

神奈川県におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性雑草の現状

聖代橋史佳・上西愛子・久保深雪¹⁾・野村研²⁾

The Current State of Sulfonylurea Resistant Paddy Weeds in Kanagawa

Fumika MIYOHASHI, Aiko KAMINISHI, Miyuki KUBO and Ken NOMURA¹⁾

摘 要

全国の水田でスルホニルウレア系除草剤 (SU 剤) 抵抗性雑草の発生が確認されている。神奈川県でも、水稻初期除草剤処理後に水田雑草の残存が認められることから、SU 剤抵抗性の生物検定を行った。その結果、本県各地の水田で発生しているコナギ、イヌホタルイ、オモダカに SU 剤抵抗性のバイオタイプが存在することが明らかになった。さらに、SU 剤の作用点であるアセト乳酸合成酵素 (ALS) 遺伝子の部分塩基配列を決定し、解析を行ったところ、コナギとイヌホタルイの SU 剤抵抗性は ALS 遺伝子の変異に起因するものと考えられた。一方、オモダカの SU 剤抵抗性については、ALS 遺伝子の変異に起因するものと、既存の SU 剤標的部位の変異に起因しないものがあると考えられた。また、ALS 活性を利用した迅速検定法は県内で発生する SU 剤抵抗性イヌホタルイの検定に有効であった。

キーワード：スルホニルウレア系除草剤抵抗性、アセト乳酸合成酵素、コナギ、イヌホタルイ、オモダカ

Summary

In Japan, sulfonylurea (SU) herbicides are widely used to control weeds in rice paddies. As a result, biotypes resistant to SUs (SU-R) have emerged in a dozen weed plants. In most cases, the resistance is due to changes in each species' ALS, resulting in reduced sensitivity to the herbicides. This type of resistance called target-site-based resistance (TSR). Acetolactate synthase inhibitor resistance also is caused by non-target-site-based resistance (NTSR) mechanisms. In this study, we found SU resistant paddy weeds by bioassay method (*Monochoria vaginalis*, *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla and *Sagittaria trifolia* L.) in Kanagawa. *M. vaginalis* and *S. juncooides* had amino acid substitutions. On the one hand, *S. trifolia* that show different mechanisms of cross-resistance to sulfonylureas related to TSR and NTSR.

Key words: sulfonylurea resistance, acetolactate synthase, *Monochoria vaginalis*, *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla, *Sagittaria trifolia* L.

緒 言

スルホニルウレア系除草剤 (SU 剤) は多くの雑草に対し非常に高い防除効果を持つ一方で、人畜に対する毒性が低く、1980 年代から水稻作の一発処理剤として広く利用されてきた。しかし、1996 年に日本国内で初めて SU 剤に抵抗性を示すミズアオイが北海道で報告されて以降 (古原ら 1996)、現在までに 22 種類の水田雑草で SU 剤抵抗性の発生が確認されている (内

野 2016)。神奈川県内の水田でも、水稻の初期除草剤処理後に一年生雑草のコナギ (*Monochoria vaginalis*)、また多年生雑草のイヌホタルイ (*Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla) とオモダカ (*Sagittaria trifolia* L.) などが残存し、多発する圃場が認められている。これら 3 種の雑草は主に肥料養分や光の競合によって水稻の収量減少をもたらす (宮原 1992)。伊藤 (2015) は国内で発生している SU 剤抵抗性雑草の中で、これら

¹⁾東京都府中市本宿町、²⁾現神奈川県政策局総合政策課

表1 PCR反応及びシーケンス反応に用いたプライマー配列

草種	遺伝子名	プライマー名	配列 (5' 3')
コナギ	<i>ALS1</i>	<i>ALS1</i> _459fw ^z	ATACGCGCGCTCCACTGGAA
		<i>ALS1</i> _1003rv ^z	TACCCATCAATGTACTCGCT
	<i>ALS3</i>	<i>ALS3</i> _448fw ^z	TCTGCATCGCCACCTCG
イヌホタルイ	<i>ALS1</i>	5' primer specific for <i>ALS1</i> ^y	CCCCACGCCTTACAA
		3' primer specific for <i>ALS1</i> ^y	GGTCAAACGACAAATTTCGCA
	<i>ALS2</i>	5' primer specific for <i>ALS2</i> ^y	CACCCGCACACCTTAT
		3' primer specific for <i>ALS2</i> ^y	GTCAAGTGATCCCTTCC
	<i>ALS1</i> 及び <i>ALS2</i>	ALS F4 ^y	ACTAGGATTCTAATGCC
ALS F6 ^y		GTTTGGGTGCCATGGGTTTC	
オモダカ	<i>ALS</i>	omoALS5 ^x	GCAGACCCTCCAC
		omoALS3 ^x	GGGAAACTAAGAGCGCA
		omoALS549 ^w	GTTTGCATTGCGACCTCTGG
		omoALS1365R ^w	GCTGCTCGTGTATTTTCGTCT
		omoALS1556 ^w	TAAGAAGCCCCGTAACCTGGC
		omoALS1740R ^w	TCTTGACAGGGAGGTTCTCA

^z Imaizumiら (2008) . ^y Uchinoら (2007) . ^x Iwakamiら (2014a) .

^w AB301496.1 (DDBJ/EMBL/GenBankアクセッション番号) に基づき、本研究で設計 .

