

植物防護基礎講座：

植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル 2016

(7) 野菜類灰色かび病

—ピリベンカルブ（培地・生物・遺伝子検定）—

おざき こういち おの ゆうじ
クミアイ化学工業株式会社 尾崎 剛一・小野 友慈

はじめに

灰色かび病は多くの野菜や果樹等に感染する多犯性的灰色かび病菌によって引き起こされ、商品となる果実に病斑を形成し、収量に直接的な被害を及ぼすことから、農業場面において最も重要な病害の一つである。また、灰色かび病菌は薬剤耐性発達リスクが高い病原菌であり、これまでに多数の殺菌剤が開発されているが、その多くで耐性菌が発生している。そのため本病害の防除においては、異なる系統の殺菌剤をローテーション散布するとともに、圃場で発生する灰色かび病菌の各種薬剤に対する感受性を明らかにすることが重要である。

ピリベンカルブは、クミアイ化学工業（株）とイハラケミカル工業（株）が創薬し、日本曹達（株）と共同開発した殺菌剤であり、2012年に単剤のファンタジスタ顆粒水和剤（ピリベンカルブ40%）と混合剤のファンベル顆粒水和剤（ピリベンカルブ10%，イミノクタジンアルベシル酸塩15%）を上市している。本剤は幅広い防除スペクトラムを有しており、灰色かび病や菌核病等の子のう菌類をはじめとする各種植物病原菌によって引き起こされる病害に対して優れた防除効果を發揮し、灰色かび病や各種病害防除のローテーション散布の一角を担うことのできる殺菌剤である（尾崎・貴田、2014）。しかし、本剤はミトコンドリアの電子伝達系複合体III（Complex III）のシトクロムbを阻害するQoI剤であることから、十分な耐性菌対策の実施が必要であり、簡易的な感受性検定法の確立が求められている。

一方、ピリベンカルブはQoI剤ではあるが、耐性菌に対する効果の低下幅が小さい、植物への薬害発生リスクが低いなどの既存のQoI剤とは異なる特長を有している（KATAOKA et al., 2010）。また、化学構造もストロビルリン系ではなくベンジルカーバメート系の基本骨格に有していることから、筆者らのグループでは作用点に系

統名を新たに加えて本剤をベンジルカーバメート系QoI剤（以下BC-QoI剤）、既存のQoI剤をストロビルリン系QoI剤（以下ST-QoI剤）としてさらに分類している。そのため、感受性検定方法についても、これまでのST-QoI剤とは異なる考え方をする必要があることから、本稿ではピリベンカルブの特長をもとに確立した感受性検定方法（抗菌力試験・ポット試験・PCR-RFLP解析）とその考え方について紹介する。

I ピリベンカルブ感受性の検定方法の考え方

これまでに確認されているST-QoI剤耐性菌に対して、ピリベンカルブは耐性が交差するが、耐性菌における感受性の低下幅はST-QoI剤と比較して明らかに小さく、一定の防除効果が認められている。そのため、キュウリ灰色かび病のポット試験において、ピリベンカルブの実用濃度である200 ppmでは感受性菌とST-QoI剤耐性菌に対する効果の差はわずかであるが、1/10濃度である20 ppmでは感受性菌とST-QoI剤耐性菌に対する効果に明らかな差が認められる（図-1A）。これより、ピリベンカルブ200 ppm、20 ppmを用いたポット試験によってキュウリ灰色かび病菌の感受性検定を実施することが可能である。

ピリベンカルブがST-QoI剤耐性菌に対しても抑制効果を示すというユニークな特長は、培地上での菌糸生育阻害試験においても同様に認められている（図-1B）。そのため、菌糸生育阻害試験によるピリベンカルブ感受性の検定法（暫定版）として、ピリベンカルブ100 ppm、1 ppmを用いた方法を提案している（高垣、2009；TAKAGAKI et al., 2011）。しかし、本法による感受性モニタリングの結果の一部がポット試験と異なり、感受性を誤って判定する事例が生じている（小野ら、2014）。図-2は2012年に三重県で分離された灰色かび病菌の菌株に対する、ピリベンカルブ20 ppmのポット試験における防除価とピリベンカルブ100 ppm、1 ppmおよびアゾキシストロビン100 ppmの菌糸生育阻害率との相関を示している。ピリベンカルブ100 ppmでは、いずれの菌株に対しても阻害率80%以上となり、ポット試験にお

