

高知県におけるPCR-RFLP法を用いた ストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌の検出

矢野和孝・川田洋一*・石井英夫**

(高知県農業技術センター・高知県中央農業振興センター嶺北農業改良普及所*・
農業環境技術研究所**)

Detection of Strobilurin Resistant Strains of *Mycovellosiella natrassii*, Causal Fungus of Leaf Mold of Eggplant, by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism in Kochi Prefecture

By Kazutaka YANO, Youichi KAWADA and Hideo ISHII (Kochi Prefectural Agricultural Research Center, Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan, * Reihoku Agriculture Development Expansion Center, Tai, Tosa, Tosa, Kochi 781-3521, Japan and ** National Institute for Agro-Environmental Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan.)

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method, which was adopted by Ishii *et al.* (2002) for identifying strobilurin resistant isolates, was used to detect strobilurin resistant strains of *Mycovellosiella natrassii*, causal fungus of leaf mold of eggplant. This method was superior to a conventional time-consuming method that uses agar plate media containing fungicides because the mycelium growth of the fungus was very slow. The distribution of resistant strains in Kochi Prefecture was investigated in 2002 and 2003 by PCR-RFLP. As a result, the resistant strains were detected in all 17 fields in 2002 and 19 fields out of 20 fields investigated in 2003. The detection frequency of resistant strains was over 50% in almost fields in which the resistant strains were detected. PCR products, which were derived from DNA extracted from a leaf disk, were not sometimes digested completely by restriction enzyme *Ita I*. It was considered that both sensitive and resistant strains were mixed on a lesion. This method is not always suitable for a mass sample analysis because the testing cost is very high and the procedure is laborious. However, this method is still useful for rapidly detecting resistant strains because it is possible to extract pathogen DNA at once using 10 infected leaf disks from individual fields.

(Received September 1, 2006; Accepted November 20, 2006)

はじめに

ナスすすかび病は、1971~72年に福岡県や高知県で初めて発生が報告された(斉藤ら, 1974; 佐藤・松本, 1973)病害で、その後西日本各地の施設栽培ナスに発生が拡大した(孫工, 1988)。本病は激発すると落葉し、草勢の低下を招くことから、ナス栽培では重要病害である。本病の防除薬剤には、イプロジオンやトリフルミゾールが使

用されてきたが、ストロビルリン系薬剤(上杉, 1999)のアゾキシストロピンは、本病に卓効を示すことから1999年に登録認可され、防除に使用され始めた。しかし、使用開始後間もない時期に防除効果の低下が観察され、調査の結果、耐性菌の発生が確認された(矢野・川田, 2003)。本耐性菌は、キュウリ褐斑病菌(富士ら, 2003)と異なり、薬剤添加培地上での菌糸生育による検定が可

能であるが、すすかび病菌は菌糸生育が遅く、検定には時間を要する。そこで、ストロビルリン系薬剤耐性キュウリべと病菌や褐斑病菌の遺伝子診断に用いられたPCR-RFLP (石井ら, 2001; Ishii *et al.*, 2002) をすすかび病菌に用い、高知県内の耐性菌の分布調査を実施したので報告する。

材料および方法

1. サンプル採集

高知県内のナス栽培地帯において、2002年4～5月に17圃場、2003年4～5月に20圃場からナスすすかび病の罹病葉を採集し、1病斑を直径11mmのコルクボーラーで打ち抜いたリーフディスクを1個ずつ-80℃で冷凍保存した。

2. 核酸抽出

ナスすすかび病の罹病リーフディスク1枚または10枚を抽出用バッファー (Ishii *et al.*, 2001) で磨碎し、65℃、30分間静置後、13,000rpmで5分間遠心分離した上清をDNA抽出キット (QIAGEN Dneasy Plant Mini Kit) を用いるか、またはCTABバッファー (2% CTAB, 100mM Tris-HCl・pH 8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA・pH 8.0, 1% PVP-10) で磨碎後、65℃、30分間処理し、クロロホルム・イソアミルアルコール液 (24:1) による抽出とイソプロパノールによる沈殿でDNAを精製した。

