

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）

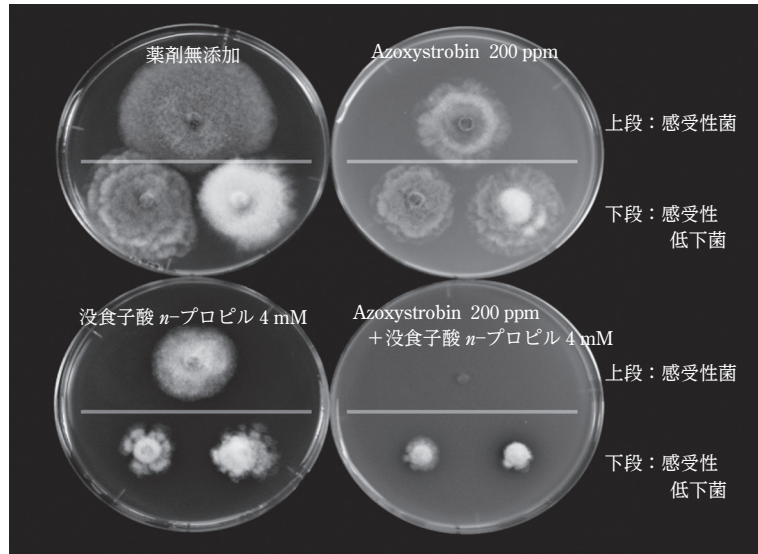


図-1 ウリ科野菜つる枯病菌のアゾキシストロビン感受性検定 (PDA 培地, 25℃, 3日間培養)

が推奨されるが、製剤でも検定可能である。市販の PDA 培地 (Difco 製など) を用い、滅菌・溶解後 55℃ まで冷まし、没食子酸 *n*-プロピル 4 mM (検定用培地における最終濃度) とアゾキシストロビンを 0 ~ 400 ppm になるよう添加する。なお、没食子酸 *n*-プロピルはあらかじめジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して加える。アゾキシストロビン原体を用いる場合は、没食子酸 *n*-プロピルとともに DMSO に溶解する。DMSO は検定用培地の 1% (v/v) を超えない範囲であれば本菌の生育に影響しない。アゾキシストロビン製剤 (アゾキシストロビン 20% 水和剤, 商品名: アミスター 20 フロアブル) を用いる場合、そのまま培地に添加してもよいが、培地の温度が低いと均一な混合が難しいことがある。そのため検定用培地の 1% (v/v) の滅菌水に懸濁させてから加用する。没食子酸 *n*-プロピルおよびアゾキシストロビンを加えた培地を均一に攪拌し、直径 90 mm のシャーレに約 15 ml 分注し、検定用培地とする。

供試菌株を PDA 培地で 25℃, 3 ~ 6 日間前培養し、菌叢の先端付近を、接種点から同心円状に直径 4 mm のコルクボーラーで打ち抜き、菌叢ディスクを検定用培地に接するよう下向きにして置床する。25℃ で 3 日間培養後、菌糸生育の有無を観察し、薬剤の菌に対する最小生育阻止濃度 (MIC) を求める。培養期間が長くなると感受性菌でも菌叢生育が認められる場合があるため、観察は 3 日後とする。

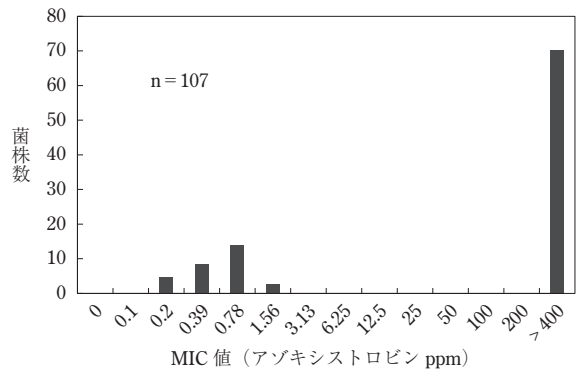


図-2 2011 年に神奈川県三浦半島地域から採集したウリ科野菜つる枯病菌のアゾキシストロビンに対する感受性の頻度分布 (アゾキシストロビン原体を検定に用いた場合)

(2) 感受性の頻度分布

2011 年 7 月に神奈川県三浦半島地域のスイカ、メロン等ウリ科野菜圃場から採集した本病原菌 107 菌株を供試し、上記の方法でアゾキシストロビンの本菌に対する MIC を調査した。供試菌株は原体 (純度 95.7%, シンジェンタジャパン株式会社より分譲) を用いた検定では MIC が 0.2 ~ 1.56 ppm と 400 ppm 以上の二つの菌群に分けられた (図-2)。なお、同供試菌株をアゾキシストロビン製剤で検定すると、菌株群の感受性は原体を用いた場合と同様、明瞭な二峰性を示したが、感受性菌に対する MIC は 0.39 ~ 6.25 ppm となった。製剤を用いる検定では、感受性菌の MIC 値が原体を用いた検定より