Methods for Detecting Pyribencarb Resistance in Vegetables Gray Mold Fungus. By Koichi OZAKI and Yuji ONO

(キーワード：野菜類灰色かび病、ピリベンカルブ、感受性検定)

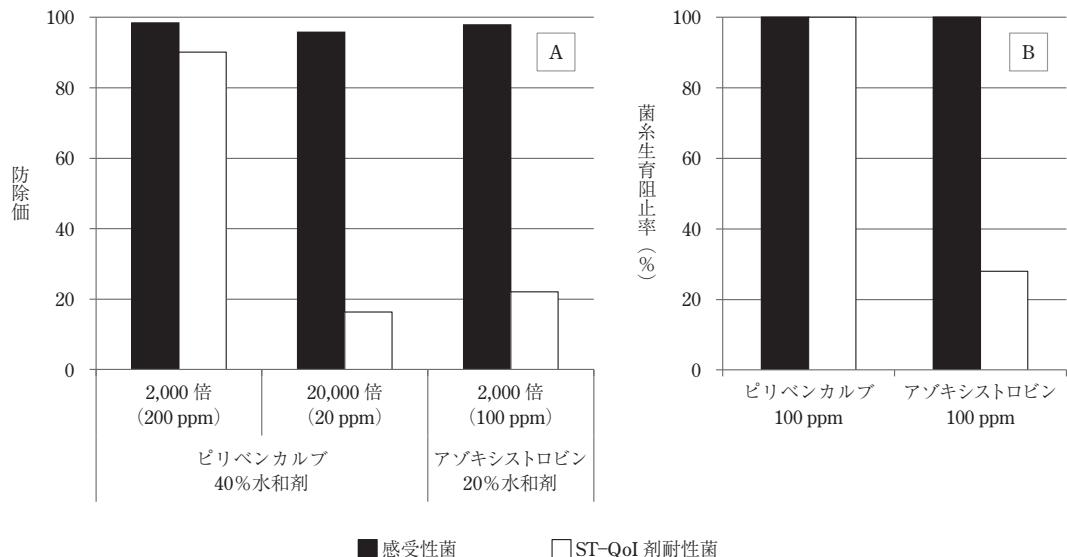


図-1 ST-QoI 剤耐性菌に対するピリベンカルブの防除効果および菌糸生育阻害活性

A: キュウリ子葉ポット試験による防除効果, B: 寒天希釀平板法による菌糸生育阻害活性 (SHAM 1 mM 加用).

