

ナシ枝を利用したラッカセイ茎腐病菌 (*Lasiodiplodia theobromae*) 分生子の簡易な形成法

金子洋平・高野幸成・鈴木達哉*・牛尾進吾

キーワード：ラッカセイ、茎腐病、分生子、ナシ枝

I 緒 言

ラッカセイ (*Arachis hypogaea* L.) は千葉県における主要な特産作物であり、栽培面積5,300 haと全国の77%を占める (農林水産省, 2014) . しかし, 2012年8月に県内の海匝地域の現地圃場において, *Lasiodiplodia theobromae* (P-
atouillard) Griffon and Maublancによるラッカセイ茎腐病が多発し, 大きな問題となった (写真1 A, B) . 現場からは本病に対する早急な防除対策を求められているが, これを構築するためには試験を行うための汚染圃場が必要である. しかし, 未発病の圃場を均一な汚染圃場にするためには, 本病の感染源である分生子を大量に圃場に投入しなければならず, 前提として分生子を効率的に大量に形成する方法が

必須となる.

一般的な病害においても, 農薬の効果試験等に大量に必要なになるため, 有性孢子や分生子の形成法については供試培地や物理的刺激といった様々な方法が検討されている (堀田, 1999 ; 乃美・小林, 1999 ; 大畑, 1999) . 特に, 岸 (1995) は寒天葉片法によって何種類もの植物病原菌の分生子を形成できたことを報告している. また, 佐藤ら (1993) はメロン紅色根腐病菌 (*Pyrenochaeta terrestris*) の同定のために滅菌麦藁片で培養し, 孢子形成を成功させている. このように, 培養基質として分生子形成に適した植物組織があることが考えられる. そこで, 本病菌の柄子殻及び分生子を効率的に得るために, 培養基質となる植物組織を探索するとともに, 温度, 光条件を検討した結果, 形成法を確立できたので報告する.

