

ナス黒枯病菌 (*Corynespora cassiicola*) のチオファネートメチル, ジエトフェンカルブおよびQoI剤に対する感受性

下元祥史・隅田 茂*・西岡久人**

(高知県農業技術センター・*高知県中央東農業振興センター嶺北農業改良普及所・

**高知県病害虫防除所)

Sensitivity to thiophanate-methyl, diethofencarb and QoI fungicides of *Corynespora cassiicola* isolated from Black rot of eggplant (*Solanum melongena*)

By Yoshifumi SHIMOMOTO, Shigeru SUMIDA and Hisato NISHIOKA (Kochi Agricultural Research Center, Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan; *Kochi Central East Agricultural Promotion Center, Reihoku Agricultural Extension Office, Tai, Tosa, Tosa, Kochi 781-3521, Japan; **Kochi Prefectural Plant Protection Office, Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan)

We evaluated the sensitivity to thiophanate-methyl, diethofencarb and QoI fungicides of *Corynespora cassiicola* isolated from Black rot of eggplant. A plate dilution method for thiophanate-methyl and diethofencarb, or polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for QoI fungicides was applied. In 2007 and 2008, 47 isolates were collected from 18 eggplant fields in Kochi Prefecture, Japan. 30 isolates from 12 fields and 3 isolates from 2 fields were resistant strains to thiophanate-methyl or QoI fungicides, respectively. However, all isolates showed sensitivity to diethofencarb. Inoculation tests of isolates using eggplant seedlings presented that Thiophanate-methyl was not effective for control of black rot of eggplant, and this result was in agreement with the plate dilution method. On the other hand, the control effect of kresoxim-methyl on each isolate did not fully agree with the results of PCR-RFLP. These results might have been caused by the heteroplasmic status of the mitochondrial cytochrome *b* gene like other fungi.

緒 言

近年、高知県のナス栽培で問題となっている病害の1つに黒枯病がある。本病害は主として葉に黒褐色の病斑を形成し、多発すると早期に落葉する。また果実表面に水疱状の小突起を形成し、品質上問題となる場合もある。2005年以降、本県の主要作型である促成栽培における発生圃場率は50%以上で、また甚発生圃場も多数認められている(高知県病害虫防除所, 2006~2008)。

本病害の防除にはベンズイミダゾール系薬剤のチオファネートメチル水和剤, ベノミル水和剤, およびこれらの剤の耐性菌に負相関交差耐性を示

すジエトフェンカルブとの混合剤であるジエトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤や、すすかび病およびうどんこ病に対する同時防除剤としてストロビルリン系薬剤(QoI剤)のアズキシストロビン水和剤およびクレスキシムメチル水和剤が使用されてきた。しかし生産現場ではこれらの薬剤の防除効果の低下が指摘されている。

筆者らは、高知県で発生しているナス黒枯病の新たな病原菌としてキュウリ褐斑病菌やトマト褐色輪紋病菌と同種の*Corynespora cassiicola* (Berkeley & Curtis) Weiを報告した(下元ら, 2008)。本種と既知のナス黒枯病菌とされる*Corynespora melongenae* Takimotoとの異同については今後の

検討課題であるが、キュウリ褐斑病やトマト褐色輪紋病では既にベンズイミダゾール系薬剤およびストロビルリン系薬剤（QoI剤）に対する耐性菌の発生が報告されており（狭間，1991；狭間・佐藤，1996；伊達ら，2004a；伊達ら，2004b），本県での，新たに提案した*C. cassiicola*によるナス黒枯病の本県での多発生要因も，これらの薬剤に対する感受性低下が原因ではないかと疑われた。そこで両系統に対するナス黒枯病菌の感受性検定を実施したところ，いずれの薬剤に対しても感受性の低下が確認されたので，その概要を報告する。

本研究を実施するに当たり，ジエトフェンカルブ水和剤を提供していただいた住友化学（株），並びにサンプル収集に御協力いただいた高知県内の各農業振興センターの諸氏に深く感謝の意を表す。

材料および方法

1. ナス黒枯病菌の薬剤に対する感受性検定

1) チオファネートメチルに対する感受性

2007年および2008年に，高知県内のナス栽培18圃場で黒枯病罹病葉を採取し，病斑上の分生子を直接単孢子分離し，形態観察により*C. cassiicola*と認められた47菌株を供試した。検定には市販のチオファネートメチル水和剤（製品名：トップジンM水和剤）を用いた平板希釈法（狭間，1998）により実施し，薬剤添加培地において生育が認められた場合に耐性菌と判定した。なお，チオファネートメチルの検定濃度は100ppmおよび10ppmとした。

