

福岡県農林業総合試験場特別報告

第 11 号

福岡県における落葉果樹病害の
薬剤耐性糸状菌の現状と対策に関する研究

令和 2 年 3 月

福岡県農林業総合試験場

(福岡県筑紫野市大字吉木)

SPECIAL BULLETIN
OF
THE FUKUOKA AGRICULTURE AND FORESTRY
RESEARCH CENTER
NO.11

Occurrence and control of fungicide resistance in plant pathogens
of deciduous fruit tree diseases in Fukuoka Prefecture

by

Kenji KIKUHARA

THE FUKUOKA AGRICULTURE AND FORESTRY
RESEARCH CENTER

Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan

March 2020

福岡県における落葉果樹病害の
薬剤耐性糸状菌の現状と対策に関する研究

菊原 賢次

2020

* 九州大学 審査学位論文

目次

緒言	1
第1章 ナシ病害における DMI 剤耐性菌の発生と防除対策	4
1.1 ナシ赤星病	4
1.1.1 疫学的研究	7
1.1.2 植物体を用いた薬剤感受性検定	13
1.1.3 圃場における各種薬剤の防除効果	21
1.1.4 考察	25
1.2 ナシ黒星病	27
1.2.1 薬剤感受性検定	29
1.2.2 薬剤耐性菌発生リスク管理と代替剤の検討	39
1.2.3 圃場における各種薬剤の防除効果	42
1.2.4 考察	45
第2章 ブドウ病害における QoI 剤耐性菌の発生と防除対策	48
2.1 ブドウ褐斑病	48
2.1.1 薬剤感受性検定方法の改良	50
2.1.2 福岡県内における薬剤感受性の状況	56
2.1.3 代替剤の探索	58
2.1.4 圃場における各種薬剤の防除効果	60
2.1.5 考察	62
2.2 ブドウべと病菌	64
2.2.1 薬剤感受性検定	65
2.2.2 圃場試験における QoI 剤と代替剤の防除効果	67
2.2.3 考察	69
第3章 総合考察	70
摘要	74
謝辞	76
引用文献	77
Summary	85

緒 言

福岡県の果樹栽培は明治から昭和初期にかけて拡大した。この動向は全国的なもので、日露戦争終了直後の経済発展に伴う生活水準向上による果樹消費の増加をきっかけとした。さらに、明治30～40年に導入されたボルドー液等の近代的な薬剤防除法は、ナシ黒星病や赤星病等の発生を抑制し、病害虫の発生が多い落葉果樹の栽培を推進した。昭和16年には、本県の温州みかん、カキおよびブドウの栽培面積が順じて1784 ha、1084 ha および322 ha となり、現在の果樹栽培の原型が作られた。しかし、戦時下には、農薬の原料である硫酸ニコチン、砒酸鉛、生石灰および硫酸銅等の農業資材が欠乏したため、病害虫管理が困難になり、果樹園は荒廃していった。戦後、日本の経済復興に伴い、果樹栽培も復興し、1970年頃から現在の栽培品種が栽培され始めた(安藤, 1963; 福岡県園芸農業協同組合連合会, 1981)。現在、福岡県で栽培されている主な果樹は、温州みかん(栽培面積 1260 ha, 全国8位)、カキ(栽培面積 1430 ha, 全国2位)、ブドウ(栽培面積 802 ha, 全国6位) およびナシ(栽培面積 400 ha, 全国9位)で、多品目栽培が特徴である(農林水産省大臣官房統計部 2018)。

福岡県で栽培されているナシ(*Pyrus pyrifolia* Nakai var. *culta* Nakai)の主要品種は嗜好性の高い‘幸水’である。本品種は黒斑病(病原菌, *Alternaria alternata* (Fries) Keissler)に抵抗性であるものの、赤星病(病原菌, *Gymnosporangium asiaticum* Miyabe ex G. Yamada)、黒星病(病原菌, *Venturia nashicola* Tanaka & Yamamoto)および輪紋病(病原菌, *Botryosphaeria berengeriana* De Notaris f. sp. *piricola* Koganezawa & Sakuma)に感受性で、特に黒星病に弱く、年間を通じて十数回の殺菌剤が散布されている。本病の防除薬剤としてチアアジアジン、ジネブ、キャプタンおよび有機銅などの多作用点阻害剤が古くから使用されてきたが、赤星病や黒星病に対する防除効果は十分ではなかった。1971年に登録されたベンゾイミダゾール剤のチオファネートメチルおよびベノミルは黒星病に対し効果が高く、広く普及した(御園生・深津 1970, 石井 1994, 佐久間 2004)。しかし、使用数年後にはいくつかのナシ産地でベンゾイミダゾール剤の効果低減が指摘され、その原因は薬剤耐性菌の出現によることが明らかにされた(Ishii & Yamaguchi 1977)。その後、1986年にトリフルミゾールやピテルタノールをはじめとし、次々に新しいDMI剤(demethylation inhibitors, ステロール脱メチル化阻害剤)が登場し、いずれも黒星病および赤星病に対し非常に優れた効果を示し(梅本 1993)、現在でも基幹防除剤として広く普及している。

本県のブドウ(*Vitis* spp.)は‘巨峰’を中心に栽培されている。温暖な気候を生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、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、主な防除対象病害はブドウ灰色かび病(病原菌, *Botrytis cinerea* Person)および褐斑病(病原菌, *Pseudocercospora vitis* (Lev.) Speg.)である。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月頃に被覆が除去されるため、前述の病害に加え、べと病（病原菌、*Plasmopara viticola* (Berkeley et Curtis) Berlese et deToni）、晩腐病（病原菌、*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & H. Schrenk）および枝膨病（病原菌、*Diaporthe kyushuensis* Kajitani & Kanematsu）の防除が必要である。さらに、露地栽培ではこれらの病害に黒とう病（病原菌、*Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear）を加えた防除が必要となる。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とされる。ブドウ栽培における基幹防除剤はボルドー液やマンゼブであったが、1999年に県の防除指針に掲載された QoI（quinone outside inhibitor）剤のアゾキシストロビンやクレソキシムメチルは抗菌スペクトラムが広く、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、開花期から幼果期の基幹防除剤として広く使用されてきた。

しかし、2000年を過ぎたころから、通常の薬剤防除を実施しているにもかかわらず、ナシ黒星病、赤星病、ブドウべと病および褐斑病が多発する事例が見られるようになり、生産者や現場の農業指導者からは薬剤耐性菌の発生が疑われた。ナシの基幹防除剤である DMI 剤およびブドウの基幹防除剤である QoI 剤は特異作用点阻害剤で、耐性菌発生リスクが比較的高い薬剤である（FRAC 2013, 2018c）。

DMI 剤に対する耐性は、ナスすすかび病菌（*Mycovellosiella natrassii* Deighton）、キュウリうどんこ病菌（*Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun & Shishkoff）およびイチゴうどんこ病菌（*P. aphanis* (Wallroth) U. Braun & S. Takamatsu var. *aphanis*）等多くの病原菌で発生している（Ishii *et al.* 1990, 中野ら 1992, 浅利ら 1994, 山口ら 2000, FRAC 2018a）。植物病原菌の DMI 剤耐性には、本剤の標的酵素であるステロール脱メチル化酵素 cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) のアミノ酸置換を伴う変異、プロモーター領域の変異による CYP51 遺伝子発現量の増大、および膜輸送タンパク質遺伝子の活性化による薬剤排出能力の増強などの機構が関連すると考えられている（Schnabel & Jones 2001, de Waard *et al.* 2006, Ma *et al.* 2006, Cools *et al.* 2013, Villani *et al.* 2016）。

QoI 剤は多くの病害に優れた効果を発揮することから、さまざまな作物で使用されてきたが、イチゴ灰色かび病菌（*B. cinerea*）、イチゴ炭そ病菌（*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & H. Schrenk）、キュウリうどんこ病菌（*Golovinomyces cucurbitacearum* (R.Y. Zheng & G.Q. Chen) Vakal. & Kliron.）およびキュウリべと病菌（*Pseudoperonospora cubensis* (Berkeley & M.A. Curtis) Rostovzev）などによる多くの病害で耐性菌が確認されている（石井ら 2006, 稲田ら 2008, Ishii *et al.* 2009, FRAC 2018a）。QoI 剤の薬剤耐性は本剤の作用点タンパク質であるチトクローム *b* のアミノ酸置換変異、特に 143 番目の変異（G143A）が深くかかわっていることが知られている（Gisi *et al.* 2002）。

このような背景から、福岡県における落葉果樹病害の薬剤耐性菌の発生状況と防除対策に関する研究を実施した。本論文は、これらの研究成果を取りまとめたものである(菊原・石井 2008, 菊原ら 2014a, 2014b, 2018a, 2018b, Kikuhara *et al.* 2019)。なお、本論文において使用された殺菌剤の作用機作と耐性菌発生リスクについて Table 1 に示した。

Table 1 Fungicides sorted by mode of action ^a

Mode of action	Group name	Common name	Resistant risk
Nucleic acids metabolism	PA – fungicides (phenylamides)	Metalaxyl	High risk
Cytoskeleton and motor protein	MBC - fungicides (methyl benzimidazole carbamates)	Thiophanate-methyl	High risk
Respiration	SDHI - fungicides (succinate dehydrogenase inhibitors)	Penthiopyrad Boscalid Pyraziflumid	Medium to high risk
	QoI-fungicides (quinone outside Inhibitors)	Azoxystrobin Kresoxim-methyl Mandestrobin Famoxadone	High risk
Amino acids and protein synthesis	AP - fungicides (anilino pyrimidines)	Mepanipyrim	Medium risk.
Sterol biosynthesis in membranes	DMI-fungicides (demethylation Inhibitors)	Difenoconazole Fenbuconazole Hexaconazole Tebuconazole Fenarimol	Medium risk
Cell wall biosynthesis	CAA-fungicides (carboxylic acid amides)	Benthiavalicarb Mandipropamid	Low to medium risk
Host plant defense induction	Ethyl phosphonates	Fosetyl-Al	Low risk
Chemicals with multi-site activity	Quinones	Dithianon	Low risk
	Phthalimides	Captan	Low risk
	Inorganic	Copper	Low risk
	Dithiocarbamates	Mancozeb Thiram	Low risk

^a Excerpt from FRAC cord list (FRAC 2018c).

第1章 ナシ病害における DMI 剤耐性菌の発生と防除対策

1.1 ナシ赤星病

ナシ赤星病はニホンナシの葉や果実に発生する。本病は落葉や奇形果を生じさせ、収量および樹勢の低下をひきおこす重要病害である (Fig. 1)。病原は *Gymnosporangium asiaticum* で、さび病菌の一種である。本菌は夏胞子を欠き、年1世代の生活環の完結には中間宿主のビャクシン (*Juniperus*) 属植物が必要である (北島 1989) (Fig. 1)。ビャクシン属の中でも感受性の高い‘カイヅカイブキ’ (*J. chinensis* L. cv. Kaizuka) は生垣や観賞用に利用されることが多い。このため、住宅地に近い地域では本病が多発する傾向にある。本県のナシ園は山間部や山沿いだけでなく、住宅地に近い平野部にも存在している。このため、これらの園地では本病による被害を古くから受けてきた。

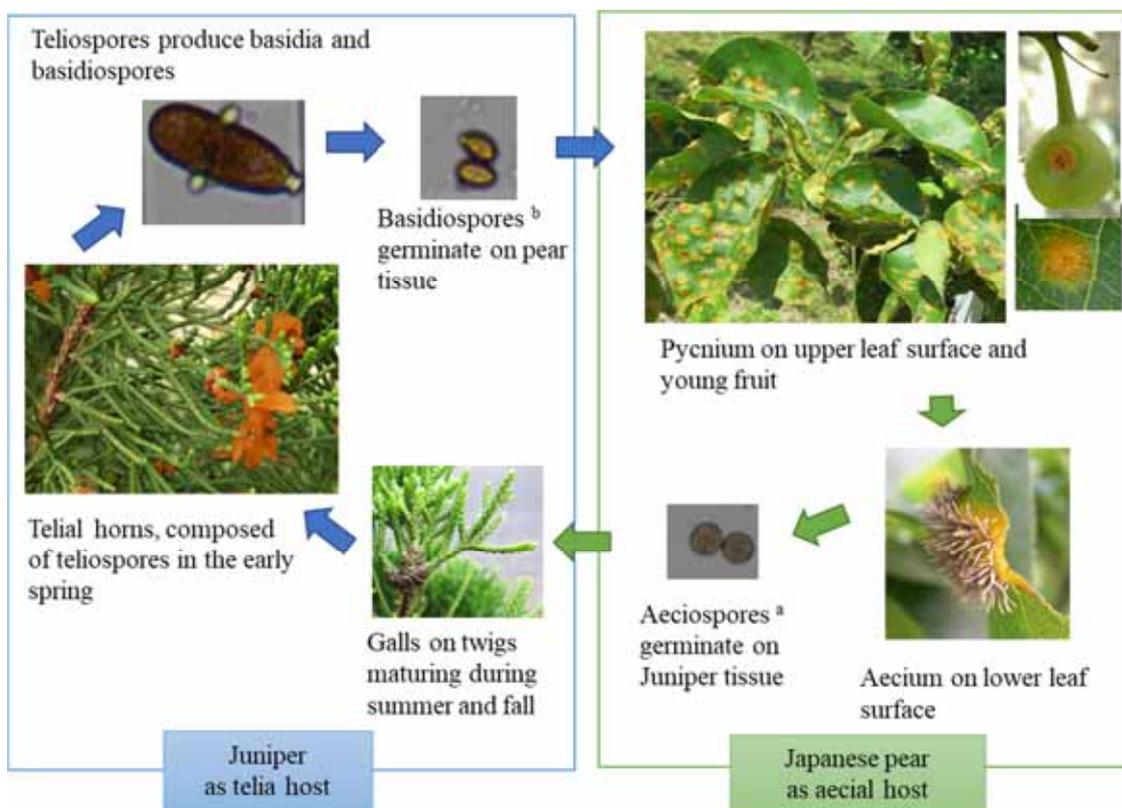


Fig. 1 Life cycle of *Gymnosporangium asiaticum*, created with reference to Kitajima (1989)
To analyze DMI fungicides sensitivity, aeciospores were inoculated into juniper plants ^a, and basidiospores were inoculated into Japanese pear plants ^b

福岡県における本病の主な防除対策はナシへの殺菌剤散布である。本病の第一次伝染源である小生子はビャクシン属植物上の冬胞子が発芽した後形成される。このため、殺菌剤散布は冬胞子の発芽状況、すなわち、冬胞子堆の膨潤状況から予測される小生子の飛散消長に合わせて実施される。冬胞子の発芽期間は気象条件によって年次ごとに異なるものの、本県では、およそ3月下旬から5月上旬である(田中 1966)。この時期はナシの展葉期にあたり、定期的な薬剤散布の間に発生した新葉には薬剤が付着しない。このため、降雨等によって防除適期を逸すると、ポリカーバメートのように感染後の散布では発病抑制効果が得られない殺菌剤の場合、感染した新葉の発病を防ぐことができない(野口 1983, 青野 1986)。ポリカーバメートと同様に予防効果のみしか期待できないチアアジアジンやジネブなどの殺菌剤が主に使用されていた1960~1980年代(福岡県 1979)までは、十分な薬効が得られず、本病は難防除病害とされていた(君島 1977, 野口 1983)。トリアジメホンをはじめとするDMI剤は、優れた予防効果と感染成立後の散布でも発病抑制効果を有しており(野口 1983, 磯田・上村 1987, 中田ら 1991)、これらの薬剤の普及にともない、本病の発生は減少した。その後、後発のDMI剤のジフェノコナゾールやヘキサコナゾールが広く普及するに至り(Table 2)、本病の発生は激減した(福岡県 1994)。ところが、2008年頃から再び本病の発生が増加した(福岡県 2007, 福岡県病害虫防除所 2008)。この要因の一つとしてDMI剤に耐性を示す赤星病菌の出現による防除効果の減退が疑われた。

一般的に微生物における薬剤耐性の有無は薬剤感受性に関するベースラインデータとの比較によって判断され、検定には、薬剤添加培地上における菌糸生育試験を実施することが多い(石井 1998)。一方、ナシ赤星病菌は絶対寄生菌で培養ができず、薬剤耐性検定のための遺伝子診断法も確立されていない。キク白さび病菌(*Puccinia horiana* Hennings)では冬胞子堆からの小生子形成量や冬胞子の発芽の有無によるオキシカルボキシン感受性検定法が報告されているが(飯嶋 1976)、他に実施例がなく、本法が他系統剤や他病害に利用できるかは不明である。このため、通常は生物検定を行う必要がある。生物検定は、

Table 2 Fungicide spray program on Japanese pear diseases in Yame region, Fukuoka Prefecture ^a

Date	Growth stage	Fungicides
Late March	Bud blast	Dithianon
Early April	pre-blossom	A mixture of Difenoconazole ^b and Thiram
Middle April	After artificial pollination	A mixture of dithianon and thiophanate-methyl
Late April	post-blossom	A mixture of Difenoconazole and Thiram
Early May	20 days post-blossom	Hexaconazole

^a Fungicides against Japanese pear rust are extracted from spray program of Japanese pear in 2013 and 2014.

^b DMI fungicides are shown in bold letters.

接種源となる冬孢子堆やさび胞子の採取時期が限定され、年1回の試験しか実施できない。耐性菌の確認には複数回の試験結果を必要とするため、迅速に生物検定の結果を出すことが困難である。しかし、ナシ栽培地域における耐性菌の増加に伴う被害を回避するため、DMI剤の効力低下を生物検定以外の方法により、早急に検証する必要がある。

近年、新しい病害虫管理法として提唱されているEBC (Evidence-Based Control) は臨床疫学を用いた治療法の評価(エビデンス)を基礎とするEBM (Evidence-Based Medicine) の概念を植物疫学へ応用したものである(田代 2015)。EBMの根拠となる研究に多用される観察疫学研究は、治療等の特定の行為や事象(疫学用語で「曝露」と疾病の頻度との関係を介入せずに観察によって検討する研究デザインである(中村 2013)。特に、観察疫学研究の中心となるコホート研究(cohort studies, ある集団に発生した曝露とその後に発生した疾病の関連性を明らかにする研究手法)や症例対照研究は比較的質の高いエビデンスが得られるため(川口 2012)、近年、植物疫学に応用することの有用性が報告されている(石黒ら 2003, 猫塚ら 2009, 堀江・都外川 2012, Kawaguchi 2014, 篠崎ら 2015)。このためナシ生産者に対するアンケート調査に基づく疫学的解析は、薬剤耐性ナシ赤星病菌の出現による殺菌剤の効力の低下を推定でき、耐性菌に対する早急な対策を講じることが可能となると考えられた。

本章では、まず、ナシ赤星病菌の耐性菌発生を早急に明らかにするため、疫学的な研究手法を用いて生産現場における薬剤防除と発病との関連性を調査した。つぎに、疫学的な研究結果を評価するため、DMI剤感受性検定を実施した。さらに、試験圃場でDMI剤の防除効果の確認と代替薬剤の探索を行った。

1.1.1 疫学的研究

福岡県内の主要産地のうち、住宅地に近く、ナシ赤星病の発生が多い八女地域のナシ栽培圃場における発病状況と防除実績の関連について、2013年と2014年に観察疫学研究の一つである後ろ向きコホート研究（retrospective cohort studies）を実施し、本病に対するDMI剤の防除効果低下の可能性について検討した。後ろ向きコホート研究はコホート研究の一種で、過去において曝露情報が明らかになっている集団について現在からさかのぼって疾病発生を確認する研究デザインである（中村 2013）。

材料と方法

1. 2013年における後ろ向きコホート研究

(1) アンケート調査

2013年12月に、福岡県八女農業協同組合のナシ部会員（構成員109人、約500圃場、栽培面積約113ha）に「栽培地域」、「栽培品種」、「ビャクシン類の植栽」および赤星病の「発生程度」の項目でアンケート調査を実施した。「栽培地域」は、Fig. 2に示す旧4市町村である。「栽培品種」は植栽されている品種、‘幸水’または‘豊水’である。「ビャクシン類の植栽」については、(a)園から見える位置に確認できる、(b)園から見えないが、樹はあるようだ、(c)確認できない（見当たらない）、(d)（ビャクシン類がどれか）分からない、の4カテゴリーで調査し、(a)および(b)を植栽有り、(c)を植栽無し、と区分し、(d)は解析の対象から除いた。「発生程度」については、(A)果実に銹子毛が発生、(B)果実に橙黄色の斑点が発生、(C)葉に銹子毛が発生、(D)葉に橙黄色の斑点が発生、(E)未発病、の5カテゴリーで複数回答の調査を行った。「発生状況」として、(A)～(C)のいずれかの回答があった圃場を多発群、それ以外を少発群と区分した。このカテゴリーによる分類は本部会員にしばしば実施されるアンケート調査で用いられており、部会員が慣れていることから、回答の精度が高いと判断したため、本研究において使用した。

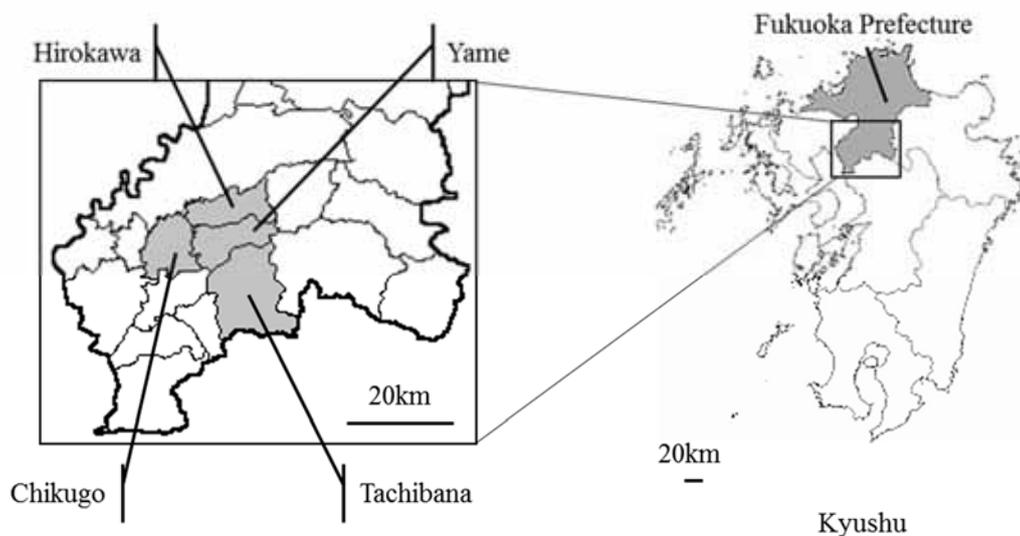


Fig. 2 Location of Yame region in Fukuoka Prefecture

(2) 赤星病菌小生子の飛散時期から推定される防除適期

殺菌剤散布と発病状況との関連を明らかにするために、当該年における防除適期を推察した。感染源である小生子の飛散期間を防除適期とし、この期間を冬胞子が完全に発芽する頃からすべての冬胞子の発芽が終わる頃までの間とした（野口 1970）。2013 年 3 月から同年 4 月にかけて、福岡県病害虫防除所が赤星病の発生予察調査を実施している八女市の‘カイヅカイブキ’において、水浸調査（農林水産省消費・安全局植物防疫課 2015）で外観的に完全に膨潤（発芽）した冬胞子堆は 4 月 1 日から確認され、4 月 5 日に 90%に達した（福岡県病害虫防除所 2013, 一部未公開データ）。この前後の降水量（アメダス久留米地点）は 4 月 2 日（22 mm）と 6 日（30.5 mm）であった。冬胞子堆の多くが成熟した 4 月 5 日の後に発芽に必要な 10 mm 以上の降雨（野口 1970）があった 4 月 6 日に多くの小生子が飛散し、終息したと推察された。このことから、当該年の防除適期を 4 月 1～5 日と推察した。

(3) 解析対象とする防除薬剤

防除実績は同農業協同組合に提出されている生産履歴を利用した。その中で、赤星病に登録がある DMI 剤 5 種類（ジフェノコナゾール、フェンブコナゾール、ヘキサコナゾール、テブコナゾール、トリアジメホン）と非 DMI 剤 4 種類（コハク酸脱水素酵素阻害剤（succinate dehydrogenase inhibitors, SDHI 剤）のペンチオピラド、有機硫黄剤のチウ

ラムおよびマンゼブ、キノロン剤のジチアノン) を解析対象とした。本病に効果がない有機銅、イミノクタジンアルベシル酸塩および殺虫剤は解析対象から除外した。前述の5日間に1回以上の薬剤散布を実施した場合を防除実施とした。

2. 2014年における後ろ向きコホート研究

(1) 調査対象と調査方法

2014年ではデータの精度を上げるため、栽培管理が良好で、その記録が保たれている筑後市の44圃場を選抜し、5月8~9日にナシの果叢葉200枚の発病の有無を調査した。病害虫発生予察事業の調査実施基準(農林水産省消費・安全局植物防疫課2015)を参考に、発病葉率16%以上を多発群とし、16%未満を少発群とした。なお、2013年に発病状況との間に有意差が認められなかった殺菌剤散布以外の要因は調査対象から除外した。

(2) 赤星病菌小生子の飛散時期から推定される防除適期

防除適期の推定は2013年に準じた。水浸調査で外観的に完全に膨潤した冬孢子堆は3月28日から4月16日までに確認され(福岡県病害虫防除所2014,一部未公開データ)、この間に小生子の形成を促す降雨が6日間あり、4月17日の16.5mmの降雨量により、多くの小生子が飛散し、終息したと推察された(アメダス久留米地点)。このことから、防除適期を3月28日~4月16日と推察した。

