

イチゴ小葉を用いたイチゴ炭疽病菌の簡易病原性判定法

千葉県農林総合研究センター ^{すず} 鈴 ^き 木 ^{たけし} 健

はじめに

Glomerella cingulata (不完全世代: *Colletotrichum gloeosporioides*) によるイチゴ炭疽病は、イチゴ栽培において最も問題視されている重要病害である。イチゴ炭疽病は、いったん発生すると薬剤散布による防除が難しく、時には壊滅的な被害をもたらす場合がある。本病の主要な第一次伝染源は潜在感染株によると考えられており(岡山, 1994)、効果的な防除対策を行うには潜在感染株の早期発見が必要である。現在は、ISHIKAWA (2003) が開発したエタノール浸漬法による簡易検定などにより、潜在感染株の検査が行われている。

一方、イチゴに感染する *C. gloeosporioides* にはイチゴに強い病原性を示す菌株(以下強病原性菌株: highly virulent isolate)と病原性をほとんど示さない菌株(弱病原性菌株: lowly virulent isolate)があることが知られている(植松ら, 2002)。これらの菌株の形態を比較してみると、分生子の形状や PDA 培地上での菌叢の色・形態に明確な違いは見いだせなかった。

エタノール浸漬法による簡易検定では、感染している菌株が強病原性菌株であっても弱病原性菌株であっても、同様に炭疽病陽性と判定されてしまい、栽培に使用可能な苗が少なからず廃棄されている。この問題を解決するには菌の病原性の有無を判定する必要がある。筆者らは、現在、遺伝子増幅法(PCR)によるイチゴ炭疽病潜在感染株検出方法の開発に取り組んでいる(鈴木ら, 2008)。この方法は、短時間で強病原性菌株と弱病原性菌株の識別ができるものと期待されている。この方法の検出精度を担保するため、全国のイチゴ産地から数多くの菌株を収集し菌株の病原性を判定し、PCRによる検出結果との整合性を調査しているところである。

菌の病原性を判定するには、イチゴ苗に接種し、その病徴を調査し判定する必要があるが、多数の菌を判定するには大量の苗、施設および労力が必要となる。田中ら(2009)は、イチゴのランナーに菌を接種し、病徴を観

察する方法を報告したが、この検定法はランナーの発生時期に限定される。そこで筆者らは、田中らの方法を基に、常時利用可能で取り扱いの容易なイチゴ小葉を使用した病原性判定方法を開発したので紹介したい。なお、本稿における図表および研究成果は鈴木ら(2010)より引用している。

I 簡易病原性判定法について

これまでに、炭疽病菌に対するイチゴ生体の反応を利用し、イチゴ炭疽病抵抗性や炭疽病菌の病原性を検定する方法が検討されている。例えば、NOGUCHI et al. (1994) は、イチゴ葉柄を *C. gloeosporioides* の分生子懸濁液に挿し、病徴の発生程度でイチゴの抵抗性を評価する方法を報告しており、DENOVES-ROTHAN and GUÉRIN (1996) は、*C. acutatum* の分生子懸濁液にイチゴ苗を浸漬し、イチゴの抵抗性を検定する方法を報告している。*C. gloeosporioides* の病原性検定には分生子懸濁液をイチゴ苗へ噴霧接種する方法(石川, 2005; 片山ら, 2008)が多く用いられている。また、平成6年度「総合農業」研究成果情報(野菜・茶業試験場久留米支場・病害研究室, 1995)では、イチゴおよびシクラメンの葉を用いた炭疽病菌の簡易病原性検定法が紹介されている。田中ら(2009)は、切断したイチゴのランナーに *C. gloeosporioides* 分生子懸濁液を滴下接種することにより、株への噴霧接種と同等の病原性検定が可能であることを報告している。この報告では、イチゴ小葉の利用は、病斑形成までの時間が長く結果のばらつきが大きいため検定には不適當であるとしている。しかし、材料の供給や取り扱いの観点からはイチゴ小葉を利用するメリットは大きいものと考えられた。そこで、我々は試料の調製方法および接種方法を検討し、イチゴ小葉を用いた実用的かつ簡易な病原性判定方法の開発を試みた。

