

九州に分布する MBI-D 耐性イネいもち病菌の起源は複数である

九州沖縄農業研究センター ^{すず}鈴 ^き木 ^{ふみ}文 ^{ひこ}彦

はじめに

九州地域における MBI-D 耐性いもち病菌の発生とその後の急速な分布拡大は、防除体系の見直しを迫られる大きな問題となり、これまでにモニタリング調査や耐性機構の解析が進められてきた。耐性菌の発生経過や耐性機構、遺伝子診断法等の詳細は、既に本誌の総説などがあるのでそちらを参照されたい（荒井，2004；高垣ら，2004）。本稿では、いもち病菌集団の個体群構造解析を通して見えてきた耐性菌の多様性、優占する遺伝子型の存在等、これまであまり情報がなかった部分に焦点をあてる。ここで実施した個体群構造解析とは、rep-PCR 法によるフィンガープリント解析と耐性変異の遺伝子診断データを合わせて評価するというものである。耐性菌の初確認地域である佐賀県および九州 6 県を対象に実施した個体群構造解析の結果（Suzuki et al., 2007）を中心に紹介する。

I MBI-D 耐性菌の発生経過

いもち病防除剤の中心的な剤としてメラニン合成阻害剤（MBIs : Melanin Biosynthesis Inhibitors）がある。MBIs には多くの製品があり、その作用特性からシタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤（MBI-D）と還元酵素阻害型メラニン合成阻害剤（MBI-R）に分類される。このうち MBI-D については、1998 年にカルプロパミド、2000 年にジクロシメット、01 年にフェノキサニルの 3 剤がそれぞれ上市され、その高い防除効果から全国的に短期間のうちに普及した。MBI-D は主に長期持続型の育苗箱処理剤として用いられ、省力化や減農薬に結びつく技術として IPM には欠かせないものとなっている。九州地域でもいもち病常発地帯を中心に本剤への切り替えが進み、2002 年佐賀県を例に見るとその普及は作付面積の 20% を超えるレベルに達していた。

2001 年 7 月、佐賀県においてカルプロパミド剤の防

除効果の低下が認められ、MBI-D に対する耐性菌の関与が示された（山口ら，2002）。モニタリングの結果、2002 年には九州地域のすべての県において耐性菌の分布が認められた（相原・高垣，2003）。耐性機構については、MBI-D がターゲットとしているメラニン生合成経路のシタロン脱水酵素（SDH）遺伝子の 1 塩基変異により、薬剤との結合性が低下したことが主因であった（高垣ら，2004）。この変異によってカルプロパミド以外のジクロシメットやフェノキサニルにも交差耐性を示したが、MBI-R に対する感受性には変わりはなかった。MBI-D 耐性の遺伝子診断法として、SDH 遺伝子の変異を検出する PIRA-PCR 法が開発され、比較的低コストなことから広く用いられてきた（高垣ら，2004）。また、定量 PCR や Luminex などの装置を用いる耐性菌検定法についても、高コストではあるが分析精度に優れることから一部で導入されている。

II いもち病菌の収集と MBI-D 耐性の遺伝子診断

2002 年佐賀県および 03 年九州 6 県（鹿児島県を除く）を対象にして、いもち病菌を多数収集した。サンプリングは、九州各県の農業試験場、防除所等の協力を得て、巡回調査地点の農家圃場を中心に行った。各圃場で葉いもち病斑 5～10 サンプルを任意に収集し、各病斑から単胞子分離法により菌株を獲得した。次に各菌株から抽出した DNA を用い、PIRA-PCR 法によって MBI-D 耐性の遺伝子診断を実施した。本試験により収集した菌株数、分離地点数、耐性菌分離株数等のデータはすべて表-1 にまとめた。

2002 年の佐賀県では、解析した 404 菌株のうち 290 菌株（71.8%）が耐性菌であり、調査した 102 地点のうち 75 地点（73.5%）から耐性菌が分離された。2002 年の耐性菌の分離地点を佐賀県の地図上に示すと、県西部を中心としてほぼ全県的に耐性菌が分布し、初確認の翌年には既にまん延状態であったことがわかる（図-1）。なお、2002 年佐賀県のいもち病発生状況は、一部の地域で葉いもちの多発生や防除効果の低下事例を認めたが、全体的には中発生であった。

