

DMI 剤耐性遺伝子(*CYP51*)の解析と機能性を活用した

ナシ黒星病発生リスクの低減技術

平野泰志*・酒井和彦**・野田聡***

Sequence analysis of DMI agricultural chemical resistance gene (*CYP51*), and the management technique of the disease occurrence using the functional mechanism for Japanese pear scab fungus *Venturia nashicola*

Yasushi HIRANO, Kazuhiko SAKAI and Satoshi NODA

要約 近年、ナシ黒星病の発生は増加傾向にあり、DMI 剤耐性菌の出現が一要因とされている。そこで埼玉県各地の DMI 剤耐性菌の発生状況調査と発生リスク軽減のための防除方法を検討した。DMI 剤耐性菌出現の原因として *CYP51* 遺伝子の変異が知られている。採取した DMI 剤耐性黒星病菌について *CYP51* 遺伝子配列の変異を解析した。調査の結果、県内各地で DMI 剤耐性菌の発生が認められ、*CYP51* 遺伝子は DMI 剤感受性系統、テブコナゾールにのみ耐性がある系統、複数の DMI 剤に耐性がある系統の 3 つのクレードとどれにも属さない系統(32 株中 1 株)に分かれた。現在、DMI 剤耐性は検定植物に接種して判断しているため即時性に欠ける。そこでこれらの耐性菌の種類を迅速に検定するため、遺伝子配列を基に各系統に特異的なプライマーセットを設計した。その結果、それぞれの系統を識別することが可能であった。本結果から、DMI 剤耐性菌の種類を迅速な判別に基づき効果的な DMI 剤を選択し、微生物農薬との併用により発生リスクを低減できる可能性が示唆された。

梨は本県の主要果樹である。梨の病害としては黒星病(図 1, 2)、赤星病、輪紋病、疫病、黒斑病、うどんこ病、胴枯病、白紋羽病、心腐れ症(胴枯病菌)、炭疽病などがある。特に春先から発生が認められる黒星病や赤星病が問題となっており、年間 20 回近く農薬を散布している。ナシ黒星病の発生は全国的に増加傾向にあり、本病対策には DMI 剤(エルゴステロール生合成阻害剤: EBI 剤の一つである脱メチル化反応阻害剤)が有効であるが、近年、九州などの西南暖地において黒星病に有効な DMI 剤に対する薬剤耐性菌の出現が認められ、ナシ黒星病増加の一因とされている。本県においても薬剤感受性の低下が確認された。

対策の一つとして微生物農薬の利用がある。微生物農薬の一部には主要病害に対する防除効果・実用性が確認され、微生物農薬を慣行防除体系に組み入

れば、薬剤耐性菌の出現防止と化学農薬の使用回数削減が期待できる。しかし、すべての農薬を微生物農薬に置き替え、微生物農薬だけで病害発生を抑えることは不可能である。他の方策として直接的に殺菌活性は示さないが、植物病原菌に対して抵抗性を誘導する「プラントアクティベーター」である殺菌剤アシベンゾラルのメチル誘導体であるアシベンゾラル-S-メチル(SAM)の利用も考えられる。ペクチン分解酵素阻害タンパク質(PGIP)は果実が熟すのを抑制するタンパク質として知られているが、SAM による黒星病抵抗性誘導には PGIP が密接に関与しているといわれている(Narusaka *et al.*, 1999)。ナシ品種「巾着」の PGIP はナシ黒星病の抑制に関与していることが報告されている(石井, 2003; Faize *et al.*, 2003)。

