灰色かび病菌の薬剤耐性菌培養ろ液による ジカルボキシイミド系薬剤耐性誘発検定

阿久津克巳*・一家 伴安**・遠藤 毅***
小原 貴子*・奥山 哲*

Katsumi AKUTSU*, Tomoyasu IKKA**, Takeshi ENDO***,
Takako OHARA* and Satoshi OKUYAMA* :
Bioassays for Induction of Dicarboximide Fungicide-Resistance
with Filtrate of the Resistant Strains of *Botrytis cinerea*

Abstract

Induction of dicarboximide fungicide-resistance by pre-culturing in the filtrates of the field resistant strains (IHES-2 and CAES-4) of *Botrytis cinerea* was examined by two bioassay methods. In the protoplast bioassay method, the regeneration frequencies of the mycelial protoplasts of the sensitive strain (IPCR-1) pre-treated with IHES-2 and CAES-4 filtrates, respectively, were 2.7 and 2.4% on the medium containing the fungicide, which were about tenfold higher than that by pre-treatment with IPCR-1 filtrate. In another method, IPCR-1 conidia were shaking-cultured in IHES-2 and CAES-4 filtrates for 3 days, respectively, and each of the conidia was harvested as a mycelial ball like structure (MBS). The MBSs pre-cultured in these filtrates formed the colonies about three times as many as those with IPCR-1 filtrate. From the two different bioassays, the induction of dicarboximide fungicide-resistance with the filtrates of the resistant strains was confirmed. Especially, MBS bioassay method may be a useful one for bioassays of filamentous fungi, in which it is hard to statistically detect the effects of physiologically active substances because of the morphogenic changes in the growth cycle.

Key words : fungicide-resistance, *Botrytis cinerea*, bioassay method, dicarboximide fungicide.

著者らは、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) のジカルボキシイミド系薬剤耐性菌培養ろ液中に本薬剤耐性を誘発する熱安定性の低分子物質が存在することを見だし¹⁾、その誘発物質の単離・精製、ならびにその誘発機構の解析を進めている。これらの研究を進める上で、本誘発物質の活性を微量で、かつ高精度に検定できる方法が必須となった。しかし多細胞で構成され、形態分化を伴う糸状菌ではこのような条件を満たす検定法は確立されておらず、必ずしも的確な検定が行われているとはいえないのが現状である。

そこで筆者らは、灰色かび病菌における薬剤耐性誘発を高精度で検出できる検定法の開発に着手し、薬剤

耐性誘発の量的検定を試みた。本論文では、今回試行した二つの検定法について詳述し、これらの方法で検定した培養ろ液による薬剤耐性の誘発結果を報告し、さらに糸状菌における生理活性物質の検定法としての有用性について考察した。

本研究では、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea* Persoon) のジカルボキシイミド系薬剤耐性菌として IHES-2 株 (茨城県園芸試験場より分譲) と CAES-4 株 (千葉県農業試験場より分譲) を薬剤感性菌として IPCR-1 株 (理化学研究所より分譲) を供試した。ジカルボキシイミド系薬剤としてピンクロゾリン (商品名: ロニラン水和剤, 日本曹達株式会社) を用いた。

* 茨城大学農学部 Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ami-machi, Ibaraki 300-03, Japan

** 現在: 茨城県筑波地区農業改良普及所 Tsukuba Agricultural Extension Service Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

*** 現在: 福島県安達農業改良普及所 Adachi Agricultural Extension Service Station, Nihonmatsu, Fukushima 964, Japan

Fig. 1. Colonies formed from mycelial ball like structures (MBS) of the fungicide-sensitive strain pre-cultured in filtrates of the sensitive IPCR-1 (A) or the resistant CAES-4 (B) strain of *Botrytis cinerea* on PSA media containing 50 ppm of vinclozolin, 7 days after the onset of incubation.

