

BULLETIN  
OF THE  
IBARAKI AGRICULTURAL CENTER  
No.1  
March 2019

---

---

茨城県農業総合センター研究報告

第1号

2019年3月

---

---

目次

- キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌のコハク酸脱水素酵素阻害剤耐性に関する研究  
宮本拓也・・・1
- ニホングリ‘ぼろたん’のペースト加工適性に関する研究  
佐野建人・・・42
- ニホングリ‘丹沢’，‘ぼろたん’における品質劣化果の発生および果実品質に収穫前後の  
温度が及ぼす影響  
唐澤友洋・清水 明・・・57
- ニホンナシ‘恵水’の着果量の違いが収量・果実品質に及ぼす影響  
加川敬祐・市毛秀則・清水 明・・・67
- 茨城県におけるパン用コムギ認定品種‘ゆめかおり’の特性と普及状況  
大越三登志・寺門ゆかり・遠藤千尋・樫村英一・狩野幹夫・鈴木正明・飯田幸彦・・・73
- 茨城県における麦茶用六条オオムギ準奨励品種‘カシマゴール’の特性と普及状況  
大越三登志・寺門ゆかり・遠藤千尋・樫村英一・狩野幹夫・鈴木正明・飯田幸彦・・・81

茨城県農業総合センター

茨城県笠間市安居3165-1



# キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌の コハク酸脱水素酵素阻害剤耐性に関する研究

宮本拓也

(茨城県農業総合センター園芸研究所)

## Studies on *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii* Isolates Resistant to Succinate Dehydrogenase Inhibitors on Cucumber

Takuya MIYAMOTO<sup>1</sup>

### 要約

茨城県内のキュウリ栽培圃場における褐斑病菌およびうどんこ病菌のボスカリド剤に対する感受性を調査するとともに、耐性菌の分子生物学的特徴を把握するために、コハク酸脱水素酵素 (SDH) 遺伝子の解析を行った。

YBA 寒天培地を用いた菌糸伸長阻止法を用いた褐斑病菌の本剤に対する感受性ベースラインは、最小生育阻止濃度 (MIC 値) および 50% 生育阻止濃度 (EC<sub>50</sub> 値) がそれぞれ 0.5~7.5µg/ml, 0.04~0.59µg/ml であった。本剤の使用履歴がある 28 圃場から採集した 907 菌株を検定した結果、MIC 値が 30µg/ml 以上である耐性菌が 26 圃場で計 427 菌株検出され、EC<sub>50</sub> 値の違いから中等度耐性 (MR) 菌、高度耐性 (HR) 菌、超高度耐性 (VHR) 菌に分類された。キュウリ苗を用いた接種試験の結果、これら耐性菌に対するボスカリド剤の防除効果の低下が確認された。

うどんこ病菌については、ボスカリド剤の使用履歴がある 13 圃場の 74 菌株についてリーフディスク検定法により感受性を検討した。その結果、感受性菌に対する本剤の MIC 値が 5µg/ml であったのに対し、50µg/ml 以上となった耐性菌が 11 圃場で計 34 菌株検出され、耐性菌は感受性の違いにより MR 菌と VHR 菌に分類された。また、キュウリ苗を用いた接種試験を行った結果、これら耐性菌に対する防除効果の低下が確認された。

さらに、褐斑病菌では SDH のサブユニット A, B, C および D 遺伝子 (それぞれ *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD*)、うどんこ病菌では *SdhB* の塩基配列を解析し、耐性菌と感受性菌の比較を行った。その結果、褐斑病菌の VHR 菌では *SdhB* の 278 番目のヒスチジンがチロシン (B-H278Y) に、HR 菌ではアルギニン (B-H278R) への置換が認められた。MR 菌では、一部で *SdhC* および *SdhD* に置換が認められたが、全サブユニットに置換が認められない菌株も認められた。また、うどんこ病菌でも VHR 菌では *SdhB* の 3rd cysteine-rich クラスタ内のヒスチジンに変異が認められたものの、MR 菌では認められなかった。

キーワード：キュウリ、褐斑病菌、うどんこ病菌、コハク酸脱水素酵素阻害剤、薬剤耐性

### 1 はじめに

茨城県のキュウリ栽培は、2007 年産で作付面積 617ha、生産量 32,400t といずれも全国 5 位であり、県内農産物の主要品目の一つである。作型としては、促成、半促成、トンネル、露地、抑制など様々であるが、主要産

---

本稿は、筑波大学大学院生命環境科学研究科審査学位論文 (2011 年 7 月) に一部追加修正したものである。

1 Address : Horticultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3165-1 Ago, Kasama,  
Ibaraki 319-0292, Japan

地である常総市や筑西市などでは、促成と抑制栽培により年間2作の作型で栽培を行っている場合が多い。

近年、安全・安心な農産物の安定した供給が望まれており、化学農薬を削減した生産方式の普及が図られている。一方で、キュウリ栽培では、各種病害虫の多発生により化学農薬の削減は困難な状況にある。特に病害においては、キュウリ収穫開始直後から多発生する褐斑病（病原菌：*Corynespora cassiicola*）の被害が最も甚大である。また、うどんこ病（病原菌：主に *Podosphaera xanthii*）も年次によっては多発生する。べと病も多発生することもあるが、本病では登録薬剤が豊富なことから現在、本県では大きな問題とはなっていない。灰色かび病および菌核病については、以前は重要病害であったが近年、発生はほとんど見られない。

褐斑病は、主に葉に発生する病害であり、はじめハローを伴った淡褐色で円形の小斑点を生じ、次第に大型で不整形の病斑となる（図1）。多発生時には、これら病斑が融合し、発生がひどい場合には葉が枯死する。本病は古くから知られている病害であるが、長い間、問題とされることはなかった。しかし、1980年代ころから、ブルームレス台木の普及や多肥栽培、周年栽培による菌の常在化により被害が増大するようになった（挾間ら、1993；宮本ら、2007）。さらに、近年のキュウリ品種の変遷（宮本ら、2006）により被害が深刻化した（図2）。現在、本病の防除は主に化学的防除に頼っており、茨城県の生産者は本病の防除のためだけにほぼ毎週のように薬剤を散布している。しかし、このような化学的防除を行っていても、わずかな散布時期の遅れや効果の低い薬剤の使用により本病が甚発生となる圃場が多い。なお、以前は重要病害であった灰色かび病や菌核病の発生が近年極めて少ない理由として、褐斑病を対象とした防除が頻繁に行われているために、薬剤のスペクトラムが似る両病害が効果的に防除されていることが考えられる。

うどんこ病も、主に葉や茎に発生する病害であり、表面にうどんこ粉をふりかけたような白いかびを生じ、発生がひどいときには葉が枯死する（図3）。本病は古くから問題とされている病害であるが、褐斑病と同様にブルームレス台木の普及（千葉・富田、1993）や多肥栽培、品種の変遷など（宮本、未発表）により被害が増大するようになった。本病の防除もやはり多くを化学的防除に頼っている。定期的な薬剤散布により、被害が褐斑病ほどの大きな問題となることは少ないが、寡日照の年などには多発生することがある。近年では2009年がそれにあたり、県内の圃場で多発生傾向にあった。

両病害に対して薬剤による防除を行う際には、各種薬剤に対する耐性菌の発生が問題となる。褐斑病菌では、ベンズイミダゾール系剤、N-フェニルカーバメート系剤、ジカルボキシイミド系剤、QoI剤（quinone outside inhibitors）（挾間・佐藤、1996；石井ら、2002；伊達ら、2004；宮本ら、2006；竹内ら、2006；Ishii et al., 2007）に対する耐性菌の発生が確認されている。特に、ベンズイミダゾール系剤やQoI剤では耐性菌の発生が深刻であり、茨城県では検出率がともに100%となる圃場も多い（宮本ら、2006；宮本ら、2010）。また、うどんこ病菌では、ステロール脱メチル化阻害剤（DMI剤）（Ohtsuka et al., 1988）、QoI剤（Ishii et al., 2001）やシフルフェナミド剤（細川ら、2006）で耐性菌の発生が報告されている。これら耐性菌の発生は、両病害の防除を困難にする要因の一つとなっている。したがって、耐性菌の発生状況に関する情報を生産者にいち早く伝達し、薬剤の使用について注意を促すことは両病害を効率的に防除するために重要である。

このような中、ボスカリド水和剤（商品名：カンタスドライフロアブル）が2005年1月に農薬登録された。本剤は、新規のコハク酸脱水素酵素阻害剤（succinate dehydrogenase inhibitors：SDHI剤）である。本系統剤は、病原菌の電子伝達系におけるComplexIIのコハク酸脱水素酵素（succinate dehydrogenase：SDH）を作用点としている（Stammler et al., 2008）。SDHI剤としてはこれまでカルボキシシン剤、フルトラニル剤、ベノダニル剤等が開発されてきた。これらSDHI剤は主に担子菌類による病害の防除薬剤であったが、ボスカリド剤はこれに加えて、*Sclerotinia*属や*Alternaria*属、*Monilinia*属、各種うどんこ病菌など、子のう菌類や不完全菌類に対しても高い発病抑制効果を示す（Matheron and Porchas, 2004；Stammler and Speakman, 2006）。ボスカリド剤に続いて、新規のSDHI剤として2010年から上市されたペンチオピラド剤についても、同様のスペクトラムを示す（櫻井、2007）。さらに、フルオピラム剤、イソピラザム剤およびピキサフェン剤なども上市に向けて開発中であり、SDHI剤は現在最も注目されている系統の一つである。

SDHI剤は単一の作用点を持った薬剤であり、そのような薬剤では一般的に耐性菌の発達が速い場合が多い。本系統薬剤では、過去にカルボキシシン剤等で、野外からはオオムギでの*Ustilago nuda*やキクの*Puccinia horiana*で耐性菌の発生が報告されている（飯島、1976；Leroux and Berthier, 1988）。ボスカリド剤についても、ピスタチオでの*Alternaria alternata*、ブドウやイチゴでの*Botrytis cinerea*などで、圃場における耐性菌の発生が報告され

ている (Avenot and Michailides, 2007 ; Stammler, 2008)。

キュウリ栽培圃場においては、ボスカリド水和剤の褐斑病に対する防除効果の高さから、本剤を特効薬的に使用する生産者も多く、防除体系における重要な薬剤として考えられていた。しかし、本剤では使用開始から間もなく、防除効果の低下を訴える生産者の声が聞かれた。薬剤の防除効果を実感できない理由としては、薬剤の散布時期や散布方法等に問題がある場合も多いが、上述のように本剤では耐性菌の発生を考慮する必要がある。そのため、褐斑病菌の本剤に対する感受性の変動を調査し、防除効果の低下の原因を検討する必要があると考えられた。

一方、ボスカリド水和剤ではキュウリうどんこ病を対象とした農薬登録は取られていない(2011年4月時点)。しかし、本病に対して農薬登録を有するペンチオピラド水和剤が2010年から上市された。上述のように、本病では各種薬剤に対する耐性菌の発生によって有効な薬剤が制限されていることから、ペンチオピラド水和剤は防除体系における重要な役割を担うと期待されていた。しかし、キュウリ栽培において、本病は比較的恒常的に発生している病害であり、生産者がボスカリド水和剤を褐斑病の防除を目的に散布していても、同時にうどんこ病菌が防除圧を受けている可能性が非常に高い。ペンチオピラド剤はボスカリド剤と同じくSDHI剤であることから感受性が交叉する恐れがあり、ボスカリド剤耐性菌の発生はペンチオピラド剤の防除効果に影響を及ぼす可能性が考えられた。すでに、アメリカのウリ科作物では、ボスカリド剤はQoI剤であるピラクロストロビン剤との混合剤で使用されており、ボスカリド剤耐性菌が検出されていた (McGrath, 2008 ; McGrath and Miazzi, 2008 ; Miazzi and McGrath, 2008)。そのため、日本においても本病原菌について、ボスカリド剤に対する感受性の変動を調査し、今後のキュウリ栽培におけるペンチオピラド水和剤の使用方法を検討する必要があると考えられた。

薬剤に対する感受性の変動の評価は、培地検定やポット試験などの方法を用いて当該薬剤の曝露を受けていない菌の集団の感受性(感受性ベースライン)と比較することで行うことが多い(Justum et al., 1998; Russell, 2004)。近年、感受性評価方法として、遺伝子診断法が用いられつつある。この方法は、褐斑病菌のように培地上で検定できる菌についてももちろんであるが、うどんこ病菌のように人工培養ができない菌において特に検定時間の短縮や作業性の改善のために大きな力を発揮する。遺伝子診断を行うには、その基本情報として当該薬剤に対する感受性の低下に関与する遺伝子変異を明らかにする必要がある。

ボスカリド剤を含むSDHI剤が作用点とするSDHは、2個の親水性の部分と2個の疎水性の部分の合計4個のサブユニットから構成される(Hägerhäll 1997)。2個の親水性サブユニットはフラボタンパク質(SdhA)と鉄硫黄タンパク質(SdhB)である。SdhAにはフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)補因子とコハク酸結合部位が共有結合しており、SdhBには3種の鉄硫黄クラスターのリガンドとなる、3つのcysteine-richクラスター(S1, S2, S3)が存在する。残りの2個のサブユニットは疎水性膜アンカーサブユニットで、それぞれSdhCとSdhDである。これまで、SDHI剤に対する感受性の低下についての遺伝子解析は、カルボキシシン剤等に対する細菌や、担子菌、子のう菌で報告されており、関連するアミノ酸置換はSdhBやSdhC、SdhDで認められている(Keon et al., 1991 ; Broomfield and Hargreaves, 1992 ; Matsson et al., 1998 ; Skinner et al., 1998 ; Honda et al., 2000 ; Matsson and Hederstedt, 2001 ; Ito et al., 2004 ; Li et al., 2006 ; Shima et al., 2008)。ボスカリド剤についても、*A. alternata* や *B. cinerea* の耐性菌でSdhB, SdhCやSdhDにアミノ酸置換が認められている(Avenot et al., 2008; Stammler, 2008; Stammler et al., 2008 ; Avenot et al., 2009 ; Avenot and Michailides, 2010 ; Leroux et al., 2010)。特に、SdhBについては研究事例が多く、最近の研究ではSdhCやSdhDよりもSdhBで置換が生じているSDHI剤耐性菌のほうが高度耐性となる場合が多い(Avenot et al., 2009 ; Leroux et al., 2010 ; Shima et al., 2011)。

殺菌剤耐性に関与するメカニズムは様々なものが知られている(Ma and Michailides, 2005; Hollomon, 2007a)(表1)。最もメジャーなケースが当該薬剤の作用点の変異である。また、本論文で述べるような当該薬剤の使用開始後間もなく耐性菌が検出されてくる事例でもこの作用点の変異が関わっているケースが多い。しかし、関与するメカニズムはこの他にも、作用点の代替となる機構の発現や、作用点の過剰発現、薬剤の排出機構の活性化や取り込みの減少、解毒などが挙げられる。その一方で、上述したように既報のSDHI剤耐性菌では、いずれもSDHサブユニットのいずれかの遺伝子に変異が認められている。そこで、本研究では、将来の遺伝子診断法の開発に資するためのボスカリド剤耐性菌の遺伝的特徴の解析として、SDHの各遺伝子に注目して研究を行った。

以上のような背景のもと、本研究は、茨城県内のキュウリ栽培圃場における褐斑病菌およびうどんこ病菌のボスカリド剤耐性菌の発生状況とともに、耐性菌のSDHの各遺伝子の特徴を明らかにすることを目的に行われた。そのため、2では、ボスカリド剤に対する褐斑病菌の耐性菌の発生状況を検討するため、本剤に対する感受性の変動の調査を行った。また、3では、同じくうどんこ病菌の現地圃場における耐性菌の発生状況を検討するため、感受性の変動の調査を行った。さらに、4では、両病原菌の本剤耐性菌と感受性菌のSDHの推定アミノ酸配列を比較するために、褐斑病菌についてはSDHの4つのサブユニット遺伝子、うどんこ病菌では耐性に関与する可能性が最も高いと思われる*SdhB* 遺伝子についてのシーケンス解析を行った。

なお、本論文の内容の多くは Miyamoto et al. (2009), Miyamoto et al. (2010a) および Miyamoto et al. (2010b) で報告したものである。

表1 各種薬剤に対する耐性機構 (Ma & Michailides (2005), Brent & Hollomon (2007a) を一部改変)

薬剤名または系統名	耐性機構
ドジン	不明
ベンズイミダゾール系	作用点の変異 ( $\beta$ チューブリン) 不明な機構
アニリノピリミジン系	不明
カスガマイシン	作用点の変異 (リボソーム)
有機リン系	薬物代謝性解毒
フェニルアマイド系	作用点の変異? (RNAポリメラーゼ)
ジカルボキシイミド系およびフェニルピロール系	作用点の変異 (浸透圧調節に関わるプロテインキナーゼ)
DMI剤 (ステロール脱メチル化阻害剤)	作用点の変異や過剰発現 (ステロール脱メチル化酵素) ATP-binding cassetteトランスポーターの過剰発現
QoI剤 (ストロビルリン系)	作用点の変異 (シトクロームb) 代替呼吸回路
シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤	作用点の変異 (シタロン脱水酵素)
SDHI剤 (コハク酸脱水酵素阻害剤)	作用点の変異 (コハク酸脱水酵素)



図1 キュウリ褐斑病の病徴  
(左：初期病斑，右：本病により枯死した状態)



図2 キュウリ褐斑病が多発生した圃場の状況



図3 キュウリうどんこ病の病徴

## 2 キュウリ褐斑病菌におけるボスカリド剤耐性菌の発生

### 2. 1 目的

キュウリ栽培圃場において、ボスカリド水和剤は主に褐斑病の防除を対象に使用され、その防除効果の高さから生産者からも好評を得ていた。しかし、その後、本剤を散布しても上市直後ほどの防除効果が得られないとの声が生産者から寄せられた。そこで、本研究では、茨城県のキュウリ栽培圃場より採集した褐斑病菌について、ボスカリド剤に対する感受性を検討した。

### 2. 2 材料および方法

#### 2. 2. 1 供試菌株

ボスカリド剤に対する *C. cassiicola* の感受性ベースラインデータを作成するため、本剤の曝露を受けていないキュウリ、トマト、ナス、ダイズおよびササゲから分離された 220 菌株の本病原菌を用いた (表 2)。このうち、9 菌株は農業生物資源ジーンバンク、キュウリからの 2 菌株、トマトからの 3 菌株、ナスからの 1 菌株は岡山県農業総合センター、キュウリからの 1 菌株は千葉県農林水産総合センター、キュウリからの 51 菌株は農業環境技術研究所より、それぞれ分譲を受けた菌株である。残る 153 菌株は茨城県で 2004 年から 2006 年にかけて分離された菌株で、単孢子または単菌糸分離をした後に検定に供試するまで 10 倍希釈したポテトデキストロース寒天 (PDA) 斜面培地上において室温で保存した。

ボスカリド剤に対する感受性検定には、2005 年から 2008 年にかけて、ボスカリド水和剤の使用履歴がある茨城県内 11 市町のキュウリ栽培 28 圃場より採集した罹病葉から、単孢子または単菌糸分離によって得られた計 907 菌株を供試した。また、本剤の上市から 2 年 9 カ月が経過した 2007 年 10 月には、本剤の使用履歴がない 3 市 5 圃場において罹病葉の採集を行い、単孢子分離によって得られた計 145 菌株も検定に供した。これらの菌株は検定に供するまで 10 倍希釈 PDA 斜面培地上で室温で保存した。



表2 ボスカリド剤に対する感受性ベースラインの作成に用いた*Corynespora cassiicola* 菌株

分離年	分離地	分離源	供試菌株数(株)
不明	茨城県	キュウリ	1 (MAFF712093) <sup>a)</sup>
1949	埼玉県	ダイス	1 (MAFF305087)
1959	千葉県	ササゲ	1 (MAFF305092)
1978	北海道	ダイス	1 (MAFF235139)
1988	長野県	キュウリ	1 (MAFF306176)
1989	大分県	キュウリ	1 (MAFF306348)
1995	茨城県	キュウリ	2 (MAFF237272, MAFF237273)
	宮崎県	キュウリ	1
	大分県	キュウリ	1
1999	岡山県	ナス	1
2000	茨城県	キュウリ	12
	岡山県	キュウリ	1
2001	茨城県	キュウリ	10
	岡山県	キュウリ	2
	福岡県	キュウリ	1 (MAFF744073)
2002	茨城県	キュウリ	14
	岡山県	トマト	3
		キュウリ	1
2004	茨城県	キュウリ	2
	千葉県	キュウリ	1
	佐賀県	キュウリ	11
2005	茨城県	キュウリ	121
2006	茨城県	キュウリ	30
Total number			220

<sup>a)</sup>カッコ内は菌株名を示し, 農業生物資源研究所ジーンバンクより分譲を受けた菌株のみを示す。

また, キュウリポット苗を用いた接種試験には, 表3に示したボスカリド剤感受性菌(S菌), 中等度耐性菌(MR菌), 高度耐性菌(HR菌)および超高度耐性菌(VHR菌)を各2菌株, 計8菌株を供試した。なお, ここで示したボスカリド剤に対する感受性の表現型については後述する。S菌であるIbCor0008は感受性ベースラインを構築するために採集した菌株, 残りの7株は感受性の変動を調査する際に分離した菌株であり, 感受性菌および各耐性菌から任意に抽出した菌株であった。これらの菌株もまた, 検定に供試するまで10倍希釈PDA斜面培地上で室温で保存した。

表3 キュウリポット苗を用いた感受性検定に供試した褐斑病菌株

菌株名	分離地	ボスカリド剤 に対する感受性 <sup>a)</sup>
IbCor0008	笠間市	S
IbCor3001	筑西市	S
IbCor3003	筑西市	MR
IbCor3004	筑西市	MR
IbCor3006	筑西市	HR
IbCor3013	筑西市	HR
IbCor3002	筑西市	VHR
IbCor3022	筑西市	VHR

<sup>a)</sup>S:感受性, MR:中等度耐性, HR:高度耐性, VHR:超高度耐性

## 2. 2. 2 感受性ベースラインの検討

褐斑病菌のボスカリド剤に対する感受性の変動を評価するため, 本剤の曝露を受けていない菌を用いた感受性ベースライン(Russell, 2004)の検討を行った。

検定に供試する前に、各菌株を PDA 平板培地上で 25°C で 5~9 日間、培養した。PDA 培地上で伸長した菌叢の先端付近を中心から同心円状に培地ごと 4mm 径のコルクボーラーで打ち抜いたディスクを作成した。検定用の培地には Stammler and Speakman (2006) の YBA 培地 (Yeast Extract 1%, Bacto Peptone 1%, 酢酸ナトリウム 2%) に寒天 1.5% を添加した YBA 寒天培地 (石井・西村, 2007) を用いた。ボスカリド剤の添加は、BASF ジャパン (株) より分譲を受けたボスカリド原体を培地中の最終濃度が 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 30 µg/ml となるように行った。なお、ボスカリド原体の添加はジメチルスルホキシド (DMSO, 最終濃度 0.25%) に溶解して行った。ボスカリド剤を添加しなかった培地には DMSO のみを添加した。その後、菌叢ディスクを検定用培地に置床し、25°C で 4 日間培養した後、コルクボーラーの径である 4mm を差し引いた菌叢の直径を計測した。さらに、最小生育阻止濃度 (MIC 値) および 50% 生育阻止濃度 (EC<sub>50</sub> 値) を算出し、これらをボスカリド剤に対する褐斑病菌の感受性ベースラインとした。各菌株に対する MIC 値および EC<sub>50</sub> 値は 3 回の異なる試験によって得られた値の平均値である。なお、EC<sub>50</sub> 値の算出には全農より提供を受けた Log-linear model software を用いた。

### 2. 2. 3 ボスカリド水和剤の使用開始後における褐斑病菌の感受性および本剤使用履歴の調査

検定は 2007 年 5 月以前に分離した 438 菌株については、上述した菌糸伸長阻止法を用いて行った。2007 年 10 月以降に分離した 614 菌株については検定を簡易に行うため、ボスカリド剤の濃度を 0, 0.1, 1, 5, 7.5, 10, 30 µg/ml とした。

また、本研究では、検定結果が感受性ベースラインの範囲内となる菌を S 菌、それを超える菌を耐性菌とした。さらに、この耐性菌は EC<sub>50</sub> 値の範囲が異なる 3 つのグループに分けることができ、これらの分類は防除上重要になると考えられた。そこで、EC<sub>50</sub> 値が 1.1~6.3 µg/ml の菌を MR 菌、8.9~10.7 µg/ml の菌を HR 菌、24.8 µg/ml 以上の菌を VHR 菌として判断することとした。

なお、各圃場におけるボスカリド水和剤または他の薬剤の使用履歴は、生産者が記帳している栽培履歴または聞き取りにより調査した。

### 2. 2. 4 キュウリポット苗を用いた感受性検定

ポット植えたキュウリ苗を用いた接種試験により、ボスカリド剤耐性菌に対する本剤の植物体上における発病抑制効果の検討を行った。供試した 8 菌株は PDA 培地上で 25°C で 10 日間培養した後、葉さじで培地表面の菌糸を除去し、さらに、分生胞子の形成を促すために、ブラックライトブルーランプ照射下で 25°C で 3 日間培養した。培地上の分生胞子を筆を用いて滅菌水中に懸濁し、濃度が約 10<sup>4</sup> spores/ml となるよう調製した。キュウリ苗は、品種として 'ハイ・グリーン 21' (埼玉原種育成会) を用い、培土を詰めた育苗ポットに播種した後、約 3 週間 25°C の人工気象器内で育苗した苗を用いた。市販のボスカリド水和剤を水道水で 1,500 倍 (キュウリ褐斑病に対する適用登録希釈倍数) に希釈し、ボスカリド剤の成分濃度が 333 µg/ml になるように調製した薬液をハンドスプレーを用いてキュウリ苗に噴霧した。対照としてマンゼブ水和剤 (散布時の成分濃度は 1,250 µg/ml) および水道水の処理を設けた。苗数は各処理当たり 4 株とした。噴霧した薬液を風乾させた後、病原菌の胞子懸濁液を葉全体にハンドスプレーを用いて噴霧した。薬液および胞子懸濁液の噴霧は、葉から液がやや垂れる程度に行った。胞子懸濁液を接種したキュウリ苗は、28°C で 24 時間暗黒下 (湿度 99% 以上) で管理し、その後 4 日間、25°C の人工気象器で明期 12 時間 (湿度約 80%)、暗期 12 時間 (99% 以上) の周期で管理した。

発病調査は接種 5 日後に行い、第 2 葉に発生した褐斑病の病斑を計数 (各処理 4 株の平均) することで行い、水道水処理株に対する薬剤処理株の発病抑制率 {= [(水道水処理株における病斑数 - 薬剤処理株における病斑数) / 水道水処理株における病斑数] × 100} を算出した。

## 2. 3 結果

### 2. 3. 1 感受性ベースライン

ボスカリド水和剤の使用履歴がない圃場から採集した 220 菌株に対するボスカリド剤の MIC 値は 5 µg/ml をピークとする一峰型であり、最小値が 0.5 µg/ml、最大値が 7.5 µg/ml、平均値が 5.27 µg/ml であった (図 4)。EC<sub>50</sub> 値も一峰型を示し、最小値が 0.04、最大値が 0.59 µg/ml、平均値が 0.27 µg/ml であった (図 5)。

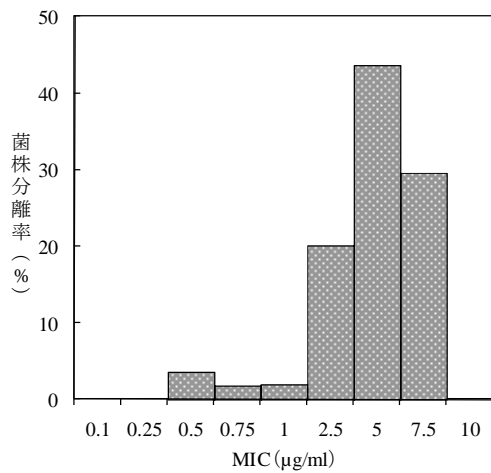


図4 *Corynespora cassiicola* のボスカリド剤に対する感受性ベースライン (最小生育阻止濃度 (MIC 値))

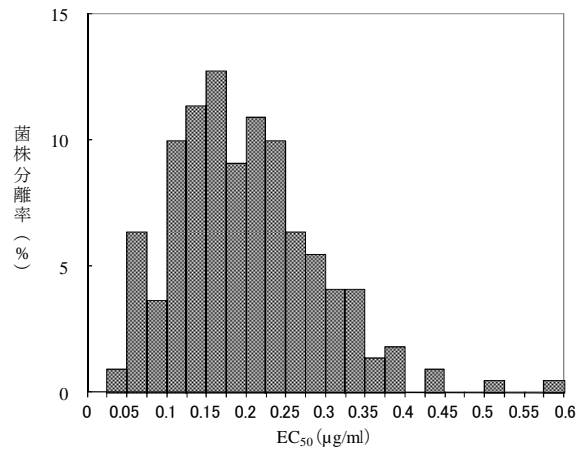


図5 *Corynespora cassiicola* のボスカリド剤に対する感受性ベースライン (50%生育阻止濃度 (EC50 値))

### 2. 3. 2 耐性菌の発生状況

ボスカリド水和剤の使用履歴がある圃場から採集した褐斑病菌の感受性を検討した結果、総検定数 907 菌株中 480 菌株が MIC 値 7.5μg/ml 以下の S 菌であったが、427 菌株が MIC 値 30μg/ml 以上の耐性菌であった(表 4)。耐性菌は 2005 年 9 月に筑西市の 2 つの圃場 (圃場 No.7, 8) で初めて検出され、その後、検定を実施した 28 圃場中 26 圃場で認められた。加えて、14 圃場では耐性菌の検出率が 50%以上となり、非常に高頻度で耐性菌が分布していることが明らかとなった。

表4 ポスカリド水和剤の使用履歴があるキュウリ栽培圃場における本剤耐性褐斑病菌の発生状況

圃場 No.	市町名	菌株採集年月 または期間	検定菌株数	耐性菌株数 <sup>a)</sup>			耐性菌率 (%) <sup>b)</sup>	ホスカリドの 総使用回数
				MR	HR	VHR		
1	大子町	2007年10月	30	6	0	18	80.0	10
2	大子町	2007年10月	18	1	0	15	88.9	15
3	城里町	2007年10月	6	0	0	0	0	6
4	城里町	2007年10月	28	0	0	0	0	9
5	城里町	2007年10月	17	1	0	1	11.8	1
6	筑西市	2005年8月～06年11月	15	10	0	0	66.7	5
7	筑西市	2005年8月～07年4月	138	64	0	0	46.4	6
8	筑西市	2005年8月～06年2月	30	15	0	0	50.0	5
9	筑西市	2005年9月～06年4月	21	5	0	6	52.4	6以上
10	筑西市	2005年9月～07年4月	108	64	0	2	61.1	7
11	筑西市	2006年2月	8	8	0	0	100	不明
12	筑西市	2006年9月	10	1	0	0	10.0	不明
13	筑西市	2007年10月	30	9	4	5	60.0	4
14	筑西市	2007年10月	30	22	0	3	83.3	11
15	桜川市	2007年10月	30	2	0	4	20.0	12
16	常総市	2007年10月	21	1	0	9	47.6	7
17	常総市	2007年10月	25	4	0	10	56.0	6
18	常総市	2007年10月	30	0	0	18	60.0	4
19	常総市	2007年10月	30	20	0	10	100	4
20	常総市	2007年10月	30	2	0	3	16.7	5
21	かすみがうら市	2006年4月～08年11月	53	28	0	14	79.2	4
22	かすみがうら市	2007年3月～5月	51	7	0	3	19.6	2
23	河内町	2007年10月	28	0	0	1	3.6	不明
24	竜ヶ崎市	2007年10月	6	2	0	0	33.3	2
25	竜ヶ崎市	2007年10月	30	0	0	1	3.3	1
26	古河市	2007年11月	22	0	0	2	9.1	5
27	行方市	2007年10月	30	18	0	4	73.3	6
28	つくば市	2007年10月	32	1	0	3	12.5	3
合計			907	291	4	132	47.1	

<sup>a)</sup>MR: 中等度耐性菌, HR: 高度耐性菌, VHR: 超高度耐性菌

<sup>b)</sup>耐性菌率(%)=100×{(MR菌株数+HR菌株数+VHR菌株数)/検定菌株数}

これら耐性菌株に対するボスカリド剤の EC<sub>50</sub> 値を算出したところ、感受性が明らかに異なる菌群の存在が明らかとなり、本研究において EC<sub>50</sub> 値が 1.1～6.3μg/ml であった菌群を MR 菌, 8.9～10.7μg/ml を HR 菌, 24.8μg/ml 以上を VHR 菌と名付けた(図6)。各菌群に対するボスカリド剤の濃度別の菌糸伸長抑制率は図7の通りであり、目視でもその差異は明瞭であった(図8)。菌群別の菌株数は、427 菌株の耐性菌のうち、MR 菌は 291 菌株、HR 菌は 4 菌株、VHR 菌は 132 菌株であった(表4)。圃場別で見ると、MR 菌は 21 圃場、VHR 菌は 20 圃場で検出されたのに対して、HR 菌は筑西市の圃場 No.13 のみで検出された。

2005 年 9 月に初めて分離された耐性菌 2 菌株はいずれも MR 菌であった。その後、2006 年 9 月までに筑西市(圃場 No.6～12) およびかすみがうら市 (No.21, 22) から分離した耐性菌 67 菌株も全てが MR 菌であった。VHR 菌は 2006 年 9 月に筑西市の No.10 圃場で初めて検出された。それ以降、VHR 菌は頻繁に検出されるようになり、2007 年の 10 月および 11 月に実施した 13 市町 20 圃場での調査になると、検出した 200 菌株の耐性菌のうち MR 菌は 89 菌株、HR 菌は 4 菌株、VHR 菌は 107 菌株であった。

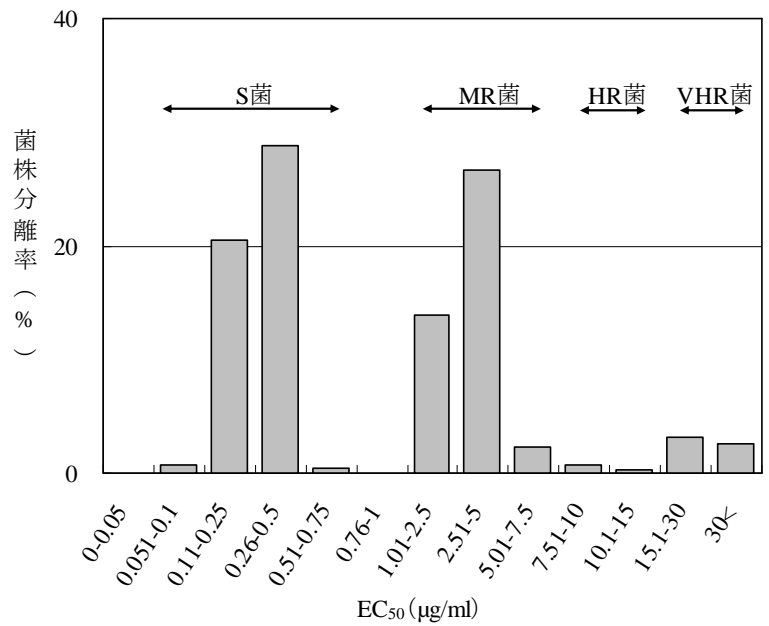


図6 ボスカリド水和剤の散布履歴がある圃場から分離したキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤に対する感受性頻度分布  
 S菌：感受性，MR菌：中等度耐性菌，HR菌：高度耐性菌，VHR菌：超高度耐性菌

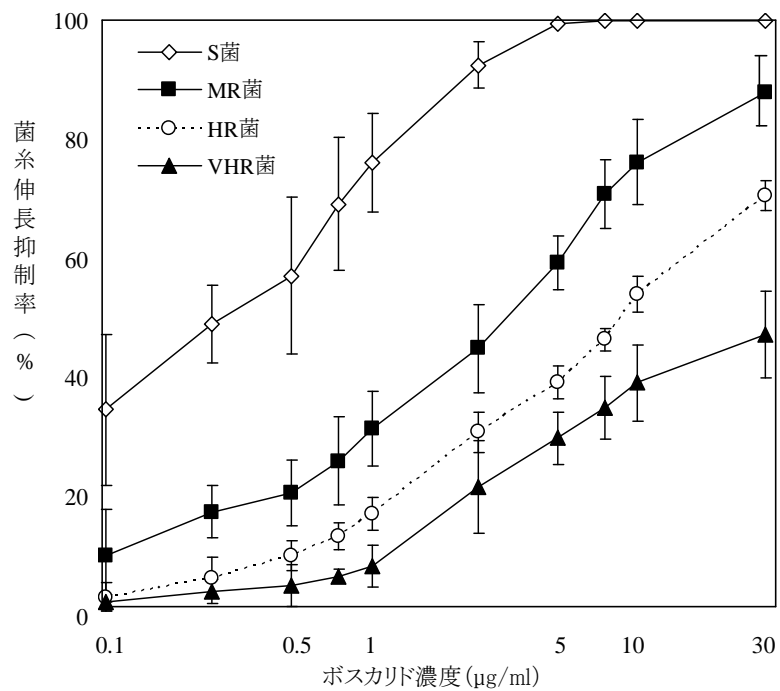


図7 キュウリ褐斑病菌のボスカリド剤感受性菌 (S)，中等度耐性菌 (MR)，高度耐性菌 (HR) および超高度耐性菌 (VHR) のボスカリド剤感受性：薬剤無添加培地における菌糸伸長に対する薬剤添加培地での菌糸伸長抑制率の推移

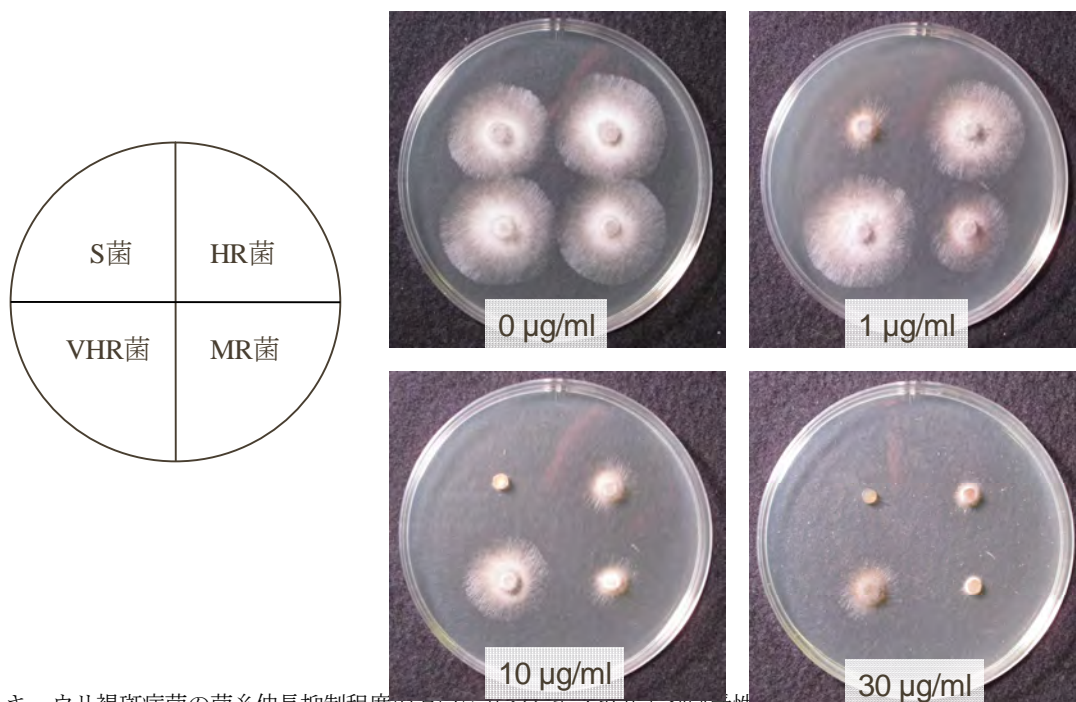


図8 キュウリ褐斑病菌の菌糸伸長抑制程度の違いに基づくボスカリド剤感受性の検出  
 S菌：感受性菌，MR菌：中等度耐性菌，HR菌：高度耐性菌，VHR菌：超高度耐性菌。シャーレの写真に記した数字は各培地中のボスカリド剤の濃度を示す。

