

山形県に発生した除草剤抵抗性オモダカの遺伝子変異と各種除草剤成分に対する反応

誌名	雑草研究
ISSN	0372798X
著者名	松田,晃 岩上,哲史 青木,大輔 内野,彰
発行元	日本雑草防除研究会
巻/号	62巻3号
掲載ページ	p. 117-125
発行年月	2017年9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



山形県に発生した除草剤抵抗性オモダカの遺伝子変異と 各種除草剤成分に対する反応*

松田 晃^{★1}・岩上哲史²・青木大輔^{3,4}・内野 彰³

要 約：山形県内に発生したオモダカ (*Sagittaria trifolia* L.) のスルホニルウレア系除草剤 (SU 剤) に対する抵抗性の発生状況を、地上部再生法による抵抗性検定とアセト乳酸合成酵素 (ALS) 遺伝子解析により調査した。SU 剤抵抗性オモダカは県内に広く分布し、作用点抵抗性 (Target-site resistance: TSR) と非作用点抵抗性 (Non target-site resistance: NTSR) の両方のバイオタイプが検出された。感受性, NTSR, Pro₁₉₇ 変異型 TSR は広範な地域で発生が確認されたが, Trp₅₇₄ 変異型 TSR の発生が確認された地域は限られていた。これらのバイオタイプの異なる SU 剤抵抗性オモダカを、塊茎から発生させた個体を用いたポット試験に供試し、代替除草剤の効果を調査した結果、非 SU 系成分のピラクロニル、ピラゾレートおよびテフリトリオンがいずれのバイオタイプにも高い効果を示した。さらに、地上部再生法でベンスルフロンメチル、ピラゾスルフロンエチル、ピリミスルファンを供試して各バイオタイプの反応を比較したところ、感受性系統には3剤とも効果が高かったが、NTSR にはベンスルフロンメチルの効果のみ低かった。一方、Pro₁₉₇ 変異型 TSR にはベンスルフロンメチルとピラゾスルフロンエチルの効果が低く、Trp₅₇₄ 変異型 TSR には3剤とも効果が低かった。従って、無処理区とこれら3剤の処理を設けることにより、地上部再生法によって感受性系統と NTSR, TSR のおよその判別が可能であると考えられた。

キーワード：オモダカ, 除草剤抵抗性, スルホニルウレア系除草剤, アセト乳酸合成酵素阻害剤

緒 言

スルホニルウレア系除草剤 (sulfonyleurea herbicides: SU 剤) は、アセト乳酸合成酵素 (acetolactate synthase: ALS) を標的とする ALS 阻害剤の一種であり、日本国内の水田雑草防除に広く用いられている。ALS 阻害剤に対する抵抗性は世界

中で 130 種以上の雑草種で報告されている (Heap 2014; Heap *et al.* 2016)。特に、SU 剤に対する抵抗性の発生は、国内ではミズアオイ (*Monochoria korsakowii* Regel et Maack), アゼトウガラシ (*Lindernia angustifolia* (Benth.) Wettst.), アゼナ類 (アゼナ *Lindernia procumbens* (Krock.) Borbas, アメリカアゼナ *L. dubia* (L.) Pennell subsp. *major* (Pursh) Pennell, タケトアゼナ *L. dubia* (L.) Pennell subsp. *dubia*), イヌホタルイ (*Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla), コナギ (*Monochoria vaginalis* (Burm. f.) Presl var. *plantaginea* (Roxb.) Solms-Laub.), オモダカ (*Sagittaria trifolia* L.) 等の 20 種の水田雑草で確認されている (Itoh *et al.* 1999; 古原ら 1999; 内野ら 2000; 小荒井・森田 2002; 内野 2017)。

除草剤抵抗性の機構は標的部位の変異、すなわち作用点 (target-site) の変異による作用点抵抗性 (Target-site resistance: TSR) と、標的部位の変異によらない非作用点抵抗性 (Non target-site resistance: NTSR) に大別される (Yuan *et al.* 2006; Yu *et al.* 2010; Busi *et al.* 2013)。SU 剤抵抗性の場合、TSR は ALS 遺伝子の変異に由来する ALS のアミノ酸置換によって引き起こされる (Tranel and Wright 2002)。抵抗性を引き起こす ALS のアミノ酸置換部位としては Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Ala₂₀₅, Asp₃₇₆, Asp₃₇₇, Trp₅₇₄, Ser₆₅₃, Gly₆₅₄ の 8 箇所があり、このうちの1箇所部位でアミノ酸置換が起こると ALS 阻害剤に対して抵抗性となることが知られている。一方、NTSR は除草剤の解毒代謝機能の向上など作用点以外の変異による抵抗性である。NTSR の抵抗性機構は、解毒代謝酵素のシトクロム P450 が関与することが複数の雑草種で示されているが、TSR に比べて解明が進んでいない (Yu and Powles 2014)。

日本で確認されている水田雑草の SU 剤抵抗性については、そのほとんどの種が TSR による抵抗性であるが、オモダカについては TSR と NTSR の両方の抵抗性が確認されている (内野 2015)。秋田県で確認された TSR と NTSR のオモダカは除草剤反応が異なっており、TSR 系統はベンスルフロンメチル (bensulfuron-methyl: BSM) とピラゾスルフロンエチル (pyrazosulfuron-ethyl: PSE) の両方に交差抵抗性を示すのに対し、NTSR 系統は BSM に抵抗性を示すものの PSE に感受性を示すという特徴が認められている (Iwakami *et al.* 2014)。

山形県内の水田では、SU 剤抵抗性のアゼナ類、イヌホタルイ、コナギの発生が 2003 年までに県内の多くの市町村で確認されており、最近では SU 剤抵抗性のオモダカが広く発生していることも報告されている (松田 2012, 2013, 2014, 2015)。

* 本報告は、内容の一部を「東北の雑草 12 (2013)」に掲載済みであり、これにデータを追加してとりまとめたものである。

1 山形県農業総合研究センター水田農業試験場
〒999-7601 山形県鶴岡市藤島字山ノ前 25

★ matsudaakir@pref.yamagata.jp

2 京都大学大学院農学研究科

3 国立研究開発法人 農研機構・中央農業研究センター

4 現：(株)クオルテック

(2017年1月24日受付, 2017年4月28日受理)

