

十勝地方の豆類および野菜類における

ジカルボキシイミド系薬剤耐性灰色かび病菌の発生

堀田 治邦*¹ 谷井 昭夫*²

ジカルボキシイミド系薬剤であるプロシミドン、ビンクロゾリンおよびイプロジオン剤は、道内における豆類および野菜類の灰色かび病防除薬剤として広く用いられている。1987年、十勝地方の豆類圃場で灰色かび病に対するこれら薬剤の防除効果の低下例が認められた。そこで同地方の豆類および野菜の罹病株から灰色かび病菌を分離し、同系薬剤に対する感受性を調査した。インゲンマメから分離した314菌株のうちプロシミドン剤耐性は94.8%、ビンクロゾリン剤耐性は67.2%であった。アズキから分離した137菌株ではプロシミドンおよびビンクロゾリン剤とも81.8%が耐性であった。これらの耐性菌は十勝地方の全市町村に分布していた。なお、耐性菌は野菜類から分離した菌株でも認められた。十勝農試内のインゲンマメ圃場でビンクロゾリン水和剤を3回散布した区では薬剤の効果の低下が見られ、分離した灰色かび病菌の耐性菌率は87%であり、無処理区の同27%に比べ著しく高かった。耐性菌はプロシミドン、ビンクロゾリンおよびイプロジオン剤間で交差耐性が認められた。

I 緒 言

Botrytis cinerea Persoon による灰色かび病は、多犯性であり、各種作物の重要病害の一つである。十勝地方でも豆類、野菜類および花卉類で発生が多く、被害を与えている。本病の防除薬剤としては従来ベンゾイミダゾール系の薬剤が全国的に普及していたが、1974年、花卉類で同系の薬剤に耐性を有する灰色かび病の発生が初めて報告され¹⁾、その後各地の各種作物で耐性菌の発生による防除効果の低下が起こり問題となった。十勝地方でも豆類の灰色かび病防除に同系のチオファネートメチル剤が使用されていたが、1977年にアズキで同剤耐性菌の発生による灰色かび病が多発生した例が見られ¹⁾、翌年種子感染による立枯症が発生した。

その後、本病の防除薬剤としてジカルボキシイミド系薬剤が登録され、各種作物の基幹防除薬剤

となった。現在同系薬剤は、菌核病に対しても卓効を示すので、同時防除が可能であり、広く普及している。

本病菌のジカルボキシイミド系薬剤に対する耐性に関して、in vitro では耐性菌が出現しやすく圃場では出現しにくいとされていた^{1,2)}が、Maraité ら⁷⁾は同系のビンクロゾリン剤に対する耐性菌が圃場でも発生し得ることを報告しており、わが国でも1980～1981年に本州の施設野菜類で同系のイプロジオンおよびプロシミドン剤に耐性菌が発生した例が報告されている^{8)・10)}。同系薬剤に対する耐性菌の発生、拡大は大きく懸念されていた。

1987年、ジカルボキシイミド系薬剤を散布した十勝地方の豆類圃場で灰色かび病が多発生し、耐性菌の発生による本剤の防除効果の低下が懸念された。このことから、本報告では、これらの圃場における灰色かび病菌のジカルボキシイミド系薬剤に対する感受性の検定を行い、十勝地方における耐性菌の発生、分布とその諸性質について検討したので報告する。

1991年10月4日受理

*¹ 北海道立十勝農業試験場 082 河西郡芽室町

*² 同上(現;道南農業試験場 014 12 亀田郡大野町)

II 試験方法

1. 圃場におけるビンクロゾリン剤の防除効果試験

豆類圃場における灰色かび病の発生とビンクロゾリン剤の防除効果に関して、十勝農試圃場内圃場において、インゲンマメでは1986年および1987年、アズキでは1987年に調査した。試験区はビンクロゾリン剤散布区と無散布区を設け、それぞれ3反復とし、散布区では開花後10日以内に初回散布を行い、以降10日間隔で計3回散布した。発病度は最終散布の1週間後に調査した。また、1987年にはインゲンマメに関する試験圃場において菌核病の発病度も同時に調査し、更に同圃場から灰色かび病菌を分離採集して、薬剤に対する感受性検定に供試した。分離、採取した菌株数は、散布区から45菌株、および無散布区から15菌株である。