II 試験方法

簡易病原性判定に用いる接種源および接種方法は、田中ら(2009)の方法に準じて行った。以下に、方法を紹介する。

1 接種源の調整

供試菌株をブドウ糖加用ジャガイモ煎汁溶液 potatodextrose broth : PDB) 培地中で 25℃, 1 週間振とう培

A Simple and Rapid Evaluation Method for Virulence of *Glomerella cingulata* Isolates from Strawberry Plants by Excised-leaf Inoculation. By Takeshi SUZUKI

(キーワード: *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, イチゴ炭疽病, 病原性, 生物検定, イチゴ)

養を行い、ガーゼろ過後、遠心分離により分生子を回収する。この分生子を蒸留水に懸濁し、分生子濃度を 10^6 個/ml に調整して接種源とする。

2 検定用イチゴ小葉の調製

検定用イチゴ小葉は以下の方法で調製する。イチゴ健全苗から完全展開した小葉を採取し、よく水洗した後、70%エタノールに30秒間浸漬して表面殺菌を行う。表面殺菌後に小葉を切り離し、切断面を流動パラフィンで覆い、風乾し葉面の水分を取り除く。

3 接種方法および病徴観察

調製した小葉は、滅菌水で湿らせたろ紙を敷いた9cmシャーレ内に置床し接種を行う。接種は、調製したイチゴ小葉1枚当たり接種源を $10\mu\text{l}$ 滴下する。滴下接種後にシャーレのふたを閉め、滅菌水で湿らせた紙ウエス(商品名:キムタオル, 日本製紙クレシア社)を敷いたプラスチック容器に入れ、28℃の恒温器内に置いて、4週間程度、経時的に病斑形成の有無を観察する。病原性菌の場合、口絵①のように2~3週間程度でイチゴ小葉上に病斑が形成される。一方、弱病原性菌の場合は、病原性菌に比べ病斑の形成が遅いか、もしくは病斑が形成されない(口絵②)。筆者らは、接種部位に直径5mm以上の病斑が形成された場合に陽性と判定し、陽性判定した小葉が半数以上の場合の菌株を強病原性菌と判断している。なお、接種後4週間以上経過したイチゴ小葉は、黄化・黒変等が見られ判定が難しくなるので注意を要する。

III 葉位の葉齢の違いが判定結果に及ぼす影響

田中ら(2009)が指摘しているイチゴ小葉を用いた試験結果のばらつきは、寄主となるイチゴ小葉の病原菌に対する感受性の個体差が反映されている可能性がある。この点については、野菜・茶業試験場久留米支場・病害研究室(1995)の報告においても、検定する葉の葉齢を揃えることが留意点としてあげられている。そこで、検定に最適な葉位を明らかにするため試験を実施した。

試験には、生育の揃ったイチゴ苗の葉位の異なる葉を供試し、イチゴ小葉に接種を行った。材料として、最も若い完全展開葉を第1葉とし、第3葉および最も古い葉である第8葉の3種類を試験に用いた。これらの小葉を用い、病原性菌株および弱病原性菌株を接種し、病斑形成の有無を観察した。各試験区はそれぞれ小葉9枚を供試した。なお、本試験に供試した病原性菌株および弱病原性菌株は表-1のとおりである。

第1葉を用いた試験区では、病斑の形成は早いものの弱病原性菌を接種した小葉にも病斑が認められた(表-2)。一方、第8葉を使用した試験区では、病斑の形成が比較的遅かった。また、試験中に葉の黄化が認められた。これに対し、第3葉を用いた試験では、強病原性菌株を接種した小葉にのみ病斑が形成され、試験完了時まで葉の黄化、黒変等の障害は認められなかった。これらのことから、イチゴ小葉を用いた検定には、葉齢の若い葉や老成した古葉は不相当であり、生育の揃いがよく充実した中位の展開葉を使用することが適切であると考えられた。

