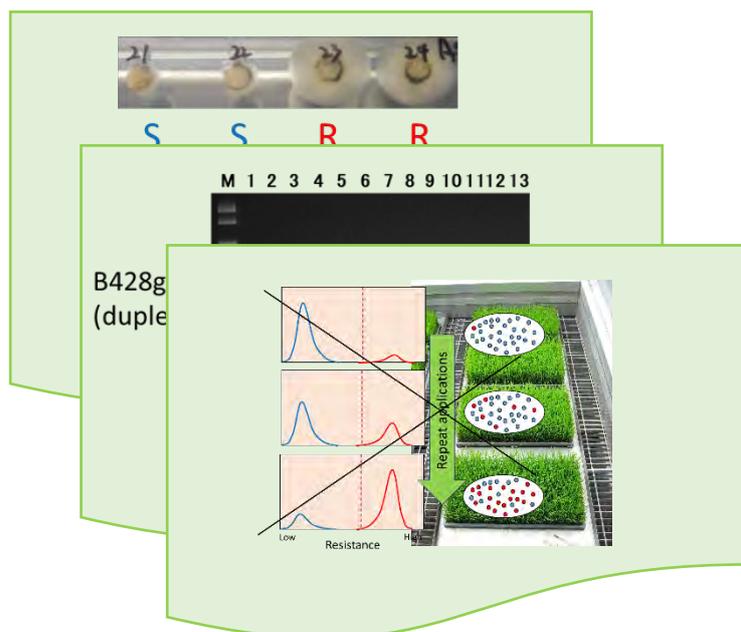


# 殺菌剤耐性イネいもち病菌 対策マニュアル

## <QoI 剤>



令和元年12月



農研機構



# 目次

はじめに	1
1. QoI 剤耐性いもち病菌の発生経過	2
1-1 QoI 剤耐性いもち病菌の国内発生状況	2
1-2 QoI 剤耐性いもち病菌の耐性機構、耐性菌発生リスク	3
2. 耐性菌対策における管理目標	4
3. 耐性菌対策の推進に必要な協力関係と役割	5
4. 耐性菌管理の作業手順	6
4-1 情報収集と発生予測	7
4-2 モニタリング調査と耐性菌検定	12
4-3 リスク評価と対策	14
5. 耐性菌の発生拡大を抑制する基本的対策	16
5-1 種子管理(いもち病発生量の管理)	16
5-2 使用面積率の管理(QoI 剤使用量の管理)	17
5-3 連用の回避	18
5-4 対策のチェックリスト(補足)	19
6. 耐性菌発生時の緊急対応	20
おわりに	21

付録 1	補足資料と関連するデータ	24
	QoI 剤耐性いもち病菌発生背景と経過等 (付録 1-1~1-3)	24
	イネいもち病防除薬剤の作用特性と耐性菌発生リスク (付録 1-4, 1-5)	26
	シミュレーションモデル (付録 1-6)	28
	QoI 剤の使用統計と統計分析 (付録 1-7~1-9)	29
	サンプリング数の検討 (付録 1-10)	32
	代替防除試験 (付録 1-11, 1-12)	33
	モニタリング調査 (付録 1-13)	35
	種子管理の実践例 (付録 1-14)	36
付録 2	耐性菌診断の具体的なプロトコール	37
	A 液体培地による簡易耐性菌診断法	37
	B 遺伝子診断法	44
	C PCR 用テンプレートの簡易調製方法 (paper-disk 法)	52
	D 培地検定法	55
	引用文献	61
	参考情報	62

## はじめに

近年、病害虫の殺菌剤や殺虫剤に対する抵抗性発達の問題は国内外を問わず一層深刻化しており、現行の防除体系の見直しが強く求められる状況となっています。このような情勢を受け、農林水産省の次世代ゲノム基盤プロジェクトにおいて、研究課題「ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発」のテーマの1つとして、イネいもち病のストロビルリン系殺菌剤（QoI 剤）耐性菌に関わる研究課題「薬剤抵抗性水稻病原菌の発生・伝搬抑制技術の高度化」が遂行されました（2014－2016 年）。研究期間を通して得られた成果を中心に整理し、「殺菌剤耐性イネいもち病菌対策マニュアル〈QoI 剤〉」として取りまとめました。本マニュアルでは、主に耐性菌を適切に管理するために必要な作業手順をフローチャートとして解説するとともに、QoI 剤耐性イネいもち病菌の診断技術、モニタリング手法、代替防除体系等、耐性菌管理に関連する情報を詳しく紹介します。

なお、本マニュアルは、県や地域単位で取り組むことが前提となっています。実施可能性や実効性が期待できる耐性菌対策を考慮し、当該剤の使用面積と連用の制限、および、種子管理に重点を置きました。このため、都道府県の試験場、普及センターや防除所、農協などの指導的立場にある方々を対象とした技術情報ですが、個々の農家が取り組む栽培管理等の耐性菌対策を否定するものではありません。適切な殺菌剤の使用と肥培管理、種子消毒の徹底などは、農家が耐性菌によるいもち病の被害にあわないために不可欠ですし、地域として耐性菌の発生や発達を遅らせることにも繋がります。本マニュアルを利用することで、より一層の耐性菌対策が普及することを期待しています。

# 1. QoI 剤耐性いもち病菌の発生経過

## 1-1 QoI 剤耐性いもち病菌の国内発生状況

ストロビルリン系殺菌剤耐性イネいもち病菌(以下、QoI 剤耐性いもち病菌)は、2012年に国内で初めて発生が確認され、これまでにその分布域が九州から東北地方まで拡大しています(図 1-1)。QoI 剤の耐性菌発生リスクが高いことは以前から知られており、とくに長期持続型の育苗箱処理剤の普及が耐性菌の発達を速めた可能性が高いと考えられています(石井, 2009a, 2014, 2015; 鈴木・早野, 2016)。

イネいもち病を対象とした QoI 剤は、アゾキシストロビン、メトミノストロビン、オリサストロビンの 3 種類が登録されています(付録 1-1: P.24)。近年では、オリサストロビンの育苗箱処理剤としての普及が進みました(付録 1-2: P.24)。

これまでに QoI 剤耐性いもち病菌の発生が公表されている府県では、発生状況に応じた対応策として、全面的な使用中止、一部使用中止などの判断がなされています(付録 1-3: P.25)。

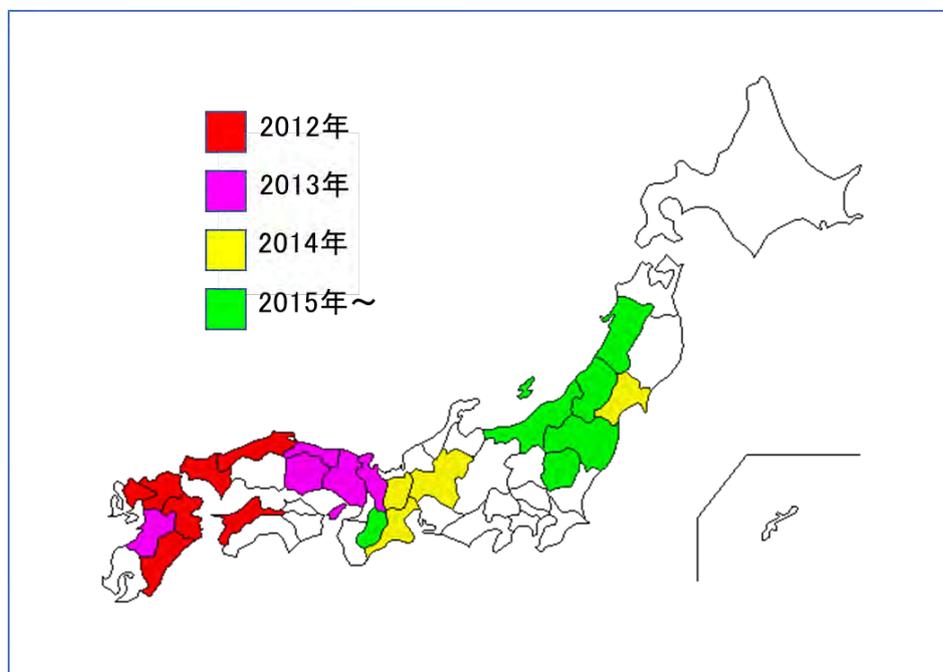


図 1-1 QoI 剤耐性イネいもち病菌の発生が公表されている府県(2018 年まで)

## 1-2 QoI 剤耐性菌の耐性機構、耐性菌発生リスク

国内で確認された QoI 剤耐性イネいもち病菌は、ミトコンドリアのチトクローム *b* 遺伝子の 428 番目の塩基が G (グアニン) から C (シトシン) に変異し、その結果として 143 番目のアミノ酸がグリシンからアラニンに置換 (G143A) することで耐性を獲得しています (図 1-2) (宮川・富士, 2013)。

FRAC (Fungicide Resistance Action Committee)による耐性菌発生の複合リスクの分類では、QoI 剤とイネいもち病菌の組み合わせは、最も耐性菌の発生リスクが高いとされる最高レベルの 9 に位置づけられています(付録 1-4: P.26)。

関連する情報は、Japan FRA ホームページ (<https://www.jcpa.or.jp/labo/jfrac/>) を参照してください。

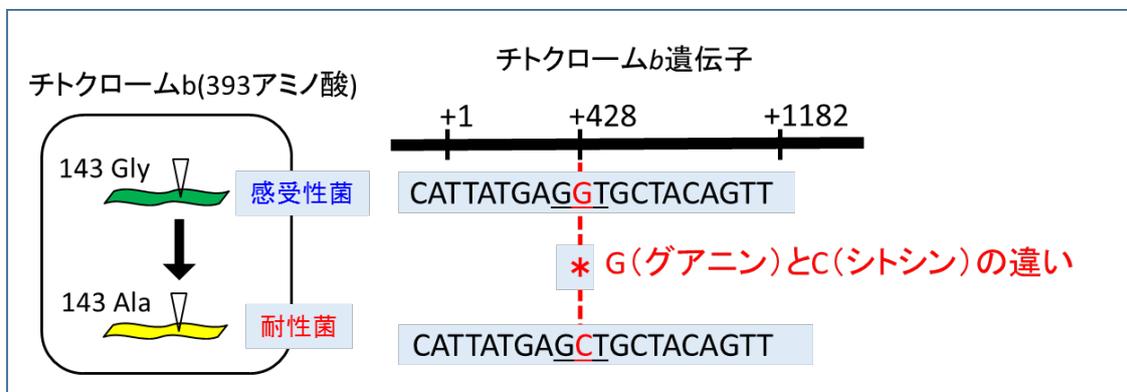


図 1-2 QoI 剤耐性獲得に関与するチトクローム *b* 遺伝子の 1 塩基置換

## 2. 耐性菌対策における管理目標

本マニュアルに基づく QoI 剤耐性イネいもち病菌対策の中心は、1. 箱処理剤の使用面積率の管理、2. 連用の制限、3. 種子保菌率の低減化の 3 点に集約されます。図 2-1 のように、この 3 点に管理目標の数値を設定して実践することが基本となります。これらの対策と並行してモニタリング調査を実施し、管理区域内で耐性菌が検出された場合には、リスク評価基準(表 4-2: P.14)に基づき対応策を選択します。

⇒管理区域：種子や殺菌剤の流通を把握かつ管理可能な区域

目標数値の設定次第で耐性菌発生リスクの閾値は変動しますが、実施可能な目標でなければ対策の推進は困難です。例示した数値を参考にして、地域の実情を踏まえた現実的なラインを設定することが大切です。また、地域によっていもち病の発病リスクが異なるため、ここでは全国一律に同じ管理目標を設定することは行いません。

4 章 (P.6) 以降では、これらの要因を抽出する根拠となるデータやモニタリング調査の作業手順等を、フローチャートに沿って解説します。

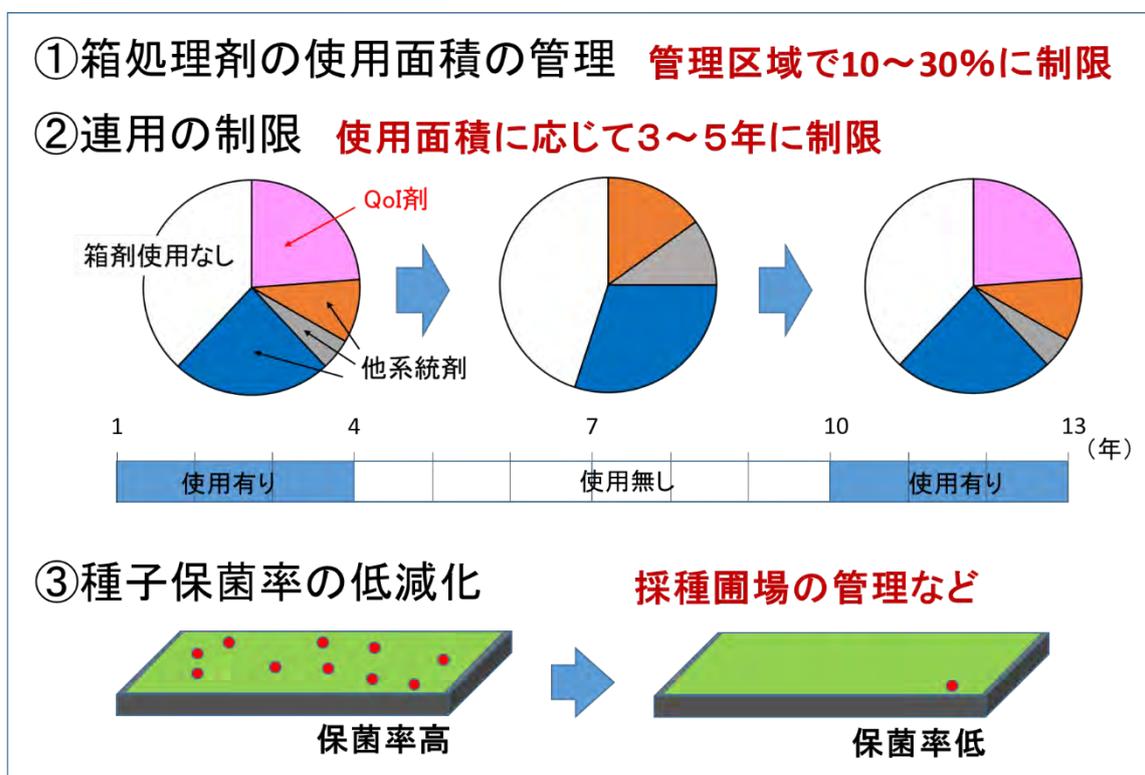


図 2-1 管理区域における耐性菌対策の管理目標(設定例)

### 3. 耐性菌対策の推進に必要な協力関係と役割

生産者の農薬の購入先としては、6割がJAから、4割が小売店からとなっています。殺菌剤の使用面積を管理するためには、系統ルート（農薬会社→全農→JA→生産者）、商系ルート（農薬会社→卸売業者→小売→生産者）の2つを把握する必要があります。したがって、本マニュアルで示した耐性菌対策の管理目標を達成するには、図3-1に示すように、全ての関係団体を含む枠組みで取り組むことが不可欠となります。耐性菌対策の取り組みにより、耐性菌発生リスクの高い殺菌剤でも持続的な使用が可能となれば、農薬メーカーと生産者の双方に大きなメリットがあります。

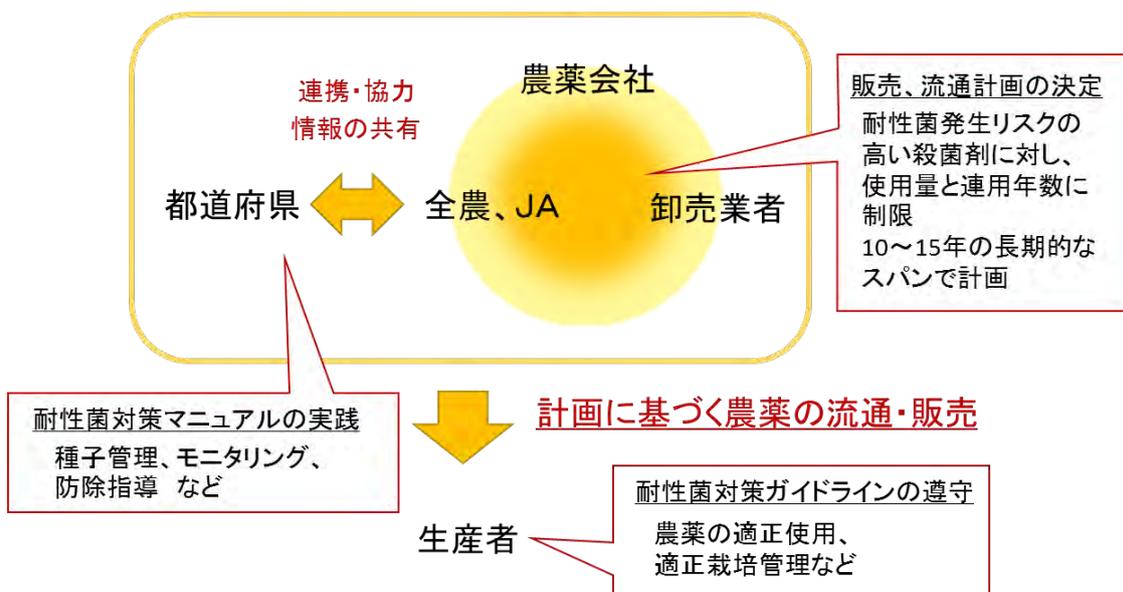


図 3-1 耐性菌対策における協力関係と各役割

## 4. 耐性菌管理の作業手順

実際に取り組む耐性菌管理の一連の作業手順をフローチャートで示しました。フローチャートは、3つのセクション（1. 情報収集と発生予測、2. モニタリング調査と耐性菌検定、および3. リスク評価と耐性菌対策）から構成されています。耐性菌検出時には、モニタリング調査や各種情報に基づき、継続使用か使用中止かなどの的確な判断が求められます。

