

## 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(20)

## チャ炭そ病菌・輪斑病菌・赤葉枯病菌

静岡県茶業試験場 <sup>にし</sup>西 <sup>じま</sup>島 <sup>たく</sup>卓 <sup>や</sup>也

## ——チャ炭そ病菌——

## はじめに

チャ炭そ病は全国の茶産地で普遍的に発生がみられるチャの最重要病害である。

チャ炭そ病の防除には TPN 剤、銅剤などの非選択性の保護殺菌剤が古くから使用されてきたが、チオファネートメチル剤（1975 年登録）とベノミル剤（1980 年登録）のベンゾイミダゾール系薬剤は、チャ炭そ病に対して治療効果を有し、卓効を示すことから、急速に普及した。しかし、チオファネートメチル剤の登録 3 年後の 1978 年には、鹿児島県でベンゾイミダゾール系薬剤に耐性を示すチャ炭そ病菌 (*Colletotrichum theae-sinensis*) の出現が確認された（野中, 1979）。その後、全国の茶生産府県においても耐性菌の発生が確認されている（鬼木ら, 1985）。

ここではベンゾイミダゾール耐性チャ炭そ病菌の検定法について紹介する。

## 1 病原菌の分離方法

チャ炭そ病菌では、同一病斑上にベンゾイミダゾール耐性菌と感受性菌が混在することは知られていない（野中, 1979）。したがって、検定には必ずしも単孢子分離菌を用いる必要はない。

病斑上に分生子層を形成している病葉を採集し、25°C の湿室に保持する。2~3 日後には病斑上の分生子層から黄白色粘質の分生子塊が噴出されるので、そこから実体顕微鏡下で分生子を少量かき取り、PDA 培地または PSA 培地に移植する。分離用培地には細菌の繁殖を抑えるために、乳酸もしくはクロラムフェニコールなどの抗生物質を加えておく。この方法による分離は効率的で、雑菌の混入も少ない。ただし、古い病葉では炭そ病菌の分生子塊に混じって、しばしば赤葉枯病菌 (*Glomerella cingulata*) の分生子塊が生じたり、他の雑菌が繁殖して

分離の際に支障となる。分離には雑菌の汚染が少ない分生子層形成初期の病葉が適している。

病葉は圃場全体からランダムサンプリングし、分離に当たっては 1 病葉につき 1 菌株を原則とする。圃場内の耐性菌の発生状況を知るためには、1 圃場について少なくとも 20 菌株を検定に供試する。

## 2 検定方法と判定基準

市販のチオファネートメチル 70% 水和剤またはベノミル 50% 水和剤を滅菌蒸留水に懸濁し、所定濃度の 10 倍液を PDA 培地または PSA 培地に 1:9 の割合で混和し、平板を作製する。最小生育阻止濃度 (MIC) を求める場合は有効成分濃度 100 µg/ml を基準とした倍数希釈系列に調整するが（櫻井, 1975）、耐性菌の判定と耐性程度の識別をするのが目的であれば、有効成分濃度は 0, 1, 100 µg/ml とすればよい。

チオファネートメチル剤は培地に添加してから加圧滅菌すると、培地の加圧滅菌後に添加した場合に比べて MIC 値は低くなり、ベノミル剤の MIC 値と一致する（野中, 未発表）。そこで、チオファネートメチル剤を用いる場合は、培地を加圧滅菌する前に加えておく。

耐性菌の発生状況を迅速に知るために、分離後の生育菌叢をそのまま検定に供試する。分離後 25°C で 5 日間培養した菌叢の周縁部をコルクボーラなどで打ち抜き、菌叢ディスクの菌叢面を検定培地に接触するように置床し、25°C で 5 日間培養する。

チャ炭そ病菌のベンゾイミダゾール系薬剤に対する MIC 値は、感受性菌では 0.10~0.20 µg/ml、中等度耐性菌では 3.13~25 µg/ml、高度耐性菌では 800 µg/ml 以上となる（野中, 1982a: 図-1）。そこで、1 µg/ml で生育しない菌株を感受性菌、1 µg/ml で生育し 100 µg/ml で生育しない菌株を中等度耐性菌、100 µg/ml でも生育する菌株を高度耐性菌と判定する（野中, 1982a）。

