

# 集団遺伝学的解析による QoI 耐性チャ輪斑病菌の分布拡大経路の推定

農研機構 果樹茶業研究部門 やま だ けん ご  
山 田 憲 吾

## はじめに

チャ輪斑病は糸状菌の一種の *Pestalotiopsis longiseta* によって引き起こされるチャの重要病害である。おもに機械による新芽の摘採によって葉に生じた傷口から発病し、同心円状の輪紋を有する円形～V字型の大型え死病斑を生じる。輪斑病の防除薬剤として、かつては治療効果があり有効な防除期間が長いベンゾイミダゾール系 (MBC) 剤が広く使用されていたが、薬剤耐性の発達によって 1980 年代半ばには防除効果が失われてしまった (尾松ら, 2012; 外側, 2015)。1998 年に QoI 剤のアゾキシストロビンが登録されると、MBC 剤に代わる治療剤として広く普及したが (外側, 2015), QoI 剤でも 2008 年に鹿児島県で耐性菌の出現が確認された (富濱, 2009)。その後の調査で、耐性菌は静岡県でもすでに広く分布していることが明らかとなった (外側, 2015)。

輪斑病菌は雨滴伝染性の病原菌である。また、チャは永年性作物で定植後数十年にわたって栽培される。このため、風媒伝染性の病原菌や一年生作物の種苗伝染性病原菌に比べ、伝播速度は非常に遅いと推測される。それにもかかわらず、耐性菌が短期間のうちに広く茶産地にまん延することが繰り返されてきた。そこで、薬剤耐性輪斑病菌の分布拡大機構を解明するため、静岡県牧ノ原台地における QoI 剤耐性輪斑病菌の集団遺伝学的解析を行った (YAMADA et al., 2016)。

## I サンプリング

静岡県牧ノ原台地の一般農家圃場で 2009～12 年に輪斑病罹病葉を採集した (図-1)。サンプリングはそれぞれの圃場で 1 回のみ行い、圃場全体から無作為に採集した。アゾキシストロビン (100 mg/l) および没食子酸 *n*-プロピル (2 mM) 含有 PDA 培地で菌の分離と QoI 剤感受性検定を同時に行い、検定後の培地から単胞子分離菌株を得た。高度耐性菌 623 菌株 (244 圃場)、中度耐

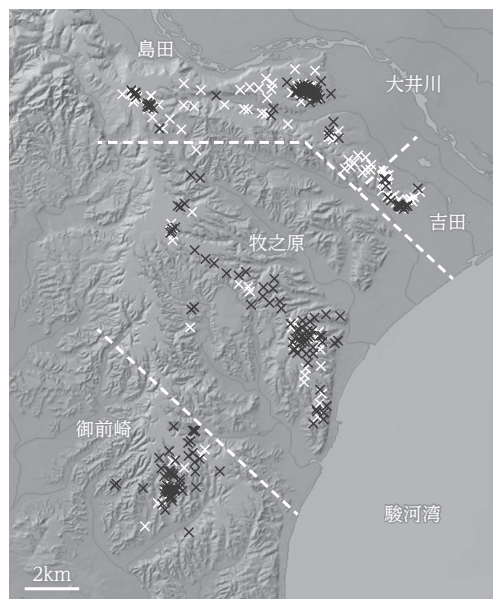


図-1 静岡県牧之原台地におけるチャ輪斑病菌 ISSR 型の調査圃場  
 黒色の×は耐性菌が検出された圃場。白色の×は感受性菌のみが検出された圃場。点線は本研究において設定した地域グループの境界線。

性菌 64 菌株 (27 圃場), 感受性菌 395 菌株 (319 圃場), 合計 1,082 菌株 (395 圃場) を解析に用いた。

## II DNA フィンガープリント解析

Inter simple sequence repeat (ISSR) 法 (ZIĘTKIEWICZ et al., 1994; TAKATSUKA, 2007) によって DNA フィンガープリント解析を行った。3 種類の ISSR プライマーを用いてそれぞれ PCR を行い、得られたバンドパターンをまとめて一つの ISSR 型とした。解析した 1,082 菌株から 42 種の ISSR 型 (PL01～42) が検出された (図-2)。高度耐性菌からは 18 種、中度耐性菌からは 7 種、感受性菌からは 38 種が検出された。このうち 5 種の ISSR 型が高度耐性、中度耐性および感受性菌で共通して検出され、1 種が中度耐性および感受性菌、10 種が高度耐性および感受性菌、1 種が中度耐性と感受性菌で共通していた。3, 1 および 22 種はそれぞれ高度耐性、中度耐性および感受性菌でのみ検出された。通常、1 圃場から複

