

うどんこ病菌の薬剤耐性機構と遺伝子診断

独立行政法人農業環境技術研究所 石井 英夫

はじめに

花、野菜類、緑化樹木のうどんこ病菌のうち、我が国で発生が報告されている薬剤耐性菌には、ウリ類うどんこ病菌のベンゾイミダゾール耐性菌 (OHTSUKA et al., 1991) やステロール脱メチル化阻害剤 (DMI 剤) 耐性菌 (OHTSUKA et al., 1988; 竹内・村田, 1988), イチゴうどんこ病菌の DMI 剤耐性菌 (中野ら, 1992) などがある。この他、果樹では既に報告のあるカキうどんこ病菌 (松本, 1981) のほか、ナシうどんこ病でベンゾイミダゾール系薬剤の効力低下が各地で指摘され、耐性菌が存在する可能性が濃厚である。また海外では、ブドウうどんこ病で DMI 剤耐性菌 (STEVA and CLERJEAU, 1990) の報告もある。

うどんこ病菌は一般に孢子形成量が多く、しかも世代交代に要する時間も短いことから、耐性菌発達のリスクが高い病原菌といえるが、薬剤耐性の分子遺伝学的な機構が明らかになっているものは比較的少ない。しかし、うどんこ病菌はべと病菌などととも、人工培養のできない純寄生菌 (絶対寄生菌) であることから、薬剤耐性機構の解明に基づく耐性菌の遺伝子診断が最も威力を発揮する場面と考えられる。

ここでは、筆者らが最近取り組んでいる、ウリ類うどんこ病菌のストロビルリン系薬剤耐性菌を中心に、耐性機構と遺伝子診断の実例を紹介する。なお、耐性菌発生の経過や遺伝子診断全般については既に報告がある (天野, 2000; 石井, 2000; ISHII, 2002; 石井, 2002a) ので、それらもあわせて参照願いたい。

I ストロビルリン系薬剤の作用機構と交差耐性

そもそもストロビルリン系薬剤の作用点は、菌のミトコンドリア内膜に存在するチトクローム bc_1 (複合体 III) であるとされ、薬剤がこのタンパク質に鍵と鍵穴のように結合する結果、ミトコンドリアにおける電子伝達、ひいては菌の呼吸が阻害される (SAUTER et al., 1995)。

Mechanism of Fungicide Resistance in Powdery Mildew and Gene Diagnosis of Resistance. By Hideo ISHII

(キーワード: ストロビルリン系薬剤, ステロール脱メチル化阻害剤, チトクローム b , ミトコンドリア DNA, PCR)

ストロビルリン系薬剤はアゾキシストロビン (商品名: アミスター) やクレソキシメチル (同: ストロビー) に代表されるが、これらの薬剤に対する耐性菌は、最近農業登録された同系統の薬剤、トリフロキシストロビン (同: フリント) にも交差耐性を示す。また、シモキサニルとの混合剤 (商品名: ホライズン) に含まれるファモキサドンは、化学構造の基本骨格は異なるものの、ストロビルリン系薬剤と同様、チトクローム b の Qo 部位に作用点をもつことから、最近はこれらをまとめて QoIs (Quinone outside inhibitors) と呼ぶようになってきている。国の内外で今後も新たな QoIs の開発が見込まれるため、この交差耐性の問題を植物防疫関係者は十分認識しておく必要がある。

II うどんこ病菌の薬剤耐性機構

1 ストロビルリン系薬剤耐性

キュウリなどウリ類のうどんこ病菌のストロビルリン系薬剤耐性菌では、コムギうどんこ病菌 (SIEROTZKI et al., 2000) やキュウリべと病菌 (ISHII et al., 2001) などの耐性菌と同様、薬剤作用点の変異が耐性に密接に関係すると考えられる (HEANEY et al., 2000; ISHII et al., 2001)。過去にベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌の多くで経験したように、普及後間もない薬剤に対して速やかに耐性菌が出現した場合、耐性機構として薬剤作用点の変異をまず疑ってみるのが、いわば常識である。これはストロビルリン系薬剤耐性菌の場合にも当てはまる。すなわちキュウリのうどんこ病菌やべと病菌で、チトクローム b 遺伝子の塩基配列を解析した結果、耐性菌からは点突然変異が見つかり、それによってコドン 143 のアミノ酸がグリシンからアラニンに置き換わっていると推定された (図-1)。この変異部位はちょうど、薬剤の結合にとって重要とされる箇所でもあることから、このアミノ酸置換によって、チトクローム b の薬剤に対する結合親和性が低下しているものと思われる。

