

チャ輪斑病菌の QoI 剤耐性に関する研究

2017 年 11 月

山 田 憲 吾

チャ輪斑病菌の QoI 剤耐性に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

博士（農学）学位論文

山 田 憲 吾

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の発生実態	8
第 1 節 チャ輪斑病菌の QoI 剤感受性統一検定法の策定	8
第 2 節 静岡県牧ノ原台地における耐性菌の発生実態	13
第 3 節 その他の地域における耐性菌の発生実態	23
第 3 章 チャ輪斑病菌の QoI 剤中等度耐性の解析	27
第 1 節 中等度耐性の原因遺伝子変異	27
第 2 節 中等度耐性菌の各種 QoI 剤に対する感受性	37
第 3 節 中等度耐性菌の分布	53
第 4 章 新規 QoI 剤感受性検定法の構築	56
第 1 節 遺伝子診断法	56
第 2 節 煮沸チャ葉法	63
第 5 章 耐性菌の分布拡大経路の推定	71
第 1 節 ISSR 分析によるチャ輪斑病菌の DNA フィンガープリンティング	71
第 2 節 集団遺伝学的解析による耐性菌の分布拡大経路の推定	76
第 6 章 総合考察	90
摘要	98

Summary	101
謝 辞	104
引用文献	105

第 1 章 緒言

チャ [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] はツバキ科ツバキ属の常緑樹である。葉にカフェイン、カテキン、アミノ酸などを豊富に含み、その煎汁が飲料として利用される。アジア南部の亜熱帯地方原産で、現在では世界各地の亜熱帯～温帯地域で広く栽培されている。チャは中国種 (var. *sinensis*) とアッサム種 (var. *assamica*) の 2 変種に大別される。我が国で栽培されているチャの大部分は、寒さに比較的強く、緑茶（不発酵茶）に適する中国種である。アッサム種は中国種に比べて葉が大きく、樹高が高い。また、カテキン類やカフェインを多く含み、発酵に必要な酸化酵素ポリフェノールオキシダーゼの活性が高いことから紅茶（発酵茶）に適する。日本のチャ栽培の歴史は古く、平安時代にはすでに茶園が存在していた記録がある。幕末に茶の輸出が始まると、明治時代には生糸と並ぶ重要な輸出品として栽培が奨励され、静岡県牧ノ原台地を始めとする現在まで続く産地が各地に形成された。

我が国でチャ栽培において問題となる病害は、栽培体系の変化とともに変遷してきた。最も古い病害発生の記録は 1887 年の斑点病（異名：点々星病）である（鶴田 1916）。のちに本病の病原菌は *Elsinoë leucospila* Bitancourt & Jenkins と同定され、病名には「白星病」が採用された（広川 1965）。白星病はチャの最重要病害として長く猛威を振るったが、在来実生品種から栄養繁殖品種への改植が進むにしたがって発生が減少していった。1960 年代後半以降は一部の地域・茶園を除くと被害は軽微となり、現在ではほとんど発生が見られなくなった（広川 1968; 園田 2008）。これに代わって 1950 年代から、当時普及しつつあった主要品種の「やぶきた」が罹病性である網もち病（病原菌：*Exobasidium reticulatum* S. Ito & Sawada）および炭疽病〔病原菌：*Discula theae-sinensis* (I. Miyake) Moriwaki & Toy. Sato〕の発生が増加した（江塚 1957a, 1957b; 永田 1954）。網もち病は 1950 年代から 60 年代にかけて全国的に多発して甚大な被害をもたらしたが、その後は減少して現在では

あまり発生が見られなくなった。その原因として、殺菌剤による防除法の確立に加えて、チャの栽培体系の変化が挙げられる（小泊 1972）。すなわち、夏期に生育する三番茶芽を樹勢維持のために摘採しない茶園が増えたことから、網もち病菌の感染に適した気象条件となる秋期に生育する四番茶芽（秋芽）が減り、これに伴って網もち病の発生も減少したものと考えられる。一方、より高温を好み三番茶芽にもよく発生する炭疽病は、三番茶不摘採園の増加とともに発生が増え、我が国のチャ栽培において最も広く発生が見られる最重要病害となった（高屋 1978）。1970 年代に入って摘採の機械化と「やぶきた」の普及が進むと、機械摘採によって生じた傷口から発病し、この品種の感受性が高い輪斑病〔病原菌：*Pestalotiopsis longiseta* (Spegazzini) Dai et Kobayashi〕が、炭疽病と並ぶ重要病害となった。

輪斑病は最初、*P. longiseta* とは別種の *Pestalotiopsis theae* (Sawada) Steyaert による病害として報告された（澤田 1913; Steyaert 1949）。*Pestalotiopsis theae* による輪斑病はインド、スリランカ、インドネシア、台湾など世界各地で古くから発生が記録されている（澤田 1913; Petch 1923; Farr and Rossman 2017）。しかし、通常は他の要因によって衰弱した茶樹に発生する病害とされ、輪斑病自体が問題視されることはなかった（Butler 1918; Petch 1923）。我が国でも「なつみどり」など特定の品種に発生するのみであり、重要な病害とはみなされていなかった（広川 1969）。ところが、1973 年頃から静岡県西部において、当時栽培面積が急速に増加していた品種「やぶきた」に枝枯れを伴う激しい症状の輪斑病が発生するようになった（福田 1976）。浜屋・堀川（1982）はこの輪斑病の病原菌を *P. longiseta* と同定し、さらに 1954 年に発見された *P. theae* とは形態的に異なる未同定の *Pestalotiopsis* 属輪斑病菌（*Pestalotiopsis* sp.）（木伏ら 1974）も同種である可能性が高いとした上で、両者が病原性に関しては異なる系統であることを示した。すなわち、木伏らの *Pestalotiopsis* sp. に対するチャ品種の感受性は「なつみどり」、「たまみどり」が高く、「やぶきた」は低かったのに対し、*P. longiseta* に対する感受性

は「やぶきた」、「さやまみどり」が最も高く、「たまみどり」は低かった。また、*Pestalotiopsis* sp.による病斑は *P. theae* のそれと肉眼的に区別できないとされているのに対し、*P. longiseta* による病斑は明らかに大きかった。これらのことから、1970年代の輪斑病の激発は *P. longiseta* の病原性変異系統の出現によるものであると推察された（浜屋・堀川 1982）。また、この *P. longiseta* による輪斑病の発生は、摘採・整枝機が普及した時期と重なる。輪斑病は摘採・整枝による傷口から発病することから、摘採・整枝機の普及と輪斑病の多発との相関関係は容易に推測できる。さらに、それまでの茶園の多くは遺伝的に不均一な在来実生茶園であったが、摘採の機械化にはクローン品種の栽培によって新芽の生育を斉一化することが必須であり、このため当時の優良品種「やぶきた」の栽培面積が急速に拡大した。このような栽培体系および栽培品種の変化が病原菌の病原性変異系統の選抜を促し、輪斑病の激発を引き起こしたものと推定された（浜屋・堀川 1982）。1973 年頃には静岡県西部のみであった *P. longiseta* による輪斑病の発生は、1979 年頃には静岡県西部一帯および愛知県、三重県に拡大した。1980 年代に入ると九州にも発生が広がり、現在では全国的に発生が見られるようになった（堀川 1984）。

輪斑病の病徴と発生生態は江塚・安藤（1994）および西島（2008）によると以下の通りである。本病は植物体にできた傷口から発病する。輪斑病菌の生育適温は 25～30℃で、6～8 月の二番茶および三番茶摘採によって生じた傷口に多く発生する。葉では円形または主脈部が張り出した V 字形で同心円状の輪紋を有する茶褐色の壊死病斑を生じ、罹病葉は落葉しやすくなる（図 1-1A）。茎では切り口から下方に向かって暗褐色の壊死病斑を生じる（図 1-1B）。茎の壊死が最上位葉の着生部に達すると腋芽を枯死させる。葉および茎の病斑上に小黑点状の分生子層を散生する。また、新梢基部の包葉や不完全葉の脱落などによって生じた傷口から発病すると、上方への水分供給が断たれて発病部位より上部の新梢全体が枯死する新梢枯死症状を呈する（図 1-1C）。輪斑病が多発すると落葉および芽数の減少による樹勢の低下を

招き，次茶期以降の収量および品質の低下を引き起こす．

輪斑病菌は付傷後すみやかに感染を開始することから，殺菌剤散布による防除は摘採あるいは整枝の直後に行うことが望ましい（堀川 1982）．輪斑病に有効な薬剤のうち，TPN 水和剤やフルアジナム水和剤は摘採・整枝の当日に予防的に散布する必要がある．しかし，労力の配分および周辺の未摘採圃場への薬剤のドリフトの問題から，摘採・整枝当日の防除の実施は困難である．一方，アゾキシストロビン水和剤は輪斑病に対して治療効果を有し，摘採・整枝の 3 日後の散布でも実用的な防除効果が得られることから，基幹防除薬剤として広く普及している（西島 2008）．アゾキシストロビンは担子菌由来のメトキシアクリレート骨格を有する天然の殺菌活性物質 strobilurin A から誘導されたストロビルリン系殺菌剤の一種である（Anke et al. 1977; 田村・水谷 1999）（図 1-2）．ストロビルリン系殺菌剤は卵菌から子の菌，担子菌に至る広い範囲の病原菌に対して高い防除効果を示すことから世界的に多くの作物で広く使用されており，農業上最も重要な殺菌剤グループの一つとなっている（Bartlett et al. 2002）．ストロビルリン系殺菌剤は作用機構上，ミトコンドリア内膜の複合体 III の Qo 部位に結合してミトコンドリア電子伝達系を阻害する Qo 阻害（QoI）剤に分類されるが，QoI 剤は作用点が単一であることから病原菌に薬剤耐性が発達するリスクが高く，これまでに 60 種以上の植物病原菌で耐性菌の発生が報告されている（石井 2015）．チャ輪斑病菌でも 2008 年に鹿児島県において QoI 剤耐性菌の出現と，それによる QoI 剤の効力低下が確認され（富濱ら 2009），耐性菌の分布拡大が危惧された．薬剤耐性対策のためには，耐性菌の発生実態や生理・生態的特性を把握する必要があるが，QoI 剤耐性チャ輪斑病菌におけるこれらの詳細は不明であった．

本研究は，チャ輪斑病菌の薬剤耐性対策に資するため，我が国における QoI 剤耐性輪斑病菌の発生実態を把握し，その生理・生態的特性を解明することを目的とした．第 2 章では我が国で最大の茶産地である静岡県牧ノ原台地における QoI 剤耐性

チャ輪斑病菌の発生実態を調査し、第 3 章では調査の過程で新たに検出された中等度耐性菌の諸性質を解析した。第 4 章では新規 QoI 剤感受性検定法を構築し、第 5 章では耐性菌の集団遺伝学的解析から耐性菌の出現および分布拡大経路を推察した。これらの研究結果を総括して、第 6 章ではチャ輪斑病菌における薬剤耐性対策について考察した。

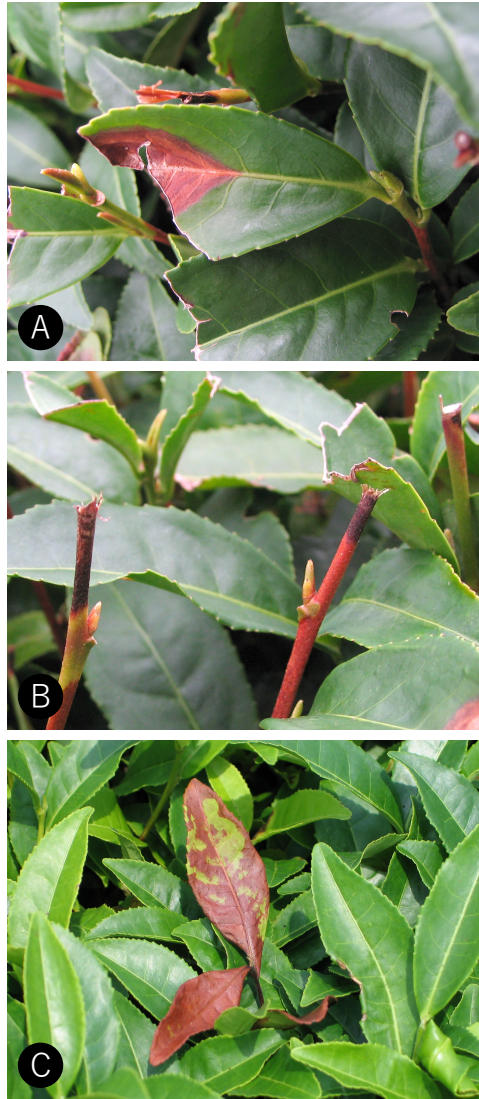
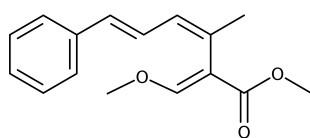
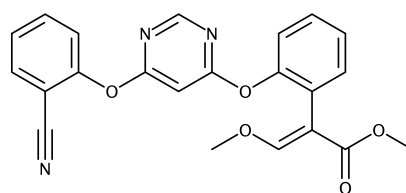


図1-1 チャ輪斑病の病徴

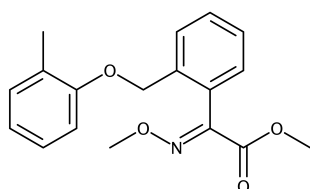
A: 葉枯れ症状, B: 枝枯れ症状, C: 新梢枯死症状



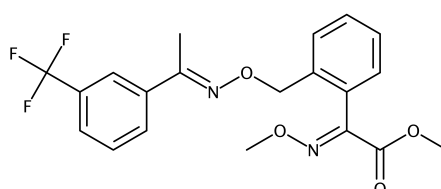
Strobilurin A



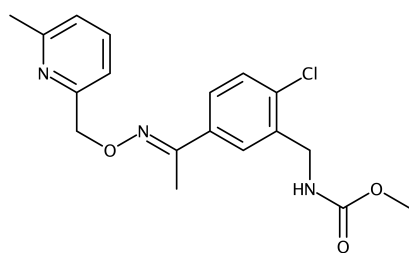
アゾキシストロビン



クレソキシムメチル



トリフロキシストロビン



ピリベンカルブ

図1-2 Qol剤の化学構造

第2章 QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の発生実態

チャ輪斑病菌における QoI 剤耐性菌の発生とそれによる QoI 剤の効力低下が 2008 年に鹿児島県で確認され（富濱ら 2009），その分布拡大が危惧された．そこで，我が国における QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の発生実態を明らかにするため，QoI 剤感受性の統一検定法を策定して関係者に広く調査を呼びかけると共に，我が国で最大の茶産地である静岡県牧ノ原台地における耐性菌の発生実態を調査した．

第1節 チャ輪斑病菌の QoI 剤感受性統一検定法の策定

薬剤耐性菌の蔓延を未然に防ぐためには，共通の手法で継続的に病原菌の薬剤感受性モニタリングを行うことが必要である（宗 2009）．そこで，多数の調査者が共通の方法で輪斑病菌の QoI 剤感受性をモニタリングし，相互に比較可能な形でデータを蓄積できるよう，統一検定法を策定した．

材料および方法

（1）供試サンプル

2009 年 3 月に鹿児島県南九州市知覧町の耐性菌検出率 100% の圃場 2 ヶ所（いずれも品種「やぶきた」）で採集した輪斑病罹病葉（鹿児島県農業開発総合センター富濱毅氏より分与）ならびに農研機構金谷茶業研究拠点内圃場（品種「やぶきた」）および周辺の一般農家圃場で採集した輪斑病罹病葉を供試した．

（2）検定培地

培地上において QoI 剤は単独では菌に対する生育抑制効果が低く，感受性菌であっても生育が完全には抑止されないことが多い．これは，QoI 剤によってミトコン

ドリア電子伝達系が阻害されると、alternative oxidase (AOX) によるバイパス代謝経路が活性化するためである (田村・水谷 1999)。このため、寒天平板希釈法での検定には QoI 剤に加えて、没食子酸 *n*-プロピルなどの AOX 阻害剤を培地に添加する必要がある (石井ら 1999)。しかし、没食子酸 *n*-プロピル自体も菌の生育を抑制することから、その最適濃度を検討した。基礎培地としてポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地 (栄研化学) を用いた。PDA 培地を所定の濃度で調製してオートクレーブ滅菌し、60°C 程度に冷ましてから PDA 培地の 1/9 倍量のアゾキシストロビン水和剤 [アミスター20 フロアブル, 有効成分 20% (w/w), シンジェンタジャパン] 200 倍希釈液を加えてアゾキシストロビン濃度を 100 µg/ml とした。対照には蒸留水のみを加えた。没食子酸 *n*-プロピルは PDA 培地の 1/90 倍量のエタノールに溶解して最終濃度 1, 2 および 5 mM となるように PDA 培地に加えた。対照にはエタノールのみを加えた。

(3) 検定

輪斑病罹病葉を 25°C の湿室に 2~4 日間静置し、病斑上に形成された分生子塊をピンセットで採取して検定培地に接種した。25°C, 暗黒下で培養し、輪斑病菌の生育を経時的に観察した。

結果および考察

アゾキシストロビン 100 µg/ml を含む PDA 培地において、没食子酸 *n*-プロピル 1 mM では感受性菌の生育が完全には抑えられず、一方 5 mM では耐性菌も生育が強く抑制されたことから、検定培地中の没食子酸 *n*-プロピル濃度は 2 mM とした (図 2-1)。検定培地への菌の接種法として、ベンゾイミダゾール系 (methyl benzimidazole carbamate, MBC) 殺菌剤感受性検定では菌の分離を経ずに、病斑上に形成された分生子塊を直接検定培地に移植することで簡便に実施することができ

る（鬼木ら 1986; 西島 1998）. QoI 剤感受性検定で同様の方法を試みた結果，雑菌の混入が問題となることはなく，本法で十分に検定が可能であった（図 2-2）. その他の条件は QoI 剤耐性輪斑病菌発生の初報（富濱ら 2009）に準じ，統一検定法を以下の通り策定した.

①罹病葉の採集：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. 罹病葉を 25℃, 湿潤条件下で 2～4 日間静置して分生子を形成させる（図 2-2A）.

②検定培地：PDA 培地にアゾキシストロビン 100 µg/ml および没食子酸 *n*-プロピル 2 mM（いずれも最終濃度）を加用する. アゾキシストロビンは 20%（w/w）水和剤を滅菌蒸留水で 200 倍に希釈し，PDA 培地の 1/9 倍量を加える. 没食子酸 *n*-プロピルは PDA 培地の 1/90 倍量のエタノールまたはジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して加える. 対照には没食子酸 *n*-プロピルのみを加用する.

③接種：病斑上の分生子塊を先細ピンセットで採取し，対照培地および検定培地に分生子を付着させる（図 2-2B, C）. 分生子塊の状態のままでは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，ピンセットで強く挟んで分生子塊を押しつぶしてから付着させる.

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耐性と判定する（図 2-2D）. 菌の分離・同定が必要なときは検定終了後，ブラックライトブルー（BLB）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をする.

* 本節の内容の大部分は山田ら（2010）として学術誌 茶業研究報告に発表した.

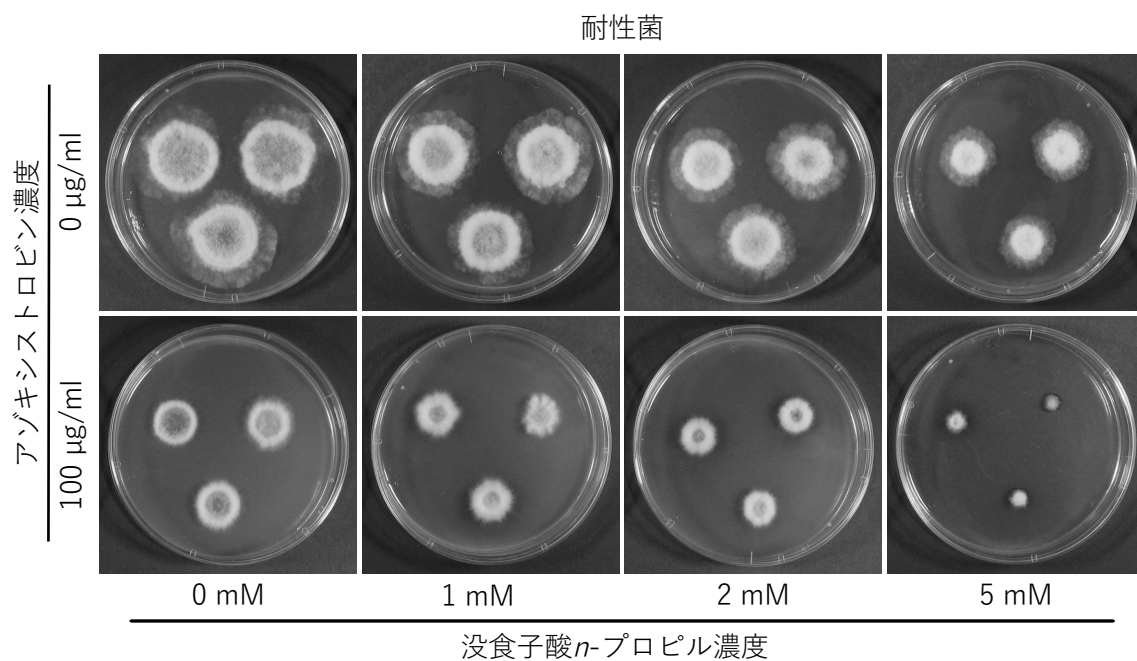
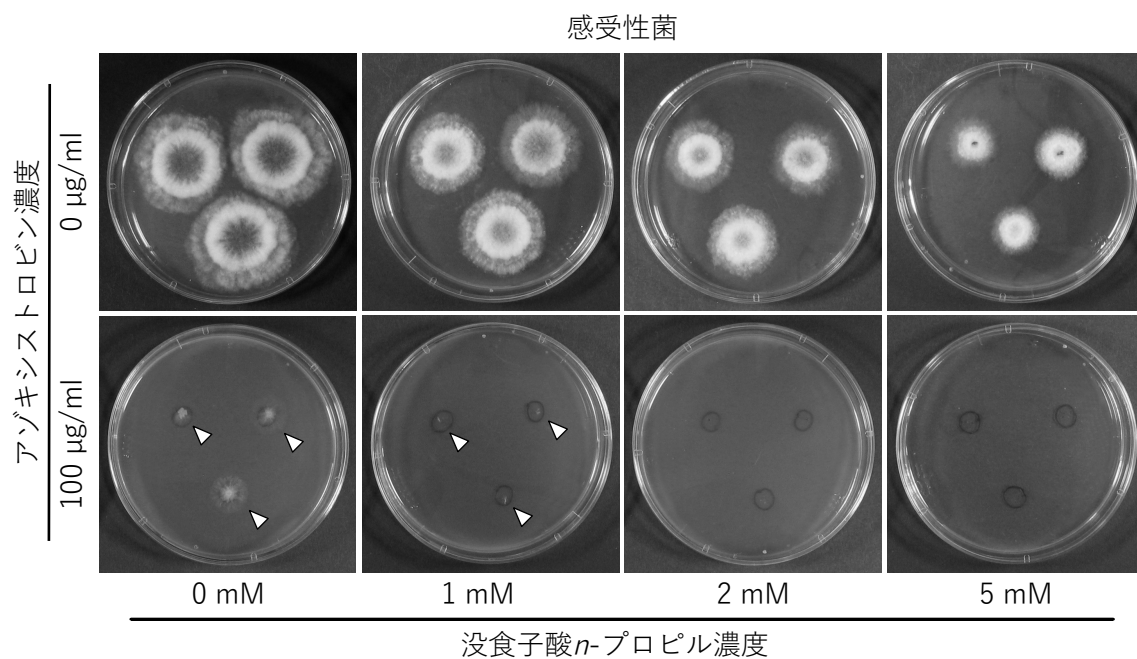


図2-1 チャ輪斑病菌に対するアゾキシストロビンと没食子酸*n*-プロピルの協力作用
アゾキシストロビンおよび没食子酸*n*-プロピルを添加したPDA培地に、輪斑病病斑上に形成された分生子を接種して、25°Cで4日間培養。矢尻：アゾキシストロビン添加培地上に形成された感受性菌のコロニー。

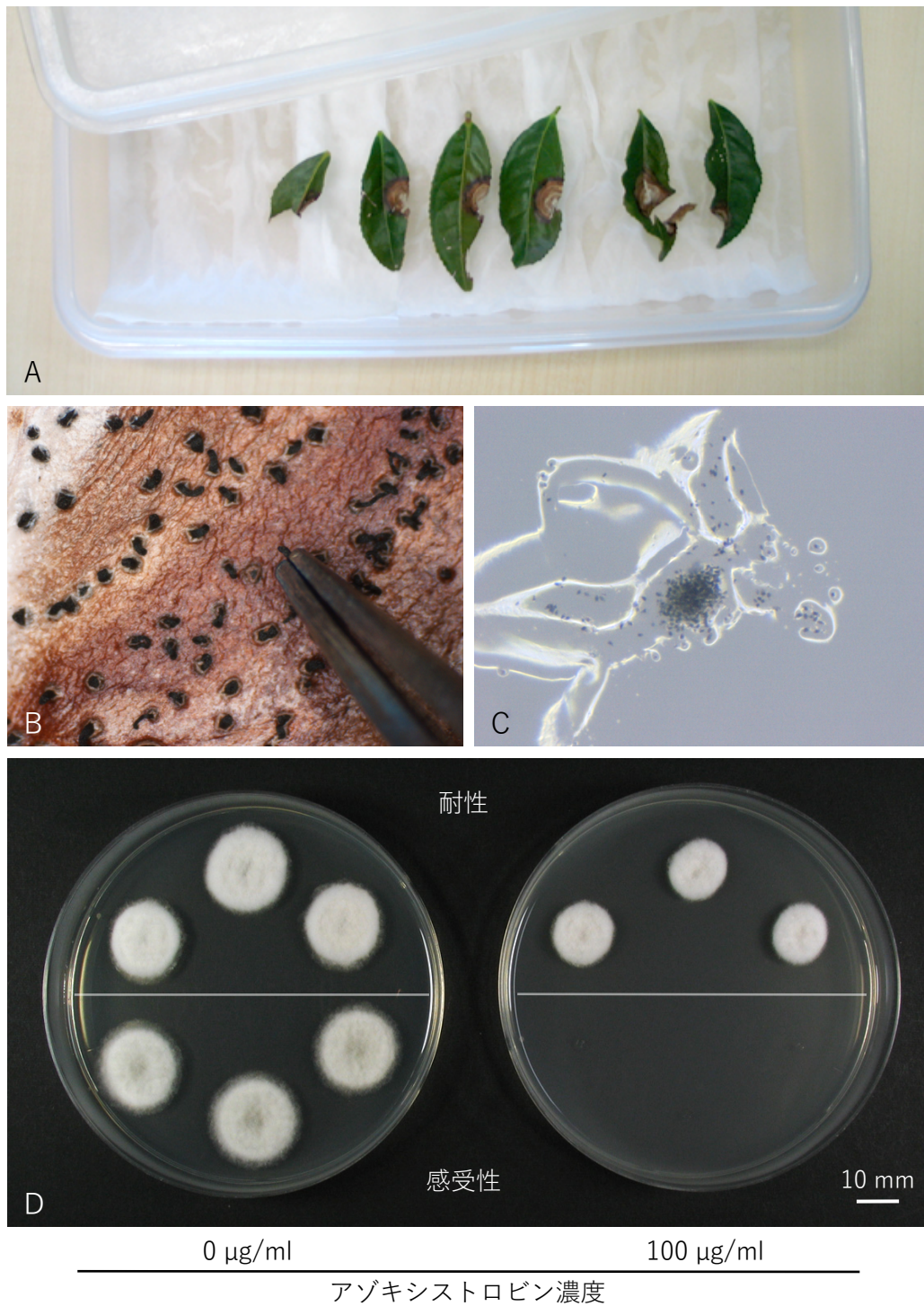


図2-2 チャ輪斑病菌のQoI剤感受性の寒天平板希釈法による検定手順
 A: 湿潤条件に置いた罹病葉, B: 病斑上の分生子塊の採取, C: 培地に接種した分生子, D: 4日間培養後のコロニー

第2節 静岡県牧ノ原台地における耐性菌の発生実態

牧ノ原台地は静岡県中西部、大井川下流域右岸の島田市、牧之原市、菊川市および御前崎市にまたがる日本最大の茶生産地である。周辺地域を含めると茶園面積は5,000ha以上におよび、全国の茶園面積の10%以上を占める。QoI剤耐性菌が初めて確認された鹿児島県と同様に、牧ノ原台地でも大部分の地域でアゾキシストロビン水和剤を始めとするQoI剤が輪斑病に対する基幹防除薬剤として防除暦に組み込まれており、年に複数回使用している圃場も少なからずあることから、耐性菌の発生が懸念された（外側 2015）。そこで、2009年から2013年にかけて牧ノ原台地および周辺地域におけるQoI剤耐性輪斑病菌の発生実態を調査した。

材料および方法

2009～2013年に牧ノ原台地および周辺地域の一般農家圃場で輪斑病罹病葉を収集した（表2-1）。すぐに菌の分離あるいは薬剤感受性検定を行わない場合は、罹病葉を4～8℃の冷蔵庫に乾燥状態で保存した。検定は前節で定めた統一検定法によって実施した。1病斑を1菌株によるものとみなし、1圃場あたり20菌株を目安として調査し、各圃場における耐性菌株率を以下の計算式によって算出した。耐性菌株率（%）＝耐性菌株数／検定菌株数×100。輪斑病は本地域において7～8月を中心に5月から10月にかけて発生し、越冬葉に発生すると翌春まで罹病葉が樹上に残存することから、本調査では一番茶摘採期にあたる5月1日を区切りとして5月から翌年4月までを年度の期間とした。

結果および考察

2009/2010年は牧ノ原台地南部の御前崎市を中心に合計98圃場から採集した2,176菌株を検定した。その結果、59圃場で637菌株の耐性菌が検出された（表2-1、

