

イチゴ炭疽病の伝染様式の解明と診断・防除技術の確立

平山喜彦

Lifecycle Analysis and Control Technique Development of Strawberry Anthracnose Caused by *Colletotrichum fructicola*

HIRAYAMA Yoshihiko

Summary

Colletotrichum fructicola is a major causal agent among anthracnose pathogens of strawberry in Japan. The recent development of new strawberry cultivars which are susceptible to the pathogen and the rapid delivery of their seedlings enhance the development of the disease throughout the country. However, limited information is available regarding the life cycle, detection, and control measures of the pathogen. The objectives of this study were to clarify whether; 1) the pathogen can survive latently on the weeds growing around strawberry fields and whether acervuli form on the leaves after the treatment of glyphosate, 2) a newly-developed Bio-PCR assay can effectively detect *C. fructicola* in symptomless strawberry plants, 3) an ethanol-spray treatment forecasts the occurrence of strawberry anthracnose at the late nursery stage by detecting the latent infection at an early nursery stage, 4) neutral electrolyzed water and ozone water treatments through overhead irrigation effectively suppress strawberry anthracnose caused by the pathogen.

It was hypothesized that the wide range of weeds growing in and around strawberry fields represented an inoculum source of the disease; therefore, their potential as hosts of *C. fructicola* was investigated. The influence of a herbicide treatment on *C. fructicola* sporulation on weeds was also examined. The fungus was detected on 31 out of 541 (5.7%) of the leaves examined from 13 weed species sampled from 2005 to 2008. The fungus was most frequently isolated from *Amaranthus ascendens* Loisel. with an isolation frequency of 17.9% from leaves. Artificial inoculation of the pathogen caused brown leaf spots on *A. ascendens*. Other weeds such as *Echinochloa crus-galli* P. Beauv, *Galinsoga ciliata* Blake, *Solidago altissima* L., *Erigeron annuus* L., and *Sonchus oleraceus* L. were found to harbor the fungus at lower rates (4.3–8.1%) without symptoms. *C. fructicola* formed acervuli on leaves of *A. ascendens*, *E. crus-galli*, and *S. oleraceus* when killed by a herbicide (glyphosate). These results demonstrated that infected weeds associated with strawberry cultivation are potential inoculum sources of *C. fructicola*, especially when combined with a herbicide treatment.

A polymerase chain reaction (PCR) assay was developed for detection of *Colletotrichum fructicola* on symptomless strawberry plants. This protocol gave more rapid and sensitive detection results than existing assays. The magnetic beads method was used to efficiently extract the DNA of *C. fructicola* from the latent infection in strawberry plant tissues. The sensitivity of the PCR was increased by culturing the samples in potato dextrose broth for 2 days at 28 °C before the DNA extraction. This method shortened the duration of detection from approximately 3 weeks to 4 days. Furthermore, in composite samples of noninoculated and inoculated strawberry plants, the PCR assay detected *C. fructicola* in bulk samples of 1 infested and 9 noninfested petiole bases. In foundation-stock fields in Nara prefecture, we confirmed the usefulness of the assay by detecting and removing positive plants. These results demonstrated that the assay is a reliable diagnosis of the pathogen for production of healthy foundation-stock strawberries.

An ethanol-spray treatment was evaluated as a practical forecasting of strawberry anthracnose caused by *Glomerella cingulata* in Nara Prefecture, Japan. Evaluations were conducted of latent infection of the pathogen and disease occurrence in commercial strawberry nurseries every summer from 2010 to 2014. Latent infection was highest in early July and highly corresponded with the disease occurrence throughout the experiments. The results showed that the ethanol-spray treatment was a reliable and useful method for forecasting anthracnose in strawberry nurseries.

Neutral electrolyzed water (NEW: pH 6.5–7.5) applied through an overhead irrigation system was evaluated for control of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum fructicola*. Conidia of the pathogen were completely killed by a 10s exposure to 10.0 mg/L of available chlorine in NEW. Disease suppression was significantly higher using the NEW treatment through overhead irrigation, either alone or in combination with fungicides, than using conventional fungicides alone. Plants had no visible phytotoxicity after the NEW treatment, even when combined with fungicides. Thus, the NEW treatment was effective at controlling anthracnose caused by *C. fructicola*.

The effect of ozonated water (OZW) applied through overhead irrigation was evaluated for control of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum fructicola*. In vitro, conidia of the pathogen were completely inactivated

after exposure to 0.5 mg L⁻¹ of dissolved ozone in OZW for 10, 30 and 60 s, and more over 90% after exposure to 0.2 mg L⁻¹ for 10 s. In the greenhouse, disease severity significantly decreased at 0.5-1.0 mg L⁻¹ ozone concentration in water, but no significant difference were found at 0.1-0.4 mg L⁻¹. When combined with fungicides in irrigation water, the effectiveness was significantly improved compared with OZW alone or a conventional fungicide spray. No visible phytotoxicity was recognized on plants treated with OZW alone or when combined with fungicides. Fungicides have so far been the only practical control measure for strawberry anthracnose. This study revealed the potential of OZW as an additional control measure for control of *C. fructicola* in commercial nurseries without phytotoxicity.

In conclusion, the results of this study demonstrated that; 1) the strawberry anthracnose pathogen can survive latently on most weeds and forms acervuli on the leaves after treatment with glyphosate, 2) the Bio-PCR assay can sensitively detect *C. fructicola* in symptomless strawberry plants and inspections using the assay are effective in decreasing the disease in foundation-stock fields, 3) the ethanol-spray treatment forecasts occurrence of strawberry anthracnose at the late nursery stage by detecting the latent infection at an early nursery stage, 4) treating with neutral electrolyzed water through overhead irrigation significantly suppresses strawberry anthracnose caused by the pathogen without any phytotoxicity.

Key Words: anthracnose, disease control, ethanol-spray treatment, inoculum source, neutral electrolyzed water, ozonated water, pathogen detection, PCR, strawberry, weed

本論文は、大阪府立大学博士（応用生命科学）学位論文（2018年3月）に加筆、修正を加えたものである。

目次

序章

第1章 イチゴ炭疽病の新たな伝染源としての雑草の評価

第2章 イチゴ無病徴感染株からのイチゴ炭疽病の新たな検出技術の開発と健全苗育成および本病発生予察への応用

第1節 健全苗育成のためのPCRによる早期検出技術の確立

第2節 葉面エタノール噴霧法を活用した発生予察の有効性

第3章 食品の殺菌処理技術を応用したイチゴ炭疽病の新たな防除法の開発

第4章 総合考察

謝辞

要旨

引用文献

序章

日本のイチゴ (*Fragaria × ananassa* Duch.) の栽培は、2015年度産では作付面積 5,450ha、販売額 1,700億円であり、10a 当りの販売額が年間 300 万円以上となる極めて経済価値の高い品目である (農林水産省 2016a; 2016b). 高品質な日本のイチゴは海外でも非常に人気が高く、台湾、香港などの東南アジアを中心に輸出が増加しており、我が国の輸出戦略を推進する上でも期待されている (農林水産省 2017). しかし、栄養繁殖性のイチゴは、野菜種子などで一般的に施される高温処理 (Kubota et al. 2012; 中村ら 1981) や高濃度の薬剤浸漬 (Hopkins et al. 1996) が実施できないため、一旦病原体に感染するとその除去が難しい。また、イチゴは栽培期間が長く、通常 3、4 月から育苗が始まり、9 月に本圃へ苗を定植し、その後 12 月から翌年の 6 月まで約半年間収穫が続く (Yoshida 2012). 長期間にわたる栽培は、必然的に病原体の感染と、それによって生じる発病のリスクを高める。

イチゴの主要病害として、うどんこ病、萎黄病および炭疽病が 3 大病害として知られている (Mass 1998). いずれも真菌の子嚢菌類に属する糸状菌によって生じる。なかでも炭疽病は、アメリカ合衆国、ヨーロッパ、韓国、イスラエルなど世界の主要なイチゴ栽培国で被害が報告されている (Carlos et al. 2008; Freeman et al. 1997; Nam et al. 2004; Peres et al. 2005; Van Hemelrijck et al. 2010). 本病の初期感染は育苗期に起こることが多く、一旦病原菌が感染して病害が発生すると、病原菌が全身にまん延し、最終的には苗が枯死するため、イチゴの最重要病害に位置づけられている (Mass 1998; 岡山・辻本 1994). 日本においては、本病による年間の推定被害面積は 890ha、被害金額は 35 億円と見積もられている (Sato and Moriwaki 2009).

イチゴ炭疽病は、日本では 1970 年に徳島県で品種‘芳玉’において発病が確認されたのが初めての報告であり (山本 1971), その後奈良県においても発病が確認された (小玉 1978). 一方で、この時期の日本国内のイチゴ栽培品種の主流は、炭疽病抵抗性品種の‘宝交早生’であったため、本病の発生は罹病性である‘芳玉’や‘麗紅’などの品種のみに限られ、全国的に問題になることはなかった (岡山・辻本 1994). しかし、1980 年以降から、花芽分化が早く、収量、品質ともに優れた品種である‘女峰’や‘とよのか’へと主要品種が代わっていった。これらの品種は炭

疽病に罹病性であり、特に感受性の高い‘女峰’で発生が急増し、イチゴの重要病害として本病が問題となるようになった。その後の各県でのイチゴの独自のブランド品種育成では良食味や収量が優先され、これらの特性をもつ品種が広く栽培されるようになった (Yoshida 2012) が、本病抵抗性を併せ持つ品種は限られており (森 2008; 沖村ら 2007), その防除に多くの労力が注がれているのが現状である。

イチゴ炭疽病の病原菌として、*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *C. acutatum* J.H. Simmonds および *Colletotrichum fragariae* Brooks の 3 種が知られている (Howard et al. 1992; Peres et al. 2005). このうち日本では、*C. gloeosporioides* (岡山・辻本 1994) と *C. acutatum* (石川ら 1992; 松尾・太田 1992) の 2 種が報告されている。いずれの病原菌種も高温多湿を好み、より病原性の強い *C. gloeosporioides* の発生が多く、被害も大きい (Suzuki et al. 2010). *C. gloeosporioides* は、熱帯から温帯地域において穀類、野菜、花、果樹などに広く被害を引き起こす多犯性の病原菌である (Sato and Moriwaki 2009). 本種は様々な植物に病気を犯す一方で、単一種の中に宿主特異性の異なる数多くの分化型が存在することも知られている (Gunnell et al. 1992; Moriwaki et al. 2002; Sutton 1992). このような中、近年 *C. gloeosporioides* について種の再分類が行われ、集合種である本種が 22 種 1 亜種に細分化されて整理され、イチゴに病原性を持つものは *C. fructicola* Prihastuti, L. Cai & K. D. Hyde, *C. siamense* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde および *C. theobromicola* Delacr. の 3 種に分類された (Weir et al. 2012). 日本国内で *C. gloeosporioides* が最も数多く保存されている農業生物資源ジーンバンクの本種保存菌株についても再同定が行われ、多くが *C. fructicola* であることが分かった (遺伝資源データベース, <https://www.gene.affrc.go.jp/databases.php>). また、千葉県内のイチゴ炭疽病菌を詳しく調査した結果では、上記の 3 種のうち *C. fructicola* が最も病原性が強いと報告された (Gan et al. 2017). つまりイチゴ炭疽病菌の分類に関するこれらの最近の研究から、本病の病原菌としては *C. fructicola* が優占種であり、最も大きな被害を及ぼしていると考えられた。そのため、本研究においてもイチゴ炭疽病菌として *C. fructicola* を主な対象とした。

イチゴ炭疽病についてはこれまで、病原菌の同定、伝染源、伝染方法の解明などの生態研究 (Horn and

Carver 1963; 1968; Howerd and Albregts 1984; 稲田ら 2005a; Norman and Strandberg 1997; 岡山・辻本 1994; 岡山・平山 2013; Smith and Black 1990; Ureña-Padilla et al. 2001; Yang et al. 1990), それに基づく耕種的防除技術の開発 (越川ら 2003; Nam et al. 2006; Ntahimpera et al. 1999; Okayama 1993; 米本ら 2008), 薬剤防除技術の開発 (稲田ら 2005b; MacKenzie et al. 2009; MacKenzie and Peres 2012; 奈尾 2005; 岡山・平山 2011) などが行われ, 国内各地域のイチゴ産地に導入されてきた. 本病の主要な伝染源は潜在感染したイチゴ株やその残渣であるとされ (Debodea et al. 2015; Urena-padilla et al. 2001), 無病株の利用, 施設内の土壌や機材等の太陽熱による消毒 (小玉・福井 1982) などが実施されている. また, 本病は風雨や頭上かん水などの水滴により分生子が飛散し周辺株へと被害が拡大する (稲田ら 2005a; Rahman et al. 2015). そのため, 雨よけ栽培, 点滴かん水や底面給水などの水滴を発生させない方法が非常に有効である (越川ら 2003; Okayama 1993; 米本ら 2008). さらに, イチゴ炭疽病に登録のある殺菌剤は比較的多く, 育苗期を中心に薬剤防除が行われている (平山ら 2010; 稲田ら 2005b). 本病の防除は, これら耕種的防除や薬剤防除など様々な技術を組み合わせ実施されており, 本病の被害軽減に役立っている.

一方, イチゴ栽培様式の変化や, 全国的なブランド品種の開発とその親苗の流通増加など, イチゴ栽培を取り巻く状況は近年大きく変化しており, これら変化の多くがイチゴ炭疽病の発生や拡散に好適に働くために本病の被害は恒常的なものとなっている. 例えば, これまで土壌燻蒸剤としてイチゴ栽培で広く利用されてきた臭化メチルが, モントリオール議定書においてオゾン層破壊に関与する物質と位置付けられ (Ristaino and Thomas 1997), 2005年に使用が制限された. また, これまで土耕栽培が主流であったイチゴ育苗が, 用土にオガクズを用いた無仮植育苗 (西本ら 2007) や, 市販培土を用いたポット育苗などの隔離栽培へと変化した. これにより, 多くの植物病害, 特に土壌病害に有効な田畑輪換 (Subbarao et al. 2007) から, 毎年同じ圃場での連作へとイチゴの栽培方式が変化した. これらの栽培方式の変化はいずれも, 結果として炭疽病菌の残存や増殖に好適な環境をつくり出している. これらに加え筆者の経験では, 本病の伝染源とされてきたイチゴの潜在感染親株や被害残渣などに対して十分な対策を実施したにもかかわらず本病が発生する事例があり, このようなイ

チゴ植物体やその残渣以外にも伝染源が存在し, 本病の被害を拡大させている可能性が考えられた (平山ら 2007). そこで生産地において本病の発病状況調査を実施した結果, 雑草に近接したイチゴ株が発生する現象がしばしば観察され, 伝染源としての可能性が示唆された. そこで第1章において, 現地調査とモデル試験により, 雑草が本病の感染源になりうることを実証した.

また近年, 前述の罹病性品種の作付けに加えて, 民間業者による親苗の販売や各県や産地間で, 苗の安定供給を目的として増殖や育成を他地域に委託するリレー生産が増加しており, イチゴ苗の移動による広域的な汚染リスクが増大している (植松ら 2002). 奈良県においても他県の育成品種が直接または民間業者を通して, 県内に導入され栽培されている (平山ら 2010). また, 奈良県内では, イチゴ原種苗増殖体制が整備されており, 県内の苗の多くは産地間で苗の譲渡が行われている (平山 2016b). このような背景から, イチゴ苗の譲渡の際には, 品質保証の観点からイチゴ苗の病害検査が不可欠になり, 本病に対する迅速で正確な診断法も求められるようになっていく. これまで, 本菌の検出法には, 選択培地を用いた培養法 (岡山ら 2007; Tu 1985), エタノール浸漬簡易法 (Ishikawa 2003), 生物検定 (岡山 1993) などさまざまな手法が開発されている. しかし, これらの手法では *Colletotrichum* 属菌を種レベルまでしか識別できないことや, 判定に3週間以上の日数を要するなどの課題がある. さらに, 農林水産省で実施している発生予察事業では, 主要な作物や病害虫について, 県や地域など広域的な発生状況を予測するための予察法が定められている. しかし, イチゴの重要病害である本病の発生予察手法は確立されておらず, 薬剤防除の要否あるいは適期を判断するための適切な方法が必要とされていた. これら課題を解決するために, 第2章では迅速で高感度な無病徴感染株からの本菌のPCR検出法を確立するとともに, PCR検出法よりも精度は低くなるがより簡易で安価なエタノール検出を応用した発生予察法を考案し, 現地実証により有効性を確認した.

さらに, 薬剤の多用により, 治療効果の高い殺菌剤において高頻度で耐性菌が発生し, 薬剤による防除効果が著しく低下するなど, 新たな問題が生じている (Fernández-Ortuño et al. 2012; Ishii et al. 1998). そのため, 耐性菌対策として, 既存の薬剤に頼らない防除対策の確立が緊急の課題となっていた. このよう

な中、2013年に農薬取締法において、電解水が特定防除資材(特定農薬)として指定されたことを受け(農林水産省・環境省 2013)、イチゴ炭疽病防除への応用を試みた。本剤は食品添加物としても指定されているために生産者や消費者への安全性が高いと考えられ、また作用機構が細胞壁などの物理的破壊であるため耐性菌が発生しにくい(Al-Haq et al. 2005)。しかし、電解水の農業分野での利用法の研究は少なく、炭疽病防除への応用については検討されてこなかった。そこで電解水および、同様の理由で耐性菌が発生しにくいと考えられるオゾン水について、第3章においてイチゴ炭疽病防除への活用法を開発した。

第1章 イチゴ炭疽病の新たな伝染源としての雑草の評価

1-1. 緒言

イチゴ炭疽病のこれまでの生態研究から、炭疽病の主要な伝染源はイチゴ無病徴感染株やその被害残渣であることが知られている(debodea et al. 2015; Ureña-padilla et al. 2001)。そのため、栽培後には被害残渣を除去して施設内を消毒し、その後に無病株を植え付けて病原菌を侵入させないことで本病の防除が可能とされてきた。この考え方に基づき、奈良県では、炭疽病菌に汚染された親株を除去するためにPCRによるイチゴ苗の病害検査が導入されている(平山 2016a)。さらに、育苗前には被害残渣を圃場外へ持ち出し(平山ら 2010)、太陽熱消毒により施設内に残った病原菌を完全に殺菌する対策が取られている(小玉・福井 1982)。しかし、このような対策を実施しても翌年の栽培で本病が発生する圃場が見られたことから、イチゴ植物体やその残渣以外にも伝染源が存在している可能性が考えられた。そこで、現地のイチゴ育苗圃場での本病の発病状況を調査したところ、雑草に近接しているイチゴ株で本病が発病している現象をしばしば観察することができた(平山ら 2007)。

イチゴ炭疽病菌は、イチゴ以外にシクラメンやマメ科作物などの栽培植物や、一部の雑草などにも病原性を持つことが報告されている(Howard and Albregts 1973; MacKenzie et al. 2007; 岡山・辻本 1994; Whiting and Roncadori 1997; Xiao et al. 2004)。これらの植物に病徴を現した場合には、その病斑部に大量

の分生子が形成され、これが水滴伝播することで伝染源としての役割を担うことになる。しかし、これら植物がイチゴ栽培圃場周辺で栽培されることは稀である。また雑草については多くが海外にしか生息しない種であり、雑草が日本国内でイチゴ炭疽病菌の感染源になる可能性は非常に低いと考えられてきた。

一方、炭疽病菌はある種の植物に対しては、病徴を現すことなく感染する、つまり無病徴感染することが報告されている。例えば、イチゴ炭疽病の病原菌の1種である *C. acutatum* は、ナス、トマト、ピーマンや数種雑草に感染するが(Freeman et al. 2001)、表皮細胞に留まり、病徴を示さないまま数ヶ月間にわたって生存する(Horowitz et al. 2002)。しかし、これらのイチゴ以外の植物が、イチゴ炭疽病の伝染源としての役割を果たすには分生子密度が最低でも103個/mlは必要であるため(岡山 1994)、大量の分生子を形成することが必須条件となる。そのため、植物に感染しただけで伝染源になるとは必ずしも言えない。Cerkuskas et al. (1983)は、マメ科植物に除草剤を処理して枯死させると、*C. truncatum* の分生子形成が促されたと報告している。このことは、無病徴感染した植物であっても除草剤などのストレスが加われば伝染源になりうることを示唆している。しかし、本研究で対象としている *C. fructicola* でイチゴ以外の植物が感染源になることや、分生子形成の条件については明らかにされていない。

そこで、イチゴ炭疽病菌 *C. fructicola* の伝染源として雑草の役割を調査するために、1) イチゴ圃場およびその周辺に生息している雑草から本菌を分離し、2) 雑草での本菌の病原性と感染性について調査し、最後に3) 除草剤グリホサート処理が本菌の活性に与える影響について調べた(Hirayama et al. 2018)。

1-2. 材料および方法

1) 雑草からの *Colletotrichum* 属菌の検出

2005年から2008年に奈良県内のイチゴ育苗圃場12か所から雑草の葉を計541枚採取した。採取した雑草葉は、水道水の流水中で3分間洗浄し、70%エタノールで瞬時、続いて2%次亜塩素酸ナトリウムに2分間浸漬して表面殺菌した。滅菌蒸留水で洗浄後、殺菌処理した雑草葉を1時間風乾し、改変 Mathur 培地(Tu 1985)上に置床し、25°C、暗黒下で培養した。改変 Mathur 培地は、蒸留水1,000ml中に、シュクロ

ース 10g, 酵母エキス 1.0g, Bacto ペプトン 1.0g, MgSO₄·7H₂O 2.5g, KH₂PO₄ 2.7g, 寒天 20g を加えて高压滅菌し, 冷却後にイプロジオン 50%水和剤 5mg (商品名:ロブラール水和剤, バイエルクロップサイエンス株式会社, 東京), 乳酸 1ml, アンピシリン 25mg を添加して作製した. 培養 7 日後, コロニー上に形成した分生子を光学顕微鏡で観察し, その形態から *Colletotrichum* 属菌かどうかを判別した. また, 採取圃場では, 次の作期の栽培時における本病の発病の有無を調査した.

2) 分離された *Colletotrichum* 属菌の PCR 法による同定

分離された *Colletotrichum* 属菌は, ポテト・デキストロース寒天培地 (Difco) で 7 日間培養し, その菌そうから CTAB 法 (Freeman et al. 2001) により全 DNA を抽出した. PCR は種特異的プライマーを用いた PCR により *C. gloeosporioides* 集合種に属するかどうかを判別した. すなわち, *C. gloeosporioides* 集合種では CgInt とユニバーサルプライマーである ITS4 (Mills et al. 1992), *C. acutatum* 集合種では, CaInt2 と ITS4 (Sreenivasaprasad et al. 1996) をそれぞれ用いた. PCR は以下の手順で行った. DNA ポリメラーゼは 2 × GoTaq master mix (Promega) を使用し, 10 pmol のプライマー, 1 μl 鋳型 DNA および滅菌水を加えて混合し, 反応液量 20 μl とした. DNA 増幅装置は GeneAmp PCR Systems 9700 (Thermo Fisher Scientific) を使用し, 各反応サイクルは 95°C で 10 分間反応後, 95°C で 30 秒間, 58°C で 30 秒間, 72°C で 1 分間を 35 回繰り返した後, 最後に 72°C で 7 分間反応させた. PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動後, SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Life Technologies Japan) で染色後, 紫外線下で写真撮影した.

さらに *C. gloeosporioides* 集合種を, Marker 2 プライマーセット (Gan et al. 2017) を用いて, 種を同定した. PCR 反応は, 95°C で 10 分間後に, 95°C で 1 分間, 55°C で 30 秒間, 72°C で 30 秒間を 30 サイクルし, 最後に 72°C を 5 分間行った.

3) *Colletotrichum gloeosporioides* 集合種のイチゴでの病原性

C. gloeosporioides 集合種として同定した分離菌のイチゴ苗での病原性を下記の方法で調査した. 分離菌をポテト・デキストロース寒天培地で 25°C, 7 日間培養し, 培地上に形成された分生子をコンラージ棒

で掻きとり, 滅菌蒸留水に懸濁して 106 分生子/ml に調整した. イチゴ (品種 ‘アスカルビー’) の小葉に葉 1 枚当たり 10ml の分生子液を滴下し, 透明のプラスチック容器に静置し, 25°C, 温室, 自然光条件下で培養した. 小葉の 3 分の 2 以上で病徴が観察された菌株を病原性菌として判定した. 試験はそれぞれの菌株について, イチゴ苗 3 株のそれぞれ 2 小葉ずつを供試した.

4) 雑草での *Colletotrichum fructicola* の病原性

雑草に *C. fructicola* を接種し, 病原性を調査した. 雑草は優占種であるイヌビユ (*Amaranthus blitum* L.), メヒシバ (*Digitaria ciliaris* (Retz.) Koeler), ノゲシ (*Sonchus oleraceus* L.), ハキダメグサ (*Galinsoga ciliata* Blake) およびスベリヒユ (*Portulaca oleracea* L.) の 5 種を用いた. 奈良県農業研究開発センター (奈良県橿原市) 内のイチゴ栽培歴のない圃場において, それぞれ 3-5 葉期の雑草を採取し, 培養土 (TM-1, タキイ種苗) を入れたポット (300ml 容) に植え替えた. 対照として 3 葉期のイチゴ (品種 ‘アスカルビー’) を用いた. 接種には *C. fructicola* 菌株の Nara-gc5 株 (MAFF 245243 株) と 19002 (MAFF 306782) の 2 つの株を用いた. それぞれの菌株は, 200ml 容の三角フラスコに 100ml のショ糖加用ジャガイモ煮汁 (PS) 液体培地 (蒸留水 1L 中にスライスしたジャガイモ 200g の煮汁とショ糖 20g を添加して高压滅菌) 中で, 120rpm, 10 日間の振とう培養を行った. 培養後, 菌そうをガーゼでろ過し, 分生子液を得た. 分生子液は, 滅菌蒸留水で希釈し, 106 分生子液/ml に調整した. 接種は無傷および有傷で行った. 無傷接種はそれぞれの雑草およびイチゴ苗に分生子液 10ml をハンドスプレーで噴霧した. 有傷接種は昆虫針 (志賀昆虫 2 号, 志賀昆虫普及社製) の針先を分生子液に瞬時浸漬し, それぞれの株の葉に突き刺す針接種とした. それぞれ透明のプラスチック容器に入れて温室条件下で 7 日間培養して, 病徴を観察し, 病原性の有無を判断した. 試験はそれぞれの雑草およびイチゴで 3 株, 3 反復で実施した.

