

特集：QoI 剤耐性菌の発生状況とその対策

沖縄県における QoI 剤耐性 マンゴー炭疽病菌の発生

沖縄県農業研究センター 名護支所 澤^{たく} 岷^し 哲^{てつ} 也^や

はじめに

我が国のマンゴー (*Mangifera indica* L.) は沖縄県、鹿児島県および宮崎県等の西南暖地を中心に栽培が盛んに行われているが、果実の流通過程においてマンゴー炭疽病の発病が深刻な問題となっている。本病は *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo (中村ら, 1979) および *C. acutatum* J. H. Simmonds (田場ら, 2004) の 2 種の糸状菌によって引き起こされ、輸送中の果実に黒色円状の病斑が発症、進行するため (澤岷ら, 2012)、経済的損失だけでなく市場や消費者の信頼、さらには産地ブランドの評価にも大きく影響を与える。そのため、生育期の圃場における防除対策が急務となっている。沖縄県の施設マンゴーにおける一般的な炭疽病対策は、出蕾期の 1 月以降から収穫期の 7 月まで、ビニール被覆による雨よけと併せて薬剤防除が行われている。特に着果期から袋かけ直前までの主要散布剤として、残効性に優れ、果実の汚れが少ないストロビルリン系薬剤 (以下、QoI 剤) であるアゾキシストロビン剤やクレソキシムメチル剤の散布が普及、定着しつつある。しかし、主要なイチゴ産地である佐賀県 (稲田ら, 2008)、奈良県 (平山ら, 2008) および茨城県 (菊地ら, 2010) において QoI 剤耐性イチゴ炭疽病菌が既に確認されており、防除層における散布回数の削減を余儀なくされている。2013 年まで沖縄県におけるマンゴー炭疽病菌では本剤に対する防除効果の低下事例ならびに耐性菌の発生は確認されておらず、その実態については不明であった。しかし、本病原菌はイチゴ炭疽病菌と同種であること、マンゴーでは 2006 年の薬剤登録から継続して使用されてきたことから、マンゴーにおいても QoI 剤耐性菌の発生リスクが高まっていると推察される。そこで、本稿では 2009 ~ 10 年にかけて沖縄県全域から採集したマンゴ

ー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* に対するアゾキシストロビン剤およびクレソキシムメチル剤の感受性検定ならびに耐性菌のチトクローム *b* 遺伝子の変異を利用した PCR-RFLP による遺伝子診断を行い、初めて QoI 剤耐性菌が確認された (澤岷ら, 2014) のでその概要を報告する。

I 供試菌株

2009 ~ 10 年に沖縄本島 42 圃場および宮古島、石垣島、西表島、久米島、伊是名島、伊平屋島、与那国島等 32 圃場の計 74 圃場より発病葉および発病果実を採集し、黒色病斑部から単孢子分離によりマンゴー炭疽病菌を分離した。全分離株について佐藤 (1997) の同定法に従い、分生子の形態、菌叢の色調および直径 (25℃, 5 日間) を観察・計測するとともに、*C. gloeosporioides* および *C. acutatum* を特異的に識別するプライマー (WHITE et al., 1990; MILLS et al., 1992; GREENIVASAPRASAD et al., 1996) を用いた PCR 検定によって *C. gloeosporioides* と同定された計 107 菌株 (2009 年: 84 菌株, 2010 年: 23 菌株) に加え、標準菌株として QoI 剤耐性イチゴ炭疽病菌 *C. gloeosporioides* (03-33-1) とその感受性菌 (96C-1) の 2 菌株 (佐賀農研セ分譲株) を使用した。

II 分離菌に対するアゾキシストロビン剤の 最小生育阻止濃度 (MIC 値)

