

岩手県におけるMBI-D耐性イネいもち病菌のrep-PCR法によるフィンガープリント解析とそれらのレース

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	佐々木,直子 荒井,治喜 鈴木,文彦
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	57号
巻号補足	
掲載ページ	p. 10-13
発行年月	2006年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



岩手県における MBI-D 耐性イネいもち病菌の rep-PCR 法による フィンガープリント解析とそれらのレース

佐々木直子*・荒井治喜**・鈴木文彦**

Rep-PCR Fingerprinting Analysis of *Pyricularia oryzae* Isolates with Decreased Sensitivity to
Dehydratase Inhibitors in Melanin Biosynthesis (MBI-D) in Iwate Prefecture and their Pathogenic Races

Naoko SASAKI, Michiyoshi ARAI and Fumihiko SUZUKI

2004年から2005年にかけて岩手県で MBI-D 耐性イネいもち病菌の発生が確認された。本耐性菌発生の遺伝的背景を解明するため、2004年と2005年に県内から分離したイネいもち病菌423菌株について、Pot2 rep-PCR 法によるフィンガープリント (FP) 解析を実施した。その結果、これら菌株から52種類の FP が検出され、このうち耐性菌143菌株は9種類の FP に類別された。また、耐性菌39菌株のレースを検定したところ、これらは007.0および037.1の2種のレースに判別された。FP 解析、レースおよび分離地点の情報をもとに、県中南部に特定の遺伝子型の耐性菌 (FP, Iwa 3 ; レース, 037.1) が優占して分布していることを明らかにした。

Key words: MBI-D, pathogenic races, Pot2 rep-PCR, *Pyricularia oryzae*

2001年、佐賀県において、カルプロパミド、ジクロシメット、フェノキサニルなどの MBI-D 系統の薬剤 (シタロン脱水酵素型の薬剤、以下 MBI-D) に耐性を示すイネいもち病菌 (以下耐性菌) の発生が確認された (7)。岩手県の MBI-D の箱施用は、1998年から始まり、2001年には岩手県病害虫防除所の調査で県内水稻栽培面積の約25%で本剤が施用された。このような状況下で、耐性菌の発生が懸念されたため2002年よりその発生調査を行ってきた。その結果、2004年は12市町村42地点中、1市4地点5圃場 (2) で、2005年は22市町村95地点中、4市15地点42圃場 (5) で耐性菌の発生が確認された。

鈴木らは (3)、Pot2 rep-PCR 法を用いたイネいもち病菌の個体群構造を解析し、九州各地で発生した耐性菌は地域ごとに異なる遺伝的背景を持ち、その起源は複数であると推定している。

そこで、本研究では、耐性菌の遺伝的背景や一般栽培圃場での耐性菌の伝搬ルートを明らかにするため、2004年と2005年に岩手県で分離された耐性菌を含むイネいもち病菌集団を対象に、Pot2 rep-PCR 法によるフィンガープリント (FP) 解析を行い、それらのレースを同定した。

材料および方法

1. 供試菌株

2004年および2005年の県内の耐性菌発生調査 (2, 5) で一般栽培圃場から分離したイネいもち病菌株を本研究に用いた。すなわち、2004年に北上市の8地点、11圃場の葉いもち病斑から分離した耐性菌8菌株を含む27菌株、2005年に22市町村95地点、164圃場の葉いもち135病斑、穂いもち261病斑から分離した耐性菌135菌株を含む計396菌株を本研究に供試した。

2. rep-PCR 法によるいもち病菌のフィンガープリント解析

rep-PCR 法は、Suzuki *et al.* (4) の方法に準じて行った。プライマーはイネいもち病菌の転移因子 Pot2 の末端部反復配列内に設計したシングルプライマーを用いた。本解析に供した鋳型 DNA は、供試菌株を9mL の potato dextrose broth (Difco 社製) で25℃、4日間暗所静置培養した菌体を DNA 抽出キット (Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit, MO BIO 社製) を用いて調製した。フィンガープリント解析は、検出されたバンドの有無を比較することにより行った。なお、本解析では分子量が6 kb以上のバンドは再現性が低いと判断し、解析には用いなかった。