以下、図 4-1 の①～⑥の各項目について解説します。

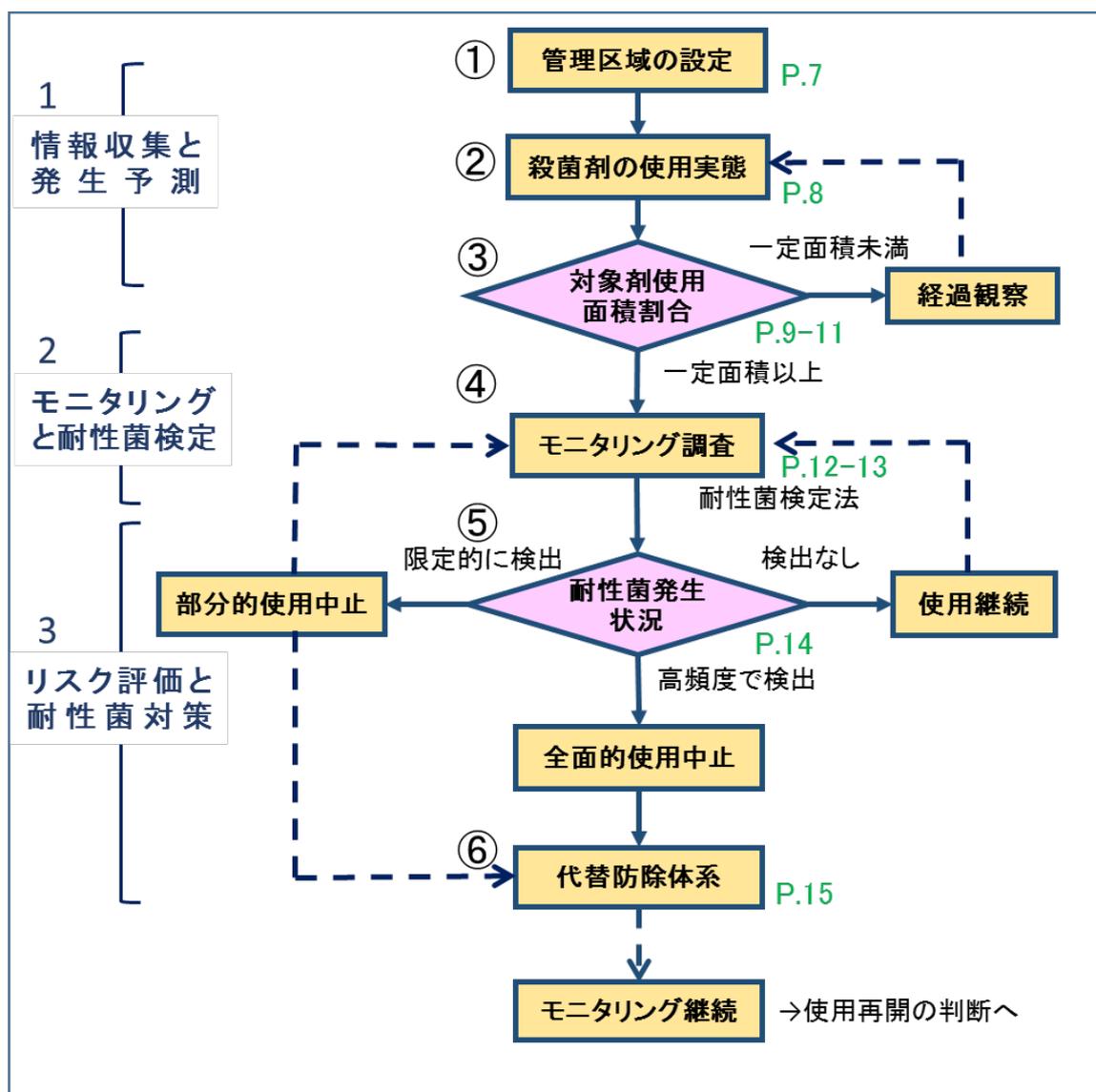


図 4-1 いもち病の薬剤耐性菌管理のフローチャート

## 4-1 情報収集と発生予測

### ① 管理区域の設定

イネいもち病の発生を抑制するには、保菌種子による伝搬ルートを考慮した対策がもっとも重要です。水稻種子に関しては、「主要農作物種子条例」などに基づき、種子の生産・安定供給が都道府県の管理の下で行われています（図 4-2）。このような背景から、薬剤耐性イネいもち病菌の管理については、各都道府県の種子生産・供給体制を考慮し、「管理区域」を全県や特定の地域などに設定した上で対策を講じることが効果的です。なお、「管理区域」の設定にあたっては、種子の流通に加えて、当該薬剤の使用実態やいもち病の発生量の情報を加味することで、より現実的かつ効率的な管理対策をとることが可能になります。

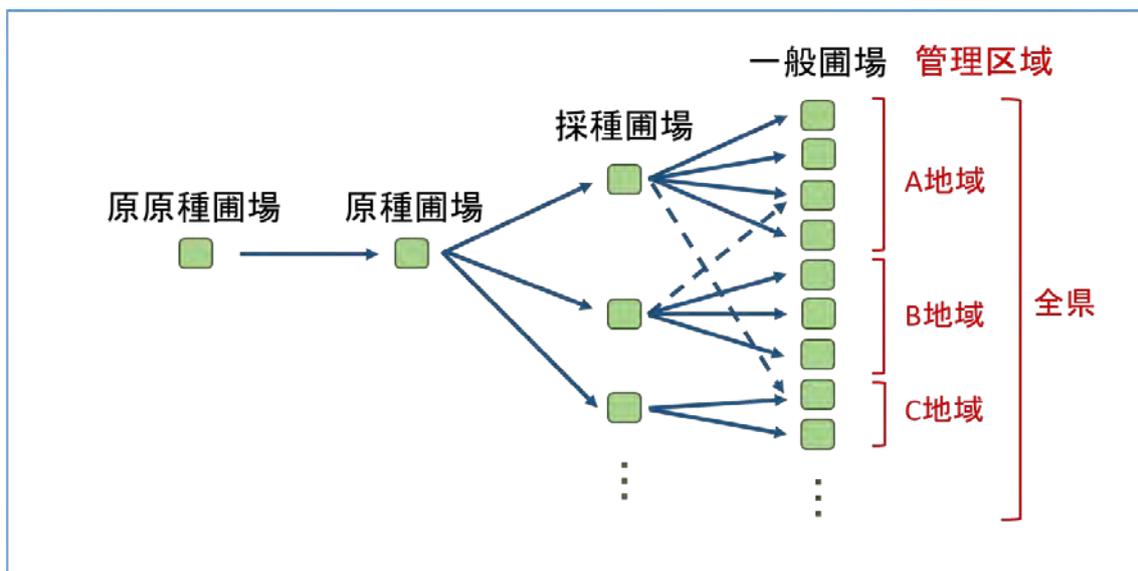


図 4-2 水稻種子生産の流れと管理区域の設定

## ②疫学的情報の収集（殺菌剤の使用実態の把握）

管理区域における対象薬剤の使用状況やいもち病の発生量を把握します。QoI剤の場合、育苗箱処理剤と本田散布剤等の使用形態ごとに普及面積を算出します。防除所の発生予察のための調査データ等を活用し、過去数年分のいもち病の発生状況についても整理します。

ここで示した図 4-3 は、日本植物防疫協会（JPP-NET）の統計データに基づき、水稻で登録のある 3 種類の QoI 剤について、単剤と混合剤の県別出荷量をすべて抽出し、所定の使用量で散布したと仮定して使用面積を算出した例です。なお、育苗箱施用剤は、10a あたり育苗箱 20 枚を使用したものと仮定しました。付録 1-7（P.29）は、福岡・佐賀の両県について、3 種類の QoI 剤の使用面積を年度ごとに集計し、その推移を示したグラフです。さらに、各県の作付面積に比べて、使用面積率を算出します。

QoI剤を含む製品	成分(%)	A	B	C
		1haあたりの 施用量	出荷量(トン)	使用面積 (ha)
<b>殺菌剤</b>				
メチノストロビン1キロ粒剤	15	10kg	1.5	150
アゾキシストロビン水和剤	8	1L	4.3	4300
フラメビル・メチノストロビン粒剤	1.5-4	30kg	0	0
メチノストロビン粒剤	4	30kg	0	0
メチノストロビン250g剤	60	2.5kg	0	0
シメナゾール・メチノストロビン粒剤	1.5-4	30kg	0.1	3
メチノストロビン粒剤(パック剤)	27	5.5kg	0	0
メチノストロビン1キロ粒剤	10	10kg	0	0
オリサストロビン粒剤	3.3	30kg	0	0
オリサストロビン粒剤	7	10kg	0	0
<b>殺菌殺虫剤</b>				
フィプロニル・アゾキシストロビン粒剤	1-6	10kg	10.4	1040
エトフェンブロックス・アゾキシストロビン・フェキサニル粉剤DL	0.5-0.5-0.6	30kg	0.1	3
エトフェンブロックス・アゾキシストロビン水和剤SE	10-8	1L	0	0
クロリアジン・オリサストロビン粒剤	1.5-7	10kg	0	0
フィプロニル・オリサストロビン粒剤	1-7	10kg	43.3	4330
フィプロニル・オリサストロビン粒剤	0.6-7	10kg	0	0
ジノテフラン・オリサストロビン粒剤	1.67-2.2	30kg	1.3	43
ジノテフラン・メチノストロビン粒剤	1.67-4	30kg	0	0
イミダクロプリド・フィプロニル・オリサストロビン粒剤	2-1-7	10kg	1.6	160
エチプロール・メチノストロビン粒剤	2-4	30kg	6	200
エチプロール・オリサストロビン粒剤	2-2.2	30kg	0	0
ジノテフラン・オリサストロビン粒剤	2-7	10kg	0	0
			アゾキシストロビン 合計	5343
			メチノストロビン 合計	353
			オリサストロビン 合計	4533

図 4-3 QoI 剤の使用面積の計算例

$$C = B \times 1,000 / A$$

A: 1ha あたりの施用量、B: 出荷量(トン)、C: 使用面積 (ha)

### ③対象剤使用面積割合と耐性菌発生予測

管理区域での当該薬剤の使用面積やいもち病の発生量などに関わるデータを解析すれば、管理区域での耐性菌の発生リスクを事前に予測することが可能です。具体的には、図 4-4 と付録 1-6 (P.28) で示した耐性菌動態シミュレーションモデル、および統計データに基づくロジスティック回帰モデル (図 4-6: P.11) を活用し、収集した情報を入力することで、管理区域での耐性菌の発生リスクを予測します。発生リスクの評価結果は、管理区域での殺菌剤の使用計画 (P.17-18) やモニタリング調査のサンプリング数 (P.12) を決める際の判断基準とします。

なお、これらのモデル式を用いたパラメータ分析の結果は、「2. 耐性菌対策における管理目標」を提示する際の数学的根拠にしました。

#### ③-① 耐性菌動態シミュレーションモデル

宿主-病原共進化モデル (Ohtsuki and Sasaki, 2006; 芦澤ら, 2015) を元に作成された耐性菌動態シミュレーションモデルでは、耐性菌の出現・蔓延に影響するパラメータを評価することができます。いもち病の発生生態においては、突然変異頻度、越冬確率 (種子保菌率)、QoI 剤の使用面積、年度内流行病斑数 (発生量)、気象変動が耐性菌の動態に影響する主なパラメータです。これらのパラメータ値を様々に組み合わせて計算することにより、各地域で耐性菌が蔓延するまでの年数を計算することができます。なお、地域毎に個々のパラメータがどのように影響するかは実情が異なりますので、それに合わせた計算が必要です。シミュレーションモデルを用いた解析に関しては、中央農業研究センター (病害研究領域・抵抗性利用グループ) までお問い合わせください。

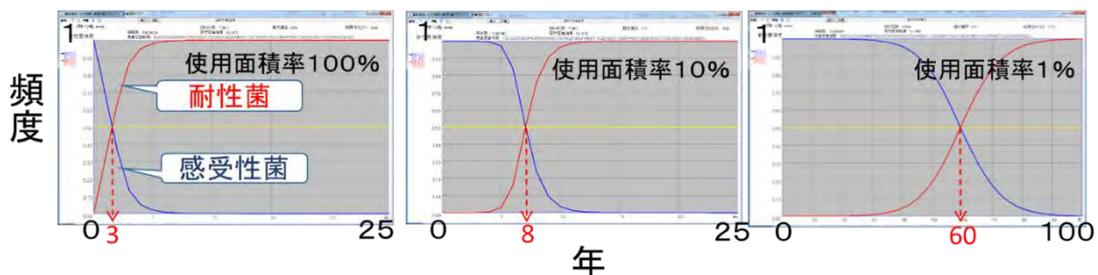


図 4-4 シミュレーションモデルによる感度分析例 ～使用面積率 (%) の影響評価～  
QoI 剤使用面積では、使用面積率が 100% で 3 年目、10% で 8 年目、1% で 60 年目に耐性菌の頻度が 50% を超えたと計算される。

図 4-4 は、シミュレーションモデルにおいて、QoI 剤使用面積率 (%) を対象としてパラメータの感度分析を実施した結果です。この結果は、使用面積を制限すれば、耐性菌が蔓延するまでの時間をより長くできることを示しています。また、年度内流行病斑数 (発生量) を対象としてパラメータの感度分析を実施した結果は、付録 1-6 (P.28) に示しました。

## ②-(2)リスクマトリックス

耐性菌を管理する上で重要なポイントを示すため、耐性菌動態シミュレーションモデルによる各パラメータの感度分析で得られた計算結果をもとに、気象変動、QoI 剤の使用面積、年度内流行病斑数 (発生量)、種子保菌率の値を組み合わせたリスクマトリックスを作成しました (図 4-5)。この図から、耐性菌管理のポイントは、種子の保菌率を低く抑えること、および QoI 剤の使用面積をある一定程度以下に抑えることであると分かります。具体的には、採種圃場で被害率が 1% を超えないように防除対策等で管理した種子を使用すること、QoI 剤の使用面積を 10% 程度以下に抑えることなどの対策によって、耐性菌の発生を抑制できることが示唆されます。

		気象変動(係数)			
		1(不適)	10(中)	20(好適)	
QoI 使用 面積 (%)	100	高(3)	高(3)	高(3)	1000万 (多発生)
	10	中(8)	中(8)	高(3)	100万 (多発生)
	1	低(50<)	中(8)	高(3)	10万 (少発生)
		0.01	0.1	1	
		保菌率(%)			
					年度内 流行 病斑 数(個)

図 4-5 シミュレーションモデルのパラメータ分析から作成したリスクマトリックス

### ③-(3) 使用面積と QoI 剤耐性菌の発生確率

耐性菌の発生県と未発生県の統計データを分析した結果、耐性菌の発生は、3種類の QoI 剤のうちオリサストロビン（箱処理剤）の使用面積率と関係することが明らかになりました(付録 1-8: P.30、1-9: P.31)。さらに、年次ごとの累積使用面積率データを用いたモデル選択を行い、オリサストロビンの累積使用面積率のみを説明変数としたロジスティック回帰モデルを作成しました（図 4-6）。

使用開始から 8 年目（2014 年）での QoI 剤耐性菌の発生確率 50% に対するオリサストロビン累積使用面積率を推定すると、6 年目（2012 年）までに 68% と計算されます(図 4-6)。この結果は、使用面積率 10% 以上で連用した場合に 5～6 年程度で耐性菌が蔓延することを示唆しており、前項のシミュレーションモデルの分析結果と合わせ、2 章（P.4）で提示した耐性菌対策における管理目標（①箱処理剤の使用面積の管理と②連用の制限）の数学的根拠としました。

この回帰モデルの予測式は、QoI 剤（箱処理剤）の使用計画を策定する際にも利用することが可能です。また、発生確率が小さいと予測された場合には、モニタリング調査の規模を縮小、あるいは実施を見送る選択も許容されます。

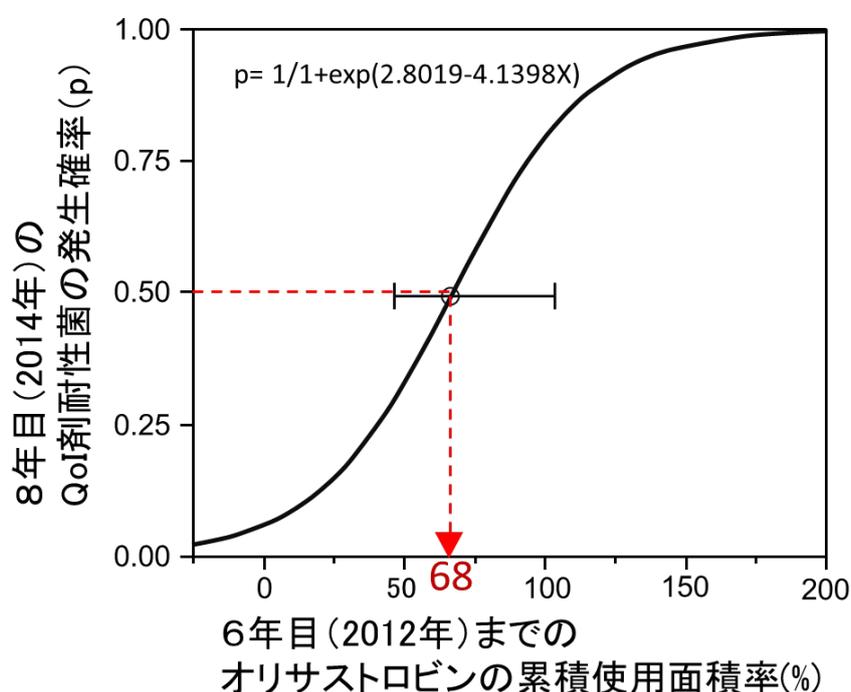


図 4-6 ロジスティック回帰モデルによる QoI 剤耐性菌発生確率の予測  
オリサストロビンの連用開始後 6 年目の累積使用面積率から、8 年目での耐性菌発生確率を予測するモデル。発生確率 50% の累積使用面積率は 68% (図中の棒線は 95% 信頼区間: 48-105%) と推定される。

## 4-2 モニタリング調査と耐性菌検定

### ④モニタリング調査

#### ④-(1) サンプリング法

発生初期の段階で耐性菌を検出するためには、QoI 剤が普及している地域を重点的にサンプリングする方が効率的です。一方、長期的に実施するモニタリングとしては、地域や圃場の偏りなく菌株を集めることが大切です。たとえば、調査対象地域において、100～1,000ha あたり 1 菌株ずつ集めるなどの系統抽出法が推奨されます。いずれにしても、目的や実情に合わせたモニタリング調査の計画を予め設定した上で、サンプリングを実施する必要があります。