The Route of Spread of QoI Resistance of *Pestalotiopsis longiseta* Inferred by Population Genetics Analysis. By Kengo YAMADA

(キーワード: チャ輪斑病, QoI 剤, 薬剤耐性菌, 集団遺伝学, AMOVA)

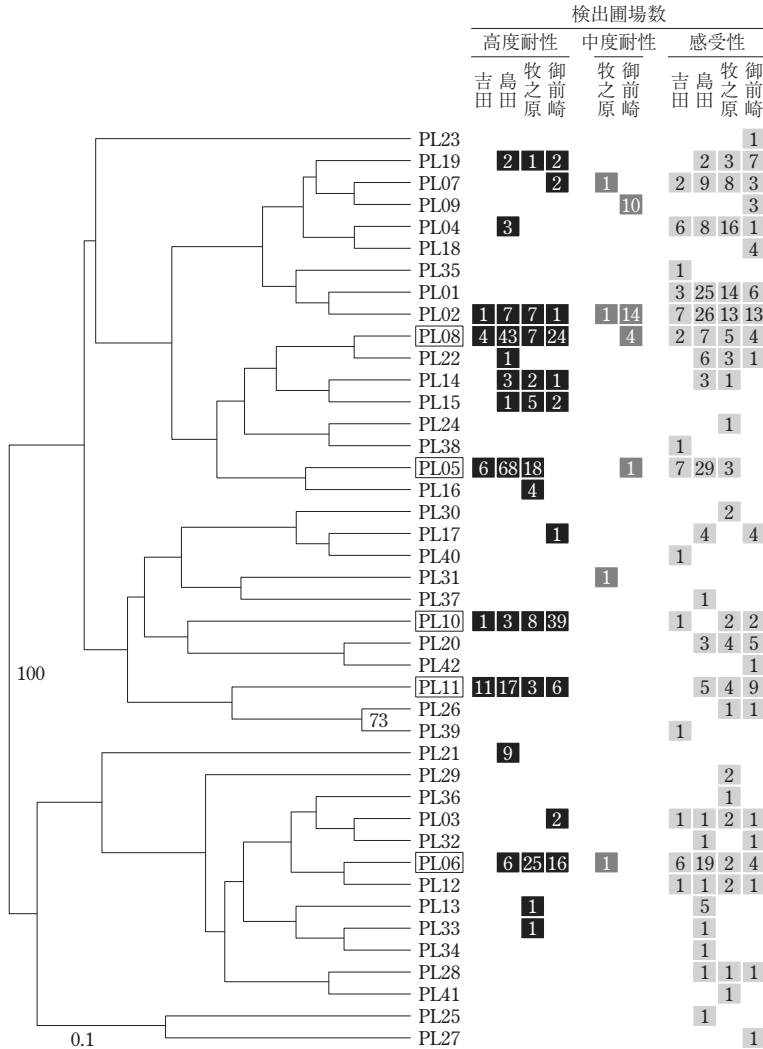


図-2 チャ輪斑病菌の ISSR 型の系統樹と地理的分布  
 高度耐性菌の主要な ISSR 型を□で示した。系統樹内の数字はブートストラップ値  
 (50%以上のみ)。

数の ISSR 型が検出された。圃場内の高度耐性菌の ISSR 型の多様度は平均 0.51 であった。この値は大まかに言うと 2 種の ISSR 型が 1 : 1 の割合で検出されたことを示す。感受性菌は多様度が平均 0.85 と高く、中度耐性菌は平均 0.17 と低かった。ISSR 型の系統樹を FreeTree v. 0.9.1.50 (PAVLICEK et al., 1999) によって Nei and Li/Dice の類似度指数を用いて UPGMA 法で作成した結果、採集地や QoI 剤感受性に対応する明確な系統関係は認められなかった (図-2)。

