

温州ミカンにおけるチオファネートメチル剤 耐性灰色かび病菌の出現とその防除¹⁾

橘 泰宣・大森 尚典

(愛媛県立果樹試験場)

松本 英紀

(愛媛県農業試験場)

石井 卓男

(愛媛県園芸農蚕課)

I 緒 言

カンキツ類の灰色かび病は、開花の中・終期から第一次生理落果期にかけて、本病菌繁殖花卉が果実表面へ接触もしくは、同菌汚染の離脱花卉が果実表面へ付着することにより傷害果を形成する(大串・関, 1972; Klotz, L.J., 1973)。特に温州ミカンにおいて、その花卉離脱が困難なことから長期にわたり同菌の感染を受け、被害が多くなることを大森・松本(1973)は指摘している。また、開花時の長雨や遅花の多い年では本病が多発して、汚染果が高頻度に発生し経済的損失が著しい。

このようなことから、本病の防除はペノミル剤やチオファネートメチル剤を用いて、5月中下旬の開花期や落花期に1~2回の散布が実行されているのが現状である。しかしながら、最近、愛媛県内の主要な栽培地帯で温州ミカンの灰色かび病に対して、ペノミル剤およびチオファネートメチル剤耐性菌に起因すると考えられる効力低下の現象が問題視されるようになった(橘, 1980)。

ペノミル剤およびチオファネートメチル剤耐性の灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)については、1971年に Bollen and Scholten(1971)がシクラメンにおいてその発生をはじめて報告して以来、施設栽培の果菜類で手塚・木曾(1975)、山本(1975)、竹内・長井(1976)が、その発生例を報告している。Maude(1980)によると他作物での発生例が分類整理されている。果樹ではブドウで高梨(1976)が報告している。

一方、温州ミカンにおける同菌の薬剤耐性については、国内外を問わず現在までその発生例の報告は皆無であった。このため著者らは1978年以来、県内における温州ミカンの灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)を対象にチオファネートメチル剤耐性菌の発生分布調査を中心に2, 3の研究を行ってきた。その結果、同剤耐性菌が確認されたので、現在までに得られた若干の研究結果を報告する。

本試験を行うに当たって、兵庫県農業総合センターの松尾綾男博士には供試菌の同定を賜わり、また元野菜試久留米支場の木曾皓博士からは一部供試菌の分譲を受けた。さらに、標本採取あるいはほ場試験等では当场南予分場の舟上和喜主任研究員および愛媛青果連の丹原克則氏並びに青果農協の技術員各位に多大のご協力を仰いだ。これらの方々に対して深甚なる謝意を表する次第である。

なお、本試験結果の一部は昭和55年度日本植物病理学会で報告した。

1) Occurrence of *Botrytis cinerea* resistant to thiophanate-methyl on Satsuma orange, *Citrus unshu* Marc., and its chemical control.

By Yasunobu TACHIBANA, Hisanori OOMORI, Hideki MATUMOTO and Takuo ISHII.
Proc. Assoc. Plant Protec. Shikoku, No. 19 : 41 ~ 54 (1984).

II 材料および方法

1 耐性菌の確認とその分布

1978~'79年の温州ミカンの開花期に、主要栽培地域から採取した本病罹病花卉および枯死花卉から病原菌をストレプトマイシン200ppm添加PSA平板上で常法によって分離したのち、耐性検定を行った。なお、花卉採取時の注意として、チオファネートメチル剤もしくはペノミル剤散布前のものを原則とした。検定用培地はPSA培地を用い、高圧滅菌後溶解して60°Cに調節し、チオファネートメチル剤を所定濃度になるように添加してよく攪拌しながらシャーレ平板とし、予めPSA平面培地で培養した菌叢片(径5mm)を移植して、25°C、4~5日間培養後に培地上での菌叢発育の有無を調査した。

1980年には、温州ミカン栽培農家で聞きとり調査した結果をもとに、チオファネートメチル剤の防除効果を維持している園ないしは今までに灰色かび病対策に同剤を散布したことがない園と同剤の効力減退が認められる園とに2分し、灰色かび病菌を花卉から採取し、ストマイ加用PSA培地で分離した。その後、分離菌をチオファネートメチル剤含有培地(添加濃度:基本的には1.0,10,100および1,000ppmの4段階)で検定した。培養は前記同様に行い、菌糸生育の有無で判定した。判定は、本剤濃度10ppm以下で生育阻止されるものを感性菌(S)とし、同濃度10~1,000ppmのものを中等度耐性菌(M)とし、1,000ppm以上のものを高度耐性菌(R)とした。

2 薬剤感受性値の検定

試験1:1979年から1980年にわたって分離保存していた116菌株を用いて、それらの薬剤感受性値を最小発育阻止濃度(MIC)によって求めた。検定は桜井(1975)の方法を参考にしてチオファネートメチル剤あるいはイプロジオン剤を10,486ppm以下順次2倍希釈で0.01ppmまで各段階の濃度になるようにした薬剤含有PSA培地を一定量シャーレに流しこみ、これに予め培養した供試菌叢片(径3~5mm)を1シャーレ当たり25株ずつ菌叢面を下にして配列移植した。25°C、5日後における菌糸発育の有無によって各菌株のMICを求めた。

このようにして得られた代表的なチオファネートメチル剤感性(S-4菌)および耐性(R-D1菌)の両菌株を用いて、薬剤添加濃度別の菌糸生育量を検討した。

試験2:0.1~5,000ppm(変則希釈)に調整したチオファネートメチル原体(アセトン希釈)含有PSA培地上に供試菌叢を移植して25°Cに保ち、3日後、発育菌叢の直径を測定し検定した。

試験3:試験1と同様の菌を用いて、沔紙円板法(菅原・古山,1965)により薬剤感受性値を求めた。すなわち、供試菌は予めPSA培地に20°C、10日間培養(3,000 lux 光培養)し、その産生胞子を適正な胞子濃度(10^4 個/ml)になるように殺菌水に懸濁した後、それぞれをPSAシャーレ平板上に噴霧接種した。さらに25°C、16時間の予備培養を行い、そこにチオファネートメチル剤含有沔紙円板(径6mm)を置床して、25°Cに保ち、21時間後の阻止円距離(mm)を測定した。沔紙含有薬剤濃度はチオファネートメチル原体を少量のアセトンで10,000ppm~0.15ppmの2倍段階希釈のものを設定した。

