

2013年および2014年の広島県におけるイネいもち病菌の QoI剤感受性検定

松浦昌平・吉岡弥生*・佐伯浩輔**・山村哲史***

キーワード：いもち病，QoI剤，ストロビルリン，耐性菌

近年，コメの輸入，食料自給率の低下，そして耕作放棄地増加等の問題への対策として，コメの生産費削減や稲作の省力化に向け，集落営農組織での共同作業化や大規模農家への農地集積等が推進されている。

QoI剤は病原菌ミトコンドリア電子伝達系の複合体タンパク質のうち，複合体Ⅲにあるチトクローム*b*のQo部位に作用する農薬の総称で，そのほとんどはストロビルリン系化合物であり，糸状菌や卵菌による多くの病害防除に卓効を示す。イネではオリサストロビン，メトミノストロビン，アゾキシストロビンを有効成分とするQoI剤が箱施用剤，本田施用剤等多様な処理法に対応した剤型で販売されており上記施策に貢献している。広島県では2012年10月現在，1農協の1地区の防除暦に箱施用剤としてのオリサストロビン剤の掲載があるほか，県内多くの農協の防除暦に，本田防除剤としてアゾキシストロビン剤またはメトミノストロビン剤の掲載がある。

病原菌のチトクローム*b*の遺伝子にG143A（143番目のアミノ酸残基がグリシンからアラニンに置換）の変異が起こると，QoI剤はチトクローム*b*タンパク質のQo部位に十分結合できなくなり，耐性菌となると考えられている（Ishii et al., 2007）。QoI剤は一般に耐性菌の発達が速く，耐性程度も高いため，耐性発達リスクは高いとされている（石井，2012）。そのため，突発的な薬効低下により病害が多発する傾向がある。わが国だけでも，キュウリうどんこ病など25種の病害で耐性菌の発生が報告されている（石井，2015）。

2012年西日本の各地でオリサストロビン剤を育苗箱施

本調査研究は「病害虫発生予察事業（2013～2014年）」において実施した。

* 広島県西部農業技術指導所

** 広島県農林水産局農業技術課

*** 広島県東部農業技術指導所

平成28年1月13日受理

用した水田でいもち病が多発し，山口，島根，愛媛県で本剤に対する耐性菌の出現が報告された。その後2013年には九州地方の長崎を除く各県，岡山県，鳥取県でも報告され，いくつかの県では耐性菌分布が広範囲に及んでいることが明らかにされた。2013年12月現在，中国5県では広島県以外のすべての県で（石井，2014），2015年12月現在，秋田県を最北とする17府県でQoI剤耐性いもち病菌の発生が確認された（各府県の防除対策技術情報等による）。さらに，オリサストロビン耐性菌が，同系統のアゾキシストロビン，メトミノストロビンに交差耐性を示すことも確かめられた（宮川・富士，2013）。

そこで，筆者らは広島県に発生したいもち病菌のQoI剤に対する感受性検定を実施し，QoI剤耐性菌の発生の有無を調査，またQoI剤の使用状況についても調査したのでそれらの結果をここに報告する。

材料および方法

1. いもち病菌の採集

いもち病菌の採集は，2013年および2014年に県内の病害虫防除所巡回調査地点を中心に行った。2013年は，6月26日～8月12日に16水田から，また，2014年は7月14日～7月23日に6水田から葉いもち病斑を採集した。持ち帰った病斑は直ちに素寒天平板培地に付着させ，顕微鏡下でキャピラリーを用いて単孢子分離を行った。この時，1圃場から最大10菌株を目標に分離した。分離した菌株はPDA斜面培地で培養，保存した。その結果，2013年は137菌株，2014年は30菌株を分離した。なお，薬剤が使用される前の感受性の野生株として，北-1株（石川県立大学より分譲）を使用した。

