

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

(15) QoI 剤 (ストロビルリン系薬剤) 耐性ブドウべと病菌 (*Plasmopara viticola*)

山梨大学ワイン科学研究センター ^{すず}鈴 ^き木 ^{しゅん}俊 ^じ二

はじめに

ブドウべと病菌は絶対寄生菌であるため、薬剤耐性の診断を行う場合、人工培地を用いた試験法は適用できず、宿主植物（主にブドウ葉）を使用する生物検定法を行うしかなかった。ブドウべと病菌の生物検定の場合、検定用ブドウの育成、検定材料であるブドウべと病菌の維持等、生物検定を行う前準備に多大な時間、場所、そして労力が必要となる (WONG and WILCOX, 2000)。そのため、薬剤耐性ブドウべと病菌の全国分布を調査することは非常に困難であり、思うように調査が進められてこなかった。筆者らは、植物病原菌の薬剤耐性診断法として常法になりつつある遺伝子診断法 (ISHII, 2002) の一つ「PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polymorphism) 法」をブドウべと病菌に適用することにより、少量の検定材料でも簡便かつ迅速に、一度に多検体の薬剤耐性診断を可能とする技術開発を行った (FURUYA et al., 2009)。本稿では、QoI 剤 (ストロビルリン系薬剤) 耐性ブドウべと病菌の遺伝子診断法について、筆者らが実施している方法を紹介する。

I 遺伝子診断法

1 遺伝子診断に用いる材料

肉眼でブドウべと病の病徴が認められるブドウ器官であれば、特に制限はない。枯死したものや乾燥したもので十分に検定材料として使用可能である。罹病葉の場合、2～3 mm 四方の病徴が出現していれば診断に供試できる。実験室レベルにおいて、筆者らの方法は分生子 1 個からも標的とする遺伝子を増幅することが可能であった (FURUYA et al., 2009)。

2 検定材料からの DNA 抽出

植物や微生物から DNA を抽出するキットであればい

ずれのものでも使用可能であるが、筆者らは多くの検定材料から迅速に DNA を抽出できる REDExtract-N-Amp Plant PCR Kits (Sigma-Aldrich) を使用している。病徴を示す検定材料から 5 mm 四方の切片を切り取り、本キットのプロトコールに従い、DNA を抽出する。

3 PCR-RFLP 法

QoI 剤耐性ブドウべと病菌の多くは、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* のコドン 143 に相当する塩基が GGT から GCT に変異し、アミノ酸がグリシン (G) からアラニン (A) に置換する G143A 変異を有している (GISI et al., 2002)。この変異部位を標的とした PCR-RFLP 法はうどんこ病菌 (SIEROTZKI et al., 2000)、灰色かび病菌 (BANNO et al., 2009) 等多くの植物病原糸状菌で実績を挙げていることから、QoI 剤耐性ブドウべと病菌に関しても 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) PCR によるチトクローム *b* 遺伝子断片の増幅

センスプライマー Pvcybt295-315 (5'-GGGGTTTGT ATTACGGATCT-3') およびアンチセンスプライマー Pvcybt626-607 (5'-GGATTATTTGAACCTACCTC-3') を最終濃度 2 μM で使用し、10×緩衝液 (Taq DNA Polymerase に付属する緩衝液) 1 μl, DNA 抽出液 1 μl, dNTP Mixture 0.2 mM, Taq DNA Polymerase (Ex Taq Hot Start Version, Takara) 0.5 U を加え、滅菌水で全量を 10 μl とする。95℃で3分の熱変性後、95℃で20秒、55℃で30秒、72℃で30秒を30サイクル繰り返し、さらに72℃で5分反応させる。この段階で目的のチトクローム *b* 遺伝子断片が増幅されているか確認したい場合は、2ないし3 μl の PCR 反応液を2%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドによりアガロースゲルを染色し、紫外線照射下で増幅産物を観察する (目的のチトクローム *b* 遺伝子断片が増幅された場合、330 bp 程度のバンドが確認される)。

(2) 制限酵素処理

G143A 変異による遺伝子変異を特異的に認識する制限酵素として、*ApeKI* あるいは *Fnu4HI* や *ItaI* が使用可

QoI Oomycete Fungicide-resistance of *Plasmopara viticola*, the Pathogen of Grape Downy Mildew. By Shunji SUZUKI

(キーワード: QoI 剤, ストロビルリン系, チトクローム *b* 遺伝子, ブドウべと病菌, PCR-RFLP 法)