ここでは、耐性菌を検出することに重点を置いた場合のサンプリング数の目安を示しました(表 4-1)。たとえば、想定される耐性菌率が 1%とした場合、299 地点を調査すれば 95%の確率で捕捉できると考えます。これは、耐性菌が一律に分布する場合を想定しています。

1 圃場あたりのいもち病菌の解析数については、多検体を調査しても検出できる遺伝子型の種類は頭打ちになります(付録 1-10: P.32)。解析できるサンプル数に上限があるならば、地点あたりの検体数は 1～3 程度に抑え、できるだけ地点数が多い方が耐性菌を高率に検出できます。

表 4-1 モニタリング調査におけるサンプリング数の目安  
(二項分布から計算)

想定される耐性菌率	検出に必要なサンプル数(地点数)				
	95%確率	90%確率	80%確率	70%確率	60%確率
1%	299	230	161	120	92
2%	149	114	80	60	46
3%	99	76	53	40	31
4%	74	57	40	30	23
5%	59	45	32	24	18

## ④-(2) 検出診断法

QoI 剤耐性菌の検定法としては、これまで①培地検定法（鈴木ら，2016a；付録 2-D: P.55）と②PCR-RFLP 法（Kim et al. 2003; 宮川・富士，2013）が用いられていますが、本プロジェクトにおいては、「③液体培地診断法」（付録 2-A: P.37）、「④ 1 秒法による PCR 診断法」（付録 2-B: P.44）、「⑤簡易 DNA 調製法（ろ紙法）」（付録 2-C: P.52）、⑥LAMP-FLP 法（鈴木ら，2017）などを新たに開発しました。

「③液体培地診断法」のメリットは、葉いもち病斑をそのまま用いることで分離・培養操作を必要としないところです。「④ 1 秒法による PCR 診断法」では、従来の遺伝子診断法に比べて作業時間とコストを削減できます。それぞれ手法によって操作性、コスト、作業時間などのメリット・デメリットが異なりますので、目的や作業環境に適した手法を選択します（図 4-7）。詳しい手法の特徴や操作手順は、付録 2（P.37-60）をご覧ください。

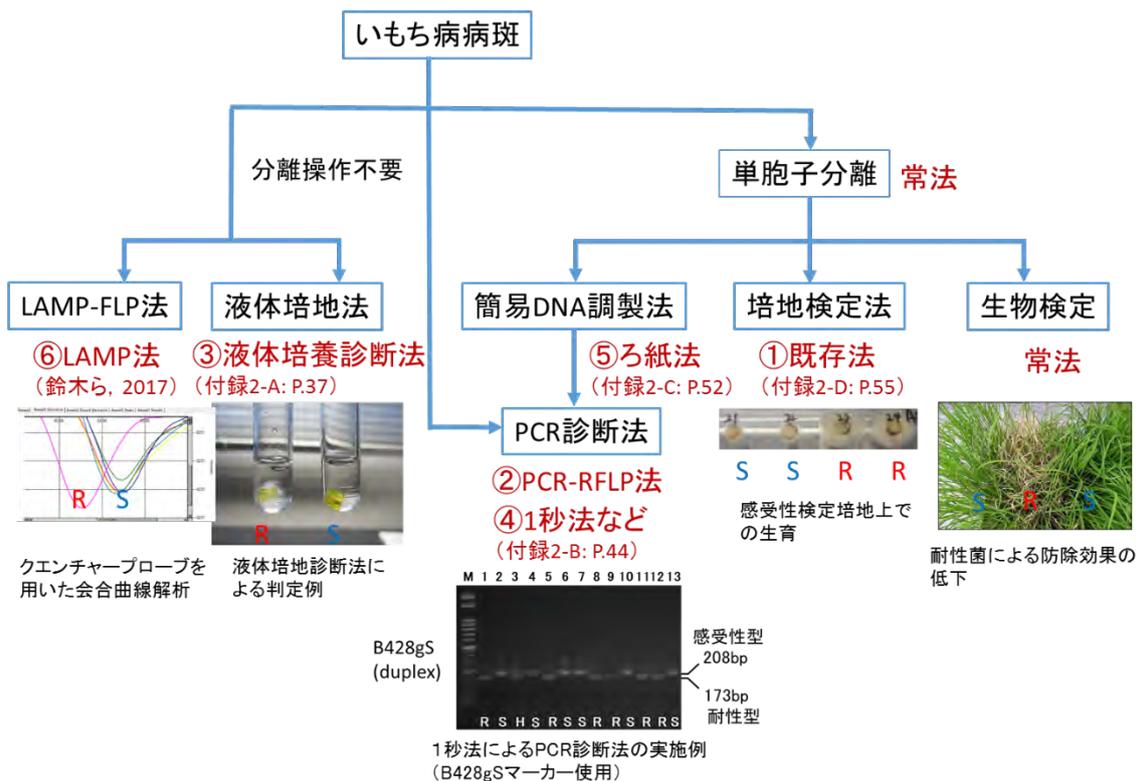


図 4-7 各種耐性菌検定手法の特徴

## 4-3 リスク評価と対策

### ⑤耐性菌発生状況と対応

管理対象区域からモニタリング調査によって耐性菌が検出された時には、当該薬剤の今後の使用方針について迅速に判断する必要があります。ここでは、農林水産省の消費・安全局植物防疫課の「指定有害動植物のリスク評価方法」における分類基準を元にした対応策を提示しました（表 4-2）。いもち病における耐性菌の発生拡大リスク分類では、種子伝染による発生拡大の可能性があると判断された場合、より上位（フェーズ2以上）の対応が必要です。

さらに、SSR マーカー解析（鈴木ら，2012）や *Pot2rep*-PCR 法（Suzuki et al., 2006）などの手法を用いて耐性菌の遺伝子型を解析すれば、耐性菌の分布の拡がりや伝搬ルートなどをより詳細に推定することも可能です。

表 4-2 モニタリング調査結果に基づくリスク分類と対応策

フェーズ (リスク分類)	発生状況	対応例
フェーズ3 (リスク高)	薬剤耐性が県内で広域に発達、もしくは広域に広がる可能性が高い状況 (例: 種子や苗の流通を介した発生拡大が疑われる など)	対象薬剤について、県内での使用中止もしくは使用制限を要請する。 (例: 箱処理剤、本田散布剤ともに全面的に使用中止 など)
フェーズ2 (リスク中)	薬剤耐性が県内で認められ、ある程度の面積規模で発達している状況 (例: 発生が特定の地域に限定される、発生地域以外では対象薬剤の使用面積割合が低い など)	対象薬剤について、地域限定での使用中止もしくは使用制限を要請する。 (例: 本田散布剤のみ使用継続 など)
フェーズ1 (リスク低)	薬剤耐性の発達が県内で認められたものの、一部のほ場、地域にとどまっている状況 (例: 発生圃場が限られ、種子での発生拡大の可能性は低い など)	対象薬剤の県内での使用について注意喚起を行う。 (例: 使用継続 など)
フェーズ0A (リスク低)	県内で薬剤耐性菌は認められていないものの、国内で発生があり警戒が必要な状況	薬剤耐性菌発生情報の周知を行いつつ、基本的な耐性菌対策を励行する。
フェーズ0B (リスク低)	国内で薬剤耐性菌は認められていないものの、薬剤耐性菌の発生リスクが高いため注意が必要な状況	技術研修会等で、対象薬剤の薬剤耐性菌の発生リスクを周知する。

本表は、三重県作成「薬剤抵抗性病害虫雑草対策フェーズ管理表」を改変した。

フェーズ1～3の発生状況は、農林水産省消費・安全局植物防疫課の「指定有害動植物のリスク評価方法」の記述を参考にした。

## ⑥代替防除薬剤の選択

QoI 剤耐性菌に対する各種いもち病防除薬剤の防除効果を評価した結果、他系統剤ではいずれも感受性菌と変わらない高い防除効果を示しました(表 4-3)。また、徹底した種子消毒と他系統の本田防除剤等を組合せた代替防除体系を採用すれば、QoI 剤耐性菌の存在下でも、いもち病に対して実用的な防除効果を示しました(付録 1-11: P.33)。さらに、QoI 剤耐性菌が存在する条件で QoI 剤の本田茎葉散布剤を出穂時期に 1 回だけ使用した場合、穂いもちに対する防除効果は他系統薬剤と同等であり、耐性菌の検出率も上昇しませんでした(付録 1-12: P.34)。

以上、QoI 剤耐性菌が発生した場合、当座は各地域の栽培暦等で採用されている他系統のいもち病防除剤を使用することで、耐性菌による被害拡大を防ぐことは可能です。QoI 剤の使用再開には慎重を期す必要はありますが、付録 1-12 の防除試験や付録 1-13 (P.35) のモニタリング調査の結果からは、今後、部分的な再使用を検討することは可能と考えます。

表 4-3 各種いもち病防除薬剤の QoI 剤耐性菌に対する防除効果(福岡県 2014 年)

系統	供試薬剤 <sup>a)</sup>	処理量・濃度	供試菌株					
			福岡A株(耐性菌)		福岡B株(耐性菌)		感受性株	
			病斑数 <sup>b)</sup>	防除価	病斑数	防除価	病斑数	防除価
ピリミジン系・MBI-R	フェリムゾン・フサライド水和剤	1000倍	0	100	0	100	0	100
MBI-R	トリシクラゾール水和剤	1000倍	0	100	0	100	0	100
MBI-R	ピロキロン箱粒剤	50g/箱	0	100	0	100	0	100
MBI-D	ジクロシメット箱粒剤	50g/箱	0	100	0	100	0	100
抗生物質	カスガマイシン液剤	1000倍	2.3	92	6.3	92	0	100
QoI	アゾキシストロピン水和剤	1000倍	19.3	35	64.8	15	0	100
	無処理		29.7		76		60.7	

a)アゾキシストロピン水和剤及びフェリムゾン・フサライド水和剤は製剤を常用濃度に希釈し散布した。

b)病斑数は30株あたり、3反復の平均値。

## 5. 耐性菌の発生拡大を抑制する基本的対策

本章では、P.4の「2. 耐性菌対策における管理目標」をサポートする考え方や基本的対策の設定例を示します。

耐性獲得に関わる遺伝子の点変異は、薬剤使用の有無に関わらず、一定頻度で生じているものと考えられます(1世代・1遺伝子座あたり $10^{-5} \sim 10^{-6}$ など)。したがって、いもち病の発生量(個体数)が多ければ、それだけ潜在的な耐性遺伝子の獲得個体が増えることとなります。さらに、当該薬剤を使用すれば耐性遺伝子を持った個体が有利となり、必然的に耐性菌の選抜が進みます。この耐性菌の発達の過程を少しでも遅らせるには、「基本的な防除対策の徹底によりいもち病の発生量を抑制すること」、「当該薬剤の使用制限や計画的使用によって耐性菌発達の機会を減らすこと」がポイントとなります。

### 5-1 種子管理(いもち病発生量の管理)

採種圃管理によって種子保菌量を低減し、さらに種子消毒の徹底によっていもち病菌の個体数を可能な限り減らします。また、種子への耐性菌の混入を極力避けるため、採種圃場ではQoI剤は一切使用せず、周辺圃場でも同様の管理を行うことが求められます。

図5-1は、三重県の採種圃場での取り組み事例を示しました。いもち病の流行

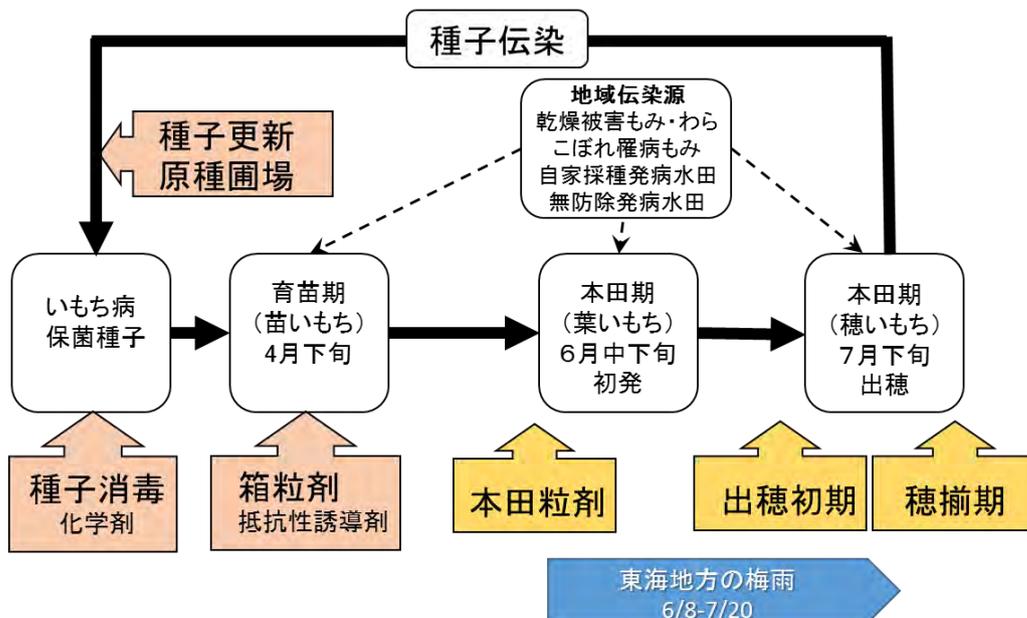


図 5-1 採種圃場でのいもち病の防除対策(三重県の事例)

前に本田粒剤の散布を実施するなど、穂いもちの伝染源となる葉いもちの発生を確実に抑制することで、保菌種子率の低減を図っています。また、付録 1-14 (P.36) には、リスクに応じた種子消毒法の基準の設定例を示しました。これらの対策を実施した上で、種子更新率を高めることが大切です。

## 5-2 使用面積率の管理(QoI 剤使用量の管理)

シミュレーションモデル(リスクマトリックス)と統計データによる試算から示されているとおり(図 4-4~4-6: P.9-11)、QoI 剤の箱処理剤の使用面積率を制限することによって、耐性菌発生リスクを低減する効果が期待できます。一方で箱処理剤には多くのメリットがあり、たとえリスクがあっても本田散布のみの防除体系に戻ることは難しいと思われます。現在、いもち病菌を対象とした箱処理剤を作用機序から分類すると、抵抗性誘導剤、MBI-R 剤、QoI 剤、MBI-D 剤、MBI-P 剤などに整理されます。いずれの剤についても、FRAC の耐性菌の発生リスク(付録 1-5: P.27)を参考にして、使用面積に一定の制限を設けることが大切です。QoI 剤の箱処理剤の使用面積については、他系統剤とのバランスも考慮しながら、中長期的な計画のもとに決める必要があります(表 5-1)。また、MBI-P 剤のような新剤については、予め高いリスクを仮定して慎重に普及を図るべきです。

表 5-1 殺菌剤の耐性菌発生リスクと使用面積の管理例

リスク分類	殺菌剤の種類	使用面積の管理例
高	MBI-D 剤、QoI 剤	作付面積の 20%以下
未発生	抵抗性誘導剤	作付面積の 50%以下
未発生	MBI-R 剤	作付面積の 40%以下
未発生	MBI-P 剤	作付面積の 20%以下

リスクが高い剤については、連用制限を前提として、図 2-1(P.4)の管理目標の数値に基づき使用面積を設定した。耐性菌未発生の殺菌剤に関しては、これまでの使用実績に基づいて提示した。

### 5-3 連用の回避

耐性菌の選抜の機会を増やさないこと（選択圧の低減）は、最も基本的な対策の1つです。耐性菌発生リスクのある殺菌剤を制限なく連用すれば、どんなに防除対策を徹底しても、遅かれ早かれ耐性菌が出現することは明らかです。作期内での使用は1回とし、あわせて箱処理剤の使用面積率を管理する必要があります。統計データによれば、QoI 剤の箱処理剤を使用面積率 10%程度で連用した場合、多発年がなければ 5 年程度は顕在化しにくいことが明らかになっています。このようなデータも参考に、管理区域単位で中長期的な使用計画を立てることが大切です。

図 5-2 は、県内を 3 地域に分けた場合の連用回避例です。いずれの地域も一定年数の連用後に使用を止め、数年間の非使用期間を挟んで再使用します。非使用期間を設けることで、採種圃場に耐性菌が入り込むリスクを低減できるなど、種子管理の面からも好循環が期待できます。再使用前には、モニタリング調査を実施して、耐性菌の分離頻度を確認します。

なお、農薬や種子流通の実情を踏まえ、県内を 1 つの管理区域として取り組むことも選択できます。そのほか、採種圃場を多く抱える地域では QoI 剤の箱処理剤を原則使用しない対策なども考えられます。

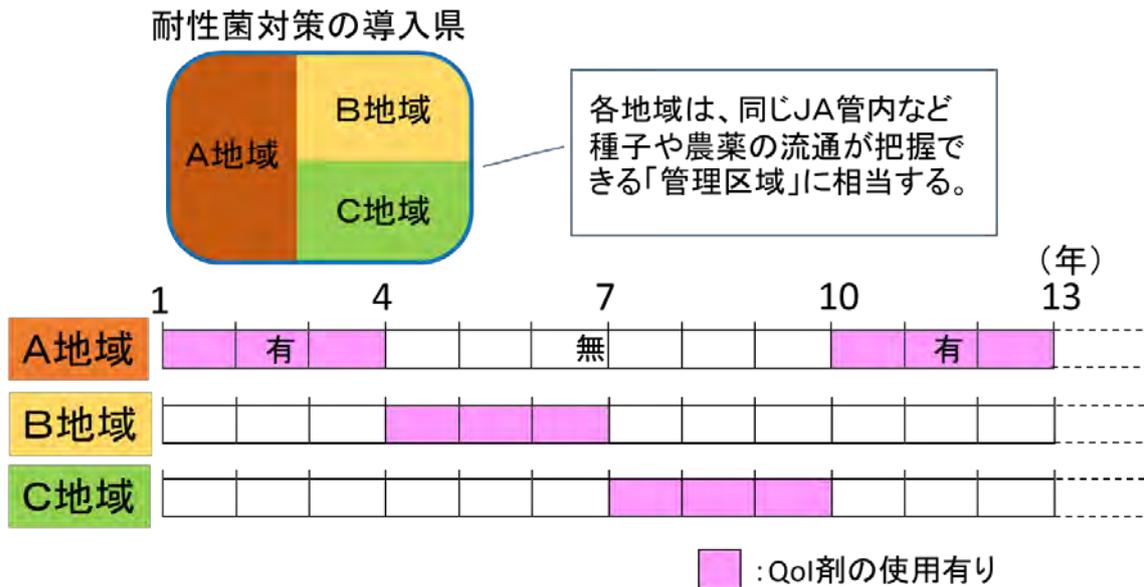


図 5-2 連用回避の取り組み例（イメージ図）

QoI 剤の使用中止期間は、抵抗性誘導剤など作用機序の異なる箱処理剤や本田散布剤のみの体系による防除を行う。

## 5-4 対策のチェックリスト(補足)

本マニュアルで示した対策は、県、地域、JAなどの単位で取り組むことを前提としましたが、個々の農家の取り組みも大切であることには変わりありません。小さな対策の積み重ねでも、地域として耐性菌の発達を遅らせることに繋がります。下に示したチェックリスト(表5-2)を日頃から確認し、農家の防除意識を高める活動も継続します。