各圃場におけるボスカリド水和剤の使用履歴を調査した結果、耐性菌が最も早く2005年の9月に検出された筑西市の圃場（圃場No.7, 8）では、わずか3回または4回の使用で耐性菌が検出された（表5）。筑西市ではキュウリは促成栽培（11月上旬から5月上旬）と抑制栽培（7月下旬から10月上旬）で年2回作付けし、また2005年の2月から本剤の使用を開始して、1作に1～3回使用していた圃場が多かった。これらの圃場では表6に一例を示す通り、ボスカリド水和剤を散布する間に本剤とは作用機作が異なる薬剤を複数使用していた。また、初めての耐性菌検出時に最も本剤の使用回数が少なかったのは城里町のNo.5圃場と竜ヶ崎市のNo.25圃場での1回であった。一方で、城里町のNo.3およびNo.4の2圃場ではそれぞれ本剤を年2回または3回、合計6回または9回使用したにもかかわらず耐性菌は検出されなかった。

また、本剤の使用履歴がない圃場についても調査を実施した結果、5圃場中2圃場で耐性菌が検出された（表7）。つくば市のNo.32圃場では32菌株中1菌株がMR菌であり、No.33圃場では23菌株中8菌株がVHR菌であった。No.32圃場の周囲は住宅街や大学キャンパスであり、少なくとも周囲300m範囲に少なくとも商業的に作物が栽培されている圃場は認められなかった。また、No.33圃場の周囲には、本剤が農薬登録されたトマトなどの作物が栽培されていたが、それらの圃場での聞き取り調査では本剤の使用履歴は認められなかった。

表5 筑西市の圃場No.7, 8および10におけるボスカリド剤耐性キュウリ褐斑病菌の検出と本剤の使用回数の推移

圃場 No.	菌株採集 年月日	検定菌 株数	耐性菌株数 <sup>a)</sup>			耐性菌率 (%) <sup>b)</sup>	ボスカリドの 総使用回数
			MR	HR	VHR		
7	2005年 8月29日	11	0	0	0	0	3
	9月21日	32	1	0	0	3	4
	2006年 2月8日	27	26	0	0	96	5
	9月14日	15	12	0	0	80	6
	12月1日	13	9	0	0	69	6
	2007年 1月11日	18	14	0	0	78	6
	2月21日	6	6	0	0	100	6
	4月5日	9	6	0	0	67	6
8	2005年 8月29日	9	0	0	0	0	2
	9月21日	4	1	0	0	25	3
	2006年 1月13日	9	7	0	0	78	4
	2月8日	8	7	0	0	88	5
10	2005年 9月7日	31	0	0	0	0	2
	9月21日	12	0	0	0	0	2
	2006年 2月8日	11	7	0	0	64	3
	9月14日	15	5	0	1	40	5
	12月1日	7	6	0	1	100	6
	2007年 1月11日	9	6	0	0	67	6
	4月5日	16	15	0	0	94	7

<sup>a)</sup>MR: 中等度耐性菌, HR: 高度耐性菌, VHR: 超高度耐性菌

<sup>b)</sup>耐性菌率(%)=100×{(MR菌株数+HR菌株数+VHR菌株数)/検定菌株数}

表6 筑西市の圃場No.7および10におけるボスカリド剤耐性キュウリ 褐斑病菌の検出に至るボスカリド水和剤およびその他薬剤の散布履歴

圃場No.	作型	薬剤散布年月日	薬剤名	
7	促成栽培	2005年 1月13日	キャプタン	
		1月20日	カスガマイシン・銅, プロシミドン	
		1月28日	イミノクタジンアルベシル酸塩, ポリオキシシ	
		2月3日	ボスカリド	
		2月14日	ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル	
		2月23日	カスガマイシン・銅	
		3月2日	ボスカリド	
		3月12日	カスガマイシン・銅, ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル	
		3月21日	キャプタン	
		3月31日	カスガマイシン・銅, シフルフェナミド・トリフルミゾール	
	4月8日	ボスカリド, TPN		
	4月24日	キャプタン		
	抑制栽培	2005年 8月9日	ポリオキシシ, プロシミドン	
		8月14日	シアゾファミド	
		8月21日	TPN, トリフルミゾール	
		9月3日	ボスカリド	
		9月17日	ジエトフェンカルブ・プロシミドン	
10		促成栽培	2005年 1月6日	マンゼブ
			1月11日	ジエトフェンカルブ・プロシミドン
	1月21日		イミノクタジンアルベシル酸塩	
	2月1日		シモキサニル・TPN	
	2月6日		ボスカリド	
	2月18日		ジエトフェンカルブ・プロシミドン, トリフルミゾール	
	2月25日		シメコナゾール・マンゼブ	
	3月4日		ポリオキシシ	
	3月14日		ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル	
	3月20日		ポリカーバメート	
	3月28日		ジエトフェンカルブ・プロシミドン, ポリオキシシ	
	4月2日		ボスカリド	
	4月15日		TPN	
	抑制栽培		2005年 8月2日	キャプタン
			8月7日	TPN
		8月13日	ポリカーバメート	
		8月23日	シメコナゾール・マンゼブ	
		8月30日	ジエトフェンカルブ・プロシミドン	
		9月10日	ポリオキシシ	
		促成栽培	2005年 11月9日	TPN, トリフルミゾール
			11月18日	ポリカーバメート, ポリオキシシ
	12月10日		マンゼブ, メパニピリム	
	12月20日		ジエトフェンカルブ・プロシミドン, TPN	
12月30日	ボスカリド, キャプタン			
2006年 1月10日	マンゼブ, ポリオキシシ			
1月20日	シアゾファミド, チオファネートメチル			
2月4日	ジエトフェンカルブ・プロシミドン, ポリカーバメート			



表7 ポスカリド水和剤の使用履歴がないキュウリ栽培圃場における本剤耐性褐斑病菌の発生状況

圃場 No.	市町名	菌株採集年月	検定菌株数	耐性菌株数 <sup>a)</sup>			耐性菌率 (%) <sup>b)</sup>
				MR	HR	VHR	
29	水戸市	2007年10月	30	0	0	0	0
30	水戸市	2007年10月	30	0	0	0	0
31	常陸大宮市	2007年10月	30	0	0	0	0
32	つくば市	2007年10月	32	1	0	0	3.1
33	つくば市	2007年10月	23	0	0	8	34.8

a) MR: 中等度耐性菌, HR: 高度耐性菌, VHR: 超高度耐性菌

b) 耐性菌率 (%) = 100 × {(MR 菌株数 + HR 菌株数 + VHR 菌株数) / 検定菌株数}

### 2. 3. 3 耐性菌に対するポスカリド水和剤の発病抑制効果

ポット試験において、供試した 8 菌株は水道水処理苗においてはほぼ同様の病斑数を形成した (表 8)。また、同様にマンゼブ水和剤はいずれの菌株処理苗に対しても高い発病抑制効果を示した。ポスカリド水和剤処理苗においては、S 菌を接種した場合、完全に発病は抑制された。一方で、耐性菌に対しては発病抑制効果に低下が認められ、その程度は MR 菌, HR 菌, VHR 菌の順により顕著であった。

表8 ポスカリド剤感受性を異にするキュウリ褐斑病菌に対する本剤の発病抑制効果

菌株名	ポスカリドに対する感受性 <sup>a)</sup>	処理 <sup>b)</sup>	病斑数 <sup>c)</sup>	発病抑制率 (%) <sup>d)</sup>
IbCor0008	S	ポスカリド水和剤	0	100
		マンゼブ水和剤	2.0	96
		水道水	50.5	-
IbCor3001	S	ポスカリド水和剤	0	100
		マンゼブ水和剤	0.3	99
		水道水	33.0	-
IbCor3003	MR	ポスカリド水和剤	16.8	75
		マンゼブ水和剤	1.3	98
		水道水	67.0	-
IbCor3004	MR	ポスカリド水和剤	13.5	63
		マンゼブ水和剤	0	100
		水道水	36.8	-
IbCor3006	HR	ポスカリド水和剤	42.5	39
		マンゼブ水和剤	2.3	97
		水道水	69.5	-
IbCor3013	HR	ポスカリド水和剤	26.0	48
		マンゼブ水和剤	0	100
		水道水	49.8	-
IbCor3002	VHR	ポスカリド水和剤	52.0	-5
		マンゼブ水和剤	0.6	99
		水道水	49.5	-
IbCor3022	VHR	ポスカリド水和剤	36.0	5
		マンゼブ水和剤	0.0	100
		水道水	38.0	-

a) S: 感受性, MR: 中等度耐性, HR: 高度耐性, VHR: 超高度耐性

b) ポスカリド水和剤およびマンゼブ水和剤はそれぞれ、333 $\mu$ g/ml, 1,250 $\mu$ g/mlの有効成分濃度で散布した。

c) キュウリ苗4株に各薬剤を散布し、風乾した後、約104 個/mlの褐斑病菌分生孢子懸濁液を噴霧接種し、5日後に発生した病斑数の1葉当たりの平均値。

d) 発病抑制率 (%) = [(水道水処理株における病斑数 - 薬剤処理株における病斑数) / 水道水処理株における病斑数] × 100

### 2. 4 考察

本研究の結果、茨城県内にはポスカリド水和剤の防除効果の低下を伴うキュウリ褐斑病菌の本剤耐性菌が広

範囲で高率に分布していることが明らかとなった。ポット試験の結果に見られたように、耐性菌に対する本剤の発病抑制効果は顕著に低下しており、現在の褐斑病の恒常的な多発生を考慮すると、県内の多くのキュウリ栽培圃場で本剤の防除効果はほぼ失われていると考えられる。また、ボスカリド水和剤の上市からの使用回数が1, 2回と少ない圃場でも耐性菌が検出されていることから、キュウリ褐斑病菌では本剤に対する耐性菌が非常に発生しやすいと推察される。その要因としては本剤が単一の作用点をもった薬剤であること、また本菌は孢子形成量が多く、世代交代も速い菌であることなどが考えられる。

本研究では、褐斑病菌のボスカリド剤に対する感受性の低下を示すために、*C. cassiicola* の感受性ベースラインを最初に検討した。ボスカリド剤に対する感受性ベースラインはいくつかの病原菌で評価されている (Lu et al., 2004; Spiegel and Stammler, 2006; Stammler and Speakman, 2006; Avenot and Michailides, 2007; Stammler et al., 2007; Zhang et al., 2007; Myresiotis et al., 2008; Wise et al., 2008) が、*C. cassiicola* では得られていなかった。ボスカリド剤感受性の検定では、*B. cinerea*, *Monilinia* spp. や *Sclerotinia sclerotiorum* など YBA 液体培地を用いた方法が開発されている (Spiegel and Stammler, 2006; Stammler and Speakman, 2006; Stammler et al., 2007)。*C. cassiicola* の感受性の評価において、他の薬剤では一般的に PDA 平板培地が用いられてきた。しかし、石井・西村 (2007) は、PDA 平板ではボスカリド剤を高濃度 (100 $\mu$ g/ml) で添加した場合でも感受性菌に生育が見られ、MIC 値が得られなかったが、YBA 寒天培地を用いることで比較的 low 濃度のボスカリド剤でも菌糸伸長を抑制できることを報告した。Ragsdale and Sisler (1970) はボスカリド剤と同様に SDHI 剤に属するカルボキシシン剤に対する *Neurospora crassa* などの感受性検定において、培地中の炭素源をグルコースから酢酸に代えることによって薬剤感受性が約 10 倍高くなることを示している。*C. cassiicola* で認められた培地による感受性の違いは、炭素源の違いによるものと考えられる。YBA 寒天培地を用いて調べた *C. cassiicola* のボスカリド剤に対する感受性のベースラインは MIC 値および EC<sub>50</sub> 値ともに一峰性を示し、薬剤濃度も狭い範囲に収まった。さらに、感受性菌のみならず耐性菌においても培地上での検定結果とポット苗を用いた接種試験の結果がよく一致していた。したがって、本培地を用いた *C. cassiicola* の菌糸伸長阻止法はボスカリド剤感受性のモニタリング手法として適していると考えられた。

興味深いことに、No.4 および No.5 の城里町の両圃場ではそれぞれボスカリド水和剤が通算 6 回、9 回使用されているにもかかわらず、耐性菌が検出されなかった。これらの圃場では、他の圃場とは異なり、キュウリの栽培は抑制のみの年 1 作であり、褐斑病も作期後半にやや多発生はするものの、さほど深刻ではなかった。したがって、本病の発病圧が他の圃場よりも比較的低いことが、耐性菌が検出されなかった要因と考えられるが、詳細は明らかではない。実際、他系統の薬剤では、対象となる病害の発生が少なければ耐性菌の選抜も遅くなることが報告されている (Staub, 1991; Brent and Hollomon, 2007a)。今後は検定菌株を増やし、さらにその推移を調査して、要因を検討する必要があると考えられた。

その一方で、耐性菌は本剤の使用履歴がない圃場からも検出された。その原因として、周囲からの耐性菌の飛散が考えられたが、近隣の圃場での本剤の使用は認められなかったため、そこからの飛散の可能性は低いと考えられた。一方で、薬剤耐性菌が風によって長距離離搬している可能性も報告されている (Foster and Staub, 1996; Ishii et al., 2001)。さらに、病原菌が付着した資材や植物残さ (宮本ら, 2007)、種子 (挾間ら, 1993) での伝搬の可能性も考えられる。しかし、いずれの移動手段でもつくば市の No.33 での検出率の高さを説明するには不十分と考えられる。したがって、なぜ使用履歴がない圃場で耐性菌が検出されたのか、その理由は定かではない。なお、同様の事例は、カリフォルニア州の本剤耐性 *A. alternata* でも報告されている (Avenot and Michailides, 2007)。

本研究では本剤耐性菌を EC<sub>50</sub> 値の違いから 3 つの菌群に分類した。これら耐性菌の検出時における分類は、圃場におけるボスカリド水和剤の防除効果の低下を検討するために有効とも考えられた。しかし、各圃場における耐性菌の検出頻度は高く、例え MR 菌のみの発生であっても本剤の防除効果は顕著に低下することが予想される。さらに、耐性菌検出の経緯から、最初に登場した耐性菌は MR 菌であり、時間の経過とともに VHR 菌が増加したと考えられる。VHR 菌の増加傾向はボスカリド水和剤の使用回数の増加に伴うものと推察される。一方で、HR 菌は極希少な発生をしていると考えられる。これは HR 菌の fitness が低いことに起因すると推測される。ボスカリド剤耐性菌に程度が異なる菌群が存在することは第 3 章で述べる *Podosphaera xanthii* の他、*A. alternata* および *B. cinerea* でも同様に報告されている (Avenot and Michailides, 2010; Leroux et al., 2010) が、そ

これらの圃場での発生頻度の差異については明確にされていない。

### 3 キュウリうどんこ病菌におけるボスカリド剤耐性菌の発生

#### 3. 1 目的

日本ではキュウリうどんこ病するボスカリド水和剤の農薬登録はないが、2008年（上市は2010年）にSDHI剤であるペンチオピラド水和剤が本病に対して登録された。キュウリ栽培では、2005年から主に褐斑病を対象にボスカリド水和剤が使用されていたため、うどんこ病菌も本剤の曝露を受けていたと考えられた。そのため、ペンチオピラド水和剤の上市以前に、本病におけるSDHI剤に対する耐性菌対策を検討するために、予めボスカリド剤に対する感受性の変動を調査する必要があると考えられた。そこで、本研究では本剤の使用履歴がある圃場からキュウリうどんこ菌を採集し、感受性の検定を行った。

#### 3. 2 材料および方法

##### 3. 2. 1 供試菌株

ボスカリド水和剤の曝露を受けていない菌株の本剤に対する感受性を検討するため、全国農業協同組合連合会より分譲を受けた菌株 K-7-2、および2008年8月に茨城県鉾田市のメロン栽培圃場より採集した病斑から単胞子分離によって得られた菌株 IbMPx0501、IbMPx0502、IbMPx0503 および IbMPx0609 を用いた（表9）。

さらに、本剤に対する感受性の変動を調査するために、2008年の10月、11月、または2009年の10月に、ボスカリド水和剤の使用履歴がある茨城県内の6市（筑西市、桜川市、常総市、かすみがうら市、石岡市、小美玉市）13圃場からうどんこ病が発生しているキュウリ葉を採集した。採集を行った全ての圃場でキュウリは年2作栽培されており、ボスカリド水和剤の使用履歴も認められた。採集した罹病葉は試験に供するまで5°Cで保存した。なお、ここでは単胞子分離を行わず、罹病葉1枚を1菌株として扱った。

また、ボスカリド剤耐性菌の特徴を詳細に検討するために、本剤の使用履歴がある圃場の罹病葉から単胞子分離した以下の6菌株を得た（表9）。すなわち、IbCPx2-4-1、IbCPx2-4-2、IbCPx4-4-1は、桜川市の圃場より採集した罹病葉を由来とし、後述するリーフディスク検定において、ボスカリド剤500μg/mlの液に浮かべたディスク上で発生した病斑から得られた菌株である。また1-1S、1-2S および1-3Sも単胞子分離株であるが、選抜の方法が異なり、333μg/mlのボスカリド剤を噴霧したキュウリ本葉に筑西市の圃場から採集した罹病葉上の分生胞子を接種し、その後、形成された病斑から得られた菌株であり、農業環境技術研究所より分譲いただいた。これらの菌株は各々、ペトリ皿内に入れたキュウリ本葉または子葉上において維持した。

なお、本研究で用いた単胞子分離菌株については、いずれも発芽管の形態が *fuliginea* 型であること、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* (*Oidium* 属 *Fibroidium* 亜属) であることを簡易に同定した (Uchida et al., 2009)。

表9 本研究で用いたウリ類うどんこ病菌の単胞子分離菌株

菌株名	採集地	分離源宿主	来歴
IbMPx0501	鉾田市	メロン	本研究
IbMPx0502	鉾田市	メロン	本研究
IbMPx0503	鉾田市	メロン	本研究
IbMPx0609	鉾田市	メロン	本研究
IbCPx2-4-1	桜川市	キュウリ	本研究
IbCPx2-4-2	桜川市	キュウリ	本研究
IbCPx4-4-1	桜川市	キュウリ	本研究
1-1S	筑西市	キュウリ	農業環境技術研究所より分譲
1-2S	筑西市	キュウリ	農業環境技術研究所より分譲
1-3S	筑西市	キュウリ	農業環境技術研究所より分譲
K-7-2	不明	キュウリ	全国農業協同組合連合会より分譲

### 3. 2. 2 リーフディスク法を用いた感受性検定

感受性検定は Ishii et al. (2001) および Schepers (1984) に従ってリーフディスク法により行った。キュウリ苗の外観健全な子葉からコルクボーラーで 1cm 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ディスクを置いた。うどんこ病菌の接種は、ディスク上で検定菌株の病斑を軽く指で弾いて分生胞子を落下させることで行った。その後、このディスクを 6 穴培養皿内の薬液に浮かべた (1 穴当たり 5 ディスク)。薬液は市販のボスカリド水和剤と滅菌水を用いて本剤の成分濃度が 0, 0.05, 0.5, 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように調製した。なお、ボスカリド剤 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  はキュウリ灰色かび病および菌核病で農薬登録された実用濃度である。その後、培養皿は 12 時間間隔の明暗条件下で 20°C で管理した。

接種 10 日後、実体顕微鏡下でリーフディスク上に形成された病斑の調査を行った。発病の有無や程度により指数化 (0=病斑形成無し, 1=病斑面積がディスクの 5% 未満, 2=5% 以上 25% 未満, 3=25% 以上 50% 未満, 4=50% 以上 75% 未満, 5=75% 以上) してディスクごとに調査した後に、発病度  $(=[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F] \times 100)$ 。A~E はそれぞれ発病指数 5~1 のディスク数、F はディスクの総数) を求めた。

### 3. 2. 3 キュウリポット苗を用いた感受性検定

ボスカリド水和剤の実用的な使用場面における本剤耐性菌に対する発病抑制効果を検討するため、ポット植えたキュウリ苗を用いた接種試験を行った。試験には、リーフディスク検定においてボスカリド剤 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  でも病斑形成が認められ耐性菌として判断された IbCPx2-4-1, IbCPx2-4-2, IbCPx4-4-1, 1-1S および 1-3S, 対照として感受性菌 (S 菌) である K-7-2 を用いた。各菌株の孢子懸濁液は、キュウリ葉上で形成させた分生胞子を水道水に懸濁し、濃度を約  $5 \times 10^4$  spores/ml として調製した。キュウリ苗は、品種として 'ハイ・グリーン 21' を用い、ガラスハウスで育苗した第 3 葉期のものを用いた。市販のボスカリド水和剤を水道水で 1,000 倍に希釈し、成分濃度が 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように調製した薬液をハンドスプレーを用いて苗に噴霧した。また、対照として水道水のみを散布した処理を設けた。苗数は各処理当たり 5 株とした。薬液を風乾させた後、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。その後、発病調査までキュウリ苗の管理はガラスハウス内で行った。

接種 8 日後、第 2 葉に形成された病斑の程度を指数化 (0=病斑形成無し, 1=病斑が葉面積の 5% 未満, 2=5% 以上 25% 未満, 3=25% 以上 50% 未満, 4=50% 以上 75% 未満, 5=75% 以上) して調査し、発病度  $(=[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F] \times 100)$ 。A~E はそれぞれ発病指数 5~1 の葉数、F は葉の総数) を求め、さらに、薬剤の発病抑制率  $(=[(水道水処理株における発病度 - ボスカリド剤処理株における発病度) / 水道水処理株における発病度] \times 100)$  を算出した。

## 3. 3 結果

### 3. 3. 1 ボスカリド剤に対するうどんこ病菌の感受性

リーフディスク法による感受性検定の結果、S 菌である K-7-2, IbMPx0501, IbMPx0502, IbMPx0503 および IbMPx0609 の病斑形成は、ボスカリド剤濃度が 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  でほとんど抑制され、最小生育阻止濃度 (MIC 値) は 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった (表 10)。これらと比較し、ボスカリド水和剤の使用履歴がある圃場から採集した 74 菌株のうち 34 菌株では感受性の低下が認められた。これらは MIC 値が 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  を超えて 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上であったことから耐性菌であると判断された (表 11)。さらに、そのうちの 21 菌株では 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  でも病斑形成が認められた。

圃場別では検定を行った 13 圃場中 11 圃場で耐性菌が検出された。また、常総市の No.5 圃場と No.8 圃場より採集した 5 菌株は、いずれも MIC 値が 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上であった。これら圃場での本剤の使用回数はそれぞれ 8 回、8 回以上であった。検定菌株の全てが MIC 値 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下の S 菌であったのは No.10 圃場および No.13 圃場であり、本剤の使用回数はそれぞれ 4 回、4 回以上であった。その一方で、桜川市の No.3 圃場で 2008 年 10 月に採集を行った際には、使用回数が 8 回以上であったにもかかわらず、検定した菌株の全てが S 菌であった。

表10 ポスカリド水和剤の使用履歴がない圃場から採集したウリ類うどんこ病菌の本剤に対する感受性

菌株名	ボスカリド濃度(μg/ml)別の発病度 <sup>a)</sup>					
	0	0.05	0.5	5	50	500
IbMPx0501	97	21	5	0	0	0
IbMPx0502	87	37	8	0	0	0
IbMPx0503	97	41	4	0	0	0
IbMPx0609	96	60	4	0	0	0
K-7-2	93	24	4	0	0	0

<sup>a)</sup> 発病度=[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F]×100

A～Eはそれぞれ発病指数5～1のディスク数, Fはディスクの総数。

発病指数:0=病斑形成無し, 1=病斑面積がディスクの5%未満, 2=5%以上25%未満,

3=25%以上50%未満, 4=50%以上75%未満, 5=75%以上。

発病度は3反復の平均値である。

表11 ボスカリド水和剤の使用履歴がある圃場から採集したうどんこ病菌の本剤に対する感受性

圃場No.	市町名	採集年月	供試菌株数	MIC値 <sup>a)</sup> (μg/ml)別菌株数(株)					ボスカリドの総使用回数
				0.5	5	50	500	500<	
1	筑西市	2008年10月	5	0	1	2	2	0	8<
2	桜川市	2008年10月	5	1	1	0	1	2	5
		2009年10月	5	2	0	1	0	2	6
3	桜川市	2008年10月	5	4	1	0	0	0	8<
		2009年10月	5	3	1	1	0	0	8<
4	桜川市	2008年10月	5	0	4	1	0	0	8<
5	常総市	2008年11月	5	0	0	0	0	5	8
6	常総市	2008年11月	4	0	0	2	1	1	7
7	常総市	2008年11月	4	2	1	1	0	0	5
8	常総市	2008年11月	5	0	0	0	0	5	8<
9	常総市	2008年11月	4	1	1	0	1	1	5<
10	かすみがうら市	2009年10月	5	3	2	0	0	0	4
11	石岡市	2009年10月	5	0	1	0	0	4	12
12	石岡市	2009年10月	5	4	0	0	0	1	5<
13	小美玉市	2009年10月	5	5	0	0	0	0	4<

<sup>a)</sup> 最小生育阻止濃度。

### 3. 3. 2 単孢子分離菌株のボスカリド剤に対する感受性

単孢子分離菌株の感受性を明らかにするためにリーフディスク法を用いた検定を実施した結果, S 菌である K-7-2 に対する MIC 値が 5μg/ml であったのに対し, 現地圃場より採集した 6 菌株では MIC 値が 500μg/ml 以上であった(表 12)。さらに, これらの耐性菌株には耐性程度に違いが認められたことから 2 つのグループに区別した。すなわち, 薬剤濃度が 50μg/ml で病斑形成が大きく抑制され, 500μg/ml でさらに大きく抑制される IbCPx4-4-1, 1-1S, 1-2S および 1-3S を中等度耐性菌 (MR 菌), 500μg/ml でもほとんど抑制されない IbCPx2-4-1 および IbCPx2-4-2 を超高度耐性菌 (VHR 菌) とした。

ポット苗を用いた接種試験の結果, K-7-2 はボスカリド水和剤 1,000 倍希釈液 (有効成分濃度 500μg/ml) で完全に病斑形成が抑制されたのに対して, 供試した 5 菌株の耐性菌に対してはその発病抑制効果が大きく低下していた(表 13)。特に, VHR 菌に対する効力低下は顕著であり, MR 菌 3 菌株に対する発病抑制効果が 20～58% であったのに対して, VHR 菌では 3% または 0% であった。

表12 キュウリうどんこ病菌の単胞子分離菌株のボスカリド剤に対する感受性

菌株名	ボスカリド濃度 (µg/ml) 別の発病度 <sup>a)</sup>					
	0	0.05	0.5	5	50	500
IbCPx2-4-1	100	100	97	100	96	93
IbCPx2-4-2	100	99	100	100	100	95
IbCPx4-4-1	100	100	100	97	31	8
1-1S	100	100	99	72	26	1
1-2S	100	100	100	87	23	8
1-3S	100	100	97	95	25	4
K-7-2 <sup>b)</sup>	93	61	8	0	0	0

<sup>a)</sup> 発病度= $[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F] \times 100$

A~Eはそれぞれ発病指数5~1のディスク数, Fはディスクの総数。

発病指数:0=病斑形成無し, 1=病斑面積がディスクの5%未満, 2=5%以上25%未満, 3=25%以上50%未満, 4=50%以上75%未満, 5=75%以上。

発病度は3反復の平均値である。

<sup>b)</sup> K-7-2:感受性菌株。

表13 ボスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリうどんこ病菌に対する本剤の発病抑制効果

菌株名	ボスカリド剤に対する感受性 <sup>a)</sup>	処理 <sup>b)</sup>	発病度 <sup>c)</sup>	発病抑制率 (%) <sup>d)</sup>
IbCPx2-4-1	VHR	ボスカリド水和剤	60	3
		水道水	62	-
IbCPx2-4-2	VHR	ボスカリド水和剤	30	0
		水道水	30	-
IbCPx4-4-1	MR	ボスカリド水和剤	22	54
		水道水	48	-
1-1S	MR	ボスカリド水和剤	62	28
		水道水	86	-
1-3S	MR	ボスカリド水和剤	32	20
		水道水	40	-
K-7-2	S	ボスカリド水和剤	0	100
		水道水	56	-

<sup>a)</sup> S:感受性, MR:中等度耐性, VHR:超高度耐性。

<sup>b)</sup> ボスカリド水和剤は有効成分濃度500µg/mlで処理した。

<sup>c)</sup> 発病度= $[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F] \times 100$

A~Eはそれぞれ発病指数5~1の葉数, Fは葉の総数。

発病指数:0=病斑形成無し, 1=病斑が葉面積の5%未満, 2=5%以上25%未満, 3=25%以上50%未満, 4=50%以上75%未満, 5=75%以上。

<sup>d)</sup> 発病抑制率 (%)= $[(\text{水道水処理株における発病度} - \text{ボスカリド剤処理株における発病度}) / \text{水道水処理株における発病度}] \times 100$

### 3. 4 考察

本研究により, ボスカリド剤耐性うどんこ病菌が本剤の使用履歴がある圃場ですでに高頻度で発生していることが明らかとなった。キュウリ栽培において, 本病は作型を問わず断続的に発生していることが多い。そのため, 本剤の登録がある褐斑病を対象に散布されていたボスカリド剤にうどんこ病菌が頻繁に曝露したことにより, 耐性菌の選抜が進んだと考えられる。ウリ類うどんこ病菌の本剤に対する耐性菌の発生はアメリカ等ですでに報告されていたが (McGrath, 2008 ; McGrath and Miazzi, 2008 ; Miazzi and McGrath, 2008), 日本での発生の確認は石井ら (2009) の報告とともに本研究が初めてであった。

本剤の使用履歴と耐性菌の発生の関係であるが、一般的に耐性菌率は薬剤の使用回数に伴って上昇すると考えられる (Brent and Hollomon, 2007a)。しかし、本研究では、No.3 圃場では 8 回以上を使用したにもかかわらず耐性菌が検出されなかった一方で、No.5 圃場では 8 回の使用で検定した全菌株が耐性菌であったように、耐性菌の検出頻度とボスカリド水和剤の使用回数の関係に傾向は見出せなかった。なお、両圃場では、本剤上市以降のキュウリ作付けは同数 (促成 4 回, 抑制 4 回) であった。また、今回調査した全圃場では、本剤を連用する等、耐性菌の選抜を助長しやすい誤った使用はされていない。そのため、耐性菌の発生程度の差異には、本剤を使用した際の本病の発生状況が影響を及ぼしていると考えられる。今後、この原因についてさらに検討を重ねることは、耐性菌対策に生かせる知見になると考えられる。

本剤耐性菌の発生は、2010 年に上市されたペンチオピラド水和剤の防除効果に影響を及ぼす可能性が高い。ペンチオピラド剤とボスカリド剤間の交叉耐性については *A. alternata* や *Didymella bryoniae* で検討されており、SDH の変異の違いによって程度には違いが見られているものの、耐性が交叉することが確認されている (Avenot and Michailides, 2010; Avenot et al., 2010)。また、最近ではキュウリ褐斑病菌、そしてうどんこ病菌でも交叉耐性が確認されている (Ishii et al., 2011)。そのため、キュウリ栽培においてボスカリド水和剤の使用履歴がある圃場では、ペンチオピラド水和剤の使用に際しては十分な注意を払う必要があると考えられた。

本研究では、うどんこ病菌のボスカリド剤耐性菌にも第 2 章のキュウリ褐斑病菌と同様に、菌株によって耐性程度が異なることを明らかにした。このような耐性菌の区別はその特徴を知る上で重要であり、今後さらに菌株を増やして耐性程度の違いを明確にすることが必要である。しかし、MR 菌および VHR 菌のいずれに対しても、ポット苗を用いた接種試験では本剤の発病抑制効果が著しく低下していたことから、耐性程度の違いにかかわらずこれらの耐性菌の発生は圃場での薬剤の防除効果の低下の原因になると考えられた。なお、耐性程度の異なる耐性菌の検出は、変異源として UV を用いて作出した *Aspergillus oryzae* のカルボキシシン剤に対する耐性菌で認められている (Shima et al., 2008)。この他、ボスカリド剤では、*A. alternata* および *B. cinerea* でも報告されている (Avenot and Michailides, 2010 ; Leroux et al., 2010)。

## 4 キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌のボスカリド剤耐性菌におけるコハク酸脱水素酵素 (SDH) 遺伝子のシーケンス解析

### 4. 1 キュウリ褐斑病菌の SDH サブユニット遺伝子の解析

#### 4. 1. 1 目的

ボスカリド剤を含む SDHI 剤の作用点である SDH は 4 つのサブユニット (SdhA, SdhB, SdhC および SdhD) から成る。既報では、本系統剤感受性の低下に関与する遺伝子変異は、SdhB, SdhC および SdhD をコードする領域に認められていた (Keon et al., 1991 ; Broomfield and Hargreaves, 1992 ; Skinner et al., 1998 ; Honda et al., 2000 ; Matsson and Hederstedt, 2001 ; Ito et al., 2004 ; Li et al., 2006 ; Avenot et al., 2008 ; Shima et al., 2008 ; Stammli et al., 2008 ; Avenot et al., 2009)。ここではキュウリ褐斑病菌について、SDH サブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を解析し、S 菌と耐性菌の推定アミノ酸配列の違いについて明らかにする。

#### 4. 1. 2 材料および方法

##### 4. 1. 2. 1 供試菌株

SDH の各遺伝子の解析には、S 菌を 9 菌株、耐性菌を 47 菌株、合計 56 菌株を供試した。なお、耐性菌の耐性程度別の内訳は、MR 菌が 20 菌株、HR 菌が 4 菌株および VHR 菌が 23 菌株であった。供試した 56 菌株うち、21 菌株は本研究で分離した菌株である。また、33 菌株は茨城県、千葉県、佐賀県から分離された菌株であり、農業環境技術研究所から分譲いただいた。残る 2 菌株は香川県農業試験場より分譲いただいた。これら菌株は、分離または分譲を受けた後、供試するまで PDA 斜面培地上で 5°C で保存した。なお、SDH の各サブユニットをコードする各遺伝子に特異的な PCR (Polymerase chain reaction) プライマーの設計には、BASF SE Agricultural Center Limburgerhof (ドイツ) に保存されていた 1 菌株 (菌株名 house strain) を供試した。

#### 4. 1. 2. 2 SDHの各遺伝子増幅のための特異的プライマーの設計

*C. cassiicola* の *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* の全塩基配列を増幅するため、house strain を用いて4つのプライマーセットをデザインした。RNAの抽出は、house strain をPDA培地で培養した後、菌叢を採集し、NucleoSpin RNA Plant Mini Kit (Macherey-Nagel) を用いて行った。その後、ゲル電気泳動でRNAの抽出量を確認した後、700-1000ngのRNAからVerso cDNA Kit (ABgene) を用いてcDNAを合成した。また、*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *B. cinerea*, *Septoria tritici*, *Magnaporthe grisea* および *Fusarium graminearum* の *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* 遺伝子内の保存領域を参考に、*SdhA* の増幅のためのプライマーセットとして KES 503/KES 504, *SdhB* のための KES 719/KES 729, *SdhC* のための KES 544/KES 519, *SdhD* のための KES 750/KES 187 を設計した (表 14)。各遺伝子のPCR増幅は2x Thermo-Start PCR Mastermix (ABgene) および上述のプライマーセットを用いて行った。反応条件は、95°Cで15分間プレヒートした後、*SdhA* については95°Cで15秒、50°Cで30秒、72°Cで60秒、*SdhB* については95°Cで15秒、55°Cで30秒、72°Cで60秒でそれぞれ40サイクル、*SdhC* および *SdhD* については95°Cで15秒、55°Cで30秒、72°Cで30秒で50サイクル、最後に72°Cで5分間伸長反応を行った。PCR産物はNucleoSpin Extract2 (Macherey-Nagel) を用いて精製した。その増幅断片をCloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas) を用いてベクターpJET1.2に挿入し、*Escherichia coli* XL-1 (Stratagene) を形質転換した。遺伝子ごとに2つのコロニーからNucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) を用いてプラスミドを回収し、各プライマーセットとBigDye Terminator Version 3.1 (Applied Biosystems) を用いて、ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) により、塩基配列の決定を行った。

得られた各遺伝子の部分配列を元にSDHの各遺伝子の全塩基配列を得るため、PrimerExpress Software (Applied Biosystems) を用いて新しいプライマーのデザインを行った。CapFishing Full-length cDNA Premix Kit (Seegene) および上述のプライマーセットでSDHの各遺伝子のcDNAを用いたRACE反応を行った。塩基配列の決定はLasergene Software package (DNASTAR) を用いて行った。得られた各遺伝子の全塩基配列を元に、特異的プライマーセットとして、*SdhA* のための KES 897/KES 903, *SdhB* のための KES 746/KES 747, *SdhC* のための KES 764/KES 751, *SdhD* のための KES 862/KES 762 を設計した (表 14)。

表14 *Corynespora cassiicola* のコハク酸脱水素酵素サブユニットの各遺伝子の増幅に用いたPCRプライマー

増幅遺伝子	プライマー名 <sup>a)</sup>	プライマー配列 (5' to 3')
<i>SdhA</i>	KES 503 (F)	CTCGTGGTGAGGGTGGTTACCT
	KES 504 (R)	CGCTTGAAAGGTGGAACAGC
<i>SdhA</i>	KES 897 (F)	ATGAGTTGTCTCAGGATGCGTC
	KES 903 (R)	AGAATACAGGACAGCAGCAAACAA
<i>SdhB</i>	KES 719 (F)	CTBCCNCACACCTACGTCGTC AAGGAC
	KES 729 (R)	CTTCTTRATCTCVGCRATVGCC
<i>SdhB</i>	KES 746 (F)	ATGGCTTGACACGCGC
	KES 747 (R)	CTACCCAACAGCTCACTTGCC
<i>SdhB</i>	SDHMF-1 (F) <sup>b)</sup>	TGYCCVTCB TACTGGTGAA
	SDHMB-1a (R)	GGRCAKGY YCKNGWRCARTT
<i>SdhC</i>	KES 544 (F)	CGVCCCGTVTCVCCVCA YCT
	KES 519 (R)	AVVGGIGCRRCGAGGTAKGC
<i>SdhC</i>	KES 764 (F)	ATGGCTTCCCAGCGCGTC
	KES 751 (R)	CTAAACAAACAGAGAATAGTAGAGGGTGG
<i>SdhD</i>	KES 750 (F)	GTAYGAGTTYGARACVAA YGA
	KES 187 (R)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
	KES 283 (R)	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
<i>SdhD</i>	KES 862 (F)	ATGAAGCGCACCTCGCCAATC
	KES 762 (R)	AAAGATCCTAATAATCACATGTATCCAAC