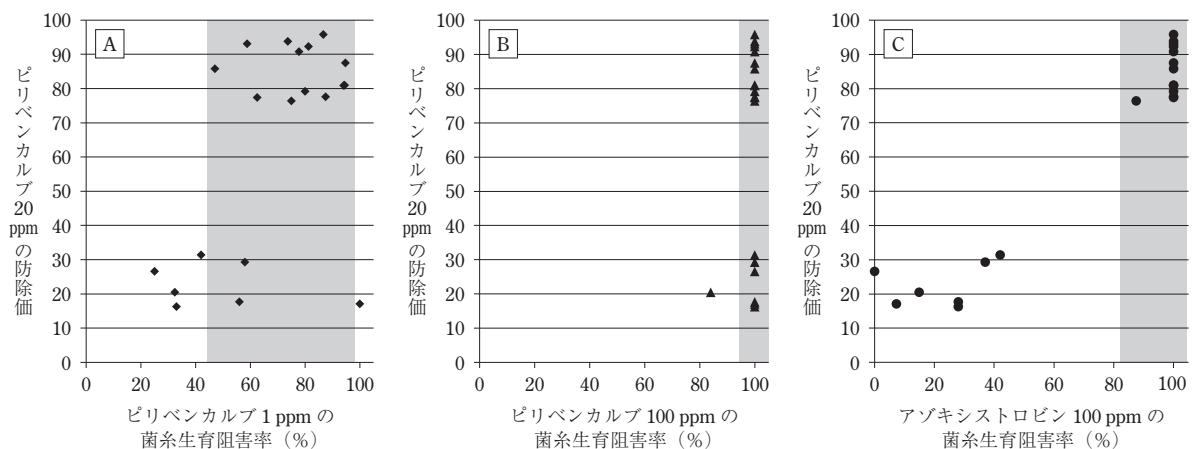


図-2 各種灰色かび病菌に対するピリベンカルブ 20 ppm の防除価 (キュウリ灰色かび病ポット試験) とピリベンカルブ

およびアゾキシストロビンの菌糸生育阻害率 (SHAM 1 mM 加用) の相関

A: ピリベンカルブ 20 ppm の防除価とピリベンカルブ 1 ppm の菌糸生育阻害率の相関。

B: ピリベンカルブ 20 ppm の防除価とピリベンカルブ 100 ppm の菌糸生育阻害率の相関。

C: ピリベンカルブ 20 ppm の防除価とアゾキシストロビン 100 ppm の菌糸生育阻害率の相関。

※網掛け部分はポット試験で感受性と判定された菌株 (防除価 70 以上) の抗菌力試験における分布範囲を示す。

ける防除価と相関していない。また、ピリベンカルブ 1 ppm では、明瞭なグループ分けができず、感受性菌株群と耐性菌株群が一部重複する結果となっている。そのためピリベンカルブを含む PDA 培地による菌糸生育阻害試験のみでは、灰色かび病菌のピリベンカルブ感受性を正確に判断することはできないと考えている。

一方、アゾキシストロビン 100 ppm では、感受性菌株群と ST-QoI 剤耐性菌株群の明瞭な 2 グループに分かれ、ピリベンカルブ 20 ppm のポット試験による防除価と相同性が認められている。また、これまでにポット試験でピリベンカルブが一定の効果を示し、弱耐性と判断した菌株を PCR-RFLP 解析した結果、いずれもシトク

ロム b の143番目のアミノ酸がグリシンからアラニンに変異していることが確認されている。シトクロム b の143番目のアミノ酸がグリシンからアラニンに変異した灰色かび病菌はST-QoI剤に対して耐性を示すことから(Ishii et al., 2009; Banno et al., 2009), ピリベンカルブに弱耐性の灰色かび病菌(BC-QoI剤弱耐性菌)はST-QoI剤に耐性の灰色かび病菌と耐性機構が同一であると推察される。そのため、アゾキシストロビン100 ppmによる菌糸生育阻害試験を実施することでBC-QoI剤弱耐性菌を検出することが可能と考えている。

また、ピリベンカルブに対して高度耐性的灰色かび病菌はこれまでに確認されていないが、その存在を否定することはできない。そのため、感受性検定法ではアゾキシストロビンを用いた検定によって弱耐性的判断を行うと同時に、ピリベンカルブを用いた検定によって高度耐性的検討も実施する必要がある。

以上の考え方を基に、既報の感受性検定法(高垣, 2009; TAKAGAKI et al., 2011)を改良した菌糸生育阻害試験(抗菌力試験)による灰色かび病菌のピリベンカルブ感受性検定法を以下の項に示す。また、灰色かび病菌のポット試験およびPCR-RFLP解析による感受性検定方法についても以下の項で紹介する。

II 灰色かび病菌のピリベンカルブ感受性検定方法

1 菌の分離方法

農薬メーカーが感受性検定を行う場合、日本各地から菌株を採取するため、現地から研究所への罹病植物の送付方法が重要となる。サンプリング当日に菌の分離ができないことから、灰色かび病菌以外の雑菌の繁殖を抑制する必要がある。そのため、サンプリングした灰色かび病の罹病部位はなるべく水分を取り除いてから紙の封筒に入れて、冷蔵で送付する。もし胞子が大量に発生している場合は、綿棒で胞子をかきとり、その綿棒を送付することも可能である。送付された罹病部位をローズベンガル(30 ppm)入りのPDA培地(菌糸生育を抑制することで単胞子分離および单コロニー分離がしやすくなる)を流したシャーレのふたの内側に両面テープで張り付け、20~25°Cで24時間保管する。24時間後、罹病部位から落ちた灰色かび病菌の胞子を顕微鏡下で単胞子分離する。もし罹病部位に胞子が形成されていない場合でも、シャーレ内で数日間保管することで、病斑に胞子の形成が認められる場合がある。

なお、灰色かび病菌の分離方法については、野菜類灰色かび病(木曾・山田, 1998), ブドウ灰色かび病(深谷, 1998), マメ類灰色かび病(谷井・堀田, 1998; 三谷・

杉本, 2009), カンキツ灰色かび病(石井, 2009; 間佐古, 2009), イチゴ灰色かび病(石井, 2009)について『植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル』および『植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II』で報告されているので、そちらも参照していただきたい。

