

戦略的プロジェクト研究推進事業

「ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発」

平成30年度 最終年度報告書

中課題番号	14526424
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発

研究実施期間	平成26年度～平成30年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門
研究開発責任者	中島 信彦
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-6071
	FAX : 029-838-7106
	E-mail : nakaji@affrc.go.jp
共同研究機関	国立大学法人 京都大学 (大学院工学研究科、大学院農学研究科)
	国立大学法人 宇都宮大学農学部
	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 (東北農業研究センター、中央農業研究センター、九州沖縄中央農業研究センター、野菜花き研究部門、果樹茶業研究部門、生物機能利用研究部門、農業環境変動研究センター)
	熊本県 (熊本県農業研究センター)
	長野県野菜花き試験場
	静岡県農林技術研究所 茶業研究センター
	宮崎県総合農業試験場
	大分県農林水産研究指導センター
	和歌山県 (和歌山県農業試験場環境部)
	茨城県農業総合センター
	地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所
	静岡県農林技術研究所
	奈良県 (奈良県農業研究開発センター)
日本農業株式会社	
日本曹達株式会社	
普及・実用化 支援組織	—
	—

ドライン案への反映						
2. チャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性機構の解明と管理技術の開発					農研機構 生物機能利用研究部門	昆虫機能制御ユニット、先進昆虫ゲノム改変ユニット
(1) 薬剤抵抗性機構の解明と抵抗性診断技術の開発						
①DAH系IGR剤抵抗性診断技術の開発	←			→		
②ジアミド剤抵抗性診断技術の開発	←			→		
③DAH系IGR剤の抵抗性遺伝子の同定				←	→	
④ジアミド剤の抵抗性遺伝子の同定				←	→	
⑤遺伝子診断技術の実証				←	→	
(2) 薬剤抵抗性の発達に関する要因の解明と抵抗性管理ガイドライン案策定					静岡県農林技術研究所茶業研究センター	茶環境適応技術科
①抵抗性の実態把握	←			→		
②交差抵抗性の解明	←			→		
③抵抗性の遺伝様式の解明	←			→		
④抵抗性診断技術の実用性検証				←	→	
⑤抵抗性遺伝子の分布拡散予測	←			→		
⑥抵抗性管理ガイドライン案の策定				←	→	
3. ワタアブラムシの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発					農研機構 果樹茶業研究部門	虫害ユニット
(1) ネオニコチノイド抵抗性系統の遺伝子診断法の開発とガイドラインの策定						
①遺伝子診断法の開発と実証	←			→		
②ガイドラインの策定と改良				←	→	
(2) ワタアブラムシのネオニコチノイド抵抗性の分子機構の解明と検証					日本曹達(株)	研究開発本部 小田原研究所
①抵抗性分子機構の解明	←			→		
②得られた知見・技術の他の害虫への応用と検証				←	→	
(3) ネオニコチノイド抵抗性系統の生態解明と薬剤感受性検定マニュアルの策定					宮崎県総合農業試験場	生物環境部
①生物検定法の開発と抵抗性系統生物学的性質の解明	←			→		
②抵抗性発達低リスク資材による効率的な防除体系の実証				←	→	
(4) ネオニコチノイド抵抗性系統の発生実態解明と生物的防除等による抵抗性管理技術の開発					大分県農林水産研究指導センター	農業研究部 病害虫対策チーム

①抵抗性系統の寄主範囲の解明と診断技術の検証						
②生物的防除を核とした抵抗性管理技術の開発と実証						
(5) ネオニコチノイド抵抗性系統の発生実態解明と物理的防除等による抵抗性管理技術の開発					和歌山県農業試験場	環境部
①抵抗性発達拡大の実態把握						
②物理的防除を核とした抵抗性管理技術の開発と実証						
4. ネギアザミウマの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発						
(1) 微小害虫の網羅的遺伝子配列セットの整備と遺伝子診断技術開発					農研機構 生物機能利用研究部門	先進昆虫ゲノム改変ユニット
(2) ネギアザミウマの薬剤抵抗性発達を遅延させる防除体系とガイドラインの策定					農研機構 野菜花き研究部門	野菜病害虫・機能解析研究領域 虫害ユニット
(3) ネギアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性診断技術の開発と薬剤使用判断基準の策定					北海道立総合研究機構 中央農業試験場	病虫部 予察診断グループ
(4) 茨城県におけるネギアザミウマの薬剤抵抗性の実態解明と薬剤抵抗性管理技術の有効性検証					茨城県農業総合センター園芸研究所	病虫研究室
(5) 大阪府におけるネギアザミウマの薬剤抵抗性の実態解明と薬剤感受性検定マニュアル策定					大阪府立環境農林水産総合研究所	食の安全研究部 防除グループ
5. ナミハダニの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発						
(1) 薬剤抵抗性原因遺伝子解明・診断法の開発とガイドライン策定					京都大学大学院農学研究科	生態情報開発学分野
①エトキサゾール抵抗性の原因遺伝子の解明と診断法の開発						
②抵抗性遺伝子診断法の適用拡大						
③ピリダベン抵抗性原因遺伝子の解明と診断法の開発						
④シフルメトフェン抵抗性系統の遺伝・生理特性ならびに原因遺伝子の解明						
(2) 抵抗性診断と物理的防除法に基づく薬剤抵抗性管理技術の開発					静岡県農林技術研究所	植物保護科
①産地における抵抗性実態						

の解明						
②薬剤抵抗性個体群の時間・空間的分布の解明	←	→				
③遺伝子診断手法による薬剤抵抗性調査の有効性評価	←		→			
④物理的防除法等を組み合わせたIPM体系の確立と薬剤抵抗性遺伝子頻度低下の効果検証		←		→		
(3) 抵抗性診断と生物的防除法に基づく薬剤抵抗性管理技術の開発					奈良県農業研究開発センター	病害虫防除ユニット
①ハダニ類の薬剤感受性検定法の標準化(マニュアル策定、抵抗性実態把握)	←	→				
②簡易検定法の開発	←	→				
③遺伝子診断手法による薬剤抵抗性調査の有効性評価		←		→		
④生物的防除等を組み合わせたIPM体系の確立と薬剤抵抗性遺伝子頻度低下の効果検証	←		→			
6. 水稻害虫(ウンカ類)の薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発						
①ウンカ類抵抗性システムの収集と薬剤抵抗性モニタリング	←			→	農研機構九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域、虫害グループ
②ウンカ類の標準および簡易検定マニュアルの作成	←		→			
③選択実験による強度抵抗性システムの作出	←		→			
④遺伝様式の解明と感受性回復過程の解析				←		
⑤トビウカのイミダクロプリド抵抗性機構の解明と遺伝子診断技術の開発	←		→		農研機構生物機能利用研究部門	昆虫機能制御ユニット、先進昆虫ゲノム改変ユニット
⑥ヒメビウカのフィプロニル抵抗性遺伝子診断技術の開発	←		→			
⑦セジロウカのフィプロニル抵抗性遺伝子診断技術の開発	←		→			
⑧ヒメビウカのイミダクロプリド抵抗性機構解明と遺伝子診断技術の開発		←		→		
⑨イネウンカ類の遺伝子診断技術の実証				←		
7. 害虫タイプ別/薬剤組み合わせ別、抵抗性発達遅延戦略の構築						
①汎用性が高く単純なモ	←	→			農業環境変動研	統計モデル

I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室			研究担当者
	機関	研究室		
研究開発責任者	農業生物資源研究所	昆虫科学 研究領域	—	◎野田 隆志 (~2016.3)
	農研機構 生物機能利用研究部門	昆虫制御 研究領域	—	◎中島 信彦 (2016.4~)
PRM 01コナガの 薬剤抵抗性機構 の解明と管理技 術の開発	農研機構 中央農業研究センター	虫・鳥獣害 研究領域	生物的防除グループ	○日本 典秀
	農研機構 東北農業研究センター	生産環境 研究領域	病害虫グループ	上杉 龍士
	農研機構 中央農業研究センター	虫・鳥獣害 研究領域	—	後藤 千枝
	農研機構 中央農業研究センター	虫・鳥獣害 研究領域	生物的防除グループ	有本 誠 (2017.4~)
	農研機構 生物機能利用研究部門	遺伝子利用基盤研究領域	先進昆虫ゲノム改変ユニット	上樂 明也
	農研機構 生物機能利用研究部門	遺伝子利用基盤研究領域	先進昆虫ゲノム改変ユニット	山本 公子
	農業生物資源研究所			神村 学 (~2016.3)
	農業生物資源研究所			和田 早苗 (~2016.3)
	農業生物資源研究所			瀬筒秀樹 (~2016.3)
	農業生物資源研究所			宮本和久 (~2016.3)
	京都大学	大学院工学研究科合成・生物化学専攻	分子生物化学分野	森 泰生
	京都大学	大学院工学研究科合成・生物化学専攻	分子生物化学分野	黒川 竜紀 (~2017.3)

日本農薬（株）	総合研究所	生物ユニット	藤岡 伸祐 (2017.4～)
日本農薬（株）	総合研究所	生物ユニット	坂田 和之 (2015.4～ 2017.3)
日本農薬（株）	総合研究所	生物ユニット	西松 哲義 (～2015.3)
京都大学	大学院工学研究科 合成・生物 化学専攻	分子生物化学分野	黒川竜紀 (～2017.3)
京都大学	大学院工学研究科 合成・生物 化学専攻	分子生物化学分野	森 誠之 (2017.4～)
日本農薬（株）	総合研究所	生物ユニット	藤岡 伸祐
宇都宮大学	農学部	応用昆虫学研究室	園田 昌司
熊本県農業研究センター	生産環境 研究所	病害虫研究室	古家 忠
熊本県農業研究センター	生産環境 研究所	病害虫研究室	本田 裕貴
長野県野菜花き試験場	環境部	—	北林 聡
長野県野菜花き試験場	環境部	—	野口 忠久
長野県野菜花き試験場	環境部	—	金子 政夫
長野県野菜花き試験場	環境部	—	桑澤 久仁厚 (～2017.3)
長野県野菜花き試験場	環境部	—	増澤 高亨 (～2017.3)
長野県野菜花き試験場	環境部	—	杉山 薫 (～2017.3)
北海道立中央農業試験場	病虫部	予察診断グループ	岩崎暁生 (～2016.3)
北海道立中央農業試験場	病虫部	予察診断グループ	武澤友二 (～2016.3)

PRM 02 チャノコ カクモンハマキ の薬剤抵抗性機 構の解明と管理 技術の開発	静岡県農林技術研究所茶 業研究センター	茶環境適 応技術科	—	○内山 徹
	静岡県農林技術研究所茶 業研究センター	茶環境適 応技術科	—	小澤 朗人 (~2018. 3)
	静岡県農林技術研究所茶 業研究センター	茶環境適 応技術科	—	吉田 達也 (2018. 4~)
	農研機構 生物機能利用研 究部門	昆虫制御 研究領域	昆虫機能制御ユニ ット	浅野 美和
	農研機構 生物機能利用研 究部門	昆虫制御 研究領域	昆虫機能制御ユニ ット	秋月 岳 (~2018. 3)
	農研機構 生物機能利用研 究部門	昆虫制御 研究領域	昆虫機能制御ユニ ット	松倉 啓一郎 (2018. 4~)
	農研機構 生物機能利用研 究部門	遺伝子利 用基盤研 究領域	先進昆虫ゲノム改 変ユニット	上樂 明也
	農研機構 生物機能利用研 究部門	遺伝子利 用基盤研 究領域	先進昆虫ゲノム改 変ユニット	横井 翔
	農業生物資源研究所	農業生物 先端ゲノ ム研究セ ンター	昆虫ゲノム研究ユ ニット	末次 克行 (~2015. 3)
農研機構 九州沖縄農業研 究センター	生産環境 研究領域	虫害グループ	秋月 岳 (2018. 4~)	
農業生物資源研究所	昆虫科学 研究領域	昆虫成長制御研究 ユニット	大門 高明 (~2016. 3)	
PRM 03ワタアブ ラムシの薬剤抵 抗性メカニズム 解明と管理技術 の開発	農研機構 果樹茶業研究部 門	生産・流通 研究領域	虫害ユニット	○土田 聡
	農研機構 果樹茶業研究部 門	生産・流通 研究領域	虫害ユニット	三代 浩二
	日本曹達 (株)	研究開発 本部 小 田原研 究所	研究企画管理部 兼 創薬解析研究 部	山本 敦司
	日本曹達 (株)	研究開発 本部 小 田原研 究所創薬解 析研究部	先端研究グルー プ、分子設計グル ープ	平田 晃一

	日本曹達 (株)	研究開発本部 小田原研究所圃場評価研究部	殺虫剤研究グループ	清田 隆太郎
	日本曹達 (株)	研究開発本部 小田原研究所創薬解析研究部	分子設計グループ	金澤 潤
	日本曹達 (株)	研究開発本部 小田原研究所創薬生物研究部	殺虫剤研究グループ	岩佐 孝男
	宮崎県総合農業試験場	生物環境部	—	松浦 明
	宮崎県総合農業試験場	生物環境部	—	竹原 剛史 (2017.4~)
	宮崎県総合農業試験場	生物環境部	—	日高 春美 (~2017.3)
	宮崎県総合農業試験場	生物環境部	—	下大園 佳由 (2017.4~)
	宮崎県総合農業試験場	生物環境部	—	寺本 敏
	大分県農林水産研究指導センター	農業研究部	病害虫対策チーム	岡崎真一郎 (~2016.3)
	大分県農林水産研究指導センター	農業研究部	病害虫対策チーム	姫野和洋 (~2018.3)
	大分県農林水産研究指導センター	農業研究部	病害虫対策チーム	竹内 実 (2018.4~)
	大分県農林水産研究指導センター	農業研究部	病害虫対策チーム	井上 美樹 (2015.4~ 2017.3)
	大分県農林水産研究指導センター	農業研究部	病害虫対策チーム	山崎 真居 (2017.4~)
	大分県農林水産研究指導センター	農業研究部	病害虫対策チーム	野村 雄太 (2016.4~)
	大分県農林水産研究指導センター	農業研究部	病害虫対策チーム	山村 駿太郎 (2017.4~)
	和歌山県農業試験場	環境部	—	岡本 崇
	和歌山県農業試験場	環境部	—	岩橋 良典 (~2015.3)
	和歌山県農業試験場	環境部	—	井口 雅裕 (2015.4~)
	和歌山県農業試験場	環境部	—	林 恭弘 (~2018.3)

	和歌山県農業試験場	環境部	—	藪野 佳寿郎 (2018.4～)
PRM 04ネギアザミウマの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発	農研機構 野菜花き研究部門	野菜病害虫・機能解析研究領域	虫害ユニット	○太田 泉
	農研機構 野菜花き研究部門	野菜病害虫・機能解析研究領域	—	武田 光能
	農研機構 野菜花き研究部門	野菜病害虫・機能解析研究領域	虫害ユニット	飯田 博之
	農研機構 生物機能利用研究部門	遺伝子利用基盤研究領域	先進昆虫ゲノム改変ユニット	上樂 明也
	茨城県農業総合センター	園芸研究所	病虫研究室	草野 尚雄 (～2017.3)
	茨城県農業総合センター	園芸研究所	病虫研究室	窪田 直也 (2017.4～)
	茨城県農業総合センター	園芸研究所	病虫研究室	高木 素紀
	茨城県農業総合センター	園芸研究所	病虫研究室	鹿島哲郎 (～2018.3)
	茨城県農業総合センター	園芸研究所	病虫研究室	小河原 孝司 (2018.4～)
	大阪府立環境農林水産総合研究所	食と農の研究部	防除グループ	柴尾 学
	大阪府立環境農林水産総合研究所	食と農の研究部	防除グループ	金子 修治
	大阪府立環境農林水産総合研究所	食と農の研究部	防除グループ	城塚 可奈子
	北海道立中央農業試験場	病虫部	予察診断グループ	岩崎暁生 (～2016.3)
北海道立中央農業試験場	病虫部	予察診断グループ	武澤友二 (～2016.3)	
北海道立中央農業試験場	病虫部	予察診断グループ	荻野瑠衣 (～2016.3)	
PRM 05ナミハダニの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発	京都大学	大学院農学研究科地域環境科学専攻	生態情報開発学分野	○刑部 正博
	静岡県農林技術研究所	植物保護・環境保全科	—	土井 誠
	静岡県農林技術研究所	植物保護・環境保全科	—	斎藤 千温 (2018.4～)

	静岡県農林技術研究所	植物保護・環境保全科	—	石川 隆輔 (~2017. 3)
	静岡県農林技術研究所	植物保護・環境保全科	—	中野 亮平 (~2018. 3)
	静岡県農林技術研究所	植物保護・環境保全科	—	片山 晴喜 (2016. 4~)
	奈良県農業研究開発センター	基盤技術科	—	國本 佳範 (~2017. 3)
	奈良県農業研究開発センター	環境科	病害虫防除ユニット	井村 岳男 (2017. 4~)
	奈良県農業研究開発センター	環境科	病害虫防除ユニット	今村 剛士 (~2018. 3)
	奈良県農業研究開発センター	環境科	病害虫防除ユニット	山口 貴大 (2018. 4~)
PRM 06水稲害虫(ウンカ類)の薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発	農研機構 九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	虫害グループ	○松村 正哉 (~2018. 9)
	農研機構 九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	虫害グループ	○真田 幸代 (2018. 10~)
	農研機構 九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	虫害グループ	秋月 岳
	農研機構 九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	虫害グループ	藤井 智久 (2018. 4~)
	農研機構 生物機能利用研究部門	遺伝子利用基盤研究領域	先進昆虫ゲノム改変ユニット	山本 公子
	農研機構 生物機能利用研究部門	遺伝子利用基盤研究領域	先進昆虫ゲノム改変ユニット	上樂 明也
	農研機構 生物機能利用研究部門	遺伝子利用基盤研究領域	先進昆虫ゲノム改変ユニット	横井 翔
	近畿大学	農学部	生物制御科学研究室	松田 一彦 (~2016. 3)
PRM 07害虫タイプ別/薬剤組み合わせ別、抵抗性発達遅延戦略の構築	農研機構 農業環境変動研究センター	環境情報基盤研究領域	統計モデル解析ユニット	○山中 武彦
	農研機構 農業環境変動研究センター	環境情報基盤研究領域	統計モデル解析ユニット	山村 光司 (2018. 4~)
	農研機構 果樹茶業研究部門	茶業研究部門	茶業研究領域茶病害虫ユニット	須藤 正彬

PRM08薬剤抵抗性 水稻病原菌の発 生・伝搬抑制技術 の高度化	農研機構 中央農業研究センター	病害研究領域	抵抗性利用グループ	○鈴木 文彦 (~2017.3)
	農研機構 中央農業研究センター	病害研究領域	抵抗性利用グループ	早野 由里子 (~2017.3)
	農研機構 中央農業研究センター	病害研究領域	抵抗性利用グループ	芦沢 武人 (~2017.3)
	農研機構 中央農業研究センター	病害研究領域	抵抗性利用グループ	安田 伸子 (~2017.3)
	農研機構 中央農業研究センター	病害研究領域	抵抗性利用グループ	林 敬子 (~2017.3)
	農研機構 九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	病害グループ	井上 博貴 (~2017.3)
	農研機構 九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	病害グループ	園田 良一 (~2017.3)
	農研機構 九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	病害グループ	笹谷 孝英 (~2016.3)
	福岡県農林業総合試験場	病害虫部	病害虫チーム	石井 貴明 (~2017.3)
	福岡県農林業総合試験場	病害虫部	病害虫チーム	菊原 賢次 (~2017.3)
佐賀県農業試験研究センター	環境農業部	病害虫・有機農業研究担当	菖蒲 信一郎 (~2017.3)	
佐賀県農業試験研究センター	環境農業部	病害虫・有機農業研究担当	田中 弘毅 (~2017.3)	
佐賀県農業試験研究センター	環境農業部	病害虫・有機農業研究担当	衛藤 友紀 (~2017.3)	
佐賀県農業試験研究センター	環境農業部	病害虫・有機農業研究担当	山口 純一郎 (~2017.3)	
三重県農業研究所	農産物安全安心研究課	—	鈴木 啓史 (~2017.3)	
三重県農業研究所	農産物安全安心研究課	—	黒田 克利 (~2017.3)	

	三重県農業研究所	農産物安全安心研究課	—	川上 拓 (～2017.3)
--	----------	------------	---	-------------------

(改ページ)

中課題番号	14526424	中課題 研究期間	平成26～30年度
大課題名	ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発		
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究開発部門 昆虫制御研究領域長 中島信彦		

I-3. 研究目的

生産現場で薬剤抵抗性の発達が問題となっている、あるいは今後問題になる恐れのある害虫等を対象に、原因遺伝子の特定を含む薬剤抵抗性の機構解明と簡易遺伝子診断技術の開発を行う。また、抵抗性が問題となっている現地における抵抗性発達過程を解析し、害虫の生活史パターンや抵抗性遺伝子の遺伝様式を踏まえた害虫タイプごとの抵抗性発達予測の他、薬剤の特性を考慮したローテーションと代替技術となる防除手段を組み合わせたシミュレーションを行い、薬剤抵抗性の発達を事前に回避または大幅に遅延させるための抵抗性管理ガイドライン（薬剤の使用基準）案を策定することを目的とする。

このため、本研究では、

1. コナガの薬剤抵抗性機構の解明と管理技術の開発
2. チャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性機構の解明と管理技術の開発
3. ワタアブラムシの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発
4. ネギアザミウマの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発
5. ナミハダニの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発
6. 水稻害虫（ウンカ類）の薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発
7. 害虫タイプ別／薬剤組み合わせ別、抵抗性発達遅延戦略の構築
8. 薬剤抵抗性水稻病原菌の発生・伝搬抑制技術の高度化

により、薬剤抵抗性の発達・拡大を予測するシミュレーションモデルを開発し、それを元に地域特性に応じた薬剤抵抗性ガイドラインの策定に役立つガイドライン案を作成し公表する。

その結果、

1. 上記病害虫種について薬剤抵抗性系統を早期発見し、被害拡大前に適切な防除手段を講じられるようになり、農作物の安定生産に貢献することが期待される。

I-4. 研究方法

(1) 薬剤抵抗性原因遺伝子の同定と遺伝子診断用プライマーの作出。

参画機関が保有する各害虫種の薬剤抵抗性系統と感受性系統について、ゲノム配列ドラフト解析、ddRADseq解析、トランスクリプトーム解析等、次世代シーケンサーを活用したゲノム情報解析を行うことにより、薬剤抵抗性獲得原因となる遺伝子の変異を探索した。候補遺伝子を発見した場合には、その遺伝子および変異体産物の生化学的な性状を調査し、最終的な原因変異の同定を行った。変異箇所を含むDNA合成プライマーを種々作成し、感受性個体と抵抗性個体のDNAを鋳型としたPCR反応産物を解析し、抵抗性特異的な増幅産物が得られるか調査した。検出用DNAプライマーを確定した後、各地の抵抗性強度が様々な個体群を対象に、抵抗性遺伝子頻度と補正死虫率の相関関係を調査し、抵抗性遺伝子頻度が生物検定の抵抗性強度に相関する場合に、遺伝子診断用プライマーとした。

(2) 抵抗性の発達を予測するシミュレーションモデルの作成と抵抗性の発達を抑制する施用方法の提案

害虫種の増殖パターン、周辺環境への移動・分散の状況、抵抗性原因遺伝子の遺伝様式等を考慮して、薬剤のうち漏らし状態の変化を考慮した抵抗性発達速度の予測モデルを作成し、どのような薬剤の使用方法で抵抗性の発達速度を抑制することができるか解析した。

(3) 薬剤抵抗性原因遺伝子の遺伝様式の解明

薬剤抵抗性の原因遺伝子が、優性遺伝する場合と劣性遺伝する場合で、個体群中での拡大速度が異なるため抵抗性管理のためには遺伝様式の解明が重要である。抵抗性系統と感受性系統の掛け合わせ後代の抵抗性強度を調査することにより、抵抗性原因遺伝子の遺伝様式を解析した。

(4) 開発した抵抗性遺伝子診断技術の実証

プロジェクトに参画する公設試験場や、遺伝子診断法技術講習会（ワークショップ）を通じて、診断技術の汎用性に関する情報を収集し、非特異的増幅産物が現れやすい場合等、条件を再検討し、再現性が高くなるようPCR増幅条件の改善を行った。

I-5. 研究結果

(1) 薬剤抵抗性原因遺伝子の同定と遺伝子診断用プライマーの作出。

国内に分布するコナガのジアミド剤抵抗性原因遺伝子については、ddRAD解析とF2集団の生物検定により、リアノジン受容体の1アミノ酸変異が抵抗性獲得原因であることが判明し、この塩基変異を検出するプライマーを設計して遺伝子診断技術とした。チャノコカクモンハマキのDAH系IGR剤（テブフェノジド剤）抵抗性原因遺伝子についても同様に原因遺伝子解析を行った結果、エクダイソン受容体の1アミノ酸変異が抵抗性獲得原因であることが判明し、この塩基変異を検出するプライマーを設計して遺伝子診断技術とした。ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性原因遺伝子については、ヨーロッパのモモアカアブラムシで報告されていたニコチン性アセチルコリン受容体の1アミノ酸変異と同じ変異が原因であった。ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性遺伝子はナトリウムチャンネル遺伝子に複数のアミノ酸置換が検出されたが、国内各地の系統を解析した結果、そのうちの1箇所の変異で診断できることが判明したため、これを診断用プライマーとした。ナミハダニについてはキチン生合成遺伝子の変異

を検出するプライマーを設計した。トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性獲得原因遺伝子については、受容体遺伝子に変異はなく、RNAseqにより代謝酵素であるCyp6ER1遺伝子が抵抗性系統で高発現していることが判明した。塩基配列比較の結果、抵抗性系統のCyp6ER1には3塩基欠損があり、この部分を検出するプライマーを設計した。

水稲のいもち病菌については、QoI剤耐性獲得原因であるシトクロム b 遺伝子上の変異を特異的に検出するプライマーを設計した。

(2) 抵抗性の発達を予測するシミュレーションモデルの作成と抵抗性の発達を抑制する施用方法の提案

害虫の抵抗性遺伝形質のタイプ、薬剤のタイプや、移動をとまなう害虫の交尾行動の違い、薬剤に暴露されるタイミングなどを組み合わせて、汎用性が高く単純でありながら、実際の抵抗性管理に決定的な示唆を与えられるシミュレーションモデルを構築した。このシミュレーションモデルを用いて検討した結果、殺虫剤が非浸透移行性である場合など、「世代内施用」の方が抵抗性の発達遅延に効果的であるケースが多いことが明らかになった。

水稲のいもち病殺菌剤で問題が拡大しつつあるQoI剤耐性菌については、種子の保毒率が重要な要因で種子の流通が分布拡大原因として働くことが示唆された。

(3) 薬剤抵抗性原因遺伝子の遺伝様式の解明

コナガのジアミド剤抵抗性については完全劣性であることがわかった。チャノコカクモンハマキのDAH系IGR剤については、不完全優性の遺伝様式であることが判明したが、エクダイソン受容体の変異に加え、効果は少ないものの、RNAseqによるトランスクリプトーム解析で分解酵素の発現向上も認められており、その影響を反映した結果と考えられる。ワタアブラムシのネオニコチノイド剤耐性については、交配実験の結果、抵抗性系統の出現率が高く当初は優性遺伝すると考えられたが、次世代シーケンサーによるワタアブラムシのゲノム解析で、抵抗性遺伝子の対立遺伝子に欠損変異が存在することが判明し、本来は劣性遺伝であるが、対立遺伝子に欠損があると表現形質として抵抗性を示していることが判明した。そのほか、ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性遺伝子は優性遺伝、ナミハダニのキチン合成酵素阻害剤耐性遺伝子は劣性、トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性遺伝子は優性遺伝であった。

(4) 開発した抵抗性遺伝子診断技術の実証

技術講習ワークショップや、公設試験場で試行した結果、ワタアブラムシのネネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断法において、サーマルサイクラーの機種により人非特異的増幅産物が検出されやすい場合があり、ホットスタート型の増幅酵素を使用し、プライマーの濃度を調整することにより安定した結果が得られるようになった。その他の対象害虫種-薬剤の組み合わせについても各地で採集した野外採集個体群を用いて遺伝子診断技術を検証し、抵抗性検定に使用可能な技術であることを実証した。

(5) ガイドライン案の公表

これら結果を骨子に、薬剤抵抗性農業害虫の管理に役立つ知見をとりまとめ、「殺菌剤耐性イネいもち病菌対策マニュアル<QoI剤>」、「薬剤抵抗性農業害虫管理のためのガイドライン案」としてとりまとめ、研究プロジェクト代表機関である農研機構ホームページ上で各々平成29年3月、平成31年3月に公開した。

I-6. 今後の課題

プロジェクト研究期間中には対応しきれなかった主要害虫の薬剤抵抗性も知られており、ミカンキイロアザミウマ、ミナミキイロアザミウマ、コナジラミ類等の各種薬剤抵抗性原因遺伝子の同定、遺伝子診断用マーカーの開発および簡易遺伝子診断法の開発が望まれる。公表したガイドライン案には、抵抗性害虫管理を行うに当たって必要な基礎的知識と実際の抵抗性モニタリングを行うためのマニュアル的説明を掲載しているが、これらの技術および考え方を、いかに普及させるかは今後の課題であるが、研究担当者だけでなく、現場技術指導者や農薬企業等の利害関係者も一丸となって取り組む必要がある。

中課題番号	14526424	中課題 研究期間	平成26～30年度
小課題番号	PRM01	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発		
小課題名	コナガの薬剤抵抗性機構の解明と管理技術の開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	農研機構中央農業研究センター・虫・鳥獣害研究領域・生物的防除グループ・日本典秀		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

コナガはアブラナ科野菜の最重要害虫で、過去に有機リン剤やカーバメート剤、合成ピレスロイド剤に対して高度の抵抗性を発達させてきた。最近、コナガ防除の基幹剤であるジアミド系殺虫剤に対する抵抗性が国内の一部地域で報告されており、今後全国的な問題に発展する恐れがある。したがって本種に対する薬剤抵抗性管理技術の開発が急務となっている。そこで本課題では、主にジアミド剤抵抗性を対象に、その発生実態やメカニズム等の基礎的知見の収集、抵抗性遺伝子診断技術の開発や移動分散の実態の解明、発生予測技術の検証を行い、それらによって殺虫剤抵抗性の発達を回避するコナガの薬剤抵抗性管理ガイドライン案を作成する。

2) 研究方法

コナガのゲノム情報、RNAseq等の最新技術を活用して原因遺伝子を同定し、抵抗性の分子機構を解明する。特にジアミド剤の作用点であるリアノジン受容体 (RyR) の変異と抵抗性の関係を明らかにする。得られた知見に基づきPCR法をベースとした簡易な遺伝子診断技術を開発する。また、複数の抵抗性遺伝子の診断や、集団レベルで遺伝子変異の頻度を解析するための高度な手法を開発する。

薬剤感受性モニタリング法 (簡易生物検定法) を標準化し、それをを用いて各地域個体群のジアミド剤に対する抵抗性の発達実態や年次変動を明らかにする。ジアミド剤に対する抵抗性の遺伝様式を解明し、交差抵抗性も考慮して抵抗性管理に有効な薬剤を選定する。

コナガ発生条件の大きく異なる主要産地 (西南暖地・高冷地・非越冬地域) において、簡易生物検定法等を用いて、ジアミド系殺虫剤に対する薬剤感受性のモニタリングを行い、使用薬剤と抵抗性発達過程の関係を解明する。また、簡易遺伝子診断法の有効性について圃場で検証を行う。コナガの移動分散や生活史パラメーター等の特性を解明して、抵抗性発達予測技術の開発に資する。開発された抵抗性発達予測技術についてその有効性を圃場で検証する。遺伝子診断法による抵抗性発達の早期発見や発達予測技術を利用し、各地域の特性に即した防除対策を策定し、殺虫剤抵抗性の発達を回避する管理技術を確立する。

以上から得られた知見をもとに、コナガのジアミド剤抵抗性管理に有効なガイドライン案を作成する。

3) 研究結果

コナガのジアミド剤抵抗性原因遺伝子の同定と次世代判定手法の開発では、抵抗性(R)型特異的バンドと感受性(S)型特異的バンドをマルチプレックスPCRによって同時に判別する方法(図1) および、個別に判定する汎用性の高い代替法(図2) について開発した。

