

[成果情報名] LAMP-FLP 法によるイネいもち病菌の薬剤抵抗性検定技術

[要約] TE バッファーの入ったチューブに葉いもち病斑を入れ、激しく上下に振るだけの簡易な DNA 調製液を用いた LAMP-FLP 法により、イネいもち病菌に対する QoI 剤および MBI-D 剤の薬剤抵抗性検定ができる。

[キーワード] イネいもち病菌、薬剤抵抗性検定、LAMP-FLP 法、QoI 剤、MBI-D 剤

[担当] 三重県農業研究所 農産物安全安心研究課

[分類] 研究

[背景・ねらい]

殺菌剤の使用は病害防除の根幹である一方、病原菌の薬剤抵抗性の発達は、殺菌剤の使用とは切り離せない課題であり、その管理が重要である。各都道府県では、どのような病害に対して抵抗性が発生しているかを検定（モニタリング）しているが、検定における人員不足や検定に関するノウハウ不足が課題である。

抵抗性検定には、PCR 法を使った遺伝子診断技術が活用されているが、PCR 法より簡易な遺伝子診断技術である LAMP-FLP 法を用いた薬剤抵抗性検定技術をイネいもち病菌を対象に開発する。さらに PCR 法では困難な病斑を直接検定することについて、阻害物質の影響を比較的受けにくい LAMP-FLP 法での利用技術を開発する。

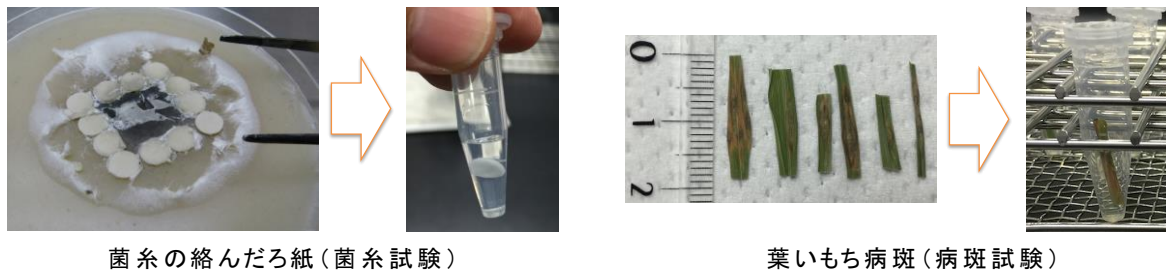
[成果の内容・特徴]

1. DNA 調製液は、TE バッファー (pH8.0) 400 μ l を 1.5ml 容チューブに入れ、葉いもち病斑 (約 1.5cm) を添加後 (早野ら,2015) 上下に激しく振るのみで得られる (図 1)。
2. 耐性変異の検出は、LAMP-FLP 法により、耐性変異の SNP 領域にハイブリダイズするクエンチャープローブを用いた会合曲線解析で行う。
3. LAMP 反応は、蛍光色素を測定解析できる LAMP 法用測定装置 LF-8 または GenieII (株式会社ニッポンジーン) を用いて、65°C で 30 分反応させる。
4. 1secPCR 法 (Hayashi et al 2015) で QoI 剤抵抗性を判定済みの菌糸培養乾燥ろ紙片を用いて試験したところ、会合曲線解析における蛍光値ピークの 2 群間 (R と S) の温度差は 4.6°C (95%信頼区間 4.2~5.0°C) となり、本法で正確に抵抗性を判定できる (図 2)。葉いもち病斑を用いて試験したところ、温度差は 4.3°C となり、本法で実用的に抵抗性を判定できる。
5. 同様に、MBI-D 剤についても、菌糸培養乾燥ろ紙片を用いて試験したところ、会合曲線解析における蛍光値ピークの 2 群間 (R と S) の温度差は 4.4°C (95%信頼区間 4.0~4.9°C) となり、本法で正確に抵抗性を判定できる。葉いもち病斑を用いて試験したところ、温度差は 4.3°C となり、本法で実用的に抵抗性を判定できる。
6. LF-8 を用いて反応を行うと、QoI 剤および MBI-D 剤それぞれ自動判定が可能である (図 3)。