表 5-2 QoI 剤耐性菌対策のチェックリスト

- QoI 剤は年1回の使用に限定する(商品名だけでなく成分に注意)
- QoI 剤の箱処理剤の連用には制限を設け、計画的に他系統剤に切り替える
- 防除履歴を記載する(複数年、使用薬剤の作用機序の確認等)
- 多発生時はQoI 剤を使用しない(発生前の予防的な散布を主な使用方法とする)
- 基本的な防除対策の徹底(種子消毒の徹底、適正な肥培管理、殺菌剤の適期散布等)
- 防除効果の低下を認めたら、すぐに関係機関に連絡(緊急防除の実施へ)

## 6. 耐性菌発生時の緊急対応

QoI 剤を使用してもいもち病の発生を認めた場合には、検定結果を待たずに他系統の薬剤で速やかに緊急防除を実施します（育苗時に発生した場合は苗を廃棄する）。図 6-1 には、三重県で作成した緊急対策の判断基準を示しました。耐性菌の発生時期（苗いもち、葉いもち、穂いもち）によって、必要な対策や緊急性が異なり、初期から発生した場合には、当年の発生拡大に留意する必要があります。穂いもちなどの栽培後期で発生した場合には、採種圃場やその近隣でなければ、当年の被害への影響の範囲は限定的であると判断されます。関係機関においては、発生要因の分析からリスク程度を評価した上で、次年度の方針等を決定します。

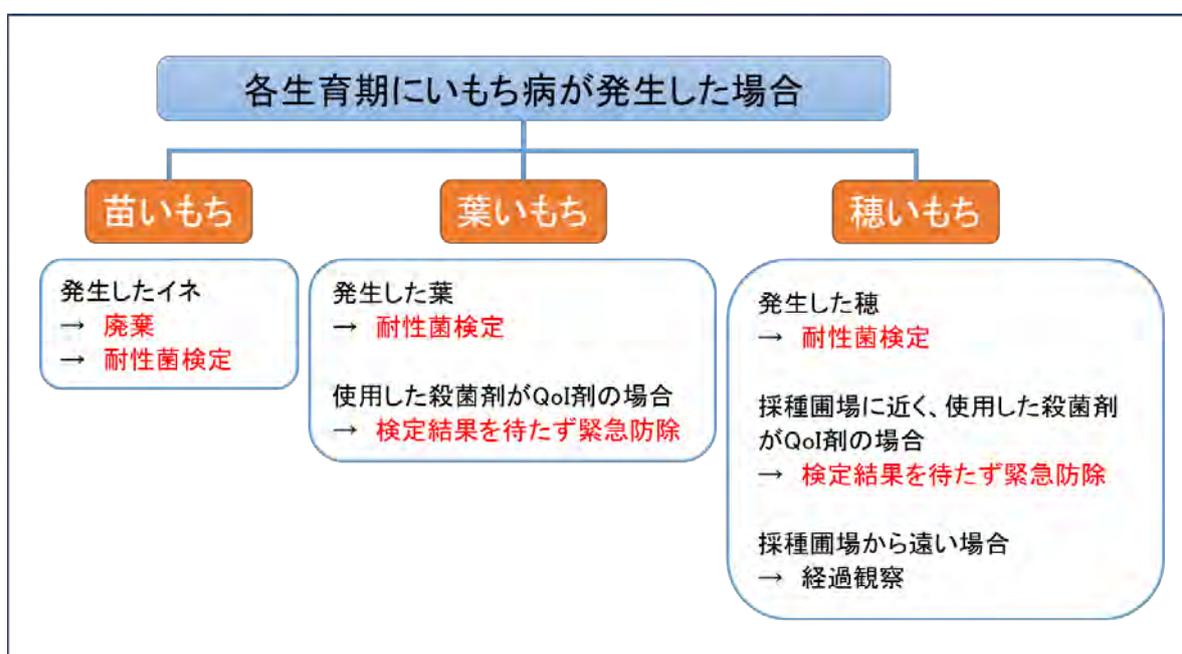


図 6-1 耐性菌発生時の緊急対策（三重県の作成例）

## おわりに

本マニュアルでは、プロジェクト研究を通して明確になった耐性菌対策のポイントとして、①種子管理の重要性、および②当該剤の使用面積率の管理と③連用の制限を提示しました。発生原因と関連する各種データを分析した結果、これらの対策を進める上で目安となる管理数値を示すことができました。今後、モニタリング調査や情報分析、実証試験などを通して、さらに対策の高度化を図っていくべきであると考えています。



# 付 録

## 付録 1 補足資料と関連するデータ

### QoI 剤耐性いもち病菌発生背景と経過等

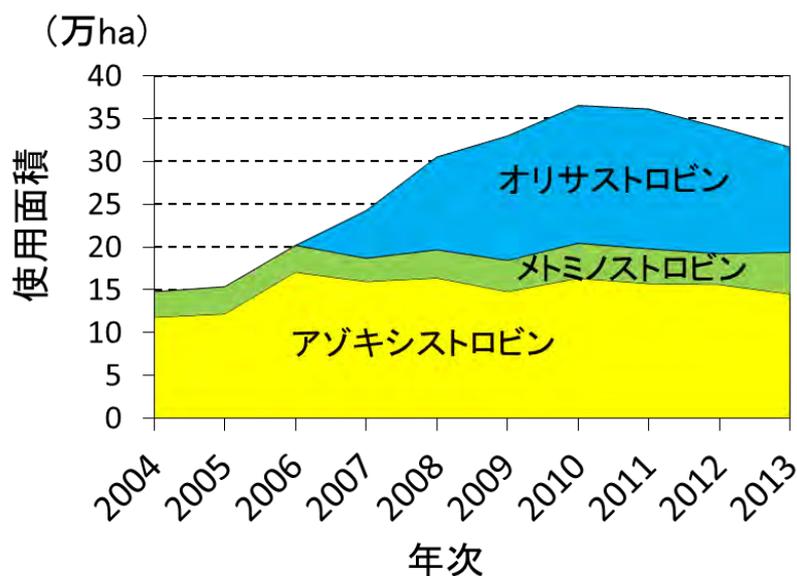
#### 付録 1-1 いもち病に登録のある QoI 剤の種類

3種類が登録されており、アゾキシストロビンとメトミノストロビンは、おもに本田散布剤として、オリサストロビンは育苗箱処理剤として使用されています。耐性菌は、いずれの剤に対しても感受性が低下しており、化学構造や作用機序が類似している薬剤間で生じる交差耐性を示します。

有効成分名	商品名の例	主な散布形態	登録年次
アゾキシストロビン	アミスター	本田散布液剤	1998年
メトミノストロビン	イモチエース オリブライト	本田散布粒剤	1998年
オリサストロビン	嵐	育苗箱散布粒剤	2006年

#### 付録 1-2 QoI 剤の使用面積の推移(いもち病対象剤)

全国の QoI 剤の普及実績を使用面積率で示しました。2004 年から 2013 年までの 10 年間を表していますが、アゾキシストロビンは 10~15 万 ha、メトミノストロビンは 3~5 万 ha の使用面積率で推移しています。オリサストロビンは、2007 年以降に普及が進み、10~15 万 ha の面積で使用されています。



### 付録 1-3 QoI 剤耐性イネいもち病菌発生時の対応例

2012 年以降、QoI 剤耐性イネいもち病菌の発生は、22 府県で公表されています。発生状況に応じて、全面的な使用中止、発生地域での使用中止、一部使用制限などの判断がなされています。なお、下表の対応については、発生県で発信された発生予察情報等の記述を元に記載しました。

発生年	発生県	対応
2012年	山口	全面的に使用中止
	島根	一部使用制限
	愛媛	全面的に使用中止
	福岡	全面的に使用中止
	佐賀	発生地域は使用中止
	大分	全面的に使用中止
	宮崎	一部使用制限
2013年	岡山	発生地域は使用中止
	兵庫	全面的に使用中止
	鳥取	全面的に使用中止
	京都	発生地域は使用中止
	熊本	発生地域は使用中止
2014年	滋賀	発生地域は使用中止
	岐阜	発生地域は使用中止
	三重	一部使用制限
	宮城	全面的に使用中止
2015年	秋田	全面的に使用中止
	奈良	一部使用制限
	山形	一部使用制限
2016年	福島	一部使用制限
	新潟	一部使用制限
	栃木	一部使用制限

# イネいもち病防除薬剤の作用特性と耐性菌発生リスク

## 付録 1-4 殺菌剤と病原リスクに基づく複合リスク

殺菌剤の系統と病原菌固有の耐性菌リスクを掛け合わせた複合リスクが、FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) から提示されています。ここで、イネいもち病菌と QoI 剤の複合リスクは9となり、もっとも耐性菌の発生リスクが高いケースとして分類されています。

関連する情報は、Japan FRAC のホームページ (<https://www.jcpa.or.jp/labo/jfrac/>) を参照してください。

殺菌剤の系統	殺菌剤リスク	複合リスク		
QoI阻害剤 ベンゾイミダゾール ジカルボキシイミド フェニルアミド	高=3	3	6	9
有機リン剤 SBI剤 SDHI剤 アニリノピリミジン フェニルピロール	中=2	2	4	6
多作用点阻害剤 (ジチオカーバメート、 銅、硫黄等) MBI-R剤 抵抗性誘導剤	低=1	1	2	3
病原リスク→		低=1	中=2	高=3
病原グループ→		種子伝染性(例: 黒穂病) 土壌伝染性(例: 疫病) イネ紋枯病 麦類さび病 夏疫病、輪紋病、赤かび病、苗立枯病等	イネばか苗病 べと病(一部作物) テンサイ褐斑病 灰星病 ジャガイモ・トマト疫病 (RNAポリメラーゼ阻害剤以外) コムギ眼紋病 ブドウうどんこ病	イネいもち病 灰色かび病 麦類・ウリ類うどんこ病 柑橘貯蔵病害 ジャガイモ・トマト疫病 (RNAポリメラーゼ阻害剤) ブドウ・ウリ類べと病 リンゴ・ナシ黒星病

田辺 (2013) 農薬時代 No. 195 から改変

## 付録 1-5 イネいもち病に登録のある殺菌剤のコードと耐性菌発生リスク

FRAC の情報を基に、イネいもち病に登録ある殺菌剤について、系統ごとに発生リスクを整理しました。この中で、MBI-D 剤、QoI 殺菌剤、カスガマイシン、有機リン系剤については、過去に耐性菌の発生報告があります。殺菌剤の作用機構や耐性菌対策の最新情報については、Japan FRAC ホームページ (<https://www.jcpa.or.jp/labo/jfrac/>) を参照してください。

殺菌剤のコード	耐性菌の発生リスク	系統名	有効成分名	商品名(例)	主な作用
1	高	ベンズイミダゾール系	チオファネートメチル	トップジンM	有糸分裂阻害
			ベノミル	ベンレート	
3	中	DMI殺菌剤	ベフラゾエート	ヘルシード	細胞膜のステロール生合成阻害
			ブクロラズ	スポルタック	
			トリフルミゾール	トリフミン	
			イブコナゾール	テクリード	
6	中	有機リン系	IBP	キタジンP	脂質および細胞膜合成阻害
			EDDP	ヒノザン	
		ジチオラン系	イソプロチオラン	フジワン	
11	高	QoI殺菌剤	アゾキシストロピン	アミスター	呼吸阻害
			オリサastroピン	嵐	
			メミノストロピン	イモチエース、オリブライト	
16.1	未発生	MBI-R (メラニン生合成阻害剤－還元酵素)	トリシクラゾール	ビーム	メラニン生合成阻害
			ピロキロン	コラトップ	
			フサライド	ラブサイド	
16.2	高	MBI-D (メラニン生合成阻害剤－脱水酵素)	カルプロバミド	ウイン	メラニン生合成阻害
			ジクロシメット	デラウス	
			フェノキサニル	アチーフ	
16.3	未発生	MBI-P (メラニン生合成阻害剤－ポリケタイド合成酵素)	トルプロカルブ	サンプラス、ゴウケツ	
24	中～高	抗生物質剤	カスガマイシン	カスミン	タンパク質合成阻害
14	未発生	ピリミジン系	フェリムゾン	ブラシン(フサライドとの混合剤)	不明(細胞膜機能阻害?)
P2	未発生	抵抗性誘導剤	プロベナゾール	オリゼメート	宿主植物の抵抗性誘導
P3			チアジニル	ブイゲット	
			イソチアニル	ルーチン	

FRACコード表(2016年4月版)参照

# シミュレーションモデル

## 付録 1-6 シミュレーションモデルの構築とパラメータの評価

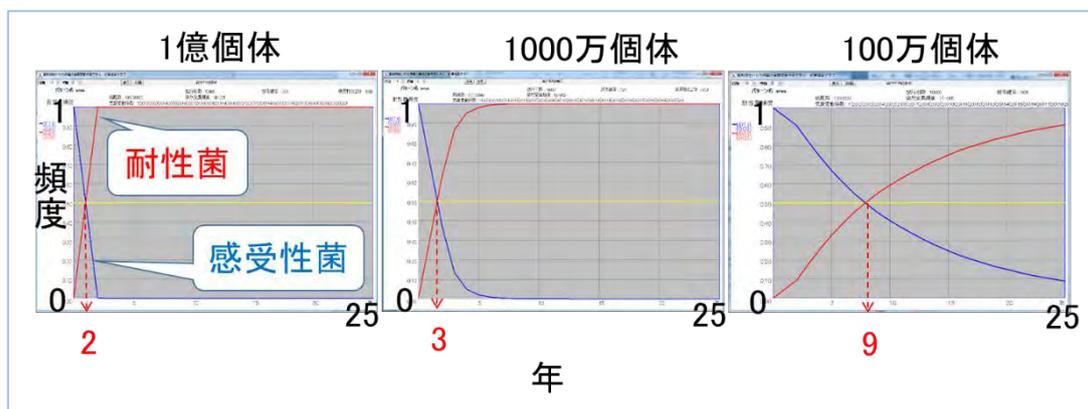
薬剤耐性菌の動態を把握するためのシミュレーションモデルをソフトウェアとして作成しました（下図）。パラメータとして、突然変異頻度、越冬確率（種子保菌率）、QoI 剤の使用面積、年度内流行病斑数（発生量）、適応度コストを評価した結果、いずれのパラメータも耐性菌の動態に影響することが明らかになりました。本モデルの利用に際しては、中央農業研究センターまでお問い合わせください。

パラメータの感度分析として、発生量の影響を評価した場合には、100 万個体では 9 年目、1000 万個体では 3 年目、1 億個体では 2 年目に耐性菌の頻度が 50%を超えます（下図）。QoI 剤使用面積の影響を評価した結果は、図 4-4 に示しました。以上、種子消毒の徹底などによる発生量の管理や QoI 剤の使用面積の制限によって、耐性菌が蔓延するまでの時間が長くなることが示唆されます。



シミュレーションモデルのソフトウェア初期設定画面

### シミュレーションモデルによるパラメータ感度分析例 ～発生量の影響評価～



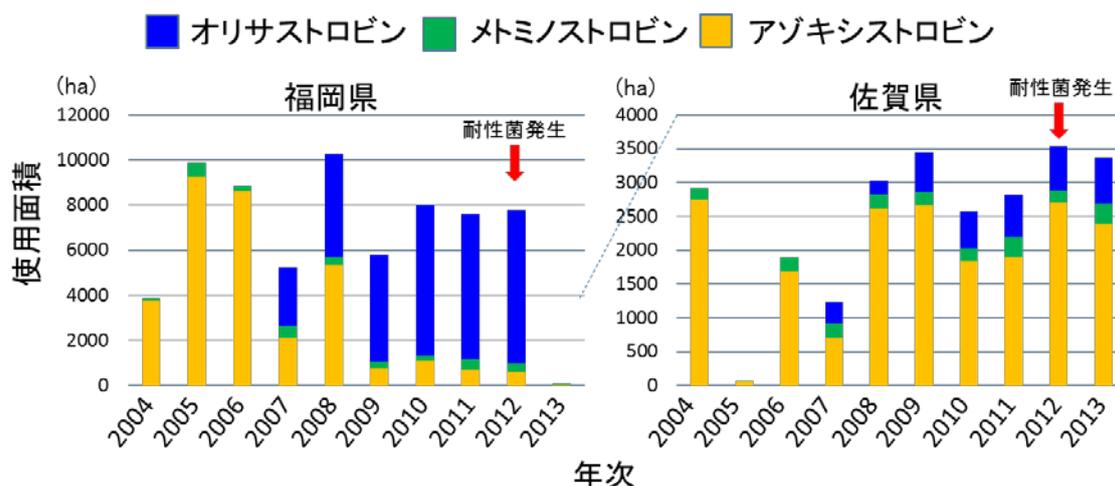
## QoI 剤の使用統計と統計分析

### 付録 1-7 福岡県と佐賀県における QoI 剤の使用面積の推移

(2004～2013 年)

