

Assay Method for Screening of Tea Plants with Resistance to Anthracnose Caused by *Colletotrichum theae-sinensis* by Use of Novel Wound-inoculation.

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): tea, anthracnose, <i>Colletotrichum theae-sinensis</i> , resistance, breeding. 作成者: 吉田, 克志, 武田, 善行 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00001513">https://doi.org/10.24514/00001513</a>

# 新しい付傷接種法を用いたチャ炭疽病抵抗性の検定法<sup>†</sup>

吉田 克志・武田 善行

(平成 15 年 11 月 10 日受理)

## Assay Method for Screening of Tea Plants with Resistance to Anthracnose Caused by *Colletotrichum theae-sinensis* by Use of Novel Wound-inoculation.

Katsuyuki YOSHIDA and Yoshiyuki TAKEDA

### Synopsis

Anthracnose, caused by *Colletotrichum theae-sinensis* (Miyake) Yamamoto, is one of the most serious diseases in the cultivation of tea (*Camellia sinensis* L.) in Japan. We have developed an assay method for anthracnose resistance in tea plants for disease resistance breeding. Conidia of *C. theae-sinensis* were suspended in an adhesive mixture consisting of potato-sucrose broth and methyl-cellulose 400 cP (3% w/v). Detached mature tea leaves were wounded crosswise by a screwdriver with adhesive conidial suspension. Inoculated leaves were cultivated on OASIS® growing medium for two weeks under high humid conditions in a growth chamber. The degree of resistance to anthracnose was estimated by lesion size. The results of anthracnose assay of detached leaves related well to the natural occurrences of anthracnose in the tea field. This method is useful for tea breeding for anthracnose resistance.

**Key Words:** tea, anthracnose, *Colletotrichum theae-sinensis*, resistance, breeding.

## I 緒 言

チャ炭疽病は、*Colletotrichum theae-sinensis* (Miyake) Yamamoto により引き起こされるチャの重要病害の一つである。本病は 5 月から 11 月に発生が認められ、秋季に多発生すると、落葉による葉層の減少や翌年の一番茶新芽の生育不良を起し、一番茶の収量の減少をもたらす。日本の茶栽培面積の 70% を占める主要品種の‘やぶきた’は、本病に対し罹病性であるため、その栽培面積の拡大と共に本病の重要性が増しており、さらに‘やぶきた’を交配親に用いて育成された日本のチャ品種の多くが本病に対し罹病性である（江塚ら、1994）。そのため、鹿児島県等の西南暖地における茶裁

培では慣行防除として、年 4 回以上の殺菌剤の散布が行われるが、薬剤耐性菌の出現を回避するために、一薬剤年一回散布が原則とされることから（鹿児島県茶業技術協会、2001）、病害防除には多くの労力・費用を必要とする。さらに、消費者の安全・安心な食料要求の高まりから、減農薬・無農薬の茶栽培が求められており、殺菌剤の使用量を低減することが可能な、病害抵抗性チャ品種の育成が強く求められている。

チャの炭疽病抵抗性については、圃場における自然発生の調査および接種試験により、抵抗性を示す品種・系統が示されている（鳥屋尾ら、1976；安藤ら、1986；古野ら、2001）。しかしながら、一般的に行われている自然発病による炭疽病抵抗性の判定は、圃場の環境条件に結果が大きく左右されることから、圃場観察の結果のみ

〒898-0032 鹿児島県枕崎市別府 15451

茶業研究部 育種素材開発チーム

<sup>†</sup> 本研究の一部は、平成 14 年度日本植物病理学会九州部会において講演発表するとともに、平成 14 年度野菜茶業研究成果情報として公表した。

で、その品種の炭疽病抵抗性を正確に判断することはできない。チャの炭疽病抵抗性を検討する手法として、山口ら（1993）は新梢の切り枝のチャ葉に付傷し、傷口に濾紙をテープで取り付け、そこに炭疽病菌を接種し、温室で1週間維持して発病を調査する方法を報告している。また、武弓ら（2000）は切り離し葉ないしは切り枝の葉に付傷した後、炭疽病菌を接種し、温室で培養する方法を報告した。しかしながら、これらの方法では、接種検定による抵抗性判定の結果と、圃場における抵抗性判定の結果に著しい差異が認められる場合があり、実際の抵抗性育種に利用するには不都合な点が多く残されていた。また、炭疽病菌は新芽の葉裏面の毛茸から侵入することから（浜屋，1984）、新梢への噴霧接種による抵抗性検定が自然発病の条件に近いと考えられるが、本法では侵入から発病まで20-30日前後かかること、接種葉の発病による自然落葉により抵抗性の評価が影響を受けること、毛茸が脱落していない若いチャ葉を供試しなければならないため、抵抗性検定を実施できる時期が限定されること、圃場ないしはガラス室で検定するため、環境条件の変化に影響されやすいなど、抵抗性育種で多量に個体選抜を行うには不向きな点がある。そのため、育種に使用できる、簡便で高精度な炭疽病抵抗性検定法の開発が必要とされている。

そこで筆者らは、チャの炭疽病抵抗性育種を進めるにあたり、抵抗性育種の効率化のための炭疽病抵抗性検定法を検討した。チャ成葉への炭疽病菌接種について、付傷と同時に接種できる簡便な手法を開発するとともに、接種葉の培養にオアシス®育苗成形培地とグロースチャンパーを用いることによって、既存の検定法よりも効率的かつ高精度な炭疽病抵抗性検定法を開発したので、その結果を報告する。