2003 年九州 6 県では、解析した 771 菌株のうち 356

Mutation for MBI-D Resistance Occurred in Several Genetic Backgrounds of the Rice Blast Population in Kyushu. By Fumihiko SUZUKI

（キーワード：イネいもち病菌，MBI-D 耐性菌，*Pot2* rep-PCR，個体群構造解析）

表-1 2002 年佐賀県および 03 年九州 6 県から収集したいもち病菌集団の解析結果 (Suzuki et al., 2007 から改変)

分離年および 分離県	分離地点数 ^{a)}		分離菌株数 ^{b)}		遺伝子型数 ^{c)}		遺伝子型の 多様度 (<i>H</i>) ^{d)}	
	T	R	T	R	T	R	T	R
2002 年								
佐賀	102	75	404	290	37	15	0.76	0.55
2003 年								
佐賀	64	46	286	158	35	18	0.88	0.80
福岡	13	6	57	32	12	5	0.86	0.76
長崎	4	2	21	13	4	2	0.73	0.54
熊本	15	2	110	30	13	4	0.60	0.58
大分	28	14	234	105	22	8	0.79	0.69
宮崎	14	11	63	18	12	3	0.85	0.31
2003 年合計	138	81	771	356	64	28	0.86	0.87
2002 ~ 03 年合計	240	156	1,175	646	76	31	0.88	0.80

^{a)} T: 分離地点の総数, R: 耐性菌の分離地点数. ^{b)} T: 分離菌株の総数, R: 耐性菌の分離菌株数. ^{c)} T: *Pot2* rep-PCR 法で検出された遺伝子型の総数, R: 耐性菌の遺伝子型数. ^{d)} T: 遺伝子型に基づく全集団の多様度指数, R: 耐性菌集団の多様度指数.

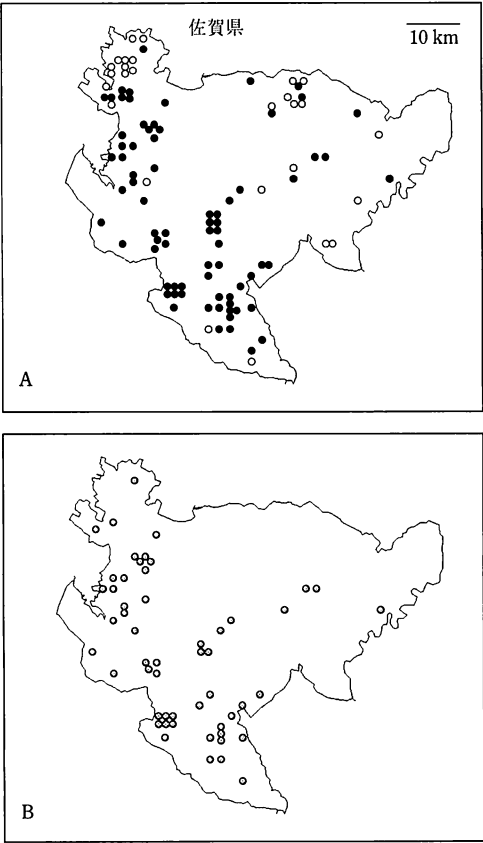


図-1 2002 年佐賀県における MBI-D 耐性菌分離地点
A: ●は耐性菌分離, ○は感受性菌のみ分離, B: 遺伝子型 Sa4 の分離地点 (Suzuki et al., 2007 から改変).

菌株 (46.2%) が耐性菌であり, 調査した 138 地点のうち 81 地点 (58.7%) で耐性菌が分離された。県別に見た場合でも 6 県すべてにおいて高い耐性菌の分離率を示しており (表-1), 2002 年に農業メーカーを中心に行ったモニタリングの結果と同様であった。2003 年九州のいもち病の発生状況は, 全体的に小発生であり防除効果の低下は一部地域に限られた。

