

イチゴ苗の長期冷蔵処理による炭疽病潜在感染株の低減

一般社団法人奈良県植物防疫協会 おか やま けん お
岡 山 健 夫

はじめに

Glomerella cingulata (アナモルフ: *Colletotrichum gloeosporioides*) によるイチゴ炭疽病は、全国的に被害が拡大しているイチゴの重要病害である。本病は高温期の降雨によって発病が助長され、育苗圃全体にまん延して大被害につながる。本病の主要な第1次伝染源は、低温期に外見上無病徴となる潜在感染株であり (HORN and CARVER, 1968; 岡山, 1988; OKAYAMA, 1993), その早期発見と除去が重要である。

潜在感染株は、鉢植え子苗や葉、葉柄をビニル袋に入れて 25～28℃の高温多湿状態に保ち、葉や株の中心部に形成させた分生子の確認により検出できる (岡山, 1993)。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、潜在感染株を検出する簡易法として利用されている。しかし、これらの方法では、イチゴ炭疽病菌 *C. gloeosporioides* と胞子の形態で区別できない非病原性菌が分離されることがしばしばある (植松ら, 2002)。しかもこれらの菌株は *C. gloeosporioides* の種特異的プライマーを使った Polymerase Chain Reaction (PCR) (MILLS et al., 1992) で分別できないため、両者の区別にはイチゴへの接種によって病原性を確認する必要がある。PCR 診断法は、その後イチゴ炭疽病菌を非病原性菌と識別する病原菌特異的プライマーを用いた方法が開発され、潜在感染株の検出に利用されている (SUZUKI, et al., 2010; 鈴木・吉田, 2012)。この診断技術は精度が高く、健全親苗の確保につながるものと期待されているが、全株検査を実施するには多大な時間と費用がかかり、抽出検査では感染株の見落としが避けられない。このため潜在感染株対策には検出だけでなく、全株を対象にしたフリー化技術が必要である。

本菌は、イチゴの株内で潜在、越冬し、翌年の第1次伝染源となって被害が拡大する。筆者らはこれまでに、潜在感染株体内でイチゴ炭疽病菌が高頻度に存在する部位を明らかにした (岡山ら, 2007) が、越冬中の株内での炭疽病菌の動態は不明であった。そこで、越冬株体内での炭疽病菌の動態を追跡し、最も低温となる時期に分

離頻度が低下し、低温条件が炭疽病菌の生育に深いダメージを与えることを明らかにした。さらに本知見を基に、周年収穫のために確立された長期冷蔵技術の応用によるイチゴ苗の炭疽病フリー化の可能性について検討した (岡山・平山, 2013)。

なお、本試験の一部は、農林水産省高度化事業「イチゴ炭疽病潜在感染と薬剤耐性菌の迅速同時診断技術の開発 (2006～08年)」および新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「イチゴ健全種苗生産のための病害検査プログラムの構築 (2009～11年)」により行われた。

I 露地およびビニルハウス内で維持した潜在感染イチゴ株からの炭疽病菌分離頻度の推移

イチゴ炭疽病の接種株や接種葉柄の調製には、イチゴ炭疽病菌 *G. cingulata* (アナモルフ: *C. gloeosporioides*) のベノミル耐性菌株 Nara-gc5 を用いた。接種試験には奈良県農業研究開発センター育成のイチゴ品種‘アスカルビー’を用いた。供試苗は健全株を確保するために雨よけハウス内で不織布を用いた底面給水管理 (OKAYAMA, 1993) によって育成した。接種用の苗はポリエチレン製の鉢 (容量 300 ml) に植え、5～7葉期のものを供試した。

イチゴ炭疽病菌は、Nara-gc5 菌株をショ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地で 25℃, 2週間振とう培養 (150 rpm) して得られた分生子の懸濁液を調製した。2005年、2007年ともに約 10^5 胞子/ml の分生子を株当たり 10 ml 噴霧接種後、1昼夜 25～30℃の温室状態に置いて感染を促して接種感染株を作製した。2005年の感染株は9月22日に接種し、無加温のビニルハウス内で維持した。2007年の感染株は10月1日に接種し、露地状態で維持した。感染株はいずれも1日につき1～3回、1回当たり15分間頭上灌水を行った。