2. 病原菌の分離と薬剤に対する感受性検定

病原菌の分離は罹病組織上に形成された分生胞子を殺菌水（1%ツイン20を含む）に懸濁したのち、ストレプトマイシン加用ポテトデキストロース寒天培地（PDA）に画線し、伸長した菌糸を純粋分離した。

灰色かび病菌の薬剤に対する感受性の検定はPDA培地に薬剤を添加して行った。検定薬剤はプロシミドン、ビンクロゾリンおよびチオファネートメチル剤で、検定濃度は250ppm、5ppmおよび最少生育阻止濃度（MIC：プロシミドン剤1.56ppm、ビンクロゾリン剤3.1ppm、チオファ

ネートメチル剤1.0ppm）である。これら培地に4～5日平板培養した検定菌株をコルクボーラで直径5mmに打ち抜き、移植した。25℃、2～3日間培養後、菌糸の生育したものを耐性菌と判定した。耐性菌のうち250ppm以上で生育したものを強耐性菌、それ以下を弱耐性菌とした。

3. 耐性菌の分布調査

十勝地方の各市町村から罹病株（1地点5サンプル、各3地点）を採集し耐性菌の分布を調査した。供試菌はインゲンマメから分離した314株（20市町村）、アズキから分離した137株（15市町村）および野菜類から分離した88株（6市町村）で、ビンクロゾリン、プロシミドンおよびチオファネートメチル剤に対する感受性検定を前記と同様の方法で実施した。

4. 耐性菌の交差耐性

1988年に十勝農試圃場で実施したインゲンマメにおけるビンクロゾリン剤の防除効果試験区から分離した灰色かび病菌60菌株（散布区から45菌株および無散布区から15菌株）のジカルボキシイミド系薬剤に対する交差耐性を調査した。検定薬剤は同系の3薬剤（プロシミドン、ビンクロゾリンおよびイプロジオン剤）とベンゾイミダゾール系のチオファネートメチル剤で、処理濃度はそれぞれの薬剤とも0.625、1.25、2.5、5、20、50、100、250、625、1000、2000ppmである。培養した検定菌株を上記の培地に移植し、菌糸の伸長の有無を調査した。

Table 1 Effect of vinclozolin on the incidence of gray mold and sclerotinia rot of beans

(Tokachi Agr. Exp. Sta. 1986 - 1987)

Treatment	disease severity			
	Gray mold			Sclerotinia rot
	Common bean ^{a)} Aug. 22, 1986	Common bean ^{b)} Aug. 14, 1987	Azuki bean ^{c)} Sept. 9, 1987	Common bean ^{b)} Aug. 14, 1987
Vinclozolin 1/1000 (50%)WP	24.1*	23.6	12.7	0.5**
Untreated control	31.4	26.9	17.0	67.8

Remark 1) *and** indicate a statistically difference from untreated control at p=0.05 and 0.01, respectively.

2) Cultivating condition and fungicide applications are as follows,

a): cv. Taishokintoki, initial flowering date July 15, foliage application date July. 25, Aug. 4 and 14, application rate 100 ℓ/10a,

b): cv. Taishokintoki, initial flowering date July 13, foliage application date July. 18, 28 and Aug. 7, application rate 100 ℓ/10a,

c): cv. Takarashozu, initial flowering date July 29, foliage application date Aug 10, 20 and 31, application rate 100 ℓ/10a,

Ⅲ 試験結果

1. 圃場における薬剤感受性の低下

インゲンマメ圃場におけるビンクロゾリン水和剤の灰色かび病に対する防除効果は、1986年は認められるが、1987年は認められなかった。1987年における散布区では、菌核病に対する防除効果が著しく高かったため、防除効果の低下は灰色かび病に対してのみ認められたと言える。また、アズキ圃場においても灰色かび病に対し同剤の散布は防除効果が認められなかった。(Table. 1)。