図 2-3). 御前崎市では朝比奈地区を中心に調査した結果、55 圃場中 44 圃場と大部分の圃場で耐性菌が検出された。調査圃場のほぼ半数にあたる 25 圃場で耐性菌株率が 50%以上と高く、うち 4 圃場で 100%、12 圃場で 75%以上の菌株が耐性菌であった。これらの圃場では耐性菌による QoI 剤の効力低下が顕著に起こっているものと考えられた。島田市では金谷猪土居地区を中心に調査した結果、22 圃場中 2 圃場で耐性菌が検出された。耐性菌株率は低く、いずれの圃場でも検出数は 1 菌株のみであった。牧之原市では 19 圃場中 13 圃場で耐性菌が検出され、うち 7 圃場で耐性菌株率が 50%以上であった。御前崎市朝比奈地区に隣接する菅ヶ谷地区で耐性菌の検出率が高かった。

2010/2011 年は牧ノ原台地北部の島田市と中部～南東部の牧之原市を中心に合計 195 圃場から採集した 3,950 菌株を検定した。その結果、121 圃場で 893 菌株の耐性菌が検出された（表 2-1, 図 2-3）。島田市では阪本地区を中心に 95 圃場を調査した結果、ほぼ半数の 46 圃場で耐性菌が検出された。18 圃場で耐性菌が過半数を占め、うち 3 圃場で耐性菌株率 100%、6 圃場で 75%以上であった。牧之原市では 79 圃場を調査した結果、およそ 7 割の 58 圃場で耐性菌が検出された。耐性菌が検出された圃場数が多かったのに対し、耐性菌株率が 50%以上の圃場は 10 圃場にどまり、大部分の圃場では 50%未満であった。御前崎市では前年度も調査した圃場を中心に 17 圃場を調査した結果、16 圃場で耐性菌が検出された。

2011/2012 年は牧ノ原台地北部の島田市と東部の吉田町を中心に 155 圃場 3,153 菌株を検定した結果、85 圃場で 738 菌株の耐性菌が検出された（表 2-1, 図 2-3）。島田市では阪本地区を中心に、前年度も調査した 21 圃場を含む 73 圃場で調査を行った結果、52 圃場で耐性菌が検出され、うち 29 圃場で耐性菌株率が 50%以上であった。吉田町では 47 圃場を調査した結果、21 圃場で耐性菌が検出されたが、耐性菌株率が 50%以上の圃場は 6 圃場と少なかった。牧ノ原台地西部の菊川市では 19 圃場中 5 圃場で耐性菌が検出されたが、いずれの圃場でも耐性菌株率は低く 25%未

満であった。

2012/2013 年は島田市を中心に 62 圃場 1,249 菌株を検定した結果, 44 圃場で 301 菌株の耐性菌が検出された(表 2-1, 図 2-3)。島田市では金谷猪土居地区を中心に, 前年度も調査した 9 圃場を含む 52 圃場で調査を行った結果, 34 圃場で耐性菌が検出され, うち 9 圃場で耐性菌株率が 50%以上であった。

複数年にわたって調査を行った 51 圃場のうち, 初年度に耐性菌が検出されなかった 9 圃場では次年度あるいはそれ以降も耐性菌は検出されなかった(表 2-2)。初年度に耐性菌が検出された 42 圃場でも耐性菌株率の年次変動はほとんどの圃場で小さく, 2 倍以上に増加した圃場は 9 圃場, 1/2 以下に減少した圃場は 6 圃場であった(表 2-2)。これらのことから, 圃場内の耐性菌株率の年次変動は小さく, 本調査で観察された耐性菌株率の差異は年次変動ではなく圃場間差であると考えられた。

本調査を開始するまでは QoI 剤の防除効果の低下は認識されていなかったが, 調査の結果, 初年度から多数の圃場で耐性菌が検出された。4 年間の調査結果をまとめると 10,528 菌株中 2,569 菌株が QoI 剤耐性で, 耐性菌株率は 24.4%であった。調査を行った 457 圃場の過半数の 266 圃場で耐性菌が検出され, そのうち 103 圃場で耐性菌株率が 50%以上であった(表 2-1, 図 2-3)。耐性菌株率が 50%以上の圃場では QoI 剤の効果が顕著に低下して実用的な防除効果は期待できないとされており(尾松ら 2012, 外側 2014), これらの圃場では QoI 剤による輪斑病の防除は事実上不可能となっていると考えられた。実際に QoI 剤による輪斑病防除を実施しているにも関わらず, 輪斑病が多発している事例も確認された。地域によって耐性菌の分布状況に違いが見られたが, 耐性菌が多い地域であっても耐性菌株率が低い, あるいはまったく検出されない圃場が存在し, 逆に耐性菌が少ない地域でも一部の圃場では耐性菌株率が非常に高かった。このことから, 耐性菌の発生と蔓延には個々の圃場における QoI 剤の使用履歴が大きく影響しているものと考えられた。

表2-1 牧ノ原台地におけるQol剤耐性チャ輪斑病菌の発生実態

圃場 No.	所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)	圃場 No.	所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)
001	島田市金谷猪土居	2009/03	23	0	049	御前崎市上朝比奈	2010/02	29	55
002	島田市湯日	2009/03	22	0			2011/04	20	65
003	島田市湯日	2009/03	23	0	050	牧之原市布引原	2010/02	20	0
004	島田市金谷猪土居	2009/07	20	0	051	牧之原市静谷	2010/02	20	65
005	島田市金谷猪土居	2009/07	23	0	052	牧之原市静谷	2010/02	20	0
006	島田市金谷猪土居	2009/07	22	0	053	御前崎市下朝比奈	2010/02	20	40
007	島田市金谷猪土居	2009/07	22	0			2011/04	20	75
008	島田市金谷富士見町	2009/07	40	3	054	御前崎市下朝比奈	2010/02	20	15
009	島田市金谷猪土居	2009/07	22	0	055	御前崎市下朝比奈	2010/02	20	0
010	島田市神谷城	2009/07	22	0	056	御前崎市下朝比奈	2010/02	20	0
011	菊川市倉沢	2009/07	24	0	057	御前崎市下朝比奈	2010/02	20	95
012	島田市金谷猪土居	2009/07	22	0	058	牧之原市菅ヶ谷	2010/02	20	40
013	島田市湯日	2009/07	23	0	059	牧之原市菅ヶ谷	2010/02	20	50
014	島田市切山	2009/07	22	0	060	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	30
015	島田市金谷猪土居	2009/07	22	0	061	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	5
016	島田市大代	2009/07	22	0	062	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	50
017	島田市大代	2009/07	22	0			2011/04	20	25
018	島田市横岡	2009/07	22	0	063	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	5
019	牧之原市布引原	2009/07	36	3			2011/04	20	40
020	牧之原市布引原	2009/07	35	3	064	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	10
021	牧之原市勝田	2009/07	24	0	065	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	25
022	島田市金谷富士見町	2009/07	34	3			2011/04	20	70
		2010/07	20	0	066	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	60
023	島田市金谷富士見町	2009/07	22	0	067	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	50
024	島田市金谷富士見町	2009/07	22	0			2011/04	20	40
025	島田市金谷猪土居	2009/07	22	0			2012/08	20	80
026	島田市金谷富士見町	2009/08	42	0	068	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	35
027	牧之原市静谷	2009/10	15	53			2011/04	20	40
028	御前崎市上朝比奈	2009/11	24	100	069	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	70
		2010/08	20	100	070	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	60
		2011/07	20	90			2012/08	20	70
029	牧之原市布引原	2009/11	20	5	071	御前崎市上朝比奈	2010/03	20	0
030	牧之原市布引原	2009/11	21	0	072	御前崎市上朝比奈	2010/03	20	35
031	牧之原市布引原	2009/11	20	0			2011/04	20	85
032	牧之原市静谷	2009/11	20	5	073	御前崎市上朝比奈	2010/03	20	40
033	御前崎市上朝比奈	2009/12	22	100	074	牧之原市菅ヶ谷	2010/03	20	0
034	御前崎市上朝比奈	2009/12	20	90	075	御前崎市上朝比奈	2010/03	20	5
		2010/07	20	80	076	御前崎市上朝比奈	2010/03	20	90
035	御前崎市上朝比奈	2009/12	21	86	077	御前崎市上朝比奈	2010/03	20	55
036	御前崎市上朝比奈	2009/12	20	90			2011/04	20	10
037	御前崎市上朝比奈	2009/12	20	0	078	牧之原市菅ヶ谷	2010/03	20	70
038	御前崎市上朝比奈	2009/12	37	0			2011/02	20	90
039	御前崎市上朝比奈	2009/12	20	95	079	菊川市神尾	2010/03	20	0
040	御前崎市下朝比奈	2009/12	20	10	080	御前崎市上朝比奈	2010/03	20	0
041	御前崎市上朝比奈	2009/12	37	89	081	御前崎市上朝比奈	2010/03	29	38
042	御前崎市上朝比奈	2009/12	36	89	082	御前崎市上朝比奈	2010/03	20	5
		2011/02	20	90	083	御前崎市上朝比奈	2010/03	20	0
043	御前崎市上朝比奈	2010/01	20	5	084	御前崎市下朝比奈	2010/03	20	60
044	御前崎市上朝比奈	2010/01	20	95	085	御前崎市下朝比奈	2010/03	20	0
045	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	95	086	御前崎市下朝比奈	2010/03	20	15
046	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	100	087	御前崎市下朝比奈	2010/03	20	0
047	御前崎市上朝比奈	2010/02	20	90	088	御前崎市下朝比奈	2010/03	20	90
		2011/04	20	75			2011/04	20	95
048	御前崎市上朝比奈	2010/02	30	60	089	御前崎市新野	2010/03	20	20

表2-1 (つづき)

圃場 No.	所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)	圃場 No.	所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)
090	御前崎市新野	2010/03	20	0	142	島田市阪本	2010/08	20	15
091	牧之原市菅ヶ谷	2010/03	20	50			2012/03	20	15
		2011/04	20	75	143	島田市阪本	2010/08	20	0
092	牧之原市菅ヶ谷	2010/03	20	20			2013/02	20	0
093	牧之原市菅ヶ谷	2010/03	20	90	144	牧之原市東萩間	2010/08	20	20
094	牧之原市菅ヶ谷	2010/03	20	100	145	島田市金谷猪土居	2010/09	20	0
095	御前崎市下朝比奈	2010/04	20	0	146	牧之原市東萩間	2010/09	20	65
096	御前崎市上朝比奈	2010/04	20	20	147	牧之原市白井	2010/09	20	5
097	御前崎市下朝比奈	2010/04	20	5	148	牧之原市静谷	2010/09	20	40
098	御前崎市下朝比奈	2010/04	20	100	149	牧之原市静谷	2010/09	20	25
099	牧之原市萩間	2010/06	20	35	150	牧之原市白井	2010/09	20	0
100	牧之原市萩間	2010/06	20	5	151	牧之原市静谷	2010/09	20	0
101	島田市船木	2010/06	20	0	152	牧之原市静谷	2010/09	20	0
102	島田市牧之原	2010/06	20	0	153	牧之原市静谷	2010/09	20	5
103	御前崎市上朝比奈	2010/07	20	0	154	牧之原市静谷	2010/09	20	5
104	御前崎市上朝比奈	2010/07	20	20	155	牧之原市静谷	2010/09	20	10
		2012/08	20	80	156	牧之原市勝俣	2010/09	20	5
105	島田市湯日	2010/07	20	0	157	牧之原市勝俣	2010/09	20	5
106	島田市湯日	2010/07	20	0	158	牧之原市勝俣	2010/09	20	20
107	島田市湯日	2010/07	20	0	159	牧之原市勝俣	2010/09	20	5
108	島田市湯日	2010/07	20	0	160	牧之原市静波	2010/09	20	0
109	島田市湯日	2010/07	20	0	161	牧之原市静波	2010/09	20	65
110	島田市湯日	2010/07	20	0	162	牧之原市静波	2010/09	20	30
111	島田市湯日	2010/07	20	0	163	牧之原市静波	2010/09	20	95
112	島田市湯日	2010/07	20	0	164	牧之原市静波	2010/09	20	35
113	島田市湯日	2010/07	20	10	165	牧之原市勝俣	2010/10	20	80
114	島田市湯日	2010/07	20	0	166	牧之原市大江	2010/10	20	30
115	島田市金谷富士見町	2010/07	20	0	167	牧之原市大江	2010/10	20	45
116	島田市金谷富士見町	2010/07	20	0	168	牧之原市西萩間	2010/10	20	0
117	島田市湯日	2010/07	20	0	169	牧之原市白井	2010/11	20	50
118	島田市湯日	2010/07	20	0	170	牧之原市静波	2010/11	20	20
119	島田市湯日	2010/07	20	0	171	牧之原市静波	2010/11	20	25
120	島田市湯日	2010/07	20	0	172	牧之原市静波	2010/11	20	5
121	島田市湯日	2010/07	20	0	173	牧之原市静波	2010/11	20	10
122	島田市湯日	2010/07	20	5	174	島田市阪本	2010/12	20	35
123	島田市湯日	2010/07	24	0	175	牧之原市静波	2011/01	20	20
124	島田市湯日	2010/07	20	0	176	牧之原市片浜	2011/01	20	75
125	島田市湯日	2010/07	20	0	177	牧之原市大江	2011/01	20	25
126	島田市湯日	2010/07	20	0	178	御前崎市上朝比奈	2011/02	20	80
127	島田市湯日	2010/07	20	5	179	牧之原市片浜	2011/02	20	10
128	島田市阪本	2010/08	22	0	180	牧之原市大江	2011/02	20	0
129	島田市阪本	2010/08	22	5	181	牧之原市大江	2011/02	20	0
130	島田市阪本	2010/08	22	0	182	牧之原市大江	2011/02	20	0
131	島田市阪本	2010/08	21	0	183	牧之原市片浜	2011/02	20	10
132	島田市阪本	2010/08	22	0	184	牧之原市片浜	2011/02	20	0
133	島田市阪本	2010/08	22	0	185	牧之原市片浜	2011/02	20	15
134	島田市阪本	2010/08	22	95	186	牧之原市片浜	2011/02	20	0
135	島田市阪本	2010/08	22	5	187	牧之原市大江	2011/02	20	15
136	島田市阪本	2010/08	22	77	188	牧之原市片浜	2011/02	20	40
137	島田市船木	2010/08	21	5	189	牧之原市片浜	2011/02	20	0
138	牧之原市白井	2010/08	20	15	190	牧之原市片浜	2011/02	20	15
139	島田市阪本	2010/08	20	100	191	牧之原市片浜	2011/02	20	15
140	牧之原市東萩間	2010/08	20	0	192	牧之原市大江	2011/02	20	25
141	牧之原市東萩間	2010/08	20	5	193	島田市阪本	2011/03	20	20

表2-1 (つづき)

圃場 No. 所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)	圃場 No. 所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)
(193つづき)	2012/03	20	15	233 牧之原市静波	2011/03	20	5
194 島田市阪本	2011/03	20	0	234 牧之原市道場	2011/03	20	20
	2012/03	20	0	235 牧之原市道場	2011/03	20	50
195 島田市阪本	2011/03	20	60	236 島田市金谷猪土居	2011/03	20	0
	2012/02	20	50	237 牧之原市道場	2011/03	20	15
196 島田市阪本	2011/03	20	0	238 牧之原市道場	2011/03	20	10
	2012/01	20	0	239 牧之原市静波	2011/03	20	0
197 島田市阪本	2011/03	20	45	240 牧之原市道場	2011/03	20	0
198 島田市阪本	2011/03	20	55	241 牧之原市道場	2011/03	20	0
199 島田市阪本	2011/03	20	25	242 牧之原市道場	2011/03	20	30
	2012/03	20	20	243 牧之原市道場	2011/03	20	80
200 島田市阪本	2011/03	20	0	244 牧之原市道場	2011/03	20	45
	2012/03	18	0	245 牧之原市勝俣	2011/03	20	0
201 島田市阪本	2011/03	20	0	246 牧之原市道場	2011/03	20	10
202 島田市阪本	2011/03	20	0	247 牧之原市道場	2011/03	20	45
203 島田市阪本	2011/03	20	15	248 牧之原市静波	2011/03	20	10
204 島田市阪本	2011/03	20	90	249 牧之原市静波	2011/03	20	5
205 島田市阪本	2011/03	20	0	250 牧之原市勝俣	2011/03	20	0
206 島田市阪本	2011/03	20	15	251 島田市阪本	2011/03	20	0
207 島田市阪本	2011/03	20	5	252 島田市阪本	2011/03	20	15
208 島田市阪本	2011/03	20	35	253 島田市阪本	2011/03	19	0
209 島田市阪本	2011/03	20	55	254 島田市阪本	2011/03	19	47
210 島田市阪本	2011/03	20	0		2012/01	20	50
211 島田市阪本	2011/03	20	0	255 島田市阪本	2011/03	20	0
212 島田市阪本	2011/03	20	55		2012/01	16	0
213 島田市阪本	2011/03	20	0	256 島田市阪本	2011/03	20	0
214 島田市阪本	2011/03	20	55		2012/01	20	0
215 島田市阪本	2011/03	20	10	257 島田市阪本	2011/03	20	5
216 島田市阪本	2011/03	20	0	258 島田市阪本	2011/03	20	80
217 島田市阪本	2011/03	20	0		2012/01	20	85
218 島田市阪本	2011/03	20	95	259 島田市阪本	2011/03	20	80
	2013/02	20	75		2012/02	20	40
219 島田市阪本	2011/03	20	50	260 島田市阪本	2011/03	20	20
	2012/02	20	40		2012/02	20	20
220 島田市阪本	2011/03	20	50	261 島田市阪本	2011/03	20	0
	2013/02	20	10		2012/02	20	0
221 島田市阪本	2011/03	20	50	262 島田市阪本	2011/03	20	20
	2013/02	20	75		2012/03	20	65
222 島田市阪本	2011/03	20	0	263 島田市阪本	2011/03	20	40
	2013/01	20	0		2012/02	20	80
223 島田市阪本	2011/03	30	30	264 島田市阪本	2011/03	20	100
	2013/01	20	25		2012/02	20	85
224 島田市阪本	2011/03	30	13	265 島田市阪本	2011/03	20	70
	2013/01	20	35		2012/03	20	70
225 島田市阪本	2011/03	30	33	266 島田市阪本	2011/03	20	20
	2013/01	20	5		2012/03	20	65
226 島田市阪本	2011/03	20	0	267 島田市阪本	2011/03	20	5
	2013/01	20	0		2012/02	20	5
227 島田市阪本	2011/03	20	5	268 牧之原市片浜	2011/04	20	0
228 島田市阪本	2011/03	20	100	269 牧之原市大江	2011/04	20	0
229 牧之原市白井	2011/03	20	0	270 牧之原市静波	2011/04	20	45
230 牧之原市白井	2011/03	20	10	271 牧之原市大江	2011/04	20	0
231 牧之原市静波	2011/03	20	10	272 牧之原市大江	2011/04	20	5
232 牧之原市静波	2011/03	20	5	279 菊川市東横地	2011/04	20	0

表2-1 (つづき)

圃場 No.	所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)	圃場 No.	所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)
280	菊川市東横地	2011/04	20	5	334	菊川市友田	2011/10	22	23
281	菊川市東横地	2011/04	20	0			2013/02	20	5
282	菊川市三沢	2011/04	20	0	335	菊川市友田	2011/11	22	0
284	菊川市倉沢	2011/06	20	0	336	菊川市友田	2011/11	22	0
285	島田市金谷猪土居	2011/06	20	0	337	菊川市友田	2011/11	20	0
286	島田市金谷猪土居	2011/07	20	0	338	吉田町神戸	2011/11	20	5
287	菊川市倉沢	2011/07	19	11	339	吉田町神戸	2011/11	22	0
288	菊川市倉沢	2011/07	21	5	340	吉田町神戸	2011/11	22	0
289	菊川市倉沢	2011/07	20	5	341	吉田町神戸	2011/11	22	0
290	菊川市倉沢	2011/07	20	0	342	吉田町神戸	2011/11	20	0
291	菊川市吉沢	2011/07	20	0	343	吉田町神戸	2011/11	22	0
292	島田市切山	2011/07	21	5	344	牧之原市坂部	2011/11	21	0
293	牧之原市勝田	2011/07	22	23	345	吉田町神戸	2011/11	22	0
294	牧之原市勝田	2011/07	20	5	346	吉田町神戸	2011/11	22	0
295	牧之原市切山	2011/07	20	0	347	御前崎市下朝比奈	2011/11	20	90
296	島田市切山	2011/07	20	0	348	島田市船木	2011/11	20	0
297	牧之原市布引原	2011/07	20	5	349	島田市船木	2011/11	20	0
298	菊川市倉沢	2011/07	22	0	350	島田市船木	2011/11	19	0
299	吉田町神戸	2011/08	22	0	351	吉田町片岡	2011/12	20	20
300	牧之原市坂部	2011/08	20	0	352	吉田町片岡	2011/12	20	0
301	島田市船木	2011/09	22	9	353	吉田町片岡	2011/12	20	10
302	島田市船木	2011/09	21	81	354	吉田町片岡	2011/12	22	91
303	島田市船木	2011/09	18	6	355	吉田町片岡	2011/12	20	0
304	島田市船木	2011/09	22	0	356	吉田町片岡	2011/12	20	0
305	牧之原市坂部	2011/09	20	0	357	吉田町片岡	2011/12	20	0
306	島田市船木	2011/09	20	0	358	吉田町片岡	2011/12	20	10
307	島田市船木	2011/09	20	0	359	吉田町片岡	2011/12	20	85
308	島田市船木	2011/09	19	0	360	吉田町片岡	2011/12	20	60
309	島田市船木	2011/09	20	0	361	吉田町片岡	2011/12	20	70
310	牧之原市坂部	2011/09	22	0	362	吉田町片岡	2011/12	20	0
311	島田市船木	2011/09	22	0	363	吉田町片岡	2011/12	20	35
312	牧之原市坂部	2011/10	22	0	364	吉田町片岡	2012/01	20	0
313	牧之原市坂部	2011/10	21	0	365	吉田町片岡	2012/01	20	5
314	吉田町神戸	2011/10	20	0	366	吉田町片岡	2012/01	20	90
315	吉田町神戸	2011/10	22	0	367	吉田町片岡	2012/01	20	15
316	吉田町神戸	2011/10	20	0	368	吉田町片岡	2012/01	20	10
317	吉田町神戸	2011/10	22	14	369	吉田町片岡	2012/01	20	5
318	吉田町神戸	2011/10	22	0	370	吉田町片岡	2012/01	20	10
319	吉田町神戸	2011/10	20	0	371	吉田町片岡	2012/01	20	0
320	吉田町神戸	2011/10	22	50	372	吉田町片岡	2012/01	20	20
321	吉田町神戸	2011/10	22	0	373	吉田町片岡	2012/01	20	45
322	牧之原市坂部	2011/10	22	14	374	吉田町片岡	2012/01	20	0
323	牧之原市坂部	2011/10	20	5	375	吉田町片岡	2012/01	20	10
324	牧之原市坂部	2011/10	22	0	376	吉田町片岡	2012/01	20	0
325	牧之原市坂部	2011/10	20	0	377	吉田町片岡	2012/01	20	0
326	菊川市友田	2011/10	20	15	378	吉田町片岡	2012/01	20	0
		2013/02	20	5	379	吉田町片岡	2012/01	20	0
327	菊川市友田	2011/10	20	0	380	吉田町片岡	2012/01	20	5
328	菊川市友田	2011/10	20	0	381	島田市阪本	2012/01	20	20
329	菊川市倉沢	2011/10	22	0	382	島田市阪本	2012/02	20	20
330	菊川市倉沢	2011/10	22	0	383	島田市阪本	2012/02	20	20
331	菊川市友田	2011/10	22	0	384	島田市阪本	2012/02	20	45
332	菊川市友田	2011/10	21	0	385	島田市阪本	2012/02	20	10
333	菊川市友田	2011/10	22	0	386	島田市阪本	2012/02	20	95

表2-1 (つづき)

圃場 No.	所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)	圃場 No.	所在地	調査年月	検定 菌株数	耐性 菌株率 (%)
387	島田市阪本	2012/02	20	0	454	島田市金谷猪土居	2012/11	20	5
388	島田市阪本	2012/02	20	60	455	島田市金谷猪土居	2012/11	20	0
389	島田市阪本	2012/02	20	70	456	島田市金谷猪土居	2012/11	20	0
390	島田市阪本	2012/02	20	85	457	島田市金谷猪土居	2012/11	20	0
391	島田市阪本	2012/02	20	100	458	島田市金谷猪土居	2012/11	20	0
392	島田市阪本	2012/02	20	85	459	島田市金谷猪土居	2012/11	20	15
393	島田市阪本	2012/02	20	0	460	島田市金谷猪土居	2012/11	20	0
394	島田市阪本	2012/03	20	90	461	島田市金谷猪土居	2012/11	20	20
395	島田市阪本	2012/03	20	85	462	島田市金谷猪土居	2012/11	20	20
396	島田市阪本	2012/03	20	5	463	島田市金谷猪土居	2012/12	20	5
397	島田市阪本	2012/03	20	100	464	島田市金谷猪土居	2012/12	20	5
398	島田市阪本	2012/03	20	25	465	島田市金谷猪土居	2012/12	20	0
399	島田市阪本	2012/03	20	85	466	島田市金谷猪土居	2012/12	20	0
400	島田市阪本	2012/03	20	65	467	島田市金谷猪土居	2012/12	20	10
401	島田市阪本	2012/03	20	20	468	島田市金谷猪土居	2012/12	20	0
402	島田市阪本	2012/03	20	65	469	島田市金谷猪土居	2012/12	20	20
403	島田市阪本	2012/03	20	75	470	島田市湯日	2012/12	20	5
404	島田市阪本	2012/03	20	45	471	島田市金谷猪土居	2013/01	20	10
405	島田市阪本	2012/03	20	75	472	島田市湯日	2013/01	20	25
406	島田市阪本	2012/03	20	95	473	島田市湯日	2013/01	20	5
407	島田市阪本	2012/03	20	90	474	島田市阪本	2013/01	20	60
408	島田市阪本	2012/03	20	65	475	島田市阪本	2013/01	20	75
409	島田市阪本	2012/03	20	10	476	島田市阪本	2013/02	20	5
410	島田市阪本	2012/03	20	10	477	島田市阪本	2013/02	20	25
411	島田市阪本	2012/03	20	100					
412	島田市阪本	2012/03	20	100					
413	島田市阪本	2012/03	20	0					
414	島田市阪本	2012/03	20	60					
415	島田市阪本	2012/03	20	10					
416	島田市阪本	2012/03	20	20					
417	御前崎市上朝比奈	2012/07	20	5					
431	御前崎市上朝比奈	2012/08	20	85					
432	御前崎市上朝比奈	2012/08	20	25					
433	島田市湯日	2012/09	20	45					
434	島田市湯日	2012/09	20	20					
435	御前崎市上朝比奈	2012/09	20	10					
436	御前崎市上朝比奈	2012/09	20	30					
437	島田市金谷猪土居	2012/09	20	40					
438	島田市湯日	2012/09	20	85					
439	島田市金谷猪土居	2012/09	20	5					
440	島田市金谷猪土居	2012/09	29	28					
441	島田市湯日	2012/10	20	85					
442	島田市湯日	2012/10	20	80					
443	島田市湯日	2012/10	20	80					
444	島田市湯日	2012/10	20	0					
445	島田市湯日	2012/10	20	0					
446	島田市金谷猪土居	2012/10	20	0					
447	島田市金谷猪土居	2012/10	20	85					
448	島田市金谷猪土居	2012/10	20	0					
449	島田市金谷猪土居	2012/10	20	0					
450	島田市金谷猪土居	2012/10	20	5					
451	島田市金谷猪土居	2012/11	20	0					
452	島田市金谷猪土居	2012/11	20	0					
453	島田市金谷猪土居	2012/11	20	5					

