

灰色かび病菌の thiophanate-methyl 剤耐性について

野 中 福 次・田 中 欽 二

(植物病理学教室)

昭和 52 年 8 月 30 日 受理

Tolerance of Gray Mold Fungus, *Botrytis cinerea*
Persoon, to Thiophanate-methyl Fungicide

Fukuji NONAKA and Kinji TANAKA

(Laboratory of Plant Pathology)

Received August 30, 1977

Summary

Thiophanate-methyl tolerant isolates of gray mold fungus, *Botrytis cinerea* Persoon, mainly obtained from cucumber or strawberry cultivated in a vinyl plastic hothouse and from flower or onion cultivated in field were collected in Saga and Fukuoka prefecture. Thiophanate-methyl tolerant isolates accounted for 144 of all 282 isolates tested and were derived from the former two plants, cucumber and strawberry. The mycelial growth of some tolerant isolates was conversely enhanced by the addition of thiophanate-methyl at concentrations of 10 to 100 $\mu\text{g/ml}$ to PSA as compared with that growth on PSA not containing the fungicide. The tolerant isolate was also resistant to benomyl fungicide (cross-tolerant), whereas both thiophanate-methyl-tolerant and thiophanate-methyl-sensitive isolates were sensitive to three fungicides, polyoxin, sulfonic acid and S-7131.

緒 言

灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* Persoon は多くの作物に寄生する代表的な多犯性菌であるが、近年施設園芸の普及に伴ない、とくにハウス内にて加温多湿下で栽培されるキュウリ、ナス、イチゴなどのそ葉類や花卉類に大きな被害をもたらしている。従って、本病防除のために benzimidazol 系薬剤である thiophanate-methyl 剤または benomyl 剤が多年にわたり使用されてきたが、過度の連用の結果、これら薬剤に対する耐性菌が出現してその防除効果が低下し、地域によってはほとんどその効果がみられないハウスも現われ、大きな問題となっている。その実態については飯田の調査報告⁵⁾があり、また、九州地域では手塚らが耐性菌の存在について報告¹¹⁾している。本病菌以外に benzimidazole 系薬剤に対する耐性菌の存在については多くの病原菌^{1, 3, 5, 6, 8, 9, 10)}について知られている。

本実験は佐賀、福岡県下のハウス栽培のキュウリ、イチゴの中で thiophanate-methyl または benomyl 剤を散布しても灰色かび病の防除効果があまりみられないといわれている所を主体に菌の分離を行なって、耐性検定を行なったものである。また、この他に薬剤散布が全く行なわれていない露地の花卉類およびタマネギから同様に菌を分離して検定した。

材料および方法

1. 菌の分離：佐賀，福岡県下から灰色かび病に罹病した植物（第1表）を1976年4月～5月に採集し，常法に従い単孢子分離により病原菌を分離した。胞子を形成しない材料については罹病部の組織から分離を行なった。なお，この他にタマネギの葉から小菌核性腐敗病菌 *Botrytis squamosa* を分離して供試した。

2. Thiophanate-methyl に対する耐性菌の検出：耐性菌の検出は thiophanate-methyl 剤（トップジン M 水和剤）含有培地に培養することにより行なった。すなわち，蔗糖加用馬鈴薯煎汁寒天培地（PSA）上に分離菌株を 25°C で3日間培養し，その菌そう周辺部を径 4mm のコルクボーラで切り取って接種源とし，本剤を 10 μ g/ml 添加した PSA 培地上に，菌そう面を下にして接種，25°C で48時間培養して菌糸伸長がみられた菌株を耐性菌，菌糸伸長がみられなかった菌株を感性菌とした。また，採集地別に全分離菌株に対する耐性菌の出現比率を調べ，さらに，耐性菌については thiophanate-methyl 添加培地上での菌糸の伸長度により耐性度の比較を行なった。