<sup>a)</sup>F:フォワードプライマー, R:リバースプライマー

<sup>b)</sup>SDHMF-1およびSDHMB-1aは櫻井(2007)より引用した。



#### 4. 1. 2. 3 SDHの各遺伝子の塩基配列

ボスカリド剤に対する S 菌および耐性菌間の SDH の各遺伝子の塩基配列を比較するため、S 菌 5 菌株 (IbCor0008, IbCor1522, IbCor1658, IbCor1683 および IbCor1907), MR 菌 5 菌株 (IbCor1218, IbCor1361, IbCor1481, IbCor1482 および IbCor1679) および VHR 菌 1 菌株 (IbCor1689) の *SdhA*, *SdhB*, *SdhC*, *SdhD* のクローニングと全塩基配列の決定を行った。これらの 11 菌株を PDA 培地で培養し、菌糸を採集した。その後、NucleoSpin DNA Plant Mini Kit (Macherey-Nagel) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。各遺伝子の PCR 増幅のため、プライマーセットとして *SdhA* では KES 897/KES 903, *SdhB* では KES 746/KES 747, *SdhC* では KES 764/KES 751, *SdhD* では KES 862/KES 762 を用いた (表 14)。PCR の反応条件としては、98°C で 60 秒間プレヒートを行った後、熱変性を 98°C で 10 秒行い、アニーリングを *SdhA* では 62°C, *SdhB* および *SdhC* では 68°C, *SdhD* は 66°C で 30 秒、伸長反応を 72°C で 30 秒行った。この熱変性、アニーリング、伸長反応を 40 サイクル繰り返したのち、最終の伸長反応を 72°C で 5 分間行った。PCR 産物は NucleoSpin Extract2 を用いて精製した。その増幅断片を CloneJET PCR Cloning Kit を用いてベクター pJET1.2 に挿入し、*E. coli* XL-1 を形質転換した。形質転換体は 100µg/ml のアンピシリンを含む Luria-Bertani (LB) 培地で選抜した。同濃度のアンピシリンを含む LB 液体培地で 37°C で一晩振とう培養し、NucleoSpin Plasmid Mini Kit を用いてプラスミドの抽出を行った。塩基配列の決定は、各遺伝子に対して設計した特異的プライマーセットと BigDye Terminator Version 3.1 を用いて、ABI Prism 377 DNA Sequencer により行った。

さらに、4 菌株の S 菌、15 菌株の MR 菌、4 菌株の HR 菌、22 菌株の VHR 菌について、*SdhB* の部分塩基配列、*SdhC* および *SdhD* の全配列の決定を行った。DNA の抽出は Saitoh et al. (2006) の方法を用いて行った。プライマーセットとしては、*SdhB* の増幅用として SDHMF-1/SDHMB-1a (櫻井, 2007), *SdhC* として KES 764/KES 751, *SdhD* として KES 862/KES 762 を用いた (表 14)。SDHMF-1/SDHMB-1a は、他の病原菌で SDHI 剤感受性の低下に関与するとされる S2 クラスター内のプロリン残基 (*C. cassiicola* では 231 番目) および S3 クラスター内のヒスチジン残基 (同 278 番目) を含む領域を増幅することができる (Keon et al., 1991; Broomfield and Hargreaves, 1992; Skinner et al., 1998; Avenot et al., 2008; Stammler et al., 2008)。PCR 増幅の反応条件は、最初、プレヒートを 94°C で 2.5 分間行った後、*SdhB* では 40 サイクル、*SdhC* および *SdhD* では 30 サイクル、熱変性、アニーリング、伸長反応をそれぞれ、94°C で 30 秒、48°C で 1 分、72°C で 1 分行った。その後、最終の伸長反応を 72°C で 10 分間行った。PCR 産物の精製は MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて行い、塩基配列の決定は、fluorescent-dye-labeled dideoxy terminators を用いた automated DNA sequencer Prism Model (Applied Biosystems) により、または Greiner Bio-one の DNA シークエンス解析サービスにより行った。

#### 4. 1. 3 結果

##### 4. 1. 3. 1 キュウリ褐斑病菌の SDH 各遺伝子の塩基配列

特異的プライマーセットである、KES 897/KES 903, KES 746/KES 747, KES 764/KES 751, KES 862/KES 762 を用いて、本研究で分離された褐斑病菌 11 菌株を用いて PCR を行った結果、*SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* ではそれぞれ、2340bp, 1071bp, 629bp, 1083bp の増幅産物が得られた。これらの断片をクローニングし、さらに塩基配列の決定を行った。解析の結果、各遺伝子は順に、647, 307, 177 および 165 アミノ酸の open reading frame (ORF) を有していることが推定された。さらに、各 ORF には、*SdhA* では 3 つ (206, 56, 47bp), *SdhB* では 2 つ (64, 59bp), *SdhC* では 1 つ (95bp), *SdhD* では 2 つ (250, 120bp) のイントロンが挿入されていた。推定したアミノ酸配列について DDBJ データベースの BLASTX を用いて相同性を検討したところ、褐斑病菌の *SdhA*, *SdhB*, *SdhC*, *SdhD* はそれぞれ、*Saccharomyces cerevisiae* のコハク酸脱水素酵素の mitochondrial flavoprotein (71% (identity), accession No. B3LQV3), iron-sulfur protein (71%, 同 B3LTD3), cytochrome b (34%, 同 B3LQV9), membrane anchor (32%, 同 B3LGA5) に比較的高い相同性を示した。加えて、ボスカリド剤に対する耐性菌の研究が多くなされている *A. alternata* の推定 *SdhA* (84% (identity), accession No. B8XCQ1), *SdhB* (89%, 同 B2BZ64), *SdhC* (67%, 同 B8XSR3), *SdhD* (78%, 同 B8XSR4) にも高い相同性を示した。

残る 45 菌株については、*SdhB* の部分配列、*SdhC* および *SdhD* の全配列の PCR 産物をダイレクトシーケンシングした。その結果、これら菌株の 3 つの遺伝子の配列は、以下に述べる点変異箇所を除き、それぞれ全て

同一であった。

#### 4. 1. 3. 2 S菌および耐性菌におけるSDH各遺伝子の配列の比較

S菌5菌株, MR菌5菌株およびVHR菌1菌株の*SdhA*, *SdhB*, *SdhC*および*SdhD*の全塩基配列の比較を行った。その結果, *SdhA*の塩基配列はいずれも同一であった(データ省略)。一方で, *SdhB*では, S3クラスターにあたる278番目のアミノ酸が, S菌では野生型であるヒスチジン(CAC)であったのに対して, VHR菌であるIbCor1689では同残基のチロシンへの置換を伴うTACへの変異が認められた(B-H278Y)(表15, 図9)。MR菌の*SdhB*は, S菌のものと同一であった。しかし, MR菌であるIbCor1481およびIbCor1482の*SdhC*において, 73番目のセリン(野生型)からプロリンへの置換を伴う, TCGからCCGへの変異が認められた(C-S73P)(表16, 図10)。さらに, IbCor1361では*SdhD*において89番目のアミノ酸にセリン(野生型)からプロリンへの置換を伴うTCCからCCCへの変異が認められた(D-S89P)(図11)。その一方で, 同じくMR菌であるIbCor1218およびIbCor1679ではいずれの遺伝子にも変異は認められなかった。

表15 ボスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリ褐斑病菌(S菌, HR菌, VHR菌)のコハク酸脱水素酵素(SDH)における推定アミノ酸置換

菌株名	分離地	EC <sub>50</sub> 値 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ボスカリド剤に 対する感受性 <sup>a)</sup>	推定アミノ酸置換		
				SdhB	SdhC	SdhD
IbCor0008* <sup>b)</sup>	茨城県	0.4	S	WT <sup>c)</sup>	WT	WT
IbCor0101	茨城県	0.4	S	WT	WT	WT
IbCor1522*	茨城県	0.4	S	WT	WT	WT
IbCor1658*	茨城県	0.2	S	WT	WT	WT
IbCor1683*	茨城県	0.4	S	WT	WT	WT
IbCor1907*	茨城県	0.3	S	WT	WT	WT
20060410	千葉県	0.3	S	WT	WT	WT
050600-1	千葉県	0.2	S	WT	WT	WT
Mur9-1-1	香川県	0.5	S	WT	WT	WT
IbCor3006	茨城県	10.7	HR	H278R	WT	WT
IbCor3009	茨城県	8.9	HR	H278R	WT	WT
IbCor3011	茨城県	9.8	HR	H278R	WT	WT
IbCor3013	茨城県	8.9	HR	H278R	WT	WT
IbCor1689*	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
IbCor2036B	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
IbCor2529A	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
IbCor2616A	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
IbCor2617A	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
Chikusei1-5	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070327A1	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070327A2	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070327A3	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070428B2	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070508C3	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070508D1	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070508E1	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070508F1	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
1-1-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
1-2-2	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
2-1-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
2-2-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
3-1-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
3-2-2	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
4-1-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
4-3-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
Toy2-1-1	香川県	30<	VHR	H278Y	WT	WT

<sup>a)</sup>S:感受性, HR:高度耐性, VHR:超高度耐性。

<sup>b)</sup>アステリスクを付した菌株では, *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* の全塩基配列を解析した。なお, *SdhA* は解析した6菌株で配列は同一であった。

<sup>c)</sup>WT:野生型。

## SdhB

Cca (S)	230	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCH <u>T</u> ILNC
Cca (MR)	230	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCH <u>T</u> ILNC
Cca (HR)	230	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCH <u>R</u> ILNC
Cca (VHR)	230	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCH <u>Y</u> ILNC
Aal (B2BZ64)	229	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKKAERQDALNNSMSLYRCH <u>T</u> ILNC
Aor (Q2TWM0)	201	C <u>P</u> SYWWNSEEYLGPAIILLQSYRWLADSRDEKTAERKHALDNSMSVYRCH <u>T</u> ILNC
Mgr (AAB97419.1)	219	C <u>P</u> SYWWNSEEYLGPAVLLQSYRWINDSRDEKTAQRKDALNNSMSLYRCH <u>T</u> ILNC
Eco (AAA23896.1)	159	C <u>P</u> SFWWNPDKFIGPAGLLAAYRFLIDSRDTE TDSRLDGLSDAFSVFRCH <u>S</u> IMNC

図9 ポスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassicola*) および SDHI 剤耐性について研究されている他の微生物の SdhB アミノ酸配列の比較

Cca は *C. cassicola*, Aal は *Alternaria alternata*, Aor は *Aspergillus oryzae*, Mgr は *Mycosphaerella graminicola*, Eco は *Escherichia coli* を示す。菌名の右のカッコ内は、*C. cassicola* では S がボスカリド剤感受性菌、MR が中等度耐性菌、HR が高度耐性菌、VHR 菌が超高度耐性菌を示し、それ以外の菌では用いた配列の DNA データベース上での Accession Number を示す。アステリスクはカルボキシ剤とユビキノンの結合に関与する残基を示す (Horsefield et al., 2006)。アミノ酸配列中の太字はキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤耐性菌で置換が認められた残基を示す。また、下線は、他の微生物で SDHI 剤耐性に関与するとされている残基を示す。

表16 ポスカリド剤に対して中等度耐性(MR)を示すキュウリ褐斑病菌のコハク酸脱水素酵素(SDH)における推定アミノ酸置換

菌株名	分離地	EC <sub>50</sub> 値 (μg/mL)	ボスカリド剤に 対する感受性 <sup>a)</sup>	推定アミノ酸置換		
				SdhB	SdhC	SdhD
IbCor1218 <sup>*b)</sup>	茨城県	5.3	MR	WT <sup>c)</sup>	WT	WT
IbCor1361*	茨城県	5.0	MR	WT	WT	S89P
IbCor1481*	茨城県	3.2	MR	WT	S73P	WT
IbCor1482*	茨城県	4.5	MR	WT	S73P	WT
IbCor1679*	茨城県	2.0	MR	WT	WT	WT
IbCor2429	茨城県	3.2	MR	WT	S73P	WT
Chikusei1-2	茨城県	2.7	MR	WT	WT	WT
Chikusei1-3	茨城県	3.5	MR	WT	S73P	WT
Chikusei1-11	茨城県	2.0	MR	WT	WT	WT
Chikusei1-14	茨城県	2.9	MR	WT	NA <sup>d)</sup>	NA
Chikusei1-22	茨城県	2.3	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-1	茨城県	3.5	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-3	茨城県	2.6	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-4	茨城県	5.4	MR	WT	WT	G109V
Chikusei2-5	茨城県	5.8	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-7	茨城県	3.8	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-8	茨城県	3.1	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-9	茨城県	5.9	MR	WT	NA	NA
Chikusei2-15	茨城県	4.8	MR	WT	NA	NA
Chikusei2-26	茨城県	4.2	MR	WT	NA	NA

<sup>a)</sup>MR: 中等度耐性。

<sup>b)</sup>アステリスクを付した菌株では、*SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* の全塩基配列を解析した。なお、*SdhA* は解析した5菌株で配列は同一であった。

<sup>c)</sup>WT: 野生型。

<sup>d)</sup>NA: 未解析。

## SdhC

		*	*	
Cca (S)	56	VSPHLSIYRPQITWYASSF	<u>N</u> RI TGVALS... 131	FFF <u>H</u> SLNGLRHLSWDI GLG
Cca (MR)	56	VSPHLSIYRPQITWYASSF	<u>N</u> RI TGVALS... 131	FFF <u>H</u> SLNGLRHLSWDI GLG
Cca (MR)	56	VSPHLSIYRPQITWYASSP	<u>F</u> NRITGVALS... 131	FFF <u>H</u> SLNGLRHLSWDI GLG
Cca (HR&VHR)	56	VSPHLSIYRPQITWYASSF	<u>N</u> RI TGVALS... 131	FFF <u>H</u> SLNGLRHLSWDI GLG
Aal (B8XSR3)	68	VSPHLAIYKPQITWYASSL	<u>N</u> RI TGITLS... 141	FFF <u>H</u> SFNGLRH LAWVGI G
Aor (Q2U3V9)	68	VSPHLSIYRPQITWIGSSF	<u>H</u> RITGFALS... 143	FTY <u>H</u> CFNGVRHLVWDLGRG
Cci (AB092687)	61	SSPHFTIYQPQLTWLGSIA	<u>N</u> RV TGAGLS... 133	FSY <u>H</u> AWNGLRHLAWDAGKF
Eco (AAA23893.1)	11	VNLDLQTI RFPITAIASIL	<u>H</u> RVSGVITF... 81	LAY <u>H</u> VVVGIRHMMDFGYL

図 10 ボスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*) および SDHI 剤耐性について研究されている他の微生物の SdhC アミノ酸配列の比較

Cca は *C. cassiicola*, Aal は *Alternaria alternata*, Aor は *Aspergillus oryzae*, Cci は *Coprinosopsis cinerea*, Eco は *Escherichia coli* を示す。菌名の右のカッコ内は, *C. cassiicola* では S がボスカリド剤感受性菌, MR が中等度耐性菌, HR が高度耐性菌, VHR 菌が超高度耐性菌を示し, それ以外の菌では用いた配列の DNA データベース上での Accession Number を示す。アステリクスはカルボキシシン剤とユビキノンの結合に関与する残基を示す (Horsefield et al., 2006)。アミノ酸配列中の太字はキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤耐性菌で置換が認められた残基を示す。また, 下線は, 他の微生物で SDHI 剤耐性に関与するとされている残基を示す。

## SdhD

				*
Cca (S)	64	SYHWSFERA ISAGLIP LTIAPFAAGS	<u>L</u> NPVT <u>D</u> SILCALLVI <u>H</u> SHI <u>G</u> FEACV <u>I</u> <u>D</u> <u>Y</u>	
Cca (MR)	64	SYHWSFERA ISAGLIP LTIAPFAAGS	<u>L</u> NPVT <u>D</u> SILCALLVI <u>H</u> SHI <u>G</u> FEACV <u>I</u> <u>D</u> <u>Y</u>	
Cca (MR)	64	SYHWSFERA ISAGLIP LTIAPFAAGP	<u>L</u> NPVT <u>D</u> SILCALLVI <u>H</u> SHI <u>V</u> FEACV <u>I</u> <u>D</u> <u>Y</u>	
Cca (MR)	64	SYHWSFERA ISAGLIP LTIAPFAAGS	<u>L</u> NPVT <u>D</u> SILCALLVI <u>H</u> SHI <u>V</u> FEACV <u>I</u> <u>D</u> <u>Y</u>	
Cca (HR&VHR)	64	SYHWSFERA ISAGLIP LTIAPFAAGS	<u>L</u> NPVT <u>D</u> SILCALLVI <u>H</u> SHI <u>G</u> FEACV <u>I</u> <u>D</u> <u>Y</u>	
Aal (B8XSR4)	72	SYHWSFERI VSAGLIP LTIAPFAAGS	<u>L</u> NPLT <u>D</u> SILCALLV <u>H</u> SHI <u>G</u> FESC <u>I</u> <u>D</u> <u>Y</u>	
Pde (AAA75176.1)	37	TPLFMIVVARA IGLSQEQLLAYFGR	<u>P</u> FALIT <u>A</u> L FVIVGMV <u>H</u> F I <u>K</u> <u>G</u> TR <u>I</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>Y</u>	
Eco (AAA23894.1)	30	I IYMGFFATSGELTYE VWI GFFAS	<u>A</u> FTKV <u>F</u> T <u>L</u> LALF <u>S</u> I <u>L</u> I <u>H</u> A <u>W</u> I <u>G</u> M <u>W</u> Q <u>V</u> L <u>T</u> <u>D</u> <u>Y</u>	

図 11 ボスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*) および SDHI 剤耐性について研究されている他の微生物の SdhD アミノ酸配列の比較

Cca は *C. cassiicola*, Aal は *Alternaria alternata*, Pde は *Paracoccus denitrificans*, Eco は *Escherichia coli* を示す。菌名の右のカッコ内は, *C. cassiicola* では S がボスカリド剤感受性菌, MR が中等度耐性菌, HR が高度耐性菌, VHR 菌が超高度耐性菌を示し, それ以外の菌では用いた配列の DNA データベース上での Accession Number を示す。アステリクスはカルボキシシン剤とユビキノンの結合に関与する残基を示す (Horsefield et al., 2006)。アミノ酸配列中の太字はキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤耐性菌で置換が認められた残基を示す。また, 下線は, 他の微生物で SDHI 剤耐性に関与するとされている残基を示す。

さらに、*SdhB* の部分配列、*SdhC* および *SdhD* の全配列の解析を行った S 菌 4 菌株、MR 菌 15 菌株、HR 菌 4 菌株、VHR 菌 22 菌株について比較を行った。その結果、上述した IbCor1689 株と同様の B-H278Y を伴う変異が VHR 菌 22 菌株のすべてで認められた (表 15)。さらに、*SdhB* の 278 番目のヒスチジン (野生型) がアルギニンへと置換する CAC から CGC への変異が新たに HR 菌 4 菌株のすべてで認められた (B-H278R)。MR 菌では、*SdhB* に変異は認められなかったが、C-S73P を伴う変異が IbCor2429 および Chikusei1-3 で認められ、また新たに、Chikusei2-4 の *SdhD* において、109 番目のアミノ酸が野生型のグリシンからバリンに置換する、GGC から GTC への変異が認められた (D-G109V) (表 16)。しかし、それ以外の MR 菌では、解析した 3 つの遺伝子内に変異は認められなかった。

なお、本研究で解析した主な塩基配列は表 17 の通り DNA データベース (DDBJ) に登録した。

表17 DNAデータベース(DDBJ)に登録したキュウリ褐斑病菌の塩基配列のAccession Number

Accession Number	遺伝子名	菌株名	ボスカリド剤に対する感受性 <sup>a)</sup>
AB548737	<i>SdhA</i>	IbCor0008	S
AB548738	<i>SdhB</i>	IbCor0008	S
AB548739	<i>SdhB</i>	IbCor1689	VHR
AB548740	<i>SdhB</i>	IbCor3006	HR
AB548741	<i>SdhC</i>	IbCor0008	S
AB548742	<i>SdhC</i>	IbCor1482	MR
AB548743	<i>SdhD</i>	IbCor0008	S
AB548744	<i>SdhD</i>	IbCor1361	MR
AB548745	<i>SdhD</i>	Chikusei2-4	MR

<sup>a)</sup>S: 感受性, MR: 中等度耐性, HR: 高度耐性, VHR: 超高度耐性。

#### 4. 1. 4 考察

ボスカリド剤 S 菌と耐性菌における SDH の各遺伝子の配列を比較した結果、HR 菌では B-H278R、VHR 菌では B-H278Y の変異が認められた。このヒスチジン残基は、多くの生物で高度に保存された S3 クラスターの領域に位置している (Broomfield and Hargreaves, 1992)。E. coli の SDH 内のキノン結合部位 (Q-site) の構造解析の研究では、Q-site の一部は保存性の高いこのヒスチジンのごく近隣に位置して、ユビキノンの結合と還元に必要な役割を果たしていることが推察されている (Horsefield et al., 2006)。その報告では、ユビキノンと同様の様式でカルボキシン剤のメチルオキサチン環の酸素原子が結合することが示されている。Broomfield and Hargreaves (1992) は、*Ustilago maydis* の形質転換体を用いてこのヒスチジンがロイシンに置換することでカルボキシン剤に対して耐性となることを示した。同様に、*Mycosphaerella graminicola* でも形質転換体を用いた実験により、ヒスチジンをチロシンに置換させた菌株は耐性となることが報告されている (Skinner et al., 1998)。ボスカリド剤では、2-クロロピリジン環の窒素原子がヒスチジンへの結合に関与していると考えられる (Shima et al., 2011)。B. cinerea や A. alternata などのボスカリド剤耐性菌でもこのヒスチジンの置換が感受性の低下に関与していると報告されている (Avenot et al., 2008 ; Stammler, 2008 ; Stammler et al., 2008 ; Leroux et al., 2010)。これら報告から、C. cassicola の耐性菌、特に HR 菌や VHR 菌で認められた B-H278 の置換がボスカリド剤に対する感受性の大幅な低下に関与している可能性が高いと考えられる。

Shima et al. (2008) は、*Aspergillus oryzae* を用いて S3 クラスター内のヒスチジンがチロシン、ロイシン、アスパラギン酸に置換したカルボキシン剤耐性菌を得たが、置換アミノ酸の種類によって培地上での感受性や菌株の SDH 活性が異なっていたことを報告した。一方、B. cinerea では同じくヒスチジンがチロシンやアルギニンに変異した菌株が認められており、培地上におけるボスカリド剤感受性には違いは認められていないものの、置換アミノ酸の違いによって別の SDHI 剤であるフルトラニル剤やベノダニル剤に対しては感受性が異なっ

いた (Leroux et al., 2010)。また、最近、*Didymella bryoniae* では、同ヒスチジンがアルギニンまたはチロシンに置換している耐性菌が発見され、いずれもボスカリド剤に対しては感受性の低下を示すものの、前者の耐性菌では SDHI 剤であるペンチオピラド剤には感受性の低下が認められなかった (Avenot et al., 2010)。以上のような報告から、このヒスチジンから置換している残基の違いは、SDHI 剤と SDH の結合親和性に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。しかし、本研究の褐斑病菌で得られたようなボスカリド剤に対する感受性と SDH の置換アミノ酸の関係についてさらに解析を進めることは、SDHI 剤に対する耐性機構を明らかにするために今後重要であると考えられる。

HR菌やVHR菌とは異なり、MR菌では*SdhB*にアミノ酸置換を伴う変異は認められなかったが、一部の菌株で C-S73P、D-S89PおよびD-G109Vが認められた。しかし、置換が認められたこれらのアミノ酸は、他の糸状菌で*SdhC*および*SdhD*内でSDHI剤に対する感受性低下に影響するとされている残基とは異なっていた (Matsson and Hederstedt, 2001 ; Ito et al., 2004 ; Shima et al., 2008 ; Avenot et al., 2009 ; Avenot and Michailides, 2010 ; Leroux et al., 2010)。また、D-G109は多くの生物間で保存性が高い残基であるが、C-S73およびD-S89の保存性は高くない。加えて、SDHI剤とSDHの結合に関与する残基とも異なっていた (Horsefield et al., 2006)。ボスカリド剤とSDHとの結合に関する十分な研究はなされていないため、上述したアミノ酸の関与を完全には否定できないが、上述した既報や残基の保存性を考慮すると、MR菌で認められた3つのアミノ酸置換が本剤に対する感受性低下に関与している可能性は低いと考えられた。

さらに、MR菌では、SDHの4つの遺伝子の塩基配列を決定した菌株であるIbCor1218およびIbCor1679において、そのいずれでもアミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。したがって、少なくともこれら2菌株では、感受性低下に関与する要因はSDHの4つの遺伝子以外に存在していると考えられる。*SdhA*はSDHI剤との結合には関与していないため (Horsefield et al., 2006)、*SdhB*、*SdhC*および*SdhD*が野生型であったMR菌8菌株 (Chikusei1-2, Chikusei1-11, Chikusei1-22, Chikusei2-1, Chikusei2-3, Chikusei2-5, Chikusei2-7, Chikusei2-8) についても同様である可能性が考えられる。形質転換体を用いたこれまでの実験では、SDHI剤耐性菌の全てでSDHにアミノ酸置換が認められていたが、SDHに置換が認められないSDHI剤耐性菌は本研究の褐斑病菌のほか、最近、*B. cinerea*でも発見されている (Leroux et al., 2010)。

## 4. 2 キュウリうどんこ病菌のSDHサブユニットB遺伝子の解析

### 4. 2. 1 目的

ボスカリド剤を含むSDHI剤の作用点であるSDHは4つのサブユニット (*SdhA*、*SdhB*、*SdhC* および *SdhD*) から成る。既報では、本系統剤に対する感受性低下に関与する遺伝子変異は、*SdhB*、*SdhC* および *SdhD* に認められている。そのうち、*SdhB* はSDHI剤耐性に関与する変異が最も多く明らかになっている遺伝子であり、さらに高度耐性に関与している事例も認められていた (Keon et al., 1991 ; Broomfield and Hargreaves, 1992 ; Skinner et al., 1998 ; Matsson and Hederstedt, 2001 ; Avenot et al., 2008 ; Shima et al., 2008 ; Stammler et al., 2008)。ここでは、キュウリうどんこ病菌について、SDHサブユニットをコードする遺伝子のうち *SdhB* の塩基配列を決定し、S菌と耐性菌の推定アミノ酸配列の違いについて明らかにする。

### 4. 2. 2 材料および方法

#### 4. 2. 2. 1 供試菌株

*SdhB* のPCR増幅には、S菌であるK-7-2、IbMPx0501、IbMPx0502、IbMPx0503 および IbMPx0609、VHR菌であるIbCPx2-4-1、IbCPx2-4-2、MR菌であるIbCPx4-4-1、1-1S および 1-3S を用いた。各菌株はキュウリ子葉を用いて人工気象器で維持した。

#### 4. 2. 2. 2 DNA抽出

キュウリ子葉上で形成させた分生胞子を滅菌した葉さじでエッペンドルフチューブに回収し、0.1% (v/v) の Tween 20 を含んだ滅菌水中に懸濁した。この懸濁液を十分に攪拌した後、10分間 18,000 × g で遠心分離を行った。上澄み液を除去した後、分生胞子のペレットを風乾した。

DNA 抽出は、一部を改変した Fraaije et al. (1999) の方法を用いて行った。まず、風乾した分生胞子のペレットを抽出バッファー40 $\mu$ l に懸濁した。このバッファーは、19  $\mu$ l の TEN buffer (500mM NaCl, 400mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8.0), 19 $\mu$ l の 2% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム, 1.9 $\mu$ l の 1% (v/v)  $\beta$ -メルカプトエタノール, 0.8mg のポリビニルピロリドン, および 36 $\mu$ g のフェナントロリンから成る。その後、エッペンドルフチューブを氷上に移して、プラスチック製の棒を用いてバッファー中の分生胞子のペレットを粉砕した。この磨砕液を 70°C に 30 分間静置した後、氷冷した 7.5 mM 酢酸ナトリウムを 200 $\mu$ l 添加して混和し、さらに氷上に 30 分間静置した。20 分間、18,000  $\times$  g で遠心した後、上澄み液を氷冷したイソプロパノール 150 $\mu$ l を予め加えた新しいチューブに移した。軽く混和した後、さらに 20 分間氷上に静置した。その後、15 分間、18,000  $\times$  g で遠心分離を行った。上澄み液を除去し、沈殿したペレットを 70% (v/v) エタノールでリンスし、100 $\mu$ l の滅菌水に溶解した。

#### 4. 2. 2. 3 *SdhB* 遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列の解析

PCR プライマーとして、SDHMF-1 および SDHMB-1a (櫻井, 2007) を用い、*SdhB* 遺伝子の部分配列の PCR 増幅およびダイレクトシーケンシングを行った。なお、ここで用いたプライマーセットは、第 4 章第 1 節で述べたとおり、様々な糸状菌の *SdhB* の保存領域を基に設計されたものである。PCR 反応は、1 $\mu$ l の DNA template に、25 $\mu$ l の GoTaq Green Master Mix (Promega), 0.25 $\mu$ M の各プライマー, および 14 $\mu$ l の滅菌水を加えて行った。PCR の反応条件としては、94°C で 2.5 分間プレヒートを行った後、熱変性を 94°C で 30 秒、アニーリングを 46°C で 1 分間、伸長反応を 72°C で 1 分間行った。この熱変性から伸長反応までを 40 サイクル繰り返したのち、最終の伸長反応を 72°C で 10 分間行った。その後、増幅産物を MinElute PCR Purification Kit を用いて精製した。塩基配列の決定は、Greiner Bio-one の DNA シークエンス解析サービスにより行った。DNA 塩基配列および推定アミノ酸配列は DDBJ データベースの BLAST および ClustalW を用いて解析した。

#### 4. 2. 3 結果

10 菌株のうどんこ病菌から抽出した DNA を用いて、PCR プライマーである SDHMF-1 および SDHMB-1a による *SdhB* の増幅を行い、その産物の塩基配列を決定した。その結果、176bp の増幅断片が得られ、推定アミノ酸は *Saccharomyces cerevisiae* の SDH の iron-sulfur protein (80% (identity), accession No. B3LTD3) に高い相同性を示した。また、ボスカリド剤耐性菌の研究がされている *A. alternata* (82%, 同 B2BZ64), *B. cinerea* (87%, 同 Q3ZMH4) および *Aspergillus oryzae* (87%, 同 Q2TWM0) の *SdhB* とも同様に高い相同性を示した。本研究で増幅した断片は、*SdhB* の S2 および S3 センターのそれぞれ、後半および前半の一部を含んでいた (図 12)。他の病原菌では、SDHI 剤に対する感受性低下に関与するアミノ酸として、S2 センター内のプロリン (キュウリ褐斑病菌の *SdhB* では 231 番目に相当) (Stammler et al., 2008) および S3 センターのヒスチジン (同じく 278 番目) (Keon et al., 1991; Broomfield and Hargreaves, 1992; Skinner et al., 1998; Matsson and Hederstedt, 2001; Avenot et al., 2008; Shima et al., 2008) が報告されている。本研究の結果、これらの両アミノ酸は解析した S 菌 5 菌株のいずれにも認められた。MR 菌 3 菌株 (IbCPx4-4-1, 1-1S および 1-3S) の配列も S 菌と同一であったが、VHR 菌 2 菌株 (IbCPx2-4-1 および IbCPx2-4-2) では、プロリンは認められたものの、ヒスチジン (野生型) をコードする塩基配列が CAT から TAT に変異したことに伴い、チロシンへの置換が認められた。

なお、本研究で解析した主な塩基配列は表 18 の通り DNA データベース (DDBJ) に登録した。



	S2	S3
Px (VHR)	C <u>P</u> S YWVNSE <sup>Y</sup> EYLGPVLMQSYRWLADSRDEKTEERKSALDNSMSLYR	<sup>C</sup> Y <u>T</u> IL
Px (MR)	C <u>P</u> S YWVNSE <sup>Y</sup> EYLGPVLMQSYRWLADSRDEKTEERKSALDNSMSLYR	<sup>C</sup> H <u>T</u> IL
Px (S)	C <u>P</u> S YWVNSE <sup>Y</sup> EYLGPVLMQSYRWLADSRDEKTEERKSALDNSMSLYR	<sup>C</sup> H <u>T</u> IL
Cc	C <u>P</u> S YWVNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYR	<sup>C</sup> H <u>T</u> IL
Aa	C <u>P</u> S YWVNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKKAERQDALNNSMSLYR	<sup>C</sup> H <u>T</u> IL
Ao	C <u>P</u> S YWVNSE <sup>Y</sup> EYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKHALDNSMSVYR	<sup>C</sup> H <u>T</u> IL
Mg	C <u>P</u> S YWVNSE <sup>Y</sup> EYLGPVLLQSYRWINDSRDEKTAQRKDALNNSMSLYR	<sup>C</sup> H <u>T</u> IL
Sc	C <u>P</u> S YWVNQEQYLGPVLMQAYRWLIDSRDQATKTRKAMLNNSMSLYR	<sup>C</sup> H <u>T</u> IM
Ec	C <u>P</u> S FWWNPDKFIGPAGLLAAYRFLIDSRDTE <sup>T</sup> SDSRLDGLSDAFSVFR	<sup>C</sup> H <u>S</u> IM

図 12 ポスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリうどんこ病菌 (*Podosphaera xanthii*) および SDHI 剤耐性について研究されている他の微生物の SdhB アミノ酸配列の比較

Px は *P. xanthii*, Aa は *Alternaria alternata* (accession No. B2BZ64), Ao は *Aspergillus oryzae* (Q2TWM0), Cc は *Corynespora cassiicola* (AB548738), Ec は *Escherichia coli* (AAA23896.1), Mg は *Mycosphaerella graminicola* (AAB97419.1), Sc は *Saccharomyces cerevisiae* (B3LTD3) を示す。菌名の右のカッコ内は、VHR がキュウリうどんこ病菌のボスカリド剤超高度耐性菌、MR が中等度耐性菌および S が感受性菌を示す。アミノ酸配列中の太字はキュウリうどんこ病菌の VHR 菌で置換が認められた残基を示す。背景が灰色の残基はカルボキシンとユビキノンの結合に関与する残基を示す (Horsefield et al., 2006)。また、下線は、他の微生物で SDHI 剤耐性に関与するとされている残基を示す。四角で囲った部分は、前半部分は second cysteine-rich クラスタ (S2)、後半が third cysteine-rich クラスタ (S3) の一部である。

表 18 DNA データベース (DDBJ) に登録したウリ類うどんこ菌の塩基配列の Accession Number

Accession Number	遺伝子名	菌株名	ボスカリド剤に対する感受性 <sup>a)</sup>
AB547415	<i>SdhB</i>	IbCPx2-4-1	VHR
AB547416	<i>SdhB</i>	IbCPx4-4-1	MR
AB547417	<i>SdhB</i>	IbMPx0502	S

<sup>a)</sup>S: 感受性, MR: 中等度耐性, VHR: 超高度耐性。

#### 4. 2. 4 考察

キュウリうどんこ病菌の S 菌および耐性菌について、*SdhB* の部分塩基配列について解析を行ったところ、その推定アミノ酸に VHR 菌 2 菌株では S3 センター内のヒスチジンにチロシンへの置換が認められた。この結果は、カルボキシン剤に対して耐性を示す *Ustilago maydis* や *Mycosphaerella graminicola* の人為的突然変異菌株において、以前に報告された結果と一致する (Broomfield and Hargreaves, 1992; Skinner et al., 1998)。また、Skinner et al. (1998) は、このヒスチジンからチロシンへの置換がカルボキシン剤耐性に深く関与していることを形質転換体の作出により明らかにした。同様の置換は、4. 1 で述べた *C. cassiicola* など、ほかの複数の糸状菌の SDHI 剤耐性菌でも報告されている。したがって、*P. xanthii* においてもこの置換がボスカリド剤に対する感受性の低下に関与している可能性が高い。なお、*P. xanthii* におけるヒスチジンからチロシンへの置換は、海外の耐性菌株でも認められている (Anonymous, [http://www.frac.info/frac/work/work\\_sdhi.htm](http://www.frac.info/frac/work/work_sdhi.htm) [5 May 2011])。

一方、MR 菌 3 菌株では *SdhB* の解析した領域内に変異は認められなかった。*SdhB* の S3 クラスタのヒスチジンに置換が認められない SDHI 剤耐性うどんこ病菌の発見は本研究が初めてである。現在までのところ、*SdhB* では、本研究で増幅した領域以外でのアミノ酸置換はいずれの植物病原菌の SDHI 剤耐性菌においても発見されていない。そのため、これらの MR 菌 3 菌株においては、ボスカリド剤に対する感受性の低下につながる要因は、*SdhC* や *SdhD* での変異にある可能性が考えられる。実際に、SDHI 剤に対する感受性の低下が *SdhC* や *SdhD*

内の置換によるものと考えられる報告も複数ある (Matsson and Hederstedt, 2001 ; Ito et al., 2004 ; Avenot et al., 2009 ; Avenot et al., 2010 ; Leroux et al., 2010)。しかし、4. 1 で述べた *C. cassiicola* や Leroux et al. (2010) が報告した *B. cinerea* のように SDH のいずれのサブユニットにも置換が認められなかった菌もあり、うどんこ病菌においても SDH の各遺伝子変異の解析だけでは耐性発現との関係が明らかにならない可能性も考えられる。

## 5 総合考察

本研究では、茨城県内のキュウリ栽培圃場における褐斑病菌およびうどんこ病菌のボスカリド剤耐性菌の発生状況、および耐性菌の分子生物学的特徴の一部として SDH の各遺伝子の塩基配列を明らかにした。結論として、耐性菌は極めて高頻度に分布しており、さらに、それらの耐性菌のうち実用上重要な褐斑病菌の VHR 菌、HR 菌、うどんこ病菌の VHR 菌では SdhB サブユニットの薬剤との結合にとって重要な部位にアミノ酸置換が生じていることを示した。ここでは、本研究により得られた成果と今後の課題について、さらに考察を試みた。

### 5. 1 耐性菌の発生とその対策について

本研究で明らかになった、両病原菌のボスカリド剤に対する耐性菌の発生状況から、両病害では今後 SDHI 剤の使用により継続的に十分な防除効果が得られる可能性は低いと考えられた。そのため、両病害に対して効果的な化学的防除を実施するためには、SDHI 剤の使用は避け、他の系統の薬剤を用いた防除体系を構築すべきである。また、生産者からは、ボスカリド水和剤の使用を中止することで感受性の回復を期待する声もあるが、本剤使用開始から間もなく耐性菌が発生していた結果を考慮すると、仮に回復してもその後の使用で即座に感受性が再び低下することが予想される。したがって、SDHI 剤を実際に使用していくことは将来的にも困難であると考えられる。なお、褐斑病菌においてはその後、千葉県 (牛尾・竹内, 2009) や香川県 (森, 私信), 長野県 (山岸・川上, 2010), 宮城県 (近藤, 2010), 佐賀県 (Ishii et al., 2011) 等でも高頻度で耐性菌が検出されており、すでに全国的に注意すべき状況となっている。

ボスカリド剤の耐性菌の発生がここまで深刻となったのは、本剤が SDH のみを作用点とするという薬剤側のリスク以外にも、褐斑病菌やうどんこ病菌が持つ特性である、耐性菌の発生リスクの高さ (Brent and Hollomon, 2007b) にも大きな原因があると考えられる。また、病害の多発生を恒常的に招いている現在の栽培品種の両病害に対する耐病性の低さ (宮本ら, 2006) も耐性菌の発生リスクをさらに助長させた原因として考えられる。近年、特に褐斑病の深刻さから、本病に対する耐病性を高めた品種の試験的な導入も進んでいるが、キュウリ果実の品質や収量面でやや劣る評価を生産者から受けているため、現行の品種から切り替わるほどには至っていない。