*病害虫防除技術担当(現 品種開発・ブランド育成研究担当), **同左(現 生産環境・安全管理研究担当), ***元園芸研究所

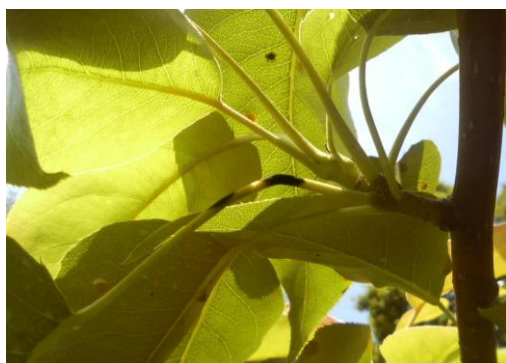


図1 葉柄の黒星病（発生初期）



図2 果実の黒星病

一方、DMI 耐性菌発現の原因として黒星病菌の *CYP51* 遺伝子が関連していると報告がある (Schnabel and Jones, 2001 ; Cools *et al.*, 2002 ; Proffer *et al.*, 2006). そこで、主要な品種の PGIP の誘導効果の分析、県内から採取した DMI 耐性菌の種類分類を行うとともに DMI 耐性菌の *CYP51* 遺伝子配列を解析する。耐性菌の種類を識別するには今までは生物検定で実施していたが、時間と手間が掛かった。同じ菌でも一部の配列の違いにより、例えばレースの違いを識別することが可能なため (Hirano and Arie, 2006 ; Hirano and Arie, 2009), *CYP51* の遺伝子配列を解析した結果をもとに迅速に耐性菌の種類を識別する DNA マーカーの開発を試み、遺伝子診断技術を開発する。

耐性菌の疫学的調査結果、微生物農薬の効果的利用法、生体防御物質である PGIP の活用、DMI 剤耐性菌の迅速診断などの技術を組み合わせることにより、DMI 剤の黒星病への効果向上および耐性菌の発生防止に有効な新たな手段を解明して、耐性菌が出現しにくい環境に負担の少ない総合管理体系技術を検証する。

材料および方法

1 県内の DMI 剤耐性黒星病菌の調査

2010 年に県内 10 地点から黒星病菌、計 32 株を採取した。採取した各病斑から孢子懸濁液を調製した。調整した孢子懸濁液から作製した分生子懸濁液を検定用ナシ稚苗の展開葉にハンドスプレーを用いて噴霧接種して DMI 剤耐性を調査した(菊原ら・石井, 2008)。

2 微生物農薬のリスク低減効果

農薬会社が異なる 3 種類の微生物農薬(成分:バチルス ズブチリス種(*Bacillus subtilis* sp.) 生芽胞 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ CFU/g) E, B または A を 200~300L/10a, 慣行区は微生物農薬に替えて化学農薬(チオノックフロアブルならびにベルコート水和剤)を防除暦に準じて動力噴霧器で散布して、発病葉率、発病果率を調査した。調査方法は 1 樹当たり 200 葉について程度別発病葉数を調査し、発病率及び発病度を算出した。発病度 = $\Sigma(\text{程度別発病葉数} \times \text{指数}) \times 100 / (\text{調査葉数} \times 5)$ 。指数は 0 : 無発病, 1 : 病斑が 1 個, 3 : 病斑が 2~3 個, またはそれ相当の大きな病斑が 1 個, 5 : 病斑が 4 個以上, またはそれ相当の大きな病斑が 2 個以上とした(菊原ら・石井, 2008)。

2009 年は 5 月 14 日と 5 月 20 日に散布して、5 月 21 日~6 月 9 日に程度別発病葉数(発病葉率)を、7 月 30 日, 8 月 5 日に果実発病(発病果率)を調査した。2010 年は 5 月 13 日と 5 月 18 日に散布して、5 月 19 日~6 月 10 日に程度別発病葉数を、7 月 9 日, 7 月 16 日に果実発病を調査した。2011 年は 5 月 9 日と 5 月 17 日に散布して、5 月 18 日~6 月 23 日に程度別発病葉数を、7 月 8 日, 7 月 15 日に果実発病を調査した。

3 生体防御物質 PGIP による病害抑制技術の開発

ペクチン分解酵素阻害タンパク質(PGIP)による黒星病に対する発病抑制効果、PGIP の時期別発現量を検討した。豊水および幸水について登熟時に果実からタンパク質を調製した。10g(生重量)の果実を 100mL の 50mM トリス-HCl 緩衝液, pH8.0 とともに乳鉢と乳棒で破碎した。磨砕液を 12,000×g 15 分間遠心分離して沈澱を除き、上清を回収した。マイクロコン(MILIPORE)で濃縮して粗抽出液とした。タンパク質の分析は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)法により、12.5%泳動ゲル、

