

我が国における QoI 剤耐性ブドウベと病菌の発生実態

山梨大学ワイン科学研究センター果実遺伝子工学研究部門 ^{すずき しゅんじ あおき よしなほ} 鈴木 俊二・青木 是直

はじめに

山梨県の特産品と言えば、ブドウあるいはワインが頭に浮かぶのではなからうか。山梨県のブドウ収穫量は、45,100 t で全国 1 位である (2010 年作物統計)。「甲斐路」,「甲州」等山梨県の地名を示すブドウ品種名が多いことから、山梨県が全国有数のブドウ生産地であることが伺える。日本で生産されるブドウのおよそ 7 割は生食用であり、品質の高さから高値で卸されている。また、近年では、台湾、香港、シンガポール等への輸出量が 10 年前と比べ 10 倍近くに伸び、日本で栽培されるブドウは高級ブドウとして海外でも高い評価を受けている。一方、山梨県はワインの名醸地としても知られている。山梨県で栽培されているブドウ品種「甲州」から作られるワイン「甲州ワイン」はその代表作である。2003 年より毎年開催されている国産ワインコンクールにおいて、甲州ワインを対象とするカテゴリーが創設されるほど、甲州は日本のワイン醸造に欠かせないブドウ品種である。また、近年、甲州ワインのヨーロッパへの輸出が開始され、海外での高評価を得たことで、「甲州」を積極的に栽培する機運がブドウ栽培農家で高まっている。

山梨県でブドウ栽培を行ううえで最も注意すべき栽培管理は、ブドウ灰色かび病、ブドウ晩腐病、そしてブドウベと病の防除である。いずれの病原菌に対しても、基本的には、殺菌剤およびボルドー液散布で防除体系を構築しているが、山梨県では、近年、殺菌剤耐性菌の出現そしてまん延という問題に遭遇している。人工培地を用いた従来の殺菌剤耐性試験が可能である前者二つの病原菌に対して、絶対寄生菌であるブドウベと病の殺菌剤耐性試験は、宿主植物を使用する関係上煩雑であり、また時間、場所、そして労力が非常にかかる (WONG and WILCOX, 2000)。この技術的問題から、殺菌剤耐性ブドウベと病菌の全国分布を調査することは非常に困難であり、事実、ほとんど調査されていない。そこで、筆者らは、植物糸状菌の殺菌剤耐性診断法として常法となりつつある遺伝子診断法「PCR-RFLP 法」をブドウベと病

菌に適用することで、大量のサンプルでも、誰にでも簡単にそして迅速に診断できる技術開発を行っている。

本稿では、その一例として、山梨県で耐性ブドウベと病菌の出現が疑われた QoI (Quinone outside Inhibitor) 剤耐性に関し、遺伝子診断法の確立およびそれを利用した全国調査の例を紹介する。

I 遺伝子診断法の確立

ブドウ栽培が盛んなフランスとイタリアでは、1999 年に QoI 剤に耐性を示すブドウベと菌が発見された (HEANEY et al., 2000)。フランスでは 1997 年に、イタリアでは 1998 年に QoI 剤が登録され、広くブドウ栽培で使用されてきた。日本では 1997 年に登録されたが、筆者らが研究を始めた 2007 年の段階では QoI 剤耐性ブドウベと病菌に関する報告は皆無であった。QoI 剤耐性獲得機構として、ミトコンドリア電子伝達系複合体 III を構成するチトクローム *b* の 143 番目のコドン GGT (グリシン) が GCT (アラニン) に変異する G143A 変異が挙げられる (ISHII et al., 2001)。この変異部位を標的とした PCR-RFLP 法はうどんこ病、灰色かび病等多くの植物病原菌で実績を挙げていることから、QoI 剤耐性ブドウベと病菌に関しても、G143A 変異を標的とした PCR-RFLP 法が使用可能であると考え、以下の方法を構築した。

(1) ブドウベと病罹病葉の採取

- ・ 10 mm 四方もあれば十分である。
- ・ 乾燥したものでも使用可能である。

(2) サンプルからの DNA 抽出

- ・ REDExtract-N-Amp Plant PCR Kits (SIGMA) を使用するが、他メーカーの DNA 抽出キットでも可能である。
- ・ 罹病葉から直径 6 mm のリーフディスクを 1 枚切り取り、DNA 抽出に供試する。
- ・ キットのプロトコールに従い、DNA を抽出する。

