

セルトレイ底面給液によるハクサイ根こぶ病菌の菌密度及び病原性の簡易生物検定法

誌名	和歌山県農林水産総合技術センター研究報告
ISSN	13455028
著者名	吉本,均 前田,和也
発行元	和歌山県農林水産総合技術センター
巻/号	2号
掲載ページ	p. 143-148
発行年月	2001年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



セルトレイ底面給液によるハクサイ根こぶ病菌の菌密度 及び病原性の簡易生物検定法

吉本 均・前田 和也¹

農林水産総合技術センター 農業試験場

A Simple Biological Test of Fungus Density of Resting Spore and Pathogenicity
of Chinese Cabbage Clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin)
by the Cell Tray Bottom Face Supplying

Hitoshi Yoshimoto and Kazuya Maeda¹

Agricultural Experiment Station

Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries

緒 言

アブラナ科野菜の根こぶ病は枯死や著しい減収を引き起こす土壌病害で、土壌中に残存する休眠胞子によって発病する(土壌病害の手引編集委員会, 1986)。罹病性ハクサイでは環境が整うと土壌 1gあたり 50 個の休眠胞子で発病し(農林水産省農業研究センター, 1989), 菌密度の増加と共に被害が増加する。土壌中の休眠胞子の菌密度の推定には土壌直接検定法(Takahasi・Yamaguchi, 1987)が開発されている。この方法は短期間に検定が可能であるが、処理が煩雑で専用機器や特定試薬が必要なうえに熟練を要し、土壌 1gあたり 10^4 個以下の検定土壌では精度が低下する。

本菌の土壌中の菌密度の間接的な推定方法として、大谷らによる生物検定方法(農林水産省農業研究センター, 1989)が考案されている。水を溜めた容器の中に検定土壌を入れたポットを置き、そこでの検定苗の発病を調査するもので、1ヶ月以上に及ぶ検定期間が必要である。また、同様な方法での病原性の検定方法も報告されている(堀内, 1980)。根こぶ病の発病は土壌の温湿度に強く影響を受け、検定中は水分条件の管理が重要となる。そのため、産地の発病圃場などの多数の検定には広い専用施設と毎日の管理労力が必要であ

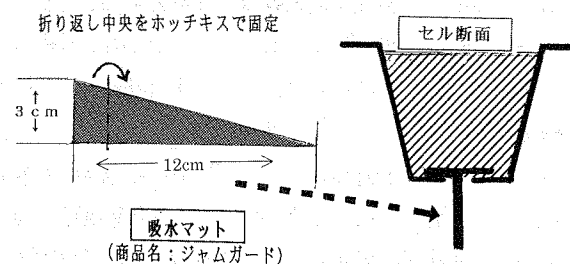
る。これらの問題を改善し、根こぶ病菌の菌密度や病原性を検定できる簡易生物検定法として、セルトレイと底面給液栽培を組み合わせたセルトレイ底面給液法を考案した。

材料および方法

1. セルトレイ底面給液法の概要

1) 供試資材

- (1) セルトレイ (ランドマーク社製, 5×10穴型, 底穴が円形)
- (2) 吸水マット (東洋紡績社製, ジャムガード・品番 7210S, 垂直吸収能 5.5cm/幅 1cm) 底辺 3cm, 高さ 12cm の直角三角形に切り取り, 底辺より 3cm で折り返し, 底辺より 1.5cm の所をホッチキスで重ね合わせたもの(第1図) 50枚。



第1図 給水マットの作成とセル内の設置

¹現在: 日高地域農業改良普及センター

- (3) 水受け用バット：深さ10cm, 40×60cmプラスチック製, 4隅の底より5cmに排水用の穴を開けたもの。
- (4) セルトレイ支持棒：被覆鉄線(トンネル用の弓)長さ60cm程度4本, 水受け用バットの横幅に中心を合わせ, 残りの部分を下向きに直角に曲げる。
- (5) 簡易給水容器：そそぎ口をV字に切り込んだペットボトル, 蒸散が激しい夏期や休日の自動給水用として使用