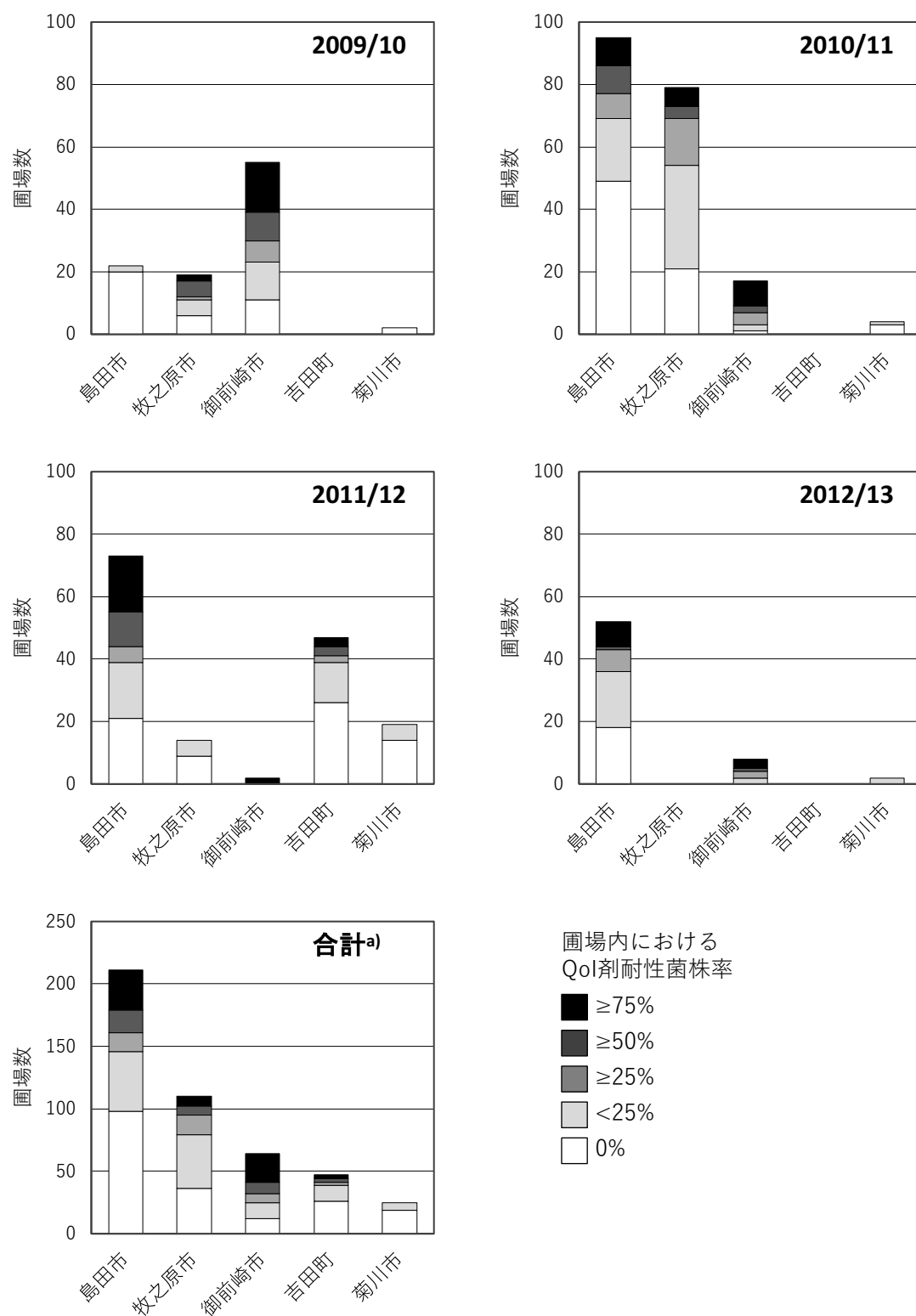


図2-3 牧ノ原台地の茶園におけるQol剤耐性チャ輪斑病菌の発生実態

^{a)} 複数年にわたって調査した圃場は最大値のみを集計した。

表2-2 圃場内のQol剤耐性菌株率の年次変動

圃場No.	所在地	耐性菌株率 (%)			
		2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013
022	島田市	3	— ^{a)}	—	0
028	御前崎市	100	100	90	—
034	御前崎市	90	80	—	—
042	御前崎市	89	90	—	—
047	御前崎市	90	75	—	—
049	御前崎市	55	65	—	—
053	御前崎市	40	75	—	—
062	御前崎市	50	25	—	—
063	御前崎市	5	40	—	—
065	御前崎市	25	70	—	—
067	御前崎市	50	40	—	80
068	御前崎市	35	40	—	—
070	御前崎市	60	—	70	—
072	御前崎市	35	85	—	—
077	御前崎市	55	10	—	—
078	御前崎市	70	90	—	—
088	御前崎市	90	95	—	—
091	御前崎市	50	75	—	—
104	御前崎市	—	20	—	80
142	島田市	—	15	15	—
143	島田市	—	0	—	0
193	島田市	—	20	15	—
194	島田市	—	0	0	—
195	島田市	—	60	50	—
196	島田市	—	0	0	—
199	島田市	—	25	20	—
200	島田市	—	0	0	—
218	島田市	—	95	75	—
219	島田市	—	50	40	—
220	島田市	—	50	—	10
221	島田市	—	50	—	75
222	島田市	—	0	—	0
223	島田市	—	30	—	25
224	島田市	—	13	—	35
225	島田市	—	33	—	5
226	島田市	—	0	—	0
254	島田市	—	47	50	—
255	島田市	—	0	0	—
256	島田市	—	0	0	—
258	島田市	—	80	85	—
259	島田市	—	80	40	—
260	島田市	—	20	20	—
261	島田市	—	0	0	—
262	島田市	—	20	65	—
263	島田市	—	40	80	—
264	島田市	—	100	85	—
265	島田市	—	70	70	—
266	島田市	—	20	65	—
267	島田市	—	5	5	—
326	菊川市	—	—	15	5
334	菊川市	—	—	23	5

a) —: 未調査

第3節 その他の地域における耐性菌の発生実態

本研究では静岡県牧ノ原台地を中心に耐性菌の発生実態を調査したが，静岡県内の他地域および他県についても調査を行った．

材料および方法

2009～2012 年に静岡県袋井市，川根本町および掛川市ならびに香川県，三重県および滋賀県の茶園から輪斑病罹病葉を採集し，前節と同様に QoI 剤感受性検定を行った．

結果および考察

静岡県では，袋井市の数百 ha の茶園からなる産地の 17 圃場，川根本町の数十 ha の産地の 2 圃場，掛川市の小規模の茶園が散在する地域の 1 圃場で採集した 436 菌株を検定した結果，8 圃場の 77 菌株が QoI 剤耐性であった（表 2-3）．袋井市の 3 圃場で耐性菌株率が 50%以上と高かった．香川県では，小規模茶園が散在する地域の 5 圃場および同県農業試験場内の 1 圃場で採集した 128 菌株を検定した結果，耐性菌は検出されなかった（表 2-3）．三重県では，北部（四日市市，鈴鹿市，亀山市）および中部（松阪市，大台町）の大規模な産地の 11 圃場 90 菌株を検定した結果，耐性菌は検出されなかった（表 2-3）．滋賀県では約 10 ha の茶産地の 1 圃場で採集した 21 菌株を検定した結果，1 菌株が耐性菌であった（表 2-3）．

本調査の他に，各県の公設試験研究機関による調査が茨城県，埼玉県，静岡県，滋賀県，福岡県，宮崎県および鹿児島県で行われている．その結果，最初に耐性菌の出現が報告された鹿児島県に加え，静岡県および宮崎県で耐性菌が検出された（富濱ら 2009；宮崎県総合農業試験場茶業支場 2011；尾松ら 2012；外側 2015）．鹿児島県では調査を行った 7 地域中 6 地域で耐性菌が検出された（富濱ら 2009；尾

松ら 2012). 最初に耐性菌が検出された南薩地域で検出率が最も高く、2008 年の鹿児島県全体における検出圃場率が 31.7%、耐性菌株率が 12.8%であったのに対して、南薩地域では検出圃場率 57.7%、耐性菌株率 26.2%であった (富濱ら 2009). また、耐性菌株率が 100%であった 8 圃場のうち 7 圃場が南薩地域の圃場であった (富濱ら 2009). 静岡県では県内の主要 5 産地のすべてで耐性菌が検出され、静岡県全体における耐性菌検出圃場率は 24.8%、耐性菌株率は 10.1%で、耐性菌はすでに静岡県全域に広く分布しているものと考えられた (外側 2015). 鹿児島県と同様に耐性菌の発生状況には地域間差がみられ、最も検出率の高かった牧ノ原地域では検出圃場率が 43.1%であったのに対し、最も低かった富士山麓は 5.6% (18 圃場中 1 圃場) であった (外側 2015). 牧ノ原地域は他の地域に比べて輪斑病の発生程度および QoI 剤の使用頻度が高く、これらのことが耐性菌増加の要因であると考えられた (外側 2015).

以上の結果から、耐性菌はすでに国内各地に広く分布しており、静岡県および鹿児島県では県内のほぼ全域に発生していることが明らかとなった。輪斑病菌の分生子は雨滴によって飛散するため (堀川 1986c; 江塚・安藤 1994; 西島 2008), 飛散距離はごく短いと考えられる。また、宿主のチャは永年性作物で、ひとたび圃場に定植されると数十年にわたって栽培されるため、宿主植物を介した菌の伝播が起こる頻度は低い。したがって、各地で発生している耐性菌は、ある地域で発生した系統が他の地域へ伝播したのではなく、それぞれの地域で独立して出現したものと推測される。このため、現在は耐性菌の発生が確認されていない地域や圃場でも QoI 剤を使用している限り、常に耐性発達のリスクが伴うと考えられる。日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会 (2012) が策定した「野菜・果樹・茶における QoI 剤及び SDHI 剤使用ガイドライン」において、チャ輪斑病菌は耐性菌発生リスク「高」と位置付けられており、耐性菌未発生圃場の場合の QoI 剤の使用回数は、単剤の場合は 1 年 1 回まで、混用 (効果が期待できる他の成分を含む) の場合は 1 年 2 回ま

で，とされている．QoI 剤による輪斑病の防除においてはガイドラインを遵守するとともに，定期的かつ継続的な感受性モニタリングが必要であろう．

表2-3 牧ノ原台地以外の地域におけるQol剤耐性菌の発生実態

採集地	採集年月	検定菌株数	耐性菌株率 (%)
静岡県			
袋井市豊沢	2011/04	20	0
袋井市豊沢	2011/04	20	0
袋井市豊沢	2011/04	20	0
袋井市豊沢	2011/04	20	0
袋井市豊沢	2011/04	20	0
袋井市豊沢	2011/04	20	100
袋井市豊沢	2011/04	20	25
掛川市大坂	2012/07	40	0
榛原郡川根本町地名	2012/07	44	9
榛原郡川根本町地名	2012/07	12	0
袋井市豊沢	2012/07	20	0
袋井市豊沢	2012/07	20	0
袋井市豊沢	2012/07	20	45
袋井市豊沢	2012/07	20	95
袋井市豊沢	2012/07	20	65
袋井市山崎	2012/07	20	5
袋井市山崎	2012/07	20	0
袋井市山崎	2012/07	20	30
袋井市岡崎	2012/07	20	0
袋井市岡崎	2012/07	20	0
三重県			
多気郡大台町	2009/12	9	0
松阪市飯高町	2012/02	13	0
松阪市飯南町	2012/02	5	0
松阪市飯南町	2012/02	9	0
多気郡大台町栃原	2012/02	6	0
鈴鹿市長沢	2012/02	12	0
鈴鹿市山本町	2012/02	4	0
四日市市水沢町	2012/02	2	0
四日市市宮妻町	2012/02	6	0
四日市市宮妻町	2012/02	18	0
亀山市中ノ山	2012/02	6	0
滋賀県			
甲賀市信楽町	2011/09	21	5
香川県			
仲多度郡まんのう町 (香川県農業試験場満濃分場)	2009/07	22	0
三豊市高瀬町	2009/07	22	0
三豊市高瀬町	2009/07	20	0
高松市塩江町	2009/07	22	0
高松市塩江町	2009/07	22	0
高松市塩江町	2009/07	20	0

第3章 チャ輪斑病菌の QoI 剤中等度耐性の解析

牧ノ原台地における QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の発生実態を調査する過程で、QoI 剤に対して耐性と感受性の中間的な反応を示す菌株が検出された。これらの菌株は、QoI 剤添加培地に接種して4日間培養後の生育は無いかごく僅かで、前章の判定基準に従うと感受性と判定される。しかし、培養を続けると明らかな菌叢生育がみられ、蛍光灯あるいは BLB 照射下で分生子を形成した。この分生子を用いて再検定を行っても同様の反応を示したことから、これらの菌株は従来の耐性菌（以下、高度耐性菌）と感受性菌の中間的な QoI 剤感受性をもった中等度耐性菌であると考え、その性質を解析した。

第1節 中等度耐性の原因遺伝子変異

菌類や卵菌類の QoI 剤耐性は通常、QoI 剤の作用点であるミトコンドリア電子伝達系の複合体 III を構成するチトクローム *b* のアミノ酸置換に起因する (Fernández-Ortuño et al. 2010)。QoI 剤低感受性菌や実験室内で作出された感受性低下変異株では QoI 剤耐性に寄与するアミノ酸置換が多数報告されているが (Zheng and Köller 1997)、このうち、これまでに植物病原菌の QoI 剤耐性圃場分離株で検出されたものは 143 番目のグリシンのアラニンへの置換 (G143A)、129 番目のフェニルアラニンのロイシンへの置換 (F129L) および 137 番目のグリシンのアルギニンへの置換 (G137R) の3種類である (Fernández-Ortuño et al. 2010)。最も強い QoI 剤耐性を引き起こすのは G143A 変異で、圃場において防除上の問題となっている QoI 剤耐性菌の多くは G143A 変異に起因する。鹿児島県における輪斑病菌の高度耐性も G143A 変異に起因することが明らかとなっている (富濱ら 2009)。我々の調査で検出された静岡県産の高度および中等度耐性菌株の原因遺伝

子変異を明らかにするため、チトクローム *b* 遺伝子 (*cytb*) のシークエンス解析を行った。

材料および方法

(1) 供試菌株

前章の調査において、病斑上に生じた分生子をアゾキシストロビン 100 µg/ml および没食子酸 *n*-プロピル 2 mM 含有 PDA 培地に接種して 4 日間培養後、菌叢生育が無いかごく僅かで感受性と判定された菌株のうち、7 日後に明確な菌叢生育がみられた菌株を中等度耐性とみなした (図 3-1)。検定終了後の平板を BLB 照射下で培養して分生子を形成させ、単孢子分離菌株を得た (表 3-1)。

(2) シークエンス解析

供試菌株を、オートクレーブ処理して PDA 培地に置いたセロファンフィルム上に接種し、25°C で 3~4 日間培養した。菌体を採取して凍結乾燥し、Mini-Beadbeater-8 (BioSpec Products) で破碎した後、DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン) を用いて全 DNA を抽出した。この DNA 溶液を鋳型とし、プライマー RSCBF1 および RSCBR2 (Ishii et al. 2001; 富濱ら 2009) を用いて *cytb* の部分配列を増幅した。PCR 反応液の組成は、KOD -Plus- Neo (東洋紡) 1 U, 1×PCR バッファー, MgSO₄ 1.5 mM, dNTP 各 200 µM, プライマー各 0.3 µM, 鋳型 DNA 60 ng で、全量を 50 µl とした。増幅反応は、熱変性 94°C 2 分間の後、熱変性 98°C 10 秒間、アニーリング 54°C 30 秒間、伸長反応 68°C 1 分間を 30 サイクル行い、最後に伸長反応を 68°C で 2 分間行った。増幅産物に 1/9 倍量の 10× A-attachment mix (東洋紡) を添加し、60°C で 10 分間インキュベートして dA 付加を行った後、pGEM-T Easy Vector System (プロメガ) を用いてクローニングした。これを大腸菌 DH5α 株に導入して増殖し、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System

(プロメガ) でプラスミドを精製した。シーケンス解析はユーロフィンジェノミクス株式会社に委託して行った。

結果および考察

PCR の結果、多くの菌株では鹿児島県産菌株 (富濱ら 2009) と同様に 286 bp の増幅産物が得られたが、一部の菌株ではこれよりも長い 1,520 bp の遺伝子断片が増幅された (図 3-2)。286 bp の増幅産物のシーケンス解析の結果、感受性菌株 K08-2 (DDBJ アクセッション番号 AB713421), K19-1, K20-1 および K22-1 の塩基配列は既報の鹿児島県産感受性菌株 (FJ811964) と一致した (図 3-3, 表 3-1)。また、高度耐性菌株 K08-5 (AB713422), K19-12, K20-5 および K22-15 の塩基配列は鹿児島県産高度耐性菌株 (FJ811965) と一致し、コドン 143 に相当する箇所の塩基配列が GGT から GCT に、推定アミノ酸がグリシンからアラニンに置換 (G143A) していた (図 3-3, 3-4, 表 3-1)。このことから、静岡県の輪斑病菌にみられる高度耐性は鹿児島県と同様に G143A 変異に起因することが確認された。中等度耐性菌株 K42-6 (AB713423) および K73-20 では、コドン 129 に相当する箇所の塩基配列が TTC から TTG に、推定アミノ酸がフェニルアラニンからロイシンに置換 (F129L) していた (図 3-3, 3-4, 表 3-1)。感受性菌株 K66-2 (AB713424) および K133-10, 中等度耐性菌株 K38-8 (AB713426) および K41-5 ならびに高度耐性菌株 K68-1 (AB713425) および K139-1 から得られた 1,520 bp の増幅産物の塩基配列を 286 bp の増幅産物と比較すると、コドン 131 と 132 の間に 1,234 bp の挿入配列が存在した (図 3-3, 表 3-1)。この挿入配列は、自身の 3'末端がG、上流のエキシソンの 3'末端がTで、エンドヌクレアーゼと高い相同性を示す ORF を含むことから、group I イントロンであると考えられた (Nielsen and Johansen 2009)。このイントロンの有無に関わらず、高度耐性菌株では G143A 変異、中等度耐性菌株では F129L 変異が認められた (図 3-3, 3-4, 表 3-1)。これらの QoI 剤耐性に関

わる一塩基置換を除くと、エキソンおよびイントロンの塩基配列は解析したすべての菌株でそれぞれ 100%一致した (図 3-3)。

以上の結果から、輪斑病菌の *cytb* にはエキソン-イントロン構造の異なる 2 タイプがあり、いずれのタイプの菌株においても QoI 剤高度耐性は G143A 変異、中等度耐性は F129L 変異に起因することが明らかとなった。F129L 変異による QoI 剤耐性は、これまでにジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani*、トマト葉かび病菌 *Passalora fulva*、ブドウべと病菌 *Plasmopara viticola*、オオムギ網斑病菌 *Pyrenophora teres*、コムギ黄斑病菌 *Pyrenophora tritici-repentis*、ペレニアルライグラスいもち病菌 *Pyricularia oryzae* および立枯病菌 *Pythium aphanidermatum*、イネ紋枯病菌 *Rhizoctonia solani* で報告がある (Fungicide Resistance Action Committee 2012)。このうち、*Pl. viticola* (Grasso et al. 2006)、*Pyre. tritici-repentis* (Sierotzki et al. 2007) および *Pyri. oryzae* (Kim et al. 2003) では G143A 変異、さらに *Pyre. tritici-repentis* (Sierotzki et al. 2007) では G137R 変異による QoI 剤耐性も報告されている。国内でこれまでに F129L 変異菌の報告があるのは *Pa. fulva* のみである (Watanabe et al. 2017)。チャ輪斑病菌の F129L 変異菌は国内 2 例目の発見で、同一種内で G143A と F129L の 2 種類のアミノ酸置換による QoI 剤耐性菌が確認された国内初の事例である。

cytb のエキソン-イントロン構造は種によって大きく異なるが、一般的に種内においては保存的であるとされている (Grasso et al. 2006; Sierotzki et al. 2007)。しかし、*Botrytis cinerea* および *A. solani* で輪斑病菌と同様にエキソン-イントロン構造の種内多型が報告されている (Banno et al. 2009; Yin et al. 2012; Leiminger et al. 2013)。 *Botrytis cinerea* の *cytb* にはエキソン-イントロン構造の異なる 6 タイプが存在する (Yin et al. 2012)。コドン 143 と 144 の間にイントロンが存在する種では、G143A 変異が起きるとイントロンのスプライシングに支障を来して死に至るため、G143A 変異菌が出現しないとされている (Grasso et al. 2006; Sierotzki et al.

2007). このため *B. cinerea* では、この位置にイントロンをもたないタイプの *cytb* を有する菌株でのみ G143A 変異が検出された (Banno et al. 2009; Yin et al. 2012). 一方, *A. solani* ではコドン 126 と 127 の間のイントロンの有無に種内多型がみられる (Leiminger et al. 2013). アメリカではこのイントロンが無い系統, ヨーロッパではこのイントロンが有る系統で F129L 変異による耐性菌が検出されており, 耐性菌は両地域において独立して出現したと推測されている. 輪斑病菌では, エキソン-イントロン構造の異なるいずれのタイプの *cytb* でも G143A および F129L 変異が検出された. 従って, この 2 種類の変異菌はそれぞれ, イントロンの有無によって区別される 2 つの系統において独立して出現したものと推測された. また, 耐性菌の出現に影響するイントロンの存在は認められず, いずれの系統でも *cytb* の変異による耐性菌出現の可能性があると考えられた.

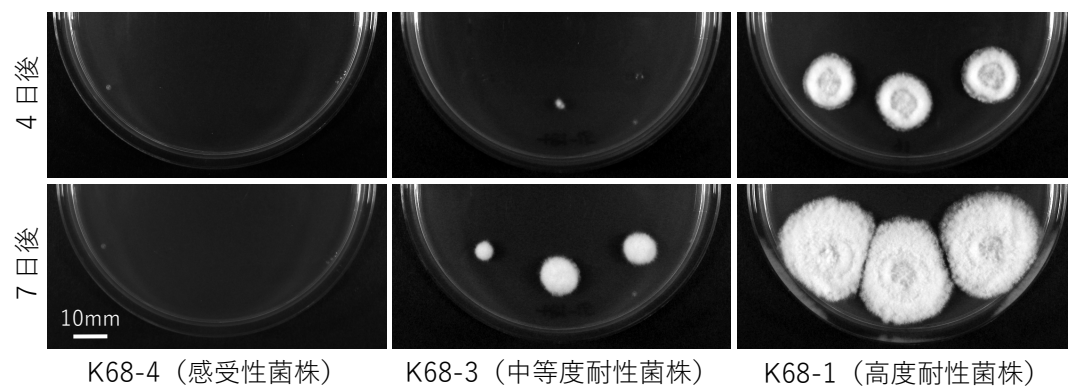


図3-1 Qol剤中等度耐性菌株の検定培地上での生育
 アゾキシストロビン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および没食子酸*n*-プロピル2 mM加用PDA培地に分生子を接種して25°Cで培養.

表3-1 供試菌株の来歴と特性

菌株	採集圃場 No.	採集年月	QoI剤 感受性 ^{a)}	チトクローム ^b	
				遺伝子型 ^{b)}	塩基配列 ^{c)}
K38-8	038	2009/12	MR	F129L(+)	AB713426
K41-5	041	2009/12	MR	F129L(+)	未登録
K42-6	042	2009/12	MR	F129L(-)	AB713423
K68-3	068	2010/02	MR	F129L(-)	-
K73-20	073	2010/03	MR	F129L(-)	未登録
K08-5	008	2009/07	HR	G143A(-)	AB713422
K19-12	019	2009/07	HR	G143A(-)	未登録
K20-5	020	2009/07	HR	G143A(-)	未登録
K22-15	022	2009/07	HR	G143A(-)	未登録
K68-1	068	2010/02	HR	G143A(+)	AB713425
K73-2	073	2010/03	HR	G143A(-)	未登録
K139-1	139	2010/08	HR	G143A(+)	未登録
K08-2	008	2009/07	S	WT(-)	AB713421
K19-1	019	2009/07	S	WT(-)	未登録
K20-1	020	2009/07	S	WT(-)	未登録
K22-1	022	2009/07	S	WT(-)	未登録
K68-4	068	2010/02	S	WT(-)	-
K73-1	073	2010/03	S	WT(-)	-
K66-2	066	2010/02	S	WT(+)	AB713424
K133-10	133	2010/08	S	WT(+)	未登録

a) HR: 高度耐性, MR: 中等度耐性, S: 感受性

b) カッコ内の記号 (+/-) はイントロンの有無

c) DDBJアクセッション番号, -は未解析

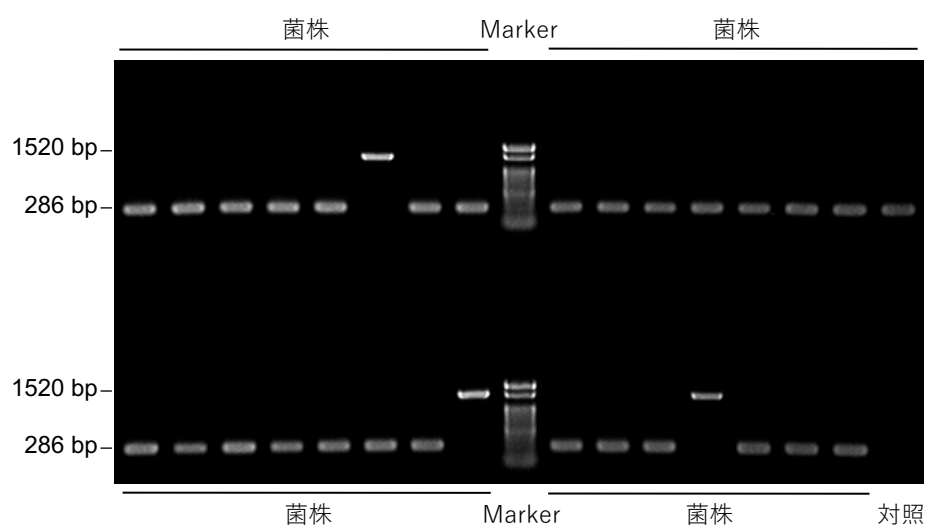


図3-2 チャ輪斑病菌のチトクローム*b*遺伝子のプライマーRSCBF1
およびRSCBR2によるPCR産物の電気泳動像

```

K66-2 ATGATTAGTTCGTTACTTACATAGTAATACAGCTTCAGCTTTCTTCTTTTAGTTTACTTACACATAGGTAGAGGTATGTATTACGGATCTTACAGATCTCCAAGAACATTAGTTTGAGC
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 TATTGGTACTGTTATACTTATACTTATGATGGCTACAGCTTTCTCTGGGTTACCAACATAGCCCAAAATGATATAATACAAAAAGTTTAAATAATAAAAAATAAGTTTCAGGATACTTAAC
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 AAGAAATATGATTAGAAATTATAGTACAAAATCTCCTGTACCTGCATCTAATTTTTCTAATAATTACAAGATGTGATTAAAGAATTACAATTAATCCGATTTATGTTTTCGAGGATTT
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 AACTTTAGAAACAATAAAAAAGATATTTTAAAATCTACTTCAGGTTTAAAGTGGTATATATATGGTAATAATAAAAAAGAACAAAAGATTATTATATAGGTTCTGCATCTACTGATAGATT
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 TTATGCTAGATTAGTAATCATCTTATTTATTTTAGAGGTAGTAAAGTACTTAAAGCTGCAGTAAAAAATATGGTTTAAATAATTTTTCTTTTTGGTTCTAGAGTTATATCCTGAAGT
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 TATACTAAAGAAAAATAAAGGAGTTATTAATTTAGAGATAAATATTTGAAAACCTTATTACCTAATTATAATATTTAACTGAAGCAGGATCTAGTTTTGGTTATAAACATACAGA
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 AATAGATCGTATAAAAAATGAGAGAAATTTTAGTGATGAAAGACGAGAACAAATAGGAAGTTTAAATAGAGGTAAAAAATTTCTCCTGAAACAATAGAAAAAATCAGGAAAAAGCTCT
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 TAATAGACCTCCTATGTCAAATGAACTAAATTAAGTATTTCTCATACGAGATCTGTTATTTATACAATTTAAATGATACTGTTTATGGTAAATATCCACAATAGTAGAAGCAGC
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 TAAAGCTATTAATTGTGATGAAAAACGATCCGAAGAGCTTTAAAAACAGAAAAAAATAGTCAAAAGACAATGAATAGTTAAAGATACTAATCATACTTATTTTAAAAACAACT
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 TTTTATATTATATTATAGTCTCACGAGTAAAAATCTTTTGCAATTTTATAGAGAAAAAAGATTAAAGTGATATAGCCCGACGGGGTTATAGAATAATATTGAATATTATTGGCGAT
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 GCTAGTGAACGATTAAAGAAGTTAATAAACTTTAAGATCGTCGGTTATATAAATGATCGCGACAGACTGGGTCACTGGTGGGTAGCTGAAATGCTGCTTAATGCACAGTCGGAACTTT
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 TAGTAAAAATGAAATGGAATTAACATAAGAAATTTCAAATTCAAAGGTATTCTAGCTTATCTATTATTGATAAGTAAGTGTGTATGTTCTCCATATGGACAAATGCTTTATGAGGTG
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

K66-2 CTACAGTTATTACAACTTGATTAGTGCTATA
K38-8 .....
K68-1 .....
K08-2 .....
K42-6 .....
K08-5 .....

```

図3-3 チャ輪斑病菌のチトクローム*b*遺伝子の部分塩基配列

K66-2およびK08-2はQoI剤感受性，K38-8およびK42-6は中等度耐性，K68-1およびK08-5は高度耐性菌株。点は感受性菌株K66-2と同一塩基，バーはギャップ，□はコドン129および143に相当する部位を示す。

		129		143
K66-2, K08-2	WLVRYLHSNTASAFFFLVYLHIGRGMYYGSYRSPRTLVAIGTVILILMMATAFLGYVLPYGQMSLWGATVITNLISAI			
K38-8, K42-6L.....			
K68-1, K08-5A.....			

図3-4 チャ輪斑病菌のチトクローム*b*の部分推定アミノ酸配列

K66-2およびK08-2はQoI剤感受性，K38-8およびK42-6は中等度耐性，K68-1およびK08-5は高度耐性菌株．
 点は感受性菌株と同一のアミノ酸，数字は129および143番目のアミノ酸残基に相当する部位を示す．

第2節 中等度耐性菌の各種 QoI 剤に対する感受性

一般に常用濃度の QoI 剤の散布は *cytb* の F129L 変異による中等度耐性菌に対して十分な防除効果を示すとされている (Fungicide Resistance Action Committee 2006). しかし, トマト葉かび病菌 *Pa. fulva* のように F129L 変異菌による QoI 剤の防除効果の低下が実際に圃場で確認されている例もある (Watanabe et al. 2017). そこで, 輪斑病菌の高度耐性菌および中等度耐性菌に対する QoI 剤の有効性を明らかにするため, 培地およびチャ切離葉における G143A 変異菌株と F129L 変異菌株の各種 QoI 剤に対する感受性を調査した.

材料および方法

(1) 供試薬剤

QoI 剤として, 市販のアゾキシストロビン水和剤 [アミスター20フロアブル, 有効成分 20% (w/w), シンジェンタジャパン], クレソキシムメチル水和剤 [ストロビーフロアブル, 有効成分 41.5% (w/w), 日本曹達], トリフロキシストロビン水和剤 [フリントフロアブル 25, 有効成分 25% (w/w), バイエルクロップサイエンス] およびピリベンカルブ水和剤 [ファンタジスタ顆粒水和剤, 有効成分 40% (w/w), クミアイ化学工業] を供試した (図 1-2).