5) 雑草での *C. fructicola* の潜在感染

現地圃場において優占種であるイヌビユとメヒシバを試験に用いた. これらの株は前述のようにポットに移植した. イチゴ (品種 ‘アスカルビー’) は 3 葉期の苗を用いた. *C. fructicola* Nara-gc5 株の分生子液を前述のように作製し, 103 分生子/ml の濃度に調

整してそれぞれの雑草およびイチゴ苗に噴霧接種した。接種苗はビニールハウス内で管理し、かん水は点滴チューブを用いて行った。接種後、0, 2, 4, 6 および 8 週間後にそれぞれの葉を 9 枚ずつ無作為に採取した。採取した試料は 70%エタノールで瞬時、続いて 2%次亜塩素酸ナトリウムに 2 分間浸漬して表面殺菌し、1 時間風乾し、8 つに均等に分割した。切片は改変 Mathur's 培地に置床し、25°C で 7 日間培養した。潜在感染率は、本菌の菌糸伸長が観察された切片数から求めた。試験は 3 反復で行った。

6) 炭疽病菌の雑草上での分生子発芽および付着器形成

雑草としてイヌビユとメヒシバを用い、これらの葉上での *C. fructicola* Nara-gc5 株の発芽と吸着器形成を調査した。雑草の採取と接種は前述と同様に行った。接種苗は 25°C、湿室条件下で 24 時間静置し、その後葉を採取し、顕微鏡観察のために試料調整を行った。すなわち、葉切片(約 10mm 角)にアルコールラクトフェノールコットンブルー液(フェノール 10g, グリセリン 10ml, 乳酸 10ml, アニリンブルー 0.02g/10ml 蒸留水, 95%エタノール 20ml)を加えて加熱し、48 時間浸漬後、水洗して抱水クロラール水溶液(抱水クロラール 5g/蒸留水 2ml)に 30~50 分間浸漬した。試料をスライドガラスに乗せ、50%グリセリンで封入した後に検鏡し、染色された菌体を観察した。対照としてイチゴ葉を用いた。切片当たり 100 個の分生子について発芽率を調査した。さらに、分生子発芽した菌糸について付着器形成の有無を観察し、付着器形成率を求めた。試験は 2 切片を 1 つの反復として 3 反復で行った。

7) 雑草上でのイチゴ炭疽病菌の分生子形成に及ぼす除草剤グリホサートの影響

除草剤を処理した雑草での炭疽病菌の分生子形成能を調査した。菌株は、*C. fructicola* Nara-gc5 株を用いた。植物は、雑草としてイヌビユ、メヒシバ、ノゲシ、対照としてイチゴ(品種‘アスカルビー’)を用いた。雑草およびイチゴの育成と病原菌の接種は前述の通りとした。接種 2 週間後に、それぞれの雑草苗とイチゴ苗に除草剤グリホサートカリウム塩(5.0g 成分量/L, ラウンドアップハイロード, 日産化学) 1ml を噴霧処理した。対照として除草剤グリホサートカリウム塩を処理しない区を設けた。除草剤処理の 7 日後に雑草およびイチゴ苗が枯死しているのを確認し、

それぞれの葉を採取して 1cm² に切り分けた。5 切片を 10ml の滅菌蒸留水で 2 分間激しく振とうした後に、振とう液をベノミル(50mg 成分量/L, ベンレート水和剤, 住友化学)を添加した改変 Mathur 培地に塗布し、暗黒下で 25°C, 7 日間培養した。なお、ベノミルは本菌のコロニーの大きさを制限するとともに、他の雑菌や *Colletotrichum* 属菌の生育を制御し、本菌のコロニー数を計測し易くするために添加した。培養後、培地上に出現したコロニー数を計測し、炭疽病菌の分生子形成数を求めた。本試験は、1 回につきシャーレ 5 枚を用いてこれを 1 反復とし、5 反復で行った。また、同時に葉上での分生子形成を光学顕微鏡下で観察して確認した。

1-3. 結果

1) 雑草からの *Colletotrichum* 属菌の検出とイチゴに対する病原性

2005 年から 08 年に、奈良県内 6 市町の延べ 31 圃場において、雑草 13 種の 541 試料を採取した。分離菌について種特異的プライマーによる PCR を行った結果、*C. gloeosporioides* が 15.9%の試料から検出された(Table 1-1, Fig. 1-1)。さらにこれらの *C. gloeosporioides* 菌株を *C. fructicola* 検出用プライマーによる PCR によって種を特定した結果、全採取試料の 5.7%が *C. fructicola* であることが明らかとなった。なお、分離した *C. fructicola* の 4 菌株については、登録番号 MAFF 246279 から同 246282 として農業生物資源ジーンバンクに登録した。また、雑草からイチゴ炭疽病菌が検出された圃場では、次作においてイチゴでの発病が多く認められた。また、分離した *C. fructicola* はイチゴ苗の生物検定ですべて発病し、*C. fructicola* 以外の *Colletotrichum* 属菌はイチゴに対して病原性は示さなかったことから、イチゴ炭疽病の病原菌は、すべて *C. fructicola* であることが明らかになった。

雑草種の比較では、13 種中 6 種から *C. fructicola* が検出され、イヌビユではこの雑草の供試数の 17.9%から検出され、最も検出頻度が高かった。続いて、ハキダメグサとセイタカアワダチソウ(*Solidago altissima* L.) が 8.1%、メヒシバが 5.5%、ヒメビヨオン(*Erigeron annuus* L.) が 4.8%、ノゲシが 4.3%であった(Table 1-2)。一方、カヤツリグサ(*Cyperus microiria* Steud.)、スベリヒ

Table 1-1 奈良県内のイチゴ圃場およびその周辺で生息する雑草からのイチゴ炭疽病菌の *Colletotrichum fructicola* の検出

Month, Year	Locality	Weed species ^{a)}	Number of weed leaves examined	Detection frequency (%)		Pathogenic isolates (%)		Disease occurrence in the following season	
				<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i> complex ^{b)}	<i>C. fructicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i> complex		
Nov, 2005	Kashihara 1	Ab, Gc, Sa, Dc, Cm, So	60	21.7	35.0	21.7	21.7	+	
May, 2006	Kashihara 1	Sa, Dc, Ea, So, Ab, Cb, Cg	70	1.1	1.1	1.1	1.1	+	
May, 2007	Kashiba 1	Dc, Sa, Ea, So	18	0	0	0	0	-	
	Kashiba 2	Gc, Sa, Dc, So, Ea, Po	24	4.2	12.5	4.2	4.2	+	
	Kashiba 3	Ab, Dc, Ea, So	16	0	0	0	0	-	
	Kashiba 4	Gc, Dc, Sa	10	0	0	0	0	-	
	Kashiba 5	Sa, Dc, So, Ea	10	0	0	0	0	-	
	Kanmaki 1	Dc	10	0	0	0	0	-	
	Kawai 1	Dc, Sv	12	0	0	0	0	-	
	Katsuragi 1	Ab, Sa, Dc, La, Po	12	0	0	0	0	-	
	Katsuragi 2	Ab, Dc, Ea	12	0	0	0	0	-	
	Kouryo 1	Sa, Dc	12	0	25.0	0	0	+	
	Kouryo 2	Sa, Dc, Ab, Cb	14	5.6	35.7	5.6	5.6	+	
	Nov, 2007	Kashiba 1	Ab, Ea	8	0	0	0	0	-
		Kashiba 2	Ab, Dc, Ea	16	15.0	68.8	15.0	15.0	-
		Kashiba 3	Dc, Ea	16	0	18.8	0	0	-
Kashiba 4		Gc, Dc, Sa	12	0	0	0	0	-	
Kashiba 5		Sa, Dc, So, Ea	14	0	0	0	0	-	
Kanmaki 1		Sa, Dc, So	24	37.5	58.3	37.5	37.5	+	
Kawai 1		Ab, Sa, Dc, Ea	12	0	0	0	0	-	
Katsuragi 1		Ab, Sa, Dc	16	0	6.3	0	0	-	
Katsuragi 2		Ab, Sa, Ea	7	0	0	0	0	-	
Kouryo 1		Sa, Dc	10	0	30.0	0	0	-	
Kouryo 2		Sa, Gc	20	20.0	60.0	20.0	20.0	+	
Jun, 2008	Kashiba 1	Dc	6	0	0	0	0	-	
	Kashiba 2	Gc, Sa, Dc	16	6.3	31.3	6.3	6.3	-	
	Kashiba 5	Sa, Dc, So	12	0	0	0	0	-	
	Kanmaki 1	Ab, Dc, Sa	8	0	0	0	0	+	
	Kawai 1	Sa, So, Sv	14	0	0	0	0	-	
	Katuragi 1	Ab, Dc, Ea, Cg	8	0	25.0	0	0	-	
	Katuragi 2	Ab, Sa, Dc, Po	14	0	0	0	0	-	
	Kouryo 1	Gc, Dc	14	0	14.3	0	0	-	
	Kouryo 2	Sa, Dc, So	14	7.1	14.3	7.1	7.1	+	
	Total (2005-2008)			541	5.7	15.9	5.7	5.7	

a) Ab: *Amaranthus blitum* L. (イヌビユ) ; Gc: *Galinsoga ciliata* Blake (ハキダメグサ) ; Sa: *Solidago altissima* L. (セイタカアワダチソウ) ; Dc: *Digitaria ciliaris* (Retz.) Koeler (メヒシバ) ; Ea: *Erigeron annuus* L. (ヒメジョオン) ; So: *Sonchus oleraceus* L. (ノグシ) ; Sv: *Senecio vulgaris* L. (ノボロギク) ; Cm: *Cyperus microiria* Steud. (カヤツリグサ) ; La: *Lamium amplexicaule* L. (ホトケノザ) ; Aa: *Alopecurus aequalis* Sobol. (スズメノテッポウ) ; Cb: *Capsella bursa-pastoris* Medicus (ナズナ) ; Po: *Portulaca oleracea* L. (スベリヒユ) ; Cg: *Cerastium glomeratum* Thuill. (オランダミミナグサ)

b) *C. gloeosporioides* complex には *C. fructicola* を含む

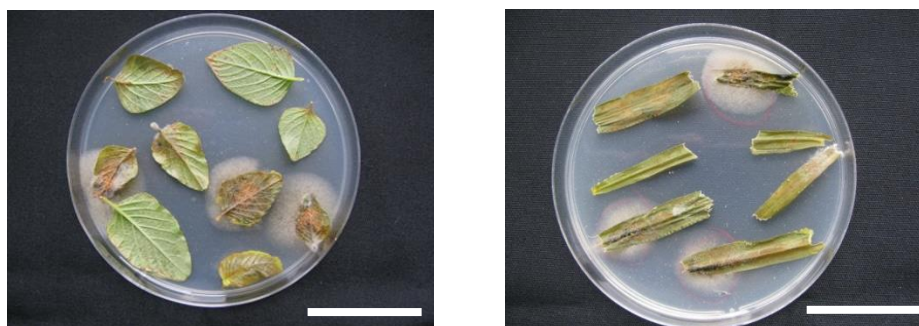


Fig. 1-1 Mathur 培地での雑草からの *Colletotrichum* 属菌の分離状況 (bar: 3 cm)

Table 1-2 雑草の種類別のイチゴ炭疽病菌
*Colletotrichum fructicola*の検出頻度

Weed species ^{a)}	Growing month	Isolation frequency (%)
Warm-season weeds		
<i>Amaranthus blitum</i>	Mar-Nov	17.9 (56 ^b)
<i>Galinsoga ciliata</i>	Apr-Oct	8.1 (37)
<i>Solidago altissima</i>	Apr-Oct	8.1 (74)
<i>Digitaria ciliaris</i>	May-Oct	5.5 (128)
<i>Cyperus microiria</i>	Apr-Oct	0 (24)
<i>Portulaca oleracea</i>	Mar-Oct	0 (16)
Cool-season weeds		
<i>Sonchus oleraceus</i>	Nov-Jur	4.3 (70)
<i>Senecio vulgaris</i>	Dec-Jur	0 (26)
<i>Lamium amplexicaule</i>	Dec-Jun	0 (20)
<i>Alopecurus aequalis</i>	Oct-Jun	0 (18)
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Nov-Jun	0 (16)
<i>Cerastium glomeratum</i>	Nov-Jun	0 (14)
All season weed		
<i>Erigeron annuus</i>	Year around	4.8 (42)

a: 雑草葉数

Amaranthus blitum : イヌビユ, *Galinsoga ciliata* : ハキダメグサ, *Solidago altissima* : セイタカアワダチソウ, *Digitaria ciliaris* : メヒシバ, *Cyperus microiria* : カヤツリグサ, *Portulaca oleracea* : スベリヒユ, *Sonchus oleraceus* : ノゲシ, *Senecio vulgaris* : ノボロギク, *Lamium amplexicaule* : ホトケノザ, *Alopecurus aequalis* : スズメノテッポウ, *Capsella bursa-pastoris* : ナズナ, *Cerastium glomeratum* : オランダミミナグサ, *Erigeron annuus* : ヒメジョオン

ユ, ノボロギク (*Senecio vulgaris* L.), ホトケノザ (*Lamium amplexicaule* L.), スズメノテッポウ (*Alopecurus aequalis* Sobol.), ナズナ (*Capsella bursa-pastoris* Medicus), オランダミミナグサ (*Cerastium glomeratum* Thuill.) の7種からは本菌は検出されなかった. 各雑草の生育時期との関係では, *C. fructicola* が検出され雑草は, 生育期間が春から秋の1年生が多く, 主に低温期に生息する越年雑草からの検出は少なかった.

2) 雑草に対するイチゴ炭疽病菌の病原性

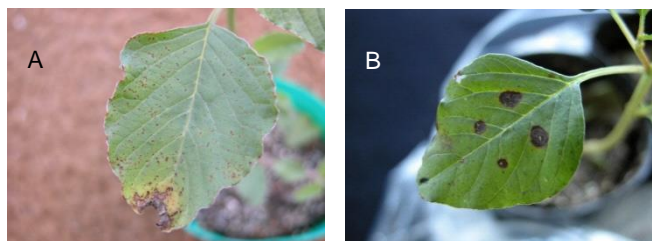
人工接種によって5種の雑草(イヌビユ, メヒシバ, ノゲシ, ハキダメグサおよびスベリヒユ)に対する病原性を調査した. 無傷接種では, イヌビユにおいて *C. fructicola* の Nara-gc5 株と 19002 株の両菌株ともに噴霧接種7日後に葉に褐点症状が認められたが, これらの症状は大型病斑に拡大することにはなかった (Table 1-3, Fig. 1-2). 病斑からは炭疽病菌 *C. fructicola* が再分離され, その症状が炭疽病菌によるものであることを確認した. イチゴでは, 小葉での黒色の汚斑状病斑や葉柄での黒色病斑が認められた. イヌビユでの症状は本菌によるイチゴでの症状とは明らかに異なっており, イヌビユ特有のものであった. また, メヒシバ, ノゲシ, ハキダメグサ, ノゲシ, スベリヒユは無病徴であり, 病原性は確認されなかった. 次に, 有傷接種では, イヌビユ

Table 1-3 無傷接種におけるイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* の雑草に対する病原性

Weeds species	Isolate Nara-gc5	Isolate 19002	Control
<i>Amaranthus blitum</i>	Brown leaf spot	Brown leaf spot	ns
<i>Digitaria ciliaris</i>	ns	ns	ns
<i>Galinsoga ciliata</i>	ns	ns	ns
<i>Sonchus oleraceus</i>	ns	ns	ns
<i>Portulaca oleracea</i>	ns	ns	ns
<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> (Strawberry)	Black leaf spot or Lesions on leaflets and petioles	Black leaf spot or Lesions on leaflets and petioles	ns

ns: 無病徴

Amaranthus blitum : イヌビユ, *Digitaria ciliaris* : メヒシバ, *Galinsoga ciliata* : ハキダメグサ, *Sonchus oleraceus* : ノゲシ, *Portulaca oleracea* : スベリヒユ

Fig. 1-2 イチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* Nara-gc5 株のイヌビユでの病徴

A: 無傷接種, B: 有傷接種

において針接種した中心部から灰色で輪紋状の大型病斑が観察され (Table 1-4, Fig. 1-2), 無傷接種とは症状が明らかに異なった。また, 他の雑草種については, 無傷接種と同様に病徴は確認されなかった。

3) イチゴ炭疽病菌の雑草での潜在感染

イヌビユでの炭疽病菌の感染率は, 接種直後, 2, 4, 6 および 8 週間後では, それぞれ 96%, 91%, 96%, 83% および 96% であり, 常に 80% 以上の高頻度での感染を維持していた (Fig. 1-3)。このイヌビユの感染率は, 比較対照のイチゴの感染率と同様に高い値であった。一方, メヒシバでは, 接種直後, 2, 4, 6 および 8 週間後では, それぞれ 85%, 54%, 31%, 33% および 22% であり, 接種後はイヌビユと同様に高い感染率であったが, その後徐々に低下した。しかし, メヒシバの感染率は感染

後に低下するものの 8 週間後でも本菌が生存することが明らかになった。なお試験期間中, イチゴでは若干の症状が現れたが, イヌビユとメヒシバでは本病菌による症状の発生は確認されなかった。

4) 雑草葉上でのイチゴ炭疽病菌の分生子発芽と付着器形成

雑草およびイチゴ葉上での炭疽病菌の分生子発芽率は, イヌビユで 92.0%, メヒシバで 85.7%, イチゴで 93.1% であり, メヒシバで若干低くなったが, いずれの試料でも高い発芽率を示した (Table 1-5, Fig. 1-4)。発芽後に植物へ侵入する際に形成する付着器形成は, イヌビユで 40.4%, メヒシバで 63.1%, イチゴで 66.7% であった。分生子発芽率および付着器形成率は, 植物の種類により大きな違いは認められなかった。

Table 1-4 有傷接種におけるイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* の雑草に対する病原性

Weeds species	Isolate Nara-gc5	Isolate 19002	Control
<i>Amaranthus blitum</i>	Dark lesions	Dark lesions	ns
<i>Digitaria ciliaris</i>	ns	ns	ns
<i>Galinsoga ciliata</i>	ns	ns	ns
<i>Sonchus oleraceus</i>	ns	ns	ns
<i>Portulaca oleracea</i>	ns	ns	ns
<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> (Strawberry)	Dark lesions	Dark lesions	ns

ns: 無病徴

Amaranthus blitum : イヌビユ, *Digitaria ciliaris* : メヒシバ, *Galinsoga ciliata* : ハキダメグサ, *Sonchus oleraceus* : ノゲンシ, *Portulaca oleracea* : スベリヒユ

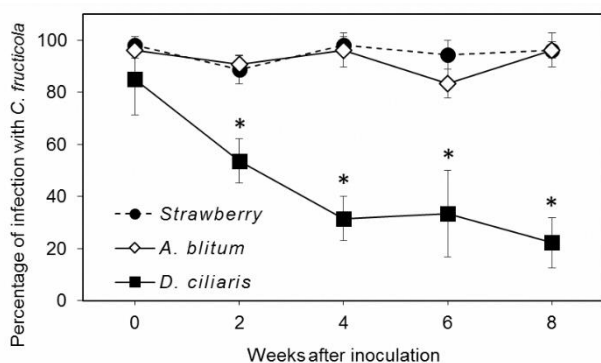


Fig. 1-3 イヌビユ (*Amaranthus blitum*) とメヒシバ (*Digitaria ciliaris*) の各葉でのイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* の感染率の変化
感染率は炭疽病菌が検出された葉切片に基づいて算出した。イチゴ葉を対照として用いた。試験は 3 反復で実施した。

Table 1-5 イヌビユ (*Amaranthus blitum*) とメヒシバ (*Digitaria ciliaris*) 葉上でのイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* の分生子発芽と付着器形成

Weed species	Conidia germination (%)	Appressorium formation (%)
<i>Amaranthus blitum</i>	92.0 ± 0.4	40.4 ± 6.2
<i>Echinochloa Crus-galli</i>	85.7 ± 3.6	63.1 ± 3.9
Strawberry	93.1 ± 2.0	66.7 ± 3.9

値は平均値 ± 標準誤差 n=600 (100 分生子 × 2 切片 × 3 反復)

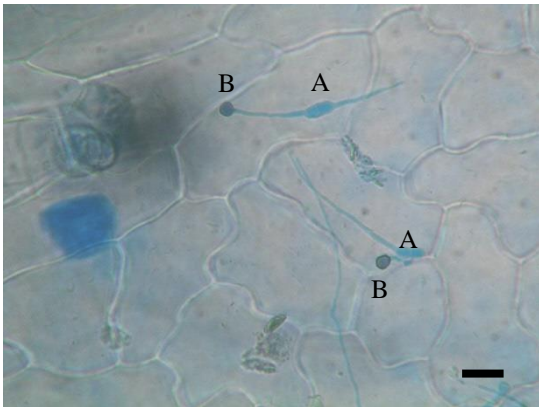


Fig. 1-4 イヌビユ上でのイチゴ炭疽病菌の分生子発芽と付着器形成の状況
A: 分生子 B: 付着器 (bar: 30 μm)

5) 雑草でのイチゴ炭疽病菌の分生子形成に及ぼす除草剤グリホサートの影響

炭疽病菌の生菌数は、グリホサートを処理しない場合には、すべての雑草で 101 個/ml 以下であったが、処理した場合には 104 個/ml レベルで多くなった (Fig. 1-5)。このとき生菌数は雑草の種類に関係なく、イチゴの場合と同等の数であった。このときグリホサートを処理した葉上に点在して分生子塊が観察され (Fig. 1-6)、多くの分生子が形成されたことから、選択培地上で出現したコロニーの由来は分生子によるものと考えられた。このことから、雑草が除草剤で枯死した場合には、雑草種に関係なく、本菌は大量の分生子を形成することが明らかとなった。

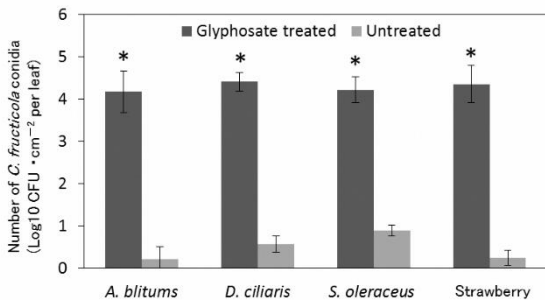


Fig. 1-5 除草剤処理したイヌビユ (*Amaranthus blitum*), メヒシバ (*Digitaria ciliaris*) およびノゲシ (*Sonchus oleraceus*) の各葉でのイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* の分生子

1-4. 考察

奈良県のイチゴ栽培において、炭疽病は最も被害の大きい病害であるが (平山ら 2010), 伝染源については必ずしも明確にされてこなかった。筆者は現地圃場での発病調査の際に、雑草に近接しているイチゴで本病が発生しているのをしばしば観察することがあった (平山ら 2007)。そこで、雑草が本病の伝染源になるとの仮説を立て本章の実験を開始した。まず、現地圃場において、圃場内およびその周辺に生息する雑草が本菌にどの程度感染しているかを調査した。その結果、13 種の雑草のうち 6 種で本菌に感染していることが明らかとなった。これまで病原菌を人工的に接種して、雑草への本菌の感染頻度を確認した報告はあるが (Freeman et al. 2001), 現地圃場において確認したのはこれが初めてである。本研究から、炭疽病菌は栽培圃場においてもイチゴ以外の植物へ感染し、定着していることが明らかになった。また、感染が確認された 6 種の雑草のうち 5 種は春から秋にかけての中高温期に生息する 1 年生雑草であった。本菌はイチゴ育苗期の高温期に発生が多く、菌糸伸長や分生子形成が活発になることから、この時期に生育する雑草での感染が多くなったと考えられた。

次に、本菌の雑草に対する病原性を人工接種試験により調査した。県内で多く見られる雑草であるイヌビユで病徴が認められ、無傷接種で葉に褐点症状、有傷接種で灰色の大型の輪紋状病斑を示した。しかし、病斑が確認されたのはイヌビユの 1 種類のみで、

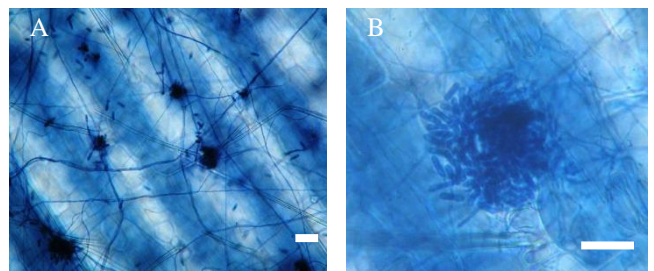


Fig. 1-6 除草剤グリホサート処理 7 日後のイヌビユ葉上の形成された分生子塊 (bar: 50 μm)
A: 葉上に点在する分生子塊, B: 分生子塊

その他雑草では全く病徴を示さず、無病徴感染することが明らかとなった。イチゴの典型的な症状は、無傷接種においても小葉や葉柄に進展型の大型病斑が現れることであるが(岡山・辻本 1994)、イヌビユでは褐点症状のみで病斑の拡大は認められなかった。このことからイヌビユの炭疽病菌に対する感受性は、イチゴよりも低いと思われたが、これについては感染後の菌糸伸長や遺伝子レベルでの抵抗性メカニズムについて調査する必要がある。一方、有傷接種においては、イヌビユでも進展型の大型病斑となった。自然条件下では風などの物理的な障害により、有傷接種と同じような条件となることがあるため、このような場合には病斑上に大量の分生子を形成し、感染源になると考えられる。

