

高知県における SDHI 剤耐性ナスすすかび病菌の分布

矢野和孝*・溝渕啓介・岡田知之・岡美佐子

SDHI (Succinate dehydrogenase inhibitors) Resistant Strains of *Mycovellosiella*
natrassii Deighton on Eggplant Distributed
in Kochi Prefecture

Kazutaka YANO*, Keisuke MIZOBUCHI, Tomoyuki OKADA and Misako OKA

要 約

2021 年に高知県内のナスほ場から 78 菌株のすすかび病菌を単孢子分離し、菌体磨砕液を SDHI 剤のボスカリド、ペンチオピラド、イソピラザムおよびピラジフルミド添加 YB 培地上にスポットする方法で感受性を調査後、抽出した 15 菌株について EC₅₀ を調査した。その結果、いずれの薬剤に対しても感受性菌(S)の他、ボスカリドとペンチオピラドでは中等度耐性菌(MR)と高度耐性菌(HR)、イソピラザムは MR が発生し、ボスカリド、ペンチオピラド、イソピラザムの順に HR-S-S (R1 型)、S-MR-MR (R2 型)および MR-HR-MR (R3 型)の 3 種類に類別された。これらの耐性菌を検定するために培地への薬剤添加濃度について検討した結果、ボスカリドは 3ppm と 10ppm、ペンチオピラドは 3ppm と 20ppm、イソピラザムは 1ppm と 10ppm、ピラジフルミドは 1ppm に決定した。2022 年に分離した 101 菌株を同濃度で検定したところ、R1~3 型の他にピラジフルミドの 1ppm 添加培地上で生育する菌株が 1 菌株見つかった。本菌株はボスカリドとペンチオピラドに対しては HR でイソピラザムに対しては MR であったので R4 型と呼称することにした。これらの菌株の *SdhB* 遺伝子変異を調査したところ、R1 型は H268R、R4 型は H268C、R2 型の一部と R1~4 型のいずれにも該当しない菌株の一部は I270V であった。2021~2023 年に合計 294 菌株について調査したところ、R2 型が最も多く、次いで R1 型、R3 型の順で、R4 型は 1 菌株しか検出されなかった。また、R1~4 型のいずれにも該当しない菌株も検出され、冬春栽培地帯では地域的な傾向は見られなかった。

キーワード : ナス, すすかび病, SDHI 剤, 耐性菌, 分布

はじめに

ナス (学名 *Solanum melongena* L.) は高知県における野菜の出荷額第一位の重要品目であり、その栽培面積は 314ha で主に施設で栽培されている⁵⁾。施設栽培のナスではハウスを密閉して栽培するため、特に冬期の栽培環境が高湿度状態になりやすく、灰色かび病、黒枯病、すすかび病などのいわゆる好湿性病害が発生し、時に大きな被害を受けることが知られている^{1,7)}。中で

もすすかび病は、潜伏期間が長いために防除が遅れて被害を出しやすく¹⁴⁾、毎年約 8 割以上のほ場で発生している⁴⁾。本病の防除にはハウス内の湿度制御も有効である¹³⁾が、防除効果を実感しやすいことから、生産者は主に薬剤散布による防除に頼っているのが実状である。しかし、効果の高いエルゴステロール生合成阻害 (DMI) 剤やストロビルリン系殺菌 (QoI) 剤などには次々と耐性菌が発生し^{15,17)}、防除に苦慮するようになった。このよ

*元高知県農業技術センター
2024 年 10 月 7 日受理

うな状況の中で登場したコハク酸脱水素酵素阻害 (SDHI) 剤のボスカリド (商品名: カンタスドライフロアブル) も、当初は卓効を示したが、まもなく耐性菌が発生し、防除薬剤としての地位を失った¹¹⁾。耐性菌が発生すると、同系統の薬剤に対しても耐性を示す、いわゆる交差耐性を示すのが一般的であるが、SDHI 剤に関しては当てはまらず、今でも次々に新規の化合物が登録認可されている³⁾。ボスカリドと同じ SDHI 剤でナスすすかび病に対して登録を有するペンチオピラド (商品名: アフェットフロアブル) においても、ボスカリド耐性菌に対しては防除効果の低下は確認されなかったが、その後、両剤に耐性を示す菌株が出現したことが報告されている^{8,10)}。近年、同じ SDHI 剤であるイソピラザム (商品名: ネクスターフロアブル) やピラジフルミド (商品名: パレード 20 フロアブル) がすすかび病に対して使用されるようになり、どのような組み合わせの耐性菌が出現するのか注目されている。そこで、ナスすすかび病に対して登録を有するボスカリド、ペンチオピラド、イソピラザム、ピラジフルミドの4種類の殺菌剤について感受性を調査し、高知県に分布する耐性菌の種類について調査したので、その概要を報告する。なお、本研究の一部は、2023 年日本植物病理学会大会において口頭発表した¹⁸⁾。