鬼木ら（1985）は、病葉に形成させた分生子を直接薬剤を添加した検定培地に移植し、25°C、5 日間培養した後、チャ炭そ病菌の検出の有無から耐性菌の判定を行っている。この方法を用いれば耐性菌の判定までの期間をさらに短縮できる。なお、この場合、分離の良否が問題であり、検定数を確保するために、病葉は目標の検定数

Methods for Monitoring Fungicide Resistance—Tea Anthracnose (*Colletotrichum theae-sinensis*), Tea Gray Blight (*Pestalotiopsis longiseta*) and Tea Brown Blight (*Glomerella cingulata*). By Takuya NISHIJIMA

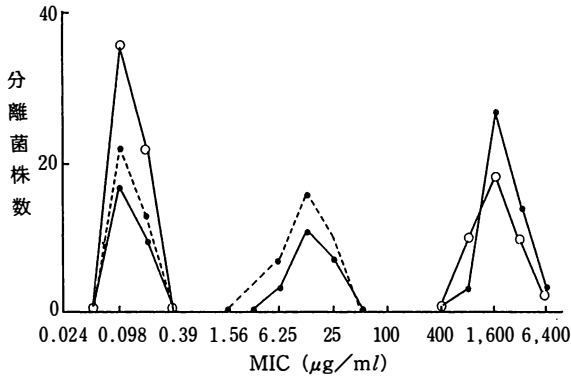


図-1 チャ炭そ病菌のチオファネートメチル剤及びペノミル剤に対する感受性(野中, 1982a)  
 ●-----●: 中等度耐性菌単独発生型  
 ○————○: 高度耐性菌単独発生型  
 ●————●: 中等度・高度耐性菌混在発生型

の2倍程度準備し、分離の際は雑菌の汚染がなく、分生子塊の形成状態の良い病葉を用いる。

3 簡易検定法

野中(1982b)は、ベンゾイミダゾール系薬剤が病斑上の分生子形成を阻害することに着目し、薬液に浸漬した病葉をインキュベートした後、病斑上の分生子塊形成の有無によって耐性菌を識別する簡易検定法を考案している。

分生子層を形成している病葉を1圃場当たり100~200葉採集する。病葉は三等分し、うち二つをチオファネートメチル70%水和剤5,000倍液と1,000倍液にそれぞれ数秒間浸漬し、風乾する。処理した病葉は20~30°Cの温室に保持し、約5日後に病斑上の分生子塊形成の有無を調査する。採取した病葉が分生子形成能力を有しているか確認するために、残りの病葉は、そのまま温室に保持し、同様に分生子塊形成の有無を調査しておく。

分生子塊の形成は肉眼でも観察可能であるが、ルーペまたは実体顕微鏡下で観察したほうが確実で、判定を誤る危険が少ない。

感受性菌による病葉では、チオファネートメチル70%水和剤5,000倍液で分生子塊の形成が完全に阻害されるが、耐性菌による病葉は5,000倍液でも分生子塊を形成する。さらに、高度耐性菌では1,000倍液でも形成が認められる。そこで、5,000倍液で分生子塊が形成された病葉を全耐性菌によるもの、また、1,000倍液での分生子塊形成病葉を高度耐性菌に基づくものと判定して耐性菌の検出率を求める。中等度耐性菌は全耐性菌率から高度耐性菌率を減じれば算出できる。

この方法による検定結果は、分離菌を用いた検定結果

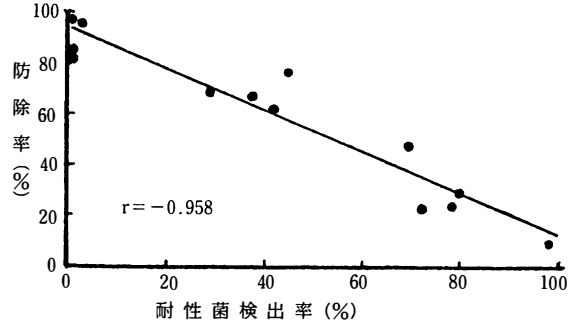


図-2 高度耐性菌検出率とチオファネートメチル剤の防除効果との関係(野中, 1979)