2. チトクローム*b*遺伝子解析による耐性菌検定

分離した菌株をPDA平板培地で培養し，菌糸先端部5mm角程度の菌体を培地を含まないように切り取り，

100 μ lのTE緩衝液 (pH8) に入れベッスル棒でつぶした。その後沸騰水で5分間煮沸し, 10,000rpmで5分間遠心して得た上清2 μ lをPCRの鋳型とした。PCR-RFLP解析はKim et al. (2003) の方法を修正して行った。PCRにはKOD FX Neoキット (東洋紡) を使用し, 全量50 μ lで反応させた。プライマーにはチトクローム*b* 遺伝子を増幅するPgCytb_F1およびPgCytb_R1 (Kim et al., 2003) を用い, 最終濃度を0.3 μ Mとした。PCRの反応条件は変性98 $^{\circ}$ C, 10秒, アニーリング55 $^{\circ}$ C, 30秒, 伸長68 $^{\circ}$ C, 1分を30サイクルとした。この反応で, 879 bpのDNA断片が増幅された。PCR産物は電気泳動により確認した後, 制限酵素*Fnu*4HIで消化した。すなわち, キット*Ita* I (ロシユ) により, PCR産物12 μ lと制限酵素0.33 μ l (3.3U) を含有する反応液50 μ lで37 $^{\circ}$ C, 20分反応させた。その後, 反応液の20 μ lを電気泳動し, DNA断片の消化の有無を確認した。

3. 寒天平板希釈法による耐性菌検定

2013年に採集した137菌株のうち, 各水田ごとに1~2菌株を任意に選び, 計13菌株を検定に供試した。QoI剤は寒天培地上で菌のシアン耐性呼吸を誘導する (Hayashi et al., 1996)。このため, 培地にシアン耐性呼吸阻害剤を添加することで, 耐性菌検定法がいくつかの病原菌で確立されている。採集したいもち病菌と野生株をPDA平板培地を用いた耐性菌検定に供試した。約50 $^{\circ}$ CのPDA培地にアゾキシストロビンフロアブルを有効成分で0, 0.1, 1, 10, 100 ppmとなるように懸濁した。一方, シアン耐性呼吸阻害剤として没食子酸*n*-プロピル (Wei et al. 2009) の0.5M DMSO溶液を作り, それを培地中で0.5mMとなるように添加した。薬剤無添加のPDA平板培地で前培養したいもち病菌の菌糸先端から径5mmの菌糸片をコルクボーラーで打ち抜き, 薬剤添加PDA平板培地の中央に置床し, 25 $^{\circ}$ C, 5日間培養した。薬剤による菌糸伸長阻止率を, 阻止率 = 100 - 薬剤添加培地上での菌糸伸長量 \times 100 / 無添加培地上での菌糸伸長量, で算出し, 各濃度における阻止率に基づく対数近似曲線から, 菌糸伸長を50%抑制するEC₅₀値を算出した。

4. 県内のQoI剤使用実態

農薬要覧 (2009~2013) よりイネ箱施用剤の流通量を抽出し, 広島県内および中国地方4県ならびに全国の水稲用QoI剤使用量の推移を調査した。このとき, 箱施用剤については, 9kg/haで使用するものとみなして, 使用面積に換算後, 農林水産統計年報の水稲作付面積により除してQoI箱施用剤の使用割合を算出した。一方,



図1 いもち病菌野生株のチトクローム*b* 遺伝子増幅断片の制限酵素*Fnu*4HIによる消化パターン, M: サイズマーカー, WT: 野生株

本田施用剤については, 10a当たり所定の使用量から, 同様に算出した。この時, 使用液量に幅のある農薬については, 広島県水稲経営指標に記載された液量に基づいて算出した。なお, エトフェンプロックス・アゾキシストロビン水和剤は水稲以外にダイズでも使用されているが, 使用量調査からは除外しなかった。

結 果

1. チトクローム*b* 遺伝子解析による耐性菌検定

2013年, 2014年ともに, 供試したすべてのいもち病菌株でチトクローム*b* 遺伝子の予測されるサイズ (879bp) のPCR増幅断片が確認された。この断片を制限酵素*Fnu*4HIで処理した結果, すべての菌株で410bp, 238bpおよび231bpの断片に消化され, 野生型 (北-1株, 感受性菌) と同様の消化パターンが観察された (図1)。すべての供試菌株でG143A変異 (耐性菌) を示す消化パターンは観察されなかった (表1, 2)。

2. 寒天平板希釈法による耐性菌検定

2013, 2014年ともに, 野生株, 供試菌株のすべてが, 没食子酸*n*-プロピル 0.5 mMを加用したアゾキシストロビン無添加培地上で2.6mm/日以上 (平均3.0mm/日, 野生株3.2mm/日) の菌糸伸長量を示した。一方, 没食子酸*n*-プロピル加用アゾキシストロビン添加培地での菌糸伸長阻止率は, 0.1ppmで60.0~84.6% (平均67.3%, 野生株75.0%) であり, 100ppmで85.7~94.1% (平均90.7%, 野生株87.5%) であった (図2)。また, すべての供試菌株が, 生育の有無でいもち病菌QoI剤耐性菌の判断の一