2. ビンクロゾリン水和剤散布区における耐性菌率

1987年のインゲンマメにおけるビンクロゾリン剤の防除効果試験の圃場から灰色かび病菌を分離し、それらのビンクロゾリン、プロシミドンおよびチオファネートメチル剤に対する感受性を調査した。その結果、散布区から分離した菌株(45菌株)はビンクロゾリン剤に対し高い耐性菌率(約87%)を示し、また同剤の耐性について程度の異なる強耐性菌と弱耐性菌を含んでいた。なお、無散布区からの菌株(15菌株)では、ビンクロゾリン剤に対する耐性菌率が散布区に比べ著しく低かった(27%)が、耐性の程度の異なる菌株を含んでいるのは散布区と同様であった(Fig. 1 左側のグラフ)。また、これらの分離菌のプロシミドン剤耐性をみると、散布区からの菌株では耐性菌率が著しく高く(約87%)、それらは全て強耐

性菌に区分された(Fig. 1 中間のグラフ)。ビンクロゾリン剤耐性菌は同時にプロシミドン剤耐性も獲得していたといえる。同様に分離菌株のチオファネートメチル剤への耐性菌率は散布区からの分離株でかなり高率となり、無散布区からの分離菌株も同様であった。なお、チオファネートメチル剤耐性に関しても強および弱の程度の異なる菌株が混在していた(Fig. 1 右側のグラフ)。

3. 十勝地方における耐性菌の分布

十勝地方の灰色かび病罹病インゲンマメから分離した314菌株について、プロシミドン、ビンクロゾリンおよびチオファネートメチル剤に対する感受性を調査した。その結果、これらのジカルボキシイミド系薬剤耐性菌率はプロシミドン剤に対して98.4%、ビンクロゾリン剤に対して67.2%といずれも高かった(Fig. 2)。また、場内圃場からの分離菌と同様それぞれの薬剤に対し、耐性強度の異なる強および弱の耐性菌が含まれていた。なお、プロシミドンおよびビンクロゾリン剤の耐性菌数は異なったが、ビンクロゾリン剤耐性菌数とプロシミドン剤耐性菌数はほぼ同水準であった。

十勝地方における耐性菌の分布を見ると、プロシミドン剤に対しては全20市町村で(Fig. 3)、ビンクロゾリン剤に対しては陸別町を除く19市町村で耐性菌がみられている(Fig. 4)。特に、鹿追町、清水町および帯広市では、両薬剤への耐性菌率がいずれも100%に達した。

次に十勝地方の罹病アズキから分離した137菌

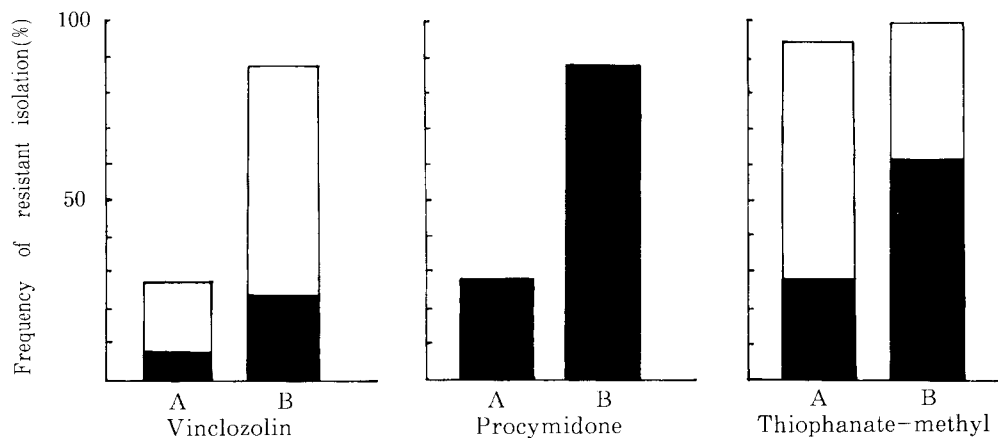


Fig.1 Change of the population of dicarboximides and benzimidazole resistant strains of *Botrytis cinerea* isolated from untreated (A) and vinclozolin application (B) in the field.
 ■: high level(250ppm), □: low level(5-50ppm)