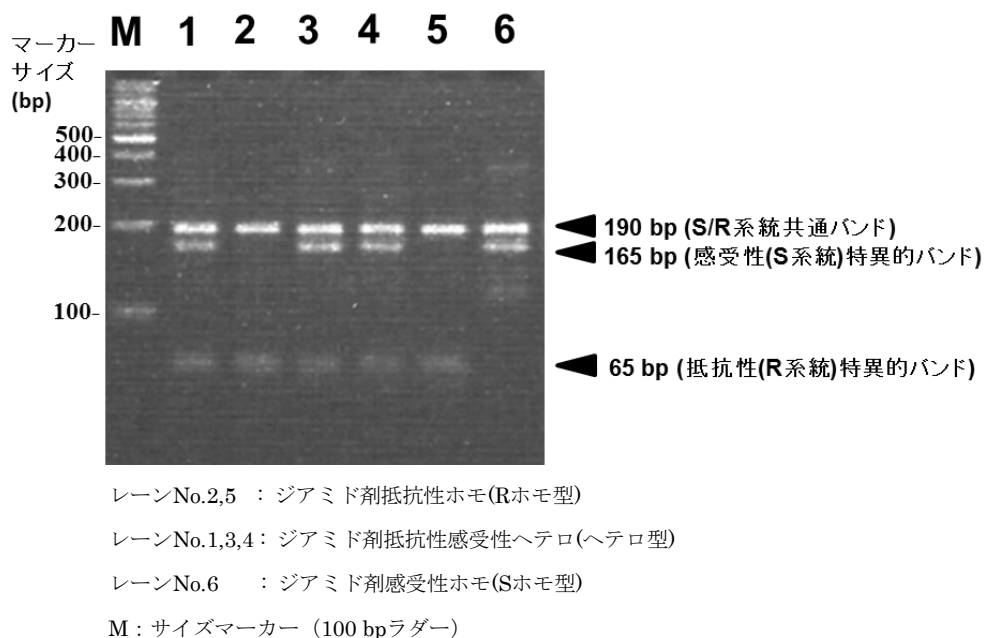


図1 抵抗性型と感受性型の判定を同時に行う遺伝子診断法の電気泳動結果

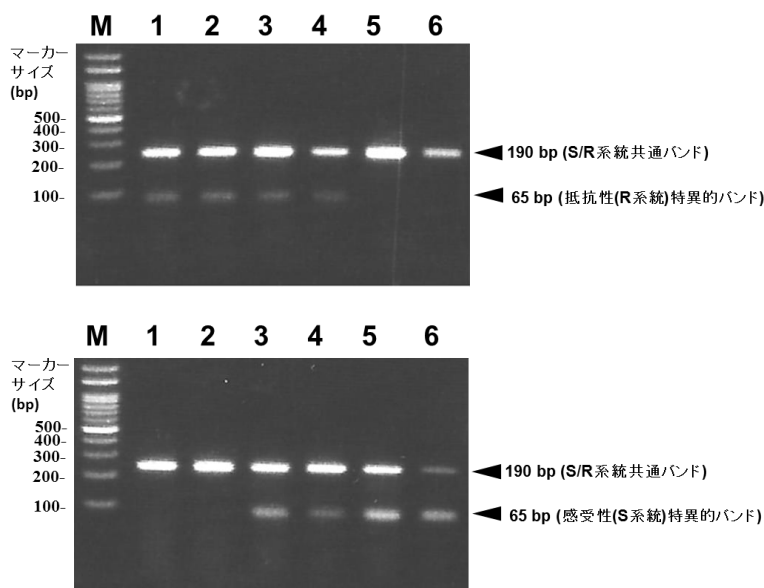


図2 抵抗性型と感受性型の判定を二回のPCRに分けて行う遺伝子診断法の電気泳動像。(上) 抵抗性型の判定、(下) 感受性型の判定

また、2017年に長野県の各地で採集したコナガ個体群を対象に5薬剤抵抗性12マーカー

の大規模遺伝子診断実験を実施した。その結果、BT剤(Cry1A)および合成ピレスロイド剤抵抗性関連の一部のマーカで80~90%弱とやや低くなるケースがみられるが、これら以外のマーカでは概ね100%に近い判定成功率となった。ジアミド剤抵抗性の主要因であるG4946E変異による抵抗性遺伝子頻度は2016年および2017年のいずれも春と比較して秋に上昇することが確認された。

コナガの薬剤抵抗性の分子機構の解明では、ジアミド剤殺虫剤の標的分子である、リアノジン受容体(RyR)においてアミノ酸の点変異がジアミド剤抵抗性に与える影響を評価した。カイコRyR強制発現系を用いて、アミノ酸変異体に対する応答を検討した。また、ジアミド系殺虫剤のターゲット分子であるリアノジン受容体(RyR)においてアミノ酸の点変異がジアミド剤抵抗性に与える影響を評価した。カイコRyR強制発現系(ショウジョウバエS2細胞)を用いて、ジアミド剤抵抗性コナガに見られるアミノ酸変異と同等の場所に変異を入れたカイコRyR変異体を作製し、ジアミド剤による活性化を評価した。

薬剤感受性モニタリング法(簡易生物検定法)を標準化した。パクチョイ葉を用いることで、抵抗性を発達させた飼育しにくい個体群も容易に飼育、試験を実施できる。また、食害程度の食害面積率のグレード評価を標準化(図3)したことにより、全国各地での検定結果を相互に参照できる。

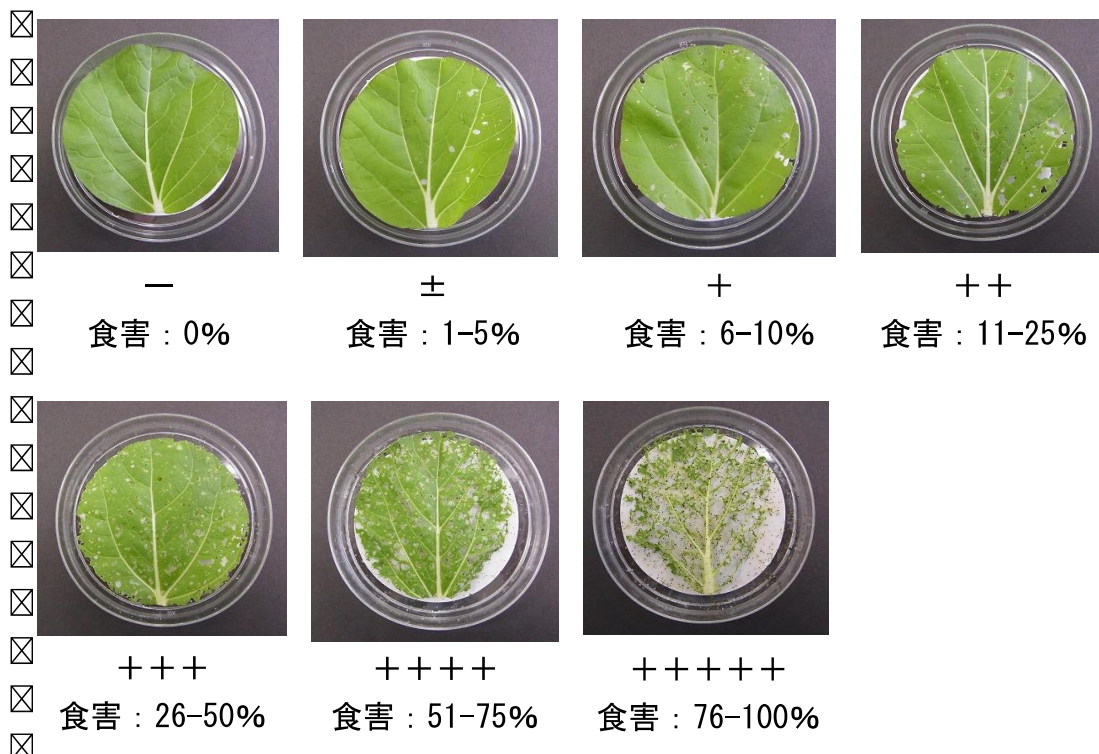


図3 食害程度の食害面積率によるグレード評価

野外コナガ個体群においてG4946E頻度を遺伝子診断によって継続的にモニタリングした。抵抗性遺伝子頻度が40%を超えたため先発ジアミド剤の使用を中止したところ、感受性の回復が部分的に認められ、抵抗性遺伝子頻度は概ね前年度よりも低く、40%未満で推移した(図4)。このことから、ひとたび先発ジアミド剤に対して抵抗性を発達させた個体群でも薬剤使用を中止すれば、薬剤の効果が期待できるレベルまで感受性が回復するこ

とが明らかとなった。実験室内で確立したシアントラニプロール抵抗性系統の発育を調べた結果、抵抗性系統の発育は先発ジアミド剤抵抗性および感受性系統に比べて遅く、羽化率も低い傾向が認められた。

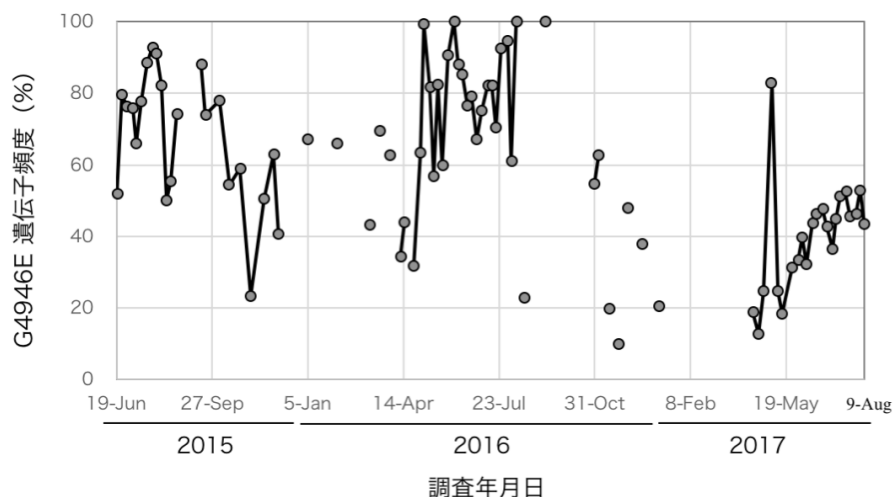


図4 圃場におけるジアミド剤抵抗性遺伝子（G4946E）頻度。
2017年は先行ジアミド剤の使用を中止した。

西南暖地、高冷地および非越冬地域における圃場試験では、それぞれの地域での防除体系の有効性が示され、ガイドライン案に事例集として掲載した。

西南暖地では、野外個体群の遺伝子診断による抵抗性遺伝子頻度が18.7%であったコナガ個体群に対して体系防除の効果を検討した。その結果、ジアミド系殺虫剤の灌注後に発生したコナガは、現地での使用履歴がない薬剤を含む体系および既登録薬剤のみを組み合わせたいずれの防除体系も効果が認められた。また、新規ジアミド系殺虫剤の効果も既登録殺虫剤と同等であった。一方、同時に発生した他のチョウ目害虫に対しても防除効果が認められたが、残効は14日間未満と考えられた。なお、新規ジアミド系殺虫剤を組み込んだ体系では、散布後の他のチョウ目害虫の密度は低く推移した。以上の結果から、ジアミド剤抵抗性遺伝子の頻度が40%未満のコナガ個体群および同時期に発生するアオムシに対しては、ジアミド系殺虫剤の使用を1回までに止め、ジアミド系以外の殺虫剤主体で体系防除行うことでコナガおよび他のチョウ目害虫の防除が可能と考えられた。

高冷地では、主要なアブラナ科産地において、フェロモントラップを用いてコナガを採集し遺伝子診断を行ったところ、各地域の抵抗性遺伝子頻度はすべての主要産地現地圃場で40%を上回った。そこでコナガに有効な薬剤に加え交信かく乱剤を併用した栽培の実証を行い、使用した薬剤及び防除効果について検証した。その結果、問題となる被害は認められず、交信かく乱剤など、化学的防除のみによらない技術の併用は抵抗性管理上有効と考えられた。

非越冬地では、抵抗性が発達しても冬期に死滅するため、ジアミド剤の使用は一定程度有効である。効果の高い系統の薬剤を基幹として1ヶ月ごとに系統を変えるブロックローテーションを実施することにより、他の問題となるチョウ目害虫とともに防除可能であることが示された。

薬剤抵抗性遺伝子診断技術の確立のためには、対象害虫について簡便かつ効率的なサン

プル収集およびDNA抽出を行う技術が望まれる。フェロモン誘引粘着トラップで誘殺したコナガ標本を利用したDNA抽出技術を確立した。粘着トラップに付着したコナガ標本については、ヘキサンで粘着物質を溶解させながら剥離した後、簡易DNA抽出法で抵抗性遺伝子マーカー解析のためのPCRへの利用が可能となることを示した。また、野外に放置されたトラップ捕獲標本の劣化が激しい夏期の高温期でも、トラップの回収間隔を1週間程度にすることで、PCRに利用可能なコナガ標本を得られることが分かった(図5、Uesugi et al., 2016)。

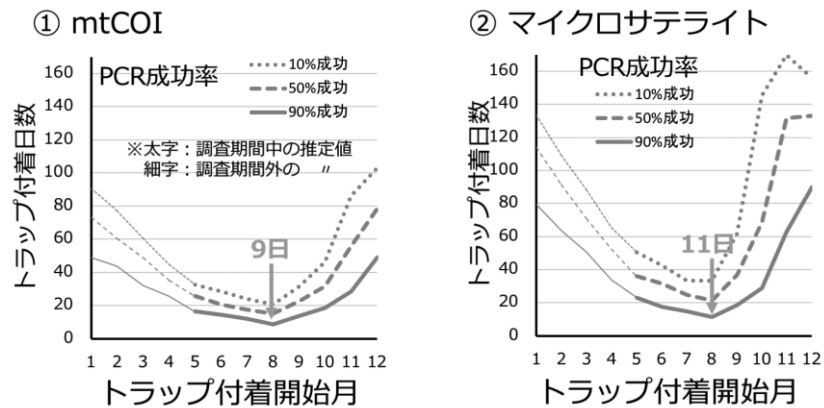


図5 トラップから回収したコナガ成虫から抽出したDNAによるPCR成功率に対するトラップ設置時期と付着日数の関係

コナガ移動分散の実態を解明においては、ジアミド剤抵抗性の全国的な発達状況を把握するために、ダイレクトシーケンス法によってジアミド剤抵抗性遺伝子(G4946E)頻度を調査した。その結果、コナガの非越冬地である宮城県・山形県以北では、越冬可能な関東以西と比較して抵抗性遺伝子頻度が有意に低い傾向が認められ、これら2地域の抵抗性発達の特性に考慮した抵抗性遅延戦略の重要性が明らかになった(図6)。アブラナ科作物圃場およびアブラナ科雑草地からコナガを収集し、同様にジアミド剤抵抗性遺伝子頻度を調査した結果、雑草地の方がより抵抗性遺伝子頻度が低かったことから、雑草地がコナガの感受性遺伝子を温存する生息地となっていることが明らかになった。G4946E周辺領域の塩基配列から、日本から採集したコナガのジアミド剤抵抗性遺伝子には4つの系統が存在し、そのうち3つの系統についてはタイのコナガと一致した。したがって、日本とタイの抵抗性遺伝子について共通祖先の存在が推測され、日本の抵抗性遺伝子は海外から移入した可能性が高い。また、遺伝子マーカーを用いた遺伝的構造解析(AMOVAおよびIBD解析)によって、コナガのジアミド剤抵抗性遺伝子は国内で地理的障壁がなく急速に拡散したことが明らかになった。

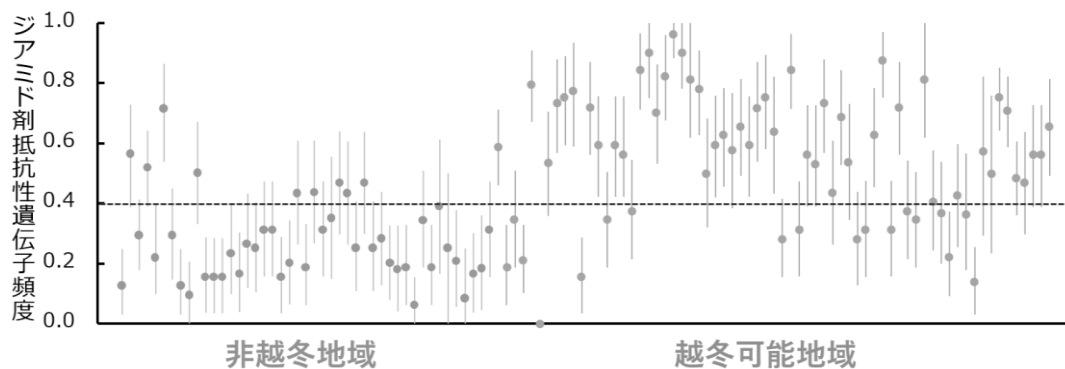


図6 コナガ非越冬地域（青字）と越冬可能地域（橙字）におけるジアミド剤抵抗性遺伝子（G4946E）頻度。越冬可能地域で有意に頻度が高い。

過去の文献を解析し、ジアミド剤の代替となる殺虫剤の有効性を明らかにするとともに、都道府県間および市町村間での感受性程度に差があることを明らかにした。その結果、代替する殺虫効果の高い系統の殺虫剤を明らかにするとともに、スピノシン系およびBt剤は抵抗性が発達しづらい系統の殺虫剤であることが判明した。以上の情報については、基礎的データとして抵抗性管理ガイドライン案に掲載するために整理した（表1）

表1 文献解析による各種薬剤の殺虫効果

作用機作分類名	IRACコード	オッズ比*	有意差	死虫率	(95%信頼区間)
スピノシン系	5	1.0	a	0.998	(0.996-0.999)
Bt	11A	3.4	b	0.995	(0.990-0.998)
ピリダリル	UN	21	c	0.858	(0.812-0.893)
アベルメクチン系/ミルベマイシン系	6	26	cd	0.934	(0.912-0.951)
オキサジアジン（インドキサカルブ）	22A	31	d	0.806	(0.728-0.863)
ネライストキシン類縁体	14	34	d	0.955	(0.927-0.975)
セミカルバゾン	22B	36	e	0.767	(0.679-0.840)
ピロール（クロルフェナピル）	13	48	f	0.702	(0.632-0.759)
フェニルピラゾール系（フィプロニル）	2B	67	g	0.641	(0.559-0.715)
METI剤（トルフェンピラト）	21A	89	h	0.589	(0.503-0.667)
有機リン系	1B	101	gi	0.671	(0.595-0.740)
ベンゾイル尿素系（IGR）	15	117	gi	0.364	(0.308-0.431)
ジアミド系	28	229	h	0.395	(0.353-0.441)
ネオニコチノイド系	4A	242	hij	0.271	(0.208-0.350)
カーバメート系	1A	643	j	0.184	(0.109-0.288)
ピレスロイド系	3A	1805	k	0.128	(0.093-0.170)

*表の順位が高いものほど（オッズ比が低いものほど）殺虫効果が高い。

4) 成果活用における留意点

- ・開発した簡易遺伝子診断法は、フェロモントラップで捕獲されるコナガ以外のネギコガ、イモコガ類等については偽陽性となる可能性があるため、トラップからの採集時に非コナガ個体を除外しておくことが望ましい。
- ・他に発生するチョウ目害虫の防除にあたっては、コナガのジアミド剤抵抗性のリスク評価を行い、ジアミド系殺虫剤の使用回数を決める。
- ・非越冬地域における防除体系は、越冬地域では絶対に使用してはならない。

5) 今後の課題

- ・シアントラニリプロール、クロルフェナピルおよびピリダリル抵抗性について遺伝子診断用マーカーの開発および簡易遺伝子診断法の開発を進めて抵抗性モニタリングを実現する必要がある。
- ・大規模遺伝子診断法について、実用化に向けたアップデートおよび運用方法の検討等を進める。
- ・変異体の細胞内局在や立体構造との関連性について検討が必要である。
- ・I4790K以外のメカニズムがシアントラニリプロール抵抗性に関与している可能性について明らかにする必要がある。
- ・引き続き野外のコナガ個体群におけるG4946EおよびI4790K頻度をモニタリングする必要がある。
- ・ジアミド系以外の系統の殺虫剤に対するコナガの感受性モニタリングも必要となる。
- ・新規系統の殺虫剤上市後に、海外からの抵抗性個体の流入に対する対策を検討する必要がある。
- ・ガイドライン案における抵抗性管理の考え方を、いかに普及させるかが課題である。

<引用文献>

Uesugi R, Hinomoto N and Goto C (2016) Estimated time frame for successful PCR analysis of diamondback moths, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), collected from sticky traps in field conditions. *Appl Entomol Zool* 51 (3):505-510. doi: 10.1007/s13355-016-0418-3

中課題番号	14526424	中課題 研究期間	平成26～30年度
小課題番号	PRM02	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発		
小課題名	チャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性機構の解明と管理技術の開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	静岡県農林技術研究所茶業研究センター・茶環境適応技術科・内山 徹（共同研究機関：農研機構 生物機能利用研究部門）		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

チャの重要害虫であるハマキガ科のチャノコカクモンハマキは、近年、静岡県内の茶産地において多発傾向を示しており被害が深刻化しつつある。原因として、本種の防除に使用されてきたジアシルヒドラジン系(DAH系)昆虫成長制御剤(IGR剤)やジアミド系薬剤への薬剤抵抗性の獲得が指摘されている。本課題では、チャノコカクモンハマキにおけるこれらの薬剤に対する抵抗性発達の診断指標として利用可能な分子マーカーの同定と抵抗性発達の原因遺伝子の同定を行い、簡便で低コストな遺伝子診断技術を開発し、栽培現場での殺虫剤抵抗性管理体系の構築に寄与することを目的とする。

また、静岡県の茶産地では、チャノコカクモンハマキの複数殺虫剤に対する複合抵抗性が大きな問題となっており、今後は本種の薬剤抵抗性が全国的な問題となる可能性がある。しかし、本種防除の基幹剤であるジアミド剤やIGR剤に対する薬剤抵抗性の実態や抵抗性機構については大部分が不明であり、抵抗性管理に必要な情報が不足している。そこで、薬剤抵抗性チャノコカクモンハマキの発生実態を明らかにし、交差抵抗性や抵抗性の遺伝様式等の抵抗性機構を解明する。さらに、農研機構生物機能利用研究部門で開発された抵抗性遺伝子診断技術の現場での実用性を検証するとともに、DNAマーカーを活用した遺伝的血縁度推定の手法により、抵抗性遺伝子の分布拡散を予測する。以上の研究で得られた成果をもとに、薬剤抵抗性管理ガイドライン案を策定する。

2) 研究方法

●農研機構生物機能利用研究部門

(1) DAH系IGR剤抵抗性原因遺伝子・マーカーの検出と診断技術の開発

DAH系IGR剤抵抗性責任候補領域を特定するために、次世代シーケンサーを用いてddRAD-seq解析および全ゲノム配列解読を行った。抵抗性責任候補であるエクダイソン受容体(EcR)のA415V変異が抵抗性に関与するか調べるために、EcRのリガンド分子結合親和性試験を行った。EcR A415V変異を標的にしたPCR-RFLP法、LAMP-蛍光検出法を開発した。2015-2016年に7府県の全24地点から採集したチャノコカクモンハマキを用いて、PCR-RFLP法によりEcR A415V抵抗性遺伝子頻度、葉片浸漬法によりテブフェノジド剤に対する補

正死虫率を算出し、両者の相関を調査した。2015-2018年に18府県の全63地点から採集したチャノコカクモンハマキを用いて、PCR-RFLP法によりEcR A415V抵抗性遺伝子頻度を調査した。

(2) ジアミド剤抵抗性原因遺伝子・マーカーの検出と診断技術の開発

ジアミド剤の抵抗性に関わる遺伝子を絞り込むために、感受性2系統、抵抗性2系統を用いてRNA-seq解析を行い、標的遺伝子であるリアノジン受容体の変異の有無、発現変動遺伝子について調査した。フルベンジアミド抵抗性原因候補(カルボキシルエステラーゼ)上の抵抗性系統特異的なSNPを探索するために、抵抗性系統メスと感受性系統オスの交配後代F₂に常用濃度フルベンジアミド処理し、得られた生存虫と死亡虫のカルボキシルエステラーゼ遺伝子の塩基配列を調査した。抵抗性系統メスと感受性系統オスの交配後代F₂に常用濃度フルベンジアミド処理し、生存虫と苦悶虫のカルボキシルエステラーゼ発現量をリアルタイムPCR法により比較した。シアントラニリプロール剤抵抗性原因候補(P450)の転写開始点の特定および上流領域のSNP探索のために、CAGE-seq解析およびHiSeq Xによる全ゲノム解析を行った。2014-2016年に6府県全12地点から採集したチャノコカクモンハマキを用いてP450遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法により解析し、茶葉浸漬法によりシアントラニリプロール剤に対する補正死虫率を算出して、両者の相関を調査した。

●静岡県農林技術研究所茶業研究センター

(1) 殺虫剤抵抗性チャノコカクモンハマキの発生実態把握

2014年～2018年にかけて、全国各地の茶産地から合計40個体群を採集し、IGR剤およびジアミド剤を含む本種の殺虫剤感受性(補正死虫率および半数致死濃度LC₅₀値)を調査した。

(2) 交差抵抗性の解明

DAH系IGR剤およびジアミド剤と、現場で使用頻度の高い殺虫剤との交差抵抗性を、実験室内における殺虫剤淘汰を繰り返して淘汰系統を作出した。その後、同系統において殺虫剤感受性検定を実施し、LC₅₀値を算出して交差抵抗性を解析した。

(3) 殺虫剤抵抗性の遺伝様式の解明

DAH系IGR剤およびジアミド剤の抵抗性について、本種の殺虫剤抵抗性系統と感受性系統の交配試験により、その遺伝様式を解明した。

(4) 殺虫剤抵抗性診断技術の実用性検証

2015年～2018年にかけて、全国各地の18府県63地点からフェロモンモントラップにより成虫を回収するとともに、生物機能利用研究部門においてテブフェノジド剤抵抗性診断を行って実用性を検証した。また、静岡県の4地域の茶園においてフェロモンモントラップを3年連続して設置し、地域ごとの抵抗性遺伝子頻度の推移を調査した。

(5) 殺虫剤抵抗性遺伝子の分布拡散予測

2016年9月に静岡県菊川市高橋の半径500m程度の地域の13箇所の茶園にフェロモンモントラップを設置し、成虫を回収した後、生物機能利用研究部門でテブフェノジド剤抵抗性遺伝子診断を行った。果樹茶業研究部門(金谷)の協力により、フェロモンモントラップ設置地点間の距離と抵抗性遺伝子頻度の相関解析を実施した。また、中央農業研究センターで開発されたマイクロサテライトDNAマーカーを活用して、静岡県内の各個体群における遺伝的血縁度を解析した。

(6) 殺虫剤抵抗性ガイドライン案の策定

本研究の成果を反映させて、ガイドライン本体、サンプリング法、遺伝子診断法、および生物検定法を執筆した。

3) 研究結果

●農研機構生物機能利用研究部門

(1) DAH系IGR剤抵抗性原因遺伝子・マーカーの検出と診断技術の開発

抵抗性系統と感受性系統の交配後代(F₂世代)集団を用いたddRAD-seq解析および全ゲノム配列情報に基づく連鎖解析により、第17連鎖群に抵抗性マーカーが高頻度で集積する抵抗性責任候補領域が同定された。本領域中には抵抗性の原因候補遺伝子としてエクダイソン受容体(EcR)遺伝子が検出された。抵抗性系統では、EcR遺伝子の1244番目の塩基がシトシン(C)からチミン(T)に置換(C1244T)されることにより、415番目のアミノ酸がアラニンからバリンに置換(A415V)されている(図1)。結合親和性試験の結果、抵抗性型EcRでは、テブフェノジド剤の結合親和性が感受性型EcRと比較して5倍低いことから、EcR A415V変異がテブフェノジド剤抵抗性に関与することが示唆された。

EcR A415Vの遺伝子型を検出して抵抗性個体を判別する遺伝子診断法としてPCR-RFLP法(図2)およびLAMP法(図3)を開発した。PCR-RFLP法で算出した抵抗性遺伝子頻度と補正死亡率との相関関係には、高い相関が認められ(Spearmanの順位相関係数 $\rho = -0.8970$ 、P value < 0.0001)、抵抗性遺伝子頻度から抵抗性レベルを推定できる。国内の茶産地における野外個体群の抵抗性遺伝子頻度を調査した結果、静岡県、三重県、京都府、佐賀県、長崎県では、抵抗性遺伝子頻度が40%を超えており、テブフェノジド剤に対する抵抗性発達が示唆される(図4)。

塩基配列 (C1244T)

```

感受性型EcR: 1201 ctgctcaaggcttgcctcaagcggaggaatgatgctccgagtagcgcgcggtacgacgcg 1260
                |||
抵抗性型EcR: 1201 ctgctcaaggcttgcctcaagcggaggaatgatgctccgagtagcgcgcggtacgacgcg 1260
                |||
    
```

アミノ酸配列 (A415V)

```

感受性型EcR: 361 ESDTPFRQITENTILTVQLIVEFAKGLPGFAKISQPDQITLLKACSEVMMLRVRRYDA 420
                ESDTPFRQITENTILTVQLIVEFAKGLPGFAKISQPDQITLLKACSEVMMLRVRRYDA
抵抗性型EcR: 361 ESDTPFRQITENTILTVQLIVEFAKGLPGFAKISQPDQITLLKACSEVMMLRVRRYDA 420
                ESDTPFRQITENTILTVQLIVEFAKGLPGFAKISQPDQITLLKACSEVMMLRVRRYDA
    
```

図1 エクダイソン受容体の塩基配列およびアミノ酸変異

エクダイソン受容体(EcR)のアミノ酸変異A415Vは塩基配列変異C1244Tによって引き起こされる。赤字: 塩基配列変異、緑字: アミノ酸変異、黄色: 昆虫間で保存された領域、紫色: チョウ目昆虫で保存された領域、水色: ポナステロンA(脱皮ホルモンと同様にEcRと結合する分子)との水素結合に関与するアミノ酸、矢印: α ヘリックス

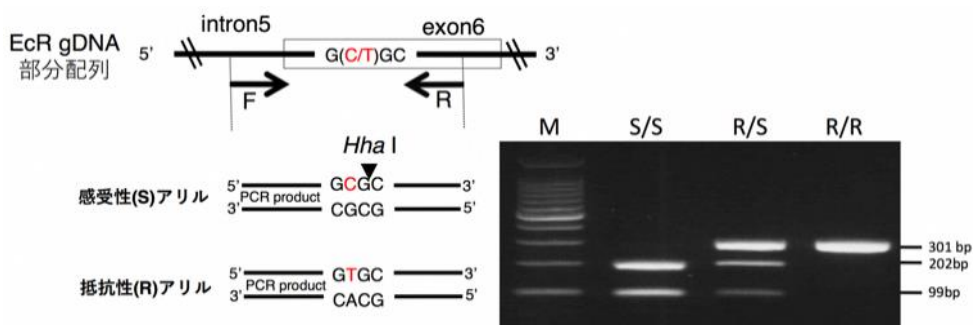


図2 PCR-RFLP法によりEcR A415V変異の有無を検出する遺伝子診断法

抵抗性ホモ型個体(R/R)では1本、感受性ホモ型個体(S/S)では2本、抵抗性感感性ヘテロ型個体(R/S)

では3本のバンドが検出される。Mは100 bp DNAラダーマーカー。

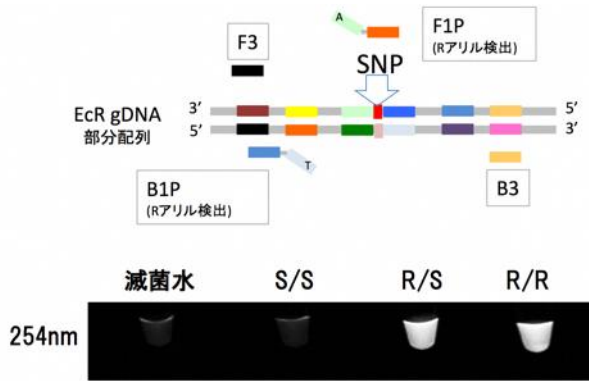


図3 LAMP法によりEcR A415V変異の有無を検出する遺伝子診断法

紫外線波長(254nm)下で、抵抗性ホモ型個体(R/R)および抵抗性感受性ヘテロ型個体(R/S)は蛍光を呈する。感受性ホモ型個体(S/S)は、蛍光を呈さない。

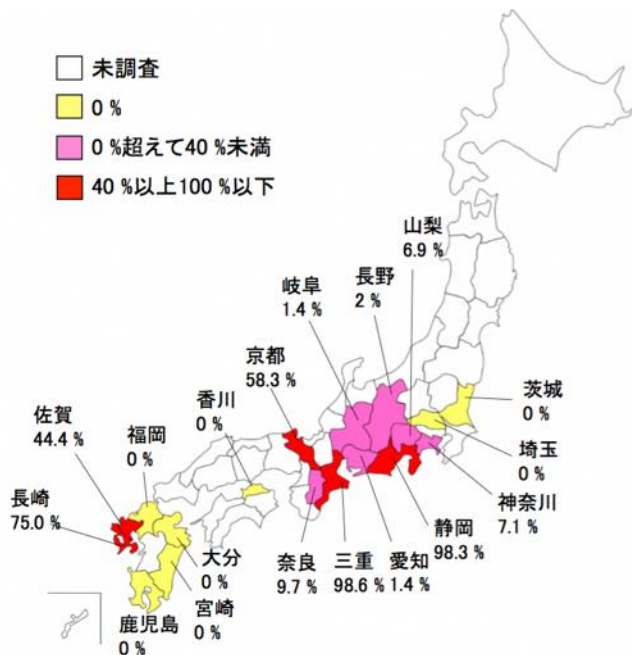


図4 各府県の調査地点における最も高いEcR A415V抵抗性遺伝子頻度

(2) ジアミド剤抵抗性原因遺伝子・マーカーの検出と診断技術の開発

RNA-seq解析の結果、ジアミド剤の標的分子であるリアノジン受容体には、抵抗性特異的な変異がないことが明らかになった。さらに、フルベンジアミド剤抵抗性原因遺伝子候補であるカルボキシエステラーゼのうち1遺伝子(comp37374)が抵抗性系統(島田市湯日2016系統、京都府和束町2015系統)に共通して高発現していた。またde novo assemblyの結果、感受性系統(金谷1960系統)では、comp37374の134番目のアミノ酸に該当する部分にストップコドンが挿入されており、本遺伝子が機能していない可能性が示唆された。comp37374のアミノ酸配列の相同性は、島田市湯日2016系統と京都府和束町2015系統で97.9%と非常に高く、ORF上には13ヶ所のSNPが存在する。そこで、抵抗性系統メスと感受性系統オスの交配後代F2に常用濃度フルベンジアミド処理し、生存虫と死亡虫に分けてジェノタイピングを行ったが、抵抗性系統特異的なSNPは特定できなかった。今後、CAGE-seq解析、全ゲノム解析により上

流領域のSNP探索を行う必要がある。抵抗性系統メスと感受性系統オスの交配後代F2のcomp37374発現量を調査した結果、4000倍希釈したフルベンジアミド塗布葉を与えた時の生存虫のcomp37374発現量は、感受性系統と比較して約30倍高く、本遺伝子の発現上昇がフルベンジアミド抵抗性に関与している可能性が示唆された。

