

スギ赤枯病対策に関する研究

Research on Passalora Needle Blight Disease of Japanese Cedar.

北野 皓大、小野里 光^{*}、白石 泉、川島 祐介

要旨

スギ赤枯病の感染状況等に関して調査した結果、以下の知見を得た。

- 1 2年生実生苗を30cm間隔で植栽したところ、罹病木からの感染が確認された。
- 2 分生子懸濁液の散布により感染させ、病徴ならびに標徴を把握することができた。
- 3 菌糸懸濁液ならびに菌糸（PDA培地）体による接種については感染が確認できなかった。
- 4 DNAの抽出方法及び希釈倍率を検討し、当社におけるPCR法による本病害の同定技術を確立した。

キーワード：スギ (*Cryptomeria japonica*)、苗木、病害、接種、PCR法

I はじめに

スギ赤枯病（以下、赤枯病）は、*Passalora sequoiae*によって引き起こされるスギ苗木生産における重大な病害である。罹病苗を植栽した造林地はスギ溝腐れ病の林分となるおそれがあることから、同病の防除は徹底する必要がある。県内の造林地においては2017年に被害が発生したが、2018年以降は報告されていない。赤枯病に関する研究は主に1954～1974年頃に行われたが（伊藤ら, 1974）（伊藤ら, 1954）（陣野, 1962）、近年の研究は多くはなく、現在は本病害の知識を有する林業関係者が少ないことから、同病に関する感染状況等の知見や同定技術が求められている。

そこで、本病害の識別に必要な病徴及び標徴を把握するため、接種試験（人工接種）による詳細な観察ならびに記録を行った。また、罹病苗からの感染状況を把握するために苗畑での野外感染試験を実施した。さらに、（国研）森林総合研究所において、本病害のPCR法による同定技術が確立されたため、同技術の本場における検証を実施した。

II 方法

1 屋内接種試験

(1) 菌糸懸濁液による接種試験

供試苗木は、マルチキャビティコンテナに移植（2019年12月）したスギ実生裸苗（2年生、高さ約10～15cm）とした（図-1）。接種源は（国研）森林総合研究所から分譲された菌株を用いた。分譲された菌糸をPDA培地上（半径9cmシャーレ）で20℃、30日間培養した。蔓延した菌糸を三角フラスコ内に滅菌水、ガラスビーズと混入し、十分攪拌して懸濁液とした。ガラス温室内にコンテナを設置し、2020年1月に供試苗木120本に菌糸懸濁液をジョウロでまんべんなく散布し、その後の病徴ならびに標徴の発生について6ヶ月間観察した。

*）群馬県鳥獣被害対策支援センター

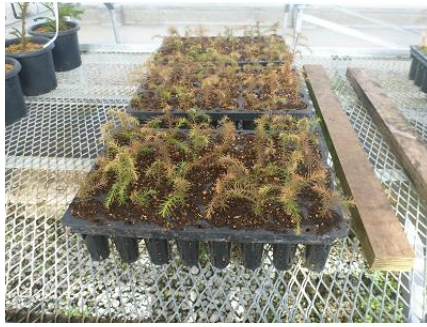


図-1 マルチキャビティコンテナに移植した供試苗木

(2) 菌糸 (PDA 培地) 体による接種試験

供試苗木は、当场苗畑に 2019 年 5 月に植栽した 3 年生苗 10 本と 6 号菊鉢 (直径 168mm、高さ 158mm) に植栽した 3 年生ポット苗 10 本、合わせて 20 本とした (図-2, 4)。2020 年 1 月に苗木の主軸 (幹) に切り込みを入れ、PDA 培地で培養した菌糸体 (L 5mm×W 5mm×H 5mm) を挟み込み、食品包装用ラップフィルムで覆い (図-3, 5)、ポット苗木はガラス温室内に設置し、病徴ならびに標徴について 6 ヶ月間観察した。なお、菌株は上記接種試験と同一である。



図-2 ポットに植栽した供試苗木



図-3 菌糸体の接種状況



図-4 苗畑に植栽した供試苗木



図-5 菌糸体の接種状況

(3) 分生子懸濁液 (罹病苗由来) による接種試験

供試苗木は場内苗畑で播種したスギ実生裸苗 (高さ約 10~15cm) とした。接種源は (国研) 森林総合研究所から分譲した罹病枝または罹病葉から抽出した分生子懸濁液を用いた。

