

特集：果樹病原体の病原性検定法

ブドウ晩腐病の抵抗性検定

農研機構 果樹研究所 ブドウ・カキ研究領域 須 崎 浩 一

はじめに

ブドウ晩腐病は植物病原糸状菌 *Colletotrichum acutatum* (山本ら, 1999; 以下 C.a. と表記) および *Colletotrichum gloeosporioides* (MILHOLLAND, 1988; 以下 C.g. と表記) によって引き起こされるブドウの重要病害である。本病は収穫期、収穫後貯蔵中のブドウ果実を腐敗させる(図-1)ことから、大きな経済的被害を与える。春先に幼果に感染した病原菌は潜伏し、果実の成熟に伴い有機酸含量が低下し糖度が上昇すると初めて腐敗を引き起こす。腐敗果上には伝染源である分生子が形成され、二次的に感染してさらに被害を拡大する。伝染源である分生子は春先から収穫期まで飛散すること、またこの病気は雨媒で拡がっていくことから雨の多い年に発生が多く、殺菌剤散布だけでは防除が間に合わない場合がある。このため、果房が雨滴に当たらないようにブドウ棚上にビニールの屋根を設置する雨除け栽培や、袋掛けの際に袋の口を固く閉じること等が推奨されている。

今日、ブドウ栽培において省力化、低コスト化が求められるとともに、消費者からは化学農薬の使用量を減らした農産物を求める傾向が強まっており、農薬だけに頼らない晩腐病防除技術が求められている。抵抗性品種の利用は、こうした要望に応える一つの方法であり、本稿ではブドウ晩腐病の抵抗性検定に関連した最近の研究状況について紹介したい。

なお、最近の再同定の結果、ブドウから分離される *C. acutatum* は *C. fioriniae* として整理されているが(佐藤・森脇, 2013)、本稿では従来からの C.a. として扱うこととする。

I *Colletotrichum acutatum* に対する抵抗性検定

C.a. に対する抵抗性の差異については、すでに SHIRAIISHI et al. (2007) により報告されている。果樹研究所ブドウ・カキ研究拠点には 700 を超えるブドウ品種・育成系統が保存されているが、これらの晩腐病に対する抵抗性の差異についてはほとんどわかっておらず、このうちの 200 を超える品種・育成系統を対象に抵抗性検定

が行われた。また C.a. はベノミルなどの殺菌剤に元々抵抗性を有しており、晩腐病の防除上、問題になる可能性がある(佐藤, 1996)ため本菌に対する抵抗性検定が先行して行われた。

ここでは採取したブドウ果粒に分生子懸濁液を噴霧接種、発病果粒率から抵抗性の強弱を比較している。他のブドウ病害では一般的に米国系品種 (*Vitis labrusca*) は強く、欧州系品種 (*V. vinifera*) は弱い、C.a. に対して国内で栽培されている品種については以下のような結果となった。

- ・特に強い品種として、‘白南’、‘巨峰’、‘マスカットベリー A’、‘シャインマスカット’、‘スチューベン’、‘翠峰’等
- ・強い品種として、‘コンコード’、‘デラウェア’等
- ・弱い品種として、‘ナガノパープル’、‘ナイアガラ’、‘ソースブラック’、‘オリエンタルスター’、‘ルビーオクヤマ’等
- ・特に弱い品種として、‘安芸クイーン’、‘カベルネ・ソービニオン’、‘ダーククリッジ’、‘藤稔’、‘ゴルビー’、‘ハニービーナス’、‘甲斐路’、‘甲州’、‘メルロー’、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’、‘ネオマスカット’、‘ピオーネ’、‘ロザリオビアンコ’等。

