

# キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌の コハク酸脱水素酵素阻害剤耐性に関する研究

宮本拓也

(茨城県農業総合センター園芸研究所)

## Studies on *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii* Isolates Resistant to Succinate Dehydrogenase Inhibitors on Cucumber

Takuya MIYAMOTO<sup>1</sup>

### 要約

茨城県内のキュウリ栽培圃場における褐斑病菌およびうどんこ病菌のボスカリド剤に対する感受性を調査するとともに、耐性菌の分子生物学的特徴を把握するために、コハク酸脱水素酵素 (SDH) 遺伝子の解析を行った。

YBA 寒天培地を用いた菌糸伸長阻止法を用いた褐斑病菌の本剤に対する感受性ベースラインは、最小生育阻止濃度 (MIC 値) および 50% 生育阻止濃度 (EC<sub>50</sub> 値) がそれぞれ 0.5~7.5 $\mu$ g/ml, 0.04~0.59 $\mu$ g/ml であった。本剤の使用履歴がある 28 圃場から採集した 907 菌株を検定した結果、MIC 値が 30 $\mu$ g/ml 以上である耐性菌が 26 圃場で計 427 菌株検出され、EC<sub>50</sub> 値の違いから中等度耐性 (MR) 菌, 高度耐性 (HR) 菌, 超高度耐性 (VHR) 菌に分類された。キュウリ苗を用いた接種試験の結果、これら耐性菌に対するボスカリド剤の防除効果の低下が確認された。

うどんこ病菌については、ボスカリド剤の使用履歴がある 13 圃場の 74 菌株についてリーフディスク検定法により感受性を検討した。その結果、感受性菌に対する本剤の MIC 値が 5 $\mu$ g/ml であったのに対し、50 $\mu$ g/ml 以上となった耐性菌が 11 圃場で計 34 菌株検出され、耐性菌は感受性の違いにより MR 菌と VHR 菌に分類された。また、キュウリ苗を用いた接種試験を行った結果、これら耐性菌に対する防除効果の低下が確認された。

さらに、褐斑病菌では SDH のサブユニット A, B, C および D 遺伝子 (それぞれ *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD*)、うどんこ病菌では *SdhB* の塩基配列を解析し、耐性菌と感受性菌の比較を行った。その結果、褐斑病菌の VHR 菌では *SdhB* の 278 番目のヒスチジンがチロシン (B-H278Y) に、HR 菌ではアルギニン (B-H278R) への置換が認められた。MR 菌では、一部で *SdhC* および *SdhD* に置換が認められたが、全サブユニットに置換が認められない菌株も認められた。また、うどんこ病菌でも VHR 菌では *SdhB* の 3rd cysteine-rich クラスター内のヒスチジンに変異が認められたものの、MR 菌では認められなかった。

キーワード：キュウリ, 褐斑病菌, うどんこ病菌, コハク酸脱水素酵素阻害剤, 薬剤耐性

### 1 はじめに

茨城県のキュウリ栽培は、2007 年産で作付面積 617ha, 生産量 32,400t といずれも全国 5 位であり、県内農産物の主要品目の一つである。作型としては、促成, 半促成, トンネル, 露地, 抑制など様々であるが、主要産

---

本稿は、筑波大学大学院生命環境科学研究科審査学位論文 (2011 年 7 月) に一部追加修正したものである。

1 Address : Horticultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3165-1 Ago, Kasama,  
Ibaraki 319-0292, Japan

地である常総市や筑西市などでは、促成と抑制栽培により年間2作の作型で栽培を行っている場合が多い。

近年、安全・安心な農産物の安定した供給が望まれており、化学農薬を削減した生産方式の普及が図られている。一方で、キュウリ栽培では、各種病害虫の多発生により化学農薬の削減は困難な状況にある。特に病害においては、キュウリ収穫開始直後から多発生する褐斑病（病原菌：*Corynespora cassiicola*）の被害が最も甚大である。また、うどんこ病（病原菌：主に *Podosphaera xanthii*）も年次によっては多発生する。べと病も多発生することもあるが、本病では登録薬剤が豊富なことから現在、本県では大きな問題とはなっていない。灰色かび病および菌核病については、以前は重要病害であったが近年、発生はほとんど見られない。

褐斑病は、主に葉に発生する病害であり、はじめハローを伴った淡褐色で円形の小斑点を生じ、次第に大型で不整形の病斑となる（図1）。多発生時には、これら病斑が融合し、発生がひどい場合には葉が枯死する。本病は古くから知られている病害であるが、長い間、問題とされることはなかった。しかし、1980年代ころから、ブルームレス台木の普及や多肥栽培、周年栽培による菌の常在化により被害が増大するようになった（挟間ら、1993；宮本ら、2007）。さらに、近年のキュウリ品種の変遷（宮本ら、2006）により被害が深刻化した（図2）。現在、本病の防除は主に化学的防除に頼っており、茨城県の生産者は本病の防除のためだけにほぼ毎週のように薬剤を散布している。しかし、このような化学的防除を行っていても、わずかな散布時期の遅れや効果の低い薬剤の使用により本病が甚発生となる圃場が多い。なお、以前は重要病害であった灰色かび病や菌核病の発生が近年極めて少ない理由として、褐斑病を対象とした防除が頻繁に行われているために、薬剤のスペクトラムが似る両病害が効果的に防除されていることが考えられる。

うどんこ病も、主に葉や茎に発生する病害であり、表面にうどんこ粉をふりかけたような白いかびを生じ、発生がひどいときには葉が枯死する（図3）。本病は古くから問題とされている病害であるが、褐斑病と同様にブルームレス台木の普及（千葉・富田、1993）や多肥栽培、品種の変遷など（宮本、未発表）により被害が増大するようになった。本病の防除もやはり多くを化学的防除に頼っている。定期的な薬剤散布により、被害が褐斑病ほどの大きな問題となることは少ないが、寡日照の年などには多発生することがある。近年では2009年がそれにあたり、県内の圃場で多発生傾向にあった。

両病害に対して薬剤による防除を行う際には、各種薬剤に対する耐性菌の発生が問題となる。褐斑病菌では、ベンズイミダゾール系剤、N-フェニルカーバメート系剤、ジカルボキシイミド系剤、QoI剤（quinone outside inhibitors）（挟間・佐藤、1996；石井ら、2002；伊達ら、2004；宮本ら、2006；竹内ら、2006；Ishii et al., 2007）に対する耐性菌の発生が確認されている。特に、ベンズイミダゾール系剤やQoI剤では耐性菌の発生が深刻であり、茨城県では検出率がともに100%となる圃場も多い（宮本ら、2006；宮本ら、2010）。また、うどんこ病菌では、ステロール脱メチル化阻害剤（DMI剤）（Ohtsuka et al., 1988）、QoI剤（Ishii et al., 2001）やシフルフェナミド剤（細川ら、2006）で耐性菌の発生が報告されている。これら耐性菌の発生は、両病害の防除を困難にする要因の一つとなっている。したがって、耐性菌の発生状況に関する情報を生産者にいち早く伝達し、薬剤の使用について注意を促すことは両病害を効率的に防除するために重要である。

このような中、ボスカリド水和剤（商品名：カンタスドライフロアブル）が2005年1月に農薬登録された。本剤は、新規のコハク酸脱水素酵素阻害剤（succinate dehydrogenase inhibitors：SDHI剤）である。本系統剤は、病原菌の電子伝達系におけるComplexIIのコハク酸脱水素酵素（succinate dehydrogenase：SDH）を作用点としている（Stammler et al., 2008）。SDHI剤としてはこれまでカルボキシシン剤、フルトラニル剤、ベノダニル剤等が開発されてきた。これらSDHI剤は主に担子菌類による病害の防除薬剤であったが、ボスカリド剤はこれに加えて、*Sclerotinia*属や*Alternaria*属、*Monilinia*属、各種うどんこ病菌など、子の菌類や不完全菌類に対しても高い発病抑制効果を示す（Matheron and Porchas, 2004；Stammler and Speakman, 2006）。ボスカリド剤に続いて、新規のSDHI剤として2010年から上市されたペンチオピラド剤についても、同様のスペクトラムを示す（櫻井、2007）。さらに、フルオピラム剤、イソピラザム剤およびピキサフェン剤なども上市に向けて開発中であり、SDHI剤は現在最も注目されている系統の一つである。

SDHI剤は単一の作用点を持った薬剤であり、そのような薬剤では一般的に耐性菌の発達が速い場合が多い。本系統薬剤では、過去にカルボキシシン剤等で、野外からはオオムギでの*Ustilago nuda*やキクの*Puccinia horiana*で耐性菌の発生が報告されている（飯島、1976；Leroux and Berthier, 1988）。ボスカリド剤についても、ピスタチオでの*Alternaria alternata*、ブドウやイチゴでの*Botrytis cinerea*などで、圃場における耐性菌の発生が報告され

ている (Avenot and Michailides, 2007 ; Stammler, 2008)。

キュウリ栽培圃場においては、ボスカリド水和剤の褐斑病に対する防除効果の高さから、本剤を特効薬的に使用する生産者も多く、防除体系における重要な薬剤として考えられていた。しかし、本剤では使用開始から間もなく、防除効果の低下を訴える生産者の声が聞かれた。薬剤の防除効果を実感できない理由としては、薬剤の散布時期や散布方法等に問題がある場合も多いが、上述のように本剤では耐性菌の発生を考慮する必要がある。そのため、褐斑病菌の本剤に対する感受性の変動を調査し、防除効果の低下の原因を検討する必要があると考えられた。

一方、ボスカリド水和剤ではキュウリうどんこ病を対象とした農薬登録は取られていない(2011年4月時点)。しかし、本病に対して農薬登録を有するペンチオピラド水和剤が2010年から上市された。上述のように、本病では各種薬剤に対する耐性菌の発生によって有効な薬剤が制限されていることから、ペンチオピラド水和剤は防除体系における重要な役割を担うと期待されていた。しかし、キュウリ栽培において、本病は比較的恒常的に発生している病害であり、生産者がボスカリド水和剤を褐斑病の防除を目的に散布していても、同時にうどんこ病菌が防除圧を受けている可能性が非常に高い。ペンチオピラド剤はボスカリド剤と同じくSDHI剤であることから感受性が交叉する恐れがあり、ボスカリド剤耐性菌の発生はペンチオピラド剤の防除効果に影響を及ぼす可能性が考えられた。すでに、アメリカのウリ科作物では、ボスカリド剤はQoI剤であるピラクロストロビン剤との混合剤で使用されており、ボスカリド剤耐性菌が検出されていた (McGrath, 2008 ; McGrath and Miazzi, 2008 ; Miazzi and McGrath, 2008)。そのため、日本においても本病原菌について、ボスカリド剤に対する感受性の変動を調査し、今後のキュウリ栽培におけるペンチオピラド水和剤の使用方法を検討する必要があると考えられた。

薬剤に対する感受性の変動の評価は、培地検定やポット試験などの方法を用いて当該薬剤の曝露を受けていない菌の集団の感受性(感受性ベースライン)と比較することで行うことが多い (Justum et al., 1998; Russell, 2004)。近年、感受性評価方法として、遺伝子診断法が用いられつつある。この方法は、褐斑病菌のように培地上で検定できる菌についてももちろんであるが、うどんこ病菌のように人工培養ができない菌において特に検定時間の短縮や作業性の改善のために大きな力を発揮する。遺伝子診断を行うには、その基本情報として当該薬剤に対する感受性の低下に関与する遺伝子変異を明らかにする必要がある。

ボスカリド剤を含むSDHI剤が作用点とするSDHは、2個の親水性の部分と2個の疎水性の部分の合計4個のサブユニットから構成される (Hägerhäll 1997)。2個の親水性サブユニットはフラボタンパク質 (SdhA) と鉄硫黄タンパク質 (SdhB) である。SdhAにはフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 補因子とコハク酸結合部位が共有結合しており、SdhBには3種の鉄硫黄クラスターのリガンドとなる、3つのcysteine-richクラスター (S1, S2, S3) が存在する。残りの2個のサブユニットは疎水性膜アンカーサブユニットで、それぞれSdhCとSdhDである。これまで、SDHI剤に対する感受性の低下についての遺伝子解析は、カルボキシシン剤等に対する細菌や、担子菌、子のう菌で報告されており、関連するアミノ酸置換はSdhBやSdhC、SdhDで認められている (Keon et al., 1991 ; Broomfield and Hargreaves, 1992 ; Matsson et al., 1998 ; Skinner et al., 1998 ; Honda et al., 2000 ; Matsson and Hederstedt, 2001 ; Ito et al., 2004 ; Li et al., 2006 ; Shima et al., 2008)。ボスカリド剤についても、*A. alternata* や *B. cinerea* の耐性菌でSdhB、SdhCやSdhDにアミノ酸置換が認められている (Avenot et al., 2008; Stammler, 2008; Stammler et al., 2008 ; Avenot et al., 2009 ; Avenot and Michailides, 2010 ; Leroux et al., 2010)。特に、SdhBについては研究事例が多く、最近の研究ではSdhCやSdhDよりもSdhBで置換が生じているSDHI剤耐性菌のほうが高度耐性となる場合が多い (Avenot et al., 2009 ; Leroux et al., 2010 ; Shima et al., 2011)。

殺菌剤耐性に関与するメカニズムは様々なものが知られている (Ma and Michailides, 2005; Hollomon, 2007a) (表1)。最もメジャーなケースが当該薬剤の作用点の変異である。また、本論文で述べるような当該薬剤の使用開始後間もなく耐性菌が検出されてくる事例でもこの作用点の変異が関わっているケースが多い。しかし、関与するメカニズムはこの他にも、作用点の代替となる機構の発現や、作用点の過剰発現、薬剤の排出機構の活性化や取り込みの減少、解毒などが挙げられる。その一方で、上述したように既報のSDHI剤耐性菌では、いずれもSDHサブユニットのいずれかの遺伝子に変異が認められている。そこで、本研究では、将来の遺伝子診断法の開発に資するためのボスカリド剤耐性菌の遺伝的特徴の解析として、SDHの各遺伝子に注目して研究を行った。

以上のような背景のもと、本研究は、茨城県内のキュウリ栽培圃場における褐斑病菌およびうどんこ病菌のボスカリド剤耐性菌の発生状況とともに、耐性菌のSDHの各遺伝子の特徴を明らかにすることを目的に行われた。そのため、2では、ボスカリド剤に対する褐斑病菌の耐性菌の発生状況を検討するため、本剤に対する感受性の変動の調査を行った。また、3では、同じくうどんこ病菌の現地圃場における耐性菌の発生状況を検討するため、感受性の変動の調査を行った。さらに、4では、両病原菌の本剤耐性菌と感受性菌のSDHの推定アミノ酸配列を比較するために、褐斑病菌についてはSDHの4つのサブユニット遺伝子、うどんこ病菌では耐性に関与する可能性が最も高いと思われる*SdhB* 遺伝子についてのシーケンス解析を行った。

なお、本論文の内容の多くは Miyamoto et al. (2009), Miyamoto et al. (2010a) および Miyamoto et al. (2010b) で報告したものである。

表1 各種薬剤に対する耐性機構 (Ma & Michailides (2005), Brent & Hollomon (2007a) を一部改変)

薬剤名または系統名	耐性機構
ドジン	不明
ベンズイミダゾール系	作用点の変異 (βチューブリン) 不明な機構
アニリノピリミジン系	不明
カスガマイシン	作用点の変異 (リボソーム)
有機リン系	薬物代謝性解毒
フェニルアマイド系	作用点の変異? (RNAポリメラーゼ)
ジカルボキシイミド系およびフェニルピロール系	作用点の変異 (浸透圧調節に関わるプロテインキナーゼ)
DMI剤 (ステロール脱メチル化阻害剤)	作用点の変異や過剰発現 (ステロール脱メチル化酵素) ATP-binding cassetteトランスポーターの過剰発現
QoI剤 (ストロビルリン系)	作用点の変異 (シトクロームb) 代替呼吸回路
シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤	作用点の変異 (シタロン脱水酵素)
SDHI剤 (コハク酸脱水素酵素阻害剤)	作用点の変異 (コハク酸脱水素酵素)



図1 キュウリ褐斑病の病徴  
(左：初期病斑，右：本病により枯死した状態)



図2 キュウリ褐斑病が多発生した圃場の状況



図3 キュウリうどんこ病の病徴

## 2 キュウリ褐斑病菌におけるボスカリド剤耐性菌の発生

### 2. 1 目的

キュウリ栽培圃場において、ボスカリド水和剤は主に褐斑病の防除を対象に使用され、その防除効果の高さから生産者からも好評を得ていた。しかし、その後、本剤を散布しても上市直後ほどの防除効果が得られないとの声が生産者から寄せられた。そこで、本研究では、茨城県のキュウリ栽培圃場より採集した褐斑病菌について、ボスカリド剤に対する感受性を検討した。

### 2. 2 材料および方法

#### 2. 2. 1 供試菌株

ボスカリド剤に対する *C. cassiicola* の感受性ベースラインデータを作成するため、本剤の曝露を受けていないキュウリ、トマト、ナス、ダイズおよびササゲから分離された 220 菌株の本病原菌を用いた (表 2)。このうち、9 菌株は農業生物資源ジーンバンク、キュウリからの 2 菌株、トマトからの 3 菌株、ナスからの 1 菌株は岡山県農業総合センター、キュウリからの 1 菌株は千葉県農林水産総合センター、キュウリからの 51 菌株は農業環境技術研究所より、それぞれ分譲を受けた菌株である。残る 153 菌株は茨城県で 2004 年から 2006 年にかけて分離された菌株で、単孢子または単菌糸分離をした後に検定に供試するまで 10 倍希釈したポテトデキストロース寒天 (PDA) 斜面培地上において室温で保存した。

ボスカリド剤に対する感受性検定には、2005 年から 2008 年にかけて、ボスカリド水和剤の使用履歴がある茨城県内 11 市町のキュウリ栽培 28 圃場より採集した罹病葉から、単孢子または単菌糸分離によって得られた計 907 菌株を供試した。また、本剤の上市から 2 年 9 カ月が経過した 2007 年 10 月には、本剤の使用履歴がない 3 市 5 圃場において罹病葉の採集を行い、単孢子分離によって得られた計 145 菌株も検定に供した。これらの菌株は検定に供するまで 10 倍希釈 PDA 斜面培地上で室温で保存した。

表2 ボスカリド剤に対する感受性ベースラインの作成に用いた*Corynespora cassiicola* 菌株

分離年	分離地	分離源	供試菌株数(株)
不明	茨城県	キュウリ	1 (MAFF712093) <sup>a)</sup>
1949	埼玉県	ダイス	1 (MAFF305087)
1959	千葉県	ササゲ	1 (MAFF305092)
1978	北海道	ダイス	1 (MAFF235139)
1988	長野県	キュウリ	1 (MAFF306176)
1989	大分県	キュウリ	1 (MAFF306348)
1995	茨城県	キュウリ	2 (MAFF237272, MAFF237273)
	宮崎県	キュウリ	1
	大分県	キュウリ	1
1999	岡山県	ナス	1
2000	茨城県	キュウリ	12
	岡山県	キュウリ	1
2001	茨城県	キュウリ	10
	岡山県	キュウリ	2
	福岡県	キュウリ	1 (MAFF744073)
2002	茨城県	キュウリ	14
	岡山県	トマト	3
		キュウリ	1
2004	茨城県	キュウリ	2
	千葉県	キュウリ	1
	佐賀県	キュウリ	11
2005	茨城県	キュウリ	121
2006	茨城県	キュウリ	30
Total number			220

