長崎県におけるエタノール噴霧法によるイチゴ炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*) の発生予察法

寺本 健[†]・森 三紗^{*}
(長崎県農林技術開発センター)

Method for forecasting strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* using an ethanol-spray treatment in Nagasaki Prefecture. Takeshi Teramoto and Misa Mori (Nagasaki Agriculture and Forestry Technical Development Center, Isahaya, Nagasaki 854-0063, Japan)

長崎県においてエタノール噴霧法を用いた *Colletotrichum gloeosporioides* によるイチゴ炭疽病の発生予察手法の有効性を検討した。その結果、7月上旬のエタノール噴霧法による潜在感染株率と9月上旬の発病株率には高い関連性が認められ、エタノール噴霧法を用いた発生予察手法が *C. gloeosporioides* によるイチゴ炭疽病の発生予察に活用できる可能性がある。

Keywords : latent infection, nursery season, pathogenicity

緒 言

Colletotrichum gloeosporioides によるイチゴ炭疽病は、イチゴ (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne) の最重要病害であり、多発生した場合には、定植苗の不足や減収を招く。本病は、日本各地のイチゴ産地で発生し、その発生生態および防除に関する試験研究が取り組まれており、九州においてもその成果が多数報告されている(松崎・山口, 1989; 池田・中村, 1990; 稲田ら, 2005; 稲田・古田, 2011; 吉田ら, 2012)。生産現場ではこれらの成果を踏まえ、小葉に病斑(以下、汚斑状斑点)を生じた株を含む発病株の除去、7~10日間隔の薬剤防除等の対策を実施しているが、その被害は年により多発生している。

一方、本病の発生予察手法は未策定である(農林水産省生産局植物防疫課, 2001)ため、長崎県では現地での発生状況を経時的に調査し、発生予察を行っている。しかし、本病の発病に重要な要因となる潜在感染(稲田ら, 2005; 稲田・古田, 2011)に関する調査が

実施されていないため、的確な感染状況が把握できず、生産現場における効率的・効果的な防除につながっていないと考えられる。

このような状況を踏まえ、2010~2014年に「発生予察の手法検討委託事業: 発生予察調査実施基準の新規手法策定事業」(農林水産省委託事業)においてエタノール噴霧法(Hirayama et al., 2015)による本病の発生予察手法策定に茨城県、奈良県、福岡県および長崎県で取り組んだので、長崎県における結果をとりまとめ報告する。

なお、PCR技術について多大なご指導、ご協力賜った坂本麻衣子氏に厚く御礼申し上げる。

材料および方法

調査は2012~2014年の3ヵ年、長崎市現川町、同市牧島町、雲仙市瑞穂町、同市国見町のそれぞれ3育苗圃場、計12育苗圃場を定め、年次を通じ同一圃場で実施した。ただし、苗の移動、定植等で調査できない圃場があったが、最低10圃場は保持した。供試品種は「さちのか」であったが、2013年、2014年は一部「ゆめのか」であった。育苗はすべてポット育苗で、2012年の2圃場が地床栽培で、それ以外は高設ベンチ栽培であった。また、雨よけ栽培は3圃場で、灌水方法はスプリンクラーが4圃場で、他は手灌水であった。

[†] t.teramoto@pref.nagasaki.lg.jp

^{*} 現在: 長崎県島原振興局農林水産部

^{*} Present address: Nagasaki Prefecture Shimabara Promotion Bureau Ministry of Agriculture & Forestry and Fisheries Department, Shimabara, Nagasaki 855-8501, Japan

1. 発病状況調査

毎年5～9月の上旬（毎月10日前後）に各圃場，親株は100株（5～6月），苗は500株（6～9月）について葉に汚斑状斑点を形成した株も対象とし発病株数を計数し，圃場ごとに発病株率を算出した。なお，苗が親株から切り離された（ランナー切り）時点で調査対象を親株から苗へ切り替えた。

