

## 特集：果樹病原体の病原性検定法

## ナシ黒星病菌のレース検定法

農研機構 果樹研究所 カンキツ研究領域 <sup>あ</sup>足 <sup>だち</sup>立 <sup>よし</sup>嘉 <sup>ひこ</sup>彦

## はじめに

黒星病は、ニホンナシ栽培における最重要病害である。葉、果実および新梢等に多量の胞子形成を伴った病斑が現れ、降雨時に分散して伝染を繰り返す（図-1）。果実での被害はもちろん、葉での発生も早期落葉の原因となり、果実品質の低下と減収をもたらす。特に果実は、幼果期の感受性が高く、いずれの品種にも多発する（図-1）。加えて、主要な品種の一つである幸水では、幼果だけでなく成熟果においても発病に至ることが知られている。

これまで本病の防除は、専ら殺菌剤散布に依存してきた。特に、エルゴステロール生合成阻害剤（EBI）は極めて優れた防除効果を示し、各地で広く使用されてきた。しかし、2005年以降、国内各地でEBI剤耐性菌の発生が相次いでおり、代替する殺菌剤の開発や抵抗性品種育成を含む新たな防除技術の開発が急務となっている（菊原・石井，2008；吉田ら，2012）。

我が国の主要な栽培品種の中に黒星病に抵抗性を示すものはない。様々なナシ品種・系統のうち、抵抗性を有するものとして、ニホンナシでは唯一、在来品種の‘巾着’が、チュウゴクナシでは‘紅梨’、‘蜜梨’が真性抵抗性を示し、いずれも単一優性遺伝すると報告されている（ISHII et al., 1992；阿部・栗原，1993；ABE and KOTOBUKI, 1998）。近年、民間で育成された‘豊華’は、‘紅梨’を片親とし黒星病に抵抗性を示す（石井・木村，2012）。また、長野県の育成品種である‘南水’および‘サザンスイート’は、殺菌剤無散布下の栽培においても、本病の発生はわずかで、いわゆる圃場抵抗性を示すことが明らかとなってきた（小仁所ら，2009；小仁所，2011）。

植物の抵抗性に対して、これを侵す病原菌のレースが新たに出現して、抵抗性品種の罹病化を引き起こすことが知られている。リンゴでは、黒星病の抵抗性遺伝子 Vf を導入した品種が育成されたものの、これに感染する新たなレースの出現が問題となっている（MacHardy,

1996）。これは、抵抗性を有する特定品種の普及に伴って、病原菌の中からこれを侵す特定レースが選抜される結果と考えられている。現在までに、我が国のナシ黒星病菌についても、栽培品種の‘幸水’と野生ナシの遺伝資源である‘マメナシ 12’に対する病原性が異なる三つのレースの存在が確認されている（ISHII et al. 2002；表-1）。したがって、今後の黒星病抵抗性品種の利用を考えるうえでは、黒星病菌のレース分化に関する研究の蓄積が不可欠である。

そこで、本稿ではナシ黒星病菌のレース判別を目的とした病原性検定法を紹介することとした。なお、ナシ属に黒星病を引き起こす *Venturia* 属菌には、ニホンナシ・チュウゴクナシなどの黒星病菌 (*V. nashicola*) とセイヨウナシ黒星病菌 (*V. pirina*) の2種がある。前者はニホンナシおよびチュウゴクナシ等アジア産のナシに病原性を有するが、セイヨウナシには感染しない。一方、後者

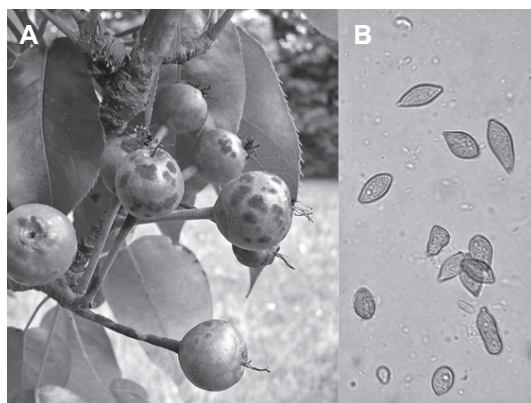


図-1 ナシ黒星病の果実病斑 (A) と病原菌の分生子 (B)

