

ビワ灰斑病のベンズイミダゾール系薬剤耐性菌 の発生状況と防除対策

小嶺正敬・早田栄一郎・中村吉秀

State of Emergence and Control Measures for Benzimidazole-resistant *Pestalotiopsis eriobotrifolia*
and *Pestalotiopsis neglecta*, the causal fungi of loquat gray leaf spot

Masayuki KOMINE , Eiichirou SOUDA , Yoshihide NAKAMURA

緒 言

ビワ灰斑病は葉および果実に発生する。果実での発生は果実腐敗をひきおこすため、市場へ出荷後に腐敗が発生した場合、産地の評価に大きく影響し、経済的な被害が大きい。

本病における防除薬剤は主にチオファネートメチル水和剤やベノミル水和剤等のベンズイミダゾール系薬剤が使用されてきた。しかし、本病による果実腐敗が多発した1998年にベンズイミダゾール系薬剤に対する防除効果が疑問視されたため、現地数カ所から採集したビワ灰斑病菌のベノミル剤感受性検定を行った結果、感受性の低下がみられた³⁾。

現行の主な防除薬剤に対する感受性の低下が本病による果実腐敗の多発の一因と考えられたため、ビワ主産地である茂木の露地栽培「茂木」においてベンズイミダゾール系薬剤耐性ビワ灰斑病菌の発生状況を調査し、防除対策を検討した。

1. ベノミル剤耐性ビワ灰斑病菌 の発生状況

材料および方法

1999～2001年の3年間、長崎市茂木の現地(17～

18圃場)から採果し、持ち帰り後に腐敗した果実から1圃場3菌株程度常法によりビワ灰斑病菌を分離した。これらの菌叢ディスクを径4mmのコルクボーラーで打ち抜き、1, 10, 100, 1000ppmになるようにベノミル剤を添加したPDA培地上に置床し、25℃で5日間静置後、菌糸の生育を調査し、感受性の検定を行った。なお、ベノミル剤感受性検定は、ベノミル剤を添加した後にオートクレーブ滅菌したPDA培地を用いて行った。以下のベノミル剤の検定も同様である。

結果および考察

ベノミル剤100ppmで菌糸の生育可能なものをベノミル剤耐性菌とすると、耐性菌の発生は、1999年は17圃場中8圃場でみられ耐性菌株率37%、2000年は18圃場中8圃場でみられ耐性菌株率27%、2001年は17圃場中10圃場でみられ耐性菌株率35%であった。また、耐性菌株のうち、ベノミル剤1000ppm以上で菌糸生育がみられる高度な耐性を示す菌株が大半を占めていた(第1表)。このため現行の防除薬剤であるベンズイミダゾール系薬剤でのビワ灰斑病の防除は困難だと思われる。

第1表 ビワ灰斑病におけるベノミル剤耐性菌の発生

年	検定圃場数	耐性菌発生圃場数	検定菌株数	ベノミル100ppm以上耐性菌株数	ベノミル1000ppm以上の耐性菌株数	耐性菌株率 [*] (%)
1999年	17	8	46	17	14	37.0
2000年	18	8	62	17	15	27.4
2001年	17	10	51	18	18	35.3

* ベノミル100ppm以上で菌糸生育がみられたものを耐性菌とした

2. ベノミル剤耐性機構の解明 (ビワ灰斑病のβチューブリン遺伝子のDNA解析)

材料および方法

2000年に長崎市茂木の現地の露地栽培「茂木」8圃場から採集し、ベノミル剤に対する検定を行った10菌株を供試した。感受性の程度は第2表のとおりでベノミル剤1000ppm以上で生育できる菌株を3菌株含んだ。

ビワ灰斑病菌の菌糸からゲノムDNAを抽出し、縮重プライマーを用いたPCRでβチューブリン遺伝子断片を増幅させた。この断片をTAクローニングベクター (Invitrogen) にクローニングし、その塩基配列を解析した。

結果および考察

多くの植物病原菌のベンズイミダゾール系薬剤耐性菌では、その作用点であるβチューブリンと呼ば

れる微小管タンパク質の点突然変異によりアミノ酸配列の置換が生じ、その結果、薬剤とβチューブリンとの親和性が低下し、薬剤の阻害作用を受けにくくなることが知られている⁵⁾。