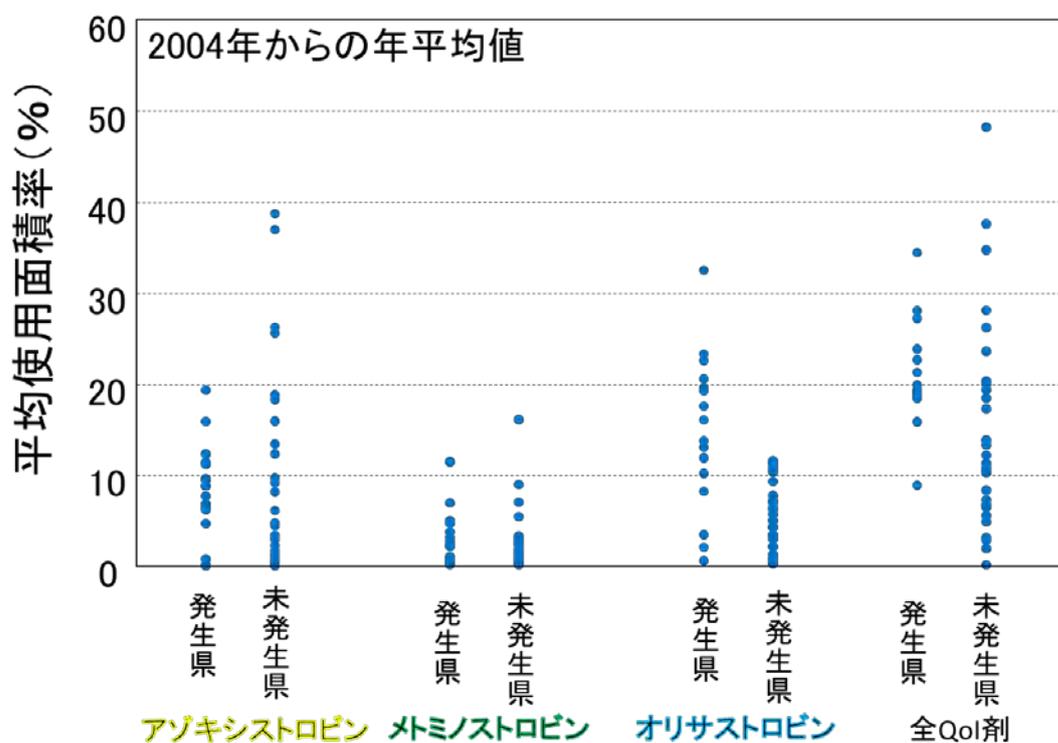
福岡県、および佐賀県を例として、3 種類の QoI 剤の使用面積を年度ごとに集計し、その推移を示しました。オリサストロビンの使用が開始された 2007 年以降、3 剤ともあまり使用面積に変化がないまま連用されています。佐賀県では、オリサストロビンは一部地域に限定して使用されたため、耐性菌の発生地域に限ると、高い使用面積率で連用されていました。福岡県では、発生年の翌年には全面的な使用中止の対応がとられました。

本マニュアルでは、ここで算出された使用面積を各県の作付面積に応じて使用面積率に換算した上、統計解析等に使用します。



## 付録 1-8 QoI 剤の種類別の使用面積率と耐性菌発生の関係 — 散布図による耐性菌発生県と未発生県の比較 —

47 都道府県について、3 種類の QoI 剤の 2004 年から 2013 年までの使用面積率の年平均値を計算し、剤の種類ごとにプロットしました。なお、耐性菌の発生県については、発生翌年から使用中止等の対策がとられるため、耐性菌発生年までの平均値としました。この散布図からは、オリサストロビンの使用面積率の高い都道府県から耐性菌が発生したこと、アゾキシストロビンとメトミノストロビンではそのような傾向が認められないことが推測されます。さらに、次頁の付録 1-9 では、耐性菌発生県と未発生県の 2 群間で、QoI 剤の種類別の使用面積率の有意差検定を行いました (P.31)。



## 付録 1-9 QoI 剤の種類別の使用面積率と耐性菌発生の関係 —2 群間の有意差検定—

耐性菌の発生県と未発生県の 2 群間における 3 種類の QoI 剤の使用面積率 (2007~2013 年の平均) を比較すると、オリサストロビンと全 QoI 剤で有意差が認められますが、アゾキシストロビンとメトミノストロビンについては、有意差は検出されません。以上より、オリサストロビンの使用面積率が高い県で耐性菌が発生したことが統計学的に裏付けられました。

耐性菌対策には種子更新率の向上が有効とされていますが、種子更新率についても 2 群間で有意差は検出されません。

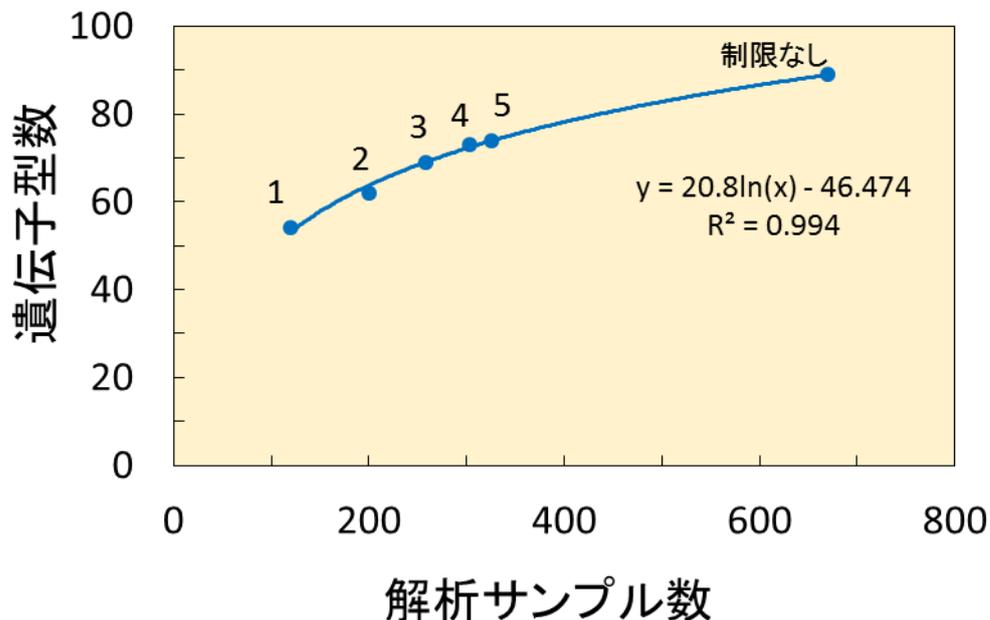
要因	発生県			未発生県			Kruskal-Wallis 検定
	n	平均 (%) (範囲)	標準偏差	n	平均 (%) (範囲)	標準偏差	P値
オリサストロビン	16	14.4 (0.3-32.3)	8.5	31	5.0 (0-11.3)	3.6	0.0003**
メトミノストロビン	16	2.9 (0.3-11.3)	2.9	31	2.4 (0-16.0)	3.2	NS
アゾキシストロビン	16	8.7 (0-19.4)	4.9	31	8.6 (0-38.8)	10.1	NS
全QoI	16	20.8 (8.7-34.4)	5.7	31	14.4 (0-48.2)	11.2	0.0075**
種子更新率(参考)	16	85.1 (73.3-97.7)	9.0	28	81 (70.2-100)	17.1	NS

種子更新率は、全国米麦改良協会データを使用(2014年度)。

## サンプリング数の検討

### 付録 1-10 イネいもち病菌の圃場あたりの解析菌株数の検討例 (2013～2014 年三重県)

1 圃場あたりの解析菌株数の上限を「1～5 菌株まで」、および「制限なし」として、総解析菌株数に対して検出される SSR 遺伝子型数との関係をプロットしました。この例では調査圃場数が 120 であり、1 圃場 1 菌株として 120 菌株を解析した場合には 54 種類の遺伝子型が検出されました。圃場あたりの解析数の上限を 5 菌株として合計で 326 菌株を解析した場合には 74 種類の遺伝子型が検出され、上限を設けずに 670 菌株を調査した場合には 89 種類の遺伝子型が検出されました。この結果は、同じ圃場から多数のサンプルを収集・解析しても検出される SSR 遺伝子型数はさほど増えないこと、すなわち多様な菌系をサンプリングはできないことを示唆しています。耐性菌のモニタリングにかかる労力を考慮すると、圃場あたりの解析数を 1～3 程度に抑え、調査圃場数を重視した方が捕捉率は上がると予想されます。



## 代替防除試験

### 付録 1-11 代替防除体系の防除効果(種子消毒の強化など)

#### (福岡県 2014 年試験)

種子消毒の強化(ベノミル水和剤の加用など)と QoI 系統を除く他系統の育苗箱施用剤、本田防除剤を組合せた代替防除体系は QoI 剤耐性菌が発生しているほ場において、いもち病に対して実用的な防除効果を示しました。QoI 系統の育苗箱施用剤の使用を止め、栽培暦等で採用されているいもち病防除剤を使用すれば、耐性菌発生圃場でもいもち病の発生を抑制できます。

処理区	苗いもち		葉いもち(初発10日後)		穂いもち		
	発病苗率	防除価	発病株率	株あたり病斑数	発病穂率	被害度	防除価
① 種子消毒:イブコナゾール・銅+ ベノミル水浸漬処理 箱剤:イソチアニル 出穂期:フェリムゾン・フサライド	0.1	99.1	1.0	0.0	1.0	0.4a	89
② 種子消毒:イブコナゾール・銅+ ベノミル水浸漬処理 箱剤:イソチアニル 出穂期:アゾキシストロビン	0.1	99.1	1.0	0.0	1.0	1.1a	73
③ 種子消毒:温湯浸漬+ カスガマイシン灌注 箱剤:イソチアニル 出穂期:フェリムゾン・フサライド	0.0	100	0.7	0.0	0.7	0.3a	94
④ 種子消毒:イブコナゾール・銅浸漬 箱剤:チアニジル 出穂期:フェリムゾン・フサライド	1.0	97.1	5.7	0.1	1.9	0.9a	78
無処理	34.8		50.0	1.1	9.6	3.8ab	

注1) 穂いもちの防除価は被害度から算出した。

注2) 分離されたいもち病菌はすべてQoI剤耐性菌であった。

注3) 穂いもち被害度の英異文字間に1%水準で有意差あり(Box-Cox変換後、Tukey-HSD検定)。

注4) 各区の調査結果は3反復の平均値で示した。

## 付録 1-12 代替防除体系の防除効果および QoI 剤耐性菌の検出状況 (福岡県 現地圃場B 2014 年試験)

耐性菌が発生している現地圃場（耐性菌率が 20%程度）において、本田散布剤を出穂時期に 1 回だけ使用した場合、穂いもちの発病抑制効果は、QoI 剤、他系統薬剤ともに実用的な高い効果を示しました。また、QoI 剤耐性菌の検出率は、QoI 剤の本田散布剤を使用した後でも上昇しませんでした。複数年の試験（佐賀県含む）で同様の傾向が認められています。耐性菌率が十分に低下した場合、本田期 1 回に限定した QoI 剤の使用再開は可能と考えられます。

出穂期の防除	防除効果				耐性菌の検出率	
	葉いもち		穂いもち		穂いもち	
	8月10日調査		9月2日調査		8月10日	9月2日
8月14日(出穂直前)	発病株率	病斑数/株	発病穂率	被害度		
	%		%		%	%
フェリムゾン・フサライド水和剤 (他系統)	84.0	1.1	10.2	6.4 <sup>ab</sup>	16.7 (5/30)	20 (6/30)
ジクロシメット・フサライド水和剤 (他系統)	76.0	0.9	17.7	5.0 <sup>ab</sup>	16.7 (5/30)	23.3 (7/30)
テブフロキン水和剤 (他系統)	78.7	1.0	13.4	4.0 <sup>a</sup>	13.3 (4/30)	16.7 (5/30)
カスガマイシン・トリシクラゾール 水和剤 (他系統)	86.7	0.9	13.8	4.9 <sup>ab</sup>	13.3 (4/30)	23.3 (7/30)
アゾキシストロピン水和剤 (QoI系統)	78.7	1.0	13.4	4.9 <sup>ab</sup>	16.7 (5/30)	16.7 (5/30)
無散布	74.7	1.2	23.4	9.2 <sup>b</sup>	10 (3/30)	16.7 (5/30)

注1) 防除効果および耐性菌率の調査は、各区3反復で行い、平均値のみを示した。

注2) すべての試験区で種子消毒、育苗箱施薬剤、初発時防除剤にそれぞれ温湯浸漬+カスミン液剤、イソチアニル・クロチアニジン・クロラントラニリプロール粒剤、およびピロキロン粒剤を処理した。

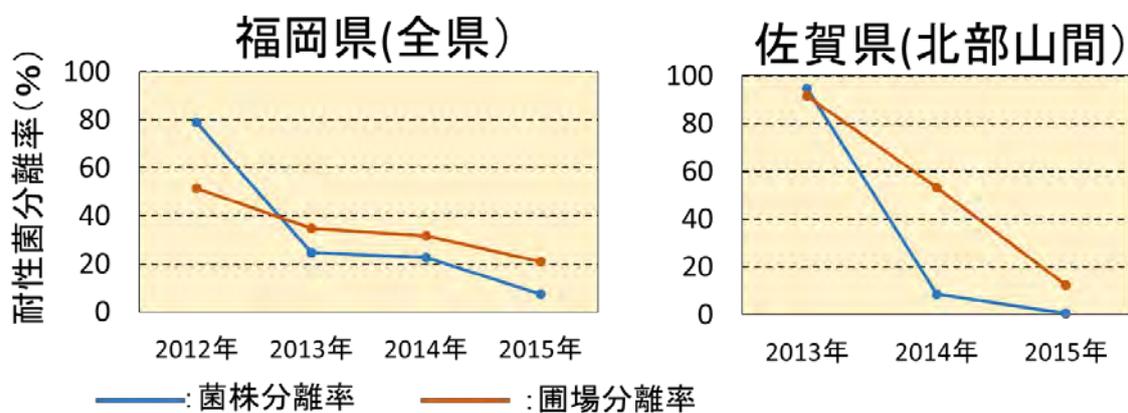
注3) 7月21日(初発時)の耐性菌率は、12.5%(1/8)であった。

注4) 穂いもち被害度の英異文字間に1%水準で有意差あり(角変換後、Tukey-HSD検定)。

## モニタリング調査

### 付録 1-13 QoI 剤使用中止後の耐性菌の発生推移

福岡県では 2012 年に QoI 剤耐性いもち病菌が全県的に発生しましたが、QoI 剤の全面的な使用中止により、2015 年の耐性菌の分離率は、菌株数ベースで 7.5%、圃場数ベースで 22.8%まで低下しました。佐賀県の北部山間地域でも大幅に耐性菌の分離率は低下し、2015 年には菌株数ベースで 0.4%、圃場数ベースで 12.5%となりました。この先耐性菌が分離されなくなった時点で、QoI 剤の使用は再開できると考えられます。



## 種子管理の実践例

### 付録 1-14 リスクに応じた種子消毒法の実践例

富山県を参考にして三重県が策定した種子消毒法の基準を示しました。図 5-1 の採種圃場での防除対策を強化することにより、採種圃場産種子を使用する一般圃場では従来どおりの種子消毒法としました。採種圃場外産種子については、ベノミル水和剤を加用する薬剤による種子消毒を奨励しています。採種圃場外産種子に対する基準を厳しく設定することは、薬剤耐性菌を持ち込ませないための重要な対策と考えます。

種子消毒法の基準(三重県の事例)

リスクに応じた種子消毒法 (判断基準)		
	採種圃場産種子 原種圃場産種子	採種圃場外産種子 (飼料用米含む)
一般圃場	今までどおり 温湯消毒 生物農薬など	銅・フルジオキシニル・ ペフラゾエート水和剤 または イプロナゾール・銅水和剤 ＋ ベノミル水和剤
種子生産圃場	銅・フルジオキシニル・ ペフラゾエート水和剤 または イプロナゾール・銅水和剤	

## 付録 2 耐性菌診断の具体的なプロトコール

### A. 液体培地による簡易耐性菌診断法

生産現場で簡易に QoI 剤耐性菌の検定が実施できるように、液体培地を用いる検定手法を開発しました。オリサストロビンなどを含む PDB 液体培地（通常の 10 倍希釈）に表面殺菌した罹病部位を静置し、病斑部からの菌糸生育の有無によって耐性菌かどうかを判定します。本法では、予め表面殺菌などの作業準備をしておくことで、単孢子分離や PCR を実施しなくても多検体の検定が実施可能となります。

#### A-1) 添加試薬の調製

##### (1) オリサストロビン(OS)

OS 原体 (BASF) を最終濃度 (100ppm) の 1000 倍となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解する。室温で 3 ヶ月保存可能。

$$100\text{ppm} (\cong 0.1\text{mg/ml}) \times 1000 = 0.1\text{g/ml}$$

##### (2) サリチルヒドロキサム酸 (SHAM)

SHAM を最終濃度(100ppm)の 1000 倍となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解する。室温で 3 ヶ月保存可能。

$$100\text{ppm} (\cong 0.1\text{mg/ml}) \times 1000 = 0.1\text{g/ml}$$

##### (3) ストレプトマイシン (SM)

ストレプトマイシン硫酸塩を最終濃度 (300ppm) の 1000 倍になるように蒸留水に溶解する。0.2 $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過滅菌した後、小分けして $-20^{\circ}\text{C}$ で保存。

$$300\text{ppm} (\cong 0.1\text{mg/ml}) \times 1000 = 0.3\text{g/ml}$$

##### (4) クロラムフェニコール (CP)

CP を最終濃度 (100ppm) の 1000 倍になるようにエタノールに溶解する。小分けして $-20^{\circ}\text{C}$ で保存。

$$100\text{ppm} (\cong 0.1\text{mg/ml}) \times 1000 = 0.1\text{g/ml}$$

## A-2) 培地の調製

### 0.1×PDB (Potato Dextrose Broth)

オートクレーブ滅菌後に以下の4試薬を添加

オリサストロビン(OS)	100ppm
サリチルヒドロキシ酸	100ppm
ストレプトマイシン(SM)	300ppm
クロラムフェニコール(CP)	100ppm

## A-3) 液体培地の分注

- (1) 調製した液体培地をクリーンベンチ内で滅菌チューブに分注する。
- (2) 2ポジションキャップ付きチューブ (写真、ポリスチレン製、透明、容量5ml) に培地を1ml分注する。分注後は出来るだけ冷暗所に保存する。



## A-4) 葉いもち病斑の前処理・表面殺菌

以下の工程をエタノール消毒した実験台の上で実施する。

- (1) 病斑 (進展型が望ましい) を幅 5mm 程度に切断する。(可能であれば、残りの病斑部分は単孢子分離用に保存しておく)
- (2) 病斑をピンセットでつかみ、消毒用エタノール液 (75~80%) に 30 秒間浸漬する。
- (3) 滅菌水で洗浄する。
- (4) 別の滅菌水で洗浄する。