2. 潜在感染状況調査

上記調査時に各圃場20株の最下位複葉1枚を葉柄基部から採取し，エタノール噴霧法より炭疽病菌の潜在感染状況を調査した。なお，エタノール噴霧処理は以下の手順により行った。すなわち，①供試葉を水道水で洗浄し，軽く水切り，②複葉の表裏，葉柄および葉柄基部に70%エタノールをハンドスプレーを用い十分量噴霧後，再度水道水で洗浄し，軽く水切り，③水道水で湿らせたキッチンペーパーを敷いたトレイ（内寸：縦34.5×横53.0×高さ6.0cm）に10～20葉ずつ葉表を上向きに葉および葉柄が重ならないように並べ，トレイごとビニール袋に入れ，28℃恒温条件で14日間静置した。処理後，葉，葉柄および葉柄基部に形成された分生子塊の有無により潜在感染株数を計数し，圃場ごとに潜在感染株率を算出した。なお，分生子塊から分生子をかきとり，光学顕微鏡を用い，形態観察により *C. gloeosporioides* であることを確認した。

3. PCR 法による病原性菌の発生状況調査

上記潜在感染状況調査のうち，7～9月の調査で形成された分生子塊を1複葉ごとに1.5ml マイクロチューブに入る長さに切断した滅菌済み爪楊枝の先端部ですべてをかきとり，1.5ml マイクロチューブに爪楊枝ごとに入れ，-20℃で凍結保存した。その後，CTAB法によりDNA抽出後，*C. gloeosporioides* を特異的に検出するプライマー CgInt (Mills et al., 1992) と ITS4 (White et al., 1990) を用い，PCR法（第1表）によりDNAが確実に抽出されたことが確認された全

サンプルを鈴木ら（2008）の手法によりイチゴ炭疽病菌病原性検定プライマーを用いてNested-PCR法により病原性を確認した。ただし，1複葉に発生した1～数コロニーをまとめてかきとり1サンプルとしたため，病原性菌出現率として圃場ごとに算出した。なお，2012年のみ1圃場あたり11サンプル以上得られた場合は10サンプルを無作為に選択し，試験に供した。

結 果

1. 発病状況

圃場単位での発生推移は，3ヵ年とも調査時期により発病株率にふれが大きく，明確な推移は確認できなかったが，各調査圃場の発病株率を平均すると以下のような発病推移がみられた。

2012年は，7月上旬調査において苗で初発が認められ（発生圃場数/調査圃場数：1/12，平均発病株率0.02%），8月上旬には発生圃場数1圃場（調査圃場数12），平均発病株率0.13%であったが，9月上旬には同4圃場（同11），同4.17%と急増した（第1図上段）。2013年は，8月上旬調査において苗で初発が認められ（発生圃場数/調査圃場数：3/12，平均発病株率0.17%），9月上旬には発生圃場数9圃場（調査圃場数12），平均発病株率1.90%となった（第1図中段）。2014年は，7月上旬調査において苗で初発が認められた（発生圃場数/調査圃場数：3/12，平均発病株率1.30%）が，8月上旬には発生圃場数3圃場（調査圃場数12），平均発病株率0.38%，9月上旬には同3圃場（同11），同0.29%と発生は減少し，2012年，2013年のような9月上旬の急激な発病の増加は認められなかった（第1図下段）。

3ヵ年とも親株での発病は認められず，7月上旬，8月上旬に苗で初発し，2014年を除き，9月上旬に発病が増加する推移となった。

2. 潜在感染状況

発病状況と同様に圃場単位での潜在感染の推移は，

第1表 DNA抽出確認PCRプロトコル^{a)}

PCR混合液の組成	鋳型DNA 1μl, 10×Buffer 2μl, dNTP 1.6μl, プライマー (CgInt, ITS4) 各0.2μl, rTaq 0.1μl, DW 14.9μl
反応条件	94℃4min. ↓ 94℃30sec. → 59℃30sec. → 72℃1min. (40サイクル) ↓ 72℃7min.

a) Ishii et al. (1998) を一部改変.