(2) 培地における QoI 剤感受性

供試薬剤を蒸留水で設定濃度の 10 倍の濃度に希釈し, 溶解した PDA 培地に 1/9 倍量の薬剤希釈液を混和して, 供試薬剤 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 および 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と没食子酸 *n*-プロピル 2 mM を含有する PDA 培地を調製した. 供試菌株を PDA 培地, 25°C で 4 日間培養して, 菌叢外周部から直径 6 mm の菌叢ディスクを取り, 菌叢面が培地に接するように検定培地に置床した. 25°C で 4 日間培養後に菌叢直径

を測定し、菌叢ディスク直径の 6 mm を減じて菌叢伸長量とした。以下の計算式によって菌叢生育率および生育阻害率を算出した。菌叢生育率 = QoI 剤加用区の菌叢伸長量 / QoI 剤無加用区の菌叢伸長量 $\times 100$ ，生育阻害率 = $100 - \text{菌叢生育率}$ 。薬剤濃度に対する菌叢生育率を対数目盛上にプロットして 50%生育阻止濃度 (EC_{50}) を決定し、耐性係数 (resistance factor, RF) を以下の計算式によって算出した。RF = 耐性菌株の EC_{50} / 感受性菌株の EC_{50} 。

(3) チャ切離葉における QoI 剤感受性

圃場から採取したチャ品種「やぶきた」の成葉に 3×3 mm の十字形の傷を付けたのち、農薬登録上の希釈倍数 (アゾキシストロビン水和剤、クレソキシムメチル水和剤およびトリフロキシストロビン水和剤は 2,000 倍、ピリベンカルブ水和剤は 3,000 倍) で希釈した供試薬剤に瞬時浸漬した。対照は蒸留水に浸漬した。風乾したのち、付傷部に供試菌株の分生子懸濁液 (2×10^5 個/ml) 5 μ l を滴下した。1 処理区あたりチャ葉 5~10 枚を用いて計 10~20 ヶ所に接種した。接種葉を 25°C, 12 h 照明の温室に静置し、接種 10 日後に発病率および病斑直径を調査して、以下の計算式により抑制率を算出した。発病抑制率 (%) = $(1 - \text{薬剤処理区の発病率} / \text{薬剤無処理区の発病率}) \times 100$ ，病斑拡大抑制率 (%) = $(1 - \text{薬剤処理区の病斑直径} / \text{薬剤無処理区の病斑直径}) \times 100$ 。アゾキシストロビン水和剤については試験を 3 回、その他の薬剤では 2 回行った。

結果および考察

培地上における感受性菌株 K08-2, K66-2, K68-4 および K73-1 の生育は、アゾキシストロビン 1 μ g/ml によって対照の 4.6~8.5%に抑制された (図 3-5)。一方、G143A 変異菌株 K08-5, K68-1 および K73-2 の生育はまったく抑制されなかった (図 3-5)。これに対し、F129L 変異菌株 K38-8, K41-5, K42-6, K68-3 および K73-20

は感受性菌株と G143A 変異菌株の中間的な反応を示し、アゾキシストロビン 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ によって生育が対照の 50.3~75.0%に抑制された (図 3-5). アゾキシストロビンの EC_{50} は、感受性菌株ではすべて 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったのに対し F129L 変異菌株では 1.22~2.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (平均 1.69 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で、RF は 40.7~96.7 (平均 56.2) であった (表 3-2). G143A 変異菌株は生育阻害率がアゾキシストロビン濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上において最大 50%前後で頭打ちとなり、 EC_{50} および RF を算出できなかった. G143A および F129L 変異菌株は他の QoI 剤に対して交差耐性を示したが、F129L 変異菌株の RF はクレソキシムメチルで 3.6~8.7 (平均 5.8), トリフロキシストロビンで 0.5~7.0 (平均 3.0) とアゾキシストロビンに対する RF に比べて著しく低く、ピリベンカルブでも 16.2~35.2 (平均 24.7) と低かった (図 3-6~3-8, 表 3-2). G143A 変異菌株に対する EC_{50} はクレソキシムメチルおよびトリフロキシストロビンではアゾキシストロビンと同様に算出不能であったが、ピリベンカルブの EC_{50} は 1.10~4.36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (平均 2.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で RF は 18.3~72.7 (平均 39.4) であった (図 3-6~3-8, 表 3-2).

チャ切離葉への接種試験では、対照の蒸留水処理区における発病率は 95~100% であったのに対し、アゾキシストロビン処理区では感受性菌株による発病は完全に抑えられ、発病抑制率は 100%であった (図 3-9, 図 3-10). 一方、G143A 変異菌株に対する抑制効果は低く、発病抑制率は -4~12%, 病斑拡大抑制率は 4~17%であった (図 3-9, 図 3-10). F129L 変異株は感受性菌株と G143A 変異菌株の中間的な反応を示し、発病抑制率は 15~77%, 病斑拡大抑制率は 56~91%であった (図 3-9, 図 3-10). クレソキシムメチルはアゾキシストロビンよりも抑制効果が低く、感受性菌株に対する発病抑制率および病斑拡大抑制率はそれぞれ 33%および 72%, G143A 変異菌株に対する発病抑制率および病斑拡大抑制率はそれぞれ 0%および -21~-8%であった (図 3-11). F129L 変異菌株に対する発病抑制率は 18~42%, 病斑拡大抑制率は 52~69%で感受性菌株に対する抑制率と同等であった (図 3-11).

トリフロキシストロピンは感受性菌株に対する発病抑制率および病斑拡大抑制率がそれぞれ 95%および 98%, G143A 変異菌株に対する発病抑制率および病斑拡大抑制率がそれぞれ 0%および -1~8%であったのに対し, F129L 変異菌株に対する発病抑制率は 78~92%, 病斑拡大抑制率は 93~98%で感受性菌株に対する抑制率と同等であった (図 3-12). ピリベンカルブは感受性菌株に対する発病抑制率および病斑拡大抑制率が 100%であったのに対し, F129L 変異菌株に対する発病抑制率および病斑拡大抑制率は 75~90%および 84~96%, G143A 変異菌株に対する発病抑制率および病斑拡大抑制率は 43~68%および 69~79%で, 耐性菌に対してある程度の抑制効果が認められた (図 3-13). 切離葉への接種試験と先に述べた寒天平板希釈法による菌叢生育試験における QoI 剤感受性の間には高い相関が認められた (図 3-14).

多くの植物病原菌において, G143A 変異による高度耐性菌のアゾキシストロピンに対する RF は 100 以上であるのに対し, F129L 変異による中等度耐性菌のアゾキシストロピンに対する RF は低く 5~15 程度である (Fungicide Resistance Action Committee 2006). F129L 変異菌のアゾキシストロピン以外の QoI 剤のトリフロキシストロピン, ピラクロストロピン, ファモキサドンおよびフェンアミドンに対する交差耐性の程度はさらに低く, ほとんど耐性を示さない場合もある (Kim et al. 2003; Leiminger et al. 2013; Pasche et al. 2004, 2005). 輪斑病菌の F129L 変異菌のアゾキシストロピン感受性を調査した結果, 耐性の程度は G143A 変異菌よりも低いものの RF は 50 以上と比較的高かった. チャ切離葉を用いた接種試験でも, アゾキシストロピン処理によって病斑拡大は遅くなるものの, 発病を強く抑えることはできなかった. これらのことから, 輪斑病菌の F129L 変異菌は圃場においてアゾキシストロピンの防除効果の低下の原因となりうると考えられた. 一方, クレソキシムメチルおよびトリフロキシストロピンに対して G143A 変異菌はアゾキシストロピンと同様に高い耐性を示すが, F129L 変異菌の感受性低下は非常に小さかった.

このことから、クレソキシムメチルおよびトリフロキシストロビンによる輪斑病防除において F129L 変異菌による防除効果の低下が問題となる可能性は G143A 変異菌に比べて低いと考えられた。また、ピリベンカルブは QoI 剤の一種であるが、キュウリ灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* などにおいて QoI 剤耐性菌のピリベンカルブに対する交差耐性の程度が低いことが報告されている（尾崎・貴田 2014）。輪斑病菌の F129L および G143A 変異菌に対しても、ピリベンカルブは一定の生育・発病抑制効果を示した。耐性菌発生圃場における防除試験でも、ピリベンカルブはアゾキシストロビンよりも高い防除効果を示すことが報告されている（外側 2015）。しかし、ピリベンカルブとアゾキシストロビンとの間には弱いながらも交差耐性が認められ、耐性菌の割合が高い圃場では十分な防除効果は期待できないことから、輪斑病の耐性菌対策においてはピリベンカルブも他の QoI 剤と同様に扱い、他の QoI 剤との連用は避けるべきである（外側 2015）。

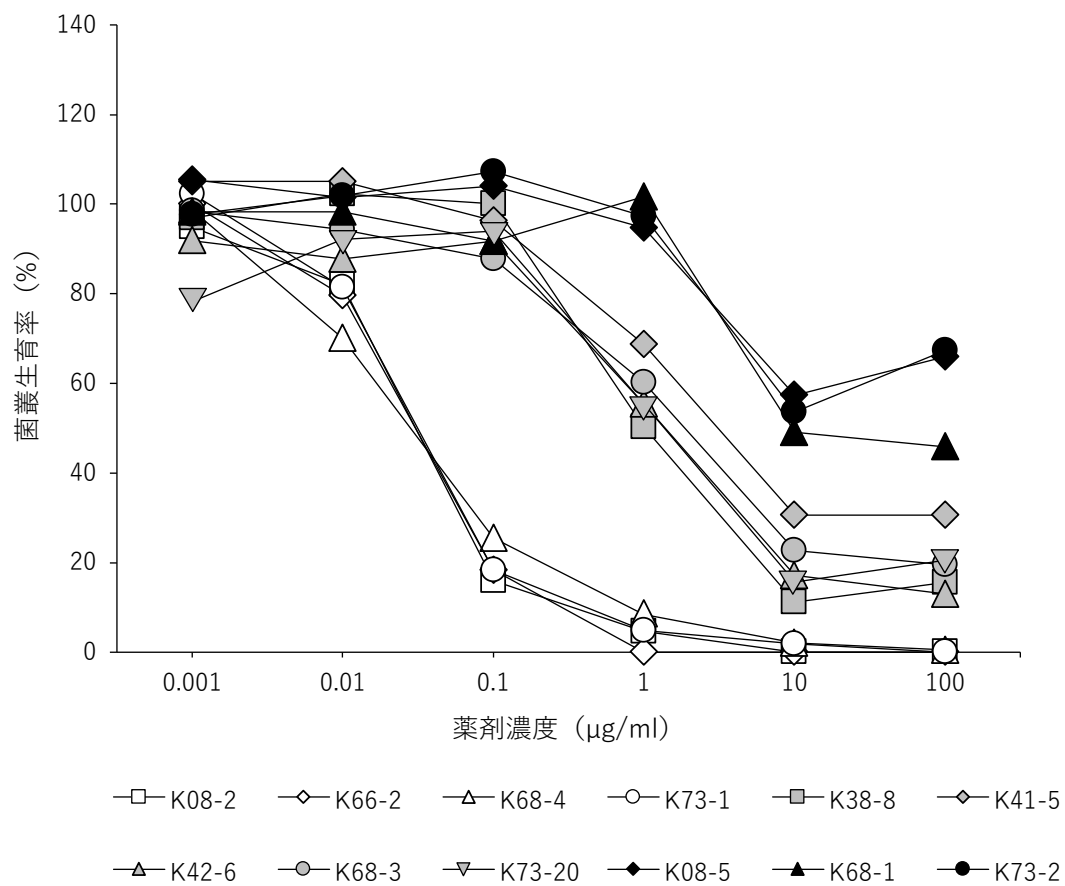


図3-5 チャ輪斑病菌株の培地上におけるアゾキシストロビン感受性

没食子酸*n*-プロピル2 mM含有PDAに供試薬剤を添加した。菌叢生育率は対照の供試薬剤無加用培地での生育に対する相対値。白：感受性菌株，灰色：F129L変異菌株，黒：G143A変異菌株。

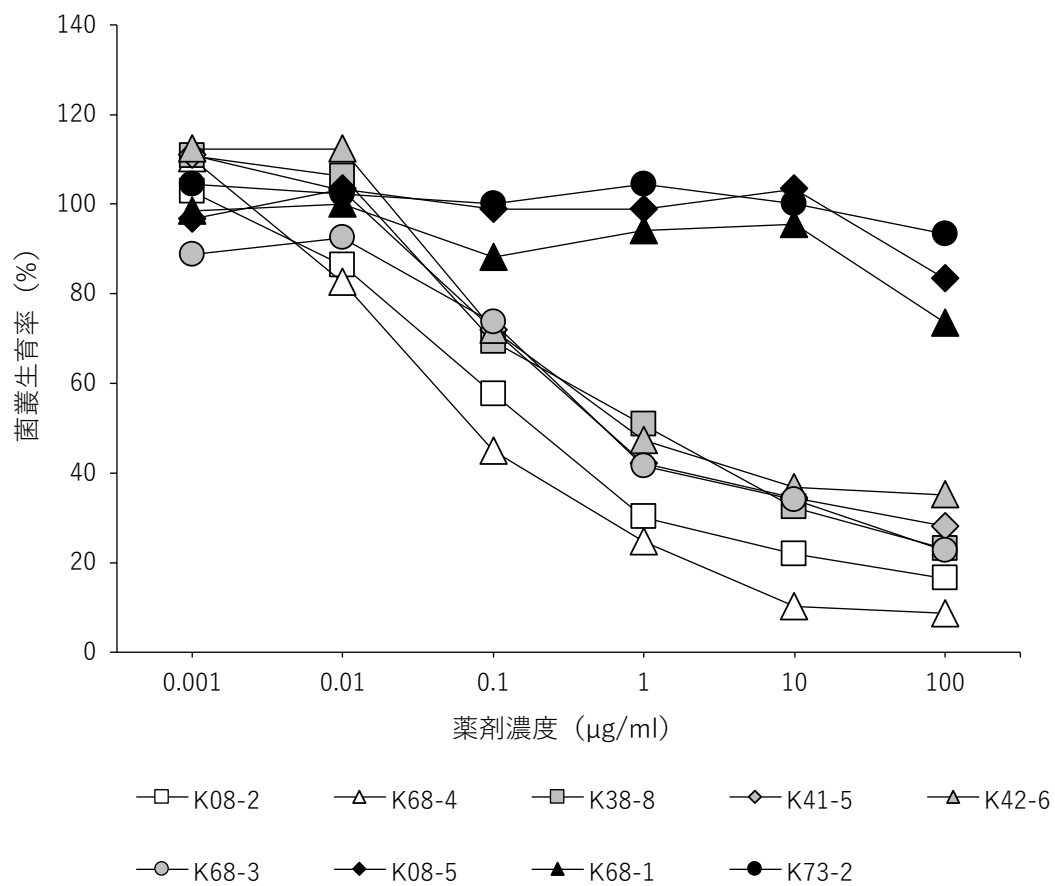


図3-6 チャ輪斑病菌株の培地上におけるクレソキシムメチル感受性

没食子酸*n*-プロピル2 mM含有PDAに供試薬剤を添加した。菌叢生育率は対照の供試薬剤無加用培地での生育に対する相対値。白：感受性菌株，灰色：F129L変異菌株，黒：G143A変異菌株。

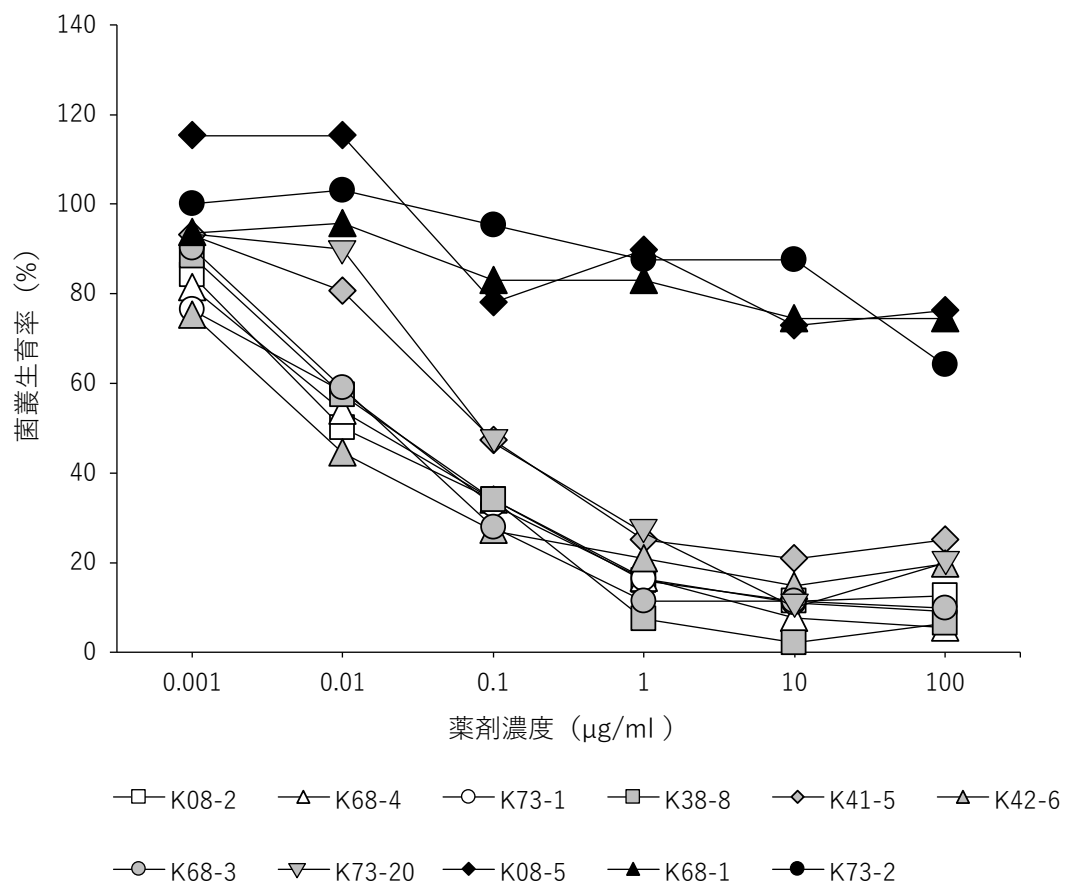


図3-7 チャ輪斑病菌株の培地上におけるトリフロキシストロビン感受性
没食子酸*n*-プロピル2 mM含有PDAに供試薬剤を添加した。菌叢生育率は対照の供試薬剤無加用培地での生育に対する相対値。白：感受性菌株，灰色：F129L変異菌株，黒：G143A変異菌株。

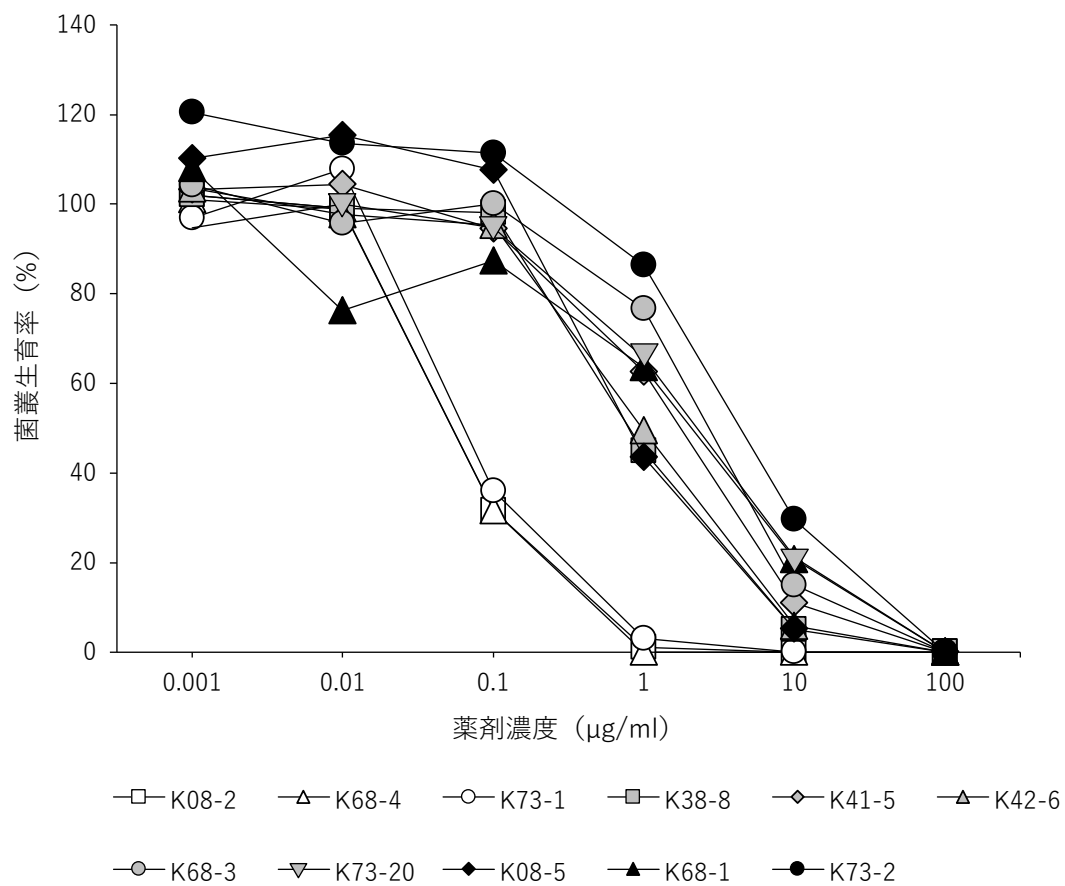


図3-8 チャ輪斑病菌株の培地上におけるピリベンカルブ感受性

没食子酸*n*-プロピル2 mM含有PDAに供試薬剤を添加した。菌叢生育率は対照の供試薬剤無加用培地での生育に対する相対値。白：感受性菌株，灰色：F129L変異菌株，黒：G143A変異菌株。

表3-2 チャ輪斑病菌の各種Qol剤に対する感受性

菌株	アゾキシストロビン		クレソキシムメチル		トリフロキシ ストロビン		ピリベンカルブ	
	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF	EC ₅₀	RF
F129L変異菌株								
K38-8	1.22	40.7	1.10	7.3	0.02	1.0	0.97	16.2
K41-5	2.90	96.7	0.54	3.6	0.11	5.5	1.40	23.3
K42-6	1.34	44.7	1.31	8.7	0.01	0.5	1.01	16.8
K68-3	1.63	54.3	0.54	3.6	0.02	1.0	2.11	35.2
K73-20	1.34	44.7	ND	ND	0.14	7.0	1.93	32.2
平均	1.69	56.2	0.87	5.8	0.06	3.0	1.48	24.7
G143A変異菌株								
K08-5	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1.10	18.3
K68-1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1.64	27.3
K73-2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	4.36	72.7
平均	NC	NC	NC	NC	NC	NC	2.37	39.4
感受性菌株								
K08-2	0.03	—	0.19	—	0.02	—	0.08	—
K66-2	0.03	—	ND	—	ND	—	ND	—
K68-4	0.03	—	0.11	—	0.02	—	0.05	—
K73-1	0.03	—	ND	—	0.02	—	0.06	—
平均	0.03	—	0.15	—	0.02	—	0.06	—

EC₅₀: 50%生育阻止濃度 (μg/ml) , RF: 耐性係数, ND: 未調査, NC: 算出不能

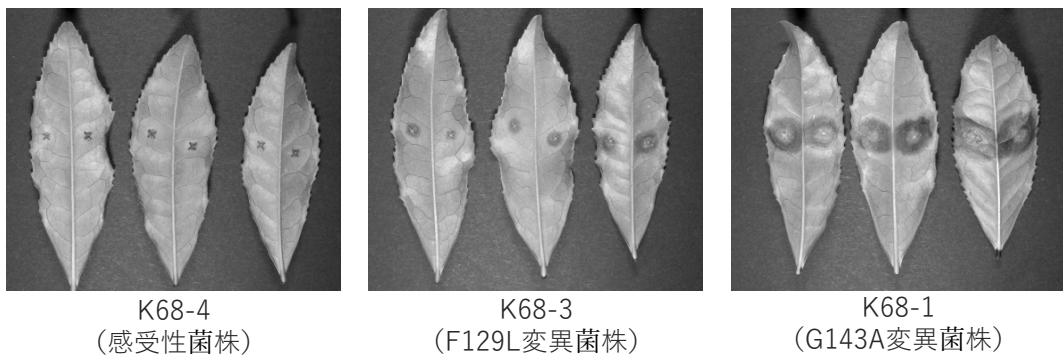


図3-9 切離葉におけるアゾキシストロビンの輪斑病に対する病斑拡大抑制効果
 供試薬剤はアゾキシストロビン水和剤 [有効成分20% (w/w) , 2,000倍希釈] .

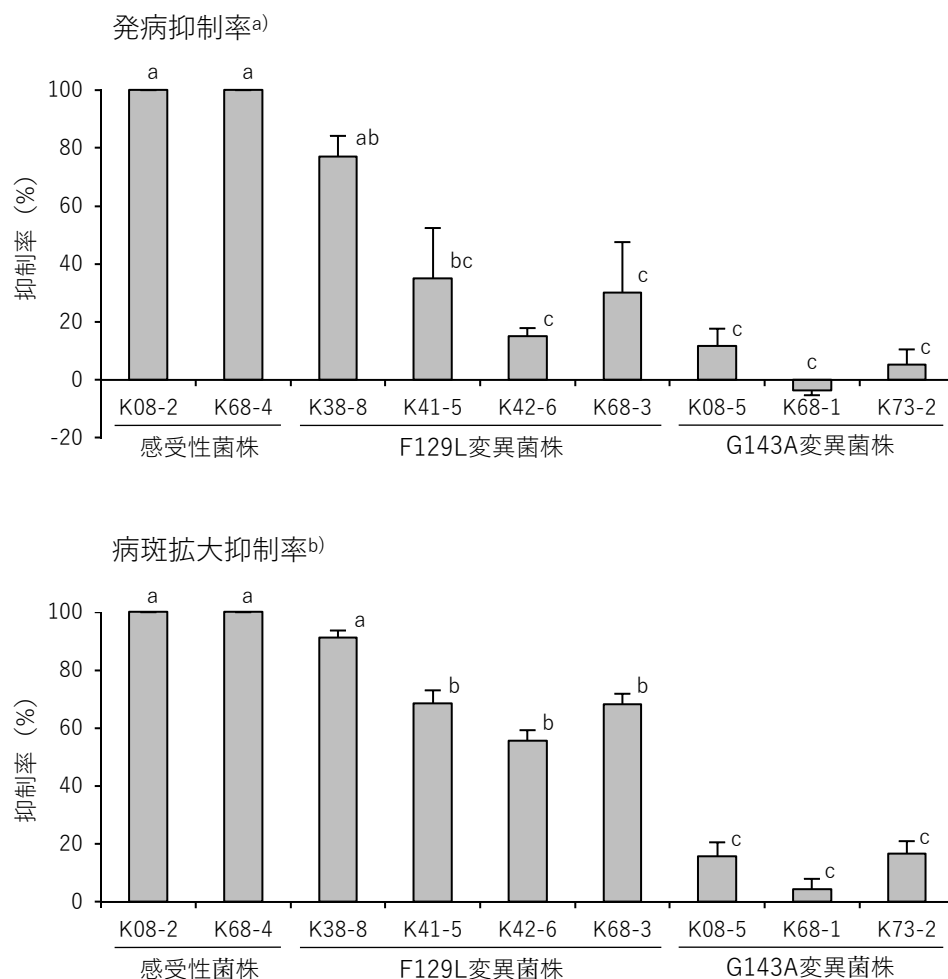


図3-10 切離葉におけるアゾキシストロビンの輪斑病に対する抑制効果
供試薬剤はアゾキシストロビン水和剤〔有効成分20% (w/w) , 2,000倍希釈〕. ^{a)} 3反復の平均値. 対照の薬剤無処理区における発病率は95~100%であった. ^{b)} n=60. エラーバーは標準誤差. 同一英文字間で有意差なし (5%水準, Tukey-Kramer法) .

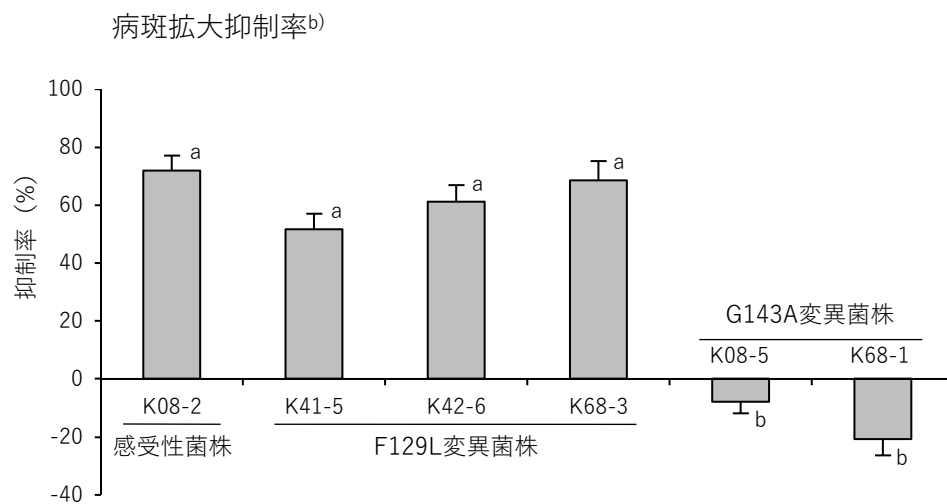
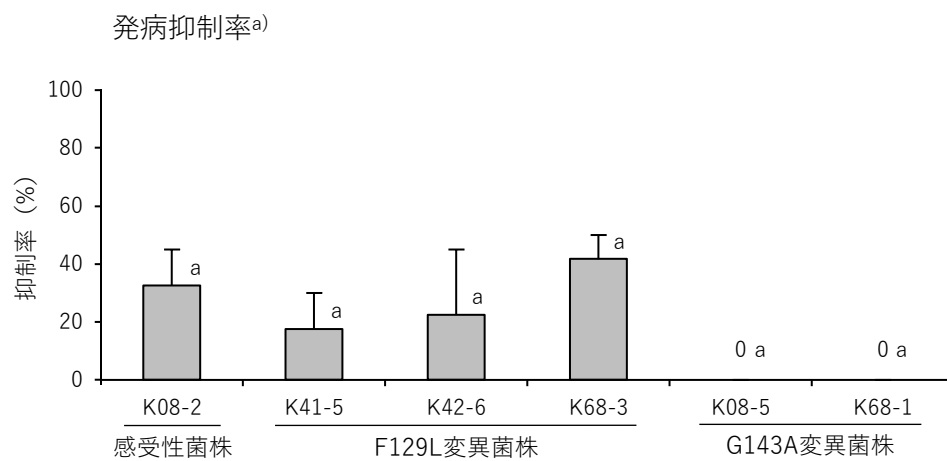


図3-11 切離葉におけるクレソキシムメチルの輪斑病に対する抑制効果
供試薬剤はクレソキシムメチル水和剤〔有効成分41.5% (w/w) , 2,000倍希釈〕. ^{a)} 2反復の平均値. 対照の薬剤無処理区における発病率はすべての菌株で100%であった. ^{b)} n=30. エラーバーは標準誤差. 同一英文字間で有意差なし (5%水準, Tukey-Kramer法) .

