

ジフェノコナゾールがオオムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) の感染過程に及ぼす影響

魯 紅 学*・山岡 直人**

Hongxue LU* and Naoto YAMAOKA **: The Effect of Difenoconazole
on the Infection Process of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

Abstract

The effect of Difenonazole on the infection process of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* was examined using an infection system of barley coleoptile and the powdery mildew fungi. Difenonazole was effective for inhibiting the morphogenesis and penetration of the fungi, and even after haustoria formation the treatment of Difenonazole was effective for stopping the secondary hyphae elongation by killing directly the fungi. It seemed to be important for the curing of the disease that Difenonazole should be sprayed as soon as possible after establishment of the infection.

キーワード：オオムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)，二次菌糸，ジフェノコナゾール

1. 緒 言

オオムギうどんこ病は *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* によって引き起こされ、ムギ類を栽培する国々でその被害が問題となっている。日本や北米の東部と南部、中国の貴州省と四川省および東南沿海地区においても、その発生が報告されている (黄ら, 2002)。罹病葉ではクロロシスを呈し、さらに枯れ葉症状を引き起こすのみならず、激しい場合には発病株の成長が抑制され、穂の発達も悪くなり20%以上の減収に至る。例えばヨーロッパにおいては、最も被害の多かった年における減収は25%~30%にまで及んだ (朱ら, 2006)。本菌に対する抵抗性品種の開発が試みられてはいるが、現在防除の主流は化学的なものに依存しており (馬ら, 2004; 丁ら, 2007)、その中でもアゾール系の殺菌剤が主に使用されている。

アゾール系の殺菌剤の作用機作は病原菌の細胞膜のエルゴステロール合成阻害であり、植物組織への浸透性に優れると同時に薫蒸効果も認められ、ムギ類の栽培において、うどんこ病に対する予防効果と治療効果があると報告されている (許ら, 2010)。

アゾール系の殺菌剤の一つ、トリアジメホンはコム

ギうどんこ病防除に効果があり、これまで多くの研究報告がなされている。1995年、中国農業大学において、トリアジメホンを含む殺虫剤と殺菌剤の混合剤として、種子粉衣剤17号が開発された。光学顕微鏡と電子顕微鏡による観察の結果、本剤はコムギうどんこ病菌の分生子の第一発芽管 (primary germ tube: PGT) 形成と付着器発芽管 (appressorial germ tube: AGT) の出現は抑制しなかったが、付着器の奇形率を増加させることが明らかとなった。またこの薬剤によって、吸器原基の形成が抑制され、さらに初期吸器の発達も阻害され、感染率の低下が認められた (李ら, 1995)。トリアジメホンの種子粉衣剤は本菌侵入後においても二次菌糸の発育を抑制することで、二次菌糸からの吸器形成も減少し、コムギうどんこ病菌のコロニー形成が抑えられ、結果として高い防除効果を示した (楊ら, 2002)。

一方、オオムギうどんこ病については、これまでアゾール系の殺菌剤によって防除できるという報告はなされているものの、その報告例は少ない。さらに、本研究で用いたジフェノコナゾール (Difenoconazole) はアゾール系の比較的新しい化合物であり、本薬剤はオオムギうどんこ病菌自身の一連の形態形成や、吸器形成後の二次菌糸の発達にどのような影響を及ぼすのか、また本菌の感染が確立した際に、治療効果を目的とした薬剤処理の最も適正な時期を特定することなどの点については明らかになってはいない。また、エル

2011年3月17日受領

2011年7月4日受理

*長江大学農学院 中国湖北

**愛媛大学農学部植物病学教育分野

ゴステロール生合成阻害剤には耐性菌の出現などの問題もあり、本菌の感染過程のどの段階において効果がなくなるのか、そのことを知るためにもジフェノコナゾールの各形態形成に及ぼす影響を詳細に調べておくことはきわめて重要であると思われる。