しかし、SU 剤抵抗性オモダカの ALS 遺伝子の変異の有無は明らかにされておらず、TSR と NTSR の割合や分布は分かっていない。TSR と NTSR は SU 剤に対する反応が異なるため、TSR と NTSR を区別して明らかにすることは防除対策において重要であり、非 SU 系の各種代替成分の効果についても両者を区別して有効性を確認する必要がある。近年では、BSM や PSE 等の従来から用いられてきた SU 成分に加え、新規の ALS 阻害剤としてピリミスルファン (Asakura *et al.* 2012) やペノキスラム等が市販され、水田雑草防除に用いられる ALS 阻害剤の種類が増加しており、これらの有効性の確認も必要である。そこで本研究では、山形県内に発生したオモダカについて ALS 遺伝子を解析し、バイオタイプ別の地理的分布を明確にするとともに、防除対策を明確にするため、非 SU 系成分や新規 ALS 阻害剤を含む各種除草剤成分に対する反応をポット試験により調査し、バイオタイプによる違いを検討した。さらに地上部再生法 (大野ら 2004) を利用したバイオタイプの判別の可否についても検討した。

材料および方法

1. 調査地点

2010~2013 年にかけて山形県内の現地水田 31 地点 (地点 1~31) から矢じり葉期のオモダカを採取した (第 1 表)。現地個体の採取は 6 月末から 7 月中旬に行い、採取後は直ちに地上部再生法による抵抗性検定に供試した。残りの個体もポットに移植して生育させ、土中に生産された塊茎を 11 月に洗い出し、これを 4°C で暗所に保存した。なお翌年までに供試しない場合には継代した。これらの塊茎を供試して ALS 遺伝子の解析を行い、その後、各バイオタイプから数系統を代表としてポット試験に供試し、防除試験および地上部再生法によるバイオタイプ判別の検討を行った。

なお、感受性対照には山形県農業総合研究センター (山形市みのりが丘、以下山形農研) 場内産のオモダカを用いた (地点 0)。以下では材料の呼称として、現地で採取した個体を供試した場合は「地点」、塊茎をポットで増殖した後代を供試した場合は「系統」を用いた。

2. 現地採取個体の抵抗性検定

現地で採取した個体の SU 剤感受性を短期間で判定するため、地上部再生法 (大野ら 2004) による抵抗性検定を行った。検定は山形農研において行い、場内水田土壌 (灰色低地土、埴壤土) を 1/10,000 a (1 L 容) ポットに充填し、代かき後、現地水田で採取したオモダカを移植した。検定に用いた成分は BSM および PSE とした。薬剤はそれぞれ 0.25% BSM・4.0% メフェナセット混合 3 キロ粒剤 (デュボン株式会社)、0.07% PSE 3 キロ粒剤 (日産化学工業株式会社) を用いた。処理量は標準薬量とし、それぞれ BSM 7.5 mg a.i. m⁻²、PSE 2.1 mg a.i. m⁻² とした。なお、メフェナセットはノビエに対して高い効果を

持つために除草剤に混合されるが、標準薬量ではオモダカにはほとんど効果がないことが既に知られている (日本植物調節剤研究協会編 1998)。本試験の現地採取個体の検定では、BSM 成分だけを含む除草剤が市販されていないことから、入手が容易な市販の BSM・メフェナセット混合 3 キロ粒剤を用いた。原則として、ポットは各処理区 2 反復、ポット当たり個体数を 2 または 3 としたが、一部の地点は現地で採取した個体の数が不足したため、反復数を減じた。ポットに移植して 2 日後に地表から 3 cm の高さで地上部を切除し、湛水して薬剤を処理した。ポットは網室に静置し湛水を保ち、3 ないし 4 週間後に再生葉数を記録した。抑制された葉も再生葉数に含めた。抵抗性の判定は、除草剤処理区の再生葉数を無処理区と比較することにより行った。除草剤処理区において新葉の再生が認められない場合は感受性と判定し、無処理区と同等の旺盛な生育を示した場合や、抑制されながらも数枚の葉の再生を示した場合は、抵抗性と判定した。各除草剤処理区と無処理区との再生葉数の差の有意性は Dunnett 検定により検定し、統計処理ソフトは KyPlot 2.0 (Yoshioka 2002) を用いた。

3. ALS 遺伝子の解析

ALS 遺伝子の解析には、31 現地系統のうち 27 系統を供試し、1 系統につき 1 個体を解析に用いた。オモダカ植物体の ALS 遺伝子は、Iwakami *et al.* (2014) によりコピー数が 1 つであることが示されており、その報告された ALS 遺伝子 (AB301496) をもとに塩基配列を解析した。すなわち、Iwakami *et al.* (2014) に従い、塊茎由来の個体の緑葉から DNA を抽出し、PCR によって ALS 遺伝子を増幅した後、アミノ酸置換が ALS 阻害剤抵抗性を付与する部位 (Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Ala₂₀₅, Asp₃₇₆, Asp₃₇₇, Trp₅₇₄, Ser₆₅₃, Gly₆₅₄) の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定した。

4. 各種除草剤成分に対する反応

現地系統の中から感受性、NTSR, Pro₁₉₇ 変異型 TSR, Trp₅₇₄ 変異型 TSR の 4 種類の系統の塊茎を供試し、山形県農業総合研究センター水田農業試験場 (山形県鶴岡市藤島、以下山形農研水田試) でポット試験を行った。試験には 1/5,000 a ポットを用い、すべて 1 個体/ポット、3 反復とした。

2016 年 7 月上旬に室温湛水土中で塊茎を催芽し、場内水田土壌 (細粒強グライ土、埴壤土) を充填した 1/5,000 a ワグネルポットに移植した。薬剤の処理は 2~3 葉期、すなわち地上部長が 2~3 cm に伸長した時点で行った。供試成分は ALS 阻害剤として BSM, PSE, ピリミスルファン (Asakura *et al.* 2012)、非 SU 系除草剤としてピラクロニル、ピラゾレート、テフリルトリオンを用いた。使用した薬剤はすべて単剤とし、それぞれ 60% BSM 水和剤 (試験名 DPX-84 水和剤、デュボン株式会社)、0.07% PSE 3 キロ粒剤 (既出)、0.67% ピリミスルファン 1 キロ粒剤 (クミアイ化学工業株式会社)、1.8%

