

土壌中からのダイズ黒根腐病菌の特異的検出法の開発

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター

新潟県農業総合研究所 作物研究センター

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構本部

お
越
くろ
黒
なか
仲

ち
智
だ
田
がわ
川

とも
智
あき
晃

すな
直
ひさ
久
お
生

はじめに

ダイズ黒根腐病は土壌伝染性の病原性糸状菌 *Calonectria ilicicola* によって引き起こされる病害である。本病は水田転換畑のように土壌水分の高い圃場において多発し、ダイズに重大な被害を生じる立枯性病害の一種である。本病は 1968 年に千葉県において世界で初めて発生が認められた（御園生・深津，1970）。その後，水田転換畑の広がりおよびダイズの作付け回数の増加とともに発生が拡大し，2002 年現在 38 道府県で発生が報告されており（西ら，1999；相馬・武田，2002），今後さらにその発生は増えるものと考えられる。

ダイズは全生育ステージにおいても黒根腐病菌に対して感受性を示すが，その被害は早期に感染した株ほど大きくなる。しかし感染が生育初期であっても典型的な病徴は開花期以降に現れる。すなわち罹病個体では 8 月中旬ごろから葉に退緑えそ斑（口絵①）を生じ，早期に葉が黄化する。この罹病個体の地下部では侵入した黒根腐病菌が根の組織を侵し（口絵②），被害の著しい場合には側根が崩壊・脱落した「ゴボウ根」状態となる。また地際部には黒根腐病菌の赤色の子のう殻を形成する場合があります，これが本病の診断の一つの目安となる。病原菌は罹病ダイズの根に微小菌核を形成し，これが越冬して翌年の一次伝染源となる（Rowe et al., 1974）。黒根腐病による被害は主に莢数の減少による子実量の減少と成熟期が早まり，子実が十分に太らないことによる粒径および粒重の減少等の品質の低下が挙げられる。本病の発病程度と収量との関係を明らかにするため被害程度別（被害程度 1；側根がわずかに褐変し腐朽している，2；側根の腐朽が著しい，3；側根がほとんど残っていない，4；側根が崩壊し主根の腐朽が著しい）にダイズの収量を調査すると，程度 1 では収量に及ぼす影響は大きくない場合が多いが，程度 2 以上の場合には収量への影響が著しく，程度 4 では収穫可能な子実が着いていない場合が

ほとんどである（荒井ら，2010）。本病に対する防除試験はいくつか行われてきている（西ら，1999；仲川・越智，2006；越智ら，2013）が，その知見はまだ不十分である。この原因としては防除効果を判断するうえでの土壌中の病原菌の動態を評価する手法が確立されていないことが挙げられる。土壌病害において土壌中の病原菌の動態を把握することは防除対策を構築するうえで重要なキーとなる。

本病菌の微小菌核を土壌中から定量的に検出した例は過去にもいくつかある（Krigsvold and Griffin, 1975；Phipps et al., 1976；Griffin, 1977）。しかし，これらの手法では選択性は弱く，また現在では入手不可能な試薬を培地に用いることや，使用する試薬数が多いため，調製が面倒なことが問題点として挙げられる。そこで本稿では，新たに我々が開発したダイズ黒根腐病菌の土壌中からの特異的検出法（Ochi and Nakagawa, 2012）とその実用例について以下に紹介する。

I ダイズ黒根腐病菌の特異的検出方法

1 検出培地

黒根腐病菌の新規検出培地として開発した YLS 培地の組成は以下の通りである。培地 1 l 当たり，L-ソルボース 20 g，イーストエキストラクト 4 g，フルトラニル 12.5 mg，チアベンダゾール 1.5 mg，クロルテトラサイクリン塩酸塩 40 mg，クロラムフェニコール 10 mg，ターゲットール type NP-7（Sigma-Aldrich）および寒天 20 g を加用する。本培地上では *C. ilicicola* 菌を識別するうえでの指標となるオレンジ色の微小菌核を多量に形成させることができる。本培地を調製するに当たり炭素基質をスクリーニングしたところ，L-ソルボースで接合菌を抑制する（Awuah and Lorbeer, 1986）とともに他の雑菌の生育を抑制し，*C. ilicicola* 菌の生育が良好となる効果が認められた。*C. ilicicola* 菌の微小菌核の形成数はイーストエキストラクトを添加することにより増加した。フルトラニルは担子菌類の生育を阻害し，チアベンダゾールは過去の報告においても使用されているように，フザリウム属菌やトリコデルマ属菌等雑菌の生育を抑制する（Krigsvold and Griffin, 1975；Phipps et al., 1976；Griffin,