表1 2013年に広島県の各地域から分離されたイネいもち病菌のQoI剤耐性菌の有無

採集地	調査圃場数	分離菌株数	耐性菌分離頻度 (%) ^a	QoI 剤の使用履歴 ^b		
				育苗箱	本田	
県西部	東広島市	2	18	0	-	-
	安芸高田市	2	20	0	-	-
	廿日市市	1	10	0	-	- ^c
	北広島町	1	10	0	-	-
県東部	三原市	1	10	0	-	-
	福山市	1	10	0	-	-
	世羅町	1	10	0	-	-
	府中市	1	9	0	-	+ ^d
	神石高原町	1	7	0	-	-
	尾道市	2	12	0	-	-
県北部	庄原市	3	21	0	-	-

a PCR-RFLP および培地検定による結果

b +は当該年に QoI 剤を使用したことを表す

c 数年間本田で年1回メトミノストロピンを使用

d 本田でアゾキシストロピン水和剤を散布

表2 2014年に広島県の各地域から分離されたイネいもち病菌のQoI剤耐性菌の有無

採集地	調査圃場数	分離菌株数	耐性菌分離頻度 (%) ^a	QoI 剤の使用履歴 ^b		
				育苗箱	本田	
県西部	安芸高田市	2	10	0	-	-
	廿日市市	1	5	0	-	-
県東部	尾道市	1	5	0	-	-
県北部	三次市	1	5	0	-	-
	庄原市	1	5	0	-	-

a PCR-RFLP による結果

b +は当該年に QoI 剤を使用したことを表す

指標となり得る1ppm (Wei et al. 2009) で64.3~87.5% (平均75.2%, 野生株75.0%) の阻害率を示した (データ省略)。供試したすべての菌株に対するアゾキシストロピンの菌糸伸長に対するEC₅₀値は0.1 ppm以下であり、感受性菌と判断された。

3. 県内の QoI剤使用実態

広島県、中国地方および全国の水稲における QoI剤の流通量を図3に示した。2009年から2013年までの QoI箱施用剤の使用割合が、鳥取、島根、山口及び岡山の中国4県で12.5~32.3%、全国平均が8.3~11.1%であったのに対し、広島県では3.1%以下と低率で推移した。なお、2013年に山口県で使用割合がゼロになったのは、QoI剤耐性菌の検出に伴う使用停止によるものと推察された。一方、広島県における QoI本田施用剤の使用割合は2009年以降、増加傾向にあり、2013年には25.7%と、全国平均8.0%の3倍以上、中国地方でも高い使用割合で推移した。

考 察

広島県の水田は、標高50m未満の瀬戸内沿岸部から標高700m以上の中国山地にまで分布しており、気象条件の違いに基づき地域間でいもち病発生に差が認められることが多い。特に、近年の防除体系としては、長期残効型の育苗箱施用剤、特にイソチアニル、プロベナゾールといった抵抗性誘導剤の使用が多く、警報や注意報の発令がなければ葉いもち防除は進んではなされないのが現状である。そのため、早生品種の作付が多く、葉いもちから穂いもちへの移行が発生しやすい北部や中東部地帯では、穂いもちを対象とした穂ばらみ期の防除が主流である。

2013年および2014年に県内の各地から採集したイネいもち病菌では、すべてチトクローム*b* 遺伝子に G143A の変異は認められなかった。また、すべての菌株において、没食子酸*n*-プロピル0.5mM共存下でアゾキシス

