

イチゴ炭疽病潜在感染株の 選択培地による検出と防除対策

奈良県農業総合センター ^{おか}岡 ^{やま}山 ^{けん}健 ^お夫

はじめに

イチゴ炭疽病は西南暖地を中心に多発し、被害が拡大しているイチゴの最重要病害である。2007年3月にまとめられた農林水産省の調査では、全国で施設の発生面積は1,000 haを超え、我が国のイチゴ栽培面積の1/6に及んでおり、筆者の試算では年間30億円を超える甚大な被害を招いている。

本病は、低温期に無病徴となる潜在感染株あるいは発病株残渣や病原菌に汚染された土壤が主な第1次伝染源である。このため、健全親株の養成や親株更新が各地で実施されているが、潜在感染株の発見が難しく、感染株の混入が避けられない。そこで、筆者らは現在、農水省研究高度化事業により、千葉県農業総合研究センター、農業環境技術研究所と共同研究に取り組み、PCRによる潜在感染株の検出と薬剤耐性菌の同時検出法の開発を目指している。ここでは、PCRに供する伝染源や高頻度感染部位を特定するため、第1段階として選択培地を作製した。結果を報告するとともに、潜在感染株による発病の防止策を紹介する。

I 潜在感染株の発生様相

イチゴ炭疽病の初発生時期は、奈良県の露地では平均気温がおおむね24℃以上となる5月下旬以降である。初期症状は、親株として植えられた潜在感染株の葉や葉柄に病斑を形成し、親株から発生したランナーの一部が黒変した、くぼんだ病斑を形成する。育苗圃では梅雨期以降、病斑上に分生子を形成し、雨滴によって飛散して徐々に発生が拡大する。発病適温は28℃で、高温多湿条件が続くと小葉や葉柄、ランナーに分生子堆を形成する。8月中旬以降になると、混み合った苗に感染して枯死株が坪状に発生する。この時期の病勢進展は急激で、雨滴やしぶきによって分生子が飛び散り育苗圃全体にまん延する。伝搬は降雨だけではなく、頻繁な頭上灌水によって助長していることも多い。定植期の9月中旬にな

ると苗が萎凋枯死し、採苗ができなくなることもまれではない。平均気温が24℃を下回る9月下旬以降になると、発病は次第に終息する。10月以降、感染苗は外見上無病徴となるため健全株と識別ができず、定植苗として本圃に植えられたり、翌年の親株として使われる(図-1)。このような無病徴感染株は、本圃ではビニール被覆後の高温によって急激に萎凋し、枯死株が多発して甚大な被害を招く。また、親株として使われると、イチゴの株で炭疽病菌が越冬し、翌年の第1次伝染源となる。

II 潜在感染株の検出方法

潜在感染株は、鉢植え子苗をビニール袋に入れて25～28℃の高温多湿状態を1～2週間保って発病を促し、葉や株の中心部に形成する分生子を確認することで検出できる(岡山, 1993)。しかし、この方法は株の衰弱を招きやすく、大量の苗を扱うことが難しい。ISHIKAWA (2003)は、アルコール浸漬法により葉で検出する方法を開発し、無病徴感染株を検出する簡易法として利用されている。しかしながら、これらの方法によって検出する分生子には、胞子形態が同一の非病原性菌が分離されることがしばしばある(植松ら, 2002; 海老原ら,



図-1 イチゴ炭疽病潜在感染株の発生状況
上：発生圃場，下：潜在感染株。

Detection and Counter Measures of Benomyl-resistant *Glomerella cingulata* from Latently Infected Strawberry Plants Using a Semiselective Medium. By Ken-o OKAYAMA

(キーワード：イチゴ，炭疽病，潜在感染，検出，防除)

2007)。しかもこれらの非病原性菌は *C. gloeosporioides* の種特異的プライマーを使った PCR (ADASKAVERG and HARTIN, 1997) で検出されるため、病原性を接種によって確認する必要がある。そこで筆者らは、現在、共同研究により炭疽病菌特異的プライマーを設計し、これを用いた PCR による診断法の開発に取り組んでいる。その前段階として、高精度診断に供する炭疽病菌の高頻度感染部位を特定するために選択培地を作成し、伝染源の網羅的探索を行うとともに潜在感染株の高頻度感染部位を明らかにした。

III 選択培地の作製

炭疽病菌の感染部位を知るために、県内で高率に発生している (平山ら, 未発表) ベノミル耐性イチゴ炭疽病菌 *Glomerella cingulata* (不完全世代 *Colletotrichum gloeosporioides*) を用いて選択培地を作製した。培地の作製には基礎培地として PSA を用い、20 種類の薬剤の中から炭疽病菌の生育を比較的抑制せず、他の病原系状