次にRNA-seq解析の結果、シアントラニプロール剤抵抗性原因遺伝子候補である複数のP450のうち1遺伝子(comp64594)が京都府和東町2015系統特異的に高発現しており、この遺伝子がシアントラニプロール剤抵抗性に関与する可能性が示唆された。本遺伝子のORF上にはSNPはないが、感受性系統と抵抗性系統の全ゲノムの比較により、上流領域に抵抗性系統特異的な3ヶ所のSNPが特定できた(表1)。2014-2016年に採集した野外個体群12系統におけるcomp64594の発現量と常用濃度のシアントラニプロール剤に対する補正死虫率の相関を調査した。その結果、常用濃度のシアントラニプロール剤に対する補正死虫率が低いほどcomp64594の発現量が高いことが明らかになり、両者に負の相関が見られたことから、本遺伝子の発現上昇がシアントラニプロール剤抵抗性に関与する可能性が示唆された。

表1 チャノコカクモンハマキのP450遺伝子(comp64594)上流領域における抵抗性系統特異的SNP

xfSc0002470 上の位置	感受性系統(金谷系統)配列	抵抗性系統(和東町系統)配列
11,560 bp	C	T
11,616 bp	A	-
11,624 bp	C	T

comp64594はゲノムスキヤフォールドxfSc0002470(30,236 bp)上に座乗し、転写開始点が9,661 bpに存在する。抵抗性系統特異的SNPは転写開始点の上流(マイナス鎖方向)約2 Kbに存在する。

●静岡県農林技術研究所茶業研究センター

(1) 殺虫剤抵抗性チャノコカクモンハマキの発生実態把握

DAH系IGR剤は、静岡県、三重県、京都府、佐賀県、および長崎県で感受性が低かった(図5左上)。ジアミド剤のうちフルベンジアミド剤やクロラントラニプロール剤は、静岡県、三重県、京都府、および福岡県で感受性が低下していたが、新規ジアミド剤であるシアントラニプロール剤およびシクラニプロール剤は、一部の個体群を除いて総じて感受性が高かった(図5右上、同左下、同右下)。また、静岡県島田市湯日個体群におけるジアミド剤感受性を2007年~2018年にかけて毎年調査したところ、感受性の回復が示唆された(データ略)。

(2) 交差抵抗性の解明

DAH系IGR剤(メトキシフェノジド剤)で22世代にわたり淘汰した結果、本剤の常用濃度50ppmを上回る抵抗性系統(LC₅₀値=281ppm、抵抗性比=1561倍)を作出した(データ略)。本剤による選抜前F2と選抜後F23における殺虫剤感受性を比較することで交差抵抗性を解析した結果、メトキシフェノジド剤とテブフェノジド剤の抵抗性が交差する(同系統の交差)とともに、メトキシフェノジド剤とルフェヌロン剤の抵抗性が交差していた(異系統の交差)(図6左)。さらに、メトキシフェノジド剤とジアミド剤(フルベンジアミド剤およびクロラントラニプロール剤)の抵抗性は交差せず、メトキシフェノジド剤とエマメクチン安息香酸塩剤の抵抗性も交差しないことが明らかになった(図6左)。

ジアミド剤（フルベンジアミド剤）で19世代にわたり淘汰した結果、本剤の常用濃度100ppmを上回る抵抗性系統（ LC_{50} 値=875ppm、抵抗性比=568倍）を作出した（データ略）。本剤による選抜前F3と選抜後F19における殺虫剤感受性を比較することで交差抵抗性を解析した結果、フルベンジアミド剤と3種のジアミド剤の抵抗性がいずれも交差するとともに（同系統の交差）、フルベンジアミド剤と2種のDAH系IGR剤、および2種のベンゾイル尿素系（BU系）IGR剤の抵抗性がいずれも交差していた（異系統の交差）（図6右）。

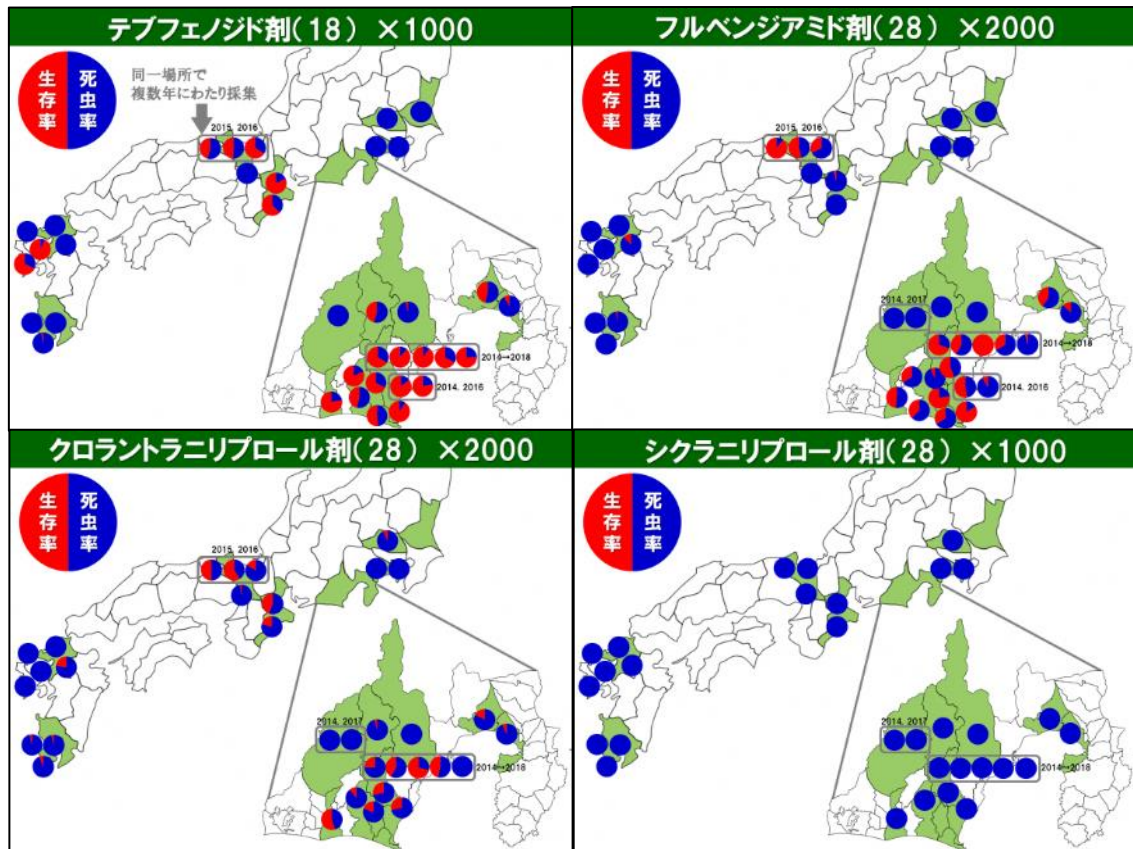


図5 全国の茶産地におけるDAH系IGR剤およびジアミド剤に対する感受性

カッコ内は、IRACコード。各薬剤の常用濃度（希釈倍数を×1000のように表記）に対する補正死虫率を円グラフで示しており、赤色の割合が多いほど感受性が低く、青色の割合が多いほど感受性が高い。



図6 DAH系IGR剤（メトキシフェノジド剤）およびジアミド剤（フルベンジアミド剤）における交差抵抗性

矢印は抵抗性が交差していることを示し、矢印が太いほど抵抗性の交差関係が強いことを示す。バツ

印は、抵抗性が交差しないことを示す。

(3) 殺虫剤抵抗性の遺伝様式の解明

テブフェノジド剤抵抗性は、常染色体性の複数因子による不完全優性の遺伝であることを明らかにした（内山・小澤、2015）。また、フルベンジアミド剤およびクロラントラニリプロール剤抵抗性は、いずれも常染色体性の複数因子による不完全優性の遺伝であることを明らかにした（内山・小澤、2017）。

(4) 殺虫剤抵抗性診断技術の実用性検証

全国各地の18府県61地点の個体群について、テブフェノジド剤抵抗性遺伝子診断を行った結果、同遺伝子頻度と本剤常用濃度に対する補正死虫率には相関が認められ、高い実用性が確認された（生物機能利用研究部門の結果参照）。また、茶園において3年間継続的に同遺伝子頻度を調査した結果、その頻度は地域ごとに異なるものの同一地域内では年次での変化はほぼないことが判明した（図7）。

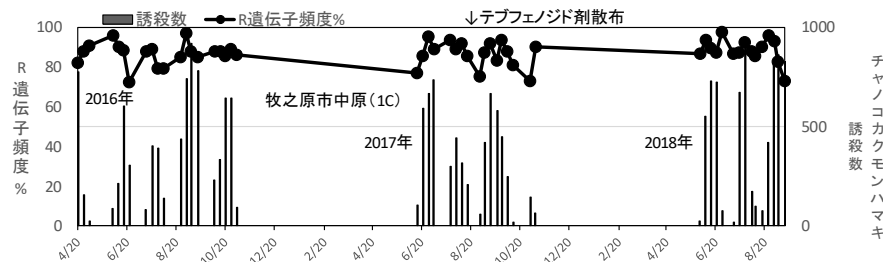


図7 茶園におけるDAH系IGR剤抵抗性遺伝子頻度の推移

(5) 殺虫剤抵抗性遺伝子の分布拡散予測

静岡県菊川市の茶園に設置したフェロモントラップ13地点の各個体群におけるテブフェノジド剤抵抗性遺伝子頻度を調査し、フェロモントラップ設置地点間の距離とR頻度の相関解析を実施したところ、数百mの地域内では同遺伝子頻度に空間的相関はないことが判明した（データ略）。

マイクロサテライトDNAマーカーによりチャノコカクモンハマキの遺伝的血縁度を解析した結果、本種成虫はそれほど移動分散せずに極小個体群を形成するとともに、その中で近親交配を行っている可能性が考えられた（図8）。

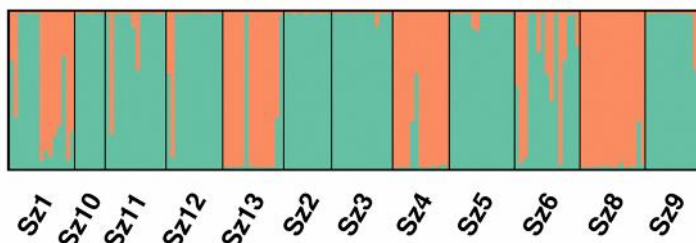


図8 マイクロサテライトDNAマーカーによる遺伝的血縁度解析

Sz1～13は各フェロモントラップの個体群を示し、一つの棒グラフはトラップ内の各個体を示す。各個体は、もともと2個体群に由来する。各個体は概ね単色（単起源）で、混じり合っていない。各トラップ内でも、どちらかの色にほぼ固定している。また、Sz3とSz4は100mしか離れていないが起源は全く違う。

(6) 殺虫剤抵抗性ガイドライン案の策定

ガイドライン案の各項目（ガイドライン本体、サンプリング法、DAH系IGR剤抵抗性遺伝子診断法、生物検定法）について執筆を完了した（ガイドライン案を参照）。

4) 成果活用における留意点

●農研機構生物機能利用研究部門

DAH系IGR剤抵抗性に関しては、開発した遺伝子診断法のうち、EcR A415Vを標的にしたPCR-RFLP法、LAMP-蛍光検出法をモニタリング手法として記載する。PCR-RFLP法は、R/RとR/Sを区別できるため、抵抗性遺伝子頻度を算出することができ、抵抗性遺伝子頻度の高い地域でも、詳細にモニタリングすることが可能である。一方、LAMP-蛍光検出法は、R/RとR/Sを区別できないが、抵抗性遺伝子頻度の低い地域においては、簡便に抵抗性個体の有無を把握するために有用な手法であると考えられる。

●静岡県農林技術研究所茶業研究センター

チャノコカクモンハマキの殺虫剤感受性については、府県ごとに異なるとともに、同一府県内でも地域により異なっていることが判明したため、各地域においてテブフェノジド剤抵抗性診断または生物検定を実施することが望ましい。なお、各個体群の殺虫剤感受性については、本種の採集地点から数百mの範囲内に適用できると考えられる。また、DAH系IGR剤およびジアミド剤の交差抵抗性については、室内淘汰による結果であることから、生産現場では必ずしも本研究の結果と同様の現象が起きているとは限らないため、注意が必要である。

5) 今後の課題

●農研機構生物機能利用研究部門

本課題実施期間中では、フルベンジアミド抵抗性遺伝子診断法およびシアントラニリプロール抵抗性遺伝子診断法の開発に至らなかった。開発に至らなかった原因としては、標的分子であるリアノジン受容体変異が抵抗性の主要因ではなかったことがあげられる。フルベンジアミド抵抗性候補遺伝子としてカルボキシエステラーゼ遺伝子を同定した。しかし、抵抗性系統特異的なDNAマーカーが特定できていないため、今後、上流領域におけるDNAマーカーの探索が必要である。シアントラニリプロール抵抗性候補遺伝子としてP450遺伝子を同定した。DNAマーカーとして上流領域の3ヶ所のSNPが同定されたが、今後、殺虫剤分解活性の有無を明らかにするとともに、野外個体群のSNPのシーケンスと補正死虫率との相関関係を明らかにし、遺伝子診断法の開発につなげる必要がある。

●静岡県農林技術研究所茶業研究センター

本研究では、抵抗性の原因が作用点変異だったテブフェノジド剤抵抗性については順調に抵抗性遺伝子診断法が開発されたものの、抵抗性の原因が作用点変異ではないジアミド剤抵抗性については同診断法が開発が難航した。本種のみならず、抵抗性の原因が解毒分解酵素の場合、抵抗性遺伝子診断法の開発に必要なDNAマーカーの特定は、非常に難しいと思われる。今後は、解毒分解酵素に起因する抵抗性遺伝子診断法をいかに開発するかが課題として残された。また、チャノコカクモンハマキの殺虫剤抵抗性については、DAH系IGR剤およびジアミド剤のみならず、ベンゾイル尿素系IGR剤、ピレスロイド剤、およびカーバメート剤にも及んでいるため、抵抗性が問題となっている一連の殺虫剤について優先順位を考えながら抵抗性診断法を開発していく必要がある。

<引用文献>

内山 徹・小澤朗人 (2015) チャノコカクモンハマキ (チョウ目：ハマキガ科) におけるテブフェノジド剤抵抗性の遺伝様式. 応動昆 59: 127-131.

内山 徹・小澤朗人 (2017) チャノコカクモンハマキ (チョウ目：ハマキガ科) におけるジアミド系殺虫剤抵抗性の遺伝様式. 応動昆 61: 109-117.

中課題番号	14526424	中課題 研究期間	平成26～30年度
小課題番号	PRM03	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発		
小課題名	ワタアブラムシの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	農研機構 果樹茶業研究部門 生産・流通研究領域・虫害ユニット・土田聡		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性の分子メカニズムを解明し、遺伝子診断法を開発する。アブラムシ類を対象とした生物検定法を開発する。有効な代替薬剤の検討、天敵等を利用した生物的防除法の開発、高温処理等の物理的防除法の開発により、ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの効果的防除法を明らかにする。

2) 研究方法

(1) ネオニコチノイド剤抵抗性系統の遺伝子診断法の開発とガイドラインの策定

ニコチン性アセチルコリン受容体上に発見されたネオニコチノイド剤抵抗性関連遺伝子変異R81Tを迅速かつ正確に検出するための遺伝子診断法を開発する。また、ネオニコチノイド剤抵抗性発現への関与が予想される感受性対立遺伝子上の欠損部位(欠損S遺伝子)の遺伝子診断法の開発も行う。全実施課題で得られた知見をもとに、ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性管理のためのガイドライン案を策定する。

(2) ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性の分子機構の解明と検証

作用点であるニコチン性アセチルコリン受容体の変異を明らかにするため、抵抗性系統および感受性系統の作用点の塩基配列を比較し、抵抗性関連変異を特定する。また、遺伝子解析及び生物検定より、薬物代謝の抵抗性への関与度を解析する。抵抗性系統の作用点での機能変化を解析するため、電気生理的、生化学的および計算化学的手法により抵抗性系統の受容体とネオニコチノイド剤との相互作用を解析する。さらに、殺虫試験及び上記の技術を用いて、複数のネオニコチノイド剤の分子構造の違いにより抵抗性レベルが異なることを証明する。

(3) ネオニコチノイド剤抵抗性系統の生態解明と薬剤感受性検定マニュアルの策定

アブラムシ類の薬剤感受性検定法の標準化および簡易化を図り、マニュアルを策定する。抵抗性系統の生活環型などの生物学的特性を明らかにするとともに、交雑試験を行い、ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性の遺伝様式を明らかにする。施設果菜類における気門封鎖剤や生物的防除など抵抗性発達リスクの低い資材を活用した防除体系の実証を行う。

(4) ネオニコチノイド剤抵抗性系統の発生実態解明と生物的防除等による抵抗性管理技術の開発

ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシ既発生地域における発生実態を把握する。生物的防除を核とした防除体系を実証し、抵抗性発達を遅延させる管理技術を策定する。抵抗性系統の寄主範囲を明らかにし、発生リスクの高い作物および中間寄主となる雑草種を明らかにする。

(5) ネオニコチノイド剤抵抗性系統の発生実態解明と物理的防除等による抵抗性管理技術の開発

ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシ新規発生地域における発生実態を把握する。物理的防除技術として、物理障壁（防虫ネット等）の効率的な設置方法を検証する。高温によるワタアブラムシの殺虫効果および作物への影響を検討し、施設密閉高温処理の防除効果と安全性を検証する。

3) 研究結果

(1) ネオニコチノイド剤抵抗性系統の遺伝子診断法の開発とガイドラインの策定

①ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性発達に關与するニコチン性アセチルコリン受容体遺伝子上の遺伝子変異 (R81T) を検出するために、マルチプレックスPCR法による遺伝子診断法を開発した (図1左)。PCR条件 (プライマー濃度) 設定は個体単位およびバルク単位でそれぞれ行った (引用文献4)。

②R81T変異と組み合わさることによりネオニコチノイド剤抵抗性を発現されることが明らかになった欠損S遺伝子を検出するため、マルチプレックスPCR法による遺伝子診断法を開発した (図1右)。

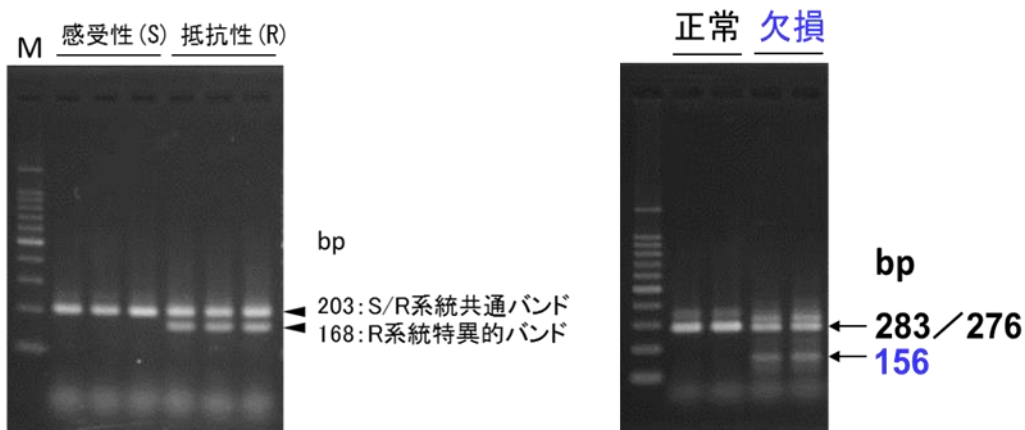


図1 ワタアブラムシネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断法 (左) および欠損S遺伝子診断法 (右)

③茨城県内において、黄色水盤トラップを用いて採集したワタアブラムシ有翅虫について個体単位でDNAを抽出し、遺伝子型を解析した結果、R81Tおよび欠損S遺伝子を併せ持つ個体 (RS') およびR81Tのみ保有する個体 (RS) の季節消長が明らかになった (図2: つくば市の1地点の結果のみ示す)。本調査により、ネオニコチノイド剤抵抗性であるRS' 有翅虫のモニタリング実施適期は5~6月であると考えられた。

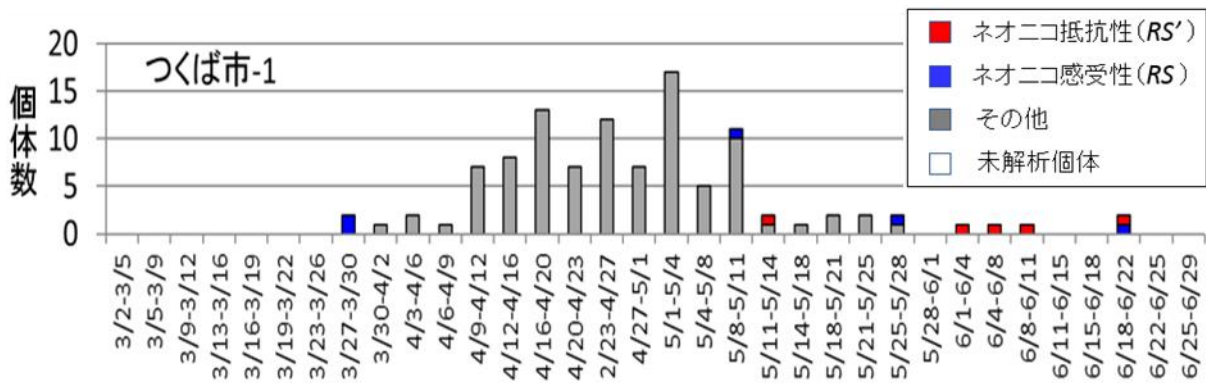


図2 茨城県つくば市におけるネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子 (R81T) および欠損S 遺伝子保有個体の発生消長

④全実施課題で得られた知見をもとに、ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断法、サンプリング手法、簡易生物検定法、抵抗性発達リスク判定の基準、代替防除法の提案をまとめた抵抗性管理ガイドライン案を策定した(図3は薬剤抵抗性管理の具体的手順)。

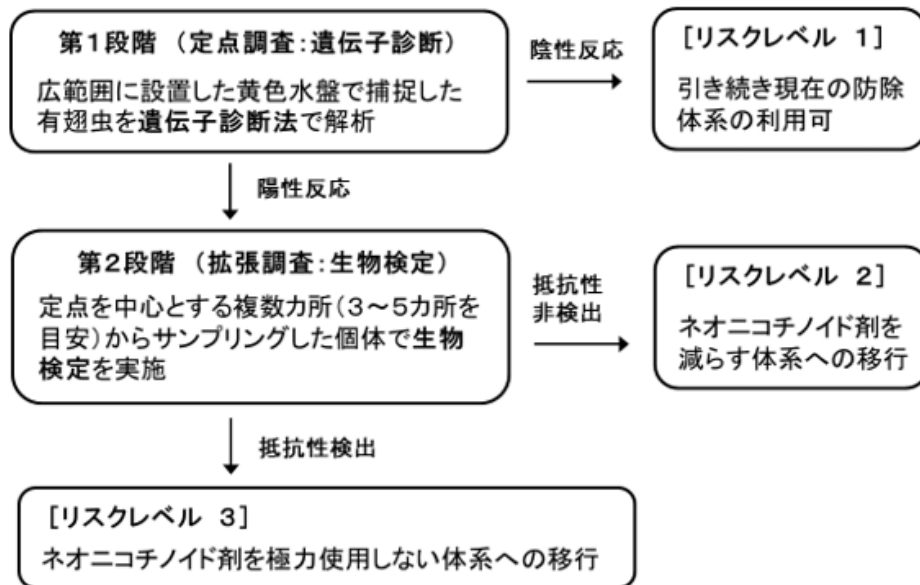


図3 ワタアブラムシの薬剤抵抗性管理の具体的手順 (フローチャート)

(2) ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性の分子機構の解明と検証

ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの感受性検定を行うと、同じネオニコチノイド系殺虫剤間でも抵抗性レベルに差異が見られた。シアノ基を有するネオニコチノイドでは抵抗性レベルが比較的 low、ニトロ基を有するネオニコチノイドでは高い抵抗性レベルが見られた。また代謝阻害剤による共力効果は小さく、解毒代謝の抵抗性への寄与は部分的なものである可能性が高いことが示唆された。これは、この研究で確立された P450 代謝研究手法で得られた結果も支持するものであった。作用点(ニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta 1$ サブユニット)の変異解析を行った結果、R81T アミノ酸残基が確認された(引用文献 1)。この変異の影響を電気生理学的手法で解析した結果、感受性検定と同様に分子構造の違いにより変異の影響に差異が見られた(図 4)。また、この変異の影響を計算科学シミュレーションで検証したところ、感受性検定および電気生理学的

手法で解析した結果と矛盾しないものであった(図5)。研究成果を統括すると、抵抗性の主要因は、作用点のアミノ酸残基変異によるものであり、ネオニコチノイド系殺虫剤の部分構造の違いで変異の影響に差異が見られること、解毒代謝による抵抗性への寄与は小さいことを明らかにした(引用文献2)。

Wild-type vs R81T

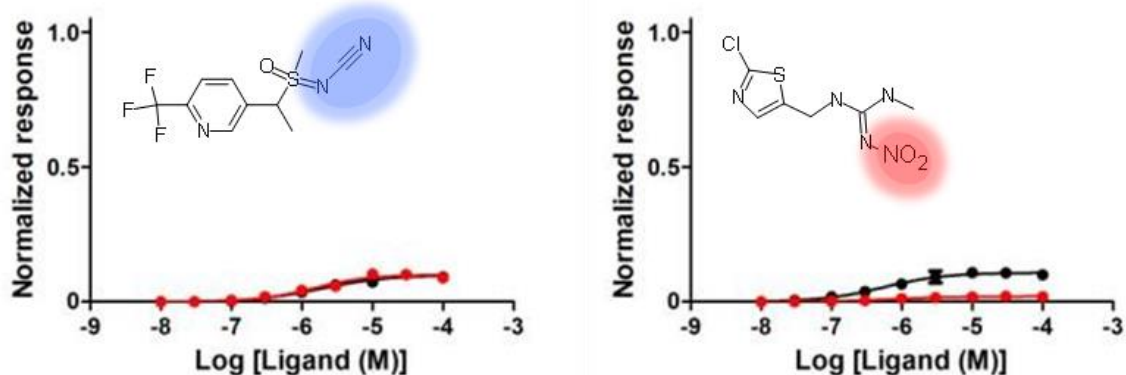


図4 電気生理学的手法によるシアノ基を有するものとニトロ基を有する化合物の変異の影響

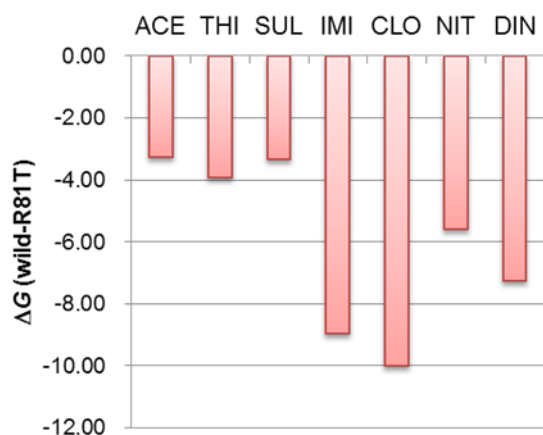


図5 計算科学シミュレーションによる変異の影響の評価

ACE: アセタミプリド、THI: チアクロプリド、SUL: スルホキサフロル、IMI: イミダクロプリド、CLO: クロチアニジン、NIT: ニテンピラム、DIN: ジノテフラン

(3) ネオニコチノイド剤抵抗性系統の生態解明と薬剤感受性検定マニュアルの策定

①ワタアブラムシの殺虫剤感受性検定作業の効率化を目的に簡易検定法を開発した。本手法はプラスチックシャーレ(直径6.0×深さ1.5cm)に2枚のペーパータオル(約8×5cm)を半分に折り、シャーレ内に敷く。次に水道水1.0~1.5mlを滴下後、薬液に浸漬・風乾した円形葉片(直径約5cm)を入れる。これに無翅雌成虫を接種し、72時間後に死虫率を調査する手順で行う。本手法は、同じく植物体浸漬法である幼苗処理法やマンジャーセル法に比べ、全て市販品を用いるため、検定容器の作成労力が不要であり、普及センター等でも容易に取り組める検定法である(引用文献3)。

②アブラムシ類のネオニコチノイド剤抵抗性発現には、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)における作用点変異R81Tの関与が明らかになっている。ところがネオニコチノイド剤抵抗性系統とピレスロイド剤抵抗性系統を交配し得られた両剤の抵抗性遺伝子を持つF₁において、感受性が高い現象が認められた(表1)。

表1 両剤抵抗性遺伝子保有系統の各殺虫剤に対する補正

系統名	薬剤名	検定濃度	両剤抵抗性クローン	親世代	
				ネオニコチノイド抵抗性クローン (♂)	ピレスロイド抵抗性クローン (♀)
ネオニコチノイド	イミダクロプリド水和剤	2,000	100	52	100
	クロチアニジン水溶剤	2,000	96	67	100
	ジノテフラン顆粒水溶剤	2,000	96	44	92
合成ピレスロイド	アクリナトリン水和剤	1,000	100	100	0
	ペルメトリン乳剤	2,000	100	100	0
	シペルメトリン乳剤	1,000	100	100	0

ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシのRNAseqデータを解析した結果、感受性対立遺伝子におけるR81T突然変異部位の下流に7bpの欠損部位があることが判明した。この遺伝子欠損（以下、欠損S'）が、ネオニコチノイド剤抵抗性の発現に関与していると考えられたため、R81Tと欠損遺伝子をそれぞれ単独に保有する2系統（102および104）の交配を行った（「R81T」はR、「欠損S'」=S'と表記）。その結果、両方の遺伝子を持つ系統（R/S'）のみ抵抗性を示した。R/S'クローンのジノテフランLC₅₀値は250.0~2568.3ppmと、親クローンと比べ33~778倍の抵抗性比レベルを示し、ネオニコチノイド剤抵抗性の発現には、「R81T」および「欠損S'」の両方が必要であることが明らかとなった（表2）。以上の成果により、ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの抵抗性発現の新たなメカニズムが解明された。

表2 「R81T」および「欠損S'」保有した各F₁の遺伝子型とジノテフランLC₅₀値

クローン名	遺伝子型a)	ジノテフラン			
		(LC ₅₀ 値)ppm	102比	104比	
F ₁	1	250.0	33.3	75.8	
	2	371.8	49.6	112.7	
	3	1676.4	223.5	508.0	
	4	2568.3	342.4	778.3	
	5	R/S	3.8	0.5	1.2
	6	S/S'	4.5	0.6	1.4
	7	S/S	1.6	0.2	0.5
交配親	102	R/S	7.5	—	
	104	S/S'	3.3	—	
参考b)	12串間市	R/S'	981.7	130.9	297.5

a)R=R81T, S' =欠損あり, S =欠損なし. b)2012年採集ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシ.