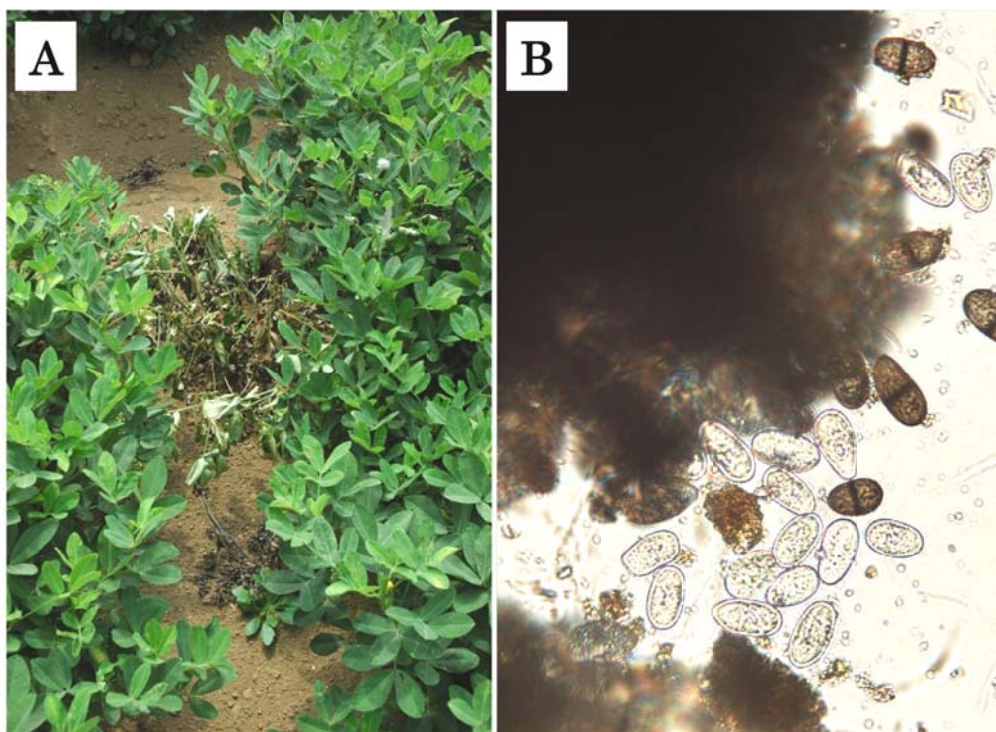


写真1 ラッカセイに発生した茎腐病

A: 現地圃場におけるラッカセイ茎腐病の発生の様子

B: 罹病組織に形成された分生子 (大きさは平均 $26.7 \times 13.5 \mu\text{m}$ (明日山・山中, 1953))

受理日 2014 年 8 月 4 日

* 現農林水産部担い手支援課

II 材料及び方法

1. 供試菌株

現地発病圃場（千葉県内）のラッカセイ罹病組織に形成した柄子殻を滅菌水に入れ、分生子懸濁液を調製した。これを素寒天（WA）平板培地に白金耳を用いて画線し、25℃で一晩培養した。発芽した分生子を倒立顕微鏡下で、柄付き針を用いて単孢子分離し、得られた菌株をLT2-1株とし試験に供試した。LT-2-1株はショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天（以下、PSA）またはブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天（以下、PDA）平板培地に移植し、試験に用いた。また、長期間使用しない場合は、PSA斜面培地で室温保存した。

2. 菌糸の生育温度試験

LT2-1株をPSA平板培地で前培養し、菌叢の先端部からコルクボーラーで打ち抜いた直径4 mmの含菌寒天を、菌叢面を下にしてPSA培地に置床し、5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40及び45℃、暗黒下で培養した。7日後、菌叢の直径を直交した2ヶ所で測定して平均し、菌糸伸長速度（mm/日）を算出した。各温度とも反復無しで調査した。

3. 分生子形成の光条件試験

LT2-1株をPSAまたはPDA平板培地に接種し、室内（概ね20～25℃、自然光下）あるいは25℃に設定した培養器内で、暗黒下及びBLB照射下で培養し、2～3週間後に柄子殻及び

分生子の形成の有無を確認した。各光条件とも反復無しで調査した。

4. 培養基質の探索

LT2-1分生子を形成する培養基質を探索するため、2012年9～10月において、以下に示す各植物組織に供試菌株（LT2-1）の含菌寒天等を接種し、2～3週間培養し、柄子殻及び分生子の形成の有無や程度を肉眼及び顕微鏡により適時観察した。

ナシ及びクワの太さ1～2 cmの一年生枝を15～20 cmの長さに切断し、束にしてガラスビーカー（φ110×H151mm）に立てて入れ、アルミ箔で蓋をし、オートクレーブ滅菌した（写真2 A, B）。これに含菌寒天を投入して、28℃暗黒条件下で培養した。概ね7～10日後（写真2 C），菌糸が完全に蔓延した直後に枝の束を外して1本ずつガラスビーカーの外に出し、自然光、室温下（約25℃）で2週間静置した（写真2 D）。その間、1～2日に一度、約30 cmの距離から霧吹きを用いて枝表面が湿る程度に水道水を散布した。

リンゴ及びマンゴー果実は炎熱滅菌した柄付き針で果実側面に付傷し、そこに約5 mm角に切り出した含菌寒天を密着させた。バナナ及びパパイヤ果実は果軸を切断し、その切断面に含菌寒天を密着させた。それぞれ果実ごとビニル袋に入れ、室温、自然光下に置いた。その後、菌糸の伸展がみられた後はビニル袋から出して自然光下で管理した。

