

日本植物病理学会

第20回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム

《プログラム》

2010年4月21日

(開会) 9:30

9:40-10:40	殺菌剤耐性菌研究会 20年の歩み 石井 英夫 (農業環境技術研究所) ……………	1
10:40-11:20	三重県における灰色かび病菌の薬剤耐性菌マネジメント 鈴木 啓史 (三重県農業研究所) ……………	11
11:20-12:00	チャ輪斑病における QoI 剤耐性菌の発生 尾松 直志 (鹿児島県農業開発総合センター) ……………	21

(昼食休憩 70分)

13:10-14:00	イネもみ枯細菌病菌の GyrA のアミノ酸置換は oxolinic acid 耐性とイネ体での生存適応に關与する 曳地 康史 (高知大学) ……………	29
14:00-14:50	カンキツ果実腐敗の防除における耐性菌問題とその対策 田代 暢哉 (佐賀県上場営農センター) ……………	39

(休憩 15分)

15:05-15:45	ムギ類赤かび病菌におけるチオファネートメチル耐性化と伝播機構の分子遺傳学的研究 須賀 晴久 (岐阜大学) ……………	52
15:45-16:25	麦類赤かび病菌 (<i>Fusarium graminearum</i> 種複合体) のメトコナゾールに対する感受性分布 豎石 秀明 (株式会社クレハ総合研究所) ……………	59

(閉会) 16:30

殺菌剤耐性菌研究会 20 年の歩み

Activities of the Research Committee on Fungicide Resistance for the Last Two Decades

農業環境技術研究所

石井英夫

Hideo Ishii, National Institute for Agro-Environmental Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan

Abstract

In Japan, the field occurrence of fungicide resistance was first found in 1971 when control efficacy of two antibiotics polyoxin and kasugamycin was reduced against black spot disease on Japanese pear and blast disease on rice, respectively. Since then, fungicide resistance has been causing problems, decreasing fungicide efficacy, on various crops repeatedly. The Research Committee on Fungicide Resistance was established in 1991 and authorized by the Phytopathological Society of Japan subsequently. Major activities of the Research Committee are composed of organization of annual symposia, publication of laboratory manuals for testing fungicide sensitivity, and production of a data base of literature relating to fungicide resistance reported within Japan. The Research Committee also proposed a guideline indicating how to use QoI and MBI-D fungicides on rice. Here the author will review the past and current activities of the Research Committee and make a proposal to minimize the problem of fungicide resistance.

1. はじめに

1991年に有志の集まりで発足した殺菌剤耐性菌研究会は、来年でちょうど20周年を迎える。この間多くの方々により、農業現場における耐性菌問題の回避、軽減に努力が傾けられてきたが、残念なことにはまだ解決の途は遠く、新たな問題の発生が続いている。

このような現況下、これまでの活動を振り返り、何が不足するのかを冷静に考えることも重要であろう。そこで、過去の経緯と今後の取り組み、克服すべき課題を述べてみたい。

2. 研究会発足とその背景

わが国における耐性菌問題は1971年に端を発する。ナシ黒斑病菌のポリオキシシン、イネいもち病菌のカスガマイシン耐性菌の初発生（顕在化）である。それ以来、ベンゾイミダゾール系薬剤ほか多くの薬剤で耐性菌の発生が今日まで繰り返され、ストロビルリン系薬剤（QoI剤）耐性菌に至っては毎年のように新たな問題を生じている（第1表）。

海外でもほぼ時を同じくして同様の事態が起こり、これを契機に1980年には当時世界における耐性菌研究の中心的存在であったオランダ・ワーゲニンゲン農科大学において、耐

三重県における灰色かび病菌の薬剤耐性菌マネジメント
Management of fungicide resistance on gray mold caused
by *Botrytis cinerea* in Mie Prefecture

三重県農業研究所
鈴木啓史

Hirofumi Suzuki, Mie Prefecture Agricultural Research Institute,
Uresinokawakita-cho 530, Matsusaka-shi, Mie 515-2316, Japan

Abstract

In Mie Prefecture, we have been carrying out monitoring for fungicide sensitivity to propose control measures of the gray mold disease in vegetables. The pathogen of this disease has high capacity in developing resistance to fungicides, so we must combat the problem of resistance.