## II 材料および方法

### 1 炭疽病菌接種法の検討

#### a 供試植物および供試菌

供試植物として、圃場で炭疽病が多発する‘やぶきた’と炭疽病の発生が全く認められない‘べにほまれ’を供試した。供試葉は、野菜茶業研究所枕崎茶業研究拠点の品種見本園の成木の木化枝に付いている、十分に硬化した成葉を採取した。チャ葉は中性洗剤で葉の汚れを洗い流した後、蒸留水で洗浄し、ペーパータオルで余分な水分を拭き取り、接種試験に供試した。チャ炭疽病菌は、野菜茶業研究所茶業研究部病害研究室保存菌 SI-4-2 株

を供試した。チャ炭疽病菌は、安藤ら（1986）の方法に準じて、200ml 三角フラスコに硬化したチャ葉を5-8枚（約5g）入れ、25mlの蒸留水を注ぎ、オートクレイブ滅菌して作製したチャ葉培地を用いて、26℃暗黒下で4週間静置培養した。分生子は滅菌水によりチャ葉培地より洗い出し、3重ガーゼで濾過後に3,800×gで2分間遠心分離して集菌し、滅菌水に懸濁して同様に遠心分離した後で、滅菌水に懸濁して分生子懸濁液とした。

#### b 接種法

チャ葉への付傷は、刃渡り1mmのプラスドライバー、もしくは刃渡り3mmのマイナスドライバーを用いた。チャ葉をゴムシートの上に葉裏面を上にして置き、一葉あたり2カ所、ドライバーを用いて十字型に付傷した後で、下記の3通りの方法で炭疽病菌を接種した。一試験区あたり、チャ葉6枚を使用し、実験は2回繰り返した。また、接種試験に用いる分生子懸濁液の最終濃度は $1 \times 10^7$ 個/mlに調整した。

##### 1) 点滴接種法

滅菌水で作製した分生子懸濁液を、付傷部位に10 $\mu$ l滴下して接種した。

##### 2) メチルセルロース接種法

メチルセルロース400cPの3%（w/v）水溶液を作製し、これに炭疽病菌分生子を加えて、粘度の高い分生子懸濁液を作製した。これにドライバーを入れて分生子懸濁液を付着させてから、ドライバーを用いて付傷と同時に接種した。

##### 3) メチルセルロース・ジャガイモ蔗糖液体培地法（以下、MC/PS法）

ジャガイモ蔗糖液体培地にメチルセルロース400cPを終濃度3%（w/v）になるように加え、これに分生子を懸濁し、粘度が高く、栄養分に富む分生子懸濁液とし、2)と同法で接種した。

#### c 接種葉培養法および調査法

接種葉は、滅菌水で湿らせたペーパータオルを敷いたタッパーウェアに、葉の裏面を上に入れて入れた。その後、葉の乾燥を防止するために、滅菌水を噴霧し、蓋をして26℃、18時間暗黒下で一晩培養した。その後、切り離し葉の切断部を水中で切り戻し、ポリエチレンバット（外寸442×322×70mm）中の水道水を含ませたオアシス®育苗成形培地P-1.5（SMITHER-OASHIS Co., 1ブロック約50×50×40mm）に挿した。接種葉に滅菌水を噴霧した後、布ガムテープを用いて、15cmのプラ

スチック棒をバットに取り付け、滅菌水を噴霧したビニールシート（大倉工業 FC-50）で覆い、布ゴムひもで縛り、同一サイズのポリエチレンバットにビニールシートを巻き込むように重ねて入れた（図-1）。その後、26°C-10,000lx（12hr/12hr 明暗周期）、相対湿度 90% に設定したグロースチャンパー（サンヨー、MLR-350H）で培養した。炭疽病の病斑形成は接種 1 週間後と 2 週間後にそれぞれ接種部位を肉眼で調査し、形成された病斑の長径と短径を計測した。なお、以下の試験においても接種葉の培養法は本法を用いた。

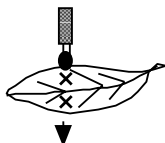
## 2 炭疽病病斑形成に及ぼす分生子濃度の影響

付傷接種の条件設定では  $1 \times 10^7$  個/ml の高濃度の分生子濃度で接種したが、さらに低濃度の分生子懸濁液を抵抗性検定に使用できるかどうか検討した。供試品種として、‘やぶきた’ と ‘べにほまれ’ の完全に硬化した成葉を供試した。チャ葉への接種は MC/PS 法を用い、3mm のマイナスドライバーで十字型に付傷すると同時に炭疽病菌を接種した。分生子濃度は最終濃度を  $1 \times 10^5$  個/ml、 $1 \times 10^6$  個/ml および  $1 \times 10^7$  個/ml に調整し、2 週間培養後に形成された病斑の大きさを計測した。

## 3 葉の成熟度の違いが抵抗性検定に及ぼす影響

圃場における炭疽病の抵抗性が罹病性の ‘やぶきた’ と ‘さやまかおり’、中度抵抗性の ‘ゆたかみどり’ および抵抗性の ‘べにほまれ’、‘ふじみどり’ の 5 品種を供試した。これらの新梢の新葉、木化していない枝に付い

1) 葉裏面にドライバーで 2 カ所十字に付傷して接種する。



2) 接種後、湿らせたペーパータオルを敷いたタッパーウェアに移し、滅菌水を噴霧して、26°C-暗黒下で一晩静置。



3) 水を含ませたオアシス®育苗成形培地に葉を挿し、ビニールシートで覆い、26°C-10,000lx（12/12hr : L/D）の人工気象器で 2 週間培養

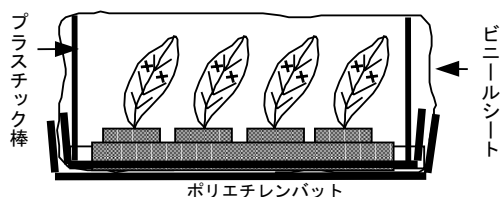


図-1 チャ切り離し葉へのチャ炭疽菌接種試験の模式図

ているやや硬化した若葉および完全に硬化した成葉をそれぞれ 6 枚採取し、接種試験に供試した。分生子濃度は  $1 \times 10^7$  個/ml とし、チャ葉への接種は MC/PS 法を用いて 3mm のマイナスドライバーで十字型に付傷すると同時に炭疽病菌を接種した。病斑の大きさは接種 2 週間後に調査した。