(3) 解析対象とする防除薬剤

防除実績調査は2013年に準じた。薬剤効果試験(日本植物防疫協会2016)や地域の防除基準(Table 2)における本病の一般的な散布間隔は10日であることから、前述の20日間の防除適期に2回以上薬剤が散布された場合を防除実施とした。

3. 統計解析

2013年において、「栽培地域」、「栽培品種」、「ビヤクシン類の植栽」および「発病状況」の関連についてはPearsonの χ^2 検定を行い、 P 値を求めた。非DMI剤はDMI剤耐性菌の発生リスクを低減させる目的でDMI剤に混合して使用されることがあるため(Table 2)、「非DMI剤による防除」と「DMI剤による防除」は無関係ではない。このため、両調査項目間の影響の排除が可能なロジスティック回帰分析を行い、 P 値とオッズ比を求めた。また、2014年についても同様の方法で統計解析を実施した。統計解析ソフトはJMP version 9(SAS Institute Japan 株式会社)を用いた。以下の統計解析も特別な記述がない限り本ソフトを用いた。

結 果

1. 2013 年における後ろ向きコホート研究

アンケート調査の結果、不備な回答を除き、73 圃場で有効回答が得られた。これらの回答を後ろ向きコホート研究のデータとして採用した。得られたデータは記帳の管理のよい生産者によるものであり、その園地は地域の栽培指導に従って管理されており、生育不良などの問題はなかった。アンケートの有効回答数のうち多発群は 41 例、少発群は 32 例であった (Table 3)。「栽培地域」についてみると、筑後市での多発群の割合は 44%で調査地域のなかでは最も高かったが、少発群の 56%よりも低かった。一方、八女市の多発群は 32%で、少発群の 19%よりも高かった。しかし、旧 4 市町間での栽培地域と発病状況の間に有意な関係はなかった ($P = 0.621$)。調査対象となった圃場の「栽培品種」は 2 品種のみで、「豊水」(11 例)よりも「幸水」(62 例)が多かった。「幸水」は多発群では 90%、少発群では 78%を占めた。しかし、品種と発病状況との間に関連は認められなかった ($P = 0.151$)。また「ビャクシン類の植栽」有りは、多発群では 60%、少発群では 50%を占めたが、発病状況との関係は有意ではなかった ($P = 0.424$)。殺菌剤散布以外の要因は全て発病状況と関連しなかった。さらに、殺菌剤散布と発病状況の関連性を解析した結果、「DMI 剤による防除」は多発群 (41 例の DMI 剤平均散布回数 0.3 ± 0.5 回, \pm 標準偏差, 以下同様) では 34%、少発群 (32 例の DMI 剤平均散布回数 0.5 ± 0.5 回) では 50%を占めたが、発病状況との関係は有意ではなかった (Table 4, $P = 0.394$, オッズ比 0.647, 95%信頼区間 (0.237–1.772))。一方、「非 DMI 剤による防除」は多発群 (41 例の非 DMI 剤平均散布回数 0.2 ± 0.4 回) では 24%を占めていたのに対して、少発群 (32 例の非 DMI 剤平均散布回数 0.6 ± 0.5 回) では 56%で、発病状況との関係は有意であった ($P = 0.011$, オッズ比 0.275, 95%信頼区間 (0.097–0.746))。この結果は、DMI 剤と比較して、非 DMI 剤がナシ赤星病菌による発病を有意に抑制していたことを示している。

Table 3 Correlation between the factor of cultivation and the occurrence of Japanese pear rust in 2013

Factor		Number of cases	High-grade disease group (%)	Low-grade disease group (%)	<i>P</i> value ^c
Location ^a	Chikugo	36	18/41 (44) ^c	18/32 (56)	0.621
	Hirokawa	13	7/41 (17)	6/32 (19)	
	Yame	19	13/41 (32)	6/32 (19)	
	Tachibana	5	3/41 (7)	2/32 (6)	
Cultivar ^b	‘Kosui’	62	37/41 (90)	25/32 (78)	0.151
	‘Housui’	11	4/41 (10)	7/32 (22)	
Kaizuka	Present	37	24/40 (60) ^d	13/26 (50)	0.424
	Absent	29	16/40 (40)	13/26 (50)	

^a Classified by local governments.

^b Cultivars in the assessment orchard were only ‘Kousui’ and ‘Housui’.

^c Number of cases of respective factors in 41 cases of high-grade disease or 32 cases of low-grade disease (rate %).

^d Answers "I don't know Kaizuka" (1 case of high-grade disease and 6 cases of low-grade disease) were excepted.

^e Pearson's χ^2 test.

2. 2014年における後ろ向きコホート研究

2014年において「DMI剤による防除」は多発群（13例のDMI剤平均散布回数 1.9 ± 0.6 回）では77%、少発群（31例のDMI剤平均散布回数 1.5 ± 0.8 回）では42%を占めたが、発病状況との間に関係はなかった（Table 4, $P = 0.292$, オッズ比2.333, 95%信頼区間(0.491–13.338)). 一方, 「非DMI剤による防除」は多発群（13例の非DMI剤平均散布回数 0.2 ± 0.4 回）では0%、少発群（31例の非DMI剤平均散布回数 1.2 ± 1.0 回）では45.2%を占めていた. 両群の差は有意であることから($P = 0.003$, オッズ比0), 非DMI剤がDMI剤に比べて発病を抑制したとする結果が得られ, 2013年に得られた結果を支持するものであった.

Table 4 Correlations between the occurrence of Japanese pear rust and spraying fungicides

Year	Fungicide	High-grade disease group (%)	Low-grade disease group (%)	P value ^c	Odds Ratio (95% CI) ^d
2013	DMI fungicides ^a	14/41 (34) ^b	16/32 (50)	0.394	0.647 (0.237–1.772)
	Non-DMI fungicides	10/41 (24)	18/32 (56)	0.011	0.275 (0.097–0.746)
2014	DMI fungicides ^e	10/13 (77) ^f	13/31 (42)	0.292	2.333 (0.491–13.338)
	Non-DMI fungicides	0/13 (0)	14/31 (45)	0.003	0 (0)

^a The fungicide was sprayed one or more times from 1 April to 5 April

^b Number of cases of spraying the fungicide in 41 cases of high-grade disease or 32 cases of low-grade disease (rate %).

^c A logistic regression analysis was performed using fungicide factors as explanatory variables and the disease-grade as a dependent variable.

^d 95% confidence interval.

^e The fungicide was sprayed one or more times from 28 March to 16 April.

^f Number of cases of spraying the fungicide in 13 cases of high-grade disease or 31 cases of low-grade disease (rate %).

1.1.2 植物体を用いた薬剤感受性検定

観察疫学研究では、様々な要因の中から病害の多発と関連する要因を見出すことが可能である。しかし、この関連は現場の事象を示しているにすぎず、原因と結果の関係を証明するものではない。したがって、観察疫学研究で明らかになった関連要因と他の研究結果との整合性を検証することで、因果関係を証明することができる(中村 2013)。このため、生物検定により、耐性菌の存在を証明することは重要である。

ここでは、まず、ナシ園に発生している病斑上に形成されたさび胞子を接種源として、中間宿主である‘カイヅカイブキ’に薬剤を処理し、その防除効果を検討した。次に、‘カイヅカイブキ’に発生している冬胞子堆を採取し、それから得られる小生子を接種源として、ナシ‘幸水’に薬剤を処理し、その防除効果を検討した。

材料と方法

1. ‘カイヅカイブキ’苗木を用いた DMI 剤感受性検定

(1) 接種源の収集

2013 年 6 月に主要産地の久留米市、筑後市、八女市の一般栽培のナシ園および、筑紫野市にある福岡県農林業総合試験場の試験園から銹子腔が形成されている罹病葉を採取した。さらに、DMI 殺菌剤の散布暦のない茨城県の生物環境研究所の試験園から採取された罹病葉を対照(推定の DMI 感受性菌)として利用した。

(2) 薬剤感受性検定方法

ナシ赤星病菌に感受性の高い‘カイヅカイブキ’を用いた。直径 15 cm のプラスチックポットに約 40 cm の高さの植物体を個別に植え、無加温の温室で栽培した。2013 年 6 月 18 日にジフェノコナゾール(有効成分濃度 25 ppm, 以下同様)、フェナリモル(30 ppm)の薬液および対照として水道水を散布した。罹病葉から採取したさび胞子を 0.05% (w/v) ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(和光純薬工業, 大阪)を含む蒸留水中に懸濁させ、約 2×10^4 胞子/mL に調整した。胞子懸濁液約 50 mL を殺菌剤処理 1 日後の植物に噴霧接種した。接種した植物体をそれぞれビニル袋で覆い、高湿度に維持した。翌日に同様な接種を繰り返し、6 月 21 日にビニル袋を撤去した。接種から約 9 ヶ月後の 2014 年 3 月 2 日に長さ 5 cm 以上のすべての小枝(植物あたり約 40 本の小枝)の発病の有無について調査し、発病枝率および防除価 $(100 - (\text{試験区の発病枝率} / \text{水処理区の発病枝率}) \times 100)$ を算出した。試験は 1 区 1 植物体、3 反復で行った。なお、ジフェノコナゾールおよび筑後から採取した胞子懸濁液で処理した植物は 1 反復とした。

2. ナシ苗木を用いた DMI 剤感受性検定

(1) 接種源の収集

福岡県広川町、筑後市、八女市および朝倉市における栽培ナシ園のある地域の民家にある生垣あるいは福岡県農林業総合試験場のナシ試験圃場の近くに栽培されている‘カイヅカイブキ’の冬胞子堆が着生している枝を 2015 年と 2016 年の 3 月に採取した。さらに、日本植物防疫協会の茨城県の実験圃場で DMI 殺菌剤の防除効果が確認されている冬胞子堆を感受性菌の対照として用いた。採取した枝は使用するまで 5°C で保存した。

(2) 薬剤感受性検定方法

実験植物にはナシ‘幸水’を用いた。30 cm のプラスチックポットに苗木を 1 本植え、1~2 年間生育させた。2014 年 4 月 22 日または 2015 年 5 月 18 日にジフェノコナゾール (25 ppm)、フェナリモル (30 ppm) あるいは対照として水道水を 8 枚程度が展葉した新梢に散布した。

工藤 (1995) の方法に従い、冬胞子の発芽を促進するため、枝を水道水に 1 時間浸漬し、次いで 30 × 38 × 13 cm 密閉容器中のサランネット上におき、20°C で 1 日間静置した。形成された小生子を蒸留水中に懸濁させた。0.05% (w/v) ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを含む蒸留水中に懸濁させ、約 1 × 10⁴ 孢子/mL に調整した。殺菌剤処理の翌日に、植物あたり 20~25 mL の孢子懸濁液を噴霧接種し、次いで高湿度を保つため、70 L~90 L のビニル袋で覆い、直射日光を受けない屋内で管理した。翌日、同様の方法で接種を行った。高湿度を 2 日間維持した後、ビニル袋を取り除き、植物体を無加温のガラス室で管理した。2014 年では 1 区 1 植物体、2 反復で、2015 年では 3 反復で行った。

接種約 3 週間後に、下記の日本植物防疫協会 (2016) の調査方法に準じて、1 新梢当たり 6 葉、1 鉢あたり約 20 葉について発病の有無と発病程度を調査し、発病葉率、発病度および防除価を算出した。

発病度 = Σ (罹病葉数 × 発病指数) / (葉総数 × 5) × 100

発病指数 0 : 無発病, 1 : 1~5 個の病斑, 3 : 6~15 個の病斑, 5 : 16 以上の病斑数点

防除価 = 100 - (殺菌剤処理区の発病度/水処理区の発病度) × 100

3. 統計解析

‘カイヅカイブキ’を用いた試験では、採取菌ごとに、殺菌剤で処理された植物体の小枝における発病の有無と水処理について、ロジスティック回帰分析により統計的に比較した。ナシ苗木を用いた試験では、採取菌ごとに、殺菌剤で処理された植物体の葉の発病指数と水処理について、順序ロジスティック回帰分析により統計的に比較した。福岡県採取菌に対する殺菌剤の防除効果と対照の茨城県採取菌に対する防除効果の関係について、‘カイヅカイブキ’を用いた試験では、ロジスティック回帰分析、ナシ苗木

を用いた試験では順序ロジスティック回帰分析により統計的に比較した。採取菌と殺菌剤の処理に交互作用があったとき、福岡県採取菌に対する殺菌剤の防除効果と茨城県採取菌の防除効果に有意な差があると推定した。個々の分析の後、Bonferroni-Holmの方法により多重比較した。

結 果

1. ‘カイズカイブキ’ 苗木を用いた DMI 剤感受性検定

接種後約9ヶ月には、水処理区のカイズカイブキに冬孢子堆の形成が観察され、その発病枝率は54.4~85.3%であった (Table 5, Fig.3)。一方、殺菌剤処理の植物体は、接種源および殺菌剤により発病程度が異なった。すなわち、ジフェノコナゾールおよびフェナリモル処理は、茨城県採取菌に対して、発病枝率を有意に減少させた (ジフェノコナゾール, 防除価 = 100, $P < 0.05$; フェナリモル, 防除価 = 79.7, $P < 0.05$)。フェナリモルは、福岡県から採取された4地域すべてにおいて防除効果が低かった (久留米市採取菌; 防除価 = 9.0, $P > 0.05$, 筑後市採取菌; 防除価 = 5.3, $P = 0.05$, 八女市採取菌; 防除価 = 29.0, $P < 0.05$, 福岡県農林業総合試験場採取菌; 防除価 = 26.5, $P < 0.05$)。対照的に、ジフェノコナゾールは、久留米採取菌 (防除価 = 57.3, $P < 0.05$) および筑後採取菌 (防除価 = 54.0, $P < 0.05$) に対して防除効果があった。しかし、すべての福岡県採取菌に対するジフェノコナゾールの防除効果は、茨城県採取菌より低かった ($P < 0.05$)。

2. ナシ苗木を用いた DMI 剤感受性検定

調査時におけるすべての水処理区の発病葉率 (92.0%以上) と発病度 (55.2以上) は非常に高かった (Table 6, Fig. 4)。各採取菌の各薬剤処理区について、発病葉率と発病度は類似した傾向を示した。茨城県採取菌に対するフェナリモルおよびジフェノコナゾール処理は、対照の水処理と比較して発病度を有意に減少させた (ジフェノコナゾールの防除価 = 99.1, $P < 0.05$, フェナリモルの防除価 = 96.3, $P < 0.05$)。対照的に、いずれの福岡県採取菌に対してもフェナリモルの防除価 (0~8.7) は低かった。また、ジフェノコナゾールは広川採取菌 (防除価 = 12.8, $P > 0.05$) および筑後採取菌 (防除価 = 0, $P > 0.05$) に対して防除効果がなかった。一方、八女採取菌, 朝倉採取菌, 福岡県農林業総合試験場採取菌に対してはわずかに防除効果が認められたが (防除価 = 25.0~44.0, $P < 0.05$)、その効果は茨城県採取菌よりも低かった ($P < 0.05$)。

Table 5 Efficacy of two DMI fungicides against the aeciospores of *Gymnosporangium asiaticum*, collected from the diseased leaves of *Pyrus pyrifolia* ‘Kousui’ in inoculation tests on *Juniperus chinensis* L. cv. Kaizuka

Prefecture	Location of sampling inoculum ^a	Treatment	Total no. of twigs ^b	DI ^c (%)	CP ^d	Statistical analysis	
						Control ^e	Ibaraki ^f
Fukuoka	Kurume	Difenoconazole	132	36.4	57.3	*	*
		Fenarimol	175	77.6	9.0	-	*
		Water (control)	134	85.3			
	Chikugo	Difenoconazole	40	25.0	54.0	*	*
		Fenarimol	128	51.5	5.3	-	*
		Water (control)	138	54.4			
	Yame	Fenarimol	132	59.8	29.0	*	*
		Water (control)	127	84.2			
	FARC	Fenarimol	104	45.2	26.5	*	*
Water (control)		144	61.5				
Ibaraki	Ibaraki	Difenoconazole	126	0	100	*	
		Fenarimol	126	12.8	79.7	*	
		Water (control)	143	63.2			

^a The inocula from Fukuoka Prefecture were collected from commercial orchards in Kurume, Chikugo, and Yame, and from the experimental orchard in the Fukuoka Agricultural and Forest Research Center (FARC) in 2013. The inoculum from Ibaraki Prefecture was collected from the experimental orchard at the National Institute for Agro-Environmental Sciences in 2013, where no DMI fungicides had been sprayed.

^b Total number of twigs on three plants (approximately 40 twigs per plant), with the exception of one treatment, in which there was one plant treated with difenoconazole and the inoculum from Chikugo.

^c DI, disease incidence is expressed as the total number of infected twigs as a percentage of the total number of tested twigs.

^d CP, control proportion is expressed as the value calculated by: $[1 - \text{DI of treatment with fungicide} / \text{DI of water (control)}] \times 100$.

^e A logistic regression analysis was calculated to compare DI based on treatment with fungicides. Significant levels were adjusted using the Bonferroni-Holm method. * Indicates a significant difference between the control (water treatment) and treatment with each fungicide at $P < 0.05$.

^f A logistic regression analysis was calculated to compare DI based on treatment with fungicide and pathogen population. Significant levels of interaction between the treatment with fungicide and pathogen population were adjusted using the Bonferroni-Holm method. * indicates a significant difference between the population from Ibaraki Prefecture and each population from Fukuoka Prefecture at $P < 0.05$.

Population

Fukuoka



Ibaraki



Difenconazole

Fenarimol

Water (control)

Treatment

Fig. 3 Signs of DMI fungicide resistance in the population of *Gymnosporangium asiaticum* from on juniper twigs in Fukuoka Prefecture, compared with that in the fungicide-sensitive population from Ibaraki Prefecture

Table 6 Efficacy of two DMI fungicides against basidiospores of *Gymnosporangium asiaticum* formed from diseased twigs of *Juniperus chinensis* L. cv. Kaizuka in inoculation tests on *Pyrus pyrifolia* ‘Kousui’

Prefecture	Location of sampling inoculum ^a (year)	Treatment	Total no. of leaves ^b	DI ^c (%)	DS ^d	CP ^e (%)	Statistical analysis	
							Control ^f	Ibaraki ^g
Fukuoka	Yame (2015)	Difenoconazole	94	86.2	61.5	27.1	*	*
		Fenarimol	90	97.8	85.1	0	-	*
		Water (control)	101	100	84.4			
	Hirokawa (2015)	Difenoconazole	108	94.4	64.1	12.8	-	*
		Fenarimol	124	92.7	67.1	8.7	-	*
		Water (control)	117	94.0	73.5			
	Chikugo (2014)	Difenoconazole	37	100	100	0	-	*
		Fenarimol	36	100	96.7	3.3	-	*
		Water (control)	40	100	100			
Asakura (2014)	Difenoconazole	52	88.7	41.4	25.0	*	*	
	Fenarimol	28	89.3	59.3	0	-	*	
	Water (control)	50	92.0	55.2				
FARC (2015)	Difenoconazole	92	93.2	51.5	44.0	*	*	
	Fenarimol	88	98.9	93.6	0	-	*	
	Water (control)	85	98.9	92.0				
Ibaraki (2015)	Difenoconazole	112	1.8	0.7	99.1	*		
	Fenarimol	110	14.5	2.9	96.3	*		
	Water (control)	103	97.1	77.5				

^a The inocula from Fukuoka Prefecture were collected from juniper hedges in Yame, Hirokawa, Chikugo, and Asakura, and from experimentally grown juniper plants at the Fukuoka Agricultural and Forest Research Center (FARC). The inoculum from Ibaraki Prefecture was collected from experimentally grown juniper plants at the Japan Plant Protection Association Tsukuba Research Center, which was sensitive to DMI fungicides.

^b Total number of leaves on two plants (approximately 30 leaves per plant) in 2014 or three plants in 2015, with the exception of one treatment, in which there was one plant treated with fenarimol and the inoculum from Asakura.

^c DI, disease incidence is expressed as the percentage of the total number of observed leaves that

were infected.

^d DS, disease severity is expressed as the proportion of leaves with severity (S) scores. Calculated by Σ (number of diseased leaves \times S score)/(total number of leaves \times 5) \times 100. S score: 0 = no visible rust spots; 1 = 1–5 rust spots; 3 = 6–15 rust spots; 5 \geq 16 rust spots.

^e CP, control proportion is expressed as the value calculated by $[1 - \text{DS of treatment with fungicide} / \text{DS of water (control)}] \times 100$.

^f An ordered logistic regression analysis was calculated to compare DS based on treatment with fungicides. Significant levels were adjusted using the Bonferroni-Holm method. * Indicates a significant difference between the control (water treatment) and treatment with each fungicide at $P < 0.05$.

^g An ordered logistic regression analysis was calculated to compare DS based on treatment with fungicide and pathogen population. Significant levels of interaction between the treatment with fungicide and pathogen population were adjusted using the Bonferroni-Holm method. * Indicates a significant difference between the population from Ibaraki Prefecture and each population from Fukuoka Prefecture at $P < 0.05$.

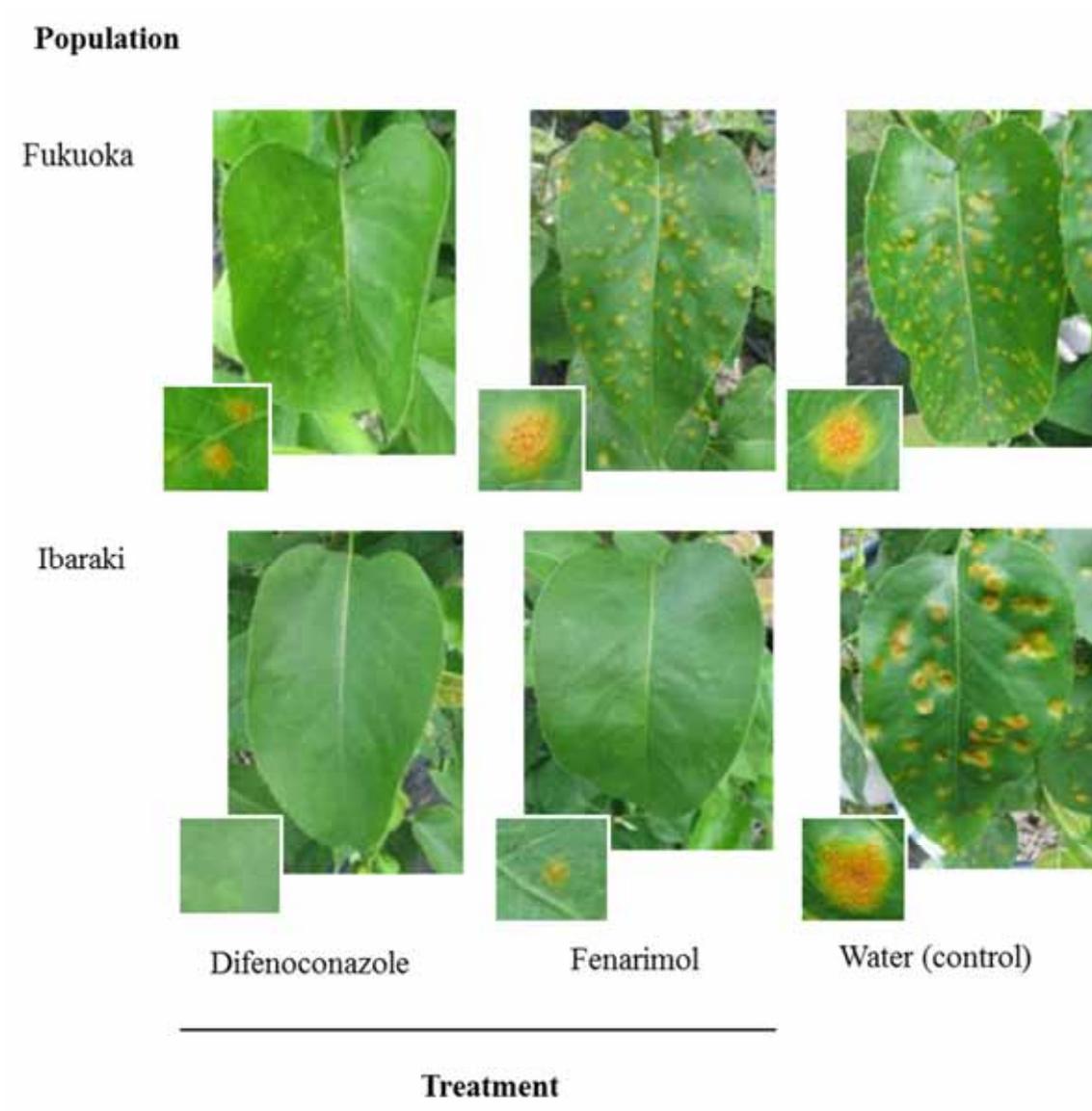


Fig. 4 Symptoms of DMI fungicide resistance in the population of *Gymnosporangium asiaticum* from Japanese pear leaves in Fukuoka Prefecture, compared with that in the fungicide-sensitive population from Ibaraki Prefecture

1.1.3 圃場における各種薬剤の防除効果

薬剤感受性検定により、福岡県において耐性菌が発生していることが証明された。このような耐性菌発生圃場における DMI 剤の防除効果ならびに DMI 剤の代替剤を明らかにするため、薬剤効果試験を試験圃場で実施した。

材料と方法

1. DMI 剤の防除効果

筑紫野市農林業総合試験場実験圃場 A で試験を実施した。1983 年に縦横 2 m 間隔で植栽したナシ品種‘幸水’と‘二十世紀’を用いた。ナシ樹から約 3 m 離れた場所に 2009 年に 3 本の‘カイヅカイブキ’を植栽し、自然発生で感染させ、本病の伝染源とした。冬胞子が発芽した期間、すなわち、2013 年は 4 月 3 日および 12 日、2014 年は 4 月 3 日、11 日および 24 日に以下の薬剤を 1 樹あたり 8 L の薬液を散布した。ジフェノコナゾール（有効成分濃度 25 ppm，以下同様）、フェナリモル（30 ppm）、チオカーバメート系剤のチウラム（800 ppm）および無散布を加えた 4 区について、1 区 1 樹 3 反復で実施した。

最終散布約 3 週間後に発病葉率と発病度を前述のナシ苗木を用いた DMI 剤感受性検定の調査方法に準じて調査した。発病度を Box-Cox 変換し、処理区、年および品種間の 3 元配置分散分析（ANOVA）を用いて統計的に比較した。続いて、Tukey-Kramer の HSD 検定を用いて平均間の差を決定した。

2. 代替薬剤の探索

筑紫野市農林業総合試験場実験圃場 B で各種薬剤の評価試験を 2013 年と 2014 年に実施した。1983 年に縦横 4 m 間隔で植栽されたナシ品種‘幸水’と‘豊水’を用いた。2014 年は、DMI 剤のジフェノコナゾール（25 ppm）、フェナリモル（30 ppm）、SDHI 剤のペンチオピラド（75 ppm）、QoI 剤のピリベンカルブ（200 ppm）、およびジチオカーバメート剤のチウラム（800 ppm）と無散布を加えた 6 区について、1 区 1 樹 3 反復で実施した。2015 年は、ジフェノコナゾール、ペンチオピラド、ピリベンカルブ、チウラムおよび QoI 剤と SDHI 剤の混合剤であるピラクロストロビン（34 ppm）・ボスカリド（68 ppm）と無散布を加えた 6 区について、1 区 1 樹 3 反復で実施した。伝染源として、実験圃場 1 に隣接して植栽されている冬胞子堆が着生した‘カイヅカイブキ’の枝を 2014 年と 2015 年ともに 4 月 7 日に実験圃場外に設置した。薬剤散布を 2014 年と 2015 年共に、4 月 7 日および 17 日に実施した。

最終散布約 4 週間後に発病葉率と発病度を本章前項の 1.1.2 の材料と方法 2. に準じて調査した。

結 果

1. DMI 剤の防除効果

‘二十世紀’と‘幸水’のナシ赤星病の発病度に有意な差はなかった (Table 7, 品種; $P > 0.05$). ‘カイヅカイブキ’は年ごとに生長し, それに着生した赤星病菌の量も増加したと思われ, 2014 年の発病度は 2013 年よりも高かった (年; $P < 0.05$). 殺菌剤処理間に有意差が認められた (処理; $P < 0.05$). フェナリモルで処理したナシ葉の発病度は, 非 DMI 剤のチウラムで処理したものより有意に高く (Table 8, $P < 0.05$), 無散布と差が見られなかった ($P > 0.05$). ジフェノコナゾールは, フェナリモルよりも発病度を有意に低下させた ($P < 0.05$) が, チウラムより効果的ではなかった ($P > 0.05$). これらの結果は, 圃場で薬剤に低下が認められる赤星病菌が発生し, ジフェノコナゾールとフェナリモルとの間に不完全な交差耐性があることを示唆した. ナシと‘カイヅカイブキ’の苗木を用いた感受性検定で用いられた接種源の一つはこの圃場から採取した. 本圃場試験における 2 種の DMI 剤の防除効果は感受性検定の結果と同じ傾向を示した.

