

常総市キュウリ栽培圃場におけるうどんこ病菌(*Podosphaera xanthii*)の各種薬剤に対する感受性の検討

誌名	茨城県病害虫研究会報
ISSN	03862739
著者名	後藤,舞 宮本,拓也 林,可奈子 鹿島,哲郎
発行元	茨城県病害虫研究会
巻/号	57号
掲載ページ	p. 17-23
発行年月	2018年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



常総市キュウリ栽培圃場におけるうどんこ病菌 (*Podosphaera xanthii*) の各種薬剤に対する感受性の検討

後藤 舞・宮本 拓也*・林 可奈子*・鹿島 哲郎*

(茨城県西農林事務所結城地域農業改良普及センター
茨城県農業総合センター園芸研究所*)

はじめに

茨城県の平成28年のキュウリの作付面積は534haで、年間出荷量は全国第6位の23,500tである(農林水産統計)。常総市は本県を代表するキュウリ産地の一つであり、千石キュウリとよばれるブランドキュウリが生産されている。同産地は本県青果物銘柄産地に指定され、市場からも評価される高品質なキュウリを生産している。

キュウリ栽培では多くの病害虫が発生し、これらを防除するために多数の農薬が使用されている。中でも、薬剤耐性菌発生リスクの高いうどんこ病は、重要な病害の一つである。本病の防除には主に化学農薬が使用されており、多い時には週に1回の頻度で薬剤散布が行われている。数ある防除薬剤の中でもステロール脱メチル化阻害剤(DMI剤)、Quinone outside inhibitors(QoI剤)、コハク酸脱水素酵素阻害剤(SDHI剤)が基幹薬剤となっているが、これらの薬剤は耐性菌が発生しやすいことが知られている(Japan FRAC, 2017)。

現地での耐性菌の発生状況を把握することは、効率よく持続的に防除を行うために必要な情報である。本県では、これまでにキュウリやメロンについてウリ類うどんこ病菌(*Podosphaera xanthii*)の薬剤感受性の調査が行われ、DMI剤(宮本ら, 2016)、QoI剤(Ishii et al., 2001, 宮本ら, 2016)、SDHI(ボスカリド)剤(Miyamoto et al., 2010)に対する耐性菌の発生が確認されている。

本研究では、常総市のキュウリ栽培ほ場で採集したうどんこ病菌についてDMI剤、QoI剤およびSDHI剤に対する感受性を明らかにするため、リーフディスク法および接種試験法による薬剤感受性検定を行った。

材料および方法

1. 供試菌株

うどんこ病菌の採集は、常総市内でキュウリを生産する計4農家(A, B, C, D)のほ場で行い、促成栽培を行っていた2016年5月30日に3ほ場(B, C, D)、抑制栽培を行っていた9月6日~10月18日に4ほ場(A, B, C, D)より採集した。

罹病葉1枚を1菌株として扱い、リーフディスク検定には最大45菌株(農家A:8菌株, 農家B:8菌株, 農家C:15菌株, 農家D:14菌株)を供試した。また、ポット苗を用いた接種試験には農家Cより採集した菌株であるCP078, 農家Dより採集したCP079, 農家Bより採集したCP082, CP083, 農家Aより採集したCP084を供試した。加えて、各リーフディスク検定や接種試験にはJA全農営農・技術センターから分譲を受けた感受性菌株(K-7-2)を参考として供試した。

*E-mail : yunofu@pref.ibaraki.lg.jp

キーワード: キュウリうどんこ病, 薬剤耐性, DMI剤, QoI剤, SDHI剤

なお、検定した菌株については顕微鏡下で、分生胞子が連鎖し、かつフィブリン体を持つことを確認し、*P. xanthii*であることを簡易に同定した (Uchida et al., 2009)。

また、菌株の採集を行った農家A~Dについて、2016年の促成栽培、夏秋栽培、抑制栽培におけるDMI剤、QoI剤、SDHI剤の使用履歴を聞き取りによって調査した。

2. DMI剤およびQoI剤に対する感受性の検討

1) リーフディスク法

本検定では、DMI剤としてトリフルミゾール水和剤（商品名：トリフミン水和剤）、QoI剤としてアゾキシストロビン水和剤（同：アミスター20フロアブル）を用いた。

両剤の感受性検定は中澤・大塚（1998）、武田（2009）および Ishii et al.（2001）の方法に従ってリーフディスク法により行った。外観健全に育苗したキュウリ「ハイ・グリーン22」苗の子葉からコルクボーラーで8mm径のリーフディスクを打ち抜き、ペトリ皿内の湿らせた濾紙上に葉表側を上にして置いた。そこに現地ほ場から採取した罹病葉の病斑から分生胞子を落下させることでディスクへの接種を行った。このディスクを6穴培養皿内の葉液に浮かべた（1穴当たり5ディスク）。葉液は市販のトリフルミゾール水和剤と滅菌水を用いて有効成分濃度で0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 ppmになるように作成した。同様にアゾキシストロビン水和剤については0, 1, 10, 100 ppmとなるように作成した。

