

## 試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	研究
課題名：白紋羽病菌非病原性菌株を用いて作製した白紋羽病発病抑止土壌の効果			
〔要約〕 白紋羽病菌非病原性菌株を培養した剪定枝チップをナシ園土壌に5% (v/v) 以上混和することにより、白紋羽病菌に対して拮抗能を有する複数の土着の糸状菌が増加し、土壌の白紋羽病抑止性が向上する。また当該土壌には、一定の発病抑止効果がある。			
キーワード ナシ、白紋羽病、発病抑止土壌、非病原性菌、拮抗菌			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター	生物工学研究室
	協力機関	農林総合研究センター	果樹研究室、(国研)農研機構果樹茶業研究部門、(公財)園芸植物育種研究所、千葉農業事務所、東葛飾農業事務所、印旛農業事務所、長生農業事務所
実施期間	2018年度～2020年度		

### [目的及び背景]

ニホンナシは本県の主要な園芸品目であるが、難防除病害の白紋羽病による改植後の若木の枯死が頻発している。現在、主に講じられている対策は、改植時の化学合成農薬の土壌灌注であるが、1～2年おきの処理が必要なことから生産者の負担となっており、容易に実施できる環境負荷の少ない対策技術が求められている。近年、(国研)農研機構が白紋羽病菌非病原性菌株を用いて白紋羽病の発病抑止土壌を作製する手法を報告した。しかし、本県のナシ園土壌に用いた場合の効果やその発病抑止機構の詳細は分かっていなかった。そこで、改植時の新たなナシ白紋羽病対策技術の確立に向けて、県内ナシ園土壌に対する同技術の適応性を明らかにするとともに、土壌の糸状菌相解析等による、微生物性評価を行う。

### [成果内容]

- 1 白紋羽病菌非病原性菌株を培養した剪定枝チップ（以下、非病原性菌資材）を千葉市、白井市、八千代市、船橋市、一宮町のナシ園から採取した土壌に1、5、10% (v/v) 混和し2か月培養した場合、5%以上混和することにより、土壌の白紋羽病抑止性程度は無混和土壌よりも有意に向上する（表1）。
- 2 無混和土壌及び非病原性菌資材（5%）混和土壌から白紋羽病菌の抑止に関連することが推定される糸状菌を分離した場合、非病原性菌資材（5%）混和土壌は、*Gonytrichum* 属菌、*Trichoderma* 属菌が多く分離される傾向が見られる（表2、3）。
- 3 2で分離された *Gonytrichum* 属菌、*Trichoderma* 属菌、*Codinaea* 属菌は、全て白紋羽病菌に対して抑止性を有する拮抗菌であり、3属の中では、*Trichoderma* 属菌の抑止性が最も高い（表4）。

- 4 複数の地域の無混和土壌及び非病原性菌資材（5%）混和土壌の糸状菌相を PCR-DGGE 法により解析した場合、非病原性菌資材混和土壌においてのみ、拮抗菌の *Gonytrichum* 属菌のバンドが出現し、一部では最も優占する（図1）。
- 5 千葉市、白井市、八千代市のナシ園から採取した土壌に非病原性菌資材を5%（v/v）混和し2か月間培養した土壌を用いて、ポットにマメナシ実生苗を定植し、強毒性の白紋羽病菌を接種した場合、2か月後、無処理区ではほぼ全ての株が発病するのに対し、非病原性菌資材混和区は発病が認められず、白紋羽病の発病抑止効果がある（表5）。

[留意事項]

白紋羽病菌非病原性菌株を利用した資材は土壌改良材として製品化されている。

[普及対象地域]

県内全域

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

表1 白紋羽病菌非病原性菌株を培養した剪定枝チップの混和量がナシ園土壌の白紋羽病抑止性程度に与える影響

処理区	ナシ園土壌採取地ごとの白紋羽病抑止性程度の評価値					
	千葉市	白井市	八千代市	船橋市	一宮町	平均±標準誤差
無混和区	9.3	13.4	14.3	6.1	21.3	12.9±2.6 c
非病原性菌資材1%混和区	13.8	17.1	15.3	16.2	22.8	17.0±1.5 bc
非病原性菌資材5%混和区	25.1	17.9	20.4	16.6	25.5	21.1±1.8 ab
非病原性菌資材10%混和区	24.7	19.9	18.8	20.7	29.9	22.8±2.0 a

