

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

(11) チャ輪斑病菌の QoI 耐性検定 (生葉による生物検定)

静岡県農林技術研究所 茶業研究センター 生産環境科 と が わ の ま さ の ゆ き
外 側 正 之

はじめに

チャ輪斑病は、糸状菌 *Pestalotiopsis* 属 (旧: *Pestalotia* 属) 菌によって生じるチャの代表的な病害であるが、2008 年度以降、鹿児島県 (富濱ら, 2009) および静岡県を中心として QoI 剤耐性菌が高頻度で発生・検出され、防除に支障を来している (外側, 2015)。今回は、生物検定法について述べるが、煮沸チャ葉を用いた方法については、既に山田 (2015) の掲載があるので、ここでは生葉を用いた検定法について述べる。

I 使用器具

生葉を用いた検定法には、(1)葉が付いたままの苗木を使用する方法と、(2)樹体から切り離した生葉を使用する方法がある。前者では特別な器具は不要だが、後者の検定法には、カットフルーツやミニトマトの販売で使われるタイプのプラスチック容器と吸水性フローラルフォームが必要となる。具体的な商品名として、静岡茶研センターでは、125 mm × 125 mm × 54 mm のクリーンカップ (リスパック株式会社製) にフラワースタンド用オアシス® (スミザーズオアシスジャパン社製) を容器に合わせて適宜切断したものを使用している。

II サンプリング

1 使用する病原菌のサンプリングおよび保管

一般的な組織分離法で罹病部と健全部との境から切片を切り取り培地上に置床して菌を分離してもよいし、山田ら (2010) の方法に従い、罹病葉を温室において分生子塊を形成させた後、分生子懸濁液を粗く画線培養し実体顕微鏡下で釣菌することで単胞子分離株を得てもよい。

得られた菌株は PDA 斜面培地などに植菌し、5°C 前後で保存する。*Fusarium* 菌などと違って、チャ輪斑病菌は PDA や PSA のような富栄養培地でも変異することが少なく長期保存が可能である。ただし、QoI 剤耐性菌に

ついては、保存中に耐性程度が変化することが時折見られる (外側, 未発表) ので、耐性菌を長期間保存する場合は、冷凍庫などでの保存を検討したほうがよい。

菌株を使用する際は、分離の場合と同様に PDA, PSA といった一般的な培地を用いて 25°C 付近で培養する。菌株によっては暗黒でも分生子塊 (黒い粘液状) を形成するが、形成状態が悪い場合には、窓際に置くとか BLB ランプを照射する等して分生子形成を促進させる。培養したシャーレに滅菌水を注ぎコーンラージ棒などで表面を軽く擦った後、ガーゼのような目の粗いもので濾すことで分生子懸濁液を作成する。輪斑病菌の分生子は 3 本の長い付属糸を持ち、この付属糸が互いに容易に絡まりあうため、脱脂綿やキムワイプ等のような目の細かいもので濾すのは回収率が非常に悪い。分生子懸濁液は $10^4 \sim 10^5$ cells/ml 程度に調整する。 10^3 cells/ml 以下では、薬剤無処理の葉でも発病が不安定になるため、好ましくない。なお、輪斑病菌の分生子は懸濁液中で容易に沈殿するが、均一に分散させようとして攪拌を繰り返すと付属糸や分生子が折れたりするため、使用する直前に分生子懸濁液を作成し、速やかに供試することが望ましい。

2 接種に使用するチャ葉のサンプリング

まず重要になるのは葉の生育ステージである。展開したばかりの柔らかい黄緑色の葉は発病が不安定で好ましくなく、また、硬化しきった葉も発病が不安定になる。11 月～翌年 3 月くらいまでの葉が発病しにくいのも、硬化しすぎるためと考えている。以上から、完全に展開して硬化が始まってから 2 か月以内くらいの濃緑色の葉が使用に適している。なお、山田による煮沸葉を用いた方法 (山田, 2015) では葉の生育ステージは問わないため、11 月～翌年 3 月くらいまでに生物検定をしたい場合には、煮沸法を用いるべきである。

3 検定法の実際

(1) 葉が付いたままの苗木を使用する方法

展開葉が 10 ~ 20 枚程度付いた苗木が使いやすい。チャの苗木を育成していると、本圃と同様に、ダニやアブラムシ、ハマキ類等に加害されるので、しっかりと害虫防除を行って健全葉が十分確保されるようにする。また、温室内などで過湿状態が続くと、葉先から蒸れによ

Methods for Detecting QoI Fungicide Resistance in *Pestalotiopsis longiseta* (Pathogen of Gray Blight of Tea). By Masayuki TOGAWA (キーワード: チャ, 輪斑病, QoI 剤, アゾキシストロピン)

る褐変や赤葉枯病の発生が誘発されるので、過湿にならないように注意する。

接種直前に葉先1/4～1/3くらいを事務用ハサミで切断する。本病は、切断面が綺麗すぎると発病率が低下する(堀川, 1990)。各種試した結果、一般的な事務用ハサミが適している。切断面が乾燥するにしたがい発病率が低下していくので、切断が終わったら、可能な限り速やかに分生子懸濁液を散布(噴霧接種)する。

発病に最も重要な要素は「温度」である。輪斑病は25℃未満では、他の条件が十分に揃っていても発病率が低下することから、25℃以上の温度が毎日数時間以上は保たれるような条件を設定する。これに対し、極端な乾燥でなければ、湿度については神経質になる必要はない。接種後12～24時間程度を多湿状態に保てば発病がより確実になることは確かであるが、無理に多湿状態を維持する必要はない。

