

九州・沖縄地域における薬剤耐性キュウリ褐斑病菌の発生実態

挾間 渉・佐藤 通浩* (大分県農業技術センター)

Occurrence and distribution of fungicide-resistant field isolates of *Corynespora cassiicola*, causal fungus of target leaf spot of cucumber, in Kyushu and Okinawa districts. Wataru HASAMA and Michihiro SATO* (Oita Prefectural Agricultural Research Center, Usa, Oita 872-01)

Key words: *Corynespora cassiicola*, cucumber, benzimidazole, procymidone, fungicide resistance

キュウリ褐斑病に関して、筆者らは1992年まで近年の顕在化の要因解明と防除対策の確立に向けて研究を行い、その結果、病原菌の生理、宿主体侵入条件、伝染環と発病要因など発生生態をはじめ、これらの知見に基づく耕種的防除法と薬剤防除法を明らかにしてきた¹⁾。これらの一連の研究の過程で、本病原菌株間にベンゾイミダゾール系薬剤に対して感受性を異にする系統が存在することを明らかにした²⁾。また、これらの菌株はベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌に特異的に抗菌活性を示すジエトフェンカルブに対して明確な負相関差耐性を示すことから、ジエトフェンカルブ混合剤の適用が可能なることを明らかにした³⁾。これらの結果をもとにジエトフェンカルブ・プロシミドン、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル各水和剤が本病に対しても相次いで適用拡大され、キュウリ主産地では灰色かび病のみならず褐斑病をも対象として使用されつつあり、圃場における薬剤感受性の動向に少なからず影響を及ぼしていると考えられる。そこで、大分県をはじめとして九州・沖縄地域のキュウリ主産地における褐斑病菌の薬剤感受性の実態を調査した。

試験材料および方法

1. 薬剤感受性ベースラインの検討

薬剤の上市される以前にあらかじめ野生型菌の薬剤感受性のベースラインデータを把握しておくことが、その後の薬剤耐性の発達程度の指標としてきわめて重要な意味を持つ⁴⁾。そこでまず、ベンゾイミダゾール系薬剤やジカルボキシイミド系薬剤が上市される以前に採取・分離された保存菌株、およびこれらの薬剤に接触する可能

性がほとんどないと考えられ、かつキュウリ褐斑病菌とは同種菌である⁵⁾が寄生性分化がみられる¹⁾アジサイ褐斑病菌について、数種薬剤に対する感受性のベースラインを明らかにするために感受性検定を行った。

供試菌株 1960年以前に採取・分離された農林水産省生物資源研究所保存のダイズ褐色輪紋病菌2菌株、キュウリ褐斑病菌2菌株、アジサイ褐斑病菌2菌株、ササゲ輪紋病菌1菌株、エゴマからの分離菌1菌株、ゴマ葉枯病菌1菌株、および1979年に採取分離された農林水産省生物資源研究所保存のアジサイ褐斑病菌1菌株と1995年に大分県内で採取した罹病標本から単胞子分離したアジサイ褐斑病菌99菌株の合計109菌株を供試した。

病原菌の分離 後藤氏の単胞子分離装置⁶⁾を使用して、オキシテトラサイクリン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とストレプトマイシン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加用したPDA平板上で単胞子分離を行い、25°C、3~4日後に伸長した菌叢先端部を切り取り、PDA斜面培養後、20°Cで保存して検定に供した⁴⁾。

検定培地 検定にはベンゾイミダゾール系薬剤の活性体であるカルベンダジム(MBC)、ジカルボキシイミド系薬剤であるプロシミドンの原体およびジエトフェンカルブの原体を供試した。カルベンダジムは0.1Nの塩酸に、ジエトフェンカルブとプロシミドンはジメチルスルホキシドに溶解して、カルベンダジムとジエトフェンカルブは100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ からの10段階階希釈または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ からの2段階階希釈により、プロシミドンは100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ からの2段階階希釈により高圧滅菌後のPDAに加用してのち10×15cmの角形シャーレに分注し、検定培地とした。なお、0.1N塩酸およびジメチルスルホキシドの培地中の濃度は供試菌の菌糸伸長に影響のない0.5%以下⁴⁾とした。