<sup>a)</sup>カッコ内は菌株名を示し、農業生物資源研究所ジーンバンクより分譲を受けた菌株のみを示す。

また、キュウリポット苗を用いた接種試験には、表3に示したボスカリド剤感受性菌（S菌）、中等度耐性菌（MR菌）、高度耐性菌（HR菌）および超高度耐性菌（VHR菌）を各2菌株、計8菌株を供試した。なお、ここで示したボスカリド剤に対する感受性の表現型については後述する。S菌であるIbCor0008は感受性ベースラインを構築するために採集した菌株、残りの7株は感受性の変動を調査する際に分離した菌株であり、感受性菌および各耐性菌から任意に抽出した菌株であった。これらの菌株もまた、検定に供試するまで10倍希釈PDA斜面培地上で室温で保存した。

表3 キュウリポット苗を用いた感受性検定に供試した褐斑病菌株

菌株名	分離地	ボスカリド剤 に対する感受性 <sup>a)</sup>
IbCor0008	笠間市	S
IbCor3001	筑西市	S
IbCor3003	筑西市	MR
IbCor3004	筑西市	MR
IbCor3006	筑西市	HR
IbCor3013	筑西市	HR
IbCor3002	筑西市	VHR
IbCor3022	筑西市	VHR

<sup>a)</sup>S:感受性, MR:中等度耐性, HR:高度耐性, VHR:超高度耐性

## 2. 2. 2 感受性ベースラインの検討

褐斑病菌のボスカリド剤に対する感受性の変動を評価するため、本剤の曝露を受けていない菌を用いた感受性ベースライン（Russell, 2004）の検討を行った。

検定に供試する前に、各菌株を PDA 平板培地上で 25°C で 5~9 日間、培養した。PDA 培地上で伸長した菌叢の先端付近を中心から同心円状に培地ごと 4mm 径のコルクボーラーで打ち抜いたディスクを作成した。検定用の培地には Stammler and Speakman (2006) の YBA 培地 (Yeast Extract 1%, Bacto Peptone 1%, 酢酸ナトリウム 2%) に寒天 1.5% を添加した YBA 寒天培地 (石井・西村, 2007) を用いた。ボスカリド剤の添加は、BASF ジャパン (株) より分譲を受けたボスカリド原体を培地中の最終濃度が 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 30 µg/ml となるように行った。なお、ボスカリド原体の添加はジメチルスルホキシド (DMSO, 最終濃度 0.25%) に溶解して行った。ボスカリド剤を添加しなかった培地には DMSO のみを添加した。その後、菌叢ディスクを検定用培地に置床し、25°C で 4 日間培養した後、コルクボーラーの径である 4mm を差し引いた菌叢の直径を計測した。さらに、最小生育阻止濃度 (MIC 値) および 50% 生育阻止濃度 (EC<sub>50</sub> 値) を算出し、これらをボスカリド剤に対する褐斑病菌の感受性ベースラインとした。各菌株に対する MIC 値および EC<sub>50</sub> 値は 3 回の異なる試験によって得られた値の平均値である。なお、EC<sub>50</sub> 値の算出には全農より提供を受けた Log-linear model software を用いた。

### 2. 2. 3 ボスカリド水和剤の使用開始後における褐斑病菌の感受性および本剤使用履歴の調査

検定は 2007 年 5 月以前に分離した 438 菌株については、上述した菌糸伸長阻止法を用いて行った。2007 年 10 月以降に分離した 614 菌株については検定を簡易に行うため、ボスカリド剤の濃度を 0, 0.1, 1, 5, 7.5, 10, 30 µg/ml とした。

また、本研究では、検定結果が感受性ベースラインの範囲内となる菌を S 菌、それを超える菌を耐性菌とした。さらに、この耐性菌は EC<sub>50</sub> 値の範囲が異なる 3 つのグループに分けることができ、これらの分類は防除上重要になると考えられた。そこで、EC<sub>50</sub> 値が 1.1~6.3 µg/ml の菌を MR 菌、8.9~10.7 µg/ml の菌を HR 菌、24.8 µg/ml 以上の菌を VHR 菌として判断することとした。

なお、各圃場におけるボスカリド水和剤または他の薬剤の使用履歴は、生産者が記帳している栽培履歴または聞き取りにより調査した。

### 2. 2. 4 キュウリポット苗を用いた感受性検定

ポット植えたキュウリ苗を用いた接種試験により、ボスカリド剤耐性菌に対する本剤の植物体上における発病抑制効果の検討を行った。供試した 8 菌株は PDA 培地上で 25°C で 10 日間培養した後、葉さじで培地表面の菌糸を除去し、さらに、分生胞子の形成を促すために、ブラックライトブルーランプ照射下で 25°C で 3 日間培養した。培地上の分生胞子を筆を用いて滅菌水中に懸濁し、濃度が約 10<sup>4</sup> spores/ml となるよう調製した。キュウリ苗は、品種として 'ハイ・グリーン 21' (埼玉原種育成会) を用い、培土を詰めた育苗ポットに播種した後、約 3 週間 25°C の人工気象器内で育苗した苗を用いた。市販のボスカリド水和剤を水道水で 1,500 倍 (キュウリ褐斑病に対する適用登録希釈倍数) に希釈し、ボスカリド剤の成分濃度が 333 µg/ml になるように調製した薬液をハンドスプレーを用いてキュウリ苗に噴霧した。対照としてマンゼブ水和剤 (散布時の成分濃度は 1,250 µg/ml) および水道水の処理を設けた。苗数は各処理当たり 4 株とした。噴霧した薬液を風乾させた後、病原菌の胞子懸濁液を葉全体にハンドスプレーを用いて噴霧した。薬液および胞子懸濁液の噴霧は、葉から液がやや垂れる程度に行った。胞子懸濁液を接種したキュウリ苗は、28°C で 24 時間暗黒下 (湿度 99% 以上) で管理し、その後 4 日間、25°C の人工気象器で明期 12 時間 (湿度約 80%)、暗期 12 時間 (99% 以上) の周期で管理した。

発病調査は接種 5 日後に行い、第 2 葉に発生した褐斑病の病斑を計数 (各処理 4 株の平均) することで行い、水道水処理株に対する薬剤処理株の発病抑制率 {= [(水道水処理株における病斑数 - 薬剤処理株における病斑数) / 水道水処理株における病斑数] × 100} を算出した。

## 2. 3 結果

### 2. 3. 1 感受性ベースライン

ボスカリド水和剤の使用履歴がない圃場から採集した 220 菌株に対するボスカリド剤の MIC 値は 5 µg/ml をピークとする一峰型であり、最小値が 0.5 µg/ml、最大値が 7.5 µg/ml、平均値が 5.27 µg/ml であった (図 4)。EC<sub>50</sub> 値も一峰型を示し、最小値が 0.04、最大値が 0.59 µg/ml、平均値が 0.27 µg/ml であった (図 5)。

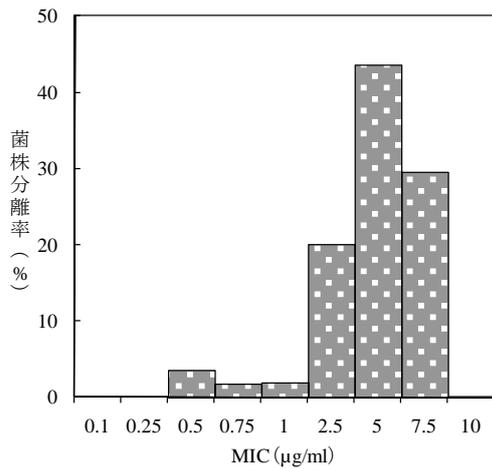


図4 *Corynespora cassiicola* のボスカリド剤に対する感受性ベースライン (最小生育阻止濃度 (MIC 値))

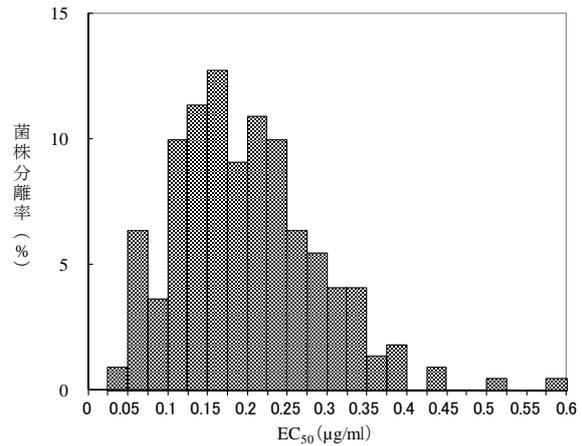


図5 *Corynespora cassiicola* のボスカリド剤に対する感受性ベースライン (50%生育阻止濃度 (EC<sub>50</sub> 値))

### 2. 3. 2 耐性菌の発生状況

ボスカリド水和剤の使用履歴がある圃場から採集した褐斑病菌の感受性を検討した結果、総検定数 907 菌株中 480 菌株が MIC 値 7.5μg/ml 以下の S 菌であったが、427 菌株が MIC 値 30μg/ml 以上の耐性菌であった(表 4)。耐性菌は 2005 年 9 月に筑西市の 2 つの圃場 (圃場 No.7, 8) で初めて検出され、その後、検定を実施した 28 圃場中 26 圃場で認められた。加えて、14 圃場では耐性菌の検出率が 50%以上となり、非常に高頻度で耐性菌が分布していることが明らかとなった。

表4 ボスカリド水和剤の使用履歴があるキュウリ栽培圃場における本剤耐性褐斑病菌の発生状況

圃場 No.	市町名	菌株採集年月 または期間	検定菌株数	耐性菌株数 <sup>a)</sup>			耐性菌率 (%) <sup>b)</sup>	ボスカリドの 総使用回数
				MR	HR	VHR		
1	大子町	2007年10月	30	6	0	18	80.0	10
2	大子町	2007年10月	18	1	0	15	88.9	15
3	城里町	2007年10月	6	0	0	0	0	6
4	城里町	2007年10月	28	0	0	0	0	9
5	城里町	2007年10月	17	1	0	1	11.8	1
6	筑西市	2005年8月～06年11月	15	10	0	0	66.7	5
7	筑西市	2005年8月～07年4月	138	64	0	0	46.4	6
8	筑西市	2005年8月～06年2月	30	15	0	0	50.0	5
9	筑西市	2005年9月～06年4月	21	5	0	6	52.4	6以上
10	筑西市	2005年9月～07年4月	108	64	0	2	61.1	7
11	筑西市	2006年2月	8	8	0	0	100	不明
12	筑西市	2006年9月	10	1	0	0	10.0	不明
13	筑西市	2007年10月	30	9	4	5	60.0	4
14	筑西市	2007年10月	30	22	0	3	83.3	11
15	桜川市	2007年10月	30	2	0	4	20.0	12
16	常総市	2007年10月	21	1	0	9	47.6	7
17	常総市	2007年10月	25	4	0	10	56.0	6
18	常総市	2007年10月	30	0	0	18	60.0	4
19	常総市	2007年10月	30	20	0	10	100	4
20	常総市	2007年10月	30	2	0	3	16.7	5
21	かすみがうら市	2006年4月～08年11月	53	28	0	14	79.2	4
22	かすみがうら市	2007年3月～5月	51	7	0	3	19.6	2
23	河内町	2007年10月	28	0	0	1	3.6	不明
24	竜ヶ崎市	2007年10月	6	2	0	0	33.3	2
25	竜ヶ崎市	2007年10月	30	0	0	1	3.3	1
26	古河市	2007年11月	22	0	0	2	9.1	5
27	行方市	2007年10月	30	18	0	4	73.3	6
28	つくば市	2007年10月	32	1	0	3	12.5	3
合計			907	291	4	132	47.1	

<sup>a)</sup>MR: 中等度耐性菌, HR: 高度耐性菌, VHR: 超高度耐性菌

<sup>b)</sup>耐性菌率(%)=100×{(MR菌株数+HR菌株数+VHR菌株数)/検定菌株数}

これら耐性菌株に対するボスカリド剤のEC<sub>50</sub>値を算出したところ、感受性が明らかに異なる菌群の存在が明らかとなり、本研究においてEC<sub>50</sub>値が1.1～6.3μg/mlであった菌群をMR菌、8.9～10.7μg/mlをHR菌、24.8μg/ml以上をVHR菌と名付けた(図6)。各菌群に対するボスカリド剤の濃度別の菌糸伸長抑制率は図7の通りであり、目視でもその差異は明瞭であった(図8)。菌群別の菌株数は、427菌株の耐性菌のうち、MR菌は291菌株、HR菌は4菌株、VHR菌は132菌株であった(表4)。圃場別で見ると、MR菌は21圃場、VHR菌は20圃場で検出されたのに対して、HR菌は筑西市の圃場No.13のみで検出された。

2005年9月に初めて分離された耐性菌2菌株はいずれもMR菌であった。その後、2006年9月までに筑西市(圃場No.6～12)およびかすみがうら市(No.21, 22)から分離した耐性菌67菌株も全てがMR菌であった。VHR菌は2006年9月に筑西市のNo.10圃場で初めて検出された。それ以降、VHR菌は頻繁に検出されるようになり、2007年の10月および11月に実施した13市町20圃場での調査になると、検出した200菌株の耐性菌のうちMR菌は89菌株、HR菌は4菌株、VHR菌は107菌株であった。

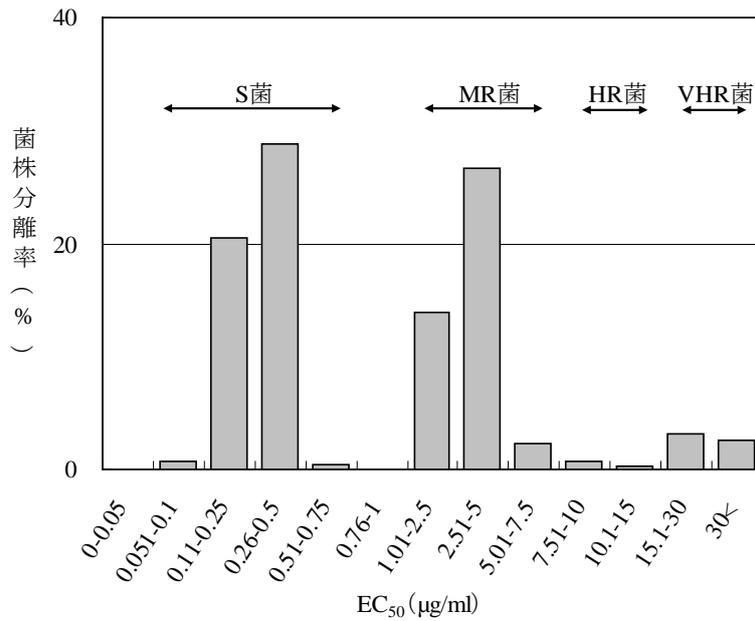


図6 ボスカリド水和剤の散布履歴がある圃場から分離したキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤に対する感受性頻度分布  
 S菌：感受性，MR菌：中等度耐性菌，HR菌：高度耐性菌，VHR菌：超高度耐性菌

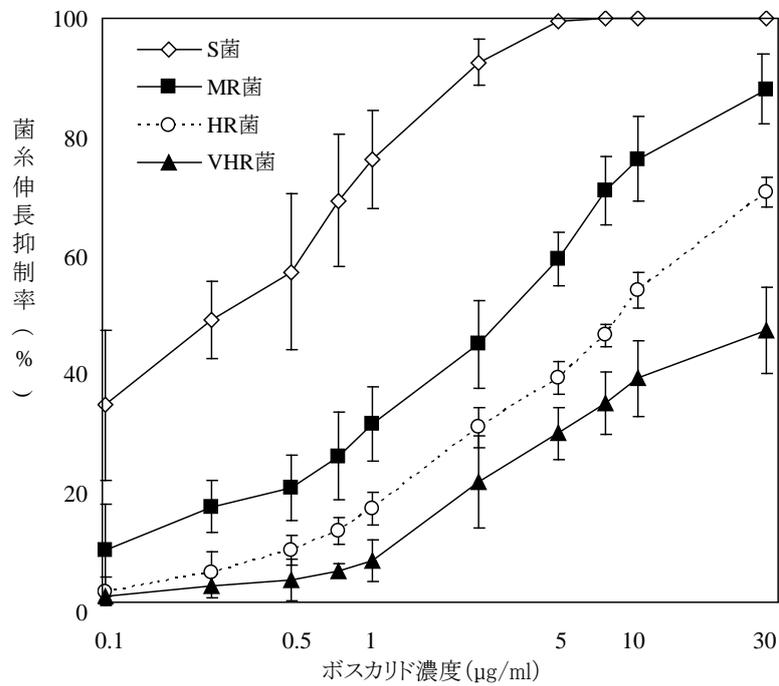


図7 キュウリ褐斑病菌のボスカリド剤感受性菌 (S)，中等度耐性菌 (MR)，高度耐性菌 (HR) および超高度耐性菌 (VHR) のボスカリド剤感受性：薬剤無添加培地における菌糸伸長に対する薬剤添加培地での菌糸伸長抑制率の推移

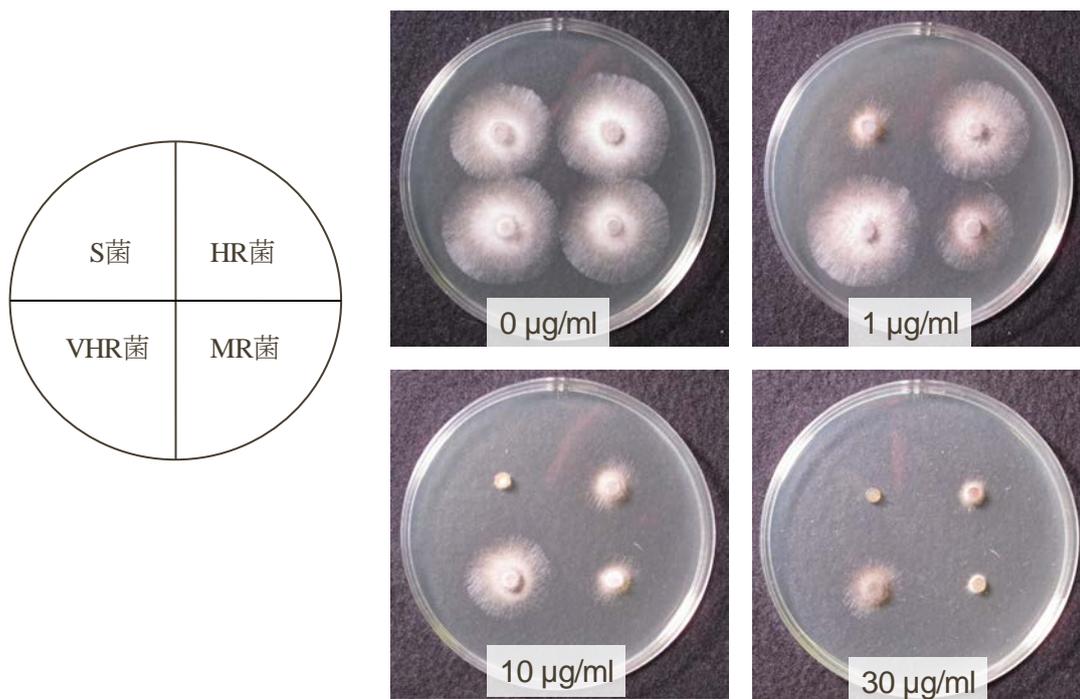


図8 キュウリ褐斑病菌の菌糸伸長抑制程度の違いに基づくボスカリド剤感受性の類別

S 菌：感受性菌，MR 菌：中等度耐性菌，HR 菌：高度耐性菌，VHR 菌：超高度耐性菌。シャーレの写真に記した数字は各培地中のボスカリド剤の濃度を示す。

各圃場におけるボスカリド水和剤の使用履歴を調査した結果、耐性菌が最も早く 2005 年の 9 月に検出された筑西市の圃場（圃場 No.7, 8）では、わずか 3 回または 4 回の使用で耐性菌が検出された（表 5）。筑西市ではキュウリは促成栽培（11 月上旬から 5 月上旬）と抑制栽培（7 月下旬から 10 月上旬）で年 2 回作付けし、また 2005 年の 2 月から本剤の使用を開始して、1 作に 1~3 回使用していた圃場が多かった。これらの圃場では表 6 に一例を示す通り、ボスカリド水和剤を散布する間に本剤とは作用機作が異なる薬剤を複数使用していた。また、初めての耐性菌検出時に最も本剤の使用回数が少なかったのは城里町の No.5 圃場と竜ヶ崎市の No.25 圃場での 1 回であった。一方で、城里町の No.3 および No.4 の 2 圃場ではそれぞれ本剤を年 2 回または 3 回、合計 6 回または 9 回使用したにもかかわらず耐性菌は検出されなかった。