## 4 採取時期の異なるチャ葉の供試が抵抗性検定に及ぼす影響

チャ葉の採取時期の違いが検定法に及ぼす影響を調査した。二番茶残葉が完全に硬化する 7 月と、チャ葉の生育が完全に停止した 12 月に、完全に硬化した成葉を採取し、接種試験に供試した。供試品種として、‘やぶきた’、‘ふじみどり’、‘ゆたかみどり’、‘やまなみ’、‘大葉烏龍’ および ‘べにほまれ’ の 6 品種を供試した。これらの成葉をそれぞれ 6 枚採取し、3mm のマイナスドライバーを用いて MC/PS 法で接種し、2 週間培養後に形成された炭疽病斑の大きさを計測した。

## 5 炭疽病抵抗性検定法と圃場における抵抗性判定の比較

付傷接種試験の条件設定により確立された炭疽病抵抗性検定法を用いて、多くのチャ品種の炭疽病抵抗性の品種・系統間の差異を調査すると共に、抵抗性の判定基準を作製した。さらに、圃場の炭疽病自然発生による抵抗性判定の結果を比較した。供試品種として、品種見本園の茶農林登録品種 1 号の ‘べにほまれ’ から 44 号の ‘べにふうき’ までの 44 品種と ‘ゆたかみどり’、‘ふじみどり’、‘大葉烏龍’、‘MAKURA1 号’、‘静一印雑 131’ および ‘Z1’ の計 50 品種・系統を用い、各品種 6 枚の成葉を供試した。接種は 3mm のマイナスドライバーを用いて MC/PS 法で行い、2 週間培養後に形成された炭疽病斑の大きさを計測した。なお、実験は 2 回繰り返した。圃場における炭疽病の自然発生の調査は、2002 年 6 月および 2003 年 6 月に、品種見本園における炭疽病の発病葉数を調査し、 $1\text{m}^2$  の発病葉数に応じて、抵抗性・極強（発病葉数 0）、強（発病葉数 5 枚以内）、中（発病葉数 5-15 枚未満）および弱（発病葉数 15 枚以上）に抵抗性を分級した。判定結果は 2 年間のデータの平均値とした。

## 6 幼木から採取したチャ葉を用いた炭疽病抵抗性検定

個体選抜試験中の幼木から採取したチャ葉への炭疽病抵抗性検定法の適用について調査するため、定植 2 年目の幼木から硬化した成葉を採取し、炭疽病菌を接種して、

炭疽病抵抗性の差異を成木園のものと比較した。挿し穂由来の供試品種として、炭疽病抵抗性の‘みなみさやか’と罹病性の‘やえほ’を供試した。また、種子由来の個体として、‘みなみさやか’×‘やえほ’の交配後代、枕F<sub>1</sub>-103222、枕F<sub>1</sub>-103223 および枕F<sub>1</sub>-103262 を供試した。接種は3mmのマイナスドライバーを用いてMC/PS法で行い、接種2週間後に形成された炭疽病斑の大きさを計測した。また、圃場における炭疽病に対する抵抗性は2003年6月に一番茶残葉における炭疽病の自然発病の程度から判定した。

### III 試験結果

#### 1 炭疽病菌接種法の比較

炭疽病菌付傷接種のための最適な接種条件を‘やぶきた’と‘べにほまれ’の硬化した成葉を用いて調査した。病斑形成率を調査すると、‘やぶきた’、‘べにほまれ’ともに付傷3mmのほうが、1mmの場合より病斑形成率が高く、MC/PS法を用いた場合に最も安定して病斑が形成され、100%接種に成功したが、他の方法では安定した病斑形成を得ることはできなかった(表-1)。また、病斑の大きさも3mmの付傷でMC/PS法を用いた場合に、ばらつきの少ない病斑形成が観察されたのに対し、他の方法では病斑の大きさにばらつきが認められた(表-1)。  
‘やぶきた’と‘べにほまれ’の病斑を接種1週間後と2週間後に調査したところ、‘やぶきた’では経時的な病斑拡大が認められ、病斑の褐変が認められたが、‘べにほまれ’の場合には、接種部位の付傷

部位が濃緑色の水浸状を呈し、病斑拡大は接種1週間後に停止した(表-1)。

#### 2 炭疽病病斑形成に及ぼす分生子濃度の影響

安定して病斑形成が認められたMC/PS法に用いる分生子濃度を検討した。‘やぶきた’では $1 \times 10^7$ 個/mlの分生子濃度の時に最も安定して大きな病斑が形成されたが、分生子濃度を $1 \times 10^6$ 個/ml以下にした場合、病斑が著しく小さくなった(図-2)。  
‘べにほまれ’の場合は‘やぶきた’ほど、接種濃度変化の大きさは無く、いずれの場合も小さい病斑が形成された(図-2)。