3%濃縮ゲルを用いて 20mA で 20 分間泳動した。タンパク質のバンドは 0.08%(v/v)クマシーブリリアントブルーR-250 による染色後、ゲルを脱色し、電気泳動像のデンストメトリは GENEGENUS(SYNGENE)を用いて解析した。標準分子量マーカーは SDS-PAGE Standards, Broad Range(Bio-Rad)を用いた。

PGIP 遺伝子の DNA 精製はナシ新梢葉から ISOPLANT(TaKaRa)を使用した。PCR 反応は各マニュアルにしたがって、サーマルサイクラー TP600(TaKaRa)を用いて実施した。プライマーは日本 DNA データバンク(DDBJ)から *PGIP* 遺伝子の部分配列を基にデザインした。PCR 反応物は 2-プロパノールで沈殿し、20mM TE 緩衝液、pH8.0 100 μ L に溶解した。調製した試料をサイクルシークエンス後、Gene Analyser ABI310(アプライドバイオシステム)で解析した。シークエンスグラムから解析したデータのアライメント解析は GENETYX-Win 4.0(ソフトウェア開発)で、系統樹解析は MEGA 3.1 で行った。

4 DMI 耐性関連遺伝子の解析

圃場から採取した防除価の異なる計 32 株の黒星病薬剤耐性菌と薬剤感受性菌から DNA を抽出して DMI 剤耐性に関連があるとされる *CYP51* 遺伝子領域を解析した。

DNA 精製は DNA 抽出キット ISOPLANT(ニッポンジーン)を使用し、PCR 反応は各マニュアルにしたがって、サーマルサイクラー TP600(TaKaRa)で実施した。プライマーは DDBJ の情報を基にデザインした。PCR 反応物は 2-プロパノールで沈殿し、20 mM TE 緩衝液、pH8.0 100 μ L に溶解した。調製した試料をサイクルシークエンス後、Gene Analyser ABI310(アプライドバイオシステム)で解析した。シークエンスグラムから解析したデータのアライメント解析は GENETYX-Win 4.0(ソフトウェア開発)で、系統樹解析は MEGA 3.1 で行った。

5 検出用プライマーの作成および有効性の検証

DMI 剤耐性菌の *CYP51* 遺伝子配列の解析結果を基に様々な配列のオリゴマー、薬剤耐性菌検出用プライマーをアプリケーションソフト OLIGO 4.0(National Biosciences)を使用してデザインし、それら複数のプライマーの有効性を検証した。検定には県内の DMI 剤耐性黒星病菌の調査で使用した

計 32 株を用いた。DNA 精製は DNA 抽出キット ISOPLANT(ニッポンジーン)を用いた。PCR 反応は各マニュアルにしたがって、サーマルサイクラー TP600(TaKaRa)を用いた。PCR 反応物は Mupid(アドバンス)を用い、2%アガロースゲルで電気泳動して検証した。

結果

1 県内の DMI 剤耐性黒星病菌の調査

県内のナシ黒星病菌に対する DMI 剤の防除価(接種試験)は、ジフェノコナゾールは 77~100、ヘキサコナゾールは 42~90、フェンブコナゾールは 51~97、テブコナゾールは 49~76 であり、防除価 50 以下の地点は耐性菌と推定された。県内でも DMI 剤に対する耐性菌が多々発生しており、今後拡大が懸念された。各地点で耐性は異なり、また同一地域でも異なっており、地域性はないと考えられた(表 1)。

