

特集：果樹病原体の病原性検定法

## ブドウ黒とう病菌の分生子形成および接種方法

農研機構 果樹研究所 ブドウ・カキ研究領域 <sup>こう</sup>河 <sup>の</sup>野 <sup>あつし</sup>淳

## はじめに

ブドウ黒とう病(図-1)は日本国内でも古くから問題とされてきたが、雨よけ栽培や防除薬剤の改良により近年の被害は大きくない。しかし、典型的な雨媒伝染性の病害である本病は、降雨の多い地域では現在でも被害が生じうるうえ、集中豪雨の増加などに代表される地球温暖化に対応するため、また消費者および生産者共通のニーズである減農薬へ対応するためには、長期的には抵抗性品種の育成が不可欠である。

本稿では、実生集団あるいは既存の品種系統の抵抗性を評価することを目的とし、技術的な側面について詳細に記した。以下に示すのは筆者が行っている手法であり、あくまで一例に過ぎない。各研究者の研究環境や目的により適宜改良していただきたい。ただし、必須であると考えられるポイントについては、その都度その必要性について明記した。

## I 人工培地上でのブドウ黒とう病菌分生子の形成手法

黒とう病菌は罹病葉からの分生子単離は比較的容易であり、ジャガイモ煎汁寒天培地(PDA)などの人工培地上で容易にコロニーを形成する。他の多くの糸状菌とは異なり、黒とう病菌は人工培地上で菌糸を大きく広げることはなく、コンパクトな小さなコロニーを形成する(図-2)。しかし、人工培地上のコロニーから分生子を大量に得ることは容易でなかった。そこで、筆者らは黒とう病菌コロニーを大腸菌や酵母のように水中で振盪培養したところ、分生子形成がなされることを見いだした(Kono et al., 2009)。現在は手法をさらに改良し、より簡便に高濃度の分生子懸濁液を得られるようになっている。本稿では、スモールスケールとラージスケールの二つの形成法に分けて詳細に説明する。

## 1 スモールスケールでの黒とう病菌分生子形成法

## (1) 準備

用いる人工培地は1/10 PDA培地(蒸留水200 ml,

The Method for the Preparation and the Inoculation of Conidial Suspension of Grapevine Anthracnose. By Atsushi KONO

(キーワード: ブドウ, 黒とう病, 分生子形成, 抵抗性評価)

Potato Dextrose Broth (Becton Dickinson) 0.48 g, 寒天(和光:植物培養用)4 g)である。オートクレーブした培地を9 cmの使い捨てシャーレに流し込み、平板として用いている。よく用いられるBacto Agar (Becton Dickinson)は分生子形成を阻害するため用いない。Becton Dickinsonから市販されているPotato Dextrose



図-1 ブドウ黒とう病の圃場での病徴(品種‘リザマート’)  
左: 茎頂の枯死。  
右: 葉における病斑。典型的な病斑では病斑中央部に穴が開く。

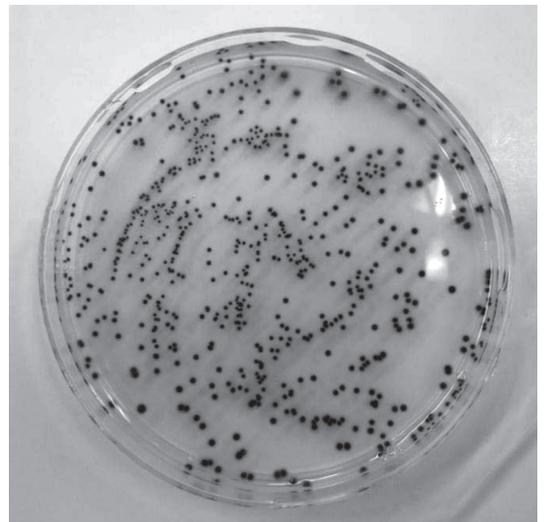


図-2 1/10PDA培地で培養10日目の黒とう病菌一つ一つが独立の分生子由来するコロニーであり、菌糸が培地全面に進展することはない。ラージスケールでの分生子形成にはこの程度のコロニー密度のプレートを用いる。

AgarはBacto Agarを含むので使用しない。これ以外には、滅菌した蒸留水、白金耳（白金部位が直線状のものを、先端の1 mm程度を直角に曲げておく）、振盪培養可能なシェーカー（TAITEC社製など）、暗黒条件下で培養可能なインキュベーターなどのごく一般的な備品が必要である。

