

## 2002年に長崎県島原半島で分離されたジャガイモ疫病菌の系統について

佐山 充・小川 哲治・迎田 幸博

(長崎県総合農林試験場愛野馬鈴薯支場)

**Characteristics of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato crops in all area of Shimabara peninsula of Nagasaki prefecture in 2002.** Mitsuru Sayama, Tetsuji Ogawa and Yoshihiro Mukaida (Aino Potato Branch, Nagasaki Prefectural Agricultural and Forestry Experiment Station, Aino, Nagasaki 854-0302, Japan)

We investigated mating types, allozymes of glucose-6-phosphate isomerase (Gpi), colony development ability on oatmeal agar, and metalaxyl resistance among 118 isolates of *Phytophthora infestans* obtained from potato on Shimabara peninsula, Nagasaki prefecture, in 2002. The frequency of A1 mating type isolates was 66%. The ratio of A1 mating type isolates in the south and west of Shimabara was higher than that in the east. All of the isolates had the 100/100 allozyme pattern of Gpi, indicating that the A1 isolates do not belong to US-1 genotype. Poor growers on oatmeal agar were a majority in the A1 isolates and good growers were a great majority in the A2 isolates. Fifty-eight percent of the isolates were resistant to metalaxyl, 20% were intermediately resistant, and 23% were sensitive. Sensitivity to metalaxyl was closely associated with mating type: resistant isolates with A1 mating type and sensitive with A2. On the basis of Gpi-allozymes, metalaxyl resistance, and colony development on oatmeal agar, more than 70% of the A1 isolates probably belong to the A strain.

**Key word :** allozyme, glucose-6-phosphate isomerase, mating type, metalaxyl resistance, *Phytophthora infestans*

### 緒 言

疫病は、暖地のジャガイモ春作栽培において、例年4月下旬から6月にかけて発生し、天候により薬剤の適期散布ができなかった場合には大きな被害を起こす。病原菌であるジャガイモ疫病菌には幾つかの系統が存在し (Goodwin et al., 1994), その識別に用いられている指標には、交配型 (A1, A2), 酵素多型, レース, メタラキシル耐性, DNA多型, ジャガイモ塊茎スライス上の菌叢の形態, オートミール培地上の菌糸生育がある (加藤, 2001)。現在発生している疫病菌の系統を調べることは、疫病菌の伝搬経路や伝搬範囲を解明する上で重要であり、特にメタラキシル耐性菌の発生程度や分布を明らかにすることは、輪番防除薬剤の構築に不可欠である。菅・仲川 (2000) は、1999年に島原半島を中心に長崎県内の疫病菌の分離を行い、メタラキシル耐性検定を行ったところ、分離菌株の半数以上が感受性の低下した菌 (EC<sub>50</sub>値が0.1 μg/ml以上) であることを明らかにした。しかし、市町村別の発生分布は明らかではない。

本試験では、暖地パレイショの主産地の一つである長

崎県の島原半島内17市町毎に疫病菌の採集を行い、交配型, グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ (Gpi), オートミール寒天培地上の菌糸生育, メタラキシル耐性を調査し、系統の識別と各市町毎の分離頻度について明らかにしたので報告する。

本試験を行うに当たり、貴重な菌株の分譲、多くの有益なご助言と本論文の御校閲を賜った独立行政法人国際農林水産業研究センター主任研究官加藤雅康博士、メタラキシル原体を分譲していただいた株式会社ノバルティス・アグロの関係各位、種子消毒のされていないライムギ種子を分譲していただいた北海道農業研究センター畑作研究部遺伝資源利用研究室主任研究官 (現てん菜育種研究室室長) 中司啓二氏ならびに種いもの出荷量に関する資料を提供くださった全農長崎県本部特産課の関係各位に厚く感謝の意を表す。