2) 組み立て

吸水マットの細い先をセルトレイの底穴に通し, 折り返し部分が底穴を塞ぐまで引き出す(第1図)。そして, 吸水マットを取り付けたセルトレイの底に2~3列おきに支持棒を通し, 水受けバット上に浮き掛けするように設置する(写真1)。

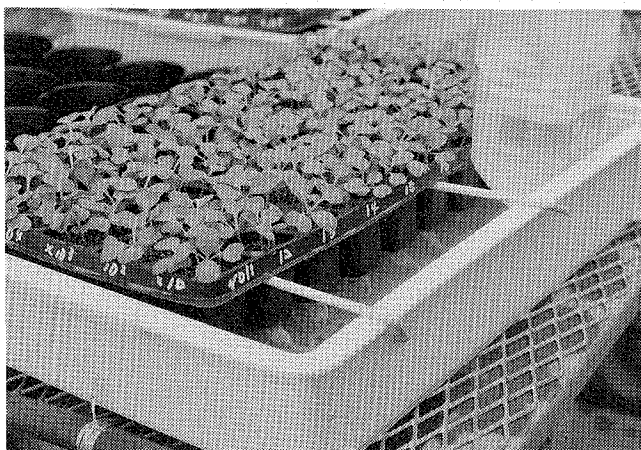


写真1 組み立て後の状態

3) 検定方法

*大谷らの圃場菌密度の簡易検定法(農林水産省農業研究センター, 1989)の概要

採取土壌15gを殺菌市販培土(pH6.0程度)135gと混和して10倍希釈土壌を作成し, この希釈土壌についても希釈を繰り返して10倍単位の希釈土壌(135g)を所定の段階まで作成する。底穴を小紙片で塞いだ直径8cm, 深さ7.5cmの黒ポリポットに希釈土壌を入れ, ハクサイ種子20粒を播種し, イチゴ用パック等の容器内に置く。検定用ポリポットの底面より1~2cmを常時湛水状態にし, 気温13~25℃で管理し, 播種40日後に抜き取り発病を調査する。発病限界の希釈倍数(発病株率10%以上)を求め, $\text{孢子数/g乾土} = 50 \times \text{発病限界希釈数} \times (\text{湿土重/乾土重})$ の式に基づ

き菌密度を検定する。(以下従来法)

*セルトレイ底面給液法

- (1) 菌密度検定では, 検定土壌を従来法と同様に無病土で希釈して作成する。1セルの充填には検定土壌が60~65g必要で, 作成した135gの希釈土壌は2分して2反復とする。
- (2) 菌密度検定では1セルに1段階希釈土壌を充填する。充填作業では他の土壌希釈区のセルはガムテープで上面を密閉しておき, 高希釈土壌より充填する。充填済みのセルは透明アクリル板等で押さえ, 土壌の飛散による周辺セルへの汚染を防ぐ。
- (3) 検定用種子を1セルあたり4~5粒は種する。
- (4) 水受け用バットに水道水を入れ, 発芽後10日間程度はセルトレイの底面近くまで水位を保ち, その後は1~2cmの低水位で管理する。給水はすべて底面から行う。

2. セルトレイ底面給液法の検討

1) 供試菌

試験1~3及び試験5は1995年12月に那賀郡岩出町岡田で採取したハクサイの根こぶ組織を, 試験4では1997年12月に岩出町山で採取したハクサイの根こぶ組織を使用した。これらは同一圃場で採取して水洗し, -80℃で冷凍保存した。試験には解凍した根こぶ組織に3倍の水道水を加え, ミキサーで2~3分磨砕し, 4重に重ねたガーゼでろ過して休眠孢子けん濁液を作成した。なお, 作成したけん濁液中の休眠孢子数は高橋らの方法(Takahashi・Yamaguchi, 1987)に準じ血球計算用スライドガラス上に滴下した孢子けん濁液にカルコフルオール・ホワイト(M2R)と臭化エチジウムを加えて2重染色(Takahashi・Yamaguchi, 1989)を行い, 活性がある孢子を識別して求めた。