Table 1. Sensitivity to vinclozolin of protoplasts from mycelia of the fungicide-sensitive strain cultured in filtrates of the resistant strains of *Botrytis cinerea*^{a)}

Culture filtrate ^{b)}	Number of colony on regeneration medium containing		Induction rate (%) ^{c)}
	Vinclozolin	No fungicide	
IHES-2	52	1,908	2.7*
CAES-4	37	1,523	2.4*
IPCR-1	3	1,628	0.2

a) The protoplasts were isolated by the modified method of Shirane and Hatta²⁾, from the mycelia of the sensitive strain (IPCR-1) shaking-cultured in the filtrates of the resistant (IHES-2 and CAES-4) or sensitive strain (IPCR-1) for 3 days at 20°C, and incubated on 0.6 M of mannitol agar medium containing 50 ppm of vinclozolin. Number of colony was counted 11 days after the onset of incubation.

b) The filtrates were prepared by the method of Akutsu *et al.*¹⁾

c) Ratio of colonies on the medium containing the fungicide to those on the medium without the fungicide.

* indicates significance at $P=0.05$.

供試菌株に対するビンクロゾリンの最小生育阻止濃度 (MIC 値) は, CAES-4 株では 750 ppm, IHES-2 株では 75 ppm 以上, IPCR-1 株では 5 ppm 未満である。

耐性菌培養ろ液の作製 ショ糖加用ジャガイモ寒天 (PSA) 培地上で 5 日間培養した耐性菌のコロニーを, 径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜き, 20 個の菌糸体片を 20 ml の MS 液体培地³⁾ で振とう培養 (20°C, 120 ストローク/分) した。培養 3 日後, 培養液から菌糸体を除去し, pH 値を 6 に調整した後, オートクレーブ (121°C, 20 分) 処理し, これを耐性菌培養ろ液として供試した。

プロトプラスト検定法 20 ml の耐性菌 IHES-2 および CAES-4 培養ろ液に, 感性菌 IPCR-1 の分生孢子懸濁液 (約 4×10^5 個/ml) を 1 ml ずつ接種し, 20°C で振とう培養 (120 ストローク/分) した。培養 3 日後, それぞれの培養ろ液から菌糸体を回収し, 白根らの方法²⁾ でプロトプラストを分離し, 0.6 M マンニトール

溶液に懸濁した。1 ml のプロトプラスト懸濁液 (約 6×10^5 個/ml) を 50 ppm のビンクロゾリンを含む再生培地 (0.6 M マンニトール寒天培地) および薬剤無含有の再生培地に接種・培養した。培養 11 日後, 肉眼で観察されるコロニー数を計測し, 薬剤無含有培地上でのコロニー数に対する薬剤含有培地上でのコロニー数の比率を, 耐性誘発率として求めた。対照区として, 感性菌 IPCR-1 の培養ろ液で培養した菌糸体から分離されたプロトプラストの耐性誘発率を求めた。

菌糸球検定法 20 ml の耐性菌 IHES-2 および CAES-4 培養ろ液に, 感性菌 IPCR-1 の分生孢子懸濁液 (約 1×10^6 個/ml) を 0.5 ml ずつ接種し, 20°C で振とう培養 (120 ストローク/分) した。培養 2~3 日後, それぞれの培養ろ液から球状に発達した菌糸体を菌糸球 (MBS) として白金耳で採取し, 50 ppm のビンクロゾリンを含む検定培地 (PSA 培地) 上で個々の菌糸球 (約 50 個/径 9 cm シャーレ) が分散するように培養し

Table 3. Sensitivity to vinclozolin of mycelial ball like structures (MBS) of the fungicide-sensitive strain cultured in filtrates of the resistant strains of *Botrytis cinerea*^{a)}

Culture filtrate ^{b)}	Number of colony on PSA media containing		Induction rate (%) ^{c)}
	Vinclozolin	No fungicide	
IHES-2	7	116	6.03*
CAES-4	6	100	6.00*
IPCR-1	2	108	1.86

a) The conidia of the sensitive strain (IPCR-1) were shaking-cultured in the filtrates of the resistant (IHES-2 and CAES-4) or sensitive strain (IPCR-1) for 3 days at 20°C, and the MBSs were incubated on PSA medium containing 50 ppm of vinclozolin. Number of colony was counted 7 days after the onset of incubation.

b) The filtrates were prepared by the method of Akutsu *et al.*¹⁾

c) Ratio of colonies on the medium containing the fungicide to those on the medium without the fungicide.

