

新技術 解説

AS-qPCR 法による QoI 剤耐性コムギうどんこ病の 1 塩基変異の検出および愛知県内における本変異の分布調査への適用

愛知県農業総合試験場 つねかわ けんた いしい なおき
恒川 健太・石井 直樹

はじめに

農業生産現場において、殺菌剤耐性菌の顕在化は病害の大発生につながるため、しばしば大きな問題となる。一般に、殺菌剤耐性菌検定は病原体を培養し、培地検定や生物検定によって増殖阻害や発芽阻害を確認する方法で実施される。一方、殺菌剤の中でも作用点が単一のもの、病原体への作用機構との関係が、鍵と鍵穴の関係に似ていると言われる（農業工業会 Japan FRAC, 2020）。病原体の鍵穴にあたる酵素の作用点に、鍵である殺菌剤が入れば効果を示すが、病原体側の酵素遺伝子に変異が入って形が変わると、鍵である殺菌剤が入らなくなり耐性を獲得する。このような殺菌剤の場合は病原体の遺伝子変異を調べる遺伝子診断により、耐性判定が可能となる。今回取り上げたコムギうどんこ病 (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) の QoI 剤耐性変異は、筆者らによって上述の鍵穴の遺伝子変異した結果起こることが示されている（恒川ら, 2023）。本稿では、遺伝子診断の中でも迅速かつ労力が少ない手法である Quantitative allele-specific PCR 法（以下「AS-qPCR 法」）による対象病害の一塩基変異の検出、およびそれを用いた愛知県内の耐性菌の分布調査について紹介したい。

I コムギうどんこ病 QoI 剤耐性変異について

愛知県においてコムギうどんこ病は近年多発傾向にあり、2021 および 23、24 年には病害虫発生予察注意報を発表している。そのような状況下で、コムギうどんこ病に対する QoI 剤の効果低下が疑われる事例が発生した。QoI 剤耐性は、シトクロム b 遺伝子の塩基置換により、有効成分の菌への結合能力が低下することによって起こ

ることが知られている（田辺, 2020）。コムギうどんこ病の QoI 剤耐性では、海外ではシトクロム b 遺伝子の 143 番目のアミノ酸がグリシン（GGT）からアラニン（GCT）に変異する G143A 変異が報告されているほか、シトクロム b 遺伝子に変異が確認されていなくても感受性が低下する事例の報告（COWGER et al., 2022）があるが、国内のコムギうどんこ病で QoI 剤耐性変異の有無の調査は未報告であった。一方、トマト葉かび病菌やコムギ黄斑病菌などのほかの病原菌では、129 や 137 番目のアミノ酸変異による QoI 剤耐性獲得も報告されている（FRAC, 2006）。そこで、まずは愛知県におけるコムギうどんこ病の QoI 剤耐性の程度を明らかにするため、2021 年に県内の 6 地点から採取したコムギうどんこ病菌について、林（2009）の方法に準じてアゾキシストロビン水和剤を用いて生物検定を実施した。その結果、6 地点中、5 地点の採取株では供試した剤の効果がほとんどなく（病斑形成阻害率 0~5.6%）、シーケンス解析によってこれらの菌のシトクロム b 遺伝子はすべて G143A 変異を有していることが明らかとなった。

以上の結果から、愛知県内のコムギうどんこ病の QoI 剤耐性調査はシトクロム b 遺伝子の G143A 変異を遺伝子診断により確認することで実施可能であると判断した。うどんこ病のような絶対寄生菌を対象に薬剤感受性試験を実施する場合、対象となる菌を生植物上で維持管理しなければならない。そのため、十分な管理スペースの確保が必要となり、かつコンタミリスクも伴うため、注意深い作業が要求される。また、分生胞子を確保するための増殖過程を経ることから、サンプル採取から薬剤感受性検定結果が得られるまで、タイムラグが生じる。遺伝子診断が可能な場合は採取後、DNA を抽出すれば菌体を維持管理する必要がなく、その作業労力および時間を大幅に軽減できる点で、多検体を取り扱わなければならない耐性菌モニタリングに際して有効な手段である。

AS-qPCR to Diagnose Fungicide Resistance Gene Mutation and its Application to Monitoring of QoI Fungicide Resistance in Wheat Powdery Mildew. By Kenta TSUNEKAWA and Naoki ISHII

（キーワード：AS-qPCR 法、遺伝子診断、コムギうどんこ病、QoI 剤耐性、G143A 変異）