株についてみると、ジカルボキシイミド系薬剤耐性菌率は、プロシミドンおよびビンクロゾリン剤ともに81.8%であった (Fig. 5)。なお、プロシミドン剤耐性菌はすべて強耐性菌で、ビンクロゾリン剤耐性菌は強および弱耐性菌が存在した。

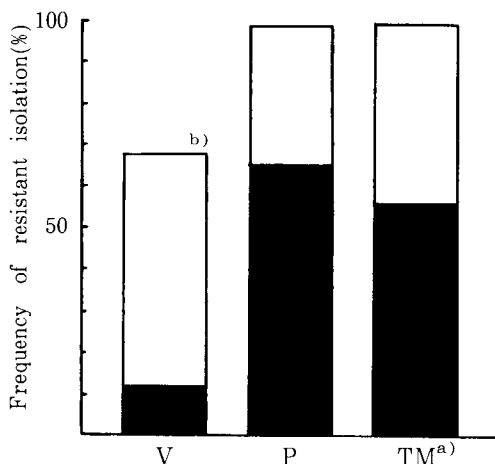


Fig.2 Rate of isolates resistant to dicarboximides and benzimidazole in 314 *Botrytis cinerea* isolates of common bean collected from Tokachi district

a) resistant isolates V: to vinclorzin, P: to procymidone TM: to thiophanate-methyl.
b) ■: high level (250ppm), □: low level (5ppm)

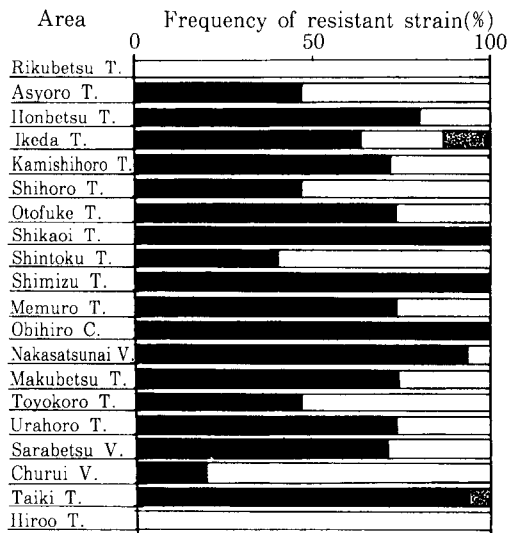


Fig.3 Distribution and rate of procymidone-resistant *Botrytis cinerea* on common bean in Tokachi district-1987-

■: high level (250ppm), □: low level (5ppm),
▨: sensitive.

十勝地方におけるビンクロゾリン剤耐性菌の分布は、調査した15市町村全地域に及び、各市町村とも60~100%と高率の耐性菌率となった (Fig. 6)。

野菜類分離菌株のビンクロゾリン剤耐性菌率は54.5%であった。調査した6市町村のうち畑圃場

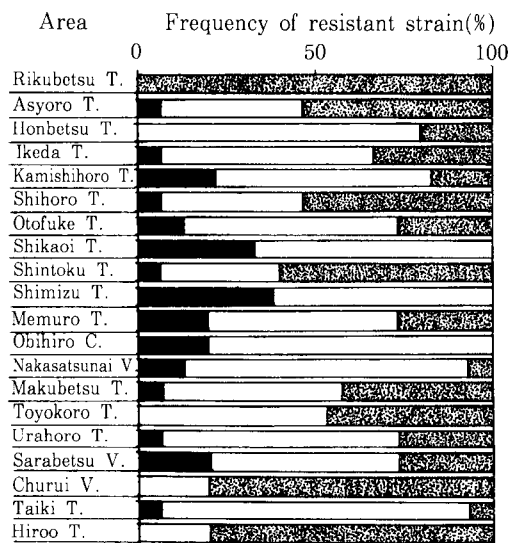


Fig.4 Distribution and rate of procymidone-resistant *Botrytis cinerea* on common bean in Tokachi district-1987-

■: high level (250ppm), □: low level (5ppm),
▨: sensitive.