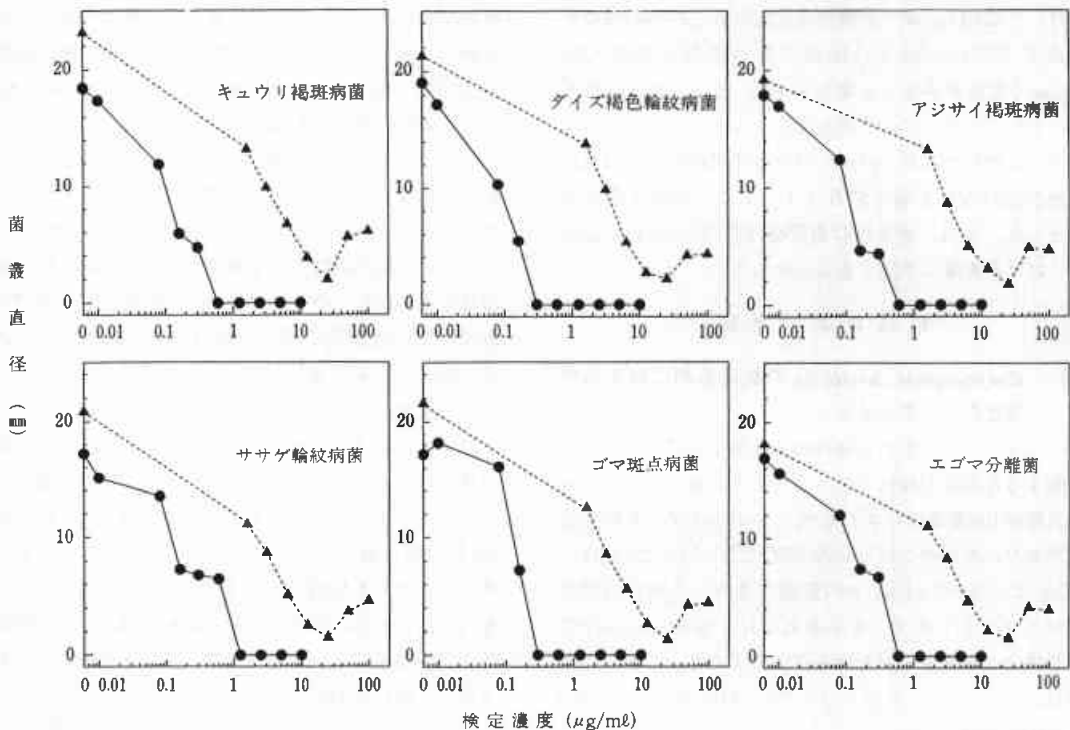
検定方法 PDA平板培地で前培養後に直径5mmのコルクボーラで打ち抜いて得た供試菌の菌叢片を検定培地

*現在 大分県病害虫防除所

*Present address: Oita Prefectural Plant Protection Office, Oita 870

第1表 *Corynespora cassiicola* の数種薬剤に対する感受性のベースライン

供試菌株	分離源	分離年次	カルベンダジム		ジエトフェンカルブ		プロシミドン
			MIC	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	EC ₅₀
MAFF03-05087	ダイズ	1949	0.31 ^{a)}	0.08	>100	>100	3.13
MAFF03-05088	ダイズ	1950	0.31	0.16	>100	>100	6.25
MAFF03-05089	キュウリ	1957	0.63	0.16	>100	>100	3.13
MAFF03-05090	キュウリ	1959	0.31	0.16	>100	>100	3.13
MAFF03-05091	アジサイ	1959	0.63	0.16	>100	>100	3.13
MAFF03-05092	ササゲ	1959	1.25	0.16	>100	>100	3.13
MAFF03-05093	エゴマ	1959	0.63	0.16	>100	>100	3.13
MAFF03-05094	アジサイ	1960	0.63	0.16	>100	>100	3.13
MAFF03-05095	ゴマ	1951	0.31	0.16	>100	>100	3.13
MAFF03-05451	アジサイ	1979	0.61	0.31	>100	>100	3.13
アジサイ褐斑病菌(99菌株)		1995	0.08~1.25	0.08~0.61	>100	>100	3.13