注) 採取したナシ園土壌に白紋羽病菌非病原性菌株を培養したチップ（非病原性菌資材）を所定の割合（v/v）で混和し、2週間に1回、攪拌しながら23℃で2か月間培養したのち、爪楊枝法（Takahashi and Nakamura, 2020）により土壌の白紋羽病抑止性程度を評価した。評価値は0～30の値をとり、評価値が高いほど抑止性が高い。表中の異なるアルファベット間にはTukey-KramerのHSD検定により有意差があることを示す（ $P < 0.05$ ）

表2 爪楊枝法による無混和土壌及び非病原性菌資材（5%）混和土壌の白紋羽病抑止性程度の評価後に爪楊枝の白紋羽病菌死滅域の表面に出現した糸状菌の出現頻度（%）

土壌採取地	処理区	<i>Gonytrichum</i> 属菌	<i>Codinaea</i> 属菌	<i>Trichoderma</i> 属菌	<i>Clonostachys</i> 属菌	その他
千葉市	無混和区	0.0	20.8	0.0	0.0	8.3
	非病原性菌資材混和区	4.2	29.2	0.0	0.0	4.2
白井市	無混和区	18.8	43.8	0.0	0.0	2.1
	非病原性菌資材混和区	62.5	10.4	2.1	0.0	0.0
八千代市	無混和区	2.1	18.8	0.0	0.0	14.6
	非病原性菌資材混和区	50.0	0.0	0.0	2.1	18.8
船橋市	無混和区	2.1	4.2	2.1	0.0	4.2
	非病原性菌資材混和区	64.6	0.0	0.0	4.2	0.0
一宮町	無混和区	2.1	18.8	0.0	0.0	14.6
	非病原性菌資材混和区	87.5	25.0	2.1	2.1	10.4

注) 表1の爪楊枝法による評価後、白紋羽病菌死滅域表面に出現し、分生子を形成した糸状菌について属レベルで同定した。1反復あたり16本の爪楊枝を調査した。出現頻度は3反復の平均値を示す

表3 爪楊枝法による無混和土壌及び非病原性菌資材（5%）混和土壌の白紋羽病抑止性程度の評価後に爪楊枝の白紋羽病菌死滅域の内部から分離した糸状菌の出現頻度（%）

土壌採取地	処理区	<i>Trichoderma</i> 属菌	<i>Fusarium</i> 属菌	<i>Clonostachys</i> 属菌	<i>Humicola</i> 属菌	その他
千葉市	無混和区	27.1	10.4	35.4	10.4	16.7
	非病原性菌資材混和区	62.5	39.6	4.2	4.2	6.3
白井市	無混和区	68.8	16.7	2.1	0.0	16.7
	非病原性菌資材混和区	89.6	10.4	0.0	0.0	4.2
八千代市	無混和区	58.3	18.8	6.3	8.3	12.5
	非病原性菌資材混和区	87.5	10.4	4.2	2.1	4.2
船橋市	無混和区	87.5	2.1	0.0	8.3	6.3
	非病原性菌資材混和区	95.8	0.0	0.0	0.0	2.1
一宮町	無混和区	93.8	2.1	0.0	0.0	6.3
	非病原性菌資材混和区	93.8	2.1	2.1	0.0	4.2

注) 表1の爪楊枝法による評価後、白紋羽病菌死滅域の内部を滅菌したメスを用いて削り取り、約1~2mm角の木片をストレプトマイシン加用1/10PDA培地上に置き、出現した糸状菌について生物顕微鏡を用いて分生子等の形状から属レベルで同定した。1反復あたり16本の爪楊枝を調査した。出現頻度は3反復の平均値を示す

表4 爪楊枝の白紋羽病菌死滅域から分離した糸状菌の白紋羽病菌に対する抑止性程度

菌株 (属名)	滅菌土壌 (160ml) に添加した分生子数	
	10 <sup>3</sup> 個	10 <sup>4</sup> 個
1801NC ( <i>Codinaea</i> )	4.2 ± 1.4	19.3 ± 2.5
1802YC ( <i>Codinaea</i> )	10.1 ± 0.6	23.4 ± 0.5
1803SC ( <i>Codinaea</i> )	6.0 ± 0.4	19.2 ± 2.5
1804YG ( <i>Gonytrichum</i> )	4.4 ± 1.6	25.0 ± 1.5
1805SG ( <i>Gonytrichum</i> )	3.5 ± 1.2	25.0 ± 0.4
1808NT ( <i>Trichoderma</i> )	25.3 ± 1.7	23.5 ± 3.4
1809YT ( <i>Trichoderma</i> )	25.2 ± 3.3	26.2 ± 2.7
1810FT ( <i>Trichoderma</i> )	27.6 ± 1.4	28.5 ± 1.3
滅菌土壌	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

