

## ピーマン黒枯病菌のチオファネートメチルおよび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・\*高知県病害虫防除所・\*\*現 高知県中央東農業振興センター  
嶺北農業改良普及所)

### Sensitivity to thiophanate-methyl and QoI fungicides of *Corynespora cassiicola* isolated from *Corynespora* blight of sweet pepper (*Capsicum annuum*)

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

We evaluated the sensitivity to thiophanate-methyl and QoI fungicides of *Corynespora cassiicola* isolated from *Corynespora* blight of sweet pepper. In 2007 and 2008, 67 isolates of *C. cassiicola* were collected from 27 sweet pepper fields in Kochi Prefecture, Japan. We used a plate-dilution method to evaluate resistance to thiophanate-methyl fungicide, and a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method to evaluate resistance to QoI fungicide. Five isolates from two fields were resistant to thiophanate-methyl, and 33 isolates from 14 fields were resistant to QoI fungicides. Sweet pepper seedlings treated with thiophanate-methyl and kresoxim-methyl fungicides were inoculated with resistant and sensitive isolates of the fungus. The fungicides controlled the sensitive strains more effectively than the resistant strains.

### 緒 言

ピーマン黒枯病(病原菌:*Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei)は、日本では2004年1月に高知県土佐市の施設栽培ピーマン・シシトウガラシにおいて初めて発生が確認された病害で、葉茎および果実に黒褐色の病斑が形成され、その結果、早期の落葉、果実の品質低下、枝枯れを起こす(Shimomoto *et al.*, 2008)。また、地際部に病斑が形成された場合には株枯れとなる場合もある。初発生確認後、県内全域へ拡大し、露地栽培でも発生が認められている。さらに、高知県以外でも宮崎県、鹿児島県および大分県において発生が認められ(宮崎県病害虫防除所, 2004; 鹿児島県病害虫防除所, 2005; 大分県農林水産研究センター, 2007)、今後の更

なる拡大が懸念される病害である。

本病害に対して、チオファネートメチル水和剤およびQoI剤に含まれるクレソキシムメチル水和剤の防除効果が高いことが報告されている(下元ら, 2007)。しかし、同じ病原菌種によって引き起こされるキュウリ褐斑病、トマト褐色輪紋病およびナス黒枯病では、これらの薬剤またはチオファネートメチルの活性体であるカルベンダジムに対する耐性菌の発生が認められており(狭間, 1991; 狭間・佐藤, 1996; 伊達ら, 2004a; 伊達ら, 2004b; 下元ら, 2009; 竹内ら, 2006)、ピーマン黒枯病においても同様に発生している可能性が示唆された。そこで、これらの薬剤に対する感受性を調査したので、報告する。

なお、本研究を実施するに当たり、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る。

## 材料および方法

### 1. 供試菌株

2007年および2008年に、高知県内のシトウガラシおよびピーマン27圃場で黒枯病罹病葉を採取後、病斑上に分生子の形成が認められる場合には2%素寒天培地（和光純薬工業）に病斑部を密着させることにより分生子を付着させ、微細針を用いて実態顕微鏡下で目的の分生子を単孢子分離し、ジャガイモデキストロース寒天培地（PDA

培地：日水製薬）で保存した。病斑上に分生子の形成が認められない場合には病葉を1日間、25℃に設定した恒温器内で湿室に保ち分生子の形成を促した後、上記と同様の方法で菌株を得た。以上により得られた67菌株を以下の実験に供試した（第1表）。

### 2. チオファネートメチルに対する感受性

チオファネートメチルに対する感受性検定は市販のチオファネートメチル水和剤を用いた平板希釈法（狭間，1998）により実施し、薬剤添加培地上で菌糸伸長が認められた場合に耐性菌と判定し