上記 107 菌株を用いて、SHAM (サリチルヒドロキサム酸) 添加条件下におけるアゾキシストロビン剤の最小生育阻止濃度 (以下、MIC 値) を調査した。SHAM 1,000 ppm とともにアゾキシストロビン剤 (シンジェンタジャパン株式会社, 商品名: アミスター 10 フロアブル) を有効成分が 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000, 3,000 ppm (11 段階) になるように添加した PDA 培地上に、供試菌株の菌叢ディスクを置床した。その後 25℃ で 4 日間培養し、菌糸生育の有無を肉眼で確認した。その結果、2010 年に採集した 23 菌株はすべて MIC 値が 0.1 ~ 5 ppm の範囲に分布していた。一方、2009 年に採集した 84 菌株では、82 菌株が 0.1 ~ 50 ppm の範囲に分布し、MIC 値が 3,000 ppm を超える菌株が 2 菌株認められた (図-1)。稲田ら (2010) は、1996 ~ 2004 年に

Occurrence of Strobilurin-resistant Strains of the Causal Fungus of Mango Anthracnose in Okinawa Prefecture. By Tetsuya TAKUSHI

(キーワード: マンゴー炭疽病, アゾキシストロビン, クレソキシムメチル, ストロビルリン, 耐性菌)

佐賀県内から分離したイチゴ炭疽病菌 113 菌株に対するアゾキシストロビン剤の MIC 値の分布を調査した結果、58 菌株が MIC 値 0.19 ~ 3.12 ppm の範囲に分布したが、55 菌株は 3,200 ppm 以上に分布し、明瞭な二峰性を示した。さらに、これらの MIC 値が異なる菌株について、生物検定およびチトクローム *b* 遺伝子の PCR-RFLP 解析を行った結果、MIC 値 0.19 ~ 3.12 ppm の菌株はアゾキシストロビン剤感受性菌、3,200 ppm 以上の菌株は耐性菌と判定した。このことから、マンゴーでは MIC 値が 0.1 ~ 5 ppm の範囲に分布した 103 菌株は感受性菌であり、10 ppm と 50 ppm に分布した各 1 菌株については今後、再度の検討を要すると考えられた。一方、MIC 値が 3,000 ppm を超える 2 菌株については耐性菌であると判断した。なお、耐性菌と判断した 2 菌株は石垣島の同一圃場から採集された。

III 生物検定によるアゾキシストロビン剤の発病抑制効果

分離菌株のマンゴー葉に対する病原性を、含菌寒天片を用いた接種試験で確認した。供試菌株はアゾキシストロビン 3,000 ppm 添加培地で菌糸生育を示した耐性菌 Isg-25 および Isg-26 の 2 菌株に加え、対照菌株として MIC 値が 0.5 ppm 以下の感受性菌 Hng-1 および Tmg-6 の計 4 菌株を用いた。国頭マーヅ土壤（沖縄本島中北部や八重山諸島、久米島等に広く分布し、土色は明るい赤色～黄色であり、pH は酸性を呈する）を入れた園芸ポットに定植したマンゴー（品種‘アーウィン’）の 2 年生接ぎ木苗の全葉に、100 ppm 濃度（常用濃度 1,000 倍）のアゾキシストロビン剤を手動噴霧器で 200 ml 散布した。散布 24 時間後に若い未硬化葉の中央部を滅菌した柄付き針で付傷し、その上に供試菌株の含菌寒天片を貼り付けた。接種葉を含む苗全体をポリエチレン袋で覆

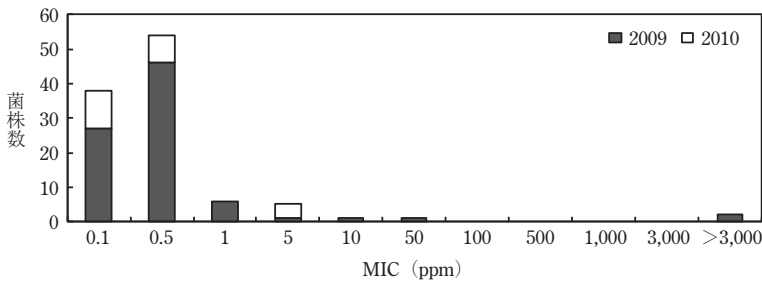


図-1 マンゴー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* の菌糸生育に対するアゾキシストロビン剤の MIC 値の分布
供試菌株は計 107 菌株 (2009 年: 84 菌株, 2010 年: 23 菌株)。

表-1 アゾキシストロビン剤耐性および感受性マンゴー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* の生物検定による発病率と発病度

