

リンゴ腐らん病研究における切枝接種法*

田村 修† 斎藤 泉† 高桑 亮† 馬場 徹代†

THE DETACHED SHOOT METHODS IN RESEARCH OF JAPANESE APPLE CANCER

Osamu TAMURA, Izumi SAITO, Makoto TAKAKUWA & Tetsushiro BABA

リンゴ腐らん病の発生生態は種々の要因によって支配され、複雑であるがそれぞれの要因の影響を的確に把握するため、単純な系としてのりんご切枝接種法を検討した。

切枝でも、各種の菌に対する反応を保っていること、生組織に隣接する死組織がなければ侵入困難であること、さらには高温で枝の活性が高まり耐病性となる現象などがほ場観察と一致することから、本病の発生条件の解明に当たって切枝を用いた室内試験が有効であると考えられる。なお、これに付随した接種条件の検討では切枝の状態、特に枝齡の相違、樹皮水分の過不足によって病斑の進展が影響されることが明らかとなった。

I 緒 言

近年、りんご栽培地帯にリンゴ腐らん病が多発し、年々増加の傾向を示している。本病は本邦において古くから認められており、病渠が樹皮組織の深部に形成されるため、防除が困難で被害が甚大となりりんご樹重要病害の1つである。

本病害に関してすでに高橋¹⁾、三浦²⁾、富樫³⁾、宇井ら⁴⁾、平良木⁵⁾により調査研究がなされた。しかし、本病の発生条件については宇井ら、平良木の報告があるのみで、不明の点が多い。このことは本病が永年作物の病害であること、本病の発生が樹勢、樹齡、品種、栽培条件、気候などの複雑な要因に左右され⁶⁾、しかも本病発生が周期的であることにより非常に解析しにくい病害であるためと考えられる。このように多くの要因に左右される病害の発生条件を的確に把握するためには、ほ場における調査のみでは不十分であって、より単純な系を用いて要因を1つずつ解析する必要がある。

† 中央農業試験場

* 本報文の一部は昭和45年度日本植物病理学会北海道支部講演会において報告した。

従来、リンゴ腐らん病の人工接種には鉢植えの幼木を用いた例があるが¹⁾、切り取った枝を用いる方法も考えられる。後者についてはポプラの *Cytospora canker*¹⁾ の発病条件を検討するために用いられており、その反復性、簡便性の点ではより優れているといえよう。このことは発病条件等の解析のみならず有効薬剤の探索を行なうにも利点となる。このような観点からりんご切枝の実験材料としての適否を検討し、同時にリンゴ腐らん病の接種条件について若干の知見を得たのでその結果を報告する。

本研究を行なうに当たり、実験用りんご樹を提供された北海道立中央農業試験場園芸部果樹科の各位、および供試菌株を分譲された農林省園芸試験場我孫子和雄氏、茨城県園芸試験場内田和馬氏に深く謝意を表わす。

II 実験材料および方法

供試切枝は生育期の新鮮なデリシャスの1~2年枝で、太さの均一なものをよく水洗し10~15 cm 長にしたものである。

供試接種源は次のとおりである。

○ 含菌寒天…4日間ブドウ糖加用バレイショ寒天培地（以下 PDA と略）上で生育させた菌叢の伸長

先端部を枝の太さに応じてコルクボーラーで打ち抜いた。

○生菌体…ブドウ糖加用バレイショ煎汁で7日間生育した菌叢をワーリングブレンダーで碎き、よく水洗した。

○柄孢子懸濁液…自然罹病組織上に、あるいは高圧滅菌枝上で培養して、形成された孢子角を殺菌水を加えて所定濃度の孢子懸濁液とした。

○子のう孢子懸濁液…罹病組織から子のう殻のみを摘出し、蒸留水を加えてすりつぶし三重ガーゼで濾過し、蒸留水を加えて所定濃度の孢子懸濁液とした。

接種は含菌寒天の場合切枝の先端方向切口に、孢子の場合は切枝中央部を径 10 mm の灼熱したコルクボーラーで樹皮を打ち抜いた部分に行なった。

接種後、各切枝をポリエチレン製バットに濾紙を敷いて温室とした容器にホルダーを用いて並べ、ポリエチレン袋で密封して所定温度に保った。各切枝は一定期間ごとに病斑長を測定した。なお、供試菌株は Table 1 に示した。

