

令和元年6月8日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07629

研究課題名(和文) DNAプールから各種殺菌剤耐性変異の頻度を算出する遺伝子診断法の構築

研究課題名(英文) Construction of pyrosequencing-based assays to determine frequency for fungicide-resistance mutation alleles in genomic DNA pools

研究代表者

藤村 真 (Fujimura, Makoto)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：50297735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：特異的作用をもつ農業用殺菌剤が開発され、病害防除に主要な役割を果たしている。しかし、多くの殺菌剤で耐性菌が出現している。本研究では、新しい12種類の遺伝子診断系(パイロシーケンシング法とサスペンションアレイ法)をキュウリとトマトの重要病原菌を対象に構築した。前者は、圃場単位で耐性菌の比率算出に有効で、後者は、分離株がどの殺菌剤に耐性を持つのかを判定できる。これらの検定法は、圃場における多剤耐性菌の動向をモニターするために有効である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界人口の増加にともない、安全で安定した農作物を生産する技術の重要度は増している。病害防除分野では、農業用殺菌剤の耐性菌が出現し、深刻な問題を与えている。本研究は、複雑化する圃場における耐性菌をモニターする2種類の遺伝子診断法を提案するものであり、学術的な意義をもつ。また、耐性菌の動態をモニターできるようになることから、無駄な農薬散布を抑制した減農薬に貢献する。従って、食の安全・安心および環境にやさしい農業に貢献する意義がある。

研究成果の概要(英文)： Many specific-MOA-fungicides have been developed and contributed to crop and vegetable production through disease control, however, the problem of fungicide resistance becomes serious and more complicated in many fungal plant pathogens particularly of cucumber and tomato. In this study, we constructed the pyrosequencing assays and the suspension-array assays for the fungicide-resistance mutations in various plant pathogen such as *Botrytis cinerea* and *Corynespora cassiicola*. Pyrosequencing assays were useful not only to detect the fungicide resistance mutations in each isolate of plant pathogen, but also to estimate the frequency of fungicide resistance alleles in pooled DNA. In contrast, the suspension-array assays could be used to determine the fungicide resistance mutations in several fungicide-target genes in a single reaction. The combination of these two tools contributes to monitoring and management of the fungicide-resistance pathogens in each field.

研究分野：農薬科学

キーワード：パイロシーケンシング法 サスペンションアレイ法 キュウリ褐斑病菌 灰色かび病菌 殺菌剤耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

農作物の病害防除のために殺菌剤は現在でも重要な役割を果たしている。近年、特異的なタンパク質(酵素)を標的とする様々な殺菌剤が開発され、主要な病害の防除に使用されている。しかし、特異的なタンパク質を標的とする殺菌剤は、低薬量と高活性を示す反面、耐性菌の発生リスクが一般的に高い。すでに、主要な薬剤のほとんどで耐性菌の報告がある。重要な病害ほど薬剤が多用される傾向にあることから、主要作物に大きな被害を及ぼす病原菌では複数種の殺菌剤に耐性を示す多剤耐性菌も深刻化している。また、作物ごとに様々な病原菌が発生するが、各病原菌で耐性菌が出現している。したがって、耐性菌の発生を防ぐ(あるいは遅延させる)技術やすでに出現している耐性菌に対する解決策が求められている。

耐性菌問題に取り組むときに、耐性菌の分布を解析する手法が必要となるが、遺伝子診断法が有効であることが知られている。耐性変異を検出する手法には様々な方法があるが、現在最も一般的に用いられている方法は殺菌剤耐性変異の部位にプライマーを設計し PCR 増幅の有無で耐性変異を検出する AS-PCR 法と耐性変異を含む領域を PCR 増幅して制限酵素の切断の有無で変異を同定する手法が使用されている。これらの手法は、特定の殺菌剤の特定の耐性変異をモニターする手法として優れており、新規剤に初めて耐性菌が発見された場合などの動向モニタリングに有効に使用されている。しかし、実際の農業現場を考えた場合には、様々な耐性変異を同時に多剤耐性菌が発生している。また、複数の病原菌で耐性が出現している。例えば、キュウリに感染する病害では、灰色かび病菌、褐斑病菌、うどんこ病菌などが重要であるが、これらに共通に防除効果のある QoI 剤や SDHI 剤などに対してそれぞれに耐性菌が存在する。ただし、それぞれの圃場では、病害の発生度合や薬剤の使用歴等の違いにより、耐性菌の比率やパターンが大きく異なる。このことから、耐性菌が出現した薬剤の使用を中止する措置がとられ、新規剤が従来剤に置き換わることで耐性菌問題は打開されてきた。しかし、新規殺菌剤の開発の確率は大きく減少している。このような現状から、複雑化する多剤耐性菌の分布を簡便にモニターする新しい遺伝子診断法を構築し、既存薬剤を有効に利用してゆく技術を開発する必要がある。

