

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(7)

キュウリべと病菌

なかざわやすひこ くらさわ みほこ おおつかのりお
JA 全農農業技術センター 中澤靖彦・黒沢美保子・大塚範夫

はじめに

キュウリべと病の防除には、従来から銅やマンゼブ、TPNなどの保護殺菌剤が使用されてきたが、1970年代末(日本では1980年代中頃)に、メトラキシルやオキサジキシルなどのフェニルアמיד系殺菌剤が登場し、本病に対して卓効を示したことから、現在では広く使用されている。

フェニルアמיד系殺菌剤は、疫病菌やべと病菌などの卵菌類にのみ特異的に高い活性を示し、浸透移行性に優れ、予防効果のみならず治療効果も示す優れた殺菌剤である。

その反面、本系統の薬剤は耐性菌を生じやすいことが知られており、キュウリべと病では、イスラエルやギリシャで使用を開始して2~3年の後に、耐性菌の発生とそれによる防除効果の低下が報告された(Reuveni et al., 1980; Georgopoulos and Grigoriu, 1981)。

日本では、耐性菌発生回避のため、本系統の薬剤はマンゼブや銅、またはTPNとの混合剤として上市された。しかし、1990年に千葉県及び神奈川県下のキュウリ圃場からフェニルアמיד耐性べと病菌の発生が報告された(竹内, 1990; 大塚ら, 1990)。さらに、黒沢ら(1992)は関東地方におけるキュウリべと病菌の薬剤感受性についてモニタリングを行い、上述の2県のほかに、茨城、栃木、群馬の各県からもフェニルアמיד耐性菌を得ている。

一般に、べと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下でポット試験を行っている例が多い。FRAC (Fungicide Resistance Action Committee of GIFAP)でも、本病原菌にはこの方法を用いている(Cohen, 1992)。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、環境条件によって薬剤感受性値の変動がみられるなどの問題がある。

一方、バレイシヨの疫病では、室内で多数の菌株を扱

うことを目的に、バレイシヨのリーフディスクを薬液に浮遊させ、これに疫病菌の遊走子囊懸濁液を点滴接種して薬剤感受性を検定する方法が開発されており(以下、リーフディスク法と呼ぶ)、耐性菌の薬剤に対する反応はポット試験や切離葉を用いた試験に比べて鋭敏であり、*in vitro*の平板希釈法に匹敵する(Schwinn and Sozzi, 1982a; Sozzi and Staub, 1987)。

リーフディスク法はバレイシヨ疫病菌のみならず、ブドウべと病菌やキュウリべと病菌にも適用可能であり(Schwinn and Sozzi, 1982b; Stähle-Csech et al., 1992; King-Watson, 1988)、日本におけるキュウリべと病菌のフェニルアמיד耐性菌の検出には、ほとんど本法が用いられている。

本稿では、このリーフディスク法を紹介するとともに、その問題点についても触れたい。

1 べと病菌のサンプリング

採取する罹病葉は、淡黄色の初期病斑を形成しているもので、遊走子囊の形成がまだ認められない程度の新しいものが望ましい。採取する時点で、多量の遊走子囊を形成しているものは、遊走子囊が古くて病原性を失っている場合や、移送中に遊走子が脱落してしまい、その後遊走子囊の再生がみられない場合がある。

採取する葉の数は1サンプル(感受性を検定しようとする最小単位)当たり2枚程度でよい。採取した罹病葉は、サンプルごとにビニール袋に入れ、すぐに実験室に持ち帰る。移送に長時間を要する場合は、低温条件下で保持する。

2 接種源の準備

実験室に到着次第、採取した罹病葉を葉裏を上にして、湿った沷紙をしいた大型のシャーレ内に入れ、20°C、3,500~5,000 Lux、12時間照明下に保持する。通常の場合、1~2日以内に病斑上に遊走子囊の形成がみられる。

ここで得られた遊走子囊を直接、薬剤感受性検定に供してもよい。しかし、この場合、検定に十分な量の遊走子囊が得られないことがあるのと、採取したキュウリ葉に付着している種々の薬剤の影響が懸念される。Cohen(1992)は薬剤の影響を除去するために、遊走子囊を8µmミリアフィルタを用いて冷たい蒸留水で洗うことを勧

Methods for Monitoring Fungicide Resistance - Cucumber downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*).

