

# 台湾・マレーシアにおけるチャもち病菌の探索収集

農業生物資源研究所 ジーンバンク

微生物資源研究チーム

元特別研究員

長尾 英幸

## Collection of *Exobasidium* Blister of Tea in Taiwan and Malaysia

Hideyuki NAGAO

Genebank, National Institute of Agrobiological Sciences

2-1-2, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

### 1. 目的

チャはアジアモンスーン地域に起源を發し、チャもち病は1868年に初めて發見され、1898年に Massee 氏により *Exobasidium vexans* として記載された。病斑が網目状となるチャ網もち病が、1911年に新たに澤田・伊藤両博士により *E. reticulatum* として記載され、日本と台湾から報告された。チャもち病菌の研究史に関しては成書に詳述されている（江塚・安藤，1994）。チャもち病菌はアジアモンスーン地域における重要病害である（大石，2004 b）。チャ *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze は紅茶用のアッサム種 var. *assamica* と中国茶および日本茶用の中国種 var. *sinensis* に区別される（大石，2004a）。もち病菌の培養は、1960年代に確立された。日本産のチャもち病菌は生育が大変遅く、担子胞子を形成すると報告されていた（江塚，1955）。しかしながら、CBS（オランダ）および農業生物資源研究所ジーンバンクに登録されている菌株は別種あるいは汚染菌であった。CBS 株については、生化学的性状および分子生物学的特徴からもち病菌であることが否定されている（Boekhout et al., 1995; Fell et al., 1995）。筆者の分子生物学的調査により、ジーンバンク登録株も別種と判定された（未発表）。他方、チャ網もち病は、ツツジ科に寄生するもち病菌と同様に容易に培養できる。チャもち病菌の培養は、江塚（1955）の発表以外に成功例がなかった。筆者は茨城県および静岡県で採集された新鮮な材料で培養を試みた結果、ようやく従来培養が困難であったチャもち病菌の培養方法を確立した。そこで、アッサム種と中国種に病原性を持つチャもち病菌の培養性状は明らかにされていなかったため、従来形態学的にチャもち病菌と見なされてきた病原菌を分離培養し、培養特性調査と遺伝子解析を行うことを2005年度のジーンバンク海外探索事業（台湾およびマレーシア）の目的とした。台湾では中国種の栽培が主に行われているが、日月湖周辺のみでアッサム種の

栽培が行われている。そこで、異なる宿主である中国種とアッサム種が栽培されている地域よりのもち病菌の分離、またマレーシアではアッサム種の栽培のみが行われているので、アッサム種よりのもち病菌の分離が地域ごとの目的である。さらに系統について分離培養した菌株を用いてわが国の菌株と比較する。これらの知見は、海外での抵抗性品種の選抜や育成などチャの生産性向上に貢献できると考えられる。

## 2. 探索概要

### 2-1. 台湾

2005年4月25日から5月10日の16日間にわたって、台湾・台北縣、宜蘭縣および南投縣のチャ生産地帯合計16地域でもち病罹病植物体の探索・収集を行った（表1、図1）。収集した植物体は、冷蔵した状態で宿舎に持ち帰り分離源とした。

表 1. 探索・収集日程

年月日	行 程	行 動 内 容
H17.4.25	つくば→新東京国際空港→台北 Taipei	移動（空路）
4.26	台湾林業試験所 Taiwan Forest Research Institute	収集準備
4.27	台北市南港 Nangang →台北縣石碇 Shrding →台北縣木柵 Muja →台北	収集及び培養
4.28	宜蘭縣大同鄉玉蘭 Ilang (Yilang) →三星鄉三星 Sanshing →宜蘭縣福山 Fushan	収集
4.29	宜蘭縣福山植物園→冬山鄉 Dungshan	収集及び培養
4.30	国立台湾大学 National Taiwan University	収集及び培養
5.1	台北縣陽明山 Yangmingshan →林口 Linkou →龜山 Gueishan	収集及び培養
5.2	南投縣魚池鄉九族文化村 Formosan Aboriginal Culture Village (Nantou) →魚池鄉 Yuchih →林試魚池分場 Yuchih Branch, Tea Experiment Station	収集及び SEM 試料と標本の作製
5.3	南投縣茶業改良場魚池分場→台大実験林清水溝營林區 Ching-shui-kou Tract, The Experimental Forest, National Taiwan University	収集及び培養