注) 糸状菌の白紋羽病抑止性程度は爪楊枝法 (Takahashi and Nakamura, 2020) により評価した (3 反復、平均 ± 標準誤差)

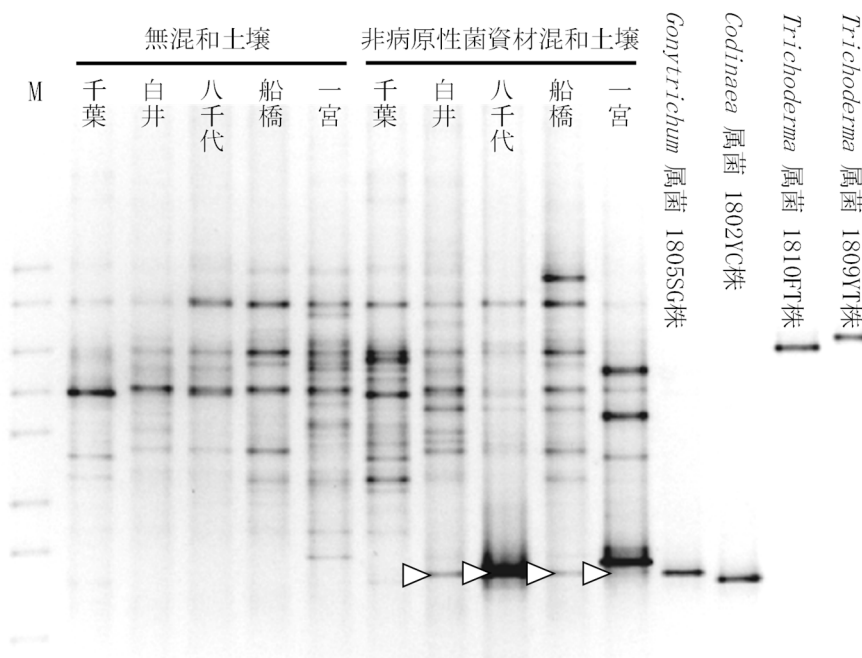


図1 無混和土壌と非病原性菌資材 (5%) 混和土壌の糸状菌相及び土壌から分離した拮抗菌の DGGE バンドプロファイル

注) 白色の矢じりは、切り出しを行い、塩基配列を決定した結果、マーカーとした *Gonytrichum* 属菌と同一の塩基配列だったバンドを示す

表5 非病原性菌資材 (5%) 混和土壌に定植したマメナシ実生苗の接種2か月後の白紋羽病発病率

処理区	供試土壌採取地		
	千葉市	白井市	八千代市
無混和土壌	80% (4/5)	100% (5/5)	100% (5/5)
非病原性菌資材混和土壌	0% (0/5)*	0% (0/5)*	0% (0/5)*

注) 発病の有無は、根部への菌糸の付着及び腐敗により判定した。括弧内の数字は、発病したポット数/供試したポット数を示す。\*は、フィッシャーの正確確率検定において有意な差があることを示す ( $P < 0.05$ )

[発表及び関連文献]

- 1 高橋・中村、白紋羽病菌非病原性菌株を用いて作製した白紋羽病発病抑止土壌の効果と *Trichoderma* 属菌の寄与、平成31年度日本植物病理学会大会
- 2 高橋・中村、白紋羽病発病抑止土壌の作製と抑止機構に関与する複数糸状菌種の特定、日本土壌微生物学会2019年度大会
- 3 Takahashi and Nakamura, Toothpick method to evaluate soil antagonism against the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. Journal of General Plant Pathology, 2020 86:55-59
- 4 令和3年度試験研究成果発表会（果樹部門）

[その他]

白紋羽病菌非病原性菌株（W450株）は（国研）農研機構果樹茶業研究部門より提供された。