

カンキツそうか病菌に対する ベンズイミダゾール系薬剤の感受性

磯田隆晴*・山田一字**・行徳 裕*

緒 言

ベンズイミダゾール系の薬剤が、カンキツそうか病の防除剤として登録されたのは、チオファネート剤が1969年、ベノミル剤やチオファネートメチル剤が1971年であるから、これらの薬剤が、カンキツの防除に使用されるようになってから20年以上が経過している。カンキツ園では、現在ベンズイミダゾール系薬剤は、そうか病の防除の他に灰色かび病、青かび病、緑かび病の防除にも使用されており、年に2～3回散布されている。そして、すでに青かび病、緑かび病の病原菌に対しては、1976年¹⁾、灰色かび病菌に対しては、1980年²⁾に薬剤耐性菌の出現が報告されている。そうか病菌に対しては、フロリダのカンキツ園(ラフレモン)に耐性菌が出現したとの報告³⁾はあるが、わが国では、まだそのような記載はない。しかし、熊本県では、1990年頃から早生温州のミカン園でそうか病に対して効果の低下が見られたことから、薬剤耐性菌の出現について検討したところ、発生を確認したので報告する。

1. *in vitro*での感受性検定

目 的

カンキツそうか病の防除として、ベンズイミダゾール系薬剤の効果が低下している園について、耐性菌の出現があるかどうかを、寒天培地上で検討する。

試験方法

1992年5月に、三角町の農家ほ場に発生している温州ミカン春葉の病斑から7菌株を分離し、また、同年9、10月には熊本県農業研究センター果樹研究所内ほ場の早生温州に発生しているそうか病の病斑から、35菌株を分離した。分離菌は、温室内で10、11月に温州ミカンとラフレモンの新葉に接種して、いずれもそうか病菌であることを確認した。

薬剤感受性の検定は、11、12月に平板希釈法で行った。検定用の培養器は、ジャガイモ煎汁寒天培地(PDA)

を使用し、検定薬剤は、ベノミル剤(50%)とチオファネートメチル剤(70%)を供試した。検定は、24℃で7日間培養した菌叢塊を1.5～2 mm³に切り取って、検定用培地に静置した。概ね2週間培養した後、菌叢の生育状態を以下の基準で程度別に調査した。

培地上での菌叢の調査基準

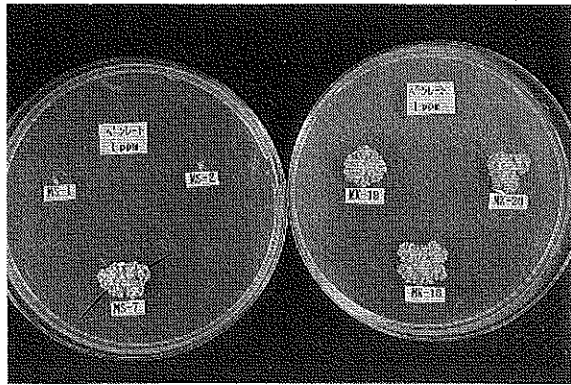
基 準	菌叢の生育程度
(一)	全く増殖しないか、僅かに生育しても数日で黒褐色に変色、死滅するもの。
(+)	僅かに増殖がみられ、その後も生育するもの。
(#)	かなり増殖するが、薬剤の無添加培地での増殖には劣るもの。
(#)	薬剤の無添加培地での増殖とほとんど変わらないもの。

結 果

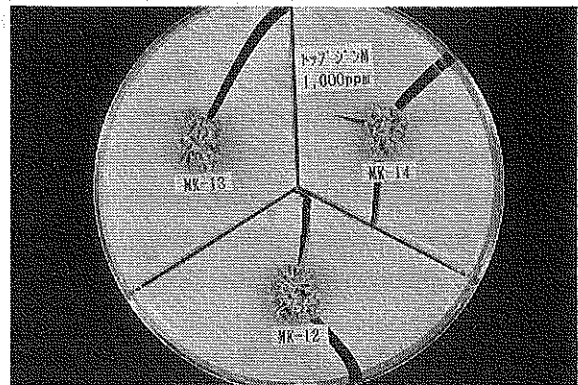
薬剤の有効成分量を0、1、10、100、1000ppmの5段階に調整して、菌叢の生育を調査した。その結果、三角町農家ほ場由来の2菌株は、ベノミル剤1 ppm濃度を含む培地でも生育阻害が見られた。しかし、同じ三角町由来の他の5菌株と果樹研究所由来の35菌株は、いずれもベノミル剤1 ppm濃度を含む培地では、無添加培地と変わらない生育を示した(第1、2図、第1表)。これは100ppmまでは全く変わらず、1,000ppmの濃度で若干菌株によって菌叢の発育に差は見られたものの、いずれも菌叢の生育は認められた。チオファネートメチル剤についてもベノミル剤とほぼ同じ傾向で、2菌株が感性菌、40菌株が耐性菌であった。