*岩手県農業研究センター Iwate Agricultural Research Center, Narita, Kitakami, Iwate, 024-0003 Japan

**農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター

3. レース検定

岩手県の一般栽培圃場で分離した耐性菌39菌株（2004年に北上市の4地点から分離した5菌株、2005年に北上市の6地点から分離した25菌株、遠野市の5地点から分離した8菌株および一関市の1地点から分離した1菌株）を用い、Yamada *et al.* (6) の9判別品種にKiyosawa (1) の3品種を加えた12判別品種を用いてレース検定を行った。すなわち、各供試菌株から常法により調製した分生子懸濁液を4.5葉期の判別品種に噴霧接種し、7日間温室で管理した後、接種時展開葉に生じた病斑型を調査した。

結 果

1. rep-PCR 法による岩手県分離菌のフィンガープリント解析

Pot2 rep-PCR 法によるフィンガープリント (FP) 解析の結果、岩手県分離菌株（2004、2005年一般栽培圃場分離菌423菌株）は52種類の遺伝子型 (Iwa 1～Iwa 52) に類別された（第1図）。岩手県分離菌から検出されたすべての FP と、2005年の分離地点数を耐性菌検定のデータと合わせて第1図に示した。2005年の一般栽培圃場では Iwa 3、6 および 8 の3種類の遺伝子型を持つ菌株が分離される地点が多かった。

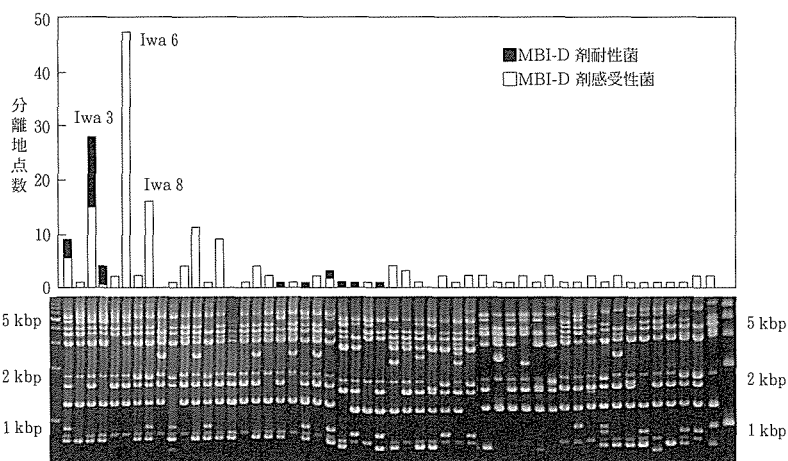
2005年に分離された耐性菌は、9種（Iwa 1、3、4、

19、21、23、24、25および27）に類別され、この中で Iwa 3 が比較的高頻度で分離された。また、Iwa 1、3、4 および 23 は、感受性菌、耐性菌に共通する FP であった。なお、今回検出された FP は全体的に各バンドパターンの保存性が高いことから、岩手県分離菌は近縁な集団であることが推定された。

第1表に2005年の一般栽培圃場で耐性菌が確認された市と遺伝子型別の分離地点数をまとめて示した。2005年に耐性菌が確認された全ての市で遺伝子型 Iwa 3 の菌株が認められ、Iwa 3 は耐性菌の FP としてはもっとも広域に分布していた。

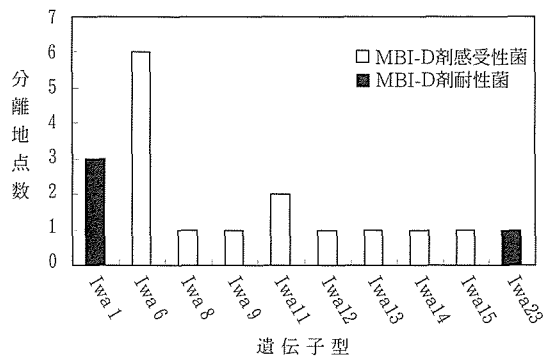
一方、2004年に北上市の一般栽培圃場で分離された27菌株の FP 解析結果では、10種類の FP が検出された（第2図）。8菌株の耐性菌の FP は Iwa 1 または Iwa 23 で、それぞれ3および1地点で分離された。また、2005年同様、感受性菌である Iwa 6 の分離地点数が多かった。