ビワ灰斑病のβチューブリン遺伝子の塩基配列を菌株間で比較したところ、ベノミル剤1000ppm以上で菌糸の生育がみられる菌株のβチューブリン遺伝子に点突然変異が見いだされた。この点突然変異はβチューブリン遺伝子のアミノ酸配列において198番目のアミノ酸に対応し、ベノミル剤1000ppm以上で菌糸の生育がみられる菌株ではグルタミン酸からアラニンへ置換されていた(第1図)。このアミノ酸の置換によってナシ黒星病等ではベンズイミダゾール系薬剤に対し高度耐性、ジエトフェンカルブ剤に感受性であることが知られており^{1) 2)}、ベンズイミダゾール系薬剤耐性ビワ灰斑病に対するジエトフェンカルブ剤の有効性が示唆された。

第2表 DNA解析を行ったビワ灰斑病菌のベノミル剤に対する感受性

ベノミル剤の濃度 (ppm)	< 1	1	10	100	1000	合計
菌糸伸長菌株数	3	2	2	0	3	10

ベノミル剤10ppm以下で菌糸伸長がみられる菌株
 GTGAGMGTLLISKIREEFDPDRMMATFSVVPSPKVSdTVEPYNATLSVHQLVENSDETFE
 ベノミル剤1000ppm以上で菌糸伸長がみられる菌株 ↓
 GTGAGMGTLLISKIREEFDPDRMMATFSVVPSPKVSdTVEPYNATLSVHQLVENSDA TFE
 E : G l u (グルタミン酸) A : A l a (アラニン)

第1図 ビワ灰斑病菌のβチューブリン遺伝子のアミノ酸配列

3. ベンズイミダゾール系薬剤耐性 ビワ灰斑病の防除対策

1) 果実腐敗防止薬剤（開花期～袋掛け前）の散布回数とビワ灰斑病による腐敗果の発生

材料および方法

1999年に長崎市茂木の現地の露地ビワ‘茂木’18圃場から5樹×20果程度を採果し、平コンテナに入れ室温下で8日後までビワ灰斑病による腐敗果の調査を行った。また、各圃場における開花～袋掛け前の果実腐敗を対象とした薬剤の散布実績を調べ、

その薬剤散布回数とビワ灰斑病による腐敗果の発生との関連を調査した。

結果および考察

開花期～袋掛け前までに散布された薬剤は、すべてベンズイミダゾール系薬剤であるチオファネートメチル水和剤であった。ビワ灰斑病による腐敗果の発生率は、散布回数0回が5.2%、散布回数1回が4.3%、散布回数2回以上が8.1%であり、薬剤散布回数と腐敗果の発生との関連は判然としなかった。このことから現地圃場においてチオファネートメチル水和剤はビワ灰斑病に対し防除効果を示していないことが伺えた（第3表）。

第3表 開花期～袋掛け前のチオファネートメチル水和剤の散布回数とビワ灰斑病による腐敗果の発生（1999年）

チオファネートメチル水和剤散布回数	圃場数	灰斑病による腐敗果率 (%)
2回以上	5	8.1
1回	9	4.3
0回	4	5.2

2) ベノミル剤耐性菌株のジエトフェンカルブ剤に対する感受性検定

材料および方法

前述のβチューブリン遺伝子の198番目のアミノ酸配列がグルタミン酸からアラニンへ置換された耐性3菌株および2001年に17圃場から採集したベノミル剤に耐性を示す18菌株（DNA解析未実施）についてジエトフェンカルブ剤を1, 10, 100, 1000ppmの濃度に調整したPDA培地上に置床し検定した。

結果および考察

DNAを解析し、198番目のアミノ酸がグルタミ

ン酸からアラニンへ置換された耐性の3菌株はすべてジエトフェンカルブ剤に対し感受性であった（第4表）。一方、2001年に現地（17圃場）から採集したベノミル剤耐性菌18菌株（DNA解析未実施）について同剤に対する感受性を検定した結果、9菌株は感受性であったが、9菌株は耐性を示した（第5表）。このことからビワ灰斑病のベノミル剤耐性菌の中には上述の点突然変異以外の変異に由来する耐性菌も存在すると考えられた。そのため、ジエトフェンカルブ剤はベンズイミダゾール系薬剤耐性ビワ灰斑病対策の薬剤として有効でないと思われた。

第4表 DNAを解析したベノミル剤耐性菌株のジエトフェンカルブ剤、ベノミル剤に対する感受性

濃度 (ppm)	< 1	1	10	100	1000	合計
ジエトフェンカルブ剤に対する菌糸伸長菌株数	3	0	0	0	0	3
ベノミル剤に対する菌糸伸長菌株数	0	0	0	0	3	3

