

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(8)

ジャガイモ疫病菌及び各種作物のピシウム病菌

日本チバガイギー株式会社 ^{つじ} ^{もと} ^{かず} ^{ゆき} 辻 本 一 幸

——ジャガイモ疫病菌——

はじめに

フェニルアמיד（またはフェニルアミド）系化合物は、卵菌亜綱(*Oomycetes*) ツユカビ目(*Peronosporales*)に属する糸状菌に特異的に高い活性を示し、優れた浸透移行性ととも、従来の保護殺菌剤にはない治療効果を併せ持っている。“フェニルアמיד”の呼称は、1983年 Gisiらによって、アシルアラニン、ブチロラクトン、オキサゾリジノン系化合物を包括する名称として提案され、使用されるようになった。

アイルランド、オランダ、スイスなどのヨーロッパ諸国では、当初フェニルアמיד剤の単剤が1970年代後半に上市され、ジャガイモ疫病（疫病菌：*Phytophthora infestans*）の特効薬として広汎に使用されたが、1980年には早くも薬剤耐性菌が発生し、防除効果の低下をまねいた（STAUB, 1991）。

我が国では、メタラキシルとオキサジキシルの2剤が登録されたが、諸外国での耐性菌発生事例をかんがみ、いずれも銅、マンゼブまたはTPNとの混合剤として上市された。ジャガイモの一大産地である北海道では、1987年から疫病の基幹防除薬剤としてフェニルアמיד混合剤が広く用いられるようになったが、1989年に一部の地域で本剤の防除効果の低減が認められ、当該圃場からフェニルアמיד耐性菌が検出された（堀田ら、1990；加藤ら、1990；辻本ら、1990）。また、その翌年には本州で採取されたジャガイモ疫病罹病葉からも低頻度ながら耐性菌が検出されている（加藤ら、1992）。

フェニルアמיד耐性菌のモニタリング法については、耐性菌出現の報告以来、様々な方法が考案、提唱されている。PA-FRAC(Phenylamide-Fungicide Resistance Action Committee of GIFAP)は、1992年にフェニルアמיד耐性菌のモニタリング法に関する報告書を発行し、その中でジャガイモ疫病については、定性的な検定を主眼としたリーフディスク法と切離葉を用いる半

定量法（以下、切離葉法と呼ぶ）及びジャガイモ塊茎ディスクによる定量法（以下、塊茎ディスク法と呼ぶ）をFRAC法として推奨している（Gisi et al., 1992）。本稿では、これらの方法を紹介したい。

1 標本の採集と移送

① リーフディスク法：病斑上に新鮮な遊走子のうの形成がみられるものを、望ましくは同一個体から2葉程度採り、1標本とする。互いに離れた地点（目安として約6m）で採取した複数の病斑を合わせて1標本とした場合、耐性菌と感性菌が混在する可能性が高くなり、検定結果の解釈を誤る原因につながる。得られた罹病葉は、各標本ごとに、半切した疫病感受性ジャガイモ塊茎の切断面にはさみ、輪ゴムで留めた後、新聞紙などで包んで移送する。近距離で直ちに処理できる場合は、罹病葉をビニル袋に入れて持ち帰り、病斑上の遊走子のうをそのまま供試する。

② 切離葉法・塊茎ディスク法：一定区画あるいは圃場内に存在する耐性菌比率を求めるいわゆる定量検定では、目的とする区画内からランダムに40～60罹病葉を採集し、これを一括して1標本とする。長時間の移送を必要とする場合は、標本をビニル袋に入れ、空気を送り込んでふくらませ、これをクーラーボックスに入れて低温条件で運ぶ。

