

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

内野 彰*・尾形 茂**・渡邊寛明*

Improvement of the rapid diagnosis of sulfonylurea resistance in several paddy weeds

Akira Uchino*, Shigeru Ogata** and Hiroaki Watanabe*

キーワード：除草剤抵抗性，スルホニルウレア系除草剤，アセト乳酸合成酵素，ALS，水田雑草

はじめに

スルホニルウレア系除草剤 (SU 剤) に対して抵抗性を持つ SU 抵抗性バイオタイプが数多くの水田雑草で見つかっており (内野 2003), 特にアゼトウガラシ属の水田雑草 (アゼナ, アメリカアゼナ, タケトアゼナ, アゼトウガラシ) やイヌホタルイ, コナギでその確認事例が多くなっている (内野ら 2005, 児嶋 2005)。

抵抗性バイオタイプの検定法としては発根法 (村岡 2000; Hamamura *et al.* 2003) や地上部再生法 (大野ら 2004) などが報告されているが, 少量の植物片から迅速に抵抗性を検定する方法としてアセト乳酸合成酵素 (ALS) の *in vivo* assay 法を利用した迅速検定法がある (Gerwick *et al.* 1993; 内野 1999)。この方法は植物体を残したまま検定できる点, 多数の検体を短時間で検定できる点が長所となっており, 抵抗性雑草の後代の解析や分布調査などに極めて有用な検定手法となっている。

筆者らは以前, アゼトウガラシ属水田雑草の迅速検定法について紹介しているが (内野 1999), その後, 更にこの方法に改良を加え, 現在ではイヌホタルイとコナギも対象とした安定した検定手法を確立している。本稿では, 改良した部分も含めて迅速検定法の原理と手順についてあらためて紹介する。

検定法の原理

SU 剤の作用点は ALS であり, この検定法は SU 剤による ALS の活性阻害を *in vivo* assay 法を利用して視覚的に確認するというものである (Gerwick *et al.* 1993)。ALS によって生成されたアセト乳酸は ketol-acid reductoisomerase (KARI) によって代謝されるが, KARI の阻害剤 (1, 1-cyclopropane dicarboxylic acid) を処理するとアセト乳酸が代謝されず植物体内に蓄積する (第 1 図)。このアセト乳酸の蓄積量が ALS 活性に比例して増加するため, その蓄積量を定量することで ALS 活性の測定が可能となる。アセト乳酸はアセトインに変換すると比色分析で赤色に発色させることができ, これを利用すると ALS の活性を赤色の発色として視覚的に確認することができる。

実際の抵抗性検定では, 各試料につき無処理区と SU 剤処理区を用意して赤色の発色を調べる。無処理区で赤色の発色があり SU 剤処理区で発色がなければ, SU 剤によって ALS 活性が阻害されていると判断でき, SU 感受性バイオタイプと診断される。無処理区と SU 剤処理区とで同じように赤色の発色があれば, SU 剤によって ALS 活性が阻害されていないと判断でき, SU 抵抗性バイオタイプと診断される。

この方法で重要なのは, 無処理区で強い赤色の発色が得られる実験系を確立することである。無処理区の発色

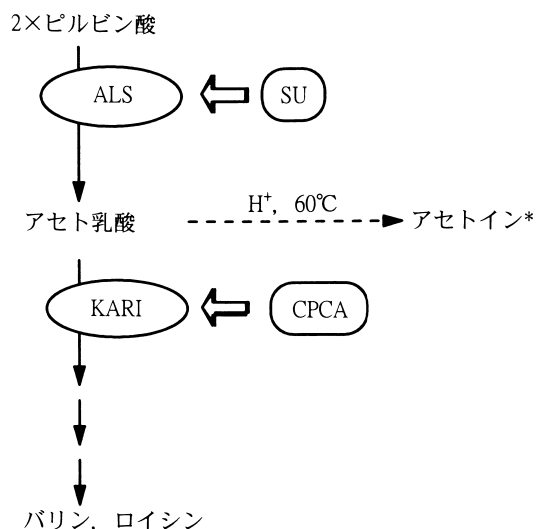
* 東北農業研究センター 〒014-0102 秋田県大仙市四ツ屋字下古道 3

National Agricultural Research Center for Tohoku Region, Yotsuya, Daisen, Akita 014-0102, Japan

現在: 中央農業総合研究センター 〒305-8666 茨城県つくば市観音台 3-1-1

Present address: National Agricultural Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