(3) PCR-RFLP 法

- ・ プライマーの塩基配列 (図-1A にプライマー地図を示した) は以下の通りである。

Pvcytb295-315: 5'-GGGGTTTGTATTACGGATCT-3'

Pvcytb626-607 5'-GGATTATTGAACCTACCTC-3'

- ・ 制限酵素処理に使用する制限酵素 (図-1B に切斷

Monitoring of QoI Fungicide Resistance in *Plasmopara viticola* Populations in Japan. By Shunji SUZUKI and Yoshinaho AOKI

(キーワード: ブドウ, *Plasmopara viticola*, ブドウベと病, QoI 剤, 遺伝子診断)

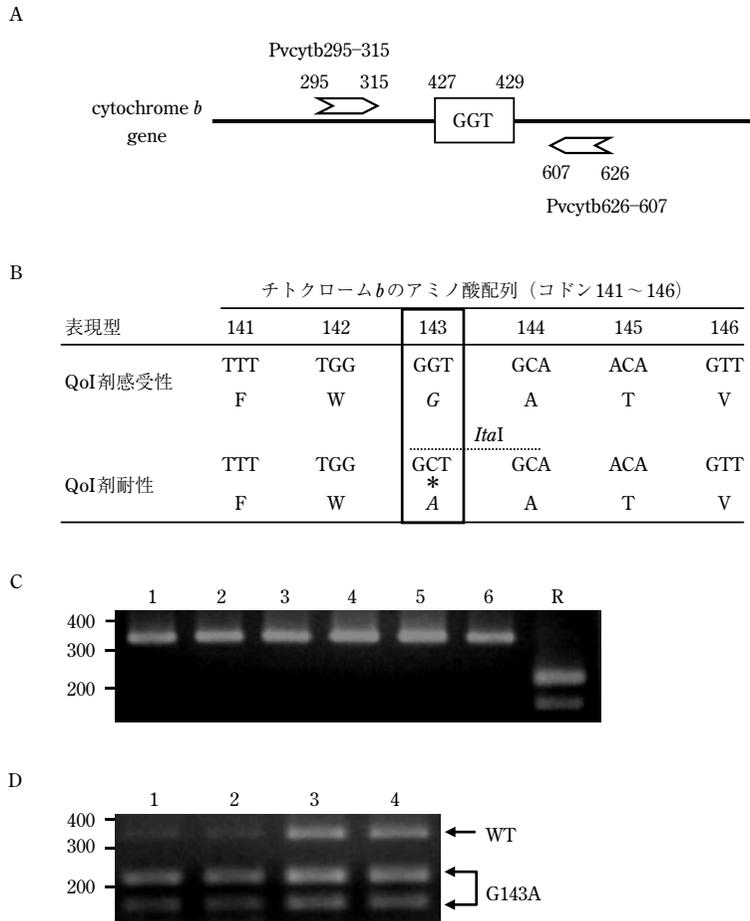


図-1 PCR-RFLP法を用いた QoI 剤耐性ブドウベと病菌の遺伝子診断法

- (A) プライマー地図 *P. viticola* cytochrome *b* gene (accession no. DQ459468).
- (B) G143A 変異を認識する制限酵素 *ItaI* の切断部位。
- (C) 診断例 1: 2008 年山梨大学育種試験地から採集したブドウベと病菌 (レーン 1~6). R: G143A 変異をもつ遺伝子断片。
- (D) 診断例 2: 2008 年福島県から採集したブドウベと病菌 (レーン 1~4). WT: QoI 剤感受性 (FURUYA et al., 2009 を改変)。

部位を示した) は, *ApeKI* あるいは *ItaI* (*Fmu4HI*) である。

・制限酵素処理後, 電気泳動にて PCR 産物が切断されたかを確認する (図-1 C, D)。

II 遺伝子診断法の評価

上記方法によりブドウベと病罹病葉から抽出された DNA から上記のプライマーにより増幅された PCR 産物は, NCBI に登録されている *P. viticola* チトクローム *b* 遺伝子の塩基配列 (accession no. DQ459468) と 100% 一致した。本遺伝子診断法を立ち上げていた 2007 年の

段階では, QoI 剤耐性ブドウベと病菌の報告は日本ではされておらず, 耐性菌のゲノム DNA を入手することが困難であった。そこで人工的に G143A 変異をもつチトクローム *b* 遺伝子断片を合成し, 実験対照区として使用した。その結果, 本遺伝子診断法は QoI 剤耐性ブドウベと病菌がもつと思われる G143A 変異を特異的に認識することが示された (図-1 C)。