### 2. 研究の目的

近年、様々な殺菌剤が開発され、病害防除剤の選抜幅は広がっている。一方で、多くの薬剤で耐性菌が発生しており、実際の栽培圃場では、様々な病原菌が多様な薬剤に耐性変異を獲得している。多様な耐性変異パターンをもつ病原菌が圃場ごとに分布するようになっており、有効薬剤の選択は困難になっている。

本研究は、複雑化している殺菌剤耐性菌を圃場単位で簡便にモニターできる遺伝子診断系の構築を目的とする。分離株(病斑)ごとに耐性変異の有無を検定する従来法ではなく、パイロシークエンス法を用いて、圃場のサンプルを混合して DNA プールとして、各耐性変異の比率を算出するアッセイ系を構築する。さらに、実際の圃場解析をして有効性を検証する。また、様々な薬剤に耐性をもつ複合耐性株が分布するようになっており、複雑化する圃場分離株の耐性変異のパターンをサスペンションアレイ法を用いて一括診断できる手法を構築する。これらの新しい遺伝子診断法の導入により、どのような病原菌でどの程度の耐性菌が分布するのかを圃場単位で簡便に解析できれば、効果の期待できない農薬の排除につながり、減農薬栽培に貢献することが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象とした病原菌および殺菌剤

本研究では、圃場単位で適切な殺菌剤を選抜するための遺伝子診断系の構築を目指しており、主要野菜であるキュウリとトマトを対象作物とした。キュウリの主要な病害の病原菌である灰色かび病菌、褐斑病菌、うどんこ病菌およびべと病菌を対象とし、トマトの主要病害である灰色かび病菌、葉かび病菌およびすすかび病菌とした。検出する耐性変異として、ベンズイミダゾール剤(標的: -チューブリン: TubA)、ジエトフェンカルブ剤(標的: -チューブリン: TubA)、ジカルボキシイミド剤(標的: OS-1 様ヒスチジンキナーゼ: BcOS1)、QoI 剤(標的: チトクローム b: Cytb)、フェンヘキサミド剤(ステロール合成酵素 type III: Erg27)、Azole 剤(ステロール合成酵素: Cyp51) SDHI 剤(コハク酸脱水素酵素サブユニット B: SdhB)、CAA 剤(セルロース合成酵素: CesA3)とした。灰色かび病菌は、日本各地から収集した各種耐性菌を用いた。キュウリ病害の圃場サンプルの解析は、群馬県農業技術センターの協力を得て、主に板倉・館林地域の栽培施設等から収集したものをを用いた。トマト葉かび病菌は、主に岐阜県農業技術センターにより分離された株を分譲いただき使用した。

#### (2) DNA の調整法

植物病原菌のゲノム DNA 抽出は、基本的には、胞子を 24 時間培養し、形成された菌糸を回収し、液体窒素で保存した。この菌体をビーズビータを用いて細胞破碎した。細胞破碎液を遠心した上清を除タンパクして、市販の DNA 結合担体に結合させて、洗浄後、滅菌蒸留水で溶出させた。この DNA サンプルを使用して、PCR 増幅や遺伝子診断法の構築に使用した。

### (3) パイロシーケンス法

パイロシーケンス法による変異の検出は、PyroMark Q96 システム(キアゲン社)を使用し、基本的な方法は、ユーザーマニュアルに従った。

### (4) サスペンションアレイ(ルミネックス)法

サスペンションアレイ法による変異の検出は、Bio-Plex 200 システム(Bio-Rad社)を使用し、基本的な方法は、ルミネックス社が提供する点変異の検出法マニュアルを基本とした。サスペンションアレイ法による点変異検出法として、ASPE(Allele-Specific Primer Extension)法およびMOL-PCR(Multiplex Oligonucleotide Ligation-PCR)法について検討した。なお、サスペンションアレイ法については、異なる耐性変異の組み合わせをもつ6株の灰色かび病菌と5株のキュウリ褐斑病菌を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) パイロシーケンス法による耐性変異検出と耐性菌比率の算出