2 検定方法

(1) 接種源の調製

① リーフディスク法：ジャガイモ塊茎にはさみこんだ標本は、切断面から罹病葉を取り出す。塊茎は、エタノール滅菌したナイフで切断面から約1cmの厚さのスライスを切りだし、上記の罹病葉とともに湿らせた汚紙を敷いた大型ペトリ皿に入れ、15～17℃、暗黒下で5～7日間保持すると、表面に遊走子のうが形成される。スライスは汚紙上に直接置かず、ジャガイモ塊茎で5～10mm角のブロックを数個作り、その上に乗せるようにすると置床面からの雑菌の混入が少ない。標本移送が高温下でかつ長時間を要した場合、しばしば、ジャガイモ切断面に細菌の繁殖がみられる。この場合、切断面をいったん薄く切り落とした後、改めてスライスを作ると、ジャガイモ内部に侵入した疫病菌のみが生育し、良好な結果が得られる。罹病葉またはジャガイモスライス上の

表-1 1 ディスク当りに接種する遊走子のうの数と
供試ディスク数 (塊茎ディスク法)

予想される 耐性菌比率(%)	遊走子のう数/10 μ l	供試ディスク数
5-95	5	20
1<5	50	40
1	100	40
0.1	200	40
0.01	800	40

遊走子のうを白金耳で軽くかきとり、約 1 ml の滅菌蒸留水に懸濁した後、遊走子のう濃度を $10^4 \sim 10^5$ 個/ml に調整し、5℃に 2～3 時間保ち、遊走子を放出させる。

② 切離葉法・塊茎ディスク法：定量検定のために採取した標本は、罹病葉が互いに重ならないように、温室条件、16℃で 1～2 日間保持すると病斑上に遊走子のうが形成される。切離葉法の場合は、これを滅菌した筆でかき取り、0.001% クエン酸カリウム溶液に懸濁する。初期濃度を 10^6 個/ml とし、順次希釈して 10^5 , 10^4 , 10^3 個/ml の各遊走子のう懸濁液を調製する。COHEN らの提唱している塊茎ディスク法では、冷蒸留水 (4℃) に遊走子のうを懸濁させ、濃度は 10 μ l 当たり 5～800 遊走子のうの範囲で、想定される耐性菌の存在比に応じて調整する (表-1)。

いずれの場合も、菌の活性を保持するため、遊走子のう懸濁液は、調製から接種まで氷冷しながら速やかに行う。

(2) 供試植物

① リーフディスク法・切離葉法：疫病フリーの感受性ジャガイモの新鮮な若葉を用い、リーフディスク法では、リーフパンチまたはコルクボーラーで直径 15 mm のディスクを打ち抜く。切離葉法に用いる葉は葉齢、葉面積ともそろったものを選んで供試する。

② 塊茎ディスク法：洗浄した感受性ジャガイモ塊茎をスライサーで厚さ 3 mm に切断し流水洗浄する。この塊茎スライスから、コルクボーラーで直径 5 mm のディスクを打ち抜き、再度流水洗浄した後、金網などの上に乗せ 1～3 時間軽く乾燥させる。なお、ジャガイモを冷蔵保存している場合は、使用前日にあらかじめ室温条件に移しておく。

(3) 薬液の調製と処理

供試薬剤としては、メタラキシルまたはオキサジキシルの原体または水和剤をメーカーから入手して使用することになるが、浸透移行性がより強く、耐性比 (R/S 比) の高いメタラキシルのほうが扱いやすい。以下、メ

表-2 1 標本を検定するのに要する葉数及び接種源の濃度 (切離葉法)

接種源の濃度 (遊走子のう数/ml)	処理葉の数 (2 葉/ペトリ皿)	
	対照 (蒸留水)	メタラキシル 30 μ g/ml
1,000	20	20
10,000	—	20
100,000	—	20
1,000,000	—	20

タラキシルを供試した場合について説明する。原体を使用する場合は、いったん、アセトンで薬剤を溶解した後、蒸留水を加えて所定濃度の薬液を調製するが、このときアセトンの最終濃度は 1% 以下となるようにする。

① リーフディスク法：薬液濃度は、100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0 (対照) μ g/ml とする。各濃度の薬液を直径 5 cm のペトリ皿 2 枚に 10 ml ずつ分注し、この薬液の上にリーフディスクを、裏面が上になるように 5 枚ずつ (計 10 枚/濃度) 浮かべる。