ただし、うどんこ病菌の耐性菌の中には、この変異が見られない菌株も一部に存在するようなので、それらでは作用点変異以外の機構が関係している可能性がある。また、これまで我が国で見ついている耐性菌のほとんどは、ストロビルリン系薬剤を実用濃度で散布しても全く効果が見られないような、高いレベルの耐性をもって

いるが、アメリカでは耐性レベルの低い菌の存在が明らかになっており、それらの菌では、上述したようなチトクローム *b* 遺伝子の変異は確認されなかった (石井・McGrath, 未発表)。

なお、実験室内で人工的に選抜したストロビルリン耐性菌ではなく、実際に圃場から分離された耐性菌で、作用点変異以外の耐性機構が見つまっているのはこれまでのところ、ヨーロッパにおけるリング黒星病菌の一部だけである。この菌の場合、菌株によっては作用点変異ではなく、薬剤の分解、代謝が耐性化をもたらすことが報じられている (JABS et al., 2001)。

2 DMI 剤耐性

初期に開発されたトリアジメホン (商品名: バイレトン) のほか、その後登場したトリフルミゾール (同: トリフミン) などの DMI 剤に感受性が低下したものが、ウリ類うどんこ病菌 (浅利ら, 1994) やイチゴうどんこ病菌でしばしば検出されている。キュウリうどんこ病菌ではまた、テトラコナゾール (商品名: サルバトーレ ME) の効力を低下させる菌も最近見いだされている (石井, 2002 b)。

海外で発生しているブドウうどんこ病菌の耐性菌では、DMI 剤の作用点タンパク質であるステロール脱メチル化酵素の遺伝子に点突然変異が見つまっている (DeLye et al., 1997)。トリアジメノール感受性菌では、この酵素タンパク質の 136 番目のアミノ酸がチロシンであるが、resistance factor (Rf) が 10 以上の菌ではフ

ウリ類うどんこ病菌:	129	146
耐性菌 R-2:	...	FMGYGLPWGGMSFWAATV...
S-1:	...	FMGYGLPWGQMSFWGATV...
S-3:	...	FMGYGLPWGQMSFWAATV...
感受性菌 K-7-2*:	...	FLGYGLPYGQMSLWGATV...
Melon 1:	...	FLGYGLPYGQMSLWGATV...
キュウリべと病菌:		
耐性菌 R:	...	FMGYVLPWQMSFWAATV...
MAZ-1*:	...	FMGYVLPWQMSFWAATV...
A1-9:	...	FMGYVLPWQMSFWAATV...
感受性菌 S:	...	FMGYVLPWQMSFWGATV...
FS*:	...	FMGYVLPWQMSFWGATV...

図-1 ウリ類うどんこ病菌およびキュウリべと病菌のストロビルリン系薬剤耐性菌と感受性菌における、チトクローム *b* の推定アミノ酸配列 (コドン 129~146)

耐性菌の配列のうち、下線を施したのはアミノ酸置換が見られる部位、*全農営農・技術センターより分譲。

ェニルアラニンに置換していた。一方、Rf が 5 以下の菌では、このような点突然変異は見られなかった。フェニルアラニンは、チロシンと違って水酸基を欠くため、薬剤作用部位の疎水性が増して薬剤親和性が低下するのではないかと述べられている。また、このアミノ酸置換を伴う 1 塩基変異は、ASPCR (Allele-specific PCR, 対立遺伝子特異的 PCR) によって検出されている。

我が国でも、この点についてイチゴうどんこ病菌で調べられているが、今までのところ耐性菌にこの遺伝子変異は見いだされていない (後藤ら, 未発表)。さらに、ウリ類うどんこ病菌から、ステロール脱メチル化酵素遺伝子を検出する試みもまだ成功していない。

III 耐性の遺伝子診断

うどんこ病菌のような純寄生菌では通常、薬剤耐性の検定を鉢植え植物やリーフディスクを使って行う。しかし、試験用植物の準備ほかで作業が繁雑になるため、筆者らは現場から持ち帰った罹病植物サンプルを直接用いて、菌のストロビルリン耐性を迅速に遺伝子診断できる手法を開発している (石井ら, 2001 a; Ishii et al., in press)。