材料および方法

1. 供試菌株

2021 年は 4~5 月に高知県安芸市、香南市および南国市の 8 ほ場、11 月に津野町の 2 ほ場から採集したナスすすかび病の発病葉から 93 菌株を単孢子分離した。2022 年は 4~6 月に高知県安芸市、香南市、南国市および大月町の 10 ほ場から同様に 101 菌株を単孢子分離した。2023 年は 4~6 月に高知県室戸市、田野町、安芸市、芸西村、香南市および大月町の 13 ほ場から同様に 103 菌株を単孢子分離した。なお、各菌株はブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 斜面培地で保存した。

2. 感受性調査

2021 年に高知県安芸市、香南市および南国市の 8 ほ場から分離した 78 菌株の供試菌株を PDA 平板培地上で 25℃、約 1 ヶ月間前培養し、直径 6mm の含菌ディスク 1~2 個を 0.5mL の滅菌蒸留水中で磨砕し、懸濁液を得た。これを薬剤添加 YB (Bacto ペプトン 10g, 酵母エキス 10g, 寒天 15g, 蒸留水 1L) 平板培地上に 5 μ L スポットし、25℃で培養した。薬剤のボスカリドは 5ppm、ペンチオ

ピラドは 1ppm、イソピラザムは 5ppm、ピラジフルミドは 1ppm の濃度で添加した。7 および 13 日後に菌そうの出現の有無を調査した。

3. EC₅₀ の調査

前項で使用した菌株の中から薬剤添加培地上における生育が異なることを指標に抽出した 15 菌株および 2022 年に分離した KO-111 を供試した。供試菌株を PDA 平板培地上に塗抹し、約 1 ヶ月間前培養後、直径 6mm のコルクボーラーで菌そう周縁を打ち抜いて含菌ディスクを得た。これをボスカリドは 0.5, 1, 2, 5, 10 および 20ppm、ペンチオピラドは 1, 2, 5, 10, 20, 50 および 100ppm、イソピラザムは 0.5, 1, 2, 5, 10 および 20ppm、ピラジフルミドは 1, 2, 5, 10, 20 および 50ppm の濃度で添加した PDA 平板培地上と無添加培地上に置床し、25℃、14 日間培養後、菌そう直径を計測した。いずれの濃度においても 3 反復を平均し、含菌ディスクの直径を除いた値から、無添加培地に対する抑制率を算出後、プロビット法により 50% 生育阻止濃度 (EC₅₀) を求めた。

4. 検定濃度の検討

2021 年分離の EC₅₀ を調査した 15 菌株を PDA 平板培地上で 25℃、約 1 ヶ月間前培養し、直径 6mm のコルクボーラーで打ち抜いて得た含菌ディスク 2 個を 0.5mL の滅菌蒸留水が入った専用容器に入れ、直径 5.5mm のステンレスビーズとともにビーズ式細胞破碎装置 (Micro Smash MS-100, TOMY) で 3,500rpm、15 秒間振とうして菌そう磨砕液を得た。これを薬剤添加および無添加 YB 平板培地上に 5 μ L スポットし、25℃で 7 日間培養後、菌そうの出現の有無を調査した。薬剤のボスカリドは 1, 2, 3, 5 および 10ppm、ペンチオピラドは 2, 3, 5, 10 および 20ppm、イソピラザムは 1 および 10ppm、ピラジフルミドは 0.1, 0.5, 1 および 5ppm の濃度で培地に添加した。

5. 分布調査

2021 年に分離した 90 菌株、2022 年に分離した 101 菌株、2023 年に分離した 103 菌株を前項と同様な方法で調査した。ただし、ボスカリドは 3ppm と 10ppm、ペンチオピラドは 3ppm と 20ppm、イソピラザムは 1ppm と 10ppm、ピラジフルミドは 1ppm の濃度で培地に添加した。

