

植物防疫基礎講座：

植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル 2016

(3) イネいもち病菌

—QoI 剤 (遺伝子検定法)—

農研機構 中央農業研究センター ^{すずき}鈴木 ^{ふみひこ}文彦・^{はやの}早野 ^{ゆりこ}由里子・^{はやし}林 ^{けいこ}敬子

はじめに

QoI 剤 (ストロビルリン系殺菌剤) 耐性イネいもち病菌は、2012年に国内で初めて発生が確認され、これまでにその分布域が九州から東北地方まで拡大している (宮川・富士, 2013; 石井, 2015b; 稲田・菖蒲, 2015; 櫻田, 2016)。QoI 剤の耐性菌発生リスクが高いことは以前から知られていたが、特に長期持続型の箱処理剤の普及が耐性菌の発達を速めた可能性が高い (石井, 2009; 2014; 2015a; 鈴木・早野, 2016)。本耐性菌に対する既存の遺伝子診断法 (たとえば制限酵素 Fnu4HI の消化による PCR-RFLP 法) (Kim et al., 2003; 宮川・富士, 2013) は、信頼性も高く十分に確立された技術であるが、作業効率やコスト等の面ではまだ改良の余地があると考えられた。そこで、筆者らは QoI 剤に対する耐性変異の 1 塩基多型 (SNP) を識別できる 2 種類の遺伝子診断マーカー (B428gS および B428gDC) を新たに開発した (HAYASHI et al., 2015)。

これらのマーカーの特徴の一つは、伸長反応を 1 秒まで短縮した「1 秒 PCR」であり、簡易調製法の一つである Paper-Disc 法により調製された DNA を基本鋳型として設計した。本稿では、B428gS および B428gDC の設計における考え方とその使用方法を中心に紹介する。

I 遺伝子診断マーカーの設計および検出法

国内で確認された QoI 剤耐性イネいもち病菌は、ミトコンドリアのチトクローム *b* 遺伝子の 428 番目の塩基が G (グアニン) から C (シトシン) に変異し、その結果として 143 番目のアミノ酸がグリシンからアラニンに置換 (G143A) することで耐性を獲得していた (図-1) (宮川・富士, 2013)。

Molecular Diagnostic Methods for QoI Fungicide Resistance in the Rice Blast Pathogen. By Fumihiko SUZUKI, Yuriko HAYANO-SAITO and Keiko HAYASHI

(キーワード: *Pyricularia oryzae*, 殺菌剤耐性菌, 遺伝子診断法, QoI 剤耐性)

したがって、既存法と同様に、この 428 番目の SNP を識別することがマーカー開発の目標となる。

1 duplex マーカー B428gS

チトクローム *b* 遺伝子の 428 番目の塩基を標的として、耐性菌および感受性菌のそれぞれの SNP を検出する二つのマーカー (感受性菌型 Out1/In2 と耐性菌型 In3/Out4) を設計した (図-1)。In2 は耐性菌型アリルに、In3 は感受性菌型アリルにそれぞれ特異的なプライマーである。今回、4 本のプライマー (Out1/In2/In3/Out4) をすべて組合せた duplex マーカー (B428gS) にすることで、1 回の PCR で判定することに成功した (HAYASHI et al., 2015; 林・早野, 2015)。

(1) 反応条件

PCR 反応には、ブルーフリーディング機能を有さない DNA ポリメラーゼの使用を推奨する。筆者らは、TaKaRa Taq Hot Start Version (TaKaRa Taq HS, タカラバイオ) を使用している。1 検体当たりの反応溶液の総量を 10 μ l として、10x PCR buffer を 1 μ l, 200 μ M dNTPs, 0.25U TaKaRa Taq HS, 1 μ l の鋳型 DNA (約 0.5 ~ 1 ng 程度)、4 種類のプライマー (Out1, In2, In3, Out4) をそれぞれ

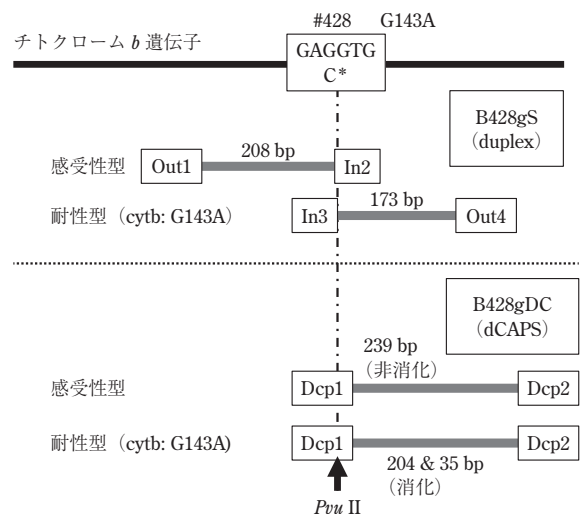


図-1 イネいもち病菌の QoI 剤耐性菌検定マーカーの設計 duplex マーカー B428gS (上) と dCAPS マーカー B428gDC (下)。