Isolates of the pathogen obtained from 1995 to 2006 in Mie, showed resistance to benzimidazole fungicides and *N*-phenylcarbamates in a high ratio. After that, the monitoring for sensitivity to these fungicides was not carried out every year. Ratio of isolates resistant to dicarboximides has decreased since 2002, and it was below 20% in recent years. No isolates carrying reduced sensitivity to phenylpyrrole fungicides were detected in isolates obtained from 2000 to 2009 in Mie.

In 2005, we confirmed isolates resistant to anilinopyrimidine fungicides in Mie for the first time within Japan. We started the monitoring for sensitivity to boscalid and penthiopyrad in 2008 and 2009, respectively, using the paper disk method on YBA agar medium containing 1ppm of these SDHI fungicides.

To prevent the occurrence of resistance problems, it is most important to early detect isolates with reduced sensitivity and take measures against them.

1. はじめに

FRAC(Fungicide Resistance Action Committee)は、灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)の耐性菌発生リスクを高いレベルに位置づけている²⁾。また、灰色かび病菌は、ベンズイミダゾール系剤、*N*-フェニルカーバメート系剤およびジカルボキシイミド系剤に対する耐性菌が現地で発生し、これらの薬剤の防除効果を低下させている⁷⁾。このことから、農薬メーカーは新規剤の販売に先立ち、病原菌の新規剤に対する感受性検定法とともに、感受性のベースラインを示し、耐性菌のリスクマネジメントを考案している。一方、全国の研究機関では、農家の薬剤選択の一助とするため、各薬剤に対する感受性検定法³⁾⁶⁾⁸⁾¹¹⁾¹³⁾に基づき病原菌の感受性検定を行なっている。三重県でも、ジカルボキシイミド系剤、フェニルピロール系剤、アニリノピリミジン系剤、コハク酸脱水素酵素阻害剤、イミノクタジンアルベシル酸塩、ポリオキシシン、フェンヘキサミドなど主要薬剤についての検定を毎年行ない、感受性の経年変化のモニタリングを行ってきた。その過程で、2005年にアニリノピリミジン系殺菌剤耐性菌の発生を国内で初確認したが¹²⁾、圃場での薬剤防除効果の低下は認められていない。このことから、早期に感受性検定を行ない、耐性菌が検出された農家においてその薬剤の使用を一時中止すれば、耐性菌密度の増大を阻止できると考えている。このように、病原菌の感受性のモニタリングは、耐性菌対策上、重要性

チャ輪斑病における QoI 剤耐性菌の発生

Occurrence of QoI resistance in *Pestalotiopsis longiseta*, the pathogen causing gray blight disease in tea plants.

鹿児島県農業開発総合センター 茶業部 環境研究室
尾松直志

Omatsu Naoshi, Kagoshima Prefectural Institute for Agricultural Development, Tea Division, Kagoshima, Japan, 897-0303

Abstract

Management of gray blight of tea has relied on fungicides that include quinone outside inhibitor (QoI) fungicides such as azoxystrobin since 1998. However, in 2008, resistant isolates of *Pestalotiopsis longiseta* to Azoxystrobin and other QoI fungicides were first detected in tea fields in Kagoshima prefecture. Therefore, we have collected *Pestalotiopsis longiseta* strains from several green tea cultivation regions in Kagoshima prefecture, and their sensitivity against azoxystrobin were investigated from 2008 to 2009. As a result, resistant strains were detected from all regions, and rate of the field where the resistant strain exists accounted for 31.7% in 2008 and 33.6% in 2009. The rate was especially high in Nansatsu region and low in Aira and Sensatsu region. Application records of fungicides and QoI resistance rates indicated that spraying strobilurin fungicide caused rapid spread of QoI resistance in *Pestalotiopsis longiseta* on tea fields. Kasugamycin+copper oxychloride was highly effective against QoI resistance.