Table 7 Results of a 3-way ANOVA on the disease severity scores (transformed by arcsine square root) in the field performance test

Factor	<i>Df</i>	SS	<i>F</i> value	<i>P</i> value
Treatment	1	1.498	22.6	<0.001
Year	3	0.833	37.7	<0.001
Cultivar	1	0.074	3.3	0.105
Treatment × Year	3	0.116	1.8	0.233
Treatment × Cultivar	3	0.449	6.8	0.014
Year × Cultivar	1	0.001	0.0	0.841
Treatment × Year × Cultivar	3	0.004	0.1	0.979

df, degrees of freedom; SS, sum of squares

Table 8 Field performance of two DMI fungicides and a dithiocarbamate fungicide against Japanese pear rust on leaves of *Pyrus pyrifolia* ‘Kousui’ and ‘Nijisseiki’ in the experimental orchard in 2013 and 2014

Treatment	2013		2014		Statistical analysis ^c
	DI (%) ^a	DS ^b	DI (%)	DS	
Difenoconazole	61.7	35.3	75.7	48.6	a
Fenarimol	87.7	57.9	100.0	94.4	b
Thiram	25.3	7.9	80.3	47.9	a
Control	91.7	67.7	99.7	94.6	b

^a DI, disease incidence is expressed as the mean percentage of infected leaves per tree; three trees were observed per treatment, with 100 leaves assessed per tree.

^b DS, disease severity is expressed as the mean proportion of leaves with severity (S) scores. Calculated by Σ (number of diseased leaves \times S score)/(total number of leaves \times 5) \times 100. S score: 0 = no visible rust spots; 1 = 1–5 rust spots; 3 = 6–15 rust spots; 5 \geq 16 rust spots.

^c Same letters indicate that mean DS values are not significantly different according to the Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$) with data transformed by arcsine square root transformation after a 3-way ANOVA

2. 代替薬剤の探索

2014 年の無処理区の発病葉率は 94.5%，発病度は 61.4 で，本試験は多発条件であった (Table 9). DMI 剤のジフェノコナゾールとフェナリモルの防除価はそれぞれ，63.1 と 27.1 でやや低かった。SDHI 剤のペンチオピラドが最も防除価 (95.3) が高く，ジチオカーバメート剤のチウラム (防除価 90.0)，SDHI 剤のピラジフルミド (防除価 84.7)，QoI 剤のピリベンカルブ (防除価 81.3) が続いた。

2015 年の無処理区の発病葉率は 80.3%，発病度 28.1 で，本試験は 2014 年より発病が少ないものの，薬剤の防除効果を評価するのに，十分な発生があった (Table 9)。DMI 剤のジフェノコナゾールの防除価は 54.8 とやや低かった。SDHI 剤のペンチオピラドが最も防除価 (89.8) が高く，次いで，ジチオカーバメート剤のチウラム剤 (防除価 81.5)，QoI 剤と SDHI 剤の混合剤であるピラクロストロビン・ボスカリド (防除価 80.5) の防除効果が高かった。QoI 剤のピリベンカルブの防除価 (47.8) は低く，ジフェノコナゾールと同等であった。

本試験の接種源は，前述の植物体を用いた感受性検定で耐性菌が確認され (Table 6)，圃場 A における DMI 剤の防除効果試験で利用した ‘カイヅカイブキ’ から採取しており，DMI 剤のジフェノコナゾールとフェナリモルの防除価が低いことが確認されている。両試験を通じて，SDHI 剤のペンチオピラドとジチオカーバメート剤のチウラムの防除効果が高かった。一方，QoI 剤のピリベンカルブは年次で防除効果にばらつきがあった。単年度

の成績であるが、SDHI 剤のピラジフルミドと QoI 剤と SDHI 剤の混合剤であるボスカリド・ピラクロストロビンの防除効果は高かった。

Table 9 Field performance of various fungicides against Japanese pear rust on leaves of *Pyrus pyrifolia* ‘Kousui’ and ‘Housui’ in the experimental orchard in 2014 and 2015

Treatment (mode of action ^a)	2014			2015		
	DI (%) ^b	DS ^c	CP	DI (%)	DS	CP
Difenoconazole (DMI)	59.2	22.6 a ^d	63.1	51.5	12.7 a	54.8
Fenarimol (DMI)	77.2	44.8 b	27.1	Nt ^e	Nt	Nt
Penthiopyrad (SDHI)	13.2	2.9 c	95.3	13.7	2.9 b	89.8
Pyraziflumid (SDHI)	41.3	9.5 d	84.7	Nt	Nt	Nt
Pyribencarb (QoI)	4.2	11.5 d	81.3	51.0	14.6 a	47.8
Picoxystrobin (QoI)	Nt	Nt	Nt	22.0	5.5 c	80.5
+ Boscalid (SDHI)						
Thiram (MsI)	27.2	6.2 d	90.0	25.3	5.2 c	81.5
Control	94.5	61.4 b		80.3	28.1 d	

^a Mode of action of fungicides. DMI: demethylation inhibitors, SDHI: succinate dehydrogenase inhibitors, QoI: quinone outside inhibitors, MsI: multi-site inhibitors.

^b DI, disease incidence is expressed as the mean percentage of infected leaves per tree; three trees were observed per treatment, with 100 leaves assessed per tree.

^c DS, disease severity is expressed as the mean proportion of leaves with severity (S) scores. Calculated by Σ (number of diseased leaves \times S score)/(total number of leaves \times 5) \times 100. S score: 0 = no visible rust spots; 1 = 1–5 rust spots; 3 = 6–15 rust spots; 5 \geq 16 rust spots.

^e CP, control proportion is expressed as the value calculated by $[1 - \text{DS of treatment with fungicide} / \text{DS of water (control)}] \times 100$.

^d Same letters indicate that mean DS values are not significantly different according to the step wise test with data transformed by Box-Cox transformation.

^e Not tested.

1.1.4 考察

これまでに、ナシ赤星病菌における DMI 剤耐性の報告例はない。また類縁種の *G. yamadae* Miyabe ex G. Yamada (リンゴ赤星病), *G. juniper-virginianae* Schwein. (cedar-apple rust) および *G. sabinae* (Dicks.) G. Winter (european pear rust) にもまだ耐性菌の存在は知られていない。一般的に、さび病菌は薬剤耐性菌発生リスクの低い菌種であると考えられていた (FRAC 2013, 田辺 2017) が、近年、ブラジルで DMI 剤耐性ダイズさび病菌 (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow) による被害が報告されている (Godoy *et al.* 2016, FRAC 2017)。さらに、さび病菌の薬剤耐性菌発生リスクが再評価された結果、さび病菌は生活環が短い、胞子の形成量が多い等のことから耐性菌発生リスクが高い性質を有しており、薬剤耐性を獲得する可能性が高いことが示されている (Oliver 2014)。一方、一般的なさび病菌とは異なり、ナシ赤星病菌においては、同一の宿主に二次感染する胞子を欠き、生活環は年 1 世代に限られるため、薬剤耐性菌発生リスクは比較的低いと考えられた。

観察疫学研究の一つである後ろ向きコホート研究を福岡県八女地域で 2 ヶ年実施した。非 DMI 剤による適期防除は赤星病の発生を効果的に抑制していた。これに対し、感染後にも防除効果があり、散布間隔や防除適期に非 DMI 剤ほど厳格に守る必要がない (野口 1983, 磯田・上村 1987) DMI 剤による防除の有無は、発病状況との関連性が認められなかった。なお、栽培品種間に本病に対する感受性の差はないため (北島 1989)、本研究でも「品種」は発病状況に影響を与えなかったと考えられた。小生子の飛散距離は約 1.5 km と長距離であるため (梅本ら 1989)、筑後平野に位置し、ビャクシン類の植栽を制限するような社会的な環境に差がない同一地域内では、「栽培地域」や「ビャクシン類の植栽」は発病に影響を与えなかったと考えられた。よって、ナシ赤星病多発要因の一つとして、DMI 剤の防除効果が減退、すなわち DMI 剤耐性菌発生の可能性が示唆された。さらに、鉢植えのビャクシンとナシを用いた感受性検定により、福岡県の栽培圃場と実験圃場から採取されたナシ赤星病菌に対する DMI 剤のジフェノコナゾールおよびフェナリモルの防除価は感受性と推定される対照の茨城県採取菌より低かった。同様に、これらの殺菌剤の防除効果は福岡県の実験現場圃場でも低いことが示され、福岡県で DMI 剤耐性ナシ赤星病菌が発生していることが示された。この結果は観察疫学研究によって証明された関連性を裏付け、近年の多発の原因に耐性菌が関与していることを明らかにした。本研究は、ナシ赤星病菌における DMI 剤の防除効果の低下を伴う耐性菌の発生の最初の報告である。

DMI 剤耐性赤星病菌は本病の発生の多い八女市や筑後市だけでなく、比較的発生の少ない朝倉市でも確認された。ナシ赤星病菌の小生子は長距離を飛散することができることから (梅本ら 1989)、DMI 剤耐性菌が広範囲に分散したと考えられた。一方、茨城県など、福岡県から地理的に遠い地域で、DMI 剤の防除効果が低下した報告は 2018 年現在確認されていない。DMI 剤耐性ナシ赤星病菌は九州北部に限定されているものと推定される。

Venturia inaequalis (Cooke) G. Winter などの多くの糸状菌に対して DMI 剤は不完全な交差耐性を示すことが知られている (Cools *et al.* 2013, 赤平 2017). 本試験もジフェノコナゾールとフェナリモルの防除効果に差があり, DMI 剤の交差耐性は不完全であった.

代替薬剤の探索の結果, SDHI 剤のペンチオピラドの防除効果が最も高く, チウラムやピラジフルミドが続いた. これらの薬剤は農薬登録のために実施される新農薬実用化試験成績においても実用性が高いと判定されている成績が多かった (日本植物防疫協会 2002, 2003, 2004, 2005, 2013, 2014, 2015). なお, 2018 年現在, ピリベンカルブおよびピラクロストロビン・ボスカリドのナシ赤星病に対する登録はない.

本試験成績を現地に説明し, 代替薬剤の普及を図った. 2015 年頃から, SDHI 剤の中で先行して市販されたペンチオピラドが地域の防除暦に掲載された. その後, 現地から大きな被害を受ける報告は少なくなった. しかし, 八女地域の一部では現在も多発事例の報告がある. 八女茶で有名なこの地域はチャ園に隣接するナシ園が多数存在している. 2018 年現在, ナシ赤星病とチャ病害に薬剤登録されている非 DMI 剤はない. 散布薬液のドリフトに伴う周辺作物の飛散が問題となっており, このようなナシ園ではチャに登録がない非 DMI 剤は自粛され, 防除適期には DMI 剤のみに依存した薬剤防除が実施される傾向がある. ナシの開花時期に近いチャの摘採時期に使用される農薬はチャに残留しやすく, 農薬使用基準を満たされにくいことやこの時期にチャに重要病害が発生しないため, 新規に登録される農薬は少ない. ドリフト対策用の遮蔽シートの設置や中間宿主の伐採が試みられているが, 設置費用や伐採への理解が得られず, 今後の問題として残されている.

今回使用した観察疫学研究では, 様々な要因の中から病害の多発と関連する要因を見出すことが可能であった. 特に, 経費や時間, 施設等の制約のため直接試験を実施することが困難な課題について, 本研究手法は調査結果に科学的根拠を与え, 最善の防除対策を講じるための有力な手段になるものと考えられた.

1.2 ナシ黒星病

ナシ黒星病は *Venturia nashicola* により引き起こされる病害で、ニホンナシの葉および果実に黒色のすす状病斑を生じ、果実の外観品質の低下や裂果などの直接的な被害を与えるため、ナシ栽培における重要病害である (Fig. 5) (北島 1989, 佐久間 2004). 本病に優れた防除効果を示す DMI 剤が登録された時には、海外において、同属菌のリンゴ黒星病菌 (*V. inaequalis*) に DMI 剤の効果低下が報告されており (石井 1995, Villani *et al.* 2015), 本病菌についても耐性菌の発生を警戒していた (Ishii *et al.* 1990). そこで薬剤添加培地を用いた感受性検定が実施され、1991 年に茨城県や佐賀県などで DMI 剤の一つであるフェナリモルに対する感受性低下菌が検出された (富田ら 1992). その後、福岡県 (菊原 2005), 栃木県 (後藤ら 2000) および鳥取県 (安田ら 2003) においても同様な感受性低下菌が検出された. しかし、1992 年にフェナリモル感受性低下菌が分離された茨城県や佐賀県の圃場から採取されたナシ黒星病菌を用いてナシ実生葉を用いた生物検定を行った結果、フェナリモルは高い発病抑制効果を示した (石井ら 1995, Tomita & Ishii 1998). このため、培地上での感受性低下は薬剤の効果を必ずしも反映しないことが明らかとなり、圃場において薬剤の効果を下げるような耐性菌はまだほとんど分布していないと思われた (石井 1994, Tomita & Ishii 1998).

福岡県では、ナシ黒星病に対して DMI 剤のジフェノコナゾール、ヘキサコナゾールおよびフェンブコナゾールが長期にわたり基幹防除剤として使用されていた. 2005 年頃から、防除適期の開花前後から数回使用したにもかかわらず、黒星病が多発した事例が確認され、DMI 剤の効果低下が指摘されるようになった.

本章では、まず、本菌の DMI 剤感受性を 2006~2007 年および 2015~2016 年にナシ苗木を用いた生物試験で評価した. つぎに、耐性菌発生リスク管理と耐性菌防除対策のため、代替剤の探索とその代替剤および DMI 剤と多作用点阻害剤の混用および代替剤の探索を行った. さらに、DMI 剤耐性菌発生圃場における薬剤の防除効果を確認した.

a)



b)



Fig. 5 Symptoms of Japanese pear scab by *Venturia nashicola*

a) Scab lesions on leaves and fruitlets

b) Scab lesions on fruit

1.2.1 薬剤感受性検定

本病に対する感受性の低下が疑われた 2006 年および 2007 年に感受性検定を実施した。その結果、一部の DMI 剤に対して感受性が低下した菌が確認されたが、感受性低下が確認されなかった DMI 剤は使用が継続された。DMI 剤に対する病原菌の感受性低下が進行したことによる薬剤の防除効果の低下が疑われたため、2015 年および 2016 年に再度、感受性検定を実施した。

材料と方法

1. 接種源の収集

2006 年 5～6 月に福岡県内のナシ主要産地 5 地域 11 圃場, 2007 年 5 月に 4 地域 8 圃場, 2015 年 5 月に 6 地域 13 圃場および 2016 年 5 月に 4 地域 6 圃場と福岡県農林業総合試験場の試験圃場から罹病葉, 罹病果を圃場全体から無作為に 30 枚あるいは 30 個以上採取した。2006 年および 2015 年は春先の天候不順により本病の発生が多く, その翌年の 2007 年および 2016 年の発生は前年ほどではなかったが, 多発傾向であった。対照として, 2006 年に茨城県にある生物環境研究所の DMI 殺菌剤の散布暦のない試験圃場および 2015 年と 2016 年に DMI 剤の効果低下の報告がなく, 感受性が維持されていると期待される千葉県の栽培圃場から採取した黒星病菌を用いた。

2. 接種源の調整方法

採取した罹病葉, 罹病果の病斑を組織ごとメスで切り取り, 圃場ごとに 50 mL のチューブに入れた。分生子を効率よく回収するためポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート 0.01% 添加した滅菌水を約 20 mL 加えて振とうし, 上清を回収した。これを数回繰り返し, 回収した上清を約 1600 ×g, 5 分間遠心分離して分生子を濃縮し, 滅菌水で洗浄し, 再度濃縮した後, 発病を安定させるためショ糖を 0.1% 添加した 0.01～0.5% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート溶液で孢子懸濁液を約 1×10⁵ 個/ mL の濃度に調製した。長期保存をする場合は孢子懸濁液を約 1×10⁶ 個/ mL の濃度に調製し, -80℃で保存した。使用前日に約 5℃の冷蔵庫で解凍して用いた。

3. 薬剤感受性検定方法

(1) 検定植物

2006 年および 2007 年採取菌の薬剤感受性検定は当年に実施したため, 発芽を遅らせる処理を実施した。1 月にナシ‘幸水’の 1 年生苗木を購入し, 5℃の大型冷蔵庫に保存した。それぞれ 2006 年 4 月 18 日および 2007 年 4 月 19 日に鉢植えにし, 露地で管理した。

2015年および2016年採取菌の薬剤感受性検定では、冷凍保存の分生子を用いた、30 cmポットで育成した1～2年生のナシ‘幸水’を冬期に強剪定し、露地で管理した。

いずれの試験も採取圃場ごとに1区1樹で試験を行った。

(2) 薬剤散布

2006年採取菌の検定では、2006年5月18日に展葉4～5枚期の新梢が3～4本伸長した苗木に実用濃度のフェナリモル（有効成分濃度30 ppm，以下同様），ジフェノコナゾール（25 ppm）および対照として水道水をハンドスプレーで十分量散布した。2007年採取菌の検定では、2007年5月28日に展葉5～6枚期の新梢が3～7本伸長した苗木にジフェノコナゾール（25 ppm），ヘキサコナゾール（10 ppm），フェンブコナゾール（22 ppm），フェナリモル（30 ppm）および対照として水道水を十分量散布した。

2015年採取菌の検定では、翌年の2016年4月18日に展葉5～6枚で新梢伸長中の植物体に2007年と同様の薬剤を十分量散布した。2016年採取菌の検定のうち、5圃場分は後述の代替剤探索試験と同時に実施したため、後述とする。残りの2圃場分について、2018年4月23日にジフェノコナゾール（25 ppm），ヘキサコナゾール（10 ppm）および対照として水道水を十分量噴霧した。

いずれの試験も薬剤の残効期間を考慮して、薬剤散布約2週間後に同じ薬剤を散布した。

(3) 接種方法

2006年および2007年採取菌の検定では、1回目の薬剤散布翌日に約 1×10^5 個/mLに調整した孢子懸濁液をハンドスプレーで苗木1本あたり50 mLを葉の両面に噴霧接種した。接種したナシ苗木は上部を寒冷紗で、側面を農業用塩化ビニルで被覆した高さ約1.8 m×奥行き約2 m×幅約2 mの接種箱に入れた後、ポット上に設置した散水チューブで散水し、2日間室内を高湿度に保った。その後、接種箱から出し、露地条件に置いた。

2015年採取菌および2016年採取菌の検定では、1回目の薬剤散布翌日に $0.2 \sim 2.5 \times 10^5$ 個/mLに調整した孢子懸濁液をハンドスプレーで1本あたり40～50 mLを葉の両面に噴霧接種し、75 Lあるいは90 Lのポリビニル袋で植物体を覆い、高湿度を保った。複数回接種による確実な発病を得るため（永井・三宅 2012），その翌日にも同様な接種を繰り返した。薬剤散布から接種を屋内で実施した。さらに2日後にポリビニル袋を除去し、露地あるいは無加温のガラス室で管理した。

なお、いずれの試験でもナメクジや虫害を防ぐため、適宜殺虫剤の散布を行った。

(4) 発病調査方法

接種4週間後、水処理区で発病が確認された接種時の展開最上位葉以下4～6枚と新た

に展葉した3枚を調査した。調査は発病の有無と下記の発病程度に従って行い、発病度と防除価を算出した。

発病程度（指数：1葉あたりの孢子形成病斑数）

0：発病なし，1：1個，2：2～5個，3：6～20個，4：21～80個，5：81個以上

発病度＝ Σ （発病指数×指数別葉数）／（5×（調査葉数））×100

防除価＝（1-（薬剤処理区の発病度）／（薬剤無処理区の発病度））×100

4. 統計解析

各DMI剤を単年度で調査した2007年と2015年の防除価を比較するため、Box-Cox変換後、Welch検定を実施した。次に、2015年の防除価に後述の2016年の結果を加え、採取菌ごとのジフェノコナゾールとヘキサコナゾールの防除価について相関分析を実施した。さらに、これらの採取菌について、本県主要産地間における薬剤の防除価を比較するため、分散分析を実施し、有意差が見られた場合は更にTukey-KramerのHSD検定で多重比較した。なお、都市近郊でチャの隣接園が多く、チャへのドリフト対策のためDMI剤の多い防除暦を使うC地区はそれ以外の地区と分けた。

結 果

薬剤無処理区における黒星病の初発は接種3週間後頃に確認され、接種4週間後には接種時の最上位展開葉以下4～6枚から新たに展葉した3枚には病斑が多く認められた。2006年採取菌の検定では、薬剤無処理区で発病葉率が59～100%、発病度が32～51と多発生した（Table 10, Fig. 6）。実用濃度で散布したジフェノコナゾール区の発病度は0～9、防除価は80～100で採取圃場によるばらつきは少なく、いずれの圃場から採取したナシ黒星病菌に対しても高い防除効果を示した。一方、フェナリモル区の発病度は15～47であり、防除価は0～67と発病度や防除価のばらつきが大きかった。防除価が比較的高かったナシ黒星病菌は久留米地域U2および久留米地域K1から採取したものであった。

2007年採取菌の検定では、薬剤無処理区の発病葉率が36～79%、発病度が16～32と中発生した（Table 11, Fig. 6）。福岡県内で採取した黒星病菌に対するジフェノコナゾール区の防除価はいずれも100であった。フェナリモル区の発病度は4～12、防除価は35～79でばらつきが大きく、発病度が比較的低く防除価が高かった圃場は朝倉地域A2および久留米地域U3であった。2カ年連続で同一圃場を調査した朝倉地域A1、A2およびC1圃場のジフェノコナゾール区とフェナリモル区の防除価は2006年より高かった。また、2007年は2006年より全体的に発病度が低く、防除価が高い傾向であった。ヘキサコナゾール区の発病度は1～5、防除価は75～96で防除効果を示し、採取圃場によるばらつきは少なかった。また、フェンブコナゾール区の発病度は0～5、防除価は85～100でばらつきは少なく、

飯塚地域 K1 と八女地域 K2 からの菌に対してはヘキサコナゾール区の防除価と同等で、他の 5 圃場についてはさらに効果が高かった。

Table 10 Efficacy of DMI fungicides against *Venturia nashicola* from Fukuoka Prefecture in inoculation tests on *Pyrus pyrifolia* 'Kousui' in 2006

Inoculum ^a		Water control of DS ^b	Control proportion ^c	
Year	Location		Difenoconazole	fenarimol
2006	Asakura A1	34	83	5
2006	Asakura A2	32	100	0
2006	Asakura C1	51	92	21
2006	Kurume U1	46	80	28
2006	Kurume U2	45	94	67
2006	Kurume K1	46	89	61
2006	Kurume K2	50	- ^d	35
2006	Yame T1	32	88	23
2006	Yame K1	46	-	21
2006	Tagawa A1	44	97	52
2006	Keichiku Y1	48	-	22

^a Inocula from Fukuoka Prefecture were collected from commercial orchards in Asakura, Kurume, Yame, Tagawa, and Keichiku in 2006.