第1図 イチゴ炭疽病の発病と潜在感染の推移。調査対象は5月：親株、6月：親株あるいは苗（親株圃場数 / 苗圃場数：2012年7/5、2013年8/3、2014年7/5）、7月：苗。

3ヵ年とも調査時期により感染株率にぶれが大きく、明確な推移は検討できなかったが、各調査圃場の感染株率を平均すると以下のような潜在感染の推移がみられた。

2012年は、5月上旬調査で親株での潜在感染が認められ（感染圃場数 / 調査圃場数：7/11、平均感染株率15.1%）、その後感染株は増加し、8月上旬調査では苗の感染圃場数12圃場（調査圃場数12）、平均感染株率76.4%となった。9月上旬調査では感染圃場数は11圃場（調査圃場数11）であったが、平均感染株率は60.6%に減少した（第1図上段）。2013年も5月上旬調査で親株の潜在感染が認められ（感染圃場数 / 調査圃場数：5/10、平均感染株率3.4%）、7月上旬調査で

は苗の感染圃場数10圃場（調査圃場数12）、平均感染株率42.0%となった。その後、感染圃場数は8月上旬11圃場（同12）、9月上旬10圃場（同12）と減少しなかったが、平均感染株率は8月上旬36.9%、9月上旬34.0%と僅かに減少した（第1図中段）。2014年も2012年、2013年と同様に5月上旬調査で親株の潜在感染が認められ（感染圃場数 / 調査圃場数：6/12、平均感染株率8.5%）、7月上旬まで増加し、感染圃場数11圃場（調査圃場数12）、平均感染株率24.6%となったが、感染株率は他の2年より低かった。その後、感染圃場数は8月上旬8圃場（同12）、9月上旬6圃場（同11）、平均感染株率は8月上旬17.5%、9月上旬9.1%とともに減少した（第1図下段）。

第2表 PCR法による *C. gloeosporioides* 病原性菌の出現率の推移

調査年次	病原性菌出現率 (%)		
	7月上旬	8月上旬	9月上旬
2012	48.9	43.2	62.1
2013	50.5	50.0	69.5
2014	32.5	47.1	90.3

3ヵ年とも5月上旬の時点で親株での潜在感染が認められ、平均潜在感染株率のピークは、2012年、2013年は7月上旬に、2014年は8月上旬に苗で認められた。

3. PCR法による病原性菌の発生状況

病原性菌出現率は圃場により0～100%とバラツキが大きく、同一圃場でも調査時期により数値のふれが大きく、圃場ごとの明確な検討はできなかった。しかし、発病状況、潜在感染状況と同様に各調査圃場の病原菌出現率を平均すると以下のような推移がみられた。

2012年は、7月上旬で平均病原性菌出現率48.9%（出現圃場数/調査圃場数：9/11）、8月上旬で同43.2%（同11/12）とほぼ横ばいであったが、9月上旬には同62.1%（同12/12）と増加した。2013年もほぼ同様の推移を示し、病原性菌出現率は7月上旬で50.5%（同9/10）、8月上旬が50.0%（同9/11）とほぼ横ばいであったが、9月上旬には69.5%（同10/10）と増加した。2014年は、7月上旬の病原性菌出現率は32.5%（同7/11）であったが、8月上旬にはやや増加し、同47.1%（同8/9）となり、9月上旬には同90.3%（同6/6）に増加した（第2表）。

3ヵ年とも7月上旬、8月上旬の病原性菌出現率は40～50%であったが、9月上旬には増加する傾向が認められた。

考 察

イチゴ炭疽病の発生予察として、本病が発病する前の潜在感染状況を把握することが重要と考えられる（稲田ら、2005；稲田・古田、2011）。潜在感染状況を把握する手法としてエタノール浸漬法（Ishikawa, 2003）があるが、本研究では、この浸漬法を改変したエタノール噴霧法（Hirayama et al., 2015）を使用した。Hirayama et al. (2015) は本噴霧法と浸漬法の検出精度が同等であり、浸漬法よりも処理が簡単であると報告している。さらに、本県においても噴霧法と浸漬法の検出精度が同じであること、同量のサンプル量に対する一人あたりの処理時間が浸漬法に比べ約1/5

