

千葉県におけるキュウリ褐斑病菌の数種薬剤に対する感受性

竹内妙子・久保周子・石井英夫*

(千葉県農業総合研究センター・*農業環境技術研究所)

Sensitivity of Chiba Prefecture Isolates of *Corynespora cassicola*, the Cause of Corynespora Leaf Spot on Cucumber, to Several FungicidesTaeko TAKEUCHI¹, Chikako KUBO and Hideo ISHII

摘 要

千葉県内の促成栽培及び抑制栽培のキュウリで発生したキュウリ褐斑病菌のアゾキシストロピンに対する感受性を検定したところ、促成栽培では100%、半促成栽培では76.7%、全体では86.7%が耐性菌であった。耐性菌に対するアゾキシストロピン剤の防除効果はほとんど認められなかった。次に、チオファネートメチル、ジエトフェンカルブおよびプロシミドンに対する感受性を検定した。チオファネートメチルに対しては、耐性菌が全体の90.6%を占めた。ジエトフェンカルブに対しては、感受性菌が55.9%、弱耐性菌が13.4%、中等度耐性菌が17.3%、強耐性菌が13.4%であった。プロシミドンに対しては、感受性菌が95.3%であった。ジエトフェンカルブに弱～強耐性でプロシミドン感受性または耐性の菌株に対するジエトフェンカルブ・プロシミドン剤の防除効果はジエトフェンカルブ、プロシミドンの両剤に感受性の菌株に対する効果に比べて劣った。

キュウリには様々な病害虫が発生するため、各種の薬剤を多数回散布することが必要とされている。なかでも促成栽培、半促成栽培では殺菌剤の使用頻度が高い。その原因の一つに、近年多発傾向にある褐斑病の発生がある。褐斑病にはいくつかの登録薬剤があるが、2001年にキュウリに登録されたアゾキシストロピン剤は防除効果が高く、主要な薬剤の一つとして使用されてきた。しかし、最近、防除効果が低下している事例がみられ、薬剤耐性菌の発生が懸念された。一方、ジエトフェンカルブ・プロシミドン剤、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル剤は灰色かび病の防除薬剤として1990年にキュウリに登録された。その後、褐斑病にも有効であることから適用拡大され、本県でも長く使用されている。そこで、本県で発生しているキュウリ褐斑病菌のこれら薬剤成分に対する感受性を検定した。さらに、感受性の異なる菌株に対するアゾキ

シストロピン剤およびジエトフェンカルブ・プロシミドン剤の防除効果を明らかにした。

病原菌の採集、薬剤散布歴の調査等にご協力いただいた各農林振興センターの担当者の方々に厚くお礼申し上げます。

材料および方法

1. 供試菌

旭市、茂原市、君津市及び野栄町の促成栽培キュウリ10圃場と柏市、船橋市、佐倉市、成田市、木更津市、君津市、八日市場市、一宮町及び千倉町の抑制栽培キュウリ22圃場から、促成栽培では2004年4～6月に、抑制栽培では2004年10～11月に、1圃場当たり3～5枚の罹病葉を採集し、常法に従って褐斑病菌を単孢子分離した。

アゾキシストロピンに対する感受性検定には1圃場当たり2～3菌株を供試し、その他の薬剤に対する感

1 Address : Chiba Prefectural Agriculture Research Center, Daizenno-cho 808, Midori-ku, Chiba-shi 266-0006, Japan

2006年5月1日受領

2006年7月20日登載決定

受性検定には1圃場当たり3～5菌株を供試した。アゾキシストロピン感受性菌の基準菌株としてC2-6(佐賀県農業研究センターより分譲)を用いた。

2. 検定方法

アゾキシストロピンに対する耐性の遺伝子診断にはIshii et al. (2001)の方法を用いた。電子レンジを用いた簡易な方法で培養菌体からDNAを抽出した後(高垣・相原, 2003), PCR法によってミトコンドリアDNAのチトクロームb領域を増幅した。得られたPCR産物を37℃で1晩, 制限酵素 *Ita* で処理し, 1.5%アガロースゲルで電気泳動した後, エチジウムブロマイドで染色し紫外線照射によりDNA断片を確認した。PCR産物が *Ita* で切断されるものを耐性菌と判断した。