前述のように本菌は、ほとんどの雑草に病徴を示さずに無病徴感染する。*Colletotrichum fructicola*とは別の種のイチゴ炭疽病菌である*C. acutatum*は、ピーマン、ナス、トマトなどの栽培植物やキク科やマメ科雑草に無病徴感染し、このとき表皮細胞にのみ侵入することが明らかになっている(Horowitz et al. 2002)。本研究において、*C. fructicola*は雑草葉上で80%以上の頻度で分生子発芽し、そのうちの半数近くが付着器を形成することが明らかとなり、本菌が雑草へ感染することが顕微鏡観察においても確認された。Leandro et al. (2001)は、*C. acutatum*がイチゴの無病徴の葉上において、分生子発芽した菌糸の先にさらに分生子を形成し、分生子数が3倍に増加している。今回の研究では、このような2次分生子形成については調査していないが、本研究で対象としている*C. fructicola*についても、雑草の表皮組織に無病徴感染し、分生子が増加している可能性がある。しかし、イチゴの発病には、炭疽病菌の分生子密度が最低でも 10^3 個/mlは必要であるため(岡山 1994)、雑草が伝染源となることを証明するには、分生子の指数的な増加を確認する必要がある。

そこで、雑草への除草剤処理が本菌の分生子形成に及ぼす影響について調査した。雑草が除草剤に晒されると潜在的に感染していた植物病原菌が顕在化することは他の植物病害で知られている(Schlatter et al. 2017)。本研究においても炭疽病菌に無病徴感染している雑草に除草剤を処理した場合に、雑草の葉上の至る所に分生子塊を形成され、分生子数が指数的に増加することが明らかになった。本研究の一連の結果から、雑草からその周辺の雑草へと本菌の感染が起こることや、雑草からイチゴへ感染し、発病する

ことが想定された(Fig. 1-7)。また、本菌は定着と分生子形成を繰り返しながら、イチゴ以外の植物でも生存できると考えられた。

本研究において、雑草は*C. fructicola*に対する感受性によって3つのグループに分けられた。一つは、本菌に対して常に感受性が高く、感染後に病徴を現すイヌビユのようなグループである。二つ目は、ハキダメグサのように感染はするが病徴が現れず、感染後に感染率が低下するグループである。最後に、カヤツリグサのように本菌に抵抗性か感染しないグループであり、このグループの雑草種は本菌の感染源になる可能性は低いと考えられた。二つ目のグループは、雑草が生育中には感染源としての役割は低い、除草剤を処理し雑草が枯死した場合には、大量の分生子を形成し、感染源として働く。また、実際の栽培場面において、無病徴感染している雑草では症状が肉眼で判断できないため、この認識不足によって伝染源が放置され被害を広げてしまうリスクがあると考えられる。そのため無病徴の雑草も感染していることを想定し、雑草の刈り込みや防草シートの設置などの対策を行う必要がある。

イチゴ炭疽病菌の分生子は雨や頭上かん水による水滴伝搬することが知られている(Ntahimpera et al. 1999)。岡山(1994)は、強い風雨の時には、本菌の分生子は3m以上の距離まで飛散し、イチゴ小葉や葉柄に発病させることを明らかにしている。イチゴ圃場内やその周辺には雑草が生育していることが多く、雑草上に形成された分生子が、イチゴ株に飛散し、発病する可能性が十分にあると考えられる。臭化メチルが使用禁止になるまでは、イチゴ育苗は土耕栽培が多く、また通常は毎年輪作され、主に水田にイネの次作として作付されていた(平山ら 2010)。しかしながら、近年は作業性の改善や土壌病害の回避ために高設のベンチ栽培でイチゴ栽培が行われることが多く、毎年同じ場所で栽培されるようになってきている。このように同じ場所で栽培することで耕起の回数が減るなどにより雑草の発生量が増加し、除草剤に頼ることが多くなる。その結果として、雑草から病原菌がイチゴへ伝搬する可能性が高まっていると思われる。現地での発病調査において、雑草が本菌に感染した圃場では、次作にイチゴで発病する圃場が多かった。このことから、イチゴへの伝染源としては、除草剤処理によって大量の分生子が形成された雑草も重要な伝染源にあると考えられた。

最後に、本研究は、イチゴ炭疽病の伝染源としての雑草の潜在的な可能性に注目し、本病の発生拡大に対する除草剤処理のリスクの大きさを明らかにした。本研究は、適切な方法で雑草を防除することが、本病の発生を抑えるために重要であることを示している。今後、このようなイチゴ炭疽病の伝染源としての雑草のリスクを生産現場に周知する必要がある。一方で、本病の伝染源については未だ不明な部分があり、さらに本病の発生を抑制するための伝染源の解明や管理法の研究が必要である。

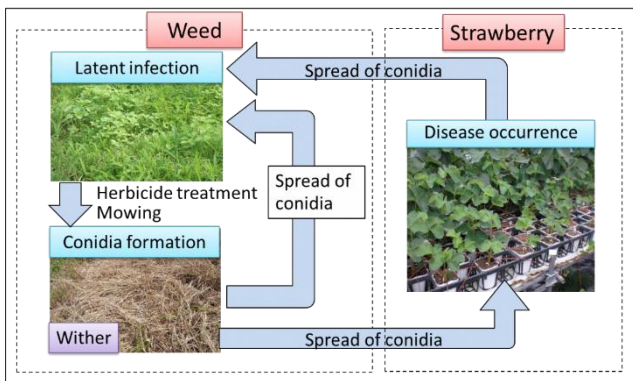


Fig. 1-7 イチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* の除草剤散布が行われる環境における雑草での生活環とイチゴへの感染モデル

第2章 イチゴ無病徴感染株からのイチゴ炭疽病の新たな検出技術の開発と健全苗育成および本病発生予察への応用

第1節 健全苗育成のためのPCRによる早期検出技術の確立

2-1-1. 緒言

奈良県では県育成品種の‘アスカルビー’や‘古都華’を中心にイチゴ親苗供給体制が整備されている(平山 2016a)。具体的には、まず1年目に奈良県農業研究開発センター大和野菜研究センターにおいて原原種苗を育成し、2年目にイチゴ原種苗生産圃場において原種苗を育成する。さらに3年目に各地域の原種苗生産圃場において親苗を増殖し、約3万本の健全親苗を生産者へ供給している。これら増殖段階でわずかな数でも感染株が混入すると、県内全域に本病の被害が広がる危険性がある。そのため、イチゴ株の病害

検査を行い、汚染株を早期に除去し、水際で被害を食い止めることが重要である。

これまで本菌の検出法には、選択培地を用いた培養法(岡山ら 2007; Tu 1985)、エタノール浸漬簡易法(Ishikawa 2003)、生物検定(岡山 1993)などさまざまな手法が開発されている。培養法とエタノール浸漬法は、簡便な手法で大量の試料を検定するのに適しているが、*Colletotrichum*属菌の属レベルまでしか識別できないため、検出した菌をイチゴ苗へ接種して病原性を確認する必要がある。そのため判定には3週間以上を要するため、正確かつ迅速な対応が迫られる親苗の診断には適していない。近年では、PCRが病原菌の検出技術の主流になり、迅速で高感度な検出が可能となっている(McCartney et al. 2003)。Sreenivasaprasad et al. (1993)は、*Colletotrichum*属菌のさまざまな種を識別することができるプライマーを開発し、炭疽病の病原菌である*C. gloeosporioides*集合種や*C. acutatum*の特異的検出を可能にした。しかし、本研究で対象としている*C. gloeosporioides*集合種には、作物ごとに病原性が異なる分化型が存在し、イチゴに病原性を持たない非病原性菌株も検出される。海老原ら(2006)は、生産圃場のイチゴ無病徴株からは、形態や培地上の特性がイチゴ炭疽病菌と同じである非病原性菌が分離されたとしている。そのため、*C. gloeosporioides*集合種検出用プライマーを用いたPCR検定では、炭疽病菌に感染していない株も陽性と判定され、必要以上にイチゴ株が廃棄される恐れがある。そのような中、Suzuki et al. (2010)は、筆者らとの共同研究により、RAPD法による炭疽病菌と非病原菌の塩基配列の比較から、*C. gloeosporioides*集合種の中からイチゴ炭疽病菌のみを特異的に検出できるプライマーを開発した。これにより生物検定を行わずに本菌を識別することが可能となった。

一方、イチゴ株に感染している病原菌をPCR検出するには、イチゴ組織から純度の高いDNAを効率的に抽出することが必要となる。しかし、イチゴはPCR阻害物質である多糖類やポリフェノールが多く含まれるため高感度なPCR検出が難しいとされている(Wilson 1997)。イチゴ株に感染した病原菌のPCR検出は、CTAB法によりDNAを抽出し、その後煩雑なDNA精製を行うことで可能としている(Freeman et al. 2001; Sreenivasaprasad et al. 1996)。しかし、イチゴ親株の検定株数は多く、DNA抽出の効率化が求められる。

そこでまず、イチゴ無病徴感染株からの本菌のPCR検出法を確立するため、DNA抽出法を確立した。次に、検出感度を高めるためのDNA抽出前にあらかじめサンプルを培養するBio-PCR法を確立した。さらに、検定の効率化のために、複数試料を合わせて検定するバルク法などについて検討し、イチゴ炭疽病菌の検定技術を確立した。次に、開発した検定技術について奈良県内のイチゴ増殖親苗圃場においてその有効性を検証した。最後に、今後現地への導入を図るために、炭疽病菌と、炭疽病菌と並ぶイチゴの重要病原菌である萎黄病菌との同時に検出する技術について検討した。

2-1-2. 材料および方法

1) DNA抽出方法の検討

イチゴに感染した本菌を安定的に検出するために、数種キットのDNA抽出効率を比較検討した。

イチゴ炭疽病菌は *C. fructicola* 菌株 Nara-gc5 株 (MAFF 245243 株) を用いた。ポテト・デキストロス寒天培地 (Difco) で培養した菌そう片を、200ml 容の三角フラスコに入れた 100ml のショ糖加用ジャガイモ煮汁 (PS) 液体培地中で、120rpm, 4日間, 25°C で振とう培養した。培養した菌糸体は滅菌水で洗浄し、ろ紙上で風乾させて DNA 抽出に用いた。イチゴ試料として品種‘アスカルビー’の外葉の小葉を用いた。DNA 抽出には、菌糸体のみ、イチゴ小葉のみ、菌糸体とイチゴ小葉を混合した 3 種試料を用いた。菌糸体およびイチゴ葉はそれぞれ 50mg を用いた。DNA 抽出法は、MagExtractor-Plant Genome-(東洋紡)、ISOPLANT II (ニッポンジーン)、DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン)、および CTAB 法 (Freeman et al. 2001) の 4 種方法を比較した。CTAB 法以外の抽出は、キットに添付のマニュアルに従った。なお、それぞれの試料は抽出前にサンプル破碎装置 (商品名: SH-48, 倉敷紡績) により、1 分間破碎した。DNA 抽出液は、NanoDrop ND-1000 (スクラム) を用いて、抽出した DNA 量を測定した。PCR は、DNA ポリメラーゼは TaKaRa ExTaq (タカラバイオ) を 0.5unit 使用し、添付の PCR buffer を規定量用い、0.2mM dNTPs, 0.5μM プライマー, 1μl 鋳型 DNA および滅菌水を加えて混合し、反応液量 20μl とした。プライマーは *C. gloeosporioides* 特異的プライマーの CgInt (Mills et al. 1992), ITS4 (White et al. 1990) を用いた。DNA 増

幅装置は GeneAmp PCR Systems 9700 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、各反応サイクルは 94°C で 4 分間反応後、94°C で 1 分間、59°C で 2 分間、72°C で 2 分間を 35 回繰り返した後、最後に 72°C で 7 分間反応させた。PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動後、SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Life Technologies Japan) で染色後、紫外線下で写真撮影した。

2) nested-PCR による無病徴感染株からの検出

無病徴感染株からの検出感度を高めるため nested-PCR による検出を検討した。

2006 年 10 月 30 日に、*C. fructicola* 菌株 Nara-gc5 株 (MAFF 245243 株) を PS 液体培地で 25°C, 1 週間培養し、培養後、分生子濃度を 10^5 個/ml に調整した。分生子液をポリエチレン製鉢 (容量 300ml) で育苗したイチゴ (品種‘アスカルビー’) 苗に噴霧接種し、試験に供試するまでの約 2 ヶ月間ハウス内で管理し、無病徴感染株を作製した。12 月 27 日に無病徴感染株の外葉を採取し、小葉および葉柄基部各 50-100mg を用いた。DNA 抽出は MagExtractor-Plant Genome-を使用し、キットのマニュアルに従って抽出した。DNA 抽出試料は、あらかじめ破碎装置 SH-48 を用いて破碎処理を行った。DNA ポリメラーゼおよび DNA 増幅装置は、2-1-2-1) と同じものを使用した。1stPCR のプライマーは、Cgint (Mills et al. 1992) の 5'側の ITS 領域に新たに設計した Cg-1f (5'-ACC TAT AAC TGT TGC TTC GGC G) と ITS4 を用い、94°C で 4 分間反応後、94°C で 30 秒間、58°C で 30 秒間、72°C で 1 分間を 35 回繰り返した後、最後に 72°C で 7 分間反応させた。2ndPCR は、1stPCR の反応液 1μl を鋳型とし、プライマーに CgInt, ITS4 を用いた。PCR 反応、電気泳動および染色などは 2-1-2-1) と同様とした。

比較対照として実施した選択培地による検出は、前述のイチゴ小葉及び葉柄基部を 80%エタノールに瞬時浸漬後、2%次亜塩素酸ナトリウムに 2 分間浸漬して表面殺菌し、ベノミル耐性イチゴ炭疽病菌選択培地 (岡山ら 2007) に置床して、28°C, 1 週間培養後にコロニーの有無を確認した。

小葉および葉柄基部はそれぞれ 10 および 24 サンプルずつ用い、Nested-PCR と選択培地での検出率を求めて比較した。

3) Bio-PCRにおける前培養条件の検討

PCR 検出精度を上げるために DNA 抽出前にサンプルを増菌する Bio-PCR の培養条件を検討した。

イチゴ炭疽病菌を 3-2-1) に準じて液体培養し、得られた分生子懸濁液を滅菌蒸留水で 10^4 個/ml に調整し、ポリエチレン製鉢 (容量 300ml) で育苗したイチゴ (品種‘アスカルビー’) の株に噴霧接種した。接種株はプラスチックケースに入れ、温室条件下で 28°C 、7 日間静置して感染を促し、試験に供試した。無病徴感染株の外葉葉柄基部を採取し、附着している土を水道水で洗い流し、80%エタノールで 30 秒間表面殺菌後、滅菌水で洗浄し、風乾させた。培養条件として、培地の種類と培養日数、培養温度、培地量について検討した。すなわち、培地の種類と培養日数の検討では、PS 液体培地と改変 Mathur 液体培地について、それぞれ 2, 4 および 8 日間の培養日数の条件下で検討した。PS 培地には 50ppm ストレプトマイシン硫酸塩を添加した。また、培養温度は 28°C で行った。培養温度の検討では、 20°C 、 25°C 、 28°C 、 30°C で検討し、培養日数は 2 日間、培地は PS 液体培地とした。培地量の検討では、PS 培地 10ml および 0.3ml の液量で比較した。10ml 培養区は 50ml 容遠沈管、0.3ml 培養区は 2.0ml マイクロチューブを用いた。また、培養温度は 28°C で行った。

培養した葉柄基部は、10ml 滅菌蒸留水の入った 50ml 容遠沈管に入れて 1500rpm で 1 分間振とうし、得られた懸濁液をベノミル添加改変 Mathur 培地にコラーゼ棒を用いて塗布した。 28°C で 7 日間培養し、出現したコロニー数を計測して菌数を算出した。1 処理当たり葉柄基部 5 試料を用いてこれを 1 反復とし、計 3 反復で行った。

4) Bio-PCR法および従来法の検出精度の比較

Bio-PCR検出技術による検定と従来法である選択培地を用いた培養法およびエタノール簡易浸漬法による検定との検出精度を比較検討した。

無病徴感染株の作製は2-1-2-3) に準じて行った。検定試料には接種株100株の最外葉を採取して用いた。Bio-PCR法と培養法は、葉柄基部切片を等分してそれぞれの検定に用いた。エタノール簡易浸漬法は、同じ株の中央の小葉を用いた。

Bio-PCRの前培養は、2ml マイクロチューブに葉柄基部切片入れ、50ppm ストレプトマイシンを添加した 0.3ml PS 培地を添加し、 28°C 、2 日間培養した。培養後、容器内の PS 培地を除去し、葉柄基部切片を試料とし DNA 抽出を行った。DNA 抽出および PCR は、2-1-2-2) に準じて行った。ただし、DNA ポリメラーゼは、GoTaq Green Master Mix (Promega 社製) を用

いた。なお、Bio-PCR は、PCR と Nested-PCR を実施した。プライマーには共同研究で開発したイチゴ炭疽病菌特異的プライマーを用いた (鈴木ら 2008)。すなわち、PCR では Forward プライマーは AP-f3 (5'-GAA GGG GCT TGT AGT CGA AAT)、Reverse プライマーは AP-7R (5'-GAT GAG GTT GCT CTC CAT AT) を用いた。nested-PCR では 1stPCR に Forward プライマー APBF (5'-TGA ATG CTG AGG CTG CGA TGA G)、Reverse プライマー AP-N1 (5'-GCG GCG AGG TAA CTC TTC TC) を用いた。2ndPCR に、AP-f3 と AP-7R を用いた。それぞれ、本プライマーの増幅領域である 683bp 付近のバンドを確認し、検出率を求めた。

培養法による検定は、外葉の葉柄基部切片を 80% エタノールで表面殺菌後、改変 Mathur 培地に置床し、 28°C 、暗黒下で培養した。10 日後に、出現した菌そうを顕微鏡観察し、炭疽病菌の分生子を形成していることを確認して検出率を求めた。

エタノール簡易浸漬法による検定は、Ishikawa (2003) の方法に準じて行った。外葉中央の小葉を 80% エタノールで 30 秒間表面殺菌し、滅菌水で洗浄した。表面殺菌後、ろ紙を敷いたガラスシャーレに、小葉の表面を上にして置き、 28°C の温室暗黒条件下で静置した。14 日後に肉眼で鮭肉色の分生子塊または顕微鏡下で分生子形成を確認して検出率を求めた。

検定に供試した苗は、 28°C 、温室条件下に静置して 14 日後に発病の有無を確認して発病株率を求めた。また、それぞれの検出法について、判定までに要する日数を調査した。

5) PCR検定の現地適応性

奈良県内の原親苗生産圃場において、PCR検定とその後の発病調査を行い、現地適用性を確認した。

2008年4月28日に原原種苗生産圃場である宇陀1 (Uda1)、また3月28日に宇陀2 (Uda2)、5月21日に柳本 (Yanagimoto)、二階堂 (Nnikaido)、櫛本 (Ichinomoto)、片桐 (Katagiri)、西和 (Seiwa) 6地区のイチゴ原種苗生産圃場の親株計 339 株の最外葉を採取した。採取株の品種構成は、‘アスカルビー’237 株、‘とよのか’42 株、‘宝交早生’23 株、‘さがほのか’21 株、‘章姫’16 株であった。採取葉は、ビニール袋に入れてセンターに持ち帰り、供試するまで 4°C で保存し、採取後 1 週間以内に検定を行った。PCR 検出は、葉柄基部切片を試料とし、2-1-2-4) の Bio-nested PCR の方法に準じて行った。検定の判定は、本プライマーの増幅領域である 683bp 付近にバンドが認められたも

のを陽性、認められないものを陰性とした。PCR 検定で陽性と判定された株は、検定後に除去した。さらに、9月30日にイチゴ原種苗生産圃場の親株および子苗について、炭疽病の発生状況を調査した。

6) 現地圃場での検出精度の比較

現地圃場において、従来の検出法と PCR 法による検出精度を比較検討した。

2009年6月12, 14日に原種苗生産圃場6カ所から計118株, 9月30日には原種苗生産圃場10カ所から198株の親株の最外葉を採取した。採取葉はビニール袋に入れて研究開発センターに持ち帰り、供試するまで4°Cで保存し、採取後1週間以内に検定を行った。6月には、最外葉の葉柄基部を80%エタノールで30秒間浸漬して表面殺菌後、2等分し、それぞれ改変 Mathur 培地による培養法と PCR 法により検出した。培養法による検出は、9月には6月に行った二つの検出法に加えて、採取した最外葉の中央の小葉を用いてエタノール浸漬簡易診断法 (Ishikawa 2003) を行った。それぞれの検出法は、2-1-2-4) に準じて実施した。さらに、培養法とエタノール浸漬簡易診断法については、検出した培地上のコロニーまたは小葉に形成した分生子塊から菌を分離し、イチゴ炭疽病菌検出用プライマーを用いた PCR により病原性を確認した。

7) PCR検出に及ぼす薬剤の影響

まず、各種薬剤がイチゴ炭疽病菌の増殖に与える影響について調査した。

殺菌剤は、イチゴ炭疽病に登録のあるプロピネブ水和剤、マンゼブ水和剤、8-ヒドロキシキノリン銅フロアブル、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤、フルジオキシニルフロアブル、ジチアノンフロアブル、ビデルタノール水和剤の8薬剤を用い、各薬剤適用濃度の1/10, 1/100, 1/500, 1/1,000 および 1/5,000 に希釈して供試した。殺菌剤による前培養の影響は、菌そうの増殖程度及び分生子形成の有無を調査して評価した。まず、30ppm クロラムフェニコールを添加したポテト・デキストロース (PD) 液体培地で濃度調整した各薬剤希釈液を2ml マイクロチューブに2ml 分注し、PDA 培地で培養したイチゴ炭疽病菌 Nara-gc5 (MAFF 245243 株) の菌そう先端部の寒天片5mm 角を加えた。28°Cで5日間培養後に、菌そうの増殖を程度別に調査し、光学顕微鏡により分生子形成の有無を観察した。試験は各薬剤の各濃度3反復行った。

次に、薬剤散布がPCR及び選択培地での検出に与える影響について調査した。無病徴感染株の作製は、2-1-2-4) に準じて行った。ただし、分生子液は、 6.1×10^4 分生子/mlとし、接種株は28°C, 3日間静置して感染を促した後、20°C, 12時間日長下の人工気象室内で2日間管理し、上記と同薬剤にアズキシストロビンフロアブルを加えた9薬剤をイチゴの登録濃度で1株当たり5mlずつ散布した。薬剤処理24時間後にポット株の最外葉葉柄基部を採取し、水道水で洗浄後、80%エタノールで30秒間表面殺菌し、滅菌水で洗浄後、縦に等分して検定に供した。PCRは、2-1-2-4) に準じて実施した。試験は各薬剤10株を用いた。

8) Bio-PCRによる多検体検出

イチゴ炭疽病菌の検定費用と作業労力を軽減するため、多検体をまとめて検定する Bio-PCR 法による検出技術の確立が必要である。そこで、複数試料をまとめて前培養するバルク法の培養条件を確立するため、培地の種類と培養日数を検討した。

PS 液体培地で培養したイチゴ炭疽病菌 Nara-gc5 株 (MAFF 245243 株) の分生子液濃度を 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 分生子/ml に調整した。イチゴ (品種‘アスカルビー’) の葉柄基部を調整した分生子液に瞬時浸漬し、28°Cの湿室条件下で2日間静置した。その後、試料を80%エタノールで表面殺菌した。前培養は、接種した葉柄基部1切片と無接種の葉柄基部9切片をまとめて50ml 遠沈管に入れ、培養液10mlを加えて、28°Cで2日間、振とう培養した。培養液は50ppm ストレプトマイシン硫酸塩を添加した PD 液体培地または改変 Mathur 液体培地を用い、それぞれ2日または4日間の培養を行った。対照の従来法として、接種した1切片を2ml マイクロチューブに入れ、PD 液体培地1mlを加えて28°Cで2日間培養した。培養後、それぞれの培養液を1ml採取し、15,000gで5分間の遠心分離を行い、その沈殿物から2-1-2-4) に準じて、DNA 抽出およびPCRを行った。なお、PCRは、イチゴ炭疽病菌検出用プライマー (AP-f3, AP-r7) による1st-PCRのみとした。

また、分生子濃度 10^4 分生子/ml で接種して前培養した培養液については、改変 Mathur 培地を用いた希釈平板法により、前培養後の菌数についても計測した。

9) 多検体の Bio-PCR 検出の現地適応性

2010年および2011年に奈良県内原種苗生産圃場

において、多検体をまとめて検出するバルク法によるイチゴ炭疽病菌のPCR検出技術の現地適応性を評価した。

2010年8月5日に、県内の原種苗生産圃場9カ所で5品種621株について親苗の最外葉を採取し、その葉柄基部を検定に用いた。さらに、10月5日にも、1回目の検定以降に処分した3株を除く、同じ親株618株を対照として検定を行った。採取した各試料は80%エタノールに30秒間浸漬して表面殺菌し、ほ場ごとに10切片ずつまとめて50ml遠沈管入れ、PD液体培地10mlを加えて28°Cで4日間振とう培養を行った。培養液を1ml採取し、15,000gで5分間遠心分離を行い、その沈殿物をDNA試料として用いた。DNA抽出およびPCR検出は、2-1-2-8)に準じて行った。また、第1回検定後の8月から10月まで随時、現地圃場においてイチゴ炭疽病の発病を確認した。

さらに、2011年8月11日に、県内の原種育成ほ場9カ所で5品種806株について親株の最外葉を採取し、その葉柄基部を検定に用いた。さらに、10月6日には、1回目の検定以降に処分した株を除いた、同親株740株について検定を行った。PCR検出法については、2010年に準じて行った。