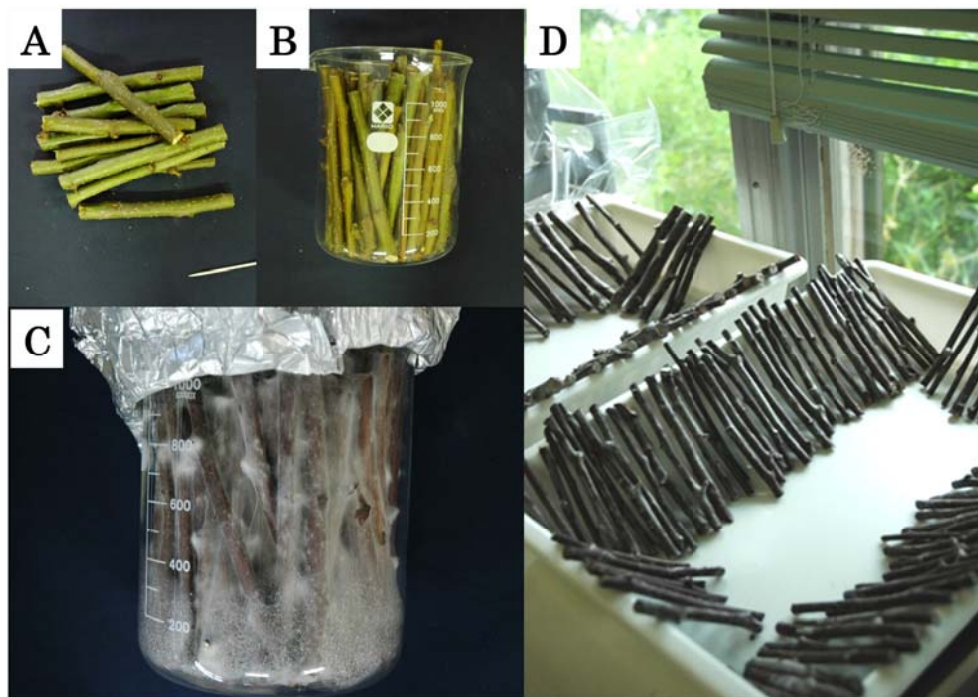
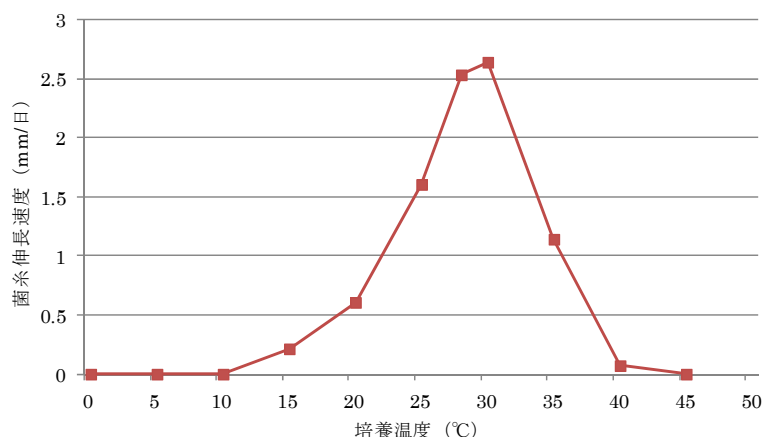


写真2 ラッカセイ茎腐病菌のナシ枝を用いた分生子形成手順

- A: 20 cm程度に切断したナシ枝（長果枝）
- B: ガラスビーカーに立てて詰め、アルミ箔で蓋をし、オートクレーブ滅菌する
- C: 含菌寒天接種後、28℃、暗黒下で7～10日間培養し、菌糸が蔓延した状態
- D: 自然光下で管理し、分生子の形成を誘起する



第1図 ラッカセイ茎腐病菌の温度別菌糸伸長速度

第1表 光条件がラッカセイ茎腐病菌の分生子形成に与える影響

培地	温度	光条件	分生子形成
PSA	25℃	暗黒	—
PSA	室温	自然光	—
PDA	25℃	BLB照射	±

注) ± ; 分生子形成がわずかにみられた
 — ; 分生子形成がみられなかった

リョクトウもやし及びさやえんどう未成熟莢はそれぞれガラスフラスコに入れ、アルミ箔で蓋をし、オートクレーブ滅菌後、含菌寒天を用いて接種し、室温、自然光下で管理した。ラッカセイ「おおまさり」種子については、園芸培土1号（日本肥料株式会社）にPS液体培地で培養した菌糸体を混合し、その上に無傷の種子を置いた。室温、自然光下で管理した。