菌株	アゾキシストロビン剤処理区		無処理区	
	発病率 (%)	発病度 ^{a)}	発病率 (%)	発病度
Isg-25	100.0 a	63.3 a ^{b)}	100.0 a	58.3 ab
Isg-26	93.3 ac	46.7 a	100.0 a	41.7 a
Hng-1	26.7 b	8.3 b	100.0 a	78.3 b
Tmg-6	53.3 bc	13.3 b	100.0 a	76.7 b

a) 発病度は以下の基準で算出した。

指数 0: 病斑なし, 指数 1: 病斑径が 0.6 ~ 1.0 cm, 指数 2: 病斑径が 1.1 ~ 1.5 cm, 指数 3: 病斑径が 1.6 ~ 2.0 cm, 指数 4: 病斑径が 2.1 cm 以上。

発病度 = $\sum \{(\text{程度別病斑数} \times \text{指数}) / \text{調査葉数} \times 4\} \times 100$ 。

b) アルファベットは Steel-Dwass test による多重比較検定 ($p < 0.05$) の結果であり、異符号間に有意差あり。

い、27℃の暗室内で5日間静置した。その後ポリエチレン袋を除去し、ガラス室に移して自然条件下で管理した。調査は接種15日後の発病病斑の直径を計測し、発病度を算出した。その結果、対照菌株の Hng-1 および Tmg-6 の接種では、無処理区の発病度はそれぞれ 78.3 および 76.7 に対し、アゾキシストロビン剤処理区では発病抑制効果が認められ、発病度はそれぞれ 8.3 および 13.3 であった。一方、耐性菌 Isg-25 および Isg-26 の接種では、無処理区の発病度はそれぞれ 58.3 および 41.7 に対し、アゾキシストロビン剤処理区では発病度は 63.3 および 46.7 と発病抑制効果は認められなかった(表-1)。

IV 分離菌に対するクレソキシムメチル剤の最小生育阻止濃度 (MIC 値)

マンゴー由来の耐性菌 Isg-25 および Isg-26 の2菌株に加え、対照として感受性菌である Hng-1 および Tmg-6、標準菌株として QoI 剤耐性イチゴ炭疽病菌 (03-33-1) とその感受性菌 (96C-1) の計6菌株を供試してクレソキシムメチル剤に対する MIC 値を調査した。SHAM 1,000 ppm とともにクレソキシムメチル剤 (日産化学工業株式会社、商品名: ストロビードライフフロアブル) を有効成分が 0, 0.1, 1, 10, 100, 1,000, 3,000 ppm (7段階) になるように添加した PDA 培地上に、供試菌株の菌叢ディスクを置床した。その後 25℃ で4日間培養し、菌糸生育の有無を肉眼で確認した。その結果、耐性菌 Isg-25, Isg-26 およびイチゴ炭疽病菌 (03-33-1) ではクレソキシムメチル添加培地上で菌糸生育が認められ、いずれも MIC 値は 3,000 ppm 以上を示した。一方、感受性菌 Tmg-6 では MIC 値が 1 ppm, Hng-1 およびイチゴ炭疽病菌 (96C-1) ではそれぞれ 10 ppm であった(表

表-2 アゾキシストロビン剤耐性および感受性マンゴー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* の菌糸生育に対するクレソキシムメチル剤の効果

Phenotype	菌株	MIC ^{a)} (ppm)
		クレソキシムメチル
耐性菌	Isg-25	> 3,000
	Isg-26	> 3,000
	03-33-1 *	> 3,000
感受性菌	Tmg-6	1
	Hng-1	10
	96C-1 *	10

^{a)} MIC : 最小生育阻止濃度。

* : 03-33-1 株と 96C-1 株はイチゴ炭疽病菌 (標準菌株)。

-2)。このことから、アゾキシストロビン 3,000 ppm 添加培地で菌糸生育を示した耐性菌 Isg-25 および Isg-26 の2菌株はクレソキシムメチル剤に対しても交差耐性を示すことが確認された。