第1表 地上部再生法における再生葉数, ALS 遺伝子におけるアミノ酸部位のDNA塩基配列と推定アミノ酸, 判定されたバイオタイプ

地点	地上部再生法					ほ場内の混在	遺伝子解析				バイオタイプ
	再生葉数						アミノ酸部位				
	無処理	BSM		PSE			Pro ₁₉₇		Trp ₅₇₄		
平均 ± SE	平均 ± SE		平均 ± SE		DNA 配列	アミノ酸	DNA 配列	アミノ酸			
0	5.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0			CCC	Pro	TGG	Trp	感受性
1	5.7 ± 0.7	0.5 ± 0.5	**	0.0 ± 0.0	**		—	—	—	—	感受性
2	4.8 ± 1.1	4.7 ± 0.3	NS	4.3 ± 0.8	NS	混在	CAC	His	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
3	5.0 ± 0.4	4.3 ± 0.5	NS	2.0 ± 1.2	*		CAC	His	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
4	5.0 ± 1.0	5.0 ± 0.0	NS	4.5 ± 0.5	NS		CCC	Pro	TTG	Leu	TSR-Trp ₅₇₄
5	5.0 ± 0.6	4.0 ± 0.0	NS	4.0 ± 0.0	NS		CCC	Pro	TTG	Leu	TSR-Trp ₅₇₄
6	4.3 ± 0.7	4.0 ± 0.0	NS	0.3 ± 0.3	**		CCC	Pro	TGG	Trp	NTSR
7	4.3 ± 0.3	5.0 ± 0.6	NS	4.7 ± 0.3	NS		—	—	—	—	TSR (未分析)
8	5.8 ± 0.7	0.0 ± 0.0	***	0.0 ± 0.0	***		CCC	Pro	TGG	Trp	感受性
9	7.0 ± 0.0	0.3 ± 0.3	***	0.0 ± 0.0	***		CCC	Pro	TGG	Trp	感受性
10	6.0 ± 0.4	4.0 ± 1.0	NS	5.5 ± 0.3	NS		—	—	—	—	TSR (未分析)
11	4.3 ± 0.3	5.5 ± 0.3	*	5.0 ± 0.4	NS	混在	—	—	—	—	TSR (未分析)
12	5.8 ± 0.6	5.5 ± 0.3	NS	3.0 ± 1.2	NS		CCC	Pro	TGG	Trp	NTSR
13	3.7 ± 0.3	3.3 ± 0.3	NS	0.0 ± 0.0	**		CCC	Pro	TGG	Trp	NTSR
14	5.3 ± 0.3	4.0 ± 0.6	NS	0.3 ± 0.3	***		CCC	Pro	TGG	Trp	NTSR
15	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3	NS	0.5 ± 0.3	***		CCC	Pro	TGG	Trp	NTSR
16	5.0 ± 0.4	5.3 ± 0.5	NS	0.0 ± 0.0	***	混在	CCC	Pro	TGG	Trp	NTSR
17	4.8 ± 0.4	2.8 ± 1.2	NS	1.2 ± 0.7	*	混在	CCC/CTC	Pro/Leu	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
18	5.3 ± 0.3	3.3 ± 1.1	NS	2.8 ± 1.6	NS		CCC	Pro	TGG	Trp	NTSR
19	5.3 ± 0.6	0.8 ± 0.8	***	0.3 ± 0.2	***		CCC	Pro	TGG	Trp	感受性
20	4.0 ± 0.0	5.0 ± 0.4	NS	4.5 ± 0.5	NS		ACC	Thr	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
21	5.3 ± 0.3	5.0 ± 0.0	NS	0.3 ± 0.3	***		CCC	Pro	TGG	Trp	NTSR
22	6.8 ± 0.6	6.8 ± 0.3	NS	7.0 ± 0.0	NS		CAC	His	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
23	6.8 ± 0.3	6.8 ± 0.5	NS	1.3 ± 0.7	***		CCC/TCC	Pro/Ser	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
24	5.8 ± 0.3	5.5 ± 0.3	NS	3.0 ± 3.0	NS		CCC/GCC	Pro/Ala	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
25	5.3 ± 0.3	4.0 ± 1.0	NS	3.5 ± 0.5	NS		TCC	Ser	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
26	4.5 ± 0.3	5.0 ± 0.0	NS	4.0 ± 2.0	NS		CCC/ACC	Pro/Thr	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
27	4.0 ± 0.0	4.5 ± 0.5	NS	4.0 ± 0.0	NS		GCC	Ala	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
28	4.5 ± 0.5	5.0 ± 0.0	NS	5.0 ± 0.0	NS		—	—	—	—	TSR (未分析)
29	4.5 ± 0.5	4.0 ± 1.0	NS	5.0 ± 0.0	NS		CCC	Pro	TTG	Leu	TSR-Trp ₅₇₄
30	6.0 ± 0.0	4.8 ± 0.3	NS	3.3 ± 0.3	**		TCC	Ser	TGG	Trp	TSR-Pro ₁₉₇
31	5.0 ± 0.0	3.5 ± 0.5	NS	4.5 ± 0.5	NS		CCC	Pro	TTG	Leu	TSR-Trp ₅₇₄

- 再生葉数は各処理 2~6 個体の平均と標準誤差。記号は Dunnett 検定で無処理区と有意差があることを示す。* : p < 0.05, ** : p < 0.01, *** : p < 0.001, NS : 有意差無し。
- 地上部再生法でSU剤処理区の個体間差が大きく、新葉の再生を示す個体と示さない個体が混じっていた場合に、ほ場内で異なるバイオタイプの個体が混在したと推定した。
- アミノ酸番号はシロイヌナズナのALSのアミノ酸番号による。'/'は解析結果のクロマトグラムにおいて2種類のピークがあったことを示す。「—」は未分析。
- Pro₁₉₇ および Trp₅₇₄ の分析を行ったすべての系統は, Ala₁₂₂, Ala₂₀₅, Asp₃₇₆, Arg₃₇₇, Ser₆₅₃, Gly₆₅₄ の塩基配列も決定したが, 塩基置換は検出されなかった。
- バイオタイプの略号は TSR : 作用点抵抗性, NTSR : 非作用点抵抗性 (以下の図表でも同様)。