#### 3 葉の成熟度が抵抗性検定に及ぼす影響

葉が硬化していない新梢の新葉、やや硬化した若葉および完全に硬化した成葉を用いて接種試験を行った。新

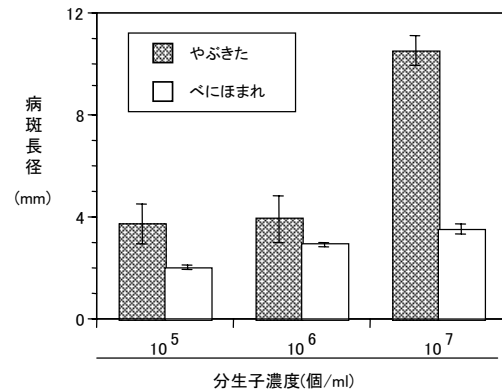


図-2 炭疽病菌分生子濃度が付傷接種による病斑形成に及ぼす影響

図中の bar は標準誤差を示す (n=12)。

表-1 付傷法および胞子懸濁液の組成の違いが炭疽病の病斑形成に及ぼす影響

供試品種	付傷法	胞子懸濁液	病斑形成率 (%)	病斑長径 (mm)	
				1週間後	2週間後
やぶきた	1mm	滅菌水	45.8	1.6±0.1 <sup>a)</sup>	1.7±0.1
		3% MC	61.1	1.5±0.1	1.3±0.1
		3% MC/PS	65.3	3.3±0.7	4.5±1.2
	3mm	滅菌水	75.0	4.2±0.4	6.1±0.9
		3% MC	83.3	4.8±1.3	7.4±0.1
		3% MC/PS	100.0	7.3±0.3	10.3±0.5
べにほまれ	1mm	滅菌水	66.7	1.5±0.1	1.5±0.1
		3% MC	66.7	1.4±0.1	1.5±0.1
		3% MC/PS	70.8	2.2±0.2	2.2±0.2
	3mm	滅菌水	75.0	3.1±0.2	3.3±0.3
		3% MC	79.2	3.0±0.2	3.1±0.2
		3% MC/PS	100.0	3.5±0.2	3.6±0.2

MC:メチルセルロース 400cP、PS:ジャガイモ蔗糖液体培地。

a) 標準誤差 (n=24)。

芽は全て萎れてしまい、病斑形成を調査できなかった。若葉を供試した場合、罹病性の‘やぶきた’や‘さやまかおり’は葉の全幅におよぶ大きな病斑が形成された(表-2)。また、圃場における炭疽病抵抗性が中の‘ゆたかみどり’、抵抗性が強の‘ふじみどり’でも、10mm程度の大きな病斑が形成され、‘べにほまれ’においても7mm前後の大きな病斑が形成された。さらに、若葉を供試した場合、形成された病斑の大きさのばらつきが大きく、安定した病斑形成が認められなかった。

これに対し、完全に硬化した成葉の場合、‘べにほまれ’の病斑拡大は極めて小さく、‘ゆたかみどり’や‘ふじみどり’の病斑拡大も5mm程度で、病斑は濃い緑色の水浸状を呈しており、褐変や分生子形成は認められなかった。これに対し、罹病性の‘やぶきた’や‘さやまかおり’では、病斑は10mm程度の大きな病斑が形成され(表-2)、病斑の褐変や分生子形成が認められた。

表-2 供試葉の成熟度の違いが炭疽病の病斑拡大に及ぼす影響

供試品種	圃場における 抵抗性	若葉	成葉
		平均値 (mm)	平均値 (mm)
やぶきた	弱	34.0±2.1 <sup>a)</sup>	10.1±0.6
さやまかおり	弱	34.5±2.2	10.9±0.4
ゆたかみどり	中	19.8±2.0	5.6±0.3
ふじみどり	強	10.9±0.8	5.5±0.4
べにほまれ	強	7.4±0.9	3.1±0.3

接種2週間後に調査。

a) 標準誤差 (n=12)

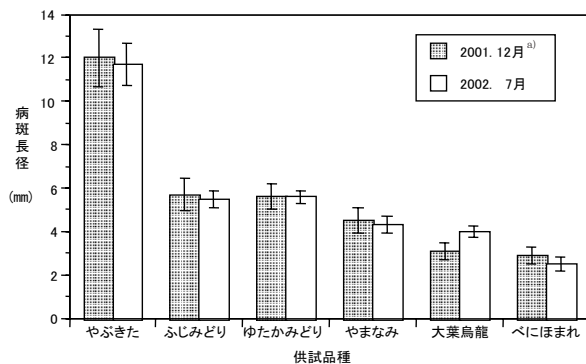


図-3 異なる時期に採取したチャ成葉を炭疽病抵抗性検定法に供試して形成された炭疽病病斑の比較

図中の bar は標準誤差を示す (n=12).

a) 供試チャ成葉を採取した時期。

#### 4 採取時期の異なるチャ葉の供試が抵抗性検定に及ぼす影響

7月と12月に‘やぶきた’、‘ふじみどり’、‘ゆたかみどり’、‘やまなみ’、‘大葉烏龍’および‘べにほまれ’の6品種から完全に硬化した成葉を採取し、炭疽病検定法に供試した。接種2週間後に形成された病斑長径を計測して比較したところ、全ての品種で採取時期の違いによる病斑形成の差異は認められなかった(図-3)。

#### 5 炭疽病抵抗性検定法と圃場における炭疽病抵抗性判定の比較

品種見本園に定植されている、農林登録品種など50品種・系統を用いて、抵抗性検定法の結果と圃場における炭疽病の自然発生を比較した。病害抵抗性の強弱の判断は、一般に接種して形成される病斑面積で評価されることが多いが、検定法により得られた病斑の長径と病斑面積の平方根の間には高い相関が認められたので ( $r=0.99$ )、より簡便に調査できる病斑長径を病害感受性の指標とした。この結果と各品種・系統で形成された病斑の特徴から、抵抗性を4段階に分別し、病斑が付傷部分の外に広がらない3mm未満のものを抵抗性・極強、3mm-5mm未満のものを抵抗性・強、5mm-8mm未満のものを抵抗性・中、8mm以上のものを罹病性に分類した。