② 切離葉法：薬液は、30, 0 (対照) μ g/ml の 2 濃度で調製する。新鮮な切離葉をこの薬液または対照の蒸留水に 1～2 秒間浸漬した後、葉を軽く上下に振って過剰の液を落とし、14 cm 径のペトリ皿に葉裏を上にして、2 葉ずつ置く。なおペトリ皿には湿度を保持するために湿らせた沓紙を敷いておく。処理葉は、薬剤が葉身全体に浸透移行するよう温室条件下、16℃で 1 晩放置してから接種する。1 標本を検定するのに要する葉数は表-2 に示したとおりである。

③ 塊茎ディスク法：100, 0 (対照) μ g/ml の薬液を準備する。径 7 cm の沓紙 (Whatman no. 1) を敷いた径 9 cm のペトリ皿に、薬液を 3 ml ずつ分注し、その上に、1 枚のペトリ皿につき 20 個の塊茎ディスクを置く。標本中の耐性菌の存在比率が 5～95% と推測される場合は、20 ディスク/濃度でよいが、0.01～1% の場合は、40 ディスク/濃度 (ペトリ皿 2 枚) を要する。

(4) 接種と培養

① リーフディスク法：遊走子のう懸濁液 10 μ l をマイクロピペットで各リーフディスクの葉脈間に滴下し、ふたをして、17℃、16 時間照明条件下で 7 日間培養する。

② 切離葉法：所定濃度に調製した遊走子のう懸濁液を、クロマトグラフィー用噴霧器で 1 ペトリ皿当たり 0.5 ml の割合で均一に噴霧接種する。接種後は 16℃、12 時間照明の温室条件で 5 日間培養する。

③ 塊茎ディスク法：所定濃度の遊走子のう懸濁液を各ディスク上に 10 μ l ずつ滴下する。接種後はふたをして 20℃、暗黒下、7 日間培養する。

表-3 標本中の耐性菌比率の求め方(切離葉法)

接種源濃度 (遊走子のう数/ml)	20葉当たりの感染点の数		耐性菌比率 ^{a)} (%)
	対照 (蒸留水)	メタラキシル 30 µg/ml	
1,000	500	0	
10,000	(5,000) ^{b)}	0	
100,000	(50,000)	10	0.02
1,000,000	(500,000)	108	0.02

^{a)}：標本に含まれる耐性菌の割合は、 $100 \times (10 : 50,000)$ 及び $100 \times (108 : 500,000)$ で計算する。

^{b)}：()内は外挿で求めた数値。

(5) 調査と判定

① リーフディスク法：各リーフディスクの発病程度を以下の指数で調査し、EC₅₀及びMIC値を求める。

0：無病徴または小黒点のみ，1：壊死，2：リーフディスク上での遊走子のう形成面積が5%未満，3：”5～20%，4：”20～50%，5：”>50%。なお，簡便な判定法として，0～3の指数を用い，それぞれ，無病徴及び遊走子のう形成程度を少，中，多としてもよい。FRACの報告書では，本法による感性菌と耐性菌のEC₅₀値はそれぞれ0.001～0.01，>10 µg/mlとしている。このため，薬液濃度を1濃度(例えば10 µg/mlのみ)としても耐性菌と感性菌の簡易な判定は可能である。筆者らは，耐性菌問題が発生する前の1987年と1988年に，北海道の農家圃場から計72標本を採集し，本法で検定したところ，いずれも0.1 µg/mlで遊走子のうの形成が完全に抑制され，感性菌と判断した。一方，1989年にフェニルアミド剤の効果の低減が認められた圃場から採取した標本では，1 µg/ml以上でも明らかに遊走子のうが形成され，耐性菌と判断された。

② 切離葉法：各処理区20葉に認められる感染点(葉面に黒点として肉眼で判別できる)の，対照の蒸留水処理区(感性菌と耐性菌が感染)と薬剤処理区(耐性菌のみ感染)における計数値から標本中の耐性菌比率を求める(表-3)。