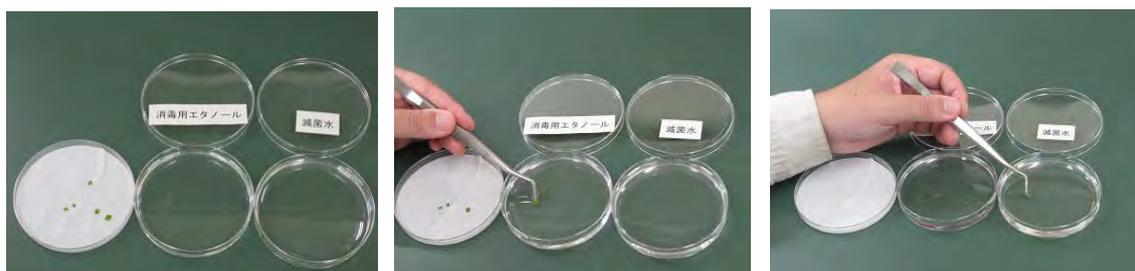
新鮮な病斑を使用する



使用前にピンセットとハサミはエタノール消毒



幅 5mm×長さ 10mm 以下に切断



エタノール液に 30 秒間

滅菌水で 2 回洗浄

### A-5) 培養

- (1) 培地を分注したチューブに A-4) の病斑を入れ、培地中に沈めて、ふたをする。チューブは室内に静置する。
- (2) 葉いもちの発生時期には十分な室内温度を確保できるため、耐性菌であれば 3 日間程度で病斑から菌糸の生育が目視で認められる。



罹病葉は浮きやすいため完全に浸漬されていることを確認する。

### A-6) 検定用資材の廃棄

- (1) 農薬の原体を含む使用済みまたは不要となったチューブは産業廃棄物として適切に処分する。
- (2) 使用したピンセットおよびハサミはオートクレーブで滅菌する。
- (3) 切り落とした不要な葉いもち病斑についても、オートクレーブ等で滅菌後に処分する。
- (4) 作業終了後は実験台を消毒用エタノールで拭く。

## A-7) 耐性菌を検出するために必要な菌株（病斑）数

95%の確率で耐性菌を検出するのに必要なサンプル数は耐性菌率の値により異なる。

耐性菌率(%)	必要なサンプル数	備考(計算式)
70	4 n>3	二項分布 $(1 - 0.7)^n < 0.05$
50	6 n>5	二項分布 $(1 - 0.5)^n < 0.05$
25	12 n>11	二項分布 $(1 - 0.25)^n < 0.05$
20	15 n>14	二項分布 $(1 - 0.2)^n < 0.05$
10	30 n>29	ポアソン分布 $P(N = 0) = \frac{e^{-0.1} \times 0.1^0}{0!} = e^{-0.1} = 0.9048 \dots$ $0.9048^n < 0.05 \rightarrow n > 29 \rightarrow 30$
5	60 n>59	ポアソン分布 $P(N = 0) = \frac{e^{-0.05} \times 0.1^0}{0!} = e^{-0.05} = 0.9512 \dots$ $0.9512^n < 0.05 \rightarrow n > 59 \rightarrow 60$
1	300 n>299	ポアソン分布 $P(N = 0) = \frac{e^{-0.01} \times 0.1^0}{0!} = e^{-0.01} = 0.9900 \dots$ $0.9900^n < 0.05 \rightarrow n > 299 \rightarrow 300$

ポアソン分布の一般式： $P(N = k) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!}$   $\lambda$  は平均値、 $k$  は観察された回数。

例) 10 株中 1 株が耐性菌の場合（ポアソン分布）には平均値が 0.1 のため

$\lambda=0.1$ 、観察されない確率は、

$$P(N = 0) = \frac{e^{-0.1} \times 0.1^0}{0!} = e^{-0.1} = 0.9048 \dots$$

となります。これをポアソンの 0 項と言う。

あとは二項分布の場合と同じで、 $0.9048^n < 0.05$ を満たす  $n$  を求める。

$n > 29$ となるので、30 以上のサンプル数が必要になる。

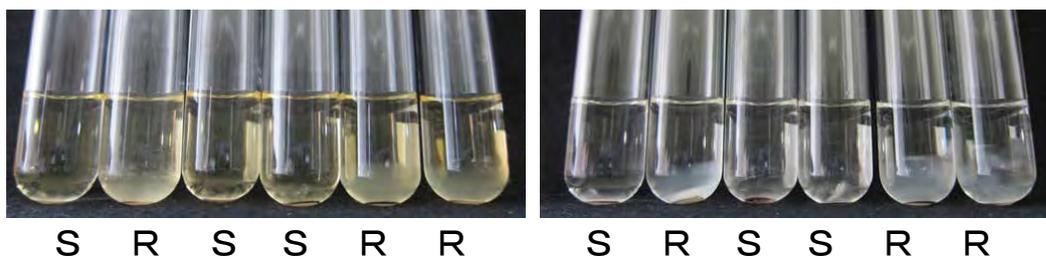
注) たとえば、耐性菌率 70%の圃場では、4 菌株を調べれば 95%の確率で耐性菌を検出できると解釈する。

## A-補足 手法のポイント

① 平板培地では、保管や操作時に雑菌が混入しやすいので取り扱いに注意する。



② 0.1×PDB (PDB を 10 倍希釈 : 右側) では、PDB (左側) と同等の菌糸生育が見られ、かつ視認しやすい。



S : 感受性菌、R : 耐性菌

## A-Ⅱ. 液体培地による簡易耐性菌診断法(市販 QoI 剤使用版)

37 ページで記載した液体培地検定手法をより使い易くしました。オリサストロビン原体でなく入手しやすい市販の QoI 剤を使用しても、オリサストロビン原体を使用した時と同様に耐性菌の検定が可能となります。

### A-Ⅱ-1) 添加試薬の調製

#### (1) 市販 QoI 剤 (2019.6.12 現在の農薬登録)

##### ① ジノテフラン・オリサストロビン粒剤 (オリサストロビン 2.2%)

オリサストロビンが最終濃度 (100ppm) の 10 倍となるように蒸留水に溶解する。

$$100\text{ppm} (\doteq 0.1\text{mg/ml}) \times 10 = 1\text{mg/ml}$$

$$\rightarrow \text{①粒剤 } 4.54\text{g}/100\text{ml}$$

##### ② フィプロニル・オリサストロビン粒剤 (オリサストロビン 7.0%)

オリサストロビンが最終濃度 (100ppm) の 10 倍となるように蒸留水に溶解する。

$$100\text{ppm} (\doteq 0.1\text{mg/ml}) \times 10 = 1\text{mg/ml}$$

$$\rightarrow \text{②粒剤 } 1.43\text{g}/100\text{ml}$$

##### ③ アズキシストロビン水和剤 (アズキシストロビン 20.0%)

アズキシストロビンが最終濃度 (100ppm) の 10 倍となるように蒸留水に懸濁する。

$$100\text{ppm} (\doteq 0.1 \mu\text{l/ml}) \times 10 = 1 \mu\text{l/ml}$$

$$\rightarrow \text{③水和剤 } 500 \mu\text{l}/100\text{ml}$$

#### (2) サリチルヒドロキサム酸 (SHAM)

SHAM を最終濃度 (100ppm) の 1000 倍となるようにジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解する。室温で 3 ヶ月保存可能。

$$100\text{ppm} (\doteq 0.1\text{mg/ml}) \times 1000 = 0.1\text{g/ml}$$

#### (3) ストレプトマイシン (SM)

ストレプトマイシン硫酸塩を最終濃度 (300ppm) の 1000 倍になるよう

に蒸留水に溶解する。0.2 $\mu$ m のフィルターで濾過滅菌した後、小分けして-20 $^{\circ}$ Cで保存。

$$300\text{ppm} (\doteq 0.3\text{mg/ml}) \times 1000 = 0.3\text{g/ml}$$

(4) クロラムフェニコール (CP)

CP を最終濃度 (100ppm) の 1000 倍になるようにエタノールに溶解する。小分けして-20 $^{\circ}$ Cで保存。

$$100\text{ppm} (\doteq 0.1\text{mg/ml}) \times 1000 = 0.1\text{g/ml}$$

## A- II -2) 培地の調製

### 0.1 $\times$ PDB (Potato Dextrose Broth)

添加する農薬溶液の容量を差し引き、蒸留水を 1/10 容減じて作製する。  
オートクレーブ滅菌後に以下の 4 溶液を添加

農薬溶液 (①、②、③のいずれか)	100ppm (0.1 $\times$ PDB の 1/10 容)
サリチルヒドロキサム酸	100ppm (0.1 $\times$ PDB の 1/1000 容)
ストレプトマイシン	300ppm (0.1 $\times$ PDB の 1/1000 容)
クロラムフェニコール	100ppm (0.1 $\times$ PDB の 1/1000 容)

これ以降の手順は、38~39 ページと同じです。

## B. 遺伝子診断法

QoI 剤に対する耐性変異の 1 塩基多型 (SNP) を識別できる 2 種類のマーカー (B428gS、B428gDC) を開発しました (Hayashi, K. et al., 2015; 林・早野, 2015)。これらのマーカーの特徴は、反応時間を 1 秒まで短縮した方法であり、感度と精度を担保しつつ作業効率とコストなどの実用面の向上を図りました。B428gS マーカー (duplex) は、耐性菌と感受性菌の PCR 産物のサイズの違いを判定します (B-1)。B428gDC マーカー (dCAPS) は、PCR 産物を制限酵素処理し、その切断長から変異の有無を判定します (B-2)。

さらに本技術を応用し、QoI 剤と MBI-D 剤の 2 つの耐性菌の遺伝子診断を 1 回の PCR で判定できる MDQ マーカー (Multiplex) を開発しました (B-3)。

### B-1 duplex マーカー-B428gS ～QoI 剤耐性菌判定～

チトクローム b 遺伝子の 428 番目の塩基を標的として、耐性菌および感受性菌のそれぞれの塩基を検出する 2 つのマーカー (感受性菌型 Out1/In2 と耐性菌型 In3/Out4) を設計した (図 B1)。In2 は耐性菌型の塩基を、In3 は感受性菌型の塩基を特異的に検出するプライマーである。4 本のプライマー (Out1/In2/In3/Out4) をすべて組み合わせて duplex マーカー (B428gS) とすることで、検体が耐性菌か感受性菌かを 1 回の PCR と電気泳動によって判定できる。

#### G143A

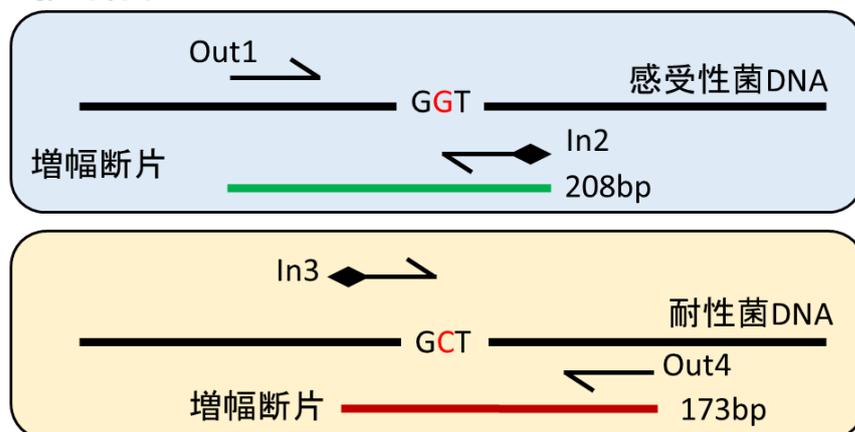


図 B1 duplex マーカー-B428gS の 2 組のプライマーセットと増幅断片サイズ  
赤字の G : 感受性菌の塩基 ; 赤字の C : 耐性菌の塩基

### B-1-(1) 反応条件

PCR 反応には、プルーフリーディング（校正）機能を持たない DNA ポリメラーゼを使用する。たとえば、*TaKaRa Taq Hot Start Version (TaKaRa Taq HS, タカラバイオ)*などが推奨される。ここでは、1 検体あたりの反応溶液の総量を 10 $\mu$ L とした場合の反応液組成と PCR プログラムを以下に示した (図 B2)。4 種類のプライマー (Out1、In2、In3、Out4) を最終濃度がそれぞれ 200nM になるように調製し、PCR 後の増幅産物のサイズ確認は、0.5xTBE バッファーによる 2% アガロースゲル電気泳動によって行う。たとえば、電気泳動装置に Mupid-exU を使用した場合、100V で 1 時間を目安に電気泳動を行い、電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド等で染色してバンドを検出する。

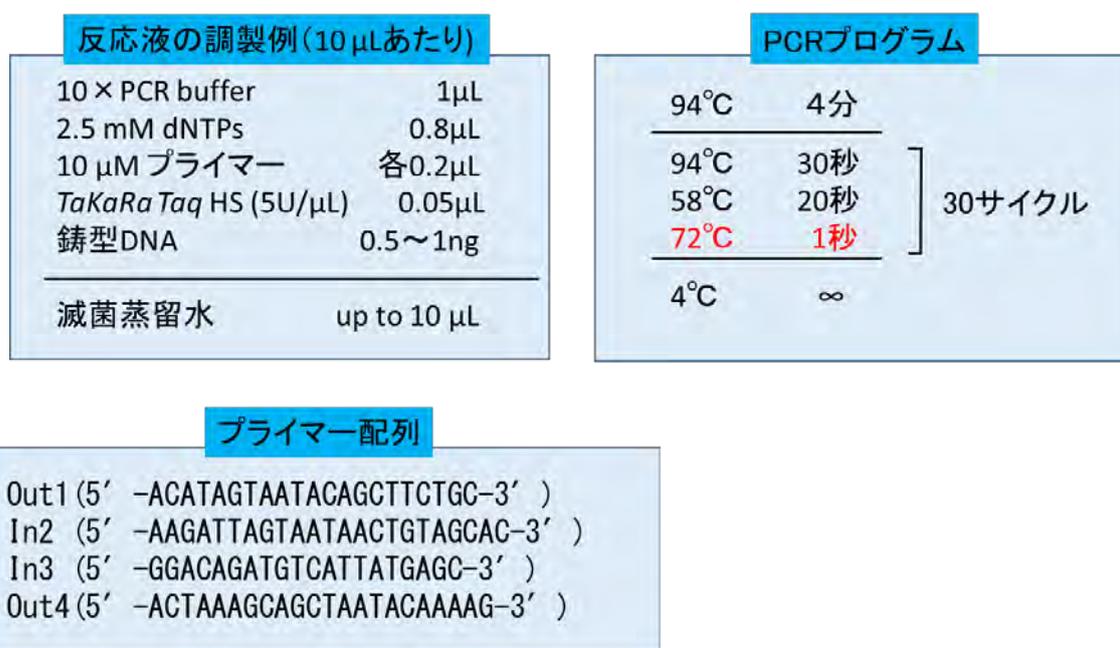


図 B2 duplex マーカー-B428gS の PCR 条件

### B-1-(2) 判定方法

B428gS を用いた場合、感受性菌からは 208bp、耐性菌からは 173bp の断片が増幅される (図 B3)。断片長の差を 30-50bp 前後と比較的小さく設計してあるため、各断片の増幅効率を同程度に保ちつつ、一般的に用いられている 2%前後のアガロースゲル上で識別が可能である。さらに、PCR の伸長反応時間を 1 秒と極端に短く設定したことによって、非特異的増幅や Out1 と Out4 から増幅される断片 (321bp) も抑制できる。反応時間の短縮により、B428gS の PCR に要する時間は約 1 時間となり、電気泳動を含めた作業時間は合計 2 時間となる。

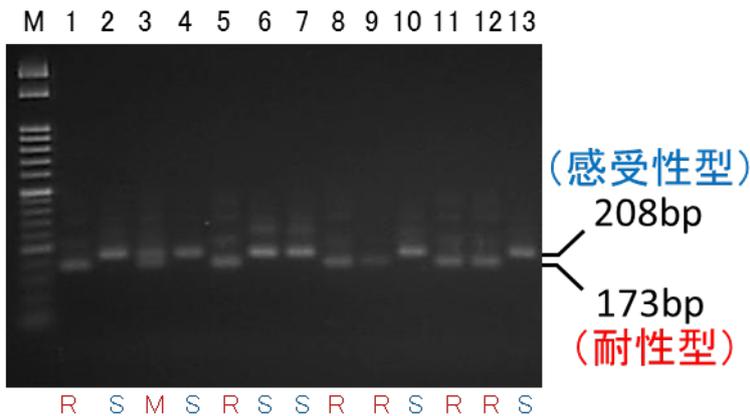


図 B3 duplex マーカーB428gS による遺伝子診断例

レーン 1～13 は、耐性菌検定済みの標準菌株の DNA を供試した。レーン 3 には、耐性菌と感受性菌の DNA を 1:1 で混合したテンプレートを使用した。R は耐性菌、S は感受性菌、M は耐性菌と感受性菌が混在と判定。

## B-2 dCAPS マーカーB428gDC ～QoI 剤耐性菌判定～

SNP の判定法としては、PCR で増幅した DNA 断片を制限酵素によって切断し、その切断長から変異の有無を判断する CAPS マーカー (PCR-RFLP と呼ばれる) を用いても耐性菌の判定を行える。CAPS マーカーである B428gDC は、制限酵素処理に手間が掛かるが、一般的に最も確実な判定結果が期待できる。イネいもち病の QoI 剤耐性菌では、G143A 変異によって制限酵素 Fnu4HI の認識配列 (GC<sup>^</sup>NGC) が生成されるため、現在は Fnu4HI を用いた遺伝子診断技術が普及している。しかし、Fnu4HI は比較的高価で、多検体の解析にはコスト負担が大きくなる。また、PCR 反応液と Fnu4HI の至適塩濃度が異なるため、PCR 後に反応液のバッファー交換作業を行って、塩濃度を調整する必要があった。そこで、G143A 変異部位において、制限酵素 (PvuII) 認識配列が生成するようプライマーに人工変異を加えることで、dCAPS マーカーB428gDC を構築した (図 B4)。PvuII は比較的安価で、PCR 後の塩濃度調整を要せず、PCR 終了後のチューブに直接 PvuII 酵素液を添加して制限酵素処理に進むことができる。なお、dCAPS 法の使用場面としては、おもに duplex 法の判定結果を再確認したい場合に用いることを推奨する。