圃場において、炭疽病の自然発生が全く認められない、‘べにたちわせ’、‘べにふうき’および‘MAKURA1号’等のアッサム雑種から育成された品種は、接種部位の傷を上回る病斑拡大が認められず、付傷部位にわずかな濃緑色の水浸状の病斑形成が認められた(表-3)。同じくアッサム雑種から育成された‘静-印雑131’は病斑の拡大が認められるものの、褐変することは無かったが、‘いずみ’は病斑形成の拡大と褐変が認められた。

次に、圃場における炭疽病発生が少ない‘やまなみ’や‘大葉烏龍’などの導入中国種とその交配後代から育成された‘みなみかおり’等の品種は、付傷部位よりわずかに広い部分に、濃緑色水浸状の病斑拡大が認められたが、分生子形成は認められなかった(表-3)。

‘やぶきた’、‘さやまみどり’、‘おくみどり’等日本在来種から育成・選抜した品種の多くは病斑拡大と分生子形成が認められ、これらの品種は圃場での炭疽病発生も大きかった(表-3, 図-4)。また‘ゆたかみどり’や‘かなやみどり’等では、濃緑色水浸状の病斑拡大はあるものの、分生子形成はほとんど観察されなかった(表-3, 図-4)。また、‘やまとみどり’が唯一、アッサム雑

表-3 炭疽病抵抗性検定法および圃場調査によるチャ品種・系統の炭疽病抵抗性の判定結果

供試品種	来歴 <sup>a)</sup>	病斑長径 (mm)	検定法 <sup>b)</sup>	圃場 <sup>b)</sup>	供試品種	来歴 <sup>a)</sup>	病斑長径 (mm)	検定法 <sup>b)</sup>	圃場 <sup>b)</sup>
べにほまれ	A	2.6	1	1	おくむさし	J	12.4	4	3.5
あさつゆ	J	7.2	3	3	やまなみ	C	4.3	2	2
みよし	J	9.2	4	4	べにひかり	A	2.7	1	1
たまみどり	J	14.0	4	4	うんかい	A	3.2	2	2
さやまみどり	J	13.0	4	4	かなやみどり	J	7.8	3	3
やぶきた	J	11.6	4	4	さやまかおり	J	10.0	4	4
まきのはらわせ	J	5.6	3	3	おくみどり	J	12.7	4	4
こやにし	J	12.6	4	4	とよか	J	10.2	4	4
ろくろう	J	10.7	4	4	おくゆたか	J	11.9	4	4
やまとみどり	J	3.0	1	1	めいりょく	J	7.0	3	3
たかちほ	J	10.7	4	3	ふくみどり	J	7.8	3	3
いんど	A	2.4	1	1	しゅんめい	J	10.5	4	4
はつもみじ	A	3.6	2	1	みねかおり	A	7.3	3	2
べにたちわせ	A	2.6	1	1	みなみかおり	C	4.4	2	2
あかね	A	3.3	2	1	さえみどり	J	6.0	3	3
なつみどり	J	11.7	4	3	ふうしゅん	J	8.2	4	4
やえほ	J	11.2	4	4	みなみさやか	A	3.8	2	2
あさぎり	J	14.1	4	3	ほくめい	J	10.4	4	3
きょうみどり	J	11.6	4	4	べにふうき	A	2.9	1	1
はつみどり	J	10.7	4	4	ゆたかみどり	J	5.6	3	3
べにかおり	A	2.7	1	1	ふじみどり	A	5.5	3	2
べにふじ	A	4.2	2	2	大葉烏龍	C	4.0	2	1
ひめみどり	J	7.7	3	3	MAKURA1号	A	2.2	1	1
いずみ	A	8.0	3	3	静一印雑 131	A	5.8	3	2
さつまべに	A	3.4	2	1	Z1	J	10.2	4	3.5

a) A:アッサム雑種および交配後代選抜, C:導入中国種および交配後代選抜, J:日本在来種および交配後代選抜.

b) 抵抗性判断基準; 1:極強, 2:強, 3:中, 4:弱.



図-4 チャ炭疽病抵抗性検定法による炭疽病病斑形成

炭疽病菌を接種して2週間後の病斑形成を示す。図中の供試葉は左から抵抗性・極強の‘やまとみどり’, 抵抗性・中の‘かなやみどり’, 罹病性の‘さやまみどり’.

種同様の強い抵抗性を示した（表-3，図-4）。

次に，検定法による炭疽病抵抗性判定結果と圃場における炭疽病抵抗性の評価との比較を行った。それぞれの抵抗性の判定結果を4段階に分類し，抵抗性「極強」を1，「強」を2，「中」を3，「弱」を4として，X値を検定法の結果，Y値を圃場の判定結果として，グラフにプロットしたところ，圃場の判定結果と本検定法の結果に類似性が認められた（図-5）。この場合，圃場の数値が検定法の数値を上回ることには無かったが，検定法の判定結果の数値が，圃場の数値を上回る場合が14品種・系統で認められた。

