

特集：QoI 剤耐性菌の発生状況とその対策

煮沸チャ葉法によるチャ輪斑病菌の QoI 剤感受性検定

 農研機構 野菜茶業研究所 ^{やま}山 ^だ田 ^{けん}憲 ^こ吾

はじめに

チャ輪斑病は、我が国におけるチャの重要病害の一つである。病原菌 *Pestalotiopsis longiseta* (Spegazzini) Dai et Kobayashi は子のう菌類に属する不完全菌の一種で、葉や茎にできた傷口から感染してえ死を引き起こす。チャはバリカン型の管理機で新芽の摘採や枝の剪定を行うため、これによって生じた傷口から輪斑病菌が感染して葉枯れ・枝枯れ症状が発生することが多い。特に高温期にあたる 6～8 月の二番茶および三番茶摘採後に多く発生する。葉では同心円状の輪紋を有する円形～V 字形の大型え死病斑を形成し、病斑上に小黑点状の分生子層を散生または輪生する。茎では切断面から下方にえ死が進む。え死が葉の着生部に達すると腋芽が枯死する。また、新梢基部の包葉や不完全葉の脱落等によって生じた傷口から発病すると、上方への水分補給が断たれて新梢全体が枯死する新梢枯死症状を引き起こす。

一般に病害の防除では病原菌の感染前の予防的な殺菌剤散布が基本であるが、輪斑病菌は摘採による傷口から感染するため、予防的防除は摘採直前に行うことになり、実施が不可能である。また、輪斑病菌の感染行動は迅速で、好適条件下では傷口に付着した分生子が付傷後 2～3 時間で発芽して侵入を開始する。このため、防除は摘採後にできるだけ早く行う必要がある。予防剤の場合、摘採当日に散布しなければ十分な防除効果を得ることができず、翌日以降の散布では効果が劣る。しかし、労力の配分や周辺の未摘採圃場へのドリフトの問題から、摘採当日の防除の実施は困難である。一方、治療剤は摘採の 1～3 日後に散布しても、予防剤の当日散布と同等の防除効果を示す。このため、輪斑病の防除には治療剤の使用が不可欠である。

輪斑病に対する治療剤として、かつてはベンゾイミダゾール系薬剤 (MBC 剤) が広く用いられていたが、耐性の発達により防除効果が失われてしまった (堀川, 1986; 尾松ら, 2012)。その後、QoI 剤の一つであるアゾキシストロビン水和剤が輪斑病治療剤として使用され

るようになった。しかし、すでに広く知られているように QoI 剤は MBC 剤と同様に耐性リスクが高く、多くの植物病原菌で耐性の発達が問題となっている。輪斑病菌でも複数の地域で耐性菌の出現が確認されていることから (富濱ら, 2009; 園田・山田, 2012; 外側ら, 2012)、QoI 剤を今後も輪斑病の防除に使用し続けるためには定期的かつ継続的な耐性モニタリングが必須である (外側, 2014)。また、耐性菌の発生状況は同一地域内であっても個々の圃場ごとに大きく異なっており、モニタリングはできるだけきめ細かく実施する必要がある (園田・山田, 2012)。そこで、指導・普及機関や生産現場において実施が可能なチャ輪斑病菌の QoI 剤感受性簡易検定法として、寒天培地の代わりに煮沸したチャ葉を培養基質として用いる「煮沸チャ葉法」(図-1) を考案したので紹介する。

I 使用器具

本検定法に必要な器具は、チャ葉を煮沸するための鍋とコンロ、罹病葉サンプルと煮沸チャ葉を湿室に保つための密閉容器 (平型のシール容器が最適だが、バットや食品トレーをポリ袋に入れて密閉することで代用できる) とティッシュペーパー、薬液の調製に用いる計量器 (100 ml および 0.5 ml を計り取れるもの) とプラスチックカップ、分生子の接種に使う綿棒である。また、検定薬剤としてアゾキシストロビン水和剤 (アミスター 20 フロアブル) を使用する。

II サンプリング

検定する輪斑病罹病葉サンプルは 1 圃場当たり 20 枚を目安とし、圃場全体からまんべんなく採集する。すぐに検定を行わない場合は、過湿による腐敗を防ぐため、紙袋に入れて保存する。乾燥状態で冷蔵すれば 3 年間に以上保存できるが、短期間であれば室温でよい。検定に用いる分生子を形成させるため、あらかじめ罹病葉を室温 (20～30℃)、室内散光下の湿室に 2～4 日間静置し、病斑上に黒色で角状あるいは球状の分生子塊の形成を確認したら検定に移る。