第1表 ピーマン黒枯病菌のチオファネートメチルおよびQoI剤に対する感受性

分離源作物	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 <sup>b)</sup>
					チオファネートメチル <sup>a)</sup>		
					100ppm	10ppm	
シトウガラシ	1	香美市	2007年10月	3	0	0	0
	2	香美市	2007年10月	3	0	0	0
	3	香美市	2007年10月	3	0	0	3
	4	香美市	2007年10月	2	0	0	2
	5	香南市	2008年4月	2	0	0	0
	6	香南市	2008年4月	2	0	0	0
	7	香南市	2008年4月	1	0	0	0
	8	南国市	2008年5月	2	0	0	2
	9	南国市	2008年5月	3	0	0	3
	10	南国市	2008年5月	3	0	0	3
	11	南国市	2008年4月	2	2	2	2
	12	土佐町	2007年10月	3	0	0	0
	13	土佐町	2007年10月	2	0	0	0
	14	本山町	2007年10月	3	0	0	0
	15	津野町	2007年10月	3	3	3	3
	16	津野町	2007年10月	2	0	0	2
	17	津野町	2007年10月	3	0	0	3
	18	須崎市	2007年10月	1	0	0	0
	19	須崎市	2008年4月	2	0	0	2
	20	須崎市	2008年4月	3	0	0	3
	21	須崎市	2008年4月	1	0	0	1
	22	中土佐町	2007年10月	3	0	0	0
	23	四万十町	2007年10月	3	0	0	2
	24	四万十町	2007年10月	3	0	0	0
	25	四万十町	2007年10月	3	0	0	0
	26	四万十市	2008年4月	3	0	0	0
ピーマン	27	本山町	2007年10月	3	0	0	2
合計				67	5	5	33

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

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

た。なお、チオファネートメチルの検定濃度は10ppm および100ppmとした。

### 3. QoI剤に対する感受性

QoI剤に対する感受性はPCR-RFLPにより実施した。すなわち、各菌株をPDA培地に移植し、25℃に設定した恒温器内で培養後、菌叢がシャーレの壁面に達する前に滅菌したスライドグラスで菌叢を採取し、Luo *et al.* (2005) に従い全DNAを抽出した。その後はIshii *et al.* (2007) の方法に準じて実施し、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。

### 4. 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

前項の感受性検定においていずれの薬剤に対しても耐性菌と判定された2菌株および感受性菌と判定された1菌株をPDA培地に移植し、25℃暗黒下で10日間培養した。シャーレ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、滅菌水で分生子の濃度を $1.0 \times 10^4$ 個/mlに調整して分生子懸濁液を作製した。次に、あらかじめチオファネートメチル水和剤1,500倍液、クレソキシムメチル水和剤3,000倍液および対照の滅菌水それぞれをハンドスプレーで十分量散布後、風乾させておいた本葉6葉期のピーマン（品種：京波）全体に、分生子懸濁液を1株当たり7mlずつ噴霧接種した。なお、各剤の散布は懸濁液調整日に行い、ピーマンは直径10.5cmのポリエチレンポットに試販培土（土太郎：スミリン農産工業）を充填して栽培したものを各処理区とも2株供試した。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、接種7日後に、株ごとの発病程度を以下の指数別に調査し、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な病斑が認められる
- 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

## 結 果

### 1. チオファネートメチルに対する感受性

供試した67菌株中2圃場で採取された5菌株は、10ppmおよび100ppm添加培地上で菌糸伸長が認められ、耐性菌と判定された（第1表）。

### 2. QoI剤に対する感受性

供試した67菌株中14圃場で採取された33菌株において、制限酵素処理によりPCR産物の消化が認められ、耐性菌と判定された（第1表）。

### 3. 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

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ともに感受性菌に対しては、滅菌水散布区の平均発病指数が3.5であったのに対して、薬剤散布区では1.0と大きく低下し、高い防除効果が認められた。一方、いずれの薬剤も耐性菌に対しては4.0と滅菌水散布区と比較して防除効果が全く認められなかった（第2、3表）。