次に、三角町農家ほ場由来7菌株、果樹研究所ほ場由来菌のうち適宜14菌株を選定して、ベノミル剤とチオファネートメチル剤について、日本化学療法学会が標準法²⁾として推奨している800～0.19ppmの各2倍段階希釈

* : 果樹研究所 ** : 現 経営普及課



第1図 菌叢の生育 (感性菌MS-1, MS-2)
(耐菌性MS-7, MK-18)
MK-19, MK-20)



第2図 耐性菌の生育 (MK-12, MK-13)
(MK-14)

系列平板を調整して、菌叢の培地上での生育を調査した(第2表、第3表)。ベノミル剤に対しては、三角町農家は場由来7菌株のうち2菌株が0.19ppmでわずかに生育阻害が見られ、0.39ppm以上になると完全に菌叢の生育を阻止した。そして、他の5菌株と果樹研究所由来の14菌株は、800ppm濃度でも薬剤無添加培地での生育と変わらなかった。チオファネートメチル剤では、ベノミル剤で生育阻害があった同菌株が、1.56ppm以上の濃度で

生育が阻害され、また、他の19菌株については同様にいずれも800ppm濃度でも菌叢生育が認められた。

考察

ベンズイミダゾール系の薬剤は、マシン油乳剤と混用あるいは近接散布ができることから、開花期から幼果期のそうか病、灰色かび病の同時防除剤として、広く体系防除に使用されている。しかし、最近では、生産現場で

第1表 寒天培地上におけるそうか病菌の生育

供試薬剤	濃度 (ppm)	三角町農家ほ場分離菌				果樹研究所ほ場分離菌			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
ベノミル水和剤	0	0	0	0	7	0	0	0	35
	1	2	0	0	5	0	0	0	35
	10	2	0	0	5	0	0	0	35
	100	2	0	0	5	0	0	0	35
	10,000	2	1	4	0	2	23	10	0
チオファネートメチル水和剤	0	0	0	0	7	0	0	0	35
	1	2	0	0	5	0	0	0	35
	10	2	0	0	5	0	0	0	35
	100	2	0	0	5	0	0	0	35
	10,000	2	0	0	5	0	1	2	32

第2表 ベノミル剤に対するカンキツそうか病菌の感受性

菌採取場所	菌叢生育	濃度 (ppm)													
		0	.19	.39	.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800
三角町生産者ほ場	-	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
果樹研究所ほ場	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14

第3表 チオファネートメチル剤に対するカンキツそうか病菌の感受性

菌採取場所	菌叢生育	濃度 (ppm)													
		0	.19	.39	.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800
三角町	—	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
生産者	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ほ場	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7菌株	≡	7	7	7	7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
果樹研	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
究 所	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ほ場	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14菌株	≡	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14

はそうか病に対する効果の低下が云われており、また、筆者らが1990、'91、'92年に行った防除試験でも効果が劣っている。そのようなことから、ベンズイミダゾール系薬剤のカンキツそうか病菌に対する薬剤感受性について検討した。

そうか病は、PDA培地上では練り菌磨きをチューブから押し出したような菌糸塊を作る。そのため、検定法としては、*Botrytis*菌のように培地上の菌糸ブロック塊を使つての検定が出来ない。そこで検定に使用する菌糸のブロック塊を作るために、菌糸伸長の可能な培地探索を行った。田代は、同じ*Elsinoe*菌であるブドウの黒とう病菌が、素寒天培地で検定に適することを指摘した(私信)が、そうか病菌については、同培地で菌糸伸長がわずかにみられたものの、感受性検定に使用できる生育は見られなかった。また、培地組成について、カンキツ葉、果皮、緑梢枝の煎汁液とサッカロースの量を組み合わせ検討したが、いずれも培地上での菌糸の十分な生育は認めなかった。そのため、本検定では*Botrytis*菌の検定に使用する菌糸伸長による検定法ではなく、そうか病菌の菌叢塊の一部を切り取り、これの増殖による検定を行うこととした。

