

静岡県におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性コナギの分布

稲垣栄洋*・今泉智通**・汪 光熙**・富永 達**

要約：コナギのスルホニルウレア系除草剤（SU 剤）抵抗性生物型がこれまで顕在化していない静岡県において、この抵抗性生物型の発生の有無を調査した。その結果、静岡県東部から西部地域にかけて抵抗性生物型が広く発生していることが明らかとなった。認められた抵抗性生物型は、すべて *ALSI* あるいは *ALS3* の Pro₁₉₇ 部位に変異が認められたが、そのうち 2 地域からの SU 剤抵抗性生物型は、コナギではこれまで報告のないプロリンからトレオニンへのアミノ酸置換であった。抵抗性生物型が採集された伊豆地域では、1 km 以内の距離にある異なる水田で異なるアミノ酸置換が認められたことから、抵抗性生物型は、それぞれの地域で独立して起源したと考えられた。この結果から、コナギの残草が顕在化していない水田においても抵抗性生物型が発生していることが明らかとなった。

キーワード：スルホニルウレア系除草剤、除草剤抵抗性生物型、コナギ、アセト乳酸合成酵素、静岡県

緒 言

日本の水田では、1980 年代後半以降スルホニルウレア系除草剤（SU 剤）が広く使用されるようになり、それに伴って 1990 年代半ばから SU 剤に対して抵抗性を示す生物型の出現が顕在化してきた。日本の水田における SU 剤抵抗性生物型の顕在化は、1995 年にミズアオイ (*Monochoria korsakowii*) で初めて確認され²²⁾、その後、アゼトウガラシ (*Lindernia micrantha*)⁹⁾、アゼナ類 (*Lindernia* spp.)²⁰⁾、キクモ (*Limnophila sessiliflora*)²⁵⁾、ミゾハコベ (*Elatine triandra*)^{7, 15)}、キカシグサ (*Rotala indica*)¹⁾、イヌホタルイ (*Scirpus juncoides*)^{10, 12, 28)}、タイワンヤマイ (*S. wallichii*)⁶⁾、オモダガ (*Sagittaria trifolia*)²³⁾ など 13 の水田雑草で確認されている。

コナギ (*M. vaginalis*) は日本の水田でもっとも重要な強害草の一つであり、1998 年に秋田県と茨城県で SU 剤抵抗性生物型が初めて報告され¹¹⁾、その後、19 府県でこの抵抗性生物型の顕在化が確認されている^{4, 5, 13, 16)}。除草剤抵抗性生物型は、適切な除草剤管理を行っている水田において、残草した水田雑草が繁茂することによって発見されることが多い。一方、静岡県では、これまでイヌホタルイの SU 剤抵抗性生物型について確認されているが^{8, 13)}、コナギの残草は特に問題とならなかったことから、コナギの SU 剤抵抗性生物型の発生状況は未調査のままであった。雑草の除草剤抵抗性生物型の蔓延を防止するには、発生状況の実態を把握する必要がある。

本研究においては、静岡県内の水田を対象にコナギの SU 剤抵抗性生物型の分布を調査した。その結果、SU 剤抵抗性生物型の発生が問題となっていない地域においても、この生物型の発生が広く認められたので報告する。

材料および方法

2006 年 6 月 23 日から 6 月 30 日に、静岡県内の 7 地域のすべての主要な水田地帯でコナギの残草を探索し、静岡県浜松市、磐田市、森町、掛川市、藤枝市、静岡市、芝川町、富士宮市、富士市、沼津市、御殿場市、小山町、函南町、伊豆の国市の 14 市町計 22 地点において、コナギの残草が認められた水田からその個体を採取した (Fig. 1a)。採取した個体は、1/10,000a ワグネルポットに移植し、京都大学農学部圃場内で育成した。個体ごとの SU 剤抵抗性の有無を確認するための 1 次スクリーニングとして、DuPont 社の Instant Test in Office kit を用いた発根法^{5, 27)}を行った。すなわち、1.5~2 cm に根を切断した個体をペンシルフロノメチル 150 ppb 中で育成し、25℃ 明条件のインキュベーター内に 14 日間静置し、抵抗性の有無を検定した。1 次スクリーニングの結果、抵抗性と判定された個体について、Escaravage *et al.*²⁾ の方法に従って DNA を抽出し、PCR により *ALSI* および *ALS3* の Pro₁₉₇ を含む周辺領域を増幅した。増幅