いくらか高い傾向を示した。

(3) 感受性の異なる菌株に対する薬剤の防除効果

薬剤の防除効果を検討する場合、以下のポット試験が適用できる。供試菌株の分離源植物の本葉 3～5 葉期の苗を、薬剤散布区と無散布区、それぞれ 5 株用意する。茎葉全体にアゾキシストロピン 20%フロアブル 2,000 倍液を十分量散布し、1 日後、供試菌株の分生子懸濁液（約 1.0×10^5 conidia/ml）を噴霧接種する。分生子懸濁液は、供試菌株を PDA 培地で 25℃、BLB 照射下で 2 週間培養すると分生子殻が形成されるので、菌叢上に滅菌水を滴下し、絵筆で菌叢表面を軽く擦り、キムワイプなどでろ過して調製する。

分生子懸濁液を接種した苗を直ちにポリ袋に入れ、25℃、16 時間照明のグロースキャビネットまたは温室内で管理する。1 日後にポリ袋を除去する。病斑は主に葉縁部分から形成されることが多い（図-3）。約 10 日後、薬剤散布区と無散布区の葉における病斑面積率を調査し、下記の基準により発病度および薬剤の防除価を算出



図-3 ウリ科野菜つる枯病菌を接種したメロン葉（品種：‘タカミ’）における発病状況

する。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{程度別発病葉数} \times \text{指数}) \times 100 / (\text{調査葉数} \times 4)$$

葉の発病指数 0：病斑を認めない，1：病斑面積率が葉面積の 5% 未満，2：同 5% 以上 25% 未満，3：同 25% 以上 50% 未満，4：同 50% 以上

$$\text{防除価} = (\text{無散布区の発病度} - \text{散布区の発病度}) / \text{無散布区の発病度} \times 100$$

(4) 耐性菌の判定

2011 年に神奈川県内で採集した菌株について、メロン（品種：‘タカミ’）を用いて前項のポット試験を行ったところ、希釈平板法による検定で MIC が 0.2～1.56 ppm の菌を接種した場合、アゾキシストロピン剤の防除価は 96 程度認められた。一方、MIC が 400 ppm 以上の菌では防除効果が認められなかった（表-1）。以上のことから、MIC が 0.2～1.56 ppm の菌を感受性菌、MIC が 400 ppm 以上の菌株を耐性菌と判定することが妥当と考えられる。

2 遺伝子診断

キュウリうどんこ病菌、キュウリ褐斑病菌およびイチゴ炭疽病菌等の病原菌において、QoI 剤の作用部位であるチトクローム *b* の遺伝子について解析が行われ、遺伝子変異に伴うアミノ酸置換と薬剤耐性の関係が明らかにされている（Ishii et al., 2001；石井, 2009；稲田, 2009）。本菌においても、アゾキシストロピン耐性菌株のチトクローム *b* の遺伝子変異について調査した。その結果、前述の他の病原菌と同様、コドン 143 の 1 塩基が、感受性菌では G（グアニン）であるのに対し、耐性菌では C（シトシン）に置換していた。それにより、この変異から推定される 143 番目のアミノ酸はグリシン（G）からアラニン（A）に置換、すなわち G143A の変異が生じているものと考えられた（FINGER et al., 2014）。この変異を検

表-1 QoI 剤耐性ウリ科野菜つる枯病菌株に対するアゾキシストロピン 20% 水和剤 2,000 倍液散布の防除効果

菌株	採集場所	採集年月	発病度		防除価
			散布区	無散布区	
KNOF62 ^{S)}	神奈川県横浜市	2007 年 9 月	1.6	41.5	96.0
21-1 ^{R)}	横須賀市	2011 年 7 月	22.0	21.4	0.0
22-3 ^{R)}	横須賀市	2011 年 7 月	18.5	13.0	0.0

S)：感受性菌，R)：耐性菌。

発病度 = $\Sigma (\text{程度別発病葉数} \times \text{指数}) \times 100 / (\text{調査葉数} \times 4)$ 。

指数 0：病斑を認めない，1：病斑面積率が葉面積の 5% 未満，2：同 5% 以上 25% 未満，3：同 25% 以上 50% 未満，4：同 50% 以上。

防除価 = $(\text{無散布区の発病度} - \text{散布区の発病度}) / \text{無散布区の発病度} \times 100$ 。

出するPCR-RFLPによるQoI耐性菌の遺伝子診断(石井, 2009)を, 前項で感受性検定を行った菌株の一部で試みたところ, 培地での検定結果とすべて一致したため, 本法はウリ科野菜つる枯病菌においても適用が可能であると考えられた(折原ら, 2013 b)。