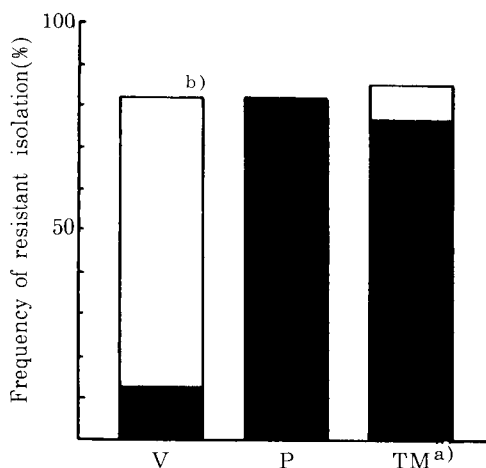


Fig.5 Rate of isolates resistant to dicarboximides and benzimidazole in 137 *Botrytis cinerea* isolates of azuki bean collected from Tokachi district

a) resistant isolates V: to vinclorzin, P: to procymidone TM: to thiophanate-methyl.

b) ■: high level (250ppm), □: low level (5ppm)

に隣接したハウス栽培から罹病株を採取した帯広市、幕別町および更別村では耐性菌率が高かった (Fig. 7)。

ベンゾイミダゾール系薬剤のチオファネートメチル剤に対する耐性菌率は、インゲンマメ分離株で98.7%, アズキ分離株で84.7%, 野菜類分離株で65.9%といずれもジカルボキシイミド系薬剤耐性菌率を上回り、十勝地方全域に分布していた。

4. ジカルボキシイミド系薬剤に対する交差耐性

前記2の試験結果を菌株毎(60菌株)にジカルボキシイミド系の3薬剤およびベンゾイミダゾール系のチオファネートメチル剤に対する耐性濃度を比較して示したのが Fig. 8 である。ジカルボキシイミド系薬剤に対する耐性は、いずれの薬剤に対しても類似した傾向を示しており、交差耐性が認められる。また、耐性菌は各薬剤に対し耐性となる濃度が異なり、プロシモン剤では2000ppm以上で耐性の強耐性菌、ビンクロゾリン剤では50ppm以下および2000ppm以上で耐性の弱および強耐性菌、イプロジオン剤では5ppm以下で耐性の弱耐性菌が存在した。チオファネートメチル

剤耐性も同時に持つ菌株が多いが、ジカルボキシイミド系薬剤との交差耐性は認められなかった。

IV 論 議

Botrytis cinerea による灰色かび病は、多くの作物で耐性菌を発生し、栽培上大きな問題となっている。本病菌はかつてベンゾイミダゾール系薬剤に対し耐性菌が発生し、防除薬剤はジカルボキシイミド系薬剤に転換せざるを得なかった。同系の薬剤は、各種作物の灰色かび病に有効であり、十勝地方では主に豆類および野菜類で使用されている。しかし、同系の薬剤に対しても耐性菌の出現が報告されている^{2), 3), 4), 5), 6), 8), 12), 14)}。

ジカルボキシイミド系薬剤では“耐性菌は in vitro で容易に発生するが、in vivo では発生しづらいか、発生しても淘汰される”と考えられていた¹²⁾。Maraite⁷⁾らは、ビンクロゾリン剤を散布した圃場で耐性菌が発生し、それによる防除効果の低下が起こりうることを初めて報告した。その後、わが国においても竹内・長井¹⁰⁾および村越・細矢⁸⁾により、野菜類で耐性菌の発生による防除効果の低下が指摘されてきた。十勝地方の豆類圃場における灰色かび病に対して、ジカルボキシイミド系薬剤の防除効果の低下は、過去の事例から耐性菌の発生によることは十分推測される。この試験の in vitro における薬剤感受性検定の結果、同系薬剤の耐性菌は十勝全域から分離

