

植物防疫基礎講座：

植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル 2016

(12) チャ輪斑病

—QoI 剤 (培地・遺伝子検定)—

農研機構 果樹茶業研究部門 やま山 だ田 けん憲 こ吾

はじめに

チャ輪斑病菌 *Pestalotiopsis longiseta* の QoI 剤耐性菌は 2008 年に鹿児島県で初めて検出された (富濱ら, 2009)。その後の調査で、静岡県でもすでに主要な茶産地において QoI 剤耐性菌がまん延していることが判明した (外側, 2015)。輪斑病の防除に使用できる殺菌剤の中で QoI 剤は治療効果を有するほぼ唯一の薬剤であることから、QoI 剤耐性菌の存在は輪斑病の防除を行ううえで大きな障害となっている (尾松, 2012; 外側, 2015)。

ここでは、チャ輪斑病菌の QoI 剤感受性の培地検定法および遺伝子検定法について解説する。

I 培地検定

多くの植物病原菌と同様にチャ輪斑病菌でも、QoI 剤は培地上において単独では十分な生育抑制効果を示さない。培地に alternative oxidase 阻害剤として没食子酸 *n*-プロピルを加えることで感受性菌の生育が完全に抑制され、判定が容易になる。輪斑病菌は培地上での生育が速く、また病斑上に大型で採取しやすい分生子塊を形成することから、菌の分離を経ずに病斑上の分生子を直接培地に接種することで検定が可能である。

1 サンプリング

1 圃場につき罹病葉 20 枚以上を目安とし、圃場全体から無作為に採集する。乾燥状態で冷蔵すれば 3 年以上保存できる。罹病葉を 25℃ の湿室に 2～4 日間静置し、病斑上に黒色で角状～球状の分生子塊を形成させる。水分が多すぎると分生子塊が崩れて検定しづらくなる。病斑上に雑菌が繁殖することもあるが検定に支障を来すことはない。

2 検定培地

ポテトデキストロース寒天培地 (PDA) を基礎培地と

し、アゾキシストロビン 100 ppm および没食子酸 *n*-プロピル 2 mM (いずれも終濃度) を加用する。対照には没食子酸 *n*-プロピルのみを加用する。アゾキシストロビンは市販の 20% 水和剤 (商品名: アミスター 20 フロアブル) を用い、培地の 1/2,000 量を添加して終濃度を約 100 mg/l とする。没食子酸 *n*-プロピルはエタノールまたはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して 200 mM のストック溶液とし、培地の 1/100 量を添加する。

3 検定

病斑上の分生子を先細ピンセットで取り、対照培地および検定培地に分生子を付着させる。サンプルごとにピンセットの先端を火炎滅菌する。分生子塊の状態だと感受性菌でも検定培地上でわずかに生育することがあるので、ピンセットで分生子塊を強く挟んで押しつぶしてから付着させるとよい。

4 判定

25℃ で 4 日間培養後に検定培地上でコロニー直径 10 mm 以上に生育したものを高度耐性、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等度耐性、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する (図-1)。分離・同定が必要なときは検定終了後、ブラックライト (BLB) 蛍光ランプまたは室内散光下で培養を続けて分生子を形成させ、単孢子分離または形態観察する。

5 50% 生育阻止濃度 (EC₅₀)

薬剤感受性の程度は EC₅₀ で評価する。検定培地は PDA に没食子酸 *n*-プロピル (終濃度 2 mM) と 1/9 量の供試薬剤希釈液を加えて所定の薬剤濃度にする。単孢子分離菌株を PDA で 5 日間程度培養し、コロニー周縁部から打ち抜いた菌そうディスク (直径 6 mm) を検定培地に置床する。25℃ で 4 日間培養後にコロニー直径を測定し、菌そうディスク直径分を減じてコロニー伸長量を算出する。アゾキシストロビンの EC₅₀ は感受性菌で 0.01～0.07 mg/l、中等度耐性菌で 1.2～2.9 mg/l である。高度耐性菌は薬剤濃度 10 mg/l 以上において生育阻害率が最大 50% 程度で頭打ちとなる。

Methods for Detecting QoI Fungicide Resistance in *Pestalotiopsis longiseta*. By Kengo YAMADA

(キーワード: チャ輪斑病, QoI 剤, 薬剤感受性検定法)