

薬剤感受性の差を利用したベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性 *Colletotrichum gloeosporioides*の判別法

矢野和孝・川田洋一*・佐藤豊三**

(高知県農業技術センター・高知県中央農業振興センター

嶺北農業改良普及所*・農業生物資源研究所**)

Methods for detecting intermediately benzimidazole-resistant strains of *Colletotrichum gloeosporioides* using the characteristics of fungicide sensitivity

By Kazutaka YANO, Youichi KAWADA* and Toyozo SATO** (Kochi Prefectural Agricultural Research Center, Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan, * Reihoku Agriculture Development Expansion Center, Tai, Tosa, Tosa, Kochi 781-3521, Japan and ** National Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan)

It was examined to distinguish the intermediately benzimidazole-resistant strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo, which were found on Japanese pear, from sensitive strains and highly resistant strains of *C. gloeosporioides*, and *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds by using the difference of the fungicide sensitivity. As a result, it is possible to distinguish them by the measurement of the colony diameter on PDA containing 1 ppm benomyl, adding a result of the differentiation method proposed by T. Sato in 1997, the difference of mycelial growth rate on the medium containing 1250 ppm benomyl and 625 ppm diethofencarb.

(Received August 2, 2005; Accepted December 1, 2005)

緒 言

Colletotrichum gloeosporioides (Penzig) Penzig & Saccardoによる炭疽病は各種作物に発生し、葉の斑点や果実腐敗を引き起こしたり、茎に壊死病斑を形成し、ときには株全体を枯死させて甚大な被害をもたらす(岸, 1998)。

近年、本種と同様な被害をもたらすが、病原菌の性質が異なることから、別種と見なされている *C. acutatum* Simmonds ex Simmondsによる炭疽病が新病害として報告されたり(本多ら, 2001; Sato *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1997; 竹内・堀江, 1997; 矢口ら, 1993), 炭疽病の新しい病原として追加されている(深谷, 2004; 樋口ら, 1997; 石川ら, 1992; Sato *et al.*, 1997; 佐藤ら, 1998; 山本ら, 1999)。両種は薬剤に対する感受性が異な

る(松尾, 1994)ことから、その識別は防除上においても重要である。しかし、両種の同定の指標となる分生子の形態において、区別しにくい系統が存在すること(Adaskaveg and Hartin, 1997; Adaskaveg and Förster, 2000; 佐藤, 1996; 佐藤, 1997; 佐藤ら, 1998), 付着器の形態は変異が大きく、同定のための根拠となりにくいこと(Gunnell and Gubler, 1992)などから、しばしば混乱を生じている。

このような状況の中で、矢野ら(2003)は、1998年にニホンナシ(*Pyrus serotina* var. *culta*)からベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性で、ジエトフェンカルブにも非感受性の炭疽病菌を検出した。これは当初、*C. acutatum*によるナシ炭疽病(深谷ら, 2000; 深谷, 2004)の可能性が疑

われたが、最終的にはrDNA-ITS領域の塩基配列の違いをPCR法 (Adaskaveg and Hartin 1997; Adaskaveg and Förster, 2000; Ishii *et al.*, 1998) によって識別し、ベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性*C. gloeosporioides*と結論づけた (矢野ら, 2004)。PCR法は*C. acutatum*によるナシ炭疽病の病原菌の同定にも用いており (深谷ら, 2000; 深谷, 2004) 本法は両種を容易に識別できるが、高価な設備や熟練した技術が必要であり、利用にはやや難点があると考えられる。

一方、薬剤に対する感受性の違いを利用して両種を識別する方法が提唱されている (佐藤・小金澤, 1995; 佐藤, 1996; 佐藤, 1997; 佐藤ら, 1998)。そこで、ベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性*C. gloeosporioides*においても、薬剤に対する感受性の違いを利用して両種を識別することが可能かどうか検討したところ、佐藤 (1997) の提唱した方法に、ベノミルの1 ppm添加培地上における菌糸生育の結果を付け加えることで、識別可能であることが明らかとなったので、その概要について報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

ナシから分離された*C. gloeosporioides*のベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性菌 (菌株名: M14-2, M19-1, I6-1), 同感受性菌 (菌株名: I5-1, I9-1), イチゴから分離された*C. gloeosporioides*のベンズイミダゾール系薬剤高度耐性菌 (MKU818-2) およびブドウとイチゴからそれぞれ分離された同感受性菌 (GC-2, NM-1), ブドウとイチゴからそれぞれ分離された*C. acutatum* (G5-1 7, Na91-016) を供試した。

2. *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum*の薬剤に対する感受性

供試菌株をブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 平板培地上で25°C, 7日間培養した後、菌叢の周縁部を直径6 mmのコルクボーラーで打ち抜いた。この菌叢ディスクをベノミルの1 ppmおよび1250 ppm, ジェトフェンカルブの625 ppm (いずれも有効成分濃度) 添加ならびに無添加PDA平板培地上の中央に置床し、25°C, 暗黒下で培養した。5日後に菌叢の最大直径を計