供試苗木は鹿沼土を用土とした 3 または 4 号鉢 (直径 9 又は 12cm) に植え付け、プラスチックボックス (以下、ボックス、巾 22cm×高 23cm×奥 33cm 又は巾 31cm×高 30cm×奥 44cm) 内に水道水を約

3 cm 浸して苗鉢を静置したのち、罹病枝を苗木の枝に静置、または罹病葉から抽出した分生子懸濁液 1 cc をパスツールピペットで苗木の枝に複数箇所滴下し、ボックスに蓋をして密閉状態とした。ボックスは、室内に静置または 25℃ の恒温器に入れた。試験は 2020 年 10 月から 2021 年 1 月にかけて実施し、罹病枝による接種苗は 13 本、分生子懸濁液による接種苗は 6 本を用いた。接種後は約 1 週間に 1 回の頻度でボックス内の水を交換し、1 月中旬から約 1 週間に 1 回の頻度で苗木 1 本あたり約 10cc の純水を噴霧した。病徴の有無は 2021 年 3 月中旬に調査した。

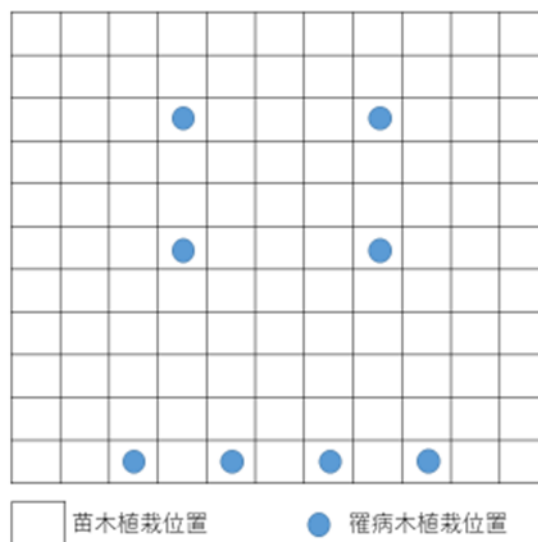
2 野外感染試験

実際の野外における本病の感染状況を把握するために、次のような試験を実施した。野外の植栽した苗木の仕様は表－1 のとおりである。植栽場所は当場内の苗畑（標高約 220m）とした。植栽状況及び罹病木の設置位置は図－6 及び 7 に示した。なお、2 年生実生苗調査における罹病木の植栽位置については風向を考慮し、南側に設置した。

表－1 苗木の仕様

供試苗木	植栽間隔 (cm)	植栽本数 (本)	罹病木植栽本数 (本)	植栽年月
3 年生実生苗	1 0 0	1 0 0	8	2019.5
2 年生実生苗	3 0	1 1 3	8	2021.3

それぞれの植栽年の 11 月中から下旬（冬期の赤褐色変葉が始まる前まで）に、苗木の感染状況を把握するため、赤枯病の疑いのある病徴（葉や軸の褐色や暗褐色の変色、以下病徴）の有無について調査した。



図－6 2 年生苗木の植栽状況
（格子の一边は 30cm）

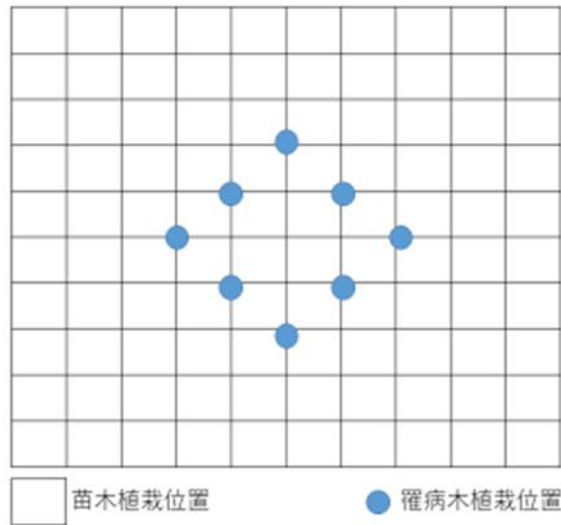


図-7 3年生苗木の植栽状況
(格子の一辺は100cm)

