

イチゴ炭疽病菌の薬剤感受性検定法と耐性菌の発生状況

佐賀県農業試験研究センター ^{いな}稲 ^だ田 ^{みのる}稔

はじめに

Glomerella cingulata (不完全世代: *Colletotrichum gloeosporioides*) によるイチゴ炭疽病は、苗や本圃株に立枯れを起し、定植苗の不足や減収を招くため、防除上の重要病害となっている。降雨によって伝染する本病に対し、雨よけ育苗は発病抑制に有効であるが、完全に抑えることは困難であり、薬剤防除を欠かすことはできない(稲田ら, 2005)。また、台風の影響が多く雨よけ育苗の普及が進んでいない九州地域では、薬剤防除が防除対策の中心となっている。

効果的な薬剤防除を行ううえで、病原菌の薬剤感受性を把握することは重要である。筆者らは、イチゴ炭疽病菌の主要薬剤に対する感受性を調査し、有効な薬剤防除体系を現地に提示してきた。

本稿では、ストロビルリン系剤、ベンズイミダゾール系剤およびジエトフェンカルブ剤の感受性検定法を紹介するとともに、佐賀県および他地域における耐性菌の発生状況について述べたい。今回の内容が各イチゴ生産における安定栽培の一助になれば幸いである。

I 感受性検定法

1 ストロビルリン系剤 (QoI)

ストロビルリン系 (以下, QoI) 剤は糸状菌のチトクローム電子伝達系に作用し、菌の呼吸を阻害して活性を示す。本系統剤であるアゾキシストロピン水和剤 (商品名: アミスター 20 フロアブル) は 1998 年に農薬登録され、イチゴ炭疽病に高い効果を示すため、育苗期の基幹薬剤として広く使用されてきたが、2003 年に佐賀県で耐性菌の発生が初めて確認された(稲田ら, 2008)。

本病原菌の QoI 剤耐性は、苗を用いた生物検定法、遺伝子診断法、寒天希釈平板法により判別可能であり、状況に応じて最適な方法を選択する。なお、詳細については、「植物病原菌の薬剤耐性菌検定マニュアル II : p. 96 ~ 99」((社)日本植物防疫協会)を参照していただき

たい。

(1) 生物検定

アゾキシストロピン水和剤 2,000 倍散布区と無散布区を設定する。ポット栽培の苗令がそろったイチゴ苗に薬液を十分量散布し、風乾後、分生子懸濁液 ($10^4 \sim 5$ 個/ml) (グルコース加用ジャガイモ煎汁液体培地で 25°C, 7 日程度振とう培養し、二重ガーゼで菌糸を除去後、滅菌水で濃度を調整) を株全体に噴霧接種する。25°C で 24 ~ 48 時間温室に保った後、ハウス内または露地圃場で管理する。接種 5 ~ 10 日後に葉に汚斑状の小黒点病斑が現れるので、上位 3 複葉の 9 小葉に形成された病斑数をそれぞれ調査し、下記の基準に従って発病度を算出する。筆者らの試験によるアゾキシストロピン水和剤の防除価は、感受性菌で 72 ~ 100, 耐性菌で 0 ~ 35 であり、容易に感受性を判定できる。

小葉の発病指数 0 : 発病なし, 1 : 病斑数が 1 ~ 5 個, 2 : 病斑数が 6 ~ 25 個, 3 : 病斑数が 26 ~ 50 個, 4 : 病斑数が 51 個以上

発病度 = Σ (発病程度別小葉数 × 指数) / (調査小葉数 × 4) × 100

(2) 遺伝子診断

QoI 剤耐性のイチゴ炭疽病菌についても、キュウリベと病菌などと同様に、チトクローム *b* 遺伝子に変異が認められるため、Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment-Length Polymorphism (PCR-RFLP) による遺伝子診断法が適用できる。

検定菌株を PDA 平板培地で培養して生じた気中菌糸を電子レンジで 6 分間処理した後、キット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit, Germany など) を用いて DNA を抽出し、センスプライマー GCCBF1 (5'-TTTCTTGGGTTATGTTTACCTTA-3') およびアンチセンスプライマー RSCBR2 (5'-AACAAATATCTTGTC CAATTCATGG-3') (ISHII et al., 2001) を用いて PCR [94°C : 2 分 → (94°C : 30 秒 → 53°C : 1 分 → 72°C : 1 分) × 40 サイクル → 72°C : 8.5 分] を行う。耐性菌のチトクローム *b* 遺伝子の変異部位 (コドン 143 ~ 144 : GCTGC) を認識し切断する制限酵素 *ItaI* (または *Fnu4HI*) を処理し、2% アガロースゲルでの電気泳動、エチジウムブロマイド染色を行い、紫外線照射下で観察する。感受性菌では制限酵素処理の有無にかかわらず