に短縮できることを確認しており（吉田、未発表）、エタノール噴霧法はイチゴ炭疽病の潜在感染状況調査に有用であると考えられた。

このエタノール噴霧法を用いて、長崎県内イチゴ4産地、12圃場におけるイチゴ炭疽病の育苗期における感染、発病推移を調査した結果、5月上旬には親株での潜在感染が認められるが、親株での発病はなく、苗では潜在感染が7～8月上旬にピークとなり、同時に病徴が現れるようになり、9月上旬に発病株が増加するものと推察された。ただし、2014年の潜在感染推移は2012年、2014年と同様の推移を示したが、発病株は7月上旬をピークとして、9月の発病の増加がみられなかった。同年は当センター内での調査でも同じ推移を示しており、薬剤防除および耕種的要因ではなく、気象的要因が影響している可能性があり、詳細な検討が必要と思われる。Hirayama et al. (2015) は、奈良県において同様の調査を行い、潜在感染は7月上旬に最も多くなり、発病株は7月下旬から認められ、8月下旬に増加すると報告しており、本報告とほぼ一致している。

なお、圃場単位で潜在感染状況、発病状況の推移を検討することは困難であった。この原因として、圃場（生産者）により発病株の除去、薬剤散布、下葉除去等のタイミングが異なっており、そのタイミングと調査時期の時間的差が影響したものと考えられる。また、発病状況調査において、確認された発病株のほとんどが汚斑状斑点を生じた株であったことから、発病株除去対策が徹底されていたと考えられる。

本県におけるイチゴ炭疽病の薬剤散布は7～10日間隔を基本としている。降雨が多い梅雨時期には散布タイミングを逃す場合が多いが、梅雨明け後の7月下旬以降は天候が安定し、本病の防除が定期的実施される。一方、本病の発生予察に重要と考えられる潜在感染は、7月上旬～8月上旬にピークを迎えることが明らかになり、この時期の感染状況を把握することでその後の発病を予測できる可能性がある。エタノール噴霧法は処理14日後に分生子塊が生じ、結果が得られる

第2図 潜在感染株率（7月上旬）と発病株率の関係。

ことおよび梅雨明け後の7月下旬頃から定期的な防除が実施可能となることを考慮すると7月上旬が本法による検定の実施時期と考えられる。また、本病の発病は9月上旬に増加することが明らかになったが、この時期は定植直前で、本病の発病程度がその後のイチゴ栽培に影響する。

そこで、7月上旬の潜在感染株率と9月上旬の発病株率との関係を2011年のデータ（潜在感染状況調査をエタノール浸漬法で行った以外、調査場所、時期、方法は同じ）を加え、検討した結果、第2図のとおり高い関連性が認められた。Hirayama et al. (2015) も7月上旬のエタノール噴霧法による潜在感染株率と8月下旬から11月上旬の発病株率に同様の関係を認めており、7月上旬のエタノール噴霧法による潜在感染状況調査は、9月の発病株率を予測する発生予察手法として有効と考えられる。

C. gloeosporioides には形態的に判別できない病原性がある菌（病原性菌）とない菌（非病原性菌）が存在し、ともにエタノール浸漬法で検出されることが報告されている（植松ら, 2002）。本研究で用いたエタノール噴霧法でも病原性菌、非病原性菌が検出されることが確認されており（吉田, 未発表）、両菌の比率が大きく変動するとエタノール噴霧法による潜在感染状況と発病株率の関係が大きく異なる可能性がある。しかし、本研究において病原性菌出現率は9月上旬に増加するものの、7～8月上旬には40～50%であり、大きな年次変動もないことが明らかになり、7月上旬

の潜在感染状況調査の結果から9月上旬の発病株率を予測することに支障がないと考えられる。ただし、9月上旬に病原性菌出現率が増加する原因は不明であり、また、今後その比率が変化する可能性もあるため、今後詳細な研究が必要と考えられる。