パイロシーケンス法の原理は、鋳型DNAと相補的な基質(dNTP)を順次添加しながら、DNAポリメラーゼによる基質の取り込み時に放出される二リン酸をATPに変換する。このATP量をルシフェラーゼ反応で定量的することにより塩基配列を決定してゆく。従って、従来のAS(Allele Specific)-PCR法やPCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法が特定のSNP(点変異)を検出するのに対して、パイロシーケンス法では、耐性変異を含む領域の塩基配列を直接決定することにより耐性変異を同定する。

#### アッセイ系の構築

パイロシーケンス法により、キュウリとトマトの病原菌の各種殺菌剤耐性変異を検出する系を構築した。まず、標的遺伝子の変異を含む領域(約100bp)を

| 殺菌剤名/標的遺伝子名                   | 灰色かび病菌           | 褐斑病菌           | うどんこ病菌       | 葉かび病菌        | べと病菌                 |
|-------------------------------|------------------|----------------|--------------|--------------|----------------------|
| ベンズイミダゾール剤( $\beta$ -tubulin) | E198A/V/K, F200Y | E198A/N, F200Y | E198A, F200Y | E198A, F200Y | -                    |
| ジカルゴキシミド剤/BcOS1               | I365S, Q369H     | -              | -            | -            | -                    |
| Qol剤/Cytb                     | G143A            | G143A          | G143A        | F129L        | G143A                |
| SDHI剤/SdhB                    | H272R/Y          | H272R/Y        | 検討中          | 検討中          | -                    |
| EBI-typeIII剤/Erg27            | F412S            | -              | -            | -            | -                    |
| Azole剤/Cyp51                  | -                | -              | -            | 検討中          | -                    |
| CAA剤/CesA3                    | -                | -              | -            | -            | (G1105S/A/V, V1109L) |

表中の-は、登録がないあるいは耐性の報告がほとんどないことを示す。検討中は本研究により耐性変異の同定に至らなかったものを示す。なお、菌株をもっていない変異は()以外は表から除外した。

PCR増幅するためのプライマーを設計した。なお、PCR増幅断片から鋳型鎖となる一本鎖DNAを精製するために、PCRプライマーセットの一方のプライマーにはビオチンを付与した。さらに、変異(塩基置換)の直前にシーケンスプライマーを作製した。これらのプライマーを使ってパイロシーケンス反応をおこなった。表1に示した植物病原菌とそれに対応する耐性変異を検出する診断系を構築した。キュウリ病害については、主要な耐性菌について広く検出する診断系の構築ができた。本研究により構築した診断系は、5種類の病原菌の7種類の薬剤を対象として、合計で14種類の耐性診断系を構築できた。いずれも、新しく設計した診断系である。

### パイロシーケンス法による複数変異種の同定

パイロシーケンス法は、耐性変異を含む領域の塩基配列を直接解読して変異を同定する方法であることから、同一遺伝子内に複数種の耐性変異が知られている場合に、どの耐性変異を持つかを簡単に判別できることが明らかになった。例えば、ベンズイミダゾール剤に対する耐性変異はTubA遺伝子の198番目のグルタミン酸(E198)からアラニン(E198A)やリジン(E198K)への変異や200番目のフェニルアラニン(F200)からチロシン(F200Y)への変異が知られている。従来法では、それぞれの点変種ごとに診断系を構築する必要があるため、ベンズイミダゾール耐性株か否かを検出するためだけに、多数の遺伝子診断系を構築する必要があった。一方、パイロシーケンス法では、単一のアッセイでいずれの耐性変異を持つ株であるかを簡便に決定することができることが明らかになった。

### パイロシーケンス法による混合DNAからの耐性/感受性比率の算出

パイロシーケンス法による塩基配列の決定は、ddNTPを基質として特定塩基で合成を終結させるサンガー法と異なり、基質の導入をルシフェラーゼ反応で定量的に検出することにより塩基配列を決定する。この時のルシフェラーゼ反応の定量性が高いことを利用して、耐性菌と感受性菌のDNAを人為的に特定の比率で混合して、パイロシーケンス法で解析したところ、耐性/感受性比