6. 遺伝子変異の調査

1) PCR-RFLP

表8に示した菌株から8菌株を抽出し、PDA上で約1ヵ月間培養後、含菌ディスクをlysis buffer¹²⁾ 0.5mLに浸漬した。エタノール沈殿によりDNAを回収後、TE buffer 50μLに溶解して鋳型DNAとした。PCRは、*SdhB*遺伝子の一部を増幅するプライマー(F: 5'-GTTCTCCTCCAGTCCTACCGCTGGATCG-3', R: 5'-GAACTTATGTACACAACCTCCCGGTAGTG-3')をいずれも0.5μM, dNTP Mixtureを0.2mM, Takara EX Taq DNA Polymerase(タカラバイオ)を2.5Uの最終濃度に調整し、鋳型DNA1μLと添付バッファーを10倍希釈で加えて全量を50μLとした反応液を、95℃で2分のプレヒートの後、95℃で10秒、60℃で30秒、72℃で1分を40サイクル、最後に72℃で2分反応させた。PCR産物は電気泳動後、出現する300bp付近のバンドを観察した。制限酵素処理は、PCR産物10.3μLに制限酵素*Rsa*I 0.5μLと添付バッファー1.2μLを加えた全量12μLの反応液を37℃で一晩反応させ、同様にバンドの観察を行った。

2) 塩基配列解析

EC₅₀を調査した菌株に加え、2023年に分離しR1~4型のいずれにも該当しない6菌株(MM-208, IT-221, TNY-250, TNY-255, TNY-256, H-288)を供試した。前項と同様な方法でDNAを抽出した後、PCRを実施した。PCRは*SdhB*遺伝子の全長を増幅するプライマー(3'RACE1stF: 5'-CATTCCGAAGGAGTTGCCGAG-3', R: 5'-GAACTTATGTACACAACCTCCCGGTAGTG-3')を用い、前項と同

様な組成の反応液を同様な条件で反応させた。PCR産物は電気泳動し、出現した遺伝子断片を精製後、ユーロフィンジェノミックス株式会社に塩基配列解析を依頼した。

結 果

1. 感受性調査

7日後の調査において、ペンチオピラドで生育するがその他の薬剤で生育しないのは56菌株、ボスカリドで生育するがその他の薬剤で生育しないのは3菌株、ボスカリドとペンチオピラドで生育するがその他の薬剤で生育しないのは18菌株、ボスカリド、ペンチオピラドおよびイソピラザムで生育するがピラジフルミドで生育しないのは1菌株であった。13日後では、ペンチオピラドで生育するがその他の薬剤で生育しないのは18菌株、ペンチオピラドとイソピラザムで生育するがその他の薬剤で生育しないのは35菌株、ボスカリドとペンチオピラドで生育するがその他の薬剤で生育しないのは21菌株、ボスカリド、ペンチオピラドおよびイソピラザムで生育するがピラジフルミドで生育しないのは4菌株であった(表1)。

2. EC₅₀の調査

抽出した供試15菌株の前項での調査結果を表2に示した。これらの菌株のEC₅₀を調査したところ、ボ

表1 高知県内で分離されたナスすすかび病菌のボスカリド、ペンチオピラド、イソピラザムおよびピラジフルミドに対する感受性

市町村	圃場名	供試 菌株数	薬剤名 ^{a)}	7日後				13日後			
			ボスカリド ^{b)}	×	○	○	○	×	×	○	○
			ペンチオピラド ^{b)}	○	×	○	○	○	○	○	○
			イソピラザム ^{b)}	×	×	×	○	×	○	×	○
			ピラジフルミド ^{b)}	×	×	×	×	×	×	×	×
安芸市	MA	10		8 ^{c)}	1	1		1	5	2	2
	MI	10		8		1	1		7	1	2
	KO	10		5		5			5	5	
	U	10		10				6	4		
香南市	KI	10		3		7		1	2	7	
	B	10		10				6	4		
	H	8		5	2	1		4	1	3	
南国市	Y0	10		7		3			7	3	
合計		78		56	3	18	1	18	35	21	4

a) 薬剤の濃度はボスカリドおよびイソピラザムでは5ppm, ペンチオピラドおよびピラジフルミドでは1ppm

b) ○: 生育した, ×: 生育しなかった

c) 数字は生育が見られた菌株, 空欄は該当なし

スカリドでは1.18~2.32ppm, 3.51~4.32ppm, 12.18~

17.18ppmの3グループに、ペンチオピラドでは0.80~

1. 26ppm, 2. 01~7. 01ppm, 40. 79~44. 72ppm の 3 グループに, イソピラザムでは 0. 43~0. 77ppm, 1. 73~5. 33ppm の 2 グループに分かれたが, ピラジフルミドでは 0. 41~2. 30ppm の範囲に分布した. 2022 年に分離された KO-111 に対するボスカリドの EC_{50} は 29. 17ppm, ペンチオピラドでは 16. 17ppm, イソピラザムでは 3. 67ppm, ピラジフルミドでは 6. 12ppm であった (表 3). 以上の結果から, 2021 年に分離された 15 菌株は, 感受性菌 (S) の他, ボスカリドおよびペンチオピラドでは中等度耐性菌 (MR) と高度耐性菌 (HR), イソピラザムは MR が発生し, ボスカリド, ペンチオピラド, イソピラザムの順