3. 交叉耐性の検定：Thiophanate-methyl 耐性菌株と感性菌株をそれぞれ3菌株選び，各種薬剤に対する交叉耐性の有無について調べた。検定に用いた薬剤は benomyl 剤（ベンレート水和剤），sulfonic acid 剤（ユーパレン水和剤），polyoxin 剤（ポリオキシシン水和剤）および S-7131 剤（スミレックス水和剤）の4種である。各薬剤の濃度は前3者については 0, 1, 10, 100, 500 μ g/ml, S-7131 剤では 0, 0.1, 0.5, 1, 10 μ g/ml とし，いずれの薬剤も PSA 培地をオートクレーブで殺菌した後に各薬剤を添加した。

検定法は耐性菌検出の場合と同様に，まず，PSA 培地上で3日間，25°C で培養した菌の菌そう周辺部を 4mm のコルクボーラで切り取って接種源とし，各薬剤を添加した平面培地上に接種，25°C で48時間培養後，菌そう直径を測定した。その場合接種菌そうの直径を差引いて表示した。

4. 耐性菌の耐性度の比較：各分離菌を thiophanate-methyl 剤耐性によって強，中，弱（感性菌）に分け，それぞれから3菌株を選び，耐性度の比較を行なった。すなわち，強耐性菌として N-II-4, Q-2, T-6, 中程度耐性菌として M-II-1, N-II-1, P-4, 感性菌として 11, 30, M-II-3 の計9菌株を供試した。検定培地は thiophanate-methyl の 0, 1, 10, 100, 500, 1000 μ g/ml 含有 PSA 培地を用い，検定は前項の試験と同様にして行なった。さらに，これとは別に 10 μ g/ml 添加培地で，菌そうの伸長（直径）が無添加培地のそれより20%以上を示した強耐性菌7株（L-III-3, L-IV-2, L-IV-3, L-V-1, N-IV-4, Q-2）について 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 μ g/ml 添加培地を用いて同様の検定を行なった。

結 果

1. 佐賀，福岡県から採集した灰色かび病菌の thiophanate-methyl 剤に対する耐性：Thiophanate-methyl 耐性菌の検定を 10 μ g/ml 添加した培地上で行ない，その結果を採集地別にまとめたものが第1表である。耐性菌は分離菌282株中144株であり，また，耐性菌はその出現率からみて，採集地点により非常に異なり，一般にハウス栽培のキュウリとイチゴから検出された。これに対し，露地の花卉類から分離された菌株およびタマネギから分離された *Botrytis squamosa*（小菌核性腐敗病菌）からは耐性菌株は全く検出されなかった。

次に，耐性菌について薬剤無添加培地上での菌糸伸長を 100 とした場合，thiophanate-methyl 剤 10 μ g/ml 添加培地上での菌糸伸長率をまとめたのが第2表である。この表から，本剤添加培

Table 1. Tolerant and susceptible isolates of *Botrytis cinerea* obtained from various plants to thiophanate-methyl.

Locality	Host	Isolate		$\frac{R}{R+S} \times 100$ (%)	
		Susceptible (S)	Resistant (R)		
Saga pre.					
Karatsu	(1)	Strawberry	8	12	60
	(2)	Cucumber	4	11	73
	(3)	Cucumber	1	7	87
	(4)	Tomato	0	5	100
Mitagawa	(1)	Strawberry	12	0	0
	(2)	" "	1	9	90
Higashiyoka	" "	" "	7	2	22
Higashi-					
kawanobori	(1)	" "	14	0	0
	(2)	" "	5	0	0
	(3)	" "	12	0	0
Takeo		Cucumber	1	25	96
Masaki		Strawberry	11	9	45
Gochoda		Cucumber	0	16	100
Kashima		" "	1	1	50
Saga C.		Flower	35	0	0
Fukudomi		Onion ^{a)}	26	0	0
Fukuoka pre.					
Amagi C.	(1)	Cucumber	0	10	100
	(2)	" "	0	4	100
Asakura	(1)	" "	0	9	100
	(2)	" "	0	9	100
	(3)	" "	0	9	100
	(4)	" "	0	6	100
Total			138	144	

a) Fungi isolated from onion were identified as *Botrytis squamosa*.Table 2. Degree of tolerance in *Botrytis cinerea* to thiophanate-methyl (10 μ g/ml).