まず、べと病に罹って遊走子のうが形成されているキュウリから、直径 1 cm のディスクをコルクボーラーで打ち抜き、液体窒素存在下、乳鉢中で磨砕してパウダーにした後、市販のキット (QIAGEN 社製, DNeasy Plant Mini Kit) を使って DNA を抽出、精製した。次に、これを鋳型として PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) でチトクローム *b* 遺伝子の断片を増幅後、スピнкаラムで精製した PCR 産物を 37°C の条件下、制限酵素 *ItaI* で処理した。図-2 に見られるように、ストロビルリン感受性菌ではコドン 143 から 144 に相当する部分の塩基が GGTGCA であるが、耐性菌ではこれが GCTGCA のように 1 塩基だけ変異し、その結果 *ItaI* の認識部位 GCNGC (N の部位は ATGC のどの塩基でもよい) が

耐性菌:	<i>ItaI</i>
	↓
...	CCTTGGGGACAAATGAGTTTTGGGCTGCAACTGTTATTACTAA...
感受性菌:	...
	CCTTGGGGACAAATGAGTTTTGGGGTCAACTGTTATTACTAA...

図-2 キュウリべと病菌のストロビルリン系薬剤耐性菌と感受性菌におけるチトクローム *b* 遺伝子の部分塩基配列

下線を施した部分がチトクローム *b* のコドン 143 のアミノ酸に相当。耐性菌に見られる点突然変異は、制限酵素 *ItaI* によって特異的に認識される。

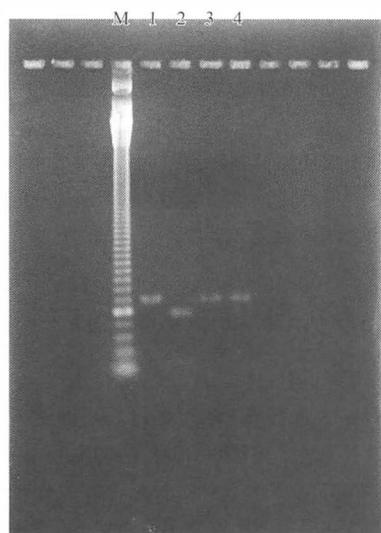


図-3 制限酵素 *Itai* で処理したキュウリべと病菌のチトクローム *b* 遺伝子の電気泳動パターン

M: マーカー(50 bp ラダー), 1: 耐性菌遺伝子/酵素無処理, 2: 耐性菌遺伝子/酵素処理, 3: 感受性菌遺伝子/酵素無処理, 4: 感受性菌遺伝子/酵素処理, 2でのみ, 酵素による切断が見られる。

生じている。この特徴的な塩基配列をもつチトクローム *b* 遺伝子を *Itai* で処理し、電気泳動すれば、耐性菌を特異的に検出して、感受性菌と識別することができるはずである。

耐性菌の PCR 産物は理論どおり *Itai* によって切断されて、2本のバンドになったが、感受性菌では *Itai* を処理してもこの酵素の認識部位がないため、バンドは1本のままであった(図-3)。この方法は、チトクローム *b* 遺伝子に同じ変異をもつ、キュウリうどんこ病菌の耐性菌にも応用できたほか、ナスすすかび病菌のように培養はできても生育の遅い菌についても、分離培養を行わずに罹病葉から耐性菌を直接診断することが可能であった(石井, 2002 a)。

IV うどんこ病菌の遺伝的多型

ウリ類うどんこ病菌のストロビルリン耐性菌が、予想よりはるかに速く出現した際、従来の菌 *Podosphaera fusca* (*Sphaerotheca fusca*) とは異なる別種の菌が広がり、たまたまその菌がもともと薬剤に非感受性であったために、ストロビルリン系薬剤の効果が得られなかったのではないかと、筆者はそのように考えた。しかし、菌の同定を依頼した、富山県立大の佐藤先生による形態観察の結果、この考えは打ち消された。また、筆者らの研究室で、TAKAMATSU and KANO (2001) のプライマーを用

EcoT141

↓

耐性菌 R-2: ...TTA CCT TGG GGA CAA...GCT GC...
 S-1: ...TTA CCT TGG GGA CAA...GGT GC...
 S-3: ...TTA CCT TGG GGA CAA...GCT GC...
 感受性菌 K-7-2*: ...TTA CCT TAT GGA CAA...GGT GC...
 Melon 1: ...TTA CCT TAT GGA CAA...GGT GC...
 135 136 143