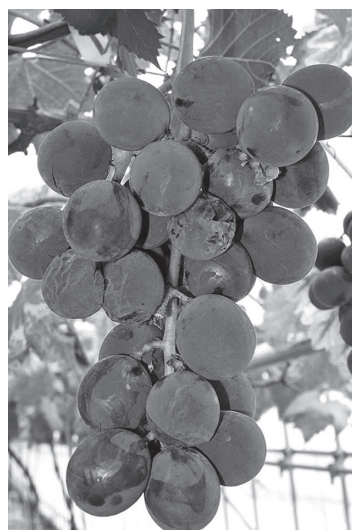


図-1 ‘ピオーネ’果実に生じた晩腐病

抵抗性を示すものの多くは、米国系品種と欧州系品種との交雑種（欧米雑種）と考えられ、罹病性の品種には多くの欧州系品種が含まれていた。その一方で欧州系品種でも‘白南’や‘カッタクルガン’は強い抵抗性を有することが明らかになった。これらは果樹研究所が育成し、現在普及が進んでいる良食味品種の‘シャインマスカット’の祖先にあたり（山田ら, 2008）, ‘シャインマスカット’も晩腐病に対して強い抵抗性を有していた。

果樹研究所では欧米雑種同士、あるいは欧米雑種に欧州系品種を掛け合わせて優良品種の育成を目指している。C.a. に対しては、この網羅的な調査によって‘シャインマスカット’およびいくつかの系統が今後、晩腐病抵抗性育種の素材として期待できることが明らかにされた。

C.a. に対する抵抗性の遺伝様式は全くわかっていないが、交配来歴の明らかな系統から、おそらくポリジーン支配ではないかと予想されており、詳細の解明には今後の解析を待つ必要がある。

II *Colletotrichum gloeosporioides* の分生子形成法の改良および本菌に対するブドウの抵抗性検定

C.g. は培地上で分生子を比較的作りやすいことから、これまで実験室内での形成方法について特に工夫はされてこなかったようである。深谷（1995）によれば、ジャガイモ煎汁デキストロース寒天（PDA）平板培地上に菌叢片を移植後、25℃で2～3週間培養すると菌叢面に鮭肉色の分生子が同心円状に多数形成、また胞子形成に光条件を特に必要としないとされている。

しかし、実際には分生子の形成は菌株や培養条件によ

って差があると思われる。筆者はあるブドウ生産県の試験研究機関から「実験に常用している C.g. の分生子が思わしくないの、なにかよい方法はないだろうか？」との相談を受け、これを契機に C.g. を対象に効率的に胞子形成可能な改良法の開発を試みた（SUZAKI, 2011）。

1 培地の種類の検討

前述の深谷（1995）の方法では PDA 培地が用いられていたことから、まず PDA 培地上での分生子形成を試みた。菌株は長野県および山梨県のブドウから分離された C.g. 菌株（長野株-1, 山梨株-1 および 2）を用いた。それぞれの菌株の含菌寒天片を PDA 培地に接種、室温実験台上で培養し培地上に形成される分生子数を計数した。

この結果、PDA 培地では分生子の形成数にかなりのばらつきがあった（図-2）。長野株-1 では反復すべてのシャーレで胞子形成が見られたが反復間でかなりの差があり、山梨株-2 では反復中に全く胞子形成が見られないものがあり、PDA 培地上での分生子形成は不安定と考えられた。

ところで、オートミールを含む培地上では種々の糸状菌の胞子形成が促進されることが知られている（Cook and Jones, 1970; KAISER, 1973; 生井・山中, 1983; NAMAI and YAMANAKA, 1985）。そこでオートミール寒天培地と PDA 培地で分生子の形成数を比較した。オートミール寒天培地は市販のものを使用し、併せて分生子形成に最適なオートミール濃度についても検討した。

オートミール寒天培地は製造元の処方通りに作製したもの、製造元処方の 10%, 15% および 20% に希釈したもの（寒天は追加して元の処方と同じ濃度になるように