## （2）前培養

−80℃に保存したフリーズストックの一部をかき取り1/10 PDA培地に植菌する。植え継ぎなどで既に分生子懸濁液が得られる場合は、 $1 \times 10^3$  個/mlの懸濁液を50～100  $\mu$ l プレーティングすることでプレート当たり20～50コロニーが生じるように植菌する。分生子懸濁液を用いて前培養を始める場合、本培養時間があまり長くない（約8時間以内）ものを用いる。一晚培養したものや調整後に4℃保存しておいたものを使うと、分生子形成能が低くなる。前培養はインキュベーターを用いて、24℃暗黒下で行う。ただし、黒とう病菌分生子形成に光は関与しないので、光条件に細かく気を遣う必要はない。

平板培地上では、外観が酵母に似たコロニーが生じる（図-2）。通常の糸状菌のように、プレート全体に広く菌糸が伸びることはなく、次第に盛り上がった山形で赤色のコロニーを作る。培養4日以前のコロニーは小さすぎて肉眼では見えない。培養後5日程度のコロニーからは分生子が得られるが少ない。その後、培養10日に至ってもかなりの分生子形成能を維持しているが、培地のコロニー密度が低いと次第にコロニーが巨大化するので、以下に示す本培養方法で扱うには大きくなりすぎる。

## （3）本培養

200  $\mu$ lの滅菌水を加えた2 mlチューブに、1週間程度前培養したプレートから10個程度のコロニーを白金耳で取り上げる。酵母とは異なり、黒とう病菌コロニーは培地に固着しているので、培地ごとかきとる。直線状の白金線の先端を直角に曲げた白金耳を用い、培地はなるべく取らないようにしてコロニーを単離し、用意した滅菌水中に入れる。

24～26℃、暗黒下で振盪培養する。振盪方法は往復振盪とし、回転数は150 rpm程度で行う。あまりに激しく往復振盪すると、コロニーの菌糸が物理的に破壊され、懸濁液中に大量に混ざってしまう。こうした懸濁液を再度前培養に用いると、その後の本培養での分生子形成が悪くなるので、本培養の際には懸濁液中に菌糸が混ざらないようなマイルドな振盪での培養を行う必要がある。

培養2～3時間程度で、懸濁液中に分生子が観察され始める。植え継ぐだけであれば、この程度の時間でよい。その後、培養8時間以内に分生子濃度は極大に達し、こ

れ以上培養する必要はない。

こうして $10^6 \sim 10^7$  個/ml程度の濃度の分生子懸濁液を約150  $\mu$ lは得ることができる。ブドウ接種試験には $10^3 \sim 10^4$  個/mlの懸濁液を用いればよいので、切葉への接種などの小規模なブドウ接種試験であれば、本法で得られる懸濁液を用いることで十分である。また、筆者は黒とう病菌の継代には常に本法による分生子懸濁液を用いている。

黒とう病菌は大腸菌や酵母と同様に−80℃で保存が可能である。筆者は4年前に作成したストックを用いて問題なく培養を開始できている。保存する場合は分生子懸濁液に終濃度20% (v/v) グリセロールを添加し、 $1 \times 10^6$  個/mlの濃度で保存している。この程度の高濃度にするので、平板培地で培養を開始した際に十分な数のコロニーを確保できる。

## 2 ラージスケールでの黒とう病菌分生子形成法

圃場での接種試験や、実生を用いた幼苗検定等の大規模な接種が必要となる場合、スモールスケールの培養で得られる懸濁液では分生子量が不十分な場合がある。そこで、次に大量かつ簡易に懸濁液を得る手法について紹介する。

### （1）準備

スモールスケールの場合と同様、1/10 PDA培地を用いる。ラージスケールでの培養に温度管理のできるシーソー振盪可能な機器（ハイブリオープンなど）を用いている。

### （2）前培養

スモールスケールでの培養により得られた分生子懸濁液を $1 \times 10^4$  個/mlに希釈し、1/10 PDA平板培地に100  $\mu$ l植菌する。これにより、9 cmプレート当たり、コロニー数が500～1,000個程度となる（図-2）。前培養は24℃暗黒下で10～18日程度行う。

