メパニピリム耐性灰色かび病菌の発生

鈴木 啓史^{1*}・黒田 克利¹・貴田 健一²・松澤 章彦²・高垣真喜一²

ABSTRACT

SUZUKI, H.^{1*}, KURODA, K.¹, KIDA, K.², MATSUZAWA, A.² and TAKAGAKI, M.² (2011). Occurrence of mepanipyrim-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Jpn. J. Phytopathol. 77: 1-6.

We tested 977 strains of *Botrytis cinerea*, isolated from eggplants and tomatoes between 2002 and 2006 in Mie Prefecture, for their sensitivity to mepanipyrim. In the *in vitro* assays using the FGA-paper disc method, the MIC values for 974 strains were 3 ppm, whereas three strains collected from a greenhouse in 2005 had MIC values >3 ppm. In an *in vivo* assay using cucumber to determine whether the three strains were resistant to mepanipyrim, mepanipyrim gave 100% control of the sensitive strains at 100 ppm but had poor efficacy against the three strains and a resistant strain isolated from Europe. Therefore, the strains were confirmed to be resistant to mepanipyrim. This is the first report of mepanipyrim-resistant strains of *B. cinerea* in Japan. The practical dosage of mepanipyrim WP had excellent efficacy against resistant strains to mepanipyrim in the field trial. However, the rate of resistant strains significantly increased in the area treated with mepanipyrim compared with the nontreated area.

(Received April 16, 2010; Accepted September 17, 2010)

Key words: anilinopyrimidine, mepanipyrim, fungicide resistance, *Botrytis cinerea*, monitoring

緒 言

三重県では、施設野菜における灰色かび病菌のベンズイミダゾール系剤、ジカルボキシイミド系剤、*N*-フェニルカーバメート系剤に対する感受性検定を1995年から実施している。ベンズイミダゾール系剤および*N*-フェニルカーバメート系剤は、検定当初から高い耐性菌率を示しており（黒田・富川, 1999）、現在でも灰色かび病に対して防除効果が期待できない状況である。一方、ジカルボキシイミド系剤は、2002年から2006年の平均で耐性菌率は44.3%であり（鈴木, 未発表）、耐性菌の施設内での存在有無を予めモニタリングすることは、防除対策を講じるために重要である。

このような状況下で、三重県では、野菜類灰色かび病防除薬剤としてアニリノピリミジン系及びフェニルピロール系などの他系統剤の使用を推奨している。しかし、アニリノピリミジン系剤については、既にヨーロッパで灰色かび病菌の耐性菌が報告されていることから（Forster and Staub, 1996）、国内での耐性菌発生にも注意が必要である。そこで三重県で

は、2002年よりアニリノピリミジン系及びフェニルピロール系薬剤についても、既存の手法を用いて野菜類の灰色かび病菌を対象に感受性検定を開始している（Takagaki *et al.*, 2004; 平田, 2000）。2006年までの5年間の調査で合計977菌株について感受性検定を実施したが、フェニルピロール系剤については、感受性が低下した灰色かび病菌は検出されなかった。一方、アニリノピリミジン系剤については、2005年に分離された3菌株で感受性の低下が疑われたため、詳細な検討を行った。本稿では、アニリノピリミジン系剤として国内で農薬登録を取得しているメパニピリムを用いて各種試験を行ったので、その概要を報告する。

材料および方法

1. 灰色かび病菌の分離 2002～2006年に、三重県内の主要なトマト及びナス栽培地域から、灰色かび病菌を合計977菌株採取した（第1表）。現地において、果実、葉および茎の孢子形成標徴部に、火炎滅菌した白金耳でわずかに触れ、素寒天平板培地（1.75%寒天）に画線した後、実験室内

¹ 三重県農業研究所（〒515-2316 三重県松阪市嬉野川北町530） Mie Prefecture Agricultural Research Institute, Uresinokawakita-cho 530, Matusaka-shi, Mie 515-2316, Japan

² クミアイ化学工業株式会社（〒439-0031 静岡県菊川市加茂3360） KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD., Kamo 3360, Kikugawa-shi, Shizuoka 439-0031, Japan