3種を強害雑草として位置付けている。しかしながら、これまで本県ではSU剤抵抗性雑草についての詳細な調査は行われておらず、その発生状況は不明である。

SU剤はアセト乳酸合成酵素 (acetolactate synthase: ALS) に結合し、ALSが介する分岐鎖アミノ酸の合成経路を阻害することで殺草活性を示す除草剤である。雑草におけるSU剤抵抗性は、ALSの1アミノ酸置換により獲得される場合が多い (内野 2015)。この抵抗性は、作用点の変異によることから作用点抵抗性 (Target site resistance: TSR) と呼ばれる。また、タイヌビエやオモダカでは、作用点変異によらない抵抗性である非作用点抵抗性 (Non-target site resistance: NTSR) が確認されており、その抵抗性機構としてシトクロム P450 が関与する解毒代謝機能の向上が報告されている (Iwakamiら 2014b, 三浦ら 2012)。

雑草のSU剤抵抗性を検定する方法は、ポット試験 (汪 2001) や発根法 (Hamamuraら 2003, 村岡 2000)、地上部再生法 (大野ら 2004) などがあるが、結果が出るまでに早くとも1週間、遅ければ数か月を要する。内野ら (2007) は、アゼトウガラシ属の水田雑草やイヌホタルイ、コナギにおいて2, 3日で検定可能な迅速検定法を確立している。これは、アセト乳酸を代謝する酵素であるケトール酸リダクイソメラーゼ (ketol-acid reductoisomerase: KARI) の阻害剤である

1,1-cyclopropanedicarboxylic acid (CPCA) を利用して検定する方法で、マイクロチューブを用い、赤色の発色で簡単に判別ができる。本県においても、この検定法を活用することができれば、SU剤抵抗性雑草が発生した場合でも速やかに対応ができるようになると思われる。

そこで、適切な水田雑草の防除を行っていくために、県内各地の水田で繁茂するコナギ、イヌホタルイ、オモダカを採取し、SU剤抵抗性の生物検定を行うとともに、ALS遺伝子内の変異を調査することとした。また、イヌホタルイについては、迅速検定を用いたSU剤抵抗性の検定法を検討した。

試験1 コナギのSU剤抵抗性

材料及び方法

1. コナギにおけるSU剤抵抗性の生物検定

2010年に平塚市内のコナギの残草が認められる水田から土壌を収集し、水を張ったバット内で攪拌後、温室内で静置して雑草を発芽させた。幼植物体の生育を確認後にオキサジクロメホン・ベンスルフロンメチルを成分とする一発処理剤を所定の2倍量 (2 kg/10 a) で処理した。対照区には、上記成分に加えてSU剤抵抗性雑草に効果を持つとされるクロメプロップを含む除

草剤を処理した。

2. コナギの DNA 抽出

コナギの葉から全 DNA を Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 法 (Murray and Thompson 1980, 島本・佐々木 1997) により抽出した。凍結した葉を破砕機シェイクマスター (バイオメディカルサイエンス社) で破砕したのち、試料 300 mg に対し 0.8 ml の CTAB バッファーを加えて DNA 抽出を行った。抽出した DNA は 50 μ l の RNase を含む TE バッファー (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。

3. コナギの ALS 遺伝子の解析

PCR 反応は TaKaRa Ex Taq[®] (タカラバイオ社) を使用し、95 で 2 分の後、94 で 1 分、60 で 1 分、72 で 1 分の 35 サイクルとした。プライマーは Imaizumi ら (2008) に基づき、コナギの ALS1 遺伝子を増幅する *ALS1_459fw* 及び *ALS1_1003rv*、また ALS3 遺伝子を増幅する *ALS3_448fw* 及び *ALS3_1003rv* を用いた (表 1)。PCR 産物はアガロースゲルを用いて電気泳動した後、NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (マッハライ・ナーゲル社) で精製した。PCR で用いたものと同様のプライマーを使い、BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社) により反応させ、Genetic Analyzer 3130 (アプライドバイオシステムズ社) で部分塩基配列を決定した。SU 剤抵抗性のコナギで変異が報告されている ALS1 または ALS3 遺伝子の Pro₁₉₇ 部位について解析を行っ

た。

4. 県内各地域から収集したコナギの解析

2011 年に厚木市、座間市、愛川町、平塚市及び伊勢原市のコナギの多発生が認められる 16 カ所の水田からコナギを収集した。厚木市と平塚市から採取したコナギについては、オキサジクロメホン・ベンスルフロロンメチルを成分とする一発処理剤を所定の 2 倍量 (2 kg/10 a) で処理し、抵抗性の生物検定を行った。各圃場につき 3 個体から全 DNA を CTAB 法で抽出し、ALS1 遺伝子を増幅する *ALS1_459fw* 及び *ALS1_1003rv* と ALS3 遺伝子を増幅する *ALS3_448fw* 及び *ALS3_1003rv* を用いたダイレクトシーケンスで ALS1 及び ALS3 遺伝子内の塩基配列を調べた。

