

特集：果樹病原体の病原性検定法

果樹類紋羽病菌の病原性（病原力）検定法

農研機構 果樹研究所 リンゴ研究領域 兼 松 聡 子

はじめに

果樹類紋羽病は、子の菌類に属する *Rosellinia necatrix* Prilleux による白紋羽病と、担子菌類に属する *Helicobasidium mompa* Tanaka による紫紋羽病という二病害の総称であり、二つの病原菌は大きく異なる。しかしながら、土壤中の植物遺体上で長期間生存し、根に感染・腐敗させることで植物体を衰弱・枯死に至らしめるという発生生態は類似している。両病害ともに宿主範囲は広く草本から木本まで多くの植物に感染するが、果樹類で被害が大きい。リンゴでは白紋羽病、紫紋羽病ともに被害が見られるが、ナシ、ブドウ、等は白紋羽病の被害が顕著である。宿主範囲が広い病害であるためか、病原菌における病原性の分化は見いだされていない。紋羽病菌の生産する植物毒性のある二次代謝物、および細胞壁分解酵素活性の報告はあるものの、紋羽病菌の病原性機構についてはほとんど何も明らかとなっていない。根の上で白紋羽病菌は菌糸・（扇状）菌糸束を伸展させ、菌糸塊を形成して根表面から侵入する。樹皮や形成層を腐敗させて、さらには木部を腐朽させる。紫紋羽病菌も根の上に菌糸・菌糸束を伸展させた後に、感染座と呼ばれる構造物を形成してそこから侵入する。紫紋羽病菌は木質部の腐朽は引き起こさず、樹皮のみを腐敗させる。

上記2種の近縁種として *R. compacta* Takemoto, *H. brebissonii* (Desm.) Donk も、紋羽病の病原菌として本邦で報告されている (NAKAMURA et al., 2004; TAKEMOTO et al., 2009)。しかしながら現在までのところ果樹における自然発病は確認されていないため本稿では対象としませんが、接種法についてはそれぞれ *R. necatrix*, *H. mompa* に準じる。

紋羽病菌の接種試験をして判定をするのは、①当該植物種に感染して発病するか（宿主範囲の検討）、②分離菌に病原性があるか（菌の病原性の有無）、および、③分離菌株間での発病程度に違いはあるか（菌の病原力の比較）となる。②、③においては、果樹類などの木本植物のみならず、草本植物を利用した簡易接種法も行われ

る。草本植物を検定植物として利用する場合は、木本植物で必要とされる菌の病原性要因が発動しなくても感染する可能性があることに留意する必要はあろう。また、各種防除法の効果を確認するために、接種樹を使用して処理後の発病の有無、病勢の伸展を調査することも多い。感染の程度が類似した複数の自然発病樹を試験に供するのは容易ではないため、接種樹を利用した試験では、短期的に多数樹を利用した効果の確認をしやすいこと、発病条件を揃えられることが利点となる。

以下に白紋羽病菌、紫紋羽病菌それぞれの接種試験において、筆者らがマイコウイルス感染による紋羽病菌の病原力変動を検定するために行っている方法を中心に述べるが、特別に注意する点以外は、植物体の大きさ、接種源量や接種期間等、適宜変更して構わない。

I 接種源の作製法

紋羽病菌は菌糸が根上で増殖した後に侵入、感染する。しかしながら、例えば液体培養で増殖した菌糸体のような菌体のみを接種源として土壤に混和しても、植物はほとんど感染しない。紋羽病菌は土壤中で均等に存在するのではなく、感染した植物遺体上で局所的に残存し、そこを足掛かりとして菌糸が伸展するためである。剪定枝などの枝の入手が容易である場合は、リンゴ、ナシ、クワ枝等を細断した枝片を接種源用の培養基質とする。冬季剪定時に得られる徒長枝を回収し、乾燥しないようにビニールで被覆して冷蔵すれば、秋口くらいまで利用可能である。枝の大きさは試験の目的によって様々となるであろうが、筆者らは直径 8 mm、長さ 2.5 cm に切ったリンゴ枝を常用している。切断した枝片を軽く洗浄、吸水させてから水気を切った後にオートクレーブ (121℃, 20 分間) する。乾燥した枝も使用できるが、その場合は枝片に十分に吸水させるため一晩浸漬してから滅菌処理する。接種する植物体数が少ない場合は、白紋羽病菌では potato dextrose agar, 紫紋羽病菌では oatmeal agar のプレート培地上で菌体を培養し、その上に滅菌済みの枝片を載せる。深型シャーレ (直径 9 cm, 深さ 2 cm) を用いると枝がフタに付かなくて便利である。そのまま培養を継続し、白紋羽病菌では 2 (～4) 週間後に、紫紋羽病菌では 3～4 週間後 (さらに長期培