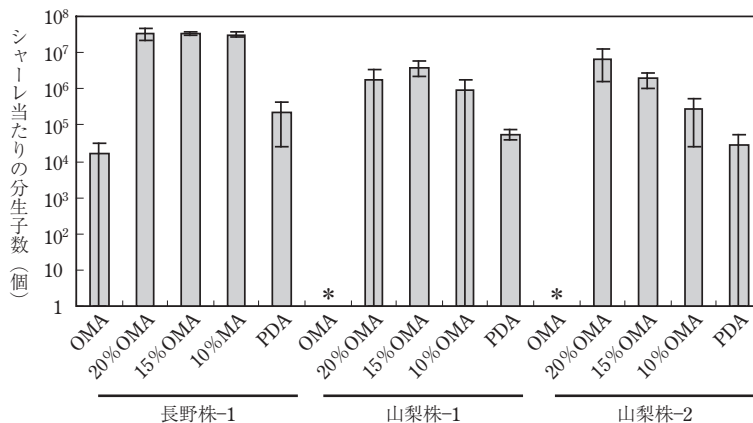


図-2 晩腐病菌分生子形成に適した培地の検討

OMA: オートミール寒天, PDA: ジャガイモ煎汁デキストロース寒天.

*はその処理において分生子形成がなかったことを示す. バーは標準誤差 (n = 10).

調整した)を準備し、各菌株の含菌寒天片を接種した。

この結果(図-2), 処方通りに作製したオートミール寒天培地では分生子が形成されないか(山梨株-1および2), あるいは形成されても反復間での差が極端に大きく(長野株-1), 分生子形成には不適当と考えられた。これに対し, 希釈オートミール寒天培地では山梨株-1は10%希釈区と20%希釈区において分生子形成が不安定であったものの, 山梨株-2, 長野株-1のどちらも分生子数はPDA培地および処方通りに作製したオートミール寒天培地を上回った。このことから晩腐病菌の分生子形成には, 元の処方に対し15~20%程度に希釈したオートミール寒天培地が適していると考えられた。

2 培地への接種方法の検討

先の実験から希釈オートミール寒天培地が晩腐病菌の分生孢子形成に適していると考えられたが, 山梨株-1のように菌株によっては希釈オートミール寒天上でも分生子形成が不安定な場合が見られた。ところで, インゲンマメ炭疽病菌(*Colletotrichum lindemthianum*)の場合, 1個の含菌寒天片を移植するよりも細断した含菌寒天片を培地一面に移植すると孢子形成が促進されることが知られている(石川, 1995)。そこでC.g.についても平板培地への接種源として含菌寒天片を使用した場合と, あらかじめ液体培地中で培養した菌糸塊をホモジナイザーで破碎したものを使用した場合で, 分生子形成量に違いがあるかどうかを検討した。

C.g. はジャガイモ煎汁デキストロース液体(PDB)培地中で1週間静置培養し, 白色綿毛状の菌糸塊を形成さ

せた。菌糸塊は培地ごとホモジナイザーで破碎, 少量の破碎液を平板培地に滴下し全体に塗り拡げた。その後1週間程度, 室温で培養し分生子の形成を待った。

この結果(図-3), 供試したいずれの菌株についても含菌寒天片を接種源とした場合に比較して菌糸塊破碎液を接種源とした場合に, より多くの分生子を得ることができた。また, 反復間での分生子形成数にばらつきは少なく安定的に分生子を得ることができた。

3 培養条件の検討

晩腐病菌の分生子形成実験は室温実験台上で培養を行っていた。日照時間が短く気温が低下する秋期は, 分生子形成が夏期に比較して劣るようになってきた。そこで菌糸塊破碎液を接種後の光条件および温度条件について検討を行った。温度条件は10℃と25℃の二通り, 光条件は24時間暗黒下と昼光色蛍光灯24時間照明下の二通りを設定し, 分生子が効率的に形成される条件を探った。

この結果(図-4), 山梨株-2では培養温度25℃で光条件に関係なく分生子が多量に形成された一方, 長野株-1および山梨株-1では25℃, 照明下で最も多量の分生子が形成された。このことから, 菌株間差はあるもののC.g. は生育適温下で光を照射することによって, より多くの分生子が得られると考えられた。

