

イチジク圃場の土壌から株枯病菌を簡易に検出する「枝挿し法」

広島県立総合技術研究所 農業技術センター 果樹研究部 ^{もりた}森田 ^{たけしげ}剛成・^{じくまる}軸丸 ^{しょうた}祥大
 広島県西部農業技術指導所 ^{はら}原 ^{ひろ}敬 ^{かず}和*
 京都大学農学研究科附属農場 ^{なか}中 ^の野 ^{みち}道 ^{はる}治**

はじめに

株枯病（以下、本病）は、イチジク（*Ficus carica* L.）の伝染病である。本病の病原体である株枯病菌は最近、*Ceratocystis ficicola* Kajitani et Masuya として再記載された（Kajitani and Masuya, 2011）。本病は1981年に愛知県で初めて確認され（加藤ら, 1981）、その後、西日本を中心に拡大し、広島県では1996年に初発が確認されている（新田ら, 2005）。近年では2006年に新潟県、2009年に福島県、2011年に宮城県から病害虫発生予察情報特殊報が発表されるなど、全国の多くのイチジク栽培府県で本病が発生している。本病は成木を枯死させる（口絵①）ことに加えて土壌伝染性であることから、その被害は甚大である。このため、本病は我が国のイチジク産地が最も警戒する重要病害の一つとなっている。

イチジク成木を枯死させる病害として、株枯病のほかに白紋羽病、疫病および胴枯病が知られており、それぞれを正確に識別するには顕微鏡を用いて菌の形態を確認する必要があるため、生産者自身が取組むことは困難である。診断は病害防除の第一歩であり、農業散布などの対策を判断するためにとりわけ重要である。また、正確な診断によって経費や労力の節約が可能になる（白石ら, 2012）。

既存の本病の土壌診断技術として、感染が疑われる土壌をカップに入れ、そこにイチジク枝（長さ約5cm、直径約1cm）を挿入して株枯病菌を検出する梶谷(1995)の方法が知られている。しかし、イチジク生産者や農業技術者がこの方法を実施した場合、診断土壌を入れたカップ内の水分量の調製を誤るケースが多く（水分不足および過湿）、確実な診断ができない事例もあった（森田

未発表）。また、PCRを用いた本病原菌の検出方法（三好ら, 2011など）が確立されているが、高価な機材と煩雑な手順が必要であることから、現在のところ研究機関などでしか実施できない。したがって、生産者が自ら確実に実施できる本病の土壌診断技術は存在しない。

ナシヤリングでは、それぞれの剪定枝や桑の切り枝（長さ30cm）を樹幹付近の土壌に挿入し、一定期間後にそれらを回収して、切り枝に菌糸の着生が認められるかどうかで白紋羽病の診断を行っている（EGUCHI et al., 2009）。一方、同様の手法を用いて、株枯病菌の検出を試みた事例はない。株枯病菌は肉眼で同定が可能な子のう殻や子のう胞子塊を形成する（口絵②）ため、このような手法を用いれば特別な装置や技術がなくても容易に菌の存在が判断できると予想される。

そこで、白紋羽病を対象とした手法を参考にして、イチジク生産者が現地で簡単に使える確実な本病の土壌診断技術（枝挿し法、以下本法）の確立を目指した。以下に検討した本法の土壌診断手順をまとめる（図-1）。

- ①本病の発生履歴のない圃場からイチジク「蓬葉柿」の木化した当年枝を剪定期間に採取する（長さ約50cm）。
- ②検査時まで5℃で貯蔵する。これらの枝を長さ約30cmに切り出し、土壌への挿入を容易にするため一端を斜めに切断する。
- ③診断土壌へ垂直に挿入する（本病の土壌汚染範囲は深さ約30cmまでの比較的浅い部位に集中しているため（森田ら, 2012）、挿入深度は25cmとする）。
- ④一定期間土壌に挿入した枝を抜き取り、付着した土壌を軽く落とす。枝は個別に、滅菌水に浸漬したティッシュペーパーを入れたビニール袋内で湿潤状態に保つ。このとき、過剰な水分が付着して枝が早期に軟腐し検出率が低下することを避けるため、枝とティッシュペーパーとの間隔が約5cmになる位置で枝を固定するとともに、袋を密封し、袋底を下向きに枝を吊るす。
- ⑤約25℃、暗黒条件でこの枝を10日間培養する。