## 考 察

狭間（1998）はカルベンダジム（チオファネートメチルの活性体）に対するキュウリ褐斑病菌の感受性について、100ppmで生育が認められる菌を高度耐性菌、100ppmでは認められないが10ppmでは認められる菌を中等度耐性菌、10ppmで認められない菌を感受性菌とする判定基準を示している。宿主を異にする*C. cassiicola* 菌株間でカルベンタジムに対する感受性のベースラインに差は認められなかったことから（狭間・佐藤、1996）、上記の判定基準は本試験結果にも適用できると考えられた。そこで、狭間（1998）を基に判定を行った結果、ピーマン黒枯病菌においてチオファネートメチルに対する耐性菌（高度耐性菌）の発生が初めて確認された。しかし、耐性菌率は約7%と低かったことから、現在のところは大部分の圃場において本剤を使用した防除は有効であると考えられる。一方、病原菌種が同じであるキュウリ褐斑病、トマト褐色輪紋病およびナス黒枯病では本剤に対する耐性菌が高率に発生し、また、耐性菌に対する本剤の防除効果は非常

第2表 ピーマン黒枯病菌に対するチオファネートメチル水和剤の防除効果

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	滅菌水散布区
11	耐性菌	4.0	4.0
15		4.0	4.0
5	感受性菌	1.0	3.5

注1) 発病指数0:発病無し, 1:一部の葉にわずかな病斑が認められる, 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

注2) 各区ピーマン(京波)2株を供試

注3) 2008年9月14日薬剤散布および病原菌接種, 9月21日発病調査

第3表 ピーマン黒枯病菌に対するクレソキシムメチル水和剤の防除効果

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	滅菌水散布区
11	耐性菌	4.0	4.0
15		4.0	4.0
5	感受性菌	1.0	3.5

注1) 発病指数0:発病無し, 1:一部の葉にわずかな病斑が認められる, 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

注2) 各区ピーマン(京波)2株を供試

注3) 2008年9月14日薬剤散布および病原菌接種, 9月21日発病調査

に低いことが報告されている(伊達ら, 2004a:伊達ら, 2004b:狭間, 1991:狭間・佐藤, 1996, 下元ら, 2009:竹内ら, 2006)。ピーマン黒枯病においても同様の状況となる可能性があることから, 今後の耐性菌の発生動向には注意が必要である。

本検定結果よりQoI剤に対しても耐性菌の発生が認められ, その割合はチオファネートメチルとは異なり, 約49%とかなり高かった。また, 耐性菌に対するクレソキシムメチル水和剤の防除効果はほとんど認められなかったことから, 今後, 高知県において本病害を対象にしたQoI剤の使用に当たっては注意が必要であり, 本剤に頼らない薬剤防除体系の確立が重要であると考えられた。なお, 生物検定に供試した3菌株は感受性検定結果と生物検定結果が一致したが, ナス黒枯病菌では一致せず(下元ら, 2009), その要因はQoI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っているためであると考えられた(Ishii *et al.*, 2007)。従って, 本試験結果においても感受性菌と判定された菌株には耐性菌が含まれており, 本来の耐性菌率はより高い可能

性がある。以上のように本手法では正確な耐性菌率の把握は困難であるが, 現状では平板希釈法での検定が不可能であることから(富士ら, 2003), 多量の菌株を供試する場合, 本手法を採用せざるを得ない。今後, より正確で迅速に判定可能な検定手法の開発が望まれる。

なお, 生物検定に供試したピーマン株数は各区2株と少なかったものの各区内の供試株間において発病指数に差はほとんど認められなかった。このことは本病原菌を対象に生物検定で薬剤の防除効果を判定する場合, 本病原菌の接種に当たっては良好な生育を示すピーマン株を供試すれば安定的に発病させることが可能であることを示しており, 本試験で供試したピーマン株数は適切であったと考えられた。

ピーマン, シシトウガラシは甘トウガラシに分類され, 学名はいずれも*Capsicum annuum*で植物学的に同種である(柴崎, 1985)。このため, 本研究では収集した菌株の大部分はシシトウガラシ由来のものであったが, 本菌が両作物間の伝染環に関与し, ピーマンでもシシトウガラシと同様の薬剤感受性を示す菌が発生している可能性があると考えられる。その一方で, 農業登録上はシシト