以上のような条件検討を踏まえたC.g. の分生子形成法(図-5)および培地上での分生子形成の状態(図-6)を示した。さらにこの方法がC.g. の他のブドウ分離株にも適用可能かを示した結果が図-7である。C.g. の安芸津株では従来法(PDA培地に含菌寒天片を接種する

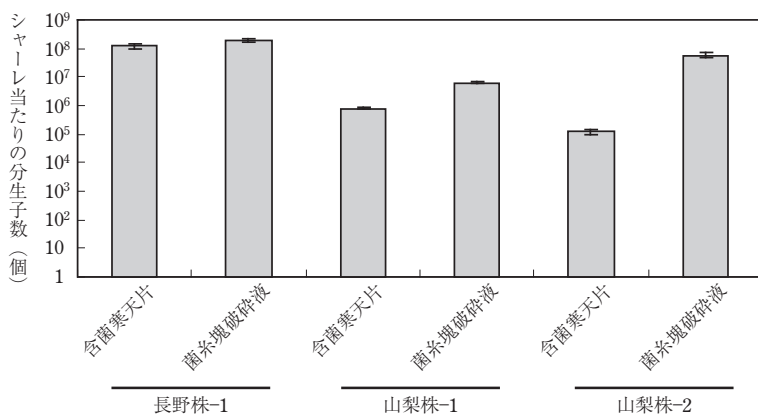


図-3 接種源の違いが希釈オートミール寒天培地上での分生子形成に及ぼす影響
それぞれの菌株について, 含菌寒天片と菌糸塊破碎液を接種した場合の分生子形成数を比較した。

バーは標準誤差 (n = 10). 各菌株につき処理間に統計的な有意差あり (p < 0.05).

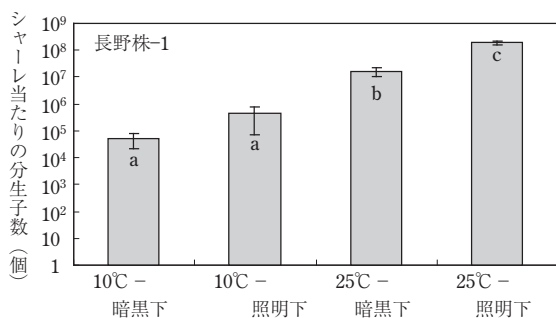


図-4 光および温度が分生子形成に及ぼす影響

温度条件、光条件を変えて分生子形成に最適な条件を探った。*はその処理で分生子形成がなかったことを示す。

バーは標準誤差 (n = 5)。また同一小文字は処理間で統計的な有意差がないことを示す ($p < 0.05$)。

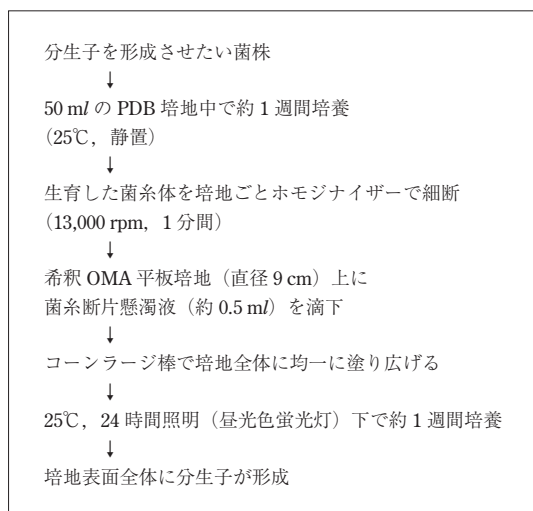
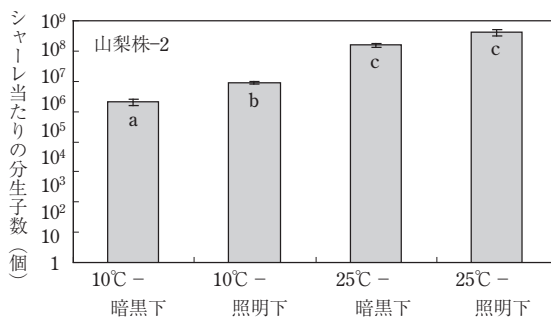
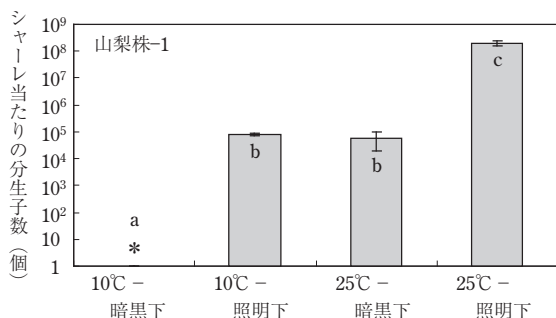