結 果

1. コナギの SU 剤抵抗性

2010 年に平塚市の水田からコナギを採取し、SU 剤に対する抵抗性の生物検定を行った。その結果、無処理区ではコナギの他にカヤツリグサなどの発生が見られた (図 1)。これに対し、ノビエに効果の高いオキサジクロメホンと SU 剤であるベンスルフロロンメチルの混合剤を処理した区において正常に生育するコナギが確認された。さらに、これらの 2 剤に加え、SU 剤抵抗性雑草に効果が高いとされるクロメプロップ剤を混合した剤を処理した区では雑草の生育は認められなかった。このことから、平塚市で採取したコナギには

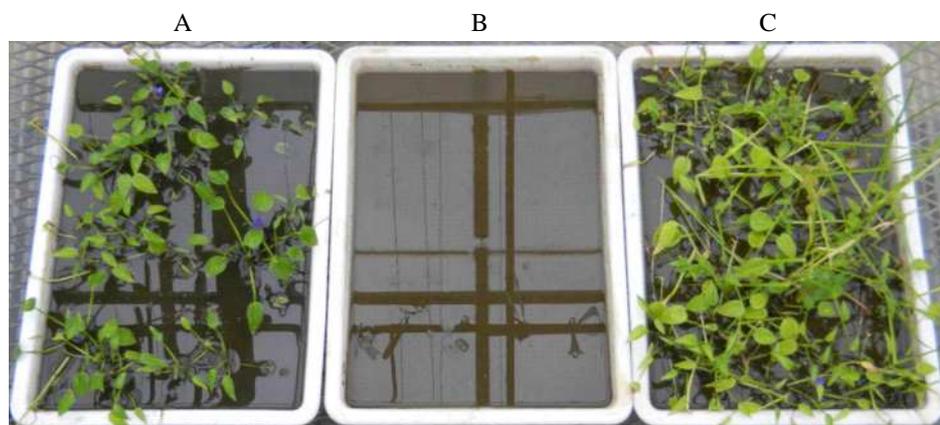


図1 コナギのSU剤抵抗性生物検定の結果

A: オキサジクロメホン・ベンスルフロロンメチル剤処理区

B: オキサジクロメホン・ベンスルフロロンメチル・クロメプロップ剤処理区

C: 無処理区

無処理区ではコナギの他にカヤツリグサなどの発生が認められた。

クロメプロップ剤には感受性だが、オキサジクロメホンとベンスルフロンメチルに対して抵抗性を示すバイオタイプが存在することが明らかになった。以降、オキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤を用いてSU剤抵抗性の生物検定を行うこととした。

2. コナギのALS遺伝子の変異

オキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤に抵抗性を示した平塚市のコナギのうち4個体から全DNAを抽出し、PCRでALS1及びALS3遺伝子を増幅し(図2)、部分塩基配列を決定した。ALS1遺伝子ではPro₁₉₇部位がSerに置換する1塩基変異のみが確認された(表2)。一方、ALS3遺伝子については、変異は認められなかった。このことから、平塚市で見つかったコナギのSU剤抵抗性に、ALS1遺伝子の変異が関与していると考えられた。

3. 県内各地域から収集したコナギの解析

県内各地の水田におけるSU剤抵抗性コナギの発生状況を調査するため、2011年に厚木市及び平塚市から採取したコナギにオキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤を処理した。その結果、正常に生育するコナギが確認され、SU剤に対して強い抵抗性を示すバイオタイプの存在が明らかになった。この2地域に加え、座間市、愛川町及び伊勢原市で収集したコナギについて、ALS遺伝子内の塩基配列を調べた。ALS1遺伝子のPro₁₉₇部位に変異のある個体が厚木市、愛川町、平塚市及び伊勢原市の10カ所の圃場で確認された(表3)。変異の種類としては、ProからSerへの変異が最も多く、7カ所の圃場で確認された。また、Alaへの変異が2カ所で、Leuへの変異が1カ所で認められた。調査したすべての個体でALS3遺伝子内に変異は認められなかった(データ省略)。

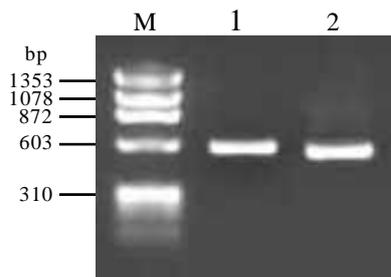


図2 PCRにより増幅したコナギのALS遺伝子
M: 分子量マーカー, 1: ALS1遺伝子, 2: ALS3遺伝子

試験2 イヌホタルイのSU剤抵抗性

材料及び方法

1. イヌホタルイにおけるSU剤抵抗性の生物検定

2012年に神奈川県厚木市、愛川町、平塚市、小田原市及び南足柄市でイヌホタルイの残草が認められる水田から土壌を収集し、水を張ったバット内で攪拌後に温室内で静置して雑草を発芽させた。幼植物体の生育を確認後にオキサジクロメホン・ベンスルフロンメチルを成分とする一発処理剤を所定の2倍量(2 kg/10 a)で処理し、SU剤抵抗性の生物検定を行った。