Inoculation Methods of White and Violet Root Rot Fungi of Fruit Trees. By Satoko KANEMATSU

(キーワード：白紋羽病, 紫紋羽病, 果樹類, 土壤病害, 糸状菌)

養をすると感染率が低下する)に、菌そうが十分生育した枝片(図-1)を接種源として用いる。多量の接種源を得たい場合は、フラスコや滅菌バック、あるいはステンレスバットに入れて枝片をオートクレーブし、枝の上に菌そう片(直径6mm以上)を複数個入れてから培養する。菌そう片の代わりに、シャーレで培養した培養枝片を数個入れて拡大培養してもよい。枝片に水分を過剰に添加した状態にしておくと、(余分な水分がジャブジャブある状態)、添加した菌の初期生育が極端に悪くなることがあるので注意する。枝片上で菌糸が旺盛に生育を始めれば、その後の生育は順調である。フラスコや滅菌袋等枝が重なる状態で培養している場合には、培養1週間前後に軽く振り混ぜてやると全体に菌が行き渡りやすい。振り過ぎには注意する。

白紋羽病菌では枝片の代わりに、小麦粒に培養した接種源を用いる方法もある(SZTEJNBERG and MADAR, 1980)。小麦粒に十分吸水させてからオートクレーブ滅菌する。吸水時間を短縮するために、水に浸漬した小麦粒を5分間オートクレーブして吸水を促進することもできる。その際は、水を切った後に再度オートクレーブ滅菌を行う。

II 草本植物を用いた検定法

白紋羽病菌では黄花ルピナスを(UETAKE et al., 2001 b)、紫紋羽病菌ではニンジンを用いる方法(UETAKE et al., 2001 a)が報告されている。それぞれについて以下に述べる。

1 白紋羽病菌

黄花ルピナスはマメ科の草本植物である。発芽後の胚軸の直径が2mm近くあり、大豆や緑豆等と比較して接種試験に用いるのに都合がよい。用土は鹿沼土(細粒)と培養土(クレハ園芸培土、あるいは腐葉土)を1:1、あるいは2:1に混合したものを用いる。鹿沼土(中粒)だけでも可能である。クレハ園芸培土など栄養豊富な培

養土のみを使用すると種子が腐敗しやすい。プラスチックポットに3粒播種する(種子が腐敗して発芽しない、あるいは生育不良の苗もあるため)。播種10日後ぐらいに1ポット2本になるよう間引く。引き抜く際にポット上部を外側から軽く押し土を柔らかくしてやると根が残らずに引き抜きやすい。

播種3週間後(本葉が4~5枚程度)になったら、同じくポット上部を外側から軽く押し土を柔らかくする。カップ上部の土をバットにあげて露出した胚軸に接するように培養枝片を1個置き、土を戻す。

接種後は25℃程度の温室内で灌水して適湿に保ちながら(過湿に注意)発病程度を観察する(図-2左)。10日前後から地上部の萎凋が見られ、罹病すると地際部が黒変する。一定期間後に枯死した植物体数、あるいは一定期間後の発病程度を指数化(0;健全, 1;軽い凋れ, 2;完全に凋れ, 3;枯死)し、発病程度を判定する。

2 紫紋羽病菌

発病過程を観察できるようにする場合は、透明の亚克力板2枚をビニール袋に入れて作成した根箱を利用する。枯死した植物体数や一定期間後の感染座形成率の調査をする場合には、プラスチックポットなどを使用しても構わない。根箱、あるいはポットに播種後3~4か月後のニンジン苗2本を入れ、これに接するように培養枝片を設置してパーミキュライトなどの用土で埋め戻す。中村(2009)は、パーミキュライトに10%(V/V)非殺菌圃場土を混合した用土を推奨している。

接種後は25℃程度の温室内で灌水しながら育成して亚克力板から見える発病状況を観察する(図-2右)。紫紋羽病菌は、菌糸を伸展させた後に植物体上に感染座と呼ばれる小粒上の構造物を形成する。菌糸が直接侵入