The Development of Quantitative Method for Isolating *Calonectria ilicicola* from Naturally Infested Soils. By Sunao Ochi, Tomohisa Kuroda and Akio Nakagawa

（キーワード：黒根腐病，ダイズ，特異的検出法）

1977) 効果が認められる。しかし、本試薬は *C. ilicicola* 菌の生育も若干抑制する。クロルテトラサイクリン塩酸塩およびクロラムフェニコールはバクテリアの生育阻害目的で添加した。ターゲットは菌糸の生育を抑制し、コロニー化しやすくさせるとともに、表面張力が小さくなるため、培地を薄く延ばしやすくなる効果を示す。

2 黒根腐病菌検出のための土壌の調製方法

土壌の調製方法を図-1 にまとめた。土壌はダイズ黒根腐病の発生している現地圃場内においてランダムに5箇所を選び、その0～15 cmの深さから土壌を採取し、これらを混合して検出試料とする。これらの土壌試料5 gを300 mlのフラスコに入れ、100 mlの滅菌蒸留水を添加し、200 rpmで20分間振とうし、蒸留水中に土壌を拡散させる。本病原菌は土壌における密度が低く、希釈平板法では検出不可能であったため、KRIGSVOLD and GRIFFIN (1975), PHIPPS et al. (1976) や GRIFFIN (1977) と同様に土壌を適切なふるいを通して、土壌中における菌密度を増加させることが有効である。すなわち黒根腐

病菌の微小菌核を濃縮するために0.25 mm目および0.038 mm目のふるいを重ねたふるいに土壌試料液を通し、流水中でふるいながら、0.038 mm目のふるい上に残った土壌を有効塩素濃度0.25%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で30秒間表面殺菌する。この土壌を滅菌水でよく洗浄後、回収し、滅菌水を用いて50 mlに希釈する。このうち400 μ lを10枚の9 cmシャーレそれぞれに分注し、その上から約50℃に冷やした前述検出培地を注ぐ。培地は固化した後、25℃で8日間培養し、生育した菌叢の様子から黒根腐病菌の有無を確認する。黒根腐病菌は本培地上ではシャーレの裏面にオレンジ色の微小菌核を多量に形成するため、容易に判別が可能である(口絵③a)。

3 検出効率について既報の手法との比較

開発した検出法と既報のKRIGSVOLD and GRIFFIN (1975) および PHIPPS et al. (1976) の手法について検出効率を比較した。これら以外の手法は必要な試薬が手に入らないことから比較不可能であった。4種類の自然土壌試料を用いて比較した。新しく開発した検出法は他の2種類の手法と比較して黒根腐病菌の検出効率が高いことが明らかになった。すなわち、新たに開発したYLS培地上では、黒根腐病菌のコロニーは表面が白く円形をし、裏面は濃いオレンジ色を呈することで他の菌のコロニーとの明瞭な識別が可能であった(口絵③)。YLS培地では培養約5日後に着色によるコロニーの検出が可能であるが、既報の手法では着色が遅いため、検出は約8日後からと遅い。さらに開発した手法では雑菌の出現が他の手法と比べ安定して少なく(表-1)、本手法の優位性が示された。