2) ジエトフェンカルブに対する感受性

チオファネートメチルに対する感受性検定において，いずれの濃度でも生育が認められた30菌株を供試した。検定にはジエトフェンカルブ水和剤を用い，前項と同様の方法で実施した。なおジエトフェンカルブの濃度は10ppmとした。

3) QoI剤に対する感受性

チオファネートメチルに対する感受性検定に用いた47菌株を供試し，Ishii *et al.* (2007) の方法に準じて，PCR-RFLPを実施し，制限酵素処理により消化されたPCR産物が確認された場合に耐性菌と判定した。

2. 薬剤耐性ナス黒枯病菌に対する薬剤の防除効果

1) チオファネートメチル水和剤の効果

チオファネートメチルに対する感受性検定において，いずれの濃度でも生育が認められ，耐性菌と判定された2菌株および薬剤添加培地において生育が認められず，感受性菌と判定された1菌株を，ペトリ皿に分注したオートミール寒天平板培地（Difco製）に移植後，25℃に調節した恒温器内においてブラックライトブルー蛍光灯（FL15BL-B：ナショナル社製）で近紫外光を約20cmの距離から連続照射しながら10日間培養した。培養後，ペトリ皿に滅菌水を流し込み，滅菌した筆で分生子をかき取った後，2重のガーゼで濾過し，分生子の濃度を 1×10^4 個/mlに調整した。分生子懸濁液調製同日に，直径10.5cmのポリエチレンポットで育成した本葉6葉期のナス（品種：千両2号）にチオファネートメチル水和剤の1,500倍液または対照として滅菌水を十分量散布した後風乾させ，直ちに分生子懸濁液を1株当たり7mlずつ噴霧接種した。供試株数は各処理区ともナス2株とした。接種後は25℃多湿条件に2日間保った後，ガラス室で管理した。接種10日後，株ごとに以下の基準で発病程度を調査し，平均発病指数を算出した。

0：発病無し

1：一部の葉にわずかに病斑が認められる

2：株全体に病斑が認められ，全葉面積に対する病斑面積率が3分の1未満である

3：株全体に病斑が認められ，全葉面積に対する病斑面積率が3分の1以上である

4：株全体に病斑が認められ，全葉面積に対する病斑面積率が3分の1以上で，かつ落葉も認められる

2) クレソキシムメチル水和剤の効果

QoI剤に対する感受性検定において耐性菌と判定された1菌株および感受性菌と判定された2菌株を供試し，これら3菌株に対するクレソキシムメチル水和剤3,000倍液の防除効果について，前項と同様に検討した。

結 果

1. ナス黒枯病菌の薬剤に対する感受性検定

1) チオファネートメチルおよびジエトフェンカルブに対する感受性

供試した47菌株中30菌株においてチオファネートメチルの100ppmおよび10ppm添加培地上での生育が認められ、耐性菌と判定された。残りの17菌株は両濃度において生育が認められなかった。また、チオファネートメチル添加培地上で生育した30菌株はいずれもジエトフェンカルブ10ppm添加培地上での生育は認められなかった（表1）。

2) QoI剤に対する感受性

供試した47菌株中3菌株においてPCRの増幅産物が制限酵素によって消化され、耐性菌と判定された（表1）。

2. 薬剤耐性ナス黒枯病菌に対する薬剤の効果

1) チオファネートメチル水和剤の効果

100ppmおよび10ppm添加培地上のいずれでも生育した菌株に対するチオファネートメチル水和剤の防除効果は、両濃度で生育しなかった菌株に対する防除効果より明らかに劣った（表2）。

2) クレソキシムメチル水和剤の効果

QoI剤に対する感受性検定において、耐性菌と判定された1菌株は滅菌水散布区と同様の発病程度を示し、ほとんど防除効果が認められなかった。一方、感受性菌と判定された2菌株のうち、1菌株は滅菌水散布区よりも発病程度が低く、高い防除効果が認められたが、もう1菌株は耐性菌と判定された菌株と同様に滅菌水散布区と同じ発病程度を示し、ほとんど防除効果が認められなかった（表3）。