表 1 DMI 剤に対する発病抑制効果

採取場所	試験区	散布濃度(倍)	発病率(%)	防除価
伊奈町	無処理(水散布)	-	41.3	-
	ジフェノコナゾール	4,000	0.0	100
	ヘキサコナゾール	2,000	9.9	86
	フェンブコナゾール	10,000	2.1	97
	テブコナゾール	4,000	15.4	65
白岡町A	無処理(水散布)	-	79.0	-
	ジフェノコナゾール	4,000	4.8	96
	ヘキサコナゾール	2,000	30.9	61
	フェンブコナゾール	10,000	36.0	56
	テブコナゾール	4,000	28.3	66
白岡町B	無処理(水散布)	-	63.7	-
	ジフェノコナゾール	4,000	12.3	86
	ヘキサコナゾール	2,000	30.6	51
	フェンブコナゾール	10,000	31.1	51
	テブコナゾール	4,000	33.7	49
神川町A	無処理(水散布)	-	26.5	-
	ジフェノコナゾール	4,000	5.9	77
	ヘキサコナゾール	2,000	12.8	42
	フェンブコナゾール	10,000	11.7	57
	テブコナゾール	4,000	6.8	76
神川町B	無処理(水散布)	-	30.5	-
	ジフェノコナゾール	4,000	1.0	99
	ヘキサコナゾール	2,000	14.5	53
	フェンブコナゾール	10,000	7.3	78
	テブコナゾール	4,000	13.5	49
加須市A	無処理(水散布)	-	53.4	-
	ジフェノコナゾール	4,000	3.2	94
	ヘキサコナゾール	2,000	8.1	90
	フェンブコナゾール	10,000	11.6	80
	テブコナゾール	4,000	15.1	75
加須市B	無処理(水散布)	-	63.3	-
	ジフェノコナゾール	4,000	5.2	94
	ヘキサコナゾール	2,000	17.2	74
	フェンブコナゾール	10,000	27.0	59
	テブコナゾール	4,000	25.7	67
加須市C	無処理(水散布)	-	40.8	-
	ジフェノコナゾール	4,000	5.6	93
	ヘキサコナゾール	2,000	13.6	75
	フェンブコナゾール	10,000	3.4	94
	テブコナゾール	4,000	19.3	56

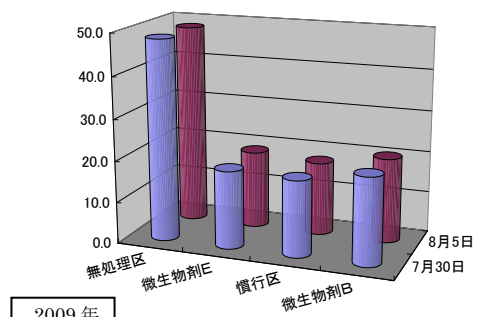
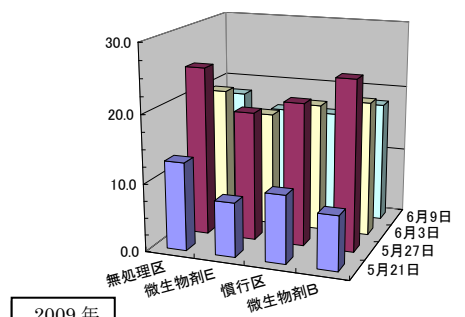
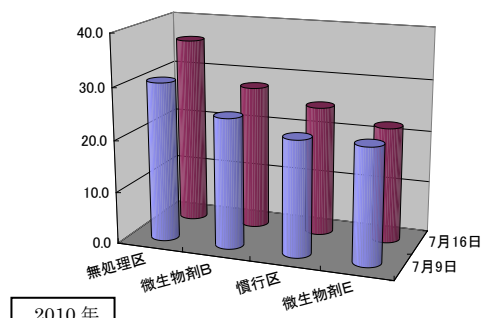
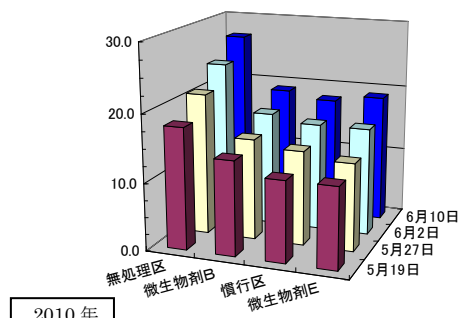
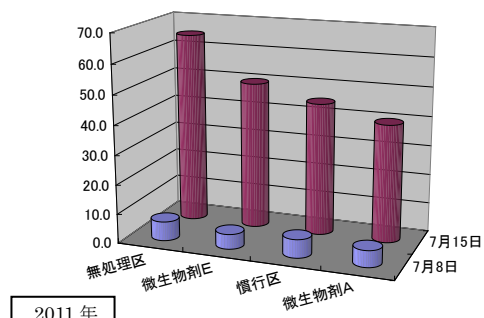
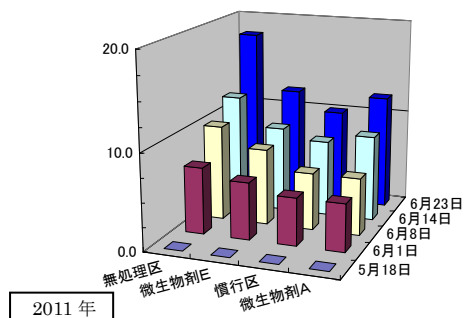