** 岩手県農業研究センター 現在: 岩手県大船渡農業改良普及センター



第1図 バリン、ロイシンの生合成経路の流れとSU剤抵抗性検定法の原理

ALS; アセト乳酸合成酵素 (Acetolactate synthase), KARI; Ketol-acid reductoisomerase, SU; スルホニルウレア系除草剤, CPCA; 1,1-cyclopropanedicarboxylic acid, ⇐; 阻害効果を示す。
*アセトインは比色分析で赤色に発色する。

が不明瞭であれば、SU剤処理による阻害効果を判定することができない。従って、無処理区で高いALS活性が検出できるよう、下記に記すように検定試料や処理条件などに注意することが重要となる。

実際の検定手順

検定の手順は、(1)対象雑草の試料について試薬・除草剤処理を行う(第1表)、(2)処理試料からアセト乳酸を抽出して比色分析を行う(第2表)、という順になる。

1. 試薬処理

処理溶液を調製して試験管に分注し、雑草の葉(花茎)を切り取って入れ、約2日間、明条件で静置する(第1表)。この間に、試料のALS活性に依存して植物組織内にアセト乳酸が蓄積する。一つの試料に対して2本の試験管を用意し、片方にSU剤を加える。

両方に加える処理溶液の組成は25%ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類, 500 μ M 1, 1-cyclopropane dicarboxylic acid, 10mMピルビン酸ナトリウムとする。この処理溶液は冷凍保存が可能であり、あらかじめ調製して小分けしたものを冷凍保存しておけば毎回調製する手間が省ける。筆者らの研究室では、4倍濃度の溶液を1Lで調製した後に50mLずつに小分けして冷凍保存し、使用時に必要量を溶かして蒸留水で4倍に薄めて使用している。また、ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類は市販の混合品(ムラシゲスクーグ植物培地用混合塩類, 和光純薬工業な

第1表 試薬処理の手順

- (1) 1サンプルにつき2本の15ml試験管を用意し、4mlの処理溶液*を入れる。
- ↓
- (2) 2本の試験管の片方に除草剤**を加える。
- ↓
- (3) 各試験管に30~60mgの検定試料を入れ***, 30°C明条件で2日間(40-55時間程度)静置する。
- ↓
- (4) 試験管から試料を取り出し、冷凍保存する。

* 処理溶液

25% ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類
500 μ M 1, 1-cyclopropanedicarboxylic acid
10mM ピルビン酸ナトリウム

**SU剤処理区では、試験管内で100ng/mlとなるように、10mg/Lに調製した75%チフェンスルフロメチル水和剤(ハーモニー75DF水和剤, デュポン)を40 μ L加える。

***アゼトウガラシ属水田雑草では成長点を含む茎頂部及び幼葉2~4枚, イヌホタルイでは花茎上部約10cmを1~2本, コナギでは未展開葉1~2枚を試料とする。イヌホタルイは花茎を3~5mmに切断する。検定試料は生育の旺盛な個体から採取し、採取後直ちに試薬処理を行う。

第2表 アセト乳酸の抽出と比色分析

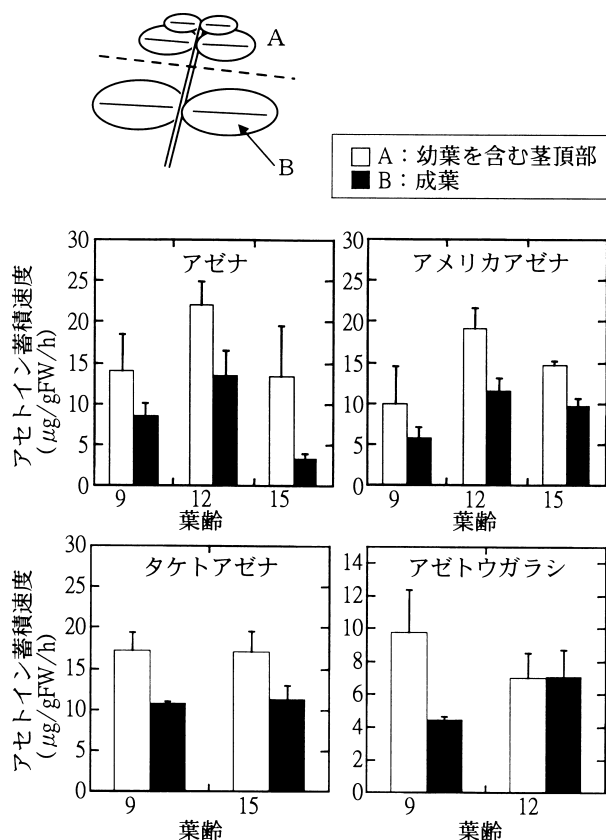
- (1) 1.5mlチューブに300 μ lの蒸留水を入れて凍結保存試料を浸し、60°Cで5分間静置する。
- ↓
- (2) 常温で45分間静置する。
- ↓
- (3) 試料が入らないように100 μ lとり、新たな1.5mlチューブに移す。
- ↓
- (4) 10 μ lの5%(v/v)H₂SO₄を加え、60°Cで30分間静置する。
- ↓
- (5) 50 μ lの0.5%(w/v)クレアチン溶液と50 μ lの5%(w/v)1-ナフトール溶液*を順に加える。
- ↓
- (6) 37°Cで30分間静置し、赤色の発色により抵抗性を検定する**。