Bait Twig Method for Detection of *Ceratocystis ficicola*, Causal Agent of Ceratocystis Canker of *Ficus carica* L., from Soil in Fig Orchard. By Takeshige MORITA, Hirokazu HARA*, Michiharu NAKANO** and Shota JIKUMARU

（キーワード：イチジク、株枯病、枝挿し法、土壌診断技術）

現所属：* 広島県東部農業技術指導所

** 広島大学大学院理学研究科

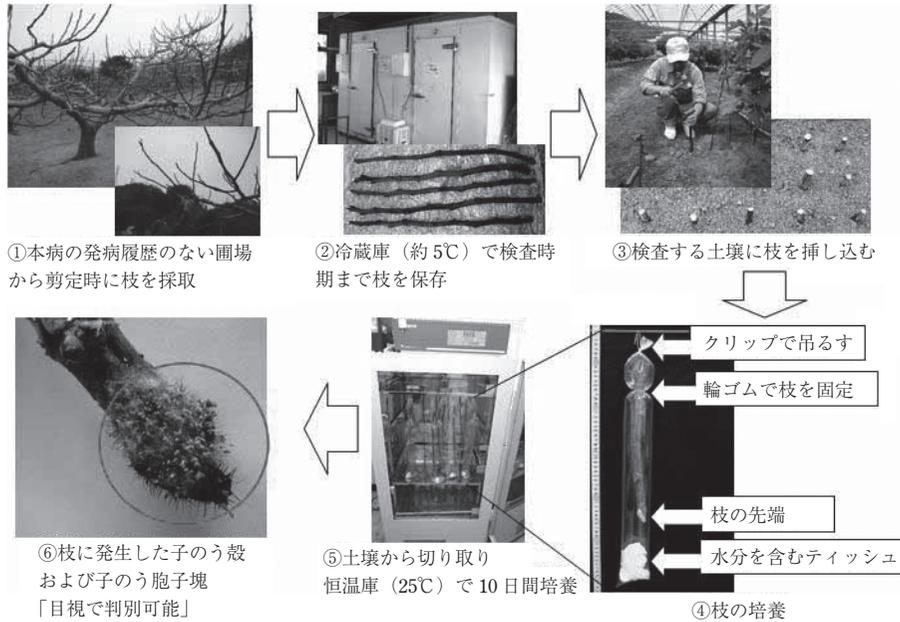


図-1 「枝挿し法」による診断手順

⑥株枯病は、特徴的な菌の形態を肉眼で判別、確認できる(口絵②)。同時に、土壌に挿さない枝を同じ条件で培養して、検査枝が土壌挿入前に株枯病菌に感染していないことを確認する。

本稿では既報(森田ら, 2013)の内容を中心に、本法の検出感度や最適な実施時期を明らかにした室内試験、および本法の実用性を検討したイチジク圃場を用いた野外試験の結果を本報の根拠データとして紹介したい。

I 室内試験

1 試験方法

人工汚染土壌は、2006年に広島県内のイチジク圃場の土壌から分離した株枯病菌を接種源とし、5段階の濃度勾配をつけて供試した(表-1)。検査枝は、本病の発生履歴のない圃場から剪定時に採取したイチジク‘蓬萊柿’の当年枝を約5cmに切断して用いた。人工汚染土壌をプラスチックカップに入れ、滅菌水で土壌水分を調整し、切り枝5本を垂直に1/2程度土壌に埋め込んだ。その後、このプラスチックカップは6段階の温度条件(5, 10, 15, 20, 25および30℃)、各処理温度について6種類の挿入期間(1, 3, 5, 7, 14および21日)を設定して処理した。なお、検出までに長い期間を要することが想定される5℃と10℃区は、28日と35日の挿入期間を追加した。各期間、土壌に挿入した枝を抜き取り、付着した土壌を水道水で洗い流した後、アルコールラン

プを用いて枝の表面を火炎滅菌し、25℃、暗黒条件下で10日間培養した。各処理条件に10枝を供試し、子のう殻形成状況から株枯病菌の検出率を算出した。土壌に挿さない枝5本を同様に各温度で培養して、検査枝が実験前に株枯病菌に感染していないことを確認した。