4 黒根腐病菌の定量性の精度

人工汚染土壌を用いて、開発した検出法における黒根腐病菌の定量性を調査した。接種に用いる微小菌核を調製するため、PDAで黒根腐病菌を2週間培養し、適量の滅菌水とともにホモジナイザーで攪拌した。懸濁液を0.25 mm目および0.038 mm目のふるいに通し、0.038 mm目上の残渣を流水でよく洗い、ふるい上の微小菌核を回収し、滅菌水で50 mlに希釈することで微小菌核液を調製した。調製した微小菌核液中の生存微小菌核数は、YLS培地上に微小菌核液を50 μ l、20 μ lおよび10 μ l広げ、菌糸が生育した数量を計測して決定した。その後、黒根腐病菌に汚染されていない5 gの土壌に微小菌核液1 ml、500 μ l、200 μ lおよび50 μ lを混和し、人工汚染土壌とした。本土壌を使い、開発した手法とKRIGSVOLD and GRIFFIN (1975) および PHIPPS et al. (1976) の手法との黒根腐病菌の回収効率を比較した。その結果、開発した検

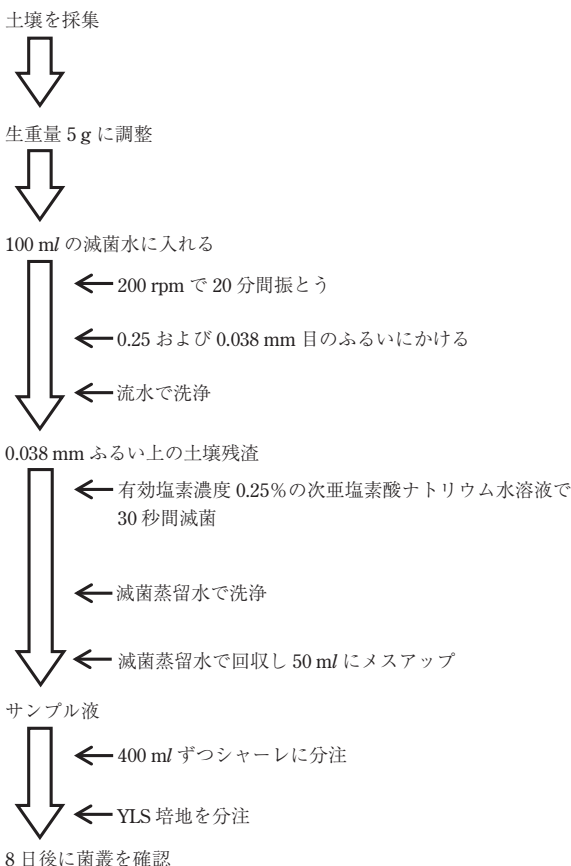


図-1 黒根腐病菌検出のための土壌の調製方法

表-1 新規検出法と既報の検出法の黒根腐病菌の検出効率の比較 (3 反復の平均値)

手法	乾土 1 g 当たりの黒根腐病菌検出数				乾土 1 g 当たりの雑菌数			
	圃場 1	圃場 2	圃場 3	圃場 4	圃場 1	圃場 2	圃場 3	圃場 4
新規検出法	174.2 ^a ± 49.3 *	34.5 ^a ± 1.4	189.4 ^a ± 8.5	0	23.1 ^a ± 7.6	91.9 ^a ± 10.0	288.3 ^{ab} ± 14.1	32.4 ^a ± 4.8
PHIPPS et al. の手法	141.8 ^a ± 13.4	24.6 ^{ab} ± 4.9	108.8 ^b ± 12.7	0	70.9 ^a ± 6.7	116.5 ^a ± 24.2	450.8 ^a ± 52.3	80.2 ^b ± 4.8
KRIGSVOLD and GRIFFIN の手法	154.0 ^a ± 18.3	11.1 ^b ± 1.2	73.9 ^b ± 13.7	0	302.2 ^b ± 45.7	299.0 ^b ± 28.3	148.4 ^b ± 28.4	8.9 ^c ± 3.3

異なる文字は Tukey-Kramer 検定 (圃場 1 の雑菌数の比較のみ Scheffe's F 検定) で手法間に有意な差 ($P < 0.05$) があったことを示す。
*標準誤差を示す。

