

野菜病害の耐性菌問題と 防除対策

農業・食品産業技術総合研究機構

野菜茶業研究所 野菜生産技術研究領域

窪田昌春

野菜病害の耐性菌問題と 防除対策

1. 国内の殺菌剤耐性菌の状況
2. 殺菌剤耐性の検定方法
3. リスク評価と対策

耐性菌

「圃場において薬剤の効果の減退が観察され、病斑部から当該病原菌が分離でき、しかも分離菌株の薬剤耐性が薬剤添加培地上で認められ、さらに分離菌株の宿主に対する接種によって、薬剤の効力低下が再現される」

「植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアルⅠ」日本植物防疫協会

特異作用点阻害剤に発生 = 菌のピンポイント変異でも耐性化
比較的新しい剤 ← 環境問題意識(1980年代から増)
特異点作用阻害: 他生物種への影響少
使用開始後、数年で発生 ← 新剤の多用

ベースラインとの比較 → 耐性の判定

ベースライン = **感受性菌株**のMIC、EC₅₀

感受性菌：対象殺菌剤の使用開始前に採集された菌株など

MIC (ppm)：最小生育阻止濃度 生育できないぎりぎりの濃度

EC₅₀ (ppm)：50%効果濃度 菌叢生育(直径)が無処理(農薬なし)の1/2になる濃度

耐性菌MIC、EC₅₀値の分布

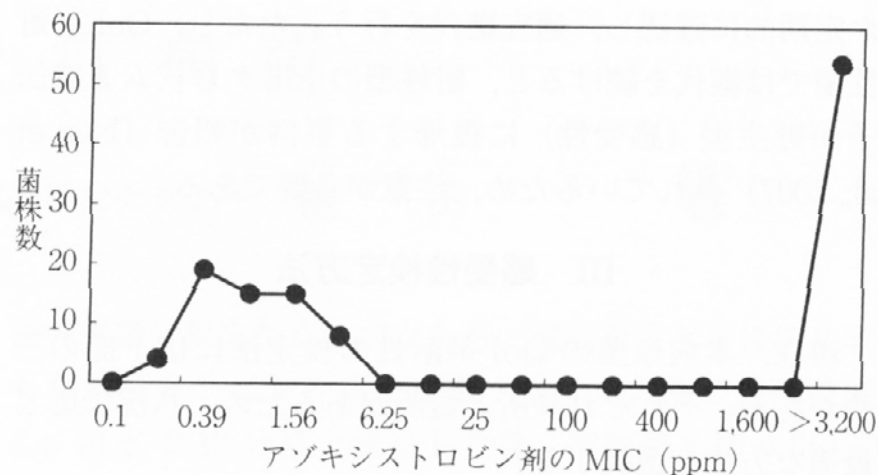


図-2 イチゴ炭疽病菌に対するアゾキシストロビン剤のMIC分布 (SHAM 1,000 ppm 加用条件下)

