

特集：DMI 剤耐性菌に関する最近の話題

# イチゴうどんこ病菌における DMI 剤耐性菌の遺伝子診断

栃木県農業試験場  なか  やま  き  いち

## はじめに

イチゴうどんこ病（病原：*Sphaerotheca aphanis* var. *aphanis*）は、炭疽病、萎黄病、灰色かび病などと並んでイチゴの最重要病害の一つである。本病の防除には、微生物農薬も含めて多くの薬剤が農薬登録されている。なかでも、DMI 剤は防除の切り札的な薬剤として位置づけられている。

しかし、近年現地ではうどんこ病に対する DMI 剤の効力低下が懸念されている。本菌が絶対寄生菌であるため、DMI 剤に対する感受性の検定は、イチゴ葉を用いた生物検定（殺菌剤耐性菌研究会編，1998）に頼らざるを得ないのが現状である。この生物検定は、イチゴうどんこ病菌フリーのイチゴ葉を多数準備したり、検定結果の判定までに時間を要するなどの短所もある。

そこで、DMI 剤耐性イチゴうどんこ病菌の迅速で高精度な診断法として、遺伝子診断技術の開発に取り組み、以下の成果が得られたのでその概要を紹介する。

## I DMI 剤標的酵素遺伝子（CYP51）の塩基配列解析

### 1 CYP51 遺伝子の全塩基配列の決定

イチゴうどんこ病菌 CYP51 遺伝子の塩基配列解析には、JA 全農営農・技術センターから分譲された菌株を供試し、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。まず、オオムギうどんこ病菌（*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*）、ブドウうどんこ病菌（*Uncinula necator*）の CYP51 遺伝子の保存領域から degenerate primer を作製し、PCR 増幅断片をクローニングして部分塩基配列を決定した。この塩基配列を基にゲノムウォーキング法により、CYP51 遺伝子の全塩基配列を決定した。CYP51 遺伝子の構造は、オオムギうどんこ病菌、ブドウうどんこ病菌と同様に、六つの保存領域と二つのイントロンで構成され、全長 1,686 bp で

あった（図-1；後藤ら，2002）。

この全塩基配列の解析結果から、CYP51 遺伝子全長を増幅するプライマー（C51Str-F/C51Str-R）を作製し、罹病葉からの検出条件を検討した。その結果、品種‘とちおとめ’の罹病葉 0.1 g から DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN 製）で全 DNA を抽出し、設計したプライマーを用いた PCR により CYP51 遺伝子を特異的に検出できることが明らかになった。

### 2 CYP51 遺伝子内の変異検索

JA 全農営農・技術センターが全国から採集した菌株および栃木農試場内で DMI 剤連用処理により選抜した菌株を供試して、DMI 剤耐性菌に特異的な CYP51 遺伝子内の変異を検索した。

なお、DMI 剤連用処理は、感受性菌（菌株 98HOK-1）を感染させたイチゴにトリフルミゾール 30% 水和剤を 50,000 倍液の散布からスタートし、約 1 週間間隔で散布して、2,000 倍液まで濃度を徐々に高めていった。この連用処理は 2003 年、05 年および 06 年の 3 年間にわたって実施した。菌株 98HOK-1 への散布は、最終的に計 29 回となった。

CYP51 遺伝子の解析の結果、供試菌株のうち菌株 TOC5 などには感受性菌 98HOK-1 との比較から 1 塩基変異が存在することが明らかになった。この 1 塩基変異は、コドン 461 部位に当たり塩基配列が GGC から AGC へ変異しており、アミノ酸は G（グリシン）から S（セリン）に置換していると推定された（図-2）。なお、この変異部位は、キュウリうどんこ病 DMI 剤耐性菌で報告されている CYP51 遺伝子内の塩基変異のうち、すべての耐性菌に共通的に認められている変異部位（久保，2007）と同一であった。

オオムギうどんこ病菌、ブドウうどんこ病菌の DMI 剤耐性菌では、CYP51 遺伝子のコドン 136 がチロシン（TAT）からフェニルアラニン（TTT）へ変異し、これ