### III 地理的分布

調査圃場をそれらの位置関係に基づいて、市町とほぼ

一致する四つの地域グループ[島田(北部)、吉田(東部)、牧之原(中部~南東部)、御前崎(南部)]に分割し、それぞれの地域グループにおける高度耐性菌の ISSR 型の検出圃場数を集計した結果、高度耐性菌の優占 ISSR 型は地域によって異なっていた (図-2, 3)。島田の高度耐性菌の優占 ISSR 型は PL05 で、高度耐性菌が分離された圃場の 69% で検出された。PL05 は吉田および牧之原の高度耐性株でもそれぞれ 26 および 28% の圃場で検出されたが、御前崎の高度耐性菌からは検出されなかった。反対に、御前崎の高度耐性菌分離圃場の 68% で検出された優占 ISSR 型 PL10 は、他の地域での検出率は 3 ~ 12% と低かった。この 2 地域の間位置する牧之原

では高度耐性菌の集団構造も中間的であった。PL06 がもっとも多く検出されたが検出率は 38% と低かった。島田および御前崎での優占 ISSR 型である PL05 および

PL10 が 2 および 3 番目に多く、それぞれ 28 および 12% の圃場で検出された。吉田では PL11 がもっとも多く、48% の圃場で検出された。PL11 は他の地域でも検出されたが、検出率は 5 ~ 17% と低かった。

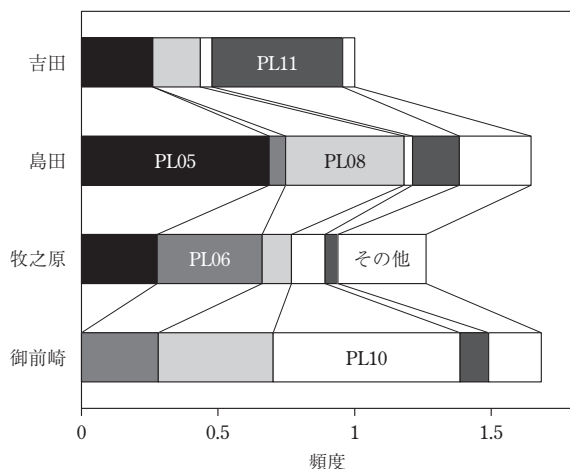


図-3 QoI 剤高度耐性チャ輪斑病菌の ISSR 型の地理的分布  
頻度 = 検出圃場数/調査圃場数。1 圃場から複数の ISSR 型が検出されるため、頻度の合計は 1 以上となる。

#### IV 耕作者間差異

島田・阪本地区の 6 耕作者の 19 圃場について、高度耐性菌の ISSR 型の検出頻度を集計した (表-1)。島田で検出頻度が高い PL05 および PL08 がこの地区でも多く、PL05 は全圃場、PL08 は 17 圃場で検出された。PL05 と PL08 の比率やそれ以外の ISSR 型の検出頻度から、耕作者間で HR 菌の集団構造に小さな差異があると考えられた。

#### V 集団遺伝学的解析

地域間および耕作者間で認められた高度耐性菌集団構造の差異を明らかにするため、analysis of molecular variance (AMOVA; EXCOFFIER et al., 1992) による集団遺伝学的解析を行った。AMOVA では、集団を地域などでまとめた集団グループを設定して、遺伝的変異を階層的

表-1 QoI 剤高度耐性チャ輪斑病菌の ISSR 型の耕作者間差異

耕作者	圃場	ISSR 型								
		PL02	PL04	PL05	PL06	PL08	PL10	PL11	PL15	PL21
A	a			6		1				
	b	1 <sup>a)</sup>		4		1				
B	a			6		1			1	
	b			5		3				
C	a			7		2				
	b			5		4				
	c			6		2				
D	a	1		2	1	1				
	b		1	5				1		1
	c		1	2		2	2	1		
E	a			8						
	b	1		4		2				
	c			5		3				
F	a			3		5				
	b			1		1				1
	c			1		2				1
	d			1		5				2
	e			4		3		1		
	f			4		3	1			

a) 菌株数.