1. はじめに

チャ輪斑病（以下、輪斑病）は、*Pestalotiopsis longiseta* (Spegazzini) Dai & Kobayashi によって引き起こされる病害で、チャ (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) の主要病害のひとつである（江藤・安藤, 1994）。本病は高温期の二・三番茶期に発生し、病原菌は摘採・整枝による葉・枝の切り口から感染するため、防除は摘採・整枝直後に実施する必要がある。本県では、摘採・整枝直後の防除に TPN 水和剤、フルアジナム水和剤およびトリフロキシストロビン水和剤などの予防剤を使用するように指導しているが、茶工場の操業や周辺茶園への農薬の飛散の危険性から、摘採直後の実施は困難となっている。そのため、治療効果のある剤を摘採・整枝 3 日後に使用する場合が多い。ストロビルリン系殺菌剤（以下、QoI 剤）は、食用キノコから発見された天然生理活性物質に由来する殺菌剤で、病原菌細胞内におけるミトコンドリア内の電子伝達系に作用し、呼吸を阻害する（Sauter et al., 1999）。QoI 剤は、植物体内移行性に優れ、浸透性も有する。QoI 剤のアゾキシストロビン剤（商品名：アミスター 20フロアブル）は、1998 年にチャに登録され、輪斑病に登録のある薬剤の中では治療効果が最も高く、摘採 3 日後まで輪斑病に対する防除効果がある。また、輪斑病菌による秋芽の新梢枯死症にも効果が高いことから、摘採後の防除だけではなく、秋芽生育期の防除にも用いられている。以上のことから、アゾキシストロビン剤は、ほとんどの地域の茶栽培歴に基幹防除剤として掲載されている。

近年、様々な作物で QoI 剤に対する耐性菌の発生が多数報告されている（Sierotzki, et al., 2000; Ishii, et al., 2007）。これまで輪斑病については、チャの主要産地においてチオファネートメチル剤やベノミル剤に対する高度耐性菌の発生が報告されている（堀川, 1986; 鬼木ら、

イネもみ枯細菌病菌のGyrAのアミノ酸置換はoxolinic acid耐性と

イネ体での生存適応に関与する

Amino Acid Substitutions in GyrA of *Burkholderia glumae* Are Implicated in Not Only Oxolinic Acid Resistance but Also Fitness on Rice Plants

高知大学 植物工学研究室*・総合研究センター**

曳地康史*・前田由紀子*・大西浩平**・木場章範*

Yasufumi HIKICHI*, Yukiko MAEDA*, Kouhei OHNISHI** and Akinori KIBA*, Laboratory of Plant Pathology & Biotechnology* and RIMG**, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan.

Abstract

Oxolinic acid, a quinolone, inhibits the activity of DNA gyrase composed of GyrA and GyrB and shows antibacterial activity against *Burkholderia glumae*. Since *B. glumae* causes bacterial seedling rot and grain rot of rice, both of which are devastating diseases, the emergence of oxolinic acid-resistant bacteria has important implications on rice cultivation in Japan. Based on the MIC of oxolinic acid, 34 *B. glumae* field isolates from rice seedlings grown from oxolinic acid-treated seeds in Japan were divided into moderately resistant isolates (MRs; 50 µg/ml), and highly resistant isolates (HRs; >100 µg/ml). The amino acid at position 83 in the GyrA of all sensitive isolates was Ser, but in all MRs and HRs it was Arg and Ile, respectively. Ser83Arg and Ser83Ile substitutions in the GyrA of an oxolinic acid-sensitive isolate, Pg-10, resulted in moderate and high oxolinic acid-resistance, respectively. Moreover, Arg83Ser and Ile83Ser substitutions in the GyrA of MRs and HRs, respectively, resulted in susceptibility to oxolinic acid. Among spontaneous *in vitro* mutants from Pg-10, we selected oxolinic acid-resistant mutants that emerged at a rate of 5.7×10^{10} . Nucleotide sequence analysis showed that Gly81Cys, Gly81Asp, Asp82Gly, Ser83Arg, Asp87Gly, and Asp87Asn were observed in these oxolinic acid-resistant mutants. The introduction of each amino acid substitution into Pg-10 resulted in oxolinic acid resistance, similar to what was observed for mutants with the responsible amino acid substitution. *In vitro* growth of recombinants with Asp82Gly was delayed significantly compared to that of Pg-10; however, that of the other recombinants did not differ significantly. The inoculation of each recombinant into rice spikelets did not result in disease. In inoculated rice spikelets, recombinants with Ser83Arg grew less than Pg-10 during flowering, and growth of the other recombinants was reduced significantly. On the other hand, the reduced growth of recombinants with Ser83Arg in spikelets was compensated for under oxolinic acid treatment, resulting in disease. These results suggest that amino acid substitutions in GyrA of *B. glumae* are implicated in not only oxolinic acid resistance but also fitness on rice plants. Therefore, Ser83Arg and Ser83Ile substitutions in GyrA are thought to be responsible for oxolinic acid resistance in *B. glumae* field isolates.