III MBI-D 耐性菌を含むいもち病菌集団の
個体群構造解析

1 *Pot2* rep-PCR 法

MBI-D 耐性菌出現と分布拡大の遺伝的背景を解明するために, 2002 年佐賀県および 03 年九州 6 県のいもち病菌集団を対象に, フィンガープリント解析に基づく個体群構造解析を実施した。本解析を通して, 耐性菌が単一起源で分布拡大したのか, あるいは複数起源で地域ごとにそれぞれ選抜されて増殖したのか, という二つの可能性を検証することができると考えた。フィンガープリント解析は, いもち病菌のゲノム中に散在する転移因子である *Pot2* 配列内に設計したプライマーを使用する rep-PCR 法 (*Pot2* rep-PCR 法) を適用した。本研究に先行し, 筆者らは GEORGE et al. (1998) の方法からプライマーの設計などを変更し, 簡便で再現性の高い方法を開発した (Suzuki et al., 2006)。この手法を適用することによって, 今回のように多数の検体数であっても迅速に解析することが可能になった。検出されたフィンガー

プリントは遺伝子型 (haplotype) として集計した。さらに、各いもち病菌集団から検出される遺伝子型の種類と頻度に基づき、多様度指数を算出した。この数値は、1に近いほど多様性が高く0に近いほど低いと判断される。

2 2002 年佐賀県の個体群構造

2002 年佐賀分離菌株を対象に *Pot2* rep-PCR 法によるフィンガープリント解析を行った結果、すべての菌株で 0.5 kb から 6 kb の範囲に 10 本前後のバンドが検出され、フィンガープリントに多型が認められた。解析した 404 菌株からは 37 種類のフィンガープリントを検出することができ、それぞれを遺伝子型として Sa1 ~ 37 と名付けた (図-2 B)。耐性菌検定結果と合わせ、図-2 A には遺伝子型ごとに分離地点数をグラフで表示している。耐性菌は 15 種類の遺伝子型 (Sa1, 4, 5, 11, 17, 18, 20, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37) に類別されることがわかった。このうち、Sa4 の分離頻度が菌株数で 189 (46.8%)、分離地点で 54 (52.9%) と極めて高いことが明らかになった。地図上に Sa4 の分離地点を記すと、先に示した耐性菌の分離地点とほぼ重なることがわかる (図-1 A, 1 B)。上市から 4 年、初確認からわずか 2 年でありながら耐性菌には高い多様性があること ($H = 0.55$)、その中で優占する遺伝子型 (Sa4) が存在することが明らかになった。さらに、耐性菌の遺伝子型について見ると、Sa1 と Sa33 の分離頻度が Sa4 に次いで比較的高かったこと、Sa5 と Sa11 は感受性菌の遺伝子型としても存在することなども読み取れた。

3 2003 年九州 6 県の個体群構造

2003 年九州分離の 771 菌株を対象に *Pot2* rep-PCR 法によるフィンガープリント解析を行った結果、64 種類のフィンガープリントが検出され、そのうち耐性菌の集団としては 28 種類に類別できた (表-1)。各県とも耐性菌から検出される遺伝子型に高い多様性が認められ ($H = 0.31 \sim 0.80$)、すべての県のデータを合わせて計算すると 0.87 になった。これは、感受性菌を含めた集団全体の多様度 ($H = 0.86$) とほぼ同レベルであった。図-3 は、検出された 28 種類の耐性菌の遺伝子型を抜き出し、それぞれの分離地点数と分離県のデータを合わせてグラフに示した。この結果、分離地点数の多い 3 種類の遺伝子型 (Sa4, Sa5, Sa18) の存在が明らかになった。Sa4 は 2002 年の佐賀県で優占していた遺伝子型だが、03 年についても引き続き佐賀県内に優占的に広く分布しており、64 調査地点のうち 26 地点 (40.1%) で分離された。Sa5 は福岡、佐賀、熊本、大分の 4 県から検出され、比較的広域に分布していた。Sa18 については、大分県と宮崎県において優占的に分布する遺伝子型であり、両県においては 42 調査地点のうち 20 地点 (48%) で分離された。その他の耐性菌の遺伝子型については、分離率が低い、もしくは比較的限られた地域でのみ分離される傾向を示している (図-3)。これら 3 種類の遺伝子型の分離地点を九州の地図上に記入して見ると、Sa4 が佐賀県全域と長崎県の一部を含む九州北西部に、Sa18 は大分県から宮崎県にかけて九州東部に、