3 チオファネートメチル剤耐性菌の他種薬剤に対する反応

試験1:供試菌は、前項2に示したS-4菌とR-D1菌(チオファネートメチル剤耐性菌)を選んだ。他剤に対する反応は、これら供試菌を第4図に示したペノミル剤を含む5種の市販薬剤を所定量添加したPSA平板に移植し、25°Cで4日間培養して菌叢の発育を調べた。

別に、S-4菌、R-D1菌を用いて、第4表に示す9種の市販薬剤を所定量添加したPSA斜面培地(内径27mm)に移植し、上記と同一方法で培養後、菌叢の生育(cm)を測定した。

試験2:木曾(1975)の方法を参考にして温州みかん新葉を用いて、第5図に示した薬剤の所定濃度液に5分間浸漬し、風乾した後、予め培養していたR-D1菌の菌糸片(径5mm)を葉部中肋の両側に各1カ所接種し、25°C高湿度条件下に保持した。5日後に褐変病斑長および菌叢伸長を測定した。

別に、温州ミカン新葉および幼果を用いて、試験1に用いたと同様の9種薬剤を供試し、前記同様に試験した。ただし幼果試験では、供試果実は昇汞アルコール液で表面殺菌し、滅菌水で十分洗浄したものを、葉片法同様に試験を行い、1果に2箇所ずつ菌叢接種した。1処理区2シャーレとし、1シャーレ5果を用いた。調査は、新葉を用いた試験では、試験開始4日後に葉部の変色程度を、幼果試験では、10日後に接種菌叢下の果実表面の傷形成度を測定した。

4 耐性菌の病原性確認

試験1：培養菌糸片の樹上果実への接種

供試樹は当場内の温州ミカン成木(20年生)で、その樹上果にチオファネートメチル剤1,500倍、イプロジオン剤1,500倍を1980年7月10日に散布した後、7月16日に果実表面へ培養菌糸片をビニールテープを用いて各果2か所ずつ付着接種した(各区20果を供試した)。なお対照として無散布果実を用いた。供試菌は、R-D1菌(チオファネートメチル剤のMIC値1,000ppm以上)、R-78(同(MIC)78ppm)およびS-4菌(同(MIC)0.1ppm)の3菌とし、予めPSA平板上で25°C、5日間培養したものの菌叢先端部を5mm角に切り取って用いた。なお有傷接種の場合は7月9日に予め絵筆で果面を縦に沿って傷をつけた後と同様に試験した。果面の傷形成を7月23日に調査し、無、少、中、多、甚の5段階に分け、それぞれ罹病指数を0,1,3,5,7とし、傷形成度 = $\frac{\sum \text{罹病指数} \times \text{傷果数}}{\text{調査果数} \times 7} \times 100$ で表わした。

試験2：培養菌糸片の切除果への接種

同場の温州ミカン果実を用い、1980年7月10日に果梗を2~3cm残して切除したものを持ち帰り、25°C空調のガラス室内で以下の試験を各区30果を用いて行った。供試果実には直ちにイプロジオン剤の1,000倍、1,500倍および2,000倍液にそれぞれ浸漬し、風乾した後で水で湿らせたパーミュキュライト床のバットに果梗部分を挿し込んで置床した。別に対照として薬剤で処理しない果実を用いた。培養菌糸片(7mm角)を果面へ置き、バット全体を透明ラップで包み高湿度条件下に保ち、5日後果面の傷を試験1と同様に調査した。供試菌は試験1で用いたR-D1菌、R-78菌、S-4菌のほかに農水省野菜試験場久留米支場より分譲していただいたチオファネートメチル剤耐性ナス灰色かび病菌を加え検討した。

5 耐性菌発現場での薬剤効果

試験1：耐性菌による灰色かび病が花卉に激発しているビニールハウス栽培温州ミカン(愛媛果試南予分場の「宮川早生」28年生)を供試して、1980年4月から6月にかけて防除試験を実施した。供試薬剤はin vitroで耐性菌に効果のみられたビンクロゾリン剤1,000倍および1,500倍と慣行薬剤のチオファネートメチル剤1,000倍とし、1区3樹の規模で4月17日(落弁初期)に1樹15lの割合で散布した。調査は4月24日(落弁後期)に花卉発病を、6月6日(幼果期)に灰色かび病菌による傷害果を、それぞれ各区300個を対象に行った。

試験2：八幡浜市真穴の耐性菌検出率の高い地帯の露地栽培温州ミカン(「普通温州」41年生)を供試して1980年5月から7月にかけて試験を行った。第8図に示す薬剤を用いて1区3樹とし、5月20日(開花盛期)に散布した。2回散布区は5月26日に散布した。調査は5月27日(2回散布区の調査は5月31日)に花卉発病を、7月8日に幼果の傷害果について試験1と同方法で行った。

III 結 果

1 耐性菌の確認とその分布

第1表に示したように、県下主要栽培地域から分離された灰色かび病菌の中でチオファネートメチル剤に対する耐性菌株が高い頻度で出現していることが確認された。分離した160菌株のうち37%が本剤

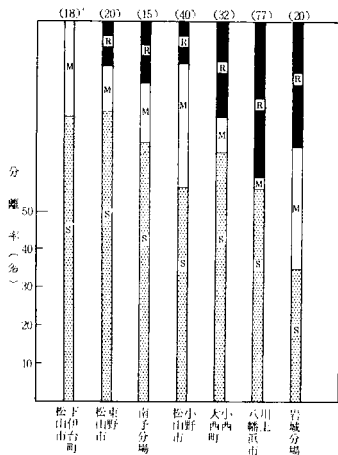
の10ppm以下で発育しない感性菌群として分離される一方、1,000ppmでも生育可能な耐性菌が96株(60%)分離された。分離の中には本剤の100ppm以上1,000ppm以下で生育が阻止される菌株が少数ながら認められた。

第1表 温州ミカン花卉より分離された*Botrytis*菌のチオファネートメチル剤耐性分布 (1978~'79)

| 採 集 場 所 | 分離菌数 | チオファネートメチル剤添加濃度(ppm) | | | | |
|--------------------------|------|----------------------|-----|----|-----|-------|
| | | 0.1 | 1.0 | 10 | 100 | 1,000 |
| 八幡浜市・真穴一青年農場 | 70 | 30* ¹ | 9 | 0 | 2 | 29 |
| 〃 一 大 下 | 22 | 2 | 0 | 0 | 1 | 19 |
| 〃 一 橋 本 | 20 | 2 | 1 | 0 | 0 | 17 |
| 中 島 町一石 原 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| 〃 一 阿 部 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 吉田町* ² (果試分場) | 9 | 2 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 松山市 (果試本場) | 17 | 13 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| (計) | 160 | 49 | 10 | 0 | 5 | 96 |

