

特集：QoI 剤耐性菌の発生状況とその対策

福岡県における QoI 剤耐性ブドウ糸状菌病害の発生とその対策

福岡県農林業総合試験場 病害虫部 菊原賢次

はじめに

福岡県におけるブドウ栽培は2012年度の統計では栽培面積916 ha、産出額64億円、生産量9,120 t (全国5位)に達し果樹栽培の中でも重要な品目の一つである。

本県のブドウ栽培は‘巨峰’を中心とし、温暖な気候を活かした促成栽培が盛んに行われ、栽培面積の約8割が加温または無加温のハウス栽培や簡易施設栽培で行なわれ、露地栽培は2割程度である。ハウス栽培では通年で被覆されるため、降雨の影響を受ける病害の発生は少なく、防除対象病害は灰色かび病を中心に褐斑病や晩腐病である(図-1)。簡易施設栽培では高温による品質低下を避ける目的で7月ごろに被覆が除去されるため、前述の病害に加え、べと病や枝膨病の防除が必要である。露地栽培ではこれらの病害に黒とう病を加えた防除が春先から必要となる。これらの病害の発生推移は異なるものの、いずれの栽培体系も開花期から幼果期の防除が重要である。1999年に県の防除指針に搭載されたQoI (Quinone outside inhibitor) 剤のアズキシストロピン水和剤(商品名：アミスター10フロアブル)やクレソキシムメチル水和剤(商品名：ストロビードライフロアブル)は、これらの病害に優れた防除効果を示し、商品価値を低下させる果実の汚れや果粉の溶脱が比較的少ないため、基幹防除剤として使用されてきた。

QoI 剤は多くの病害に優れた効果を発揮することから、様々な作物で使用されてきたが、カンキツやイチゴの灰色かび病菌など多くの病害で耐性菌が確認されており、耐性菌が発生するリスクが高い薬剤である(石井, 2012)。近年、本県では、褐斑病やべと病に対して十分な防除が行われているにもかかわらず、多発する事例が発生し、薬剤の効果低下が疑われた。一方他県でも同様な事例が確認され、QoI 剤耐性褐斑病菌は2006年に岡山県で(神谷ら, 2008)、QoI 剤耐性べと病菌は2008年に山梨県と長野県で(FURUYA et al., 2010)、QoI 剤耐性

晩腐病菌が2008年に長野県で確認された(近藤, 2011)。本県でも既報を参考に、一部を改変した感受性検定を実施した結果、耐性菌の発生が確認された(菊原ら, 2014 a; 2014 b; 2014 c)。このため、代替薬剤の探索を行い、防除対策について検討したので、その詳細について紹介する。

I ブドウ褐斑病

1 本病の特徴と本県における発生状況

ブドウ褐斑病は *Pseudocercospora vitis* (Lev.) Speg. により引き起こされる病害で、ブドウ (*Vitis vinifera* L., *V. labrusca* L.) の葉に褐色の斑点を形成した後、黄変落葉させ、樹勢の低下を引き起こす。本県における発生は古くから確認されていたが、薬剤防除が不十分な施設栽培園で散見される程度であった。しかし、2000年半ばごろから施設栽培で多発し、問題となった。

2 感受性検定

寒天希釈平板法は分離菌株の菌叢を薬剤添加寒天培地に置床し、薬剤の最小生育阻止濃度(MIC値)や50%生育阻止濃度(EC₅₀値)を求め、感受性を明らかにする方法である。特別な機器や試薬の必要がなく、操作も簡便なため、感受性検定に多く利用される。ここでは井上(2009)の寒天希釈平板法を参考に感受性検定を行った。

(1) 供試菌の分離

2007～09年に福岡県内12箇所のブドウ褐斑病多発の施設栽培圃場から罹病葉を採取した。病斑上に形成された分生子を白金耳で掻き取り、素寒天培地に画線し、1～2日後発芽した分生子を寒天培地ごと切り出し、ジャガイモ・ブドウ糖寒天培地(PDA)に移植し、分離菌株とした。1葉から1菌株を分離し、106菌株を得た。