10) イチゴ炭疽病菌と萎黄病菌の同時検出技術

萎黄病菌と炭疽病菌の同時検出技術を確立するため、PCR反応時の最適な両菌のプライマー量と、前培養培地および培養期間について検討した。イチゴ炭疽病菌Nara-gc5株(MAFF 245243株)およびイチゴ萎黄病菌は-2株(*Fusarium oxysporum* Schlechtendahl f. sp. *fragariae* Winks et Y.N. Willi, MAFF 727510)を供試した。

まず、両菌のプライマー量を決定するため、それぞれのプライマー量の割合を変えてPCRの検出結果を比較した。すなわち、萎黄病菌および炭疽病菌の培養菌体からMag Extractor -plant genome-を用いてDNA抽出し、それぞれのDNA抽出液(各4ng/μL)の等量混合液を用い、炭疽病菌検出用プライマー(F: AP-f3, R: AP-r7)とイチゴ萎黄病菌検出用プライマー(F: HS430, R: HS432)を用いたマルチプレックスPCRを行った。イチゴ萎黄病菌検出用プライマーは、ForwardプライマーにHS430(5'-CAG ACT GGG GTG CTT AAA GTT), ReverseプライマーにHS432(5'-AAC CGC TAG GGT CGT AAC AAA)を用いた(Suga et al. 2013)。プライマー量は炭疽病菌と萎黄病菌検出用プライマーの最終濃度(μM)は、それぞれ0.25:0.05, 0.25:

0.1, 0.25:0.25, 0.1:0.25, 0.05:0.25となるように調整した。PCR反応条件は94°Cで2分間の後に、94°Cで30秒間、55°Cで30秒間、72°Cで30秒間を40サイクル繰り返し、最後に72°Cで8分間とした。終了後、2.0%アガロースゲルを用いて、100V、40分で電気泳動し、紫外線照射により検出した。

次に、前培養培地および培養期間について検討した。検定試料には炭疽病菌と萎黄病菌のそれぞれの高頻度感染部位である葉柄基部とランナーを用いた。葉柄基部は、分生子濃度を 9×10^4 個/mlに調整したイチゴ炭疽病菌の分生子液に瞬時浸漬して、28°Cで2日間静置培養した。ランナーは、萎黄病菌の小型分生子(4×10^6 個/ml \times 20ml)を接種したイチゴ親苗(径18cmポット)から発生したものを1.5cm切片にして用いた。葉柄基部とランナー切片は、70%エタノールで30秒間表面殺菌し、滅菌水で洗浄した。次に、それぞれの試料を同じマイクロチューブに入れ、Mathur培地、Fo-G2培地(*Fusarium oxysporum*選択培地)、PD培地の各液体培地で28°C、2日および4日間振とう培養した。Fo-G2液体培地は、蒸留水1,000mlにリン酸一カリウム1.0g、塩化カリウム1.0g、硫酸マグネシウム・7水和物0.5g、クエン酸水素二アンモニウム2.0g、ホウ酸0.5g、硝酸エコナゾール10mg、クロラムフェニコール0.25gを添加して高圧滅菌し、L-ソルボース20g、イミノクタジン酢酸塩25%液(商品名:ベフラン液剤25)0.4ml、トリクロホスメチル50%水和剤3mg(商品名:リゾレックス水和剤)、10%リン酸でpH3.7~3.9に調整した(Nishimura 2007)。培養液は0.5ml採取し、1.5mlチューブに入れ、15,000rpmで1分間遠心分離し上清を除去した。沈殿物を試料とし、Mag Extractor -plant genome-を用いてDNA抽出を行い、炭疽病菌検出用プライマーとイチゴ萎黄病菌検出用プライマーを用いたマルチプレックスPCRを行った。また、炭疽病菌と萎黄病菌検出用のプライマー量は、最終濃度をそれぞれ0.25μMと0.1μMとした。PCR検出のその他の手順は、上記に準じて行った。

2-1-3. 結果

1) DNA抽出方法の検討

イチゴ炭疽病菌の菌そうから抽出したDNA量は、CTAB法で最も多く、次のISOPLANT II, MagExtractor-plant genome-, DNeasy Plant Mini Kitの順であった

(Table 2-1-1). 菌糸体から抽出した DNA を鋳型とした PCR では、いずれの抽出方法でも *Colletotrichum gloeosporioides* の検出用プライマーで増幅される位置にバンドが検出された (Fig. 2-1-1). しかし、菌糸体とイチゴ小葉を混合して抽出した場合には、MagExtractor-Plant Genome-でのみ PCR による増幅が確認でき、その他の抽出法ではイチゴ小葉を混合することで検出できなくなった。また、イチゴ小葉のみの試料では、いずれの抽出方法でも増幅産物は得られなかった。以上から、MagExtractor-Plant Genome-を用いた DNA 抽出法は、イチゴ組織に感染した炭疽病菌の PCR による検出に有効であることが明らかになった。

Table 2-1-1 各種 DNA 抽出方法がイチゴ炭疽病菌 *C. fructicola* の菌体からの DNA 収量に及ぼす影響

Methods of DNA extraction	DNA yield (ng/μl)
MagExtractor -plant genome-	3.1
ISOPLANT II	22.0
DNeasy Plant Mini Kit	1.4
CTAB method	25.3

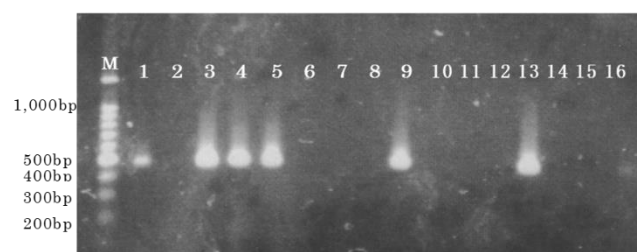


Fig. 2-1-1 DNA 抽出方法の違いがイチゴ組織と炭疽病菌 *C. fructicola* の菌体の混合試料からの PCR 検出に及ぼす影響

Lane1-4 : MagExtractor -Plant Genome-, Lane5-8 : ISOPLANT II, Lane9-12 : DNeasy Plant Mini Kit, Lane13-16 : CTAB 法, Lane1, 5, 9, 13 : 炭疽病菌の菌糸体, Lane2, 6, 10, 14 : イチゴ小葉, M : 100bp ladder marker

2) nested-PCR による無病徴感染株からの検出

nested-PCR によるイチゴ無病徴感染株からの炭疽病菌の検出率は、葉柄基部で 70.8%, 小葉で 40.0% であった (Table 2-1-2). 一方、従来法の選択培地での検出率は、葉柄基部で 95.8%, 小葉で 100.0% であり、nested-PCR に比較して高かった。以上から、nested-

PCR によるイチゴ無病徴感染株からの炭疽病菌の検出は可能であったが、選択培地による検出に比べて劣ったことから、より感度の高い検出方法の検討が必要であった。

3) Bio-PCRにおける前培養条件の検討

潜在感染した葉柄基部の菌数は、無培養ではごくわずかであったが、2日間培養した場合には PS 培地でコロニー数が 10^4 cfu/葉柄基部、改変 Mathur 培地では 10^3 cfu/葉柄基部に増加した (Fig. 2-1-2). 4日および8日間培養は、2日間培養よりわずかに増加する程度であった。培養温度は、28°C で培養することで最も増菌効果が得られた (Fig. 2-1-3). 遠沈管を用いた 10ml 培養区とマイクロチューブを用いた 0.3ml 培養区は、ほぼ同じ菌量であった (Fig. 2-1-4). 以上から、イチゴに潜在感染した炭疽病菌は、葉柄基部を 0.3ml 量の PS (ポテト・シュクロース) 培地入れたマイクロチューブ内で 2日間培養することで効率的に増菌することができることが明らかになった。

4) Bio-PCR法および従来法の検出精度の比較

Bio-PCR による検出率は、エタノール簡易浸漬法より高く、選択培地を用いた培養法と同程度であったが、生物検定による発病株率よりも低かった (Fig. 2-1-5, 6). Bio-nested-PCR による検定は、発病調査によるすべての発病株が陽性と判定でき、すべての無病徴感染株からの本菌の検出が可能であった。検出日数は、PCR および nested-PCR による検出で約 4 日間、培養法で 10 日間、エタノール浸漬法で 14 日間必要であった (Fig. 2-1-7). 培養法やエタノール浸漬法は、イチゴ炭疽病菌の他に非病原性 *C. gloeosporioides* が検出され、正確に判定するには接種による病原性を確認する必要があるため、さらに 2 週間程度が必要であった。前培養後に DNA 抽出し Bio-nested-PCR を行う検定法は、従来の選択培地を用いた培養法やエタノール簡易浸漬法による検定法より検出精度が高く、検出日数が短いことから、無病徴感染株からのイチゴ炭疽病菌の検出に有効であった。

5) 現地実証

PCR 検定において、原原種苗圃場である宇陀1 (Uda1) では陽性株は認められなかったが、宇陀1の育成苗が配布される宇陀2 (Uda2) 圃場で陽性株率が 30.2% と高かった (Table 2-1-3). なお、宇陀2では、陽性株率が高かったため、すべての株を廃棄処分と

Table 2-1-2 Nested-PCR と改変 Mathur 培地のイチゴ炭疽病菌 *C. fructicola* の検出比較

Detection methods	Sampling parts	Number of detection / Number of samples examined	Detection frequency (%)
Nested-PCR	Base of a petiole	17/24	70.8
	Leaflet	4/10	40.0
Selective medium	Base of a petiole	23/24	95.8
	Leaflet	10/10	100.0

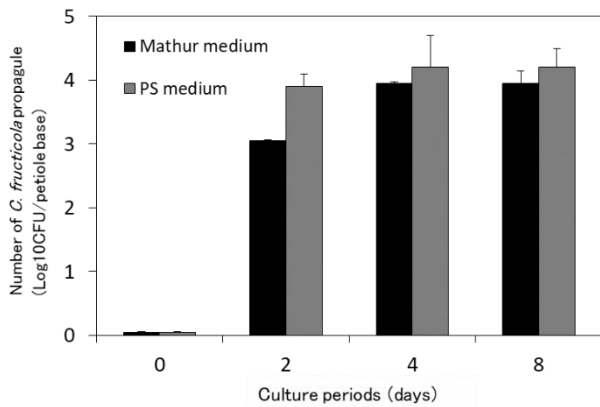


Fig. 2-1-2 培地の種類が炭疽病菌の増殖量に及ぼす影響

DNA 抽出前にサンプルを増菌する前培養条件を調査した。PS (ポテト・シュクロース) 液体培地および改変 Mathur 液体培地を用いて 2, 4, 8 日間, 28°C で培養した。PS 培地には 50ppm ストレプトマイシン硫酸塩を添加した。得られた培養液は、ベノミル添加改変 Mathur 培地を用いた希釈平板法により菌数を測定した。垂線は標準誤差を示す。

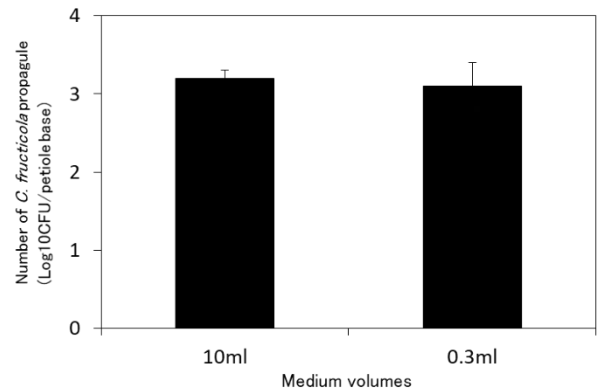


Fig. 2-1-4 培地量が炭疽病菌の増殖量に及ぼす影響

DNA 抽出前にサンプルを増菌する前培養条件における培地量について調査した。10ml 培養区は 50ml 容遠沈管, 0.3ml 培養区は 2.0ml マイクロチューブを用い, PS (ポテト・シュクロース) 液体培地で 28°C, 2 日間培養した。PS 培地には 50ppm ストレプトマイシン硫酸塩を添加した。得られた培養液は、ベノミル添加改変 Mathur 培地を用いた希釈平板法により菌数を測定した。垂線は標準誤差を示す。

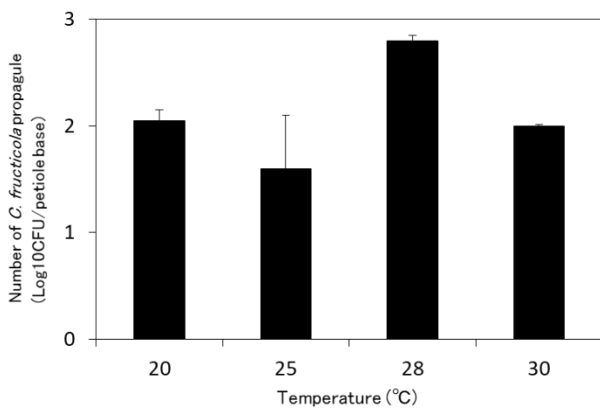


Fig. 2-1-3 培地温度が炭疽病菌の増殖量に及ぼす影響

DNA 抽出前にサンプルを増菌する前培養条件の培養温度について調査した。20°C, 25°C, 28°C, 30°C で 2 日間, PS (ポテト・シュクロース) 液体培地で培養した。培地には 50ppm ストレプトマイシン硫酸塩を添加した。得られた培養液は、ベノミル添加改変 Mathur 培地を用いた希釈平板法により菌数を測定した。垂線は標準誤差を示す。

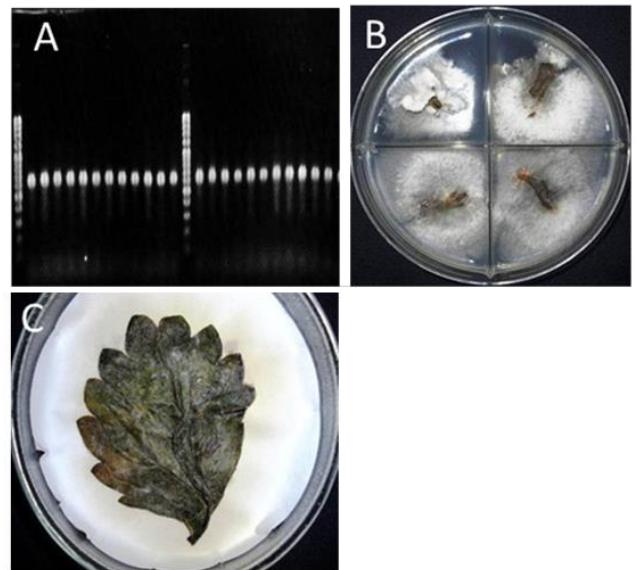


Fig. 2-1-5 各種方法によるイチゴ炭疽病菌の検出状況

A : PCR 検出, B : Mathur 培地による培養法, C : エタノール簡易浸漬法

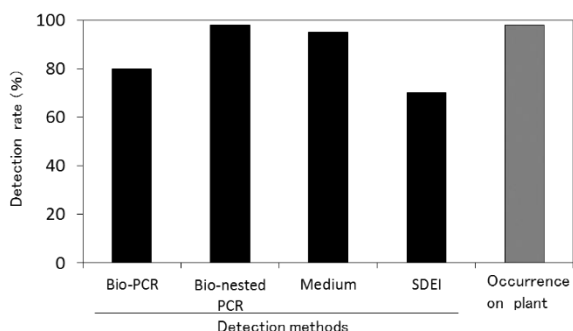


Fig. 2-1-6 各種検定法における無病徴感染株からのイチゴ炭疽病菌の検出精度の比較

Bio-PCR および Bio-nested PCR の前培養は、2ml マイクロチューブに葉柄基部切片入れ、50ppm ストレプトマイシンを添加した 0.3ml PS 培地を添加し、28°C、2 日間培養した。培地による培養法は、外葉の葉柄基部切片を改変 Mathur 培地で培養した。SDEI (エタノール簡易浸漬法) は、小葉を 28°C の湿室暗黒条件下で静置し、14 日後に鮭肉色の分生子塊を確認した。検定に供試した苗は、28°C、湿室条件下に静置して 14 日後に発病の有無を確認した。株数はそれぞれの検定法について 100 株を用いた。

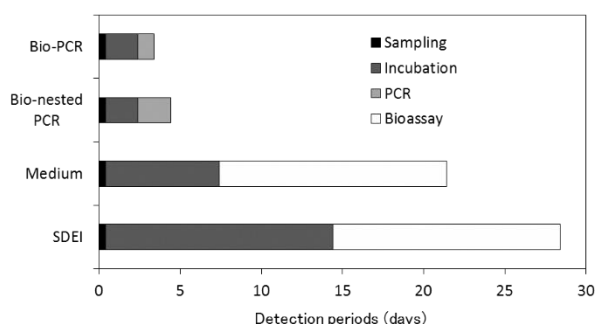


Fig. 2-1-7 各種検定法における検出日数

Bio-PCR および Bio-nested PCR の検定には、サンプリング、全培養および PCR に要する時間から算出。培地による培養法と SDEI (エタノール簡易浸漬法) は、サンプリング (sampling)、培養 (incubation) および生物検定 (bioassay) に要する時間から算出。

した。櫟本 (Ichinomoto) および片桐園場片桐 (Katagiri) で陽性株が認められたが、柳本 (Yanagimoto)、二階堂 (Nnikaido) および西和 (Seiwa) では認められなかった。品種別の陽性株率は、‘さがほのか’が 23.8% で最も高く、次いで‘とよのか’19.0%、‘アスカルビー’5.9%で、‘宝交早生’、‘章姫’では認められなかった

(Table 2-1-4)。検定後、陽性株についてはすべて廃棄処分し、その後の発病を確認した。その結果、9月30日の発病調査では、いずれの圃場においても発病は認められなかった (Table 2-1-3)。

6) 現地での検出精度の比較

6月の検定では、Bio-PCR法で全調査株の17.8%から本菌が検出され、培養法では検出されなかった (Fig. 2-1-8)。9月の検定では、PCR法で4.5%、培養法で3.5%、エタノール法で5.0%の株から検出されたが、培養法とエタノール法で検出された分離菌のうちそれぞれ約43%と30%が非病原性菌であったことから、イチゴ炭疽病菌の検出にはBio-PCRによる検定法で最も検出率が高くなった。6月の圃場ごとの検定では、培養法でいずれの圃場においても検出されなかったが、Bio-PCR法では2圃場において21株が陽性であった (Table 2-1-5)。このうち20株を陽性と判定した西和 (Seiwa) では、一部の陽性株で炭疽病の発生を確認した (データ省略)。9月の圃場ごとの検定では、10圃場中8圃場でいずれかの検定法によって陽性株が認められ、本菌が県内の増殖圃場の広範囲に潜在感染していた (Table 2-1-5)。Bio-PCR法は本菌の検出率が最も高かった。しかし、各検定法の株ごとの判定結果は、必ずしも一致せず、PCR法で検出できなかった汚染株が培養法やエタノール法で検出される事例も認められた。

7) PCR検出に及ぼす薬剤の影響

イチゴ炭疽病菌の PCR 検出で行う PD 前培養に各種薬剤が与える影響について調査した結果、プロピネブ水和剤及びフルジオキシニルフロアブルでは適用濃度の 10 分の 1 でも菌の増殖に大きく影響しなかったが、イミノクタジナルベシル酸塩水和剤では適用濃度の 5,000 分の 1、8-ヒドロキシキノリン銅フロアブルでは適用濃度の 1,000 分の 1 で菌の強い増殖抑制が認められた (Table 2-1-6)。

PCR 検出では、供試した 9 薬剤中 6 薬剤で無処理と比較して検出率が 50%以上低下し、nested-PCR では 5 薬剤で 20~40%低下した (Table 2-1-7)。特に、イミノクタジナルベシル酸塩水和剤の 1,000 倍で最も低下した。以上から、試料採取 24 時間前の薬剤散布により、PCR 検出ではイミノクタジナルベシル酸塩水和剤、プロピネブ水和剤、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤等で検出結果に影響を与える可能性が示唆された。

Table 2-1-3 現地原種苗生産圃場における Bio-PCR 検定結果と陽性株除去後の発病

Locality of nursery	Number of plants examined	Number of Positive plants	Frequency of positive plants (%)	Disease occurrence after removed positive plants (%)
Uda1	76	0	0.0	0.0
Uda2	53	16	30.2	-
Yanagimoto	9	0	0.0	0.0
Nikaido	41	0	0.0	0.0
Ichinmoto	28	1	3.6	0.0
Katagiri	63	10	15.9	0.0
Seiwa	69	0	0.0	0.0

2008年3~5月にイチゴ炭疽病菌特異的プライマーセットを用いてPCR検定を実施した。2008年9月下旬に各圃場における炭疽病の発病を調査した。Uda2圃場では、すべての株を処分したため発生調査は実施しなかった。

Table 2-1-4 現地原種苗生産圃場における Bio-PCR の品種別検定結果

Variety	Number of plants examined	Number of positive plants	Frequency of positive plants (%)
Asukarubi	237	14	5.9
Toyonoka	42	8	19.0
Hokowase	23	0	0.0
Sagahonoka	21	5	23.8
Akihime	16	0	0.0

2008年3~5月にイチゴ炭疽病菌特異的プライマーセットを用いてPCR検定を実施した。2008年9月下旬に各圃場における炭疽病の発病を調査した。

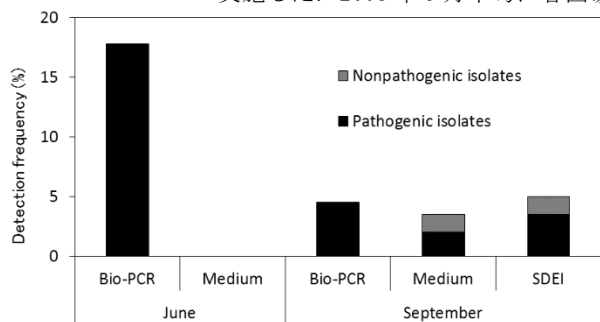


Fig. 2-1-8 各種検出法の検出率と病原性菌と非病原性菌の検出割合

6月にはBio-PCRとMathur培地による培養法で検出を行った。10月には、左記方法に加えてSDHI(エタノール浸漬簡易法)による検出を行った。Bio-PCRは、イチゴ炭疽病菌検出用プライマーを用いたPCRを行った。培養法およびエタノールは、イチゴ炭疽病菌検出用プライマーを用いたPCRにより分離菌の病原性を判定し、検出できた分離菌株を病原性菌株、検出できなかった分離菌を非病原性菌株とした。検定には6月には118株、10月には198株を用いた。

8) バルク法によるPCR検出感度

希釈板法により測定したイチゴ炭疽病菌の菌数は、培地の種類ではPD液体培地よりも改変Mathur液体培地で多く、両培地とも培養日数2日より4日が多かった(Fig. 2-1-9)。PCR検出感度は、従来法が 10^2 分生子/ml以上で検出されたのに対して、同じ培養条件で前培養を行ったPD培地によるバルク法では、 10^3 分生子/ml以上で菌が検出され、感度がやや低下したが、PD液体培地で4日間の培養または改変Mathur液体培地で2~4日間の培養を行うことで、従来法と同等以上のPCR検出感度が得られた(Table 2-1-8)。以上から、PD液体培地で4日間の培養、または改変Mathur液体培地で2~4日間の培養を行うバルク法は、10切片を同時に処理しても従来法よりも高い検出感度が維持でき、多検体から効率的に本菌を検出できる有効な方法であった。

Table 2-1-5 現地原種苗生産圃場における各種検定方法による検出精度の比較

Locality of nursery	June			September			
	Number of plants examined	Number of positive plants		Number of plants examined	Number of positive plants		
		Bio-PCR	Medium		Bio-PCR	Medium	SDEI
Uda	-	-	-	30	2	2	0
Kashihara	19	1	0	25	0	0	1
Asuka	20	0	0	20	1	0	0
Yanagimoto	20	0	0	20	1	1	5
Nikaido	20	0	0	20	2	0	0
Ichinomoto	20	0	0	20	0	0	0
Obitoke	-	-	-	10	1	1	0
Kitanosyo	-	-	-	10	0	0	0
Katagiri	-	-	-	20	0	0	1
Seiwa	30	20	0	35	2	0	0
Total	118	21	0	198	9	4	7

6月にはBio-PCRとMathur培地による培養法で検出を行った。10月には、左記方法に加えてSDHI（エタノール浸漬簡易法）を実施した。Bio-PCRは、イチゴ炭疽病菌検出用プライマーを用いたPCRを行った。培養法およびエタノールは、イチゴ炭疽病菌検出用プライマーを用いたPCRにより分離菌の病原性を確認した。

Table 2-1-6 培養液中の薬剤濃度がイチゴ炭疽病菌の増殖程度と分生子形成に与える影響

Fungicides	Ingredient concentrations (%)	Dilution degree					Conidia formation
		10	100	500	1000	5000	
Oxine-Copper	3500	-	-	-	-	++	-
Propineb	1400	++	+++	+++	+++	+++	-
Mancozeb	1250	-	++	+++	+++	+++	-
Diethofencarb	125	-	-	+	++	+++	+
Iminoctadine Albesilate	300	-	-	-	-	-	-
Fludioxonil	200	+++	+++	+++	+++	+++	-
Dithianthraquinone-2,3-dinitrile	400	-	++	+++	+++	+++	-
Bitertanol	100	-	+	++	+++	+++	+

殺菌剤は、適用濃度の薬液をさらに10から500倍に段階希釈して用いた。菌そうの増殖程度は、+：わずかに増殖，++：無処理の1/2未満の増殖，+++：無処理の1/2以上の～同程度の増殖とした。分生子形成は光学顕微鏡で確認した。

Table 2-1-7 イチゴ炭疽病感染株への薬剤散布が PCR 検出に与える影響

Fungicides	Ingredient concentrations (%)	Detection frequency (%)	
		PCR	Nested-PCR
Oxine-Copper	3500	30	80
Propineb	1400	40	70
Mancozeb	1250	40	100
Diethofencarb	125	10	80
Iminoctadine Albesilate	300	10	60
Fludioxonil	200	30	90
Dithiaanthraquinone-2,3-dinitrile	400	50	90
Azoxystrobin	100	10	80
Bitertanol	100	20	90
Water (Negative control)	-	60	100