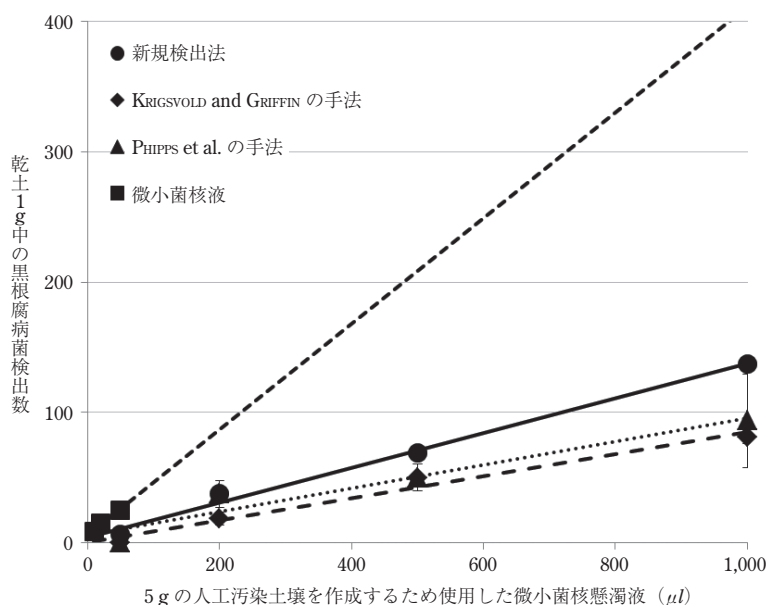


図-2 人工汚染土壌における黒根腐病菌検出効率の比較試験

出法の回収率は約 33.8%と低かったものの、他の手法と比較して優れた定量性を示すことが明らかになった (図-2)。

II 土壌におけるダイズ黒根腐病菌の動態解析

ダイズ作付け時の黒根腐病菌の土壌における動態の調査と次年度に水稻を作付けた場合の土壌中の黒根腐病菌の消長を調査するため、2010～11 年にかけて新潟県から来歴の異なる三つのダイズ作付け圃場を用い、2 年間にわたり土壌のサンプリングを行った。サンプリングの手法は前述に準じ、一つの圃場当たり 5 箇所から土壌を採集し、それらを混合し、一つの試料として用いた。各圃場の概略は A 圃場：2010 年ダイズ転作初作、黒根腐病発病度 55.1, 2011 年水稻, B 圃場：2010 年ダイズ転作初年, 発病度 71.0, 2011 年水稻, C 圃場：2010 年

ダイズ連作 8 年目, 発病度 54.8, 2011 年水稻。土壌をサンプリングした日付は、2010 年はダイズ播種直後の 6 月 11～17 日, 7 月 8～9 日, 8 月 13 日, 9 月 6 日および収穫後の 11 月 8 日。そして 2011 年は 4 月 1 日および水稻を作付け後の 12 月 2 日の計 7 回行った。

開発した検出法を用いて乾土 1 g 当たりの黒根腐病菌を計測し、その結果を図-3 に示した。ダイズを連作している C 圃場の土壌からは栽培初期から黒根腐病菌が多数検出されたが、初作である A, B 圃場土では栽培初期には全く、もしくはほとんど黒根腐病菌が検出されなかったにもかかわらず、栽培後期には爆発的に増加する結果となった。これらの結果は栽培期間中の黒根腐病菌の菌数増加および圃場発病度は、栽培初期の菌数に左右されないことを意味している。このため、栽培初期の菌量の計測によるその圃場の黒根腐病の発生リスクを推測

