

ダイズ紫斑病菌のチオファネートメチル剤耐性と 個体群生態

中央農業総合研究センター ^{いま}今 ^{ざき}崎 ^い伊 ^{おり}織
 東北農業研究センター ^こ小 ^{いづみ}泉 ^{しん}信 ^{ぞう}三

はじめに

ダイズ紫斑病菌 (*Cercospora kikuchii*) は、葉茎や莢、種子などに感染し病害を引き起こす。発病組織や病徴の違いによって、英語では *Cercospora blight*, *leaf spot*, *purple seed stain* と区別されているが (SCHUH, 1999), 日本ではこれらを特に区別せずに、ダイズ紫斑病と総称している。本病は種子伝染性の病害で、紫色の斑点を呈した罹病種子から発芽・展開した子葉に、暗赤褐色の雲紋状の病斑を形成する。その後、上位の各組織に伝染し、紫黒色の斑点を形成する。特に種子への感染は、発芽率を低下させるばかりではなく、苗の立枯と罹病種子の増加などを引き起こす。また、紫斑粒の混入によってダイズの検査等級が下がるため、経済的な損失も大きい。さらに、炭水化物含量の低下も報告されており (勝部, 1980), 食品としての栄養価にも影響を及ぼす。

我が国では、上記のような理由から特に種子の紫斑病の防除を目的として、ベンゾイミダゾール系薬剤の一つチオファネートメチル剤 (TM) が 1971 年に登録されて以来使用されてきた。しかしながら、1980 年代の後半以降、各地で TM 耐性のダイズ紫斑病菌が分離されるようになり、防除効果の低下が危惧されるようになった。

ベンゾイミダゾール系薬剤の耐性化は他の糸状菌でも報告されており、その多くが β -チューブリン遺伝子の点変異によって引き起こされるアミノ酸置換が原因であることが明らかとなっている (ISHII, 2002)。モデル糸状菌や酵母を使った実験室レベルの研究では、 β -チューブリン遺伝子の 9 箇所のコドン置換によって、それぞれが単独に本剤耐性に関与することが報告されている (KOENRAADT et al., 1992) が、圃場で分離された TM 耐性株の多くは第 198 コドンがコードするグルタミン酸がアラニンへ置換している (DAVIDSE and ISHII, 1995)。なお、第 198 コドンの変異が TM 耐性に関与することは部位

特異的変異によって証明されている (FUJIMURA et al., 1992)。その他に、第 6 (MA et al., 2003), 50 (McKAY et al., 1998), 200 (KOENRAADT et al., 1992 ; YARDEN and KATAN, 1993 ; ALBERTINI et al., 1999), 240 (ALBERTINI et al., 1999) コドンの置換に起因する圃場分離株も報告されている。

分子生物学的技術の進歩に伴い、病原糸状菌の同一種個体間の遺伝的背景の違いをより高精度に識別し、遺伝子型レベルで集団構造を分析することが可能となり、薬剤耐性菌や病原性系統の進化的位置づけ (NAMIKI et al., 1994 ; ADACHI et al., 1996), 病原菌の地理的な発生源 (ZHANG and BLACKWELL, 2002), 集団間の遺伝子流動 (GALE et al., 2002 ; ZELLER et al., 2003), 交配の有無 (RAU et al., 2003 ; ZELLER et al., 2003) 等に関する個体群レベルの生態が解き明かされてきた。ダイズ紫斑病菌の生態については多数の報告があるものの、分子生物学的手法を用いた個体群生態についてはほとんど研究されていなかった。遺伝子型の識別には、一般にハイブリダイゼーションや Polymerase Chain Reaction (PCR) を利用した DNA フィンガープリント多型を検出する技術が用いられる。ダイズ紫斑病菌では DNA 多型検出法に関する研究情報が乏しかったため、筆者らは事前に遺伝的情報を必要とせず、さらに WANG et al. (1998) によって *Cercospora* 属菌の系統解析に利用された Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 法 (Vos et al., 1995 ; HORI et al., 2003) を用いて、我が国のダイズ紫斑病菌の TM 耐性個体群の遺伝的構造の特徴 (IMAZAKI et al., 2006 a), 日本と南米の個体群の遺伝的構造の比較 (IMAZAKI et al., 2006 b), TM と 2002 年に登録されたアゾキシストロビン剤 (AZ) の本菌個体群への影響 (IMAZAKI et al., 2006 c) を解析した。