IV 風乾処理が判定結果に及ぼす影響

分生子懸濁液をイチゴ小葉に接種すると、病斑は滴下した液の外縁部から形成されることが観察された。クワ炭疽病菌 *C. dematium* では、クワ葉面上の成分が分生子の発芽を促進していることが報告されている(吉田・白田, 1997)。このことから、接種源を風乾することにより、分生子と葉面を密着させ分生子の発芽と病斑の形成を促進できるのではないかと推察された。そこで、分生子懸濁液を滴下した小葉に対し、風乾した場合の効果を調査した。使用菌株は、S-1菌株(強病原性)、N-1菌株(弱病原性)の2菌株で、対照として蒸留水を使用した。材料として、十分に展開した第3葉を供試した。風乾区の処理は、滴下接種後の小葉を吹き出し式クリーンベンチ内に放置し、接種源の水分を蒸発させることにより行った。無風乾区の処理は、滴下接種後、直ちに小

表-1 供試した菌株

供試菌株番号	菌株名	分離年	分離源	採取地	接種株の症状	病斑の形成	病原性判定
S-1	CH94 col	1994	イチゴ	千葉県	萎凋・枯死	有	強病原性
S-2	CE01CgK2	2001	イチゴ	千葉県	萎凋・枯死	有	強病原性
S-3	CE05Cg13-13	2005	イチゴ	千葉県	萎凋・枯死	有	強病原性
S-4	MAFF305913	1987	イチゴ	栃木県	萎凋・枯死	有	強病原性
N-1	HE01CgS3	2001	イチゴ	北海道	無病徴	無	弱病原性
N-2	CE01Cg1-3	2001	イチゴ	北海道	無病徴	無	弱病原性
N-3	CE02Cg4-1	2002	イチゴ	千葉県	無病徴	無	弱病原性
N-4	CC01Cg9-15	2001	イチゴ	千葉県	無病徴	無	弱病原性

表-2 葉位の違いが小葉接種病原性判定に与える影響

供試葉 葉位	接種 菌株	陽性判定率 (%) ^{a)}				
		6日目 ^{b)}	11日目	14日目	18日目	22日目
第1葉	S-1	67	89	78	88	83
	S-2	22	67	100	100	100
	S-3	0	22	33	63	83
	S-4	0	100	100	100	100
	N-1	0	0	0	0	29
	N-2	0	0	11	43	60
	N-3	0	0	0	0	33
	N-4	0	0	33	57	67
	対照	0	0	0	0	0
第3葉	S-1	33	89	89	89	89
	S-2	0	11	22	33	78
	S-3	22	44	44	44	67
	S-4	11	67	100	100	100
	N-1	0	0	0	0	0
	N-2	0	0	0	0	0
	N-3	0	0	0	0	0
	N-4	0	0	0	0	0
	対照	0	0	0	0	0
第8葉	S-1	11	89	67	100	N
	S-2	0	0	63	N ^{c)}	N
	S-3	0	11	67	100	N
	S-4	0	0	0	N	N
	N-1	0	0	0	0	N
	N-2	0	0	0	0	N
	N-3	0	0	0	N	N
	N-4	0	0	22	N	N
	対照	0	0	0	0	N

^{a)} 接種部位に直径5mm以上の病斑が形成された場合陽性と判定した。1区につき小葉9枚を供試し、この中で判定可能な小葉のうち陽性と判定した小葉の割合を示す。

^{b)} 菌株分生子接種後の経過日数を示す。

^{c)} 供試したすべての小葉が判定不能となったことを示す。

葉をシャーレに置床した。その結果、風乾処理した区では無風乾区に比べ病斑の形成が促進され、判定に要する日数が7~12日程度短縮できた(表-3)。また、風乾処理によるイチゴ小葉への影響も認められなかった。