a) $\mu\text{g/ml}$ 

第1図 ベンゾイミダゾールおよびジカルボキシイミド系薬剤上市以前からの保存菌株のカルベンダジムまたはプロシミドン添加 PDA 培地における生育

25°C, カルベンダジム: 3日後, プロシミドン: 4日後, 供試菌株: キュウリ褐斑病菌; MAFF 03-5089, '5090, ダイズ褐色輪紋病菌; MAFF 03-5087, '5088, アジサイ褐斑病菌; MAFF 03-5091, '5094 ササゲ輪紋病菌; MAFF 03-5092, ゴマ斑点病菌; MAFF 03-5095, エゴマ分離菌; MAFF 03-5093, ●—●: カルベンダジム, ▲---▲: プロシミドン

に移植した。カルベンダジムとジエトフェンカルブの検定では3日間, プロシミドンの検定では4日間, それぞれ25°Cで培養したのちに菌叢直径を測定し, 最低生育阻

止濃度 (MIC) と50%菌糸伸長阻止濃度 (EC₅₀) を求めた。

2. キュウリ褐斑病菌の薬剤感受性検定

供試菌株 1995年9~12月の間に九州・沖縄地域のキ

キュウリ主産地42圃場から採取・送付された褐斑病罹病標本から前項の手法により単孢子分離して得た689菌株を供試した。

検定培地および検定方法 多数の菌株の耐性程度を簡易に把握する検定培地として、カルベンダジム100, 10各 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ジェトフェンカルブ10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, プロシミドン25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をそれぞれ含有する PDA 平板を供試した。また, MIC および EC_{50} を求めるための検定培地の濃度段階は前項に準じた。なお, 検定方法は前項に準じた。

判定基準 山田¹⁰⁾は灰色かび病菌で, ベンゾイミダゾール系薬剤, ジカルボキシイミド系薬剤, ジェトフェンカルブに対する感受性差異の組合せから15種類の表現型を区別するための検定濃度を提案している。これを参考にして, アジサイ褐斑病菌等で求めた感受性のベースラインや1989年までの本病原菌における感受性検定結果²⁾を踏まえて, 感受性の判定基準は, カルベンダジムに対しては10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で対無処理比50%以上の菌糸伸長を認めるが100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では伸長しない場合を MR, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも菌糸伸長する場合を HR, ジェトフェンカルブに対しては10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で菌糸伸長する場合を R, プロシミドンに対しては25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で対無処理比70%以上の菌糸伸長が認められる場合を R とし, これら以外の場合を S とした。なお, 感受性の表記法は竹内⁸⁾の灰色かび病菌における提案に準拠することとした。

結果 および 考察

1. *Corynespora cassiicola* の数種薬剤に対する感受性のベースライン

ペノミル上市以前から保存の9菌株およびペノミルに接触する可能性が極めて低いと考えられるアジサイからの分離菌100菌株はいずれもベンゾイミダゾール感受性菌であり, カルベンダジムの MIC は0.08~1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, EC_{50} は0.08~0.61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲にあり, これらの濃度域がベンゾイミダゾール系薬剤に対する *C. cassiicola* の感受性のベースラインと考えられた。なお, これらの菌株は, ジェトフェンカルブに対し MIC がすべて 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった。

プロシミドンの EC_{50} は, 供試菌株のすべてが3.13~6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内であった。また, すべての供試菌株のプロシミドン添加 PDA 培地での菌糸伸長は, プロシミドン濃度25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で最も抑制され, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の時よりもむしろ増加した。すなわち, 供試菌株のすべてはプロシミドンに対して, 灰色かび病菌におけるジカルボキシイミド系薬剤の場合⁶⁾と同様, いわゆるポリモーダル生育を示した(第1表,