2. イヌホタルイにおけるSU剤抵抗性の迅速検定

内野ら(2007)の方法に従って実験を実施した。4 mlの処理液(25% ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類, 500 µM 1,1-cyclopropanedicarboxylic acid, 10 mM ピルビン酸ナトリウム)を入れた14 ml ラウンドチューブを用意し、無処理区とSU剤である75%チフェンスルフロンメチル水和剤(100 ng/ml)区を設けた。1, 2本の花茎を2から5 mm程度に細断し、処理液に浸した。30℃, 12時間日長で2日間静置した後、試料を-80℃に凍結保存した。150または300 µlの蒸留水を入れて凍結保存試料を浸し、60℃で5分間静置した後、常温で45分間置いた。100 µlの上清に10 µlの5%(v/v) H₂SO₄を加え、60℃で30分間静置した。50 µlの0.5%(w/v)クレアチン溶液と50 µlの5%(w/v)1-ナフトール溶液を加え、37℃で30分間置いた後、赤色の発色により抵抗性の検定を行った。

3. イヌホタルイのDNA抽出

イヌホタルイの花茎から全DNAをCTAB法により抽出した。凍結した花茎は、破砕機シェイクマスターで破砕したのち、試料20 mgに対し0.3 mlのCTABバ

表2 平塚市から採取したコナギのALS1及びALS3遺伝子内の塩基配列と推定アミノ酸残基(Pro₁₉₇部位)

バイオタイプ	ALS1		ALS3	
	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸
感受性	CCT	Pro	CCT	Pro
抵抗性	TCT	Ser	CCT	Pro
	TCT	Ser	CCT	Pro
	TCT	Ser	CCT	Pro
	TCT	Ser	CCT	Pro

表3 県内各地から採取したコナギのALS1遺伝子内の塩基配列と推定アミノ酸残基

採取地	バイオタイプ	Pro ₁₉₇ 部位		検出箇所数
		塩基配列	アミノ酸	
厚木市	抵抗性	TCT	Ser	3
	抵抗性	GCT	Ala	2
	感受性	CCT	Pro	2
座間市	感受性	CCT	Pro	1
愛川町	抵抗性	TCT	Ser	1
平塚市	抵抗性	TCT	Ser	2
	抵抗性	CTT	Leu	1
	感受性	CCT	Pro	2
伊勢原市	抵抗性	TCT	Ser	1

結果

1. イヌホタルイのSU剤抵抗性

2012年に厚木市、愛川町、平塚市、小田原市及び南足柄市の水田からイヌホタルイを採取し、オキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤に対する抵抗性の生物検定を行った。その結果、無処理区ではすべての地域において、イヌホタルイの発生が確認された他、コナギやノビエ、アゼナ等が発生した(図3)。これに対し、厚木市と平塚市のオキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤処理区では、正常に生育するイヌホタルイが認められた。このことから、厚木市と平塚市のイヌホタルイにSU剤抵抗性のバイオタイプが存在することが明らかになった。愛川町、小田原市及び南足柄市から採取したイヌホタルイにSU剤に抵抗性

ッファーを加えてDNA抽出を行った。抽出したDNAは50 µlのRNaseを含むTEバッファーに溶解した。

4. イヌホタルイのALS遺伝子の解析

PCR反応はTaKaRa Ex Taq®を使用し、94℃を3分の後、94℃を30秒、55℃を30秒、72℃を1分の35サイクルとした。プライマーはUchinoら(2007)に基づき、イヌホタルイのALS1遺伝子を増幅する5' primer specific for ALS1及び3' primer specific for ALS1、またALS2遺伝子を増幅する5' primer specific for ALS2及び3' primer specific for ALS2を用いた(表1)。厚木市と平塚市で採取したイヌホタルイのPCR産物はアガロースゲルを用いて電気泳動した後、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-upで精製し、pTAC-1ベクター(バイオダイナミクス社)またはpT7Blue(ノバジェン社)に挿入後、DH5α(タカラバイオ社)にクローニングした。Uchinoら(2007)に基づき、イヌホタルイのALS遺伝子のSU剤標的部位として報告されているPro₁₉₇部位またはTrp₅₇₄部位を検出できるプライマーとしてALSF4とALSF6を使い(表1)、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitにより反応させ、Genetic Analyzer 3130で部分塩基配列を決定した。愛川町と小田原市で採取したイヌホタルイについては、ALSF4またはALSF6プライマーを用いて、ALS遺伝子の部分塩基配列をダイレクトシーケンスで調べた。SU剤抵抗性のイヌホタルイで変異が報告されているALS1またはALS2遺伝子のPro₁₉₇部位及びTrp₅₇₄部位について解析を行った。

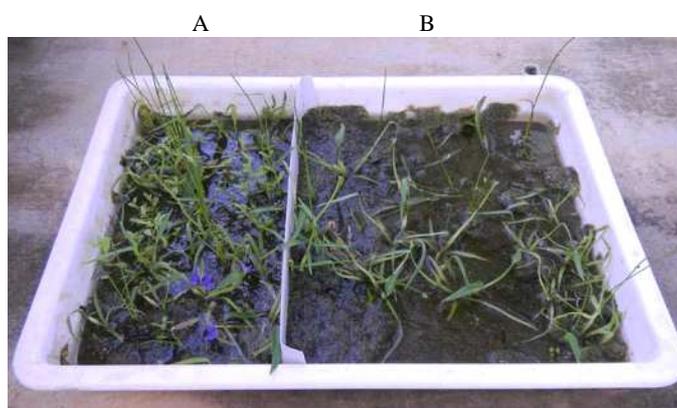


図3 イヌホタルイのSU剤抵抗性生物検定の結果
A: 無処理区
B: オキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤処理区
無処理区ではイヌホタルイ他にコナギやノビエ、アゼナなどの発生が認められた。