(4) ネオニコチノイド剤抵抗性系統の発生実態解明と生物的防除等による抵抗性管理技術の開発

①大分県のピーマン栽培ほ場で採集されたワタアブラムシについて、ネオニコチノイド剤抵抗性の有無の発生実態を調査した。2013年までに5地点で採集したすべてのワタアブラムシでネオニコチノイド剤抵抗性を示したが、2014年の9地点での採集結果では、感受性と抵抗性の混在していた。さらに2015年は2地点でネオニコチノイド剤抵抗性個体が確認されたが、2016

年では認められず、2017年には3地点で確認された。

②ハウス夏秋ピーマンにおいてネオニコチノイド剤抵抗性系統として生物的防除体系を実践した。コレマンアブラバチとヒメカメノコテントウ資材を組み合わせることで生物的防除資材のみで抵抗性系統の防除が可能になった（図6）。

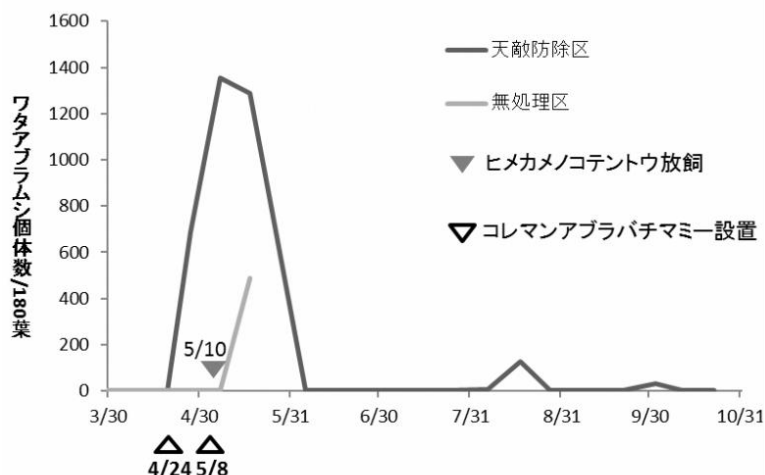


図6 夏秋ピーマンハウス内のワタアブラムシ個体数の推移（2018）

③ピーマンから採集されたネオニコチノイド剤抵抗性系統が選好する（増殖率が高い）植物は、カボチャ、キュウリ、ヒョウタン、ヘチマ、ピーマン（パプリカ）、ナズナなどであり、オクラ、シロツメクサ、ウンシュウミカンなどでも増殖する。一方、なす、ジャガイモ、イチゴなどでは増殖率が低い（表3）

表3 ネオニコチノイド剤抵抗性系統の寄主選好性程度（増殖率）の高低

高	中	低
ウリ科 カボチャ、キュウリ、 ヒョウタン、ヘチマ ナス科 ピーマン（パプリカ） アブラナ科 ナズナ	アオイ科 オクラ キンボウゲ科 トゲミノキツネノボタン オオバコ科 オオイヌノフ グリ マメ科 シロツメクサ シソ科 ホトケノザ ムラサキ科 キュウリグサ ミカン科 ウンシュウミカン キク科 シュンギク、キク、 ヒマワリ、コスモス バラ科 ナシ スミレ科 パンジー	ナス科 ナス、ジャガイモ キク科 ゴボウ、ジニア、 ヒメジョオン、 オオバナノセンダングサ バラ科 イチゴ マメ科 ダイズ タデ科 イヌタデ ヒルガオ科 サツマイモ、アサガオ フクロソウ科 アメリカフウロ キョウチクトウ科 ニチニチソウ

※キュウリ苗を用い、20℃16L8D条件で累代飼育した無翅成虫を、直径9cmのビニールポットで栽培した寄主植物に接種し、15日後の増殖率を調査した。

(増殖率：高・50倍以上、中・10～50倍、低・10倍未満)

(5) ネオニコチノイド剤抵抗性系統の発生実態解明と物理的防除等による抵抗性管理技術の開発

①圃場採取によりワタアブラムシの抵抗性個体割合の推移を調査した。印南町のスイカ産地では、調査開始時の平成26年は50%であったが、翌年から減少し0～0.6%で推移した。有田川町の露地栽培シントウガラシ産地においても平成27年では51%であったが、平成30年には0%に減少した(図7)。

これら産地の抵抗性個体割合の減少は、ネオニコチノイド剤代替農薬が常用化したためだと考えられる。しかし、平成30年に設置した黄色水盤トラップで抵抗性個体が両産地において捕獲されている。これらのことから、抵抗性発達の初確認から4、5年を経て、地域での抵抗性個体割合は減少しているが発生は続いていることが判明した。

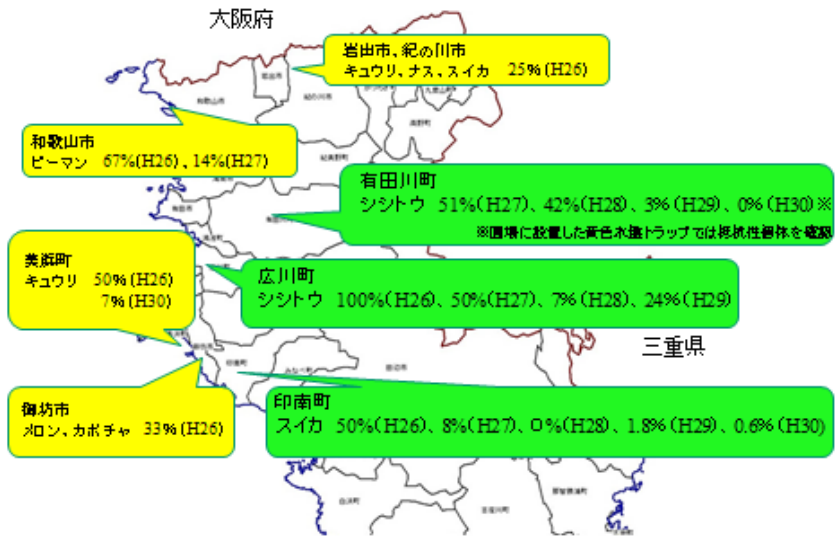


図7 ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシ個体割合の推移
H26年は幼苗検定法による抵抗性個体群割合、H27～は遺伝子診断法による抵抗性個体割合(圃場調査によるサンプリング)

②遺伝子診断で抵抗性発生のモニタリングを行うために、効率が良いアブラムシ類の採集方法を検討した。黄色水盤と黄色粘着板を比べると、3月～7月は黄色水盤、9月、10月では黄色粘着板による捕獲虫数が多かった。また、黄色水盤とおとり作物のオクラを比べると、すべての月で黄色水盤による捕獲虫数が多かった。これらの結果と集団単位での遺伝子診断の容易さから黄色水盤トラップを選定し、ワタアブラムシ有翅虫採集法手順を作成した。

③ピーマン栽培ハウスにおいて施設密閉高温処理を実施した。7月中旬にビニルハウスを30分間密閉したところ、地上高150cmの最高気温は47.5℃に達した。ワタアブラムシはネオニコチノイド剤抵抗性系統、同剤感受性系統ともに高い防除効果が認められ、処理15日後まで発生が抑えられた(図8)。

同日に38分間密閉し最高温度50.0℃に達した隣接ハウスではピーマンの葉、果実に日

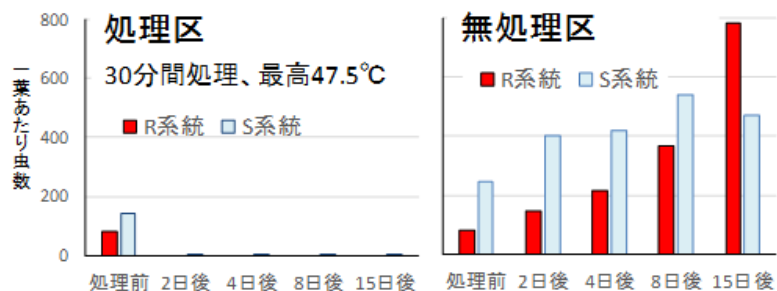


図8 ピーマンの施設密閉高温処理によるワタアブラムシの防除効果
(処理日：2017年7月20日)

焼けが認められたが、30分間密閉し最高47.5℃の処理区では、葉、果実に日焼けが認められなかった。

また、8月上旬にビニルハウスを30分間密閉したところ、最高気温は45.5℃に達した。天敵類は処理直後は少なくなるが、処理11日後にスワルスキーカブリダニが処理前比67%、ヒメハナカメムシ類が処理前比79%に回復した。このことから、IPMへの展開が期待される。

④ワタアブラムシ有翅虫に対する各種防虫ネットによる侵入防止効果の比較を1m立方体ネットを用いてスイカ産地で行った。ワタアブラムシ有翅虫が通り抜けることがほぼ可能な1mm目合い防虫ネットでも侵入阻止率は平均92.6%で、0.8mm目合い以下の防虫ネットでは侵入阻止率が平均96%以上であった。0.8mm目合い赤色防虫ネットの侵入阻止率は99.2%で、同じ目合いの透明ネットの96.4%より高かった。さらに細かな目合いおよび色違いネットの侵入阻止効果を簡易に比較するためアクリル平板による方法を検討した。結果、ワタアブラムシを増殖させたハウス内での比較は可能であったが、現地ほ場では比較が困難であった。

4) 成果活用における留意点

特になし

5) 今後の課題

ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性系統の実態把握を引き続き実施していく必要がある。また、発生実態調査結果をもとに生物的防除資材等の代替防除法の活用を促し、抵抗性発達を遅延させる管理技術の構築を関係機関と協力して行っていく必要がある。

<引用文献>

Hirata K, R. Kiyota, A. Matsuura, S. Toda, A. Yamamoto, T. Iwasa (2015) A R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit of *Aphis gossypii* and the differential resistance to acetamiprid and imidacloprid. *J. Pestic. Sci.* 40: 25–31.

Hirata K, A. Joraku, S. Kuwzaki, H. Shimomura, T. Iwasa (2017) Studies on *Aphis gossypii* cytochrome P450s CYP6CY22 and CYP6CY13 using an in vitro system. *J. Pestic. Sci.* 42(3): 97-104.

松浦明・日高春美 (2017) アブラムシ類の殺虫剤感受性検定のための簡易検定法. 九病虫研会報 62: 82-88, 2016.

Toda S., K. Hirata, A. Yamamoto and A. Matsuura (2017) Molecular diagnostics of the R81T mutation on the D-loop region of the $\beta 1$ subunit of nicotinic acetylcholine receptor gene conferring resistance to neonicotinoids in the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). *Appl. Entomol. Zool.* 52: 147–151.

中課題番号	14526424	中課題 研究期間	平成26～30年度
小課題番号	PRM04	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発		
小課題名	ネギアザミウマの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	農研機構野菜花き研究部門・野菜病害虫・機能解析研究領域・虫害ユニット・太田 泉		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

ネギアザミウマの薬剤抵抗性系統と感受性系統の網羅的な遺伝子配列セットを構築し、系統間の遺伝子変異・発現変動遺伝子情報等を取得して抵抗性原因遺伝子を解明する。ネギアザミウマのピレスロイド剤やネオニコチノイド剤等に対する簡易遺伝子診断技術の開発と生殖様式等に対応した薬剤抵抗性の簡易診断技術を開発する。これらの診断技術とネギアザミウマの薬剤抵抗性の発達に伴う薬剤抵抗性系統の適応度コストの変動を解明することによって、薬剤抵抗性の発達を遅延させるネギアザミウマの管理体系を示したガイドラインを策定する。

2) 研究方法

1. ネギアザミウマの薬剤抵抗性発達を遅延させる防除体系とガイドラインの策定

産雄単為生殖型ネギアザミウマのスピノシン・ジノテフラン両剤抵抗性系統（茨城県つくば市個体群）と感受性系統（高知県南国市個体群）を使用し、両系統の増殖能力を比較することで、薬剤抵抗性系統の適応度コストを明らかにする。ガイドラインは、ネギアザミウマのサンプリング方法、ピレスロイド剤抵抗性遺伝子診断法、生物検定法を解説し、これらを利用して薬剤抵抗性発達のリスクレベルを判定する内容とする。

2. 微小害虫の網羅的遺伝子配列セットの整備と遺伝子診断技術開発

ネギアザミウマについて、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析を行って網羅的遺伝子配列セットを整備し、これを用いて薬剤抵抗性の原因遺伝子解明のための遺伝子変異解析、発現変動遺伝子解析等を行う。同定した抵抗性原因遺伝子を対象に、ピレスロイド剤抵抗性等に対するPCRベースの簡易遺伝子診断技術を開発する。

3. ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性診断技術の開発と薬剤使用判断基準の策定

タマネギ、ナガネギほ場において、平成26年度に提案したピレスロイド剤に依存しない薬剤防除体系による防除効果を確認する。ナガネギでは、防除薬剤による寄生密度と被害許容水準の比較、収穫時の商品化率により、使用薬剤の有効性を検証する。これら試験においてピレスロイド剤、ネオニコチノイド剤散布後に生存していたネギアザミウマ成虫を採取し、遺伝子検定を実施すると共に、葉片浸漬法による感受性検定を行う。

4. 茨城県におけるネギアザミウマの薬剤抵抗性の実態解明と薬剤抵抗性管理技術の有効性調査

茨城県内のネギ圃場からネギアザミウマを採集し、PCR法により生殖型やピレスロイド剤抵抗性個体の割合、生物検定法によりピレスロイド剤を含む薬剤感受性を調査し、薬剤発達状況を明らかにする。また、ピレスロイド剤抵抗性が発達した状況を想定し、ピレスロイド剤以外の有効薬剤を用いた防除体系によるネギアザミウマの防除効果を調査する。

5. 大阪府におけるネギアザミウマの薬剤抵抗性の実態解明と薬剤感受性検定マニュアル策定

ネギアザミウマ成虫、幼虫の薬剤感受性を調査するための生物検定法を開発する。大阪府内のネギ、タマネギ圃場からネギアザミウマを採集して、生物検定法によりシペルメトリン乳剤、ジノテフラン水溶剤、スピノサド水和剤の薬剤感受性を調査して、薬剤抵抗性系統の発生実態を明らかにする。露地ネギ栽培圃場で、赤色防虫ネット区、微生物農薬区および無処理区を設置して、各防除手法によるネギアザミウマの抑制効果を明らかにする。

3) 研究結果

1. ネギアザミウマの薬剤抵抗性発達を遅延させる防除体系とガイドラインの策定

次世代雌雄成虫数および雌率は、スピノシン・ジノテフラン両剤抵抗性系統と両剤感受性系統の間で有意差が認められず、適応度コストは検出されなかった（データ省略）。ガイドラインについては、ネギアザミウマのサンプリング方法、ピレスロイド剤抵抗性遺伝子診断法、生物検定法、及び薬剤抵抗性発達のリスクレベルの判定基準を作成し、各リスクレベルに応じた管理指針を提示した。

2. 微小害虫の網羅的遺伝子配列セットの整備と遺伝子診断技術開発

ネギアザミウマについて各薬剤抵抗性系統および感受性系統のRNA-seq解析を行い、それぞれ網羅的遺伝子配列セットの構築および抵抗性原因遺伝子の探索を行った。その結果、ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性の主要因がナトリウムチャンネル遺伝子上のアミノ酸変異であることを明らかにし、T929IおよびK1774Nのアミノ酸変異ペアおよびM918Lのアミノ酸変異の2種の抵抗性関連変異を同定した。これらのうち、T929IおよびK1774Nの変異ペアが野外における抵抗性個体のほとんどで確認され、日本におけるピレスロイド剤抵抗性の主要因であることがわかった。一方、M918L変異は産雌単為生殖型の一部の個体でのみ確認された。T929IおよびK1774N変異ペアを対象としたピレスロイド剤抵抗性の簡易遺伝子診断法を開発した（図1）。T929IおよびK1774N変異について、抵抗性遺伝子頻度と補正死虫率（シペルメトリン2000倍処理後）の間には高い負の相関（スピアマンの順位相関係数 $\rho = -0.828$ ($p < 0.01$)) が確認され、遺伝子診断法の有効性が確認された（図2）。

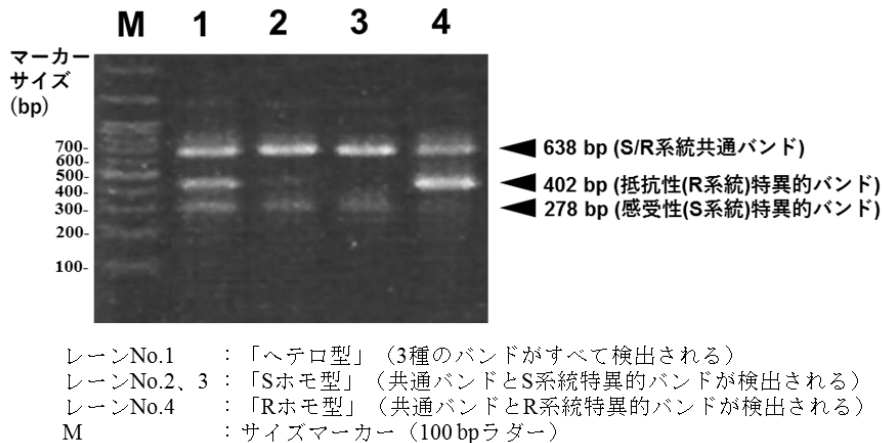


図1 ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性の簡易遺伝子診断法

マルチプレックスPCR法によりT929I変異について、感受性 (S) 型および抵抗性 (R) 型の有無を検出し遺伝子型を判定する。判定結果から各個体群の抵抗性遺伝子頻度を算出することで抵抗性レベルを推定できる。K1774N変異についても同様の診断法を開発しているが、これらの変異はペアで存在しているため、基本的にT929I変異の遺伝子型を判定すればよい。

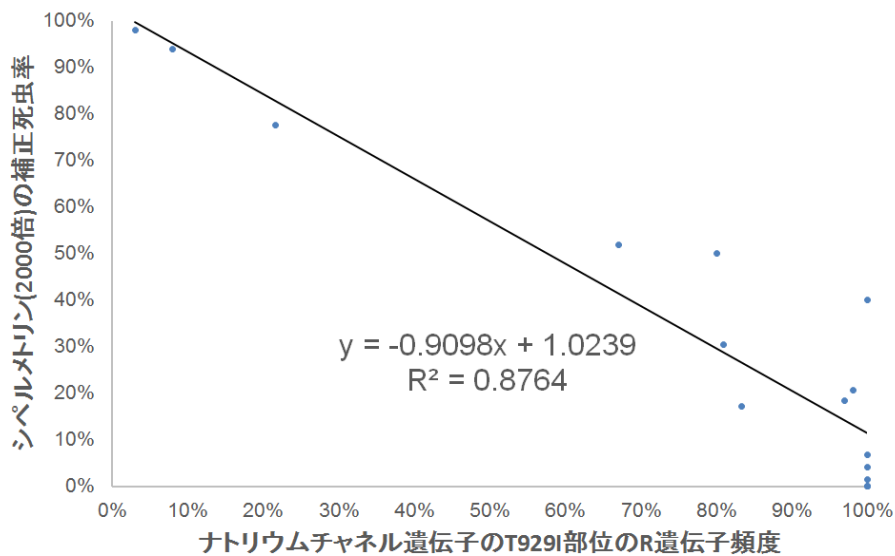


図2 ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性遺伝子頻度と補正死虫率の関係

茨城県と大阪府で採集した17集団 (合計712個体) について、シペルメトリン (2000倍処理後) の補正死虫率とT929I変異部位の抵抗性 (R) 遺伝子頻度との間に高い負の相関が確認された。K1774N変異部位についても、ほぼ同等の結果が確認された (データ省略)。

ネギアザミウマの有力なネオニコチノイド剤抵抗性原因候補遺伝子としてチトクロームP450 (CYP) の1種であるCYP6K1-like遺伝子を同定した。同遺伝子は、抵抗性系統で有意に発現上昇し、薬剤代謝試験の結果、ジノテフラン等のネオニコチノイド剤に対して高い代謝活性を示すことが確認され、抵抗性に関与する可能性が高いことがわかった (図3)。一方で、同遺伝子上および同遺伝子の上流領域には抵抗性関連変異が存在しないことが確認された。

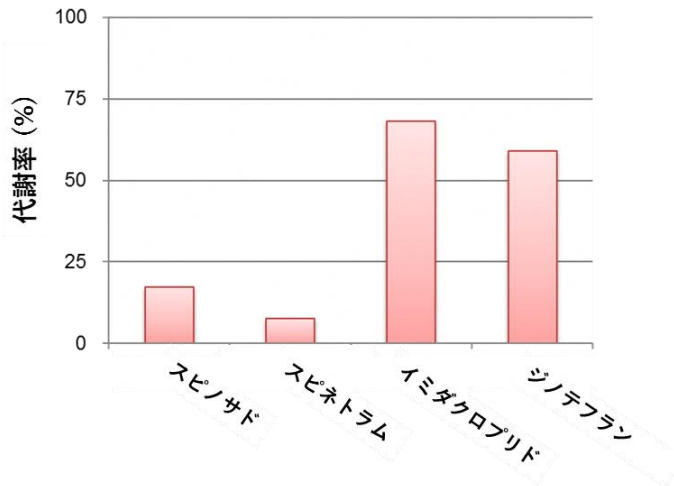


図3 ネギアザミウマのCYP6K1-like遺伝子の薬剤代謝試験結果

CYP6K1-likeによるネオニコチノイド剤（イミダクロプリドおよびジノテフラン）の高い代謝活性が確認された。同遺伝子はスピノシン系についても若干の代謝活性が確認された。

更に、ネギアザミウマのスピノシン剤抵抗性原因遺伝子としてニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 6$ サブユニット遺伝子を同定し、同遺伝子上に抵抗性関連アミノ酸変異であるG275E変異を同定した。G275E変異部位を対象としたスピノシン剤抵抗性の簡易遺伝子診断法を開発した（図4）。G275E変異について、抵抗性遺伝子頻度と補正死虫率（スピネトラム5000倍処理後）の間に高い負の相関（スピアマンの順位相関係数 $\rho = -0.788$ ($p < 0.01$)) が確認され、遺伝子診断法の有効性が確認された（図5）。

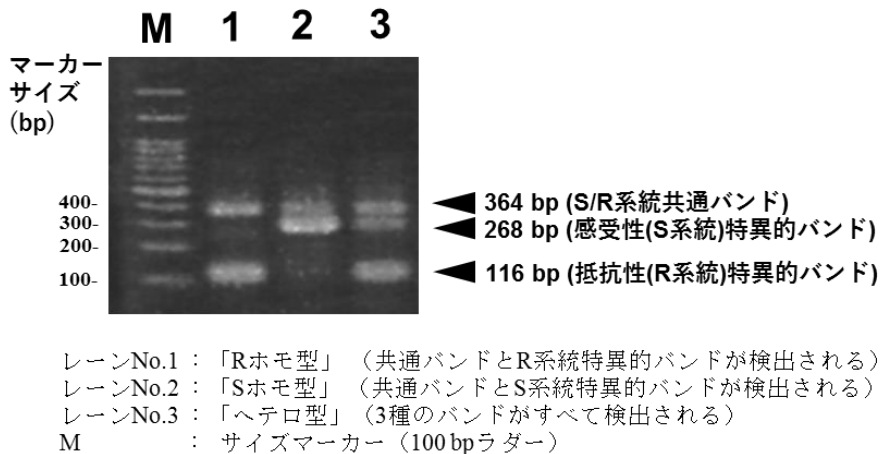


図4 ネギアザミウマのスピノシン剤抵抗性の簡易遺伝子診断法

マルチプレックスPCR法によりG275E変異について、感受性 (S) 型および抵抗性 (R) 型の有無を検出し遺伝子型を判定する。

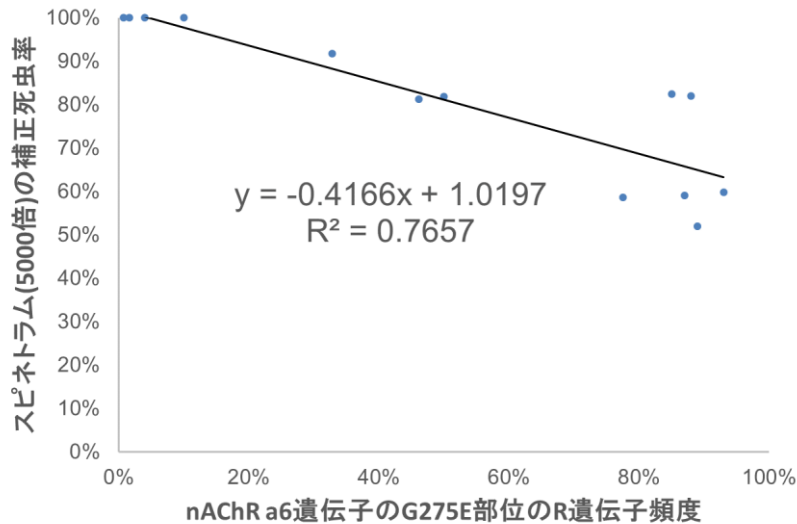


図5 ネギアザミウマのスピノシン剤抵抗性遺伝子頻度と補正死虫率の関係

茨城県で採集した13集団(合計452個体)について、スピネトラム(5000倍処理後)の補正死虫率とG275E変異部位の抵抗性(R)遺伝子頻度との間に高い負の相関が確認された。

3. ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性診断技術の開発と薬剤使用判断基準の策定

平成27年と28年に実施したネギ、タマネギ圃場における防除試験で、ピレスロイド剤のシペルメトリンは、いずれの作物においても平成10年と比較して防除効果の著しい低下が確認された。供試した他系統薬剤の中で、プロチオホス乳剤、スピネトラム水和剤(2,500倍)、シアントラニリプロール水和剤、トルフェンピラド乳剤、アセタミプリド液剤、フロメトキン水和剤は、ネギアザミウマの密度抑制効果が高かった(図6)。ネギの収穫前30日間の7日間隔複数回散布処理において、これら薬剤は概ね90%以上の高い商品化率を得ることができた。一方、ニテンピラム水溶剤、アバメクチン乳剤、ピリダリル水和剤、ジノテフラン水溶剤、チオシクラム水和剤は一定の防除効果を得られたが、その程度はやや低く、7日間隔散布で高い商品化率を得ることはできなかった。

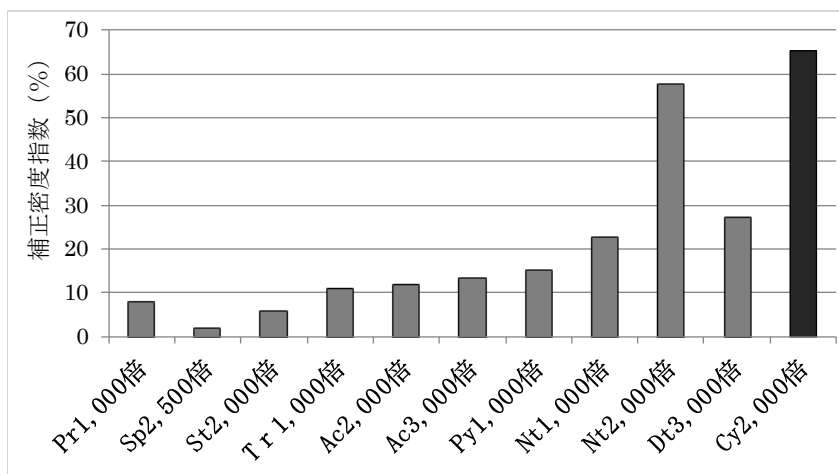


図6 ネギにおける2回目散布7日後の補正密度指数(平成28年)

Pr:プロチオホス(45%)乳剤、Sp:スピネトラム(11.7%)水和剤、St:シアントラニリプロール(10.3%)水和剤、Tr:トルフェンピラド(15%)乳剤、Ac:アセタミプリド(18%)液剤、Py:ピリダリル(10%)水和剤、Nt:ニテンピラム(10%)水溶剤、Dt:ジノテフラン(20%)水溶剤、Cy:シペルメトリン(6%)乳剤

2016年にシペルメトリン散布区タマネギから採取した全生存個体が、ピレスロイド剤抵抗性に関わる変異を保持していた。確認された変異は、産雌型個体は国内未報告のM918L変異、産雄型個体はT929I & K1774N変異であった。

4. 茨城県におけるネギアザミウマの薬剤抵抗性の実態解明と薬剤抵抗性管理技術の有効性調査

(1) 茨城県におけるネギアザミウマの薬剤抵抗性発達状況

茨城県内のネギ栽培10圃場からネギアザミウマ雌成虫を採集し、生殖型およびピレスロイド剤抵抗性個体の割合を調べた。また、表1に示した薬剤および希釈倍数を用いて薬剤感受性検定を実施した。その結果、生殖型については常陸太田市の1圃場で産雄単為生殖型（以下産雄型）の割合は21%であったが、他の全ての圃場では93~100%と高く、産雄型が優占する圃場が多かった。産雄型が優占する9圃場では、ピレスロイド剤であるシペルメトリンに対する補正死虫率が1~40%であり、防除効果が低かった。9圃場のうち、シペルメトリンの効果が低かった6圃場の個体群についてピレスロイド剤抵抗性遺伝子の有無について調べた結果、全ての個体がピレスロイド剤抵抗性遺伝子を有していた（表1）。以上より本県のネギ栽培圃場では、ピレスロイド剤抵抗性遺伝子を有する産雄型の個体群が多量の圃場で優占していることが明らかになった。

表1 茨城県内のネギから採集したネギアザミウマ雌成虫の各種薬剤に対する補正死虫率、産雄単為生殖型およびピレスロイド系剤抵抗性個体割合

供試薬剤 ¹⁾	作用機構 (IRAC コード)	希釈 倍数 (倍)	補正死虫率(%) ²⁾									
			常陸太 田市 (2015) ³⁾	つくば市 A (2017)	つくば市 B (2017)	結城市A (2017)	結城市B (2017)	八千代町 (2016)	坂東市A (2016)	坂東市B (2017)	境町A (2017)	境町B (2017)
シペルメトリン	3A	2,000	78	2	40	15	4	7	2	5	1	10
アセタミプリド	4A	2,000	100	68	90	90	93	39	76	80	92	79
イミダクロプリド	4A	5,000	100	76	100	97	99	90	82	89	88	62
ジノテフラン	4A	2,000	100	51	87	90	77	53	41	77	80	65
クロチアニジン	4A	2,000	— ⁴⁾	54	89	63	75	60	49	30	90	67
チアメトキサム	4A	1,000	—	92	98	95	88	81	74	67	90	60
スピネトラム	5	2,500	—	97	90	94	90	—	—	92	80	93
		5,000	100	52	84	87	57	60	59	78	80	82
スピノサド	5	5,000	—	73	77	71	28	44	—	55	61	25
アバメクチン	6	500	—	92	87	80	73	83	84	—	92	98
チオシクラム	14	1,500	—	—	—	94	100	95	96	100	58	73
シアントラニプロール	28	2,000	—	—	—	96	71	91	82	100	79	29
対照(生存虫率)			(81.2)	(96)	(90)	(91)	(91)	(86)	(87)	(91)	(90)	(98)
産雄単為生殖型割合(%) ⁵⁾			21	100	100	93	100	100	100	100	100	100
合成ピレスロイド系剤抵抗性個体割合(%) ⁶⁾			—	—	100	100	100	—	—	100	100	100

1) 剤型は省略、2) 補正死虫率= (無処理の生存率-処理の生存率)/無処理の生存率×100

3) 採集年、4) 未実施、5) 産雄単為生殖型割合(%)=産雄単為生殖型判定個体数/診断個体数×100

6) ピレスロイド剤抵抗性個体割合(%)=ピレスロイド剤抵抗性遺伝子保持個体数/診断個体数×100

※色塗りのセルは補正死虫率70%未満の薬剤を示す。

ピレスロイド剤抵抗性が発達した状況を想定し、薬剤抵抗性管理技術の一つとしてピレスロイド剤以外の薬剤を用いたネギアザミウマの防除体系を検証した。所内圃場で、(1)により選抜した効果のある薬剤を組み合わせ、表2に示した体系で防除を実施した(薬剤選抜区)。定期的にネギアザミウマの個体数およびネギへの食害程度の調査を行った結果、ピレスロイド剤区では、7/24および8/13のシペルメトリン散布後の調査でネギアザミウマの個体数が増加し、ピレスロイド剤であるシペルメトリン乳剤の効果が低いと考えられた(図

7)。薬剤選抜区では、7/12以降の体系処理により9/3の収穫まで個体数は低く推移した。収穫時の被害程度はピレスロイド剤使用区1.8、薬剤選抜区0.2となり、薬剤選抜区で被害が抑えられた(図8)。なお、両区とも7/12の薬剤散布後から収穫期までピレスロイド剤抵抗性個体の割合は79~100%で推移した(データ省略)。

以上より、ピレスロイド剤抵抗性が発達した状態でピレスロイド剤を使用しなくとも、有効薬剤を活用した体系防除によりネギアザミウマの防除が可能であると考えられた。

表2 所内ネギ圃場における各区の薬剤散布履歴

試験区 ¹⁾	7/12	7/24	8/7	8/13	8/20	8/27
ピレスロイド剤使用区	チアメキサム [4A] ²⁾	シベルメリン [3A]	イミダクロプリド [4A]	シベルメリン [3A]	アバメクチン [6]	シベルメリン [3A]
薬剤選抜区	チアメキサム [4A]	シアントラニリブロール [28]	イミダクロプリド [4A]	チオシクラム [14]	アバメクチン [6]	スピネトラム [5]

1) 両区とも4月14日に定植し、9月3日に収穫した。

2) [] 内の英数字はIRACコードを示す。

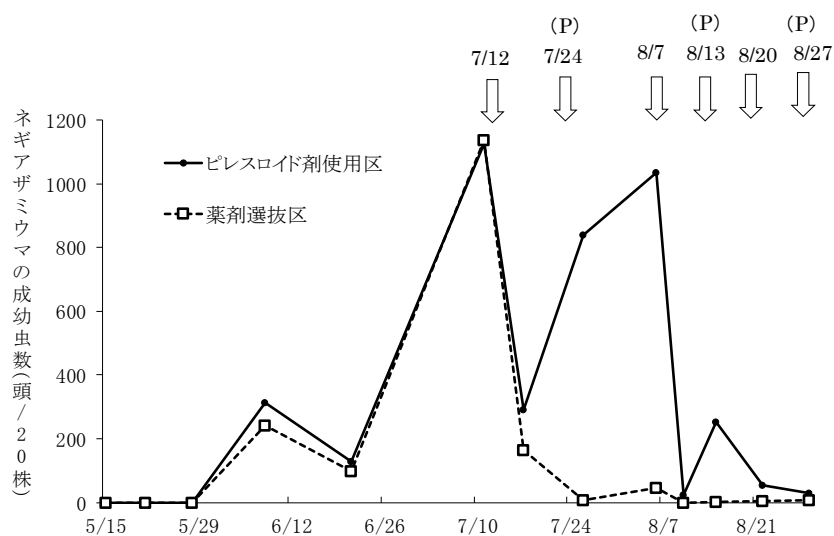


図7 異なる薬剤防除体系がネギアザミウマの個体数推移に及ぼす影響

注：矢印は薬剤散布日を示す。(P)：ピレスロイド剤使用区におけるピレスロイド剤の散布日を示す。7/16に36.5mm、8/8-9に合計48mmの降雨があったため、無防除区(データ省略)でもネギアザミウマの個体数が減少した。

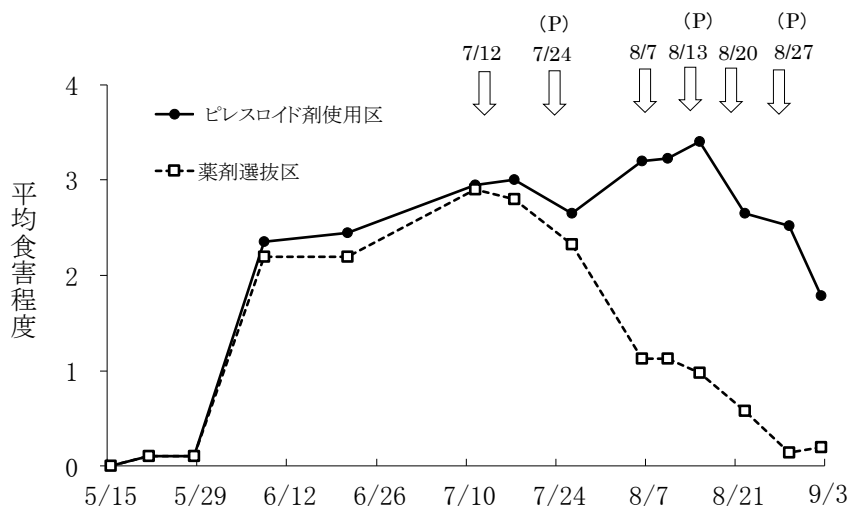


図8 異なる薬剤防除体系がネギアザミウマのネギへの食害程度に及ぼす影響

注：矢印は薬剤散布日を示す。(P)：ピレスロイド剤使用区におけるピレスロイド剤の散布日を示す。食害程度は以下の基準にて評価し、平均値を算出した。(n=20)。
 0：全葉面積に食害なし、1：全葉面積の1～10%の食害、2：全葉面積の11～20%の食害、3：全葉面積の21～30%の食害、4：全葉面積の31%以上の食害