#### 6 幼木園から採取したチャ葉を用いた炭疽病抵抗性検定

幼木園から採取したチャ葉と，成木から採取したチャ葉を検定法に供試して，炭疽病の病斑形成を比較した。

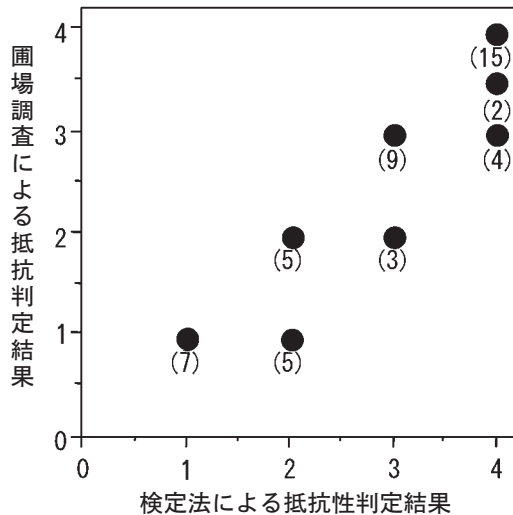


図-5 チャ炭疽病抵抗性検定法による抵抗性判定結果と圃場判定結果との類似性

チャ品種・系統50種を抵抗性検定法と圃場調査を行って抵抗性を判定し，グラフにプロットした。図中の括弧内の数字は各プロットの品種・系統数を示す。

表-4 成木及び幼木から採取した茶葉における炭疽病抵抗

供試品種	由来	圃場抵抗性程度	病斑長径 (mm)
みなみさやか	成木	強	2.9±0.1 <sup>a)</sup>
	挿し穂・幼木	強	2.8±0.1
やえほ	成木	弱	9.8±0.4
	挿し穂・幼木	弱	8.4±0.5
枕F <sub>1</sub> -103222	種子・幼木	強	3.6±0.1
枕F <sub>1</sub> -103223	種子・幼木	強	4.0±0.1
枕F <sub>1</sub> -103262	種子・幼木	弱	9.6±0.1

枕F<sub>1</sub>-103222，枕F<sub>1</sub>-103223 および枕F<sub>1</sub>-103262 は 'みなみさやか' × 'やえほ' のF<sub>1</sub>個体。a) 標準誤差 (n=12)。

‘みなみさやか’ および ‘やえほ’ は，ともに幼木と成木のチャ葉の炭疽病の病斑の拡大に差異は認められなかった（表-4）。一方，これらの交配後代のうち，圃場で罹病性であると認められた枕F<sub>1</sub>-103262 は接種試験でも病斑拡大が認められたが，圃場で抵抗性と判断された枕F<sub>1</sub>-103222 および枕F<sub>1</sub>-103223 は接種試験でも病斑拡大が抑制されており，抵抗性が観察された（表-4）。

## IV 考 察

本研究では，チャ炭疽病抵抗性品種の選抜に利用できる，実用的で高精度なチャ炭疽病抵抗性検定法について検討した。まず，付傷接種法の条件設定を行うため，付傷法，分生子を懸濁する分散媒，分生子濃度について検討した。チャ輪斑病の抵抗性検定では，分生子懸濁液の粘度を高めてチャ葉への付着性を良くする方法として，胞子懸濁液にメチルセルロース 400cP を終濃度 3% (w/v) になるように加えて，3mm のマイナスドライバーで十字に付傷すると同時に接種して，再現性の高い検定法を確立している（築瀬ら，1987）。今回の試験では，3%メチルセルロース 400cP を用いた付傷接種は，滅菌水による接種に比較すると発病率は良好であったが，安定した発病は得ることはできず，抵抗性検定試験に不向きであった。この原因として，チャ炭疽病菌分生子の蒸留水中における発芽率は著しく低く，チャ葉抽出液やチャサポニンによる発芽促進が報告されていることから（安藤ら，1985），蒸留水やメチルセルロースを分生子懸濁液に用いた接種では病斑形成に十分な分生子の発芽が起らず，発病率の低下や病斑長径の不均一につながったと考えられる。分生子懸濁液にジャガイモ蔗糖液体培地とメチルセルロース 400cP の混合液を用い，粘度を高め，栄養分を添加した分散媒を用いて，3mm の付傷接種を行うと，炭疽病罹病性である ‘やぶきた’ に安定した発病を得ることができた。また，当初，分生子濃度は 1×10<sup>7</sup>個/ml としたが，これより低濃度の分生子濃度で接種試験を行ったところ，安定した病斑形成は得られなかった。以上の結果から，成葉への付傷接種の場合，病斑形成には多数の炭疽病菌の侵入が不可欠であり，そのため高濃度の分生子濃度が必要になると考えられる。

本研究では，接種を行ったチャ葉の培養にオアシス®育苗成形培地を供試した。予備試験で，チャ葉を水挿しして1週間以上培養すると，切断部の褐変による吸水不足が起り，チャ葉が萎れる等，生理的に弱体化することが確認されたために，この方法は抵抗性検定には不適



であると考えられた。オアシス®育苗成形培地を使用した場合、切断2週間後でも切断部の褐変やチャ葉の萎れは認められず、チャ葉の状態を良好に保持することが可能であった。これは切断部が完全に水没せず、通気性を保つこと、オアシス®育苗成形培地にあらかじめ肥料成分が混合されているためと考えられる。今回使用したオアシス®育苗成形培地は、1ブロックあたりチャ葉を6枚挿せることから、30ブロックを入れることができるポリエチレンバットで、一回に30系統の抵抗性の判別を行うことが可能であり、少ないスペースを利用して、多くのチャ品種・系統の抵抗性検定が可能であった。検定に用いるグロースチャンバーは、10,000lxの照度と加湿機能が必要であるが、グロースチャンバーの容量に対応して、オアシス®育苗成形培地を入れるバットの大きさを加減することにより、多様な大きさのグロースチャンバーに対応する実験系の構築が可能である。また、グロースチャンバーを用いることにより、接種から発病に至るまでの環境条件を均一に設定することができるため、圃場やガラス室で行う検定よりも環境変化の影響を受けない、安定した環境条件下における抵抗性判定手法が確立されたと考えられる。