殺菌剤は、適用濃度の薬液をイチゴ株に噴霧し、24 時間後に試料を採取し、PCR 検定を行った。

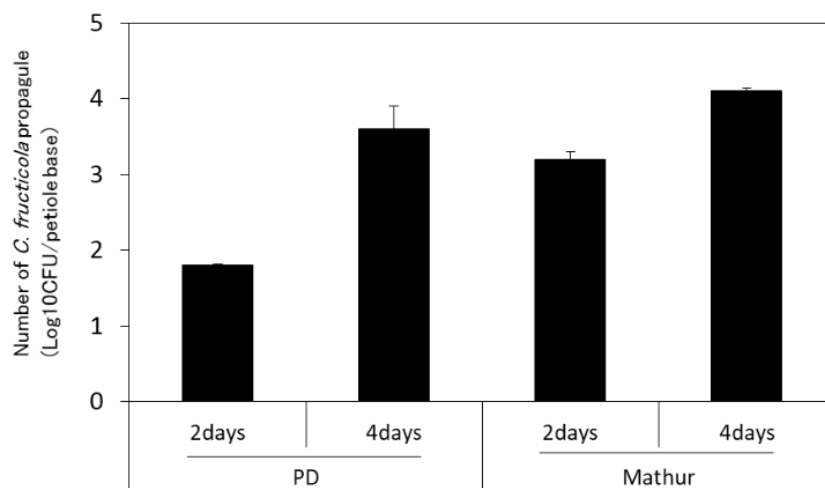


Fig. 2-1-9 多検体の前培養のための培地および培養日

数がイチゴ炭疽病菌の菌数に及ぼす影響

培養液はポテト・デキストロース (PD) 液体培地または Mathur 液体培地を用い、それぞれ 2 日または 4 日間の培養を行った。分生子濃度 10^4 分生子/ml で接種して前培養した培養液を用いて、Mathur 培地による希釈平板法により菌数を求めた。垂線は標準誤差を示す。

Table 2-1-8 多検体前培養における培地と培養日数が PCR 検出に及ぼす影響

Number of incubated samples	Medium	Incubation periods (days)	Number of samples detected / Number of samples examined				
			Inoculum concentration (conidia/ml)				
			0	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
Mono	PD	2	0/3	0/3	2/3	2/3	3/3
		4	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3
Multiple	PD	2	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3
		4	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3
	Mathur	2	0/3	1/3	2/3	3/3	3/3
		4	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3

多検体の前培養は、接種した葉柄基部 1 切片と無接種の葉柄基部 9 切片をまとめて 50ml 遠沈管に入れ、培養液 10ml を加えて、28℃で 2 日間、振とう培養した。培養液は 50ppm ストレプトマイシン硫酸塩を添加したポテト・デキストロース (PD) 液体培地または Mathur 液体培地を用い、それぞれ 2 日または 4 日間の培養を行った。対照の従来法として、接種した 1 切片を 2ml マイクロチューブに入れ、PD 液体培地 1ml を加えて 28℃で 2 日間培養した。

9) パルク法による PCR 検出の現地適応性

2010 年の検定では、8 月 5 日に採取した 621 株の 64 検定では、3 ほ場の 6 検定が陽性であった。10 月 5 日には採取した 618 株の 64 検定では、5 ほ場の 11 検定が陽性であった (Table 2-1-9)。検出数は 8 月よりも 10 月で高まった。また、8 月に陽性であった試料は、10 月にも陽性であるか、もしくはその周辺から採取した試料で陽性であった。発病調査では、1 回目の検定を行った 8 月 5 日には、すべての親株で炭疽病の発生は認められなかったが、検定約 1 ヶ月後の 9 月 2 日には陽性の 1 株、その後 10 月 5 日には陰性の 1 株で発生が認められた。以上から、全パルク法による PCR 検定は、一定の精度で発病前に本菌を検出でき、再現性および検定効率が高かった。

2011 年の検定では、8 月にはいずれのほ場においても炭疽病菌は検出されなかったが、10 月には、柳本 (Yanagimoto)、櫛本 (Ichinmoto)、帯解 (Obitoke)、片桐 (Katagiri) において炭疽病菌が検出され、特に櫛本での検出率が高頻度であった (Table 2-1-10)。時期別の検定では、8 月よりも 10 月で陽性株の検出率が高かった。

10) イチゴ炭疽病菌と萎黄病菌の同時検出技術

炭疽病菌と萎黄病菌のマルチプレックスにおける両菌のプライマーの割合は、PCR 炭疽病菌検出用プライマー量の割合を高くすることで比較的安定して検出され、炭疽病菌検出用プライマーを各 0.5μL、萎黄病菌検出用プライマーを各 0.2μL で混合したとき

に両菌のバンドが鮮明に確認することができた (Fig. 2-1-10)。

また、2 日間の前培養での検出率は、萎黄病菌が Mathur 液体培地および Fo-G2 液体培地でそれぞれ 90%および 80%と高かったが、炭疽病菌は最も高い PD 液体培地で 30%と低かった (Fig. 2-1-11)。4 日間培養では、萎黄病菌はすべての培地で 80%以上の高い検出率で、炭疽病菌は Mathur 液体培地でのみ 90%以上の高い検出率であった。

2-1-4. 考察

本研究では、PCR によるイチゴ無病徴感染株からの炭疽病菌検出技術を開発した。本法は迅速で高感度の検出法であり、奈良県内のイチゴ原種苗生産圃場において、本検出法の有効性を検証し、無病の親株生産に有効であることを明らかにした。

これまでイチゴ炭疽病の検出法は、選択培地を用いた培養法 (岡山ら 2007; Tu 1985)、エタノール浸漬簡易法 (Ishikawa 2003)、パラコート処理法 (Cook 1993)、凍結法 (Mertely and Legard 2004) などが開発されてきた。しかし、これら検出法は、炭疽病菌の近縁種も検出されるため、炭疽病菌であることを確定するには、イチゴ株での病原性を確認する生物検定が必要である。そのため、判定には少なくとも 3 週間必要であり、生産現場に早急に対応するためには、

Table 2-1-9 原種苗生産圃場における多検体のBio-PCR法による検定結果と発病状況
(2010年)

Locality of nursery	Strawberry varieties	Number of plants examined	Number of multi samples examined	Number of positive samples		Total number of disease plants
				8 Aug.	5 Oct.	
Kashihara	Asukarubi	90	9	1	2	1
Asuka	Asukarubi	30	3	0	0	0
Yanagimoto	Asukarubi	46	5	0	0	0
	Yumenoka	39	4	3	1	0
Nikaido	Asukarubi	90	9	0	0	0
	Kotoka	15	2	0	0	0
	Toyonoka	10	1	0	0	0
Ichinomoto	Asukarubi	71	7	1	5	0
	Toyonoka	4	1	1	1	0
Obitoke	Akihime	55	6	0	0	0
Kitanosyo	Akihime	17	2	0	0	0
Katagiri	Asukarubi	54	5	0	1	0
	Kotoka	10	1	0	1	0
Seiwa	Asukarubi	50	5	0	1	0
	Kotoka	34	3	0	0	1
	Toyonoka	6	1	0	0	0
Total		621	64	6	11	2

検定は2010年8月8日と10月5日に10株ずつまとめて前培養を行う全バルク法で検定した。各ほ場において試料が端数の場合には、試料に対する培養液量の割合を一定とした。

Table 2-1-10 原種苗生産圃場における多検体のBio-PCR法による検定結果 (2011年)

Locality of nursery	Strawberry varieties	Sampling in 11Aug.			Sampling in 6 Oct.		
		Number of plants examined	Number of multi samples examined	Number of positive samples	Number of plants examined	Number of multi samples examined	Number of positive samples
Uda	Asukarubi	17	2	0	17	2	0
	Kotoka	20	2	0	20	2	0
	Yumenoka	5	1	0	4	1	0
	Toyonoka	4	1	0	4	1	0
	Hokowase	6	1	0	6	1	0
Kashihara	Asukarubi	90	9	0	90	9	0
Asuka	Asukarubi	23	3	0	23	3	0
Yanagimoto	Asukarubi	53	6	0	53	6	0
	Yumenoka	51	5	0	60	5	1
Nikaido	Asukarubi	101	10	0	100	10	0
	Kotoka	40	4	0	35	4	0
	Yumenoka	27	3	0	25	3	0
	Hokowase	13	1	0	14	1	0
Ichinomoto	Asukarubi	87	9	0	87	9	8
	Toyonoka	2	1	0	2	1	0
	Hokowase	5	1	0	5	1	0
Obitoke	Akihime	50	5	0	48	5	0
	Kaorino	13	1	0	10	1	1
Katagiri	Asukarubi	87	8	0	87	8	2
	Kotoka	21	2	0	20	2	0
	Toyonoka	10	1	0	10	1	0
Seiwa	Asukarubi	41	4	0	20	2	0
	Kotoka	17	2	0	0	0	0
	Toyonoka	5	1	0	0	0	0
	Hokowase	18	2	0	0	0	0
Total		806	85	0	730	78	12

検定は2011年8月6日と10月6日に10株ずつまとめて前培養を行うバルク法で検定した。各ほ場において試料が端数の場合には、試料に対する培養液量の割合を一定とした。

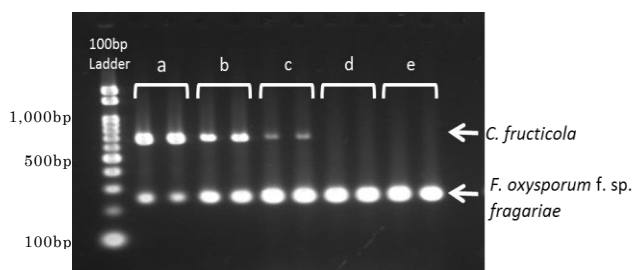


Fig. 2-1-10 イチゴ炭疽病菌と萎黄病菌の同時検出のための両菌のプライマー量と電気泳動の検出状況
炭疽病菌(*C. fructicola*)と萎黄病菌(*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*) 検出用プライマーのそれぞれの最終濃度 (μM) は、a が 0.25 と 0.05, b が 0.25 と 0.1, c が 0.25 と 0.25, d が 0.1 と 0.25, e が 0.05 と 0.25 で行った。

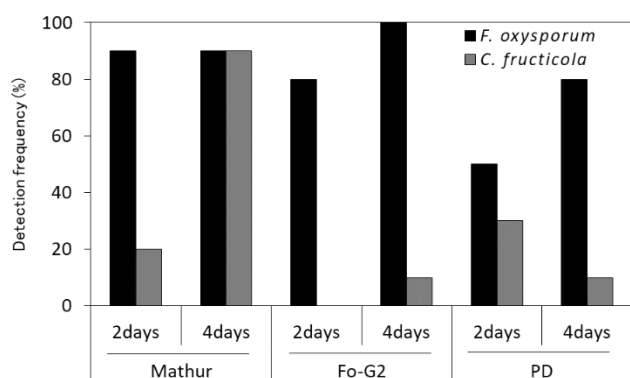


Fig. 2-1-11 前培養培地の種類が PCR 同時検出に及ぼす影響

炭疽病菌と萎黄病菌のそれぞれの高頻度感染部位である葉柄基部とランナーを用いた。Mathur 培地、Fo-G2 培地 (*Fusarium oxysporum* 選択培地)、PD 培地の各液体培地で 28°C、2 日および 4 日間振とう培養した。PCR は、炭疽病菌と萎黄病菌検出用プライマーを用い、最終濃度をそれぞれ 0.25 μM と 0.1 μM で混合して行った。

より迅速な検出法が求められていた。本検出法は、サンプリングから判定結果まで 3 から 4 日で可能であり、検定に要する期間を大幅に短縮することが可能となった。また、これまで PCR 検出法が開発されてきたが、検出感度が低く、無病徴感染株から安定して本菌を検出することは難しかった (Freeman et al. 1997; Parikka and Lemmetty 2004; Sreenivasaprasad et al. 1996)。Pérez-Hernández et al. (2008) は、検出感度を高めるために、試料の前処理として凍結処理と静置培養を行い、さらに超音波処理などを加えて DNA

抽出し、nested-PCR を行うことで検出感度を高めることが可能となったとしている。この方法は、操作が煩雑であるため、今回の目的とする効率的な検出法ではなかった。本研究では、DNA 抽出前に試料を 2 日間液体培養し、イチゴ組織内に潜在感染している本菌を液体培地中で増殖させる Bio-PCR を開発した。本法は、培養した液体培地から DNA 抽出するため、試料の破碎などの煩雑な作業がなくなり、PCR 阻害物質である多糖類やポリフェノールの混入を軽減することが可能となり、高感度な検出が可能となった。

さらに、本研究では複数の試料を検出するバルク法について検討し、10 株の試料を同時に検出しても十分な検出感度を得られた。奈良県ではイチゴ親株を 3 年かけて増殖し、約 3 万株をイチゴ生産者へ配布している。そのため、イチゴ親株の病害検査の検定数は、抽出検査を実施するにしても 1000 株程度を検査する必要があり、実際の検査場面では、バルク法のような手法が実用であると言える。イチゴ原種苗生産圃場では、通常の実産者の圃場よりも厳密な病害防除を実施しており、通常は本病が発生したとしても数%程度である。このように発生割合が少ない場合には、バルク法は有効である。しかし、生産者の圃場のように発生割合が多い圃場では、1 株でも汚染株が混入していると陽性と判定され、廃棄する株数が多くなるため適さないと考えられる。

本検定法では、一部の殺菌剤が前培養時に本菌の増菌を抑制し、検出結果に影響することが明らかになった。特に、イミノクタジナルベシル酸塩水和剤、プロピネブ水和剤、ジエトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤ではその影響が強かった。イミノクタジナルベシル酸塩水和剤やジエトフェンカルブ・チオファネートメチル水和剤は治療効果が高いため (平山ら 2008)、薬剤散布により本菌の菌密度を低下させたと考えられた。そのため、試料を採取する際には、薬剤散布状況についても考慮する必要があると考えられた。

千葉県の実産圃場においてイチゴ株から分離した *C. gloeosporioides* 菌株には、イチゴ炭疽病菌と同じ形態の非病原性菌が分離されている (海老原ら 2006)。本研究で奈良県の実産圃場から分離した場合にも、イチゴ炭疽病菌とともに非病原性菌が検出されたことから、イチゴ株には *C. gloeosporioides* のさまざまな種類の菌が共存していると考えられた。このような菌株が混在する条件下において、本研究で開発した炭疽病菌のみを検出できる PCR 検出技術の果たす役割

は大きいと言える。

イチゴ親株増殖圃場の検定において、炭疽病菌の抵抗性品種である‘かおり野’や‘宝幸早生’からも本菌が検出された。イチゴ無病徴葉上の分生子は、菌糸伸張し、2次分生子を形成する(Leandro et al. 2001)。また、第1章から無病徴のイチゴや雑草を除草剤処理した場合には、大量の分生子を形成することが明らかになっている。このことから抵抗性品種であっても分生子が形成され、伝染源となる可能性があるため、罹病性品種と同様に防除対策や栽培管理について実施する必要があると考えられた。

検定期間については、8月よりも10月以降に実施した方が陽性株の検出頻度が高かった。イチゴ炭疽病菌の好適温度は28℃であり(Smith and Black 1987)、奈良県では8月が最もイチゴ炭疽病菌の活動が活発になる時期となる。そのため、生産現場では、この時期の薬剤防除は多くなり、1週間に一度程度の頻度で実施されることが多い(平山 2016b)。このような理由から8月には陽性株の検出頻度が低下したと考えられた。いずれにしてもこの時期の検定は漏れ落ちが発生しやすいため、本菌の検定には秋以降に実施するのが適していると考えられた。

イチゴ重要病害である萎黄病菌との同時診断も可能となった。現在、イチゴ親株増殖圃場において、本病と萎黄病の検定は別々に実施している(平山 2016a)が、今後、現地実証を行い、両菌の同時検出技術に改良を加えながら、導入していくことでさらに検定の効率化が図れる。

本検定技術は本研究による実証試験を経て、現在、奈良県内のイチゴ親苗圃場において導入されている。現地試験のため詳細な比較はできないが、本技術導入前と導入後の奈良県内の本病の発生は、減少傾向で推移している。そのため、本検定は県内全体のイチゴ生産における本病の発病抑制に役立つ技術と考えられ、今後も継続して実施していくことが望まれる。

第2節 葉面エタノール噴霧法を活用した発生予察の有効性

2-2-1. 緒言

病害の発生予察は気象条件や病原菌密度などのデータから病害の発生を予測する。その予察情報は防除の要否あるいは防除適期を判断するために活用され、発生前あるいは発病初期の効率的な防除が可能

となる。この10年間に世界的には、病害予察システムの研究報告が増加しており(Landschoot et al. 2012)、日本においても2010年から、農林水産省において、数種病害について新規予察基準が検討されている。

これまでイチゴ炭疽病では、アメリカにおいて本圃での露地栽培を対象に降水量や気温データを活用した予察法が開発されている(MacKenzie et al. 2012)。しかし、日本では、本病の発生は育苗期に多く、育苗圃での予察法の確立が求められる。

本章第1節では、PCRによる本菌の検出法を開発したが、発生予察では広域的な調査が必要であり、適期に大量の調査が必要であるため、精度よりも簡便さが必要となされる。石川(2003)は、エタノール簡易診断法は簡便なイチゴ炭疽病菌の検出法であり、予察法として適しているとしている。

そこで、イチゴ炭疽病の発生予察法を確立するため、奈良県の主要品種である‘アスカルビー’を対象に、エタノール浸漬簡易診断法を改良した葉面エタノール噴霧法による潜在感染状況と、その後の本病の発生状況との関係を調査し、その有効性を検証した(Hirayama et al. 2015)。

2-2-2. 材料および方法

1) 葉面エタノール噴霧法と浸漬法の検出比較

エタノールの使用量を減らし、コスト低減を図るために考案した葉面エタノール噴霧法と従来のエタノール浸漬法(Ishikawa 2003)との検出率を比較した。イチゴ炭疽病菌 *C. fructicola* 菌株 Nara-gc5 株(MAFF 245243 株)を200ml容の三角フラスコに100mlのPS液体培地で、120rpm、10日間の振とう培養を行った。培養後、菌そうをガーゼでろ過し、分生子液を得た。分生子液は、滅菌蒸留水で希釈し、 10^3 分生子/mlに調整した。調整した分生子液はイチゴ(品種‘アスカルビー’)の株あたり5mlずつハンドスプレーで噴霧した。接種株は、15℃から30℃のビニールハウス内で管理し、2週間後に無病徴の最外葉を採取した。試験はそれぞれの方法で20小葉を用いて3反復で実施した。葉面エタノール噴霧法は、採取試料を水道水で洗浄、風乾後、70%エタノールを十分量噴霧して表面殺菌し、さらに30秒後にエタノールを水道水で洗い流した(Fig. 2-2-1)。小葉の表面を上にして置き、28℃の温室暗黒条件下で静置した。14日後に肉眼で鮭肉色の分生子塊(Fig. 2-2-2)を確認して検出率を求めた。エタノール簡易浸漬法による検定は、Ishikawa(2003)の方法に準じて行った。すなわち、まず外葉中央の小

葉を 80% エタノールで 30 秒間表面殺菌し、滅菌水で洗浄した。その他の方法については葉面エタノール噴霧法と同様に行った。

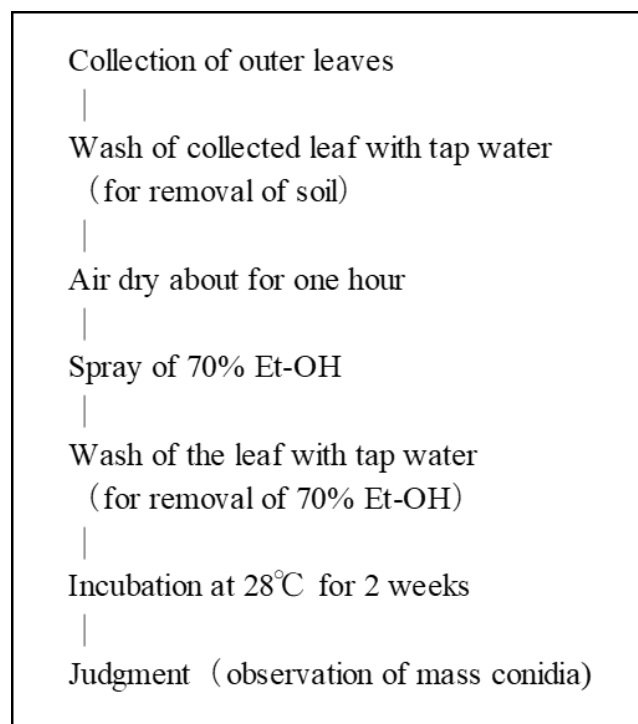


Fig. 2-2-1 エタノール噴霧法の手順

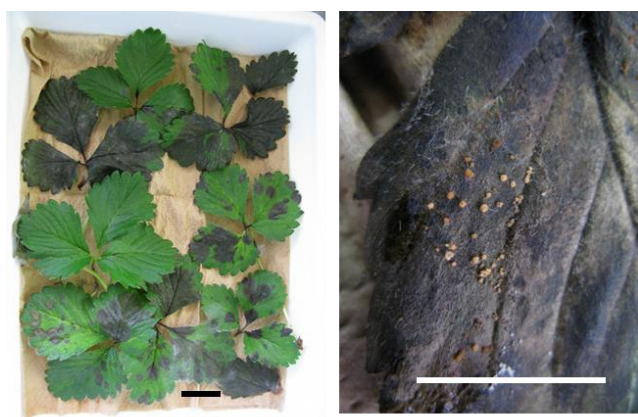


Fig. 2-2-2 エタノール噴霧法による検出状況
培養後のイチゴ葉（左）、
イチゴ炭疽病菌の分生子塊（右）
(bar: 3 cm)

2) 調査圃場

2010 年から 2014 年の 5 年間、奈良県内のイチゴ産地 4 地域延べ 82 カ所の育苗圃と、その育苗圃から採取したイチゴ苗を定植した本圃において (Table 2-2-1), 潜在感染状況と発病状を調査した。

3) 育苗圃における葉面エタノール噴霧法による潜在感染菌の検出

2010 年から 2014 年の 7 月上旬に、各育苗圃のイチゴ親株 20 株を任意に抽出し、それぞれ株の最外葉を採取した。採取した試料は葉面エタノール噴霧法で処理した。温室条件下で 28°C, 14 日間培養後、小葉に形成された分生子塊を肉眼で調査して潜在感染圃場率および無病徴感染株率を求めた。また、2012 年から 2014 年には、7 月上旬に加えて 6 月中旬および 7 月下旬についても調査し、潜在感染状況の推移について調査した。

4) 検出菌の病原性

2011 年から 2014 年の検出菌について、イチゴ株への接種により病原性を確認した。葉面エタノール噴霧法で検出した分生子塊を爪楊枝で掻き取り、イチゴ健全株の葉柄に有傷接種した。それぞれ 2 株を用い、1 株あたり 2 葉の葉柄にそれぞれ 1 カ所ずつ接種した (Fig. 2-2-3)。判定は、2 株ともに病斑が進展したものを病原性菌株とし、1 株のみあるいは 2 株とも病斑の進展が見られないものを非病原性菌株とした。

5) 育苗圃および本圃における発生調査

2010 年から 2014 年に潜在感染状況を調査した育苗圃と、そのイチゴ苗を定植した本圃において、その後の発病状況を調査した。育苗圃では 9 月上旬、本圃場では 11 月上旬に、各 500 株について発病株率を調査した。また、2012 年から 2014 年には、6 月中旬から 12 月上旬まで継続的に発病株率を調査した。

6) 葉面エタノール噴霧法の有効性評価

葉面エタノール噴霧法による無病徴感染株調査の有効性を確認するため、2010 年から 2014 年の 5 カ年について、7 月上旬の無病徴感染株率および潜在感染圃場率と、9 月上旬の育苗圃及び 11 月の本圃における発病圃場率を年ごとにプロットし、それぞれの相関関係を調べた。

2-2-3. 結果

1) 葉面エタノール噴霧法と浸漬法の検出比較

噴霧法と浸漬法の検出率はそれぞれ 80.5% と 86.1% となり、噴霧法が若干低くなったが、ほぼ同程度であり有意差は認められなかった (Fig. 2-2-4)。こ

Table 2-2-1 調査圃場の育苗および本圃における栽培様式

Locarity of field	Nursery		Grown-Field
	Rain Shelter	Irigaition	Cultivation
Yamatokoriyama1	-	Over head	Soil culture
Yamatokoriyama2	+	Over head	Soil culture
Yamatokoriyama3	-	Over head	Soil culture
Yamatokoriyama4	-	Over head	Soil culture
Yamatokoriyama5	-	Over head	Soil culture
Asuka1	+	drip	Solution culture
Asuka2	+	drip	Solution culture
Asuka3	+	drip	Solution culture
Asuka4	+	drip	Solution culture
Asuka5	+	drip	Solution culture
Asuka6	+	Over head	Solution culture
Tenri1	+	drip	Soil culture
Tenri2	-	Over head	Soil culture
Tenri3	+	Over head	Soil culture
Tenri4	+	Over head	Soil culture
Tenri5	+	Over head	Soil culture



