

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

(8) ナスすすかび病

—ボスカリド剤（培地・生物・遺伝子検定）—

高知県農業技術センター おか だ とも ゆき
岡田知之

はじめに

ナスすすかび病は葉に灰色の菌叢を生じる病害であり、多発すると落葉してナスの生育を阻害する。施設栽培で冬季の湿度が高い環境では特に発生が多い。高知県では9割以上の圃場で発生が認められ、既に DMI 剤および QoI 剤で耐性菌を確認している（矢野・川田，2003）。

ボスカリドはコハク酸脱水素酵素阻害剤（SDHI）に分類される殺菌剤であり、2005年にナスに登録された。当初はすすかび病に対し高い防除効果を示したが、2011年に耐性菌が認められた（岡田・下元，2016）。本稿では、ボスカリドに対するナスすすかび病菌の感受性検定法として、薬剤添加培地検定法、生物検定法、遺伝子診断法の三つを紹介する。検定の手順としては、まず薬剤添加培地検定法で網羅的に検定を行い、生育が確認された菌株について生物検定を行うとより精度が高くなる。また、遺伝子診断法については、現在確認している遺伝子変異（後述する SdhB の H268R）の検出にのみ使用できるものであることに留意する必要がある。

I 高知県内における耐性菌の発生状況

2012年に遺伝子診断法により高知県内の29圃場を調査したところ、県東部の22圃場でボスカリド耐性菌が認められた。うち4圃場では耐性菌の割合が80%以上であり、圃場によっては優占していると考えられた。また、2014年12月から翌年1月にかけて県東部の6圃場24菌株を薬剤添加培地法にて検定したところ、ボスカリド耐性菌は3圃場で計4菌株認められた。

II 薬剤添加培地検定法

本方法は、ボスカリドを添加した YB 培地に菌叢磨砕液を滴下して生育の有無から耐性の有無を判断する方法であり、櫻井ら（2011）のペンチオピラド感受性検定法

を参考にボスカリド用に改変したものである。単孢子分離が必要であるため、生育が遅いすすかび病菌の場合、病斑から直接単孢子分離しても検定結果が出るまで4週間ほどかかる。

【手順】

1 単孢子分離、前培養

単孢子分離には、まず病斑部をピンセットでちぎり取り（1 cm 角程度）、菌叢を PDA あるいは素寒天平板培地等に軽く押しつける。このとき培地上の異なる場所に3回ほど連続して押しつけると、徐々に培地上の胞子がまばらになり、釣菌しやすい。次に実体顕微鏡で培地上の胞子を観察し、他の胞子と離れた位置にある胞子を見つけて。それを白金針で釣り上げ、新しい PDA 培地に移す。25℃で5日ほど培養すると、菌糸の伸長が確認できる。単孢子分離後は PDA 斜面培地にて20℃で数年間保管できる。

前培養として、まず PDA 培地にて25℃で培養する。培養7日目には1 cm ほどの菌叢を生じるので、200 μl の滅菌蒸留水を培地上に滴下し、白金針などで菌叢を培地全体に広げる。そこからさらに1週間、25℃で培養を行うことで、比較的平らで均一な菌叢を得ることができる。

2 薬剤添加培地の調製

薬剤添加培地の組成は以下の通り。ボスカリドには、市販のボスカリド水和剤をジメチルスルホキシド（DMSO）に懸濁して用いる。

・ YB 培地（50 ml，1 シャーレ，36 菌株分）	
Bacto™ Peptone (Becton, Dickinson and Company)	0.5 g
Bacto™ Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company)	0.5 g
寒天	0.75 g
蒸留水	50 ml
・ ボスカリド（有効成分 500 ppm）	
50% ボスカリド水和剤	10 mg
DMSO	10 ml
YB 培地を 121℃，10 分間オートクレーブ後，DMSO に懸濁したボスカリドを最終濃度が 5 ppm となるよう	

Methods for Detection of Boscalid-resistant *Passalora natrassii* Isolates from Eggplant. By Tomoyuki OKADA
(キーワード：耐性菌，ボスカリド，SDHI，すすかび病，ナス)