炭疽病菌の分離には、選択培地 (岡山ら, 2007) を用いた。潜在感染株の葉位別の分離には、2005年、2007年接種株とも12月、および翌年の2、4月に中心葉から外側第7葉位までの小葉、葉柄を採取して行った。小葉は約1cm四方、葉柄は約1cmの長さに切断して葉位ごとに4切片を作成した。切片は常法により表面殺菌後、滅菌水で洗浄し、選択培地上に置床して28℃で5

Reduction of Latent Infection of Strawberry Anthracnose by Long-term Cold Seedling Storage below Freezing. By Ken-o OKAYAMA

(キーワード: イチゴ, 炭疽病, 潜在感染, 冷蔵, 防除)

日間培養した。2005年は時期ごとに5株、2007年は8株を越冬中の株から無作為に抽出して供試した。分離頻度の調査は、培養後の小葉および葉柄切片から生じる炭疽病菌の生育の有無を調査して葉位別分離率を算出した。

接種株は2005年、2007年とも10月末以降には病徴が認められず、潜在感染株となった。2005年にビニルハウス内に置いたイチゴ潜在感染株から炭疽病菌を分離した結果、12月には外側葉位5～7葉の小葉、葉柄から80%以上の高率で検出され、2～4葉位まで低率ながら検出された(図-1)。2006年2月には最も外側の7葉位からの分離頻度が高かったが、5ないし6葉位では分離頻度が低くなり、1～4葉位からの分離頻度は顕著に下がった。4月には5および6葉位でやや高まる傾向が見られた。

一方、2007年に露地に置いた潜在感染株の分離結果は、12月には外側葉位6～7葉の小葉および葉柄からの分離頻度は85%以上であり、1～4葉位の葉すべてから検出された(図-2)。しかし、2008年2月には分離頻度が低くなり、4月には1～4葉位からの分離頻度は

10%以下であった。

秋季の接種により調製した潜在感染株からの炭疽病菌の分離結果は、両年とも12月に分離頻度が高く、越冬後に低下する傾向が見られた。2月には両年とも内側の葉位で分離頻度が低くなり、4月の分離頻度は2007年に露地で越冬させた株が全葉位で最も低かった。

潜在感染株における菌の越冬について、イチゴ炭疽病菌の *C. fragariae* は外見上健全なイチゴの株で越冬し、クラウンで長期間生存する (HORN and CARVER, 1968) ことが知られ、*C. gloeosporioides* は、発病圃場から採取した潜在感染苗が翌年の伝染源になり、6月以降に高率に発病する (OKAYAMA, 1993)。潜在感染株では株の外側の古い葉や葉柄、葉柄基部の感染頻度が高いことが明らかにされている (築尾, 1994; 岡山ら, 2007) が、潜在感染株内での炭疽病菌の動態や衰退に関する報告はない。そこで、越冬後に感染頻度が著しく低下し、特に露地で越冬した潜在感染株からの分離頻度が低下した原因を探るために、イチゴ炭疽病菌菌糸の生育に及ぼす低温の影響を調査した。