に評価し、各階層における固定指数を得る。固定指数は集団分化の程度を表す指数で0～1の値をとり、分化がないとき0で、値が大きいほど集団分化が進んでいることを示す。AMOVAを行うソフトウェアはArlequin 3.5 (EXCOFFIER and LISCHER, 2010) や GenAlEx 6.5 (PEAKALL and SMOUSE, 2012) がある。どちらもドキュメントが充実しており、集団遺伝学の教科書的な内容となっているので一読をお勧めする。特に GenAlEx に付属するチュートリアルは、AMOVA を始めとする集団遺伝学的解析手法を実習形式で学習できてわかりやすい。本研究では Arlequin を使用し、ISSR 型をハプロタイプ、圃場を集団とみなして、集団におけるハプロタイプの出現頻度をデータとして用いて AMOVA を行った。

牧ノ原台地の高度耐性菌集団を地域によってグループ分け (図-1～3) して解析した結果、各階層で有意な集団分化が認められ、グループ間の固定指数  $F_{CT}$  は 0.213 でグループ内の集団間の固定指数  $F_{SC}$  の 0.128 よりも大きかった (表-2a)。このことから、高度耐性菌集団間の遺伝的変異は地域内よりも地域間で大きく、地域間でより大きな集団分化が生じていることが示された。

次に、阪本地区の高度耐性菌集団 (表-1) を耕作者によってグループ分けして解析した (表-2b)。狭い地区内での解析のため集団間の遺伝的変異は小さく、全集団間の固定指数  $F_{ST}$  は 0.059 と低く、分化は認められなかった。グループ内の集団間の固定指数  $F_{SC}$  はさらに低く -0.013 であった。一方、グループ間の固定指数  $F_{CT}$  は 0.071 とこれらよりも大きく、有意な集団分化が認められた。これらの結果から、高度耐性菌集団の集団構造は同一耕作者の圃場間では極めて類似しており、一方、耕作者間ではわずかではあるが集団分化が生じていることが明らかとなった。

## VI 耐性菌の分布拡大経路

輪斑病菌は有性世代が未確認のいわゆる不完全菌であり、分生子によってクローン増殖していると考えられている。したがって、ISSR 型の違いはクローン系統の違いを反映していると考えられる。牧ノ原台地の QoI 剤高度耐性輪斑病菌からは多数の ISSR 型が検出され、各地域で異なる少数の優占 ISSR 型が優占していた。また、ISSR 型の間に QoI 剤耐性や採取地点に対応する明確な系統関係は認められなかった。これらのことから、牧ノ原台地の高度耐性菌は突然変異または外部からの移入によって各地域で独立して出現し、それぞれの地域内にまん延したものと推測できる。

輪斑病は摘採による傷口から発病することから、輪斑病菌の圃場間伝播は分生子や罹病組織片に汚染された摘採機によって起こると考えられている (西島, 2008)。本研究で認められた耐性菌の耕作者間における集団分化は、摘採機を介した人為的伝播の重要性を支持するものである。一方、輪斑病菌の自然伝播は粘質の分生子が雨滴によって周囲に分散することで起こるため、自然伝播による移動距離はごく短いと推測される。このため、輪斑病菌の圃場間伝播において、分生子の雨滴分散による自然伝播は軽視されていた。しかし、本研究において、それぞれの地域内の耐性菌集団では耕作者にかかわらず特定の ISSR 型が優占していた。これは、耐性菌の圃場間伝播において自然伝播が無視できない頻度で起きていることを示している。

以上のことから、耐性菌は以下の経路で広まったと推測される。まず、突然変異または外部からの移入によってある圃場に耐性菌が出現する。QoI 剤の選択圧下で優占化した耐性菌は雨滴と摘採機によって速やかに圃場全

表-2 QoI 剤高度耐性チャ輪斑病菌集団の AMOVA の結果

変動要因	自由度	平方和	変動組成	変動 (%)	固定指数
a) 地域によるグループ分け					
グループ間	3	37.99	0.093***	21.26	$F_{CT} = 0.213^{***}$
グループ内の集団間	240	98.69	0.044***	10.12	$F_{SC} = 0.128^{***}$
集団内	380	113.83	0.300***	68.62	$F_{ST} = 0.314^{***}$
b) 耕作者によるグループ分け					
グループ間	5	3.62	0.021*	7.13	$F_{CT} = 0.071^*$
グループ内の集団間	13	3.28	-0.004	-1.25	$F_{SC} = -0.013$
集団内	119	33.19	0.279	94.12	$F_{ST} = 0.059$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (1,023 反復).

