

## 試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	研究
課題名：千葉県で発生するナシ黒星病菌の <i>CYP51</i> 遺伝子の解析			
<p>[要約] 平成 30 年から令和 2 年にかけて千葉県内で採取した 107 菌株のナシ黒星病菌の <i>CYP51</i> 遺伝子を解析したところ、105 菌株の塩基配列は完全に一致した。また、アミノ酸配列を野生型の配列と比較したところ 4 か所の変異が確認されたが、DMI 剤耐性との関連性は低いことが推察された。</p>			
キーワード ナシ黒星病、DMI 剤、薬剤耐性、 <i>CYP51</i>			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター 生物工学研究室	
	協力機関	農林総合研究センター 病理昆虫研究室、全国農業協同組合連合会千葉県本部、千葉農業事務所、東葛飾農業事務所、印旛農業事務所、香取農業事務所、長生農業事務所、夷隅農業事務所、君津農業事務所	
実施期間	2018 年度～2020 年度		

### [目的及び背景]

DMI 剤は浸透移行性がありナシ黒星病に対して長らく卓効を示してきたが、近年国内において実用上問題となる耐性菌の発生が報告されている。このような中、国内で分離された一部の DMI 剤耐性菌において、DMI 剤が標的としている酵素である *CYP51* をコードしている遺伝子内に特有の変異が起きていることが報告された。そこで、DMI 剤耐性菌の遺伝子診断技術の開発に向けて基礎的知見を収集するため、県内主要産地のナシ黒星病菌を採取し、*CYP51* 遺伝子の解析を行う。

### [成果内容]

- 1 平成 30 年から令和 2 年にかけて、「DMI 剤耐性ナシ黒星病の簡易なモニタリング法の開発」(令和 3 年度試験研究成果普及情報)における鉢苗を用いたモニタリング実施圃場を含む県内 7 地域 16 か所のナシ圃場から採取したナシ黒星病菌 107 株を供試した(表 1)。
- 2 1 で採取した 107 菌株から DNA を抽出し、*CYP51* 遺伝子を増幅するプライマー(表 2)を用いて PCR を行い、ダイレクトシーケンスを行ったところ、平成 30 年に香取市で採取された 2018KT01 株を始めとする 105 株の *CYP51* 遺伝子の塩基配列は完全に一致した。他の 2 株はそれぞれ令和 2 年に八千代市及び松戸市から採取されたがこれらの塩基配列は完全に一致した。
- 3 2018KT01 株及び令和 2 年に八千代市から採取された 2020YC01 株と DMI 剤が使用される以前の昭和 54 年に茨城県で採取されたナシ黒星病菌の野生型 JS-18 株の塩基配列(Cools et al. 2002)との相同性はそれぞれ 99.4%及び 99.6%である(図 1)。

- 4 2018KT01 株及び 2020YC01 株と野生型 JS-18 株との *CYP51* 遺伝子のアミノ酸配列を比較した場合、前者は Y102N, L140F, Q359-, G428R のアミノ酸置換を伴う 4 か所の変異が確認され、後者には Y102N, M141L, Q359-, G428R の変異が確認される。しかし、Ishii et al. (2021) が報告した一部の DMI 剤耐性ナシ黒星病菌に特有の *CYP51* 遺伝子の変異 G60S、S310P、P324S は確認されない (図 2)。
- 5 鉢苗を用いたモニタリング実施圃場では千葉県で発生するナシ黒星病菌に DMI 剤耐性は確認されなかったことから、2018KT01 株をはじめとする 105 菌株の *CYP51* 遺伝子の変異は、DMI 剤耐性との関連性は低いことが推察される。

[留意事項]

ナシ黒星病菌の DMI 剤耐性菌の遺伝子診断技術は確立されておらず、*CYP51* 遺伝子の塩基配列情報のみでは、DMI 剤耐性の有無を判断することができないので注意する。

[普及対象地域]