Mycelial growth (%) ^{a)}	Number of isolates	(Percent to total isolates)	Mean (%)
1~49	13	(9.1)	80.6
50~79	71	(49.3)	
80~99	32	(22.2)	
100~109	12	(8.3)	19.4
110~119	5	(3.5)	
120<	11	(7.6)	
Total	144	(100)	100

a) $\frac{\text{Diameter of linear mycelial growth on PSA containing 10 ppm thiophanate-methyl}}{\text{Diameter of linear mycelial growth on PSA}} \times 100$

地上での耐性菌の生育の程度をみると、無添加培地上での菌糸伸長の50~99%であった菌株が全耐性菌株の71%を占めていた。しかし、この他にわずかし菌糸伸長を示さない菌株から、120%以上の菌糸伸長率を示す強耐性菌も検出された。このように耐性菌の中にもその耐性度には差異がみられた。

2. Thiophanate-methyl 耐性菌の交叉耐性：Thiophanate-methyl 耐性菌の benomyl 剤, sulfonic acid 剤, polyoxin 剤および S-7131 剤に対する交叉耐性の検定の結果はそれぞれ第1, 第2, 3 および 4 図に示す通りである。まず, benomyl 剤に対しては第1図にみられる通り, 1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で感性菌に対しては顕著な菌糸伸長抑制効果のみられたが, 耐性菌では抑制は非常に低下し, thiophanate-methyl 剤による抑制効果と全く一致した。このことから, thiophanate-methyl 耐性菌は benomyl 剤に対して明らかに交叉耐性が認められた。また一方, 感性菌は benomyl 剤によって強い阻害のみられた。Sulfonic acid 剤に対しては, 第2図にみられるように耐性菌, 感性菌のいずれも, 1 および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地上で強い菌糸伸長阻害のみられ, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培地ではすべての菌株が全く生育しなかった。このことから, thiophanate-methyl 耐性菌は

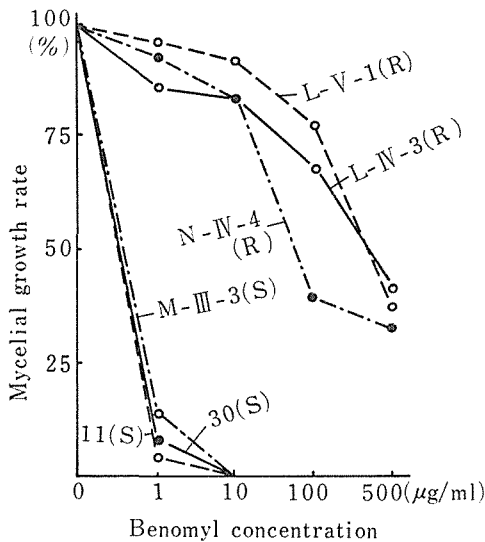


Fig. 1. Inhibition of benomyl to mycelial growth of *Botrytis cinerea*.

R: thiophanate-methyl tolerant isolate
S: thiophanate-methyl susceptible isolate

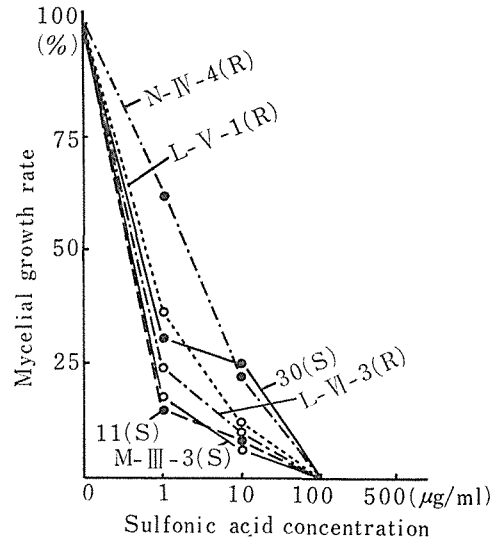


Fig. 2. Inhibition of sulfonic acid to mycelial growth of *Botrytis cinerea*.