2) 試験場所

各試験は農業試験場内ガラスハウス(42㎡)内の高さ90cmの育苗ベンチ上で行った。自動の天窓換気装置を30℃に設定して温度管理を行った。また, 6月から側窓を開放し, 7月からは10~14時まで室内を遮光して昇温を抑制した。

3) 供試(希釈)用土

無病の市販用土で土壌pHがハクサイの生育(伊藤, 1986)と発病に適した「愛菜2号」(片倉チッカリン, pH5.9)を用いた。

4) 発病調査

調査は生育株の根部を切断しないように抜き取り、水中で土壌を落とし、さらに流水で洗って細根まで肥大した組織の有無を確認した。発病程度の調査では、根こぶの着生位置と大きさにより以下の指数に分けて調査した。根こぶ組織が主根及び側根に発生し、肥大が著しい：3，根こぶ組織が主根及び側根に発生：2，根こぶ組織が主根端及び側根に発生：1，小さなこぶ組織が側根にわずかに発生：0.5，こぶ組織の発生なし：0。なお、発病指数の基準は従来法に準じたが、発病程度の極めて軽微なものは従来法の1から分けて0.5の指数を新設した。

試験1. セル間の汚染

1996年7月にセルトレイ底面給液法でのセル間の汚染の有無を調査した。セルトレイの中央の1穴に冷凍保存菌より作成した菌密度 10^8 個/g土の汚染土壌を、その横の1穴にハクサイ根こぶ病が激発した那賀郡岩出町の汚染土壌をそれぞれ65g充填した。その他セルにはオートクレイブで殺菌した市販用土を充填し、全セルにハクサイ‘大福75’の種子を2粒播種した。検定苗の成長を観察し、播種後35日にセル内の1株を静かに抜き取りこぶ組織の形成を調査し、播種後45日に残りの1株について根こぶ病の発病の有無を調査した。

試験2. 検定方法の比較

1996年5月にセルトレイ底面給液法と従来法でハクサイ根こぶ病の菌密度検定を行い、検定方法による発病の差を比較した。冷凍保存菌より作成した菌密度 $40 \sim 4 \times 10^6$ 個/g土の6段階の根こぶ病菌接種土壌を、セルトレイ底面給液法で使用するセルトレイの1穴に65g、従来法で使用する3号ポリポットに135g充填し、‘大福75’をセルに5粒、ポットに10粒播種した。それぞれの検定方法で管理し、播種後16, 20, 26日に発病の有無を調査した。

試験3. 現地土壌での適応性

1997年7月にセルトレイ底面給液法で現地汚染土壌の菌密度検定を行い、現地土壌での本法の適応性を検討した。冬どりハクサイで発病した和

歌山市岩橋1圃場と岩出町山2圃場から5月16日に1圃場5ヶ所の地下5~10cm土壌を採取し、圃場ごとに混合して調整し、検定土壌とした。対照土壌として冷凍保存菌より作成した菌密度 10^4 個/g土の汚染土壌を供試した。供試4土壌を $10^2 \sim 10^6$ 倍の5段階に市販用土で希釈し、‘大福75’を1セルに4粒播種した。播種30日後に発病株数と発病程度を調査した。

試験4. ハクサイ品種の根こぶ病抵抗性検定

1998年6月に現地で栽培されるハクサイ品種の根こぶ病菌に対する抵抗性をセルトレイ底面給液法で調査した。抵抗性品種として現地に導入されたハクサイ9品種(‘黄ごころ’, ‘T695’; タキイ種苗, ‘黄苑80’; 日本農林, ‘冬牙’, ‘CR502’, ‘CR603’, ‘CR609’, ‘CR706’, ‘CR1101’; 石井育種場)と抵抗性をもたない‘大福75’(東北種苗)の種子を、冷凍保存菌より作成した菌密度 $10^3 \sim 10^7$ 個/g土の土壌を充填した底面給液用のセルトレイに播種し、30日後の発病程度を調査した。また、10月5日に供試根こぶ組織を採取した岩出町山の圃場に10号ペーパーポットで23日間育苗した‘冬牙’と‘CR502’を定植し、現地での発病状況を調査した。なお、この圃場の菌密度は本法の菌密度検定では 6×10^4 個/g乾土であった。