5. 大阪府におけるネギアザミウマの薬剤抵抗性の実態解明と薬剤感受性検定マニュアル策定

(1) 薬剤感受性検定における生物検定法の標準化および簡易化

ネギアザミウマ成虫には、透明の円筒型スチロール棒瓶を検定容器とし、薬液に浸漬させてから風乾したインゲンマメ葉片と成虫を検定容器に入れて、薄膜フィルムで覆って密封し、48時間後の生死虫を計数する葉片浸漬法を標準法とした。幼虫には、透明のプラスチックシャーレを検定容器とし、インゲンマメ葉片に1齢幼虫を接種した後に薬液をエアスプレーで噴霧する虫体・葉片散布法、および、インゲンマメ葉片を薬液に浸漬して風乾した後に1齢幼虫を接種する葉片浸漬法を開発し、48時間後の生死虫を計数する手法を標準法とした。開発した生物検定手法は「薬剤感受性検定マニュアル」としてとりまとめた。

(2) 大阪府におけるネギアザミウマの薬剤感受性の実態解明

葉片浸漬法により成虫の薬剤感受性を調査した結果、調査年によりばらつきがあるものの、シペルメトリン乳剤およびジノテフラン水溶剤では補正死亡率が全般的に低く、感受性は低いことが明らかになった(表3)。また、スピノサド水和剤では2015年および2016年では各地域とも補正死亡率が高く、感受性は高かったが、泉佐野タマネギ個体群では2017年が61.7%、2018年が26.2%となり、府内で初めて感受性の低下を確認した。

表3 各調査年の薬剤感受性検定結果

薬剤系統	供試薬剤	希釈倍率	死亡率(%) ※()内は補正死亡率											
			羽曳野<タマネギ>				泉佐野<タマネギ>				岸和田<タマネギ>			
			2015	2016	2017	2018	2015	2016	2017	2018	2015	2016	2017	2018
ピレスロイド	シベルメトリン乳剤	2000	10.9 (4.5)	83.3 (77.6)	40.9 (37.0)	93.0 (93.0)	20.4 (18.4)	—	48.8 (36.7)	3.7 (0)	32.7 (28.4)	—	15.9 (15.9)	19.3 (19.3)
ネオニコチノイド	ジノテフラン水溶剤	2000	56.8 (53.7)	92.4 (89.9)	76.2 (74.6)	96.0 (96.0)	44.0 (42.6)	—	44.6 (31.7)	41.5 (36.5)	75.8 (74.2)	—	37.1 (37.1)	38.2 (38.2)
スピノシン	スピノサド水和剤	2500	—	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	—	69.0 (61.7)	32.0 (26.2)	100 (100)	—	79.1 (79.1)	95.2 (95.2)
	無処理(水)		6.7	25.5	6.3	0	2.4	—	19.0	7.8	5.9	—	0	0

薬剤系統	供試薬剤	希釈倍率	死亡率(%) ※()内は補正死亡率											
			八尾<ネギ>				和泉<ネギ>				阪南<ネギ>			
			2015	2016	2017	2018	2015	2016	2017	2018	2015	2016	2017	2018
ピレスロイド	シベルメトリン乳剤	2000	1.8 (0)	33.3 (30.4)	34.8 (34.8)	—	4.2 (0)	—	—	—	26.9 (26.9)	—	—	—
ネオニコチノイド	ジノテフラン水溶剤	2000	32.7 (31.3)	46.3 (44.0)	66.7 (66.7)	—	17.4 (12.0)	—	—	—	17.4 (17.4)	—	—	—
スピノシン	スピノサド水和剤	2500	—	100 (100)	100 (100)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	無処理(水)		1.9	4.2	0	—	6.1	—	—	—	0	—	—	—

(3) 物理的防除資材および微生物農薬によるネギアザミウマの防除効果

赤色防虫ネット区および微生物農薬区におけるネギアザミウマ成虫の生息密度は無処理区の約4割に低減して推移した(図10左)。ピレスロイド剤抵抗性原因遺伝子のT929I変異および産雄型の割合は微生物農薬区および無処理区で同等であり、赤色防虫ネット区でやや低かった(図10右)。

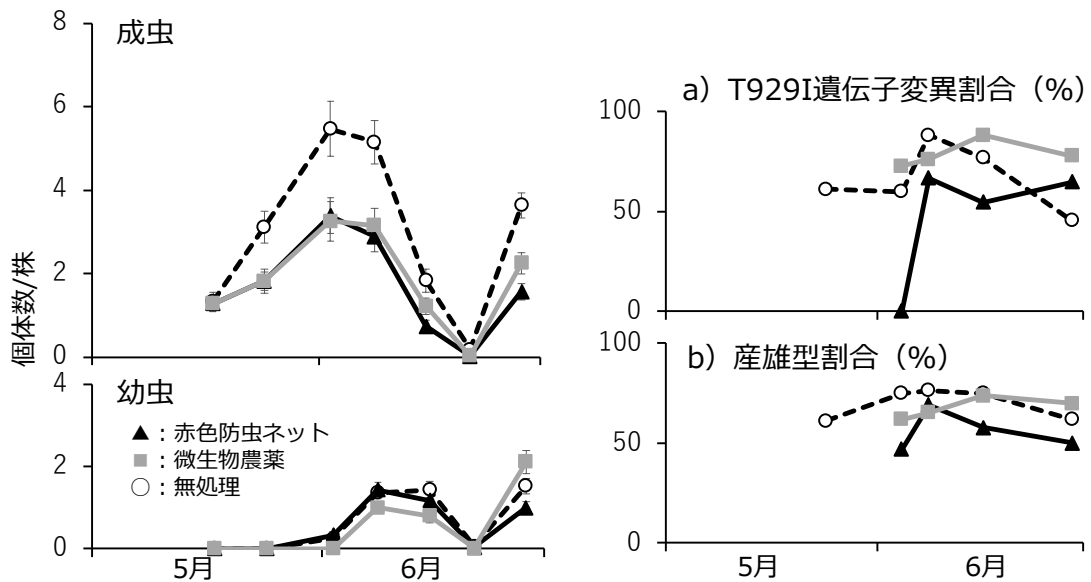


図10 赤色防虫ネットおよび微生物農薬によるネギアザミウマの密度抑制効果(左)と各区におけるネギアザミウマの遺伝子診断結果(右)

赤色防虫ネット区：サンサンネット® e-レッドSLR2700(目合い0.8mm)をトンネル被覆、微生物農薬区：ポーベリア・バシアーナ乳剤1000倍を約7日間隔で計4回散布、無処理区：無防除。各試験区を3反復設置。計60株のネギアザミウマ成虫幼虫数を調査した。また、調査期間中にネギアザミウマ成虫計24個体を採集し、ピレスロイド剤抵抗性原因遺伝子のT929I変異および生殖型を調査した。

4) 成果活用における留意点

1. ネギアザミウマの薬剤抵抗性発達を遅延させる防除体系とガイドラインの策定

本研究で供試したスピノシン・ジノテフラン両剤抵抗性系統および両剤感受性系統のネギアザミウマは元になる個体群が異なるため、これらが適応度の差に影響していた可能性も考慮する必要がある。ガイドラインについては、ネギアザミウマの薬剤抵抗性は地域によって異なる場合もあるので、その都度、薬剤抵抗性遺伝子診断や生物検定を実施してリスクレベル判定をし、地域にあった防除体系を構築する必要がある。

2. 微小害虫の網羅的遺伝子配列セットの整備と遺伝子診断技術開発

ネギアザミウマのスピノシン系抵抗性の要因として、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 6$ サブユニットのG275E変異以外に、P450遺伝子等が関与する可能性も考えられる。

4. 茨城県におけるネギアザミウマの薬剤抵抗性の実態解明と薬剤抵抗性管理技術の有効性調査

調査中にネギアザミウマの感受性の低下が認められる剤があった。有効薬剤を活用した防除体系を行う際には、実施地域の薬剤感受性を考慮する必要がある。

5) 今後の課題

1. ネギアザミウマの薬剤抵抗性発達を遅延させる防除体系とガイドラインの策定

適応度コストの解明については、同じ個体群由来の薬剤抵抗性系統と感受性系統間で増殖率等の違いを比較する必要がある。ガイドラインについては、ピレスロイド剤以外の薬剤についても抵抗性遺伝子診断法を開発中であり、これらが構築されれば、ガイドラインを改訂していく予定である。

2. 微小害虫の網羅的遺伝子配列セットの整備と遺伝子診断技術開発

遺伝子診断法が未整備の薬剤抵抗性について、診断用DNAマーカーおよび遺伝子診断法の開発を適宜進める。

5. 大阪府におけるネギアザミウマの薬剤抵抗性の実態解明と薬剤感受性検定マニュアル策定

病虫害防除所職員などに薬剤抵抗性の遺伝子診断法を伝達し、実践してもらう必要がある。

中課題番号	14526424	中課題 研究期間	平成26～30年度
小課題番号	PRM05	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発		
小課題名	ナミハダニの薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	京都大学大学院・農学研究科地域環境科学専攻・生態情報 開発学分野・刑部正博		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

現在、施設栽培イチゴではナミハダニの薬剤抵抗性発達が喫緊の課題であり、生産者によっては既に使用可能な農薬（殺ダニ剤）がほとんど無い場合も珍しくない。そこで本小課題ではイチゴのナミハダニを対象として、従来の薬剤検定法を標準化して産地における薬剤抵抗性の実態を調査すると共にゲノム情報を基に薬剤抵抗性原因遺伝子を解明する。さらに、広く利用できるよう殺ダニ剤の作用特性を考慮した簡易検定法および薬剤抵抗性遺伝子頻度を評価可能な遺伝子診断法を開発し、圃場における実態調査での評価ならびに経時的変化・分布調査への適用を通じて、薬剤抵抗性遺伝子のモニタリング手法を確立する。また、生物的防除法や物理的防除法がハダニ密度の抑制だけでなく抵抗性遺伝子頻度の変化にどのような影響を及ぼしているのかを評価する。これらのデータをもとに、薬剤抵抗性発達回避・延長戦略を構築し、イチゴのナミハダニにおける薬剤抵抗性管理技術を確立する。

2) 研究方法

① 薬剤抵抗性原因遺伝子解明

薬剤抵抗性原因遺伝子の解明に関しては、ミトコンドリア電子伝達系複合体IおよびII阻害剤であり、広く使用され、ナミハダニで薬剤抵抗性の発達が問題となっている殺ダニ剤ピリダベンおよびシフルメトフェンについて、ゲノム情報を利用した量的形質遺伝子座（QTL）解析の方法を考案して原因遺伝子を分析した。また、QTL解析を効率化するためにマイクロサテライトを遺伝マーカーとした染色体地図を構築した。

② 薬剤抵抗性遺伝子診断法の開発

先ず作用点（キチン合成酵素CHS1）のアミノ酸置換（I1017F）による抵抗性発現が知られているナミハダニのエトキサゾール抵抗性をモデルとして、制限酵素とリアルタイムPCRを用いた量的PCR（qPCR）により複数個体から抽出したDNAサンプルにおける抵抗性遺伝子頻度推定法を考案し、検証した。PRM07（農環研）と共同で初期頻度の違いと気門封鎖剤散布がエトキサゾール抵抗性遺伝子頻度の推移に及ぼす影響を調査するための圃場試験を静岡農林技研と奈良農研開セで実施し、遺伝子診断手法を用いて調査した。この圃場試験の結果は「研究結果」の⑥と⑦において紹介する。

しかし、この手法を産地における抵抗性実態調査（④）において、効果が確認されたビフェナゼートに適用を図った際に、適用可能な制限酵素の能力上の制約から低頻度の変異が検出できないことが判明した。このため、抵抗性の変異を特異的に検出するプライマーを用いたqPCRにより抵抗性遺伝子頻度を推定する方法を新たに考案し、検出精度を検証した。この新しい手法がエトキサゾール抵抗性にも適用できることを確認し、さらにピリダベン抵抗性など他の薬剤に対する抵抗性遺伝子頻度の推定への適用拡大を図っている。

③ ハダニ類の薬剤感受性検定法の標準化と簡易検定法の確立

ハダニ類では薬剤抵抗性が既に発達した薬剤が多岐に渡っているため、遺伝子診断法が未開発の薬剤に対しては生物検定法により対応する必要がある。そこで、イチゴで使用される殺ダニ剤を用いて、インゲンマメ葉片へのハダニ接種後に薬液を散布する方法（虫体散布法）と薬液に浸漬したインゲンマメ葉片にハダニを接種する方法（葉片浸漬法）を用いて効果を比較し、標準検定法を確立した。

また、小筆を用いない簡易検定法を考案し、これらのマニュアルを作成した。

④ 産地における抵抗性実態の解明

静岡県と奈良県のイチゴ生産者圃場から毎年ナミハダニをサンプリングし、③で標準化した生物検定法を用いて各種殺ダニ剤に対する感受性検定を行った。調査は主に2014～2015年に行い、静岡県（11および9個体群）と奈良県（22および17個体群）について雌成虫（静岡：7および8剤，奈良：6および4剤）と卵（静岡：8および9剤）の常用濃度での死亡率を調査した。

⑤ 薬剤抵抗性個体群の時間・空間的分布の解明

2015および2016年の2作について、静岡県内のイチゴ主要産地の生産者3圃場において、育苗圃とそこからの苗を定植した本圃について、ナミハダニ雌成虫の主要殺ダニ剤4剤（エマメクチン安息香酸塩、アセキノシル、シエノピラフェン、ビフェナゼート）に対する感受性の推移と散布履歴との関連を調査した。

⑥ 物理的防除法等を組合せたIPM体系の確立と薬剤抵抗性遺伝子頻度低下の効果検証

高設栽培のイチゴ圃場において紫外線照射のナミハダニに対する防除効果を確認するとともに、紫外線照射が薬剤抵抗性遺伝子頻度に影響しないことを検証した。また、定植苗への蒸熱処理と定植後の紫外線照射を基幹としたIPM体系の有効性を実証するため、慣行防除（農薬とカブリダニの組合せ体系）との比較試験を、研究所内高設栽培圃場において2018年10月上旬に定植して実施中であり、ハダニとその他病害虫の発生状況について2019年5月まで調査予定である。このほか、既存殺ダニ剤または殺虫剤と気門封鎖剤の混用による防除効果を圃場試験で確認した。

⑦ 生物的防除等を組み合わせたIPM体系の確立と薬剤抵抗性遺伝子頻度低下の効果検証

天敵製剤を導入した生物的防除を行っている生産圃場と殺ダニ剤を中心とした慣行防除を行っている圃場から、育苗期～定植直後と収穫終期に採集した個体群に対する各種殺ダニ剤感受性を生物検定で調査し、感受性を比較した。

また、生物的防除（天敵製剤）、化学的防除（ビフェナゼート）および物理的防除（気門封鎖剤）がビフェナゼートの感受性に及ぼす影響を調査するため、ビフェナゼート抵抗性個体群と感受性個体群を1：10で混合して飼育した個体群（ $LC_{50} < 6.25$ ppm）を試験圃場に放飼し、ビフェナゼート散布、気門封鎖剤散布、チリカブリダニ放飼の3試験区を設定して感受性および遺伝子頻度の変化を調査した。

さらに、カブリダニ製剤利用マニュアルを策定してホームページ上に公開し、利用者の

意見を踏まえて改訂を行っている。

3) 研究結果

① 薬剤抵抗性原因遺伝子解明

ナミハダニのピリダベン抵抗性について、マイクロサテライト (SSR) を用いたQTL解析を行った。その結果、本剤の作用点であるミトコンドリア電子伝達系複合体Iのサブユニットであり、ゲノムのscaffold 7上に存在するPSSTにおけるアミノ酸変異H110Rが抵抗性に関与していることが明らかになった (図1, Bajda et al. 2017)。

一方、ピリダベン抵抗性はチトクロムP450 (CYP) 阻害剤処理により著しい感受性回復が認められる (Sugimoto and Osakabe 2014)。RNAシーケンス (RNA-seq) による網羅的発現解析から抵抗性系統で発現上昇が見られた15遺伝子のCYPについてqPCR、抵抗性レベルおよびPSST変異の相関を調べた結果、QTL領域に含まれているSSR、tu07ms_g7とtu07ms_g4の間にあるCYP392A3 (図1) がピリダベンの解毒酵素として有力な候補であり、またPSSTの変異とCYP392A3の高発現の両方の要因によって高度抵抗性が発現することが示された。

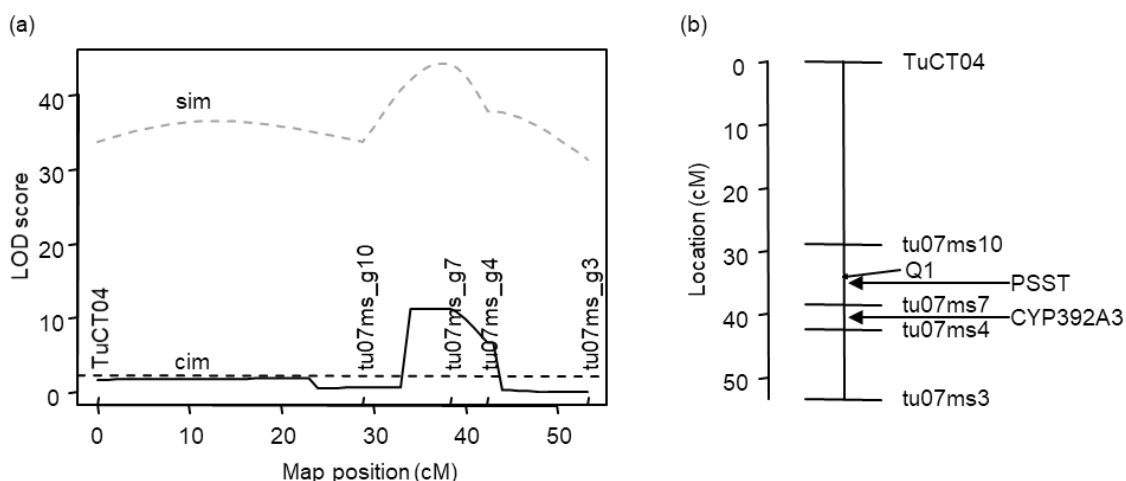


図1 ナミハダニscaffold 7上におけるピリダベン抵抗性遺伝子のQTL解析. (a)実線: composite interval mapping (cim), 破線: simple interval mapping (sim), 点線の水平線: cimにおける $\alpha = 0.05$. (b) 遺伝地図. Q1: QTL位置.

シフルメトフェン抵抗性では、RNA-seqにより発現変動が認められたCYP (5遺伝子)、グルタチオンS-転移酵素 (GST, 2遺伝子)、カルボキシエステラーゼ (CCE, 7遺伝子) およびグルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT, 4遺伝子) について、qPCRによる発現解析を行った。その結果、CYP 4遺伝子およびGST 2遺伝子で発現上昇が認められた。TuCCE04とTuCCE09で発現低下が認められた。シフルメトフェンはCCEにより活性化されるため、これらの発現低下についても今後の検討が必要である。しかし、阻害剤処理によってこれらの酵素活性を抑制しても抵抗性レベルの顕著な低下が見られないことから、解毒酵素の抵抗性への関与は小さいものと推測された。

そこで、抵抗性系統と感受性系統の戻し交雑によるB1処女雌のSSR遺伝子型とそれらが産んだ雄卵の死亡率を用いてシフルメトフェン抵抗性のQTL解析を行った。その結果、染色体地図上のマイクロサテライトtu01ms743付近にQTL領域が検出された。また、作用点がシフルメトフェンと同じミトコンドリア電子伝達系複合体IIであるピフルブミドについても同様にQTL解析を行った結果、同じ領域でQTLが検出された。このことから、この領域にこの系統の薬剤に共通する抵抗性因子があるものと推定された。ゲノムデータを調べた結果、この領域にコハク酸デヒドロゲナ

ーゼ(ミトコンドリア電子伝達系複合体II)のサブユニットBの遺伝子(*sdhB*)が存在することが分かった。また*sdhB*ではRNA-seqにより高度抵抗性系統においてのみI260Tの変異が検出された(変異率:約70%)。SDHI剤(殺菌剤)耐性においても*sdhB*の変異が重要である(石井2012)ことから、*sdhB*の変異がシフルメトフェン抵抗性の有力な原因遺伝子候補と考えられる。

② 薬剤抵抗性遺伝子診断法の開発

50個体程度のナミハダニから抽出・精製したゲノムDNAについて、制限酵素(*TaqI*および*MluC*)処理とリアルタイムPCRにより、*CHS1*におけるエトキサゾール抵抗性変異(I1017F)頻度を推定する方法(RED- $\Delta\Delta C_t$)を確立した。*CHS1*用PCRプライマーの増幅効率(設計したレファレンス用の*GAPDH*プライマーとほぼ一致した)。エトキサゾール抵抗性系統および感受性系統のDNAを適宜混合した頻度推定では、抵抗性系統のDNAの混合割合(抵抗性遺伝子頻度)との間に高い相関と直線性が得られ、少なくとも0.5%程度まで正確に推定可能と考えられた(図2a, Osakabe et al. 2017)。

さらに、制限酵素処理をしないサンプルをキャリブレーションとして抵抗性レベルが不明な系統の処女雌が産んだ雄卵に薬剤処理した際のふ化率と抵抗性遺伝子頻度の推定値の関係を調べた結果、極めて高い相関が得られた(図2b)。

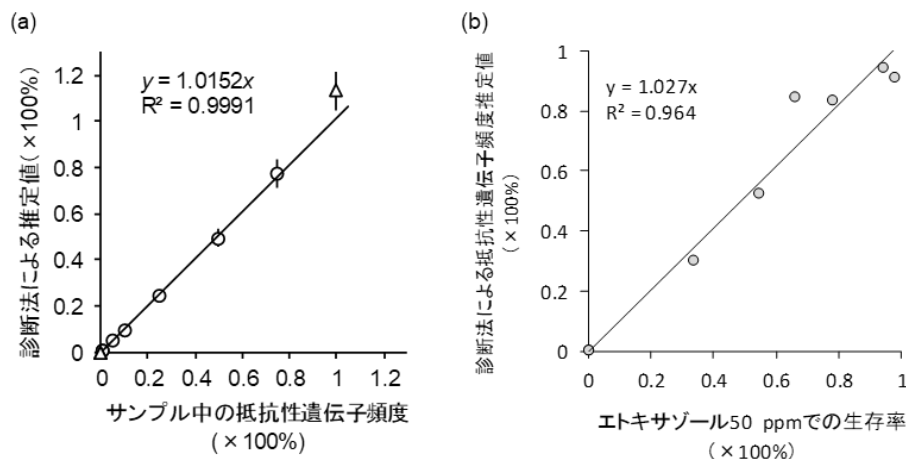


図2 抵抗性と感受性のDNAを混合し、制限酵素処理したサンプルにおけるリアルタイムPCRによる増幅(a)および抵抗性レベルが不明な系統の処女雌(31~42雌)が産んだ雄卵の生存率と診断法による雌親での抵抗性遺伝子頻度推定値

奈良県で選抜されたビフェナゼート抵抗性系統(NBR; $LC_{50} = 463.2$ ppm)においてチトクロムbのシーケンスを解析した結果、ビフェナゼート抵抗性に関与する5つのアミノ酸置換(G126S, I136T, S141F, P262T)の内、G126Sが奈良県のビフェナゼート選抜系統ならびに奈良県の薬剤感受性系統において固定していた。一方、静岡県の複合抵抗性系統および茨城県の薬剤感受性系統では変異は見られずG126に固定していた。G126SはI136TもしくはS141Fとの組合せにより、またP262Tは単独で抵抗性を発揮する。しかし、G126S以外のアミノ酸置換は認められなかった。検出されたチトクロムbにおける抵抗性関連変異(G126S)の診断のため、チトクロムb遺伝子内に抵抗性変異特異的プライマーとリファレンス用プライマーを設計し、 $\Delta\Delta C_t$ 法により抵抗性変異率($2^{-\Delta\Delta C_q}$)を推定したところ、サンプル中の抵抗性遺伝子頻度との間に高い相関とが得られ、有効性が示された。

③ ハダニ類の薬剤感受性検定法の標準化と簡易検定法の確立

薬剤感受性系統を用いた場合には、葉片浸漬法と虫体散布法との間で死亡率に大きな差

は見られなかった。しかし、葉片浸漬法では、特にエマメクチン安息香酸塩処理で、死亡するまでの時間が虫体散布法に比べて長くなった。生産者圃場の個体群では、24時間後の死亡率がエマメクチン安息香酸塩で虫体散布法において顕著に高くなり、ビフェナゼートおよびミルベメクチンでも差が認められた。

そこで、エアブラシとターンテーブルを用いた散布装置を考案して標準検定法を策定した（國本ら2017）。また、労力を掛けられない場合や散布装置がない場合を想定して、ハダニを自ら寄生葉から試験用のインゲンマメ葉に移動させた後、ハダニが移動した葉を薬液に浸漬することによって検定する簡易検定法が確立できた。

④ 産地における抵抗性実態の解明

2014～2015年の調査において静岡県ではビフェナゼートが高い補正死亡率を示し、アセキノシルとエマメクチン安息香酸塩でも一部でのみ感受性低下が確認されたが、他の薬剤（シエノピラフェン、シフルメトフェン、ピリダベン、クロルフェナピル）では全個体群で感受性が低かった。奈良県においても、シエノピラフェンとアセキノシルでは死亡率の高い圃場は少なかった。しかし、静岡県の場合とは異なり、ビフェナゼートでは死亡率が80%を超える圃場は半分以下であり、ミルベメクチンとエマメクチン安息香酸塩ではほぼ半分程度であった。ところが、2018年の奈良県の調査では調査した11圃場の全てでビフェナゼートによる死亡率が100%と感受性の回復が見られた。また、ミルベメクチンおよびエマメクチン安息香酸塩、アセキノシルについても感受性の高い圃場が多くなった。

奈良県ではエマメクチン安息香酸塩とビフェナゼートについて、室内選抜により抵抗性系統を作成した。このとき、エマメクチンに関しては薬剤による選抜を中止するとその後の世代において感受性が回復する現象を確認した。また、ビフェナゼートにおいても一定期間無選抜で累代飼育した後の感受性レベルが上昇していることを確認した。この結果は、これらの薬剤が今後も長く使用できる可能性を示唆しており、抵抗性遺伝子頻度の推移に関するモニタリングが望まれる。

ビフェナゼート抵抗性診断法を生産者圃場の個体群に適用したところ、静岡県の4圃場の個体群の死亡率は95～100%であったが、抵抗性変異（G126S）の頻度は0.5～95.7%と変動した。また、奈良県の5圃場（12サンプル）においても63～100%のバラツキが認められた。なお、静岡の4個体群についてLC₅₀値を求めたところ、いずれも生物検定濃度（200 ppm）以下であった。しかし、弱いながら個体群間で感受性に差異が認められ、G126Sの変異頻度が低い2個体群ではLC₅₀値が1 ppm以下であったのに対して、G126Sの変異頻度が高い2個体群では54および63 ppmに上昇していることが分かった。50～60 ppmのLC₅₀値はG126Sが単独で存在する海外の系統で検出されたLC₅₀値（43.3 ppm, Van Nieuwenhuyse et al. 2009）とほぼ同等と考えられる。このことから、診断法と薬剤感受性との間で整合性が確認され、遺伝子診断法の有効性が示された。

⑤ 薬剤抵抗性個体群の時間・空間的分布の解明

ナミハダニの殺ダニ剤感受性は本圃に比べて育苗圃で高い傾向が認められた。エマメクチン安息香酸塩（IRACコード6）、シエノピラフェン（同25A）およびピフルブミド・フェンピロキシメート（同25B・21A）は育苗圃と本圃の調査期間中に同剤または同一IRACコード剤が使用されたためと考えられたが、アセキノシル（同20B）とビフェナゼート（同20D）については、使用実績がほとんどなく散布履歴との関連は明確でなかった。

⑥ 物理的防除法等を組合せたIPM体系の確立と薬剤抵抗性遺伝子頻度低下の効果検証

高設栽培圃場において、紫外線（UV-B）照射と組合せる反射資材（タイベック）を栽

培ベッド両側下方に垂らした場合(たらし区)とベッド両側に逆八の字に設置した場合(角度区)について、ハダニに対する防除効果を比較した。その結果、ハダニの増殖が盛んになる4月以降は角度区において相対的に高い防除効果が得られることが分かった。

遺伝子診断法によるエトキサゾール抵抗性遺伝子頻度推定およびエマメクチン安息香酸塩に対する感受性検定(LC₅₀値)を紫外線照射区と薬剤散布区を比較することで紫外線照射が薬剤抵抗性発達に影響を及ぼすかを調査した。その結果、紫外線処理が抵抗性遺伝子頻度および薬剤感受性に大きな影響を及ぼさないことが確認された。また、気門封鎖型薬剤(ソルビタン脂肪酸エステル)についても同様の実験を行い、エトキサゾール抵抗性遺伝子頻度に大きな影響を及ぼさないことを確認した。

さらに、ピフルブミド・フェンピロキシメート水和剤またはスピノサド水和剤と脂肪酸グリセリド乳剤の混用による防除効果を圃場試験で評価した。その結果、防除効果の上昇と残効が確認された。

⑦ 生物的防除等を組み合わせたIPM体系の確立と薬剤抵抗性遺伝子頻度低下の効果検証

現地の慣行防除圃場では供試した6剤中ビフェナゼート以外の5剤で顕著な感受性低下が認められたが、生物的防除圃場では供試した5剤中3剤で感受性は変化せず、2剤では感受性が高くなったことから、化学的防除中心の慣行防除が殺ダニ剤感受性の低下をもたらし、生物的防除の導入によって感受性低下を抑止できることが、現地生産圃場レベルでも期待できることが示唆された。

圃場試験において防除法が抵抗性遺伝子頻度に及ぼす影響を調査した結果、エトキサゾールに関しては、当初低かった抵抗性遺伝子が生物的防除区や物理的防除区では低頻度のままに維持されたのに対して、エトキサゾールを用いた化学的防除区では抵抗性遺伝子頻度が顕著に上昇した。また、ビフェナゼートでは当初から高かった抵抗性変異頻度(100%)が、ほぼ1.5か月後に化学的防除区では81%、物理的防除区(気門封鎖剤)で66%であったのに対して生物的防除区では28%となり、生物的防除によって抵抗性発達が抑制される傾向が見られた。

4) 成果活用における留意点

本プロジェクトにおいて、抵抗性発達の著しいイチゴで長年に渡って抵抗性の発達が比較的抑制されている薬剤が明らかになったことは大きな成果である。特に、ビフェナゼートやエマメクチン安息香酸塩において圃場や実験室で感受性の回復の傾向が生じたこと、また物理的防除剤の混用により殺ダニ剤の効果が向上した事実は、今後のハダニ管理における重要な情報となる。また、特異的プライマーを用いた $\Delta\Delta Ct$ 法による抵抗性遺伝子頻度推定法は既に複数の殺ダニ剤抵抗性に適用できることを確認していることから、今後、様々な害虫における抵抗性遺伝子頻度の推定に利用可能と考えられる。

研究成果については学术论文や紹介記事、講演会等を通じて公開しており、未発表の内容についても順次公開していく予定である。また、生物検定法及び遺伝子診断法は研修会等を通じて技術移転する予定である。

5) 今後の課題

ビフェナゼートなどの薬剤において抵抗性発達が生じ難い要因が不明であり、そのメカニズムが分かれば寿命の長い新規薬剤の開発のための重要な情報となる。さらに、抵抗性遺伝子診断法に関しては、普及に向けたプライマーセットの開発やキャリブレーションの供給方法の確立などが今後の課題である。キャリブレーションとして抵抗性系統を維持することは困難であるため、抵抗性ホモ系統から作成したPCR産物の利用を検討しており、既に利用

可能なことを確認している。

<引用文献>

(○は本プロジェクトによる発表論文。下線は研究代表および分担者)

- Bajda S, W Dermauw, R Panteleri, N Sugimoto, V Douris, L Tirry, M Osakabe, J Vontas, T Van Leeuwen (2017) A mutation in the PSST homologue of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Tetranychus urticae* is associated with resistance to METI acaricides. *Insect Biochem Mol Biol* 80, 79-90.
- 國本佳範・今村剛士・土井誠・中野亮平・刑部正博 (2017) 回転式散布塔に代わる散布装置の考案. *応動昆*61, 192-194.
- Osakabe M, T Imamura, R Nakano, S Kamikawa, M Tadatsua, Y Kunimoto, M Doi (2017) Combination of restriction endonuclease digestion with the $\Delta\Delta Ct$ method in real-time PCR to monitor etoxazole resistance allele frequency in the two-spotted spider mite. *Pestic Biochem Physiol* 139, 1-8.
- Pavlidis N, M Khalighi, A Myridakis, W Dermauw, N Wybouw, D Tsakireli, EG Stephanou, NE Labrou, J Vontas, T Van Leeuwen (2017) A glutathione-S-transferase (TuGSTd05) associated with acaricide resistance in *Tetranychus urticae* directly metabolizes the complex II inhibitor cyflumetofen. *Insect Biochem Mol Biol* 80, 101-115.
- Sugimoto N, M Osakabe (2014) Cross-resistance between cyenopyrafen and pyridaben in the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pest Manag Sci* 70, 1090-1096.
- Van Nieuwenhuysse P, T Van Leeuwen, J Khajehali, B Vanholme, L Tirry (2009) Mutations in the mitochondrial cytochrome b of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifenthrin and acequinocyl. *Pest Manag Sci* 65, 404-412.