Ⅲ 結果及び考察

1. 菌糸の生育温度試験

5～45℃で生育試験を行った結果、LT2-1株の生育温度は15～40℃、生育適温は概ね28～30℃であり（第1図）、明日山・山中（1953）の報告とほぼ一致した。以上から大量培養試験では、28℃で菌糸を蔓延させることとした。

2. 分生子形成の光条件試験

PSA 平板培地において、暗黒下及び自然光では柄子殻及び分生子の形成はみられなかった。一方、BLB 照射下では、両者の形成がわずかに認められた（第1表）。光条件について、Honda and Aragaki (1978)は *L. theobromae* において 520 nm 以下の波長域で分生子殻の形成が誘起され、さらに、分生子の成熟、噴出には 333 nm 以下の波長域が必要であることを報告している。このように、柄子殻及び分生子の形成には光、特に紫外線が必要であると推察される。他の病原菌でも光条件が重要な要因である報

告があり（本田・坂本, 1968 ; 本田・柚木, 1976）, 本報告における結果も、この傾向は矛盾しなかった。自然光にも紫外線が含まれるが本試験で分生子の形成はみられなかったのは、厚さ 0.05mm ポリスチレンの紫外線透過率（波長 253.7nm）が 0.5%であるため（内藤, 2012）, シャーレ（ポリスチレン製）内の菌体に照射される紫外線量が低下したためと推察された。野外のラッカセイ個体では自然光下で旺盛に分生子形成されていること、また、本報告では植物体を用いた大量培養を目的とすることから、BLB 照射のための器具を用いるよりも、できるだけ自然光に含まれる紫外線で孢子形成させることが合理的と思われる。

3. 培養基質の探索

分生子の形成に適した培養基質となる植物組織を探索した。マンゴー、ブドウ及びビワから分離された同種の菌では、リンゴ、マンゴー、バナナ、パパイヤ、ビワ及びカカオ等で柄子殻及び分生子が形成された報告がある（澤岬ら, 2013 ; 井上・那須, 2008 ; 矢口ら, 1999）。そのため本試験では、本来の宿主であるラッカセイ種子の他に、上記の植物体のうち手に入りやすかったリンゴ、マンゴー、バナナ及びパパイヤの果実を試験に供試した。また、手に入りやすいマメ科植物体であることから、リョクトウモヤシ、エンドウも供試した。さらに、完全世代がナシボトリオディプロディア枝枯病菌 (*Botryodiplodia*属) と同属であることや（大和, 1983）, クワでは同じ病原菌によ

第2表 各種植物組織上における接種方法と分生子形成の有無

接種植物	接種部位	接種方法	自然光照射	分生子形成
リンゴ	果実	針傷に含菌寒天を接種	接種直後	—
マンゴー	果実	針傷に含菌寒天を接種	接種直後	—
ラッカセイ	種子	含菌土壌中に播種	接種直後	+
バナナ	果実	果柄断面に含菌寒天を接種	接種直後	++
パイナップル	果実	果柄断面に含菌寒天を接種	接種直後	—
リュウクトウ	幼苗（もやし）	オートクレーブ後、含菌寒天を接種	菌糸蔓延後	—
エンドウ	未成熟莢	オートクレーブ後、含菌寒天を接種	菌糸蔓延後	—
ナシ	一年生枝	オートクレーブ後、含菌寒天を接種	菌糸蔓延後	+
クワ	一年生枝	オートクレーブ後、含菌寒天を接種	菌糸蔓延後	—

注) ++；旺盛な形成がみられた，+；形成がみられた，—；形成しなかった

る病害が報告されていることから、ナシ枝、クワ枝も供試した。その結果、供試した植物体で本菌を培養後、自然光下においたところ、ラッカセイ種子、バナナ及びナシ枝で柄子殻及び分生子の形成がみられた（第2表）。このことから、これらの植物体には本分離菌の分生子形成にとって必要な栄養素を含むものと推定された。一方、リンゴ、パイナップル、マンゴーでは自然光下で分生子の形成は認められ