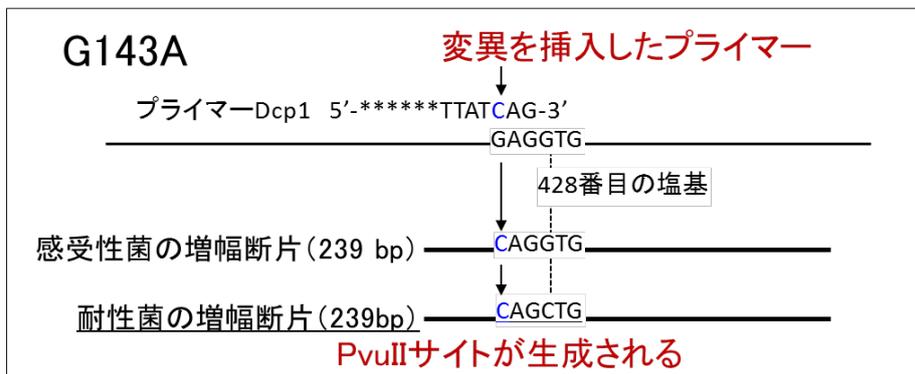


図 B4 dCAPS マーカー-B428gDC の設計

プライマーDcp1 において、G143A 変異部位に制限酵素 (PvuII) 認識配列が生成されるように設計

### B-2-(1) 反応条件

反応液組成は、プライマーを除いては上述の B428gS と同様となる (図 B5)。Dcp1 および Dcp2 の 2 種類のプライマーを最終濃度 200nM になるように調製する。制限酵素処理は、PCR 増幅サンプルに対して 1 $\mu$ L の PvuII 酵素液 (1 $\times$  酵素添付バッファーで 1U/1L に希釈) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間処理する。

制限酵素処理後のサイズ確認は、0.5 $\times$ TBE バッファーを用いた 2% アガロースゲル電気泳動によって行う。電気泳動装置に Mupid-exU を使用した場合、100V で 1 時間を目安に電気泳動を行い、電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド等で染色してバンドを検出する。

反応液の調製例 (10 $\mu$ L あたり)		PCRプログラム	
10 $\times$ PCR buffer	1 $\mu$ L	94 $^{\circ}$ C	4分
2.5 mM dNTPs	0.8 $\mu$ L	94 $^{\circ}$ C	30秒
10 $\mu$ M プライマー	各0.2 $\mu$ L	58 $^{\circ}$ C	20秒
TaKaRa Taq HS (5U/ $\mu$ L)	0.05 $\mu$ L	72 $^{\circ}$ C	1秒
鋳型DNA	0.5~1ng		} 35サイクル
		72 $^{\circ}$ C	
滅菌蒸留水	up to 10 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C	$\infty$

プライマー配列
Dcp1 (5' -TTATGTTTTACCTTATGGACAGATGTCATTATCAG-3' )
Dcp2 (5' -GAGGATTGCTTGAACCAGC-3' )

図 B5 dCAPS マーカー-B428gDC の PCR 条件

## B-2-(2) 判定方法

B428gDC のプライマーを用いた PCR では、両遺伝子型ともに 239bp の断片が増幅されるが、PvuII 処理によって感受性型は切断されないのに対し、耐性菌型は 204bp および 35bp に切断される (図 B6)。切断後の断片長の差異は、2% アガロースゲル電気泳動で十分に判別が可能であり、B428gDC では、PCR に要する時間は約 1 時間、制限酵素処理に約 1 時間、電気泳動を含めた合計作業時間は約 3 時間となる。

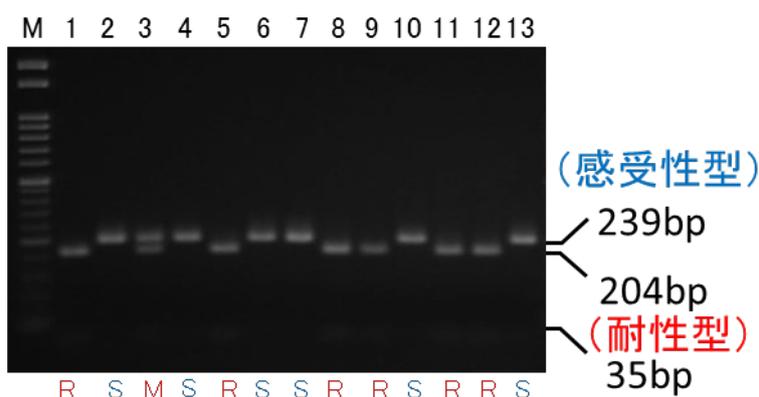


図 B6 dCAPS マーカー-B428gDC による遺伝子診断例

レーン1~13は、接種による生物検定により判定済みの標準菌株のDNAを供試した。レーン3には、耐性菌と感受性菌のDNAを1:1で混合したテンプレートを使用した。Rは耐性菌、Sは感受性菌、Mは耐性菌と感受性菌が混在と判定される。

## B-3 multiplex マーカー-MDQ

~QoI 剤耐性菌および MBI-D 剤耐性菌の同時判定~

イネいもち病菌では、シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤 (MBI-D 剤) に対する耐性菌が 2001 年以降に全国的に発生拡大した。MBI-D 剤耐性は、シタロン脱水酵素遺伝子 (*SDH*) の 1 塩基置換に起因し、QoI 剤耐性菌と同様に遺伝子診断法によってモニタリングが行われている (高垣ら, 2004)。したがって、これらの 2 種類の耐性菌の分布や分離頻度を効率的に調査するためには、1 回の作業で同時に耐性菌診断できる手法が求められる。そこで、感受性型、MBI-D 剤耐性型 (V75M 変異)、QoI 剤耐性型 (G143A 変異) の 3 遺伝子型を 1 回の PCR により判別できる multiplex マーカー (MDQ) を新たに開発した (Hayashi et al, 2017)。本マーカーは、迅速かつ安価で高精度な簡易同時診断法として、モニタリングなどの耐性菌管理に利用できる。PCR の反応開始から判別までに要する平均作業時間は 2 時間となる。

### B-3-(1) マーカー設計の概要

multiplex マーカーMDQ は、5 種のプライマーセット MDQ-p1～p5 から構成され (図 B7)、上述の duplex マーカーB428gS と同様の方法を採用する。プライマーMDQ-p1 および p2 は、核ゲノムにコードされるシタロン脱水酵素遺伝子 (*SDH*) より 250bp 断片を増幅する。この断片は、感受性型・変異型共に増幅されることから、両遺伝子型を識別するためのコントロールとなる。

プライマーMDQ-p1 および p3 は、*SDH* 遺伝子において、MBI-D 剤耐性獲得のアミノ酸変異 (Val75Met) に関わる 223 番目の塩基変異 (G→A) を識別でき、MBI-D 剤耐性菌に対して特異的な 98bp の DNA 断片を増幅する。

プライマーMDQ-p4 および p5 は、ミトコンドリアゲノムにコードされるチトクローム (*cytb*) 遺伝子において、QoI 剤耐性獲得のアミノ酸変異 (Gly143Ala) に関わる 428 番目の塩基変異 (G→C) を識別でき、QoI 剤耐性菌に対して特異的な 173bp の DNA 断片を増幅する。

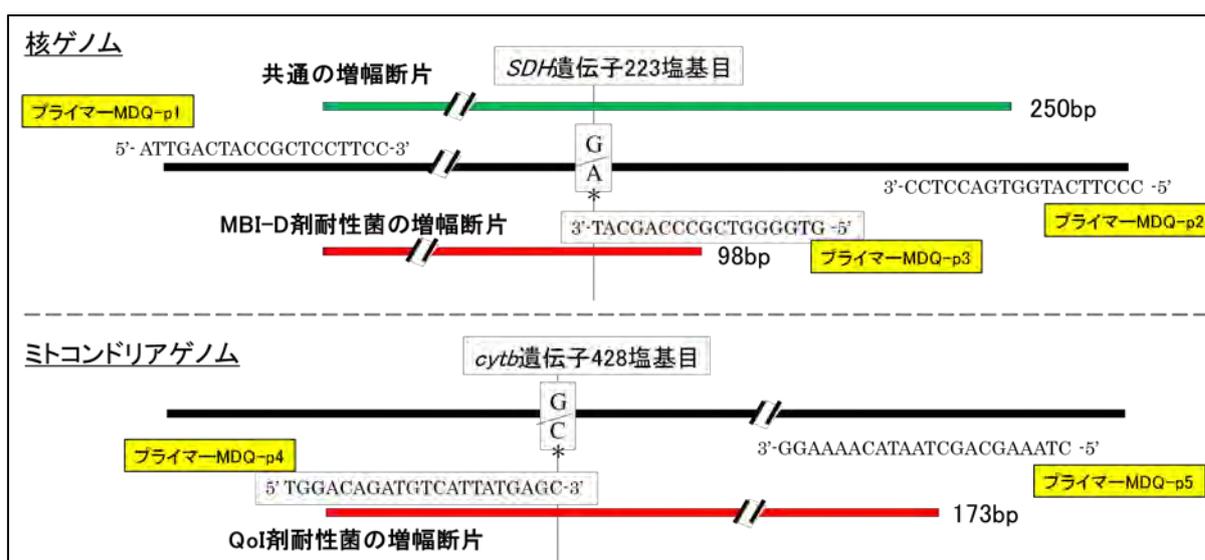


図 B7 multiplex マーカーMDQ の設計

### B-3-(2) 反応条件

反応液組成は、プライマーを除いては上述の B428gS、B428gDC と同様である (図 B8)。プルーフリーディング機能を持たない DNA ポリメラーゼを選択し、MDQ-p1～p5 の 5 種類のプライマーを最終濃度 200nM になるように調製する。PCR プログラムは、B-1 (P.44) と同じ方法を採用し、増幅産物のサイズ確認は、0.5xTBE バッファーを用いた 2%アガロースゲル電気泳動によって行

う。たとえば、電気泳動装置に Mupid-2plus 使用した場合、100V で 40 分間を目安に電気泳動を行い、電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド等で染色してバンドを検出する。

反応液の調製例(10 μLあたり)		PCRプログラム	
10 × PCR buffer	1 μL	94°C	4分
2.5 mM dNTPs	0.8 μL	94°C	30秒
10 μM プライマー	各0.2 μL	58°C	20秒
TaKaRa Taq HS (5U/μL)	0.05 μL	72°C	1秒
鋳型DNA	0.5~1ng	4°C	∞
滅菌蒸留水 up to 10 μL		30サイクル	

プライマー配列
MDQ-p1 (5' -ATTGACTACCGCTCCTTCC-3' )
MDQ-p2 (5' -CCTCCAGTGGTACTTCCC-3' )
MDQ-p3 (5' -TACGACCCGCTGGGGTG-3' )
MDQ-p4 (5' -TGGACAGATGTCATTATGAGC-3' )
MDQ-p5 (5' -GGAAAACATAATCGACGAAATC-3' )

図 B8 multiplex マーカーMDQ の PCR 条件

### B-3-(3)判定方法

multiplex マーカーMDQ の 5 種類のプライマーを用いた PCR では、感受性菌からは共通の増幅産物である 250bp の断片が 1 本のみ検出される (図 B9、レーン 1)。MBI-D 剤耐性菌からは 250bp の断片とともに 98bp の DNA 断片が検出される (図 B9、レーン 2~5)。QoI 剤耐性菌からは 250bp の DNA 断片とともに 173bp の DNA 断片が検出される (図 B9、レーン 6~9)。さらに、MBI-D 剤耐性菌および QoI 剤耐性菌の菌体 DNA を等量混合したサンプルをテンプレートとした場合には、250bp、173bp、98bp の 3 本の DNA 断片が検出されるので (図 B9、レーン 5+9)、両剤に対する耐性を併せて保有する菌を検出できるが、現在までその報告はない。

本検出に用いる DNA は市販キット等により調製された DNA の他、簡易調製

法である paper-disc 法(早野ら, 2015)により調製した DNA 溶液も使用できる(本紙掲載)。葉いもちの罹病性病斑から直接調製された DNA を供試した場合にも本マーカーで耐性菌を診断できることを確認している。また、東北から九州地方の 6 県の分離菌を対象に実用性を確認している。本 PCR に要する時間は約 1 時間となり、電気泳動を含めた作業時間も合計 2 時間となる。

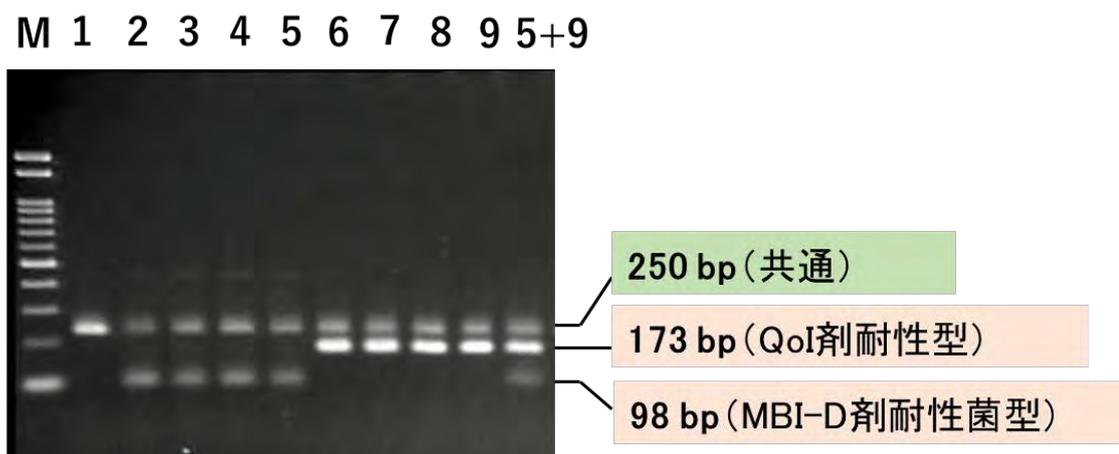


図 B9 multiplex マーカーMDQ による遺伝子診断例

レーン 1 は野生型(非変異菌)、2~5 は MBI-D 剤耐性菌、6~9 は QoI 剤耐性菌、5+9 は MBI-D 剤耐性菌(レーン 5)および QoI 剤耐性菌(レーン 9)DNA の等量混合サンプル。M は 100bp ラダーサイズマーカー(ニッポンジーン社)。PCR の鋳型 DNA は paper-disc 法により調製。泳動は 2%アガロース(0.5xTBE)を使用。

#### B-4 Fnu4HI 消化による PCR-RFLP 法 (既存法)

日本でのイネいもち病菌の QoI 剤耐性菌の初確認は 2012 年であったが、シバいもち病菌においては、2000 年に同剤耐性菌の発生が米国で確認されている(Vincelli et al., 2001; Kim et al., 2003)。これまで、イネいもち病菌ではチトクローム *b* 遺伝子の G143A の変異菌のみ検出されているが、シバいもち病菌では F129L と G143A の 2 つのタイプの変異菌が検出されており、F129L よりも G143A の耐性レベルが高いことが知られている (Kim et al., 2003)。

両菌は遺伝的に近縁であることから、シバいもち病菌で報告のある PCR-RFLP 法を参考にして、イネいもち病菌の QoI 剤耐性菌の遺伝子診断も実施できる。本法では、G143A 変異により生成される制限酵素 Fnu4HI の認識配列を利用し、切断パターンから変異の有無が判定できる (Kim et al., 2003)。本法のプライマー配列などの情報については、「植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアルⅡ」(日本植物防疫協会)でも紹介されている(中村, 2009)。なお、同じ Fnu4HI

による PCR-RFLP 法としては、BASF 社が開発した方法も同様に利用可能である（宮川・富士，2013）。

Fnu4HI による PCR-RFLP 法は、いもち病菌に限らず多くの植物病原糸状菌や卵菌類で採用されており、その実績から信頼性は高いと思われるが、難点としては、制限酵素処理に手間がかかること、制限酵素 Fnu4HI が高価であることなどがあげられる。

PCR-RFLP 法以外では、変異部位に特異的な蛍光標識プローブを用いた PCR-Luminex 法（Wei et al., 2009）やパイロシーケンシング法（Stammler et al., 2007）などの診断法も報告されている。なお、これらの方法を採用する際には専用の検出用機器を必要とする。

## C. PCR 用テンプレートの簡易調製方法

遺伝子診断における PCR 用テンプレートの調製法としては、市販のキットを用いれば確実だが、一方でコストや作業時間などを考慮した簡易な方法も多数開発されている。たとえば、いもち病菌の耐性菌診断用としては、PEX 法（Nakahara et al., 1999）、マイクロウェーブ法（Goodwin and Lee, 1993; Tendulkar et al., 2003; 高垣・梶原, 2003）、paper-disc（ろ紙）法（早野ら, 2015; 早野・林, 2015）などの簡易法が用いられている。本マニュアルでは、paper-disc 法を採用して作業の効率化を図った。本法の利点は、病斑から単孢子分離によって取得した菌株の保存作業と耐性菌検定作業を 1 枚の培養プレートで実施できることであり、培養ろ紙片を培地検定に用いることもできる上、試薬は TE バッファーのみの準備で良い。

留意点として、培養期間が長くなりすぎると抽出効率が低下するので、ろ紙片に菌糸が十分に行き渡る頃（目安は培養 7~10 日目）には回収する（図 C1）。また、ろ紙は十分に乾燥してから TE バッファーを添加する必要があるが、本法で調製した DNA で増幅できるバンドサイズは、2 kb 程度までとなる。なお、図 C2 には本マニュアルで紹介した DNA 調製から遺伝子診断までの作業の流れを示した。paper-disc 法の作業手順については、以下の①~⑧に記載した。

## 【DNA 調製手順 (paper-disc 法)】

- ①複数の滅菌ろ紙片 (No.1,  $\phi$  6 mm, アドバンテック東洋) を載せた 0.5% ショ糖加用オートミール寒天培地を作成する。
- ②いもち病菌の菌糸片を培地の中央部に静置後, 26°C で 7~10 日間培養する(図 C1)。
- ③菌体が付着したろ紙片 (培養ろ紙片) を回収する。
- ④培養ろ紙片は常法に従い, シリカゲル入り密閉容器もしくはデシケーター内で乾燥する。
- ⑤乾燥した培養ろ紙片を 1.5 ml マイクロチューブに入れる。
- ⑥TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 200  $\mu$ l をチューブに添加する。
- ⑦遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 30 分間) する。
- ⑧遠心上清を DNA 調製液とする。