これらに加えて、ボスカリド剤に限ったことではないが、生産者の新規薬剤に対する考え方にもこの耐性菌の発生を深刻化させた原因があると思われた。それは多くの生産者はもちろん、一部指導者が持っている、新規薬剤は対象病害が多発生した場合に使用する特効薬であるという考え方である。ボスカリド水和剤については、表 6 に示したようにすでに褐斑病が多発生し菌密度が上昇している促成栽培の 2 月以降や、抑制栽培の 9 月以降に使用されることが多かった。うどんこ病も、特に抑制栽培では 9 月以降に多発生していることも多く、褐斑病と同様に菌密度が高い条件で曝露していた可能性が高い。生産者の間では、耐性菌対策として輪播散布などは一般的な知識として普及しているが、菌密度と耐性菌発生の関係について知る者は少ない。今回のボスカリド水和剤における深刻な耐性菌問題を機に、このような新規薬剤についての考えを改め、耐性菌発生リスクがある薬剤については徹底して予防的に使用する等、使用方法については十分な注意を払うことが、今後の耐性菌対策には重要である。

生産者は耐性菌の情報について高い関心を持っている。近年、消費者の安全・安心な農産物の安定供給に対する要望の高まりから、化学農薬の使用量の削減が求められており、そのためには一つ一つの薬剤の選択が適切な病害虫防除のために重要となる。そのためには、耐性菌の発生状況を生産者に迅速に伝達するとともに、その対策として、単に当該薬剤の使用に際しての注意を促すのみではなく、代替の薬剤または防除方法も併せて情報提供するための取り組みも必要になる。なお、筆者らは、ボスカリド水和剤等、耐性菌が発生している薬剤の使用に関して注意を促すとともに、褐斑病に対して効果の高い薬剤を選抜し、これらを本病の発生消長

に応じて使用する防除体系を作成した（茨城県, <http://www.pref.ibaraki.jp/nourinsuisan/nosose/cont/img/0119.pdf> [2018年10月現在])。現地でもこれに応じて防除を行った圃場では一定の成果を収めている。今後は、この体系に最新の薬剤情報も取り入れ、常に効率的な防除方法を生産者に情報提供していくことが重要と考えられる。

## 5. 2 耐性菌のSDHの各遺伝子について

SDHI剤に対する耐性菌は様々な病原菌で検出されているが、最近の報告である *B. cinerea* (Leroux et al., 2010) の例を除き、その全てで SdhB, SdhC および SdhD のいずれかで耐性の原因と考えられるアミノ酸置換が認められていた (表 5-1)。また、第 1 章で述べたように他の系統の薬剤についても感受性の低下となる要因は作用点の変異にある場合が多い。そのため、本研究では、SDHI 剤に対する両病原菌の耐性菌について分子生物学的な検討を行うためには、作用点である SDH に焦点を絞ることが妥当であると考え、本遺伝子について解析を行った。

キュウリ褐斑病菌の VHR 菌および HR 菌、うどんこ病菌の VHR 菌では、SdhB の S3 クラスターのヒスチジンに置換が認められた。SDH は TCA 回路および電子伝達系の両方を構成する酵素であり、コハク酸をフマル酸へ酸化させ、ユビキノンをユビキノールへと還元させる反応を担う。その中でも SdhB は SdhC および SdhD とともにユビキノンの結合部位である間隙を構成しており、*E. coli* ではユビキノンは SdhB の H207 (褐斑病菌の H278 に相当)、SdhC の S27 (同 S72) と R31 (同 R76)、および SdhD の D83 (同 D116) のそれぞれの側鎖で安定化されており、同時に SDHI 剤の結合部位でもある (Horsefield et al., 2006)。さらに、このヒスチジンは、ユビキノロンまたは SDHI 剤との結合に特に重要な役割を果たしていると考えられている (Shima et al., 2008 ; Shima et al., 2011)。褐斑病菌およびうどんこ病菌で置換が認められたヒスチジンは、*E. coli* の H207 に相当していた。したがって、このヒスチジンで生ずるアミノ酸の置換は SDHI 剤と SDH の結合に何らかの影響を及ぼすと考えられる。また、本アミノ酸の置換を促す変異で形質転換した菌株ではカルボキシシン剤耐性となること (Broomfield and Hargreaves, 1992 ; Skinner et al., 1998 ; Shima et al., 2008)、他の病原菌の SDHI 剤耐性菌では本アミノ酸の置換が多く認められていること (表 19) から、褐斑病菌およびうどんこ病菌でもこのヒスチジンの置換がボスカリド剤に対する感受性の低下に深く関与していると推察された。今後は、形質転換体を作成し、このアミノ酸置換と耐性との関係について確認を行う必要があるが、将来の遺伝子診断法の開発のためにはこの変異が耐性菌検出用のマーカーの候補として有力であると考えられた。

一方で、褐斑病菌およびうどんこ病菌の MR 菌では、感受性低下に関与すると思われる変異が認められなかった。褐斑病菌の MR 菌の一部では C-S73P や D-S89P, D-G109V が認められた。これら置換についてもボスカリド剤に対する感受性の低下への関与を形質転換体の作出により検討する必要がある。その一方で、SDH のいずれの遺伝子にもアミノ酸置換が存在しない菌株も認められた。これまで、SDHI 剤に対する感受性の低下は標的タンパク質である SDH のアミノ酸置換に原因があるとされていた (Brent and Hollomon, 2007a)。作用点の変異以外にも耐性に関与するメカニズムとしては、作用点の代替となる機構の発現や、作用点の過剰発現、薬剤の排出機構の活性化や取り込みの減少、解毒などが知られている。例えば、DMI 剤では作用点 (ステロール脱メチル化酵素) の変異以外にも、作用点の過剰発現や薬剤の細胞外排出に関わる ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター群の過剰発現が感受性に影響を及ぼしていることが報告されている (Hamamoto et al., 2000 ; Schnabel and Jones, 2001 ; Hayashi et al., 2002 ; Zwiers et al., 2002)。特に、ABC トランスポーター群については多剤耐性にも関与していることから、SDHI 剤耐性にも関与する可能性も考えられる。今後は、DMI 剤などの他の薬剤で明らかになっている機構を参考にしながら、SDHI 剤に対する耐性機構についても解明を進める必要がある。

最近、SDHI 剤間での交叉耐性について数例の報告がなされており、各病原菌の SDH のアミノ酸置換を考慮すると大変興味深い。*Aspergillus oryzae* の人為的突然変異株を用いた研究では、S3 クラスター内のヒスチジンがチロシンやロイシンに置換した菌株はボスカリド剤に対して耐性となるが、アスパラギンに置換した菌株は感受性であった (Shima et al., 2011)。新規の SDHI 剤であり現在開発中であるフルオピラム剤は、キュウリ褐斑病菌の MR 菌に対しての効果は低いが、VHR 菌や HR 菌に対しては S 菌同様の効果を示す (Ishii et al., 2011)。VHR 菌および HR 菌は SdhB の H278 に置換を持つ耐性菌であることから、フルオピラム剤では本残基に生じているチロシンやアルギニンへの置換は実用的な防除効果に対して影響を及ぼさない可能性が考えられる。*A. alternata*

でも、フルオピラム剤の菌糸伸長抑制率は SdhB に H277Y を持つボスカリド剤耐性菌株と野生株でほぼ同等であったことが報告されている (Avenot et al., 2010)。なお、この研究では SdhC や SdhD にアミノ酸置換を持つ菌株でペンチオピラド剤やフルオピラム剤に対する感受性も調査しているが、その結果は置換しているアミノ酸の種類によって異なっていた。また、*D. bryoniae* では、SdhB の S3 クラスター内のヒスチジンがチロシンに置換していたボスカリド剤耐性菌は、ペンチオピラド剤に対しても耐性を示すが、アルギニンに置換していた場合、前者に対しては耐性を示すが、後者には感受性となる (Avenot and Michailides, 2010)。*B. cinerea* でも、ボスカリド剤の他、複数の SDHI 剤で試験が行われており、アミノ酸置換の違いによって SDHI 剤に対する反応が多様化していることが報告されている (Leroux et al., 2010)。これらの報告のように、SDHI 剤は薬剤によって交叉耐性のパターンが異なっている。SDHI 剤は構造的にさらに 7 つのグループに分類されており (Anonymous, [http://www.frac.info/frac/work/work\\_sdhi.htm](http://www.frac.info/frac/work/work_sdhi.htm) [5 May 2011])、それぞれの薬剤で SDH に結合する部位の構造がわずかに異なっている。薬剤の活性は作用部位への結合親和性や細胞内への浸透移行性、作用点への到達速度によって異なる (Yamaguchi and Fujimura, 2005)。SDHI 剤についても、作用部位である SDH のアミノ酸の違いによって各薬剤の結合親和性に差異が生じており、そのことが交叉耐性のパターンを多様化させている可能性が考えられる。

SDHI 剤耐性菌の研究は各種病原菌で行われており、新規剤の登場によりその研究はさらに発展すると思われる。現状では、茨城県内のキュウリ栽培圃場では褐斑病およびうどんこ病の防除において、SDHI 剤を実用的に使用することは困難である。しかし、今後、感受性の低下につながる様々なアミノ酸置換を明らかにし、さらに本系統剤の作用機構もしくは耐性機構を解明することは、将来の耐性菌対策に用いられるユニークな SDHI 剤の発見にも寄与できると考えられる。

表19 既報のSDHI剤耐性菌において認められているコハク酸脱水素酵素サブユニットのアミノ酸置換

サブユニット	アミノ酸置換	菌名	引用文献
SdhB	H278Y, R	<i>Corynespora cassiicola</i>	石井ら, 2008; 本研究
	H→Y	<i>Podosphaera xanthii</i>	Anonymous <sup>a)</sup> ; 本研究
	H252L	<i>Ustilago maydis</i>	Keon et al., 1991
	H267Y	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Skinner et al., 1998
	H239L	<i>Peurotus ostreatus</i>	Honda et al., 2000
	H228N	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Matsson and Hederstedt, 2001
	H229L	<i>Xanthomonas campestris</i>	Li et al., 2006
	H277Y, R	<i>Alternaria alternata</i>	Avenot et al., 2008
	P225L, T, F; H272Y, R, L	<i>Botrytis cinerea</i>	Stammler et al., 2007; Leroux et al., 2010
	H249Y, L, N	<i>Aspergillus oryzae</i>	Shima et al., 2009
H→Y, R	<i>Didymella bryoniae</i>	Avenot et al., 2010	
SdhC	S73P	<i>Corynespora cassiicola</i>	本研究
	N80K	<i>Coprius cinereus</i>	Ito et al., 2004
	H234R	<i>Alternaria alternata</i>	Avenot et al., 2009
	T90I	<i>Aspergillus oryzae</i>	Shima et al., 2009
SdhD	S89P, G109V	<i>Corynespora cassiicola</i>	本研究
	D89G	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Matsson et al., 1998
	D123E, D133R	<i>Alternaria alternata</i>	Avenot et al., 2009
	D132R	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Glaettli et al., 2009
	D124E	<i>Aspergillus oryzae</i>	Shima et al., 2009

<sup>a)</sup> [http://www.frac.info/frac/work/work\\_sdhi.htm](http://www.frac.info/frac/work/work_sdhi.htm) (5 May 2011)

## 摘要

キュウリ栽培圃場において問題となる褐斑病およびうどんこ病の防除は、主に化学的防除に頼っている。しかし、両病原菌では各種薬剤に対する耐性菌が発生し、両病害の防除を困難にしている。このような中、新規のコハク酸脱水素酵素阻害剤（SDHI 剤）であるボスカリド水和剤がキュウリで農薬登録された。さらに近年、同系統薬剤であるペンチオピラド水和剤が登録された。SDHI 剤はコハク酸脱水素酵素（SDH）の阻害を単一の作用機作とするため、両病原菌の SDHI 剤に対する感受性の変動には注意を払う必要があると考えられた。実際、褐斑病ではボスカリド水和剤の使用開始後間もなく、生産者から防除効果が低下しているとの声が聞こえた。また、近年は薬剤耐性菌の検出に、その簡便さや迅速さから薬剤標的タンパク質をコードする領域の塩基変異を利用した遺伝子診断法が用いられる場合がある。しかし、褐斑病菌およびうどんこ病菌では、感受性菌および耐性菌における SDH 遺伝子は解析されていない。そこで本研究では、茨城県内の現地キュウリ栽培圃場における褐斑病菌およびうどんこ病菌の本剤に対する耐性菌発生状況を調査するとともに、耐性菌の分子生物学的特徴を把握するために、SDH 遺伝子のシーケンス解析を行った。

ボスカリド剤に対する感受性を検討するため、褐斑病菌では YBA 寒天培地を用いた菌糸伸長阻止試験を行った。その結果、本病原菌の本剤に対する感受性ベースラインは、最小生育阻止濃度（MIC 値）および 50% 生育阻止濃度（EC<sub>50</sub> 値）がそれぞれ 0.5~7.5µg/ml, 0.04~0.59µg/ml であった。ボスカリド水和剤の使用履歴がある茨城県内のキュウリ栽培 28 圃場から採集した 907 菌株の感受性を検討した結果、MIC 値が 30µg/ml 以上である本剤耐性菌が 26 圃場で計 427 菌株検出された。さらに、そのうち 14 圃場では検出率が 50% 以上であった。さらに、本研究では、この耐性菌を EC<sub>50</sub> 値の違いから中等度耐性（MR）菌（EC<sub>50</sub> 値：1.1~6.3µg/ml）、高度耐性（HR）菌（8.9~10.7µg/ml）、超高度耐性（VHR）菌（24.8µg/ml 以上）に分類した。さらに、植物体上におけるこれら耐性菌に対する本剤の発病抑制効果を検討するために、ポット植えのキュウリ苗を用いた接種試験を行った。その結果、本剤の S 菌に対する発病抑制率が 100% であったのに対し、MR 菌、HR 菌および VHR 菌に対しては、それぞれ平均で 69%、44%、0% であった。

うどんこ病菌については、茨城県内においてボスカリド剤の使用履歴がある 13 圃場より罹病葉を採集し、74 菌株についてリーフディスク検定法により感受性を検討した。その結果、感受性菌に対する本剤の MIC 値が 5µg/ml であったのに対し、50µg/ml 以上となった耐性菌が 11 圃場で計 34 菌検出された。さらに、本剤 500µg/ml において発病度が大きく抑制される MR 菌とほとんど抑制されない VHR 菌に耐性菌を分類した。また、キュウリ苗を用いた接種試験を行った結果、S 菌に対する発病抑制率が 100% であったのに対し、MR 菌および VHR 菌に対しては、それぞれ平均で 34%、2% であった。

さらに、両病原菌のボスカリド剤耐性菌と感受性菌の SDH 遺伝子を解析し、推定アミノ酸配列の比較を行った。褐斑病菌では SDH サブユニット A, B, C および D をコードする遺伝子（それぞれ *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD*）、うどんこ病菌では *SdhB* の塩基配列を解析した。その結果、褐斑病菌の耐性菌では、*SdhB* の 3rd cysteine-rich クラスター内のヒスチジンにチロシン（B-H278Y）またはアルギニン（B-H278R）への置換が認められた。これらの置換は過去に SDHI 剤耐性菌で検出された置換と一致していた。B-H278Y は全 VHR 菌、B-H278R は全 HR 菌で認められた。一方、残る耐性菌である MR 菌では、一部の菌株で *SdhC* および *SdhD* に置換が認められたが、この置換部位は SDHI 剤で予想されている SDH 結合部位とは異なっていた。さらに MR 菌では SDH のいずれのサブユニットにもアミノ酸置換が認められない菌株も認められた。また、うどんこ病菌でも VHR 菌では *SdhB* の 3rd cysteine-rich クラスター内のヒスチジンに変異が認められたものの、MR 菌では認められなかった。

以上の結果から、キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌では、ボスカリド剤の上市からわずかの期間で本剤耐性菌が本県では高頻度に分布していることが明らかとなった。さらに、褐斑病菌については HR 菌と VHR 菌、うどんこ病菌については VHR 菌において SDH の置換が耐性に深く関与している可能性が明らかとなった。

## 謝辞

本論文のとりまとめにあたり格別のご指導と綿密なご校閲を賜った筑波大学大学院生命環境科学研究科 柿 眞教授（現：名誉教授）に深甚な感謝の意を表す。ならびに、本論文作成に当たり、審査員として多くのご助言をいただきました、本田 洋教授（現：東京農業大学 教授）、山岡裕一教授、松本 宏教授、松倉千昭准教授（現：教授）に深甚な感謝の意を表す。また、本論文のとりまとめや学術誌への投稿論文についての綿密なご校閲、本研究の遂行にあたり多大なご指導および菌株分譲等のご協力を賜った農業環境技術研究所 石井 英夫博士（現：吉備国際大学 教授）に深甚な感謝の意を表す。

さらに、元茨城県園芸研究所所長 小川吉雄博士（現：鯉沼学園農業栄養専門学校 教授）、元生物工学研究所所長 佐久間 文雄博士には格別なご高配をいただきました。また、本研究の遂行にあたり多大なご指導を賜った茨城県病害虫防除所 富田恭範博士（現：日本植物防疫協会 茨城研究所所長）、園芸研究所 小河原 孝司氏に感謝の意を表す。日頃の研究に多大なご指導を賜った元農業総合センター 長塚 久氏、農業研究所 渡邊 健博士、園芸研究所 鹿島哲郎氏（現：病害虫防除所）、金子賢一氏（現：県央農林事務所経営・普及部門）、金田真人氏（現：鹿行農林事務所経営・普及部門）、県西農林事務所経営・普及部門 草野尚雄氏（現：農業総合センター）に感謝の意を表す。

ボスカリド剤の御提供をいただくとともに多大なご指導をいただいた、BASF ジャパン株式会社の日野 勲氏、瀬古 隆氏、実験に関する各種情報やデータの提供をいただいた BASF SE の Gerd Stammler 氏および Anderea Koch 氏、元農業環境技術研究所の James Fountaine 氏に感謝の意を表す。また、菌株の提供をいただいた元千葉県農林総合研究センターの竹内妙子博士、牛尾進吾氏、元岡山県農業総合センターの谷名光治氏、香川県農業試験場の森 充隆氏、佐賀県農業試験研究センターの稲田 稔氏（現：農業技術防除センター 病害虫防除部長）、本研究の遂行において多大なご協力をいただいた水野 学氏、現地調査にご協力いただいた坂東地域農業改良普及センターの神原幸雄氏（現：農業政策課）、鹿行農林事務所経営・普及部門の皆藤昌彦氏（現：鹿行農林事務所 行方地域農業改良普及センター）、その他諸氏に感謝の意を表す。

## 引用文献

- Avenot HF and Michailides TJ (2007) Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease* 91:1345-1350.
- Avenot HF, Sellam A, Karaoglanidis G, Michailides TJ (2008) Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. *Phytopathology* 98:736-742.
- Avenot HF, Sellam A, Michailides TJ (2009) Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. *Plant Pathology* 58:1134-1143.
- Avenot HF and Michailides TJ (2010) Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29:643-651.
- Avenot HF, Thomas A, Gitaitis RD, Langston DB, Stevenson KL (2010) Molecular characterization of resistance to boscalid and penthiopyrad in *Didymella bryoniae* isolates collected from Georgia watermelon fields. *Phytopathology* 100 (suppl 1): S9 (Abstr).
- Brent KJ and Hollomon DW (2007a) Fungicide resistance in crop pathogen: How can it be managed? 2<sup>nd</sup> edition. Brussels, Belgium: CropLife International: FRAC Monograph 1.
- Brent KJ and Hollomon DW (2007b) Fungicide resistance: The assessment of risk. 2<sup>nd</sup> edition. Brussels, Belgium: CropLife International: FRAC Monograph 2.
- Broomfield PLE and Hargreaves JA (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current Genetics* 22:117-121.

- 千葉恒夫・富田恭範 (1993) 有機物施用, ブルームレス台木利用キュウリ栽培におけるうどんこ病の発生. 関東東山病害虫研究会報 40 : 41-42.
- 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 (2004) 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ビンに対するキュウリ褐斑病菌の感受性. 日本植物病理学会報 70 : 10-13.
- Fraaije BA, Lovell DJ, Rohel EA, Hollomon DW (1999) Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. *Journal of Applied Microbiology* 86:701-708.
- Foster B and Staub T (1996) Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection* 15:529-537.
- Glaetli A, Stammler G, Schlehuber S (2009) Mutations in the target proteins of succinate-dehydrogenase inhibitors (SDHI) and 14 $\alpha$ -demethylase inhibitors (DMI) conferring changes in the sensitivity – structural insights from molecular modeling. In: 9th International Conference on Plant Diseases, Tours, France 670-681.
- Hägerhäll C (1997) Succinate: quinone oxidoreductases variations on a conserved theme. *Biochimica et Biophysica Acta* 1320:107-141.
- Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, Lee Y, Makizumi Y, Akutsu K, Hibi T (2000) Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3421-3426.
- 挾間渉・森田鈴美・加藤徳弘 (1993) ブルームレス台木接ぎ木キュウリにおける褐斑病抵抗性の低下. 日本植物病理学会報 59 : 243-248.
- 挾間渉・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. 九州病害虫研究会報 42 : 26-30.
- Hayashi K, Schoonbeek H, de Waard MA (2002) Expression of the ABC transporter *BcatrD* from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73:110-121.
- Honda Y, Matsuyama T, Irie T, Watanabe T, Kuwahara M (2000) Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics* 37:209-212.
- Horsefield R, Yankovskaya V, Sexton G, Whittingham W, Shiomi K, Omura S, Byrne B, Cecchini G, Iwata S (2006) Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (Succinate-ubiquinone oxidoreductase). *The Journal of Biological Chemistry* 281:7309-7316.
- 細川浩靖・山中誉・原本雅昇・佐野慎亮・横田因・濱村洋 (2006) シフルフェナミド (パンチョ) 耐性キュウリうどんこ病菌の発生とその諸性質. 日本植物病理学会報 72 : 260-261 (講要) .
- 飯島勉 (1976) 東京都におけるオキシカルボキシ耐性キク白さび病菌の発生. 東京都農業試験場研究報告 10 : 31-41.
- Ishii H, Fraaije BA, Sugiyama T, Noguchi K, Nishimura K, Takeda T, Amano T, Hollomon DW (2001) Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91:1166-1171.
- 石井英夫・杉山知子・西村久美子 (2002) キュウリ病害におけるストロビルリン系薬剤耐性菌の分布状況の推移. 日本植物病理学会報 68 : 74 (講要) .
- Ishii H, Yano K, Date H, Furuta A, Sagehashi Y, Yamaguchi T, Sugiyama T, Nishimura K, Hasama W (2007) Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. *Phytopathology* 97, 1458-1466.
- 石井英夫・西村久美子 (2007) ストロビルリン系薬剤耐性菌のボスカリド感受性. 日本農薬学会第 32 回大会講演要旨集 64.
- 石井英夫・Fountaine James・宮本拓也・西村久美子・富田恭範 (2008) ボスカリド耐性キュウリ褐斑病菌にみられるコハク酸脱水素酵素遺伝子の変異. 日本植物病理学会報 74 : 38-39 (講要).
- 石井英夫・宮本拓也・西村久美子・稲田稔 (2009) キュウリ褐斑病菌及びうどんこ病菌のミトコンドリア電子伝達系阻害剤耐性菌の検出方法. 日本農薬学会第 34 回大会講演要旨集 124.

- Ishii H, Miyamoto T, Ushio S, Kakishima M (2011) Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*. *Pest Management Science* 67, 474-482.
- Ito Y, Muraguchi H, Seshime Y, Oita S, Yanagi SO (2004) Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a mutation in the cytochrome *b<sub>560</sub>* subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II). *Molecular Genetics and Genomics* 272:328-335.
- Justum AR, Heaney SP, Perrin BM, Wege PJ (1998) Pesticide resistance: Assessment of risk and implementation of effective management strategies. *Pesticide Science* 54:435-446.
- Keon JPR, White GA, Hargreaves JA (1991) Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Current Genetics* 19:475-481.
- 近藤誠 (2010) 数種薬剤に耐性を持つキュウリ褐斑病菌に対する各種薬剤の防除効果. 北日本病害虫研究会報 61 : 76-79.
- Leroux P and Berthier G (1988) Resistance to carboxin and fenfuram in *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr., the causal agent of barley loose smut. *Crop Protection* 7, 16-19.
- Leroux P, Gredt M, Leroch M, Walker AS (2010) Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6615-6630.
- Li J, Zhou M, Li H, Chen C, Wang J, Zhang Y (2006) A study on the molecular mechanism of resistance to amicarbazol in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Pest Management Science* 62:440-445.
- Lu Y, Ma J, Sutton TB, Ypema H (2004) Comparison of two assay methods for evaluating the sensitivity of *Alternaria mali* to boscalid. *Phytopathology* 94:S64 (Abstr).
- Ma Z and Michailides TJ (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24:853-863.
- Matheron ME and Porchas M (2004) Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Disease* 88:665-668.
- Matsson M, Ackrell BAC, Cochran B, Hederstedt L (1998) Carboxin resistance in *Paracoccus denitrificans* conferred by a mutation in the membrane-anchor domain of succinate:quinone reductase (complex II). *Archives of Microbiology* 170:27-37.
- Matsson M and Hederstedt L (2001) The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate:quinone reductase identified by mutations. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33:99-105.
- McGrath MT (2008) Fungicide sensitivity in *Podosphaera xanthii* and efficacy for cucurbit powdery mildew in NY, USA, in 2003-2006. *Journal of Plant Pathology* 90 (Suppl 2): 90 (Abstr).
- McGrath MT and Miazzi MM (2008) Sensitivity of *Podosphaera xanthii* to registered fungicides at-risk for resistance related to their efficacy for powdery mildew in pumpkin. *Phytopathology* 98:S102 (Abstr).
- Miazzi M and McGrath MT (2008) Sensitivity of *Podosphaera xanthii* to registered fungicides and experimentals in GA and NY, USA, in 2007. *Journal of Plant Pathology* 90 (Suppl 2): 90 (Abstr).
- 宮本拓也・富田恭範・鹿島哲郎・米山一海・野上真希・諏訪順子 (2006) キュウリ褐斑病の品種間における発生差異とチオファネートメチル, プロシミドン, ジエトフェンカルブに対する感受性. 日本植物病理学会報 72 : 236-237 (講要) .
- 宮本拓也・富田恭範・神原幸雄・皆藤昌彦 (2007) キュウリ褐斑病の発病と農業用資材および罹病残渣に存在する分生子との関係. 関東東山病害虫研究会報 54 : 9-12.
- Miyamoto T, Ishii H, Seko T, Kobori S, Tomita Y (2009) Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology* 58:1144-1151.
- Miyamoto T, Ishii H, Stammler G, Koch A, Ogawara T, Tomita Y, Fountaine JM, Ushio S, Seko T, Kobori S (2010a) Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. *Plant Pathology* 59:873-881.
- Miyamoto T, Ishii H, Tomita Y (2010b) Occurrence of boscalid resistance in cucumber powdery mildew in Japan and



- molecular characterization of the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase of the causal fungus. *Journal of General Plant Pathology* 76:261-267.
- 宮本拓也・富田恭範・小河原孝司 (2010) 茨城県における QoI 剤耐性キュウリ褐斑病菌の発生状況. *茨城県病害虫研究会会報* 49 : 74-77.
- Myresiotis CK, Bardas GA, Karaoglanidis GS (2008) Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease* 92:1427-1431.
- Ohtsuka N, Sou K, Amano T, Ojima M, Nakazawa Y, Yamada Y (1988) Decreased sensitivity of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) to ergosterol biosynthesis inhibitors. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 54:629-632.
- Ragsdale NN and Sisler HD (1970) Metabolic effects related to fungitoxicity of carboxin. *Phytopathology* 60:1422-1427.
- Russell PE (2004) Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. Brussels, Belgium: Crop Life International: FRAC Monograph 3.
- Saitoh K, Togashi K, Arie T, Teraoka T (2006) A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology* 72:348-350.
- 櫻井誠也 (2007) ペンチオピラドの作用機作と耐性菌対策. 日本植物病理学会第 17 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 30-39.
- Schepers HTAM (1984) Persistence of resistance to fungicides in *Sphaerotheca fuliginea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 90:165-171.
- Schnabel G and Jones AL (2001) The 14 $\alpha$ -demethylase (*CYP51A*) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* 91:102-110.
- Shima Y, Ito Y, Kaneko S, Hatabayashi H, Watanabe Y, Adachi Y, Yabe K (2008) Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 46:67-76.
- Shima Y, Ito Y, Hatabayashi H, Koma A, Yabe K (2011) Five carboxin-resistant mutants exhibited various responses to carboxin and related fungicides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75:181-184.
- Skinner W, Bailey A, Renwick A, Keon J, Gurr S, Hargreaves J (1998) A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 34:393-398.
- Spiegel J and Stammler G (2006) Baseline sensitivity of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* to pyraclostrobin and boscalid. *Journal of Plant Disease and Protection* 113:199-206.
- Stammler G and Speakman J (2006) Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. *Journal of Phytopathology* 154: 508-510.
- Stammler G, Benzinger G, Speakman J (2007) A rapid and reliable method for monitoring the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to boscalid. *Journal of Phytopathology* 155:746-748.
- Stammler G (2008) Mode of action, biological performance and latest monitoring results of boscalid sensitivity. 日本植物病理学会第 18 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 30-43.
- Stammler G, Brix HD, Nave B, Gold R, Schoefl U (2008) Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. In: *Proceedings of the 15th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany*, 45-51.
- Staub T (1991) Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology* 29:421-442.
- 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. *関東東山病害虫研究会報* 53 : 55-60.
- Uchida K, Takamatsu S, Matsuda K, So K, Sato Y (2009) Morphological and molecular characterization of *Oidium* subgenus *Reticuloidium* (powdery mildew) newly occurred on cucumber in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75:92-100.
- 牛尾進吾・竹内妙子 (2009) 千葉県におけるキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤に対する感受性. 千葉県農林総合

研究センター研究報告 1 : 47-50.

Wise KA, Bradley CA, Pasche JS, Gudmestad NC, Dugan FM, Chen W (2008) Baseline sensitivity of *Ascochyta rabiei* to azoxystrobin, pyraclostrobin, and boscalid. *Plant Disease* 92:295-300.

山岸菜穂・川上暢喜 (2010) 長野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. 関東東山病害虫研究会報 57 : 107-109.

Yamaguchi I and Fujimura M (2005) Recent topics on action mechanisms of fungicides. *Journal of Pesticide Science* 30:67-74.

Zhang CQ, Yuan SK, Sun HY, Qi ZQ, Zhou MG, Zhu GN (2007) Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. *Plant Pathology* 56:646-653.

Zwiars LH, Stergiopoulos I, Van Nistelrooy JGM, De Waard MA (2002) ABC transporters and azole susceptibility on laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:3900-3906.

## **Studies on *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii* Isolates Resistant to Succinate Dehydrogenase Inhibitors on Cucumber**

**Takuya MIYAMOTO**

### **Summary**

Control of corynespora leaf spot (*Corynespora cassiicola*) and powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) in commercial cucumber greenhouse have heavily relied on the use of chemical fungicide treatment. Recently, development of resistance against various fungicides in both fungi makes it difficult to control those diseases. Meanwhile, boscalid which belongs to the succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) group has been registered commercially in Japan for the control of some diseases of cucumber. Recently, penthiopyrad which belongs to SDHI fungicide has also been registered for some diseases containing powdery mildew on cucumber. SDHI fungicide is a site-specific inhibitor and is considered to be at risk for resistance development in pathogen population. Unfortunately, soon after application for corynespora leaf spot, cucumber growers reported reduced efficacy of boscalid in greenhouse. In recent studies, molecular diagnostic method using the gene mutation of a region which encodes target protein has been reported to be useful for monitoring sensitivity of some fungicides quickly and easy. However, nucleotide sequences in SDH genes of *C. cassiicola* and *P. xanthii* had not been analyzed. The objectives of the current study were to monitor boscalid sensitivity of both fungi isolates collected from cucumber greenhouses in Ibaraki Prefecture, Japan, and sequence putative succinate dehydrogenase (SDH) genes and determine if mutations in these genes are responsible for boscalid resistance.

*C. cassiicola* collected from cucumber in Japan, were tested for their sensitivity to boscalid by using a mycelial growth inhibition method on YBA agar medium. Minimum inhibitory concentration (MIC) and 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) values for 220 isolates from five crops without a prior history of boscalid use ranged from 0.5 to 7.5 µg/ml and from 0.04 to 0.59 µg/ml, respectively. Four hundred and twenty seven out of 907 isolates collected from 28 cucumber greenhouses in Ibaraki Prefecture, which received boscalid spray applications showed boscalid resistance with MIC values higher than 30 µg/ml and detection frequencies of the resistant isolates exceeded 50 % in 14 greenhouses. Moreover, resistant isolates were divided into three groups: a moderately resistant (MR) group with EC<sub>50</sub> values ranging from 1.1 to 6.3 µg/ml, highly resistant (HR) group with EC<sub>50</sub> from 8.9 to 10.7 µg/ml and a very highly resistant (VHR) group with EC<sub>50</sub> higher than 24.8 µg/ml. To evaluate the efficacy of boscalid, inoculation tests using potted cucumber plants were done using sensitive and three resistant groups. Sensitive isolates were almost completely controlled by boscalid, as well as mancozeb which was used as a reference fungicide. In contrast, low efficacy of boscalid was recorded against resistant isolates. Boscalid still

slightly inhibited the number of lesions on leaves inoculated with MR and HR isolates, but completely lost its efficacy against VHR isolates.

A total of 74 mass isolates of *P. xanthii* collected from commercial greenhouses with a prior history of boscalid use, were tested for their sensitivity to boscalid by utilizing leaf disk method. The mildew development from five reference sensitive isolates on disks was completely suppressed at 5 µg/ml. MIC values of boscalid for 34 out of 74 isolates were 50 µg/ml or higher than this value. Moreover, resistant isolates were divided into moderately resistant (MR) and two very highly resistant (VHR) group. MR isolates grew slightly at 500 µg/ml, but VHR isolates showed vigorous growth at 500 µg/ml. In foliar inoculation tests using potted cucumber plants, low efficacy of boscalid (500 µg/ml) was recorded against both MR and VHR isolates. In foliar spray tests using boscalid, sensitive isolate was controlled completely, however, low efficacy of the fungicide was recorded against resistant isolates. In particular, this fungicide drastically lost its efficacy against VHR isolates

Furthermore, to elucidate the deduced amino acid substitution responsible for the resistance to boscalid, molecular characterization of genes encoding SDH subunits (*SdhA*, *SdhB*, *SdhC* and *SdhD*) in *C. cassiicola* and the partial fragments of *SdhB* gene in *P. xanthii* was carried out. All VHR isolates of *C. cassiicola* had a mutation in the *SdhB* gene leading to the substitution of histidine with tyrosine at amino acid position 278 (B-H278Y). At the same position, the substitution to arginine conferred by a mutation (B-H278R) was detected in all HR isolates. The same substitution was previously reported in SDHI resistant isolates of other fungus pathogen. However, there was no common mutation in SDH genes of all MR isolates and some isolates possessed no mutations in the genes examined. In *P. xanthii*, VHR isolates possessed a substitution from a highly conserved histidine to tyrosine in third cystein-rich center of putative SdhB. No such substitutions were found in SdhB so far analyzed in MR isolates.

According to the above results, it was suggested that soon after boscalid was introduced to the market, resistance against boscalid in both pathogens was developed and widely distributed within Ibaraki Prefecture, Japan. Additionally, it was inferred that the development of resistance was caused by amino acid substitution in SDH of HR and VHR isolates of *C. cassiicola*, and VHR isolates of *P. xanthii*.

