

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 2016

(6) 野菜類灰色かび病菌

—SDHI 剤 (培地・生物検定法)—

三重県農業研究所 ^{すずき}鈴木 ^{ひろふみ}啓史・^{つじ}辻 ^{ともこ}朋子・^{かわかみ}川上 ^{たく}拓・^{くろだ}黒田 ^{かつとし}克利

はじめに

SDHI 剤は、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 II 蛋白質 (コハク酸脱水素酵素) を阻害する FRAC コード 7 の殺菌剤である (Japan FRAC, 2016)。SDHI 剤は世代分けがなされ、ボスカリドとベンチオピラドに続きイソフエタミド、フルオピラム、イソピラザム、フルキサピロキサド等といった第 3 世代と呼ばれる剤が、複数の企業から開発・販売されている (廣岡・石井, 2014)。これらの殺菌剤の耐性菌発生リスクは、日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会によれば中～高とされており、海外では、ブドウ・イチゴ・リンゴ・キウイフルーツ灰色かび病、ウリ類うどんこ病、ウリ類つる枯病、アブラナ科作物菌核病等で、また国内でも、キュウリ褐斑病、キュウリうどんこ病、イチゴ灰色かび病、ナスすすかび病で耐性菌が報告されている (廣岡・石井, 2014)。

有効な殺菌剤を永続的に利用するためには、対象とする病原菌の生態に基づく栽培管理と、その殺菌剤の使用方法を工夫する必要がある。また、耐性菌対策の一つとして殺菌剤に対する感受性の動向をモニタリングして現状を把握することが重要である。ここでは、灰色かび病菌の SDHI 剤 (ボスカリド、ベンチオピラド) に対する感受性低下菌を、培地を用いて検出し、その後、キュウリ子葉を用いて生物検定することで耐性菌かどうか判定する方法について、筆者らが実施している方法を紹介する。

I 検定用材料の調製

1 灰色かび病菌のサンプリング

Water Agar (以下 WA, 18 g/l) 平板, 金属鈎 (割り箸の先に鈎状に伸ばしたクリップを挟みテープで止めることで自作している), ガスバーナ (ライターでも可)

Methods for Detecting SDHI Fungicide Resistance in Vegetables Gray Mold Fungus on Culture Medium and Plants. By Hirofumi SUZUKI, Tomoko TSUJI, Taku KAWAKAMI and Katsutoshi KURODA

(キーワード: SDHI 剤耐性菌, 野菜類灰色かび病, 野菜類灰色かび病菌, 感受性検定法, 寒天培地法, キュウリ子葉法)

を持ち現場に向かう。現場で発病した葉, 茎, 果実上に胞子形成を確認したら, ライターで火焰滅菌した金属鈎を WA 平板で冷却後, その胞子に軽く触れ, 下向きにした WA 平板に画線する。シャーレの 4 隅に画線することで, 1 枚の WA 平板で 4 菌株採取できる。

2 灰色かび病菌の単菌糸分離方法

WA 平板上にサンプリングした灰色かび病菌は, 20℃で 2～3 日間培養する。灰色かび病菌は胞子発芽および菌糸伸長が速いので, 最も生育が速い菌糸はほぼ灰色かび病菌である。その菌糸の先端が位置するシャーレの裏ぶたにマジックで印をつけ, 寒天ごと切り抜いて, PDA (ニッスイ) の斜面培地に移植し, 菌叢を生育させて単菌糸分離株を得る。うまく灰色かび病菌を分離できると, 菌叢の外周にアブリに似た黒い帯ができる。

3 灰色かび病菌の保存法

菌叢を生育させた PDA 斜面培地を, ビニル袋に入れ乾燥を抑制し 20～25℃で保存することで, 2 年間は継代せずに利用できる。石井 (2009) は, QoI 剤耐性菌の検定のために, 継代せず冷凍保存することを勧めている。また, 間佐古 (2009) は, 5℃で冷蔵保存を紹介している。

II 殺菌剤感受性の培地検定法

1 検定用菌株の前培養

PDA 斜面培地上の保存菌株の一部を PDA 平板培地に移植し, 20℃で 3 日間生育させた後, Black Light Blue (BLB) を 20℃で 3～4 日間照射 (高さ: 35～40 cm) して, 胞子を形成させる。

2 検定培地の調製

YBA 寒天培地 (酵母エキス 10 g, ペプトン 10 g, 酢酸ナトリウム 20 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 l) を用いて, 殺菌剤添加培地および無添加培地を作製する。殺菌剤添加培地は, YBA 寒天培地をオートクレーブ滅菌 (120℃, 20 分) し, 55℃程度まで冷却後に, 最終濃度でボスカリド 1 ppm, ベンチオピラド 1 ppm となるように調整する (石井・西村, 2007)。具体的には, 市販の製剤と滅菌水を用いて 100 ppm になるようにボスカリド (カン