考 察

狭間・佐藤（1996）は*C. cassiicola*に対するカルベンダジム（ベノミルおよびチオファネートメチル共通の抗菌性代謝生成物）の感受性のベース

表1 チオファネートメチル、ジエトフェンカルブおよびQoI剤に対する感受性

圃場No.	病葉採取地	病葉採取年月	供試菌株数	耐性菌株数			QoI剤 ^{b)}
				チオファネートメチル ^{a)} 100ppm	チオファネートメチル ^{a)} 10ppm	ジエトフェンカルブ ^{a)}	
0	安田町東島	2007年2月	3	3	3	0	0
1	安田町東島	2008年5月	2	2	2	0	0
2	安芸市穴内	2008年5月	1	1	1	0	0
3	安芸市黒鳥	2008年5月	2	2	2	0	0
4	安芸市赤野	2007年2月	2	2	2	0	0
5	芸西村和喰	2008年5月	2	2	2	0	0
6	芸西村和喰	2008年5月	3	3	3	0	0
7	香南市野市町	2007年12月	4	4	4	0	0
8	香南市香我美町	2008年1月	2	2	2	0	0
9	土佐町田井	2007年10月	3	0	0	NT ^{c)}	0
10	土佐町地藏寺	2007年10月	3	0	0	NT	0
11	土佐町東石原	2007年10月	3	0	0	NT	0
12	津野町鳥手川	2007年10月	3	0	0	NT	2
13	梶原町飯母	2007年11月	3	0	0	NT	1
14	梶原町太田戸	2007年10月	3	3	3	0	0
15	四万十町古城	2007年10月	2	0	0	NT	0
16	四万十町井崎	2007年10月	3	3	3	0	0
17	大月町弘見	2007年11月	3	3	3	0	0
合計			47	30	30	0	3

a) 平板希釈法（狭間，1998）により実施し、所定の薬剤添加培地において生育が認められた場合に耐性菌と判定した。

b) Ishii et al. (2007) の方法により実施し、制限酵素処理により消化されたPCR産物が確認された場合に耐性菌と判定した。

c) 試験未実施

表2 ナス黒枯病菌に対するチオファネートメチル水和剤の効果

菌株採取圃場No.	感受性検定結果	平均発病指数*	
		薬剤散布区	減菌水散布区
1	耐性菌	3	3
2		3.5	4
16	感受性菌	0	4

* 0：発病無し

1：一部の葉にわずかに病斑が認められる

2：株全体に病斑が認められ、全葉面積に対する病斑面積率が3分の1未満である

3：株全体に病斑が認められ、全葉面積に対する病斑面積率が3分の1以上である

4：株全体に病斑が認められ、全葉面積に対する病斑面積率が3分の1以上で、かつ落葉も認められる

表3 ナス黒枯病菌に対するクレソキシムメチル水和剤の効果

菌株採取圃場No.	感受性検定結果	平均発病指数*	
		薬剤散布区	減菌水散布区
13	耐性菌	4	4
10	感受性菌	4	4
16		0.5	3

* 0：発病無し

1：一部の葉にわずかに病斑が認められる

2：株全体に病斑が認められ、全葉面積に対する病斑面積率が3分の1未満である

3：株全体に病斑が認められ、全葉面積に対する病斑面積率が3分の1以上である

4：株全体に病斑が認められ、全葉面積に対する病斑面積率が3分の1以上で、かつ落葉も認められる

ラインは0.08～1.25ppmで、10ppmで対無処理比50%以上の菌糸伸長が認められ、かつ100ppmでは伸長しないものを中等度耐性菌、100ppmでも伸長が認められるものを高度耐性菌とした。この基準を本試験結果に当てはめると、供試した47菌株中30菌株が高度耐性菌で、中等度耐性菌は検出されず、高度耐性菌が高い割合で発生していることが明らかとなった。したがって、本病の多発生の要因の1つとして、チオファネートメチルに対する耐性菌の発生が関与しているものと考えられた。また、耐性菌の発生状況は地域によって異なり、安芸市、芸西村および香南市といった高知県の東部に位置する地域から採取した菌株は、いずれも耐性菌であったことから、これらの地域では本耐性菌が高率に発生している可能性が高いと考えられる。さらに生物検定においても耐性菌に対する本剤の防除効果はほとんど認められなかったことから、これらの地域では本剤の防除効果は期待できないと考えられた。

チオファネートメチル耐性菌はジエトフェンカルブに対して負相関交差耐性を示すことが知られている(挟間ら, 1991)。しかし、すでにキュウリ褐斑病およびトマト褐色輪紋病において両剤耐性菌の発生が報告されていることから(挟間・佐

藤, 1996; 伊達ら, 2004a; 伊達ら, 2004b), 本試験ではチオファネートメチルに対して耐性を示した菌株を対象に、ジエトフェンカルブに対する感受性を調査した結果、供試したすべての菌株が感受性であった。そのため、チオファネートメチル耐性菌が広く分布している地域でもチオファネートメチル・ジエトフェンカルブ水和剤の効果は期待できる。