表-1 我が国におけるナシ黒星病菌のレース分化

| レース | 品種 |         |    |
|-----|----|---------|----|
|     | 幸水 | マメナシ 12 | 巾着 |
| 1   | S  | R       | R  |
| 2   | R  | S       | R  |
| 3   | S  | S       | R  |

S：感受性，R：抵抗性。

Inoculation Method for Identification of Pathological Races in *Venturia nashicola*, Causal Agent of Pear Scab. By Yoshihiko ADACHI

(キーワード：ナシ黒星病，病原性，レース，抵抗性品種)

はセイヨウナシに寄生するが、ニホンナシ、チュウゴクナシに感染しない。分生子の形態にも有意な差異があり、お互いに交配しないことから両者は別種であり、種分化にともない病原性も分化したと考えられる (ISHII and YANASE, 2000)。今回は、我が国でより重要な病原菌である *V. nashicola* を取り上げる。本菌の基本的性質については北島 (1989) が、分離法などの取扱については梅本 (1995) および石井 (1998) の優れた解説があり、本稿でも適宜引用させていただいた。併せて、参照いただきたい。

## I 分 離 法

ナシ黒星病菌は、培地上での生育が極めて緩慢である。そのため、病斑部と健全部の境界から作成した分離切片を次亜塩素酸ナトリウム水溶液などで消毒して培地に置換し、切片から分離した微生物の中から病原菌を選抜する、いわゆる組織分離法で菌株を得ることは実際には困難である。

一方、葉や果実の病斑上には、分生子が多量に形成されるので、これを分離源として利用することが一般的である。梅雨期、6 月ころの新鮮な病斑を使用すれば、雑菌の混入もかなり少なく、効率よく菌株を得ることができる。7～8 月の盛夏期に入ると高温の影響で黒星病の病勢は一端衰える。そのせいか分離作業の際、雑菌の混入が増加する傾向にある。9～10 月に入ると再度病勢は回復するが、この時期の病斑は春～初夏にかけての病斑とは異なり、胞子形成が少ない秋型病斑となるので、注意が必要である。

その他の分離源として、罹病落葉上の偽子のう殻に形成される子のう胞子が利用できるが、分離可能な期間がかなり限られる (関東地方では、4 月下旬から 5 月上旬)。ここでは、より一般的な葉や果実の病斑上に形成された分生子を材料とする方法について述べる。

分離培地には、ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA)、素寒天培地等が使われる。細菌の混入を防止するために、ストレプトマイシン、アンピシリン等の抗生物質の添加、乳酸を 0.05% (v/v) ほど加えて pH を低くすることが有効である。

病斑上の分生子塊をかき取り、滅菌水に懸濁させる。このとき、滅菌水はエッペンドルフチューブに入れ、白金針の代わりにオートクレーブで滅菌した爪楊枝などで分生子をかき取れば、効率よく作業を進めることができる。あらかじめシャーレに流し込んで固めた分離培地上に適宜希釈した分生子懸濁液をコーンラージ棒などで塗布、もしくは、画線培養を行う。分離培地は薄く分注し

たほうが、顕微鏡での検鏡作業や寒天ブロックの切り出しが容易になる。風乾後、15～20℃で 3～5 日間程度培養し、分生子を発芽させる。

次いで、実体顕微鏡下で分生子の発芽を確認し、周囲の寒天ごと単胞子を柄付針で切り出して、PDA 培地へ移植する。柄付針の滅菌は、市販のガラスビーズ滅菌器が便利だが、ライターの炎でも十分である。また、この作業をクリーンベンチやクリーンルーム等で行う必要はなく、周囲をなるべく清浄に保てば、通常の実験室内で十分可能である。なお、レース検定を目的とする場合には、異なるレースの混入を避けねばならないので、厳密に単胞子由来とする必要がある。後述するように本菌は、培養による胞子形成法が十分確立されていない。分離作業で単胞子由来の菌株とすることが極めて重要である。