* Corresponding author (E-mail: suzukh09@pref.mie.jp)

第1表 採取年および採取市町村別の検定菌株数

採取市町村 ^{a)}	採取年		検定菌株数				計
	2002	2003	2004	2005	2006		
木曽岬町	41	40	31	35	29		176
長島町	40	36	31	54	54		215
四日市市				16	12		28
鈴鹿市					6		6
津市	20	16	13	23	9		81
河芸町	4	8					12
久居市		4					4
白山町	4	3	4				11
松阪市				19	8		27
嬉野町	15	15	12				42
三雲町	12	12	5				29
多気町		23			6		29
勢和村		16					16
明和町	59	56			5		120
伊勢市	12		10	25	20		67
小俣町	20		17				37
熊野市			21	27	23		71
紀宝町				3	3		6
計	227	229	144	202	175		977

a) 合併前の市町村名(2002年)で表記

のインキュベーター(20°C)で培養した。そこから生育した菌糸先端を切り取り、単菌糸分離を行ったものをPDA(Potato Dextrose Agar “Nissui” 39 g/l)斜面培地で保存した。

2. FGA ペーパーディスク法によるメパニピリムに対する感受性検定 灰色かび病菌のメパニピリムに対する感受性検定を、FGA ペーパーディスク法(Takagaki *et al.*, 2004)で行った。すなわち、FGA 培地(fructose 10 g, gelatin 2 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄・7H₂O 0.5 g, NaNO₃ 2 g, Agar 15 g, 蒸留水 1 l)に、滅菌蒸留水で 300 ppm に調整したメパニピリム水和剤(有効成分 40%)を培地中に 1% 添加することにより、有効成分が 3 ppm となるよう検定培地を作製した。予め各菌株を PDA 平板培地上で 25°C 3 日間培養し、さらに BLB 照射下で 4 日間培養して孢子形成させた灰色かび病菌の菌叢を、直径 6 mm のコルクボーラーで打ち抜き、滅菌水 1 ml に加え孢子懸濁液(約 10⁵ 個/ml)を調製した。この孢子懸濁液に、滅菌済みペーパーディスク(東洋濾紙抗生物質検定用 φ 6 mm)を浸し、ボルテックス後、滅菌ろ紙で過剰な水分を軽く除去し、メパニピリム 3 ppm 含有 FGA 培地に置床した。暗黒下 20°C で 4 日間培養後、菌叢生育の有無を調査した。

3. ヨーロッパで分離されたメパニピリム耐性菌との感受性比較 前述の FGA ペーパーディスク法で生育した菌株が耐性菌であるか確認するため、ヨーロッパで分離されたアニ

リノピリミジン系薬剤耐性灰色かび病菌(以下 EU 耐性菌)(Takagaki *et al.*, 2004)を供試し、メパニピリムに対する感受性を比較した。

3-1. FGA 培地を用いた菌糸生育阻止試験(*in vitro* 試験)

メパニピリム水和剤を滅菌蒸留水に溶解し、最終濃度が 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 ppm になるよう FGA 培地に添加後、前述の通り調製した孢子懸濁液含有ペーパーディスクを FGA 培地に置床した。暗黒下 20°C で 4 日間培養後、菌叢直径を計測し、次式により薬剤の菌糸生育抑制率を算出した。

$$\text{菌糸生育抑制率(\%)} = \{(\text{無処理区平均菌叢直径} - \text{薬剤処理区平均菌叢直径}) / \text{無処理区平均菌叢直径}\} \times 100$$

3-2. キュウリ灰色かび病防除効果(ポット試験)

播種 1 週間後のキュウリ(相模半白)子葉に、メパニピリムの最終濃度が 1, 3, 10, 30, 100 ppm となるように調製した薬液を散布した。また、無処理区には、水道水を散布した。風乾後、キュウリ子葉中央に置いた滅菌ペーパーディスクに、1/2PDB(Difco™ Potato Dextrose Broth 12 g/l, Tween20 0.01%)で約 10⁶ 個/ml に調製した各菌株の孢子懸濁液を 50 μl 滴下した。株全体をビニール袋で覆い高湿度とし、20°C, 12 時間日照条件下で、人工気象室内に 3 日間静置した後、発生した病斑の直径を計測し、次式によりメパニピリムの防除価を算出した(田中ら, 1987)。

$$\text{防除価} = \{(\text{無処理区平均病斑直径} - \text{薬剤処理区平均病斑直径}) / \text{無処理区平均病斑直径}\} \times 100$$