図3 発病葉率

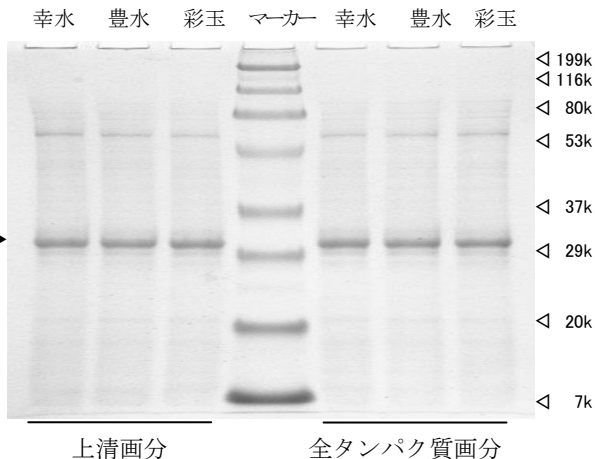
図4 発病果率

2 微生物農薬のリスク低減効果

2009年の発病葉率は無処理区が13~25%、微生物剤Eは8~19%、微生物剤Bは8~25%、慣行区は10~21%であり、全般的に5月27日がピークであった(図3)。微生物剤E散布区は慣行区に比べて黒星病の発病抑制は同程度の効果が認められた。微生物剤B散布区ではやや発病が多かった。発病果率は無処理区が48%、微生物剤Eは19%、微生物剤Bは21%、慣行区は18%であり、慣行区に比べて同程度の効果が認められた(図4)。2010年の発病葉率は無処理区が18~27%、微生物剤Eは12~19%、微生物剤Bは14~19%、慣行区は12~18%であり、全般的に6月10日がピークであった(図3)。微生物剤E散布区は慣行区に比べて黒星病の発病抑制は同

程度の効果が認められた。発病果率は無処理区が36%、微生物剤Eは22%、微生物剤Bは28%、慣行区は25%であり、慣行区に比べて同程度の効果が認められた(図4)。2011年の発病葉率は無処理区が7~18%、微生物剤Eは6~12%、微生物剤Aは5~12%、慣行区は5~10%であり、全般的に6月23日がピークであり、慣行区に比べて微生物剤Eと微生物剤Aに効果の差は認められなかった(図3, 4)。

微生物剤Eまたは微生物剤Aはナシ黒星病に対し、発生前から2回散布しておけば慣行(化学農薬散布)に替えて使用できることが示唆された。なお、微生物剤による薬害は認められなかった。



上清画分 全タンパク質画分
図5 PGIPタンパク質のSDS-PAGE像

▶ : PGIPと想定されるタンパク質

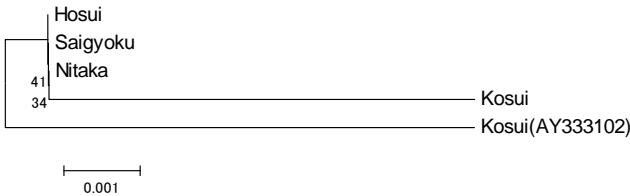


図6 PGIP遺伝子配列解析結果 (NJ法系統樹)

3 生体防御物質 PGIP による病害抑制技術の開発

PGIP(ca 36k)の発現量は各品種間で違いは認められなかった(図5). PGIP遺伝子(1057bp)の部分配列(899bp)を比較した結果. 彩玉(S-genotype: S3S5), 豊水(S3S5), 新高(S3S9)は100%同一配列であったが, 幸水(S4S5)は5か所で配列が異なっていた(図6). PGIPのタンパク質レベルでは差は見られなかった.