- 5.4 台大実験林清水溝營林區→溪頭森林遊樂區 Shitou Forest Amusement Park →草嶺 Caoling 収集及び SEM 試料と標本の作製
- 5.5 草嶺→樟湖 Jhanghu →梅山 Meishan (Chiayi) →太和 Taihuo →奮起湖 Fen-chi-hu 収集及び SEM 試料と標本の作製
- 5.6 奮起湖→阿里山郷楽野村 Leyecun Village, Alishan Township → (Chiayi) →阿里山 Alishan →台北 収集及び培養
- 5.7 国立台湾大学 培養と標本の作製
- 5.8 国立台湾大学 培養と標本の作製
- 5.9 国立台湾大学 (澤田兼吉博士標本観察) 標本の分類及び同定
- 5.10 台北→つくば 移動 (空路)

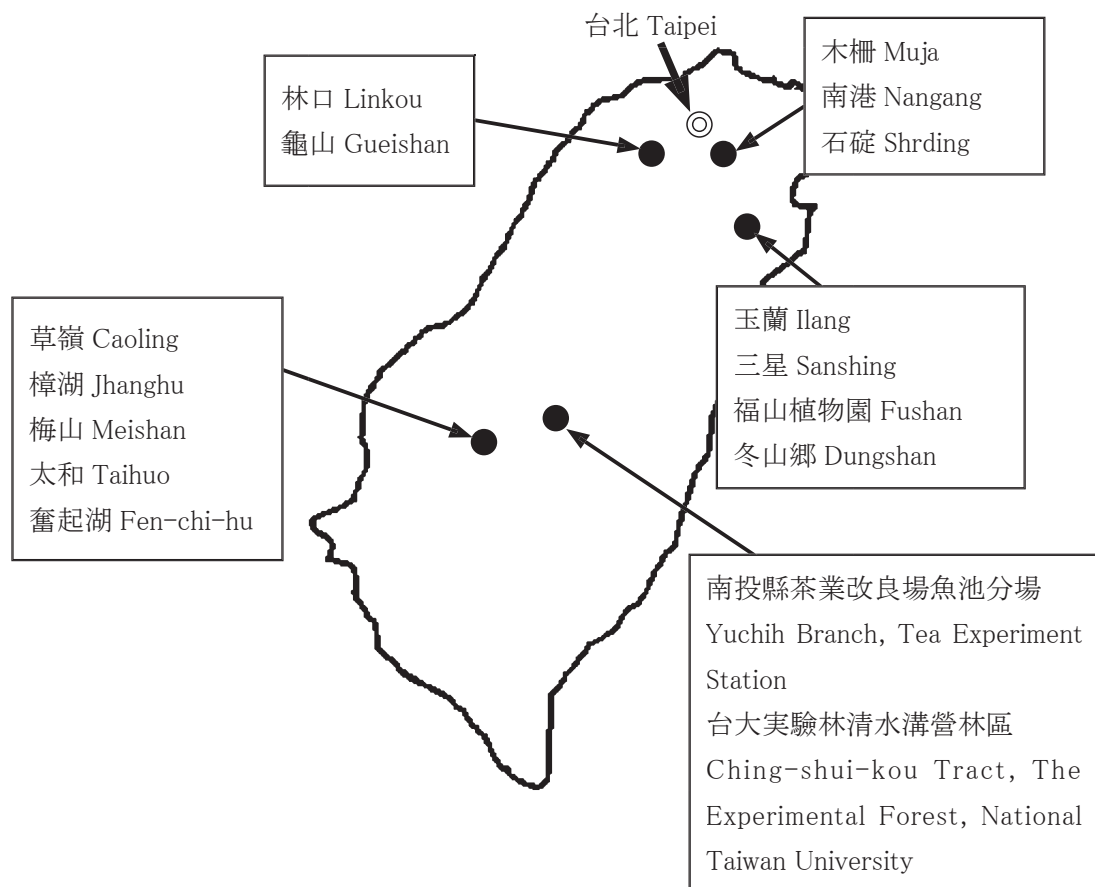


図 1. 台湾における探索収集地点

## 2-2. マレーシア

2006年1月24日から2月9日の17日間にわたって、マレーシア・パハン州キャメロンハイランド、ジョホール州クルアン、およびペラ州コタレンゴンのチャ生産地帯の合計6地域でもち病罹病植物体の探索・収集を行った（表2、図2）。収集した植物体は、冷蔵した状態で宿舎に持ち帰り分離源とした。