図-5 晩腐病菌分生子形成の改良法の流れ



図-6 改良法で培地表面全体に形成した鮭肉色の分生子

方法)と改良法(希釈オートミール培地の表面全体に少量の菌糸塊破砕液を接種する方法)で分生子形成量に差は見られなかったが、他の菌株ではいずれも改良法でより多くの分生子を安定的に得ることが可能となった。

4 C.g. に対する抵抗性検定

先に紹介した SHIRAIISHI et al. (2006; 2007) による C.a. に対する網羅的な抵抗性検定、および上述の C.g. の効率的な分生子形成法を踏まえて、筆者は現在、ブドウ主要

品種の C.g. に対する抵抗性検定を実施中である。

抵抗性検定には国内の主要品種である、‘サニールージュ’、‘安芸クイーン’、‘巨峰’、‘ハニービーナス’、‘シャインマスカット’、‘翠峰’、‘ピオーネ’、‘甲州’を用い、接種に最適な時期を探るためにベレーゾン期(成熟に伴い果粒が軟化し始める時期)を基準に10日間隔で果実を採取して検定に用いた。接種源として果樹研究所ブドウ・カキ研究拠点内ブドウ圃場で分離された C.g. を用い、分生子懸濁液噴霧接種した。接種後の果粒は大型シャーレに入れ1週間、実験室内で培養した。発病の指標としては発病果粒率および発病度を用いた。また果粒に含まれる有機酸の含量も果実の採取ごとに測定した。

