

# 愛媛県における QoI 剤耐性イネいもち病菌の検出率変化

芝田英明 黒田剛\* 毛利幸喜 村上要三 山本智樹  
萬周平 芝章二\*\* 青野光男\*\*\* 奈尾雅浩\*\*\*\*

## Changes in detection rate of QoI-resistant of *Pyricularia oryzae* in Ehime Prefecture

SHIBATA Hideaki, KURODA Tsuyoshi, MOURI Kouki, MURAKAMI Youzou, YAMAMOTO Satoki,  
YOROZU Syuuhei, SHIBA Shouji, AONO Mitsuo and NAO Masahiro

### 要 旨

2013 年から 2016 年の 4 年間、愛媛県西予市および四国中央市において、イネいもち病 QoI 剤（ストロビリン系殺菌剤）耐性菌検定を実施した。耐性菌が発生した場合、当該薬剤の使用を中止することは、耐性菌の減少に有効な手段であると考えられた。また 1 ほ場内および 1 葉内に、耐性菌と感受性菌が混在していることを確認した。

キーワード：イネ，いもち病，QoI 剤，耐性菌

### 1. 緒言

イネいもち病菌は指定有害動植物の対象種（農林水産省，2001）となるなど、水稻栽培における重要病害となっており、適切な薬剤防除が求められている。このような中で、2012 年に本病の有効薬剤とされていたストロビリン系殺菌剤（QoI 剤）において、耐性菌の発生が国内で初めて確認された（農研機構，2017）。具体的には、その年の 10 月 3 日に山口県，11 月 7 日に島根県，次いで 12 月 21 日に愛媛県から、病害虫防除技術情報等により、本耐性菌の発生確認と防除上の注意が公表された（山口県病害虫防除所，2012；島根県病害虫防除所，2012；愛媛県病害虫防除所，2012）。また 2013 年には、前年における発生も含めて福岡県をはじめ 9 府県で本耐性菌の発生が公表され（石井，2014），その後は全国に拡大し，2016 年までに 21 府県での発生確認となっている（農研機構，2017）。

2012 年の本県での発生は、南予地域の水稻ほ場で、オリサストロビン剤の混合剤を育苗箱施用していたにもかかわらず、いもち病（葉いもち）が多発したことから、QoI 剤への感受性低下の疑いが持たれた。このため、製剤を取り扱う農薬メーカーの BASF ジャパン(株)が、愛媛県下から 56 菌株を採取して耐性菌検定を実施し

た結果、耐性菌と判断される遺伝子変異菌が 51.8%の割合で確認された。これを受けて愛媛県病害虫防除所は、関係機関との調整を図った上で、前述のとおり 2012 年 12 月 21 日付け「病害虫防除技術情報（第 3 号）」にて、QoI 剤耐性菌の県内での初確認を公表するとともに、当該薬剤の使用中止などの防除対策を示した。

このような状況を踏まえ、2013 年から 2016 年の 4 年間、耐性菌検出率の高かった地区および耐性菌未確認地区を対象として QoI 剤耐性菌の年次的な発生割合を追跡調査し、防除対策に係る一知見を得たので報告する。

### 2. 材料および方法

#### 2.1 検定地域

検定の対象地域は、2012 年に耐性菌検出率が高く、2013 年から QoI 剤の使用を中止した西予市宇和町，並びに 2012 年時点で耐性菌未確認で 2014 年から一部を除き QoI 剤の使用を中止した四国中央市とした。

#### 2.2 いもち病罹病葉の採取方法

7～9 月に、主に普通期を対象とし、イネいもち病が発病しているほ場において、任意の発病株を 1 ほ場あたり 3 株抽出し、それぞれの株から罹病葉を 1 葉ずつ採取し、検定に供した。

\* 現 愛媛県南予地方局産業振興課西予農業指導班

\*\*\* 現 愛媛県農林水産研究所果樹研究センター

\*\* 現 愛媛県県民環境部環境局環境政策課

\*\*\*\* 現 愛媛県農林水産部農業振興局農産園芸課

## 2.3 検定方法

Kim, Y.S. et al (2003) の知見を基に BASF ジャパン(株)により設計されたプライマーを用いた PCR-RELP 法により検定を実施した。すなわち、いもち病罹病葉から全 DNA を抽出し、PCR によりチトクローム b 遺伝子を増幅して、制限酵素処理 (Fnu4HI) した後、電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射による増幅バンドの数とサイズを確認した。