4 DMI 耐性関連遺伝子の解析

CYP51の遺伝子配列(AJ314649)はDDBJの情報を利用した. 対照株としてNBRC保存株(NBRC8777)及びナシ園から採取して単離したDMI剤耐性菌(防除価未調査)のCYP51遺伝子配列(1680bp)の部分配列(1100bp)を解析した. その結果, 4か所で配列が異なっていた(図7).

DMI剤耐性に関する遺伝子領域をMEGA3.1で解析して系統樹を作成した結果, I. 感受性菌の系統, II. テブコナゾールのみ耐性の系統, III. 複数種類に耐性がある系統の3クレードと調査した32株中1株のみ, どれにも属さない系統に分かれた(図8).

5 検出用プライマーの作成および有効性の検証

それぞれのDMI剤耐性菌は形態的に識別できないので, それぞれに特異的な検出試薬を作成し, 検討した. CYP51遺伝子配列(1680bp)の部分配列(1100bp)の解析結果を基に各クレード用識別プライマーを作成した. 感受性菌は感受性用識別試薬とのみ反応し, テブコナゾール耐性菌はテブコナゾール耐性用識別試薬とのみ反応した. また, 複数の耐性を有する菌は複数耐性用識別試薬と反応した. 今回作成した各クレード用識別プライマーセットを用いることにより, それぞれの菌群を識別することが可能であると示唆された(図9).

AJ314649	181:AACACGGTCGTCTACGGCATCGACCCTATCAAGTCTTTGCTGAGTGCAAAGAAAAGGTA	240
NBRC8777	132:AACACGGTCGTCTACGGCATCGACCCTATCAAGTCTTTGCTGAGTGCAAAGAAAAGGTA	191
09Ven001	136:AACACGGTCGTCTACGGCATCGACCCTATCAAGTCTTT CG CTGAGTGCAAAGAAAAGGTA	195
AJ314649	241:ACGCGTCCAGTCTAGTAGCAAGGACACAAGTTGCCTCGAGCTTACTTGCTCCAGCATGG	300
NBRC8777	192:ACGCGTCCAGTCTAGTAGCAAGGACACAAGTTGCCTCGAGCTTACTTGCTCCAGCATGG	251
09Ven001	196:ACGCGTCCAGTCTAGTAGCAAG AA CACAAGTTGCCT GG GAGCTTACTTGCTCCAGCATGG	255
AJ314649	301:CGATATCTTTACCTTCATTCTCCTCGGCAGGAAAACAACAGTCTATATTGGGACAAAGGG	360
NBRC8777	252:CGATATCTTTACCTTCATTCTCCTCGGCAGGAAAACAACAGTCTATATTGGGACAAAGGG	311
09Ven001	256:CGATATCTTTACCTTCATTCTCCTCGGCAGGAAAACAACAGTCTATATTGGGACAAAGGG	315
AJ314649	361:GTACGAGTTCATTCTCAATGAAAAACAGAGCCATGTCAACGCAGAGGAAATCTATAGCCC	420
NBRC8777	312:GAACGAGTTCATTCTCAATGAAAAACAGAGCCATGTCAACGCAGAGGAAATCTATAGCCC	371
09Ven001	316: GA ACGAGTTCATTCTCAATGAAAAACAGAGCCATGTCAACGCAGAGGAAATCTATAGCCC	375

図7 CYP51遺伝子配の比較 (一部)