Table 1 Sources of isolates of fungi used for experiment

Isolate No.	Fungi & (Sources)
VCP-1	<i>Valsa ceratosperma</i> (from canker on apple)
LP-1	<i>Leucostoma persoonii</i> (from canker on peach)
EP-1	<i>Endothia parasitica</i> (from canker on chestnut)
VP-1	<i>Valsa poulowniae</i> (from canker on poulownia)
CY-1 CY-2 CY-3	<i>Cytospora</i> sp. (from naturally died parts on apple shoots)

III 実験結果

1. リンゴ切枝に対する各種胴枯性病原菌ならびにりんご樹枯死部より分離した菌の寄生性

りんご樹木の病原菌、他樹の胴枯性病原菌およびりんご樹枯死部着生菌の含菌寒天を切枝先端切口に接種し、切枝に対する寄生性をみた。結果は Table 2 に示した。

Table 2 Pathogenicity of *Cytospora* spp. and *Endothia parasitica* to the detached apple shoots

Isolate No.	Canker length (mm)	
	Days after inoculation	
	3	6
VCP-1	9.1	26.7
LP-1	3.8	14.3
EP-1	1.3	2.7
VP-1	1.7	2.5
CY-1	0.4	0.8
CY-2	0.1	0.9
CY-3	0.2	0.8
Control	0	0

本病原菌の *Valsa ceratosperma* およびニュー・メキシコで apple canker の病原菌とされている *Valsa leucostoma* (= *Leucostoma persoonii*)⁷⁾ によってのみ拡大型の病斑が形成された。従来、りんご樹への寄生が報告されていない⁸⁾ クリとキリの胴枯病原菌(*Endothia parasitica*, *Valsa poulowniae*)では止り型の病斑であった。りんご樹枯死部より分離した *Cytospora* spp., 3 種では接種部位がわずかに変色するにすぎなかった。このことから、りんご樹の病原菌として認められている菌以外に切枝に拡大型病斑を形成するものはなかった。

2. 接種源

i) 傷痕および接種源の種類と発病

菌糸状態の接種源として含菌寒天と生菌体を、孢子状態の接種源として柄孢子と子のう孢子の濃厚懸濁液と 2 % グルコースを含む柄孢子懸濁液を切枝中央部の新鮮な傷(径 10 mm のコルクボーラーで樹皮を打ち抜く)と枯死部を伴う傷(灼熱した同上コルクボーラーで樹皮を打ち抜く)および対照として無傷部へ接種し、種々の接種源がどのような傷痕を侵入門戸としようか検討した。

結果は Table 3 に示した。傷をつけない樹皮の場合には、いずれの接種源でも発病は認められなかった。これに対し枯死部を伴う傷口の場合

Table 3 Infectivity of various inocula of *V. ceratosperma* to different types of wound on detached apple shoots

Inocula	No. of infected detached / No. of inoculated detached apple shoots*		
	Treatments to detached apple shoots		
	No wounded	Wounded with cork borer cut	Wounded with hot cork borer cut
Agar inoculum (Mycelial mat on PDA)	0/10	10/10	10/10
Fragmented mycelial mat	0/10	7/10	10/10
Pycnosporium suspended in distilled water	0/10	0/10, (4/10)**	10/10
Pycnosporium suspended in 2% glucose solution	—	0/10, (8/10)**	10/10
Ascosporium suspended in distilled water	0/10	0/10	10/10

*.....at 6 days after inoculation.