表2. 探索・収集日程

年月日	行 程	行 動 内 容
H18.1.24	つくば→新東京国際空港→クアラルンプール	移動（空路）
1.25	マレーシア経済企画院マクロ経済局	許可証の受領
1.26	クアラルンプール→ペナン	移動（空路）
1.27	マレーシア科学大学	収集準備
1.28	ペナン→キャメロンハイランド	移動
1.29	農業研究所公園および茶園での採集	収集及び培養
1.30	茶園およびブリンチャン山での採集	収集及び培養
1.31	茶園およびジャスラ山での採集	収集及び培養
2.1	キャメロンハイランド→フレイザーヒル	収集及び培養
2.2	フレイザーヒル→クルアン茶園での採集→クアラカンサー	収集及び培養
2.3	クアラカンサー→コタレンゴン；茶園での採集→ジュライ山での採集→ペナン	収集及び培養
2.4	マレーシア科学大学	培養及び標本の作製
2.5	マレーシア科学大学	培養及び標本の作製
2.6	マレーシア科学大学	培養及び標本の作製
2.7	ペナン→クアラルンプール	移動（空路）
2.8	マレーシア経済企画院マクロ経済局	許可証の返却，報告書の提出
2.9	クアラルンプール→新東京国際空港→つくば	移動（空路）