4. 三重県で分離されたメパニピリム耐性菌に対する防除効果(圃場試験) 三重県で分離されたメパニピリム耐性菌に対する防除効果を評価するため、耐性菌と感受性菌を混合接種した際のトマト灰色かび病に対するメパニピリムの防除効果を確認した。試験は、2007 年 1 月 17 日に温室内ベッドにトマト(品種:ハウス桃太郎)を 10 株/区となるよう定植し、メパニピリム水和剤 3,000 倍散布区、フルジオキソニル水和剤 1,500 倍散布区、無処理区の 3 区を 3 連で設置した。第 3 果房開花期の 3 月 12 日から 1 週間間隔で各薬剤を 3 回散布した。接種源は、耐性菌(M0518)と感受性菌(M05213)をそれぞれナス果実に接種し、BLB 照射下で孢子形成させたものを用いた。この接種源を、第 1 回散布直後から各区にそれぞれ 1 果ずつ吊り下げ、耐性菌と感受性菌が 1:1 になるように混合接種した。

調査は、各区 10 株について、最終散布 1 週間後まで全着生果の発病を調査し、累計により発病果率を算出した。防除価は次式により算出した。

$$\text{防除価} = 100 - (\text{処理区の平均発病果率} / \text{無処理区の平均発病果率}) \times 100$$

5. 発病部位から再分離した灰色かび病菌のメパニピリムに対する感受性 薬剤散布の有無による耐性菌密度の変化を確認するため、前述の圃場試験のメパニピリム水和剤散布区と無処理区の各初期病斑から、病斑ごとに灰色かび病菌を1～6菌株単孢子分離し、メパニピリムに対する感受性を検定した。単孢子分離は、それぞれの区の果実および葉の孢子形成標徴部に、火炎滅菌した白金耳でわずかに触れ、素寒天平板培地（1.75%寒天）に画線し、そこから行った。これをPDA斜面培地に保存し、前述のFGAペーパーディスク法によりメパニピリムに対する感受性を検定した。

結 果

1. 三重県で分離された灰色かび病菌のメパニピリムに対する感受性

2002年から2006年までに三重県内のトマト及びナスから分離された灰色かび病菌合計977菌株について、FGAペーパーディスク法（Takagaki *et al.*, 2004）で感受性検定を行った結果、99.7%（974菌株）はメパニピリムに対するMIC値が3ppm以下であり、明らかに感受性菌であると判断された。一方、0.3%（2005年にナス生産ハウス1地点から採取した4菌株の内3菌株：M0517, M0518, M0520）はMIC値が3ppmより高く、明らかに感受性が低下していると考えられた（第1図）。

2. ヨーロッパで分離されたメパニピリム耐性菌との感受性比較

前述のFGAペーパーディスク法で菌叢の生育が認められた3菌株（M0517, M0518, M0520）とEU耐性菌について、メパニピリムの濃度別にFGA培地を用いて菌糸生育抑制率を調べた。メパニピリムは1ppmで感受性菌（M05213）に対して抑制率100%であったが、EU耐性菌に対しては抑制率26.5%, M0517は13.9%, M0518は21.5%, M0520は35.6%であり、2005年に三重県で分離された3菌株に対するメパニピリムの抑制率は明らかに低かった（第2表）。また、メパニピリム30ppmでは、EU耐性菌に対して抑制率は68.8%であるのに対し、M0517は63.5%, M0518は68.4%, M0520は65.0%であり、抑制率の程度はEU耐性菌とほぼ同等であった。