* indicates significance at $P=0.05$.

Table 2. Formation of mycelial ball like structures (MBS) by shaking-cultures of *Botrytis cinerea* conidia in MS liquid medium^{a)}

Number of the		Collection rate (%) ^{b)}
Conidia	MBS	
2.2×10^4	2.0×10^4	90.9

a) The conidia were incubated in MS liquid medium at 20°C on the reciprocal shaker (120 strokes/min), and number of the MBS was counted 3 days after the onset of incubation.

b) Ratio of the collected MBC to the inoculated conidia.

た。培養7日後、菌糸球の生育の有無を調べ、径2 mm以上のコロニーを形成したものを耐性誘発菌糸球とし、薬剤無含有培地でのコロニー形成菌糸球に対する比率を耐性誘発率として求めた。一回の検定には約200個の菌糸球を用いた。対照区として、感性菌IPCR-1の培養ろ液で培養した菌糸球の耐性誘発率を求めた。また、個々の菌糸球が一個の分生孢子から形成されていることを確認するために、接種孢子数に対する菌糸球の回収率を求めた。

プロトプラスト検定法による耐性誘発率 培養11日後に薬剤含有および無含有の再生培地に出現したコロニー数をかぞえ、プロトプラストの再生数とし、これらの数値から薬剤耐性誘発率を求めた (Table 1)。1枚の培養プレートに約 6×10^5 個のプロトプラストを培養した。耐性菌IHES-2およびCAES-4の培養ろ液中で培養した菌糸体から分離されたプロトプラストは、薬剤無含有培地で1,908個と1,523個のコロニーを、また、薬剤含有培地では52個と37個のコロニーをそれぞれ形成し、これらの耐性誘発率はともに2.5%前後の数値を示した。一方、感性菌培養ろ液中で培養した菌糸体プロトプラストは、薬剤無含有培地では耐

性菌培地ろ液の場合とほぼ同等の再生数を示したが、薬剤含有培地での再生数は極めて低く、耐性誘発率は、耐性菌培養ろ液の場合の1/10弱であった (Table 1)。

菌糸球検定法による耐性誘発率 耐性菌IHES-2とCAES-4、および感性菌の培養ろ液で振とう培養した感性菌IPCR-1の分生孢子は、ともに100%に近い発芽率を示し、培養3日後には肉眼的に採取可能な大きさの菌糸球を形成した。また、菌糸球の回収率は、90%以上の数値を示したことから (Table 2)、個々の菌糸球は、一個の分生孢子から形成されていると考えられた。耐性菌培養ろ液中で培養された菌糸球では、薬剤含有培地上においてもコロニーを形成する菌糸球が観察された (Fig. 1)。5回の反復実験において、両耐性菌の培養ろ液による耐性誘発率は、ともに約6.0%の安定した数値を示し、感性菌の培養ろ液を用いた対照区に比べて3倍強の出現頻度であった (Table 3)。また、対照区でコロニーを形成した菌糸球の大部分は、その後生育を停止し、耐性菌培養ろ液処理の場合とは明らかに異なった。このことから、対照区においても耐性誘発菌糸球の出現が認められた理由は、今回の耐性菌出現基準 (50 ppmの薬剤含有培地で、培養7日後に2 mm以上のコロニー形成) の設定が低かったことに起因すると思われる。