(2) 寒天希釈平板法

本菌の生育は遅く、菌株によっては不揃いになるため、均一な菌叢を多数得ることが困難な場合があった。また、感受性菌が薬剤添加培地上でわずかに生育する場合があります。既報のままではMIC値の判定が困難であった。これらの問題を解決するため、感受性検定培地に植菌する菌叢片に代わり、菌糸磨砕液を用いる渡辺(2009)の方法で感受性検定を行った。

| 生育状況 | 萌芽直前 | 展葉初期 | 新梢伸長開始期 | 開花直前 | 開花直後 | 幼果期 | 袋掛け後 | (被覆除去) | 梅雨明け後 収穫前 | 収穫後 |
|--------------------|------|------|---------------|------|------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----|
| 簡易施設栽培の 暦日 (月旬) | 3上 | 3下 | 4上 ~ 4下 | 5上 | 5中 | 5下 ~ 6上 | 6中 ~ 7上 | 6中 ~ 7上 | 7中 ~ 8上 | 9月 |
| 露地栽培の暦日 (月旬) | 3下 | 4上 | 4中 ~ 5上 | 5中 | 5下 | 6上 ~ 6中 | 6下 ~ 7上 | — | 7中 ~ 8上 | 9月 |
| 褐斑病 | | | | ● | ● | ● | ● | | | |
| べと病 | | | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | ● | ● |
| 晩腐病 | ● | | | ○ | ● | ● | | | | |
| 灰色かび病 | | | | ● | ● | | | | | |
| 枝膨病 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ● | | |
| 黒とう病 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | | | |

図-1 福岡県における主要ブドウ病害と防除時期

●は施設栽培と露地栽培共通防除時期, ○は露地栽培の防除時期。

被覆除去を行わないハウス栽培ではべと病と枝膨病は防除対象から除外する。

アゾキシストロピン水和剤を有効成分で 25, 100, 400 ppm, シアン耐性呼吸を阻害する没食子酸 *n*-プロピルを 5 mM になるように PDA 培地に添加し, 検定培地を作製した。なお, 没食子酸 *n*-プロピルは最終的な培地容量の 1% 以下のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解後, 添加した。また, アゾキシストロピン水和剤は市販の農薬を使用した。供試菌株を PDA 平板培地で 25°C, 3~4 週間前培養後, 菌叢の周縁部から直径 6 mm のコルクボーラで菌叢ディスクを 2 枚とり, 200 μ l の滅菌水とともに 1.5 ml のマイクロチューブ内でポリプロピレン製のペレットミキサーを用いて磨砕し, 10 μ l を検定培地に滴下した。25°C で 10 日間培養後に菌糸生育の有無を判別した。

(3) 検定結果

耐性菌と感受性菌の菌叢片と菌糸磨砕液を薬剤添加培地に置いた結果, 菌叢片では感受性菌の一部に薬剤添加培地でわずかに生育が見られる場合があったが, 菌糸磨砕液では, 生育が見られず, 判定が容易であった(図-2)。

感受性検定の結果, 1 圃場から分離された 9 菌株を除き, 11 圃場から分離された 97 菌株すべてが QoI 剤耐性菌と判定された(表-1)。これら罹病葉を採取した地域の防除暦には QoI 剤が数回登載されていたが, 感受性菌が分離された圃場は例年晩腐病の発生がないことから, QoI 剤は使用されていなかった。県内の多くの生産