I AFLP 法

AFLP 法は、染色体 DNA を 2 種の制限酵素で切断した後、それぞれの切断末端に特異的なアダプターを連結し、アダプターと染色体 DNA 断片の連結部分に設計されたプライマーを用いた PCR によって得られる増幅産物の電気泳動パターンの違いによって遺伝的多型を検出

Thiophanate-Methyl Resistance and Population Ecology of the Soybean Purple Stain Fungus *Cercospora kikuchii*. By Iori IMAZAKI and Shinzo KOIZUMI

(キーワード: ダイズ紫斑病菌, チオファネートメチル剤耐性, AFLP 分析, 個体群構造, 薬剤防除)

する技術である(図-1)。本法では、使用する制限酵素とプライマーの塩基配列によって異なる増幅産物が得られること、さらにその組み合わせが多数あることから、近縁な個体間でも遺伝的多型を検出できる可能性が高いことが知られている。筆者らは本法を実施するに当たり、制限酵素 *EcoRI* および *MseI*、プライマー組 A-CA, C-TC, T-AG を使用した(表-1)。

II TM 耐性個体群の遺伝的構造

我が国の15県より分離したダイズ紫斑病菌247株(表-2)のTM感受性を0, 1.6, 6.3, 25, 100, 400および1,600 $\mu\text{g/ml}$ のTMを含むジャガイモ煎汁寒天培地上での最小生育阻止濃度(MIC)によって判定した。その結果、93株は感受性(MIC < 1.6 $\mu\text{g/ml}$)、残りの154株は高度耐性(1,600 $\mu\text{g/ml}$ < MIC)を示した(表-2)。また、15県のうち13県でTM耐性株が分離されたことから、TM耐性個体群は我が国に広く分布していることが示唆された。

TM耐性個体群の遺伝的構造を明らかにするため、遺伝子型識別に有効な AFLP プライマー組 C-TC(表-1)を用いたフィンガープリント分析によって、247株の遺伝的類縁性を調べた。その結果、四つの遺伝的類縁グル

ープ(I~IV)に分かれることが明らかとなった(表-2)。また、すべてのTM耐性株は、グループIに属した。グループIに属した遺伝子型を詳細に調べると71遺伝子型が認められ、そのうちTM感受性株のみを含む遺伝子型は33個、TM耐性株のみを含む遺伝子型は26個、TM感受性株と耐性株の双方を含む遺伝子型は12個認められた。また、グループI内の遺伝子型の違いを区別することはできるものの、これらの類縁性は非常に高く、今回の分析だけでは信頼性のある系統樹を作成することができなかった。したがって、TM耐性が単一の遺伝子型に由来するのか、あるいは異なる複数の遺伝子型で独立して発生したのかを明らかにするためには、より感度の高いマーカーが必要である。

任意に抽出したTM耐性12株と各遺伝的類縁グループから選抜したTM感受性17株の β -チューブリン遺伝子の部分塩基配列を決定したところ、他の菌類のTM高度耐性株で既に報告されているように、TM耐性株では第198番目のグルタミン酸がアラニンに置換していることが明らかとなり、ダイズ紫斑病菌のTM高度耐性は第198コドンの変異が原因であると推察された。なお、門間ら(2003)によっても同様な報告がなされている。

III 日本と南米産個体群の構造の比較

ダイズは3,000年以上前に中国東北部で栽培種となり(Hymowitz et al., 1999; Qiu et al., 1999)、我が国ではおよそ2,000年前から栽培されている(Hymowitz, 1995; 砂田, 1977; 後藤, 2001)。一方米国には、1765年以降に主に日本と中国から導入され、大規模に栽培されるようになった(PIPER and MORSE, 1923; NAGATA, 1959; Hymowitz et al., 1999)。また、南米には、20世紀初頭に日本からブラジルへの移民によって持ち込まれ、栽培されるようになり、20世紀中ごろになって米国の品種が導入され、米国や中国と並ぶ世界的なダイズ栽培地域となった(BONETTI, 1981; WILLIAMS and THOMPSON, 1985; SMITH and HUYSER, 1987)。このように、南米のダイズ栽培は日本や中国と深いつながりがあることから、南米のダイズ紫斑病菌個体群の少なくとも一部は日本に由来するという仮説のもとに、アルゼンチンの2州とブラジル