^b DS, disease severity is expressed as the mean proportion of leaves with severity (S) scores. Calculated by $\Sigma (\text{number of diseased leaves} \times \text{S score}) / (\text{total number of leaves} \times 5) \times 100$.
S score: 0 = no visible spots; 1 = 1 spots; 2 = 2–5 spots; 3 = 6–20 spots; 4 = 21–80 spots; 5 \geq 81 spots.

^c CP, control proportion is expressed as the value calculated by $[1 - \text{DS of treatment with fungicide} / \text{DS of water (control)}] \times 100$.

^d Not tested.

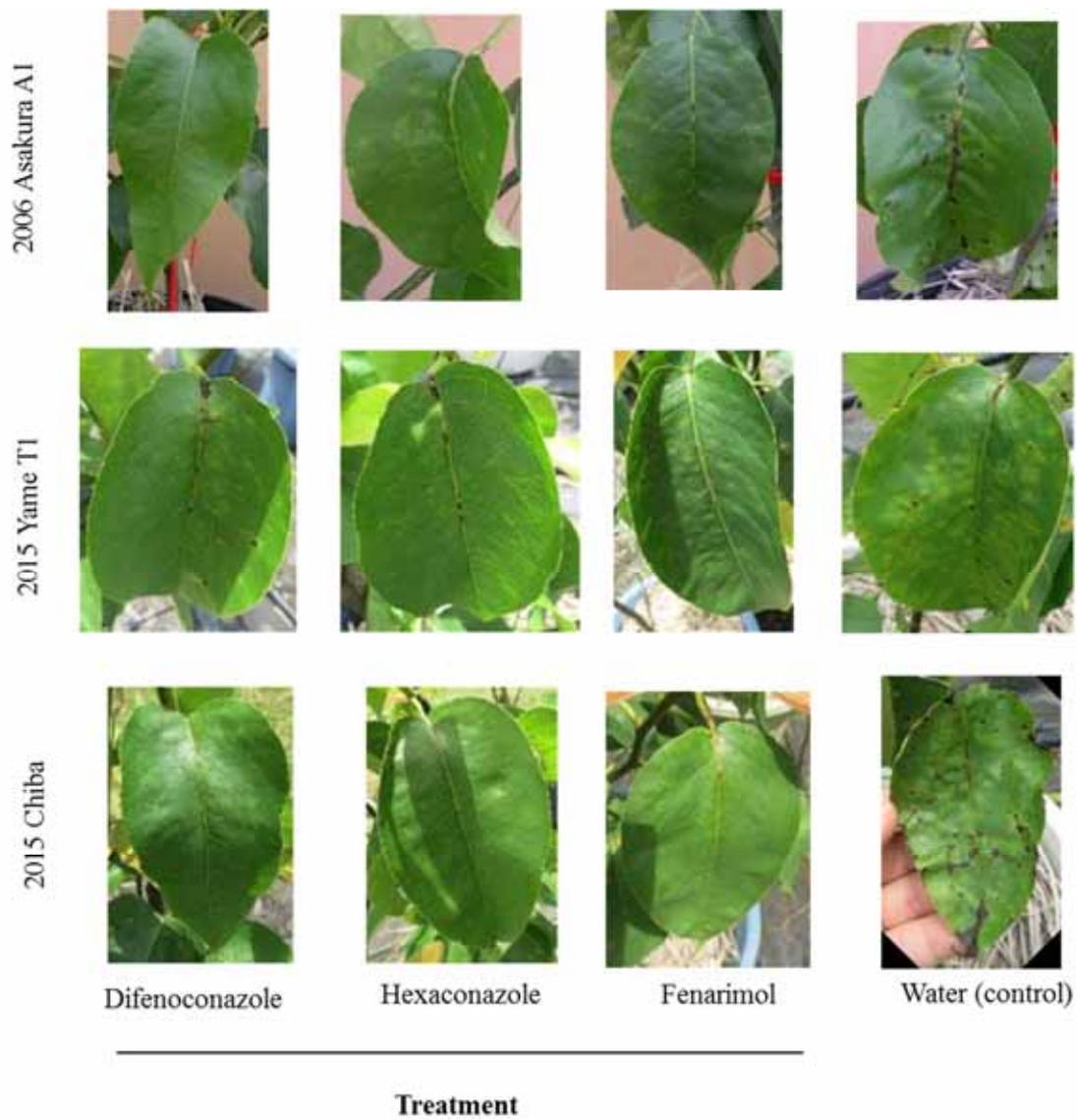


Fig. 6 Symptoms of DMI fungicide resistance in the populations of *Venturia nashicola* from Fukuoka Prefecture on Japanese pear leaves in 2006, Asakura A1, and 2015, Yame T1, compared with that in fungicide-sensitive population from Chiba Prefecture in 2015

Table 11 Efficacy of DMI fungicides against *Venturia nashicola* from Fukuoka Prefecture in inoculation tests on *Pyrus pyrifolia* 'Kousui' in 2007.

Inoculum ^a		DS of water control	Control proportion ^c			
Year	location		Difenoconazole	Hexaconazole	Fenbuconazole	Fenarimol
2006	Ibaraki	21	100	100	100	100
2007	Asakura A1 ^b	16	100	77	91	35
2007	Asakura A2	19	100	75	100	79
2007	Asakura A3	23	- ^d	96	-	50
2007	Asakura C1	21	100	85	100	46
2007	Kurume U3	31	100	93	100	77
2007	Kurume U4	32	100	90	94	65
2007	Iizuka K1	30	100	89	85	62
2007	Yame K2	31	100	88	89	61

^a Inocula from Fukuoka Prefecture were collected from commercial orchards in Asakura, Kurume, Iizuka, and Yame, in 2007. The inoculum from Ibaraki Prefecture was collected from the experimental orchard at the National Institute for Agro-Environmental Sciences in 2006, where no DMI fungicides had been sprayed.

^b DS, disease severity is expressed as the mean proportion of leaves with severity (S) scores. Calculated by Σ (number of diseased leaves \times S score)/(total number of leaves \times 5) \times 100. S score: 0 = no visible spots; 1 = 1 spots; 2 = 2–5 spots; 3 = 6–20 spots; 4 = 21–80 spots; 5 \geq 81 spots.

^c CP, control proportion is expressed as the value calculated by $[1 - \text{DS of treatment with fungicide} / \text{DS of water (control)}] \times 100$.

^d Not tested.

2015年採取の検定では、水処理区の発病度は45～91でいずれの接種源も薬剤の防除効果を判定するために十分な発病を得た (Table 12, Fig. 6). ジフェノコナゾールの防除価は26～100で、大きく感受性が低下した採取菌から、2006～2007年と同様に感受性が維持された採取菌まで、採取圃場により大きく異なった。特に、防除価が低い八女地域 C1 および T2 の採取菌はヘキサコナゾールの防除価を下回った。ヘキサコナゾールの防除価は43～85 (平均 63.6)、フェンブコナゾールの防除価は26～44 (平均 34.9) およびフェナリモルの防除価は31～50 (平均 40.4) で、2007年の調査時より有意に減少していた ($P < 0.05$)。また、感受性が維持されていると期待される対照の千葉県採取菌の各 DMI 剤防除価は75～95でテブコナゾールがやや低かったが、2007年に調査した感受性菌と同様に防除効果が高かった。

2016年採取の検定では、水処理区の発病度は24～68でいずれの接種源も薬剤の防除効果を判定するために十分な発病を得た (Table 13). ジフェノコナゾールの防除価は20～92、ヘキサコナゾールの防除価は14～100で2015年と同様な傾向であった。

2015年および2016年のジフェノコナゾールとヘキサコナゾールの防除価に有意な正の相関の傾向がみられ、交差耐性があることが示された ($y = 0.47x + 29.1, r^2 = 0.3944, P = 0.004$) (Fig. 7). 多くの採取菌でジフェノコナゾールの防除価はヘキサコナゾールの防除価を上回り、不完全な交差耐性を示した。回帰式から、ジフェノコナゾールの防除価が54.9以下ではヘキサコナゾールの防除価を下回り、ジフェノコナゾールの防除価が低い採取菌はヘキサコナゾールの防除価を下回る傾向があった。

2015年および2016年のジフェノコナゾールとヘキサコナゾールの防除価と地域との関連性を統計解析した (Table 14). 八女地域 C 地区におけるジフェノコナゾールの防除価は、八女地域以外の地域に対して有意に低かった。一方、ヘキサコナゾールの防除価は地域間に有意差は見られなかったものの、八女地域 C 地区では低い傾向であった。

Table 12 Efficacy of DMI fungicides and others against *Venturia nashicola* in inoculation tests on *Pyrus pyrifolia* ‘Kousui’ in 2016

Year	Location	DS of water		Control proportion ^c						
		control ^b	DS of water	Difenoconazole	Hexaconazole	Fenbuconazole	Fenarimol	Tebuconazole	Mandestrobin	
2015	Chiba	66	95	97	94	83	75	100		
2015	Asakura A4	91	73	48	44	41	42	80		
2015	Asakura A5	45	58	52	- ^d	-	-	-		
2015	Asakura C3	79	93	61	-	-	-	-		
2015	Iizuka K2	83	93	70	-	-	-	-		
2015	Iizuka K3	61	62	71	-	-	-	-		
2015	Kurume K3	45	80	67	-	-	-	-		
2015	Kurume U5	68	89	62	-	-	-	-		
2015	Kurume U6	65	84	69	26	50	46	99		
2015	Minamichikugo O1	46	100	61	-	-	-	-		
2015	Tagawa A2	63	97	78	-	-	-	-		
2015	Yame C1	55	26	43	-	-	-	-		
2015	Yame H1	61	83	85	-	-	-	-		
2015	Yame T2	70	31	62	35	31	72	99		
Ave. 2015 (number of tests)			74.4 (13)	63.6 (13)	34.9(3)	40.4(3)	53.3(3)	92.7(3)		
Ave. 2007 (number of tests)			100.0 (7)	86.6 (8)	94.1(7)	59.4(8)				
Welch test ^e			**	**	**	*				

^a Inocula from Fukuoka Prefecture were collected from commercial orchards in Asakura, Kurume, Iizuka, Yame, and Minamichikugo in 2015. The inoculum as control was collected from a commercial orchard in Chiba Prefecture in 2015.

^b DS, disease severity is expressed as the mean proportion of leaves with severity (S) scores. Calculated by Σ (number of diseased leaves \times S score)/(total number of leaves \times 5) \times 100. S score: 0 = no visible spots; 1 = 1 spots; 2 = 2–5 spots; 3 = 6–20 spots; 4 = 21–80 spots; 5 \geq 81 spots.

^c CP, control proportion is expressed as the value calculated by [1- DS of treatment with fungicide/DS of water (control)] \times 100.

^d Not tested.

^e Significant differences between mean DS values in 2015 and in 2007 are marked * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$) by Welch’s test.

Table 13 Efficacy of DMI fungicides and others against *Venturia nashicola* in inoculation tests on *Pyrus pyrifolia* ‘Kousui’ in 2017

Inoculum ^a		Control proportion ^c								
Year	Location	DS ^b of water control	Difenoconazole	Mandestrobin	Thiram	Iminoctadine albesilate	Difenoconazole + Thiram	Mandestrobin + Thiram	Mandestrobin + Iminoctadine albesilate	Hexaconazole
2016	Chiba	66	100	90	- ^d	-	-	-	-	100
2016	FARC	48	82	76	-	-	-	-	-	43
2016	Yame C2	59	20	-	-	-	-	-	-	14
2016	Yame C3	65	45	-	-	-	-	-	-	43
2016	Kurume U7	66	92	70	74	54	97	94	92	82
2016	Asakura A5	24	88	38	1	34	92	100	100	100
2016	Iizuka K2	36	83	74	89	100	93	100	100	45
2016	Yame T3	68	46	100	74	93	88	95	89	67
Statistics analysis ^e							$P < 0.001$	$P < 0.038$	$P = 0.063$	
							$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	

^a Inocula from Fukuoka Prefecture were collected from commercial orchards in Asakura, Kurume, Iizuka, and Yame and from the experimental orchard in the Fukuoka Agricultural and Forest Research Center (FARC) in 2016. The inoculum as control was collected from the commercial orchard in Chiba Prefecture in 2016.

^b DS, disease severity is expressed as the mean proportion of leaves with severity (S) scores. Calculated by Σ (number of diseased leaves \times S score)/(total number of leaves \times 5) \times 100. S score: 0 = no visible spots; 1 = 1 spots; 2 = 2–5 spots; 3 = 6–20 spots; 4 = 21–80 spots; 5 \geq 81 spots.

^c CP, control proportion is expressed as the value calculated by $[1 - DS \text{ of treatment with fungicide} / DS \text{ of water (control)}] \times 100$.

^d Not tested.

^e An ordered logistic regression analysis was calculated to compare DS based on treatment with difenoconazole + thiram and difenoconazole (upper column) or thiram (lower column), and mandestrobin + multi-site inhibitor fungicides and mandestrobin (upper column) or multi-site inhibitor fungicides (lower column).

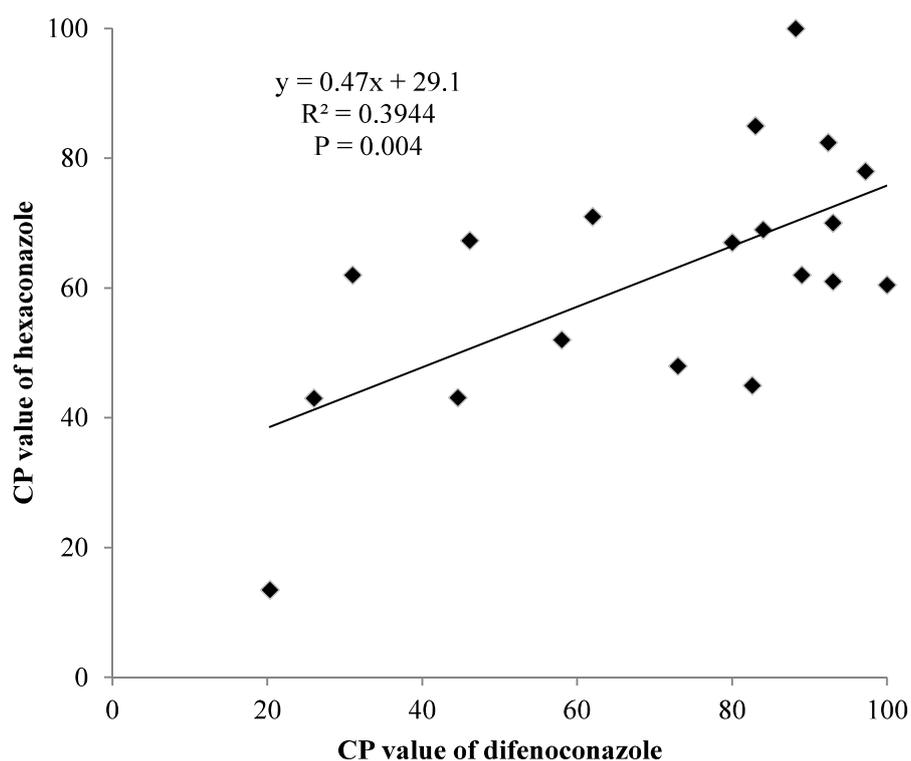


Fig. 7 Relationship between control proportion (CP) values of efficacy of difenoconazole and hexaconazole in *in vivo* test against *Venturia nashicola* from the orchards in Fukuoka Prefecture in 2015 to 2016

Table 14 Comparison among regions by efficacy of difenoconazole and hexaconazole against *Venturia nashicola* collected from the orchards in Fukuoka Prefecture from 2015 to 2016 *in vivo* tests

Region	Number of tests	Average of CP ^a value of difenoconazole	Average of CP value of hexaconazole
Asakura	4	78.1 a ^b	65.3 a
Iizuka	3	79.2 a	60.0 a
Kurume	4	86.4 a	70.1 a
Yame excepted C area	3	53.4 ab	71.4 a
Yame C area	3	30.3 b	33.2 a
ANOVA		$P = 0.009$	$P = 0.093$

^a CP, control proportion

^b Same letters indicate that mean CP values are not significantly different according to the Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$) with data transformed by Box-Cox transformation after an ANOVA.

1.2.2 薬剤耐性菌発生リスク管理と代替剤の検討

2006年および2007年に本県の栽培園地から採取したナシ黒星病菌ではDMI剤に対する感受性が低下していることが明らかとなった。薬剤耐性菌リスク管理の一つとして、耐性菌発生リスクのある薬剤に耐性菌の発生リスクの低い多作用点阻害剤を混合して使用することが推奨されている（FRAC 2010）。さらに、ジフェノコナゾールにイミノクタジンアルベシル酸塩を混用すると防除効果が向上することが報告されている（井手 2009）。ここでは、DMI剤と多作用点阻害剤の混用の防除効果について検討し、近年、ナシ黒星病に登録された薬剤から代替剤の探索を行った。さらに、これら特異作用点阻害剤は耐性菌発生リスクがあるため、多作用点阻害剤との混用効果についても検討した。

材料と方法

1. 接種源

2006年採取菌による試験では、前項の薬剤感受性検定で使用した朝倉地域A1圃場採取菌を用いた。2016年採取菌による試験では、前述した採取菌のうち4地域4圃場と福岡県農林業総合試験場試験圃場のものを用いた。

2. 薬剤感受性検定方法

検定植物、薬剤散布および接種方法は前項の薬剤感受性検定に準じた。検定植物として、30 cmポットで育成した1~2年生のナシ‘幸水’を冬期に強剪定し、露地で管理した。

2006年採取菌による試験では、2007年4月11日に展葉5~6枚の植物体にジフェノコナゾール（有効成分濃度25 ppm，以下同様）、ヘキサコナゾール（10 ppm）、イミノクタジンアルベシル酸塩（400 ppm）、ヘキサコナゾール（10 ppm）とイミノクタジンアルベシル酸塩（400 ppm）の混合物および対照として水道水をハンドスプレーで十分量散布した。4月26日にも同様の薬剤を追加散布した。薬剤散布翌日に約 3×10^4 個/mLに調製した分生子懸濁液をハンドスプレーで1本あたり50 mlを噴霧した。ただちに大型のビニル製の接種箱で覆い、高湿度を保った。その2日後に接種箱を除去し、露地で管理した。1区1鉢とし、1薬剤につき3反復実施した。

2016年採取菌による試験では、2017年4月20日に展葉5~6枚で新梢伸長中の植物体にジフェノコナゾール（25 ppm）、ヘキサコナゾール（10 ppm）、マンデストロビン（133 ppm）、イミノクタジンアルベシル酸塩（200 ppm）、チウラム（800 ppm）、マンデストロビン（133 ppm）とイミノクタジンアルベシル酸塩（200 ppm）の混合物、マンデストロビン（133 ppm）とチウラム（800 ppm）の混合物、ジフェノコナゾール（25 ppm）とチウラム（800 ppm）の混合物および対照として水道水をハンドスプレーで十分量散布した。薬剤散布4日後の

4月24日に2016年に採取した分生子懸濁液を $0.3\sim 1\times 10^5$ 個/mLに調整し、ハンドスプレーで1植物体あたり40mlを噴霧した。翌日に同様の接種を行い、ただちに70Lあるいは90Lのビニル袋で覆い、その2日後に除去した。その後、無加温のガラス室で管理した。1薬剤につき1反復実施した。

3. 調査方法

2006年採取菌の試験では、接種4週間後に最上位展開葉以下5枚と上位2枚について、2016年採取菌の試験では、接種約5週間後に接種時の最上位展開葉以下5葉のうち、薬剤散布時に展葉していた葉について、前項の薬剤感受性検定の調査方法に準じて調査した。

4. 統計解析

DMI剤あるいはQoI剤と多作用点阻害剤の混用効果について、それぞれの単剤と混用の発病指数を基に、順序ロジスティック回帰分析により比較した。

結 果

水処理区の発病度は56.7で多発生した (Table 15)。ジフェノコナゾールおよびジフェノコナゾールとイミノクタジンアルベシル酸塩の混用の防除価は100で、ジフェノコナゾール単剤の防除効果が高く、混用による効果の向上は判然としなかった。ヘキサコナゾールの防除価は74.2、イミノクタジンアルベシル酸塩の防除価は84.9、これらの混用の防除価は97.2でそれぞれの単剤より高かった ($P < 0.001$)。

水処理区の発病度は24~68で中~多発生した (Table 13)。福岡県採取菌に対するジフェノコナゾールの防除価は46~92、ヘキサコナゾールの防除価は45~100、マンデストロビンの防除価は38~100、イミノクタジンアルベシル酸塩の防除価は34~100、チウラムの防除価は1~89で、採取圃場間でばらつきが見られた。ジフェノコナゾール単剤の防除価と比較して、ジフェノコナゾールとチウラムの混用の防除価は88~97で高かった ($P < 0.001$)。マンデストロビン単剤の防除価と比較して、マンデストロビンとイミノクタジンアルベシル酸塩の混用の防除価は89~100で統計的な有意差は見られないが高い傾向がみられ ($P = 0.063$)、マンデストロビンとチウラムの防除価は94~100で有意に高かった ($P = 0.038$)。

Table 15 Efficacy of DMI fungicides mixed with others against *Venturia nashicola* in inoculation tests on *Pyrus pyrifolia* ‘Kousui’ in 2007

Year	Location	Inoculum ^a		Control proportion ^c			
		DS of water control ^b	DS of water control ^b	Difenoconazole + Iminoctadine albesilate	Difenoconazole + Iminoctadine albesilate	Hexaconazole + Iminoctadine albesilate	Hexaconazole + Iminoctadine albesilate
2006	Asakura A1	56.7	100	100	74.2	97.2	84.9
Statistics analysis ^e							
$P < 0.001$							
$P < 0.001$							

^a Inocula were collected from commercial orchards in Asakura of Fukuoka Prefecture in 2006.

^b DS, disease severity is expressed as the mean proportion of leaves with severity (S) scores. Calculated by Σ (number of diseased leaves \times S score)/(total number of leaves \times 5) \times 100. S score: 0 = no visible spots; 1 = 1 spots; 2 = 2–5 spots; 3 = 6–20 spots; 4 = 21–80 spots; 5 \geq 81 spots.

^c CP, control proportion is expressed as the value calculated by $[1 - DS \text{ of treatment with fungicide} / DS \text{ of water (control)}] \times 100$.

^d Spraying fungicides post 4 days inoculation.

^e An ordered logistic regression analysis was calculated to compare DS based on treatment with hexaconazole + iminoctadine albesilate and hexaconazole (upper column) or iminoctadine albesilate (lower column).

1.2.3 圃場における各種薬剤の防除効果

ナシ黒星病に対する各種 DMI 剤の防除効果は感受性菌では非常に優れていた（梅本 1993, 富田ら 2003）。一方, 耐性菌発生圃場における DMI 剤の防除効果は未検討である。また, 苗木による接種試験で選抜した代替剤や多作用点阻害剤との混用についても, 圃場における検討が必要である。本項では, DMI 剤感受性低下が確認された試験圃場で各種 DMI 剤および代替剤候補のマンドストロビンを使用した薬剤防除体系の効果を調査した。

材料と方法

2016 年および 2017 年に筑紫野市農林業総合試験場内圃場 B で試験を実施した。この圃場から採取したナシ黒星病菌を用いた接種試験は前項で実施され, ジフェノコナゾールとヘキサコナゾールの防除価はそれぞれ, 82 と 43 (水処理区の発病度 48) で DMI 剤に対する感受性が低下していた (Table 13)。約 3.5×4m 間隔で植栽された露地栽培の‘幸水’と‘豊水’の約 30 年生樹を試験に用いた。1 区 1 樹, ‘幸水’ 2 反復, ‘豊水’ 1 反復で行った。

2016 年の試験では, DMI 剤のジフェノコナゾール (有効成分濃度 25 ppm, 以下同様), ヘキサコナゾール (20 ppm), テブコナゾール (50 ppm), および多作用点阻害剤のチウラム (400 ppm) を開花初期から約 10 日間隔で 3 回 (4 月 5 日, 15 日および 26 日) に動力噴霧器を用い, 500 L/10 a 換算量を散布した。また, 満開期 (4 月 11 日) に, 無処理区を含めた試験区全体にイミノクタジンアルベシル酸塩 (200 ppm) を散布した。最終散布日から 15 日後の 5 月 11 日に 1 樹当たり 200 葉の発病の有無を調査した。

2017 年はマンドストロビンを中心とした防除体系試験を行った。マンドストロビン体系, ジフェノコナゾール体系およびチウラム混用体系を設定し, それぞれに, 開花前の 4 月 5 日にマンドストロビン (133 ppm), ジフェノコナゾール (25 ppm), マンドストロビン (133 ppm) とチウラム (800 ppm) の混合物をそれぞれの体系区に散布した。さらに, 満開期の 4 月 13 日に無処理区を含めたすべての区にイミノクタジンアルベシル酸塩 (400 ppm) を散布し, 落弁期の 4 月 19 日にマンドストロビン体系とジフェノコナゾール体系にはジフェノコナゾール, チウラム混用体系にはジフェノコナゾールとチウラムの混用を 500 L/10 a 換算量を動力噴霧器で散布した。最終散布日から 19 日後の 5 月 8 日に 1 樹当たり 200 葉の発病の有無を調査した。

薬剤間の組み合わせそれぞれについて, 豊水と幸水で層別化し, いずれの層でも関連性があるか検定できる Cochran-Mantel-Haenszel 検定を行い, Bonferroni-Holm 法で多重解析を行った。

結 果

2016年の試験では、‘幸水’と‘豊水’の無処理区の発病葉率はそれぞれ、10.5%と45.5%であり、薬剤の防除価を評価するのに十分な発病があった (Table 16)。DMI 剤の防除価はジフェノコナゾール区 (‘幸水’で87.6, ‘豊水’で74.7, 以下同順), ヘキサコナゾール区 (73.3, 59.3), テブコナゾール区 (66.7, 33.0) の順に高かった ($P < 0.05$)。チウラム区の防除価 (6.7, 57.1) はジフェノコナゾール区やヘキサコナゾール区より低く ($P < 0.05$), テブコナゾールと有意差が無かった。また、発病が低い幸水で防除価が高い傾向があった。

2017年の体系防除試験では、‘幸水’と‘豊水’の無処理区の発病葉率はそれぞれ、5.0%と46.0%であり、薬剤の防除価を評価するのに十分な発病があった (Table 17)。ジフェノコナゾール体系区の防除価は (60.0, 71.7) はマンデストロビン体系区 (75.0, 87.0) およびチウラム混用体系区 (95.0, 83.7) より低かった ($P < 0.05$) が、マンデストロビン体系区とチウラム混用体系区に有意差はみられなかった。

Table 16 Field performance of DMI fungicides and against Japanese pear scab on *Pyrus pyrifolia* ‘Kousui’ and ‘Housui’ in the experimental orchard in 2016

Treatment ^a	‘Kousui’			‘Housui’			Statistics analysis ^d
	Number of leaves	DI ^b (%)	CP ^c	Number of leaves	DI (%)	CP	
Difenoconazole	400	1.3	87.6	200	11.5	74.7	a
Hexaconazole	400	2.8	73.3	200	18.5	59.3	b
Tebuconazole	400	3.5	66.7	200	30.5	33.0	c
Thiram	400	9.8	6.7	200	19.5	57.1	c
Control	400	10.5	-	200	45.5	-	d

^a Spraying difenoconazole (a.i. 25 ppm), Hexaconazole (a.i. 10 ppm), Tebuconazole (a.i. 50 ppm), and Thiram (a.i. 400 ppm) at 5 April, 15 April and 26 April in 2016

^b DI, disease incidence is expressed as the percentage of infected leaves. Two trees of ‘Kousui’ and one tree of ‘Housui’ were observed per treatment, with 200 leaves assessed per tree.

