

福井県におけるチオファネートメチル剤耐性ダイズ紫斑病菌の発生と有効薬剤

本多 範行・佐藤 陽子

Noriyuki HONDA and Yoko SATO : Occurrence and control effect of fungicide of Thiophanatemethyl-resistant strains of Soybean purple seed stain in Fukui Prefecture

福井県におけるダイズの作付面積は約1,000haで、そのほとんどが水田転作で栽培されている。紫斑病は種子および葉に発生し、種子では表面の一部あるいは全面を紫色に変色させ、品質を低下させる。本県では、紫斑病に対してチオファネートメチル剤を含むベンズイミダゾール系殺菌剤が1975年から種子消毒剤および散布剤として使用され、高い防除効果を発揮してきた。しかし、1990年頃から全国的にチオファネートメチル剤の効果の減退が指摘されてきた^{1,2,3)}。本県では1991年に、適期に散布しているにもかかわらず、紫斑病が多発する圃場があり、問題となった。そこで、本県におけるチオファネートメチル剤耐性紫斑病菌の発生状況を調査し、代替薬剤について検討したので報告する。

試験方法

1. 分離菌

1991年、1992年に第1表に示す県内13ヶ所のダイズ圃場から紫斑粒を採取した。常法により表面殺菌し、素寒天(WA)培地に置床し、伸長してきた菌糸を切り取り、127菌株の紫斑病菌を分離した。また、1995年の圃場試験で採取した紫斑粒から同様に65菌株を分離した。なお、対照としてチオファネートメチル剤が使用される以前の1952年に分離されたMAFF03-05041(以降03S)菌株を用いた。

2. 最小生育阻止濃度の測定

1991年、1992年に分離した127菌株は、PDA培地で前培養した菌体ディスクを、培地中の濃度が1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800および1,600ppm(成分比、以下同じ)になるように、チオファネートメチル剤を添加したジャガイモ・デキストロース・寒天(PDA)培地に移植した。26°C, 3日間培養後に、菌糸生育の有無を調査した。

1995年に分離した65菌株は、PDA培地とWA培地で前培養した菌体ディスクを、薬剤濃度が1.56, 6.25, 25, 100, 400, 1,600および6,400ppmのPDA培地に移植し、25°C, 4日間培養後、菌糸の生育の有無を調査し、最小生育阻止濃度(MIC)を測定した。

3. 菌糸生育阻止率の測定

チオファネートメチル剤、ベノミル剤、イプロジオン剤、塩基性硫酸銅剤、プロシミドン剤およびジエトフェンカルブ剤を供試した。所定濃度になるように添加したPDA培地にPDA培地で前培養した紫斑病菌の菌叢ディスクを移植し、25°C, 6~8日間培養後の菌叢直径を測定した。菌叢直径からディスクの直径を差し引いた値をもとに、次式から菌糸生育阻止率を算出した。

$$\text{菌糸生育阻止率 (\%)} = (a - b) / a \times 100$$

a : 薬剤無添加培地での菌叢直径

b : 薬剤添加培地での菌叢直径

4. 分生胞子に対する感受性

PDA培地で培養した紫斑病菌の気中菌糸を洗い落とし、3日間照明後、24時間暗黒下におき、分生胞子を形成させた。殺菌水に懸濁させた分生胞子液を、チオファネートメチル剤添加PDA培地に塗り付け、25°C, 7日間培養後、菌糸の生育を調査した。

また、紫斑粒を常法により表面殺菌後、湿室状態としたシャーレに置き、25°C, 5日間培養し分生胞子を形成させた。分生胞子を直接、白金耳でかきとり、チオファネートメチル剤添加PDA培地に塗り付け、25°C, 7日間培養後、菌糸の生育を調査した。

5. ダイズ切離葉における防除効果

ダイズ(品種:エンレイ)の単葉をチオファネートメチル剤の1.56, 6.25, 25, 100, 400ppm希釈液にtween 20が5,000倍になるように添加し、5分間浸漬後、風乾した。これにPDA培地で培養した菌叢ディスクを移植し、湿室状態に保った。25°C, 12日間培養後、病斑直径を測定した。

