

第 33 回

殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム 講演要旨集

Abstracts of the 33rd Symposium
of Research Committee on Fungicide Resistance

2024 年 3 月 16 日
東北大学

March 16, 2024
Tohoku University

日本植物病理学会

The Phytopathological Society of Japan

日本植物病理学会
第 33 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム

《プログラム》

- | | |
|-------------|--|
| 9:30- | 開会 |
| 9:35-10:15 | 秋田県における MBC 剤および DMI 剤耐性リンゴ褐斑病菌の発生
佐藤 裕（秋田県仙北地域振興局農林部） |
| 10:15-10:45 | 愛知県における灰色かび病菌の薬剤耐性獲得状況調査及びその対応
恒川 健太（愛知県農業総合試験場） |
| 10:45-11:35 | 滋賀県で分離されたタマネギ腐敗病菌の薬剤感受性と各種殺菌剤の防除効果
小幡 善也（滋賀県農業技術振興センター） |
| 11:35-12:15 | トマト葉かび病に対する有効な SDHI 剤の探索
浅野 峻介（奈良県農業研究開発センター） |
| 12:15-13:15 | <昼食休憩> |
| 13:15-13:25 | 研究会会計および幹事会活動報告 |
| 13:25-14:05 | 新規殺菌剤キノプロール®（ミギワ®）の作用特性と感受性検定
西野 茂樹（日本曹達株式会社） |
| 14:05-15:00 | Role and Activities of the Asia Fungicide Resistance Action Committee
(Asia FRAC)
Dr.Susan Knight (Syngenta Asia Pacific Pte. Ltd.
& Founding chairperson at Asia FRAC) |
| 15:00- | 質疑応答 |
| 15:15- | 閉会 |

秋田県における MBC 剤および DMI 剤耐性リンゴ褐斑病菌の発生

Occurrence of MBC and DMI resistant isolates of Apple blotch in Akita Prefecture

秋田県仙北地域振興局農林部

佐藤 裕

Yutaka Sato, Akita Prefectural Senboku Regional Development Bureau, Agriculture and Forestry
Department, 13-62 Kamisakae, Daisen, Akita 014-0062, Japan

Abstract

In Akita Prefecture, the method of applying MBC from July to August to control apple blotch (*Diplocarpon mali*), an important disease, has been implemented since around 1980. However, in 1998, MBC-resistant isolates were detected in the southern part of Akita prefecture. Since then, the number of orchards with detected resistant isolate has increased, and in 2014, resistant isolates were found throughout Akita Prefecture. Therefore, the use of MBC has been discontinued in orchards, which have a high density of MBC-resistant isolate. When we measured the susceptibility test of apple blotch obtained from fields where MBC use had been discontinued for 14 years, MBC-resistant isolate densities remained high. I selected Cyprodinil and Tebuconazole as fungicides with an equivalent therapeutic control efficacy to MBC agents against apple blotch. However, DMI containing Tebuconazole is used as a preventive measure against apple scab during the flowering season. Therefore, Cyprodinil is predominantly used as a successor to MBC in apple orchards across Akita Prefecture. In 2020, a strain with significantly reduced susceptibility to tebuconazole was detected for the first time in Japan in an apple orchard in Akita Prefecture, and a reduction in control efficacy was also confirmed in an inoculation test. Furthermore, these isolates exhibited reduced susceptibility to Fenarimol, and cross-resistance to DMI was observed. When using DMI to control Apple Blotch, it is necessary to consider in advance whether the control effect can be expected.

1. はじめに

秋田県の果樹栽培は、東北北部の冷涼な気象条件を生かしたリンゴ等の寒冷地果樹を主体とし、2022年の果樹栽培面積は2,150haである。主要樹種にはリンゴの他、ブドウ、ニホンナシ、モモ、オウトウがある。主力のリンゴ栽培面積は1973年の3,560haをピークに減少が続き、2022年には1,220haとピーク時の34%となっている。農林水産省作物統計調査によると、栽培面積、出荷量ともに全国5位となっている。

リンゴ褐斑病（病原菌：*Diplocarpon mali*）は主に葉に発生する糸状菌であり、発病後の早期落葉を特徴とし、多発すると激しく落葉した影響から果実が着色不良や小玉化、未熟果となる。さらに、光合成量の低下から樹体の貯蔵養分が不足し、翌年の花芽の充実不良や花数の不足を招く。一次感染は前年の被害落葉上に形成された子のう盤から飛散する子のう胞子によっておこり、4～5月が主要感染期となる。発病葉上には、褐色の病斑と分生子堆が形成され、湿度の上昇に伴って分生子が噴出した後、雨

滴に混じって分散し、二次感染を繰り返す。果実には黒褐色の不定形病斑を果面に生じ外観を損ねる程度であるが、激しい落葉による果実品質への影響が大きいことから、本病に対する防除の対象は主に葉となる。秋田県では本病に対する効果的な防除法として、保護防除剤散布による一次感染阻止および二次感染阻止、治療防除剤散布による二次感染の発病抑制による散布体系が普及している。このうち、治療防除剤には現在ベンゾイミダゾール系(MBC)剤、シプロジニル(Cyp)剤およびテブコナゾール(Teb)剤が現場指導されているが 1998 年に MBC 剤耐性菌が、さらに 2020 年に Teb 剤耐性菌が秋田県で検出された。

2. MBC 剤耐性リンゴ褐斑病菌の発生と分布の拡大

MBC 剤耐性については、第 11 回本シンポジウム（佐藤，2001）において、当時の感受性検定結果とチオファネートメチル(TM)水和剤の本菌に対する防除効果試験の結果を述べた。本稿では、その後の MBC 剤耐性菌の発生状況について述べる。

1998 年に秋田県で MBC 剤耐性菌が初検出された際、県南部の 12 圃場（60 菌株）中 1 圃場（2 菌株）のみが耐性菌であった。その後 2001、2004 年の調査では検出圃場が増加および県中央部にも分布が拡大し、2014 年にはさらに県北部でも検出され、図 1 に示すとおり、初検出から 16 年を経て県内全域に広く存在していることが明らかとなった。なお、他県での MBC 剤耐性菌検出は広島県（亀川ら，1999）、茨城県（椎葉ら，2014）、青森県（十川ら，2018）、福島県（七海ら，2019）など主要リンゴ産地を含めた国内の広い範囲で報告されている。

本県のリンゴ産地で MBC 剤が褐斑病防除剤として普及し始めたのは、本病に卓効を示していたボルドー液の使用を他県に先がけて中止した 1980 年頃となる。他県のリンゴ産地がボルドー体系から non-ボルドー体系へと移行し褐斑病防除剤として MBC 剤を利用し始めたのは、さらに 10 年以上後となる（十川ら，2018）。MBC 剤はすでに 1970 年代から黒星病あるいはモニリア病防除に利用されており、対象病害を異にして同一年で複数回使用されたこともしばしばあった。黒星病に対しては普及からわずか数年で耐性菌が優占したために使用が中止されたが、モニリア病あるいは腐らん病に対しては、感染後の被害軽減対策として、現在も多発年やその翌年を主体に使用されている。国内のリンゴ産地で、最も早く褐斑病菌の MBC 剤耐性菌が発生した背景には、本県が防除対象としていた病害が他県に比べて多く、MBC 剤の使用頻度も高かったためと考えられる。

県内では褐斑病に対し MBC 剤の防除効果が低下している園の多くで本系統剤の使用を中止しており、10 年以上 MBC 剤未使用の園も多い。そこ

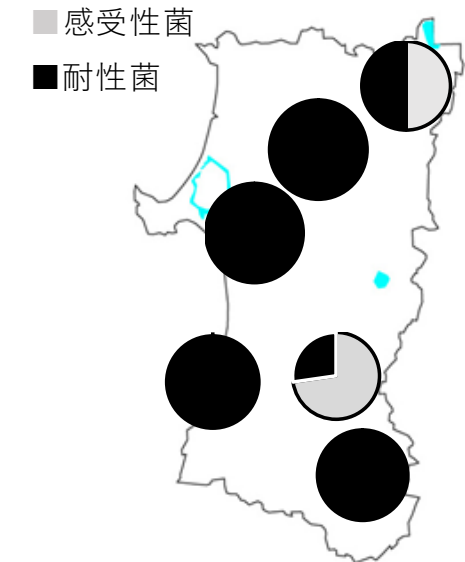


図 1 県内6地域でのMBC剤耐性菌検出割合(2014)

本県のリンゴ産地で MBC 剤が褐斑病防除剤として普及し始めたのは、本病に卓効を示していたボルドー液の使用を他県に先がけて中止した 1980 年頃となる。他県のリンゴ産地がボルドー体系から non-ボルドー体系へと移行し褐斑病防除剤として MBC 剤を利用し始めたのは、さらに 10 年以上後となる（十川ら，2018）。MBC 剤はすでに 1970 年代から黒星病あるいはモニリア病防除に利用されており、対象病害を異にして同一年で複数回使用されたこともしばしばあった。黒星病に対しては普及からわずか数年で耐性菌が優占したために使用が中止されたが、モニリア病あるいは腐らん病に対しては、感染後の被害軽減対策として、現在も多発年やその翌年を主体に使用されている。国内のリンゴ産地で、最も早く褐斑病菌の MBC 剤耐性菌が発生した背景には、本県が防除対象としていた病害が他県に比べて多く、MBC 剤の使用頻度も高かったため

表 1 西目地区(MBC剤耐性リンゴ褐斑病菌まん延圃場※)での年次別MBC剤耐性菌検出率

	調査年		
	2004	2014	2020
供試菌株数	12	20	60
耐性菌検出率(%)	100	100	93.3

※2007年以降、MBC剤は使用していない。

で、感受性回復の有無や程度を確認するため、MBC 剤耐性菌のまん延が確認され、2007 年以降、本剤の使用を中止している由利本荘市西目地区から 2020 年に分離された 60 菌株の MBC 剤感受性検定を行った。しかし、耐性菌検出率は高く、MBC 剤の使用を 14 年間中止しても、感受性の回復は認められなかった(表 1)。MBC 剤耐性のナシ黒星病菌でも感受性の回復は容易に回復しないことが報告されており(石井ら、1979)、リンゴ褐斑病菌についても MBC 剤耐性菌がまん延した圃場では、感受性の早期回復は見込めないと考えられた。

3. MBC 剤の代替剤スクリーニング

リンゴ褐斑病の薬剤防除体系において MBC 剤散布は効果が高く、生産者からの信頼も厚い。しかし、耐性菌の出現とその後のまん延に対応するため、2001 年から、作用機作が異なり、さらに感染後の散布でも防除効果が期待できる殺菌剤スクリーニングに取り組んだ。その結果、表 2 に示すように数剤に治療効果が認められ、特に Cyp 水和剤と Teb 水和剤が有望視された。

1) アニリノピリミジン (AP) 剤本系統剤の一つである Cyp 水和剤はリンゴ斑点落葉病および黒星病防除剤として高い効果が認められていたが、斑点落葉病に対する防除試験を実施している課程で、褐斑病の発生量も同時に抑えられていたことから、本剤に注目し防除効果を行った。その結果、図 2 に示すとおり、TM 水和剤にはやや及ばないものの、高い治療効果が認められ、現在は MBC 剤耐性菌が高率に検出された圃場で普及している。

2) 脱メチル化阻害 (DMI) 剤

AP 剤の Cyp 水和剤は、褐斑病の他、黒星病やモニア病にも治療効果が認められており、さらに斑点落葉病にも卓効を示すことから、各リンゴ産地の病害発生状況に応じて、開花期前から落花期、梅雨期と様々な時期に使用されている。そのため、AP 剤の使用回数を抑えるためにも、MBC 剤、AP 剤とは異なる作用機作を持つ褐斑病治療防除剤が必要となった。リンゴ殺菌剤として普及しているストロビルリン系 (QoI) 剤、ポリオキシシン剤や今後リンゴ病害での普及が期待されるジヒドロオロト酸脱水素酵素阻害 (DHODHI) 剤、さらにリンゴでは国内未登録だが、海外ではリンゴ病害防除剤として普及しているフェニルピロール剤を供試し、治療効果を検討した。しかし、QoI 剤 (トリフロキシストロビン、ピリベンカルブ、クレソキシムメチル各水和剤)、ポリオキシシン水和剤、DHODHI 剤 (イブフルフェノキン水和剤)、フェニルピロール剤 (フルジオキシソニル水和剤) の治療効果は認められず、

表2 リンゴ褐斑病 (MBC剤耐性菌) に対する治療防除効果

グループ名	供試薬剤名	効果の程度
MBC剤	チオファネートメチル水和剤	×
	ベノミル水和剤	×
SDHI剤	イソピラザム水和剤	×
	インピルフルキサム水和剤	×
	フルオピラム水和剤	×
	ベンチオピラド水和剤	×
	ピラジフルミド水和剤	△
イミノクタジン剤	イミノクタジナルベシル酸塩水和剤	×
QoI剤	トリフロキシストロビン水和剤	×
	ピリベンカルブ水和剤	×
	クレソキシムメチル水和剤	×
DHODHI	イブフルフェノキン水和剤	×
DMI剤	ヘキサコナゾール水和剤	△
	テブコナゾール水和剤	×～○
AP剤	シプロジニル水和剤	△～○
ポリオキシシン剤	ポリオキシシン水和剤	×
フェニルピロール剤	フルジオキシソニル水和剤	×

※効果の程度はMBC剤耐性菌を用いた接種試験による防除価を基に以下の基準で示した。○：防除価80以上、△：同50以上80未満、×：50未満。

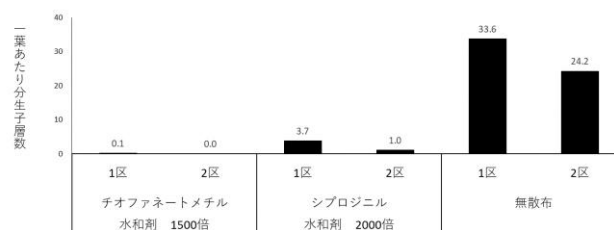


図2 リンゴ褐斑病に対する治療効果試験 (2001)

供試樹：ふじ、わい性樹、10年生、1区あたり6新梢、接種:MBC剤感受性菌の分生子懸濁液(5×10^4 /ml)を噴霧、直ちに3日間ポリ袋で密封、散布：ポリ袋を除いて風乾後、各薬剤をハンドスプレーで噴霧、調査:接種から18日後に供試枝の先端10～16葉について発病状況を実態顕微鏡下で観察し、1葉あたり分生子層数を算出。

SDHI 剤は一部の剤で治療効果が認められたものの、その効果は低いとみられた（データ略）。一方、DMI 剤では **Teb** 剤、ヘキサコナゾール剤などで治療効果が認められた（表3）。**Teb** 水和剤は本県では黒星病防除剤として、さらにモニリア病の葉腐れへの治療効果も併せ持つことや、他樹種でも広く普及していることから、本剤での圃場試験を実施した。試験は **MBC** 剤感受性菌の優占圃場（試験終了後の **MBC** 剤感受性検定で 11 菌株中 8 菌株が感受性菌）、および同剤耐性菌優占圃場（試験終了後の **MBC** 剤感受性検定で供試した 16 菌株すべて耐性菌）の 2 箇所を実施し、いずれの圃場でも、**Teb** 水和剤を加用した区では高い防除効果を示した（図 3、4）。

表3 MBC剤耐性リンゴ褐斑病に対する各種殺菌剤の治療防除効果

供試薬剤	希釈倍数	調査葉数	発病指数				発病度	発病葉率
			0	1	2	3		
テブコナゾール水和剤	2,000	52	16	17	18	1	35.9	69.2
ヘキサコナゾール水和	1,000	53	15	17	18	3	39.0	71.7
シプロジニル水和剤	2,000	54	17	11	20	6	42.6	68.5
メバニピリム水和剤	4,000	42	4	11	12	15	63.5	90.5
ベンチオビラド水和剤	1,500	42	4	6	17	15	67.5	90.5
無散布	—	56	11	11	14	20	58.9	80.4

供試樹：秋田紅あかり、3年生、各2樹、接種：褐斑病菌（MBC剤耐性菌 胞子濃度： $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ ）を噴霧、ポリ袋で接種部を2日間保湿、散布：接種4日後に供試薬剤を散布
調査：接種13日後に全葉について、発病程度を以下の基準で調べ、発病葉率および発病度を算出した。指数0：発病無し、指数1：1葉当たり病斑数1～10個、指数2：同病斑数11以上、指数3：黄変または落葉

発病度 = $\{ \sum (\text{指数} \times \text{程度別発病葉数}) / (3 \times \text{調査葉数}) \} \times 100$

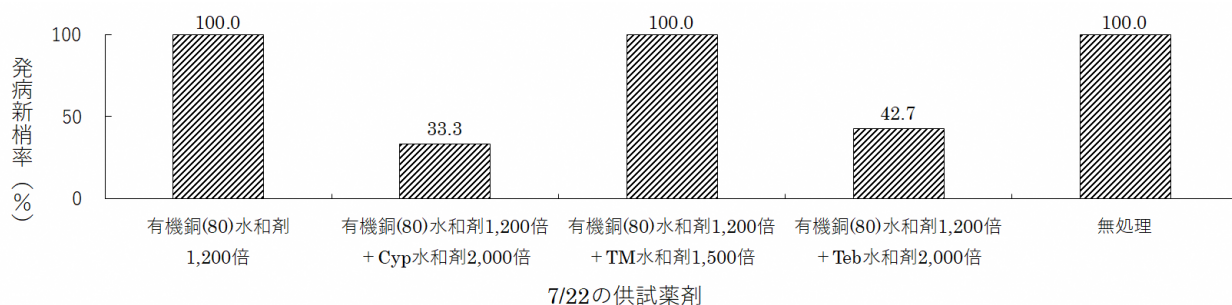


図3 MBC剤耐性菌優占圃場での褐斑病防除試験(2014)

供試樹：秋田市農家圃場「ふじ」わい性樹(36年生)、試験散布：7/22各区に供試薬剤を散布（7/22以外は通年で一律防除）
調査：10/8、1樹あたり30新梢について発病葉の有無を観察（1区あたり3～5樹を供試）

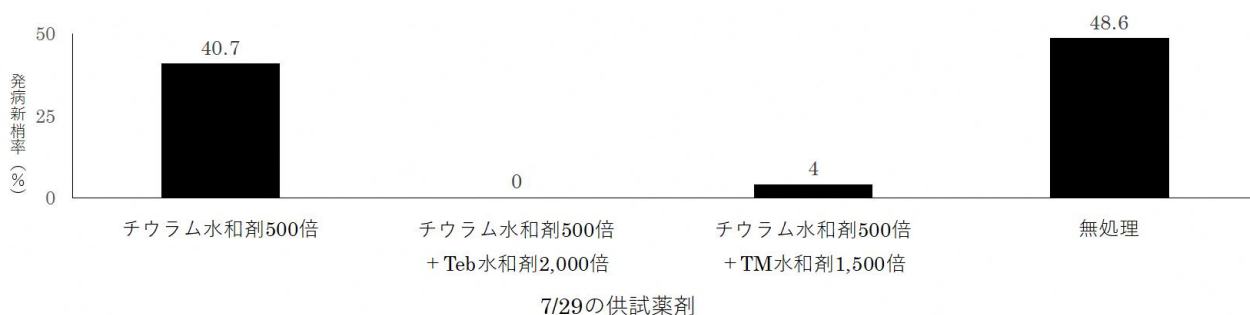


図4 MBC剤感受性菌優占圃場での褐斑病防除試験(2014)

供試樹：場内圃場「ふじ」わい性樹(5年生)、試験散布：7/29各区に供試薬剤を散布(7/29以外は通年で一律防除)
調査：10/15各樹の全新梢について発病葉の有無を観察(各区5樹、1樹あたり14～46本)

4. DMI 剤耐性菌の検出

2020 年はリンゴ褐斑病が県全域で発生し、特に沿岸部の由利本荘市西目地区では 6 月下旬から発病が見え始め、8 月下旬には本病による早期落葉も見られたことから、当該地域の防除組織が夏場（9 月）の褐斑病対策として **Teb** 水和剤の散布を計画した。しかし、既に落葉も見られる状況での本剤使用は指

導上想定しておらず、指導機関からは多発圃場に対する **Teb** 水和剤散布の有効性を不安視する声もあったことから、**Teb** 剤感受性を調査するため、散布直前の 8 月末に発病葉を採取した。また、県南部の多発圃場（美郷町 2 圃場）および果樹試験場病害虫圃場の計 6 圃場からも発病葉を採取し、得られた 88 菌株について **Teb** 剤感受性検定を行った。

その結果、図 5 に示すとおり、感受性頻度分布は MIC 値が 0.4ppm 未満および 6.3ppm にピークを持つ 2 峰性を示した。MIC 値を 6.3ppm 付近とする 41 菌株はいずれも西目地区の 3 圃場由来であった。本剤が県内で普及している濃度（100ppm）よりは低いものの、2 峰性を示し、効力低下が疑われたことから、ポット苗の‘ふじ’を用いて本病に対する防除効果を検討した。

2 峰それぞれから Ni-1-4 菌株（西目地区由来株、MIC 値 6.3ppm）および Se-8 菌株（美郷町由来株、MIC 値 0.4ppm 未満）を接種源として供試し、**Teb** 水和剤 2000 倍を散布した場合の防除価は、予防的散布でそれぞれ 6.7、90.6、治療的散布で 8.7、100 となり、感受性低下菌株では著しく防除効果が劣った。MBC 剤や QoI 剤、DMI 剤などではある薬剤に耐性を示した場合に、同系統内で交差耐性を示す事例が多い。本県リンゴ病害では 2018 年にリンゴ黒星病菌の DMI 剤耐性菌が検出されたが、雪田（2017）は本系統剤のリンゴ黒星病耐性菌には交差耐性が認められたとし、栢森（2019）はテンサイ褐斑病菌の交差耐性について第 29 回本シンポジウムで述べている。そこで、DMI 剤のフェナリモル水和剤を用い、**Teb** 剤に対する耐性菌 8 菌株、感受性 8 菌株について感受性検定を行ったところ 2 峰性を示し（図 6）、それぞれの感受性ピークに含まれた菌株は両剤で一致し、DMI 剤に対する交差耐性が確認された。本報告において供試した内の 2 菌株を農業生物資源遺伝子バンクに DMI 剤耐性菌 MAFF247723（= Ni-1-4 株）、DMI 剤感受性菌 MAFF247724（= Se-8 株）として寄託した。

5. 生産現場への対応（由利本荘市西目地区）

1) 防除実績

表 4 に示すように当該地区の DMI 剤使用実績は 10 年以上にわたり年間 2 回以内となっていた。なお、2020 年に **Teb** 水和剤が 3 回使用されているが、前項で述べたとおり褐斑病に

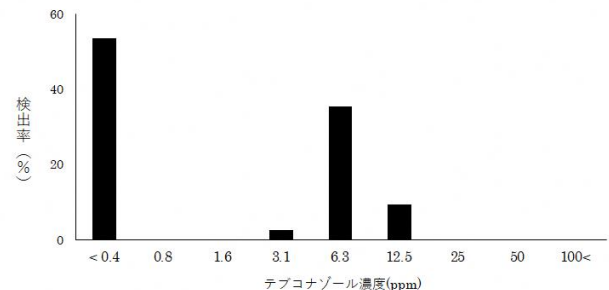


図5 リンゴ褐斑病菌のテブコナゾールに対するMIC値 (n=88)

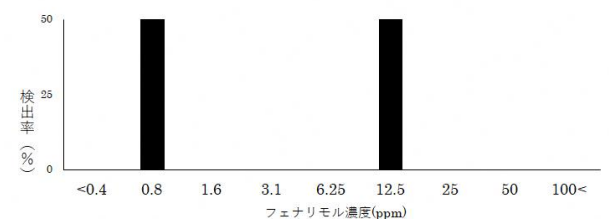


図6 リンゴ褐斑病菌のフェナリモルに対するMIC値 (n=16、内訳：Teb剤感受性菌8、Teb剤耐性菌8)