③ 塊茎ディスク法：各ディスク上に遊走子のうが形成されているかどうかを実体顕微鏡で観察する。標本中の耐性菌比率(%)は，薬剤処理区の遊走子のう形成ディスクの数をX，対照(蒸留水処理)区の遊走子のう形成ディスクの数をY，ディスク1枚当たりに接種された遊走子のうの数をZとすると， $100 \times X / Y \times 5 / Z$ で算出される。

3 検定にあたっての留意点

標本の採取は，その方法とともに採取時期が，得られ

たデータを解釈するうえで非常に重要になる。すなわち，当該圃場の薬剤散布歴，特にフェニルアミド系薬剤散布の有無についての情報は必須である。送付にあたっては，採取時の病害発生程度や初発時期，種イモの来歴，近隣圃場の発病状況など，検定結果の考察に必要なと思われる情報を標本採集カードに記入し，標本に添付するとよい。なお，罹病葉標本の簡便な収集移送方法として，佐藤ら(1991)は，新聞紙を折り畳んだサンプルバッグを考案し，日本全国から郵送によって標本を収集することに成功している。

リーフディスク法によって定性的検定を行うときの留意点については，前号のキュウリべと病の項に詳述されているので，参考にされたい。本稿で紹介した塊茎ディスク法は，1枚のディスク(無処理)に5個の遊走子のうを接種した場合，接種ディスクの90%に遊走子のうが形成されるという前提で記載されている。本法を適用する場合は，あらかじめ供試する標本とジャガイモとの組み合わせで予備試験を行い，上記の条件を満たす接種遊走子のうの数(Z)を決めておく必要がある。

4 今後の問題点

PA-FRACの申し合わせにより，現在，いずれの国でも，茎葉散布にあたってはフェニルアミド混合剤のみが使用されており，その使用時期，使用方法，対象など耐性菌問題を回避するための指針(作物の生育期前半，14日間隔以内，3回以内の使用)が取り決められている。先に述べたアイルランドやオランダでは，耐性菌問題の発生後，いったんフェニルアミド系化合物の使用は見合わされたが，その後の疫病激発と耐性菌密度の低下を考慮して，再び，保護殺菌剤との混合剤が使用されるようになり，PA-FRACの指針の下で，安定した高い防除効果をあげている(STAUB, 1991)。北海道では，耐性菌検出の翌年である1990年以降，フェニルアミド混合剤の使用が規制されて使用量は減少したが，耐性菌の割合は減少していないとする，加藤ら(1992)の調査結果がある。一方，適切な使用状況下では，他の慣行防除剤に比し同等以上の効果が期待できるとの調査報告もある(高桑, 1992)。いずれにせよ国内では，フェニルアミド耐性菌の環境適応性や年次変動，耐性菌の存在密度と薬剤防除効果との関係などまだ十分に解明されていない点が多く，これらの諸問題を検討するうえで，今後，定量的なモニタリング検定法の果たす役割が大きいと思われる。

——ピシウム病——

はじめに

フェニルアミド系化合物は、各種作物のピシウム病に土壌処理や種子消毒で卓効を示すことから、世界各国で使用されている。耐性菌に関しては、メタラキシル耐性菌の出現によって、コムギとベントグラスのピシウム病害の防除効果が低減した例が海外で報告されている (Cook et al., 1983; SANDERS, 1984)。国内では、現在登録のあるミョウガ、ショウガ、日本シバのピシウム病害のうち、日本シバのピシウム病菌 (*Pythium vanterpoolii*) の耐性菌が、メタラキシルを3年間連用した試験グリーンにおいて検出されている (一谷ら, 1991)。

土壌伝染性の *Phytophthora* と *Pythium* 属菌のフェニルアミド耐性のモニタリング法についても、先に述べた PA-FRAC の報告にその方法が記述してある。本稿では、このうちピシウム病菌のモニタリング法について紹介する。

1 標本の採取と移送

罹病植物体または感染器官 (根、茎など) を持ち帰るが、遠距離移送の場合は、乾いた新聞紙の間に標本をはさみ、これをビニル袋に入れて送付する。土壌標本は、罹病植物の周辺数か所から、約 500 ml の土壌を採取し、ビニル袋などに入れて移送する。