V 小葉を用いたイチゴ炭疽病菌の簡易病原性判定法

以上の結果から、イチゴ小葉を使用した簡易病原性検定には、生育が揃い充実したイチゴ苗の中位葉を使用すること、接種源を滴下後に風乾処理を行うことが重要であると考えられた。これらの点を考慮し、田中ら(2009)の方法を図-1に示した手順に改変することで、イチゴ小葉を用いた簡易病原性判定が可能と判断された。本法を用いることで、おおむね2週間程度で菌の病原性が判

表-3 接種後風乾処理の有無が小葉接種病原性判定に与える影響

処理区	接種菌株	接種後経過日数(日)				
		6	11	14	18	22
風乾	S-1	5/9 ^{a)}	8/9	8/9	8/9	8/9
	N-1	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	対照	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
無風乾	S-1	0/9	2/9	2/9	6/9	7/9
	N-1	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	対照	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9

^{a)} 数字は、病斑を形成した小葉の枚数/検査した小葉の枚数。

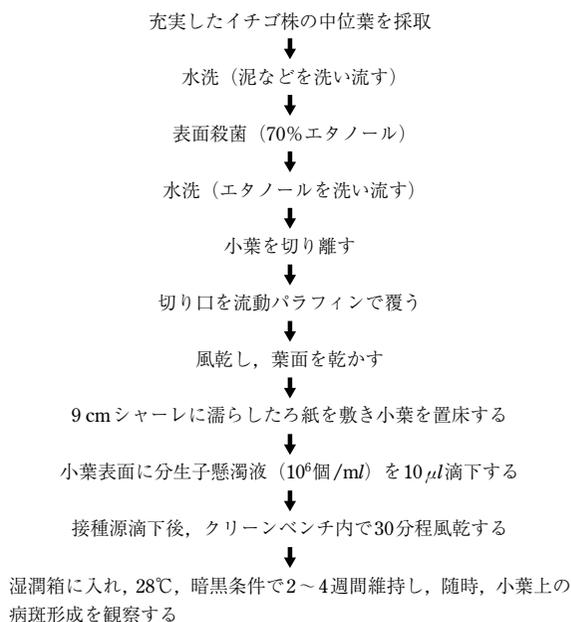


図-1 イチゴ小葉を用いた炭疽病菌の簡易病原性判定の手順

定できる。しかし、本検定方法は寄主であるイチゴ小葉の状態により試験結果に差が出る可能性があるため、十分な反復を取ることが望ましい。また、病原性の有無を確認した病原性菌、弱病原性菌および蒸留水を標準試料として同時に供試し、病徴の形成状態を比較する必要がある。

おわりに

C. gloeosporioides は多犯性で数多くの植物種から分離されており、その性状も多種多様である。本菌の研究を進めるうえで、病原力の強弱を一元的に評価する手法は有意義なものと考えられる。また、菌の病原性の有無を

明らかにすることは、イチゴ生産現場では非常に重要である。本稿では、イチゴ小葉を用いたイチゴ炭疽病菌の簡易病原性判定法について紹介した。本法は、比較的簡便・安価であり、結果の判定が容易なため、大量の試料を検定する一次スクリーニングとして、極めて有効な方法と考えられる。しかし、本法は簡易な生物検定法であることから検定精度には限界がある。このため、イチゴに対する病原性を確実に判定するにはイチゴ苗に対する接種試験を行う必要がある。本法の活用について、読者諸兄のご指導、ご助言をいただければ幸甚である。

引用文献

- 1) DENOYES-ROTHAN, B. and G. GUÉRIN (1996): Eur. J. Plant Pathol.