ピラクロニル 1 キロ粒剤 (協友アグリ株式会社), 10%ピラゾレート 3 キロ粒剤 (三井化学アグロ株式会社), 2%テフリルトリオン粒剤 (試験名 HOK-1402 粒剤, 北興化学工業株式会社) を用いた。処理量はすべて市販一発処理剤の標準用量に

相当するように設定し, BSM 7.5 mg a.i. m⁻², PSE 2.1 mg a.i. m⁻², ピリミスルファン 6.7 mg a.i. m⁻², ピラクロニル 18 mg a.i. m⁻², ピラゾレート 300 mg a.i. m⁻², テフリルトリオン 30 mg a.i. m⁻² とした。肥料は化成肥料 (13%N, 13%P₂O₅, 13%K₂O) を一

律量 (5 g N m⁻²) 与えた。除草剤処理後は裾を開放したビニルハウス内に湛水を保ち静置し、処理から1ヶ月後に地上部乾物重を測定した。各種除草剤の効果は、地上部乾物重及びその対無処理区比によって比較した。また、各除草剤処理区の地上部乾物重の無処理区との差の有意性を Dunnett 検定により検定した。

5. 地上部再生法によるバイオタイプ判別

抵抗性の各バイオタイプを簡易に識別する方法を検討するため、代表とする系統について、塊茎から矢じり葉抽出期まであらかじめ生育させた個体を供試し、2016年8月に山形農研水田試で地上部再生法を行った。場内水田土壌(細粒強グライ土、埴壤土)を1/10,000 a (1 L 容) ポットに充填し、代かき後、矢じり葉抽出期のオモダカを移植した。検定に用いた成分は BSM, PSE, ピリミスルファンとした。薬剤はそれぞれ 60% BSM 水和剤, 0.07% PSE 3 キロ粒剤, 0.67% ピリミスルファン 1 キロ粒剤を用いた。処理量は標準薬量(既出)とした。ポットは各処理区3反復、ポット当たり1個体とした。ポットに移植してから2日後に3 cm の高さで地上部を切断し、湛水し、薬剤を処理した。その後は裾を開放したビニルハウスに湛水を保ち静置し、処理3週間後に再生葉数を記録し、抵抗性を判定した。各除草剤処理区の再生葉数の無処理区との差の有意性を Dunnett 検定により検定した。

結 果

1. 現地採取個体の抵抗性検定

第1表の左側は、地上部再生法における各地点のオモダカの再生葉数を示す。供試した地点の多くでいずれかの SU 成分の効果が劣り、特に、BSM に対しては試験場内の地点0を除く現地31地点中27地点(87%)が強い抵抗性を示し、高い割合にのぼった。BSM の効果が高い地点、すなわち BSM 感受性であった5地点(0, 1, 8, 9, 19)のオモダカはすべて PSE にも感受性であった。BSM に対して抵抗性を示した27地点のうち、PSE に対しては6地点(6, 13, 14, 15, 16, 21)が感受性、6地点(3, 12, 17, 18, 23, 30)が弱い抵抗性、残る15地点が強い抵抗性を示した。地点17における BSM 処理および地点3, 12, 17, 18における PSE 処理では、再生葉数の標準誤差が大きく、検定に供試した複数の個体に、新葉の再生を示す個体と示さない個体が混じっていた。結果の異なる個体が存在したこれらの地点では、ほ場内に異なるバイオタイプが存在した可能性が高い。

このように、山形県内には BSM と PSE に対して異なる反応を示すオモダカが発生しており、多様な除草剤感受性を有するオモダカが広範な地域に分布していた。

2. ALS 遺伝子の解析

第1表の右側は、オモダカの ALS 遺伝子の解析結果を示す。一部の系統は分析に未供試であるが、遺伝子解析を行った

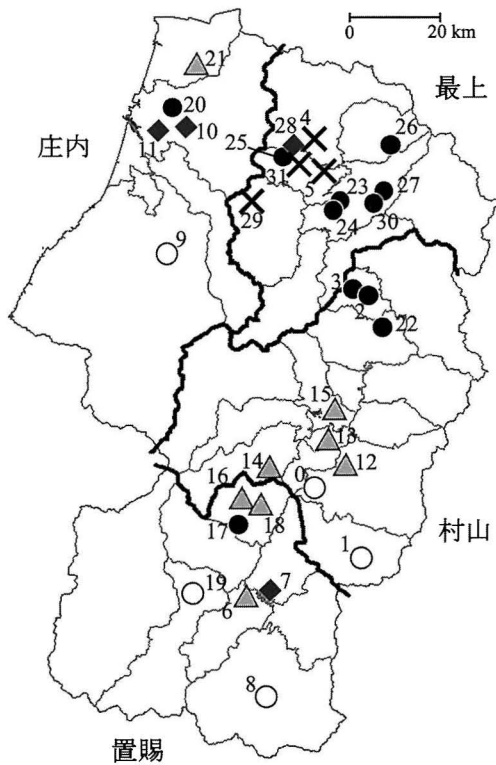
27系統のうち、11系統の ALS において Pro₁₉₇ の His または Thr, Leu, Ser, Ala へのアミノ酸置換が認められ、4系統の ALS において Trp₅₇₄ の Leu へのアミノ酸置換が認められた。Pro₁₉₇ および Trp₅₇₄ の他にも、アミノ酸置換が SU 剤抵抗性を引き起こす部位として Ala₁₂₂, Ala₂₀₅, Asp₃₇₆, Asp₃₇₇, Ser₆₅₃, Gly₆₅₄ の塩基配列も決定したが、これらの部位に塩基置換は検出されなかった。なお、地点17, 23, 24, 26では Pro₁₉₇ 部位をコードするコドンに2通りの塩基配列が検出されるヘテロ接合型であった(第1表)。また BSM に対する反応が混在と判断された系統17については、複数の個体を解析し、アミノ酸置換が認められない個体もあったことから、感受性個体が混在していた可能性が高い。これらの遺伝子解析の結果をもとに、BSM 抵抗性を示した系統のうち、上記のアミノ酸置換が認められた系統を TSR, アミノ酸置換がない系統を NTSR とし、第1表の右端の列に示した。遺伝子解析ができなかった BSM 抵抗性系統は、いずれも PSE に強い抵抗性を示したことから、Iwakami *et al.* (2014) の結果をもとに TSR と推定し、「TSR (未分析)」とした。系統17については、抵抗性バイオタイプの結果として TSR のみを記載した。