抵抗性を評価する指標として発病果粒率で比較した場

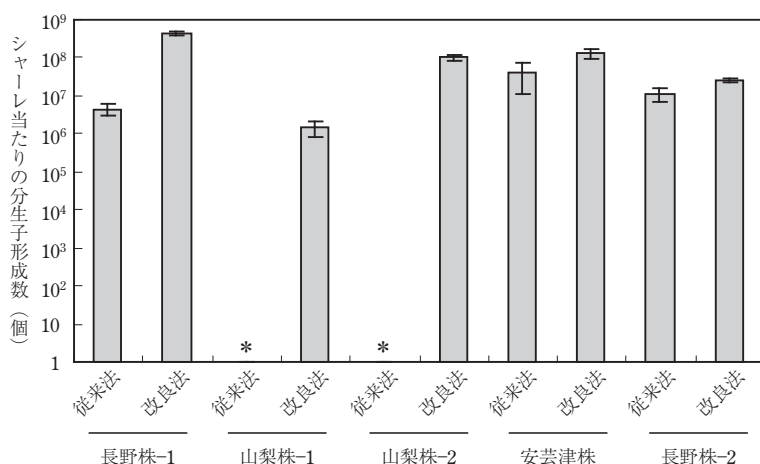


図-7 従来法と改良法における分生子形成数の比較

従来法（含菌寒天片-PDA培地）と改良法（菌糸塊破砕液-希釈オートミール培地）で分生子形成数を比較した。

*はその処理によって分生子形成がなかったことを示す。

バーは標準誤差（n = 10）。安芸津株以外は、処理間に統計的な有意差あり（ $p < 0.05$ ）。

合、‘シャインマスカット’以外の品種では、ベレーゾン以降急激に発病果粒率が上昇し100%近くに達したため、品種間差異を比較することが困難であった。一方、発病度で比較した場合は、ベレーゾン直後から収穫期まで発病程度の低い品種から高い品種まで分離し、品種間での強弱が比較可能と考えられた。しかし収穫期近くになると、いずれの品種でも発病度が上昇することから、抵抗性の比較にはベレーゾンからその後30日程度までが適当と考えられた。SHIRAISHI et al. (2006)は抵抗性検定には満開後70～80日くらいの間が適切としているが、ベレーゾン以降30日までの範囲はSHIRAISHI et al. (2006)が明らかにした期間に含まれると考えられる。なお品種の有機酸含量と抵抗性の強弱の間に相関関係は見られなかった。

用いた品種の抵抗性を比較すると、強いものから順番に、‘シャインマスカット’>‘甲州’>‘翠峰’、‘ハニービーナス’、‘サニールージュ’>‘巨峰’、‘ピオーネ’>‘安芸クイーン’となった。C.a.に対する抵抗性検定の結果と比較すると、いずれの病原菌に対しても‘安芸クイーン’は弱く‘シャインマスカット’は強いというように抵抗性の程度が一致する場合があった一方で、C.g.に対して‘巨峰’は比較的弱く（C.a.に対しては特に強い）、‘甲州’は強い（C.a.に対しては特に弱い）といったように抵抗性の程度が一致しない場合もあり、品種によってはC.a.とC.g.に対する抵抗性の程度が異なる場合もあることが予想された。今後、同一条件下で比較を行うなど

再検討が必要と考えられる。

おわりに

果樹類の品種育成には長い年月を要することから、果樹研究所では各種形質に関連したDNAマーカーを開発するとともに、これを利用した効率的な育種を推進している。先に述べたように、晩腐病抵抗性の遺伝様式は全くわかっていないが、今後、ブドウ品種・系統の抵抗性の強弱が精査され、晩腐病抵抗性に関連したDNAマーカー開発および抵抗性の新品種育成につながることを期待している。

引用文献

- 1) COOK, B. M. and D. G. JONES (1970): Trans. Br. Mycol. Soc. **54**: 221～226.
- 2) 深谷雅子 (1995): 作物病原菌研究技法の基礎—分離・培養・接種—, 大畑貫一 編, 日本植物防疫協会, 東京, p. 257～258.
- 3) 石川成寿 (1995): 同上, p. 101～102.
- 4) KAISER, W. J. (1973): Mycologia **65**: 444～457.
- 5) MILHOLLAND, R. D. (1988): Compendium of Grape Diseases, Pearson, R. C. and A. C. Goheen Eds, APS Press, St. Paul, MN, USA, p. 23～24.
- 6) 生井恒雄・山中 達 (1983): 日植病報 **49**: 274～276.
- 7) NAMAI, T. and S. YAMANAKA (1985): Tohoku J. Agric. Res. **35**: 69～79.
- 8) 佐藤豊三 (1996): 植物防疫 **50**: 273～280.
- 9) ———・森脇文治 (2013): 同上: 113～120.
- 10) SHIRAISHI, M. et al. (2006): J. Japan Soc. Hort. **75**: 264～266.
- 11) ——— et al. (2007): Vitis **46**: 196～200.
- 12) SUZAKI, K. (2011): J. Gen. Plant Pathol. **77**: 81～84.
- 13) 山田昌彦 (2008): 果樹研報 **7**: 21～38.
- 14) 山本 淳ら (1999): 日植病報 **65**: 83～86.