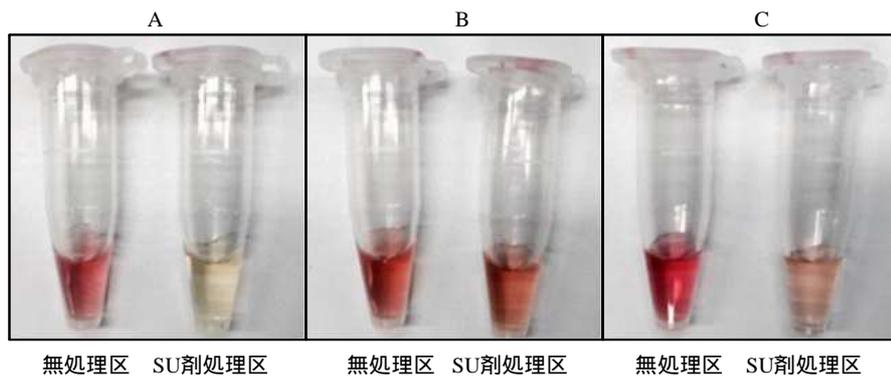


図4 イヌホタルイにおける迅速検定法を用いたSU剤抵抗性の検定結果
 A：感受性バイオタイプ，B：抵抗性バイオタイプ（厚木市），C：抵抗性バイオタイプ（平塚市）
 左は無処理区，右はSU剤（チフェンスルフロンメチル剤）処理区。
 感受性バイオタイプではSU剤処理によって赤色の発色が阻害されたが，抵抗性バイオタイプでは無処理区と同じように赤色に発色した。

を示すバイオタイプは検出されなかった。

2. イヌホタルイの迅速検定

SU 剤の一種であるチフェンスルフロンメチル剤を用いた迅速検定法を行ったところ，感受性バイオタイプでは除草剤処理によって赤色の発色が阻害された（図 4）。それに対し，厚木市及び平塚市で採取した抵抗性バイオタイプでは発色は阻害されず，無処理区と同じように赤色の発色が認められた。このことから，この迅速検定法で生物検定と同様に本県で発生するSU 剤抵抗性のイヌホタルイを検出できることが示された。

3. イヌホタルイの ALS 遺伝子の変異

イヌホタルイの ALS1 及び ALS2 遺伝子の部分塩基配列を調べた。厚木市で採取した系統で，ALS1 遺伝子の Pro₁₉₇ 部位が Ser に変異しているバイオタイプが見つかった（表 4）。平塚市から採取した系統では，ALS2 遺伝子の Pro₁₉₇ 部位が Ser へ変異していた。どちらの系統も Trp₅₇₄ 部位に変異は認められなかった。このことから，今回，本県で見つかったイヌホタルイの

SU 剤抵抗性は，ALS1 または ALS2 遺伝子の Pro₁₉₇ 部位の変異に起因すると考えられた。また，愛川町及び小田原市から採取した感受性イヌホタルイの ALS 遺伝子の Pro₁₉₇ 部位及び Trp₅₇₄ 部位に変異は認められなかった（データ省略）。

試験 3 オモダカの SU 剤抵抗性

材料及び方法

1. オモダカにおける SU 剤抵抗性の生物検定

2012 年から 2013 年にかけて，神奈川県厚木市，座間市，愛川町，平塚市，伊勢原市，南足柄市及び開成町の水田で残存していたオモダカを収集し，水を張ったバット内で塊茎から再生させた。幼植物体の生育を確認後にオキサジクロメホン・ベンスルフロンメチルを成分とする一発処理剤を所定の 2 倍量（2 kg/10 a）で処理し，SU 剤抵抗性の生物検定を行った。

2. オモダカの DNA 抽出

座間市，平塚市，伊勢原市及び開成町の水田で採取

表4 厚木市及び平塚市から採取したイヌホタルイのALS1及びALS2遺伝子内の塩基配列と推定アミノ酸残基（Pro₁₉₇部位，Trp₅₇₄部位）

採取地	バイオタイプ	ALS1				ALS2			
		Pro ₁₉₇ 部位		Trp ₅₇₄ 部位		Pro ₁₉₇ 部位		Trp ₅₇₄ 部位	
		塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸
厚木市	感受性	CCT	Pro	TGG	Trp	CCT	Pro	TGG	Trp
	抵抗性	TCT	Ser	TGG	Trp	CCT	Pro	TGG	Trp
平塚市	感受性	CCT	Pro	TGG	Trp	CCT	Pro	TGG	Trp
	抵抗性	CCT	Pro	TGG	Trp	TCT	Ser	TGG	Trp

したオモダカの葉から全 DNA を CTAB 法により抽出した。凍結した葉は、破砕機シェイクマスターで破砕したのち、試料 50 mg に対し 0.6 ml の CTAB バッファーを加えて DNA 抽出を行った。抽出した DNA は 50 µl の RNase を含む TE バッファーに溶解した。