チオファネートメチル, ジエトフェンカルブ, プロシミドンに対する感受性検定は希釈平板法によった。チオファネートメチル(トップジンM水和剤, 有効成分70%), ジエトフェンカルブ(パウミル水和剤, 有効成分25%), プロシミドン(スミレックス水和剤, 有効成分50%)を有効成分で0, 1, 10, 100 µg/ml含有するPSA培地に直径4mmのコルクポラーで打ち抜いた菌そう片を置床し, 28℃で3日間培養後に菌糸の伸長量を測定し, 感受性の程度を判定した。

3. 防除効果試験

耐性菌に対するアゾキシストロピン剤(アミスター20フロアブル, 有効成分20%)の防除効果を明らかにするために, 旭市, 茂原市, 君津市から採集されたNo.C4-5, No.13-3-1, No.15-1の計3菌株を供試して試験を行った。対照の感受性菌としてC2-6を用いた。2004年9月30日にアゾキシストロピン剤2,000倍液を6～7葉期のキュウリ(品種:ハイグリーン)に散布し, 10月1日に, 供試菌の分生子懸濁液(10⁴～10⁵個/ml)15ml/株を葉の全面に噴霧接種した。10月14日に中位葉5枚の発病を程度別に調査し, 次式により発病度と防除価を算出した。1区3株とした。

発病度 = (程度別指数 × 程度別葉数) / (4 × 調査葉数) × 100 .

0 : 無発病, 1 : 病斑面積5%未満, 2 : 同5%以

上25%未満, 3 : 同25%以上50%未満, 4 : 50%以上

防除価 = (無散布区発病度 - 散布区発病度) / 無散布区発病度 × 100 .

ジエトフェンカルブ及びプロシミドンに対して感受性を異にする, 第4表に示す8菌株を用いてジエトフェンカルブ・プロシミドン剤(スミブレンド水和剤, 有効成分12.5%・37.5%)の防除効果を検討した。2005年6月3日に3葉期のキュウリ(品種:南極1号)にジエトフェンカルブ・プロシミドン剤1,500倍液を散布し, 6月7日に供試菌の分生子懸濁液(1～5 × 10⁴ 個/ml)10ml/株を葉の全面に噴霧接種した。6月17日に接種葉の発病程度を上記同様に調査した。1区3株2反復とした。

結 果

1. アゾキシストロピン耐性菌の発生と同剤の防除効果

キュウリ褐斑病菌のアゾキシストロピンに対する耐性を遺伝子診断したところ, チトクロームb遺伝子のPCR産物のほとんどが制限酵素 *Ita* で切断される耐性菌と, *Ita* で切断されない菌が認められた(第1図)。促成栽培では供試した32菌株全てが, 抑制栽培では供試した43菌株の76.7%がアゾキシストロピン耐性菌で, 全体では86.7%が耐性菌であった。ストロビルリン系剤(アゾキシストロピン, クレソキシムメチル)の1作あたりの散布回数は促成栽培で平均2.8回, 抑制栽培で0.9回であった。最多散布回数は旭市の7回で, この地域で多用される傾向があった(第1表)。感受性菌はこれらの薬剤の散布回数が1作あたり1回以下の成田市, 佐倉市, 木更津市, 八日市場市の計6圃場で確認され, 感受性菌と耐性菌が混在している圃場も認められた(第1図, 第2図)。

キュウリ苗にアゾキシストロピン剤を散布し, 1日後に耐性菌または感受性菌を接種してその防除効果を調査したところ, 対照とした感受性菌C2-6に対する防除価は93.3と高い防除効果を示した。一方, 耐性菌No.C4-5, No.13-3-1, No.15-1に対する防除価は17.6, 0,

