

チャ輪斑病菌の収集と QoI 剤感受性の評価

山田 憲吾^{a)}

農研機構 野菜茶業研究所

[〒428-8501 静岡県島田市金谷猪土居 2769]

Collection of *Pestalotiopsis* causing tea gray blight and their sensitivity to QoI fungicides

Kengo YAMADA^{a)}

NARO Institute of Vegetable and Tea Science

1. 目的

輪斑病は我が国におけるチャ (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) の重要病害の一つである (西島, 2008). その病原菌は *Pestalotiopsis theae* (Sawada) Steyaert と *P. longiseta* (Speg.) K. Dai & Tak. Kobay. の 2 種である. 主にチャ葉の機械収穫によって葉に形成された傷口から発病し, 同心円状の輪紋を有する円形~V 字型の大型壊死病斑を生じる. 茎では壊死が傷口から下方に進展し, 葉の着生部に到達すると腋芽を枯死させる. また, 新梢の基部で自然に生じた傷口から発病すると, 上部への水分供給が絶たれて新梢全体が枯死する新梢枯死症状を呈する. 輪斑病の防除には, 治療効果を有し卓効を示すアゾキシストロビン水和剤が基幹薬剤として広く使用されている. しかし, アゾキシストロビンを含む QoI 剤は耐性菌の発生リスクが高いことが明らかとなっており, チャ輪斑病菌でも 2008 年に鹿児島県で QoI 剤耐性菌の出現と, それによる栽培現場における QoI 剤の効力低下が確認された. そこで, 他の地域における QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の発生状況を明らかにするため, 国内各地で輪斑病菌を採集して QoI 剤感受性を調査した. なお, 本成果の一部はすでに原著論文などで発表している (園田・山田, 2012 ; Yamada and Sonoda, 2012).

2. 材料および方法

1) 菌株の採集, 分離および QoI 剤感受性予備検定

2009~2012 年に静岡県, 埼玉県, 香川県, 高知県, 滋賀県および三重県の茶園において輪斑病罹病葉を採集した (表 1). アゾキシストロビン 100 mg/L および没食子酸 *n*-プロピル 2 mM を添加した PDA 培地 (栄研化学) を用いて, 菌の分離および QoI 剤感受性の予備検定を行った. すべ

a) (現所属) 農研機構 果樹茶業研究部門 Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO
[〒428-8501 静岡県島田市金谷猪土居 2769]

ての試験において、アゾキシストロピンは市販の水和剤（アミスター20フロアブル，シンジェンタジャパン）を用いた。罹病葉を25℃の湿室で2～4日間静置して病斑上に形成された分生子を培地に接種し，25℃で4日間培養後に菌叢直径が10 mm以上となったものを高度耐性，4日後の生育がないかごくわずかで7日後に明確な生育が認められたものを中度耐性，7日後まで生育が認められなかったものを感受性と判定した。予備検定終了後，ブラックライト（BLB）蛍光ランプ照射下で培養を継続して分生子を形成させ，単孢子分離菌株を得た。

2) 特性調査

(1) 同定

オートクレーブ滅菌したチャ葉に供試菌株を接種し，25℃，BLB照射下で2～3週間培養後に形成された分生子の形態から菌種を同定した。また，マイクロウェーブ法 (Ferreira and Glass, 1996) で抽出したDNAを鋳型として，ITS4およびITS5プライマー (White et al., 1990) を用いてリボソームRNA遺伝子のinternal transcribe spacers (ITS) 領域を増幅し，ダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定した。

(2) 病原性

圃場の茶樹（品種「やぶきた」）から切り離したチャ成葉に十字形（約3×3mm）に付傷し，分生子を塗抹して25℃，12時間照明の湿室に静置した。接種10日後に病斑形成の有無を判定した。

(3) QoI 剤感受性

供試菌株をPDA培地，25℃で4～5日間培養し，6 mm径の菌叢ディスクを切り取って，所定濃度のアゾキシストロピンおよび没食子酸 *n*-プロピル 2 mMを含むPDA培地に置床した。25℃，暗黒下で4日間培養後に菌叢直径を測定して，生育阻害率（1 - アゾキシストロピン添加区の菌叢伸長量 / アゾキシストロピン無添加区の菌叢伸長量 × 100）を薬剤濃度の対数に対してプロットし，50%生育阻害濃度（EC₅₀）を算出した。一部の菌株のQoI剤感受性は，各薬剤濃度における菌叢生育の有無から決定した最小生育阻止濃度（MIC）またはアゾキシストロピン濃度100 mg/Lにおける生育阻害率で示した。