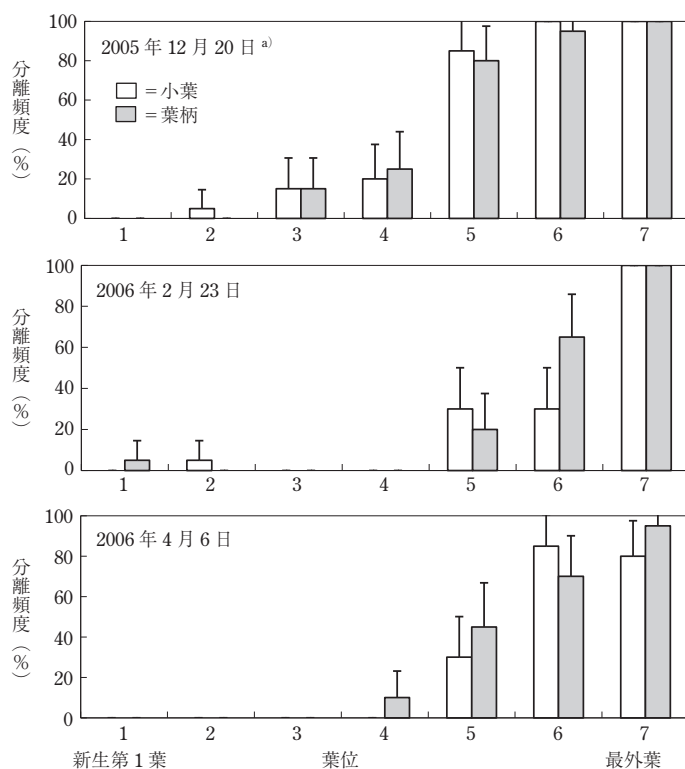


図-1 ビニルハウスで維持したイチゴ炭疽病潜在感染株における炭疽病菌の葉位別分離頻度

a) 潜在感染株からの組織切片採取日。

b) 図中の縦棒は95%信頼区間を示す。

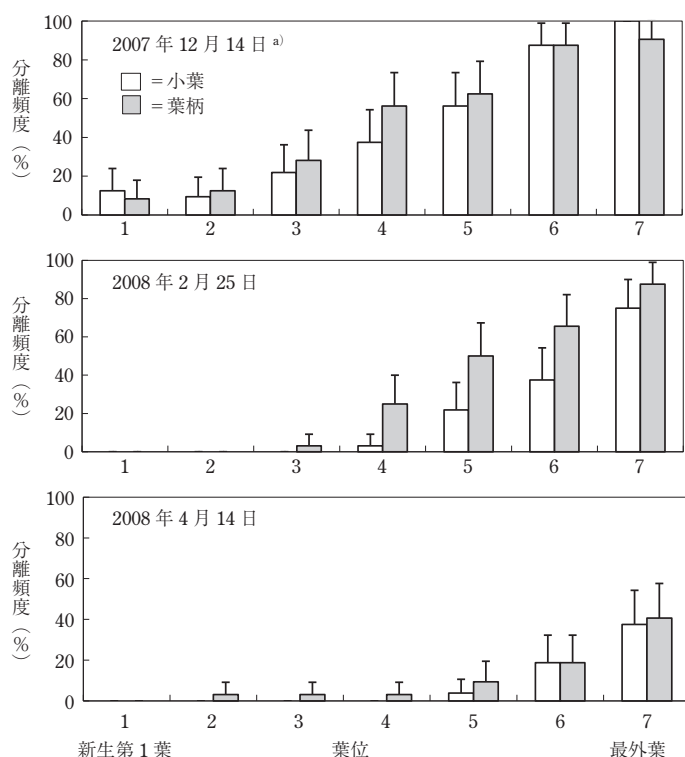


図-2 露地で維持したイチゴ炭疽病潜在感染株における炭疽病菌の葉位別分離頻度

a) 潜在感染株からの組織切片採取日.

b) 図中の縦棒は 95%信頼区間を示す.

II イチゴ炭疽病菌菌糸の生育に及ぼす低温の影響

イチゴ炭疽病菌 *C. gloeosporioides* (Nara-gc5) を直径 9 cm のプラスチックシャーレに入れた PSA 培地にて 25℃, 7 日間培養し, 生育した培養菌そうをビニル袋に入れて -2℃, 2℃, 5℃, 10℃ および 25℃ に設定した冷凍冷蔵庫内に 21 日間静置後, 取り出して直径 6 mm のコルクボーラで菌そうディスクを抜いた。この菌そうディスクを PSA 培地に置床し, 28℃ に設定した人工気象器内で 5 日間培養して菌そうの生育を調査した。

その結果, *C. gloeosporioides* の培養菌そうは, -2℃, 21 日間の冷蔵により菌糸伸長が見られなくなった。一方, 2℃, 5℃ で冷蔵した菌そうは 10℃, 25℃ で維持した菌そうに比べて伸長速度がわずかに遅れたが, 菌糸伸長が認められた (表-1)。

次に, 冷蔵処理による菌株間の生育を比較するため, *C. gloeosporioides* として Nara-gc5, IZU-1, MAFF 305913, Nara-gc6, Nara-gc17 および CHI-94 の計 6 菌株と, 主に葉枯症状を起こす炭疽病菌として病名記載さ

表-1 イチゴ炭疽病菌 *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) の菌糸伸長に及ぼす低温の影響

温度 a) (℃)	平均菌糸伸長 ± SE (mm)
-2	0
2	60.0 ± 0.0
5	63.0 ± 0.0
10	64.0 ± 0.0
25	64.0 ± 0.0

a) 菌そうディスクの培養温度.