第1表 作型別のストロビルリン系剤散布回数とアゾキシストロピン耐性菌の発生状況

作 型	散布回数 ^{a)}	供試菌株数	耐性菌株率(%)	採集地域
促成栽培	2.8 (0～7)	32	100	旭市・茂原市・君津市・野栄町
抑制栽培	0.9 (0～5)	43	76.7	佐倉市・君津市・八日市場市他

a) 平均値(最少数～最多数)。

5.6と低く、防除効果はほとんど認められなかった(第2表)

2. チオファネートメチル, ジエトフェンカルブおよびプロシミドンに対する感受性

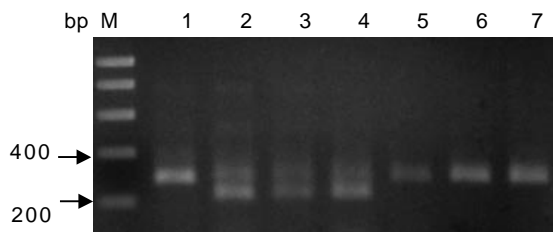
キュウリ褐斑病菌のチオファネートメチルに対する感受性を検定したところ, 10 µg/ml含有培地で生育しない感受性菌と100 µg/mlでも旺盛に生育する耐性菌が確認された(第3図)。促成栽培では全てが, 抑制栽培では85.1%が耐性菌で, 全体では90.6%が耐性菌であった(第3表)。

ジエトフェンカルブに対する感受性を検定したところ, 1 µg/ml含有培地でほとんど生育しない感受性菌, 1 µg/mlではかなり生育するが10 µg/mlでは生育しない弱耐性菌, 10 µg/mlでは生育するが100 µg/mlでは生育しない中等度耐性菌, 100 µg/mlでも旺盛に生育する強耐性菌が確認された(第3図)。促成栽培では

感受性菌が76.1%, 弱耐性菌13.0%, 中等度耐性菌が10.9%で, 強耐性菌は認められなかった。一方, 抑制栽培では感受性菌が44.4%, 弱耐性菌が13.6%, 中等度耐性菌が21.0%で, 強耐性菌も21.0%認められた。全体では感受性菌が55.9%, 弱耐性菌が13.4%, 中等度耐性菌が17.3%, 強耐性菌が13.4%であった(第3表)。

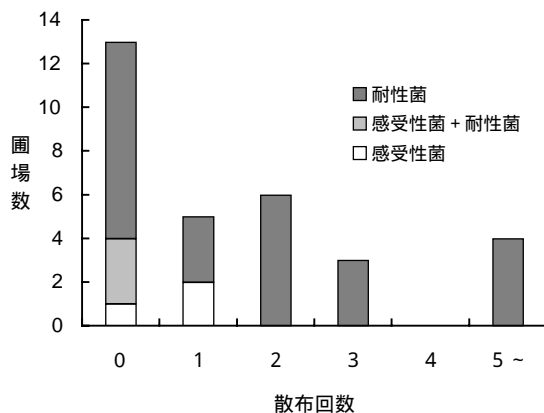
プロシミドンに対する感受性を検定したところ, 10~100 µg/ml含有培地でかなり生育が抑制される感受性菌(S)と100 µg/mlでも旺盛に生育する耐性菌(R)が存在した(第3図)。全体の95.3%が感受性菌であった(第3表)。

チオファネートメチル・プロシミドン・ジエトフェンカルブに対する感受性の組み合わせでみると, 野生型であるチオファネートメチル感受性・プロシミドン感受性・ジエトフェンカルブ強耐性(非感受性)の菌株は9.4%であった。薬剤耐性変異株ではチオファネートメチル耐性・ジエトフェンカルブ感受性・プロシ