0.5 ml 添加する。対照として DMSO のみを添加した YB 培地も用意する。

3 菌叢磨砕液のスポット

前培養した菌叢から直径 5 mm 程度のコルクボーラーで菌叢ディスクを 2 枚くり抜き 1.5 ml チューブなどに入れ、500 μ l の滅菌蒸留水を添加し磨砕する。筆者は 5.5 mm のステンレスビーズを専用チューブに入れ、ビーズ式細胞破碎装置 (Micro Smash MS-100, TOMY) で 3,500 rpm, 15 秒間振とうして菌叢磨砕液を調製している。装置がない場合、プラスチックペッセルなどで菌叢ディスクを磨砕する。菌叢磨砕液 5 μ l を薬剤添加 YB 培地に滴下し、25°C で 1 週間培養する。

4 判定

培養 1 週間後の菌糸生育の有無で感受性を判断する。耐性菌の場合、薬剤添加培地上で対照の薬剤無添加培地と同様に明瞭な灰色の菌叢が生じる (図-1)。

5 留意点

- ・単孢子分離に用いる罹病葉は、できるだけ若い葉がよい。全面に発病しているような古い葉より、単病斑のみの青々とした葉のほうがコンタミネーションは少ない。また釣り上げた分生子は、コンタミネーションを防ぐため pH を下げた PDA 培地に移してもよい。
- ・シャーレは角型で外側にグリッド線が入ったものを用いている (Square Petri Dish with Grid, 100 \times 100 \times 15 mm, Simport)。6 \times 6 の 36 マスに分かれており、菌叢磨砕液を滴下する際にわかりやすい。
- ・500 ppm のボスカリド懸濁液を調製する際、ボスカリド水和剤は滅菌した蒸留水に懸濁しても結果に影響はない。ただし、DMSO に懸濁したほうが細菌のコンタミネーションが少ないようである。上記の方法では YB 培地に 1% の濃度で DMSO が添加されるが、この濃度ではすすかび病菌の生育に影響はないことを確認している。

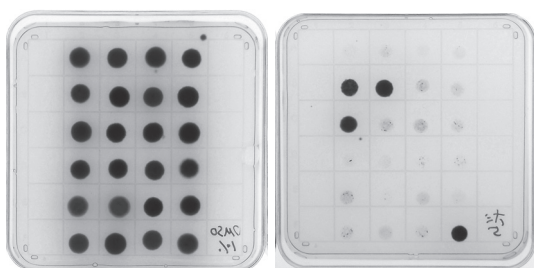


図-1 薬剤添加培地検定法による検定結果
高知県内の施設ナス圃場から単孢子分離した 24 菌株の菌叢磨砕液をボスカリド添加 YB 培地に滴下した。25°C で 1 週間培養後の写真。

III 生物検定

本方法は、ナスのポット苗に薬剤を散布後、ナスすすかび病菌の分生子懸濁液を噴霧接種することで、薬剤の防除効果を調べる方法である。すすかび病の潜伏期間は短くて 2 週間程度であり、下位葉が多く発病する。発病適温はやや低く 18°C 程度であり (山口, 2003)、高温・乾燥条件では顕著に潜伏期間が延びるか、接種しても発病しないことがある。そのため、生物検定で良好な検定結果を得るためには、接種したポット苗を比較的低温・高湿度条件で管理し、発病するまで下位葉を黄化・落葉させずに維持する必要がある。播種時期・品種等によるが、播種から接種までにおよそ 30 ~ 50 日、接種から発病調査までに 3 週間以上を要する。

[手順]

1 ナスの育苗

7.5 cm のポリポットに播種する。1 処理当たり 3 株供試し、対照として無散布の株と、可能であれば TPN 水和剤など別系統の防除効果のある薬剤を処理した株も用意する。本葉が 5 枚程度で接種を行うが、接種 10 日ほど前から 2 日に 1 回程度の頻度で液肥を施用する。十分肥料を与えることで、下位葉が落葉しにくくなる。