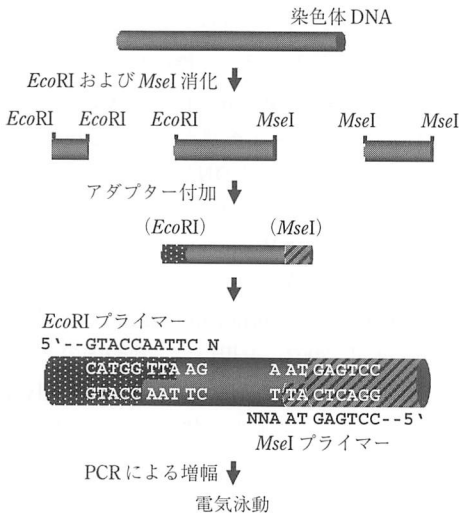


図-1 AFLP法の手順

表-1 本研究に用いた AFLP プライマーの組み合わせ

組み合わせ	<i>EcoRI</i> プライマー	<i>MseI</i> プライマー
A-CA	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAACA-3'
C-TC	5'-GACTGCGTACCAATTCC-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAATC-3'
T-AG	5'-GACTGCGTACCAATTCT-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAAAG-3'

表-2 県別のダイズ紫斑病菌の分離株数

分離県	TM 感受性 ^{a)}		遺伝的類縁グループ ^{b)}			
	感受性	耐性	I	II	III	IV
青森	15	31	42	2	0	2
岩手	13	1	14	0	0	0
宮城	0	2	2	0	0	0
秋田	2	24	26	0	0	0
山形	2	7	7	2	0	0
新潟	23	13	31	4	1	0
富山	3	1	2	2	0	0
茨城	2	24	26	0	0	0
埼玉	2	0	1	0	1	0
長野	0	2	2	0	0	0
鳥取	2	17	19	0	0	0
岡山	0	22	22	0	0	0
愛媛	10	5	11	1	3	0
大分	5	5	10	0	0	0
佐賀	14	0	10	1	3	0
合計	93	154	225	12	8	2

^{a)} チオファネートメチル剤感受性、^{b)} すべての TM 耐性株はグループ I に属した。

の 4 州においてダイズ紫斑病菌を収集した (表-3)。

南米産の 160 株と日本産の 245 株の A-CA および C-TC 組 (表-1) を用いた AFLP 分析の結果、南米には日本に存在した 2 グループ (I, III) に加え、新たな 3 グループ (V, VI, VII) が認められた。グループ I には、供試した日本の 245 株のうち 223 株と南米の 160 株のうち 136 株が含まれた。本結果から、両地域の個体群構造は異なるが、グループ I が共通して優占していることが示唆された。さらに、グループ I と III が南米にも存在したことは、種子によって日本から伝搬した可能性があることを示している。現在、筆者らは、中国で本菌の分離を始めており、中国、日本および南米の個体群構造を比較することで、南米の個体群の由来をより明らかにできると考えている。

IV TM および AZ の散布が個体群構造に及ぼす影響

TM 耐性ダイズ紫斑病菌の発生が問題化し、2002 年に呼吸を阻害するストロビルリン系薬剤の AZ とエルゴステロール生合成を阻害するシメコナゾール剤、さらに、03 年には同じくエルゴステロール生合成を阻害するイミベンコナゾール剤がダイズに登録された。今後、TM と作用点が異なるこれらの薬剤が代替として農業現場で実際に使用されることが予想されるため、筆者らは新規登録剤のうち AZ を使用した場合のダイズ紫斑病菌へ与