本研究においては、ジフェノコナゾールを用いて、オオムギ子葉鞘に接種したオオムギうどんこ病菌の感染過程における本剤の影響を中心に調べた結果を報告する。

2. 材料および方法

供試植物および供試菌 本実験ではオオムギうどんこ病菌に対して感受性であるオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の品種 (コビンカタギ) を供試植物とした。供試菌としてオオムギうどんこ病菌 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* race 1 を用いた。

接種および培養 まず播種後8日目のオオムギ苗から、Takamatsu *et al.* (1978) の方法に従って子葉鞘ポートを作成し、宿主上に形成された若い菌叢から筆により分生子を掻き取り、子葉鞘の上から落下させて接種した。接種後、子葉鞘を1 mM CaCl₂ 溶液を入れた小型プラスチックシャーレに浮かべ、紙製の箱内に入れ暗黒条件下で培養した。培養に用いた恒温器の温度、湿度条件はそれぞれ20℃、70%RH とした。

薬剤濃度決定のための予備実験 本実験で用いる薬剤の最適濃度を調べるために、それぞれ1 ppm, 10 ppm, 100ppm となるように1 mM CaCl₂ 溶液に薬剤を加えた。対照区として1 mM CaCl₂ のみを用いた。接種した子葉鞘を培養し、接種30時間後にオオムギうどんこ病菌の形態形成の観察を行った。対照区と比較して有意差が認められた濃度を選び以下の実験濃度とした。

本菌の形態形成に及ぼす薬剤の影響の評価 オオムギうどんこ病菌の発芽過程における薬剤の効果を見るために、分生子を接種した子葉鞘を本実験濃度の薬剤を含む1 mM CaCl₂ 溶液に浮かべて培養した。薬剤は、接種0時間、2時間、5時間、8時間後にそれぞれ処理した。培養30時間後、光学顕微鏡 (オリンパス PowerBX10×20) を用いて、本菌形態形成の観察を行った。分生子の発芽過程において、第一発芽管 (primary germ tube: PGT), 付着器発芽管 (appressorial germ tube: AGT), 付着器 (appressorium: APP), パピラ (papilla: PA), 吸器 (haustorium: HA) の形成数を調べ、それぞれの率を以下の式で求めた。

発芽率 (%) = (PGT 形成分生子数 / 分生子総数) × 100

AGT 形成率 (%) = (AGT 形成分生子数 / PGT 形成分生子数) × 100

APP 形成率 (%) = (APP 形成分生子数 / AGT 形成分生子数) × 100

侵入行動率 (%) = (PA 形成分生子数 / APP 形成分生子数) × 100

感染率 (%) = (HA 形成胞子数 / PA 形成分生子数) × 100

吸器形成後および二次菌糸の伸展に及ぼす薬剤の影響の評価 オオムギうどんこ病菌の侵入成功後における本薬剤の効果を調べるために、本菌を接種した子葉鞘を1 mM CaCl₂ 溶液を入れた小型プラスチックシャーレに浮かべて、接種26時間、50時間、74時間後に10 ppm となるようにそれぞれ薬剤を添加した。対照区として1 mM CaCl₂ のみに浮かべる区を設けた。薬剤添加24時間後においてオオムギうどんこ病菌二次菌糸の伸長を観察し、その分岐数と分生子の致死率を調べて、薬剤が本菌の菌糸発育にどのような影響を及ぼすのかについて検討した。

分生子の致死率は以下の式で求めた。

分生子致死率 = (分生子死亡数 / 分生子総数) × 100

薬剤の治療効果 ジフェノコナゾールの治療効果を調べるために、オオムギを播種後第1葉が展開した時点で本菌を接種し、その後48時間、96時間、144時間目に薬剤 (100ppm) をそれぞれの葉にスプレーした。対照区として接種葉に薬剤を処理しない区と、非接種の区を設けた。対照区においてコロニーの発達が認められた時点で観察し薬剤効果を調べた。

3. 結 果

まず、予備的な実験において、本薬剤のそれぞれの濃度における分生子の発芽率、AGT 形成率、APP 形成率、侵入行動率および感染率を調べた。1 ppm の薬剤を処理した子葉鞘では対照区と比較して有意差は認められなかった。100ppm においては、薬剤処理した場合、分生子の発芽率は約25%であったが、その後ほとんどが死滅した。この結果により、10ppm の濃度を用いて、以後の実験を行った。