R: thiophanate-methyl tolerant isolate
S: thiophanate-methyl susceptible isolate

sulfonic acid 剤に対して交叉耐性は認められなかった。polyoxin 剤に対しては, 第3図に示すように同薬剤の100および500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地上では耐性菌, 感性菌のいずれも阻害のみられ, 両者間に阻害度の差はみられず, この場合も交叉耐性はみられなかった。S-7131 剤に対しては第4図に示すように, 同剤の1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地で, 耐性菌, 感性菌とも全く菌糸伸長のみられず, また, 両者間にも差異は認められず, この場合も交叉耐性はみられなかった。

3. Thiophanate-methyl 剤耐性菌の耐性度の比較：Thiophanate-methyl 剤を各濃度含有する培地上で, 各菌の菌糸伸長度を調べ, それらの耐性度を比較したものが第5図である。その結果, 強耐性菌 N-II-4 と T-6 および中程度耐性菌 N-II-1 と P-4 の4菌株は, 本剤を10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

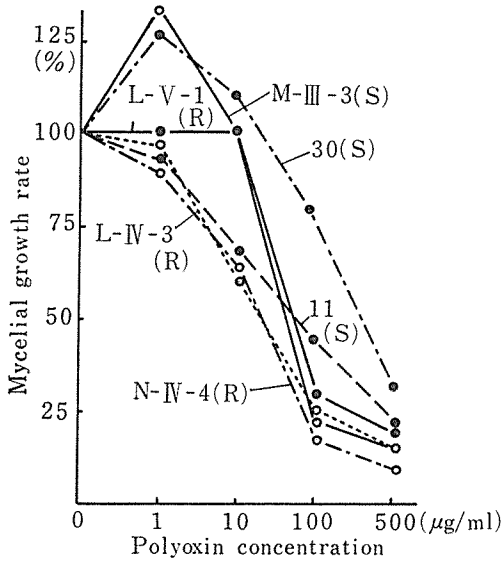


Fig. 3. Inhibition of polyoxin to mycelial growth of *Botrytis cinerea*.

R: thiophanate-methyl tolerant isolate
S: thiophanate-methyl susceptible isolate

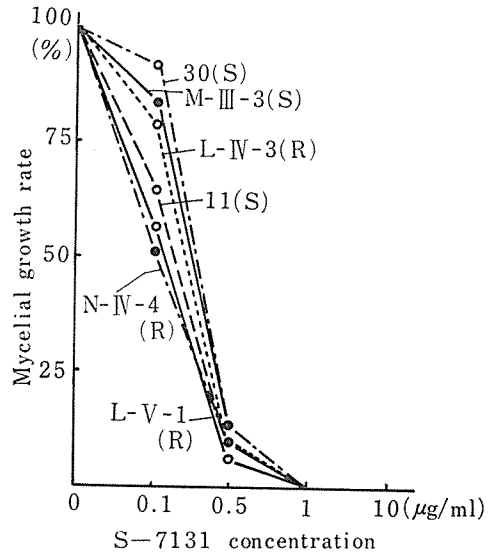


Fig. 4. Inhibition of S-7131 to mycelial growth of *Botrytis cinerea*.

R: thiophanate-methyl tolerant isolate
S: thiophanate-methyl susceptible isolate

含有する培地上での菌糸伸長の方が、本剤の無添加培地上でのそれよりも良好であり、また、500 μg/ml でも菌糸の伸長は十分みられた。これに対し、感性菌の 11, 30, M-III-3 では 10 μg/ml で完全に菌糸の伸長は阻害された。この現象をさらに、強耐性菌 7 株について検討した結果が第 6 図である。それによると、N-I-4 と N-IV-4 の 2 菌糸が前述と同様に、本剤を含む培地上での方が生育は良好であった。