3 PCR法による同定

(1) 培養菌株と罹病葉のPCR法による赤枯病の同定

供試体は(国研)森林総合研究所より取り寄せた菌株をPDA平板培地に接種し、20℃の恒温器で培養した培養菌株と、赤枯病の接種試験を行ったスギ苗木の罹病葉とした。赤枯病菌の種特異的プライマーを用いて供試体のDNA抽出物を超純水で希釈したものを鋳型としPCR反応を行った(表-2)。PCR反応は、初期熱変性(95℃)2分間後に、熱変性(94℃)30秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)30秒を40サイクル、最終伸長反応(72℃)8分で行った。PCR反応の終了後、電気泳動を100V、16分間行い、トランスイルミネーターを用いて増幅の有無を確認した。

表-2 供試試薬

DNA抽出	Prepman™ Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific(株))	
	鋳型DNA	1 μl
	GoTaq® Green Master Mix (プロメガ(株))	12.5 μl
PCR反応液	Fプライマー (10 μM)	0.5 μl
	Rプライマー (10 μM)	0.5 μl
	超純水	10.5 μl
		計 25 μl
電気泳動	アガロースS<錠> ((株)ニッポンジーン)	
	Gel Green Nucleic Acid Gel Stain (コスモバイオ(株))	

(2) 罹病段階ごとのPCR法による赤枯病の同定

供試体は、赤枯病の接種試験を行ったスギ苗木の罹病段階の異なる葉とした(表-3)。罹病段

階別に1枚ずつ針葉を採取し、供試体とした（図-8, 9, 10）。赤枯病菌の種特異的プライマーを用いて供試体のDNA抽出物を超純水で希釈したものを鋳型としPCR反応を行った（表-4）。PCR反応は、初期熱変性（95℃）5分間後に、熱変性（94℃）30秒、アニーリング（60℃）30秒、伸長反応（72℃）1分を45サイクル、最終伸長反応（72℃）8分で行った。PCR反応後に、電気泳動を100V、16分間または20分間行い、トランスイルミネーターを用いて増幅の有無を確認した。

表-3 供試体の罹病段階

供試体	採取日	苗木状態	分生子の有無
供試体1	令和3年2月21日	恒温器（20℃）	有（少量）
供試体2	令和3年3月2日	屋外	無（子座有）



図-8, 9 供試体1



図-10 供試体2

表-4 供試試薬

DNA抽出	Prepman™ Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific(株))	
	鋳型DNA	1 μl
	GoTaq® Green Master Mix (プロメガ(株))	12.5 μl
PCR反応液	Fプライマー (10 μM)	0.5 μl
	Rプライマー (10 μM)	0.5 μl
	超純水	10.5 μl
	計 25 μl	
電気泳動	アガロースS<錠> ((株)ニッポンジーン)	
	Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (コスモバイオ(株))	

III 結果及び考察

1 屋内接種試験

(1) 菌糸懸濁液による接種試験

2020年3月まで、供試苗木を継続して観察したが、針葉の褐変、分生子の形成などの病徴ならびに標徴は確認できなかった。

(2) 菌糸体（PDA培地）による接種試験

2020年3月まで、供試苗木を継続して観察したが、針葉の褐変、分生子の形成などの病徴ならびに標徴は確認できなかった。

(3) 分生子懸濁液（罹病苗木由来）による接種試験

病徴が認められた苗木は、罹病枝接種苗木は13本中11本、分生子接種苗木は6本中6本であった。感染

確認までの期間は、早いもので接種後から約2週間であった。

感染状況は、既報（安藤，2020）と同様で、分生子懸濁液を滴下した箇所付近に、針葉1本単位で暗褐色から焦げ茶色の変色が認められ、次第に変色域が拡大していった（図-11）。罹病葉には黒色の小さな球形である子座が認められ、時間が経過すると子座上に分生子柄が叢生し（図-12）、分生子柄の先端に分生子が形成された（図-13、14）。なお、叢生した分生子柄は暗緑色とされているが、室内で見る限りは黒色であった。図-14の状態の罹病葉を水に浸漬すると、分生子柄から分生子が離脱して水に浮遊する状況が観察され（図-15）、自然条件下で雨滴により分生子が飛散し感染拡大する状況と同様のものと推察された。なお、苗に純水を噴霧すると感染速度が早くなると考えられた。また、罹病苗木からはペスタロチア病菌も観察されたことから、同病の同定には慎重を要することが想定された。