Boiled Tea Leaf Method of QoI Sensitivity Assay for Tea Gray Blight Fungus, *Pestalotiopsis longiseta*. By Kengo YAMADA

(キーワード：チャ輪斑病, QoI 剤, 薬剤耐性菌, 簡易検定法)

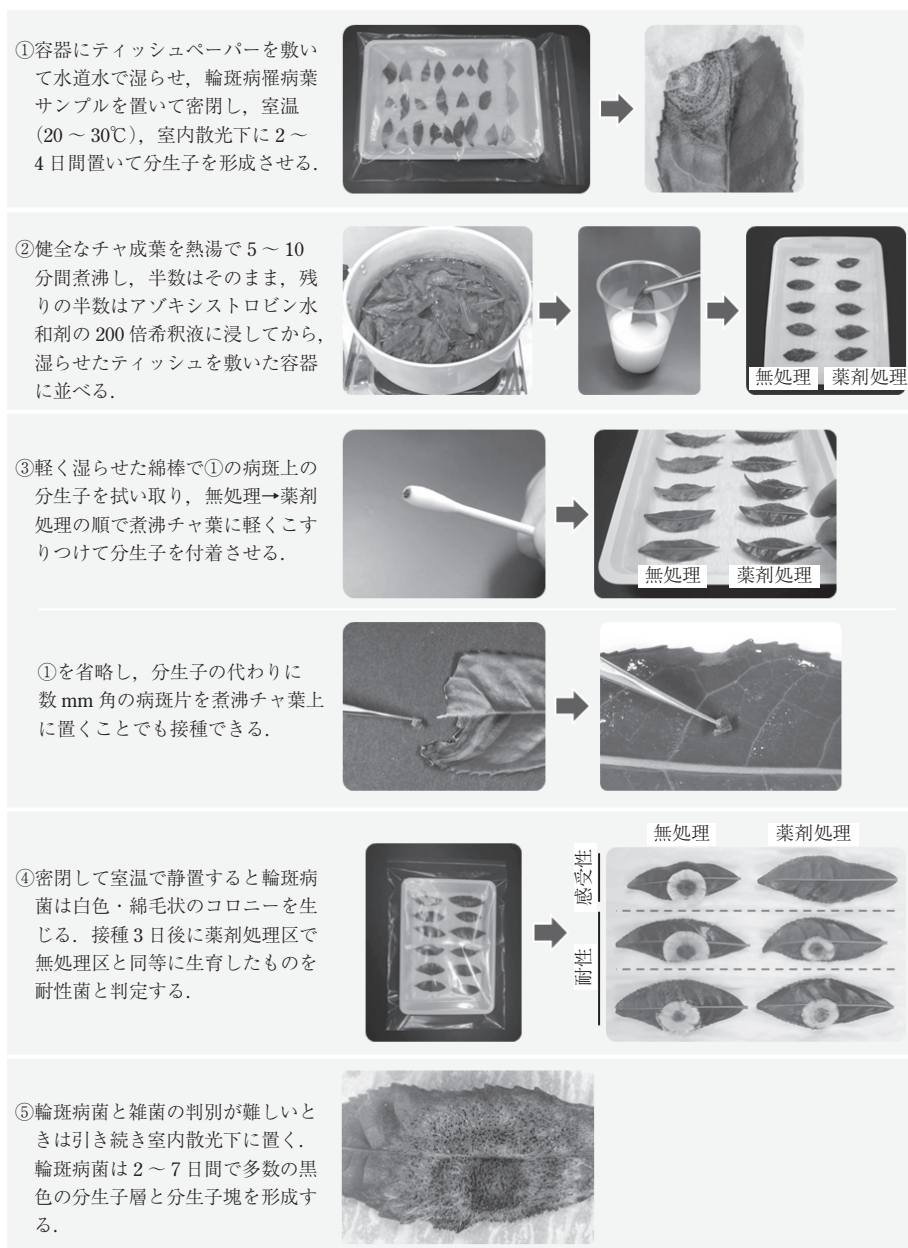


図-1 煮沸チャ葉法によるチャ輪斑病菌の QoI 剤感受性検定 (山田ら, 2014)