PCR-based Detection of DMI-Resistant Isolates in Strawberry Powdery Mildew Fungus. By Kiichi NAKAYAMA

（キーワード：イチゴうどんこ病菌，DMI 剤耐性菌，遺伝子診断）



図-1 イチゴうどんこ病菌 CYP51 遺伝子の構造

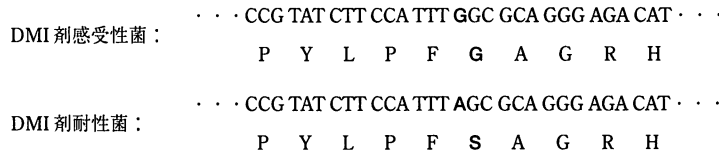


図-2 イチゴうどんこ病菌 *CYP51* 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列 (一部)  
太字が塩基変異が見られるコドン 461 部位。

が特異的な変異部位とされている (DÉLYE et al., 1997; 1998)。そこで、この変異を想定したプライマー (C51Str-F/Mut-A, C51Str-F/Mut-T) を設計し AS-PCR (Allele specific PCR) を行ったが、イチゴうどんこ病菌の供試菌株にはコドン 136 に 1 塩基変異をもつものは認められなかった (後藤ら, 2002)。

### 3 *CYP51* 遺伝子上流域における挿入配列の存在

供試菌株の *CYP51* 遺伝子上流域を解析した結果、*CYP51* 遺伝子の 75 bp 上流に 360 bp の挿入配列が認められた。これはリング黒星病菌 (*Venturia inaequalis*) の DMI 剤耐性菌に見いだされる変異 (挿入配列) と同様であった (SCHNABEL et al., 2001)。設計したプライマー (C51Pro-F/C51Pro-R) を用いて PCR 検定の結果、採集したイチゴうどんこ病菌のうち、一部例外はあるが、ほとんどの耐性菌に共通的に挿入配列 (360 bp) が確認された (後藤ら, 2004)。これに対して、*CYP51* 遺伝子のコドン 461 に 1 塩基変異をもつ菌株には、約 4.4 kb の挿入配列の存在が示唆された。

現時点では、イチゴうどんこ病菌の DMI 剤に対する耐性機構と *CYP51* 遺伝子上流域の挿入配列との因果関係は判然としない。ただ、*CYP51* 遺伝子のコドン 461 に 1 塩基変異をもたない DMI 剤耐性菌は、ほとんどの菌株で *CYP51* 遺伝子上流域に 360 bp の挿入配列が認められ、状況証拠的には耐性化に関与している可能性が考えられる。今後解明すべき検討課題である。

### 4 イチゴうどんこ病菌 DNA の簡易抽出法

DNA 抽出キットに比べて、より安価で操作を簡便化する目的で各種抽出方法を検討したところ、イソプロパノールによる沈殿法が有効であった。具体的には、イチゴ罹病葉をコルクボーラーで打ち抜き、そのリーフディスク 1 枚を 1.5 ml チューブに入れ、500  $\mu$ l の 0.1% Tween-20 を加えた後、かくはんし、リーフディスクを取り除く。さらに遠心分離により分生子を沈殿させ、上清を捨て、50  $\mu$ l の TE バッファーを加えベレットミキサーで分生子を破壊する。再度遠心分離し、不純物を沈殿させて上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、等量のイソプロパノールを加えて混合する。遠心分離により

DNA を沈殿させた後、真空乾燥し、20  $\mu$ l の TE バッファーに懸濁し、DNA 試料とする。現地で発生しているイチゴうどんこ病菌の耐性菌検定を行うためには、簡易で安価な DNA 抽出法の開発が不可欠であり、本抽出法は非常に有効である。

## II PCR による DMI 剤耐性菌の遺伝子診断手法の開発

### 1 特異的なプライマーの設計

前章までに述べたイチゴうどんこ病菌の DMI 剤標的酵素遺伝子 (*CYP51*) の塩基配列解析の結果、DMI 剤耐性に大きく関与していると考えられるコドン 461 部位における 1 塩基変異を明らかにした。そこで、この 1 塩基変異を検出するための遺伝子診断手法を開発した。リバースプライマーは、3' 末端を変異部位に設定し、田淵ら (特開 2004-248635) の方法に準じて 3' 末端から 2 塩基隣りに人為的に塩基置換を導入することでミスアニーリングを防ぐように設計した。

