

7 検定結果

(1) 薬剤耐性菌検定

1. QoI剤耐性の遺伝子型を持つぶどうのべと病菌

ア. 目的

平成24年度に調査したブドウべと病菌のQoI剤（アゾキシストロピン剤、クレソキシムメチル剤等）耐性菌検定（遺伝子診断）によって、本県の一部のブドウ園でQoI剤耐性菌が発生している可能性が示唆された。このため、平成25年度は更に調査地点を増やしてQoI剤耐性菌の発生実態を調査し、防除指導の基礎資料とする。

イ. 検定概要

平成25年5～11月、県内8市町の20圃場からべと病の発病葉を採集（計23試料；3圃場は採取時期が異なる2サンプルを供試）した。1圃場当たり1葉からべと病菌のDNAを抽出し、遺伝子診断（PCR-RFLP）を行った。PCRの手順はFuruyaら（2009）を参考にし、95℃で3分の変性後、95℃で1分、53℃で1分、72℃で1分を35サイクル繰り返し、最後に72℃で7分の伸長反応を行った。このPCR産物をQoI剤耐性菌のチトクロームb遺伝子の変異部位を認識する制限酵素ApeKIで消化し、75℃で16時間処理した後アガロースゲル電気泳動により標的部位の切断の有無を確認した。

ウ. 結果の概要

PCR-RFLPの結果、供試23検体のうち15検体でPCR産物が切断された。この変異菌は感受性菌と比較して遺伝子のアミノ酸配列が1か所異なり、QoI剤に対する感受性が低下している可能性が高いと考えられた。

サンプルの採取地域別に見ると、変異菌の地理的分布に明瞭な傾向は認められず、圃毎に異なっていたことから、耐性菌の発生要因として圃地の薬剤散布履歴との関係が疑われた。

表 H25分離ブドウべと病菌のQoI剤耐性菌検定結果

No.	採集地	採集月日	品種	PCR-RFLP結果 ¹⁾		判定 ²⁾
				1回目	2回目	
1	佐世保市崎岡	2013/5/29	巨峰	+	+	R
2	大村市鬼橋	2013/6/5	巨峰	-	-	S
3	大村市福重	2013/6/11	巨峰	+	+	R
4	大村市福重 -1	2013/6/11	巨峰	+	+	R
5	佐世保市崎岡 -1	2013/7/9	巨峰	+	+	R
6	時津町	2013/7/10	ピオーネ	-	-	S
7	西彼下岳	2013/7/11	巨峰	+	+	R
8	西彼下岳 -1	2013/7/11	巨峰	-	-	S
9	西彼下岳 -2	2013/7/24	巨峰	-	-	S
10	佐世保市崎岡 -2	2013/7/30	巨峰	+	+	R
11	大村市福重 -2	2013/7/30	巨峰	+	+	R
12	時津町	2013/10/2	巨峰	+	+	R
13	時津町	2013/10/2	巨峰	-	-	S
14	南島原市(西有家)	2013/10/4	ピオーネ	+	+	R
15	島原市(有明; デラ)	2013/10/4	デラウエア	+	+	R
16	島原市(有明; ふじみのり)	2013/10/4	ふじみのり	+	+	R
17	松浦市御厨	2013/10/7	巨峰	-	-	S
18	松浦市御厨	2013/10/7	巨峰	-	-	S
19	松浦市御厨	2013/10/7	巨峰	+	+	R
20	松浦市御厨	2013/10/7	巨峰	+	+	R
21	松浦市御厨	2013/10/7	巨峰	+	+	R
22	島原市(安中)	2013/10/29	巨峰	-	-	S
23	南島原市有家町(巨峰; 前年QoI-S圃)	2013/11/6	巨峰	+	+	R

1) + : 変異あり(バンドが2本)、- : 変異なし(バンドが1本) 2) R: QoI剤耐性、S: QoI剤感受性

2. ブドウ褐斑病菌の薬剤耐性

ア. 目的

近年、国内外のブドウ産地でQoI剤に対し耐性を示すブドウ褐斑病菌の存在が示されている。また、本県では近年、収穫後にブドウ褐斑病が蔓延して早期落葉の原因となっている事例が多く見られることから、適切な防除の必要性が再認識されつつある。ここでは、県下のブドウ園で発生している褐斑病菌の各種薬剤に対する耐性の程度を明らかにし、適切な防除体系の構築に寄与することを目的として培地上での菌糸伸長を指標とした薬剤耐性菌検定を行なった。