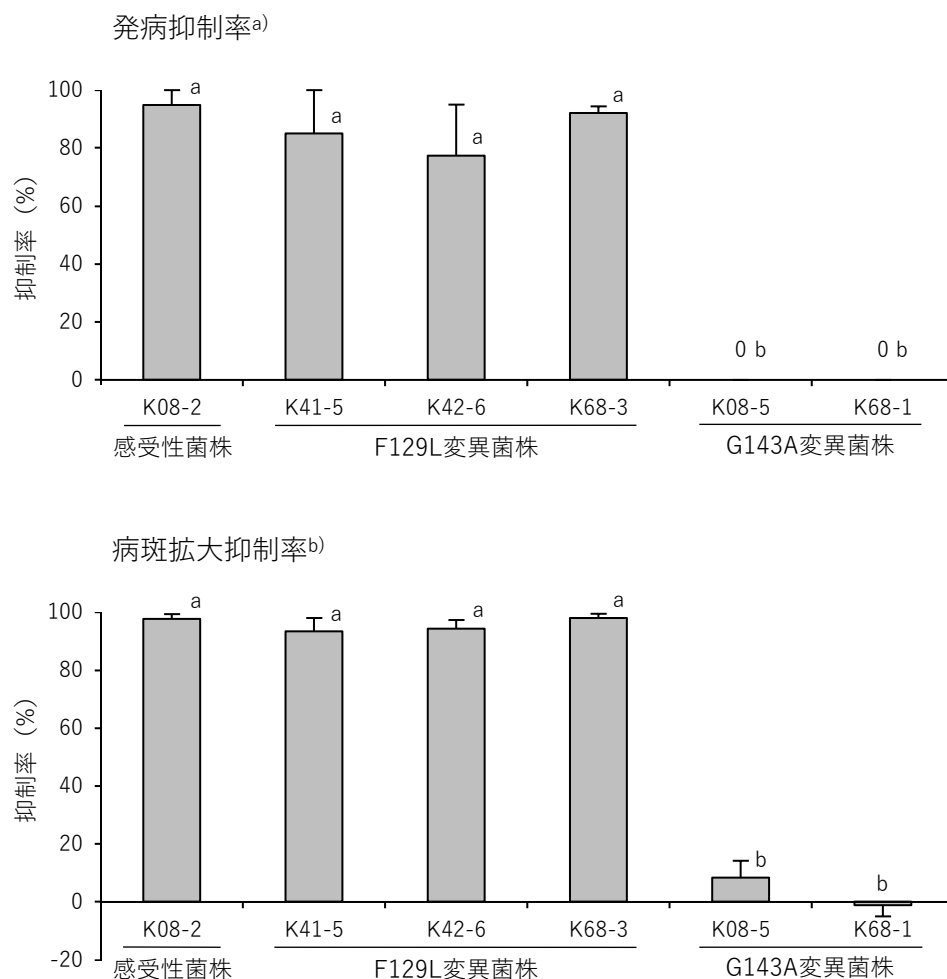


図3-12 切離葉におけるトリフロキシストロビンの輪斑病に対する抑制効果
供試薬剤はトリフロキシストロビン水和剤〔有効成分25% (w/w) , 2,000倍希釈〕。
^{a)} 2反復の平均値。対照の薬剤無処理区における発病率はすべての菌株で100%であった。^{b)} n=30。エラーバーは標準誤差。同一英文字間で有意差なし (5%水準, Tukey-Kramer法)。

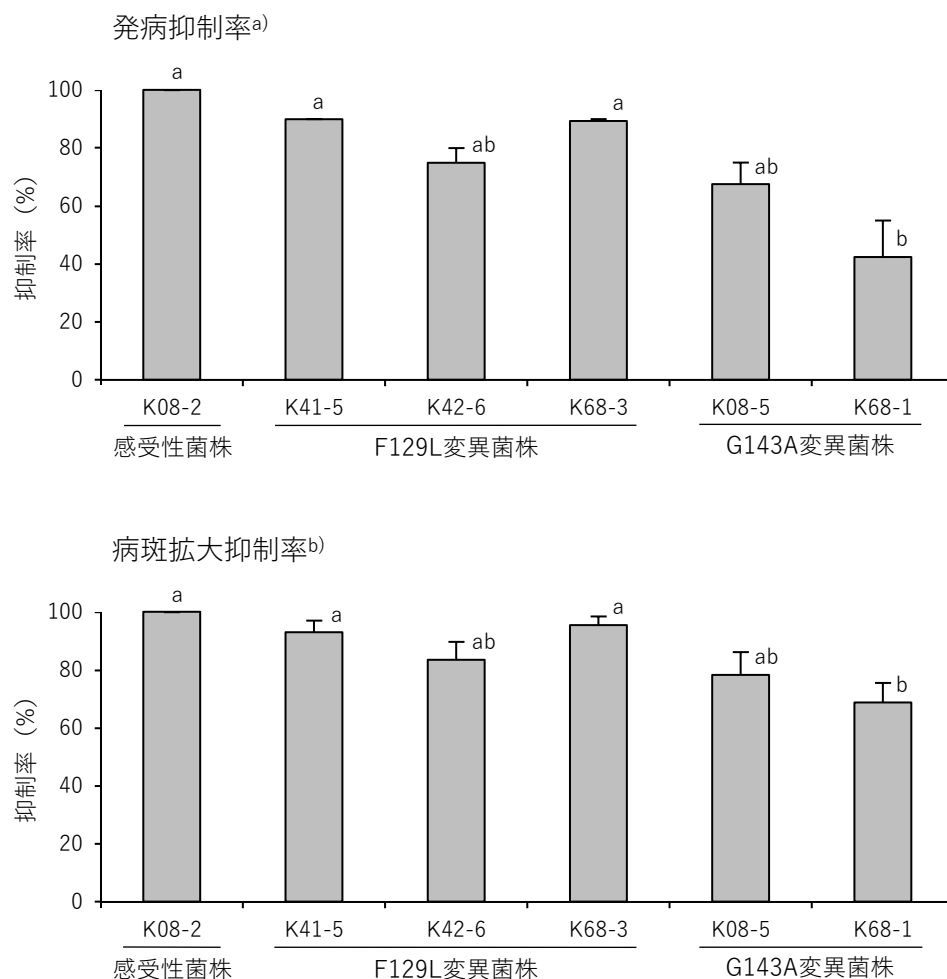


図3-13 切離葉におけるピリベンカルブの輪斑病に対する抑制効果

供試薬剤はピリベンカルブ水和剤〔有効成分40% (w/w) , 3,000倍希釈〕. ^{a)} 2反復の平均値. 対照の薬剤無処理区における発病率はすべての菌株で100%であった. ^{b)} n=30. エラーバーは標準誤差. 同一英文字間で有意差なし (5%水準, Tukey-Kramer法) .

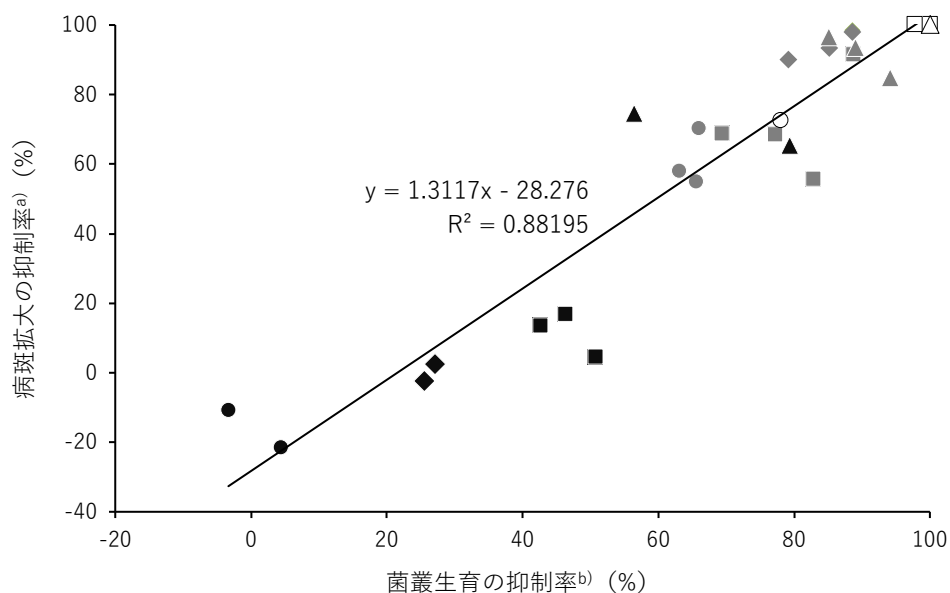


図3-14 切離葉への接種試験と寒天平板希釈法による菌叢生育試験におけるQol剤感受性の相関

a) 切離葉への接種試験における病斑拡大の抑制率. b) 寒天平板希釈法（薬剤濃度10 µg/ml）による菌叢生育試験における抑制率. □アゾキシストロビン, ○クレソキシムメチル, ◇トリフロキシストロビン, △ピリベンカルブ, 黒: G143A変異菌株, 灰色: F129L変異菌株, 白: 感受性菌株.

第3節 中等度耐性菌の分布

前章の耐性菌の発生実態調査の過程で中等度耐性菌が検出されたことから、その分布状況を明らかにするため、2010/2011年以降はすべての調査圃場において中等度耐性菌も検出できるように検定を行った。2009/2010年の調査圃場についても保存サンプルおよび分離菌株を用いて再度検定を行った。

材料および方法

前章の2010/2011年以降の調査において、分生子を薬剤添加培地に接種して4日間の培養では菌叢生育が無いかごく僅かであるにもかかわらず、7日後には明瞭な菌叢生育がみられたものを中等度耐性、7日後でも生育が認められなかったものを感受性と判定した。2009/2010年の調査圃場については、保存してあった罹病葉および分離菌株を用いて同様に検定を行った。

結果および考察

中等度耐性菌の分布状況を456圃場で調査した結果、28圃場から85菌株の中等度耐性菌が検出された（図3-15）。中等度耐性菌の分布は牧ノ原台地の一部地域に集中しており、検出圃場のうち21圃場が御前崎の朝比奈地区、4圃場が御前崎の朝比奈以外の地区、3圃場が牧之原で、島田および吉田では検出されなかった。多くの圃場では中等度耐性菌の検出割合は低く、20圃場で10%以下であったが、中等度耐性菌が過半数を占める圃場もあった。また、高度耐性菌が検出されず中等度耐性菌のみが検出されたのは3圃場だけで、残る25圃場では中等度耐性菌と高度耐性菌の両方が検出された（図3-15）。

一般にF129L変異によるQoI剤耐性は弱く、実用濃度のQoI剤はF129L変異菌に対して十分な防除効果を示すとされている（Fungicide Resistance Action

Committee 2006). しかし、トマト葉かび病菌 *Pa. fulva* では一般生産者圃場において F129L 変異菌によるアゾキシストロビンの薬効低下が問題となっている (Watanabe et al. 2017). 前節で述べたように、輪斑病菌の F129L 変異菌の QoI 剤感受性低下の程度は大きく、さらに一般生産者の圃場において少数ではあるが中等度耐性菌の比率が高い圃場が存在したことから、輪斑病菌の F129L 変異による中等度耐性菌は圃場においてアゾキシストロビンの効力低下をもたらす可能性がある と推測された. 輪斑病菌と同様に複数の異なる遺伝子変異による QoI 剤耐性菌が存在するコムギ黄斑病菌 *Pyre. tritici-repentis* では、当初は F129L 変異による中等度耐性菌のみが検出されたが、現在では G143A 変異による高度耐性菌が多数を占めている (Sierotzki et al 2007; Fungicide Resistance Action Committee 2017). 輪斑病菌でも同様に、アゾキシストロビンによる選択圧が十分に高い条件下では高度耐性菌が優占すると考えられる. 一方、輪斑病の防除適期ではない新芽生育期などの他病害を対象としたアゾキシストロビン散布により輪斑病菌に対して弱い選択圧がかかると、耐性の低い中等度耐性菌でも高度耐性菌と同等に増加するのではないかと推測される. 高度耐性菌が検出されないにも関わらずアゾキシストロビンの防除効果の低下がみられる圃場では、薬剤散布の時期や方法に問題がないか確認するとともに、中等度耐性菌による薬剤の効力低下も疑う必要がある.

* 本章の内容の大部分は Yamada et al. (2012) として学術誌 *Journal of General Plant Pathology* に発表した.

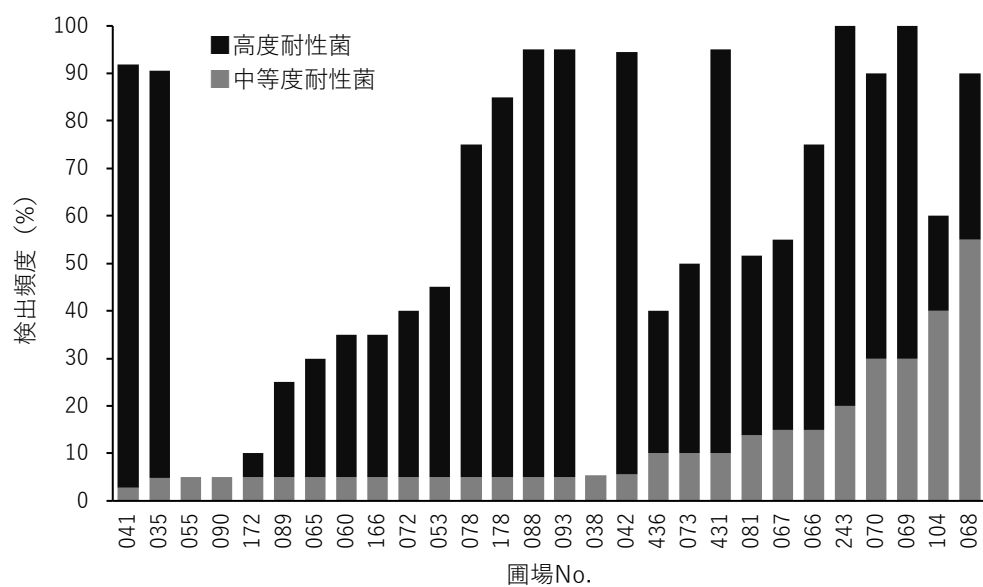


図3-15 中等度耐性菌の分布

第 4 章 新規 QoI 剤感受性検定法の構築

寒天平板希釈法は最も一般的な薬剤感受性検定法であるが、多大な労力と時間を要するため多数のサンプルの検定を行うことは困難である。また、専門的な技術および機器類を必要とするため、実施できるのは試験研究機関などに限られる。そこで、迅速かつ省力的に検定できる遺伝子診断法と、普及・指導機関あるいは生産者が自ら実施できる簡便な煮沸チャ葉法を構築した。

第 1 節 遺伝子診断法

輪斑病菌の QoI 剤耐性は *cytb* の一塩基置換に起因することから、これを検出することにより耐性菌の診断が可能である。G143A 変異による耐性菌の遺伝子診断法として、前章でも用いたプライマー RSCBF1 および RSCBR2 と制限酵素 *Fnu*4HI を用いた PCR-RFLP 法 (Ishii et al. 2007) がある。本法は当初はうどんこ病菌などを対象として開発されたものであるが、プライマーの汎用性が高いことから多くの植物病原菌で利用されており、輪斑病菌にも適用可能である。しかし、前章で示した通り、*cytb* にイントロン 131/132 を有する菌株では増幅産物が 1,520 bp と大きくなる。このような菌株では PCR による増幅の失敗が、特に粗抽出 DNA を鋳型とした場合には無視できない頻度で発生した。また、イントロン中に *Fnu*4HI 認識配列が 3 カ所存在するため、イントロンを有する菌株では RFLP 分析の結果の判読が困難であった。そこで、イントロンを有する菌株に対応し、F129L 変異も検出できる遺伝子診断法を構築した。

材料および方法

輪斑病菌の DNA 抽出は前章と同様に市販の DNA 抽出キットを用いて行った。

既存のプライマーRSCBF1 および RSCBR2 (Ishii et al. 2007) とそれぞれ対になる新規プライマーPlcbinR (5'-GCATAAAATCTATCAGTAGATGCAGAA-3') および PlcbinF (5'-GCTTAATGCACAGTCGGAAC-3') をイントロン配列中に設定し、これら 4 種類のプライマーを用いたマルチプレックス PCR により、コドン 129 および 143 を含む遺伝子断片を増幅した (表 4-1, 図 4-1)。PCR 反応液の組成は、TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (タカラバイオ) 0.5 U, 1× Ex Taq バッファー, dNTP 各 200 μM, プライマー各 0.2 μM, 鋳型 DNA 10~15 ng で、全量を 20 μl とした。増幅反応は、熱変性 94°C 30 秒間, アニーリング 52°C 30 秒間, 伸長 72°C 1 分間を 30 サイクル行った。PCR 反応液 10 μl に *Fnu*4HI および *Scr*FI (ともに New England Biolabs) 各 1 U を加え、37°C で 1 時間インキュベートした後、2.5% アガロースゲルおよび Tris-acetate-EDTA (TAE) バッファーで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して UV 照射下で泳動パターンを確認した。

より省力的な方法として、マイクロウェーブ法 (Ferreira and Glass 1996) による DNA 抽出を試みた。PDA 培地上のコロニーから微量の気中菌糸をマイクロチューブに採取し、キャップを閉めて家庭用電子レンジ (500 W) で 5 分間マイクロウェーブ照射した後、Tris-EDTA (TE) バッファー 50 μl を加えてボルテックスミキサーで攪拌し、上清を鋳型 DNA 溶液として PCR 反応液 20 μl あたり 2 μl を用いた。

結果および考察

既存のプライマー 2 種類と新規プライマー 2 種類を用いたマルチプレックス PCR によって、イントロン 131/132 を有する菌株ではコドン 129 および 143 をそれぞれ含む 510 bp および 200 bp の増幅産物が得られた (図 4-1)。イントロンを含まない菌株では、イントロンに設定した新規プライマーがアニーリングしないため、従来法 (Ishii et al. 2007) と同様にコドン 129 および 143 の両方を含む 286 bp の増幅産物が得られた (図 4-1)。マイクロウェーブ法による粗抽出 DNA 溶液を鋳型とし

た場合でも PCR を 35～40 サイクル行うことで十分な増幅産物が得られた。G143A 変異はコドン 143 から 144 の塩基配列 GGTGC の GCTGC への変異による *Fnu4HI* の認識配列 GCNGC の生成として検出された（図 4-1, 4-2）。F129L 変異はコドン 129 から 131 の塩基配列 CCTGG の GCTGG への変異による *ScrFI* の認識配列 CCNGG の消失として検出された（図 4-1, 4-2）。したがって、増幅産物は制限酵素 *Fnu4HI* および *ScrFI* によって、感受性菌では 1 ヶ所、高度耐性菌では 2 ヶ所で切断され、中等度耐性菌では切断されなかった（図 4-1）。

本法によって、中等度耐性菌 32 菌株、高度耐性菌 8 菌株および感受性菌 7 菌株の遺伝子診断を行ったところ、すべての菌株で寒天平板希釈法による検定結果と一致した（表 4-2）。*cytb* にイントロン 131/132 を有する菌株の割合は 26%であった（表 4-2）。DNA 抽出にマイクロウェーブ法を用いると、DNA 抽出から判定までを 4 時間程度で行うことができた。

以上の結果から、本法はチャ輪斑病菌の QoI 剤に対する高度および中等度耐性菌の遺伝子診断法として利用できると考えた。いくつかの植物病原菌において、耐性菌を感受性菌と誤診断する原因となる *cytb* のヘテロプラスミー（野生型と変異型のミトコンドリア DNA の混在）や、*ScrFI* では検出できない塩基置換による F129L 変異が報告されているが（Ishii et al. 2007; Sierotzki et al. 2007; Watanabe et al. 2017）、輪斑病菌ではこれまでのところ、これらの事例は確認されていない。したがって、誤診断の可能性に十分留意すれば、本法によってチャ輪斑病菌の QoI 剤感受性を迅速かつ省力的に検定できる。

* 本節の内容の大部分は Yamada et al. (2012) として学術誌 *Journal of General Plant Pathology* に発表した。

表4-1 遺伝子診断用プライマー

プライマー	配列
RSCBF1 ^{a)}	5'-TATTATGAGAGATGTAAATAATGG-3'
RSCBR2 ^{a)}	5'-AACAATATCTTGTCCAATTCATGG-3'
PlcbinR	5'-GCATAAAATCTATCAGTAGATGCAGAA-3'
PlcbinF	5'-GCTTAATGCACAGTCGGAAC-3'

^{a)} Ishii et al. (2007)

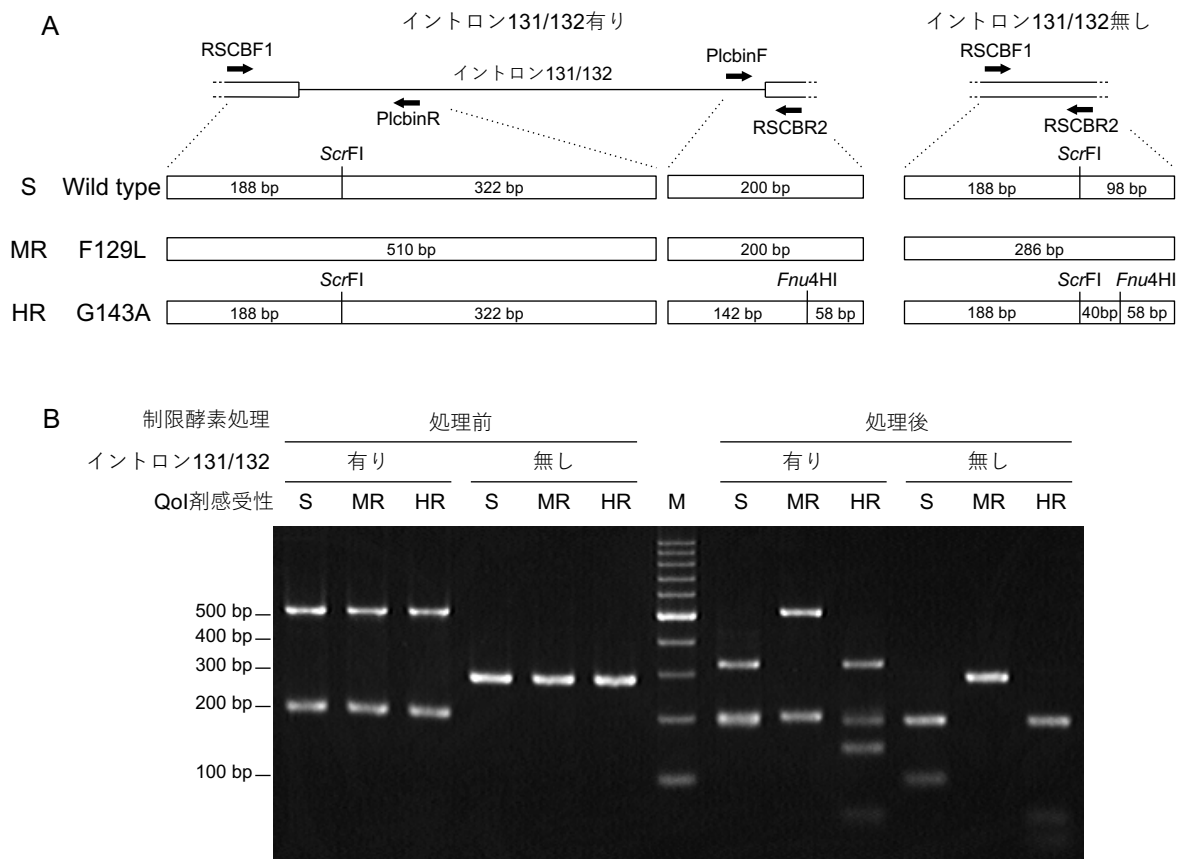


図4-1 マルチプレックスPCR-RFLP分析によるQol剤耐性チャ輪斑病菌の遺伝子診断

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. 200 bpと188 bpのバンドは分離が不完全, 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.

	コドン							
	129	130	131		142	143	144	
感受性	... TTC	CTG	GGT	...	TGA	GGT	GCT	...
	...	F	L	G	...	W	G	A
中等度耐性 F129L	... TTG [*]	CTG	GGT	...	TGA	GGT	GCT	...
	...	L	L	G	...	W	G	A
高度耐性 G143A	... TTC	CTG	GGT	...	TGA	GCT [*]	GCT	...
	...	F	L	G	...	W	A	A

図4-2 Qol剤耐性に関わるチトクローム*b*遺伝子変異と制限酵素認識配列

上段：塩基配列，下段：推定アミノ酸配列，下線：制限酵素 *ScrFI* (CCNGG) および *Fnu4HI* (GCNGC) 認識配列，アステリスク：塩基置換.