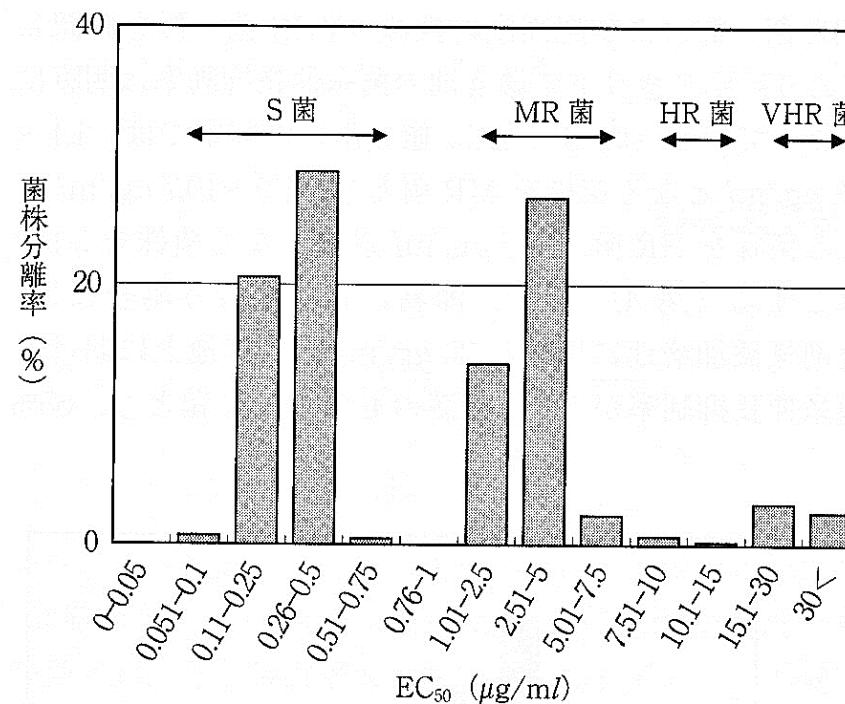


図-4 ボスカリド水和剤の散布履歴がある圃場から分離したキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤に対する感受性頻度分布

殺菌剤のグループ分け → 交差耐性

化学構造、作用機作による

ここでは「[農薬ハンドブック](#)」日本植物防疫協会に準じる

グループ	作用機作
銅	タンパク質SH基阻害（多作用点）
無機	代謝異常（多作用点）
有機硫黄	タンパク質SH基阻害（多作用点）
有機リン系	リン脂質合成阻害→膜異常
メラニン合成阻害(MBI)	メラニン合成酵素阻害→形態形成異常
ベンゾイミダゾール系	チューブリンタンパク質結合→細胞分裂阻害
フェニルカーバメート	チューブリンタンパク質結合→細胞分裂阻害
ジカルボキシイミド系	浸透圧シグナル伝達系
酸アミド系(SDHI)	ミトコンドリア電子伝達系Ⅱ→呼吸阻害
(フェニルアマイド系)	RNA・脂質合成阻害
ステロール生合成阻害(DMI、EBI、SBI)	細胞壁合成酵素阻害
ストロビルリン系(QoI)	ミトコンドリア電子伝達系チトクロームbc→呼吸阻害
アニリノピリミジン系	細胞膜阻害
その他	剤によって異なる
抗生物質	剤によって異なる
生物農薬	
土壌消毒	

野菜で使用できる、耐性菌が発生した殺菌剤(糸状菌)

グループ	一般名(主な商品名)
ベンゾイミダゾール系	チオファネートメチル(トップジン)、ベノミル(ベンレート)
フェニルカーバメート	ジエトフェンカルブ(パウミル)
ジカルボキシイミド系	イプロジオン(ロブラール)、プロシミドン(スミレックス)
酸アミド系(SDHI)	メプロニル(バシタック)、フルトラニル(モンカット)、ボスカリド(カンタス)、ペンチオピラド(アフェット)フェンキサミド(パスワード)、マンジプロパミド(レーバス)
フェニルアマイド系	メタラキシル(リドミル)
ステロール生合成阻害(DMI、EBI、SBI)	トリフルミゾール(トリフミン)、プロクラズ(スポルタック)、トリアジメホン(バイレトン)、ビテルタノール(バイコラル)、ミクロブタニル(ラリー)、テブコナゾール(オンリーワン)、ジフェノコナゾール(スコア)、イミベンコナゾール(マネージ)、シプロコナゾール(アルト)、テトラコナゾール(サルバトーレ)、シメコナゾール(サンリット、モンガリット)、フェナリモル(ルビゲン)、トリホリン(サプロール)
ストロビルリン系(QoI)	アゾキシストロビン(アミスター)、クレソキシムメチル(ストロビー)、トリフロキシストロビン(フリント)、ピラクロスロトビン(カルビオ)、ファモキサドン(ホライズンの一部)、フェンアミドン(ビトリーン)、ピリベンカルブ(ファンタジスタ)
アニリノピリミジン系	メパニピリム(フルピカ)
その他	フルジオキシニル(セイビアー)、イミノクタジンアルベシル酸塩(ベルコート)
抗生物質	ポリオキシシン

国内で発生した耐性菌(糸状菌)

ベンゾイミダゾール系 *Botrytis cinerea*

トッブジン・ベンレート *Botrytis alli*

Colletotrichum

gloeosporioides

Passalora fulva

Corynespora cassiicola

Fusarium oxysporum

Cercospora capsici

Cercospora chrysanthemi

Sclerotinia sclerotiorum

Colletotrichum orbiculare

Didymella bryoniae

Podosphaera xanthii

灰色かび病(1976イチゴ)