V チトクローム b 遺伝子の PCR-RFLP 解析

マンゴー由来の耐性菌 Isg-25 および Isg-26、対照の感受性菌 Hng-1 および Tmg-6 に加え、標準菌株として QoI 剤耐性イチゴ炭疽病菌 (03-33-1) とその感受性菌 (96C-1) の計6菌株について、稲田ら (2010) の方法に準じてチトクローム b 遺伝子の PCR-RFLP 解析を行った。DNA 抽出は市販のキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) を用いて抽出し、センスプライマー GCCBF1 (稲田ら, 2008) およびアンチセンスプライマー RSCBR2 (ISHII et al, 2001) を用いて PCR を行った。PCR 反応は 94℃ で2分間の熱変性後、94℃ 30秒間、53℃ 1分間、72℃ 1分間の処理を40サイクル行い、最後に 72℃ で8.5分間加熱した。得られた PCR 産物に耐性菌のチトクローム b 遺伝子の変異部位 (コドン 143 : G143A) を認識して切断する制限酵素 *Fnu4HI* で (37℃ で10分間) 処理した後、1.5% アガロースゲルで電気泳動して、バンドの有無を確認した。感受性菌では 100 bp 付近に1本のバンドが認められるのに対し、耐性菌では制限酵素処理により PCR 産物が切断され、50 bp 付近にバンドが確認できる。その結果、Hng-1, Tmg-6 およびイチゴ炭疽病菌 (96C-1) では制限酵素による PCR

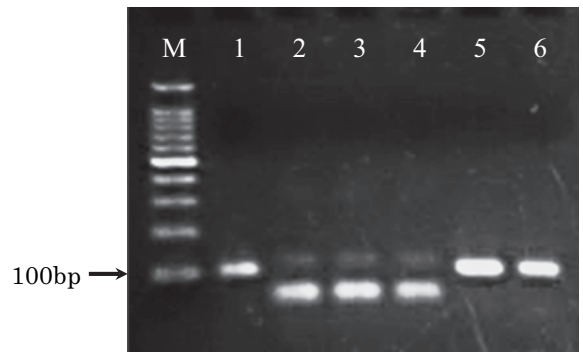


図-2 制限酵素 *Fnu4HI* 処理によるマンゴー炭疽病 *C. gloeosporioides* のチトクローム b 遺伝子の PCR-RFLP パターン

M : 100 bp ラダーマーカー、

1 : 感受性菌 96C-1, 2 : 耐性菌 03-33-01,

3 : 耐性菌 Isg-25, 4 : 耐性菌 Isg-26,

5 : 感受性菌 Hng-1, 6 : 感受性菌 Tmg-6.

矢印は 100 bp を示す。

96C-1 株と 03-33-01 株はそれぞれイチゴ炭疽病菌 (標準菌株)。

産物の切断は認められず、100 bp 付近に1本のバンドが認められたが、Isg-25, Isg-26 およびイチゴ炭疽病菌 (03-33-1) ではPCR産物が切断され、50 bp 付近にバンドが認められた。このことから、マンゴー由来の耐性菌 Isg-25 および Isg-26 の2菌株でチトクローム *b* 遺伝子の変異が確認された (図-2)。

QoI 剤の作用点は、病原菌のミトコンドリア内膜に存在するチトクローム *bc1* 複合体であり、QoI 剤がタンパク質に結合することで、電子伝達系が阻害され、病原菌は呼吸できなくなり死滅する (Sierotzki et al., 2000)。キュウリうどんこ病菌、キュウリべと病菌およびイチゴ炭疽病菌の耐性菌では、チトクローム *b* 遺伝子に点変異があり、それによりコドン 143 のアミノ酸がグリシンからアラニンに置き換わることが報告されている (Ishii et al., 2007; 稲田ら, 2008)。この変異部位は QoI 剤の結合に重要な部位であり、アミノ酸置換によってチトクローム複合体への QoI 剤の結合性が低下することで、殺菌作用がなくなるものと推察されている (Ishii et al., 2001)。チトクローム *b* 遺伝子の PCR-RFLP 解析の結果から、マンゴー炭疽病菌で確認された耐性菌2菌株においても、キュウリうどんこ病菌、キュウリべと病菌およびイチゴ炭疽病菌と同様な耐性機構が関与していると考えられる。