表4 リンゴ褐斑病に対する西目地区の開花期前後および治療防除剤の散布実績

		各散布時期の防除剤※			
		開花前	落花直後	7月	9月
2023	Teb4000+Thi	Teb4000+Thi	Cyp		
2022	Teb2000+Thi	Teb4000+Thi	Cyp		
2021	Teb2000+Mz	Teb4000+Mz	Cyp		
2020	Teb2000+Thi	Teb4000+Thi	Cyp		Teb
2019	Teb2000+Thi	Teb4000+Thi	Cyp		
2018	Teb2000	Teb4000+Thi	Cyp		
2017	Teb2000	Teb4000+Thi	Cyp		
2016	Teb2000	Teb4000+Thi	Cyp		
2015	Teb2000	Teb4000+Thi	Cyp		
2014	Teb2000	Teb4000+Thi	Cyp		
2013	Teb2000	Teb4000+Thi	Cyp		
2012	Teb2000+Dit	Teb4000+Thi	Cyp		
2011	Teb2000+Dit	Teb4000+Thi	Cyp		
2010	Teb2000+Dit	Teb4000+Thi	Cyp		
2009	Teb2000+Dit	Teb4000+Thi	Cyp		
2008	Sim+Dit	Sim+Z・T	Cyp		
2007	Sim+Dit	Sim+Z・T	Cyp		
2006	Sim+Dit	Sim+Z・T	Cyp		TM
2004	Hex+Z・T	Z・T	Cyp		

※Teb:テブコナゾール、Sim:シメコナゾール、Hex:ヘキサコナゾール、Cyp:シプロジニル、TM:チオファネートメチル、Dit:ジチアノン、Thi:チウラム、Mz:マンゼブ、Z・T:ジラム・チウラム

よる落葉が見られるほど多発してからの散布であり、防除適期を逸していたことや、Teb 剤耐性菌が既に高密度に存在していたことから、9 月の Teb 水和剤散布は効果が無かったと考えられる。

県内での DMI 剤の使用回数は主にリンゴ黒星病防除剤として定着した 1990 年代から年 2 回が一般的であるが、この地域は重要病害の一つである黒星病の被害が 20 年以上認められていないことから、DMI 剤をうどんこ病、赤星病、褐斑病防除を主な目的として用いられている。特に褐斑病は多発により激しい落葉が見られる年もあることから、2003 年まで使用していた TM 水和剤を 2004 年からは Cyp 剤に変更、さらに、一次感染期防除に有効な試験成績が得られたシメコナゾール水和剤やジチアノン水和剤（図 7）を開花前に使用するなど、褐斑病に対する防除圧の高さを特徴とした防除体系となっている。ただし、コスト低減のために 2013 年から 6 年にわたり開花前防除の Teb 水和剤が単用されており、さらに落花期防除の Teb 水和剤は県内で普及している希釈倍数 2000 倍より低濃度で 10 年以上使用されているなど他産地の防除体系では見られない特徴があり、これらが DMI 剤耐性褐斑病菌を選抜した可能性が考えられる。また、2020 年の Teb 剤感受性調査は、当年に Teb 剤 3 回目散布をする直前の発病葉から得られた菌株であることから、2020 年には、既に、Teb 剤耐性菌が圃場内にまん延していたことになる。この地域については、過去に MBC 剤感受性を複数回検討したことはあったが、Teb 剤感受性については未検討であった。そのため、Teb 剤耐性菌がいつの時点で出現したかについては不明であるが、Teb 耐性菌の検出率が非常に高いことから、数年前から存在していたものと推測している。

日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会による「耐性菌対策のための DMI 剤使用ガイドライン」では、リンゴ防除剤として「効果が期待できる他系統薬剤との混用または混合剤で使用し、1 年 2 回まで」としているが、防除対象は黒星病とうどんこ病の 2 種で、褐斑病は対象とされていない。今後は、本病についても検討が必要と考える。

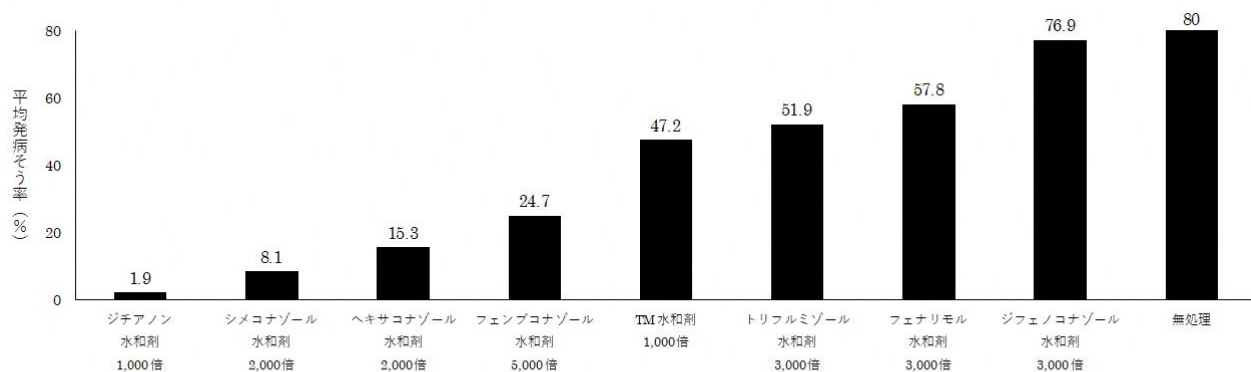


図7 各種殺菌剤による褐斑病一次感染期散布の防除効果(2004)

供試樹：場内圃場、「王林」わい性樹、11年生、1区2樹2反復、散布：4/22、5/7、5/21、以降は無散布区を含め6/3、6/17、7/1に一律防除を実施、調査：9月13日、1樹当たり80果葉そうについて発病の有無を観察。

2) 治療防除剤は Cyp 剤の 1 択

国内リンゴ主産地での開花期前後の防除体系は、DMI 剤耐性リンゴ黒星病菌の出現により大きく変化している。SDHI 剤あるいは DHODHI 剤を主軸としたいわゆる non-DMI 剤体系と従来通りの DMI 剤を主軸とした体系であり、秋田県のリンゴ産地では黒星病の発生状況に応じてこれら 2 体系が混在している。一方、西目地区では近年黒星病のほか、うどんこ病や赤星病もまったく見られないことや、DMI 剤による褐斑病防除も期待できないことなどから、2024 年度は開花期前後を保護殺菌剤のみの体系とする方針である。しかし、DMI 剤と MBC 剤の両剤に対する感受性については急激な回復が見込めない

ことから、今後しばらくは **Cyp** 剤のみが選択肢とならざるを得ない。そこで、当該地域から分離された 1 菌株（DMI 剤耐性+MBC 剤耐性）を用いて **Cyp** 水和剤の治療防除試験を行った結果、高い効果が得られた（表 5）。1 菌株のみの結果であるが、この菌株も含め 20 菌株について **Cyp** 剤感受性を薬剤添加培地により調査したところ、いずれの菌株も MIC 値は 0.05ppm 未満であり、感受性低下の可能性は低いと考えられた。これらのことから、今後も夏場の褐斑病治療防除剤として **Cyp** 水和剤を防除体系に組み入れることが有効と考えられる。しかし、FRAC コード表日本版（2023 年 8 月）「殺菌剤の耐性リスク」ではアニリノピリミジン剤の一つである **Cyp** 剤は DMI 剤と同様に「中程度の耐性リスク」があるとされており、国内ではメパニピリム耐性灰色かび病菌（鈴木ら，2011）が報告されている。**Cyp** 剤は西目地区を含め複数の地域で 20 年近く継続して褐斑病対策として使用されていることから、耐性リスクの高まりが懸念される。さらに、**Cyp** 剤が本病の他、地域によっては黒星病あるいは斑点落葉病などの防除剤としても継続して使用されていることから、褐斑病菌を含め、感受性の定期的なモニタリング等を検討する時期に来ていると考える。

表5 DMI剤およびMBC剤耐性菌（Ni-1-4菌株）に対する各種薬剤の治療防除効果

供試薬剤	希釈倍数	区	調査葉数	発病葉率(%)	防除価
テブコナゾール 水和剤	2,000	1	13	100.0	0
		2	13	100.0	
		3	13	100.0	
		平均	13	100.0	
チオファネートメチル 水和剤	1,500	1	13	100.0	0
		2	13	100.0	
		3	13	100.0	
		平均	13	100.0	
シプロジニル 水和剤	2,000	1	13	0.0	100
		2	13	0.0	
		3	13	0.0	
		平均	13	0.0	
無処理	-	1	13	100.0	
		2	13	100.0	
		3	13	100.0	
		平均	13	100.0	

供試樹：「ふじ」ポット樹、新梢先端の未展開葉部分を摘心し、上位13葉を供試、
接種：孢子懸濁液（ 5.7×10^5 /ml）を噴霧し、直ちにポリ袋で3日間密封、散布：除袋翌日にハndsプレーを用いて十分量を散布、調査：接種14日後に発病葉の有無を肉眼観察した。

6. 求められる新技術

1) 治療剤に頼らない防除体系

リンゴ褐斑病は感染期間が開花期（5月上旬頃）から10月までと長く、治療剤を用いた夏場の防除だけでは制御できない。子のう孢子による一次感染の阻止や梅雨期の保護防除、さらには適切な散布量や散布間隔など様々な防除技術の組み合わせ、総合力が特に求められる病害ともいえる。

一次感染の防除については須崎・吉田（2002）が本病の子のう孢子飛散期間にキャプタン水和剤やヘキサコナゾール水和剤、イミベンコナゾール水和剤、トリフロキシストロビン水和剤を散布（5/14、5/23、6/8）すると10月の発病葉や落葉が抑えられたと報告しており、佐藤・水野（2002）も開花期から初発が確認されるまでの期間、すなわち一次感染期間を薬剤散布期間としてその後の発生量を比較し、ジチアノン水和剤やマンゼブ水和剤、プロピネブ水和剤で一次感染の抑制効果が高いことを、猫塚・勝部（2005）もジチアノン水和剤を落花直後～落花30日後までに散布することによる褐斑病防除の有効性を報告している。この一次感染に対して、より効率的な防除ができれば、二次感染量を大きく抑えられ、治療防除剤を頼らずとも本病の発生制御が可能となると考える。



図9 孢子懸濁液を3週間培養した状況

さらに、この一次感染制御を強くアシストすることが期待できる技術として、リンゴ黒星病防除対策として開発された「けん引式落葉収集機」がある。リンゴの重要病害である黒星病は一次感染防除の成否がその後の発生量に大きく影響することから、前年の被害落葉を効率的に収集して伝染源を園外に搬出する「けん引式落葉収集機」(図 8) が販売され、実用化している(赤平ら, 2022)。リンゴ褐斑病はリンゴ黒星病と同様に前年の被害落葉を主な越冬伝染源としており、被害葉が園外に搬出されることによって黒星病に対する発生低減効果と同様の現象が得られるものとする。また、今まで未解明だった一次感染に関する解明も進んでおり、猫塚ら(2023)は気象データから本病の一次感染開始日や初発日の推定が可能と報告しており、今後、より効率的な防除体系の構築につながることを期待される。



図 8 けん引式落葉収集機(赤平 原図)

2) 感受性検定方法の改善

筆者が行っているリンゴ褐斑病菌の分離方法を簡単に紹介する。まず、単孢子分離株を得るために、病斑上に形成した分生子堆を釣菌し、微量の滅菌水に混和して孢子懸濁液として培地上に画線、後に形成された単コロニーを供試菌株として得るが(図 9)、本菌は糸状菌とは思えないほど、菌そう形成速度が遅い。分離培養中に、雑菌によるコンタミが生じやすく、得られる菌株数は分離作業の習熟度に大きく左右される。ここからさらに感受性検定用に前培養し、検定培地上で培養して感受性を判定するため、概ね 2~3 ヶ月程度を要する。

リンゴ黒星病菌も菌糸伸長が遅く、菌株を得るために多くの労力と技術の習熟が必要であるが、2018 年以降、リンゴ黒星病菌の DMI 剤耐性菌の発現が国内各地で確認された際には、遺伝子診断法により 3 時間程度と非常に短時間で DMI 剤感受性評価が可能となった(Yaegashi et al. 2020)。この技術により、リンゴ黒星病が発生した各産地では、病原菌の分離作業や感受性検定に要した時間が大幅に短縮され、短期間で変異株を検出し、生産現場の防除指導に速やかに活用された。今後、リンゴ褐斑病菌についても MBC 剤耐性菌あるいは DMI 剤耐性菌の遺伝子診断法が確立できれば、生産現場への迅速な防除指導や防除暦作成などに活かされることが期待される。

7. おわりに

リンゴ褐斑病の治療防除剤として県内で普及している MBC 剤は、1998 年以降、県内各地で耐性菌が出現したことより、新たな治療防除剤として Cyp 剤および Teb 剤を選抜した。Cyp 剤、Teb 剤ともに黒星病防除剤として既に利用されている剤であること、JFRAC コード表(2023 年 8 月)では両剤ともに耐性菌リスクが「中」と示されており、これらの剤の体系化利用には、単に MBC 剤の代替利用とできないジレンマが存在する。特に DMI 剤を防除体系として組み入れた場合には、薬剤耐性が黒星病、褐斑病以外の病原菌に対しても発現する可能性もあることから、黒星病の防除に対する non-DMI 剤体系を前提とするなど、他病害への防除体系も考慮に入れる必要があり、指導機関を含め十分な周知による耐性菌管理体制が求められる。

Teb 剤については、2014 年に県中央部の MBC 剤耐性菌まん延圃場を用いて実用性を検討し、有効性

を確認できたことから、リンゴ褐斑病防除の3剤目の治療剤として、またMBC剤耐性対策としても利用できると考えられた。しかし、DMI剤は県全域でリンゴ黒星病防除剤として年間に2回、既に使用されていたことから、実際に県内の生産現場で使用されることは2020年まで一度も無かった。県内でリンゴ黒星病防除剤としてDMI剤が普及し始めた時期はどの地域も同じであり、DMI剤の使用履歴もほぼ同一であることから、DMI剤耐性菌の出現場所は1地域にとどまらない可能性がある。今後、褐斑病対策にTeb剤の利用を検討している地域では、地域内に実証圃を設けてTeb剤に対する防除効果の有無を検討する、あるいはDMI剤感受性の検定をするなど、事前に指導機関との十分な連携が必要と考える。

引用文献

- 赤平知也・大西正洋・谷山英世（2022）多雪地帯における落葉収集機を利用した省力的な落葉除去とリンゴ黒星病に対する発生低減効果. 東北農業研究 75 : 55-56.
- 石井英夫・山口明・草場俊彦（1979）ナシ黒星病菌のチオファネートメチル剤およびベノミル剤に対する耐性—当該薬剤使用中止後の耐性菌検出割合の推移. 日植病報 45 : 551. （講要）
- 稲田稔（2018）DMI 剤耐性菌と薬剤使用ガイドライン. 植物防疫 72 : 31-37.
- 亀川展枝・田中秀平・伊藤真一・亀谷満郎（1999）チオファネートメチル耐性リンゴ褐斑病菌(*Diplocarpon mali*)の検出. 日植病報 65 : 692. （講要）
- 柏森美如（2019）北海道における薬剤耐性テンサイ褐斑病菌の現状と今後の防除戦略について. 第29回耐性菌研究会シンポジウム講演要旨 : 28-36.
- 佐藤裕（2001）リンゴ褐斑病菌におけるベンズイミダゾール系薬剤耐性菌の出現と対策. 第11回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨. 1-7.
- 佐藤裕・水野昇（2002）リンゴ褐斑病菌に対する各種薬剤の防除効果. 北日本病害虫研報. 53 : 112-114.
- 椎葉岳彦・祝園真一・富田恭範（2014）茨城県におけるチオファネートメチル剤耐性リンゴ褐斑病菌の発生について. 茨城県病害虫研究会報 53 : 13-15.
- 須崎浩一・吉田幸二（2002）リンゴ褐斑病菌 (*Diplocarpon mali*) の子のう孢子飛散時期における殺菌剤散布が本病発生に及ぼす影響. 北日本病害虫研報 53 : 115-117.
- 鈴木啓史・黒田克利・貴田健一・松澤章彦・高垣真喜一（2011）メパニピリム耐性灰色かび病菌の発生. 日植病報 77 : 1-6.
- 十川聡子・花岡朋絵・平山和幸・赤平知也（2018）青森県におけるリンゴ褐斑病のベンズイミダゾール系薬剤に対する感受性の低下. 日植病報 84 : 218-219. （講要）
- 七海隆之・菅野孝盛（2019）福島県におけるリンゴ褐斑病菌のチオファネートメチルおよびクレソキシムメチルに対する感受性. 北日本病害虫研報 70 : 203. （講要）
- 猫塚修一・勝部和則（2005）岩手県におけるリンゴ褐斑病の一次感染期を主体とした防除法. 北日本病害虫研報 53 : 212. （講要）
- 猫塚修一・近藤賢一・藤田剛輝・横田誠・佐藤裕・平山和幸（2023）気象データを用いたリンゴ褐斑病の一次感染開始日と初発日の推定. 日植病報 89 : 215-224.
- 農薬工業会 FRAC コード表日本版(<https://www.jcpa.or.jp/labo/mechanism.html>)
- Yaegashi, H., Hirayama, K., Akahira, T. and Ito, T. (2020) Point mutation in CYP51A1 of *Venturia*

inaqualis is associated with low sensitivity to sterol demethylation inhibitors. J. Gen. Plant Pathol. 86 : 245-249.

雪田金助（2017）青森県由来のリンゴ黒星病菌にみられた DMI 剤, QoI 剤および MBC 剤への感受性低下. 北日本病害虫研究会報 68 : 102-107.

愛知県における灰色かび病菌の薬剤耐性獲得状況調査及びその対応

Monitoring of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* and its response in Aichi Prefecture

愛知県農業総合試験場

恒川健太

Kenta Tsunekawa · Aichi Agricultural Research Center · 1-1 Yazako Sagamine, Nagakute, Aichi,
480-1193, Japan

Abstract

A Fungicide Sensitivity test using the green bean leaf disk method was conducted on gray mold (*Botrytis cinerea*) collected from vegetable greenhouses in Aichi Prefecture, and revealed that the rate of resistance acquisition was high for QoI and SDHI agents. In vegetable greenhouses, the status of resistance acquisition varies with the fungi in individual fields. To investigate the acquisition of resistance to QoI and SDHI agents by genetic testing, we established the AS-qPCR method, which is a simple and rapid test method. Using this method, we investigated the acquisition of resistance mutations in many fields of gray mold fungi, and found that resistance mutations were predominant. Currently, we are working with extension organizations to develop appropriate countermeasures against resistant fungi and disease management.

1. はじめに

愛知県は、トマトが全国 3 位の産出額で 168 億円、イチゴが全国 6 位の 104 億円、ナスが全国 6 位の 34 億円を誇る全国でも屈指の施設野菜生産地である（農林水産省、2021）。施設野菜栽培で特に問題になる病害は、灰色かび病（*Botrytis cinerea*）である。灰色かび病は、収穫物である果実に直接被害が生じるだけでなく、葉や茎にも感染し、茎に入った場合、侵入部より上位が枯れるなど大きな収量減に繋がる。

灰色かび病菌は、薬剤耐性獲得リスクが高いことが知られる（日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会、2021）。古くは 1970 年代にベンズイミダゾール系薬剤で耐性獲得が報告され（山本、1975）、近年も多くの薬剤で耐性獲得確認の報告が相次いでいる。そのため、三重県や栃木県など毎年あるいは数年おきに耐性モニタリング調査を実施している都道府県も多い（川上、2021；大森、2019）。一方、愛知県では間下(1997) が本病原菌のベンズイミダゾール系薬剤等の感受性検定結果について報告したのを最後に、20 年以上薬剤耐性モニタリングを実施していなかった。近年では 2020 年及び 2023 年に愛知県病害虫防除所から本病の注意喚起情報が発表されるなど発生量が多い年もあり（愛知県、2020；愛知県、2023a；愛知県、2023b）、さらに生産現場では、薬剤耐性が疑われる事例も増加していた。

本講演では愛知県におけるこのような背景を受け、愛知農総試として取り組んだ内容、開発した技術、普及組織と連携した対応を紹介する。

2. インゲンリーフディスク法による薬剤感受性検定で SDHI 剤、QoI 剤が特に耐性獲得率が高かった

本県における耐性獲得の実態を明らかにするため、2021～22 年に施設生産のトマト、ミニトマト、イチゴ、ナス、キュウリなどの施設果菜類を中心に本病原菌 95 菌株を収集し、QoI 剤及び SDHI 剤等トマト灰色かび病に登録のある計 16 種類の薬剤（表 1）に対する感受性検定を実施した（一部；堀川、2022 年）。なお、方法はインゲンマメによるリーフディスク法にて行った（図 1）。なお、インゲンマメを用いることについて、竹内（1987）がマメ科植物を用いた灰色かび病菌の生物検定を検討した結果、インゲンマメを最適と評価したほか、松本ら（2013）はインゲンマメ初生葉を用いた場合、キュウリ子葉に比べ、感受性低下菌とされた菌株の病斑伸長阻害率が全般にやや低い傾向を示すものの、感受性菌に対する病斑抑制率は同等に高く、接種試験の方法の一つとして活用できると結論づけている。

愛知県内で収集した菌株を検定した結果、特に耐性獲得が目立ったのは、QoI 剤（FRAC コード：11）であった。具体的には QoI 剤に含まれるアゾキシストロビン水和剤で 51/95 菌株、ピリベンカルブ水和剤で 25/95 菌株が、病斑伸長阻害率 30%未満となり耐性判定となった。SDHI 剤（FRAC コード：7）については、ペンチオピラド水和剤、ピラジフルミド水和剤、イソフェタミド水和剤でそれぞれ 7/95、9/95、3/95 菌株、QoI 剤+SDHI 剤の混合剤であるピラクロストロビン・ボスカリド水和剤でも 49/95 菌株で病斑伸長阻害率 30%未満となり耐性判定となった。これら SDHI 剤では、病斑伸長阻害率が 30～59%を示す感受性低下菌も多く確認され、QoI 剤及び SDHI 剤で本病原菌の耐性獲得が顕在化している現状が明らかになった。

表 1 灰色かび病菌に対する薬剤感受性検定に供試した薬剤一覧

供試薬剤名	FRAC	試験に用いた
	コード	希釈倍数
イプロジオン水和剤	2	1,000
ペンチオピラド水和剤	7	2,000
イソフェタミド水和剤	7	1,500
ピラジフルミド水和剤	7	2,000
メパニピリム水和剤	9	2,000
アゾキシストロビン水和剤	11	2,000
ピリベンカルブ水和剤	11	2,000
フルジオキシニル水和剤	12	1,000
フェンピラザミン水和剤	17	2,000
ポリオキシシン水溶剤	19	5,000
ジェトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤	1・10	1,500
ピラクロストロビン・ボスカリド水和剤	11・7	2,000
イミノクタジンアルベシル酸塩・フェンヘキサミド水和剤	17・M07	1,500
キャプタン水和剤	M04	800
TPN 水和剤	M05	1,000
イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤	M07	2,000

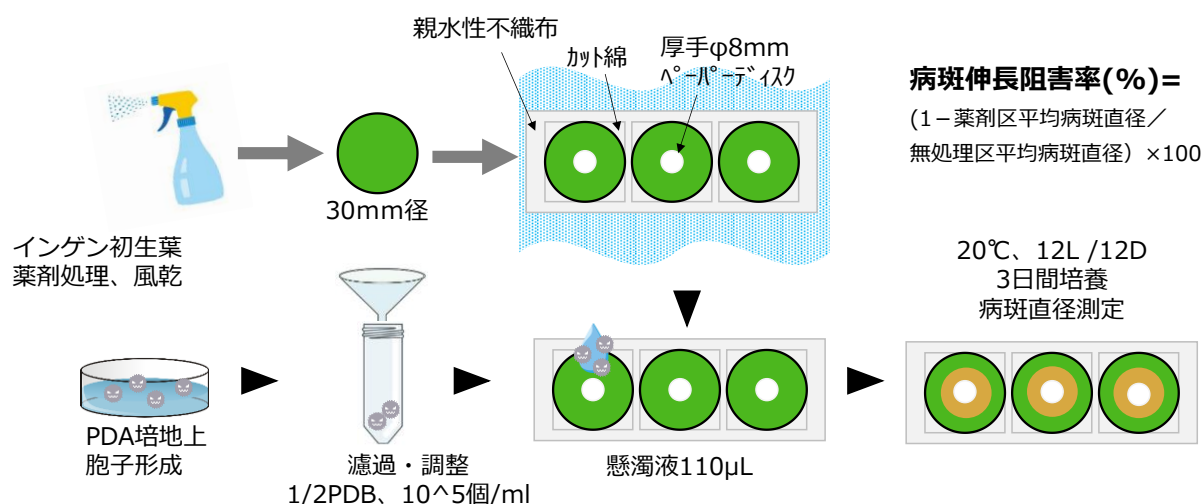


図 1 インゲンリーフディスク法の概要

QoI 剤、SDHI 剤以外では、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤 (FRAC コード : 1 + 10) で 10/95 菌株、ポリオキシシン複合体 (FRAC コード : 19) で 4/95 菌株で耐性判定となる菌株が確認されたが、多作用点接触活性に区分される殺菌剤 (FRAC コード : M のグループ) では、本手法において耐性判定となる菌株はほぼ確認されなかった。