ベンズイミダゾール系の薬剤をPDA培地に添加すると、三角町由来の7菌株中2菌株は1ppm以下の添加培地で生育阻害が見られ、明らかに感受性菌であったが、他の5菌株は800ppm添加培地でも菌の増殖が見られた。また、果樹研究所由来の菌株は、いずれも800~1,000ppm添加培地で菌叢が生育し、高度耐性の様相を示した。

現在ベノミル剤は、そうか病の防除として250ppm濃度で散布されており、チオファネートメチル剤も467ppmで使用されているが、いずれも培地上での生育阻害濃度から考察すると、ほ場での効果の低下は、耐性菌出現によるものと思われる。

2. *in vivo* での感受性検定

目 的

熊本県宇土郡三角町の生産農家はほ場と果樹研究所ほ場から分離したそうか病菌が、ベンズイミダゾール系薬剤に対して、*in vitro*での感受性検定では、耐性菌の出現様相を示したが、これが*in vivo*でも、全く同じように耐性菌出現を示すかどうかを知るために検討する。

試験方法

供試菌株は、ベンズイミダゾール系薬剤の平板希釈法による検定で分類した、感性菌2菌株(MS-1、MS-2)と耐性菌2菌株(MS-7、MK-14)を使用した。

1) カンキツ新梢への接種試験

ガラス室内で育成した早生温州の鉢植苗を供試し、発芽した新梢葉(5~10cm)に、あらかじめベノミル剤を100倍、500倍、1,000倍、2,000倍、5,000倍、10,000倍、20,000倍、40,000倍液に希釈して、手押噴霧器で散布した。散布後薬剤が乾いたのを見計らって、そうか病の懸濁液を噴霧接種した。接種法は、供試菌株をPDA培地で5日間培養した後、滅菌した乳鉢で磨砕し、ガーゼで濾過してそうか病菌の懸濁液を作った。接種した新梢葉は、ビニル袋で覆って湿度を保ち、22℃の人工気象器内に入庫した。ビニルは、接種2日後に除去し、5日後には、人工気象器から出してガラス室内に置いた。調査は、接種20日後に発生予察調査基準に準じて行い、発病率及び発病度を算出した。

2) 病斑からの分生孢子形成の阻止試験

ガラス室内で育成した鉢植苗の新梢葉に、あらかじめ感性菌と耐性菌を接種して、そうか病の発病葉を作った。発病葉を供試して0、1、100、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、40,000ppmに調整したベノミル剤の薬剤液に10分間浸漬し、風乾後病斑を切り取ってスライドガラス上に16時間、22℃の定温器

第4表 ベノミル剤散布後の接種による発病

散布濃度 倍数	ppm	感 性 菌				耐 性 菌			
		MS-1 発病率	MS-1 発病度	MS-2 発病率	MS-2 発病度	MS-7 発病率	MS-7 発病度	MK-14 発病率	MK-14 発病度
無散布	0	100	44.6	100	58.3	100	82.5	100	87.3
40,000	12.5	57.1	10.9	12.1	1.7	95.5	61.7	100	74.1
20,000	25	16.7	2.4	4.8	0.7	100	68.3	100	45.9
10,000	50	7.1	1.1	5.7	0.8	75.9	20.7	100	54.9
5,000	100	0	0	0	0	76.2	27.2	96.0	65.1
2,000	250	0	0	0	0	63.9	17.1	100	72.8
1,000	500	0	0	0	0	96.3	27.5	100	71.4
500	1000	0	0	0	0	70.0	21.4	100	56.6
100	5000	0	0	0	0	30.0	5.7	95.5	51.3

第5表 ベノミル剤処理による孢子形成状況

濃度 ppm	感 性 菌				耐 性 菌			
	MS-1 形成率	MS-1 形成度	MS-2 形成率	MS-2 形成度	MS-7 形成率	MS-7 形成度	MK-14 形成率	MK-14 形成度
0	100	97.3	100	100	100	100	100	100
1	86.7	57.3	73.3	52.0	100	100	100	100
10	73.3	33.3	60.0	22.7	100	100	100	100
100	46.7	12.0	33.3	6.7	100	97.3	100	100
1,000	13.3	2.7	6.7	1.3	100	100	100	100
5,000	0	0	0	0	100	97.3	100	94.7
10,000	0	0	0	0	100	84.0	100	89.3
20,000	0	0	0	0	20.0	9.3	33.3	9.3
40,000	0	0	0	0	0	0	0	0