2 菌糸生育阻害試験

(1) 検定培地の作製

基本培地としてPDA培地を用い、検定薬剤としてピリベンカルブはファンタジスタ顆粒水和剤、アゾキシストロビンはアミスター20フロアップルを使用する。PDA培地を溶解後に50°C程度まで冷まし、ピリベンカルブとアゾキシストロビンをそれぞれ最終濃度100 ppmとなるようにPDA平板培地に添加し、さらにジメチルスルホキシド(DMSO)に溶かしたサリチルヒドロキサム酸(SHAM)を培地量の0.5%となるように添加する(SHAMの最終濃度1 mM)。QoI剤の抗菌力試験では代替呼吸経路(シアノ耐性呼吸経路)を遮断するために、阻害剤のSHAMや没食子酸n-プロピルを併用するが、筆者らの灰色かび病菌の菌糸生育阻害試験では没食子酸n-プロピルよりも、SHAMのほうが安定した菌糸生育阻害活性を示す結果が得られている(データ未掲載)。なお、SHAMは水に溶解しにくいことからDMSOに溶かして使用している。

(2) 検定方法

PDA培地で20°C、4日前培養した灰色かび病菌菌叢の先端を滅菌したストロー(直径6 mm)で打ち抜き、検定培地に菌糸面を下にして移植し、20°Cで2~3日間培養する。培養後に菌叢の直径を測定し、薬剤の菌糸生育阻害率を算出する。この際の無処理区(SHAM 1 mMのみの添加区)の菌叢直径は菌叢ディスクも含めて約10~30 mm程度となる。なお、培養期間が長すぎると感受性菌でも菌糸がわずかに生育する場合があるため、菌糸生育の有無が確認できる時期を逃さずに調査することが重要である。

(3) 判定方法

アゾキシストロビン100 ppmおよびピリベンカルブ100 ppmで菌糸生育阻害率80%以上のは両剤に感受性菌、アゾキシストロビン100 ppmで菌糸生育阻害率50%未満、ピリベンカルブ100 ppmで菌糸生育阻害率80%以上の場合はBC-QoI剤に対して弱耐性菌、ST-QoI剤に対して耐性菌と判断する(表-1)。なお、アゾキシストロビン100 ppmで菌糸生育阻害率50%以上から80%未満の場合、ピリベンカルブ100 ppmで同80%未満の場合は生物試験(ポット試験)によって別途確認する。

表-1 抗菌力試験による感受性判定基準

供試薬剤および処理濃度	菌糸生育阻害率	判定	
		ST-QoI 剤	BC-QoI 剤
アゾキシストロビン 100 ppm	80%以上		
ピリベンカルブ 100 ppm	80%以上	感受性菌	感受性菌
アゾキシストロビン 100 ppm	50%未満		
ピリベンカルブ 100 ppm	80%以上	耐性菌	弱耐性菌
ピリベンカルブ 100 ppm	80%未満		生物試験で再確認

*アゾキシストロビン 100 ppm で阻害率が 50%以上から 80%未満の菌株については今後の検定結果によって判定基準を作成する予定。

表-2 キュウリ灰色かび病ポット試験による感受性判定基準

ポット試験の結果（防除価）	判定
ピリベンカルブ 20 ppm で防除価 70 以上	感受性菌
ピリベンカルブ 20 ppm で防除価 70 未満、 200 ppm で防除価 50 以上	弱耐性菌
ピリベンカルブ 200 ppm で防除価 50 未満	事例なし、要検討

3 ポット試験

(1) 検定方法

子葉期のキュウリにピリベンカルブ 200 ppm (実用濃度) および 20 ppm (実用濃度の 1/10) を散布する。風乾後に PDA 培地表面上に形成した灰色かび病菌の胞子を 1/2 濃度の YG 培地 (グルコース 0.1%, 酵母エキス 0.1%, K₂HPO₄ 0.03%, KH₂PO₄ 0.02%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, pH6.8) で回収し, 1 × 10⁵ 個/ml に調整した胞子懸濁液をペーパーディスクに含ませて子葉の上に置き, 20 ~ 25°C の加湿条件で調査まで保管する。接種 2 ~ 3 日後に子葉上の病斑直径を測定し, 防除価を算出する。

(2) 判定方法

ピリベンカルブ 20 ppm で防除価 70 以上の場合は感受性菌, ピリベンカルブ 20 ppm で防除価 70 未満, 200 ppm で防除価 50 以上の場合は弱耐性菌と判断する (表-2)。ピリベンカルブ 200 ppm で防除価 50 未満の菌株はこれまで確認されていないことから, 別途詳細な検討が必要と考えている。