第1図は、判定された各バイオタイプの地理的分布を示す(混在と判定された地点は、防除対策を考慮して、交差抵抗性の広いバイオタイプにあわせて分類した)。感受性、NTSR, Pro₁₉₇ 変異型 TSR はいずれも山形県の全4地域(村山, 置賜, 最上, 庄内)のうち3地域以上で広く発生が確認されたのに対し、Trp₅₇₄ 変異型の TSR は内陸北部の最上1地域でのみ発生が確認された。感受性, NTSR, TSR (未分析を含む) の調査地点数に占める割合はそれぞれ13%, 26%, 61%であった(第2表)。TSR の少なくとも半数は Pro₁₉₇ 変異型であり、Trp₅₇₄ 変異型よりも多くの地点で発生が確認された。

3. 各種除草剤成分に対する反応

ポット試験におけるピラクロニル, ピラズレート, テフリルトリオン処理区の地上部乾物重の対無処理区比は、それぞれ2.4~8.0%, 0.0~1.3%, 0.0~0.4%であり、いずれの成分も高い除草効果を示した。従って、これらの3種の成分は、感受性, NTSR, TSR, Pro₁₉₇ 変異型 TSR, Trp₅₇₄ 変異型 TSR 系統のいずれにも効果が高いと判断した(第3表)。

感受性系統(系統0)には、BSM, PSE, ピリミスルファンの効果がいずれも高かった。NTSR 系統(系統14)には、BSM の効果が劣ったが(対無処理区比16%; 抑制を受けたが生育), PSE とピリミスルファンの効果はともに高かった(同0.3, 0.6%)。Pro₁₉₇ 変異型 TSR 系統(系統25)には BSM と PSE の効果が劣り(対無処理区比29, 14%; 抑制を受けたが生育), ピリミスルファンの効果が高かった(同1.0%)。Trp₅₇₄ 変異型 TSR 系統(系統31)には3成分とも効



第1図 山形県におけるSU剤抵抗性オモダカの発生状況

- 1) ○ 感受性, ▲ NTSR, ● TSR (Pro₁₉₇ 変異), × TSR (Trp₅₇₄ 変異), ◆ TSR (未分析)。
- 2) NTSR には、遺伝子解析の結果変異が検出されなかった場合と、遺伝子解析を行わずポット試験結果から推定した場合の両方を含む。
- 3) 混在と判定された地点は交差抵抗性の広いバイオタイプにあわせて分類した。
- 4) 太線の市町村界は県内4地域の境界。

第2表 各抵抗性タイプの地点数と割合

ALS 遺伝子変異		地点数	割合 (%)
感受性	検出せず	4	13
NTSR	検出せず	8	26
TSR	Pro ₁₉₇	11	35
	Trp ₅₇₄	4	13
	未分析	4	13
	(TSR 計)	19	61
合計		31	100

- 1) 現地 31 地点 (地点 1~31)。場内 (地点 0) を除く。
- 2) 混在と判定された地点は交差抵抗性の広いバイオタイプにあわせて分類した。

果が劣り (対無処理区比 84~112%)、薬剤による生育抑制が全く観察されなかった。

4. 地上部再生法によるバイオタイプ判別

ポット試験で認められた除草剤反応の差異を簡易に検出するため、各系統について地上部再生法をあらためて行い、地上部再生法によるバイオタイプ判別の可能性について検討した。BSM, PSE に加えてピリミスルファンを用いて地上部再生法を行ったところ、感受性系統 (系統 0) では BSM, PSE, ピリミスルファンの 3 成分とも新葉の再生が認められず、NTSR 系統 (系統 14) では BSM 処理でのみ新葉が再生し、PSE とピリミスルファン処理で新葉の再生が認められなかった (第 4 表)。Pro₁₉₇ 変異型 TSR (系統 25) ではピリミスルファンでのみ新葉の再生が認められなかった。Trp₅₇₄ 変異型 TSR (系統 31) ではすべての処理で新葉が無処理区同様に再生した。このように各系統に対する BSM, PSE およびピリミスルファンの効果は前項の除草剤反応試験の結果と概ね一致し、各バイオタイプ間で異なる反応を示した。

第3表 防除試験における地上部乾物重と対無処理区比

供試系統	バイオタイプ	処理時葉齢	地上部乾物重 (g/pot, 平均 ± SE) (対無処理比%, 有意差)						
			無処理	ピラクロニル	ピラゾレート	テフリルトリオン	BSM	PSE	ピリミスルファン
0	感受性	2-3L	3.57 ± 0.39	0.29 ± 0.19 (8.0 ***)	0.01 ± 0.01 (0.4 ***)	0.01 ± 0.01 (0.4 ***)	0.05 ± 0.01 (1.3 ***)	0.06 ± 0.00 (1.8 ***)	0.04 ± 0.03 (1.0 ***)
14	NTSR	2-3L	4.51 ± 0.38	0.20 ± 0.07 (4.5 ***)	0.06 ± 0.03 (1.3 ***)	0.01 ± 0.01 (0.1 ***)	0.71 ± 0.41 (16 ***)	0.03 ± 0.01 (0.6 ***)	0.01 ± 0.01 (0.3 ***)
25	Pro ₁₉₇ 変異	2-3L	5.96 ± 1.15	0.15 ± 0.11 (2.4 ***)	0.04 ± 0.01 (0.7 ***)	0.00 ± 0.00 (0.0 ***)	1.75 ± 0.58 (29 ***)	0.84 ± 0.45 (14 ***)	0.06 ± 0.02 (1.0 ***)
31	Trp ₅₇₄ 変異	2-3L	6.71 ± 1.54	0.41 ± 0.14 (6.1 ***)	0.00 ± 0.00 (0.0 ***)	0.01 ± 0.01 (0.2 ***)	5.60 ± 0.06 (84 NS)	7.51 ± 0.44 (112 NS)	5.94 ± 0.80 (89 NS)