QoI 剤及び SDHI 剤で耐性獲得が顕在化した状況は、我々指導的な立場の人間が、殺菌スペクトラムも広い QoI 剤や SDHI 剤を安易に使用薬剤の候補として提示してきた結果であると言える。この結果を重く受け止め、責任を痛感している。しかしながら、嘆いていても現状は変わらないため、農総試・普及組織が一致団結してスピード感を持って、耐性菌管理及び適切な病害コントロールについて、生産現場に浸透させるための取り組みを行うこととした。

3. 一気に気運を高めるため、池の水を全部抜く作戦を敢行中

施設野菜の場合、個々のほ場で散布履歴が異なる場合がほとんどであり、半閉鎖的な空間であるため、菌の拡散も限定的であると推察される。そのため、個々のほ場で耐性獲得状況が異なる結果となる。このことは、耐性検定結果に対する生産者の受け止め方にも影響していると考えられる。試験場が検定した菌株が自らのほ場の菌株でない場合、「うちのほ場では異なる結果だろう」と考えるのは自然なことである。また、指導者側の立場にとっても、一部ほ場で耐性菌が確認されたことを理由に、使用中止のような一律的な取り扱いをすべきかどうかは判断に迷う。

この問題を解決しつつ、耐性菌対策について地域の指導者及び生産者がより当事者感覚をもって対処できるようにするため、我々はできるだけ多くのほ場で菌株 (可能であれば 1 圃場あたり複数菌株) を収集し、個々のほ場における耐性菌状況を調べられる体制を整えることを考えた。「池の水全部抜く作戦」である。これにより、個々のほ場での耐性獲得状況が把握できるため、指導者側も耐性菌対策についてより具体的な提言を行うことができるようになる。ただし、検定を実施する人員・労力とも限界があるため、作業量的に楽で、迅速に結果を出せる遺伝子検定で実施することとした。

4. 薬剤耐性と菌の遺伝子変異との関係を整理

ここで、薬剤と菌への作用機構との関係は、鍵と鍵穴の関係によく似ていると言われる。菌の鍵穴にあたる遺伝子に変異が入って鍵穴の形が変わると、鍵である農薬が入らなくなり耐性を獲得する(図 2)。QoI 剤を例にとると、灰色かび病菌では、QoI 剤の作用点にあたるミトコンドリアゲノム上のチトクロム *b* 遺伝子の 143 番目のアミノ酸が G (グリシン : GGT) → A (アラニン : GCT) に変わった G143A 変異 (*cytb* - G143A 型) を持つと QoI 剤耐性を示すことが知られている (Banno et al., 2009)。

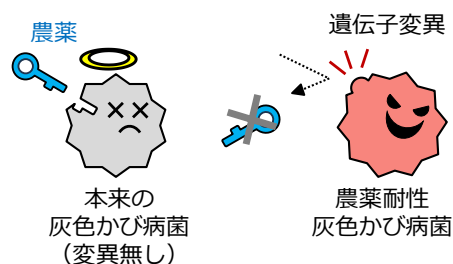


図 2 薬剤と菌への作用機構は鍵と鍵穴の関係にある

また、灰色かび病菌では *cytb* 遺伝子に変異がない QoI 剤感受性型 (*cytb* - 野生型) 以外に、コドン 143 と 144 番目の間にイントロンが挿入されるタイプ (*cytb* - intron 型) も存在するが、*cytb* - intron 型を持つ灰色かび病菌は QoI 剤に感受性を示すとされる (Banno et al., 2009 ; Grasso et al., 2006)。この 3 タイプの遺伝子型を見分ける遺伝子検定手法として、PCR-RFLP 法が開発されている (Banno et al., 2009)。しかし、PCR-RFLP 法は PCR 増幅の他に制限酵素処理及び電気泳動、DNA 染色による可視化が必要である。大量検体を扱う上で、作業量を少しでも減らすため、我々は多波長に対応したリアルタイム PCR 装置を用いる蛍光プローブベースの allele-specific qPCR 法 (AS-qPCR) を確立した。通常の蛍光プローブは QoI 剤耐性変異のような 1 塩基置換を識別することが難しいが、ロック核酸を配置し特異性が向上した蛍光プローブを用いることにより、識別が可能となっている。それぞれの遺伝子型を識別するプローブは蛍光色素を変えているため、マルチプレックスで判定できる。本手法により、対象検体の DNA 抽出後、1 回の反応調製操作で対象検体が 3 タイプのどれかを識別できるようになった。

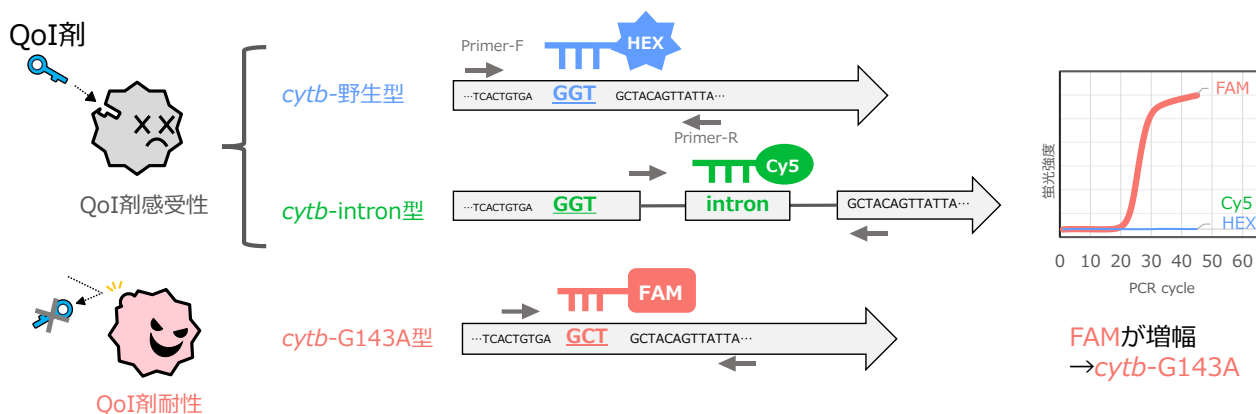


図 3 QoI 剤に関する 3 タイプの遺伝子型を判別する AS-qPCR の概要

SDHI 剤についても灰色かび病菌では、*sdhB* 遺伝子変異により感受性低下が付与されることが報告されている (Leroux et al., 2010 ; Veloukas et al., 2011 ; Amiri et al., 2014 ; Zuniga et al., 2020 ; Alzohairy et al., 2023)。これら報告では *sdhB* 遺伝子の H272、N230、P225 位におけるアミノ酸変異により SDHI 剤の感受性低下が生じることが示され、EC₅₀ も算出されている。特に *sdhB* - P225F 変異は、多くの SDHI 剤で感受性低下が生じることが明らかになっている。

今回我々は、主要な SDHI 剤耐性変異についても識別可能な AS-qPCR 法を確立した (図 4)。本手法では 1 反応目で、*sdhB*-H272 型 (野生型)、-H272R 型、-H272Y 型を識別する。2 反応目で、-P225 型 (野生型)、-P225F 型、-N230 型 (野生型)、-N230I 型を識別する。

QoI 剤、SDHI 剤の 2 反応の PCR 条件はすべて揃えているため、3 チューブ用意すれば両系統の遺伝子型を同時に決定できる。

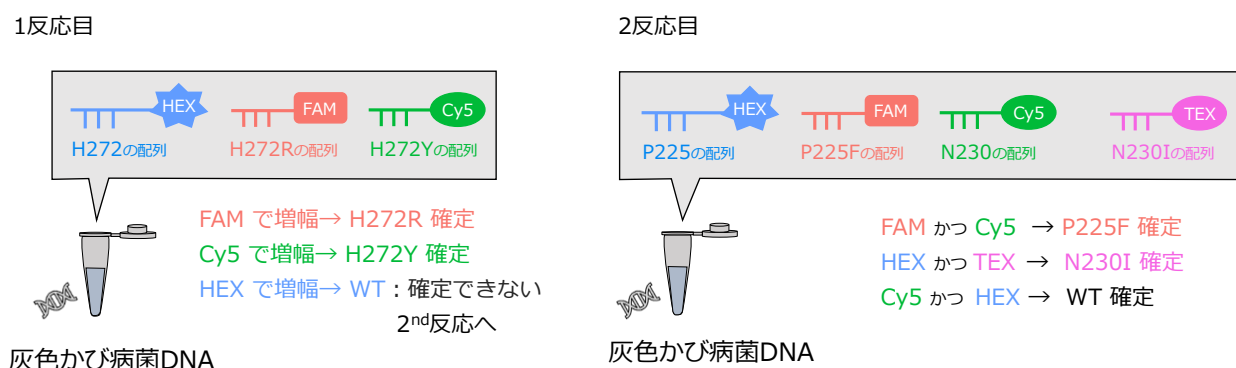


図 4 *sdhB* 遺伝子変異を検出する AS-qPCR 法の概要

5. 愛知県内株は耐性遺伝子変異が優占化していた

2023 年にも愛知県内の各産地において菌株を採取し、2021 年からの総計 281 菌株に対して AS-qPCR 法を用いながら QoI 剤耐性変異及び SDHI 剤耐性変異を調査した。

QoI 剤耐性変異では、約 78% が *cytb*-G143A 型を示し耐性変異が優占化していた。

SDHI 剤耐性変異においても、*sdhB*-野生型は 18.9% にすぎず、割合が多かった変異は *sdhB*-H272R (30.6%)、H272Y (23.5%) で、主要な SDHI 剤すべてで感受性低下が起こる *sdhB*-P225F も 23.1% 確認された。その他、H272V (2%)、N230I (1.4%)、P225H (0.4%) も確認された。

必然的に、QoI 剤耐性変異及び SDHI 剤耐性変異を複合的に有する菌株の割合も高く、全体として *cytb*-G143A + *sdhB*-H272R 株が最も多く、*cytb*-G143A + *sdhB*-H272Y 株、*cytb*-G143A + *sdhB*-P225F 株がそれに続いた。

耐性変異の獲得状況は作目によって異なる傾向を示した。例えば、トマトでは H272R 及び H272Y が多く確認され、P225F は少なかった。一方、イチゴ・キュウリでは P225F が確認される割合が高かった。

殺菌剤散布履歴と耐性菌出現に関しては、川上 (2021) は、QoI 剤散布圃場では同剤の散布がなかった圃場よりも耐性菌が多く検出される傾向があるほか、ペンチオピラドの散布圃場で同じ SDHI 剤であるボスカリド耐性菌が増加していると報告している。今回の結果についても、殺菌剤散布履歴との関連があると考え、現在解析を進めているところである。

6. リーフディスク法の結果と耐性変異の関係をまとめ、直感的に理解しやすい内容にした

検出された遺伝子変異と耐性獲得との関係について、現場指導者や農業者団体との情報共有する上で、EC₅₀ を用いての説明はやや難解である。加えて、SDHI 剤は、各変異株の変異箇所及び置換アミノ酸残

基によって、SDHI 剤の各成分の効果が異なり複雑である。関係者が現状を的確に理解し、その対策について議論するためには、受け入れられやすい指標を用いた方が議論しやすい。そこで、我々は、日本で登録のある実用濃度で行ったインゲンリーフディスク法の病斑形成阻害率と変異株との関係を整理した。その結果、既報の EC_{50} とおおよそ矛盾のない結果が得られた。実用濃度で実施するリーフディスク法は実際の防除場面と似ているため、専門的な知識がなくてもイメージがつかみやすいと考えられる。さらに、新型コロナの蔓延によって、「変異株」「PCR」という言葉が広く一般的になったことも、生産現場側の理解醸成の後押しとなった。

7. 耐性菌対策への対応と現場での取組

この結果を受けて、愛知県では 2022 年以降、普及指導員を参集した会議を計 4 回開催し、愛知県での耐性菌の現状を共有、その対策について議論している。施設野菜の産地を有する農業改良普及課では、普及課題として灰色かび病の薬剤耐性対策を位置づけ、防除暦の見直し、薬剤ローテーションの遵守、そもそも病害が発生しないような環境づくり、多点計測による湿度ムラの発生しやすい場所の特定や、早朝加温などの試験に取り組んでいる。直近の会議上では、普及指導員から「保護殺菌剤主体の予防重視の防除に切り替えたところ、病害も抑えることができていると好評である」と発言があるなど、耐性菌マネジメントにとってもより適切な方向に産地を誘導していく気運が高まっている。

生産者や農業者団体職員向けには 2023 年 7 月に研究会を開催し、耐性獲得状況を共有するとともに、殺菌剤使用ガイドラインの遵守、耐性が獲得されにくいとされている FRAC コードに M がつく系統の特徴をイメージを用いながら説明するなど、耐性菌対策について共有した。

8. おわりに

山本（2022）は抵抗性害虫対策において、薬剤抵抗性リスクコミュニケーションの重要性を示した。すなわち「技術側が生産者へ薬剤抵抗性リスクの重大性や被害・損失の程度を正しく伝え、薬剤抵抗性対策ツールや方法をわかりやすく説明する。そして、生産者からの現場情報・問題を汲み上げる。この双方向の情報の流れによって相互理解が深まり、抵抗性管理が普及する。」としている。耐性菌についても同様と考える。今後も関係者と連携した耐性菌対策を実施し、生産現場で経済性の高い持続的な病害コントロールが可能となるように努力していきたい。

9. 謝辞

菌株の採取に協力してくださった生産者及び農業協同組合職員、普及指導員、本研究をともに進めている愛知農総試の共同研究者に厚く御礼申し上げる。

引用文献

- 愛知県病虫害防除所（2020）灰色かび病情報第 1 号。
愛知県病虫害防除所（2023a）灰色かび病情報第 1 号。（2023 年 3 月 3 日付け）
愛知県病虫害防除所（2023b）灰色かび病情報第 1 号。（2023 年 12 月 26 日付け）
Amiri, A., Heath, S. M., and Peres, N. A. (2014) Resistance to Fluopyram, Fluxapyroxad, and Penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from Strawberry. Plant Disease, 98(4), 532–539.

- Alzohairy, S. A., Heger, L., Nikzainalalam, N., and Miles, T. D. (2023) Cross-Resistance of Succinate Dehydrogenase Inhibitors (SDHI) in *Botrytis cinerea* and Development of Molecular Diagnostic Tools for SDHI Resistance Detection. *Phytopathology*, 113(6), 998-1009.
- Banno, S., Yamashita, K., Fukumori, F., Okada, K., Uekusa, H., Takagaki, M., Kimura, M., and Fujimura, M. (2009) Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene. *Plant Pathology*, 58(1), 120-129.
- Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., and Gisi, U. (2006) Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(6), 465-472.
- 堀川英則・石井直樹・松崎聖史 (2022) 愛知県内で収集されたトマト等果菜類の灰色かび病に対する QoI 剤及 SDHI 剤等各種薬剤の感受性検定結果. 日植病報(88), 227 (講要)
- 川上拓 (2021) 三重県における灰色かび病菌の薬剤感受性検定体制の構築. 第 30 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集, 23-32
- Leroux, P., Gredt, M., Lerouch, M., and Walker, A. S. (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(19), 6615-6630.
- 間下なぎさ (1997) 愛知県における、ベンゾイミダゾール、ジカルボキシイミド、N-フェニルカーバメート系薬剤に対する灰色かび病複合耐性菌の発生推移. 愛知農総試研報(29), 163-170
- 松本華苗・森島正二・福田 充 (2013) 栃木県におけるトマトおよびイチゴの灰色かび病菌の薬剤感受性. 関東東山病害虫研究会報, 60, 37-40.
- 日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会 (2021) 作物別・病原菌別耐性菌発生リスク表 (20221031 現在)
<http://www.taiseikin.jp/mwbhwp/wp-content/uploads/649741680793376b39c22404c6022459.pdf> (2023 年 12 月 25 日アクセス)
- 農林水産省 (2021) 生産農業所得統計. <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?tclass=000001202640andcycle=7andyear=20210> (2023 年 12 月 25 日アクセス)
- 大森雅子・中澤佳子 (2019) 栃木県におけるトマト、イチゴの灰色かび病菌の薬剤感受性. 関東東山病害虫報(66), 7-11
- 竹内妙子 (1987) 薬剤耐性灰色かび病菌の発生生態と防除対策に関する研究. 千葉県農試特別報告 141-75.
- Veloukas, T., Markoglou, A. N., and Karaoglanidis, G. S. (2013) Differential effect of Sdh B gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant disease*, 97(1), 118-122.
- 山本敦司 (2022) IPM を基盤とした薬剤抵抗性管理の実践を！. 第 31 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集, 9-20
- 山本磐 (1975) ベノミル耐性灰色かび病菌の野菜における発生と対策. 植物防疫 29(5), 32-34
- Zuniga, A. I., Oliveira, M. S., Rebello, C. S., and Peres, N. A. (2020) Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from strawberry to isofetamid compared to other SDHIs. *Plant disease*, 104(4), 1224-1230.

滋賀県で分離されたタマネギ腐敗病菌の薬剤感受性と各種殺菌剤の防除効果

Susceptibility of causal agent of onion bacterial rot to bactericide in Shiga prefecture and control effects of various bactericides

滋賀県農業技術振興センター

小幡 善也

Yoshiya Obata, Shiga Prefecture Agricultural Technology Promotion Center, 516 Dainaka, Azuchicho, Omihachiman, Shiga 521-1301, Japan

Abstract

Along with autumn planting onion cultivation in Shiga prefecture, bacterial rot of onion bulbs can occur at storage facilities and shipment destinations, leading to complaints from processors and the necessary disposal of bulbs. For this study, we tested the susceptibilities of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia cenocepacia*, and *Burkholderia gladioli* isolated from onions to various bactericides to select effective bactericides for suppressing onion bacterial rot. Furthermore, we tested the various bactericides to assess control effects in the field against bacterial rot of bulbs. The three *Burkholderia* species were susceptible to oxolinic acid. In the field, application of oxolinic acid wettable powder was effective for controlling bacterial rot of bulbs. Both *B. cepacia* and *B. cenocepacia* showed resistance to copper sulfate on PDA medium, and no effect was observed on control of bacterial rot of bulbs by spraying copper wettable powder in field. Validamycin showed growth inhibition of three *Burkholderia* species on CDA medium containing trehalose as the sole carbon source, but no effect was observed on controlling bacterial rot of bulbs by spraying validamycin liquid formulation in the field. Spraying oxolinic acid wettable powder was inferred as effective for suppressing onion bacterial rot occurrence.

1. はじめに

滋賀県の耕地における水田率は 93%と全国で 2 番目に高く（農林水産省, 2023）、水田での水稻、ムギ類およびダイズなどの土地利用型作物を中心とした水田農業が展開されている。一方で、農業者の所得向上を図るために、水田野菜等の高収益作物の導入も進められている（滋賀県, 2023a）。特に、水田野菜の重点品目としてタマネギやキャベツ等の加工業務用野菜の作付けが推進されている。その結果、タマネギの作付面積は 2012 年の 40 ha から 2021 年には 83 ha と約 2 倍に増加している（滋賀県, 2023b）。滋賀県のタマネギ栽培では 9 月に播種、11 月に定植、6 月に収穫する秋植作型が一般的である（滋賀県園芸農産振興協議会, 2019）。本作型において、貯蔵施設および出荷先でタマネギりん茎に細菌性腐敗病害が発生し、加工業者からのクレームやタマネギの廃棄につながる大きな問題となっている。タマネギ細菌性腐敗病害の原因菌を特定するために、2020 年から 2022 年に県内 19 地点で細菌性腐敗病害が発生した生育期間中のタマネギ葉身やりん茎もしくは収穫後のタマネギりん茎から細菌を分離した。特異的 PCR, 16S rRNA の相同性検索および複数のハウスキーピング遺伝子に基づく Multilocus Sequence Analysis (MLSA) の結果から、分離された細菌は *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Pantoea ananatis* および *Erwinia persicina* と同

定された（小幡ら, 2023）. そのうち、タマネギリん茎からは *B. cepacia*, *B. cenocepacia* および *B. gladioli* のみが分離され、これらが防除対象とすべき病原細菌であると考えられた. 特に、分離地点数が 19 地点中 10 地点と最も多いことから、*B. cepacia* が滋賀県のタマネギに腐敗を引き起こす主要な病原細菌であると考えられた.

日本ではタマネギ腐敗病として、*B. cepacia* を含む 9 種の病原細菌が記載されている（植物病名ジーンバンク, 2023）. したがって、同一病名であっても病原細菌が異なれば、殺菌剤に対する薬剤感受性が異なる可能性がある. 特に、タマネギに感染する細菌の薬剤感受性に関する報告は、東北地域のタマネギ病原細菌での事例に限られている（達, 2022）. 本報告ではタマネギ細菌性腐敗病害の防除対策の構築に向けて、その発生抑制に有効な薬剤を選定するために、*B. cepacia*, *B. cenocepacia* および *B. gladioli* の薬剤感受性を検定するとともに、ほ場での *B. cepacia* によるタマネギ腐敗病に対する各種薬剤の防除効果を検討した結果を紹介する.

2. 滋賀県内のタマネギ細菌性腐敗病害の防除状況

タマネギ細菌性腐敗病害の防除は、県内各地域の県農業農村振興事務所もしくは JA により作成される防除暦や研修会資料を参考に実施されている. 対象病害は農薬登録のとおりであるが、タマネギ細菌性腐敗病害の防除薬剤としてバリダマイシン液剤やオキシリニック酸水和剤、銅水和剤が防除暦に多く採用されている. また、一部地域ではストレプトマイシンやカスガマイシンを含む剤が採用されている. そこで、防除暦に多く採用されている殺菌剤成分を中心に、滋賀県で分離されたタマネギの病原細菌に対する培地上での薬剤感受性検定および *B. cepacia* が優占するほ場におけるタマネギ細菌性腐敗病害に対するほ場での防除効果試験を実施した. タマネギの病原細菌の薬剤感受性を評価するために、最小生育阻止濃度（MIC）試験（小幡・金子, 2023）およびペーパーディスク試験（Ishikawa et al., 1996）を行った.

3. 滋賀県で分離されたタマネギ病原細菌の薬剤感受性

（1）薬剤感受性検定の試験方法

①MIC 試験

MIC 試験（松崎・林, 1998；篠原, 2014；山口ら, 2014）の供試薬剤として、オキシテトラサイクリン塩酸塩（試薬）、ストレプトマイシン硫酸塩（試薬）、オキシリニック酸（試薬）、バリダマイシン（バリダマイシン液剤）および硫酸銅(Ⅱ)五水和物（試薬）を用いた. 基礎培地を普通寒天（NA）培地とし、各成分（オキシテトラサイクリン、ストレプトマイシン、オキシリニック酸およびバリダマイシン）の最終濃度が 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 または 1600 ppm となるように調整した. なお、硫酸銅(Ⅱ)五水和物は基礎培地を Potato Dextrose Agar（PDA）培地とし、硫酸銅の最終濃度を同様に調整した. オキシリニック酸は 0.1 N 水酸化ナトリウム、その他の薬剤は滅菌蒸留水に溶解した. 薬液は 0.22 μ m のフィルターでろ過滅菌後に使用した.

10^8 cfu/ml に調整した細菌懸濁液をディスポールブにより薬剤を含む培地に塗布した. 28℃で培養 3 日後の細菌の生育の有無を調査し、生育が認められない最小濃度（ppm）を MIC とした.