*静岡県農林技術研究所 〒438-0803 磐田市富丘 678-1
hidehiro1_inagaki@pref.shizuoka.lg.jp

**京都大学農学研究科 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
(2007 年 12 月 12 日受付 2008 年 3 月 24 日受理)

プライマーとして, Ohsako and Tominaga¹⁷⁾ (DDBJ/EMBL/GenBank Accession Nos.: AB243606-243639) に基づき, *ALS1* を特異的に増幅する *ALS1*_459fw: 5'-ATACGCGCGCTCCACTGGAA-3', と *ALS1*_1003rv: 5'-TACCCATCAATGTACTCGCT-3', *ALS3* を特異的に増幅する *ALS3*_488fw: 5'-TCTGCATCGCCACCTCG-3', と *ALS3*_1003rv: 5'-GACCCATTAGTGTACTCGC-3' を用いた。PCR 反応を行った 1 チューブあたりの組成は 10×PCR buffer 1 μl, dNTPs (2.5 mM 濃度) 0.8 μl, 各プライマー (10 μM) 各 0.3 μl, Ex Taq (5 U/μl) に, テンプ

レート DNA 1 μl を加え, 蒸留水で全量を 10 μl としたものとした。PCR 条件は, 初期変性 95℃ に続き, 変性温度 2 分, 94℃ · 1 分 × 35 サイクル, アニール温度 60℃ (*ALS1*), 65℃ (*ALS3*) · 1 分, 伸長温度 72℃ · 1 分, 最終伸長 72℃ · 7 分とした。得られた PCR 産物は *Nla*IV (New England Biolabs) を制限酵素とした CAPS 法¹⁴⁾ により Pro₁₉₇ の変異の有無を確認した。*Nla*IV は Pro₁₉₇ の塩基配列である GGN⁻NCC を切断するため, アミノ酸置換が Pro₁₉₇ 部位に起こっていると切断されないことになる。制限酵素処理は *Nla*IV 1 U を含む 6 μl のバッファーに 4 μl の PCR