(4) チトクローム *b* 遺伝子型

QoI剤の作用点であるチトクローム *b* の遺伝子型をシーケンス解析またはマルチプレックスPCR-RFLP法により決定した。シーケンス解析では，マイクロウェーブ法 (Ferreira and Glass, 1996) またはDNeasy Plant Mini Kit (キアゲン) で抽出したDNAを鋳型とし，RSCBF1およびRSCBR2プライマー (Ishii et al., 2001) を用いたPCRによってチトクローム *b* 遺伝子の部分配列を増幅してダイレクトシーケンス，もしくはクローニング後にシーケンス解析を行った。マルチプレックスPCR-RFLP法はYamada and Sonoda (2012)の方法によって行った。

3. 結果および考察

1) 菌種および病原性

チャ輪斑病病斑から分離した *Pestalotiopsis* 属菌50菌株はすべて，チャに対して強い病原性を示

表 1. 供試菌株の来歴と特性

MAFF番号	採集地	採集年	ITS領域 菌種 ^{a)} 塩基配列 ^{b)}	QoI剤		チトクローム <i>b</i>	
				耐性 ^{c)}	EC ₅₀ ^{d)}	遺伝子型 ^{e)}	塩基配列 ^{b)}
752021	静岡県島田市	2009	PI AB758106	S	(0.39)	WT(-)	AB713421
752022	静岡県島田市	2009	PI AB758107	HR	(>800)	G143A(-)	AB713422
752023	静岡県牧之原市	2009	PI	S	(0.2)	WT(-)	未登録
752024	静岡県牧之原市	2009	PI 未登録	HR	(>800)	G143A(-)	未登録
752025	静岡県牧之原市	2009	PI	S	(0.2)	WT(-)	未登録
752026	静岡県牧之原市	2009	PI	HR	(>800)	G143A(-)	未登録
752027	静岡県島田市	2009	PI	S	(0.2)	WT(-)	未登録
752028	静岡県島田市	2009	PI	HR	(>800)	G143A(-)	未登録
752029	静岡県御前崎市	2009	PI	HR	(>800)	G143A(-)	
752030	静岡県御前崎市	2009	PI	S	(0.2)		
752031	静岡県御前崎市	2009	PI AB758111	MR	1.2	F129L(+)	AB713426
752032	静岡県御前崎市	2009	PI 未登録	MR	2.9	F129L(+)	未登録
752033	静岡県御前崎市	2009	PI AB758108	MR	1.3	F129L(-)	AB713423
752034	静岡県御前崎市	2010	PI AB758110	HR	(54%)	G143A(+)	AB713425
752035	静岡県御前崎市	2010	PI 未登録	MR	1.6	F129L(-)	
752036	静岡県御前崎市	2010	PI 未登録	S	0.03	WT(-)	
752037	静岡県御前崎市	2010	PI	S	0.03	WT(-)	
752038	静岡県御前崎市	2010	PI 未登録	HR	(32%)	G143A(-)	未登録
752039	静岡県御前崎市	2010	PI	MR	1.9		
752040	静岡県御前崎市	2010	PI 未登録	MR	1.3	F129L(-)	未登録
752041	静岡県御前崎市	2010	PI AB758109	S	0.03	WT(+)	AB713424
752042	静岡県牧之原市	2010	PI	S	0.02		
752043	静岡県島田市	2010	PI	S	0.01		
752044	静岡県御前崎市	2010	PI	S	0.02		
752045	静岡県御前崎市	2010	PI	MR	2.1	F129L(-)	
752046	静岡県島田市	2010	PI	HR	(41%)		
752047	静岡県島田市	2010	PI	HR	(29%)		
752048	静岡県島田市	2010	PI 未登録	HR	(16%)	G143A(+)	未登録
752049	静岡県牧之原市	2010	PI	MR	2.0	F129L(-)	
752050	静岡県牧之原市	2010	PI	MR	1.4	F129L(-)	
752051	静岡県島田市	2010	PI 未登録	S	0.06	WT(+)	未登録
752052	埼玉県入間市	2009	PI	S	0.02		
752053	埼玉県入間市	2009	Pt	S	0.01		
752054	埼玉県所沢市	2009	PI	S	0.03		
752055	埼玉県所沢市	2009	PI	S	0.03		
752056	香川県まんのう町	2009	PI	S	0.03		
752057	香川県三豊市	2009	PI	S	0.04		
752058	高知県大豊町	2009	Pt	S	0.01		
752059	滋賀県甲賀市	2011	PI	S	0.02		
752060	滋賀県甲賀市	2011	PI	HR	(24%)		
752061	静岡県牧之原市	2010	PI	HR	(30%)		
752062	香川県三豊市	2009	PI	S	0.01		
752063	香川県高松市	2009	PI	S	0.07		
752064	三重県松坂市	2012	PI	S	0.01		
752065	三重県松坂市	2012	PI	S	0.02		
752066	三重県鈴鹿市	2012	PI	S	0.02		