第1図 制限酵素Ita で処理したPCR産物の電気泳動パターン

- M Smart ladder (0.2-10kbp)
- 1 感受性菌 C2-6 (佐賀県)
- 2 耐性菌 No.26-2-1 (一宮町A圃場)
- 3 耐性菌 No.26-2-2 (一宮町A圃場)
- 4 耐性菌 No.24-2-1 (成田市B圃場)
- 5 感受性菌 No.24-2-2 (成田市B圃場)
- 6 感受性菌 No.31-1 (木更津市C圃場)
- 7 感受性菌 No.31-2 (木更津市C圃場)



第2図 ストロピリン系剤の散布回数とアゾキシストロピン耐性菌の発生

第2表 アゾキシストロピン耐性菌に対する同剤の防除効果

供試菌(No.)	採集場所	発病度 ^{a)}		防除価 ^{b)}
		散布	無散布	
C4-5	旭市	23.3	28.3	17.6
13-3-1	茂原市	68.3	56.7	0
15-1	君津市	28.3	30.0	5.6
C2-6	佐賀県 (感受性菌)	1.7	25.0	93.3

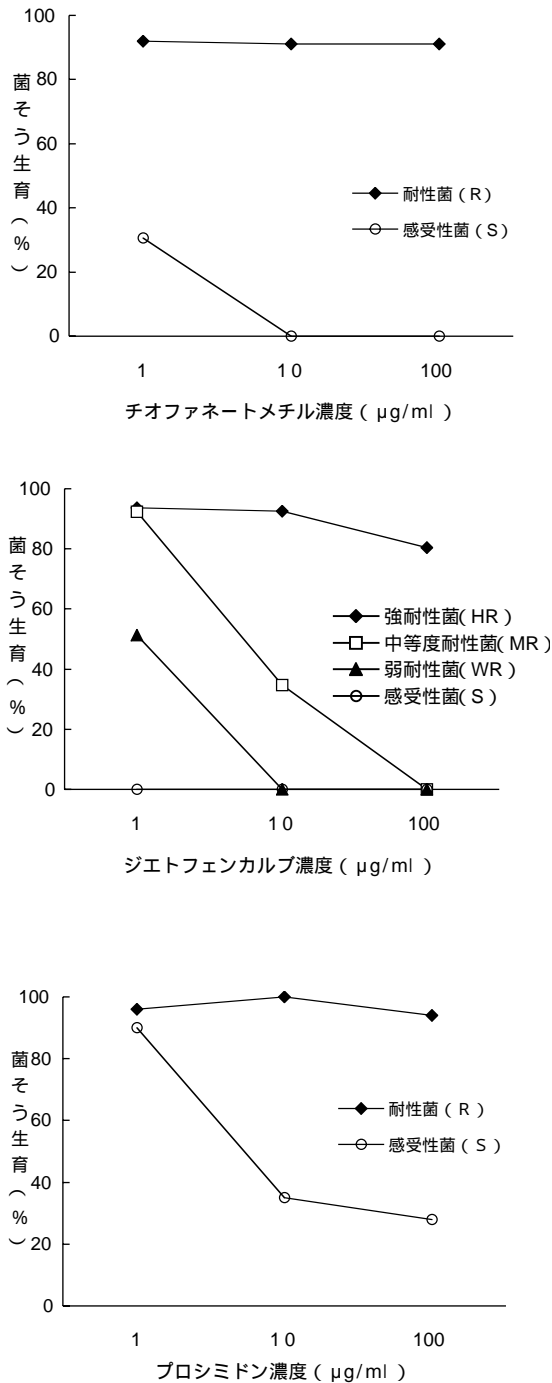
a) 発病度 = (程度別指数 × 程度別葉数) / (4 × 調査葉数) × 100 .

0 : 無発病, 1 : 病斑面積5%未満, 2 : 5以上25%未満,

3 : 25以上50%未満, 4 : 5%以上

b) 防除価 = (無散布区発病度 - 散布区発病度) / 無散布区発病度 × 100 .