**Keyword: Cucumber, *Corynespora cassiicola*, *Podospaera xanthii*, succinate dehydrogenase inhibitor, fungicide resistance,**

# ニホングリ ‘ぼろたん’ のペースト加工適性に関する研究

佐野健人<sup>1)</sup>

(茨城県農業総合センター園芸研究所)

## Study on Processing Suitability for Fruit Paste Made from Japanese Chestnut Cultivar 'Porotan'.

Taketo SANO<sup>1</sup>

### 要約

渋皮易剥皮性を有するニホングリ ‘ぼろたん’ のペーストへの加工適性を評価するとともに、ペーストの色とポリフェノール量との関係について検討した。

‘ぼろたん’ は、‘丹沢’ に比べて、ペースト加工歩留まりは同等～やや高いが、加熱による剥皮を行うと時間がかかり、ペースト加工の作業時間は長くかかる。作業効率を考えると、加熱による剥皮は行わず、従来の品種と同様に、蒸煮後果肉取り出しの方法でペースト加工することが望ましい。

ペーストの品質については、色は‘ぼろたん’の方が‘丹沢’に比べて黄色く明るい。これは、ペーストのポリフェノール量が‘ぼろたん’の方が‘丹沢’よりも少ないためと考えられる。色以外の品質は‘丹沢’とほぼ同様であった。このことから、明るい色のペーストが求められる場合は、‘丹沢’より‘ぼろたん’が向いていると考えられた。

キーワード：ニホングリ，‘ぼろたん’，ペースト，加工，品質

### 1 はじめに

2007年に品種登録されたニホングリ ‘ぼろたん’ は、加熱することで渋皮（種皮）が簡単に剥皮できるという特性を有する。そのため、‘ぼろたん’ は従来の品種では多くの労力を要する剥皮作業を容易にし、クリの消費拡大に寄与すると注目されている。

筆者は、これまで ‘ぼろたん’ について、剥皮と貯蔵に関する研究結果を報告してきた。‘ぼろたん’ は剥皮した果肉の表面が露わになるために、部分的な変色や障害が目立ちやすいこと（佐野ら，2015）、また、‘ぼろたん’ は甘露煮に加工する場合に、従来の品種に比べて割れが生じやすいことを明らかにした（佐野ら，2016）。

クリでは、変色や障害が見られる果肉を切除した残りの健全部分の果肉や、加工中に割れた果肉は、ペーストとして再利用されることが一般的である。‘ぼろたん’ では、変色や障害が目立ちやすく、加工中の割れも生じやすいことから、従来品種よりもペーストへの利用が多くなることが想定される。そこで、従来のニホングリ品種で収穫時期も近い早生の ‘丹沢’ を対照として、‘ぼろたん’ のペーストの加工歩留まりや作業性等の加工適性の評価を行った。

また、ペーストの色に影響する成分として、ポリフェノールに着目し、その量がペーストの色に与える影響について検討したので報告する。

---

1) 現 県央農林事務所企画調整部門

1 Address : Ibaraki Prefecture Central Agriculture And Forestry Management Office,  
1-3-1 Sakumati, Mito, Ibaraki 310-0802, Japan

## 2 材料および方法

### 2. 1 ペーストへの加工適性（試験1）

#### 2. 1. 1 ペースト加工の歩留まりと作業時間

試験は2011～2013年の3か年行い、各品種・年度とも茨城県産の果実4～6 kgを用いた。加工工程の概略を図1-1に、果実の収穫・加工日・貯蔵等の日程を表1-1に示した。



図1-1 品種ごとのペースト加工工程の組み合わせ

表1-1 ペースト加工試験日程

年	品種	貯蔵期間 <sup>z</sup>	収穫日	一時保管		凍結	加工	開封
				温度	期間			
2011	'ぼろたん'	0.5 か月	9/20 頃	2℃	～9/28	10/14	10/19	11/8
	'丹沢'	0 か月	9/9	2℃	～9/13	9/13	10/18	11/8
2012	'ぼろたん'	0 か月	9/22, 24	0℃	～9/24	10/2	12/5	2/20
		1 か月	9/22, 24	0℃	～9/24	11/1	12/5	—
	'丹沢'	0 か月	9/7～18	0℃	～9/19	9/19	12/7	2/20
		1 か月	9/7～18	0℃	～9/19	10/24	12/7	—
2013	'ぼろたん'	0 か月	9/23	0℃	～9/25	9/26	11/20	1/16
		1 か月	9/23	-1℃	～9/23	10/25	11/19,20	1/9, 16
	'丹沢'	0 か月	9/17	-1℃	～9/19	9/19	11/19	1/16
		1 か月	9/17	-1℃	～9/19	10/18	11/19	1/16

<sup>z</sup> 'ぼろたん'は凍結前日に皮への傷入れを行い、凍結当日に剥皮・凍結した。一時保管末日から凍結日（'丹沢'の場合）または凍結の前日（同'ぼろたん'）まで、2011・2012年は0℃、2013年は-1℃で貯蔵した。

貯蔵0か月区では、'ぼろたん'は収穫後の果実を速やかに剥皮して果肉を凍結保存し、'丹沢'は収穫後の果実を剥皮せずに丸ごと凍結保存した。

貯蔵0.5か月区および1か月区では、収穫後の果実をLDPE（低密度ポリエチレン）袋でハンカチ折包装し、0℃または-1℃で貯蔵後、'ぼろたん'は剥皮して果肉のみを、'丹沢'は果実を丸ごと凍結保存した。

なお、'ぼろたん'はブランチング剥皮後に剥皮果肉の品質をABCDの4等級に選別し、A果肉、B果肉とC果肉の健全部のみを凍結保存した。Aは変色等の無い健全果肉、Bは変色があるが可食な果肉、Cは変色や腐敗部を除去すれば可食な果肉、Dは変色や腐敗が広範囲に発生したか、剥皮できなかった果肉とした（図1-2）。

'ぼろたん'の2011年では、A果肉、B果肉およびC果肉の障害部を除いた健全部を混合して利用し、D果肉は廃棄した。2012年では、A果肉とB果肉を分けてペースト加工し、C果肉とD果肉は廃棄した。2013年では、A果肉、B果肉およびC果肉の健全部を分けてペースト加工し、D果肉は廃棄した。

凍結保存した'ぼろたん'の果肉または'丹沢'の果実は、凍結したまま圧力鍋で加圧後15分間蒸した。'丹沢'は、各年・貯蔵期間とも、果実を半分に切り、異臭や変色の見られた果実はすべて廃棄し、残った健全な果実のみスプーンで果肉を抉り出した。'ぼろたん'の蒸し上がった果肉または'丹沢'の取り出した果肉に、その重量の1/4の上白糖を加え、2mmメッシュで裏ごしし、容器へ真空包装後にスチームで1時間殺菌し、流水冷却後に凍結保存した。ペースト加工の詳細は、鹿島（2000）の方法に従った。各加工工程で重量を測定し、加工歩留まりを算出した。

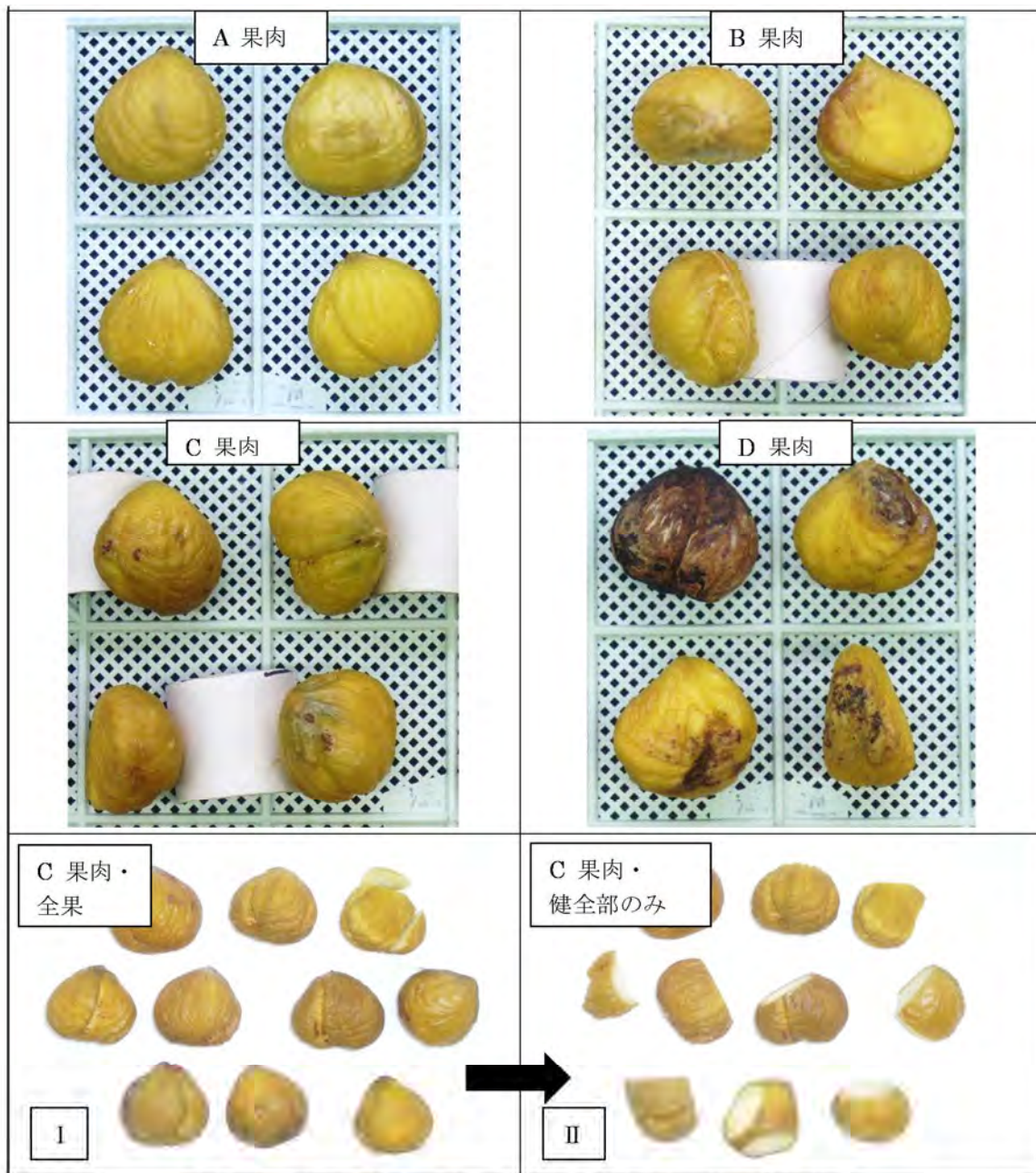


図 1-2 ‘ぽろたん’ ペースト加工原料果肉の等級分け基準

- A 果肉：変色等の無い健全果肉，B 果肉：変色があるが可食な果肉  
 C 果肉：変色や腐敗部を除去すれば可食な果肉，D 果肉：変色や腐敗部が広範囲に発生し廃棄する果肉  
 C 果肉は変色や腐敗部を除去してペースト加工原料とした（最下段・左右の I および II）

## 2. 1. 2 ペーストの品質等

凍結保存したペーストを包装したまま流水にさらして解凍後，開封して糖度，色，食味等を調査した。糖度はペン糖度・濃度計 PEN-J（㈱アタゴ）をペースト現物に接触させて測定した。色については，ペースト 50 g を透明ポリ袋（厚さ 0.08 mm ・幅 8.5 cm ・高さ 12 cm）に入れて均一に伸ばし，袋ごと色を測色計 CM-700d（コニカミノルタ㈱）を用い，光源 D65，正反射光処理 SCE，測定径  $\phi$  8 mm の条件で測定した。ペーストの 10 か所を測定して得られた  $L^*a^*b^*$  値を平均後に  $L^*C^*h$  値に変換した。変換は，式  $C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$ ， $h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$  で行った。また，試料を厚さ 15  $\mu$ m のアルミシート上に載せた状態で zoom 値 7，focus 値 52 に設定したビジュアルアナライザ IRIS VA300（アルファ・モス・ジャパ

ン株)により外観を撮影した。

また、各年とも貯蔵0か月の‘丹沢’のペーストを基準として、その他のペーストを食味評価した。評価項目は、食感(粉質・粘質)、香り(良い・悪い)、総合評価(良い・悪い)とし、基準を0として±3の7段階評価とした。パネリストは当所職員で構成し、毎回20名程度で、それぞれの評点を平均した。

さらに、2013年は、A果肉とB果肉、C果肉の健全部を分けて加工したペーストの測色および官能評価を行った。官能評価はシェッフエの一対比較法(中屋の変法)で行った(佐藤, 1985)。すなわち、3種のペーストから2種を選ぶ3通りの組み合わせについて、一方を基準として他方を評価し、最終的には3種すべてのペーストの順位と差の程度を求める方法である。12名のパネリストに3通りの組み合わせについて、それぞれ一方を基準とした $0\pm3$ の7段階で評価を行った。

## 2. 2 色調とポリフェノール量との関係解明(試験2)

### 2. 2. 1 果肉の変色程度とポリフェノール量の関係

試験には、2010年9月26日に熊本県で収穫された‘ぼろたん’果実を用いた。収穫後 $10^{\circ}\text{C}$ 以下に予冷し、9月29日からLDPE袋によるハンカチ折包装で貯蔵した。10月12日まではすべて $-1^{\circ}\text{C}$ で貯蔵し、同日に小分けして以後は $-1^{\circ}\text{C}$ または $+2^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。10月14日(貯蔵0.5か月)、12月15日(貯蔵2か月)および2011年2月24日(貯蔵4か月)に調査を行った。

既報(佐野ら, 2015)により、電子レンジまたはブランチング剥皮した果肉を、左右・上下・裏表方向に8分割してそれぞれの片側を80%エタノール中でホモジナイズし、懸濁液を遠心分離した上澄みを検液とした。没食子酸を標準としたフォーリンデニス法によりポリフェノール量を求めた。各処理10果ずつ剥皮し、剥皮果肉から任意に選んだ3~6果を定量した(図2-1)。











貯蔵期間	貯蔵温度	ブランチング剥皮	電子レンジ剥皮
0ヶ月 (0.5ヶ月)	未貯蔵		
2ヶ月	-1℃		
	+2℃		
4ヶ月	-1℃		
	+2℃		

図 2-1 ポリフェノール定量に供試した果肉の変色状態  
<sup>z</sup> 上段：軽度変色，下段：重度変色

各果肉を表・裏両面より撮影した写真データをもとに、各果肉の変色割合を求めた。すなわち、得られた写真（図 2-1）を基に AlphaSoft for Iris Ver12.46（アルファ・モス・ジャパン(株)）により、HSV フィルターで果肉の全画素数と、非変色部分の画素数を求め、両者の比より変色割合を算出した（図 2-2）。

		
①元の写真（果肉と背景）	②果肉のみ (S20-255in に設定)	③果肉の非変色部分のみ

図 2-2 画像処理による果肉変色割合の推定

測定には AlphaSoft for Iris の HSV フィルターを用いた。H（色相）、S（彩度）、V（明度）をそれぞれ 0-255 で設定し、任意の範囲のみ選択させることで、設定範囲内の画素数を求める。②、③の画素数から以下により変色割合を求めた。なお、③の H の下限値は写真に合わせ 16~22 の範囲で調整した。

$$[\text{変色割合}] = [\text{変色部分画素数}③] \div [\text{果肉全画素数}②] \times 100$$



## 2. 2. 2 ペーストの色調とポリフェノール量との関係

### (1) 原料果実の貯蔵がポリフェノール量に及ぼす影響

クリは、秋に収穫されて、年末まで貯蔵しつつ順次加工される。このことから、原料果実の貯蔵によるペーストの色調とポリフェノール量との関係を調査した。

試験1で、2013年に作製した‘ぼろたん’と‘丹沢’の、原料果実貯蔵0か月と1か月のペーストについて調査を行った(表1-1)。原料果実の取り扱いおよびペーストへの加工は試験1と共通である。加工したペーストを包装前に小分けし、1日間冷蔵庫で保存した。冷蔵保存したペースト5gを80%エタノールで20倍に懸濁・希釈した上澄みのポリフェノール量をフォーリンデニス法により求めた。

### (2) 原料果実の品質がポリフェノール量に及ぼす影響

試験1の2013年の‘ぼろたん’貯蔵1か月原料果実で、剥皮果肉の等級(A~C)ごとに加工したペーストのポリフェノール量を求めた。ペーストの加工方法等は試験1に、ポリフェノールの定量方法は2.2.1と共通である。

### (3) 加工工程がポリフェノール量に及ぼす影響

ペーストに加工する際の果肉の取り出し方を変え、果肉の取り出し方がペーストの色や官能評価に及ぼす影響を調査した。果肉は3通りの方法で取り出した。すなわち、全果を蒸した後に半分に切って果肉を抉り出す方法(以下「全果ペースト」、図2-3の処理①③)、生の状態で鬼皮(果皮)・渋皮(種皮)を果肉表面ごと削り取り果肉を得る方法(以下「削りペースト」、図2-3の処理②④)、ブランチング剥皮により果肉を得る方法(以下「ブランチングペースト」、図2-3の処理⑤)である。全果ペーストは、凍結果実を圧力鍋で蒸した後に果肉を取り出してペーストに加工したが、削りペーストとブランチングペーストは果肉を得た後に凍結して圧力鍋で蒸してからペーストに加工した。なお、処理①②には‘丹沢’を、処理③~⑤には‘ぼろたん’を供試した。

各処理により図2-3記載の日程でペーストに加工し、11月14日に開封して色の調査を行った。また、20名のパネリストにより、処理⑤を基準に処理③の官能評価を行った。さらに、各ペースト5gを80%エタノールで20倍(全容量100mL)に懸濁・希釈した上澄みを冷蔵保存し、11月19日にフォーリンデニス法でポリフェノール量の定量を行った。

‘丹沢’	① <sup>Y</sup>	収穫 9月8日	→	→	凍結 9月11日	蒸煮	切断	選別	抉り出し	加工 <sup>Z</sup> 9月30日
	②	収穫 9月8日	削り取り剥皮	選別	凍結 9月11日	蒸煮	→	→	→	加工 <sup>Z</sup> 10月7日
‘ぼろたん’	③	収穫 9月17日	→	→	凍結 9月19日	蒸煮	切断	選別	抉り出し	加工 <sup>Z</sup> 9月29日
	④	収穫 9月17日	削り取り剥皮	選別	凍結 9月19日	蒸煮	→	→	→	加工 <sup>Z</sup> 10月7日
	⑤ <sup>Y</sup>	収穫 9月17日	ブランチング剥皮	選別	凍結 9月19日	蒸煮	→	→	→	加工 <sup>Z</sup> 9月30日

図2-3 果肉の取り出し方の違いとペースト加工工程の組み合わせ

(上段：工程，下段：実施日，いずれも2014年)

<sup>Z</sup> 加工：図1-1の加糖～殺菌までの工程

<sup>Y</sup> 図1-1の‘ぼろたん’は処理⑤に、‘丹沢’は処理①に相当する

## 3 結果

### 3. 1 ペーストへの加工適性(試験1)

#### 3. 1. 1 ペースト加工の歩留まりと作業時間

‘丹沢’における貯蔵期間と加工歩留まりとの関係をみると、貯蔵0か月では加工歩留まりが60~68%

であったのに対し、貯蔵1か月では54~60%とやや低下した(表1-2)。「ぼろたん」のA果肉のみについてみると、貯蔵0か月では加工歩留まりが67~68%であったのに対し、貯蔵1か月では38~44%と大幅に低下した。

「ぼろたん」でも、A果肉に加え、B果肉およびC果肉の健全部も合わせてペーストに加工した「全利用」の場合、加工歩留まりはA果肉のみの場合より高くなり、特に貯蔵1か月ではA果肉のみの38~44%に対して66%と高くなった。このように、全利用することにより「ぼろたん」のペースト加工歩留まりは「丹沢」並み~高くなった。

表1-2 ペーストの貯蔵期間と年度ごとの加工歩留まり(%)

貯蔵期間	年度	‘丹沢’	‘ぼろたん’	
			全利用 <sup>z</sup>	A果肉のみ
0か月	2011	61	—	—
	2012	68	67	67
	2013	60	82	68
0.5か月	2011	—	65	—
	2012	60	66	38
1か月	2012	60	66	38
	2013	54	66	44

<sup>z</sup> 全利用:A, B, C(健全部のみ)の果肉を合わせてペースト加工した

また、工程ごとに歩留まりを評価すると(図1-3)、「ぼろたん」の「剥皮」工程時の歩留まりは、「丹沢」の「取出」工程時より高く、両品種が果肉だけになった「果肉」時点でも、「ぼろたん」の歩留まりが「丹沢」より高かった。ペースト製品での歩留まりも同様で、特に貯蔵0か月の「ぼろたん」の歩留まりが高かった。

作業時間は、「ぼろたん」の「剥皮」と「選別」工程が合計で90分となり、「丹沢」の「選別」と「取出」工程の35分より長かった。「ぼろたん」の合計作業時間は310分で、「丹沢」の245分を上回った。なお、「ぼろたん」の「剥皮」と「選別」、「丹沢」の「選別」と「取出」は並行して作業を行ったため、作業時間を分けずに合算した。

‘ぼろたん’ <sup>x</sup>	歩留まり <sup>y</sup>		作業時間 <sup>z</sup>	‘丹沢’	歩留まり <sup>y</sup>		作業時間 <sup>z</sup>
	0か月	1か月			0か月	1か月	
果実	100	100		果実	100	100	
↓(剥皮)	↓(76)	↓(76)	90	↓(蒸煮)	↓(100)	↓(98)	90
↓(選別)	↓(87)	↓(81)		↓(選別 <sup>w</sup> )	↓(84)	↓(78)	35
果肉	66	62		↓(取出)	↓(61)	↓(61)	
↓(蒸煮)	↓(110)	↓(104)	90	果肉	51	47	
↓(加工 <sup>v</sup> )	↓(115)	↓(109)	130	↓(加工 <sup>v</sup> )	↓(117)	↓(116)	120
製品	82	66	310	製品	60	54	245

図1-3 ペースト加工の工程ごとの歩留まりと作業時間(2013年)

<sup>z</sup> 0か月と1か月の果実約4kgを2名で加工したときの平均作業時間(分)

<sup>y</sup> 括弧無し数値は貯蔵前果実の重量を100とした相対値。括弧付き数値はその工程前後での重量比

<sup>x</sup> 剥皮果肉を等級(A~C 健全部)に分け加工し、それぞれの重量・時間を合算した

<sup>w</sup> 切斷工程を含めた

<sup>v</sup> 加糖・裏ごし・充填・包装・殺菌の各工程を総称し「加工」とした

‘ぼろたん’ <sup>x</sup>	歩留まり <sup>y</sup>		作業時間 <sup>z</sup>	‘丹沢’	歩留まり <sup>y</sup>		作業時間 <sup>z</sup>
	0か月	1か月			0か月	1か月	
果実	100	100		果実	100	100	
↓(剥皮)	↓(76)	↓(76)	90	↓(蒸煮)	↓(100)	↓(98)	90
↓(選別)	↓(87)	↓(81)		↓(選別 <sup>w</sup> )	↓(84)	↓(78)	35
果肉	66	62		↓(取出)	↓(61)	↓(61)	
↓(蒸煮)	↓(110)	↓(104)	90	果肉	51	47	
↓(加工 <sup>v</sup> )	↓(115)	↓(109)	130	↓(加工 <sup>v</sup> )	↓(117)	↓(116)	120
製品	82	66	310	製品	60	54	245

図 1-3 ペースト加工の工程ごとの歩留まりと作業時間 (2013 年)

<sup>z</sup> 0か月と1か月の果実約4kgを2名で加工したときの平均作業時間(分)

<sup>y</sup> 括弧無し数値は貯蔵前果実の重量を100とした相対値。括弧付き数値はその工程前後での重量比

<sup>x</sup> 剥皮果肉を等級(A-C 健全部)に分け加工し、それぞれの重量・時間を合算した

<sup>w</sup> 切断工程を含めた

<sup>v</sup> 加糖・裏ごし・充填・包装・殺菌の各工程を総称し「加工」とした

### 3. 1. 2 ペーストの品質等

ペーストの糖度(Brix%)は42.8~51.5%であったが、年次による差が大きく、また、品種による一定の傾向は認められなかった(図1-4)。

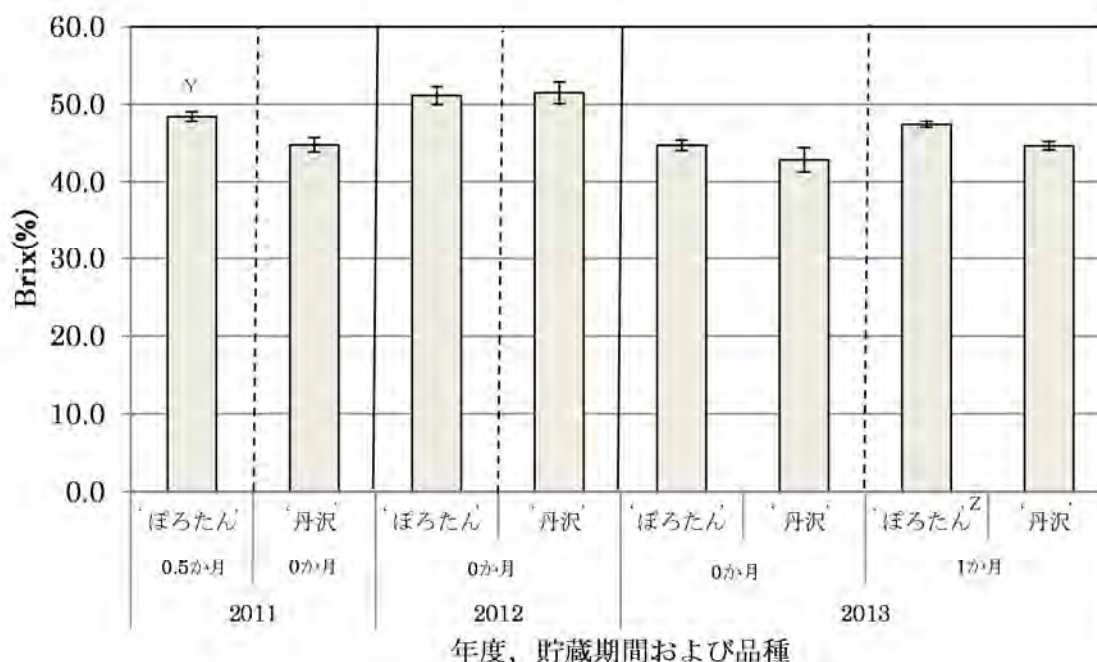


図 1-4 ペースト糖度の品種間、年次間差

<sup>z</sup> A 果肉のみを原料とした

<sup>y</sup> エラーバーは標準誤差

ペーストの色は、‘ぼろたん’が‘丹沢’よりL\*（明度）とC\*（彩度）の値が高く、h（色相角度）が90°に近く（表1-3）, ‘ぼろたん’のペーストの方が明るく、鮮やかな黄色い色調となった（図1-5）。また、‘ぼろたん’、‘丹沢’とも、貯蔵によってL\*、C\*およびhの値が低くなり、貯蔵前より暗く、くすみ、赤みを帯びた色に変化した（表1-3、図1-5）。

官能評価では、貯蔵前より貯蔵後のペーストが粘質になる傾向が認められた（表1-3）。香りに明瞭な傾向は認められなかった。総合評価は、貯蔵後のペーストで優れる傾向がみられたが、品種による差はみられなかった。

表 1-3 ペーストの色および官能評価結果の品種間、年次間差

年度	2011		2012		2013		備考			
	貯蔵期間	0.5か月	0か月	0か月	0か月	1か月				
品種	‘ぼろたん’	‘丹沢’	‘ぼろたん’	‘丹沢’	‘ぼろたん’	‘丹沢’				
色 <sup>Z</sup>	L*	45.1	41.6	53.1	50.4	55.5	52.2	48.6	43.4	明度。0~100
	C*	27.5	21.8	30.9	29.0	28.3	21.4	25.0	17.3	彩度。0~60
	h(°)	83.9	81.4	84.4	80.6	81.6	78.3	81.6	78.7	色相角度
官能評価 <sup>Y</sup>	食感	+1.18	(0)	-0.85	(0)	-0.10	(0)	+1.62	+1.95	(-)粉質,(+)粘質
	香り	+0.24	(0)	-0.45	(0)	+0.14	(0)	+0.50	+0.45	(-)悪い,(+)良い
	総合	+0.47	(0)	±0	(0)	+0.29	(0)	+1.00	+1.19	(-)悪い,(+)良い

<sup>Z</sup> 各10反復のL\*a\*b\*平均値をL\*C\*h値に変換。hは0~90~180~270°がそれぞれ赤~黄~緑~青

<sup>Y</sup> パネリスト数は各年17, 20, 21名。基準を(0)とし、±3の7段階評価

<sup>X</sup> A果肉のみを原料とした

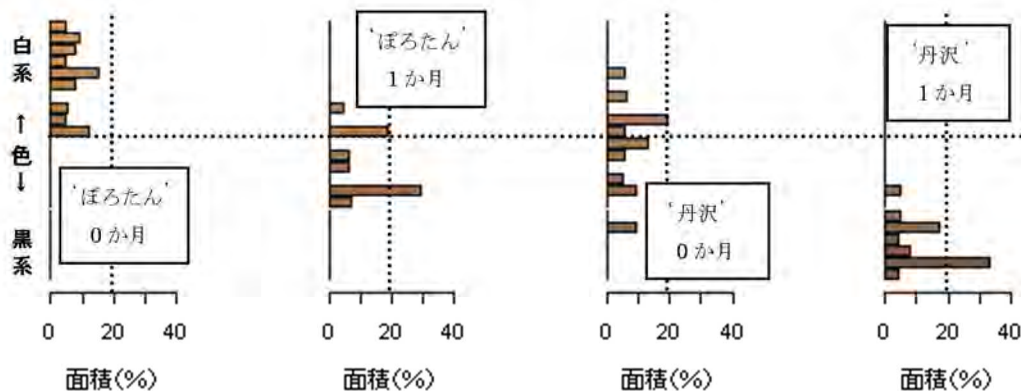


図 1-5 原料品種および貯蔵期間によるペーストの色分布の差異  
色の分類および定量化はビジュアルアナライザ IRIS VA300 による。  
面積率 3%以上の色のみ抽出した。  
また、縦軸は明度 (L\*) の高い順に上から下へ色を配置した

また、‘ぼろたん’の原料果肉の等級別にペーストの品質をみると、B 果肉のペーストの糖度が他より3%程度高かった（表1-4）。C 果肉（健全部のみを使用）のペーストの色は、他より明るく鮮やかな傾向にあった（表1-4、図1-6）。しかし、官能評価では、見た目、食感（粘・粉質）、総合評価とも、有意な差はみられなかった（表1-5）。

表 1-4 ‘ぼろたん’における原料果肉の違いによる加工後のペースト品質の差

原料果肉	A 果肉	B 果肉	C 果肉 <sup>Y</sup>
糖度(%) <sup>Z</sup>	44.9b	47.4c	44.1a
L*	48.4	48.5	49.7
色 C*	25.2	25.4	25.4
h	80.3	80.7	82.9

<sup>Z</sup> いずれも危険率 5%水準で有意差有り

<sup>Y</sup> C 果肉は障害部を切除した健全部のみを加工した

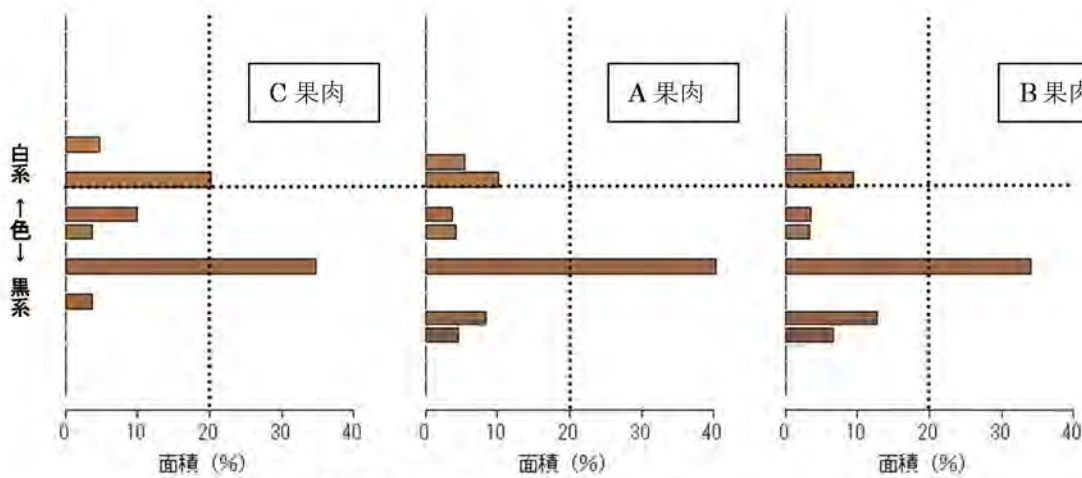


図 1-6 原料果肉の等級の違いによる‘ぼろたん’ペーストの色分布

※ 作図は図 1-5 に準じた

表 1-5 ‘ぼろたん’における原料果肉の違いによるペーストの官能評価結果

項目	比較組み合わせ <sup>Z</sup>			備考
	A-B	B-C	A-C	
見た目	+0.27	-0.45	+0.18	(+)良い⇔(-)悪い
粘・粉質	±0	±0	+0.09	(+)粘質⇔(-)粉質
総合評価	±0	+0.25	+0.17	(+)良い⇔(-)悪い

<sup>Z</sup> 組み合わせの○-△で○が優れると+。12名で0±3の7段階評価  
シェッフェの対比較法(中屋の変法)で、いずれも有意差無し

### 3. 2 色調とポリフェノール量との関係説明 (試験 2)

#### 3. 2. 1 果肉の変色程度とポリフェノール量の関係

‘ぼろたん’剥皮果肉のポリフェノール量は、貯蔵 0.5 か月ではいずれの剥皮方法でも 6,000 mg/100 g 程度であり差はなかった (図 2-4)。貯蔵 2 か月には、2℃貯蔵が-1℃貯蔵より、また、レンジ剥皮がブランディング剥皮よりポリフェノール量が多い傾向がみられたが、変色割合とポリフェノール量との間には関連性はみられなかった (図 2-4)。貯蔵 4 か月では、ポリフェノール量は、貯蔵 2 か月よりやや低下し、剥皮方法による差はみられなくなった (図 2-4)。ポリフェノール量と変色割合との間に関連性はみられなかった。

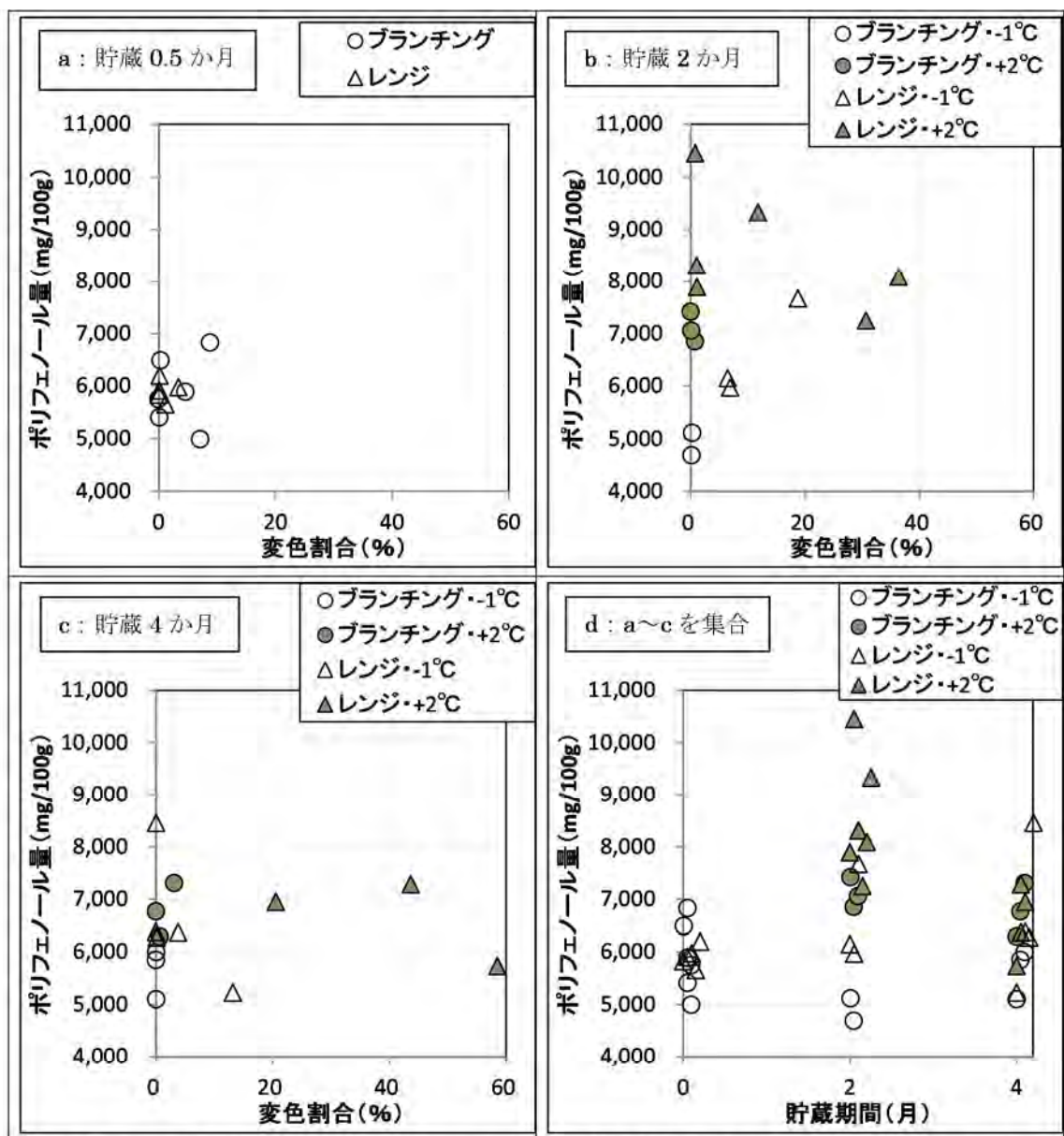


図 2-4 ‘ぼろたん’の貯蔵期間、剥皮果肉の変色割合とポリフェノール量との関係  
 a~c 図はそれぞれ貯蔵 0.5 か月、2 か月、4 か月の果実を供試した。d 図は a~c 図のデータをまとめてプロットしたが、0.5 か月は 0 か月と表し、また、点の重なりを抑えるために横方向にわずかにばらつかせて配置した。

### 3. 2. 2 ペーストの色調とポリフェノール量との関係

#### (1) 原料果実の貯蔵がポリフェノール量に及ぼす影響

‘丹沢’のペーストに比べ‘ぼろたん’の色調は明るかった(図 1-5)。「ぼろたん」と「丹沢」の両品種とも、原料果実の貯蔵によって色調が暗く変化する傾向が認められた(図 1-5)。色調が明るいペースト(貯蔵 0 か月)ほどポリフェノール量が少ない傾向を示し、原料果実の貯蔵により、両品種ともペースト中のポリフェノール量は増加した(図 2-5)。ポリフェノールの量は、原料果実の貯蔵の有無によらず、「丹沢」に比べて「ぼろたん」の方が少なかった(図 2-5)。

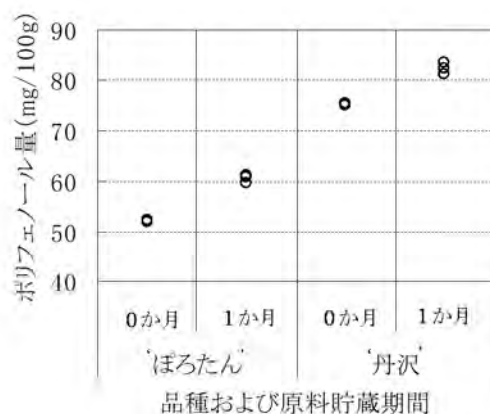


図 2-5 原料果実の品種および貯蔵期間とペーストのポリフェノール量との関係 (2013 年)

### (2) 原料果実の品質がポリフェノール量に及ぼす影響

C 果肉で作った‘ぼろたん’ペーストの色調は他に比べて明るく (図 1-6), ポリフェノール量が少ない傾向がみられた (図 2-6)。A 果肉および B 果肉で作ったペースト間では, 色調 (図 1-6) およびポリフェノール量 (図 2-6) との間に差はみられなかった。

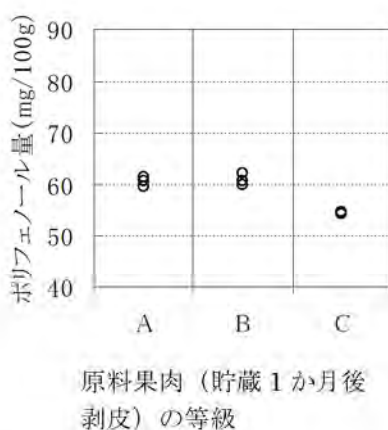


図 2-6 ‘ぼろたん’におけるポリフェノール量と原料等級との関係  
※ 等級 (A-C) は本文参照

### (3) 加工工程がポリフェノール量に及ぼす影響

全果ペーストでは, ‘ぼろたん’は‘丹沢’よりやや色が明るかった。ポリフェノール量は, 丹沢’の 70.2 mg/100 g に対し, ‘ぼろたん’では 60.8 mg/100 g とやや少なかった (図 2-7, ③と①)。

削りペーストでは品種間で色に明瞭な差はみられず, ポリフェノール量は‘丹沢’の 34.9 mg/100g に対し, ‘ぼろたん’では 23.2 mg/100 g とやや少なかった (図 2-7, ②と④)。

両品種とも, 全果ペーストよりも削りペーストの方が色は明るく, ポリフェノール量は少なくなった (図 2-7, ③と④, ①と②)。「ぼろたん」でのブランチングペーストは, 色の明るさ, ポリフェノール量ともに, 全果ペーストと削りペーストの間であった。




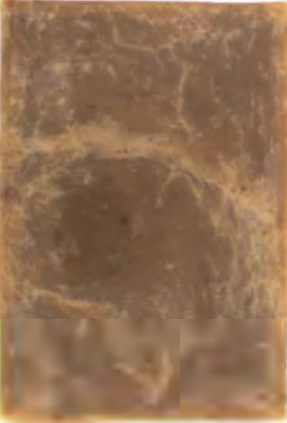

工程	全果を蒸し、 果肉を抉り出し加工 (全果ペースト)	皮と果肉表面を削り取り 果肉のみを蒸して加工 (削りペースト)	ブランチングで剥皮して 果肉のみを蒸して加工 (ブランチングペースト)
ぼろたん	 ③ <sup>Z</sup> 60.8mg/100g	 ④ 23.2mg/100g	 ⑤ 51.0mg/100g
丹沢	 ① 70.2mg/100g	 ② 34.9mg/100g	

図 2-7 品種および果肉の取り出し方の違いによるペースト外観とポリフェノール量

<sup>Z</sup> 丸数字①～⑤は、図 2-3 に同じ

また、丸数字の後の数値はペースト 100g あたりの没色子酸換算ポリフェノール量

## 4 考察

### 4. 1 ペーストへの加工適性 (試験 1)

#### 4. 1. 1 ペースト加工の歩留まりと作業時間

‘筑波’を甘露煮用に剥皮した場合の剥皮歩留まり 55～57% (佐野ら, 2016) に比べ, ‘丹沢’のペースト加工「取出」工程の歩留まりは 61% (図 1-3) とやや高かった。

一方, ‘ぼろたん’では, 剥皮の際に果肉表面を切除しないため, 「剥皮」工程の歩留まりは 76% と ‘丹沢’の「取出」工程よりさらに高い (図 1-3)。「ぼろたん」の剥皮が容易という特性が, 剥皮歩留まりの高さとして表れている。

また, 剥皮した ‘ぼろたん’の果肉は, 表面が露わになり障害部 (変色や腐敗) が目立ちやすく, 障害の無い A 果肉のみのペースト加工歩留まりは ‘丹沢’より低くなるが, 重度な障害部を除いた「全利用」を行うことで, ‘丹沢’並み～やや高いペースト加工歩留まりに改善することができる (表 1-2)。