**.....at 10 days after inoculation.

は、いずれの接種源でも容易に発病した。一方、新しい切傷口の場合には、菌糸状態（含菌寒天および生菌体接種源）では容易に侵入し発病を起こすが、胞子状態では接種 10 日後に 40 % の発病が認められるに過ぎなかった。しかし、この発病は接種菌液にグルコースを加用すると早まるとともに率が高められた。

ii) 柄胞子および子のう胞子の接種胞子濃度
柄胞子および子のう胞子の各濃度の胞子懸濁液を切枝中央部の焼傷部へ接種し、発病率を比較して、その感染能力を明らかにしようとした。結果

は Fig. 1 に示した。

$10^5/\text{mm}^3$ から $10^3/\text{mm}^3$ の胞子濃度では両型の胞子とも 100 % 発病が認められた。しかし、 $10^4/\text{mm}^3$ 以下の胞子濃度では胞子濃度が低くなるに従い、発病率は低下したが、子のう胞子は柄胞子より低下の率は少なかった。

iii) 接種菌糸の新旧

径 15 cm のシャーレ内の PDA で生育した菌叢の伸長先端、3 日経過した部位、さらに 5 日経過した部位を切枝先端方向切口に接種し、接種菌糸の新旧が発病に及ぼす影響を知ろうとした。結果は Table 4 に示した。

Table 4 Effect of culture age on virulence of the pathogen to detached apple shoots

Culture age	Days after inoculation					
	2		4		6	
	P*	CL**	P	CL	P	CL
1 day old	100	3.8	100	6.1	100	7.7
3 days old	0	0	10	0.6	50	1.3
5 days old	0	0	0	0	40	0.8

* P.....Percentage of infected apple shoots.

** CL---Canker length in millimeters.

用いた菌叢が新しいほど確実にかつ、速かに発病し、その後の病斑進展も良好であった。

3. 接種温度

柄胞子懸濁液（胞子濃度 $8.4 \times 10^5/\text{mm}^3$ ）を切枝中央部の枯死部を伴う傷口に接種し、発病に及ぼす温度の影響を明らかにしようとした。結果は Table 5 に示した。

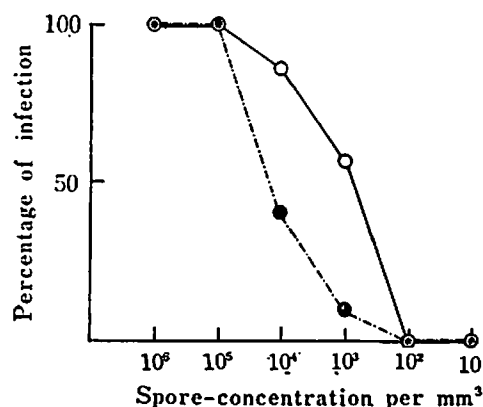


Fig. 1 Difference between the infectivity of pycnosporium (---●---) and ascospore (—○—) on detached apple shoots. The data were obtained at 3 days after inoculation.

Table 5 Effect of temperature on the infection of pycnospora to wounded apple shoots

Temp., °C	Percentage of infected apple shoots					
	Days after inoculation*					
	2	3	5	7	9	17
1-3	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	17	75
10	0	0	25	100	—	—
15	0	25	92	100	—	—
20	0	67	100	—	—	—
25	67	100	—	—	—	—
30	83	100	—	—	—	—
35	0	0	—	—	—	—

* Concentration of pycnospora: 84,000/mm³.

発病は 5~30°C で認められ、その適温範囲は 25~30°C であった。35°C においては接種後 3 日目までの発病は認められず、それ以後は雑菌の混入が著しく調査不能となった。これらの結果は室内における胞子発芽温度試験の結果と一致した¹¹⁾。次に、含菌寒天で接種し 25°C の温室に 2 日間保ち、病斑を形成させた切枝を用いて、形成病斑の各温度における進展程度を比較した。結果は Fig. 2 に示すように病斑進展は 20~25°C で良好であった。発病適温範囲である 30°C では徐々に病斑進展がおさえられ、処理後 8 日目では 15°C よりも病斑長は劣った。以上のことから切枝における本病の発病と病斑進展の好適温度は 25°C であると判定された。なお、PDA 上での本菌の生育は Fig. 3 に示す通りで、菌糸生育適温範囲は 25~30°C であった。

4. 切枝の相違

i) 枝齢および枝の太さの影響

まず発病に及ぼす切枝の状態の違いの 1 つとしての枝齢および枝の太さの影響を明らかにするため 1 年枝と 2 年枝、2 年枝と 5~6 年枝の先端方向切口に含菌寒天で接種し、病斑進展速度を比較した。結果は Table 6 および Fig. 4 に示した。