ミドン感受性の菌株が52.0%で最も多く、その他に第3表に示す5つの表現型が認められた。



第3図 キュウリ褐斑病菌のチオファネートメチル、ジエトフェンカルブおよびプロシミドンに対する感受性

3. ジエトフェンカルブ・プロシミドン剤の防除効果

キュウリ苗にジエトフェンカルブ・プロシミドン剤を散布し、4日後にジエトフェンカルブおよびプロシミドンに対して感受性の異なる8菌株をそれぞれ接種し、ジエトフェンカルブ・プロシミドン剤の防除効果を調査した結果を第4表に示した。ジエトフェンカルブ、プロシミドンの両剤に感受性のNo.22-1に対する防除価が55.6であったのに対し、ジエトフェンカルブ弱耐性、プロシミドン感受性のNo.27-3に対する防除価は42.1とやや劣った。ジエトフェンカルブ中等度耐性、プロシミドン感受性のNo.25-1-5, No.26-2-1には39.5および29.0、ジエトフェンカルブ中等度耐性、プロシミドン耐性のNo.C4-5, No.25-2-3には38.9, 14.8と劣り、ジエトフェンカルブ強耐性、プロシミドン感受性のNo.24-2-1, No.28-2-1には3.6および20.8と明らかに防除効果が劣った。

考察

アゾキシストロピン剤はキュウリ褐斑病に対して高い防除効果が認められたため、その効果を期待して、一部の地域では多数回散布された事例もあったが、平均散布回数は促成栽培では2.8回、抑制栽培では0.9回であり、全く使用していない圃場も多かった。しかし、促成栽培では供試菌株の全てが、抑制栽培でも70%以上が耐性菌で、ストロビルリン系剤を1作当たり2回以上散布した圃場では全てが耐性菌であった。また、耐性菌をキュウリに接種し、アゾキシストロピン剤を散布したところ、防除効果はほとんど認められなかった。これらの結果から、千葉県内の多くのほ場で本剤の防除効果は期待できないと考えられた。アゾキシストロピン剤は耐性菌の出現を招きやすい薬剤で、キュウリ褐斑病でも耐性菌が2001年に既に確認されている(石井ら, 2002; 伊達ら, 2004)。千葉県においても耐性菌が徐々に蔓延、定着したため、当作にストロビルリン系剤を使用しなかった圃場においても耐性菌が検出されたものと思われる。アゾキシストロピン耐性の検定はストロビルリン系剤耐性の遺伝子診断法として報告しているIshii et al. (2001)の方法に従ったが、耐性菌の場合も制限酵素で消化されたバンドのほか、消化されずに残ったバンドが薄く認められた。その原因として、増幅された遺伝子の中に耐性変異型DNAと正常型DNAが混在するヘテロプラスミーの状態(石井, 2003)になっていることが考えられた。

ジエトフェンカルブはベンズイミダゾール系剤(チオファネートメチルおよびベノミル)の負相関剤として開発された薬剤で、混合剤のジエトフェンカルブ・プロシミドン剤、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル剤として市販されている。これらの薬剤成分であるチオファネートメチル、ジエトフェンカルブおよびプロシミドンに対する感受性を検討したところ、野生型感受性菌を含む7つの表現型に分かれた。そのうち、野生型の褐斑病菌は9.4%と少なかった。作型や地域、個々の圃場によって様々な薬剤淘汰圧を受けた結果、それぞれ異なった薬剤耐性変異株が出現したと考えられる。