また、本剤の使用履歴がない圃場についても調査を実施した結果、5 圃場中 2 圃場で耐性菌が検出された（表 7）。つくば市の No.32 圃場では 32 菌株中 1 菌株が MR 菌であり、No.33 圃場では 23 菌株中 8 菌株が VHR 菌であった。No.32 圃場の周囲は住宅街や大学キャンパスであり、少なくとも周囲 300m 範囲に少なくとも商業的に作物が栽培されている圃場は認められなかった。また、No.33 圃場の周囲には、本剤が農薬登録されたトマトなどの作物が栽培されていたが、それらの圃場での聞き取り調査では本剤の使用履歴は認められなかった。

表5 筑西市の圃場No.7, 8および10におけるボスカリド剤耐性キュウリ褐斑病菌の検出と本剤の使用回数の推移

圃場 No.	菌株採集 年月日	検定菌 株数	耐性菌株数 <sup>a)</sup>			耐性菌率 (%) <sup>b)</sup>	ボスカリド <sup>®</sup> の 総使用回数
			MR	HR	VHR		
7	2005年 8月29日	11	0	0	0	0	3
	9月21日	32	1	0	0	3	4
	2006年 2月8日	27	26	0	0	96	5
	9月14日	15	12	0	0	80	6
	12月1日	13	9	0	0	69	6
	2007年 1月11日	18	14	0	0	78	6
	2月21日	6	6	0	0	100	6
	4月5日	9	6	0	0	67	6
8	2005年 8月29日	9	0	0	0	0	2
	9月21日	4	1	0	0	25	3
	2006年 1月13日	9	7	0	0	78	4
	2月8日	8	7	0	0	88	5
10	2005年 9月7日	31	0	0	0	0	2
	9月21日	12	0	0	0	0	2
	2006年 2月8日	11	7	0	0	64	3
	9月14日	15	5	0	1	40	5
	12月1日	7	6	0	1	100	6
	2007年 1月11日	9	6	0	0	67	6
	4月5日	16	15	0	0	94	7

<sup>a)</sup>MR: 中等度耐性菌, HR: 高度耐性菌, VHR: 超高度耐性菌

<sup>b)</sup>耐性菌率(%)=100×{(MR菌株数+HR菌株数+VHR菌株数)/検定菌株数}

表6 筑西市の圃場No.7および10におけるボスカリド剤耐性キュウリ 褐斑病菌の検出に至るボスカリド水和剤およびその他薬剤の散布履歴

圃場No.	作型	薬剤散布年月日	薬剤名	
7	促成栽培	2005年 1月13日	キャプタン	
		1月20日	カスガマイシン・銅, プロシミドン	
		1月28日	イミノクタジンアルベシル酸塩, ポリオキシシ	
		2月3日	ボスカリド	
		2月14日	ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル	
		2月23日	カスガマイシン・銅	
		3月2日	ボスカリド	
		3月12日	カスガマイシン・銅, ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル	
		3月21日	キャプタン	
		3月31日	カスガマイシン・銅, シフルフェナミド・トリフルミゾール	
	4月8日	ボスカリド, TPN		
	4月24日	キャプタン		
	抑制栽培	2005年 8月9日	ポリオキシシ, プロシミドン	
		8月14日	シアゾファミド	
		8月21日	TPN, トリフルミゾール	
		9月3日	ボスカリド	
		9月17日	ジエトフェンカルブ・プロシミドン	
10		促成栽培	2005年 1月6日	マンゼブ
			1月11日	ジエトフェンカルブ・プロシミドン
	1月21日		イミノクタジンアルベシル酸塩	
	2月1日		シモキサニル・TPN	
	2月6日		ボスカリド	
	2月18日		ジエトフェンカルブ・プロシミドン, トリフルミゾール	
	2月25日		シメコナゾール・マンゼブ	
	3月4日		ポリオキシシ	
	3月14日		ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル	
	3月20日		ポリカーバメート	
	3月28日		ジエトフェンカルブ・プロシミドン, ポリオキシシ	
	4月2日		ボスカリド	
	4月15日		TPN	
	抑制栽培		2005年 8月2日	キャプタン
			8月7日	TPN
		8月13日	ポリカーバメート	
		8月23日	シメコナゾール・マンゼブ	
		8月30日	ジエトフェンカルブ・プロシミドン	
		9月10日	ポリオキシシ	
		促成栽培	2005年 11月9日	TPN, トリフルミゾール
			11月18日	ポリカーバメート, ポリオキシシ
	12月10日		マンゼブ, メバニピリム	
	12月20日		ジエトフェンカルブ・プロシミドン, TPN	
12月30日	ボスカリド, キャプタン			
2006年 1月10日	マンゼブ, ポリオキシシ			
1月20日	シアゾファミド, チオファネートメチル			
2月4日	ジエトフェンカルブ・プロシミドン, ポリカーバメート			

表7 ポスカリド水和剤の使用履歴がないキュウリ栽培圃場における本剤耐性褐斑病菌の発生状況

圃場 No.	市町名	菌株採集年月	検定菌株数	耐性菌株数 <sup>a)</sup>			耐性菌率 (%) <sup>b)</sup>
				MR	HR	VHR	
29	水戸市	2007年10月	30	0	0	0	0
30	水戸市	2007年10月	30	0	0	0	0
31	常陸大宮市	2007年10月	30	0	0	0	0
32	つくば市	2007年10月	32	1	0	0	3.1
33	つくば市	2007年10月	23	0	0	8	34.8

a) MR: 中等度耐性菌, HR: 高度耐性菌, VHR: 超高度耐性菌

b) 耐性菌率(%)=100×{(MR菌株数+HR菌株数+VHR菌株数)/検定菌株数}

### 2. 3. 3 耐性菌に対するポスカリド水和剤の発病抑制効果

ポット試験において、供試した8菌株は水道水処理苗においてはほぼ同様の病斑数を形成した(表8)。また、同様にマンゼブ水和剤はいずれの菌株処理苗に対しても高い発病抑制効果を示した。ポスカリド水和剤処理苗においては、S菌を接種した場合、完全に発病は抑制された。一方で、耐性菌に対しては発病抑制効果に低下が認められ、その程度はMR菌、HR菌、VHR菌の順により顕著であった。

表8 ポスカリド剤感受性を異にするキュウリ褐斑病菌に対する本剤の発病抑制効果

菌株名	ポスカリドに対する感受性 <sup>a)</sup>	処理 <sup>b)</sup>	病斑数 <sup>c)</sup>	発病抑制率 (%) <sup>d)</sup>
IbCor0008	S	ポスカリド水和剤	0	100
		マンゼブ水和剤	2.0	96
		水道水	50.5	-
IbCor3001	S	ポスカリド水和剤	0	100
		マンゼブ水和剤	0.3	99
		水道水	33.0	-
IbCor3003	MR	ポスカリド水和剤	16.8	75
		マンゼブ水和剤	1.3	98
		水道水	67.0	-
IbCor3004	MR	ポスカリド水和剤	13.5	63
		マンゼブ水和剤	0	100
		水道水	36.8	-
IbCor3006	HR	ポスカリド水和剤	42.5	39
		マンゼブ水和剤	2.3	97
		水道水	69.5	-
IbCor3013	HR	ポスカリド水和剤	26.0	48
		マンゼブ水和剤	0	100
		水道水	49.8	-
IbCor3002	VHR	ポスカリド水和剤	52.0	-5
		マンゼブ水和剤	0.6	99
		水道水	49.5	-
IbCor3022	VHR	ポスカリド水和剤	36.0	5
		マンゼブ水和剤	0.0	100
		水道水	38.0	-

a) S: 感受性, MR: 中等度耐性, HR: 高度耐性, VHR: 超高度耐性

b) ポスカリド水和剤およびマンゼブ水和剤はそれぞれ、333 $\mu$ g/ml, 1,250 $\mu$ g/mlの有効成分濃度で散布した。

c) キュウリ苗4株に各薬剤を散布し、風乾した後、約104個/mlの褐斑病菌分生孢子懸濁液を噴霧接種し、5日後に発生した病斑数の1葉当たりの平均値。

d) 発病抑制率(%)=[(水道水処理株における病斑数-薬剤処理株における病斑数)/水道水処理株における病斑数]×100

### 2. 4 考察

本研究の結果、茨城県内にはポスカリド水和剤の防除効果の低下を伴うキュウリ褐斑病菌の本剤耐性菌が広

範囲で高率に分布していることが明らかとなった。ポット試験の結果に見られたように、耐性菌に対する本剤の発病抑制効果は顕著に低下しており、現在の褐斑病の恒常的な多発生を考慮すると、県内の多くのキュウリ栽培圃場で本剤の防除効果はほぼ失われていると考えられる。また、ボスカリド水和剤の上市からの使用回数が1, 2回と少ない圃場でも耐性菌が検出されていることから、キュウリ褐斑病菌では本剤に対する耐性菌が非常に発生しやすいと推察される。その要因としては本剤が単一の作用点をもった薬剤であること、また本菌は孢子形成量が多く、世代交代も速い菌であることなどが考えられる。

本研究では、褐斑病菌のボスカリド剤に対する感受性の低下を示すために、*C. cassiicola* の感受性ベースラインを最初に検討した。ボスカリド剤に対する感受性ベースラインはいくつかの病原菌で評価されている (Lu et al., 2004; Spiegel and Stammler, 2006; Stammler and Speakman, 2006; Avenot and Michailides, 2007; Stammler et al., 2007; Zhang et al., 2007; Myresiotis et al., 2008; Wise et al., 2008) が、*C. cassiicola* では得られていなかった。ボスカリド剤感受性の検定では、*B. cinerea*, *Monilinia* spp. や *Sclerotinia sclerotiorum* など YBA 液体培地を用いた方法が開発されている (Spiegel and Stammler, 2006; Stammler and Speakman, 2006; Stammler et al., 2007)。*C. cassiicola* の感受性の評価において、他の薬剤では一般的に PDA 平板培地が用いられてきた。しかし、石井・西村 (2007) は、PDA 平板ではボスカリド剤を高濃度 (100 $\mu$ g/ml) で添加した場合でも感受性菌に生育が見られ、MIC 値が得られなかったが、YBA 寒天培地を用いることで比較的 low 濃度のボスカリド剤でも菌糸伸長を抑制できることを報告した。Ragsdale and Sisler (1970) はボスカリド剤と同様に SDHI 剤に属するカルボキシシン剤に対する *Neurospora crassa* などの感受性検定において、培地中の炭素源をグルコースから酢酸に代えることによって薬剤感受性が約 10 倍高くなることを示している。*C. cassiicola* で認められた培地による感受性の違いは、炭素源の違いによるものと考えられる。YBA 寒天培地を用いて調べた *C. cassiicola* のボスカリド剤に対する感受性のベースラインは MIC 値および EC<sub>50</sub> 値ともに一峰性を示し、薬剤濃度も狭い範囲に収まった。さらに、感受性菌のみならず耐性菌においても培地上での検定結果とポット苗を用いた接種試験の結果がよく一致していた。したがって、本培地を用いた *C. cassiicola* の菌糸伸長阻止法はボスカリド剤感受性のモニタリング手法として適していると考えられた。

興味深いことに、No.4 および No.5 の城里町の両圃場ではそれぞれボスカリド水和剤が通算 6 回、9 回使用されているにもかかわらず、耐性菌が検出されなかった。これらの圃場では、他の圃場とは異なり、キュウリの栽培は抑制のみの年 1 作であり、褐斑病も作期後半にやや多発生はするものの、さほど深刻ではなかった。したがって、本病の発病圧が他の圃場よりも比較的低いことが、耐性菌が検出されなかった要因と考えられるが、詳細は明らかではない。実際、他系統の薬剤では、対象となる病害の発生が少なければ耐性菌の選抜も遅くなることが報告されている (Staub, 1991; Brent and Hollomon, 2007a)。今後は検定菌株を増やし、さらにその推移を調査して、要因を検討する必要があると考えられた。

その一方で、耐性菌は本剤の使用履歴がない圃場からも検出された。その原因として、周囲からの耐性菌の飛散が考えられたが、近隣の圃場での本剤の使用は認められなかったため、そこからの飛散の可能性は低いと考えられた。一方で、薬剤耐性菌が風によって長距離離搬している可能性も報告されている (Foster and Staub, 1996; Ishii et al., 2001)。さらに、病原菌が付着した資材や植物残さ (宮本ら, 2007)、種子 (挾間ら, 1993) での伝搬の可能性も考えられる。しかし、いずれの移動手段でもつくば市の No.33 での検出率の高さを説明するには不十分と考えられる。したがって、なぜ使用履歴がない圃場で耐性菌が検出されたのか、その理由は定かではない。なお、同様の事例は、カリフォルニア州の本剤耐性 *A. alternata* でも報告されている (Avenot and Michailides, 2007)。

本研究では本剤耐性菌を EC<sub>50</sub> 値の違いから 3 つの菌群に分類した。これら耐性菌の検出時における分類は、圃場におけるボスカリド水和剤の防除効果の低下を検討するために有効とも考えられた。しかし、各圃場における耐性菌の検出頻度は高く、例え MR 菌のみの発生であっても本剤の防除効果は顕著に低下することが予想される。さらに、耐性菌検出の経緯から、最初に登場した耐性菌は MR 菌であり、時間の経過とともに VHR 菌が増加したと考えられる。VHR 菌の増加傾向はボスカリド水和剤の使用回数の増加に伴うものと推察される。一方で、HR 菌は極希少な発生をしていると考えられる。これは HR 菌の fitness が低いことに起因すると推測される。ボスカリド剤耐性菌に程度が異なる菌群が存在することは第 3 章で述べる *Podosphaera xanthii* の他、*A. alternata* および *B. cinerea* でも同様に報告されている (Avenot and Michailides, 2010; Leroux et al., 2010) が、そ

これらの圃場での発生頻度の差異については明確にされていない。

### 3 キュウリうどんこ病菌におけるボスカリド剤耐性菌の発生

#### 3. 1 目的

日本ではキュウリうどんこ病するボスカリド水和剤の農薬登録はないが、2008年（上市は2010年）にSDHI剤であるペンチオピラド水和剤が本病に対して登録された。キュウリ栽培では、2005年から主に褐斑病を対象にボスカリド水和剤が使用されていたため、うどんこ病菌も本剤の曝露を受けていたと考えられた。そのため、ペンチオピラド水和剤の上市以前に、本病におけるSDHI剤に対する耐性菌対策を検討するために、予めボスカリド剤に対する感受性の変動を調査する必要があると考えられた。そこで、本研究では本剤の使用履歴がある圃場からキュウリうどんこ菌を採集し、感受性の検定を行った。

#### 3. 2 材料および方法

##### 3. 2. 1 供試菌株

ボスカリド水和剤の曝露を受けていない菌株の本剤に対する感受性を検討するため、全国農業協同組合連合会より分譲を受けた菌株 K-7-2、および2008年8月に茨城県鉦田市のメロン栽培圃場より採集した病斑から単胞子分離によって得られた菌株 IbMPx0501、IbMPx0502、IbMPx0503 および IbMPx0609 を用いた（表9）。

さらに、本剤に対する感受性の変動を調査するために、2008年の10月、11月、または2009年の10月に、ボスカリド水和剤の使用履歴がある茨城県内の6市（筑西市、桜川市、常総市、かすみがうら市、石岡市、小美玉市）13圃場からうどんこ病が発生しているキュウリ葉を採集した。採集を行った全ての圃場でキュウリは年2作栽培されており、ボスカリド水和剤の使用履歴も認められた。採集した罹病葉は試験に供するまで5°Cで保存した。なお、ここでは単胞子分離を行わず、罹病葉1枚を1菌株として扱った。

また、ボスカリド剤耐性菌の特徴を詳細に検討するために、本剤の使用履歴がある圃場の罹病葉から単胞子分離した以下の6菌株を得た（表9）。すなわち、IbCPx2-4-1、IbCPx2-4-2、IbCPx4-4-1は、桜川市の圃場より採集した罹病葉を由来とし、後述するリーフディスク検定において、ボスカリド剤500μg/mlの液に浮かべたディスク上で発生した病斑から得られた菌株である。また1-1S、1-2S および1-3Sも単胞子分離株であるが、選抜の方法が異なり、333μg/mlのボスカリド剤を噴霧したキュウリ本葉に筑西市の圃場から採集した罹病葉上の分生胞子を接種し、その後、形成された病斑から得られた菌株であり、農業環境技術研究所より分譲いただいた。これらの菌株は各々、ペトリ皿内に入れたキュウリ本葉または子葉上において維持した。

なお、本研究で用いた単胞子分離菌株については、いずれも発芽管の形態が *fuliginea* 型であること、分生胞子が連鎖し、かつフィブリン体を持つことを確認し、*P. xanthii* (*Oidium* 属 *Fibroidium* 亜属) であることを簡易に同定した (Uchida et al., 2009)。

表9 本研究で用いたウリ類うどんこ病菌の単胞子分離菌株

菌株名	採集地	分離源宿主	来歴
IbMPx0501	鉦田市	メロン	本研究
IbMPx0502	鉦田市	メロン	本研究
IbMPx0503	鉦田市	メロン	本研究
IbMPx0609	鉦田市	メロン	本研究
IbCPx2-4-1	桜川市	キュウリ	本研究
IbCPx2-4-2	桜川市	キュウリ	本研究
IbCPx4-4-1	桜川市	キュウリ	本研究
1-1S	筑西市	キュウリ	農業環境技術研究所より分譲
1-2S	筑西市	キュウリ	農業環境技術研究所より分譲
1-3S	筑西市	キュウリ	農業環境技術研究所より分譲
K-7-2	不明	キュウリ	全国農業協同組合連合会より分譲

