

課題3 植物クリニックセンターの運営と作物の病害診断・防除・予防

担当者：眞山 滋志、石井 英夫、村上 二郎

■研究目的

吉備国際大学植物クリニックセンターは、淡路地域の農業生産者および県や市をはじめ産官学の関係研究機関と連携し、淡路ブランド野菜や果樹など島内の植物資源の病害等の防除に貢献することを主たる目的として活動している。本課題では、本クリニックセンターの運営を強化し、病害の診断解析や防除法の提案など、地域のニーズに沿った問題の解決に取り組む。また、本クリニックセンターの活動をホームページやシンポジウム等で情報発信していく。

■平成30年度の達成目標

病原菌の分離・採集と薬剤耐性菌の調査および診断受付➡病原菌の同定と耐性菌の有無の確認と情報公開

■平成30年度研究方法

1. 病原菌の採集と分離ならびに薬剤耐性菌の調査

1) タマネギやレタスの重要病害であるべと病において、防除薬剤メタラキシルに対する耐性菌が国内外で報告されている(菖蒲・山口、2016ほか)。このため今後、代替薬剤としてQoI剤(電子伝達系複合体Ⅲたんぱく質阻害剤)やCAA(カルボン酸アミド)系薬剤の使用増加が見込まれるが、ともに耐性菌の発達リスクがあるため薬剤感受性モニタリングなどの管理が必要である。しかし、べと病菌は培養が出来ない絶対寄生菌でありモニタリングにも困難を伴う。そこで、当研究室で考案、発表済み(山邊ら、2016)のQoI剤感受性検定法に続いて、CAA系薬剤感受性の遺伝子診断法を検討した。

まず、佐賀県と兵庫県の実地圃場で採集したタマネギの罹病葉から各種の方法を用いてべと病菌の全DNAを抽出後、CAA系薬剤の作用点たんぱく質(細胞壁成分であるセルロースを合成する酵素の1種)をコードする*CesA3*遺伝子のPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)増幅を試みた。また、得られたPCR産物を精製後、ダイレクトシーケンシングとNCBI BLAST検索により塩基配列を解析するとともにアミノ酸配列を推定した。

ブドウべと病菌など他の病原菌では、*CesA3*のコードン1105部位にみられるCAA系薬剤耐性変異を検出するために、PCR産物に制限酵素*AluI*を処理して、切断の有無を調べるPCR-RFLP(制限酵素断片長多型)解析法が考案されている(Aoki et al., 2011)。そこで、この方法も用いてダイレクトシーケンシングの結果が正しいことを確認した。

2) レタスべと病菌についてもCAA系薬剤感受性の遺伝子診断法を検討した。兵庫県から罹病葉を採集し、べと病菌の全DNAをSigma REExtract-N-Amp™ Plant PCR Kitを用いて抽出後、*CesA3*遺伝子のPCR増幅を試みた。得られたPCR産物を精製後、ダイレクトシーク

エンシングと NCBI BLAST 検索により塩基配列を解析するとともにアミノ酸配列を推定した。

2. 病原菌の採集、同定と耐性菌の有無の確認

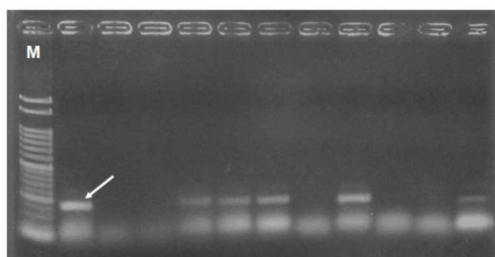
あわじ島農業協同組合が立ち上げた(株)アグリア일랜드の最先端園芸施設で本年トマトとパプリカにうどんこ病が多発した。このため、使用されている薬剤の耐性菌発達リスクや代替薬剤の選択など防除に関する助言を行った。

トマトとパプリカのうどんこ病菌には各々複数の種が知られている。また、防除に QoI 剤が使用された経歴もあるため、この園芸施設から採集したうどんこ病菌の分生子の形態を光学顕微鏡で観察するとともに、菌の rDNA-ITS 領域ならびにチトクローム *b* 遺伝子をそれぞれ PCR 増幅した。得られた産物についてダイレクトシーケンシングと NCBI BLAST 検索により塩基配列や推定アミノ酸配列を解析した。これにより、病原菌の種を同定し、QoI 剤耐性菌が存在する可能性を検討した。

■平成 30 年度研究成果

1. 病原菌の採集と分離ならびに薬剤耐性菌の調査

1) タマネギベと病菌から市販の Sigma REExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit で抽出した鋳型 DNA を使用した場合、約 210bp (塩基対) の DNA 断片がほぼ確実に PCR 増幅された(第 1 図)。また、BLAST 検索により PCR 産物が *CesA3* 遺伝子であることを確認した。



