

# いちごうどんこ病DMI剤耐性菌の遺伝子診断法

## 1. 試験のねらい

いちごでは、うどんこ病が最重要病害の一つとなっているが、防除薬剤である DMI 剤の効力低下が問題となっている。そこで、いちごうどんこ病菌の DMI 剤標的酵素遺伝子 (*CYP51*) を解析し、DMI 剤耐性菌の遺伝子レベルでの特異的な変異を見出すとともに、その診断法を開発する。

## 2. 試験方法

### (1) 供試菌株

いちごうどんこ病菌は、JA 全農営農・技術センターから分譲された DMI 剤に対する感受性菌株、感受性低下菌株 (耐性菌) および農試場内で DMI 剤の連用処理により選抜した菌株を用いた。

### (2) *CYP51* 遺伝子の塩基配列の解析

供試菌株から DNA を抽出し、設計したプライマー C51Str-F/C51Str-R により、*CYP51* 遺伝子全長を増幅した。*CYP51* 遺伝子をクローニングした後、その全塩基配列を決定した。

### (3) PCR 法による DMI 剤耐性菌の遺伝子診断法の開発

DMI 剤耐性菌に特異的な *CYP51* 内の変異を見出し、それを検出するためのプライマーを設計するとともに、最適な PCR 条件を検討した。

### (4) 現地ほ場での DMI 剤耐性菌の発生状況

県内各地の現地ほ場から、いちごうどんこ病罹病葉を採集し、開発した PCR 法で DMI 剤耐性菌の発生状況を調査した。

## 3. 試験結果および考察

(1) いちごうどんこ病 DMI 剤耐性菌には、*CYP51* コドン 461 に G (グリシン) から S (セリン) へのアミノ酸置換を伴う 1 塩基変異をもつ菌株 (変異型) があることを明らかにした (図-1)。

(2) *CYP51* に 1 塩基変異がなくとも (野生型)、*CYP51* の上流に 360bp の挿入配列があり耐性を示す菌株や挿入配列も認められない DMI 剤耐性菌株もあることを明らかにした。

(3) *CYP51* コドン 461 の 1 塩基変異を検出するための変異型検出用プライマー、野生型検出用プライマーを作製し、PCR 条件は 94 °C × 1min、65 °C × 1min、72 °C × 1min、40 サイクルが最適であることを明らかにした (図-2)。

(4) 現地ほ場から採集したいちごうどんこ病菌を PCR 法で検定した結果、病斑によっては *CYP51* の野生型 DNA をもつ菌株とコドン 461 に 1 塩基変異をもつ菌株が、それぞれ単独あるいは重複感染していることが明らかになった。また、*CYP51* コドン 461 に 1 塩基変異を有するタイプの DMI 剤耐性菌が県内に広く分布している可能性が示唆された (表-1)。

## 4. 成果の要約

いちごうどんこ病 DMI 剤耐性菌には、いくつかのタイプがあることを明らかにした。その一つに *CYP51* コドン 461 に 1 塩基変異を有するタイプがあることを見出し、その遺伝子診断法を確立した。

(担当者 環境技術部 病理昆虫研究室 中山喜一・大関文恵)

DMI 剤感受性菌:     ...CCG TAT CTT CCA TTT **G**GC GCA GGG AGA CAT...  
                           P   Y   L   P   F   **G**   A   G   R   H

DMI 剤耐性菌:     ...CCG TAT CTT CCA TTT **A**GC GCA GGG AGA CAT...  
                           P   Y   L   P   F   **S**   A   G   R   H

図-1 いちごうどんこ病菌 *CYP51* 遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列(一部)  
 太字が塩基変異がみられるコドン461部位

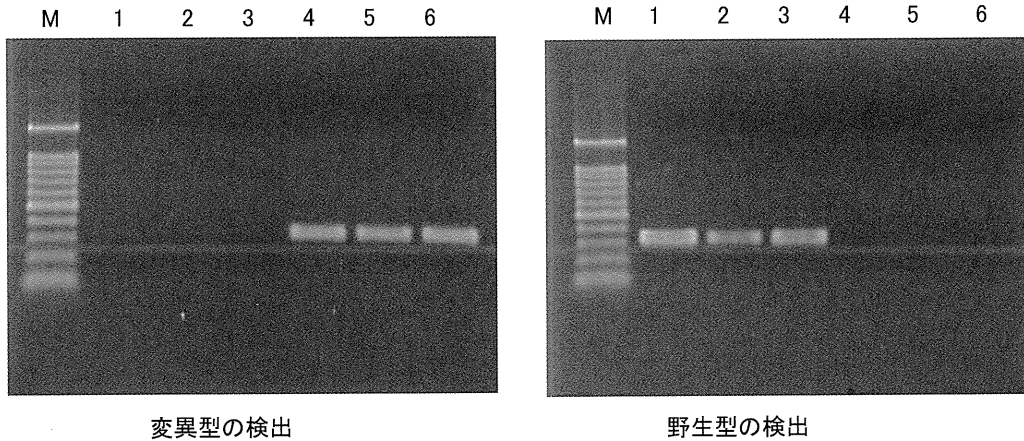


図-2 変異型に特異的なプライマーによるDMI剤耐性いちごうどんこ病菌の検出

M: 100bpラダー  
 1: 98HOK-1(野生型)     2: 98HOK-1M(野生型)     3: DMI11-6(野生型)  
 4: TOC5(変異型)       5: SGK13-1(変異型)     6: SGK13-2(変異型)

注 1) 変異型はDMI剤耐性菌を示す。  
 2) 変異型の検出では、野生型の試料1～3は反応しない。

表-1 いちごうどんこ病菌現地採集株のPCR  
 によるDMI剤耐性の診断結果

地点No.	病斑No.	野生型	変異型
1	1	+	-
	2	+	-
2	1	+	-
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	-
	5	+	-
3	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
	4	-	+
4	1	+	+
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	+
	5	+	-
5	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
	4	+	-
6	1	+	-
	2	+	+
	3	+	-