に置いた。なお、スライドガラスは、シャーレ内に水質を含んだ濾紙を敷きその上に置いて、湿潤を保った。調査はそうか病斑からの分生孢子の形成状況を顕微鏡下で、無、少、中、多の4段階に区分し、グレード1（少）、3（中）、6（多）を付けて、形成率と形成度を算出した。

結 果

ベノミル剤を散布した後、そうか病菌を接種した試験では、感性菌（MS-1、MS-2）については40,000倍（12.5ppm）の散布でも無散布に比べると発病は少なく、薬剤の散布効果が認められた。また、10,000倍（50ppm）の散布でもわずかに発病はしたものの、5,000倍（100ppm）散布になると全く認められず、発病は、完全に抑えられた。これに対して、耐性菌（MS-7、MK-14）の接種では、500倍（1,000ppm）散布では70～100%の発病を認め、100倍（5,000ppm）散布でも30～95.5%の発病率であった。

次に、ベノミル剤の薬液浸漬による孢子形成阻止試験では、感性菌（MS-1、MS-2）接種によるそうか病の病斑からは、1,000ppm濃度までは孢子形成が認められたものの、5,000ppm以上の濃度になると全く認められず、完全に孢子形成を阻止した。これに対して、耐性菌

（MS-7、MK-14）接種によるそうか病の病斑では、10,000ppmまでは多量の孢子を作り、20,000ppmでもわずかではあるが孢子を形成した。

考 察

三角町農家ほ場と果樹研究所内ほ場から分離したそうか病菌が、ベンズイミダゾール系薬剤を添加した寒天培地上での生育状況から感性菌と耐性菌を分類したが、これが*in vivo*でも同様に相同性があるかどうかを検討した。検定は、接種試験と孢子形成阻止濃度について行ったが、いずれも感性菌と耐性菌は*in vitro*で分離した結果と一致した。

接種試験では、通常そうか病の防除としてベノミル剤は2,000倍（250ppm）で使用しているが、感性菌は、5,000倍（1,000ppm）の散布まで全く発病しなかったのに対して、耐性菌は、100倍（5,000ppm）の散布でも発病しており、耐性菌にたいしては効果がないことが解った。

また、孢子形成阻止濃度の試験では、感性菌は、100～1,000ppmでわずかに孢子形成が見られ、2,000ppm以上で完全に阻止した。これに対して、耐性菌では1,000ppm濃度でも形成率、形成度ともに無処理と変わらず、

第6表 県内におけるペノミル剤耐性菌発生状況

項目	河内町	玉名市	三加和町	三角町	水俣市	本渡市	五和町	松橋町
感性菌	20	0	4	6	22	7	2	0
中度耐性菌	0	0	0	15	0	0	0	0
高度耐性菌	0	2	0	23	0	0	1	35

20,000ppmでも孢子形成は、完全には抑えることが出来なかった。

以上のことから、ベンズイミダゾール系薬剤にたいするそうか病菌の感受性検定は、*in vitro*と*in vivo*での検定結果が一致しており、平板希釈法による寒天培地上での感性菌と耐性菌の分類は、妥当性があると考えられる。

3. 県内産地での耐性菌発生調査

目的

そうか病菌に対して、平板希釈法による薬剤耐性菌の分類が明らかになったことから、県内カンキツ産地でのそうか病に対するベンズイミダゾール系薬剤の耐性菌出現について、発生実態を把握する。

試験方法

(1) 耐性菌検定法：PDA培地による平板希釈法

(2) 調査場所：河内町、玉名市、三加和町、三角町、水俣市、本渡市、五和町、松橋町（果樹研）

(3) 方法：寒天平板希釈法でペノミル剤の濃度を0、1、10、100、1,000ppmに調整し、そうか病の分離菌株2mm³の切片を培地上に静置した。その後、10日間22℃の定温器で培養した後、菌叢の生育状況を調査した。

調査は、100ppm以上の濃度添加培地で生育したものを高度耐性菌、1～10ppmで生育したものを中度耐性菌、1ppmでも生育しなかった菌株を感性菌とした。

結果

県内カンキツ産地で、ベンズイミダゾール系薬剤に対して耐性菌の出現が見られたのは、玉名市、三角町、五和町、松橋町の4市町村であった。また、感性菌だけが発生して耐性菌の出現が認められなかったのは河内町、三加和町、水俣市、本渡市の4市町村で、感性菌と耐性菌の両菌の出現が見られたのは三角町と五和町であった。なお、中度耐性菌は三角町でのみ確認された。