3. オモダカの ALS 遺伝子の解析

PCR 反応は Tks Gflex™ DNA Polymerase (タカラバイオ社)を用い,94 を 1 分の後,98 を 10 秒,50 を 15 秒,68 を 2 分 30 秒の 45 サイクルとした。プライマーは Iwakami ら (2014a) に基づき、オモダカの ALS 遺伝子を増幅する omoALS5'及び omoALS3'を用いた(表 1)。PCR 産物はアガロースゲルを用いて電気泳動した後、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up で精製した。ALS 遺伝子(DDBJ/EMBL/GenBan アクセション番号: AB301496.1)の SU 剤標的部位として報告されている 8 箇所を検出できるプライマーとして、omoALS549, omoALS1556, omoALS1365R, omoALS1740R を設計した(表 1)。これらと PCR でも用いた omoALS5'と omoALS3'を使い、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit により反応させ、Genetic Analyzer 3130 で部分塩基配列を決定した。SU 剤抵抗性の雑草で変異が報告されている ALS 遺伝子

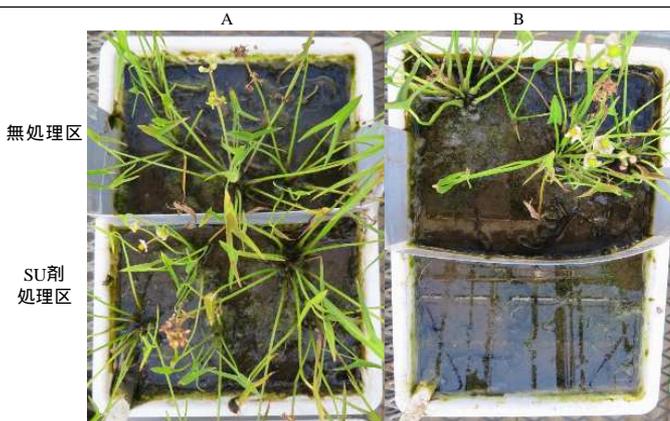


図5 オモダカのSU剤抵抗性生物検定の結果
A: 抵抗性バイオタイプ(伊勢原市A地点)
B: 感受性バイオタイプ(伊勢原市A地点)
上段は無処理区
下段はオキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤

の 8 つの部位について解析を行った。

結果

1. オモダカの SU 剤抵抗性

2012 年から 2013 年にかけて、厚木市、座間市、愛川町、平塚市、伊勢原市、南足柄市及び開成町の水田からオモダカを採取し、オキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤に対する抵抗性の生物検定を行った。その結果、無処理区ではすべての地域において、オモ

表5 県内各地から採取したオモダカのALS遺伝子内の塩基配列と推定アミノ酸残基

採取地	バイオタイプ	Ala ₁₂₂ 部位		Pro ₁₉₇ 部位		Ala ₂₀₅ 部位		Asp ₃₇₆ 部位	
		塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸
座間市 地点A	抵抗性	GCG	Ala	CCC/TCC	Ser/Pro	GCC	Ala	GAT	Asp
座間市 地点B	抵抗性	GCG	Ala	CCC	Pro	GCC	Ala	GAT	Asp
座間市 地点C	抵抗性	GCG	Ala	CCC	Pro	GCC	Ala	GAT	Asp
	抵抗性	GCG	Ala	CCC	Pro	GCC	Ala	GAT	Asp
平塚市	感受性	GCG	Ala	CCC	Pro	GCC	Ala	GAT	Asp
伊勢原市 地点A	抵抗性	GCG	Ala	CCC	Pro	GCC	Ala	GAT	Asp
伊勢原市 地点B	感受性	GCG	Ala	CCC	Pro	GCC	Ala	GAT	Asp
開成町	抵抗性	GCG	Ala	CCC	Pro	GCC	Ala	GAT	Asp

採取地	バイオタイプ	Arg ₃₇₇ 部位		Trp ₅₇₄ 部位		Ser ₆₅₃ 部位		Gly ₆₅₄ 部位	
		塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸	塩基配列	アミノ酸
座間市 地点A	抵抗性	CGC	Arg	TGG	Trp	AGT	Ser	GGA	Gly
座間市 地点B	抵抗性	CGC	Arg	TGG	Trp	AGT	Ser	GGA	Gly
座間市 地点C	抵抗性	CGC	Arg	TGG	Trp	AGT	Ser	GGA	Gly
	抵抗性	CGC	Arg	TGG	Trp	AGT	Ser	GGA	Gly
平塚市	感受性	CGC	Arg	TGG	Trp	AGT	Ser	GGA	Gly
伊勢原市 地点A	抵抗性	CGC	Arg	TGG	Trp	AGT	Ser	GGA	Gly
伊勢原市 地点B	感受性	CGC	Arg	TGG	Trp	AGT	Ser	GGA	Gly
開成町	抵抗性	CGC	Arg	TGG	Trp	AGT	Ser	GGA	Gly