図 C1 DNA 抽出 (paper-disc 法) に使用する菌体培養ろ紙片  
写真はオートミール寒天培地(日本 BD)を使用し、25°C で 8 日間培養した例



葉・穂いもちの病斑

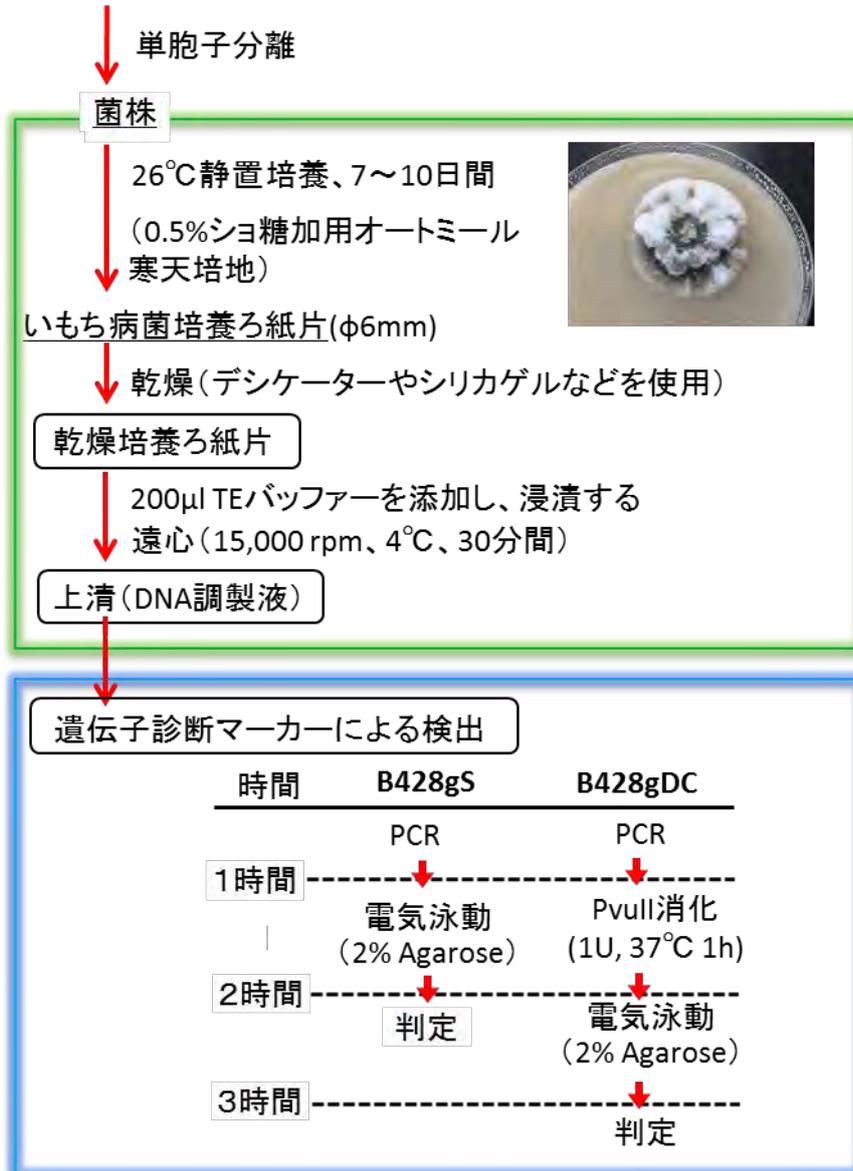


図 C2 遺伝子診断作業の流れ

## D. 培地検定法

ここでは、培地を用いて、イネいもち病菌の QoI 剤耐性菌を判定する方法を紹介します。キュウリ褐斑病菌の QoI 剤検定法（石井, 2009b）、および Wei ら（2009）の報告を参考にして、いもち病菌の培地検定法としてとりまとめました。本プロジェクト研究での実施例を中心に、いもち病罹病葉のサンプリングから培地上での生育の有無の判定までの一連の作業手順を記載しました。

### D-1. 検定用材料の調製

#### D-1-(1) いもち病菌のサンプリング

- ①罹病葉を葉鞘の一部も含めて採取し、紙封筒に入れ実験室に持ち帰る。紙封筒を厚い冊子の間に挟むことで、乾燥により葉が巻かれて病斑が見えなくなることを抑えることができる（図 D1）。



図 D1 罹病葉(葉いもち)のサンプリング

葉いもちの病斑(左)を採取し、紙封筒に入れて(右上)冊子に挟み込む(右下)。

- ②実験室に持ち帰った後は、紙封筒のまま新聞紙に挟み乾燥状態を保持する。3週間以内に単孢子分離の作業ができない時は、紙封筒のままビニル袋に入れ、冷蔵庫（4℃）で保存する。

#### D-1-(2) いもち病菌の単孢子分離

- ①直径 9cm のプラスチック滅菌シャーレを用い、Water Agar（以下 WA、寒天 18g/L）平板を作製する。雑菌（主に細菌）の繁殖を抑えるため、WA に少量の乳酸やストレプトマイシンなどを加える。

- ②白金耳を火炎滅菌し WA 平板上で冷却した後、胞子を形成した病斑に軽く触れ、WA 平板培地に 1 cm ほど画線する (図 D2)。予めシャーレの裏にペンで印をつけ、胞子を塗布した位置が分かるようにする。

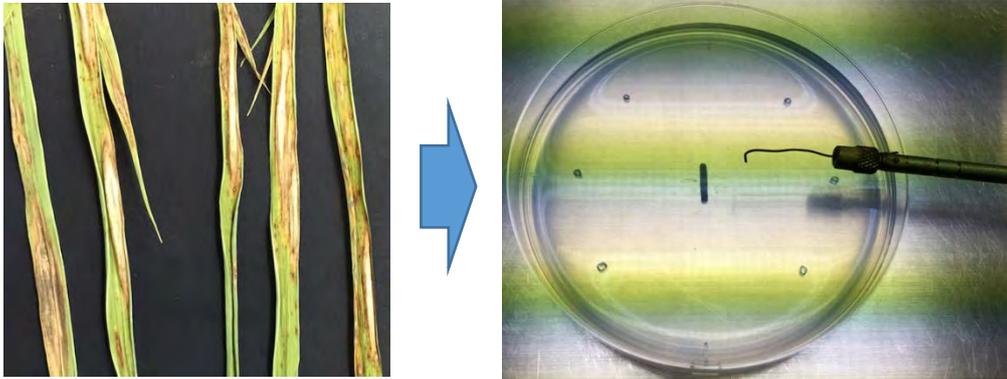


図 D2 白金耳を用いたいもち病菌胞子の画線操作

胞子を形成している葉いもち病斑(左)から、白金耳を用いて WA 平板上(右)に胞子を塗布する。

- ③画線した付近を顕微鏡で観察し、胞子を確認したら、虫ピン型後藤氏法 (大畑, 1995) で単胞子分離を行う (図 D3)。

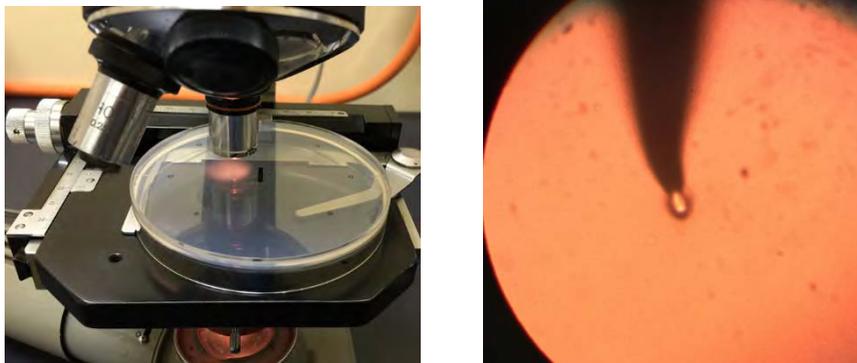


図 D3 単胞子分離の操作

シャーレのふたを取り、逆さにして顕微鏡のステージの上に乗せる(左)。顕微鏡を覗きながら針先で胞子を釣り上げる(右)。

#### D-1-(3) いもち病菌の保存法

- ①単胞子分離後、WA 平板培地で 25℃、2 日間培養する。顕微鏡で発芽が確認できた胞子を寒天ごと切り抜いて、オートミール平板培地の中央に移植する。なお、培地の中央部には、事前に乾熱滅菌したペーパーディスク (薄手 φ6mm) を、12 枚ほど四角に並べておく (図 D4)。



図 D4 オートミール平板培地上に並べたペーパーディスク

- ② 25℃で7～10日間培養する。滅菌したピンセット等で気中菌糸を取り除いた後、ペーパーディスクを回収する（図 D5）。このペーパーディスクを薬剤感受性検定培地に置床して、D-2-(2)の培地検定に進むことができる。



図 D5 オートミール平板培地上でのいもち病菌株の生育状況  
右の写真は気中菌糸を取り除いたところ。

- ③すぐに使用しない含菌ペーパーディスクは、滅菌した 2ml のスクリーキャップチューブに移す。キャップを閉めずにデシケーター内で 7 日間乾燥させた後、キャップを閉めて冷凍（-30℃）保存する。なお、デシケーター内でのコンタミを防ぐため、菌株ごとに別の滅菌ガラスシャーレ内で乾燥させると良い（図 D6）。



図 D6 ペーパーディスクによるいもち病菌株の保存  
スクリーキャップ付きチューブにペーパーディスクを回収し(左)、デシケーター内で乾燥させる(右)。

## D-2. 薬剤感受性の検定方法

PDA 培地に QoI 剤を添加してイネいもち病菌を培養すると、感受性菌でも菌糸生育がみられ、感受性菌と耐性菌を区別することは難しい。これは、QoI 剤がミトコンドリア電子伝達系の複合体 III タンパク質を阻害すると、代替呼吸経路が働き始めるためと考えられている（石井，2009b）。そこで、QoI 剤に加えて代替呼吸経路の **alternative oxidase (AOX、代替酸化酵素)** の阻害剤を添加することにより、感受性菌の発育を完全に阻止する必要がある。ここでは、QoI 剤としてアゾキシストロビン、AOX 阻害剤としてサリチルヒドロキサム酸 (SHAM) をそれぞれ用いる方法を紹介する。

### D-2-(1) 検定培地の調製

- ①基本培地となる PDA をオートクレーブ滅菌（120℃、20 分間）する。例えば、最終的な容量を 200ml とする場合、添加する試薬の容量を差し引いて、蒸留水で 178ml に調整しておく。

参考：PDA 300g（ポテトデキストロース寒天培地「ニッスイ」顆粒 05709 ￥8,000）

#### < 添加試薬の準備 >

- ◎市販の製剤（アミスター20 フロアブル）と滅菌水を用いて 1,000ppm のアゾキシストロビン懸濁液を作製する（図 D7）。

参考：アミスター20 フロアブル 250ml（シンジェンタ ￥4,500）

- ◎SHAM はアセトンを経媒として 100mM 溶液を作製する（図 D7）。

参考：サリチルヒドロキサム酸 10g（和光純薬 156576 ￥8,300）

アセトン（医薬品試験用） 500ml（和光純薬 016-23345 ￥1,200）

アゾキシストロビン懸濁液の調製		SHAM溶液の調製	
<u>アミスター20フロアブル/滅菌水</u>		<u>SHAM/アセトン</u>	
1000ppm	: 1μl/1ml	1M	: 153.14g/1000ml
	100μl/100ml		1.531g/10ml
アミスター20フロアブル	アゾキシストロビン 1000ppm溶液	100mM	: 0.1531g/10ml
アゾキシストロビン20%			<b>0.107g/7ml</b>
x × 20% = 100μl			
x = 500μl	よって		<b>500μl/100ml</b>

図 D7 添加試薬の調製

②オートクレーブ滅菌後に 55℃程度まで冷却したら、PDA 178ml に対して 1,000ppm のアゾキシストロビン懸濁液 20ml、100mM の SHAM 溶液 2ml を添加する（最終濃度でアゾキシストロビン 100ppm と SHAM 1 mM となる）。対照のアゾキシストロビン無添加培地には滅菌水 20ml と 100mM の SHAM 溶液 2ml を添加する。

③滅菌 1 号角シャーレ（栄研化学）に、1 枚あたり約 30ml の培地を流し込む（図 D8）。200ml の培地から、角シャーレ 6 枚分を作製することができる。シャーレ 1 枚あたり 20 菌株を置床することができるため、200ml の培地で 120 菌株の検定が可能である。

参考：滅菌 1 号角シャーレ 100 枚（栄研化学 AV2000, 36-3452  
¥14,000）

#### D-2-(2) 検定方法

供試菌株を PDA 平板培地で 25℃、7 日間前培養する。次に、形成した菌叢の周縁部を直径 4mm のコルクボーラで打ち抜き、菌叢ディスクとする。菌叢面が培地に接触するように裏返して検定用培地に置床し、25℃で 3 日間培養後、菌糸生育の有無を観察する（図 D8）。なお、D-1-(3)で作製したペーパーディスクを置床すれば、PDA 平板培地での前培養を省略できる。



図 D8 角シャーレで作製した検定用培地  
シャーレあたり 20 菌株を置床できる。

#### D-2-(3) 判定基準

100ppm のアゾキシストロビン添加培地において、25℃、3 日間培養後に菌糸の生育が認められたものを耐性菌、生育が認められないものを感受性菌とする（図 D9）。なお、3 日間より長く培養すると、感受性菌であっても生育すること

があることから、判定は、必ず3日目に行う。また、検定済みのQoI剤耐性イネいもち病菌をポジティブコントロールとして、判定の際の基準とする。



図 D9 耐性菌検定用培地上でのいもち病菌の菌糸伸長

培養3日目の菌糸伸長の有無で感受性を判定する。耐性レベルの低い菌の出現を想定して、1ppmでの検定も合わせて実施することを推奨している。

## 引用文献

- 芦澤武人ら (2015) 中央農研報告 24: 15-29.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC): <https://www.frac.info/working-group/qoI-fungicides>
- Goodwin, D.C. and S.B. Lee (1993) *Biotechniques* 15: 438-444.
- 早野由里子ら (2015) 日植病報 81: 141-143.
- 早野由里子・林 敬子 (2015) 植物防疫 69: 569-572.
- 林 敬子・早野由里子 (2015) 植物防疫 69: 558-562.
- Hayashi, K. et al. (2015) *J. Gen. Plant Pathol.* 81: 131-135.
- Hayashi, K. et al. (2017) *J. Gen. Plant Pathol.* 83: 304-309
- 石井英夫 (2009a) 第 19 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集 62-69.
- 石井英夫 (2009b) 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II. 日本植物防疫協会 69-71.
- 石井英夫 (2014) 日本農薬学会誌 39: 53-57.
- 石井英夫 (2015) 植物防疫 69: 469-474.
- Kim, Y.S. et al. (2003) *Phytopathology* 93: 891-900.
- 宮川典子・富士 真 (2013) 第 23 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集 25-36.
- Nakahara, K. et al. (1999) *J. Virol. Methods* 77: 47-58.
- 中村亘宏 (2009) 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II. 日本植物防疫協会 14-16.
- 大畑貫一ら (1995) 作物病原菌研究技法の基礎 日本植物防疫協会 7-8.
- Ohtsuki, A. and A. Sasaki (2006) *J. Theor. Biol.* 238: 780-794.
- Suzuki, F. et al. (2006) *J Gen. Plant Pathol.* 72: 314-317.
- 鈴木文彦・早野由里子 (2016) 第 26 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集 27-36.
- 鈴木文彦ら (2012) 日植病報 78: 10-17.
- 鈴木啓史ら (2016a) 植物防疫 70: 605-610.
- 鈴木啓史ら (2017) 日植病報 83: 191-192.
- Stammler, G. et al. (2007) *J. Pestic. Sci.* 32: 10-15.
- 高垣真樹一ら (2004) 植物防疫 58: 24-28.
- Tendulkar, S.R. et al. (2003) *Biotechnol. Lett.* 25: 1941-1944.
- Vincelli, P. et al. (2001) *Plant Dis.* 86: 235-240.
- Wei, C.-Z. et al. (2009) *Pest Manag. Sci.* 65: 1344-1351.

## 参考情報

### 【ホームページ】

農研機構 中央農業研究センター

「殺菌剤耐性イネいもち病菌対策マニュアル<QoI 剤>」

[http://www.naro.affrc.go.jp/publicity\\_report/publication/pamphlet/tech-pamph/073008.html](http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/073008.html)

### 【参画機関】

農林水産省委託プロジェクト「ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発コンソーシアム」(2014-2018年)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

福岡県農林業総合試験場

佐賀県農業試験研究センター

三重県農業研究所

### 【担当一覧】(プロジェクト終了時点)

#### <編集代表>

鈴木文彦 農研機構 中央農業研究センター 病害研究領域

#### <分担>

芦澤武人 農研機構 中央農業研究センター 病害研究領域

早野由里子 農研機構 中央農業研究センター 病害研究領域

井上博喜 農研機構 九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域

石井貴明 福岡県農林業総合試験場 病害虫部

菖蒲信一郎 佐賀県農業試験研究センター 環境農業部

鈴木啓史 三重県農業研究所 農産物安全安心研究課

#### <協力>

林 敬子 農研機構 中央農業研究センター 病害研究領域

安田伸子 農研機構 中央農業研究センター 病害研究領域

光永貴之 農研機構 中央農業研究センター 虫・鳥獣害研究領域

平八重一之 農研機構 九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域

園田亮一 農研機構 九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域

宮坂 篤 農研機構 九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域

笹谷孝英 農研機構 本部企画調整部 つくば技術支援センター

菊原賢次 福岡県農林業総合試験場 病害虫部

稲田 稔 佐賀県農業技術防除センター 病害虫防除部

田中弘毅	佐賀県農業試験研究センター 環境農業部
衛藤友紀	佐賀県農業試験研究センター 環境農業部
山口純一郎	佐賀県農業試験研究センター 環境農業部
黒田克利	三重県農業研究所 農産物安全安心研究課
川上 拓	三重県農業研究所 農産物安全安心研究課

---

令和元年12月2日改訂

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
中央農業研究センター

〒305-8666 茨城県つくば市観音台2-1-18

TEL 029-838-8481 (代表)

<https://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/carc/>

---