イ. 検定概要

平成25年9～11月、県内15圃場から褐斑病の罹病葉を採集し、1圃場あたり2菌株を上限に単孢子分離または単菌糸分離により計23菌株を得た。QoI剤の場合には没食子酸n-プロピル（以下、PG）を5mM添加したPDA培地を、他の薬剤はPG無添加のPDA培地を用いて各供試薬剤を1,000～0.1ppmとなるように調整した平板培地に予めPIA培地で培養しておいた供試菌株の菌そうディスク（6mm）を切り出し、1.2mlの滅菌水で磨砕してマイクロプランタで滴下して移植した。移植後の各種薬剤含有培地は27℃下に静置し、約2週間後に菌糸伸長の有無を調べた。

ウ. 結果の概要

（1）ストロビードライフロアブル

供試22菌株は1000ppmでも生育する18菌株と1ppmで菌糸伸長が見られない15菌株に類別され、前者を耐性菌とすると、耐性菌の出現頻度は81.8%に達した。

（2）ファンタジスタ顆粒水和剤

供試22菌株はすべて10ppmで菌糸伸長が認められず、内4菌株は1ppmでも菌糸伸長は認められなかった。耐性菌は認められなかった。

（3）トリフミン水和剤

供試22菌株のうち、1菌株は10ppmで菌糸伸長が認められず、1ppmで菌糸伸長が認められないものが13菌株と0.1ppm以上で菌糸伸長が見られないものが8菌株存在した。耐性菌は認められなかった。

（4）オンリーワンフロアブル

供試22菌株はすべて10ppm以上で菌糸伸長が見られず、内19菌株は1ppmでの菌糸伸長も認められなかった。耐性菌は認められなかった。

（5）ベンレート水和剤

供試22菌株のうち21菌株が100ppm以上で菌糸伸長が認められ、内10菌株は1000ppmでも菌糸伸長が認められた。0.1ppmで菌糸の伸長が認められない感受性菌が1菌株認められたものの、100ppm以上の耐性菌の出現率は95.5%に達した。

表 H25分離ブドウ褐斑病菌に対する各種薬剤の最小生育阻止濃度(MIC)

No.	採集地	菌株名	最小生育阻止濃度(ppm)				
			ストロビードラ イフロアブル	ファンタジス 夕顆粒水和	トリフミン水和 剤	オンリーワン フロアブル	ベンレート水 和剤
1	佐世保崎岡	K2	1000<	10	0.1>	1	1000<
2	佐世保崎岡	K3	1000<	10	1	1	1000<
3	西彼下岳	K5	1000<	10	0.1>	1	1000
4	時津町	K6	1000<	10	0.1>	1	1000
5	時津町	K7	1000<	10	0.1>	1	1000
6	南島原市(西有家)	K10	1000<	10	1	1	1000<
7	南島原市(西有家)	K11	1	1	0.1>	10	1000<
8	島原 ; 島原市(有明)	K12	1000<	10	1	1	1000
9	島原 ; 雲仙市(吾妻)	K15	1	1	0.1>	1	0.1>
10	御厨	K16	1000<	10	1	1	1000<
11	御厨	K17	1000<	10	1	1	1000
12	御厨	K18	1000<	10	1	1	1000<
13	御厨	K19	1000<	10	10	10	1000<
14	御厨	K21	1000<	10	0.1>	1	1000
15	御厨	K22	1000<	10	1	1	1000<
16	御厨	K23	1000<	10	0.1>	1	1000
17	御厨	K25	1000<	10	1	10	1000
18	島原	K26	1	10	1	1	1000<
19	国見	K28	1	1	1	1	1000
20	国見	K29	1	1	1	1	1000<
21	安中	K30	1000<	10	1	1	1000
22	安中	K31	1000<	10	1	1	1000

注) 耐性と判断される場合にはMIC値を太文字で標記した