表4-2 寒天平板希釈法と遺伝子診断法によるQol剤感受性検定結果の比較

菌株	寒天平板 希釈法 ^{a)}	遺伝子 診断法 ^{b)}	菌株	寒天平板 希釈法 ^{a)}	遺伝子 診断法 ^{b)}
K35-11	MR	F129L(+)	K89-12	MR	F129L(-)
K41-5	MR	F129L(+)	K90-2	MR	F129L(-)
K42-6	MR	F129L(-)	K93-7	MR	F129L(-)
K42-34	MR	F129L(+)	K104-2	MR	F129L(-)
K53-16	MR	F129L(+)	K166-9	MR	F129L(-)
K55-16	MR	F129L(-)	K172-5	MR	F129L(-)
K60-17	MR	F129L(-)	K178-2	MR	F129L(-)
K65-8	MR	F129L(-)	K243-1	MR	F129L(+)
K66-6	MR	F129L(+)	K27-1	HR	G143A(-)
K66-10	MR	F129L(+)	K28-1	HR	G143A(-)
K66-16	MR	F129L(+)	K29-4	HR	G143A(-)
K67-1	MR	F129L(-)	K32-10	HR	G143A(-)
K67-4	MR	F129L(-)	K33-1	HR	G143A(-)
K67-II-8	MR	F129L(-)	K34-1	HR	G143A(-)
K68-7	MR	F129L(-)	K67-2	HR	G143A(-)
K68-3	MR	F129L(-)	K68-2	HR	G143A(-)
K68-5	MR	F129L(-)	K27-2	S	WT(-)
K68-II-6	MR	F129L(-)	K29-1	S	WT(-)
K70-6	MR	F129L(+)	K30-1	S	WT(-)
K72-8	MR	F129L(+)	K31-1	S	WT(-)
K73-20	MR	F129L(-)	K66-17	S	WT(-)
K78-8	MR	F129L(-)	K68-4	S	WT(-)
K81-1	MR	F129L(+)	K73-1	S	WT(-)
K88-4	MR	F129L(+)			

a) HR: 高度耐性, MR: 中等度耐性, S: 感受性

b) カッコ内の記号 (+/-) はイントロン131/132の有無

第2節 煮沸チャ葉法

QoI 剤の輪斑病に対する防除効果は、圃場内の輪斑病菌集団中の耐性菌の比率の増加に比例して低下する（尾松ら 2012; 外側 2014）。このため、QoI 剤の使用にあたっては事前に対象圃場における発病圧や耐性菌の分布状況を把握し、QoI 剤による輪斑病防除の可否を判断する必要がある。一方、これまでの調査結果から、耐性菌の分布状況は同じ地域内であっても圃場毎に大きく異なることが明らかとなった。このため、調査は可能な限り細かく行う必要があり、個々の圃場毎に実施することが理想的である。そこで、普及・指導機関あるいは生産者が実施できる QoI 剤感受性検定法として、寒天培地の代わりに煮沸チャ葉を培養基質として用いる煮沸チャ葉法を開発した。

材料および方法

供試サンプルとして第2章の調査において採集した輪斑病罹病葉を用いた。検定は図 4-3 に示した手順で行った。罹病葉を室温（20～30℃）、室内散光下の温室に2～4 日間静置して分生子を形成させた。十分に硬化した健全なチャ成葉を沸騰水道水で5～10 分間煮沸した後、アゾキシストロビン水和剤（アミスター20フロアブル、シンジェンタジャパン）の200 倍希釈液に瞬時浸漬した。アゾキシストロビン水和剤の農薬登録上の希釈倍数は2,000 倍であるが、この場合の薬剤の所要量は薬液100 ml あたり 0.05 ml とごく少なく計量にピペットが必要である。そこで、本法では簡単なスポイトで希釈液を調製できるように、希釈倍数を200 倍（薬液100 ml あたり薬剤0.5 ml）とした。水道水で軽く湿らせた綿棒で罹病葉の病斑上の分生子を拭き取り、最初に対照の薬剤無処理区、ついで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接種した。その後、温室に保って室温、室内散光下で静置し、輪斑病菌の生育を観察した。並行して、寒天平板希釈法による QoI 剤感受性

検定を行った。

雑菌の繁殖を抑制するため、輪斑病菌に対する活性が低いステロール脱メチル化阻害（demethylation inhibitor, DMI）剤を薬液へ添加したときの、輪斑病菌の生育に対する影響を調査した。DMI 剤として、ジフェノコナゾール水和剤〔スコア 10 顆粒水和剤，有効成分 10%（w/w），シンジェンタジャパン〕，フェンブコナゾール水和剤〔インダーフロアブル，有効成分 22%（w/w），ダウ・ケミカル日本〕およびテブコナゾール水和剤〔オンリーワンフロアブル，有効成分 20%（w/w），バイエルクロップサイエンス〕の 3 剤を供試した。アゾキシストロビン水和剤の 200 倍希釈液に供試 DMI 剤を 200 倍希釈となるように添加した薬液に煮沸チャ葉を浸漬し、輪斑病菌の分生子を接種して、その後の輪斑病菌の生育を観察した。

より簡便な検定法として、罹病葉片の貼付接種による検定を試みた。輪斑病病斑の中央部から約 2 mm 角の小片を取り、上述と同様に調製した煮沸チャ葉上に置いて、その後の輪斑病菌のコロニー生育を観察した。

結果および考察

輪斑病菌は薬剤処理していない煮沸チャ葉上において、接種後 1～3 日間で白色、綿毛状の気中菌糸に富んだ濃密なコロニーを形成し、5～10 日間でコロニー上に多数の黒色の分生子塊を生じた（図 4-3④，⑤）。雑菌が繁殖することもあったが、コロニーの性状によって輪斑病菌とは容易に識別できた。また、雑菌によって輪斑病菌の生育が阻害されることはなかった。薬剤処理区では、感受性菌は接種 3 日後まではほとんど生育しなかったが、培養期間が長くなるとわずかに生育し、まれに分生子形成に至ることがあった。高度耐性菌は薬剤処理区でも無処理区と同等の生育を示した。中等度耐性菌は薬剤処理区での生育が無処理区と比較してわずかに劣ることがあったが、高度耐性菌と明確に判別することはできなかった。アゾキシストロビン水和剤の農薬登録上の希釈倍数は 2,000 倍であるが、本法における耐性菌の

生育は 200 倍希釈でも無処理区とほぼ同等であった。これらのことから、200 倍希釈の薬液に浸漬した煮沸チャ葉に輪斑病菌の分生子を接種して 3 日後の菌の生育状態から薬剤感受性を判定し、輪斑病菌と雑菌の判別が困難なときは 7~10 日後まで培養を続けて黒色分生子塊形成の有無によって判別することとした（図 4-3）。

本法により、一般農家の 14 圃場から採集した罹病葉 147 枚について検定を行ったところ、11 圃場ではすべてのサンプルで本法と従来の寒天平板希釈法による検定結果が一致した（表 4-3）。一方、J、L および M 圃場の計 4 サンプルが従来法では感受性、本法では耐性と判定された（表 4-3）。これらのサンプルについて、検定終了後の煮沸チャ葉上の菌を分離して薬剤感受性を寒天平板希釈法で検定した結果、薬剤処理区から分離した菌株はすべて耐性であった。したがって、これらの検定結果の相違は、単一病斑中での耐性菌と感受性菌の混在、もしく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。

DMI 剤を薬液に添加した結果、ジフェノコナゾール水和剤およびテブコナゾール水和剤には輪斑病菌に対する弱い生育阻害が認められたが、フェンブコナゾール水和剤は輪斑病菌の生育に影響しなかった（図 4-4）。このことから、作業場所の清浄度や作業者の熟練度が不十分で雑菌の繁殖が問題となる場合は、アゾキシストロビン水和剤 200 倍希釈液にフェンブコナゾール水和剤を 200 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と考えられた。

葉片貼付接種は、分生子接種の場合に必要な罹病葉での分生子形成が不要で、検定の所要日数を 2~4 日間短縮できる。しかし、分生子接種に比べると輪斑病菌の生育が劣り、検定結果がやや不安定であった（図 4-5）。その原因として、雑菌が混入しやすく葉片上に雑菌が繁殖する場合が多いことや、前培養を経ないため葉片中の輪斑病菌の活性がサンプルによって異なることが影響すると考えられた。しかし、分生子接種と比較して検定結果に大きな違いが出ることはなく、より省力的かつ短

期間で検定を実施できる方法として利用可能であると考えられた。

チャ輪斑病菌の QoI 剤耐性菌には、前章で示した通り高度耐性菌と中等度耐性菌の 2 種類が存在する。本法では両者を明確に判別することはできず、いずれも同じく耐性菌と判定される。高度耐性菌が圃場において明らかに QoI 剤の効力低下をもたらすのに対し、中等度耐性菌の防除効果への影響は不明である。しかし、前章で示した室内試験の結果および一般農家圃場における発生状況から、中等度耐性菌も QoI 剤の効力低下を引き起こす可能性が高いと推測される。また、これまでのところ中等度耐性菌の分布は静岡県牧ノ原台地の一部地域に限られており、大部分の圃場では検出頻度もごく低い。これらのことから、高度耐性菌と中等度耐性菌をまとめて耐性菌と判定しても、実用上の問題はないと考えられる。

以上の結果から、寒天培地の代わりに煮沸処理したチャ葉を培養基質として用いる本検定法は、高価な機器や専門的な技術を必要とせず、簡単な操作で十分な精度の結果が得られる QoI 剤感受性検定法として利用できると考えた。

* 本節の内容の大部分は山田ら（2014）として学術誌 関西病虫害研究会報に発表した。



図4-3 煮沸チャ葉法によるチャ輪斑病菌のQol剤感受性検定

表4-3 寒天平板希釈法と煮沸チャ葉法によるQol剤
感受性検定結果の比較

圃場 No.	採集年	検定 菌株数	耐性菌株数 ^{a)}	
			寒天平板 希釈法	煮沸チャ葉法
153	2010	10	0	0
159	2010	10	0	0
466	2012	10	0	0
468	2012	10	0	0
470	2012	10	0	0
469	2012	10	1	1
479	2012	10	1	1
138	2010	8	2	2
467	2012	10	3	3
480	2013	10	4	5
131	2010	10	5 (1)	5
478	2013	10	7	8
146	2013	20	10 (2)	12
167	2010	9	8	8

^{a)} カッコ内の数値は耐性菌株数に含まれる中等度耐性菌株数。

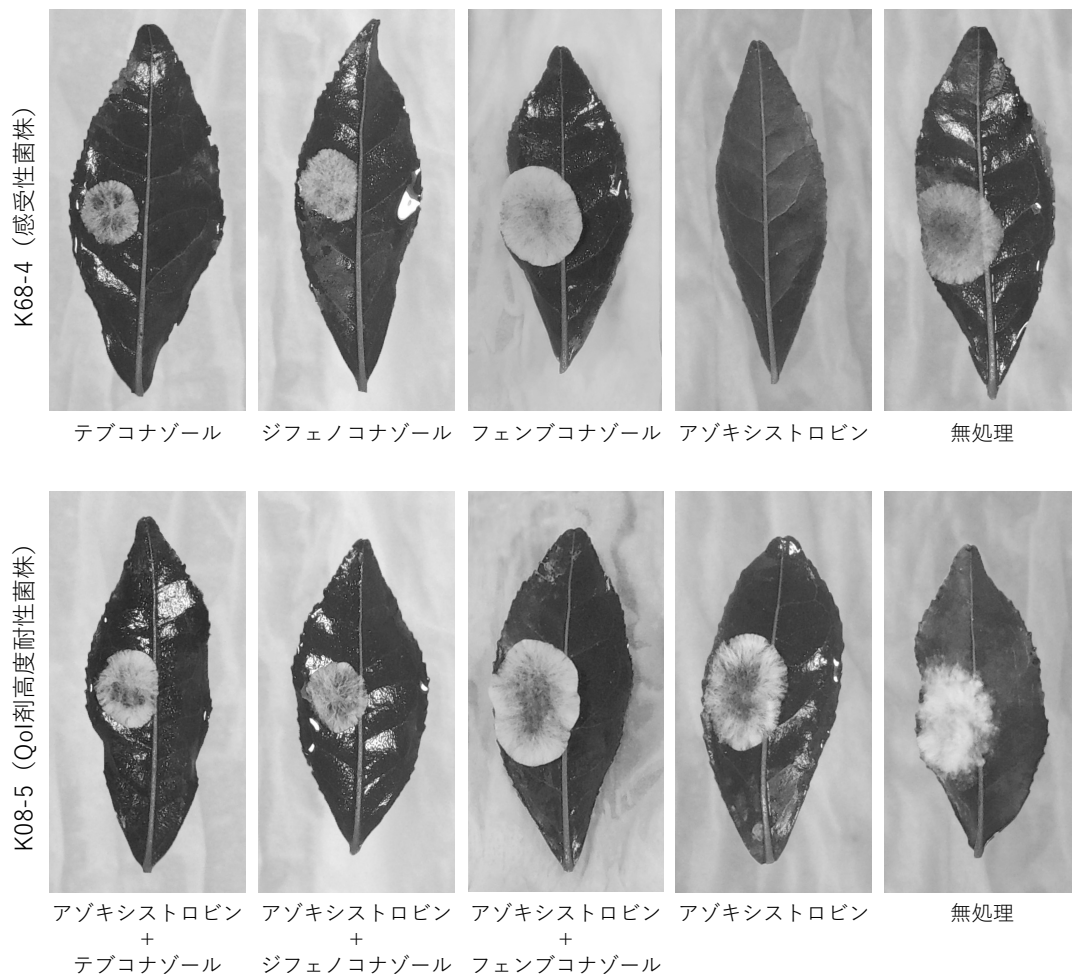


図4-4 煮沸チャ葉上におけるチャ輪斑病菌の生育に対するDMI剤の影響
薬剤の希釈倍数はすべて200倍.

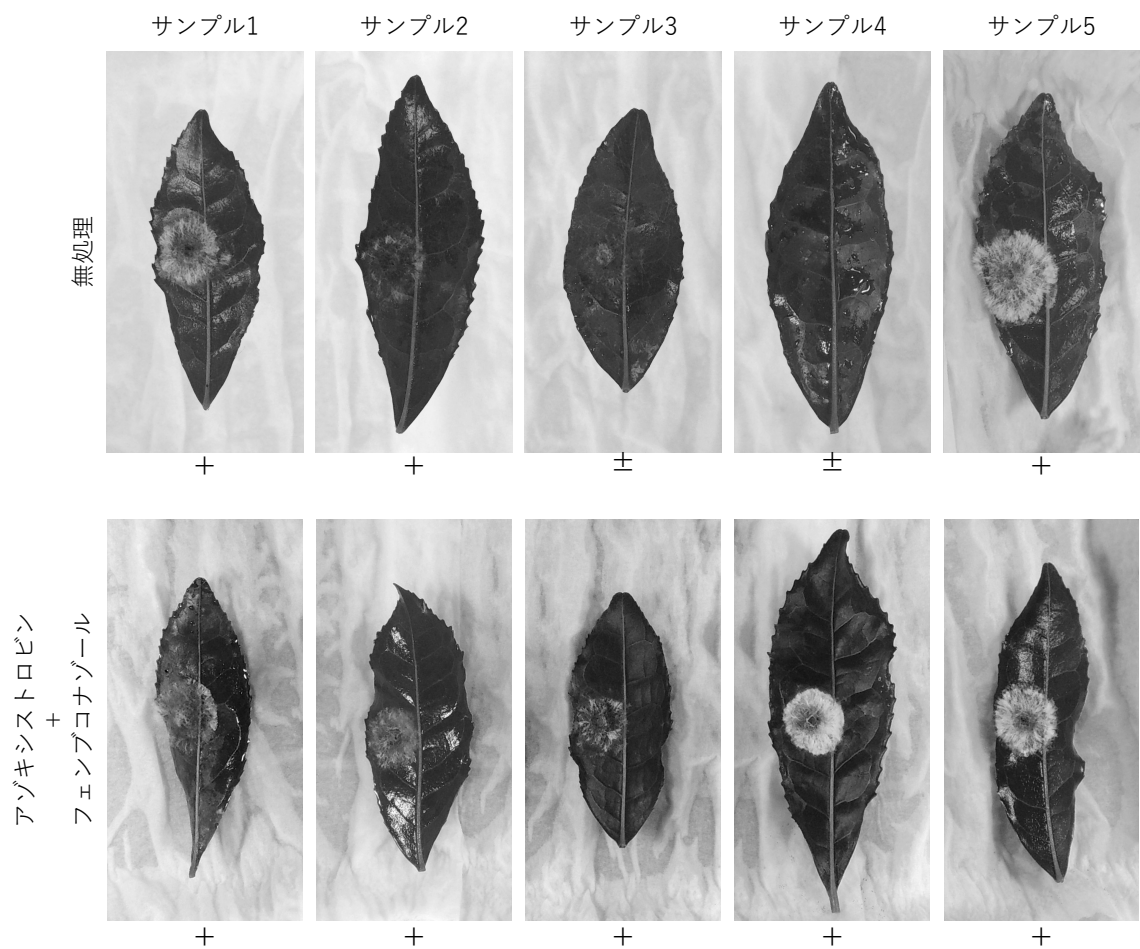


図4-5 煮沸チャ葉への葉片貼付接種によるチャ輪斑病菌の生育
 薬剤の希釈倍数はそれぞれ200倍. +, ±は輪斑病菌の生育の有無を示す. いずれのサンプルも寒天平板希釈法ではQoI剤耐性菌によるものと判定.

第 5 章 耐性菌の分布拡大経路の推定

チャ輪斑病菌の QoI 剤耐性菌は鹿児島県で初めて検出された 2008 年の時点で、すでに鹿児島県内のほぼ全域に分布していた（富濱ら 2009）。静岡県でも 2009 年からの調査において、県内の主要茶産地のすべてで耐性菌が検出された。このことから、耐性菌は短期間のうちに急速に分布を拡大したものと考えられる。そこで、牧ノ原台地における耐性菌の集団遺伝学的解析を行い、耐性菌の分布拡大経路を推定した。

第 1 節 ISSR 分析によるチャ輪斑病菌の DNA フィンガープリンティング

Inter-simple sequence repeat (ISSR) 分析は、simple sequence repeat (SSR, マイクロサテライト) を利用した簡便な DNA 多型検出法である (Ziętkiewicz et al. 1994)。SSR の塩基配列に基づいたプライマーを用いて PCR を行うことによってゲノムの SSR 間、すなわち ISSR 領域を増幅し、増幅産物を DNA マーカーとして利用する。基本原理は random amplified polymorphic DNA (RAPD) と同じであり、RAPD と同様にマーカー開発が簡単で、クローン同定や半数体生物の遺伝的多様性の研究に利用できる。ISSR は RAPD よりも多型性が高く、また、アニーリング温度を高く設定できることから安定性が高いとされている (種生物学会 2001)。ここでは、遺伝的集団構造解析による耐性菌の分布拡大経路の推定を目的として、ISSR 分析による輪斑病菌の DNA フィンガープリンティングを試みた。

材料および方法

第 2 章の調査において採集した単孢子分離菌株を PDA 培地に置いたセロファン上で培養し、菌体を採取して凍結乾燥した後、Mini-Beadbeater-8 (BioSpec Products)

を用いてビーズ破碎した．E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek) を用い、メーカーのプロトコルに従って全 DNA を精製した．ISSR プライマーとして CGA [DHB (CGA)₅], CCA [DD (CCA)₅] および GT [VHV (GT)₅G] (D, H, B および V は混合塩基：D は C 以外, H は G 以外, B は A 以外, V は T 以外) の 3 種類を用いて ISSR 領域を増幅した (Hantula et al. 1996; Takatsuka 2007)．PCR 反応液の組成は 1× HotStarTaq Plus Master Mix (キアゲン), 1× CoralLoad Concentrate (キアゲン), プライマー 0.4 μM, 鋳型 DNA 5 ng, 総容量 20 μl とした．反応条件は熱変性を 95°C で 5 分間行った後, 熱変性 94°C 1 分間, アニーリング 1 分間, 伸長 72°C 2 分間を 35 サイクル行い, 最後に伸長を 72°C で 10 分間行った．アニーリング温度は 53.5°C (プライマー CGA および CCA) または 49°C (プライマー GT) とした (Takatsuka 2007)．増幅産物を 1.0% アガロースゲルおよび 0.5× Tris-borate-EDTA (TBE) バッファーで電気泳動した後, エチジウムブロマイドで染色し, UV 照射によって DNA バンドを検出した．バンドのサイズは 200 bp DNA Ladder (タカラバイオ) との比較によって推定した．400~3,000 bp の範囲にある明瞭なバンドについて, その有無を目視で判定した．明確に判定できないバンドは分析から除外した．それぞれの ISSR 型について少なくとも 1 菌株は解析を 2 回実施して, ISSR 型の安定性を確認した．ISSR 型をハプロタイプと見なし, 以下の計算式によりハプロタイプ多様度 (haplotype diversity, h) (根井 1990) を算出した．

$$h = n (1 - \sum x_i^2) / (n - 1)$$

ここで n は解析した菌株数, x_i は i 番目のハプロタイプの頻度である．

結果および考察

輪斑病菌 193 菌株について ISSR 分析を行った結果, 3 種類のプライマーで合計

34本の安定なバンドが検出され、その内16本(47%)に菌株間で多型が認められた(図5-1)。感受性菌では8圃場からのそれぞれ6~10菌株を解析した結果、各圃場内において4~7(平均5.3)種類のISSR型が検出され、圃場内におけるハプロタイプ多様度 h は0.79~0.94(平均0.85)と高かった(表5-1)。一方、高度耐性菌では13圃場からのそれぞれ8~9菌株を解析した結果、1~5(平均2.6)種類のISSR型が検出され、ハプロタイプ多様度 h は0.00~0.89(平均0.51)で、感受性菌に比べて低かった(表5-1)。中等度耐性菌はさらに多様度が低く、4圃場からのそれぞれ4~6菌株を解析した結果、3圃場から1種類、1圃場から2種類のISSR型が検出され、ハプロタイプ多様度 h は0.00~0.67(平均0.17)であった(表5-1)。以上の結果から、輪斑病菌のISSR分析によって検出されるDNA多型は多様性が高く、QoI剤耐性菌の分布拡大経路の推定を目的とした輪斑病菌のDNAフィンガープリンティングに十分に用いることができると考えられた。

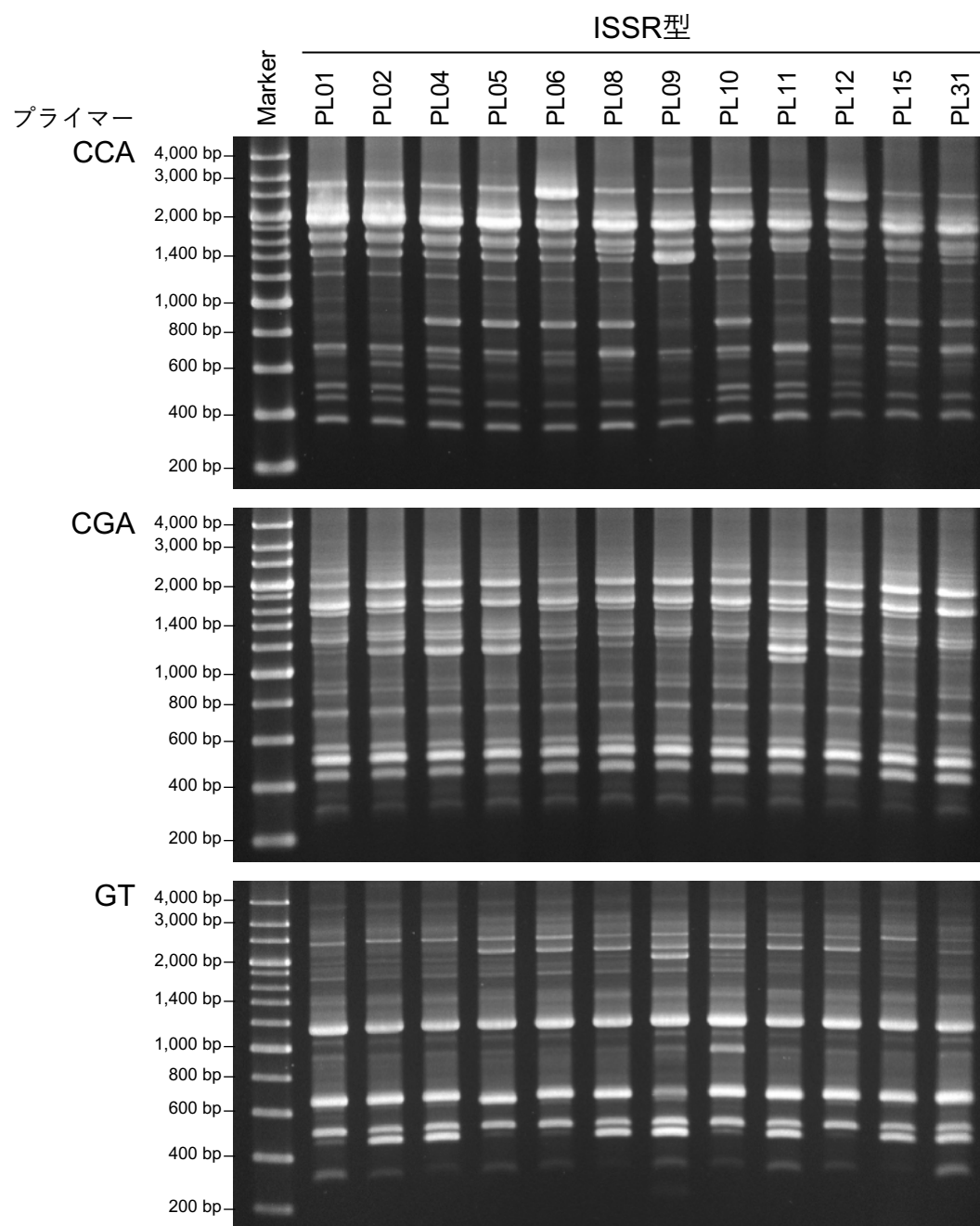


図5-1 チャ輪斑病菌の主要なISSR型の電気泳動像

表5-1 圃場内におけるチャ輪斑病菌のハプロタイプ多様度

Qol剤感受性	圃場No.	菌株数 n	ハプロタイプ 検出数	ハプロタイプ 多様度 $h^a)$
感受性	008	9	7	0.94
	019	10	6	0.89
	020	7	4	0.81
	022	10	7	0.93
	103	6	4	0.80
	239	8	5	0.86
	255	8	5	0.79
	261	8	4	0.79
	平均	8.3	5.3	0.85
中度耐性	069	6	1	0.00
	070	6	1	0.00
	081	4	1	0.00
	243	4	2	0.67
	平均	5.0	1.3	0.17
高度耐性	134	9	2	0.39
	139	9	2	0.56
	174	8	1	0.00
	195	8	2	0.54
	204	8	2	0.43
	212	8	3	0.46
	214	8	2	0.54
	259	8	2	0.54
	263	8	3	0.61
	264	8	3	0.68
	394	8	3	0.68
	404	8	4	0.64
	405	8	5	0.89
	平均	8.2	2.6	0.51

^{a)} $h = n(1 - \sum x_i^2) / (n-1)$, x_i は i 番目のハプロタイプの頻度.

第2節 集団遺伝学的解析による耐性菌の分布拡大経路の推定

第2章の調査において採集した牧ノ原台地産輪斑病菌株を材料として、ISSR分析によるDNAフィンガープリンティングを行った。地域間および耕作者間の高度耐性菌集団構造の差異を明らかにするため、analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier et al. 1992) による集団遺伝学的解析を行い、QoI剤耐性チャ輪斑病菌の分布拡大経路を考察した。

材料および方法

ISSR分析は前節と同様に行った。第2章の調査で採集した菌株の中から、高度耐性菌 623 菌株 (244 圃場)、中等度耐性菌 64 菌株 (27 圃場)、感受性菌 395 菌株 (319 圃場) の合計 1,082 菌株 (395 圃場) を分析した (図 5-2)。調査圃場のうち 233 圃場で耐性菌と感受性菌の両方が検出され、うち 171 圃場について両方の菌株を解析した。調査圃場を島田 (北部)、吉田 (東部)、牧之原 (中部～南東部) および御前崎 (南部) の4つの地域グループに分けて (図 5-2)、各地域グループにおける高度耐性菌のISSR型の検出圃場数を集計し、以下の計算式により検出頻度を算出した。

$$\text{検出頻度 (\%)} = \text{検出圃場数} / \text{調査圃場数} \times 100$$

地域グループの境界は調査圃場の位置関係に基づいて設定したため、行政上の市町の境界とは一部異なる。複数年にわたって調査を行った圃場については基本的に1回目の調査で採集した菌株のみを解析したが、集団構造の年次変動を解析するため、御前崎の15圃場および島田の12圃場については翌年に採集した菌株も分析した。ISSR型を、バンド有りを「1」、バンド無しを「0」で表したバイナリデータとして記録し、Nei and Li/Diceの類似度係数 (Nei and Li 1979) を算出した。FreeTree ver 0.9.1.50 ソフトウェア (Pavlicek et al. 1999) を使用し、非加重結合法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) によってデンドログラムを作成した。デンドログラムの頑健性を

ブートストラップ解析(1,000 反復)によって評価した. 系統樹の描画には TreeView ver 1.6.6 ソフトウェア (Page 1996) を使用した. Arlequin ver 3.5.1.3 ソフトウェア (Excoffier and Lischer 2010) を使用して AMOVA を行った. 圃場を集団, ISSR 型をハプロタイプ型データとみなし, 各集団におけるハプロタイプ頻度を用いて解析を行った. 変動組成および固定指数の有意性を並べ替え検定 (1,023 回) によって検定した.

結果

(1) 輪斑病菌株の ISSR 型

ISSR 分析の結果, 42 種類の明確に異なる ISSR 型 (PL01~PL42) が検出された (図 5-3). 高度耐性菌からは 18 種類, 中等度耐性菌からは 7 種類, 感受性菌からは 38 種類の ISSR 型が検出された (図 5-3). このうち 5 種類の ISSR 型が高度耐性, 中等度耐性および感受性菌で共通して検出され, 10 種類が高度耐性および感受性菌, 1 種類が中等度耐性および感受性菌で共通であった. 3 種類が高度耐性菌のみ, 1 種類が中等度耐性菌のみ, 22 種類が感受性菌のみで検出された. ISSR 型の類縁関係と菌株の QoI 剤感受性およびサンプリング地点との間に明確な関連性は認められなかった (図 5-3).

(2) ISSR 型の地理的分布

島田の高度耐性菌の優占 ISSR 型は PL05 で, 高度耐性菌が分離された圃場の 69% で検出された. PL05 は隣接する吉田および牧之原でも検出されたが頻度は 26% および 28% と低く, 御前崎では検出されなかった (図 5-3, 5-4). 一方, 御前崎の高度耐性菌では PL10 が優占しており, 68% の圃場で検出された. PL10 は他の 3 地域グループでも検出されたが頻度は低く 3~12% であった (図 5-3, 5-4). 島田と御前崎の中間に位置する牧之原では高度耐性菌の集団構造も中間的で, 島田および御前

崎における優占 ISSR 型の PL05 および PL10 がそれぞれ 2 および 3 番目に多く、検出頻度はそれぞれ 28% および 12% であった。最も多かった PL06 の検出頻度は 38% で、島田における PL05 および御前崎における PL10 に比べると優占度は低かった（図 5-3, 5-4）。吉田では PL11 が最も多く、48% の圃場で検出された。PL11 は他の 3 地域グループでも検出されたが頻度は低く 5~17% であった（図 5-3, 5-4）。同一圃場から分離された高度耐性菌株を一つの集団と見なし、4 つの地域グループに分け、集団内における ISSR 型の頻度をデータとして用いて AMOVA を行った結果、各階層で有意な集団分化が検出された。グループ間の固定指数 F_{CT} は 0.213 で、グループ内の集団間の固定指数 F_{SC} の 0.128 よりも高かった（表 5-2）。このことから、高度耐性菌では地域間でより大きな集団分化が生じていることが示唆された。

中等度耐性菌は御前崎の 24 圃場および牧之原の 3 圃場で検出された。これらの 27 圃場から分離された中等度耐性菌 64 菌株から 7 種の ISSR 型が検出された（図 5-3）。御前崎では合計 4 種の ISSR 型が検出された。最も多い ISSR 型は PL02 で、14 圃場（58%）で検出された。次に多かった PL09 は 10 圃場（42%）で検出され、うち 3 圃場では両方が検出された（図 5-3）。牧之原では 3 圃場の 5 菌株から 4 種の ISSR 型が検出された。牧之原と御前崎で共通する ISSR 型は PL02 のみであった（図 5-3）。中等度耐性菌は大部分が御前崎で検出されたため、AMOVA によって地域間の集団分化を検証することはできなかったが、地域内において少数の ISSR 型が優占している状況は高度耐性菌と同様であった。

（3）高度耐性菌の遺伝的集団構造の耕作者間差異

高度耐性菌が検出され、かつ耕作者を特定できた島田の阪本地区の 19 圃場について、高度耐性菌の遺伝的集団構造を解析した。これらの圃場における高度耐性菌の ISSR 型は島田地域全体と同様に PL05 および PL08 が多く、それぞれ 19 および 17 圃場で検出された（表 5-3）。圃場を耕作者別に 6 グループに分けて AMOVA を

行った結果，グループ内の集団間の固定指数 F_{SC} は -0.013 ，全集団間の固定指数 F_{ST} は 0.059 で集団分化は認められなかったのに対し，グループ間の固定指数 F_{CT} は 0.071 で有意な集団分化が認められた（表 5-4）．

（４）高度耐性菌の遺伝的集団構造の年次変動

同一圃場で異なる年に採集した高度耐性菌株を採集年でグループ分けして AMOVA を行った．御前崎の 15 圃場で 2009 年および 2010 年に採集した 30 集団 112 菌株および島田の 12 圃場で 2010 年および 2011 年に採集した 24 集団 110 菌株について解析を行った結果，2009/2010 年のサンプルのグループ内の集団間の固定指数 F_{SC} および全集団間の固定指数 F_{ST} はそれぞれ 0.147 および 0.139 で，それぞれの階層で有意な集団分化が認められたのに対し，グループ間の固定指数 F_{CT} は -0.010 と非常に低かった（表 5-5）．2010/2011 年のサンプルでは F_{SC} および F_{ST} がいずれも 0.020 と低かったが， F_{CT} はさらに低く -0.000 であった（表 5-5）．

考察

ISSR 分析の結果，耐性菌株から多数の ISSR 型が検出された．ISSR 型は核 DNA マーカーである（Ziętkiewicz et al. 1994）のに対し，QoI 剤耐性は通常ミトコンドリア DNA (mtDNA) 上の遺伝子の変異に起因する（Fernández-Ortuño et al. 2010; Gisi et al. 2002）．*Pestalotiopsis* はいわゆる不完全菌であり，*P. longiseta* を含む大部分の種で有性世代が知られていないことから，その伝染環において分生子によるクローン増殖が重要な役割を果たしていると推測されている（Maharachchikumbura et al. 2011）．したがって，輪斑病菌において ISSR 型の違いは菌株のクローン系統の違いを反映しており，また，核 DNA と mtDNA はともにクローン増殖によって後代に伝わるものと考えられる．本研究において観察された各地域の耐性菌集団における特定の ISSR 型の優占と集団構造の年次安定性は，

この推測を支持するものである (Taylor et al. 1999). また, ISSR 型の間に QoI 剤耐性や採集地点に対応する明確な系統関係は認められなかった. これらのことから, 牧ノ原台地では輪斑病菌の QoI 剤耐性がそれぞれの地域で独立して発達したものと推測できる.