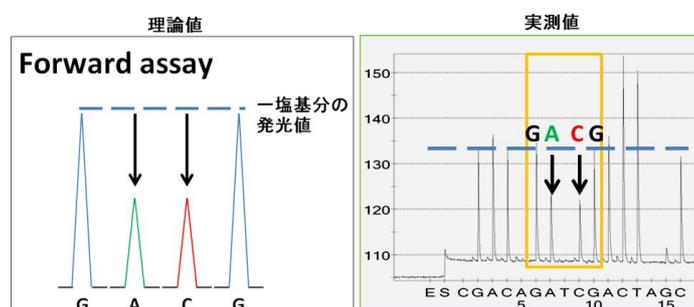


図1 パイロシーケンス法によるキュウリ褐斑病菌のベンズイミダゾール耐性変異E198A(GAG→GCG)の検出

感受性株と耐性株のDNAを1:1で混合して解析した。AとCがそれぞれ約0.5塩基分のピークとなっており、理論値と実測値がほぼ一致している。

率は、混合比率と良好な相関が認められた。図1にキュウリ褐斑病菌のベンズイミダゾール感受性株と耐性株を1:1で混合した場合の解析例を示した。詳細は省略するが、ほとんどの診断系で効率よく耐性変異の含有率を算出できることが判明した。

ただし、トマト葉かび病菌のQoI耐性変異(F129L)のように、耐性変異部位が同じ塩基の連続である場合(TTTTTA TTATTA)には、dTTP導入によるルシフェラーゼ発光ピークが5塩基分から2塩基分に変化する。このような場合には、単独株の変異の診断精度に全く問題はないが、混合DNAで耐性変異の比率を解析する場合には、点変異による発光値の減少を正確に見積もることが困難であることが判明した。さらに、耐性/感受性の比率を精度よく算出するために、耐性変異を5'末端側から解析するアッセイと3'末端から解析するアッセイの両方を構築した。これにより、混合DNAから耐性菌比率を算出する精度の向上が認められた。

#### パイロシーケンス法の圃場での検証

キュウリの日本有数の産地である群馬県板倉/館林地域の褐斑病発病圃場から発病葉を収集した。パイロシーケンス法による混合DNAサンプルから耐性菌比率を求める手法が、実際に圃場モニタリングに使用できるかを検証した。まず、3ヶ所の圃場から収集した病葉から、圃場ごとに1枚の発病葉から1株として約10株を分離した。この各分離株からDNAを調整し、パイロシーケンス法で3種類の殺菌剤(ベンズイミダゾール/ジエトフェンカルブ剤・QoI剤・SDHI剤)に対する耐性変異を同定した。次に、各圃場から収集した病葉から比較的発病が激しかった葉を5枚/各圃場を選抜し、5枚の病葉に形成されている褐斑病菌の胞子をまとめて回収し、DNAを抽出した。この圃場単位でプールされた混合DNAを用いて、パイロシーケンス法により耐性菌の分布を解析した。その結果、個別に分離株を解析した結果と、混合DNAを用いて圃場単位で解析した結果に良好な相関が認められた。このことから、パイロシーケンス法が各圃場にどのような耐性菌が優先しているかを簡単に把握できる手法であることが実証された。今回行った3ヶ所の圃場は、所有者(農家)は異なるが比較的近接している圃場であるが、興味深いことに、分布している耐性菌の種類と比率は3種類の圃場とも大きく異なることが明らかになった。これまでの殺菌剤の使用歴等と関係があると思われる。さらに、個別の解析は行っていないが、キュウリのうどんこ病菌(QoI剤・アゾール剤)、べと病菌(QoI剤・CAA剤)の耐性のモニタリングも同時に行った。応用への重要なポイントは、病斑上に胞子を形成している状態であれば、容易に胞子を回収してDNAプールを調整できるので、効率的に圃場モニタリングができることが明らかになった。

#### (2) サスペンションアレイ法による複合耐性変異の一括診断

パイロシーケンス法では、混合DNAを用いて、圃場単位でそれぞれの殺菌剤ごとに耐性菌の比率を簡便に算出できることが明らかになった。しかし、混合DNAを用いる欠点として、異なる殺菌剤の耐性変異の組み合わせについては、情報が得られない欠点がある。例えば、QoI剤耐性菌とSDHI耐性菌がともに50%で分布していることが判っても、両剤に複合耐性の株が50%存在する場合と、QoI剤とSDHIそれぞれの単独耐性株が50%ずつ存在する場合がある。両剤の混合剤は、前者では効力はあまり期待できないが、後者の場合は十分な病害防除効果が期待できる。そこで、本研究では、個別の株の様々な殺菌剤に対する耐性変異の組み合わせパターン(多剤耐性)を同一溶液中で一括検出できる可能性のあるサスペンションアレイ法を検討した。