Fig. 2-2-3 有傷接種後のイチゴ葉柄部の病斑

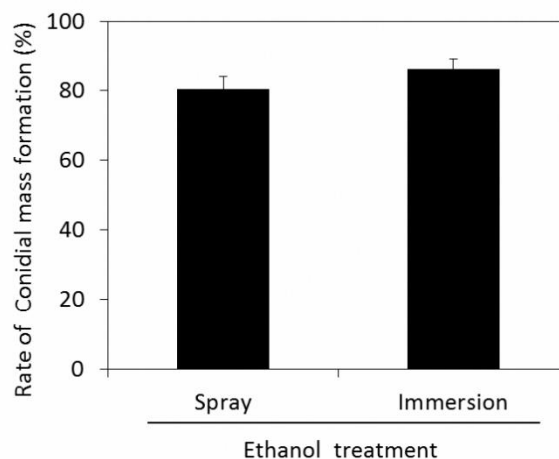


Fig. 2-2-4 エタノール噴霧処理と浸漬処理のイチゴ炭疽病菌の検出比較

噴霧処理と浸漬処理の間には、Student's t-test ($p < 0.05$) で有意差がなかった。垂線は、標準誤差を示す。

れにより、噴霧法は本菌の検出法として有効であることが明らかとなり、本法を用いて現地実証を行った。

2) 育苗圃での感染状況

2010年から2014年の7月上旬の潜在感染圃場率は、2011年には100%と最も高く、2014年には50%で最も低く、年次変動の幅が大きかった (Fig. 2-2-5)。このとき感染株率は、2011年に44.2%、2014年に12.5%であった。2012年から2014年の3カ年の検出圃場率および検出株率は、いずれの年も7月上旬に最も高くなった (Fig. 2-2-6)。

3) 病原性菌株の割合

2011年から2014年に行った病原性菌株の検出率は、73.0%から78.6%の範囲内で病原性菌株の割合は比較的安定していた (Fig. 2-2-7)。

4) 育苗圃および本圃での発生状況

2010年から2014年の育苗期の9月上旬での発病圃場率は、2011年に35.7%で最も高く、2012年と2013年に6.3%と最も低かった (Fig. 2-2-8)。また、本圃の11月上旬には、2011年に35.7%と最も高く、2013年と2014年に12.5%で最も低かった。発病株率は、育苗圃、本圃ともに最も高い2011年でも2%以下で低い値であった。

2012年から2014年の発病推移は、6月中旬から7月上旬までは、7月下旬以降から発病が認められ、その後、9月上旬の育苗後期さらに本圃定植後にかけて増加し、12月上旬には低下した。このとき、育苗期では9月上旬、本圃では11月上旬の発病圃場率が最も高かった。また、発病株率は2012年11月上旬、2013年8月、2014年10月で発病株率が最も高かったが、その値は0.2%で非常に低かった。

5) 葉面エタノール噴霧法の有効性評価

7月の育苗圃での感染圃場率および感染株率と、その後の育苗圃での発病圃場率との関係では、相関係数はそれぞれ0.65, 0.87で高い相関が認められた (Fig. 2-2-9)。感染圃場率および感染株率と、その後の発病株率との相関係数は、それぞれ0.84, 0.94で高い相関が認められた。一方、感染圃場率および感染株率と、その後の本圃での発病圃場率との関係では、相関係数はそれぞれ0.61, 0.75、また、その後の発病株率との相関係数はそれぞれ0.60, 0.62であり、育苗圃より

も若干低かった。

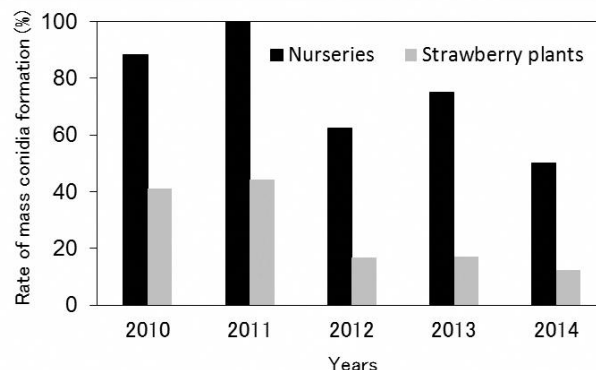


Fig. 2-2-5 年度別のエタノール噴霧法によるイチゴ炭疽病の分生子塊の検出

2010年から2014年の7月中旬に4市町16圃場の育苗圃場において、それぞれ20株の最外葉を採取し、検出に用いた。

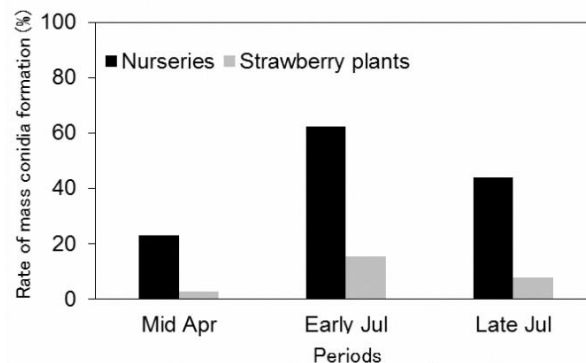


Fig. 2-2-6 時期別のエタノール噴霧法によるイチゴ炭疽病の分生子塊の検出

2012年から2014年に4市町16圃場の育苗圃場において、それぞれ20株の最外葉を採取し、検出に用いた。

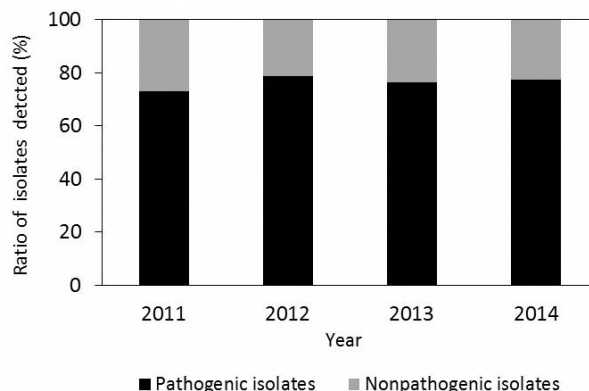


Fig. 2-2-7 エタノール噴霧法における病原性菌株と非病原性菌株の検出割合

病原性はイチゴ株の葉柄における有傷接種により確認した。2011年12月、2013年、2014年にそれぞれ318菌株、56菌株、55菌株、40菌株の計469菌株について調査した。

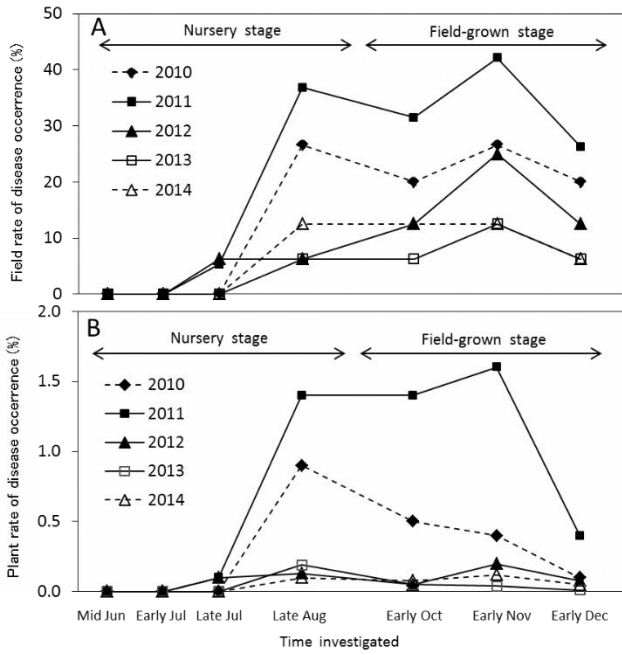


Fig. 2-2-8 イチゴ炭疽病の発生推移

A: 発病圃場率, B: 発病株率.

調査は2010年から2014年に4市町村の16圃場について継続的に行った。6月中旬から8月下旬までは育苗圃, 10月上旬から12月上旬は本圃について, 調査時に各圃場500株ずつ調査した。

2-2-4. 考察

奈良県のイチゴ産地において, 葉面エタノール噴霧法による感染状況調査がイチゴ炭疽病の発生予察に有効であることを検証した. MacKenzie et al. (2012) は, イチゴ露地栽培における炭疽病の薬剤散布時期を決定する際に, 降雨量と温度データを活用した予察システムが有効であるとしている. しかし, 奈良県内では, 雨よけで栽培されていることが多く, 必ずしも発病に降雨量が反映されない. 葉面エタノール噴霧法を活用した発生予察は, イチゴ株の感染状況を調査するため, 奈良県内におけるイチゴ炭疽病の予察法として適していると考えられた.

育苗圃での時期別の潜在感染は, 7月上旬に最も高く, その後7月下旬には低下した. 本菌の最適気温は28℃であるため (Smith and Black 1987), 通常, 本病の発生は7月上旬よりも7月下旬で多くなる. しかし, 奈良県での炭疽病の薬剤防除は, 7月中旬以降から散布間隔を2週間から1週間に短くし, 保護剤中心から保護剤と治療剤の交互散布へと切り替える防除体系が取られている (平山 2016b). 炭疽病発生の好適条件であるにもかかわらず7月下旬に潜在感染率が低下したのは, このような防除体系が原因であ

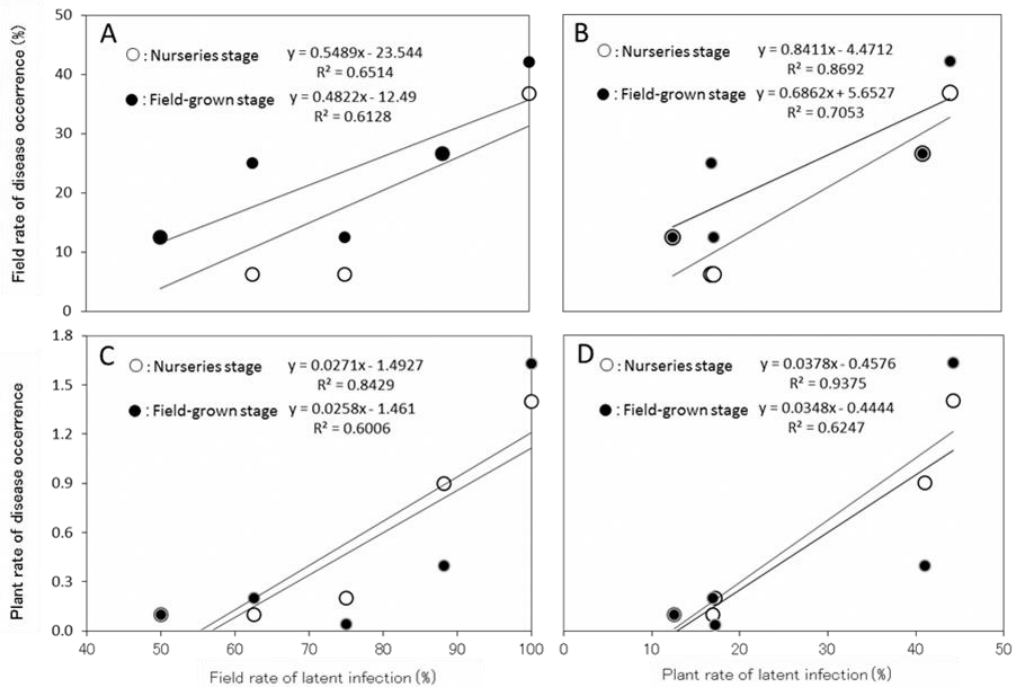


Fig. 2-2-9 エタノール噴霧法による感染検出と其後の発病との関係

A: 感染圃場率と発病圃場率との関係, B: 感染株率と発病圃場率との関係, C: 感染圃場率と発病株率との関係, D: 感染株率と発病株率発病との関係.

2010年から2014年の5カ年のエタノール噴霧法による潜在感染調査と炭疽病発病調査の相関関係を調査した. 潜在感染は7月上旬, 発病は育苗圃では8月下旬, 本圃では11月上旬の調査データから求めた.

る可能性がある。また、炭疽病菌の感染や発病は、気温とともに湿度が大きく影響する (Wilson et al. 1990) ため、7月中旬以降の梅雨明けにより湿度が低下したことも要因の一つと考えられた。

育苗期における炭疽病は、7月下旬に初発し、その後育苗後期になるに従って発病が高まることから、本菌の活動が活発になるこの時期は、薬剤散布間隔や種類の変更を判断することが必要となる。そのため、遅くとも7月下旬までには予察情報を生産者へ提供する必要がある。葉面エタノール噴霧法の検定には2週間を要することから、遅くとも7月上旬までに検定を行う必要があると考えられた。

*C. gloeosporioides*の病原性は多様性を示し

(Denoyes-Rothan et al.; 2003; Suzuki et al. 2010) , イチゴ株からは病原性菌株のほか非病原性菌株も分離される (海老原ら 2006) 。本研究においてもイチゴ葉から病原性菌株と非病原性菌株の両方が検出された。しかし、2011年から2015年の4ヵ年において検出菌株に対する病原性菌株の割合は、70~80%と比較的安定していた。本法は病原性菌株を特定できない検出法であるが、病原菌の検出割合の年次変動が少ないことから、年ごとの発生量を相対的に比較した予察が可能であると考えられる。

2010年から2014年の5ヵ年の調査において、無病徴感染株率と、育苗圃および本圃での発生圃場率で相関係数が高かった。このことから、葉面エタノール噴霧法による無病徴感染株調査により、その後の発生状況を把握することが可能であり、本法が発生予察に有効であることが明らかとなった。葉面エタノール噴霧法を活用した予察法により、その年の発生状況を予測し、生産者へ情報提供や注意喚起が可能になると思われる。今後、予察データに基づいた薬剤散布により、散布間隔や薬剤の種類などをどのように反映していくかについても検討する必要がある。

第3章 食品の殺菌処理技術を応用したイチゴ炭疽病の新たな防除法の開発

3-1. 緒言

本病の防除対策は、雨よけ育苗、隔離育苗などの効果が高く、奈良県内においても普及しているが、同時に定期的な薬剤散布も必須となっている (稲田ら 2005b; MacKenzie et al. 2009; MacKenzie and Peres 2012;

奈尾 2005; 岡山・平山 2011)。本病の薬剤防除には、感染を抑制する保護殺菌剤と病原菌に対して殺菌効果の高い治療殺菌剤が使用される (MacKenzie et al. 2009; 平山ら 2008a)。なかでも治療殺菌剤は、耐性菌の発生により効果が期待できる種類は少なくなっており、防除効果の低下が懸念されている。これまで炭疽病に対する耐性菌が確認されているのは、ベンズイミダゾール剤 (Davidse 1986) やアゾキシストロビン剤 (Bartlett et al. 2002) である。両剤ともに非常に優れた治療殺菌剤であるが、病原菌の一塩基が置換することによって耐性を獲得するため、比較的耐性菌が発生しやすい特性を持っている (Ishii et al. 2001)。

ベンズイミダゾール剤耐性菌の発生は古く、イチゴ炭疽病では1989年に静岡県、1991年に静岡県、奈良県、北九州地域で報告がある (楠ら 1992)。2009年に奈良県において現地から分離した菌株について薬剤感受性検定を行ったが、高頻度で耐性菌が検出されており、約20年経過した現在でも耐性が維持されていた (平山ら 2008b)。

アゾキシストロビン剤は1998年に農薬登録され、イチゴ炭疽病に対する防除効果が高く、うどんこ病および灰色かび病との同時防除が可能であることから、重要な防除薬剤に位置づけられていた。しかし、1999年にウリ類うどんこ病で耐性菌が報告されて以来、多くの野菜や果樹の病原菌で薬剤耐性菌が確認されており (Ishii et al. 2007)、イチゴ炭疽病での発生が懸念されていた。このような状況の中、2003年に佐賀県において分離されたイチゴ炭疽病菌が本剤に対し耐性菌であることが報告され (稲田ら 2010)、その後四国地方、長崎県、奈良県でも確認された (平山ら 2008b)。

また、DMI剤 (ステロール脱メチル化阻害剤) は、地域によっては防除効果が著しく低下しているとの報告がある (中澤ら 1993)。

このような課題に対応するため、現在の薬剤防除とは異なる新たな治療効果の高い防除対策が求められている。

一方、電解水は、耐性菌の発生リスクがなく、核酸やタンパク質の酸性化により微生物を物理的に破壊することが知られている (Al-Haq et al. 2005)。これまで酸性電解水は、多くの作物の地上病害の防除に活用するため研究されている (Fujiwara et al. 2000; Guentzel et al. 2011; Hou et al. 2012; Jia et al. 2015; 草刈ら 2013; Mueller et al. 2003)。この中では、作物自体

に生育障害が発生し (Fujiwara et al. 2000; Mueller et al. 2003), また人体や環境に対して悪影響を与えたり, 農業用資材や機械などを腐食することがある (Issa-Zacharia et al. 2010). 近年, 中性電解水の処理が, 食品分野において衛生管理用として研究が始められており, 殺菌剤として認識されている (Guentzel et al. 2008; Huang et al. 2008; Monnin et al. 2012; Torlak 2014). 中性電解水は, 酸性電解水よりも人や環境に対して安全であり, 貯蔵中の安定性が高いといった利点がある (Cui et al. 2009). しかし, 植物病原菌に対する殺菌効果については, ほとんど知られていない.

オゾンは, 果物, 野菜や貯蔵穀物に被害を及ぼす細菌, 糸状菌, 昆虫などの殺菌, 殺虫に利用されている (Guzzon et al. 2013; O'Donnell et al. 2012). オゾンは幅広い微生物に対して強い殺菌効果を示すが, 急速に水に溶け, 酸素に分解する特性を持っている. 黒田ら (2011) は, 毎日のオゾン水の散布がイチゴ炭疽病の防除に有効であるとした. しかし, 頻繁な散布処理は生産者への負担が大きいと, 生産現場で導入することは難しい. そのため, オゾンを病害防除に活用するためには省力化を図ることがなにより必要となる.

そこで本研究では, 中性電解水およびオゾン水の *C. fruticola* の分生子に対する殺菌効果について検討し, さらに圃場試験においてかん水に両機能水を用いた頭上かん水と殺菌剤との組み合わせによる防除効果について検討した (Hirayama et al. 2016c; d).

3-2. 材料および方法

1) 病原菌と接種源の調整

イチゴ炭疽病菌は *Colletotrichum fruticola* の Nara-gc5 株 (MAFF 245243 株) 株を用いた. 本菌株の寒天切片はショ糖加用ジャガイモ煮汁 (PS) 液体培地 100ml の入った 200ml 容三角フラスコに入れ, 25°C, 10 日間, 自然光条件下で振とう (120rpm) 培養を行い, 分生子を形成させた. 分生子懸濁液は滅菌ガーゼで濾過して菌体を取り除き, 滅菌蒸留水で希釈し, 10⁶ 分生子/ml に調整した.

2) 中性電解水の生成

中性電解水の生成には, 一層式の電解水生成装置 (試作機, シャープ製) を用いた. 塩化カリウム (濃度10%以下) と塩酸 (濃度1%以下) を含んだ水道水を生成装置の電解槽に通し, 中性電解水を作成した. 有

効塩素濃度は塩素測定器 (C-201, エムケー・サイエンティフィック) を用いて測定した.

3) オゾン水の生成

オゾンは, コロナ放電式オゾン生成装置 (試作機, シャープ製) を用いて生成した. 実験室内での試験では, 溶解オゾン濃度はポータブル型オゾン水モニタ (荏原実業), 圃場試験では, 頭上かん水用ノズルから出たかん水用のオゾン水を2, 3日ごとに採取し, 比色計 (DR/850, Hach) を用いて測定した.

4) 電解水およびオゾン水の処理濃度および処理時間が炭疽病菌の殺菌効果に及ぼす影響

中性電解水およびオゾン水の炭疽病菌に対する殺菌効果については, 実験室内において試験を行った. 中性電解水は前述の電解水生成装置で生成し, 水道水により有効塩素濃度を1.8, 3.6, 7.0および10.0 mg/l に調整した. オゾン水は前述のコロな放電式オゾン生成装置で生成し, 水道水によりオゾン濃度を0.2, 0.3および0.5 mg/l に調整した. それぞれの中性電解水およびオゾン水99mlに10⁶ 分生子/ml濃度の分生子液1mlを速やかに添加した. 添加10, 30および60秒後に還元剤であるチオ硫酸ナトリウムの5% (w/v) 溶液を200μl加え, 中性電解水とオゾン水による反応を停止させた. 無処理対照区として水道水を用いた. 生菌数はベノミル (50 mg a.i./l, 商品名: ベンレート水和剤, 住友化学) を添加した改変Mathur培地 (Tu 1985) を用いた希釈平板法によって定量した. なお, ベノミルは雑菌の生育抑制と, コロニーの大きさを制限するために使用した. シャーレは暗黒下で25°C, 7日間培養した. 分生子の殺菌率は, 次式によって求めた. 試験は各処理濃度および処理時間あたり3反復し, それぞれ10プレートずつ使用した.

殺菌率 (%) = [1 - (各処理区でのコロニー再生数 / 水道水でのコロニー再生数)] × 100

5) イチゴ葉上での中性電解水の処理条件の検討

圃場での中性電解水の処理条件を決定するため, イチゴ炭疽病菌接種前および処理後における中性電解水の効果と処理時間について検討した. イチゴ (品種 'アスカルビー') の3葉期のポット苗にハンドスプレーを用いて濃度 10⁶ 個/ml の分生子液を 10ml ずつ噴霧接種した. 接種株は透明のプラスチックケースに入れ湿室に保った. 接種直後, 24 時間後および 72 時間後に有効塩素濃度が 10.0 mg/l の中性電解水をイチ

ゴ株当たり 1.7ml/秒の割合で 0, 5, 10, 30 および 60 秒間処理した。また、中性電解水の保護効果を確認するために、本菌分生子を接種する 1 時間前に中性電解水を噴霧する区を設けた。本菌のイチゴ葉での感染率は、Freeman ら (2001) の方法を改変して求めた。すなわち、本菌接種と中性電解水を処理したイチゴ株からイチゴ小葉を切り取り、1 時間の風乾後、8 切片に分割した。小葉の切片は改変 Mathur 培地へ置床し、暗黒下で 25°C、7 日間培養した。本菌の感染率は、供試した小葉切片のうちコロニー伸長が確認された小葉切片の割合を計算して求めた。試験は 3 反復し、1 反復あたり 3 株から 2 小葉ずつ計 6 小葉を用い、それぞれの小葉を 8 切片に分割して計 48 切片を用いた。

6) 圃場試験

①中性電解水の頭上かん水の防除効果

2014 年 7 月から 11 月にかけて奈良県農業研究開発センターのビニールハウスにおいて、中性電解水の頭上かん水処理のイチゴ炭疽病菌に対する防除効果について検証した (Fig. 3-1, 3-2)。イチゴ (品種 ‘アスカルビー’) は、培養土 (TM-1, タキイ種苗) の入った 300ml 容ビニールポットで育成し、試験前に葉かきを行い、3 葉のイチゴ株にして用いた。試験開始前のかん水は、水道水による頭上かん水とし、試験開始後には、中性電解水を株当たり 13ml/秒の水量で 10 分間頭上かん水した。頭上かん水用のノズルは、Pin Nozzle Blue M11 (Royal Brinkman) を用いた。無処理区として、水道水の頭上かん水区を設けた。肥料は、試験開始時に IB-S1 号 (N-P-K: 10-10-10, ジェイカムアグリ) を株当たり 0.5g ずつ施用した。処理したかん水は、ノズルの先から 2 日から 3 日おきに採取し、有効塩素濃度を測定し、試験中の塩素濃度は 2~8 mg/l の範囲内であった。病原菌の接種は間接接種で行った。すなわち、試験に用いた健全株を 24 穴の SS トレイの真ん中 4 穴を除く 20 穴に配置し、残った中央の 4 穴の対角線上に接種株を 2 株置いた。接種株は 15 日間そのままにして感染を促し、その後取り除いた。接種株は濃度 10^6 個/ml の分生子液を株当たり 10ml の割合で噴霧接種し、その後プラスチック容器に入れて湿室条件下で、25°C、48 時間静置し、感染させたものを用いた。接種 30 日後に発病株数を調査し、発病株率を求めた。同時に病徴部を光学顕微鏡で観察し、その分生子を確認することで本症状が本菌によるものであることを確認した。

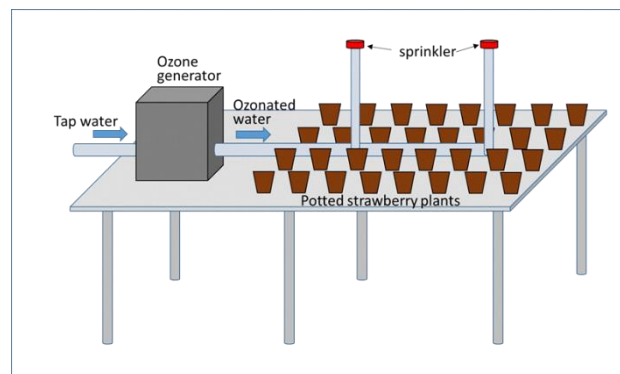


Fig. 3-1 中性電解水およびオゾン水による頭上かん水システムの概念図



Fig. 3-2 機能水の発病抑制試験

②中性電解水の頭上かん水と殺菌剤処理の併用による防除効果

試験は 2014 年 11 月から 12 月にかけて実施した。試験に用いたイチゴ株は前述と同様に育成した。中性電解水の有効塩素濃度は 8~12mg/l 範囲内での試験であった。中性電解水による頭上かん水は、株当たり 13ml/秒の水量で 5 分間行った。慣行の防除法である薬剤処理には、現地での主要薬剤であるプロピネブ (1.4 g a.i./l, 商品名: アントラコール水和剤, バイエルクロップサイエンス株式会社, 東京), イミノクタジナルベシル酸塩 (0.4 g a.i./l, ベルクート水和剤, 日本曹達), マンゼブ (1.2 g a.i./l, ジマンダイセン水和剤, ダウ・アグロサイエンス), フルジオキシニル (0.2 g a.i./l, セイビアフロアブル 20, シンジェンタジャパン) の 4 種類の殺菌剤を用いた。薬剤処理は接種 3 日前から 10 日おきに各薬剤を記述の順番にローテーションで株当たり 20ml の割合で散布した。なお、接種株は前述のとおり作製し、健全株の中央に設置した。試験区は、中性電解水をかん水代わりに使用する電解水かん水区, 対照として慣行の殺菌剤散布区, 水道水をかん水する無処理区および中性電解