②ペーパーディスク試験

Ralstonia solanacearum では唯一の炭素源としてトレハロースを添加した Czapek Dox Agar（CDA）

培地上でバリダマイシンを含むペーパーディスク周辺に生育阻止円ができることが報告されている (Ishikawa et al., 1996). そこで, 供試薬剤として, 100 ppm のバリダマイシン (100 倍希釈のバリダマイシン液剤) を使用したペーパーディスク試験を行った. オートクレーブ滅菌した 8 mm のペーパーディスクに薬剤を 30 μ L 滴下した後, クリーンベンチ内で 1~2 時間風乾した. 唯一の炭素源として 0.8% のトレハロース (トレハロース二水和物) もしくはグルコース (D-(+)グルコース) を添加した Czapek Dox Agar (0.3% NaNO_3 , 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KCl , 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5% 寒天) (Ishikawa et al., 1996) を基礎培地として使用した. 薬液は 0.22 μ m のフィルターでろ過滅菌後に使用した.

10^8 cfu/ml の細菌懸濁液 100 μ L を 9cm の滅菌シャーレに滴下し, 50°C に冷やしたオートクレーブ済み培地 10 mL をシャーレに流し込み, 静かに混和した. 培地の硬化後, 100 倍希釈のバリダマイシン液剤を含むペーパーディスクを培地上に置いた. 34°C で培養 5 日後の生育阻止円の有無を調査した.

(2) 薬剤感受性検定の結果

①オキシテトラサイクリンおよびストレプトマイシンに対する薬剤感受性 (MIC 試験)

オキシテトラサイクリンの *B. cepacia* に対する MIC は 400~800 ppm で, *B. cenocepacia* に対する MIC は 800 ppm であった (表 1). また, ストレプトマイシンの *B. cepacia* および *B. cenocepacia* に対する MIC は, 1 菌株の *B. cepacia* を除き 1600 ppm であった. この *B. cepacia* および *B. cenocepacia* の MIC は, オキシテトラサイクリンおよびストレプトマイシンの殺菌剤の常用濃度 (オキシテトラサイクリン; 10~20 ppm, ストレプトマイシン; 100~200 ppm) よりも高かった.

②オキシリニック酸に対する薬剤感受性 (MIC 試験)

オキシリニック酸の *B. cepacia* に対する MIC は 1.56~12.5 ppm, *B. cenocepacia* に対する MIC は 1.56~6.25 ppm, *B. gladioli* に対する MIC は 1.56 ppm 以下であった (表 1). このオキシリニック酸の *B. cepacia*, *B. cenocepacia* および *B. gladioli* に対する MIC は, オキシリニック酸の殺菌剤の常用濃度 (100~200 ppm) よりも低かった (表 1).

③バリダマイシンに対する薬剤感受性 (MIC 試験およびペーパーディスク試験)

NA 培地を基礎培地とした MIC 試験では, バリダマイシンはいずれの細菌の生育も阻害しなかった (表 1). 一方, 唯一の炭素源としてトレハロースを添加した CDA 培地を用いた実験では, *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, および *B. gladioli* は, 対照菌株の *R. solanacearum* と同様にバリダマイシンを含むペーパーディスク周辺に生育阻止円が形成された (図 1, 表 2). なお, 唯一の炭素源としてグルコースを添加した CDA 培地上では, 全ての菌株の生育が阻害されなかった.

④硫酸銅に対する薬剤感受性 (MIC 試験)

基礎培地を PDA 培地とした場合の硫酸銅の *B. cepacia* に対する MIC は 400~800 ppm, *B. cenocepacia* に対する MIC は 400 ppm, *B. gladioli* に対する MIC は 200~400 ppm であった (表 1). Goto ら (1994) は 1.25 mM (199.5 ppm) 以上の CuSO_4 を含む PDA 上で生育した細菌を銅耐性菌と分類した. 1 菌株の *B. gladioli* を除き, 3 種の *Burkholderia* 属細菌は 200ppm の CuSO_4 を

含む PDA 上で生育した。なお、参考として供試した *Pectobacterium carotovorum* (コマツナから分離), *Pseudomonas cichorii* (レタスから分離) の MIC は 100 ppm 以下であった。

表 1 タマネギから分離された病原細菌に対する各種薬剤の最小生育阻止濃度 (MIC ; ppm)

細菌種	薬剤	オキシテトラサイクリン 塩酸塩	ストレプトマイシン 硫酸塩	オキシソリニック 酸	バリダマイシン 液剤	硫酸銅(II) 五水和物
	基礎培地	NA	NA	NA	NA	PDA
<i>B. cepacia</i> (n = 9)		400~800	400~1600	1.56~12.5	>1600	400~800
<i>B. cenocepacia</i> (n = 4)		800	1600	1.56~6.25	>1600	400
<i>B. gladioli</i> (n = 3)		50	1.56~50	<0.78~1.56	>1600	200~400
<i>P. carotovorum</i> (n = 1)		6.25	6.25	<0.78	>1600	50
<i>P. cichorii</i> (n = 1)		12.5	3.13	<0.78	>1600	100

各細菌種について異なる地域から分離された菌株を供試した。

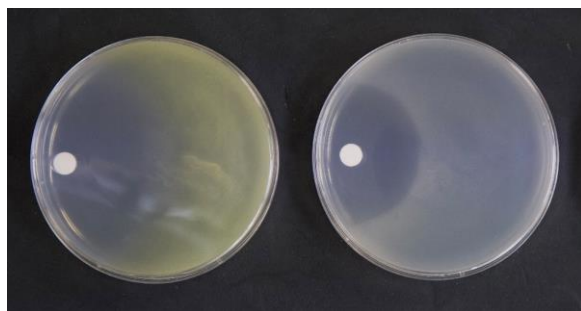


図 1 バリダマイシン処理による生育阻止円
図左 ; *B. cepacia*, 図右 ; *R. solanacearum*.
培養 5 日後の菌そうである。

表 2 バリダマイシン処理による生育阻止円の有無

細菌種	基礎培地	
	CDA-Trehalose	CDA-Glucose
<i>B. cepacia</i> (n = 12)	+	-
<i>B. cenocepacia</i> (n = 4)	+	-
<i>B. gladioli</i> (n = 3)	+	-
<i>R. solanacearum</i> (n = 1)	+	-

＋；生育阻止円あり。－；生育阻止円なし。

(3) 3 種の *Burkholderia* 属細菌の各種薬剤に対する薬剤感受性の傾向について

MIC 試験の結果から, 3 種の *Burkholderia* 属菌のオキシソリニック酸に対する感受性は高いと考えられた。一方で, *B. cepacia* および *B. cenocepacia* はオキシテトラサイクリン, ストレプトマイシンおよび硫酸銅に対して耐性があると考えられた。

東北地域のタマネギから分離された *B. cepacia* および *B. cenocepacia* では, オキシソリニック酸が常用濃度よりも低い濃度で両細菌の生育を阻止したことが報告されている (達, 2022)。さらに, 1%グルコースを添加した改変 Ayers 培地上での両細菌に対するストレプトマイシンの MIC が 1000 ppm 以上, 硫酸銅五水和物の MIC が 1000 ppm 以上, オキシテトラサイクリンの MIC が *B. cepacia* で 750 ~1000 ppm, *B. cenocepacia* で 1000 ppm 以上であることが報告されている (達, 2022)。このことから, 本県で分離された菌株の薬剤感受性は, 上述の東北地域で分離された菌株の薬剤感受性の傾向と概ね一致していた。

滋賀県では水田を活用したタマネギ栽培が行われ, タマネギが連作されることはほとんどないため, 同一ほ場での薬剤の過度な連用は基本的に行われたい。しかし, *B. cepacia* および *B. cenocepacia* の硫酸銅およびストレプトマイシンに対する低感受性は本研究で供試した全ての菌株で認められた。地域によらず上述の薬剤の感受性が低いことや本県での薬剤の使用状況を考慮すると, これらの両細菌の薬剤

感受性は種特有の特性ではないかと推測される。

ペーパーディスク試験の結果から、炭素源をトレハロースに依存する場合は、バリダマイシン処理により 3 種の *Burkholderia* 細菌の生育抑制が引き起こされると考えられた。*R. solanacearum* や *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* などでは、同条件での生育抑制効果が報告されているが（石川, 1996 ; Ishikawa et al., 1996 ; Ishikawa et al., 2004), 本研究で使用した 3 種の *Burkholderia* 属細菌に対する生育抑制効果は初めての報告である。

以上の培地上での薬剤感受性検定の結果から、オキシリニック酸が 3 種 *Burkholderia* 属細菌の生育抑制に有効であること、バリダマイシンは炭素源をトレハロースに依存する場合に生育抑制効果を発揮すると結論付けられた。

4. *B. cepacia* が優占するほ場におけるタマネギ細菌性腐敗病害に対する各種薬剤の防除効果

(1) ほ場での防除効果試験の方法

滋賀県農業技術振興センター（滋賀県近江八幡市安土町大中）内のタマネギ連作ほ場（畑作固定ほ場で前作のタマネギ収穫後から次作のタマネギ定植までの期間は作付けなし）でタマネギ細菌性腐敗病害に対する各種薬剤の防除効果試験を行った。このほ場では *B. cepacia*, *B. cenocepacia* および *P. carotovorum* の検出履歴がある。試験前年（2022 年）の収穫後に発生した腐敗球の病原菌を調査したところ、*B. cepacia* の分離割合は 71%（10 球/14 球）と、本種が優占種であると考えられた。

供試薬剤として、オキシリニック酸水和剤（1000 倍希釈）、バリダマイシン液剤（500 倍希釈）および水酸化第二銅水和剤（1000 倍希釈）を使用した。なお、オキシリニック酸を含む殺菌剤は軟腐病、バリダマイシンを含む殺菌剤は腐敗病および軟腐病、銅を含む殺菌剤はりん片腐敗病および軟腐病に農薬登録がある（農薬登録情報システム, 2023）。展着剤として、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム 22.5%・ポリオキシエチレンアルキルエーテル 50%溶液を加用した。対照区として、無散布区を設定した。試験薬剤を所定濃度に希釈後、200 L/10a 散布した。1.5 × 3 m に 100 株程度のタマネギを定植した試験区を 1 反復とし、処理区ごとにランダムに 3 反復を配置した。品種は、「もみじ 3 号」を供試した。なお、病原細菌の接種およびアザミウマ類の防除は行わなかった。

試験は 2022 年の 11 月に定植する秋植作型で実施した（表 3）。試験薬剤を約 10 日ごとに計 5 回連続散布し（表 3）、収穫 8 日前および貯蔵 42 日後の腐敗率を調査した。収穫前は葉身の腐敗がりん茎内部へつながっているもの（図 2a）もしくはりん茎外部が腐敗しているものを腐敗株として外観から調査し、貯蔵後は腐敗の有無についてりん茎を切断して調査した。また、貯蔵後の腐敗株は一番外側のりん片が腐敗したものを外部腐敗（図 2b）、内側のりん片または内外複数のりん片が腐敗したものを内部腐敗（図 2c, d）に分類して記録した。なお、収穫時にりん茎への腐敗進展が認められた株は、収穫せずに廃棄し、貯蔵後の腐敗株数にカウントした。

表 3 ほ場での防除効果試験の栽培および薬剤防除日

播種	定植	殺菌剤散布日					収穫	収穫前 調査	貯蔵後 調査
		1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	5 回目			
2022/9/14	11/15	2023/4/24	5/6	5/16	5/25	6/6	6/13	6/5	7/25

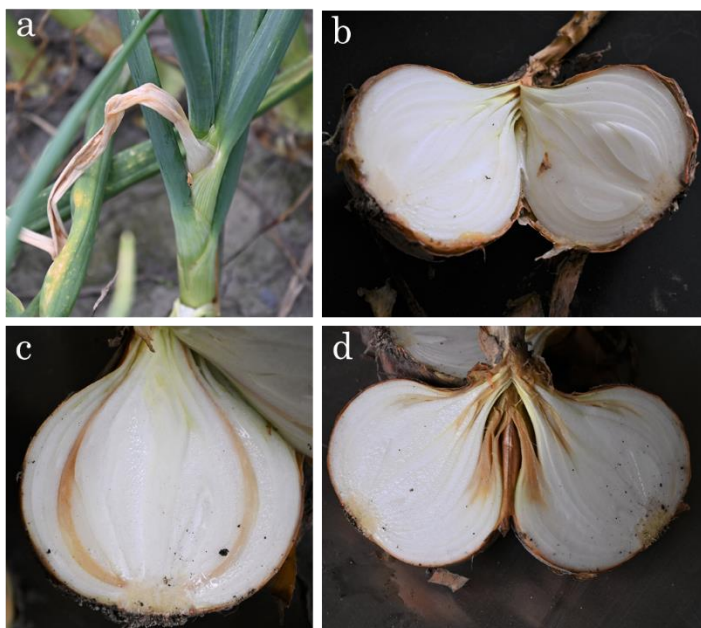


図 2 タマネギ細菌性腐敗病害による腐敗症状

a; 葉身の腐敗がりん茎内部へつながっている株, b; 一番外側のりん片が腐敗した球, c; 内側のりん片が腐敗した球, d; 内外複数のりん片が腐敗した球.

(2) ロジスティック回帰分析による各種薬剤散布のタマネギ細菌性腐敗病害発生への影響の推定

無散布区のタマネギ細菌性腐敗病害による腐敗率は収穫前の 15.0%から貯蔵後には 41.5%に増加した (表 4). オキシリニック酸水和剤散布区のタマネギ細菌性腐敗病害による腐敗率は収穫前で 3.6%, 貯蔵後で 17.8%であった. 応答変数を腐敗率, 説明変数を各殺菌剤の散布の有無としたロジスティック回帰分析により, この収穫前および貯蔵後のタマネギ細菌性腐敗病害による腐敗病発生は, オキシリニック酸水和剤散布により無散布と比較して減少すると推定された (表 5, $p < 0.05$). 特に, オキシリニック酸水和剤散布区では, 貯蔵後の内部腐敗率は 0.7%と, 無散布区の 10.6%と比較して有意に少なかった (表 6, Ryan 法, $p < 0.05$).

これに対して, 水酸化第二銅水和剤散布により貯蔵後の腐敗病発生が増加すると推定された (表 5, ロジスティック回帰分析, $p < 0.05$).

表 4 収穫前および貯蔵後におけるタマネギ細菌性腐敗病害による腐敗率

調査時期	薬剤	反復ごとの n 数			反復ごとの腐敗率 (%)			平均腐敗率 (%)
		1	2	3	1	2	3	
収穫前	オキシリニック酸水和剤	92	94	89	1.1	4.3	5.6	3.6
	バリダマイシン液剤	100	90	88	16.0	21.1	20.5	19.1
	水酸化第二銅水和剤	93	91	95	8.6	28.6	16.8	17.9
	無散布	101	93	90	11.9	12.9	22.2	15.5
貯蔵後	オキシリニック酸水和剤	92	94	89	10.9	17.0	25.8	17.8
	バリダマイシン液剤	100	90	88	48.0	44.4	55.7	49.3
	水酸化第二銅水和剤	93	91	95	46.2	48.4	55.8	50.2
	無散布	101	93	90	38.6	44.1	42.2	41.5

平均腐敗率は (3 反復の合計腐敗数/3 反復の合計 n 数) $\times 100$ により算出した.

表 5 タマネギ細菌性腐敗病害 による腐敗発生に対する薬剤散布の影響の推定

調査時期	説明変数	回帰係数	標準誤差	z 値	p 値
収穫前	オキシリニック酸水和剤	-1.54	0.4	-4.3	< 0.001 *
	バリダマイシン液剤	0.28	0.2	1.3	0.21
	水酸化第二銅水和剤	0.19	0.2	0.9	0.39
	切片	-1.73	0.2	-10.6	< 0.001 *
貯蔵後	オキシリニック酸水和剤	-1.19	0.2	-6.0	< 0.001 *
	バリダマイシン液剤	0.31	0.2	1.8	0.07
	水酸化第二銅水和剤	0.35	0.2	2.1	< 0.05 *
	切片	-0.34	0.1	-2.8	< 0.001 *

応答変数を腐敗率，説明変数を各殺菌剤の散布の有無としたロジスティック回帰分析により解析した．

* $p < 0.05$ である．

表 6 貯蔵後のタマネギ細菌性腐敗病害の腐敗部位ごとの割合 (%)

薬剤	n	外部腐敗	*	内部腐敗	*
オキシリニック酸水和剤	275	17.1	b	0.7	b
バリダマイシン液剤	278	38.1	a	11.2	a
水酸化第二銅水和剤	279	40.9	a	9.3	a
無処理	284	31.0	a	10.6	a

*異なる文字は Ryan 法により同じ腐敗の種類ごとに有意差があることを示す ($p < 0.05$)．

(3) タマネギ細菌性腐敗病害に対する各種薬剤の防除効果

オキシリニック酸の寒天培地上での *Burkholderia* 属細菌に対する生育抑制効果は高く，タマネギ細菌性腐敗病害に対するオキシリニック酸水和剤散布によるほ場での発生抑制効果が認められた．特に，流通上，問題となりやすい内部腐敗の抑制効果が高かった．試験ほ場の病原細菌の優占種は *B. cepacia* であることから，オキシリニック酸水和剤散布による防除効果は本種に対する防除効果であると推察される．なお，本試験はタマネギ細菌性腐敗病害が多発生し，同一薬剤を 5 回連用した場合の試験のため，異なる発生条件下で散布回数が少ない場合の知見も必要であると考えられる．特に，最低限の防除回数で効率的・効果的に防除するために，タマネギ細菌性腐敗病害が感染しやすい気象条件やタマネギが罹病しやすい生育ステージを明らかにすることは今後の課題である．

水酸化第二銅水和剤散布によるタマネギ細菌性腐敗病害に対するほ場での防除効果は認められなかった．また，寒天培地上では *B. cepacia* は銅耐性があることから，*B. cepacia* が優占種である試験ほ場での防除効果も低いと考えられた．

バリダマイシン液剤処理により，タマネギ細菌性腐敗病害に対するほ場での防除効果は認められなかった．バリダマイシン処理によるトマト青枯病 (*R. solanacearum*) やキャベツ黒腐病 (*X. campestris* pv. *campestris*) の防除効果は植物体内の細菌増殖抑制および菌体外多糖質の生産量の抑制により引き起こされることが明らかにされている (Ishikawa et al., 1996 ; Ishikawa et al., 2004)．また，その発病抑制メカニズムとして，同処理による *R. solanacearum* 由来のトレハロース分解酵素活性の阻害効果が明らかにされている (石川ら, 1996)．

これらのことから，バリダマイシン処理によりタマネギ細菌性腐敗病害に対する防除効果が認められな

かった要因として、タマネギの植物体上もしくは内部では、細菌の増殖抑制効果が低い可能性がある。本試験では、トレハロースを唯一の炭素源とした場合、CDA培地上でのバリダマイシン処理による *B. cepacia* や *B. cenocepacia* の生育抑制が *R. solanacearum* と同様に認められた。一方で、バリダマイシン液剤散布後のタマネギの植物体上もしくは内部における病原細菌のトレハロースやその他の炭素源の利用や細菌密度の動態は不明である。このことを明らかにするためには、バリダマイシン処理後のタマネギの植物体上もしくは内部での細菌密度の動態調査が必要である。また、本試験は、無散布区の収穫後の腐敗率が41.5%と高い条件で実施したことから、発生程度が低い条件での防除効果の検討を行うなど、複数年の試験結果からその防除効果を判断する必要がある。

5. おわりに

本研究ではオキシリニック酸水和剤の散布が *B. cepacia* が優占するほ場でのタマネギ細菌性腐敗病害の発生抑制に有効であることを明らかにした。一方で、本試験はタマネギ細菌性腐敗病害が多発生し、同一薬剤を連用した結果であり、栽培現地の自然発生条件下での適切な防除回数や防除開始時期は明らかでない。特に、*B. cepacia* と同属である *Burkholderia glumae* では、オキシリニック酸の耐性菌の存在が確認されており（守川ら, 1997）、本剤の多用は避けることが望ましい。同じ殺菌剤だけに依存した防除とならないためには、発生生態や発生要因に応じた防除対策や耕種的防除法の確立が重要となる。例えば、東北地域の春まき栽培ではネギアザミウマを防除しなければ腐敗球が増加すること（横田・福田, 2016）、ネギアザミウマの食害痕が病原細菌の侵入口となること（達ら, 2019）が明らかにされている。一方で、秋植栽培における腐敗発生へのネギアザミウマの関与とその防除の必要性については明らかでない。その他に、滋賀県においては、6月にタマネギ収穫時期と梅雨時期が重なる場合があり、タマネギの収穫の遅れがタマネギ細菌性腐敗病害の発生を助長する可能性があることから、適期収穫は重要な対策である。

現在、タマネギ細菌性腐敗病害の防除対策を確立するために、異なる殺菌殺虫剤を組み合わせ、本病害の発生抑制に効果的な防除体系を検討している。また、耕種的防除法としてリビングマルチを用いたネギアザミウマ防除によるタマネギ細菌性腐敗病害の発生への影響やタマネギ貯蔵期間中の温度管理の影響を検討しており、タマネギの定植から出荷までの期間を網羅した防除体系を今後構築したい。

引用文献

- Goto, M., Hikota, T., Nakajima, M., Takikawa, Y. and Tsuyumu, S. (1994) Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 60 : 147–53.
- 石川 亮 (1996) 植物病原細菌に対するバリダマイシン A の活性. *植物防疫* 50 : 422–425.
- Ishikawa, R., Fujimori, K. and Matsuura, K. (1996) Antibacterial activity of validamycin A against *Pseudomonas solanacearum* and its efficacy against tomato bacterial wilt. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62 : 478–482.
- 石川 亮・中山政治・藤森健一・松浦一穂 (1996) バリダマイシン A による *Pseudomonas solanacearum* 由来のトレハロース分解酵素活性の阻害. *日植病報* 62 : 313. (講要)
- Ishikawa, R., Suzuki-Nishimoto, M., Fukuchi, A. and Matsuura, K. (2004) Effective control of cabbage black rot by validamycin A and its effect on extracellular polysaccharide-production of

Xanthomonas campestris pv. *campestris*. J. Pestic. Sci. 29 : 209–213.

農業生物資源ジェンバンク (2023) URL : https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php (2023 年 12 月アクセス)

農林水産省 (2023) URL : <https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/menseki/> (2023 年 12 月アクセス)

農薬登録情報システム (2023) URL : <https://pesticide.maff.go.jp>. (2023 年 12 月アクセス)

達 瑞枝 (2022) 東北地域のタマネギ細菌性腐敗病害の病原細菌とその薬剤耐性について. 日本植物病理学会第 31 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨 21–27.

達 瑞枝・上杉龍士・横田 啓 (2019) ネギアザミウマ食害痕が *Burkholderia cepacia* complex 細菌によるタマネギ腐敗病におよぼす影響について. 日植病報 85 : 296. (講要)

松崎 正文・林 宣夫 (1998) (11) 野菜類細菌病菌, コンニャク腐敗病菌. 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル : 53–55.

守川俊幸・松崎卓志・西山幸司・宮川久義・向畠博行 (1997) イネ褐条病菌ともみ枯細菌病菌のオキシリニック酸およびカスガマイシンに対する感受性. 日植病報 63 : 516. (講要)

小幡善也・柴田隆豊・金子 誠 (2023) 滋賀県におけるタマネギ細菌性腐敗病害の病原菌の同定. 日植病報 89 : 17. (講要)

小幡善也・金子 誠 (2023) 滋賀県で分離されたタマネギ腐敗病細菌の薬剤感受性. 日植病報 89 : 192. (講要)

滋賀県 (2023a) URL : <https://www.pref.shiga.lg.jp/ippan/shigotosangyou/nougyou/seisangizyutsu/314532.html> (2023 年 12 月アクセス)

滋賀県 (2023b) URL : <http://www.pref.shiga.lg.jp/ippan/shigotosangyou/nougyou/ryutsuu/324470.html> (2023 年 12 月アクセス)

滋賀県園芸農産振興協議会 (2019) 水田野菜 (キャベツ・タマネギ) 栽培の手引き.

篠原 弘亮 (2014) 植物病原細菌の薬剤感受性. 微生物遺伝資源利用マニュアル 36 : 1–15.

山口 修平・伊山 公二・田方 康平・夏秋 啓子・根岸 寛光・篠原 弘亮 (2014) モモせん孔細菌病菌 (主に *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) の薬剤感受性に関する研究. 東京農大農学集報 59 : 74–80.