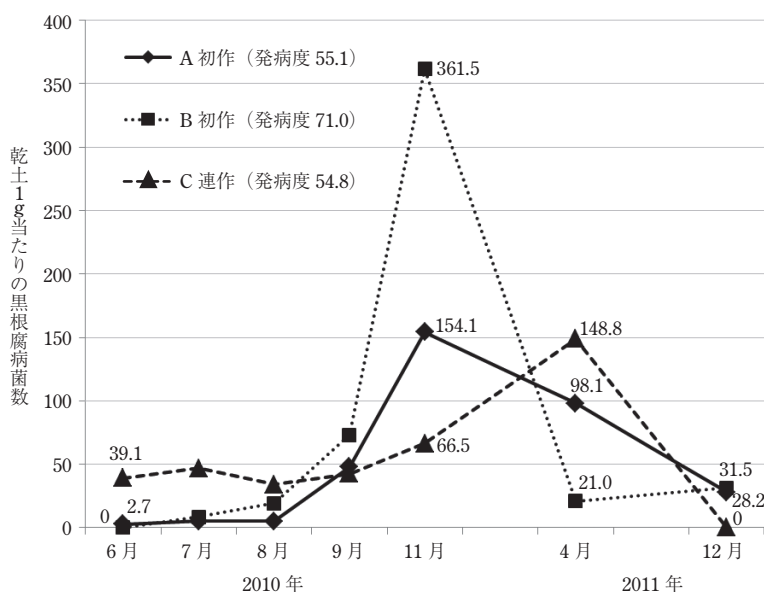


図-3 土壌からの黒根腐病菌検出数の推移

することが困難であるものと考えられる。一般に連作圃場では黒根腐病の発生は甚大化する、とされている（西ら、1999）が、今回の結果から、連作圃場土だけでなくダイズ初作圃場においても菌数が爆発的に増加する可能性があることが明らかである。また、水稻を1作しても多数の黒根腐病菌が検出され、西ら（1999）の、黒根腐病は1年程度の短期間の水田化では黒根腐病の発病程度はあまり低下しない、という報告を支持する結果となった。

おわりに

ダイズ黒根腐病は栽培期間中に目に見える病変は早期黄化程度のため、その発生に気づきにくい病害であり、現在も現地では湿害として判断されているなど、病害であるとの認識が非常に少ない病害である。しかし、転換畑ダイズ作が増加している現在、潜在的な発生面積は非常に大きいと考えられ、本病の発生生態の解明を通じて有効な対策が確立されることでダイズの収量は確実に増加するものと考えられる。

しかし、本病の発生生態にはいまだに不明な点が多い。例えばダイズを連作しても発病が見られない圃場がある一方、転換初作で激発する圃場があるなど、どのよ

うな条件で本病が多発するのか、また発生が少なくなるのかなど、今後も本手法や圃場調査等を組合せてデータを蓄積し、調査していく必要がある。

今回開発した特異的検出法は既報の手法と比べて *C. ilicicola* 菌を効率よく検出することが可能であり、加えて菌のコロニーは濃いオレンジ色に着色するため判別しやすい。しかし、いまだ検出時に混在する雑菌の量は多く、選択性は不十分であると考えられる。今後は手法のさらなる改良が必要である。

引用文献

- 1) 荒井義光ら (2010): 日作東北支部報 53: 47 ~ 48.
- 2) AWUAH, R. T. and J. W. LORBEER (1986): Phytopathology 76: 1202 ~ 1205.
- 3) GRIFFIN, G. J. (1977): Can. J. Microbiol. 23: 680 ~ 683.
- 4) KRIGSVOLD, D. T. and G. J. GRIFFIN (1975): Plant Dis. Rep. 59: 543 ~ 546.
- 5) 御園生 尹・深津量栄 (1970): 関東病虫研報 17: 34.
- 6) 仲川晃生・越智 直 (2006): 関東東山病虫研報 53: 13 ~ 21.
- 7) 西 和文ら (1999): 農業研究センター研究報告 30: 11 ~ 109.
- 8) OCHI, S. and A. NAKAGAWA (2012): J. Gen. Plant Pathol. 78: 147 ~ 150.
- 9) 越智 直ら (2013): 北日本病虫研報 (印刷中).
- 10) PHIPPS, P. M. et al. (1976): Phytopathology 66: 1255 ~ 1259.
- 11) ROWE, R. C. et al. (1974): ibid. 64: 1294 ~ 1297.
- 12) 相馬 潤・武田尚隆 (2002): 北日本病虫研報 53: 101 ~ 104.