なかった（第2表）。これは本分離菌と既報の *L. theobromae* とは寄生性が異なることによると思われる。

バナナは供試した植物体の中でも最も分生子形成が旺盛であったが、雑菌の混入や虫の食害が培養期間中から起こり易く、野外に設置する接種源として適さないと考えられた。ラッカセイ種子も旺盛な分生子形成がみられたが、培養基質として大量に準備するにはコストが高過ぎると

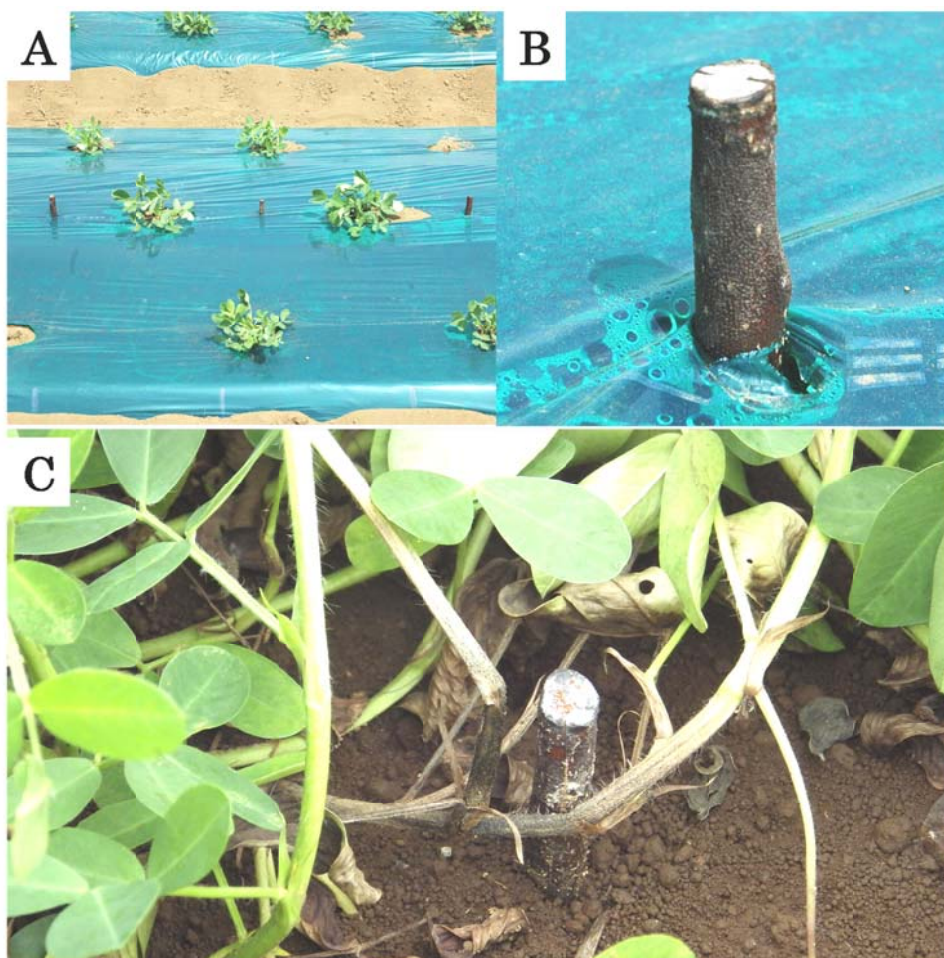


写真3 培養ナシ枝を接種源としてラッカセイ圃場に設置した様子

A: 培養ナシ枝を株間に等間隔に設置した状態

B: 設置した培養ナシ枝の拡大写真；柄子殻が旺盛に形成されている

C: 設置した培養ナシ枝に近接した茎で発病した個体

判断した。一方、ナシ枝については分生子形成はバナナには劣るものの、旺盛であり、果実や草本類の組織と比べ、培養過程で雑菌の混入が起こりにくかった。また、ナシ枝は本県では入手しやすく、コストが安いと、圃場試験の接種源用としても量を確保し易い。さらに、野外における耐久性にも優れると推察される。以上から圃場で利用できる大量の接種源を作製するためにはナシ枝が最適であると判断した。

