

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 木村教男

論文題目

イネいもち病菌のメラニン生合成阻害剤  
耐性菌の生態と防除に関する研究

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	川北	一人
委員	名古屋大学教授	肘井	直樹
委員	名古屋大学教授	浅川	晋
委員	名古屋大学准教授	吉岡	博文
委員	中部大学教授	柘植	尚志

## 論文審査の結果の要旨

*Pyricularia oryzae* Cavara によって引き起こされるイネいもち病は、イネの最重要病害である。我が国においては、1950年代からその防除を目的として、抗生物質を含め多くの種類の化学合成殺菌剤が開発・販売されている。そのひとつが、イネいもち病菌の防除を主目的として開発されたメラニン生合成阻害剤（MBI剤）である。MBI剤は抗菌性を示さないが、イネいもち病菌ではメラニン生合成が阻害されるとイネに対する感染能力を失うため、本菌の非殺菌性防除剤として広く使用されている。メラニン生合成酵素のうちシタロン脱水酵素阻害剤である MBI-D 剤は、長期の残効を有するという特徴から広く利用されていたが、2001年に耐性菌の発生が確認された。MBI-D 剤耐性菌の耐性機構については、シタロン脱水酵素遺伝子の点突然変異による1か所のアミノ酸置換（V75M）に起因することが明らかにされている。本研究では、イネいもち病菌の MBI-D 剤耐性菌の生理学的・生態学的特性の解明に基づく、実圃場における耐性菌管理対策の策定を目的として、以下の研究を行った。

## 1. MBI-D 剤感受性菌と耐性菌の生理学的性質とシタロン脱水酵素活性の比較

MBI-D 剤感受性4株と耐性4株について、イネに対する病原性、培地上での生育時の温度感受性、胞子の紫外線耐性および MBI-D 剤の標的酵素であるシタロン脱水酵素の活性を比較した。その結果、病原性、温度感受性および紫外線耐性については、感受性株と耐性株で有意な差は認められなかった。感受性、耐性のそれぞれ1株からシタロン脱水酵素を精製し、酵素活性を測定したところ、感受性菌酵素の分子活性が 38.2/s であったのに対して、耐性菌酵素の活性は 19.6/s であり、耐性菌の酵素活性が約 1/2 に低下していることが明らかとなった。また、感受性4株と耐性4株からそれぞれ粗酵素液を調製し、シタロン脱水酵素活性を比較したところ、耐性菌群の酵素活性の低下が同様に確認された。以上の結果は、イネいもち病菌のシタロン脱水酵素遺伝子における MBI-D 剤耐性化変異によって、その酵素活性が低下することを示した。

## 2. MBI-D 剤感受性菌と耐性菌のフィットネスの比較

耐性菌のシタロン脱水酵素活性が低下していることから、耐性菌ではメラニン生合成能、さらにイネへの感染能力が低下していることが予想された。そこで、感受性菌と耐性菌の胞子を混合接種し、MBI-D 剤を処理しない条件下で両者の競合試験を実施した。感受性菌と耐性菌の4組のペアについて、耐性菌の比率が感受性菌より高くなるように混合した胞子懸濁液をイネ体に接種した後、植物体上での継代を繰り返した。その結果、5~6回の継代によって、すべての組合せで発生病斑から感受性菌のみが検出されるようになった。その原因を探るために、感受性2株と耐性2株を用いてイネ体への感染に必要な加湿時間を比較した。その結果、感受性株ではイネ体への感染成立に必要な加湿時間が12時間であったのに対して、耐性株では2時間長い14時

間であった。この結果は、耐性菌ではイネ体への感染能力が低下していることを示唆した。

MBI-D 剤の使用を中止した実圃場における耐性菌の頻度推移を調査した。単年度内の推移を調査する 4 圃場と数年間の経年推移を調査する 5 圃場で調査したところ、9 圃場すべてにおいて、調査開始時に比べ最終調査時の耐性菌頻度が顕著に低下した。以上の結果は、実圃場においても、MBI-D 剤の使用中止によって、耐性菌頻度が低下し、数年後には感受性菌が優占化すること、すなわちシタロン脱水酵素遺伝子における MBI-D 剤耐性化変異がフィットネスクストを負うことを示した。

### 3. MBI-D 剤耐性菌管理対策の策定

イネいもち病菌の防除対象としては、種子伝染性のいもち病（種子消毒）、葉いもち（育苗箱施用）、穂いもち（茎葉散布）の 3 段階があり、それぞれの防除対象に対して異なる作用機作の剤を用いることが推奨されている。MBI-D 剤耐性菌頻度が低下し、MBI-D 剤の効果が回復した圃場では、MBI-D 剤と他剤を組み合わせた防除体系によって、高い防除効果に加え、耐性菌再選抜の抑制が可能であると考えた。そこで、MBI-D 剤を有効利用した耐性菌管理対策の策定を目的として、以下の研究を行った。