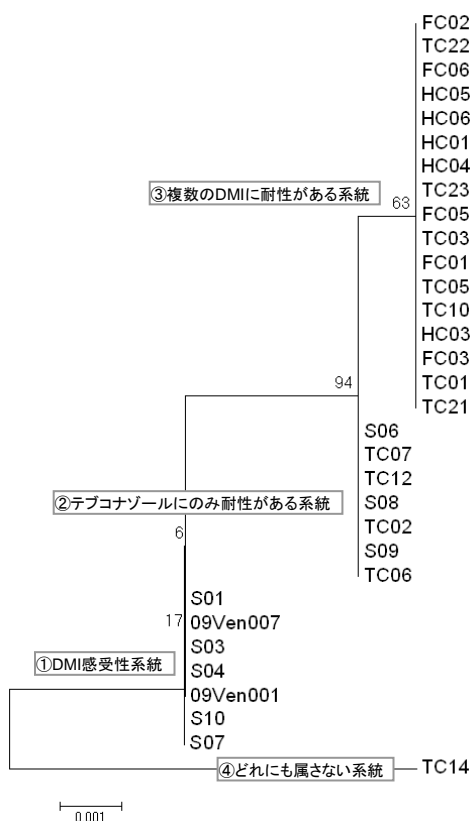


図8 CYP51 遺伝子配列解析結果 (NJ 法系統樹)

耐性菌の対策として微生物農薬(バチルス ズブチリス)の使用も有効であると考えられ、微生物農薬によるリスク低減効果は発生前から2回散布すれば慣行(化学農薬散布)に替えて使用できることが示唆された。

生体防御物質 PGIP による効果が報告(石井, 2003 ; Faize *et al.*, 2003)されている「巾着」の PGIP 遺伝子(1057bp)の部分配列(899bp)を比較した結果、「彩玉」, 「豊水」, 「新高」とほぼ同一配列であり、PGIP 遺伝子、タンパク質レベルに相異はなかった。PGIP のタンパク質の SDS-PAGE の解析でもほとんど違いは見られなかったことから主要品種の「彩玉」, 「豊水」, 「新高」の3品種間では発現量に差はないと考えられた。

「巾着」とは遺伝子配列のどこか、例えばプロモーター領域やイントロン配列に違いがある可能性が示唆された。PGIP の効果についてはさらに検討が必要であり、現地での活用は難しく、生体防御物質 PGIP の他の視点から検討し、耐性菌が出現しにくい方策を検証する必要がある。

DMI 耐性関連遺伝子配列のアライメント解析、系統解析をした結果、まず、感受性系統からテブコナゾールに耐性がある系統が発生してきて、それがさらに複数に耐性がある耐性菌に変異した可能性が示唆される。それぞれの DMI 剤耐性菌は見た目では識別できず、生物検定では労力と時間が必要なため、それぞれのクレードに特異的な検出用プライマーをデザインして検討を行った結果、感受性菌は感受性用識別試薬とのみ反応し、テブコナゾール耐性菌はテブコナゾール耐性用識別試薬とのみ反応した。一方、複数の耐性を有する菌は複数耐性用識別試薬と反応し、それぞれのクレードを識別できた。調査した32株中1株だけどれも属さない系統があり、識別用プライマーセットと反応しなかったので識別は可能であるがさらに解析を進める必要があると考えられる。

これらの結果を組み合わせ、防除体系を組み立て、耐性菌の出現しにくい総合管理体系を構築する上で耐性菌の種類がわかれば、ナシ園で効果が低い薬剤を使わずに効果が望める薬剤を使うことが可能になる。微生物農薬の一部で主要病害に対する防除効果・実用性が確認され始めており、これらを慣行防除体系に組み入れられれば、化学農薬の使用回数削減が期待できる。