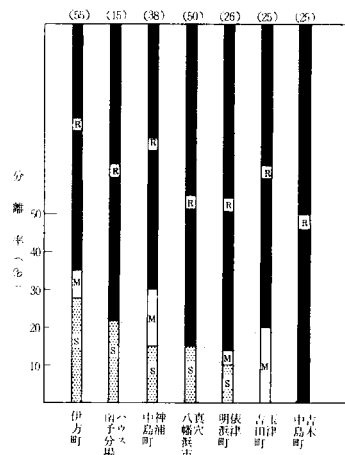
* 1 数字は該当濃度で発育した菌数 * 2 ハウス栽培(無加温) (PSA培地上)

灰色かび病に対するチオファネートメチル剤の防除効果が認められる園ないしは同剤を灰色かび病対象には使用していない園と効果減退が明らかな園とに大別してみると分離される灰色かび病菌は、第1



第1図 チオファネートメチル剤の効果が認められる場所から分離される*Botrytis*菌の耐性分布

* ()内数値は検定菌数を示す。
 S=感性菌 (チオファネートメチル剤のMIC 10 ppm以下)
 M=中等度耐性菌 (チオファネートメチル剤のMIC 10~1,000 ppm)
 R=高度耐性菌 (チオファネートメチル剤のMIC 1,000 ppm以上)

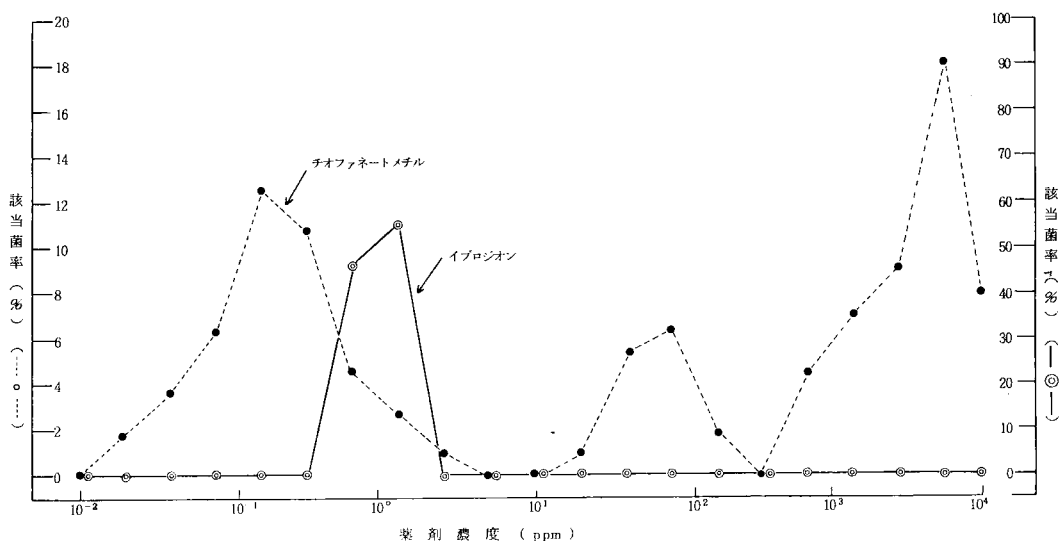


第2図 チオファネートメチル剤の効果減退が明らかな場所から分離される*Botrytis*菌の耐性分布

図および第2図に示すように高度耐性菌(MIC1,000ppm以上)の出現率が前者では0~41%, 後者では65~100%であり, 防除効果の低下を認めている園で明らかに高かった。中等度耐性菌(MIC10~1,000ppm)の検出率は前者で平均18.7%と高く, 後者では6.7%と低い傾向が認められた。検定対象園からの耐性菌出現率の増減傾向は階段状を示し, 一定傾向がみられた。

2 薬剤感受性の検定

分離菌116株を用い, チオファネートメチル剤およびイプロジオン剤のMIC値によって感受性を調べた結果(試験1)は第3図のとおりである。チオファネートメチルでは, MIC0.16ppmにピークを示す感性菌群(41%)とMIC82ppmにピークを示す中等度耐性菌群(10%)およびMIC5,242ppmにピークを示す高度耐性菌(49%)があり, 頻度分布は3峰型を呈した。一方, イプロジオン剤では, MIC0.64~1.28ppmだけにピークを示す感性菌群の1峰型であり, 耐性菌は認められなかった。



第3図 チオファネートメチル剤およびイプロジオン剤に対する灰色かび病菌の最小発育阻止濃度(MIC)

代表的耐性菌株の薬剤含有培地上における菌糸生育量を検討した結果(試験2)は第2表のとおりである。R-D1菌(耐性菌)の菌糸生育はチオファネートメチル剤5,000ppmでも認められ, 生育量は約30%

第2表 ミカン灰色かび病菌のチオファネートメチル剤耐性(薬剤添加PSA培地)

| 供試菌 | チオファネートメチル剤原体濃度(ppm) | | | | | | | | | | | |
|------------|----------------------|-----|----|----|----|----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | 0 | 0.1 | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 200 | 500 | 1000 | 2000 | 5000 |
| R-D1菌(耐性菌) | 49* | 49 | 49 | 48 | 48 | 45 | 44 | 40 | 40 | 38 | 38 | 34 |
| S-4菌(感性菌) | 51 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* 菌糸生育長(mm), 25°C 3日間培養後測定

しか抑制されなかった。一方、S-4菌(感性菌)は1ppmで菌糸生育は止まった。

ペーパーディスク法を用い、耐性菌に対する薬剤含有汚紙円板の阻止円形成を検討した結果(試験3)は第3表に示した。R-D1菌は1,000ppmで半径0.5mmの阻止円を形成したが、S-4菌は0.62ppmで0.5mm, 19.5ppmで7.2mmの阻止円を形成した(第3表)。薬剤感受性の検定においてペーパーディスク法はPSA平板法に比較して検定精度は低いものと思われた。

第3表 ミカン灰色かび病菌のチオファネートメチル剤耐性(ペーパーディスク法)