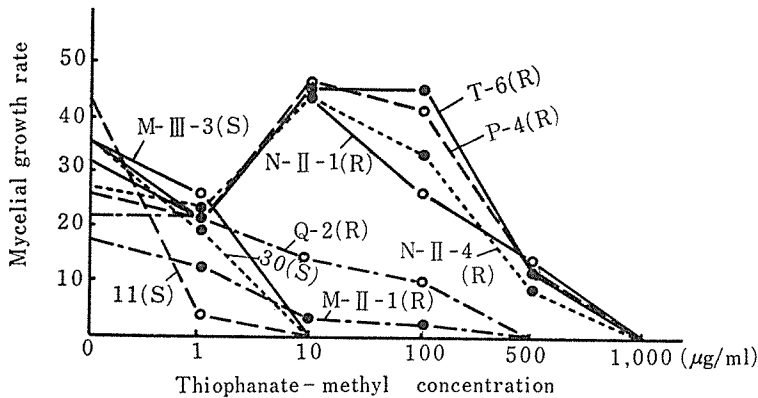


Fig. 5. Inhibition of thiophanate-methyl to mycelial growth of *Botrytis cinerea*.

R: thiophanate-methyl tolerant isolate
S: thiophanate-methyl susceptible isolate

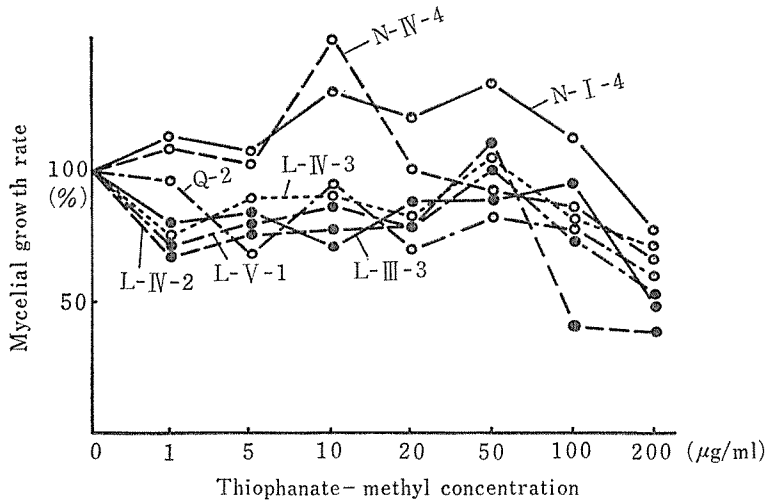


Fig. 6. Inhibition of thiophanate-methyl to mycelial growth of thiophanate-methyl tolerant isolate of *B. cinerea*.

考 察

各種病害に対する thiophanate-methyl 剤の防除効果が低下してきた原因は本剤耐性菌の出現とその増加によることが報告^{3,5,11)}されているが、とくに、キュウリ灰色かび病の場合は年間5～9回、本剤を散布すれば1年にして耐性菌が現われ、他の病害、例えばキュウリ・メロンうどんこ病やリンゴ黒星病にみられる耐性菌の出現より非常に早いことが分かっている⁵⁾。従って、九州においても、ハウス栽培のキュウリでは thiophanate-methyl または benomyl 剤の防除効果が低下していることは手塚らの報告¹¹⁾にある通り、早くから問題になっていた。本実験においても、佐賀、福岡県のハウス栽培キュウリ、イチゴから耐性菌が検出された。また、耐性菌の検出率はその採集地点によって異なり、本剤の効果が低下したといわれているハウス栽培のキュウリからもっとも多く分離された。一方、露地栽培の花弁およびタマネギから分離された菌株には全く耐性菌は検出されず、benzimidazole 系薬剤の散布と耐性菌の出現とは密接な関係がみられ、このことは今までの報告^{2,3,10,12)}にある通りである。

Thiophanate-methyl 耐性菌はこれと同系 (benzimidazole 系) 列の殺菌剤である benomyl 剤にも交叉耐性がみられることは広く知られている^{1,3,6,8)} ことであるが、本実験の検定結果についても従来の報告にあるように、thiophanate-methyl 耐性菌は benomyl 剤にも耐性を示した。一方、これとは異種の殺菌剤である polyxin 剤、sulfonic acid 剤および S-7131 剤には耐性菌も感性菌も同じように感性であり、いずれの菌も、sulfonic acid 剤では 100ppm で、S-7131 剤では 1ppm で完全に菌糸伸長は阻害された。このことは thiophanate-methyl 耐性菌によって占められているハウスでの防除に1つの指針を与えるものと思われる。