設計したプライマー 1532F と 1532R-T (耐性菌 (変異型) 検出用) または 1532R-C (野生型検出用) を用いた PCR により、耐性菌 (変異型) を特異的に検出することが可能であった (図-3; 大関ら, 2007)。

### 2 鋳型 DNA 量の違いと PCR の検定結果

供試菌株には、コドン 461 に 1 塩基変異をもつ耐性菌株 TOC5 および感受性菌株 98HOK-1 を用いた。供試菌株を感染させたイチゴ罹病葉から DNeasy Plant Mini Kit により抽出した鋳型 DNA をそれぞれ 1, 5, 10  $\mu$ l ずつ供試して PCR を行った。その結果、鋳型 DNA を通常の 10 倍加えた 10  $\mu$ l においても野生型検出系では野生型、耐性菌 (変異型) 検出系では変異型菌株のみが検出され、供試した DNA 量の範囲内ではそれぞれ安定した検出が可能であった (図-4)。

### 3 野生型 DNA, 変異型 DNA 混在下での PCR 検定

野生型菌株 (98HOK-1) と変異型菌株 (TOC5) の DNA を 10:1 ~ 1:10 の割合で混合し、その 1  $\mu$ l を供試して PCR を行った。その結果、混合比が、10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 のいずれの場合

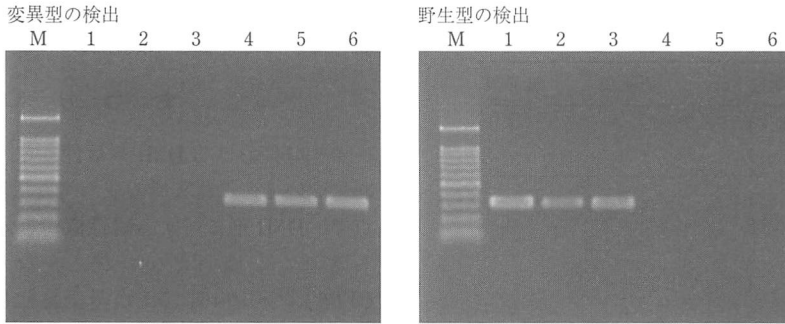


図-3 特異的プライマーを用いた DMI 剤耐性イチゴうどんこ病菌の検出  
 M : 100 bp ラダー, 1 : 98HOK-1 (野生型), 2 : 98HOK-1M (野生型),  
 3 : DMI11-6 (野生型), 4 : TOC5 (変異型), 5 : SGK13-1 (変異型),  
 6 : SGK13-2 (変異型).

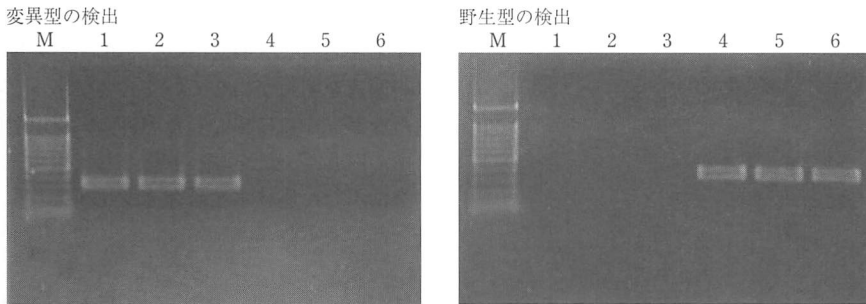


図-4 鋳型 DNA 量の違いと PCR 産物の泳動パターン  
 M : 100 bp ラダー, 1 : TOC5 (DNA 1 $\mu$ l), 2 : TOC5 (DNA 5 $\mu$ l), 3 : TOC5 (DNA 10 $\mu$ l),  
 4 : 98HOK-1 (DNA 1 $\mu$ l), 5 : 98HOK-1 (DNA 5 $\mu$ l), 6 : 98HOK-1 (DNA 10 $\mu$ l).