6. 圃場における防除効果試験

福井市寮町の水田転換畑のダイズ(品種:エンレイ, 播種:1995年6月上旬, 開花期:7月下旬, 収穫期:10月中旬)栽培圃場で行った。試験は1区20㎡, 3連制で行った。ジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤(ジェットフェンカルブ12.5%・チオファネートメチル52.5%水和剤)は1,000倍液を10a当たり200ℓ, チオファネートメチル剤(2%粉剤)と塩基性硫酸銅剤(17.7%粉剤)は10a当たり4kgを, 1995年8月14日と8月28日に散布した。収穫期の10月11日に区の中央60株を刈り取り, 風乾, 脱穀後, 紫斑粒率を調べるとともに, 紫斑粒から紫斑病菌を分離し, チオファネートメチル剤およびジェットフェンカルブ剤に対する耐性検定を行った。チオファネートメチル剤濃度100ppmでも菌糸が伸長してきた菌株をチオファネートメチル剤耐性菌とした。また, ジェットフェンカルブ剤では濃度6.25ppmで菌糸生育量4mm以上の菌株をジェットフェンカルブ剤耐性菌とした。

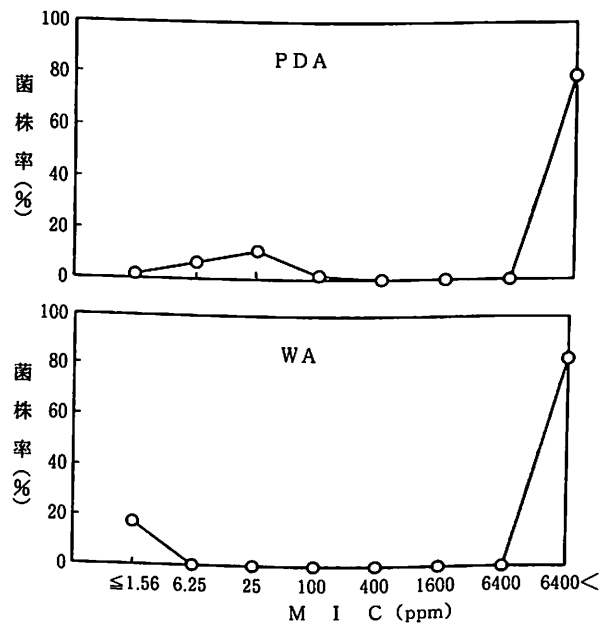
試験結果

1. 福井県における耐性菌の発生

地域別の耐性菌の発生状況を第1表に示した。13カ所の紫斑粒から分離した127菌株のうち, 124菌株は1,600ppmでも生育する高度耐性菌で, 分離率は98%と高かった。他の3菌株のMIC値は, それぞれ6.25ppm, 12.5ppmおよび50ppmであった。対照に用いた03S菌株は1.56ppm以下と低かった。品種, 地域による差は

認められず, 本県においても高い割合で耐性菌の発生が認められた。

圃場試験で採取した紫斑粒から分離した65菌株の培地をかえて耐性検定を行った結果を第1図に示した。PDA培地で前培養すると, MIC値が25ppmと6,400ppm以上にピークのある2群に分かれた。しかし,



第1図 ダイズ紫斑病菌の前培養の培地とMICの頻度分布

第1表 ダイズ紫斑病菌に対するチオファネートメチル剤最小生育阻止濃度頻度分布

採取地	品種	最小生育阻止濃度 (ppm)											
		1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	1600<
福井市1	エンレイ	0 ^{a)}	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	34
福井市2	タチナガハ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
大野市	エンレイ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
金津町1	エンレイ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
金津町2	エンレイ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
丸岡町1	エンレイ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
丸岡町2	エンレイ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
清水町1	エンレイ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28
清水町2	エンレイ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
清水町3	エンレイ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
清水町4	タチナガハ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
清水町5	不明	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
清水町6	エンレイ	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3
計		0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	124

注 a) 菌株数

WA 培地で前培養すると MIC 値は 1.56ppm 以下と 6,400 ppm 以上の 2 群に分かれた。WA 培地で前培養すると感性菌は低濃度でも、全く菌糸生育は認められなかった。また、ジェットフェンカルブ剤 1.56ppm 添加培地においても、WA 培地で前培養した場合、感性菌は菌糸の生育は全く認められなかった。