*1-ナフトールは2.5N NaOH溶液に溶かして5%(w/v)溶液とする。また、使用前に調製する。

**無処理区で赤色の発色がない場合は再検定が必要。SU剤処理区で赤色の発色があれば抵抗性、なければ感受性と判定する。

ど)を使用すると調製が容易にできる。以前の方法(内野1999; Uchino *et al.* 1999)ではピルビン酸を加えていなかったが、ALSの基質となるピルビン酸を加えることで、より強い発色が得られるようになる(Uchino & Watanabe 2007; 内野・渡邊2007)。

検定に使用するSU剤には、市販のチフェンスルフロ

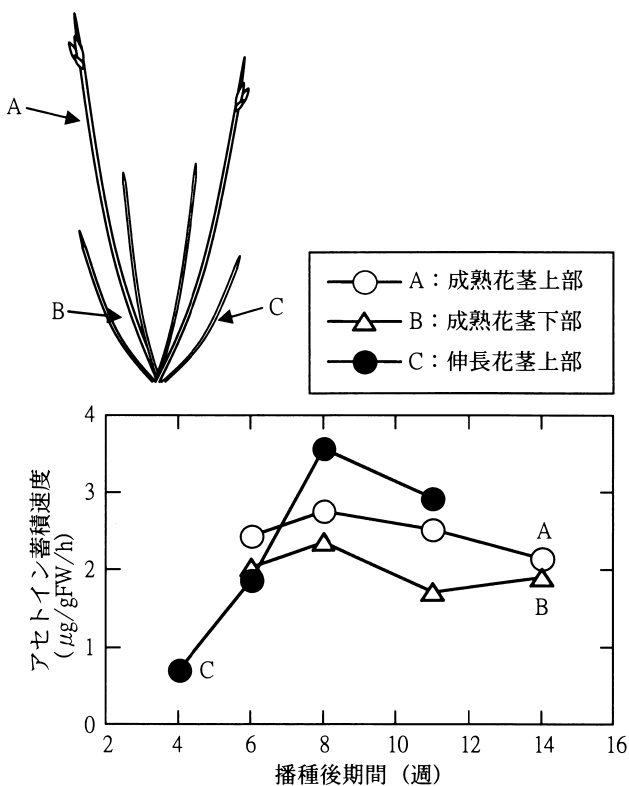


第2図 アゼトウガラシ属水田雑草の異なる部位における発色の差異
アセトインの蓄積速度で発色程度を表示した。

ンメチル 75%水和剤（ハーモニー 75DF 水和剤，デュボン）を使用する。ハーモニーは畑用の除草剤商品であるが，他の有効除草剤成分が混合されていないため，任意の濃度のSU剤溶液を調製することができる。チフェンスルフロンメチル 75%水和剤の濃度を 100ng/ml になるよう調製すると感受性ではアセトインの蓄積による発色がほとんど見られず，抵抗性との差異が明確に区別できる。ただしアゼナの感受性個体については，この濃度で薄い発色が見られる場合があるため，1μg/ml で検定するのがよい。検定に使用するSU剤にチフェンスルフロンメチル以外の化合物（例えばペンシルフロメチルなど）を使用する場合は，適切な処理濃度が異なると予想されるので，処理濃度の再検討が必要である。

原著 (Gerwick *et al.* 1993) では溶液の葉への浸透性を高めるために界面活性剤 (0.025% Triton X-100) を処理溶液に加えているが，水田雑草の場合は原著の濃度で界面活性剤を加えると葉の周辺部が白化して損傷がみられる場合がある。水田雑草の場合は界面活性剤を加えなくても検定に問題はない。