2 年枝より 1 年枝、5~6 年枝より 2 年枝と枝齢が若いほど病斑の進展は大であった。また、同一枝齢で太さの異なる切枝間では、Fig. 4 に示すように枝が細いほど病斑伸長は顕著であり、枝の太さと病斑伸長量間に 1 年枝と 2 年枝でそれぞれ一

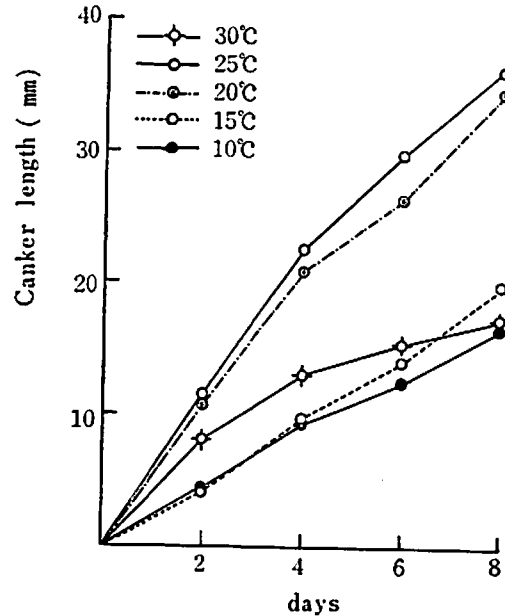


Fig. 2 Effect of temperature on canker development on detached apple shoots. Inoculations were carried out with mycelial mats.

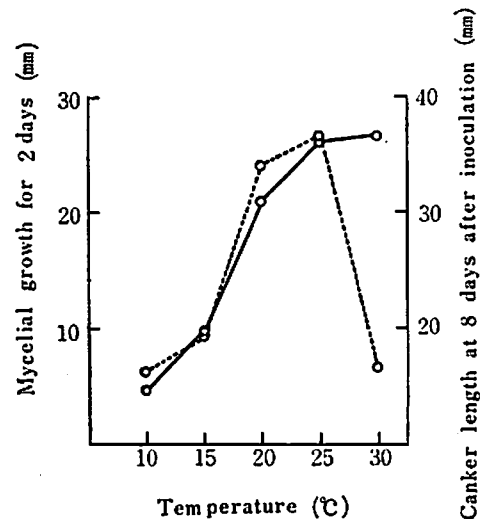


Fig. 3 Difference in temperature of mycelial growth on PDA (○—○) and canker development (○---○)

0.78, -0.66 の相関係数が得られた。

ii) 樹皮水分

3°C の低温室内で乾燥させた枝を切枝とし、その基部を蒸留水に浸漬し、樹皮内の水分量を変化させた。すなわち、乾燥状態のもの、接種前 1

Table 6 Effect of the age of shoots on canker development

Age of shoots	Canker area in sp. cm	
	2 days after inoculation	4 days after inoculation
2-years old	0.66	11.41
5~6-years old	0.25	2.81

昼夜基部を蒸留水に浸漬したもの、さらに接種1日前から終始基部を蒸留水に浸漬したものとした。これらの切枝を上向に保ち、先端方向切口に含菌寒天を接種し、20℃の接種箱に保った。なお、樹皮内の水分含有量は各処理とも7本無接種とし、試験開始後8日目に常法通りに測定した。結果は Table 7 に示した。

樹皮が乾燥状態の切枝は樹皮水分含有量の多い枝より病斑の進展が顕著であった。また、樹皮水分含有量の多い枝では接種後6日目ころから病患部と健全部の境界にカルス様組織の形成がおう盛となっていることが観察された。

IV 論 議

リンゴ腐らん病と類似の胴枯性病害であるモモ

Table 7 Effect of bark moisture content on canker development

Treatment*	Bark moisture content % dry wt. (8 days after inoculation)	Canker length (mm)		Degree of cullus-like tissue formation (at 6 days after inoculation)		
		Days after inoculation		+	±	-
		4	6			
Dry	52.3	9.7	20.4	4**	2	14
Watered 1	64.4	6.8	12.0	16	4	0
Watered 2	64.8	7.2	9.5	20	0	0