2 試験結果

結果は表-1に示した。土壌1ml当たり株枯病菌の厚膜胞子が1個しか存在しない条件でも株枯病菌が確認されたことから、本方法の検出感度は高いと考えられる。

株枯病菌の検出頻度は、培養温度に依存して変化した。20℃以上で株枯病菌の検出頻度が比較的高く、15℃以下ではほとんど検出されなかった。

培養温度20℃では枝の挿入期間が3日および5日、25℃では1日および3日、30℃では1日で、土壌中の株枯病菌濃度の上昇につれて検出率が高くなる傾向があった。20～30℃の場合、枝の挿入期間を上記の日数よりも延長すると、土壌中の株枯病菌濃度と検出率に一定の傾向は認められなくなるが、検出頻度が高い傾向は続いた。しかし、さらに挿入期間が長くなり14日以上に及ぶと、株枯病菌の検出頻度が低下した。これは、株枯病菌以外の生育旺盛な糸状菌が枝に増殖し、肉眼観察による株枯病菌の子のう殻の判別が困難になったことや、枝の腐敗により株枯病菌が生育できる条件が整わなくなったことが原因であると考えられる。他の糸状菌増殖や枝の腐敗の割合は、土壌への枝の挿入期間が長いほど増加

表-1 培養温度、土壌中の菌濃度および挿入期間がイチジク枝を用いた株枯病菌検出に及ぼす影響（室内試験）

| 培養 温度 (°C) | 土壌中の 株枯病菌 濃度 ^{a)} | 検出率 (%) ^{b)} 挿入期間 (日) | | | | | | | |
|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|----|----|
| | | 1 | 3 | 5 | 7 | 14 | 21 | 28 | 35 |
| 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 ² | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 ³ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 ⁴ | 0 | 10 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 ² | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 ³ | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 ² | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 ³ | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 ⁴ | 0 | 0 | 70 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 1 | 0 | 0 | 20 | (20) | (20) | (10) | | |
| | 10 | 0 | 0 | 20 | (60) | (20) | (10) | | |
| | 10 ² | 0 | 10 | 30 | (60) | (40) | (0) | | |
| | 10 ³ | 0 | 30 | 40 | (80) | (20) | (0) | | |
| | 10 ⁴ | 0 | 70 | 70 | (40) | (0) | (0) | | |
| 25 | 1 | 0 | 0 | (30) | (20) | (20) | (0) | | |
| | 10 | 0 | 20 | (50) | (60) | (20) | (0) | | |
| | 10 ² | 0 | 10 | (10) | (30) | (0) | (0) | | |
| | 10 ³ | 10 | 20 | (50) | (40) | (0) | (0) | | |
| | 10 ⁴ | 40 | 40 | (60) | (30) | (30) | (0) | | |
| 30 | 1 | 0 | (10) | (10) | (80) | (20) | (0) | | |
| | 10 | 0 | (60) | (40) | (30) | (10) | (0) | | |
| | 10 ² | 10 | (40) | (30) | (50) | (20) | (0) | | |
| | 10 ³ | 10 | (20) | (40) | (50) | (10) | (0) | | |
| | 10 ⁴ | 50 | (40) | (40) | (40) | (0) | (0) | | |

(森田ら (2013) を改変)

a) 滅菌土壌 1 ml 中の株枯病菌の厚膜胞子密度を示す。

なお、10⁴ 区には、土壌 1 ml 中に厚膜胞子 10⁴ 個に加え、分生胞子 10⁵ 個および子のう胞子 10³ 個が含有されている。他の区では厚膜胞子の希釈率と同等に、分生胞子および子のう胞子が希釈されている。

b) 土壌から抜き取った枝は、水洗と火炎滅菌後に 25°C 暗黒条件下で 10 日間培養した。試験区当たり 10 枝を供試した。枝に形成される株枯病菌子のう殻の有無を確認し、検出率を算出した。() 示した区では、*Fusarium* 属菌の増殖や枝の腐敗が確認された。

c) 調査を行わなかった。

する傾向があり、20°C では 7 日間以上の区で、25°C では 5 日間以上で、30°C では 3 日間以上で確認された (表-1)。これらの枝から検出された株枯病菌以外の糸状菌のうち、代表的な 2 種について rDNA-ITS 領域の塩基配列

を中野ら (2012) の方法を用いて解析した結果、2 種とも *Fusarium* 属菌に対して高い相同性が確認された。このことから、本実験では *Fusarium* 属菌の増殖により、各処理区の挿入期間後半において株枯病菌の検出率が低