図-4 ウリ類うどんこ病菌のストロビルリン系薬剤耐性菌と感受性菌におけるチトクローム *b* 遺伝子の部分塩基配列

耐性菌のコードン135~136に見られる配列は、制限酵素 *EcoT141* に特異的に認識される。*全農農機・技術センターより分譲。

いて、耐性菌と感受性菌の rDNA (リボソーム RNA 遺伝子) 断片を PCR で増幅し、そのホモロジーを比較した結果、*S. fusca* のものと 99~100% のレベルでよく一致した(石井ら, 2001 b)。さらに、キュウリ分離株における rDNA の ITS 領域は、制限酵素 *AhaI* の認識部位を一つ持つことが、HIRATA and TAKAMATSU (2001) によって報告されているが、耐性菌と感受性菌の両方に由来する PCR 産物とはともに、この酵素で明瞭に切断された。

それでも、キュウリべと病菌などとは大きく異なり、ウリ類うどんこ病菌のチトクローム *b* 遺伝子には著しい多型が見られた。すなわち、ストロビルリン耐性に深く関わりと予想されるコードン143の部分以外でも菌株によって、塩基配列やそれに基づく推定アミノ酸配列にしばしば違いが観察された(図-1, 4)。例えば、チトクローム *b* のコードン136のアミノ酸であるチロシンは、耐性菌ではトリプトファンに置換していた(この配列自体はべと病菌ほかの感受性菌にも見られるものであるため、直接耐性の原因になっているとは思えない)。そこで、このシークエンスの読みとり結果が正しいものであるかどうかを、制限酵素 *EcoT141* を用いて調べてみたところ、耐性菌のチトクローム *b* 遺伝子のみが特異的に切断され、データの正しさが証明された(石井ら, 2001 b; Isumi et al., 2001)。また、そればかりか、この酵素を使えば結果的に耐性菌を検出することができるという副産物まで得られた。

V うどんこ病菌のストロビルリン耐性はどの程度安定か?

ストロビルリン耐性が多い場合、チトクローム *b* 遺伝子の点突然変異によると考えられることから、しば

らくこのグループの薬剤を使用しなければ、いったんまん延した耐性菌の衰退現象が起こるのではないかと、当初は期待された。しかし、モニタリングの結果は、はじめはこの期待を裏切るものであった。茨城県明野町にあるキュウリ栽培農家のハウスでは、1998年秋にうどんこ病に対するストロビリリン系薬剤の効果が低下し、それ以降この系統の薬剤を使用しなかった。しかし、約2年後の2000年12月においても耐性菌が依然として優占していた(表1-A, 石井ら, 2001b; Ishii et al., in press)。

ところが、次作に当たる2001年6月の調査では様相が一変し、耐性菌が検出されなくなった(表1-B, 石井ら, 2001b)。同じ農家の別のハウスで2001年12月に行ったサンプリングでも、同様の結果であった。一時期ストロビリリン感受性菌を見つけ出すことができないほど耐性菌が増加したが、その後徐々にではあるが耐性菌の衰退が始まっているのではないだろうか? もしそうであれば、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の突然変

表-1 ストロビリリン系薬剤の使用を約2年間(A)または2年半(B)中止したキュウリハウスにおける薬剤耐性うどんこ病菌の分布の推移(リーフディスク法による検定)

菌 株	防 除 価				
	アゾキシストロビン濃度(有効成分, ppm)				
	0.01	0.1	1	10	100
(A) OMI-1	0	0	0	0	0
OMI-2	0	0	0	26.7	0
OMI-3	0	0	0	0	0
OMI-4	0	0	0	13.3	0
OMI-5	0	0	0	0	0
OMI-6	0	0	0	0	0
OMI-7	0	0	0	0	20.0
OMI-8	0	0	0	0	0
OMI-9	0	46.7	40.0	100	86.7
OMI-10	0	0	0	0	0
K-7-2*	100	100	100	100	100
(B) A 01-3-23	100	100	100	100	100
A 01-3-24	93.3	100	100	100	100
A 01-3-25	86.7	53.3	53.3	100	100
A 01-3-26	66.7	66.7	73.3	100	100
A 01-3-29	100	90.9	100	100	100
A 01-3-31	53.9	84.7	69.2	100	100
A 01-3-32	100	100	100	100	100
A 01-3-33	86.7	60	60	100	100
A 01-3-34	100	100	100	100	100
A 01-3-35	53.9	69.2	53.9	100	100
K-7-2*	100	100	100	100	100
R-2**	25	0	-25	75	100