By Yasuhiko NAKAZAWA, Mihoko KUROSAWA and Norio OHTSUKA

めている。筆者らは、採取したキュウリ葉上に形成された遊走子嚢を、いったん、べと病フリー（もちろん薬剤無処理）のキュウリ葉に接種して、再度形成された遊走子嚢を薬剤感受性検定に供している。

すなわち、採取したキュウリ葉上に形成された遊走子嚢を筆でかき取り（このとき、できるだけキュウリ葉の表面に直接筆先が触れないようにする）、蒸留水に懸濁して室温で2~3時間保持して遊走子を放出させる。べと病フリーのキュウリ（品種：相模半白またはときわ光3号P型）の第1本葉を切り取り、湿った沔紙をしいたシャーレ内に葉裏を上にして置き、10~20か所にパスツールピペットを用いて遊走子嚢懸濁液を滴下する。これを、20℃、3,000~5,000 Lux、12時間照明下に保持する。約7日後には、薬剤感受性検定に十分な量の遊走子嚢が得られる。

べと病菌の移植作業は、使用する材料及び器具さえべと病菌に汚染されていないければ、無菌条件で行う必要はない。移植に使用する筆は市販の絵筆を用いるが、サイズとしては4号が使いやすい。絵筆はべと病フリーであれば必ずしも滅菌の必要はない。

3 薬剤感受性の検定方法

① 供試植物：径8cmのスチロール製ポットに、乾熱滅菌した人工培土（クミアイ園芸培土[®]）を充てんし、キュウリ（品種：相模半白またはときわ光3号P型）の催芽種子を1ポット当たり2粒まく。播種後、26℃、10,000 Lux、16時間照明下の人工気象器内で3~4週間育苗する（3週間で第2本葉が完全に展開する）。この第2本葉から、径10mmのコルクボーラーでリーフディスクを打ち抜く。

第1本葉も使用可能であるが、第2本葉に比べて小さく、葉が硬い。このため、得られるリーフディスクの数が少なく、また第2本葉と一緒に使うと材料の均一性の点で問題がある。筆者らは、薬剤感受性検定には第2本葉を用い、第1本葉はもっぱら2で述べたべと病菌の増殖に用いている。

供試作物は温室内で育苗してもよいが、べと病の自然感染には十分注意が必要である。

② 供試薬剤：メトラキシル25%水和剤、オキサジキシル25%水和剤を用いる。SCHWINN and Sozzi (1982 a) は、製剤に含まれる界面活性剤の影響で薬液に浮遊させたリーフディスクが沈んでしまうので、リーフディスク法では原体を適当な溶媒に溶かして使用するとしているが、後に述べる設定濃度の範囲内では、水和剤を用いても差し支えない。なお、水和剤も原体も市販されていないので、メーカーに使用目的を説明して分譲を受けるこ

とが望ましい。

薬剤は蒸留水で希釈して所定の濃度とする。濃度段階は、メトラキシルでは100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ppm, オキサジキシルでは100, 10, 1, 0.1, 0.01 ppm とすれば十分である。薬剤無処理区（蒸留水のみ）を設けることはもちろんである。

③ 薬剤の処理方法：所定濃度に調整した薬液を直径50mmのシャーレに5mlずつ分注し、これにリーフディスクを5枚ずつ葉裏を上にして浮遊させる。なお、薬剤処理は菌の接種の前日に行い、接種まで室内で保持する。

オキサジキシルは、メトラキシルに比べて浸透移行性が低い。このため、バレイショ疫病菌の場合、オキサジキシルをあらかじめ散布したバレイショの葉からディスクを打ち抜き、これを湿った沔紙をしいたシャーレに並べるといった方法がとられている (Sozzi et al., 1992)。しかし、筆者らの経験では、キュウリべと病菌では、オキサジキシルもメトラキシルと同様に薬液にリーフディスクを浮遊させる方法で感受性検定を行う事が可能である。

④ 接種方法：薬剤処理1日後に行う。2で述べた条件で形成させた新鮮な遊走子嚢を筆でかき取り、蒸留水に懸濁して遊走子嚢濃度を 10^4 個/ml程度に調整し、室温で2~3時間保持して遊走子を放出させる。遊走子型発芽（間接発芽）が50%以上であることを確認した後、この懸濁液をマイクロピペットでリーフディスク1枚当たり10 μ l、ディスクの中央に滴下する。

⑤ 培養条件：接種後、シャーレにふたをして、20℃、3,000~5,000 Lux、12時間照明下で7日間培養する。

⑥ 調査方法：実体顕微鏡下で遊走子嚢形成を伴う病斑の面積率に下記の指数を与えて調査し、発病度を求める。

0：無発病，1：病斑面積率5%以下，2：6~25%，

3：26~50%，4：51~75%，5：76%以上

発病度 = Σ (指数 \times 該当リーフディスク数) \times 100 / (5 \times 調査リーフディスク数)