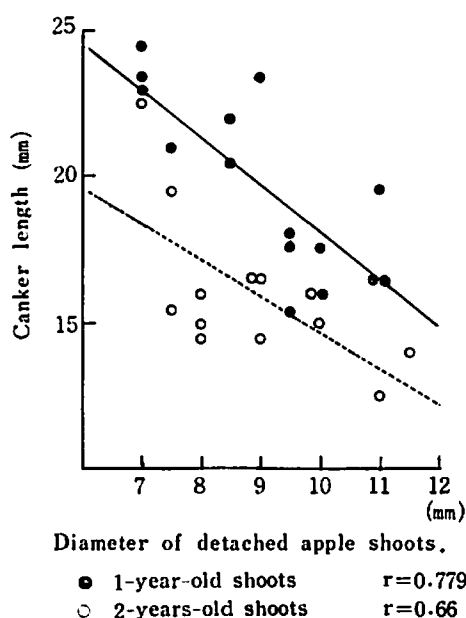
* Dry.....Detached apple shoots were placed upright without water.

Watered 1 ...Detached apple shoots were placed with their bases in water before inoculation.

Watered 2 ...Detached apple shoots were placed with their bases in water throughout the experiment.

** No. of shoots.

の *Cytospora* canker (*Cytospora cincta*) について、HELTON²⁾は樹勢、樹齡、品種、栽培条件、天候、他の病原菌の存否等により接種結果が変動するとのべている。このことはモモの *Cytospora* canker の発生がこれら多くの要因に支配されていることを示唆している。リンゴ腐らん病の発生も多くの要因が関与していると考えられるので¹⁴⁾、本病的確に把握するためには、これらを1つずつ解明する必要がある。しかし、ほ場でこのような条件

**Fig. 4** Relation between canker development and diameter of apple shoots.

を設定することは困難であるので、多くの個体を供試することにより個体間差を小さくすることができ、しかも環境条件を単純化できるりんご切枝を用いた実験方法の適否を、接種条件をも加えて検討した。

まず、リンゴ腐らん病菌、枯死部着生菌、さらには他樹の胴枯性病原菌を切枝に接種したところ、病原性を示したのはリンゴ腐らん病菌、ニューメキシコの apple canker の病原菌である *Valsa*

*leucostoma*⁷⁾ で、他の菌類は切枝でも病斑を形成しなかった。それ故この試験で用いたりんご切枝は樹体の性質が変化し、りんご樹の特性を失っているとは考えられなかった。

TOGASHI¹³⁾ は3年生幼木を用いた柄孢子接種試験の結果、リンゴ腐らん病菌の寄生性はあまり強くなり、枝の新しい切口から通常の場合侵入困難で、古い枯死した組織が必要であるという結果を得ている。切枝を用いた筆者らの実験においても、柄孢子、子のう孢子は新鮮な傷からの侵入は困難であり、焼傷などの死組織を伴う傷では容易に侵入発病することが分かり、TOGASHI と同じ結果を得た。一方、菌糸状態の接種源(含菌寒天と生菌体)では無傷部位から侵入できないが傷があれば新鮮な切口からでも容易に侵入した。HEMMI⁹⁾ によれば、サクラのがんしゅ病菌の孢子は寄主侵入する場合生組織に隣接する死組織で菌糸増殖する必要があると論じているが、本病も上述の結果から侵入には菌糸化が必要であることが明らかである。なお、菌糸状態の接種源が死組織を伴わない傷口から侵入しうる原因についてはさらに検討を要する。

さらに、含菌寒天接種の場合、菌叢が古くなれば発病し難くなることが明らかとなったが、このことについては HELTON²⁾ のほ場試験の結果と一致する。これらのことから接種の成否を決定する要因としては、単に菌の量のみならず菌自体の質的变化あるいは菌糸生育の栄養条件なども影響していることを示していると考察された。