本菌は、PDA をはじめとするほとんど培地上で生育する。3～28℃で生育し、適温は 20℃である。保存は斜面培地上で菌糸が十分生育した後、8℃前後の暗所にそのまま置か、流動パラフィンを重層する。

## II 胞 子 形 成 法

黒星病菌の人工培養による分生子の形成程度は、基本的には極めて低い。そもそも生育が緩慢な本菌は、胞子形成に至る菌叢を培地上に十分生育させるまでにかなりの時間を要する。そこで、あらかじめ PDA 平板培地などで 3～4 週間程度は前培養した菌叢を用意する。この菌叢を切り出して、滅菌水中で無菌的に磨砕し、それを新たな PDA 平板培地上に広げる。すると、磨砕された菌糸からいっせいに生育が始まり、比較的短い間に生育程度の揃った黒星病菌の菌叢を培地上に生育させることができる。

梅本 (1995) は、磨砕した菌糸を広げた PDA 平板培地を暗黒下 10℃で 18 日間程度培養した後、BLB 灯照射下 15℃で 20 日間程度培養する方法を紹介している。また、石井ら (1994) は、セロファン培養法を報告している。まず、PDA 平板培地の表面に滅菌したセロファン膜を気泡が入らないように広げたものを用意する。その上に磨砕した菌糸を広げ BLB 灯照射下 20℃で分生子が形成されるまで培養する。

筆者らは、磨砕した菌糸を広げた PDA 平板培地を暗黒下 20℃で 5～7 日間ほど培養した後、BLB 灯照射下 15℃での 2 週間程度の培養で分生子を得ることができた (足立ら, 2003; 2004; 図-2)。BLB 灯照射の際、シャーレのフタ裏に多量の水滴を生じる場合があることから、15℃の培養に移行する際はフタを空けることとした。そのため、培地の乾燥を加味して培地をあらかじめ厚め

に作成するとともに、雑菌の混入を防ぐため、磨砕した菌糸を培地に多めに流し込み、20℃、5～7日間の前培養で培地表面が黒星病菌の菌叢で覆われるように留意した(図-2)。

いずれの手法においても、菌株によって孢子の形成量には大きな差が生じるようである。接種試験に供試できるのは、ある程度、孢子形成能に優れたものにならざるを得ない。

### Ⅲ 接 種 法

#### 1 レース判別品種の選定

我が国のナシ黒星病菌には、栽培品種の‘幸水’と野生ナシの遺伝資源である‘マメナシ12’に対する病原性が異なる三つのレースの存在が明らかとなっている。すなわち、‘幸水’に病原性を示すもの(レース1)、『マメナシ12』に病原性を示すもの(レース2)、『マメナシ12』と‘幸水’の両方に病原性を示すもの(レース3)が見いだされている(Ishii et al., 2002; 表-1)。したがって、レース判別にはこの2品種が必要である。

これまで報告された抵抗性品種の‘巾着’、‘紅梨’および‘蜜梨’は、いずれも国内3レースすべてに対して抵抗性を示す(Ishii et al., 2002; 足立ら, 2003; 表-1)。このうち、‘紅梨’を片親とする‘豊華’は、民間で育成され、既に品種として登録されている。また、農研機構 果樹

研究所では、‘巾着’に由来する抵抗性品種の開発を精力的に進めている。将来、これら抵抗性品種の普及に伴い、それを侵すレースの出現が危惧される。したがって、これら真性抵抗性の品種をレース判別に加えることを提案したい。

#### 2 供試植物の育成

黒星病の感染から発病までの潜伏期間はかなり長い。葉では短くとも約10日間、展葉後の日数を経過するほど潜伏期間は長くなり、通常は約14～30日ほどにもなる。加えて、展葉1か月ほど経過した葉の感受性はかなり低下し、接種しても発病に至らない。果実の潜伏期間はさらに長く、通常でも20～30日間ほどである。したがって、実験室内で切り取り葉・果実を接種の材料に用いることは難しい。そこで、鉢植えのナシ苗木を接種の材料に用いる。ただし、果実は年1回の試験になり、反復を確保することが難しい。葉への接種試験のほうが実用的と考えられる。