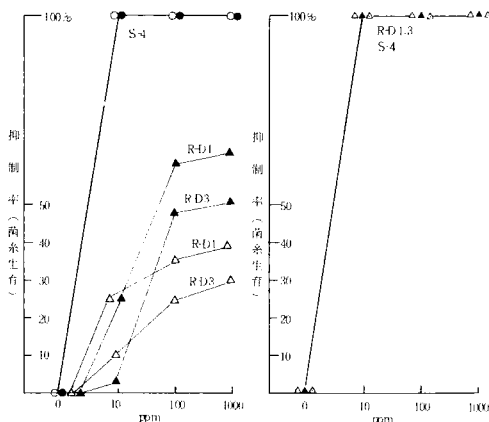
| 供 試 菌 | チオファネートメチル剤原体濃度(ppm) | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|----------------------|------|------|------|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|----|------|-------|
| | 0 | 0.15 | 0.31 | 0.62 | 1.25 | 2.5 | 4.9 | 9.8 | 19.5 | 39 | 78 | 156 | …… | 5000 | 10000 |
| R-D1菌(耐性菌) | 0* | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0.5 |
| S-4菌(感性菌) | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 1.2 | 1.8 | 2.8 | 4.5 | 7.2 | 7.2 | 7.5 | 7.5 | | - | - |

* 円板ろ紙の縁よりの阻止距離 (mm) (PSA培地)
 R-D1菌の孢子噴霧接種濃度 (6.4 × 10⁴個/ml)
 S-4菌の " (8.7 × 10⁴個/ml)

3 チオファネートメチル剤耐性菌の他種薬剤に対する反応

新農薬および市販主要薬剤に対するチオファネートメチル剤耐性菌の交差耐性を薬剤含有PSA培地上で検定した結果(試験1)は第4図および第4表に示したとおりである。チオファネートメチル剤耐性菌はベノミル剤に対して明らかな交差耐性を示したが、イプロジオン剤、ピンクロゾリン剤、プロシミドン剤に対しては交差耐性を全く示さず、かつ、これら薬剤は感性菌に対するチオファネートメチル剤の作用と同等の発育阻止効果を示した(第4図)。一方、同耐性菌は他の市販薬剤に対しても上記農薬に対すると同様交差耐性を示さなかった。同耐性菌に対する菌糸発育抑制効果の比較的高かった薬剤は、アニラジン剤、ジクロフルアニド剤、ポリキャプタン剤であり、370ppmの濃度で本菌の発育を阻止した。なお、これら薬剤は感性菌に対しても耐性菌と同様の濃度で菌糸生育を阻止した(第4表)。

温州ミカンの切除葉あるいは切除果実を所定濃度の薬液に浸漬することによりチオファネートメチル剤耐性菌の他種薬剤に対する反応を検討した(試験2)。その結果は第5図と第5表のとおりである。本耐性菌は、プロシミドン剤ではPSA平板を用いた試験1の結果と同様に10ppm以上で生育を阻止されたが、イプロジオン剤、ピンクロゾリン剤に対しては100ppm以上にならないと阻止されなかった。ベノミル剤に対しては試験1とほぼ同様な結果が得られた(第5図)。アニラジン剤、ジクロフルアニド剤、ポリキャプタン剤は1,111ppmでミカン葉の葉肉褐変を阻止したが、この結果は試験1のPSA平板内薬剤濃度370ppmに比し高濃度であった。TPN剤は、



第4図 温州ミカンより分離されたチオファネートメチル剤耐性菌の他に対する反応(PSA平板培地上)

R-D1,3:耐性菌, S-4:感性菌

- : ベノミル剤, ○— : チオファネートメチル剤
- ▲— : プロシミドン剤
- ▲^a— : イプロジオン剤
- ▲^b— : イプロジオン剤
- △^c— : ピンクロゾリン剤

第4表 ミカン灰色かび病菌(チオファネートメチル耐性および感性菌)の薬剤感受性

| 薬剤濃度(ppm)・感性菌(S-4菌) | | | | | | | | 薬剤名 | 薬剤濃度(ppm)・耐性菌(R-D1菌) | | | | | | |
|---------------------|------|----|-----|-----|------|------|-------|--------------------------------------|----------------------|------|------|-----|-----|-----|----|
| 0.057 | 0.17 | 41 | 123 | 370 | 1111 | 3333 | 10000 | | 10000 | 3333 | 1111 | 370 | 123 | 41 | 14 |
| 3 | 0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ベノミル | 0* ¹ | 0.5 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 5 | 5 | 5 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | TPN | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 5 |
| 5 | 5 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | ジクロフルアニド | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 2 |
| 5 | 5 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | アニラジン | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 5 |
| 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 3 | 3 | 2 | 銅水和剤(水酸化第2銅) | 1 | 3 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | マンネブ | 0 | 0 | 2 | 3 | 5 | 5 | 5 |
| 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 3 | 2 | 0 | キャプタル | 0 | 2 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | キャプタ* ² ン・ポリ オキシン | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 5 |
| 2 | 0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | マンネブ* ³ チオファネ ートメチル | 0 | 0.5 | 3 | 4 | 5 | 5 | 5 |

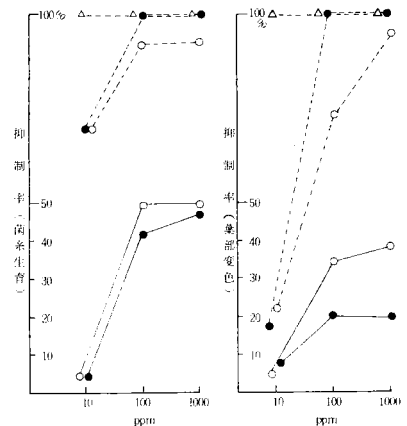
- * 1 数字はPSA培地(試験管)上での菌糸生育量(縦径・cm)。
- * 2 ポリオキシン剤濃度を代表。
- * 3 チオファネートメチル濃度を代表。

3,333ppmの濃度で病斑形成を阻止したが、これはPSA平板法に比べて低濃度であった。他の供試薬剤については概ね試験1の結果と類似した。また、薬液浸漬処理を行った果実での試験結果は切除葉で行った場合と同様の結果であった(第5表)。

4 耐性菌の病原性確認

チオファネートメチル剤に対し異った感受性を示す*Botrytis cinerea*菌を用い、温州ミカン果実表面へ接種することにより病原性を検討した。併せて、チオファネートメチル剤もしくはイプロジオン剤を散布して本菌に対する傷形成阻止力を検討した。