### 3. 2. 2 リーフディスク法を用いた感受性検定

感受性検定は Ishii et al. (2001) および Schepers (1984) に従ってリーフディスク法により行った。キュウリ苗の外観健全な子葉からコルクボーラーで 1cm 径のリーフディスクを打ち抜き、ペトリ皿内の湿らせた濾紙上に葉表側を上にしてディスクを置いた。うどんこ病菌の接種は、ディスク上で検定菌株の病斑を軽く指で弾いて分生胞子を落下させることで行った。その後、このディスクを 6 穴培養皿内の薬液に浮かべた (1 穴当たり 5 ディスク)。薬液は市販のボスカリド水和剤と滅菌水を用いて本剤の成分濃度が 0, 0.05, 0.5, 5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$  となるように調製した。なお、ボスカリド剤 500 $\mu\text{g/ml}$  はキュウリ灰色かび病および菌核病で農薬登録された実用濃度である。その後、培養皿は 12 時間間隔の明暗条件下で 20°C で管理した。

接種 10 日後、実体顕微鏡下でリーフディスク上に形成された病斑の調査を行った。発病の有無や程度により指数化 (0=病斑形成無し, 1=病斑面積がディスクの 5% 未満, 2=5% 以上 25% 未満, 3=25% 以上 50% 未満, 4=50% 以上 75% 未満, 5=75% 以上) してディスクごとに調査した後に、発病度  $(=[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F] \times 100)$ 。A~E はそれぞれ発病指数 5~1 のディスク数、F はディスクの総数) を求めた。

### 3. 2. 3 キュウリポット苗を用いた感受性検定

ボスカリド水和剤の実用的な使用場面における本剤耐性菌に対する発病抑制効果を検討するため、ポット植えしたキュウリ苗を用いた接種試験を行った。試験には、リーフディスク検定においてボスカリド剤 500 $\mu\text{g/ml}$  でも病斑形成が認められ耐性菌として判断された IbCPx2-4-1, IbCPx2-4-2, IbCPx4-4-1, 1-1S および 1-3S, 対照として感受性菌 (S 菌) である K-7-2 を用いた。各菌株の孢子懸濁液は、キュウリ葉上で形成させた分生胞子を水道水に懸濁し、濃度を約  $5 \times 10^4$  spores/ml として調製した。キュウリ苗は、品種として 'ハイ・グリーン 21' を用い、ガラスハウスで育苗した第 3 葉期のものを用いた。市販のボスカリド水和剤を水道水で 1,000 倍に希釈し、成分濃度が 500 $\mu\text{g/ml}$  になるように調製した薬液をハンドスプレーを用いて苗に噴霧した。また、対照として水道水のみを散布した処理を設けた。苗数は各処理当たり 5 株とした。薬液を風乾させた後、病原菌の孢子懸濁液を葉全体にハンドスプレーを用いて噴霧した。その後、発病調査までキュウリ苗の管理はガラスハウス内で行った。

接種 8 日後、第 2 葉に形成された病斑の程度を指数化 (0=病斑形成無し, 1=病斑が葉面積の 5% 未満, 2=5% 以上 25% 未満, 3=25% 以上 50% 未満, 4=50% 以上 75% 未満, 5=75% 以上) して調査し、発病度  $(=[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F] \times 100)$ 。A~E はそれぞれ発病指数 5~1 の葉数、F は葉の総数) を求め、さらに、薬剤の発病抑制率  $(=[(水道水処理株における発病度 - ボスカリド剤処理株における発病度) / 水道水処理株における発病度] \times 100)$  を算出した。

## 3. 3 結果

### 3. 3. 1 ボスカリド剤に対するうどんこ病菌の感受性

リーフディスク法による感受性検定の結果、S 菌である K-7-2, IbMPx0501, IbMPx0502, IbMPx0503 および IbMPx0609 の病斑形成は、ボスカリド剤濃度が 0.5 $\mu\text{g/ml}$  でほとんど抑制され、最小生育阻止濃度 (MIC 値) は 5 $\mu\text{g/ml}$  であった (表 10)。これらと比較し、ボスカリド水和剤の使用履歴がある圃場から採集した 74 菌株のうち 34 菌株では感受性の低下が認められた。これらは MIC 値が 5 $\mu\text{g/ml}$  を超えて 50 $\mu\text{g/ml}$  以上であったことから耐性菌であると判断された (表 11)。さらに、そのうちの 21 菌株では 500 $\mu\text{g/ml}$  でも病斑形成が認められた。

圃場別では検定を行った 13 圃場中 11 圃場で耐性菌が検出された。また、常総市の No.5 圃場と No.8 圃場より採集した 5 菌株は、いずれも MIC 値が 500 $\mu\text{g/ml}$  以上であった。これら圃場での本剤の使用回数はそれぞれ 8 回、8 回以上であった。検定菌株の全てが MIC 値 5 $\mu\text{g/ml}$  以下の S 菌であったのは No.10 圃場および No.13 圃場であり、本剤の使用回数はそれぞれ 4 回、4 回以上であった。その一方で、桜川市の No.3 圃場で 2008 年 10 月に採集を行った際には、使用回数が 8 回以上であったにもかかわらず、検定した菌株の全てが S 菌であった。

表10 ポスカリド水和剤の使用履歴がない圃場から採集したウリ類うどんこ病菌の本剤に対する感受性

菌株名	ボスカリド濃度(μg/ml)別の発病度 <sup>a)</sup>					
	0	0.05	0.5	5	50	500
IbMPx0501	97	21	5	0	0	0
IbMPx0502	87	37	8	0	0	0
IbMPx0503	97	41	4	0	0	0
IbMPx0609	96	60	4	0	0	0
K-7-2	93	24	4	0	0	0

<sup>a)</sup> 発病度 $=[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F] \times 100$

A~Eはそれぞれ発病指数5~1のディスク数, Fはディスクの総数。

発病指数:0=病斑形成無し, 1=病斑面積がディスクの5%未満, 2=5%以上25%未満,

3=25%以上50%未満, 4=50%以上75%未満, 5=75%以上。

発病度は3反復の平均値である。

表11 ボスカリド水和剤の使用履歴がある圃場から採集したうどんこ病菌の本剤に対する感受性

圃場No.	市町名	採集年月	供試菌株数	MIC値 <sup>a)</sup> (μg/ml)別菌株数(株)					ボスカリドの総使用回数
				0.5	5	50	500	500<	
1	筑西市	2008年10月	5	0	1	2	2	0	8<
2	桜川市	2008年10月	5	1	1	0	1	2	5
		2009年10月	5	2	0	1	0	2	6
3	桜川市	2008年10月	5	4	1	0	0	0	8<
		2009年10月	5	3	1	1	0	0	8<
4	桜川市	2008年10月	5	0	4	1	0	0	8<
5	常総市	2008年11月	5	0	0	0	0	5	8
6	常総市	2008年11月	4	0	0	2	1	1	7
7	常総市	2008年11月	4	2	1	1	0	0	5
8	常総市	2008年11月	5	0	0	0	0	5	8<
9	常総市	2008年11月	4	1	1	0	1	1	5<
10	かすみがうら市	2009年10月	5	3	2	0	0	0	4
11	石岡市	2009年10月	5	0	1	0	0	4	12
12	石岡市	2009年10月	5	4	0	0	0	1	5<
13	小美玉市	2009年10月	5	5	0	0	0	0	4<

<sup>a)</sup> 最小生育阻止濃度。

### 3. 3. 2 単孢子分離菌株のボスカリド剤に対する感受性

単孢子分離菌株の感受性を明らかにするためにリーフディスク法を用いた検定を実施した結果, S 菌である K-7-2 に対する MIC 値が 5μg/ml であったのに対し, 現地圃場より採集した 6 菌株では MIC 値が 500μg/ml 以上であった(表 12)。さらに, これらの耐性菌株には耐性程度に違いが認められたことから 2つのグループに区別した。すなわち, 薬剤濃度が 50μg/ml で病斑形成が大きく抑制され, 500μg/ml でさらに大きく抑制される IbCPx4-4-1, 1-1S, 1-2S および 1-3S を中等度耐性菌(MR 菌), 500μg/ml でもほとんど抑制されない IbCPx2-4-1 および IbCPx2-4-2 を超高度耐性菌(VHR 菌)とした。

ポット苗を用いた接種試験の結果, K-7-2 はボスカリド水和剤 1,000 倍希釈液(有効成分濃度 500μg/ml)で完全に病斑形成が抑制されたのに対して, 供試した 5 菌株の耐性菌に対してはその発病抑制効果が大きく低下していた(表 13)。特に, VHR 菌に対する効力低下は顕著であり, MR 菌 3 菌株に対する発病抑制効果が 20~58%であったのに対して, VHR 菌では 3%または 0%であった。

表12 キュウリうどんこ病菌の単胞子分離菌株のボスカリド剤に対する感受性

菌株名	ボスカリド濃度(μg/ml)別の発病度 <sup>a)</sup>					
	0	0.05	0.5	5	50	500
IbCPx2-4-1	100	100	97	100	96	93
IbCPx2-4-2	100	99	100	100	100	95
IbCPx4-4-1	100	100	100	97	31	8
1-1S	100	100	99	72	26	1
1-2S	100	100	100	87	23	8
1-3S	100	100	97	95	25	4
K-7-2 <sup>b)</sup>	93	61	8	0	0	0

<sup>a)</sup> 発病度= $[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F] \times 100$

A～Eはそれぞれ発病指数5～1のディスク数, Fはディスクの総数。

発病指数:0=病斑形成無し, 1=病斑面積がディスクの5%未満, 2=5%以上25%未満, 3=25%以上50%未満, 4=50%以上75%未満, 5=75%以上。

発病度は3反復の平均値である。

<sup>b)</sup> K-7-2:感受性菌株。

表13 ボスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリうどんこ病菌に対する本剤の発病抑制効果

菌株名	ボスカリド剤に対する感受性 <sup>a)</sup>	処理 <sup>b)</sup>	発病度 <sup>c)</sup>	発病抑制率(%) <sup>d)</sup>
IbCPx2-4-1	VHR	ボスカリド水和剤	60	3
		水道水	62	-
IbCPx2-4-2	VHR	ボスカリド水和剤	30	0
		水道水	30	-
IbCPx4-4-1	MR	ボスカリド水和剤	22	54
		水道水	48	-
1-1S	MR	ボスカリド水和剤	62	28
		水道水	86	-
1-3S	MR	ボスカリド水和剤	32	20
		水道水	40	-
K-7-2	S	ボスカリド水和剤	0	100
		水道水	56	-

<sup>a)</sup> S:感受性, MR:中等度耐性, VHR:超高度耐性。

<sup>b)</sup> ボスカリド水和剤は有効成分濃度500μg/mlで処理した。

<sup>c)</sup> 発病度= $[(5A+4B+3C+2D+1E)/5F] \times 100$

A～Eはそれぞれ発病指数5～1の葉数, Fは葉の総数。

発病指数:0=病斑形成無し, 1=病斑が葉面積の5%未満, 2=5%以上25%未満, 3=25%以上50%未満, 4=50%以上75%未満, 5=75%以上。

<sup>d)</sup> 発病抑制率(%)= $[(\text{水道水処理株における発病度} - \text{ボスカリド剤処理株における発病度}) / \text{水道水処理株における発病度}] \times 100$

### 3. 4 考察

本研究により, ボスカリド剤耐性うどんこ病菌が本剤の使用履歴がある圃場ですでに高頻度で発生していることが明らかとなった。キュウリ栽培において, 本病は作型を問わず断続的に発生していることが多い。そのため, 本剤の登録がある褐斑病を対象に散布されていたボスカリド剤にうどんこ病菌が頻繁に曝露したことにより, 耐性菌の選抜が進んだと考えられる。ウリ類うどんこ病菌の本剤に対する耐性菌の発生はアメリカ等ですでに報告されていたが (McGrath, 2008 ; McGrath and Miazzi, 2008 ; Miazzi and McGrath, 2008), 日本での発生の確認は石井ら (2009) の報告とともに本研究が初めてであった。

本剤の使用履歴と耐性菌の発生の関係であるが、一般的に耐性菌率は薬剤の使用回数に伴って上昇すると考えられる (Brent and Hollomon, 2007a)。しかし、本研究では、No.3 圃場では 8 回以上を使用したにもかかわらず耐性菌が検出されなかった一方で、No.5 圃場では 8 回の使用で検定した全菌株が耐性菌であったように、耐性菌の検出頻度とボスカリド水和剤の使用回数に傾向は見出せなかった。なお、両圃場では、本剤上市以降のキュウリ作付けは同数 (促成 4 回, 抑制 4 回) であった。また、今回調査した全圃場では、本剤を連用する等、耐性菌の選抜を助長しやすい誤った使用はされていない。そのため、耐性菌の発生程度の差異には、本剤を使用した際の本病の発生状況が影響を及ぼしていると考えられる。今後、この原因についてさらに検討を重ねることは、耐性菌対策に生かせる知見になると考えられる。

本剤耐性菌の発生は、2010 年に上市されたペンチオピラド水和剤の防除効果に影響を及ぼす可能性が高い。ペンチオピラド剤とボスカリド剤間の交叉耐性については *A. alternata* や *Didymella bryoniae* で検討されており、SDH の変異の違いによって程度には違いが見られているものの、耐性が交叉することが確認されている (Avenot and Michailides, 2010; Avenot et al., 2010)。また、最近ではキュウリ褐斑病菌、そしてうどんこ病菌でも交叉耐性が確認されている (Ishii et al., 2011)。そのため、キュウリ栽培においてボスカリド水和剤の使用履歴がある圃場では、ペンチオピラド水和剤の使用に際しては十分な注意を払う必要があると考えられた。

本研究では、うどんこ病菌のボスカリド剤耐性菌にも第 2 章のキュウリ褐斑病菌と同様に、菌株によって耐性程度が異なることを明らかにした。このような耐性菌の区別はその特徴を知る上で重要であり、今後さらに菌株を増やして耐性程度の違いを明確にすることが必要である。しかし、MR 菌および VHR 菌のいずれに対しても、ポット苗を用いた接種試験では本剤の発病抑制効果が著しく低下していたことから、耐性程度の違いにかかわらずこれらの耐性菌の発生は圃場での薬剤の防除効果の低下の原因になると考えられた。なお、耐性程度の異なる耐性菌の検出は、変異源として UV を用いて作出した *Aspergillus oryzae* のカルボキシシン剤に対する耐性菌で認められている (Shima et al., 2008)。この他、ボスカリド剤では、*A. alternata* および *B. cinerea* でも報告されている (Avenot and Michailides, 2010 ; Leroux et al., 2010)。

## 4 キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌のボスカリド剤耐性菌におけるコハク酸脱水素酵素 (SDH) 遺伝子のシーケンス解析

### 4. 1 キュウリ褐斑病菌の SDH サブユニット遺伝子の解析

#### 4. 1. 1 目的

ボスカリド剤を含む SDHI 剤の作用点である SDH は 4 つのサブユニット (SdhA, SdhB, SdhC および SdhD) から成る。既報では、本系統剤感受性の低下に関与する遺伝子変異は、SdhB, SdhC および SdhD をコードする領域に認められていた (Keon et al., 1991 ; Broomfield and Hargreaves, 1992 ; Skinner et al., 1998 ; Honda et al., 2000 ; Matsson and Hederstedt, 2001 ; Ito et al., 2004 ; Li et al., 2006 ; Avenot et al., 2008 ; Shima et al., 2008 ; Stammler et al., 2008 ; Avenot et al., 2009)。ここではキュウリ褐斑病菌について、SDH サブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を解析し、S 菌と耐性菌の推定アミノ酸配列の違いについて明らかにする。

#### 4. 1. 2 材料および方法

##### 4. 1. 2. 1 供試菌株

SDH の各遺伝子の解析には、S 菌を 9 菌株、耐性菌を 47 菌株、合計 56 菌株を供試した。なお、耐性菌の耐性程度別の内訳は、MR 菌が 20 菌株、HR 菌が 4 菌株および VHR 菌が 23 菌株であった。供試した 56 菌株うち、21 菌株は本研究で分離した菌株である。また、33 菌株は茨城県、千葉県、佐賀県から分離された菌株であり、農業環境技術研究所から分譲いただいた。残る 2 菌株は香川県農業試験場より分譲いただいた。これら菌株は、分離または分譲を受けた後、供試するまで PDA 斜面培地上で 5°C で保存した。なお、SDH の各サブユニットをコードする各遺伝子に特異的な PCR (Polymerase chain reaction) プライマーの設計には、BASF SE Agricultural Center Limburgerhof (ドイツ) に保存されていた 1 菌株 (菌株名 house strain) を供試した。

#### 4. 1. 2. 2 SDH の各遺伝子増幅のための特異的プライマーの設計

*C. cassiicola* の *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* の全塩基配列を増幅するため、house strain を用いて4つのプライマーセットをデザインした。RNA の抽出は、house strain を PDA 培地で培養した後、菌叢を採集し、NucleoSpin RNA Plant Mini Kit (Macherey-Nagel) を用いて行った。その後、ゲル電気泳動で RNA の抽出量を確認した後、700-1000ng の RNA から Verso cDNA Kit (ABgene) を用いて cDNA を合成した。また、*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *B. cinerea*, *Septoria tritici*, *Magnaporthe grisea* および *Fusarium graminearum* の *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* 遺伝子内の保存領域を参考に、*SdhA* の増幅のためのプライマーセットとして KES 503/KES 504, *SdhB* のための KES 719/KES 729, *SdhC* のための KES 544/KES 519, *SdhD* のための KES 750/KES 187 を設計した (表 14)。各遺伝子の PCR 増幅は 2x Thermo-Start PCR Mastermix (ABgene) および上述のプライマーセットを用いて行った。反応条件は、95°C で 15 分間プレヒートした後、*SdhA* については 95°C で 15 秒、50°C で 30 秒、72°C で 60 秒、*SdhB* については 95°C で 15 秒、55°C で 30 秒、72°C で 60 秒でそれぞれ 40 サイクル、*SdhC* および *SdhD* については 95°C で 15 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒で 50 サイクル、最後に 72°C で 5 分間伸長反応を行った。PCR 産物は NucleoSpin Extract2 (Macherey-Nagel) を用いて精製した。その増幅断片を CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas) を用いてベクター pJET1.2 に挿入し、*Escherichia coli* XL-1 (Stratagene) を形質転換した。遺伝子ごとに2つのコロニーから NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) を用いてプラスミドを回収し、各プライマーセットと BigDye Terminator Version 3.1 (Applied Biosystems) を用いて、ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) により、塩基配列の決定を行った。

得られた各遺伝子の部分配列を元に SDH の各遺伝子の全塩基配列を得るため、PrimerExpress Software (Applied Biosystems) を用いて新しいプライマーのデザインを行った。CapFishing Full-length cDNA Premix Kit (Seegene) および上述のプライマーセットで SDH の各遺伝子の cDNA を用いた RACE 反応を行った。塩基配列の決定は Lasergene Software package (DNASTAR) を用いて行った。得られた各遺伝子の全塩基配列を元に、特異的プライマーセットとして、*SdhA* のための KES 897/KES 903, *SdhB* のための KES 746/KES 747, *SdhC* のための KES 764/KES 751, *SdhD* のための KES 862/KES 762 を設計した (表 14)。