2004年および2005年の解析結果を比較すると、2004年に耐性菌が確認された北上市の5圃場中のうち、4圃場において耐性菌が確認された（第2表）。これらの圃場ではすべて購入による種子更新を行っていることを聞き取り調査によって確認している。また、2圃場では2年間にわたり同一の遺伝子型（Iwa 1 および 23）の耐性菌が確認された。



第1図 Pot2 rep-PCR 法により岩手県分離菌から検出されたフィンガープリントパターンと2005年の分離地点数

- 注) 1. 22市町村95地点から分離した396菌株調査。
2. 各フィンガープリントパターンを遺伝子型 (Iwa 1～Iwa 52) とした。両端のレーンはサイズマーカーを示す。
3. 同一地点で2種類以上の遺伝子型が検出されている地点があるため地点の総計は192地点となる。



第2図 2004年に北上市内の一般栽培圃場から分離された
たいもち病菌の遺伝子型と分離地点数

第1表 2005年に分離された耐性菌の遺伝子型と分離地点数

市町村	遺伝子型と分離地点数								
	Iwa 1	Iwa 3	Iwa 4	Iwa19	Iwa21	Iwa23	Iwa24	Iwa25	Iwa27
北上市	2(66)	6(28)	0	0	1(1)	1(7)	1(1)	1(1)	1(1)
遠野市	0	5(15)	3(8)	1(3)	0	0	0	0	0
一関市	1(1)	1(2)	0	0	0	0	0	0	0
陸前高田市	0	1(1)	0	0	0	0	0	0	0

注) 1. () 内は調査菌株数を示す。
2. 網掛けは4市に共通して分布していた Iwa 3 を示す。

第2表 2004年および2005年に分離された耐性菌の遺伝子型とレース

市町村	分離年	地点	遺伝子型	菌株数 レース	
				007.0	037.1
北上	2004	岩崎	Iwa 1	1	0
		岩崎新田 1	Iwa 1	1	0
		二子	Iwa23	1	0
		横川目	Iwa 1	2	0
	2005	岩崎	Iwa 3	0	1
		岩崎新田 1	Iwa 1	7	0
			Iwa 3	0	4
			Iwa27	1	0
		岩崎新田 2	Iwa 3	0	1
			Iwa24	0	1
		煤孫	Iwa 1	1	0
			Iwa 3	0	1
			Iwa21	1	0
		二子	Iwa 3	0	2
			Iwa23	3	0
			Iwa25	1	0
遠野	2005	横川目	Iwa 3	0	1
		青笹 1	Iwa19	0	2
		青笹 2	Iwa 3	0	1
		上郷	Iwa 3	0	2
		光興寺	Iwa 3	0	1
		栃内	Iwa 4	0	2
		東山	Iwa 1	1	0

注) 1. 表には調査した菌株数を示す。
2. 耐性菌39菌株を調査した。

2. 耐性菌の遺伝子型とレースの関係

耐性菌のレース検定結果を、rep-PCR に基づく遺伝子型、分離地点および分離年とともに第2表に示した。2004年に分離された耐性菌はすべてレース007.0であった。しかし、2005年に分離された耐性菌のレースは007.0と037.1の2種類で、遺伝子型 Iwa 1, 21, 23, 24, 25および27の菌株はレース007.0, Iwa 3, 4 および19の菌株はレース037.1であった。

