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（4）

# コムギ赤かび病菌・うどんこ病菌

北海道立中央農業試験場　宮島邦之（みやじまくにゆき）
JA全農農業技術センター　中澤靖彦（なかざわやすひこ）

## ――コムギ赤かび病菌――

### はじめに

コムギの赤かび病菌には，数種類が知られており，北海道ではそのうち *F. avenaceum*, *F. culmorum* 及び *F. nivale* が発生する。特にコムギの主産地である道東北部では，赤かび病が多発生する冷涼年には *F. nivale* が優占種となる。本病原菌は北海道で1928年にコムギの紅色雪腐病菌として認められて以来，毎年多少の差はあれ発生していた。この病原菌はまた，コムギの生育期にも発生し，幼苗の立ち枯れ，葉身の斑紋，葉鞘の褐枯症状及び穂の赤かび病も引き起こす（宮島・斉藤，1984；斉藤ら，1982；坪木，1984；坪木・青田，1986）。病原菌は種子伝染及び土壌伝染して積雪期に紅色雪腐病を起こし，夏季の生育期には分生胞子及び子のう胞子が空気伝染して赤かび病を生じる（萱場ら，1993）。北海道では，前者の紅色雪腐病や雪腐大粒菌核病を防除するためにチオファネートメチル剤（以下，TM剤と略す）が1973年以降使用されてきたが，1981年にはベンゾイミダゾール剤に対する紅色雪腐病菌の耐性菌が全道各地に広く分布し（田中ら，1983），次いで赤かび病菌（*F. nivale*）の耐性菌も認められた（坪木，1984）。

ここでは，赤かび病菌，特に *F. nivale* のチオファネートメチル耐性菌の北海道における例を紹介する。

### 1　赤かび病菌の分離方法

（1）　単胞子分離

紅色雪腐病罹病葉，生育期の葉の斑紋及び赤かび病罹病穂には多量の大型分生胞子が形成されているので，これらの新鮮な病斑部を滅菌水中で振とうする。これにより得られた胞子浮遊液を素寒天培地（ストレプトマイシンまたはクロラムフェニコール50 ppm加用）に白金耳またはコンラージ棒で広げ，15～20°Cで培養する。1～2日後に発芽した胞子を単個分離し，ジャガイモ煎汁ショ糖寒天培地（PSA）または同ブドウ糖寒天培地（PDA）で培養し，4°Cで保存する。

（2）　菌糸分離

罹病組織を流水で洗浄し，2%アンチホルミン液に30秒間浸漬して表面殺菌後，十分に水洗してPDAまたはベンゾキサゾリノン300 ppm加用PDA（斉藤・宮島，1984）上に静置，培養後，伸長した菌糸の先端を切り取り，分離，培養する。

### 2　検定方法

耐性検定は胞子発芽と菌糸生育について行う。

（1）　胞子発芽試験法

胞子形成培地：コムギ葉煎汁寒天培地（乾燥コムギ葉10 g，ショ糖10 g，寒天15 g，蒸留水1 *l*），エンバク粒培地（エンバク穀粒50 g，蒸留水50 m*l*），カーネーション葉寒天培地（CLA），PDA。

胞子形成法：PDAで前培養した供試菌株の菌叢片を各寒天培地に置床し，10～20°C，BLBを照射して培養する。また，胞子浮游液をエンバク粒培地に加え，暗所で7日間培養後，穀粒をプラスチックペトリ皿に移し，BLB照射下，10～20°Cで培養する。

検定：TM剤の希釈液を調製し，これに等量の胞子浮游液（$3\times10^5$個/m*l*）を混合した液をコロジオン膜被覆スライドグラスに滴下し，20°C，24時間，湿室内で静置して100個の胞子の発芽の状況を検鏡する。

*F. nivale* の大型分生胞子は，コムギ葉煎汁寒天培地またはPDAを用いて15°C，BLB照射（12または24時間/日），7日間培養すると多量に形成され，エンバク粒培地では3日間のBLB照射で良好であった（萱場・宮島，1992）。チオファネートメチルの胞子発芽に対する影響は，耐性菌では5ppmでほとんど認められず，50 ppmで73%が阻害され，MICは50 ppm以上であった。なお，参考に供試した *F. graminearum* S1菌株は感受性であり，1ppmで阻害された。