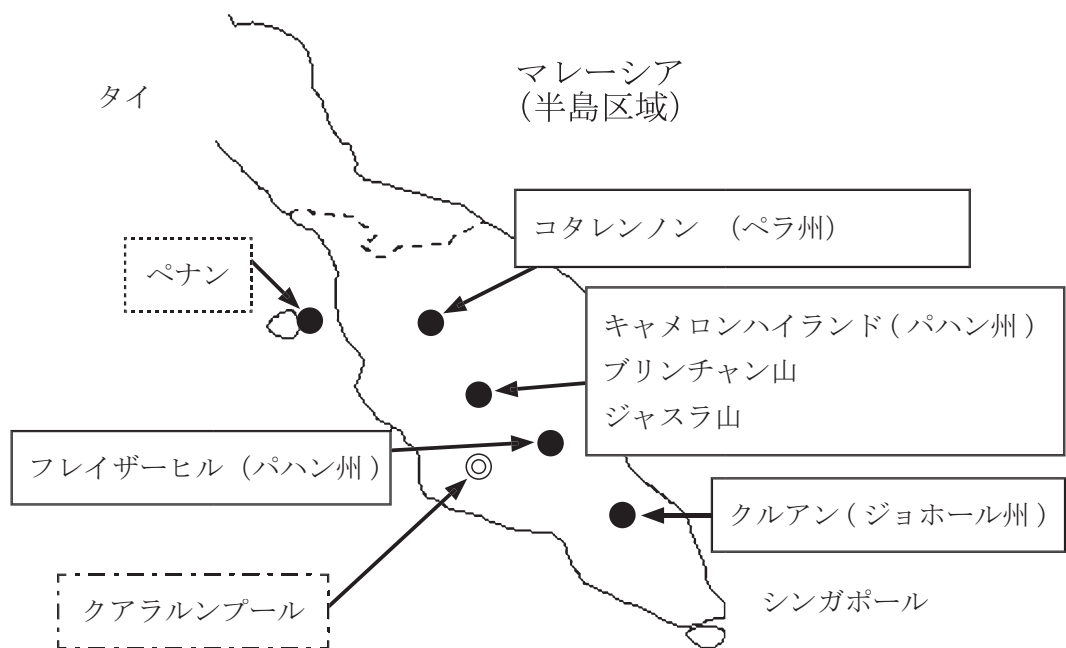


図2. マレーシアにおける探索収集地点

### 3. 収集成果

#### 1) チャもち病菌の分離・同定

採集した新鮮な病斑から担子器、担子胞子および分生子を得て、光学顕微鏡で観察した。採集した新鮮な試料からチャもち病菌の分離を試みた。台湾では3種類の栄養物（ビオチン、パントテン酸およびチアミン）をそれぞれ添加した酸性 Difco ツァペック寒天培地（以後培地 c1、培地 c2、培地 c3 と略称）を用いて、シャーレのふたに貼り付けた病斑から担子胞子を落下させ、病原菌を発芽させた。マレーシアでは現地の都合で3種類の栄養物（ビオチン、パントテン酸およびチアミン）をそれぞれ添加した酸性 Difco ジャガイモブドウ糖寒天培地（以後、順に培地 1、培地 2、培地 3 と略称）を供試した。発芽様式を光学顕微鏡で確認し、単胞子分離した。担子胞子の発芽観察は従来の方で行った (Nagao et al., 2003a)。25°Cで14日間以上培養した後、出現したコロニーを保存した。

分離したコロニーは、チャ以外のもち病菌はユニバーサルプライマー (ITS1F および ITS4) を用いて、PCR 法で ITS1, 5SrDNA, ITS2 領域を増幅し、約560 bp についてシーケンスを行った。また、全ての菌株について、ユニバーサルプライマー (NL1 および NL4) (White et al., 1990) を用いて、PCR 法で 28S rDNA を増幅し、約600 bp についてシーケンスを行った。

#### 2) 結果

##### 2-1. 台湾

9箇所から標本56点を収集した。標本10点の担子胞子の大きさ (8-15 × 3-6 μm) は日本のチャ

もち病菌と一致した（江塚・安藤，1994）。形態は卵形から倒卵形で、一隔壁を有した。チャもち病菌は中国種とハイブリッド種（中国種とアッサム種の交配種）の2種類の宿主から採集することができたが、もち病菌の形態には差異は見られなかった。

チャもち病菌担子胞子の発芽法は、発芽管によるものであった。供試したチャもち病菌担子胞子の発芽結果は、試料および培地により異なった（表3）。すべてのチャもち病菌は培地2で生育した。台湾産チャもち病菌は栄養要求性があることが確かめられた。また台湾産チャもち病菌のうち、中国種とハイブリッド種に寄生するそれぞれの菌は生理学的な分化が生じている可能性が考えられた。

チャもち病菌の培養は、8菌株を得た。チャもち病菌は自家製ジャガイモブドウ糖寒天培地で生育し、直径10mmに達するのにおよそ14日以上かかった。菌叢は擬菌糸からなり、色は黄白色から汚白色で、脆かった。コロニーの形態には2種類の宿主の違い（var. *sinensis* とハイブリッド種）は影響しなかった。

台湾でツバキ科およびツツジ科に病原性を示すもち病菌5菌株のITS領域および28SrRNA領域を用いて相同性検索を行った結果、日本産の種と98–100%の相同性を示した。今回の探索・収集の結果、台湾産のもち病菌13培養菌株を農業生物資源ジーンバンク（MAFF）に登録した。標本は農業環境技術研究所微生物標本館および国立台湾大学植物病理與微生物學系標本庫に収蔵した。培養菌株より得たDNAデータは日本DNAデータバンク（DDBJ）を通じてデータベースに登録した。

