

ベンズイミダゾール耐性野菜類の灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の簡易検定法

王 健 ・ 深 谷 富 夫*

(中国蘭州市農業科学研究所・*秋田県農業試験場)

Simple Method for Detecting Resistant Strains of Vegetables Gray Mold

(*Botrytis cinerea* Persoon) to Benzimidazole Fungicides

Jian WANG and Tomio FUKAYA*

(The Agricultural Sciences Research Institute of Lanzhou Gansu, China・*Akita Agricultural Experiment Station)

1 はじめに

チオファネートメチル剤の防除効果の減退は、ベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌の混在割合に負うといわれている⁴⁾。したがって耐性菌対策のための分布調査は統計的に信頼性の高いものになるよう狭い面積を単位に多数の標本の検定が要求されるので、簡便で能率的な検定法が必要となる。竹内³⁾はベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌の簡易検定法として、チオファネートメチル400 μ m, ストレプトマイシン100 μ mを含有したPSA培地に分生胞子を塗布して、20℃で1~2日間培養した後、顕微鏡観察し、正常に発芽して引き続き生育するものを耐性菌、また異常発芽後生育を停止するものや発芽しないものを感性菌とするということを発表している。しかしながら、竹内の方法では培養時間が長くなるほど他の糸状菌が混入すると灰色かび病菌との識別が困難になる傾向がある。そこで著者らは、雑菌が混入しても識別が容易であり、しかも耐性菌、感性菌の判別がより客観的である検定方法となるようカスガマイシン耐性菌の簡易検定法¹⁾である二次分枝法を参考に作成を試み、ほぼ満足するものができたので報告する。

報告に当たり、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) を提供くださった秋田県果樹試験場天王分場に厚く感謝する。

2 試験方法

供試菌は1985年に秋田県内で採集した灰色かび病に罹病したブドウ葉及び花穂から分離して得た菌株である。

培養基は、PSA培地で寒天、ショ糖を各1%相当量を加え、pH4.0に調整したものである。これにチオファネートメチル含有量が級比1/2の等比級数になるようにチオファネートメチル製剤を添加し、3.2~400 μ g/ml及びチオファネートメチル無添加の平板を作成した。次に供試菌株の菌叢をナス、キュウリ、イチゴの果実上に接種し、分生胞子を形成させた。この新鮮な分生胞子を白金耳でかきとり、チオファネートメチルの添加量を異にする上記PSA平板上に塗抹接種した。その後直ちに20℃で22時間培養した後、ラクトフェノールで固定し、1菌株当たり約100個の分生胞子について発芽の有無や菌糸及び分枝の発育状況を観察した。更に、上記で用いた菌株について0.4~800 μ g/mlの

含チオファネートメチルPSは培地に菌叢を接種し、20℃で48時間培養し、最小生育阻止濃度 (MIC) を求めた。

3 結果と考察

(1) 耐性菌及び感性菌分生胞子の発芽、菌糸の発育に及ぼすチオファネートメチルの影響

簡易検定法の作成に先立ち、含チオファネートメチル培地上での分生胞子の発芽とその後の発育状況を観察した。供試菌にはMIC800 μ g/mlの耐性菌 (R菌) とMIC3.2 μ g/mlの感性菌 (S菌) の2菌株を用いた。その結果を図1, 2, 3図に示した。初めに、図1のナス果実上に形成させた分生胞子についての結果をみると、発芽率においては、いずれのチオファネートメチル濃度でも、S菌、R菌とも高く、菌株間の差異は認められなかった。また発芽管から分岐した分枝を发育させている分生胞子の割合、すなわち分枝形成率についてみると、R菌はチオファネートメチル濃度が400 μ g/mlでもほぼ100%の分生胞子が分枝を有するのに対し、S菌ではチオファネートメチル濃度が100 μ g/mlから分枝をもつ分生胞子の割合が低くなる傾向がみられ、R菌とS菌の間に差が認められた。次に発芽管長又は最長菌糸長においては、S菌ではチオファネートメチル濃度が6.3 μ g/mlから菌糸の伸長に抑制作用がみられ、50 μ g/ml以上になるとS菌とR菌の間には明瞭な差異が認められた。図2, 3図には、それぞれキュウリ、イチゴ果

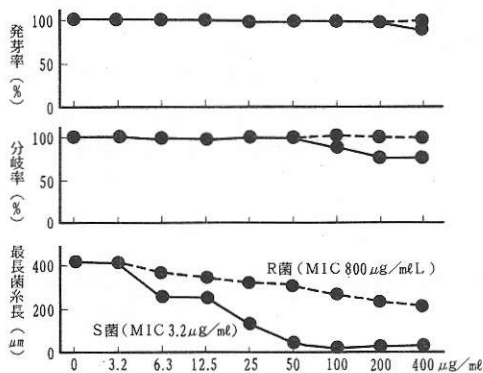


図1 ナス果実上に形成させたチオファネートメチルに対し感受性を異にする灰色かび病菌分生胞子の含チオファネートメチル培地上における発芽、発育状況

実上に形成させた分生胞子を用いて検討した結果を示したが、ナス上の分生胞子を用いた上記の結果とはほぼ同様であった。以上のことから耐性菌と感性菌の識別には分生胞子から発育した発芽管すなわち最長菌糸長を観察するのが有効であり能率的であると考えられた。