2007 年 6 月, 本遺伝子診断法の有効性・可能性についてまとめた論文を *Pest Management Science* 誌に投稿したところ, 2 人の審査員ともに, 以下のコメントを返してきた。

表-1 リーフディスク法を用いた G143A 変異に基づく遺伝子診断法の評価

サンプル	PCR-RFLP ^b	対照区 ^a		アゾキシストロピン ^a		マンゼブ ^a	
		検定数	耐性菌数	検定数	耐性菌数	検定数	耐性菌数
1	R	10	6	10	10	10	0
2	R	10	10	10	5	10	0
3	R	10	9	10	3	10	0
4	R	10	6	10	5	10	0
5	S	10	10	10	0	10	0

^a対照区は蒸留水を用いた。アゾキシストロピン、マンゼブは、1,000 mg/l の濃度で処理した。

^bR: QoI 剤耐性表現型 G143A, S: QoI 感受性表現型 (FURUYA et al., 2010 より抜粋)。

「The weakest point in this manuscript is the lack of use of resistant isolates in their experiments.」

この論文に用いたブドウベと病菌は、筆者らが所属する山梨大学所有の育種試験地（約 3 ha）および山梨県の数箇所のブドウ園から得たものであった。そこで、翌シーズンにあたる 2008 年から、山梨県、長野県、山形県等のブドウ生産地からブドウベと病罹病葉を収集した。その結果、G143A 変異を有するブドウベと病菌を日本で初めて確認することに成功した（図-1D）。次に、G143A 変異をもつブドウベと病菌が QoI 剤に対し真に耐性を示すか否か、リーフディスク法により確認した（表-1）。PCR-RFLP 法において G143A 変異を示した分離株 4 株は、アゾキシストロピンを散布したブドウ葉上でも生育したのに対し、G143A 変異をもたない 1 株は同薬剤に対し感受性であった。以上の結果から、G143A 変異に基づく遺伝子診断法は QoI 剤に対し耐性をもつブドウベと病菌を正確に検出できることが示唆された。

従来 1 週間以上の日数を費やしていたブドウベと病菌の殺菌剤耐性試験であるが、本遺伝子診断法を利用すれば、ブドウベと病罹病組織のサンプリングからわずか 5 時間足らずで診断が可能であった。また一度に多検体のサンプルを扱うことができるという点でも、従来法より本遺伝子診断法は優れている。ただし、本遺伝子診断法には課題も残っている。筆者らが DNA シークエンス解析に供試した 50 株の QoI 剤耐性ブドウベと病菌はすべて G143A 変異をもっており、チトクローム *b* 遺伝子の他の塩基置換、例えば他の病原菌で確認されている F129L や Y275N (Gisi et al., 2002) は確認されなかった。ブドウベと病菌において、これらのアミノ酸置換が QoI 剤に対する感受性度にどのように影響するか明らかではないが、本遺伝子診断法は G143A 変異をもつ QoI 剤耐性ブドウベと病菌を検出する方法であることを常に覚えておく必要がある。

III 我が国における QoI 剤耐性ブドウベと病菌の発生実態

2008 年および 2009 年シーズンに、日本の主要ブドウ生産地のブドウ生産者からブドウベと病罹病葉を提供していただき、上記の遺伝子診断法を用いて G143A 変異をもつブドウベと病菌の分布および頻度調査を実施した（図-2）。2008 年は、山形県（13/15, 86.6%）、福島県（7/7, 100%）、長野県（17/17, 100%）、そして山梨県（22/87, 25.3%）といった本州の主要ブドウ生産地で G143A 変異をもつブドウベと病菌が高頻度で検出された。一方、2008 年に採取した青森および北海道のブドウベと病菌からは G143A 変異を検出することはなかった（青森：0/5, 北海道、0/29）。

翌年 2009 年は、長野県（24/25, 96.6%）、山梨県（13/23, 56.5%）、岡山県（1/38, 2.6%）、そして広島県（2/6, 33.3%）から G143A 変異をもつブドウベと病菌が検出された。一方、北海道では 2008 年に引き続き、G143A 変異をもつブドウベと病菌は検出されなかった（0/26）。2008 年と 2009 年のデータから考察すると、QoI 剤耐性ブドウベと病菌は既に日本にまん延していることは間違いない。特に、ブドウの収穫量が全国 1 位の山梨県と 2 位の長野県（2010 年調べ）での検出頻度は他の地域に比べ非常に高いものであった。

