福岡県における DMI 剤低感受性ナシ黒星病菌の発生状況

菊原 賢次^{1), 2) †}・足立 龍弥¹⁾・齊藤 紀子¹⁾・飯山 和弘²⁾・松元 賢³⁾・古屋 成人²⁾
(¹⁾福岡県農林業総合試験場・²⁾九州大学大学院農学研究院・³⁾九州大学熱帯農学研究センター)

Development of resistance to DMI fungicides in *Venturia nashicola*, the causal agent of the Japanese pear scab, in Fukuoka Prefecture, Japan. Kenji Kikuhara^{1), 2) †}, Tatsuya Adachi¹⁾, Noriko Saito¹⁾, Kazuhiro Iiyama²⁾, Masaru Matsumoto³⁾, and Naruto Furuya²⁾ (¹⁾Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center, 587 Yoshiki, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan, ²⁾Faculty of Agriculture, Kyushu University, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan, ³⁾Institute of Tropical Agriculture, Kyushu University, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan)

Japanese pear scab caused by *Venturia nashicola* is one of the most prevalent diseases of Japanese pear trees in Japan. We estimated the sensitivity of this fungus to sterol demethylation inhibitor (DMI) fungicides on the basis of the disease severity in young pear trees pretreated with DMI fungicides and inoculated with fungal populations collected from commercial orchards in Fukuoka Prefecture in 2015. The protective values, 26.4-100.0 for difenoconazole (active ingredient (a.i.), 25 ppm) ; 42.5-85.3, hexaconazole (a.i., 10 ppm) ; 25.8-44.2, fenbuconazole (a.i., 27.5 ppm) ; and 30.6-49.9 fenarimol (a.i., 30 ppm), were significantly reduced in comparison with those recorded in 2007 ($P < 0.05$, Welch test). In an experimental orchard in Fukuoka Prefecture, the efficacy of difenoconazole (protective value, 87.6 in cultivar 'Kousui' and 74.7 in cultivar 'Housui') was higher than that of hexaconazole (protective value, 73.3 in 'Kousui' and 59.3 in 'Housui') in 2016. In a sensitivity test on young pear trees, the efficacies of difenoconazole (protective values, 85.9) and hexaconazole (protective values, 42.6) against fungal population from that orchard were similar to those in the orchard test. Therefore, the resistance of *Venturia nashicola* to DMI fungicides has a broad range in Fukuoka Prefecture.

Keywords : FRAC Cord 3, fungicide resistance, Japanese pear scab, sterol demethylation inhibitor, *Venturia nashicola*

緒 言

ナシ黒星病は *Venturia nashicola* S. Tanaka & S. Yamamoto によって引き起こされ、ニホンナシ (*Pyrus serotina* Rehder var. *culta* Rehder) の葉や果実に黒色すす状の病斑を形成し、収量や品質に影響を与える。現在の栽培品種の多くは罹病性であり、ナシ栽培における重要病害のひとつである(北島, 1989; 佐久間, 2004)。特に、主要品種である「幸水」は果実肥大期も感受性が高く(梅本, 1993)、本県ではその防除の

ため、作用機作の異なる様々な殺菌剤で年間十数回の薬剤散布が行われる(菊原, 2005)。防除薬剤の中でも、1986年以降において、ナシで登録されたトリフルミゾールを初めとするステロール脱メチル化阻害剤(DMI 剤)は、本病に優れた防除効果を示し、現在、後発のジフェノコナゾール等が全国の栽培圃場で普及している。

2000年頃、生産現場から本病に対する DMI 剤の薬効低下が指摘され、低感受性ナシ黒星病菌の発生が疑われた。一般的に感受性検定で用いられる薬剤含有寒天培地を用いた検定法は、ナシ黒星病菌の DMI 剤感受性では、実際の防除効果低下と必ずしも一致しない(石井, 1998; 石井・菊原, 2007)。このため、菊原・