試験5. ハクサイ根こぶ病菌の病原性の分化

1997年5月に発病圃場の土壌中に残る根こぶ病菌のハクサイ品種に対する病原性をセルトレイ底面給液法で検定した。和歌山市(3地区, 5ほ場)のハクサイ発病土壌を採取し、土壌pHや土壌の物理性の差をなくすために市販用土で10倍に希釈して調査した。また、比較のために冷凍保存菌より作成した菌密度 $10^3, 10^5, 10^7$ 個/g土の病原菌接種土壌を供試した。検定土壌を底面給液用のセルトレイに充填し、ハクサイ4品種(‘CR1101’, ‘CR502’, ‘黄苑80’, ‘大福75’)とカラシナの種子を播種し、31日後の発病程度を調査した。

結 果

試験1. セル間の汚染

セルトレイ底面給液法でのセル間汚染の有無を

汚染土壌を充填したセルと周辺セルの発病の有無で調査した。根こぶ病菌接種土壌及び汚染圃場の土壌に播種したハクサイは播種 25 日頃より生育が停止し、播種後 35 日には地際部まで肥大（発病程度 3）が見られ、播種後 45 日には腐敗を伴う激しい発病が見られた（写真 2）。無病土に播種したハクサイでは隣接セルにおいても発病は確認されなかった（第 1 表）。また、発病株では根部の伸長が著しく抑制され、細根の発生も少なかった。無病土に播種したハクサイでは伸長した根が給水マットに沿って水面まで達したが、セル外の根についてもこぶ組織の形成は見られなかった。

試験 2. 検定方法の比較

検定方法の比較では、播種 20 日後にはセルトレイ底面給液法は菌密度 4×10^4 個/g 土の土壌まで発病が見られたが、従来法では菌密度は 4×10^3 個/g 土の土壌まで発病が見られ、検定精度は従来法が優った。しかし、播種 26 日後には両方法とも検出限界に近い 4×10^2 個/g 土の土壌まで発病した（第 2 表）。

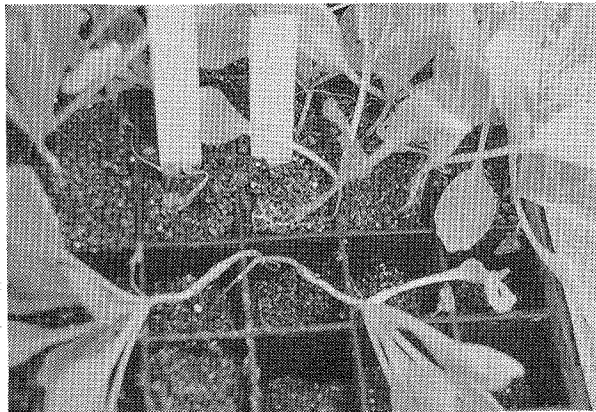


写真 2 セル間汚染の検定 (ラベルの2セルのみ発病)



写真 3 従来法による検定

セルトレイ底面給液法では検定期間中のかん水はほぼ 3 ~ 4 日間隔であったが、従来法では検定株の成長と共にかん水間隔が短くなり、播種 15 日以降の晴天日は毎日かん水を行った。また、同じ検定土壌数で比較すると、セルトレイを 2 区制で並べた面積はポットを 1 区制で並べた面積の約半分であった（写真 3, 4）。