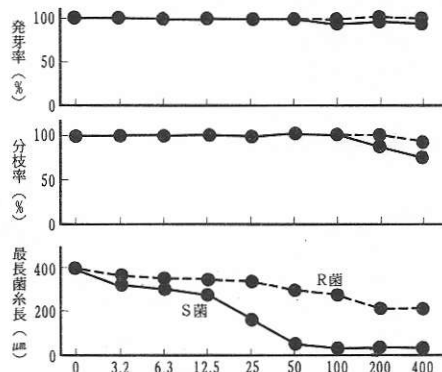


図2 キュウリ果実上に形成させたチオファネートメチルに対し感受性を異にする灰色かび病菌分生胞子の含チオファネートメチル培地上における発芽、発育状況

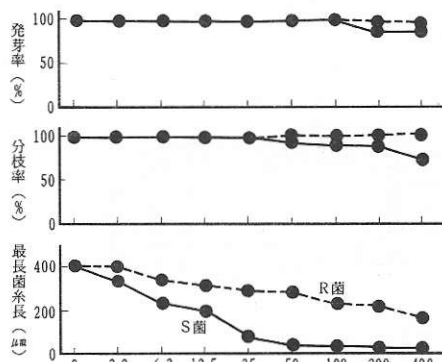


図3 イチゴの果実上に形成させたチオファネートメチルに対し感受性を異にする灰色かび病菌分生胞子の含チオファネートメチル培地上における発芽、発育状況

(2) 最長菌糸長 (MIC200 μm) の違いによる耐性菌、感性菌の分類

耐性菌を判定する定義として、農薬に対する感受性の頻度分布曲線を描くことにより耐性菌と感性菌の環界濃度を判定又は推定するとしている²⁾。そこで感受性の異なる49菌株を供試し、最長菌糸長が200 μm 以上の形成を抑制する最低濃度 (MIC200 μm) を求めたところ、表1に示すように200 mg/mlの濃度を境とする耐性菌群と感性菌群の2峰性の頻度分布曲線が得られ、上記定義を満足した。更にMICとの関係についてみると、MIC値が同一の菌株は本簡易検定法では広い濃度域に存在し、MICとの感受性の関係が直線的ではなかったしかしながら、MIC値3.2 mg/ml以下の感性菌は本簡易検定法でも感性菌群に存在し、MIC値800 mg/mlの耐性菌は本簡易検定法でも耐

表1 チオファネートメチルに対し感受性を異にする菌株の最長菌糸長が200 μm 以上の形成を抑制する最低濃度 (MIC 200 μm) と最小生育阻止濃度 (MIC) の頻度分布

MIC (200 μm)	MIC								合計
	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	800 $\mu g/ml$ <	
12.5									
25									20
50			2	5	3				10
100			2	7	4				13
200								6	6
400 < $\mu g/ml$								6	6
合計	24	12	7					6	49

注. ナスの果実に菌叢を接種して形成させた分生胞子を供試。*: 表中の数字は菌株数を示す。

性菌であり、耐性菌と感性菌が交ることがなかった。

本試験においてはMIC6.3 mg/ml以上の中間型の菌株を供試できなかった。しかしながら、一般圃場においてはMIC6.3 mg/ml以上の中間型の菌株の分布は少ないと考えられる。したがって、仮りにこれらの菌株を誤って判定しても調査結果に与える影響は少ないと考えられる。

(3) 能率、その他

本簡易検定法は分生胞子の塗抹接種、検鏡の操作が連続的に実施できるので1日当たり1人で200菌株以上の検定が可能である。また本簡易検定法では病斑上の分生胞子を直接供試することを考慮して無菌部操作をさせた。すなわち、検定培地上の細菌の繁殖を防止するために検定培地のpHを4.0とした。また培養時間を22時間とすることにより他の糸状菌が混入しても灰色かび病菌との識別が容易で検定が妨害されることがほとんどない。

4 ま と め

以上から簡易検定法を次のように策定した。

pH4.0に調整したPSA培地にチオファネートメチルを200 mg/mlになるように添加し平板を作成する。これに病斑上の新鮮な分生胞子を塗抹接種し、20℃で22時間培養したのち検鏡し、200 μm の菌糸を有する分生胞子が存在する場合、その菌株を耐性菌とする。

引 用 文 献

- 1) 深谷富夫, 小林次郎. 1975. カスガマイシン耐性イネいもち病菌の簡易検定法. 北日本病虫研報 34: 91-94.
- 2) 桜井寿. 1975. 農薬耐性菌の検定法. 植物防疫 29: 206-212.
- 3) 竹内妙子. 1987. 薬剤耐性灰色かび病の発生生態と防除に関する研究 14: 75.
- 4) 山本磐. 1975. ペノミル耐性灰色かび病菌の野菜における発生と対策. 植物防疫 29: 194-198.