

特集：果樹病原体の病原性検定法

## ナシ黒斑病菌およびリンゴ斑点落葉病菌の病原性検定法

農研機構 果樹研究所 カンキツ研究領域 **あ だ ち よ し ひ こ**  
**足 立 嘉 彦**

## はじめに

ナシ黒斑病は、ニホンナシの重要病害である。これは、今日でも主要品種の一つである‘二十世紀’が感受性を示し、対策に困難を極めたことによる。本病感受性の品種間差は極めて明確で、‘二十世紀’などの特定品種には激しい病徴が現れるが、‘幸水’、‘豊水’等抵抗性品種には全く発病しない。このメカニズムは、黒斑病菌が感受性品種のみに作用する宿主特異的毒素 (host-specific toxin; HST), AK 毒素を放出して病気を引き起こすという性質に基づいている (NISHIMURA and KOHMOTO, 1983)。こうした背景から、本病抵抗性は育種の最大の目標とされ、‘二十世紀’の血を受け継いで育成された‘幸水’、‘豊水’は抵抗性であり、現在、広く普及している (壽, 2003)。また、黒斑病に強い‘二十世紀’を獲得するため、放射線育種も利用された。すなわち、‘二十世紀’へのガンマ線照射と AK 毒素を用いた耐病性の突然変異体の選抜によって育成された品種が‘ゴールド二十世紀’である (壽, 2003)。今日、本病は抵抗性品種の栽培で完全に防除できる病害となっている。

リンゴ斑点落葉病は、1950年代の初発生を端緒に、瞬く間に全国の産地に拡大した。これは、‘スターキング・デリシャス’に代表されるデリシャス系品種の普及に端を発している。本病に対する感受性も品種間差が明確であり、デリシャス系品種や‘印度’が高度感受性で激しい病徴が現れるのに対し、抵抗性の‘紅玉’、‘さんざ’、‘つがる’等にはほとんど発生しない。このメカニズムも、斑点落葉病菌が生産する HST である AM 毒素に起因する (NISHIMURA and KOHMOTO, 1983)。抵抗性の評価では、分生子の接種試験のほか、AM 毒素を利用した検定も用いられた。こうした成果から、我が国で近年、育成されたリンゴ品種の多くが斑点落葉病に抵抗性を有する (副島, 2003)。にもかかわらず、本病は依然として防除を欠かすことのできない病害である。これは、ナシ黒斑病と異なり、高度感受性と抵抗性の間に様々な中間程度の

感受性を示す品種が存在し、その中に‘ふじ’、‘王林’、‘陸奥’、‘北斗’、‘金星’等現役の栽培品種が含まれていることによる。これらの品種の栽培には、やはり本病の対策が必要になる。

さらに、近年、リンゴ斑点落葉病菌は、セイヨウナシ黒斑病の病原としても同定された。すなわち、セイヨウナシの品種‘ル・レクチュ’および‘ゼネラル・レクラーク’に特異的に黒斑病を引き起こす病原でもある (棚橋ら, 2004; 小笠原・荒井, 2004)。

ナシ黒斑病およびリンゴ斑点落葉病ともに、当初、固有の新種として同定された。その後、両者の分生子の形態が *Alternaria alternata* と一致することから、宿主特異的毒素の生産性の付加によって、各々の宿主への病原性を獲得した *A. alternata* の種内変異系統 (病原型) との位置づけが提案された (NISHIMURA and KOHMOTO, 1983; 図-1)。これは、分子系統学的にも支持される結果となっている (KUSABA and TSUGE, 1994; 1995; 1997)。したがって、胞子形成法など両者の取扱いは、重複するところが多い。そこで、本稿ではナシ黒斑病およびリンゴ斑点落葉病の病原性検定法をあわせて述べる。また、両者とも HST を産生する点に特徴があり、毒素感受性検定についても簡単に付記することとした。

なお、二つの病気についての基本的性質については北島 (1989 a; 1989 b)、分離法などの取扱いについては、最近の澤村 (1995)、渡辺 (1995)、棚橋 (2009) および對馬 (2009) の優れた解説もあり、本稿でも適宜引用させ