平良木は本病の感染適温を 20~30℃ と述べている⁹⁾。筆者らの接種温度試験では本病は 5~30℃ 間で発病し、その適温範囲は 25~30℃ であった。しかし、形成された病斑の進展適温は 25℃ 付近にあると考えられ、30℃ では徐々に進展が抑制された。他方、培地上での菌糸生育適温範囲は、本試験では 25~30℃、TOGASHI¹³⁾ によれば 28~31℃ であり、30℃ での菌糸生育の抑制はみられなかった。したがって、30℃ では切枝上のカルス形成がおう盛であり、組織内の活性が高まっていたと推定されることから、30℃ では容易に感染するが、徐々に切枝に体質の変化が生

じ耐病性になり、病斑の進展が抑制されたと考えられる。このように、高温下で組織の活性が高まり、病斑の進展が抑制されることは、ほ場で夏期に樹体の活性が高まり、そのためりんご樹上の病患部の進展が夏期に一時停滞する事実¹¹⁾ と、さらにはモモの胴枯病での JONE ら⁹⁾ のほ場試験結果と一致した。このように切離枝でも高温下で組織の活性が高まり、耐病性が増強されることは切枝における実験結果が、ほ場での生態と矛盾しないことを示すものと考えられる。

接種に当たっては、上記の条件のほかに切枝の状態においても影響を受けると考えられる。まず、用いる枝の齡については、若い枝ほど病斑進展が著しく、BLOOMBERG¹⁾ のポプラでの観察と一致する。また同一枝齡の枝でも、枝が細いほど病斑の進展が著しかった。次に貯蔵中の樹皮水分の脱出さらには季節的に樹皮水分が多少変動することから、樹皮水分の過不足の及ぼす影響について検討したところ、BLOOMBERG¹⁾ がポプラ切枝において述べたように、りんご切枝の場合も樹皮水分含有量と病斑進展に負の関係が認められた。これはさらに鉢植えの2年生幼木を用いた結果とも一致する¹¹⁾。りんご樹の場合、乾燥状態では病斑進展方向に形成されるカルス様組織の形成が著しく劣ることから、樹体活性が低下していると考えられ、このため病斑の進展が大となったと推察される。なお、望月⁹⁾ はりんご樹への水分供給の過不足によってりんご樹皮内の窒素、澱粉の含有率が影響を受け、特に過乾にした場合は、リンゴ紋羽病に対する感受性が高まることを示唆していることから、供試した切枝内の成分変化については今後さらに検討を要する。

以上のことから、接種に供する枝は同一枝齡で太さの均一なもので、なるべく新鮮な切枝を用いるのが望ましいが、貯蔵枝を用いる場合は保湿に十分注意する必要がある。

以上、本病の発生に関与するいくつかの要因の解析法としてのりんご切枝法について検討した。モデル実験として切枝を用いることについては枝の衰弱や代謝の変化が予想され、実験手法として不適当であるとする人もある。しかし、リンゴ腐

らん病の場合は発病温度、各種接種菌類に対する抵抗反応、その他がほ場での観察結果と傾向が一致することから、切枝接種法によって本病発生条件の検討が可能であると考えられた。なお、この切枝法を本病防除薬剤の検索に応用して試験した結果から、ほ場においても有効な 2, 3 の薬剤を見出すことができた¹²⁾。

V 摘 要

1 リンゴ切枝を用いリンゴ腐らん病菌の接種方法について試験し、同時に本病の発生条件の解明にあたって、切枝を用いた室内試験が可能であるかを検討した。

2 切枝に各種の胴枯性病原菌とリンゴ樹枯死部着生菌を接種したところ、病斑形成の認められたのはりんご樹の病原菌として認められているもののみであった。

3 本菌の伝染源である柄胞子、子のう胞子は生組織に隣接する枯死組織がなければ侵入が困難である。一方、菌糸体接種では新鮮な傷からでも侵入発病する。

4 $10^5/\text{mm}^3$ 以上の胞子濃度で接種すると、子のう胞子、柄胞子とも 100 % の発病を示すが、この濃度以下では発病率は低下し、子のう胞子よりも柄胞子の低下が著しい。

5 含菌寒天接種の場合、菌叢が古くなると発病困難となる。

6 本病発病は $5\sim 30^\circ\text{C}$ の間で認められ、適温範囲は $25\sim 30^\circ\text{C}$ であった。しかし、形成病斑の進展には 25°C が適温であり、 30°C では徐々に病斑の進展が抑制される傾向が認められた。このことは他温度におけるより 30°C において切枝組織内の活性が徐々に高揚した結果、耐病性に働いたと考えられた。