図-11 暗褐色の罹病枝及び葉



図-12 子座上の分生子柄



図-13 分生子柄及び分生子



図-14 分生子柄及び分生子



図-15 水浸しで分生子柄から離脱した分生子



図-16 スギ赤枯病で枯死した2年生苗木

2 野外感染試験

2年生実生苗を30cm間隔で植栽したところ（2021年植栽）、目視及びルーペによる病徴の確認により感染していることがわかった。赤枯病に感染したと判断される病徴は、植栽した苗113本の全てに認められ、このうち1本の苗が枯死した（図-16）。

苗高別による活苗の病徴の発現部位については、苗高が低い苗は苗の頂部（苗高3/3まで）に近い軸や葉に病徴が認められ、苗高の高い苗は苗高の2/3以下や1/3以下に多い傾向が認められたことから、地面に近いところから感染していることが示唆された。また、感染する高さについては、苗高80-89cmの苗における軸の病徴は14本全てで苗高2/3以下まで認められていることから、概ね60cmまで達すると判断された。

赤枯病の病徴の診断は、12月下旬になると冬期のためスギ苗全体が赤くなってしまい、病徴がわかりづらくなることから、苗が緑色の時期に実施することが重要である。

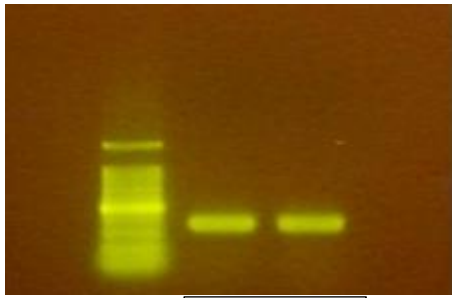
また、2022年3月3日に罹病苗を検鏡したところ、胞子が確認されたことから、3月上旬には農薬散布などの防除対策が必要である。

なお、3年生実生苗を100cm間隔で植栽したところ、目視ならびにルーペによる観察では、病徴は確認できなかったことから、スギ赤枯病は2年生に比べて3年生以上の苗木で植栽間隔が100cm以上の場合、感染しにくくなることが示唆された。

3 PCR法による同定

(1) 培養菌株と罹病葉のPCR法による赤枯病の同定

PCR法によるスギ赤枯病菌の検出結果は、培養菌株および罹病葉いずれにおいてもスギ赤枯病菌のバンドを確認することができた（図-17、18）

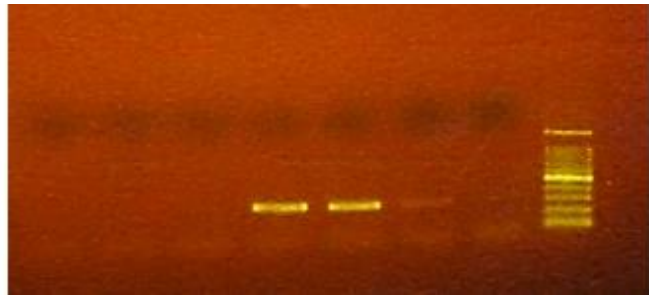


M ① ②

図-17 培養菌株の電気泳動結果

①②スギ赤枯病菌

M : 100bp ラダーマーカー



① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ M

図-18 罹病葉の電気泳動結果

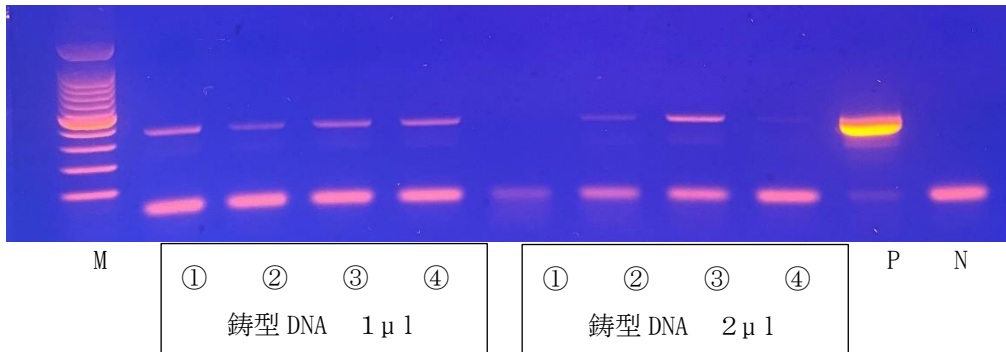
M : 100bp ラダーマーカー

罹病葉由来の DNA 抽出物の希釈倍率

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦
 × 1 × 2 × 5 × 10 × 100 × 500 × 1000