### （3）本培養

前培養した平板培地に10 mlの滅菌水を直接加える。パラフィルムを用いてシャーレを封じる。30℃暗黒条件下でシーソー振盪によりゆっくりと培養を行う。培養4時間程度で十分な分生子形成が見られる。図-3に示した通り、前培養7日では得られる分生子濃度は高くないが、11日以降であれば高濃度の分生子懸濁液を容易に得ることができる。本法で行う限り、培養せずとも水を加えるのみ（培養0時間）で懸濁液を得ることができるが、筆者は形成直後のフレッシュな分生子を多く含む培養2時間以降の分生子懸濁液を接種試験に用いている。本法で $10^6 \sim 10^7$  個/ml程度の濃度の懸濁液が8 ml程度得られる。

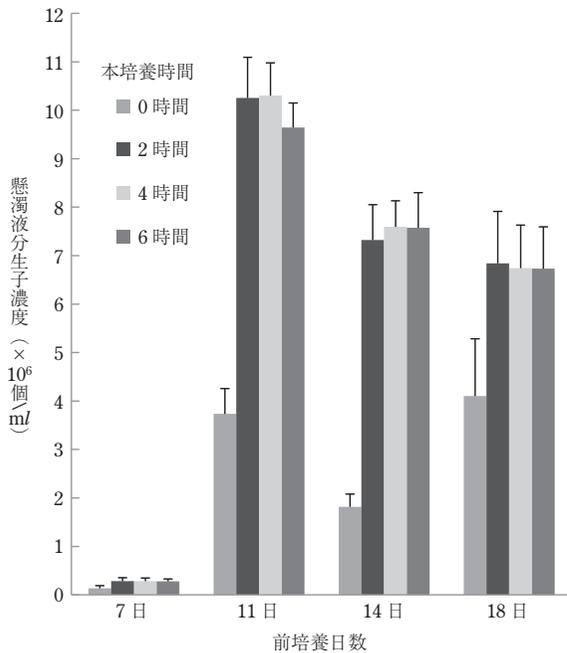


図-3 ラージスケールでの分生子形成

40枚の1/10 PDA培地に黒とう病菌懸濁液 ( $1 \times 10^4$  個/ml) を100  $\mu$ l 植菌し、前培養7, 11, 14, 18日後にそれぞれ10枚の培地を用いてラージスケールでの分生子形成を行った。本培養0, 2, 4, 6時間後に各10枚のプレート上の懸濁液の分生子濃度を測定した。

以上の実験を2回繰り返す。各前培養日数での本培養時間ごとの懸濁液分生子濃度の平均値と標準誤差を示した。

## II ブドウ黒とう病の接種方法

黒とう病を発病させるうえで特に重要なことは、よく伸長しているブドウ個体を供試することである。伸長が停止し始めた葉では黒とう病抵抗性が上昇しており、展開を停止した葉は、罹病性品種であっても全く発病しない。ただ、接種に適した伸長途上の植物体を用意することは、実際はかなり気を遣う作業である。そこで、まずブドウ実生と挿し木苗の作製・維持管理手法について簡潔に述べ、その次に切葉へ接種する手法と、苗全体に接種する手法に分けて説明する。

### 1 ブドウ実生と挿し木苗の作製・維持管理手法

筆者は幼苗・挿し木苗の準備から接種まで一貫して、密閉温室内で管理を行っている。密閉温室のほうが生育環境をなるべく一定にすることが容易であり、各種の病虫害の防除が少なくて済む。

交雑実生群は種子から得られる幼苗1個体を供試するしかないが、既存の品種系統を供試する場合は、複数の挿し木苗を作り、苗を反復として接種試験を行う。また、抵抗性の知られている品種あるいは比較したい品種の挿

し木苗も用意し、同時に接種することが重要である。抵抗性品種としてはデラウェア、中程度抵抗性の品種としては巨峰、罹病性の品種としてはリザマートを筆者は用いている。その他の手に入れやすい罹病性品種としては赤嶺(甲斐路)が挙げられる。

### (1) 実生苗の作成・維持管理手法

播種に用いる土は、滅菌していない肥料分を含んだ培養土でも可能である。ただし、発芽後は加湿になると立枯れたり、発根直後に腐敗したりしやすいので注意が必要である。特に低温でその傾向が強いので、日中のみ中途半端に気温の高くなる無加温温室での播種は避け、25℃程度まで加温するか、十分に気温の高くなった時期に播種する。