中課題番号	14526424	中課題 研究期間	平成26～30年度
小課題番号	PRM06	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発		
小課題名	水稻害虫（ウンカ類）の薬剤抵抗性メカニズム解明と管理技術の開発		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	九州沖縄農業研究センター・生産環境研究領域・虫害グループ・真田幸代		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

2000年代中頃から、イネウンカ類に種や地域によって異なる殺虫剤に対して抵抗性が発達して、とりわけ西日本地域における防除対策の見直しが進められている。イネウンカ類の殺虫剤抵抗性問題の特徴は、飛来源で抵抗性を発達させたウンカが飛んでくることであり、日本における防除対策においてもベトナム北部などの飛来源での薬剤感受性情報が重要となっている。そこで本小課題では、飛来源や日本に飛来するイネウンカ類の薬剤抵抗性情報を収集するとともに、現場で使える簡便かつ高精度な遺伝子診断による薬剤抵抗性モニタリング手法を開発し、日本国内のみならず飛来源も含めて普及を行うことを目的とする。また、感受性回復過程を解析し、効果的な薬剤抵抗性管理方策を提案する。

2) 研究方法

①ウンカ類抵抗性系統の収集と薬剤抵抗性モニタリング

日本に飛来したイネウンカ類（トビイロウンカ、セジロウンカ）を採集し、主要薬剤に対する感受性について、微量局所施用法およびピメトロジンの感受性検定法を用いて調査し、感受性の年次変動を明らかにする。

②ウンカ類の標準および簡易検定マニュアルの作成

薬剤感受性検定法（生物検定）のマニュアル（和文・英文）を作成するとともに、ウンカ類についての薬剤抵抗性ガイドラインを作成する。日本国内およびベトナム（2カ所）において微量局所施用法による感受性検定の講習会を開催し、普及を図る。

③選択実験による強度抵抗性系統の作出

トビイロウンカを用いて、イミダクロプリドおよびジノテフランによる薬剤選択実験を行い、強い抵抗性系統を作出する。選択応答が十分に高まった後に、抵抗性原因因子の解明に利用する。

④遺伝様式の解明と感受性回復過程の解析

選択実験により作出した抵抗性系統を用いて、感受性系統との交配実験を行い、抵抗性の遺伝様式を解明する。また、抵抗性系統に対する薬剤選択を停止した後の感受性回復過程を解明する。

⑤トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性機構の解明と遺伝子診断技術の開発

トビイロウンカにおいて薬剤選択により作出した抵抗性系統と、室内継代飼育している感

受性系統を利用し、RNA-seq、Rad-seq解析等により抵抗性遺伝子を特定する。その結果に基づき遺伝診断技術を開発する。

⑥ヒメトビウンカのフィプロニル抵抗性遺伝子診断技術の開発

主にRNA-seq解析により、ヒメトビウンカのフィプロニル抵抗性遺伝子を解明し、その結果に基づき遺伝子診断技術を開発する。

⑦セジロウンカのフィプロニル抵抗性遺伝子診断技術の開発

主にRNA-seq解析により、セジロウンカのフィプロニル抵抗性遺伝子を解明し、その結果に基づき遺伝子診断技術を開発する。

⑧ヒメトビウンカのイミダクロプリド抵抗性機構解明と遺伝子診断技術の開発

主にRNA-seq解析により、ヒメトビウンカのイミダクロプリド抵抗性遺伝子を解明し、その結果に基づき遺伝子診断技術を開発する。

⑨イネウンカ類の遺伝子診断技術の実証。

上記で開発した遺伝子診断法、特にトビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性診断技術について、圃場での検証と改良を行い、実用的な技術とする。

3) 研究結果

①ウンカ類抵抗性系統の収集と薬剤抵抗性

トビイロウンカについては、イミダクロプリドに対するLD₅₀値（半数致死薬量）は2005年から2011年までに徐々に上昇する傾向（Matsumura et al. 2018）がみられていたが、本研究課題で実施した2016年以降も強い抵抗性が維持されていた。他のネオニコチノイド系殺虫剤については顕著な変動はなく、顕著な抵抗性発達は起こっていなかった。セジロウンカについては、フィプロニルに対する感受性低下が起こっており抵抗性発達が維持されていたが、ネオニコチノイド系殺虫剤については、感受性低下は起きていなかった。

②ウンカ類の標準および簡易検定マニュアルの作成

アジアで広く利用されている葉鞘浸漬法による薬剤感受性検定では、異なる実験データを直接比較することができないため、データを直接比較することができる微量局所施用法を用いたピメトロジン新検定法を開発した。開発した新検定法を含めた、微量局所施用法を用いたイネウンカ類の生物検定法についてマニュアル（図1）を作成した。このマニュアルに基づいて、日本国内およびベトナムで薬剤感受性検定の講習を実施し普及を行った。

図1. イネウンカ類薬剤感受性検定法マニュアル（和文：左、英文：右）



これらのマニュアルは農研機構ホームページで公開されている。

③選択実験による強度抵抗性系統の作出

ベトナム個体群とフィリピン個体群から、イミダクロプリドに対して強い抵抗性を持つ抵抗性系統を作出した。ジノテフランによる薬剤選択により、ある程度強い抵抗性を持つ系統が安定して維持できるようになった。引き続きさらに強い抵抗性系統の作出を継続する。

④遺伝様式の解明と感受性回復過程の解析

ベトナム個体群とフィリピン個体群から作出したイミダクロプリド抵抗性系統と、室内で継代飼育してきた感受性系統（出雲系統、1987年採集）を正逆交配させ、トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性の遺伝様式が、伴性遺伝のない、ほぼ優性の主導遺伝子支配であることを明らかにした（図2）（Sanada-Morimura et al. 2019）。

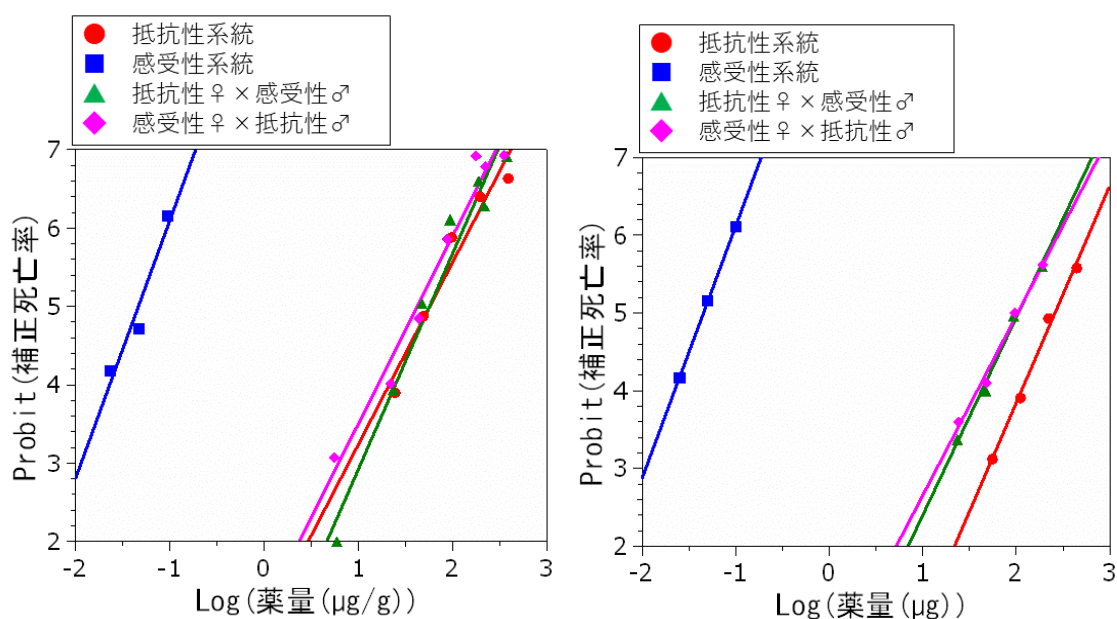


図2. トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性と感受性系統と交配F₁の回帰直線

ベトナム個体群から選択した抵抗性系統（左）とフィリピン個体群から選択した抵抗性系統（右）と感受性系統との正逆交配F₁の薬量（対数変換値）に対する補正死亡率（Probit変換値）の回帰直線。いずれの正逆交雑のF₁も、抵抗性親系統の回帰直線とほぼ一致し、優性遺伝することを示した。

⑤トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性機構の解明と遺伝子診断技術の開発

薬剤選択によって作出したトビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性発達の原因因子がチトクロムP450の高発現であり、Bass et al. (2010)の報告に一致することを明らかにした。イミダクロプリド抵抗性であることを示すチトクロムP450の遺伝変異を、PCR-RFLP法及びMultiplex PCR法で検出する診断技術を開発した（図3）。

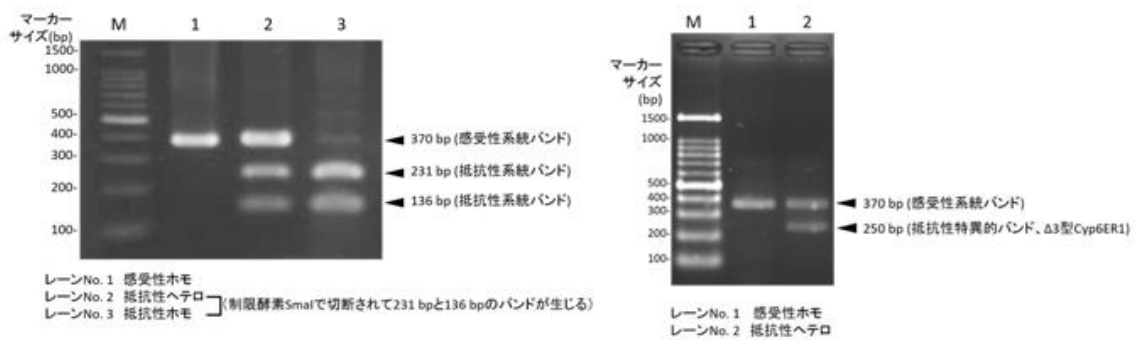


図3. トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性遺伝子診断技術（左）PCR-RFLP（右）Multiplex PCR法

⑥ヒメトビウンカのフィプロニル抵抗性遺伝子診断技術の開発

フィプロニルの作用機作であるGABAレセプターの遺伝変異が、野外から採集したヒメトビウンカのフィプロニル抵抗性に関与することを明らかにした。

⑦セジロウンカのフィプロニル抵抗性遺伝子診断技術の開発

フィプロニルの作用機作であるGABAレセプターの遺伝変異が、野外から採集したセジロウンカのフィプロニル抵抗性に関与することを明らかにした。

⑧ヒメトビウンカのイミダクロプリド抵抗性機構解明と遺伝子診断技術の開発

ヒメトビウンカのイミダクロプリド抵抗性については、RNA-seqデータから抵抗性の原因として有力と考えられた受容体変異について、想定以外の系統間の塩基配列多型が存在することが明らかとなり、どの多型が関与しているかについての絞り込みが必要となったため、発現変動遺伝子については、今年度に検出された解毒分解酵素遺伝子の実際の発現変動を解析する。

⑨イネウンカ類の遺伝子診断技術の実証

開発したトビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性遺伝子診断技術の講習会をベトナム植物保護研究所（PPRI）で実施した。その際に強い抵抗性を持つベトナム野外個体群から採集したトビイロウンカの遺伝子診断を行い、ほぼすべての個体が抵抗性遺伝子を持っており、野外個体群での遺伝子診断技術として有効であることが実証された。

4) 成果活用における留意点

イミダクロプリド抵抗性遺伝子診断については、PCR-RFLP法がより安定した結果を得られる。

5) 今後の課題

ジノテフランに対して強い抵抗性をもつ選択系統の作出についてはほぼ完了した。今後はこの系統を利用し、抵抗性の原因因子を特定し、遺伝子診断技術の開発を図る必要がある。ヒメトビウンカのイミダクロプリド抵抗性の原因因子の解明を引き続き行い、遺伝子診断技術を開発する必要がある。

<引用文献>

Bass et al. (2011) Overexpression of a cytochrome P450 monooxygenase, CYP6ER1, is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insec. Mol. Biol.* 20(6):763-773.

Matsumura et al. (2018) Insecticide susceptibilities of the two rice planthoppers *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* in East Asia, the Red River Delta, and the Mekong Delta. *Pest. Mang. Sci.* 74(2):456-464.

Sanada-Morimura et al. (2019) Selection for imidacloprid resistance and mode of inheritance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Mang. Sci.* doi: 10.1002/ps.5364

イネウンカ類薬剤検定マニュアル (和文)

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/072957.html

イネウンカ類薬剤検定マニュアル (英文)

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/075959.html

中課題番号	14526424	中課題 研究期間	平成26～30年度
小課題番号	PRM07	小課題 研究期間	平成26～30年度
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発		
小課題名	害虫タイプ別／薬剤組み合わせ別、抵抗性発達遅延戦略の構築		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	農研機構 農業環境変動研究センター・統計モデル解析ユニット・山中武彦		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

実際の害虫の抵抗性遺伝形質をタイプ分けし、汎用性が高く単純でありながら、実際の抵抗性管理に決定的な示唆を与えられるアプローチを模索する。さらに対象となる個々の害虫に即した状況を想定して個別のシミュレーションを行う。

他小課題と連携して、ほ場試験や室内試験での抵抗性発達パターンとシミュレーション結果を比較・検討し、害虫タイプごとの抵抗性マネジメントプランを構築する。同時に他小課題と協力して広域、複数時点での抵抗性モニタリングを行って、抵抗性管理戦略の意思決定に最適な時点と調査の空間スケールを提案する。

2) 研究方法

実際の害虫の抵抗性遺伝形質をタイプ分けし、汎用性が高く単純でありながら、実際の抵抗性管理に決定的な示唆を与えられるアプローチを模索する。それぞれの害虫タイプごとに様々な薬剤組み合わせ・圃場管理をシミュレーションし、タイプ別・薬剤別の最適抵抗性管理戦略を提案する。

様々な害虫種を対象に、室内・半野外の仮想防除試験を行い、二つの剤の世代内同時施用、世代間交互施用のどちらが抵抗性抑制効果が高いか検証する。

抵抗性管理戦略の時間的・空間的意思決定のために、複数の害虫種で抵抗性モニタリング調査を行い、抵抗性発達の空間的時間的な傾向を定量化する。

3) 研究結果

実際の害虫の抵抗性遺伝形質をタイプ分けし、汎用性が高く単純でありながら、実際の抵抗性管理に決定的な示唆を与えられるシミュレーションモデルを構築した。その結果、世代内で同時に別の殺虫剤を施用した方が、抵抗性害虫管理に効果的なケースが多いことが明らかになった（図1）。

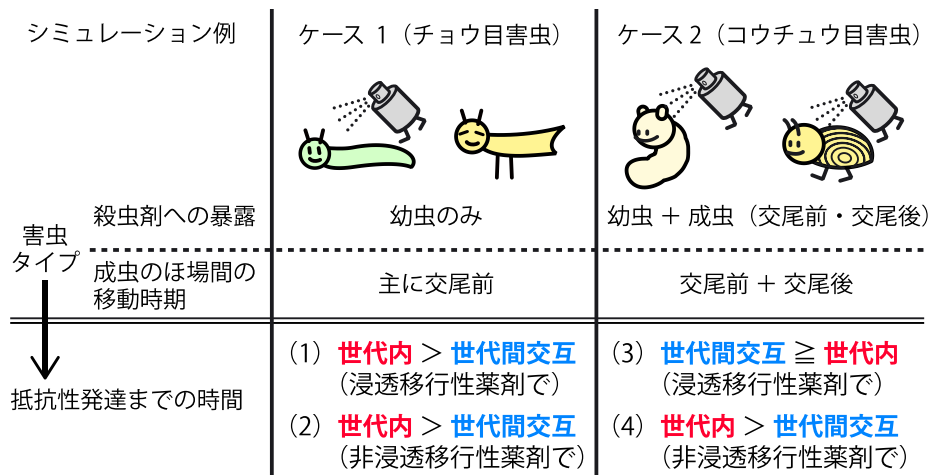


図 1. チョウ目害虫・コウチュウ目害虫のシミュレーション例と効果的戦略

さらに室内・半野外の仮想防除試験を行い、抵抗性発達を抑制しうる防除方法の検討を行った。ナミハダニでは、ハウス内のイチゴ栽培条件下で物理的防除法が抵抗性発達与える影響を評価した。具体的には人為的に5%の初期エトキサゾール抵抗性遺伝子を導入したナミハダニ集団に対して、気門封鎖剤と殺ダニ剤を様々な組み合わせで防除を行い、抵抗性頻度をモニタリングした。その結果、気門封鎖剤を用いた物理防除はエトキサゾール抵抗性を増加も減少もさせず中立であることがわかった (図 2)。

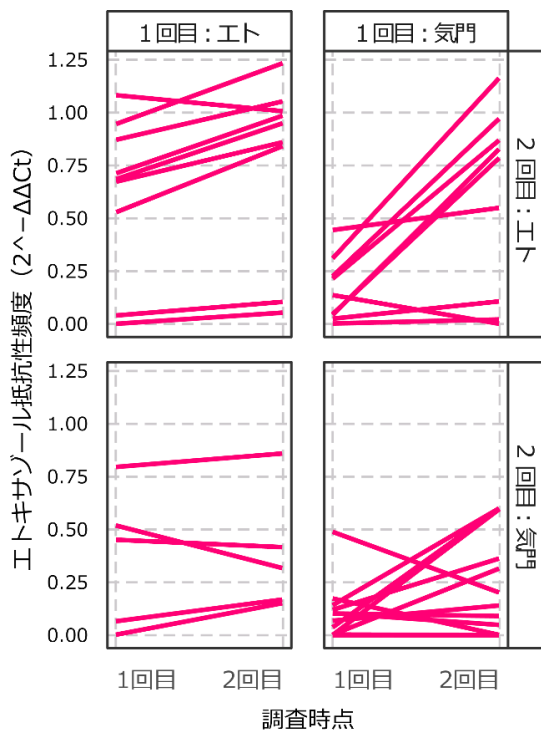


図 2. 気門封鎖剤 (ソルビタン脂肪酸エステル乳剤: ムシラップ500倍) による初期防除が、ナミハダニのエトキサゾール (バロックフロアブル2000倍) 抵抗性遺伝子頻度に与える影響 (ハダニチームとの共同研究)。連続した2回の防除をいずれかの手段を用いて行い、気門封鎖剤がエトキサゾール抵抗性頻度を変化させない (中立な) 防除手段で

あることを示した。

また、ネギアザミウマを対象に、世代内ローテーション（ジノテフラン→スピノサド）、世代間ローテ、ジノテフラン連続、スピノサド連続の4つの処理を継続する室内試験を行い、2反復を完了した。スピノサドについては遺伝子診断が実施可能であり、スピノサド連続選抜によるR頻度上昇を確認した（図3）。一方、ジノテフランについてはサンプルを保管しており、今後、ジノテフランについての遺伝子診断技術が開発され次第、解析を行う予定である。現在のところ世代内・世代間ローテーションは、実施済みの2反復間で頻度状況のタイミングが安定せず、遅延戦略としての効果の判断に至らなかったため、殺虫剤の実用濃度を念頭に施用条件の見直し中である。

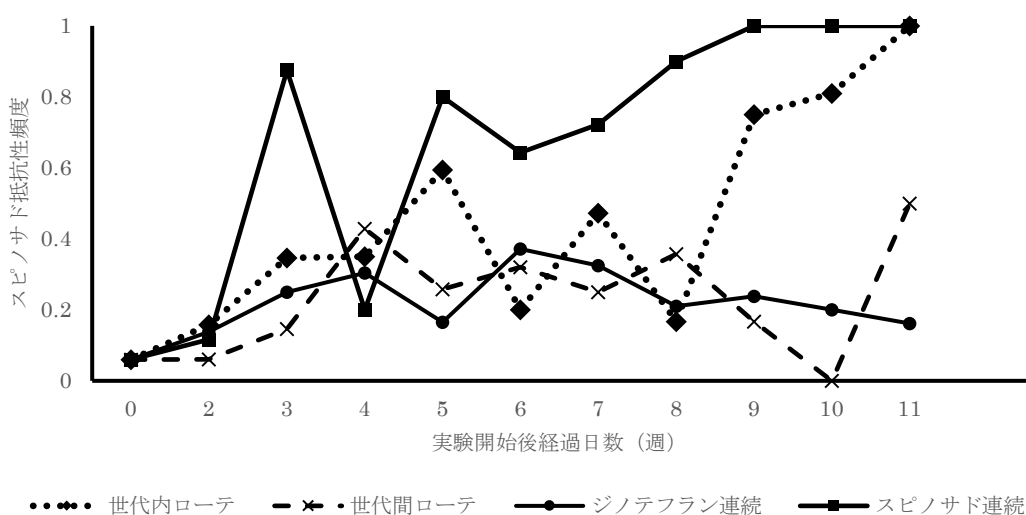


図3. スピノサドおよびジノテフラン抵抗性遺伝子をいずれも5%の初期頻度で含むネギアザミウマ室内個体群に対し、各剤の連続施用、2剤の世代内ローテーション、および世代間ローテーションによる薬剤選抜を10週間行ったときの、スピノサド抵抗性遺伝子頻度の推移（ネギアザミウマチームとの共同研究）。2反復目の例。設定された試験条件において単剤選抜時の抵抗性頻度上昇を追跡できることを確認した。

長野県全域でコナガのフェロモントラップ調査を実施し、様々な殺虫剤に対する抵抗性原因遺伝子10変異コードを調査した。2016年春から2017年秋にかけて時間的・空間的な抵抗性形質の変動を観察した。各抵抗性遺伝子頻度とも長野県全体で変動していて地域性はなく、春世代に抵抗性頻度が下がって秋に上がる傾向が見られた（図4）。越冬地での全体的な感受性との交雑が影響しているものと考えられた。

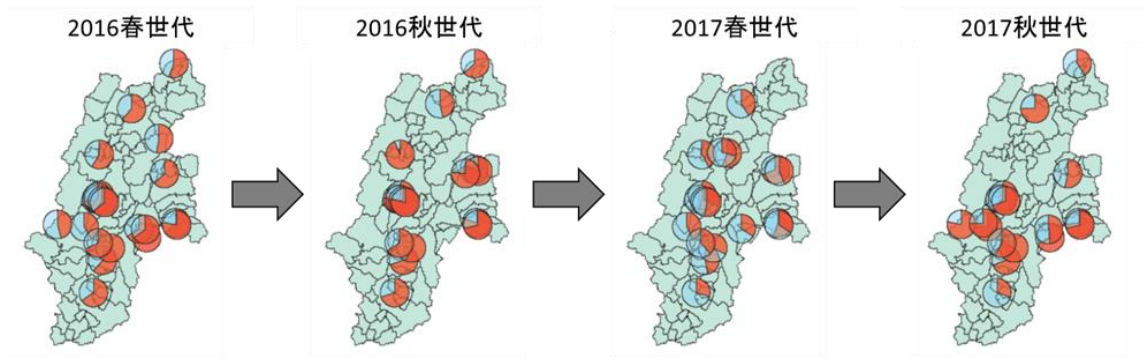


図4. 長野県コナガ殺虫剤抵抗性広域調査（コナガチームとの共同研究）。10 抵抗性変異部位について調査を行っている。図はリアノジン受容体変異 G4946E の出現頻度の例。

また、茨城県南部のワタアブラムシ、ネオニコチノイド抵抗性原因遺伝子変異と考えられているR81Tの調査を行った。2016年の調査では、抵抗性が茨城県南西部と南端に多く見られたが、2017年の調査では全体的に薄まって北のほうへ拡散していることが確認された（図5）。特に秋の調査ではほ場ごとの変動が激しく、まとまった空間構造が検出できなかった。

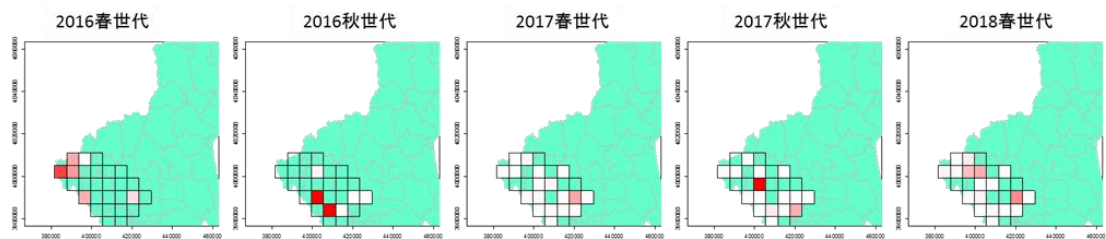


図5. 茨城県南部ワタアブラムシ、ネオニコチノイド抵抗性変異R81Tについての広域調査（ワタアブラムシチームとの共同研究）。データは6 km四方の格子セルに分割して整理して空間統計学による空間構造解析を行った。

4) 成果活用における留意点

世代内同時施用の抵抗性抑制効果の優位性はモデルの中での結論であり、実際の害虫をターゲットにする場合、室内実験・ほ場での検証が不可欠である。また、複数の害虫がターゲットとなる実際の防除暦の中にどのように組み込んでいくかは、十分な検討が必要であろう。また、最適な時間的・空間的、抵抗性管理戦略の意思決定のためには、それぞれの害虫について、事前の抵抗性発達モニタリングを行うことが望ましい。

5) 今後の課題

今回、汎用性が高く単純なシミュレーションモデルによって得られた結論を、実際の害虫に対する抵抗性管理に応用するためには、室内実験・ほ場での検証が不可欠である。我々が開発した単純なモデルを、実際の害虫の生活史イベントと殺虫剤による具体的な選抜強度を組み込んだ記述的なシミュレーションモデルに発展させて、実際の害虫を使った実験結果と比較・検討を行うことが効果的と考える。多くの殺虫剤の原因遺伝子に対する遺伝子診断方法が開発され、大量の試料を診断すれば、ほ場検証が進むと期待される。

中課題番号	14526424	中課題 研究期間	平成26～30年度
小課題番号	PRM08	小課題 研究期間	平成26～28年度
中課題名	ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発		
小課題名	薬剤抵抗性水稻病原菌の発生・伝搬抑制技術の高度化		
小課題 代表研究機関・研究室・研究者名	農研機構・中央農業研究センター・病害研究領域・抵抗性 利用グループ・鈴木文彦		

II. 小課題ごとの研究目的等

1) 研究目的

近年、QoI剤抵抗性いもち病菌の発生が国内で初めて確認され、その分布域が全国的に拡大している。そこで、本研究では、薬剤使用歴や種子流通などの情報とQoI剤抵抗性菌の発生実態との関連を分析し、薬剤抵抗性管理のポイントを明らかにする。また、抵抗性菌の簡易診断技術の開発、薬剤抵抗性の発達・拡大予測技術の構築、抵抗性菌発生レベルに対応した代替防除体系の構築とその効果の検証を実施する。本研究課題の成果を取りまとめ、薬剤抵抗性管理マニュアルを策定する。

2) 研究方法

- (1) 薬剤使用歴や種子流通などの情報とQoI剤抵抗性菌の発生実態との関連を分析するとともに、薬剤抵抗性菌の発生・伝搬を予測するシミュレーションモデルを構築する。
- (2) QoI剤抵抗性菌の発生地域、および未発生地域においてモニタリング調査を実施するとともに、SSRマーカーによる個体識別解析により薬剤抵抗性の発達や伝搬における種子流通等の影響を解析する。
- (3) QoI 剤抵抗性いもち病菌を簡易・迅速に検出可能なPCR 法を開発する。また、培地を用いたQoI 剤抵抗性菌の簡易検出手法を開発する。
- (4) QoI剤抵抗性菌が広範に発生している地域における代替防除体系を確立し、被害軽減効果、抵抗性菌の発生・伝搬抑制効果を検証する。
- (5) QoI剤抵抗性菌が低密度で発生する圃場において、他系統薬剤等による体系防除の有効性を明らかにするとともに、低密度発生地域でも適用できるQoI系薬剤の使用法を提示する。
- (6) QoI剤抵抗性菌未発生地域において、QoI 剤の処理形態（箱剤、本田粒剤、散布剤）の違いによる感受性低下リスクを評価し、QoI 剤の使用継続を可能とする防除体系を確立する。
- (7) 本研究課題の成果を取りまとめ、薬剤抵抗性管理マニュアルの策定、公開する。

3) 研究結果

(1) 発生実態の分析およびシミュレーションモデルの構築

抵抗性菌の発生県と未発生県間で3種類のQoI剤の使用面積率（平成19～25年の平均）を比較すると、オリサストロビンと全QoI剤で有意差が認められた。平成19年以降のオリサストロビンの累積使用面積率を説明変数としたロジスティック回帰分析によって、QoI剤抵抗性菌の発生確率をモデル化することができた。モデル式から発生確率50%を逆推定すると、累積使用面積率で68%（95%信頼区間：48-105%）となった（図1）。

いもち病菌の流行予測システムを利用して薬剤抵抗性菌の動態を把握するためのシミュレーションモデルをソフトウェアとして作成した。パラメータとして、突然変異頻度、越冬確率、QoI剤普及面積、個体数、適応度コストを評価した結果、いずれのパラメータも耐性菌の動態に影響することが明らかになった。たとえば、QoI剤普及面積では、普及面積率が100%で3年目、10%で8年目、1%で60年目に抵抗性菌の頻度が50%を超えた（図）。個体数では、100万個体では9年目、1000万個体では3年目、1億個体では2年目に50%を超えた。これらの結果から、QoI剤の普及面積の制限や種子消毒の徹底によって抵抗性菌が蔓延するまでの時間が長くなることが示された。シミュレーションで得られた計算結果をもとに、気象変動、QoI剤の使用面積、年度内流行病斑数（発生量）、保菌率のパラメータ値を組み合わせたリスクマトリックスを作成できた。採種圃場での審査で被害率が1%を超えないように防除して管理した種子を使用すること、QoI剤の使用面積を10%程度以下に抑えることで、抵抗性菌の発生を抑制できることが計算により示された。

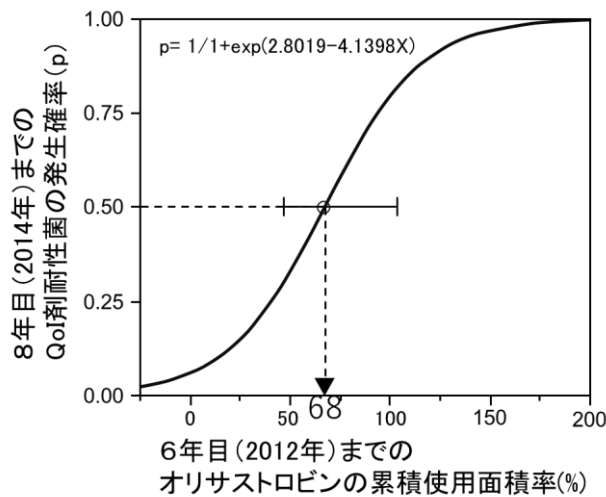


図1 ロジスティック回帰モデルによるQoI剤抵抗性菌発生確率の予測
発生確率50%のQoI剤処理剤の累積使用面積率を推定すると68%となった。

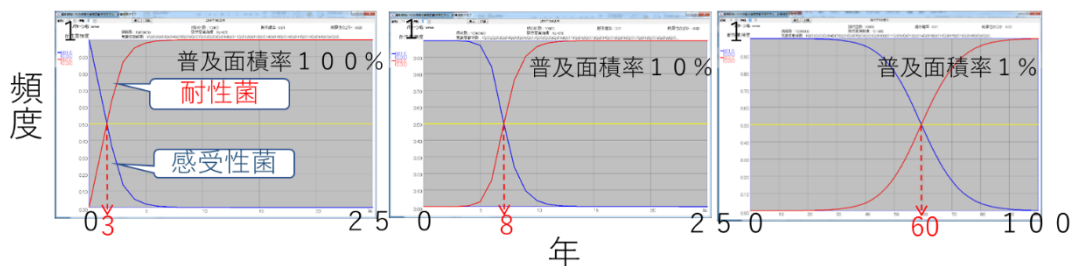


図2 薬剤抵抗性いもち病菌変動予測モデルでのパラメータ感度分析例

パラメータとして殺菌剤使用面積率の影響を評価した。

(2) モニタリング調査と分布拡大要因

2016年に福岡県全域の95 ほ場から採集した561菌株のいもち病菌を採集し、抵抗性菌の発生ほ場率および分離頻度を調査した結果、抵抗性菌の発生ほ場率は7.4% (7ほ場)、抵抗性菌の分離頻度は2.7% (15菌株)であった。抵抗性菌の初発生以来の徹底した種子消毒、本田での他系統薬剤の使用(QoI剤の使用停止)により、これまでと比べて大きく低下したものと考えられた(表1)。

2016年における佐賀県北部山間地域(2013年抵抗性菌高密度発生地域)での抵抗性菌検出圃場率は10% (2013年91.7%、2014年53.3%、2015年12.5%)、抵抗性菌株率は0.4% (2013年94.8%、2014年8.7%、2015年0.5%)であり、2013~2014年に比べ著しく低下した状態を保っていることを確認した。これは同地域において、種子更新やQoI剤以外の薬剤防除等、抵抗性菌対策の徹底が図られた結果であると考えられる。また、東松浦地域(低密度発生地域)での抵抗性菌検出圃場率は8.3% (2013年14.7%、2014年34.8%、2015年26.7%)、抵抗性菌株率は0.3% (2013年3.1%、2014年2.6%、2015年1.9%)であり、2013~2016年は比較的低率で推移していることを確認した。

三重県内で広域にモニタリングを行い、2014年に初めて抵抗性菌を確認した(2地点3菌株)。採集地の種苗の来歴を調査した結果、2地点とも飼料用イネであった。2015年には3地点7菌株の抵抗性菌が検出されたが、分離頻度は低値で推移した。

6種類のSSRマーカーのサイズ情報の組み合わせからいもち病菌のハプロタイプを分類した結果、2012~2014年に九州北部(福岡、佐賀)および九州以外の4県で発生した薬剤抵抗性菌は、10種類のハプロタイプに分類された。このうち、1つのハプロタイプの菌株が、いずれの地域でも優占的に分布していた。また10種類のハプロタイプの多くは近縁関係にあり、抵抗性菌は感受性菌に比べて遺伝的多様性が極端に低かった。これらの結果から、同一起源の抵抗性菌が種子の移動などで短期間に分布拡大したことが示唆された。