表-3 日本および南米からのダイズ紫斑病菌の分離株数

分離国	採取地 (州・県)	分離株数
アルゼンチン	Cordoba	102
	Santa Fe	46
ブラジル	Goias	1
	Maranhao	4
	Mato Grosso	2
	Parana	3
	不明	2
日本	表-2 に示した 15 県	245

える影響を詳細に調べた。

2003 年および 04 年に紫斑病罹病種子と健全種子 (1 : 1) を圃場に播き (畝間 : 70 cm, 株間 : 20 cm, 1 株 2 本植え、品種 : エンレイ), 莢肥大期に TM と AZ を散布した。収穫した種子の紫斑病罹病率および、収穫した種子からの TM 耐性株の分離率を調査した。なお、ダイズ圃場の 8 × 8 m の区画に薬剤を散布し、その中央の 7 × 7 m より種子を収穫した (各区 3 反復)。その結果、罹病率は、TM 散布では無散布の場合と有意な差がなかったが (25 ~ 33%), AZ 散布によって著しく低下した (1% 以下)。一方、TM 耐性株の分離率は、TM 散布ではほぼ 100% にまで増加したが、AZ 散布では無散布と有意な差がなかった (35 ~ 44%)。さらに、分離株群を A-CA, C-TC, T-AG 組 (表-1) を用いた AFLP 分析に供試し、遺伝子型多様性に与えるこれら薬剤の影響を各区より収穫した種子から分離した株の AFLP 遺伝子型多様性によって評価した。その結果、TM 散布によって遺伝子型多様性が低下すること、また、AZ 散布では遺伝子型多様性に影響しないことが示された。さらに、検出された遺伝子型に基づいて各薬剤散布区に由来する個体群をクラスター分析したところ、TM 散布の結果として個体群構造が類似することが示された。以上の結果から、TM 散布によってその耐性菌が強く選択され、遺伝子型多様性が低下して個体群構造が単純化すること、一方 AZ 散布では、本菌は非選択的 (ランダム) に感染が抑制されるため、遺伝子型多様性には影響を与えず特定の系統が優占化されることはないことが明らかになった。

おわりに

植物病原菌の個体レベルの生態とともに個体群レベルの生態を明らかにすることは、植物保護上、重要な知見となる。これまで、ダイズ紫斑病菌の個体群生態に関する知見は十分ではなく、本研究で得られた成果は本菌集団の生態に関する新規かつ重要な知見である。特に、単

一の遺伝子型が少なくとも我が国と南米で優占していたことから、種子によって本菌が伝搬されたことが示唆された。本結果は、種子管理が植物防疫上極めて重要であることを改めて示している。また、単一のグループが優占していること、さらに耐性系統が優占グループにのみが発生している原因の究明は今後の課題である。

植物病原菌の薬剤耐性は、古くて新しい問題である。卓効を示す薬剤に対する耐性化を極力回避し、持続的に使用していくためには、他種剤とのローテーション施用が推奨されている。そのためには、各種薬剤の作用をこれまで以上に詳細に分析し、適切な使用要領を作成していくことが重要であると考え。本研究では、チオファネートメチル剤 (TM) とアゾキシストロビン剤 (AZ) のダイズ紫斑病菌の個体群構造への影響について解析したが、今後、薬剤の作用が様々な角度からより詳細に解析され、持続的な薬剤防除体系が確立されることを期待する。