^c CP, Control proportion is expressed as the value calculated by $[1 - \text{DI of treatment with fungicide} / \text{DI of no treatment (control)}] \times 100$.

^d Same letters indicate that DI values of ‘Kousui’ and ‘Housui’ are not significantly different according to the Bonferroni-Holm test ($P < 0.05$) after Cochran–Mantel–Haenszel test.

Table 17 Field performance of fungicide spray program using mandestrobin, difenoconazole and thiram against Japanese pear scab on *Pyrus pyrifolia* ‘Kousui’ and ‘Housui’ in the experimental orchard in 2017

Fungicide spray program	‘Kousui’			‘Housui’			Statistics analysis ^f
	Number of leaves	DI ^d (%)	CP ^e	Number of leaves	DI (%)	CP	
Combination ^a	400	1.3	75.0	200	6.0	87.0	a
Combination + thiram ^b	400	0.3	95.0	200	7.5	83.7	a
Difenoconazole ^c	400	2.0	60.0	200	13.0	71.7	b
Control	400	5.0	-	200	46.0	-	c

^a Spraying mandestrobin (a.i. 133 ppm) at 5 April, and difenoconazole (a.i. 25 ppm) at 19 April.

^b Spraying a mixture of mandestrobin (a.i. 133 ppm) and thiram (a.i. 400 ppm) at 5 April, and a mixture of difenoconazole (a.i. 25 ppm) and thiram (a.i. 400 ppm) at 19 April.

^c Spraying difenoconazole (a.i. 25 ppm) at 5 April, and 19 April.

^d DI, disease incidence is expressed as the percentage of infected leaves. Two trees of ‘Kousui’ and one tree of ‘Housui’ were observed per treatment, with 200 leaves assessed per tree.

^e CP, control proportion is expressed as the value calculated by $[1 - \text{DS of treatment with fungicide} / \text{DS of no treatment (control)}] \times 100$.

^f Same letters indicate that DI values of ‘Kousui’ and ‘Housui’ are not significantly different according to the Bonferroni-Holm test ($P < 0.05$) after Cochran–Mantel–Haenszel test.

1.2.4 考察

福岡県におけるナシ黒星病の初発時期は5月上旬頃で、芽基部、果叢葉および幼果に発生し、分生子を採取できる時期は発病が多くなる5月中旬以降である。通常、露地栽培で管理された苗木の果叢葉や新梢葉における本病に感受性が最も高い時期は展葉期の4月であり、5月中旬には葉の硬化により感受性が低下している。このため、分生子の採取時期に感受性の高いナシ苗木を用意することが困難で、生物検定の実施が翌年以降になる。本試験では苗木の冷蔵保存による発芽時期の調整を試みた結果、黒星病菌の採取時期にあたる5月中旬に感受性の高い葉を展葉させることで当年の試験実施が可能になり、感受性検定の迅速化が図られた。

茨城県由来の黒星病菌はDMI剤の散布実績がない圃場から2006年に採取されたものであり、今回調査したすべてのDMI剤に感受性が高かった。これに対して、福岡県で2006年と2007年に計19圃場から採取された黒星病菌はすべてフェナリモル感受性が低く、耐性菌が広く分布していることが推察された。今回調査した圃場は生産者圃場で通常の防除が行われ、ジフェノコナゾールを中心として年間3~6回のDMI剤が使用されていたが、天候不順により本病が多発した。オーストリアやカナダでは本菌の近縁種であるリンゴ黒星病菌に対して、DMI剤が年間数回連用された結果、効果の低下を伴う耐性菌が出現した(Hildebrand *et al.* 1988, Hermann *et al.* 1989)。ナシ黒星病で防除効果の低下を伴うDMI剤耐性菌の出現は福岡県におけるものが最初である(石井ら 2007, 石井・菊原 2007a, 石井・菊原 2007b)。しかし、いずれの試験においてもジフェノコナゾールの防除効果は高く、またヘキサコナゾールやフェンブコナゾールの防除効果はフェナリモルより高かった。DMI剤に対する耐性菌が他のDMI剤に必ずしも同程度の交差耐性を示さない例はオオムギうどんこ病菌(Hollomon & Butters 1991)などで知られており、ナシ黒星病菌においても交差耐性は不完全であった。

フェナリモル耐性菌が確認されてから、約10年後の2015年にDMI剤の感受性検定を再度実施した。その間もDMI剤は本病に対する基幹防除剤として使用された。2015年に採取されたナシ黒星病菌におけるジフェノコナゾール、ヘキサコナゾール、フェンブコナゾールおよびフェナリモルに対する防除価は全体的に2007年より低く、薬剤感受性の低下が進行していた。また、ジフェノコナゾールの防除価はヘキサコナゾールの防除価と正の相関がみられたものの、全体的に上回るものが多く、不完全な交差耐性が再確認された(Fig. 7)。一方、2015年の八女地域T2圃場採取菌のようにジフェノコナゾールの防除価よりヘキサコナゾールの防除価が高い事例がいくつか確認された(Table 12, 13)。2007年までの採取菌の試験結果及び長野県の試験結果(岩波 2016)では、ジフェノコナゾールの防除価がヘキサコナゾールの防除価を上回っていた。交差耐性が不完全な理由として、薬剤間に病原菌細胞への浸透程度の違いや標的酵素への親和性の違いが推論された(石井・菊原

2007a). 一方、リンゴ黒星病菌ではミクロブタニル低感受性かつジフェノコナゾール感受性菌株が存在するが、薬剤感受性がその逆の菌株も存在することから、薬剤感受性を低下させるメカニズムが両者で異なることが推察された (Villani *et al.* 2015, 2016). ナシ黒星病菌でも同様に DMI 剤の感受性を低下させるメカニズムが複数存在する可能性が考えられた。

2015 年の八女地域 C 地区採取菌はジフェノコナゾールの感受性が他地域より低く、ヘキサコナゾールの感受性も低い傾向であった (Table 14). C 地区の 3 圃場と同様にこの地区に多いチャの隣接圃場では、ナシの防除薬剤のドリフト対策のため、チャに登録のある薬剤で防除を実施している。一般的に、薬剤耐性菌発生リスク管理は、特定の農薬の連続散布の回避、使用回数の制限および耐性菌リスクの低い薬剤との混用散布である (FRAC 2010, 2018b, JFRAC 2017a). チャに登録のある DMI 剤は複数あるが、耐性菌発生リスクの低い多作用点剤阻害剤は限られるため、DMI 剤偏重の防除が実施され、耐性菌リスク管理は十分に実施されていなかった。一方、C 地区以外の八女地域の採取菌では、ジフェノコナゾールの感受性はやや低いものの、ヘキサコナゾールの感受性と同様に維持されていた。八女地域の防除暦では、2013 年からジフェノコナゾールとチウラムの混用が掲載され、耐性菌発生リスク管理が行われた。また、朝倉地域では 2009 年から 2011 年まで、久留米地域と飯塚地域では少なくとも 2011 年から耐性菌発生リスク管理が行われた。福岡県における耐性菌発生リスク管理はナシに DMI 剤が使用されてから 20 年経過した後に開始された。他方、千葉県では DMI 剤の使用開始当初から耐性菌発生リスク管理が指導され (梅本 1993)、現在まで DMI 剤の効果低下の報告はなく、本試験で対照に使用された 2015 年および 2016 年の千葉県の生産者圃場採取菌も感受性が維持されていた。本県では、DMI 剤の防除効果は本来より減退したものの、地域によっては非 DMI 剤より高く、さらに、多作用点阻害剤との混用により向上するため (Table 13)、現在でも DMI 剤の使用が継続されている。

2007 年にヘキサコナゾールに対して感受性が低下したナシ黒星病菌を用い、ヘキサコナゾールとイミノクタジンアルベシル酸塩との混用効果を調査した結果、防除効果の向上が認められた (Table 15)。さらに、2016 年にジフェノコナゾールに対して感受性が低下した黒星病菌を用い、ジフェノコナゾールとチウラムとの混用効果を調査した結果、防除効果の向上が認められ、イミノクタジンアルベシル酸塩との混用も防除効果が向上する傾向があった (Table 13)。DMI 剤耐性菌が確認されていない圃場試験でジフェノコナゾールとイミノクタジンアルベシル酸塩の混用において防除効果の向上が報告されている (井手ら 2007, 2009)。チウラムは孢子発芽抑制効果があり、DMI 剤は菌糸生育抑制効果がある。作用の異なる複数の薬剤の混用は相乗効果が現れる可能性がある (FRAC 2010)。

苗木を用いた感受性検定試験で低感受性菌が存在していることが示された福岡県農

林業総合試験場の実験圃における DMI 剤の防除効果は低かった（ジフェノコナゾールの防除価 74.7～87.6，ヘキサコナゾールの防除価 59.3～73.3）。富田ら（2003）が実施した圃場試験では DMI 剤の防除効果は非常に高かった（ジフェノコナゾールの防除価 95，ヘキサコナゾールの防除価 94）。苗木による DMI 剤感受性検定の結果は採取圃場における DMI 剤の防除効果と一致すると推察され、本県に圃場で防除効果低下を引き起こす DMI 剤耐性菌が広く存在していることが推察された。

DMI 剤耐性菌に対してマンデストロピンの防除効果は優れ、さらにマンデストロピンとチウラムの混用の防除効果が優れた。圃場試験では、混用効果による向上が確認されなかったが、耐性菌発生リスクが存在する薬剤には、その対策として多作用点阻害剤との混用は必要である（FRAC 2010）。

ナシ黒星病菌の DMI 剤に対する感受性低下とマンデストロピンが代替剤として有望であることを 2016 年に普及指導員に報告し、防除暦の変更を促した。ただし、耐性菌発生リスク管理を考慮し、年 1 回を推奨した。2017 年に少なくとも主要 4 地域の防除暦にマンデストロピンが掲載された。ナシ黒星病は生育期間を通じて防除が必要であるため、十数回使用される防除薬剤のうち、代替剤が 1 回使用されても劇的な防除効果の向上は見込められない。本病を持続的かつ安定的に防除するため、第一次伝染源除去を目的とした落葉の処理（梅本 1993）などの耕種的防除、開花期前後の伝染源を減らす萌芽期および秋期防除（梅本 1993，井手ら 2003）および薬剤の防除価を向上させる適切なスピードスプレーヤーの走行法（井手・田代 2007）の実施等、総合的な防除対策を実施する必要がある。

第2章 ブドウ病害における QoI 剤耐性菌の発生と防除対策

2.1 ブドウ褐斑病

ブドウ褐斑病は *Pseudocercospora vitis* により引き起こされる病害で、ブドウ (*Vitis* spp.) の葉に褐色の斑点を形成した後、黄変落葉させ (Fig. 8)、樹勢の低下を引き起こす (佐久間, 2004; 富樫, 1950)。福岡県における本病の発生は、1960 年代頃まで多発傾向が続いていたが、マンゼブなどの効果の高い化学合成農薬が使用されるようになると、次第に減少していった。ところが、2000 年代になると本県をはじめ西日本各地の施設栽培で多発し、問題になってきた (井上 2009a)。岡山県において発生要因の調査が行われ、2006 年に採取された分離菌株から基幹防除剤の QoI 剤耐性菌が確認された (神谷ら 2008, 井上 2009a, 宮本ら 2010)。そのため、本県における多発の一因が QoI 剤に対する耐性の発達と考えられた。

薬剤感受性検定法は植物体を用いた生物検定法や遺伝子検定法などがあるが、多数の菌株の検定には最小生育阻止濃度 (MIC) で判別する寒天平板希釈法が優れる。ナスすずかび病菌 (*Mycovellosiella natrassii* Deighton) では QoI 剤を培地に添加するだけで MIC による感受性の判別が可能である (矢野・川田 2003)。一方、他の多くの菌は QoI 剤でミトコンドリア呼吸鎖の複合体 III タンパク質を阻害すると、代替経路で alternative oxidase (AOX) が働き始めるため、MIC による判別が困難になる (石井 1999)。そこで、井上 (2009b) は灰色かび病菌などで MIC により感受性を判別するときを使用される AOX 阻害剤の一種である没食子酸 *n*-プロピルを添加することで、褐斑病菌の MIC による判別を可能にした。本研究では、その寒天平板希釈法を実施したが、生物検定で感受性菌株でも検定培地上でわずかに菌糸が生育するなど、MIC による判別が困難であった。一方、渡辺 (2009) は、トマト葉かび病菌 (*Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous) において、同様の問題点を改善するため、通常検定培地への植菌に用いられる菌叢ディスクに代えて、菌糸磨砕液を用いることで、MIC による判別を可能にした。

ここでは、まず、渡辺 (2009) の方法を参考に既報の寒天平板希釈法 (井上 2009b) を改良した。つぎに、本県内における QoI 剤感受性の実態調査を行った。さらに、耐性菌を用いた接種試験により、代替薬剤を探索した。最後に、QoI 剤を始めとする各種薬剤の防除効果を検証するため、耐性菌発生圃場における薬剤防除試験を実施した。



Fig. 8 Symptoms of grapevine leaf spot on the leaves by *Pseudocercospora vitis*

2.1.1 薬剤感受性検定方法の改良

材料と方法

1. 供試菌株

感受性の明らかな指標菌株を得るため、罹病葉採取当年の 2007 年に QoI 剤の使用履歴があり、耐性菌が含まれる可能性が高い 4 圃場、八女地域 N、飯塚地域 P、朝倉地域 S、朝倉地域 H から分離された菌株の中から、分生子形成が確認された 4 菌株 (07KN4, 07NP6, 07AS7, 07AH7) と、罹病葉採取当年の 2008 年に QoI 剤の使用履歴が無く、感受性菌が含まれる可能性が高い久留米地域 T の圃場の分離菌株のうち、分生子形成が確認された 7 菌株 (08T1, 08T4, 08T5, 08T6, 08T7, 08T8, 08T9) を選んだ。菌株の分離は以下の手順で行った。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、ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA ; ジャガイモ 200 g の煎汁, ブドウ糖 20 g, 寒天 18 g, 蒸留水で合計 1 L に調整) に移植し、分離菌株とした。さらに、QoI 剤登録前に島根県で分離され、農業生物資源ジーンバンクから分譲された MAFF 237623, 岡山県農林水産総合センター農業研究所の井上氏より分譲を受けた生物検定と遺伝子検定により感受性と判定された O34 および遺伝子検定により感受性と判断された O11-1 の計 14 菌株を供試した。

2. 菌糸磨砕液を用いた寒天平板希釈法

既報の寒天平板希釈法に準じ、上述の生物検定により定めた感受性・耐性指標菌株の感受性を判別した。すなわち、アゾキシストロビンの有効成分で 25, 100, 400 ppm になるように 5 mM 没食子酸 *n*-プロピル加用 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約 1% のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解後、添加した。感受性・耐性指標菌株を 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 4 mm のコルクボーラで菌叢ディスクをとり、菌叢面が検定培地に接するように置床した。25°C で 10 日間培養後に菌糸生育の有無を判別した。次に、菌糸磨砕液を使用した渡辺 (2009) の方法を参考に、上記の寒天平板希釈法を改良した。すなわち、上述の菌株を前培養した後、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。検定培地はアゾキシストロビン有効成分で 25, 100, 400 ppm になるように添加した 5 mM 没食子酸 *n*-プロピル加用 PDA を用いた。25°C で約 10 日間培養後に菌糸生育の有無を肉眼で判別した。試験はそれぞれ、2~4 反復行なった。

3. 生物検定

生物検定により上述の14菌株のうち07KN4および07NP6は2008年と2011年に、07AS7、07AH7およびO11-1は2009年と2010年に、久留米地域T圃場分離7菌株およびO34は2010年に、MAFF 237623は2008年にアゾキシストロビンに対する感受性を判定した。すなわち、5月にガラス室で大型ポット栽培のブドウ（‘巨峰’および‘デラウェア’）の1新梢の若い展開葉約6枚に、実用濃度であるアゾキシストロビン（有効成分100 ppm）あるいは滅菌水をハンドスプレーで十分量散布した。翌日、各菌株の分生子懸濁液（約 1×10^4 個/ml）を1葉あたり3~4 ml 噴霧接種し、直ちにビニル袋で覆い湿度を保持した後、翌日に除去した。分生子の形成方法は田代ら（1998）に準じた。接種約2ヶ月後に下記の基準に従って発病程度を葉ごとに調査し、発病指数の平均値（発病度）から防除価を算出した。

発病指数 0：発病なし、25：病斑が1~3個、50：病斑が4~10個、75：病斑が11個以上

上または病斑面積が葉の1/2未満、100：病斑面積が葉の1/2以上または落葉したものの
防除価 = $(1 - \text{薬剤処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度}) \times 100$

4. 遺伝子検定

感受性・耐性指標菌株について、チトクローム*b*遺伝子のPCR-RFLP解析による遺伝子診断（井上 2009b）を行った。なお、DNAの抽出は前述の菌糸磨砕液100 μ lから、川崎（1997）の方法を用いて行った。耐性菌の変異部位（コドン143~144：GCTGC）を認識する制限酵素には*Fnu*4HI（認識配列：GCNGC）を用いた。

結 果

菌叢ディスクを用いた寒天平板希釈法、菌糸磨砕液を用いた寒天平板希釈法、生物検定および遺伝子検定の結果をTable 18に、検定培地上の菌叢の生育状況をFig. 9に示した。生物検定では、‘巨峰’より‘デラウェア’の発病が遅かったが、接種2ヶ月後には両品種とも水処理において十分発病し、アゾキシストロビンに対する感受性の判定が可能になった。07KN4、07NP6、07AS7および07AH7株におけるアゾキシストロビンの防除価は15以下と低く、耐性を示したため、耐性指標菌株とした（Fig. 10）。一方、久留米地域T圃場の7菌株、MAFF 237623およびO34株における防除価は57~100と高く、感受性を示したため、感受性指標菌株とした。なお、O11-1株における防除価は16~39で感受性と耐性の中間を示した。

耐性指標菌株では菌叢ディスクおよび菌糸磨砕液を用いた寒天平板希釈法と遺伝子検定の結果はいずれも耐性を示し、生物検定の結果と一致した。感受性指標菌株の菌叢ディスクを用いた検定結果は08T8株ではアゾキシストロビンの濃度が25 ppmでは反復間で異なるものの、濃度が高い100 ppmおよび400 ppmでは感受性であった。しかし、08T1、08T4、

08T5, 08T6, 08T7, 08T9, MAFF 237623 および O34 株では濃度が上がるほど判定が感受性になる傾向はなく、最も濃度の高い 400 ppm で 08T9 株は耐性を示し、それ以外は反復間で異なった。一方、菌糸磨砕液を用いた検定結果と遺伝子検定の結果はすべて感受性を示し、生物検定の結果と一致した。O11-1 株では、菌叢ディスクを用いた検定は耐性であったが、菌糸磨砕液を用いた検定と遺伝子検定では感受性で、感受性指標菌株に類似した。

Table 18 Sensitivity of isolates of *Pseudocercospora vitis* to azoxystrobin as measured by mycelial growth on PDA medium, by severity of disease induced on two grape cultivars and by PCR-RFLP analysis of the cytochrome *b* gene

Isolate	Mycelial growth on PDA ^a										Mean disease severity ^b				PCR-RFLP ^c		
	Disc					Suspension					'Kyoho'					'Delaware'	
	25	100	400	25	100	400	Azo	Wat	CP	Azo	Wat	CP	Azo	Wat		CP	
07KN4	+	+	+	+	+	+	89	93	4	79	75	4	79	75	<0	+	
07NP6	+	+	+	+	+	+	39	43	8	57	32	8	57	32	<0	+	
07AS7	+	+	+	+	+	+	67	79	15	79	75	15	79	75	<0	+	
07AH7	+	+	+	+	+	+	70	75	7	75	7	7	75	7	<0	+	
08T1	+	+	±	—	—	—	13	50	74	8	63	74	8	63	87	—	
08T4	±	+	±	—	—	—	25	58	57	13	67	57	13	67	81	—	
08T5	+	±	±	—	—	—	4	33	88	13	33	88	13	33	60	—	
08T6	+	—	±	—	—	—	4	17	79	Nt	Nt	79	Nt	Nt	Nt	—	
08T7	±	±	±	—	—	—	4	67	94	8	42	94	8	42	81	—	
08T8	±	—	—	—	—	—	14	67	79	Nt	Nt	79	Nt	Nt	Nt	—	
08T9	±	±	+	—	—	—	25	64	61	8	46	61	8	46	83	—	
MAFF237623	—	—	±	—	—	—	0	21	100	Nt	Nt	100	Nt	Nt	Nt	—	
O34	—	—	±	—	—	—	4	63	94	0	25	94	0	25	100	—	
O11-1	+	+	+	—	—	—	50	82	39	63	75	39	63	75	16	—	

^a Either a mycelial disc or suspension was placed onto PDA medium amended with 25–400 ppm azoxystrobin and 5 mM *n*-propyl gallate. Mycelial growth was scored after incubation 10 days, + : mycelial growth, — : no growth, ± : sometimes present.

^b Cultivars were treated with azoxystrobin (Azo, 100 ppm) or water (Wat), 4 to 7 leaves inoculated with 2 to 3 ml of spore suspension ($1 \times 10,000$ conidia/ml) per a leaf. At 2 months post-inoculation, all inoculated leaves were scored for disease severity based on a scale of 0 = no visible lesions; 25 = 1 to 3 lesions; 50 = 4 to 10 lesions; 75 = 11 lesions to lesions below 50% of leaf; 100 = lesions over 50% of leaf or defoliation. CP: Control proportion = (1 — disease severity index in leaves treated with azoxystrobin / disease severity index in leaves treated with water) \times 100.

^c PCR products of partial cytochrome *b* gene that contains the G143A mutation responsible for QoI resistance were digested with restriction enzyme Fnu4HI and analyzed by agarose gel electrophoresis. PCR products of QoI resistant isolate were digested. + : resistant, — : sensitive. Nt: Not tested.