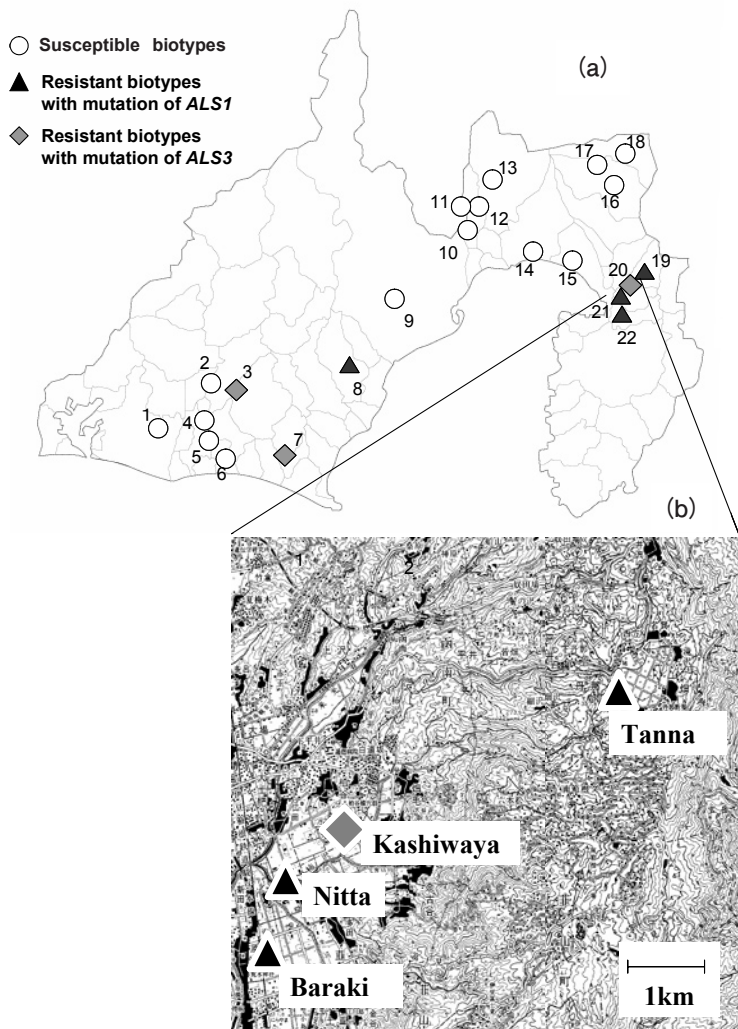


Fig. 1. Distribution of SU-R biotypes of *M. vaginalis* in Shizuoka Prefecture. (a) Shizuoka Prefecture, (b) Izu area. The number in the map corresponds to the collection site number in Table 1.

産物を加えて 10 µl とし、37℃ で一昼夜静置した後、3% アガロースゲルで電気泳動し、SYBR Green I で染色し、UV 下で RFLP パターンを検出した。CAPS 法により Pro₁₉₇ 部位のアミノ酸置換が認められた PCR 産物については、ポリエチレングリコール沈殿で精製した後、DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter Inc., USA) によりシーケンシング反応を行い、CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc., USA) を用いて塩基配列を決定した。

結果および考察

発根法による検定の結果、供試した 22 地点由来の個体のうち 7 地点由来の個体が抵抗性であると判定され (Table 1)、これらの個体からは、SU 剤に対して抵抗性を引き起こすとされている Pro₁₉₇ 部位における一塩基置換が確認された (Fig. 1a)。1 次スクリーニングで抵抗性が確認された 7 筆の水田のうち、5 筆ではコナギの残草は軽微であった。また、雑草害が生じると予測される程度のコナギの残草が観察された 3 筆の水田のうち抵抗性が確認されたのは 2 筆であり、残草の程度とコナギの SU 剤抵抗性生物型の発生は必ずしも一致しなかった。これらの結果から、これまで未調査であった静岡県において、コナギの SU 剤抵抗性生物型が発生していることが新たに確認された。また、7 地点由来の抵抗性個体のうち、4 個体が県東部地域、1 個体が県中部地域、2 個体が県西部地域由来で、静岡県全域で抵抗性生物型が出現していることが明らかとなった。

コナギの SU 剤抵抗性生物型は、19 府県で報告されているが¹³⁾、静岡県では、これまでコナギの SU 剤抵抗性生物型の発生は問題化していないため、SU 剤抵抗性生物型の発生に関する調査は行われてこなかった。本研究の結果から、県内でコナギの残草が問題になっていない水田で SU 剤抵抗性生物型が発生していることが明らかとなった。近年、SU 剤抵抗性生物型の簡易な検定方法の普及により、抵抗性生物型の発生地域の調査が進められているが、その調査は一般的に残草が顕著な地域を中心に行われる傾向にある。本研究の結果から、残草が顕著でない地域も含めて調査を行うべきであることが指摘できる。

本調査で確認された SU 剤抵抗性生物型の *ALS* 遺伝子の塩基配列と Pro₁₉₇ 部位におけるアミノ酸置換を Table 2 に示した。CAPS 法とダイレクトシーケンスの結果、SU 剤抵抗性生物型はすべて *ALS1* あるいは

Table 1. Result of the root bioassay for resistant biotypes in *M. vaginalis*.