2 ナスすすかび病菌の前培養

「II 薬剤添加培地検定法」の手順 1 と同じ方法で培養し、培養 7 日目に菌叢を滅菌蒸留水で伸ばし、さらに 1 週間程度培養する。接種当日に滅菌蒸留水をシャーレに適量加え、筆を用いて菌叢が水によく混ざるようかき混ぜ、その懸濁液を 100 μ m 目合いのナイロンメッシュ (Cell Strainer, FALCON) あるいは 2 重のガーゼを用いてこす。分生子の濃度を 2 \times 10⁸ 個/ml に調整する。

3 薬剤散布と接種

接種前に薬剤散布を行う。50% ボスカリド水和剤は 1,000 倍希釈してナスに散布する。展着剤は添加しない。薬剤が乾いた後、分生子懸濁液を株全体にまんべんなく十分量噴霧接種する。葉を軽く乾かし、分生子懸濁液の水滴が消えてきたら、液肥を 1 ~ 2 cm ほどの高さまで入れた透明の衣装ケース (44 cm \times 75 cm \times 35 cm) に 1 ケース当たり 12 株を移してふたをし、恒温室にて 20°C で 3 週間程度管理する。このとき衣装ケースと蓋の間にビニールを挟むことで、ふたとの隙間から水分が蒸発するのをある程度防ぐことができる。衣装ケースの外側上部中央での放射照度は 40 W/m² 程度とし、恒温室がない場合はガラス室などで管理するが、20°C 前後で多湿条件を維持できる環境が望ましい。

4 判定方法

発病確認後（20℃の条件下では接種3週間後）に株当たり病斑数あるいは下位葉の発病面積率（%）を調査し、防除価を求める。ボスカリド散布株の場合、感受性菌ではほとんど病斑を生じず、防除価はほぼ100となる。一方、耐性菌では無散布株とほぼ同程度か半分程度の発病となり、防除価は0～60程度となることが多い（岡田・下元, 2016）。

5 留意点

- ・接種後にポット苗をガラス室などで管理した場合、湿度が下がると潜伏期間が延びるため、接種3週間後でも発病しないことが多い。その場合、下位葉の黄化・落葉を防ぐため、接種後は15 cm程度の大さめのポリポットに移植したほうがよい。また、すすかび病が多発した場合も下位葉は黄化・落葉するため、まめに発病の有無を確認し、発病確認後は早めに調査する。
- ・接種日までに黄化した下位葉は、接種前に切除しておく、接種後の黄化・落葉の有無を判断しやすい。
- ・供試するナス品種は各地域の一般的なものを用いてもよいが、筆者は安定して発病することから「うす皮味丸（サカタのタネ）」を用いることが多い。

IV 遺伝子診断法

耐性獲得に関与する遺伝子変異を Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) 法により検出する。PCR-RFLP 法とは、PCR産物を制限酵素処理して生じるバンドパターンから変異の有無を推定する方法である（図-2a）。罹病サンプルの採集から2日間で検定結果が得られ、多検体を処理できるため、例えば、産地全体にどれだけ耐性菌が拡

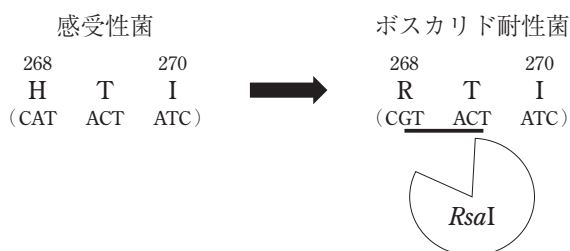


図-2a ボスカリド耐性菌に認められる変異と PCR-RFLP による検出

ボスカリド耐性菌ではコハク酸脱水素酵素のサブユニットである SdhB の 268 番目タンパク質がヒスチジン (CAT) からアルギニン (CGT) に変異しており、その変異により制限酵素 *RsaI* の認識配列 GTAC (下線部) が生じる。変異箇所を含む PCR産物を *RsaI* で処理し、切断の有無から変異の有無を判定する。