最後に、本研究を実施するに当たり、有益なご助言、技術指導、罹病植物と菌株のご提供をいただいた各位に心よりお礼申し上げます。

引用文献

- 1) ADACHI, Y. et al. (1996) : *Phytopathology* **86** : 1248 ~ 1254.
- 2) ALBERTINI, C. et al. (1999) : *Pestic. Biochem. Physiol.* **64** : 17 ~ 31.
- 3) BONETTI, L. P. (1981) : *A soja no Brasil*. Instituto de tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, Brazil, p. 1 ~ 6.
- 4) DAVIDSE, L. C. and H. ISHII (1995) : *Modern selective fungicides*, 2nd ed., Verlag, Jena, Germany, p. 305 ~ 322.
- 5) FUJIMURA, M. et al. (1992) : *Pestic. Biochem. Physiol.* **44** : 165 ~ 167.
- 6) GALE, L. R. et al. (2002) : *Phytopathology* **92** : 1315 ~ 1322.
- 7) 後藤寛治 (2001) : *ダイズ・アズキ*, 農文協, 東京, p. 33 ~ 41.
- 8) HORI, K. (2003) : *Theor. Appl. Genet.* **107** : 806 ~ 813.
- 9) HYMOWITZ, R.J. et al. (1995) : *Evolution of crop plants*, 2nd ed., Longman Scientific and Technical, Essex, England, p. 261 ~ 265.
- 10) ——— (1999) : *Compendium of soybean diseases*, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, p. 1 ~ 3.
- 11) IMAZAKI, I. et al. (2006 a) : *J. Gen. Plant Pathol.* **72** : 77 ~ 84.
- 12) ——— (2006 b) : *Phytopathology* **96** (印刷中).
- 13) ——— (2006 c) : *J. Gen. Plant Pathol.* **72** (印刷中).
- 14) ISHII, H. (2002) : *Agrochemical resistance*, American Chemical Society, Washington DC, USA, p. 242 ~ 259.
- 15) 勝部利弘 (1980) : *北日本病虫研報* **31** : 64 ~ 66.
- 16) KOENRAADT, H. et al. (1992) : *Phytopathology* **82** : 1348 ~ 1354.
- 17) MA, Z. et al. (2003) : *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 7145 ~ 7152.
- 18) MCKAY, J. G. et al. (1998) : *Mycol. Res.* **102** : 671 ~ 676.
- 19) 門間陽一ら (2003) : *日植病報* **69** : 299 (講要).
- 20) MAGATA, T. (1959) : *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn* **28** : 79 ~ 82.
- 21) NAMIKI, F. et al. (1994) : *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 2684 ~ 2691.
- 22) PIPER, C. V. and W. J. MORSE (1923) : *The soybean*, McGraw-Hill Book Company, New York, USA, p. 35 ~ 54.
- 23) QIU, L. et al. (1999) : *World soybean research conference VI : Proceedings*, 165 ~ 172.
- 24) RAU, D. et al. (2003) : *Theor. Appl. Genet.* **106** : 947 ~ 959.
- 25) SCHUH, W. et al. (1999) : *Compendium of soybean diseases*, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, p. 17 ~ 18.
- 26) SMITH, K. J. and W. HUYSER (1987) : *Soybeans : improvement, production, and uses*, 2nd ed., American Society of agronomy, Crop science society of America, and Soil Science of America, Wisconsin, USA, p. 1 ~ 22.
- 27) 砂田喜与志 (1977) : *北海道における豆類の品種*, 日本豆類基金協会, 東京, p. 34 ~ 38.
- 28) VOS, P. et al. (1995) : *Nucleic Acids Res.* **23** : 4407 ~ 4414.
- 29) WANG, J. et al. (1998) : *Phytopathology* **88** : 1269 ~ 1275.
- 30) WILLIAMS, G. W. and R. L. THOMPSON (1985) : *World soybean research conference III : Proceedings*, Westview press, Boulder, Colorado, USA, p. 49 ~ 56.
- 31) YARDEN, O. and T. KATAN (1993) : *Phytopathology* **83** : 1478 ~ 1483.
- 32) ZHANG, N. and M. BLACKWELL (2002) : *ibid.* **92** : 1276 ~ 1283.
- 33) ZELLER, K. A. et al. (2003) : *ibid.* **93** : 874 ~ 880.

! 好評の「植物防疫講座」 全3冊 B5判

病害編

植物防疫講座第3版編集委員会編 本文 395 頁
 定価 3,675 円税込み (本体 3,500 円) 送料 340 円

害虫・有害動物編

植物防疫講座第3版編集委員会編 本文 400 頁
 定価 3,990 円税込み (本体 3,800 円) 送料 340 円

雑草編

日本植物防疫協会編 本文 197 頁
 定価 2,520 円税込み (本体 2,400 円) 送料 340 円

お申し込みは直接当協会へ、前金 (現金書留・郵便振替) で申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11

郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03) 3944-1561 (代) FAX (03) 3944-2103 メール : order@jppa.or.jp