

ナシ黒斑病菌のダイホルタンに対する耐性菌検定方法について

貞松光男 (佐賀県果樹試験場)

Mitsuo SADAMATSU : Method for determining difolatan tolerance of *Alternaria kikuchiana*

このところ、黒斑病が多発したこともあって、本病に特效を示すダイホルタンの耐性菌が出現したのではないかとの声が聞かれるようになったため、検定を行ったところ従来の方法では十分でなかったため検定法について検討した。

1. 試験方法

供試菌：県内主産地の5園から黒斑病罹病葉を採取し、各園から約100病斑を切り取り、酸性培地上に置き、28℃4日ないし1週間培養した菌叢ならびに胞子を供試した。

検定法：1. 平板希釈法による菌そうの最少生育阻止濃度(MIC)検定。PSA培地にダイホルタン水和剤(a.i.80%)を5~800ppmの範囲で変則段階希釈して加用し、直ちに10mlをペトリ皿に分注した。そして、この上に、28℃4日間培養して伸長した供試菌の菌そうの先端部分を4mmのコルクボーラで打ち抜いたものを置き、28℃で2日間培養後菌そうの直径を測定した。2回反覆した。病原性の確認は生葉に接種して行った。2. 平板希釈法による胞子の最少発芽阻止濃度検定。PSA培地にダイホルタン水和剤を2~10ppmの範囲で希釈して直ちに10mlをペトリ皿に分注した。そして、この上に、28℃1週間培養して胞子形成が認められた菌株について、胞子濃度が顕微鏡の1視野(100倍)当たり30~60個となるように滅菌水で調整した後、白金耳で画線し、28℃で2日間培養後の胞子発芽の有無を調査した。なお、発芽は胞子の長さ以上に伸長したものを発芽とみなした。調査は1区約50胞子について行った。3. 生葉を用いた検定法。新水の幼葉を供試し、室内で供試葉を垂直にし、全自動噴霧器で薬液を全面に噴霧し、薬液が乾いた後、4mm径に打ち抜いた菌そう片を葉面に置き、2日後に発病の有無を調査した。なお、本法については定法がないので、適切な検定法について検討を加えた。

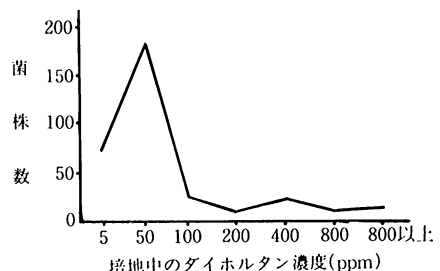
2. 試験結果

1) 菌そうの生育による検定結果 第1図に検定結果を示した。MICでみると50ppmに大きなピークがあり、さらに400ppmに小さなピークがあるように見える。800ppm(実用濃度)でも生育する菌株があり、これらのことから耐性菌が出現した可能性がある。しかし、再度検定すると、全体としては同一傾向を示すが、個々の菌株についてみるとMICのふれが多く、本検定法はダイホルタン耐性菌の検定には不向きなように思われた。ふれる原因は、もともと単胞子から出発していないことや *Alternaria* 属菌の性質等が考えられるが明らかでない。

2) 胞子発芽法による検定結果 2ppmで発芽しない

菌株が約15%、発芽する菌株(5ppm前後では発芽しない)が約50%あり、10ppmで発芽しない菌株(5ppm前後では発芽する)が約4%、発芽する菌株が約2%であった。本結果と菌そう生育試験結果との間には相関が認められなかった。本法の問題点として、菌株によっては胞子形成が認められないかきわめてわずかであるため検定に供されないこと、胞子濃度を一定にするための操作や調査に時間を要する点などである。

3) 生葉法による検定結果 生葉を用いる方法は、結果に再現性があり、操作も簡単なことがわかったので、本法をより確実な方法とするために行った結果は次のとおりである。①20世紀または新水を用い、成葉の80%前後に伸長した幼葉の裏面を用いる。②葉柄基部を脱脂綿等でくるみ湿らせ、葉が乾燥しないようにする。③薬液には必ず展着剤(アグラール5000倍等)を加用し、葉面にむらなく薬液を付着させる。④供試菌は前もってペトリ皿に培養しておき、菌そう面をコルクボーラで打ち抜き、葉面と密着させるため1%の砂糖液を微量たらししておく。⑤ペトリ皿の底面を葉面(菌そう面を上)に密着させる。⑥処理後は28℃の暗湿室に置き、1~2日後に発病調査を行う。なお、薬液濃度は、ダイホルタン水和剤1000倍と3000倍とする。再現性について、葉内、葉間、時間別に同一菌株を8回反覆したが、最大18%の変異のみみられただけで、他の検定法に比し高い再現性を示すように思われた。その他、本法の特徴は、病原性が同時に検定できる。1葉で10~20検体が検定できる。操作が簡単である点などである。実際の使用場面に近い。本法による5園の検定結果は、1000倍、3000倍で発病した菌株率は平均で35%で、28%から49%の範囲にあった。本法では、ダイホルタン無散園における黒斑病菌の検定結果がなく耐性菌が出現したか否かは明らかでないが、これらの数値からみると効果が低下している可能性がある。なお、本法と菌そう生育法、胞子発芽法のそれぞれの結果を比較した場合、いずれも相関を認めなかった。



第1図 ダイホルタンに対する菌糸生育最少濃度