これらの耐性菌にも、その耐性の程度には差異がみられ、耐性菌の中の80%は 10 μ g/ml 添加培地では無添加培地のそれより菌糸伸長は劣るが、中には強耐性菌も存在しており、10～100 μ g/ml 添加培地上の方が菌糸伸長が逆に促進されるという菌株も認められた。Geeson⁴⁾ や Polach⁷⁾ は耐性菌の中には 1,000 μ g/ml 含有培地上でも生育する菌の存在を報告しており、このような強耐性菌が存在するハウス内での薬剤の散布は逆効果をもたらすことも考えられる。

摘 要

佐賀，福岡県下のハウス栽培のキュウリ，イチゴおよび露地栽培の花弁類，タマネギから灰色かび病菌を分離し，これらの菌について thiophanate-methyl 剤耐性の検定を行なった．分離菌 282株の中，thiophanate-methyl 耐性菌は144株で，耐性菌はすべてハウス栽培のキュウリ，イチゴから分離された．耐性菌の中には強い菌株がみられ，10～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の thiophanate-methyl 剤を添加した培地中での菌糸伸長が無添加培地中のそれよりも良好な菌株も認められた．これらの本剤耐性菌は benomyl 剤に対して耐性を示して交叉耐性がみられたが，polyoxin 剤，sulfonic acid 剤および S-7131 剤に対しては感性であった．

謝 辞

本実験は森川希志子君の協力によってなされたもので，ここに深謝の意を表する．

引 用 文 献

- 1) Bollen, G. J. (1971). Resistance to benomyl and some chemically related compounds in strains of *Penicillium* species. *Neth. J. Pl. Path.* **77**: 187-193.
- 2) ——— (1972). A comparison of the in vitro antifungal spectra of thiophanates and benomyl. *ibid.* **78**: 55-64.
- 3) ——— and A. van Zaayen (1975). Resistance to benzimidazole fungicides in pathogenic strains of *Verticillium fungicola*. *ibid.* **81**: 157-167.
- 4) Geeson, J. D. (1976). Comparative studies of methyl-benzimidazol-2-ylcarbamate-tolerant and sensitive isolates of *Botrytis cinerea* and other fungi. *Trans. Br. mycol. Soc.* **66**: 123-129.
- 5) 飯田 格 (1975). 我が国における薬剤耐性植物病原菌の発生と実態. 植物防疫, **29**, 163-166.
- 6) Jones, A. L. and R. J. Walker (1976). Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine and benzimidazole fungicides in Michigan. *Plant Dis. Repter.* **60**, 40-44.
- 7) Polach, F. J. and W. T. Molin (1975). Benzimidazole-resistant mutant derived from a single ascospore culture of *Botryotinia fuckeliana*. *Phytopathology*, **65**, 902-904.
- 8) Ruppel, E. G. (1975). Biology of benomyl-tolerant strains of *Cercospora beticola* from sugar beet. *ibid.* **65**, 785-789.
- 9) Schreiber, L. R. and A. M. Townsend (1976). Naturally occurring tolerance in isolates of *Ceratocystis ulmi* to methyl-2-benzimidazolecarbamate hydrochloride. *ibid.* **66**, 225-227.
- 10) Talboys, P. W. and M. K. Davies (1976). Benomyl tolerance in *Verticillium dahliae*. *Ann. appl. Biol.* **82**, 41-50.
- 11) 手塚信夫・木曾 皓 (1975). 福岡県における *Botrytis* 属菌のチオフェネートメチル耐性菌株の出現. 九病虫研会報, **21**, 76-77.
- 12) Yoder, K. S. and E. J. Klos (1976). Tolerance to dodine in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, **66**, 918-923.