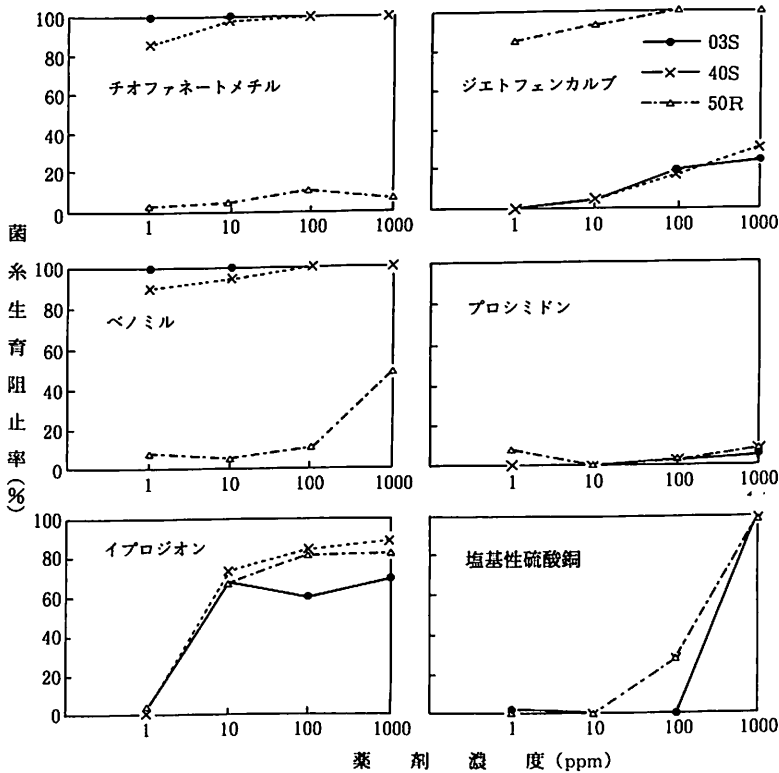
2. 各種薬剤に対する感受性

感性菌と耐性菌の各種薬剤における菌糸生育阻止率を第 2 図に示した。感性菌である 40S 菌株, 03S 菌株はチオファネートメチル剤 1 ppm で、菌糸の生育がそれぞれ 86%, 100% 抑制されたが、40S 菌株の生育阻止率は 03S 菌株に比べやや低かった。チオファネートメチル剤に耐性を示す 50R 菌株は、チオファネートメチル剤 1,000 ppm でも生育し、阻止率は 7% と低かった。チオファネートメチル剤耐性菌はベノミル剤に対しても、同様に菌糸の生育阻止率は低く、交差耐性を示した。ベノミル剤においても 40S 菌株は 03S 菌株に比べて、菌糸生育阻

止率はやや低かった。しかし、ジェットフェンカルブ剤に対して、50R 菌株は 1 ppm で 85%, 100ppm で 100% 菌糸生育が抑制された。反対に 03S 菌株, 40S 菌株は 1,000ppm 濃度での阻止率は 25%, 31% と低く、負の交差耐性を示した。また、ダイズに登録のあるイプロジオン剤、塩基性硫酸銅剤、プロシミドン剤では耐性菌と感性菌との差は認められなかった。各剤における 1,000ppm 濃度での菌糸生育阻止率は、塩基性硫酸銅剤が 98~100% と高く、次いでイプロジオン剤の 69~88% で、プロシミドン剤では 7~12% とほとんど効果が認められなかった。

3. 菌糸生育阻止率の測定

感性菌でも 03S 菌株と 40S 菌株とでは、チオファネートメチル剤 1 ppm 濃度で感受性が若干異なった。そこで耐性菌を含めた紫斑病菌 20 菌株について、チオファネートメチル剤 0.006, 0.02, 0.1, 0.39, 1.56, 6.24, 25 および 100ppm 濃度における菌糸生育阻止率を第 3 図



第 2 図 ダイズ紫斑病菌に対する各種薬剤の菌糸生育阻止率

に示した。菌糸生育が100%抑えられる濃度は菌株ごとに異なったが、50%生育が阻止される濃度（EC50）が、0.1~0.39ppmは9菌株、0.39~1.56ppmは4菌株および100ppm以上は7菌株の3群に分かれた。03S菌株、40S菌株は0.1~0.39ppmの群に含まれた。また、チオファネートメチル剤をオートクレイブで加圧滅菌前に添加するとEC50は、それぞれ0.02~0.1ppmが11菌株、0.1~0.39ppmが2菌株、100ppm以上が7菌株とチオファネートメチル剤の効果が高まった。