#### サスペンションアレイ法による殺菌剤耐性変異の検出系の構築

サスペンションアレイ法による点変異の検出原理は、フローサイトメトリーで識別可能な複数のビーズ担体を用いて、各ビーズ担体上でそれぞれ独立に点変異を検出するアッセイを行うことを原理としている。そこで、まず、6種類の耐性変異を(ベンズイミダゾール耐性の3種類(E198A, E198N, F200Y))、QoI耐性の1種類(G143A)及びSDHI耐性の2種類(H278YとH278R))の各SNPの感受性型と耐性型の塩基を検出するために、計12種類のビーズ担体を購入した。なお、各ビーズ担体にはあらかじめ特有のタグ配列として1本差DNA(24bp)が結合されている。まず、変異を検出する手法としてAllele-Specific Primerを設計し、点変異の有無を伸長反応の有無で判定するASPE(Allele-Specific Primer Extension)法を検討した。変異を含む領域をPCR増幅するプライマーと変異を検出するプライマーを設計した。なお、検出プライマーの5'末端にはビーズ担体のタグ配列(24bp)と相補する塩基配列(24bp)を付与し、3'末端には耐性変異を持たせた。PCR産物と検出プライマーを混合してDNAポリメラーゼで伸長反応を行った。なお、伸長反応産物をビオチン化するためビオチン化dCTPを用いた。この反応液にビーズ担体を添加して、検出プライマーをビーズと結合させた。さらに、ストレプトアビジンを添加してビオチン化された反応産物を蛍光標識した。最後に、この混合液をBio-Plex 200システム(Bio-Rad社)のフローサイトメトリー機能でビーズ担体を識別・カウントしながら、タグ配列にキャプチャーされている検出プライマーが伸長反応(ビオチン化)されているかを判定することにより耐性変異の有無を検出した。いずれの検出系も良好に耐性変異の有無を検出が可能であった。

#### サスペンションアレイ法による複数遺伝子の複数耐性変異の同一溶液中での一括診断

さらに、複数の遺伝子の各耐性変異を同時検出できるかを調べた。各株から調整したDNAを鋳型として、キュウリ褐斑病の3種類の遺伝子(TubA, SdhB, Cytb)をマルチプレックスPCR

により一括増幅された。これを鋳型として6種類の耐性変異を検出するプライマー（のべ12種類のプライマー）を混合した。さらに、各検出プライマーを結合する12種類のタグ配列をもつビーズ担体を添加して、Bio-Plex 200 システム（Bio-Rad 社）で解析した。いずれの変異も良好に検出が可能であった(図2)。

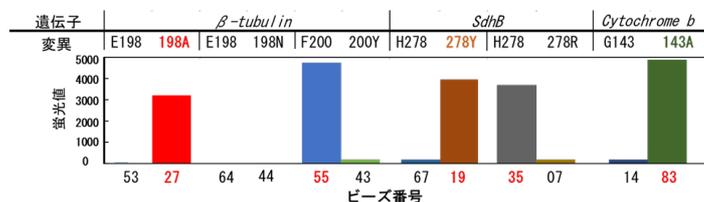


図2 サスペンションアレイ法によるキュウリ褐斑病菌の3遺伝子のべ6種類変異の一括診断

キュウリ褐斑病17-30株の耐性変異（β-tubulin：198A、SdhB：278Y、Cytochrome b：143A）を12種類のビーズを用いて6種類の耐性変異の有無を一括で診断した。赤字のビーズ番号が伸長反応が起こったことを示している。

さらに、灰色かび病菌では、5種類の遺伝子（TubA, BcOS1, SdhB, Cytb, Erg27）に対するのべ9種類の耐性変異の検出系の構築にも成功した。複数のプライマーが同一溶液内で反応するが、精度は良好であった。特に最終段階のフローサイトメトリーによる診断は、菌株あたり1分程度で9種類の耐性変異を一括で診断でき、PC画面上で確認ができることから、ハイスループット解析に十分対応できることが明らかになった。ただし、精度を決定する要因として重要な点は、多数の標的遺伝子をマルチプレックスPCRで効率よく増幅するステップにあることも明らかになった。