1. はじめに

Burkholderia glumae により引き起こされるもみ枯細菌病 (図1, 後藤・大畑 1956) と苗腐敗症 (図1, 植松ら 1976) は、日本や韓国を中心とした東南アジアの国々 (Cottyn et al. 1996a, b) のイネ栽培に甚大な被害をもたらしてきた (茂木 1985)。イネ種子の穎内に感染している *B. glumae*

カンキツ果実腐敗の防除における耐性菌問題とその対策

A problem of Fungicide Resistant and its Effective Control in Decays of Citrus

佐賀県^{うわば}上場営農センター 研究部

田代暢哉

Nobuya Tashiro, Saga Prefectural Uwaba Farming and Extension Center, 1471-6 Hayata, Chinzei, Karatsu, Saga, 847-0326, Japan.

E-mail: tashiro-nobuya @pref.saga.lg.jp

Abstract

Harvested fruit of mandarin orange developed rot caused by green mold (*Penicillium digitatum*), in plastic greenhouses, orchards, and packing houses in August to September 1993 in Saga Prefecture. When the disease was found, many benzimidazole-resistant strains were present among strains of *P. digitatum* isolated from packing houses at different locations in Saga Prefecture. Benzimidazole-resistant strains were also frequently detected among strains of *P. digitatum* that were collected from fruit of very early ripening Satsuma in plastic greenhouses and from orchards before any benzimidazoles were sprayed. Thus, benzimidazole sprays would not have prevented fruit rot in those orchards, strongly suggesting that the benzimidazole-resistant strains were widely prevalent at harvest, resulting in that rot was found on the harvested fruit in the packing house and market an epidemic of rot on harvested fruit. This finding differs from the previous view that the population of resistant strain are extremely low before harvest. Benomyl wettable powder control of green mold of a very early ripening variety of mandarin orange, Satsuma, decreased to unacceptable levels for practical use against benzimidazole-resistant strains of *P. digitatum* in orchards. Application of an iminocadine triacetate liquid formulation that achieved a high fungicidal efficacy *in vitro* against benzimidazole-resistant and -sensitive strains of *P. digitatum* gave variable effects in the control of the disease under field conditions. When the disease incidence was severe, the efficacy of the iminocadine triacetate application was significantly lower. However, simultaneous application of an iminocadine triacetate liquid formulation and benomyl wettable powder improved the control efficacy to levels acceptable for practical use. Interestingly, the effect was not additive but synergistic. Although thiophanate-methyl wettable powder is also a benzimidazole like benomyl wettable powder, it was not as effective. In addition, no significant effect on application timing during 3 weeks before harvest and cumulative precipitation of up to 150 mm during the treatment period was detected.