れている *Colletotrichum acutatum* の MAFF306283 および MAFF 306247 の 2 菌株を用いて調査した。これら 8 菌株を PSA 培地で上述の試験と同様に培養後, 菌そうを -2℃, 5℃ に設定した冷凍冷蔵庫内に静置した。所定の期間後取り出して, 前項と同様にして打ち抜いた菌そうディスクを PSA 培地に置床し, 25℃ で 4 日間培養後, 菌そうの生育を調査した。

イチゴ炭疽病菌の異なる菌株に対する低温の影響を調

表-2 イチゴ炭疽病菌 *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) および *Colletotrichum acutatum* の菌糸伸長に及ぼす低温貯蔵の影響

病原菌	菌株	平均菌糸伸長 ± SE (mm)			
		21 日後 ^{a)}		56 日後	
		- 2℃ ^{b)}	5℃	- 2℃	5℃
<i>C. gloeosporioides</i>	Nara-gc5	0	44.0 ± 0.0	0	45.0 ± 0.6
<i>C. gloeosporioides</i>	Izu-1	0	44.0 ± 0.0	0	47.7 ± 1.5
<i>C. gloeosporioides</i>	MAFF305913	0	41.0 ± 0.0	0	41.7 ± 0.3
<i>C. gloeosporioides</i>	Nara-gc6	10.7 ± 6.1	41.0 ± 0.0	0	43.0 ± 0.0
<i>C. gloeosporioides</i>	Nara-gc17	33.0 ± 0.6	41.0 ± 0.0	0	43.3 ± 0.3
<i>C. gloeosporioides</i>	CHI-94	33.0 ± 1.2	44.0 ± 0.0	0	44.0 ± 0.0
<i>C. acutatum</i>	MAFF306283	34.0 ± 0.0	34.0 ± 0.0	35.0 ± 0.0	32.7 ± 0.3
<i>C. acutatum</i>	MAFF306247	34.0 ± 0.0	29.0 ± 0.0	33.7 ± 0.3	30.0 ± 1.0

a) 菌そうの貯蔵日数.

b) 菌そうの貯蔵温度.

査した結果, *C. gloeosporioides* は 3 菌株が - 2℃ の冷蔵 21 日間で菌糸伸長が認められず, 残り 3 菌株は菌糸が伸長したが, 56 日間の冷蔵後には全菌株で菌糸伸長が認められなかった。一方, 5℃ では *C. gloeosporioides* の生育抑制は認められず, *C. acutatum* は, 2 菌株とも - 2℃ 冷蔵による影響がなかった (表-2)。

イチゴ炭疽病菌は, これまで生育温度や発病適温が明らかにされ, 低温 (4 ~ 10℃) では感染株のクラウンで菌が長期間生存することが知られている (HORN and CARVER, 1968; SMITH, 1998)。しかし, 菌の生育に及ぼす冷蔵の影響は報告がなく, - 2℃ の冷蔵でイチゴ炭疽病菌 *C. gloeosporioides* が生育しなくなり, 死滅することが本研究によって初めて明らかになった。

III 冷蔵処理をしたイチゴ炭疽病菌接種葉柄からの炭疽病菌分離頻度の推移

- 2℃ の低温条件がイチゴ炭疽病の感染組織に及ぼす影響を知るために, 感染葉柄を用いて調査した。冷蔵処理に供した接種葉柄は, イチゴの葉柄部を約 1 cm の長さに切り, 約 10⁵ 孢子/ml の分生子懸濁液に浸漬して接種後, ビニル袋に入れて 25℃ の湿室状態に 1 昼夜置いて感染を促した。接種葉柄は, ビニル袋に入れて - 2℃ および 5℃ に設定した冷凍冷蔵庫内に静置した。