セルトレイへの播種後、本葉が展開するようになれば移植が可能である。筆者は20 × 60 cm サイズのプランタに、2列5個体(計10個体)を定植している。ブドウは根域が限られていても灌水さえ十分に行えば非常に旺盛に生育する。

発芽直後を除けば、ブドウは土壌の乾湿に強く、管理は容易である。接種にはよく伸長している個体が望ましいので、灌水は頻繁に行う。筆者は自動灌水を利用している。十分に根付くと急速に伸長するので、早いうちに支柱を立て誘引する。市販の培養土を用いる限り接種までに施肥は必要ないが、必要に応じて液肥を施用し伸長が止まらないように注意する。

### (2) 挿し木苗の作成・維持管理手法

冬季に穂木をとる場合、なるべく充実した穂木をとる。温室内で挿し木する限り、挿し穂は一芽(一芽挿し)で十分である。筆者はセルトレイにミックスピートBM-1を充てんしたものを挿し木床に用いている。セルトレイはバットに入れ腰水管理し、下からプレートヒーターにより温床(25℃設定)を行う。温床をすることで発根が促進され、挿し木苗の育成期間が顕著に短縮されるので必ず温床をする。バットは下から1 cm 程度のところに穴を開け、それ以上水が入らないようにする。晴天の温室内は非常に乾燥が早いので、自動灌水で1日1回あるいは2回灌水を行う。こうした腰水管理でも毎日灌水する限り根腐れすることはない。

早いものでは挿し木後20日程度で発芽して複数枚の葉が展開する。ある程度本葉が展開し、根がセルトレイ内で十分に伸長したものをポリポットに植え替える。セルトレイの場合と同じく、底面からの自動灌水を行う。早いものでも旺盛に伸長するまでには挿し木後2か月程度はかかるので、接種の日程を考慮したうえで挿し木を開始する。

### (3) 病害虫管理

安定した評価結果を得るには、接種する植物が病害虫に侵されていないものを用いることが望ましい。密閉温室内で問題となりうるのはブドウうどんこ病とダニ類である。うどんこ病に登録のある薬剤は、残念ながら黒とう病にも登録がある場合が多く、接種前に用いることはできない。そのため、発病が始まったら炭酸水素カリウム水溶剤（商品名 カリグリーン）などの明らかに黒とう病菌には効果がないと予想される剤で対応する。ただし、こうした薬剤は治療効果しかなく予防はできないので、発生後は頻繁に散布する必要がある。

ダニ類では特にハダニ類（カンザワハダニなど）が出やすく、ホコリダニ類（チャノホコリダニなど）も発生する場合がある。後者のほうが影響はより深刻であり、発生初期から茎頂や若い葉の枯死を引き起こすため、抵抗性評価が不可能になる。黒とう病への影響はあまりないと考えられるダニ剤で対応できるが、天敵製剤を利用するのが最も望ましい。筆者はミヤコカブリダニ剤（商品名 スパイカル EX）を用いることで、ダニ類の発生を抑えている。

## 2 ブドウ切葉への接種および評価方法

### (1) 切葉の準備

温室内で生育させたブドウから葉身縦径が3～6 cmの伸長途上の葉（展開第2, 3葉程度）をサンプリングし、0.5% (W/V) 寒天培地に葉柄部分を挿し、接種用の切葉とする。筆者は直径12 cmのガラスシャーレを用いて寒天培地を作成している。接種直後を除き、シャーレをパラフィルムなどで密封する必要はないが、内部の湿度が非常に高い状態（シャーレ内での結露が見られる状態）で維持できるようにする必要がある。湿度さえ保つことができれば、こうした切葉の状態ではブドウ葉は非常に長期間（2週間以上）維持が可能である。ただし、ブドウ葉が各種の菌類や細菌でひどく汚染されている場合

はその限りではない。例えば、野外から採取した葉は、次亜塩素酸などで表面殺菌しても高湿度状態で容易に雑菌がコンタミネーションし、一週間も経たずに主に葉柄周辺から腐敗してしまう場合が多い。したがって、切葉試験を行うためには、降雨や土埃などに曝されて各種の菌類や細菌で汚染されないよう、密閉温室で育てたブドウ葉を準備することが必須である。

