

栃木県におけるイネいもち病菌のMBI-D剤に対する感受性の 遺伝子診断による検定¹

毛 雪琴・後藤知昭^{*2}・川嶋勇樹^{**}

(中国浙江省農業科学院・*栃木県農業試験場・**栃木県農業環境指導センター)

Sensitivity Assay to Melanin Biosynthesis Inhibitors Targeting Scytalone Dehydratase (MBI-D) of *Magnaporthe grisea* with a Gene Diagnostic Method in Tochigi Prefecture

Xueqin MAO, Tomoaki GOTO² and Yuki KAWASHIMA

摘 要

MBI-D剤に対する薬剤耐性イネいもち病菌は、2001年の佐賀県での発生を初めとし、九州、西日本を中心にその発生が確認され、東日本での発生拡大が懸念されている。そこで、2004年、栃木県で採集したイネいもち病病斑から単孢子分離した本病病原菌48菌株のMBI-D剤に対する感受性をPIRA-PCR法により検定したところ、1圃場から採集した2菌株がMBI-D剤耐性菌と判定された。PIRA-PCR法により耐性菌と判定された菌株のシタロン脱水酵素(SDH)遺伝子の塩基配列は、対照とした佐賀県で発生した耐性菌の配列と同様で、223番目の塩基がグアニン(G)からアデニン(A)に変異しており、対応するアミノ酸では75番目がバリン(V)からメチオニン(M)へ変異していた。耐性菌が検出された圃場では、カルプロパミド剤が2000年から5年連続で使用されていた。なお、2004年における葉いもちの発生は前年よりやや多めであったが穂いもちの発生は平年並で、MBI-D剤耐性菌による本病の被害は判然としなかった。

カルプロパミド箱粒剤は、シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤(MBI-D)に分類される殺菌剤で、イネいもち病に対する効果が高く、長期持続型箱施用殺菌剤として広く普及している。しかし、2001年佐賀県においてカルプロパミド箱粒剤を施用したにもかかわらず、葉いもちが多発し、その原因究明の結果、MBI-D剤に対する耐性菌の出現であることが報告された(宗ら、2002; 山口ら、2002, 2003)。その後、九州をはじめとする西日本各地でMBI-D剤耐性菌の出現が報告され(荒井、2004)、2004年には静岡県や岩手県でもその発生が報告されている(岩手農研セ、2004; 静岡防除所、2004)。

栃木県では、水稻作付面積の約23.5%(2003年推定)

となる約15,000haでMBI-D剤が普及し、本剤のいもち病に対する効果や利便性から今後もその使用量の増加が見込まれている。しかし、東日本で、本剤に対する耐性菌の発生が確認されたこと(岩手農研セ、2004; 静岡防除所、2004)で本県でもMBI-D剤に対する耐性菌の発生が懸念される。

そこで、本県では2004年産水稻に発生したいもち病菌の単孢子分離菌株について、遺伝子診断法によりMBI-D剤に対する感受性検定を行った。

本研究の実施にあたり、試験方法や対策等についてご助言頂いた独立行政法人農業環境技術研究所の石井英夫氏、貴重な菌株を分譲いただいたJA全農の宗和弘氏、佐賀県農業技術センター山口純一郎氏にお礼申

1 本報の要旨は、第52回関東東山病害虫研究会(2005年3月3日、茨城県水戸市)において口頭発表した。

2 現在、栃木県農務部

Address: Department of Agriculture, Tochigi Prefectural Government, 1-1-20 Hanawada, Utsunomiya, Tochigi 320-8501, Japan

2005年5月25日受領

し上げる。

材料および方法

1. 供試菌株

2004年6月から7月に県内各地から葉いもち病斑を採集し、常法により組織分離後、単胞子分離をして得られた菌株を本研究に供試した(第1表)。対照菌株には、JA全農より譲受したMBI-D剤感受性菌株の研60-19、耐性菌株のSW-1を用いた。

2. 試験方法

1) イネいもち病菌ゲノムDNAの抽出

イネいもち病菌のゲノムDNAの抽出は、供試菌株を25, 6日間PDB液体培地(Difco社製)で振とう培養し、得られた菌体を回収し、液体窒素で粉碎後、DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN社製)を用いて行った。抽出したDNAは、-20℃で保存し、遺伝子診断法による耐性菌検定に供試した。

2) PIRA (Primer-introduced Restriction Enzyme Analysis) -PCR法によるMBI-D剤の耐性菌検定

PCRによるイネいもち病菌のシタロン脱水酵素(SDH)遺伝子の増幅は、高垣・梶原(2003)、Kakuら(2003)の方法に準じて行った。すなわち、抽出したイネいもち病菌のゲノムDNAを鋳型とし、DNA 2 μl、センスプライマーSCDH-13(5'-TTCGTCGGCATGGTCTCGAGCATCTAG-3') 25pmol、アンチセンスプライマーSCDH-4(5'-TTATTTGTCGGCAAAGGTCTCC-3') 25pmol、*rTaq*(Takara社製) 0.1U、10×PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μl

