

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(22)

イチゴうどんこ病菌

JA 全農営農・技術センター ^{たけだ}武田 ^{としゆき}敏幸・^{なかざわ}中澤 ^{やすひこ}靖彦

はじめに

イチゴうどんこ病(病原菌：*Sphaerotheca aphanis* var. *aphanis*)はイチゴ栽培における最も重要な病害であり、その薬剤防除は必須である。現在、防除薬剤としてDMI剤、キノキサリン系剤、イオウ剤などが散布されているが、最も効果が高く、頻繁に使用されているのがトリフルミゾールなどに代表されるDMI剤のグループである。しかし、DMI剤は耐性菌が出現しやすく、イチゴうどんこ病菌でも、1986年にベルギーにおいてDMI剤に対する感受性の低下と防除効果の低下が報告された(BAL and GILLES, 1986)。日本においても1992年に圃場レベルにおける防除効果の低下と、感受性低下菌の確認が報告されている(中野ら, 1992)。現在、薬剤感受性のベースラインデータが存在しないためDMI剤に対する感受性低下の実態は明確ではない。しかし、感受性検定において50%阻止濃度(EC₅₀値)の分布が40倍程度の範囲に広がっており、また、防除効果が低下したといわれる圃場から採集された菌株は感受性が低い傾

向が見られる。このため、既に防除効果の低下を招く程度の感受性低下が起こっている可能性が推測されている(武田ら, 1996)。

イチゴうどんこ病菌のDMI剤に対する感受性検定方法としては、ランナー先端小葉を用いる方法(中野ら, 1992)とリーフディスクを用いる方法(稲田・松崎, 1994; 岡山ら, 1995)が報告されている。ランナー先端小葉を用いる方法はランナーの確保がやや難しく、かなりのイチゴ株を必要とする。稲田らのリーフディスク法は発病した葉をくりぬき、その再生によって判定する点で簡便であるが、菌叢の新しさによって再生の程度に違いが出ることが考えられ、多数の菌株の感受性を横並びで比較する場合には適用しにくいと思われる。

本稿では、比較的簡便で、適用範囲の広いと思われる岡山らのリーフディスク法を改良した感受性検定法について紹介したい。

I うどんこ病菌のサンプリング

サンプリングするには、分生胞子を十分に形成した新鮮な病斑を持つ罹病葉、あるいはまだ青い果実が好ましい。古く乾いた病斑からは分生胞子が取れない。成熟した果実は腐敗しやすく、他の菌の混入が起りやすいため適していない。採集したサンプルはビニール袋に入れ、すぐに実験室に持ち帰るか郵送する。このとき、ビニール袋に空気を入れ、口を密閉すると病斑がつぶれない。

II 接種源の準備

採集したサンプルが新鮮で、病斑面積が十分ならば、そのまま湿った汚紙を敷いた大型シャーレ内で1週間程度静置し分生胞子が多量に形成された段階で検定してもよい。しかし、通常は

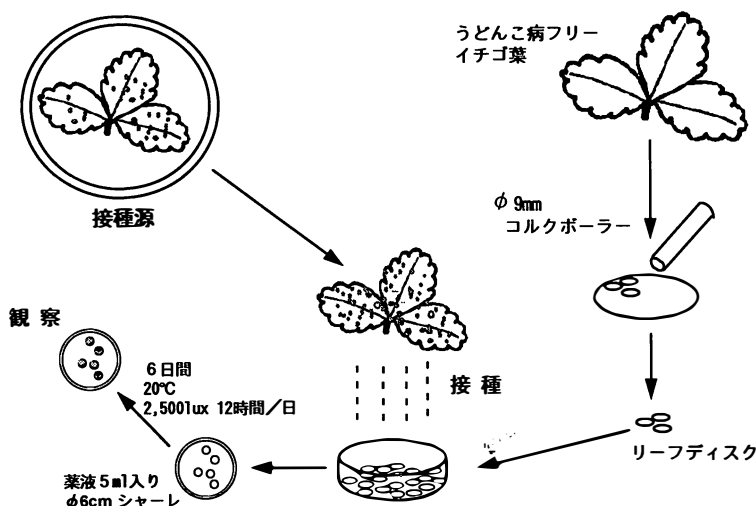


図-1 イチゴうどんこ病菌のDMI剤に対する感受性検定方法

圃場から採集した葉上では、感受性検定に供するには十分な分生孢子が得られない場合が多い。そのため、いったんうどんこ病フリーのイチゴ葉に接種、増殖してから検定に供試する。

(1) 供試植物：うどんこ病フリーの条件下で育成したイチゴ苗の展葉後間もない複葉を切り取り、湿った沓紙を敷いた大型シャーレ内に並べる。

(2) 接種方法：採集した罹病葉、罹病果上の病斑から分生孢子を滅菌した筆でかき取り、上記のイチゴ葉にはたき落として接種する。シャーレはパラフィルムで密閉し、水分を保つようにして維持する。