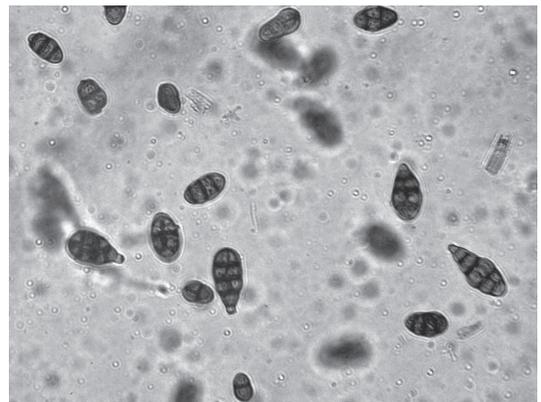


図-1 ナシ黒斑病菌の分生子

Evaluation Method for Pathogenicity and Host-specific Toxicity of the Japanese Pear and Apple Pathotypes of *Alternaria alternata*.  
By Yoshihiko ADACHI

(キーワード：ナシ黒斑病, リンゴ斑点落葉病, 宿主特異的毒素)

ていただいた。併せて、参照いただきたい。

## I 分離法

### 1 罹病サンプルの採集

ナシ黒斑病およびリンゴ斑点落葉病ともに、品種によって病気に対する感受性が大きく異なる。抵抗性品種の中には全く発病しないものがあり、罹病サンプルの採集は、病気が発生する品種を選択しなくてはならない。

ナシ黒斑病は、今日の栽培品種では‘二十世紀’（‘おさ二十世紀’などを含む）、‘南水’、‘新水’、‘喜水’等限られた品種でしか発生しない。放射線育種によって本病抵抗性が改良された‘ゴールド二十世紀’、‘おさゴールド’等は、感受性が完全には失われてはいないので、本病が発生する品種の一つと考えてよい。

リンゴ斑点落葉病については、デリシャス系品種や‘印度’等の高度感受性品種については、栽培面積が大幅に減少している。今日の問題は、‘ふじ’、‘王林’、‘陸奥’、‘金星’、‘北斗’等中程度の感受性栽培品種での発生になる。これらの中で比較的感受性が高く栽培面積も大きい‘王林’が、斑点落葉病の採集の際、まず注目すべき品種と思われる。また、主要品種の‘ふじ’については、通常の天候と防除で多発することはないが、天候不順や殺菌剤散布の手術等で被害を生じることがある。

### 2 分離の手順

ナシ黒斑病およびリンゴ斑点落葉病ともに、主に葉、果実および枝に発生する。このうち、葉の病斑からの分離が最も容易である。葉が樹上に生育している6～10月にかけて、感受性品種では発病葉の採集が可能であるが、なるべく若い葉の新鮮な病斑を材料にするのがよい。病斑が古くなるほど、雑菌の混入が増加する傾向があり、特に9月以降の病斑では顕著になる。

分離用培地には、一般的なジャガイモ煎汁寒天培地(PDA)が使用できる。細菌の混入を防止するためには、ストレプトマイシン、アンピシリン等の抗生物質を添加することや乳酸を容量で0.05% (v/v)ほど加えてpHを低くすることが有効である。さらに、雑菌の混入が著しい場合、谷口ら(1991)が開発した選択培地が有効である。

葉や果実の病斑部と健全部の境界から、約3～5mm四方の切片を切り出し、70%エタノール30秒、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で3分、浸漬して表面殺菌を行う。殺菌した切片を滅菌水で十分洗浄した後、滅菌したろ紙などで乾かし、分離用培地に置床する。28℃で3～5日間程度、培養して、分離切片から伸長した菌叢の形態や顕微鏡で分生子を確認し、*Alternaria*属菌と判断できるものを新たな培地へ移植する(図-1)。

目的によっては、上記の組織分離で得られた菌を試験材料に用いてもよい。しかし、一つの病斑上に病原性を持つものと持たないものが重複感染する事例がナシ黒斑病で報告されており、厳密には単孢子分離を行うほうがよい(ADACHI and TSUGE, 1994)。

その場合、新たな培地へ移植して、伸長してきた菌叢で形成された分生子をPDAや素寒天培地上に画線培養する。*Alternaria*属菌はPDA培地上でも孢子形成は良好であるが、乾アンズ寒天培地(乾アンズ25g、スクロース30g、寒天20g、蒸留水1l、pH4.5～5)やV8ジュース寒天培地でさらに旺盛である。また、BLB灯照射で孢子形成が促進されるので、適宜活用する。