表14 *Corynespora cassiicola* のコハク酸脱水素酵素サブユニットの各遺伝子の増幅に用いた PCRプライマー

増幅遺伝子	プライマー名 <sup>a)</sup>	プライマー配列 (5' to 3')
<i>SdhA</i>	KES 503 (F)	CTCGTGGTGAGGGTGGTTACCT
	KES 504 (R)	CGCTTGAAAGGTGGAACAGC
<i>SdhA</i>	KES 897 (F)	ATGAGTTGTCTCAGGATGCGTC
	KES 903 (R)	AGAATACAGGACAGCAGCAAACAA
<i>SdhB</i>	KES 719 (F)	CTBCCNCACACCTACGTCGTCAAGGAC
	KES 729 (R)	CTTCTTRATCTCVGCRATVGCC
<i>SdhB</i>	KES 746 (F)	ATGGCTTGACACGCGC
	KES 747 (R)	CTACCCAACAGCTCACTTGCC
<i>SdhB</i>	SDHMF-1 (F) <sup>b)</sup>	TGYCCVTCBTA CTGGTGAA
	SDHMB-1a (R)	GGRCAKGYCCKNGWRCARTT
<i>SdhC</i>	KES 544 (F)	CGVCCCGTIVTCVCCVCA YCT
	KES 519 (R)	AVVGGIGCRRCGAGGTAKGC
<i>SdhC</i>	KES 764 (F)	ATGGCTTCCCAGCGCGTC
	KES 751 (R)	CTAAACAAACAGAGAATAGTAGAGGGTGG
<i>SdhD</i>	KES 750 (F)	GTAYGAGTTYGARACVAA YGA
	KES 187 (R)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
	KES 283 (R)	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
<i>SdhD</i>	KES 862 (F)	ATGAAGCGCACCTCGCCAATC
	KES 762 (R)	AAAGATCCTAATAATCACATGTATCCAAC

<sup>a)</sup>F: フォワードプライマー, R: リバースプライマー

<sup>b)</sup>SDHMF-1およびSDHMB-1aは櫻井(2007)より引用した。

#### 4. 1. 2. 3 SDHの各遺伝子の塩基配列

ボスカリド剤に対する S 菌および耐性菌間の SDH の各遺伝子の塩基配列を比較するため、S 菌 5 菌株 (IbCor0008, IbCor1522, IbCor1658, IbCor1683 および IbCor1907), MR 菌 5 菌株 (IbCor1218, IbCor1361, IbCor1481, IbCor1482 および IbCor1679) および VHR 菌 1 菌株 (IbCor1689) の *SdhA*, *SdhB*, *SdhC*, *SdhD* のクローニングと全塩基配列の決定を行った。これらの 11 菌株を PDA 培地で培養し、菌糸を採集した。その後、NucleoSpin DNA Plant Mini Kit (Macherey-Nagel) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。各遺伝子の PCR 増幅のため、プライマーセットとして *SdhA* では KES 897/KES 903, *SdhB* では KES 746/KES 747, *SdhC* では KES 764/KES 751, *SdhD* では KES 862/KES 762 を用いた (表 14)。PCR の反応条件としては、98°C で 60 秒間プレヒートを行った後、熱変性を 98°C で 10 秒行い、アニーリングを *SdhA* では 62°C, *SdhB* および *SdhC* では 68°C, *SdhD* は 66°C で 30 秒、伸長反応を 72°C で 30 秒行った。この熱変性、アニーリング、伸長反応を 40 サイクル繰り返したのち、最終の伸長反応を 72°C で 5 分間行った。PCR 産物は NucleoSpin Extract2 を用いて精製した。その増幅断片を CloneJET PCR Cloning Kit を用いてベクター pJET1.2 に挿入し、*E. coli* XL-1 を形質転換した。形質転換体は 100µg/ml のアンピシリンを含む Luria-Bertani (LB) 培地で選抜した。同濃度のアンピシリンを含む LB 液体培地で 37°C で一晩振とう培養し、NucleoSpin Plasmid Mini Kit を用いてプラスミドの抽出を行った。塩基配列の決定は、各遺伝子に対して設計した特異的プライマーセットと BigDye Terminator Version 3.1 を用いて、ABI Prism 377 DNA Sequencer により行った。

さらに、4 菌株の S 菌、15 菌株の MR 菌、4 菌株の HR 菌、22 菌株の VHR 菌について、*SdhB* の部分塩基配列、*SdhC* および *SdhD* の全配列の決定を行った。DNA の抽出は Saitoh et al. (2006) の方法を用いて行った。プライマーセットとしては、*SdhB* の増幅用として SDHMF-1/SDHMB-1a (櫻井, 2007), *SdhC* として KES 764/KES 751, *SdhD* として KES 862/KES 762 を用いた (表 14)。SDHMF-1/SDHMB-1a は、他の病原菌で SDHI 剤感受性の低下に関与するとされる S2 クラスター内のプロリン残基 (*C. cassiicola* では 231 番目) および S3 クラスター内のヒスチジン残基 (同 278 番目) を含む領域を増幅することができる (Keon et al., 1991; Broomfield and Hargreaves, 1992; Skinner et al., 1998; Avenot et al., 2008; Stammler et al., 2008)。PCR 増幅の反応条件は、最初、プレヒートを 94°C で 2.5 分間行った後、*SdhB* では 40 サイクル、*SdhC* および *SdhD* では 30 サイクル、熱変性、アニーリング、伸長反応をそれぞれ、94°C で 30 秒、48°C で 1 分、72°C で 1 分行った。その後、最終の伸長反応を 72°C で 10 分間行った。PCR 産物の精製は MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて行い、塩基配列の決定は、fluorescent-dye-labeled dideoxy terminators を用いた automated DNA sequencer Prism Model (Applied Biosystems) により、または Greiner Bio-one の DNA シークエンス解析サービスにより行った。

#### 4. 1. 3 結果

##### 4. 1. 3. 1 キュウリ褐斑病菌の SDH 各遺伝子の塩基配列

特異的プライマーセットである、KES 897/KES 903, KES 746/KES 747, KES 764/KES 751, KES 862/KES 762 を用いて、本研究で分離された褐斑病菌 11 菌株を用いて PCR を行った結果、*SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* ではそれぞれ、2340bp, 1071bp, 629bp, 1083bp の増幅産物が得られた。これらの断片をクローニングし、さらに塩基配列の決定を行った。解析の結果、各遺伝子は順に、647, 307, 177 および 165 アミノ酸の open reading frame (ORF) を有していることが推定された。さらに、各 ORF には、*SdhA* では 3 つ (206, 56, 47bp), *SdhB* では 2 つ (64, 59bp), *SdhC* では 1 つ (95bp), *SdhD* では 2 つ (250, 120bp) のイントロンが挿入されていた。推定したアミノ酸配列について DDBJ データベースの BLASTX を用いて相同性を検討したところ、褐斑病菌の *SdhA*, *SdhB*, *SdhC*, *SdhD* はそれぞれ、*Saccharomyces cerevisiae* のコハク酸脱水素酵素の mitochondrial flavoprotein (71% (identity), accession No. B3LQV3), iron-sulfur protein (71%, 同 B3LTD3), cytochrome b (34%, 同 B3LQV9), membrane anchor (32%, 同 B3LGA5) に比較的高い相同性を示した。加えて、ボスカリド剤に対する耐性菌の研究が多くなされている *A. alternata* の推定 *SdhA* (84% (identity), accession No. B8XCQ1), *SdhB* (89%, 同 B2BZ64), *SdhC* (67%, 同 B8XSR3), *SdhD* (78%, 同 B8XSR4) にも高い相同性を示した。

残る 45 菌株については、*SdhB* の部分配列、*SdhC* および *SdhD* の全配列の PCR 産物をダイレクトシーケンシングした。その結果、これら菌株の 3 つの遺伝子の配列は、以下に述べる点変異個所を除き、それぞれ全て

同一であった。

#### 4. 1. 3. 2 S菌および耐性菌におけるSDH各遺伝子の配列の比較

S菌5菌株, MR菌5菌株およびVHR菌1菌株の*SdhA*, *SdhB*, *SdhC*および*SdhD*の全塩基配列の比較を行った。その結果, *SdhA*の塩基配列はいずれも同一であった(データ省略)。一方で, *SdhB*では, S3クラスターにあたる278番目のアミノ酸が, S菌では野生型であるヒスチジン(CAC)であったのに対して, VHR菌であるIbCor1689では同残基のチロシンへの置換を伴うTACへの変異が認められた(B-H278Y)(表15, 図9)。MR菌の*SdhB*は, S菌のものと同一であった。しかし, MR菌であるIbCor1481およびIbCor1482の*SdhC*において, 73番目のセリン(野生型)からプロリンへの置換を伴う, TCGからCCGへの変異が認められた(C-S73P)(表16, 図10)。さらに, IbCor1361では*SdhD*において89番目のアミノ酸にセリン(野生型)からプロリンへの置換を伴うTCCからCCCへの変異が認められた(D-S89P)(図11)。その一方で, 同じくMR菌であるIbCor1218およびIbCor1679ではいずれの遺伝子にも変異は認められなかった。

表15 ボスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリ褐斑病菌(S菌, HR菌, VHR菌)のコハク酸脱水素酵素(SDH)における推定アミノ酸置換

菌株名	分離地	EC <sub>50</sub> 値 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ボスカリド剤に 対する感受性 <sup>a)</sup>	推定アミノ酸置換		
				SdhB	SdhC	SdhD
IbCor0008* <sup>b)</sup>	茨城県	0.4	S	WT <sup>c)</sup>	WT	WT
IbCor0101	茨城県	0.4	S	WT	WT	WT
IbCor1522*	茨城県	0.4	S	WT	WT	WT
IbCor1658*	茨城県	0.2	S	WT	WT	WT
IbCor1683*	茨城県	0.4	S	WT	WT	WT
IbCor1907*	茨城県	0.3	S	WT	WT	WT
20060410	千葉県	0.3	S	WT	WT	WT
050600-1	千葉県	0.2	S	WT	WT	WT
Mur9-1-1	香川県	0.5	S	WT	WT	WT
IbCor3006	茨城県	10.7	HR	H278R	WT	WT
IbCor3009	茨城県	8.9	HR	H278R	WT	WT
IbCor3011	茨城県	9.8	HR	H278R	WT	WT
IbCor3013	茨城県	8.9	HR	H278R	WT	WT
IbCor1689*	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
IbCor2036B	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
IbCor2529A	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
IbCor2616A	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
IbCor2617A	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
Chikusei1-5	茨城県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070327A1	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070327A2	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070327A3	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070428B2	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070508C3	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070508D1	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070508E1	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
070508F1	千葉県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
1-1-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
1-2-2	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
2-1-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
2-2-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
3-1-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
3-2-2	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
4-1-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
4-3-1	佐賀県	30<	VHR	H278Y	WT	WT
Toy2-1-1	香川県	30<	VHR	H278Y	WT	WT

<sup>a)</sup>S:感受性, HR:高度耐性, VHR:超高度耐性。

<sup>b)</sup>アステリスクを付した菌株では, *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* の全塩基配列を解析した。なお, *SdhA* は解析した6菌株で配列は同一であった。

<sup>c)</sup>WT:野生型。

## SdhB

Cca (S)	230	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCH <u>T</u> ILNC
Cca (MR)	230	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCH <u>T</u> ILNC
Cca (HR)	230	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCH <u>R</u> ILNC
Cca (VHR)	230	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCH <u>Y</u> ILNC
Aal (B2BZ64)	229	C <u>P</u> SYWWNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKKAERQDALNNSMSLYRCH <u>T</u> ILNC
Aor (Q2TWM0)	201	C <u>P</u> SYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKHALDNSMSVYRCH <u>T</u> ILNC
Mgr (AAB97419.1)	219	C <u>P</u> SYWWNSEEYLGPVLLQSYRWINDSRDEKTAQRKDALNNSMSLYRCH <u>T</u> ILNC
Eco (AAA23896.1)	159	C <u>P</u> SFWWNPDKFIGPAGLLAAYRFLIDSRDTE TDSRLDGLSDAFSVFRCH <u>S</u> IMNC

図9 ポスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassicola*) および SDHI 剤耐性について研究されている他の微生物の SdhB アミノ酸配列の比較

Cca は *C. cassicola*, Aal は *Alternaria alternata*, Aor は *Aspergillus oryzae*, Mgr は *Mycosphaerella graminicola*, Eco は *Escherichia coli* を示す。菌名の右のカッコ内は、*C. cassicola* では S がボスカリド剤感受性菌、MR が中等度耐性菌、HR が高度耐性菌、VHR 菌が超高度耐性菌を示し、それ以外の菌では用いた配列の DNA データベース上での Accession Number を示す。アステリスクはカルボキシ剤とユビキノンの結合に関与する残基を示す (Horsefield et al., 2006)。アミノ酸配列中の太字はキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤耐性菌で置換が認められた残基を示す。また、下線は、他の微生物で SDHI 剤耐性に関与するとされている残基を示す。

表16 ポスカリド剤に対して中等度耐性(MR)を示すキュウリ褐斑病菌のコハク酸脱水素酵素 (SDH) における推定アミノ酸置換

菌株名	分離地	EC <sub>50</sub> 値 (µg/mL)	ボスカリド剤に 対する感受性 <sup>a)</sup>	推定アミノ酸置換		
				SdhB	SdhC	SdhD
IbCor1218 <sup>*b)</sup>	茨城県	5.3	MR	WT <sup>c)</sup>	WT	WT
IbCor1361*	茨城県	5.0	MR	WT	WT	S89P
IbCor1481*	茨城県	3.2	MR	WT	S73P	WT
IbCor1482*	茨城県	4.5	MR	WT	S73P	WT
IbCor1679*	茨城県	2.0	MR	WT	WT	WT
IbCor2429	茨城県	3.2	MR	WT	S73P	WT
Chikusei1-2	茨城県	2.7	MR	WT	WT	WT
Chikusei1-3	茨城県	3.5	MR	WT	S73P	WT
Chikusei1-11	茨城県	2.0	MR	WT	WT	WT
Chikusei1-14	茨城県	2.9	MR	WT	NA <sup>d)</sup>	NA
Chikusei1-22	茨城県	2.3	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-1	茨城県	3.5	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-3	茨城県	2.6	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-4	茨城県	5.4	MR	WT	WT	G109V
Chikusei2-5	茨城県	5.8	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-7	茨城県	3.8	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-8	茨城県	3.1	MR	WT	WT	WT
Chikusei2-9	茨城県	5.9	MR	WT	NA	NA
Chikusei2-15	茨城県	4.8	MR	WT	NA	NA
Chikusei2-26	茨城県	4.2	MR	WT	NA	NA

<sup>a)</sup>MR: 中等度耐性。

<sup>b)</sup>アステリスクを付した菌株では、*SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD* の全塩基配列を解析した。なお、*SdhA* は解析した5菌株で配列は同一であった。

<sup>c)</sup>WT: 野生型。

<sup>d)</sup>NA: 未解析。

## SdhC

		*   *	
Cca (S)	56	VSPHLSIYRPQITWYASSFNRITGVALS...	131 FFFHSLNGLRHLSDWIGLG
Cca (MR)	56	VSPHLSIYRPQITWYASSFNRITGVALS...	131 FFFHSLNGLRHLSDWIGLG
Cca (MR)	56	VSPHLSIYRPQITWYASSPFNRITGVALS...	131 FFFHSLNGLRHLSDWIGLG
Cca (HR&VHR)	56	VSPHLSIYRPQITWYASSFNRITGVALS...	131 FFFHSLNGLRHLSDWIGLG
Aal (B8XSR3)	68	VSPHLAIYKPQITWYASSLNRITGITLS...	141 FFFHSFNGLRHLAWDVGIG
Aor (Q2U3V9)	68	VSPHLSIYRPQITWIGSSFHRITGFALS...	143 FTYHCFNGVRHLVWDLGRG
Cci (AB092687)	61	SSPHFTIYQPQLTWLGSIANRVTGAGLS...	133 FSYHAWNGLRHLAWDAGKF
Eco (AAA23893.1)	11	VNLDLQTI RFPITAIASILHRVSGVITF...	81 LAYHVVVGIRHMMMDFGYL

図 10 ボスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*) および SDHI 剤耐性について研究されている他の微生物の SdhC アミノ酸配列の比較

Cca は *C. cassiicola*, Aal は *Alternaria alternata*, Aor は *Aspergillus oryzae*, Cci は *Coprinopsis cinerea*, Eco は *Escherichia coli* を示す。菌名の右のカッコ内は, *C. cassiicola* では S がボスカリド剤感受性菌, MR が中等度耐性菌, HR が高度耐性菌, VHR 菌が超高度耐性菌を示し, それ以外の菌では用いた配列の DNA データベース上での Accession Number を示す。アスタリスクはカルボキシシン剤とユビキノンの結合に関与する残基を示す (Horsefield et al., 2006)。アミノ酸配列中の太字はキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤耐性菌で置換が認められた残基を示す。また, 下線は, 他の微生物で SDHI 剤耐性に関与するとされている残基を示す。

## SdhD

			*
Cca (S)	64	SYHWSFERAISAGLIPLTIAPFAAGSLNPVTDSILCALLVIHSHIGFEACVIDY	
Cca (MR)	64	SYHWSFERAISAGLIPLTIAPFAAGSLNPVTDSILCALLVIHSHIGFEACVIDY	
Cca (MR)	64	SYHWSFERAISAGLIPLTIAPFAAGPLNPVTDSILCALLVIHSHIGFEACVIDY	
Cca (MR)	64	SYHWSFERAISAGLIPLTIAPFAAGSLNPVTDSILCALLVIHSHIVFEACVIDY	
Cca (HR&VHR)	64	SYHWSFERAISAGLIPLTIAPFAAGSLNPVTDSILCALLVIHSHIGFEACVIDY	
Aal (B8XSR4)	72	SYHWSFERIVSAGLIPLTIAPFAAGSLNPLTDSILCALLVWHSHIGFESCIDY	
Pde (AAA75176.1)	37	TPLFMIVVARAIGLSQEQLLAYFGRPFPALITALFVIVGMVHFIKGTRIMIDDY	
Eco (AAA23894.1)	30	IYMVGFFATSGELTYEVDWIGFFASAF TKVF TLLALFSILIHAWIGMWQLTDY	

図 11 ボスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola*) および SDHI 剤耐性について研究されている他の微生物の SdhD アミノ酸配列の比較

Cca は *C. cassiicola*, Aal は *Alternaria alternata*, Pde は *Paracoccus denitrificans*, Eco は *Escherichia coli* を示す。菌名の右のカッコ内は, *C. cassiicola* では S がボスカリド剤感受性菌, MR が中等度耐性菌, HR が高度耐性菌, VHR 菌が超高度耐性菌を示し, それ以外の菌では用いた配列の DNA データベース上での Accession Number を示す。アスタリスクはカルボキシシン剤とユビキノンの結合に関与する残基を示す (Horsefield et al., 2006)。アミノ酸配列中の太字はキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤耐性菌で置換が認められた残基を示す。また, 下線は, 他の微生物で SDHI 剤耐性に関与するとされている残基を示す。