（2）　平板希釈法

PDA培地に供試菌株の菌叢片を移植し，20°Cで3～4日間，暗所で前培養した。チオファネートメチルを1，

Methods for Monitoring Fungicide Resistance—Wheat scab (*Fusarium graminearum, F. nivale, F. avenaceum*)・Wheat powdery mildew (*Erysiphe zraminis* f. sp. *tritici*).
By Kuniyuki MIYAJIMA and Yasuhiko NAKAZAWA

10，100及び1,000 ppmになるようにPDAに混合し，オートクレーブののち9 cmペトリ皿で平板として検定培地とした。前培養したコロニー周辺部を直径4 mmのコルクボーラーで打ち抜き，菌叢面を下にして検定培地に移植し，15～20℃で3～5日間培養後，菌糸伸長の有無により感受性菌と耐性菌の判定を行う（Smith et al., 1991）。

1984年に北海道十勝支庁管内，17市町村の赤かび病罹病穂から分離した*F. nivale*の菌株はすべてベノミル耐性菌であり，50,000 ppmでも生育した。なお，*F. graminearum*の菌株はすべて感受性菌であった（坪木，1984）。また1991年に北海道網走支庁管内の3市町村の赤かび病罹病穂から分離した*F. nivale*の7菌株もすべてチオファネートメチル耐性菌であり，MICは1,000 ppm以上であった。なお，*F. avenaceum* 17菌株，*F. graminearum* 13菌株はすべて感受性菌であり，MICは10 ppm以下であった（表-1）。

紅色雪腐病罹病葉から分離した*F. nivale*の菌株は，感受性菌のMICが3 ppm，耐性菌が40,000 ppm以上であり（田中ら，1983），赤かび病菌の*F. nivale*の耐性菌もMICが50,000 ppm以上の高度耐性菌であって，道東部に広く分布していた。なお，同菌の感受性菌のMICをさらに検討する必要があり，その際，チオファネートメチルの希釈は2倍系列が望ましい。また，検定用培地調製のときに同剤をオートクレーブしない場合には，テンサイ褐斑病菌その他で報告されているように（山口ら，1975）抗菌活性が低く，*F. avenaceum*，*F. graminearum*でも100 ppmで生育することがあるので，オートクレーブ前に培地に添加する。

表-1　コムギ赤かび病菌のチオファネートメチルに対する感受性の比較（1991）

| 供試菌種 | 感受性 | 供試菌株数 | 菌糸の伸長（mm）[1] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | 1 | 10 | 100 | 1,000 ppm[2] |
| *F. nivale* | | (9) | | | | | |
| 訓子府町 | 耐性菌 | 3 | 17 | 17 | 17 | 8 | 4 |
| 小清水町 | 〃 | 2 | 17 | 17 | 17 | 14 | 3 |
| 女満別町 | 〃 | 2 | 17 | 17 | 17 | 12 | 5 |
| 〃 | 感性菌[3] | 2 | 17 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| *F. avenaceum* | | (17) | | | | | |
| 斜里町 | 感性菌 | 6 | 15 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 小清水町 | 〃 | 2 | 15 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| 美幌町 | 〃 | 4 | 11 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| 女満別町 | 〃 | 5 | 17 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| *F. graminearum* | | (13) | | | | | |
| 置戸町 | 感性菌 | 2 | 10 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| 端野町 | 〃 | 2 | 17 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| 斜里町 | 〃 | 2 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| 美幌町 | 〃 | 2 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| 豊頃町 | 〃 | 1 | 19 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| 鹿追町 | 〃 | 1 | 11 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| 川西町 | 〃 | 1 | 14 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 池田町 | 〃 | 1 | 16 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| 士幌町 | 〃 | 1 | 12 | 11 | 0 | 0 | 0 |

[1]：培養温度は*F. nivale*が15℃，*F. avenaceum*及び*F. graminearum*は25℃で，いずれも3日間培養した．
[2]：チオファネートメチルを混和した後にオートクレーブしたPDA培地を用いた．
[3]：紅色雪腐病菌を供試した．

