

ブドウ灰色かび病菌の早期薬剤耐性診断法に関する研究

○齋藤 誠也、鈴木 俊二、高柳 勉 山梨大学 ワイン科学研究センター

【研究目的】今日の薬剤散布は、発生予察等の発展により適期防除法の確立がなされ、さらに、新しい化学薬剤も次々と開発されたことにより、農作物の安定した供給や労働力の軽減などに大きく貢献している。その反面、薬剤の連年使用や多使用により薬剤耐性菌の存在が顕著になっている。適切な薬剤散布を行なうためには、病原菌の薬剤に対する感受性を知る必要がある。そこで、本研究ではブドウ灰色かび病の病原菌であるブドウ灰色かび病菌に注目し、nested-PCR RFLP法を応用して、野外での灰色かび病菌の早期薬剤耐性診断の開発を試みた。

- ① 灰色かび病菌の薬剤耐性検定: 薬剤耐性検定に供試した72株のうち、Ben耐性株は、51株(70.8%)、Pcm耐性株は、24株(33.3%)、Dic耐性株は13株(18.1%)であった。このことから、野外の灰色かび病菌の多くはすでに薬剤耐性を有していることが明らかとなった。また2005年と2006年に採集した株において薬剤耐性菌の出現パターンが異なっていた。この結果は年度によって薬剤耐性菌の分布が変動することを示しており、早期薬剤耐性診断法の確立の必要性が示唆された。
- ② 薬剤耐性獲得に関与する遺伝子の塩基配列の決定: 三剤に対してそれぞれの薬剤耐性獲得に関与する遺伝子の塩基配列の決定を行なった結果、1アミノ酸の変異によって耐性を獲得していることが示唆された。薬剤耐性菌と感受性菌での当該部位の塩基配列を利用し、PCR-RFLP法での薬剤耐性診断法の確立を試みた。
- ③ 灰色かび病菌の早期薬剤耐性診断: 制限酵素を使用し、PCR-RFLP法を用いた薬剤耐性診断法を開発した。PCR-RFLP法で得られた全72株の診断結果は、薬剤耐性検定の結果とすべて一致した。したがって、PCR-RFLP法での薬剤耐性診断が可能であることが示唆された。このPCR-RFLP法を応用し、さらに高感度であるnested PCR-RFLP法を開発し、野外での早期薬剤耐性診断を試みた。2006年6月下旬、2007年6月上旬から7月下旬に行なったnested PCR-RFLP法での野外調査の結果、ブドウ組織(果皮および葉: Eichorn-Lorenz growth stage 26-29)より7つの薬剤耐性灰色かび病菌が検出された(Table 1)。

以上の結果から、nested PCR-RFLP法を用いた灰色かび病菌の早期薬剤耐性診断法は、薬剤散布プログラムの変更や修正等、その年の総合防除法の計画に役に立つと考えられた。

研究背景

灰色かび病菌 *Botrytis cinerea*

- ブドウに大きな被害を与える病原菌のひとつ。
- 開花前の果穂、成熟期の果実、若葉や未熟な果実など、ブドウのさまざまな生育段階に感染し、被害を及ぼす。

果樹害虫防除層(防除層)