千葉県内のナシ生産者及び指導機関

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

表 1 *CYP51* 遺伝子の解析に供試したナシ黒星病菌の採取圃場、採取年ごとの菌株数

採取圃場	採取年			鉢苗設置によるDMI剤耐性菌の モニタリング調査実施年 <sup>注)</sup>
	平成30年	令和元年	令和2年	
千葉市（農林総研）		7	4	令和元年
市原市	3			平成30年
八千代市			4	-
船橋市	5		2	平成30年～令和2年
市川市	3	5	4	平成30年～令和2年
鎌ヶ谷市			4	-
松戸市			2	-
白井市①	4	5		平成30年～令和元年
白井市②	3	4	4	平成30年～令和2年
成田市			4	-
印西市			4	-
香取市	5	5		平成30年～令和元年
一宮町①		8		-
一宮町②			3	-
いすみ市			5	令和2年
木更津市		6	4	令和元年～令和2年
計	23	40	44	
総計			107	

注) 令和3年度試験研究成果普及情報「DMI剤耐性ナシ黒星病の簡易なモニタリング法の開発」のモニタリング調査実施圃場

表 2 ナシ黒星病菌の *CYP51* 遺伝子のシークエンスに用いたプライマー

セット	プライマー名	配列 (5'-3')
A	VN14DM1-F <sup>2)</sup>	GGCCACCACCTCACCACCAAC
	VNcyp453-R	ACAACATCGGAACCGAAGAC
B	VNcyp311-F	ACCTTCATTCTCCTCGGCAG
	VNcyp867-R	TCTCCGTCATCTTCTGTTCG
C	VNcyp711-F	TTACAAGGCAAGGAGGTTTCG
	VNcyp1258-R	ATGGGCATAGGCTGTTTGAC
D	VNcyp1137-F	CCGTTGAAATACGACGACCT
	VN14DM2-R <sup>2)</sup>	CTTTCACCTCTATCGCACTTCC

注 1) 採取した病斑から滅菌した爪楊枝で分生子をかきとり、シカジーニアス DNA 抽出試薬 ST（関東化学）を用いて DNA 抽出した後、KOD-Plus-Neo（東洋紡）を用いて A～D の 4 セットのプライマーを用いて 94℃ 2 分間 → (94℃ 30 秒 → 60℃ 30 秒 → 72℃ 1 分) × 30 サイクル → 72℃ 5 分の PCR 反応を行った。得られた反応液は、Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System を用いて DNA 抽出・精製を行った後、各プライマーと BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてサイクルシークエンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてジデオキシ法により塩基配列を決定した