に HR-S-S (R1 型), S-MR-MR (R2 型) および MR-HR-MR (R3 型) の 3 種類に類別されると考えられた. また, 2022 年に分離されたピラジフルミドに対して耐性を示す菌株 KO-111 は R4 型とした (表 4).

3. 検定濃度の検討

ボスカリド添加培地では, R1 型はすべての濃度で生育したが, R2 型は 1ppm でのみ生育した. R3 型は 5ppm 以下でほぼ生育した. ペンチオピラドでは, R1 型はすべての濃度で生育しなかったが, R3 型はすべて生育した. R2 型は 5ppm 以下でほぼ生育した. イソピラザムで

表 2 EC_{50} 調査に用いた菌株の薬剤添加培地上での生育

菌株番号	ボスカリド		ペンチオピラド		イソピラザム		ピラジフルミド	
	7 日後	13 日後	7 日後	13 日後	7 日後	13 日後	7 日後	13 日後
H-11	○	○	×	○	×	×	×	×
H-71								
MI-61	○	○	○	○	×	×	×	×
H-51								
MI-51						○		
U-21						○		
U-31						×		
KI-31	×	×	○	○	×	×	×	×
B-11						○		
B-41						×		
YO-11						○		
YO-31						○		
MI-91								
MA-21	×	○	○	○	×	○	×	×
MA-51								
KO-111	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt

表 1 の脚注を参照, nt : 試験を未実施

表 3 ボスカリド, ペンチオピラド, イソピラザムおよびピラジフルミドの EC_{50}

菌株番号	EC_{50} 値 (ppm)				耐性菌の種類
	ボスカリド	ペンチオピラド	イソピラザム	ピラジフルミド	
H-11	12. 18	0. 89	0. 59	0. 48	R1 型
H-71	15. 20	1. 26	0. 74	0. 51	
MI-61	13. 91	0. 80	0. 43	0. 41	
H-51	17. 18	nt	0. 77	0. 53	
MI-51	1. 81	7. 01	2. 72	0. 68	R2 型
U-21	1. 47	4. 14	1. 73	0. 59	
U-31	1. 77	6. 98	4. 62	1. 12	
KI-31	1. 31	5. 05	2. 29	0. 53	
B-11	2. 32	2. 01	1. 83	0. 64	
B-41	1. 75	6. 76	5. 33	0. 82	
YO-11	1. 18	4. 71	2. 10	0. 46	
YO-31	1. 91	6. 89	2. 46	0. 78	
MI-91	4. 32	44. 72	3. 88	1. 50	R3 型
MA-21	3. 99	43. 86	4. 79	2. 30	
MA-51	3. 51	40. 79	4. 08	1. 54	
KO-111	29. 17	16. 17	3. 67	6. 12	R4 型

は、R1型はすべて生育しなかった。R2型とR3型は1ppmではほぼ生育したが、10ppmでは生育しなかった。ピラジフルミドでは、0.1ppmですべて生育したが、1ppm以上ではすべて生育しなかった。0.5ppmではR3型でわずかに生育したが、R1型とR2型では生育しなかった（表5）。以上の結果から、各薬剤に対して耐性程度の異なる菌株群を判別するための薬剤の濃度は、ボスカリドでは3ppmと10ppm、ペンチオピラドでは3ppmと20ppm、イソピラザムでは1ppmと10ppm、ピラジフルミドでは1ppmに決定した（表6）。

ボスカリドとペンチオピラドでは中等度耐性菌と高度耐性菌が検出されたが、イソピラザムでは中等度耐性菌のみで高度耐性菌は検出されなかった。ピラジフルミドの耐性菌は2022年に1菌株だけ検出された。耐性菌の種類では、ペンチオピラドとイソピラザムの中等度耐性のR2型が最も多く、次いでボスカリドの高度耐性であるR1型、ボスカリドとイソピラザムの中等度耐性でペンチオピラドの高度耐性のR3型、いずれの薬剤に対しても感受性菌の順に多く検出された。ピラジフルミドに耐性のR4型はボスカリドの高度耐性であるR1型、ボスカリドとイソピラザムの中等度耐性でペンチオピラドの高度