3. PCR-RFLP法

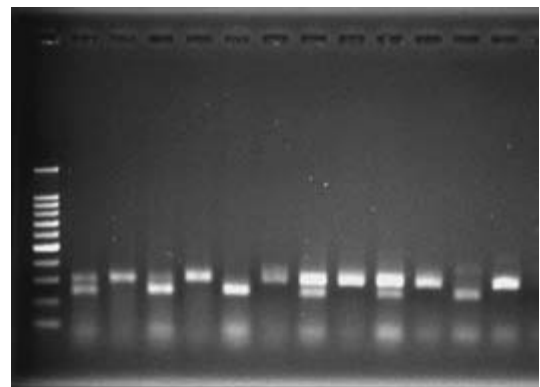
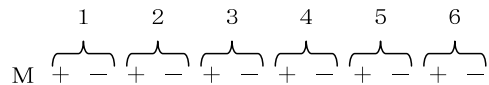
精製DNAの20倍希釈液1 μ lを鋳型とし、チトクロームb遺伝子を増幅するプライマー、RSCBF1およびRSCBR2 (Ishii *et al.*, 2001) をそれぞれ0.5 μ M、dNTP Mixtureを0.2mM、*Taq* DNA Polymelase (Takara Ex *Taq*) を1.25Uの最終濃度に調整し、10倍希釈した添付バッファーを加えて反応液の全量を50 μ lとした。PCRは94℃、2.5分のプレヒートの後、94℃、0.5分、52℃、1分、72℃、1.5分を40サイクル、最後に72℃で8.5分反応させた。PCR産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下で出現したバンドを観察した。制限酵素処理は、PCR産物10.3 μ lにストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌において変異が見られるチトクロームb遺伝子のコドン143番目に

存在する塩基を切断する制限酵素*Ita* I (Roche Diagnostics) 0.5 μ lと添付バッファー1.2 μ lを加えて全量12 μ lの反応液とし、37℃で一晩反応させた。これを2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下でバンドの観察を行った。

結 果

チトクロームb遺伝子を増幅するプライマーを用いてPCRを行うと、285bpのバンドが出現し、これを制限酵素処理すると切断されてバンドが短くなる場合と、切断されずに変化しない場合があり、前者を耐性菌、後者は感性菌と判定した。また、PCR産物が完全に消化されず、切断されて短くなったバンドと切断されずに変化しないバンドの両方が見られる場合があった (第1図)。

2002年および2003年にナスすすかび病菌の病斑を採集したほとんどの圃場から、ストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌が検出され、その耐性菌率も高い圃場が多かった (第1, 2表)。また、10病斑まとめて抽出したDNAからPCR-RFLPを用いて検定を実施した結果は、1病斑ずつ検定した場合と、圃場における耐性菌の検出状況が一致



第1図 ナスすすかび病の罹病リーフディスクより抽出した核酸からチトクロームb遺伝子をPCRで増幅後、制限酵素 (*Ita* I) 処理したDNAの電気泳動像
M: 100bp DNA Ladder, +: 制限酵素処理, -: 制限酵素処理なし, 1~6: サンプル番号

した。

考 察

薬剤添加培地を用いてストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌を検出しようとする、病斑からのすすかび病菌の分離、前培養、薬剤添加培地上での菌糸生育調査の手順を要し、最低でも40日程度かかる。耐性菌のモニタリングに、これほど長期間を要しては、使用する防除薬剤の選択に役立てることはできない。一方、もともと薬剤添加培地上では検定不可能であったストロビルリン系薬剤耐性キュウリべと病菌や褐斑病菌では、薬剤の作用点であるチトクロームbをコードする遺伝子の変異を調査する遺伝子診断が可能である(石井ら, 2001)。ストロビルリン系薬剤耐性すすかび病菌においてもこれらと同様の変異が確認されており、チトクロームb遺伝子の変異した部位を制限酵素で消化するPCR-RFLPが可能である(石井, 2002)。更に、病斑を葉から直接コルクボーラーで打ち抜いたリーフディスクからDNAを抽出することで、病原菌を培養することなく、短期間に検定が可能である(石井, 2002)。

