、耐性菌を確認した殺菌剤系統の使用中止を比較的容易に実行できる。特に、灰色かび病の場合は、代替殺菌剤の系統が複数あることから対応可能である。

しかし、耐性菌が確認され、その殺菌剤を使用しないという耐性菌対策は事後対応に過ぎない。まずは、殺菌剤使用以外の防除対策である施設内の環境制御や、伝染源の除去を実行し、病原菌密度を低く抑える。そのうえで、殺菌剤の FRAC コードに基づく意味のある混用あるいはローテーション散布を発病前から確実に実行することを心がけたい。

日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会からは、発病しにくい環境条件にすることや、殺菌剤の予防散布を徹底すること等一般的な耐性菌対策に加え、殺菌剤使用回数に関するガイドラインが提案されている (石井, 2012)。一例としてナス科野菜のガイドラインを紹介する。

・SDHI 剤は単剤あるいは QoI 剤との混用、混合剤のいずれの場合も 1 作 1 回まで。その他の混合もしくは混合剤 (効果が期待できる他の成分を含む) の場合は 1 作 2 回まで。

耐性菌の顕在化を未然に防ぐため、ガイドラインの実行が望まれる。さらに、新規 SDHI 剤の数が増加する中

表-1 SDHI 剤に対する培地検定菌株数と耐性菌検出菌数の推移

調査年度		2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
殺菌剤名	検定菌株数	31	41	35	116	174	199	168	239	185	181	201
	培地検定による感受性低下菌	0	0	0	0	0	7	4	23	30	27	37
	ボスカリド	キュウリ子葉法検定菌株数	0	0	0	0	0	6	2	19	17	25
耐性菌数		0	0	0	0	0	2	2	19	11	21	24
ベンチオピラド	培地検定による感受性低下菌	0	0	0	0	1	0	0	4	4	17	20
	キュウリ子葉法検定菌株数	0	0	0	0	1	0	0	1	3	15	17
	耐性菌数	0	0	0	0	0	0	0	1	0	9	11

でどのように病原菌の感受性が推移するか、引き続きモニタリングしていくことが重要と考える。

最後に、感受性検定法を提案するにあたり、貴重なお助言、ご指導をいただいた石井英夫博士に感謝の意を表す。

引用文献

- 1) FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) 2009
<http://www.frac.info/monitoring-methods>. (2016年7月27日アクセス確認)
- 2) 廣岡 卓・石井英夫 (2014): 日植病報 80 特集号, p.172 ~ 178.
- 3) 石井英夫・西村久美子 (2007): 日本農薬学会第 32 回大会講要集: 64 (講要).
- 4) ——— (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II, 日本植物防疫協会, 東京, p.93 ~ 95.
- 5) ISHII, H. et al. (2011): Pest Manag. Sci. 67: 474 ~ 482.
- 6) 石井英夫 (2012): 第 22 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 49 ~ 60 (講要).
- 7) ———ら (2012): 日本農薬学会第 37 回大会講要集: 80 (講要).
- 8) ISHII, H. et al. (2013): Acta Phytopathol. Sinica 43 (Suppl.): 142.
- 9) Japan FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) 2016.
<http://www.jfrac.com>. (2016年7月27日アクセス確認)
- 10) MIYAMOTO, T. et al. (2009): Plant Pathol. 58: 1144 ~ 1151.
- 11) 間佐古将則 (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II, 日本植物防疫協会, 東京, p.121 ~ 124.
- 12) 櫻井誠也ら (2007): 第 17 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 30 ~ 39 (講要).
- 13) 佐瀬政明 (2016): 第 26 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 37 ~ 45 (講要).
- 14) STAMMLER, G. and J. SPEAKMAN (2006): J. Phytopathol. 154: 508 ~ 510.
- 15) 鈴木啓史・黒田克利 (2010): 関西病虫研報 (52): 45 ~ 51.
- 16) ———ら (2012): 日植病報 78: 56 (講要).
- 17) 高垣真喜一 (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II, 日本植物防疫協会, 東京, p.38 ~ 40.
- 18) 佃 晋太郎 (2015): 第 25 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 11 ~ 21 (講要).