

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 サンプルング

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℃ の温室に 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 (EC<sub>50</sub>)

薬剤感受性の程度は EC<sub>50</sub> 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 EC<sub>50</sub> 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)

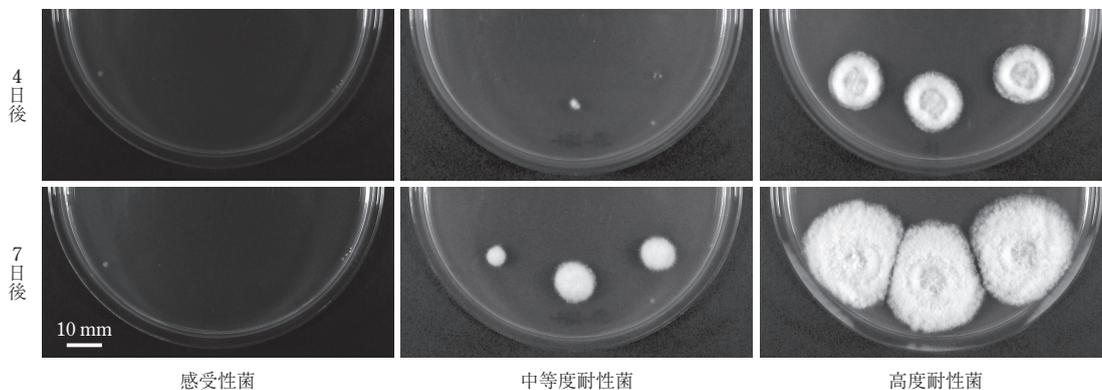


図-1 QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の検定培地上での生育  
 アズキシストロビン 100 mg/l および没食子酸 *n*-プロピル 2 mM 加用 PDA 培地に分生子を接種して 25℃ で培養。

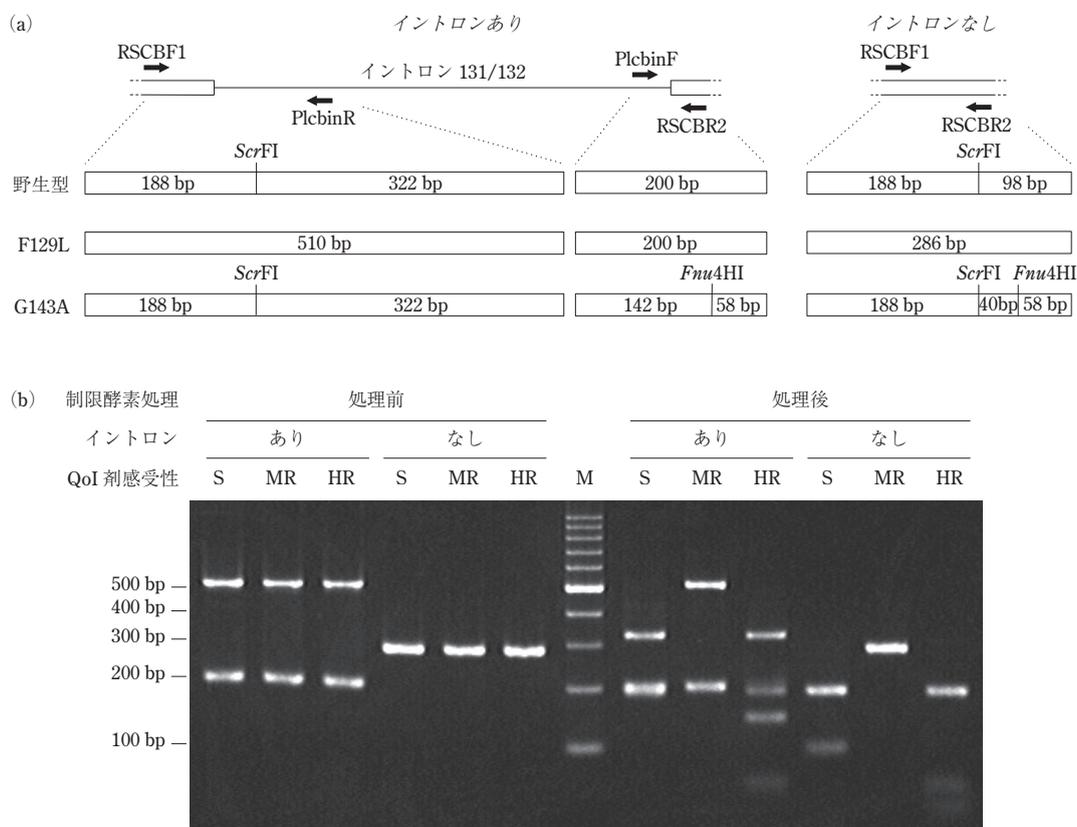


図-2 マルチプレックス PCR-RFLP 分析による QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の遺伝子検定 (YAMADA and SONODA, 2012)  
 (a) プライマーの配置と増幅産物の制限酵素地図。(b) マルチプレックス PCR-RFLP 分析結果の電気泳動像。イントロンの有無によって 2 種類または 1 種類のフラグメントが増幅され、チトクローム *b* の G143A 変異は *Fnu4HI* 認識配列の生成、F129L 変異は *ScrFI* 認識配列の消失として検出される。200 bp と 188 bp のバンドは判別が困難、100 bp 未満のバンドは不鮮明である。S: 感受性, MR: 中等度耐性, HR: 高度耐性, M: マーカー。