#### MOL-PCR(ライゲーション)法を用いた遺伝子診断系の構築

サスペンションアレイ法には、上記で述べた点変異の有無をプライマーの伸長反応で判定するASPE法のほかにも、点変異を挟むように2つのDNAプローブを合成し、鋳型DNA断片とアニーリングさせて、ライゲーション反応の有無で検出する手法がある。ライゲーションによる変異判定にはOLA法やMOL-PCR法などの変法が報告されている。本研究では、MOL-PCR法の構築を行い、灰色かび病菌の遺伝子診断系を構築した。その結果、各変異の有無の判定の精度に問題はないものの、ライゲーション反応の効率がやや不安定であるためか、ASPE法に比べて全体的に蛍光強度が低い傾向にあった。さらなる検討は必要であると思われるが、ASPE法の方が手軽にアッセイ系を構築できる印象がある。

#### (3) キュウリ褐斑病菌およびトマト葉かび病菌の新規耐性変異の探索と同定

本研究では、多数の植物病原菌の薬剤耐性変異を検出しながら、遺伝子診断法の構築を行ったが、想定していなかった下記の研究成果を得ることができた。

##### キュウリ褐斑病菌のベンズイミダゾール耐性変異E198Nの同定

ベンズイミダゾール耐性変異はE198Aが最も広く植物病原菌で同定されているが、植物病原菌によってはE198G/V/Kも報告されている。本研究によりキュウリ褐斑病菌のベンズイミダゾール耐性株の一部が、これまでに報告がないE198Nをもつことが明らかになった。2塩基の同時置換によるアミノ酸置換であることから、希少な耐性変異と思われる。

##### キュウリ褐斑病菌のジカルボキシイミド耐性変異の同定

ジカルボキシイミド剤はキュウリ褐斑病の防除薬剤としてほとんど使用されていないと思われるが、圃場分離株に、CcOS1遺伝子のN末端に25bpの挿入をもつ株が分離された。この株はフルジオキソニルにも高度耐性を獲得していた。耐性株は浸透圧感受性を示したものの、キュウリ苗に感受性株と同様の病原性を示すことが明らかになった。キュウリ褐斑病のジカルボキシイミド耐性株の報告は世界で初めてである。また、ジカルボキシイミド剤が、灰色かび病の防除に使用されており、褐斑病菌で耐性化したと推定される。

##### トマト葉かび病菌のSDHI耐性変異の探索

葉かび病菌のSDHI耐性株の耐性変異を同定すべく、Sdh酵素のサブユニットA, B, C遺伝子をPCR増幅して塩基配列を決定したが、耐性変異は存在しなかった。SDHI剤の標的以外に耐性変異が存在する例が報告されはじめているが、原因遺伝子の同定に至っていない。トマト葉かび病菌も同様の耐性変異をもつと考えられた。SDHI剤は従来の化合物と交差耐性しない化合物が開発されてきており、世界的に非Sdh遺伝子による耐性メカニズムが注目されている。今後、葉かび病菌の耐性株のゲノム解読し、新しいSDHI耐性変異の同定を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1件)

二反田正悟・藤本菜月・藤村真：ルミネックス法を用いた複数遺伝子の殺菌剤耐性変異の同時検出, 植物防疫, 73, (4) 14 - 19, (2019) 査読無

[http://www.jpapa.or.jp/shuppan/images-txt/2019/2019\\_0404.pdf](http://www.jpapa.or.jp/shuppan/images-txt/2019/2019_0404.pdf)

### 〔学会発表〕(計 4件)

佐竹諒子, 渡辺秀樹, 藤村真：トマト葉かび病菌のベンズイミダゾール剤とSDHI剤に対す

る耐性変異の同定とパイロシーケンス法による診断系の構築, 第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2018 年 11 月 16 日

藤村真, 二反田正悟, 藤本菜月, 佐竹諒子, 堀内愛実, 山口友輔: ルミネックス法を用いた複数遺伝子の殺菌剤耐性変異の同時検出, 日本農薬学会第 43 回大会, 2018 年 05 月

Yamaguchi Y., Tsukada Y., Horiuchi A., Fujimura M.: Null mutations of OS-1 like histidine kinase gene confer resistance to dicarboximides and phenylpyrroles in *Corynespora cassiicola*, Asian Conference on Plant Pathology 2017, ( Jeju, South Korea, 2017 年 )

Aimi Horiuchi, Tsuyoshi Shinpuku, Yoshihito Tsukada, Yusuke Yamaguchi, Ryouko Satake, Makoto Fujimura: Construction and application of pyrosequencing assays to detect fungicide-resistance mutations in cucumber pathogens, Asian Conference on Plant Pathology 2017, (Jeju, South Korea, 2017 年 )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。