タマネギ灰色腐敗(2001)

イチゴ炭疽

トマト葉かび

キュウリ褐斑(1983)、トウガラシ黒
枯、ハス褐斑

ラッキョウ乾腐(1980)、ネギ萎凋

ピーマン斑点(1987)

シュンギク葉枯(1994)

キュウリ菌核(2002)

ウリ類炭疽(1989スイカ)

ウリ類つる枯(1979スイカ)

ウリ類うどんこ(1974キュウリ)

フェニルカーバメート *Botrytis cinerea*

パウミル

灰色かび(1984ナス)

ベンゾイミダゾール(トップジン・ベンレート)系の耐性

作用機作: チューブリンタンパク質(細胞骨格要素) 結合
→ 細胞分裂阻害

耐性: β チューブリン遺伝子変異 = チューブリンタンパク質 変異

E198A/G/K グルタミン酸 → アラニン、グリシン、リジン

F200Y フェニルアラニン → チロシン

遺伝子塩基配列 コドン中 1塩基置換

フェニルカーバメート(パウミル)系の耐性

作用機作: チューブリンタンパク質(細胞骨格要素) 結合
→ 細胞分裂阻害

耐性: β チューブリン遺伝子変異 = チューブリンタンパク質 変異

E198/K グルタミン酸 → リジン

遺伝子塩基配列 コドン中 1塩基置換

E198A/G 負交差耐性

E198K 複合耐性

国内で発生した耐性菌(糸状菌)

ジカルボキシイミド系
(**ロブラール・スミレックス**)

Botrytis cinerea

灰色かび病(1979)

酸アミド系
(**カンタス、アフエット**)

Corynespora cassiicola

Podosphaera xanthii

※農薬登録なし

Botrytis cinerea

Mycovellosiella nattrassii

Passalora fulva

キュウリ褐斑(宮本ら、2008)

キュウリうどんこ(宮本ら、2009)

イチゴ灰色かび(鈴木ら、2012)

ナスすすかび(岡田ら、2012)

トマト葉かび(渡辺ら、2013)

アニリノピリジン系
(**フルピカ**)

Botrytis cinerea

灰色かび病(1999)

ポリオキシン
＜抗生物質＞

Botrytis squamosa

Mycovellosiella nattrassii

Botrytis cinerea

ニンニク白斑葉枯

ナスすすかび(1989)

灰色かび病(1979トマト)

ジカルボキシイミド系(ロブラール・スミレックス)の耐性

作用機作:浸透圧シグナル阻害

耐性:糸状菌特異的ヒスチジンキナーゼ(Os-1)変異

I365Sなど イソロイシン → セリン

遺伝子塩基配列 コドン中 1塩基置換

酸アミド系(カンタス、アフエット)の耐性

作用機作:ミトコンドリア電子伝達系Ⅱ阻害 → 呼吸阻害

耐性:コハク酸脱水素酵素(SDHI)遺伝子変異

ナスすすかび病菌 H268Rカンタスのみ、I270V 両剤交差耐性

アニリノピリミジン系(フルピカ)の耐性

作用機作:細胞膜阻害

耐性:取り込み阻害

ポリオキシン<抗生物質>の耐性

作用機作:キチン合成阻害 → 細胞壁合成阻害

耐性:取り込み阻害

国内で発生した耐性菌(糸状菌)

ステロール生 *Podosphaera xanthii*
合成阻害 *Sphaerotheca aphanis*
(トリフミン・ *Passalora fulva*
ルビゲン) *Mycovellosiella nattrassii*

キュウリうどんこ(1988)
イチゴうどんこ(1992)
トマト葉かび
ナスすすかび(1998)

ストロビルリン *Podosphaera xanthii*
系 *Pseudoperonospora cubensis*
(アミスター・ス *Corynespora cassiicola*
トロビー) *Didymella bryoniae*
Passalora fulva
Botrytis squamosa
Colletotrichum gloeosporioides
Sphaerotheca aphanis
Stemphylium vesicarium
Botrytis cinerea
Mycovellosiella nattrassii