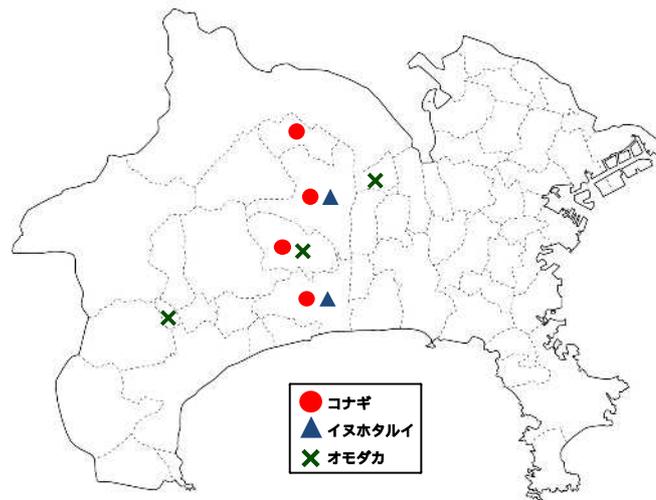


図6 神奈川県におけるSU剤抵抗性雑草の発生状況

ダカの発生が確認された(図5)。これに対し、オキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤を処理した座間市の3地点、伊勢原市の1地点、開成町の1地点で正常に生育するオモダカが認められた。このことから、座間市、伊勢原市及び開成町のオモダカにSU剤抵抗性のバイオタイプが存在することが明らかになった。一方で、厚木市、愛川町、平塚市、南足柄市から採取したオモダカにはSU剤に抵抗性を示すバイオタイプは検出されなかった。

2. オモダカのALS遺伝子の変異

オモダカのALS遺伝子内の部分塩基配列を調べた。座間市から採取した系統で、Pro₁₉₇部位がヘテロでSerに変異しているバイオタイプが見つかった(表5)。これに対し、座間市の他の2地域と平塚市、伊勢原市、開成町から採取したオモダカのALS遺伝子については、SU剤標的部位として報告されている8箇所(Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Ala₂₀₅, Asp₃₇₆, Arg₃₇₇, Trp₅₇₄, Ser₆₅₃, Gly₆₅₄)に変異は認められなかった(表5)。このことから、オモダカにおけるSU剤抵抗性は、ALS遺伝子のPro₁₉₇部位における1塩基変異に起因するものと、既存のSU剤標的部位の変異に起因しないものがあると考えられた。

総合考察

神奈川県内の主要な地域の水田において、水稻初期除草剤処理後もコナギ、イヌホタルイ、オモダカなどの草種が残存する場合があることが報告されており、

SU剤抵抗性雑草の発生が懸念されていた。そこで、これら3種類の水田雑草が多発する水田から土壌を採取し、育成した植物にオキサジクロメホン・ベンスルフロンメチル剤を処理し、SU剤抵抗性の生物検定を行った。その結果、本県において、これらの水田雑草にSU剤抵抗性のバイオタイプが発生していることが明らかになった。また、内野ら(2007)が提唱するALS活性を利用した迅速検定法について検討したところ、生物検定の結果と一致したことから、この方法が県内で発生するSU剤抵抗性イヌホタルイの検定に有効であると示された。今後はイヌホタルイ以外の草種についても適用性を確認する必要があると考えられる。

本試験で確認されたSU剤抵抗性のコナギでは、ALS1遺伝子のPro₁₉₇部位に変異が生じていた。近年、コナギのSU剤抵抗性はALS1及びALS5(t)遺伝子に変異が生じるタイプとALS3遺伝子及びALS5(t)遺伝子に変異が生じるタイプがあることが知られており、SU剤抵抗性を獲得するのに2遺伝子が同時に変異する必要があると考えられている(伊藤ら2012)。このことから、本県で見つかったコナギもALS1遺伝子の変異だけではなく、ALS5(t)遺伝子に変異を有する可能性があると考えられる。

本試験で確認されたSU剤抵抗性のイヌホタルイは、ALS1またはALS2遺伝子に変異が認められた。定(2015)によると、イヌホタルイのTSRの出現頻度には特徴があり、ALS1及びALS2遺伝子ともにPro₁₉₇

部位が Ser に変異するものが最多とされる。本県で確認された SU 剤抵抗性イヌホタルイもこのタイプであった。また、他県で報告されている Pro₁₉₇Ser のバイオタイプは、ベンスルフロンメチルの他にイマゾスルフロンに対しても強い抵抗性を示す一方で、同じ SU 剤であるメトスルフロンメチルや ALS を標的にするイミダゾリン系のイマザキンに対しては大きな抵抗性を示さない (Uchino ら 2007, Sada ら 2013a)。イヌホタルイの SU 剤抵抗性の表現型は作用点変異からの予想性が高く (定 2015)、本県で見つかったバイオタイプも同様の傾向を示す可能性がある。イヌホタルイでは、今回調べた Pro₁₉₇ や Trp₅₇₄ 部位の変異の他にも、Asp₃₇₆Glu が見つかっており (Sada ら 2013b)、今後試験を行う際には調査する必要があると考えられる。

本県で確認された SU 剤抵抗性オモダカは、ALS 遺伝子の変異に起因するものと、既存の SU 剤標的部位の変異に起因しないものがあると考えられた。オモダカの SU 剤抵抗性では、TSR だけではなく、NTSR も比較的高い割合で存在するとされている (内野 2015)。Iwakami ら (2014a) によると、NTSR を示すオモダカは、ベンスルフロンメチル剤には抵抗性だが、同じ SU 剤であるピラゾスルフロンエチルには感受性を示す。また、ベンスルフロンメチルの吸収量が少なく、シトクロム P450 による解毒代謝機能の向上が認められている (三浦ら 2012)。本県で発生する非作用点抵抗性バイオタイプも同様の作用機構が働いている可能性があると考えられた。