† Corresponding author (E-mail : kikuhara-k6200@pref.fukuoka.lg.jp)

石井（2008）は、2006年～2007年に福岡県のナシ圃場から採取した分生子をナシ幼木に噴霧接種し、ナシ黒星病菌に対する DMI 剤の感受性を調査した。その結果、実用濃度のフェナリモルでは、いずれの圃場の分生子も顕著に感受性が低下しており、ヘキサコナゾールとフェンブコナゾールにおいても一部の圃場の分生子で若干の感受性の低下が認められた。一方、ジフェノコナゾールでは感受性の低下は認められなかった。これらの調査結果を受け、生産現場では防除効果が優れたジフェノコナゾールの使用が推奨された。

2015年頃から、例年発生が少ない平野部でも多発する事例が生じ、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効の低下が疑われた。本研究は2015年における福岡県のナシ黒星病菌の DMI 剤に対する感受性を明らかにするとともに、低感受性菌発生圃場における DMI 剤の防除効果を検証することを目的とした。

本研究を実施するに当たり、対照のナシ黒星病菌を分譲していただいた元千葉県農林総合研究センターの金子洋平氏に謝意を表する。本研究の一部は JA 全農農業関係委託試験で実施されたものである。

材料および方法

1. DMI 剤感受性検定

1) ナシ黒星病菌の採取

2015年5月に福岡県内のナシ主要産地、13圃場から罹病葉や罹病果を圃場全体からランダムに30個以上採取した。分生子の調製は菊原・石井（2008）の方法に従った。すなわち、圃場ごとに採取した罹病葉と罹病果の病斑を組織ごとメスで切り取り、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 Tween20 を 0.01% 添加した滅菌水をチューブの3分の2ほど加えて振とうし、上澄み液を回収した。これを数回繰り返し、回収した上澄み液を 4000 rpm で5分間遠心分離して分生子を濃縮、滅菌水で洗浄、再度濃縮し、約 1×10^6 個/ml に調整した後、 -80°C で試験開始まで保存した。また、対照として、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) 接種方法

30cm ポットで育成した 1～2 年生のナシ（品種「幸水」）を冬期に強剪定し、露地で管理した。以下の薬剤散布と接種は屋内で実施した。2016年4月18日に展葉 5～6 枚で新梢伸長中の植物体に実用濃度のジフェノコナゾール（有効成分で 25 ppm）、ヘキサコナ

ゾール（10 ppm）、フェンブコナゾール（27.5 ppm）、フェナリモル（30 ppm）および対照として水をハンドスプレーで十分量噴霧した。4月19日に、冷凍保存されている各圃場で採取された病原菌（菌集団）の分生子を 5°C の冷蔵庫で解凍させ、ショ糖 0.1% 添加 0.5% Tween20 溶液を用いて $0.2 \sim 2.5 \times 10^5$ 個/ml の胞子懸濁液に調整した。胞子懸濁液は 1 植物体に対して、ハンドスプレーを用いて 40 ml を葉の裏表に満遍なく拭きつけ、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）、4月20日にも同様な接種を繰り返した。4月22日にポリビニル袋を除去し、露地で管理した。薬剤の残効を考慮し、5月2日に4月18日と同様に薬剤散布を行った。なお、虫害等を防ぐため、適宜殺虫剤の散布を行った。

3) 発病調査

病原菌の最初の接種日から28日後の5月17日に、接種時の展開最上位葉以下 6 枚について調査した。調査は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 個以上または落葉

発病度 = $\Sigma(\text{発病指数} \times \text{指数別葉数}) / (5 \times (\text{調査葉数})) \times 100$

防除価 = $(1 - (\text{薬剤処理区の発病度}) / (\text{薬剤無処理区の発病度})) \times 100$

2. DMI 剤低感受性圃場における DMI 剤の防除効果の評価

2016年に筑紫野市農林業総合試験場内圃場でジフェノコナゾールおよびヘキサコナゾールの防除効果を調査した。約 3.5×4 m 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。DMI 剤のジフェノコナゾール（有効成分 25 ppm）とヘキサコナゾール（有効成分 20 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。さらに、調査後にこの圃場から黒星病菌集団を採取し、上記と同様な方法で、2017年に感受性を検定した。