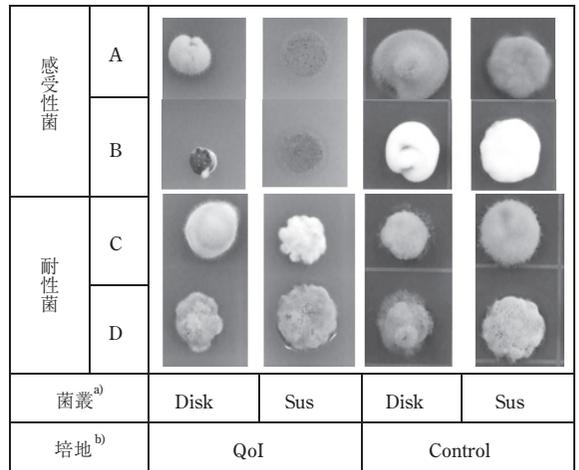


図-2 QoI 剤感受性菌と耐性菌における菌叢片と菌叢磨砕液の QoI 剤含有培地上の菌糸生育

(菊原ら, 2014 c より抜粋)

a) Disk は菌叢片, Sus は菌叢磨砕液。

b) 5 mM 没食子酸 *n*-プロピル含有 PDA 培地に, QoI はアゾキシストロピン 400 ppm 添加, Control は無添加。

者は地域の防除暦を参考に防除を実施しており, この結果から, 県内に広域に耐性菌が発生していると推察された。

3 代替剤の検討

耐性菌発生圃場において, 薬剤試験を実施した結果,

表-1 福岡県における各種ブドウ病害のQoI剤に対する感受性

| 病原菌 | 耐性菌発生圃場数/調査圃場数 | 調査菌株数/耐性菌株数 | 調査年 |
|---------|----------------|-------------|---------|
| ブドウ褐斑病菌 | 11/12 | 97/106 | 2007～09 |
| ブドウべと病菌 | 9/9 | 31/31 | 2011 |
| ブドウ晩腐病菌 | 1/9 | 3/100 | 2012～13 |

QoI剤のアゾキシストロピン水和剤の防除効果は低かった(表-2)が,DMI剤のフェンブコナゾール水和剤(商品名:インダーフロアブル)とテブコナゾール水和剤(商品名:オンリーワンフロアブル)の防除効果は高かった。なお,これらの薬液による果実への汚れや果粉の溶脱は少なかった。

II ブドウべと病

1 本病の特徴と本県における発生状況

Plasmopara viticola (Berkeley et Curtis) Berlese et de Toni によるブドウべと病は,葉や花穂の枯死および幼果の乾枯を引き起こすため,ブドウ栽培における最重要病害の一つである。本県では,抵抗性品種の‘キャンベル・アーリー’に替わり罹病性品種の‘巨峰’が導入されて以降,多雨年に多発し,被害をもたらしている。特に2010年は初発が早く,葉のみならず花穂や幼果にも発病し,問題となった。

2 感受性検定

本病は絶対寄生菌であるため,分離菌株を用いた寒天希釈平板法は使用できない。一方,遺伝子診断法は,PCR-RFLPに必要な機器や試薬が必要であるものの,数時間で検定結果が判定可能である。ここでは, FURUYA et al. (2010) の方法を参考に感受性検定を行った。

(1) 罹病葉の採取

2011年8～9月に主要産地の5市8圃場および試験場内圃場から葉裏に白色の菌叢を生じた罹病葉を採取した。

(2) 遺伝子診断法

現地圃場1箇所につき3葉,場内圃場7葉について,1葉を1サンプルとして以下の検定に供試した。まず,採取した葉の裏面に発生している白色の菌叢からDNAを抽出した。裏面に菌叢が十分発生していない葉では,湿室に20℃,約2日間静置し,菌叢形成を促した。DNAの抽出には SAITOH et al. (2006) の簡易抽出法を行った。すなわち,菌叢を三角刀で数回掻き取り,500 μ lの抽出バッファー(200mM トリス-塩酸,50mM EDTA,200mM 塩化ナトリウム,1% N-ラウロイルサルコシン ナトリウム塩;pH8.0) 中に入れ,激しく攪拌