とほぼ一致し、かなり正確に耐性菌の発生状況を知ることができる。しかも、特別な器具、設備を必要としないので、栽培者自身でも検定が可能である。

4 防除効果との関係

野中(1979)は、伝染源である前茶期の病葉の高度耐性菌検出率と、次茶期でのチオファネートメチル70%水和剤1,500倍の防除効果との関係を検討し、高度耐性菌検出率と防除率に高い負の相関を認めている(図-2)。

また、野中(1982a)は中等度耐性菌についても同様に検討したが、検出率が高い圃場でも比較的高い薬剤防除効果が得られる事例があり、相関はそれほど高くはないとしている。一方、安藤ら(1986)は中等度耐性菌を接種し、チオファネートメチル70%水和剤1,500倍の効果を検討したが、全く効果が認められなかったとしている。

5 今後の問題点

近年、チャ炭そ病の防除にDMI剤が普及している。同剤の連用は耐性菌の発生を招く恐れがあり、耐性菌のモニタリングが必要となっている。しかし、DMI剤に対するチャ炭そ病菌の感受性検定の事例は少なく、検定法も十分に検討されていないことから、今後、検定法の確立とともに感受性のベースラインデータを早急に検討する必要がある。

引用文献

- 1) 安藤康雄ら(1986):茶業研究報告 63:67(講要).
- 2) 野中寿之(1979):九病虫研会報 25:61~63.
- 3) ———(1982a):同上 28:100~102.
- 4) ———(1982b):茶業研究報告 55:113(講要).
- 5) 鬼木正臣ら(1985):同上 61:7~11.
- 6) 櫻井 寿(1975):植物防疫 29:206~212.

——チャ輪斑病菌——

はじめに

チャ輪斑病の病原菌には *Pestalotiopsis theae* と *P.*

*longiseta* の2種がある。*P. theae* によるチャ輪斑病は発生が少なく、ほとんど問題にならないが、*P. longiseta* によるチャ輪斑病には主要品種のやぶきたがきわめて罹病性で被害も大きい。*P. longiseta* は摘採時に生じる葉、莖の傷口や新梢基部の包葉などの離脱痕から感染し、発病に至る。新梢の場合はえ死部から上が枯死し、いわゆる新梢枯死症となる。

*P. longiseta* による輪斑病の防除剤として数種の薬剤が登録されているが、なかでもベンゾイミダゾール系薬剤は最も効果が高い(堀川, 1982)。静岡県では1978年から輪斑病の防除にチオファネートメチル剤が普及したが、1979年には同剤に対する耐性菌が出現した(堀川, 未発表)。その後の実態調査で、ベンゾイミダゾール耐性菌が静岡県下全域で高率に発生していることが確認されたため、1982年以降、静岡県では輪斑病防除への同薬剤の使用を中止している(堀川, 1986)。一方、他府県においても鬼木ら(1986)の実態調査により、耐性菌の発生が認められている。

*P. theae* にもベンゾイミダゾール耐性菌の発生が確認されているが(鬼木ら, 1986年)、ここでは *P. longiseta* のベンゾイミダゾール耐性菌の検定方法を紹介する。

### 1 病原菌の分離

供試菌は病葉から分離する。枯死した莖や新梢枯死症のえ死部は、赤葉枯病菌 (*Glomerella cingulata*) などが混在しているので分離には適さない。

*P. longiseta* では、同一病斑上にベンゾイミダゾール耐性菌と感受性菌が混在することはほとんどなく(堀川, 1987)、あえて単孢子分離をする必要はない。

病斑上に分生子層を形成している病葉を採集し、25°Cの湿室に保持する。2~3日後には分生子層から黒色の分生子塊が角状に伸びてくるので、そこから分生子を少量取り、乳酸もしくは抗生物質加用のPDA培地またはPSA培地の平板に移植し、供試菌を分離する

病葉は圃場全体からランダムサンプリングし、分離に当たっては1病葉から1菌株を原則とする。圃場の耐性菌の発生状況を知るためには、1圃場当たり少なくとも20菌株を検定に供試する。

### 2 検定方法と判定基準

市販のチオファネートメチル70%水和剤またはペノミル50%水和剤を滅菌蒸留水に懸濁し、所定濃度の10倍液をPDA培地またはPSA培地に1:9の割合で混和し、平板を作製する。耐性菌の検出と耐性程度の識別のためには、培地中の薬剤の有効成分濃度を0, 1, 100 µg/mlに調整して用いる。