(1) DNAの抽出

菌体から全DNAを抽出するには市販のキットの使用も可能だが, 筆者らはSaitoh et al. (2006)に準じて以下の通り抽出を行っている。供試菌株をPDA培地に移植し, 25°Cで3日間培養する。菌糸先端部分を含む菌叢を培地ごと1.5 mlマイクロチューブに回収し, 滅菌爪楊枝を用いて細断, 溶出用バッファー500 μ l (200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 200 mM 塩化ナトリウム, 1% *n*-ラウロイルサルコシン ナトリウム塩 (pH8.0))を加え室温に10分間待ち, 4°C, 18,000 \times g, 5分間遠心分離を行う。上清300 μ lを新たな1.5 mlマイクロチューブに移し, エタノール750 μ lを添加し, 4°C, 18,000 \times g, 2分間遠心分離を行い, DNAを沈殿させる。上清を除去したのち, 70%エタノールで沈殿を洗い, 再び遠心分離して上清を除去した後, 沈殿を乾燥させる。次いで50 μ lのTEバッファー (pH8.0)を滴下し, 65°Cで沈殿を溶解する。溶解後は冷凍保存する。

(2) PCR-RFLP

石井(2009)に準じて行う。PCR反応液には, 前項の要領で抽出したつる枯病菌の全DNAを適宜滅菌水で希釈した鋳型, プライマーRSCBF1: 5'-TATTATGAGAGATGTAAATAATGG-3'およびRSCBR2: 5'-ACAATATCTTGTCCTCAATTCATGG-3' (Ishii et al., 2001)を最終濃度0.2 μ MとなるようGo Taq Colorless Master Mix (Promega)およびDNase free waterを加える。Go Taq Colorless Master Mixを使用する代わりに, 1.5 mM 塩化マグネシウム, 200 μ M dNTP混合物, 2.5 units TaqDNAポリメラーゼおよびバッファーで調製してもよい。PCR反応条件は, 94°C, 2.5分の変性後, 94°Cで30秒, 52°Cで60秒, 72°Cで90秒を40サイクル繰り返し, さらに72°C, 8.5分伸長反応を行う。PCR産物に耐性菌のチトクローム*b*遺伝子の変異部位を認識して切断する制限酵素*Ita I*を処理した後, アガロースゲル(1.5~2.0%)

電気泳動を行い, ゲルをエチジウムブロマイド染色し, 紫外線照射下で観察する。

(3) 判定方法

感受性菌では制限酵素*Ita I*処理の有無にかかわらず280 bp付近に1本のバンドが認められるが, 耐性菌では*Ita I*処理により切断されるため, バンドサイズは小さく, 200 bp付近に現れる。

なお, 本菌において上記変異を検出し, RFLP法をともなわないアレル特異的PCR法が開発されている(Finger et al., 2014)。

おわりに

神奈川県施設栽培キュウリにおいて, 主に褐斑病防除のためにQoI剤が多用されていた2006年に, 同一圃場内で, 褐斑病とともにつる枯病でQoI剤耐性菌が優占化した事例があった(折原ら, 2013 b)。当時キュウリつる枯病にはQoI剤の適用はなく, 褐斑病を対象に散布されたQoI剤がつる枯病菌に作用し, その結果つる枯病菌の耐性菌が優占化したものと推測される。このように, 薬剤を圃場で散布することにより, 栽培圃場に生息する病原を含む様々な菌類に作用し, 想定外の耐性菌の出現をもたらすことがある(石井, 2014)。特にQoI剤のように適用病害が多く, 耐性菌優占化のリスクが非常に高い薬剤を使用する場合, 作物の栽培期間を通じた散布回数の適切な管理など耐性菌発達リスクを低減化する取り組みが不可欠である。

引用文献

- 1) FINGER, M. J. et al. (2014): *Plant Disease* **98**: 1681~1684.
- 2) 稲田 稔 (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアルII, 日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会, 東京, p.96~99.
- 3) ISHII, H. et al. (2001): *Phytopathology* **91**: 1166~1171.
- 4) 石井英夫 (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアルII, 日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会, 東京, p.69~71.
- 5) ——— (2014): *日植病報* **80**: 289 (講要).
- 6) KEINATH, A. P. (2009): *Pest Manag. Sci.* **65**: 1090~1096.
- 7) 日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会 (2012): 野菜・果樹・茶におけるQoI剤及びSDHI剤使用ガイドライン. http://www.taiseikin.jp/mwbhwp/wp-content/uploads/vege_gl.pdf (2016年9月12日アクセス確認)
- 8) 折原紀子ら (2013 a): *日植病報* **79**: 197 (講要).
- 9) ———ら (2013 b): *関東病虫研報* **60**: 31~33.
- 10) SAITOH, K. et al. (2006): *J. Gen. Plant Pathol.* **72**: 348~350.