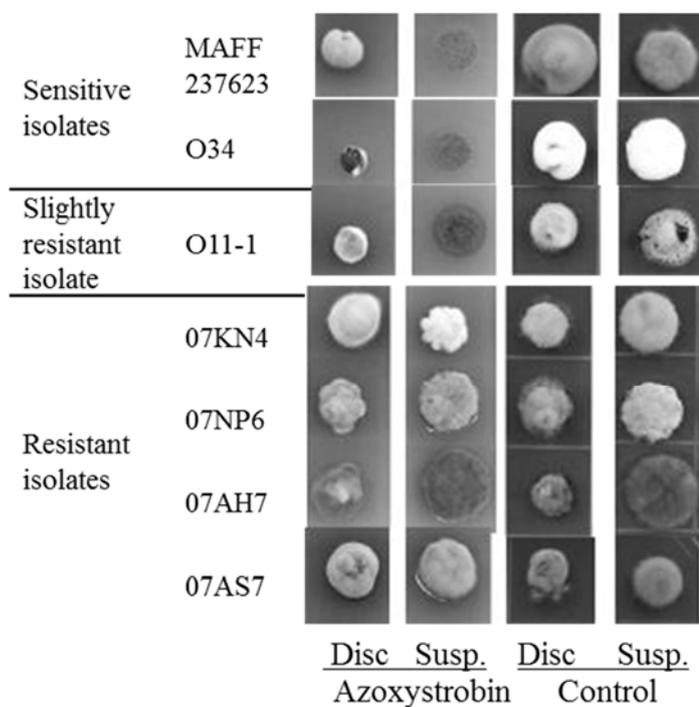


Fig. 9 Representative results of *in vitro* azoxystrobin sensitivity test with mycelial disc or suspension of sensitive or resistant isolates of *Pseudocercospora vitis*. Azoxystrobin: PDA medium with 400 ppm azoxystrobin and 5 mM *n*-propyl gallate. Control: PDA medium with 5 mM *n*-propyl gallate. Disc: mycelial disc. Susp.: drop of mycelial suspension

Isolates

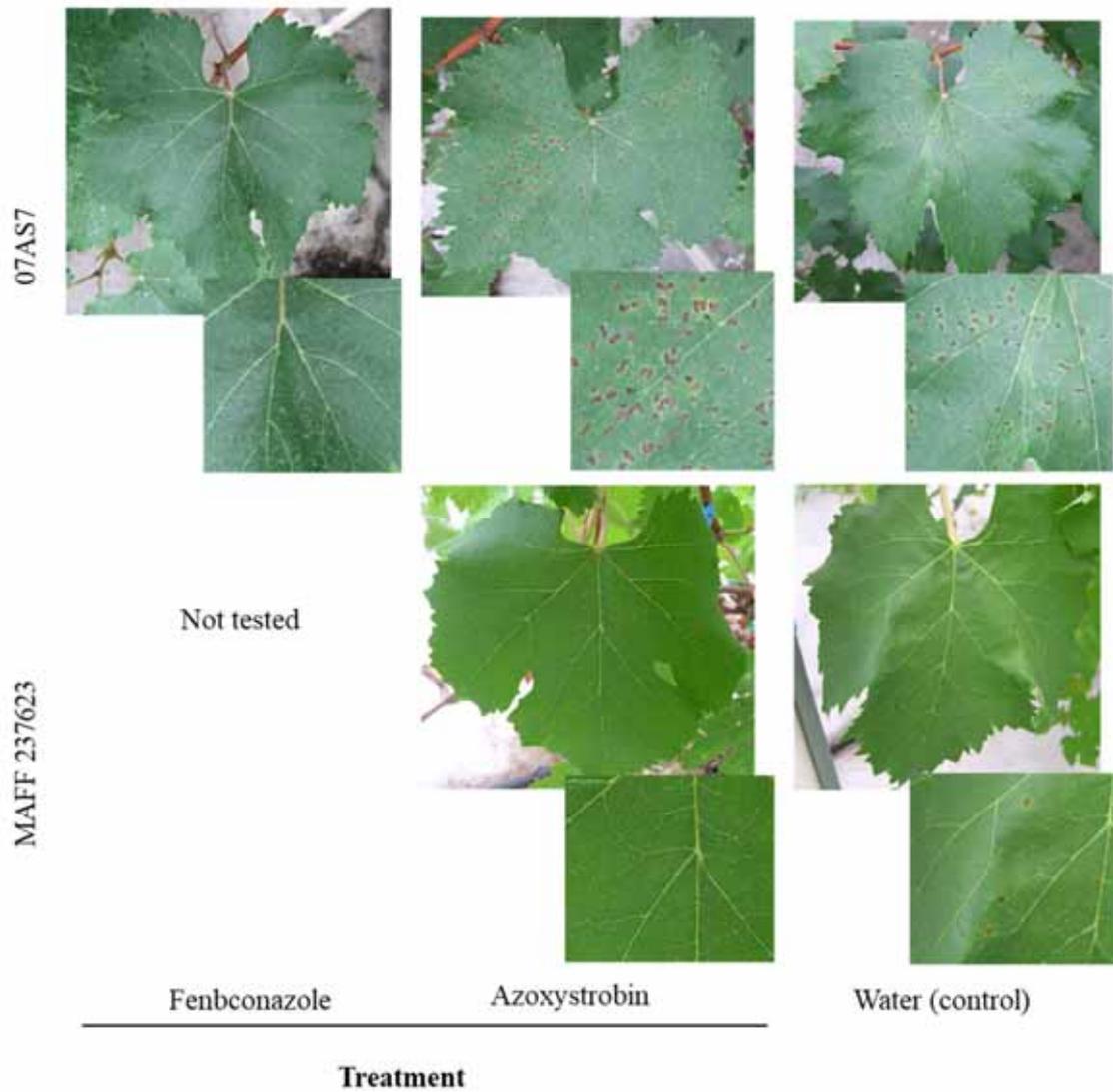


Fig. 10 Symptoms of QoI fungicide resistant isolate of *Pseudocercospora vitis* from grapevine leaves ‘Kyoho’ in Fukuoka Prefecture, 07AS7, compared with that of the fungicide-sensitive isolate, MAFF 237623

2.1.2 福岡県内における薬剤感受性の状況

材料と方法

2007年から2009年に前述の供試菌株を分離した5圃場と後述の圃場試験を実施した生産者2圃場を含む、福岡県内主要産地4地域でブドウ褐斑病が多発している施設栽培12圃場から罹病葉を採取し、前述の薬剤感受性検定方法の改良の方法に準じて、1葉から1菌株を分離し、106菌株を得た。さらに、2017年に3地域7圃場から59菌株を得た。

これらの菌株について、前述の菌糸磨砕液を使用した改良後の寒天平板希釈法に従い、アズキシストロピンを有効成分で100 ppmとなるように5 mM 没食子酸 *n*-プロピル加用PDAに添加した検定培地を用いて感受性を検定した。試験はそれぞれ2反復行った。

結 果

2007年～2009年に分離された感受性・耐性指標菌株を含む、福岡県内の12圃場から分離された106菌株の菌糸磨砕液を用いた寒天平板希釈法による検定の結果をTable 19に示した。久留米地域T圃場において分離された9菌株を除く、3地域11圃場の97菌株がQoI剤耐性菌と判定された。2017年では3地域7圃場すべての圃場でQoI剤耐性菌が確認され、その菌株の内訳は59菌株中53菌株であった。なお、感受性菌は田川地域の1圃場でのみ確認された。

Table 19 *In vitro* azoxystrobin sensitivity of *Pseudocercospora vitis* isolates from the Fukuoka Prefecture^a

Location	2007 to 2009		2017	
	No. of resistant orchards ^b / No. of tested orchards	No. of resistant isolates / No. of tested isolates	No. of resistant orchards / No. of tested orchards	No. of resistant isolates / No. of tested isolates
Asakura	2 / 2	13 / 13	-	-
Kurume	0 / 1	0 / 9	1 / 1	5 / 5
Iizuka	4 / 4	25 / 25	3 / 3	25 / 25
Tagawa	- ^c	-	3 / 3	23 / 29
Yame	3 / 3	22 / 22	-	-
Tests in Yame				
Kuroki I-QoI ^d	1 / 1	9 / 9	-	-
Kuroki I-Teb ^e		12 / 12		-
Hirokawa-QoI	1 / 1	4 / 4	-	-
Hirokawa-Teb		12 / 12		-
Total	11 / 12	97 / 106	7 / 7	53 / 59

^a Sensitivity was tested by dropping a mycelial suspension onto PDA medium amended with 100 ppm azoxystrobin and 5 mM *n*-propyl gallate.

^b No. of orchards where QoI resistant isolates of *P. vitis* were recognized.

^c Not tested.

^d Obtained from leaves treated with tebuconazole.

^e Obtained from leaves treated with QoI fungicides.

2.1.3 代替剤の探索

材料と方法

ブドウに登録がある QoI 剤以外の薬剤のうち、QoI 剤の代替薬剤になりうる以下の 2 剤と QoI 剤との防除効果を比較した。すなわち、ブドウ灰色かび病に登録があり、果実の外観品質に影響が少ない DMI 剤のテブコナゾール(有効成分濃度 50 ppm, 以下同様)とフェンブコナゾール (27.5 ppm), QoI 剤のアズキシストロビン (100 ppm) を試験に用いた。さらに、これら DMI 剤と灰色かび病, 晩腐病, ベと病などに登録があり, 果実品質に影響が少ないフルアジナム (197.5 ppm), ベと病防除剤として現地で普及しているキャプタン・ホセチル (それぞれ 500 ppm) について, QoI 剤耐性菌株に対する防除効果を確認した。供試菌株は QoI 剤耐性の 07AS7, 07AH7 株および O11-1 株を用いた。なお, 圃場に発生した耐性菌の中には O11-1 株のような中間型が存在する可能性があるため, O11-1 株を中間型の耐性菌として, 調査菌株に加えた。試験は 2009~2011 年に実施し, 試験方法と調査方法は前述の薬剤感受性検定方法の改良に準じた。QoI 剤とそれ以外の薬剤の防除効果では, 発病度について対応のある t 検定を行い, Bonferroni-Holm の方法で多重比較を行った。統計ソフトウェアは Windows 版の R version 2.15.0 (<http://www.R-project.org>) を用いた。

結 果

QoI 剤とそれ以外の薬剤の防除効果試験の結果を Table 20 および Fig. 10 に示した。水処理区の発病度は 2011 年の O11-1 と 07AS7 株で 25~50 とやや低かったものの, 防除効果の判定に十分な発病であった。2009 年のアズキシストロビン区の発病度は 55~98 で, 水処理の発病度 76~100 より有意に低かったが, テブコナゾール区の発病度 5~63 より有意に高かった ($P < 0.05$)。2010 年のアズキシストロビン区の発病度は 50~79 で, 水処理の発病度 71~82 と有意な差はなく, フェンブコナゾール区の発病度 0~18 より有意に高かった ($P < 0.05$)。2011 年のキャプタン・ホセチル区の発病度は 0~7 で, フルアジナム区の発病度 4~54 と有意差は認められないものの, 低い傾向があった。また, それぞれが水処理区の発病度 25~83 より有意に低かった ($P < 0.05$)。

Table 20 Efficacy of fungicides for the control of grapevine leaf blight

Isolate	Cultivar	Disease severity ^a								
		Tested in 2009			Tested in 2010			Tested in 2011		
		Teb _b	Azo	Wat	Fen	Azo	Wat	Cap+Fos	Flu	Wat
07AS7	Kyoho	13	98	100	8	67	79	0	14	38
	Delaware	5	58	84	0	79	75	0	4	31
07AH7	Kyoho	63	92	100	17	70	75	0	54	83
	Delaware	9	56	76	4	75	71	0	50	79
O11-1	Kyoho	15	55	96	13	50	82	0	11	50
	Delaware	44	69	98	18	63	75	7	11	25
Mean ^c		25 a	71 b	92 c	10 a	67 b	76 b	1 a	24 a	51 b

^a Mean severity from 3 to 14 leaves using index: 0 = no visible lesions; 25 = 1–3 lesions; 50 = 4–10 lesions; 75 = 11 lesions to lesions on less than 50% of leaf; 100 = lesions on more than 50% of leaf or defoliation.

^b Treated with fungicides; Teb = 100 ppm tebuconazole, Azo = 100ppm azoxystrobin, Fen = 27.5 ppm fenbuconazole, Cap+Fos = 500 ppm captan and 500 pm fosetyl, Flu = 197.5 ppm fluazinam, Wat = water.

^c The same letter after data for test year indicates no significant difference ($P > 0.05$, paired *t*-test with Bonferroni-Holm correction).

2.1.4 圃場における各種薬剤の防除効果

材料と方法

QoI 剤の使用にもかかわらず褐斑病が多発し、QoI 剤耐性菌の発生が疑われる八女地域の栽培圃場（以下、K 圃場、H 圃場）において、QoI 剤とそれ以外の薬剤の防除効果を比較した。具体的な防除実績を Table 21 に示した。なお、K 圃場および H 圃場では試験薬剤散布後から発病調査までの間にテブコナゾール区および QoI 区から罹病葉を採取し、分離された褐斑病菌の QoI 剤に対する感受性を前述の菌糸磨砕液を使用した改良後の寒天平板希釈法により調査した。

試験 1 は 2009 年に K 圃場の加温ハウスの‘巨峰’の成木で実施した。2008 年 12 月から加温し始め、満開日は 3 月 11 日であった。テブコナゾール区とフェンブコナゾール区にそれぞれ 3a 以上を割り当て、これら以外を QoI 区とし、反復を設けなかった。QoI 区では、QoI 剤を中心に使用している地域の慣行防除体系に準じ、開花前の 3 月 7 日にキャプタン・ホセチル（有効成分濃度それぞれ 500 ppm，以下同様）とメパニピリム（200 ppm）の混用、小豆粒大期（幼果の直径が 5～10 mm）の 3 月 21 日に QoI 剤のクレソキシムメチル（250 ppm）、被袋後幼果の直径が 20～30 mm の 4 月 28 日に QoI 剤のファモキサドン・シモキサニル（56 ppm・75 ppm）を散布した。テブコナゾール区の 3 月 7 日の散布は慣行防除に合わせてホセチル（1000 ppm）と混用し、フェンブコナゾール区の 3 月 7 日の散布は QoI 区と同一の薬剤を散布した。3 月 21 日と 4 月 28 日にテブコナゾールまたはフェンブコナゾールを散布した。なお、いずれも約 200L/10 a 相当量の薬液をスピードスプレーヤーで散布した。その後、いずれの区も収穫期まで薬剤散布を行わなかった。

試験 2 は 2009 年に H 圃場の加温ハウスの品種‘巨峰’の成木で実施した。2009 年 1 月から加温し始め、満開日は 4 月 11 日であった。試験区は試験 3 と同じ組合せで同規模の区を設け、試験 1 と同様の各薬剤を開花前の 3 月 30 日、小豆粒大期の 4 月 21 日、被袋後の 5 月 20 日に散布した。

収穫直前に、試験 1, 2 では各反復新梢 20 本、基部から 10 葉の褐斑病の発病の有無を調査し、発病葉率を算出した。また、薬剤散布が果粒の外観品質（汚れ、果粉溶脱）に与える影響について、収穫期に肉眼で観察した。

QoI 剤とそれ以外の薬剤の防除効果では、各試験の発病葉率については、 χ^2 検定を実施した後、Ryan の方法で多重比較を行った。統計ソフトウェアは Windows 版の R version 2.15.0 (<http://www.R-project.org>) を用いた。

結 果

圃場試験における QoI 剤と DMI 剤を核とした体系の防除効果の比較試験の結果を Table 21 に示し、試験 1 と試験 2 の感受性検定の結果を Table 19 の八女地域の K 圃場および H 圃場に示した。なお、使用した薬剤のうち、シモキサニルとメパニピリムは褐斑病に対する活性はなく、塩基性硫酸銅は本病の発生時期より遅い時期に散布されたため、これらの薬剤が試験結果に与える影響は少ないと考えられた。

試験 1 では、QoI 区の発病葉率 7.3%より、テブコナゾール区は 3.7%で有意に低く、フェンブコナゾール区は 0.1%でさらに有意に低かった ($P < 0.05$)。また、この圃場の QoI 区から分離された 9 菌株およびテブコナゾール区から分離された 12 菌株全てが QoI 剤耐性菌と判定され、耐性菌が高率に存在していた。

試験 2 では、QoI 区の発病葉率 23.0%より、テブコナゾール区とフェンブコナゾール区の発病葉率はともに 2.7%で有意に低かった ($P < 0.05$)。また、この圃場の QoI 区から分離された 4 菌株およびテブコナゾール区から分離された 12 菌株全てが QoI 剤耐性菌と判定され、耐性菌が高率に存在していた。

Table 21 Comparison between DMI and QoI fungicides for the control of grapevine leaf blight on the heating cultivation methods in 2009

Test	Location ^a	Treatment	Fungicide ^b and growth stage when sprayed			DI ^c (%)	
			Pre-bloom	Diameter of berries			
				≤ 10 mm	20–30 mm		
No. 1	Yame K ^d	Tebuconazole	7 Mar ^f	21 Mar	28 Apr	9 June	
			Teb+Fos	Teb	Teb	3.7b	
			Fenbuconazole	Cap+Fos+Mep	Fen	Fen	0.1a
			QoI	Cap+Fos+Mep	Kre	Cym+Fam	7.3c
No. 2	Yame H ^e	Tebuconazole	30 Mar	21 Apr	20 May	21 July	
			Teb+Fos	Teb	Teb	2.7a	
			Fenbuconazole	Cap+Fos+Mep	Fen	Fen	2.7a
			QoI	Cap+Fos+Mep	Kre	Cym+Fam	23.0b

^a City and orchard name.

^b QoI fungicides, Kre = kresoxim-methyl, Fam = famoxadone; DMI fungicides, Teb = tebuconazole, Fen = fenbuconazole; Other fungicides, Cap = Captan, Fos = Fosetyl, Mep = Mepanipyrim, Cym = Cymoxanil.

^c Means followed by the same letter did not differ significantly at the 5% level in a Ryan test.

^d The greenhouse was heated from December.

^e The greenhouse was heated from January.

^f Date when sprayed with fungicide and investigating date.

2.1.5 考察

ブドウ褐斑病菌は PDA 平板培地上での生育が遅く、単孢子分離菌株であっても菌叢が不均一になることがある。本研究の供試菌株には、寒天平板希釈法に供するための数週間の前培養において均質な菌叢ディスクを多数用意することが困難な菌株も存在したが、菌糸磨砕液を用いる改良により少量の菌体で QoI 剤感受性の検定が可能になった。菌糸磨砕液を用いた寒天平板希釈法は生物検定の結果と一致し、菌叢ディスクを用いる検定法より菌糸生育の有無の判定が容易で、遺伝子検定法より操作が簡便であるため、優れた検定方法と考えられた。ただし、生物検定で耐性と感受性の中間を示した O11-1 株は遺伝子検定や菌糸磨砕液による検定では感受性と判定された。寒天平板希釈法や生物検定と遺伝子検定が異なる事例として、細胞内に耐性変異型と野生型のチトクローム *b* 遺伝子を有するミトコンドリアが混在するヘテロプラスミー (石井ら 2006, Ishii *et al.* 2007) の関与が知られているが、この場合、寒天平板希釈法や生物検定で耐性を示しても遺伝子検定では感受性を示す。O11-1 株の耐性メカニズムについては、チトクローム *b* 遺伝子の G143A 以外の変異、あるいはその他未知の機構による中程度耐性菌によるものか、更なる検討が必要である。

2007~2009 年に福岡県内の 12 圃場から分離された菌株のうち、久留米地域 T 圃場の分離菌株を除く、11 圃場全ての分離菌株が QoI 剤耐性菌であり、県内の広範囲に高率に耐性菌が分布していることが明らかとなった。福岡県のブドウ栽培生産者の多くは地域の防除暦に従い病害虫防除を行っており、防除基準に登載された 1999 年以来少なくとも 2005 年までには県内全地域のほとんどの防除暦に 1~複数回の QoI 剤が採用され、耐性菌が発生しやすい状況であったと考えられた。一方、久留米地域 T 圃場では例年、晩腐病やべと病の発生が少ないことから、これまでに QoI 剤が使用されていなかった。このため、感受性が維持されていたと考えられた。

野口ら (1971) は露地ブドウにおける本病の感染最盛期について、落花期~被袋期を中心としたその前後であると報告し、森田ら (1985) はハウスブドウにおいて開花直前期から開花期に防除が欠落すると発生が激しいことを指摘していることから、防除適期は開花直前期~被袋期と推察される。施設栽培におけるこの時期の主な防除対象は褐斑病のほかに灰色かび病と晩腐病であるため、これらの病害に優れた効果を示す QoI 剤のアズキシストロビンやクレソキシムメチルが頻繁に使用されている。QoI 剤は元来褐斑病菌に殺菌活性が高いことから発生を抑制していたが、毎年 1~数回の QoI 剤を使用した結果、感受性が低下し、さらに、QoI 剤以外の薬剤防除が少なかったため、広域に多発したと考えられた。一方、露地栽培ではこれらの病害以外に黒とう病、枝膨病、晩腐病やべと病に対する防除が必要なため、施設栽培より QoI 剤以外の防除回数が多く、総防除回数も多い。本県での褐斑病は露地栽培ではほとんど発生しておらず、QoI 剤以

外の薬剤により発生が抑制されていると考えられた。

本病に対する生物検定による QoI 剤とそれ以外の薬剤の防除効果試験の結果、耐性菌に対してアズキシストロビンはフェンブコナゾールおよびテブコナゾールより発病抑制効果が劣り、防除効果の減退が確認され、これら 2 剤を含む QoI 剤以外の 4 剤は防除効果が確認された。さらに、フェンブコナゾールとテブコナゾールは果粒の汚れや薬害がなく、QoI 剤の代替となる基幹防除剤として使用できると考えられた。一方、キャプタン・ホセチルは果粒の汚れが多く、フルアジナムは使用基準が開花直前～落弁期であるなどの特徴があるが、QoI 剤や DMI 剤と作用機構が異なり、耐性菌対策として、ローテーション散布の中で補完的に使用できると考えられた。そこで、QoI 剤耐性菌の発生が疑われる圃場において、防除適期と推定される開花直前期～被袋期にテブコナゾールやフェンブコナゾールを用いた体系と QoI 剤を用いた体系における褐斑病の発生程度を比較した。その結果、栽培圃場においても QoI 剤の防除効果の減退が確認されると同時に、QoI 剤耐性菌に対するテブコナゾールおよびフェンブコナゾールの有効性が実証された。また、灰色かび病や晩腐病等を対象に開花直前期にキャプタン・ホセチルまたはフルアジナムを防除体系に組み込むことにより、褐斑病に対しても防除効果が高まる可能性が示唆された。2018 年現在、フェンブコナゾールとテブコナゾールは褐斑病に登録があるが、フルアジナムとキャプタン・ホセチルは本病には登録がないため、早期の適用拡大が望まれる。

本研究結果を現地に説明し、代替剤の普及を図った。2012 年には多くの地域で代替剤が防除暦に記載され、現地から大きな被害を受ける報告は少なくなった。

2017 年に分離された褐斑病菌の QoI 剤に対する感受性は、2007 年～2009 年の結果と同様に耐性菌が優先していた。本病に対する QoI 剤代替剤が普及して以降も、QoI 剤は晩腐病に対する基幹防除薬剤として使用され続けたため、耐性菌が高い割合で維持されたと考えられた。

2.2 ブドウべと病菌

Plasmopara viticola によるブドウべと病は、ブドウの葉や花穂の枯死および幼果の乾枯を引き起こすため、ブドウ栽培で最も重要な病害の一つである (Fig. 11 ; 北島 1989). 福岡県では、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、冷夏長雨の年に本病が多発し、被害をもたらしている. 特に 2010 年は初発が早く、葉のみならず幼果にも発病し、大きな被害を受けた. 本病における QoI 剤耐性菌は 1999 年にイタリアとフランスで初め発見され、国内においても、2008 年に山梨県や長野県など複数の県で確認された (Furuya *et al.* 2009, Furuya *et al.* 2010). そのため、本県における多発の一因が QoI 剤に対する耐性の発達と考えられた.

ここでは、まず、2011 年～2013 年および 2017 年に罹病葉を採取し、PCR-RFLP 法を用いて QoI 剤の耐性菌検定を行った. つぎに、QoI 剤耐性菌発生圃場において、QoI 剤の防除効果の低下と非 QoI 剤などの発病抑制効果について検討した.

a)



b)



Fig. 11 Symptoms of downy mildew on the grapevine leaves by *Plasmopara viticola*

a) Lesions on leaf

b) Rot on berries

2.2.1 薬剤感受性検定

材料と方法

1. 病原菌の収集

福岡県の主要品種である‘巨峰’および‘ピオーネ’を調査対象とした。2011年8月から9月に福岡県内の主要産地の5地域8圃場および2011年8月と2013年9月に福岡県農林業総合試験場の1圃場から葉裏に白色の菌叢を生じた罹病葉を10枚以上採取した。さらに、2017年に4地域13圃場から採取した。対照として、山梨県果樹試験場から分譲を受けた感受性菌と耐性菌が感染した罹病葉を用いた。

2. DNAの抽出

2011年では、現地圃場1ヶ所につき3葉、2017年では、1圃場につき5葉、場内圃場は2011年と2013年にそれぞれ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。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の抽出はSaitoh *et al.* (2006) の簡易抽出法で行った。

3. PCR-RFLP法によるQoI剤耐性菌検定

Furuya *et al.* (2010) の方法に準じて、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'-GGATTATTTGAACCTACCTC-3')を用い、チトクローム*b*遺伝子の一部のPCR-RFLP解析を行った。耐性菌の変異部位(コドン143~144:GCTGC)を認識する制限酵素には*Fnu4HI* (New England Biolabos) (認識配列:GCNGC)を用いた。

結 果

PCR の結果、すべてのサンプルで目的となる約 300 塩基の DNA 断片の増幅が確認された。福岡県で発生したブドウべと病菌における PCR-RFLP 法による QoI 剤耐性菌検定の結果を Table 22 に示した。2011 年に採取された 5 地域 8 圃場 24 サンプルと試験場内の 2 ヶ年 14 サンプルおよび 2017 年に採取された 4 地域 13 圃場 65 サンプル、すべてが耐性菌の遺伝子パターンを示した。

Table 22 Sensitivity of isolates of *Plasmopara viticola* to QoI fungicides by PCR-RFLP analysis of the cytochrome *b* gene in Fukuoka Prefecture

Location	2011		2017	
	No. of resistant orchards ^b / No. of tested orchards	No. of resistant isolates / No. of tested isolates	No. of resistant orchards / No. of tested orchards	No. of resistant isolates / No. of tested isolates
Asakura	1 / 1	3 / 3	-	-
Kurume	2 / 2	6 / 6	4 / 4	20 / 20
Iizuka	2 / 2	6 / 6	2 / 2	10 / 10
Tagawa	-	-	3 / 3	15 / 15
Minamichikugo	1 / 1	3 / 3	-	-
Yame	2 / 2	6 / 6	4 / 4	20 / 20
Total	8 / 8	24 / 24	13 / 13	65 / 65
FARC ^a				
2011	1 / 1	7 / 7	-	-
2013	1 / 1	7 / 7	-	-

^a Collection from the same experimental orchard at FARC (Fukuoka Agricultural and Forestry Research Center) in 2011 and 2013

^b No. of orchards where QoI resistant isolates of *P. viticola* were recognized.