本研究では二つの検定法を用いることにより、灰色かび病菌のジカルボキシイミド系薬剤耐性菌の培養ろ液処理による本薬剤耐性誘発効果を再確認することができた。また、これらの方法を用いた活性の量的検定に基づいて、耐性誘発物質の単離・精製をより効率的に進めることができるであろう。しかし今回の二つの検定法において、MIC値の異なる耐性菌の培養ろ液による耐性誘発活性における顕著な違いは認められなかった (Table 1 および 3)。このことは、検定法の検定精

度によるのか、あるいは耐性誘発活性が必ずしも耐性値と相関しないことによるのか、今後の検討課題である。

次にこれらの二つの検定法を比較しながら、灰色かび病菌などの糸状菌を対象とした生理活性検定法としての有用性について考察する。糸状菌に対する生理活性を量的に評価するために、菌糸体を単細胞化し、検定数を増やすとともに検定対象を均一化したプロトプラスト検定法は、統計処理ができる点で優れた検定法といえよう。しかし、この検定法には幾つかの問題点がある。この方法においては、検定時間の経過とともに検定対象である分生胞子は菌糸体を形成し、これからプロトプラストが分離される。ところが今回、プロトプラストの分離過程を経時的に顕微鏡観察した結果、プロトプラストは、観察時にすべての菌糸から均一に分離されておらず、一部の菌糸に集中して分離されることが観察された。このことは、プロトプラストが個々の胞子由来の菌糸体から均一に分離されていないことを示唆する。また、プロトプラストの再生率が低く、変動することから、耐性が誘発されたプロトプラストを漏れなく検出できたという判定が難しいことである。今回、5回の反復実験で耐性誘発率が、1.5%から4.2%と変動幅が大きかったことは、上記の点を反映しているものと思われる。さらにプロトプラストの分離や再生など、検定の操作過程が煩雑化するとともに、その所要時間も増加し、検定法の簡便化が計れないなどの問題点があげられる。

そこで、これらの問題点を踏まえて菌糸球検定法を考察した。糸状菌の分生胞子は時間の経過とともに発芽し、菌糸を伸長して菌糸体を形成する。このような形態分化が、2分裂で増殖する細菌や出芽によって増殖する酵母と異なり、糸状菌における生理活性の量的検定を困難にしている。しかし、胞子が多細胞からなる菌糸体に生長したとしても、それぞれが個々の胞子から由来したものであれば独立した構造体として取り扱うことができ、量的検定が可能になると考えられる。Table 2に示したように培養胞子は、ほぼ100%に近い数値で菌糸球として回収されることから、菌糸球は上記の条件を満たすものと思われる。すなわち本法を用いることで、検定対象の均一性が増し、精度の高い検定結果が期待できるであろう。また胞子は、微量の検定溶液で振とう培養でき、短時間で菌糸球として回収、検定できることから、単離・精製に伴う検定標品量の微量化、検定時間の短縮および検定方法の簡便化が計れる利点がある。以上のことから、菌糸球検定法は形態分化を伴う糸状菌の生理活性を検定する上で、有用な方法と思われる。本法では胞子で検定した生理活性効果を多細胞からなる菌糸球に置き換えて間接的に検定するという問題は残るものの、今回の反復実験を通して常に一定の数値が得られたことは、本検定法が標品の生理活性を正確に反映していることを示唆している。

更に菌糸球検定法の精度を高めるために、検定数の増加および操作過程の簡便化を検討している。

引用文献

1. Akutsu, K., Irino, T., Kubo, A., Okuyama, S. and Hibi, T. (1988). Induction of dicarboximide fungicide-resistance with filtrates of the resistant strains of *Botrytis cinerea*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 54 : 593-599.
2. Shirane, N. and Hatta, T. (1986). Isolation of protoplasts from *Botrytis cinerea*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52 : 721-724.
3. Shirane, N. and Hatta, T. (1987). Mineral salt medium for the growth of *Botrytis cinerea* in vitro. Ann. Phytopath. Soc. Japan 53 : 191-197.

(平成3年12月4日受理)