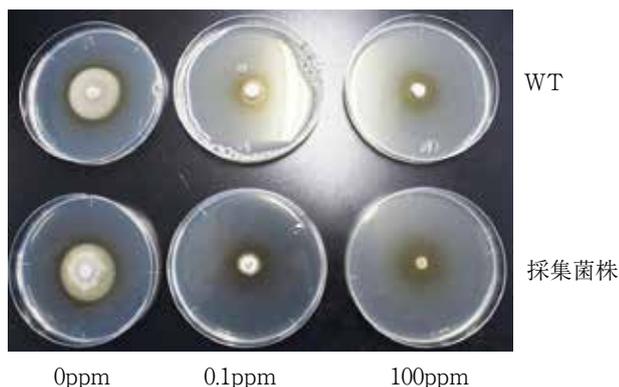


図2 いもち病菌株のアゾキシストロピン含有寒天平板希釈法による耐性菌検定

WT：野生株，採集菌株：2013年廿日市市分離菌株

トロピンの EC_{50} 値は0.1 ppm以下であった。このことから、これらの菌株はすべて QoI 剤感受性菌と考えられた。QoI 剤に対する耐性変異には、ペレニアルライグラスから分離されたいもち病菌でチトクローム *b* 遺伝子に F129L の変異も知られている (Kim et al. 2003)。しかし、イネいもち病菌の圃場耐性菌では、この変異は未だ見つかっていない。今回の PCR-RFLP 検定ではこの変異の有無を確かめなかった。しかし、この変異を持つ菌は一般に G143A 変異菌に比べ耐性程度が低く、Kim et al. (2003) は F129L 変異を有するいもち病菌の発芽に対する EC_{50} 値は約 3.5 ppm であり、G143A 変異菌に対する EC_{50} 値の 1/10 程度であったと報告している。本研究で供試した菌株ではアゾキシストロピン含有培地での菌糸伸長に対する EC_{50} 値がすべて 0.1 ppm 以下であり、検定した菌株は F129L 変異を有していないものと推察される。採集したいもち病菌株のうち、アゾキシストロピンの散布実績がある圃場由来のものは 1 菌株のみで、QoI 箱施用剤を使用した水田からはいもち病菌を採集することができなかった。しかし、いもち病菌を巡回調査地点を中心に県内全域から採集したことを考慮すると、少なくとも広島県においては、QoI 剤耐性菌が広域的に顕在化しているとは考え難い。

広島県のイネにおける QoI 箱施用剤の使用面積割合は、QoI 剤耐性いもち病菌の発生が確認された中国 4 県と比べ極めて少なく推移した。一方、QoI 本田施用剤の使用割合は、中国 4 県でも高く推移し、2013 年には全国平均の 3 倍以上まで増加した。これらの結果だけをもって、広島県で耐性菌が顕在化していない理由には必ずしもならないが、長期持続型 QoI 剤の育苗箱施用の場合、本田施用剤と比べ、QoI 剤耐性菌に対する選択圧が強く、耐性菌を発達させやすいことが推察される。このことについては、実験や疫学調査に基づいて今後実証する

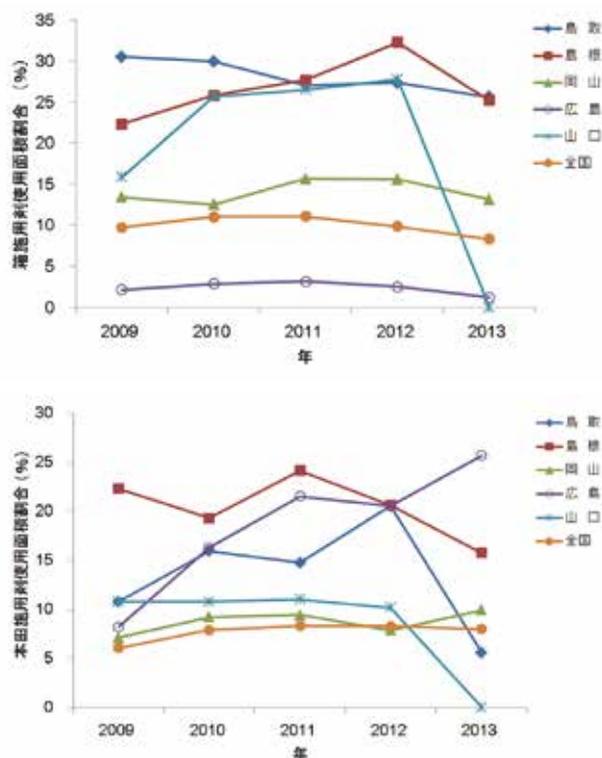


図3 水稲作付面積に対するQoI剤の使用面積割合の年次推移(上：箱施用剤，下：本田施用剤)

必要がある。

本調査の結果を受けて、広島県では「イネいもち病防除における QoI 剤及び MBI-D 剤耐性菌対策ガイドライン」(2008) に基づき、生産現場への啓発を実施した。具体的には、QoI 剤は最大年 1 回の使用とし、水稲の採種およびその周辺ほ場での使用は避ける、水稲種子は毎年更新し、種子消毒をするなどである。また、食用、飼料用を問わず種子の流通を介して耐性菌汚染種子が伝搬した事例などもあることから、今後も QoI 剤耐性菌の継続的なモニタリング調査の実施が不可欠である。