* 標準感受性菌株(全農営農・技術センターより分譲), ** 標準耐性菌株。

異が菌にとって有害であると期待したこともあながち間違いではなかったことになる。ただし、他のハウスに耐性菌がまだ広く分布することも事実であるので、うどんこ病や、後に述べるべと病の防除に当たって、ストロビリリン系薬剤の使用再開の是非を議論するのはまだ時期尚早である。それにはまず農薬メーカーや試験場、病害虫防除所など関係機関による、耐性菌の広域モニタリングが欠かせない。

VI ヘテロプラスミーの高感度検出と生態研究への応用

チトクローム *b* は核DNAではなく、塩基置換速度がより速い(突然変異ししやすい) mtDNA にコードされる(宝来, 2001)。また、mtDNA は複数コピーからなり、ヒトでは変異型と正常型が混在するヘテロプラスミーが、病的状態に深く関与するとされる。そこで、これに関連した研究例を紹介しよう。

上記農家のハウスでは、べと病菌の耐性菌モニタリングも併行して実施しており、ストロビリリン系薬剤の使用を約1年間中止しても、耐性菌が依然として広く分布していた(石井ら, 2001b; Ishii et al., in press)。その後2001年の調査でも、ポット試験で見た限り、対照の感受性菌を除く供試12菌株はすべて耐性菌で、実用濃度のアゾキシストロビン剤に効果は認められなかった。ところが、PCRと制限酵素 *ItaI* を用いた遺伝子診断では、変異型(薬剤耐性型)DNAに比べて、*ItaI* で切断されない正常型(感受性型)DNAの割合が高く、当該薬剤の使用中止によって、べと病菌の集団のDNAが薬剤感受性側にシフトバックしていると推察された(石井ら, 2001b)。

すなわち、耐性菌が何らかの fitness penalty を負っている、つまり環境適応度の点で感受性菌よりも劣ることが再び期待されるわけである。あるいは、薬剤選択圧が除かれた結果、同一のミトコンドリア内で変異型DNAの占める割合がしだいに低下する、つまり正常型DNAに置き換わっていくのかもしれない。これを裏付けるかのように、イチゴ炭疽病菌やキュウリ褐斑病菌では、培地上で継代を繰り返すことによって、当初見られた変異型DNAが検出されなくなる現象が最近観察されている(石井ら, 2002)。

このように、病原菌を薬剤耐性という表現形質だけでなく、分子生態学的に解析することで、耐性菌の挙動や、耐性化をもたらす遺伝子の環境動態をより詳細に知ることができる。しかし、そのような研究のアプローチに、果たしてどのような実用的な意味があるのだろうか

表-2 キュウリうどんこ病菌のストロビリン系薬剤耐性菌と感受性菌に対するアゾキシストロビン製剤*の防除効果(ポット試験)

耐性菌:感受性菌	薬剤の防除価	対照区の発病度
1:0	-53.8	26.0
9:1	5.8	38.2
1:1	-9.4	28.0
1:9	54.1	47.3
1:99	89.6	48.0
0:1	100	43.6

* 実用濃度 (有効成分濃度 100 ppm).

か? うどんこ病菌で、耐性菌と感受性菌の孢子懸濁液を種々の比率で混合し、実用濃度のアゾキシストロビン剤を散布したキュウリ苗に接種した。すると、耐性菌と感受性菌の割合が1:9で薬剤の防除価は50程度であり、1:99でも薬剤の効果はいくぶん劣った(表-2)。したがって、変異型DNAを高感度に検出することは十分意味があると考えられた。そこで、菌のチトクローム*b*遺伝子をローダミン標識プライマーを用いてPCR増幅し、*ItaI*処理後、蛍光イメージアナライザーで解析したところ、変異型DNAが1%しか存在しない場合でも、これを検出することができた(石井ら, 2002)。

Ⅶ 残された課題

これまでほとんど、試験研究場面での利用に限られてきた耐性菌の遺伝子診断が、ようやく日常的なモニタリングなどにも使われ始めている。また、以前のように菌を分離、培養してからDNAを抽出、精製するのではなく、罹病植物の一部から直接菌のDNAを得て、耐性を診断することもはやさほど珍しくない。それらを可能にしたのはもちろん、耐性機構に関する分子遺伝学的な研究成果の蓄積と、PCRなど遺伝子操作手法の一般化、各種キットの商品化などがあったからである。耐性菌の出現は、関連する農薬メーカーにとって死活問題でもあることから、今後も遺伝子診断の利用が進むと予想される。