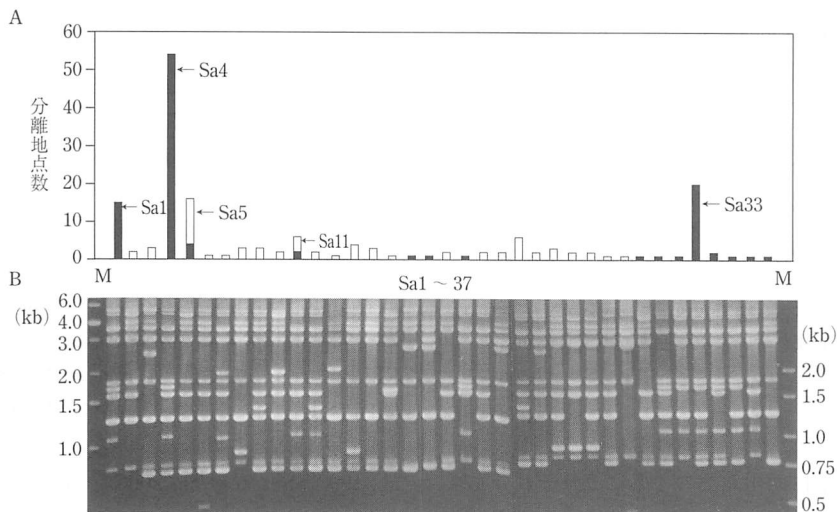


図-2 2002 年佐賀県分離いもち病菌の *Pot2* rep-PCR 法による解析

A: ■は耐性菌分離地点数, □は感受性菌分離地点数, B: 検出された 37 種類のフィンガープリントパターン. 左から右に遺伝子型 Sa1 ~ Sa37 のパターンを示している (SUZUKI et al., 2007 から改変).

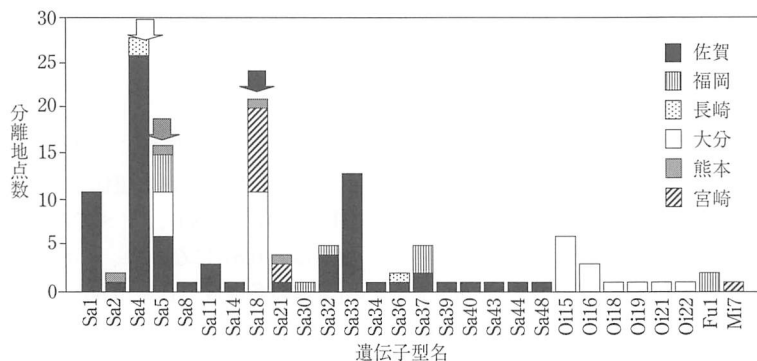


図-3 2003 年九州 6 県において検出された MBI-D 耐性菌の遺伝子型と各分離地点数
各県の子離地点数を合わせてグラフにしている。優占する 3 種類の遺伝子型を矢印で示した (SUZUKI et al., 2007 から改変)。

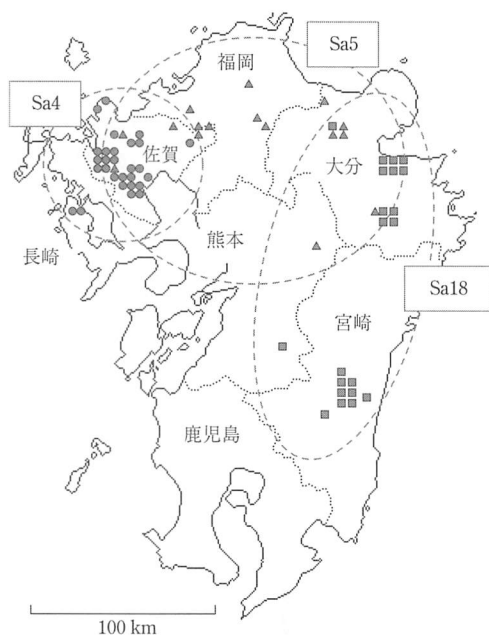


図-4 2003 年九州における MBI-D 耐性菌の主要な遺伝子型の分離地点
●: Sa4, ▲: Sa5, ■: Sa18. それぞれの遺伝子型が分布する地域をサークルで囲んだ (SUZUKI et al., 2007 から改変)。

Sa5 は福岡県を中心に九州北部の 4 県にそれぞれ分布域があることがわかる (図-4)。以上の結果から、九州地域における耐性菌の広域的な分布拡大は、主要な 3 種類の遺伝子型を中心にして短期間のうちに進行したものと推定できた。なお、転移因子の影響が少ない SSR マーカ