(2) 罹病段階ごとの PCR 法による赤枯病の同定

子座を形成している供試体までスギ赤枯病菌のバンドを確認することができた。供試体上のスギ赤枯病菌の量によって検出されるバンドの位置は異なるが、希釈液 500 倍～2000 倍のいずれかで検出された。また鋳型 DNA が 1 μ l と 2 μ l のどちらもプライマーダイマーが出たものの陽性を検出することができた (図-19, 20)。



M ① ② ③ ④ ① ② ③ ④ P N
 鋳型 DNA 1 μ l 鋳型 DNA 2 μ l

図-19 供試体 1 の電気泳動結果

DNA 抽出物の希釈倍率
 ① ② ③ ④
 × 500 × 1000 × 1500 × 2000

M: 100bp ラダーマーカー

P: ポジティブコントロール (培養菌株)

N: ネガティブコントロール (鋳型添加なし)

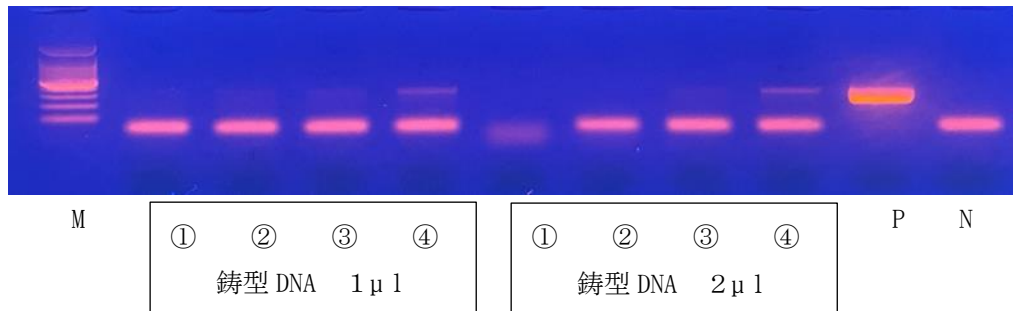


図-20 供試体2の電気泳動結果

DNA 抽出物の希釈倍率			
①	②	③	④
×500	×1000	×1500	×2000
①	②	③	④
①	②	③	④

M:100bp ラダーマーカー
P:ポジティブコントロール (培養菌株)
N:ネガティブコントロール (鋳型添加なし)

IV おわりに

スギ赤枯病については、過去の多くの研究事例から、その病理学的知見は既知のものである。しかし、今回改めていくつかの課題に取り組んだところ、菌糸体の接種による感染は難しいこと、苗木の年齢や植栽間隔によって感染状況が異なることなどが判明した。また、同定技術として最新技術であるPCR法が当场にも導入できることがわかった。

本病害は、既存の登録された農薬等を使用法とおりに散布すれば、防除できることがわかっている。主伐の増加による再生林面積の拡大に伴い、苗木の需要も増えつつある。健全な苗木を出荷するために本報告がその一助となれば幸いである。

謝辞

苗木の調達について、群馬県山林種苗緑化協同組合に協力を得た。また、PCR解析等の最新の知見について、(国研)森林総合研究所にご指導いただいた。この場を借りて厚くお礼申し上げる。

引用文献

- 1) 安藤裕萌・升屋勇人(2020), スギ赤枯病研究の現状と課題, 日林誌 102, 44-53
- 2) 安藤裕萌(2019), 種特異的プライマーを用いたスギ赤枯病の早期診断, 樹木医学研究 23 巻・2 号, 98-99
- 3) 伊藤一雄・渋川浩三・小林享夫(1974), スギの赤枯病に関する病原学的ならびに病理学的研究 (IV) *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART (*C. cryptomeriae* SHIRAI) による赤枯病と溝腐病, 林試研報 268, 81・134
- 4) 伊藤一雄・渋川浩三・寺下隆喜代(1954), スギの赤枯病に関する病原学的ならびに病理学的研究 (II) *Cercospora cryptomeriae* SHIRAI の生理・生態的性質, 林試研報 76, 27・61
- 5) 陳野好之(1962), スギ赤枯病菌 *Cercospora cryptomeriae* SHIRAI 分生胞子の分散に関する研究, 林試研報 144, 31・53