横田 啓・福田拓斗 (2016) 岩手県のタマネギ春まき作型におけるネギアザミウマ被害実態と有効薬剤. 北日本病虫研報 67 : 154–158.

トマト葉かび病に対する有効な SDHI 剤の探索

Selection of effective succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicides
against *Fulvia fulva* causing tomato leaf mold

奈良県農業研究開発センター

浅野峻介

Shunsuke Asano, Nara Prefecture Agricultural Research and Development Center,
130-1 Ikenouchi, Sakurai, Nara 633-0046, Japan

Abstract

Leaf mold caused by *Fulvia fulva* is one of the economically important diseases of tomato in Japan. Resistance to several types of fungicides, including succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs), has been reported in isolates from Japan. In this study, we evaluated the sensitivity of *F. fulva* to SDHI fungicides and SDHI fungicide efficacy in control of sensitive and resistant isolates. The minimum inhibitory concentration (MIC) of six SDHI fungicides, excluding isofetamid, ranged from 0.1 to >100µg/mL against mycelial growth of 45 *F. fulva* isolates collected in Nara Prefecture, Japan, whereas that of isofetamid ranged from 0.1 to only 10µg/mL. The peak MIC distributions of fluopyram and isofetamid, inpyrfluxam, and remaining SDHI fungicides were 10µg/mL, 100µg/mL, and >100µg/mL, respectively. In an inoculation experiment, only isofetamid controlled the highly resistant isolates. In addition, moderately and highly resistant isolates were controlled by the application of isofetamid 6 hours or 7 days before inoculation or 3 days after inoculation. Our results indicate the presence of cross-resistance and different levels of sensitivity reduction among SDHI fungicides. Isofetamid showed the lowest resistance development among the tested SDHI fungicides and was considered effective in controlling tomato leaf mold.

1. はじめに

トマト葉かび病は *Fulvia fulva* (syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*) により引き起こされ、国内のトマト生産における主要病害の一つである。葉かび病の病徴は葉裏に灰色～オリーブ色の菌叢が生じ、孢子形成が始まると褐色になる。菌叢が生じた部位の葉表には黄色の斑点が認められる (Thomma et al., 2005)。

国内で栽培されている品種の多くは、葉かび病に対する抵抗性遺伝子である *Cf-2*、*Cf-4*、*Cf-5* または *Cf-9* を保有している。しかし、これらの抵抗性を打破するレースが国内各地で発生したことから (Iida et al., 2015)、殺菌剤への依存度が高まっている。本病に対する登録薬剤には SDHI 剤、QoI 剤、DMI 剤、MBC 剤、N-フェニルカルバメートおよび多作用点接触阻害剤が含まれ、作用機作は多岐に渡る。しかし、耐性菌の出現により薬剤の選択に制限がかかる状況にある。耐性菌が確認されたのは、本稿の主題である SDHI 剤に加え、QoI 剤、DMI 剤、MBC 剤および N-フェニルカルバメートである (表 1)。SDHI 剤において培地での感受性の低下と植物体での防除効果の低下が確認されたの

は、ペンチオピラド、ボスカリド、イソピラザム、ピラジフルミド、フルオピラムと多数ある（中嶋ら 2021; 渡辺 2017; 木村ら 2023）。

SDHI 剤は単一の作用点を標的としており、クエン酸回路 (tricarboxylic acid cycle) のミトコンドリア電子伝達系複合体 II であるコハク酸脱水素酵素を阻害することにより、細胞のエネルギー産生を阻害する (Sierotzki and Scalliet 2013)。他の系統と同様に SDHI 剤でも多くの交差耐性の報告がある一方で、興味深いことに交差耐性の程度に薬剤間差が生じる事例が確認されている。例えば、*Botrytis cinerea*、*Corynespora cassiicola*、*Podosphaera xanthii* では *SdhB* の H272R または H272Y 変異を有するボスカリドおよびペンチオピラド耐性菌に対して、フルオピラムは高い効果を示した (Veloukas et al., 2013; Ishii et al., 2011)。*B. cinerea* の N230I 変異株はボスカリド、ペンチオピラドおよびフルオピラムに対する耐性を示す一方でイソフェタミドに対しては耐性の程度が低かった (Fernández-Ortuño et al., 2017; Zuniga et al., 2020)。同様にトマト葉かび病菌についても SDHI 剤耐性菌の感受性には薬剤間差が認められ、その中でフルオピラムに対する感受性は高く、一方でペンチオピラド、ボスカリド、イソピラザム、ピラジフルミドは低い傾向にあった (中嶋ら 2021)。また、イソフェタミドは、*Alternaria* 属や *B. cinerea* では、他の SDHI 剤との間に強い交差耐性を示さない事例が報告されている (Zuniga et al., 2020; Förster et al., 2022)。これらのことからトマト葉かび病菌では複数の SDHI 剤に対する耐性菌が確認されているものの、現場での使用に耐えうる薬剤が存在する可能性が考えられた。

なお、奈良県でのトマト葉かび病に対して有効な薬剤は予防剤である TPN、マンゼブ、キャプタン、イミノクタジンアルベシル酢酸塩といった多作用点接触阻害剤が主である (表 2)。感染後の効果が期待できるのは DMI 剤のジフェノコナゾールのみであり、抵抗性の発達リスクを考慮すると薬剤の選択肢を増やすことが求められていた。このような背景がありトマト葉かび病の防除に有効な SDHI 剤を探索した結果、Asano et al. (2024) においてイソフェタミドの効果が最も高く、生産圃場レベルでも実用性があることを明らかにしたので、その内容を紹介する。

表 1 トマト葉かび病菌で耐性菌が報告された薬剤

FRAC	系統	薬剤	引用
7	SDHI 剤	ペンチオピラド、ボスカリド、 ピラジフルミド、イソピラザム	渡辺 2017; 中嶋ら 2021; Asano et al. 2023
11	QoI 剤	アゾキシストロビン、ピリベンカルブ	渡辺 2017; Watanabe et al. 2017; 浅野ら 2023
3	DMI 剤	トリフルミゾール	渡辺 2017
1	MBC 剤	チオファネートメチル	渡辺 2017, 木村ら 2023
10	N-フェニルカーバメート	ジエトフェンカルブ	渡辺 2017

表 2 奈良県でのトマト葉かび病に対する主要な薬剤と防除効果

FRAC	系統	薬剤	防除価 ^a
M5		TPN	100、100、99
M3	多作用点	マンゼブ	99
M4	接触阻害剤	キャプタン	77
M7		イミノクタジンアルベシル酸塩	66
3	DMI剤	ジフェノコナゾール	99、97、79

^a複数の試験の結果を示す。

2. 奈良県内のトマト葉かび病菌の SDHI 剤に対する感受性

2018～19 年に奈良県内の 16 施設におけるトマト葉かび病の罹病葉から 45 菌株を採取した。これら菌株の SDHI 剤 7 剤に対する感受性を、渡辺（2017）に従って寒天培地上で評価した。検定に用いた薬剤は、ペンチオピラド（アフエットフロアブル）、ボスカリド（カンタスドライフロアブル）、イソピラザム（ネクスターフロアブル）、ピラジフルミド（パレード 20 フロアブル）、インピルフルキサム（カナメフロアブル）、フルオピラム（オルフィンフロアブル）、イソフェタミド（ケンジャフロアブル）である。ただし、インピルフルキサムとフルオピラムはトマト葉かび病に対する登録はない。YB 培地（Yeast bacto agar；酵母エキス 10g、ペプトン 10g、寒天 15g）に各 SDHI 剤を 0.01、0.1、1、10 および 100 μ g/mL になるよう添加した。PSA 培地上で培養した菌体を 5mm 角に切り出し、1.5mL チューブ内で滅菌蒸留水 800 μ L に懸濁した。得られた菌叢摩砕液 10 μ L を薬剤添加培地に滴下し、25℃、暗黒下で 10 日間培養した。菌株の生育の有無を調査し、最小生育阻止濃度（MIC）を求めた。

イソフェタミドの MIC は 0.1～10 μ g/mL と低い傾向にあり、その他 6 剤は 0.1～>100 μ g/mL であった。ペンチオピラド、ボスカリドおよびイソピラザムの MIC は 0.1～1 μ g/mL と >100 μ g/mL に分かれており、80%以上の菌株は >100 μ g/mL であった。ピラジフルミドの MIC が >100 μ g/mL であった菌株の割合は 60%であり、前述の 3 剤よりやや低かった。なお、MIC の分布のピークはインピルフルキサムで 100 μ g/mL、フルオピラムとイソフェタミドでは 10 μ g/mL であり、他の薬剤と比べて低い傾向を示した（表 3）。

表3 奈良県で採取したトマト葉かび病菌における各SDHI剤の最小生育阻止濃度（MIC）別の菌株の割合

薬剤	最小生育阻止濃度（MIC）（ $\mu\text{g/ml}$ ）別の菌株の割合（％）					菌株数
	0.1	1	10	100	>100	
ペンチオピラド	13 (6) ^a	4 (2)	0 (0)	0 (0)	82 (37)	45
ボスカリド	13 (6)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	82 (37)	45
イソピラザム	18 (8)	2 (1)	0 (0)	0 (0)	80 (36)	45
ピラジフルミド	18 (8)	0 (0)	7 (3)	16 (7)	60 (27)	45
インピルフルキサム	18 (8)	0 (0)	33 (15)	44 (20)	4 (2)	45
フルオピラム	4 (2)	13 (6)	78 (35)	0 (0)	4 (2)	45
イソフェタミド	11 (5)	13 (6)	76 (34)	0 (0)	0 (0)	45

^a 菌株数

ペンチオピラドとボスカリドの MIC が 0.1 または 1 $\mu\text{g/mL}$ であった菌株は、他の 5 剤の MIC 値が 0.1 または 1 $\mu\text{g/mL}$ であり同等の感受性を示した。同様に、ペンチオピラドとボスカリドに対する MIC が >100 $\mu\text{g/mL}$ であった 37 菌株中 34 菌株は、他の 5 剤の MIC が 10～>100 $\mu\text{g/mL}$ であり感受性が低下していた。フルオピラムに対する MIC が 10 $\mu\text{g/mL}$ であった 35 菌株はすべて、インピルフルキサムに対する MIC が 10 $\mu\text{g/mL}$ または 100 $\mu\text{g/mL}$ であった。イソフェタミドを除く 6 剤すべての MIC が >100 $\mu\text{g/mL}$ を示したのは 2 菌株のみであった（表 4）。

表4 奈良県で採取したトマト葉かび病菌の菌株それぞれの各種SDHI剤に対する感受性

最小生育阻止濃度（MIC）（ $\mu\text{g/ml}$ ）							菌株数
ペンチオピラド	ボスカリド	イソピラザム	ピラジフルミド	インピルフルキサム	フルオピラム	イソフェタミド	
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	2
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1	0.1	1
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1	1	3
1	1	0.1	0.1	0.1	1	1	2
>100	>100	1	10	100	10	0.1	1
>100	>100	>100	10	10	10	10	1
>100	>100	>100	10	100	10	10	1
>100	>100	>100	100	10	10	10	4
>100	>100	>100	100	100	10	10	3
>100	>100	>100	>100	10	10	10	10
>100	>100	>100	>100	100	10	0.1	1
>100	>100	>100	>100	100	10	1	1
>100	>100	>100	>100	100	10	10	13
>100	>100	>100	>100	>100	>100	10	2
合計							45

供試菌株に対するすべての SDHI 剤の最低の MIC は 0.1 $\mu\text{g/mL}$ であった。この結果は中嶋ら(2021) とほぼ同等であり、そこではペンチオピラド、ボスカリド、イソピラザム、ピラジフルミドおよびフルオピラムの最低の MIC は 0.5 $\mu\text{g/mL}$ と報告されている。本報告ではペンチオピラド、ボスカリド、イソピラザムおよびピラジフルミドの MIC が >100 $\mu\text{g/mL}$ であった菌株の割合は 60.0～82.0% と高かった。このことから奈良県ではこれら 4 種の殺菌剤を葉かび病の防除に使用すべきではないと結論づ

けた。また、フルオピラムとイソフェタミドの MIC の分布のピークは 10 μ g/mL、インピルフルキサムでは 100 μ g/mL、その他の薬剤では>100 μ g/mL であり、SDHI 剤間で感受性に大きな差が認められた。ペンチオピラドとボスカリドの MIC が 0.1 および 1 μ g/mL であった菌株はすべて、他の 5 剤に対する MIC が 0.1 または 1 μ g/mL であった。さらに、ペンチオピラドとボスカリドの MIC が>100 μ g/mL となった菌株の多くは、他の 5 種類の SDHI 剤に対する感受性が低下していたが、その程度は農薬間で異なった。これらの結果から、SDHI 剤間には交差耐性が存在するものの、感受性の低下程度には薬剤間差があることが明らかになった。

3. 感受性の異なる菌株に対する SDHI 剤の防除効果

植物体での防除効果を評価するため、感受性、中程度耐性および高度耐性の菌株各 1 菌株をトマトに接種して防除試験を実施した。感受性菌は SDHI 剤 7 剤すべての MIC が 0.1 μ g/mL、中程度耐性菌はインピルフルキサム、フルオピラムおよびイソフェタミドの MIC が 10 μ g/mL、その他の剤の MIC が>100 μ g/mL、高度耐性菌はイソフェタミドの MIC が 10 μ g/mL、その他の剤の MIC が>100 μ g/mL と定義した。供試菌株は PSA 平板培地上で 25 $^{\circ}$ C、暗黒下で 14 日間培養した。滅菌蒸留水を加え、孢子懸濁液を 3 $\times$ 10⁵ 分生子/mL に調整した。トマト「桃太郎 8」は 15cm ポットで栽培し、本葉 5 枚、草丈約 30cm 時に用いた。2021 年 10 月に 7 剤をそれぞれ登録濃度に希釈して散布し、風乾後の同日にトマト 1 株あたり 5 ml の分生子懸濁液を噴霧した。発病調査は、接種 20 日後、株当たり 4 複葉を対象に以下の発病指数で評価した。0；病斑なし、1；複葉に占める病斑面積が 1～5%、2；6～25%、3；26～50%、4；51～100%。発病度は、(1A+2B+3C+4E) / 4F $\times$ 100 として計算した。A、B、C、E は、それぞれの発病指数に対応する複葉の数であり、F は評価した複葉の総数である。防除価は発病度から算出した。

感受性菌に対して SDHI 剤 7 剤すべてが防除価 97 以上の高い効果を示した。中程度耐性菌に対してペンチオピラド、ボスカリド、イソピラザム、ピラジフルミドおよびインピルフルキサムは防除価 2～35 であり効果は認められなかった。一方でフルオピラムとイソフェタミドは防除価がそれぞれ 56 と 100 であり効果が認められた。高度耐性菌に対してはイソフェタミドのみが防除効果を示し、その防除価は 92 と高かった（表 5）。

表 5 感受性の異なるトマト葉かび病菌に対する SDHI 剤の防除効果

薬剤	感受性菌				中程度耐性菌				高度耐性菌			
	発病葉率 (%)	発病度	防除価	MIC (μ g/ml)	発病葉率 (%)	発病度	防除価	MIC (μ g/ml)	発病葉率 (%)	発病度	防除価	MIC (μ g/ml)
ペンチオピラド	5	1	99	0.1	100	93	6	>100	100	90	10	>100
ボスカリド	7	2	98	0.1	100	97	2	>100	100	97	2	>100
イソピラザム	12	3	97	0.1	100	85	14	>100	100	90	9	>100
ピラジフルミド	0	0	100	0.1	88	64	35	>100	100	80	19	>100
インピルフルキサム	2	0	100	0.1	100	90	8	10	100	92	7	>100
フルオピラム	0	0	100	0.1	72	44	56	10	98	78	21	>100
イソフェタミド	0	0	100	0.1	0	0	100	10	20	8	92	10
無処理	100	99			100	98			100	99		

培地検定での MIC と接種試験での防除価には関連性が認められ、MIC が 0.1 μ g/mL の菌株に対しては防除価が高く、MIC が >100 μ g/mL では効果は認められなかった。この結果は 渡辺 (2017) や中嶋ら (2021) と一致する。なお、MIC が 10 μ g/mL の菌株に対しては防除価が 8~100 と幅が認められた。イソフェタミドは MIC が 10 μ g/mL の菌株に対して高い防除効果を示したが、インピルフルキサムとフルオピラムは効果がないあるいは低く、MIC が高い菌株では防除効果に薬剤間差が生じることが明らかになった。これらのことから、MIC は SDHI 剤耐性菌に対する防除効果を予測する有効な手段であり、イソフェタミドは MIC が 10 μ g/mL の菌株に対しても高い防除効果を示すことが明らかになった。

4. イソフェタミドの予防および治療効果

予防効果と治療効果の評価は、接種に対するイソフェタミドの散布時期を変えることで実施した。登録濃度に希釈したイソフェタミドのトマトへの散布はトマト葉かび病菌の分生子懸濁液の接種 7 日前、接種当日（接種 6 時間前）、または接種 3 日後に実施した。中程度耐性菌と高度耐性菌の 1 菌株ずつを用いて、分生子懸濁液は 1×10^5 分生子/mL に調整した。発病調査は接種 27 日後に行った。

イソフェタミドは中程度および高度耐性菌株に対して、接種 7 日前、接種当日および接種 3 日後の散布のすべてで防除価 77~100 の高い効果を示した。なお、接種 7 日前散布は、他の散布時期と比べてやや低い効果となった（表 6）。

表 6 トマト葉かび病に対するイソフェタミドの散布時期別での防除効果

薬剤	散布時期	中程度耐性菌			高度耐性菌		
		発病葉率	発病度	防除価	発病葉率	発病度	防除価
イソフェタミド	接種7日前	3	1	95	42	14	77
	接種当日	0	0	100	20	8	88
	接種3日後	0	0	100	15	4	93
ベンチオピラド	接種当日	43	23	0	84	52	13
無処理		40	18		95	60	

このことから、イソフェタミドはトマト葉かび病に対して予防効果に加え、治療的な効果を有することが明らかになった。同様に、SDHI 剤は様々な病害に対して感染後の散布での防除効果を示しており、ベンチオピラドは *F. fulva*、イソピラザムは *Sclerotinia sclerotiorum*、ベンゾベンジフルピルは *C. cassiicola* における報告がある（金谷 2011; Huang et al., 2019; Zhu et al., 2021）。

5. おわりに

奈良県では SDHI 剤に対するトマト葉かび病菌の感受性の低下が高頻度で確認された。このような状況下でも SDHI 剤 7 剤の中でイソフェタミドの交差耐性の程度が最も低く、その防除効果は感受性菌、中程度耐性菌および高度耐性菌のいずれに対しても高かった。さらにイソフェタミドは予防効果だけでなく、治療効果を高度耐性菌に対して示した。このことから本剤は奈良県におけるトマト葉かび病の防除に有効と考えられる。

現状のトマト葉かび病の防除体系の中心は TPN 等の多作用点接触阻害剤であり、これらは防除効果が高いことに加え耐性リスクが低いものの、感染後の効果は期待できない。これに対しイソフェタミドは感染後にも効果を示すことから、発病しやすい時期での使用を想定している。但し、他の SDHI 剤と同様に感受性の低下が生じる可能性があるため、使用回数は 1 作に 1 回とするべきと考える。また、殺菌剤散布以外の防除も重要であり、伝染環の遮断に着目するといいい。本病の一次伝染源は分生子であり、施設内や資材に付着して残存している。施設の太陽熱消毒が有効であり、45℃で 3 時間以上の条件で死滅し、夏場であればビニールハウスを数日閉め切るだけで高い効果が得られる（山内・吉田 2020）。殺菌剤は多くの病害に対する防除の中心ではあるが、耐性菌の発生を抑えることに加え、長期間安定して生産を続けるためにも殺菌剤だけに頼らない総合的な防除体系が慣行となることを目標としたい。

引用文献

- Asano S, Yoshida K, Hirayama Y (2024) Sensitivity of tomato leaf mould-causing *Fulvia fulva* to seven succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicides in Nara Prefecture, Japan and high efficacy of isofetamid in controlling SDHI-resistant isolates. *J Phytopathol* 172:e13243
- 浅野峻介・堀浩太郎・平山喜彦（2023）奈良県における QoI 剤耐性トマト葉かび病菌の発生状況とピリベンカルブの防除効果. 令和 5 年度日本植物病理学会関西西部会プログラム・講演要旨集 17
- Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, Chamorro M, de la Peña E, de Vicente A, Torés JA. (2017) Resistance to the SDHI fungicides boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from commercial strawberry fields in Spain. *Plant Dis* 101:1306–1313
- Förster H, Luo Y, Hou L, Adaskaveg JE. (2022) Mutations in *Sdh* gene subunits confer different cross-resistance patterns to SDHI fungicides in *Alternaria alternata* causing Alternaria leaf spot of almond in California. *Plant Dis* 106:1911–1918
- Huang XP, Song YF, Li BX, Mu W, Liu F. (2019) Baseline sensitivity of isopyrazam against *Sclerotinia sclerotiorum* and its efficacy for the control of Sclerotinia stem rot in vegetables. *Crop Prot* 122:42–48
- Iida Y, van Hof P, Beenen H, Mesarich C, Kubota M, Stergiopoulos I, Mehrabi R, Notsu A, Fujiwara K, Bahkali A, Abd-Elsalam K, Collemare J, de Wit PJGM (2015) Novel mutations detected in avirulence genes overcoming tomato *Cf* resistance genes in isolates of a Japanese population of *Cladosporium fulvum*. *PLoS One* 10:e0123271
- 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 cassicola* and *Podosphaera xanthii*. *Pest Manag Sci* 67:474–482
- 金谷寛子（2011）トマト葉かび病に対する感染前薬剤散布の有効性. 岡山県農業研究所平成 22 年度試験研究主要成果 39–40
- 木村 響・中居由依奈・井沼 崇（2023）和歌山県におけるトマト葉かび病菌の薬剤感受性と各種薬剤の防除効果. 関西病虫研報告 64:66–68
- 中嶋香織・川上 拓・鈴木啓史・黒田克利（2021）三重県におけるトマト葉かび病菌の SDHI 剤に対す

る感受性. 関西病虫研報 63:67–73

- Sierotzki H, Scalliet G. (2013) A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 103:880–887
- Thomma BPHJ, Van Esse HP, Vrous PW, de Wit PJGM. (2005) *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Mol Plant Pathol* 6:379–393
- Veloukas T, Markoglou AN, Karaoglanidis GS. (2013) Differential effect of *SdhB* gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis* 97:118–122
- Watanabe H, Horinouchi H, Muramoto Y, Ishii H. (2017) Occurrence of azoxystrobin-resistant isolates in *Passalora fulva*, the pathogen of tomato leaf mould disease. *Plant Pathol* 66:1472–1479
- 渡辺秀樹 (2017) トマト葉かび病菌. 植物防疫 71:35–44
- 山内智史・吉田重信 (2020) トマト葉かび病菌に汚染された誘因資材の温湯消毒やハウス蒸し込み処理による消毒の有効性評価. 関東病虫研報 67:9–12
- Zuniga, AI, Oliveira MS, Suguinoshita RC, Peres NA. (2020) Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from strawberry to Isofetamid compared to other SDHIs. *Plant Dis* 104:1224–1230
- Zhu J, Li A, Zhang L, Gao Y, Mu W, Liu F. (2021) The bioactivity and efficacy of benzovindiflupyr against *Corynespora cassiicola*, the causal agent of cucumber Corynespora leaf spot. *Plant Dis* 105:3201–3207

新規殺菌剤キノプロール®（ミギワ®）の作用特性と感受性検定

Fungicidal properties and sensitivity study of a novel fungicide KINOPROL® (MIGIWA®)

日本曹達株式会社 研究開発本部 小田原研究所
西野茂樹

Shigeki Nishino, Nippon Soda Co., Ltd. Odawara Research Center,
Research & Development DIV. 345 Takada, Odawara, Kanagawa 250-0280, Japan

Abstract

KINOPROL® (code name: NF-180, common name: ipflufenquin, product trademark: MIGIWA®) is a novel fungicide discovered and developed by Nippon Soda Co., Ltd.. KINOPROL® inhibits dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) of phytopathogenic fungi, therefore it can be classified as a dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DHODHI). KINOPROL® is the first fungicide with this mode of action to be commercialized for agricultural and horticultural use. KINOPROL® has outstanding fungicidal activity against fungi in Ascomycota such as *Venturia* spp., *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Colletotrichum* spp.. Cross-resistance between KINOPROL® and existing fungicides has been not observed in *V. inaequalis*, *B. cinerea*, *Colletotrichum fructicola* and *C. perseeae*. In the field trials against apple scab and grape ripe rot, KINOPROL® showed excellent effectiveness. To prepare for the resistance management of KINOPROL®, it is important to understand its sensitivity distribution before actual use. Hence, it is required to establish its methods for sensitivity monitoring. In order to obtain the sensitivity monitoring data of KINOPROL®, the inhibitory activities on mycelial growth were tested using the isolates of *V. inaequalis*, *B. cinerea* and *Colletotrichum* spp. causing grape ripe rot. As a result, the range of EC₅₀ values against *V. inaequalis* and *Colletotrichum* spp. was estimated as less than 0.2 ppm and the range of EC₅₀ values against *B. cinerea* was estimated as less than 0.08 ppm. The EC₅₀ values of KINOPROL® for these three pathogens formed single-peaked normal distribution.