表1 福岡県における地域別QoI剤耐性菌率の年次推移

地域	H24耐性菌率(%)	H25耐性菌率(%)	H26耐性菌率(%)	H27耐性菌率(%)	平成28年度の調査結果					
					調査ほ場数	発生ほ場数	発生ほ場率(%)	調査菌株数	耐性菌株数	耐性菌率(%)
A	0.0	0.0	3.4	0.8	20	0	0.0	137	0	0.0
B	-	50.0	0.0	4.2	6	0	0.0	22	0	0.0
C	33.3	10.0	25.0	0.0	8	0	0.0	34	0	0.0
D	-	7.0	18.6	1.1	12	1	8.3	70	1	1.4
E	11.3	40.0	7.0	11.3	7	0	0.0	26	0	0.0
F	100.0	100.0	66.1	19.4	13	5	38.5	124	13	10.5
G	17.8	21.7	4.2	5.6	9	0	0.0	43	0	0.0
H	0.0	25.0	0.0	0.0	5	0	0.0	28	0	0.0
I	75.0	50.0	12.5	9.1	5	0	0.0	18	0	0.0
J	-	26.9	6.3	3.1	10	1	10.0	59	1	1.7
	78.8	24.8	22.6	7.5	95	7	7.4	561	15	2.7

注) -は未調査

(3) QoI 剤抵抗性いもち病菌の簡易診断法

殺菌剤、代替呼吸阻害剤、抗生物質の種類および添加濃度を検討し、葉いもち病斑からQoI剤抵抗性菌を簡易検出するための液体培地を作成できた(表2、図3)。九州沖縄地区の農業試験研究機関および病害虫防除所の担当者を対象とした研修会を開催し、液体培地法による簡易

診断技術として現場への普及を進めた。

野生菌型、MBI-D剤抵抗性菌型（V75M変異）、QoI剤抵抗性菌型（G143A変異）の3遺伝子型を1回のPCRで判別できるmultiplexマーカー（MDQマーカー）を開発できた(図4)。PCR反応開始から電気泳動後の判別までに要する平均作業時間は約2時間であった。2つの薬剤抵抗性菌の発生地域は地理的に重なるため、本マーカーはモニタリングを効率的に実施する上で優れたツールとなる。

イネいもち病菌のQoI剤耐性変異のLAMP-FLP法による検出を開発した。従来法（Hayashi et al 2015）でQoI剤耐性変異を判定済みの64菌株（R=31、S=33）の乾燥菌体培養ろ紙片を用いて試験したところ、会合曲線解析における蛍光値ピークの2群間（RとS）の温度差は4.4℃（95%信頼区間4.0～4.7℃）となり、本法で正確に変異の有無が自動判定できた。さらに、葉いもち病斑（n=18）を試験したところ、変異の有無だけでなく混在した場合も自動判定が可能であった。

表2 QoI剤抵抗性いもち病菌の簡易検定用培地組成

0.1×PDB (10倍希釈したポテトデキストロース液体培地)	
オートクレーブ滅菌後、以下の試薬を添加	
・オリサストロピン	100 ppm
・サリチルヒドロキシム酸	100 ppm
・ストレプトマイシン	300 ppm
・クロラムフェニコール	100 ppm



図3 液体培地でのQoI剤抵抗性菌の判定
左が抵抗性菌、右が感受性菌

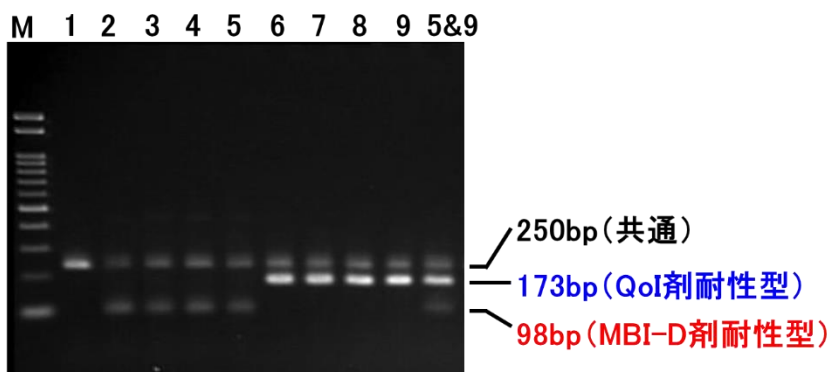


図4 MBI-D剤およびQoI剤抵抗性菌を同時判別するmultiplexマーカー（MDQマーカー）
レーン1は野生型、レーン2～5はMBI-D剤抵抗性菌、レーン6～9はQoI剤抵抗性菌、レーン5&9は、両抵抗性菌を1：1で添加。

(4) QoI剤抵抗性菌が広範に発生している地域における代替防除体系

QoI剤抵抗性菌が発生している現地ほ場で、葉いもち中発生条件下において、他系統薬剤の出穂時期1回散布は、いずれの散布剤とも出穂時期無散布と比較して被害度を1/2～1/5程度に抑えた。なお、QoI系統薬剤の同時期1回散布も被害度を約1/3程度に抑え、実用的な防除効果が示された(表3)。

表3 各薬剤処理区のいもち病に対する防除効果(H28現地実証ほ場試験)

試験区	反復	葉いもち(8/5)		穂いもち(8月31日調査)					抵抗性菌の検出率			
		株当 発病株率	り病斑 数	発病程度別穂率			被害度	薬害	葉いもち			
				穂首	枝梗 1/3以上	枝梗 1/3未満			穂率	7/14 (初発時)	8月5日	8月31日
ブラシフロアブル	1	100	5.6	1.6	0.2	3.1	4.9	2.6				
出穂時期 1回散布	2	100	4.7	2.1	0.5	2.1	4.7	3.0				
7/18コラトップ粒剤	3	90	2.0	1.2	0.2	1.4	2.8	1.7				
8/9ブラシF散布	平均	96.7	4.1	1.6	0.3	2.2	4.1	2.4				
アミスター8フロアブル	1	100	5.7	1.2	0.0	2.6	3.8	1.8				
出穂時期 1回散布	2	90	4.3	0.5	0.5	1.2	2.1	1.1				
7/18コラトップ粒剤	3	95	2.3	1.4	0.2	0.7	1.4	1.8				
8/9アミスターF散布	平均	95.0	4.1	1.0	0.2	1.5	2.4	1.6				
ブラストップフロアブル	1	100	5.6	0.5	0.0	1.6	2.1	0.9				
出穂時期 1回散布	2	100	3.9	0.0	0.2	1.2	1.4	0.5				
7/18コラトップ粒剤	3	85	1.8	0.2	0.9	1.2	2.4	1.2				
8/9ブラストップF散布	平均	95.0	3.8	0.2	0.4	1.3	2.0	0.9				
ダブルカットフロアブル	1	95	4.8	0.7	0.2	1.4	2.4	1.2				
出穂時期 1回散布	2	95	3.6	0.5	0.0	1.9	2.4	1.0				
7/18コラトップ粒剤	3	100	2.0	0.9	0.5	0.7	2.1	1.4				
8/9ダブルカットF散布	平均	96.7	3.5	0.7	0.2	1.3	2.3	1.2				
現地慣行	1	100.0	4.5	2.4	1.4	5.4	9.2	4.7				
出穂時期 無散布	2	100.0	3.3	3.3	0.2	4.2	7.8	4.6				
7/18コラトップ粒剤	3	100.0	2.1	3.5	0.2	4.5	8.2	4.8				
平均		100	3.3	3.1	0.6	4.7	8.4	4.7				

注1) 県北部いもち病常発地で試験実施(移植:6月7日、出穂期:8月12日)。購入種子を使用し、テクリードCフロアブルで種子消毒後、ツイインターボフェルテラ箱粒剤を播種時同時処理した。いもち病初発後に病勢の進展を制御するためにコラトップ粒剤5をほ場全体に散布した。

注2) 発病度が低いほど、防除効果が高いことを示す。

(5) QoI剤抵抗性菌が低密度で発生する圃場における他系統薬剤等による防除効果

QoI剤抵抗性菌低密度発生地域においても、QoI剤の本田散布は実用的な防除効果を示すことを確認した。このことから、QoI剤の本田散布は、育苗箱施用とは異なり、抵抗性リスクが低いと考えられた。ただし、抵抗性リスク回避の観点から、本剤の本田での使用は年1回にとどめるのが望ましいと考えられる。

体系防除(①購入種子の利用、②従来の薬剤にベンレート水和剤を加用した種子消毒、③QoI剤ではない長期残効型箱粒剤の育苗施用(Dr. オリゼ剤あるいはビルダー剤)、④葉いもち初発時の本田粒剤散布(QoI剤あるいは他系統の薬剤)、⑤穂ばらみ期の穂いもち防除)を実践した結果、いもち病の発生は低く抑えられ、QoI抵抗性菌も検出されなかった。体系防除は、QoI剤抵抗性菌低密度発生地域においても、実用性が高いことを確認した。

(6) QoI剤の処理形態の違いによる薬剤感受性低下リスクを評価

2014～2016年の3年にわたり、QoI剤の処理形態(箱剤、本田粒剤、散布剤)の違いによる感受性低下リスクの評価を試みたが、いずれの処理区においても抵抗性菌は分離されず、実験的に処理形態によるリスクの違いを明らかにすることはできなかった。

(7) マニュアルの策定

薬剤耐性菌管理の要点、耐性菌発生拡大リスクの分類と対応例、耐性菌検定法、代替防除体系

などの関連する情報や手法をとりまとめ、「殺菌剤耐性イネいもち病菌対策マニュアル<QoI>」を策定した（2017年3月公開）。耐性菌管理の一連の作業手順については、3つのセクション（情報収集と発生予測、モニタリング調査と耐性菌検定、リスク評価と耐性菌対策）から構成されるフローチャートとして示した。（図5）。本マニュアルにおける耐性菌対策の中心は、殺菌剤の使用実績の統計データやシミュレーションモデルによる耐性菌の発生予測などの解析から、箱処理剤の使用面積の管理（管理区域での箱処理剤の使用面積を10～30%に制限）、連用の制限（使用面積率に応じて連用年数を3～5年に制限）、種子保菌率の低減化（採種圃場の管理など）に集約される。

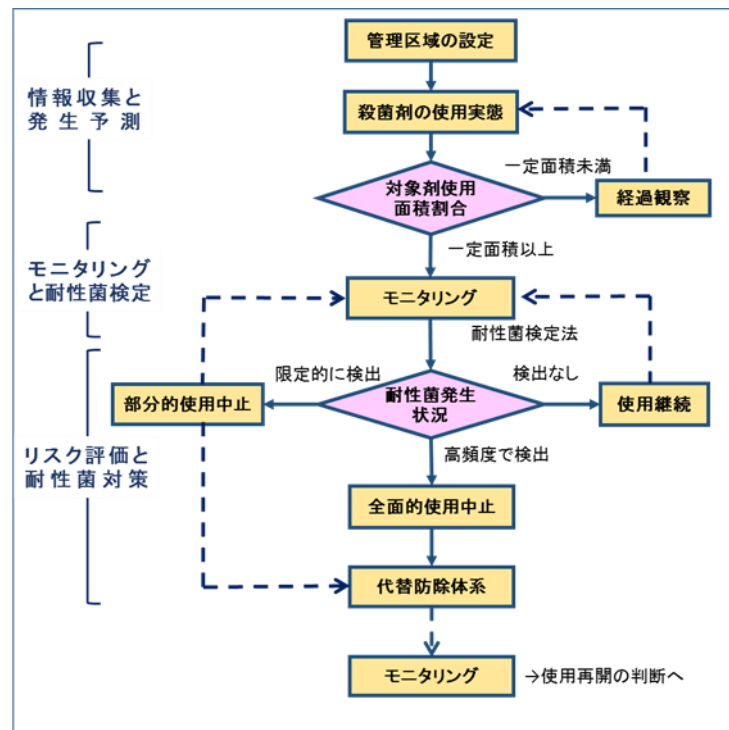


図5 イネいもち病のQoI剤抵抗性菌管理のフローチャート

4) 成果活用における留意点

農研機構HP内から「殺菌剤耐性イネいもち病菌対策マニュアル<QoI>」をダウンロードできる。
http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/laboratory/narc/073008.html

5) 今後の課題

抵抗性菌の密度が大きく低下した地域においては、QoI剤の使用方法や再使用時期の検討を積み重ねる必要がある。また、薬剤抵抗性の発達を抑制する種子管理法について、現場で導入可能な技術を開発する必要がある。

<引用文献>

Hayashi, K. et al. (2015) JGPP 81:131-135.

Ⅲ 研究成果一覧【公表可】

課題番号 14526424

中課題名 ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		PCT	報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得	出願				
14526424	16	21	128	15	15	0	0	0	0	0	2	3	8	35

(1)学術論文

区分:①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	タイトル	著者	機関名	掲載誌	掲載論文のDOI	発行年	発行月	巻(号)	掲載ページ
1	①	Studies on an acetylcholine binding protein identify a basic residue in loop G on the beta1 strand as a new structural determinant of neonicotinoid actions	M. Ihara, T. Okajima, A. Yamashita, T. Oda, T. Asano, M. Matsui, D. B. Sattelle, K. Matsuda	近畿大学、他	Mol Pharmacol		2014	12	86(6)	736-746
2	①	Genomes of the rice pest brown planthopper and its endosymbionts reveal complex complementary contributions for host adaptation	J. Xue, X. Zhou, C. X. Zhang, L. L. Yu, H. W. Fan, Z. Wang, H. J. Xu, Y. Xi, Z. R. Zhu, W. W. Zhou, P. L. Pan, B. L. Li, J. K. Colbourne, H. Noda, Y. Suetsugu, T. Kobayashi, Y. Zheng, S. Liu, R. Zhang, Y. Liu, Y. D. Luo, D. M. Fang, Y. Chen, D. L. Zhan, X	農業生物資源研究所、他	Genome Biol		2014	12	15(12)	521
3	①	Association between the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor β 1 subunit of <i>Aphis gossypii</i> and the differential resistance to acetamiprid and imidacloprid	Koichi Hirata, Ryutaro Kiyota, Akira Matsuura, Satoshi Toda, Atsushi Yamamoto, Takao Iwasa	日本曹達(株)	J. Pestic. Sci.		2015	2	40(1)	25-31
4	②	アブラムシ類の殺虫剤抵抗性について	土田 聡	果樹研究所	農業および園芸		2015	2	90(3)	331-337
5	①	Rapid PCR technique to detect QoI-resistant strains of <i>Magnaporthe oryzae</i>	Keiko Hayashi, Taketo Ashizawa, Takahide Sasaya, Kazuyuki Hirayae, Yuriko Hayano-Saito, Fumihiko Suzuki	九州沖縄農業研究センター、中央農業総合研究センター	J. Gen. Plant Pathol.		2015	3	81(2)	131-135

6	①	PCR反応のためのイネいもち病菌DNAの簡易調製法	早野由里子, 林 敬子, 芦澤武人, 鈴木文彦	中央農業総合研究センター	日本植物病理学会報	2015	5	81(2)	141-143
7	②	Probing new components (loop G and the α - α interface) of neonicotinoid binding sites on nicotinic acetylcholine receptors.	Makoto Ihara, David B. Sattelle, Kazuhiko Matsuda	近畿大学	Pestic. Biochem. Physiol.	2015	6	121	47-52
8	①	チャノコカクモンハマキ(チョウ目:ハマキガ科)におけるテブフェノジド剤抵抗性の遺伝様式	内山 徹, 小澤 朗人	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	日本応用動物昆虫学会誌	2015	8	59(3)	127-131
9	①	ミナミキイロアザミウマ1齢幼虫に対する簡易な薬剤検定手法	浜崎健児, 城塚可奈子, 柴尾 学	大阪府立環境農林水産総合研究所	関西病虫害研究会報	2015	9	57	129-130
10	①	A new method for monitoring the susceptibility of the brown planthopper, Nilaparvata lugens (Hemiptera: Delphacidae), to pymetrozine by combining topical application and measurement of offspring number.	Tsujimoto K, Sugii S, Sanada-Morimura S, Matsumura M.	九州沖縄農業研究センター	Appl. Entomol. Zool.	2016	2	51(1)	155-160
11	①	奈良県での促成栽培イチゴのナミハダニ黄緑型に対するカブリダニ製剤の防除効果	國本佳範, 竹中 勲, 今村剛士, 小島巳奈, 吉村あみ, 西村憲三, 堀川大輔	奈良県農業研究開発センター	奈良県農業研究開発センター研究報告	2016	3	47	37-42
12	①	奈良県内のイチゴに寄生するナミハダニ黄緑型の薬剤感受性	今村剛士, 國本佳範	奈良県農業研究開発センター	奈良県農業研究開発センター研究報告	2016	3	47	34-36
13	①	Genotyping for the G4946E site of ryanodine receptor gene in Plutella xylostella (Lepidoptera: Yponomeutidae) considering gene duplication	Shoji Sonoda, Yoko Kataoka	宇都宮大学	Appl. Entomol. Zool.	2016	5	51(2)	195-204
14	①	葉片浸漬と散布によるハダニ類の感受性検定の比較と簡易なハダニ接種法の開発	國本佳範, 今村剛士	奈良県農業研究開発センター	関西病虫害研究会報	2016	5	(57)	13-16
15	①	Studies on the mode of action of neurotoxic insecticides.	K. Hirata	日本曹達株式会社	J. Pestic. Sci.	2016	8	41(3)	87-94
16	①	Estimated time frame for successful PCR analysis of diamondback moths, Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae), collected from sticky traps in field conditions	Uesugi R, Hinomoto N, Goto C	農研機構中央農業研究センター	Applied Entomology Zoology	2016	8	51(3)	505-510
17	①	アブラムシ類の殺虫剤感受性検定のための簡易検定法	松浦明, 日高春美	宮崎県総合農業試験場	九病虫研会報	2016	11	62	82-88
18	①	ワタアブラムシに対する薬剤感受性検定法の違いが検定結果に及ぼす影響	松浦明	宮崎県総合農業試験場	九病虫研会報	2016	11	62	77-81

19	①	Structural model and functional characterization of the Aphis gossypii P450	K. Hirata, R. Kiyota, T. Iwasa, J. Kanazawa, A. Yamamoto	日本曹達株式会社	J. Pestic. Sci.	2017	(空白)	42	in press
20	①	A mutation in the PSST homologue of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from Tetranychus urticae is associated with resistance to METI acaricides	S. Bajda, W. Dermauw, R. Panteleri, N. Sugimoto, V. Douris, L. Tirry, M. Osakabe, J. Vontas, T. Van Leeuwen	京都大学	Insect Biochem Mol Biol	2017	1	80(1)	79-90
21	①	Molecular diagnostics of the R81T mutation on the D-loop region of the β 1 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor gene conferring resistance to neonicotinoids in the cotton aphid, Aphis gossypii (Hemiptera: Aphididae)	S. Toda, K. Hirata, A. Yamamoto, A. Matsuura	農研機構果樹茶業研究部門	Appl. Entomol. Zool.	2017	2	52(1)	in press
22	①	宮崎県で採集した殺虫剤抵抗性関連遺伝子が異なるワタアブラムシ3クローンの各種殺虫剤に対する感受性	松浦明・土田聡・日高春美	宮崎県総合農業試験場	九病虫研会報	2017	(空白)	63	62-70
23	①	チャノコカクモンハマキの殺虫剤抵抗性に関する研究	内山 徹	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	静岡農林技研特別報告	2017	3	7	54 pp
24	①	Molecular evaluation of diamide resistance in diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae) populations using quantitative sequencing	Shoji Sonoda, Kayo Inukai, Satoshi Kitabayashi, Seigo Kuwazaki, Akiya Jouraku	宇都宮大学	Applied Entomology and Zoology	2017	5	52(2)	353-357
25	①	チャノコカクモンハマキ(チョウ目:ハマキガ科)におけるジアミド系殺虫剤抵抗性の遺伝様式	内山 徹・小澤 朗人	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	日本応用動物昆虫学会誌	2017	5	61(2)	109-117
26	①	チャノコカクモンハマキの殺虫剤感受性比較による移動分散の検討	内山 徹・小澤 朗人	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	関西病虫研報	2017	5	59	97-99
27	①	Is a larger refuge always better? Dispersal and dose in pesticide resistance evolution	高橋大輔・山中武彦・須藤正彬・David A. Andow	農研機構 農業環境変動研究センター	Evolution	2017	5	71(6)	1494-1503
28	①	Combination of restriction endonuclease digestion with the $\Delta\Delta$ Ct method in real-time PCR to monitor etoxazole resistance allele frequency in the two-spotted spider mite	Osakabe, M., T. Imamura, R. Nakano, S. Kamikawa, M. Tadatsu, Y. Kunimoto, M. Doi	京都大学、静岡県農林技術研究所、奈良県農業研究開発センター	Pesticide Biochemistry and Physiology	2017	6	139(1)	1-8
29	①	Studies on Aphis gossypii cytochrome P450s CYP6CY22 and CYP6CY13 using an in vitro system	Koichi Hirata, Akiya Jouraku, Seigo Kuwazaki, Hajime Shimomura, Takao Iwasa	日本曹達(株), 農研機構生物機能利用研究部門	Journal of Pesticide Science	2017	7	42(3)	97-104
30	①	Seasonal proportion change of ryanodine receptor mutation (G4946E) in diamondback moth populations	Yuki Itagaki, Shoji Sonoda	宇都宮大学	Journal of Pesticide Science	2017	8	42(3)	116-118

31	①	回転式散布塔に代わる散布装置の構築	國本佳範、今村剛士、土井誠、中野亮平、刑部正博	奈良県農業研究開発センター、静岡県農林技術研究所、京都大学	日本応用動物昆虫学会誌		2017	8	61(3)	192-194
32	②	イネウンカ類におけるピメトロジンに対する感受性検定法の開発	真田幸代・松村正哉	農研機構九州沖縄農業研究センター	植物防疫		2017	9	71(9)	610-614
33	①	Optimal management strategy of insecticide resistance under various insect life histories: heterogeneous timing of selection and inter-patch	須藤正彬・高橋大輔・David A. Andow・鈴木芳人・山中武彦	農研機構 農業環境変動研究センター	Evolutionary Applications		2017	11	11(2)	271-283
34	①	Insecticide susceptibilities of the two rice planthoppers Nilaparvata lugens and Sogatella furcifera in East Asia, the Red River Delta, and the Mekong Delta	Matsumura M, Sanada-Morimura S, Otuka A, Sonoda S, Thanh DV, Chien HV, Tuong PV, Loc PM, Liu ZW, Zhu ZR, Li JH, Wu G, Huang SH.	農研機構九州沖縄農業研究センター	Pest Management Science		2017	11	74(2)	456-464
35	②	殺虫剤抵抗性管理を農業生産者へ分かり易く伝える仕組み作り	山本敦司	日本曹達(株)	JATAFFジャーナル		2018	9	6(9)	47-52
36	①	Optimal management strategy of insecticide resistance under various insect life histories: Heterogeneous timing of selection and interpatch dispersal.	須藤正彬	果樹茶業研究部門	Evolutionary Applications	10.1111/eva.12550	2018	2	11(2)	271-283
37	①	Selection for imidacloprid resistance and mode of inheritance in the brown planthopper, Nilaparvata lugens.	真田幸代	九州沖縄農業研究センター	Pest Management Science	10.1002/ps.5364	2019	1	未定	未定

(2) 学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	Structural determinants of selective and diverse target site actions of neonicotinoids.	Kazuhiko Matsuda	近畿大学	2014 Nicotinic acetylcholine receptor	2014	7
2	A R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit is associated with differential resistance to acetamiprid and imidacloprid in the Aphis gossypii	平田晃一, 清田隆太郎, 松浦明, 土田聡, 山本敦司, 岩佐孝男	日本曹達(株), 他	13th IUPAC INTERNATIONAL CONGRESS OF PESTICIDE CHEMISTRY	2014	8
3	Probing insect LGICs using selective ligands	Kazuhiko Matsuda	近畿大学	13th IUPAC INTERNATIONAL CONGRESS OF PESTICIDE CHEMISTRY	2014	8
4	ミナミキイロアザミウマ幼虫に対する殺虫剤の検定手法の検討	浜崎健児, 柴尾 学	大阪府立環境農林水産総合研究所	平成26年度日本応用動物昆虫学会中国支部例会	2014	10
5	奈良県のイチゴに寄生するナミハダニ黄緑型の殺ダニ剤感受性	國本佳範, 今川剛士	奈良県農業研究開発センター	日本ダニ学会 第23回大会	2014	10

6	Management of pesticide resistance based on heterogeneous field management and type of pests	Takehiko Yamanaka, Yoshito Suzuki	農業環境技術研究所	第62回アメリカ昆虫学会プログラム	2014	11
7	チャノコカクモンハマキにおける成虫期防除の試み	内山 徹, 小澤 朗人	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	日本茶業学会	2014	11
8	ワタアブラムシの薬剤感受性検定時の検定手法と虫体サイズの違いが感受性データに及ぼす影響	松浦明, 日高春美	宮崎県総合農業試験場	第88回九州病害虫研究会研究発表会	2014	11
9	営農指導機関で実施可能なQoI剤耐性イネいもち病菌の培地検定法	平八重一之, 笹谷孝英, 井上博喜, 川上 顕, 宮坂 篤	九州沖縄農業研究センター	日本植物病理学会九州部会第65回講演要旨	2014	11
10	宮崎県で発見されたネオニコチノイド抵抗性ワタアブラムシの抵抗性メカニズム(第29回農薬デザイン研究会)	平田晃一, 清田隆太郎, 松浦明, 土田聡, 山本敦司, 岩佐孝男	日本曹達(株), 他	日本農薬学会、農薬デザイン研究会	2014	11
11	三重県におけるQoI剤耐性イネいもち病菌の発生と対応について	黒田克利, 鈴木啓史	三重県農業研究所	日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会第25回シンポジウム	2015	1
12	トビイロウンカにおけるイミダクロプリド抵抗性原因遺伝子の同定	中村有希, 真田 幸代, 松村 正哉, 末次克行, 上樂 明也, 山本 公子, 野田 博明, 篠田 徹郎	農業生物資源研究所, 他	日本応用動物昆虫学会大会 第59回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨集	2015	3

13	ネオニコチノイド剤2剤のワタアブラムシに対する効果実態	岡本崇, 岩橋良典, 林恭弘	和歌山県農業試験場	第59回 日本応用動物昆虫学会大会 講演要旨集	2015	3
14	ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの遺伝子診断法の開発	土田聡, 平田晃一, 山本敦司, 岩佐孝男, 三代浩二	果樹研究所, 他	日本応用動物昆虫学会第59回大会 講演要旨	2015	3
15	宮城県におけるコナガ薬剤抵抗性遺伝子診断の試み	志賀沙智, 後藤千枝, 上杉龍士	中央農業総合研究センター	日本応用動物昆虫学会第59回大会 講演要旨集	2015	3
16	急速な進化はいつ起きる? 劣性遺伝子の突発的な顕在化	高橋大輔, 須藤正彬, 山中武彦	農業環境技術研究所	日本生態学会	2015	3
17	殺虫剤抵抗性管理における害虫生活史形質の重要性	須藤正彬, 高橋大輔, 山中武彦	農業環境技術研究所	日本生態学会	2015	3
18	三重県におけるQoI剤耐性イネいもち病菌の検出	鈴木啓史, 黒田克利, 辻朋子, 笹谷孝英, 鈴木文彦	九州沖縄農業研究センター	日本植物病理学会平成27年度日本植物病理学会大会	2015	3
19	小集会: 殺虫剤作用機構談話会「進化生態学的アプローチから薬剤抵抗性管理を考える」	山中武彦, 須藤正彬, 高橋大輔	農業環境技術研究所	日本応用動物昆虫学会	2015	3
20	静岡県のイチゴ産地におけるナミハダニの薬剤感受性	土井誠, 中野亮平, 土田祐大, 石川隆輔	静岡県農林技術研究所	第59回日本応用動物昆虫学会大会 講演要旨集	2015	3
21	点変異検出技術「1秒PCR」の開発—QoI剤耐性イネいもち病菌の遺伝子診断を例に—	早野由里子, 林敬子, 芦澤武人, 鈴木文彦	中央農業総合研究センター	日本植物病理学会	2015	3
22	粘着トラップに付着したコナガはどれぐらいの期間PCRに利用できるか?	上杉龍士, 日本典秀, 後藤千枝	中央農業総合研究センター	日本応用動物昆虫学会第59回大会 講演要旨集	2015	3
23	複数剤を有効に使った抵抗性管理: 害虫生活史と薬剤施用形態の重要性	須藤正彬, 高橋大輔, 山中武彦	農業環境技術研究所	日本応用動物昆虫学会	2015	3
24	薬剤耐性イネいもち病菌の動態を予測するシミュレーションモデルの作成	芦澤武人, 林敬子, 安田伸子, 早野由里子, 鈴木文彦	中央農業総合研究センター	日本植物病理学会	2015	3
25	紫外線(UV-B)照射による高設イチゴで発生するハダニ類の密度抑制効果	石川隆輔, 土井誠, 中野亮平, 刑部正博, 八谷佳明, 桜井尚史, 安川茂	静岡県農林技術研究所, 京都大学, 他	第20回農林害虫防除研究会大分大会 講演要旨	2015	7
26	Molecular mechanisms for diverse actions and selectivity of neonicotinoids.	K. Matsuda	近畿大学	250th American Chemical Society National Meeting & Exposition	2015	8
27	Structural, functional and mutagenesis studies identify components of neonicotinoid binding to nicotinic receptors and facilitate prediction of resistance.	K. Matsuda	近畿大学	Resistance2015	2015	9
28	イチゴのナミハダニ黄緑型の簡易感受性検定法	國本佳範, 今村剛士	奈良県農業研究開発センター	第24回日本ダニ学会	2015	9

29	静岡県のイチゴで発生しているナミハダニの薬剤感受性	土井誠, 中野亮平, 石川隆輔	静岡県農林技術研究所	第24回日本ダニ学会東京大会	2015	9
30	ポスター発表「空間的・時間的アレンジによる薬剤抵抗性管理の有効性:モデルシミュレーションによる各害虫タイプに対する効果の検証」	山中武彦, 須藤正彬	農業環境技術研究所	個体群生態学会	2015	10
31	Insecticide-resistance management for various insect life histories: Is a mixture strategy always the best choice?	Masaaki Sudo, Daisuke Takahashi, Yoshito Suzuki, David A. Andow, Takehiko Yamanaka	農業環境技術研究所	Entomological Society of America	2015	11
32	トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性の遺伝様式	真田幸代, 松村正哉	九州沖縄農業研究センター	第90回九州病害虫研究会研究発表会	2015	11
33	半数効果薬量 (ED50値) を算出可能なピメトロジンに対するウンカ類の新感受性検定法	真田幸代, 杉井信次, 辻本克彦, 松村正哉	九州沖縄農業研究センター	第90回九州病害虫研究会研究発表会	2015	11
34	ddRAD-seqによるコナガのジアミド剤抵抗性原因遺伝子のゲノムワイド解析	上樂明也, 桑崎誠剛, 宮本和久, 和田早苗, 山本公子	農業生物資源研究所	第38回日本分子生物学会年会	2015	12
35	ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの寄主別増殖数の比較	姫野和洋, 岡崎真一郎, 山崎真居, 松浦明, 土田聡	大分県農林水産研究指導センター	九州病害虫研究会第91回研究発表会(春季大会)	2016	2
36	ピーマン施設内の三尺ソルゴーに発生したアブラムシ類から確認された一次寄生蜂種	岡崎真一郎, 井上美樹, 上杉龍士, 長坂幸吉	大分県農林水産研究指導センター	九州病害虫研究会第91回研究発表会(春季大会)	2016	2
37	佐賀県における2013~15年のQoI剤耐性イネいもち病菌の発生状況	菖蒲信一郎, 稲田 稔, 渡邊幸子, 山口純一郎	佐賀県農業試験研究センター	九州病害虫研究会	2016	2
38	ddRAD-seqによるタイと日本のコナガのジアミド剤抵抗性原因遺伝子のゲノムワイド探索	上樂明也, 桑崎誠剛, 宮本和久, 和田早苗, 山本公子	農研機構 生物機能利用研究部門	第60回日本応用動物昆虫学会大会	2016	3
39	QoI剤の出荷量統計に基づきいもち病菌の耐性菌発生要因の分析	鈴木文彦, 光永貴之, 芦沢武人	中央農業総合研究センター	日本植物病理学会	2016	3

40	QTL解析によるピリダベン抵抗性遺伝子のナミハダニゲノムへのマッピング	刑部正博, 杉本直也, 井尻悠士, 上樂明也, Sabina Bajda, Thomas Van Leeuwen	京都大学	日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会	2016	3
41	チャノココクモンハマキにおけるジアシルヒドラジン系IGR剤抵抗性原因遺伝子の解析	浅野美和, 上樂明也, 内山徹, 末次克行, 大門高明, 小林徹也, 小澤朗人, 秋田岳, 篠田徹郎	農業生物資源研究所、静岡県農林技術研究所茶業研究センター	日本応用動物昆虫学会大会	2016	3
42	チャノココクモンハマキにおけるジアシルヒドラジン系IGR剤抵抗性機構解析	浅野美和, 上樂明也, 内山徹, 末次克行, 大門高明, 小林徹也, 小澤朗人, 秋月岳, 篠田徹郎	農業生物資源研究所、静岡県農林技術研究所茶業研究センター	日本農薬学会大会	2016	3
43	ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシのきゅうり上の増殖率	松浦明, 日高晴美, 土田聡	宮崎県総合農業試験場	日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会	2016	3
44	ワタアブラムシの薬剤抵抗性遺伝子診断のための黄色水盤液の検討	岡本崇, 土田聡	和歌山県農業試験場	日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会	2016	3
45	遺伝子重複を考慮したコナガのリアノジン受容体G4946E部位のジェノタイプング	園田昌司	宇都宮大学	日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会合同大会	2016	3
46	三重県におけるQoI剤耐性およびMBI-D剤耐性イネいもち病菌のハプロタイプ	鈴木啓史, 黒田克利, 辻 朋子, 林敬子, 早野由里子, 鈴木文彦	三重県農業研究所	日本植物病理学会	2016	3
47	神経系作用化合物の作用機構に関する研究(殺虫剤抵抗性について)	平田晃一	日本曹達株式会社	第61回応用動物昆虫学会大会、小集会「殺虫剤作用機構談話会」	2016	3
48	大分県におけるネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの発生実態	岡崎真一郎, 姫野和洋, 井上美樹, 山崎真居, 土田聡	大分県農林水産研究指導センター	日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会	2016	3
49	長野県内で採集したコナガのジアミド系殺虫剤等に対する薬剤感受性	北林 聡, 杉山 薫, 山戸 潤, 桑澤久仁厚, 野口 忠久, 吉沢 栄治	長野県野菜花き試験場	第60回日本応用動物昆虫学会大会	2016	3
50	薬剤耐性イネいもち病菌の動態予測モデルによる実発生要因の解析	芦沢武人, 早野由里子, 林敬子, 安田伸子, 鈴木文彦	中央農業総合研究センター	日本植物病理学会	2016	3
51	Mode of inheritance of insecticide resistance to imidacloprid in the brown planthopper, Nilaparvata lugens	Sachiyo Sanada-Morimura, Tomohisa Fujii, Masaya Matsumura	農研機構 九州沖縄農業研究センター	XXV International Congress of Entomology	2016	9
52	Reduction of clothianidin and thiamethoxam susceptibilities under selection pressure by imidacloprid in the brown planthopper, Nilaparvata lugens	Tomohisa Fujii, Sachiyo Sanada-Morimura, Masaya Matsumura	農研機構 九州沖縄農業研究センター	XXV International Congress of Entomology	2016	9