第 1 図 タマネギベと病菌の *CesA3* 遺伝子の PCR による増幅
M、50bp ラダーサイズマーカー；増幅バンドを矢印で示した。

この遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列はともに野生型を示し、コドン 1105 部位に変異はみられなかった(第 2 図)。また、PCR 産物に制限酵素 *AluI* を処理しても切断はみられず、塩基配列と PCR-RFLP の解析結果はよく一致した。したがって、今回供試したベと病菌は CAA 系薬剤に感受性と考えられた。

コドン 1105

↓

5' . . . GTGTCGGCTCGCTG . . . 3'

推定アミノ酸は G (グリシン)

第 2 図 タマネギベと病菌の *CesA3* 遺伝子の部分塩基配列と推定アミノ酸

2) レタスベと病菌から PCR により理論値 582bp の増幅バンドを得た。また、PCR 産物

が *CesA3* 遺伝子であることを確認した。この遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列はともに野生型を示し、コドン 1105 部位に変異がみられなかったことから、供試菌は CAA 系薬剤に感受性と判定された。

タマネギべと病やレタスべと病において CAA 系薬剤耐性菌は海外も含めて未報告であるが、本研究により開発された遺伝子診断法は今後国内外で広く使用されて、耐性菌による被害発生の未然防止に貢献することが期待される。

2. 病原菌の採集、同定と耐性菌の有無の確認

トマトうどんこ病菌の分生子を光学顕微鏡観察し、これを *Oidium neolycopersici* と同定した。また、パプリカうどんこ病菌については rDNA-ITS 領域の塩基配列から *Leveillula taurica* と同定した。パプリカうどんこ病菌のチトクローム *b* 遺伝子を解析した結果、コドン 143 の推定アミノ酸がアラニンであったことから、本施設内に QoI 剤耐性菌が分布する可能性が高いことが示唆された。

■平成 30 年度の達成目標の状況

本年度の目標は十分に達成されたと判断している。

■最終目標の達成見込み

最終年度の目標である地域農家からの診断依頼の受付、病害調査および病原菌採集の継続とシンポジウムの開催は予定どおり達成されるものと見込まれる。

■研究成果の発表

今年度の成果に関しては、「石井英夫・Stammler, G.・田代暢哉. 国内産タマネギべと病菌及びレタスべと病菌からの *CesA3* 遺伝子の検出とシーケンス解析」と題して 2018 年 9 月の日本植物病理学会関西西部会において発表し、講演要旨を本学植物クリニックセンターのホームページに掲載した。また、同学会殺菌剤耐性菌研究会 (<http://www.taiseikin.jp>) による『耐性菌対策のための CAA 系薬剤使用ガイドライン』等とともに、淡路農業技術センター、南淡路農業改良普及センター、あわじ島農業協同組合等の関係機関にも通知して情報共有を図った。トマトうどんこ病菌とパプリカうどんこ病菌に関する試験結果は (株) アグリア일랜드と南淡路農業改良普及センターに報告した。

また、2018 年 7 月 19 日に第 6 回植物保護シンポジウムを本学南あわじ志知キャンパスで開催した。兵庫県の試験研究機関や農業改良普及センター、南あわじ市、あわじ島農業協同組合の関係者や淡路島内の農家などに加えて、県外の公設機関や農薬メーカーなどから合計 74 名が参加した (第 3 図)。

本学の眞山滋志学長・植物クリニックセンター所長による「植物病害の診断と防除に向けて」の講演から始まり、今回は耐病性品種の利用と農薬創製の最新動向をトピックスとして、タキイ種苗(株)の小杉一夫先生に「タキイ種苗の耐病性育種の現状」、(株)サカタのタネの

加来久敏先生には「主要野菜における抵抗性品種開発の現状と今後の展望」と題して特別講演をお願いした。本学の梅津憲治客員教授による「農薬創製に関する研究の最近の動向」に続いて、兵庫県立農林水産技術総合センターの相野公孝先生に「淡路島におけるレタスビッグベイン病耐病性品種の変遷」、あわじ島農業協同組合の柏木賢治部長には「南あわじの作物生産における病害虫対策の現状」、南淡路農業改良普及センターの中西幸太郎普及主査からは「平成30年産タマネギの病害虫発生状況について」をお話いただいた。

最後は本学植物クリニックセンターからの研究報告で、石井英夫教授は「ナシの複合病害抵抗性品種」、村上二郎准教授は「キノコ廃菌床を用いたレタスビッグベイン病の防除について」を話題提供した。

本シンポジウムが今後淡路地域の農業の更なる発展に貢献出来ればと願っている。



第3図 シンポジウムのポスター