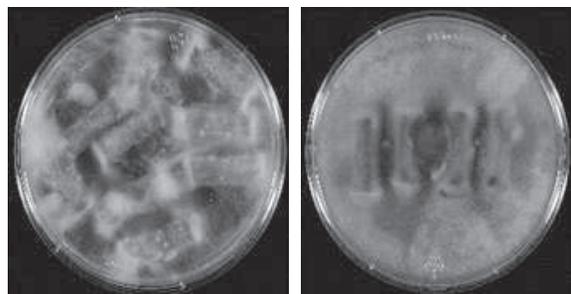


図-1 リンゴ枝片で培養した接種源
(左:白紋羽病菌, 右:紫紋羽病菌)



図-2 左:ルピナスでの接種苗(接種13日後),
右:ニンジンでの接種苗
(原図提供 中村 仁氏)

するのではなく、感染座から植物体内へ侵入することで腐敗、枯死させる。接種14週間後まで経時的に観察し、枯死した植物体数、あるいは感染座形成開始時期や一定期間後の感染座形成率を比較して病原力を判定する。

Ⅲ リンゴ (マルバカイドウ) を用いた検定法

マルバカイドウ (*Malus prunifolia* var. *ringo*) はリンゴ属の野生種であり、リンゴの台木として用いられてきた。樹勢が強く、かつ切枝からの発根がよいという特徴を有するため、クローン苗木の育成が挿し木で容易にできること、休眠期に入って掘り上げた苗は長期の冷蔵保存にも耐える(1年以内)こと、ポットの大きさに合わせて根を切り詰めても発根がよいことなどから、紋羽病菌の接種試験における木本植物のモデル宿主として利用しやすい。マルバ苗を長期保存する場合は、濡らした新聞紙や水苔等を入れて根部をビニール袋で閉じ、さらに苗木上部もビニールで覆って冷蔵する。

1 白紋羽病菌

太さを揃えたマルバカイドウの苗を挿し枝も含めて長さ32cmで切断する。主幹地下部の下端から発根している細根のみを残して、主幹(地下部)の側根を切り落とす。地下部が7cm、地上部が25cmとなるように、プラスチックポットやプランターに植え付ける。殺菌土、圃場土、培養土いずれも利用できるが、白紋羽病菌は好気性が強いので排水のよい土が望ましい。ポットで排水が悪くなる場合は、パーライトや川砂等を添加するとよい(例えば滅菌・粉碎した黒土とパーライトを4:1程度に混合する)。植え付け後1か月ほど育成した苗木の主幹地下部の側面に沿って指や割り箸で穴をあけて、主幹に接するように培養枝片を1個、あるいは両側に1個ずつ計2個を設置して埋め戻す。

接種後は25℃前後の温室で管理する。3～4週間後に



図-3 マルバカイドウでの白紋羽病発病苗

地上部が萎凋、枯死し始める。経時的に枯死苗数を計測(図-3)、あるいは、一定期間後(2～3か月)に苗木を掘り上げて地下部の発病状況を調査する。表皮を薄くナイフで剥いで、主幹地下部での病斑(腐敗部)形成程度(図-4)を目視により程度別に指数化(0:感染・腐敗部なし, 1:主根の50%に満たない部分が腐敗, 2:主根の50%以上の部分が腐敗, 3:主根すべてが腐敗して細根なし)、あるいは、病斑の面積を計測して病原力を評価する(CHIBA et al., 2009; KANEMATSU et al., 2014; SHIMIZU et al., 2014)。

2 紫紋羽病菌

紫紋羽病菌は白紋羽病菌と比較すると発病までの日数が長く、また接種樹すべてに安定して感染・発病させることが難しいとされるが、雪田・赤平(2002)により報告されたマルバ苗を用いた接種法は、比較的短期間で安定して感染する。4号の素焼き鉢、ルートボックスやプラスチックポット等の大きさに合わせて、冷蔵しておいた休眠苗の根を切り詰める。生育させた苗木に接種する白紋羽病菌の場合とは異なり、根に接するように接種源を1樹当たり10g程度(5～8個)配置した状態で休眠苗を直接植え付ける。地上部は地際から7～8cmになるように切り返す。培養土としては非殺菌の圃場土を乾燥させて振るいにかけてのもの、あるいはそこにパーライトを混合したものを用いる。

接種後は25℃前後の植物用培養室・培養器、あるいは温室で管理する。接種2か月後ころまで経時的に枯死苗数を計測、あるいは1～2か月後に苗木を掘り上げて、感染座(図-5)の形成程度を指数化して病原力を評価する。