我が国にこれほどまでの G143A 変異をもつブドウベと病菌が存在していたことは非常に驚くことであった。筆者らが報告した 2008 年まで（論文として発表されたのは 2009 年）、QoI 剤耐性ブドウベと病菌の存在が我が国で報告されなかった理由として、ブドウ生葉を用いざるを得ない従来の殺菌剤耐性試験が誰にでも気軽に実施できる手法ではなかったことが挙げられる。本遺伝子診断法を含めて、殺菌剤の標的となるタンパク質をコードする遺伝子の変異を解析することで耐性菌を検出する遺伝子診断法は、殺菌剤耐性に関与する頻度の低いまれな

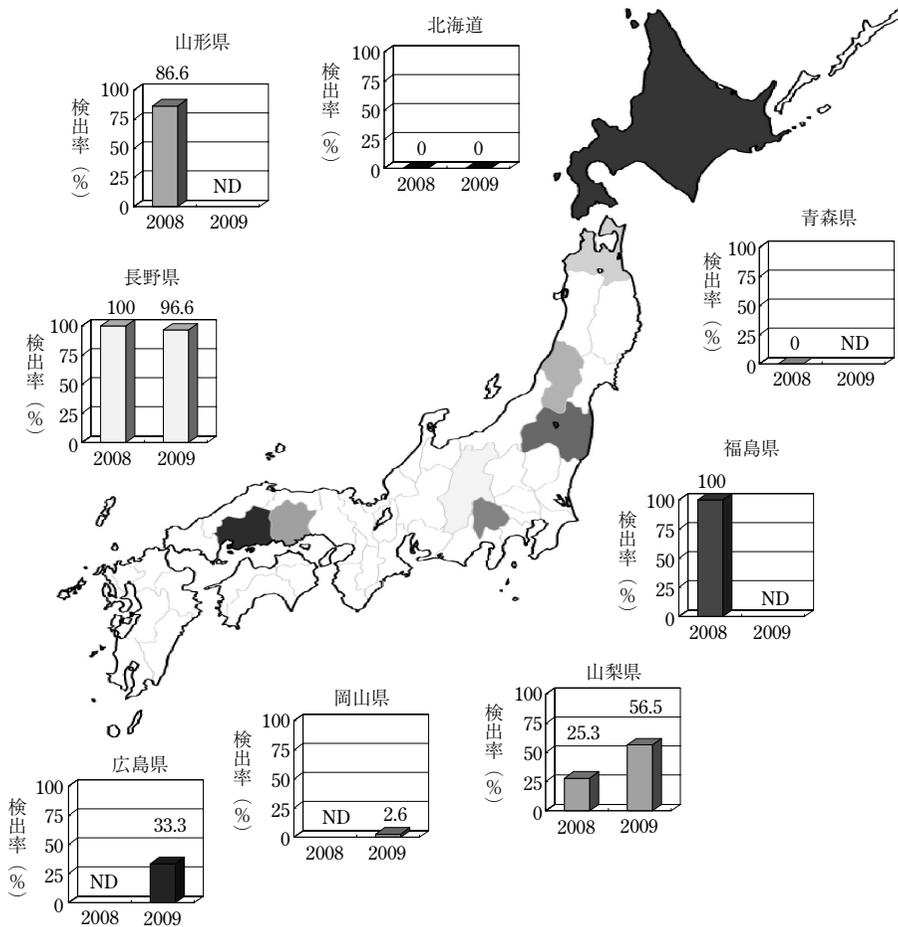


図-2 我が国における G143A 変異型 QoI 剤耐性ブドウベと病菌の発生実態

2008 年および 2009 年シーズンに発生したブドウベと病罹病葉を用いて、遺伝子診断法により診断を行った。

ND：調査せず (FURUYA et al., 2010 を改変)。

遺伝子変異や未知の遺伝子変異を検出できないという欠点はあるが、大多数を占める殺菌剤耐性菌（ブドウベと病菌の場合は、G143A 変異を持つ QoI 剤耐性菌）を誰もが簡単にかつ正確に検出でき、そして大量のサンプルを扱うことができるという点で他の診断法に比べ優れている。このような点を鑑みると、絶対寄生菌であるブドウベと病菌の殺菌剤耐性診断法として、遺伝子診断法がひとつのスタンダードになるべきではなかろうかと筆者らは考えている。この考えに基づき、筆者らはカルボキシル酸アミド系殺菌剤耐性ブドウベと病菌の診断法も確立している (AOKI et al., 2011)。