接種葉柄は, 所定期間後に冷凍冷蔵庫から取り出して表面殺菌後, 選択培地に置床し 25℃ で培養して炭疽病菌の死滅状況を調査した。接種葉柄は, 各冷蔵温度当たり 24 切片 ~ 48 切片を供試した。

分離頻度の調査は, 培養後の各切片から生じる炭疽病菌の生育の有無を調査して分離率を算出した。5 日間培養後菌糸伸長が認められなかった切片は, その後も全く

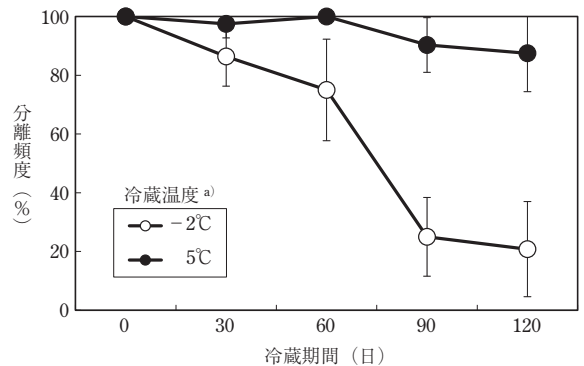


図-3 イチゴ炭疽病菌に感染させた葉柄の冷蔵期間と炭疽病菌の分離頻度

a) 冷蔵温度.

b) 図中の縦棒は 95% 信頼区間を示す.

菌糸発生が認められず, 炭疽病菌は死滅したものと判定した。

接種葉柄を - 2℃ で冷蔵した結果, 炭疽病菌の分離頻度は, 冷蔵期間が長くなるにつれて低下し, 90 日および 120 日後では著しく低かった。一方, 5℃ の冷蔵では, 120 日間の冷蔵後も分離頻度の低下が認められなかった (図-3)。

IV 冷蔵処理をした接種株からの炭疽病菌分離頻度の推移

さらに上述と同様の方法で接種し作成した潜在感染株を用いて長期冷蔵処理の影響を調査した。冷蔵処理は, 直径 9 cm のポリエチレン製鉢に植えた接種株をプラスチック製の収穫容器に入れ, 容器をビニル袋で包んで冷

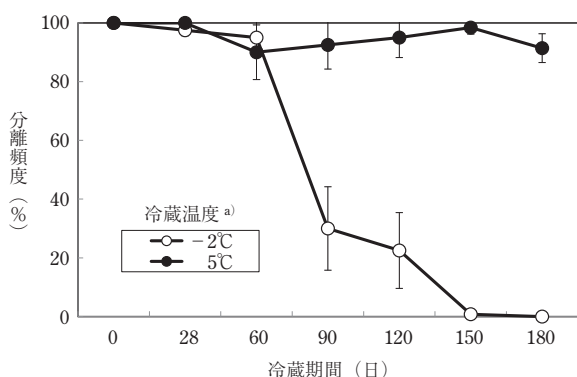


図-4 イチゴ炭疽病潜在感染株の冷蔵期間と葉から検出する炭疽病菌の分離頻度

a) 潜在感染株の冷蔵温度.

b) 図中の縦棒は 95% 信頼区間を示す.

蔵した。株の冷蔵は、 -2°C および 5°C に設定した冷凍冷蔵庫内に静置した。

炭疽病菌の分離には潜在感染株の外側葉位の 2 小葉を採取し、4 切片に切断して培養した。各時期の分離にはそれぞれ 5 株を無作為に抽出して供試した。冷蔵 150 日後および 180 日後に潜在感染株 8 株を無作為に抽出し、クラウン、葉柄基部、葉柄および小葉の切片を前項と同様に培養した。