画線後は、28℃暗黒下で12～24時間ほど培養する。分生子の発芽を確認し、周囲の寒天ごと単孢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、ライターの炎で十分である。また、作業はクリーンベンチやクリーンルーム等でなくとも、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。

本菌は、PDAをはじめほとんどの培地上で生育し、生育適温は28℃である。保存は、斜面培地上に菌糸が生育した後、暗所に冷蔵保存する。ただし、保存中に病原性を失活するものが生じることがある。

### 3 病原性の確認

ナシ黒斑病菌およびリンゴ斑点落葉病菌の分離作業では、最後に病原性の確認が必須の作業になる。両者が属する*Alternaria alternata*は、腐生菌や日和見感染菌として普遍的に分布するため、上記の操作で分離された*Alternaria*属菌も形態のみでは病原菌と判定できないためである。具体的な手法は、接種法で述べる。

## II 孢子形成法

前述したように、ナシ黒斑病菌およびリンゴ斑点落葉病菌ともに、PDA、乾アンズ寒天培地やV8ジュース寒天培地上等での孢子形成は良好である。また、BLB灯照射で孢子形成が促進される。

また、以下に述べる方法も有効である(HAYASHI et al., 1990)。培養容器に分注したジャガイモ煎汁液体培地(PDB)に斜面培地などで保存しておいた菌株の菌叢片を2～3個移植する。これを28℃暗黒下で10～14日間程度、静置培養する。培地表面に形成された菌糸マットを容器から取り出し、流水で水洗した後、スチロールケースやプラスチックバット等に広げた新聞紙上に広げる。広げる際、菌糸マットは裏返して、培養時に液体培地に浸かっていた側を表にする。また、新聞紙は湿らせ

て、適度に湿度を保つようにする。これをさらにケースごと新聞紙で包装する。暗黒下、室温で3～5日程度置くと、菌糸マット表面に黒緑色の分生子が大量に形成される。大量の育種実生を対象に黒斑病感受性を調査する場合などは、同一菌株について大量の胞子が必要になる。その場合、容量の大きな三角フラスコを活用する。また、多数の菌株を検定する場合などは、コニカルチューブなどを培養容器に用いればよい。

### III 分生子の接種法

#### 1 検定品種と供試植物の育成

ナシ黒斑病菌に対しては、‘二十世紀’、‘南水’、‘新水’等感受性品種を用意する。リンゴ斑点落葉病菌については、接種試験で‘王林’や‘ふじ’にも発病させることは可能だが、病原性の有無を高感度に検定するためには、‘スターキング・デリシャス’や‘印度’等の高度感受性品種が必要である。

ナシ黒斑病およびリンゴ斑点落葉病、ともに潜伏期間は短く、おおよそ1～3日間程度で発病する。そこで、実験室内で切り取り葉を用いて検定を行う。

どちらの病気も感染するのは若い葉だけで、成葉には発病しない。露地植えの成木から、葉を採集する場合、4～6月ころ、まだ病気の発生の少ない時期が適している。供試葉は、先端の展開葉から上位5枚程度の若い葉をそろえて採集する。適葉後、水洗して薬剤や自然感染の分生子をできる限り除いてから、試験に用いる。しかし、露地植えでは自然感染を完全に排除することはできないので、降雨を遮断できる網室や温室等で管理した鉢植えの苗木を用いるのが合理的である。

苗木は4～5月ころより発芽し、新梢の伸長とともに先端に展開していく若い葉を適宜接種に用いることができる。7月ころには新梢伸長が停止し、接種に適した若い葉が得られなくなるが、苗木を全摘葉し、新梢先端の数芽を剪定すれば、さらに若い葉が展開してくる。温室などで加温することで、9～10月ころでも接種試験が可能になる。ナシ黒星病の場合と異なり、どの時期の若葉でもかな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れば、翌春、再び発芽して、接種植物として利用できる。

#### 2 接種法と発病調査

水で湿らせたペーパータオルや薄いスポンジ等を敷いたフタのあるスチロールあるいはプラスチックケースを用意する。この中に葉裏を表にして感受性品種の葉を並べる。作成した分生子を滅菌水中に懸濁し、 $10^6$ 個/ml程度の胞子懸濁液とする。クロマト用噴霧器を用いて、均