一方、メパニピリムのキュウリ灰色かび病に対する防除効果を接種試験で調べた結果、メパニピリム30ppmは感受性菌（M05213）に対しては防除価100、EU耐性菌に対しては防除価28.7であったのに対し、M0517, M0518, M0520に対してはそれぞれ防除価20.6, 24.3, 24.9であった。（第3表）。また、同様にメパニピリム濃度100ppmでの各菌株に対する防除価は、EU耐性菌で45.1であったのに対し、M0517は

第1図 メパニピリム3ppm含有FGAペーパーディスク法により生育した灰色かび病菌

上段：メパニピリム3ppm含有FGA培地

下段：FGA培地

20°C, 4日間培養。菌株は左から、M0517, M0518, M0520（以上耐性菌）、M05213（感受性菌）。

45.3, M0518は38.6, M0520は35.1とEU耐性菌と防除価はほぼ同等であった。

3. 三重県で分離されたメパニピリム耐性菌に対する防除効果（圃場試験）

メパニピリム耐性菌の発生圃場における防除効果を確認するため、耐性菌と感受性菌を1:1で混合接種し、トマト灰色かび病菌の防除効果試験を行った。その結果、無処理区の発病果率は27.4%の中発生条件で、対照のフルジオキソニル水和剤1,500倍散布は、防除価92.3と高い防除効果を示した。一方、メパニピリム水和剤3,000倍散布は、対照のフルジオキソニル水和剤とほぼ同等の防除価92.0と高い防除効果を示しており、耐性菌の発生圃場でも安定した高い防除効果を示した（第4表）。

4. 発病部位から再分離した灰色かび病菌のメパニピリムに対する感受性

メパニピリム耐性菌の生存力を評価するため、前記したトマト灰色かび病菌の防除効果試験で生じた病斑ごとに灰色かび病菌を単孢子分離し、FGAペーパーディスク法で感受性検定を行った。その結果、病斑中に薬剤感受性の異なる菌株が混在していることは無く、どちらか一方のみが分離され、メパニピリム水和剤散布区での耐性菌分離病斑率は61.1%、無処理区では17.4%であった。このように、メパニピリム水和剤散布区では高い防除効果を示したものの、耐性菌分離病斑率は増加傾向にあり、対照的に無処理区での耐性菌分離病斑率は減少した（第5表）。

第2表 ヨーロッパで分離されたメパニピリム耐性菌との菌糸生育抑制効果の比較

FGA ペーパーディスク法 による MIC 値 ^{a)}	供試菌株	メパニピリム濃度 (ppm) と抑制率 (%) ^{b)}						無処理区平均菌叢直径 (mm)
		0	0.3	1	3	10	30	
>3	M0517	0	0	13.9	43.2	58.1	63.5	44.1
	M0518	0	0	21.5	39.9	63.4	68.4	42.3
	M0520	0	8.3	35.6	55.2	63.1	65.0	38.7
	EU 耐性菌 ^{c)}	0	0	26.5	48.6	63.1	68.8	39.4
≤ 3	M05213	0	78.4	100	100	100	100	43.1

a) メパニピリム 3 ppm 含有 FGA ペーパーディスク法における 20°C, 4 日間培養後の菌叢生育の有無により判定.

b) 菌糸生育抑制率 (%) = {(無処理区平均菌叢直径 - 薬剤処理区平均菌叢直径) / 無処理区平均菌叢直径} × 100.

c) ヨーロッパで分離されたアニリノピリミジン系薬剤耐性灰色かび病菌.

第3表 ヨーロッパで分離されたメパニピリム耐性菌との接種試験^{a)} による防除効果の比較

FGA ペーパーディスク法 による MIC 値 ^{b)}	供試菌株	メパニピリム濃度 (ppm) と防除価 ^{c)}						無処理区平均病斑直径 (mm)
		0	1	3	10	30	100	
>3	M0517	0	0	2.4	10.3	20.6	45.3	18.4
	M0518	0	2.3	0	21.5	24.3	38.6	20.1
	M0520	0	0	6.1	8.7	24.9	35.1	19.5
	EU 耐性菌 ^{d)}	0	0	0	14.6	28.7	45.1	18.3
≤ 3	M05213	0	27.9	47.3	89.9	100	100	21.6

a) 接種試験: 薬剤散布したキュウリ子葉中央に滅菌ペーパーディスクを置き, 孢子懸濁液 (約 10⁶ 個/ml) を 50 μl 滴下し, 20°C 湿室で 3 日間静置後, 8 子葉の病斑直径を計測し, 病斑形成抑制率を算出した.