2) Cools et al. (2002) から引用した（その他のプライマーは本研究にて設計した）

JS-18	1	ATGGGACTCCTCTGCTCTCCTCGCCCCCTTAGCGGGTAGCGACCCGGCTGGCTATTCTACACCCTCGCTCGTTCCGGTTTCACCGTCGCAATCGTGC	100
2018KT01	1	.....G.....	100
2020YC01	1	.....	100
JS-18	101	TCGCCAACGTCCTCAAGCAAGTCTACTCAAAAACCCCAATGAACCTCCCGTGGTCTTCCACTGGTTCCCTTTTCGGCAACACGGTCTACGGCAT	200
2018KT01	101	.....	200
2020YC01	101	.....	200
JS-18	201	CGACCCATCAAGTTCTTTGCTGAGTGCAAAGAAAAGGTAACCGGTCCAGTCTAGTAGCAAGGACACAAGTTGCCTCGAGCTTACTTGTCTCCAGCATGG	300
2018KT01	201	.....G.....A.....G.....	300
2020YC01	201	.....	300
JS-18	301	CGATATCTTTACCTTCATTCTCCTCGGCAGGAAAACAACAGTCTATATGGGACAAAAGGGGACGAGTTCATTCTCAATGGAAAACAGAGCCATGTCAAC	400
2018KT01	301	.....A.....	400
2020YC01	301	.....A.....	400
JS-18	401	GCAGAGGAAATCTATAGCCCCCTGACGACGCCCTTTCGGTTCGGATGTTGTCTATGATTGCCCAAATTCAAAATTGATGGAGCAAAGAAGGTATACC	500
2018KT01	401	.....A.....	500
2020YC01	401	.....A.....	500
JS-18	501	GGCCTTCATTCTTTAACATGACTCCTACTGATTTTTTCAAGTTCGTCAAGTACGGTCTCACCACCGAAGCCCTCAAATCCTACGTCACCCCTTATCCAAA	600
2018KT01	501	.....	600
2020YC01	501	.....	600
JS-18	601	GAGAAGTCAAGATTATGCCAAACGCTACTCTCAATTCAAAGGCGAGAAGGTAGTTTCGATGTTTGCCTACCATGGGCGAGATCACAAATTCACTGC	700
2018KT01	601	.....	700
2020YC01	601	.....	700
JS-18	701	TTCCCGTTCATTACAAGGCAAGGAGGTTTCGCGACAAGTTTGACGCCAGCTTCGACAGCTCTTCCAGCATCTGGACATGGGCTTCTCTCCCATCAACTTC	800
2018KT01	701	.....	800
2020YC01	701	.....	800
JS-18	801	ATGCTTCCATGGGCGCTCTTCCACACAATCGTCGCCGAGACGCCGGAACAAGAAGATGACGGAGACATACTTGGAAATATTAGATCGAGAAAAGTAG	900
2018KT01	801	.....	900
2020YC01	801	.....	900
JS-18	901	AGGGCGCTAAGAAGGACTCAGAGGACATGATTTGGAATCTGATGCAATGTGTATACAAGAATGGCACGCCCATCCCGACAACGAAATCGCCCATATGAT	1000
2018KT01	901	.....	1000
2020YC01	901	.....	1000
JS-18	1001	GATCGCGCTTCTCATGGCCGGTCAACACTCGTCTTAGCACCTCGTCTGGATGCTGTTTCGACTAGCTACCAGACCCGATATCCAAGAAGAACTTTAC	1100
2018KT01	1001	.....	1100
2020YC01	1001	.....	1100
JS-18	1101	CAGGAACAAATCCGGGCTGCGGCGTGATCTTCCCCGTGAAATACGACGACCTTGACACGCATGCCTCTCCACAACCAGCAGATCATTAAAGGAAACCC	1200
2018KT01	1101	.....	1197
2020YC01	1101	.....	1197
JS-18	1201	TTCGCATGCATTTCGCGGATTCACAGCATTTTTCGCGCCGTCAAACAGCCTATGCCCATCGAAGGAACTCCTTATACCATCCACAGTCGCATGTCTCCT	1300
2018KT01	1198	.....	1297
2020YC01	1198	.....	1297
JS-18	1301	TGCTGCTCCCATCGCATCTGGAGGTTTCGCCAATGTACTTCCCGCCCTGAAAAGTGGGAGCCTCACCGTTGGGACGAAGGATCCGGAAGCAACCAACTT	1400
2018KT01	1298	.....A.....	1397
2020YC01	1298	.....A.....	1397
JS-18	1401	TCGGGTGGCGATAATGGTGACGAAGAGAAGGAAGATTACGGCTATGGTCTGATCACGAAGGGTGCCAGTTCCCGGTACCTTCCGTTTGGCGTGGGAAGAC	1500
2018KT01	1398	.....	1497
2020YC01	1398	.....	1497
JS-18	1501	ATAGATGCATTGGCGAACAATTTGCATATATGCAATTGAACACGGTCTCGCGACGCAAGTCCCGAGTTCAAGTTCAAGTTTAGGGAAGGAGAATCATT	1600
2018KT01	1498	.....	1597
2020YC01	1498	.....	1597
JS-18	1601	CCCCAAGACTGACTTCTCTCCCTGTTTTCTGGACCTCAACGCCCGCGTGGTTGAATTGGGAACGCAGAGAGAAGTCATCATCAT	1686
2018KT01	1598	.....	1683
2020YC01	1598	.....	1683

図1 千葉県で採取されたナシ黒星病菌（2018KT01株及び2020YC01株）と野生型（JS-18株）のCYP51遺伝子塩基配列の比較

注）2018KT01は、平成30年に香取市から採取した菌株の配列（アクセッション番号LC659090）、2020YC01は、令和2年に八千代市から採取した菌株の配列（アクセッション番号LC659241）を示す。JS-18は、昭和54年に茨城県から採取されたDMI剤感受性の野生型の配列（アクセッション番号AJ314649）を示す。黒色網掛け部分は、配列が異なる箇所を示す