⑦ データの解析：薬剤無処理区の発病度と比較した阻害度を算出して、EC₅₀値（50%阻止濃度）を求める。同時に最小生育阻止濃度（MIC）も記録しておくことよい。

⑧ 耐性菌の判定と標準菌株：筆者らが単遊走子嚢分離して継代保存しているフェニルアミド感受性菌株（S-02）のEC₅₀値はメトラキシルで0.01 ppm前後、オキサジキシルで0.3~0.7 ppm程度である。一方、フェニルアミド耐性菌として単遊走子嚢分離して継代保存して

いる菌株 (R-08) の EC_{50} 値はメトラキシル, オキサジキシルともに 100 ppm 以上である。

薬剤感受性の検定にあたっては, 原則として標準菌株を同時に供試することが望ましいが, 本菌のような絶対寄生菌では困難な場合も多い。そこで, 標準菌株を供試できない場合には, ここに示した数値を参考にされた。

4 検定結果と薬剤の防除効果との関係

1991 年に関東の各地から採取したキュウリベと病菌の薬剤感受性に関する検定結果の一部と, その中から数菌株を選んで行ったポット試験の結果を表-1 及び表-2 に示した。感受性検定の結果, メトラキシルに対して耐性と判断された菌株は, ポット試験においてもメトラキシルの防除効果は著しく劣った。

しかし, フェニルアמיד耐性菌に対しても, 実際に

上市されているフェニルアמידと他剤との混合剤は, 高い予防効果を示したと報告されている (黒沢ら, 1991)。ただし, 治療効果では混合剤の効果は低いという報告がある (竹内, 1990)。これは, フェニルアמיד耐性菌に対しては, 混合剤の中のマンゼブや TPN などの保護殺菌剤が主に効果を示しているためであろう。

5 留意点

(1) 前述の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, 継代培養を繰り返すと薬剤感受性が変動する可能性がある。このため, 感受性検定には, できるだけ採取した罹病葉から分離直後の個体群を用いることが望ましいが, やむを得ない場合でも 1 回の継代培養にとどめる。

(2) 本法は, ある純系の (例えば単遊走子囊分離によって得られた) 菌株がフェニルアמיד感受性であるか耐性であるかを判定するにはきわめて適した方法で, 定性的な方法といえる。しかし, 感受性菌と耐性菌が様々な比率で存在する個体群の場合, 本法では耐性菌の存在比率を定量的に検出することはできない。

バレイシヨの疫病においては, 検定する菌の個体群中に耐性菌が, メトラキシルの場合 1%, オキサジキシルの場合 10%, それぞれ存在すると, 本法では個体群全体として耐性の反応を示すといわれている (Sozzi and STAUB, 1987; Gisi, 1988)。逆に, 耐性菌の存在比率が 0.1% 以下の場合には完全に感受性菌の反応を示し, 耐性発達の初期の段階ではフェニルアמיד耐性菌を検知することができない (Sozzi and STAUB, 1987)。

キュウリベと病菌においては, 本法について, このような詳細な検討は行われていないが, バレイシヨ疫病菌の場合と同様のことがいえるものと考えられる。

したがって, 本法で得られた結果を過大評価もしくは過小評価してはならない。すなわち, ある圃場から得られたサンプルが本法によって耐性の反応を示したからといって, その圃場が 100% 耐性菌に汚染されているとはいえない。ただし, 一定以上の比率で耐性菌が存在することは事実であるので, 今後の防除対策に注意する必要がある。また, 既にフェニルアמיד剤の効果の低下がみられている場合には, その原因が耐性菌の存在に帰せられる可能性が大きいと考えられる。

また逆に, あるサンプルが感受性の反応を示したからといって, その圃場には耐性菌が全く存在しないとはいえない。この場合は, 一定の比率以上には耐性菌が分布していないとみるべきであり, 今後も引き続き監視する必要がある。

(3) フェニルアמיד耐性菌の存在比率を定量的に

表-1 関東各地から採取したキュウリベと病菌のフェニルアמיד系殺菌剤に対する感受性

菌株	採取県	EC_{50} (ppm)	
		メトラキシル	オキサジキシル
2-A	千葉	>100	54.4
3-A	千葉	>100	75.4
T-3	茨城	>100	>100
T-6	茨城	>100	>100
K-5	栃木	>100	>100
TG-2	栃木	>100	>100
G-2	群馬	>100	>100
GN-2	群馬	>100	NT ^{a)}
H-91	神奈川	>100	NT ^{a)}
S-02 ^{b)}		<0.1	0.6
R-08 ^{c)}		>100	>100