第5表 ベノミル剤耐性灰斑病菌（DNA解析未実施）のジエトフェンカルブ剤、ベノミル剤に対する感受性

濃度 (ppm)	< 1	1	10	100	1000	合計
ジエトフェンカルブ剤に対する菌糸伸長菌株数	9	0	0	0	9	18
ベノミル剤に対する菌糸伸長菌株数	0	0	0	0	18	18

3) ベノミル剤耐性菌株に対する有効薬剤の検討

材料および方法

1999～2001年の3年間、長崎市茂木の現地調査（17～18圃場）から持ち帰り後に腐敗した果実からピワ灰斑病菌を分離し、ベノミル剤を添加したPDA培地上で薬剤検定を行い、ベノミル剤100ppm以上で菌糸の伸長がみられた菌株を供試した。これらの各菌叢ディスクを径4mmのコルクボーラーで打ち抜き、第6表、第7表に示す有効成分濃度となるように調整したイミノクタジナルベシル酸塩剤および

フルアジナム剤を添加したPDA培地上に置床し、25℃で5日間静置後、菌糸の生育を調査した。

結果および考察

ベノミル剤耐性菌株に対してイミノクタジナルベシル酸塩水和剤は100ppmでほとんどの菌株の菌糸伸長を抑え、フルアジナム水和剤は100ppmで全菌株の菌糸伸長を抑えた（第6表、第7表）。このことから両薬剤ともにベンズイミダゾール系薬剤耐性菌に対して抗菌活性があり、圃場における防除効果が期待される結果であった。

第6表 ベノミル剤耐性菌株に対するイミノクタジナルベシル酸塩剤の菌糸伸長抑制効果

年	イミノクタジナルベシル酸塩剤の濃度 (ppm)	< 1	1	5	10	50	100	500	1000	合計
1999	菌糸伸長菌株数	3	8	2	3	0	1	0	-	17
2000	〃	1	10	-	6	-	0	-	0	17
2001	〃	3	11	-	4	-	0	-	0	18

第7表 ベノミル剤耐性菌株に対するフルアジナム剤の菌糸伸長抑制効果

年	フルアジナム剤の濃度 (ppm)	フルアジナム剤の濃度				合計
		<10	10	100	1000	
1999	菌糸伸長菌株数	11	6	0	0	17
2000	〃	2	15	0	0	17
2001	〃	14	4	0	0	18

4) ベンズイミダゾール系薬剤耐性ビワ灰斑病菌が優占する圃場における有効薬剤の検討

材料および方法

長崎市茂木のベンズイミダゾール系薬剤耐性ビワ灰斑病菌が優占する圃場（耐性菌株率100%）の露地栽培‘茂木’10年生において、2000年 2月25日（袋掛け前）に イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤とチオファネートメチル水和剤を各 3樹に散布した。同圃場において2001年 2月27日（袋掛け前）にイミノクタジンアルベシル酸塩水和剤、チオファネートメチル水和剤およびフルアジナム水和剤を各 2樹に散布した。収穫時期に、それぞれの薬剤散布区の 1樹から10～15果房ずつ 1薬剤散布区合計30果房を採果し、収穫時から収穫 8日後までビワ灰斑病による腐敗果数を調べた。

また、果樹試験場内のベンズイミダゾール系薬剤感受性圃場の‘茂木’28年生においても同様な防除

試験を行った。

結果

ベンズイミダゾール系薬剤耐性ビワ灰斑病菌株率100%の圃場において、2000年では、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤はチオファネートメチル水和剤より高い防除効果を示した（第8表）。

2001年は、同圃場において、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤はチオファネートメチル水和剤より高い防除効果であったが、フルアジナム水和剤はチオファネートメチル水和剤と同等の防除効果であった（第9表）。

ベンズイミダゾール系薬剤感受性圃場において、2000年は、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤はチオファネートメチル水和剤と同等の防除効果であった（第10表）。2001年は、同圃場において、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤およびフルアジナム水和剤はチオファネートメチル水和剤と同等の防除効果であった（第11表）。

第8表 ベンズイミダゾール系薬剤耐性ビワ灰斑病菌が優占する圃場における各種薬剤の防除効果（2000年）

薬剤名	希釈倍数	調査果数	灰斑病による腐敗果率		
			収穫時 (%)	収穫後8日間累積 (%)	合計 (%)
イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤	1000	111	0	5.4	5.4
チオファネートメチル水和剤	1000	118	2.5	14.4	16.9