水のかん水と殺菌剤の併用処理区を設けた。接種 40 日後に発病株数を調査し、発病株率を求めた。試験は 20 株の 4 連で行った。

③オゾン水の処理濃度の違いによる防除効果

異なるオゾン濃度での本菌に対する抑制効果について検討した。試験は 2014 年 8 月から 9 月にかけて実施した。オゾン濃度は、低濃度区で 0.1~0.4mg/l, 高濃度区で 0.5~1.0mg/l とした。その他の接種、頭上かん水および栽培管理条件は、3-2-6)-①と同様に行った。

④オゾン水の頭上かん水と殺菌剤処理の併用による防除効果

試験は 2014 年 11 月から 12 月にかけて実施した。3-2-6)-③の試験においてオゾン処理の効果が低かったため、本試験でのオゾン濃度は 1.2~1.5 mg/l の範囲内で実施した。その他の接種、頭上かん水および栽培管理条件は、3-2-6)-①と同様に行った。

3-3. 結果

1) 電解水およびオゾン水の処理濃度および処理時間が炭疽病菌の殺菌効果に及ぼす影響

イチゴ炭疽病菌の分生子に対する中性電解水の殺菌率は、塩素濃度 3.6mg/l で 60 秒間処理、7.0mg/l で 30 秒間処理および 10.0mg/l で 10 秒間処理において 100%であり、完全に死滅することができた (Fig. 3-3, 3-4)。3.6mg/l で 30 秒間処理および 7.0mg/l で 10 秒間処理では 90%以上の殺菌率であり、若干殺菌効果が低下した。塩素濃度が 1.8 mg/l で場合には 60 秒間処理しても殺菌率が 10%以下であり、殺菌効果はほとんど認められなかった。

一方、オゾン水では、オゾン濃度 0.2mg/l および 0.3mg/l ではともに 60 秒間、0.5mg/l では 10 秒間の処理でも殺菌率は 100%であった (Fig. 3-5)。また、最も低濃度で処理時間が短い 0.2mg/l で 10 秒間処理でも 90%以上の高い殺菌率を示した。

中性電解水とオゾン水との比較では、オゾンの方が低濃度しかも短時間の接触で本菌の分生子を殺菌することが可能であった。有効処理濃度や時間は異なるが、中性電解水およびオゾン水ともに本菌の分生子の殺菌が可能であった。

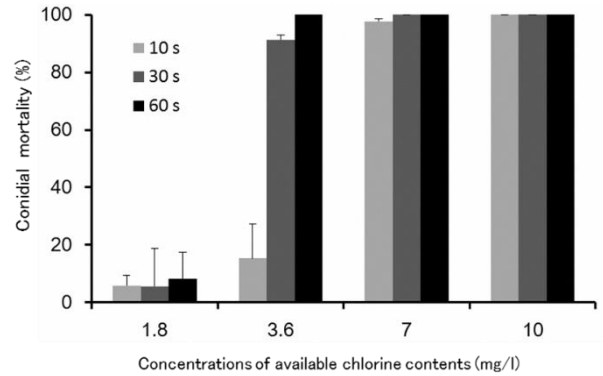


Fig. 3-3 中性電解水のイチゴ炭疽病菌

Colletotrichum fructicola の分生子に対する殺菌効果

中性電解水中に濃度の異なる分生子液を懸濁し、10, 30 および 60 秒後に Mathur 培地を用いた希釈平板法により生菌数を計測した。分生子の殺菌率は対照の水道水での生菌数を基準にして求めた。垂線は、95%信頼区間を示す (n = 3)。

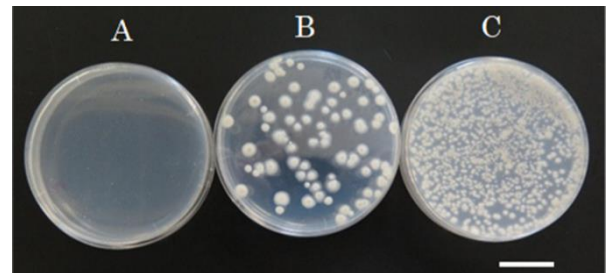


Fig. 3-4 Mathur 培地を用いた希釈平板法による

イチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* の検出状況

A: 塩素濃度 10mg/l の中性電解水で 60 秒間処理, B: 塩素濃度 1.8mg/l の中性電解水で 60 秒間処理, C: 水道水処理 (無処理対照区) (bar: 3 cm)

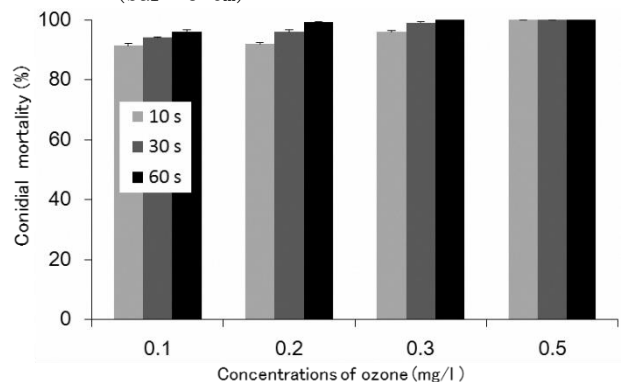


Fig. 3-5 オゾン水のイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* の分生子に対する殺菌効果

オゾン水中に濃度の異なる分生子液を懸濁し、10, 30 および 60 秒後に Mathur 培地を用いた希釈平板法により生菌数を計測した。分生子の殺菌率は対照の水道水での生菌数を基準にして求めた。垂線は、95%信頼区間を示す (n = 3)。

2) イチゴ葉上での中性電解水の処理条件の検討

イチゴ葉への感染前および感染後での中性電解水の本菌に対する効果は、接種直後に 60 秒間処理した場合の感染率が 8.3%であり、最も殺菌効果が高かった (Table 3-1)。接種後 24 時間後の 60 秒間処理では感染率が 39.6%、接種後 72 時間後の同処理時間では感染率が 100%となり、接種後の時間経過とともに殺菌効果が低下し、72 時間後には全く効果が認められなくなった。中性電解水の処理時間の違いでは、接種直後の場合に 60 秒間の処理では前述のように 8.3%であるが、30 秒間では 10.4%、10 秒間では 70.8%、5 秒間では 93.8%であり、処理時間を長くするほど感染率が低下し、殺菌効果が高くなった。また、本菌の接種 1 時間前に中性電解水を処理した場合には、60 秒間処理した場合でも全く効果が認められなかった。

3) 中性電解水の頭上かん水の防除効果

圃場試験において、対照の水道水を頭上かん水した場合は、イチゴ炭疽病の発病株率は 26.7%であったが、塩素濃度 2~8 mg/l の中性電解水を頭上かん水した場合には 1.7%であり、高い防除効果が認められた (Fig. 3-6)。なお、試験中で中性電解水の処理によるイチゴ株に対する薬害は認められなかった。

4) 中性電解水の頭上かん水と殺菌剤処理の併用による防除効果

中性電解水の有効塩素濃度は 8~12mg/l 範囲内で試験を実施した。中性電解水の頭上かん水と、慣行で実施されている殺菌剤 10 日間隔でのローテーション散布の併用では、イチゴ炭疽病の発病は全く見られず、非常に高い防除効果が得られた (Fig. 3-7)。また、

Table 3-1 中性電解水の処理時期および時間がイチゴ小葉における炭疽病菌 *Colletotrichum fructicola* の定着率に及ぼす影響

Application timing of the NEW ^x (h)	<i>C. fructicola</i> colonization rate (%)				
	0 s ^y	5 s	10 s	30 s	60 s
-1	100 a ^z	100 a	100 a	100 a	100 a
0	100 a	93.8 ± 4.3 ^w a	70.8 ± 9.5 b	10.4 ± 5.0 d	8.3 ± 4.2 d
24	100 a	100 a	95.8 ± 2.6 a	79.2 ± 11.5 ab	39.6 ± 7.5 c
72	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a

x: イチゴ炭疽病菌接種後の時間, y: 中性電解水の処理時間, z: 異なるアルファベット間は, Tukey HSD の多重検定により有意差があることを示す ($P < 0.05$), w: 標準誤差を示す ($n = 3$)。

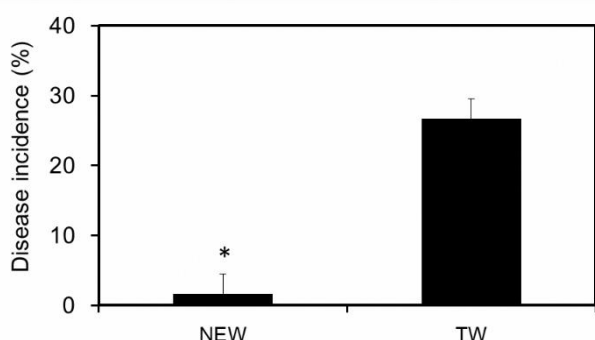


Fig. 3-6 中性電解水の頭上かん水処理によるイチゴ炭疽病の発病抑制効果

水道水による頭上かん水を対照区とした。アスタリスク (*) は、対照区と有意差があることを示す (χ^2 -test, $P < 0.05$)。垂線は 95%信頼区間を示す ($n = 4$)。

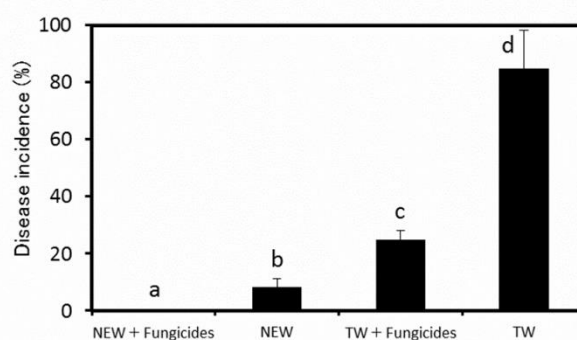


Fig. 3-7 中性電解水の頭上かん水と薬剤散布の併用処理によるイチゴ炭疽病の抑制効果

薬剤処理は、4 種の薬剤を用いて 10 日間隔でローテーション散布した。水道水による頭上かん水で薬剤無処理を対照区とした。異なるアルファベット間は, Ryan の多重検定により有意差があることを示す ($P < 0.05$)。垂線は 95%信頼区間を示す ($n = 4$)。

中性電解水の頭上かん水のみでも発病株率が8.3%であり、慣行の殺菌剤散布の25.0%よりも有意に高い防除効果が得られた。なお、本試験においても試験期間中に、中性電解水によるイチゴ株への葉害や生育抑制は観察されなかった。

5) オゾン水の処理濃度の違いによる防除効果

高オゾン濃度(0.5~1.0mg/l)のオゾン水による頭上かん水処理は、水道水を頭上かん水した場合よりも発病株率が有意に低く、防除効果が認められた(Fig. 3-8)。一方、低オゾン濃度(0.1~0.4mg/l)では、オゾン水は水道水と有意差がなく、効果は認められなかった。

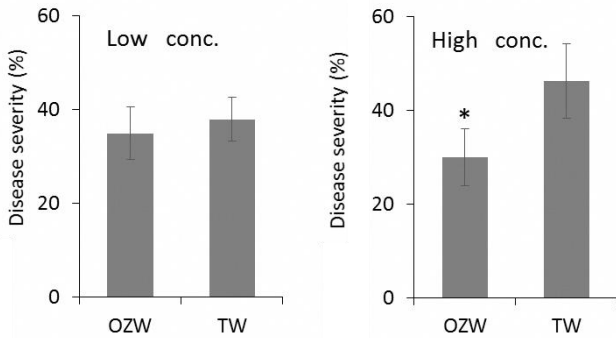


Fig. 3-8 オゾン水の頭上かん水処理によるイチゴ炭疽病の発病抑制効果

オゾン濃度は、低濃度オゾン水区で0.1~0.4 mg/l、高濃度オゾン水区で0.5~1.0 mg/lであった。水道水による頭上かん水を対照区とした。アスタリスク(*)は、対照区と有意差があることを示す(Student's t-test, P < 0.05)。垂線は標準誤差を示す(n = 4)。

6) オゾン水の頭上かん水と殺菌剤処理の併用による防除効果

オゾン水中のオゾン濃度は、1.2~1.5 mg/lの範囲内で試験を実施した。オゾン水の頭上かん水と、慣行で実施されている殺菌剤10日間隔でのローテーション散布の併用では、発病株率が5.0%であり、高い防除効果が認められた(Fig. 3-9)。また、オゾン水の頭上かん水のみでは発病株率が60.0%であり、殺菌剤処理の発病株率25.0%よりも効果が低く、無処理である水道水の頭上かん水の85.0%と比較して効果が得られた。なお、本試験においても試験期間中に、オゾン水によるイチゴ株への葉害や生育抑制は観察されなかった。

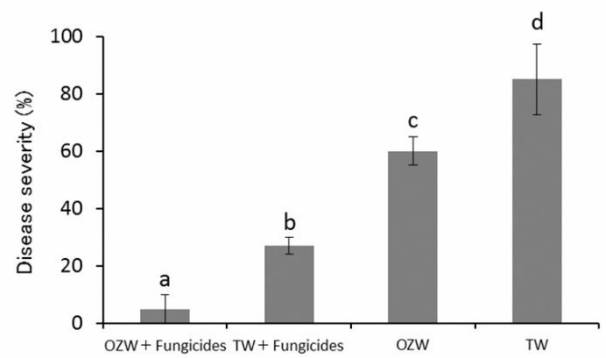


Fig. 3-9 オゾン水の頭上かん水と薬剤散布の併用処理によるイチゴ炭疽病の抑制効果

薬剤処理は、4種の薬剤を用いて10日間隔でローテーション散布した。水道水による頭上かん水で薬剤無処理を対照区とした。異なるアルファベット間は、Tukey HSDの多重検定により有意差があることを示す(P < 0.05)。垂線は標準誤差を示す(n = 4)。

3-4. 考察

本菌の耐性菌対策として、中性電解水やオゾン水の頭上かん水がイチゴ炭疽病の発病抑制に有効であることを実証した。まず、中性電解水とオゾン水の本菌の耐久体である分生子に対する殺菌効果を調査した。電解水やオゾン水は、食品分野では消毒剤として利用されており、幅広い種類の微生物に対して殺菌力を持つことが知られている(Al-Haq et al. 2005, O'Donnell et al. 2012)。今回の結果から、これら機能水は植物病原菌であるイチゴ炭疽病菌にも殺菌力を持つことが明らかになった。電解水は酸度の違いにより、大きく分けて酸性、中性およびアルカリ性電解水があるが、これまで主に酸性電解水についての研究が多かった(Fujiwara et al. 2000; Guentzel et al. 2011; Hou et al. 2012; Jia et al. 2015; 草刈ら 2013; Mueller et al. 2003)。しかし、特に強酸性では人体や環境に害を与え、施設や機器類が腐食しやすいため、本研究では中性電解水を対象に研究を行った。その結果、中性電解水でも十分な効果が期待できることが明らかになった。両機能水の比較では、オゾンは中性電解水よりも本菌の分生子に対して殺菌率が高く、10分の1以下の低濃度でも殺菌できることが明らかになった。

次に、中性電解水について、実際の圃場での処理時間や処理のタイミングを検討した。イチゴ葉に本菌の分生子を接種した直後では、中性電解水を30秒以上処理することで感染を抑制することができたが、

接種後24時間以上の処理ではほとんど効果がなかった。*C. gloeosporioides* の分生子は、好適条件下では24時間以内に多くが発芽し、植物体に感染する (MacKenzie et al. 2009)。このことから中性電解水は感染後の効果は低く、治療効果を持つ殺菌剤のような植物体内部への浸透移行は期待できないと考えられた。そのため、実際の処理では、分生子が飛散して少なくとも24時間以内には処理をする必要があることが分かった。そのため、イチゴ育苗期では通常7日から10日間隔で本病の薬剤防除が行われているが、中性電解水は、殺菌剤と同じような処理方法では効果がほとんど期待できないと思われた。また、中性電解水を処理し、1時間後に分生子を接種した場合にも全く効果が得られなかった。電解水は有機物に接触すると速やかに分解し、塩素イオンが塩素へと変化して揮発し、殺菌効果が低下するとされている (Al-Haq et al. 2005)。そのため、本試験においても処理時にイチゴ葉に接触した中性電解水が分解し、効果が消失したと考えられた。本病の防除に有効な保護殺菌剤であるプロピネブやマンゼブは、散布後2週間は本菌の感染を抑制し、高い持続性を有している (平山ら 2008a)。このことから、中性電解水は保護殺菌剤のような予防効果は期待できないと考えられた。

圃場試験において、中性電解水の頭上かん水は、防除効果が高く非常に有効であった。イチゴ炭疽病菌は分生子が風雨や頭上かん水などの雨滴で飛散し周辺株へと被害が広がる (Ntahimpera et al. 1999)。かん水を殺菌効果のある中性電解水にすることで、これまで頭上かん水により飛散していた分生子は、飛散の際に電解水に殺菌され、隣接株への広がりを抑制したと考えられた。生産農家は、底面給水や点滴かん水では根腐れやかん水ムラが生じやすいため、良質な株を育てやすい頭上かん水で水管理を実施すること多い (平山ら 2010)。中性電解水による頭上かん水は、栽培と防除を両立のできる方法としても期待できるものと考えられる。

中性電解水は、薬剤との併用によりさらに防除効果を高めることができた。前述のように中性電解水は分生子に直接作用し、殺菌効果を示すが、残効性や浸透移行性はない。一方、殺菌剤は残効性を持つ保護殺菌剤、植物体へ感染した病原菌にも有効な浸透移行性のある治療殺菌剤がある (MacKenzie et al. 2009)。これらは、中性電解水とは異なる作用機構を有しており、それぞれの作用が補完することで相乗効果が得られると考えられた。中性電解水の頭上かん水の

導入により、これまで多用してきた殺菌剤の使用を軽減することが可能であり、耐性菌の発生リスクを軽減させるためにも有効であると考えられる。

また、酸性電解水は農薬取締法において特定防除資材に指定された (農林水産省・環境省 2013)。農薬取締法上、病害虫防除に使用する資材は、農薬登録を取得する必要があるが、特定防除資材はこの登録許可が免除される。これまでに食品添加物である重曹や食酢などが指定されている。本資材が特定防除資材に指定されたことは、実際の装置の販売や使用に際して導入の促進が期待されるものである。なお、特定防除資材の電解水はpHが6.5以下と決められており、今回用いた中性電解水では対象外となる。電解水の酸度は、原料の種類や割合により変えることが可能であり、特定防除資材として利用するためには、それらを変更することで対応可能である。

オゾン水については、処理方法を検討するため、圃場において異なる処理濃度について検討した。前述のオゾン水の分生子の有効殺菌濃度から、低濃度区を0.1~0.4mg/l、高濃度区を0.5~1.0mg/lに設定した。しかしながら、高濃度区においては、水道水の頭上かん水である無処理区と比較して、有意に効果が得られたが期待していた効果を得ることはできなかった。そこで、さらにオゾン水の濃度を上げて、慣行の農薬散布との併用効果も含めて試験を実施した。しかし、中性電解水のような効果を得ることはできなかった。オゾンは非常に不安定な物質であり、その分解速度は有機物により促進される (O'Donnell et al. 2012)。オゾン水は中性電解水よりも分解しやすく、不安定であるため、分生子に直接接触した場合には殺菌効果が得られるが、圃場試験のような環境下では本来の特性を十分に発揮できないと考えられた。従って、実用場面では、オゾンよりも中性電解水が有効であると考えられた。

今回は、イチゴ炭疽病を対象に機能水の活用について試験を実施した。イチゴでは、地上病害であるうどんこ病、土壌病害である萎黄病、疫病などが重要病害である。また、ハダニ類やアブラムシ類などの害虫も発生する。今後は、他の病害虫の防除に対する適応性についても検討することで、さらに活用場面が増えてくると考えられる。

第4章 総合考察

近年、栽培されているイチゴのブランド品種の多くはイチゴの重要病害である炭疽病に対して罹病性であり、全国的に恒常的な本病の被害が発生している (Yoshida 2012). また、栄養繁殖性のイチゴでは、民間業者による親苗の販売や各道県や産地間での苗のリレー生産が増加し、イチゴ苗の移動による広域的な汚染リスクが増大している (植松ら 2002). さらに、臭化メチルの使用制限に伴う栽培様式の変化 (平山ら 2010)、殺菌剤耐性菌の発生 (Fernández-Ortuño et al. 2012; Ishii et al. 1998) などの課題を抱えており、新たな本病の対策が必要になっている。

本研究は、このようなイチゴ栽培を取り巻く情勢に変化に伴って生じているイチゴ炭疽病に関する新たな課題を解決するために、本病の生態解明および診断・防除技術の開発を行った。

第1章において、イチゴ栽培圃場の周辺に生息する無病徴の雑草が、本病の感染源になることを解明した (Hirayama et al. 2018). 研究を進めるにあたって、現地圃場での本病の発生状況から、雑草が本病の感染源になりうるとの仮説を立て、現地での感染状況調査、本菌の雑草での生存性、病原性、分生子形成条件を明らかにすることで、その仮説を検証した。優先雑草種であるイヌビユでは、イチゴとは異なる褐点症状を呈し、有傷では大型病斑に進展することを明らかにした。しかし、その他多くの雑草において、本菌は無病徴感染し、病徴を呈しないことが分かった。感染源になりうるための必要条件である大量の分生子形成は、除草剤処理により雑草を枯死させることで成立することが明らかとなった。第2章では、イチゴ原種苗の健全育成のために PCR による本病菌の迅速診断技術を開発と、葉面エタノール噴霧による本菌検出法を本病の発生予察のために応用し、奈良県内の生産圃場においてこれらの検出技術の有効性を検証した。PCR 検出では、イチゴ苗からの DNA 抽出法の確立、多検体を検出するバルク法の開発を行い、イチゴ原種苗の健全苗育成に貢献した。また、葉面エタノール噴霧法を用いた発生予察では、県内全域の発病を未然に予測し、防除対策を実施するための有益な情報を生産者に提供できるようにした (Hirayama et al. 2015). 第3章では、薬剤耐性菌の発生による防除低下に対処するために、薬剤散布の代替技術として食品分野で利用されている次亜塩素水 (Hirayama et al. 2016c) とオゾン水 (Hirayama et al. 2016d) のスプリンクラーかん水による本病の防除法を確立した。

以下で、本研究の成果の生産現場での活用とその意義、および残された課題について論じる。

本病の発生にはイチゴ品種や栽培様式が反映する。近年の品種育成における育種目標は食味や収量性が重視されており、多くが本病の罹病性品種になっている (Yoshida 2012). また、2005年からの臭化メチルの使用制限により (Ristaino and Thomas 1997)、イチゴ育苗は田畑輪換による露地育苗からベンチアップなどの隔離育苗方式へと急激に変化していった (平山ら 2010). ベンチアップ育苗は、土壌と隔離することで萎黄病や疫病などの土壌病害対策としては有効であるが、一方で、うどんこ病や炭疽病などの空気伝染や雨滴伝播する病害に対しては、毎年同じ場所で栽培することは発生を助長させる。イチゴ炭疽病菌は土壌消毒後の拮抗菌が少ない環境下では、数ヶ月間生存するが、通常は土壌中での耐久性は低い (Freeman et al. 2002). そのため、土耕栽培では、発病株の残渣は土壌中にすき込まれて本菌を死滅させ、栽培体系の中で伝染源を断つことができる。また、田畑輪換により2、3年ごとに栽培地をローテーションすることで、発生リスクをさらに低下することが可能であった。近年の同一圃場での栽培は、イチゴ炭疽病の伝染源が残り、本病が発生しやすい環境にある。本研究において、栽培圃場周辺の雑草が感染源になることを明らかにしたが、これはそのような栽培様式の変化が原因となり、新たに発生した感染源と言える。これまでイチゴ炭疽病菌が雑草に感染するとの報告はあるが (Freeman et al. 2001)、現地圃場の雑草を網羅的に調査し、感染頻度を調べた研究、さらに、雑草での分生子形成条件を明らかにし、伝染源になることを解明したのは本研究が初めてである。雑草が新たな感染源として明らかにしたことは、今後の本病の防除対策を実施する上で非常に有益な情報である。実際の生産現場では本菌が雑草に感染しているとしても、無病徴であるため肉眼では認識できない。そのため生産者が雑草は感染源になることを認識することはない。これまで感染源として重要視されてこなかったのは、このような理由からであり、感染源としての認識されないことが、本病の発生拡大させる原因となっていたと思われる。今回の研究では、生産者が雑草も本病の感染になることを認識したうえで、イチゴの栽培管理を実施することの意義は大きい。また、*Colletotrichum* 属菌を含む内部寄生菌は宿主の老化により、腐生的に適応して生存する (Promputtha et al. 2007). そのため、本研究で示

したように除草剤処理により枯死させる場合だけでなく、雑草が結実した後に自然に枯死する場合にも大量の分生子を形成することが考えられる。すなわち、本菌は自然条件下においても寄生生活と腐生生活を繰り返しながら、イチゴ以外の植物で長期間生存する可能性があり、本菌の生態を知るうえでも興味深い結果である。今後は雑草上での越冬を含めた長期耐久性や雑草の感染源としての重要度についても明らかにし、その対策についても検討していく必要がある。