3. 統計解析

各 DMI 剤の2015年と2007年（菊原・石井，2008）の防除価を平方根逆正弦変換し，Welch 検定により比較した。さらに，菌集団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。圃場試験では，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 法で補正した。これらの統計解析は JMP version 9（SAS Institute Japan 株式会社）を用いた。

結 果

1. DMI 剤感受性検定

黒星病の初発は接種約3週間後に確認され，接種約4週間後には各接種源の水処理区で接種時の展開最上位葉以下6枚には安定して多くの病斑が確認された。水処理区の発病度は44.7～90.8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（第1表）。実用濃度で散布したジフェノコナゾールの防除価は26.4～100で，大きく感受性が低下した菌集団から，2007年と同様に感受性が維持された菌集団まで，

採取圃場により大きく異なった。特に，防除価が低い Y 地域2 および3 の菌集団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42.5～85.3（平均63.6），フェンブコナゾールの防除価は25.8～44.2（平均34.9）およびフェナリモルの防除価は30.6～49.9（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の菌集団の各 DMI 剤防除価は97.0～82.7で，2007年に調査した感受性菌と同様に防除効果が高かった。

さらに，ジフェノコナゾールとヘキサコナゾールの防除価の相関を第1図に示した。両者に有意差を示さなかったが，正の相関の傾向がみられた（第1図， $r^2 = 0.267$ ， $P = 0.0704$ ）。

2. DMI 剤低感受性圃場における DMI 剤の防除効果の評価

幸水と豊水の無処理区の発病率はそれぞれ，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。このときのジフェノコナゾールとヘキサコナゾールのそれぞれの防除価は幸水で87.6と73.3，豊水で74.7と59.3であった。発病率が高かつ

第1表 2015年に福岡県の栽培圃場で採取されたナシ黒星病菌に対する各種 DMI 剤の防除効果

採取圃場	水処理区の発病度	各 DMI 剤における防除価 ^{a)}			
		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	フェナリモル
Control ^{b)}	65.9	94.9	97.0	94.2	82.7
M地域	46.4	100.0	60.5	— ^{c)}	—
T地域	62.6	97.2	78.0	—	—
I地域1	82.5	93.3	69.9	—	—
A地域1	78.7	92.6	61.0	—	—
K地域1	67.8	88.5	61.6	—	—
K地域2	64.9	83.6	69.2	25.8	49.9
Y地域1	60.8	83.0	85.3	—	—
K地域3	44.7	79.5	66.9	—	—
A地域2	90.8	72.5	47.5	44.2	40.8
I地域2	60.9	61.7	71.4	—	—
A地域3	43.6	58.2	51.5	—	—
Y地域2	70.0	31.0	61.9	34.8	30.6
Y地域3	55.0	26.4	42.5	—	—
2015年平均	—	74.4 (13) ^{d)}	63.6 (13)	34.9 (3)	40.4 (3)
2007年平均	—	100.0 (7) ^{e)}	86.6 (8)	94.1 (7)	59.4 (8)
Welch の検定 ^{f)}	—	**	**	**	*

a) 各薬剤の散布濃度。ジフェノコナゾール（有効成分25 ppm），ヘキサコナゾール（有効成分10 ppm），フェンブコナゾール（有効成分27.5 ppm），フェナリモル（有効成分30 ppm）。b) 千葉県の一般生産者の圃場。c) —：未試験。d) () の数値は検定した圃場数。e) 2007年平均は，菊原・石井（2008）より参照。f) *： $P < 0.05$ ，**： $P < 0.01$ で有意差あり