考察

県内カンキツ産地での、そうか病菌に対するペノミル剤耐性菌の出現状況を知るために、平板希釈法で検定を行った。その結果、4市町村で発生を確認したが、サンプル採集を無作為に行ったため、耐性菌出現園でのペノミル剤の効果とのすりあわせは出来なかった。しかし、果樹研究所ほ場では効果が劣っていることから、このような園については、ペノミル剤を散布しても効果がないことは十分考えられる。

検定では、感性菌だけ出現した園が4市町村あったが、いずれも一つの園からサンプルを採集した検定結果である。そのため本結果は、必ずしもその産地全体を代表するものではない。これは耐性菌出現においても全く同じである。三角町と五和町では、耐性菌と感性菌が発生しているが、複数園での検定結果である。同一園では、必ず感性菌が耐性菌のどちらかの菌株にかたよっており、同じほ場からは分離菌株によって、両菌が混ざって発生している園はなかった。このことから、ベンズイミダゾール系薬剤の耐性菌対策を防除に結びつけるためには、個々の園について検定する必要がある。

摘要

- (1) 本県のカンキツ産地では、そうか病に対してベンズイミダゾール系薬剤の効力低下が見られることから、1992年にそうか病菌を分離して、PDA培地での2段階希釈系列による耐性菌の検定を行った。その結果、感性菌はペノミル剤では0.39ppm、チオファネートメチル剤では1.56ppm添加すると全く菌の増殖が抑えられるが、これらの薬剤を800ppm添加しても増殖する耐性菌の出現が確認された。
- (2) 平板希釈法で分離した耐性菌と感性菌は、カンキツ新葉に接種すると感性菌は5,000倍（100ppm）の散布で全く発病しないが、耐性菌は100倍（5,000ppm）を散布しても発病した。
- (3) 同様に耐性菌と感性菌を接種して発病した病斑は、ペノミル剤5,000ppmに浸漬すると感性菌では全く孢子を作らないのに対し、耐性菌では無処理と全く同程度に形成した。

- (4) 以上のように、*in vitro*と*in vivo*の検定結果が一致したことからベンズイミダゾール系薬剤に対するそうか病菌の感受性検定は、寒天培養器に菌叢を2mm³置床することで、検定できることが明らかになった。
- (5) 平板希釈法を用いて、県内のカンキツ産地で発生したそうか病について、ベノミル剤に対する耐性菌の検定を行ったところ8市町村中4市町村で発生が確認された。
- (6) 同一園から分離したそうか病菌は、必ず感性菌か耐性菌のどちらかの菌株にかたよっており、両菌が混ざって発生することはない。そのため、ベンズイミダゾール系薬剤の耐性菌対策を防除に結び付けるためには、個々の園について検定する必要がある。

引用文献

- 1) 倉本 孟 (1976) 日植病報 42: 373-374
- 2) 桜井 寿 (1975) 植物防疫 29: 206-212
- 3) 橋 泰宣・大森尚典・松本英紀・石井卓男 (1980) 日植病報 46: 407-408
- 4) 牛山欽司 (1976) 日植病報 42: 374
- 5) Witeside, J.O. (1980) Plant Disease 64: 871-872

Summary

Recently there has been increasing concern regarding the resistance of *Elsinoe fawcetti* to Benzimidazole. Thus, an investigation of the sensitivity of *E. fawcetti* to Benzimidazole was conducted using Benzimidazole - containing potato - dextrose agar. Only two of 42 tested strains showed growth inhibition at concentrations of more than 1 ppm and were therefore sensitive to Benzimidazole, While 40 strains showed floral proliferation even at concentrations of 100 - 800ppm.

To examine whether the Benzimidazole resistant and sensitive isolates identified through the *in vitro* test show a similar behavior *in vivo*, an inoculation test was performed. Scabs caused by Benzimidazole sensitive isolates of *E. fawcetti* were inhibited when Benzimidazole was dusted at a concentration of 100ppm, but scabs caused by the resistant isolates were not inhibited even when Benzimidazole was dusted at a concentration of 5,000ppm. Further, although Benzimidazole - sensitive isolates failed to sporulate at 5,000ppm, the resistant isolates sporulated at even 20,000ppm. These results correlated well with the *in vitro* findings.