第1図)。

2. 九州・沖縄地域における薬剤耐性キュウリ褐斑病菌の発生実態

九州・沖縄のキュウリ主産地の42圃場から分離した689菌株は, ベンゾイミダゾール系薬剤であるカルベンダジム (MBC) とジカルボキシイミド系薬剤であるプロシミドンおよびジェトフェンカルブの3剤に対する薬剤感受性の表現型から, SSR すなわちベンゾイミダゾール系薬剤およびジカルボキシイミド系薬剤感受性菌, SRR すなわちベンゾイミダゾール系薬剤感受性かつジカルボキシイミド系薬剤耐性菌, HRSS すなわちベンゾイミダゾール系薬剤高度耐性かつジカルボキシイミド系薬剤感受性菌, MR SR すなわちベンゾイミダゾール系薬剤中等度耐性でジェトフェンカルブ耐性かつジカルボキシイミド系薬剤感受性菌, MR RR すなわちベンゾイミダゾール系薬剤中等度耐性でジェトフェンカルブ耐性かつジカルボキシイミド系薬剤耐性菌の5種類に類別された(第2図)。宮崎県綾町南俣①を除く他の圃場はSSR菌とHRSS菌だけで構成されていた(第2表)。この2種類の表現型の菌株は, カルベンダジムとジェトフェンカルブに対し明確な負相関交差耐性を示すとともに, プロシミドンに対しては感受性であることから, ジェトフェンカルブ混合剤の防除効果は高いと判断された。

一方, 宮崎県綾町南俣①圃場では, 上記の2種表現型のほか SRR 菌, MR SR 菌, MR RR 菌など従来認められていない表現型の菌が今回の調査で初めて確認された(第2図, 第2表)。プロシミドンとジェトフェンカルブに耐性である SRR 菌と MR RR 菌に対してはジェトフェンカルブ・プロシミドン水和剤の防除効果が期待できない。また, カルベンダジムに対し中等度耐性かつジェトフェンカルブに対し耐性を示す MR SR および MR RR 菌に対してはジェトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤の防除効果が期待できにくい。したがって, これらの表現型を示す菌株が優占する宮崎県綾町南俣①圃場ではジェトフェンカルブ混合剤の防除効果は期待し難いと判断された。

1989年までに主として大分県内を中心に分離した419菌株の検定結果では, 中等度耐性菌はまったく認められなかった。また, ベンゾイミダゾール系薬剤に対する感受性の差異にかかわらず, ジカルボキシイミド系薬剤のプロシミドンに対しては, 一様に感受性が高かったので, ジェトフェンカルブ・チオファネートメチルおよびジェトフェンカルブ・プロシミドン各水和剤の効果はその時点では期待できると考えられた³⁾。九州・沖縄地域を対象とした本試験の結果では, 調査対象の42圃場中41圃場