- 1) 各処理 3 個体の平均と標準誤差。括弧内は無処理比。記号は Dunnett 検定で無処理区と有意差があることを示す。*** : p < 0.001, NS : 有意差無し。

第4表 地上部再生法における再生葉数

系統	バイオタイプ	無処理	BSM	PSE	ピリミスルファン
0	感受性	8.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
14	NTSR	7.7 ± 0.3	6.3 ± 0.3 *	0.0 ± 0.0 ***	0.0 ± 0.0 ***
25	Pro ₁₉₇ 変異	6.7 ± 0.3	6.7 ± 0.3 NS	5.7 ± 0.3 NS	0.0 ± 0.0 ***
31	Trp ₅₇₄ 変異	7.0 ± 0.0	7.7 ± 0.3 NS	7.3 ± 0.3 NS	7.3 ± 0.3 NS

1) 各処理3個体の再生葉数の平均と標準誤差。記号はDunnett検定で無処理区と有意差があることを示す。

*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, NS: 有意差無し。

2) 系統0は4処理とも反復間差がないため検定できず。

考 察

1. SU 剤抵抗性オモダカのバイオタイプの種類と地理的分布

ALS 阻害剤抵抗性雑草における ALS のアミノ酸置換部位としては、複数の雑草種において Pro₁₉₇ が多く報告され、ついで Trp₅₇₄ が多くなっている (Heap *et al.* 2016)。Sada *et al.* が国内各地で採集した SU 剤抵抗性イヌホタルイにおいても、ALS の Pro₁₉₇ 変異型の割合が最も高く、Asp₃₇₆ 変異型、Trp₅₇₄ 変異型の割合はこれよりも低かったことが報告されている (Sada *et al.* 2012; 定 2014)。今回のオモダカの調査においても、検出された ALS のアミノ酸置換部位は Pro₁₉₇ が最も多く、一部が Trp₅₇₄ であったことは、他の草種の事例によく一致している。

山形県では既にオモダカと同属のウリカワ (*Sagittaria pygmaea* Miq.) における SU 剤抵抗性の発生が確認され、これに対しポット試験結果をもとに数種の非 SU 系対策剤の効果が報告されている (片岡ら 2010; 松田・内野 2015)。抵抗性ウリカワは、今のところ山形県内の多発地域に限られているが、オモダカは山形県内全域で広く問題視されるようになっており、防除対策に関する要望が高まっている。

TSR と NTSR の割合を地域別にみると、最上地域では TSR と判定された地点数の割合が他の地域よりも高く、村山地域では NTSR の地点数の割合が高かった。各調査ほ場の除草剤使用履歴は一部しか明らかでないが、TSR の多かった最上地域は使用される除草剤が地域で比較的統一されており、多様な除草剤が使用されてきた背景があり、幅広い SU 剤に交差抵抗性を示す TSR が選抜されやすい条件にあったと推察される。さらに当地域は中山間地の比率が高く、県内では最も冷涼な気象条件下にあることから多年生雑草の発生が長期に及び、残草しやすい条件にあり、増殖が助長された可能性がある。一方、NTSR の多かった村山地域は、地域での推奨等により BSM 混合剤の連用が比較的多かった経緯があり、地域における除草剤の使用履歴が NTSR を選抜しやすい条件にあったものと推察される。実際に、NTSR の発生地点 14, 15 は BSM 混合剤が連用されたほ場であった。

2. SU 剤抵抗性オモダカの防除対策

ポット試験においては、非 SU 系成分のピラクロニルおよびピラズレート、テフリルトリオンが TSR, NTSR のいずれに対しても高い効果を示した (第3表)。このことから、この3成分はいずれの抵抗性タイプに対しても効果的な対策成分として使用できると判断した。ほ場に発生する雑草の種類や消長にあわせた除草剤散布は雑草防除の原則であり、発生消長が不齊なオモダカの防除においては、除草剤の体系処理の重要性が高い。オモダカが多発し、SU 剤抵抗性が疑われる水田においては、今回幅広いバイオタイプに効果が確認されたピラクロニルおよびピラズレート、テフリルトリオン等の有効成分を含む除草剤を用いることが有効であるが、オモダカが多発水田では一発処理のみによる防除だけでなく、作用機作の異なる剤を組み合わせた体系防除を行うことが重要となる。その例として、有効成分を含む一発処理剤に非 SU 系初期剤による前処理やベンタゾンによる後処理を組み合わせた体系が挙げられ、SU 剤抵抗性オモダカに対しては、こうした体系で効果的に防除を行う必要がある。

新規 ALS 阻害剤のピリミスルファンは、NTSR 系統および Pro₁₉₇ 変異型 TSR 系統の生育を総じて強く抑制したが、Trp₅₇₄ 変異型 TSR 系統に対しては効果が劣ることが確認された。TSR のうち Trp₅₇₄ 変異による抵抗性は、他草種で幅広い ALS 阻害剤に抵抗性を示すことが報告されており (Heap 2014)、オモダカに関する本試験の結果もこうした知見に一致する。ピリミスルファンは、ノビエを含む広範な草種に対して殺草効果を有し、減農薬栽培など限られた成分数で幅広い草種を防除する必要がある場面において利用価値の高い除草剤成分である。この成分は Trp₅₇₄ 変異系統以外のオモダカが発生している大半のほ場においては一定の効果が期待されるが、Trp₅₇₄ 変異系統が発生しているほ場では、非 ALS 阻害剤を用いてオモダカを防除する必要がある。なお、Trp₅₇₄ 変異系統の発生地点数は少なかったが、日本国内で新規 ALS 阻害剤が市販され現地水田で使用が開始されたのは 2011 年以降である。今回の調査で検出された Trp₅₇₄ 変異の 4 系統のうち系統 4, 5 は 2010 年に採取して抵抗性を確認したため、これまでの SU 剤の使用下において増殖したものと推察される。一方、

系統 29, 31 は 2013 年に採取され、除草剤使用履歴は不明である。新たに市販された新規の ALS 阻害剤の連用は Trp₅₇₄ 変異型の個体数を増加させる可能性があり、これらの連用の影響は今後検討すべき課題である。