褐斑病菌のプロシミドンに対する感受性は低く(狭間・佐藤, 1996), 野生型感受性菌でも100 µg/ml含有培地で生育した。このことから、本来、プロシミドン

剤の防除効果は低いと考えられる。実際、ジエトフェンカルブ強耐性、プロシミドン感受性の菌株に対するジエトフェンカルブ・プロシミドン剤の防除効果は劣った。

今回、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチルの防除効果は検討していないが、伊達ら(2004)によるとチオファネートメチル感受性・ジエトフェンカルブ耐性菌およびチオファネートメチル耐性・ジエトフェンカルブ感受性菌に対する防除効果は高かったが、チオファネートメチル、ジエトフェンカルブの両剤に耐性の菌に対する防除効果は低かった。

本試験では、ジエトフェンカルブ・プロシミドン剤、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル剤の両剤ともに防除効果が期待できない、チオファネートメチル耐性・ジエトフェンカルブ強耐性・プロシミドン耐

第3表 チオファネートメチル、ジエトフェンカルブおよびプロシミドンに対して感受性を異にしたキュウリ褐斑病菌の発生状況

チオファネートメチル	薬剤感受性 ^{a)}		菌株数			構成比(%)
	ジエトフェンカルブ	プロシミドン	促成栽培	抑制栽培	合計	
S	HR	S	0	12	12	9.4
R	S	S	33	33	66	52.0
R	S	R	2	3	5	3.9
R	WR	S	6	11	17	13.4
R	MR	S	4	17	21	16.5
R	MR	R	1	0	1	0.8
R	HR	S	0	5	5	3.9

a) S: 感受性, R: 耐性, WR: 弱耐性, MR: 中等度耐性, HR: 強耐性

第4表 薬剤感受性の異なる数種菌株に対するジエトフェンカルブ・プロシミドン剤の防除効果

供試菌(No.)	採集場所	薬剤感受性 ^{a)}		発病度 ^{b)}		防除価 ^{c)}
		ジエトフェンカルブ	プロシミドン	散布	無散布	
22-1	成田市	S	S	33.3	75.0	55.6
27-3	千倉町	WR	S	22.2	36.1	42.1
25-1-5	佐倉市	MR	S	36.1	59.7	39.5
26-2-1	一宮町	MR	S	30.6	43.1	29.0
C4-5	旭市	MR	R	15.3	25.0	38.9
25-2-3	佐倉市	MR	R	31.9	37.5	14.8
24-2-1	成田市	HR	S	37.5	38.9	3.6
28-2-1	八日市場市	HR	S	26.4	33.3	20.8

a) S: 感受性, R: 耐性, WR: 弱耐性, MR: 中等度耐性, HR: 強耐性

b) 発病度 = (程度別指数 × 程度別葉数) / (4 × 調査葉数) × 100.

0: 無発病, 1: 病斑面積5%未満, 2: 5以上25%未満,

3: 25以上50%未満, 4: 5%以上

c) 防除価 = (無散布区発病度 - 散布区発病度) / 無散布区発病度 × 100.

性の菌株は確認されなかった。しかし、長浜(2006)は北海道においてこの様な菌株を見いだしている。これらのことから、ジエトフェンカルブ・プロシミドン剤、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル剤の使用には十分な注意が必要である。

キュウリ褐斑病は多湿条件のハウスで蔓延しやすい。窒素過多や肥料切れは発病を助長する。また、病原菌は被害残さや資材に付着して圃場に残り、次作の伝染源となる。これらの発生条件をできるだけ回避し、褐斑病の発生を抑制した上で有効薬剤を適切に使用することが、薬剤耐性菌の発生を抑制する上でも、経営

的、環境保全の見地からも重要である。

引用文献

- 伊達寛敬ら(2004)日植病報 70:10-13.
狭間 渉・佐藤通浩(1996)九病虫研報 42:26-30.
石井英夫(2003)北日本病虫研報 54:1-6.
Ishii, H. et al. (2001) Phytopathology 91:1166-1171.
石井英夫ら(2002)日植病報 68:74.
長浜 恵(2006)日植病報 72:87.
高垣真喜一・相原 穂(2003)第13回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨 49-57.