表-2 QoI剤耐性ブドウ褐斑病菌発生圃場における各種薬剤の防除効果^{a)}

| 薬剤名 | 希釈倍率 | 発病率率 (%) | |
|--------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| | | 2009年 ^{b)} | 2010年 ^{c)} |
| テブコナゾール水和剤 | 2,000 | 2.7 ^{a)} | 12.2 ^{b)} |
| フェンブコナゾール水和剤 | 10,000 | — | 6.7 ^{a)} |
| アゾキシストロピン水和剤 | 1,000 | 94.3 ^{b)} | 28.3 ^{c)} |
| 無処理 | — ^{e)} | 96.2 ^{b)} | 89.7 ^{d)} |

(菊原ら, 2014cより抜粋)

a) 大分県農林水産研究指導センター(宇佐市)の簡易施設栽培圃場で実施した。

b) 5月18,28日,6月11日に散布し,9月3日に調査した。

c) 5月31日,6月8日に散布し,8月31日に調査した。

d) 発病率は3反復の平均。

同一文字間には有意差はない(角変換後, Tukey-Kramer の HSD 検定による多重比較, $P > 0.05$)。

e) —は試験を実施しなかった。

後,10分間室温で静置した。18,000Gで4℃,5分間遠心分離後,上清300 μ lを新しいチューブに回収した。750 μ lのエタノールを加え,転倒混和し,18,000Gで4℃,2分間遠心分離し,DNAを沈殿させ,70%エタノールで洗浄した。風乾後,50 μ lのTEバッファー(pH8.0)に溶解させた。PCRに使用するプライマーはセンスプライマー(5'-GGGGTTTGTATTACGGATCT-3')およびアンチセンスプライマー(5'-GGATTATTT-GAACCTACCTC-3')を用いた。PCR反応は95℃,3分の変性後,95℃,60秒(変性),57℃,60秒(アニーリング),72℃,60秒(伸長)を35サイクル繰り返し,72℃,7分間伸長を行い,チトクロームb遺伝子の一部を増幅させた。PCR反応液の一部を耐性菌の変異部位(コドン143～144:GCTGC)を認識する制限酵素 *Fnu*4HI (New England Biolabs) (認識配列:GCNGC) で処理した。アガロースゲル電気泳動を行い,切断が認められたものを耐性菌と判定した。

(3) 検定結果

5市8圃場24サンプルおよび場内の7サンプルすべてが,耐性菌の遺伝子パターンを示し(表-1),県内広域に耐性菌が発生していると推察された。なお,本試験で用いたDNAの簡易抽出法は高価なキットを用いることなく,手早くDNAを抽出できるので,筆者は寒天培地上の菌叢片などの供雑物の少ないサンプルでは頻繁に利用している。

3 代替剤の検討

QoI剤耐性菌発生圃場で薬剤効果試験を実施した結果,QoI剤のアゾキシストロピン水和剤の防除効果は低

く、近年、登録されたカルボン酸アミド系剤 (CAA 剤) のマンジプロバミド水和剤 (商品名: レーバスフロアブル) および CAA 剤のベンチアカルブイソプロピル水和剤とマンゼブ水和剤の混合剤 (商品名: カンパネラ水和剤) の防除効果は高かった (表-3)。

III ブドウ晩腐病

1 本病の特徴と本県における発生状況

本病は *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et Schrenk (本県の優占種) および *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds による病害で、果実を腐敗させ、減収を引き起こすため、ブドウ栽培の重要病害の一つである。本病の発生は露地栽培が中心であるが、施設栽培でも発生が見られ、特に‘ピオーネ’で多い傾向にある。本県では、古くから発生が確認されていたが、特に、1999年と2000年で発生が多かった。これを機に、防除効果の高いアゾキシストロビン剤が普及したが、年によっては効果が不十分で多発する場合があった。

2 感受性検定

本病の QoI 剤耐性菌を確認した近藤 (2011) が行った寒天希釈平板法では EC₅₀ 値で判定しており、調査がやや煩雑であった。一方、本病と同種のイチゴ炭疽病菌で実施した寒天希釈平板法 (稲田ら, 2008; 稲田, 2009) では MIC 値で判定しているので、これを参考に感受性検定を行った。