### (2) 接種および評価方法

一辺約1 cmのガーゼを用意し、葉上の2箇所を設置する。そこに $1 \times 10^3$  個/ml,  $5 \times 10^3$  個/mlの異なる濃度の黒とう病菌分生子を各25  $\mu$ l接種する。接種後の切葉は27°C恒光条件でインキュベートする。接種後2日間はシャーレごとビニール袋で覆うことで、ほぼ100%の湿度を維持する。インキュベーター内の光条件などでガーゼが1日以内に乾燥してしまうような場合は、シャーレ上に紙をかけて軽く遮光することなどにより対応する。接種条件を一定にするうえで、ガーゼの乾き方がシャーレごとに異なるのは望ましくないので、すべてのシャーレでガーゼ除去までガーゼが湿っているようにする。その後ガーゼを除去し、接種14日後までインキュベートする。

病徴を評価するため、筆者は病斑数と病斑径を調査している。病斑数は接種約6日後に $5 \times 10^3$  個/ml区に生じた病斑数を測定することで評価する。接種後あまりに時間が経つと病斑が融合してしまい、数を測定するのは難しくなる。病斑径は接種14日後の罹病葉の病徴画像を基に評価する（図-4）。具体的には、著しく融合して判別不能な病斑を除いて、可能な限り一つ一つの（一つの分生子由来の）病斑径（長径）を測定し、品種系統ごとの平均病斑径を求める。罹病性品種では病斑径が3 mm程度になるので、 $1 \times 10^3$  個/ml区で病斑径の判別可能な病斑を基に評価する。画像取得の際には、罹病葉をライトボックスに移し葉の裏面から光を当てつつデ

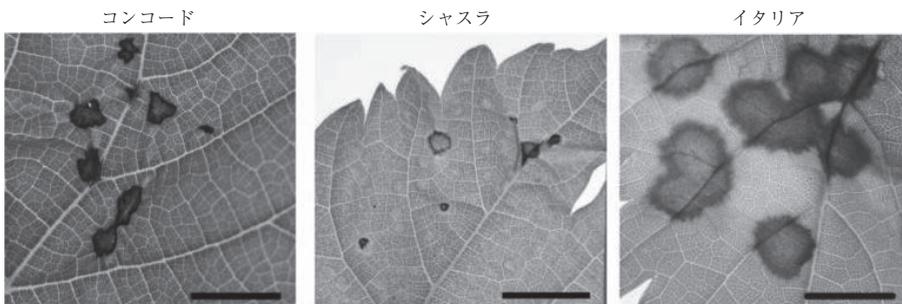


図-4 切葉接種後14日後の病斑例

バーは5 mm。欧米雑種ブドウのコンコード、ヨーロッパブドウのシャスラおよびイタリアの病斑例。同じヨーロッパブドウでも病斑径に明らかな差がある。

デジタルカメラで画像を記録する。ライトボックスによる照明なしでは、葉の健全部と病斑のコントラストの違いをカメラにより撮影することは難しい。筆者らはこのように病斑径と病斑数に分けて評価することで、ヨーロッパブドウの一部（図-4‘シャスラ’など）に病斑径を抑制するような一定の抵抗性を有する品種があることを見だしている（KONO et al. 2013）。

### 3 ブドウ苗全体への接種および評価方法

ブドウ植物体がよく伸長し、大半が支柱（約 50 cm）以上の高さとなったところを目安に接種を行う。1 × 10<sup>3</sup> 個/ml の濃度に希釈した黒とう病菌を 500 ml 用意し、市販のハンドスプレーを用いて植物体に接種する。これより高濃度の分生子懸濁液を接種すると、罹病性品種では病斑の著しい融合が起り、調査以前に罹病葉の枯死・脱落や茎頂の枯死が多く生じてしまい、調査が不可能になる。接種後は 70 l の市販のゴミ袋（0.035 mm 厚）でプランタごと覆うことで湿度を保ち、感染を成立させる。高温になるのを防ぐため、直射日光の当たらない場所に植物を移動させ感染させる。24 時間後に袋を外し温室内に搬入する。