測し、菌叢ディスクの直径を除いた値から無添加培地上における値に対する生育率を算出した。なお、いずれの菌株も各区3反復とした。

結 果

ベノミル1250 ppm添加培地上において*C. gloeosporioides*のベンズイミダゾール系薬剤感受性菌および同中等度耐性菌は、全く生育しないか、生育しても9%程度の生育率であった。ベンズイミダゾール系薬剤高度耐性*C. gloeosporioides*および*C. acutatum*では、20~26%程度の菌糸生育率であった。

これに対して、ベノミル1 ppm添加培地上における*C. gloeosporioides*のベンズイミダゾール系薬剤感受性菌および*C. acutatum*の生育は、ベノミル1250 ppm添加培地上における生育量とほとんど差がなかったが、ベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性*C. gloeosporioides*および同高度耐性菌では、菌糸生育がほとんど抑制されなかった。

ジェトフェンカルブ625 ppm添加培地上におけるベンズイミダゾール系薬剤高度耐性*C. gloeosporioides*の生育率は、4.8%であったが、その他の菌株は40~80%の生育率であった (第1表)。

考 察

ナシから分離されたベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性*C. gloeosporioides*の菌糸生育に対するベノミルの最低阻止濃度 (MIC) は、25~100 ppm (矢野ら, 2004) で、イチゴにおいて知られているベンズイミダゾール系薬剤高度耐性菌の値 (楠ら, 1992) より明らかに低く、佐藤 (1997) が提唱したベノミルの1250 ppm添加培地上ではほとんど生育せず、ベンズイミダゾール系薬剤感受性菌と見なされてしまう。

しかし、ベンズイミダゾール系薬剤感受性菌に対するMICよりは明らかに高く、調査した50%生育阻止濃度 (EC₅₀) の値等から、ベノミル1 ppm添加培地での生育で感受性菌と区別可能ではないかと予想された。そこで、同濃度における菌糸生育を調査した結果、ベンズイミダゾール系薬剤感受性菌ではほとんど菌糸生育が見られなかったのに対し、同中等度耐性菌では無添加培地における菌糸生育とほとんど差がなく、菌糸生育の抑制は

第1表 ナシから分離されたベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性*Colletotrichum gloeosporioides*および対照菌株のベノミルおよびジエトフェンカルブに対する感受性

種名	宿主	菌株名	表現型 (B/D) ^{a)}	PDA培地上での菌糸生育量 (mm)			
				無添加	ベノミル		ジエトフェンカルブ 625 ppm
					1 ppm	1250 ppm	
<i>C. gloeosporioides</i>		I5-1	S/R	56.7	0.5 (0.9) ^{b)}	0.4 (0.7)	27.3 (48.1)
		I9-1	S/R	57.5	0.3 (0.5)	0.3 (0.5)	31.9 (55.5)
	ナシ	M14-2	IR/R	60.9	59.0 (96.9)	4.0 (6.6)	33.3 (54.7)
		M19-1	IR/R	58.8	58.0 (98.6)	0.8 (1.4)	23.9 (40.6)
		I6-1	IR/R	57.4	55.7 (97.0)	5.1 (8.9)	25.1 (43.7)
	ブドウ	GC-2	S/R	43.9	0 (0)	0 (0)	26.7 (60.8)
	イチゴ	NM-1	S/R	45.8	1.8 (3.9)	0 (0)	36.9 (80.6)
MKU818-2		HR/S	62.3	60.0 (96.3)	16.3 (26.2)	3.0 (4.8)	
<i>C. acutatum</i>	ブドウ	G5-1 7	-	32.1	10.6 (33.0)	8.4 (26.2)	22.7 (70.7)
	イチゴ	Na91-016	-	36.9	14.9 (40.4)	7.6 (20.6)	24.8 (67.2)

a) B: ベノミルに対する感受性, D: ジエトフェンカルブに対する感受性, S: 感性, R: 耐性, IR: 中等度耐性, HR: 高度耐性

b) PDA, 25°C, 5日間培養後の菌叢直径から菌叢ディスクの直径6mmを除いた3反復の平均値(mm), ()内は無添加培地における菌糸生育量に対する割合

ほとんど認められなかった。

今回使用したベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性菌は3菌株と少なく、今後調査菌株を増やして信頼性を高める必要があると考えられるが、本試験結果から、ベノミルの1ppmおよび1250ppm、ならびにジエトフェンカルブの625ppm添加培地上における菌糸生育を調査することにより、ベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性*C. gloeosporioides*、同高度耐性菌、同感受性菌および*C. acutatum*の4者を区別することは可能と考えられた。

謝 辞

本研究の実施に当たり、ブドウ炭疽病菌の対照菌株を分譲いただいた秋田県果樹試験場の深谷雅子氏、イチゴ炭疽病菌の対照菌株を分譲いただいた栃木県農業試験場の後藤知昭氏、並びにジエトフェンカルブを分譲いただいた住友化学工業株式会社に深くお礼申し上げます。また、独立行政法人農業技術研究所化学環境部農薬影響軽減ユニットの石井英夫博士には、本論文の校閲を承った。こ