(1) 分生子の形態形成に及ぼす薬剤の影響

上に述べたように、薬剤の濃度を10ppm に設定し、接種0時間、2時間、5時間、8時間後に薬剤を処理した。接種30時間後に PGT, AGT, APP を観察し、

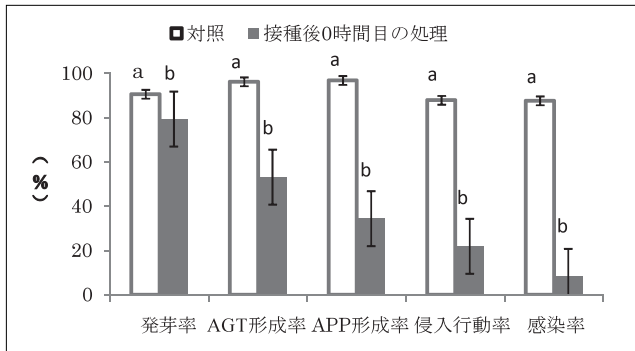


図1 接種後0時間の薬剤処理が本菌の形態形成に及ぼす影響

いずれのステージの形態形成に最も影響を及ぼすのかについて調べ、その結果を図1～図4に示した。

図1に示したように、薬剤処理区と対照区における分生子の発芽率 (PGT 形成率), AGT 形成率, APP 形成率, 侵入行動率, 感染率を調べてみると、いずれも有意な差が認められた ($P < 0.05$)。すなわち接種直後 (0時間) に薬剤を加えると PGT の発芽だけでなく、その後の一連の形態形成ならびに感染率に少なからず影響があるものと思われた。

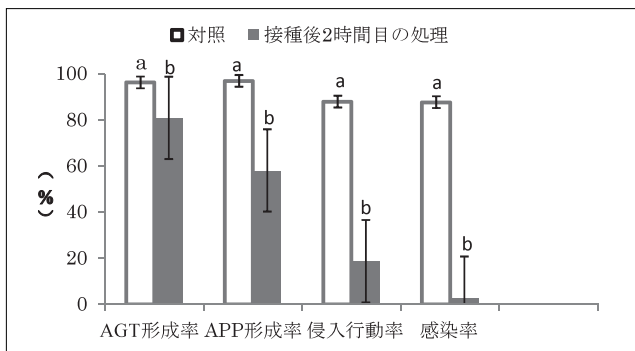


図2 接種後2時間の薬剤処理が本菌の形態形成に及ぼす影響

図2は接種2時間後に行った薬剤処理の結果である。接種2時間後では PGT 形成がすでに終わっているため、AGT 形成率, APP 形成率, 侵入行動率, 感染率について調べた。その結果、図2に示したようにいずれも有意な差が認められた ($P < 0.05$)。接種2時間後に薬剤を加えると AGT 形成に著しい影響があり、さらにその後の APP の形態形成ならびに感染率も低くなった。

図3と図4はそれぞれ接種5時間と8時間後における薬剤処理の結果を示したものである。この時間帯における薬剤処理では、本菌分生子からの PGT 形成, AGT 形成はすでに終わっているため、それ以降の APP 形成率, 侵入行動率, 感染率について調べた。