台湾大学に保管されている澤田兼吉博士の採集標本を調査する機会を得て、チャもち病菌およびチャ網もち病菌の採集品24点を観察した。その結果、1910年代から1930年代にはチャもち病菌およびチャ網もち病菌が頻繁に採集されていたことがわかった。

## 2-2. マレーシア

5箇所から標本11点を収集した。標本10点の担子胞子の大きさ（(9.6) 11.2-16 x 3.2-5.6  $\mu$ m）は日本のチャもち病菌と一致した（江塚・安藤，1994）。形態は卵形から倒卵形で、一隔膜を有した。チャもち病菌はアッサム種の宿主から採集することができたが、もち病菌の形態は台湾産と日本産と比べて差異は見られなかった。

チャもち病菌担子胞子の発芽様式は、発芽管によるものであった。供試したチャもち病菌担子胞子の発芽結果は、いずれの培地でも良好であった（表3）。マレーシア産チャもち病菌には明確な栄養要求性がみられなかった。また、マレーシア産チャもち病菌は日本産および台湾産のチャもち病菌とは、担子胞子生育のための栄養要求性が異なった。

マレーシア産チャもち病菌の分離・培養により3菌株が得られた。チャもち病菌は自家製ジャガイモブドウ糖寒天培地で生育し、直径10mmに達するのにおよそ14日以上かかった。菌叢は擬菌糸からなり、色は汚白色から赤みのある白色で、脆かった。

マレーシア産のチャもち病菌3菌株の28SrRNA領域を用いて相同性検索を行った結果、日本産の種と98–100%の相同性を示した。今回の探索・収集の結果、マレーシア産のチャもち病菌3培養菌株を農業生物資源ジーンバンク（MAFF）に登録した。標本は農業環境技術研究所微生物標本

館およびマレーシア森林研究所 (FRIM) 標本庫に収蔵した。培養菌株より得た DNA データは日本 DNA データバンク (DDBJ) を通じてデータベースに登録した。

## 4. 所感

### 4-1. 台湾

台湾・台北縣、宜蘭縣および南投縣のチャ生産地帯合計16地域で探索を行い、9箇所から標本56点を収集した。台北縣では台北市の郊外に位置する茶畑が都市開発により消失しつつあった。茶製品の付加価値を高めるために、無農薬栽培をしている茶園以外では本病を見つけることが困難であった。チャもち病菌の培養は、8菌株を得た。台湾産チャもち病菌は栄養要求性があることが確かめられた。また台湾産チャもち病菌のうち、アッサム種と中国種に寄生する菌は生理学的な分化が生じている可能性が考えられた。台湾紅茶の原料となっているチャは、台湾で独自に中国種とアッサム種と交配して育成されたことが明らかになった。現在も多数の交配種を育成している。台湾大学に保管されている澤田兼吉博士の採集標本を調査する機会を得て、チャもち病菌およびチャ網もち病菌の採集品24点を観察した。チャ網もち病は最近では観察例が無いとのことであった。また今回の探索でも採集されなかった。

### 4-2. マレーシア

マレーシア・パハン州キャメロンハイランド、ジョホール州クルアン、およびペラ州コタレンゴンのチャ生産地帯で探索を行い、5箇所から標本11点を収集した。パハン州キャメロンハイランドは、雨季の末期であったにもかかわらず日没後は霧が立ち込める環境のため、チャに対するもち病菌の感染と蔓延には好適であった。ジョホール州とペラ州はパハン州キャメロンハイランドのような高原ではないため、気温の上昇が著しく、新鮮な病斑を十分に得ることができなかった。チャもち病菌の分離・培養により3菌株を得た。マレーシア産チャもち病菌は明確な栄養要求性がみられなかった。また、マレーシア産チャもち病菌は日本産と台湾産のチャもち病菌とは担子胞子生育のための栄養要求性が異なった。もち病菌はアッサム種から生産される紅茶の重要病害であるので、収集株が人工接種による耐病性品種の育成に貢献できることを願っている。チャ・アッサム種と中国種は分布域や植物としての形態も異なるので、それらに寄生するチャもち病菌の ITS 領域遺伝子の解析は興味深い。また、中国種とアッサム種に病原性を持つチャもち病菌とツバキ科に病原性を持つもち病菌との系統関係についても興味もたれる。