こに深く感謝の意を表する。

摘 要

薬剤に対する感受性の差を利用して、ナシ炭疽病菌のベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性*C. gloeosporioides*と同高度耐性菌、同感受性菌および*C. acutatum*の4者の識別を試みた。その結果、佐藤(1997)の提唱したベノミル1250ppmおよびジエトフェンカルブ625ppm添加培地上における菌糸生育量と無添加培地上での生育量を基に算出した菌糸生育率にベノミル1ppm添加培地上における菌糸生育率の調査結果を付け加えることで、4者の識別は可能と考えられた。

引用文献

- Adaskaveg, J. E. and Hartin, R. J. (1997) : Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, 87 : 979-987.
- Adaskaveg, J. E. and Förster, H. (2000) :

- Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction* (Prusky, D., Freeman, S., and Dickman, M. B. eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota, 317-336.
- 深谷雅子・石井英夫・高橋 功 (2000) *Colletotrichum acutatum*によるナシ葉炭疽病の発生. 日植病報, 66: 99 (講要).
- 深谷雅子 (2004): *Colletotrichum acutatum*によるナシ炭疽病の発生と防除薬剤の探索. 日植病報, 70: 184-189.
- Gunnell, P. S. and Gubler, W. D. (1992): Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, 84:157-165.
- 樋口あやこ・永栄一郎・兼平 勉・篠原正行 (1997): アボカドから分離された炭疽病菌について. 日植病報, 63: 494 (講要).
- 本多哲也・矢口行雄・陶山一雄・根岸寛光・中村重正 (2001): *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmondsによるモロヘイヤ炭疽病 (新称). 東農大農学集報, 45 (4):348-353.
- Ishii, H., Iwamoto, S., Nishimura, K., and Fukaya, M. (1998): Comparative studies on fungicide sensitivity and other characteristics in *Colletotrichum* isolated from various plant species. *Proceedings of the 1998 Brighton Conference, Pests & Diseases*, 529-534.
- 石川成寿・中山喜一・常見讓史・中澤靖彦 (1992): 栃木県で発生した *Colletotrichum acutatum* Simmondsによるイチゴ炭疽病. 関東病虫研報, 39:129-133.
- 岸 國平編 (1998): 日本植物病害大事典. 全国農村教育協会, 東京, 1276pp.
- 楠 幹生・三浦 靖・十河和博・都崎芳久 (1992): イチゴ炭疽病に関する研究 第1報 香川県におけるイチゴ炭疽病のペノミル耐性菌発生と各種薬剤の効果. 香川農試研報, 43: 29-35.
- 松尾和敏 (1994): *Colletotrichum acutatum*によるイチゴ炭そ病の発生生態と防除. 植物防疫, 48: 343-346.
- 佐藤豊三・小金澤碩城 (1995) 日本産 *Colletotrichum acutatum* の *Colletotrichum gloeosporioides* 類似菌株と両種の判別法. 日植病報, 61:619-620 (講要).
- 佐藤豊三 (1996): 炭疽病菌の分類の問題点と同定法. 植物防疫, 50: 273-280.
- Sato, T., Ueda, S., Iijima, A. and Tezuka, N. (1996): Re-identification of pathogen of anemone and prune anthracnose. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 62:170-174.
- 佐藤豊三 (1997): 多犯性炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum* の諸特性と同定法. 四国植防, 32: 1-19.
- Sato, T., Uematsu, S., Mizoguchi, H., Kiku, T. and Miura, T. (1997): Anthracnose of prairie gentian and loquat caused by *Colletotrichum acutatum*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 63:16-20
- 佐藤豊三・植松清次・飯島章彦・小金澤碩城 (1998) 日本産灰色系 *Colletotrichum acutatum* によるリング炭疽病の発生と他植物由来の *C. acutatum* および *Glomerella cingulata* のリングに対する病原性. 日菌報, 39:35-44.
- 竹内 純・堀江博道 (1997): *Colletotrichum acutatum* によるアマクリナム, ベゴニアおよびスダジイの炭疽病. 関東病虫研報, 44:175-178.
- 矢口行雄・中村重正・陶山一雄・斎藤紀子 (1993): *Colletotrichum acutatum* によるコスモス花枯炭そ病. 日植病報, 59: 291 (講要).
- 山本 淳・佐藤豊三・富岡啓介 (1999) *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmondsによるブドウ晩腐病の発生. 日植病報, 65: 83-86.
- 矢野和孝・石井英夫・深谷雅子・川田洋一・佐藤豊三 (2003): ベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性 *Colletotrichum gloeosporioides* によるナシ炭疽病の発生. 日植病報, 69: 72 (講要).
- 矢野和孝・石井英夫・深谷雅子・川田洋一・佐藤豊三 (2004): ベンズイミダゾール系薬剤中等度耐性ナシ炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*)] の発生. 日植病報, 70:314-319.