チオファネートメチル剤は加圧滅菌前に培地に添加す

ることにより、感受性菌のMIC値が低くなり、ペノミル剤のMIC値と一致するようになる(堀川, 1986)。したがって、チオファネートメチル剤を用いる場合は培地に添加してから加圧滅菌する。

分離後、25°Cで5日間培養した菌叢の周縁部をコルクボーラなどで打ち抜き、菌叢ディスクの菌叢面を検定培地に接触するように置床し、25°Cで3日間培養する。

*P. longiseta* のペノミル剤に対するMIC値は、感受性菌では0.05~0.78 µg/ml、中等度耐性菌では3.13~25 µg/ml、高度耐性菌では800 µg/ml以上となる(堀川, 1986: 図-1)。そこで、1 µg/mlで生育しない菌株を感受性菌、1 µg/mlで生育し、100 µg/mlで生育しない菌株を中等度耐性菌、100 µg/mlでも生育する菌株を高度耐性菌と判定する。

堀川(1986)、鬼木ら(1986)は、病斑上に形成させた分生子を直接検定培地に移植し、菌叢生育の有無により耐性菌の判定を行っている。*P. longiseta* の分生子塊は大きいので分離は容易で、雑菌の汚染も少なく、この方法を用いても問題はない。むしろ、迅速に耐性菌を判定するには有効な手法である。ただし、移植する分生子の量が多いと、感受性菌でも検定培地上でわずかに菌叢生育が見られるので、移植する分生子の量はできるだけ少なくする。

### 3 防除効果との関係

チャの摘採時に高度耐性菌を接種し、その直後にベンゾイミダゾール系薬剤を散布した場合、全く防除効果が認められない(堀川, 未発表)。中等度耐性菌に対しては試験例がなく、防除効果との関係は明らかになっていない。

なお、ベンゾイミダゾール耐性菌の病原力は感受性菌と同等かやや強く、ベンゾイミダゾール系薬剤の使用を中止しても耐性菌の密度低下は容易に期待できない(堀

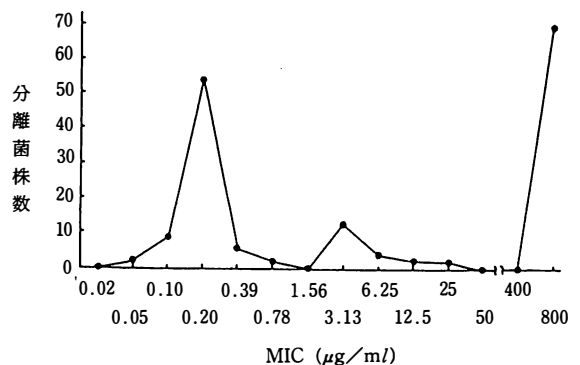


図-1 チャ輪斑病菌 (*Pestalotiopsis longiseta*) のペノミル剤に対する感受性(堀川, 1986)

川, 1987)。

#### 4 今後の問題点

現在、静岡県では *P. longisetata* による輪斑病の防除にカスガマイシン・銅水和剤がよく使用されているが、一方では、カスガマイシン耐性菌の発生が懸念されている(堀川, 1984)。しかしながら、カスガマイシン剤に対する感受性の検定方法がまだ確立されていないため、耐性菌の発生実態は全く把握できていない。

ところで、カスガマイシン剤は *P. longisetata* の分生子発芽や菌糸生育をほとんど阻害しないことから、その作用機構が不明であった (SHIBATA et al., 1988)。その後、安藤 (1993) は、本菌の病原性に深く関与する毒素であるオキシスポロンの生成をカスガマイシン剤が強く阻害することを確認した。したがって、カスガマイシン剤に対する感受性の指標に、MIC や  $EC_{50}$  (50%生育阻止濃度) を用いるのは不適當で、むしろ、毒素生成や病原性の面から判定するような方法を考案する必要がある。

#### 引用文献

- 1) 安藤康雄 (1993) : 野菜茶試研報 B.6 : 21~64.
- 2) 堀川知廣 (1982) : 茶業研究報告 56 : 45~56.
- 3) ——— (1984) : 植物防疫 38 : 275~279.
- 4) ——— (1986) : 静岡県茶業試験場報告 12 : 9~13.
- 5) ——— (1987) : 関西病虫研報 29 : 21~26.
- 6) 鬼木正臣ら (1986) : 茶業研究報告 64 : 29~33.
- 7) SHIBATA, T. et al. (1988) : 5th International Congress of Plant Pathology, Abstracts of papers : 325.