おわりに

沖縄県産マンゴー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* において寒天希釈平板法による MIC 値、生物検定および PCR-RFLP による遺伝子診断の結果から、QoI 剤耐性菌の発生が初めて確認された。しかし、今回確認された耐性菌は、供試 107 菌株のうち2菌株と低頻度であり、いずれも石垣島の1圃場から採集されたこと、生産現場で本剤の薬効低下を示唆するような状況は確認されていないこと等から推察すると、現段階では大きな問題となるレベルではないと考えられる。また、QoI 剤が農薬登録される以前に採集されたイチゴ炭疽病菌のチトクローム *b* 遺伝子解析の結果から、QoI 剤耐性菌と同じ変異を持つ菌が存在することが確認されていることから (石井, 2002)、今回マンゴーで確認された耐性菌2菌株も本系統薬剤が登録される以前から低密度ながら自然界に存在していた可能性も考えられる。この点については同圃場

での防除歴における QoI 剤の使用回数と耐性菌の発生頻度との関連性について継続して調査を行う必要がある。さらに、マンゴーの生産現場では炭疽病の登録薬剤としてアゾキシストロビン剤と同系統のクレソキシムメチル剤 (2006年11月登録) が併用されており、出蕾期から果実肥大期にかけての予防剤との体系散布により実用的な防除効果を示すことが確認されている (澤岬ら, 2013)。体系散布では着果以降は果実に薬害を生じない薬剤を選択することが必須であるが、マンゴーはマイナー作物であるために薬剤の登録数が少なく、汚れや薬害の少ない QoI 剤をやむをえず連用してしまう傾向にある。しかし、アゾキシストロビン剤耐性イチゴ炭疽病菌がクレソキシムメチル剤に交差耐性を示すように (稲田ら, 2008)、今回の耐性菌2菌株についても同様に交差耐性が認められたことから、今後、マンゴーにおいては、これら QoI 剤の使用頻度の増加とともに耐性菌密度もさらに高まることが推察される。このことから、本県では現在、研究機関において QoI 剤の散布回数削減によるマンゴー炭疽病に対する体系散布の防除効果の検討を行うとともに、普及や JA 指導員と連携しながら、QoI 剤の使用を年1回にとどめるよう防除歴の見直しを進めている。今後は QoI 剤に対する病原菌の感受性モニタリングを継続しながら、耐性菌の発生動向に注意を促すとともに、代替殺菌剤の登録などにも取り組む必要がある。また、薬剤防除による効果を補完するためにも、耕種的・物理的防除対策を積極的に取り入れながら、QoI 剤のみに依存しない総合防除体系の構築を図る必要がある。

引用文献

- 1) 平山喜彦ら (2008): 関西病虫研報 50: 93 ~ 94.
- 2) 稲田 稔ら (2008): 日植病報 74: 114 ~ 117.
- 3) ———ら (2010): 同上 76: 1 ~ 6.
- 4) 石井英夫 (2002): 茨城病虫研報 41: 1 ~ 7.
- 5) Ishii, H. et al. (2001): *Phytopathology* 91: 1166 ~ 1171.
- 6) ——— et al. (2007): *ibid.* 97: 1458 ~ 1466.
- 7) 菊地麻里ら (2010): 茨城農総七園研報 17: 35 ~ 42.
- 8) Mills, P. R. et al. (1992): *FEMS Microbiol. Lett.* 98: 137 ~ 144.
- 9) 中村重正ら (1979): 日植病報 45: 545 (講要).
- 10) 佐藤豊三 (1997): 四国植防 32: 1 ~ 19.
- 11) Sierotzki, H. et al. (2000): *Pest Management Science* 56: 833 ~ 841.
- 12) Sreenivasaprasad, S. et al. (1996): *Plant Pathol.* 45: 650 ~ 655.
- 13) 田場 聡ら (2004): 熱帯農業 48: 57 ~ 61.
- 14) 澤岬哲也ら (2012): 同上 5: 20 ~ 24.
- 15) ———ら (2013): 同上 6: 81 ~ 88.
- 16) ———ら (2014): 日植病報 80: 119 ~ 123.
- 17) White, T. J. et al. (1990): *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 315 ~ 322.