4. ナシ枝を用いた分生子形成法及び留意点

以上の結果をもとに、ラッカセイ播種時期である5月上旬にナシ枝を用いた接種源を用意するための詳細な手順及び注意点をまとめた。

(1) 培養基質の準備、保存

一般にナシ栽培では、12月～翌2月に剪定を行うため、ナシ枝はこの時期に剪定枝として大量に手に入る。培養基質としてのナシ枝は新鮮な方が良いが、剪定枝は束にして、圃場に挿しておくことで3月中旬頃までは野外で大量に保存できる。特に、1年生枝を用いることで束にしやすかった。また少量ならば、枝の切り口を濡れ新聞紙で覆い、枝ごとビニル袋に入れ、4℃で保存することも可能である。

(2) 培養基質への接種及び培養

材料及び方法に記載したとおりにナシ枝を調整、滅菌し本菌を接種する。剪定枝の入手時期、ラッカセイの播種時期及び培養に必要な時間を勘案すると3月下旬～4月中旬頃が培養開始適期である。接種源の含菌寒天は予め前培養をした菌叢の先端部分を用いることで速やかに菌糸が蔓延するため、成功しやすい。気中菌糸は多湿条件で旺盛に形成されるので、伸展が遅い場合はガラスピーカーごとチャック付きビニル袋に入れると尚良い。ただし、酸欠を防ぐために一部分を開けておく。菌糸は水平方向よりも鉛直下向きに伸展するので、培養中に菌糸の蔓延に偏りがある場合は、ピーカーを傾けることで均一に蔓延するように調整する。菌糸が蔓延しきったタイミング（概ね1週間）で培養を止めるのが丁度良い（写真2C）。3週間以上培養すると後の自然光条件に移しても形成しないので注意する。

(3) 分生子形成の誘起

ナシ枝をガラス容器から取り出す。枝は菌糸が絡んで互いに接着しているので、これを引き離して自然光下で干す（写真2D）。ナシ枝の芯部は湿度を保持できる程度に、極度の乾燥を避け、1～2日に一度霧吹きを行い、枝表面を湿らせると、1～2週間で枝表面が黒色化し、その後、柄子殻がみられるようになる。

(4) 培養ナシ枝の保存及び利用

一度柄子殻を形成した培養ナシ枝は、ビニル袋等に入れ、暗所に保管すると、再び菌糸に覆われたナシ枝に戻ってし

まうので、過湿と過乾にならないように注意しながら以下のように保存する。具体的には、1～2日に一度の頻度で水道水の噴霧と半日陰で干すことを繰り返す。あるいは、培養ナシ枝の半分を土中に立てて挿すことでも、維持できる。

上記のように作製した分生子を形成したナシ枝を圃場の接種源として利用した。例えば、ラッカセイの株間に等間隔で土中に半分挿すことで、試験圃場を均一に発病させることができた（写真3）（高野ら、2015）。なお接種方法として、ラッカセイ罹病残渣の鋤込みと比べて、接種源が耐久性に優れ、設置に手間、労力を要せず、接種源設置や回収時期を自由にできる点で優れていると思われる。本病菌は多犯性であるので、他作物から分離された菌株についても、ナシ枝を用いた分生子形成法が適用できる可能性もある。

