

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

(9) ウリ科野菜つる枯病菌の QoI 剤感受性検定方法

神奈川県農業技術センター ^{おり}折 ^{はら}原 ^{のり}紀 ^こ子

はじめに

ウリ科野菜つる枯病（病原菌：*Didymella bryoniae*）はウリ科植物に特有の病害で、主に茎、葉に発生する。茎地際部やつるに発生すると株が枯死にいたることもあり、「キャンカー」の呼称で生産者に恐れられている重要病害である。本邦では、カボチャ、キュウリ、スイカ、メロン、トウガン等幅広いウリ科野菜に発生する。

本菌は、日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会が 2012 年に発表した「野菜・果樹・茶における QoI 剤及び SDHI 剤使用ガイドライン」の補足資料では、耐性菌発生リスクが高い病原菌に位置づけられている（日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会，2012）。実際、米国では QoI 剤とウリ科野菜つる枯病菌の組合せでは、2000 年代初頭に、薬剤の上市から 2 年で感受性の低下したつる枯病菌の発生が認められている（KEINATH, 2009）。国内でも 2011 年に神奈川県三浦半島地域において、スイカ、メロン等ウリ科野菜つる枯病菌の QoI 剤に対する感受性を調査したところ、9 割以上の圃場で QoI 剤耐性菌が確認された（折原ら，2013 a；2013 b）。本稿では、ウリ科野菜つる枯病菌の QoI 剤に対する感受性検定について、筆者らが行っている手法を紹介する。

I 菌の分離方法および保存

圃場から罹病茎葉をポリ袋あるいは A4 版の紙製封筒に入れて持ち帰る。ウリ科野菜は水分が多いので、ポリ袋に採取する場合は直接入れず、新聞紙でサンプルを包んでからポリ袋に入れると結露が防止され、分離時の雑菌の混入が抑えられる。実体顕微鏡下で病斑を検鏡し、病斑中央部での分生子殻の形成を確認、その部分を切り出す。切片を次亜塩素酸ナトリウム水溶液（有効塩素 2%）で表面殺菌し、滅菌水で洗浄後、滅菌ろ紙で水分を除去し、クロラムフェニコール 5 ppm 加用素寒天培

地に置床、25℃で培養する。病斑形成初期であっても、実体顕微鏡下で観察し分生子殻が確認できれば分離しても雑菌の混入は少なく抑えられる。病斑部と健全部の境界部分を切りとると雑菌の混入が多く、組織分離に適さない場合が多い。

素寒天培地上で切片から伸長した菌糸先端部を PDA 培地に移植する。このような組織分離で得られた菌株を使っておおよその薬剤感受性程度を把握することも可能であるが、同一病斑内に薬剤感受性の異なる菌が混在している可能性があるため、単孢子分離株を供試する。

単孢子分離を行うには、PDA 培地に形成された分生子殻数個をピンセットで採取し、少量の滅菌水中で破壊して分生子を溢出させ、その懸濁液を 2% 素寒天培地上に画線する。なお PDA 培地上で分生子殻を形成しにくい場合は、近紫外光（BLB）照射下で培養を行う。分生子懸濁液を画線した素寒天培地を 25℃で 24 時間培養後、倒立顕微鏡下で、単孢子から発芽したものを寒天ごと切り取って、PDA 斜面培地に移植する。培養後、5～10℃の低温で保存する。培地が乾燥すると菌が死滅するので、乾燥する前に継代培養する。

II 耐性菌検定手法

1 希釈平板法による感受性検定

アズキシストロピンなどの QoI 剤を添加した人工培地で培養すると、感受性菌でも菌糸生育が見られる現象がキュウリ褐斑病菌やイチゴ炭疽病菌等多くの病原糸状菌において報告されている（石井，2009；稲田，2009）。培地上では、QoI 剤によって菌のミトコンドリア電子伝達系の複合体 III たんぱく質 Qo 部位が阻害されると、代替呼吸系が働き始め、その結果、菌糸生育が阻害されないためと考えられている。本菌においても他の病原糸状菌と同様（石井，2009）、アズキシストロピン 200 ppm を添加した培地上でも、感受性菌、感受性低下菌ともに菌糸生育が認められる。そのため、代替呼吸経路の阻害剤として没食子酸 *n*-プロピルを培地に加用することにより、培地上での感受性検定が可能となる（以上、図-1）。

(1) 検定用培地の作製および検定

感受性検定にはアズキシストロピン原体を用いること

Methods for detecting QoI fungicide resistance in *Didymella bryoniae*, the Causal Fungus of Gummy Stem Blight of Cucurbits.

By Noriko ORIHARA

（キーワード：ウリ科野菜つる枯病，QoI 剤，耐性菌）