

愛媛県内で発生したイネいもち病 Q o I 剤耐性菌検定

1. 目的

2012 年にオリサストロビン剤を育苗箱施用した水稻ほ場において、いもち病が多発する事例が発生し、本剤を含む Q o I 剤（ストロビルリン系殺菌剤）に対する感受性低下が懸念されたため、農薬メーカーによって県内の耐性菌検定が実施された結果、全県で耐性菌の発生が確認された。

ここでは、耐性菌検出率の高かった地域および耐性菌未確認地域における Q o I 剤耐性菌の発生動態を追跡調査し、防除対策の基礎資料を得る。

2. 調査（試験）方法

1) 検定地域：

(1) 西予市宇和町の水稲ほ場（主に普通期水稻）：いもち病が発生し易い地域で、2012 年度に耐性菌検出率が高く（耐性菌検出率 93.8%）、2013 年度から Q o I 剤の使用を中止した地域

(2) 四国中央市の水稲ほ場（主に普通期水稻）：いもち病が発生し難い地域で、2014 年度から Q o I 剤の使用を低減した地域

2) いもち病葉採取方法：8 月に、発病葉を 1 ほ場当たり 3 葉ずつ（1 株当たり 1 葉×3 株）採取した。

3) 試験方法：BASF ジャパン(株)の手法を参考に、PCR-RFLP 法により検定を実施。いもち病菌 DNA 抽出→PCR による DNA 増幅（チトクローム b 遺伝子）→制限酵素処理（Fnu4HI）→電気泳動→ゲル染色→紫外線照射による増幅バンドの数とサイズ確認。

(1) 1 葉ごとの約 5 mm 角の病斑切片 1～5 枚を混合したものを 1 検体とした。（2013 年は 3 葉をひとまとめして 1 検体とした。）検体は、破碎処理（ビーズ式細胞破碎装置 MS-100：トミー精工）後、市販キットで DNA 抽出した。

(2) DNA 抽出キット：NucleoSpin Plant II（MACHEREY-NAGEL 社製）

(3) PCR の反応溶液：Premix Taq Hot Start version（TAKARA BIO 社製）：25.0 μL
Primer F(10pmol/μL)：2.5 μL(KES 415:CTTACCTTATCGATGCGTCACAACC)
Primer R(10pmol/μL)：2.5 μL(KES 416:GCAGTATCATGAAGTGCAATTAAGTGC)
H₂O：15.0 μL、テンプレート：5.0 μL（合計：50.0 μL）

(4) PCR 反応温度サイクル：（DNA 増幅機器：iCycler 170-8720JA（BIOLAD 社製））
94℃×3 分→(94℃×15 秒、60℃×30 秒、72℃×30 秒)×40 回→72℃×5 分

(5) 制限酵素処理：反応温度 37℃、反応時間 4 時間

(6) 制限酵素反応溶液：10×Buffer：2.5 μL、Fnu4HI：0.5 μL、H₂O：2.0 μL
PCR 反応後の溶液：20.0 μL（合計：25.0 μL）

(7) 制限酵素処理後、反応溶液 5 μL（Loading Dye：1 μL 添加）を 2%アガロースゲルにアプライして電気泳動（電気泳動装置 Mupid-exu、100V、30 分）した。

(8) 耐性菌は 43、144、384bp、感受性菌は 43bp、528bp 付近の DNA 増幅の有無で判定した。

3. 結果の概要

1) 西予市では、Q o I 剤の使用を停止した 2013 年には 10 ほ場から採取した 10 検体の内 6 検体から耐性菌が検出され、耐性菌検出率は 60%であったが、2014 年には 27.3%、2015 年には 6.7%まで減少していた（表 1）。

このことから、Q o I 剤の使用を低減すると Q o I 剤耐性菌の割合が減少する傾向が見られた。

2) 四国中央市では、Q o I 剤の使用を低減した 2014 年には 9 ほ場から採取した 27 検体

のうち 27 検体から耐性菌が検出され耐性菌検出率は 100.0%であったが、2015 年には 54.2%であった (表 2)。

3) 1 圃場の中に、また 1 葉の中にも耐性菌と感受性菌が混在していることが分かった (表 1、表 2)。

表1 イネいもち病QoI剤耐性菌検定(西予市)

ほ場 番号	検体 番号	検定結果		
		2013年	2014年	2015年
1	1		S	S
	2	SR	S	S
	3		S	S
2	4		S	S
	5	SR	S	S
	6		S	S
3	7		S	S
	8	SR	SR	S
	9		S	S
4	10		SR	SR
	11	R	S	S
	12		S	S
5	13		S	SR
	14	S	S	S
	15		S	S
6	16		SR	S
	17	SR	SR	S
	18		SR	S
7	19		S	S
	20	S	SR	S
	21		SR	S
8	22		S	S
	23	SR	S	S
	24		S	S
9	25		S	S
	26	S	S	S
	27		R	S
10	28		S	S
	29	S	S	S
	30		SR	S
11	31		S	
	32		S	
	33		S	
耐性菌 検出率 (%)		60.0	27.3	6.7

※検定結果: S 感受性菌株、R 耐性菌株
SR 感受性菌株と耐性菌株の混在
※検体採取圃場は、年によって異なる

表2 イネいもち病QoI剤耐性菌検定(四国中央市)

ほ場 番号	検体 番号	検定結果	
		2014年	2015年
1	1	R	S
	2	R	S
	3	R	S
2	4	R	R
	5	R	R
	6	R	R
3	7	R	S
	8	R	S
	9	R	S
4	10	R	S
	11	R	S
	12	R	S
5	13	R	R
	14	R	R
	15	R	R
6	16	R	SR
	17	R	R
	18	R	R
7	19	R	R
	20	R	R
	21	R	SR
8	22	R	S
	23	R	S
	24	R	SR
9	25	R	
	26	R	
	27	R	
耐性菌 検出率 (%)		100.0	54.2

※検定結果: S 感受性菌株、R 耐性菌株
SR 感受性菌株と耐性菌株の混在
※検体採取圃場は、年によって異なる
※2012年、2013年は、いもち病の発生が極めて少
なく、採取できなかった