樹上果実を用いた試験結果は第6図のとおり有傷・無傷接種いずれの場合もS-4菌(感性菌)の方がR-D1菌(高度耐性菌)、R-78菌(中等度耐性菌)に比べて傷形成度がやや高い傾向にあったが病原性の差異は判然としなかった(無散布区)。S-4菌およびR-78菌接種の場合、チオファネートメチル剤散布により傷形成度は低下したが、R-D1菌接種では無散布同様に高くなった。イプロジオン剤はいずれの菌に対しても傷形成を抑制したが、有傷接種では傷形



第5図 温州ミカン切除葉の薬剤浸漬処理によるチオファネートメチル耐性菌の反応(葉片法)

- ベノミル剤、●—●—チオファネートメチル剤、○—●—イプロジオン剤、●—●—ビンクロゾリン剤、△—△—プロシミドン剤

第5表 チオファネートメチル剤耐性菌に対するミカン切除果実および葉の薬剤浸漬処理の影響

| 薬剤濃度(ppm)・ミカン葉浸漬処理 *1 | | | | | | | 薬 剤 名 | 薬剤濃度(ppm)・果 実 浸 漬 処 理 *3 | | | | | | |
|-----------------------|----|-----|-----|------|------|-------|------------------------|--------------------------|------|------|-----|-----|----|---|
| 0 | 41 | 123 | 370 | 1111 | 3333 | 10000 | | 10000 | 3333 | 1111 | 370 | 123 | 41 | 0 |
| + | + | + | + | + | + | + *2 | ベ ノ ミ ル | + | + | + | + | + | + | |
| + | + | + | + | ± | - | - | TPN | - | - | + | + | + | + | |
| + | + | + | ± | - | - | - | ジクロフルアニド | - | - | - | + | + | + | |
| + | + | + | ± | - | - | - | ア ニ ラ ジ ン | - | - | - | + | + | + | |
| + | + | + | + | + | + | + | 銅 水 和 剤 (水酸化第2銅) | + | + | + | + | + | + | |
| + | + | + | + | + | + | + | マ ン ネ ブ | + | + | + | + | + | + | |
| + | + | + | + | + | + | - | キャプタホル | - | + | + | + | + | + | |
| + | + | + | - | - | - | - | キャプタン・*5 | - | - | - | + | + | + | |
| + | + | + | + | + | + | + | ポリオキシン | - | - | - | + | + | + | |
| + | + | + | + | + | + | + | マンネブ・チオ ファネートメチル *6 | + | + | + | + | + | + | |

- * 1 : 温州ミカン新葉→薬剤浸漬→風乾→PSA培養R-D1菌(5mm角)置床→25℃高湿保存(4日間)
- * 2 : 葉部変色程度を示し、-は変色なし、±変色不明瞭、+変色直径2cm、++変色直径2cm以上。
- * 3 : 温州ミカン果実→薬剤浸漬→風乾→PSA培養R-D1菌(5mm角)→25℃高湿保存(10日間)
- * 4 : 花弁下の果実表面の傷発生度を示し、-は傷なし、+は傷をわずかに認める、++は明瞭に認める。
- * 5 : ポリオキシン剤濃度を代表。
- * 6 : チオファネートメチル剤濃度を代表。

成度は高まった。

切除果実を用いた試験結果は第6表に示した。無散布条件の場合、傷形成力はS-4菌が最も高く、それに対してR-78、R-D1菌のそれは弱い傾向が認められた。この傾向は樹上果実を用いた試験結果に比べて一段と明瞭であった。一方、TMR菌(野菜試久留米支場より分譲されたナス灰色かび病菌-高度耐性菌)の傷形成力は他菌に比べて明らかに低かった。ロブラル剤の傷形成阻止力を散布濃度別に検討すると、同剤の1,000倍、1,500倍はいつれの供試菌に対しても高い阻止効果を認めたが、2,000倍では傷形成度が上昇し、阻止効果が低下した。なお、耐性菌の病原性確認のために用いた本試験方法(樹上果実法および切除果実法)はカンキツ灰色かび病に対する有効薬剤の探索を行う場合にも、ほ場試験と併行して検討できうる方法であると考えられた。

5 耐性菌発現ほ場における薬剤効果

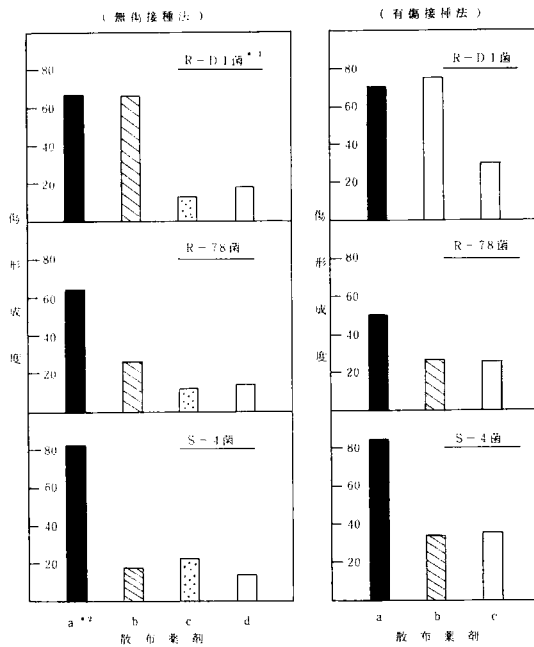
耐性菌多発のビニールハウス(無加温)における温州ミカンの防除試験(試験1)の結果は第7図に示した。無散布区での発病花弁率は72%と激しかった。チオファネートメチル剤の発病花弁率は52%と高く、散布効果の減退は明らかであった。これに対しビンクロゾリン剤は顕著な防除効果を示し、発病花弁率、有傷果率はともに7%以下であった。

耐性菌が高率に検出される地帯の露地栽培温州ミカンの灰色かび病防除試験(試験2)の結果は第8図のとおりである。ここでも試験1同様にチオファネートメチル剤の防除効果は不十分であった。効果が認められた薬剤は、オキシキノリン銅剤(2回散布)、キャプタン・ポリオキシン剤(2回散布)があり、著しい防除効果を示したのはイプロジオン剤であった。なお、花弁発病率に比べて有傷果率が高いのは落弁後期から幼果期の多雨による後期発病が高かったためと思われる。

第6表 *Botrytis*菌接種による果面傷形成とイプロジオン剤の抑制効果
(切除果実法)

