

ダイズ紫斑病菌のQoI剤感受性の遺伝子診断法

[要約]

県内に発生するダイズ紫斑病菌において、QoI剤に対する感受性低下菌は、チトクローム b タンパク質の遺伝子 (cyt-b) に変異が認められ、143 番目のアミノ酸がグリシンからアラニンに置換している。この遺伝子変異は、変異配列を認識する制限酵素を用いた PCR-RFLP により検出できる。

茨城県農業総合センター農業研究所・園芸研究所	令和2年度	成果区分	技術情報
------------------------	-------	------	------

1. 背景・ねらい

近年、種々の主要病害における耐性菌の発生が報告されており、本県のダイズ圃場においても、今年度、基幹防除薬剤である QoI 剤に対して感受性が低下した紫斑病菌の発生が認められた。耐性菌の発生は、効果的な病害防除に大きく支障をきたすことから、薬剤感受性のモニタリングが必要である。そこで、紫斑病菌の QoI 剤に対する感受性低下の有無を、省力的に診断する技術を確立する。

2. 成果の内容・特徴

- 1) 平成 30 年～令和元年産のダイズ紫斑粒から分離した 55 菌株および研究室保存菌 4 菌株 (平成 14 年～17 年産) について、QoI 剤の標的タンパク質チトクローム b をコードする遺伝子 (cyt-b) の部分配列を比較すると、2 か所 (コドン 129 およびコドン 143) にアミノ酸置換を伴う変異が認められる (図 1)。
- 2) アゾキシストロビンによる 100ppm を含む培地上で生育可能な感受性低下菌 25 菌株においては、コドン 143 の変異 (G143A: グリシン→アラニン) が生じている (図 1、表 1)。また、コドン 129 の変異 (F129L: フェニルアラニン→ロイシン) は、アゾキシストロビンによる最小生育阻止濃度が 100ppm 以下の 2 菌株で認められる。
- 3) G143A による感受性低下菌は、Standish ら (2015) の *Cercospora* 属 3 種の共通プライマー (CercUN-F、CercUN-R) を用いて cyt-b の部分配列を増幅後、変異配列を認識して切断する制限酵素 (AluI) で増幅産物を処理し、切断片の有無を確認することで診断できる (表 2、図 2)。

3. 成果の活用面・留意点

- 1) 供試菌 DNA は、滅菌した爪楊枝で供試菌の菌叢を数か所突き、AmpDirect Plus (S社) を含む PCR 反応液中に浸すことで簡易抽出できる。
- 2) F129L の変異は、複数の菌種で QoI 剤に対する低レベルな感受性低下への関与が示されている。したがって、本診断法では、防除効果への影響が大きいとされる G143A のみを診断対象とした。
- 3) 本成果は、PCR 装置を所有する試験研究機関、病害虫防除所等で活用できる。
- 4) 本検定で感受性低下菌の発生が明らかになった圃場では、QoI 剤 (FRAC コード 11) による効果の低下が認められる場合には、系統の異なる剤を使用する。
- 5) アゾキシストロビンを有効成分とするアゾキシストロビン水和剤 (商品名: アミスター20フロアブル) は、令和 3 年 3 月 1 日現在、ダイズ (紫斑病) に登録がある。

4. 具体的データ

表1 県内に発生するダイズ紫斑病菌における *cyt-b* 遺伝子の変異と QoI 剤感受性の関係

採集市町	供試菌数	感受性菌数	F129L検出菌数			G143A検出菌数		
			MIC値 < 1	≤ 100	> 100ppm	MIC値 < 1	≤ 100	> 100ppm
H14~H17年採集菌	4	4	0	0	0	0	0	0
所内(水戸市)	3	3	0	0	0	0	0	0
常陸太田市	3	2	0	0	0	0	0	1
大子町	4	4	0	0	0	0	0	0
水戸市	6	4	0	0	0	0	0	2
茨城町	2	1	0	0	0	0	0	1
行方市	5	5	0	0	0	0	0	0
石岡市	1	1	0	0	0	0	0	0
つくば市	4	0	0	0	0	0	0	4
稲敷市	3	3	0	0	0	0	0	0
筑西市	18	2	0	2	0	0	0	14
下妻市	3	0	0	0	0	0	0	3
八千代町	3	3	0	0	0	0	0	0
計	59	32	0	2	0	0	0	25