Region	Collection cite	No.	Amount of emergence ^{a)}	Root bioassay ^{b)}	
Seibu	Tsurumi, Hamamatsu	1	S	S	
	Ichinomiya, Mori	2	S	S	
	Mutsumi, Mori	3	L	R	
	Chuen	Kasami, Iwata	4	S	S
		Mikano, Iwata	5	S	S
		Asaba, Fukuroi	6	S	S
		Daito, Kakegawa	7	L	R
Shidahaibara	Kariyado, Fujieda	8	S	R	
Chubu	Kita, Shizuoka	9	S	S	
	Okubo, Shibakawa	10	S	S	
Fuji	Simojo, Shibakawa	11	S	S	
	Miyanomae, Shibakawa	12	L	S	
	Kariyado, Fujinomiya	13	S	S	
	Kawaziri, Fuji	14	S	S	
	Higashibara, Numazu	15	S	S	
	Kamado, Gotenba	16	S	S	
	Ozeki, Gotenba	17	S	S	
Tobu	Okoda, Oyama	18	S	S	
	Tanna, Kannami	19	S	R	
	Kashiwaya, Kannami	20	S	R	
	Nitta, Kannami	21	S	R	
	Baraki, Izunokuni	22	S	R	

a) L : Large number, S : Small number

b) R : Resistant, S : Susceptible

ALS3 の Pro₁₉₇ 部位に一塩基置換が認められた。SU 剤抵抗性は、その多くがアセト乳酸合成酵素 (*ALS*) 遺伝子の一塩基置換による SU 剤への感受性の低下で生じることが知られており、アミノ酸変異を引き起こす部位として Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Ala₂₀₅, Asp₃₇₆, Trp₅₇₄, Ser₆₅₃ の 6 カ所が報告されている^{19, 26)}。コナギについては *ALS1* から *ALS6* の 6 コピーの存在が示唆されており、これまで報告されている SU 剤抵抗性生物型では、*ALS1* あるいは *ALS3* の Pro₁₉₇ 部位だけで一塩基置換が報告されている^{17, 21)}。本研究で認められた SU 剤抵抗性生物型もすべて既知の報告と同様に Pro₁₉₇ 部位の一塩基置換であった。ただし、これまでコナギの SU 剤抵抗性生物型の Pro₁₉₇ 部位におけるアミノ酸置換は、プロリンからセリン、ロイシン、ヒスチジンへの置換が報告されているが^{17, 23, 24)}、本研究では函南町仁田および伊豆の国市原本で採集された個体では、トゲヂシヤ¹⁸⁾ やホウキグサ³⁾ ではすでに報告があるものの、コナギでは報告のないプロリンからトレオニンへの置換が新たに見つかった (Table 2)。

近接した地域で SU 剤抵抗性生物型が確認された

Table 2. DNA sequence and deduced amino acid at Pro 197 site of ALS genes.

Biotype	ALS1		ALS3	
	Codon	Amino acid	Codon	Amino acid
Susceptible	CCT	Pro	CCT	Pro
Resistance				
Mutsumi, Mori	— ^{a)}	Pro	CAT (AB300416) ^{b)}	His
Daito, Kakegawa	—	Pro	TCT (AB300414)	Ser
Kariyado, Fujieda	TCT (AB300417)	Ser	—	Pro
Tanna, Kannami	TCT (AB300411)	Ser	—	Pro
Kashiwaya, Kannami	—	Pro	TCT (AB300415)	Ser
Nitta, Kannami	ACT (AB300412)	Thr	—	Pro
Baraki, Izunokuni	ACT (AB300413)	Thr	—	Pro

a) No data of DNA sequence

b) Numbers in parentheses are DDBJ accession numbers

伊豆地域を Fig. 1b に示した。SU 剤抵抗性生物型が採集された函南町丹那と函南町仁田、函南町柏谷と伊豆の国市原木の 4 地域は近接し、半径 3 km 以内に位置している。特に、函南町柏谷と伊豆の国市原木は隣接し、1 km 以内の距離にある。これらの SU 剤抵抗性生物型は、隣接した地域で採集されたにもかかわらず、出現した抵抗性生物型のアミノ酸置換はそれぞれ異なっていた。Ohsako and Tominaga¹⁷⁾ は、SU 剤抵抗性生物型は、それぞれの地域で独立して生じていることを明らかにしているが、本研究結果も、極めて近接した地域においても SU 剤抵抗性生物型が独立に起源していることを示している。