ーで解析した場合でも 3 種類の遺伝子型はそれぞれ異なるプロファイルを示すことを確認している。

4 クラスター解析

2002 年および 03 年に検出された 76 種類の遺伝子型について、フィンガープリントパターン間の類似度計算を simple matching 法で行い、UPGMA でデンドログラムを作成した (図-5)。全体の類似度は 89% 以上であり、いずれのクラスターからも信頼性のあるブートストラップ確率は得られなかった。また、地理的分布や耐性遺伝子との関連性があるクラスターは認められなかった。類似度 90% のレベルで見ると二つのグループ (KP-I, KP-II) が存在し、KP-II は感受性菌の遺伝子型のみであるが、KP-I には耐性菌と感受性菌の遺伝子型が混在していた。耐性菌の主要な 3 種類の遺伝子型 (Sa4, Sa5, Sa18) は KP-I に属し、類似度 92% 以上と近縁な関係にあるものの、それぞれ異なるクラスターに位置していた (図-5)。

以上の結果、耐性菌が多様な遺伝子型を有し、それらが感受性菌と共にいくつかのクラスターを形成していることから、SDH 変異がいもち病菌集団内で複数回にわたって発生したことが示唆された。これまでに行われた RFLP や rep-PCR などに基づく系統解析によって、現在国内で分離されるいもち病菌は限られた 1 ~ 2 の系統 (リネージ) で占められていることが知られる (SONE et al., 1997; SUZUKI et al., 2006)。今回解析した九州分離菌株についても、おそらくすべてが一つのリネージに属しており、その中で病原性や環境適応力などにおける高い多様性を獲得しているものと推定できる。リネージレベルでの多様性が観察されない理由としては、機械化など

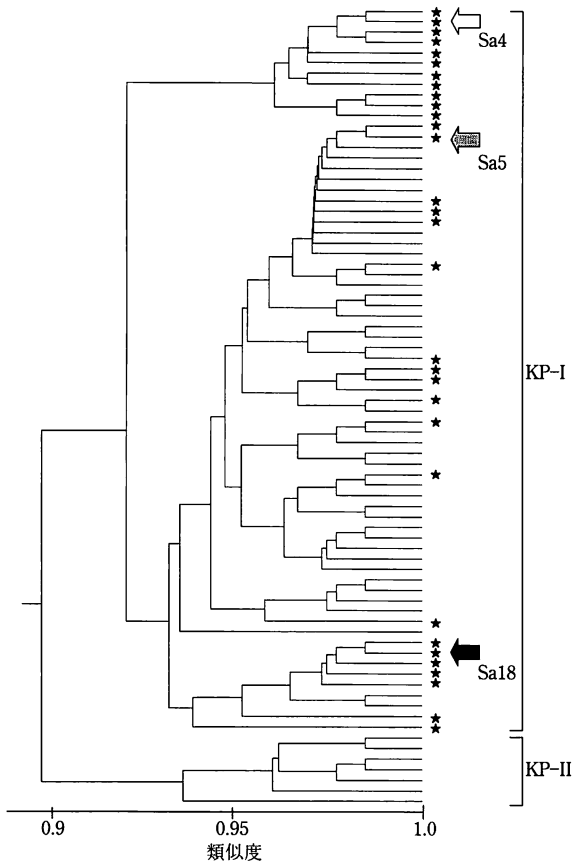


図-5 九州で検出された遺伝子型 76 種類の UPGMA 法によるクラスター解析

★：耐性菌の遺伝子型。耐性菌の主要な遺伝子型は矢印で表示した (Suzuki et al., 2007 から改変)。

により画一的な栽培体系が普及したこと、品種改良によって栽培イネ品種の遺伝的多様性が失われたことなどが関係しているのかもしれない。

IV MBI-D 耐性菌の起源

個体群構造解析を通して、九州地域で問題となった耐性菌の分布拡大は、単一の発生源から各地に分布を拡大したのではなく、各地域で異なる遺伝的背景を有する耐性菌が同時並行的に選抜されて増殖したこと、すなわち複数の起源に由来することが明らかになった。この結果は、他地域からの持ち込みがなくても MBI-D 使用地域では耐性菌出現リスクが存在することを示している。耐性菌発生メカニズムとしては、MBI-D 処理によって変異が誘発されるわけではなく、集団内に一定の頻度で発生する自然突然変異、すなわち生物が備える遺伝的な多様性を背景にして、薬剤の選択圧によって顕在化し