はじめに

カンキツの生産、流通において果実腐敗の問題は深刻なものがある。最近の食の安全を巡る消費者の反応は‘腐れ’や‘かび’といったものに対して厳しいものがあり、出荷した果実に腐敗果が混入している場合には流通に乗せないという動きが強まっている。わずか一個の腐敗果の発生によって産地の評価は一気に低下し、価格の低迷につながるばかりでなく、最悪の場合、取引中止に追い込まれることになる。まさに腐敗果の発生は産地の命運を左右するといっても過言ではなく、完璧な対策が望まれている。本稿では、果実腐敗のなかでも被害が大きな緑かび病の発生に関係している耐性菌問題(田代ら, 2008)について述べるとともに、その対策として既存薬剤を併用することの有効性(田代・井手, 2008)について紹介する。

1. カンキツで問題になる果実腐敗

カンキツには多くの種類の果実腐敗が発生する。このうち、被害が大きいものは緑かび病(病原 *Penicillium digitatum*)、白かび病(同 *Geotrichum candidum*)、青かび病(同 *P. italicum*)、こうじかび病(同 *Aspergillus niger* など)、炭疽病(同 *Colletotrichum gloeosporioides*)、褐色腐敗病(同 *Phytophthora palmivora* など)で、果皮の傷口から感染し、腐敗させるものが大部分である(北島, 1989)。果実腐敗が大きな問題になっている背景として、最近の果実は体質が弱くなっているということ、言い換えると腐りやすい果実になっていることがあげられる。消費現場では甘く(高糖度)で、酸っぱくない(低酸含量)果実が好まれていることから、完熟果生産の流れが強まっている。完熟果は果皮が薄く、傷が付きやすいため腐敗の発生が多くなるという欠点があり、このことが果実腐敗対策を講じる上で大きなハンディになっている。

2. 果実腐敗の発生要因と防除の考え方

緑かび病などに起因する果実腐敗の発生には大きく三つの要因が関係している。すなわち、①弱く、腐りやすい果実体質と果面の傷、②腐敗を起こす病原菌の存在、そして③効果が不十分な薬剤散布の三つである。これらの要因には第1図に示

ムギ類赤かび病菌におけるチオファネートメチル耐性化と 伝播機構の分子遺伝学的研究

Molecular genetical studies on thiophanate-methyl resistance and transmission mode of *Fusarium* head blight pathogen

岐阜大学生命科学総合研究支援センター
須賀晴久

Haruhisa Suga, Life Science Research Center, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

Abstract

One of the major pathogens of *Fusarium* head blight of wheat and barley is *Fusarium graminearum* species complex in the world. *F. asiaticum* and *F. graminearum* s.str. of the species complex distribute in southern and northern Japan, respectively. Thiophanate-methyl (TM) resistant *F. asiaticum* has been detected from Ooita, Fukuoka, Kumamoto and Mie prefecture so far in Japan. β -tubulin gene corresponding to gene ID FG06611.1 from TM resistant isolate confers TM resistance to TM sensitive isolate. Amino acid at 167 or 200 th in FG06611.1 of TM resistant isolates was different from TM sensitive isolates and PCR-RFLP diagnosis-method was developed for identification of their mutations. Microsatellite analyses indicated that clonal isolates were contained in TM resistant isolates from the same location but not in TM resistant isolates from the different locations even they have same type of mutation in FG06611.1 gene. We demonstrated that outcrossing between TM resistant and sensitive isolates on wheat head can generate new genotypes with TM resistance.

1. はじめに

ムギ類赤かび病は、コムギやオオムギなどの穂が侵される病害である。本病害に関連して様々な *Fusarium* 属菌が分離されている中、*Fusarium graminearum* Schw. (有性世代: *Gibberella zeae*) は世界的に主要な原因菌とされている。本菌による被害は収量の低下に留まらない。本菌は、デオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV)、ゼアラレノンといったヒトや家畜に毒性を有する、いわゆるマイコトキシン (かび毒) を産生するため、収穫ムギの安全性に問題を起こしている。現在、コムギ中の DON は暫定的に 1.1ppm まで、赤かび粒混入率は 0.049% までに制限がかけられている。外見上、菌の感染が分かる赤かび粒の収穫物への混入は問題であるが、健全のように見えていながらもマイコトキシンの汚染されている粒の存在は、問題を更に大きくしている。本菌に対しては、目に見える病害だけでなく、目に見えないマイコトキシンまで含めた対策が求められている。