2.2.2 圃場試験における QoI 剤と代替剤の防除効果

材料と方法

QoI 剤耐性菌発生が確認された場内圃場で、QoI 剤の防除効果の低下の確認と QoI 剤以外の系統薬剤などの発病抑制効果を検討するため、2011 年から 2013 年に 3 回試験を実施した。試験薬剤として、QoI 剤であるアズキシストロビン（有効成分濃度 100 ppm，以下同様）を 3 ヶ年通じて用いた。非 QoI 剤には、耐性菌発生リスクの低いジチオカーバメート剤のマンゼブ (800 ppm) を 3 ヶ年通じて用い、近年登録されたカルボン酸アミド剤 (CAA 剤) のマンジプロパミド (78 ppm) を 2012 年に、CAA 剤との混合剤であるベンチアバリカルブイソプロピル・マンゼブ (37.5 ppm・700 ppm) を 2013 年に用いた。さらに、ブドウべと病やジャガイモ疫病などの卵菌類による病害に対する発病抑制効果が報告されている (Wicks *et al.* 1991, 仲川ら 2010, 山下ら 2012) 亜リン酸肥料 (P_2O_5 320 ppm, K_2O 250 ppm) を 3 ヶ年通じて用いた。露地栽培の品種「巨峰」の成木を用い、半樹 (25 m²) 以上を 1 反復として乱塊法で 1 処理区につき、3 反復ずつ設けた。試験は落弁期から開始し、試験開始前は地域の慣行防除に準じて、薬剤防除を実施した。2011 年は 6 月 3 日、13 日、24 日、7 月 8 日に散布し、7 月 14 日に調査した。2012 年は 5 月 30 日、6 月 11 日、20 日、7 月 9 日、26 日に散布し、8 月 6 日に調査した。2013 年は 6 月 5 日、14 日、24 日、7 月 8 日、22 日に散布し、9 月 10 日に調査した。いずれの試験においても、動力噴霧器で約 250L/10 a 量を散布した。1 反復あたり 50 葉以上の発病の有無を調査し、発病葉率を算出した。角変換後、試験ごとに Tukey-Kramer の HSD 検定で多重比較を行った。

結 果

QoI 剤耐性べと病菌発生圃場における各種資材の散布試験の結果を Table 23 に示した。2011 年の発病はやや早く，調査日の 7 月 14 日には無処理区の発病葉率が 86.7% と多発した。これに対して，アゾキシストロビン区の発病葉率 (92.7%) は無処理区と同等で，マンゼブ区および亜リン酸区はいずれも 0.0% と低かった。2012 年の初発は 7 月 12 日に確認され，調査日の 8 月 6 日には無処理区の発病葉率が 80.3% と多発した。これに対して，アゾキシストロビン区の発病葉率 (45.7%) は無処理区と有意な差はなく，マンゼブ区 (5.7%)，マンジプロパミド区 (0.3%) および亜リン酸区 (22.0%) は有意に低かった。2013 年の初発は 8 月 12 日と遅く，その後の進展も緩慢であったが，調査日の 9 月 10 日には無処理区の発病葉率が 98.0% と多発した。これに対して，アゾキシストロビン区の発病葉率 (85.3%) は無処理区と同等で，マンゼブ区 (2.0%)，ベンチアバリカルブイソプロピル・マンゼブ区 (0.0%) および亜リン酸区 (22.0%) は有意に低かった。

Table 23 Efficacy of agro-chemical compounds for the control of downy mildew in the experimental vineyards

Treatment	Disease incidence (%)		
	2011 ^a	2012 ^b	2013 ^c
Mancozeb	0.0 a ^d	5.7 ab	2.0 a
Mandipropamid	Nt ^e	0.3 a	Nt
Benthiavalicarb-isopropyl and mancozeb	Nt	Nt	0.0 a
Potassium phosphite	0.0 a	22.0 ab	22.0 a
Azoxystrobin	92.7 b	45.7 bc	85.3 b
Control	86.7 b	80.3 c	98.0 b

^a Fungicides were sprayed on 3, 13 and 24 June, and 8 July. Assessment was carried out on 14 July.

^b Fungicides were sprayed at 30 May, 11 and 20 June, and 9 and 26 July. Assessment was carried out on 6 August.

^c Fungicides were sprayed at 5, 14 and 24 June, and 8 and 22 July. Assessment was carried out on 10 September.

^d Same letters indicate that mean values are not significantly different according to the Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$) with data transformed by arcsine square root transformation after ANOVA.

^e Not tested

2.2.3 考察

県内主要産地の栽培圃場 8 圃場と福岡県農林業総合試験場試験圃場から採取したべと病菌におけるチトクローム *b* 遺伝子の PCR-RFLP 解析の結果、143 番目のコドンが変異していることが示唆された。この変異菌は生物検定で QoI 剤の防除効果の低下が確認されているため (Furuya *et al.* 2009)、調査した県内すべてのべと病菌は耐性菌と判定された。べと病の耐性菌検定は全国各地で実施され、北海道や青森県を除き、山形県、福島県、山梨県、長野県、茨城県および岡山県など広域に耐性菌が検出された (Furuya *et al.* 2010, 綿打ら 2011, 椎葉ら 2013)。北海道ではもともとべと病の発生が少なく、QoI 剤の使用も少なかったため、耐性菌が検出されなかったと考えられた。今回調査した県内の生産者の防除実績では、QoI 剤が最大 5 回使用され、特に露地栽培ではさらに多い頻度で使用されていたため、耐性菌が高率に検出されたと考えられた。

QoI 剤耐性菌発生圃場における各種資材の散布試験の結果、アゾキシストロビンの防除効果の低下が確認された。県内の栽培圃場の耐性菌の検出率はこの試験圃場と同様に 100% であったため、栽培圃場でも QoI 剤耐性菌発生による本剤の防除効果の低下が広域に発生していると考えられた。これらのことから、QoI 剤耐性べと病菌の発生が近年のべと病多発の一因になっていると推察された。

耐性菌発生圃場では QoI 剤と系統が異なる薬剤は高い防除効果が確認され、特に CAA 剤であるマンジプロパミドおよびベンチアバリカルブイソプロピル・マンゼブの防除効果は高かった。これまで、CAA 剤はべと病専用剤であることから、複数の病害の感染時期に当たる開花前後から幼果期に使用されることは少なかった。マンゼブはべと病以外にも褐斑病や晩腐病にも効果があるが、果実を薬液で汚すため、袋掛け前の幼果期に使用されなかった。また、亜リン酸肥料も発病抑制が認められたが、肥料登録のみで農薬登録がないため、防除を目的として使用できない。QoI 剤と同様の性質を持った代替剤はなく、適切な時期や対象病害ごとに応じて防除薬剤を選択する必要がある。

本試験成績を現地に説明し、代替薬剤の普及を図った。2012 年頃から、CAA 剤を中心とした代替剤が地域の防除暦に掲載された。その後、現地から大きな被害を受ける報告は少なくなった。

2017 年にべと病菌の QoI 剤感受性検定を実施した結果、2011 年の結果と同様に調査菌株すべてが耐性菌であった。本病に対する QoI 剤代替剤が普及して以降も、QoI 剤は晩腐病の基幹防除薬剤として使用が継続されたため、耐性菌が高い割合で維持されていると考えられた。

第3章 総合考察

DMI 剤耐性ナシ黒星病菌および赤星病菌が発生した福岡県のナシ防除対策とこれらに耐性菌発生への報告がない千葉県での防除対策を比較した。なお、本研究においても千葉県から採取された黒星病菌に対するテブコナゾールの防除効果はやや低かったが、他の DMI 剤は防除効果が高く、福岡県のような耐性菌の発生は確認されなかった (Table 12)。千葉県では DMI 剤の使用当初からナシ黒星病菌の感受性低下リスク管理のため、多作用点阻害剤と DMI 剤の混用および使用回数の制限を推奨した (梅本 1993)。具体的には、DMI 剤は開花前、後および果実肥大期の計 3 回に制限され、それぞれ、イミベンコナゾール、ジフェノコナゾール、ヘキサコナゾールが使用された。それぞれにジラム・チウラム (現在は登録失効のため、チウラム剤) あるいはイミノクタジンアルベシル酸塩が混用された (梅本ら 2003)。この体系は少なくとも 1995 年頃から現在まで大きく変わっていない。さらに、ナシ赤星病に対しては千葉県一宮町 (1978)、松戸市 (1977) および白岡市 (1978) 等多くの市町で中間宿主のビャクシン類の植栽を制限する条例が制定されており、耕種的防除が推奨されていた。一方、福岡県では、DMI 剤のローテーション散布は提案されていたものの、近年まで回数の制限や混用は積極的に指導されなかった (Table 24)。DMI 剤が普及した 1990 年頃からフェナリモル耐性ナシ黒星病菌が確認された 2008 年までの約 20 年間、主要産地の防除暦には開花期前後に単剤で 3 回、生育期にも 1~3 回掲載されていた。使用される DMI 剤については、フェナリモル耐性菌が報告されて以降、防除効果が高いジフェノコナゾールとヘキサコナゾールに集中した。また、ナシ赤星病に対しては、福岡県内でビャクシン類の植栽を制限する条例のある市町村はなく、ナシへの防除が中心であった。このため、ナシ黒星病菌と同様に耐性菌が発生したと考えられた。本県では千葉県と比較して耐性菌発生リスク管理や耕種的防除が不十分であったことが黒星病および赤星病の耐性菌発生を助長したと推察された。

ブドウの開花期から幼果期における各種防除対象病害と QoI 剤耐性菌代替剤の防除体系について考察する。ブドウ主要産地の QoI 剤耐性菌対策実施前と後の開花期の防除体系について、防除暦から抜粋して示した (Table 25)。これまで、開花前から幼果期に発生する晩腐病、灰色かび病、褐斑病およびべと病に対して QoI 剤が使用されてきた。褐斑病代替剤のフェンブコナゾールとテブコナゾールは灰色かび病にも防除効果があり、加えて、テブコナゾールには晩腐病にも一定の防除効果がある。べと病代替剤のベンチアカルブイソプロピル・シモキサニルおよびマンジプロパミドの防除効果はべと病のみである。これらの代替剤の導入により現地における褐斑病およびべと病の発生は減少したものの、QoI 剤ほど多くの病害に効果がないため、薬剤の回数が増える傾向があった (Table 25)。飯塚地域や久留米地域では開花後にマンゼブあるいはその混合剤が使用されている。マンゼブは晩腐病、褐斑病およびべと病に防除効果がある多作用点阻害剤である。本剤は収穫物に

薬液の跡が残りやすい欠点があるが、開花前にマンゼブ、幼果期にテブコナゾールを用いた QoI 剤耐性褐斑病に対する防除体系は防除効果が高いことが報告されている（井上 2009c）。マンゼブを褐斑病およびべと病の代替剤として防除体系に使用することで、耐性菌発生リスクのある DMI 剤および CAA 剤（FRAC 2018a）の散布回数の増加を抑制できると考えられた。現在、QoI 剤は晩腐病と灰色かび病対策に用いられている。褐斑病およびべと病以外の QoI 剤耐性菌は、灰色かび病菌は海外で報告され（FRAC 2018a）、晩腐病菌は、福岡県、岡山県、長野県等の県で報告されている（近藤 2011, 菊原 2014, 桐野ら 2015）。現在、福岡県における QoI 剤耐性晩腐病菌の発生は一部の地域で低率に確認されているの

Table 24 Number of times of DMI fungicides, mixtures of DMI fungicides and others, QoI fungicides, and SDHI fungicides in spray programs from 2008 to 2017 in regions of Japanese pear production, Fukuoka Prefecture

Region	fungicide	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Asakura	DMI ^a	4	2		3		3		2	2	
	Mixture of DMI ^b	0	1		0		0		2	2	
	QoI ^c	2	2		1		1		3	3	
	SDHI ^d	0	0		0		1		1	1	
Yame	DMI	6	5		4	4	4	4	4	3	
	Mixture of DMI	0	0		0	2	2	2	2	2	
	QoI	2	2		3	2	3	3	3	4	
	SDHI	0	0		0	0	0	1	1	1	
Kurume	DMI	4	4	No data	4				4	4	
	Mixture of DMI	0	0		2				2	2	
	QoI	2	2		2				2	3	
	SDHI	0	0		0				1	1	
Iizuka	DMI	4	No data	No data	4			4(3) ^e	3	2	
	Mixture of DMI	0			2			2	2	1	
	QoI	2			2			2	2	3	
	SDHI	0			0			0(1)	1	2	

^a Difenoconazole, hexaconazole, tebuconazole, fenbuconazole, and biteranol.

^b Mixture of DMI fungicides and thiram, Iminoctadine albesilate or cyprodinil.

^c Azoxystrobin, pyraclostrobin, and Kresoxim-methyl.

^d Penthiopyrad.

^e Hexaconazole or penthiopyrad is sprayed after artificial pollination.

みで被害は受けていない。QoI 剤は晩腐病に防除効果が高く、防除体系から外すと少なからず被害を受ける（横澤 2018）。このため、QoI 剤は晩腐病対策に必要である。一方、灰色かび病には QoI 剤以外に効果のある薬剤があるため、開花前は QoI 剤以外の薬剤の使用が可能である。

本研究で代替剤として選抜した SDHI 剤、QoI 剤、DMI 剤および CAA 剤は全て耐性菌発生リスクのある薬剤である（FRAC 2013, 2018c）。日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会では、耐性菌発生リスクのある薬剤についてガイドラインを公表している。ナシ黒星病に対して DMI 剤、QoI 剤および SDHI 剤は重要時期（開花前後）に年 2 回以内が推奨される（JFRAC 2017a, 2017b, 2017d）。千葉県では DMI 剤の散布回数は多作用点殺菌剤と混用した上で、開花前後に年 2 回以内に制限されている。QoI 剤および SDHI 剤は DMI 剤より耐性菌発生リスクが高い（FRAC 2013, 2018c）。QoI 剤および SDHI 剤は多作用点殺菌剤と混用した上で、重要時期に 1 回とそれ以外で 1 回に制限する必要がある。ブドウべと病に対して、CAA 剤は多作用点阻害剤と混用で年 2 回以内、単剤なら年 1 回以内が推奨される（JFRAC 2017c）。ブドウを含む果樹類の病害における QoI 剤の使用回数は合計使用回数の 3 分の 1 までに制限されることが推奨される（JFRAC 2017b）。ブドウ病害に対する DMI 剤の記載は無いが、野菜類の病害に倣い、合計使用回数の 3 分の 1 までに制限されるべきである（JFRAC 2017a）。晩腐病および褐斑病に対する防除回数は開花前後から袋かけ前までの防除回数は 4 回前後である。このため、ブドウ栽培では両剤の使用は年 1 回に制限する必要がある。

化学農薬は経済的、効率的および安定的に病害を防除する手段であり、経営面積の広い果樹病害対策に不可欠である。新規化学農薬の多くは防除効果が優れ、薬剤耐性菌発生リスクがある特異作用点殺菌剤が多いため、耐性菌問題は今後も続くと考えられる。耐性菌発生リスク管理は試験研究機関だけで解決できる問題ではない。生産者への指導機関、農薬メーカーおよび生産者が耐性菌発生リスクを正しく理解し、対策を取らなければならない。

Table 25 Fungicide spray program on grapevine diseases in Yame Iizuka and Kurume region, Fukuoka Prefecture ^a

Growth stage	Yame		Iizuka		Kurume	
	2008	2016	2008	2016	2011	2016
pre-bloom	Fos+Cap ^b and Mepanipyrim	Fos+Cap and Mepanipyrim	Met+Man	Fos+Cap	Pol+Ita	Kresoxim-methyl
post-bloom	Azoxystrobin ^c	Azoxystrobin	Azoxystrobin	Met+Man	Kresoxim-methyl	Mancozeb
pea-size berries	-	<u>Fenbuconazole</u> ^d	Azoxystrobin	Azoxystrobin	Azoxystrobin	Fam+Cym
beginning of	-	<u>Mandipropamid</u> ^e	Cyp+Flu	<u>Fenbuconazole</u>	Cyp + Flu	Azoxystrobin
bunch cluster						<u>Tebuconazole</u>

^aFungicides are extracted from spray program of grapevine in 2007 and 2016.

^bCym +Fam = cymoxanil+ famoxadone, Flu+Cyp = fludioxonil + cyprodinil, Fos+Cap = fosetyl + captan, Met+Man = metalaxyl + mancozeb, Pol+Ita = polyoxin B + iminocadine triacetate

^cQoI fungicides are shown in bold letters.

^dFenbuconazole and tebuconazole against QoI resistance of *Pseudocercospora vitis* are shown in underlined letters.

^eMandipropamid, benthiavalicarb-isopropyl and cymoxanil against QoI resistance of *Plasmopara viticola* are shown in double underlined letters.

摘 要

近年、ナシ赤星病と黒星病の基幹剤である DMI 剤 (demethylation inhibitors) およびブドウ褐斑病とべと病の基幹剤である QoI 剤 (quinone outside inhibitors) の効果減退が疑われた。本研究では、これら薬剤に対する耐性菌の存在を明らかにし、その防除対策として代替剤の選抜とその有効性の評価を行った。

1. ナシ赤星病

Gymnosporangium asiaticum によるナシ赤星病はナシに落葉や奇形果等の被害を与える重要病害の一つである。本病の多発要因を解明するため、福岡県八女地域の栽培圃場を対象に後ろ向きコホート研究を実施した。2013 年のアンケート調査および 2014 年の圃場調査の調査要因のうち、少発と非 DMI 剤の使用は関連したものの、DMI 剤とは発生と関係がなかった。これらの結果は赤星病に対する DMI 剤の効果減退の可能性を示唆した。

本県の赤星病菌の DMI 剤感受性を苗木を用いた薬剤の防除効果試験で評価した。2013 年に 4 栽培圃場のナシから採取したさび胞子に対してジフェノコナゾールおよびフェナリモルの防除効果は対照の感受性菌より低かった。さらに、これらの薬剤は 2013 年と 2014 年に福岡県 5 地域の‘カイツカイブキ’から採取した小生子に対しても、防除効果が低かった。

2013 年と 2014 年に実施した圃場試験において、本病に対するジフェノコナゾールおよびフェナリモルの防除効果は低かった。さらに、2014 年と 2015 年に各種薬剤の防除効果を圃場試験で評価した結果、SDHI 剤 (succinate dehydrogenase inhibitors) のペンチオピラド、多作用点阻害剤 (MsI 剤, multi-site inhibitors) のチウラムの防除価が高かった。これらの結果から、福岡県に DMI 剤耐性ナシ赤星病菌の存在が明らかとなった。

2. ナシ黒星病

Venturia nashicola によるナシ黒星病はナシ栽培において最も被害を与える病害の一つである。福岡県の一般栽培園から採取した分生子とナシ苗木を用いた薬剤防除試験の結果に基づいて、本菌の DMI 剤感受性を評価した。2007 年に 8 圃場から採取された分生子に対する DMI 剤の防除効果は、対照の感受性菌と比較して、ジフェノコナゾールで高く、ヘキサコナゾールおよびフェンブコナゾールでやや低く、フェナリモルでは低かった。2015 年に 13 圃場から採取された分生子に対する DMI 剤の防除効果は 2007 年よりそれぞれ低く、DMI 剤に対する本菌の感受性は低下していた。

ナシ苗木を用いた薬剤防除試験で代替剤と作用機作の異なる 2 種類の薬剤の混用効果を評価した。その結果、QoI 剤のマンデストロビンの防除効果が優れ、ヘキサコナゾールとイミノクタジナルベシル酸塩の混用、ジフェノコナゾールとチウラムの混用およびマン

デストロビンとチウラムの混用はそれぞれの単剤より防除効果が優れた。

各種 DMI 剤の防除効果を圃場試験で比較した。ジフェノコナゾール、ヘキサコナゾール、テブコナゾールの順で防除効果が高かった。また、マンデストロビンおよびマンデストロビンとチウラムの混用はジフェノコナゾールより防除効果が高かった。

3. ブドウ褐斑病

Pseudocercospora vitis によるブドウ褐斑病は葉を黄変、落葉させる。既報の菌叢ディスクを用いた寒天平板希釈法では感受性菌株を耐性と判定されることがあった。このため、渡辺（2009）の方法を参考に菌糸磨砕液を用いた検定方法に改良した結果、判定が明確になった。

本菌の QoI 剤感受性を改良寒天培地希釈法で評価した。2007～2009 年に県内から採取された 19 圃場 106 菌株のうち 97 菌株、2017 年に採取された 7 圃場 59 菌株のうち 53 菌株が耐性菌であった。また、耐性菌株に対する各種薬剤の防除効果をブドウ鉢植えを用いた接種試験で評価した。アゾキシストロビンの防除価は低かったが、DMI 剤のテブコナゾールおよびフェンブコナゾールの防除価は高かった。耐性菌が発生している一般生産者の加温ハウスで前述の薬剤の防除効果を評価した。開花前から幼果期にかけて 2～3 回薬剤散布を実施した結果、接種試験と同様な結果が得られた。

4. ブドウべと病

Plasmopara viticola によるブドウべと病は世界的に最も被害を与える病害の一つである。本菌の QoI 剤感受性を PCR-RFLP 法で評価した。2011 年に県内主要産地 8 圃場、24 罹病葉と 2011 年と 2013 年に場内 1 圃場 14 罹病葉および 2017 年に採取した 65 罹病葉を検定した結果、全て耐性菌であった。

2011 年から 2013 年に耐性菌発生圃場において薬剤効果試験を実施した。QoI 剤のアゾキシストロビンの防除価は低く、CAA 剤（carboxylic acid amide inhibitors）のマンジプロパミドおよび CAA 剤と Msl 剤の混合剤のベンチアカリブイソプロピル・マンゼブの防除効果は高かった。また、卵菌類による病害に対して発病抑制効果があることが知られている亜リン酸肥料も発病を抑制した。

本研究は、福岡県の落葉果樹病害で薬剤耐性菌が発生し、選抜した代替剤、すなわち、ナシ赤星病ではベンチオピラドとチウラム、ナシ黒星病ではマンデストロビンと多作用点阻害剤との混用、ブドウ褐斑病ではテブコナゾールとフェンブコナゾール、およびブドウべと病では CAA 剤等の非 QoI 剤により発生を抑制できることを明らかにした。

謝 辞

本論文をとりまとめるにあたり、論文の御校閲を賜り種々の有意義な御助言と御指導をいただいた九州大学大学院農学研究院教授 古屋成人博士,同研究院教授 尾崎行生博士,同研究院准教授 飯山和弘博士,同大学院熱帯農学研究センター准教授 松元 賢博士,同大学名誉教授 土屋健一博士に対して謹んで深謝の意を表する。

本研究は福岡県農林業総合試験場にて実施されたものであり,本研究を進めるに当たり,病虫害部前部長 角重和浩氏 (現 八女分場長), 現部長 松本幸子氏並びに関係者各位には多大な御理解と御配慮を受けた。また, 福岡県農林水産部経営技術支援課専門技術指導員 松田和也氏, 田川普及指導センター果樹花き係長 原田洋司氏, 朝倉普及指導センター果樹係長 橋本文武氏, 久留米普及指導センター果樹係長 與田伸二氏並びに果樹担当者各位には生産現場における調整, 調査, サンプル採取等にご協力を頂いた。心より感謝申し上げます。

本研究の対照菌を分譲していただいた, 日本植物防疫協会 難波孝志氏, 元千葉県農林総合研究センター 金子洋平氏 (現 千葉県印旛農業事務所), 岡山県農林水産総合センター 井上幸次博士, 山梨県果樹試験場 綿打享子氏にはご協力を頂いた。さらに, 吉備大学教授 石井英夫博士には対照菌の分譲および試験に対する御助言と有用な情報を頂いた。深く謝意を表する。

また, 九州病虫害防除推進協議会前会長 敬高浪洋一博士 (九州大学名誉教授), 現会長 山中正博博士, 常務 堤 隆文博士並びに賛助会員の皆様および全国農業協同組合連合会には試験に御支援・御協力を頂いた。心より厚く感謝を申し上げます。

最後に, 本研究を実施するに当たり, 日頃から多くの面で支援してくれた妻の菊原久乃並びに心の支えとなった二人の息子の菊原陽太, 菊原佑樹に感謝の念を表する。

引用文献

- 赤平知也 (2017) 青森県における DMI 剤耐性リンゴ黒星病菌の発生実態と対応策. 第 27 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集. pp. 46–54, 日本植物病理学会, 東京.
- 安藤萬寿男 (1963) 日本の果樹. p. 53, 古今書院, 東京.
- 青野信男 (1986) ナシ赤星病の開花期薬剤散布体系. 関東病虫研報 33: 148–149.
- 浅利 覚・堀江博道・中澤靖彦 (1994) 関東東山地区における DMI 剤耐性キュウリうどんこ病菌の発生状況. 関東病虫研報 41: 69–75.
- Cools HJ, Hawkins NJ, Fraaije BA (2013) Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathol* 62: 36–42.
- de Waard MA, Andrade AC, Hayashi K, Schoonbeek HJ, Stergiopoulos I, Zwiers LH (2006) Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Manag Sci* 62: 195–207.
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) (2010) Recommendations for Fungicide Mixtures. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures---january-2010.pdf>
- FRAC (2013) Pathogen risk list 2014. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf>.
- FRAC (2017) Minutes of the 2016 SBI Meeting Recommendations for 2017. [http://www.frac.info/docs/default-source/sbi-wg/sbi-wg---current/minutes-of-the-2016-sbi-meeting-recommendations-for-2017-\(telco-update-march-07-2017\).pdf](http://www.frac.info/docs/default-source/sbi-wg/sbi-wg---current/minutes-of-the-2016-sbi-meeting-recommendations-for-2017-(telco-update-march-07-2017).pdf)
- FRAC (2018a) List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents. http://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-resistant-plant-pathogenic-organisms_may-2018.pdf
- FRAC (2018b) Importance of multisite fungicides in managing pathogen resistance. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-multisites/frac-statement-on-multisite-fungicides-2018.pdf>
- FRAC (2018c) FRAC cord list ©*2018: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). <http://www.phi-base.org/images/fracCodeList.pdf>
- 福岡県 (1979) 昭和 55 年度果樹・茶病虫害防除基準. p. 67.
- 福岡県 (1994) 果樹病虫害防除基準 1995 年度 (改訂版). p. 109.
- 福岡県 (2007) 果樹病虫害・雑草防除の手引き平成 20 年度. p. 234.
- 福岡県病虫害防除所 (2008) 平成 20 年度発生予察情報データ集. p. 88.
- 福岡県病虫害防除所 (2013) 平成 25 年度病虫害発生予察速報第 1 号. <http://www.jpfn.ne.jp/fukuoka/jyouhou/25/soku1.pdf>