4. 分布調査

表4 ナスすすかび病菌のSDHI剤に対する耐性菌の種類

耐性菌の種類	ボスカリド	ペンチオピラド	イソピラザム	ピラジフルミド
S（感受性菌）	S	S	S	S
R1型	HR	S	S	S
R2型	S	MR	MR	S
R3型	MR	HR	MR	S
R4型	HR	HR	MR	R

S：感受性，MR：中等度耐性，HR：高度耐性，R：耐性

表5 ナスすすかび病菌のSDHI剤に対する感受性検定濃度の検討

耐性菌の種類	菌株名	ボスカリド (ppm)					ペンチオピラド (ppm)					イソピラザム (ppm)		ピラジフルミド (ppm)				無添加
		1	2	3	5	10	2	3	5	10	20	1	10	0.1	0.5	1	5	
R1型	H-11	○	○	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	○
	H-71	○	○	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	○
	MI-61	○	○	○	○	○	nt	nt	nt	nt	nt	×	×	○	×	×	×	○
	H-51	○	○	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	○
R2型	MI-51	○	×	×	×	×	○	○	△	×	×	○	×	○	×	×	×	○
	U-21	○	×	×	×	×	○	○	△	×	×	○	×	○	×	×	×	○
	U-31	○	×	×	×	×	○	○	△	×	×	○	×	○	×	×	×	○
	KI-31	○	×	×	×	×	○	○	△	×	×	○	×	○	×	×	×	○
	B-11	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	○
	B-41	○	×	×	×	×	○	○	△	×	×	○	×	○	×	×	×	○
	Y0-11	○	×	×	×	×	○	○	△	×	×	○	×	○	×	×	×	○
	Y0-31	○	×	×	×	×	○	○	△	×	×	○	×	○	×	×	×	○
R3型	MI-91	○	○	○	△	×	○	○	○	○	○	○	×	○	△	×	×	○
	MA-21	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	×	○	△	×	×	○
	MA-51	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	×	○	△	×	×	○

○：生育した，△：わずかに生育した，×：生育しなかった，nt：未調査

表6 ナスすすかび病菌のSDHI剤感受性検定における薬剤の添加濃度と判定基準

耐性の程度	薬剤名と濃度							無添加
	ボスカリド		ペンチオピラド		イソピラザム		ピラジフルミド	
	3ppm	10ppm	3ppm	20ppm	1ppm	10ppm	1ppm	
感受性菌 (S)	—	—	—	—	—	—	—	+
中等度耐性菌 (MR)	+	—	+	—	+	—	—	+
高度耐性菌 (HR)	+	+	+	+	+	+	—	+
耐性菌 (R)	—	—	—	—	—	—	+	+

＋：菌そうが出現した，－：菌そうが出現しなかった

ボスカリドの高度耐性である R1 型、ボスカリドとイソピラザムの中高度耐性でペンチオピラドの高度耐性の R3 型、いずれの薬剤に対しても感受性菌の順に多く検出された。ピラジフルミドに耐性の R4 型は 2022 年に 1 菌株だけ検出された。2021 年に調査した津野町では感受性菌が多く検出された (表 7)。

5. 遺伝子変異の調査

1) PCR-RFLP 抽出した 8 菌株について、PCR-RFLP を実施したところ、R1 型の 3 菌株から抽出した DNA が消化されたが、R2 型や R3 型では消化されなかった (表 8)。

2) 塩基配列解析

R1 型は、いずれも 268 番目のアミノ酸の塩基配列が CAT から CGT に変異し、推定アミノ酸もヒスチジン (H) からアルギニン (R) に変異 (H268R) していた。

