

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、2012 年に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とする。

2. 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）

2012 年に耐性菌検出率が高く、2013 年から 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）

2012 年に耐性菌未確認で、2014 年から一部を除き Q o I 剤の使用を中止した地域

2) いもち病葉採取方法：7～9 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)の手法を参考にして、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) 2013 年は 1 ほ場ごとの約 5 mm 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 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。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（MACHERY-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:CTTACCTATCGATGCGTCACAACC)

Primer R(10pmol/μL)：2.5 μL(KES 416:GCAGTATCATGAAGTGAATTAAGTGC)

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 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. 結果の概要

1) 西予市

2012 年に耐性菌が高率に検出され、2013 年から Q o I 剤の使用を中止した。この条件下

において、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、1検体中に耐性菌と感受性菌の混在がみられた(表1)。

2) 四国中央市

耐性菌は、2012~2013年に未確認であったが、2014年に確認された。2014年から一部を除きQoI剤の使用を中止した。この条件下において、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、1検体中に耐性菌と感受性菌の混在がみられた(表1)。

3) 以上のことから、イネいもち病QoI剤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。

4. 主要成果の具体的数字

表1 イネいもち病QoI剤耐性菌検出率の推移

検定地域	項目	2013年	2014年	2015年	2016年
西予市	検体数	10	33	30	36
	検出率(%)	60.0 (50.0)	27.3 (24.2)	6.7 (3.3)	0 (0)
四国中央市	検体数	—	27	24	15
	検出率(%)	—	100 (0)	54.2 (12.5)	6.7 (6.7)

1) 検出率の()は、耐性菌株と感受性菌株の混在株検出率

2) 2013年は1サンプルほ場ごとの約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。

3) 西予市：2012年に耐性菌が高率に検出され、2013年からQoI剤の使用を中止した。

4) 四国中央市：2013年は、いもち病が極少発生のため検体を採取できなかった。耐性菌は、2012~2013年に未確認であったが、2014年に確認された。