#### (1) ベノミルを用いた種子伝染性いもち病菌の防除

ベノミルによる種子消毒と育苗箱灌注処理の効果を評価したところ、種子伝染性のいもち病菌による苗いもちに対しては、どちらも高い防除効果が認められた。さらに、育苗箱灌注処理は、イネの育苗期中に飛び込んでくるいもち病菌による葉いもちにも高い防除効果を示し、残効性も有することが明らかとなった。以上の結果は、ベノミルの育苗箱灌注処理が育苗期のいもち病防除に有効であることを示した。

#### (2) ベノミルと MBI-D 剤を組み合わせた防除体系による耐性菌管理

MBI-D 剤耐性菌頻度が低下した愛媛県西予市の水田を用いて、「ベノミル育苗箱灌注と MBI-D 剤を含む混合剤箱処理の組み合わせ」と「MBI-D 剤を含む混合剤箱処理のみ」の防除体系について、葉いもち防除効果と耐性菌頻度を比較した。その結果、どちらの防除体系も葉いもちに対して高い防除効果を示し、この水田では、MBI-D 剤耐性菌頻度の低下によって、MBI-D 剤の効果が回復していることが確認された。しかしながら、「MBI-D 剤混合剤箱処理のみ」区の耐性菌頻度は 23.8%であり、無処理区の 4.0%、対照区の抵抗性誘導剤プロベナゾール箱処理区の 0%と比べて顕著に上昇し、耐性菌の再選抜が確認された。一方、「ベノミル育苗箱灌注と MBI-D 剤混合剤箱処理の組み合わせ」区の耐性菌頻度は 3.7%であり、無処理区と同程度に抑制された。以上の結果は、ベノミル育苗箱灌注処理には MBI-D 剤耐性菌の再選抜を抑制する効果があ

り、耐性菌管理対策の有効な手段であることを示した。

### (3) 異なる作用機作の剤の箱処理と MBI-D 剤混合剤の茎葉散布を組み合わせた防除体系による耐性菌管理

上記試験の翌年に、愛媛県西予市の同じ水田で試験を実施した。箱処理剤として電子伝達系阻害剤オリサストロビンまたは抵抗性誘導剤チアジニルを、茎葉散布混合剤として MBI-D 剤ジクロシメットとフェリムゾンの混合剤をそれぞれ用いて、穂いもち防除効果と耐性菌頻度について、「MBI-D 剤ジクロシメット箱処理のみ」区と比較した。その結果、「他の作用機作の剤の箱処理と MBI-D 剤混合剤の茎葉散布」区、「ジクロシメット箱処理のみ」区のどちらも高い穂いもち防除効果が認められた。しかしながら、「ジクロシメット箱処理のみ」区の耐性菌頻度は 20%に上昇し、無処理区（0%）に比べ顕著に高く、耐性菌の再選抜が認められた。一方、「オリサストロビン箱処理と MBI-D 混合剤茎葉散布」、「チアジニル箱処理と MBI-D 剤混合剤茎葉散布」の両区の耐性菌頻度はそれぞれ 14.3%, 0%であり、特に後者では無処理と同程度に抑制された。したがって、「他の作用機作の剤の箱処理とジクロシメット・フェリムゾン混合剤茎葉散布」の防除体系には、穂いもち防除と MBI-D 剤耐性菌再選抜抑制の両効果があり、有効な耐性菌管理対策であることが示された。

以上の研究によって、シタロン脱水酵素遺伝子における MBI-D 剤耐性化変異がフィットネスクスト（感染能力の低下）を負うため、MBI-D 剤の使用中止によって、速やかに耐性菌頻度が低下することを明らかにした。さらに、その特徴に基づき、MBI-D 剤を有効利用した MBI-D 剤耐性菌管理対策として、①ベノミル苗箱灌注による種子消毒、②MBI-D 剤以外の剤による育苗箱施用、③MBI-D 剤ジクロシメット・フェリムゾン混合剤の茎葉散布（年 1 回限定）を組み合わせた防除体系を策定した。これらの成果は、MBI-D 剤だけでなく、他の作用機作の殺菌剤も含め、耐性菌研究と耐性菌管理対策策定のモデルとなるものであり、植物保護学分野への貢献が期待できる。よって、本審査委員会は、本論文の内容が博士（農学）の学位論文として十分に価値のあるものと認め、論文審査に合格と判定した。