天候やブドウの生育状態を考慮し、薬剤散布を行なう。

薬剤散布の留意点

- 薬剤耐性菌の出現
- ポジティブ制御の導入
- 食の安全

多くの農作物で出現報告 | 使用薬剤・散布時期に対する配慮 | 安全な農作物の供給

研究目的

灰色かび病菌の早期薬剤耐性診断法の確立

適切な薬剤選択 | より効率的な防除 | 薬剤散布量の軽減

- ① 薬剤耐性検定
- ② PCR-RFLP法による迅速な薬剤耐性診断
- ③ nested PCR-RFLP法による早期薬剤耐性診断

供試灰色かび病菌株と薬剤耐性検定

場所	株数
北海道	5
山梨県	86
三重県	4
岐阜県	7
大分県	4
兵庫県	4
不明	1
合計	111

宿主植物: イチゴ, イングラムメ, キュウリ, トマト, ブドウ

採集年: 1992-2007

指標性の適度を表した。

薬剤耐性検定の結果

株番号	薬剤耐性
YU0503, YU0514, YU0530, YU0613, YU0709, YU0717, YU0726, YU0734, YU0958	Ben ^r
YU0506, YU0516, YU0531, YU0516, YU0710, YU0719, YU0727, YU0735, C2-119*	Ben ^r
YU0506, YU0520, YU0532, YU0516, YU0711, YU0719, YU0728, YU0737, C2-119*	Ben ^r
YU0507, YU0522, YU0533, YU0622, YU0712, YU0721, YU0729, YU0738, C2-119*	Ben ^r
YU0510, YU0523, YU0607, YU0701, YU0713, YU0725, YU0739, H8002*	Ben ^r
YU0511, YU0524, YU0608, YU0702, YU0714, YU0723, YU0731, RPFV4115	Ben ^r
YU0512, YU0526, YU0609, YU0704, YU0715, YU0724, YU0732, H8002*	Ben ^r
YU0513, YU0529, YU0612, YU0706, YU0716, YU0725, YU0733, YU0698	Ben ^r
YU0693, YU0703, YU0958	Ben ^r
YU0694, YU0708, M002, C2-436*, C2-122*, C2-123*	Ben ^r
YU0619, YU0619, M003, C2-436*, GF-2011, C2-064*, C2-436*, GF-512, YU0954, YU0956	Ben ^r
YU0519, YU0611, YU0907, C2-2011*	Ben ^r
YU0528, YU0617, C2-2011*	Ben ^r
YU0529, YU0708, C2-2011*	Ben ^r
YU0601, YU0720, FR001, YU0736	Ben ^r
YU0502, GF-23	Ben ^r
YU0505, GF-096	Ben ^r
YU0506, H8003*	Ben ^r
YU0610, M001	Ben ^r
YU0707, M004, H8001*	Ben ^r
YU0707, C2-120*	Ben ^r

耐性株の割合: Ben 86株 (77.5%), Pcm 40株 (36.0%), Dic 15株 (13.5%)

宿主植物: 葉はブドウの葉はブドウ以外 | *は指標株 | YW: ワインリー

青森試験地での灰色かび病菌の薬剤耐性パターンの分布とその推移

年	薬剤	散布日	株数
2005年(23株)	Ben	2/29*	2/29*
	Ben+Pcm	5/1	5/1
	Ben	11/15	11/15
2006年(19株)	Ben	2/28*	2/28*
	Ben+Pcm	6/19	6/19
	Ben+Pcm	7/17	7/17
2007年(30株)	Ben	1/29*	1/29*
	Ben	2/20*	2/20*
	Ben	7/18	7/18

*薬剤耐性検定の結果は、その年の散布薬剤の影響を受ける。

薬剤耐性獲得に関する当該部位の塩基配列決定

β チュープリンをコードする198番目のアミノ酸の変異により耐性を獲得*

表現型	197	198	199	制限酵素
Ben ^r Pcm ^r	GAC	GCC	ACC	Hga I
Ben ^r Pcm ^r	GAC	GTC	ACC	Bsa I
Ben ^r Pcm ^r	GAC	GAG	ACC	Bmg BI

ヒスチジンカインースをコードする365番目のアミノ酸の変異により耐性を獲得**

表現型	364	365	366	制限酵素
Dic ^r	GAA	ATC	GTC	Taq I
Dic ^r	GAA	AGC	GTC	—

(R: resistant, S: sensitive)

PCR-RFLP法による薬剤耐性診断結果

Ben^rPcm^r, Ben^rPcm^r, Ben^rPcm^r, Dic^r, Dic^r

PCR-RFLP法での薬剤耐性診断の結果と供試72株で薬剤耐性検定の結果が一致した。

PCR-RFLP法での迅速な薬剤耐性診断の可能性が示唆された。

PCR-RFLP法の欠点と改良点

PCR-RFLP法での薬剤耐性診断

薬剤散布前に病原菌の薬剤耐性パターンを知る必要がある。

高感度に病原菌DNAを検出できるnested PCR法とPCR-RFLP法による薬剤耐性診断を組み合わせた nested PCR-RFLP法による早期薬剤耐性診断

nested PCR-RFLP法を利用した薬剤耐性診断方法

nested PCR-RFLP法を利用した薬剤耐性診断結果

薬剤耐性	2006年				2007年			
	5月26日	6月15日	6月22日	6月30日	6月30日	7月13日	7月13日	7月13日
Ben ^r Pcm ^r Dic ^r	0	1	0	0	0	0	0	0
Ben ^r Pcm ^r Dic ^r	0	0	0	0	2	0	0	0
Ben ^r Pcm ^r Dic ^r	4	0	0	0	0	0	0	0
Ben ^r Pcm ^r Dic ^r	0	0	0	0	0	0	0	0
Ben ^r Pcm ^r Dic ^r	0	0	0	0	0	0	0	0
Ben ^r Pcm ^r Dic ^r	0	0	0	0	0	0	0	0
Ben ^r Pcm ^r Dic ^r	0	0	0	0	0	0	0	0
検出	4/6	1/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10

nested PCR-RFLP法での灰色かび病菌の早期薬剤耐性診断の可能性が示唆された。

検出率の低さは(9.0%: 7/78)、今後の課題である。

まとめ

4月 5月 6月 7月 8月 9月 10月 11月

Nested PCR-RFLP → 薬剤耐性検定 or PCR-RFLP

- 同一圃場で3年にわたり採集した灰色かび病菌の薬剤耐性検定:
 - 薬剤耐性パターンの分布は、その年の散布薬剤の影響を受ける。

2006年6月26日

- nested PCR-RFLP法での灰色かび病菌の早期薬剤耐性診断:
 - サンプル採集から診断まで8時間で行える。
 - 病状の出ないブドウ組織で、薬剤散布前に診断が可能。

果粒よりBen^rPcm^rDic^rを4株検出