がっているか調べるときなどに適している。

[手順]

1 病斑部からの DNA の抽出

PCR用チューブに PrepMan™ Ultra (Applied Biosystems) を 40 μl ずつ分注した後、直径 5 mm 前後のコルクボーラーで病斑部をくり抜いたリーフディスク 1 枚を同じくチューブに入れる。ふたを閉めて、軽くボルテックスした後、スピンドアウンし、サーマルサイクラーなどを用いて 95℃ で 10 分間熱処理する。処理後氷上に置き、140 μl の TE バッファーを加えたものを DNA 抽出液とする。

2 PCR-RFLP

以下の組成、条件で PCR を行う。DNA ポリメラーゼは KAPA2G™ Robust Hot Start Ready Mix with dye (KAPA Biosystems) を用いる。

- ・PCR 反応液の組成 (Total 10 μl)
 - 2 × KAPA 2G Robust Hot Start Ready Mix……………5 μl
 - 10 μM フォワードプライマー……………0.25 μl (5'-gttctctccagtcctaccgctggatcg-3')
 - 10 μM リバースプライマー……………0.25 μl (5'-gaactatgtacacaactcccggtagtg-3')
 - 蒸留水……………2.5 μl
 - DNA 抽出液……………2 μl
- ・PCR の条件
 - 95℃, 2 分
 - 95℃, 10 秒 → 60℃, 10 秒 → 72℃, 10 秒, 40 サイクル
 - 72℃, 1 分

PCR 終了後、制限酵素 *RsaI* (ニッポンジーン) で PCR 産物を処理する。

- ・制限酵素処理
 - PCR 産物……………10 μl
 - 蒸留水……………7.8 μl
 - 10 × M バッファー……………2 μl
 - RsaI*……………0.2 μl
- ・処理条件
 - 37℃ で 4 時間以上。オーバーナイトの処理を推奨。

3 判定

制限酵素処理後、2% アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色、UV 照射下でバンドを確認する。感受性菌の場合は 300 bp 付近にバンドが 1 本のみであり、H268R の変異を持つ耐性菌の場合は 200 bp と 100 bp 付近にバンドが 2 本確認できる（図-2b）。

4 留意点

- ・本方法はボスカリド耐性獲得に必要なコハク酸脱水素酵素の特定の変異を検出するものであり（岡田・下元,

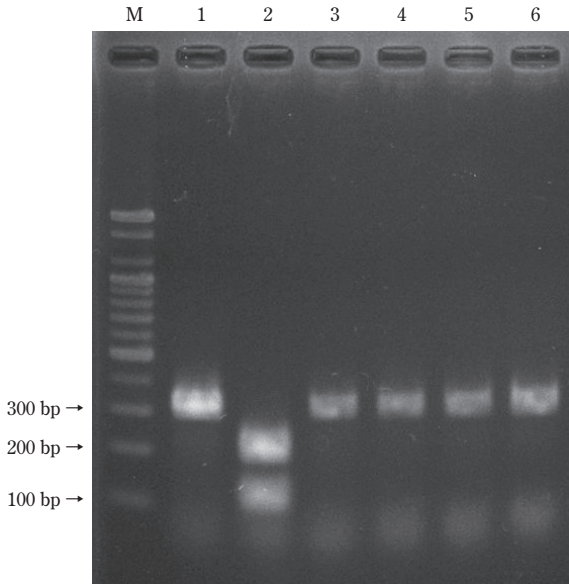


図-2b 遺伝子診断法による検定結果

SdhB に H268R の変異を持つ耐性菌の場合、バンドが2本生じる。M：100 bp ラダーマーカー、レーン1：感受性菌、レーン2：H268R 耐性菌、レーン3～6：罹病葉（すべて感受性菌）。