### ——チャ赤葉枯病菌——

#### はじめに

チャ赤葉枯病菌 (*Glomerella cingulata*) は、チャの健全な組織に潜在感染し (河野, 1965), 干害, 虫害, 排水不良や肥培管理の不良などにより、茶樹の生理活性が低下した場合に多発する。通常茶園では誘発する要因がなければ発病は少なく、一般にチャ赤葉枯病を対象とした防除はなされていない。

しかし、堀川 (1986) は、ベンゾイミダゾール系薬剤が慣行的に使用されている茶園から分離したチャ赤葉枯病菌に、ベノミル耐性菌の発生を確認している。

ここでは、堀川 (1986) の方法を中心に、ベノミル剤に対する感受性 (耐性) の検定法を紹介する。

#### 1 病原菌の分離法

チャ赤葉枯病は葉と茎に発生する。供試菌は病斑部から常法により組織分離することも可能であるが、操作が煩雑であり、病斑部に雑菌の汚染が多い場合には、必要

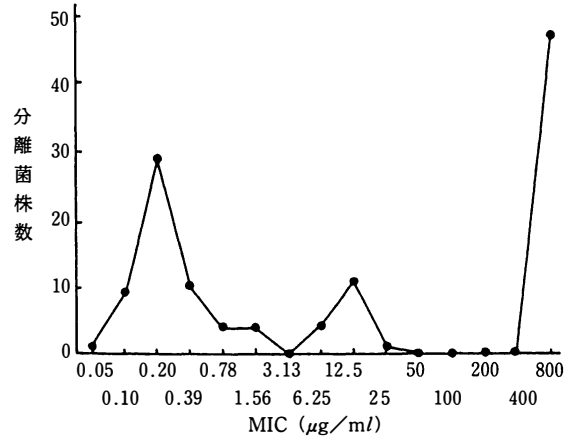


図-1 チャ赤葉枯病菌のベノミル剤に対する感受性 (堀川, 1986)

な菌株数を得難い。チャ赤葉枯病菌は外観健全な成葉や茎に潜在感染しているので、これらを 25°C の温室に数日間保持すると、しだいに葉柄部や葉縁鋸歯部が褐変し、薄紅色のチャ赤葉枯病菌の分生子塊が生じてくる。そこから分生子を少量取り、乳酸もしくは抗生物質を加用した PDA 培地または PSA 培地の平板に移植する方法が簡便で、効率がよい。

#### 2 検定方法と判定基準

市販のベノミル 50% 水和剤を滅菌蒸留水に懸濁し、所定濃度の 10 倍液を PSA 培地または PDA 培地に 1 : 9 の割合で混和し、平板を作製する。培地中の薬剤の有効成分濃度は 800~0.05 μg/ml になるように倍数希釈して調整する。分離後、25°C で 7~10 日培養した菌叢の周縁部をコルクボーラなどで打ち抜き、菌叢ディスクの菌叢面が検定培地に接触するように置床する。置床後は 25°C で 3 日間培養し、菌叢の生育の有無を調査して MIC 値を求める。

堀川 (1986) は、チャ赤葉枯病菌のベノミル剤に対する MIC 値を検討したところ、MIC 値の範囲が 0.05~1.56 μg/ml の菌群, 6.25~25 μg/ml の菌群, 800 μg/ml 以上の菌群に分かれたことから、それぞれを順に、感受性菌, 中等度耐性菌, 及び高度耐性菌とした (図-1)。

なお、耐性菌に対する薬剤の防除効果については、検討された例がなく、明らかになっていない。

#### 引用文献

- 1) 堀川知廣 (1986) : 日植病報 52 : 858~859.
- 2) 河野又四 (1965) : 近畿大学食品科学研究所 特別報告 1 : 31~40.