Ⅲ 検 定 方 法

最初に、圃場から健全なチャ成葉(サンプル数×2枚)を採集し、沸騰水道水で5～10分間煮沸する。煮沸して死んだ葉を用いるので、チャ葉の硬化程度や品種は問わない。生きた葉への接種試験には不向きな硬化が進んだ葉や、輪斑病抵抗性品種の葉を用いても問題なく検定できる。煮沸したチャ葉の半数は対照としてそのまま、

残りの半数はアゾキシストロピン水和剤の200倍希釈液に瞬時浸漬した後、水道水で湿らせたティッシュペーパーを敷いた容器に並べる。煮沸チャ葉の表面が乾燥すると、チャ葉から溶出したカフェインと思われる白い物質が残ることがあるが、検定結果には影響しない。

次に、罹病葉サンプルの病斑上の分生子を軽く湿らせた綿棒で拭い取り、最初は無処理区、次に薬剤処理区の順で煮沸チャ葉に綿棒を軽くこすりつけて分生子を付着

させる。綿棒はサンプルごとに交換する。あるいは、分生子の代わりに病斑片を付着させてもよい。この病斑片を用いる方法では最初の分生子形成の過程が不要で、所要日数をおよそ半分に短縮できる。ただし、雑菌が繁殖しやすいことや、サンプルによって病斑組織中の輪斑病菌の活性が異なることから、検定結果がやや不安定となるので注意が必要である。

すべてのサンプルを接種したのち容器を密閉して湿室とし、室温（20～30℃）で静置する。接種3日後に薬剤処理区でコロニーの生育がないものを感受性、無処理区と同等に生育したものを耐性と判定する。輪斑病菌のコロニーは白色・綿毛状で、気中菌糸の濃淡による同心円状の輪紋を生じることが多い。輪斑病菌と雑菌の判別が難しいときは引き続き室内散光下に置いておくと、輪斑病菌は2～7日間で多数の黒色の分生子層と分生子塊を形成する。なお、感受性菌でも接種量が多いとわずかにコロニーを形成し、まれに分生子形成にいたることがある。

IV 留 意 点

一連の作業は必ずしもクリーンベンチなどの無菌環境で行う必要はなく、風のない静かな室内で清潔な器具を用い、容器のふたを開け放さないように気をつければよい。輪斑病菌は生育が速いので、仮に雑菌がコンタミしても検定の妨げとなることはほとんどない。また、輪斑病菌に対する活性が低い殺菌剤であるフェンブコナゾール水和剤を薬液に200～2,000倍希釈となるように加えることで、雑菌の繁殖を抑制できる。

アゾキシストロビン水和剤の希釈倍数は、農薬登録上は2,000倍であるが、本法では200倍とした。これは、2,000倍希釈では必要な薬剤量が薬液100ml当たり0.05mlと微量で、計量にピペットが必要であるのに対し、200倍希釈では薬剤の所要量は0.5mlであり、簡単なスポイトによって容易に計り取れるためである。

また、通常の培地を用いた検定では、QoI剤のほかにオルタナティブオキシダーゼ阻害剤として没食子酸プロピルを培地に添加する必要があるが（富濱ら，2009）、本法ではQoI剤単独の処理によって感受性菌の生育はほぼ完全に抑制される。植物体上でQoI剤が単独でも高い防除効果を発揮するのは、植物体内に存在するフラボノイド類がオルタナティブオキシダーゼの誘導および酵素活性を阻害するためである（田村・水谷，1999）。本法では、チャに豊富に含まれているフラボノイド類の一種であるカテキンが、オルタナティブオキシダーゼを阻害していると推測される。このため、没食子酸プロピ