以上のことから、エタノール噴霧法による潜在感染状況調査は、イチゴ炭疽病の発生予察手法として有効と考えられるが、本手法により得られた潜在感染株率から9月の発病株率を予測するにはデータ不足である。本手法を発生予察に利用するためには、今後病害虫防除所等発生予察機関による調査データを積み上げ、精度を上げていく必要と考えられる。なお、他県において本手法を利用する場合、県により栽培概要が異なるため、潜在感染株率と発病株率との関係も異なると考えられ、各県病害虫防除所等発生予察機関による調査データを積み上げ、検証することが必要と考えられる。また、本研究では同じイチゴ炭疽病菌である *C. acutatum* の潜在感染、発病はほとんど認められなかったが、*C. acutatum* もエタノール浸漬法で潜在感染株の検出が可能であり（Ishikawa, 2004）、噴霧法での検出が可能と考えるが、発生予察手法としての有効性については検討が必要と考えられる。

引用文献

Hirayama Y., S.Asano, M.Kubota, M.Tojo and S. T.Ohki (2015) A practical method for forecasting strawberry anthracnose caused by *Glomerella*

- cingulata* using an ethanol-spray treatment in Nara Prefecture, Japan. Ann Rept Kansai Pl Prot 57 : 25-29.
- 池田弘・中村利宣 (1990) イチゴ親株床から子苗への炭疽病菌の伝染と薬剤防除効果. 九病虫研会報 36 : 46-47.
- 稲田稔・古田明子 (2011) 潜在感染株からの降雨および灌水によるイチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) の飛散. 九病虫研会報 57 : 45-50.
- 稲田稔・山口純一郎・古田明子 (2005) イチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) 潜在感染親株の育苗期における再発病と苗への感染. 九病虫研会報 51 : 11-14.
- Ishii H., S. Iwamoto, K. Nishimura (1998) Comparative studies on fungicide sensitivity and other characteristics in *Colletotrichum* isolated from various plant species. Proceedings of the 1998 Brighton Conference. Pest & Dis. : pp. 529-534.
- Ishikawa S. (2003) Method to diagnose latent infection by *Glomerella cingulata* in strawberry plants using ethanol. J Gen Plant Pathol. 69 : 372-377.
- Ishikawa S. (2004) Simple diagnosis using ethanol immersion of strawberry plants with latent infection by *Colletotrichum acutatum*, *Dendrophoma obscurans*, and *Fusarium oxysporum* f. sp. fragariae. J Gen Plant Pathol. 70 : 249-255.
- 松崎正文・山口純一郎 (1989) 親株床におけるイチゴ炭そ病の薬剤防除の効果. 九病虫研会報 35 : 41-44.
- Mills P.R., S.Sreenivasaprasad and A.E.Brown (1992) Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. FEMS Microbiol Lett 98 : 137-144.
- 農林水産省生産局植物防疫課 (2001) イチゴの病害虫. 病害虫発生予察事業の実施について: 発生予察事業の調査実施基準. pp. 378-383.
- 鈴木健・田中千華・伊藤靖之・植松清次・平山喜彦・岡山健夫 (2008) イチゴ炭疽病菌に対する特異的プライマーの作成. 日植病報 74 : 198. (講要)
- 植松清次・海老原克介・鈴木健・宮原秀一・小林敏満・野宮左近・川村栄一・河名利幸 (2002) 北海道の田畑転換圃場を利用したイチゴリレー苗生産における *Colletotrichum gloeosporioides* の潜在感染とその病原性. 日植病報 68 : 201-202. (講要)
- White T.J., T.Bruns, S.Lee and J.Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Application (Innis M.A. eds). Academic Press (New York) : pp. 315-322.
- 吉田満明・高田裕司・内川敬介・難波信行・寺本健・宮崎朋浩 (2012) イチゴ品種「さちのか」の育苗期における重要病害虫防除体系. 長崎農林技セ研報 3 : 81-109.

(2017年4月30日受領, 6月27日受理)