調査は処理10日後に指数別（0:発病なし, 1:病斑がディスク葉面積の5%以下, 2:6~25%, 3:26~50%, 4:51~75%, 5:76%以上）に行い、発病度 $[= \{ \sum (\text{発病指数別ディスク数} \times \text{発病指数}) / (\text{全ディスク数} \times 5) \} \times 100]$ を算出した。トリフルミゾールについては、50%生育阻止濃度（EC₅₀値）から算出したRf値（Resistant factor: 感受性菌株のEC₅₀値/各菌株のEC₅₀値）が100以上の菌株を耐性菌とした。EC₅₀値の算出には全農より提供を受けたLog-linear model softwareを用いた。アゾキシストロビンは最小生育阻止濃度（MIC値）が10ppm以上の菌株を耐性菌と判定した。

2) ポット苗を用いた接種試験法

接種試験には、リーフディスク検定によりトリフルミゾール剤およびアゾキシストロビン剤の両剤に耐性と判定されたCP078, CP079, CP082, CP083, CP084, およびK-7-2を供試した。各菌株の孢子懸濁液は、キュウリ子葉上で継代培養したのちに形成させた分生胞子を0.1%Tween80液に懸濁し、濃度を約 1×10^4 spores/mlに調製して作成した。

キュウリポット苗は、品種として「ハイ・グリーン22」を用い、ガラスハウスで育苗した本葉第4葉期のものを用いた。トリフルミゾール水和剤、アゾキシストロビン水和剤および参考薬剤として供試したキノキサリン系水和剤（商品名：パルミノ）を水道水でそれぞれ3,000倍, 1,500倍および2,000倍に希釈した葉液をハンドスプレーを用いてポット苗に噴霧した。対照として水道水のみを散布処理を設けた。苗数は各処理当たり4株とした。葉液を風乾させた後、病原菌の孢子懸濁液を葉全体にハンドスプレーを用いて噴霧した。

苗の管理は暖房運転温度を12℃、天窗および側窓の開閉温度を25℃に設定したガラス室内で行い、接種18~27日後に各株の本葉第1葉~4葉を対象に指数別（0:発病なし, 1:病斑が葉面積の5以下, 2:6~25%, 3:26~50%, 4:51~75%, 5:76%以上）に発病状況を調査し、発病度 $[= \{ \sum (\text{発病指数別葉数}$

×発病指数)/(全葉数×5)}×100]を算出し、発病度から防除価 [= {100-(葉剤区の平均発病度/無処理区の平均発病度)}×100]を算出した。

3. SDHI剤に対する感受性の検討

1) リーフディスク法

リーフディスク法は小原・堤 (2015) の方法に準じて行った。外観健全に育苗したキュウリ「ハイグリーン22」苗の本葉第1, 第2葉からコルクボーラーで11.5mm径のリーフディスクを打ち抜いた。ペンチオピラド水和剤 (商品名: アフェットフロアブル) を滅菌水で希釈し成分濃度で 0, 0.39, 1.56, 6.25, 25, 100ppmに調製した薬液にディスクを浸漬した後, 0.6%素寒天培地上に各濃度4ディスクずつ並べた。そこに現地ほ場から採取した罹病葉から直接うどんこ病菌の分生胞子を落下させることで接種を行った。罹病葉1枚に発生していた病斑を1菌株として扱い供試した。調査は処理10日後に行い, 1.と同様の方法で各濃度での発病度を算出した。さらに, MIC値とEC₅₀値を算出した。

2) ポット苗を用いた接種試験法

薬剤としてペンチオピラド水和剤2,000倍希釈液を用いたこと以外は, 2.の2)と同様の方法で行った。

結果および考察

1. DMI剤およびQoI剤の薬剤感受性

リーフディスク検定の結果, 両剤ともにすべての圃場で耐性菌が検出された。検出率はトリフルミゾール剤では47%~92%, アゾキシストロビン剤では40~75%といずれの圃場でも高かった (第1表)。