接種に用いるチャ葉の条件を検討するため、新葉、若葉および完全に硬化した成葉に炭疽病菌を付傷接種し、発病程度の比較を行った。その結果、新葉では葉自体が萎れてしまい、接種試験に用いるには不適であった。一方、若葉では罹病性品種の場合、炭疽病の著しい病斑拡大が認められたが、葉全体に広がる大きな病斑が形成されること、圃場で炭疽病の発病が認められない‘べにほまれ’でも大きな病斑が形成されることから、接種試験に用いるには不適であった。硬化した成葉に付傷接種をした場合にのみ、圃場における炭疽病抵抗性の強さを反映した炭疽病の病斑形成が得られた。また、7月と12月に採取した成葉を検定法に供試したところ、両方の検定結果に差異は認められず、本検定法が使用できる期間が、従来報告されていた検定法（山口ら、1993）よりも長いことが明らかになった。

今回開発したチャ炭疽病抵抗性検定法を用いて、チャ50品種・系統の抵抗性検定を行うと共に、その検定結果を基にして、抵抗性の判定基準を作成した。病斑長径と形成された病斑の特徴から、抵抗性の強さを4段階に分類した。病斑長径3mm未満で付傷部分にわずかな病斑の進展が濃緑色の水浸状病斑としてみられるものを抵抗性・極強とした。この抵抗性・極強にはアッサム雑種から育成された品種・系統が含まれていた。また、日本

の在来種から育成された品種では‘やまとみどり’のみが抵抗性・極強を示した。次に、病斑長径3-5mm未満で、接種部位をわずかに上回る形で病斑が拡大するものを抵抗性・強とした。これらの中には、アッサム雑種および導入中国種などの、海外から導入された育種素材から育成された品種が多く含まれていた。これらの結果から、抵抗性・極強もしくは抵抗性・強を示した品種には、紅茶品種や釜炒り茶品種が多く含まれることが明らかであり、そのまま煎茶品種として利用するには問題があるが、炭疽病抵抗性育種素材として有望であると考えられる。病斑の大きさ5-8mm未満の場合を抵抗性・中としたが、日本在来品種から育成された品種の中で、圃場における炭疽病抵抗性が中から強と判断される品種が多く含まれていた。本検定法で中程度の抵抗性を示す品種は、圃場で殺菌剤を頻繁に散布しなくても良い、実用的な炭疽病抵抗性を持つと考えられる。罹病性と判断された品種の多くは日本在来種から育成されたもので、炭疽病抵抗性を持たない品種であり、育種素材として利用する場合には、炭疽病抵抗性を持つ品種との交配を考慮する必要がある。

本検定法による抵抗性の判定結果と、圃場における抵抗性の判定結果を比較すると、高い類似性が認められた。しかしながら、圃場では炭疽病発生が極めて少なく、抵抗性・強と判定された‘ふじみどり’や‘静一印雑131’は本検定法では抵抗性・中と判定された。これは圃場で抵抗性・中と判定される‘ゆたかみどり’や‘さえみどり’を本検定法で評価した結果と同等であり、本検定法では、圃場の評価より抵抗性が低いと判定される場合が数例認められた。植物の病害抵抗性には、単一もしくは少数の遺伝子により支配される真性抵抗性と、病原菌に対する侵入抵抗性や侵入後の拡大抵抗性などの多数の遺伝子が統合されて発現する圃場抵抗性がある（山田、1997）。今回開発した炭疽病抵抗性検定法は、炭疽病拡大抵抗性を検定するものであり、侵入抵抗性を反映しないこと、切り離し葉の生理状態が圃場における自然状態と異なることから、圃場の判定結果よりも炭疽病抵抗性が低めに評価されたと考えられる。しかしながら、本検定法において、抵抗性と判断された品種が、圃場観察で罹病性と判断される事例は認められなかった。イチゴでは炭疽病抵抗性の検定法として、葉柄接種を用いる簡易検定法が開発されている（NOGUCHIら、1994）。この検定法は、圃場抵抗性を直接反映するものではないが、簡便なイチゴ炭疽病検定法として利用されている。本検定法も圃場抵抗性を直接反映するものではないが、チャの

炭疽病抵抗性を簡便に検定する手法として実用的であると考えられる。また、圃場における個体選抜試験中の幼木の葉を利用して、抵抗性検定を行ったところ、本検定法の結果と圃場調査の結果は類似していた。これらの結果から、本法により個体選抜試験中の幼木の炭疽病抵抗性が検定可能であり、個体選抜試験の早い段階で、炭疽病抵抗性個体の選抜が可能となることから、抵抗性育種の推進に効果が大きいことが示された。

本検定法の試験中に、炭疽病が多発生している‘やぶきた’や‘さやまかおり’から採取したチャ葉の中に、炭疽病菌を付傷接種しても、病斑拡大がほとんど認められない場合が観察された。植物は一部の葉が病原菌に感染した場合、他の葉に抵抗性が誘導される、全身獲得抵抗性を生体防御の手段として持つことが報告されている (RYALSら, 1996)。チャにおいても、傷害に対する全身的な傷害応答が誘導されることが報告されており (吉田ら, 2000)、病害に対しても全身的な抵抗性誘導が起こっている可能性がある。これについては、今後の詳細な検討が必要とされるが、本検定法を利用する場合には、炭疽病の発病が顕著な茶樹からの供試葉の採取は避ける必要がある。