7 接種切枝の状態により接種結果が異なる。すなわち、枝齡が若く、細い枝さらに樹皮水分の不足した枝ほど病斑の進展は著しかった。

8 切離による枝の衰弱が懸念されたが、接種温度、各種病原菌に対する反応、その他接種条件がほ場での観察結果や傾向と一致することから、本切枝接種法により本病発生条件の検討が可能で

あると考えられる。

引用文献

- 1) BLOMBERG, W. J., 1962; *Cytospora* canker of poplars: Factors influencing the development of the disease. Can. J. Bot., 40, 1271-1280.
- 2) HELTON, A. W., 1970; Effect of culture age on virulence of artificial *Cytospora* infections in *Prunus domestica*. Phytopathology, 60, 1694-1695.
- 3) HEMMI, T., 1916; On a new canker-disease of *Prunus yedoensis*, *P. mume* and other species caused by *Valsa japonica* Miyabe et Hemmi sp. n. Journ. Coll. Agr. Tohoku Imp. Univ., 7, 257-317.
- 4) 平良木 武, 1972; リンゴ腐らん病に関する研究, 第 1 報 発生状況および発生生態に関する 2, 3 の知見, 岩手園試研報, 2, 29-42.
- 5) JONES, A. C & N. C. LUEPSCHE, 1971; Seasonal development of *Cytospora* canker on peach in Colorado. Pl. Dis. Repr., 55, 314-317.
- 6) KOBAYASHI, T., 1970; Taxonomic studies of Japanese *Diaporthaceae* with special reference to their life histories. Bull. Govt. For. Expt. Stn., 226, 1-242.
- 7) LEONIAN, L. H., 1921; Studies on the *Valsa* apple canker in New Mexico. Phytopathology, 11, 236-243.
- 8) 三浦道哉, 1919; りんご病害に関する調査, 青森農試農事試験成績, 15, 117-141.
- 9) 望月武雄, 1963; 土壌水分の過不足がリンゴ樹の栄養状態に及ぼす影響について, 弘前大学術報告, 9, 21-30.
- 10) 高橋良直, 1907; りんご病虫害及び駆除予防法, 北農試集報, 5, 39-42.
- 11) 田村 修, 斎藤 泉, 高桑 亮, 1971; 昭和46年度リンゴ腐らん病防除対策試験(中間報告), 北海道立中央農試病虫害部成績, 1-28.
- 12) ———, ———, ———, 1972; リンゴ腐らん病防除薬剤の探索, 道農試集, (投稿中).
- 13) TOGASHI, K., 1924; Some studies on a Japanese apple canker and its causal fungus, *Valsa mali*. Jour. Coll. Agric. Hokkaido Imp. Univ., Sapporo 12, 3, 265-324.
- 14) 宇井格生ほか, 1966; リンゴ腐らん病に関する試験

研究, 昭和40年度北海道科学研究報告書, 1-54.

Summary

A laboratory method, using detached apple shoots, was studied in order to research the development of Japanese apple canker.

Among some *Cytospora* isolates inoculated to detached apple shoots, VCP-1 (*V. ceratosperma*) and LP-1 (*Leucostoma persoonii*), which are known to be invaders of apple trees, caused well-established canker.

Pycnospore and ascospore of the causal fungus were not able to invade the tissues of the host, but to invade through the wound surrounded with dead tissues. Correlation between the spore concentration and the infection rate was evidenced. On the other hand, the mass of mycelium could invade the living tissues, though their virulence decreased with

the culture age.

The optimum temperature for infection was 25-30 °C, minimum 5 °C and maximum 30 °C. However, the optimum temperature for enlargement of established canker lesion was 25 °C, and at 30 °C, though infection occurred, the subsequent enlargement of the lesions was suppressed.

Shoot age and moisture content of the bark were negatively correlated with canker development.

The facts mentioned above correlated well with the results of field observation. A laboratory method, using detached apple shoots, could be used to study not only the factors affecting the canker development but also the effectiveness of the fungicides to control the disease.