下したと考えられる。

培養温度が5～15℃の場合、枝の挿入期間が3日もしくは5日、土壤中の株枯病菌濃度が10²/ml以上の区で限定的に株枯病菌が検出された(表-1)。株枯病菌の菌糸生育に最適な温度が20～25℃である(KAJITANI and MASUYA, 2011) ことと今回得られたデータから、15℃以下の温度は株枯病菌がイチジクの枝に感染するには不適であると考えられる。

II 現地での枝挿し法実証試験

1 試験方法

試験は、2009年度は呉市安浦町で、2010年度は東広島市安芸津町で行った。両試験地のイチジク圃場では試験年の前年夏季に本病によって樹体が枯死し、同じ年の冬季に抜根していた。このような履歴の土壌を各年2～3地点使用した。株枯病菌の密度を均一化するため、抜根した発病樹の株跡を中心として1m四方(深さ30cm)の範囲の土壌を実験前にシャベルで混和した。また、混和後の土壌を回収し、梶谷の方法(梶谷, 1995)により本病原菌の存在を確認した。2009年度に

は夏季と秋季に、2010年度には秋季と冬季にそれぞれ実証試験を行った(表-2)。

検査枝は、木化した当年枝を30cmに切出し、土壤へ垂直に25cm挿入した。土壤挿入期間は、室内試験の結果を参考にして、1, 3, 7, 14および21日とし、各区5本を供試した。なお、検出までに長い期間を要することが想定される2010年度の冬季には、挿入期間に28日を追加した。

各期間土壤に挿入した枝を抜き取り、付着した土壤を水で軽く洗い流した。生産者がより取り組みやすい方法にするため、室内試験で実施した枝表面の火炎滅菌を本試験では行わなかった。その後、枝はビニール袋(中川製袋化工株式会社製の傘入袋:幅10cm×長さ80cm)に入れて湿潤状態に保ち、約25℃, 暗黒条件で10日間培養し、株枯病菌の子のう殻形成の有無を確認した。同時に、土壤に挿さない枝5本を同じ条件で培養して、検査枝が実験前に株枯病菌に感染していないことを確認した。なお、検査枝に発生した株枯病菌以外の糸状菌の属名は室内試験と同様の遺伝子解析により推定した。

表-2 試験期間および挿入期間がイチジク枝を用いた株枯病菌検出に及ぼす影響(実証試験)

| 試験区 | 試験期間中の平均気温(℃) | 反復 ^{a)} | 検出率(%) ^{b)} | | | | | | | | 試験期間(場所) | |
|-----|---------------|------------------|----------------------|------|------|------|------|------|--------------------------------|-------------------------------|----------|--|
| | | | 挿入期間(日) | | | | | | | | | |
| | | | 1 | 3 | 5 | 7 | 14 | 21 | 28 | | | |
| 夏季 | 26.2℃ | I | 20 | 100 | (80) | (40) | (0) | (20) | 2009年7月16日～8月6日 (広島県呉市) | | | |
| | | II | 0 | 40 | (20) | (60) | (0) | (0) | | | | |
| | | 平均 | 10 | 70 | 50 | 50 | 0 | 10 | | | | |
| 秋季1 | 18.9℃ | I | 20 | 20 | 20 | (40) | (80) | (20) | 2009年9月29日～10月20日 (広島県呉市) | | | |
| | | II | 0 | 20 | 60 | (20) | (20) | (0) | | | | |
| | | 平均 | 10 | 20 | 40 | 30 | 50 | 10 | | | | |
| 秋季2 | 19.1℃ | I | 20 | 20 | 0 | (40) | (60) | (0) | 2010年10月1日～10月22日 (広島県東広島市) | | | |
| | | II | 40 | 60 | 60 | (60) | (60) | (40) | | | | |
| | | III | 20 | 20 | 40 | (60) | (40) | (60) | | | | |
| 平均 | 26.7 | 33.3 | 33.3 | 53.3 | 53.3 | 33.3 | | | | | | |
| 冬季 | 2.3℃ | I | 0 | 0 | 20 | 20 | (60) | (60) | (0) | 2011年1月18日～2月15日 (広島県東広島市) | | |
| | | II | 0 | 0 | 0 | 20 | (20) | (0) | (0) | | | |
| | | III | 0 | 0 | 0 | 20 | (0) | (0) | (20) | | | |
| 平均 | 0 | 0 | 6.7 | 20 | 26.7 | 20 | 6.7 | | | | | |