4. 分生胞子に対する感受性

分生胞子に対する検定結果を第2表に示した。感性菌は5ppmチオファネートメチル剤添加培地上で接種1日後に、わずかに分生胞子は発芽したが、菌糸の先端は膨張し、明らかに異常が認められた。培養15日後に感性菌は1ppm濃度で菌糸は伸長し、黒褐色のコロニーを形成したが、無処理や耐性菌のように気中菌糸を形成するには至らなかった。また、紫斑粒上に形成させた分生胞子を、直接検定用培地に塗り付けると、124菌株のうち123菌株は100ppmでも生育した。

5. ダイズ切離葉における防除効果

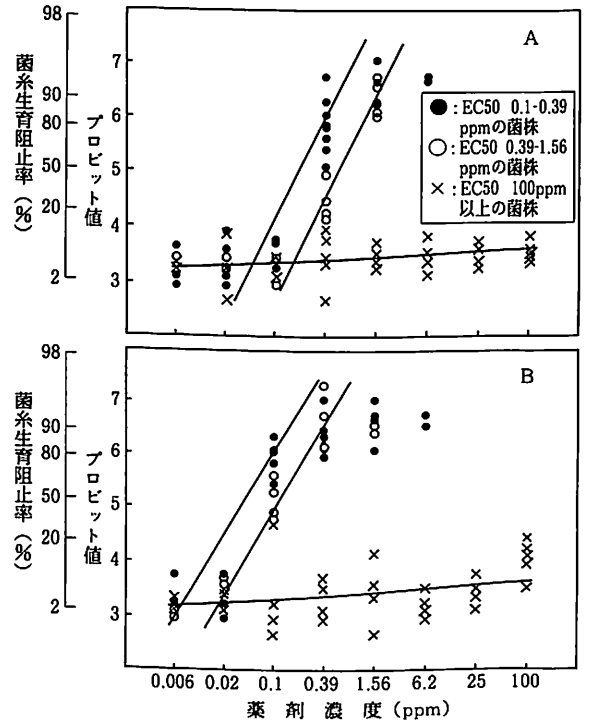
ダイズ切離葉におけるチオファネートメチル剤の病斑伸長抑制効果を第3表に示した。感性菌は100ppmでディスク接種部位に、わずかに褐変が見られるだけでは病斑の進展を抑えた。耐性菌に対しては400ppmでも効果は不十分であった。なお、薬剤無処理葉に対する各菌株の病原性はほとんど同じと考えられた。

6. 圃場における防除効果と耐性菌比率

耐性菌発生圃場における紫斑病に対する薬剤の効果を示した。無散布区で紫斑粒率が2.08%と低い条件での試験であった。また、耐性菌比率は無散

布区で83%であった。

ジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤散布区の紫斑粒率は0.03%と低く、防除価99の高い効果が認め



第3図 ダイズ紫斑病菌に対するチオファネートメチル剤の菌糸生育阻止率^{a)}

注) A : チオファネートメチル剤を加圧滅菌後に添加
B : チオファネートメチル剤を加圧滅菌前に添加
a) 25℃, 5日間培養

第2表 チオファネートメチル剤に対する紫斑病菌胞子の感受性

菌株番号	培養日数	薬 剤 濃 度 (ppm)						
		0	0.5	1	5	10	50	100
03 (S)	7	+++ ^{a)}	++	±	±	±	±	±
	15	+++	++	±	±	±	±	±
40 (S)	7	+++	±	±	-	-	-	-
	15	+++	±	±	-	-	-	-
55 (S)	7	+++	++	±	-	-	-	-
	15	+++	++	±	-	-	-	-
50 (R)	5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
62 (R)	5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

注 a) シャーレ上に菌糸の占める面積が、+++ : 50%以上, ++ : 20%~50%, + : 1~20%, ± : わずかに菌糸生育が認められるが気中菌糸は生育していない, - : 菌糸の生育は認められない

第3表 ダイズ切離葉におけるチオファネートメチル剤に対する紫斑病菌の感受性^{a)}

菌株番号	薬剤濃度 (ppm)					
	0	1.56	6.25	25	100	400
03 (S)	3 ^{b)}	2	±	±	±	±
40 (S)	13	±	±	±	±	±
50 (R)	6	15	20	16	16	21

注 a) 25°C, 12日間培養, 1処理当たりダイズ3単葉とした

b) 病斑長 (mm), ±: ディスク接種部位がわずかに褐変

第4表 チオファネートメチル剤耐性ダイズ紫斑病菌発生圃場における薬剤の防除効果^{a)}

薬剤名	調査粒数	紫斑粒数	紫斑粒率	防除価
ジェットフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤 ^{b)}	4,579粒	1.3粒	0.03%	99
チオファネートメチル粉剤 ^{c)}	4,133	10.0	0.24	88
塩基性硫酸銅粉剤 ^{c)}	4,249	17.7	0.42	80
無散布	4,545	96.0	2.08	—