表 1. (つづき)

MAFF番号	採集地	採集年	菌種 ^{a)}	ITS領域 塩基配列 ^{b)}	QoI剤		チトクローム <i>b</i>	
					耐性 ^{c)}	EC ₅₀ ^{d)}	遺伝子型 ^{e)}	塩基配列 ^{b)}
752067	三重県鈴鹿市	2012	PI		S	0.02		
752068	三重県四日市市	2012	PI		S	0.03		
752069	三重県四日市市	2012	PI		S	0.02		
752070	三重県四日市市	2012	PI		S	0.05		

a) PI: *P. longiseta*, Pt: *P. theae*.

b) DDBJアクセション番号, 空欄は未調査.

c) HR: 高度耐性, MR: 中度耐性, S: 感受性.

d) カッコ内の数値はMICまたはアゾキシストロビン濃度100mg/Lにおける生育阻害率.

e) カッコ内の記号 (+/-) はイントロンの有無, 空欄は未調査.

した. 菌種は 48 菌株が *P. longiseta*, 2 菌株が *P. theae* であった (表 1). 過去の調査では, 全国的には *P. longiseta* が大部分を占めたものの, *P. theae* も多くの府県で分離され, 埼玉県, 徳島県および熊本県では *P. theae* が過半数を占めた (鬼木ら, 1986). これに対し現在の種構成は著しく単純化していたが, 埼玉県および高知県でそれぞれ 1 菌株のみではあるが *P. theae* が検出されたことから, 輪斑病菌の種構成は現在も地域によって異なる可能性が示唆された. *P. longiseta* 14 菌株の ITS 領域の塩基配列を解析した結果, すべての菌株で既報の配列 (AB482206 [MAFF752008]) と 100% 一致した. このうち 6 菌株の配列を DDBJ に登録した (表 1).

2) QoI 剤感受性およびチトクローム *b* 遺伝子型

菌株の分離時に行った予備検定において感受性と判定された *P. longiseta* 菌株の EC₅₀ は 0.01~0.07 mg/L (平均 0.027 mg/L) であったのに対し, 中度耐性菌株は 1.2~2.9mg/L (平均 1.74mg/L) で resistance factor (RF; 耐性菌と感受性菌の EC₅₀ の比) は 64.4 であった (表 1). 高度耐性菌株は最高濃度の 100 mg/L における生育阻害率が 16~54 % で, EC₅₀ および RF は算出できなかった (表 1). チトクローム *b* 遺伝子を解析した結果, 増幅産物中にイントロンと推測される配列を含む菌株と含まない菌株があり, いずれのタイプの菌株においても中度耐性菌株はすべて F129L 変異, 高度耐性菌株はすべて G143A 変異を有していた (表 1). これらの変異を除くと, エキソンおよびイントロンの塩基配列はすべての菌株で完全に一致した. 以上の結果から, 静岡県ではすでに耐性菌が広く分布しており, チトクローム *b* 遺伝子の F129L 変異による中度耐性菌と G143A 変異による高度耐性菌の 2 種類の耐性菌が存在することが明らかとなった. また, 薬剤耐性の問題が顕在化していない滋賀県において 1 菌株のみではあるが高度耐性菌が検出されたことから, 他の未検出地域においても耐性菌が低頻度で存在する可能性が示唆された.

4. 謝辞

本研究は現・農研機構九州沖縄農業研究センターの園田亮一氏との共同研究として実施した. また, 埼玉県茶業研究所の小俣良介氏には菌株を提供して頂いた. ここに記して深謝の意を表する.

5. 参考文献

- Ferreira, A.V.B. and Glass, N.L. (1996). PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genet. Newsl.* 43: 25–26.
- Ishii, H., Fraaije, B.A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T. and Hollomon, D.W. (2001). Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91: 1166–1171.
- 西島卓也 (2008). 茶大百科 第2巻 (農山漁村文化協会編). pp. 537–538, 農山漁村文化協会, 東京.
- 鬼木正臣・成澤信吉・安藤康雄 (1986). 我が国の主要チャ産地におけるベンズイミダゾール系殺菌剤耐性輪斑病菌の発生実態. *茶研報* 64: 29–33.
- 園田亮一・山田憲吾 (2012). 2009–2011年の静岡県牧ノ原台地における QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の分布. *日植病報* 78: 200. (講要)
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR protocols: a guide to methods and applications (Innis, A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J. and White, T.J., eds.). pp. 315–322, Academic Press, San Diego.
- Yamada, K. and Sonoda, R. (2012). Characterization of moderate resistance to QoI fungicides in *Pestalotiopsis longiseta* and polymorphism in exon-intron structure of cytochrome *b* gene. *J. Gen. Plant Pathol.* 78: 398–403.