苗木は、屋外に置いた場合には、自然感染の恐れを生じるため、降雨を遮断できる網室、温室等で管理するのが望ましい。取り扱い容易で、網室や接種箱のスペースをとらないことを考慮すると、直径20～30cm程度の鉢に苗木を植え込むと都合がよい。

‘幸水’、『豊華』等市販品種の入手は、比較的容易である。一方、『マメナシ12』、『巾着』などの遺伝資源は、独立行政法人農業生物資源研究所のジーンバンクなどを通じて入手しなくてはならない。通常、穂木で配布されるので、あらかじめマメナシなどの台木を鉢で育成しておき、これに接ぎ木して苗木を育成する。接ぎ木の詳細は専門書を参照いただきたいが、果樹の中でナシは最も容易に活着する樹種の一つである。

ナシは4～5月ごろより発芽して、新梢の伸長とともに葉が順次展開していく。接種に適した葉は、新梢の長さにもよるが上位5～10枚前後の若い葉に限られる。また、展葉後の日数を経るほど潜伏期間は長くなり、感受性も低下していくことから、5月中旬～6月ごろが最も試験に適した時期になる。この時期以降、新梢伸長が停止すると、接種に適した若い葉は得られなくなる。その場合、苗木を全摘葉し、新梢先端の数芽を剪定することで、新たな葉の展開を促すことができる。温室などで加温することで、9月ごろでも接種試験は可能にはなるが、やはり5～6月ごろの葉の感受性が最も安定しており、再現性の高い結果が得られる。

育成した苗木は、冬期に十分な低温を与えて越冬させれば、翌春、再び接种植物として利用は可能である。冷蔵施設を利用できれば、翌春、苗木を施設から網室など

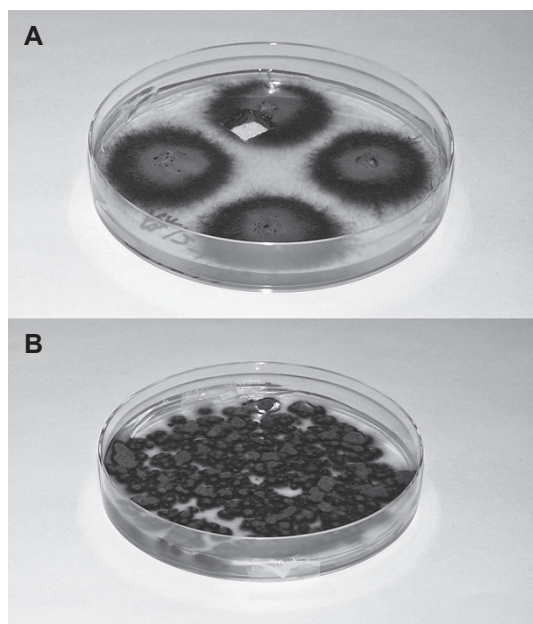


図-2 ナシ黒星病菌の分生孢子形成法

A: 前培養した菌叢, B: 孢子形成した菌叢。



図-3 ナシ黒星病菌の点滴接種  
A: 点滴接種直後の様子。  
B: 点滴接種で発病したナシ葉。

に移す時期を変えることで、試験期間を調節できる。

### 3 病原菌の接種法

培養で得られた分生子を 0.1% (w/v) ショ糖水溶液に懸濁し、孢子濃度を  $10^5 \sim 10^6$  個/ml 程度になるよう調整する。この孢子懸濁液は、 $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存可能である (菊原・石井, 2008)。また、 $5 \times 10^4$  個/ml 以下の孢子濃度では、感受性品種においても孢子形成を伴う病斑形成には至らなかったとの報告がある (阿部・栗原, 1992)。

