

<b>LAMP-FLP法によるベノミル耐性サツマイモつる割病菌の簡易検出技術</b>			
[要約] サツマイモつる割病発病株等に形成された菌糸をTEバッファーに懸濁し、簡易抽出したDNA溶液を用いたLAMP-FLP法により、ベノミル耐性サツマイモつる割病菌の検出が可能である。			
茨城県農業総合センター農業研究所	令和2年度	成果区分	技術情報

### 1. 背景・ねらい

茨城県内において、平成28年に国内未報告のベノミル耐性サツマイモつる割病菌（以下、耐性菌）の発生を確認した。耐性菌のまん延防止のためには発生実態のモニタリングが重要であるが、既存の手法による菌の分離や薬剤感受性検定は労力と日数を要する。そこで、耐性菌の遺伝子変異部位をターゲットにしたLAMP-FLP法用プライマー・プローブを利用し、耐性菌の簡易な判別技術を確立する。

### 2. 成果の内容・特徴

- 1) TEバッファー400μlに発病株等から採取した菌糸を懸濁し、ボルテックスミキサーで20秒間攪拌した抽出液を鋳型DNAとし、LAMP-FLP法用プライマー・プローブセットおよびDNA増幅酵素を含む反応液に混和して68℃30分間反応させることでβ-チューブリン遺伝子の一部を増幅することができる（図1）。
- 2) β-チューブリン遺伝子の6番目のアミノ酸変異部位（H6L）をターゲットとしたプライマー・プローブセット（Codon6 ID1）を用いてLAMP反応を行い、会合曲線解析により増幅DNAの会合温度を測定すると、ベノミル感受性菌は約62℃に対し、耐性菌は約56℃と明確な温度差が認められ、耐性菌の判別が可能である（図1、表1）。
- 3) 同様に、β-チューブリン遺伝子の198番目のアミノ酸変異部位（E198K）をターゲットとしたプライマー・プローブ（Codon198 ID419）を用いた場合、会合温度はベノミル感受性菌は約61℃に対し、耐性菌は約51℃と明確な温度差が認められ、耐性菌の判別が可能である（表1）。
- 4) LAMP法用測定装置LF-8 Plusを用いることにより、耐性菌の自動判別が可能である（図1）。
- 5) 本技術により、菌糸を採取してから約2時間で耐性菌の判別ができる。

### 3. 成果の活用面・留意点

- 1) 本成果は、LAMP法用測定装置LF-8 Plusおよび専用解析ソフト（LF-8 Manager）を用いて、室温25℃で解析を行った結果である。本機器を用いて解析を行う場合、室温によって会合温度が若干変動することがある。
- 2) 本法を用いて耐性菌または感受性菌として判別された場合でも、サツマイモつる割病菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*）であることを確認するため、別途、病原性検定が必要である。
- 3) 耐性菌対策技術については、平成29年度主要成果（技術情報）「茨城県におけるベノミル剤耐性サツマイモつる割病菌の発生」を参照する。