53	Status of migration, insecticide resistance and virulence to resistant rice varieties in the brown planthopper in Asia	Masaya Matsumura, Hideshi Yasui	農研機構 九州沖縄農業研究センター	XXV International Congress of Entomology	2016	9
54	イネいもち病菌のQoI剤耐性変異のLAMP-FLP法による検出	鈴木啓史, 川上拓, 黒田克利, 牧文典, 木谷雅和, 鈴木文彦	三重県農業研究所	日本植物病理学会関西部会	2016	9
55	高設イチゴのハダニ類に対するUV-B照射の密度抑制効果	石川隆輔, 土井誠, 中野亮平	静岡県農林技術研究所	第21回農林害虫防除研究会山梨大会	2016	9
56	全国のチャ産地におけるチャノコカクモンハマキの殺虫剤感受性	内山 徹, 山下幸司, 上室 剛, 小澤朗人	静岡県農林技術研究所茶業研究センター他	第21回農林害虫防除研究会・山梨大会	2016	9
57	エマメクチン安息香酸塩に対する感受性が低下したナミハダニ黄緑型個体群の発育および遺伝様式	今村剛士, 國本佳範	奈良県農業研究開発センター	第25回日本ダニ学会札幌大会	2016	10
58	Realistic dose-response model for pesticide resistance management (殺虫剤抵抗性管理戦略のための現実的な薬剤濃度-死亡率を組み込んだモデルシミュレーション)	須藤正彬, 山中武彦	農研機構 農業環境変動研究センター	第32回個体群生態学会大会	2016	11
59	Relationships between imidacloprid resistance and life history traits in the brown planthopper, Nilaparvata lugens	藤井智久, 真田幸代, 松村正哉	農研機構 九州沖縄農業研究センター	第32回個体群生態学会大会	2016	11
60	デスクトップ型次世代シーケンサ MiSeq を用いたコナガの殺虫剤抵抗性大規模遺伝子診断法プロトタイプの開発	上樂明也, 桑崎誠剛, 宮本和久, 山本公子	農研機構生物機能利用研究部門	第39回日本分子生物学会年会	2016	11
61	トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性選抜に伴う他剤に対する交差抵抗性と生活史形質の変化	藤井智久, 真田幸代, 松村正哉	農研機構 九州沖縄農業研究センター	第92回九州病害虫研究会(秋季大会)	2016	11
62	殺虫剤抵抗性遺伝子が異なるワタアブラムシに対する各種殺虫剤の殺虫効果	松浦明, 土田聡, 日高晴美	宮崎県総合農業試験場	九州病害虫研究会第92回研究発表会(秋季大会)	2016	11
63	福岡県のQoI剤耐性イネいもち病菌発生地域における代替防除体系の効果検証	石井貴明, 菊原賢次, 國丸謙二	福岡県農林業総合試験場病害虫部病害虫チーム	平成28年度日本植物病理学会大会 講演要旨	2016	3
64	長野県におけるコナガのジアミド系殺虫剤抵抗性の実態と対策「温故知新」古くて新しい対策 BT剤への期待」	北林 聡	長野県野菜花き試験場	日本生物的防除協議会シンポジウム	2017	2
65	殺虫剤抵抗性原因遺伝子の探索における次世代シーケンス解析	上樂明也	農研機構 生物機能利用研究部門	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
66	キャベツ苗灌注処理剤のコナガに対する効果	北林 聡・桑沢久仁厚・野口忠久・山戸 潤・山田和義	長野県野菜花き試験場	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
67	チャノコカクモンハマキにおけるジアシルヒドラジン系IGR抵抗性の遺伝子診断技術開発	浅野 美和, 上樂明也, 内山 徹, 小澤朗人, 秋月 岳, 篠田 徹郎	農研機構生物機能利用研究部門、静岡県農林技術研究所茶業研究センター	日本農薬学会	2017	3

68	チャノコカクモンハマキにおけるジアシルヒドラジン系IGR抵抗性機構の解明	浅野 美和, 内山 徹, 石塚 千遥, 上樂 明也, 小澤 朗人, 秋月 岳, 中川 好秋, 篠田 徹郎	農研機構生物機能利用研究部門、静岡県農林技術研究所茶業研究センター	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
69	複合抵抗性チャノコカクモンハマキにおける交差抵抗性の解析	内山 徹, 小澤 朗人	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
70	殺虫剤感受性の低下を示さないネオニコチノイドおよび合成ピレスロイド剤抵抗性遺伝子保有ワタアブラムシの作出	松浦明・日高春美・土田聡・平田晃一・山本敦司	宮崎県総合農業試験場	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
71	防虫ネットによるワタアブラムシ侵入阻止効果の検討	岡本崇	和歌山県農業試験場	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
72	施設密閉高温処理によるネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの防除	井口雅裕	和歌山県農業試験場	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
73	ネギアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性原因遺伝子の解析と遺伝子診断技術の開発	上樂明也, 桑崎誠剛, 飯田博之, 武田光能, 太田泉, 草野尚雄, 高木素紀, 柴尾学, 城塚可奈子, 武澤友二, 岩崎暁生	農研機構 生物機能利用研究部門	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
74	イチゴ育苗圃と本圃におけるナミハダニの薬剤感受性の差	土井誠、中野亮平、石川隆輔、片山晴喜	静岡県農林技術研究所	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
75	ナミハダニ黄緑型におけるエマメクテン安息香酸塩抵抗性個体群および感受性個体群の増殖能力	今村剛士、國本佳範	奈良県農業研究開発センター	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
76	高設イチゴのハダニ類に対するUV-B照射による密度抑制効果の検証	石川隆輔、土井誠、中野亮平、片山晴喜	静岡県農林技術研究所	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
77	セジロウンカ・ヒメトビウンカのフィプロニル抵抗性におけるGABA受容体A2' N変異の検出法の改良と抵抗性とA2' N変異の相関の解析	秋月 岳・中村有希・眞田幸代・松村正哉・桑崎誠剛・横井 翔・上樂明也・山本公子・篠田 徹郎	農研機構生物機能利用研究部門	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
78	トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性発達に伴う生活史形質への負の影響	藤井智久・眞田幸代・松村正哉	農研機構九州沖縄農業研究センター	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
79	九州地域におけるイネウンカ類のピメトロジンに対する感受性の動向	眞田幸代・藤井智久・松村正哉	農研機構九州沖縄農業研究センター	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
80	解毒分解酵素遺伝子過剰発現による殺虫剤抵抗性発達の分子メカニズムの解析	横井 翔・中村有希・上樂明也・山本公子・篠田徹郎・秋月 岳	農研機構生物機能利用研究部門	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
81	薬剤抵抗性管理のための濃度－死亡率反応曲線明示型モデル	須藤正彬・山村光司・山中武彦・高橋大輔	農研機構 果樹茶業部門	第61回日本応用動物昆虫学会大会	2017	3
82	気門封鎖剤の加用がピフルブミド・フェンピロキシメート剤のナミハダニ黄緑型に対する殺ダニ効果に及ぼす影響	今村剛士、國本佳範	奈良県農業研究開発センター	第59回関西病虫害研究会大阪大会	2017	5

83	Resistant mechanisms and development of a molecular diagnosis method to an ecdysteroid agonist, tebufenozide, in the smaller tea tortrix, <i>Adoxophyes honmai</i> .	Miwa Uchibori-Asano, Akiya Jouraku, Toru Uchiyama, Chiharu Ishizuka, Akihito Ozawa, Gaku Akizuki, Yoshiaki Nakagawa, Tetsuro Shinoda	農研機構生物機能利用研究部門、静岡県農林技術研究所茶業研究センター	The 3rd International Insect Hormone Workshop 2017	2017	7
84	Rapid evolution of imidacloprid resistance in the brown planthopper, <i>Nilaparvata lugens</i> : influences of the cross resistance and life history traits.	Fujii T, Sanada-Morimura S, Matsumura M	農研機構九州沖縄農業研究センター	15th International Auchenorrhyncha Congress and 10th International Workshop on Leafhoppers and Planthoppers of Economic Importance	2017	7
85	次世代シーケンス解析による農業害虫の殺虫剤抵抗性原因遺伝子探索について	上樂明也	農研機構 生物機能利用研究部門	バイオインフォマティクス勉強会	2017	9
86	全国のチャ産地におけるチャノコカクモンハマキの殺虫剤感受性(続報)	内山 徹, 浅野(内堀) 美和, 秋月岳, 小澤 朗人	静岡県農林技術研究所茶業研究センター、農研機構生物機能利用研究部門	第22回農林害虫防除研究会岩手大会	2017	9
87	イチゴにおけるナミハダニの薬剤抵抗性の圃場内分布と推移	土井誠、中野亮平、石川隆輔、片山晴喜	静岡県農林技術研究所	第26回日本ダニ学会鹿児島大会	2017	9
88	防除方法の違いがナミハダニ黄緑型の薬剤抵抗性遺伝子頻度に及ぼす影響	今村剛士、國本佳範、井村岳男	奈良県農業研究開発センター	第26回日本ダニ学会鹿児島大会	2017	9
89	An update on <i>Tetranychus urticae</i> SSR linkage maps and distribution of scaffolds in the linkage groups	Osakabe, M.	京都大学	9th Spider Mite Genome Meeting	2017	10
90	エトキサゾール抵抗性ナミハダニの代替防除手段としての気門封鎖剤: 土耕イチゴでの検証	須藤正彬、中野亮平、土井 誠、今村剛士、國本佳範、刑部正博	農研機構果樹茶業研究部門、静岡県農林技術研究所、奈良県農業研究開発センター、京都大学	第26回日本ダニ学会鹿児島大会	2017	10
91	QTL mapping of genes associated with high-level cyflumetofen resistance in Japanese <i>Tetranychus urticae</i> population	Takahashi, A., M. Osakabe	京都大学	9th Spider Mite Genome Meeting	2017	10
92	全国のチャ産地におけるチャノコカクモンハマキの殺虫剤感受性	内山 徹, 浅野(内堀) 美和, 秋月岳, 小澤 朗人	静岡県農林技術研究所茶業研究センター、農研機構生物機能利用研究部門	日本茶業学会研究発表会	2017	11
93	NGS analysis of insect pests for effectively diagnosing insecticide resistance in field populations	Akiya Jouraku	農研機構 生物機能利用研究部門	2017 International Conference on Management of Destructive Agricultural Pests Spodoptera (Noctuidae)	2017	11
94	薬剤抵抗性のメカニズムと管理に向けた試み	園田昌司	宇都宮大学	四国植物防疫研究協議会大会	2017	11

95	コナガのジアミド剤抵抗性	日本典秀	農研機構 中央農業研究センター	シンポジウム「薬剤抵抗性害虫の次世代管理体系構築に向けて」	2017	11
96	次世代シーケンサーやゲノム情報を利用した昆虫研究	横井 翔	農研機構生物機能利用研究部門、静岡県農林技術研究所茶業研究センター	第40回分子生物学会年会 ワークショップ	2017	12
97	概要ゲノム配列を用いたチャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性関連遺伝子の解析	上樂 明也	農研機構生物機能利用研究部門、静岡県農林技術研究所茶業研究センター	第40回分子生物学会年会	2017	12
98	コナガの長距離移動の実態と生態学的な意味	上杉龍士	東北農業研究センター	第62回日本応用動物昆虫学会大会	2018	3
99	コナガの薬剤感受性試験の文献の活用ー試験・データ公表・文献解析の仕方	上杉龍士	東北農業研究センター	第62回日本応用動物昆虫学会大会	2018	3
100	一般化線形混合モデルによる各種殺虫剤のコナガに対する殺虫効果の推移と現状の解析	上杉龍士	東北農業研究センター	第71回北日本病害虫研究発表会	2018	2
101	RNA-seqによるチャノコカクモンハマキにおけるジアミド系殺虫剤抵抗性原因遺伝子の探索	横井 翔	生物機能利用研究部門	第62回日本応用動物昆虫学会大会	2018	3
102	チャ寄生チャノコカクモンハマキの殺虫剤抵抗性とその管理に関する研究	内山徹	静岡県茶業研究センター	第62回日本応用動物昆虫学会大会	2018	3
103	チャノコカクモンハマキのジアミド剤抵抗性系統作出による交差抵抗性の解明	内山徹	静岡県茶業研究センター	日本茶業学会研究発表会	2018	11
104	ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断法の改良と有効性の検証	土田聡	果樹茶業研究部門	第62回日本応用動物昆虫学会大会	2018	3
105	神経系作用化合物の作用機構と抵抗性	平田晃一	日本曹達(株)	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
106	殺虫剤抵抗性リスクコミュニケーションをはじめようー論点整理ー	山本敦司	日本曹達(株)	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
107	殺虫剤抵抗性リスクコミュニケーション(Part 2) 研究者の叫び!	山本 敦司	日本曹達(株)	第23回農林害虫防除研究会大会	2018	6
108	ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの交配試験から推察される新たな抵抗性発現メカニズム	竹原剛史	宮崎県総合農業試験場	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
109	和歌山県におけるネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの発生状況と採集法	岡本崇	和歌山県農業試験場	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
110	施設密閉高温処理によるアザミウマ類密度抑制効果と天敵類に及ぼす影響	井口雅裕	和歌山県農業試験場	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
111	ハダニ類防除技術の最近の動向と殺ダニ剤抵抗性管理	山本敦司	日本曹達(株)	第27回日本ダニ学会大会	2018	10

112	ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの薬剤感受性と生物学的性質	松浦明	宮崎県総合農業試験場	平成29年度常緑・落葉果樹病害虫研究会虫害分科会	2018	3
113	夏ネギ栽培でのネギアザミウマにおける合成ピレスロイド系剤抵抗性個体の割合の推移	窪田直也	茨城県農業総合センター	茨城県病害虫研究会2018年度研究発表会	2018	6
114	夏ネギ栽培でのネギアザミウマにおける合成ピレスロイド系剤抵抗性個体の割合の推移	窪田直也	茨城県農業総合センター	平成30年度関東東海北陸病害虫部会	2018	11
115	アザミウマ類の薬剤感受性検定手法の開発と大阪府における感受性の現状	柴尾学	大阪府立環境農林水産総合研究所	平成29年度常緑・落葉果樹病害虫研究会虫害分科会	2018	1
116	ネギアザミウマの薬剤抵抗性系統にみられる適応度コストの検出	飯田博之	野菜花き研究部門	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
117	ネギアザミウマのジノテフラン抵抗性原因遺伝子の探索	上樂明也	生物機能利用部門	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
118	茨城県のネギアザミウマにおける生殖型と薬剤感受性との関係	高木素紀	茨城県農業総合センター	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
119	異なる餌での累代飼育がネギアザミウマの生殖型と薬剤感受性に及ぼす影響	城塚可奈子	大阪府立環境農林水産総合研究所	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
120	ピフルブミド・フェンピロキシメート水和剤と脂肪酸グリセリド乳剤混用によるナミハダニ黄緑型に対する殺虫効果向上	土井誠	静岡県農林技術研究所	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
121	紫外線(UV-B)照射による物理的防除および化学的防除がイチゴのナミハダニ個体群の薬剤抵抗性遺伝子頻度に与える影響	中野亮平	奈良県農業研究開発センター	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
122	紫外線(UVB)照射と光反射資材を組合わせたイチゴのハダニ類防除	土井誠	静岡県農林技術研究所	第23回農林害虫防除研究大会	2018	6
123	イチゴにおける紫外線照射がナミハダニ黄緑型のエマメクテン安息香酸塩感受性に与える影響	土井誠	静岡県農林技術研究所	東海4県連携虫害研究会	2018	9
124	イチゴにおける紫外線照射がナミハダニ黄緑型のエマメクテン安息香酸塩感受性に与える影響	土井誠	静岡県農林技術研究所	第27回日本ダニ学会大会	2018	10
125	ハダニ類の感受性検定～生物検定～	今村剛士	奈良県農業研究開発センター	平成29年度常緑・落葉果樹病害虫研究会虫害分科会	2018	1
126	ヒメトビウカカのフィプロニル抵抗性へのGABA受容体のA2' N変異の関与	秋月岳	九州沖縄農業研究センター	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3
127	キャピラリーDNAシーケンサーを用いた抵抗性頻度推定の統計モデル	須藤正彬	果樹茶業研究部門	第62回応用動物昆虫学会大会	2018	3

128	Descriptive simulation model of diamondback moth for the pesticide resistance management.	山中武彦	農業環境変動研究センター	2018 ESA, ESC, and ESBC Joint Annual Meeting	2018	11
129	Mechanisms of resistance evolution under spatially heterogeneous selection pressure: an explicit dose-response model approach.	須藤正彬	果樹茶業研究部門	2018 ESA, ESC, and ESBC Joint Annual Meeting	2018	11
130	殺虫剤抵抗性への理論的アプローチ:複数剤を組み合わせた発達遅延手法の評価	須藤正彬	果樹茶業研究部門	平成29年度常緑・落葉果樹病害虫研究会虫害分科会	2018	1
131	チャノコカクモンハマキのジアミド剤抵抗性	内山徹	静岡県茶業研究センター	普及指導員研修	2018	4
132	チャ害虫における薬剤抵抗性と適正な農薬の使用	内山徹	静岡県茶業研究センター	JA遠州中央・病害虫防除講習会	2018	7
133	チャ害虫における薬剤抵抗性と効果的な防除	内山徹	静岡県茶業研究センター	JA遠州夢咲・茶づくり塾	2018	8
134	チャ害虫における薬剤抵抗性と効果的な防除	内山徹	静岡県茶業研究センター	JALみず・病害虫防除研修会	2018	10
135	病害虫防除の指導と実践における薬剤抵抗性管理の課題	山本敦司	日本曹達(株)	第7回中央農研オープンラボ活用促進セミナー	2018	3
136	害虫や病害はどうして農薬に強くなるのか -薬剤抵抗性対策を生産者へ伝えよう-	山本敦司	日本曹達(株)	神奈川県営農指導協議会 平成30年度病害虫防除技術向上対策・農薬適正使用研修会	2018	8
137	害虫や病害はどうして農薬に強くなるのか -薬剤抵抗性対策を生産者へ伝えよう-	山本敦司	日本曹達(株)	高知県植物防疫協会	2018	10
138	害虫や病害はどうして農薬に強くなるのか -薬剤抵抗性対策を生産者へ伝えよう-	山本敦司	日本曹達(株)	愛知県植物防疫協会 平成30年度植物防疫研修会	2018	12
139	茨城県のネギにおけるネギアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性発達状況	窪田直也	茨城県農業総合センター	第7回中央農研オープンラボ活用促進セミナー	2018	3
140	ネギアザミウマの薬剤抵抗性発達状況について	窪田直也	茨城県農業総合センター	関城ネギ部会栽培講習会	2018	8
141	ハダニの薬剤抵抗性と紫外線を用いた防除研究の現状	刑部正博	京都大学	平成30年度クミアイ安全防除推進協会技術普及部会現地研修会	2018	6
142	殺虫剤抵抗性発達を数理モデルで予測:複数剤を用いた管理戦略評価の基礎	山中武彦	農業環境変動研究センター	2019年 J IRAC技術研修会	2019	1
143	害虫における殺虫剤抵抗性の発達とその対策	土田聡	果樹茶業研究部門	平成30年度行政ニーズ対応研修(技術研修(果樹病害虫))	2018	9

(3) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌(学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	②	JATAFFジャーナル(ゲノムとトランスクリプトームを利用した新規害虫防除技術開発の展望)	神村学, 篠田徹郎	農業生物資源研究所	公益社団法人 農林水産・食 品産業技術振 興協会	2014	7
2	②	JATAFFジャーナル(昆虫ゲノム研究の新展開とその利用)	野田博明	農業生物資源研究所	公益社団法人 農林水産・食 品産業技術振 興協会	2014	7
3	②	農業及び園芸(静岡県の茶産地におけるチャノコカクモンハマキの殺虫剤抵抗性)	内山 徹, 小澤朗人	静岡県農林技術研究所茶業 研究センター	養賢堂	2015	4
4	③	和歌山県農林水産部農林水産総務課研究推進室 刊行物 平成26年度成果情報(ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシに対する有効薬剤と発生状況)	岡本崇	和歌山県農業試験場	和歌山県	2015	4
5	②	植物防疫(Paper-disc法:PCRのためのイネいもち病菌DNAの簡易調整法)	早野由里子, 林 敬子	農業生物資源研究所, 中央農 業総合研究センター	日本植物防疫 協会	2015	9
6	②	植物防疫(佐賀県におけるQoI剤耐性イネいもち病菌の発生とその対策)	稲田稔, 菖蒲信一郎	佐賀県農業試験研究センター	日本植物防疫 協会	2015	9
7	②	植物防疫(点変異検出技術—イネいもち病菌のQoI剤耐性変異の「1秒PCR」による検出)	林 敬子, 早野由里子	中央農業総合研究センター	日本植物防疫 協会	2015	9
8	②	植物防疫(福岡県におけるQoI剤耐性イネいもち病菌の発生とその対策)	石井貴明	福岡県農林業総合試験場	日本植物防疫 協会	2015	9
9	②	植物防疫(チャノコカクモンハマキにおけるテブフェンジド剤抵抗性の遺伝様式)	内山 徹, 小澤朗人	静岡県農林技術研究所茶業 研究センター	日本植物防疫 協会	2016	5
10	④	農業試験場ニュース(県内野菜産地におけるネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの発生状況)	岡本崇	和歌山県農業試験場	和歌山県	2016	7
11	②	植物防疫(植物防疫基礎講座:植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル2016(3)イネいもち病菌:QoI剤(遺伝子検定法))	鈴木文彦, 早野由里子, 林 敬子	中央農業研究センター	日本植物防疫 協会	2016	8
12	②	植物防疫(植物防疫基礎講座:植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル2016(5)イネいもち病菌:QoI剤(培地検定法))	鈴木啓史, 川上 拓, 黒田克利	三重県農業研究所	日本植物防疫 協会	2016	9
13	②	上杉龍士(粘着トラップから回収したコナガ成虫を用いた薬剤抵抗性遺伝子診断の可能性)	上杉龍士	農研機構 東北農業研究セン ター	日本植物防疫 協会	2017	3

14	②	北日本で越冬できないコナガは毎年どこからどのように飛来するのか？	上杉龍士	東北農業研究センター	ニューサイエンス社(昆虫と自然)	2018	1
15	④	ネギ栽培におけるネギアザミウマの生殖型分布と薬剤抵抗性の状況	窪田直也	茨城県農業総合センター	茨城県農業改良協会農業いばらき	2018	6

(4) 国内特許権等

区分: ①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日
		該当無し						

(5) 国際特許権等

区分: ①育成者権、②特許権、③実用新案権、④意匠権、⑤回路配置利用権

整理番号	区分	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	出願番号	出願年月日	取得年月日	出願国
		該当無し							

(6) 報道等

区分: ①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

整理番号	区分	記事等の名称	機関名	掲載紙・放送社名等	掲載年月日	備考
1	②	薬剤耐性が多様化	奈良県農業研究開発センター	日本農業新聞	2015.7.29	
2	①	殺虫剤抵抗性害虫の出現を防ぐ施用法をシミュレーションを駆使して再検討-複数殺虫剤の「世代内施用」と「世代間交互施用」の比較-	農業環境変動研究センター	日本農業新聞、化学工業日報、科学新聞、月刊情報紙「開拓情報」	2017.11.14	

(7) 普及に移しうる成果

区分: ①普及に移されたもの・製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの(複数選択可)。

整理番号	区分	成果の名称	機関名	普及(製品化)年月		主な利用場面	普及状況
1	③	イネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアル(v.1.1)	農研機構九州沖縄農業研究センター	2017	2	国内公設試等でのウンカ類薬剤検定試験	西日本の県で使用
2	③	イネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアル(英語版)(v.1.0)	農研機構九州沖縄農業研究センター	2017	6	ベトナム等のウンカ類周年繁殖地における薬剤検定試験	ベトナム研究所等でテキストとして使用中
3	②、③	薬剤抵抗性農業害虫管理のためのガイドライン案	生物機能利用研究部門	2019	3	害虫防除指導機関における抵抗性モニタリング、指導指針作成のための参照用	

(8)発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)の状況

整理番号	発表会の名称	機関名	開催場所	年月日	参加者数	備考
1	「プロジェクト研究成果発表会～QoI剤耐性イネいもち病菌の管理技術の高度化～」	中央農業研究センター	農研機構本部	2016.3.10	100	
2	普及指導員研修	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	2017.7.18	15	
3	IPM技術指導者養成研修会	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	静岡県農林技術研究所果樹研究センター	2017.9.8	50	
4	h Institute)における薬剤感受性検定講習会	農研機構九州沖縄農業研究センター	ベトナムPlant Protection Research Institute	2017.9.5	15	
5	ベトナムPlant Protection Research Institute)における遺伝子診断講習会	農研機構生物機能利用研究部門	ベトナムPlant Protection Research Institute	2017.9.14	12	
6	「ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発」成果発表会	農研機構生物機能利用研究部門	星陵会館ホール	2017.11.13	351	
7	「コナガおよびネギアザミウマの薬剤抵抗性遺伝子診断法」実技講習ワークショップ	生物機能利用研究部門	農林交流センター	2018/2/22	30	
8	平成29年度常緑・落葉果樹病害虫研究会虫害分科会	果樹茶業研究部門	つくば国際会議場	2018/1/30	100	農水委託プロ「薬剤抵抗性」における各種抵抗性害虫の遺伝子診断法の開発について発表

(9)アウトリーチ活動の状況

区分:①一般市民向けのシンポジウム・講演会及び公開講座・サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展・大学及び研究所等の一般公開への参画、③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	機関名	開催場所	年月日	参加者数	主な参加者	備考
1	①	ハダニ類の薬剤感受性検定法の習得	奈良県農業研究開発センター	奈良県農業研究開発センター	201451	30	普及指導員/病害虫防除所職員等	
2	①	北陸農政局薬剤耐性菌対策研修会講演要旨(イネいもち病及び各種灰色かび病の耐性菌検定の基礎と応用について)	三重県農業研究所	北陸農政局	20141126	70	植物防疫職員等	
3	①	「病害虫の薬剤抵抗性の評価について」(平成26年度病害虫防除所職員等中央研修(研修会))	中央農業総合研究センター	植物防疫所研修センター	2014129	39	病害虫防除所職員等	
4	①	第67回 全日本野菜品種審査会「キャベツ」話題提供	長野県野菜花き試験場	長野県野菜花き試験場	20161111	52	日本種苗協会、参加野菜種苗メーカー担当者、各県の研究職員	

5	①	JA佐久浅間(軽井沢) 栽培指導会・講演	長野県野菜花き試験場	JA佐久浅間(軽井沢)	20161214	30	JA佐久浅間会員
6	①	信州上田農協野菜部会員指導会講演	長野県野菜花き試験場	信州上田農協	2016125	30	信州上田農協 野菜部会員
7	①	病害虫の薬剤防除における薬剤選択と薬剤感受性検定について①(ハダニ類)	奈良県農業研究開発センター	奈良県農業研究開発センター	2015114	20	病害虫防除所職員等
8	①	北海道・東北地区植物防疫職員等技術研修会講演要旨(イネいもち病及び各種灰色かび病の耐性菌検定の基礎と応用について)	三重県農業研究所	東北農政局	2015125	50	植物防疫職員等
9	①	日本植物病理学会第11回植物病害診断教育プログラム(耐性菌検定法)	三重県農業研究所	神戸大学農学部	2015730	80	病害虫防除所職員等
10	①	植物防疫所病害虫情報(ハダニ類の薬剤感受性検定法の簡略化に向けた取り組み)	奈良県農業研究開発センター	奈良県ホームページ	2015111	100	病害虫防除所職員等
11	①	北筑前地域担い手・産地育成協議会 水稻研修会にて講演(水稻作の研修会にて、いもち病対策の講演でQoI剤抵抗性いもち病菌の対応について説明)	福岡県農林業総合試験場	北筑前地域普及指導センター	2016120	50	営農者等
12	①	三重県植物防疫協会平成27年度植物防疫講演会(ハダニの薬剤抵抗性問題と紫外線を利用した新たな防除法の開発)	京都大学	三重県農業大学校(三重県松阪市)	201622	100	病害虫防除所職員等
13	①	JAふくおか嘉穂特別栽培米部会 生産振興大会にて講演(いもち病を中心とした水稻病害対策の講演にてQoI剤抵抗性いもち病菌の今後の対応について解説)	福岡県農林業総合試験場	パドゥ・ドウ寿会館大ホール	2016316	200	営農者等
14	①	第26回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム	中央農業総合研究センター	岡山	2016324	60	病害虫防除所職員等
15	①	八女地域 H28年作水稻のいもち病対策にて技術指導(いもち病対策研修会にて「QoI剤抵抗性菌対策」について説明)	福岡県農林業総合試験場	JAふくおか八女広川支所	2016320	30	営農者等
16	①	平成28年度病害虫防除員研修会(ネオニコチノイド抵抗性ワタアブラムシの発生動向について)	和歌山県農業試験場	紀の川市、田辺市	2016511	29	病害虫防除所職員等
17	①	東京農業大学総合研究所研究会 生物的防除部会	長野県野菜花き試験場	東京農業大学	2016616	30	病害虫防除所職員等
18	①	東京農業大学総合研究所研究会生物的防除部会 平成28年度第1回講演会	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	東京農業大学	2016616	50	病害虫防除所職員等

19	①	静岡県イチゴ生産者大会(イチゴのハダニ類の生態と防除)	静岡県農林技術研究所	静岡県静岡市	201677	450	営農者等	
20	①	普及指導員研修	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	2016726	20	普及指導員等	
21	①	JAふくおか嘉穂良質米生産部会向けに講演(水稲病害対策の講演内で、Qol剤抵抗性いもち病菌の発生状況と今後の対応について説明)	福岡県農林業総合試験場	福岡県農林業総合試験場会議室	2016828	20	営農者等	
22	①	奈良県葛城イチゴ研究会栽培研修会(天敵によるイチゴのハダニ防除について)	奈良県農業研究開発センター	奈良県橿原総合庁舎	201683	12	営農者等	
23	①	東京農業大学総合研究所農薬部会セミナー(神経系作用化合物の作用機構に関する研究(殺虫剤抵抗性について))	日本曹達株式会社	東京農業大学	201691	150	病害虫防除所職員等	
24	①	東部地区いちご栽培講習会(ハダニを中心とした病害虫防除)	静岡県農林技術研究所	静岡県沼津市	20161012	80	営農者等	
25	①	奈良県環境保全型農業推進講演会(天敵を活かした害虫防除)	奈良県農業研究開発センター	リサイクル館かしはら	2016104	55	営農者等	
26	①	奈良県普及指導員(野菜担当)研修(イチゴのハダニの殺ダニ剤感受性とカブリダニ製剤を用いたハダニ防除)	奈良県農業研究開発センター	奈良県橿原総合庁舎	2016107	11	普及指導員等	
27	①	JA静岡経済連茶園防除対策研修会	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	静岡県農業会館	20161111	100	営農者等	
28	①	病害虫防除員研修(ハダニ類の生態と防除)	静岡県農林技術研究所	静岡県磐田市	2016111	45	病害虫防除所職員等	
29	①	平成28年度農薬アドバイザー研修会(県内のネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの発生状況)	和歌山県農業試験場	和歌山市	20161125	53	普及指導員等	
30	①	平成28年度病害虫防除所職員等中央研修(実践的な薬剤抵抗性病害虫管理について)	奈良県農業研究開発センター	神奈川県横浜市	2016127	50	病害虫防除所職員等	
31	①	日本植物防疫協会シンポジウム「薬剤抵抗性対策の新たな展開」(薬剤抵抗性管理を見据えた新規殺菌剤・殺虫剤の開発と普及)	日本曹達株式会社	東京、日本教育会館「一ツ橋ホール」	2017112	600	病害虫防除所職員等	
32	①	第6回青果フォーラム「農薬ローテーションと薬剤抵抗性の管理」	農研機構 果樹茶業研究部門	TKPガーデンシティ PREMIUM 秋葉原	20171013	107	一般農家、生協職員	
33	①	栽培指導会・講演	長野県野菜花き試験場	JA佐久浅間	20161214	60	一般農家、生産者団体	

34	①	九州病害虫防除推進協議会 創立47周年記念講話会	静岡県農林技術研究所茶業研究センター	福岡ガーデンパレス	2017518	100	企業、団体職員、大学、生産者団体、公務員	
35	①	ケーススタディから殺虫剤抵抗性管理を考える！	日本曹達(株)	明治大学	2018/8/4	200	大学生	第52回明治大学農学部昆虫セミナー