およびdNTPs (2.5mM each) 2 μlを混合し、滅菌蒸留水で最終容量を25 μlとした。PCR反応は、最初の熱変成を95℃で5分間行った後、95℃で30秒、60℃で1分、72℃で2分のステップを40サイクル繰り返し、最後の伸長反応を72℃で7分間行った。

3) *Xba* によるRFLP解析

PIRA-PCR法により増幅された産物は、制限酵素*Xba*によるRFLP解析を行い、耐性菌を検定した。すなわち、PCR産物 5 μl、*Xba*I (TOYOBO社製) 0.5 μl、10×M Buffer 1 μl、滅菌蒸留水3.5 μlを混合後、37℃で1時間インキュベート後、3%アガロースゲルで電気泳動した。

4) SDH遺伝子のPCR-RFLP法による遺伝子診断

MBI-D剤耐性菌は、SDH遺伝子の223番目の塩基がグアニン(G)からアデニン(A)へ変異し、それに対応するアミノ酸がバリン(V)からメチオニン(M)に置換している(第3図)。この部位は制限酵素*Sfa*NIの認識部位と一致するため、PIRA-PCR法で耐性菌と診断された菌株を含む、本県産イネいもち病菌株のPo-1、Po-30、Po-31、Po-47について、SDH遺伝子全長を増幅するプライマーセットを用いてPCR後、RFLP解析を行った。

PCRはセンスプライマーSCDH-3(5'-ATGGGTTTCGCAAGTTCAAAG-3')、アンチセンスプライマーSCDH-4(5'-TTATTTGTCGGCAAAGGTCTCC-3') 25pmol、EX *Taq* HS (Takara社製) 0.1U、10×PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μlおよびdNTPs (2.5mM each) 2

第1表 供試イネいもち病菌菌株

採集場所	採集日	分離菌株数	使用薬剤
鹿沼市酒野谷	7/2	1	なし
茂木町小山	7/6	2	なし
"	7/2	3	なし
芳賀町祖母井	7/2	3	なし
益子町埜	7/6	2	なし
小山市石の上	7/20	2	なし
那須町高久甲松子	7/5	17	不明
那須町沼野井	7/5	2	イダクワリド・カブクバミド粒剤
西那須野町三区	7/5	2	ベンツラカブ・ブクバミド粒剤
大田原市親園	7/12	4	イダクワリド・カブクバミド粒剤
湯津上村蛭畑	7/16	2	フィロコル・ブクバミド粒剤
小川町高岡	7/6	3	イダクワリド・カブクバミド粒剤
小川町小川	6/30	3	なし
烏山町城東	7/6	2	なし
計		48	

μlを混合し、滅菌蒸留水で最終容量を25 μlとした。PCR反応はPIRA-PCR法と同様の条件で行い、反応後のサンプルは、制限酵素*Sfa*N (New England Biolabs社製)で処理し、3%アガロースゲルで電気泳動した。

5) SDH遺伝子の塩基配列解析

PIRA-PCR法によりMBI-D剤耐性と診断された菌株について、SDH遺伝子の塩基配列の解析を、本県産イネいもち病菌株Po-1(感受性菌)、Po-30およびPo-31(耐性菌)、対照菌株とした研60-19(感受性菌)およびSW-1(耐性菌)を用いて行った。そして、これらのゲノムDNAを鋳型としてSCDH-13とSCDH-4のプライマーセットで増幅した324bpの産物をpGEM-T Easy Vector System (Promega社製)を用いてクローニングを行い、CEQ DTCS Quick Start kit (BECKMAN COULTER社製)によりシーケンス反応後、CEQ8000 (BECKMAN COULTER社製)を用いて塩基配列を解析した。

結果および考察

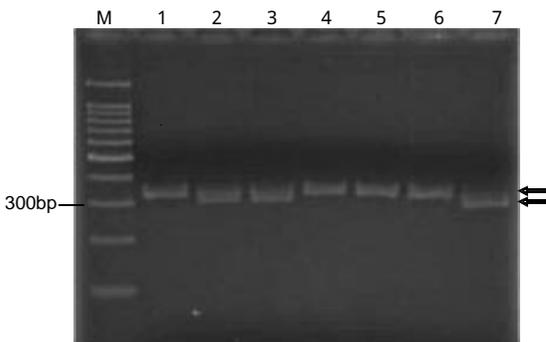
高垣・根原(2003), Kaku et al.(2003)は、イネいもち病菌のMBI-D剤耐性菌の耐性機構が、シタロン脱水酵素(SDH)遺伝子の1塩基置換であることを報告し、この遺伝子診断法としてPIRA-PCR法を開発した。そこで、2004年、栃木県内で発生したイネいもち病の単孢子分離株計48菌株について、MBI-D剤に対する感受性検定をPIRA-PCR法により検定した。その結果、