体にまん延し、さらに摘採機を共有する他の圃場にも広がっていく。圃場の端に到達した耐性菌は雨滴によって飛散して隣接圃場の端に侵入する。伝播した先でも同様に薬剤による淘汰と人為のおよび自然伝播が繰り返されて、耐性菌が地域全体に拡散する。これが複数の地域で独立して起こり、牧ノ原台地全体に耐性菌がまん延したものと考えられる。

本研究では QoI 剤耐性チャ輪斑病菌を解析の対象としたが、かつての MBC 剤耐性菌も同様の経路でまん延したと考えている。また、本菌の QoI 剤耐性に伴う適応度コスト (fitness cost) に関する報告はないが、筆者の知る限り明らかな耐性菌の適応度の低下は観察されておらず、耐性菌と感受性菌の伝播機構に差異があるとは

考えられない。したがって、QoI 剤耐性菌の圃場間伝播機構はチャ輪斑病菌全般に当てはまると言える。

#### 引用文献

- 1) EXCOFFIER, L. et al. (1992): *Genetics* **131**: 479 ~ 491.
- 2) ——— and H. E. L. LISCHER (2010): *Mol. Ecol. Resour.* **10**: 564 ~ 567.
- 3) 西島卓也 (2008): 茶大百科 第2巻, 農山漁村文化協会, 東京, p.537 ~ 538.
- 4) 尾松直志ら (2012): *日植病報* **78**: 3 ~ 9.
- 5) PAVLICEK, A. et al. (1999): *Folia Biol. (Praha)* **45**: 97 ~ 99.
- 6) PEAKALL, R. and P. E. SMOUSE (2012): *Bioinformatics* **28**: 2537 ~ 2539.
- 7) TAKATSUKA, J. (2007): *Appl. Entomol. Zool.* **42**: 563 ~ 571.
- 8) 外側正之 (2015): *植物防疫* **69**: 484 ~ 489.
- 9) 富濱 毅ら (2009): *九病虫研究会報* **55**: 83 ~ 88.
- 10) YAMADA, K. et al. (2016): *Plant Dis.*: in press.
- 11) ZIETKIEWICZ, E. et al. (1994): *Genomics* **20**: 176 ~ 183.

## 新しく登録された農薬 (28.6.1 ~ 6.30)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、**対象作物**：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、**適用雑草**等を記載。

#### 〔殺虫剤〕

##### ●スワルスキーカブリダニ剤

23807：スワマイト（出光興産）16/6/22

スワルスキーカブリダニ：50頭/ミリリットル

野菜類（施設栽培，ただし，なす，トマト，ミニトマトを除く）：コナジラミ類：発生直前～発生初期

なす（施設栽培）：コナジラミ類：発生直前～発生初期

#### 〔殺菌剤〕

##### ●ピコキシストロピン水和剤

23804：メジャーフロアブル（日本農薬）16/6/7

ピコキシストロピン：22.5%

キャベツ：株腐病：収穫3日前まで

はくさい：べと病，黒斑病：収穫3日前まで

レタス，非結球レタス：べと病，菌核病，灰色かび病，すそ枯病：収穫3日前まで

たまねぎ：べと病，灰色かび病，灰色腐敗病：収穫前日まで

ねぎ：さび病，べと病，黒斑病：収穫前日まで

##### ●ピコキシストロピン水和剤

23805：マッチョフロアブル（ニチノサービス）16/6/7

ピコキシストロピン：22.5%

りんご：斑点落葉病，輪紋病，炭疽病，黒星病，褐斑病：収穫前日まで

なし：輪紋病：収穫前日まで

もも：灰星病：収穫前日まで

おうとう：灰星病，炭疽病：収穫前日まで

かんきつ：灰色かび病，黒点病，そうか病：収穫3日前まで

#### 〔除草剤〕

##### ●フェンメディファム水和剤

23802：ビートアップフロアブル（ユーピーエルジャパン）16/6/7

23803：ホドガヤユーピーエルビートアップフロアブル（保土ヶ谷UPL）16/6/7

フェンメディファム：16.0%

てんさい（移植栽培）：一年生広葉雑草

てんさい（直播栽培）：一年生広葉雑草

##### ●デシルアルコール乳剤

23806：草サラバ（OATアグリオ）16/6/8

デシルアルコール：78.0%

樹木等：一年生雑草

##### ●フェノキサスルホン水和剤

23808：クミアイスパーダ顆粒水和剤（クミアイ化学工業）16/6/22

フェノキサスルホン：75.0%

日本芝：一年生イネ科雑草

西洋芝（パーミュラダグラス）：一年生イネ科雑草

日本芝：メヒシバ

日本芝：ヒメクグ