1. はじめに

キノプロール®（ミギワ®）は日本曹達株式会社が発明・開発したフェニルプロパノール構造を有する、農園芸用殺菌剤として実用化された初のジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ（DHODH）阻害剤であり（柴原ら、2022）、果樹や野菜などの作物に発生する各種病害に優れた防除効果を示す。国内では、NF-180の開発コードで2014年より一般社団法人日本植物防疫協会を通じて実用化試験を開始し、2020年7月14日付でミギワ®フロアブルとして農薬登録を取得した。

キノプロール®は前述のとおり新規作用機構の殺菌剤であるため、使用前の感受性分布を把握することは耐性菌管理において重要であり、感受性検定法の確立が必要である。

今回、キノプロール®の作用特性について紹介するとともに、キノプロール®が卓効を示すリンゴ黒星病菌、ブドウ晩腐病菌、灰色かび病菌に対する感受性検定法とその検定結果について報告する。

2. 物理化学的性状および安全性

キノプロール®の構造（図 1）、物理化学的性状および安全性については以下の通りである。また、セイヨウミツバチをはじめとする各種有用昆虫や天敵に対して影響が少ないことを確認している（表 1）。

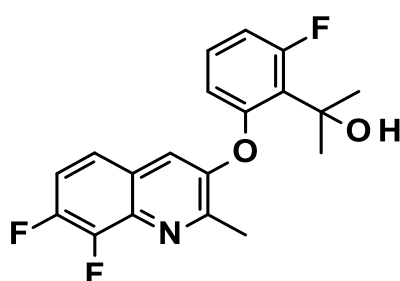


図 1. キノプロール®の構造式

物理化学的性状

一般名	: イプフルフェノキン (Ipflufenquin)
原体商標	: キノプロール® (KINOPROL®)
製品名	: ミギワ®20フロアブル (果樹・茶用) : ミギワ®10フロアブル (野菜用)
化学名 (IUPAC和名)	: 2-[2-(7,8-ジフルオロ-2-メチルキノリン-3-イルオキシ)-6-フルオロフェニル]プロパン-2-オール
作用機分類番号 (RAC番号)	: 殺菌剤分類52 (DHODH阻害)
CAS登録番号	: 1314008-27-9
分子式 (分子量)	: C ₁₉ H ₁₆ F ₃ NO ₂ (347.3)
融点	: 114.4~115.5 °C
水溶解度	: 9.20 mg/L (20°C)
オクタノール/水分配係数 (LogPow)	: 3.89 (25°C)
蒸気圧	: <1.0×10 ⁻⁵ Pa (20°C)

人畜毒性 (原体) 表 1. 有用生物への影響

急性経口毒性 (ラット 雄、雌) : LD₅₀ >2000 mg/kg 体重
(キノプロール®20%フロアブル 100ppm、社内試験)
急性経皮毒性 (ラット 雄、雌) : LD₅₀ >2000 mg/kg 体重

急性吸入毒性 (ラット 雄、雌) : LD₅₀ >5.06 mg/L

皮膚刺激性および眼刺激性 (ウサギ) : 刺激性なし

皮膚感作性 (モルモット) : 感作性なし

水産動物への影響 (原体)

魚類急性毒性 (コイ) : LC₅₀ >6.02 mg/L (96時間)

ミジンコ類急性遊泳阻害 : LC₅₀ 2.5 mg/L (48時間)

藻類生育阻害 : LrC₅₀ >3.6 mg/L (72時間)

生物種	供試ステージ	試験方法	影響 ^{a)}
セイヨウミツバチ	成虫	経口投与	影響なし
マメコバチ ^{b)}	成虫	直接散布	影響なし
ミヤコカブリダニ	成虫・次世代	直接散布	影響なし
チリカブリダニ	成虫・次世代	直接散布	影響なし
チャバラアブラコバチ	成虫	接触 (ドライフィルム法)	影響なし
ヒメカメノコテントウ	成虫	虫体浸漬	影響なし

^{a)} IOBCによる評価基準に従い、死亡率0~30%未満を影響なしとした

^{b)} 2019年 青森県産業技術センターりんご研究所委託試験

3. 適用作物・病害

果樹・茶用としてミギワ®20 フロアブル (以下、キノプロール® 20%フロアブル) の商品名でリンゴとナシの黒星病・うどんこ病、ブドウ灰色かび病・晩腐病、チャ炭疽病を中心に幅広い病害に効果を示し、表 2 の作物・病害を対象に登録を取得している。また、野菜用としてミギワ®10 フロアブル (以下、キノプロール® 10%フロアブル) の商品名でアズキおよびインゲンマメと果菜類の灰色かび病・菌核病、炭疽病を中心に幅広い病害に効果を示し、表 3 の作物・病害を対象に登録を取得している。

4. 作用機構

キノプロール®は糸状菌の *de novo* ピリミジン生合成における、ジヒドロオロト酸からオロト酸への変換を触媒するジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ (DHODH) を阻害することによって、病害防除効果を発揮すると考えられる (図 2) (栗原ら、2022)。FRAC コード表の核酸合成代謝において新規の作用を示すことから、キノプロール®は新設のコード「52」に分類された (FRAC、2022)。

ここで、キノプロール®10%フロアブルの希釈液を散布したキュウリの子葉に、ウラシル生合成における前駆体および各種中間体を含む液体培地を添加した灰色かび病菌の孢子懸濁液を接種し予防効果を評価した。その結果、L-ジヒドロオロト酸から上流の物質は本剤の予防効果に影響しなかったが、オロト

酸から下流の物質の存在下で予防効果が低下した（図 3）（栗原ら、2022）。そのため、キノプロール®の抗菌試験および感受性検定は、ピリミジン類を含まない培地で行う必要があると考えられたことから、それらを含めない SD Agar 2% Glucose（Formedium 社製）（以下、SD 培地）に着目し、以後の検討を行った。

表 2. ミギワ®20 フロアブルの適用作物・病害および使用方法（2023 年 10 月 25 日現在）

作物名	適用病害名	希釈倍数 (倍)	使用液量 (L/10a)	使用時期	本剤の 使用回数	イプフルフェノキン を含む農薬の 総使用回数	使用方法
りんご	うどんこ病 黒星病 斑点落葉病 灰色かび病	2000～ 4000	200～700	収穫前日 まで	3回以内	3回以内	散布
なし	黒星病 うどんこ病						
おうとう	灰星病						
もも ネクタリン	灰星病 ホモブシス腐敗病 黒星病						
小粒核果類	灰色かび病	2000					
	灰星病（すもも） 黒星病						
かき	うどんこ病 炭疽病 落葉病 灰色かび病	2000～ 4000					
ぶどう	晩腐病	2000					
	灰色かび病 褐斑病 黒とう病						
かんきつ	灰色かび病	2000～ 4000	200～400	摘採7日前 まで	2回以内	2回以内	
茶	炭疽病						

表 3. ミギワ®10 フロアブルの作物・適用病害および使用方法（2023 年 9 月 1 日現在）

作物名	適用病害名	希釈倍数 (倍)	使用液量 (L/10a)	使用時期	本剤の 使用回数	イプフルフェノキン を含む農薬の 総使用回数	使用方法
あずき	灰色かび病 菌核病 炭疽病	1000	100～ 300	収穫7日前 まで	3回以内	3回以内	散布
いんげんまめ	灰色かび病 菌核病						
トマト ミニトマト							
なす	灰色かび病 菌核病 うどんこ病						
きゅうり	灰色かび病 菌核病 炭疽病 つる枯病						
ピーマン	うどんこ病 灰色かび病						
シクラメン パンジー ペチュニア	灰色かび病			発病前～ 発病初期			

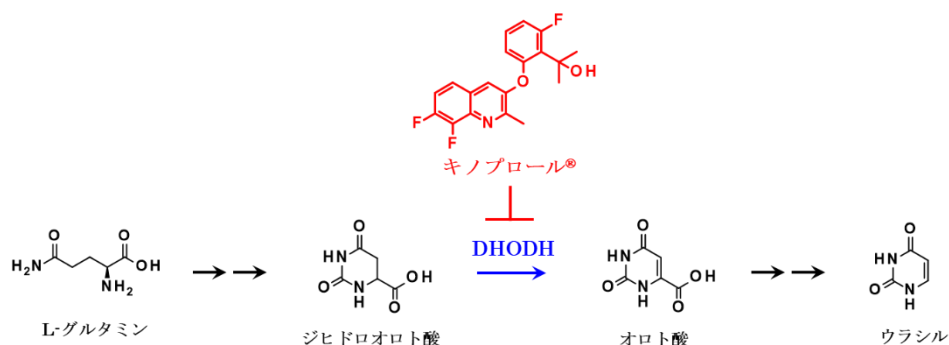


図 2. キノプロール®の作用機構

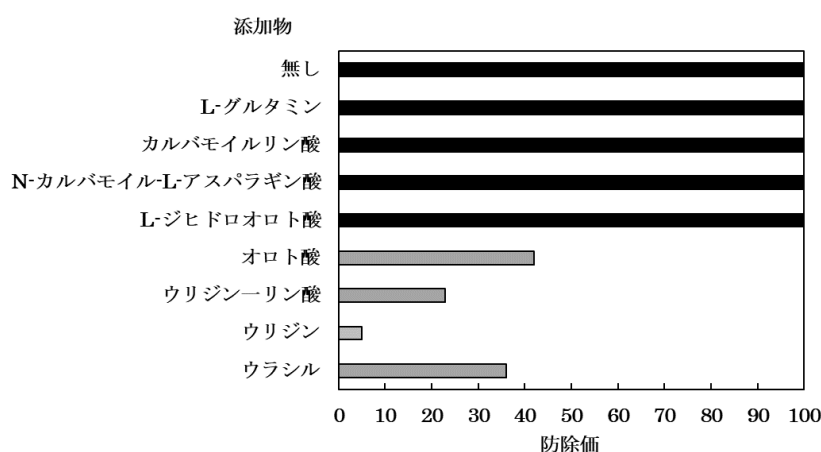


図 3. キノプロール®10%フロアブルの灰色かび病菌孢子懸濁液と各種添加物混合接種による予防効果

5. 作用特性

5-1. 既存の薬剤耐性菌に対する抗菌活性（培地検定）

既存殺菌剤に耐性または感受性のリンゴ黒星病菌および灰色かび病菌に対するキノプロール®の抗菌活性を寒天平板希釈法で検討した。キノプロール®の活性検出感度を高めるため、0.05%酢酸ナトリウムを加用した SD 培地に所定濃度になるようにキノプロール®を添加した。各種薬剤については既に報告されている感受性検定法に準じて行った（石井、1998；FRAC、2006；平山ら、2017；木曾ら、1998、鈴木ら、2016；高垣、2009）。その結果、キノプロール®は、リンゴ黒星病菌および灰色かび病菌の既存殺菌剤に対する耐性菌または感受性低下菌のいずれに対しても優れた抗菌活性を示し、交差耐性は認められなかった（表 4、表 5）（葉原ら、2021）。

さらに、国内の一部地域では MBC 殺菌剤および QoI 殺菌剤耐性のブドウ晩腐病菌が報告されている（深谷、2009；近藤、2011；菊原、2014）。ブドウ晩腐病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体の中で、MBC 殺菌剤に耐性を持つ菌種は *C. fructicola*、QoI 殺菌剤に耐性を持つ菌種は *C. fructicola* および *C. perseae* であるとの報告があるため（Yokosawa *et al.*, 2020）、これらに対するキノプロール®の抗菌活性を寒天平板希釈法で検討した。なお、事前検討において、SD 培地ではブドウ晩腐病菌の生育が鈍化する菌株があったため、Czapek Dox Broth（Difco 社製）に寒天末を終濃度 1.5% となるように添加した培地（以下、Czapek 培地）に着目した。Czapek 培地を用いることで、SD 培地よりもブドウ晩腐病菌の生育が良好であり、キノプロール®の活性検出感度が鋭敏となった。その結果、キノプロール®

ル®は MBC 殺菌剤および QoI 殺菌剤の感受性がそれぞれ異なるブドウ晩腐病菌 2 菌種 (*C. fructicola* と *C. perseae*) に対しても優れた抗菌活性を示し、交差耐性は認められなかった (表 6) (西野ら、2022)。

表 4. キノプロール®の既存殺菌剤に耐性または感受性のリンゴ黒星病菌に対する抗菌活性

病原菌	菌株	EC ₅₀ (ppm)				
		キノプロール®	DMI A剤	DMI B剤	DMI C剤	QoI D剤
リンゴ黒星病菌	Vi-101	0.0014	0.016	<0.010	0.030	0.0039
	Vi-79	0.0017	0.74	0.048	3.1	>2.0
	Vi-81	0.0025	1.3	39.1	5.3	>2.0

キノプロール®の検定には SD 培地に 0.05%酢酸ナトリウムを添加した培地を使用した。
菌株名は日本曹達 (株) 管理番号。

表 5. キノプロール®の既存殺菌剤に耐性または感受性の灰色かび病菌に対する抗菌活性

病原菌	菌株	EC ₅₀ (ppm)				MIC (ppm)	
		キノプロール®	MBC E剤	N-フェニルカーバメート F剤	ジカルボキシイミド G剤	SDHI H剤	アニリノピリミジン I剤
灰色かび病菌	Bc-86	0.021	<0.13	>10	0.31	1.0	1.0
	Bc-151	0.010	382.8	<0.10			>30
	Bc-251	0.0080			>100		
	Bc-245	0.0053				>100	
	Bc-246	0.018				>100	

キノプロール®の検定には SD 培地に 0.05%酢酸ナトリウムを添加した培地を使用した。
菌株名は日本曹達 (株) 管理番号。

表 6. キノプロール®の MBC 殺菌剤および QoI 殺菌剤に耐性または感受性のブドウ晩腐病菌に対する抗菌活性

ブドウ晩腐病菌 菌種	菌株	EC ₅₀ (ppm)	MIC (ppm)	
		キノプロール®	MBC A剤	QoI B剤
<i>Colletotrichum fructicola</i>	B-C-119	0.023	10	1
	B-C-34	0.022	>1000	>100
<i>Colletotrichum perseae</i>	B-C-18	0.023	10	1
	B-C-23	0.012	10	>100

キノプロール®の検定には Czapek 培地を使用した。
菌株名は日本曹達 (株) 管理番号。

B-C-119 菌は農研機構の農業生物資源ジーンバンク事業より配布を受けた (MAFF No.238650)。

5-2. リンゴ黒星病およびキュウリ灰色かび病に対する作用特性

キノプロール®は、ポット試験においてリンゴ黒星病に対して優れた予防効果、潜伏感染防除効果、耐雨性、残効性を示すとともに、薬剤が散布されていない未展開葉において発病を抑制したことから、上位葉への移行性を有することも確認した (図 4) (栗原ら、2021)。

また、ポット試験においてキュウリ灰色かび病に対して予防効果、浸達性、残効性および耐雨性を示すとともに、上方への移行性を有することも確認した（川崎ら、2023）。

キノプロール®はこれらの特性を有するため、圃場で安定した防除効果を示すものと考えられる。

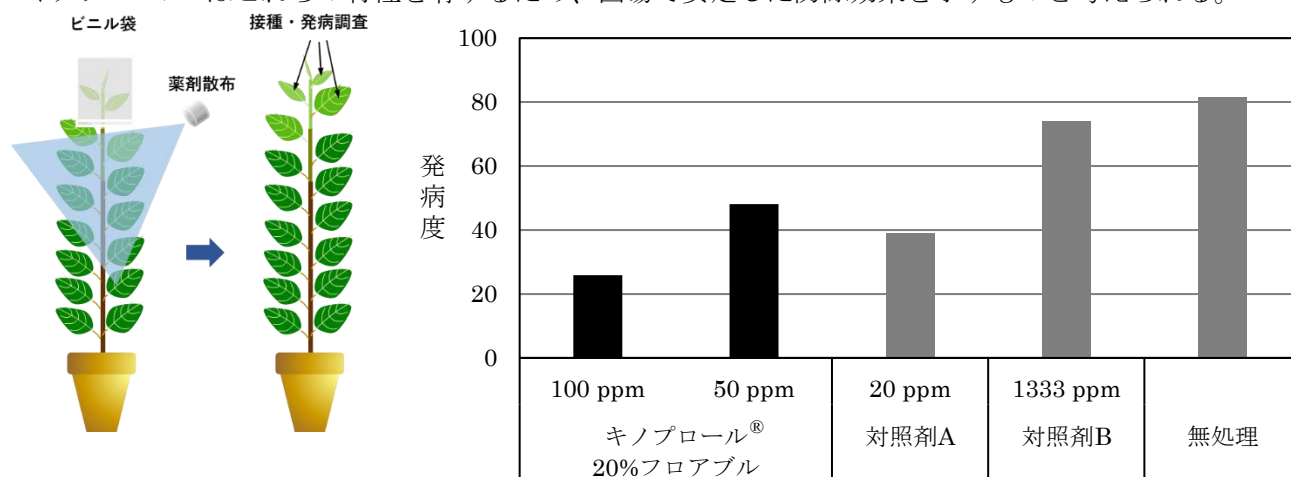


図 4. キノプロール®20%フロアブルのリンゴ黒星病に対する移行性試験の方法および結果

試験方法：リンゴ（王林種子の実生苗、16～20 葉期）の新梢先端の未展開葉をビニル袋で保護し、植物全体にキノプロール®20%フロアブルの有効成分を 100 ppm および 50 ppm（国内登録濃度）に調製した薬液を十分量散布した。風乾後、ビニル袋を取り外し、5 日間露地で栽培した。黒星病菌の分生子懸濁液（ 50×10^4 個/mL）を噴霧接種し、2 日間 20℃、暗条件、高湿度に保った。その後、露地で栽培し、平日の夜間のみ高湿度条件で管理し、接種 21 日後に散布時未展開葉であった連続 3 葉の発病状況を調査した。

5-3. リンゴ黒星病の生活環上の障害部位

キノプロール®は、リンゴ黒星病菌の孢子発芽、発芽管伸長、付着器形成に影響しないが、葉内への菌糸侵入を部分的に抑制するとともに、侵入菌糸の拡大や分生子形成を強く抑制した。これらのことから、キノプロール®はリンゴ黒星病菌の侵入後の感染行動を強く阻害することによって防除効果を示すと考えられる（図 5）（栞原ら、2021）。

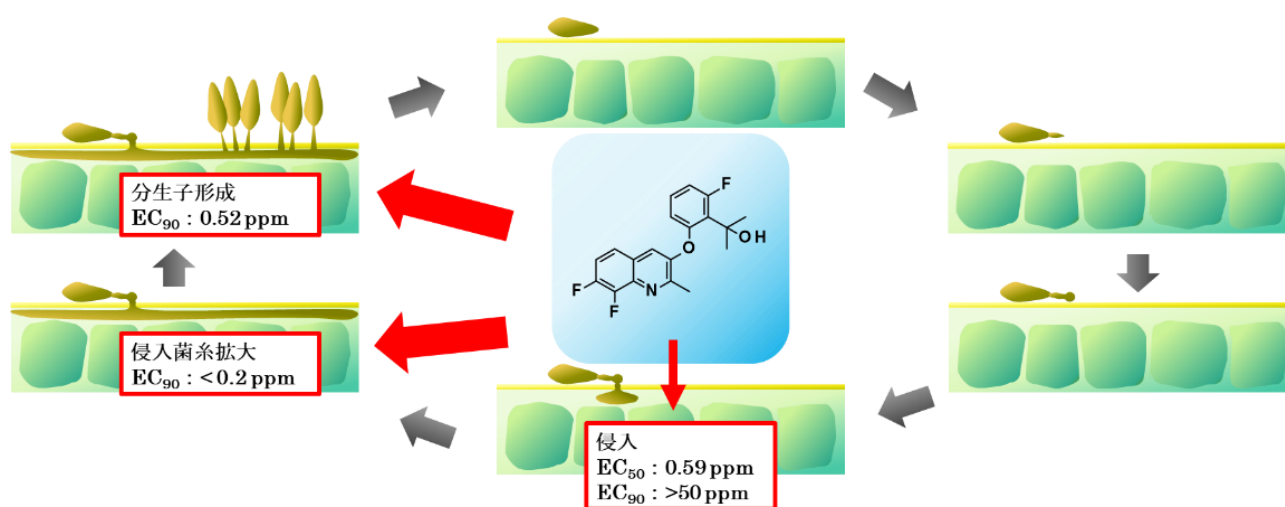


図 5. キノプロール®のリンゴ黒星病に対する生活環上の障害部位

6. 実使用場面での防除効果

リンゴ黒星病およびブドウ晩腐病、キュウリ灰色かび病・菌核病に対するキノプロール®の実用場面を想定した防除効果を社内試験で検討した。露地栽培のリンゴにキノプロール®を開花～落花期に計 3 回散布し、黒星病に対する防除効果を評価した結果、対照剤と同等以上の優れた効果を示した（図 6）（西野ら、2021）。また、露地栽培のブドウにキノプロール®を落花 5 日後と落花 12 日後に計 2 回散布し、晩腐病に対する防除効果を評価した結果、対照剤に優る優れた効果を示した（図 7）（西野ら、2022）。さらに、ハウス栽培のキュウリにキノプロール®を開花期～果実肥大期に 7 日間隔で計 3 回散布し、灰色かび病および菌核病に対する防除効果を評価した結果、対照剤と同等の優れた効果を示した（図 8）（川崎ら、2023）。