那須郡那須町の1圃場から採集した2菌株(Po-30およびPo-31)が、人為的配列を導入したプライマーを用いて増幅したSDH遺伝子の増幅産物が制限酵素*Xba*

で切断され、これらの菌株はMBI-D剤耐性菌と判定された(第1図)。さらに、耐性菌と判定された菌株を含む本県産の数菌株について、SDH遺伝子全長を増幅するプライマーセットを用いたPCR増幅後、制限酵素*Sfa*Nを用いたRFLP解析およびシーケンス解析を行ったところ、本県で発生した耐性菌は、対照菌株とした佐賀県で発生した耐性菌株SW-1と同様、SDH遺伝子内の223番目に相当する部位がグアニン(G)からアデニン(A)へ遺伝子変異し、それに対応するアミノ酸がバリン(V)からメチオニン(M)に置換していることが明らかとなった(第2図および第3図)。

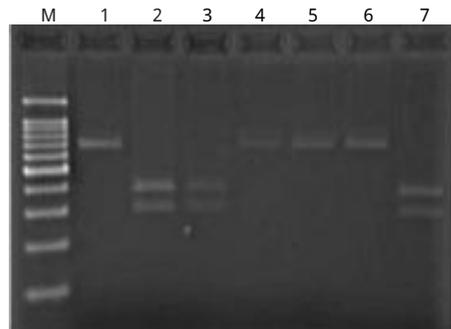
今回、耐性菌を確認した圃場では、いもち病防除薬剤として、2000年よりMBI-D剤のカルプロパミド剤が5年連続で使用されていた(第1表)。

2004年における那須町を含む県北部14圃場平均の葉いもち発生圃場率および穂いもち発生穂率は、葉いもちが前年に比べ高めであったが、穂いもち防除が実施されたことにより、穂いもちの被害は最小限に抑えら



第1図 制限酵素*Xba*で処理したイネいもち病菌SDH遺伝子の電気泳動パターン

- M:100bpラダー
 1: Po-1 5: Po-47
 2: Po-30 6: 研60-19
 3: Po-31 7: SW-1
 4: Po-34



第2図 制限酵素*Sfa*Nで処理したイネいもち病菌SDH遺伝子の電気泳動パターン

- M:100bpラダー
 1: Po-1 5: Po-47
 2: Po-30 6: 研60-19
 3: Po-31 7: SW-1
 4: Po-34



第3図 MBI-D剤耐性イネいもち病菌のアミノ酸変異

第2表 栃木県における葉いもちおよび穂いもちの年次別発生推移

年次	葉いもち ^{a)}			穂いもち ^{b)}	県内概評	
	7月前半	7月後半	8月前半		葉いもち	穂いもち
11年	1.1	1.8	1.9	7.4	少	並
12年	0.7	2.0	0.3	1.8	少	並
13年	0.0	1.8	2.3	1.9	やや少	並
14年	0.0	2.5	4.8	0.6	やや少	少
15年	0.0	1.4	2.6	5.1	多	多
16年	4.9	15.9	7.7	1.2	やや多	並

a) 発生圃場率(%)

b) 発生穂率(%)

れた(第2表)。

今回、県内各地から採集した48菌株中、耐性菌と判定された菌株は1圃場から採集した2菌株のみであった。このため、本県におけるMBI-D剤耐性菌の発生は、極めて低率であったと考えられる。

なお、耐性菌発生圃場では種子更新が毎年行われており、種子消毒も実施されている。そして、本県における種子更新率は、県内産の種子でほぼ100%である。さらに、耐性菌検出圃場では、MBI-D剤の使用が始まった2000年より、県内産物のチウラム・ペフラゾエート水和剤吹き付け処理済みの購入種子であった。これらのことから本県で今回確認されたMBI-D剤耐性菌は九州、西日本で発生したMBI-D剤耐性菌が人為的移動によって持ち込まれたのではなく、5年間のカルプロパミド剤の連用により、耐性菌が淘汰されたと考えられる。

今回、栃木県内においてMBI-D剤耐性菌の存在が初めて確認された。このことから、今後は本耐性菌検出圃場周辺を重点にその発生状況を調査し、MBI-R剤、抵抗性誘導剤とのローテーション使用やいもち病常発

地での穂いもち防除の徹底などについて指導していく必要がある。

引用文献

- 荒井治喜(2004)第14回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 14:27-36.
- 岩手県農業研究センター(2004)平成16年度試験研究成果書.
- Kaku, K. et al.(2003) Pest Manag. Sci. 59:843-846.
- 静岡県病害虫防除所(2004)平成16年度病害虫発生予察事業年報.
- 宗和弘ら(2002)日植病報 68:262(講要).
- 宗和弘(2003)第13回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要集 37-48.
- 高垣真喜一・楨原穂(2003)第13回殺菌剤耐性菌研究会講演要集 49-57.
- 山口純一郎(2002)日植病報 68:261(講要).
- 山口純一郎(2003)第13回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要集 29-36.