等に噴霧する。

接種後、容器のフタをして、20～28℃程度で多湿条件を保つ。切り取り葉への接種では、1～3日後には病斑が現れる。発病調査は、葉当たりあるいは葉面積当たりの病斑数を計測する。また、病斑が急速に拡大して融合するため、病斑が専有する面積の割合を達観もしくは画像解析によって求める(図-2)。この数値で、供試菌株の持つ病原性の強弱、宿主品種間の感受性程度を比較することができる(斎藤・武田, 1984; ABE et al., 2010)。

なお、菌株分離の際など病原性の有無を確認するだけであれば、胞子懸濁液を無傷で滴下してもよい。筆者らは、単胞子分離まで済ませた菌株について、以下の方法を用いている。滅菌した爪楊枝などで培地表面から分生子をかき取り、これを1.5 ml チューブに入れた滅菌水中に混ぜて胞子懸濁液とする。懸濁液20  $\mu$ l を感受性品種の葉裏に滴下、2～3日後に観察、明確な病斑を形成したものを病原性ありと判定した(図-2)。多数の菌株を検定する場合には、特に胞子濃度は調整せず試験を実施し、病原性を確認できたものについて、必要に応じて噴霧接種を改めて実施する。

### IV 宿主特異的毒素の感受性検定

#### 1 培養ろ液の調整

ナシ黒斑病菌およびリンゴ斑点落葉病菌の病原性検定では、分生子接種とともにHSTに対する感受性検定が

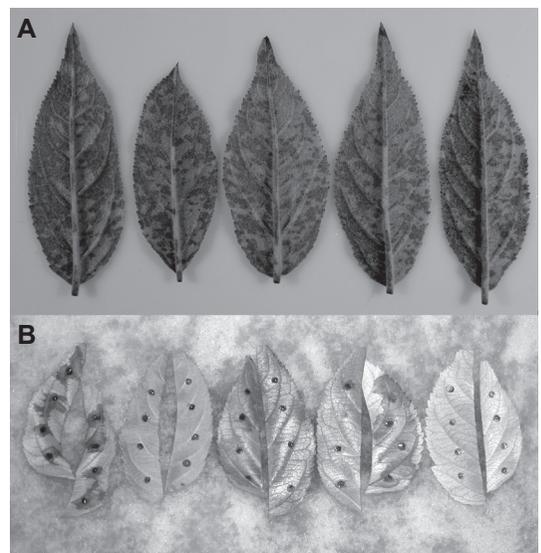


図-2 リンゴ斑点落葉病菌の分生子接種

A: 噴霧接種により現れた病徴。

B: 点滴接種により現れた病徴。

(左から2および5番目の菌株は病原性なしと判定される)

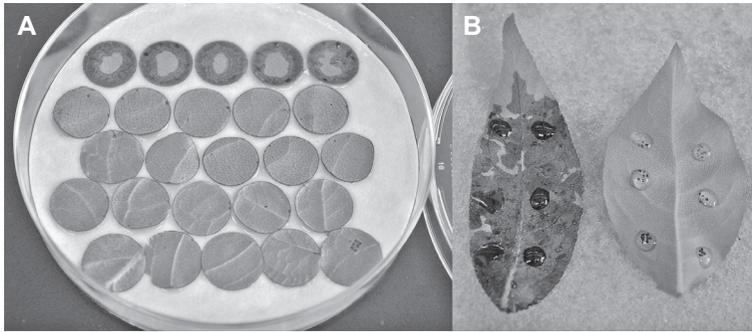


図-3 ナシ黒斑病菌の宿主特異的毒素の検定

A: リーフディスク処理 (一番上の列が、黒斑病感受性品種の葉)。

B: 有傷処理 (左側の葉が、黒斑病感受性品種の葉)。

広く用いられてきた。これは、前述したように、両菌の特異的な病原性が各々の生産する AK 毒素および AM 毒素に起因しているからである。発病過程で HST は、分生子発芽の際に放出され、病原菌の侵入に先だって宿主の防御反応を阻害し、その後の感染を成立させる因子として働くと考えられている (NISHIMURA and KOHMOTO, 1983)。