第9表 ベンズイミダゾール系薬剤耐性ピワ灰斑病菌が優占する圃場における各種薬剤の防除効果（2001年）

薬剤名	希釈 倍数	調査 果数	灰斑病による腐敗果率		
			収穫時 (%)	収穫後8日間累積 (%)	合計 (%)
イミダゾールベンゾイミダゾール酸塩水和剤	1000	109	0	1.8	1.8
フルアジンナム水和剤	2000	111	0	5.4	5.4
チオファネートメチル水和剤	1000	116	1.7	3.4	5.2

第10表 ベンズイミダゾール系薬剤感受性圃場における各種薬剤の防除効果（2000年）

薬剤名	希釈 倍数	調査 果数	灰斑病による腐敗果率		
			収穫時 (%)	収穫後8日間累積 (%)	合計 (%)
イミダゾールベンゾイミダゾール酸塩水和剤	1000	112	0	1.8	1.8
チオファネートメチル水和剤	1000	102	0	1.0	1.0
無散布		104	0	3.8	3.8

第11表 ベンズイミダゾール系薬剤感受性圃場における各種薬剤の防除効果（2001年）

薬剤名	希釈 倍数	調査 果数	灰斑病による腐敗果率		
			収穫時 (%)	収穫後8日間累積 (%)	合計 (%)
イミダゾールベンゾイミダゾール酸塩水和剤	1000	150	0	0	0
フルアジンナム水和剤	2000	148	0	0	0
チオファネートメチル水和剤	1000	177	1.1	0	1.1
無散布		159	0	5.0	5.0

総合考察

長崎市茂木においてベンズイミダゾール系薬剤耐性菌の発生が約半数の圃場でみられ、約4割の菌株が耐性菌株であることが明らかになった。このことは長い間、灰斑病、褐斑病およびたばや症等を対象として、主にベンズイミダゾール系薬剤が使用されてきたためと思われる。実際、現地において18圃場の薬剤散布歴を調査したところ、果実腐敗を対象とした防除薬剤はすべてチオファネートメチル水和剤であった。また、ベノミル剤に対する耐性程度は同剤1000ppmでも菌糸生育が可能な高度耐性を示した。そのため薬剤散布しても防除効果がなく、その

結果、ピワ灰斑病の葉や果実での多発を招く一因になっているものと思われた。

ベンズイミダゾール系薬剤耐性機構は分子レベルでの研究が行われ、多くの植物病原菌で同系薬剤の作用点であるβチューブリンの遺伝子の変異が確認されている。ピワ灰斑病については未解明であったが、ベノミル剤耐性菌では198番目のアミノ酸の配列がグルタミン酸からアラニンへ置換されていることが判明した。この変異によりナシ黒星病ではベノミル剤耐性、ジエトフェンカルブ剤感受性であることが知られており、DNAを解析したピワ灰斑病においても同様な薬剤感受性であったため有望薬剤と

して期待された。しかし、現地から採集したベノミル剤耐性菌株のなかにはジエトフェンカルブ剤に耐性を示す菌株が約 5割存在した。このことからピワ灰斑病のベノミル剤耐性菌にはジエトフェンカルブ剤に感受性のタイプと耐性のタイプがあり、アミノ酸の配列も 2種の点突然変異に由来する耐性菌が存在すると思われた。そのため、実際の現場圃場ではジエトフェンカルブ剤に対する感受性の判定は困難であるので、ジエトフェンカルブ剤は、ベンズミダゾール系薬剤耐性対策の防除薬剤として有効でないと思われた。

ピワ灰斑病に農薬登録があり、果実腐敗の主な防除時期である開花期から袋掛け前の時期に散布できるイミノクタジナルベシル酸塩剤とフルアジナム剤はPDA培地上において低濃度で菌糸伸長を抑えた。そこで、両剤を現地のベンズイミダゾール系薬剤耐性菌が優占する圃場において、袋掛け前に散布した結果、イミノクタジナルベシル酸塩水和剤はチオファネートメチル水和剤に比べ高い防除効果であった。このことからイミノクタジナルベシル酸塩水和剤はベンズイミダゾール系薬剤耐性菌対策の防除薬剤として有効であった。フルアジナム水和剤については 1ケ年のみの試験であり、今後、さらに現地で防除効果を確認する必要があると思われる。

ピワ灰斑病は葉での発生が多いと果実での発生も多くなるため⁴⁾、年間を通じた体系防除を行うことが重要であるが、現在、ピワ灰斑病に農薬登録のある薬剤は少なく、今後、有効薬剤の登録が必要である。また、近年、ピワ炭疽病の発生も多いためピワ灰斑病とピワ炭疽病が同時防除できる防除体系や防除薬剤を検討していく必要がある。