表 7 高知県に分布する SDHI 剤耐性ナスすすかび病菌

調査年	市町村	ほ場	調査 菌株数	耐性菌の種類 ^{a)}						
				S	R1 型	R2 型	R3 型	R4 型	その他	
2021 年	安芸市	MA	10	0	2	6	2	0	0	
		MI	7	0	1	5	1	0	0	
		KO	10	0	5	5	0	0	0	
		U	10	0	0	10	0	0	0	
	香南市	KI	10	0	7	3	0	0	0	
		B	10	0	0	9	1	0	0	
		H	8	0	3	5	0	0	0	
	南国市	YO	10	0	3	7	0	0	0	
	津野町	TN	8	5	3	0	0	0	0	
		TY	7	7	0	0	0	0	0	
		合計	90	12	24	50	4	0	0	
2022 年	安芸市	KO	9	0	0	5	3	1	0	
		TK	10	0	1	7	2	0	0	
		OG	10	1	4	5	0	0	0	
	芸西村	MT	4	0	2	2	0	0	0	
	香南市	HS	13	0	0	6	7	0	0	
		H	15	0	1	14	0	0	0	
		KD	13	3	3	4	3	0	0	
	南国市	DO	13	0	9	0	4	0	0	
	大月町	OTT	6	0	0	6	0	0	0	
		OT4	8	0	0	8	0	0	0	
		合計	101	4	20	57	19	1	0	
2023 年	室戸市	KOT	10	0	3	1	6	0	0	
	田野町	TNY	10	0	1	6	0	0	3	
	安芸市	OG	9	0	2	6	1	0	0	
	芸西村	HR	10	0	5	1	4	0	0	
		MT	5	0	0	5	0	0	0	
	香南市	MM	8	3	1	3	0	0	1	
		YM	9	0	1	5	3	0	0	
		IT	10	3	2	3	1	0	1	
		KD	6	0	0	0	6	0	0	
		B	7	0	1	0	6	0	0	
		H	10	0	0	9	0	0	1	
		KOY	7	0	3	4	0	0	0	
		YS	2	0	0	2	0	0	0	
			合計	103	6	19	45	27	0	6
	3 年間の総計			294	22	63	152	50	1	6

a) 表 4 を参照

R2型に属する菌株のB-11およびR1～4型のいずれにも該当しないTNY-250, TNY-255, TNY-256の3菌株が270番目アミノ酸の塩基配列がATCからGTCに変異し、推定アミノ酸もイソロイシン(I)からバリン(V)に変異(I270V)していた。R4型の菌株K0-111は268番目のア

ミノ酸の塩基配列がCATからTGTに変異し、推定アミノ酸もヒスチジン(H)からシステイン(C)に変異(H268C)していたが、その他の菌株は変異が見られなかった(表8)。

表8 高知県で分離されたナスすすかび病菌における*SdhB*遺伝子の変異

耐性菌の種類	菌株番号	耐性程度 ^{a)}				PCR-RFLP (H268R) ^{b)}	<i>SdhB</i> 遺伝子の 塩基配列解析 ^{c)}
		ボスカリド	ペンチオピラド	イソピラザム	ピラジフルミド		
R1型	H-11					R	H268R
	H-71					nt	H268R
	MI-61	HR	S	S	S	R	H268R
	H-51					R	H268R
R2型	MI-51					S	—
	U-21					S	—
	U-31					nt	—
	KI-31	S	MR	MR	S	nt	—
	B-11					nt	I270V
	B-41					S	—
	Y0-11					nt	—
	Y0-31					nt	nt
R3型	MI-91					nt	—
	MA-21	MR	HR	MR	S	S	—
	MA-51					S	—
R4型	K0-111	HR	HR	MR	R	nt	H268C
その他	MM-208	MR	S	S	S	nt	—
	IT-221	S	MR	S	S	nt	—
	TNY-250	S	S	MR	S	nt	I270V
	TNY-255	S	S	MR	S	nt	I270V
	TNY-256	S	S	MR	S	nt	I270V
	H-288	MR	MR	S	S	nt	—

a) 表4, 6を参照

b) R: 制限酵素で切断された, S: 同切断されなかった, nt: 無試験

c) H268R: 268番目の推定アミノ酸がヒスチジンからアルギニンに変異, I270V: 270番目の推定アミノ酸がイソロイシンからバリンに変異, H268C: 268番目の推定アミノ酸がヒスチジンからシステインに変異, —: 変異なし, nt: 無試験

考 察

ナスすすかび病菌の菌糸生育は遅く、培地上における菌糸生育を調査して薬剤に対する感受性を調査する場合には3週間程度を要する¹⁷⁾。より迅速にボスカリド耐性菌を調査する方法として岡田⁹⁾は、菌体磨砕液を培地上にスポットする方法で培養1週間後に判定している。この方法に準じてボスカリド、ペンチオピラド、イソピラザムおよびピラジフルミドを添加した培地上における菌そうの出現を調査したところ、ボスカリド、ペンチオピラドおよびイソピラザムに対する感受性の異なるすすかび病菌の存在が予想された。代表的な菌株

を抽出してEC₅₀を調査したところ、ボスカリドおよびペンチオピラドでは3グループに分かれたので、高度耐性菌、中等度耐性菌、感受性菌と考えられた。イソピラザムでは2グループに分かれた。トマト葉かび病菌では3グループに分かれ、イソピラザムに対して程度の異なる耐性菌の発生が報告されている⁶⁾ことから、今後調査を進めるとナスすすかび病菌においても同様な発生が予想される。今回のイソピラザムに対する耐性菌におけるEC₅₀は、ボスカリドやペンチオピラドに対する中等度耐性菌におけるEC₅₀と同程度であったことから、中等度耐性菌、感受性菌と考えられた。ボスカリドに対