注 a): 未検定

b): 対照の感受性菌株

c): 対照の耐性菌株

表-2 関東各地から採取したキュウリベと病菌に対するメトラキシルの防除効果 (ポット試験)

菌株	採取県	発病度 ^{a)}	防除価
T-6	茨城	96.7 (96.7)	0
G-2	群馬	60.0 (83.3)	28.7
K-5	栃木	86.7 (90.0)	3.7
H-91	神奈川	76.4 (90.0)	14.8
S-02 ^{b)}		0.0 (20.0)	100
R-08 ^{c)}		90.0 (96.7)	3.5

注 a): メトラキシルは 250 ppm を供試した。()内は無処理区の数値を示す。

b): 対照の感受性菌株

c): 対照の耐性菌株

測る一般的な方法としては次のことが提案されている (WILLIAMS and GISI, 1992)。

① 単一病斑はおそらく単一の遊走子嚢に由来するという前提に基づき、単一病斑から分離された菌株を用いて検定する。この場合、試験単位である1被検単位につき100以上の単一病斑分離菌株を得る必要がある。

② 発病程度を感染点 (infection point) として計測できる程度まで、被検個体群の遊走子嚢懸濁液を希釈して用い、無処理区の感染点数に対する薬剤処理区の感染点数の比率を耐性菌率とする。この場合、感染点として計測できる遊走子嚢濃度で発病が可能な実験系が必要である。

(4) 本検定方法は、フェニルアמיד剤だけでなく、ホセチルなどの各種の浸透性殺菌剤に適用できる。また、3の③で述べたオキサジキシルの処理方法(散布)を用いれば、保護殺菌剤についても適用が可能である (Sozzi et al., 1992)。

引用文献

- 1) COHEN, Y. (1992) : EPPO Bulletin 22 : 318~320.
- 2) GEORGOPOULOS, S. G. and GRIGORI, A. C. (1981) : Plant Disease 65(9) : 729~731.
- 3) GISI, U. (1988) : Fungicide Resistance in North America, APS Press, St Paul (US), pp. 66~71.
- 4) KING-WATSON, E. D. (1988) : Fungicide Resistance in North America, APS Press, St Paul (US), pp. 61~62.
- 5) 黒沢美保子ら (1992) : 関東東山病虫研報 39 : 87~89.
- 6) 大塚範夫ら (1990) : 日植病報 56(3) : 408 (講要)
- 7) REUVENI, M. et al. (1980) : Plant Disease 64(12) : 1108~1109.
- 8) SCHWINK, F. and Sozzi, D. (1982a) : FAO Plant Protection Bulletin 30(2) : 69~70.
- 9) SCHWINK, F. and Sozzi, D. (1982b) : FAO Plant Protection Bulletin 30(2) : 67~68.
- 10) Sozzi, D. and STAUB, T. (1987) : Plant Disease 71(5) : 422~425.
- 11) Sozzi, D. et al. (1992) : EPPO Bulletin 22 : 306~309.
- 12) STÄUBLE-CSECH, U. et al. (1992) : EPPO Bulletin 22 : 314~316.
- 13) 竹内妙子 (1990) : 日植病報 56(5) : 684~686.
- 14) WILLIAMS, R. J. and GISI, U. (1992) : EPPO Bulletin 22 : 299~306.

本会発行図書

『応用植物病理学用語集』

濱屋悦次 (前農林水産省農業環境技術研究所微生物管理科長) 編著 B6判 506ページ

定価 4,800円 (本体4,660円) 送料 380円

植物病理学研究に必要な用語について、植物病理学はもちろん、農業、防除、生化学、分子生物学などについても取り上げ(約6,800語)、紛らわしい用語には簡単な説明を付けそれぞれを英和、和英に分けてアルファベット順に掲載し、また、付録には植物のウイルス、細菌、線虫の分類表を付した用語集です。植物病理学の専門家はもちろん広く植物防疫の関係者にとってご活用いただきたい用語集です。

お申し込みは前金(現金書留・郵便振替・小為替など)で直接本会までお申し込み下さい。

新しい「植物防疫」専用合本ファイル

本誌名金文字入・美麗装幀

本誌B5判12冊1年分が簡単にご自分で製本できる。

- ①貴方の書棚を飾る美しい外観。 ②穴もあけず糊も使わず合本できる。
③冊誌を傷めず保存できる。 ④中のいずれでも取外しが簡単にできる。
⑤製本費がはぶける。 ⑥表紙がビニールクロスになり丈夫になった。

改訂定価 1部 720円 送料 360円

ご希望の方は現金・振替で直接本会へお申込み下さい。