Testing Methods for Fungicides Sensitivities and Distribution of Resistant Strains of *Glomerella cingulata*, the causal fungus of Strawberry Anthracnose. By Minoru INADA

(キーワード: *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, イチゴ, 炭疽病, 薬剤, 耐性菌, 感受性検定)

100 bp 付近に1本のバンドが認められるのに対し、耐性菌では制限酵素処理により PCR 産物が切断され、50 bp 付近にバンドが現れる (稲田ら, 2008)。

なお、近年、チトクローム *b* 遺伝子に耐性変異型と野生型の配列が混在 (ヘテロプラスミー) し、感受性の判定が困難な事例が報告 (石井ら, 未発表) されているので注意が必要である。

(3) 寒天希釈平板法

QoI 剤のイチゴ炭疽病菌に対する人工培地上での菌糸生育抑制効果は低く (Ishii et al., 2007), 通常の寒天希釈平板法による耐性菌の検出は難しい。これは本剤の作用により菌の電子伝達系内のバイパス呼吸経路 (シアン耐性呼吸) が活性化し、菌糸生育抑制効果が見かけ上低下するためであるが、本呼吸を阻害する salicylhydroxamic acid (以下, SHAM) を培地に添加することでアゾキシストロビン剤の感受性検定が可能となる。

基本培地には PDA 培地を用い、溶解後 50 ~ 60℃ に冷ましてから SHAM (Sigma-Aldrich) およびアゾキシストロビン剤をそれぞれ 1,000 ppm および 100 ppm になるように加用する。その後、直径 90 mm のシャーレに約 15 ml を流し込み、クリーンベンチ内などで培地表面の水分を乾燥させる。あらかじめ PDA 平板培地で 25℃, 7日程度前培養し、直径 4 mm のコルクボーラーで打ち抜いた供試菌株の菌そうディスクを、菌そう面が接するように検定培地に置床し、25℃で4日間培養後、菌糸生育の有無を調査する (図-1, 口絵①)。耐性菌の

菌そう直径は 20 mm 以下であり、1枚のシャーレで 10 菌株程度の検定が可能である。なお、対照として、SHAM1,000 ppm 添加 PDA 平板培地での菌糸伸長を比較すると、より確実に感受性を判定できる。

2 ベンズイミダゾール系剤, ジエトフェンカルブ剤

ベンズイミダゾール (BZ) 系剤耐性は、苗を用いた生物検定法、または寒天希釈平板法により判別可能である。また、BZ 系剤耐性菌に特異的に活性を示すジエトフェンカルブ (D) とチオファネートメチル (T) との混合剤 (商品名: ゲッター水和剤, 以下, DT 水和剤) についても同様に実施できる。

(1) 生物検定

BZ 系剤としてベノミル水和剤 (商品名: ベノミル水和剤, 以下, B 剤) 500 倍またはチオファネートメチル水和剤 (トップジン M 水和剤, 以下 T 剤) 1,000 倍, DT 水和剤 1,000 倍を供試し、前述のストロビルリン系剤と同様に実施する。BZ 系の両剤は感受性菌には高い防除効果を示すが、耐性菌に対しては防除効果が著しく低下する。また、DT 水和剤は両成分のいずれかに感受性を示す系統 (RS または SR 菌) に対し高い防除効果 (筆者の試験での防除値は 70 以上) を示すものの、両成分に耐性を示す系統 (RR 菌) に対しては効果の低下 (同防除値: 46) が認められる (稲田ら 2009)。

(2) 寒天希釈平板法

前述のストロビルリン系剤での試験と同様に、PDA 平板培地で前培養しコルクボーラーで打ち抜いた供試菌株の菌そうディスクを、B 剤および D 剤をそれぞれ 10 ppm になるよう添加 (B 剤はオートクレーブ前に添加) した PDA 平板培地に、菌そう面が培地に接するように置床する (D 剤は市販されていないため製造メーカーからの入手が必要)。25℃で3日間培養後、培地上に 1 mm 以上の菌そう生育が認められる場合を耐性 (R), 菌そうの長さが 1 mm 未満、または生育が認められない場合を感受性 (S) と判定する (口絵②)。結果の取りまとめにあたっては、B 剤と D 剤に対する感受性を組合せ RS, SR, RR として表記する。なお、イチゴ炭疽病菌には *Colletotrichum acutatum* が含まれるが、本病原菌の BZ 系剤および D 剤に対する感受性ははもとも低いため、RR 菌が検出された場合は、種を確認する必要がある。