しては高度耐性で、その他の薬剤に対しては感受性の菌株群を R1 型、ペンチオピラドとイソピラザムに対しては中等度耐性で、その他の薬剤に対しては感受性の菌株群を R2 型、ボスカリドとイソピラザムに対しては中等度耐性、ペンチオピラドに対しては高度耐性で、ピラジフルミドに対しては感受性の菌株群を R3 型と呼称することにした (表 4)。次に、これら感受性の異なる菌株群を判別するための培地に添加する薬剤の濃度について検討し、ボスカリドは 3ppm と 10ppm、ペンチオピラドは 3ppm と 20ppm、イソピラザムは 1ppm と 10ppm、ピラジフルミドは 1ppm に決定した (表 6)。2022 年にこれらの培地を用いて感受性検定を実施したところ、ピラジフルミド添加培地上でも菌そうが出現する菌株が見つかった。本菌株は、ボスカリドとペンチオピラドに対しても高度耐性、イソピラザムに対しては中等度耐性で、R1~3 型のいずれにも該当しないことから R4 型と呼称することにした。2021 年に分離した菌株では、保存中にダニの混入などにより 3 菌株を喪失したが、2021~2023 年に調査した結果、津野町で感受性菌が多く検出された以外は地域的な傾向は見られなかった。津野町のナスは、他のナス産地とは作型が異なる雨よけの夏秋栽培である。夏秋栽培では、すすかび病の発生が少なく、発生面積率が 20~30% しかない⁴⁾。薬剤の散布歴を調査していないので、明らかではないが、薬剤による防除圧もそれほど高くないと予想される。また、主に検出された R1~3 型の割合は年による変動が見られた。すなわち、ボスカリド、ペンチオピラドおよびイソピラザムのいずれに対しても耐性の R3 型の割合が徐々に増加した。これらの薬剤にピラジフルミドを加えた 4 剤のいずれに対しても耐性の R4 型は、2022 年に 1 菌株だけしか見つからなかったが、今後これらの薬剤の防除圧が高まるにつれて R3 型および R4 型の割合が増加することが予想される。これらの耐性菌の発生を防ぐためには、殺菌剤使用ガイドライン²⁾にもあるように、使用回数を 1 作に 1 回程度に留めるべきであろう。

PCR-RFLP と *SdhB* 遺伝子の塩基配列解析の結果から、R1 型は岡田・下元¹⁾が報告した H268R のボスカリド耐性菌であることが明らかとなった。ボスカリドとペンチオピラドに対してやや感受性が低下していた I270V^{8,10)}の変異は、R2 型の一部の菌株ならびにその他に類別されたボスカリドとペンチオピラドに対して感受性で、イソピラザムに対して中等度耐性の菌株で検

出された。このように I270V は SDHI 剤に対する感受性が必ずしも同一ではないことから、薬剤の感受性とは無関係の可能性も考えられる。また、I270V はボスカリドとペンチオピラドに対する感受性がやや低下している程度なので、感受性菌に類別されている可能性も考えられることから、いずれの薬剤に対しても感受性の菌株の一部についても塩基配列解析を実施したが、変異は見られなかった (未発表データ)。R4 型も H268C の変異が見られたが、多くの R2 型と R3 型は変異が見られなかった。SDHI 剤耐性には *SdhB* の他に *SdhC* と *SdhD* が関与していることが知られており³⁾、これらの遺伝子を調査すれば変異を見つけられる可能性が十分考えられる。*SdhB* 遺伝子に関しても、268 番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに変異 (H268Y) しているものも見つかっており¹⁶⁾、今後新たな変異が見つかる可能性も十分にあると考えられる。

今回の調査で検出された耐性菌に対する薬剤の防除効果の低下については、生物検定を実施していないので明らかでない。ボスカリド耐性菌の R1 型は防除効果の低下が確認されており¹¹⁾、ボスカリドとペンチオピラドに対してやや感受性が低下していた I270V についても防除効果の低下が確認されている⁸⁾。従って、中等度耐性菌といえども防除効果は低下すると予想されるので、ボスカリド、ペンチオピラドおよびイソピラザムの 3 剤については耐性菌が発生していないことを確認した上で使用するなど、使用場面が限られるであろう。

利益相反の有無

すべての著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) 我孫子和雄・石井正義 (1988). ナス黒枯病の発病に及ぼす温度並びに湿度の影響. 野茶試研報 A2: 93-98.
- 2) 石井英夫 (2012). QoI 剤および SDHI 剤耐性菌の現状と薬剤使用ガイドライン. 植物防疫 66: 481-487.
- 3) 石井英夫 (2019). SDHI 剤耐性菌にみられる遺伝子変異と交差耐性 第 29 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 49-57.