### 3　薬剤の防除効果

*F. nivale*の耐性菌が優占する圃場では，TM剤の赤かび病に対する防除効果の低下が認められたが，イミノクタジン酢酸塩液剤，水和硫黄剤及びプロピコナゾール乳剤などは防除効果が高い。コムギの出穂後が冷涼なときには*F. nivale*が優占するので，TM剤以外の農薬を使用することが望ましい。薬剤の圃場におけるスクリーニングは，赤かび病発生の年次変動が大きいため，判定不能の場合がある。しかし，環境を制御した室内で出穂促進栽培コムギ（内藤ら，1984）を用いると，耐性菌に対する防除効果の判定が通年可能になると思われる。

### 引　用　文　献


1) 萱場元美・宮島邦之（1992）：日植病報　58(1)：147（講要）.
2) ――――ら（1993）：同上　59(1)：93～94（講要）.
3) 宮島邦之・斉藤　泉（1984）：同上　50(1)：97（講要）.
4) 内藤秀樹ら（1984）：九州農試報告　23(3)：355～386.
5) 斉藤　泉ら（1982）：日植病報　48(1)：124（講要）.
6) ――――・宮島邦之（1984）：同上　50(1)：97（講要）.
7) Smith, C. M. et al. (1991) : Bulletin OEPP/EPPO Bulletin　21 : 336～341.
8) 田中文夫ら（1983）：日植病報　49(4)：565～566.
9) 坪木和男（1984）：同上　50(1)：97（講要）.
10) ――――・青田盾彦（1986）：同上　52(1)：142（講要）.
11) 山口武夫ら（1975）：てん菜研究会報　17：71～79.


（宮島邦之）

## ――コムギうどんこ病菌――

### は　じ　め　に

コムギうどんこ病の防除には，世界的に脱メチル化阻害剤（DMI）が使用されている。日本でも，コムギの主産地である北海道において，基幹品種の「チホクコムギ」が本病に罹病性であることから，トリアジメホンやプロピコナゾールなどのDMI剤の使用頻度が高い。

DMI剤は，その卓越した効果の反面，過度の使用による耐性菌の出現が危惧されている。既に，ヨーロッパの

ムギ類うどんこ病では，DMI剤に対する耐性菌の発生と防除効果の低下が報告されている（De Waard et al., 1986）。

一般に，うどんこ病菌のような絶対寄生菌の薬剤感受性を調べる場合には，温室内で菌株ごとに隔離した条件でポット試験を行っている例が多い。本病でもこの方法を用いた報告がある（De Waard et al., 1986；Enisz, 1988：Schulz, 1991 b）。しかし，この方法ではスペースの問題から扱う菌株数に限度があること，環境条件によって菌の薬剤感受性値に変動がみられるなどの問題がある。このため，室内で多数の菌株を扱うことを目的に，コムギの第1葉を切り取って角型シャーレに流した寒天に挿し込み薬剤処理・接種する方法（Schulz, 1991 a）や，試験管内でコムギの根から薬剤を吸収させて試験管の口から菌を接種する方法（Sozzi et al., 1991）が考案されているが，操作が煩雑であるなどの難点がある。

そこで，筆者ら（1992 a）は，De Waard et al.（1986）の方法を改変して，室内で一度に多数の菌株を検定することが可能で，再現性が高く，操作も簡単な薬剤感受性検定方法として，リーフセグメント法を考案した。

本法を用いて，北海道のコムギうどんこ病菌のDMI剤に対する感受性のモニタリングを実施し，良好な結果を得ている（中澤ら，1992 b）。

**1　うどんこ病菌のサンプリング**

径8 cmのスチロール製ポットに，乾熱滅菌した人工培土（クミアイ粒状培土®）を充てんし，コムギ（品種：チホクコムギ）の種子を1ポット当たり10粒播種する。播種後，26°C，10,000 Lux，16時間照明下の人工気象器内で7日間育苗する（7日でほぼ第1葉が展開する）。外部からのうどんこ病菌の侵入を防ぐため，人工気象器は育苗専用のものを用意し，接種源から隔離した室内に置く。