以上の結果から、残草が顕在化していない水田においても、コナギの SU 剤抵抗性生物型が生育している可能性が示され、発生動向に注意が必要であると考えられた。

謝 辞

供試材料の採集に協力いただいた静岡県産業部、嶋田昭史氏、中川孝俊氏、岸本武也氏、桑原誠氏、JA 伊豆の国の伊豆澤秀憲氏に謝意を表す。

引用文献

1) Blancaver, M.E.A., K. Itoh, and K. Usui 2001. Resistance of *Rotala indica* Koehne var. *uliginosa* Koehne to sulfonylurea herbicides. *Weed Biol. Manag.*

1, 209-215.
 2) Escaravage, N., S. Questiau, A. Pornon, B. Doche, and P. Taberlet 1998. Clonal diversity in a *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Mol. Ecol.* **7**, 975-982.
 3) Guttieri, M.J., C.V. Eberlein, and D.C. Thill 1995. Diverse mutations in the acetolactate synthase gene confer chlorsulfuron resistance in kochia (*Kochia scoparia*) biotypes. *Weed Sci.* **43**, 175-178.
 4) 濱村謙史朗・高橋宏和・村岡哲郎 2001. 茨城県における SU 剤抵抗性コナギの出現と発根阻害作用による SU 剤抵抗性簡易検定法. *雑草研究* **46**(別), 16-17.
 5) Hamamura, K., T. Murakami, J. Hashimoto, A. Tsuruya, H. Takahashi, T. Takeshita, and K. Noritake 2003. Identification of sulfonylurea-resistant biotypes of paddy field weeds using a novel method based on their rooting responses. *Weed Biol. Manag.* **3**, 242-246.
 6) 橋本仁一・三浦誠・村岡哲郎・濱村謙史朗・竹下孝史 2001. イヌホタルイの発根阻害作用によるスルホニルウレア剤抵抗性簡易検定法第 2 報. 発生現場における適用例と他草種への応用の可能性. *雑草研究* **46**(別), 18-19.
 7) 畑克利・大塚一雄・青木美里・倉持仁志 1998. スルホニルウレア系除草剤抵抗性ミゾハコベ (*Elatine triandra* Schk.) の発現. *雑草研究* **43**(別), 28-29.
 8) Inagaki, H., Y. Ishida, A. Uchino, K. Kato, C. Kageyama, H. Iyozumi, and H. Nukui 2008. Difference in ultraweak photon emissions between sulfonylurea-resistant and -susceptible biotypes of *Scirpus juncooides* following application of a sulfonylurea. *Weed Biol. Manag.* **8** (in press).
 9) 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.
 10) 神田幸英・中山幸則・青久 2002. 三重県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の発生. *雑草研究* **47**(別), 58-59.
 11) 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.
 12) 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.
 13) 児島清 2005. 稲作雑草の発生状況の変化と防除対策. 今月の農業 3月号, 16-23.
 14) Konieczny, A. and F.M. Ausbel 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based marker. *Plant J.* **4**, 403-410.
 15) 大段秀記・児嶋清・小荒井晃・三原実・横尾浩明・市丸喜久 2001. 佐賀県に発生したスルホニルウレア剤