両病原菌とも培養時に HST を生産することも知られている。検定では、両菌を液体培地で培養して得られる培養ろ液がよく用いられる。培地には、ナシ黒斑病菌では PDB 培地、リンゴ斑点落葉病菌では Richards 培地や 0.5% 酵母エキスを添加した Czapek Dox 培地を用いる。菌叢片を 2~3 個移植し、28℃ 暗黒下で 10~14 日間程度、静置培養する。これ以上長く培養すると、毒素活性はむしろ減少する。培養後、培養ろ液を回収し、フィルター滅菌で菌を取り除いて毒素液とする。また、培養ろ液を酢酸エチルで抽出すると、AK 毒素および AM 毒素とも酢酸エチル層に回収される。これをエバポレーターで濃縮乾固し、粗毒素分画として検定に使用することもできる。粗毒素分画はアセトンに溶解し、最終濃度 1% (v/v) になるように滅菌水を加えて懸濁し、毒素液とする。

なお、純化毒素まで精製するには、さらに高速液体クロマトグラフィーなどの手順が必要になる (上野, 1976)。

## 2 感受性検定

検定には、葉を用いることが多い。供試葉は、分生子接種と同様、先端の展開葉から上位 5 枚程度の若い葉をそろえる。処理法には、リーフパンチャーで打ち抜いたリーフディスクを毒素液に染みこませたろ紙上に並べて浸漬させる方法 (壽, 2003) と、葉裏にわずかに傷をつけて毒素液を滴下し、そこから有傷処理する方法がある (HAYASHI et al., 1990; 図-3)。リーフディスク法では検定液が多量に必要なこと、有傷処理では傷をつける際、葉に穴を空けてしまい、そこから検定液が消失して

しまうことに注意が必要である。毒素処理後、20~28℃ 程度の多湿条件を保てば、1~3 日程度で毒素活性に特徴的な葉脈に沿ったえ死を生じる (図-3)。

## おわりに

ナシ黒斑病およびリンゴ斑点落葉病ともに、かつてほど被害の大きな病害ではない。それは、抵抗性品種の登場によるところが大きい。とすれば、両病害に対する抵抗性は、新品種が引き続き備えなければならない不可欠の形質とも言える。育種実生での選抜、新たな遺伝資源の探索・評価等、この二つの病害にかかる検定法は依然として欠かせないものと考えている。

## 引用文献

- 1) ABE, K. et al. (2010): *Plant Breeding* **129**: 208~218.
- 2) ADACHI, Y. and T. TSUGE (1994): *Phytopathology* **84**: 447~451.
- 3) HAYASHI, N. et al. (1990): *ibid.* **80**: 1088~1091.
- 4) 北島 博 (1989 a): 果樹病害各論, 養賢堂, 東京, p. 141~151.
- 5) ——— (1989 b): 同上, p. 217~232.
- 6) 壽 和夫 (2003): *植物防疫* **57**: 290~293.
- 7) KUSABA, M. and T. TSUGE (1994): *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3055~3062.
- 8) ——— (1995): *Curr. Genet.* **28**: 491~498.
- 9) ——— (1997): *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **63**: 463~469.
- 10) NISHIMURA, S and K. KOHMOTO (1983): *Annu. Rev. Phytopathol.* **21**: 87~116.
- 11) 小笠原博幸・荒井茂充 (2004): *北日本病虫研報* **55**: 101~104.
- 12) 斎藤健一・武田和義 (1984): *育種* **34**: 197~209.
- 13) 澤村健三 (1995): 作物病原菌研究技法の基礎, 日本植物防疫協会, 東京, p. 224~225.
- 14) 副島淳一 (2003): *植物防疫* **57**: 286~289.
- 15) 棚橋 恵ら (2004): *日植病報* **70**: 168~175.
- 16) ——— (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II, 日本植物防疫協会, 東京, p. 105~107.
- 17) 谷口和久ら (1991): 同上 **72**: 97~98 (講要).
- 18) 對馬由記子 (2009): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II, 日本植物防疫協会, 東京, p. 114~117.
- 19) 上野民夫 (1976): *農化* **50**: R141~R148 (総説).
- 20) 渡辺博幸 (1995): 作物病原菌研究技法の基礎, 日本植物防疫協会, 東京, p. 237~239.