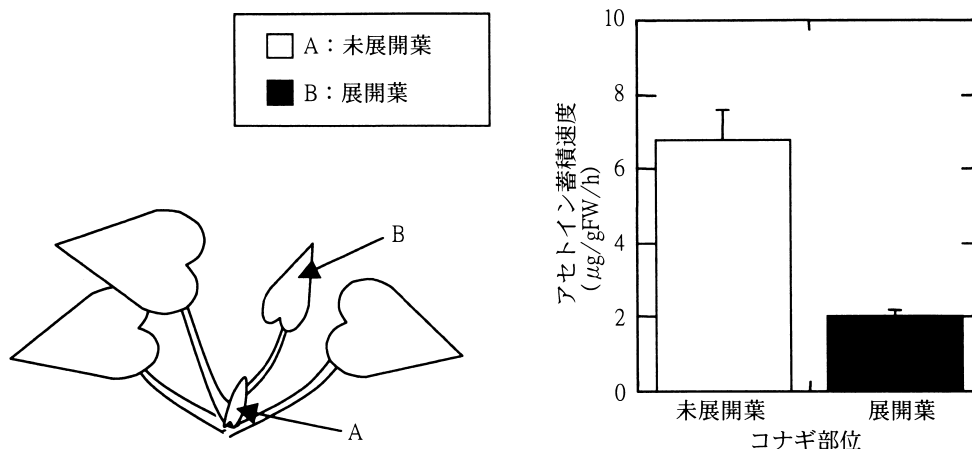
ALS は一般に，代謝活性の高い分裂組織で高い活性を示すとされる (Duggleby *et al.* 2000)。従って検定試料としては，どの草種でも成長が盛んな時期の個体から旺盛



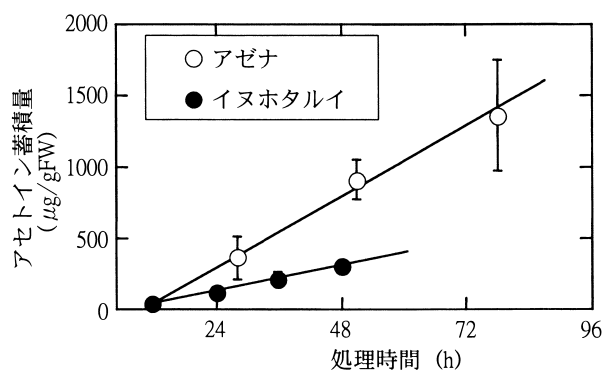
第3図 イヌホタルイの異なる部位における発色の差異
アセトインの蓄積速度で発色程度を表示した。

に生育している部位を採取して使用することが重要となる。アゼトウガラシ属水田雑草では幼葉2-4枚を含む茎頂部をまるごと切り取って使用すると，下の成葉より安定して強い発色が見られる (第2図，内野・渡邊 2007)。イヌホタルイでは部位による差が顕著でないが，花茎上部 10cm ほどを使用すると安定した発色が得られる (第3図，内野・渡邊 2007)。イヌホタルイを処理溶液に浸す際には，浸透性を良くするために花茎を 2-5 mm 程度の長さで細断してから浸す必要がある。コナギでは展開葉よりも株元に隠れている未展開葉を 1-2 枚使用すると強い発色が見られる (第4図)。開花期のコナギでは未展開葉を採取するのが難しくなるため，開花期前の個体を試料とするのが望ましい。

試料は 2 日間ほど処理溶液に浸して静置するが，この際，アゼトウガラシ属水田雑草は明条件でないとアセト乳酸が蓄積せず，結果的に発色が得られない (Uchino *et al.* 1999)。イヌホタルイとコナギでも暗所に置くとその蓄積量が低くなる。また，少なくとも 48 時間程度は明条件でアセトイン蓄積量が直線的に増加するため，静置を 2 日間ほど行うと明瞭な発色が得られる (第5図)。処理が終わった試料は冷凍して保存する。一旦冷凍する事によりアセト乳酸の抽出効率が良くなるため，処理後すぐにアセト乳酸を抽出する場合でも一旦冷凍した方がよい。



第4図 コナギの異なる部位における発色の差異
アセトインの蓄積速度で発色程度を表示した。



第5図 アゼナとイヌホタルイにおけるアセトイン蓄積量の経時的推移

2. アセト乳酸の抽出と比色分析

原著 (Gerwick *et al.* 1993) では乳棒と乳鉢を用いて葉を磨砕しているが、試料中のアセト乳酸は蒸留水に浸して攪拌するだけで抽出される (第2表)。