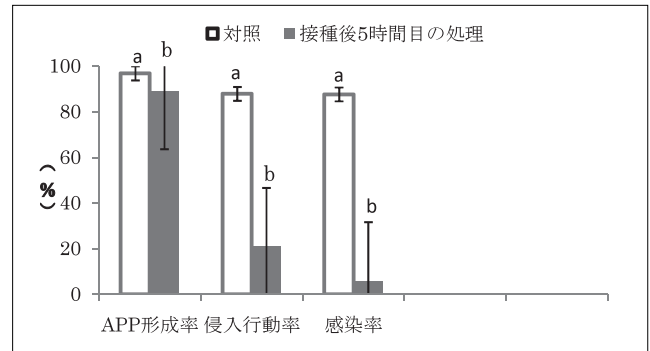


図3 接種後5時間の薬剤処理が本菌の形態形成に及ぼす影響

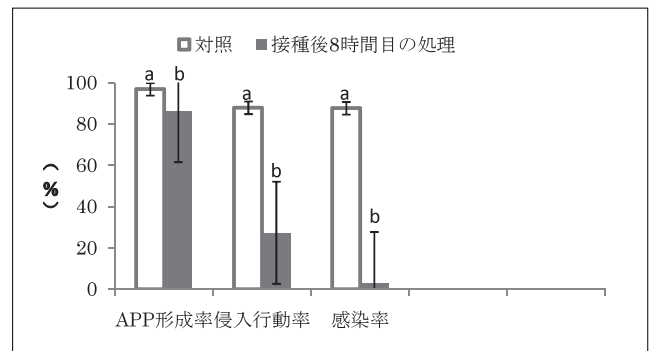


図4 接種後8時間の薬剤処理が本菌の形態形成に及ぼす影響

その結果、図3、4に示したように、いずれも薬剤によって大きくその率が減少した ($P < 0.05$)。すなわち APP 形成時においても、本薬剤の処理は十分効果が期待できると思われた。

上で述べたように、本菌の形態形成いずれの段階における薬剤処理においても、すべて効果が認められた。したがって、本薬剤の処理時期はオオムギうどんこ病菌のいずれの感染過程でも有効と思われた。