こうして育成したうどんこ病フリーのチホクコムギ苗をハイブリッドメッキンバッグHM-1104®（(株)ホギメディカル製）に入れてサンプリング圃場に持ち込む。分生胞子を十分に形成したうどんこ病罹病葉を採取して，うどんこ病フリー苗になすりつけて接種する。接種後，メッキンバッグの口を折りたたみクリップなどでとめて，実験室に持ち帰る。罹病葉を採取する方法に代えて，うどんこ病フリーのポット植えチホクコムギ苗を，うどんこ病発生圃場に数日間暴露して，その後回収する方法を採ってもよい。

**2　接種源の準備**

接種したコムギ苗は，メッキンバッグに入れたまま，20°C，蛍光灯照明下（作物体の約20 cm上から20 w蛍光灯2本により12時間/日 照明）に置き，薬剤感受性検定に十分な量の分生胞子形成がみられるまで保持する（平均10日間程度）。この段階で十分な量の分生胞子が得られない場合は，現れた病斑を滅菌した筆でかき取り，新たなチホクコムギ苗になすりつけて接種して，病原菌の増殖を図る。

うどんこ病菌の移植作業は原則としてクリーンベンチ内で行う。移植には市販の絵筆を用いるが，サイズとしては6号または4号が使いやすい。絵筆の滅菌は，先端部10 cm程度をエタノールに数分間浸し，クリーンベンチ内でアルミホイールの上で2時間以上風乾して十分乾燥していることを確認した後，そのままアルミホイールで先端部20 cm程を包んで保存しておく。乾熱滅菌では筆が傷む。オートクレーブでは毛先が濡れて好ましくない。うどんこ病菌は濡れを好まないので，移植作業中もメッキンバッグ内の結露水などで毛先を濡らさないように注意する。

**3　薬剤感受性検定方法**

① 供試植物：うどんこ病フリーで育苗したチホクコムギの第2葉の，なるべくよじれの少ない中央部から，長さ10～15 mmのセグメントを切り取る。1で述べたサンプリング用のうどんこ病フリーのチホクコムギ苗を同じ条件下でさらに7日間（播種から通算14日間）育苗すると，葉齢は2.7葉程度となり，第2葉が完全展開する。このときの第2葉を用いて筆者は良好な結果を得ている。この時期を過ぎた場合には第3葉を用いてもよい。逆に，これより早い時期だと，展葉がまだ十分でないため，葉の幅が狭く，1枚の葉から得られるセグメントも少ないので，使いにくい。また，第1葉はねじれが大きく使いにくい。

② 供試薬剤：原体をメタノールに溶解し（10,000 ppm程度），－20°Cで保存したものをTween 20 5,000倍添加蒸留水で希釈して所定の濃度とする。希釈後のメタノールの濃度は0.1%を超えないようにする。濃度段階は薬剤及び菌株により異なるが，例えば1 ppm，0.5 ppm，0.2 ppm，0.1 ppm……0.01 ppmのようにとる。
Tween 20を加えるのは，⑤の操作でリーフセグメントを浮遊させるときに，表面張力のためセグメントどうしが重なりあうのを防ぐためである。

③ 接種源：接種7～10日後の新鮮な分生胞子。

④ 接種方法：リーフセグメントを葉表を上にして，湿った沪紙を敷いたシャーレに並べ，径15 cm，高さ20 cmのアクリル製の円筒内に置き，円筒の上

からうどんこ病菌の分生胞子を十分に形成いている罹病葉（円筒1個当たり6〜12枚）を滅菌した筆で軽くたたいて分生胞子を均一に払い落とす。

⑤ 薬剤処理方法：所定濃度に調整した薬液を50 mm径のシャーレに5 mlずつ分注し，これに接種したリーフセグメント5枚を葉表を上にして浮遊させる。この作業を乱雑に行うと，セグメントが水没したり，裏表が逆になったりするので注意する。