いくつかの先行研究において, 薬剤耐性は病原菌種内の複数の系統で同時に発達し, それらの中で少数の系統が優占することが報告されている. ペレニアルライグラスいもち病菌 *Pyri. grisea* では, 米国ケンタッキー州および周辺地域で採集された QoI 剤耐性菌株の DNA フィンガープリンティングの結果, 高度耐性菌 14 菌株から 5 種類, 中等度耐性菌 6 菌株から 3 種類の DNA 型が検出され, そのうち高度耐性菌 9 菌株および中等度耐性菌 4 菌株がそれぞれ同一の DNA 型であった (Kim et al. 2003). ペレニアルライグラス上の *Pyri. grisea* 集団は輪斑病菌と同様に無性的であると考えられている (Viji et al. 2001). 同様の現象はイネいもち病菌 *Pyri. oryzae* のシタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害 (melanin biosynthesis inhibitor-dehydratase, MBI-D) 剤に対する耐性菌でも観察されている. MBI-D 剤と QoI 剤の作用機構は全く異なるが, MBI-D 剤耐性は QoI 剤耐性と同様に薬剤の標的タンパク質の遺伝子の一塩基置換によるアミノ酸置換に起因する (Takagaki et al. 2004). また, イネ上の *Pyri. oryzae* 集団は輪斑病菌と同様に無性的であると考えられている (Nottéghem et al. 1994; Suzuki et al. 2009). MBI-D 耐性イネいもち病菌の遺伝的集団構造を Pot2-TIR rep-PCR 法によって解析した結果, 佐賀県で 2002~2003 年に採集した耐性菌株から合計 24 種類の DNA 型が検出されたが, 耐性菌検出圃場の 72.0% (2002 年) および 56.5% (2003 年) で同一の DNA 型の耐性菌株が検出された (Suzuki et al. 2007). MBI-D 剤耐性イネいもち病菌の遺伝的集団構造については三重県でも 2006~2007 年に調査が行われた (Suzuki et al. 2012). 耐性菌株から合計 21 種類の DNA 型が検出されたが, 耐性菌検出圃場の 66.2% (2006 年) および 75.5% (2007 年) で同一の DNA 型の耐性菌株が検出さ

れた。

これに対して本研究では、上述の先行研究よりも狭い地域での調査にも関わらず、最も多かった ISSR 型の PL05 でも検出率は 37.7% (244 圃場中 92 圃場) に過ぎなかった。この違いは病原菌の伝播様式によるものと考えられる。前述のペレニアルライグラスいもち病菌やイネいもち病菌は種子および空気伝染性である。したがって、特定の菌の系統が広範囲に速やかに分布を拡大することが可能であると考えられる。これに対して、チャは永年性作物であり、一度圃場に定植されると数十年にわたって栽培されるため、チャの病原菌が種苗を介して他地域へ伝播する機会は非常に少ない。輪斑病菌の自然伝播は粘質の分生子が雨滴とともに飛散することで起こることから (堀川 1986c; 江塚・安藤 1994; 西島 2008)、空気伝染性の病原菌よりも伝播距離は短く、速度も遅いものと推測される (Madden 1992; McCartney et al. 2006)。一方で、輪斑病菌は主に機械摘採によって葉や茎に生じた新鮮な傷口から感染することから、摘採機を介した人為的伝播によって圃場間を速やかに伝播すると考えられている (江塚・安藤 1994; 浜屋・堀川 1982; 堀川 1984)。本研究において、高度耐性菌集団の遺伝的分化が耕作者間で確認され、同一耕作者の圃場間では分化が見られなかったことは、人為的伝播経路の重要性を支持するものである。一方、個々の圃場における耐性菌検出率は同一耕作者の圃場間でも異なることがあった。これは、それぞれの圃場における栽培管理、特に QoI 剤の散布履歴の違いによるものと推測された。調査を行った牧ノ原台地では一人の耕作者が管理する圃場が遠く離れていて、本研究で設定した地域をまたぐことも多い。このため、摘採機による地域間の菌の伝播も起こりうると考えられる。

一方、同一地域内では耕作者が異なっても特定の ISSR 型の菌株が優占していた。主な ISSR 型は地域によって異なり、島田では PL05 (99 圃場中 64 圃場)、吉田では PL11 (23 圃場中 11 圃場)、牧之原では PL06 (65 圃場中 26 圃場)、御前崎では PL10 (58 圃場中 37 圃場) の菌株が優占していた。同様の傾向は中等度耐

性菌でも認められ、御前崎では主として PL02 と PL09 が検出されたのに対し、牧之原では他の ISSR 型が多く検出された。高度耐性菌集団の地域グループ間の固定指数は耕作者グループ間よりも高かった。供試菌株は数年間にわたって採集したものであるが、地域グループ内における高度耐性菌の集団構造の年次変動は認められなかったことから、本研究で観察された地域グループ間の集団分化は年次変動によるものではないと考えられた。調査地域では小規模な個人生産者が多く、またチャは生育中の新芽を収穫するため収穫適期が短いことから、複数の生産者による摘採機の共用はほとんど行われていない。このため、摘採機による人為的伝播によって特定の ISSR 型の耐性菌が地域内に蔓延することは考えにくい。雨滴による分生子の飛散距離はごく短く、大部分は 1 m 以内に落下すると推定されるが (Madden 1992; McCartney et al. 2006)、牧ノ原台地ではチャ圃場が密集しており、圃場間に明確な物理的・空間的境界もないことから、輪斑病菌の分生子が雨滴によって隣接圃場へ伝播する可能性は十分にある。これらのことから、高度耐性菌集団の地域グループ間における集団分化は輪斑病菌の自然伝播の結果であり、耐性菌の圃場間伝播において自然伝播が無視できない頻度で起こっているものと推定した。

* 本章の内容の大部分は Yamada et al. (2016) として学術誌 *Plant Disease* に発表した。

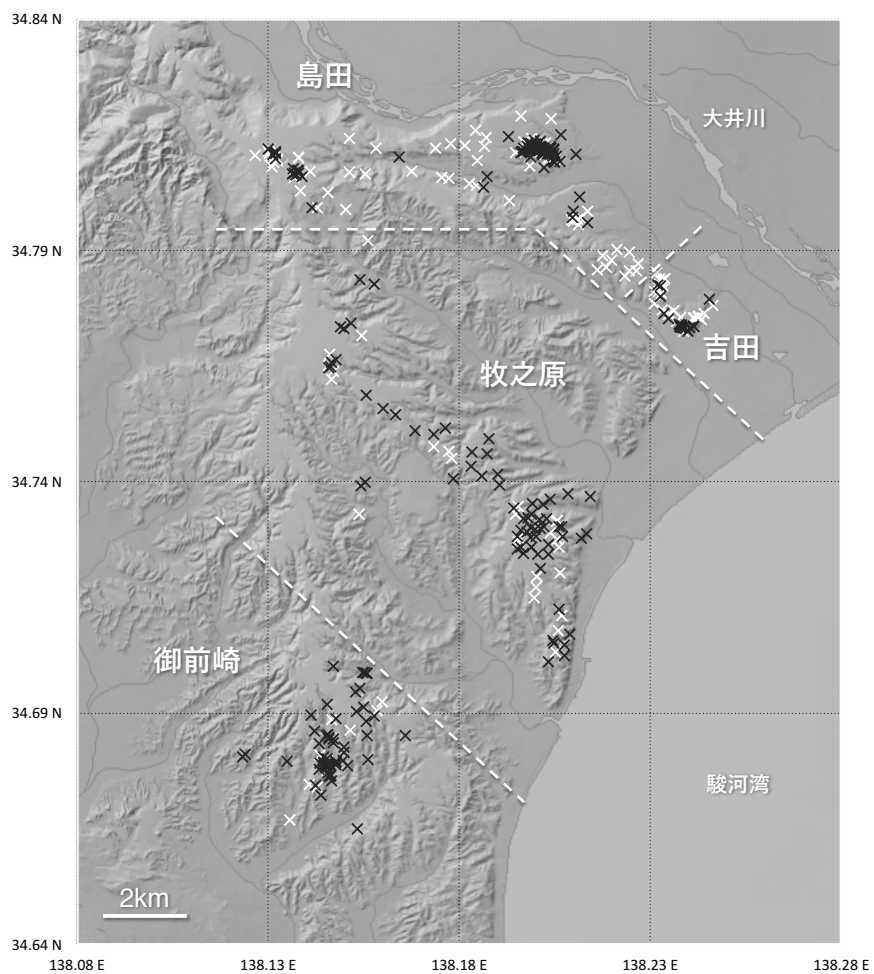


図5-2 静岡県牧ノ原台地におけるチャ輪斑病菌ISSR型の調査圃場
 黒色の×は耐性菌が検出された圃場。白色の×は感受性菌のみが検出
 された圃場。点線は本研究において設定した地域グループの境界線。

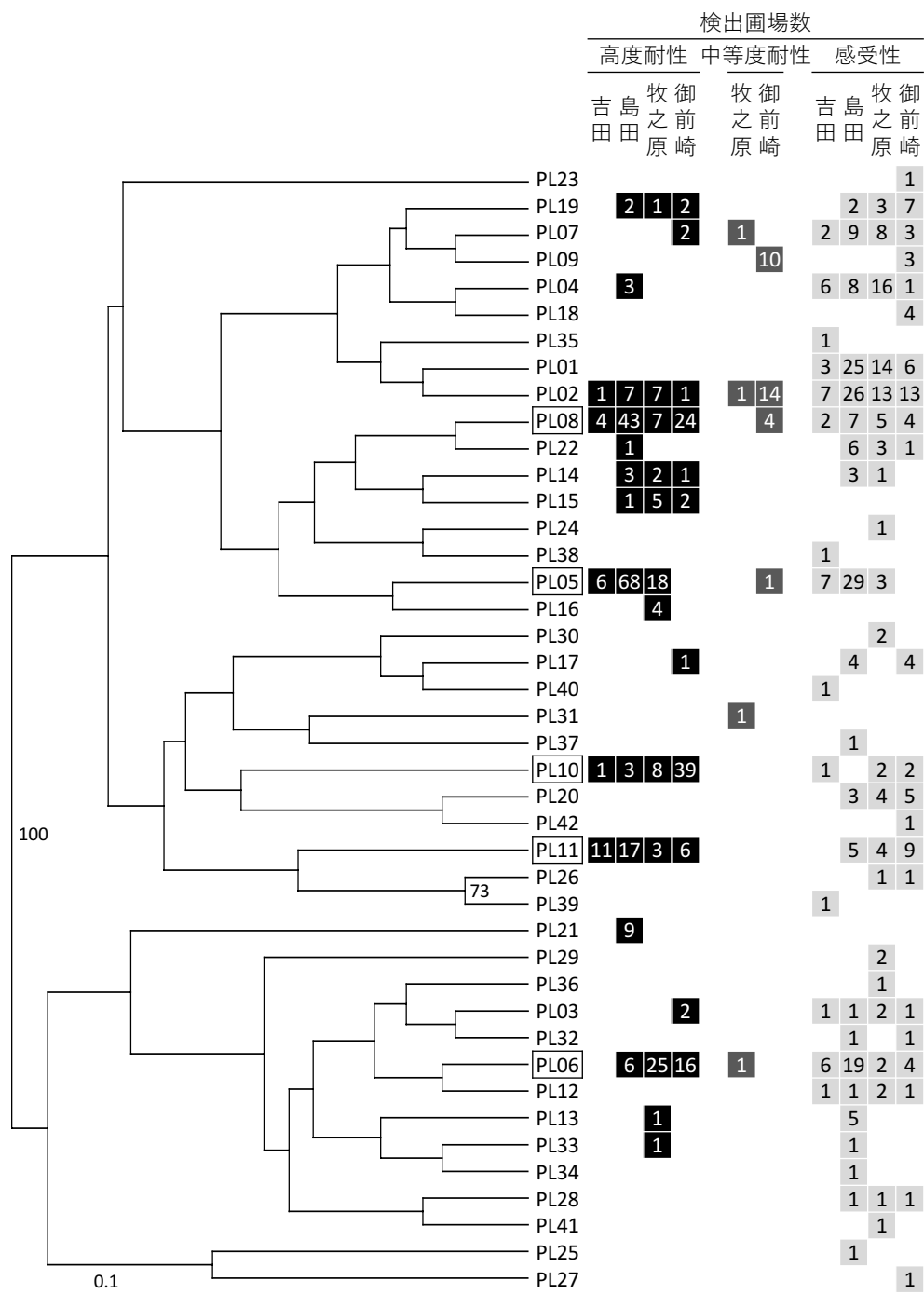


図5-3 チャ輪斑病菌のISSR型のUPGMAデンドログラムと地理的分布
高度耐性菌の主要なISSR型を□で示した。デンドログラム内の数字はブートストラップ値（50%以上のみ）。

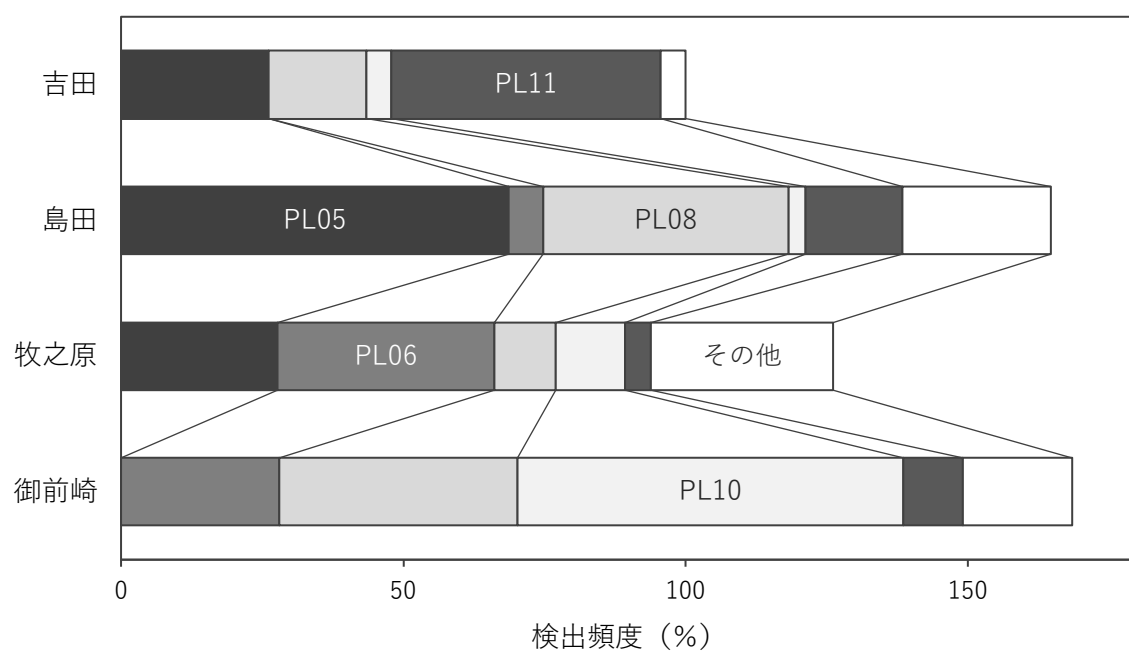


図5-4 Qol剤高度耐性チャ輪斑病菌のISSR型の地理的分布

検出頻度 (%) = 検出圃場数 / 調査圃場数 × 100. 1圃場から複数のISSR型が検出されるため、検出頻度の合計は100%以上となる.

表5-2 QoI剤高度耐性チャ輪斑病菌集団のAMOVA（地域によるグループ分け）

変動要因	自由度	平方和	変動組成	変動（％）	固定指数
グループ間	3	37.99	0.093***	21.26	$F_{CT} = 0.213^{***}$
グループ内の 集団間	240	98.69	0.044***	10.12	$F_{SC} = 0.128^{***}$
集団内	380	113.83	0.300***	68.62	$F_{ST} = 0.314^{***}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (1,023反復)

表5-3 Qol剤高度耐性チャ輪斑菌の集団構造の耕作者間差異

耕作者	圃場	ISSR型								
		PL02	PL04	PL05	PL06	PL08	PL10	PL11	PL15	PL21
A	206			6		1				
	252	1 ^{a)}		4		1				
B	212			6		1			1	
	214			5		3				
C	134			7		2				
	139			5		4				
	204			6		2				
D	193	1		2	1	1				
	404		1	5				1		1
	405		1	2		2	2	1		
E	174			8						
	208	1		4		2				
	259			5		3				
F	195			3		5				
	224			1		1				1
	262			1		2				1
	263			1		5				2
	264			4		3		1		
	394			4		3	1			

a) 菌株数.

表5-4 QoI剤高度耐性チャ輪斑病菌集団のAMOVA（耕作者によるグループ分け）

変動要因	自由度	平方和	変動組成	変動（％）	固定指数
グループ間	5	3.62	0.021*	7.13	$F_{CT} = 0.071^*$
グループ内の 集団間	13	3.28	-0.004	-1.25	$F_{SC} = -0.013$
集団内	119	33.19	0.279	94.12	$F_{ST} = 0.059$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (1,023反復)

表5-5 QoI剤高度耐性チャ輪斑病菌集団のAMOVA（採集年によるグループ分け）

変動要因	自由度	平方和	変動組成	変動（％）	固定指数
2009/2010（御前崎）					
グループ間	1	0.31	-0.003	-0.95	$F_{CT} = -0.010$
グループ内の 集団間	28	12.92	0.049**	14.85	$F_{SC} = 0.147^{**}$
集団内	82	23.10	0.282**	86.10	$F_{ST} = 0.139^{**}$
2010/2011（島田）					
グループ間	1	0.35	-0.000	-0.02	$F_{CT} = -0.000$
グループ内の 集団間	22	7.70	0.007	2.00	$F_{SC} = 0.020$
集団内	86	27.55	0.320	98.02	$F_{ST} = 0.020$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (1,023反復)

第 6 章 総合考察

農業用殺菌剤はその作用特性によって予防剤と治療剤の 2 種類に大別される。予防剤の作用は植物体の表面に限定されるのに対し、治療剤は植物体内への浸達性や浸透移行性を有し、植物体内に侵入した病原菌に対しても作用する。このため、治療剤は予防剤と比較して散布適期が長く、耕作者にとって利便性が高い。一方で、治療剤の多くは病原菌に対する作用点が単一であることから、病原菌に薬剤耐性が発達するリスクが高く、実際に多くの治療剤において耐性菌の出現が問題となっている。

チャ輪斑病に対する治療剤として、当初は MBC 剤のチオファネートメチルやベノミルが使用された。MBC 剤は真核生物の細胞骨格の一つである微小管を構成する β -チューブリンと結合し、その重合を阻害することによって病原菌の生育を抑制する (Davidse 1986)。MBC 剤は広い範囲の病原菌に対して高い治療効果を有し、優れた防除効果を示すことから上市当初は様々な作物で多用された。しかし、多くの病原菌で作用点である β -チューブリンの遺伝子変異による耐性菌が出現し、防除効果が著しく低下した (Brent and Hollomon 2007)。チャ輪斑病菌でも 1979 年に静岡県において MBC 剤耐性菌の出現が初めて確認され、1980 年代には全国の茶産地で耐性菌が検出されるようになった (堀川 1986b; 鬼木ら 1986)。このため、MBC 剤は防除効果を喪失し、輪斑病防除に使用されなくなった (尾松ら 2012; 外側 2015)。MBC 剤に代わって 1980 年代半ばから治療剤の主流となった DMI 剤は、チャでは炭疽病に対して高い治療効果を有することから現在に至るまで広く使用されているが、輪斑病菌に対する活性は低く、輪斑病に有効な治療剤が存在しない状況がしばらく続いた。1990 年代末に上市された QoI 剤のアゾキシストロピンは輪斑病に対して高い治療効果を有し、基幹防除薬剤として広く普及した。しかし、この QoI 剤に対しても 2008 年に鹿児島県で耐性菌の出現が確認された (富濱ら

2009).

輪斑病において先に問題となった MBC 剤耐性菌は、MBC 剤の使用を中止してもなかなか減少せず、未だに多くの圃場で耐性菌が高頻度で検出される（尾松ら 2012）。このため、MBC 剤による輪斑病防除は現在でも事実上不可能な状態である。QoI 剤も同様に、ひとたび耐性菌が産地に蔓延すると長期にわたって使用できなくなる恐れがある。そこで、QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の全国的な発生実態を明らかにするため、統一検定法を策定して主要な茶生産府県に調査を呼びかけるとともに、われわれの研究拠点が所在する静岡県牧ノ原台地における耐性菌の発生状況を調査した。その結果、鹿児島県に加えて静岡県、滋賀県および宮崎県で耐性菌が検出され、静岡県および鹿児島県では県内全域に耐性菌が分布していることが明らかとなった（宮崎県総合農業試験場茶業支場 2011; 尾松ら 2012; 外側 2015）。しかし、静岡県における耐性菌の分布範囲は広いものの、耐性菌が検出された圃場の割合は必ずしも高くなく、牧ノ原台地および周辺地域で調査した 477 圃場のうち、耐性菌が 1 菌株でも検出された圃場は約半数の 274 圃場、耐性菌検出率が 25%以上の圃場は約 3 割の 149 圃場であった。静岡県内の他の地域ではこれよりもさらに低く、耐性菌検出圃場率は 25%以下であった（外側 2015）。鹿児島県での発生状況も同様に、最も多かった南薩地域では約半数の圃場で耐性菌が検出されたが、他の地域では 30%以下であった（富濱ら 2009; 尾松ら 2012）。以上の調査結果から、両県において耐性菌はすでに広い範囲で発生しているものの、その分布はモザイク状であり、多くの圃場ではまだ耐性菌は発生しておらず、耐性菌の蔓延阻止が可能であると考えられた。牧ノ原台地における QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の起源として、外部からの移入と突然変異による出現が考えられる。輪斑病菌の移入経路として想定されるのは、分生子の飛散による自然伝播と、苗木あるいは耕作者や管理機を介した人為的伝播の 2 つである。輪斑病菌の分生子は雨媒伝染性であり、長距離を飛散する可能性は低い。チャの苗木は挿し木による栄養繁殖で生産されることから、母樹園が

汚染されていれば苗木も耐性菌を保有している可能性が高い。しかし、チャは永年性作物であり、改植は数十年に一度しか行われたい。摘採機は輪斑病発生圃場で使用すると、機体や後ろに引いた生葉収容袋に分生子や罹病組織片が付着する。汚染された摘採機で摘採すると、それによって葉や茎に形成された新鮮な傷口に輪斑病菌が付着して感染することから、摘採機は輪斑病菌の圃場間伝播に大きく関与していると考えられている。しかし、圃場間の摘採機の移動はせいぜい隣接する地域までであり、長距離の伝播に関与することは少ない。以上のことから、耐性菌の外部からの移入が起こる頻度は非常に低いと考えられる。一方、病原菌の殺菌剤耐性系統は突然変異によって病原菌集団中に非常に低い頻度で常に存在しており、殺菌剤による淘汰圧がない条件下では自然消滅と再出現を繰り返しているものと考えられている (Brent and Hollomon 2007)。QoI 剤耐性は通常、mtDNA 上の *cytb* の一塩基置換に起因するが、一般に mtDNA は核 DNA よりも突然変異率が高く、進化速度が速い (中澤・浅見 1995; Barr et al. 2005)。したがって、QoI 剤耐性菌は突然変異によって容易に出現すると考えられる。これらのことから、牧ノ原台地の QoI 剤耐性チャ輪斑病菌はこの地域内で突然変異によって出現した可能性が高いと推定した。

一方、牧ノ原台地の各地域の耐性菌集団においてそれぞれ異なる ISSR 型が優占していたことから、複数の系統の耐性菌が各地域で独立して出現し、地域内に拡散したものと考えられる。前述の通り、輪斑病菌の圃場間伝播は摘採機を介した人為的伝播によるところが大きく、分生子の雨媒伝染による自然伝播の関与は低いと考えられており、QoI 剤耐性菌も摘採機によって分布拡大するとされてきた (尾松ら 2012; 外側 2015)。しかし、地域内における耐性菌の集団構造は耕作者が異なっても類似性が高かったことから、輪斑病菌の圃場間伝播は人為的伝播だけによるものではなく、自然伝播もこれまで考えられていたよりも高い頻度で起こっているものと考えられた。

以上のことから、耐性菌は牧ノ原台地において以下の経路で分布を拡大したと推定した。まず、ある圃場に耐性菌が突然変異によって出現する。耐性菌は殺菌剤散布による選択圧下で優占化し、雨媒伝染による自然伝播と摘採機による人為的伝播によって速やかに圃場全体に蔓延し、摘採機を共有する他の圃場にも広がっていく。圃場の端に到達した耐性菌は雨媒伝染によって隣接圃場に侵入する。伝播した先でも同様に殺菌剤による淘汰と人為的および自然伝播が繰り返されて、耐性菌が地域全体に広がる。これが牧ノ原台地の各地域で独立して起こったものと推測される。

本研究では QoI 剤耐性菌を解析の対象としたが、かつて問題となった MBC 剤耐性も QoI 剤耐性と同様に薬剤の標的タンパク質遺伝子の一塩基置換に起因し、野生型の感受性菌が突然変異によって容易に耐性を獲得する (Koenraad et al. 1992; Brent and Hollomon 2007)。したがって、MBC 剤耐性菌も QoI 剤耐性菌と同様の経路で全国の茶産地に蔓延したと推測できる。また、QoI 剤耐性は適応度コスト (fitness cost) を伴わないことがいくつかの植物病原菌において報告されている (Fernández-Ortuño et al. 2010)。輪斑病菌でも筆者の知る限り耐性菌における明らかな適応度の低下は観察されておらず、耐性菌と感受性菌の伝播機構に差異があるとは考えられない。したがって、QoI 剤耐性菌の圃場間伝播経路は輪斑病菌全般に当てはまると言える。従来、輪斑病菌の主要な圃場間伝播経路は摘採機を介した人為的伝播であるとされてきた。しかし、本研究の結果から、雨滴による分生子の分散による自然伝播も重要な役割を果たしていることが明らかとなった。薬剤耐性輪斑病菌の分布拡大を防ぐためには、人為的伝播と自然伝播の両方の経路を考慮して対策をとる必要がある。

病原菌の薬剤耐性対策においては、継続的な病原菌の薬剤感受性モニタリングの実施が必須である。そこで、従来の調査で用いられてきた寒天平板希釈法よりも迅速あるいは簡便な薬剤感受性検定法として、遺伝子診断法と煮沸チャ葉法を開発した。QoI 剤耐性菌の遺伝子診断法として、うどんこ病菌などを対象に開発された

PCR-RFLP 法 (Ishii et al. 2007) がある。本法はプライマーの汎用性が高く、多くの植物病原糸状菌に適用できることが明らかとなっており、寒天平板希釈法とともに標準的な検定法として広く利用されている。当初はチャ輪斑病菌にも本法を適用できると考えていたが、その後の調査において輪斑病菌には *cytb* のエキソノーイントロン構造の違いにより本法での診断が困難な菌株、および本法では検出できない F129L 変異による耐性菌が存在することが明らかとなった。そこで、これらの菌株に対応するため、マルチプレックス PCR-RFLP 分析による遺伝子診断法を開発した。本法と DNA 簡易抽出法を組み合わせることで、DNA 抽出から判定までを 4 時間程度で行うことができた。一方、煮沸チャ葉法は専門的な知識・技術や機器・試薬を必要とせず、簡単な操作で十分な精度の結果が得られる QoI 剤感受性検定法として普及・指導機関や生産者が容易に実施できると考えた。QoI 剤を使用する前、あるいは QoI 剤を使用している圃場で輪斑病が発生したときには、これらの検定法を利用して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必要である。鹿児島県で QoI 剤耐性チャ輪斑病菌が初めて検出されたことを受けて、同県および静岡県で耐性菌の発生実態の調査を行った結果、耐性菌はすでに両県の全域に分布しており、地域によっては耐性菌密度が極めて高いことが明らかとなった。したがって、初確認の数年前にはすでに耐性菌密度が検出可能なレベルまで高まっており、その時点で耐性菌を検出していれば耐性の発達を未然に防ぐことができたと考えられる。まだ耐性菌が発生していない地域や圃場では継続的に薬剤感受性モニタリングを行い、同じ失敗を繰り返さないようにする必要がある。