II 耐性菌の発生状況

1 ストロビルリン系剤

佐賀県内から採取したイチゴ炭疽病菌のストロビルリン系 (QoI) 剤に対する感受性分布を把握するため、

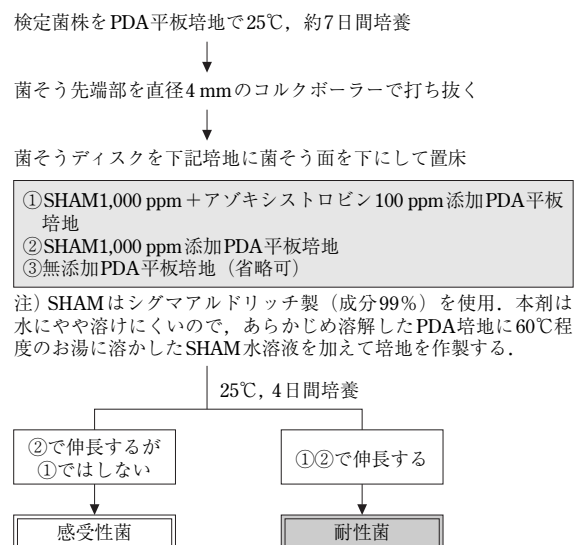


図-1 寒天希釈平板法によるイチゴ炭疽病菌のアゾキシストロビン剤耐性検定法

SHAM1,000 ppm 添加を基本とした培地を用いて、アゾキシストロビン剤の最小生育阻止濃度 (MIC 値) を調査した結果、供試菌株は MIC0.19 ~ 3.12 ppm と 3,200 ppm 以上の二つのグループに分かれた (図-2)。両グループの菌株について、イチゴ苗を用いた生物検定を行ったところ、MIC 値が低いグループは QoI 剤感受性菌、高いグループは耐性菌であることが確認された (稲田ら, 2010)。

2003 年の初確認以降、佐賀県における耐性菌率は高く推移しており、本剤の使用を中止した 2006 年以降も低下傾向は認められていない (表-1)。また、本耐性菌は佐賀県以外に茨城県 (菊池ら, 2010)、奈良県 (平山ら, 2008)、徳島県 (中野ら, 2006)、香川県 (米澤, 2010)、鹿児島県 (尾松ら, 2007) でも確認されており全国に拡大している。

耐性菌に対する QoI 剤の防除効果はほとんど認められないため、発生圃場では本系統剤の使用を中止し、他系統剤に切り替えるべきである。

2 ベンズイミダゾール系剤, ジエトフェンカルブ剤

楠ら (1992) は 1992 年に香川県内においてベンズイミダゾール (BZ) 系剤耐性イチゴ炭疽病菌を初めて確認した。その後、各地で本系統剤耐性菌の発生が確認され全国的に分布が認められている。

佐賀県ではアゾキシストロビン剤耐性菌の発生以降、DT 水和剤が使用されるようになったが、果菜類灰色かび病菌 (竹内, 1987) やキュウリ褐斑病菌 (伊達ら, 2004) では、既に本剤の両成分に対する耐性菌の発生が

報告されていたため、県内から採取したイチゴ炭疽病菌について、ベノミル (B) 剤および D 剤に対する 50% 生育阻止濃度 (以下、EC₅₀ 値) の相互関係を調査した。その結果、図-3 に示すように、供試した 104 菌株は、70 菌株が対 B 剤値 1,600 ppm 以上で対 D 剤値 0.1 ppm 以下 (図-3 中の RS)、19 菌株が対 B 剤値 0.1 ppm 以下で対 D 剤値 100 ~ 1,600 ppm 以上 (同: SR)、残り 15 菌株が対 B 剤値 138 ~ 756 ppm で対 D 剤値 4 ~ 159 ppm (同: RR) の三グループに分類された。各菌株とも T 剤に対しては B 剤と同様の感受性を示した。