4～5 日後には肉眼で病徴が確認される。ただし、罹病性個体と抵抗性個体の差を明確に見分けるには、接種後 2 週間程度は必要である。筆者は接種 14 日後に個体全体の病徴の達観評価、罹病葉位、全葉数、罹病葉数、茎に生じた病斑数を調査し、罹病葉をすべて回収してスキャナーにより画像データを保存している。対象品種とともに調査することで、抵抗性が対照品種と比較してどの程度であるか評価が可能になる。これらすべての項目の調査、画像取得には時間がかかり、一人が一日で調査できる個体数は約 80 個体である。分生子接種の際には、評価項目や内容の検討を行ったうえで接種個体数を決める必要がある。

達観評価基準としては、The International Plant Genetic Resources Institute による「Descriptors for Grapevine」（ウェブ上でダウンロード可能）の 9.2.7 項が挙げられる。黒とう病は世界的に研究が活発でないので利用例は把握していないが、ブドウべと病の抵抗性育種研究では、この Descriptor の基準は標準的なものとなっている。取得した画像データの解析には ImageJ という画像処理ソフトウェアを用い、共同研究をしている東京大学大学院新領域創成科学研究科の朽名夏鷹博士の作成したプラグインを用いている（図-5）。

### おわりに

筆者は主要な栽培品種を含む 100 以上の品種系統について、切葉を用いた接種法で抵抗性評価を行った（KONO et al., 2013）。その結果、供試したすべての品種系統が少なくとも一定程度の病徴を示した。これは、ブドウ黒

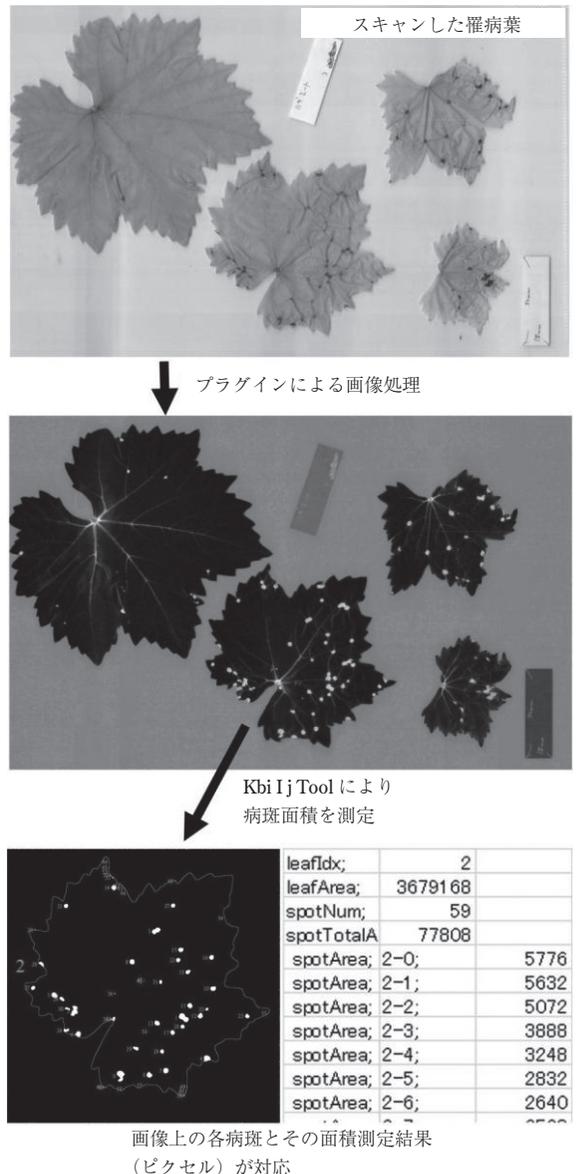


図-5 スキャンした罹病葉（品種‘リザマート’）画像および ImageJ による画像解析例

とう病を完全に抑制するような非常に強い抵抗性は、現在の栽培品種群に存在しないことを強く示唆している。そのため、黒とう病の抵抗性評価は定量的なものとならざるを得ない。本稿に示した手法を基に、できる限り一定の条件の下で抵抗性評価を行い、育種目標や各研究者の目的に応じて抵抗性、罹病性の判断を行う必要がある。

### 引用文献

- 1) KONO, A. et al. (2009): Plant Dis. 93: 481 ~ 484.
- 2) ——— et al. (2013): HortScience 48: 1433 ~ 1439.