第1表 キュウリ栽培4農家におけるトリフルミゾール剤およびアゾキシストロビン剤耐性うどんこ菌の検出率およびDMI剤とQoI剤の作型毎の使用回数

採集圃場名 ^{a)}	トリフルミゾール剤 (DMI 剤)					
	検定菌株数 (株)	耐性菌株数 (株)	耐性菌 ^{b)} 検出率 (%)	2016年の作型毎 DMI 剤使用回数 (回)		
				促成	夏秋	抑制
農家A	7	4	57	3	- ^{c)}	2
農家B	7	6	86	未調査	1	3
農家C	15	7	47	3	-	1
農家D	12	11	92	未調査	未調査	0

採集圃場名	アゾキシストロビン剤 (QoI 剤)					
	検定菌株数 (株)	耐性菌株数 (株)	耐性菌 検出率 (%)	2016年の作型毎 QoI 剤使用回数 (回)		
				促成	夏秋	抑制
農家A	8	5	63	2	-	0
農家B	8	6	75	未調査	1	0
農家C	15	6	40	2	-	0
農家D	14	6	43	未調査	未調査	0

a) 市名後ろのアルファベットは採集場所の農家が異なることを示す。

b) 耐性菌検出率 (%) = (耐性菌株数/検定菌株数) × 100

c) -は作付けしていないことを示す。

また、農薬散布履歴から各系統の使用回数を調査した結果、DMI剤は3戸の農家で年間4回以上使用されていた。QoI剤については2戸の農家で2回以上使用されていたが、抑制栽培ではいずれの農家でも使用されていなかった。特にQoI剤については、使用を中止後長期間経過しても耐性菌が検出された事例もあり (Ishii et al., 2007), 今回の調査結果は過去の防除履歴も影響している可能性が考えられる。実際に、過去の薬剤の使用状況を聞き取った結果、過去にはアゾキシストロビン剤を使用していたが防除効果が感じられなくなったために使用しなくなった生産者もいた。なお、両剤ともに他の成分とのローテーションで使用されており、連用は確認されなかった(データ省略)。

リーフディスク検定により耐性と判定された菌株についてトリフルミゾール水和剤およびアゾキシストロビン水和剤の防除効果を検討するため接種試験を行った(第2表)。無処理では、35.0~73.0の発病度が認められた。参考薬剤として供試したキノキサリン系水和剤の防除価はいずれの菌株についても96以上であり、高い防除効果が認められた。また、感受性菌であるK-7-2に対してトリフルミゾール水和剤およびアゾキシストロビン水和剤はいずれも防除価100と高い値を示した。これに対し、現地から採集した菌株については、トリフルミゾール水和剤の防除価はCP078以外の菌株では80未満であった。また、アゾキシストロビン水和剤については、いずれの菌株も防除価が50未満であり、中でもCP084のように防除価6.3と非常に低い菌株も認められた。

第2表 リーフディスク検定で耐性菌と判定されたキュウリうどんこ病菌株に対するトリフルミゾール水和剤およびアゾキシストロビン水和剤の接種試験における防除効果

供試薬剤	菌株名								
	CP078			CP079			CP082		
	感受性 ^{b)}	発病度 ^{c)}	防除価 ^{d)}	感受性	発病度	防除価	感受性	発病度	防除価
トリフルミゾール水和剤	R	6.0	91.8	R	15.0	76.2	R	13.8	60.7
アゾキシストロビン水和剤	R	41.0	43.8	R	32.0	49.2	R	31.3	10.7
キノキサリン系水和剤	-	2.0	97.3	-	2.0	96.8	-	0	100
無処理(水) ^{e)}		73.0			63.0			35.0	

供試薬剤	菌株名								
	CP083			CP084			K-7-2 ^{a)}		
	感受性	発病度	防除価	感受性	発病度	防除価	感受性	発病度	防除価
トリフルミゾール水和剤	R	8.8	78.8	R	15.0	75.0	S	0	100
アゾキシストロビン水和剤	R	31.3	24.2	R	56.3	6.3	S	0	100
キノキサリン系水和剤	-	1.3	97.0	-	0	100	-	1.0	98.1
無処理(水)		41.3			60.0			52.0	