しかし、各地の試験場や病害虫防除所等でこれを行う場合、やはり診断に要する経費、例えば制限酵素やPCRに必須のDNAポリメラーゼなどの試薬代が、無視できない問題となろう。また、耐性の生物検定に比べればはるかに迅速ではあっても、電気泳動の操作は煩わしい。このため筆者は、遺伝子診断のさらなる普及には、より簡便で安価な方法の開発が必要と考えている。

引用文献

- 1) 天野徹夫 (2000): 日植病第10回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 35~42.
- 2) 浅利 寛ら (1994): 関東東山病虫研報 41: 69~75.
- 3) D'ELYE, C. et al. (1997): Appl. Environ. Microbiol. 63: 2966~2970.
- 4) HEANEY, S. P. et al. (2000): Proc. BCPC Conf. Pests & Dis. 2000: 755~762.
- 5) HIRATA, T. and S. TAKAMATSU (2001): J. Gen. Plant Pathol. 67: 1~6.
- 6) 宝来 聡 (2001): 新ミトコンドリア学, 共立出版, 東京, pp. 81~87.
- 7) 石井英夫 (2000): 日植病第10回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 43~51.
- 8) ISHII, H. (2002): Agrochemical Resistance: Extent, Mechanism, and Detection. American Chemical Society, Washington. D. C., USA. pp. 242~259.
- 9) 石井英夫 (2002 a): 日植病第12回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 53~60.
- 10) ——— (2002 b): 茨城県病虫研報 40: 印刷中.
- 11) ———ら (2001 a): 日植病報 67: 218 (講要).
- 12) ———ら (2001 b): 日植病報 68: 74 (講要).
- 13) ISHII, H. et al. (2001): Phytopathology 91: 1166~1171.
- 14) 石井英夫ら (2002): 日植病大会講要集: 561.
- 15) ISHII, H. et al.: Modern Fungicides and Antifungal Compounds III. Intercept Ltd. Andover, Germany. in press.
- 16) JABS, T. et al. (2001): Abstr. 13th Intr. Reinhardsbrunn Symp.
- 17) 松本恭昌 (1981): 関西病虫研報 23: 89 (講要).
- 18) 中野智彦ら (1992): 日植病報 58: 134 (講要).
- 19) OHTSUKA, N. et al. (1988): Ann. Phytopath. Soc. Japan 54: 629~632.
- 20) ——— et al. (1991): J. Pesticide Sci. 16: 271~273.
- 21) SAUTER, H. et al. (1995): Antifungal Agents: Discovery and Mode of Action. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK. pp. 173~191.
- 22) SIEROTZKI, H. et al. (2000): Pestic. Biochem. Physiol. 68: 107~112.
- 23) STEVA, H. and M. CLERJEAU (1990): Med. Fac. Landboww. Rijksuniv. Gent 55/3 a: 983~988.
- 24) TAKAMATSU, S. and Y. KANO (2001): Mycoscience 42: 135~139.
- 25) 竹内妙子・村田明夫 (1988): 日植病報 54: 389 (講要).

(26 ページから続き)

クロチアニジン剤 (殺虫剤: ダントツ, フルスウィン) 米 0.5 ppm, みかん 1 ppm, みかん以外のかんきつ類 2 ppm, 第一大粒果実類 0.5 ppm, 第二大粒果実類 0.5 ppm, 小粒果実類 5 ppm, 第二果菜類 2 ppm, いも類 0.1 ppm, 茶 50 ppm を追加。

ジノテフラン剤 (殺虫剤: スタークル, アルバリン) 米 0.5 ppm, みかん以外のかんきつ類 5 ppm, 第一大粒果実類 1 ppm, 第二大粒果実類 2 ppm, 小粒果実類 10

ppm, 第二果菜類 2 ppm, 第一葉菜類 2 ppm, 第二葉菜類 0.5 ppm, 根・莖類 0.2 ppm を追加。

2. 水質汚濁に係る農薬登録保留基準

クロチアニジン剤 (殺虫剤: 前出) 2 mg/l を追加。

ジノテフラン剤 (殺虫剤: 前出) 6 mg/l を追加。