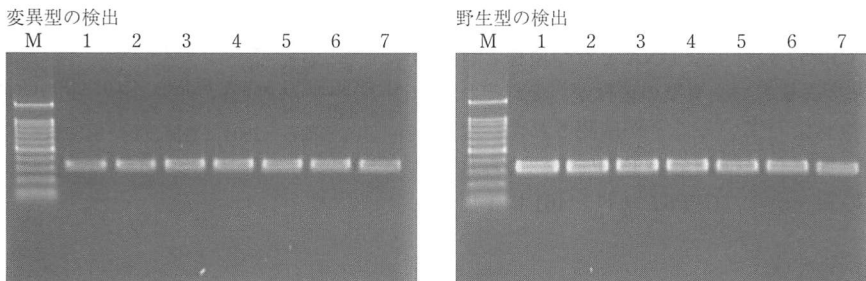


図-5 野生型・変異型 DNA 混在下での PCR 産物の泳動パターン  
 M : 100 bp ラダー. 以下, 98HOK-1 と TOC5 の混合割合は, 1. 10 : 1, 2. 5 : 1,  
 3. 2 : 1, 4. 1 : 1, 5. 1 : 2, 6. 1 : 5, 7. 1 : 10.

でも野生型菌株および変異型菌株の両方を検出することが可能であった。ただし、野生型菌株、変異型菌株ともに PCR 産物のサイズが同じであるほか、これらの菌株の混合比が違っていても遺伝子の増幅量にはほとんど変化がなく、定量性は認められなかった (図-5)。

以上から、我々が開発した診断法は、*CYP51* 遺伝子

コドン 461 に 1 塩基変異を有するタイプの DMI 剤耐性菌の検出に有効であることが明らかになった。

### III 現地での DMI 剤耐性菌の発生状況

現地圃場からイチゴうどんこ病罹病葉を採集し、イソプロパノールを用いた簡易な方法で DNA を抽出し、

表-1 イチゴ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	+	-

+: 野生型または変異型にそれぞれ特異的な増幅産物を形成, -: 特異的な増幅産物の形成なし.

DMI剤耐性菌の発生状況をPCRで調査した。その結果、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塩基変異をもつ変異型の菌株が、それぞれ単独あるいは重複感染していることが確認された。なお、重複感染は、採集した罹病葉の13.0%で認められた。また、今回の調査から、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)。

## おわりに

イチゴにおけるDMI剤耐性うどんこ病菌の遺伝子診断について、これまでの取り組み状況を紹介した。現時点で、DMI剤に対する耐性機構を分子生物学的に解明しきれたとはいえないが、少なくとも耐性菌にはCYP51コドン461に1塩基変異をもつタイプがあることが判明し、その遺伝子診断技術を開発することもできた。また、コドン461に1塩基変異がないDMI剤耐性菌には、ほとんどの菌株でCYP51の上流域に360bpの挿入配列が認められ、挿入配列の存在もDMI剤耐性化に関与している可能性が示唆された。

今後、本法を用いて県内での耐性菌の発生状況を調査するとともに、DMI剤の実用濃度における効力低下との関連を明らかにしていく必要があると考えている。

なお、ここに紹介した内容は、(独)農業環境技術研究所の石井英夫氏をリーダーとして取り組んだ「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」にかかわる成果の一部である。

## 引用文献

- 1) DELYE, C. et al. (1997): Appl. Environ. Microbiol. 63: 2966 ~ 2970.
- 2) ——— et al. (1998): Curr. Genet. 34: 399 ~ 403.
- 3) 後藤知昭ら (2002): 日植病報 (講要) 69: 38.
- 4) ———ら (2004): 同上 (講要) 70: 253.
- 5) 久保深雪 (2007): 第17回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集: 61 ~ 68.
- 6) 日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会編 (1998): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル, 日植防, 東京, p. 104 ~ 107.
- 7) 大関文恵ら (2007): 平成19年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集: 84.
- 8) SCHNABEL, G. and A. L. JONES (2001): Phytopathology 91: 102 ~ 110.
- 9) 田淵宏明ら (2004): 特開2004-248635.