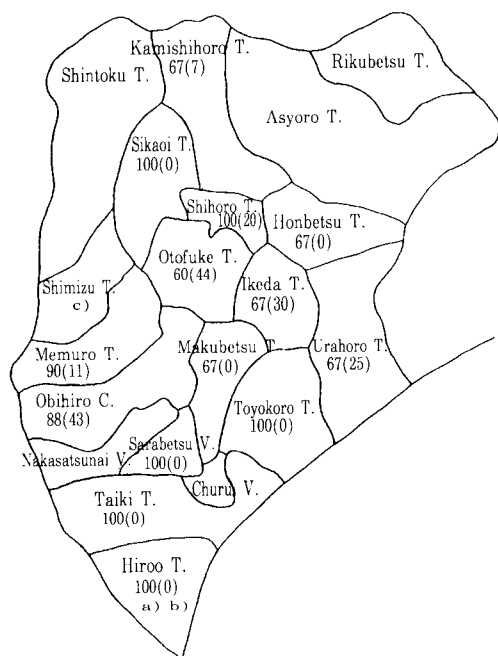


Fig. 6 Distribution of vinclozolin-resistant *Botrytis cinerea* on azuki bean in Tokachi district -1987-

- a): % isolates resistant to vinclozolin,
b): % isolates with high level resistance,
c): no investigation.

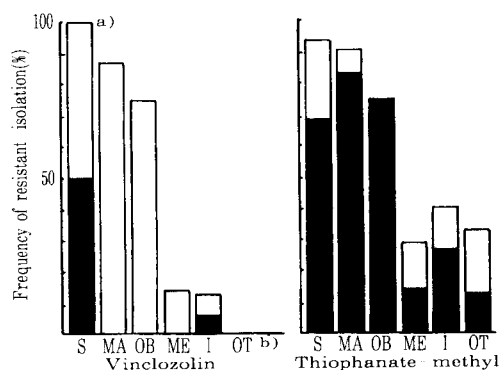


Fig. 7 Rate of isolates resistant to vinclozolin and thiophanate-methyl in 88 *Botrytis cinerea* isolates from vegetable fields collected in Tokachi district

- a) ■: high level(500ppm), □: low level(5ppm),
b) :S=Sarabetsu V., MA=Makubetsu T., OB=Obihiro C., ME=Memuro T., I=Ikeda T., OT=Otofuke T.,
c) :Tomato, Cucumber, Eggplant, Red pepper, Sweet pepper, Lettuce and Garden bean.

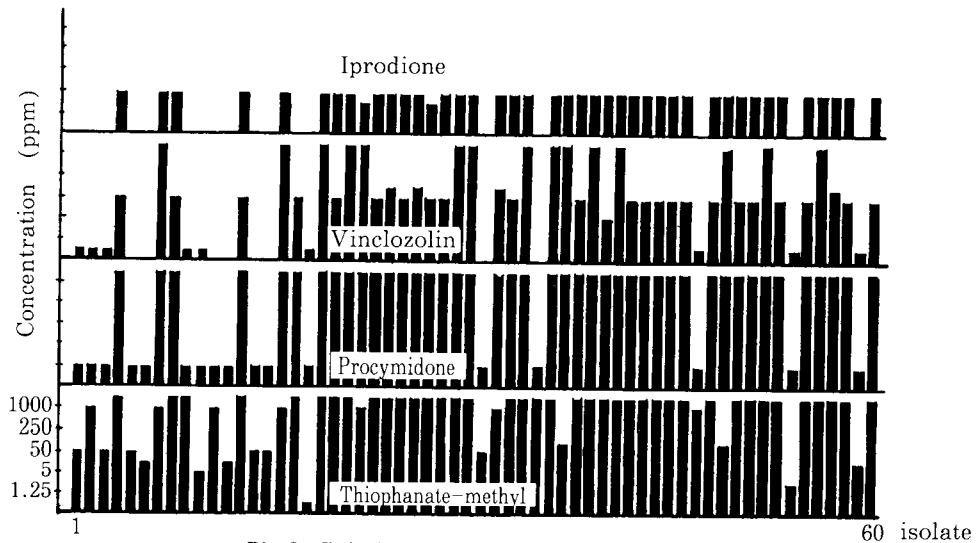


Fig.8 Relation among 4 chemicals in common bean isolates of *Botrytis cinerea*. Bars show resistant level in each isolate.