注 a) 品種: エンレイ。1区20㎡ 3連制。開花約21日後, 35日後の2回散布。チオファネートメチル剤耐性菌率83% (無散布区)

b) 1,000倍 200ℓ/10a c) 4kg/10a

第5表 ダイズ紫斑病の防除薬剤とチオファネートメチル剤耐性菌比率

処理	菌株数	チオファネートメチル剤耐性菌		ジェットフェンカルブ剤耐性菌	
		菌株数	比率	菌株数	比率
ジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤	3	0	0%	3	100%
チオファネートメチル剤	9	9	100	0	0
塩基性硫酸銅剤	20	16	80	4	20
無散布	23	19	83	4	17

められた。チオファネートメチル剤, 塩基性硫酸銅剤散布区の紫斑粒率は, それぞれ0.24%, 0.42%と防除効果が認められたが, ジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤散布区より劣った。ジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤散布区から分離した3菌株は, 全てチオファネートメチル剤感性菌であった。チオファネートメチル剤散布区から分離した9菌株は, 全てチオファネートメチル剤耐性菌であった。塩基性硫酸銅剤散布区から分離した20菌株のうち, 16菌株が耐性菌で, 耐性菌比率は無散布区とほぼ同じであった。また, チオファネートメチル剤とジェットフェンカルブ剤両方に耐性の菌株は分離されなかった。

考 察

チオファネートメチル剤などのベンズイミダゾール系殺菌剤は, 各種作物の菌核病, 灰色かび病など多くの糸状菌病に卓効を示すことから, 広く用いられてきた。しかし, β -チューブリン遺伝子のわずかに1塩基の変異に

よって耐性菌が発生する¹⁰⁾ことから, 世界各地で耐性菌の発生は問題となっている。本県でも紫斑病防除に10年以上にわたり, 連用されてきた。そのために, 県内の紫斑粒採取地の全てから, 1,600ppm以上でも生育する高度耐性菌が, 高い割合で発生したと考えられた。

耐性検定を行うにあたって, 本菌のPDA培地上での菌叢は, 盛り上がり厚くなるため検定用培地に密着しない。灰色かび病においても, 接種する菌叢ディスクの厚さが2mm以上になると, 薬剤と直接接しないディスク面に菌が生育することがある⁹⁾。また, ブドウ黒とう病においては, PDA培地で菌叢の厚さが不均一になるが, WA培地で菌叢は薄く, 均一に, かつ速く生育するため, MICの判定に適しているとされている⁶⁾。ジェットフェンカルブ剤を含む培地にPDA培地で前培養したディスクを置床すると感性菌であっても菌糸が1~2mmは伸長する⁹⁾。しかし, WA培地で前培養した菌叢ディスクを用いると, 全く菌糸の伸長は見られなかった。この培地では気中菌糸の生育がないため, 菌叢面が培地に

密着し、菌糸生育の有無の判定が容易である。しかし、WA 培地では PDA 培地に比べて本菌の生育が遅いため、菌叢ディスクを確保するために日数を要する欠点がある。

各種薬剤に対する本菌の菌糸生育阻止率から、チオファネートメチル剤耐性菌に対してジェットフェンカルブ剤および塩基性硫酸銅剤の効果が期待された。しかし、感性菌のなかでも、チオファネートメチル剤、ペノミル剤に対して、感受性が異なった。これまでも中等度耐性菌と思われる菌株が分離されている²⁾。灰色かび病菌やカンキツそうか病菌では中等度耐性菌の増加によって、ジェットフェンカルブ剤との混合剤の効力減退が報告されている³⁾。灰色かび病菌では感性菌に対する EC50 は 1 μg/ml 以下である。本試験で、MIC の異なる感性菌の EC50 は 1.56ppm 以下であったこと、圃場試験でジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤散布区から分離した菌株の EC50 は O3S 菌株と同じ 0.1~0.39ppm あったこと、また、分生孢子発芽試験法、切離葉を用いた防除試験から感性菌 O3S 菌株と同様の傾向であったことから、本県において中等度耐性菌は発生しておらず、高度耐性菌がほとんどと考えられた。