a) K-7-2はJA全農営農・技術センターから分譲を受けた感受性菌株である。

b) 感受性:リーフディスク検定により判定された結果を表す。Sは感受性菌, Rは耐性菌を表す。-は感受性検定を行っていないことを表す。

c) 発病度 = {Σ(発病指数別ディスク数×発病指数)/(全ディスク数×5)} × 100

発病指数 0:発病なし, 1:病斑がディスク葉面積の5%以下, 2:6~25%, 3:26~50%, 4:51~75%, 5:76%以上

d) 防除価 = {100 - (薬剤区の平均発病度/無処理区の平均発病度)} × 100

e) 対照として水道水を散布した。

リーフディスク検定と接種試験での結果は概ね一致したことから、耐性菌検出率が高かった4農家については、各薬剤の防除効果が大きく低下し、十分な防除効果は期待できないと考えられる。一方、農薬散布履歴を調査した結果、使用回数が遵守され、ローテーションも行われており、適正な防除が行われていた。このため、両系統剤については適正使用を行っていたとしても、耐性菌の頻度が上昇し、薬剤の防除効果が低下しているものと考えられる。そのため、4農家においては本病を対象とした両系統剤の使用を中止し、本研究で実施した接種試験で耐性菌に対しても高い効果を示したキノキサリン系剤などの他系統剤を中心とした防除を行うべきと考えられる。

なお、DMI剤については使用を中止し、他系統の剤をうどんこ病の防除体系に組み込むことによって感受性菌割合が回復する事例が報告されている（浅利ら，1994）。今後も、耐性菌のモニタリングを多くの農家で行うことで、その可能性を検討していきたい。一方、QoI剤では本病の他に、キュウリの重要病害であるべと病や褐斑病などに対しても適用登録されており、これらでも耐性菌問題は発生している（Ishii et al., 2001 ; Ishii et al., 2007）。そのため、本剤の使用中止後の耐性菌の状況と使用の再開については、他の病害も合わせて検討していくことが重要であると考えられる。

2. SDHI剤の薬剤感受性の検討

リーフディスク検定によりK-7-2のSDHI剤に対する感受性を検討した結果、MIC値は25ppm、EC₅₀値は0.3であった。小原・堤（2015）は、MIC値が6.25～25ppm、EC₅₀値が0.39～6.25ppmの菌株を感受性菌と判定しており、この結果とほぼ一致した。一方、現地から採集した菌株では、既報のMIC値を大きく超える100以上である菌株が4農家すべてで検出され、農家Cの91%を最大にいずれも高率であった（第3表）。

第3表 キュウリ栽培4農家におけるペンチオピラド剤耐性うどんこ菌の検出率およびSDHI剤の作型毎の使用回数

採集圃場名 ^{a)}	ペンチオピラド剤 (SDHI 剤)					
	検定菌株数 (株)	耐性菌株数 (株)	耐性菌 ^{b)} 検出率 (%)	2016年の作型毎SDHI剤使用回数 (回)		
				促成	夏秋	抑制
農家A	8	3	38	3	- ^{c)}	1
農家B	8	7	88	未調査	1	1
農家C	11	10	91	2	-	0
農家D	14	10	71	未調査	未調査	0

a) 市名後ろのアルファベットは採集場所の農家が異なることを示す。

b) 耐性菌検出率 (%) = (耐性菌株数/検定菌株数) × 100

c) -は作付けしていないことを示す。

これら低感受性菌株に対する植物体上におけるペンチオピラド水和剤の防除効果を検討するため、ポット苗を用いた接種試験を行った。その結果、既報の感受性の範囲と一致したCP084では防除価が100であったのに対し、MIC値およびEC₅₀値がそれぞれ100以上、30以上となった4菌株では防除価が低下した（第4表）。

第4表 リーフディスク検定で耐性菌と判定されたキュウリうどんこ病菌株に対するペンチオピラド水和剤の接種試験における防除効果

供試薬剤	菌株名								
	CP078			CP079			CP082		
	MIC 値 ^{b)}	発病度 ^{c)}	防除価 ^{d)}	MIC 値	発病度	防除価	MIC 値	発病度	防除価
ペンチオピラド水和剤	>100	67.5	7.5	>100	50.0	20.6	>100	15.0	57.1
キノキサリン系水和剤	-	2.0	97.3	-	2.0	96.8	-	0	100
無処理 (水) ^{e)}		73.0			63.0			35.0	

供試薬剤	菌株名								
	CP083			CP084			K-7-2 ^{a)}		
	MIC 値	発病度	防除価	MIC 値	発病度	防除価	MIC 値	発病度	防除価
ペンチオピラド水和剤	>100	21.3	48.5	6.25	0	100	-	0	100
キノキサリン系水和剤	-	1.3	97.0	-	0	100	-	1.0	98.1
無処理 (水)		41.3			60.0			52.0	