2016)、その他の変異によりボスカリド耐性を獲得している場合、検出できない。

- ・DNA抽出に用いる病斑は菌叢が多いもののほうがよい、菌叢が少ないとPCRで増えないことがある。

- ・KAPA 2G Robust DNA polymerase は粗抽出されたDNAに適しており、不純物の多いDNAでも伸長できる。他のPCR酵素でも代用可能だが、本法で抽出したDNAサンプルは不純物が多いので、増幅効率に影響が出る可能性がある。

- ・PCR産物には増幅されたDNA以外にバッファー由来の塩やdNTP等多くの不純物が存在するため、制限酵素処理前にPCR産物を精製することが望ましい。しかし、PCR産物を直接制限酵素処理しても本方法においては経験上問題ない。

- ・PCRで増幅されるDNA量が多い場合は、制限酵素処理時にDNAが切れ残ることがある。その場合、耐性菌と感受性菌が1病斑に混在しているのか、単なる切れ残りなのか判断できないため、オーバーナイトで十分な時間処理することを推奨する。

V 今後の課題

SDHI剤間の交叉耐性は複雑であり、菌の種類や遺伝子

型によって異なる (AMIRI et al., 2014; AVENOT et al., 2014; MALLIK et al., 2014)。ナスすすかび病菌で確認しているSdhBのH268R変異株はボスカリドに耐性でペンチオピラドに感受性であることを確認しているが、ウリ類つる枯病菌ではヒスチジンがアルギニンに変異した場合 (H277R) はボスカリド耐性・ペンチオピラド感受性の表現型を示し、チロシンに変異した場合 (H277Y) は両剤に耐性を示すことが報告されている (AVENOT et al., 2012)。ナスすすかび病菌のSdhBの268番目のヒスチジンはCAUでコードされており、1塩基の変異でアルギニン (CGU) にもチロシン (UAU) にもなりうるため、今後ボスカリドとペンチオピラド両剤に耐性を持つH268Y変異株の出現も考えられる。

現在ナスに登録のあるSDHI剤はボスカリドとペンチオピラドのみであるが、今後複数のSDHI剤がナスに登録を取得する見込みであり、遺伝子型ごとに各薬剤の交叉耐性を検討しなければならない。また、耐性菌のまん延による防除効果の低下を避けるため、SDHI剤の使用回数の制限を徹底して、新たなタイプの耐性菌の出現を防ぐことが重要であり、高知県では実際に耐性菌の発生を考慮した防除暦の作成などを行っている。

一方、薬剤のローテーション散布や使用回数の制限は耐性菌の発達を遅らせる効果は高いが、耐性菌問題の根本的な解決策とはならない。耐性菌とのイタチごっこを抜け出し、薬剤に頼らない防除方法を開発することが、耐性菌問題の解決策となる。下元・山本 (2016) は、ハウス内の相対湿度が90%以上のときにヒートポンプを用いて除湿することで、ナスすすかび病の発生が抑制されることを報告している。また、筆者も同様の除湿システムが、現地圃場でも十分有効であることを株式会社四国総合研究所との共同研究で確認している。コスト面の課題はまだ残るが、このような積極的な湿度コントロールによる病害防除の研究は始まったばかりであり、将来的には耐性菌対策につながる防除技術になると考えている。

引用文献

- 1) AMIRI, A. et al. (2014): *Plant Dis.* **98**: 532 ~ 539.
- 2) AVENOT, H. F. et al. (2012): *Pest Manag. Sci.* **68**: 645 ~ 651.
- 3) ———— et al. (2014): *Plant Dis.* **98**: 197 ~ 205.
- 4) MALLIK, I. et al. (2014): *Phytopathology* **104**: 40 ~ 49.
- 5) 岡田知之・下元祥史 (2016): *日植病報* **82**: 87 ~ 92.
- 6) 櫻井誠也ら (2011): *日本農薬学会誌* **36**: 520 ~ 523.
- 7) 下元祥史・山本敬司 (2016): 四国植防 受理済み.
- 8) 山口純一郎 (2003): *佐賀農試研報* **32**.
- 9) 矢野和孝・川田洋一 (2003): *日植病報* **69**: 220 ~ 223.