その結果、 -2°C で冷蔵した接種株は、小葉からの菌の分離頻度が 90 日以降で著しく低下し、150, 180 日後の小葉からは、菌そうの生育が全く認められなかった（口絵①；図-4）。 -2°C で冷蔵 150, 180 日後の株では、小葉だけでなく葉柄、葉柄基部、クラウン等株全体からも炭疽病菌が分離されなかった（表-3；口絵①）。一方、 5°C の冷蔵では接種葉柄の結果と同様に長期間冷蔵後も分離頻度が変化せず、180 日後でも高頻度で本菌が分離された。

炭疽病菌の菌糸生育が冷蔵後、顕著に抑えられた原因を調査するため、ビニル袋のみで包装した培養菌そうシャーレと、温度変化を少なくするために、これをさらに発泡スチロールに入れて冷蔵した培養菌そうの生育程度を比較した。その結果、発泡スチロールに入れた菌そうは、冷蔵 21 日後に生存するものがあり、ビニル袋単独包装の菌そうのほうが生育が低下した。両者の温度変化はともにおおむね $-2^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の範囲で変動したが、ビニル袋単独包装のほうが発泡スチロール包装に比べて温度変動の振幅回数が多く、温度変化が菌糸生育に影響

表-3 長期冷蔵したイチゴ炭疽病潜在感染株から分離される *Glomerella cingulata* の頻度

冷蔵期間	温度 a)	平均分離頻度 (%) ^{b)}		
		葉柄	葉柄基部	クラウン
150 日間	-2°C	0	0	0
	5°C	89.1 ± 7.6	75.0 ± 15.0	53.1 ± 12.2
180 日間	-2°C	0	0	0
	5°C	50.0 ± 12.3	53.1 ± 17.3	46.2 ± 12.2

a) 冷蔵温度.

b) 数値は、平均分離頻度 $\pm$ 95% 信頼区間を示す.

するのではないかと推察された。

以上のことから、 -2°C の長期間冷蔵処理はイチゴ炭疽病感染株の感染頻度の低下に有効であることが明らかになった。今後は、この方法をイチゴ苗に適用することによって炭疽病潜在感染株のフリー化が可能になると考えられる。

おわりに

イチゴ苗の株冷蔵はイチゴ果実の周年収穫を目指して開発され、実用化された技術である。冷蔵は 2 月上旬から始まり、2 月に掘り上げた株は -2°C で 8 か月間貯蔵してもその後全く正常に生育することが報告されている（青柳ら, 1981）。最近の主要品種は休眠が浅いものが多く、夜冷育苗や株の部分冷却で早期収穫が可能になり、冷蔵技術は使われなくなった。しかし、今回の研究によって長期冷蔵による炭疽病菌の感染頻度の低下が明らかになり、潜在感染株の低減技術として長期冷蔵処理の再評価につながるものと期待される。

引用文献

- 1) 青柳光昭ら (1981): 愛知農総試研報 **13**: 174 ~ 182.
- 2) 築尾嘉章ら (1994): 九病虫会報 **40**: 47 ~ 50.
- 3) HORN, N. I. and R. G. Carver (1968): Phytopathology **58**: 540 ~ 541.
- 4) ISHIKAWA, S. (2003): J. Gen. Plant Pathol. **69**: 372 ~ 377.
- 5) MILLS, P. R. et al. (1992): FEMS Microbiol. Lett. **98**: 137 ~ 143.
- 6) 岡山健夫 (1988): 植物防疫 **42**: 559 ~ 563.
- 7) ——— (1993): 奈良農試研報 **24**: 41 ~ 46.
- 8) ———ら (2007): 日植病報 **73**: 155 ~ 161.
- 9) ———・平山喜彦 (2013): 同上 **79**: 269 ~ 274.
- 10) OKAYAMA, K. (1993): Ann. Phytopath. Soc. Jpn. **59**: 514 ~ 519.
- 11) SMITH, B. J. (1998): Compendium of Strawberry Disease, 2nd ed., J. L. Maas (ed.), APS Press, St. Paul, MN., USA, p. 46 ~ 48.
- 12) SUZUKI, T. et al. (2010): J. Gen. Plant Pathol. **76**: 247 ~ 253.
- 13) 鈴木 健・吉田奈々子 (2012): 植物防疫 **66**: 550 ~ 554.
- 14) 植松清次ら (2002): 日植病報 **68**: 201 ~ 202 (講要).