- a) K-7-2はJA全農営農・技術センターから分譲を受けた感受性菌株である。
b) 最小生育阻止濃度。100ppmよりも大きい値は>100と表記した。-はMIC値を算出していないことを表す。
c) 発病度 = {Σ(発病指数別ディスク数×発病指数)/(全ディスク数×5)} × 100
発病指数 0:発病なし, 1:病斑がディスク葉面積の5%以下, 2:6~25%, 3:26~50%, 4:51~75%, 5:76%以上
d) 防除価 = {100 - (薬剤区の平均発病度/無処理区の平均発病度)} × 100
e) 対照として水道水を散布した。

これらの結果から、リーフディスク検定の既報の感受性範囲を超えるMIC値が25ppmかつEC₅₀値が6.25ppmを超える菌株については、ペンチオピラド水和剤の防除効果の低下を伴う耐性菌であると考えられ、第3表の結果から本耐性菌は常総市のキュウリ生産圃場において高頻度で分布することが推察された。また、耐性菌に対する本薬剤の防除価は7.5~57.1と低く、耐性菌の発達による防除効果の低下が大きいことも示された。したがって、ペンチオピラド剤は、これら農家圃場では実用的な防除効果は期待できないと推察される。

なお、本研究ではペンチオピラド剤の感受性検定法として新たに小原・堤(2015)によって報告された本葉を用いた方法で実施した。本報告のEC₅₀値、MIC値を超える菌株については、ポット試験において防除効果の低下が認められたことから、これらの基準値を超える菌株については耐性菌として評価できると考えられた。SDHI剤の検定法としてはボスカリド剤を用いたMiyamoto et al. (2010)の方法があるが、子葉で作成したリーフディスクを葉液に浮かべて行うものであった。本葉から作成したディスクを寒天培地上に並べて行う検定法は、キュウリ株数を節約できることや、ディスクの扱いなどで操作性に優れる点から、実用的な方法であると考えられた。

SDHI剤の使用履歴を調査した結果、農家A, B, Cでその使用が確認され、回数は年間で2回以上であり、いずれもペンチオピラド水和剤であった。本剤は他系統薬剤とのローテーション散布で使用されており、連用は認められなかった。Miyamoto et al. (2010)の報告では、SDHI(ボスカリド)剤の使用回数が少ない圃場でも耐性菌発生が確認された事例がある。以上のことから、本病原菌では、SDHI剤

についてもQoI剤やDMI剤と同様に適正な農薬使用を行っていても、耐性菌頻度が上昇し実用的な防除効果が失われていることが考えられた。したがって、調査を行った4農家については、前述の2系統剤に加えてペンチオピラド水和剤についても使用を中止する必要があると考えられた。なお、SDHI剤については同じくキュウリで耐性菌が多発生した褐斑病 (Miyamoto et al., 2009) などに対してボスカリド水和剤が農薬登録されている。Ishii et al. (2011) よれば、両剤に対する耐性は交叉することが明らかになっていることから、両病原菌に対する耐性発達を抑制するためには、ボスカリド水和剤の使用も合わせて中止するべきである。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、うどんこ病菌株K-7-2およびLog-linear model softwareを全国農業協同組合連合会から提供いただきました。厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 浅利 覚・中澤靖彦・馬場信吾・樋口 進 (1994) 関東東山病害虫研究会年報. 41:69-75.
- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T. and Hollomon, D. W. (2001) *Phytopathology* 91:1166-1171.
- Ishii, H., Yano, K., Date, H., Furuta, A., Sagehashi, A., Yamaguchi, T., Sugiyama, T., Nishimura, K. and Hasama, W. (2007) *Phytopathology* 97:1458-1466.
- Japan FRAC (2017) FRACコード表 2017年4月版. <<http://www.jcpa.or.jp/labo/jfrac/code.html>> (2017年9月12日閲覧)
- Miyamoto, T., Ishii, H., Seko, T., Kobori, S. and Tomita, Y. (2009) *Plant Pathol* 58:1144-1151.
- Miyamoto, T., Ishii, H. and Tomita, Y. (2010) *J Gen Plant Pathol* 176:261-267.
- 宮本拓也・藤本義子・富田恭範・小河原孝司 (2016) 茨城県農業総合センター園芸研究所研究報告 23.
- 中澤靖彦・大塚範夫 (1998) 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル I pp. 50-52 一般社団法人日本植物防疫協会東京.
- 小原敏明・堤 京子 (2015) *植物防疫* 69(9):19-24.
- 武田敏幸 (2009) 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II pp. 17-22 一般社団法人日本植物防疫協会東京.
- Uchida, K., Takamatsu, S., Matsuda, K., So, K. and Sato, Y. (2009) *J Gen Plant Pathol* 75:92-100.