ウガラシとピーマンは別作物に分類され、登録されている農薬も異なるものがあることから、両作物では薬剤感受性の異なる菌が発生している可能性もある。今後、両作物間における感受性の差異についても調査する必要があると考えられる。

また、*C. cassiicola*においては本研究で対象とした薬剤の他、ジエトフェンカルブ、プロシミドンおよびボスカリドに対する耐性菌の発生が報告されている(伊達ら, 2004a; 伊達ら, 2004b; 狭間・佐藤, 1996; Miyamoto *et al.*, 2009; 竹内ら, 2006)。これまでのところ本菌においてこれら3剤の耐性菌の出現は未確認であるが(下元ら, 私信), 今後出現する可能性があり, 本研究で対象とした薬剤と併せて定期的に感受性を調査する必要があると考えられる。

## 摘 要

2007年および2008年に、高知県内で収集したピーマン黒枯病菌67菌株の、チオファネートメチルおよびQoI剤に対する感受性を、平板希釈法およびPCR-RFLPにより調査した。その結果、チオファネートメチルに対しては2圃場で採取された5菌株が、QoI剤に対しては14圃場で採取された33菌株が耐性菌と判定された。

感受性菌、耐性菌をピーマン株に接種し、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調査した結果、両薬剤ともに感受性菌に対しては高い防除効果が認められたが、耐性菌に対しては全く認められなかった。

## 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):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.

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):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ピンに対するキュウリ褐斑病菌の感受性. 日植病報, 70:10~13.

富士 真・山口純一郎・古田明子・宗 和弘(2003):

佐賀県より採取したキュウリ褐斑病菌のストロビルリン系薬剤に対する感受性と感受性検定法の検討. 日植病報, 69:299~300 (講要).

狭間 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.

狭間 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(日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会編), 日本植物防疫協会, 東京:46~50.

狭間 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

柴崎 臣(1985):ピーマン, 野菜園芸大辞典(西貞夫ら編), 養賢堂, 東京:899~910.

Ishii, H., K. Yano, H. Date, A. Furuta, Y. Sagehashi, T. Yamaguchi, T. Sugiyama, K. Nishimura and W. Hasama (2007): Molecular Characterization and Diagnosis of QoI Resistance in Cucumber and Eggplant Fungal Pathogens. *Phytopathology*, 97: 1458~1466.

鹿児島県病害虫防除所(2005):平成16年度病害虫発生予察特殊報第1号

Luo C. X., L. F. Yin, S. Koyanagi, M. L. Farman, M. Kusaba, and H. Yaegashi (2005): Genetic mapping and chromosomal assignment of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes *AvrPik*, *AvrPiz*, and *AvrPiz-t* controlling cultivar specificity on rice. *Phytopathology*, 95: 640 ~ 647.

Miyamoto, T., H. Ishii, T. Seko, S. Kobori and Y. Tomita (2009): Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology*, 58: 1144~1151.

宮崎県病害虫防除所(2004):平成16年度病害虫発生予察特殊報第1号.

大分県農林水産研究センター(2007):病害虫発生予察特殊報第3号.

Shimomoto, Y., R. Adachi, Y. Morita, K. Yano, A. Kiba, Y. Hikichi and S. Takeuchi (2008): *Corynespora* blight of sweet pepper (*Capsicum annuum*) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. *J. Gen. Plant Pathol.*, 74:

335～337.

下元祥史・隅田茂・西岡久人 (2009) : 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. 四国植防, 44: 印刷中.

下元祥史・矢野和孝・竹内繁治 (2007) : ピーマ

ン黒枯病に対する有効薬剤. 四国植防, 42: 21～25.

竹内妙子・久保周子・石井英夫 (2006) : 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. 関東東山病虫研報, 53:55～60.