- 抗性ミゾハコベの除草成分に対する反応. 雑草研究 **46**(別), 26-27.
- 16) 大橋善之・富永達 2006. 京都府における水田雑草スルホニルウレア系除草剤抵抗性生物型の出現状況. 近畿作育研究 **51**, 49-50.
- 17) Ohsako, T. and T. Tominaga 2007. Nucleotide substitutions in the acetolactate synthase genes of sulfonyleurea-resistant biotypes of *Monochoria vaginalis* (Pontederiaceae). Gen. Genet. Syst. **82**, 207-215.
- 18) Preston, C., L.M. Stone, M.A. Rieger, and J. Baker 2006. Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide -resistant populations of *Lactuca serriola*. Pestic. Biochem. Physiol. **84**, 227-235.
- 19) Tranel, P.J. and T.R. Wright 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides, what have we learned? Weed Sci. **50**, 700-712.
- 20) 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.
- 21) 内野彰・渡邊寛明 2002. 秋田県大曲市で見つかったオモダカのスルホニルウレア系除草剤及び各種除草剤に対する反応. 雑草研究 **47**(別), 56-57.
- 22) Wang, G.X., H. Kohara, and K. Itoh 1997. Sulfonyleurea-resistance in a biotype of *Monochoria korsakowii*, an annual paddy weed in Japan. Proc. Brighton Crop Protection Conf. Weeds, 311-318.
- 23) Wang, G.X., Y. Lin, W. Li, M. Ito, and K. Itoh 2004. A mutation confers *Monochoria vaginalis* resistance to sulfonyleureas that target acetolactate synthase. Pestic. Biochem. Physiol. **80**, 43-46.
- 24) Wang, G.-X., M.-K. Tan, S. Rakshit, H. Saitoh, R. Terauchi, T. Imaizumi, T. Ohsako and T. Tominaga 2007. Discovery of single-nucleotide mutations in acetolactate synthase genes by Ecotilling. Pesticide Biochemistry and Physiology **88**, 143-148.
- 25) Wang G.-X., H. Watanabe, A. Uchino, and K. Itoh 2000. Response of a sulfonyleurea (SU) -resistant biotype of *Limnophila sessiliflora* to selected SU and alternative herbicides. Pestic. Biochem. Physiol. **68**, 59-66.
- 26) Whaley, C.M., H.P. Wilson, and J.H. Westwood 2006. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. Weed Sci. **55**, 83-90.
- 27) 吉田修一 2004. スルホニルウレア抵抗性水田雑草の簡易検定キットの開発. 日本植物調節剤研究協会東北支部会報 **39**, 3-6.
- 28) 吉田修一・小野寺和英・添田哲男・武田良和・佐々木捷二・星信幸・渡辺寛明 1999. 宮城県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の確認. 雑草研究 **44**(別), 70-71.

Distribution of sulfonyleurea-resistant biotypes of *Monochoria vaginalis* in Shizuoka Prefecture, Japan

Hidehiro Inagaki*, Toshiyuki Imaizumi**

Guang-Xi Wang** and Tohru Tominaga**

Summary

The distribution of *Monochoria vaginalis* biotypes that are resistant (R) to sulfonyleurea (SU) herbicides in Shizuoka Prefecture, Japan, was investigated by studying their rooting responses in an SU solution and analyzing the point mutation sites in the acetolactate synthase (ALS) genes. The SU-R biotypes of *M. vaginalis* were found to be distributed over a wide area in Shizuoka Prefecture. In this study, we have for the first time, discovered the substitution of proline (Pro₁₉₇) with threonine in

2 of these SU-R biotypes. The amino acid substitutions in the ALS genes of each SU-R biotype in the Izu area differed among the biotypes, although the SU-R biotypes were located merely within a distance of 1 km. The SU-R biotypes developed independently in each location. From these results, we conclude that the SU-R biotypes of *M. vaginalis* probably exist widely in rice paddy fields, where their dominance has not been previously reported.

Keywords: sulfonyleurea (SU) herbicides, resistant biotype, *Monochoria vaginalis*, acetolactate synthase, Shizuoka Prefecture

*Shizuoka Prefectural Research Institute of Agriculture and Forestry, Iwata, Shizuoka 438-0803, Japan

hidehiro1_inagaki@pref.shizuoka.lg.jp

**Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Kyoto 606-8502, Japan