### 材料および方法

#### 1. 菌の採集と分離

2002年5月に数回にわたり、長崎県島原半島全域の市町の農家圃場からジャガイモ疫病罹病葉を採集し、ナイ

スタチンとアンピシリンを添加したライムギB寒天培地 (Sato and Kato, 1993) を用いて病原菌を分離し、単菌糸分離菌株を得た。病原菌は、圃場1筆から1菌株を分離し、ライムギA寒天培地 (Sato and Kato, 1993) で保存した。ライムギ寒天培地 (Caten and Jinks, 1968, 佐藤, 1995) の作成方法は、次の通りである。ライムギA寒天培地 (1 L用): 60gのライムギを水道の流水に1日浸して吸水させたあと0.3Lの蒸留水に1日浸す。浸漬液を別に移し、ライムギ粒に0.5Lの蒸留水を加え、ミキサーで磨砕したあと、50℃で3時間抽出する。ガーゼで濾過し、その濾液に浸漬液を混合し、ショ糖20g, 寒天15g, 蒸留水を加え1 Lとして高圧殺菌する。ライムギB寒天培地: ライムギA寒天培地と同様に調整するが、ライムギ粒を磨砕せずに1時間煮沸抽出する点だけ異なる。

2. 交配型

Mosa et al. (1989) に準じ、ライムギB寒天培地上で交配型既知の菌株と対峙培養を行い、卵孢子形成の有無によって交配型を決定した。供試既知菌株として、A 1型にはUS-1系統のDN308S株, A 2型にJP-1系統のTK301株 (両菌株とも加藤氏より分譲) を用いた。

3. Gpi 酵素多型

ライムギA寒天培地で18℃暗黒下1週間程度培養した菌体をピンセットでつまみ取り、滅菌した乳鉢内で蒸留水を加えて磨砕した後、遠沈 (約16,000 × g, 5分) した上清を粗酵素液とした。酵素多型は、Goodwin et al. (1995) に準じて、セルロース・アセテート膜電気泳動法で分析した。

第1表 各交配型菌株のメタラキシル耐性程度の割合

交配型	耐性菌	弱耐性菌	感受性菌	計
A 1	67 (99) <sup>1)</sup>	9 (39)	2 (7)	78 (66)
A 2	1 (1)	14 (61)	25 (93)	40 (34)
計	68 (100)	23 (100)	27 (100)	118 (100)

1) 値は菌株数を示す。( ) 内は、各列の合計に対する百分率。

4. オートミール寒天培地上の菌糸生育

Kato et al. (1992) のV-8ジュース寒天培地上での菌糸生育の調査法に準じ、ライムギA寒天培地で18℃暗黒下1週間程度培養した菌叢を直径5 mmのコルクボーラーでくり抜き、オートミール寒天培地に置床して18℃で7日間培養し、菌糸生育量を測定した。菌糸生育が15mm以上を生育良好とした。

5. メタラキシル耐性

加藤・内藤 (1999) に準じ、ライムギB寒天培地へメタラキシルを0.1, 1.0, 10ppm濃度に添加し、供試菌株の含菌寒天を置床して18℃暗黒下で7日間培養した。菌糸生育量を無添加培地上のものと比較して、EC<sub>50</sub>値を求めた。EC<sub>50</sub>値が10ppm以上を耐性菌, 同1~10ppmを弱耐性菌, 同0.1ppm以下を感受性菌とした。

結 果

1. 交配型

分離された118菌株のうち、78菌株 (66%) がA 1型, 40菌株 (34%) がA 2型に属した (第1表)。小浜町, 南串山町, 加津佐町, 口之津町, 北有馬町, 南有馬町では、A 1型だけが分離された (第2表)。

第2表 島原半島内各市町におけるジャガイモ疫病菌分離菌株の交配型の割合およびメタラキシル耐性菌の出現頻度

市町名	調査菌株数	交配型の割合		メタラキシル耐性菌の頻度		
		A 1型	A 2型	耐性	弱耐性	感受性
吾妻町	2	50	50	50	0	50
愛野町	34	76	24	65	12	24
千々石町	9	44	56	44	0	56
小浜町	15	100	0	73	27	0
南串山町	4	100	0	100	0	0
加津佐町	3	100	0	100	0	0
口之津町	4	100	0	100	0	0
南有馬町	4	100	0	100	0	0
北有馬町	9	100	0	100	0	0
西有家町	6	0	100	0	17	83
有家町	5	40	60	20	60	20
布津町	3	0	100	0	67	33
深江町	4	0	100	0	100	0
島原市	3	33	67	33	0	67
有明町	2	0	100	0	50	50
国見町	6	33	67	33	50	17
瑞穂町	5	60	40	40	20	40
合計 (菌株数)	118	66	34	58	19	23