第2表 実験圃場におけるナシ黒星病に対する DMI 剤の防除効果 (2016年)^{a)}

薬 剤 名	幸水			豊水			統計解析 ^{c)}
	調査葉数	発病葉率 (%)	防除価 ^{b)}	調査葉数	発病葉率 (%)	防除価	
ジフェノコナゾール	400	1.3	87.6	200	11.5	74.7	a
ヘキサコナゾール	400	2.8	73.3	200	18.5	59.3	b
無処理	400	10.5		200	45.5		c

a) 2016年に福岡県農林業総合試験場圃場で実施した。ジフェノコナゾール（有効成分25 ppm）とヘキサコナゾール（有効成分10 ppm）を4月5日、15日、26日に散布した。これら以外に4月13日にイミノクタジナルベシル酸塩（有効成分200 ppm）を無処理を含めた全区に散布した。b) 防除価は品種ごとに求めた。100－（薬剤区の発病葉率／無処理区の発病葉率）×100。c) 同じアルファベット文字は5％水準で有意差が無いことを示す。統計解析はそれぞれの組み合わせでCochran-Mantel-Haenszel 検定を行い、Bonferroni 法で補正した。

第1図 福岡県で採取されたナシ黒星病菌に対するジフェノコナゾールの防除価とヘキサコナゾールの防除価の関係。

た豊水で防除価が低い傾向であった。発病葉率の薬剤処理区間の差を Cochran-Mantel-Haenszel 検定と Bonferroni 法で統計解析を実施した結果、ジフェノコナゾール区、ヘキサコナゾール区および無処理区間にそれぞれ有意差が認められた。さらに、調査後に採取した黒星病菌集団の DMI 剤感受性検定を実施した結果、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、85.9と42.6（水処理区の発病度28.3）を示し、感受性の低下が確認された。

考 察

2015年に福岡県の栽培圃場から採取されたナシ黒星病菌の DMI 剤感受性検定の防除価は全体的に2007年より低く、感受性の低下が進行していた。DMI 剤の使用による交差耐性菌の発生が懸念されているが、今回の調査において、ジフェノコナゾールの防除価とヘキサコナゾールの防除価には正の相関傾向がみられた。しかしながら、ジフェノコナゾールの防除効果が90以上の4圃場の菌集団におけるヘキサコナゾールの防除

価は60.5～78.0であるように、同等の防除価を示しておらず、両剤間の交叉耐性は不完全であることが考えられた。交叉耐性が不完全な理由として、これまで、実用濃度のジフェノコナゾールの防除効果が実用濃度のヘキサコナゾールの防除効果を上回っていることが報告されている（菊原・石井, 2008; 岩波, 2016）。そのため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ている（石井・菊原, 2007）。また、ナシ黒星病菌とは病原菌の種が異なるが、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し、感受性がその逆の菌株が存在することも報告されている。このため、ナシ黒星病菌についても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（Villani et al. 2015, 2016）、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示唆された。

福岡県の試験圃場において、ジフェノコナゾールの防除価は幸水で87.6、豊水で74.7、ヘキサコナゾールは幸水で74.7、豊水で59.3となった。この圃場から採取された黒星病菌集団の DMI 剤感受性を鉢苗で検定した結果、低感受性菌（ジフェノコナゾールの防除価 85.9、ヘキサコナゾールの防除価 42.6）が確認された。圃場試験の防除価は感受性検定と比較して、ジフェノコナゾールで同等、ヘキサコナゾールでやや高い傾向にあったが、前者が後者を上回り、感受性検定の結果の関係と一致した。富田ら（2003）は茨城県の実験圃場において、本圃場試験と同様な試験を実施した結果、ジフェノコナゾール（防除価 95）とヘキサコナゾール（防除価 94）ともほぼ同等の優れた防除効果があったことを報告している。本試験の防除価は、この以前の結果より両剤とも低くなっていた。よって、鉢苗による感受性検定の結果は、実際の現地圃場における防除効果を推定できると考えられた。今回、福岡県の検定では、ジフェノコナゾールが平均 74.4、ヘキサコナゾールが平均 63.3 となっており、県内には防除効果低下を引き起こす DMI 剤耐性ナシ黒星病菌が広く分布していることが推察された。このため、DMI 剤の更なる感受性の低下を抑制するための対策と DMI 剤に依存しない新たな防除体系の構築は急務である。