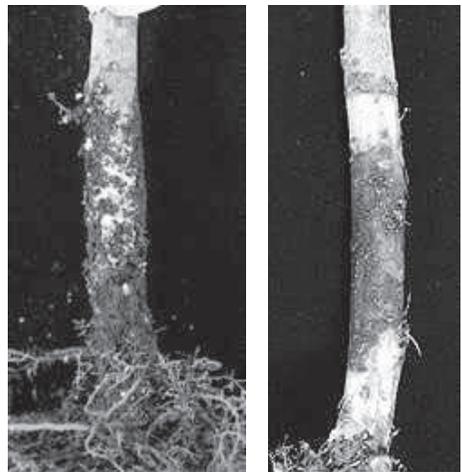


図-4 白紋羽病菌を接種したマルバカイドウの主幹地下部(左:掘り上げ時, 右:表皮を剥いだもの)

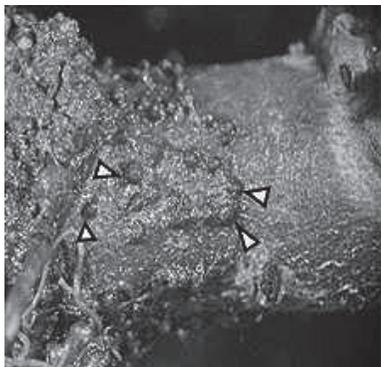


図-5 感染座（紫紋羽病菌）

おわりに

本稿では、接種源の作製方法および特定の植物を利用した場合の病原力評価法について主に述べた。これらの

方法は、その他の植物種に接種する場合（TAKEMOTO et al., 2014）、あるいは圃場の成木に接種する場合にも応用できる。長期間の防除効果試験に利用するため、急性枯死をしない緩やかな発病樹を圃場で得たい場合は、例えば5年生程度のわい性台リング樹の場合、根域の半分を掘り上げて主幹から30 cm程度離れた根の数箇所に複数個の接種源を括り付けるとよい（長野南信試・岩波靖彦氏、私信）。

引用文献

- 1) CHIBA, S. et al. (2009): J. Virol. **83**: 12801 ~ 12812.
- 2) KANEMATSU, S. et al. (2014): Virology **450-451**: 308 ~ 315.
- 3) NAKAMURA, H. et al. (2004): Mycol. Res. **108**: 641 ~ 648.
- 4) 中村 仁 (2009): 微生物遺伝資源利用マニュアル **27**, 独立行政法人農業生物資源研究所, つくば, p. 1 ~ 23.
- 5) SHIMIZU, T. et al. (2014): Fungal Biol. **118**: 413 ~ 421.
- 6) SZTEJNBERG, A. and Z. MADAR (1980): Plant Dis. **64**: 662 ~ 664.
- 7) TAKEMOTO, S. et al. (2009): Mycologia **101**: 84 ~ 94.
- 8) ——— et al. (2014): Forest Pathol. **44**: 75 ~ 81.
- 9) UETAKE, Y. et al. (2001 a): J. Gen. Plant Pathol. **67**: 175 ~ 181.
- 10) ——— et al. (2001 b): ibid. **67**: 285 ~ 287.
- 11) 雪田金助・赤平知也 (2002): 北日本病虫研報 **53**: 126 ~ 130.

新しく登録された農薬 (26.10.1 ~ 10.31)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、対象作物：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、適用作物、適用雑草等を記載。

「殺虫剤」

●シアントラニリプロール水和剤

23553：デュボン ベネビア OD（デュボン）14/10/3

シアントラニリプロール：10.3%

キャベツ：コナガ、アオムシ、ヨトウムシ、ハスモンヨトウ、

アザミウマ類、アブラムシ類：収穫前日まで

はくさい、だいこん、なす：アブラムシ類：収穫前日まで

ブロッコリー：アオムシ、ハスモンヨトウ：収穫前日まで

トマト：ハモグリバエ類、コナジラミ類：収穫前日まで

ぎゅうり：アブラムシ類、コナジラミ類、ウリノメイガ：収穫前日まで

レタス：ナモグリバエ、オオタバコガ、ハスモンヨトウ：収穫前日まで

いちご、えだまめ、だいず：ハスモンヨトウ：収穫前日まで

●シアントラニリプロール水和剤

23554：クミアイベネビア OD（クミアイ化学工業）14/10/3

23555：兼商ベネビア OD（アグロ カネシヨウ）14/10/3

(34 ページに続く)