4 PCR-RFLP 解析

灰色かび病菌のシトクロム b 遺伝子はコドン 143/144 にイントロンが存在するものと, 存在しないものがあり (BANNO et al., 2009), それぞれについて別々のプライマーおよび制限酵素を用いて PCR-RFLP 解析を実施する必要がある。ここでは, 1 回目の PCR はイントロンを

含まないシトクロム b 遺伝子の解析方法 (高垣, 2009; TAKAGAKI et al., 2011) で実施し, イントロンを含む場合に 2 回目の PCR を別のプライマーを用いて (BANNO et al., 2009) 実施する方法を紹介する。

(1) 鑄型 DNA 溶液の調製

PDA 培地上で 1 週間培養した灰色かび病菌の気中菌糸の一部を, 減菌した爪楊枝で搔きとり, 1.5 mL マイクロチューブに移し, マイクロチューブのふたをして, 電子レンジ (500 ~ 600 W) で 5 分間処理し, 細胞壁を破壊する。50 μL の TE buffer (pH8.0) を加え, 激しくボルテックス後, 遊離したゲノム DNA が溶け込んだ上清を別のマイクロチューブに移し, 鑄型 DNA とする。

(2) 143/144 イントロンを含まないシトクロム b 遺伝子の PCR-RFLP 解析

1) PCR

抽出した鑄型 DNA 8 μL, 10 × EX Taq buffer 2.5 μL, Takara Ex Taq (Takara 製) 0.2 μL, dNTP Mixture 2 μL, forward primer (BOTO-CYTB-K1F; 5'-ATATAAAA GGTGCGACAGA-3') 0.25 μL, reverse primer (BOTO-CYTB-K1R; 5'-GGCCTTAGAACTCCAA-3') 0.25 μL, 減菌水 11.8 μL を混合し, PCR を実施する。プライマーは TAKAGAKI et al. (2011) のものを使用した。条件は 94°C で 2.5 分処理した後, 94°C (0.5 分), 54°C (1 分), 72°C (1.5 分) のステップを 35 サイクル繰り返し, 最終サイクルの後 72°C で 8.5 分処理して反応を完結させる。本 PCR によって 1,031 bp の PCR 産物 (イントロンなし) が得られた場合は制限酵素 *Fnu*4HI によって RFLP 解析を実施する。一方, 2,536 bp の PCR 産物が得られた場合は, 143/144 イントロンが挿入されており, *Fnu*4HI では G143A 変異の有無が判断できないため, 別のプライマーと制限酵素による PCR-RFLP 解析を実施する。

2) 制限酵素処理

PCR 後, PCR 産物 $10\ \mu\text{l}$, NE buffer $4.2\ \mu\text{l}$, *Fnu4HI* (New England Biolabs 製) $1\ \mu\text{l}$, 減菌水 $7\ \mu\text{l}$ を混合し, 37°C で 1 時間以上インキュベートする。制限酵素処理後, アガロース濃度 1.0% / TBE のゲルを用いて 100 V , 30 分電気泳動を行い, 泳動ゲルをエチジウムプロマイドで 20 分以上染色した後に泳動パターンを確認する。

3) 判定

PCR 産物 (1,031 bp) が *Fnu4HI* 処理により一箇所で切断され, 220 bp の断片と 811 bp の断片が生じたものについては G143A 変異型 QoI 剤耐性菌と判断する (図-3)。なお, PCR-RFLP やダイレクトシークエンスで灰色かび病菌の G143A を判定できないこともあるため (ISHII et al., 2009), 注意が必要である。

(3) 143/144 イントロンを含むシトクロム *b* 遺伝子の PCR-RFLP 解析

1) PCR

抽出した鑄型 DNA $8\ \mu\text{l}$, $10 \times$ EX Taq buffer $2.5\ \mu\text{l}$, Takara Ex Taq $0.2\ \mu\text{l}$, dNTP Mixture $2\ \mu\text{l}$, forward primer (Bccytb-F1; 5'-CGTCGGCCATATAAAAGGTC-3') $0.25\ \mu\text{l}$, reverse primer (Bccytb-in-R1; 5'-TGGAATAC GTTTAGGCCATTGAT-3') $0.25\ \mu\text{l}$, 減菌水 $11.8\ \mu\text{l}$ を混合し, PCR を実施する。プライマーは BANNO et al. (2009) らのものを使用した。条件は 94°C で 2.5 分処理した後, 94°C (0.5 分), 56°C (1 分), 72°C (1.5 分) のステップを 35 サイクル繰り返し, 最終サイクルの後 72°C で 8.5 分処理して反応を完結させる。本 PCR によって $370\ \text{bp}$ の PCR 産物が得られる。