孢子発芽試験法では、紫斑粒上に形成させた分生孢子を直接検定するため、短期間で検定できる。他の糸状菌が生育することがあるが、7日間培養後の菌叢から十分判定が可能で、簡易な検定法として有効と考えられた。

耐性菌発生圃場における防除試験で、チオファネートメチル剤の効果はまだ認められた。しかし、採取した紫斑粒から分離されたのは高度耐性菌であったことから、耐性菌に対する効力減退は明らかであった。チオファネートメチル剤に代わる薬剤を用いた防除試験は各地で実施されており、ジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤、ピリフェノックス剤、イミノクタジナルベシル酸塩剤、および銅剤などの有効性が認められている⁵⁾。圃場試験では紫斑病の発生が少なく、分離菌株数が少なかったが、高度耐性菌率が高い圃場において、ジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤の高い防除効果が認められた。ジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤は野菜の灰色かび病の耐性菌対策として開発された薬剤であり、県内でも広く使用されており、ダイズへの登録が期待される。耐性菌の発生によって紫斑病の発生が多い地域では、塩基性硫酸銅剤などによる対応が必要と考えられる。

摘 要

1. 1991, 1992年に福井県内の13圃場から採取したダイズ紫斑粒から紫斑病菌を分離し、チオファネートメチル剤に対する耐性検定と、耐性菌に対する有効薬剤の

検索を行った。

2. チオファネートメチル剤に対する MIC 値は 50ppm 以下と 1,600ppm 以上に分かれた。1,600ppm 以上の菌株は全ての採取地から分離された。

3. ダイズ切離葉を用いて耐性菌に対するチオファネートメチル剤の病斑進展抑制効果を調べたところ、明らかに防除効果が低かった。

4. チオファネートメチル剤耐性菌はペノミル剤に対して交差耐性を示したが、ジェットフェンカルブ剤に対しては負の交差耐性を示した。他の3種類の薬剤には耐性を有しなかった。

5. 本菌を WA 培地で前培養すると、PDA 培地に比べて、菌叢は薄く、均一になるため、検定用培地上での MIC の判定が容易であった。

6. 孢子発芽試験法において、感性菌は 1 ppm で菌糸の異常を示し、ほとんど生育しなかったが、耐性菌は薬剤無添加の場合とほとんど変わらない菌糸生育をした。

7. 耐性菌発生圃場におけるジェットフェンカルブ・チオファネートメチル剤の防除効果はチオファネートメチル剤より高かった。

引用文献

- 1) 福西 務・奥村直志・小坂能尚 (1991) ダイズ紫斑病菌のチオファネートメチル剤に対する薬剤耐性. 関西病虫研報 33: 55~56.
- 2) 福西 務 (1995) 植物防疫講座 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル (19) ダイズ紫斑病菌. 植物防疫 49: 213~214.
- 3) 家城洋之 (1995) 植物防疫講座 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル (18) カンキツそうか病菌. 植物防疫 49: 169~171.
- 4) 木曾 皓 (1994) 植物防疫講座 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル (6) ダイズ紫斑病菌. 植物防疫 49: 42~46.
- 5) 向島博之・斉藤 毅 (1996) チオファネートメチル耐性大豆紫斑病菌の出現とその代替薬剤. 北陸農業研究成果情報 12: 30~31.
- 6) 田代暢哉 (1995) 植物防疫講座 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル (18) ブドウ黒とう病菌. 植物防疫 49: 167~169.
- 7) 竹内妙子 (1993) 千葉県で発生したベンズイミダゾール, ジカルボキシイミド, ジェットフェンカルブに多剤耐性を示す灰色かび病菌. 関東東山病虫研報 40: 47~49.
- 8) 氏家 敬・笠松紀美・清水勝之助・大塩裕陸 (1992) ジェットフェンカルブに関する灰色かび病菌薬剤感受性検定方法の検討. 日植病報 58: 608.

- 9) 山田裕章・北村義男・高士祥助 (1994) ベンズイミ
ダゾール系薬剤耐性シュンギク葉枯病菌および大豆
紫斑病菌の出現と薬剤の防除効果. 関西病虫研報
36 : 93~94. 198 and 200 of Beta-Tubulin that Correlate
with Benomyl - Resistance Phenotypes of Field
Strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*
83 : 1478~1483.
- 10) Yarden, O. and Katan, T. (1993) Mutations
Leading to Substitutions at Amino Acids (1996年8月28日受領)
-