

通し番号 4 1 5 0

分類番号 17-25-12-03

(成果情報名) DMI剤耐性を示すキュウリうどんこ病菌 <i>CYP51</i> 遺伝子のPCR法による特異的検出	
[要約] DMI剤耐性を示すキュウリうどんこ病菌の <i>CYP51</i> 遺伝子に認められる塩基変異を基にプライマー及びPCR反応条件について検討したところ、耐性菌及び感受性菌をPCR法により特異的に検出することが可能になった。	
(実施機関・部名) 神奈川県農業技術センター野菜作物研究部	連絡先 0463-58-0333

[背景・ねらい]

近年、キュウリ栽培でうどんこ病の DMI 薬剤耐性菌が出現し、防除効果が低下している。そこで、DMI 剤の標的酵素である *CYP51* 遺伝子の違いを基に PCR 法による DMI 剤耐性菌の簡易診断技術を開発する。

[成果の内容・特徴]

1 耐性菌株 IB-6-5 の *CYP51* 遺伝子内に認められる 4 箇所の塩基置換を基に、フォワードプライマー (R1F、R2F) 及びリバースプライマー (R1R、R2R) を設計した。また、同じ部位に K-7-2 株の配列と相補的なプライマー (S1F、S2F 及び S1R、S2R) を設計した。

2 上記プライマーを組み合わせ、菌体から抽出したゲノム DNA 及び *CYP51* 遺伝子を単離したプラスミド DNA を鋳型に PCR を行った結果、R1F 及び R2R の組み合わせで強度耐性菌株の DNA にのみ特異的な増幅が認められた。また、S1F 及び S1R の組み合わせで感受性株の DNA に特異的な増幅が認められた (表 1)。これらの増幅産物をシーケンスしたところ、目的とする *CYP51* 遺伝子の配列と相同であった。

3 PCR 条件について検討を行ったところ、以下の反応条件が耐性菌株 (IB-6-5、IB-6-3、KN1-1) 及び感受性菌株 (K-7-2、S231) をそれぞれ検出するのに最適であった。

R1F-R2R: 熱変性 95°C 4分 → 熱変性 95°C 30秒 → アニーリング 65°C 30秒 → 伸長 72°C 30秒  
35 サイクル

S2F-S2R: 熱変性 95°C 4分 → 熱変性 95°C 30秒 → アニーリング 67°C 30秒 → 伸長 72°C 30秒  
35 サイクル

[成果の活用面・留意点]

圃場からリーフディスク法により収集したサンプルへの適用性について検討する必要がある。

[具体的データ]

表1 プライマー組み合わせと PCR による増幅産物の有無

プライマー		IB-6-5		K-7-2	
F	R	プラスミド	ゲノム	プラスミド	ゲノム
R1F	R1R	+*	+	+	+
R1F	R2R	+	+	-	-
R2F	R1R	+	+	+	+
R2F	R2R	+	+	+	+
S1F	S1R	+	+	+	+
S1F	S2R	+	+	+	+
S2F	S1R	+	+	+	+
S2F	S2R	-	-	+	+

\*) + : 増幅産物あり - : 増幅産物なし

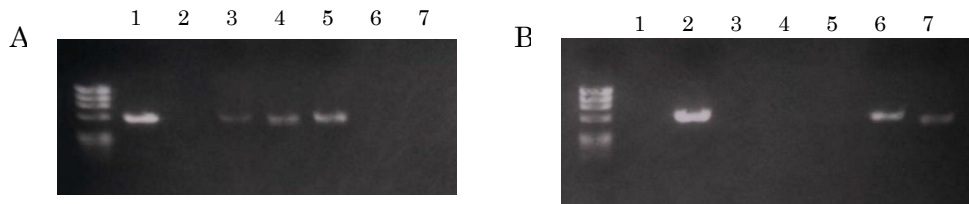


図1 DMI 剤耐性及び感受性を示すキュウリうどんこ病菌 *CYP51* 遺伝子の PCR による検出

レーン 1: IB-6-5(プラスミド)、2: K-7-2(プラスミド)、3: IB-6-5、4: IB-6-3、5: KN1-1、6: K-7-2、7: S231

A) プライマーセット: R1F-R2R

B) プライマーセット: S2F-S2R

[資料名] 平成 17 年度試験研究成績書 (野菜)

[研究課題名] 遺伝子診断法による殺菌剤耐性菌簡易検出技術の開発

[研究期間] 平成 16 年度～平成 18 年度

[研究者担当名] 野村 研・久保深雪・植草秀敏・北宜裕