ウリ類うどんこ(天野、2000)
キュウリべと(石井、2000)
キュウリ褐斑(伊達ら、2004)、トマト
褐色輪紋、ピーマン黒枯、ナス黒枯
ウリ類つる枯
トマト葉かび(渡辺ら、2009)
ニンニク白斑葉枯
イチゴ炭疽(稲田ら、2008)
イチゴうどんこ(2000)
アスパラガス斑点
トマト灰色かび(ナス2006)
ナスすすかび(2002)

ステロール生合成阻害(トリフミン)の耐性

作用機作:ステロール生合成阻害 → 膜機能阻害

耐性:

14αステロール脱メチル化酵素P-450_{14DM}(CYP51)遺伝子変異

V136A バリン → アラニン

Y137F チロシン → フェニルアラニン

A379G アラニン → グルタミン酸

I138V イソロイシン → バリン

いずれも 遺伝子塩基配列 コドン中 1塩基置換

CYP51遺伝子発現制御部位の変異 → CYP51過剰発現

ABCトランスポーター遺伝子変異 → 薬剤排除

ストロビルリン系(アミスター・ストロビー)の耐性

作用機作:ミトコンドリア電子伝達系Ⅲ阻害 → 呼吸阻害

耐性:チトクロームb遺伝子変異

G143A グルタミン酸 → アラニン

F129L フェニルアラニン → ロイシン

いずれも 遺伝子塩基配列 コドン中 1塩基置換

国内で発生した耐性菌(糸状菌)

フェニルアマイド系 (リドミル)	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> <i>Phytophthora capsici</i> <i>Bremia lactucae</i> <i>Pythium myriotylum</i>	キュウリべと(1990) カボチャ疫(1996) レタスべと(2007) ショウガ根茎腐敗(2005)
イミノクタジンアルベシル酸 塩(ベルコート)	<i>Botrytis squamosa</i> <i>Botrytis cinerea</i>	ニンニク白斑葉枯 灰色かび(2005キュウリ)
フルジオキシニル (セイビアー)	<i>Botrytis cinerea</i>	灰色かび病(1999)
<その他>(フロンサイド)	<i>Botrytis cinerea</i>	マメ類 灰色かび

耐性機構は**不明**

※フロンサイド: SH基阻害による**多作用点**

国内で発生した耐性菌(細菌)

医・家畜衛生でも(先行)

ストレプトマイシン

Pseudomonas syringae キュウリ斑点細菌

Pectobacterium carotovorum ハクサイ軟腐(1985)、ダイコン

Pseudomonas sp.? レタス細菌(1981、腐敗1999)

作用機作: リボゾーム結合 → タンパク質合成阻害

耐性: ストレプトマイシン修飾酵素遺伝子 獲得 → 薬剤不活化

オキシリニック酸(スターナ)

Burkholderia gladioli イネもみ枯細菌

作用機作: DNA gyrase結合 → DNA合成阻害

耐性: DNA gyrase遺伝子変異

カスガマイシン

Acidovorax avenae イネ褐条

作用機作: タンパク質合成阻害

耐性: カスガマイシン修飾酵素遺伝子 獲得 → 薬剤不活化

複合耐性

変異遺伝子の蓄積

ベンゾイミダゾール(トップジン・ベンレート)

酸アミド(カンタス・アフエット)

ステロール合成阻害(トリフミン・ルビゲン)

ジカルボキシイミド(ロブラール・スミレックス)

ストロビルリン(アミスター・ストロビー)



ベンゾイミダゾール・ジカルボキシイミド

灰色かび、*Corynespora cassiicola*など

ベンゾイミダゾール・ステロール合成阻害 キュウリうどんこ病菌

ストロビルリン・酸アミド 海外*Alternaria*(黒斑病菌)

特定遺伝子の変異

※ベンゾイミダゾール(トップジン・ベンレート)・フェニルカーバメート(パウミル)

負交差耐性の崩壊

薬剤の取り込み阻害？

アニリノピリジン(フルピカ)・＜その他＞フロンサイド(多作用)？

複合耐性の表記

Botrytis cinerea 灰色かび病菌

※*Corynespora cassiicola*でも同様の提案

ベンゾイミダゾール — ジカルボキシイミド — フェニルカーバメート
(トップジン・ベンレート) (ロブラール・スミレックス) (パウミル)