さらに、2003 ~ 07 年に佐賀県内から採取した菌株について、両剤に対する感受性を前述の寒天希釈平板法で

表-1 佐賀県におけるアゾキシストロビン剤耐性イチゴ炭疽病菌の発生推移

| 年度 | 調査圃場数 | 供試菌株数 | 耐性菌率 ^{a)} | |
|------------|-------|-------|--------------------|------|
| | | | 圃場 | 株 % |
| 1996, 1997 | 10 | 14 | | 0 |
| 2003 | 36 | 228 | | 55.7 |
| 2004 | 35 | 173 | | 90.8 |
| 2005 | 32 | 179 | | 82.1 |
| 2006 | 29 | 179 | | 88.3 |
| 2007 | 40 | 394 | | 88.3 |
| 2008 | 6 | 41 | | 80.5 |
| 2009 | 4 | 37 | | 91.9 |

a) SHAM1,000 ppm 添加 PDA 平板培地およびアゾキシストロビン剤 100 ppm + SHAM1,000 ppm 添加 PDA 平板培地にて、25℃、4 日後に菌糸生育が認められた菌株の割合。

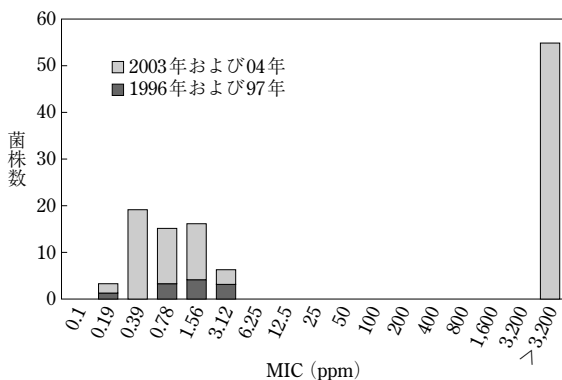


図-2 イチゴ炭疽病菌に対する SHAM 添加条件下でのアゾキシストロビン剤の MIC 値の分布

供試菌株数: 113 菌株 (1996 年および 97 年: 11 菌株, 2003 年および 04 年: 102 菌株)。各菌株に対する MIC 値は SHAM1,000 ppm とともにアゾキシストロビン剤を添加した PDA 平板培地での 25℃、4 日間培養後の菌糸生育の有無により判定。

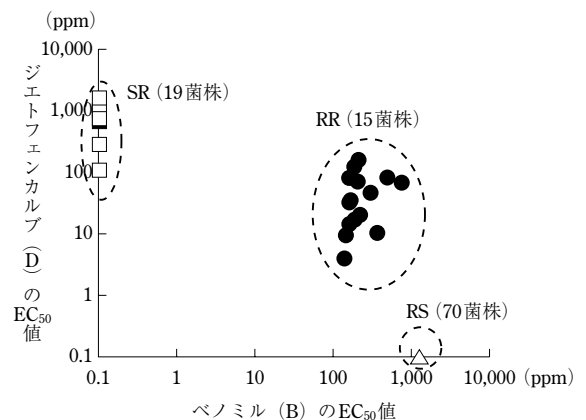


図-3 イチゴ炭疽病菌に対するベノミルとジエトフェンカルブの EC₅₀ 値の相互関係

△: RS 菌, □: SR 菌, ●: RR 菌, EC₅₀ 値が 1,600 ppm 以上の場合には 1,600 ppm, 0.1 ppm 以下の場合には 0.1 ppm として表示。

表-2 佐賀県におけるイチゴ炭疽病菌のベノミル剤およびジエトフェンカルブ剤感受性

| 年度 | 調査圃場数 | 菌株数 | 菌株率 | | |
|------|-------|-----|------------------|-----|-----|
| | | | RS ^{a)} | SR | RR |
| | 圃場 | 菌株 | % | % | % |
| 2003 | 37 | 228 | 90.4 | 9.6 | 0 |
| 2004 | 30 | 173 | 95.4 | 4.6 | 0 |
| 2005 | 31 | 179 | 96.1 | 0 | 3.9 |
| 2006 | 28 | 179 | 89.4 | 3.9 | 7.8 |
| 2007 | 39 | 394 | 91.1 | 4.6 | 4.3 |

a) ベノミル 10 ppm およびジエトフェンカルブ 10 ppm 添加 PDA 平板培地における 25℃, 3 日間培養後の菌糸伸長の有無により判定。S: 感受性, R: 耐性, 両剤に対する感受性を組合せて表記。