さらに、*SdhB* の部分配列、*SdhC* および *SdhD* の全配列の解析を行った S 菌 4 菌株、MR 菌 15 菌株、HR 菌 4 菌株、VHR 菌 22 菌株について比較を行った。その結果、上述した IbCor1689 株と同様の B-H278Y を伴う変異が VHR 菌 22 菌株のすべてで認められた (表 15)。さらに、*SdhB* の 278 番目のヒスチジン (野生型) がアルギニンへと置換する CAC から CGC への変異が新たに HR 菌 4 菌株のすべてで認められた (B-H278R)。MR 菌では、*SdhB* に変異は認められなかったが、C-S73P を伴う変異が IbCor2429 および Chikusei1-3 で認められ、また新たに、Chikusei2-4 の *SdhD* において、109 番目のアミノ酸が野生型のグリシンからバリンに置換する、GGC から GTC への変異が認められた (D-G109V) (表 16)。しかし、それ以外の MR 菌では、解析した 3 つの遺伝子内に変異は認められなかった。

なお、本研究で解析した主な塩基配列は表 17 の通り DNA データベース (DDBJ) に登録した。

表17 DNAデータベース(DDBJ)に登録したキュウリ褐斑病菌の塩基配列のAccession Number

Accession Number	遺伝子名	菌株名	ボスカリド剤に対する感受性 <sup>a)</sup>
AB548737	<i>SdhA</i>	IbCor0008	S
AB548738	<i>SdhB</i>	IbCor0008	S
AB548739	<i>SdhB</i>	IbCor1689	VHR
AB548740	<i>SdhB</i>	IbCor3006	HR
AB548741	<i>SdhC</i>	IbCor0008	S
AB548742	<i>SdhC</i>	IbCor1482	MR
AB548743	<i>SdhD</i>	IbCor0008	S
AB548744	<i>SdhD</i>	IbCor1361	MR
AB548745	<i>SdhD</i>	Chikusei2-4	MR

<sup>a)</sup>S: 感受性, MR: 中等度耐性, HR: 高度耐性, VHR: 超高度耐性。

#### 4. 1. 4 考察

ボスカリド剤 S 菌と耐性菌における SDH の各遺伝子の配列を比較した結果、HR 菌では B-H278R、VHR 菌では B-H278Y の変異が認められた。このヒスチジン残基は、多くの生物で高度に保存された S3 クラスターの領域に位置している (Broomfield and Hargreaves, 1992)。E. coli の SDH 内のキノン結合部位 (Q-site) の構造解析の研究では、Q-site の一部は保存性の高いこのヒスチジンのごく近隣に位置して、ユビキノンの結合と還元に必要な役割を果たしていることが推察されている (Horsefield et al., 2006)。その報告では、ユビキノンと同様の様式でカルボキシン剤のメチルオキサチン環の酸素原子が結合することが示されている。Broomfield and Hargreaves (1992) は、*Ustilago maydis* の形質転換体を用いてこのヒスチジンがロイシンに置換することでカルボキシン剤に対して耐性となることを示した。同様に、*Mycosphaerella graminicola* でも形質転換体を用いた実験により、ヒスチジンをチロシンに置換させた菌株は耐性となることが報告されている (Skinner et al., 1998)。ボスカリド剤では、2-クロロピリジン環の窒素原子がヒスチジンへの結合に関与していると考えられる (Shima et al., 2011)。B. cinerea や A. alternata などのボスカリド剤耐性菌でもこのヒスチジンの置換が感受性の低下に関与していると報告されている (Avenot et al., 2008 ; Stammler, 2008 ; Stammler et al., 2008 ; Leroux et al., 2010)。これら報告から、C. cassicola の耐性菌、特に HR 菌や VHR 菌で認められた B-H278 の置換がボスカリド剤に対する感受性の大幅な低下に関与している可能性が高いと考えられる。

Shima et al. (2008) は、*Aspergillus oryzae* を用いて S3 クラスター内のヒスチジンがチロシン、ロイシン、アスパラギン酸に置換したカルボキシン剤耐性菌を得たが、置換アミノ酸の種類によって培地上での感受性や菌株の SDH 活性が異なっていたことを報告した。一方、B. cinerea では同じくヒスチジンがチロシンやアルギニンに変異した菌株が認められており、培地上におけるボスカリド剤感受性には違いは認められていないものの、置換アミノ酸の違いによって別の SDHI 剤であるフルトラニル剤やベノダニル剤に対しては感受性が異なっ

いた (Leroux et al., 2010)。また、最近、*Didymella bryoniae* では、同ヒスチジンがアルギニンまたはチロシンに置換している耐性菌が発見され、いずれもボスカリド剤に対しては感受性の低下を示すものの、前者の耐性菌では SDHI 剤であるペンチオピラド剤には感受性の低下が認められなかった (Avenot et al., 2010)。以上のような報告から、このヒスチジンから置換している残基の違いは、SDHI 剤と SDH の結合親和性に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。しかし、本研究の褐斑病菌で得られたようなボスカリド剤に対する感受性と SDH の置換アミノ酸の関係についてさらに解析を進めることは、SDHI 剤に対する耐性機構を明らかにするために今後重要であると考えられる。

HR菌やVHR菌とは異なり、MR菌では*SdhB*にアミノ酸置換を伴う変異は認められなかったが、一部の菌株でC-S73P、D-S89PおよびD-G109Vが認められた。しかし、置換が認められたこれらのアミノ酸は、他の糸状菌で*SdhC*および*SdhD*内でSDHI剤に対する感受性低下に影響するとされている残基とは異なっていた (Matsson and Hederstedt, 2001 ; Ito et al., 2004 ; Shima et al., 2008 ; Avenot et al., 2009 ; Avenot and Michailides, 2010 ; Leroux et al., 2010)。また、D-G109は多くの生物間で保存性が高い残基であるが、C-S73およびD-S89の保存性は高くない。加えて、SDHI剤とSDHの結合に関与する残基とも異なっていた (Horsefield et al., 2006)。ボスカリド剤とSDHとの結合に関する十分な研究はなされていないため、上述したアミノ酸の関与を完全には否定できないが、上述した既報や残基の保存性を考慮すると、MR菌で認められた3つのアミノ酸置換が本剤に対する感受性低下に関与している可能性は低いと考えられた。

さらに、MR菌では、SDHの4つの遺伝子の塩基配列を決定した菌株であるIbCor1218およびIbCor1679において、そのいずれでもアミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。したがって、少なくともこれら2菌株では、感受性低下に関与する要因はSDHの4つの遺伝子以外に存在していると考えられる。*SdhA*はSDHI剤との結合には関与していないため (Horsefield et al., 2006)、*SdhB*、*SdhC*および*SdhD*が野生型であったMR菌8菌株 (Chikusei1-2, Chikusei1-11, Chikusei1-22, Chikusei2-1, Chikusei2-3, Chikusei2-5, Chikusei2-7, Chikusei2-8) についても同様である可能性が考えられる。形質転換体を用いたこれまでの実験では、SDHI剤耐性菌の全てでSDHにアミノ酸置換が認められていたが、SDHに置換が認められないSDHI剤耐性菌は本研究の褐斑病菌のほか、最近、*B. cinerea*でも発見されている (Leroux et al., 2010)。

## 4. 2 キュウリうどんこ病菌のSDHサブユニットB遺伝子の解析

### 4. 2. 1 目的

ボスカリド剤を含むSDHI剤の作用点であるSDHは4つのサブユニット (*SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD*) から成る。既報では、本系統剤に対する感受性低下に関与する遺伝子変異は、*SdhB*、*SdhC* および *SdhD* に認められている。そのうち、*SdhB* はSDHI剤耐性に関与する変異が最も多く明らかになっている遺伝子であり、さらに高度耐性に関与している事例も認められていた (Keon et al., 1991 ; Broomfield and Hargreaves, 1992 ; Skinner et al., 1998 ; Matsson and Hederstedt, 2001 ; Avenot et al., 2008 ; Shima et al., 2008 ; Stammler et al., 2008)。ここでは、キュウリうどんこ病菌について、SDHサブユニットをコードする遺伝子のうち*SdhB*の塩基配列を決定し、S菌と耐性菌の推定アミノ酸配列の違いについて明らかにする。

### 4. 2. 2 材料および方法

#### 4. 2. 2. 1 供試菌株

*SdhB*のPCR増幅には、S菌であるK-7-2、IbMPx0501、IbMPx0502、IbMPx0503 および IbMPx0609、VHR菌であるIbCPx2-4-1、IbCPx2-4-2、MR菌であるIbCPx4-4-1、1-1S および 1-3Sを用いた。各菌株はキュウリ子葉を用いて人工気象器で維持した。

#### 4. 2. 2. 2 DNA抽出

キュウリ子葉上で形成させた分生胞子を滅菌した葉さじでエッペンドルフチューブに回収し、0.1% (v/v) のTween 20を含んだ滅菌水中に懸濁した。この懸濁液を十分に攪拌した後、10分間18,000 × gで遠心分離を行った。上澄み液を除去した後、分生胞子のペレットを風乾した。

DNA 抽出は、一部を改変した Fraaije et al. (1999) の方法を用いて行った。まず、風乾した分生胞子のペレットを抽出バッファー40 $\mu$ l に懸濁した。このバッファーは、19  $\mu$ l の TEN buffer (500mM NaCl, 400mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8.0), 19 $\mu$ l の 2% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム, 1.9 $\mu$ l の 1% (v/v)  $\beta$ -メルカプトエタノール, 0.8mg のポリビニルピロリドン, および 36 $\mu$ g のフェナントロリンから成る。その後、エッペンドルフチューブを氷上に移して、プラスチック製の棒を用いてバッファー中の分生胞子のペレットを粉砕した。この磨砕液を 70°C に 30 分間静置した後、氷冷した 7.5 mM 酢酸ナトリウムを 200 $\mu$ l 添加して混和し、さらに氷上に 30 分間静置した。20 分間、18,000  $\times$  g で遠心した後、上澄み液を氷冷したイソプロパノール 150 $\mu$ l を予め加えた新しいチューブに移した。軽く混和した後、さらに 20 分間氷上に静置した。その後、15 分間、18,000  $\times$  g で遠心分離を行った。上澄み液を除去し、沈殿したペレットを 70% (v/v) エタノールでリンスし、100 $\mu$ l の滅菌水に溶解した。

#### 4. 2. 2. 3 *SdhB* 遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列の解析

PCR プライマーとして、SDHMF-1 および SDHMB-1a (櫻井, 2007) を用い、*SdhB* 遺伝子の部分配列の PCR 増幅およびダイレクトシーケンシングを行った。なお、ここで用いたプライマーセットは、第 4 章第 1 節で述べたとおり、様々な糸状菌の *SdhB* の保存領域を基に設計されたものである。PCR 反応は、1 $\mu$ l の DNA template に、25 $\mu$ l の GoTaq Green Master Mix (Promega), 0.25 $\mu$ M の各プライマー, および 14 $\mu$ l の滅菌水を加えて行った。PCR の反応条件としては、94°C で 2.5 分間プレヒートを行った後、熱変性を 94°C で 30 秒、アニーリングを 46°C で 1 分間、伸長反応を 72°C で 1 分間行った。この熱変性から伸長反応までを 40 サイクル繰り返したのち、最終の伸長反応を 72°C で 10 分間行った。その後、増幅産物を MinElute PCR Purification Kit を用いて精製した。塩基配列の決定は、Greiner Bio-one の DNA シークエンス解析サービスにより行った。DNA 塩基配列および推定アミノ酸配列は DDBJ データベースの BLAST および ClustalW を用いて解析した。

#### 4. 2. 3 結果

10 菌株のうどんこ病菌から抽出した DNA を用いて、PCR プライマーである SDHMF-1 および SDHMB-1a による *SdhB* の増幅を行い、その産物の塩基配列を決定した。その結果、176bp の増幅断片が得られ、推定アミノ酸は *Saccharomyces cerevisiae* の SDH の iron-sulfur protein (80% (identity), accession No. B3LTD3) に高い相同性を示した。また、ボスカリド剤耐性菌の研究がされている *A. alternata* (82%, 同 B2BZ64), *B. cinerea* (87%, 同 Q3ZMH4) および *Aspergillus oryzae* (87%, 同 Q2TWM0) の *SdhB* とも同様に高い相同性を示した。本研究で増幅した断片は、*SdhB* の S2 および S3 センターのそれぞれ、後半および前半の一部を含んでいた (図 12)。他の病原菌では、SDHI 剤に対する感受性低下に関与するアミノ酸として、S2 センター内のプロリン (キュウリ褐斑病菌の *SdhB* では 231 番目に相当) (Stammler et al., 2008) および S3 センターのヒスチジン (同じく 278 番目) (Keon et al., 1991; Broomfield and Hargreaves, 1992; Skinner et al., 1998; Matsson and Hederstedt, 2001; Avenot et al., 2008; Shima et al., 2008) が報告されている。本研究の結果、これらの両アミノ酸は解析した S 菌 5 菌株のいずれにも認められた。MR 菌 3 菌株 (IbCPx4-4-1, 1-1S および 1-3S) の配列も S 菌と同一であったが、VHR 菌 2 菌株 (IbCPx2-4-1 および IbCPx2-4-2) では、プロリンは認められたものの、ヒスチジン (野生型) をコードする塩基配列が CAT から TAT に変異したことに伴い、チロシンへの置換が認められた。

なお、本研究で解析した主な塩基配列は表 18 の通り DNA データベース (DDBJ) に登録した。

	S2	S3
Px (VHR)	C <u>P</u> S YWVNSE EYLGPVLMQSYRWLADSRDEKTEERKSALDNSMSLYR	<b>CY</b> TIL
Px (MR)	C <u>P</u> S YWVNSE EYLGPVLMQSYRWLADSRDEKTEERKSALDNSMSLYR	<b>CH</b> TIL
Px (S)	C <u>P</u> S YWVNSE EYLGPVLMQSYRWLADSRDEKTEERKSALDNSMSLYR	<b>CH</b> TIL
Cc	C <u>P</u> S YWVNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYR	<b>CH</b> TIL
Aa	C <u>P</u> S YWVNQEEYLGPVLLQSYRWIADSRDEKKAERQDALNNSMSLYR	<b>CH</b> TIL
Ao	C <u>P</u> S YWVNSE EYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKHALDNSMSVYR	<b>CH</b> TIL
Mg	C <u>P</u> S YWVNSE EYLGPVLLQSYRWINDSRDEKTAQRKDALNNSMSLYR	<b>CH</b> TIL
Sc	C <u>P</u> S YWVNQEQYLGPVLMQAYRWLIDSRDQATKTRKAMLNNSMSLYR	<b>CH</b> TIM
Ec	C <u>P</u> S FWWNPDKFIGPAGLLAAYRFLIDSRDTEETDSRLDGLSDAFSVFR	<b>CH</b> SIM

図 12 ポスカリド剤に対する感受性を異にするキュウリうどんこ病菌 (*Podosphaera xanthii*) および SDHI 剤耐性について研究されている他の微生物の SdhB アミノ酸配列の比較

Px は *P. xanthii*, Aa は *Alternaria alternata* (accession No. B2BZ64), Ao は *Aspergillus oryzae* (Q2TWM0), Cc は *Corynespora cassiicola* (AB548738), Ec は *Escherichia coli* (AAA23896.1), Mg は *Mycosphaerella graminicola* (AAB97419.1), Sc は *Saccharomyces cerevisiae* (B3LTD3) を示す。菌名の右のカッコ内は、VHR がキュウリうどんこ病菌のボスカリド剤超高度耐性菌、MR が中等度耐性菌および S が感受性菌を示す。アミノ酸配列中の太字はキュウリうどんこ病菌の VHR 菌で置換が認められた残基を示す。背景が灰色の残基はカルボキシチロシンとユビキノンの結合に関与する残基を示す (Horsefield et al., 2006)。また、下線は、他の微生物で SDHI 剤耐性に関与するとされている残基を示す。四角で囲った部分は、前半部分は second cysteine-rich クラスタ (S2)、後半が third cysteine-rich クラスタ (S3) の一部である。

表 18 DNA データベース (DDBJ) に登録したウリ類うどんこ菌の塩基配列の Accession Number

Accession Number	遺伝子名	菌株名	ボスカリド剤に対する感受性 <sup>a)</sup>
AB547415	<i>SdhB</i>	IbCPx2-4-1	VHR
AB547416	<i>SdhB</i>	IbCPx4-4-1	MR
AB547417	<i>SdhB</i>	IbMPx0502	S

<sup>a)</sup>S: 感受性, MR: 中等度耐性, VHR: 超高度耐性。

#### 4. 2. 4 考察

キュウリうどんこ病菌の S 菌および耐性菌について、*SdhB* の部分塩基配列について解析を行ったところ、その推定アミノ酸に VHR 菌 2 菌株では S3 センター内のヒスチジンにチロシンへの置換が認められた。この結果は、カルボキシチロシン剤に対して耐性を示す *Ustilago maydis* や *Mycosphaerella graminicola* の人為的突然変異菌株において、以前に報告された結果と一致する (Broomfield and Hargreaves, 1992; Skinner et al., 1998)。また、Skinner et al. (1998) は、このヒスチジンからチロシンへの置換がカルボキシチロシン剤耐性に深く関与していることを形質転換体の作出により明らかにした。同様の置換は、4. 1 で述べた *C. cassiicola* など、ほかの複数の糸状菌の SDHI 剤耐性菌でも報告されている。したがって、*P. xanthii* においてもこの置換がボスカリド剤に対する感受性の低下に関与している可能性が高い。なお、*P. xanthii* におけるヒスチジンからチロシンへの置換は、海外の耐性菌株でも認められている (Anonymous, [http://www.frac.info/frac/work/work\\_sdhi.htm](http://www.frac.info/frac/work/work_sdhi.htm) [5 May 2011])。

一方、MR 菌 3 菌株では *SdhB* の解析した領域内に変異は認められなかった。*SdhB* の S3 クラスタのヒスチジンに置換が認められない SDHI 剤耐性うどんこ病菌の発見は本研究が初めてである。現在までのところ、*SdhB* では、本研究で増幅した領域以外でのアミノ酸置換はいずれの植物病原菌の SDHI 剤耐性菌においても発見されていない。そのため、これらの MR 菌 3 菌株においては、ボスカリド剤に対する感受性の低下につながる要因は、*SdhC* や *SdhD* での変異にある可能性が考えられる。実際に、SDHI 剤に対する感受性の低下が *SdhC* や *SdhD*

内の置換によるものと考えられる報告も複数ある (Matsson and Hederstedt, 2001 ; Ito et al., 2004 ; Avenot et al., 2009 ; Avenot et al., 2010 ; Leroux et al., 2010)。しかし、4. 1 で述べた *C. cassiicola* や Leroux et al. (2010) が報告した *B. cinerea* のように SDH のいずれのサブユニットにも置換が認められなかった菌もあり、うどんこ病菌においても SDH の各遺伝子変異の解析だけでは耐性発現との関係が明らかにならない可能性も考えられる。

## 5 総合考察

本研究では、茨城県内のキュウリ栽培圃場における褐斑病菌およびうどんこ病菌のボスカリド剤耐性菌の発生状況、および耐性菌の分子生物学的特徴の一部として SDH の各遺伝子の塩基配列を明らかにした。結論として、耐性菌は極めて高頻度に分布しており、さらに、それらの耐性菌のうち実用上重要な褐斑病菌の VHR 菌、HR 菌、うどんこ病菌の VHR 菌では SdhB サブユニットの薬剤との結合にとって重要な部位にアミノ酸置換が生じていることを示した。ここでは、本研究により得られた成果と今後の課題について、さらに考察を試みた。