され、また、耐性菌の密度も60~100%とかなり高いことが明らかとなった。一般圃場で、ジカルボキシミド系薬剤の耐性菌が広域、かつ高密度に発生したことは極めてめずらしい事例である。

十勝農試圃場のインゲンマメでの灰色かび病の発病と耐性菌率の関係をみると、ビンクロゾリン剤散布区の耐性菌率が約90%に上昇した場合、防除効果は全く見られなくなっており、耐性菌の発生による防除効果の低下を直接証明する結果であるといえよう。

本州における本病の耐性菌は、主に施設栽培の野菜類で発生しているが、その密度は一度高くなっても翌年には再び低くなっていることが多い。竹内・長井¹¹⁾は耐性菌の性質として越冬後の生存率が感受性菌に比べ低く、耐性菌は夏季の高温で淘汰されると指摘している。その理由として、①保存菌株の培養6ヶ月後の生存率をみると、耐性菌は感受性菌に比べ低く、高温保存で低下する傾向にある、②保存菌株の病原力は耐性菌で劣る、③菌核の越冬状況は耐性菌の方が低い、ことをあげている。本州の野菜類の栽培は主に冬季~春季で、夏季には作付けされない。本州では耐性菌の越冬による淘汰が十分考えられる。しかし、十勝地方では、夏季に灰色かび病の発生最盛期を迎える。灰色かび病菌にとって十勝地方の夏季の高温は逆に好適で、本州地方で見られる耐性菌の

密度低下は考えにくい。今後、ジカルボキシミド系薬剤への耐性菌の発生地域における動向に注意すると共に同系薬剤の使用方法については十分な配慮が必要であろう。

ジカルボキシミド系薬剤耐性菌は圃場で発生した菌株と in vitro で発生した菌株で性質の異なる場合が多い。in vitro 由来の耐性菌は高度耐性菌が多く^{5)・6)・12)}、圃場では高度および中度耐性菌が分離される^{7)・10)}。十勝地方の分離菌のなかでも、ジカルボキシミド系薬剤に対し中度耐性(弱耐性)菌が分離された。同系薬剤に対する耐性菌の発生は、圃場特有の発生形態を示したといえる。

また、同系薬剤耐性菌のベンゾイミダゾール系薬剤への耐性についても興味深い。すなわち同系薬剤の耐性はベンゾイミダゾール系薬剤に交差耐性を示さないが、十勝地方で分離した同系薬剤の耐性菌はそのほとんどがベンゾイミダゾール系薬剤のチオファネートメチル剤に耐性であった。同様な事例は他の作物でもみられている^{8)・9)・14)}。豆類圃場における同系薬剤の耐性菌はベンゾイミダゾール系薬剤の耐性も保持しており、多剤耐性菌であったといえよう。ベンゾイミダゾール系薬剤の場合も圃場における防除効果は期待できないであろう。

耐性菌はジカルボキシミド系薬剤(プロシモド、ビンクロゾリン、イプロジオン)において交差耐性

を示すことが知られている^{3)・7)・8)・10)・12)・14)}。

本試験でも同様の交差耐性が認められた。一般農家圃場から分離した菌株のイプロジオン耐性は未検討であるが、本試験の交差耐性の結果から推察すると同剤の防除効果も期待できないといえよう。

本病菌のジカルボキシイミド系薬剤耐性菌は豆類圃場のほか、野菜類のハウスからも分離された。耐性菌の発生したハウスはいずれも畑作圃場に隣接しており、これらの圃場から耐性菌が拡散したものと考えられる。今後、同系薬剤耐性菌の他の地域および作物への発生拡大が予想され、その発生動向には十分注意する必要がある。特にアズキでは灰色かび病による発芽後の立枯症が発生する場合があります¹⁾、耐性菌の越冬による翌年の発生が懸念される。種子の厳選や種子消毒を徹底し、分布の拡大に十分注意しなくてはならない。

ジカルボキシイミド系薬剤は豆類等の灰色かび病に対する防除効果は低下したが、菌核病に対してはなお卓効を示す。灰色かび病と菌核病は発生時期が同じで同時防除が望ましい。耐性菌の密度を高めず、かつ、実用的な防除体系として他系薬剤とのローテーションによる防除体系の確立が強く望まれる。また、ジカルボキシイミド系薬剤耐性菌のモニタリングも今後継続し、発生動向や密度について調査する必要がある。