表-3 QoI 剤耐性ブドウと病菌発生圃場における各種薬剤の防除効果^{a)}

| 薬剤名 | 希釈倍率 | 発病率 (%) | |
|-------------------------|-------|----------------------|---------------------|
| | | 2012年 ^{b)} | 2013年 ^{c)} |
| マンゼブ水和剤 | 1,000 | 5.7 ab ^{d)} | 2.0 a |
| マンジプロバミド水和剤 | 1,000 | 0.3 a | — |
| ベンチアバリカルブイソプロピル・マンゼブ水和剤 | 3,000 | — ^{e)} | 0.0 a |
| アゾキシストロビン水和剤 | 1,000 | 45.7 bc | 85.3 b |
| 無処理 | | 80.3 c | 98.0 b |

(菊原ら, 2014b より抜粋)

^{a)} 福岡県農林業総合試験場 (筑紫野市) の露地栽培圃場で実施した。

^{b)} 5月30日, 6月11, 20日, 7月9, 26日に散布し, 8月6日に調査した。

^{c)} 6月5, 14, 24日, 7月8, 22日に散布し, 9月10日に調査した。

^{d)} 発病率は3反復の平均値。

同一文字間には有意差はない (角変換後, Tukey-Kramer の HSD 検定による多重比較, $P > 0.05$)。

^{e)} —は試験を実施しなかった。

(1) 菌の分離

2012年および2013年の8~9月に本県主要産地計8圃場と試験場内1圃場から罹病果を採取した。罹病果上に形成された分生子塊を白金耳で掻き取り, 素寒天培地に画線し, 1~2日25℃で培養後, 発芽した分生子を寒天培地ごと切り出し, PDA培地に移植し, 分離菌株とした。1果実から1菌株, 計100菌株を分離した。

(2) 寒天希釈平板法

アゾキシストロビン水和剤を有効成分で100ppm, シアン耐性呼吸を阻害する SHAM を1,000ppm になるように PDA 培地に添加し, 検定培地を作製した。なお, SHAM は水にやや溶けにくいいため, 50℃程度に温めた培地容量の1/3程度の滅菌水中に必要量をあらかじめ溶解した後, 培地に加用した (PDA 培地の水量はその分減じた)。供試菌株を PDA 平板培地で25℃, 4~5日培養後, 菌叢の周縁部から直径6mmのコルクボーラで菌叢ディスクを切りぬき, 菌叢面が本検定培地に接するように置床した。25℃で4日間培養し, 菌糸生育の有無で判別した。

(3) 検定結果

1圃場から分離した14菌株のうち3菌株で QoI 剤耐性菌が確認されたが, 他の8圃場86菌株は感受性であった (表-2)。耐性菌が確認された圃場は簡易施設で‘ピオーネ’が栽培されていた。この圃場では, QoI 剤の年間の使用回数は1回であったが, 調査した他の圃場では複数回使用されており, 今回, この1圃場で耐性菌が発生した原因は不明であった。このように, 本県の耐性菌の発生は一部の圃場にとどまったが, 全体的に QoI 剤の使用回数は多く, 今後, 耐性菌の分布拡大が懸念される。

IV 防除対策

今回の調査の結果, 本県では, ブドウ褐斑病とべと病で耐性菌が広域に分布し, 晩腐病ではごく一部の圃場での発生であることが明らかとなった。褐斑病の代替薬剤候補は防除効果が高く, 果実への汚れが少なかった DMI 剤が考えられ, べと病では防除効果が高かった CAA 剤が考えられた。これらの薬剤は耐性菌発生前の QoI 剤と比較しても同等かそれ以上の防除効果があると思われるが, 防除対象病害に限られる。また, 晩腐病も含めこれら3病害に効果がある薬剤として, マンゼブ剤やキャプタン剤等があるが, 防除効果は QoI 剤と同等かそれ以下で, また, 使用時期によっては商品価値に影響を与える果実の汚れを引き起こすため, 使用時期に限られる。防除対象病害が多く, 薬液の悪影響を受けやすい幼果期において, QoI 剤ほど優れた薬剤はなく, 耐性