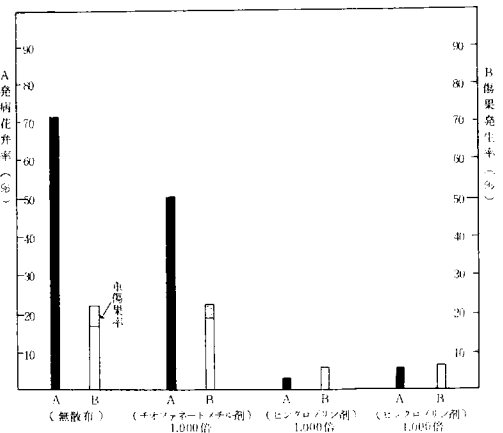
| 供試菌 | 調査項目 | イプロジオン剤浸漬濃度 | | | |
|------------|---------|-------------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 2,000倍 | 1,500倍 | 1,000倍 |
| S-4 菌 | 傷形成度 | 53.0 | 30.5 | 15.0 | 7.2 |
| | 罹病指数 *2 | 3.4 | 2.1 | 1.3 | 0.8 |
| R-78 菌 | 傷形成度 | 33.6 | 13.5 | 10.0 | 6.5 |
| | 罹病指数 | 2.3 | 1.1 | 0.8 | 0.6 |
| T M R 菌 *1 | 傷形成度 | 19.2 | 5.0 | 4.2 | 1.0 |
| | 罹病指数 | 1.7 | 0.4 | 0.3 | 0.1 |
| R-D1 菌 | 傷形成度 | 29.2 | 20.6 | 2.5 | 1.0 |
| | 罹病指数 | 2.4 | 1.5 | 0.1 | 0.1 |

* 1 野菜試久留米支場より分譲されたナス灰色かび病菌
* 2 調査果実の平均罹病指数

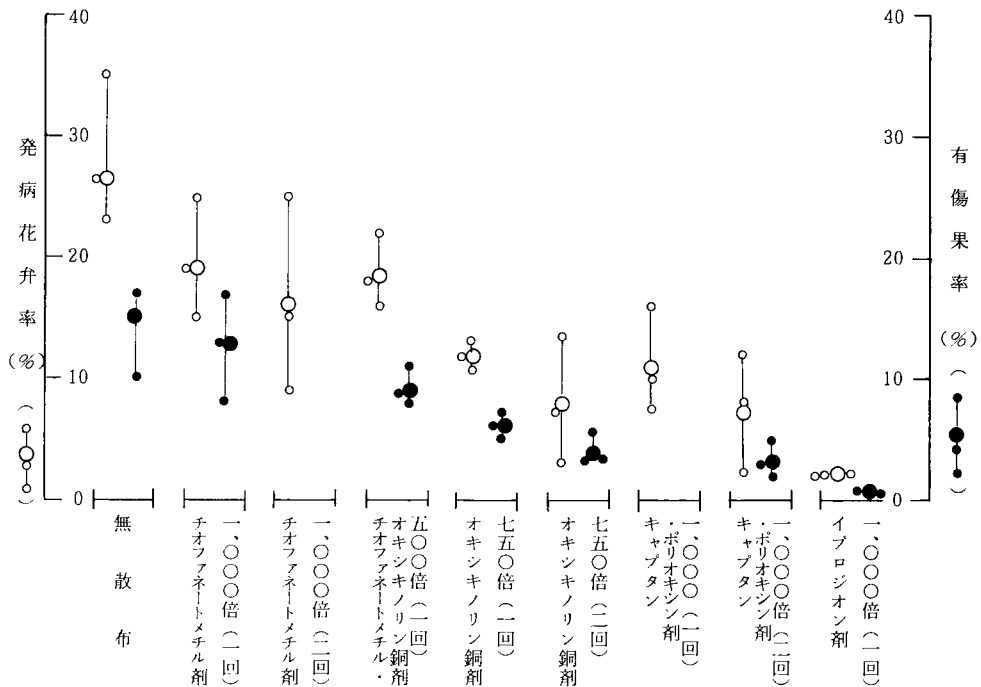


第6図 チオファネートメチル剤に対して感受性を異にする *Botrytis* 菌の温州ミカン果実に対する侵入寄生性(樹上果実法)

- * 1 R-D1 菌 (耐性菌, MIC 1,000 ppm 以上)
R-78 菌 (中等度耐性菌, MIC 78 ppm)
S-4 菌 (感性菌, MIC 0.1 ppm)
- * 2 a: 無散布
b: チオファネートメチル剤 1,500倍散布
c: イプロジオン剤 1,500倍散布
d: チオファネートメチル剤 1,500倍 + イプロジオン剤 1,500倍



第7図 チオファネートメチル剤耐性菌発現は場(ビニールハウス・無加温)での防除試験



第8図 耐性菌発現ほ場(露地)での灰色かび病防除試験

IV 考 察

カンキツ類、特に温州ミカンの灰色かび病防除において、県南西部や島しょ部を中心に1977年以後にチオファネートメチル剤もしくはベノミル剤の防除効果低下が指摘されはじめた。

このため、著者らは1978年以降、愛媛県内の温州ミカン主要栽培地を中心に、チオファネートメチル剤耐性灰色かび病菌の確認並びにその発生実態に関する調査を実施してきた。

その結果、1978年6月に八幡浜市真穴の温州ミカン花卉から分離した菌株の中に薬剤耐性菌を初めて認めて以来、1979年には中島町小浜、吉田町玉津で耐性菌が高率に認められた。これらの地域に共通した事例は高品質果実の生産地であり、灰色かび病菌による傷害果実発生を防除する意味でベンズイミダゾール系薬剤の散布を必須的に行っていたことであった。

そのため、農家へのアンケート調査をもとにして、チオファネートメチル剤の防除効果が減退している園と効力を維持している園ないしは同剤未使用園に大別して耐性検定を試みたところ、耐性菌が高率に検出されたのは明らかに効果減退園であり、耐性菌の高率な分布域は比較的限定されたものと考えられた。

以上の結果から判断すると、施設栽培の果菜類においては、一般に耐性菌検出ほ場が感性菌検出ほ場に比べて著しく高率に存在するようであるが(木曾, 1975; 竹内・長井, 1976; 山本・斎藤, 1977)、温州ミカンのそれは果菜類に比べ比較的low率であり、検出ほ場が耐性と感性の両極に2分される傾向がみら