てくるものと考えられる。その後、九州以外の西日本から東北地域まで耐性菌の報告が相次いでおり、いずれの地域でもごくわずかに存在していた SDH 遺伝子変異菌が選択的に生き残り、これが顕在化してきたものと思われる。ただし、由来の同じ種子や苗の使用によって同一の遺伝子型の耐性菌が発生する事例も観察されており、それぞれの地域内や地域間では種子や苗の移動が分布拡大に寄与していることは確かである。

MBI-D 耐性菌の適応度 (fitness) に関する情報は限られているが、MBI-D の使用中止によって耐性菌の分離割合が急激に減少する事例や (安永, 2006)、MBI-D の無淘汰圧下では感受性菌との競合で耐性菌の分離率が減少することを示したポット試験の結果がある (木村, 2006)。また、変異のある耐性型 SDH は、野生型に比較して酵素活性が低下していることも示された (木村, 2006; YAMADA et al., 2004)。これらは、耐性変異に伴う適応度コストが存在する可能性を示唆しているが、遺伝的に同一のバックグラウンドの条件下で比較を行うことが困難なため、その正確な評価はできていない。今後、適応度コストが圃場レベルで耐性菌の病原力や増殖能力などにどの程度影響しているのか、耐性菌の優占する遺伝子型の菌株は遺伝的バックグラウンドに高い適応度があるのか、などの点を明らかにできれば、耐性菌の動向を正確に予測できるだろう。

耐性菌が顕在化したときには既に高い多様性があるという今回の結果は、我々が目にする病徴はいもち病菌集団の氷山の一角に過ぎないことを示している。集団の多様性を維持するうえで重要な生息場所はどこなのか、突然変異以外にも遺伝子型の多様化を可能にする準有性的組換えなどの機構が働いていないのか、などにも大いに興味をもたれる。

おわりに

本研究において、*Pot2* rep-PCR 法によるフィンガープリント解析が極めて有効であったが、これは SNP (一塩基多型) 解析である耐性菌検定データを合わせて評価したことが大きく貢献している。rep-PCR や RFLP などのフィンガープリント解析は、単独では個体識別の精度は十分とは言えず、それぞれの研究目的に応じて SNP 解析や SSR マーカー解析などを併用することが必要だろう。今後、再現性が高く簡便な手法を組み合わせることによって、いもち病菌の生態研究や集団解析に有効な個体識別技術を構築したいと考えている。

2003 年以降、MBI-D 耐性菌は九州に限らず西日本各地でも発生し、現在までに関東、東北地域に至るまで

分布が拡大している。本来は憂慮すべき事態であるが、この数年はいもち病の発生自体が少なく、また代替剤があるという安心感から耐性菌問題は収束しつつあるようだ。しかし、MBI-D 耐性菌発生の事実は、近年開発された選択性の高い殺菌剤ほど耐性菌発生リスクがあること、直接的な殺菌作用がなくても短期間に集団が耐性化することなど様々な問題点を浮き彫りにしている。また、今回の結果から、耐性菌は高い遺伝的多様性を獲得していることが明らかになり、ひとたび発生してしまうと集団から排除することは極めて困難なことが想像される。今後は、耐性菌出現リスクを低減する防除技術や耐性菌が発生した場合でも低密度に管理する技術の確立が

重要と考える。

引 用 文 献

- 1) 荒井治喜 (2004): 植物防疫 58: 20 ~ 23.
- 2) GEORGE, M. L. C. et al. (1998): Phytopathology 88: 223 ~ 229.
- 3) 木村教男 (2006): 日本植物病理学会・第 16 回殺菌剤耐性菌研究会講要集: 41 ~ 50.
- 4) SONE, T. et al. (1997): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn : 63: 155 ~ 163.
- 5) 梶原 穂・高垣真喜一 (2003): 日本植物病理学会・第 13 回殺菌剤耐性菌研究会講要集: 59 ~ 68.
- 6) SUZUKI, F. et al. (2006): J. Gene. Plant Pathol. 72: 314 ~ 317.
- 7) ——— et al. (2007): Plant Disease 91: 176 ~ 184.
- 8) 高垣真喜一ら (2004): 植物防疫 58: 24 ~ 28.
- 9) YAMADA, N. et al. (2004): Biosci. Biotechnol. Biochem. 68: 615 ~ 621.
- 10) 山口純一郎ら (2002): 日植病報 68: 261.
- 11) 安永忠道 (2006): 今月の農業 50: 84 ~ 89.