- 4) 高知県病害虫防除所(2023). 令和4年度農作物有害動植物発生予察事業年報, P82~83.
- 5) 高知県農業振興部(2023). 高知県の園芸, P4, 15.
- 6) 中嶋香織・川上 拓・鈴木啓史・黒田克利 (2021). 三重県におけるトマト葉かび病菌の SDHI 剤に対する感受性. 関西病虫研報 63: 67-73.
- 7) 岡田清嗣・草刈眞一・鈴木敏征(1993). ナス灰色かび病の胞子飛散密度と発病果率. 関西病虫研報 35: 101-102.
- 8) 岡田知之(2013). 高知県におけるボスカリド耐性ナスすすかび病菌の発生と遺伝子診断. 第23回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 37-46.
- 9) 岡田知之(2016). 植物防疫講座：植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル 2016 (8)ナスすすかび病ーボスカリド剤(培地・生物・遺伝子検定)ー植物防疫 70: 621-624.
- 10) 岡田知之・下元祥史・矢野和孝・森田泰彰 (2013). ボスカリドとペンチオピラドの両剤に対する感受性が低下したナスすすかび病菌の発生. 日植病報 79: 198-199(講要).
- 11) 岡田知之・下元祥史(2016). ボスカリド耐性ナスすすかび病菌の発生と PCR-RFLP による検出. 日植病報 82: 87-92.
- 12) Saitoh, K., Togashi, K., Arie, T. and Teraoka, T. (2006). A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. JGPP 72: 348-350.
- 13) 下元祥史・山本敬司・工藤りか(2017). ヒートポンプ空調機を用いた湿度制御によるナスすすかび病の防除. 植物防疫 71: 324-326.
- 14) 山口純一郎(2005). ナスすすかび病の発生生態と防除. 植物防疫 59: 371-374.
- 15) 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.
- 16) 山下真生(2018). 新規殺菌剤ピラジフルミド(パレード)の作用特性と感受性検定. 第28回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 30-42.
- 17) 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.
- 18) 矢野和孝・溝渕啓介・岡田知之(2023). 高知県で発生する SDHI 剤耐性ナスすすかび病菌の培地を用いた検定方法. 日植病報 89: 166(講要).

Summary

EC₅₀ of boscalid, penthiopyrad, isopyrazam, and pyraziflumid against 15 isolates selected were investigated after examining the sensitivity of 78 monospore isolates of *Mycovellosiella nattrassii*, which were collected in the eggplant fields of Kochi Prefecture in 2021, against 4 succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides using the method of spotting the grinded mycelial solution on YB medium. As a result, in addition to susceptible strains (S) for all fungicides, moderately resistant strains (MR) and highly resistant strains (HR) were detected for boscalid and penthiopyrad, and MR was observed for isopyrazam. These strains were categorized into three types: HR-S-S (R1 type), S-MR-MR (R2 type), and MR-HR-MR (R3 type) for boscalid, penthiopyrad, and isopyrazam, respectively. To test for these resistant strains, the concentrations of the fungicides to be added to the medium were determined with 3 ppm and 10 ppm for boscalid, 3 ppm and 20 ppm for penthiopyrad, 1 ppm and 10 ppm for isopyrazam, and 1 ppm for pyraziflumid. When 101 strains isolated in 2022 were tested at the same concentration, in addition to R1 to 3 types, another strain, which grow on the medium containing 1 ppm pyraziflumid, was found. This strain was HR to boscalid and penthiopyrad and MR to isopyrazam, and was therefore designated R4 type. When the *SdhB* gene mutations of these strains were investigated, the R1 type was H268R, the R4 type was H268C, and some of the R2 type and some strains, which did not belong to any of the R1 to R4 types, were I270V. A total of 294 strains were surveyed from 2021 to 2023, and R2 type was the most common, followed by R1 and R3 type, with only one R4 type detected. In addition, strains that did not belong to any of the R1 to R4 types were also detected, and no regional trends were observed in winter-spring cultivation areas.

Key words: eggplant, leaf mold, SDHI, resistant strain, distribution