摘 要

2013 年及び 2014 年に県内各地の水田で発生した葉いもち病斑から、それぞれ 136 菌株、30 菌株のいもち病菌を単孢子分離した。これらを用いて、Kim et al. (2003) の方法で、チトクローム *b* 遺伝子の PCR-RFLP を行った結果、すべての菌株で G143A の変異は見られなかった。また、各水田ごとに 1~2 菌株をアゾキシストロピン及び没食子酸 *n*-プロピル含有平板培地で培養した結果、アゾキシストロピンの菌糸伸長阻害に対する EC_{50} 値は 0.1 ppm 以下であった。以上のことから、供試した菌株はすべて QoI 剤感受性菌と判断された。広島県内で

は、近隣の耐性菌出現県と比較して、QoI剤の育苗箱施用剤の使用面積割合は少なかった。今回の結果は、長期残効性のQoI箱施用剤の耐性菌選択圧が高いことを示唆した。

謝 辞

本研究報告の執筆に当たり御校閲を賜りました吉備国際大学地域創成農学部石井英夫氏には厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Ishii, H., Yano, K., Date, H., Furuta, A., Sagehashi, Y., Yamaguchi, T., Sugiyama, T., Nishimura, K. and Hasama, W. 2007. Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant Fungal Pathogens. *Phytopathology* 97 : 1458-1466.
- 石井英夫. 2012. QoI剤およびSDHI剤耐性菌の現状と薬剤使用ガイドライン. *植物防疫*. 66 : 481-487.
- 石井英夫. 2014. QoI剤耐性イネいもち病菌の発生状況と対策. *植物防疫*. 68 : 274-279.
- 石井英夫. 2015. QoI剤耐性菌の現状. *植物防疫*. 69 : 469-474.
- Kim, Y. S., Dixon, E. W., Vincelli, P. and Farman, M. L. 2003. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Phytopathology* 93 : 891-900.
- Hayashi, K., Watanabe, M., Tanaka, T. and Uesugi, Y. 1996. Cyanide-insensitive respiration of phytopathogenic fungi demonstrated by antifungal joint action of respiration inhibitors. *J. Pestic. Sci.* 21 : 399-403.
- 宮川典子・富士 真. 2013. QoI剤耐性イネいもち病菌の発生と対応. 第23回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集. 25.
- 日本植物病理学会耐性菌研究会. 2008. イネいもち病防除におけるQoI剤及びMBI-D剤耐性菌対策ガイドライン.
- 農薬要覧. 2009-2013. 日本植物防疫協会.
- Wei, C. Z., Katoh, H., Nishimura, K. and Ishii, H. 2009. Site-directed mutagenesis of the cytochrome *b* gene and development of diagnostic methods for identifying QoI resistance of rice blast fungus. *Pest Manag. Sci.* 65 : 1344-1351.

Susceptibility survey of Qo inhibitor for rice blast fungus in Hiroshima Prefecture in 2013-2014

Shohei MATSUURA, Yayoi YOSHIOKA, Kosuke SAIKI and
Tetsushi YAMAMURA

Summary

One hundred thirty-six and 30 isolates of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, were collected from wide areas in Hiroshima Prefecture in 2013 and 2014, respectively. All isolates were subjected to PCR-RFLP of the cytochrome *b* gene (Kim et al., 2003), resulting that the replacement of glycine with alanine was not observed at codon 143 in any of the isolates tested. Moreover, one or two isolates from each paddy field were subjected to in vitro tests for azoxystrobin sensitivity, resulting that the EC_{50} of this QoI fungicide for all isolates were less than 0.1 ppm in the presence of 0.5 mM n-propyl gallate, an inhibitor of cyanide-tolerant respiration. Thus, all isolates of rice blast fungus collected in Hiroshima were sensitive to this QoI fungicide. In Hiroshima Prefecture, the proportion of nursery box treatment with QoI fungicide was low comparing with other Prefectures where QoI resistance occurred in rice blast fungus, suggesting that nursery box treatment with QoI fungicide increases the selection pressure against resistant fungal strains due to long-lasting residual effect.

Key words : rice blast, *Pyricularia oryzae*, QoI fungicide, sensitivity