調整した孢子懸濁液に展着剤 Tween20 を最終濃度 0.01% (v/v) になるよう添加して噴霧接種する。なお、用いる苗木には、あらかじめ接種に適した上位展開葉にマジックペンで番号を記したり、先端の若い葉に毛糸などを結びつけたりしてマークする。葉への感染適温は  $20^\circ\text{C}$  で、湿潤条件では 48 時間以内に病原菌の侵入が完了するとされており、接種直後、この条件を保持することが重要である。そこで、接種した苗木は、恒温高湿庫あるいは接種箱に入れて、 $20^\circ\text{C}$ 、相対湿度 100% の高湿条件に 48 時間保持する。恒温高湿庫がない場合などは、苗木ごとビニール袋などで覆い、48 時間程度は高湿下に保つ。

その後、苗木は降雨を遮断できる網室、温室等で、症状が明確になる 3～4 週間程度、管理する。その間、アブラムシ、ハダニ等の発生に留意して、適宜殺虫剤を散

布する。発病調査は、接種前にマークした葉を対象に発病葉を数える。さらに、発病葉の被害程度を指数化して、発病度を算出することが一般的である。なお、孢子形成を伴った病斑が現れれば感受性と判断できるが、孢子形成のない死斑や微少斑点等判定の難しい症状を伴うことがある。現時点で結論下すことは難しく、筆者は症状を記載して、なるべく画像を記録することになっている。

苗木単位での噴霧接種では、接種源と供試植物を大量に準備する必要がある。そこで、筆者らは点滴接種を用いた (足立ら, 2003; 2004; 図-3)。あらかじめマジックペンでマークした接種葉上に、孢子懸濁液を  $10\mu\text{l}$  ずつ滴下し、風乾後、接種箱に入れて 48 時間保持した。本法であれば孢子懸濁液は少量で済み、注意深く操作すれば枝単位で複数の菌株を 1 本の苗木に接種することもできる。多数の菌株をレース検定する際は有用ではないかと考えている。

## おわりに

現時点では、*V. nashicola* のレース分化に関する知見は乏しく、国内では 3 レースが確認されているに過ぎない。しかし、中国本土や台湾産の黒星病菌の分析からは、さらに多くのレースの存在が示唆されている (石井ら, 2003; 2007)。イネいもち病に見られるように、病害抵抗性品種の利用にあたっては、病原菌のレースの問題を避けて通ることはできない。黒星病抵抗性品種の登場・普及を目前にして、今後、研究者をはじめ多くの関係者にこの問題に取り組んでいただきたいと考えている。本稿が、その一助になれば幸いである。

## 引用文献

- 1) 阿部和幸・栗原昭夫 (1992): 果樹試報 23: 155～168.
- 2) ——— (1993): 園学雑 61: 789～794.
- 3) ABE, K. and K. KOTOBUKI (1998): J. Japan Soc. Hort. Sci. 67: 677～680.
- 4) 足立嘉彦ら (2004): 日植病報 70: 205 (講要).
- 5) ———ら (2003): 園学雑 72 別 1: 55.
- 6) ISHII, H. and H. YANASE (2000): Mycol. Res. 104: 755～759.
- 7) ——— et al. (1992): Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica 27: 293～298.
- 8) ——— et al. (2002): Acta Hort. 587: 613～621.
- 9) 石井英夫 (1998): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル, 日本植物防疫協会, 東京, p. 67～73.
- 10) ———ら (1994): 日植病報 60: 330～331 (講要).
- 11) ———ら (2003): 同上 69: 48 (講要).
- 12) ———ら (2007): 同上 73: 42 (講要).
- 13) ———・木村 豊 (2012): 果実日本 67: 23～26.
- 14) 菊原賢次・石井英夫 (2008): 九病虫研会報 54: 24～29.
- 15) 北島 博 (1989): 果樹病害各論, 養賢堂, 東京, p. 232～240.
- 16) 小仁所邦彦 (2011): 農耕と園芸 66: 64～65.
- 17) ———ら (2009): 園学研 8 別 1: 44.
- 18) MacHARDY, W. E. (1996): Apple Scab: Biology, Epidemiology and Management, APS press, St. Paul, MN, 545 pp.
- 19) 梅本清作 (1995): 作物病原菌研究技法の基礎, 日本植物防疫協会, 東京, p. 239～241.
- 20) 吉田麻里子ら (2012): 熊本農研セ研報 19: 34～39.