摘 要

ピワ灰斑病におけるベンズイミダゾール系薬剤耐性菌の発生状況、耐性機構および防除対策について調査や検討を行った。

1. 長崎市茂木において、ベノミル剤100ppmで菌糸生育のみられるものを耐性菌とすると、耐性菌の発生は約半数の圃場でみられ、約 4割が耐性菌株であった。

2. ベノミル剤耐性菌株のうち、ベノミル剤1000 ppmで菌糸の生育可能な高度耐性を示す菌株が大半を占めていた。
3. ベノミル剤耐性菌株は、ベンズイミダゾール系薬剤の作用点である微小管タンパク質 (β チューブリン) 遺伝子の点突然変異によりアミノ酸の置換がおきていた。
4. ベノミル剤耐性菌株はジエトフェンカルブ剤に対し耐性菌株と感受性菌株が存在した。
5. PDA培地上においてベノミル剤耐性菌株に対しイミノクタジナルベシル酸塩水和剤とフルアジナム水和剤は低濃度で菌糸の伸長を抑制した。
6. ベノミル剤耐性菌が優占する圃場においてイミノクタジナルベシル酸塩水和剤はチオファネートメチル水和剤より高い防除効果であった。

謝辞 本試験を実施するにあたり、長崎農業改良普及センター、JA長崎の方々の協力、並びに独立行政法人果樹研究所ブドウ・カキ研究部中畝良二博士には、有益な御助言をいただいた。これら関係各位に対して厚く感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 石井英夫・Hollomon, D. W. 足立嘉彦・Vannraak, M. 1996. 各種植物病原糸状菌の薬剤感受性と β チューブリン遺伝子の塩基配列 日植病報. 62: 284-285.
- 2) 石井英夫ら. 1996. 植物病原糸状菌の薬剤耐性機構の解明. 平成 8年度落葉果樹試験研究成績概要集. p. 270-279.
- 3) 古賀敬一. 1999. 長崎県の露地ピワに発生した果実腐敗の原因と分離されたピワ灰斑病菌の薬剤感受性. 九病虫研報. 45:38-43.
- 4) 森田 昭. 1995. ピワ果実腐敗病害の発生生態と防除. 長崎県果樹試験場研究報告. 2: 41-47
- 5) 中畝良二. 1999. カンキツ緑かび病菌の薬剤耐性機構について. 平成11年度常緑果樹試験成績概要集. p. 202-208.

Bull.Nagasaki Fruit Tree Exp.Stn.9:19-26.2002

State of Emergence and Control Measures for Benzimidazole-resistant *Pestalotiopsis eriobotrifolia* and *Pestalotiopsis neglecta*, the causal fungi of loquat gray leaf spot

Masayuki KOMINE , Eiichirou SOUDA , Yoshihide NAKAMURA

Section of Deciduous Fruit Tree, Nagasaki Fruit Tree Experiment Station, 1370 Onibashi-cho Omura, Nagasaki, 856

Summary

A study on benzimidazole-resistant strains of *Pestalotiopsis eriobotrifolia* and *Pestalotiopsis neglecta*, the causal fungi of loquat gray leaf spot was conducted based on field surveys in order to identify the state of emergence, mechanism of resistance, and control measure.

1. Assuming that fungi whose hyphae can grow at a benomyl concentration of 100 ppm are considered as benomyl-resistant fungi, it was confirmed that benomyl-resistant fungi emerged in about half of all the fields of loquat in the Mogi District in Nagasaki City, and that such fungal strains amounted to about 40 %.
2. The majority of the benomyl-resistant fungal strains presented high resistance, and their hyphae could grow at a benomyl concentration of even 1000 ppm.
3. It was found that the benomyl-resistant fungal strains had undergone amino acid substitution due to the occurrence of point mutation of genes in the microtubule protein (β tubulin) that is the site of action of benzimidazole chemicals.
4. Benomyl-resistant fungal strains comprised both diethofencarb-resistant strains and diethofencarb-sensitive strains.
5. Both the iminoctadine albesilate chloride water-dispersible powder and the fluazinam water-dispersible powder at low concentrations suppressed the growth of hyphae of the benomyl-resistant fungal strains cultured in a PDA medium.
6. In the fields where benomyl-resistant fungi are predominant, the iminoctadine albesilate chloride water-dispersible powder had a higher effect of fungal control than the thiophanate-methyl water-dispersible powder.