試験 3. 現地土壌での適応性

現地土壌でのセルトレイ底面給液法の適応性は、無病の市販用土に根こぶ病菌を接種した土壌では 2 区合計 8 粒の播種に対して 7 株以上検定できたが、現地土壌では発芽不良により検定株数が 5 株の区も見られた。発病組織に腐敗が見られた播種

第 1 表 セルトレイ底面給液法での発病セル数 (播種 45 日)

調 査	摂取土壌	現地土壌	無 病 土
発病株率 (%)	100	100	0

注) セル数: 接種土壌 (10^8 個/g 土), 現地土壌はそれぞれ 2 セル, 無病土 (殺菌市販用土) は 96 セル

第 2 表 異なる検定方法での発病日数と発病菌密度

は種後 日 数	検 定 方 法	接 種 休 眠 胞 子 数 (個/g 土)						
		4×10^6	4×10^5	4×10^4	4×10^3	4×10^2	4×10^1	0
16	本 法	---	---	---	---	---	---	---
	従 来 法	---	---	---	---	---	---	---
20	本 法	++	++	++	--	--	--	--
	従 来 法	++	++	++	+-	--	--	--
26	本 法	++	++	++	+-	+-	--	--
	従 来 法	++	++	++	++	+-	--	--

注) : 5月16日播種, 2区制, 1株でも発病した場合を+
本 法: セルトレイ底面給液法
従来法: 大谷らの圃場菌密度の簡易検定法

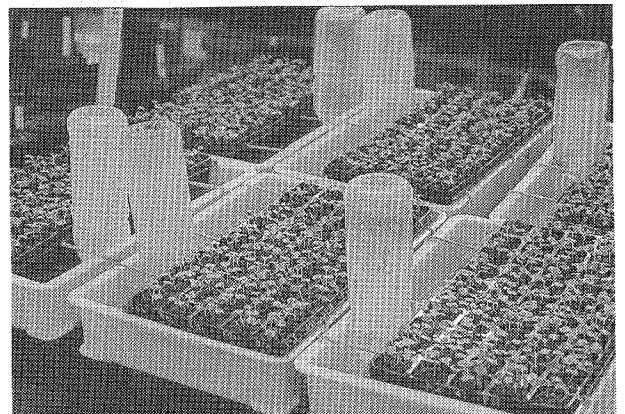


写真 4 セルトレイ底面給液法での検定

30 日後に調査を行ったが、対照の接種土壌では、 10^4 個/g 土の接種に対して 10^3 倍希釈土壌まで発病が見られ、推定菌密度はほぼ一致した。そして、発病指数は 10^2 倍希釈区が 10^3 倍希釈区より高くなった。現地土壌でも発病株率の高い低希釈区は発病指数が高く、発病限界に近い希釈区ほど発病株率や発病指数の低下が見られ、検定株数が少ない希釈区でもその傾向は変わらなかった（第 3 表）。

試験 4. ハクサイ品種の根こぶ病抵抗性検定

セルトレイ底面給液法で検定した現地栽培品種の 1997 年 12 月岩出町山採取菌に対する抵抗性は 3 種のグループに大別された。‘大福 75’、‘黄ごころ’、‘冬冴’は低菌密度から高い発病を示す罹病性のグループで、‘T695’、‘黄苑 80’は抵抗性を示すグループで、‘CR502’、‘CR603’、‘CR609’、‘CR706’、‘CR1101’は高い菌密度でも発病が軽微な強い抵抗性を示すグループであった（第 2 図）。また、病原菌を採取した圃場に定植した 1998 年冬どりハクサイの発病調査では‘冬冴’で激しい発病が見られたが、‘CR502’では発病は見られず、セルトレイ底面給液法による検定結果と同様の傾向を示した（第 4 表）。