謝 辞：本試験を遂行するにあたり、罹病サンプルの採集には十勝管内の各農業改良普及所の方々に協力いただいた。菌の分離には北海道大学農学部農業生物学科、永田龍哉氏に協力していただいた。また、日本曹達株式会社、BASF ジャパン株式会社、住友化学工業株式会社およびローヌ・プーラン アグロ株式会社には薬剤原体を提供していただいた。各位に深く謝意を表する。

引用文献

- 1) 青田盾彦, 谷井昭夫, 赤井 純. “*Botrytis cinerea* Pers. によるアズキの立枯症”. 日植病報. **44**, 72 (1978).
- 2) Dennis, C.; Davis, R. P. “Tolerance of *Botrytis cinerea* to Iprodione and Vinclozolin”. Pl. Path. **28**, 131–133 (1979).
- 3) 古谷真二, “アイプロデオン剤に対する耐性灰色かび病の発生とその特性” 日植病報. **45**, 105 (1979).
- 4) 古谷真二, “Iprodione 剤の散布条件下における耐性菌の推移および一般無散布ハウスでの検出状況”. 日植病報. **46**, 408–409 (1980).
- 5) Hisada, Y.; Takaki, H.; Kawase, Y.; Ozaki, T. “Difference in the potential of *Botrytis cinerea* to develop resistance to Procymidone in vitro and in field”. Ann. Phytopath. Soc. Japan. **45**, 283–290 (1979).
- 6) Leroux, P.; Fritz, R. et Gredt, M. “Etudes en Laboratoire de Souches de *Botrytis cinerea* Pers., Résistantes à la Dichlozoline, au Dicloran, au Quintozene, à la Vinclozoline et au 26019RP (ou Glycophene)”. Phytopath. Z. **89**, 347–358 (1977).
- 7) Maraite, H.; Gilles, G.; Meunier, S.; Weyns, J.; Bal, E. “Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. ex Pers. to dicarboximide fungicides in strawberry fields”. Parasitica. **36** (3), 90–101 (1980).
- 8) 村越重雄, 細矢俊一郎. “トマト圃場におけるイプロジオン耐性灰色かび病菌の出現”. 日植病報. **48**, 547–550 (1982).
- 9) Pappas, A. C.; Cooke, B. K.; Jodan, V. W. L. “Insensitivity of *Botrytis cinerea* to Iprodione, Procymidone and Vinclozolin and their uptake by the fungus”. Plant. Pathol. **28**, 71–76 (1979).
- 10) 竹内妙子, 長井雄治. “施設栽培のトマトおよびキュウリにおけるジカルボキシイミド系殺菌剤に対する耐性灰色かび病菌の発生”. **48**, 210–216 (1982).
- 11) 竹内妙子, 長井雄治. “ジカルボキシイミド系殺菌剤耐性灰色かび病菌の生存力”. 日植病報. **50**, 273–275 (1984).
- 12) 手塚信夫, 西 泰道, 渡辺康正. “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**, 26–33 (1980).
- 13) 山本 繁. “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 (1975).
- 14) 善林六朗. “イプロジオンとその関連化合物に対する灰色かび病菌の感受性”. 関東病虫研報. **27**, 76–77 (1980).

Occurrence of *Botrytis cinerea* Resistant to Dicarboximide Fungicides in Bean and Vegetable Fields of Tokachi District

Harukuni HORITA and Akio TANII

Summary

Dicarboximide fungicides, such as procymidone, vinclozolin and iprodione are prevalently introduced for control of gray mold in beans and vegetables fields of Tokachi district. But some reduced effect of these fungicides against *Botrytis cinerea*, which were caused of occurrence of resistant strains to those, were observed in fields of common beans and adzuki beans in 1987. The dicarboximide resistant strains of *Botrytis cinerea* were obtained with a high frequency in the fields of practical applications of fungicides.

Percentage of the resistant strains isolated from common bean were 94.8% to procymidone, and 67.2% to vinclozolin, and that from adzuki bean were 81.8% to both procymidone and vinclozolin. Resistant strains had a wide distribution within Tokachi district.

Resistant strains to vinclozolin were detected in *Botrytis* samples collected from the untreated plots of common beans in 1987 and the frequency of resistant strains increased by application of the fungicides. They showed cross-resistance to procymidone and iprodione, and often also resistance to thiophanate-methyl.