b) メパニピリム 3 ppm 含有 FGA ペーパーディスク法における 20°C, 4 日間培養後の菌叢生育の有無により判定.

c) 防除価 = {(無処理区平均病斑直径 - 薬剤処理区平均病斑直径) / 無処理区平均病斑直径} × 100.

d) ヨーロッパで分離されたアニリノピリミジン系薬剤耐性灰色かび病菌.

第4表 耐性菌と感受性菌の混合接種圃場における防除試験

供試薬剤	希釈倍数 (倍)	区	調査 果数	発病果数累計			発病果率 (%) ^{b)}	防除価 ^{c)}	薬害 ^{d)}
				3/19 ^{a)}	3/26	4/2			
メパニピリム 水和剤 有効成分 40.0%	3,000	I	123	0.0	0.0	2.0	1.6	92.0	—
		II	129	0.0	0.0	1.0	0.8		—
		III	119	0.0	2.0	5.0	4.2		—
		平均	123.7	0.0	0.7	2.7	2.2		—
フルジオキシニル 水和剤 有効成分 20.0%	1,500	I	127	0.0	1.0	2.0	1.6	92.3	—
		II	149	0.0	2.0	6.0	4.0		—
		III	135	0.0	0.0	1.0	0.7		—
		平均	137.0	0.0	1.0	3.0	2.1		—
無処理		I	119	0.0	1.0	22.0	18.5		
		II	143	0.0	4.0	56.0	39.2		
		III	139	0.0	2.0	34.0	24.5		
		平均	133.7	0.0	2.3	37.3	27.4		

a) 発病果数の調査日.

b) 発病果率 (%) = 4 / 2 (最終散布 7 日後) までの発病果数累計 / 調査果数 × 100.

c) 防除価 = 100 - (処理区の平均発病果率 / 無処理区の平均発病果率) × 100.

d) + : 薬害あり - : 薬害なし.

第5表 耐性菌と感受性菌の混合接種防除試験における感受性検定

処理	病斑数		
	分離病斑数	耐性菌 ^{a)}	感受性菌
メパニピリム 水和剤	18	11 61.1%	7 38.9%
無処理	23	4 17.4%	19 82.6%

上段：菌株数，下段：比率。

a) メパニピリム 3 ppm 含有 FGA ペーパーディスク法における 20°C，4 日間培養後の菌叢生育の有無により判定。

考 察

三重県において 2002～2006 年の 5 年間にトマト及びナスから分離した灰色かび病菌 977 菌株を用いて、メパニピリムに対する感受性を調査した。FGA ペーパーディスク法 (Takagaki *et al.*, 2004) による検定の結果、2005 年にナス生産ハウス 1 地点から採取した 4 菌株の内 3 菌株 (M0517, M0518, M0520 菌株) がメパニピリム 3 ppm で生育が認められ、薬剤感受性の低下が疑われた。これら 3 菌株のメパニピリムに対する感受性を詳細に調べるため、メパニピリムを段階的に希釈し FGA 培地上での菌糸生育阻止試験を行った。その結果、100 ppm でも菌叢生育が認められ、MIC 値は 100 ppm より大きいと判断された (データ略)。また、キュウリ子葉を用いた接種試験 (田中ら, 1987) によりメパニピリムの防除効果を確認したところ、感受性菌の M05213 に対しては高い防除価を示したが、これら 3 菌株に対しては防除価が低かった (データ略)。そこで、これら 3 菌株と EU 耐性菌とを FGA 培地を用いた菌糸生育阻止試験及びキュウリ子葉を用いた接種試験にて比較した。その結果、菌糸生育抑制率及び防除価ともに、これら 3 菌株と EU 耐性菌は同様の傾向を示し、2005 年に三重県内で分離された灰色かび病菌 3 菌株は、メパニピリム耐性菌であることが示唆された。なお、日本では初報告となる。また、灰色かび病菌のアニリノピリミジン系剤耐性菌は、メパニピリム、シプロジニル、ピリメタニル間で交差関係にあることが既に報告されているが (Forster and Staub, 1996)、これら 3 剤のうち国内でトマト及びナスに登録のある薬剤は、メパニピリム剤のみである。