試験 5. ハクサイ根こぶ病菌の病原性の分化

セルトレイ底面給液法での病原性検定では、四ヶ

第 3 表 セルトレイ底面給液検定での現地汚染土壌の発病株数と発病指数

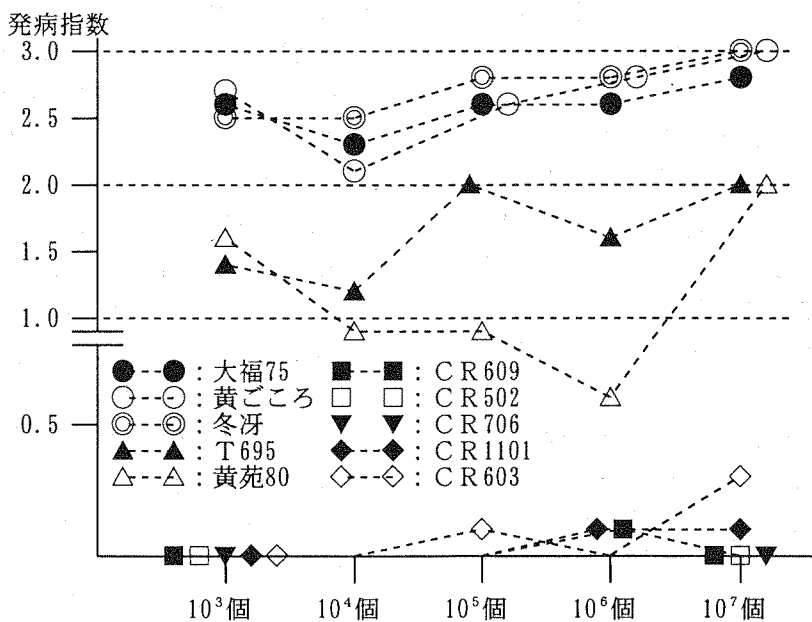
調査地域	調査 は場	調査 項目	検定土壌の希釈倍数				
			10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
和歌山市	A	株数	8/8	6/6	2/5	0/7	0/6
		指数	2.6	1.4	0.3	0	0
岩出町	A	株数	6/6	5/5	6/6	2/8	4/8
		指数	2.8	2.8	1.7	0.2	0.8
	B	株数	8/8	4/7	0/5	0/8	0/8
		指数	1.9	0.4	0	0	0
接種土壌 (10^4 個/g土)		株数	7/7	6/7	0/8	0/7	0/8
		指数	2.9	1.4	0	0	0

注) 6月6日播種, 7月4日調査, 2区制
株数: 発病株数/生育株数, 指数: 発病株合計指数/生育株数, 主根及び側根に発生し, 肥大が著しい: 3
根こぶ組織が主根及び側根に発生: 2
根こぶ組織が主根端及び側根に発生: 1
小さなこぶ組織が側根にわずかに発生: 0.5, 発病なし: 0

第 4 表 現地汚染土壌でのハクサイ品種による病原性検定

調 査	冬 冴	CR502
発病株率 (%)	75.0	0
発 病 度	64.9	0

注) 試験圃場: 岩出町山 (菌密度 6×10^4 個/g 乾土)
10月3日定植, 12月23日調査, 2区制, 各10株調査
発病度 = $\{3A + 2B + 1C + 0.5D\} / 3 \times (A + B + C + D + E) \times 100$ (A~Eは各段階の個体数),
発病指数 (3~0) は第3表注) に同じ



第 2 図 土壌の菌密度と品種別発病指数 (岩出町採取菌株)

郷B, 和佐, 安原Aの汚染土壌は‘CR1101’や‘CR502’を発病させたが, 四ヶ郷Aと安原Bの土壌は保存菌株接種土壌と同様に発病が見られず, 同地域の中で抵抗性品種に対する病原性の分化が見られた(第5表).

