

# イチゴうどんこ病菌のDMI剤標的酵素遺伝子の解明

## 1. 試験のねらい

イチゴうどんこ病菌は、人工培地上での培養が不可能であり、薬剤感受性の検定にはリーフディスク法しかなく、植物の育成および検定に多くの労力や時間が必要である。そこで、イチゴうどんこ病 DMI 剤耐性菌の PCR 法による迅速で高精度な遺伝子診断手法を開発するため、イチゴうどんこ病菌の DMI 剤標的酵素遺伝子を解明する。

## 2. 試験方法

- (1) 試験場所：農業試験場内実験室
- (2) 供試菌株：感受性の異なるイチゴうどんこ病菌（98HOK-1、95KS-5、Ka：JA 全農営農・技術センターより分譲）
- (3) 処理方法：イチゴうどんこ病菌の DNA 抽出は、うどんこ病フリー条件下で育成した「とちおとめ」の葉に接種したうどんこ病菌から分生子を採取し、DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN 社）により行った。

DMI 剤標的酵素遺伝子（*CYP51*）の増幅は、表 - 1 に示すプライマーを用いて、PCR 反応（94 × 1分、60 × 1分、72 × 1分：30回）を行った。この PCR 反応で得られた増幅断片は、pGEM-T easy vector system（Promega 社）を用いてクローニング後、DTCS Quick Start Master Mix（BECKMAN COULTER 社）によりシーケンス反応（96 × 20秒、50 × 20秒、60 × 40秒：30回）を行い、CEQ8000（BECKMAN COULTER 社）で塩基配列を決定した。

DMI 剤標的酵素遺伝子上流部の増幅には、Universal GenomeWalker kit（Clontech 社）を用いて構築したライブラリーの増幅断片からプライマーを設計し（表 - 1）、PCR 反応（94 × 1分、60 × 1分、72 × 1分：30回）を行った。

## 3. 試験結果および考察

- (1) *CYP51* 遺伝子の構造は、オオムギうどんこ病菌やブドウうどんこ病菌などと同様に、6つの保存領域と2つのイントロンで構成され、その全長は1687bpであった（データ省略）。
- (2) DMI 剤感受性の異なる2菌株（98HOK-1 および 95KS-5）における *CYP51* 遺伝子塩基配列の比較の結果、その相同性は100%であり、点突然変異などは見いだされなかった（データ省略）。
- (3) DMI 剤感受性の低下した1菌株（Ka）で *CYP51* 遺伝子の75bp上流に360bpの挿入配列が確認された（図 - 1 および図 - 2）。

## 4. 成果の要約

感受性の異なるイチゴうどんこ病菌において、DMI 剤標的酵素遺伝子（*CYP51*）の変異は見いだされなかった。しかし、感受性の低下した1菌株で *CYP51* 遺伝子上流域に挿入配列が確認されたことから、今後この機構を解明することにより DMI 剤耐性菌の遺伝子診断手法の開発に活用できると考えられた。

（担当者 環境技術部 病理昆虫研究室 後藤知昭）

表 - 1 イチゴうどんこ病菌のDMI剤標的酵素遺伝子の増幅に用いたプライマー

名称	配列	増幅部位
C51-StrF	5'- GTTTCTCCGATCTAAGGAATCTTGT -3'	<i>CYP51</i> 遺伝子全長
C51-StrR	5'- TTAAGTATACACCGTGATGACGAAT -3'	
C51-ProF	5'- TACCAGACGAGGATTTGAGGA -3'	<i>CYP51</i> 遺伝子上流部
C51-ProR	5'- GACAGCCAGAACCAAACAAGA -3'	

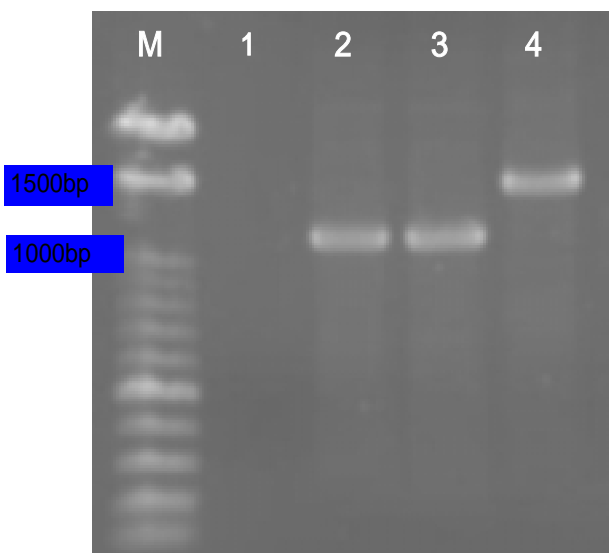


図 - 1 イチゴうどんこ病菌の*CYP51*遺伝子上流域の増幅

M: 100bpラダー  
 1: 健全葉            2: 98HOK-1接種葉  
 3: 95KS-5接種葉    4: Ka接種葉

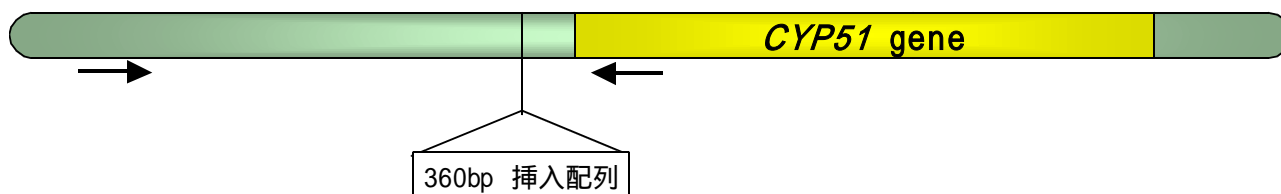


図 - 2 *CYP51*遺伝子上流にみられた挿入配列の位置  
 矢印はプライマー配列