調査した結果、全体の約 9 割が B 剤に耐性で D 剤に感受性の RS 菌であったが、05 年に両剤に耐性の RR 菌が 3.9% と初めて検出され、それ以降も低率ながら継続して検出された（表-2、データは未掲載だが 2008 年および 09 年にも検出）。同様の両剤耐性菌は愛媛県においても確認されており（奈尾, 2005）、他地域においても発生している可能性がある。

佐賀県で検出した RR 菌に対し、DT 水和剤はある程度の防除効果を示すが、今後、より感受性が低下した系統が発生する可能性があるため注意が必要である。

おわりに

薬剤による防除効果を安定的に維持するには、耐性菌の発生、まん延を抑えることが重要である。現在、佐賀県では、アゾキシストロピン水和剤の使用を中止しているが、ジエトフェンカルブ・チオフアナートメチル水和

剤についても、4～9月の育苗期間中における使用を3回以内にとどめ、他系統薬剤を組み入れたローテーションを行うよう指導している。今後、新たな耐性菌の発生を抑えるには、他系統剤によるローテーションはもちろんのこと、使用時期や回数など、薬剤ごとの耐性菌発生リスクを考慮した防除体系の組立てが必要である。

さらに、これら主要薬剤に対する感受性を定期的に調査し、耐性菌の有無や発生程度を把握することが重要である。イチゴ炭疽病の場合、感染から立枯症状を示すまでに約1か月程度を要し、また、育苗期間中に複数の薬剤を使用するため、農家自身が個々の薬剤の防除効果を把握することが難しい。そのため、結果的に防除効果が低下した薬剤が継続使用され、耐性菌密度の増加を引き起こし、被害の拡大につながりやすい。

今やイチゴ産地にとって、イチゴ炭疽病の防除対策は重要な課題である。本病による被害を抑え安定生産を図るには、県や農協等の関係機関が耐性菌の発生状況を調査し、効果的な薬剤防除体系を農家に提示する必要があると考えられる。

引用文献

- 1) 伊達寛敬ら (2004): 日植病報 70: 10～13.
- 2) 平山喜彦ら (2008): 関西病虫研報 50: 93～94.
- 3) 稲田 稔ら (2005): 九病虫研会報 51: 15～20.
- 4) ———ら (2008): 日植病報 74: 114～117.
- 5) ———ら (2009): 九病虫研会報 55: 31～36.
- 6) ———ら (2010): 日植病報 76: 1～6.
- 7) Ishii, H. et al. (2001): Phytopathology 91: 1166～1171.
- 8) ——— et al. (2007): ibid. 97: 1458～1466.
- 9) 菊池麻里ら (2010): 茨城県農総七園研報 17: 35～42.
- 10) 楠 幹生ら (1992): 香川農試研報 43: 29～35.
- 11) 中野理子ら (2006): 四国植防研報 41: 49 (講要).
- 12) 奈尾雅浩 (2005): 愛媛農試研報 39: 50～59.
- 13) 尾松直志ら (2007): 九病虫研報 53: 128 (講要).
- 14) 竹内妙子 (1987): 千葉農試特報 14: 1～75.
- 15) 米澤晃子 (2010): 香川農試研報 61: 21～27.

新しく登録された農薬 (22.10.1～10.31)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、対象作物：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、適用作物、適用雑草等を記載。（登録番号：22791～22803）種類名に下線付きは新規成分。※は新規登録の内容。

「殺虫剤」

●ピリフルキナゾン水和剤

- 22797: コルト顆粒水和剤（日本農業）10/10/20
 22798: クミアイコルト顆粒水和剤（クミアイ化学工業）10/10/20
 ピリフルキナゾン：20.0%
 かんきつ：アブラムシ類、チャノキイロアザミウマ、コナカイガラムシ類、ヤノネカイガラムシ、アカマルカイガラムシ：収穫前日まで
 りんご：アブラムシ類：収穫前日まで
 なし：アブラムシ類、クワコナカイガラムシ：収穫前日まで

- もも：アブラムシ類：収穫前日まで
 ネクタリン：アブラムシ類：収穫前日まで
 かき：フジコナカイガラムシ：収穫前日まで
 ぶどう：コナカイガラムシ類、チャノキイロアザミウマ：収穫前日まで
 茶：クワシロカイガラムシ、チャノミドリヒメヨコバイ、チャノキイロアザミウマ：摘採7日前まで
 ばれいしょ：アブラムシ類：収穫前日まで
 いちご：アブラムシ類、コナジラミ類：収穫前日まで
 トマト：アブラムシ類、コナジラミ類：収穫前日まで
 (30 ページに続く)