菌を抑制する薬剤を検索した。ベノミル添加培地では、ベノミル耐性イチゴ炭疽病菌はベノミル 50 ppm 以上の濃度で菌叢の生育量が半減するものの、200 ppm の濃度でも伸長した。一方、イチゴ萎黄病菌、イチゴ灰色かび病菌、ハウレンソウ株腐病菌は、12.5 ppm 以上で全く伸長しなかった。トリフルミゾール添加培地では、ベノミル耐性イチゴ炭疽病菌は 12.5 ppm 以上の濃度で生育量が半減したが、200 ppm の濃度でも伸長した。イチゴ萎黄病菌は 25 ppm 以上のトリフルミゾール添加によって生育せず、灰色かび病菌の生育も抑制され、6.25 ppm 以上で株腐病菌の生育も抑えられた (表-1)。細菌の生育を抑制するオキシガルおよびストレプトマイシン硫酸塩はそれぞれ 200 ppm 以下、50 ppm 以下で炭疽病菌の生育に影響がなかった。これらの結果から、PSA 培地にベノミル 50 ppm、トリフルミゾール 30 ppm、オキシガル 100 ppm、ストレプトマイシン硫酸塩 50 ppm を添加したものを選択培地とした。

IV イチゴ炭疽病菌の高頻度検出部位

選択培地を用いて炭疽病菌を分離した結果、潜在感染株および発病枯死株の小葉、葉柄、葉柄基部から高率に炭疽病菌が分離され、クラウンや鉢土からも分離された (岡山ら, 2007)。一方、本菌の分離に常用されているストレプトマイシン硫酸塩加用 PSA 培地上での菌叢の生育は速かったが、他の雑菌の生育が旺盛なため潜在感染株からの分離率は選択培地に比べて半減した。しかも、枯死株の小葉、葉柄、鉢土培養土から炭疽病菌が検出されず、葉柄基部やクラウンからの検出率も低かった (表-2)。選択培地上に生育した菌叢は *G. cingulata* を含めて 2 種類以下に抑えられ、PSA に比べて明らかに少なく選択性が高かった。選択培地上では炭疽病菌の生育はやや遅れたが、培養 7 日後には鮭肉色の分生子堆を含む菌叢が明瞭に現れ、菌叢上に本菌特有の分生子を多数形成した。本選択培地は他の糸状菌、細菌の増殖を抑制するだけではなく、菌叢の形状、着色を目視観察することにより他の菌と容易に判別できた (図-2)。この選択培地は植物体からの検出や動態調査に適するが、感受性菌の検出やコンタミしやすい土壌からの分離・定量には、*Colletotrichum acutatum* を対象に作製された改変 Mathur's 培地 (FREEMAN and KATAN, 1997) のほうが使いやすい。

選択培地を用いて、10 月以降に潜在感染状態となった外観健全株を供試し、12 ~ 4 月に炭疽病菌を分離して感染部位を調査した。その結果、炭疽病菌は小葉、葉柄、葉柄基部から高率に分離され、部位による分離頻度

表-1 *Glomerella cingulata* (Nara-gc5) (Gc), *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* (Uha-2) (Fof), *Botrytis cinerea* (Nara-bol) (Bc) および *Rhizoctonia solani* (Nara-rh1) (Rs) のベノミル水和剤、トリフルミゾール水和剤に対する感受性^{a)}

薬剤名	濃度 (ppm)	Gc	Fof	Bc	Rs
ベノミル水和剤	0.78	47	38	0	84
	1.56	47	21	0	73
	3.13	42	2	0	56
	6.25	41	1	0	0
	12.5	40	0	0	0
	25	36	0	0	0
	50	23	0	0	0
	100	18	0	0	0
	200	13	0	0	0
トリフルミゾール水和剤	0.78	32	7	32	62
	1.56	28	6	25	42
	3.13	24	3	14	40
	6.25	22	2	13	33
	12.5	19	2	9	30
	25	18	0	7	28
	50	14	0	5	13
	100	14	0	5	12
	200	13	0	4	8
Control	0	47	42	39	84

^{a)} PSA で培養した病原菌の菌そうディスク (直径 6 mm) を所定濃度の薬剤を含む培地に置床して 25℃で 4 日間培養し、菌叢の生育を測定した。

表-2 選択培地および PSA 培地による潜在感染株、枯死株および鉢土培養土からのイチゴ炭疽病菌の分離頻度比較

培地	イチゴの植物体 ^{a)}	分離率 (%) ^{b)}				
		小葉	葉柄	葉柄基部	クラウン	鉢土培養土
選択培地	潜在感染株	80.0 ± 9.4	90.0 ± 6.1	100 ± 0.0	55.0 ± 16.6	25.0 ± 6.5
	枯死株	70.0 ± 9.4	80.0 ± 9.4	100 ± 0.0	90.0 ± 6.1	25.0 ± 7.9
PSA	潜在感染株	50.0 ± 15.8	50.0 ± 15.8	37.5 ± 6.5	12.5 ± 11.2	0
	枯死株	0	0	25.0 ± 11.2	25.0 ± 19.4	0