- 102: 615 ~ 621.
 2) ISHUKAWA, S. (2003): J. Gen. Plant Pathol. 69: 372 ~ 377.
 3) 石川成寿 (2005): 栃木県農試研報 54: 1 ~ 187.
 4) 片山貴雄ら (2008): 福岡県農業総合試験場研究報告 27: 39 ~ 43.
 5) NOGUCHI, Y. et al. (1994): Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants & Tea, A, 9: 13 ~ 26.
 6) 岡山健夫 (1994): 奈良農試研報特別報告 p. 1 ~ 128.
 7) 鈴木 健ら (2008): 日植病報 74: 198.
 8) ———ら (2010): 関東東山病害虫研報 57: 31 ~ 34.
 9) 田中千華ら (2009): 同上 56: 25 ~ 27.
 10) 植松清次ら (2002): 日植病報 68: 201 ~ 202.
 11) 野菜・茶業試験場久留米支場・病害研究室 (1995): 平成6年度「総合農業」研究成果情報, 農業研究センター, 茨城, p. 137 ~ 138.
 12) 吉田重信・白田 昭 (1997): 蚕糸昆虫研報 18: 79 ~ 96.

書評

随想録

—たびびと—

都丸敬一著

A5判, 183頁, 本体価格1,500円

緑新聞社 (2011年7月20日発行)

(ISBN978-4-9902667-1-4)



タイトル「たびびと」は俳人松尾芭蕉の「奥の細道」冒頭の一節「月日は百代の過客にして、行きかう年も又旅人也」への感懐に由来するという。著者は、日本専売公社(現JT)および東京農業大学を通じ、50年余にわたって植物病理学関連の研究・技術開発、教育に携わってこられた。植物病理学会永年会員のひとりでもある。年齢を重ね、さらに今回のこのような著作を編む過程で、上記の感懐が深まったということであろう。本書では、著者がこれまでに発表してこられた多くの研究論文、著書等とは別に、ごく少人数のグループの会報等に

折に触れて投稿した随筆などから約30篇を選んでまとめられている。

本書の内容は多岐にわたるが、万葉集とジェミニウイルス(「温故知新」)、バナナパンチートップウイルス、パパイヤのウイルス病など古くて新しい話題も見られ、著者の専門分野のウイルスに関するものがやはり多い。学生寮のこと、交友関係のこと、タバコ・塩関連のこと、研究上の旅のこと、そして東南アジア諸国との研究交流のことなども散りばめられている。随筆等で発表後新たな展開があった事項については「付記」として適切な補足を加え、読者の理解を助ける配慮がなされている。

収載されている随筆等はほぼ発表年次順に並べられ、そして「読者、また筆者自身でも、蛇足となるかもしれないが」と断りながら、本書の最終の項に、活動の中心であった植物ウイルスの専門分野の研究成果を極めて簡潔に書き加えて締めくくりとされている。

史上最初のウイルスとして記載されたタバコモザイクウイルス(TMV)に関わる「ウイルス発見の物語」では、発見の舞台となったワーゲニンゲン(オランダ)に留学経験のある著者ならではの記述に加え、TMVが発見以来常にウイルスの代表としてウイルス学はもとより分子生物学の進歩にも貢献してきたことなどに話題を広げて述べられている。また、東南アジア諸大学との研究交流については、インドネシア担当コーディネーターとして東南アジア農学学術交流事業を推進し、成果の一端を記すとともに学術交流上の問題点や示唆に富む提言もなされている。また、定年退職後乞われるままにボランティアとして長期滞在したバリ島の日記(抄)は現地大学との交流のほか、現地の日常の様子にも触れられており、この項は並みのガイドブック以上の内容と思われる。

本書は先述の通り幅広い内容で、全体としては約1/3が専門分野ではないが、参考となる有用な情報は多い。筆者の優れた表現力と簡潔で配慮の行き届いた筆致は、本書に読み物としての魅力も与えていて、専門家に限らず一般の方々でも抵抗なく読み進められる変化に富んだ良書と思われ、一読されることを広くお勧めしたい。

(日本植物病理学会永年会員 久保 進)