JS-18	1	MGLLSALLAPLAGSDRGWLFYTLASFGFTVAIVVANVLKQVLLKNPNEPPVVFHWFPFFG	60
2018KT01	1	.....	60
2020YC01	1	.....	60
JS-18	61	NTVVYIGIDPIKFFFAECKEKHGDIFTFILLGRKTTVYIGTKG <b>Y</b> EFILNGKQSHVNAEEIYS	120
2018KT01	61	.....N.....	120
2020YC01	61	.....N.....	120
JS-18	121	PLTTPVFGSDVVYDCPN SKLMEQKKFVKYGLTTEALKSYVTLIQREVEDYAKRYSQFKGE	180
2018KT01	121	..... <b>F</b> .....	180
2020YC01	121	..... <b>T</b> .....	180
JS-18	181	KGSFDVCATMGEITIFTASRSLQGKEVRDKFDASFADLFHDLDMGFSPINFMLPWAPLPH	240
2018KT01	181	.....	240
2020YC01	181	.....	240
JS-18	241	NRRRDAANKKMTETYLEIIRSRKVEGAKK DSEDMIWNLMQCVYKNGTPIPDNEIAHMMIA	300
2018KT01	241	.....	300
2020YC01	241	.....	300
JS-18	301	LLMAGQHSSSSTSSWMLFRLATRPDIQEELYQEQIRVCGADLPPLKYDDLARMPLHNQQI	360
2018KT01	301	..... <b>Y</b> .....	359
2020YC01	301	..... <b>Y</b> .....	359
JS-18	361	IKETLRMHSPHHSILRAVKQPMPIEGTPYTIPTSHVLLAAPIASGGSPMYFPAPEKWEPEH	420
2018KT01	360	.....	419
2020YC01	360	.....	419
JS-18	421	RWDEGSG <b>G</b> TNISGGDNGDEEKEDYGYGLITKGASSPYLPFGAGRHR CIGEQFAYMQLNTV	480
2018KT01	420	.....R.....	479
2020YC01	420	.....R.....	479
JS-18	481	LATQVREFKFSFREGESFPKTD FSSLFSGPQRP AWLNWERREKSSS	526
2018KT01	480	.....	525
2020YC01	480	.....	525

図2 千葉県で採取されたナシ黒星病菌（2018KT01株及び2020YC01株）と野生型（JS-18株）のCYP51遺伝子アミノ酸配列の比較

注）2018KT01は、平成30年に香取市から採取した菌株、2020YC01の配列（アクセッション番号BDC60758）、令和2年に八千代市から採取した菌株の配列（アクセッション番号BDC60759）を示す。JS-18は、昭和54年に茨城県から採取されたDMI剤感受性の野生型の菌株の配列（アクセッション番号CAC85409）を示す。黒色網掛け部分は、配列が異なる箇所を示す

[発表及び関連文献]

- 1 Cools et al. Cloning and sequence analysis of the eburicol 14  $\alpha$ -demethylase encoding gene (CYP51) from the Japanese pear scab fungus *Venturia nashicola*. Journal of Phytopathology, 2002 150:444-450
- 2 Ishii et al. DMI-fungicide resistance in *Venturia nashicola*, the causal agent of Asian pear scab - How reliable are mycelial growth tests in Culture? Microorganisms, 2021, 9:1377

- 3 高橋・青木・横山、千葉県で発生するナシ黒星病菌の*CYP51*遺伝子、令和3年度日本植物病理学会大会関東部会
- 4 令和3年度試験研究成果発表会（果樹部門）
- 5 令和3年度試験研究成果普及情報「DMI剤耐性ナシ黒星病菌の簡易なモニタリング法の開発」

[その他]

緊急技術開発促進事業「耐性菌発生リスクを軽減した新たなナシ病害防除体系の確立」  
(平成30年～令和2年度)