第3表 日本におけるジャガイモ疫病菌の系統とその性質 (加藤, 2001より作成)

系統	交配型	塊茎スライス上の気中菌糸の長さ	オートミール寒天培地上の菌糸生育	酵素多型		メタラキシル耐性	病原性レース
				Gpi	ペプチダーゼ		
US-1	A 1	短	不良	86/100	92/100	感受性	0
JP-1	A 2	長	良好	100/100	96/96	感受性~耐性	1, 3, 4
A	A 1	長	不良	100/100	100/100	耐性	1, 3, 4
B	A 1	長	良好	100/100	98/98	弱耐性	1, 3, 4
C	A 1	長	不良	100/100	98/98	感受性	1, 3, 4
D	A 1	長	良好	100/100	100/100	弱耐性	?

## 2. Gpi 酵素多型

分離された全菌株のバンドパターンは、すべて移動度が100/100を示した。A 1型に属するすべての菌株のバンドパターンは、86/100のUS-1系統とは異なっていた。

## 3. オートミール寒天培地上の菌糸生育

A 1型78菌株のうち58菌株が生育不良となりGpi酵素多型の結果と合わせるとA系統(加藤, 2001)またはC系統に属した。残りの20菌株が良と判定され、B系統またはD系統に属した。A 2型は40菌株のうち38菌株が生育良と判定され、JP-1系統に属した。残りの2菌株は、ライムギA寒天培地上においても、生育が不良であった。

## 4. メタラキシル耐性

全分離菌株のうち68菌株(58%)が耐性菌、23菌株(20%)が弱耐性菌、27菌株(23%)が感受性菌であった(第1表)。分離菌株の耐性程度の違いにより交配型の割合は大きく異なり、耐性菌では99%がA 1型となったのに対し、感受性菌では93%がA 2型であった。メタラキシル耐性菌の分離頻度が高い地域では、A 1型の分離割合は高かった(第2表)。

## 考 察

我が国における疫病菌の系統は、1987年にはA 1型のUS-1系統とA 2型のJP-1系統がほぼ同じ割合で分離されていたが、その後、1993年にかけてA 1型が減少し、A 2型が増加する傾向を示していた(Kato et al., 1998)。しかし1996年に北海道で従来の系統とは異なる性質を持つA 1型が分離され(加藤・内藤, 1997)、以降新たなA 1型がその分布を広げ現在に至っている(加藤・内藤, 1999a)。これらの疫病菌の系統については、加藤(2001)によってまとめられている(第3表)。

長崎県においては、1988年から1990年にかけて分離された菌株はA 2型を示したが(Kato et al. 1998)、1998年に分離された菌株ではA 1型が全体の13%を占めた(加藤・内藤, 1999b)。今回の調査の結果、A 1型の分離頻度は66%にまで増加した。調査した菌株を加藤(2001)の分類(第3表)による系統と比較したところ、

従来のA 1型であるUS-1系統はGpiのバンドパターンが86/100であるが、今回分離されたA 1型はすべて100/100のバンドパターンを示した。従って、今回分離されたA 1型は、1990年代前半までに分布していたと考えられるUS-1系統とは異なる系統であることが明らかになった。さらに、分離されたA 1型の多くのは、メタラキシル耐性でオートミール培地上における菌糸生育が不良であったことから、A系統である可能性が示唆された。

A 1型の分布には偏りがみられ、島原半島の南部と西部で高い割合で分離された。A 1型菌の86%がメタラキシル耐性菌のため、A 1型菌の割合の高い地域では、メタラキシル耐性菌の割合も高くなった。