本研究では、コナギは調査した 5 地域のうち 3 市 1 町で、イヌホタルイは 5 地域のうち 2 市で、オモダカは 7 地域のうち 2 市 1 町で SU 剤抵抗性の発生が認められ (図 6)、県内各地に SU 剤抵抗性を有する雑草が存在することが明らかになった。また将来、コナギ、イヌホタルイ、オモダカ以外の草種でも SU 剤抵抗性のバイオタイプが県内で発生する可能性は十分考えられる。SU 剤抵抗性の雑草に対しては、迅速検定などを活用し、早期に発見して直ちに適切な防除を行う必要がある。今後、SU 剤抵抗性が疑われる水田雑草が発生した場合には、SU 剤抵抗性雑草に対して効果があるとされる除草剤を選択し防除を行うことが重要である。日本植物調節剤研究協会のホームページでは、

「SU 剤抵抗性雑草について実用化可能と判定された除草剤」の情報を公開しており、特に今回、SU 剤抵抗性が確認された地域ではこれらの情報を参考に SU 剤の連用を防いでいく必要がある。また、一発処理剤で抑えきれない場合には中期剤を使い、SU 剤抵抗性雑草の拡大を防ぐとともに、同一成分の除草剤を長期連用はしないよう注意し、SU 剤以外の成分に対する抵抗性雑草の発生を防ぐことも不可欠である。

(謝 辞)

本報告を作成するにあたり、公益財団法人日本植物調節剤研究協会関東支部長の大嶋保夫氏には、御校閲の労をとっていただいた。ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

- 古原洋・山下英雄・山崎信弘. 1996. 北海道における水田雑草ミズアオイのスルホニルウレア系除草剤抵抗性. 雑草研究 41 (別): 236-237.
- Hamamura. K., T. Muraoka, 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 Biology and Management 3: 242-246.
- Imaizumi. T., G. - X. Wang, T. Ohsako and T. Tominaga. 2008. Genetic diversity of sulfonylurea-resistant and -susceptible *Monochoria vaginalis* populations in Japan. Weed Research 48: 187-196.
- 伊藤一幸. 2015. 除草剤抵抗性雑草の出現における歴史側面. 農業および園芸. 養賢堂. 90(1): 111-119.
- 伊藤達也・汪光熙・劉士平・小澤友理子・富永達. 2012. ALS 遺伝子ファミリーの 1 遺伝子における変異で SU 剤抵抗性が獲得されるか?—ミズアオイとコナギを例に—. 雑草研究 51(別): 26.
- Iwakami, S., H. Watanabe, T. Miura, H. Matsumoto and A. Uchino. 2014a. Occurrence of sulfonylurea resistance in *Sagittaria trifolia*, a basal monocot species, based on target-site and non-target-site

- resistance. *Weed Biology and Management* 14: 43-49.
- Iwakami, S., M.Endo, H.Saika, J.Okuno, N.Nakamura, M.Yokoyama, H.Watanabe, S.Toki, A.Uchino and T.Inamura. 2014b. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Physiology* 165: 618-629.
- 三浦斗夢・春原由香里・内野彰・松本宏. 2012. アセト乳酸合成酵素遺伝子に変異を持たないオモダカにおけるベンスルフロンメチル抵抗性機構. *雑草研究* 57(別): 128.
- 宮原益次. 1992. 水田雑草の生態とその防除 水稲作の雑草と除草剤解説 . 全国農村教育協会: pp. 38-40, 53-58, 71-77.
- 村岡哲郎. 2000. イヌホタルイの発根への影響を利用したスルホニルウレア抵抗性の簡易検定法. *植調* 34: 67-71.
- Murray, M., G., and Thompson, W., F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4326.
- 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., H. Ikeda and S. Kizawa. 2013a. Resistance levels of sulfonylurea-resistant *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla with various Pro₁₉₇ mutations in acetolactate synthase to imazosulfuron, bensulfuron-methyl, metsulfuron-methyl and imazaquin-ammonium. *Weed Biology and Management* 13: 53-61.
- Sada, Y., H. Ikeda, S.Yamato and S. Kizawa. 2013b. Characterization of sulfonylurea-resistant *Schoenoplectus juncooides* having a target-site Asp₃₇₆ Glu mutation in the acetolactate synthase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107 (1): 106-111.
- 定由直. 2015. 水田雑草イヌホタルイの除草剤抵抗性. *農業および園芸*. 養賢堂. 90(1): 154-164.
- 島本功・佐々木卓治. 1997. 新版植物のPCR 実験プロトコール. 秀潤社: pp. 34-37.
- 内野彰・尾形茂・渡邊寛明. 2007. 数種水田雑草におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性迅速検定法の改良. *東北の雑草* 7: 27-31.
- Uchino, A., S.Ogata, H.Kohara, S.Yoshida, T.Yoshioka and H.Watanabe. 2007. Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea-resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*. *Weed Biology and Management* 7: 89-96.
- 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*. 養賢堂. 90(1): 174-180.
- 内野彰. 2016. これまでに日本で除草剤抵抗性が報告されている雑草. 除草剤抵抗性雑草研究会ホームページ. <http://www.wssj.jp/~hr/weeds.html>. 2016.8.29 閲覧.
- 汪光熙. 2001. 雑草科学実験法. 日本雑草学会編: pp. 362-363.