### 5. 1 耐性菌の発生とその対策について

本研究で明らかになった、両病原菌のボスカリド剤に対する耐性菌の発生状況から、両病害では今後 SDHI 剤の使用により継続的に十分な防除効果が得られる可能性は低いと考えられた。そのため、両病害に対して効果的な化学的防除を実施するためには、SDHI 剤の使用は避け、他の系統の薬剤を用いた防除体系を構築すべきである。また、生産者からは、ボスカリド水和剤の使用を中止することで感受性の回復を期待する声もあるが、本剤使用開始から間もなく耐性菌が発生していた結果を考慮すると、仮に回復してもその後の使用で即座に感受性が再び低下することが予想される。したがって、SDHI 剤を実際に使用していくことは将来的にも困難であると考えられる。なお、褐斑病菌においてはその後、千葉県 (牛尾・竹内, 2009) や香川県 (森, 私信), 長野県 (山岸・川上, 2010), 宮城県 (近藤, 2010), 佐賀県 (Ishii et al., 2011) 等でも高頻度で耐性菌が検出されており、すでに全国的に注意すべき状況となっている。

ボスカリド剤の耐性菌の発生がここまで深刻となったのは、本剤が SDH のみを作用点とするという薬剤側のリスク以外にも、褐斑病菌やうどんこ病菌が持つ特性である、耐性菌の発生リスクの高さ (Brent and Hollomon, 2007b) にも大きな原因があると考えられる。また、病害の多発生を恒常的に招いている現在の栽培品種の両病害に対する耐病性の低さ (宮本ら, 2006) も耐性菌の発生リスクをさらに助長させた原因として考えられる。近年、特に褐斑病の深刻さから、本病に対する耐病性を高めた品種の試験的な導入も進んでいるが、キュウリ果実の品質や収量面でやや劣る評価を生産者から受けているため、現行の品種から切り替わるほどには至っていない。

これらに加えて、ボスカリド剤に限ったことではないが、生産者の新規薬剤に対する考え方にもこの耐性菌の発生を深刻化させた原因があると思われた。それは多くの生産者はもちろん、一部指導者が持っている、新規薬剤は対象病害が多発生した場合に使用する特効薬であるという考え方である。ボスカリド水和剤については、表 6 に示したようにすでに褐斑病が多発生し菌密度が上昇している促成栽培の 2 月以降や、抑制栽培の 9 月以降に使用されることが多かった。うどんこ病も、特に抑制栽培では 9 月以降に多発生していることも多く、褐斑病と同様に菌密度が高い条件で曝露していた可能性が高い。生産者の間では、耐性菌対策として輪播散布などは一般的な知識として普及しているが、菌密度と耐性菌発生の関係について知る者は少ない。今回のボスカリド水和剤における深刻な耐性菌問題を機に、このような新規薬剤についての考えを改め、耐性菌発生リスクがある薬剤については徹底して予防的に使用する等、使用方法については十分な注意を払うことが、今後の耐性菌対策には重要である。

生産者は耐性菌の情報について高い関心を持っている。近年、消費者の安全・安心な農産物の安定供給に対する要望の高まりから、化学農薬の使用量の削減が求められており、そのためには一つ一つの薬剤の選択が適切な病害虫防除のために重要となる。そのためには、耐性菌の発生状況を生産者に迅速に伝達するとともに、その対策として、単に当該薬剤の使用に際しての注意を促すのみではなく、代替の薬剤または防除方法も併せて情報提供するための取り組みも必要になる。なお、筆者らは、ボスカリド水和剤等、耐性菌が発生している薬剤の使用に関して注意を促すとともに、褐斑病に対して効果の高い薬剤を選抜し、これらを本病の発生消長

に応じて使用する防除体系を作成した（茨城県, <http://www.pref.ibaraki.jp/nourinsuisan/nosose/cont/img/0119.pdf> [2018年10月現在])。現地でもこれに応じて防除を行った圃場では一定の成果を収めている。今後は、この体系に最新の薬剤情報も取り入れ、常に効率的な防除方法を生産者に情報提供していくことが重要と考えられる。

## 5. 2 耐性菌のSDHの各遺伝子について

SDHI剤に対する耐性菌は様々な病原菌で検出されているが、最近の報告である *B. cinerea* (Leroux et al., 2010) の例を除き、その全てで SdhB, SdhC および SdhD のいずれかで耐性の原因と考えられるアミノ酸置換が認められていた (表 5-1)。また、第 1 章で述べたように他の系統の薬剤についても感受性の低下となる要因は作用点の変異にある場合が多い。そのため、本研究では、SDHI 剤に対する両病原菌の耐性菌について分子生物学的な検討を行うためには、作用点である SDH に焦点を絞ることが妥当であると考え、本遺伝子について解析を行った。

キュウリ褐斑病菌の VHR 菌および HR 菌、うどんこ病菌の VHR 菌では、SdhB の S3 クラスターのヒスチジンに置換が認められた。SDH は TCA 回路および電子伝達系の両方を構成する酵素であり、コハク酸をフマル酸へ酸化させ、ユビキノンをユビキノールへと還元させる反応を担う。その中でも SdhB は SdhC および SdhD とともにユビキノンの結合部位である間隙を構成しており、*E. coli* ではユビキノンは SdhB の H207 (褐斑病菌の H278 に相当)、SdhC の S27 (同 S72) と R31 (同 R76)、および SdhD の D83 (同 D116) のそれぞれの側鎖で安定化されており、同時に SDHI 剤の結合部位でもある (Horsefield et al., 2006)。さらに、このヒスチジンは、ユビキノロンまたは SDHI 剤との結合に特に重要な役割を果たしていると考えられている (Shima et al., 2008 ; Shima et al., 2011)。褐斑病菌およびうどんこ病菌で置換が認められたヒスチジンは、*E. coli* の H207 に相当していた。したがって、このヒスチジンで生ずるアミノ酸の置換は SDHI 剤と SDH の結合に何らかの影響を及ぼすと考えられる。また、本アミノ酸の置換を促す変異で形質転換した菌株ではカルボキシシン剤耐性となること (Broomfield and Hargreaves, 1992 ; Skinner et al., 1998 ; Shima et al., 2008)、他の病原菌の SDHI 剤耐性菌では本アミノ酸の置換が多く認められていること (表 19) から、褐斑病菌およびうどんこ病菌でもこのヒスチジンの置換がボスカリド剤に対する感受性の低下に深く関与していると推察された。今後は、形質転換体を作成し、このアミノ酸置換と耐性との関係について確認を行う必要があるが、将来の遺伝子診断法の開発のためにはこの変異が耐性菌検出用のマーカーの候補として有力であると考えられた。

一方で、褐斑病菌およびうどんこ病菌の MR 菌では、感受性低下に関与すると思われる変異が認められなかった。褐斑病菌の MR 菌の一部では C-S73P や D-S89P、D-G109V が認められた。これら置換についてもボスカリド剤に対する感受性の低下への関与を形質転換体の作出により検討する必要がある。その一方で、SDH のいずれの遺伝子にもアミノ酸置換が存在しない菌株も認められた。これまで、SDHI 剤に対する感受性の低下は標的タンパク質である SDH のアミノ酸置換に原因があるとされていた (Brent and Hollomon, 2007a)。作用点の変異以外にも耐性に関与するメカニズムとしては、作用点の代替となる機構の発現や、作用点の過剰発現、薬剤の排出機構の活性化や取り込みの減少、解毒などが知られている。例えば、DMI 剤では作用点 (ステロール脱メチル化酵素) の変異以外にも、作用点の過剰発現や薬剤の細胞外排出に関わる ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター群の過剰発現が感受性に影響を及ぼしていることが報告されている (Hamamoto et al., 2000 ; Schnabel and Jones, 2001 ; Hayashi et al., 2002 ; Zwiers et al., 2002)。特に、ABC トランスポーター群については多剤耐性にも関与していることから、SDHI 剤耐性にも関与する可能性も考えられる。今後は、DMI 剤などの他の薬剤で明らかになっている機構を参考にしながら、SDHI 剤に対する耐性機構についても解明を進める必要がある。

最近、SDHI 剤間での交叉耐性について数例の報告がなされており、各病原菌の SDH のアミノ酸置換を考慮すると大変興味深い。*Aspergillus oryzae* の人為的突然変異株を用いた研究では、S3 クラスター内のヒスチジンがチロシンやロイシンに置換した菌株はボスカリド剤に対して耐性となるが、アスパラギンに置換した菌株は感受性であった (Shima et al., 2011)。新規の SDHI 剤であり現在開発中であるフルオピラム剤は、キュウリ褐斑病菌の MR 菌に対しての効果は低いが、VHR 菌や HR 菌に対しては S 菌同様の効果を示す (Ishii et al., 2011)。VHR 菌および HR 菌は SdhB の H278 に置換を持つ耐性菌であることから、フルオピラム剤では本残基に生じているチロシンやアルギニンへの置換は実用的な防除効果に対して影響を及ぼさない可能性が考えられる。*A. alternata*

でも、フルオピラム剤の菌糸伸長抑制率は SdhB に H277Y を持つボスカリド剤耐性菌株と野生株ではほぼ同等であったことが報告されている (Avenot et al., 2010)。なお、この研究では SdhC や SdhD にアミノ酸置換を持つ菌株でペンチオピラド剤やフルオピラム剤に対する感受性も調査しているが、その結果は置換しているアミノ酸の種類によって異なっていた。また、*D. bryoniae* では、SdhB の S3 クラスター内のヒスチジンがチロシンに置換していたボスカリド剤耐性菌は、ペンチオピラド剤に対しても耐性を示すが、アルギニンに置換していた場合、前者に対しては耐性を示すが、後者には感受性となる (Avenot and Michailides, 2010)。*B. cinerea* でも、ボスカリド剤の他、複数の SDHI 剤で試験が行われており、アミノ酸置換の違いによって SDHI 剤に対する反応が多様化していることが報告されている (Leroux et al., 2010)。これらの報告のように、SDHI 剤は薬剤によって交叉耐性のパターンが異なっている。SDHI 剤は構造的にさらに 7 つのグループに分類されており (Anonymous, [http://www.frac.info/frac/work/work\\_sdhi.htm](http://www.frac.info/frac/work/work_sdhi.htm) [5 May 2011])、それぞれの薬剤で SDH に結合する部位の構造がわずかに異なっている。薬剤の活性は作用部位への結合親和性や細胞内への浸透移行性、作用点への到達速度によって異なる (Yamaguchi and Fujimura, 2005)。SDHI 剤についても、作用部位である SDH のアミノ酸の違いによって各薬剤の結合親和性に差異が生じており、そのことが交叉耐性のパターンを多様化させている可能性が考えられる。

SDHI 剤耐性菌の研究は各種病原菌で行われており、新規剤の登場によりその研究はさらに発展すると思われる。現状では、茨城県内のキュウリ栽培圃場では褐斑病およびうどんこ病の防除において、SDHI 剤を実用的に使用することは困難である。しかし、今後、感受性の低下につながる様々なアミノ酸置換を明らかにし、さらに本系統剤の作用機構もしくは耐性機構を解明することは、将来の耐性菌対策に用いられるユニークな SDHI 剤の発見にも寄与できると考えられる。

表19 既報のSDHI剤耐性菌において認められているコハク酸脱水素酵素サブユニットのアミノ酸置換

サブユニット	アミノ酸置換	菌名	引用文献
SdhB	H278Y, R	<i>Corynespora cassiicola</i>	石井ら, 2008; 本研究
	H→Y	<i>Podosphaera xanthii</i>	Anonymous <sup>a)</sup> ; 本研究
	H252L	<i>Ustilago maydis</i>	Keon et al., 1991
	H267Y	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Skinner et al., 1998
	H239L	<i>Peurotus ostreatus</i>	Honda et al., 2000
	H228N	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Matsson and Hederstedt, 2001
	H229L	<i>Xanthomonas campestris</i>	Li et al., 2006
	H277Y, R	<i>Alternaria alternata</i>	Avenot et al., 2008
	P225L, T, F; H272Y, R, L	<i>Botrytis cinerea</i>	Stammler et al., 2007; Leroux et al., 2010
	H249Y, L, N	<i>Aspergillus oryzae</i>	Shima et al., 2009
	H→Y, R	<i>Didymella bryoniae</i>	Avenot et al., 2010
SdhC	S73P	<i>Corynespora cassiicola</i>	本研究
	N80K	<i>Coprius cinereus</i>	Ito et al., 2004
	H234R	<i>Alternaria alternata</i>	Avenot et al., 2009
	T90I	<i>Aspergillus oryzae</i>	Shima et al., 2009
SdhD	S89P, G109V	<i>Corynespora cassiicola</i>	本研究
	D89G	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Matsson et al., 1998
	D123E, D133R	<i>Alternaria alternata</i>	Avenot et al., 2009
	D132R	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Glaettli et al., 2009
	D124E	<i>Aspergillus oryzae</i>	Shima et al., 2009

<sup>a)</sup>[http://www.frac.info/frac/work/work\\_sdhi.htm](http://www.frac.info/frac/work/work_sdhi.htm) (5 May 2011)

## 摘要

キュウリ栽培圃場において問題となる褐斑病およびうどんこ病の防除は、主に化学的防除に頼っている。しかし、両病原菌では各種薬剤に対する耐性菌が発生し、両病害の防除を困難にしている。このような中、新規のコハク酸脱水素酵素阻害剤（SDHI 剤）であるボスカリド水和剤がキュウリで農薬登録された。さらに近年、同系統薬剤であるペンチオピラド水和剤が登録された。SDHI 剤はコハク酸脱水素酵素（SDH）の阻害を単一の作用機作とするため、両病原菌の SDHI 剤に対する感受性の変動には注意を払う必要があると考えられた。実際、褐斑病ではボスカリド水和剤の使用開始後間もなく、生産者から防除効果が低下しているとの声が聞こえた。また、近年は薬剤耐性菌の検出に、その簡便さや迅速さから薬剤標的タンパク質をコードする領域の塩基変異を利用した遺伝子診断法が用いられる場合がある。しかし、褐斑病菌およびうどんこ病菌では、感受性菌および耐性菌における SDH 遺伝子は解析されていない。そこで本研究では、茨城県内の現地キュウリ栽培圃場における褐斑病菌およびうどんこ病菌の本剤に対する耐性菌発生状況を調査するとともに、耐性菌の分子生物学的特徴を把握するために、SDH 遺伝子のシーケンス解析を行った。

ボスカリド剤に対する感受性を検討するため、褐斑病菌では YBA 寒天培地を用いた菌糸伸長阻止試験を行った。その結果、本病原菌の本剤に対する感受性ベースラインは、最小生育阻止濃度（MIC 値）および 50% 生育阻止濃度（EC<sub>50</sub> 値）がそれぞれ 0.5~7.5 $\mu$ g/ml, 0.04~0.59 $\mu$ g/ml であった。ボスカリド水和剤の使用履歴がある茨城県内のキュウリ栽培 28 圃場から採集した 907 菌株の感受性を検討した結果、MIC 値が 30 $\mu$ g/ml 以上である本剤耐性菌が 26 圃場で計 427 菌株検出された。さらに、そのうち 14 圃場では検出率が 50% 以上であった。さらに、本研究では、この耐性菌を EC<sub>50</sub> 値の違いから中等度耐性（MR）菌（EC<sub>50</sub> 値：1.1~6.3 $\mu$ g/ml）、高度耐性（HR）菌（8.9~10.7 $\mu$ g/ml）、超高度耐性（VHR）菌（24.8 $\mu$ g/ml 以上）に分類した。さらに、植物体上におけるこれら耐性菌に対する本剤の発病抑制効果を検討するために、ポット植えのキュウリ苗を用いた接種試験を行った。その結果、本剤の S 菌に対する発病抑制率が 100% であったのに対し、MR 菌、HR 菌および VHR 菌に対しては、それぞれ平均で 69%、44%、0% であった。

うどんこ病菌については、茨城県内においてボスカリド剤の使用履歴がある 13 圃場より罹病葉を採集し、74 菌株についてリーフディスク検定法により感受性を検討した。その結果、感受性菌に対する本剤の MIC 値が 5 $\mu$ g/ml であったのに対し、50 $\mu$ g/ml 以上となった耐性菌が 11 圃場で計 34 菌検出された。さらに、本剤 500 $\mu$ g/ml において発病度が大きく抑制される MR 菌とほとんど抑制されない VHR 菌に耐性菌を分類した。また、キュウリ苗を用いた接種試験を行った結果、S 菌に対する発病抑制率が 100% であったのに対し、MR 菌および VHR 菌に対しては、それぞれ平均で 34%、2% であった。

さらに、両病原菌のボスカリド剤耐性菌と感受性菌の SDH 遺伝子を解析し、推定アミノ酸配列の比較を行った。褐斑病菌では SDH サブユニット A, B, C および D をコードする遺伝子（それぞれ *SdhA*, *SdhB*, *SdhC* および *SdhD*）、うどんこ病菌では *SdhB* の塩基配列を解析した。その結果、褐斑病菌の耐性菌では、*SdhB* の 3rd cysteine-rich クラスター内のヒスチジンにチロシン（B-H278Y）またはアルギニン（B-H278R）への置換が認められた。これらの置換は過去に SDHI 剤耐性菌で検出された置換と一致していた。B-H278Y は全 VHR 菌、B-H278R は全 HR 菌で認められた。一方、残る耐性菌である MR 菌では、一部の菌株で *SdhC* および *SdhD* に置換が認められたが、この置換部位は SDHI 剤で予想されている SDH 結合部位とは異なっていた。さらに MR 菌では SDH のいずれのサブユニットにもアミノ酸置換が認められない菌株も認められた。また、うどんこ病菌でも VHR 菌では *SdhB* の 3rd cysteine-rich クラスター内のヒスチジンに変異が認められたものの、MR 菌では認められなかった。

以上の結果から、キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌では、ボスカリド剤の上市からわずかの期間で本剤耐性菌が本県では高頻度に分布していることが明らかとなった。さらに、褐斑病菌については HR 菌と VHR 菌、うどんこ病菌については VHR 菌において SDH の置換が耐性に深く関与している可能性が明らかとなった。

## 謝辞

本論文のとりまとめにあたり格別のご指導と綿密なご校閲を賜った筑波大学大学院生命環境科学研究科 柿 眞教授（現：名誉教授）に深甚な感謝の意を表す。ならびに、本論文作成に当たり、審査員として多くのご助言をいただきました、本田 洋教授（現：東京農業大学 教授）、山岡裕一教授、松本 宏教授、松倉千昭准教授（現：教授）に深甚な感謝の意を表す。また、本論文のとりまとめや学術誌への投稿論文についての綿密なご校閲、本研究の遂行にあたり多大なご指導および菌株分譲等のご協力を賜った農業環境技術研究所 石井 英夫博士（現：吉備国際大学 教授）に深甚な感謝の意を表す。

さらに、元茨城県園芸研究所所長 小川吉雄博士（現：鯉沼学園農業栄養専門学校 教授）、元生物工学研究所所長 佐久間 文雄博士には格別なご高配をいただきました。また、本研究の遂行にあたり多大なご指導を賜った茨城県病害虫防除所 富田恭範博士（現：日本植物防疫協会 茨城研究所所長）、園芸研究所 小河原 孝司氏に感謝の意を表す。日頃の研究に多大なご指導を賜った元農業総合センター 長塚 久氏、農業研究所 渡邊 健博士、園芸研究所 鹿島哲郎氏（現：病害虫防除所）、金子賢一氏（現：県央農林事務所経営・普及部門）、金田真人氏（現：鹿行農林事務所経営・普及部門）、県西農林事務所経営・普及部門 草野尚雄氏（現：農業総合センター）に感謝の意を表す。

ボスカリド剤の御提供をいただくとともに多大なご指導をいただいた、BASF ジャパン株式会社の日野 勲氏、瀬古 隆氏、実験に関する各種情報やデータの提供をいただいた BASF SE の Gerd Stammlier 氏および Anderea Koch 氏、元農業環境技術研究所の James Fountaine 氏に感謝の意を表す。また、菌株の提供をいただいた元千葉県農林総合研究センターの竹内妙子博士、牛尾進吾氏、元岡山県農業総合センターの谷名光治氏、香川県農業試験場の森 充隆氏、佐賀県農業試験研究センターの稲田 稔氏（現：農業技術防除センター 病害虫防除部長）、本研究の遂行において多大なご協力をいただいた水野 学氏、現地調査にご協力いただいた坂東地域農業改良普及センターの神原幸雄氏（現：農業政策課）、鹿行農林事務所経営・普及部門の皆藤昌彦氏（現：鹿行農林事務所 行方地域農業改良普及センター）、その他諸氏に感謝の意を表す。

## 引用文献

- Avenot HF and Michailides TJ (2007) Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease* 91:1345-1350.
- Avenot HF, Sellam A, Karaoglanidis G, Michailides TJ (2008) Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. *Phytopathology* 98:736-742.
- Avenot HF, Sellam A, Michailides TJ (2009) Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. *Plant Pathology* 58:1134-1143.
- Avenot HF and Michailides TJ (2010) Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29:643-651.
- Avenot HF, Thomas A, Gitaitis RD, Langston DB, Stevenson KL (2010) Molecular characterization of resistance to boscalid and penthiopyrad in *Didymella bryoniae* isolates collected from Georgia watermelon fields. *Phytopathology* 100 (suppl 1): S9 (Abstr).
- Brent KJ and Hollomon DW (2007a) Fungicide resistance in crop pathogen: How can it be managed? 2<sup>nd</sup> edition. Brussels, Belgium: CropLife International: FRAC Monograph 1.
- Brent KJ and Hollomon DW (2007b) Fungicide resistance: The assessment of risk. 2<sup>nd</sup> edition. Brussels, Belgium: CropLife International: FRAC Monograph 2.
- Broomfield PLE and Hargreaves JA (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current Genetics* 22:117-121.