3. 地上部再生法によるバイオタイプの判別

オモダカにおいては発根法の適用が困難であり (吉田ら 2008), 現状では地上部再生法が標準的な抵抗性検定法となる。第 4 表の結果において、各系統に対する BSM, PSE およびピリミスルファンの効果は、各バイオタイプ間で異なる反応を示したことから、BSM, PSE およびピリミスルファンを用いた地上部再生法を行うことにより、オモダカの 4 つのバイオタイプ (感受性, NTSR, Pro₁₉₇ 変異型 TSR, Trp₅₇₄ 変異型 TSR) のおおよその判別が可能であると考えられた。すなわち、BSM, PSE, ピリミスルファンの 3 成分とも感受性の場合には感受性系統と推定される。また、BSM 処理のみ抵抗性で、PSE とピリミスルファンに感受性の場合には NTSR 系統と推定される。ピリミスルファンにのみ感受性であれば Pro₁₉₇ 変異型 TSR と推定され、3 成分とも抵抗性であれば Trp₅₇₄ 変異型 TSR と推定される。これまで抵抗性の判定には BSM のみが用いられる場合が多かったが、本試験のように複数の成分で判定することにより、バイオタイプのおおよその判別も可能となると考えられる。

これらのうち Trp₅₇₄ 変異型 TSR 系統は、いずれの ALS 阻害剤処理においても標準薬量では生育抑制がほとんど認められず、地上部再生法における判定が容易であった。新規の ALS 阻害剤が広く普及し、新たな Trp₅₇₄ 変異型 TSR の発生も懸念される状況においては、BSM に対して抵抗性か否か、すなわち SU 剤抵抗性か否かという点に加えて、Trp₅₇₄ 変異型 TSR か否かを判定することが防除対策上重要となる。今後、複数成分を用いた地上部再生法は Trp₅₇₄ 変異型 TSR の有効な診断方法として活用できるものと期待される。

4. 調査ほ場におけるバイオタイプの混在

第 1 表に示した地上部再生法の結果では、遺伝子解析で NTSR と判定された地点 12 および 18 で PSE に抵抗性を示す個体の混在が認められた。これらの地点の遺伝子解析した個体の後代について、あらためて PSE に対する反応を確認したところ、Iwakami *et al.* (2014) で報告されている NTSR と同様に PSE に高い感受性を示した (未発表データ)。この結果も含めて今のところ PSE に抵抗性を示す NTSR 系統は知られていない。従って地点 12 と 18 で PSE に抵抗性を示した個体は NTSR 系統ではなく、TSR 系統が混在していた可能性が高い。一方、地点 17 では BSM および PSE に対する除草剤反応に混在が認められた。こちらは遺伝子解析で Pro₁₉₇ にアミノ酸置換のある個体とアミノ酸置換が認められない個体の両方の存在を確認したことから、ほ場内に TSR 個体と感受性個体が混在していたものと考えられる。遺伝子

解析で TSR と判定され、PSE に対する除草剤反応で混在が認められた地点 3 については、BSM 反応において混在が認められなかったことから、NTSR が混在していた可能性が高い。このように第 1 表の結果は現地の採取個体をそのまま用いて行った実験結果のため、異なる TSR 型個体や NTSR 型抵抗性個体、感受性個体が同一ほ場に混在していたことを反映している。従って、現場から個体を持ち帰り地上部再生法を行う際の注意点として、必ず複数の個体を供試するとともに、混在の可能性を含めて結果を考察する必要がある。そして異なる感受性の個体が混在している場合には、より広い種類の除草剤に交差抵抗性を示す個体にあわせて除草剤の選定を行う必要がある。

第 1 表の結果においては、Pro₁₉₇ が Ser に置換された TSR 系統 (23, 30) で PSE に対して抵抗性が弱く、同じ置換をもつ系統 25 でも有意差が無いものの抵抗性が弱い傾向が共通して認められた。一方、Pro₁₉₇ が His に置換された TSR 系統 (2, 3, 22) では、混在と判定された地点 3 を除いて PSE に対して高い抵抗性が認められた。イヌホタルイでは置換アミノ酸の種類によって除草剤反応が異なることが報告されており (Sada *et al.* 2013), オモダカでも同様に置換アミノ酸の種類によって各種 ALS 阻害剤に対する反応が異なる可能性が高い。このことは Trp₅₇₄ 変異型を速やかに判定しようとする上述のバイオタイプ診断の目的に直接影響するわけではないが、今後さらに異なる ALS 阻害剤に対する薬量反応を調査するなど、オモダカでも変異型と交差抵抗性の関係をより詳細に検討する必要がある。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、BSM 水和剤を提供頂いたデュボン株式会社、PSE 粒剤を提供頂いた日産化学工業株式会社に感謝いたします。現地調査に協力頂いた県内の各農業技術普及課、農協、生産者等関係者各位に感謝いたします。本研究の一部は (公財) 日本植物調節剤研究協会の雑草調査及び試験・展示圃設置運営支援事業による研究費の助成を受けて実施しました。

引用文献

- Asakura, S., H. Kawasaki, M. Hiraoka, T. Yoshimura and R. Hanai 2012. Biological properties of a novel paddy herbicide pyrimisulfan. *Pak. J. Weed Sci. Res.*, 18 Special Issue, 719–725.
- Busi, R., M.M. Vila-Aiub, H.J. Beckie, T.A. Gaines, D.E. Goggin, S.S. Kaundun, M. Lacoste, P. Neve, S.J. Nissen, J.K. Norsworthy, M. Renton, D.L. Shaner, P.J. Tranel, T. Wright, Q. Yu and S.B. Powles 2013. Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs. *Evolutionary Applications* 6, 1218–1221.
- Heap, I. 2014. Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Management Science* 70, 1306–1315.
- Heap, I., H. Glick, L. Glasgow and W. Vencill 2016. The International

- Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org/> (2016年12月3日アクセス確認)
- Itoh, K., G.X. Wang and S. Ohba 1999. Sulfonylurea resistance in *Lindernia micrantha*, an annual paddy weed in Japan. *Weed Res.* 39, 413–423.
- Iwakami, S., H. Watanabe, T. Miura, H. Matsumoto and A. Uchino 2014. Occurrence of sulfonylurea resistance in *Sagittaria trifolia*, a basal monocot species, based on target-site and non-target-site resistance. *Weed Biol. Manag.* 14, 43–49.
- 片岡有希子・中山壮一・内野彰・今泉智通・永田信彦・天笠正・二本理人 2010. 山形県および愛知県で採取されたウリカワのベンシルフロンメチルに対する薬量反応とアセト乳酸合成酵素遺伝子における変異. *雑草研究* 55, 254–257.
- 小荒井晃・森田弘彦 2002. 秋田県および茨城県におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性生物型コナギの出現. *雑草研究* 47, 20–28.
- 古原洋・今野一男・竹川昌和 1999. 北海道におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性イヌホタルイ (*Scirpus juncooides* Roxb. var. *ohwianus*. T. Koyama) の出現. *雑草研究* 44, 228–235.
- 松田晃 2012. 山形県におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性雑草の発生実態—オモダカを中心とした調査. *植調* 46, 230–239.
- 松田晃 2013. 山形県におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性オモダカ (*Sagittaria trifolia* L.) の発生. *東北の雑草* 12, 5–8.
- 松田晃 2014. 山形県の水田における近年の除草剤抵抗性雑草の現状. *東北の雑草* 13, 8–14.
- 松田晃 2015. 山形県における除草剤抵抗性水田雑草の実態と対策. *農業および園芸* 90, 198–202.
- 松田晃・内野彰 2015. 山形県に発生した除草剤抵抗性ウリカワの各種除草剤成分に対する反応. *雑草研究* 60, 5–8.
- 日本植物調節剤研究協会編 1998. 「1998 最新除草剤・生育調節剤解説」. 日本植物調節剤研究協会, 東京, pp. 106.
- 大野修二・柳沢克忠・花井涼・村岡哲郎 2004. スルホニルウレア系除草剤抵抗性簡易検定法としての地上部再生法の確立. *雑草研究* 49, 277–283.
- Sada, Y., S. Kizawa and H. Ikeda 2012. Varied occurrence of diverse sulfonylurea-resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla in Japan, as classified by an acetolactate synthase gene mutation. *Weed Biol. Manag.* 12, 168–176.
- Sada, Y., H. Ikeda and S. Kizawa 2013. Resistance levels of sulfonylurea-resistant *Schoenoplectus juncooides* [Roxb.] Palla having various Pro₁₉₇ mutations in acetolactate synthase to imazosulfuron, bensulfuron-methyl, metsulfuronmethyl and imazaquin-ammonium. *Weed Biol. Manag.* 13, 53–61.
- 定由直 2014. スルホニルウレア抵抗性イヌホタルイの ALS における作用点変異の多様性と交差抵抗性. *植調* 48, 186–191.
- Tranel, P.J. and T.R. Wright 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci.* 50, 700–712.
- 内野彰・伊藤一幸・汪光熙・橘雅明 2000. 東北地方におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性アゼナ類 2 種 1 変種の出現と各種除草剤に対する反応. *雑草研究* 45, 13–20.
- 内野彰 2015. 多年生水田雑草の除草剤抵抗性. *農業および園芸* 90, 174–180.
- 内野彰 2017. これまでに日本で除草剤抵抗性が報告されている雑草. <http://www.wssj.jp/~hr/weeds.html> (2017年3月9日アクセス確認)
- 吉田修一・伊藤健二・権田重雄 2008. 水田雑草のスルホニルウレア系除草剤抵抗性簡易検定キットの開発. *雑草研究* 53, 143–149.
- Yoshioka, K. 2002. KyPlot — a user-oriented tool for statistical data analysis and visualization. *Comput. Stat.* 17, 425–437.
- Yu, Q., H. Han, M.M. Vila-Aiub and S.B. Powles 2010. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *J. Exp. Bot.* 61, 3925–3934.
- Yu, Q. and S.B. Powles 2014. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Manag. Sci.* 70, 1340–1350.
- Yuan, J.S., P.J. Tranel and C.N. Stewart Jr. 2006. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12, 6–13.

Mutations of acetolactate synthase gene and response of sulfonylurea-resistant biotypes of *Sagittaria trifolia* L. to several herbicides in Yamagata, Japan

Akira Matsuda^{★1}, Satoshi Iwakami², Daisuke Aoki^{3,4}
and Akira Uchino³

Summary

Acetolactate synthase (ALS) gene was analyzed, and the response to sulfonylurea (SU) herbicides was investigated by pot experiments with *Sagittaria trifolia* L. collected in Yamagata Prefecture, Northeast Japan. The results revealed that SU-resistant

biotypes of *S. trifolia* were widely distributed in the area studied. Both target-site resistance (TSR: resistance caused by mutation of the target gene) and non-target-site resistance (NTSR: resistance not caused by mutation) were detected in the examined biotypes. The geographical distribution of TSR was different from that of NTSR. Variations were also found between the distribution of TSR with the Pro₁₉₇ mutation and that with the Trp₅₇₄ mutation, indicating that Trp₅₇₄ mutants were not ubiquitous in the area studied. In addition, pot experiments with alternative herbicides showed that pyraclonil, pyrazolate, and tefuryltrione were highly effective against both TSR and NTSR biotypes. Pyrimisulfan, which is not a SU herbicide but an ALS inhibitor, was effective against TSR with the Pro₁₉₇ mutation. However, this herbicide did not suppress the growth of TSR with the Trp₅₇₄ mutation. In conclusion, it is important that effective herbicides are adopted depending on the above different biotypes in the sequential application of different herbicides to reduce the prevalence of resistant *S. trifolia* weeds.

1 Yamagata Prefectural Agricultural Research Center, 25 Fujishima-Yamanomae, Tsuruoka, Yamagata 999-7601, Japan

★ matsudaakir@pref.yamagata.jp

2 Graduate School of Agriculture, Kyoto University

3 NARO Agricultural Research Center

4 Qualtec Co., Ltd.

Keywords: *Sagittaria trifolia* L., herbicide resistance, sulfonylurea herbicide, acetolactate synthase inhibitor