| 生育状況 | 開花直前 | 開花直後 | 幼果期 |
|------|-------|---------------------|--------------------|
| 施設栽培 | 灰色かび剤 | ← DMI 剤 → | |
| 露地栽培 | 灰色かび剤 | マンゼブ剤あるいは キャプタン剤 | QoI 剤 補正で CAA 剤 |

図-3 開花直前から幼果期における QoI 剤代替防除体系

灰色かび病には褐斑病、晩腐病にも登録のある薬剤を選ぶ。イミノクタジン酢酸塩・ポリオキシシン水和剤（商品名：ポリバリン水和剤）やフルアジナム水和剤（商品名：フロンスайд SC）等。

菌が確認された本県では、栽培体系に応じて代替薬剤を使い分ける必要がある（図-3）。すなわち灰色かび病が中心で褐斑病や晩腐病が問題となる施設栽培では、これらに登録がある DMI 剤（例えば、テブコナゾール水和剤）が代替薬剤として適する。また、べと病と晩腐病が問題になる露地栽培では果実粒の汚れが目立たない小豆大まではマンゼブ剤やキャプタン剤を使用し、大豆大期にのみ QoI 剤を使用する対策が考えられている。一方晩腐病に対しては耐性菌が一部で確認されたものの、広域には発生しておらず、効果の高い代替薬剤もないため、QoI 剤は晩腐病だけを対象にした防除薬剤として使用する。5月から降雨が多くべと病の発生が予想される場合には CAA 剤などを追加防除する。

おわりに

ブドウ褐斑病菌では DMI 剤耐性菌は確認されていないものの、類縁の *Cercospora* 属菌では発生しており（清水, 2007）、ブドウべと病 CAA 剤耐性菌は欧州で発生している（殺菌剤耐性菌対策委員会, 2014）。少なくとも

本県では、ブドウ晩腐病 QoI 剤耐性菌による被害は確認されていないが、耐性菌の発生率が高い県では QoI 剤の使用を控えているところがある。QoI 剤を含めこれらの薬剤の耐性菌を管理するため、使用回数の制限とモニタリングを実施し、薬剤耐性菌による被害を受けないようにしていくことが大切である。

引用文献

- 1) FURUYA, S. et al. (2010): Pest. Manag. Sci. **66**: 1268 ~ 1272.
- 2) 稲田 稔ら (2008): 日植病報 **74**: 114 ~ 117.
- 3) ——— (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II, 日本植物防疫協会, 東京, p.96 ~ 99.
- 4) 井上幸次 (2009): 同上, p.111 ~ 113.
- 5) 石井英夫 (2012): 第 22 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集: 49 ~ 60.
- 6) 神谷奈多紗ら (2008): 日植病報 **74**: 73 ~ 74 (講要).
- 7) 菊原賢次 (2014 a): 九病虫研会報 **60**: 103 (講要).
- 8) ———ら (2014 b): 同上 **60**: 43 ~ 47.
- 9) ———ら (2014 c): 日植病報 **80**: 162 ~ 170.
- 10) 近藤賢一 (2011): 第 21 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集: 29 ~ 44.
- 11) SAROH, K. et al. (2006): J. Gen. Plant Pathol. **72**: 348 ~ 350.
- 12) 殺菌剤耐性菌対策委員会 (2014): <http://www.jfrac.com/caa> ガイドライン / (2015年5月30日アクセス確認).
- 13) 清水基滋 (2007): 植物防疫 **61**: 421 ~ 425.
- 14) 渡辺秀樹 (2009): 第 19 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集: 42 ~ 49.