- 千葉恒夫・富田恭範 (1993) 有機物施用, ブルームレス台木利用キュウリ栽培におけるうどんこ病の発生. 関東東山病害虫研究会報 40 : 41-42.
- 伊達寛敬・片岡英子・谷名光治・佐々木静江・井上幸次・那須英夫・粕山新二 (2004) 岡山県におけるチオファネートメチル,ジエトフェンカルブ及びアゾキシストロビンに対するキュウリ褐斑病菌の感受性. 日本植物病理学会報 70 : 10-13.
- Fraaije BA, Lovell DJ, Rohel EA, Hollomon DW (1999) Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. *Journal of Applied Microbiology* 86:701-708.
- Foster B and Staub T (1996) Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection* 15:529-537.
- Glaetli A, Stammler G, Schlehner S (2009) Mutations in the target proteins of succinate-dehydrogenase inhibitors (SDHI) and 14 $\alpha$ -demethylase inhibitors (DMI) conferring changes in the sensitivity – structural insights from molecular modeling. In: 9th International Conference on Plant Diseases, Tours, France 670-681.
- Hägerhäll C (1997) Succinate: quinone oxidoreductases variations on a conserved theme. *Biochimica et Biophysica Acta* 1320:107-141.
- Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, Lee Y, Makizumi Y, Akutsu K, Hibi T (2000) Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3421-3426.
- 挾間渉・森田鈴美・加藤徳弘 (1993) ブルームレス台木接ぎ木キュウリにおける褐斑病抵抗性の低下. 日本植物病理学会報 59 : 243-248.
- 挾間渉・佐藤通浩 (1996) 九州・沖縄地域における薬剤耐性キュウリ褐斑病菌の発生実態. 九州病害虫研究会報 42 : 26-30.
- Hayashi K, Schoonbeek H, de Waard MA (2002) Expression of the ABC transporter *BcatrD* from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73:110-121.
- Honda Y, Matsuyama T, Irie T, Watanabe T, Kuwahara M (2000) Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics* 37:209-212.
- Horsefield R, Yankovskaya V, Sexton G, Whittingham W, Shiomi K, Omura S, Byrne B, Cecchini G, Iwata S (2006) Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (Succinate-ubiquinone oxidoreductase). *The Journal of Biological Chemistry* 281:7309-7316.
- 細川浩靖・山中誉・原本雅昇・佐野慎亮・横田因・濱村洋 (2006) シフルフェナミド (パンチョ) 耐性キュウリうどんこ病菌の発生とその諸性質. 日本植物病理学会報 72 : 260-261 (講要) .
- 飯島勉 (1976) 東京都におけるオキシカルボキシ耐性クハク白さび病菌の発生. 東京都農業試験場研究報告 10 : 31-41.
- Ishii H, Fraaije BA, Sugiyama T, Noguchi K, Nishimura K, Takeda T, Amano T, Hollomon DW (2001) Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91:1166-1171.
- 石井英夫・杉山知子・西村久美子 (2002) キュウリ病害におけるストロビルリン系薬剤耐性菌の分布状況の推移. 日本植物病理学会報 68 : 74 (講要) .
- Ishii H, Yano K, Date H, Furuta A, Sagehashi Y, Yamaguchi T, Sugiyama T, Nishimura K, Hasama W (2007) Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. *Phytopathology* 97, 1458-1466.
- 石井英夫・西村久美子 (2007) ストロビルリン系薬剤耐性菌のボスカリド感受性. 日本農薬学会第 32 回大会講演要旨集 64.
- 石井英夫・Fountaine James・宮本拓也・西村久美子・富田恭範 (2008) ボスカリド耐性キュウリ褐斑病菌にみられるコハク酸脱水素酵素遺伝子の変異. 日本植物病理学会報 74 : 38-39 (講要) .
- 石井英夫・宮本拓也・西村久美子・稲田稔 (2009) キュウリ褐斑病菌及びうどんこ病菌のミトコンドリア電子伝達系阻害剤耐性菌の検出方法. 日本農薬学会第 34 回大会講演要旨集 124.

- Ishii H, Miyamoto T, Ushio S, Kakishima M (2011) Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*. *Pest Management Science* 67, 474-482.
- Ito Y, Muraguchi H, Seshime Y, Oita S, Yanagi SO (2004) Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a mutation in the cytochrome *b<sub>560</sub>* subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II). *Molecular Genetics and Genomics* 272:328-335.
- Justum AR, Heaney SP, Perrin BM, Wege PJ (1998) Pesticide resistance: Assessment of risk and implementation of effective management strategies. *Pesticide Science* 54:435-446.
- Keon JPR, White GA, Hargreaves JA (1991) Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Current Genetics* 19:475-481.
- 近藤誠 (2010) 数種薬剤に耐性を持つキュウリ褐斑病菌に対する各種薬剤の防除効果. 北日本病害虫研究会報 61 : 76-79.
- Leroux P and Berthier G (1988) Resistance to carboxin and fenfuram in *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr., the causal agent of barley loose smut. *Crop Protection* 7, 16-19.
- Leroux P, Gredt M, Leroch M, Walker AS (2010) Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6615-6630.
- Li J, Zhou M, Li H, Chen C, Wang J, Zhang Y (2006) A study on the molecular mechanism of resistance to amicarbazol in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Pest Management Science* 62:440-445.
- Lu Y, Ma J, Sutton TB, Ypema H (2004) Comparison of two assay methods for evaluating the sensitivity of *Alternaria mali* to boscalid. *Phytopathology* 94:S64 (Abstr).
- Ma Z and Michailides TJ (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24:853-863.
- Matheron ME and Porchas M (2004) Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Disease* 88:665-668.
- Matsson M, Ackrell BAC, Cochran B, Hederstedt L (1998) Carboxin resistance in *Paracoccus denitrificans* conferred by a mutation in the membrane-anchor domain of succinate:quinone reductase (complex II). *Archives of Microbiology* 170:27-37.
- Matsson M and Hederstedt L (2001) The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate:quinone reductase identified by mutations. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33:99-105.
- McGrath MT (2008) Fungicide sensitivity in *Podosphaera xanthii* and efficacy for cucurbit powdery mildew in NY, USA, in 2003-2006. *Journal of Plant Pathology* 90 (Suppl 2): 90 (Abstr).
- McGrath MT and Miazzi MM (2008) Sensitivity of *Podosphaera xanthii* to registered fungicides at-risk for resistance related to their efficacy for powdery mildew in pumpkin. *Phytopathology* 98:S102 (Abstr).
- Miazzi M and McGrath MT (2008) Sensitivity of *Podosphaera xanthii* to registered fungicides and experimentals in GA and NY, USA, in 2007. *Journal of Plant Pathology* 90 (Suppl 2): 90 (Abstr).
- 宮本拓也・富田恭範・鹿島哲郎・米山一海・野上真希・諏訪順子 (2006) キュウリ褐斑病の品種間における発生差異とチオファネートメチル, プロシミドン, ジエトフェンカルブに対する感受性. 日本植物病理学会報 72 : 236-237 (講要) .
- 宮本拓也・富田恭範・神原幸雄・皆藤昌彦 (2007) キュウリ褐斑病の発病と農業用資材および罹病残渣に存在する分生子との関係. 関東東山病害虫研究会報 54 : 9-12.
- Miyamoto T, Ishii H, Seko T, Kobori S, Tomita Y (2009) Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology* 58:1144-1151.
- Miyamoto T, Ishii H, Stammler G, Koch A, Ogawara T, Tomita Y, Fountaine JM, Ushio S, Seko T, Kobori S (2010a) Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. *Plant Pathology* 59:873-881.
- Miyamoto T, Ishii H, Tomita Y (2010b) Occurrence of boscalid resistance in cucumber powdery mildew in Japan and

- molecular characterization of the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase of the causal fungus. *Journal of General Plant Pathology* 76:261-267.
- 宮本拓也・富田恭範・小河原孝司 (2010) 茨城県における QoI 剤耐性キュウリ褐斑病菌の発生状況. 茨城県病害虫研究会会報 49 : 74-77.
- Myresiotis CK, Bardas GA, Karaoglanidis GS (2008) Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease* 92:1427-1431.
- Ohtsuka N, Sou K, Amano T, Ojima M, Nakazawa Y, Yamada Y (1988) Decreased sensitivity of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) to ergosterol biosynthesis inhibitors. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 54:629-632.
- Ragsdale NN and Sisler HD (1970) Metabolic effects related to fungitoxicity of carboxin. *Phytopathology* 60:1422-1427.
- Russell PE (2004) Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. Brussels, Belgium: Crop Life International: FRAC Monograph 3.
- Saitoh K, Togashi K, Arie T, Teraoka T (2006) A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology* 72:348-350.
- 櫻井誠也 (2007) ペンチオピラドの作用機作と耐性菌対策. 日本植物病理学会第 17 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 30-39.
- Schepers HTAM (1984) Persistence of resistance to fungicides in *Sphaerotheca fuliginea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 90:165-171.
- Schnabel G and Jones AL (2001) The 14 $\alpha$ -demethylase (*CYP51A*) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* 91:102-110.
- Shima Y, Ito Y, Kaneko S, Hatabayashi H, Watanabe Y, Adachi Y, Yabe K (2008) Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 46:67-76.
- Shima Y, Ito Y, Hatabayashi H, Koma A, Yabe K (2011) Five carboxin-resistant mutants exhibited various responses to carboxin and related fungicides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75:181-184.
- Skinner W, Bailey A, Renwick A, Keon J, Gurr S, Hargreaves J (1998) A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 34:393-398.
- Spiegel J and Stammler G (2006) Baseline sensitivity of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* to pyraclostrobin and boscalid. *Journal of Plant Disease and Protection* 113:199-206.
- Stammler G and Speakman J (2006) Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. *Journal of Phytopathology* 154: 508-510.
- Stammler G, Benzinger G, Speakman J (2007) A rapid and reliable method for monitoring the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to boscalid. *Journal of Phytopathology* 155:746-748.
- Stammler G (2008) Mode of action, biological performance and latest monitoring results of boscalid sensitivity. 日本植物病理学会第 18 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 30-43.
- Stammler G, Brix HD, Nave B, Gold R, Schoefl U (2008) Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. In: Proceedings of the 15th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, 45-51.
- Staub T (1991) Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology* 29:421-442.
- 竹内妙子・久保周子・石井英夫 (2006) 千葉県におけるキュウリ褐斑病菌の数種薬剤に対する感受性. 関東東山病害虫研究会報 53 : 55-60.
- Uchida K, Takamatsu S, Matsuda K, So K, Sato Y (2009) Morphological and molecular characterization of *Oidium* subgenus *Reticuloidium* (powdery mildew) newly occurred on cucumber in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75:92-100.
- 牛尾進吾・竹内妙子 (2009) 千葉県におけるキュウリ褐斑病菌のボスカリド剤に対する感受性. 千葉県農林総合

研究センター研究報告 1 : 47-50.

Wise KA, Bradley CA, Pasche JS, Gudmestad NC, Dugan FM, Chen W (2008) Baseline sensitivity of *Ascochyta rabiei* to azoxystrobin, pyraclostrobin, and boscalid. *Plant Disease* 92:295-300.

山岸菜穂・川上暢喜 (2010) 長野県におけるキュウリ褐斑病菌の複数薬剤に対する感受性. 関東東山病害虫研究会報 57 : 107-109.

Yamaguchi I and Fujimura M (2005) Recent topics on action mechanisms of fungicides. *Journal of Pesticide Science* 30:67-74.

Zhang CQ, Yuan SK, Sun HY, Qi ZQ, Zhou MG, Zhu GN (2007) Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. *Plant Pathology* 56:646-653.

Zwiers LH, Stergiopoulos I, Van Nistelrooy JGM, De Waard MA (2002) ABC transporters and azole susceptibility on laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:3900-3906.

## **Studies on *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii* Isolates Resistant to Succinate Dehydrogenase Inhibitors on Cucumber**

**Takuya MIYAMOTO**

### **Summary**

Control of corynespora leaf spot (*Corynespora cassiicola*) and powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) in commercial cucumber greenhouse have heavily relied on the use of chemical fungicide treatment. Recently, development of resistance against various fungicides in both fungi makes it difficult to control those diseases. Meanwhile, boscalid which belongs to the succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) group has been registered commercially in Japan for the control of some diseases of cucumber. Recently, penthiopyrad which belongs to SDHI fungicide has also been registered for some diseases containing powdery mildew on cucumber. SDHI fungicide is a site-specific inhibitor and is considered to be at risk for resistance development in pathogen population. Unfortunately, soon after application for corynespora leaf spot, cucumber growers reported reduced efficacy of boscalid in greenhouse. In recent studies, molecular diagnostic method using the gene mutation of a region which encodes target protein has been reported to be useful for monitoring sensitivity of some fungicides quickly and easy. However, nucleotide sequences in SDH genes of *C. cassiicola* and *P. xanthii* had not been analyzed. The objectives of the current study were to monitor boscalid sensitivity of both fungi isolates collected from cucumber greenhouses in Ibaraki Prefecture, Japan, and sequence putative succinate dehydrogenase (SDH) genes and determine if mutations in these genes are responsible for boscalid resistance.

*C. cassiicola* collected from cucumber in Japan, were tested for their sensitivity to boscalid by using a mycelial growth inhibition method on YBA agar medium. Minimum inhibitory concentration (MIC) and 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) values for 220 isolates from five crops without a prior history of boscalid use ranged from 0.5 to 7.5 µg/ml and from 0.04 to 0.59 µg/ml, respectively. Four hundred and twenty seven out of 907 isolates collected from 28 cucumber greenhouses in Ibaraki Prefecture, which received boscalid spray applications showed boscalid resistance with MIC values higher than 30 µg/ml and detection frequencies of the resistant isolates exceeded 50 % in 14 greenhouses. Moreover, resistant isolates were divided into three groups: a moderately resistant (MR) group with EC<sub>50</sub> values ranging from 1.1 to 6.3 µg/ml, highly resistant (HR) group with EC<sub>50</sub> from 8.9 to 10.7 µg/ml and a very highly resistant (VHR) group with EC<sub>50</sub> higher than 24.8 µg/ml. To evaluate the efficacy of boscalid, inoculation tests using potted cucumber plants were done using sensitive and three resistant groups. Sensitive isolates were almost completely controlled by boscalid, as well as mancozeb which was used as a reference fungicide. In contrast, low efficacy of boscalid was recorded against resistant isolates. Boscalid still

slightly inhibited the number of lesions on leaves inoculated with MR and HR isolates, but completely lost its efficacy against VHR isolates.

A total of 74 mass isolates of *P. xanthii* collected from commercial greenhouses with a prior history of boscalid use, were tested for their sensitivity to boscalid by utilizing leaf disk method. The mildew development from five reference sensitive isolates on disks was completely suppressed at 5 µg/ml. MIC values of boscalid for 34 out of 74 isolates were 50 µg/ml or higher than this value. Moreover, resistant isolates were divided into moderately resistant (MR) and two very highly resistant (VHR) group. MR isolates grew slightly at 500 µg/ml, but VHR isolates showed vigorous growth at 500 µg/ml. In foliar inoculation tests using potted cucumber plants, low efficacy of boscalid (500 µg/ml) was recorded against both MR and VHR isolates. In foliar spray tests using boscalid, sensitive isolate was controlled completely, however, low efficacy of the fungicide was recorded against resistant isolates. In particular, this fungicide drastically lost its efficacy against VHR isolates

Furthermore, to elucidate the deduced amino acid substitution responsible for the resistance to boscalid, molecular characterization of genes encoding SDH subunits (*SdhA*, *SdhB*, *SdhC* and *SdhD*) in *C. cassiicola* and the partial fragments of *SdhB* gene in *P. xanthii* was carried out. All VHR isolates of *C. cassiicola* had a mutation in the *SdhB* gene leading to the substitution of histidine with tyrosine at amino acid position 278 (B-H278Y). At the same position, the substitution to arginine conferred by a mutation (B-H278R) was detected in all HR isolates. The same substitution was previously reported in SDHI resistant isolates of other fungus pathogen. However, there was no common mutation in SDH genes of all MR isolates and some isolates possessed no mutations in the genes examined. In *P. xanthii*, VHR isolates possessed a substitution from a highly conserved histidine to tyrosine in third cystein-rich center of putative SdhB. No such substitutions were found in SdhB so far analyzed in MR isolates.

According to the above results, it was suggested that soon after boscalid was introduced to the market, resistance against boscalid in both pathogens was developed and widely distributed within Ibaraki Prefecture, Japan. Additionally, it was inferred that the development of resistance was caused by amino acid substitution in SDH of HR and VHR isolates of *C. cassiicola*, and VHR isolates of *P. xanthii*.

**Keyword: Cucumber, *Corynespora cassiicola*, *Podosphaera xanthii*, succinate dehydrogenase inhibitor, fungicide resistance,**