⑥ 培養条件：上記のシャーレにふたをして，20°C，3,000〜5,000 Lux，12時間照明下で6日間培養する。

⑦ 調査方法：実体顕微鏡下で胞子形成を伴う病斑の面積率を10段階（0を入れると11段階）で調査する。

⑧ データの解析：1濃度（シャーレ）につき5枚のリーフセグメントを供試しているので，五つの観測値が得られるが，そのうち最小と最大をカットして中間の三つの値の平均値をその濃度における病斑面積率とする。それによって，薬剤の菌に対する最小生育阻止濃度（MIC）を求め，さらに，無処理の病斑面積率と比較した阻害度を算出して，$EC_{50}$値（50%阻止濃度）を求める。

⑨ 標準菌株：本法は図-1に示すように，きわめて再現性が高いので，菌株の感受性を絶対値としてとらえることが可能であるが，できれば標準菌株を同時に供試することが望ましい。筆者の研究室では標準菌株として，以下の4株の単胞子分離菌株を継代保存している。

DMI剤感受性菌株：CH-4-1，2-2

DMI剤耐性菌株：OB-1-1，R-2

⑩ 菌株の保存：**2**で述べた方法によって，うどんこ病菌の継代は可能である。しかし，この方法では約10日ごとに継代移植が必要である。長期間の保存のためには試験管内で培養し，低温で保存する方法がある（土佐，1989）。

**4　検定結果と薬剤の防除効果の関係**

1991年に北海道の各地域から採取したコムギうどんこ病菌の中から，代表的な感受性を示すものを用いて，隔離ポット試験を行ったところ，リーフセグメント法によって得られた感受性の差は，ポット試験によるそれとよく一致した（表-1）。

**5　留意点**

① 本サンプリング法で得られた菌株は，個体群であり遺伝的に純系とはいえない。したがって，継代を繰り返すと感受性が変動する可能性がある。このため，薬剤感受性検定には，できるだけサンプリング直後の個体群を用いることが望ましいが，やむをえない場合でも1回の継代にとどめる。

② 標準菌株として感受性が一定の菌株を得るために

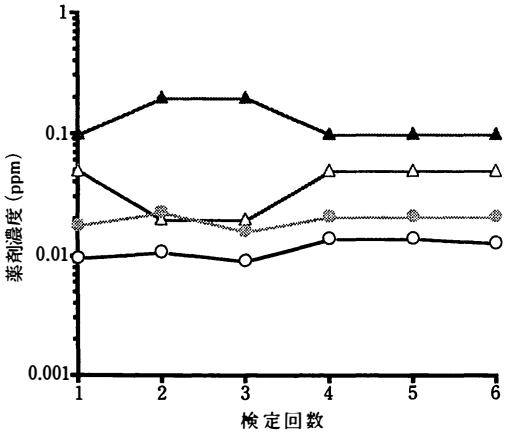


**図-1**　コムギうどんこ病菌単胞子分離株（2-2）のリーフセグメント法によるDMI剤感受性値の安定性
—○—：トリアジメホン$EC_{50}$
—△—：トリアジメホンMIC
—●—：プロピコナゾール$EC_{50}$
—▲—：プロピコナゾールMIC

**表-1**　感受性の異なるコムギうどんこ病菌に対する2種のDMI剤の防除効果（隔離ポット試験）

| 濃度（ppm） | 発病度 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | トリアジメホン | | プロピコナゾール | |
| | CH-4 | OB-1 | CH-4 | OB-1 |
| 125.00 | | 0.0 | | 0.0 |
| 62.50 | | 13.8 | | 0.0 |
| 31.25 | | 60.0 | | 0.0 |
| 15.63 | 0.0 | 87.1 | 0.0 | 2.9 |
| 7.81 | 0.0 | 90.8 | 0.0 | 20.0 |
| 3.91 | 0.0 | | 0.0 | 64.3 |
| 1.95 | 10.8 | | 7.3 | |
| 0.98 | 21.7 | | 8.6 | |
| 0.49 | | | 11.4 | |
| 0 | 92.3 | 97.1 | | |
| MIC（ppm） | 3.9 | 125 | 3.9 | 31.3 |
| Rf[1] | 1 | 32.1 | 1 | 8.0 |
| （リーフセグメント法） | | | | |
| $EC_{50}$（ppm） | 0.011 | 0.32 | 0.021 | 0.16 |
| Rf[2] | 1 | 29.1 | 1 | 7.6 |