## V 摘 要

チャの重要病害である炭疽病の抵抗性検定法を確立するため、付傷接種による抵抗性検定法を検討した。ジャガイモ蔗糖液体培地にメチルセルロース 400cP を最終濃度 3% (w/v) になるように混合し、これに炭疽病菌分生子を加え、最終濃度が  $1 \times 10^7$  個/ml になるように調整した分生子懸濁液を検定に供試した。チャ炭疽病菌分生子懸濁液を付着させた、3mm 幅のマイナスドライバーを用いて、十分に硬化したチャ成葉を十字型に付傷すると同時に接種を行った。その後、温室・暗黒下で 26°C、18 時間静置した後、オアシス® 育苗成形培地に接種葉を挿し、温室条件下で 2 週間培養すると、その品種の炭疽病拡大抵抗性の強さを反映した、炭疽病の病斑形成が認められた。炭疽病抵抗性の強さを病斑の大きさに

より、極強 (3mm 未満)、強 (3–5mm 未満)、中 (5–8mm 未満) および弱 (8mm 以上) の 4 段階に類別した。また、成葉の供試時期の違いにかかわらず再現性の高い結果が得られた。本検定法はチャの拡大抵抗性を調査するもので、圃場抵抗性を直接反映するものではないが、圃場における炭疽病自然発生の程度と本検定法の結果は類似性が高いこと、幼木から採取した成葉も検定法に供試できることから、本検定法はチャ育種における炭疽病抵抗性系統の早期選抜に利用可能であると考えられる。

## 引用文献

- 1) 安藤康雄・浜屋悦次 (1985) : チャ炭疽病菌分生胞子の発芽を促進するチャのサポニン. 茶技研, 67, 13–19.
- 2) 安藤康雄・浜屋悦次 (1986) : チャ炭疽病菌の侵入に対する宿主の抵抗反応. 茶技研, 69, 35–43.
- 3) 江塚昭典・安藤康夫 (1994) : 炭疽病. チャの病害. 日本植物防疫協会. Pp182–204.
- 4) 古野鶴吉・長友博文・水田隆史 (2001) : チャにおける炭疽病抵抗性の品種間差異. 九州沖縄農業研究成果情報, 16, 377–378.
- 5) 浜屋悦次 (1984) : チャ炭疽病菌の感染機作. 植物防疫, 49, 77–78.
- 6) NOGUCHI, Y., T. MOCHIZUKI, O. YAMAKAWA. (1994) : Petiole Dip Inoculation is Convenient Methods of Screening Strawberry for Resistance to Anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae*. Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Orn. Plants and Tea. A9, 13–26.
- 7) RYALS, J. A., U. H. NEUENSCHWANDER, M. G. WILLIT, A. MOLINA, H. STEINER, M. D. HUNT (1996) : Systemic Acquired Resistance. Plant Cell, 8, 1809–1819.
- 8) 武弓利雄・武田善行 (2000) : 成葉への付傷接種によるチャ炭疽病抵抗性の安定的な簡易検定法. 平成 11 年度野菜・茶業研究成果情報, 69–70.
- 9) 鳥屋尾忠之・武田善行・松下繁 (1976) : チャ炭疽病抵抗性の品種間差異と遺伝力. 茶技研, 50, 1–8.
- 10) 山田哲治 (1997) : 植物病理の基礎知識—理解を深めるための基礎概念. 分子レベルからみた植物の耐病性. 秀潤社. Pp18–21.
- 11) 山口聰・安藤康雄 (1993) : チャ炭疽病抵抗性育種のための素材検定 (講要). 育種, 43 (別 1), 173.
- 12) 築瀬好充・武田善行 (1987) : チャの育種における輪斑病抵抗性の検定法. 野菜茶試研報 B (金谷), 1, 1–9.
- 13) 吉田克志・荒木琢也・宮崎昌宏・本間知夫 (2000) : チャにおける全身的な傷害応答. 日作東海支部報, 130, 9–11.
- 14) 鹿児島県茶業技術協会 (2001) : 炭疽病. 環境にやさしい茶病害虫防除の手引き. Pp27.

Assay Method for Screening of Tea Plants with Resistance to Anthracnose Caused by *Colletotrichum theae-sinensis* by Use of Novel Wound-inoculation.

Katsuyuki YOSHIDA and Yoshiyuki TAKEDA

**Summary**

*Anthracnose, caused by Colletotrichum theae-sinensis* (Miyake) Yamamoto, is one of the most serious diseases in the cultivation of tea (*Camellia sinensis* L.) in Japan. Most Japanese tea cultivars are susceptible to this disease; therefore, it is very important to breed resistant tea cultivar against anthracnose. In the present study, we have developed an assay method for anthracnose resistance in tea plants. Conidia of *C. theae-sinensis* were suspended in an adhesive mixture consisting of potato-sucrose broth and methyl-cellulose 400 cP (3% w/v). Concentration of conidial suspension was adjusted to  $1 \times 10^7$  conidia/ml. Detached mature tea leaves were wounded crosswise by a screwdriver with adhesive conidial suspension. Inoculated tea leaves were cultivated on OASIS® growing medium for two weeks under high humid conditions in a growth chamber. The degree of anthracnose resistance was estimated by lesion size. Anthracnose resistance of tea plants was classified into four grades, i. e. susceptible (over 8 mm), moderate resistance (below 8 mm to 5 mm), resistant (below 5 mm to 3 mm) and highly resistant (below 3 mm). The results of anthracnose assay related well to the natural occurrences of anthracnose in the tea field. We estimated anthracnose resistance of 50 tea cultivars. Tea cultivars which were bred from Assam tea plants or introduced Chinese tea plants were highly resistant against anthracnose. Our anthracnose assay method is useful for tea breeding for anthracnose resistance.