S:感受性 R:耐性

ベンゾイミダゾール系; HR:高度耐性、MR:中程度耐性

例: SSS、MRSR、HRRR、SRS など

野菜病害の耐性菌問題と 防除対策

1. 国内の殺菌剤耐性菌の状況
2. 殺菌剤耐性の検定方法
3. リスク評価と対策

培養できる糸状菌

培地: **PDA** 市販のものでよい

培地への殺菌剤混入 (0.01~2000ppm)

殺菌剤 市販のものでよい (工業原体が望ましい)

成分濃度で段階希釈

0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000

0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 2.54, 5.08, 10.14, 20.24, 40.48, 80.96

15.9, 31.75, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000

など

オートクレーブ後、**冷めてから** (約60℃) 混入

※殺菌剤個々の注意点

ベンゾイミダゾール (**トップジン・ベンレート**): オートクレーブ前に混入

アゾキシストロビン (**アミスター・ストロビー**):

1~4mM **没食子酸プロピル**、または 0.1~0.4mM **ヒドロキシベンズアルデヒド** も混入
= 代謝のバイパス経路を抑える

酸アミド (**カンタス**): 生育が遅い菌 (ナスすすかび等) では低栄養培地を用いる

YBA (1%酵母抽出物、1%バクトペプトン、2%酢酸Na) など

平板培地上に菌叢ディスクを静置

菌の生育適温で一定時間培養

灰色かび: 20°C・3～4日、ナスすすかび: 25°C・14日

Corynespora casiiicola: 25°C・3～4日など ※菌叢が拡がらない菌種

菌叢直径測定

MIC値: 菌の生育が認められない最大濃度

培地に密着しないなどの異常菌叢は生育なしと見なす

EC₅₀値:

殺菌剤なしの場合と比較して、菌叢直径が50%以下になる濃度

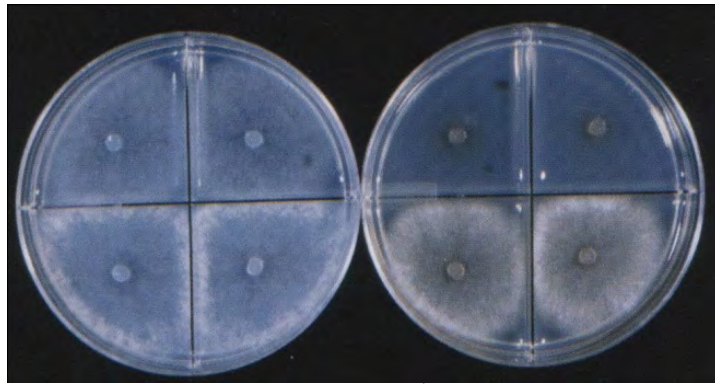
例: 培養4日後の菌叢直径 農薬なし 8.1cm

1ppm 4.9cm

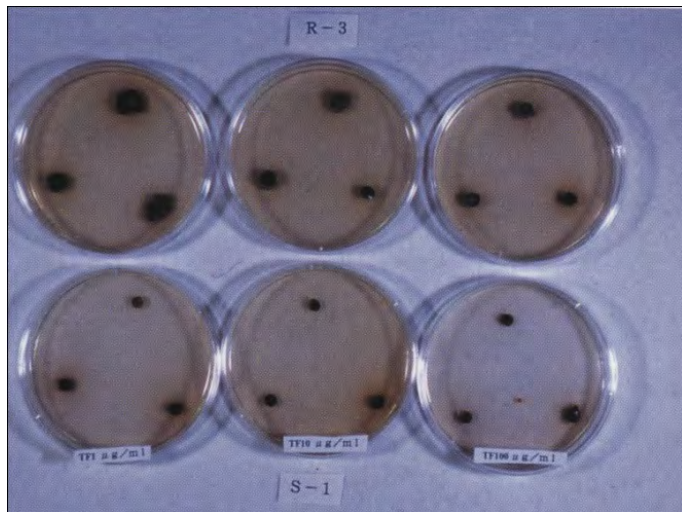
EC₅₀ → 2ppm 3.8cm

培養できる糸状菌

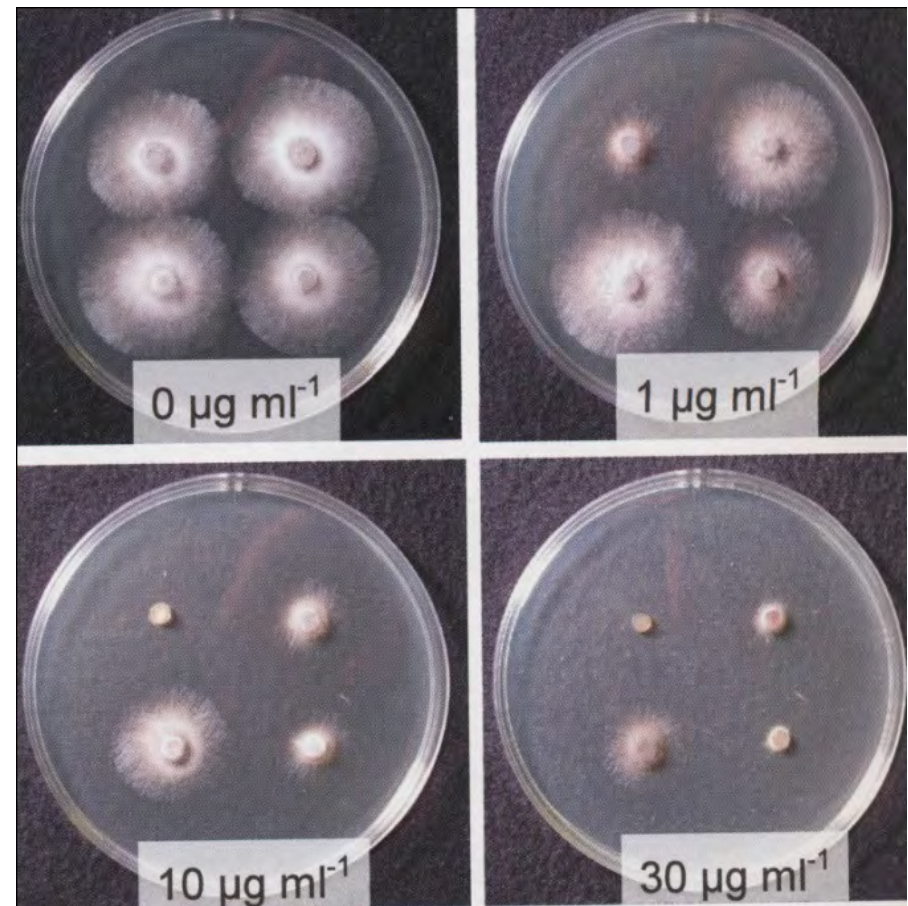
検定例



灰色かび × ストロビルリン(ストロビー)
左: 1ppm、右: 1ppm+1mM没食子酸プロピル
シャーレ内上: 感受性菌、下: 耐性菌



ナスすすかび × ステロール阻害(トリフミン)
左: 1ppm、中: 10ppm、右: 100ppm
上: 耐性菌、下: 感受性菌



Corynespora cassiicola

× 酸アミド(カンタス)

シャーレ内左上: 感受性、右上: 高度耐性

左下: 超高度耐性、右下: 中度耐性

培養できる糸状菌

タイタープレートを用いた検定法 (FRACで紹介)

基本

96穴プレート

少量の液体培地 (100~200 μ L)
+ 殺菌剤 (段階希釈)



孢子または、液体培地中であらかじめ孢子発芽させて調製した菌糸
を一定量

一定時間培養

吸光度 (405、620nmなど) (=濁度) から菌生育量 → EC_{50} など

培養できない糸状菌

接種リーフディスクを薬液(段階希釈)に浮かべる

20°C・2000～3000Luxで1週間培養

発病度 → EC_{50}

発病指数 0:発病なし 1:病斑面積率5%以下

2:5～25% 3:26～50% 4:51～75% 5:>75%

リーフディスク5枚中、中間値の3枚の数値を使用

発病度 = $\Sigma(\text{指数} \times \text{該当リーフディスク}) \times 100 \div 15$

Rf値>100 → 耐性

$Rf = \frac{\text{サンプル} EC_{50}}{\text{ベースライン}(EC_{50})}$

※絶対寄生菌:

培地保存不可 → ベースライン収集重要



PCR-RFLPによる耐性検出

標的遺伝子PCR増幅

変異部位の制限酵素切断

QoI剤 F129L 制限酵素ScrF1で切れない

Yamadaら(2012)JGPP 78:398-403(チャ輪斑病菌)

(他菌 G143A 制限酵素Fnu4HIで切断)

DMI剤

キュウリうどんこ病菌: 5'、3'両端の長いプライマーにミスマッチ塩基を含ませて制限酵素部位作成

感受性バンドが短、1塩基置換による耐性が中、複数塩基弛緩で長
ボスカリド

ナスすすかび 岡田ら(2012)日植病報78:199

PCRによる検出

標的遺伝子変異部位のPCR(非)増幅

イチゴうどんこ病菌: 変異部位を含むプライマーに、さらにミスマッチ塩基を加えてミスアニーリング防止

遺伝子診断の問題点…耐性でも不検出

該当変異以外の原因による耐性菌は検出できない

多コピー遺伝子 (Qol剤; チトクロームb遺伝子 など)

対応策？

とにかく耐性が認められた菌の標的遺伝子の塩基配列決定

= 事例集め

(Fungicide Resistance Action Committeeホームページなど参照)

→ 遺伝子診断の信頼性、変異様式の認識

→ 新たなPCRプライマーや制限酵素部位

※菌種により変異が異なる可能性

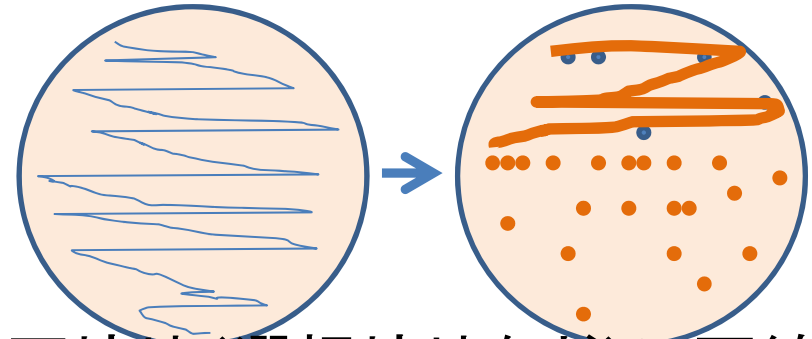
標的遺伝子の探索？ ← 作用機作？

細菌の耐性検定

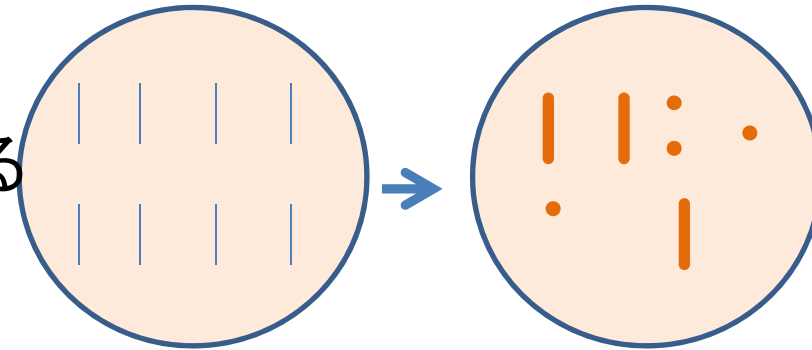
サンプリング

菌の分離:

罹病部位をこすった白金耳などで平面培地(選択培地など)に画線
単コロニーを複数選択



培地: 段階希釈した殺菌剤を含ませる
植物病原菌ならばPSAで可



検定培養: 10^4 cfu/ml菌懸濁液を2cm程の長さに画線

培養後、菌生育確認: 画線全面に細菌が生育 = 生育あり
コロニーなし、または散発 = 生育なし

MIC値 例: コンニャク腐敗病菌 (*Pectobacterium carotovorum*)