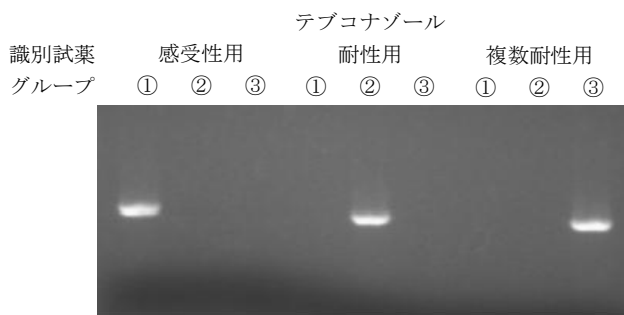


図9 DMI 耐性菌特異的 PCR 電気泳動像

- グループ ①: 感受性菌
 ②: テブコナゾール耐性菌
 ③: 複数耐性菌

考 察

2009 年にも県内の DMI 剤耐性黒星病菌を調査したが防除価は 7~100 であった。2010 年の結果(表 1)と同様に各地点で耐性の種類は異なっていて地域性はなかった。DMI 剤の種類を考えずに散布すると耐性菌の優占により黒星病に対する殺菌効果が低下し、それにより黒星病が増加する一因となる。また、

以上を組み合わせると、春先に遺伝診断により梨園に残存している DMI 耐性菌のクレードを迅速に識別する。耐性菌の種類が分かったらそれを避け、耐性のない DMI 剤を使用する。その場合、微生物農薬の併用の可能性もある。このように梨園管理を行うことにより、黒星病の果実発生による収量、収益の減少を抑えられるとともに薬剤散布回数の低減により、安全・安心な農業の推進に役立つと考えられる(平野ら, 2012)。

黒星病以外にも、灰色かび病, うどんこ病, 疫病, ベト病など数多くの耐性菌が報告されている(Japan FRAC リストより)。これらの耐性菌についても今回の手法を利活用することにより環境に負担の少ない総合管理対策に繋がると考えられた。

なお、本報告は「DMI 剤耐性菌対策によるナシ黒星病害発生リスクの低減(2010~2012)」、 「病害虫防除農薬環境リスク低減技術確立事業(微生物農薬を組み込んだナシ病害防除)」による成果の一部である。

引用文献

- Cools H. J., Ishii H., Butters J. A. and Hollomon D. W. (2002) : Cloning and Sequence Analysis of the Eburicol 14 α -Demethylase Encoding Gene (*CYP51*) from the Japanese Pear Scab Fungus *Venturia nashicola*. *Journal of Phytopathology* 150(8-9) 444-450.
- Faize M., Sugiyama T., Faize L., and Ishii H. (2003) : Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from Japanese pear: possible involvement in resistance against scab . *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63(6) 319-327.
- Hirano Y., and Arie T. (2006) : PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J Gen Plant Pathol* 72 273-283.
- Hirano Y., and Arie T. (2009) : Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolates based on the nucleotide sequences of polygalacturonase genes. *Microbes Environ.* 24 113-120.
- 平野泰志・酒井和彦・野田聡(2012) : ナシ黒星病に対する DMI 剤耐性遺伝子(*CYP51*)配列の解析. *日植病報* 78(1).
- 石井英夫(2003) : 植物防疫における病害抵抗性誘導利用の現状と展望. *今月の農業* 47(10) 13-18.
- 菊原賢次・石井英夫(2008) : 福岡県におけるフェナリモル耐性ナシ黒星病菌の発生. *九病虫研会報* 54, 24-29.
- Narusaka Y., Narusaka M., Horio T., and Ishii H. (1999) : Induction of Disease Resistance in Cucumber by Acibenzolar-S-methyl and Expression of Resistance-related Genes. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 65(2) 116-122.
- Proffer T. J., Berardi R., Zhonghua M., Nugent J. E., Ehret G. R., McManus P. S., Jones A. L., and Sundin G. W. (2006) : Occurrence, Distribution, and Polymerase Chain Reaction-Based Detection of Resistance to Sterol Demethylation Inhibitor Fungicides in Populations of *Blumeriella jaapii* in Michigan *Phytopathology*. 96 709-717.
- Schnabel G. and Jones A. L. (2001) : The 14 α -Demethylase (*CYP51A1*) Gene is Overexpressed in *Venturia inaequalis* Strains Resistant to Myclobutanil. *Phytopathology* 91 102-110.