

氏名(本籍)	宮本拓也(茨城県)			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博乙第2561号			
学位授与年月日	平成23年9月30日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	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			
主査	筑波大学教授	農学博士	柿 真	真
副査	筑波大学教授	農学博士	本 洋	洋
副査	筑波大学教授	農学博士	山 裕	裕一
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	松 千	千昭
副査	筑波大学教授	農学博士	松 宏	宏

### 論文の内容の要旨

キュウリ栽培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、各種薬剤に対する両病原菌の耐性菌の発生が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。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、両病原菌のボスカリド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。また、近年、薬剤感受性の検定には、その簡便さや迅速さから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、両病原菌では、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、キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌の現地圃場における耐性菌の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、キュウリ褐斑病菌ではYBA寒天培地を用いた菌糸伸長阻止法を行った。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0.5~7.5μg/ml、0.04~0.59μg/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圃場から採集した菌株の感受性を検討した結果、MIC値が30μg/ml以上である本剤耐性菌が26圃場で検出され、そのうち14圃場では検出率が50%以上であった。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、高度耐性(HR)菌、超高度耐性(VHR)菌に分類した。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、耐性菌に対する本剤の効果の低下が認められ、その程度はMR菌、HR菌、VHR菌の順に顕著であった。

うどんこ病菌については、茨城県内においてボスカリド水和剤の使用履歴がある13圃場より罹病葉を採集し、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値は5μg/mlであったのに対し、50μg/ml以上となった耐性菌が11圃場で検出された。本菌についても、50および500μg/mlでの生育量の違いから、耐性菌をMR菌とVHR菌に分類した。キュウリ苗を用いた接種試験でも、

耐性菌に対する本剤の発病抑制効果の低下が確認された。

さらに、両病原菌の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 クラスタ内へのヒスチジンにチロシン（H278Y）またはアルギニン（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。H278Yは全VHR菌、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。うどんこ病菌でも、*SdhB*の3rd cysteine-rich クラスタ内へのヒスチジンからチロシンへの置換がVHR菌で認められたものの、MR菌では認められなかった。

以上の結果から、茨城県内のキュウリ栽培圃場では褐斑病菌およびうどんこ病菌のボスカリド剤耐性菌が高頻度に分布していることが明らかとなった。さらに、SDHI剤に対する感受性の低下には、*SdhB*の3rd cysteine-rich クラスタ内へのヒスチジンの置換が関与している可能性が示唆された。その一方で、両病原菌のMR菌では*SdhB*以外にSDHI剤耐性に関与している変異が存在している可能性が考えられた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

キュウリ栽培圃場において問題となっている褐斑病およびうどんこ病は、農薬によって防除されているが、耐性菌が出現し、大きな問題となっている。そのため耐性菌の出現状況の正確な把握や、耐性機構解明は、農薬の使用にあたって重要な課題である。最近利用されている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やペンチオピラド水和剤は、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、耐性菌の出現が懸念されていた。しかし、この耐性菌の発生状況についての明確な情報はなく、また、その耐性機構についても明らかにされていなかった。そこで、本研究は、キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌の現地圃場における耐性菌の発生状況を調査するとともに、耐性菌のSDH遺伝子のシーケンス解析を行い、耐性機構の解明を目的として行ったものである。

研究の結果、キュウリ褐斑病菌およびうどんこ病菌では、薬剤の使用開始後、耐性の程度の異なる耐性菌が急速に、また高頻度に出現し広範囲に広がることを明らかにしたもので、今後の、薬剤防除に当たっての大きな示唆を与えるものである。また、この耐性機構については、未だ不明な点も残されているが、その一端は、病原菌のアミノ酸置換によって生じることを明確にし、耐性菌の耐性機構の解明にも大きく貢献する研究である。

平成23年7月26日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。