(森田ら(2013)を改変)

a) 発病樹を抜根した跡地単位で2～3反復とし、反復当たり枝挿し日数別に5枝を供試した。()で示した区では、*Fusarium*属菌の増殖や枝の腐敗が確認された。

b) 検出率は、土壤から抜き取った枝を水洗後に25℃, 暗黒条件下で10日間培養し、形成される株枯病菌の子のう殻の有無から算出した。

c) 調査を行わなかった。

2 試験結果

結果は表-2に示した。検出率は異なるものの、いずれの処理区においても株枯病菌が検出された。平均検出率が最も高くなる枝挿入期間は、夏季、秋季、冬季の順に長くなる傾向が認められた。このことは本法の検出率を高める最適な挿入期間が季節（温度）に応じて変化することを示唆する。また、検査枝において株枯病菌以外の糸状菌の増殖や枝の腐敗が、夏季では挿入期間が5日間以上の区に、秋季では7日間以上、冬季では14日間以上で確認された。室内試験で示したように、これらの要因により実験後半の検出率が低下し、すべての処理区で、挿入期間に対して検出率が一山型に変化した。検査枝から検出された株枯病菌以外の糸状菌は、代表的な3種のうち2種が遺伝子解析により *Fusarium* 属菌と推定された。

一般的に、*Fusarium* 属菌は生態系において土壌や水等からごく普通に分離検出される（青木，2009）。このため、生産者が自ら行うことを想定した本法で、これらの菌を実験系から排除することは困難である。室内試験や本実証試験の結果から、*Fusarium* 属菌の影響を受けず、株枯病菌の検出率が高い枝の挿入期間がそれぞれの季節（気温）に対して示された。それらの挿入期間で本法を実施することにより、*Fusarium* 属菌による株枯病菌の検出率低下は回避できると考えられる。なお、本実証試験では、湿度を保ちつつ直接水分が枝に触れない培養方法を用いたため、前述の早期軟腐症状は全く発生しなかった。

感染が困難な温度条件と考えられる冬季の現地試験（平均気温 2.3℃）においても株枯病菌が検出された。この結果は室内試験と異なった。両者の違いは、土壌から抜き取った後の枝の処理方法の違いにより説明可能である。室内試験では水洗と火炎滅菌により枝表面上の感染源を可能な限り除去して培養したのに対し、現地試験で

は軽い水洗のみで火炎滅菌を省いている。このため、冬季に行った現地試験であっても枝の表面上に感染源が残り、ビニール袋で湿潤状態に保たれ、25℃で培養している間に株枯病菌の感染が促進され検出率が向上したと推測された。

おわりに

本法は、挿入期間などに留意することで夏季、秋季および冬季に実施可能である。また、本法で使用する資材（ビニール袋、輪ゴム、クリップ、ティッシュペーパー）費は、1検体当たり約10円と安価である。以上のことから、本法は生産者自らが現地で簡単に取組める株枯病の土壌診断技術として利活用できる。

現在、本法による検査時期を剪定枝が直接利用できる11月～3月に焦点を絞り、現地実証試験を実施している。当該時期では検査枝を貯蔵しないため、貯蔵期間中の雑菌繁殖を防止する枝の洗浄（約一か月間隔）労力および大型冷蔵庫が不要になる。併せて、土壌から抜取った後の枝の培養条件について、恒温庫などの特別な機材を使わず日常生活環境から本菌が検出できる場所の選定を進めている。これらの改良は、農協や農業技術指導機関と連携して取組んでおり、より使いやすい現場技術として確立したい。

引用文献

- 1) 青木孝之 (2009): 日本微生物資源学会誌 25: 1～12.
- 2) EGUCHI, N. et al. (2009): J. Gen. Plant Pathol. 75: 325～330.
- 3) 梶谷裕二 (1995): 日植病報 61: 229 (講要).
- 4) KAJITANI, Y. and H. MASUYA (2011): Mycoscience 52: 349～353.
- 5) 加藤喜重郎ら (1981): 日植病報 47: 373～374 (講要).
- 6) 三好孝典ら (2011): 日植病報 77: 96～104.
- 7) 森田剛成ら (2012): 関西病虫研報 54: 29～34.
- 8) 〃〃〃〃ら (2013): 同上 55: 71～75.
- 9) 中野道治ら (2012): 土と微生物 66: 58～62.
- 10) 新田浩通ら (2005): 関西病虫研報 47: 95～98.
- 11) 白石友紀ら (2012): 新植物病理学概論, 養賢堂, 東京, p. 211～223.