一方、Ishii *et al.* (2007)の方法を用いて実施したQoI剤に対する感受性検定では、供試した47菌株中3菌株が耐性菌と判定された。しかし、感受性と判定された菌株の中から任意に選択した2菌株を用いてクレソキシムメチル水和剤の防除効果を検討した結果、四万十町古城で採取した菌株に対しては高い防除効果が認められたが、土佐町田井で採取した菌株に対しては全く防除効果が認められなかった。石井ら(2003)およびIshii *et al.* (2007)は、薬剤の作用点であるチトクロームタンパク質をコードするミトコンドリアDNAのチトクロームb遺伝子がヘテロプラスミーになることにより、上記のような現象が起こることを報告していることから、本試験結果もこれが原因であると考えられた。このことは感受性検定で耐性菌と判定された3菌株よりもっと多くの耐性菌が

含まれている可能性を示しており、本試験で実施したIshii *et al.* (2007)の方法による感受性検定結果は圃場での防除の際の薬剤の選定等には活用できないと考えられた。現在、*C. cassiicola*のQoI剤に対する感受性を正確に把握する手段は生物検定しかなく、より簡便に調査できる検定法の開発が望まれる。

摘 要

2007年および2008年に、高知県内のナス栽培18圃場から黒枯病菌47菌株を収集し、チオファネートメチルおよびジエトフェンカルブに対しては平板希釈法で、QoI剤に対してはPCR-RFLP法で感受性を調査した。その結果、チオファネートメチルに対しては12圃場の発病葉から分離された30菌株、QoI剤に対しては2圃場の発病葉から分離された3菌株が耐性菌と判定された。ジエトフェンカルブに対する耐性菌の発生は認められなかった。チオファネートメチルおよびQoI剤に対する感受性検定で感受性菌および耐性菌と判定された菌株を用いて、それぞれチオファネートメチル水和剤およびクレソキシムメチル水和剤の防除効果を生物検定で判定した結果、チオファネートメチル水和剤を処理した場合には感受性検定結果を支持する結果であったが、クレソキシムメチル水和剤を処理した場合には感受性菌と判定された菌株で防除効果がほとんど認められない菌株が存在した。これは、他の菌種と同様に、ミトコンドリアDNAのチトクローム*b*遺伝子がヘテロプラスミーとなっているためであると考えられた。

引 用 文 献

伊達寛敬・片岡英子・谷名光治・佐々木静江・井上幸次・那須英夫・粕山新二(2004a)：岡山県におけるチオファネートメチル、ジエトフェンカルブ及びアゾキシストロビンに対するキュウ

- リ褐斑病菌の感受性. 日植病報, 70:10~13.
- 伊達寛敬・片岡英子・谷名光治・佐々木静江・井上幸次・那須英夫・粕山新二(2004b)：チオファネートメチル及びジエトフェンカルブに対するトマト褐色輪紋病菌 (*Corynespora cassiicola*)の感受性. 日植病報, 70:7~9.
- 挟間 渉(1991)：ベンズイミダゾール系薬剤耐性キュウリ褐斑病菌の発生とその特性. 日植病報, 57:312~318.
- 挟間 渉(1998)：野菜類褐斑病菌(黒枯病菌). 植物病原菌の感受性検定マニュアル, 日本植物防疫協会, 東京:46~50.
- 挟間 渉・森田鈴美・加藤徳弘(1991)：ベンズイミダゾール系薬剤とジエトフェンカルブとの負相関交差耐性を利用したキュウリ褐斑病の防除. 日植病報, 57:319~325.
- 挟間 渉・佐藤通浩(1996)：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. 九病虫研会報, 42. 26~30.
- 石井英夫・伊達寛敬・古田明子・小池伸代(2003)：ストロビルリン系薬剤耐性菌の遺伝子診断法とその問題点. 日植病報, 69:299(講要).
- Ishii, H., Yano, K., Date, H., Furuta, A., Sagehashi, Y., Yamaguchi, T., Sugiyama, T., Nishimura, K. and Hasama, W. (2007) : Molecular Characterization and Diagnosis of QoI Resistance in Cucumber and Eggplant Fungal Pathogens. *Phytopathology*, 97:1458~1466.
- 高知県病虫害防除所(2006)：平成17年度農作物有害動植物発生予察事業年報. 79~86.
- 高知県病虫害防除所(2007)：平成17年度農作物有害動植物発生予察事業年報. 78~85.
- 高知県病虫害防除所(2008)：平成18年度農作物有害動植物発生予察事業年報. 113~126.
- 下元祥史・竹内繁治・木場章範・曳地康史・佐藤豊三(2008)：ナス黒枯病の病原追加. 四国植防, 43:50(講要).