[1]：菌株OB-1のMIC/菌株CH-4のMIC

[2]：菌株OB-1の$EC_{50}$/菌株CH-4の$EC_{50}$

は，単胞子分離（土佐，1989）を行って遺伝的に純系な菌株を得る必要がある。単胞子分離した菌株は継代を繰り返しても，感受性に変化はない。

③ 本検定法は，DMI剤だけでなく，モルホリン系及びピペリジン系殺菌剤やカルベンダジム，エチリモルなどの各種浸透性殺菌剤にも適用できる。

### 引用文献


1) De Waard, M. A. et al. (1986)：Neth. J. Pl. Path. 92：21～32.
2) Enisz, J. (1988)：Proc. Brit. Crop Prot. Conf.—Pests and Diseases—：373～378.
3) 中澤靖彦ら（1992a)：日植病報　58 (1)：99（講要).
4) ――― (1992b)：同上　58 (4)：608（講要).
5) Schulz, U. (1991a)：Bull. OEPP　21 (2)：296～298.
6) ――― (1991b)：ibid.　21 (2)：298～301.
7) Sozzi, D. et al. (1991)：ibid.　21 (2)：301～304.
8) 土佐幸雄 (1989)：植物病理学実験マニュアル，養賢堂，東京，pp. 110～114.


（中澤靖彦）

## 人事消息

(7月13日付)

野中和雄氏（農林水産省大臣官房付）は環境庁水質保全局長に

赤木　壮氏（環境庁水質保全局長）は退職

(7月16日付)

早川泰弘氏（種苗課課長補佐（国際班担当））は環境庁水質保全局土壌農薬課課長補佐に

西口正通氏（農業生物資源研分子育種部核外遺伝子研主研）は同研室長に

酒井富久美氏（同上研室長）は出向（京都大学木質科学研究所教授）

(8月1日付)

田中滋郎氏（北農試畑作管理部長）は九州農業試験場長に

岡田利承氏（北農試生産環境部長）は北農試畑作管理部長に

井上隆弘氏（技会事務局研究開発官）は北農試生産環境部長に

桑原真人氏（北農試企画連絡室企画科長）は技会事務局研究開発官に

向居彰夫氏（九州農業試験場長）は退職

水久保隆之氏（農環研環境生物部微生物管理科線虫・小動物研主研）は力農試地域基盤研究部線虫制御研主研に

## 主な次号予告

次10月号は，下記原稿を掲載する予定です。

**特集：施設環境制御と病害防除**

施設環境制御による果菜類灰色かび病の防除　入江　和己　岡田清嗣・増田吉彦・佐古　勇

雨よけ栽培による果樹病害の防除――特にブドウ技膨病防除について――　梶谷　裕二

養液栽培の培養液管理による根部病害の防除　竹内　妙子

根域隔離栽培による土壌病害の防除　上原　洋一

イネ萎縮ウイルスの全遺伝子構造　上田　一郎

わが国におけるクサカゲロウの大量飼育の可能性と問題点　新島　恵子

ニンジンしみ腐病の発生生態と防除　棚橋　一雄

植物防疫基礎講座

多重比較法とその選び方(3)/ノンパラメトリック検定で用いる多重比較　山村　光司

植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(5)ムギ眼紋病菌　竹内　徹

(リレー随筆)気象観測船に乗船して(1)三田　久男

**定期購読者以外のお申込みは至急前金にて本会へ**

**定価1部700円　送料51円**


植物防疫

平成5年

9月号

(毎月1回1日発行)

＝禁転載＝

第47巻　平成5年8月25日印刷

第9号　平成5年9月1日印刷

編集人　植物防疫編集委員会

発行人　岩本　毅

印刷所　三美印刷㈱

東京都荒川区西日暮里5-9-8

定価700円　送料51円

(本体680円)

平成5年分

前金購読料 7,800円

後払購読料 8,400円

(共に〒サービス，消費税込み)

――発行所――

東京都豊島区駒込1丁目43番11号　郵便番号170

社団法人　日本植物防疫協会

電話・東京 (03) 3944－1561～6番

振替　東京1－177867番