ジフェノコナゾールの感受性が最も低下した菌集団を採取した圃場（Y 地域 3）はチャの隣接圃であった。ナシの防除薬剤のドリフト対策のため、このような圃場では、チャに登録のある薬剤で防除を実施している。一般的に、耐性菌リスク管理は、特定の農薬の連続散布の回避、使用回数の制限および薬剤耐性リスクの低

い薬剤との混用散布である（JFRAC, 2017）。チャに登録のある DMI 剤は複数あるが、薬剤耐性リスクの低い多作用点剤は少ないため、DMI 剤偏重の防除が実施され、薬剤耐性菌リスク管理は十分に実施されていなかった。一方、同地域であるが、チャの栽培がない生産団地の圃場（Y 地域 1）の菌集団はジフェノコナゾールの感受性が維持されていた。この圃場では、地域の防除暦に従い、2012 年から DMI 剤と多作用点阻害剤との混用が実施され、薬剤耐性菌リスク管理が行われていた。DMI 剤の使用開始当初から、薬剤耐性菌リスク管理が指導されていた千葉県（梅本, 1993）では DMI 剤の効果低下の報告はなく、本試験でも対照に使用した千葉県の一般生産圃場の菌集団も感受性が維持されていた。2012 年の各地域の防除暦に耐性菌リスク管理が掲載されたが、実施していない生産者もいる。DMI 剤の更なる感受性の低下を抑制するため、耐性菌リスク管理の普及が必要である。

DMI 剤の代替剤として、比較的薬害の少なく、開花期前後に使用可能な新たな QoI 剤、マンデストロビンが注目されている（菊原ら, 2017）。現在、各地域の防除暦には、ナシ黒星病重点防除時期である開花期前後に、マンデストロビンや SDHI 剤のベンチオピラドが掲載されているが、耐性菌リスクのあるこれらの薬剤に対して、多作用点剤との混用試験等が十分に実施されておらず、薬剤耐性菌リスク管理が指導できていない。今後、本病を持続的かつ安定的に管理するため、使用回数の制限や耐性菌リスクの低い薬剤との混用を普及させる必要がある。

引用文献

- 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）。日本植物防疫協会（東京）：pp67-73。
- 石井英夫・菊原賢次（2007）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：49-60。（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。関東東山病虫研報 63：129。（講要）
- Japan Fungicide Resistance Action Committee (JFRAC) (2017) DMI 使用ガイドライン http://www.jcpa.or.jp/labo/jfrac/pdf/guidelines_pdf03.pdf (2018 年 4 月 20 日アクセス確認)
- 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。

- (講要)
- 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. 九病虫研会報
54 : 24-29.
- 北島 博 (1989) 果樹病害各論. 養賢堂 (東京) : pp.
581.
- 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)
- 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 : その史的考察. (財) 報農会受託刊
行図書 (小平), pp. 213.
- 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 (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.
- Villani, S. M., A. R. Biggs, D. R. Cooley, J. J. Raes and
K. D. Cox (2015) Prevalence of Myclobutanil
Resistance and Difenconazole Insensitivity in
Populations of *Venturia inaequalis*. Plant Dis.
99:1526-1536.
- Villani, S. M., J. Hulvey, J. M. Hily and K. D. Cox
(2016) Overexpression of the CYP51A1 Gene and
Repeated Elements are Associated with Differential
Sensitivity to DMI Fungicides in *Venturia*
inaequalis. Phytopathology 106:562-571.
- (2018年4月27日受領, 7月23日受理)