(3) 培養条件：20℃、蛍光灯照明下（12時間/日照

明）に置き、薬剤感受性検定に十分な量の分生孢子が得られるまで維持する。この段階で十分な量の分生孢子が得られない場合は、現れた病斑を新たに移植し直して、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号の平筆が使いやすい。絵筆はエタノールに浸漬して滅菌し、クリーンベンチ内で一晚風乾する。

Ⅲ 薬剤感受性の検定方法

(1) 供試植物：うどんこ病フリーの条件下で育成したイチゴ苗の展葉後間もない複葉を切り取り、径9mmのコルクボーラーでリーフディスクを打ち抜く。硬化した葉や傷の付いた葉ではうどんこ病菌が感染しにくく、ほとんど発病しないため検定できない。この段階で使用する葉を慎重に選ぶことが検定における最も重要な点である。ジベレリン25～50ppmをイチゴ苗に散布しておくとうるまい葉が得やすくなる（岡山ら、1995）。

イチゴうどんこ病菌には、少なくとも「とよのか」および「女峰」に対して病原性を異にする二つのレースがあることが報告されている（内田ら、1996）。すなわち、「女峰」から採集した菌株の中には「とよのか」上で生育しないものがある。「とよのか」、「女峰」の両品種に病原性を示すうどんこ病菌株を用いた場合、どちらの品種を供試しても、DMI剤に対して同様の薬量反応直線を示し、EC₅₀値も大差はなかった（図-2、3）。したがって、検定に使用する品種は、菌株を採集したホストを考慮して、「とよのか」か「女峰」を用いるとよく、それによって得られた感受性値はどちらの品種を用いた場合でも同列に比較できると考えられる。