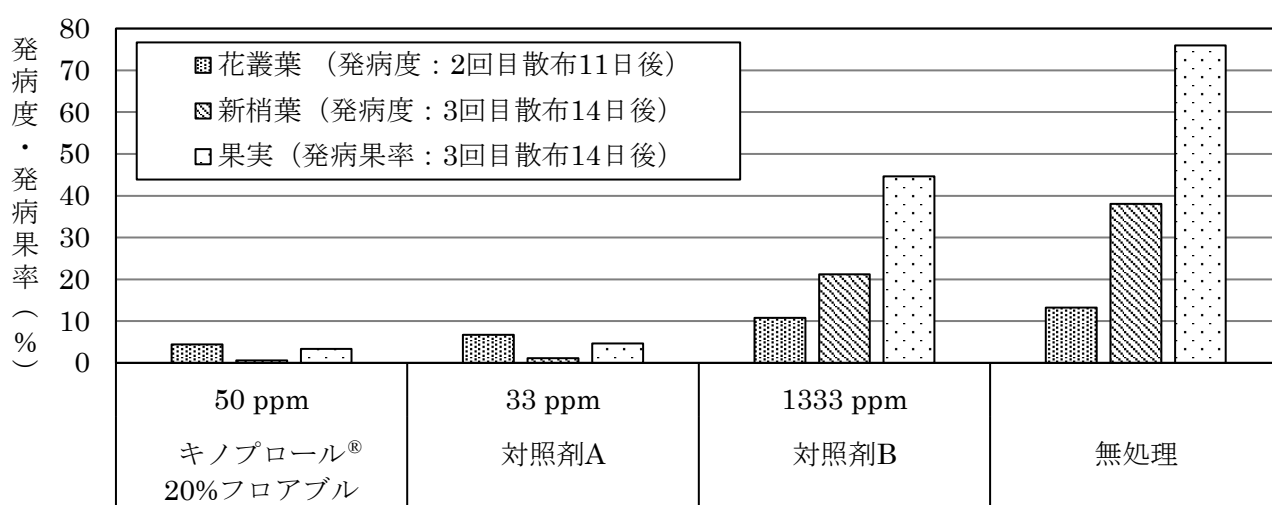


図 6. キノプロール®20%フロアブルのリンゴ黒星病に対する防除効果

試験地：日本曹達（株）磐梯フィールドリサーチステーション内露地圃場

供試作物：リンゴ（品種 らくらくふじ）

散布日：2020 年 5 月 4 日（開花直前）、14 日（落花直後）、25 日（落花 11 日後）

調査日：5 月 25 日（花叢葉（2 回目散布 11 日後））

6 月 8 日（新梢葉、果実（3 回目散布 14 日後））

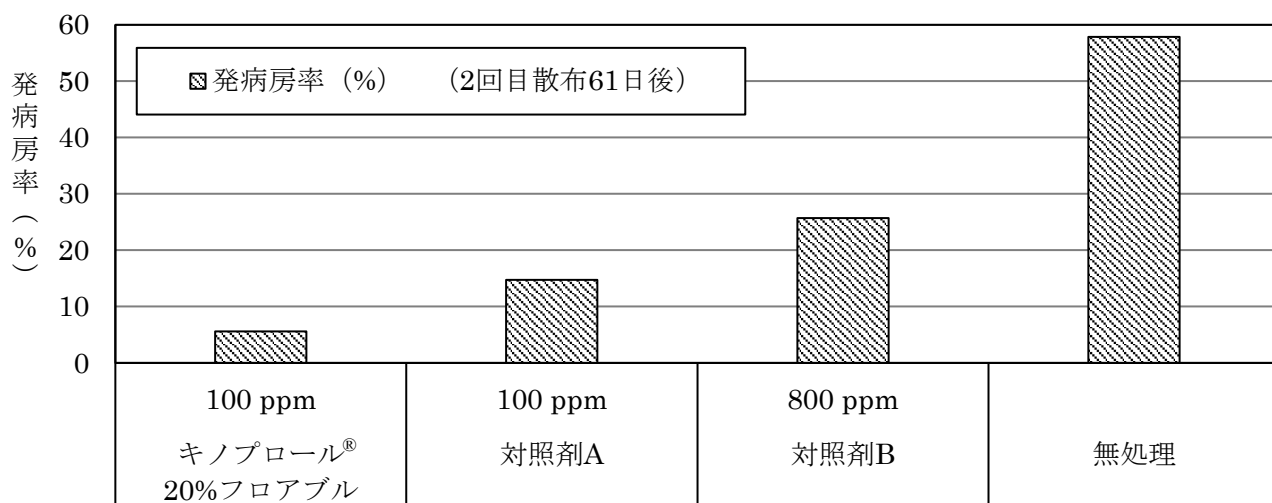


図 7. キノプロール®20%フロアブルのブドウ晩腐病に対する防除効果

試験地：日本曹達(株)磐梯フィールドリサーチステーション内露地圃場

供試作物：ブドウ（品種 巨峰）

散布日：2021年7月1日（落花5日後）、8日（落花12日後）

袋掛け：7月13日（2回目散布5日後）

調査日：9月7日（2回目散布61日後）

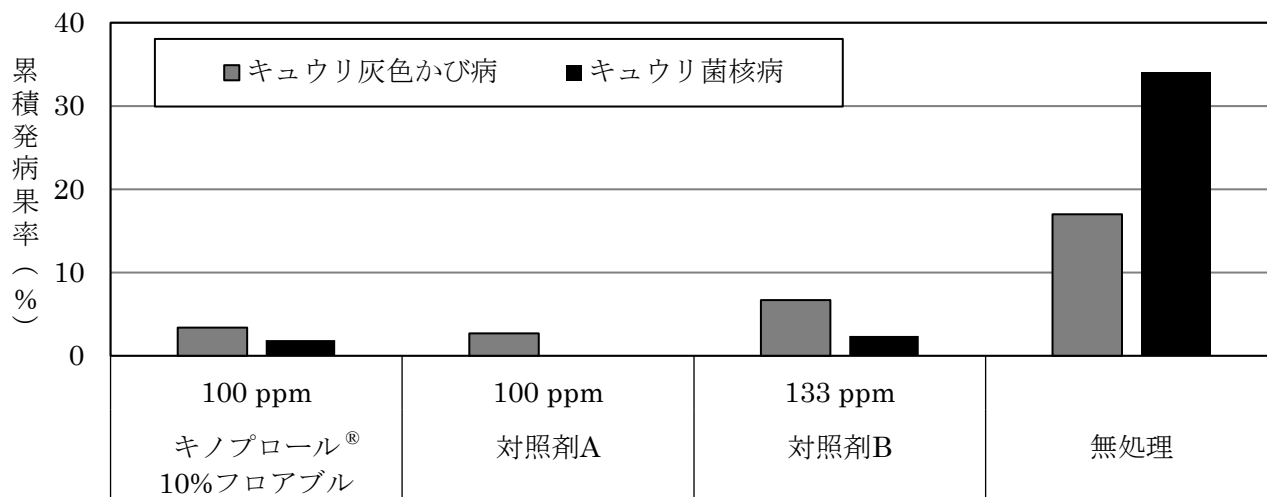


図 8. キノプロール®10%フロアブルのキュウリ灰色かび病および菌核病に対する防除効果

試験地：日本曹達(株)榛原フィールドリサーチセンター内ビニルハウス

供試作物：キュウリ（品種 リスペクト）

●灰色かび病：散布日：2021年10月20日、27日、11月4日

：初回散布時の作物ステージ：開花期～果実肥大期

：最終調査日：11月11日（3回目散布7日後）

●菌核病：散布日：2021年2月19日、26日、3月5日

：初回散布時の作物ステージ：開花期～果実肥大期

：最終調査日：3月12日（3回目散布7日後）

7. 感受性検定

FRACにおいて、リンゴ黒星病菌、灰色かび病菌、ブドウ晚腐病菌の耐性リスク（病原菌リスク）はそれぞれ「高」、「高」、「中」に分類されており、リンゴ黒星病菌と灰色かび病菌については、多くの薬剤について耐性菌発生の報告がある（FRAC、2020）。また、前述（5-1.）のとおり、国内のブドウ晚腐病菌については、MBC 殺菌剤および QoI 殺菌剤の耐性菌が報告されている（深谷、2009、近藤、2011、菊原、2014）。キノプロール®についても長期使用により耐性菌が発生するリスクを考慮し、上記3病害についてキノプロール®に対するベースライン値を把握するため、感受性検定法を確立し、検定を実施した。

7-1. リンゴ黒星病菌の感受性検定

リンゴ黒星病菌に対するキノプロール®の感受性は、SD 培地を用いた寒天平板希釈法で評価が可能であった（5-1. 参照）。2021年までに外部研究機関から購入または譲渡入手した菌株に加えて、当社で分

離した菌株を含めた計 82 菌株について、以下の方法で検討した。

① 検定用病原菌の採集

リンゴ黒星病の新鮮な病斑（葉または果実）からリンゴ黒星病菌を分離し、PDA 培地で培養した。得られた菌株は PDA 斜面培地で保管した。

② 前培養

直径 9 cm のプラスチックシャーレに SD 培地を 20 mL 流し込み平板を作成したものに、分離菌を植菌し、暗所 20℃で 25～30 日間培養した。

③ 検定培地の調製

キノプロール®20%フロアブルを滅菌水で所定の 100 倍濃度となるように希釈し、オートクレーブした 0.05%酢酸ナトリウム加用 SD 培地に 1/100 量を添加して検定培地を作成した。なお、無処理区には同量の滅菌水を添加した。培地量は 9 cm シャーレあたり 20 mL とした。ここで、検定濃度は有効成分を 1 ppm から公比 5 で段階希釈し 0.2、0.04、0.008、0.0016、0.00032、0.000064（各 ppm）と設定した。

④ 検定培地への植菌および調査

前培養した菌叢先端部から直径 4mm のディスクを打ち抜き、菌叢面を下向きにして検定培地と密着するように置床後、パラフィルムで封をして、暗所 20℃で 21～25 日間培養した。培養後、菌叢直径を測定し、以下の式から菌糸伸長阻害率（%）を算出した。試験は 3 連で行った。なお、置床時の菌叢直径 4 mm を差し引いたものを各区の菌叢直径とした。

$$\text{菌糸伸長阻害率} = (\text{無処理区の菌叢直径} - \text{処理区の菌叢直径}) / (\text{無処理区の菌叢直径}) \times 100$$

7-2. ブドウ晩腐病菌の感受性検定

ブドウ晩腐病菌に対するキノプロール®の感受性は、Czapek 培地を用いた寒天平板希釈法で評価が可能であった（5-1. 参照）。2021 年までに外部研究機関から購入または譲渡入手した菌株に加えて、当社で分離した菌株を含めた計 97 菌株について、以下の方法で検討した。

① 検定用病原菌の採集

ブドウ晩腐病の罹病果に形成した分生子からブドウ晩腐病菌を分離し、PDA 培地で培養した。得られた菌株は PDA 斜面培地で保管した。

② 前培養

直径 9 cm のプラスチックシャーレに Czapek 培地を 20 mL 流し込み平板を作成したものに、分離菌を植菌し、暗所 25℃で 4 日間培養した。

③ 検定培地の調製

キノプロール®20%フロアブルを滅菌水で所定の 100 倍濃度となるように希釈し、オートクレーブした Czapek 培地に 1/100 量を添加して検定培地を作成した。なお、無処理区には同量の滅菌水を添加した。培地量は 9 cm シャーレあたり 20 mL とした。ここで、検定濃度は有効成分を 5 ppm から公比 5 で段階希釈し 1、0.2、0.04、0.008、0.0016（各 ppm）と設定した。

④ 検定培地への植菌および調査

前培養した菌叢先端部を直径 4 mm のディスクを打ち抜き、菌叢面を下向きにして検定培地と密着するように置床後、パラフィルムで封をして、暗所 25℃で 4 日間培養した。培養後、菌叢直径を測定し、以

下の式から菌糸伸長阻害率 (%) を算出した。試験は 3 連で行った。なお、置床時の菌叢直径 4 mm を差し引いたものを各区の菌叢直径とした。

$$\text{菌糸伸長阻害率} = (\text{無処理区の菌叢直径} - \text{処理区の菌叢直径}) / (\text{無処理区の菌叢直径}) \times 100$$

7-3. 灰色かび病菌の感受性検定

灰色かび病菌に対するキノプロール®の感受性は、SD 培地を用いた平板抗菌試験で評価が可能であった。2021 年までに外部研究機関から購入または譲渡入手した菌株に加えて、当社で分離した菌株を含めた計 107 菌株について、以下の方法で検討した。

① 検定用病原菌の採集

果樹および各種野菜類から採取した罹病果または罹病葉から灰色かび病菌を分離し、PDA 培地で培養した。得られた菌株は PDA 斜面培地で保管した。

② 前培養

直径 9 cm のプラスチックシャーレに SD 培地を 20 mL 流し込み平板を作成したものに、分離菌を植菌し、暗所 20℃で菌叢直径が 40~60 mm になるまで 3~7 日間培養した。

③ 検定培地の調製

キノプロール®10%フロアブルを滅菌水で所定の 100 倍濃度となるように希釈し、オートクレーブした 0.05%酢酸ナトリウム加用 SD 培地に 1/100 量を添加して検定培地を作成した。なお、無処理区には同量の滅菌水を添加した。培地量は 9 cm シャーレあたり 20 mL とした。ここで、検定濃度は有効成分を 10 ppm から公比 5 で段階希釈し 2、0.4、0.08、0.016、0.0032、0.00064 (各 ppm) と設定した。

④ 検定培地への植菌から調査

前培養した菌叢先端部を直径 4 mm のディスクを打ち抜き、菌叢面を下向きにして検定培地と密着するように置床後、パラフィルムで封をして、暗所 20℃で無処理区の菌叢直径が 20~40 mm になるまで 2~5 日間培養した。培養後、菌叢直径を測定し、以下の式から菌糸伸長阻害率 (%) を算出した。試験は 3 連で行った。なお、置床時の菌叢直径 4 mm を差し引いたものを各区の菌叢直径とした。

$$\text{菌糸伸長阻害率} = (\text{無処理区の菌叢直径} - \text{処理区の菌叢直径}) / (\text{無処理区の菌叢直径}) \times 100$$

7-4. 感受性検定結果

日本各地のリンゴ黒星病菌 82 菌株およびブドウ晩腐病菌 97 菌株について感受性検定を行った結果、両菌種とも EC₅₀ 値は 0.2 ppm 以下に分布し、0.008~0.04 ppm を中心とする一峰性を示した (図 9)。

また、日本各地の果樹および各種野菜類の灰色かび病菌 107 菌株について感受性検定を行った結果、EC₅₀ 値は 0.08 ppm 以下に分布し、0.0032~0.016 ppm を中心とする一峰性を示した (図 10)。

現時点で、本結果をキノプロール®の感受性ベースラインと定めたい。

なお、EC₅₀ 値の分布範囲が比較的広かったリンゴ黒星病菌についてはデータの変動要因を減らすために、今後は培養期間に幅を設けず 21 日間に設定する。また、リンゴ黒星病菌は分離後の保存期間が長くなると検定結果が分離直後と乖離しやすくなるため、感受性検定は分離後速やかに実施することが望ましい。

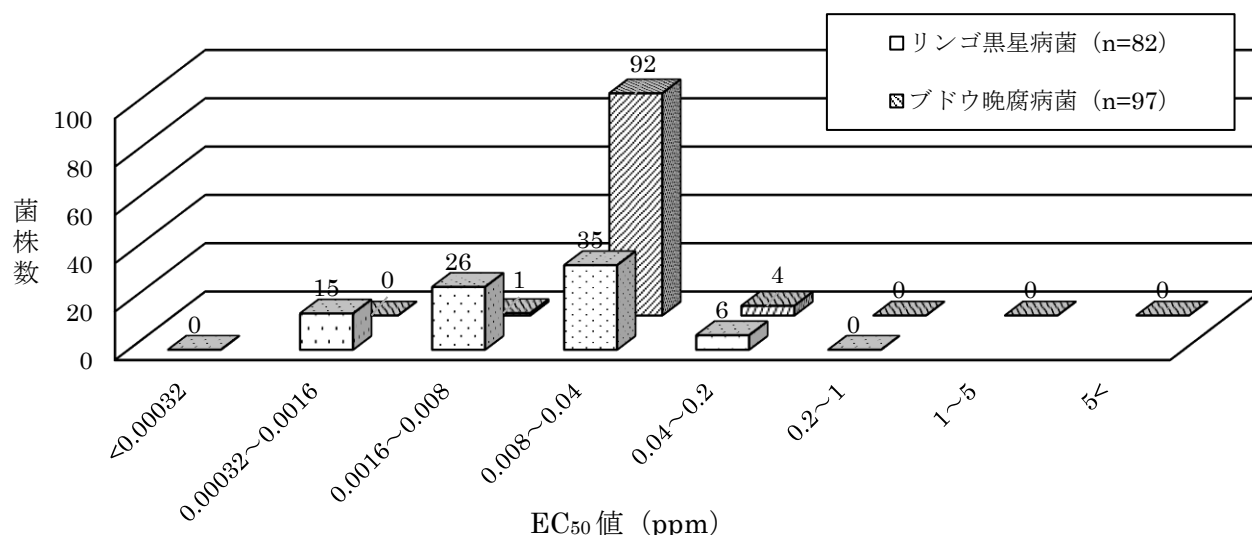


図 9. キノプロール®のリンゴ黒星病菌およびブドウ晩腐病菌に対する EC₅₀ 値の分布

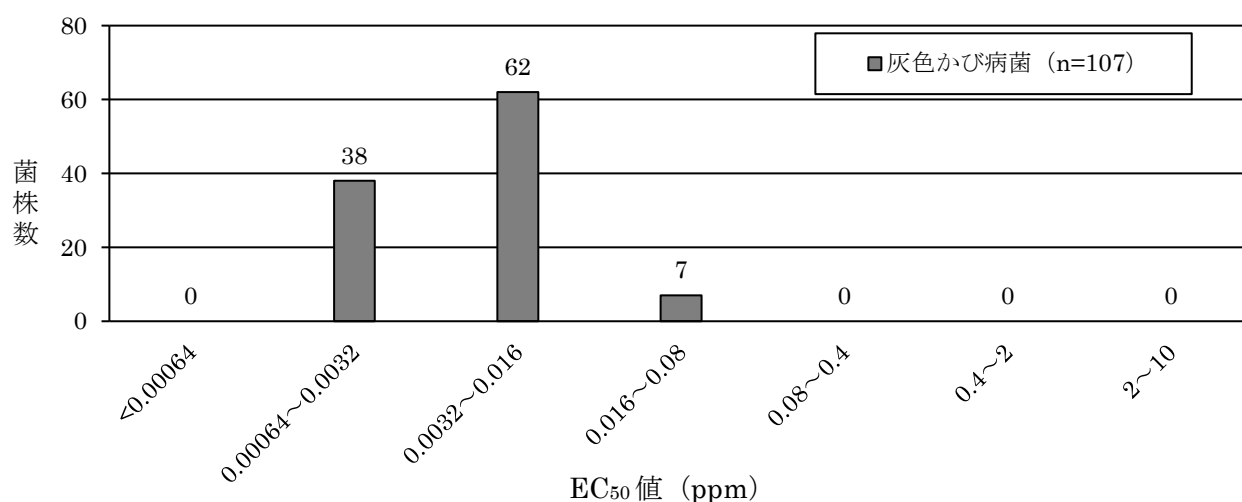


図 10. キノプロール®の灰色かび病菌に対する EC₅₀ 値の分布

8. おわりに

キノプロール®はリンゴ黒星病、ブドウ晩腐病、果菜類灰色かび病・菌核病を中心に優れた防除効果を示す新規殺菌剤であり、既存剤とは異なる作用機構（DHODH 阻害）を有する。上市前の感受性検定の結果、リンゴ黒星病菌およびブドウ晩腐病菌、灰色かび病菌の本剤に対する感受性の分布を把握し、現時点のベースライン値を設定した。今後も継続的にモニタリングを実施して感受性動向の把握に努めたい。本剤が防除対象とする植物病原菌の殺菌剤耐性菌発生リスクは低くないため、他の作用機構を有する殺菌剤と体系的に使用することによって薬剤の耐性菌発生リスクを軽減し、果樹・茶および野菜の各種病害防除に長く寄与できるよう、各病害防除指導機関と連携して本剤の普及に努めたいと考えている。

引用文献

FRAC (2006) Monitoring Methods. FRAC ホームページ. (2023 年 12 月 1 日取得. <https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/ventin-spore-germination->

basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=be99419a_4)

FRAC (2020) LIST OF FIRST CONFIRMED CASES OF PLANT PATHOGENIC ORGANISMS RESISTANT TO DISEASE CONTROL AGENTS. FRAC ホームページ(2023 年 12 月 1 日取得. https://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-first-confirmed-cases-of-plant-pathogenic-organisms-resistant-to-disease-control-agents_05_2020.pdf).

FRAC (2022) Code List® 2022 : Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). FRAC ホームページ. (2023 年 12 月 1 日取得. https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022-final.pdf?sfvrsn=b6024e9a_2).

深谷雅子 (2009) 植物病原菌の感受性検定マニュアルⅡ, 日本植物防疫協会 : 108-110.

平山和幸・赤平知也・花岡朋絵 (2017) 青森県における QoI 剤耐性リンゴ黒星病菌の発生. 北日本病害虫研報. 68: 115-119.

石井英夫 (1998) 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル, 日本植物防疫協会 : 73-76.

川崎達弘・西村聡・西野茂樹・斎賀睦幸 (2023) 新規殺菌剤キノプロール® (ミギワ®) に関する研究 (第 3 報) —キノプロール®フロアブルの豆・野菜病害に対する防除効果—. 日植病報. 89 : 203. (講要)

菊原賢次 (2014) 福岡県で分離されたブドウ晩腐病菌の QoI 剤感受性と簡易迅速検定法の検討. 九州病害虫研究会報 60: 103.

木曾皓・山田正和 (1998) 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル, 日本植物防疫協会 : 28-33.

近藤賢一 (2011) 長野県におけるブドウ晩腐病菌の QoI 剤感受性の実態. 第 21 回殺菌剤耐性菌シンポジウム講演要旨集: 29-44.

栗原頼人・西野千尋・藤井孝行・斎賀睦幸 (2021) 新規殺菌剤キノプロール® (ミギワ®) の殺菌効果と特徴. 日本農薬学会第 46 回大会講演要旨集 : 121. (講要)

栗原頼人・佐藤元亮・川崎達弘・斎賀睦幸 (2022) 新規殺菌剤キノプロール® (ミギワ®) の作用機構. 日本農薬学会第 47 回大会講演要旨集 : 79. (講要)

西野茂樹・栗原頼人・藤井孝行・西野千尋・佐野博 (2021) 新規殺菌剤キノプロール® (ミギワ®) に関する研究 (第 1 報) —キノプロール®のリンゴ黒星病に対する防除効果—. 日植病報. 87 : 197. (講要)

西野茂樹・藤井孝行・西村聡・荻野智和 (2022) 新規殺菌剤キノプロール® (ミギワ®) に関する研究 (第 2 報) —キノプロール®水和剤の果樹病害に対する防除効果—. 日植病報. 88 : 220. (講要)

鈴木啓史・辻朋子・川上拓・黒田克利 (2016) 野菜類灰色かび病菌—SDHI 剤 (培地・生物検定法) —植物防疫. 70 (9) . 610-615.

高垣真喜一 (2009) 植物病原菌の感受性検定マニュアルⅡ, 日本植物防疫協会 : 38-40.

Yokosawa, S., Eguchi, N. and Sato, T. (2020) Characterization of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing grape ripe rot in Nagano Prefecture, Japan. Journal of General Plant Pathology. 86: 163-172.

Role and Activities of the Asia Fungicide Resistance Action Committee (Asia FRAC)

Susan KNIGHT

*Syngenta Asia Pacific Pte. Ltd.; No. 1 Harbour Front Avenue, #03-03 Keppel Bay Tower; 098632;
Singapore; Singapore*

Email: susan.knight@syngenta.com

Abstract

The purpose of the global Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) network is “prolonging the effectiveness of fungicides and limiting crop losses due to resistance”. At its inception 40 years ago, the global FRAC focused primarily on the intensive European fungicide markets, particularly temperate cereals and grapevine. Until recently, in most Asian countries (except for Japan), there were no national FRACs, nor any other committees with responsibility for managing fungicide resistance. To address this gap, the Asia FRAC was formed in 2017, supported by the industry association CropLife Asia. The role of the Asia FRAC is to drive implementation of resistance management throughout the region, through educational and communication initiatives and establishing national committees.

A challenge for the FRAC network in Asia is that most farmers lack a basic understanding of how to address resistance risk. This challenge is amplified by the need to reach 450 million smallholder farmers. Successful management of fungicide resistance requires multi-stakeholder engagement, involving all those who supply products and give advice to farmers (e.g., fungicide manufacturers, the distribution channel, governments, scientists, advisors, and farmer associations).

The Asia FRAC has built a solid foundation for resistance management. It is spearheading a campaign to explain the meaning of “mode of action”, and to encourage the inclusion of this information on product labels. The Asia FRAC has supported numerous national initiatives for driving resistance management, particularly in China, India, Korea, and Southeast Asia. Finally, the Asia FRAC also links national FRACs with the global FRAC network, ensuring the flow of information and expertise. However, one fundamental challenge remains. The homepage of the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) website reminds us that “The loss of a fungicide to agriculture through resistance

is a problem that affects us all.” Farmers need to understand that it is in their interest to implement practices that preserve the long-term effectiveness of fungicides.

The author would like to acknowledge the contribution of CropLife Asia and Asia-FRAC members who have been instrumental in establishing the Asia FRAC, and have catalyzed resistance management efforts in Asia (Victor Alpuerto, Ashutosh Bhaik, Luis Camacho, DeYou Zhao, Dietrich Hermann, JinSuk Hong, Horace Hu, Ganesh Kakade, Sudhakar Kandru, Susan Knight, Janghoon Lee, Jenny Panopio, Srinivas Parimi, David Penna, Dorin Pop, Andrew Roberts, Makoto Shiraishi, Wenshyaun Fong, Sianghee Tan and Alisa Yu).