薬剤耐性対策の基本の一つは同一作用機構の薬剤の過度な使用を避けることである。多くの理論的および実験的証拠から、作用機構の異なる薬剤の混用によって薬剤耐性の発達が抑制されることが明らかとなっている (Hollomon 2015)。一方、作用機構の異なる薬剤のローテーション散布による耐性発達の遅延効果は、単純に対象薬剤の使用回数の減少によるものである (Hollomon 2015)。多くの場合、ローテ

ーション散布よりも混用の方が耐性の発達は遅くなる (Hollomon 2015)。これらのことから、日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会 (2012) が策定した「野菜・果樹・茶における QoI 剤及び SDHI 剤使用ガイドライン」では、チャにおける QoI 剤の使用は単剤の場合は 1 年 1 回まで、混用（効果が期待できる他の成分を含む）の場合は 1 年 2 回まで、とされている。しかし、輪斑病菌の QoI 剤耐性対策のために薬剤の混用を実施することは難しいであろう。その理由の第一は、輪斑病の防除に使用できる薬剤の大部分が予防剤であり、治療効果は有していないことである。QoI 剤と同等以上の治療効果を有していた MBC 剤は前述の通り、すでに耐性菌が産地に蔓延しており、MBC 剤と QoI 剤の両方に対して耐性を有する複合耐性菌も存在することから (尾松ら 2012)、QoI 剤のパートナー薬剤とはなりえない。予防剤との混用では、予防剤が十分な防除効果を発揮する摘採当日か遅くとも翌日に散布しなければ、パートナー薬剤としての機能は期待できない。このため、QoI 剤のアゾキシストロビンやピリベンカルブの有する治療効果を十分に活用することができず、予防剤の単独使用に比べて QoI 剤との混用のメリットが小さい。また、ほとんどの薬剤は単剤として市販されているため、混用によって薬剤費が増加する。QoI 剤を含む既成の混合剤として、QoI 剤とは作用機構の異なる SDHI 剤のボスカリドと QoI 剤のピラクロストロビンの混合剤があるが、ボスカリドは輪斑病菌に対する活性が低く、混用による QoI 剤耐性発達の遅延効果は期待できない (山田 未発表; 外側 2015)。これらのことから、輪斑病菌の QoI 剤耐性対策において薬剤の混用は実施が困難であり、ガイドラインに従えば QoI 剤の使用回数は年 1 回までとするしかない。

薬剤耐性対策では、耐性菌だけでなく感受性菌も含めた病原菌全体の密度をできるだけ低く抑えることが重要である (Hollomon 2015)。これによって、耐性リスクが高い薬剤の使用頻度を抑制することができ、また、病原菌の母集団サイズが小さくなれば突然変異によって薬剤耐性に関与する遺伝子変異が病原菌集団内で生じる

可能性も低くなる。前述のガイドラインでも一般的な耐性菌対策として、薬剤による防除上の留意点に先立って「薬剤防除だけに頼るのではなく、圃場や施設内を発病しにくい環境条件にする」ことを挙げ、耕種的防除の重要性を指摘している。輪斑病において薬剤防除に代わる最も有効な防除法は病害抵抗性品種の利用である。チャ品種の輪斑病抵抗性は、それぞれ独立した 2 種類の優性遺伝子 PI_1 （高度抵抗性遺伝子）と PI_2 （中等度抵抗性遺伝子）によって支配される（Takeda 2002）。抵抗性の遺伝様式が明らかになったことから効率的な育種が可能となり、近年、輪斑病抵抗性品種の育成が進んでいる（萬屋 2015）。しかし、チャは永年性作物で品種変更の機会が少ない上、品種の選択において収益性が最重要視されることから、病害虫抵抗性を優先した品種選択は難しいのが現状である。

圃場衛生や環境制御による病害発生の低減化に取り組むためには、これらの対策の基盤となる病害の発生生態に関する知見の蓄積が必要である。しかし、輪斑病の発生生態には未解明の部分が多い。たとえば、摘採・整枝によるチャ葉の傷口からの輪斑病菌の感染は葉の濡れによって助長されるという推定に基づいて、一部の耐性菌の発生地域では降雨の最中や合間の摘採・整枝を避けることが指導されている（鹿児島県農業開発総合センター 2010）。この推定は糸状菌の一般的な性質と栽培者の経験に基づくものであるが、実験的には葉や茎の切断部での水滴の有無が発病程度に及ぼす影響は比較的小さいことが示されている（堀川 1987）。輪斑病の発生に最も大きく影響する気象要因は気温で、摘採・整枝時の気温が高いほど発生が多くなるとされている（堀川 1984）。しかし、炭疽病やもち病では病害発生の年次や茶期による変動と降雨や気温との関係が比較的明確なのに対し、輪斑病では変動要因が明らかでないことが多い。今後の研究によって、輪斑病の発生に対する気象条件の影響を明確にすることが必要であろう。また、輪斑病菌の伝染環にも越冬場所を始めとして不明な点が多い。輪斑病菌は樹上に残存した罹病茎葉や葉層内落葉中の菌糸、または越冬葉、腋芽および枝条などの表面に付着した分生子の形で越冬し

うる。また、地表面に落下した罹病組織中で越冬できる可能性もある。これらのうち、残存罹病枝と樹幹内落葉上で形成される分生子が翌年の第一次伝染源として最も重要であると推測されている（成澤 1988）。しかし、それらの除去が輪斑病の発生量の低減につながるかどうかは不明である。また、輪斑病菌は健全チャ葉にも高い頻度で潜在感染している（成澤 1988）。しかし、輪斑病菌の伝染環における潜在感染の位置付けは全くわかっていない。これら輪斑病の発生生態を解明することによって、新たな薬剤防除法や耕種的防除法の開発につながることを期待される。限りある農薬をこれからも長く有効に使い続け、病害を防除することによってチャを安定的に生産していくためには、耐性菌だけではなく輪斑病全般の発生生態に対する深い理解に基づいた病害管理体系の確立が不可欠であろう。

摘要

我が国におけるチャ栽培では病害が多発することから、化学殺菌剤による病害防除が不可欠である。チャの重要病害の一つである輪斑病（病原菌：*Pestalotiopsis longiseta*）に対して、アゾキシストロビン水和剤が治療効果を有し卓効を示すことから基幹防除薬剤として広く使用されている。アゾキシストロビンは作用機構上、病原菌のミトコンドリアの複合体 III の Qo 部位に結合して電子伝達系を阻害する QoI 剤に分類される。QoI 剤は広い範囲の病原菌に対して高い防除効果を示すことから世界的に多くの作物で広く使用されており、農業上最も重要な殺菌剤グループの一つとなっている。しかし、QoI 剤は作用点が単一であることから病原菌に薬剤耐性が発達するリスクが高く、すでに多くの植物病原菌で耐性菌の発生が報告されている。チャ輪斑病菌でも 2008 年に鹿児島県において QoI 剤耐性菌の出現が確認され、その分布拡大が危惧された。

そこで、チャ輪斑病菌の QoI 剤感受性統一検定法を策定して広く調査を呼びかけると共に、我が国で最大の茶産地である静岡県牧ノ原台地における QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の発生実態を調査した。その結果、牧ノ原台地の 457 圃場中 266 圃場から耐性菌が検出され、そのうち 103 圃場で耐性菌検出率が 50%以上であった。また、全国の複数の茶産地から耐性菌が検出され、静岡県および鹿児島県では耐性菌が県内のほぼ全域に蔓延していることが明らかとなった。

この調査において、既知の高度耐性菌と感受性菌の中間的な QoI 剤感受性を示す中等度耐性菌が検出された。高度耐性菌は QoI 剤の作用点であるチトクローム *b* 遺伝子（*cytb*）の G143A 変異に起因するのに対し、中等度耐性菌は F129L 変異に起因していた。アゾキシストロビンに対する耐性係数（RF）は、高度耐性菌株ではアゾキシストロビンによる生育阻害率が低く算出不能であったのに対し、中等度耐性菌株では平均 56.2 であった。高度耐性菌株は同じ QoI 剤のクレソキシムメチルお

よびトリフロキシストロビンに対しても同様に RF が算出不能で高い耐性を示したのに対し，中等度耐性菌株の RF はそれぞれ平均 5.8 および 3.0 で交差耐性の程度は低かった．チャ切離葉を用いた接種試験では，アゾキシストロビン処理によって中等度耐性菌による病斑拡大は抑制されるものの，発病を阻止することはできなかったことから，中等度耐性菌は圃場におけるアゾキシストロビンの防除効果低下の原因となりうると考えられた．牧ノ原台地における中等度耐性菌の分布は一部地域に集中しており，中等度耐性菌が検出された 28 圃場中 21 圃場が御前崎の朝比奈地区であった．

病原菌の薬剤耐性対策においては，継続的な病原菌の薬剤感受性モニタリングの実施が必須である．そこで，迅速あるいは簡便な薬剤感受性検定法として，遺伝子診断法と煮沸チャ葉法を構築した．マルチプレックス PCR-RFLP 分析による遺伝子診断法によって，所要時間を従来の寒天平板希釈法の 4 日間から 4 時間に短縮することができた．煮沸したチャ葉を寒天培地の代わりに培養基質として用いる煮沸チャ葉法は，専門的な知識・技術や機器・試薬が不要で，普及・指導機関や生産者が容易に実施できると考えられた．

チャ輪斑病菌の QoI 剤耐性菌は短期間のうちに急速に分布を拡大したものと考えられる．そこで，耐性菌の分布拡大経路を推定するため，牧ノ原台地における耐性菌の集団遺伝学的解析を行った．前述の調査において採集した菌株を ISSR 分析によって DNA フィンガープリンティングした結果，牧ノ原台地の各地域においてそれぞれ異なる少数の ISSR 型が優占していた．このことから，耐性菌の圃場間伝播において分生子の飛散による自然伝播が無視できない頻度で起こっているものと推測した．一方，島田市阪本地区の 19 圃場について高度耐性菌の集団構造を解析した結果，同一耕作者の圃場では集団構造が極めて類似しており，AMOVA によって耕作者間で有意な集団分化が認められた．このことから，従来から指摘されている摘採機を介した人為的伝播の重要性が確認された．以上の結果から，牧ノ原台地に

において QoI 剤耐性輪斑病菌は各地域で独立して出現し、自然伝播および人為的伝播によって分布を拡大したものと推定した。種子伝染や空気伝染によって特定の系統が短期間のうちに広範囲に拡散しうる他の病原菌と比較して、移動性が低いチャ輪斑病菌の耐性菌の分布拡大には突然変異による耐性菌出現の寄与が大きいと推測される。このため、耐性菌が未発生地域であっても QoI 剤を使用している限りは常に耐性菌の出現および発達を警戒する必要がある。また、輪斑病菌の圃場間伝播には人為的伝播と自然伝播の両方が関与していると推測されたことから、輪斑病菌の薬剤耐性対策には地域全体で取り組む必要があると考えられた。

Summary

QoI fungicide resistance in *Pestalotiopsis longiseta* causing tea gray blight

Kengo YAMADA

Disease control by chemical fungicides is essential, because diseases occur frequently in Japanese tea (*Camellia sinensis*) cultivation. Azoxystrobin is the preferred fungicide against gray blight caused by *Pestalotiopsis longiseta*, which is one of the most serious tea diseases in Japan, because of its high and curative activity. Based on the mode of action, azoxystrobin is classified into the Qo inhibitor (QoI) group of fungicides, which inhibit respiration by binding to the Qo site in mitochondrial complex III. QoI fungicides are important agricultural fungicides because of their high control efficacy against a broad range of plant pathogenic fungi. However, QoI fungicides are at high risk of resistance development in pathogens due to their single-site mode of action. Occurrence of field resistance against QoI fungicides has been reported in many plant pathogenic fungi worldwide. In *P. longiseta*, QoI-resistant isolates were first identified in tea fields in Kagoshima Prefecture, Japan in 2008. Their spread to other tea-growing areas is of concern.

In this study, we established a standard method for a QoI sensitivity assay, and encouraged related people to investigate fungicide sensitivity. We investigated an occurrence of QoI resistance in *P. longiseta* in Makinohara Plateau, Shizuoka Prefecture, which is Japan's largest tea-growing area. We identified QoI-resistant isolates in 266 out of 457 fields investigated. Frequency of resistant isolates was 50% or above in 103 fields. Resistant isolates were found in several other tea-growing areas. In Shizuoka and Kagoshima prefectures, resistant isolates were found in all major tea-growing areas.

Through these investigation, we identified moderately resistant isolates which showed an intermediate response to QoI fungicides between resistant and sensitive isolates. Moderate resistance was attributed to F129L mutation of the QoI-targeting cytochrome *b* gene (*cytb*), whereas high resistance was attributed to G143A mutation. Two types of *cytb*, with or without an intron between codon 131 and 132, were identified among the *P. longiseta* isolates. Both F129L and G143A mutants were identified among the isolates with and without an intron. Resistance factor (RF) of moderately resistant isolates was 56.7 against azoxystrobin on average. Cross resistances of these isolates to other QoI fungicides kresoxym-methyl and trifloxystrobin were weak with RF 3.0–5.8. Resistance to pyribencarb was rather strong with RF 24.7. Moderate resistance was considered a practical problem in field, because azoxystrobin suppressed lesion development by moderately resistant isolates, but did not inhibit lesion formation completely in detached leaf inoculation assays. Distribution of moderately resistant isolates was limited in a small area. Out of 28 fields where moderately resistant isolates were detected, 21 were in Asahina section of Omaezaki.

Continuous monitoring of sensitivity is essential for fungicide resistance management of plant pathogens. We developed QoI sensitivity assay methods that are faster or easier than the conventional agar plate dilution method. Molecular diagnosis by multiplex PCR-RFLP takes only 4 h from DNA extraction to judgement. The boiled tea leaf method using boiled tea leaves instead of agar plates as a culture medium does not need special technical skill, equipment, or reagent. Therefore, it is considered that agricultural extension workers or farmers themselves can perform this test easily.

QoI-resistant *P. longiseta* is inferred to spread rapidly in a short period of time. We attempted DNA fingerprinting and population genetics analysis of QoI-resistant isolates collected on the Makinohara Plateau to elucidate the QoI resistance route of spread. Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis revealed that a different ISSR type was

predominant in QoI-resistant populations of each regional group; PL05 in the northern part (69%), PL11 in the eastern part (48%), PL06 in the middle to southeastern part (38%), and PL10 (68%) in the southern part. Consequently, we deduced that natural transmission of QoI-resistant isolates among fields by dispersal of conidia with rain splash occurs at a considerable frequency. In contrast, analysis of molecular variance (AMOVA), by dividing 19 fields in the Sakamoto section of Shimada into six groups according to farmer, revealed significant population differentiation among farmers. The population structures of highly resistant isolates among the fields of a farmer were extremely uniform. This result confirmed the importance of artificial transmission of pathogen mediated by plucking machine, which has been accepted for a long time. Consequently, we speculate that QoI-resistant *P. longiseta* occurred independently in a number of clonal lineages in each region, probably by natural mutation. It then spread by both natural and artificial transmission, such as rain splash and plucking machines, throughout each region on the Makinohara Plateau.

謝辞

本研究を博士論文にまとめるにあたり，筑波大学生命環境系教授 山岡裕一博士には終始懇切なご指導とご助言を賜りました．吉備国際大学地域創成農学部教授 石井英夫博士，筑波大学生命環境系教授 戒能洋一博士，同准教授 岡根泉博士，同准教授 山田小須弥准教授には貴重なご助言とご校閲の労を賜りました．ここに深く感謝の意を表します．

本研究の遂行に際し，静岡県病虫害防除所 外側正之博士，鹿児島県農業開発総合センター 尾松直志氏，同 富濱毅博士には耐性菌の発生実態と試験法についてご教授いただきました．ここに厚くお礼申し上げます．

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 園田亮一氏，石川浩一氏，吉田克志博士には終始多大なるご協力とご助言をいただきました．白川隆博士には本論文をまとめるにあたり温かい激励をいただきました．ここに深く感謝申し上げます．また，さまざまな形で研究をサポートしていただいた同 金谷茶業研究拠点の諸氏に心から感謝申し上げます．

引用文献

- Anke T, Oberwinkler F, Steglich W, Schramm G (1977) The strobilurins — New antifungal antibiotics from the basidiomycetes *Strobilurus tenacellus*. J Antibiot 30:806–810
- Banno S, Yamashita K, Fukumori F, Okada K, Uekusa H, Takagaki M, Kimura M, Fujimura M (2009) Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene. Plant Pathol 58:120-129
- Barr CM, Neiman M, Taylor DR (2005) Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. New Phytol 168:39–50
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B (2002) The strobilurin fungicides. Pest Manag Sci 58:649–662
- Brent KJ, Hollomon DW (2007) Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?, 2nd, revised edition. Fungicide Resistance Action Committee, CropLife International, Brussels
- Butler EJ (1918) Fungi and diseases in plants. Thacker, Spink & Co., Calcutta and Simia. pp. 451–455
- Davidse LC (1986) Benzimidazole fungicides: Mechanisms of action and biological impact. Ann Rev Phytopathol 24:43–65
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour 10:564–567
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human

- mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491
- 江塚昭典 (1957a) 恐るべき茶の病害「網餅」病. 茶 10(3):23–29
- 江塚昭典 (1957b) 恐るべき茶の病害「網餅」病 (下). 茶 10(4):28–34
- 江塚昭典・安藤康雄 (1994) チャの病害. 日本植物防疫協会, 東京
- Farr DF, Rossman AY (2017) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved January 30, 2017, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García A (2010) The QoI fungicides, the rise and fall of a successful class of agricultural fungicides. In: Carisse O (ed) Fungicides. InTech, Rijeka, pp 203–220
- Ferreira, AVB, Glass, NL (1996) PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genet Newsl* 43:25–26
- 福田徳治 (1976) 最近二・三の茶園に発生のみとめられた黒葉腐病・輪紋葉枯病および輪斑病. 茶 29(9):49–52
- Fungicide Resistance Action Committee (2006) Mutations associated with QoI-resistance. <http://www.frac.info/docs/default-source/about-frac/mutations-associated-with-qoi-resistance.pdf>
- Fungicide Resistance Action Committee (2012) Species with QoI-resistance (status Dec. 2012). [http://frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-\(updated-2012\).pdf](http://frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-(updated-2012).pdf)
- Fungicide Resistance Action Committee (2017) Minutes of the 2016 QoI meeting recommendations for 2017. [http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2016-qoi-meeting-recommendations-for-2017-\(telco-update-march-07-2017\).pdf](http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2016-qoi-meeting-recommendations-for-2017-(telco-update-march-07-2017).pdf)
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A (2002) Mechanisms influencing the

- evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag Sci* 58:859-867
- Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A, Gisi U (2006) Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag Sci* 62:465-472
- 浜屋悦次・堀川知廣 (1982) *Pestalotia longiseta* Spegazzini によるチャ輪斑病. 茶技研 62:21-27
- Hantula J, Dusabenyagasani M, Hamelin RC (1996) Random amplified microsatellites (RAMS) — A novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur J Forest Pathol* 26:159-166
- 広川敢 (1965) 茶白星病の病原菌について. 茶技研 30:31-38
- 広川敢 (1968) 白星病の防除. 茶 22(3):53-55
- 広川敢 (1969) 茶輪斑病, 円赤星病および髪の毛病. 茶 22(8):36-38
- Hollomon DW (2015) Fungicide resistance: Facing the challenge. *Plant Protect Sci* 51:170-176
- 堀川知廣 (1982) チャ輪斑病の有効な防除薬剤と散布時期. 茶研報 56:45-56
- 堀川知廣 (1984) 最近多発しているチャ輪斑病の発生生態と防除. 植物防疫 38:275-279
- 堀川知廣 (1986a) チャ輪斑病による減収. 静岡茶試研報 12:1-8
- 堀川知廣 (1986b) チャ輪斑病菌 *Pestalotia longiseta* Spegazzini のベンズイミダゾール系殺菌剤に対する耐性の発生. 静岡茶試研報 12:9-14
- 堀川知廣 (1986c) チャ輪斑病発病茶園における *Pestalotia longiseta* Spegazzini 分生子の生産量消長およびせん枝による感染源の除去効果. 静岡茶試研報 12:15-22
- 堀川知廣 (1987) チャ輪斑病及び新梢枯死症の発生におよぼす輪斑病菌 (*Pestalotia longiseta* Spegazzini) 感染時の降雨の影響. 静岡茶試研報 13:49-54

- 石井英夫 (2015) QoI 剤耐性菌の現状. 植物防疫 69:469–474
- Ishii H, Fraaije BA, Sugiyama T, Noguchi K, Nishimura K, Takeda T, Amano T, Hollomon DW (2001) Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91:1166–1171
- 石井英夫・Joseph-Horne T・Hollomon DW・西村久美子 (1999) ストロビルリン系殺菌剤とシアン耐性呼吸阻害剤, 没食子酸 *n*-プロピルの協力作用. 日本農薬学会講演要旨集 24:61
- Ishii H, Yano K, Date H, Furuta A, Sagehashi Y, Yamaguchi T, Sugiyama T, Nishimura K, Hasama W (2007) Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. *Phytopathology* 97:1458–1466
- 鹿児島県農業開発総合センター (2010) チャ輪斑病におけるアミスター耐性菌の発生と対策. 九州沖縄農業研究成果情報 25:277–278
- 木伏秀夫・江塚昭典・笠井久三 (1974) チャに寄生する 2 種の *Pestalotia* 属菌. 茶研報 41:37-43
- Kim YS, Dixon EW, Vincelli P, Farman ML (2003) Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Phytopathology* 93:891–900
- 小泊重洋 (1972) 茶の病害虫とその防除〔2〕. 農及園 47:1569–1573
- Koenraadt H, Somerville SC, Jones AL (1992) Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82:1348–1354
- Leiminger JH, Adolf B, Hausladen H (2013) Occurrence of the F129L mutation in *Alternaria solani* populations in Germany in response to QoI application, and

- its effect on sensitivity. *Plant Pathol* 63:640–650
- Madden LV (1992) Rainfall and the dispersal of fungal spores. In: Andrews JH, Tommerup IC (eds) *Advances in plant pathology*, vol 8. Academic Press, London, UK, pp 39–79
- Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD (2011) *Pestalotiopsis*—Morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Divers.* 50:167–187
- McCartney HA, Fitt BDL, West JS (2006) Dispersal of foliar plant pathogens: Mechanisms, gradients and spatial patterns. In: Cooke BM, Gareth Jones D, Kaye B (eds) *The epidemiology of plant diseases*, 2nd edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 159–192
- 宮崎県総合農業試験場茶業支場 (2011) 平成 23 年度宮崎県茶試験研究成果発表会資料
- 永田利美 (1954) 茶樹タンソ病に関する研究. 東近農試研報 (茶) 2:97–131
- 中澤透・浅見行一 (1995) ミトコンドリア, 第 2 版. 東京大学出版会, 東京
- 成澤信吉 (1988) 茶輪斑病菌の生態について. 茶 41(2):34–37
- 根井正利 (1990) 分子進化遺伝学 (五条堀孝・斉藤成也訳). 培風館, 東京, pp 222–223
- Nei M, Li WN (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5269–5273
- Nielsen H, Johansen SD (2009) Group I introns: Moving in new directions. *RNA Biol* 6:375–383
- 日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会 (2012) 野菜・果樹・茶における QoI 剤及び SDHI 剤使用ガイドライン. http://www.taiseikin.jp/mwbhwp/wp-content/uploads/vege_gl.pdf (2015 年 7 月 24 日閲覧)

- 西島卓也 (1998) チャ輪斑病・炭疽病・赤焼病. 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル (日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会編). 日本植物防疫協会, 東京, pp 98–101
- 西島卓也 (2008) 輪斑病. 茶大百科第 2 巻 (農山漁村文化協会編). 農山漁村文化協会, 東京, pp 537–538
- Nottéghem JL, Tharreau D, Silué D, Roumen EH (1994) Present knowledge of rice resistance genetics and strategies for *Magnaporthe grisea* pathogenicity and avirulence gene analysis. In: Zeigler RS, Leong SA, Teng PS (eds) Rice blast disease. CAB International, Wallingford, UK, pp 155–165
- 尾松直志・富濱毅・野中壽之 (2012) 鹿児島県内の茶園におけるストロビルリン系薬剤とベンゾイミダゾール系薬剤に耐性を示すチャ輪斑病菌の発生実態と薬剤の防除効果. 日植病報 78:3–9
- 鬼木正臣・成澤信吉・安藤康雄 (1986) わが国の主要茶産地におけるベンゾイミダゾール系殺菌剤耐性輪斑病菌の発生実態. 茶研報 64:29–33
- 尾崎剛一・貴田健一 (2014) 新規殺菌剤ベンジルカーバメート系 QoI 剤ピリベンカルブの特性と普及方針. 農薬誌 39:48–52
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci 12:357–359
- Pasche JS, Piche LM, Gudmestad NC (2005) Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. Plant Dis 89:269–278
- Pasche JS, Wharam CM, Gudmestad NC (2004) Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. Plant Dis 88:181–187
- Pavlicek A, Hrda S, Flegr J (1999) FreeTree — Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife

- analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol (Praha)* 45:97–99
- Petch T (1923) The diseases of the tea bush. MacMillan & Co. Ltd., London
- 澤田兼吉 (1913) 輪斑病. 台湾博物学会会報 3(9):13–17
- 種生物学会 (2001) 森の分子生態学. 文一総合出版, 東京, p 74
- Sierotzki H, Frey R, Wullscleger J, Palermo S, Karlin S, Godwin J, Gisi U (2007) Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Manag Sci* 63:225–233
- 園田亮一 (2008) 白星病. 茶大百科第 2 卷 (農山漁村文化協会編). 農山漁村文化協会, 東京, pp 522–523
- 宗 和弘 (2009) 「植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル」の増補にあたって. 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II (日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会編). 日本植物防疫協会, 東京, pp 1–4
- Steyaert RL (1949) Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). *Bull Jard Bot État Brux* 19:285–354
- Suzuki F, Arai M, Yamaguchi J (2007) Genetic analysis of *Pyricularia grisea* population by rep-PCR during development of resistance to scytalone dehydratase inhibitors of melanin biosynthesis. *Plant Dis.* 91:176–184
- Suzuki F, Suga H, Tomimura K, Fuji S, Arai M, Koba A, Nakajima T (2009) Development of simple sequence repeat markers of Japanese isolates of *Magnaporthe grisea*. *Mol Ecol Resour* 9:588–590
- Suzuki H, Suzuki F, Kusaba M, Tosa Y (2012) Population structure of rice blast isolates resistant to scytalone dehydratase inhibitors in Mie Prefecture and implications for their origin. *J Gen Plant Pathol* 78:106–114

- Takagaki M, Kaku K, Watanabe S, Kawai K, Shimizu T, Sawada H, Kumakura K, Nagayama K (2004) Mechanism of resistance to carpropamid in *Magnaporthe grisea*. Pest Manag Sci 60:921–926
- Takatsuka J (2007) Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. Appl Entomol Zool (Jpn) 42:563–571
- 高屋茂雄 (1978) 炭そ病のこと. 茶 31(1):38–44
- Takeda Y (2002) Genetic analysis of tea gray blight resistance in tea plants. JARQ 36:143–150
- 田村廣人・水谷章 (1999) ストロビルリン系殺菌剤の作用機構. 農薬誌 24:189–196
- Taylor JW, Jacobson DJ, Fisher MC (1999) The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. Annu Rev Phytopathol 37:197–246
- 外側正之 (2014) アゾキシストロビン剤耐性チャ輪斑病菌の発生程度と防除効果との関係. 関西病虫研報 56:63–64
- 外側正之 (2015) 静岡県における QoI 剤耐性チャ輪斑病菌の発生とその対策. 植物防疫 69:484–489
- 富濱毅・野中壽之・尾松直志・西八束 (2009) チャ輪斑病菌における QoI 剤耐性菌の発生. 九病虫研会報 55:83–88
- 鶴田章逸 (1916) 茶点々星病の来歴. 静岡県農会報 219:39–44
- Watanabe H, Horinouchi H, Muramoto Y, Ishii H (2017) Occurrence of azoxystrobin-resistant isolates in *Passalora fulva*, the pathogen of tomato leaf mould disease. Plant Patholol 66:1472–1479
- Viji G, Wu B, Kang S, Uddin W, Huff DR (2001) *Pyricularia grisea* causing gray leaf spot of perennial ryegrass turf: Population structure and host specificity. Plant Dis 85:817–826

- 山田憲吾・園田亮一・吉田克志 (2010) チャ輪斑病菌の QoI 剤感受性検定法. 茶研報 109:73–78
- Yamada K, Sonoda R (2012) Characterization of moderate resistance to QoI fungicides in *Pestalotiopsis longiseta* and polymorphism in exon-intron structure of cytochrome *b* gene. J Gen Plant Pathol 78:398–403
- 山田憲吾・園田亮一・石川浩一 (2014) 煮沸チャ葉を用いたチャ輪斑病菌の QoI 剤感受性簡易検定法. 関西病虫研報 56:65–66
- Yamada K, Sonoda R, Ishikawa K (2016) Population genetic structure of QoI-resistant *Pestalotiopsis longiseta* isolates causing tea gray blight. Plant Dis 100:1686–1691
- Yin YN, Kim YK, Xiao CL (2012) Molecular characterization of pyraclostrobin resistance and structural diversity of the cytochrome *b* gene in *Botrytis cinerea* from apple. Phytopathology 102:315–322
- 萬屋宏 (2015) チャ育種における病虫害抵抗性品種の現状と展望. 植物防疫 69:602–605
- Zheng D, Köller W (1997) Characterization of the mitochondrial cytochrome *b* gene from *Venturia inaequalis*. Curr Genet 32:361–366
- Ziętkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176–183