葉液(例えばアミスター20フロアブルなら2,000倍)を散布する苗木については、分生子懸濁液が乾いたことを肉眼で確認した後に散布する。接種2週間後くらいから次第に発病が見られる(図-1)が、接種3週間後くらいが発病のピークとなる。日数が経ちすぎると容易に落葉し発病調査が困難となるので、調査時期を逸さないようにする。

なお、通常の糸状菌病では、分生子の接種を薬剤散布後に行うことが多い。特に予防剤の薬効試験では薬剤散布が分生子接種より前になるのが一般的であるが、チャ輪斑病では、薬剤の種類に関係なく「傷口の作成→分生子の接種→薬剤散布、または、分生子の接種→傷口の作成→薬剤散布」となり薬剤散布処理は最後になる。これは傷口に分生子が飛散し感染・発病する一般的な糸状菌と異なり、チャ輪斑病菌は傷口が形成された際、既にその傷口付近に分生子が付着または潜在感染していること

による(外側, 2015)。傷口の形成は、葉上に付着または葉内に潜在感染しているチャ輪斑病菌が、菌糸を伸長させ病斑を形成するためのスイッチ・オンの役割をしていると考えられる。したがって、分生子が傷口付近にあらかじめ存在している状態で散布して発病を防げない薬剤は、輪斑病の防除剤としては不適格ということになる。農薬登録のための委託試験において、試験法として分生子接種を摘採(傷口作成)の直前か直後に行うように記されているのも、この理由による(日植防, 2016)。

(2) 樹体から切り離れた生葉を使用する方法

小規模で検定を行う場合は、こちらの方法が適する。なるべく生育ステージの揃った葉を葉柄基部から摘み取り、よく水洗する。葉裏にダニやチャトゲコナジラミ幼虫等が付着している葉は使用しない。水洗が終わったら、70～80%エタノールに数秒間浸漬し、その後に風乾する。これは、検定中に輪斑病菌以外の雑菌によって葉が褐変するのを防ぐために必要な処置であり、苗木を用いる(1)項の場合との相違点である。風乾した葉は(1)項と同様に事務用ハサミで先端を切り、直ちに分生子懸濁液に切断面を数秒間浸してから、水を十分に吸水させた吸水性フローラルフォームに葉柄を挿す。肉眼で葉表面が十分に乾燥したのを確認したら、必要に応じて、葉液(アミスター20フロアブル2,000倍など)を噴霧する。葉面の葉液が十分乾燥したのを確認したら、過湿を防ぐための通気穴を数箇所開けた同じ大きさのプラスチック容器をかぶせて人工気象器内などに置く(図-2)。毎日25℃以上の温度が数時間以上保たれるような条件にすることは(1)項と同様である。なお、吸水性フローラルフォームは非常に乾燥しやすいので、毎日観察して適宜給水する。例えば、25℃一定の人工気象器内に置いた場合では、2, 3日に1回は給水が必要となる。土日を含むような場合は、金曜日の夕方に容器の縁一杯まで給水



図-1 苗木における輪斑病の発病状況



図-2 プラスチック容器内で湿室に保った状態



図-3 樹体から切り離した生葉における発病状態

し、さらに月曜日の朝早く給水する必要がある。

発病調査は2～3週間後に行う。苗木を用いる場合と同様に接種3週間後くらいが発病のピークではあるが、本法では生理的要因や雑菌による葉の褐変を生じやすいので、2週間を過ぎたら適宜調査を行う(図-3)。

チャ輪斑病の場合は、(1)項、(2)項どちらの方法を用いた場合も、切断面から明瞭な輪紋模様を有する褐色の斑点が拡大していく。これに対し、接種2週間以上経っても、幅1mm程度の褐変しか見られないものは発病なしと判定する。また、健全部との境が不明瞭な褐変については、輪斑病菌以外が原因であるため、調査対象から除外する。

なお、(2)項の方法では、耐性菌の影響を過大評価する可能性がある。現地の圃場では、耐性菌の割合が3割程度までなら、実用的な防除効果が得られる(外側, 2015)ことが多いのに対し、(2)項の方法で感受性菌と耐性菌の比率を変えて接種した場合(分生子濃度: 1×10^4 cells/ml)には、表-1に示すように耐性菌が1割で

表-1 チャ輪斑病の耐性菌割合とアミスター 20フロアブルの防除効果(室内試験)²⁾

感受性菌：耐性菌	発病葉数 ¹⁾	防除価
10：0	0枚	100
9：1	7	53
8：2	8	47
7：3	10	33
6：4	13	13
5：5	11	27
4：6	15	0
3：7	14	7
2：8	14	7

¹⁾ 各区15枚を供試し、発病した葉数を示す。

²⁾ 接種に用いた分生子濃度は 1×10^4 cells/ml である。

も防除効果が大きく低下した(外側, 2013)(表-1)。これは、(2)項の方法では実際の現場よりも遙かに病原菌にとって有利な条件(特に温度と病原菌濃度)に置かれていることが原因と考えられる。室内検定を行う場合は、この点を考慮したうえで、実験データを解釈する必要があると考える。

引用文献

- 堀川知廣(1990): 茶 43: 24～31.
- 日本植物防疫協会(2016): 平成28年度 新農業実用化試験計画書: 附2.
- 外側正之(2013): 静岡県茶業研究センター平成24年度成績概要集: 342～343.
- (2015): 植物防疫 69: 484～489.
- 富濱 毅ら(2009): 九病虫研会報 55: 83～88.
- 山田憲吾ら(2010): 茶研報 109: 73～78.
- (2015): 植物防疫 69: 490～493.