^{a)} 潜在感染株および枯死株は、ペノミル耐性炭疽病菌の 10⁵/ml の分生子を株当たり 10 ml 噴霧接種して作製した。 ^{b)} 分離率の数字は平均値±標準誤差。小葉，葉柄，葉柄基部の各 4 切片を分離に用い，各 5 株を供試した。

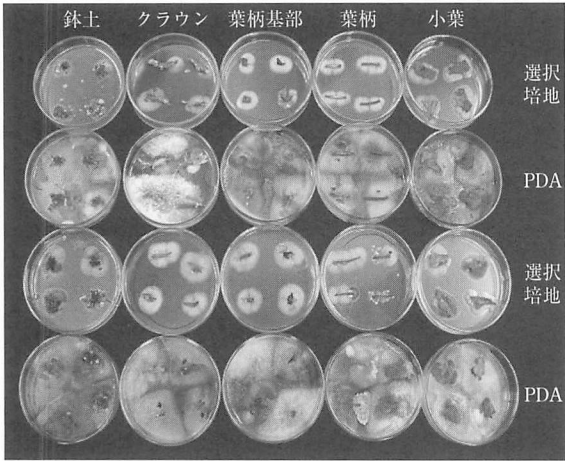


図-2 イチゴ炭疽病発病株（上 2 段）および枯死株（下 2 段）からの分離

の差はほとんどなかった。分離頻度は、外側葉位の小葉や葉柄，葉柄基部から高率に分離され，内側の新生葉位になるほど検出率が低下したが，最も新しい小葉や葉柄，葉柄基部からも分離された（図-3）。

V 根部感染による発病と培養土汚染

炭疽病菌が発病株の鉢土から分離されたため，根からの侵入を調査した。子苗の根部を分生子懸濁液に浸漬あるいは鉢土に分生子懸濁液を灌注し，ビニールハウス内に静置したところ，接種子苗は地上部が萎凋し始め，やがて葉柄基部が黒変して枯死した。発病株は根の褐変や伸長阻害が認められた。発病株の根やクラウンから炭疽病菌が分離され，根あるいはクラウンから炭疽病菌が侵入感染し，葉柄に進展すると考えられた。

鉢土培養土の汚染を調査するため，各種育苗用培養土に分生子を接種し，選択培地を用いて分離したところ，水田土壌は接種 21 日後，ピートモス・バーミキュライ

ト混合培養土とオガクズは 49 日後，砂土からは 126 日後も分離された（図-4）。

イチゴ炭疽病菌の土壌伝搬については，*C. acutatum* の感染株に付着した土壌や根圏土壌から炭疽病菌が検出され（EASTBURN and GUBLER, 1990 ; FREEMAN and KATAN, 1997），分離菌の浸根接種によって病原性が確認されている。また，*C. gloeosporioides* や *C. acutatum* の胞子は滅菌土壌で長期間生存することが知られている（FREEMAN et al., 2002）。しかし，これまでは土壌くん蒸消毒が行われているため，土壌伝搬は重視されていなかった。近年，臭化メチルの全廃や高設栽培の導入に伴い，育苗圃や本圃においてピートモスやオガクズなどの培養土資材の利用が進んでおり，このような栽培様式では培養土汚染によって発病するおそれがあることが明らかになった。

VI 防 除 対 策

選択培地を用いた検出によって炭疽病菌は小葉，葉柄，クラウンで越冬し，翌春まで高率に潜在感染して生息することが明らかになった。このような潜在感染株の発病抑止や 2 次伝搬防止には，雨よけ育苗と底面給水が最も有効である（OKAYAMA, 1993 ; 岡山, 1994）。底面給水は，ポリエステル不織布を鉢底に敷いて灌水チューブを下向きに置き，毛管水で鉢底から給水させる灌水法である。この育苗法はイチゴの地上部に水滴がかからないため潜在感染株の発病を抑制し，発病株が混入しても分生子形成が阻止され，2 次伝搬が遮断されて育苗中のまん延を防ぐことができる。底面給水は鉢土表面が乾きやすいので苗の活着が遅れることがあり普及が進んでいなかったが，近年苗の活着を損なわない工夫がなされつつあり（米本ら, 2006），今後低コストで確実な育苗技術の確立が期待される。