- 福岡県病害虫防除所（2014）平成 26 年度病害虫発生予察速報第 1 号。
<http://www.jppn.ne.jp/fukuoka/jyouhou/26/soku1.pdf>
- 福岡県園芸農業協同組合連合会（1981）福岡県果樹発達史。pp. 122–498。福岡県園芸農業協同組合連合会，福岡
- Furuya S, Suzuki S, Kobayashi H, Sato S, Takayanagi T (2009) Rapid method for detecting resistance to a QoI fungicide in *Plasmopara viticola* populations. *Pest Manag Sci* 65: 840–843.
- Furuya S, Mochizuki M, Saito S, Kobayashi H, Takayanagi T, Suzuki, S (2010) Monitoring of QoI fungicide resistance in *Plasmopara viticola* populations in Japan. *Pest Manag Sci* 66: 1268–1272.
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A McCaffery A (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag Sci* 58:859–867.
- Godoy CV, Seixas CDS, Soares RM, Marcelino-Guimarães FC, Meyer MC, Costamilan LM (2016) Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. *Pesqui Agropec Bras* 51: 407–421.
- 後藤知昭・九石寛之・石井英夫（2000）栃木県におけるナシ黒星病菌の DMI 剤に対する感受性分布。関東病虫研報 47: 83–84.
- Hermann M, Szith R, Zinkernagel V (1989) Reduced sensitivity of some scab isolates (*Venturia inaequalis*) from Steiermark (Austria) to EBI-fungicides. *Gartenbauwissenschaft* 54: 160–165.
- Hildebrand PD, Lockhart CL, Newbery RJ, Ross RG (1988) Resistance of *Venturia inaequalis* to bitertanol and other demethylation-inhibiting fungicides. *Can J Plant Pathol* 10: 311–316.
- Hollomon DW, Butters J (1991) Variation in sensitivity to tebuconazole in cereal mildews. *Integrated control of cereal mildews : Virulence patterns*. pp.155–160.
- 堀江宏彰・都外川絵明（2012）カンキツグリーンニング病感染樹の時間・空間分布解析による感染危険率評価とそれを用いた感染樹発生確率の予測。日植病報 78: 169–177.
- 一宮町（1978）一宮町なし赤星病防止条例。
http://www1.g-reiki.net/ichinomiya/reiki_honbun/g062RG00000278.html
- 井手洋一・田代暢哉・衛藤友紀（2003）ナシ黒星病に対する有機銅（フロアブル製剤）による発芽直前散布の効果とその重要性。佐賀果試研報 15: 54–61.
- 井手洋一・田代暢哉（2007）スピードスプレーヤーの走行法の違いがナシ黒星病および炭疽病に対する防除効果と薬液付着に及ぼす影響。日植病報 73: 289–294.
- 井手洋一・富田恭範・大谷徹・宮崎英一郎・田代暢哉（2007）ナシ黒星病の防除で使用する DMI 剤（ジフェノコナゾール）に対する各種薬剤の混用が防除効果に及ぼす影響。日植病報 73: 191。（講要）
- 井手洋一（2009）DMI 剤に対する各種薬剤の混用がナシ黒星病の防除効果に及ぼす影響。農薬時代 191: 5–8.

- 飯嶋 勉 (1976) 東京都におけるオキシカルボキシ耐性キク白さび病菌の発生. 東京農試研報 10: 31-41.
- 稲田 稔・石井英夫・Chung, Wen-Hsin・山田智子・山口純一郎・古田明子 (2008) ストロビルリン系薬剤耐性イチゴ炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*)] の発生. 日植病報 74: 114-117.
- 井上幸次 (2009a) QoI 剤耐性ブドウ褐斑病菌の発生 (岡山県の事例). 第 19 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集. pp. 50-55, 日本植物病理学会, 東京.
- 井上幸次 (2009b) 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II. pp. 111-113, 社団法人 日本植物防疫協会, 東京.
- 井上幸次 (2009c) ストロビルリン系薬剤耐性のブドウ褐斑病菌に効果の高い薬剤防除体系. http://www.pref.okayama.jp/uploaded/life/291700_1161585_misc.pdf
- 石黒 潔・小林 隆・岩館康哉・笹原剛志 (2003) 後向きコホート研究による 2003 年の宮城・岩手県下の穂いもち多発地域における発病程度変動要因の検討. 日植病報 70: 230. (講要)
- Ishii H, Yamaguchi A (1977) Tolerance of *Venturia nashicola* to thiophanate-methyl and benomyl in Japan. Ann Phytopath Soc Japan 43: 557-561.
- Ishii H, Takeda H, Nagamatsu Y, Nakashima H (1990) Sensitivity of the pear scab fungus (*Venturia nashicola*) to three ergosterol biosynthesis-inhibiting fungicides. Pestic Sci 30: 405-413.
- 石井英夫 (1994) ナシ黒星病菌. 植物防疫 48: 442-447.
- 石井英夫 (1995) 果樹病原菌の DMI 剤耐性. 第 5 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集. pp. 8-17, 日本植物病理学会, 東京.
- 石井英夫・山崎初美・三浦民子・羽賀久美子・富田恭範 (1995) ナシ黒星病菌の DMI 剤感受性のモニタリングとその方法. 日植病報 61: 607-608. (講要)
- 石井英夫 (1998) 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル (日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会編). pp. 1-9, 67-73, 日本植物防疫協会, 東京.
- 石井英夫 (1999) ストロビルリン系殺菌剤とシアン耐性呼吸阻害剤, 没食子酸 *n*-プロピルの協力作用. 第 24 回日本農薬学会講要集. p. 61, 日本農薬学会, 東京.
- 石井英夫・Chung, W.-H.・Fountaine, J. M.・棚橋 恵・間佐古将則・三宅律幸 (2006) キュウリうどんこ病菌や灰色かび病菌に見られるチトクローム *b* 遺伝子のヘテロプラスミーとストロビルリン系薬剤耐性診断法の問題点. 日植病報 72: 274. (講要)
- 石井英夫・菊原賢次 (2007a) ナシ黒星病菌における DMI 剤耐性菌の出現. 第 17 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集. pp. 49-60, 日本植物病理学会, 東京.
- 石井英夫・菊原賢次 (2007b) ナシ黒星病菌の DMI 剤耐性. 植物防疫 61: 426-429.
- 石井英夫・菊原賢次・西村久美子 (2007) ナシ黒星病菌における DMI 剤耐性菌の出現と薬剤効力の低下. 日植病報 73: 254. (講要)
- Ishii H, Yano K, Date H, Furuta A, Sagehashi Y, Yamaguchi T, Sugiyama T, Nishimura K, Hasama

- W (2007) Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. *Phytopathology* 97: 1458–1466.
- Ishii H, Fountaine J, Chung WH, Kansako M, Nishimura K, Takahashi K, Oshima M (2009) Characterization of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Manag Sci*, 65: 916–922.
- 磯田隆晴・上村道雄 (1987) エルゴステロール合成阻害剤によるナシ赤星病菌の銹子腔形成阻止効果. *日植病報* 53: 82. (講要)
- 岩波靖彦 (2016) 長野県におけるナシ黒星病菌に対する DMI 剤の効力低下. *関東病虫研報* 63: 129. (講要)
- JFRAC (Japan Fungicide Resistance Action Committee) (2017a) DMI 使用ガイドライン.
http://www.jcpa.or.jp/labo/jfrac/pdf/guidelines_pdf03.pdf
- JFRAC (2017b) QoI 使用ガイドライン. http://www.jcpa.or.jp/labo/jfrac/pdf/guidelines_pdf05.pdf
- JFRAC (2017c) カルボン酸アミド使用ガイドライン.
http://www.jcpa.or.jp/labo/jfrac/pdf/guidelines_pdf02.pdf
- JFRAC (2017d) SDHI 使用ガイドライン.
http://www.jcpa.or.jp/labo/jfrac/pdf/guidelines_pdf07.pdf
- 神谷奈多紗・井上幸次・川口 章 (2008) ブドウ褐斑病菌のストロビルリン系薬剤耐性菌の出現. *日植病報* 74: 73–74. (講要)
- 川口 章 (2012) EBC (Evidence-based Control) の概念とその実践—On-farm research におけるその重要性—. *植物防疫* 66: 450–455.
- Kawaguchi A (2014) Risk factors for bacterial spot on peach in Okayama Prefecture, Japan. *J Gen Plant Pathol* 80: 435–442.
- 川崎 努 (1997) 植物の PCR 実験プロトコール. pp. 67–68, 秀潤社, 東京.
- 菊原賢次 (2005) ナシ減農薬栽培の現地事例. 第 15 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 19–25, 日本植物防疫協会, 東京.
- 菊原賢次・石井英夫 (2008) 福岡県におけるフェナリモル耐性ナシ黒星病菌の発生. *九病虫研報* 54: 24–29.
- 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. *九病虫研報* 60: 103. (講要)
- 菊原賢次・國丸謙二・石井貴明 (2014a) 福岡県における QoI 剤耐性ブドウべと病菌の発生と防除対策. *九病虫研報* 60: 43–47.
- 菊原賢次・渡邊久多能・嶽本弘之 (2014b) 福岡県における QoI 耐性ブドウ褐斑病菌の発生と感受性検定法の改良. *日植病報* 80: 162–170.
- 菊原賢次・足立龍弥・齊藤紀子・飯山和弘・松元 賢・古屋成人 (2018a) 福岡県における DMI 剤低感受性ナシ黒星病菌の発生状況. *九病虫研報* 64: 1–6.

- 菊原賢次・橋本文武・松元 賢・飯山和弘・古屋成人 (2018b) ナシ赤星病の多発生と DMI 剤の効果減退との関連—福岡県八女地域での後ろ向きコホート研究—. 日植病報 84: 98–104.
- Kikuhara K, Iiyama K, Matsumoto M, Furuya N (2019) First report on DMI fungicide resistance in *Gymnosporangium asiaticum*, the causal agent of Japanese pear rust, in Japan. J Gen Plant Pathol 85: 49–56.
- 君島次男 (1977) ナシ赤星病の多発生とその対策—千葉県事例を中心として—. 植物防疫 31: 497–500.
- 桐野菜美子・妹尾真里・井上幸次 (2015) QoI 剤感受性低下菌が発生したブドウ病害に対する有効な防除薬剤. 岡山県農業研究所平成 27 年主要成果.
http://www.pref.okayama.jp/uploaded/life/502548_3749737_misc.pdf
- 北島 博 (1989) 果樹病害各論. pp. 232–251, 412–418, 養賢堂, 東京.
- 近藤賢一 (2011) 長野県におけるブドウ晩腐病の QoI 剤感受性の実態. 第 21 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集. pp. 29–44, 日本植物病理学会, 東京.
- 工藤 晟 (1995) 作物病原菌研究技法の基礎—分離・培養・接種— (大畑貫一編). pp. 235–236, 日本植物防疫協会, 東京.
- Ma Z, Proffer TJ, Jacobs JL, Sundin GW (2006) Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (CYP51) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. Appl Environ Microbiol 72: 2581–2585.
- 松戸市 (1977) 松戸市なし赤星病防止条例.
http://www1.g-reiki.net/matsudo/reiki_honbun/g008RG00000504.html
- 御園生 尹・深津量栄 (1970) ナシ黒星病に対するベノミル剤 (ベンレート) 散布の効果. 関東病虫研報 17: 59–60.
- 宮本拓也・富田恭範・小河原孝司 (2010) 茨城県における QoI 剤耐性ブドウ褐斑病菌の発生状況. 関東東山病虫研会報 57: 133.
- 森田 昭・早田栄一郎・永野道昭・高木英夫 (1985) ハウスブドウの褐斑病に関する研究 第 1 報 発生と防除. 九病虫研会報 31: 71–73.
- 永井裕史・三宅律幸 (2012) 秋期の生物検定で DMI 剤耐性ナシ黒星病菌を検出できる. 日植病報 78:199. (講要)
- 仲川晃生・越智 直・清水繁夫 (2010) ジャガイモ疫病の発生に及ぼす亜リン酸肥料の効果. 関東東山病虫研会報 57:5–9.
- 中村好一 (2013) 基礎から学ぶ楽しい疫学 第 3 版. pp 50–127, 医学書院, 東京.
- 中野智彦・荻原敏弘・岡山健夫 (1992) イチゴうどんこ病のエルゴステロール生合成阻害剤に対する感受性の低下について. 奈良農試研報 23: 27–32.
- 中田 昭・橋本 章・井倉勝弥太・勝浦喜代志 (1991) 殺菌剤トリフルミゾールの開発.

- 日本農薬学会誌 16: 301–313.
- 猫塚修一・羽田 厚・岩館康哉・石黒 潔 (2009) 流行盛期のリンゴ斑点落葉病の発病程度に関するコホート内症例対照研究. 日植病報 75: 314–322.
- 日本植物防疫協会 (2002) 平成 14 年度新農薬実用化試験成績 (落葉果樹) 37: 4–6.
- 日本植物防疫協会 (2003) 平成 15 年度新農薬実用化試験成績 (落葉果樹) 38: 1–4.
- 日本植物防疫協会 (2004) 平成 16 年度新農薬実用化試験成績 (落葉果樹) 39: 1–6, 97–107.
- 日本植物防疫協会 (2005) 平成 17 年度新農薬実用化試験成績 (落葉果樹) 40: 1–2, 98–103.
- 日本植物防疫協会 (2013) 平成 25 年度新農薬実用化試験成績 (落葉果樹) 48: 3–9.
- 日本植物防疫協会 (2014) 平成 26 年度新農薬実用化試験成績 (落葉果樹) 49: 4–10.
- 日本植物防疫協会 (2015) 平成 27 年度新農薬実用化試験成績 (落葉果樹) 50: 8.
- 日本植物防疫協会 (2016) 殺菌剤圃場試験法・落葉果樹.
- <http://www.jppa.or.jp/test/data/rakukin.pdf>
- 野口保弘 (1970) ナシ赤星病の発生予察法とその防除に関する研究. 福岡園試研報 9: 51–71.
- 野口保弘・竹石文雄・清水博之 (1971) ブドウ褐斑病の感染時期について (予報). 日植病報 37: 377–378. (講要)
- 野口保弘 (1983) ナシ赤星病に対する浸透性殺菌剤の防除効果. 福岡農総試研報 B-2: 71–77.
- 農林水産省大臣官房統計部 (2018) 作況調査 (果樹).
- http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kazyu/index.html
- 農林水産省消費・安全局植物防疫課 (2015) 発生予察事業の調査実施基準.
- http://www.jppn.ne.jp/jpp/bouteq/yosatu_data/4_kankitsu_etc.pdf
- Oliver RP (2014) A reassessment of the risk of rust fungi developing resistance to fungicides. *Pest Manag Sci* 70: 1641–1645.
- Saitoh K, Togashi K, Arie T, Teraoka T (2006) A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *J Gen Plant Pathol* 72: 348–350.
- 佐久間 勉 (2004) わが国における果物生産を阻害してきた果樹病害. pp. 81–84, 151–152, (財) 報農会受託刊行図書, 小平.
- Schnabel G, Jones AL (2001) The 14 α -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* 91: 102–110.
- 椎葉岳彦・小河原孝司・富田恭範 (2013) 茨城県における QoI 剤耐性ブドウべと病菌の発生について. 日植病報 79: 29. (講要)
- 篠崎 毅・楠元智子・清水伸一・中川雅之 (2015) 受粉によるキウイフルーツかいよう病菌の感染の可能性. 日植病報 81: 296. (講要)
- 白岡市 (1978) 白岡市なし赤星病防止条例.
- http://www1.g-reiki.net/shiraoka/reiki_honbun/e387RG00000441.html

- 田辺憲太郎 (2017) 殺菌剤耐性菌対策に係る FRAC の活動. 植物防疫 71: 426–432.
- 田中澄人 (1966) ナシ赤星病の発生時期に関する調査並びに薬剤防除試験. 福岡園試研報 5: 63–84.
- 田代暢哉・孫 益林・井手洋一・衛藤友紀 (1998) ブドウ褐斑病菌 (*Pseudocercospora vitis*) の分生孢子形成条件. 九農研 60: 74. (講要)
- 田代暢哉 (2015) EBC の概念に基づいた果樹病害防除技術の改善に関する研究. 日植病報 81: 180–184.
- 富樫浩吾 (1950) 果樹病学. pp. 219–220, 朝倉書店, 東京.
- 富田恭範・石井英夫・田代暢哉・中尾茂夫・梶谷裕二・渡辺博幸・那須英夫 (1992) フェナリモル感受性の低下したナシ黒星病菌の検出. 日植病報 58: 609. (講要)
- Tomita Y, Ishii H (1998) Reduced sensitivity to fenarimol in Japanese field strains of *Venturia nashicola*. Pestic Sci 54: 150–156.
- 富田恭範・小河原孝司・長塚 久 (2003) ナシ黒星病に対する DMI 剤の防除効果. 関東東山病虫研報 50: 75–77.
- 梅本清作・村田明夫・長井雄治 (1989) ナシ赤星病菌小生子の飛散距離. 日植病報 55: 250–253.
- 梅本清作 (1993) ニホンナシ黒星病の発生生態と防除に関する研究. 千葉農試特報 22: 1–99.
- 梅本清作・大谷徹・矢内浩二・竹内妙子 (2003) 殺菌剤の散布回数半減をめざしたナシ病害防除体系の検討. 日植病報 69: 124–131.
- Villani SM, Biggs AR, Cooley DR, Raes JJ, Cox KD (2015) Prevalence of myclobutanil resistance and difenoconazole insensitivity in populations of *Venturia inaequalis*. Plant Dis 99: 1526–1536.
- Villani SM, Hulvey J, Hily JM, Cox KD (2016) Overexpression of the CYP51A1 gene and repeated elements are associated with differential sensitivity to DMI fungicides in *Venturia inaequalis*. Phytopathology 106: 562–571.
- 渡辺秀樹 (2009) 岐阜県におけるトマト葉かび病菌のアゾキシストロビン感受性の低下. 第 19 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集. pp. 42–49, 日本植物病理学会, 東京.
- 綿打亨子・功刀幸博・村上芳照・内田一秀 (2011) 山梨県のブドウべと病菌における QoI 剤耐性菌の分布とメタラキシル耐性菌の出現. 日植病報 77: 162–163. (講要)
- Wicks TJ, Magarey PA, Wachtel MF, Frensham AB (1991) Effect of postinfection application of phosphorous (Phosphonic) acid on the incidence and sporulation of *Plasmopara viticola* on grapevine. Plant Dis 75: 40–43.
- 山口純一郎・稲田 稔・松崎正文 (2000) DMI 耐性ナスすすかび病菌の発生. 日植病報 66: 78–84.

- 山下 亨・和田美佐・武田和男（2012）*Pythium* 属菌によるイネ苗立枯病の発病に及ぼす亜リン酸肥料の影響．関東東山病虫研会報 59: 11-13.
- 矢野和孝・川田洋一（2003）ストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌の発生．日植病報 69: 220-223.
- 安田文俊・渡辺博幸・伊澤宏毅（2003）鳥取県におけるナシ黒星病菌のフェナリモル感受性モニタリングと DMI 剤の散布時期の違いによる防除効果．関西病虫研報 45: 5-9.
- 横澤志織（2018）長野県における殺菌剤耐性の現状と対策．平成 29 年度常緑・果樹病害虫研究会病害分科会資料．農研機構編．pp. 12-20.

Summary

Occurrence and control of fungicide resistance in plant pathogens of deciduous fruit tree diseases in Fukuoka Prefecture

Recently, heavy outbreaks of Japanese pear rust, Japanese pear scab, grapevine leaf blight, and grapevine downy mildew have occurred in Fukuoka Prefecture, Japan. Sterol demethylation inhibitor (DMI) fungicides and quinone outside inhibitor (QoI) fungicides have been used in the control of Japanese pear diseases and grapevine diseases, respectively. The purpose of this study is to identify occurrence of fungicide resistant strains of these diseases and to find effective fungicides for them.

Japanese pear rust, caused by *Gymnosporangium asiaticum*, is one of the most important fungal plant diseases affecting Japanese pear cultivation. A retrospective cohort study of commercial orchards in Yame region was carried out to analyze the cause. Among the factors investigated, the use of non-DMI fungicides was related only with the damaged groups graded on disease severity in 2013 and disease incidence in 2014. However, DMI fungicides did not control rust effectively. Moreover, the sensitivity of the fungus to DMI fungicides was estimated based on fungicide efficacy trials *in vivo*. Young juniper trees pretreated with DMI fungicides were inoculated with aeciospores collected from infected pear leaves at four orchards in Fukuoka Prefecture in 2013. Difenoconazole and fenarimol were ineffective against all inocula. Similarly, these fungicides were ineffective against basidiospores collected from infected juniper twigs of five areas in 2013 and 2014. Efficacy of fungicide for control of the rust was evaluated in the experimental orchard. Difenoconazole and fenarimol have lost their ability to control the rust. In contrast, penthiopyrad (succinate dehydrogenase inhibitor, SDHI) and thiram (multi-site inhibitor) were effective. These results indicate the occurrence of DMI fungicide-resistant Japanese pear rust in Fukuoka Prefecture.

Japanese pear scab, caused by *Venturia nashicola*, is one of the most prevalent Japanese pear diseases in Japan. The sensitivity of the fungus to DMI fungicides was estimated based on fungicide efficacy trials *in vivo*. Conidia were collected from infected leaves and fruitlets at eight orchards in Fukuoka Prefecture in 2007. Young pear trees pretreated with DMI fungicides were inoculated. Difenoconazole showed a high level of efficacy. However, hexaconazole and fenbuconazole showed slightly lower levels of efficacy, and fenarimol showed an even lower level of efficacy. Subsequently, the efficacy of DMI fungicides was evaluated against the inocula at 13 orchards in Fukuoka Prefecture in 2015. The efficacy of four DMI fungicides in 2015 significantly reduced in comparison with those in 2007 ($P < 0.05$, Welch test). The efficacy of non-DMI fungicides and a mixture of two fungicides with a different mode of action was evaluated *in vivo*.

Mandestrobin (QoI) was effective. A mixture of difenoconazole and thiram, and of mandestrobin and thiram were more effective than individual fungicides. Field trials were performed to evaluate the efficacy of fungicides in 2016 and 2017. The highest efficacy in DMI fungicides was difenoconazole, followed in order by hexaconazole and tebuconazole. Mandestrobin and the mixture of mandestrobin and thiram were more effective than difenoconazole.

Grapevine leaf blight, caused by *Pseudocercospora vitis*, results in leaf loss through etiolation. Sensitivity tests against QoI fungicides were performed using medium amended with azoxystrobin. Some of the sensitive isolates were mistaken to be resistant when mycelial discs were placed on the test medium in the method followed in the previous study. Sensitive and resistant isolates could be distinguished when mycelial suspension was used instead of mycelial discs. The QoI fungicide sensitivity of isolates collected from infected leaves at commercial orchards in Fukuoka Prefecture was determined using the modified method. Ninety-seven of 106 isolates collected from 2007 to 2009 and 57 of 59 isolates collected in 2017 were resistant. Some fungicides were evaluated to control for QoI resistant isolates *in vivo* and in two commercial greenhouses. Tebuconazole and fenbuconazole were effective. However, QoI fungicides were ineffective.

Grapevine downy mildew, caused by *Plasmopara viticola*, is one of the major dangers to grapevines worldwide. The sensitivity of the fungus against QoI fungicide was assessed by PCR-RFLP analysis. Thirty-one leaves were collected from nine grapevine orchards in Fukuoka Prefecture in 2011 and 65 leaves from 13 orchards in 2017. All samples were determined QoI resistant. The efficacy of some fungicides on the disease was investigated in the experimental orchard with the pathogen resistant to QoI fungicides from 2011 to 2013. Mandipromaid (carboxylic acid amide inhibitor, CAA), a mixture of benthialvalicarb-isopropyl (CAA) and mancozeb, and potassium phosphite were significantly effective. However, azoxystrobin was ineffective.

This study revealed the occurrence of fungicide resistance in fungal plant pathogens of deciduous fruit tree diseases in Fukuoka Prefecture. Furthermore, effective fungicides were found; penthiopyrad and thiram against DMI fungicide-resistant strains of *G. asiaticum*, a mixture of mandestrobin and multi-site inhibitor fungicide against DMI fungicide-resistant strains of *V. nashicola*, tebuconazole and fenbuconazole against QoI fungicide-resistant strains of *P. vitis*, and CAA fungicides against QoI fungicide-resistant strains of *P. viticola*, respectively.

福岡県農林業総合試験場特別報告
第11号

福岡県における落葉果樹病害の
薬剤耐性糸状菌の現状と対策に関する研究

発行 令和2年 3月

福岡県農林業総合試験場
〒818-8549 福岡県筑紫野市吉木 587
TEL 092-924-2971

著者 菊原 賢次

印刷所 秀英社印刷株式会社
〒818-0052 福岡県筑紫野市武蔵3-2-6
TEL 092-923-3154