(2) 供試薬剤：原体をメタノールに溶解し（10,000ppm）、-30℃で保存したものを蒸留水で希釈して所定の濃度とする。メタノールの濃

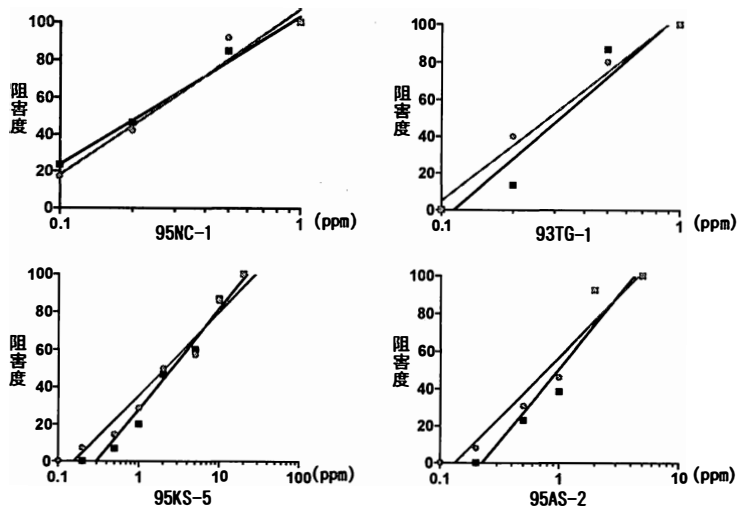


図-2 イチゴうどんこ病菌4菌株の異なる品種上におけるトリフルミゾールに対する感受性

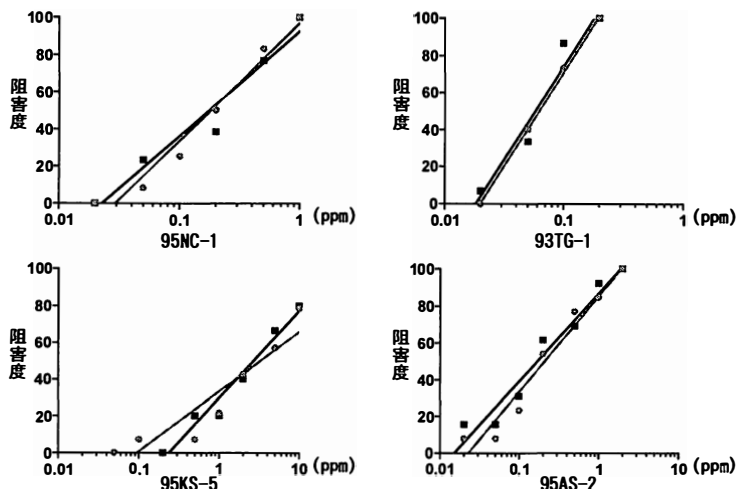


図-3 イチゴうどんこ病菌4菌株の異なる品種上におけるミクロブタニルに対する感受性

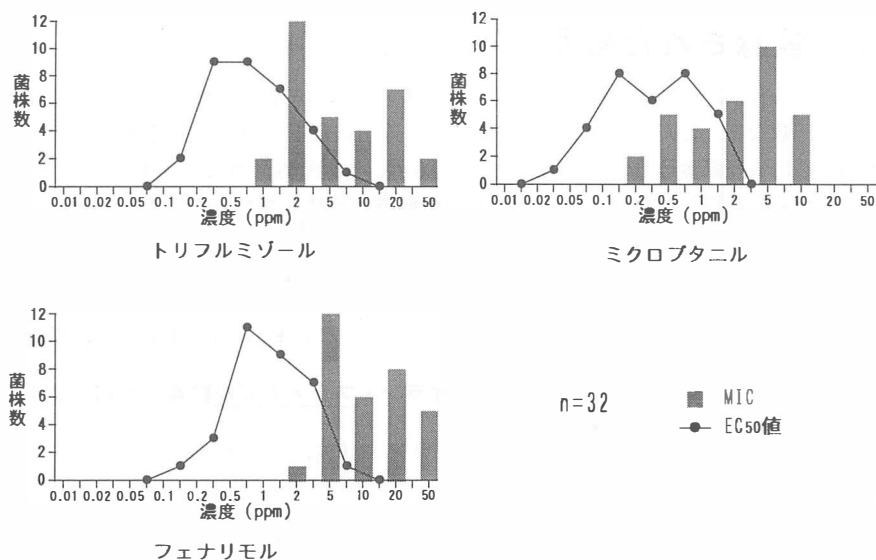


図-4 イチゴうどんこ病菌のDMJ剤に対する感受性分布

度は0.1%を超えないようにする。濃度段階は薬剤およ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。

(3) 接種方法：リーフディスクを葉裏を上にして、湿った沓紙を敷いたシャーレに並べ、高さ20 cm程度、径がシャーレと同程度の塩化ビニル製の円筒内に置き、円筒の上から、うどんこ病菌の分生孢子を十分に形成しているイチゴの複葉を指で軽くたたいて均一に払い落とす。

(4) 薬剤処理方法：所定濃度に調整した薬液を径60 mm シャーレに5 ml ずつ分注し、これに接種したリーフディスク5枚を接種面を上にして浮遊させる。

(5) 培養条件：接種・薬剤処理後、20℃、2,000～2,500 lux、12時間照明下で6日間維持する。

(6) 調査方法：実体顕微鏡下で分生孢子形成を伴う病斑の面積率に下記の指数を与えて調査する。

指数0：無発病、指数1：病斑面積率5%以下、指数2：6～25%、指数3：26～50%、指数4：51～75%、指数5：76%以上。

(7) データ解析：1濃度（1シャーレ）につき5枚のリーフディスクを供試しているの、五つの観測値が得られるが、そのうち最少と最大の値を除く中間の三つの値により、その濃度における発病度を求める。

発病度 = Σ (指数 × 該当リーフディスク数) / 15 × 100

これによって、最少生育阻止濃度（MIC）を求め、さらに無処理区の発病度と比較した阻害度を算出して、EC₅₀値を求める。

また、それぞれの菌株のEC₅₀値と対照の感受性菌株のEC₅₀値との比を、その菌株の耐性度を表す指数 Resistance factor (Rf) とする。

(8) 菌株の保存：第II章で述べた方法により、うどんこ病菌の継代保存を行える。イチゴうどんこ病菌は長時間培養すると雑菌が混入することが多いため、2週間に1回程度継代培養を行う。

IV DMI 剤に対する感受性分布

筆者らは日本各地（関東、東海、四国、九州）で採集されたイチゴうどんこ病菌32菌株について、トリフルミゾール、フェナリモル、ミクロブタニルの3種のDMI剤に対する感受性を検定した。3剤のEC₅₀値は、トリフルミゾールでは0.156～5.634 ppm、フェナリモルでは0.180～7.749 ppm、ミクロブタニルでは0.044～1.843 ppmの範囲内で一峰性の頻度分布を示した。また、3剤の感受性値間には高い相関が認められたことから、3剤に対する感受性は互いに交差するものと考えられる（図-4）。

V 留意点

(1) イチゴうどんこ病菌については、現在、DMI剤に対するベースラインが存在しないため、感受性検定の結果は慎重に判断する必要がある。

(2) 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いえない。遺伝的に純系の個体を得るには単分生孢子分離を行う必要がある。

引用文献

- 1) BAL, E. and G. GILLES (1986): Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent. 51/2b: 707～714.
- 2) 稲田 稔・松崎正文 (1994): 九州病害虫研究会報 40: 147.
- 3) 中野智彦ら (1992): 奈良農試研報 23: 27～32.
- 4) 岡山建夫ら (1995): 日植病報 61: 215 (講要).
- 5) 武田敏幸ら (1996): 同上 62: 282 (講要).
- 6) 内田景子ら (1996): 同上 62: 271 (講要).