ストレプトマイシン BL: <25ppm、中等度耐性: 25~400
高度耐性: >400

野菜病害の耐性菌問題と 防除対策

1. 国内の殺菌剤耐性菌の状況
2. 殺菌剤耐性の検定方法
3. リスク評価と対策

FRACのリスク評価

Fungicide Resistance Action Committee 農薬会社中心＋研究者
殺菌剤を非常に細かく分類 日本の状況とは異なる

High risk	<i>Botrytis cinerea</i>	灰色かび
	<i>Phytophthora infestans</i> (リドミル)	トマト疫
	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	ウリ科ベト
	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	ウリ科うどんこ
Medium risk	<i>Bremia lactucae</i>	レタスベト
	<i>Cercospora</i> spp.	
	<i>Peronospora</i> spp.	ベト
	<i>Phytophthora infestans</i> (リドミル以外)	トマト疫
	<i>Sclerotinia</i> spp.	菌核
low risk	<i>Alternaria</i> spp.	黒斑など
minor commercial	<i>Colletotrichum</i> spp.	炭疽
	<i>Fusarium</i> spp.	萎凋・萎黄・つる割など
	<i>Phytophthora</i> spp.	疫
	<i>Puccinia</i> spp.	さび
	<i>Pythium</i> spp.	苗立枯、根腐など
	<i>Rhizoctonia</i> spp.	苗立枯など
	<i>Sclerotium</i> spp.	白絹、黒腐菌核など

経済性
重視の評価

野菜病原菌のみ
抜粋

日本植物病理学会 殺菌剤耐性菌研究会

研究者、農薬会社ほぼ半々。FRACの紹介・病理学会大会サテライトとしてシンポジウムなど
作物ごとのリスク(2012年8月22日現在)

分類	作物名	病害名	耐性菌 発生リスク	耐性菌発生状況	
				QoI剤	SDHI剤
野菜類	キュウリ	うどんこ病	高い	●	●
		褐斑病	高い	●	●
		べと病	高い	●	
		黒星病	中程度	△	
	メロン	つる枯病	高い	●	○
	その他ウリ類	うどんこ病	高い	●	○
	イチゴほか	灰色かび病	高い	●	●
	トマト	葉かび病	中程度	●	△
		褐色輪紋病菌	中程度	●	○
	ナス	すすかび病	高い	●	●
		黒枯病	高い	●	
	ピーマン	黒枯病	高い	●	△
	ニンニク	白斑葉枯病	高い	●	△
	イチゴ	炭疽病	高い	●	
		うどんこ病	高い	●	△
	テンサイ	褐斑病	中程度	○	
	アブラナ科	菌核病	中程度		○

●:国内で耐性菌発生事例あり。 ○:国内未報告だが海外で発生事例あり。

△:耐性菌発生事例ないが今後出現の可能性のある病害。 —:耐性菌リスク低い

斜線部分は対象病害に対して適用なし。

野菜病原菌のみ抜粋

耐性←胞子を大量に作る菌

変異は確率的(一般的には $<10^{-7}$ /遺伝子?)

耐性菌対策 → 農薬の有効利用

● 農薬以外のできる限りの防除 → 農薬散布量を減らす
圃場管理(雑草、整枝など)、抵抗性品種、環境管理、罹病部位除去

● 薬剤の認識

グループ分類 ←ローテーション・混用でも耐性発生

耐性発見→県機関などへ連絡

● 薬剤散布

使用基準に従ってむらなく散布

※よく効かせる=中途半端に薬がかかった菌を出さない ↔ 変異誘発?

予防散布

※密度が上がった状態でかけない ↔ 耐性菌のスクリーニング?

ガイドライン守る

ストロビルリン(QoI: アミスター・ストロビー)、酸アミド(SDHI: カンタス・アフエット)

1作1回以内、同じ菌に対する効果がある剤との混合なら2回まで

今後の課題

(新規)薬剤の耐性検定方法とベースライン ←農薬会社？
検定法の標準化(各菌×各薬剤)

「植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアルⅠ、Ⅱ」日本植物防疫協会
学会発表等多数あり

圃場での耐性菌発生頻度と耐性定着性の確認

学会発表、論文等あり・・・今のところ試験よりもモニタリング調査の結果

培地上での耐性菌発生条件と耐性定着性の確認

学会発表等ごく少数あり

イネいもち×Qol:培地上で発生・消失 中村ら(2011)日植病報77:163

ショウガ根茎腐敗×メタラキシル:培地上で発生・維持or消失

矢野(2010)日植病報76:58

耐性菌の生存競争力評価

ローテーション散布時(積極的試験)の耐性モニタリング

→発生頻度・条件の解明=「ガイドライン」の実証？