## II 遺伝子検定

チャ輪斑病菌の QoI 剤耐性は多くの植物病原菌と同様に、QoI 剤の作用点であるチトクローム *b* の遺伝子変異が原因である。高度耐性は G143A 変異，中等度耐性は F129L 変異に起因する（富濱ら，2009；YAMADA and SONODA, 2012）。G143A 変異は Ishii et al. (2007) の遺伝子検定法によって検出できるが，輪斑病菌には本法による増幅領域中にイントロンを含む菌株があるため PCR に失敗したり，電気泳動でバンドパターンが読み取りにくいことがある。そこで，イントロンの有無に対応したマルチプレックス PCR-RFLP 分析（YAMADA and SONODA, 2012）によって遺伝子検定を行う。

### 1 DNA抽出

PCR に用いる鋳型 DNA はマイクロウェーブ法（FERREIRA and GLASS, 1996）による粗抽出物で十分である。培地上のコロニーから微量の気中菌糸をピペットチップなどでマイクロチューブに採り，キャップを閉めて家庭用電子レンジ（500～600 W）で5分間マイクロウェーブ照射する。その後，Tris-EDTA (TE) バッファー 50  $\mu$ l を加えてボルテックスし，上清を鋳型 DNA 溶液として使用する。

### 2 PCR

既存（Ishii et al., 2007）のプライマー RSCBF1（5'-TAT TATGAGAGATGTAAATAATGG-3'）および RSCBR2（5'-AACAATATCTTGTCCAATTCATGG-3'）に新規プライマー PlcbinR（5'-GCATAAAATCTATCAGTAGATGCA GAA-3'）および PlcbinF（5'-GCTTAATGCACAGTCGGA ACT-3'）を加えた4種類のプライマーを用いたマルチプレックス PCR によって，チトクローム *b* 遺伝子のコドン 129 および 143 を含む領域を増幅する。反応液の組成は TaKaRa Ex Taq™ HS（タカラバイオ）0.5 U，10 × Ex Taq バッファー 2  $\mu$ l，dNTP 各 200  $\mu$ M，プライマー各

0.2  $\mu$ M，鋳型 DNA 溶液 2  $\mu$ l，合計 20  $\mu$ l とし，増幅反応は 94℃，30 秒間；52℃，30 秒間；72℃，1 分間を 35～40 サイクル行う。

### 3 RFLP 分析

PCR 終了後の反応液 10  $\mu$ l に制限酵素 *Fnu*4HI および *Scr*FI（いずれも New England Biolabs）をそれぞれ 1 U ずつ加えて 37℃ で 1 時間反応させる。本実験条件において PCR 反応液中で制限酵素が十分に作用することを確認している。筆者が試した範囲では，EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix（タカラバイオ），Tks Gflex™ DNA Polymerase（タカラバイオ）および KOD FX Neo（東洋紡）の PCR 反応液中では *Fnu*4HI による切断が起こらないため，バッファー交換などが必要である。制限酵素処理後の反応液を 2.5% アガロースゲルで電気泳動して反応産物を確認する。PCR 増幅領域中にイントロンを有する菌株では 2 種類，有さない菌株では 1 種類のフラグメントが増幅され，G143A 変異は *Fnu*4HI 認識配列の生成，F129L 変異は *Scr*FI 認識配列の消失として検出される（図-2）。なお，いくつかの植物病原菌においてヘテロプラスミー（野生型と変異型のミトコンドリアの混在）（Ishii et al., 2007）や，*Scr*FI で検出できない塩基置換による F129L 変異（Sierotzki et al., 2007；渡辺ら，2010）が報告されているが，輪斑病菌ではこれまでのところ確認されていない。

### 引用文献

- 1) FERREIRA, A. V. B. and N. L. GLASS (1996): Fungal Genet. Newsl. 43: 25～26.
- 2) ISHII, H. et al. (2007): Phytopathology 97: 1458～1466.
- 3) 尾松直志 (2012): 植物防疫 66: 39～42.
- 4) SIEROTZKI, H. et al. (2007): Pest Manag. Sci. 63: 225～233.
- 5) 外側正之 (2015): 植物防疫 69: 484～489.
- 6) 富濱 毅ら (2009): 九病虫研会報 55: 83～88.
- 7) 渡辺秀樹ら (2010): 日植病報 76: 58.
- 8) YAMADA, K. and R. SONODA (2012): J. Gen. Plant Pathol. 78: 398～403.