土壌伝染については，これまでは発病枯死残渣による

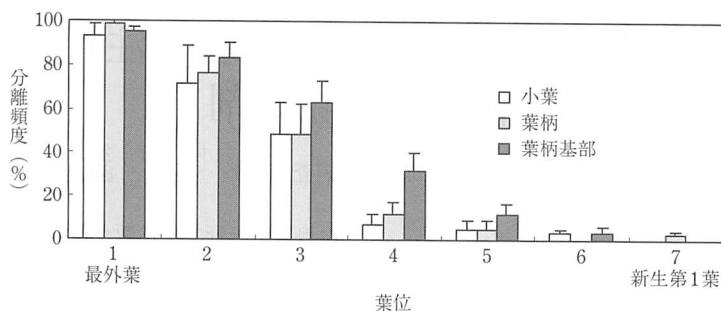


図-3 イチゴ炭疽病潜在感染株の葉位別分離頻度

子苗は、ペノミル耐性炭疽病菌の $10^5/\text{ml}$ の分生子を株当たり 10 ml 噴霧接種して作製し、雨よけハウス内に置いて頭上灌水で維持した。小葉、葉柄は各 4 切片、葉柄基部は各 2～4 切片を分離に用い、各 5 株を供試した。分離は、12 月、2 月、4 月に行った。

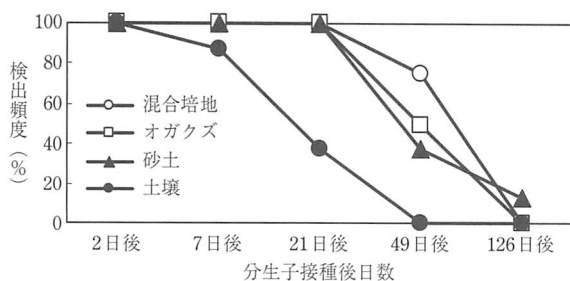


図-4 イチゴ炭疽病菌分生子の培養土における生存

混合培地はビートモスとバーミキュライトを混合した培養土、土壌は所内の水田土壌を用いた。ペノミル耐性炭疽病菌の分生子 $2 \times 10^5/\text{ml}$ を 0.3 l 容量の鉢土当たり 20 ml を灌注接種した。鉢土はビニールハウス内に静置して頭上灌水で維持した。

土壌汚染が指摘され、土壌消毒による防除が行われてきた。分生子による培養土汚染の防除には、育苗圃における根やクラウンからの感染防止あるいは本圃の補植株植付け時の対策が必要になる。これには、薬剤灌注や湛水が有効であり、有効薬剤の適用拡大が望まれる。

生産者にとって最大の問題は、発生した育苗圃から採苗せざるを得ない場合の対策である。選択培地を用いて浸透性殺菌剤の効果を評価したところ、薬剤処理によって感染株からの炭疽病菌の検出菌叢数は減少するが、防除価は処理時期によって変動した。発生前の 4、5 月に処理すると 1 か月以上初発を遅延させることができ、本圃定植直前に散布すると潜在感染株による枯死株の発生を抑えることができた。本病は高温期の露地育苗では病

勢進展がすさまじく、この時期には薬剤防除だけでは食い止めにくい。処理時期の選択によって高い薬効が期待できる。

おわりに

今回は選択培地による研究の進捗を報告したが、共同研究者の間では病原菌特異的プライマーの設計や DNA 抽出技術が着実に進んでおり、研究期間が終了する 2008 年度にはその成果を報告したい。選択培地は苗の感染状態を知るだけでなく、炭疽病菌の動態調査や薬効の評価が可能である。今年度は引き続き防除効果の検証にこれを利用して、生産者の不安感の軽減に努めた。紙面の都合上防除対策を詳述できなかったが、本病でお困りの方はメールアドレス (okayama@naranougi.jp) へ連絡していただければできるだけ対応したい。

引用文献

- 1) ADASKAVERG, J. E. and R. J. HARTIN (1997): *Phytopathology* 87: 979～989.
- 2) EASTBURN, D. M. and W. D. GUBLER (1990): *Plant Dis.* 74: 161～163.
- 3) 海老原克介ら (2007): 日植病報 (講要) 73: 41.
- 4) FREEMAN, S. and T. KATAN (1997): *Phytopathology* 87: 516～521.
- 5) ——— et al. (2002): *Plant Dis.* 86: 965～970.
- 6) ISHIKAWA, S. (2003): *J. Gen. Plant. Pathol.* 69: 372～377.
- 7) OKAYAMA, K. (1993): *Jpn. J. Phytopathol.* 59: 514～519.
- 8) 岡山健夫 (1993): 奈良農試研報 24: 41～46.
- 9) ——— (1994): 植物防疫 48: 340～342.
- 10) ———ら (2007): 日植病報 73: 155～161.
- 11) 植松清次ら (2002): 同上 (講要) 68: 201.
- 12) 米本謙悟ら (2006): 同上 72: 322.