2005 年に耐性菌が検出された施設では、メパニピリム水和剤は他剤とのローテーション散布を行っており、高い防除効果を示していた。三重県内の他の施設でも、メパニピリム水和剤による防除は実用上問題がなく、同一施設を含め 2006 年分離菌から耐性菌は一切検出されず、メパニピリム耐性菌が拡大する傾向はなかった。

耐性菌と感受性菌を 1:1 で混合接種しトマト灰色かび病の防除効果試験をハウス内で行った結果、メパニピリム水和剤の防除効果は高かった。このことは、耐性菌が検出された施設で、防除効果に問題がなかったことと一致するが、メパニピリム水和剤の連続散布区から分離した菌株の耐性菌率は増加傾向にあったことから、本剤の連続散布は耐性菌密度を増加させ、徐々に防除効果を低下させる可能性もあると考えられた。また、耐性菌と感受性菌を同じ比率で接種しているにも関わらず、無処理区では感受性菌の分離率が高かったことは、薬剤を使わない条件下では耐性菌よりも感受性菌の方が生存力が強いのではないかと考えられた。このことから、耐性菌が発生しても、しばらく薬剤の使用を中止すれば、感受性菌が増え耐性菌が減少する可能性があるかと推察された。

耐性菌リスクの高い灰色かび病菌防除対策については、まず、圃場衛生、温湿度管理など、灰色かび病が蔓延しにくい環境をつくる必要がある。そのうえで、発病前に薬剤を予防散布することで灰色かび病菌の密度を下げ、多くの灰色かび病菌が存在する中での薬剤散布による淘汰を避けるべきである。さらに、作用機構の異なる薬剤をローテーション散布することで、耐性菌の発生を未然に予防すべきと考える。また、モニタリングを継続して行うことにより、感受性低下を早期に検出し、検出された薬剤の使用を一時中止するなど、耐性菌密度の増加を防ぐことが重要である。

摘 要

2002～2006 年の 5 年間に、三重県内のトマト・ナス生産ハウスより 977 菌株の灰色かび病菌を分離し、アニリノピリミジン系殺菌剤であるメパニピリムに対する感受性を検討した。FGA ペーパーディスク法では、974 菌株の MIC 値が 3 ppm 以下であったが、2005 年に 1ヶ所から分離した 3 菌株 (M0517, M0518, M0520 菌株) の MIC 値は 3 ppm より高かった。これらの菌株について接種試験を行ったところ、100 ppm でも防除効果の低下が認められ、その程度がヨーロッパで分離された耐性菌と同様であったことから、メパニピリム耐性菌であることが確認された。アニリノピリミジン系薬剤耐性菌は、ヨーロッパの灰色かび病菌で報告されているが、日本では初報告となる。メパニピリム耐性菌を接種した防除効果試験において、メパニピリム水和剤散布は高い防除効果を示したが、無処理区に比べ耐性菌密度が高まる傾向であった。

引用文献

- Forster, B. and Staub, T. (1996). Basis for use strategies of anilino-pyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protec.* 15(6): 529–537.
- 平田明靖 (2000). 灰色かび病菌のフルジオキシニルに対する感受性検定法. 第 10 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 (殺菌剤耐性菌研究会編) pp. 27–33. 日本植物病理学会.
- 黒田克利・富川 章 (1999). トマト灰色かび病菌の薬剤耐性の推移および胞子形成に及ぼすポリエステル系硬質フィルムの影響. 関西病虫研報 41: 45–46.
- Takagaki, M., Miura, I. and Nagayama, K. (2004). A Method for Monitoring the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Mepanipyrim. *J. Pestic. Sci.* 29(4): 369–371.
- 田中 薫・木曾 皓・荒木隆男 (1987). 野菜類灰色かび病菌に対する殺菌剤検定法について. 日植病報 53(1): 65–66. (講要)