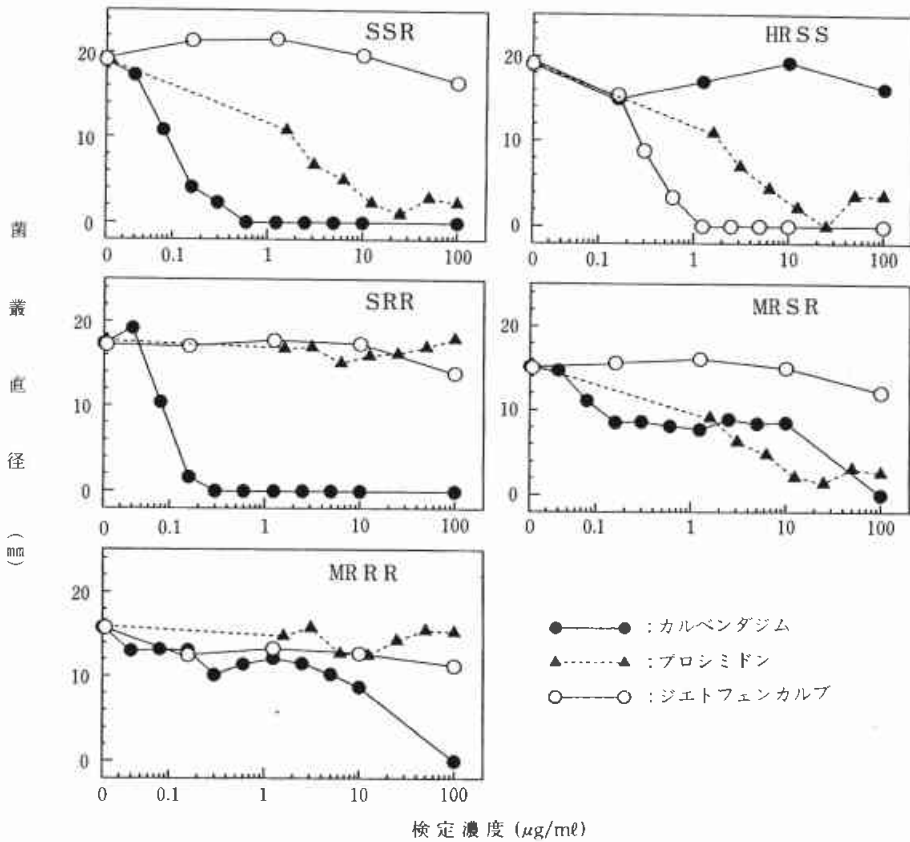
第2表 九州・沖縄地域における薬剤耐性キュウリ褐斑病菌の発生実態

採取場所	採取月日	供試 菌株数	薬剤感受性の表現型別菌株数 (%)				
			SSR ^{a)}	SRR	HRSS	MRSR	MRRR
(大分県)							
速見郡山香町中村	9/14	1			1(100)		
中山香	9/14	1	1(100)				
山浦①	9/25	32			32(100)		
山浦②	9/25	17			17(100)		
大野郡緒方町上冬原	9/21	38	17(45)		21(55)		
竹田市入田	9/21	23	16(70)		7(30)		
玖珠郡玖珠町小田	10/6	16			16(100)		
日出生本村	9/25	27	12(44)		15(56)		
日田郡上津江村	10/6	6			6(100)		
下毛郡山国町長尾野①	9/14	7			7(100)		
長尾野②	9/14	3			3(100)		
本耶馬溪町西谷	9/14	2			2(100)		
岩屋	9/28	16			16(100)		
三光村小袋	9/25	1			1(100)		
宇佐郡院内町斎藤	9/25	27	13(48)		14(52)		
安心院町佐田	9/25	30	26(87)		4(13)		
内川野	9/15	6	6(100)				
宇佐市高家	10/23	22	14(64)		8(36)		
福岡県宗像郡福岡町上西郷							
10/24	43	9(21)		34(79)			
佐賀県伊万里市①	11/24	8					
伊万里市②	11/24	9		9(100)			
塩田町	11/24	11	2(18)		9(82)		
武雄市	11/24	23		23(100)			
熊本県鹿本郡鹿央町	11/15	42	14(33)		28(67)		
宮崎県西都市鹿野田	11/21	15	2(13)		13(87)		
西都市下三財①	11/21	20		20(100)			
西都市下三財②	11/21	16		16(100)			
佐土原町巨田	11/21	20		20(100)			
西都市加勢	11/21	20		20(100)			
清武町黒北	11/21	13		13(100)			
清武町木原①	11/21	3		3(100)			
清武町木原②	11/21	10		10(100)			
清武町今泉	11/21	5		5(100)			
高岡町平八重	11/21	17		17(100)			
佐土原町農試場内	11/21	10		10(100)			
綾町南俣①	11/27	35	1(3)	30(86)	1(3)	2(6)	
綾町南俣②	11/27	22		22(100)			
鹿児島県加世田市万世①	12/8	20		20(100)			
加世田市万世②	12/8	17		17(100)			
日置郡金峰町高橋	12/8	8		8(100)			
沖縄県大里村稲嶺②	11/26	9		9(100)			
大里村稲嶺④	11/26	18		18(100)			