2) 制限酵素処理

PCR 後, PCR 産物 $3\ \mu\text{l}$, L buffer $1\ \mu\text{l}$, *Alu I* (Takara 製) $0.2\ \mu\text{l}$, 減菌水 $5.8\ \mu\text{l}$ を混合し, 37°C で 2 時間以上インキュベートする。制限酵素処理後, アガロース濃度 1.0% / TBE のゲルを用いて 100 V , 40 分電気泳動を行い, 泳動ゲルをエチジウムプロマイドで 20 分以上染色した後に泳動パターンを確認する。

3) 判定 (イントロンを含む)

PCR 産物 (370 bp) が一箇所で切断され, 135 bp と $235\ \text{bp}$ の断片を生じるものについては, 感受性菌と判断する (図-3)。一方, G143A 変異の場合は二箇所で切断され, 135 bp, 92 bp, 143 bp の断片を生じると考えられる。ただし, 143/144 イントロンが挿入された G143A 変異株の分離報告例はまだない。

III 今後の課題

灰色かび病菌以外の病原菌の抗菌力試験においても,

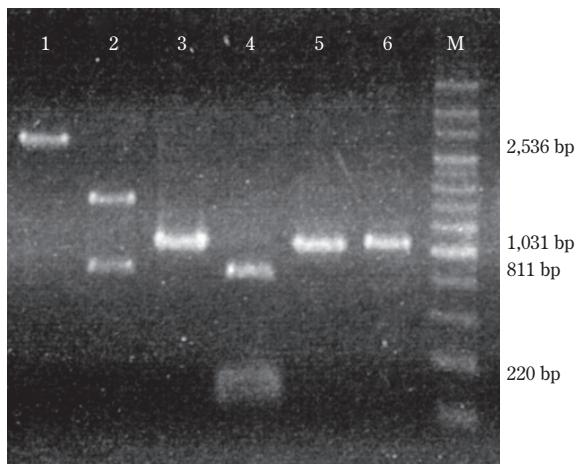


図-3 PCR-RFLP 解析の結果

- 1 : PCR 産物 (イントロンあり, 感受性菌).
- 2 : 1 の PCR 産物 (感受性菌) を制限酵素処理したもの.
- 3 : PCR 産物 (イントロンなし, 弱耐性菌).
- 4 : 3 の PCR 産物 (弱耐性菌) を制限酵素処理したもの.
- 5 : PCR 産物 (イントロンなし, 感受性菌).
- 6 : 5 の PCR 産物 (感受性菌) を制限酵素処理したもの.
- M : 200 bp DNA ラダー.

ピリベンカルブは ST-QoI 剤とは異なる動向を示すことが想定されるため, その点を考慮した感受性検定 (抗菌力試験) の実施が必要と考えている。また, 現状では確認されていないがピリベンカルブに高度耐性を示す灰色かび病菌の発生の可能性も否定できることから, ピリベンカルブの作用機構の解析や感受性検定の定期的な実施が今後も重要と考えている。

引用文献

- 1) BANNO, S. et al. (2009) : Plant Pathol. 58 : 120 ~ 129.
- 2) 深谷雅子 (1998) : 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル, 日本植物防疫協会, 東京, p.78 ~ 81.
- 3) 石井英夫 (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.
- 4) ISHII, H. et al. (2009) : Pest Manag Sci. 65 : 916 ~ 922.
- 5) KATAOKA, S. et al. (2010) : J. Pestic. Sci. 35 : 99 ~ 106.
- 6) 木曾皓・山田正和 (1998) : 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル, 日本植物防疫協会, 東京, p.28 ~ 33.
- 7) 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.
- 8) 三谷滋・杉本光二 (2009) : 同上, p.28 ~ 30.
- 9) 小野友慈ら (2014) : 日本植物病理学会報 80 : 298.
- 10) 尾崎剛一・貴田健一 (2014) : 日本農薬学会誌 39 : 48 ~ 52.
- 11) 高垣真喜一 (2009) : 第 19 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集, p.33 ~ 41.
- 12) TAKAGAKI, M. et al. (2011) : J. Pestic. Sci. 36 : 255 ~ 259.
- 13) 谷井昭夫・堀田治邦 (1998) : 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル, 日本植物防疫協会, 東京, p.93 ~ 96.