通し番号	４６２５	分類番号	24-25-13-02

ウリ科野菜つる枯病菌のQoI剤耐性菌検定手法の確立

［要約］　ウリ科野菜つる枯病菌のQoI剤耐性菌は、アゾキシストロビンを含有する没食子酸*n*-プロピル加用ポテトデキストロース寒天培地を用いて判定できる。また、耐性菌のチトクローム*b*遺伝子の塩基配列の解析からPCR－RFLPによる遺伝子診断の利用が可能である。

神奈川県農業技術センター・生産環境部　　連絡先　0463-58-0333

［背景・ねらい］

ウリ科野菜つる枯病防除剤として効果の高いアゾキシストロビン水和剤およびクレソキシムメチル水和剤などのQoI剤は薬剤耐性の発達リスクが高い。そこでウリ科野菜つる枯病におけるQoI剤耐性菌検定手法を確立する。

［成果の内容・特徴］

1　2011年7月8日に三浦半島地区のウリ科野菜29ほ場から採集したつる枯病菌に対するアゾキシストロビン剤の最小生育阻止濃度（MIC）は、没食子酸*n*-プロピル４mM加用ポテトデキストロース寒天(PDA)培地において、アゾキシストロビン原体では0.2～1.56μg/ml および400μg/ml以上（図１）、製剤（商品名：アミスター20フロアブル、有効成分20%）では0.39～6.25μg/mlおよび400μg/ml以上の、明瞭な２峰性をしめす（図２）。

2　MICが400μg/ml以上の感受性低下菌株は、アゾキシストロビン剤によるメロン苗の防除試験で薬剤の効果が認められないことから耐性菌と判定できる（表１）。

3　アゾキシストロビン原体または製剤を400μg/ml含有する没食子酸*n*-プロピル加用ポテトデキストロース寒天(PDA)培地上での菌糸生育の有無により、耐性菌の検定が可能である。

4　アゾキシストロビン耐性菌のチトクローム*b*遺伝子の塩基配列は、キュウリうどんこ病菌、キュウリ褐斑病菌、イチゴ炭疽病菌等他の数種の病原菌のQoI剤耐性菌と同様、１塩基のみG（グアニン）からC（シトシン）に変異している。この変異を基にして本菌においても耐性菌の検定には、制限酵素*Ita*Ⅰを用いたPCR－RFLPによる遺伝子診断（Ishii et al., 2001)の利用が可能である。

［成果の活用面・留意点］

1　QoI剤の単剤として、スイカおよびメロンにアゾキシストロビン水和剤、クレソキシムメチル水和剤の適用がある。この２剤は正の交差耐性を示すため、アゾキシストロビン剤耐性菌と判定された場合クレソキシムメチル剤についても同様に耐性菌と判断される。

［具体的データ］

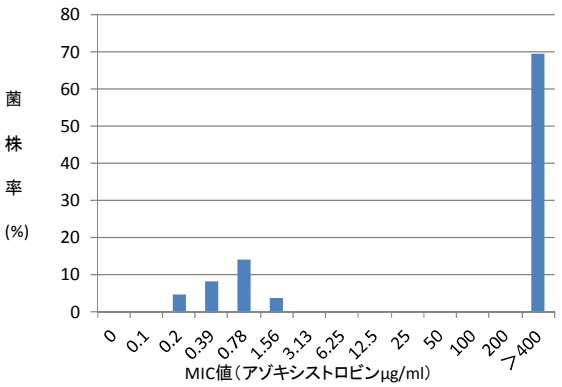


図1 神奈川県三浦半島地区から採集したウリ科野菜つる枯病菌のアゾキシストロビン原体に対する感受性(n=108)

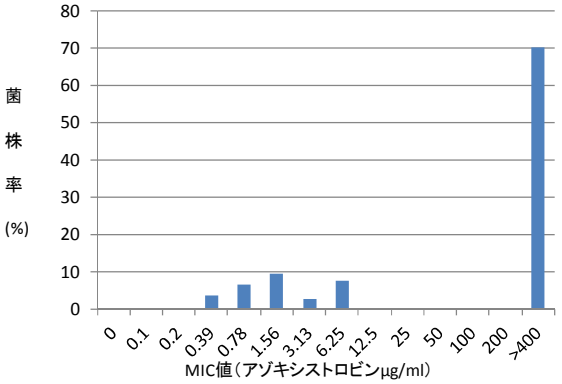


図2 神奈川県三浦半島地区から採集したウリ科野菜つる枯病菌のアゾキシストロビン製剤に対する感受性(n=107)

表１　アゾキシストロビン感受性低下菌に対するアゾキシストロビン20%水和剤の防除効果

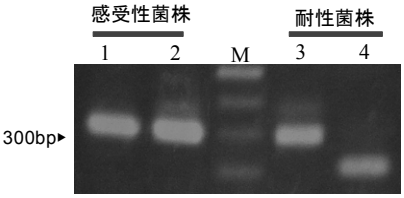
供試菌株	採集場所	採集年月	発病度[a)]		防除価[b)]
			散布	無散布	
21-1	横須賀市長井(Bほ場)	2011年7月	22.0	21.4	0
22-3	横須賀市長井(Cほ場)	2011年7月	18.5	13.0	0
KNOF62	横浜市(感受性菌)	2007年9月	1.6	41.5	96

[a)]発病度＝Σ（程度別指数×程度別葉数）／(4×調査葉数)×100.
0: 病斑を認めない，　1: 病斑面積5%未満，　2: 5以上25%未満，　3: 25以上50%未満，　4: 50%以上
[b)]防除価＝(無散布区発病度－散布区発病度)／無散布区発病度×100.

感受性菌 KNOF62：
・・・・・GGGCAGATGTCATTATGAG**G**TGCTACAGTTATTACT・・・・・

21-1(耐性菌)：
・・・・・GGGCAGATGTCATTATGAG**C**TGCTACAGTTATTACT・・・・・

28-1(耐性菌)：
・・・・・GGGCAGATGTCATTATGAG**C**TGCTACAGTTATTACT・・・・・



1, 3: 制限酵素 *Ita*I 無処理
2, 4:　〃　　処理
M ： 100bpマーカー

図３　アゾキシストロビン耐性菌のチトクローム*b*遺伝子の塩基配列（部分, 左）とPCR-RFLPによる耐性菌遺伝子診断（右）

PCR-RFLPによる耐性菌遺伝子診断：25℃、3～5日間培養した菌糸からDNAを得、Ishii et al.(2001)に準じて、RSCBF1およびRSCBR2のプライマーセットでPCRを行い増幅産物を制限酵素*Ita* I で処理。*Ita* I で切断可能な菌株を耐性菌と判断する。PCR反応条件：94℃，2.5分の変性後、94℃，0.5分→52℃，1分→72℃，1.5分を40サイクル繰り返し、次いで72℃，8.5分の伸長を行って、チトクローム*b*遺伝子を増幅する。

［資料名］　平成24年度試験研究成績書(農業環境)
［研究課題名］　診断・同定及び防除対策の確立
［研究期間］　平成23～24年度
［研究担当者名］　折原紀子・植草秀敏・岡本昌広