注1) F129L: コドン129の変異によるアミノ酸置換(フェニルアラニン→ロイシン)を示す。

G143A: コドン143の変異によるアミノ酸置換(グリシン→アラニン)を示す。

注2) MIC値: アゾキシストロピンを含有する寒天培地を用いた薬剤感受性検定における最小生育阻止濃度であり、>100ppmの菌株は、アゾキシストロピン水和剤の適用濃度以上で生育可能な感受性低下菌である。

129 アミノ酸 143 アミノ酸
↓ ↓

野生型 -FFLVYLHVGRGLYYGSYKAPRTLWVTIGTIIILVLMATAFLGYVLPYGMSLWGATVIT-
 G143A -FFLVYLHVGRGLYYGSYKAPRTLWVTIGTIIILVLMATAFLGYVLPYGMSLWAATVIT-
 F129L -FFLVYLHVGRGLYYGSYKAPRTLWVTIGTIIILVLMATALLGYVLPYGMSLWGATVIT-

図1 県内に発生するダイズ紫斑病菌における *cyt-b* 遺伝子の変異から推定されるアミノ酸置換

表2 紫斑病菌の *cyt-b* 部分配列増幅用プライマー

プライマー名	配列 (5'→3')	鎖長
CercUN-F	TCTTCTTAGTATACTTACACGTAGG	25mer
CercUN-R	AAACCTCCTCATAAAAACTCAAC	23mer

注) Standish ら (2015) による *Cercospora* 属 3 種 (*C. beticola*, *C. graminicola*, *C. kikutii*) の共通プライマーを用いた。

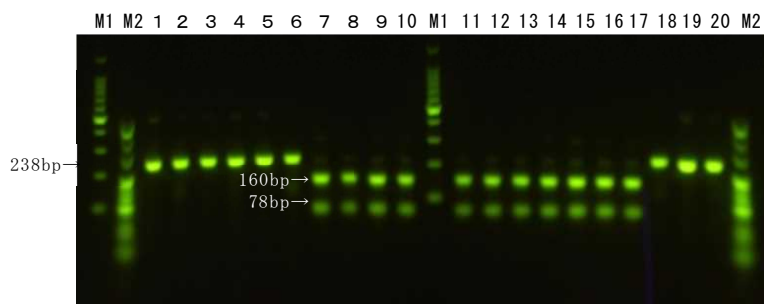


図2 ダイズ紫斑病菌の *cyt-b* 部分配列の PCR-RFLP による QoI 剤耐性変異の検出

注1) M1, M2: 100bp、20bp サイズマーカー、1~3: 研究室保存菌(H14~17年産)、4~20: H30~R1 採集菌

注2) 供試菌菌叢を滅菌した爪楊枝で数か所突き、AmpDirectPlus を添加した PCR 反応液に浸すことで DNA を簡易抽出し、Standish ら (2015) による *Cercospora* 属 3 種の共通プライマー (CercUN-F, CercUN-R) により *cyt-b* 遺伝子の部分配列 (238bp) を PCR で増幅後、制限酵素 AluI 処理 (37°C、1時間) した。次いで、0.5×TBE バッファーによる 2% アガロースゲル電気泳動で接断片の有無を解析した。

注3) 接断片 (160、78bp) が認められた 7~17 が感受性低下菌。

5. 試験課題名・試験期間・担当研究室

重要病害虫防除対策強化事業・平成 30 年度~令和 2 年度・農業研究所病虫研究室、園芸研究所病虫研究室