ブドウの収穫量が全国 6 位である北海道（2010 年調べ）で G143A 変異をもつ QoI 剤耐性ブドウベと病菌が全く検出されなかった理由として、もともとブドウベと

病の発生頻度が少なく、QoI 剤の使用頻度も少ないことが挙げられる。しかし、近年の温暖化によって、以前に比べ、北海道でもブドウベと病菌に対する殺菌剤の散布は標準作業となってきている。2010 年シーズンに実施した北海道での調査において、2004 年と 2009 年シーズンに 1 回ずつ QoI 剤を散布したブドウ園にも、いまだ G143A 変異をもつブドウベと病菌は発生していなかった (0/20)。このように、現在、津軽海峡により本州から隔離されている北海道は、QoI 剤耐性ベと病菌の発生メカニズムおよびその伝播を解析するための最良のモデルとなっている。筆者らは北海道で QoI 剤耐性ブドウベと病菌が出現するまで継続的に調査を続ける予定であり、いずれ統報を報告させていただきたいと思っている。

おわりに

ブドウベと病菌は絶対寄生菌であるため、研究が困難な植物病原菌のひとつであり、殺菌剤耐性菌を検出するだけでも非常に骨を折る仕事であった。本稿では、現行のブドウ栽培管理で広く用いられてきた QoI 剤に対し耐性を示すブドウベと病菌の遺伝子診断法と我が国における発生実態を示した。一般的に、ブドウベと病菌は化学農薬およびボルドー液を用いて防除するため、今後も続々と販売される新規化学合成農薬に対し、ブドウベと病菌は耐性を獲得し、ブドウ農家を困惑させることと想像する。殺菌剤耐性ブドウベと病菌を出現させないという妙法は存在しないが、今後は地域に存在するブドウ畑

をひとつのフィールドと考え、殺菌剤耐性ブドウベと病菌の有無、出現頻度、等を把握し、科学的根拠をもとにした防除体系の一本化を図る必要があると考える。そのためには、誰にでも簡便かつ迅速に殺菌剤耐性ブドウベと病菌を診断できる技術が必須である。その技術のひとつは、間違いなく、本遺伝子診断法であると確信する。

引用文献

- 1) AOKI, Y. et al. (2011): Pest Manag. Sci. in print.
- 2) FURUYA, S. et al. (2009): ibid. 65: 840 ~ 843.
- 3) ——— et al. (2010): ibid. 66: 1268 ~ 1272.
- 4) GISL, U. et al. (2002): ibid. 58: 859 ~ 867.
- 5) HEANEY, S. P. et al. (2000): Proc. Brighton Crop Protect Conf. Pests and Dis. BCPC, Farnham, Surrey, UK, p. 755 ~ 762.
- 6) ISHII, H. et al. (2001): Phytopathology 91: 1166 ~ 1171.
- 7) WONG, F. P. and W. F. Wilcox (2000): Plant Dis. 84: 275 ~ 281.

農薬取締法令・関連通達集 追補修正版

農薬取締法令・関連通達集

農薬取締法・政令・省令・告示
関連通達等集
日本植物防疫協会 編

農薬取締法令・関連通達集 — 追補修正版 —

農薬取締法・政令・省令・告示
関連通達等集
日本植物防疫協会 編

平成23年6月

日本植物防疫協会

新発売

社団法人 日本植物防疫協会 編

B5判 261ページ プラス
追補修正版(39ページ)付
全内容を収録(PDF)したCDも添付
新価格:1,365円(税込)

農薬取締法をはじめ、関連する政令・省令・告示および、各省庁より発信された農薬に関する通達を網羅しました。農薬に関する指導や啓発上の参考に、また研修会等のテキストとしてご使用ください。

2007年の本誌発刊以降に発令された通達の内容を別冊子に収録し(39頁)、加えて掲載内容全てをPDFファイルにしてCDに収めました。

お問い合わせとご注文は

社団法人 日本植物防疫協会 支援事業部 出版担当

〒114-0015 東京都北区中里2-28-10
TEL 03-5980-2183 FAX 03-5980-6753
ホームページ : <http://www.jpapa.or.jp/>
Eメール : order@jpapa.or.jp