### 2.3.1 DNA 抽出

2013 年は 1 ほ場ごとの約 5mm 角の病斑切片 5 枚を混合したもの、2014~2016 年は 1 サンプル葉ごとの約 5mm 角の病斑切片 1~5 枚を混合したものを 1 検体とした。2.0mL チューブ (TM-625, トミー精工) に、検体と 3.2mm ステンレスビーズ (SUB-30, トミー精工) を入れた。ビーズ式細胞破碎装置 (MS-100, トミー精工) で破碎 (3,000rpm, 3 分) した後、市販キット (NucleoSpin Plant II (MACHERY-NAGEL 社製)) で DNA を抽出した。

### 2.3.2 PCR-RFLP 法

精製 DNA 5.0 $\mu$ L を鋳型とし、チトクローム b 遺伝子を増幅するプライマー Primer F (10pmol/ $\mu$ L, KES415:CTTACCTTATCGATGCGTCACAACC) および Primer R (10pmol/ $\mu$ L, KES416:GCAGTATCATGAAGTGCAATTAAGTGC) をそれぞれ 2.5 $\mu$ L, Premix Taq Hot Start version (TAKARA BIO 社製) 25.0 $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 15.0 $\mu$ L を加えて反応液の全量を 50.0 $\mu$ L とした。反応温度サイクルは、DNA 増幅機器 (iCycler 170-8720JA, Bio-Rad 社製) により、94 $^{\circ}$ C 3 分間のプレヒートの後、94 $^{\circ}$ C 15 秒間、60 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 30 秒間を 40 サイクル行い、最終伸長のため、72 $^{\circ}$ C 5 分間反応させた。

制限酵素処理は、PCR 産物 20.0 $\mu$ L に Fnu4HI 0.5 $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 2.5 $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 2.0 $\mu$ L を加えて全量 25.0 $\mu$ L の反応液とし、37 $^{\circ}$ C で 4 時間反応させた。

制限酵素処理後、反応液 5 $\mu$ L (Loading Dye : 1  $\mu$ L 添加) を 2% アガロースゲル (アガロース S<錠>, ニッポンジーン社製) にアプライして電気泳動 (電気泳動装置 Mupid-exu, 100V, 30 分間) した。

### 2.3.3 判定方法

紫外線照射下でバンドの観察を行い、耐性菌は 43・144・384bp, 感受性菌は 43・528bp, 耐性菌と感受性菌の混在は 43・144・384・528bp 付近の DNA 増幅の有無で判定した。

## 3. 結果および考察

西予市における耐性菌検出率は、2013 年 60.0%, 2014 年 27.3%, 2015 年 6.7%, 2016 年 0% となり、年次を追うごとに低下する傾向がみられた。また耐性菌が検出された 2013~2015 年の 3 か年ともに、複数の病斑切片を混合した検体で耐性菌と感受性菌の混在がみられた (表 1)。

四国中央市において、2013 年はいもち病の発生が極めて少なく、検体を採取できなかった。2014 年以降の耐性菌検出率は、2014 年 100%, 2015 年 54.2%, 2016 年 6.7% となり、年次を追うごとに低下する傾向がみられた。また、2014 年は耐性菌のみ検出されたが、2015~2016 年の 2 か年において、複数の病斑切片を混合した検体で耐性菌と感受性菌の混在がみられた (表 2)。

本県においては、いもち病および紋枯病の防除薬剤としてオリサストロビン剤を含む箱施用剤が普及していた。そこで QoI 剤の耐性菌の発生確認を受け、本剤を含む箱施薬の使用を中止あるいは減少させ、地区を限って QoI 剤耐性菌の発生への影響を調査した結果、3~4 年後には耐性菌の検出率が著しく減少することが確認された。このことから、QoI 剤の箱施薬を中止することは、耐性菌の減少に有効な手段であると考えられた。

また、1 つの病斑切片をもって 1 検体とした場合には耐性菌または感受性菌のいずれかのみ検出されたが、複数の病斑切片を混合した検体においては耐性菌と感受性菌の両方が検出される場合があった。このことから、1 ほ場内および 1 葉内に、耐性菌と感受性菌が混在していることが示唆された。三浦ら (1976) は、カスガマイシン耐性イネいもち病菌が発生したほ場において、耐性菌と感受性菌が混在することを確認しており、また、同一罹病部から耐性菌と感受性菌が見いだされることはなかった。

表1 イネいもち病 QoI 剤耐性菌検出率の推移 (西予市)

項目	調査年			
	2013	2014	2015	2016
検体数	10	33	30	36
耐性菌が検出された検体数	6	9	2	0
耐性菌検出率 (%)	60.0	27.3	6.7	0
耐性菌と感受性菌の混在検体数	5	8	1	0
耐性菌と感受性菌の混在検体検出率 (%)	50.0	24.2	3.3	0