ルの添加は必要なく、農薬として市販されていて入手が容易なアゾキシストロビン水和剤のみで検定を行うことができる。

V 従来法との検定結果の比較

煮沸チャ葉を使った本法と寒天平板を用いた方法による検定結果を比較したところ、寒天平板法で感受性と判定されたサンプルが、本法ではまれに耐性と判定されることがあった。これらのサンプルの検定終了後の煮沸チャ葉から菌を分離して再度検定したところ、薬剤処理区から分離した菌株はすべて耐性であったことから、検定結果の不一致は単一病斑中での耐性菌と感受性菌の混在、あるいは感受性菌によって形成された病斑の表面に付着した耐性菌の分生子や罹病組織片が原因であると考えられた。また、輪斑病菌のQoI剤耐性菌には、異なる遺伝子変異に起因し、薬剤感受性が異なる高度耐性菌と中度耐性菌の2種類が存在するが、本法では両者を明確に判別することはできず、いずれも耐性菌と判定される。しかし、中度耐性菌の分布はこれまでのところ静岡県の一部地域に限られていることや、中度耐性菌も圃場においてQoI剤の効力低下を引き起こすと考えられることから、実用上の問題はないと考えられる。

お わ り に

以上のように、本法は特別な理化学機器や高度な実験技術を必要とせず、汎用的な器具と試薬を使った簡単な操作で輪斑病菌のQoI剤感受性を検定することができる。

検定の結果、耐性菌の比率が50%以上の圃場ではQoI剤の防除効果が著しく低下するため、輪斑病の防除にはQoI剤以外の系統の薬剤を選択する必要がある（尾松ら，2012；外側，2014）。一方、耐性菌率が30%未満であれば、アゾキシストロビン水和剤の散布によって実用的な防除効果が得られる（尾松ら，2012；外側，2014）。しかし、比率が低い場合でも1回のアゾキシストロビン水和剤の使用によって、耐性菌が急激に増加することが報告されている（尾松ら，2012）。このため、QoI剤を使用している圃場で輪斑病が発生したときには感受性検定を実施し、耐性菌が検出された場合にはQoI剤の使用を一時控えることが望ましい。

優れた農薬が薬剤耐性の問題によって失われてしまうことは、農業にとって大きな損失である。限りある薬剤を今後も長く有効に使い続けていくうえで、本法が一助となれば幸いである。

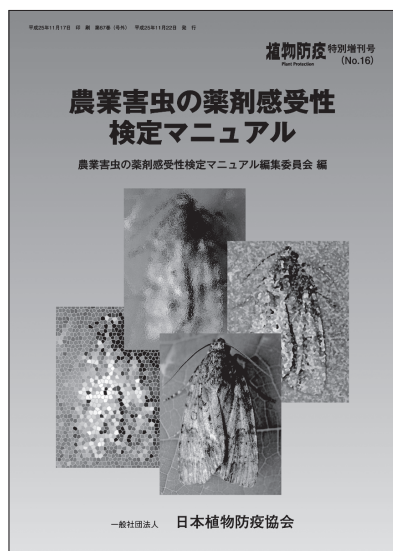
引 用 文 献

- 1) 堀川知廣（1986）：静岡茶試研報 12：9～14。

- 2) 尾松直志ら (2012): 日植病報 **78**: 3 ~ 9.
- 3) 園田亮一・山田憲吾 (2012): 同上 **78**: 200.
- 4) 田村廣人・水谷 章 (1999): 日本農薬学会誌 **24**: 189 ~ 196.
- 5) 外側正之 (2014): 関西病虫研報 **56**: 63 ~ 64.
- 6) ———ら (2012): 日植病報 **77**: 163 ~ 164.
- 7) 富濱 毅ら (2009): 九病虫研会報 **55**: 83 ~ 88.
- 8) 山田憲吾ら (2014): 関西病虫研報 **56**: 65 ~ 66.

植 物 防 疫
特別増刊号 No.16

農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル



B5 判 179 頁, 定価 2,600 円 (本体, 税別)

農業害虫の殺虫剤感受性の状況を把握することは、発生予察の重要な情報となります。本書では 42 種（類）の農業害虫について、感受性検定法の基礎から現在の手法、1990 年代から最新の状況まで、広範な情報を 1 冊にまとめました。あわせて「最近の話題」および「過去 10 年間に植物防疫誌に掲載された抵抗性関連記事リスト」を収載しました。

感受性検定を初めて行う方から経験者まで、幅広く活用いただけます。農薬の有効成分を作用機構分類別にまとめた「農薬作用機構分類一覧」とともに本書をご活用下さい。

一般社団法人日本植物防疫協会 支援事業部

TEL 03-5980-2183 FAX 03-5980-6753

<http://www.jpapa.or.jp/> order@jpapa.or.jp