2 検定方法

(1) 選択培地及び継代用培地の調製

① 選択培地: 4 層のガーゼで汙過した V-8 ジュース 25 ml と寒天 15 g を蒸留水に加え 480 ml とする。これを加圧殺菌し、50°C まで冷却した後、アンピシリン 125 mg, リファンピシン 5 mg, PCNB (75% 水和剤) 70 mg, 2.5% ピマリシン水溶液 0.2 ml を含む滅菌水 20 ml を添加する。

② 継代用培地: 常法によって調製したブドウ糖加用ジャガイモ煎汁塞天培地を加圧殺菌後、50°C に冷却し、乳酸を培地 1,000 ml 当たり 5 滴の割合で駒込ビペットで加え、培地を酸性とする。

(2) 菌の分離

① 植物体: 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 2~5 分間浸漬して表面消毒し、滅菌水で洗浄した後、選択培地に置床する。18°C, 1~2 日間培養後、伸び出した単菌糸を継代用培地に移植する。

② 土壌: 10 cm³ の土壌を、滅菌後 50°C 以下に冷却した 1% 素寒天培地 90 ml に添加かくはんし、そのうち 1

ml を径 9 cm のペトリ皿にあらかじめ流し込んだ選択培地の平板上に均一に塗抹する。18°C で暗黒下 1~2 日間培養後、培地表面を水道水で洗浄し、培地上のピシウム病菌の菌叢を継代用培地に移植する。

(3) 検定用培地の調製および植菌

供試薬剤はメーカーからメタラキシル原体または水和剤を入手して使用する。V-8 ジュース培地 (ガーゼで汙過した V-8 ジュース 50 ml, 寒天 20 g に蒸留水を加え 1,000 ml とする) を加圧殺菌し、50°C まで冷却後、メタラキシルの培地内濃度が 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 及び 0 (対照) µg/ml となるように添加し、ペトリ皿に流し込んで固化させる。あらかじめ継代用培地平板で生育させた検定菌の菌叢周縁部を径 5 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と接するように置床する。培養は、18~20°C で暗黒下 1~7 日間行う。

(4) 調査と判定

対照の菌叢直径が 50~70 mm に達した時点で菌糸の生育を測定し EC₅₀ 値を求める。EC₅₀ 値は、検定菌の種類、試験条件によって異なるが、*P. aphani dermatum*, *P. ultimum*, *P. graminicola*, *P. spinosum* の感性菌では 0.6~2.0 µg/ml が目安とされる。EC₅₀ 値が感性菌の 10 倍で低感受性、100 倍以上の場合は明らかに耐性と判断される。

3 検定の留意点及び今後の課題

ピシウム病菌のフェニルアミド耐性のモニタリング法に関しては、まだ簡易で有用な *in vivo* 試験法が確立されていない。したがって、今回紹介した *in vitro* 法で耐性菌と判定された菌が、実際に病害発生に関与しているかどうかについては、別途、*in vivo* 試験で確認する必要がある。国内では、各種ピシウム病菌のフェニルアミド剤感受性に関する知見は乏しく、今後、耐性菌の判定基準を明確にする意味で薬剤感受性のベースラインデータの集積が望まれる。

引用文献

- 1) Cook, R. J. et al. (1983): *Phytopathology* 73(6): 957 (Abstr.).
- 2) Gisi, U. et al. (1992): *EPPO Bulletin* 22: 297~322.
- 3) 堀田治邦ら (1990): 日植病報 56(1): 145 (講要).
- 4) 一谷多喜郎ら (1991): 芝草研究 20(1): 33~40.
- 5) 加藤雅康ら (1990): 日植病報 56(1): 145 (講要).
- 6) ——— (1992): 同上 58(1): 149 (講要).
- 7) SANDERS, P. L. (1984): *Plant Disease* 58(9): 776~777.
- 8) 佐藤章夫ら (1991): 日植病報 57(4): 573~576.
- 9) STAUB, T (1991): *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 421~442.
- 10) 高桑 亮 (1992): 北日本病虫研報 43: 45~47.
- 11) 辻本一幸ら (1990): 日植病報 56(1): 145 (講要).