第5表 セルトレイ底面給液法による現地汚染土壌の
ハクサイ及びカラシナに対する病原性検定

供試土壌	菌数 (/g土)	CR 1101	CR 502	黄苑 80	大福 75	カラシナ
四ヶ郷A	—	0*	0	66.7	88.9	100.0
四ヶ郷B	—	16.7	25.0	11.1	50.0	33.3
和佐	—	0	3.3	7.1	62.5	88.9
安原A	—	6.3	19.0	0	0	6.7
安原B	—	0	0	0	16.7	50.0
接種土壌	10 ⁶ 個	0	0	0	58.3	45.8
	10 ⁵ 個	0	0	20.0	61.1	83.3
	10 ⁴ 個	0	0	26.2	76.2	73.3

注) 供試土壌: 和歌山市(3地区)1997年5月8日播種, 6月8日調査, *: 発病度, 発病度 = $\{3A+2B+1C+0.5D\} / 3 \times (A+B+C+D+E) \times 100$ (A~Eは各段階の個体数), 発病指数(3~0は第3表注)に同じ

考 察

セルトレイ底面給液法は従来法に比較して検定場所をとらず, 検定中のかん水管理が省力できる方法である. 土壌水分の移動が上昇しか起こらない本検定方法では休眠孢子や遊走子によるセル間汚染が起こらず, 菌糸伝染のない根こぶ病菌(土壌病害の手引編集委員会, 1986)の検定方法に適している. また, 従来法と検定精度でほとんど差がなく菌密度検定の有効な方法と思われる. 現地土壌での適応性は, 2反復の8粒播種で発病の有無の判定は可能であった.

セルトレイ底面給液法ではセルトレイ内の土壌の湿度はほぼ一定となり, 同じ条件での多数検定が可能であった. 現地で栽培されるハクサイ品種の病原菌に対する抵抗性検定では, 異なる菌密度を同一条件で比較することで品種間で抵抗性に明確な傾向が見られた. 現地汚染土壌の検定では, 抵抗性品種の発病差から病原性の分化を確認することができた. 病原性の分化については, 検定品種をレース判別品種に替えることにより, レース検定(吉川, 1990)に利用できると思われる. また, 本方法は特定菌株に対する抵抗性品種の第一次スクリーニング等にも有効と思われる.

ハクサイ産地での根こぶ病の防除指導では, 作付け品種の選定, 防除対策の選択や作付け適否を

判断するために菌密度の把握が必要となる. セルトレイ底面給液法は, 期間を要するが検定技術に熟練を必要とせず, 多数土壌の検定を省力的に実施でき, 検定環境を考慮すれば現地の指導機関でも検定が実施できると思われる.

摘 要

1. ハクサイ根こぶ病菌休眠孢子の土壌菌密度と病原性を調査する方法で, セルトレイを使用し, 底面給液する生物検定方法が有効であった.
2. 検定期間中の根こぶ病のセル間汚染は播種45日後でも見られなかった.
3. 根こぶ病菌の菌密度検定では従来法との検定精度の差はほとんど見られなかった.
4. 検定効率率は, 従来法に比べ検定面積は1/2以下でかん水労力が大幅に省けた.
5. 検定条件が均一で, 病原性検定の他に抵抗性品種の簡易選抜等にも利用できる.

引用文献

- 土壌病害の手引編集委員会. 1986. 土壌病害の手引き. p.125-128. 養賢堂. 東京.
- 堀内誠三. 1980. アブラナ科野菜根こぶ病の人工接種法. 植物防疫. 34:559-563.
- 伊藤正. 野菜の栽培技術. 1986. p.18-19. 誠文堂新光社. 東京.
- 農林水産省農業研究センター編. 1989. 総合農業研究叢書第16号, 連作障害総合防除システム開発の手引き, P.34-46. 農林水産省農業研究センター.
- Takahasi, K. and Yamaguchi, T. 1987. An Improved Method for Estimating the Number of Resting Spores of *Plasmodiophora brassicae* in Soil. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 53: 507-515.
- Takahasi, K. and Yamaguchi, T. 1989. Assessment of Pathogenicity of Resting Spores of *Plasmodiophora brassicae* in Soil by Fluorescence Microscopy. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 53: 621-628.
- 吉川宏昭. 1990. アブラナ科野菜根こぶ病菌の病原性の分化. 植物防疫. 50: 507-510.