## 5. 謝辞

本探索では、多くの方々にご支援とご協力をいただいた。台湾・行政院農業委員會林業試験所森林保護組傅春旭博士および台湾・国立台湾大學植物病理與微生物學系施欣慧氏、マレーシア科学大学生物科学部 Baharuddin Bin Salleh 教授には、各国での全行程での探索に同行していただき、多大なご協力をいただいた。台湾・国立台湾大學生物資源暨農學院實驗林管理處蕭文偉博士には南投縣での探索に同行いただき、多大なご助力およびご助言をいただいた。また、台湾茶業関係者および

生産者の方々、ならびにマレーシア農業研究所茶業部関係者および生産者の方々には、探索期間中多くの情報とご助言をいただいた。ここに記して、深く感謝の意を表する。

## 6. 参考文献

- 1) Boekhout, T., Fell, J.W. and O' Donnell, K. (1995). Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the *Ustilaginales* and *Tilletiales*. *Studies in Mycology* 38: 175-183.
- 2) 江塚昭典 (1955). 茶餅病菌及びツツジ餅病菌の人工培養. 東近農試研報 (茶) 3: 28-53.
- 3) 江塚昭典・安藤康雄 (1994). チャの病害. pp. 138-169. 日本植物防疫協会, 東京.
- 4) Fell, J.W., Boekhout, T. and Freshwater, W. (1995). The role of nucleotide sequence analysis in the systematics of the yeast genera *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. *Studies in Mycology* 38: 129-146.
- 5) Nagao, H., Akimoto, M., Kishi, K., Ezuka, A. and Kakishima, M. (2003). *Exobasidium dubium* and *E. miyabei* sp. nov. causing Exobasidium leaf blisters on *Rhododendron* spp in Japan. *Mycoscience* 44:1-9.
- 6) 大石貞男. (2004a) 日本茶業発達史. pp.440-465. 農山漁村文化協会, 東京.
- 7) 大石貞男. (2004b). 茶の栽培と製造 II. pp. 348-354. 農山漁村文化協会, 東京.
- 8) White, T.J., Bruns, T., Lee, S.B. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Gelfand, M., Sninsky, D. and White, T. (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. pp. 315-322. Academic Press, San Diego.

## Summary

We surveyed Exobasidium blister of tea at 16 locations in Taiwan and at 7 locations in Malaysia. We obtained 8 isolates of *Exobasidium vexans* in Taiwan and 3 ones in Malaysia. There is difference in the requirement of nutrient on Difco Czapeck medium for germination of basidiospores of Taiwan isolates. Malaysia isolates are different from those collected in Japan and Taiwan in the requirement of nutrient for germination of basidiospores. Isolates of *E. vexans* collected were examined in ITS and/or 28SrRNA regions for homology search. These isolates showed 98-100% homology with Japanese isolates. Sixteen isolates of *Exobasidium* spp. collected in Taiwan and Malaysia were deposited first time in Genebank by this exploration.