Introduction

The global Fungicide Resistance Action Committee was established in 1981 to address the emerging problem of fungicide resistance in the intensive farms of North-West Europe. For the first time, fungicide manufacturers acknowledged that a collaborative effort was required. Furthermore, the creation of an industry group fostered effective engagement with scientists and policymakers.

The global Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) network has evolved over the last 40 years, while maintaining its purpose of “prolonging the effectiveness of fungicides and limiting crop losses due to resistance”.

Until recently, in most Asian countries (except Japan), there were no national FRACs in existence, nor any other committees with responsibility for managing fungicide resistance. To address this gap, the crop protection industry cooperated to form the Asia FRAC in 2017, supported by CropLife Asia (the industry association for crop protection and biotechnology companies). (Knight *et al* 2017).

The role of the Asia FRAC is to drive the implementation of fungicide resistance management throughout the region, by supporting the establishment of national FRACs and driving training and education. The term “Asia FRAC network” refers to the members of the Asia FRAC and Asian national FRACs.

In Asia, a challenge for the FRAC network is that farmers in most regions lack a basic understanding of how to manage resistance. They need simple and compelling guidelines, which can be easily understood and incorporated into farming operations. These guidelines must be based on scientific data (field, laboratory, or modeling studies) that are locally relevant. This challenge is amplified by the need to communicate with 450 million smallholder farmers. Moreover, in most Asian countries, there are many companies involved in the manufacture and sales of fungicides. Successful

management of fungicide resistance requires multi-stakeholder engagement, involving all those who supply products and give advice to farmers (e.g., fungicide manufacturers, the distribution channel, governments, scientists, advisors, and farmers associations).

Asia FRAC structure, priorities and achievements

Structure and constitution

The Asia FRAC structure and constitution align with those of the global FRAC, and it adheres strictly to CropLife International anti-trust guidelines. Members represent each of the CropLife member companies. In the Asia national FRACs, the membership is often broader, including local crop protection companies, which fosters greater inclusivity and capitalizes on the knowledge and experience of an extended community.

The Asia FRAC is guided and supported by the global FRAC. The Asia FRAC Chairperson is a member of the global FRAC Steering Committee (FRAC-SC), which facilitates alignment and the transfer of information and expertise among the global and Asia FRAC network.

The support given by CropLife Asia provides the Asia FRAC with highly relevant expertise in product stewardship and communications. It also fosters valuable connections among the Asia FRAC, Asia HRAC and Asia IRAC (Asia RACs), which were formed concurrently in 2017, and share a common goal of improving the implementation of resistance management throughout Asia.

In several Asian countries (e.g., Indonesia, Malaysia, Philippines, Taiwan, Thailand, Vietnam), the crop protection company members have responded to Asia RAC encouragement by forming “cross-indication” RACs or Resistance Management Working Groups (RMWG), which address resistance management for fungicides, herbicides and insecticides. This aligns with the individual members’ responsibilities (many of whom have roles that encompass disease, pest and weed control) and ensures that effort and resources are channeled into the common goal of driving awareness of resistance risk. In general, farmers and stakeholders in Southeast and South Asia show greater concern about insecticide resistance, compared with fungicide resistance. This cross-indication approach therefore helps the Asia FRAC, reinforcing a message that resistance management is important for all crop protection products. It is also valuable to share ideas across the RACs, and some of the approaches used for insecticide resistance management may be worth considering for fungicide resistance management, such as area-wide synchronization of modes of action. Similarly,

a lesson from herbicide resistance management is the integration of non-chemical practices such as destroying harvested weed seed and other strategies to reduce the weed “seed bank”.

Resistance management priorities in Asia

In most Asian countries, national priorities for fungicide resistance management (crops, pathogens) have been communicated by governments, scientists or other groups representing farmers. Attention and resources are deployed for these priority crops and pathogens, mainly focused on generating sensitivity monitoring data (Asia FRAC network members, pers. comm, 2017-2024).

In 2020, CropLife Asia and the Asia RACs conducted a survey of industry member companies across Asia to seek feedback on their priorities for fungicide resistance management.

Country	National priority for fungicide resistance	
	Crop	Pathogen
Australia	Barley	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> .
	Canola	<i>Leptosphaeria maculans</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	Wheat	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> , <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> , <i>Zymoseptoria tritici</i>
China	Cereals	<i>Fusarium graminearum</i>
	Various	<i>Botrytis cinerea</i>
	Oilseed rape	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	Potato	<i>Phytophthora infestans</i>
India	Grapevine	<i>Plasmopara viticola</i> , <i>Uncinula necator</i>
Indonesia	Potato, tomato	<i>Phytophthora infestans</i>
Japan	Rice	<i>Pyricularia oryzae</i>
	Apple	<i>Venturia inaequalis</i>
	Vegetable	Powdery mildews
Korea	Apple	<i>Colletotrichum</i> spp., <i>Botryosphaeria dothidea</i>
	Citrus	<i>Diaporthe citri</i>
	Hot pepper	<i>Colletotrichum</i> spp.
	Peach	<i>Monilinia fructicola</i>
	Rice	<i>Pyricularia oryzae</i>
	Strawberry	<i>Botrytis cinerea</i>
New Zealand	Barley	<i>Ramularia collo-cygni</i>
	Wheat	<i>Zymoseptoria tritici</i>
Philippines	Banana	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
Vietnam	Rice	<i>Pyricularia oryzae</i>

Table 1: National priorities for fungicide resistance research, monitoring and farmer extension activities in Asia-Pacific

Country	"Top three crop/diseases for pathogen for fungicide resistance management in your country?"
Bangladesh	Wheat blast; potato late blight; tomato wilt
China	QoI (broad); SDHI (<i>Botrytis</i> , powdery mildew); veg (esp cucumber) and grape powdery mildew & downy mildew; potato late blight
India	Rice diseases (blast, leaf spot, sheath blight, sheath rot, false smut, grain discolouration); chilli diseases (powdery mildew, leafspot, anthracnose, twig blight, damping off); wheat powdery mildew; grape diseases (powdery mildew, downy mildew, anthracnose); potato late blight; apple scab
Indonesia	Potato late blight; tomato late blight; cucumber downy mildew
Japan	Rice blast; Apple Venturia; vegetable powdery mildew
Korea	Cucumber downy mildew; cucumber powdery mildew; hot pepper anthracnose; apple anthracnose; rice blast
Pakistan	Vegetables, rice and wheat
Philippines	Banana sigatoka; tomato late blight; potato late blight
Sri Lanka	Potato & tomato late blight & early blight; onion anthracnose
Taiwan	Cucurbit downy mildew & powdery mildew, veg and fruit anthracnose
Thailand	Corn downy mildew
Vietnam	Rice blast

Table 2: CropLife National Association and member company survey of national priorities for fungicide resistance management in Asia (2020)

The priorities identified by the crop protection industry respondents are very well aligned with those of governments and other stakeholders. The priorities of the crop protection companies are more extensive in some countries, reflecting the focus of individual companies on specific products. Diseases which were identified as universally important for resistance management include rice blast; cucurbit downy mildew; cucurbit powdery mildews; potato and tomato late blight; grape downy mildew; grape powdery mildew; apple scab, and anthracnose of fruits and vegetables. In all these cases, the risk level is high for at least one of the three factors in the FRAC risk evaluation (chemistry, pathogen and agronomic practice).

The survey feedback also revealed the main obstacles to the implementation of resistance management, based on the perception of crop protection manufacturers:

1. Insufficient farmer awareness on how fungicide resistance evolves, and how to manage resistance
2. Poor understanding of the concept of mode of action
3. Lack of evidence or information demonstrating the value of managing resistance

Underlying these challenges is the limited availability of fungicide sensitivity monitoring data in most Asian countries. In China, Japan and Korea, extensive data has been generated by national institutions or fungicide manufacturers. Elsewhere in Asia, sensitivity monitoring work has been limited, and has been primarily conducted by the fungicide manufacturers. An exception is the fungicide sensitivity monitoring programme in banana black sigatoka, *Mycosphaerella fijiensis*, that has been conducted for 30 years in the Philippines by the banana producing companies. An area over of 80,000 hectares on the island of Mindanao is planted with the variety "Cavendish", which is well-suited to export

production (anon., 2022). However, it is highly susceptible to black sigatoka, creating a favourable environment for disease development across a large area. Control of black sigatoka is based on disease scouting, sanitation and a programme of synthetic and biological fungicides (up to 50 applications per year). Resistance has evolved to MBCs, DMIs and QoIs (<https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/banana-group>). Due to the high resistance risk associated with this pathogen, a FRAC Banana Working Group was created in 1987, with membership drawn from the crop protection industry and banana companies. The fungicide monitoring data are used to guide sustainable deployment of fungicides. Sensitivity to DMIs and QoIs has stabilized in recent years, despite the high intensity of fungicide programmes. This is testimony to the success of a unique global collaboration, with information and ideas exchanged among diverse organizations and across continents. A cornerstone of this programme is the frequent application of multi-site fungicides, due to their low resistance risk. Fungicides from other mode of action groups are only applied during periods of high disease risk, with strict adherence to FRAC guidelines. However the vulnerability of an extensive monoculture has been exposed again, with the spread of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4) threatening the economic viability of banana production. *F. oxysporum* is soilborne and there are few effective fungicides available for its control, and the solution for producing bananas for export will need to include other measures, such as varieties with tolerance to this devastating pathogen.

Resistance to multi-site fungicides has never been confirmed in any fungal pathogen and the risk of resistance is classified as low by the FRAC. The loss of multi-site fungicides due to regulatory restrictions would create a significant challenge for managing resistance in multiple-sprayed crops such as banana. Vegetable farmers in Asia typically control Oomycete diseases with a similar strategy based on frequent applications of multi-site fungicides, reserving more efficacious site-specific fungicides for periods of highest disease risk. Multi-site fungicides, together with biological control agents and plant defence inducers, are important tools for disease control programs and resistance management. Multi-site fungicides contribute to resistance management strategies by reducing the entire inoculum potential. **(FRAC statement on multisite fungicides)**.

Asia FRAC network Achievements

Since its inception, the Asia FRAC has led and supported several fungicide resistance management workshops and training events across the region. The aim of the workshops has been to engage a broad group of stakeholders (government regulatory agencies and policymakers, scientists, farmer associations, distribution channel, industry associations, and extension officials) to align on fungicide resistance management priorities and approaches for helping farmers. In most countries, governments and external stakeholders are increasingly requesting support with training on fungicide resistance, particularly with providing simple educational materials.

The training and educational efforts have focused on providing up-to-date science-based guidance on fungicide resistance management. The CropLife National Associations and national FRACs have led these activities, using the communication style and media best suited to reaching the relevant target audience. The COVID-19 pandemic accelerated the adoption of online events, a trend that will continue, complemented by face-to-face events. These initiatives have been successful in reaching a large population of farmers and stakeholders, often exceeding expectations, e.g.:

- Indonesia: webinar with >1100 online participants (online meeting and livestream, i.e., live online event using social media). The presentations is currently being published in a handbook. (Erwin Cuk Surahmat, Iwan Rahwanudin, pers. comm., Dec 2023; <https://www.croplifeindonesia.org/>)
- Philippines: webinar with >300 online participants and >600 subsequent Youtube viewers. The training materials have been adopted for inclusion in university curricula. (Beth Jacildo, Florinda Vasquez, pers. comm., Sept 2020; <https://www.croplife.org.ph/>)
- Vietnam: livestream, with >10,000 viewers and >800 audience comments. The participants represented a broad community, including government, academia, industry (crop protection manufacturers and distributors) and farmer associations. (Le Pham, Pham Quang Hung, Son Nguyen Hoang, Vinh Dao pers. comm., Jan 2024; <https://croplifevietnam.org/>).

The success of these events has set a precedent for the RACs to communicate with an extended stakeholder community. An interesting outcome from the Vietnam livestream was the significant number of questions raised by participants on wider issues of disease control, for example, on how to identify pathogens or how to apply fungicides correctly. This underlines the importance of including resistance management in all fungicide educational and stewardship activities.

Country	Activity	Details
Cambodia	Stakeholder engagement, training	Resistance management training workshops & engagement with government (2018); online training (2020)
China	Stakeholder engagement	FRAC-China workshop (with global and Asia FRAC) (2018)
India	Stakeholder engagement	Stakeholder engagement seminar (2022)
Indonesia	Seminars, training	Training seminar (2021)
Korea	Stakeholder engagement	Stakeholder engagement workshops and meetings (2021 to present)
Philippines	Seminars, training	Online seminar (2020)
Vietnam	Stakeholder engagement, training	Fungicide resistance management livestream (2023)

Table 3: National workshops and training events for fungicide resistance that have been led or supported by the Asia FRAC

The Asia FRAC has also made significant efforts to support farmers and stakeholders with education on fungicide mode of action codes (e.g., Knight and Elias, 2021). The global FRAC Mode of Action Expert Panel assigns fungicides to a mode of action group, based on scientific data. Each mode of action group is given a unique numeric code. CropLife International member companies have all committed to printing this mode of action code icon on product labels. This will help farmers to implement resistance management programmes based on the limitation, alternation and mixing of different modes of action. However, mode of action labelling is only fully useful if it is adopted by the majority of fungicide manufacturers. Across Asia, significant sales of fungicides are made by companies that do not belong to CropLife International. As a result of the educational campaign by CropLife Asia, these companies are beginning to acknowledge the benefits of mode of action labeling. CropLife Asia and the Asia RACs are also encouraging Asian governments to mandate mode of action labeling, which has been accepted in many several (Indonesia, Malaysia, Philippines, South Korea, Thailand). CropLife International has provided guidelines on how to add the mode of action icon, to ensure consistency, with the goal of providing farmers with clear guidance.

A unanimous request to the Asia FRAC from Asian national FRACs has been to provide support with creating practical and detailed resistance management guidelines that are crop-specific and can be customized in each country to reflect local agronomic practices and available technology. To address this request, the Asia FRAC has created a framework for resistance management guidelines for important crops (rice, mango, potato, tomato, cucurbits).

Throughout its history, the Asia FRAC has paid particular attention to fungicide resistance management in rice, since 90% of global production is harvested in Asia. Although the number of fungicide applications per season is lower in rice, compared with many fruit and vegetable crops, the crop is often grown as a monoculture, with two to three crops per year, and there is high reliance on a few modes of action. The erosion of effective products through resistance could have a significant impact on productivity. In Japan, the evolution of QoI-resistant populations of *Pyricularia oryzae* has reduced the effectiveness of QoI-based fungicides against rice blast. In the Mekong delta of South Vietnam, sensitivity monitoring has also confirmed the presence of resistance to QoI fungicides in *Pyricularia oryzae*, with recent results suggesting a highly heterogenous population based on molecular analysis of the G143A target site mutation (Knight *et al*, 2019). Rice farmers in this region will continue to use QoI-containing fungicides for broad-spectrum disease control but must include fungicides with alternative modes of action to ensure robust control of rice blast.

The cultivation of rice for seed production presents a specific challenge for managing resistance because the seed must be disease-free to meet the acceptability criteria of seed companies and local farmers. Across Asia, similar disease control practices are generally followed, irrespective of whether the rice is grown for food or seed. Hybrid rice accounts for more than half of the production in China; outside of China the global adoption of hybrid rice is relatively low, accounting for less than five percent of global production (estimated from FAOSTAT and Durand-Morat *et al*). Seed-producing companies in China typically entrust local farmers to produce seed (hybrid and inbred varieties). The companies provide a list of approved fungicides, which farmers use to create their own disease management programmes. Fungicide applications are prompted by a combination of crop growth stage, disease scouting and weather warnings. There is no testing for seedborne fungi, nor is there any industry standard, although hybrid seed is purchased from farmers based on visual quality at harvest. Rice seed fetches a slightly higher price, compared with rice grain, which incentivizes farmers to ensure rigorous control of seedborne pathogens, e.g. blast and bakanae (*Fusarium fujikuroi*). (George Lu, pers. comm., Feb 2024). In Korea, the situation is similar; around 50-70% of the rice seed is purchased by farmers from a government organization (Korea Seed & Variety Service).

The disease management regime is the same as that used for rice grown for consumption (JangHoon Lee, pers. comm., Feb 2024).

Currently there are no reported issues of fungicide resistance in rice seed production in China or Korea. FRAC guidelines for QoI fungicides used for rice blast control emphasize the high fungicide resistance risk associated with seed production: “Although QoI fungicides for seed production should be avoided, the very limited number of different modes of action available for rice blast control could justify QoI uses (in mixtures) only in areas without confirmed QoI resistance”. Fortunately, there are currently sufficient modes of action available to manage blast and other rice pathogens, but the Asia FRAC will continue to pay attention to rice, due to its vital role in food security for the region.

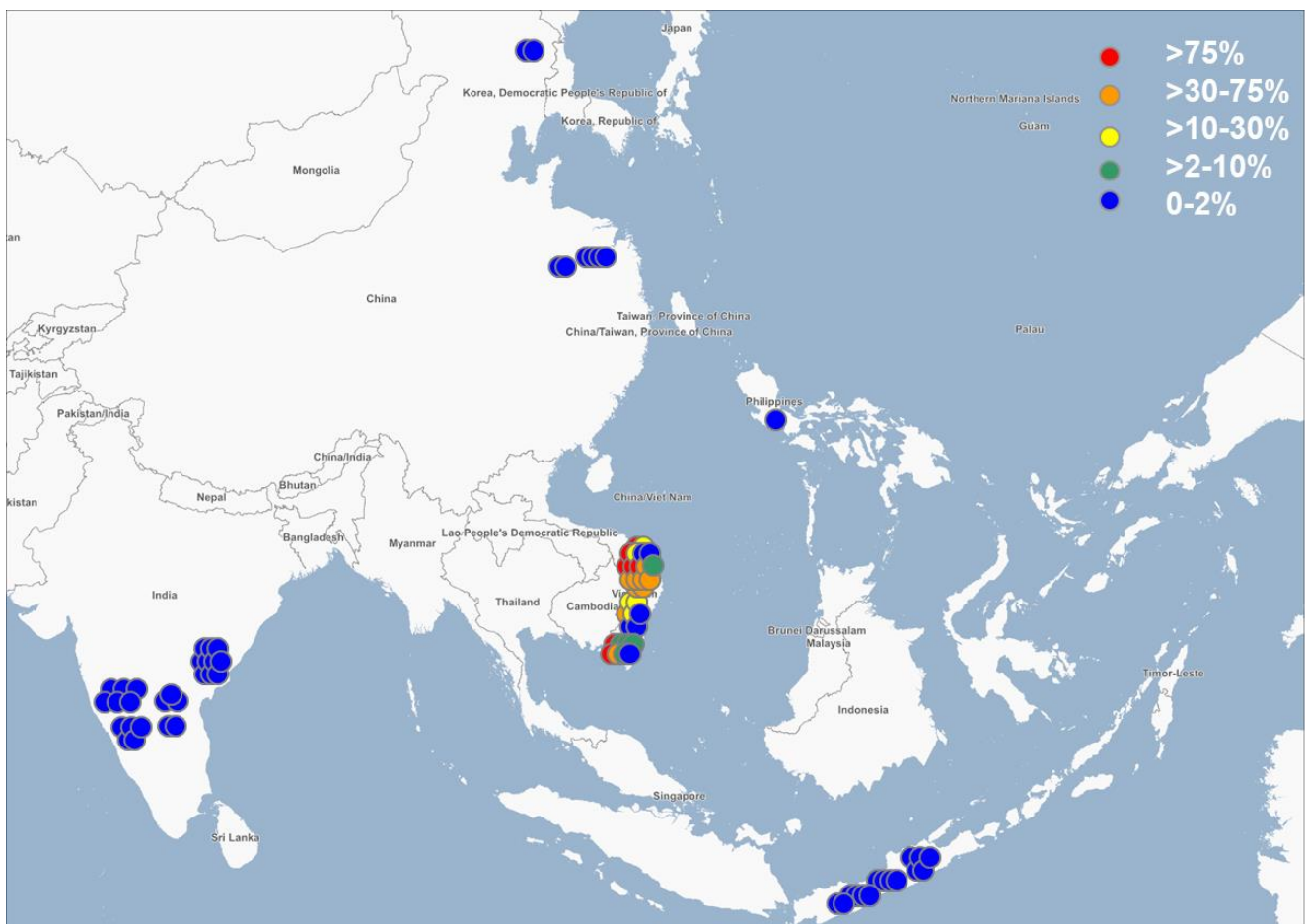


Fig. 1: Resistance to QoI fungicides in *Pyricularia oryzae* based on pyrosequencing to detect the G143A mutation

Concluding thoughts

The Asia FRAC has built a solid foundation for resistance management in Asia. Its primary role has been to encourage the formation of national FRACs that support farmers with the implementation of resistance management. The Asia FRAC has worked with CropLife Asia, Asia HRAC and Asia IRAC to spearhead a campaign to include mode of action on product labels, that will empower farmers with the information needed to adopt resistance management practices.

The Asia FRAC has supported many national initiatives for driving resistance management, particularly in China, India, Korea and Southeast Asia. The generation of sensitivity monitoring data needs to be accelerated, to allow the design of science-based disease guidelines. These results could also be used in future modeling studies to guide fungicide resistance management strategies.

However, there is a long way to go in Asia. A particular challenge is to ensure that the following statement on the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) website resonates with farmers: “The loss of a fungicide to agriculture through resistance is a problem that affects us all.” Farmers need to understand that it is in their interest to implement practices that preserve the long-term effectiveness of fungicides. Creating compelling educational materials is part of the solution. However sustained efforts are also needed from the crop protection industry to partner with respected leaders and influencers in farming communities, to gain the trust and commitment from farmers to follow sustainable fungicide resistance management practices.

References

1. Anon. The Philippine Banana Industry Roadmap (2021-2025). Published by Department of Agriculture - Bureau of Agricultural Research through the UPLB Foundation, Inc. in collaboration with the Philippine Council for Agriculture and Fisheries. 2022.
2. Knight S.C., Hu, H., Kandru, S, Penna D., Pop, D., Roberts A.D., Shiraishi M., Fong, W.S., Tan, S., Yu, A.Y. Establishment of the Asia Fungicide Resistance Management Action Committee (AFRAC). **In: Abstracts of the Asian Conference on Plant Pathology, September 2017.**
3. Knight S.C.; Elias J., Managing Insecticide Resistance in Asia. In: Srinivasan R.; Sotelo-Cardona P.; Zalucki M.P; Shelton A.M., (Eds), Proceedings of the International Conference on the management of diamondback moth and other brassica pests, 2021, WorldVeg Publication No. 21-1041, pp 88-93, ISBN: 92-9058-234-0.
4. Knight S.C., Stammeler G., Torriani S.F.F. Review of Fungicide Resistance Management in Asia. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammeler G (Eds), In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, Vol. IX, pp. 3-12. © 2019. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, ISBN: 978-3-941261-16-7.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Statistical Database. <https://www.fao.org/faostat/en/#home>
6. Durand-Morat A., Wailes E., Chavez, E. Hybrid rice and its impact on food security and the pattern of global production and trade. Southern Agricultural Economics Association Annual Meeting, Corpus Christi, TX, USA. 2011.

殺菌剤耐性菌研究会幹事・運営委員名簿

2024. 3. 16 現在

[幹事長]

藤井 直哉 秋田県農業試験場

[幹事] (50 音順)

石濱 典子	全国農業協同組合連合会
内田 聡	バイエルクロップサイエンス(株)
内橋 嘉一	兵庫県立農林水産技術総合センター
金子 洋平	千葉県農林総合研究センター
栢森 美如	北海道立総合研究機構 十勝農業試験場
川口 章	農研機構 西日本農業研究センター
菊原 賢次	福岡県農林業総合試験場
下元 祥史	高知県農業技術センター
常松 孝祐	日本農薬(株)
中島 嘉秀	シンジェンタジャパン(株)
萩原 寛之	三井化学アグロ(株)
平山 和幸	(地独) 青森県産業技術センター
鈴木 啓史	三重県農林水産部
三室 元気	富山県農林水産総合技術センター
明星 亘俊	クミアイ化学工業(株)
渡辺 秀樹	岐阜県農業技術センター

[運営委員] (県政順)

宮本 拓也	茨城県農業総合センター
近藤 賢一	長野県南信農業試験場

第 32 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集

発行	令和 6 年 3 月 16 日
発行者	日本植物病理学会 平塚 和之
編集責任者	殺菌剤耐性菌研究会 藤井 直哉