本法を用いて、2002年と2003年に高知県に分布するストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌を調査したところ、広く県内に蔓延しており、耐性菌が全く検出できなかった圃場は31圃場中1圃場のみであった。本耐性菌に対するストロビルリン系薬剤の防除効果は著しく劣る(矢野・川田, 2003)ことから、本系統の薬剤の使用はしばらく控えるべきだと考えられる。

一方、薬剤の使用を中止すると、耐性菌の占有率が低下し、やがて感性菌に戻る現象が知られている(石井, 2006)。ストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌にもこの現象があてはまるかどうか不明であるが、感性菌に戻ると、感性菌に対しては本系統の薬剤は卓効を示すことから、再び使用できると考えられる。従って、今後、モニタリング調査を実施し、注意深く観察する必要があると考えられる。

本耐性菌の検定を実施し、調査圃場の耐性菌発生を把握するためには、1圃場当たり1病斑の採集では不十分で、10~20病斑程度必要と考えられる。しかし、本法においてPCRに使用する酵素やその後の消化に使用する制限酵素は高価で、検定

第1表 PCR-RFLP法によるストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌の調査(2002年)

市町村名	圃場名	採集日	調査病斑数	耐性菌病斑数 (混在数) ^{a)}	耐性菌率
中村市	A	02.4.4	10	1	10.0
	B	02.4.4	10	7	70.0
南国市	C	02.4.17	10	10	100
	D	02.5.16	10	10	100
	E	02.5.16	8	8	100
	F	02.4.26	10	10	100
	G	02.4.26	7	4 (2)	57.1
	H	02.4.26	3	3	100
安芸市	I	02.4.25	10	10	100
香我美町	J	02.4.26	9	9	100
芸西村	K	02.5.28	10	5	50.0
	L	02.5.28	10	10	100
	M	02.5.28	10	10	100
	N	02.5.28	10	4 (3)	40.0
	O	02.5.28	10	4	40.0
	P	02.5.28	10	8 (1)	80.0
	Q	02.5.28	10	5 (2)	50.0

a) () 内は制限酵素処理によって、切断されたバンドと切断されないバンドの両方が見られたもの。

第2表 PCR-RFLP法によるストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌の調査 (2003年)

市町村名	圃場名	採集日	圃場毎 ^{a)}	調査病斑数	耐性菌病斑数 (混在数) ^{b)}	耐性菌率
中村市	A	03.4.30	+	9	9	100
	B	03.4.30	+	9	9 (1)	100
	R	03.4.30	-	10	0	0
	S	03.4.30	±	10	7 (6)	70.0
	T	03.4.30	±	8	5 (2)	62.5
	U	03.4.30	+	9	9 (1)	100
	V	03.4.30	+	9	9	100
南国市	F	03.4.22	NT	3	3	100
	J	03.4.22	NT	9	6	66.7
安芸市	W	03.4.22	+	9	7 (3)	77.8
香我美町	X	03.4.22	NT	9	9	100
芸西村	L	03.5.28	+	9	8	88.9
	K	03.5.28	+	9	9	100
	Y	03.5.28	+	9	9	100
	Z	03.5.28	+	9	7	77.8
	AA	03.5.28	+	9	8	88.9
	BB	03.5.28	+	9	8 (1)	88.9
	CC	03.5.28	±	9	6 (3)	66.7
	DD	03.5.28	+	9	9 (2)	100
	EE	03.5.28	+	9	9 (1)	100

a) 10病斑をまとめてDNA抽出し、調査した。

+: 耐性菌、-: 感性菌、±: 耐性菌と感性菌が混在。NT: 未調査。

b) () 内は制限酵素処理によって切断されたバンドと切断されないバンドの両方が見られたもの。

費用が高い。また、1度にDNA抽出できるサンプル数も20程度が限界で、手順も煩雑なために、大量検定には不向きである。そこで、1圃場の10病斑をまとめてDNA抽出したところ、1病斑からの場合と同様に検定可能で、圃場ごとの耐性菌の有無を知り、防除薬剤の選択に役立つ目的には有用であると考えられた。