(2) 吸器形成後および二次菌糸伸長時における薬剤の影響

本菌の吸器形成後および二次菌糸の伸長した時点、すなわち接種26, 50, 74時間後に薬剤処理を行い、さ

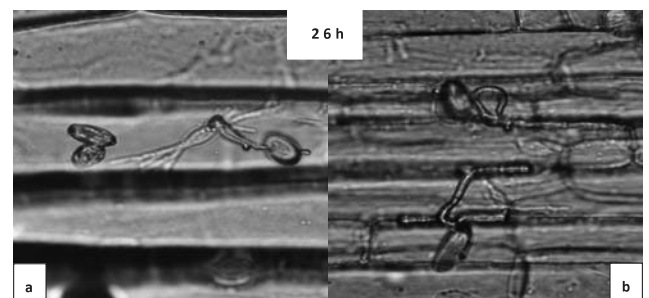


図5 吸器形成後と二次菌糸伸長時 (接種26時間後) における薬剤処理の影響
a: 処理区 (接種26時間後に薬剤を処理), b: 対照区

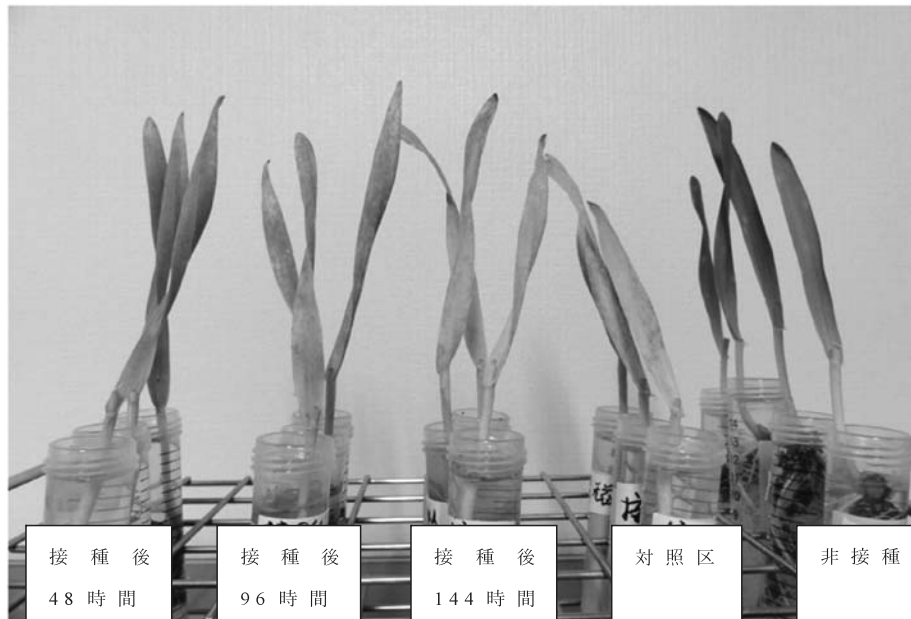


図6 接種後それぞれ時間に薬剤を使った治療効果

らに24時間後に菌糸の伸長と菌体の生死を観察した。結果は以下の通りである(図5)。

① 接種26時間後に薬剤処理を行い、その24時間後に二次菌糸伸長の状態(二次菌糸分岐数)を調べた結果、図5の(a)に示すように、処理区においては二次菌糸分岐数が1本の場合あるいは二次菌糸が出現する前に死に至る場合も多く観察された。菌体の致死率は74%に及んだ。すなわち吸器形成後に薬剤処理を行った場合、その後の二次菌糸の発育が阻害され、伸長が阻害されると思われた。

対照区(b)では二次菌糸分岐数は1本の場合が多かったものの、その場合でも菌糸は長く伸長していた。この時間帯においては、二次菌糸が2本あるいは3本認められる場合もあった。

② 接種後50時間目に薬剤処理を行い、その24時間後に二次菌糸伸長の状態(二次菌糸分岐数)を調べた。薬剤処理区においては二次菌糸分岐数が2~3本認められたが、菌体の平均死亡率は90.6%に及んだ。対照区においては二次菌糸分岐数が3本の場合が比較的多く(52.8%)、中には二次菌糸分岐数が4本に及ぶ場合も認められた(15.3%)。

③ 接種後74時間目に薬剤処理を行い、その24時間後に二次菌糸の成長の状況を調べた結果、処理区と対照区においては二次菌糸分岐数とも3~4本認められたが、処理後には菌体が死に、その率は93.7%におよんだ。

すなわち接種50時間後に薬剤を加えた場合と同じように、薬剤処理によって、二次菌糸が直接影響を受け、死に至るものと思われた。

(3) 薬剤の治療効果

接種後48時間、96時間、144時間に薬剤をスプレーした。対照区においてコロニーの発達が認められた時点で観察を行った(図6)。

図6に示すように、対照に比べて薬剤をスプレーする時間が遅くなるに伴って、オオムギ葉上のコロニーの面積が著しく大きくなると思われた。すなわち、接種144時間後では、薬剤の処理効果はほとんど認められなかった。以上より、うどんこ病の発生が認められた場合は、発生後に出来るだけ早く薬剤を散布する必要があると思われる。

4. 考 察

光学顕微鏡を用いて、ジフェノコナゾールのオオムギうどんこ病菌感染過程に及ぼす影響を細胞学的に調べた。明らかになった点は以下の通りである。

① 本菌の感染過程において、それぞれの段階における薬剤処理がいずれも効果を認めたことから、本薬剤の処理時期はオオムギうどんこ病菌のいずれの感染過程でも有効と思われる。

② 分生子の吸器形成後および二次菌糸伸長時期に薬剤処理をした結果、二次菌糸は直接死に至ることが明らかとなり、このことから、薬剤処理以降は本菌の形態形成は阻害されるものと思われた。

③ 接種後48時間、96時間、144時間に薬剤をスプレーし、薬剤による本病の治療効果を調べた結果、接種144時間後の散布では効果が認められなかったことから、本病発生後は出来るだけ早く薬剤を散布すべきであると思われる。

これまで、トリアジメホンあるいはアゾール系の殺菌剤を用いて種子粉衣(種衣剤)処理がコムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) に対する影響を調べた結果が報告されている(李ら, 1995; 楊ら, 2002)。この報告においては、薬剤処理によって侵入が阻害され、たとえ吸器が形成された場合でも、その発育ならびにその後の二次菌糸の伸長が阻害されることから、これらの効果によって本菌の発病が抑制されると言われている。一方、本菌のコムギの表皮細胞上での形態形成 (PGT, AGT, APP の形成率) に対する薬剤の影響は認められないとされている。本研究では侵入前の形態形成に、薬剤処理がかなり有効であることを明らかにした。これまでの報告と本研究による結果の食い違いについては、以下のように考えられる。すなわち、種子粉衣剤においては薬剤の成分が植物体内に存在しており、表面にはそれほど析出していない可能性もあり、侵入前にはそれほど影響が現れないと推測できる。この推測が正しいならば、本菌に対する影響が現れ始めるのは、吸器形成によって植物体内に存在する薬剤を吸収した時点以降と考えることが可能である。