今後、本法を用いての分生子懸濁液や発病圃場の作成により、種子処理剤や散布薬剤の選抜や防除時期の解明といった本病の防除対策の構築が進むことを期待する。

IV 摘 要

圃場試験のためのラッカセイ茎腐病菌の接種源として植物組織を用いた分生子形成法を検討した。その結果、培養基質としては滅菌したナシ1年生枝が適しており、菌糸生育適温である28℃、多湿条件で菌糸を蔓延させた後、培養容器から取り出し、1～2日に一度霧吹きを行い、枝表面を湿らせつつ直接自然光下に1～2週間置くことで、ナシ枝表面に柄子殻及び分生子形成が誘起された。本法で作成した接種源を播種時期からラッカセイ圃場に設置することで、ラッカセイ個体を発病させることができた。以上から、ナシ枝を利用した大量培養は本病の多発圃場の作成に実用的であると判断した。

V 引用文献

- 明日山秀文・山中 達（1953）ナンキンマメの莖腐病。日植病報。18: 28-32.
- 福田有希子・廣岡裕吏・小野 剛・小林享夫・夏秋啓子（2008）*Lasiodiplodia theobromae*によるカカオの果実腐敗病（新称）。東京農大農集報。53: 130-138.
- HONDA, Y. and Aragaki, M. (1978) Effects of monochromatic on pycnidial formation and exudation of conidia in *Botryodiplodia theobromae*. Mycologia. 70: 605-613.
- 本田雄一・坂本正幸（1968）*Helminthosporium oryzae*の孢子形成に対する光の影響。東北農研報。19: 201-214.

- 本田雄一・柚木利文 (1976) UVカットフィルムによるナス菌核病などの防除効果. 日植病報. 42: 342 (講要).
- 堀田治邦 (1999). タマネギおよびネギから分離された *Cladosporium allii-cepae* の分生子形成法. 北日本病虫研報. 50: 74-77.
- 井上幸次・那須英夫 (2008) *Lasiodiplodia theobromae* によるブドウラシオディプロディア房枯病 (新称) の発生. 日植病報. 74: 68 (講要).
- 岸 國平 (1995) 寒天葉片法による柄子殻, 柄胞子の大量形成について. 植物防疫. 49: 129.
- 内藤茂三 (2012) 食品工場の微生物制御への紫外線の利用技術. <http://www.mac.or.jp/mail/120301/02.shtml>
- 農林水産省大臣官房統計部 (2014) 平成26年産小豆, いんげん及びらっかせい (乾燥子実) の作付面積. 農林水産統計. http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/menseki/pdf/sakutuke_syouzu_14a.pdf
- 乃美千代子・小林享夫 (1999) 赤衣病菌 (*Erythricium salmonicolor*) 担子胞子の人工形成. 樹木医学研究. 3: 75-79.
- 大畑貫一 (1999) 菌糸切断・BLB蛍光灯照射によるイネいもち病菌の分生子形成法. 植物防疫. 53: 60-65.
- 佐藤豊三・香川晴彦・深見正信・佐藤京子 (1993). メロン紅色根腐病 (新称) の病原菌 (*Pyrenochaeta terrestris*) について. 日植病報. 59: 97 (講要).
- 澤岨哲也・田場 聡・諸見里善一・佐藤豊三 (2013) 狭義の *Lasiodiplodia theobromae* によるマンゴー軸腐病 (新称). 日植病報. 79: 15-19.
- 高野幸成・金子洋平・横山とも子・鈴木健司 (2015) ラッカセイ茎腐病に対するチウラム剤の種子塗沫処理及びチオファネートメチル剤の茎葉散布による防除効果. 千葉農林総研研報. 7: 41-47.
- 矢口行雄・中村重正 (1992) *Lasiodiplodia theobromae* の生育ならびに胞子形成に及ぼす培養条件の影響. 東京農大農集報. 37: 106-115.
- 矢口行雄・中村重正 (1992) パパイア軸腐病 (新称) とその病原菌. 日植病報. 58: 30-36.
- 矢口行雄・植松清次・野島秀伸・小林享夫・中村重正 (1999) ビワの新しい果実腐敗, 黒星病 (1) *Lasiodiplodia theobromae*. 日植病報. 65: 408 (講要).
- 大和浩国 (1983) ナシのボトリオディプロディア枝枯病について. 日植病報. 49: 401 (講要).