F. graminearum は形態的には一つの菌種とされてきたものの、世界各地の分離菌のゲノム分析により、少なくとも 11 種で構成されている“種複合体”であることが明らかにされた。日本ではそのうちの *F. asiaticum* と *F. graminearum* s. str. が主に見出され、東北地方を境に前者は主に南方、後者は主に北方に分布する傾向がある (Suga *et al* 2008)。

麦類赤かび病菌(*Fusarium graminearum* 種複合体)のメコナゾールに対する感受性分布 Sensitivity of *Fusarium graminearum* species complex to metconazole.

株式会社クレハ 総合研究所
堅石 秀明

Hideaki TATEISHI, Research Center, Kureha Corporation,
16 Ochiai, Nishiki, Iwaki, Fukushima, 974-8686, Japan

Abstract

The sensitivity of the *Fusarium graminearum* species complex, the causal fungus of Fusarium head blight, to metconazole, a DMI fungicide, was measured. The distribution of minimum inhibitory concentration (MIC) values of 101 isolates ranged from 0.20 to 6.25 mg/l with a single peak at 1.56 mg/l. The effective concentration of 50% growth inhibition (EC₅₀) was below 0.1 mg/l in about 80% of isolates. No isolate was significantly less sensitive among this group. Among the *F. graminearum* species complex, classifications of *F. asiaticum* and *F. graminearum* s. str. were identified by PCR-RFLP. Trichothecene chemotypes were determined as 3ADON, 15ADON and NIV type with multiplex PCR. Although differences in geographical distribution of both species and isolates with different mycotoxin productivity of were found, their MIC values to metconazole distributed in almost the same range and no significant difference of sensitivity was observed in species or trichothecene chemotypes. The CYP51 genes from isolates with different sensitivities to metconazole were amplified by PCR and the deduced amino acid sequences were compared. Then it is suggested that the difference of sensitivity was not due to the mutation of the CYP51, the target enzyme of DMI. Macrospores of the isolates with various sensitivities to metconazole were sprayed onto spikes of wheat and the efficacy of metconazole was examined. Metconazole showed high control activity against every isolate.

はじめに

麦類赤かび病(Fusarium head blight:FHB)は数種の *Fusarium* 属菌や *Microdochium nivale* によって起こされる病害である^{1, 2, 3)}。赤かび病は収量の減少を起こすばかりでなく、マイコトキシンの汚染により、品質にも問題を起こし、麦類の病害として重要である^{4, 5)}。日本においては病原菌として *Fusarium graminearum* 種複合体が最も重要である⁶⁾。*F. graminearum* 種複合体の分類に関して、O'Donnellら⁷⁾は Genealogical concordance phylogenetic species recognition (GCPSR)^{8, 9)}により少なくとも9種に分類されると報告している。また、*F. graminearum* 種複合体のマイコトキシン生産性については菌株により異なっているといわれており^{10, 11, 12, 13)}、最近ではPCR-RFLPによる種の同定や multiplex PCRによるマイコトキシン生産性の判定が報告されている¹⁴⁾。国内においては *F. graminearum* 種複合体のうち主として2種(*F. asiaticum* と *F. graminearum* s. str.)が見出され¹⁵⁾、これらのマイコトキシン生産性の特徴や^{14, 16, 17, 18, 19)}、地理的分布の特徴についても研究されている^{14, 20, 21)}。

麦類赤かび病に高い防除効果を示すメコナゾール(図1)は1986年にクレハで合成され、殺菌活性が見出されたDMI剤である²²⁾。同剤は1994年にフランスでムギ用の殺菌剤として初めて登録され、現在では麦類、ナタネ、シバ、果樹類などの殺菌剤として世界30カ国以上で登録、実用化されている(表1)。メコナゾールの麦類での対象病害は、赤かび病、赤さび病、黄さび病、葉枯病、うどんこ病等があげられる²²⁾。特に赤かび病に対しては高い防除効果と共に、マイコトキシン抑制効果が報告されている。^{20, 23)}