抽出液に硫酸を加えて 60°C に 30 分間静置することで、アセトインの脱炭酸が進みアセトインができる。その後、クレアチンと 1-ナフトールを順に加えることにより、アセトインが赤色に発色する。1-ナフトール溶液は、2.5N の NaOH 溶液に溶かして 5% (v/v) 溶液とし、毎回使用直前に調製する。アセトインの発色は、時間とともに濃くなり約 30 ~ 40 分で最大となる。アセトインの定量は 530nm の吸光度の測定によって可能であるが (Westerfeld 1945)、検定では特にアセトインを定量しなくとも、赤色の発色で視覚的に診断できる。すなわち、SU 剤処理区で赤色の発色があれば抵抗性、なければ感受性と診断される。もちろん前述のように無処理区で赤色の発色を確認することが前提となる。アセトインの定量を行う場合は、上記の操作で抽出液に硫酸を加える代わりに (第2表の (4) の操作) 2.5N の NaOH を加えた試料を同時に作り、これを吸光度測定時のレファレンス

試料とする。また定量のためには、20μM ~ 100μM 程度のアセトインの標準品を調製し、毎回、試料と同様に発色させて検量線を作成する作業も必要となる (Westerfeld 1945)。

検定上の注意点

この方法は、2 ~ 3 日で抵抗性の検定が可能で、夏期の圃場で採取した雑草について短期間に多数の検体を検定できるところに利点がある。しかし、種子や発生初期の雑草を検定するにはある程度生育するのを待つ必要があり、短期間では検定できない。また、ある程度の実験設備を要するために、設備のないところでは検定できない。こうした場合は、ポット試験 (汪 2001) や発根法 (村岡 2000; Hamamura *et al.* 2003)、地上部再生法 (大野ら 2004) などの他の検定方法を検討し、効率の良い検定を行うことが重要である。

さらに注意が必要なのは、この方法がアゼトウガラシ属水田雑草、イヌホタルイ、コナギ以外の草種の検定を保証していない点である。例えばキカシグサでは比色分析の際に別の色が強く出るため検定できない。オモダカでも別の色が強く出ることがある。きれいな発色が見られた草種でも、検定結果をもとにバイオタイプを判定するためには、圃場試験やポット試験との整合性の確認が必要であろう。これら別の草種については、現段階ではポット試験や地上部再生法など、別の試験で抵抗性検定を行うのが確実といえる。

謝 辞

本検定法の改良にあたっては、東北農業研究センターの藤田せいこ氏、鈴木奈美子氏から多大なるご協力を頂いた。ここに記して謝意を表す。

引用文献

- Duggleby, R. G. and S. S. Pang 2000. Acetohydroxyacid synthase. *J. Biochem. Mol. Biol.* 33 : 1 - 36.
- Gerwick, B. C., L. C. Mireles and R. J. Eilers 1993. Rapid diagnosis of ALS/AHAS-resistant weeds. *Weed Technol.* 7 : 519 - 524.
- 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 Biol. Manage.* 3 : 242 - 246.
- 児嶋 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(2005)」, 化学工業日報, pp17 - 23.
- 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.
- 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 - 293.
- 内野 彰 1999. スルホニルウレア抵抗性水田雑草の迅速検定法. *植調* 33 : 354 - 360.
- 内野 彰 2003. 雑草の ALS 阻害剤抵抗性とその機構. *日本農業学会誌* 28 : 479 - 483.
- Uchino, A. and H. Watanabe 2007. Effects of pyruvate and sucrose on acetolactate synthase activity in *Lindernia* spp. and *Schoenoplectus juncooides* in an *in vivo* assay. *Weed Biol. Manage.* 7 : 184 - 187.
- 内野 彰・渡邊寛明 2007. アゼトウガラシ属水田雑草 (*Lindernia* spp.) 及びイヌホタルイ (*Scirpus juncooides* var. *ohwianus*) におけるアゼト乳酸合成酵素活性の生育ステージ及び部位による差異. *雑草研究* 52 : 11 - 16.
- 内野 彰・渡邊寛明・菊池晴志・三浦嘉浩・尾形 茂・白井智彦・吉田修一・谷なつ子・三浦恒子・田口奈穂子・矢野真二・伊藤博樹・新田靖晃 2005. 東北6県における2003年までのスルホニルウレア系除草剤抵抗性水田雑草の確認状況. *東北の雑草* 5 : 24 - 28.
- Uchino, A., H. Watanabe, G-X. Wang and K. Itoh 1999. Light requirement in rapid diagnosis of sulfonylurea-resistant weeds of *Lindernia* spp. (Scrophulariaceae). *Weed Technol.* 13 : 680 - 684.
- 汪光熙 2001. ポット試験法. 日本雑草学会編「雑草科学実験法」, pp362 - 363.
- Westerfeld W. W. 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.* 161 : 495 - 502.

(2007年5月2日受理)