[成果の活用面・留意点]

1. 葉いもち病斑は、採取後乾燥させたものを用いる。
2. LAMP 法用測定装置 LF-8 を用いる場合、外気温度によって、会合曲線解析における蛍光値ピークの 2 群間 (R と S) の温度閾値が変化する。本研究成果は外気温度 18°C で行った試験である。
3. 本成果は QoI 剤で 95% (n=65)、MBI-D 剤で 97% (n=34) と高率の判定結果であったが、一部反応しない場合があることに留意する。

[具体的データ]



菌系の絡んだろ紙 (菌系試験) 葉いもち病斑 (病斑試験)

図1 DNA 調製液の作製

TE バッファー400 μ l に、それぞれ菌系培養乾燥ろ紙片または葉いもち病斑を入れ、激しく上下に振る (20 秒 \times 3回)。100 μ l を別チューブへ入れ保管する。

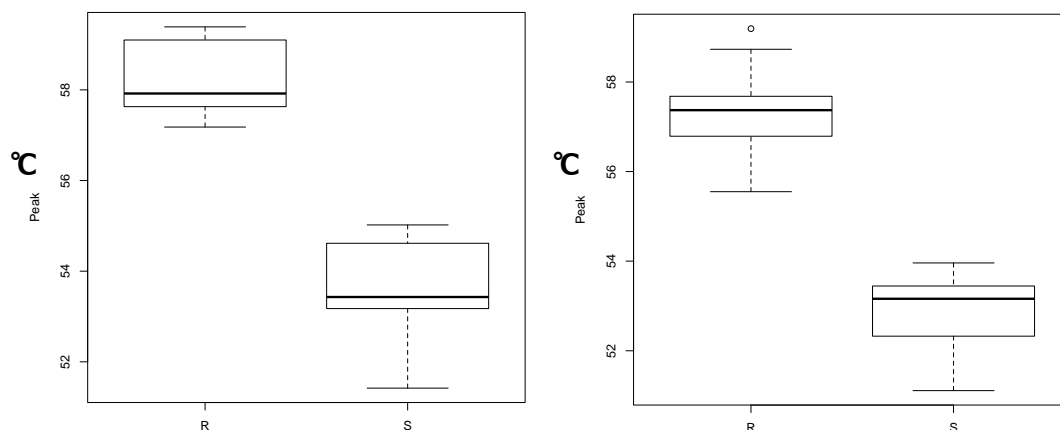


図2 イネいもち病菌に対する QoI 剤抵抗性検定結果

左図：菌系試験 72ろ紙 R 耐性菌 33 菌株 S 感受性菌 39 菌株

右図：病斑試験 62 病斑 R 耐性菌 35 病斑 S 感受性菌 27 病斑

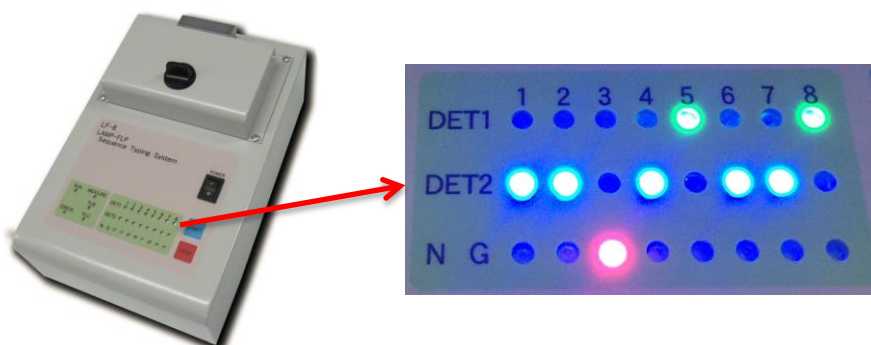


図3 LAMP 法用測定装置「LF-8」による自動判定

DET1: 耐性菌、DET2: 感受性菌、NG: 未反応

(鈴木啓史)

[その他]

研究課題名：「ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発プロジェクト」
 ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発

予算区分：農林水産省 委託プロジェクト 研究期間：2014～2016 年度

研究担当者：鈴木啓史、川上拓、黒田克利

発表論文等：