作業時間は ‘丹沢’の 245 分に比べて ‘ぼろたん’は 310 分であり, ‘ぼろたん’のペースト加工時間が 65 分間長く, ‘丹沢’との作業時間比は 127%であった (図 1-3)。これは, ‘ぼろたん’の「剥皮」と「選



別」工程が、‘丹沢’の「選別」「取出」工程より55分間長くかかったことが主な原因であった。

従来のニホングリ品種でも、ペースト加工の「取出」作業は短時間で行えるため、かえって「傷入れ」、「加熱（ブランチング）」、「皮むき」と複数の工程が必要となる‘ぼろたん’の「剥皮」工程の方が長時間となった。すなわち、‘ぼろたん’の易剥皮性は、ペースト加工の作業時間の点では利点とならず、‘ぼろたん’のペースト加工では、加工歩留まりが‘丹沢’並み～やや高いものの、作業時間が‘丹沢’より長く、作業効率の面では‘ぼろたん’が‘丹沢’より優れるとは言い難い。

#### 4. 1. 2 ペーストの品質等

原料を貯蔵することにより、ペーストの色は暗くなった（表 1-3, 図 1-5）。石井ら（2008）、原田（1960）は、貯蔵果実を加工すると変色が起きることを報告しており、ペーストの色調の変化も同様の機構によるものと考えられる。

また、クリは貯蔵によりデンプンが糖化することが知られており（永井ら、1992；新堀・日坂、1986）、原料貯蔵によるペーストの食感が粘質に変化したこともデンプンの糖化によるものと考えられる。

ゆでグリや焼き栗では、原料果実を貯蔵して糖化させることで甘くなり食味が向上する。ペーストでも糖度（Brix）の上昇（図 1-4）と総合評価の向上（表 1-3）が見られたが、ペーストは加工中に全体の20%量の砂糖を加えており、この量に比べると貯蔵による糖化の影響は小さいものと考えられる。‘ぼろたん’のA果肉、B果肉、C果肉の健全部のそれぞれから加工したペーストは、糖度には差があった（表 1-4）が、食感（粉質か粘質か）には差がなく、総合評価にも差がなかったことから（表 1-5）、原料果実を貯蔵することによるペーストの食味の向上は食感の変化によるものと推測される。

‘ぼろたん’と‘丹沢’の品種による品質の差は、色の違いがもっとも顕著であった。ペーストの色調は‘丹沢’よりも‘ぼろたん’の方が黄色く明るい（図 1-5）。また、‘ぼろたん’のA果肉、B果肉、C果肉の健全部のそれぞれから加工したペーストでは、C果肉のペーストが最も明るい色であった（図 1-6）。

#### 4. 2 色調とポリフェノール量との関係解明（試験2）

‘ぼろたん’剥皮果肉の変色程度（重度、軽度）とポリフェノール量との間に関連性は認められなかった（図 2-1, 図 2-4）。変色程度の異なる剥皮果肉（図 1-2, A果肉、B果肉）から作ったペーストの色調（図 1-6）に差はなく、ポリフェノール量にも差はなかった（図 2-6）。一方、変色や腐敗部を除去したC果肉（図 1-2）からのペーストでは、色調が明るく（図 1-6）、ポリフェノール量が少なかった（図 2-6）。また、ペースト加工時の果肉の取り出し方を変えた場合、色調の明るいペーストほどポリフェノール量が少なかった（図 2-7）。

真部（2001）は、クリ甘露煮の褐変はポリフェノールの関与が大きいと推定している。また、既報（佐野ら、2015）で述べたように、‘ぼろたん’剥皮果肉は、剥皮後の時間の経過とともに変色する。これらのことから、剥皮状態では一部しか変色していないポリフェノールが、ペーストに加工する工程で変色しているものと考えられる。

甘露煮の比較では、‘筑波’より‘ぼろたん’の色調が濃く暗い傾向にあった（佐野ら、2016）が、ペーストの比較では‘丹沢’よりも‘ぼろたん’の色調が明るく、ポリフェノールが少ない傾向がみられた（図 1-5 および図 2-7）。真部（2001）は、ポリフェノールは果肉の最外部に多く中心部で少ないことを述べており、甘露煮の色調の差は、果肉の外側を切除した‘筑波’と、切除していない‘ぼろたん’の差を反映したものと考えられる。ペーストを同じ加工方法で比較した場合、‘ぼろたん’のポリフェノール量は‘丹沢’より少なく、そのため、色がより明るく黄色いものと考えられる。

今回の‘ぼろたん’のペースト加工工程（加熱により皮を剥いてペースト加工する）より、従来品種の加工工程（皮付きの果実を蒸煮後切って果肉を取り出す）の方が作業時間は短い。そのため、‘ぼろたん’でも従来の品種と同じ方法でペースト加工することが望ましく、この点では‘ぼろたん’のペーストへの加工適性は従来のニホングリ品種と同等と考えられる。

また、‘ぼろたん’ペーストの食味は他品種との差がなく、‘ぼろたん’ペーストの特長は、色がより明るいことである。クリを用いた加工品では「クリらしい色」にするために茶色く着色することも行われるため、ペーストの色が明るいことが必ずしも利点になるとは限らないが、菓子材料のペーストには様々なラ

インアップがあり、明るい色のものも販売されていることから、菓子業者等から明るい色のペーストを求められる場合には‘ぼろたん’を原料とすることが適当であると考えられる。

### まとめ

渋皮易剥皮性を有するニホングリ‘ぼろたん’のペーストへの加工適性を評価するとともに、ペーストの色とポリフェノール量との関係について検討した。

‘ぼろたん’は、‘丹沢’に比べて、ペースト加工歩留まりは同等～やや高いが、加熱による剥皮を行うと時間がかかり、ペースト加工の作業時間は長くかかる。作業効率を考えると、加熱による剥皮は行わず、従来の品種と同様に、蒸煮後果肉取り出しの方法でペースト加工することが望ましい。

ペーストの品質については、色は‘ぼろたん’の方が‘丹沢’に比べて黄色く明るい。これは、ペーストのポリフェノール量が‘ぼろたん’の方が‘丹沢’よりも少ないためと考えられる。色以外の品質は‘丹沢’とほぼ同様であった。このことから、明るい色のペーストが求められる場合は、‘丹沢’より‘ぼろたん’が向いていると考えられた。

### 引用文献

- 原田 昇 (1960) 栗果の貯蔵に関する研究 (I) 貯蔵期間を異にする栗果の缶詰加工時に於ける変色について, 大阪学芸大紀要. 8 : 150-153.
- 石井貴・藤田醸司・鹿島恭子・小田喜保彦. 2008. クリの低温貯蔵に関する研究. 茨城農総セ園研研報. 16 : 1-11
- 鹿島恭子. 2000. おいしい栗ペーストと栗菓子の製品化. 茨城県工業技術センター研究報告. 29 : 91-92.
- 真部孝明. 2001. クリ果実 その性質と利用. pp. 66-68 および pp. 90-91 農文協. 東京.
- 永井耕介・堀本宗清・澤正樹・吉川年彦. 1992. クリの低温貯蔵における糖含量の変化. 兵庫中央農技研報 (農業). 40 : 29-34
- 新堀二千男・日坂弘行. 1986. クリ果実のプラスチックフィルム包装貯蔵に関する研究. 千葉農試研報. 27 : 81-87
- 佐野健人・鹿島恭子・池羽智子. 2015. ニホングリ‘ぼろたん’の剥皮および貯蔵に関する研究. 茨城農総セ園研研報 . 22 : 15-25
- 佐野健人・鹿島恭子・池羽智子. 2016. ニホングリ‘ぼろたん’の甘露煮加工方法に関する研究. 茨城農総セ園研研報 . 23 : 34-60
- 佐藤信. 1985. 統計的官能検査法. pp. 263-270. 日科技連出版社. 東京.

### Summary

In this study, we evaluated processing suitability for a fruit paste made from Japanese chestnut cv. ‘Porotan’, and examined a relationship between visible color and polyphenol content in its fruit paste. New variety ‘Porotan’ shows easy peeling of pellicle by heating as a unique characteristic.

Compared with ‘Tanzawa’, processing yield of a fruit paste using ‘Porotan’ is comparable higher, but working time for processing takes longer. So, it is better to process a fruit paste without heating.

Qualities of fruit pastes made from two cultivars do not show a clear difference except for its color. Pastes made from ‘Porotan’ are yellower and brighter than that of ‘Tanzawa’, while polyphenol contents of pastes using ‘Porotan’ are less than that of ‘Tanzawa’.

These results suggest that an amount of polyphenol content relates to visible color of fruit pastes made from the two cultivars, and a yellower and brighter paste is made from ‘Porotan’.

**Keywords : Japanese chestnut, 'Porotan', fruit paste, processing, quality**

# ニホングリ ‘丹沢’，‘ぼろたん’ における品質劣化果の 発生および果実品質に収穫前後の温度が及ぼす影響

唐澤友洋・清水 明

(茨城県農業総合センター園芸研究所)

## Effect of Temperature Before or After Harvest on the Occurrence of Quality

## Deterioration and Fruit Quality of Japanese Chestnut Cultivar 'Tanzawa' and 'Porotan'

Tomohiro KARASAWA<sup>1</sup> and Akira SHIMIZU

### 要約

ニホングリ ‘丹沢’ および ‘ぼろたん’ の品質劣化に収穫前後の高温が及ぼす影響を明らかにするため、時期および温度条件について検討した。その結果、‘丹沢’ では収穫始期 29 日前から収穫始期までの平均温度が高いほど、品質劣化果の発生率が高いことが明らかとなった。また、‘丹沢’ ‘ぼろたん’ いずれの品種においても収穫後 5℃ で保存することにより、品質劣化の発生が抑制されることが明らかとなった。

キーワード：ニホングリ，丹沢，ぼろたん，品質劣化果

### 1 はじめに

近年、ニホングリ (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc) の品質劣化果の発生が問題となっている。ここでの品質劣化果とは、収穫時の果実の外観は健全に見えるが、出荷後や市場流通後に果実内部が変質（腐敗、品質劣化）していることが明らかになる果実と定義する。茨城県では 2011 年の早生品種の収穫期に品質劣化果が多く発生し、市場からのクレームや返品などを招き問題となった。その際には、“果実内部が煮えたように変質している”という情報のみでありどのような症状であったか詳細は不明であった。このようなクリの品質劣化果は、熊本県において変質果（図 1）として報告があり（春崎，2009），熊本県における変質果の発生は、毬の日焼けおよび収穫期の高温に起因する可能性が高いことが示唆されていたが、具体的な高温条件（温度，時期，期間）は未解明であった。このような状況の中，2011 年に本県においても早生品種で品質劣化果の発生が問題となったため，早生品種である ‘丹沢’ と ‘ぼろたん’ を用い，収穫前の高温条件および収穫後の保存温度が品質劣化果の発生に及ぼす影響を検討した。

---

1 Address : Horticultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3165-1 Ago, Kasama, Ibaraki 319-0292, Japan

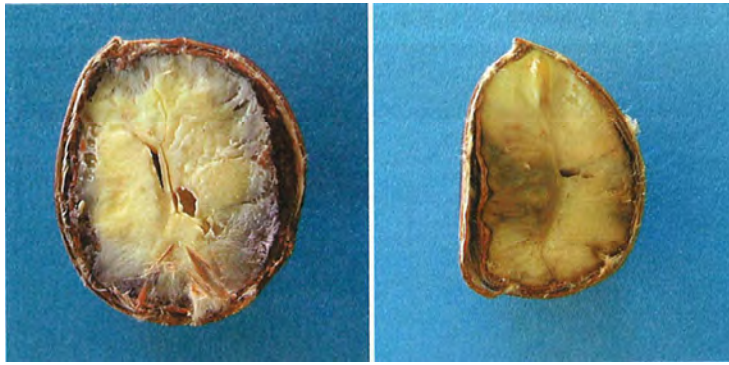


図1 クリの変質果 出典：春崎（2009）

## 2 材料および方法

### 2.1 収穫前の温度が‘丹沢’の品質劣化果の発生に及ぼす影響

茨城県農業総合センター園芸研究所露地ほ場の‘丹沢’（2000年定植，株間2m×列間4m）を供試し，2013～2016年に試験を行った。収穫前の一定期間（およそ収穫始期29日前～収穫始期）を10日前後で区切り，パイプハウスで樹体を覆うことにより高温処理した（図2）。



図2 高温処理用パイプハウス

‘丹沢’の収穫始期を予測式（門脇ら，2011）により予測し，予測した収穫始期を基準として高温処理期間を設定した。パイプハウスには自動換気装置を設置し，35℃で換気するよう設定した。2016年は30℃で換気する区を設けた。ハウス換気部分の高さの中央部に位置するよう通風筒（通風筒：NIAES-09S，温湿度データロガー：THMchip）および温度データロガー（おんどとり：TR-51i）を設置し，5分ごとに温度を測定した。

収穫は，自然落果したものを収集することによって行い，2日以上連続で収穫できた日のうち最初の日を収穫始期とした。外見から健全と判断された果実について25℃で2日間恒温器内に静置し，果実を縦半分切断し，品質劣化果の発生を調査した（図3）。

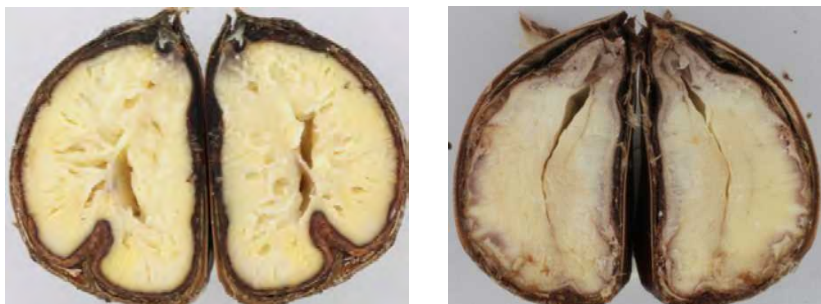


図3 品質劣化果の例

温度と品質劣化果の発生率についての関係の解析には、通風筒、おんどとり、アメダス（笠間）の測定値を用いた。2014～2016年の高温処理区および対照区の温度は、通風筒の測定値を用いた。

2013～2016年の対照区通風筒測定値（日平均温度）と各年のアメダス（笠間）日平均気温について回帰式を作成した結果、2013年のみ回帰直線の傾きが他の年に比べ大きく異なっていたため、2013年の対照区通風筒測定値は補正して用いることにした。2013年、2014年、2016年の対照区おんどとり測定値（日平均温度）と各年のアメダス（笠間）日平均気温について、回帰式を作成した結果、2014年および2016年は決定係数が高かった（ $R^2=0.99$ ）。2014年および2016年について、回帰式の併合検定を行った結果、併合可能であったため、2014年および2016年を併合した対照区おんどとり温度と対照区通風筒の回帰式を作成し、2013年対照区おんどとり温度を代入し、2013年の対照区通風筒の推定値を得た。具体的には、2014年および2016年の対照区おんどとり測定値（10分値）と2014年および2016年の対照区通風筒測定値（10分値）の関係から、7時から18時まで1時間ごとの回帰式を作成した。作成した回帰式に7時から18時までは2013年の対照区おんどとりの測定値（10分値）を代入した値を、それ以外の時間（0時～6時、19時～23時）については2013年の対照区通風筒測定値を2013年対照区通風筒測定値（推定値）として用いた。

対照区の温度データが欠損している時期については、各年の対照区通風筒測定値（2013年については推定値）の日平均温度とアメダス（笠間）の日平均気温の関係から求めた回帰式に、各年のアメダス（笠間）の日平均気温を代入し推定したものを対照区温度として用いた。

高温処理区で温度データが欠測している時期については、各年の対照通風筒測定値（2013年については推定値）と各年の高温処理区の6時から18時の平均温度の関係から求めた回帰式を作成した。作成した回帰式に6時から18時まで、各年の対照通風筒（1時間値）を、それ以外の時間（0時～5時、19時～23時）については対照通風筒測定値を代入したものを高温処理区測定値として用いた。

果実成分の分析については、デンプン含量はソモギー法、カリウム、カルシウム含量は原子吸光法、糖含量は高速液体クロマトグラフィー法で行った。

## 2. 2 収穫前の温度が‘ぼろたん’の品質劣化果の発生に及ぼす影響

茨城県農業総合センター園芸研究所露地ほ場の‘ぼろたん’（2010年定植、株間2m×列間4m）を供試し、2013～2016年に試験を行った。収穫前の一定期間（およそ収穫前29日～収穫始期）を10日前後で区切り、パイプハウスで樹体を覆うことにより高温処理した。‘ぼろたん’の収穫始期を平年値から予測し、予測した収穫始期を基準として高温処理期間を設定した。パイプハウスには自動換気装置を設置し、35℃（2013、2014年）または40℃（2015、2016年）で換気するよう設定した。ハウス換気部分の高さの中央部に位置するよう温度データロガー（おんどとり：TR-51i）を設置し、5分ごとに温度を測定した。

収穫は、自然落果したものを収集することによって行い、2日以上連続で収穫できた日のうち最初の日を収穫始期とした。外見から健全と判断された果実について25℃で2日間恒温器内に静置し、果実を縦半分（縦半分）に切断し、品質劣化果の発生を調査した。

## 2. 3 収穫後の温度が‘丹沢’、‘ぼろたん’の品質劣化の発生に及ぼす影響

茨城県農業総合センター園芸研究所露地ほ場の‘丹沢’、‘ぼろたん’を供試した。茨城県果樹栽培基準に準じた栽培を行い、収穫は2日に1回行った。外見からは健全と判断された果実について塩水選で比重により4区分（1.00未満、1.00～1.03未満、1.03～1.06未満、1.06を超える）に分類した（志村ら、1966）。分類した果実を5℃、15℃、20℃、25℃、35℃で2日間恒温器内に静置し、果実を縦半分（縦半分）に切断し、品質劣化果の発生を調査した。

## 3 結果

### 3. 1 収穫前の温度が‘丹沢’の品質劣化果の発生に及ぼす影響

2013年～2016年の高温処理期間と品質劣化果の発生率について表1に示した。2013年は、3区（収穫9日前～5日後）の発生率が50.0%と高く、2014年は、2区（収穫18日前～5日前）の発生率が10.9%と高く、2015年は、3区（収穫11日前～1日後）の発生率が22.5%と高く、2016年は、1区（収穫10日前～2

日前：35℃換気）の発生率が47.1%と高かった（表1）。

2013年～2016年において、高温処理期間の違いが果実品質に及ぼす影響は判然としなかった（表2）。

表1 収穫前の高温処理が‘丹沢’の品質劣化果の発生に及ぼす影響

調査年	試験区	高温処理期間 (収穫始期基準) <sup>x</sup>	調査果 数 (個)	品質劣 化果数 (個)	発生率 (%)	樹冠内 <sup>y</sup> 平均温度 (°C)	高温 <sup>z</sup> 処理時間 (h)
2013	1区	36日～23日前	59	7	11.9	26.3	0
	2区	22日～10日前	36	10	27.8	26.8	0
	3区	9日前～5日後	8	4	50.0	26.6	4
	対照区	-	64	10	15.6	25.9	0
2014	1区	32日～19日前	384	18	4.7	25.2	7
	2区	18日～5日前	257	28	10.9	25.9	0
	3区	4日前～9日後	278	14	5.0	25.4	0
	対照区	-	341	12	3.5	24.7	0
2015	1区	20日～11日前	103	12	11.7	25.4	3
	2区	19日～7日前	73	12	16.4	25.9	26
	3区	11日前～1日後	169	38	22.5	26.1	9
	対照区	-	130	1	0.8	24.5	0
2016	1区	10日～2日前(35℃換気)	104	49	47.1	26.2	48
	2区	10日～2日前(30℃換気)	36	9	25.0	25.8	0
	3区	1日前～6日後	89	21	23.6	25.7	0
	対照区	-	94	19	20.2	25.6	0

<sup>x</sup> 収穫始期：9月7日（2013）、9月1日（2014）、9月1日（2015）、8月25日（2016）

<sup>y</sup> 収穫始期29日前から収穫始期までの樹冠内平均温度

<sup>z</sup> 高温処理期間中における35℃以上の処理時間（1時間単位）

表 2 収穫前の高温処理が‘丹沢’の果実品質に及ぼす影響

調査年	試験区	一果重 (g)	比重	デンプン含量 (g/100g)	カルシウム含量 (mg/100g)	カリウム含量 (mg/100g)	糖含量 (mg/100g)	水分含量 (%)		
2013	1区	21.1	1.045	c <sup>z</sup>	-	-	-	-		
	2区	20.5	1.029	a	-	-	-	-		
	3区	16.7	1.015	ab	-	-	-	-		
	対照区	23.2	1.043	bc	-	-	-	-		
分散分析	-	-	***y	-	-	-	-	-		
2014	1区	17.1	1.047	b	11.6	-	437	60.4		
	2区	14.8	1.015	a	10.6	-	420	58.8		
	3区	20.7	1.041	b	9.1	-	432	60.7		
	対照区	20.9	1.050	b	11.1	-	448	60.5		
分散分析	-	-	***	n.s.	-	n.s.	-	n.s.		
2015	1区	17.0	1.064	b	17.7	a	13	476	3.9 a	66.7 a
	2区	18.2	1.042	a	21.5	b	15	484	3.8 a	65.5 a
	3区	17.5	1.045	a	20.3	ab	15	460	3.9 a	67.4 a
	対照区	20.6	1.065	b	21.6	b	15	510	5.0 b	61.4 b
分散分析	-	-	***	*	n.s.	-	n.s.	**	***	
2016	1区	22.7	1.046	-	22.4	-	77	405	5.1	66.0
	2区	21.2	1.051	-	20.8	-	84	440	4.0	64.6
	3区	23.9	1.055	-	18.9	-	95	423	4.4	65.2
	対照区	27.0	1.052	-	21.3	-	76	405	3.8	64.9
分散分析	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

<sup>z</sup> Tukey 検定により、同一アルファベット間には有意差なし

y \*\*\*は 0.1%, \*\*は 1%, \*は 5%水準で有意差あり, n.s.は有意差なし

雌花開花盛期から収穫始期までの日平均温度（対照区通風筒）の期間平均温度（収穫始期 N 日前から収穫始期までの平均）と品質劣化果の発生率（2013 年から 2016 年の 1～3 区および対照区）との関係を図 4 に示した。収穫始期 31 日前から収穫始期までの平均温度～収穫始期 2 日前から収穫始期までの平均温度において品質劣化果の発生率と有意な正の相関が認められたが、それ以外の時期においては認められなかった。

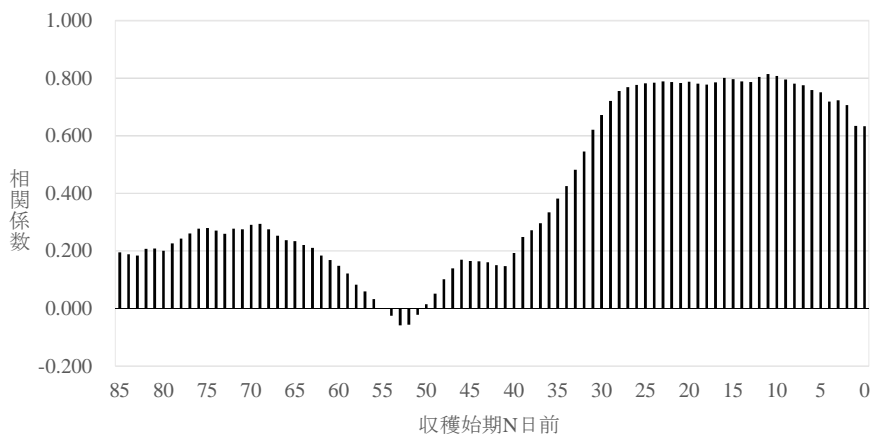


図 4 収穫始期 N 日前から収穫始期までの平均温度と品質劣化果の発生率の関係（‘丹沢’）

収穫始期 29 日前から収穫始期までの平均温度と各年の品質劣化果の発生率の関係を図 5 に示した。品質劣化果の発生率は、収穫始期 29 日前から収穫始期までの平均温度が 24.5℃を下回ると品質劣化果の発生率はほぼ 0%であった。24.5℃～25.5℃の範囲では品質劣化果の発生率は 0～10%程度であり、25.5℃～26.0℃の範囲では品質劣化果の発生率は 10～20%程度であり、26.0℃を超えると品質劣化果の発生率は 20%を超

える傾向がみられた。

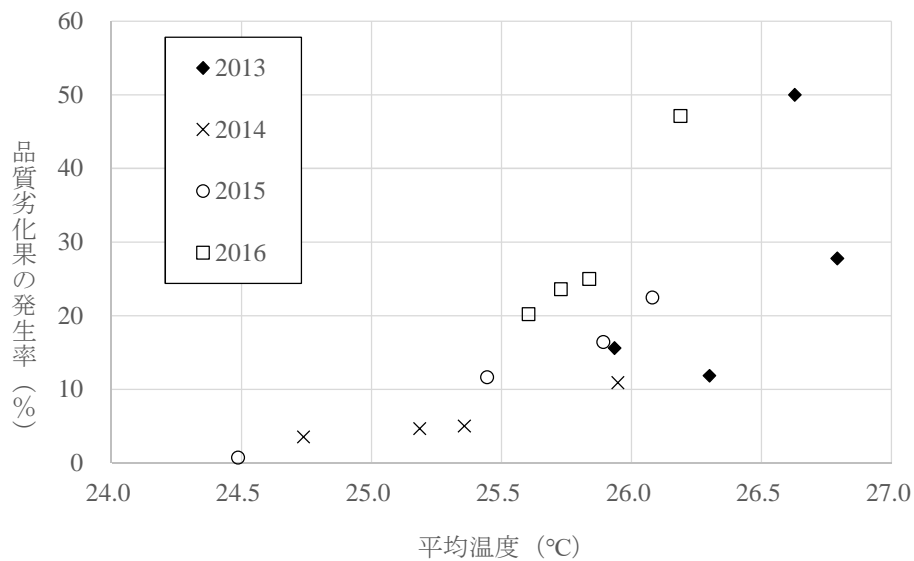


図5 収穫始期 29 日前から収穫始期までの平均温度と品質劣化果の発生率の関係

### 3. 2 収穫前の温度が‘ぽろたん’の品質劣化果の発生に及ぼす影響

2013～2016 年の高温処理期間と品質劣化果の発生率について表 3 に示した。2013 年は、2 区（収穫 26 日～13 日前）の発生率が 16.7%と高く、2014 年は、2 区（収穫 26 日～13 日前）の発生率が 3.9%と高かった。2015 年は、3 区（収穫 5 日前～収穫始期 6 日後）の発生率が 24.7%と高く、2016 年は、1 区（収穫 25 日～10 日前）の発生率が 50%と高かった。換気温度 35℃と 40℃では、40℃で全体的に品質劣化果の発生率が高かった。なお、2013 年～2016 年において、高温処理期間、換気温度の違いが果実品質に及ぼす影響は判然としなかった（表 4）。



表3 収穫前の高温処理が‘ぼろたん’の品質劣化果の発生に及ぼす影響

調査年	換気温度 (°C)	試験区	高温処理期間 (収穫始期基準) <sup>z</sup>	調査 果数 (個)	品質劣 化果数 (個)	発生率 (%)	樹冠内 <sup>y</sup> 平均温度 (°C)	高温 <sup>x</sup> 処理時間 (h)
2013	35	1区	39日～27日前	6	0	0.0	24.8	3
		2区	26日～13日前	6	1	16.7	25.5	10
		3区	12日前～3日後	3	0	0.0	24.9	3
		対照区	—	7	0	0.0	25.4	1
2014	35	1区	40日～27日前	296	2	0.7	22.8	8
		2区	26日～13日前	363	14	3.9	23.5	0
		3区	12日前～1日後	318	7	2.2	24.0	0
		対照区	—	171	3	1.8	22.7	0
2015	40	1区	22日～12日前	144	22	15.3	24.3	1
		2区	12日前～5日後	111	12	10.8	24.0	0
		3区	5日～6日後	150	37	24.7	24.1	25
		対照区	—	186	9	4.8	23.5	0
2016	40	1区	25日～10日前	30	15	50.0	27.5	69
		2区	9日前～3日後	63	10	15.9	26.3	4
		3区	4日～25日後	77	13	16.9	25.7	— <sup>w</sup>
		対照区	—	109	12	11.0	25.7	0

<sup>z</sup> 収穫始期：9月17日(2013), 9月16日(2014), 9月9日(2015), 9月2日(2016)

<sup>y</sup> 収穫始期29日前から収穫始期までの樹冠内平均温度

<sup>x</sup> 高温処理期間中における35°C以上の処理時間(1時間単位)

<sup>w</sup> 高温処理が収穫始期後になったため

表4 収穫前の高温処理が‘ぼろたん’の果実品質に及ぼす影響

調査年	換気温度 (°C)	試験区	高温処理期間 (収穫始期基準)	一果重 (g)	比重
2013	35	1区	39日前～27日前	23.0	—
		2区	26日前～13日前	20.0	—
		3区	12日前～3日後	22.0	—
		対照区	—	20.4	—
2014	35	1区	40日前～27日前	17.8	1.087 <sup>c</sup>
		2区	26日前～13日前	21.5	1.077 <sup>ab</sup>
		3区	12日前～1日後	22.8	1.072 <sup>a</sup>
		対照区	—	18.1	1.085 <sup>bc</sup>
分散分析			—	*** <sup>y</sup>	
2015	40	1区	22日前～12日前	19.9	1.069 <sup>bc</sup>
		2区	12日前～5日後	23.1	1.051 <sup>a</sup>
		3区	5日～6日後	21.5	1.063 <sup>ab</sup>
		対照区	—	19.2	1.082 <sup>c</sup>
分散分析			—	**	
2016	40	1区	25日前～10日前	22.4	1.100 <sup>b</sup>
		2区	9日前～3日後	27.4	1.037 <sup>a</sup>
		3区	4日～25日後	27.0	1.066 <sup>ab</sup>
		対照区	—	21.7	1.064 <sup>ab</sup>
分散分析			—	**	

<sup>z</sup> Tukey検定により, 同一アルファベット間には有意差なし

<sup>y</sup> \*\*\*は0.1%, \*\*は1%, \*は5%水準で有意差あり, n.s.は有意差なし

### 3. 3 収穫後の温度が‘丹沢’, ‘ぼろたん’の品質劣化の発生に及ぼす影響

‘丹沢’における2013年～2016年の収穫後保存温度別の品質劣化果の発生率について表5に示した。保存温度別では, 5°C処理で2014～2016年のいずれにおいても低かった。15°C, 20°C, 25°C, 35°C処理の

間に明らかな差はみられなかった。比重区別では、2016年においては、比重が低いほど品質劣化果の発生率が高い傾向がみられたが、2014年、2015年には明らかな差はみられなかった。

‘ぼろたん’における2015～2016年の収穫後保存温度別の品質劣化果の発生率について表6に示した。保存温度別では、5℃～35℃処理いずれの区の間においても明らかな差はみられなかった。比重区別では、2016年において、比重が低いほど品質劣化果の発生率が高い傾向がみられたが、2015年では明らかな差はみられなかった。

表5 ‘丹沢’における保存温度別、比重別の品質劣化果の発生率

保存温度 (°C)	比重区分	2014		2015		2016	
		調査果数 (個)	発生率 (%)	調査果数 (個)	発生率 (%)	調査果数 (個)	発生率 (%)
5	<1.00	0	—	2	0.0	7	14.3
	1.00≦,<1.03	20	0.0	6	0.0	35	20.0
	1.03≦,<1.06	40	0.0	30	0.0	92	12.0
	1.06≦	40	0.0	78	0.0	52	1.9
計		100	0.0	116	0.0	186	10.8
15	<1.00	0	—	—	—	9	66.7
	1.00≦,<1.03	20	0.0	—	—	12	58.3
	1.03≦,<1.06	40	5.0	—	—	90	20.0
	1.06≦	0	—	—	—	0	—
計		60	3.3	—	—	111	27.9
20	<1.00	10	30.0	—	—	9	77.8
	1.00≦,<1.03	20	5.0	—	—	23	47.8
	1.03≦,<1.06	40	5.0	—	—	90	21.1
	1.06≦	40	0.0	—	—	60	10.0
計		110	5.5	—	—	182	23.6
25	<1.00	0	—	1	100.0	6	50.0
	1.00≦,<1.03	20	5.0	16	0.0	26	42.3
	1.03≦,<1.06	40	0.0	118	9.3	89	18.0
	1.06≦	40	2.5	184	6.0	51	5.9
計		100	2.0	319	7.2	172	19.2
35	<1.00	10	10.0	—	—	7	71.4
	1.00≦,<1.03	20	5.0	—	—	25	60.0
	1.03≦,<1.06	40	7.5	—	—	75	20.0
	1.06≦	0	—	—	—	51	7.8
計		70	7.1	—	—	158	24.7

表6 ‘ぼろたん’における保存温度別、比重別の品質劣化果の発生率

保存温度 (°C)	比重区分	2015		2016	
		調査果数 (個)	発生率 (%)	調査果数 (個)	発生率 (%)
5	<1.00	0	—	0	—
	1.00≦,<1.03	2	0.0	8	25.0
	1.03≦,<1.06	33	0.0	35	8.6
	1.06≦	125	1.6	35	8.6
計		160	1.3	78	10.3
15	<1.00	—	—	0	—
	1.00≦,<1.03	—	—	35	8.6
	1.03≦,<1.06	—	—	35	2.9
	1.06≦	—	—	0	—
計		—	—	70	5.7
20	<1.00	—	—	0	—
	1.00≦,<1.03	—	—	35	25.7
	1.03≦,<1.06	—	—	35	11.4
	1.06≦	—	—	0	—
計		—	—	70	18.6
25	<1.00	0	—	9	44.4
	1.00≦,<1.03	1	0.0	35	14.3
	1.03≦,<1.06	29	13.8	35	2.9
	1.06≦	156	3.2	0	—
計		186	4.8	79	12.7
35	<1.00	—	—	0	—
	1.00≦,<1.03	—	—	35	20.0
	1.03≦,<1.06	—	—	35	11.4
	1.06≦	—	—	0	—
計		—	—	70	15.7

#### 4 考察

本研究では、ニホングリ‘丹沢’および‘ぼろたん’における収穫前の高温処理が品質劣化果の発生に及ぼす影響を検討した。その結果、‘丹沢’において、収穫始期 29 日前から収穫始期までの平均温度が高いほど品質劣化果の発生率が高くなることを明らかにした。このことから、収穫始期 29 日前から収穫始期までの平均温度は、‘丹沢’における当年の品質劣化果の発生程度の指標になると考えられた。なお、今回の高温処理試験は、園芸研究所場内（笠間市安居）でビニルハウスにより樹体を人工的に被覆・加温した結果であるため、県内全域の品質劣化果の発生率を予測するものではないので注意が必要である。

クリの果実腐敗の原因としては、実炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) が主原因であるという報告（内田, 1981）や黒色実腐病菌 (*Botrytisphaeria dothidea*) が主原因であるという報告（吉田・杉浦, 2012）などがあるが、本試験で確認された品質劣化果においては、実炭疽病はほとんど認められず、黒色実腐病が多くみられた（データ省略）。しかしながら、原因の特定できない症状が最も多くの割合を占めた。8 月上旬から収穫まで樹上散水を行った試験において、散水処理が品質劣化果の発生に及ぼす影響はみられなかった（データ省略）。また、クリの腐敗果の発生は満開後 20 日間の降雨日数と相関が高いという報告（農林水産省農林水産技術会議事務局, 2010）があることから、満開後には感染が成立しており、収穫前の気温が高くなることにより症状が増加する可能性が考えられた。

‘丹沢’の高温処理試験については図 4 に示すように収穫始期 31 日前から収穫始期までの平均温度～収穫始期 2 日前から収穫始期までの平均温度は品質劣化果の発生率と有意に相関係数が高かったことから、収穫始期 29 日前から収穫始期までの 30 日間の平均温度と品質劣化果の発生率の関係をみたところ（図 5）、平均温度が高くなるほど、品質劣化果の発生率が高くなる傾向が認められた。現地で問題となった 2011 年の園芸研究所露地ほ場の収穫始期 29 日前から収穫始期までの樹冠内平均温度（笠間アメダスからの推定）は 26.0°C であり、図 5 から 20% 程度の品質劣化果の発生率が推定され、品質劣化果の発生率が高かった現

状と一致すると考えられた。

‘ぼろたん’の高温処理試験の2013年、2014年の2年間において、35℃換気ではいずれの区においても品質劣化果の発生率が低かったため、2015年、2016年は40℃換気に変更した。40℃換気にするだけで、品質劣化果の発生率は明らかに高くなった。このように40℃を超えるような高温で処理することで‘ぼろたん’においても品質劣化果の発生率は高くなるが、実際の気象条件でこのような高温になることはまれであるため、通常の気象条件において、‘ぼろたん’は品質劣化果が発生しにくい品種だと考えられる。

比重の測定については、志村ら(1966)が、比重は鬼皮付きのまま測定できることを報告していることから、本研究でも鬼皮付き果実で測定した。志村ら(1966)は比重とデンプン含量には高い正の相関があると報告しているが、本研究において相関は認められなかった。これは、同じ試験区の果実ではあるが、比重を測定した果実とデンプン含量を測定した果実が同一ではないためと考えられる。収穫前に高温処理することにより、果実内のデンプン含量に変化があると予想したが、今回の試験ではそのような傾向はみられなかった。

‘丹沢’では収穫後の品質劣化果の発生割合を保存温度別に比較すると(表5)、5℃処理において、2016年は10.8%と比較的低く2015年、2014年はともに0%となり品質劣化果の発生が抑制された。‘ぼろたん’も同様に品質劣化果の発生割合は5℃処理において25℃処理よりも低く(表6)、いずれの品種においても収穫後直後から5℃で保存することにより品質劣化果の発生を抑制できると考えられる。クリの冷蔵については多くの報告があり、長期貯蔵については0℃での保存が望ましいとされる(石井ら, 2008)。またクリシギゾウムシの殺虫を兼ねる際は-2℃で貯蔵するとされる(吉松, 2000)。しかしながら、数日の間に流通・加工が行われる場合など短期間に消費される場合には5℃保存でも実用上問題ないと考えられる。5℃で保存した試験区においてある程度の品質劣化果の発生がみられたが、この原因として試験に用いたのは外観が健全に見える果実であり、試験開始時にすでに品質劣化していた可能性が考えられた。

以上のように、ニホングリ‘丹沢’においては、収穫始期29日前から収穫始期までの平均気温が高いほど品質劣化果の発生率が高くなる。また、‘丹沢’‘ぼろたん’いずれの品種においても収穫後5℃で保存することにより品質劣化の発生が抑制されるということが明らかになった。

## 引用文献

- 春崎聖一(2009)クリの変質果発生要因と軽減策. 農耕と園芸 64(7): 125-127.
- 石井 貴・藤田醸司・鹿島恭子・小田喜保彦(2008)クリの低温貯蔵に関する研究. 茨城県農業総合センター園芸研究所研報 16: 1-12.
- 門脇伸幸・多比良和生・杉浦俊彦(2011)ニホングリにおける雌花開花後の気温が果実の成熟に及ぼす影響と収穫始期予測法について. 園芸学研究 10(4): 513-519.
- 農林水産省農林水産技術会議事務局(2010)地球温暖化が農林水産業に及ぼす影響評価と緩和および適応技術の開発: 277.
- 志村 勲・金戸橋夫・松永春夫(1966)クリ果肉の肉質と比重について. 園学要旨. 41春: 127-128.
- 内田和馬(1981)クリ貯蔵果の腐敗原因と *Tubercularia* 菌の伝染経路. 茨城県園芸試験場研報 9: 23-31.
- 吉田麻里子・杉浦直幸(2012)クリの腐敗果の発生要因. 平成24年度落葉果樹試験研究成績概要集: 228-229.
- 吉松敬祐(2000)クリシギゾウムシ・クリミガの臭化メチルに替わる殺虫技術. 今月の農業 44(12): 85-87.