れた。また、検定対象園からの耐性菌出現率の増減傾向が階段状を示し、一定傾向がみられたことは、耐性菌密度の増加と防除効果の低下との関係を検討する意味で興味深い。

なお、施設野菜では耐性菌発現がチオファネートメチルおよびベノミル剤実用化後2年内外ですでに確認されている(竹内・長井, 1976)のに対し、温州ミカンでは実用化後6~7年でようやくその初発現を認めたにすぎず、しかもその出現地域は限定されている。このことは、ほ場における使用薬剤の濃度、散布間隔、回数などの馴化条件が施設野菜に比べ低位(少回数散布, 短期間散布等)であるからとも推察されるが、今後の検討に待ちたい。

分離菌116株を用い、チオファネートメチル剤のMIC値によって感受性の程度を求めたところ、その頻度分布曲線は3峰型を示した。即ち、MIC値が0.16ppmにピークを示す感性菌群, 同82ppmにピークを示す中等度耐性菌群および同5,242ppmにピークを示す高度耐性菌群の3群に分けられた。この結果は、Sakurai et al(1976)がチオファネートメチル剤の分解物質とされているmethyl-2-benzimidazolecarbamate(MBC)のMIC値によって採集菌株の感受性を検討し、その頻度分布が3峰に分かれ、感性, 中等度耐性および高度耐性の3群が存在するとした結果と類似した。また、前に述べたチオファネートメチル剤の効力維持園等では、中等度耐性菌分離率が効力減退園に比べて高率に認められた。このことは、灰色かび病菌の耐性程度の発達を考慮するうえで興味深い事実である。一方、分離菌のイプロジオン剤に対するMIC値は0.64~1.28ppmにしかピークを示さない感性菌群の1峰型であった。このことは、イプロジオン剤がカンキツ類に対しては未登録農薬であり、実際に園地では未散布なことからも当然の結果といえるが、最近施設野菜において本剤に対する耐性菌の出現が古谷(1979)によって報告されており、今後温州ミカンにおける新たな発生を警戒する意味で、時に応じた耐性検定が必要と思われる。

Bollen and Scholten(1971)によると、ベノミル耐性の灰色かび病菌は他のベンズイミダゾール誘導体及びチオファネートメチル剤に対して交差耐性を示すことが指摘され、同様な例が国内の施設野菜でも確認されている(木曾, 1975; 山本・斎藤, 1977)。本試験においても、チオファネートメチル剤耐性菌はベノミル剤に対して明らかに交差耐性を示した。一方、アニラジン剤, ジクロフルアニド剤に対しては交差耐性を示さず、イプロジオン剤, ピンクロゾリン剤およびプロシミドン剤に対しても交差耐性は全く認められなかった。これらジカルボキシイミド系薬剤は感性菌に対するチオファネートメチル剤の作用に匹敵する発育阻止効果を示した。このことから、温州ミカンから分離されたチオファネートメチル耐性菌の他種薬剤に対する交差耐性の傾向は、既存の果菜類の場合と全く共通した傾向にあると思われる。また、薬剤含有培地上での検討だけでなく、温州ミカンの新葉もしくは幼果を用いた薬剤浸漬法によっても同様な傾向が得られ、木曾(1975)がレタス葉を用いて行った“葉片法”の試験結果とほぼ一致するようであった。

温州ミカンの樹上果実に培養菌を接種する方法で、感性菌と耐性菌の病原性を検討したところ感性菌の病原力は耐性菌のそれに比べてやや強い傾向を認めたが判然とはしなかった。これに対し、切除果実に培養菌を接種したところ、病原力は感性菌(チオファネートメチル剤のMIC値0.1ppm)が最も強く、中等度耐性菌(同MIC78ppm)や高度耐性菌は感性菌に比べて明らかに弱かった。さらにTMR菌(高度耐性菌; 野菜試久留米支場より分譲のナス灰色かび病菌)の場合は病原力が一段と弱かった。薬剤耐性灰色かび病菌の病原性の検討については、イプロジオン剤やプロシミドン剤に対してin vitroで得られた耐性変異株が感性菌に比べて病原力が弱いとの報告がある(Hisada et al, 1979; 高山ら, 1980; 手塚ら, 1980)。これらの事例に関しては、ほ場における耐性菌の繁殖・生存力や感性菌との競合などの面からの検討が加えられる必要がある。本試験では、樹上果実または切除果実を用いて、薬剤処理を行い、その後に培養菌糸片を置床するといういわゆる“果実法”で薬効の検定を実施したが、結果はほぼ満足のいくものが得られた。薬剤の効果検定については、手塚・木曾(1976)がキウリ果実を用いて*Botrytis*菌を含む多犯性病原菌に対するそれを精細に検討し、効力判定を可能にしたが、著者らの行った試験も温州ミカンの灰色かび病防除薬剤の効力判定に利用が可能であると思われた。

耐性菌が高率に検出される試験場ハウスおよび現地農家は場で灰色かび病の防除試験を行った結果、チオファネートメチル剤の防除効果は認められないか不十分であった。これに対し、比較的良好な結果を得た薬剤は、オキシキノリン銅剤の2回散布、キャプタン・ポリオキシン剤の2回散布であった。しかし、これらの薬剤は防除効果に多少の振れがあるようであった。供試薬剤の中で、顕著な発病抑止効果が認められたのはイプロジオン剤やビンクロゾリン剤であった。これらは場試験結果は、前述した薬剤含有PSA培地上や新葉・幼果薬剤浸漬処理法での検討結果に類似し、信頼できるものであった。有効と認められた上記薬剤は現時点(1982年)では未登録であり使用不可能であるが、現行防除を考える場合、単一薬剤の連続使用によって耐性化の推進が行われるとするUesugi(1979)の報告に従えば、チオファネートメチル剤やベノミル剤の散布停止や混合剤散布への転換が当面挙げられる。この点に関しては、さらに精細な検討が必要と思われる。

V 摘 要

1 1978～'79年の両年に、温州ミカン花卉から*Botrytis*属菌を分離し、チオファネートメチル剤耐性を検討した。分離160菌株中、高度耐性菌が60%認められた。分離菌の中には中等度耐性菌が約3%存在した。

チオファネートメチル剤の防除効果維持園と効果減退園とから分離される高度耐性菌は明らかに後者が高率であった。中等度耐性菌は逆に効果維持園で高かった。

2 保存菌116株を用い、チオファネートメチル剤およびイプロジオン剤のMIC値を求めた。チオファネートメチル剤耐性の頻度分布は、高度耐性菌(49%)、中等度耐性菌(10%)および感性菌(41%)があり3峰型を示した。イプロジオンのMICは0.64～1.28ppmにしかピークを示さない感性菌群の1峰型であった。