考 察

岩手県で分離された423菌株のイネいもち病菌について、Pot2 rep-PCR 法によるフィンガープリント解析を行った。その結果、これらは52の遺伝子型に類別され、多様な遺伝子型のいもち病菌が本県内に分布していることが本研究から明らかとなった。また、これらの中で遺伝子型 Iwa 3, 6 および 8 の菌株の2005年の一般栽培圃場での分離率が高かったことから、これらの遺伝子型の菌株は岩手県内で栽培されるイネ品種や栽培体系によく適応している可能性が考えられた。

本県での耐性菌の発生調査によると、その発生は2004年に初めて確認され(2)、2005年にも県中南部を中心に再確認された(5)。また、FP 解析の結果、耐性菌は9種類の遺伝子型に類別され、本県では耐性菌が確認された1~2年後にすでに遺伝子型の多様性が存在した。これらの結果から、本県では耐性菌がイネいもち病菌集団にもともとわずかに存在し、MBI-Dの使用によって選択的に増殖し、顕在化した可能性があることが示唆される。

一方、本県の2年間の調査では、連続して耐性菌が分離される圃場が4圃場存在していた。また、一部の圃場では同じ遺伝子型の耐性菌が2年間にわたり分離された。これらの圃場では種子更新を行っていた。このため、採種圃産種子がすでに耐性菌を保菌していた可能性が考えられる。しかし、周辺圃場からの耐性菌の飛び込みも否定はできないことから、この耐性菌の由来を明らかにするためには今後、種子での保菌と耐性菌の発生状況および一般栽培圃場での耐性菌の発生状況等を調査する必要がある。

なお、本研究のレース検定から、本県の耐性菌には007.0および037.1の2種類のレースが存在し、本研究で耐性菌におけるレース分化が初めて示された。

ところで、FP 解析とレース検定結果を合わせて評価

すると、レース037.1で、遺伝子型 Iwa 3 の耐性菌が県中南部に分布したことが本研究で示された。善林ら(8)の2002年の調査では、岩手県に分布するいもち病菌のレースは95%以上が007.0で、037.1は確認されていない。したがって、岩手県中南部に発生したレース037.1は、本来はマイナーな存在であったと考えられる。また、本研究で耐性菌が確認された圃場での作付け品種は「ひとめぼれ」、「あきたこまち」、「ササニシキ」および「いわてっこ」で、真性抵抗性遺伝子 *Pik* を有する「ヒメノモチ」や「もち美人」のような、レース007.0は侵せないが、レース037.1は侵すことができる品種のみの作付けではなかった。しかし、それに関わらずレース037.1を示す耐性菌が県中南部で確認されたのは、本県の種子の高い更新率(県平均で90%以上)から推察すると今後実証する必要があるが、一部の地域で採種された採種圃産種子による耐性菌の伝搬が考えられる。

以上、本県分離耐性菌にはFPの多様性に加え、複数のレースも存在したことから、MBI-Dの使用による耐性菌の出現リスクが高いことが予想される。今後は耐性菌の発生拡大を防ぐためにその発生由来を解析する必要がある。

引用文献

- 1) Kiyosawa, S. (1984) Rice Genetic Newsletter 1 : 95-97.
- 2) 佐々木直子・岩館康哉・富永朋之・勝部和則 (2005) 北日本病害虫研報 56 : 205 (講要).
- 3) 鈴木文彦・荒井治喜・山口純一郎・中島 隆 (2004). 九州病害虫研究報 50 : 96 (講要).
- 4) Suzuki, F., Arai, M. and Yamaguchi, J. (2006) J. Gen. Plant Pathol 72 (5) : 314-317.
- 5) 富永朋之・千葉克彦・齋藤智子・佐々木直子 (2006) 北日本病害虫研報 57 : 215 (講要).
- 6) Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, K. and Watanabe, S. (1976) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 42 : 216-219.
- 7) 山口純一郎・口博文孝・平八重一之・宗 和弘 (2002) 日植病報 68 : 261 (講要).
- 8) 善林 薫・フェ デラペーニャ・芦澤武人・小泉信三 (2002) 北日本病害虫研報 53 : 19-23.

(2006年3月31日受理)