新しく登録された農薬 (19.4.1 ~ 4.30)

掲載は、**種類名**、登録番号:**商品名**(製造者又は輸入者)登録年月日、有効成分:含有量、**対象作物**:対象病害虫:使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、**適用雑草等**を記載。(登録番号:21942 ~ 21955) 下線付きは新規成分。

「殺菌剤」

● BT 水和剤

21944: エコマスター BT (クミアイ化学工業) 07/04/04
バチルス チューリングゲンシス菌の生芽胞及び産生結晶毒素: 10.0%

野菜類: コナガ、アオムシ、ヨトウムシ、ハスモンヨトウ、オオタバコガ: 発生初期 但し、収穫前日まで
キャベツ: ハイマダラノメイガ: 発生初期 但し、収穫前日まで

にんにく: ネギコガ: 発生初期 但し、収穫前日まで
ねぎ: シロイチモジヨトウ: 発生初期 但し、収穫 7 日前まで

だいず: ハスモンヨトウ: 発生初期 但し、収穫 7 日前まで

● ヨウ化メチルくん蒸剤

21946: マイヒューム (アリスタライフサイエンス) 07/04/11

21947: ヤシママイヒューム (ヤシマ産業) 07/04/11
ヨウ化メチル: 50.0%

木材こん包材 (天幕・倉庫等): マツノザイセンチュウ、カミキリムシ類、キクイムシ類、ゾウムシ類: —

● MEP 乳剤

21949: 協友スミチオン乳剤 (協友アグリ) 07/04/11
MEP: 50.0%

稲: ニカメイチュウ第 1 世代、ニカメイチュウ第 2 世代、サンカメイチュウ第 3 世代、ヒメトビウンカ、カメムシ類、イネツトムシ、イネシガラレセンチュウ、イネドロロイムシ、アブラムシ類、イネハモグリバエ、イネヒメハモグリバエ、フタオビコヤガ: 収穫 21 日前まで

稲: イネシガラレセンチュウ: は種前

稲 (箱育苗): イネシガラレセンチュウ: 硬化期 ~ 移植前日

麦類: アブラムシ類、アワヨトウ、ムギキモグリバエ: 収穫 7 日前まで

りんご: アブラムシ類、ナシヒメシンクイ、モモシンクイガ、ハマキムシ類、ナシグンバイ、クワコナカイガラムシ、アメリカシロヒトリ: 収穫 30 日前まで

なし (有袋栽培): アブラムシ類、シンクイムシ類、ハマキムシ類、ナシグンバイ、ナシホソガ、ナシチビガ、カメムシ類、クワコナカイガラムシ、アメリカシロヒトリ: 収穫 14 日前まで

なし (無袋栽培): アブラムシ類、シンクイムシ類、ハマキムシ類、ナシグンバイ、ナシホソガ、ナシチビガ、カメムシ類、クワコナカイガラムシ、アメリカシロヒトリ: 収穫 21 日前まで

かき: ハマキムシ類、カキノヘタムシガ、カキホソガ、フジコナカイガラムシ、オオワタコナカイガラムシ、メムシ類、イラガ類、アメリカシロヒトリ、ミノガ類若齢幼虫: 収穫 30 日前まで

もも: アブラムシ類、モモハモグリガ、ナシヒメシンクイ (心折防止)、ナシヒメシンクイ、モモシンクイガ、ハマキムシ類、クワシロカイガラムシ、カメムシ類、クワコナカイガラムシ: 収穫 3 日前まで

かんきつ: アブラムシ類、ハマキムシ類、サンホーゼカイガラムシ、アザミウマ類、カメムシ類、カネタタキ、ミカンツボミタマバエ、ケシキスイ類、コアオハナムグリ、フラーバラゾウムシ、コナカイガラムシ類: 収穫 14 日前まで

(20 ページに続く)