a) 左から順にベンゾイミダゾール系薬剤(カルベンダジム), ジカルボキシイミンド系薬剤(プロシミド), ジェトフェンカルブに対する感受性を示す。S: 感受性, R: 耐性(ただし, 耐性程度が異なる2種類の菌株群がある場合, MR: 中等度耐性, HR: 高度耐性)

で1989年までの傾向と大差がなかった。すなわち, 本検定結果は, ベンゾイミダゾール系薬剤に対して全体としては1989年までの2峰型の感受性頻度分布が維持されていることを示すものであると言える。したがって, 現時点でジェトフェンカルブ混合剤の防除効果は大半の地域で期待できると考えられる。

しかしながら, 今回の感受性検定の結果では, ジェトフェンカルブ混合剤のような, いわゆる「負相関剤」の効力が低いことが指摘された1圃場からは, その存在が憂慮されていたベンゾイミダゾール系薬剤中等度耐性菌のMRSR菌, MRRR菌や, ジカルボキシイミンド系薬剤耐性かつベンゾイミダゾール系薬剤感受性菌のSRR



第2図 表現型を異にする数種菌株の薬剤添加 PDA 培地における生育
25°C, 3日後, 供試菌株: SSR; C95296, HRSS; C95007, SRR; C95551,
MRSS, C95544, MRRR, C95561

菌が確認された。特に, SRR 菌は高い分離率を示していた。ジエトフェンカルブ混合剤の防除効果を脅かす表現型を示すこれらの菌株の出現は, 多剤耐性菌増加の初期段階とも受け取れる。今後これらの表現型を示す菌株の動向を注視し, 灰色かび病菌と同様きめの細かい感受性検定が必要と考えられる。

謝 辞

本試験を実施するにあたり福岡県病害虫専門技術員の池田弘氏, 佐賀県農業試験場の松崎正文氏(現同県植物病害虫防除所)および稲田稔氏, 佐賀県植物病害虫防除所の各位, 熊本県農業研究センターの小牧孝一氏, 大分県宇佐病害虫防除所の森田鈴美氏(現同県中津農業改良普及センター), 宮崎県農業試験場の田村逸美氏, 鹿児島県農業試験場の牟田辰郎氏(現同試験場大隈支場)および大司さえき氏, 沖縄県病害虫専門技術員の上原勝江氏(現同県農業試験場), 日本植物防疫協会研究所宮崎

試験農場の田代定良氏(現同協会研究所)および重松辰郎氏には, キュウリ褐斑病罹病標本採取にあたって多大のご協力とご助言をいただいた。記して感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 挾間 渉 (1993) 大分農技セ特別研報 2: 1-105.
- 2) 挾間 渉 (1991) 日植病報 57: 312-318.
- 3) 挾間 渉・森田鈴美・加藤徳弘 (1991) 日植病報 57: 319-325.
- 4) 挾間 渉 (1994) 植物防疫 48: 267-270.
- 5) 石井英夫 (1993) 植物防疫 47: 279-281.
- 6) 木曾 皓・野村良邦・鐘江義広 (1982) 日植病報 48: 90 (講要).
- 7) 大畑真一 (1981) 農薬実験法 2. 殺菌剤編 (深見順一ら編). ソフトサイエンス社, 東京. pp. 17-18.
- 8) 竹内妙子 (1992) 第3回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集: 2.
- 9) Wei, C. T. (1950) Mycol. Papers 34: 1-10.
- 10) 山田正和・内田景子・中澤靖彦 (1994) 日植病報 60: 743 (講要).

(1996年4月30日 受領)