本研究においては、オオムギ子葉鞘を用いてオオムギうどんこ病菌を接種し、その感染過程のいろいろな段階において、ジフェノコナゾールを処理することで、本菌の形態形成ならびに吸器形成、その後の二次菌糸の伸長に対する本薬剤の効果を検討した。ジフェノコナゾールはエルゴステロール合成阻害剤であり、これまで報告されているように、これらの薬剤に対する耐性菌の出現が問題となっている。植物体全体に薬剤を処理した場合、本菌感染過程のいずれの段階で効果が認められなくなるのか、その見極めは困難である。なぜなら、植物体表面には種々のステージの形態が混在しているからであり、また植物体上の菌体を生きたまま連続的に観察すること不可能だからである。そういう意味でオオムギ子葉鞘を用いた実験系は、接種時点から発芽、付着器形成、侵入、その後の二次菌糸形成といった一連の現象を連続的に観察することができ、ジフェノコナゾールに対する耐性がどの時点で引き起こされるのかについても特定することが可能である。そのような意味で、本研究で得られた結果は、ジフェノコナゾールに対して今後発生するかもしれない耐性

菌出現のメカニズムを詳細に調べる上で、きわめて有効な資料を提供するものと思われる。さらに、オオムギの栽培において、うどんこ病に対する効率的な予防と防除を行うための基礎的なデータを提供するという意味において、本研究結果はきわめて重要であると思われる。

摘 要

エルゴステロール合成阻害剤であるジフェノコナゾールがオオムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) の形態形成と宿主への侵入、ならびに二次菌糸伸長に及ぼす影響を検討した。その結果、侵入前に本菌の形態形成のいずれの段階において薬剤処理を行っても、形態形成ならびに感染率に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、感染が成立した場合でも、その後の二次菌糸に直接作用して菌体を殺すこと、また、感染成立後できる限り早い段階で薬剤を散布することが本菌の発病抑制に有効であると思われた。

引用文献

- 黄金堂・郭媛贞・陈德禄 (2002) 中国におけるオオムギうどんこ病に対する抵抗性の特徴の分析。麦類作物学報, 22(1): 80-83.
- 李金玉・康振聲・李振岐 (1995) 種子粉衣剤17号のコーティングによるコムギの苗期におけるうどんこ病菌の発育に及ぼす影響。中国農業科学, 28(4): 60-65.
- 馬青・孫輝・杜昱光 (2004) オリゴサッカリンのキュウリうどんこ病菌の感染に対する抑制効果について。菌物学報, 23(3): 423-428.
- Takamatsu, S., Ishizaki, H. and Kunoh, H. (1978) Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat.V. Effects of calcium on the infection of coleoptiles of barley by *Erysiphe graminis hordei*. Can. J. Bot. 56: 2544-2549.
- 許平・馮成玉・楊增山 (2010) トリアジメホンによるコムギうどんこ病ならびに葉さび病防除効果に関する研究。現代農業科学, 15: 186-187.
- 楊俊・劉西莉・李健 (2002) トリアジメホンの種子粉衣剤がコムギ苗うどんこ病菌の発芽と感染に及ぼす影響に関する組織的な観察。麦類作物学報, 22(3): 55-58.
- 于基成・劉秋・朱桂清 (2007) 種々の生物資材を用いたコムギうどんこ病に対する防除効果およびそのメカニズム。瀋陽農業大学学報, 38(4): 512-517.
- 朱靖環・楊建明・王軍妹 (2006) うどんこ病に対するオオムギの抵抗性に関する研究。オオムギと穀類科学, (4): 41-45.