本法を用いて耐性菌検定を実施したところ、たとえ1病斑から抽出したDNAに由来するPCR産物でも、制限酵素によって一部は消化されるが完全に消化されない場合があった。この理由として、耐性菌と感性菌の混合感染による病斑であった可能性が考えられる。また、ストロビルリン系薬剤の作用点であるチトクロームbの遺伝子は、ミトコンドリア内に複数のコピーを有し、更にミトコンドリアは細胞内に複数存在する(石井、

2000) ことから、耐性菌の単独感染であっても、耐性変異型遺伝子と感性野生型遺伝子の両方が混在していた可能性もある。キュウリ褐斑病菌ほかにおいては、耐性変異型遺伝子の割合が極端に少なくなり、PCR-RFLP法で感性菌と判断された場合でも、生物検定では耐性菌であることが知られている(石井ら、2003)。ナスすすかび病菌においても同様なことが予想され、本法の信頼性には課題も残されている。しかし、これらのことを承知して使用すれば、耐性菌を迅速検定できる本法はなお有用であると考えられる。

摘 要

培地上での菌糸生育が遅いために、薬剤添加培地を用いた検定では長期間を要するストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌の検出を、石井ら

(2001) の開発したPCR-RFLPを用いて実施し、2002および2003年の高知県におけるストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌の分布について調査した。その結果、2002年には、調査した17圃場の全てで、2003年には20圃場中19圃場で耐性菌が検出され、検出された圃場の大半は50%以上の検出率であった。なお、1病斑から抽出したDNAに由来するPCR産物でも、制限酵素処理により完全に消化されない場合があり、耐性菌と感性菌が混在していると考えられた。本法は検定費用が高く、また、手順も煩雑なために大量の検定には不向きであると考えられるが、1圃場から10病斑まとめて抽出したDNAを用いても同様に検定できることから、圃場ごとの耐性菌の有無を迅速に調査するためには有用であると考えられた。

引用文献

- 富士 真・山口純一郎・古田明子・宗 和弘(2003). 佐賀県より採取したキュウリ褐斑病菌のストロビルリン系薬剤に対する感受性と感受性検定法の検討. 日植病報 69: 299-300 (講要).
- 石井英夫(2000). 植物病原菌のストロビルリン系薬剤耐性菌と耐性機構に関する考察. 第10回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 43-51.
- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., and Hollomon, D. W. (2001): Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91: 1166-1171.
- Ishii, H., Sugiyama, T., Nishimura, K. and Ishikawa, Y. (2002): Strobilurin resistance in cucumber pathogens: Persistence and molecular diagnosis of resistance. *In* *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III* (Dehne, H. -W., Gisi, U., Kuck, K. H., Russell, P. E. and Lyr, H. eds.) . Bonn, Germany, 149-159.
- 石井英夫・杉山知子・西村久美子・石川由美(2001): PCR-RFLPによるストロビルリン系薬剤耐性菌の遺伝子診断. 日植病報 67: 218 (講要).
- 石井英夫(2002). 薬剤耐性菌の遺伝子診断. 第12回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 53-62.
- 石井英夫・伊達寛敬・古田明子・古池伸代(2003): ストロビルリン系薬剤耐性菌の遺伝子診断とその問題点. 日植病報 69: 299 (講要).
- 石井英夫(2006). 薬剤耐性とどう向き合うか? -現場と研究をむすぶもの- 九防協年報2005 22-26.
- 齊藤 正・山本 磐・倉田宗良・中田拓也(1974): *Mycovellosiella*属菌によるナスの新病害すすかび病. 高知農林研報, 6:1~6.
- 佐藤 徹・松本省平(1973): ハウス栽培のナスの新しい病害について. 九病虫研会報, 19: 28~30.
- 孫工弥寿雄(1988): なす・すすかび病防除と、トリフミン水和剤について. 農薬時代, 157:44~51.
- 上杉康彦(1999): ストロビルリン系殺菌剤の開発経緯と作用機構. 植物防疫, 53:163~166.
- 矢野和孝・川田洋一(2003): ストロビルリン系薬剤耐性ナスすすかび病菌の発生. 日植病報, 69:220-223.