長崎県における新しい系統の増加の原因として、一つには北海道から購入された種いもに寄生していた疫病菌が第一次伝染源になったことが考えられる。バレイショの作付面積(九州農政局長崎統計事務所, 2003)に対する北海道産春植え用種いもの出荷量(全農長崎県本部資料)は、島原半島南~西部では多く、小浜町で1 ha 当たり44.5袋、南串山町で97.0袋、加津佐町、南有馬町、北有馬町、口之津町の4町で82.3袋となっている。一方、半島北~東部では少なく、愛野町、千々石町、吾妻町の3町で1 ha 当たり1.8袋、瑞穂町、国見町、有明町、島原市の1市3町で9.5袋、有家町、西有家町、布津町、深江町の4町で26.9袋である。つまり、北海道産種いもの使用量の多少と、A 1型分離頻度の高低には何らかの相関がある可能性が高い。二つめとして、島原半島ではA 1型とA 2型が同じ地域に存在していた(加藤・内藤, 1999b)ことから、これらの交配型間の有性生殖により新しい系統が発生し、その後、栽培地で増加していった可能性も否定できない。

ジャガイモ疫病菌は、系統によりメタラキシル耐性菌の割合や、病斑拡大速度、病斑面積、遊走子形成量などの病原性に差異があることが知られているため(加藤2001, 加藤・内藤, 1998, 1999a)、今後も発生している疫病菌の系統の調査を行うことで、経済的に適切な殺菌

剤の選定や散布時期の検討を行うことが大切である。

### 引用文献

- Caten, C. E. and J. L. Jinks (1968) Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. Can. J. Bot. 46 : 329-348.
- Goodwin, S. B., B. A. Cohen, K. L. Deahl and W. E. Fry (1994) Migration from northern Mexico as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. Phytopathology 84 : 553-558.
- Goodwin, S. B., R. E. Schneider and W. E. Fry (1995) Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans*. Plant Dis. 79 : 1181-1185.
- 加藤雅康 (2001) ジャガイモ疫病菌の系統の分布変動とその要因. 植物防疫55 : 467-470.
- 加藤雅康・内藤繁男 (1997) 北海道におけるジャガイモ疫病菌の交配型 A 1 菌の新系統の発生とその分布. 日植病報63 : 529 (講要).
- 加藤雅康・内藤繁男 (1998) ジャガイモ疫病菌新 A 1 系統と A 2 系統の圃場抵抗性品種「マチルダ」に対する感染力の比較. 日植病報64 : 582 (講要).
- 加藤雅康・内藤繁男 (1999a) 1998年に分離したジャガイモ疫病菌のメタラキシル感受性の系統間比較. 日植病報65 : 358-359 (講要).
- 加藤雅康・内藤繁男 (1999b) 第46回日本生態学会大会講演要旨集 209.
- Kato, M., N. Sato, A. A. Mosa, K. Kobayashi and A. Ogoshi (1992) Cultural features associated with mating types of *Phytophthora infestans* isolates from potato crops in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58 : 267-275.
- Kato, M., N. Sato, K. Takahashi and T. Shimanuki (1998) Yearly change of frequency and geographical distribution of A2 mating type isolates of *Phytophthora infestans* in Japan from 1987 to 1993. Ann. Phytopath. Soc. Japan 64 : 168-174.
- 九州農政局長崎統計事務所 (2003) 第49次長崎農林水産統計年報 : 54-55.
- Mosa, A. A., M. Kato, N. Sato, K. Kobayashi and A. Ogoshi (1989) Occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* on potato in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55 : 615-620.
- 佐藤章夫 (1995) ジャガイモ疫病. 作物病原菌研究技法の基礎 (大畑貫一, 荒木隆男, 木曾皓, 工藤晟, 高橋廣治編). 日本植物防疫協会 (東京), pp.88-89.
- Sato, N. and M. Kato (1993) Improvement of the selective medium and method for the isolation of *Phytophthora infestans*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 59 : 568-571.
- 菅 康弘・仲川晃生 (2000) 長崎県のジャガイモから分離した疫病菌のメタラキシル剤耐性. 九病虫研会報 46 : 27-30.

(2003年5月1日受領 ; 7月18日受理)