## Summary

We examined to clarify effect of a temperature before or after harvest on the incidence of deterioration in Japanese chestnut.

- 1.The higher average temperature from 29 days before harvesting to harvested day revealed the higher quality deterioration rate in 'Tanzawa'.
- 2.Managing at 5 degree centigrade after harvesting suppressed the occurrence of quality deterioration in 'Tanzawa' and 'Porotan'.

**Keywords:** Japanese chestnut, 'Tanzawa', 'Porotan', quality deterioration

# ニホンナシ ‘恵水’ の着果量の違いが収量・果実品質に及ぼす影響

加川敬祐・市毛秀則<sup>1)</sup>・清水 明

(茨城県農業総合センター園芸研究所)

## Effect of a Number of Fruit Setting on Yield and Fruit Quality in

## Japanese Pear ‘Keisui’

Keisuke KAGAWA<sup>1</sup>, Hidenori ICHIGE and Akira SHIMIZU

### 要約

ナシ ‘恵水’ における適正着果量を検討するために、着果量をそれぞれ樹冠占有面積1㎡あたり8果、10果、12果に調整した試験区の収量・果実品質を調査した。12果/㎡区は最も収量が高かったが、400 g未満の小玉果の発生割合が高かった。8果/㎡区と10果/㎡区は、果実品質はほぼ同等であったが、8果/㎡区は収量が低かった。したがって、収量と果実品質を考慮すると ‘恵水’ の適正着果量は10果/㎡と考えられる。

キーワード：ナシ， 恵水， 着果量， 収量， 果実品質

### 1 緒言

‘恵水’ は、茨城県オリジナルのニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) 新品種である。茨城県農業総合センター生物工学研究所において、1994年に ‘新雪’ に ‘筑水’ を交配して得られた実生から、系統「21-60」として選抜され、2004年から同園芸研究所で栽培試験を開始し、2009年10月に品種登録の出願を行い、2011年12月6日に品種登録された(登録番号21253号)(図1)。「恵水」は9月上旬～下旬にかけて成熟し、平均果重600 g前後と大果であり、糖度は13 %前後と高く、甘みが強い。また、樹勢が強く、えき花芽の着生は非常に悪いものの、短果枝の養成が容易であるなど食味や栽培性に優れた特徴をもつ(尾形ら, 2015)。



図1 ニホンナシ ‘恵水’

茨城県のナシ栽培面積は1,120 ha、収穫量26,300 tとともに千葉県に次いで全国第2位(2015年)であり、本県の果樹産業の基幹品目となっている(茨城の園芸, 2018)。本県のナシは市場出荷が中心であり、多くの産地に選果機が導入され、京浜市場を中心に出荷されている。品種構成は主要品種の ‘幸水’、 ‘豊水’ で作付面積の約90 %を占めており、特に8月の旧盆需要に合わせた ‘幸水’ の出荷量が多い。産地では園地の高樹齢化による生産性の低下や、労力の集中、価格の低迷といった課題を抱えており、10 a当たりの収量は2 t弱、平均単価(2010年～2012年の3年間平均)は302円/kg(茨城県, 2016)と収益性が低い状況にある。‘恵水’ はナシの単価が下落する旧盆以降の時期に収穫できる、良好な食味と収量性をあわせもった品種として期待され、2013年に県内の生産者を対象とした苗木の販売が開始されて以降導入面積が増加しており、2017年の栽培面積は13.8 haとなっている。2016年からは市場出荷が開始されたが、市

1) 現 農業総合センター生物工学研究所

1 Address : Horticultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3165-1 Ago, Kasama, Ibaraki 319-0292, Japan

場からは出荷量が不安定である等の指摘があり、今後とも本県産ナシのイメージリーダーとなる品種として、高品質果実を安定生産できる技術が求められている。

果実肥大期の摘果作業による着果数の制限は、果実肥大を助長し品質を高める一方、収量を低下させる要因ともなっており、着果量は目標収量の確保と商品性を勘案して決定される。また、品種別の果実の肥大特性、生産力によっても適正な着果量は異なる（大友，2000）。本県のニホンナシ主要品種の10 a当たり成木の着果数は、‘幸水’は8,000～10,000果，‘豊水’は13,000果，‘あきづき’は10,000果で、摘果作業を行う上での着果目安は‘幸水’では長果枝2.5～3果そうに1果，‘豊水’では3果そうに1果とされている（茨城県農業総合センター，2016）。このことから、今後新品種‘恵水’の導入にあたっては、高品質果実の安定生産の基本として、着果量の目安を示すことが必要である。そこで、本研究では‘恵水’の適正着果量を明らかにしたので報告する。

## 2 材料および方法

2014年～2015年に高接ぎ（中間台‘にっこり’）‘恵水’3樹（2014年に7年生）を供試し、着果基準量が樹冠占有面積1㎡あたり8果，10果，12果の区を設けた（1区1樹）。樹冠占有面積は、主幹中心から樹冠外縁までの距離を放射状に16方位に分けて測定し、得られた16の三角形の面積を合計して求めた。2014年は満開後30日（5月22日）に本摘果を行い、2015年は満開後36日（5月25日）に1果そう1果（予備摘果）とし、満開後39日（5月30日）に本摘果を行って樹冠占有面積当たりの最終着果量（8果/㎡，10果/㎡，12果/㎡）に調整した。摘蕾は行わなかった。

生育調査は、生育期（2014年は7月14日～8月8日，2015年は6月30日）に葉枚数の調査を行い、落葉後に新梢発生数、総新梢長を計測した。葉枚数は1樹の側枝上の果そう葉数および全葉数（果そう葉および新梢葉数の合計）を計測し、着果数をもとに葉果比（1果当たりの葉枚数）を算出した。収穫は、2014年は9月3日～9月26日，2015年は8月27日～9月18日に、‘恵水’用カラーチャート値3～4を基準として収穫を行い、収穫した全果実の一果重を計測し、果実階級比率を求めた。また果実品質については、試験区ごとに30果をランダムに選び、糖度（Brix%），硬度（マグネター硬度計，10 lbs，5/16インチのプランジヤー使用で赤道部を測定）を調査した。

## 3 結果

### 3.1 着果量の違いと葉果比

葉果比は、2014年，2015年とも着果量が少ない8果/㎡区，10果/㎡区，12果/㎡区の順に大きかった。葉果比（果そう葉）は8果/㎡区で37～41，10果/㎡区で34～35，12果/㎡区で30であった（表1）。

表1 「恵水」の着果量の違いが葉果比に及ぼす影響

調査年	試験区 <sup>1)</sup>	樹冠占有面積 (㎡)	着果数 (果/樹)	葉枚数		葉果比	
				全葉枚数 <sup>2)</sup> (枚)	果そう葉枚数 (枚)	全葉枚数	果そう葉枚数
2014	8果/㎡	14.2	113	5,617	4,617	50	41
	10果/㎡	19.8	195	7,951	6,799	41	35
	12果/㎡	20.3	229	7,705	6,950	34	30
2015	8果/㎡	18.4	143	7,434	5,335	52	37
	10果/㎡	26.5	272	11,069	9,248	41	34
	12果/㎡	24.3	287	9,863	8,523	34	30

<sup>1)</sup> 試験区は各区2か年とも同一樹を用いた。

<sup>2)</sup> 全葉枚数は、側枝上の果そう葉、新梢葉の合計。

### 3.2 着果量の違いと収量

収量（kg/㎡）は、2014年，2015年とも着果量が多い12果/㎡区，10果/㎡区，8果/㎡区の順に多く、一果重は着果量が少ない8果/㎡区，10果/㎡区，12果/㎡区の順に大きかった。全体として、2014年に比べ2015年は一果重が小さく、収量が少ない傾向であった（表2）。

表2 「恵水」の着果量の違いが収量に及ぼす影響

調査年	試験区 <sup>1)</sup>	樹冠占有面積 (m <sup>2</sup> )	収量			収穫果数		一果重 (g)
			(kg/樹 <sup>2)</sup> )	(kg/m <sup>2</sup> <sup>3)</sup> )	(t/10a <sup>4)</sup> )	(個/樹)	(個/m <sup>2</sup> )	
2014	8果/m <sup>2</sup>	14.2	62.4	4.4	2.4	112	7.9	557
	10果/m <sup>2</sup>	19.8	106.0	5.4	4.0	196	9.9	541
	12果/m <sup>2</sup>	20.3	115.9	5.7	4.4	230	11.3	504
2015	8果/m <sup>2</sup>	18.4	70.7	3.8	2.7	136	7.4	518
	10果/m <sup>2</sup>	26.5	129.2	4.9	4.9	255	9.6	506
	12果/m <sup>2</sup>	24.3	123.7	5.1	4.7	271	11.2	459

<sup>1)</sup> 試験区は各区2か年とも同一樹を用いた。

<sup>2)</sup> 1樹当たり収量 (実数)

<sup>3)</sup> 樹冠占有面積1 m<sup>2</sup>当たり換算収量 (1樹当たり収量/樹冠占有面積)

<sup>4)</sup> 10a当たり38本植え換算収量 (1樹当たり収量×38)

### 3. 3 着果量の違いと果実品質および階級別果実の割合

一果重は12果/m<sup>2</sup>区が有意に小さく、8果/m<sup>2</sup>区、10果/m<sup>2</sup>区の間では有意な差は見られなかった。糖度は、2014年は12果/m<sup>2</sup>区が低い傾向となったが、2015年は有意な差は見られなかった。12%以上の果実の発生割合は8果、10果区で高く、13%以上の果実の発生割合は10果/m<sup>2</sup>区で発生割合が高かった。12果/m<sup>2</sup>区では、12%以上の果実、13%以上の果実ともに発生割合が低かった。硬度は、2014年は8果/m<sup>2</sup>区が有意に低く、2015年は、12果/m<sup>2</sup>区が有意に高かった (表3)。

表3 「恵水」の着果量の違いが果実品質に及ぼす影響

調査年	試験区 <sup>1)</sup>	一果重 (g)	糖度			硬度 (lbs)
			Brix%	12%以上の 果実割合(%)	13%以上の 果実割合	
2014	8果/m <sup>2</sup>	557 a <sup>3)</sup>	12.9 ab	97	50	4.4 b
	10果/m <sup>2</sup>	541 a	13.1 b	100	77	4.9 a
	12果/m <sup>2</sup>	504 b	12.7 a	93	23	4.8 a
	分散分析 <sup>2)</sup>	**	*			*
2015	8果/m <sup>2</sup>	518 a	12.5	82	12	5.9 a
	10果/m <sup>2</sup>	506 a	12.5	80	16	5.9 a
	12果/m <sup>2</sup>	459 b	12.2	68	6	6.2 b
	分散分析	***	n.s			***

<sup>1)</sup> 試験区は各区2か年とも同一樹を用いた。

<sup>2)</sup> \*: 5%、\*\* : 1%、\*\*\* : 0.1%で有意。n.s : 有意差なし

<sup>3)</sup> 多重比較は、Tukey検定。異なる英文字間で有意 (P<0.05)

階級別発生率は、12果/m<sup>2</sup>区が2014年、2015年ともに低位階級 (14玉以下) の発生率が高く、2015年は400 g未満の果実が33%発生した。600 g以上 (8玉) の発生率は、12果/m<sup>2</sup>区、10果/m<sup>2</sup>区では大きな差はなかったが、8果/m<sup>2</sup>区で高かった (図2)。

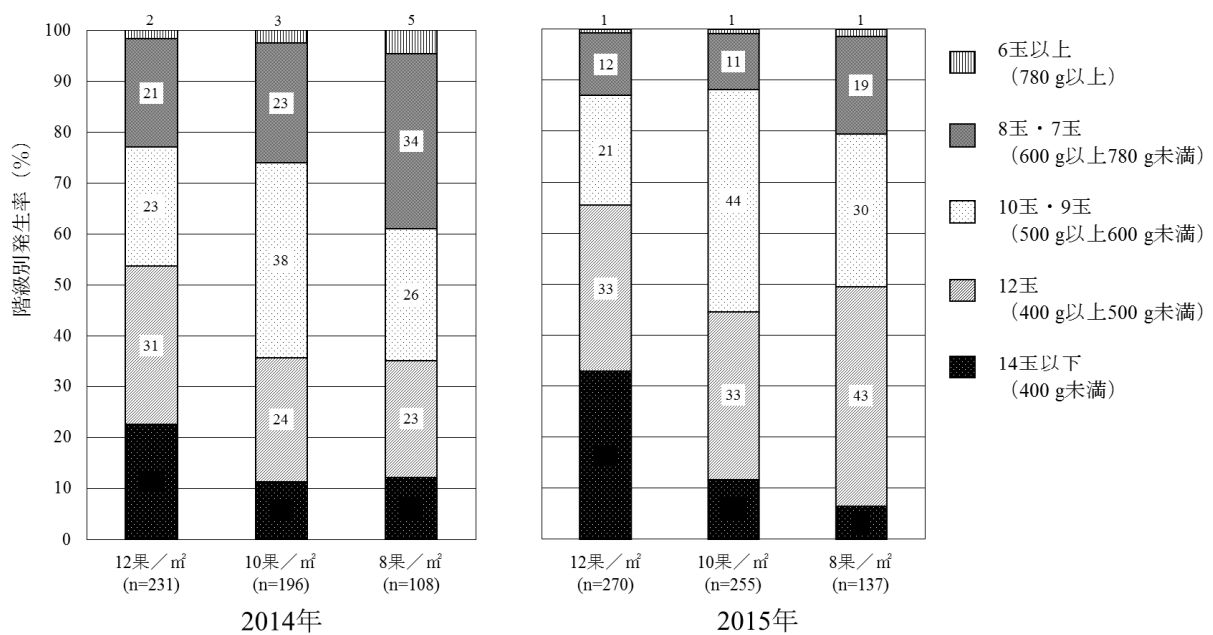


図2 「恵水」着果量の違いが階級別発生率に及ぼす影響

1) 果実の階級および基準重量は、茨城県青果物標準出荷規格「なし（新高・恵水等大玉系）」による。

果実階級別の果実品質は、2014年、2015年ともに糖度は上位階級で高く、硬度は上位階級で低い傾向がみられた（表4）。

表4 「恵水」の階級と糖度及び硬度の関係

階級	糖度 (Brix%)		硬度 (lbs)	
	2014年	2015年	2014年	2015年
6玉以上 (780 g以上)	13.1 ab <sup>1)</sup>	12.5 ab	5.3 ab	4.0 a
8玉・7玉 (600 g以上780 g未満)	13.1 a	12.7 a	5.7 a	4.6 ab
10玉・9玉 (500 g以上600 g未満)	12.8 ab	12.3 ab	5.9 ab	4.8 ab
12玉 (400 g以上500 g未満)	12.4 b	12.4 a	6.1 ab	5.1 b
14玉以下 (400 g未満)		12.0 b	6.3 a	

<sup>1)</sup>多重比較は、Tukey検定。異なる英文字間で有意 (P<0.05)

#### 4 考察

着果量がニホンナシの収量や果実品質に与える影響は大きく、これまでも‘幸水’、‘ゴールド二十世紀’などの品種で適正着果量の検討が行われてきた（松永ら、1976；高橋ら、1994；池田ら、2008）。これらの報告では、ナシの収量は着果量が増加するほど多くなること、着果量が増加するにつれて果実重は小さくなること、着果量が多いほど糖度は低下することが示されている。本試験では、着果量の多い12果/m²区は収量が最も高い一方で、果実重は最も小さく、400 g未満の小玉果の発生率が高かった。糖度の平均値は2014年の10果/m²区と12果/m²区の間のみ有意差があり、2015年は試験区間で有意な差は見られなかった。2015年は、8月中旬～9月中旬の日照不足により所内のナシは‘恵水’以外の品種も含め全体的に糖度が低かった。しかし、糖度12%以上、13%以上の果実の発生率を比較すると、2か年ともに12果/m²区では12度以上、13度以上の果実割合が低かった。本試験におけるこれらの結果は、先行研究における傾向と概ね一致するものであり、‘恵水’でも、着果量が増えると収量が増加し、果実重は小さく、糖度が低下することが明かとなった。また、‘幸水’、‘豊水’では着果条件にかかわらず大きい果実は糖度が高いとされているが（高橋ら、1994）、本試験の‘恵水’においても400 g未満の小玉果では糖度が低く、また硬度が高い傾向であり、食味が劣った。このことから、今後、‘恵水’を食味が優れた新品種として推進していくためには、樹冠占有面積1m²当たり10果以下まで着果量を制限していく必要があると



考えられる。また、8果/㎡区と10果/㎡区で一果重や果実品質の差は見られないことから、「恵水」の着果量は10果/㎡が適正であるといえる。なお、2015年の10果/㎡区において、2年生以上の枝における側枝長、着果数、果そう数の関係をみたところ、側枝1 mあたり6果、または3果そうに1果となり、栽培現場で用いる上で簡易な着果数の目安として活用できる（表5）。

表5 「恵水」10果/㎡区における着果数（2015年）

総側枝長 <sup>1)</sup>	着果数 <sup>2)</sup>		果そう数 <sup>3)</sup>	
	m	果/樹	果/側枝1m	個/樹
41.66	249	6.0	721	2.9

<sup>1)</sup>総側枝長は、2年生以上の側枝の総延長

<sup>2)</sup>着果数は、2年生以上の側枝における着果数

<sup>3)</sup>果そう数は、2年生以上の側枝における果そう数の合計

一方、本試験において10果/㎡区における樹全体の葉果比は、果そう葉枚数では34~35であった。葉果比と果実品質の関係については、池田ら（2008）の報告では、「ゴールド二十世紀」において、糖度は葉果比35までは葉果比の増加に従って高くなり、35以上ではほぼ平衡となり、葉果比50以上では糖度向上に効果が見られないとされている。また、島田ら（2013）は、「彩玉」の最適な葉果比は25程度とした上で、果重は樹全体の養分分配の影響を受けるため樹ごとの葉果比の影響を受け、糖類の生産は果実に近接した葉の同化産物が利用されるため、側枝ごとの葉果比の影響を受けると報告している。

本試験における葉果比（果そう葉）は30~41となり、着果量が少ない区で葉果比が高く、多い区で葉果比が低い結果となった。果実重については、2か年とも葉果比が30であった12果/㎡区において小玉果の発生が多かったことから、適切な果実重を得るためには、34~35が必要と思われるが、今回の試験の値の範囲では糖度と葉果比に関係性はみられなかった。

「恵水」はえき花芽の着生が悪いため、1樹の着果数に占める1年生枝の着果数は非常に少なく、2年生以上の枝への着果が中心となることから、側枝の枝齢を考慮した葉果比の検討も必要である。また、本試験では、樹全体における葉果比を検討したが、樹冠占有面積が同程度の樹においても、側枝密度や側枝の枝齢別の配枝割合の違いによって、個々の側枝における葉果比は大きく異なることが考えられる。よって、葉果比については適切な側枝配置とともに今後の詳細な検討が必要である。

以上のように、「恵水」適正着果量は10果/㎡が優れることを明らかにした。なお、現地指導の際には、この基準をより生産者が理解しやすい数字に換算した「側枝1 mあたり6果、または3果そうに1果」という目安を利用することができる。

## 引用文献

平成29年度版茨城の園芸（2018）

<http://www.pref.ibaraki.jp/nourinsuisan/sansin/yasai/h29ibarakinouengei.html>（2018年10月23日閲覧）

茨城県（2016）茨城県果樹農業振興計画～いばらきのうまい果物づくりの推進と次世代につなぐ果樹産地の育成を目指して～

<http://www.pref.ibaraki.jp/soshiki/nourinsuisan/sansin/documents/kajukeikaku27.pdf>（2018年10月23日閲覧）

茨城県農業総合センター（2016）茨城県果樹栽培基準

池田隆政・田村文男・吉田亮（2008）「ゴールド二十世紀」果実の糖蓄積に及ぼす葉果比の影響.園学研. 7(2):215-221.

大友忠三（2000）適正着果. 果樹園芸大百科4 ナシ. pp135-138. 農文協. 東京.

尾形夏海・喜多晃一・郷内武・霞正一・佐久間文雄・石井亮二（2015）ニホンナシ新品種「恵水」の育成. 茨城農総生工研研報15: 53-58.

島田智人・浅野聖子・須賀昭雄・六本木和夫・酒井雄作（2013）ニホンナシ「彩玉」における高品質果実安定生産技術（第一報）. 埼玉農総研研報 12: 32-37.

高橋建夫・金子友昭・松永永一郎（1994）ニホンナシの着果条件と着果数が糖度に及ぼす影響. 栃木農研

報 42:1-8.

松永永一郎・金子友昭・坂本秀之（1976）ナシ幸水の高品質維持と鳥害防止に関する研究. 栃木農研報 21 :69-84.

### Summary

We examined optimum number of fruit setting in the new variety of Japanese Pear 'Keisui'. A number of fruit bearing was artificially regulated to 8, 10, or 12 fruits per one square meter in crown area of test trees. Many fruit setting (12 fruits / m<sup>2</sup>) showed the highest yield and lots of small fruits (under 400 g). Though fruit size and qualities in low fruit setting (8 fruits / m<sup>2</sup>) were equivalent to those in middle fruit setting, low fruit setting showed the lowest yield among these test plots. Therefore, we concluded that the optimum number of fruit setting on 'Keisui' was 10 fruits / m<sup>2</sup> in crown area of trees.

**keywords : japanese pear, 'Keisui' , yield, fruit quality**

# 茨城県におけるパン用コムギ認定品種‘ゆめかおり’の特性と普及状況

大越三登志・寺門ゆかり<sup>1)</sup>・遠藤千尋<sup>2)</sup>・檜村英一<sup>3)</sup>・狩野幹夫<sup>4)</sup>・

鈴木正明<sup>5)</sup>・飯田幸彦<sup>6)</sup>

(茨城県農業総合センター農業研究所)

## Characterization and Dissemination of ‘Yumekaori’, a Recognized Wheat Cultivar for Bread in Ibaraki Prefecture

Satoshi OKOSHI<sup>1</sup>, Yukari TERAKADO, Chihiro ENDO, Eiichi KASHIMURA,  
Mikio KANOU, Masaaki SUZUKI and Yukihiko IIDA

### 要約

長野県農事試験場(現長野県農業試験場)において育成されたコムギ品種‘ゆめかおり’は、‘農林61号’と比較して熟期が2日程度早く、収量性が同等～やや低く、タンパク質含量が1～2%高く、加えて、従来多くの国産コムギ品種より製パン適性が高い等の特性を持つ。このことから、認定品種として採用し、主に地産地消向けのパン用コムギとして普及を図っている。

キーワード：ゆめかおり，コムギ，パン，奨励品種

### 1 はじめに

国内で栽培されるコムギは日本めん用が中心で、日本めん原料に占める国産コムギのシェアは高いが、パン用や中華めん用品種の国産シェアは低い。これは、国内で栽培されるコムギ品種が、日本めん用に適したタンパク質含量が中程度の品種が主であり、パンや中華めんに適したタンパク質含量の高い品種は北海道の春播き品種等に限られていたことが原因の一つであった。しかし、近年、優れた特性を持つパン・中華めん用品種が育成されてきており、普及が進められているところである(農林水産省, 2012)。

一方、地産地消意識が広まる中で、地元産コムギを使用したパン製造はそのメニューの一つとして各地で取組まれており、茨城県においても、地元産の小麦を使用したパンを作りたいという要望は高まっていた。しかし、本県では製パン用途に適したコムギ奨励品種が無かったことから、本県での栽培に適し、製パン適性が優れた品種の選定を進めた結果、‘ゆめかおり’は‘農林61号’と比較して成熟期が2日程度早く、耐倒伏性が優れ、タンパク質含量が1～2%程度高く、製パン適性も、「1CW」との比較ではやや劣るものの、高い水準であった。また、育成地における試験では、コムギ縮萎病に対して抵抗性を示した。このため、2010年4月に認定品種として採用し、主に地産地消用途向けとして、県内全域の主に黒ボク土畑地圃場を対象として普及を図った結果、2017年播種では県内の作付面積は約80haとなっている(県農林水産部産地振興課調べ)。ここでは、‘ゆめかおり’の特性の概要、ならびに現状について報告する。

---

1) 現 県南農林事務所企画調整部門, 2) 現 営業戦略部販売流通課,  
3) 現 県西農林事務所経営・普及部門, 4) 元 農業総合センター専門技術指導員室,  
5) 元 農林水産部農産課, 6) 現 農業総合センター専門技術指導員室

1 Address : Agricultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3402 Kamikuniityo, Mito, Ibaraki 311-4203, Japan

## 2 来歴および育成地における特性評価

図1に‘ゆめかおり’の育成系譜を示した。‘ゆめかおり’は、早生、良質、硬質、高製パン適性を育種目標として、長野県農事試験場において1997年5月に早生、硬質、高製パン適性の‘西海180号(後の‘ニシノカオリ’)’を母，越冬性の優れた超強力コムギ系統の‘KS831957’を父として人工交配を行い，同年12月に，雑種第1代においてトウモロコシ法による半数体育種法を用い，直ちに固定系統を得て，以降，派生系統育種法により選抜された品種である(長野県農業試験場，2009)。2001年に‘東山系小271’の育成地番号が，2004年には‘東山42号’の地方番号が付与され，その後，2010年に‘ゆめかおり’として品種登録された。本県では2010年に認定品種として採用した。

育成地における特性評価では，叢生はやや匍匐であり，株の開閉はやや閉である。ふ色は淡黄であり，粒の色は赤褐，粒質は硝子質である。播性程度(一定期間低温にさらされないとき花芽分化せず出穂しない性質であり，この期間が短いもの(I)から長いもの(VII)の7段階に分類される)はIIである。コムギ縮萎縮病および赤さび病に強く，うどんこ病にやや強い。赤かび病への抵抗性はやや強である。穂発芽性はやや難で，耐凍上性は強である。

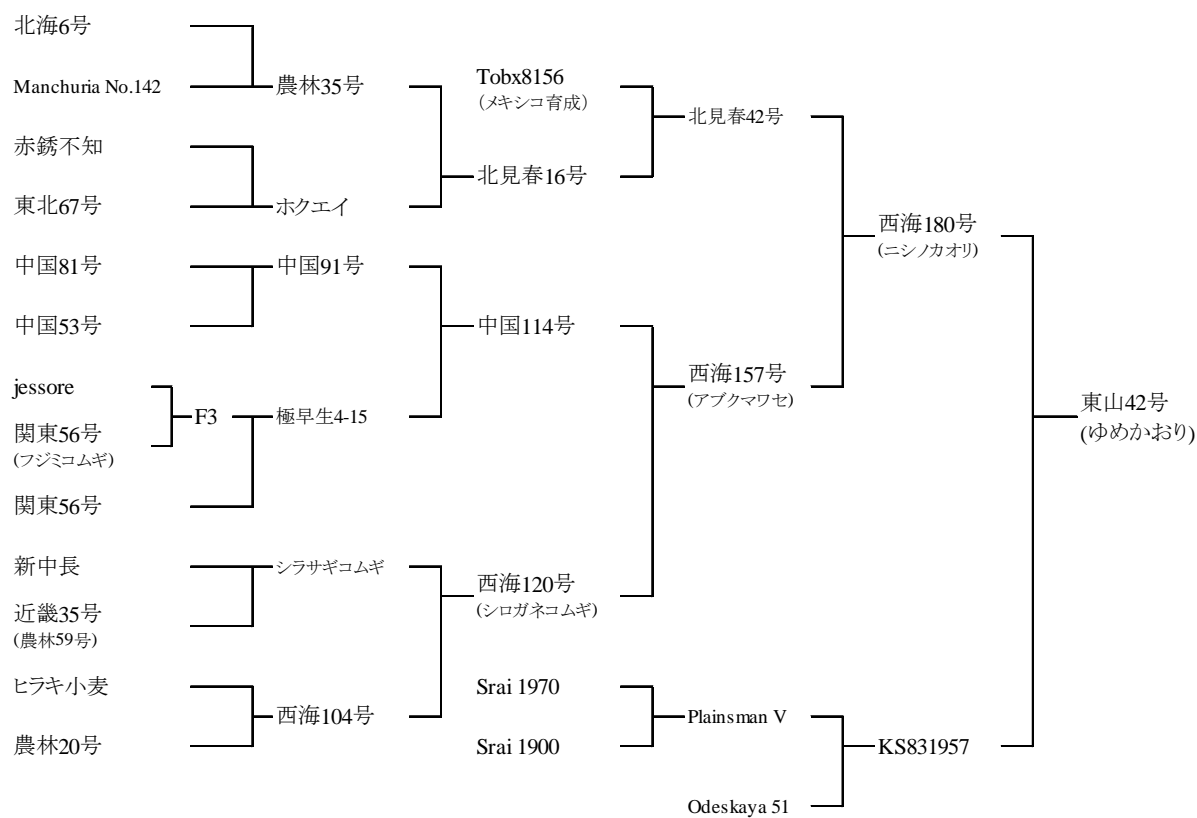


図1 ‘ゆめかおり’の育成系譜

## 3 材料および方法

### 3.1 試験年次および場所

奨励品種決定調査の試験年次(試験年次は播種年で示す)，圃場条件，場所および土壌型を表1に示す。

水戸市では2004年～2008年の5年間，龍ヶ崎市および筑西市では2008年に，対照品種を‘農林61号’として品種比較試験を実施した。また，水戸市では2006年に製パン用途向け品種‘ニシノカオリ’，‘ミナミノカオリ’，‘ユメシホウ’，‘ゆきちから’との製パン適性比較も行った。

表 1 試験場所、圃場条件、土壌型および試験年次

場所	圃場条件	土壌型	試験年次 <sup>1)</sup>				
			2004	2005	2006	2007	2008
水戸市(農業研究所本所圃場)	畑	表層腐植質黒ボク土	○	○	○	○	○
龍ヶ崎市(水田利用研究室圃場)	輪換畑	中粗粒灰色低地土	-	-	-	-	○
筑西市(現地圃場)	輪換畑	表層腐植質多湿黒ボク土	-	-	-	-	○

注 1)-:試験せず

### 3. 2 耕種概要

各試験場所の耕種概要は表 2 のとおりである。

播種期は 11 月上旬、播種量は 0.8kg/a、基肥窒素量は 0.6kg/a、播種は畦間 30cm ドリル播とした。龍ヶ崎では地力が低いことから基肥窒素量を 1.0kg/a とした。追肥は、水戸では 2006 年播種の製パン試験用栽培区のみ出穂期後 6~8 日に硫安で窒素量 0.4kg/a 施用し、龍ヶ崎では茎立期に硫安で窒素量 0.4kg/a 施用した。

表 2 耕種概要

試験場所	試験年次別の播種期(月.日) <sup>1)</sup>					基肥 <sup>2)</sup> 量(kg/a)			追肥 <sup>2)</sup> 時期	追肥 <sup>2)</sup> 窒素量(kg/a)	播種様式	播種量(kg/a)	試験区面積(m <sup>2</sup> )	区制
	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O						
水戸市	11.08	11.07	11.06	-	11.06	0.6	0.7	0.6	無追肥	0	畦間30cmドリル播	0.8	9.6	2
	-	-	-	11.09	11.06	0.8	1.0	0.8	無追肥	0				
龍ヶ崎市	-	-	11.10	-	-	0.6	0.7	0.6	出穂期後 6~8日	0.4	畦間30cmドリル播	0.8	360.0	1
	-	-	-	-	11.05	1.0	1.5	1.3	茎立期	0.4				
筑西市	-	-	-	-	11.17	0.6	0.7	0.6	-	-	畦間30cmドリル播	0.8	9.6	2

注 1)-:試験せず

2)基肥は播種溝施肥、追肥は全面散布

### 3. 3 生育・収量・品質調査

稈長および穂長は糊熟~黄熟期に各区生育中庸なサンプル 20 本を任意に抽出して測定し、穂数は畦長 50cm を任意の 2 ヲ所について測定したものを 1 m<sup>2</sup>当たり本数に換算した。収量は成熟期に各区試験区中央付近の 2.4 m<sup>2</sup>を刈り取り、1a 当たり子実重から換算した。容積重は収穫物 150g をブラウエル穀粒計により測定し、千粒重は子実 20.0g の粒数から換算した。タンパク質含量は近赤外線多成分分析装置による水分 13.5%換算値とした。収量・容積重・千粒重・タンパク質含量は、'農林 61 号' との比較ではとうみ選による粗子実サンプルの測定値とし、製パン用途向けコムギ品種間の比較では、2.4mm 目の篩いによる調製後のサンプルの測定値とした。倒伏程度は成熟期の達観調査により 0(無)~5(甚)の 6 段階評価を行った。また、検査等級の格付けについては、関東農政局茨城農政事務所(当時)に依頼した。

製パン適性評価試験は水戸・畑圃場の 2007 年産 'ゆめかおり', 'ニシノカオリ', 'ミナミノカオリ', 'ユメシホウ', 'ゆきちから' を用いて 2007 年に行った。対照として(独)農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所(現・国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構次世代作物開発研究センター。以下作物研究所)より提供を受けた「1CW」(カナダ産の高品質パン用小麦銘柄)を供試し、同研究所のビューラーテストミルによりそれぞれ歩留 60%で製粉した。60%粉のタンパク質含量は、元素分析装置で測定した窒素含量に蛋白係数 5.7 を乗じて算出し、水分 13.5%ベースに換算した。60%粉の灰分は 600℃燃焼灰化法により測定し、水分 13.5%ベースに換算した。得られた小麦粉を用いて、作物研究所の施設においてストレート法による食パンの製パン試験を行った。併せて、'ゆめかおり' と「1CW」については、一般社団法人日本パン技術研究所において 70%無糖中種 4 時間発酵法による食パンとしての評価を行った。

## 4 試験結果

### 4. 1 試験期間内の気象と県内のコムギの生育経過

試験期間内各年の気象（水戸地方気象台による）と農業研究所内(水戸)のコムギ‘農林61号’の生育経過概要および県内の10a当たり平均収量対比(10a当たり平均収量(過去7ヵ年のうち、最高及び最低を除いた5ヵ年の平均値)に対する当年産の10a当たり収量の比率。農林水産省による)は以下のとおりであった。

2004年：年内は気温が高く推移したことから麦類の生育はかなり進んでいたが、1月から気温が低く推移し、生育はやや緩慢となった。4月以降は降雨が少なく、気温が平年並～やや低く推移したことから登熟は良好となった。県内の10a当たり平均収量対比は97%であった。

2005年：12月～1月の低温・乾燥により生育は遅れた。2～3月は気温が平年並となり、2月には降雨も多かったため、その後の生育はやや回復したものの、6月は低温・多雨・寡照となり、登熟は不良となった。県内の10a当たり平均収量対比は65%であった。

2006年：播種～3月までの気温は平年を上回って推移したが、3月中～下旬には氷点下の低温となる日が数日続き、幼穂凍死が発生した。4月の気温は平年を下回ったが、出穂期は平年並～2日早く、成熟期は平年より1～3日早かった。5～6月の気温は平年並で、多照であったが、一穂粒数が少なかったことから、収量は平年を下回った。県内の10a当たり平均収量対比は85%であった。

2007年：1月中旬～2月下旬の低温により、生育は遅れたが、3月の高温で回復した。4～5月は順調に生育し、出穂期は平年より1～2日早かったが、5月下旬の台風の影響などにより、成熟期は2～4日遅かった。県内の10a当たり平均収量対比は83%であった。

2008年：気温はほぼ生育期間を通して平年並～高く推移し、生育は早まった。出穂期は平年より7日早く、成熟期は6日早かった。県内の10a当たり平均収量対比は94%であった。

### 4. 2 栽培特性

#### 4. 2. 1 ‘農林61号’との栽培特性比較

試験期間の出穂期の平均は水戸で4月27日、龍ヶ崎で4月11日、筑西で4月23日であり、‘農林61号’より1～2日早かった(表3)。成熟期は水戸で6月15日、龍ヶ崎で5月30日、筑西で6月6日であり、‘農林61号’より2～3日早かった。

稈長は水戸で103cm、龍ヶ崎で103cm、筑西で97cmであり、‘農林61号’より2～6cm長かったが、倒伏程度は水戸で0.8、龍ヶ崎で0.5、筑西で0.0と‘農林61号’より0.5～1.7小さく、耐倒伏性は優れた。穂長は水戸・龍ヶ崎・筑西とも7.7cmであり、‘農林61号’より0.9～1.2cm短かった。穂数は水戸で853本/m<sup>2</sup>、龍ヶ崎で597本/m<sup>2</sup>、筑西で662本/m<sup>2</sup>であり、‘農林61号’と比較して龍ヶ崎では23本/m<sup>2</sup>少なかったが、水戸・筑西では95～110本/m<sup>2</sup>多かった。

収量は水戸で‘農林61号’対比112%の59.6kg/a、龍ヶ崎で80%の51.5kg/a、筑西で89%の41.7kg/aであり、収量性は同等～やや低かった。容積重は水戸で836g/L、龍ヶ崎で855g/L、筑西で846g/Lであり、‘農林61号’より16～48g/L重かった。千粒重は水戸で41.2g、龍ヶ崎で42.2g、筑西で37.5gであり、‘農林61号’より0.7～6.4g重かった。タンパク質含量は水戸で13.0%、龍ヶ崎で9.1%、筑西で10.8%であり、‘農林61号’より1.2～1.9%高かった。検査等級は全ての地点・年度で1等であり、1等～規格外の‘農林61号’より優れた。また、育成地での検定では赤かび病抵抗性はやや強であるが、本県での奨励品種決定調査試験においては中程度の発病が見られた(データ略)。

表3 ‘ゆめかおり’の生育・収量・品質

試験場所	品種・系統名	試験年次	出	成	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m <sup>2</sup> )	倒伏 <sup>1)</sup> 程度 (0-5)	収量 (kg/a)	対標準比 (%)	容積重 (g/l)	千粒重 (g)	タンパク質 <sup>2)</sup> 含量 (%)	検査等級 <sup>3)</sup>
			穂期 (月・日)	熟期 (月・日)										
水戸	ゆめかおり	2004	5.01	6.16	107	7.0	932	0.0	56.3	95	848	41.8	10.0	1
		2005	5.06	6.21	96	8.6	903	3.5	47.8	107	800	38.2	14.8	1
		2006	4.26	6.12	102	8.0	917	0.0	71.8	148	848	44.7	13.5	1
		2007	4.26	6.16	106	7.4	848	0.5	56.6	99	834	39.5	13.4	1
		2008	4.17	6.11	104	7.6	665	0.0	65.7	112	852	41.9	13.1	1
	平均	4.27	6.15	103	7.7	853	0.8	59.6	112	836	41.2	13.0	-	
	(標)農林61号	2004	5.01	6.17	97	8.1	673	3.0	59.5	100	835	41.5	8.4	1
		2005	5.06	6.23	88	10.0	800	4.3	44.9	100	782	31.6	13.4	外
		2006	4.28	6.16	101	8.6	745	3.0	48.6	100	829	34.8	11.9	外
		2007	4.29	6.20	102	9.0	822	1.8	56.9	100	821	33.2	11.3	2
2008		4.18	6.12	99	8.9	750	0.5	58.6	100	832	33.1	12.8	2	
平均	4.28	6.17	97	8.9	758	2.5	53.7	100	820	34.8	11.6	-		
龍ヶ崎	ゆめかおり	2008	4.11	5.30	103	7.7	597	0.5	51.5	80	855	42.2	9.1	1
	(標)農林61号	2008	4.13	6.02	98	8.6	620	1.5	64.4	100	807	36.5	7.2	1
筑西	ゆめかおり	2008	4.23	6.06	97	7.7	662	0.0	41.7	89	846	37.5	10.8	1
	(標)農林61号	2008	4.24	6.09	95	8.8	552	0.5	47.0	100	824	36.8	9.6	1