注1) 2013年：1ほ場ごとの約5mm角の病斑切片5枚を混合したものを1検体とした

注2) 2014～2016年：1サンプル葉ごとの約5mm角の病斑切片1～5枚を混合したものを1検体とした

表2 イネいもち病 QoI 剤耐性菌検出率の推移 (四国中央市)

項目	調査年			
	2013	2014	2015	2016
検体数	—	27	24	15
耐性菌が検出された検体数	—	27	13	1
耐性菌検出率 (%)	—	100	54.2	6.7
耐性菌と感受性菌の混在検体数	—	0	3	1
耐性菌と感受性菌の混在検体検出率 (%)	—	0	12.5	6.7

注1) 2013年：いもち病が極少発生であったため検体を採取できなかった

注2) 2014～2016年：1サンプル葉ごとの約5mm角の病斑切片1～5枚を混合したものを1検体とした

としていることから、QoI 剤耐性イネいもち病菌における本試験結果と一致している。

いもち病は古くから種子伝染することが知られており(栗林, 1928), また, 水稻種子は国内で県域を越えて流通していることを鑑みると, QoI 剤への耐性を持つイネいもち病菌の県内への侵入を排除できない状況にある。特に QoI 剤の場合, 耐性菌が見つかったから対応しても手遅れとなる恐れが強く, これまで QoI 剤を連年使用してきた地域では耐性菌が未だ検出されていなくても使用を中止し, 他系統薬剤に切り替えるべきとの指摘がある(石井,

2015)。すなわち, 本耐性菌が確認された時点で QoI 剤の全国的な使用を中止し, 耐性菌のリスク回避をすべきとの見解があることに對し, 耐性菌が広範囲に確認された県域のみで本剤の使用を中止しているのが現状である。これらのことを前提にすれば, ①耐性菌に汚染された種子が本県内に移動する危険性があることに加え, ②本系統剤は本田移植時の箱施用のみで採用されていたこと, ③本耐性菌の発生による多発事例が県内で確認された3点を十分に考慮する必要がある。一方, 石井(2014)は, 耐性菌の蔓延で使用を中止した薬剤をその後の耐

性菌率の低下で再使用した場合，再び耐性菌率が上昇することを複数の病原菌と薬剤の組み合わせで経験していることを述べている．以上のことから，本系統剤の耐性菌の発生が広範囲に確認されている本県においては，仮に一部で感受性の回復がみられたとしても，移植時の育苗箱施用を再開するに当たっては，関係機関の総意を前提に慎重に判断すべきであることを指摘したい．

#### 謝辞

本検定を実施するにあたり，BASF ジャパン(株)に，耐性菌検定手法についてご教授頂いた．南予地方局産業振興課西予農業指導班，東予地方局産業振興課四国中央農業指導班，JA うま，JA 東宇和，JA 愛媛県本部の方々に，いもち病サンプル採集についてご尽力・ご協力頂いた．ここに記して御礼申し上げる．

#### 引用文献

愛媛県病害虫防除所（2012）：病害虫防除技術情報第3号．  
Haruo M., Masako K., Tomio Y., Yasuhiko U. and Hiroshi I.（1976）：Mode of Occurrence of Kasugamycin Resistant Rice Blast Fungus,

Ann.Phytopath.Soc.Japan, 42, 117-123.  
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(5), 274-279.  
石井英夫（2014）：薬剤耐性菌研究の最新動向と対策強化に向けて, 日本農薬学会誌, 39(1), 53-57.  
石井英夫（2015）：QoI 剤耐性いもち病菌について, 農薬グラフ, 189, 12-14.  
栗林数衛（1928）：稲熱病菌の越年及第一次発病の原因と其防除に関する研究, 日植病報, 2, 99-117.  
農研機構（2017）：殺菌剤耐性イネいもち病菌対策マニュアル<QoI 剤>, 2.  
農林水産省（2001）：病害虫発生予察事業の実施について, 29-39.  
島根県病害虫防除所（2012）：平成 24 年度病害虫発生予察情報技術資料第 1 号.  
山口県病害虫防除所（2012）：平成 24 年度農作物病害虫発生予察技術資料第 7 号.  
Yun-Sik K., Edward W.D., Paul V., and Mark L.F.（2003）：Field Resistance to Strobilurin(QoI) Fungicides in *Pyricularia grisea* Caused by Mutations in the Mitochondrial Cytochrome b Gene, Phytopathology, 93, 891-900.