代表的耐性菌株の感受性程度をPSA平板法およびペーパーディスク法により検討した結果、前者が検定精度において優れた。

3 チオファネートメチル剤耐性菌株はベノミルだけに交差耐性を示し、その他の剤には示さなかった。本耐性株の菌糸生育は、特にイプロジオン剤、ビンクロゾリン剤およびプロシミドン剤によって顕著に抑制された。また、同菌の生育阻止濃度は、含薬剤PSA平板法に比べ新葉ないしは幼果の薬剤浸漬法で高かった。

4 感性菌と耐性菌の病原力の差異は、樹上果実に対しては明らかでなかったが、切除果実に対しては感性菌の方が強かった。チオファネートメチル剤耐性菌株に対するイプロジオン剤の病斑形成阻止効果は、樹上果実法によっても裏付けされた。

5 耐性菌発現場(ハウス、露地)における防除効果はイプロジオン剤、ビンクロゾリン剤が最も優れた。これに対し、チオファネートメチル剤の散布効果は明かに劣った。

VI 引 用 文 献

Bollen, G. J. and Scholten, G. (1971) : Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Neth. J. Pl. Path.*, 77, 83～90.

Hisada, Y., Takaki, H., Kawase, Y and Ozaki, T. (1979) : Difference in the potential of *Botrytis cinerea* to develop resistance to Procymidon *in vitro* and in field. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 45(3), 283～290.

木曾皓(1975) : ベノミル、チオファネートメチル剤に対するボトリチス属耐性菌の分布とその防除。薬

- 剤耐性菌に関するシンポジウム(日植防), 1~16.
- Klotz, L. J. (1973) : Color handbook of citrus disease - Botrytis fungus on blossoms. University of California Citrus Research Center, 18~20.
- 高山保子・畑めぐみ・永田利美(1980) : プロサイミドン及びアイプロデオンに対する灰色かび病菌の人工耐性変異株の性質. 日植病報, 46(1), 61.
- 古谷真二(1979) : アイプロデオン剤に対する耐性灰色かび病菌の発生とその特性. 日植病報, 45(1), 105.
- Maude, R. B. (1980) : The biology of Botrytis - The development of pathogen tolerance to systemic fungicides. Academic Press Inc., 284~287.
- 大串龍一・関道生編(1972) : 原色ミカン果実の診断, 農文協, 77.
- 大林尚典・松本英紀(1973) : 昭和48年度愛媛果試業務報告, 113.
- 松井寿(1975) : 薬剤耐性菌の検定法. 植物防疫, 29(5), 206~212.
- Sakurai, H., Naito, H. and Fujita, H. (1976) : Sensitivity distribution of phytopathogenic bacteria and fungi to antibiotics. J. Antibiotics, 29 (11), 1230~1236.
- 菅原寛夫・古山清編(1965) : 農薬の生物検定法, 南江堂, 304pp.
- 橘泰宣(1980) : 温州ミカンにおける灰色かび病菌の薬剤耐性出現の現状と問題点. 四国植防, 15, 86~88.
- 高梨和雄(1976) : ブドウから分離された*Botrytis* 菌のベノミル剤およびチオファネートメチル剤耐性について. 日植病報, 42(1), 65.
- 竹内妙子・長井雄治(1976) : 数種野菜におけるベノミル及びチオファネートメチル耐性灰色かび病菌の発生事例. 日植病報, 42(1), 65.
- 手塚信夫・木曾皓(1975) : ナス *Botrytis* 属菌のチオファネートメチル耐性菌株の出現. 日植病報, 41(3), 303~304.
- 手塚信夫・木曾皓(1976) : キウリ果実法による多犯性病原菌に対する薬剤効果の検定. 日本農薬学会誌, 1, 321~324.
- 手塚信夫・西泰道・渡辺康正(1980) : 灰色かび病菌プロサイミドン耐性変異株の *in vitro* 淘汰. 日植病報, 46(1), 26~33.
- 山本磐(1975) : ベノミル耐性灰色かび病菌の野菜における発生と対策. 植物防疫, 29(5), 194~196.
- 山本磐・斎藤正(1977) : 果菜類におけるベノミル耐性灰色かび病菌の発生とその対策. 高知県農林研報, 9, 37~43.
- Yasuhiko Uesugi (1979) : Resistance of phytopathogenic fungi to fungicides. Japan Pesticide Information, No. 35, 5~9.

S u m m a r y

1. In the course of 1978-1979, 160 strains of *Botrytis cinerea* were isolated from petals of Satsuma orange and their resistant to thiophanate - methyl was studied. Sixty percent of these isolated strains was found to be highly resistant and about 3% was moderately resistant. The frequency of isolation of highly resistant strains from good performance fields (control activity of thiophanate - methyl was maintained) was apparently lower than that from poor performance fields (control activity was reduced) from which, on the contrary, moderately resistant strains were more frequently isolated.
2. MIC levels of thiophanate - methyl and iprodione were determined using 116 strains stored after isolation to estimate the sensitivity of these strains. The strains tested were classified in

three categories according to their sensitivity to thiophanate - methyl expressed in MIC : highly resistant (49%), moderately resistant (10%), sensitive (41%). Their sensitivity to iprodione had only one peak at the MIC range of 0.64 – 1.28 ppm which corresponds to the category of sensitive strains. The sensitivity of representative strains selected from these test strains was assessed by the PSA plate and the paper disk techniques and it was found that the PSA plate technique was superior in terms of accuracy in determination of resistance.

3. Thiophanate - methyl - resistant strains showed cross - resistance only to benomil and mycelial growth in these strains was remarkably inhibited by iprodion, vinclozolin and procymidone. The growth inhibition concentrations of these compounds were higher when determined on fruits immersed in fungicide solutions than on PSA plates containing the fungicides.

4. The pathogenic activity of sensitive strains was not significantly different from that of resistant strains on fruits on the tree but was higher on those picked off from the tree. The action of iprodione to inhibit formation of disease spots caused by thiophanate-resistant strains was confirmed by examination on fruits on the tree.

5. Iprodion and vinclozolin had the highest control activity in fields (vinylhouses, open - air) where resistant strains had been highly isolated. In these fields, treatments with thiophanate - methyl showed no such effect.