注 1)0(無)～5(甚) 2)近赤外線多成分分析機による(水分13.5%換算値)

3)1(1等), 2(2等), 外(規格外)

#### 4. 2. 2 製パン用途向けコムギ品種間の栽培特性比較

‘ゆめかおり’の出穂期は4月26日であり、‘ゆきちから’より2日早く、その他の品種より1~2日遅かった。成熟期は6月11日であり、‘ゆきちから’より3日早く、その他の品種とほぼ同等であった(表4)。

‘ゆめかおり’の稈長は96cmで他品種より7~16cm長かったが、倒伏は全ての品種で見られなかった。穂長は8.3cmで‘ゆきちから’より1.5cm短く、その他の品種より0.3~1cm長かった。穂数は462本/m<sup>2</sup>で‘ニシノカオリ’より34本少なく、その他の品種より18~58本多かった。

‘ゆめかおり’の収量は55.0kg/aであり、‘ミナミノカオリ’より0.6kg/a低収だったが、その他の品種より2.4~3.9kg/a多収だった。容積重は870g/Lで‘ユメシホウ’と同等、その他の品種より19~8g/L重く、千粒重は51.3gで他の品種より6.4~8.8g重かった。タンパク質含量は13.6%で他の品種より0.6~1.6%高かった。検査等級は1等であり、その他の品種は‘ミナミノカオリ’が2等であった他は全て1等であった。

表4 ‘ゆめかおり’ および製パン用途向けコムギ各品種の生育・収量・品質(2006年)

試験場所	品種・系統名	出穂期 (月・日)	成熟期 (月・日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m <sup>2</sup> )	倒伏程度 (0-5)	収量 (kg/a)	対標準左比 (%)	容積重 (g/l)	千粒重 (g)	タンパク質含量 (%)	検査等級 (等)
水戸	ゆめかおり	4.26	6.11	96	8.3	462	0.0	55.0	105	870	51.3	13.6	1
	ミナミノカオリ	4.25	6.11	85	7.8	444	0.0	55.6	106	851	44.5	12.2	2
	ユメシホウ	4.24	6.10	80	8.0	404	0.0	51.1	97	870	43.1	12.0	1
	ゆきちから	4.28	6.14	89	9.8	404	0.0	52.6	100	855	42.5	12.2	1
	(標)ニシノカオリ	4.24	6.10	89	7.3	496	0.0	52.5	100	862	44.9	13.0	1

注)表3に同じ

#### 4. 3 製パン適性

##### 4. 3. 1 製粉試験

‘ゆめかおり’の60%粉のタンパク質含量は13.0%で、「1CW」とほぼ同等であり、その他の品種より高かった(表5)。灰分は0.45%であり、「ユメシホウ」, ‘ニシノカオリ’と並んで最も低かった。バロリメーターバリュー(VV)は73.5であり、最も高かった。

表5 ‘ゆめかおり’ および製パン用途向けコムギ各品種・銘柄の60%粉の分析結果

品種・銘柄	60%粉 タンパク 質含量 (%)	60%粉 灰分 <sup>1)</sup> (%)	VV <sup>2)</sup>
ゆめかおり	13.0	0.45	73.5
ミナミノカオリ	11.1	0.49	50.8
ユメシホウ	11.0	0.45	50.5
ゆきちから	11.9	0.48	51.6
ニシノカオリ	12.5	0.45	45.9
(標)1CW	12.7	0.55	67.9

注 1)小麦粉の色に影響し、低いほうが色が明るい

2)生地物性の総合評価を表し、一般的に高いほうが良い

##### 4. 3. 2 製パン用途向けコムギ品種・銘柄間の製パン適性比較

‘ゆめかおり’の比容積は6.3cc/gで、「1CW」よりやや小さかったがその他の品種より大きかった(表6)。外観および内相の官能評価では、「1CW」と比較して各項目とも同等～やや劣り、総合評価でやや劣ったが、その他の品種との比較では優れた。



表6 ‘ゆめかおり’ および製パン用途向けコムギ各品種・銘柄の製パン適性試験結果

品種・銘柄	比容積 (cc/g)	官能評価									
		外観				内相					合計
		表皮色 (10)	形均整 (5)	表皮質 (5)	体積 (30)	す立ち (10)	色相 (5)	触感 (5)	香り (15)	味 (15)	
ゆめかおり	6.3	7.0	3.5	3.5	22.0	8.0	3.5	4.0	11.0	9.0	71.5
ミナミノカオリ	5.6	7.0	3.0	3.0	19.5	6.0	3.5	3.5	12.0	8.0	65.5
ユメシホウ	5.1	8.0	2.5	2.5	18.0	5.0	2.0	3.0	11.0	10.0	62.0
ゆきちから	5.3	8.0	2.5	3.0	19.0	5.5	3.5	3.0	11.0	9.0	64.5
ニシノカオリ	4.7	8.0	1.5	2.5	16.5	4.0	3.0	2.5	10.0	7.0	55.0
(標)1CW	6.5	8.0	4.0	4.0	24.0	8.0	4.0	4.0	12.0	12.0	80.0

#### 4. 3. 3 (一社)日本パン技術研究所による製パン適性評価

比容積は‘ゆめかおり’が5.5cc/g, 「1CW」が5.8cc/gで‘ゆめかおり’が小さく, パンのボリュームがやや劣った(表7, 図2)。外観および内相の官能評価では, 「1CW」と比較して食感がやや優れたが, 他の項目は同等～やや劣り, 総合的な評価としてはやや劣った。

表7 ‘ゆめかおり’の製パン適性試験結果((一社)日本パン技術研究所による)

品種・銘柄	比容積 (cc/g)	官能評価										
		外観				内相					合計	
		表皮色 (10)	形均整 (5)	表皮質 (5)	体積 (10)	す立ち (10)	色相 (10)	触感 (15)	香り (10)	食感 (15)		味 (10)
ゆめかおり	5.5	7.5	3.8	4.0	7.5	6.8	7.0	11.0	7.8	13.0	7.5	75.9
(標)1CW	5.8	8.0	4.0	4.0	8.0	8.0	8.0	12.0	8.0	12.0	8.0	80.0

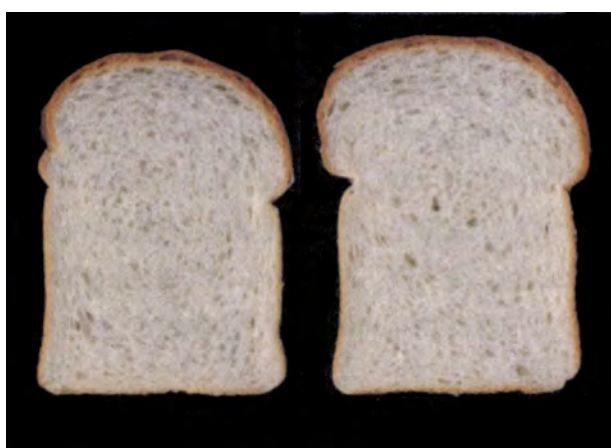


図2 製造した食パンの外観(左:ゆめかおり, 右:1CW)

## 5 考察

本県の奨励品種決定調査では, これまで‘ニシノカオリ’, ‘ミナミノカオリ’, ‘ゆきちから’, ‘ユメシホウ’等の製パン用途向けの品種を供試してきたが, 栽培特性や製パン適性に不十分な点があり, 採用には至らなかった。また, これらの品種の中には一部の生産者によって小面積の栽培が行われていたものも

あるが、産地品種銘柄に設定されておらず経営上不利な品種がほとんどであったこともあり、栽培面積は拡大しなかった。‘ゆめかおり’は、それらの品種と比較して製パン適性が優れており、栽培性も同等以上であり、産地品種銘柄にも設定された(‘ユメシホウ’も産地品種銘柄設定されている)ため、生産の拡大が期待される。‘ゆめかおり’は、当面は主に地産地消用途向けとして、県内全域の主に黒ボク土畑地圃場を対象として普及を図ることとした。

‘ゆめかおり’の県内の栽培面積は2010年の認定品種採用後漸増し、2017年播種では約80haとなっている。県内各所で栽培されており、地産地消用途での小規模生産が多いが、坂東地域では生産者が研究会組織を立ち上げて、普及センター・研究所と連携して生育量に応じた追肥等により高品質な‘ゆめかおり’栽培に取り組んでいる。同研究会では、ある程度まとまった規模の生産量があることから、規模の大きい製粉業者との契約栽培も行われており、粉製品は製粉業者と協働して売り込みを行っている。

県内で生産された‘ゆめかおり’を使用したパン・麺は、県内外の小売店で販売されており、一部市町村の学校給食にも供されている。

‘ゆめかおり’の特性に基づく栽培上の留意点は下記のとおりである。

(a) 高い製パン適性を確保するために、タンパク質含量の向上に努める必要がある。そのためにはタンパク質含量を確保しやすい黒ボク土圃場で作付し、タンパク質含量の向上に効果が大きい出穂期頃に適量の追肥を行う。

(b) ‘農林61号’より耐倒伏性が優れるが、極端に多量な基肥や、茎立期以前の多量の追肥では過繁茂による倒伏の可能性があるため、地力や生育に応じて基肥量、追肥量を調節する。

(c) 赤かび病抵抗性は中程度であるため、適期防除を必ず行う。

## 謝辞

本品種の選定にあたり、現地圃場を提供していただいた堀江正一氏、試験サンプルの提供および製粉・製パン試験でご協力いただいた作物研究所小麦育種グループ(当時)の各位にはここに謹んで謝意を表す。

## 摘要

コムギ‘ゆめかおり’は、‘農林61号’と比較して熟期が2日程度早く、収量性が同等～やや低く、タンパク質含量が1～2%高く、加えて、従来の多くの国産コムギ品種より製パン適性が高い等の特性を持つ。このことから、2010年に認定品種として採用し、主に地産地消向けのパン用コムギとして普及を図っている。‘ゆめかおり’の県内の栽培面積は2017年播種では約80haとなっている。県内で生産された‘ゆめかおり’を使用したパン・麺は、県内外の小売店で販売されており、一部市町村の学校給食にも供されている。

## 引用文献

長野県農業試験場作物部・育種部、農業技術課(2009)「ゆめかおり(東山42号)」は製パン性に優れ、諸病害に強い硬質小麦である。平成21年度普及に移す農業技術  
農林水産省(2012)平成23年度食料・農業・農村白書

## Summary

A wheat cultivar ‘Yumekaori’ which developed at Nagano agricultural experiment station shows characteristics compared with ‘Norin 61’ as below: approximately 2 day faster maturing; equal or slightly lower yield; higher grain protein content. And it is suitable as an ingredient of breads more than most of the other domestic wheat cultivars. So we adopted it as a Recognized cultivar and disseminating as a wheat cultivar for bread to apply local consumption of what is produced locally

**Keywords : Yumekaori, wheat, breads, recommended cultivar**

# 茨城県における麦茶用六条オオムギ準奨励品種 ‘カシマゴール’ の 特性と普及状況

大越三登志・寺門ゆかり<sup>1)</sup>・遠藤千尋<sup>2)</sup>・樫村英一<sup>3)</sup>・狩野幹夫<sup>4)</sup>・鈴木正明<sup>5)</sup>・飯田幸彦<sup>6)</sup>  
(茨城県農業総合センター農業研究所)

## Characterization and Dissemination of ‘Kashima Goal’, a Semi Recommended Six-rowed Barley Cultivar for Roasted Barley Tea in Ibaraki Prefecture

Satoshi OKOSHI<sup>1)</sup>, Yukari TERAKADO, Chihiro ENDO, Eiichi KASHIMURA,  
Mikio KANO, Masaaki SUZUKI and Yukihiro IIDA

### 要約

(独)農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所において育成された‘カシマゴール’は、麦茶用六条オオムギの主力品種‘カシマムギ’と比較して成熟期に稈が折損しにくく、収量も同等～やや多い等の優れた特性を持ち、麦茶適性はやや劣～同等である。また、育成地によればオオムギ縞萎縮病Ⅰ～Ⅲ型に対して抵抗性を示す。このため、準奨励品種として採用し、‘カシマムギ’を補完する麦茶用六条オオムギとして普及を図っている。

キーワード：カシマゴール，六条オオムギ，麦茶，奨励品種

### 1 はじめに

1971年度に茨城県において導入された六条オオムギ品種‘カシマムギ’は、麦茶加工適性が高く、実需者から品質面で高い評価を受けていることから長く作付けが続けられている。しかし、オオムギ縞萎縮病に罹病性で収量への影響が大きく(渡辺ら, 1995)、また、稈の折損が発生しやすく収穫時にロスが多いという栽培面での難点がある。

1980年代にはオオムギ縞萎縮病の発生面積が拡大し、‘カシマムギ’の作付面積が減少したため(図1)、1990年度にはオオムギ縞萎縮病に強い‘マサカドムギ’を準奨励品種に採用した(三田村ら, 1991)。その後、転作の強化により‘カシマムギ’、‘マサカドムギ’とも作付面積が増加し、また、オオムギ縞萎縮ウイルスに汚染されていない新規圃場での作付が増えたことや、1995年にオオムギ縞萎縮病にやや強い二条大麦‘ミカモゴールデン’が採用されたこともありオオムギ縞萎縮病発生面積も減少した。しかし、‘マサカドムギ’は麦茶適性の面で実需者の評価が得られなかったため作付面積が減少し、2006年当時‘カシマムギ’が依然として県内の六条オオムギの主力品種であった。このため、オオムギ縞萎縮病発生面積は再び増加し、県内の六条大麦の収量が低下しつつある中、栽培性が優れ、安定した収量

---

1) 現 県南農林事務所企画調整部門, 2) 現 営業戦略部販売流通課,  
3) 現 県西農林事務所経営・普及部門, 4) 元 農業総合センター専門技術指導員室,  
5) 元 農林水産部農産課, 6) 現 農業総合センター専門技術指導員室

1 Address : Agricultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3402 Kamikuniityo, Mito, Ibaraki 311-4203, Japan

が見込める品種の導入が求められていた。

そこで‘カシマムギ’を補完する品種の選定を進めた結果、‘カシマゴール’は‘カシマムギ’と比較して成熟期は同等の早生で、稈が折損しにくいなど優れた栽培特性を持ち、また、麦茶品質・加工適性はやや劣～同等であった。また、育成地における試験では、オオムギ縞萎縮病に対して抵抗性を有していた。これらのことから、‘カシマムギ’を補完する品種として、県内各地のオオムギ縞萎縮病による被害圃場での作付けを図るため、2010年4月に‘カシマゴール’を準奨励品種として採用したところ、2016年播種では県内の作付面積は約1,200haと推定される。ここでは、‘カシマゴール’の特性の概要、ならびに現状について報告する。

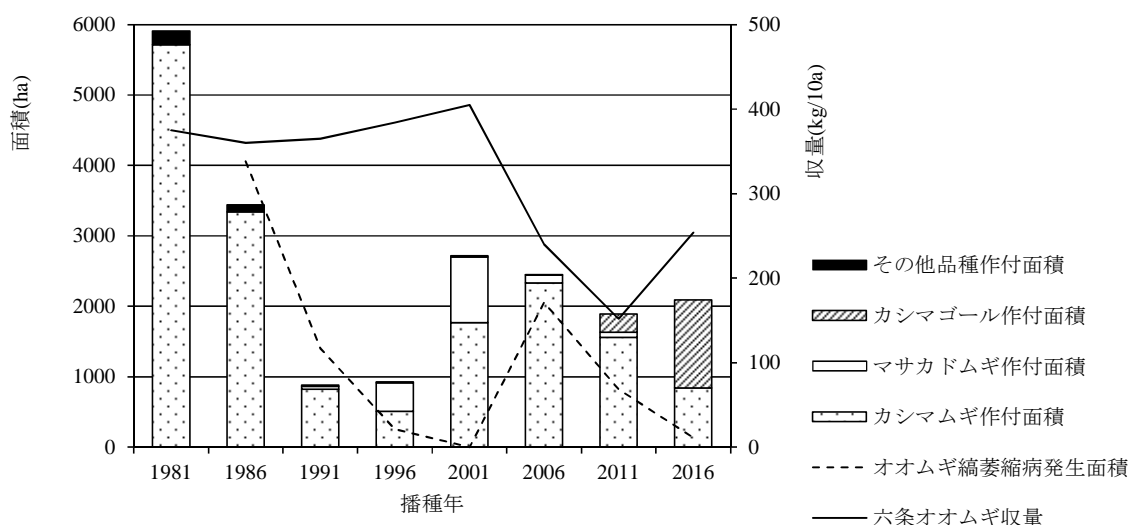


図1 県内での六条大麦の作付面積<sup>1)</sup>・収量<sup>2)</sup>とオオムギ縞萎縮病発生面積<sup>3)</sup>の推移

注 1)作付面積は農林水産省作物統計調査による六条オオムギ作付面積に、各年の品種ごとの販売予定数量から算出した品種構成比率を乗じて推定した。  
 2)六条オオムギ収量は農林水産省作物統計調査による。  
 3)オオムギ縞萎縮病発生面積は六条オオムギと二条オオムギの計。1981年はデータなし。(茨城県農業総合センター病害虫防除部調べ)

## 2 来歴および育成地における特性評価

図2に‘カシマゴール’の育成系譜を示した。‘カシマゴール’は、農業研究センター(現・国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構次世代作物開発研究センター)において1998年4月に、「関東皮78号(後の‘さやかぜ’)を母、‘関東裸77号’を父として人工交配を行い、系統育種法により選抜された品種である(塔野岡ら, 2014)。2004年度に‘関係b523’、2006年度に‘関東皮86号’の系統名が付された後、2012年に‘カシマゴール’として品種登録された。茨城県では、2010年4月に準奨励品種として採用した。

育成地における特性評価では、播性程度(一定期間低温にさらされないと花芽分化せず出穂しない性質であり、この期間が短いもの(I)から長いもの(VII)の7段階に分類される)はIである。オオムギ縞萎縮ウイルスI型～III型に抵抗性を示し、うどんこ病に強く、赤かび病抵抗性はやや弱、穂発芽性は極難である。

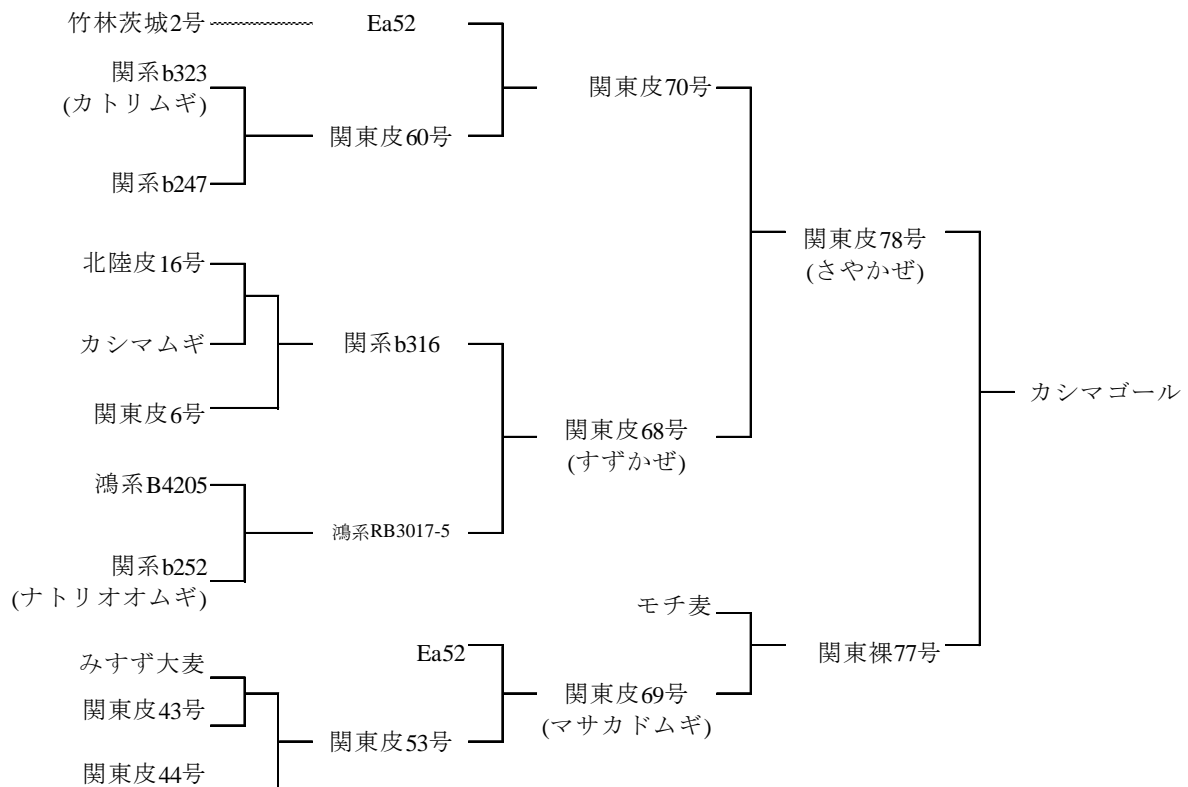


図2 ‘カシマゴール’の育成系譜

### 3 材料および方法

#### 3.1 試験年次および場所

奨励品種決定調査の試験年次(試験年次は播種年で示す), 場所および土壌型を表1に示す。

水戸市では2006年~2008年の3年間, 龍ヶ崎市および筑西市では2008年に, 対照品種を‘カシマムギ’として品種比較試験を実施した。

表1 試験場所, 圃場条件, 土壌型および試験年次

場所	圃場条件	土壌型	試験年次 <sup>1)</sup>		
			2006	2007	2008
水戸市(農業研究所本所圃場)	畑	表層腐植質黒ボク土	○	○	○
龍ヶ崎市(水田利用研究室圃場)	輪換畑	中粗粒灰色低地土	-	-	○
筑西市(現地圃場)	輪換畑	表層腐植質多湿黒ボク土	-	-	○

注 1) - : 試験せず

#### 3.2 耕種概要

各試験場所における耕種概要は表2のとおりである。

播種期は水戸市と龍ヶ崎市では11月上旬, 筑西市では11月中旬とした。播種量は0.8kg/a, 基肥窒素量は0.6kg/a, 播種は畦間30cmドリル播とした。龍ヶ崎では地力が低いことから基肥窒素量を0.8kg/aとし, 茎立期に硫酸で窒素量0.4kg/aの追肥を施用した。

表2 耕種概要

試験 場所	試験年次別の播種期(月・日) <sup>1)</sup>			基肥 <sup>2)</sup> 量(kg/a)			追肥 時期	追肥 <sup>2)</sup> 窒素量 (kg/a)	播種様式	播種量 (kg/a)	試験区 面積(m <sup>2</sup> )	区 制
	2006年	2007年	2008年	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O						
水戸市	11.06	11.09	11.06	0.6	0.7	0.6	無追肥	0	畦間30cmドリル播	0.8	9.6	2
龍ヶ崎市	-	-	11.05	0.8	1.2	1.1	茎立期	0.4	畦間30cmドリル播	0.8	12.0	2
筑西市	-	-	11.17	0.6	0.7	0.6	無追肥	0	畦間30cmドリル播	0.8	9.6	2

注 1)-: 試験せず

2)基肥は播種溝施肥, 追肥は全面散布

### 3. 3 生育・収量・品質調査

稈長および穂長は、糊熟～黄熟期に各区から生育中庸なサンプル 20 本を任意に抽出して測定し、穂数は畦長 50cm を任意の 2 ヲ所について測定したものを 1 m<sup>2</sup>当たり本数に換算した。収量は成熟期に各区試験区中央付近の 2.4 m<sup>2</sup>を刈り取り、1a 当たり子実重から換算した。容積重は収穫物 150g をブラウエル穀粒計により測定し、千粒重は子実 20.0g の粒数から換算した。タンパク質含量は近赤外線多成分分析装置による水分 13.5%換算値とした。なお、収量、容積重、千粒重およびタンパク質含量の測定は、とうみ選による粗子実を用いた。整粒歩合は、2.2mm 目の篩いによる値とした。倒伏程度は成熟期の達観調査により 0(無)～5(甚)の 6 段階評価を行った。成熟期前後に見られる稈の折損も倒伏に含めた。また、検査等級の格付けについては、関東農政局茨城農政事務所(当時)に依頼した。

麦茶品質評価は、関東地域麦新品種等品質評価協議会大麦研究会において、(独)農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所(現・国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構次世代作物開発研究センター。以下作物研究所)、(株)常陸屋本舗(以下 H 社)および(株)アルトス(以下 A 社)による小規模焙煎試験を実施した他、H 社筑波工場における工場規模焙煎試験を実施し、加工適性評価および麦茶液の官能評価を得た。小規模焙煎試験には農業研究所(水戸)内圃場での 2006 年および 2007 年播種の奨励品種決定調査で得られた‘カシマゴール’を供試し、比較対照品種は同一圃場で栽培した‘カシマムギ’とした。2006 年播種分については、作物研究所のみによる評価とした。焙煎方式は、作物研究所が遠赤外焙煎、H 社が半熱風焙煎、A 社が直火焙煎であり、‘カシマムギ’を標準として加工適性の評価、麦茶粒の官能評価、麦茶液の官能評価を得た。H 社工場における工場規模焙煎試験には、農業研究所(水戸)内圃場での 2008 年播種の‘カシマゴール’を供試した。焙煎は熱風式焙煎機により、焙煎条件は同工場の通常の焙煎方法とした。得られた麦茶粒は、粒麦煮出しおよび割砕麦冷水抽出の麦茶としてパネラーにより官能評価を得た。

## 4 試験結果

### 4. 1 試験期間内の気象と県内の六条オオムギの生育経過

試験期間内各年の気象(水戸地方気象台による)と農業研究所内(水戸)の六条オオムギ‘カシマムギ’の生育経過概要および県内の 10a 当たり平均収量対比(10a 当たり平均収量(過去 7 年のうち、最高及び最低を除いた 5 年の平均値)に対する当年産の 10a 当たり収量の比率。農林水産省による)は以下のとおりであった。

2006 年: 出芽後は平年並の気温となり、以降も平年並～やや高い気温で推移したため、生育は旺盛となり、出穂期、成熟期は平年より早かった。凍霜害により遅れ穂が多発するものがあった。県内の 10a 当たり平均収量対比は 74%であった。

2007 年: 気温は 1 月から 2 月にかけて平年を下回ったが 3 月は平年並～やや高かった。その後、5 月以降はやや低く推移した。1 月末までの生育は緩慢であったが、その後は順調に生育し、出穂期、成熟期は平年よりやや早かった。5 月 19 日から 20 日にかけての台風により、試験区によっては強度の倒伏が発生した。県内の 10a 当たり平均収量対比は 88%であった。

2008 年: 気温はほぼ生育期間を通して平年並～高く推移した。草丈は生育期間を通して平年を上回り、最高

分けつ期も平年より早くなった。出穂期，成熟期とも平年より早かった。県内の10a当たり平均収量対比は78%であった。

#### 4. 2 栽培特性

試験期間の出穂期の平均は水戸で4月13日，龍ヶ崎で3月30日，筑西で4月14日であり，‘カシマムギ’より1～3日早かった(表3)。成熟期は水戸で5月28日，龍ヶ崎で5月14日，筑西で5月25日であり，‘カシマムギ’とほぼ同等の早生であった。

稈長は水戸で90cm，龍ヶ崎で89cm，筑西で98cmであり，‘カシマムギ’と同等～やや長い，稈の折損が少ないため，倒伏程度は水戸で0.0，龍ヶ崎で0.5，筑西で0.0と‘カシマムギ’と同等～0.8小さく，耐倒伏性は優れた。穂長は水戸で4.1cm，龍ヶ崎および筑西では4.2cmであり，‘カシマムギ’とほぼ同等であった。穂数は水戸で742本/m<sup>2</sup>，龍ヶ崎で563本/m<sup>2</sup>，筑西で430本/m<sup>2</sup>であり，‘カシマムギ’と比較して水戸および龍ヶ崎では37～83本/m<sup>2</sup>多く，筑西では72本/m<sup>2</sup>少なかった。

収量は水戸で‘カシマムギ’対比で106%の66.0kg/a，龍ヶ崎で104%の63.4kg/a，筑西で126%の45.8kg/aであり，収量性は同等～やや高かった。容積重は水戸で713g/L，龍ヶ崎で744g/L，筑西で685g/Lであり，‘カシマムギ’より11～37g/L重かった。千粒重は水戸で29.2g，龍ヶ崎で28.9g，筑西で27.6gであり，‘カシマムギ’と同等～1.5g軽い小粒であった。粗タンパク質含量は水戸で11.2%，龍ヶ崎で8.0%，筑西で8.9%であり，‘カシマムギ’と同等～0.7%低かった。検査等級は1等～規格外までばらつきがあり，1等～2等である‘カシマムギ’よりやや劣った。

表3 ‘カシマゴール’の生育・収量・品質

試験場所	品種・系統名	試験年次	出穂	成熟	稈長	穂長	穂数	倒伏程度 <sup>1)</sup>	収量	対標準比	容積重	千粒重	整粒歩合	タンパク質含量	検査等級 <sup>2)</sup>
			(月・日)	(月・日)	(cm)	(cm)	(本/m <sup>2</sup> )	(0-5)	(kg/a)	(%)	(g/l)	(g)	(%)	(%)	
水戸	カシマゴール	2006	4.13	5.26	87	4.1	800	0.0	64.9	103	715	27.8	80.3	10.5	2
		2007	4.16	5.31	89	4.3	710	0.0	67.1	107	721	29.9	83.3	11.9	1
		2008	4.12	5.28	93	4.0	717	0.0	66.2	108	704	29.9	94.0	11.2	2
		平均	4.13	5.28	90	4.1	742	0.0	66.0	106	713	29.2	85.9	11.2	-
	(標)カシマムギ	2006	4.14	5.25	89	4.1	700	0.0	63.0	100	714	29.3	86.7	9.7	1
2007		4.17	5.31	85	4.1	733	0.0	62.4	100	712	32.6	88.2	11.9	1	
2008		4.14	5.28	90	4.4	683	2.5	61.1	100	680	28.7	89.0	12.0	1	
平均		4.15	5.28	88	4.2	705	0.8	62.1	100	702	30.2	87.9	11.2	-	
龍ヶ崎	カシマゴール	2008	3.30	5.14	89	4.2	563	0.5	63.4	104	744	28.9	88.0	8.0	1
	(標)カシマムギ	2008	4.02	5.14	88	4.3	480	0.8	60.7	100	707	30.4	91.0	7.9	1
筑西	カシマゴール	2008	4.14	5.25	98	4.2	430	0.0	45.8	126	685	27.6	91.0	8.9	外
	(標)カシマムギ	2008	4.15	5.23	87	4.3	502	0.0	36.3	100	659	27.6	90.0	9.6	2

注 1)0(無)～5(甚)，倒伏には稈の折損を含む(2008年水戸のカシマムギの値は稈の折損の程度である)

2)I(1等)，2(2等)，外(規格外)

#### 4. 3 品質特性

小規模焙煎試験での麦茶加工適性および官能評価は，味や香りで評価にややばらつきがあるが，概ね‘カシマムギ’と比較してやや劣～同等であった(表4)。

また，工場規模焙煎試験では，加工適性は概ね良好である(データ略)。麦茶液の官能評価においては，水色はカシマムギと同程度～やや濃い目の傾向であり，香味は，香りや風味がやや少ない評価結果も一部で確認されたが，概ねカシマムギと同等であった。

表4 ‘カシマゴール’の麦茶適性<sup>1)</sup>

試験年次	試験場所	加工適性	麦茶粒の形状	麦茶粒の外観	麦茶液の香り	麦茶の味	官能評価	総合評価 <sup>2)</sup>
2006	(独)作物研究所	0.0	1.0	0.0	0.2	0.2	0.3	-
2007	H社	0.0	0.0	0.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
	A社	0.0	-0.1	0.0	-0.3	-0.5	-0.4	-0.1
	(独)作物研究所	0.0	0.0	0.0	0.1	-0.7	-0.6	-

注 1) ‘カシマムギ’を標準(0)とした相対評価 +3(極良)～-3(極劣)

2) - : 評価せず

## 5 考察

‘カシマゴール’は、‘カシマムギ’と比較して、成熟期は同等の早生であり、稈が折損しにくく、収量も同等～やや多い等の優れた特性を持ち、麦茶適性はやや劣～同等である。また、育成地による試験や、オオムギ縞萎縮病が発生している本県の現地圃場における達観調査により、‘カシマゴール’がオオムギ縞萎縮病に抵抗性であることが確認されている。渡辺ら(1995)によれば、オオムギ縞萎縮病発生圃場へ同病抵抗性品種を付付けたり、コムギへの麦種転換を行ったりすることで、その跡地での同病の発病軽減効果が期待できるとされており、‘カシマゴール’やコムギへの転換により、ウイルスに汚染された圃場でも数年後に‘カシマムギ’の経済的な栽培が可能になることが期待される。実需者からは、麦茶品質がより高い‘カシマムギ’の継続生産が求められており、‘カシマゴール’は、‘カシマムギ’を補完する品種として、‘カシマムギ’の栽培が困難な、オオムギ縞萎縮病ウイルスに汚染された圃場を中心に普及を図っている。

‘カシマゴール’の県内の作付面積は2010年の準奨励品種採用後、安定生産を求める生産者・実需者から一定の評価を得て2012年播種には約900haに増加し、県内の六条オオムギ作付面積の約50%を占めた。実需者からは‘カシマムギ’の増産やより加工適性の高い品種の採用を要望する声もあるが、栽培性の高さからその後も‘カシマゴール’の作付面積はやや増加し、2016年播種では約1,200ha、六条オオムギ全体に対する面積割合は約60%となっている(図1)。

‘カシマゴール’の特性に基づく栽培上の留意点は下記のとおりである。

- ‘カシマゴール’より粒がやや小さく、タンパク質含量も同等～やや低いため、出穂期に追肥を行い、粒大の確保及びタンパク質含量の向上による収量および検査等級の向上並びに麦茶品質の向上に努める。
- ‘カシマムギ’より葉色が薄い特徴があるので、葉色から生育量を判断する時には注意し、追肥量が過剰とならないようにする。
- 赤かび病に対する抵抗性は‘カシマムギ’と同等であるので、適期防除を必ず行う。
- 麦類萎縮病には罹病するので、激発地での栽培は避ける。

## 謝辞

本品種の選定にあたり、現地試験にご協力いただいた堀江正一氏並びに麦茶品質評価試験でご協力いただいた作物研究所大麦研究関東サブチーム(当時)、実需者各位に謝意を表す。

## 摘要

麦茶用六条オオムギ‘カシマゴール’は主力品種‘カシマムギ’と比較して成熟期に稈が折損しにくく、収量も同等～やや多い等の優れた特性を持ち、麦茶適性はやや劣～同等である。また、育成地によればオオムギ縞萎縮病Ⅰ～Ⅲ型に強いため、2010年に準奨励品種として採用した。‘カシマゴール’の県内の作付面積は2016年播種では約1,200ha、六条オオムギ全体に対する面積割合は約60%となっている。



## 引用文献

- 三田村剛・鯉渕幸治・中川悦男・石原正敏(1991)皮麦準奨励品種「マサカドムギ」について. 茨城県農業試験場研究報告第30号
- 塔野岡卓司・吉岡藤治・青木恵美子・河田尚之・吉田めぐみ・松井勝弘・谷尾昌彦・牧野徳彦(2014)オオムギ縞萎縮病抵抗性を有し, 稈の折損が発生しにくい麦茶用六条オオムギ新品種「カシマゴール」の育成. 育種学研究 16 : 7-12.
- 渡辺健・小川奎・飯田幸彦・千葉恒夫・山崎郁子・上田康郎(1995)茨城県におけるムギ類土壌伝染性ウイルス病の発生生態と防除に関する研究 第2報 被害と防除法. 茨城県農業総合センター農業研究所研究報告第2号

## Summary

A barley cultivar 'Kashima Goal' which developed at NARO institute of crop science shows superior characteristics compared with major six-rowed barley cultivar for roasted barley tea 'Kashimamugi' as below: less breakage of culm at maturity stage; equal or slightly higher yield; equal or slightly lower suitability for an ingredient of roasted barley tea. And it exhibited resistance to barley yellow mosaic virus strain types I to III. So we adopted it as a semi recommended six-rowed barley cultivar for roasted barley tea as a backup of 'Kashimamugi'.

**Keywords : Kashima Goal, six-rowed barley, barley tea, recommended cultivar**



本誌に掲載された記事に関しては「茨城県農業総合センター」ホームページ  
<http://www.pref.ibaraki.jp/nourinsuisan/nosose/cont/>にてPDFを掲載しております。

#### 編集委員

副センター長兼企画情報部長（総括）	宮本 昭彦
農業研究所所長（編集委員長）	渡邊 健
生物工学研究所所長（副編集委員長）	河又 仁
園芸研究所所長（副編集委員長）	折本 善之
山間地帯特産指導所所長	平山 正賢
鹿島地帯特産指導所所長	高津 康正
専門技術指導員室長	水野 仁志
研究管理監	内藤 和也
企画調整課主任	半田 貴彦

#### 各研究所の連絡先

生物工学研究所	笠間市安居 3165-1	0299-45-8330
園芸研究所	笠間市安居 3165-1	0299-45-8340
農業研究所	水戸市上国井町 3402	029-239-7211
山間地帯特産指導所	大子町頃藤 6690-1	0295-74-0821
鹿島地帯特産指導所	神栖市息栖 2815	0299-92-3637

茨城県農業総合センター研究報告書 第1号

2019年 月 日発行

発行者 茨城県農業総合センター

〒319-0292 茨城県笠間市安居3165-1

電話 0299-45-8321

FAX 0299-45-8350

印刷者 ○○○○印刷所

〒○○○-○○ 茨城県○○市○○○○-○

電話 0 - 4 - 8

FAX 0 - 4 - 8

本誌に掲載された論文の著作権は、当センターに帰属するものとする

BULLETIN  
OF THE  
IBARAKI AGRICULTURAL CENTER  
NO.1  
March 2019

Contents

Studies on <i>Corynespora cassiicola</i> and <i>Podosphaera xanthii</i> Isolates Resistant to Succinate Dehydrogenase Inhibitors on Cucumber Takuya MIYAMOTO . . . . .	1
Study on Processing Suitability for Fruit Paste Made from Japanese Chestnut Cultivar 'Porotan' Taketo SANNO . . . . .	42
Effect of Temperature Before or After Harvest on the Occurrence of Quality Deterioration and Fruit Quality of Japanese Chestnut Cultivar 'Tanzawa' and 'Porotan' Tomohiro KARASAWA and Akira SHIMIZU . . . . .	57
Effect of a Number of Fruit Setting on Yield and Fruit Quality in Japanese Pear 'Keisui' Keisuke KAGAWA, Hidenori ICHIGE and Akira SHIMIZU . . . . .	67
Characterization and Dissemination of 'Yumekaori', a Recognized Wheat Cultivar for Bread in Ibaraki Prefecture Satoshi OKOSHI, Yukari TERAOKA, Chihiro ENDO, Eiichi KASHIMURA, Mikio KANO, Masaaki SUZUKI and Yukihiko IIDA . . . . .	73
Characterization and Dissemination of 'Kashima Goal', a Semi Recommended Six-rowed Barley Cultivar for Roasted Barley Tea in Ibaraki Prefecture Satoshi OKOSHI, Yukari TERAOKA, Chihiro ENDO, Eiichi KASHIMURA, Mikio KANO, Masaaki SUZUKI and Yukihiko IIDA . . . . .	81

Ibaraki Agricultural Center  
3165-1, Ago, Kasama, Ibaraki 319-0292, JAPAN

茨城県農業総合センター  
研究報告

第一号

茨城県農業総合センター