#### 4. 具体的データ

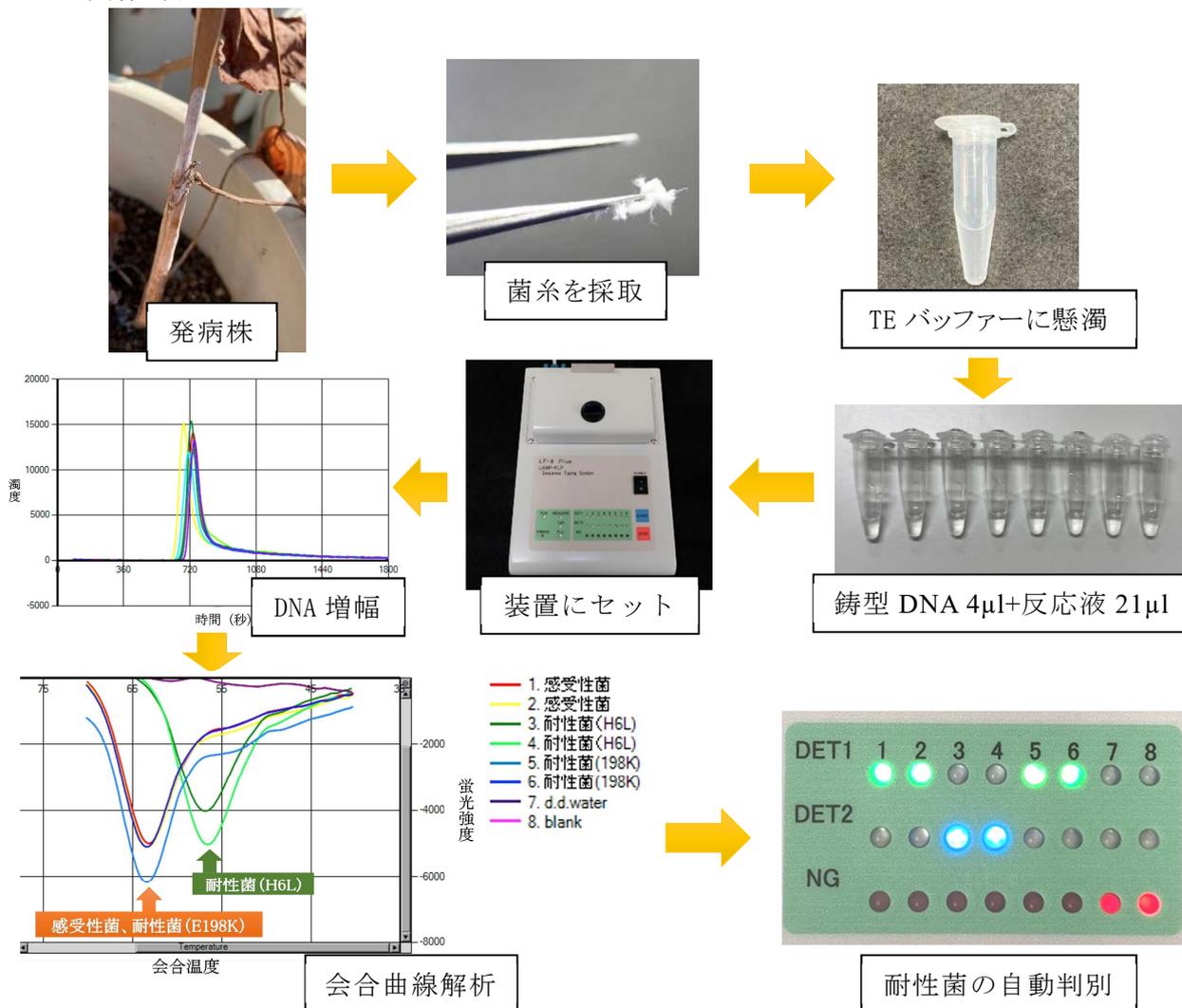


図1 LAMP-FLP法による耐性菌判別技術の操作手順

注1) 会合温度は、高温下で1本鎖に解離したDNAが2本鎖に戻る温度である

注2) 検出結果はプライマー・プローブセット (Codon6 ID1) を用いた場合の例である

表1 サツマイモつる割病菌のβ-チューブリン遺伝子の部分配列における会合温度の差異

供試菌株	Codon6 ID1		Codon198 ID419	
	会合温度 (°C)	ベノミル感受性菌との会合温度差 (°C)	会合温度 (°C)	ベノミル感受性菌との会合温度差 (°C)
ベノミル感受性	62.2	-	60.8	-
ベノミル耐性 (H6L)	55.7	6.5	60.3	0.5
ベノミル耐性 (E198K)	62.2	0	51.1	9.6

#### 5. 試験課題名・試験期間・担当研究室

新発生薬剤耐性サツマイモつる割病菌まん延防止のためのモニタリングと防除技術の開発・平成30年度～令和3年度・病虫研究室