表 3. 分離菌株一覧

標本番号 NIAES	菌株番号 MAFF	採集年月日	採 集 地	宿主植物	発芽試験結果 <sup>1), 2)</sup>			形態による同定結果	データベース登録番号	
					培地 1	培地 2	培地 3		ITS	28SrDNA
1461004	239976	2005年 4 月 27 日	台湾 台北縣石碇	<i>C. sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	+	+	-	<i>E. vexans</i>		AB262783
1461005	239977	4 月 27 日	台北縣木柵	<i>R. × pulchrum</i> <i>R. × mucronatum</i>	*	*	*	<i>Exobasidium</i> sp.	AB262797	AB262782
1461006	239978	4 月 27 日	台北縣木柵	<i>C. tenuifolia</i>	*	*	*	<i>E. camelliae-oleiferae</i>	AB262798	AB262794
1461008	239979	4 月 28 日	宜蘭縣玉蘭	<i>C. sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	+	+	-	<i>E. vexans</i>		AB262784
1461009	239980	4 月 28 日	宜蘭縣玉蘭	<i>C. sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	+	+	-	<i>E. vexans</i>		AB262785
1461011	239981	4 月 28 日	宜蘭縣三星	<i>C. sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	-	+	-	<i>E. vexans</i>		AB262786
1461014	239982	4 月 29 日	福山植物園	<i>R. rubropilosum</i> var. <i>rubropilosum</i>	*	*	*	<i>Exobasidium</i> sp.	AB262799	AB262795
1461015	239983	4 月 29 日	福山植物園	<i>R. simsii</i>	*	*	*	<i>Exobasidium</i> sp.	AB262800	AB262796
1461024	239984	5 月 1 日	台北縣陽明山	<i>R. oldhamii</i>	*	*	*	<i>E. formosanum</i>	AB262801	AB264780
1461027	239985	5 月 2 日	南投縣魚池	<i>C. sinensis</i>	+	+	-	<i>E. vexans</i>		AB262787
1461032	239986	5 月 3 日	南投縣茶業改良場魚池分場	<i>C. sinensis</i>	+	+	-	<i>E. vexans</i>		AB262788
1461039	239987	5 月 4 日	台大実験林清水溝營林區	<i>C. sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	?	?	?	<i>E. vexans</i>		AB262789
1461048	239988	5 月 4 日	台大実験林清水溝營林區	<i>C. sinensis</i>	*	+	*	<i>E. vexans</i>		AB262790
1461056	-	2006年 1 月 28 日	マレーシア キヤメロン ハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> (L.)O.Kuntze var. <i>assamica</i> (Mast.)Kitam.	+	+	+	<i>E. vexans</i>		
1461057	-	1 月 28 日	キヤメロンハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		
1461058	-	1 月 28 日	キヤメロンハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		
1461059	239989	1 月 28 日	キヤメロンハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		AB262791
1461060	-	1 月 29 日	キヤメロンハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		
1461070	239990	1 月 30 日	キヤメロンハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		AB262792
1461071	-	1 月 30 日	キヤメロンハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		
1461072	-	1 月 30 日	キヤメロンハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		
1461073	239991	1 月 30 日	キヤメロンハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		AB262793
1461074	-	2 月 1 日	キヤメロンハイランド (パハン州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		
1461075	-	2 月 3 日	コタレンゴン (ペラ州)	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	+	+	+	<i>E. vexans</i>		

1) + : 発芽、 - : 未発芽、 \* : 試験せず、 ? : 汚染により不明  
 2) 培地 1 - ビオチン添加, 培地 2 - パントテン酸添加, 培地 3 - チアミン添加

## 微生物の探索収集プロフィール



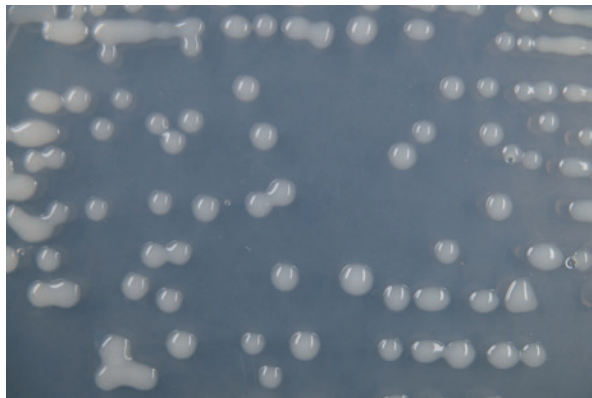
探索収集地である北海道十勝の芽室圃場(斎藤)



コムギより分離した植物内生酵母の外観(斎藤)



ダイズ根粒の着生状況(桑田)



根粒菌のコロニー(桑田)



台湾・宜蘭縣玉蘭 Ilang(Yilang)のウーロン茶向け茶園での探索(長尾)



マレーシア・キャメロンハイランドの紅茶向け茶園での探索(長尾)