栄養繁殖性のイチゴでは、イチゴ苗の保菌検定は欠かせない。奈良県では原原種苗において、イチゴ苗のウイルスフリー化のために、*Strawberry mottle virus* (SMoV)、*Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV)、*Strawberry crinkle virus* (SCV)、*Strawberry vein banding virus* (SVBV)などのウイルスを、罹病性品種である‘UC4’ (*Fragaria vesca* and *F. virginiana* hybrid) や‘UC5’ (*F. vesca*, *F. chiloensis*, and *F. virginiana* hybrid) を用いた接ぎ木により検定している。また、土壌病原菌の萎黄病に対しては*Fusarium*選択培地を用いた培養法による検定を実施してきた(平山 2016a)。今回の炭疽病菌の検出技術が加わることにより、イチゴ苗が伝染源となる主要病害の検定が網羅的に可能となった。炭疽病菌の検定では迅速で高感度な検定技術の開発が条件であり、これら条件を満たす検定方法としてPCRによる検定技術を開発した。また、多検体を検査するバルク法は、大量の苗を検定するために必要となるコスト低減を図ることが可能となった。本検定技術は、イチゴ苗の流通が頻繁になっている中で、苗の品質保証の観点からも有益な技術であると考えられる。また、これまで萎黄病菌の検出には選択培地による培養法が採用されてきたが、本法では近縁種も検出されるため、無駄な廃棄を強いられてきた(平山 2016a)。そこで炭疽病菌の検出と並行して、萎黄病菌検出用プライマーを用いたPCR検出についても開発している(Suga et al. 2013; 平山 2016a)。本研究では炭疽病菌と萎黄病菌の同時検出を試みたが、今後は現地導入を図るため、採取時期、バルク法などの実用化に向けた検定条件を検討する必要がある。また、ウイルスについてもRT-PCRによる検出技術が開発されている(鈴木ら 2005; Thompson and Jelkmann 2003)。このような検定技術についても炭疽病菌や萎黄病菌の検定技術にどのように体系的に組み入れていくかを検討する必要がある。

発生予察では葉面エタノール噴霧法を活用し、本

菌の感染率から未然に本病の発生を予測する手法を確立した。発生予察は全国の都道府県で設置されている病害虫防除所で実施されている。これら施設では無菌操作や遺伝診断用の機器類が備えられており、前述のPCRによる潜在感染調査を実施することが可能である。しかし、発生予察では広域的な調査が必要でサンプル数も多くなるため、低コストで簡易な葉面エタノール噴霧法が適していると考え、本法を採用した。本研究では奈良県内での実用性を検証したが、本法は農林水産省の発生予察基準に採用されており、全国でのさまざまな品種や栽培法での実用性についても検討されることが望まれる。

本菌の検出技術については、葉面エタノール噴霧法のような生産者が自ら実施できる簡易な手法(広田ら 2006)から近年ではReal time-PCR(Liu et al. 2012; Samuelian et al. 2011)やLAMP法(Katoh et al. 2016)なども開発されている。第2章では、PCR法と葉面エタノール噴霧法の2種方法を開発したが、様々な検出技術が開発されている中で、生産現場で応用するにあたっては、目的に合わせて技術を使い分けることが必要と考える。

本病の防除は、無病株の利用、雨よけや灌水方法の改善等の栽培管理とともに薬剤防除を組合せて実施することが必要である(平山 2016b)。近年の病害制御にはIPM(総合的病害虫管理)が求められており殺菌剤の使用回数が減少しているが、一旦本病が発病した際には薬剤防除に頼ることが多く、現状の防除体系において殺菌剤耐性菌の発生は避けられない。本研究では、殺菌剤主体の防除から脱却するために、耐性菌の発生リスクが極めて低い電解水やオゾン水の利用を試みた。これまでこれら機能水を殺菌剤と同じように散布する方法で処理されてきたが、本研究では機能水の新たな処理方法についても検討した。機能水は病原菌に対する殺菌効果が高く、耐性菌発生リスクが低い、殺菌剤のように残効性は短い。この欠点を補うために頭上かん水により毎日数回の処理を実施することとした。本法は、かん水と防除を同時に実施することができることから省力的な方法であった。また、本菌の分生子は水滴とともに飛散するため、イチゴ株の葉表、葉柄、株元など水の流れに沿って移動し、感染する。頭上かん水による処理は、そのような本菌の感染を抑制のために有効な処理方法であると言える。今回使用した機能水発生装置は、共同研究の民間企業が作製した試作機であったため、実際に生産現場で活用するためには製品開発が必要

になる。特に、電解水は防除効果が高く、特定農薬として指定されており、実用化を視野に入れた開発が望まれる。

謝 辞

本研究は、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授の東條元昭博士のご指導のもと行ったものであり、終始懇切丁寧なご指導と論文の度重なる詳細なご校閲を賜りました。社会人学生である著者のために、早朝や休日にもかかわらず多くの時間を割いていただきました。先生の熱意のこもったご指導によって、本論文を取りまとめることができました。ここに深厚なる感謝の意を表します。

また、同研究科教授の横井修司博士ならびに高野順平博士には本論文をまとめるにあたり、多くのご助言と御校閲の労を賜りました。さらに、同研究科名誉教授の大木 理博士、同研究科講師の望月知史博士には有益なご示唆とご支援を賜りました。厚く御礼申し上げます。

元奈良県農業研究開発センター所長（現 奈良県植物防疫協会事務局長）の岡山健夫博士には、研究開始の動機となる非常に貴重なご意見をいただき、その後終始適切なご助言と心のこもった叱咤激励をいただきました。元同総括研究員の故西崎仁博氏には、植物病理学実験の基礎をご指導いただき、寛大な心で本研究をご支援いただきました。同主任研究員の浅野峻介氏には、共同研究者として本研究を支えていただきました。皆様方に深く感謝の意を表します。

本研究の一部は、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」および発生予察の手法検討委託事業「発生予察事業の調査実施基準の新規策定事業」の一環で実施いたしました。このプロジェクトにおいて、千葉県農林総合研究センター室長の鈴木 健氏、岐阜大学教授の景山幸二博士、同准教授の須賀晴久博士、農研機構中央農業研究センター病害領域長の津田新哉博士、同野菜花き研究部門上級研究員の窪田昌春博士には、研究責任者として貴重なご助言を賜りました。地方独立行政法人北海道立総合研究機構道南農業試験場研究主査の角野晶大氏、元栃木県農業試験場研究員の森島正二氏、静岡県農林技術研究所上席研究員の鈴木幹彦氏、佐賀県農業技術防除センター部長の稲田 稔氏、株式会社ミヨシ

研究開発センターの小野寺 清子氏には、共同研究者として本研究を支えていただきました。深く感謝の意を表します。

奈良県農業研究開発センター所長の谷川元一博士、奈良県中部農林振興事務所長の土井正彦氏および奈良県農業研究開発センター課長の國本佳範博士には大学院入学に際して特段のご配慮をいただきました。また、大学院在籍中にあたっては奈良県農林部次長の和田正光氏、同農業水産振興課長の田中良宏氏、同課長補佐の小山裕三氏をはじめ同課職員の方々にご配慮をいただきました。深く感謝いたします。奈良県農業研究開発センター科長の前田茂一氏、同総括研究員の井村岳男氏、同主事の今村剛士氏、同同の芳田侃大氏、奈良県東部農林振興事務所主査の竹中 勲氏には、大学院在籍中にお気遣いをいただきました。厚く御礼申し上げます。奈良県農林部農業水産振興課係長の奥谷晃弘氏、同主任主査の安川人央氏、同同の小島己奈氏、奈良県中部農林振興事務所主任主査の吉村あみ氏、奈良県農業研究開発センター主任研究員の米田祥二氏をはじめ普及指導員の方々には、現地試験の実施に際しご協力と有益なご助言をいただきました。深く感謝の意を表します。奈良県農業研究開発センター果樹・薬草研究センター所長の浅尾浩史博士、奈良県農林部農業水産振興課主査の野村貴浩氏には、遺伝子診断の実験手法について懇切丁寧にご指導いただきました。ここに厚くお礼申し上げます。

吉備国際大学教授の石井英夫博士には殺菌剤耐性菌に関してご指導と有益なご助言をいただきました。農研機構遺伝資源センターの佐藤豊三博士には最新の病原菌分類に関する貴重なご意見をいただきました。シャープ株式会社の渡辺 圭一郎氏、同坂本泰宏氏には、機能水発生装置の開発に際し、多大なるご協力をいただきました。元農研機構北海道農業研究センターの松本直幸博士、University of Hawaii, Dr. Janice Y. Uchidaには、英文校閲と有益なご助言をいただきました。奈良県植物防疫協会試験員の上田加奈氏には、実験の実施に当たり、多大なご協力をいただきました。皆様方に厚く御礼申し上げます。

大阪府立大学大学生命環境科学研究科植物生体防御学グループの学生の皆様には暖かい激励をいただきました。厚く御礼申し上げます。

最後に、研究生生活を支えてくれた家族に心から感謝いたします。

要 旨

高品質で良食味の日本産のイチゴは、国内はもとより海外でも非常に人気が高く、国内農業再生や輸出戦略の要となる品目として期待されている。しかし、現在のイチゴ主要品種は炭疽病に対して極めて弱く生産拡大の制限要因になっている。本病の病原は真菌の *Colletotrichum* 属菌であり、植物体のあらゆる部位に感染して最終的に枯死させる。本病はイチゴの最重要病害であり、全国での年間被害は 890 ha、35 億円に上るとされる。近年、イチゴのブランド品種が全国各地で開発され、それに伴ってイチゴ原種苗の流通量が増加し、本病がより広がりやすくなっている。さらに、殺菌剤の多用による本病菌の薬剤耐性菌の発生が頻発しているとの指摘もある。そのためこれらの新たな課題への対策がイチゴの生産現場で急務となっている。

そこで本研究は、イチゴ炭疽病の発生生態の現状を明らかにし、それらに対応した診断・防除技術を開発することを目的とした。まず本病の新たな伝染源としてイチゴ栽培圃場周辺で生育する雑草を評価した。次に本病診断技術の課題であった検査時間の短縮と感度の向上を PCR の迅速性と高感度性を利用して実現し、原種苗生産圃場での有効性を検証した。一方、産地における本病発生を広域的に予測するための簡便な検出法を考案して病害発生予察への応用を試みた。さらに本病防除における殺菌剤の過用を緩和するために、食品の殺菌処理技術を応用した新たな防除技術の開発を検討した。

第 1 章 イチゴ炭疽病の新たな伝染源としての雑草の評価

本病の伝染源としてイチゴの本病発病株やその残さが知られていたが、それだけでは説明できない発生が生産地で従前より見られ、新たな伝染源の存在が推察されていた。筆者の現場観察で、雑草が周囲に多く生育しているイチゴ株でとくに本病が激しく発生する事例が見られた。そこでイチゴ生産圃場周辺の雑草が本病の伝染源になっているとの仮説を立てて実証を試みた。

まず生産圃場で雑草の感染状況を調査した。*Colletotrichum* 属菌選択培地を用いて無病徴の雑草の葉から本属菌を分離し、イチゴ苗への接種と PCR 法により病原種の同定を行った。その結果、イチゴ圃場の 27.3% (n=33) と被験試料の 5.7% (n=541) で、

雑草への本病菌の感染が認められた。周辺雑草への感染が認められたイチゴ圃場では、次作のイチゴでの本病の発生が高率に認められた。この結果から、雑草に本病菌が無病徴感染し次作の本病の重要な伝染源になっている可能性が示された。

次にイチゴ生産圃場周辺の雑草の優占種であるイヌビユとメヒシバについて、本病菌の感染が維持される期間を接種実験で調べた。その結果、イヌビユでは接種直後から 8 週間後まで高い感染率 (90% <) が維持されたが、メヒシバでは接種直後に 80% 前後だった感染率が 8 週間後には 20% 前後に低下した。両雑草上の本病菌の感染様態を光学顕微鏡で観察したところ、本病菌の分生子発芽率と付着器形成率がそれぞれ 90% 以上と 40~60% であった。これら雑草に本病菌を接種して病徴を調べたところ、イヌビユは接種量が多いと軽度の褐点を生じ、メヒシバは接種量に関わらず無病徴であった。これらより、本病菌はイヌビユやメヒシバに感染し、病徴が軽度あるいは無病徴な状態で少なくとも 8 週間生存することができることが明らかになった。

イチゴ生産圃場周辺の雑草は、多くの場合、除草剤の散布によって駆除される。雑草が除草剤に晒されると潜在的に感染していた植物病原菌が顕在化することは他の植物病害で知られている。そこで、雑草への除草剤処理が本病菌の分生子形成に及ぼす影響を、イヌビユ、メヒシバおよびノグシを用いた接種実験で調べた。その結果、除草剤処理したこれらの雑草の枯死葉上では大量の本病菌分生子が形成されることがわかった。この結果から、イチゴ生産圃場周辺の雑草が除草剤処理されると、枯死した雑草上で本病菌分生子が大量に形成され、本病の有力な伝染源になる可能性が示された。

第 2 章 イチゴ無病徴感染株からのイチゴ炭疽病の新たな検出技術の開発と健全苗育成および本病発生予察への応用

イチゴ植物体からの本病菌の検出には従来から選択培地法や生物検定法などが用いられてきたが、検出感度が低く判定までに時間を要するために無病徴感染株を多数検査することは困難であった。そこで、無病徴感染株からも本病菌を検出できる PCR 技術の確立を試みた。イチゴ組織は PCR 阻害物質である多糖類やポリフェノールを多く含む。そこで DNA 抽出法を改良し、磁気ビーズ法で菌体とイチゴ小葉の混合試料から本病菌を効率的に検出できるようにした。

次に分生子液を噴霧接種した無病徴感染株の小葉および葉柄基部についてPCR法と選択培地法を比較したところ、PCR法は選択培地法よりも検出率が低く、PCR法の検出感度をさらに高める必要があることがわかった。そこで検出感度向上を目的として、DNAを抽出する前に試料を培養するBio-PCR法を行うこととし、その培養条件を検討した。その結果、ショ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地を用いて28℃、2日間振とう培養すると本病菌の菌数が大幅に増加し、これにより選択培地法よりも検出感度が高くなり、検出所要時間も3週間から4日間にまで大幅に短縮できることがわかった。またこの実験の過程でイチゴの部位別の検出率を調べたところ葉柄基部の検出率が最も高く、被験試料として葉柄基部が適していることがわかった。健全苗育成におけるBio-PCR法の実用性を検証するため、奈良県内のイチゴ原種圃場において本法で炭疽病陽性反応が出たイチゴ株を全て除去し、その後の発病を7つの圃場の計339のイチゴ株を調べた結果、本病発病株は皆無であった。そこでBio-PCR法を現地圃場のイチゴ株の検定に応用し、大量の試料をまとめて検定するバルク法による健全苗育成技術として確立した。

一方イチゴ生産現場では炭疽病発生予察のために、適期に広範囲の多試料から本病菌を検出する技術も求められている。そこでBio-PCR法に較べて精度は劣るが簡便で安価なエタノール噴霧法を考案し現場への応用を試みた。エタノール噴霧法はイチゴ小葉をエタノールで処理して葉面の雑菌を殺菌し、葉組織中にいる本病菌を葉面に進出させて分生子塊の形成を促し肉眼診断する技術である。Bio-PCR法に較べて検出精度は低いですが、適期に広範囲の多数の試料からの検出が可能のため病害発生予察に適している。2010～14年の5か年に奈良県内イチゴ産地の4地域16育苗圃場においてイチゴ株の感染および発病状況を調査した。7月上旬に各育苗圃場からそれぞれ20のイチゴ株を無作為に選んで最外葉を採取し、70%エタノールを噴霧した。処理後、28℃の湿室条件下で14日間培養し、小葉に形成された分生子塊を肉眼で調査して感染株率を求めた。さらに9月上旬に各圃場500株について調査して発病株率を求めた。その結果、感染株率とその後の発生株率に高い相関($r_2 \geq 0.9$)が認められた。このことから、エタノール噴霧法で潜在感染を含む育苗初期の感染状況を把握することにより、本病による被害が実際に問題になる育苗後期の発生状況を実用レベルで予測できることがわかった。

第3章 食品の殺菌処理技術に応用したイチゴ炭疽病の新たな防除法の開発

食品の殺菌処理技術として広く利用されている次亜塩素酸水やオゾン水の散布は、微生物に対する作用機構が細胞壁破壊であることから植物病原菌が耐性を獲得しにくい新たな防除技術になり得る。しかしイチゴ炭疽病に対する抑制効果はこれまで検討されてこなかった。そこでまず、これらに本病菌の分生子を懸濁させて再生率を調べることにより殺菌効果を測定した。その結果、次亜塩素酸水は塩素濃度が7mg/Lで10秒間、オゾン水はオゾン濃度が0.2mg/Lで10秒間の各処理で、それぞれ高い殺菌効果(95%)を示すことがわかった。

次に、次亜塩素酸水やオゾン水の発病抑制効果をイチゴ圃場で検証した。省力のため次亜塩素酸水とオゾン水の処理は既存のスプリンクラーかん水によって行った。比較対照には、殺菌剤の慣行散布と水道水のスプリンクラーかん水をそれぞれ用いた。その結果、次亜塩素酸水、オゾン水および殺菌剤それぞれの単独処理では発病株率がそれぞれ8.3%、60%および27%であった。一方、次亜塩素酸水とオゾン水のそれぞれに殺菌剤を併用処理した場合には、発病株率がそれぞれ0%と5.0%になった。これらの結果から、次亜塩素酸水やオゾン水と殺菌剤慣行散布を併用することでイチゴ炭疽病菌を殺菌剤慣行散布単独よりも高いレベルで防除できることがわかった。とくに次亜塩素酸水のスプリンクラーかん水処理は省力的でもあることから、実用的な防除法になると考えられた。

結論

本研究では、まずこれまでイチゴ炭疽病の伝染源として認識されてこなかったイチゴ圃場周辺雑草に着目し、これら雑草に本病菌が感染していることと、雑草への除草剤散布によって大量の本病菌分生子が形成され有力な伝染源になり得ることを明らかにした。次にイチゴの本病菌潜在感染株からBio-PCR法で本病菌を高感度に検出できることを明らかにし、本法が原種圃場生産での無病株育成において極めて有効な手段になることを実証した。さらに本病の発生を適期に広範囲に把握するための簡易検出手段として葉面エタノール噴霧法を考案し発生予察を容易にした。また新たな本病防除手段として、耐性菌発生リスクが無く省力的な次亜塩素酸水スプリンクラーか

ん水処理技術を開発した。今後、これらの新知見や技術のイチゴ生産現場への普及が期待される。

引用文献

- Al-Haq MI, Sugiyama J, Isobe S (2005) Applications of electrolyzed water in agriculture and food industries. *Food Sci Technol Res* 11:135–150
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Manage Sci* 58:649–662
- Carlos G, María C, Francisco JFA, Giles B, Inmaculada V, Alison C, Jesús MC (2008) Isolation and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of strawberry in south west Spain. *Eur J Plant Pathol* 120:409–415
- Cerkauskas RF, Dhingra OD, Sinclair JB (1983) Effect of three desiccant-type herbicides on fruiting structures of *Colletotrichum truncatum* and *Phomopsis* spp. on soybean stems. *Plant Dis* 67:620–622
- Cook RT (1993) Strawberry black spot caused by *Colletotrichum acutatum*. Pages 301-304 in: British Crop Protection Council Monograph No. 54: Plant Health and European Single Market. Ebbels D, ed. Hampshire, UK
- Cui X, Shang Y, Shi Z, Xin H, Cao W (2009) Physicochemical properties and bactericidal efficiency of neutral and acidic electrolyzed water under different storage conditions. *J Food Eng* 91:582–586
- Davidse LC (1986) Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annu Rev Phytopathol* 24:43–65
- Debodea J, Van Hemelrijckb W, Xuc XM, Maesa M, Creemersb P, Heungensa K (2015) Latent entry and spread of *Colletotrichum acutatum* (species complex) in strawberry fields. *Plant Pathol* 64:385–395
- Denoyes-Rothan B, Guérin G, Délye C, Smith B, Minz D, Maymon M, Freeman S (2003) Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. *Phytopathology* 93:219–28
- 海老原克介・染谷 肇・宮原秀一・小林敏満・星野 勲・上堀内里沙・橋本 威・鐘ヶ江良彦・金森啓介・鈴木康雄・野宮左近・山口 勇・飯島直人・鈴木 健・田中千華・植松清次 (2006) 育苗圃におけるイチゴ炭疽病の潜在感染率の推移と発病との関係. *日植病報* 73:41 (講要)
- Fernández-Ortuño D, Chen F, Schnabel G (2012) Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Dis* 96:1198–1203
- Freeman S, Katan T (1997) Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87:516–521
- Freeman S, Horowitz S, Sharon A (2001) Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology* 91:986–992
- Freeman S, Shalev Z, Katan J (2002) Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. *Plant Dis* 86:965–970
- Fujiwara K, Doi R, Iimoto M, Fugii T (2000) Fundamental studies on crop disease control by spraying electrolyzed anode-side water. 4: Effects of pH and available chlorine concentration on the severity of powdery mildew infection and percentage of leaves with a leaf burn-like physiological disorder on tomato leaves. *Environ Cont Biol* 38:263–271
- Gan P, Nakata N, Suzuki T, Shirasu K (2017) Markers to differentiate species of anthracnose fungi identify *Colletotrichum fructicola* as the predominant virulent species in strawberry plants in Chiba Prefecture of Japan. *J Gen Plant Pathol* 83:14–22
- Guentzel JL, Lam KL, Callan MA, Emmons SA, Dunham VL (2008) Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiol* 25:36–41
- Guentzel JL, Callan MA, Lam KL, Emmons SA, Dunham VL (2011) Evaluation of electrolyzed oxidizing water for phytotoxic effects and pre-harvest management of gray mold disease on strawberry plants. *Crop Protect* 30:1274–1279
- Gunnell PS, Gubler WD (1992) Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia* 84:157–165
- Guzzon R, Nardin T, Micheletti O, Nicolini G, Larcher R

- (2013) Antimicrobial activity of ozone. Effectiveness against the main wine spoilage microorganisms and evaluation of impact on simple phenols in wine. *Australian J Grape and Wine Res* 19 (2):180–188
- 平山喜彦・岡山健夫・西崎仁博・吉村あみ(2007)イチゴ炭疽病菌の各種雑草への定着と感染源としての可能性. *日植病報* 73:64–65 (講要)
- 平山喜彦・吉村あみ・西崎仁博・岡山健夫(2008a)リーフディスクと選択培地を用いたイチゴ炭疽病の有効殺菌剤の検索および展着剤の影響. *奈良農総セ研報* 39:25–30
- 平山喜彦・川本優理子・松谷幸子・西崎仁博・岡山健夫(2008b)奈良県における薬剤耐性イチゴ炭疽病菌の発生状況. *関西病虫害研究会報* 50:93–94
- 平山喜彦・岡山健夫・西崎仁博(2010)イチゴ土壌病害の診断と防除. *土壌伝染病談話会レポート* 25:39–47
- Hirayama Y, Asano S, Kubota M, Tojo M, Ohki ST (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
- 平山喜彦(2016a)PCRによるイチゴ萎黄病菌検出技術の生産現場での活用. *植物防疫* 70:50–52
- 平山喜彦(2016b)炭疽病の総合防除・萎黄病の総合防除. *イチゴ大事典*. 農文協編. 245–260
- Hirayama Y, Asano S, Watanabe K, Sakamoto Y, Ozaki M, Okayama K, Ohki ST, Tojo M (2016c) Control of *Colletotrichum fructicola* on strawberry with a foliar spray of neutral electrolyzed water through an overhead irrigation system. *J Gen Plant Pathol* 82:186–189
- Hirayama Y, Asano S, Watanabe K, Sakamoto Y, Ozaki M, Okayama K, Ohki ST, Tojo M. (2016d) Effects of ozonated-water foliar spray on *Colletotrichum fructicola* on strawberry. *Intl J Agri Crop Sci* 9:61–65
- Hirayama Y, Asano S, Okayama K, Ohki ST, Tojo M. (2018) Weeds as the potential inoculum source of *Colletotrichum fructicola* responsible for strawberry anthracnose in Nara, Japan. *J Gen Plant Pathol* 84:12–19
- 広田恵介・中野理子・米本謙吾(2006)イチゴに潜む炭疽病の簡単な検定法. *農業および園芸* 81:1119–1123
- Hopkins DL, Cucuzza JD, Watterson JC (1996) Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Dis* 80:529–532
- Horn NL, Carver RG (1963) A new crown rot of strawberry plants caused by *Colletotrichum fragariae*. *Phytopathology* 53:768–770
- Horn NL, Carver RG (1968) Overwintering of *Colletotrichum fragariae* in strawberry crowns. *Phytopathology* 58:540–541
- Horowitz S, Freeman S, Sharon A (2002) Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 92:743–749
- Hou YT, Ren J, Liu HJ, Li FD (2012) Efficiency of electrolyzed water (EW) on inhibition of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* growth in vitro. *Crop Protect* 42:128–133
- Howard CM, Albrechts EE (1973) *Cassia obtusifolia*, a possible reservoir for inoculum of *Colletotrichum fragariae*. *Phytopathology* 63:533–534
- Howard CM, Albrechts EE (1984) Anthracnose of strawberry fruit caused by *Glomerella cingulata* in Florida. *Plant Dis* 68:824–825
- Howard CM, Maas JL, Chandler CK, Albrechts EE (1992) Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Dis* 76:976–981
- Huang YR, Hung YC, Hsu SY, Huang YW, Hwang DF (2008) Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Cont* 19:329–345
- 稲田 稔・山口純一郎・古田明子(2005a)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伝染. *九州病虫害会報* 51:11–14
- 稲田 稔・山口純一郎・古田明子(2005b)雨よけと薬剤体系散布との組み合わせによるイチゴ炭疽病(*Glomerella cingulata*)の防除. *九州病虫害会報* 51:15–20
- 稲田 稔・山口純一郎・古田明子(2010)寒天平板希釈法によるイチゴ炭疽病菌(*Glomerella cingulata*)のアゾキシストロビン剤に対する感受性検定. *日植病報* 76:1–6
- Ishii H, Iwamoto S, Nishimura K, Fukaya M (1998)

- Comparative studies on fungicide sensitivity and other characteristics in *Colletotrichum* isolated from various plant species. Proceedings of the 1998 Brighton Conference, Pests & Diseases pp. 529–534
- Ishii H, Fraaije BA, Sugiyama T, Nishimura K, Takeda T, Amano T, Hollomon DW (2001) Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91:1166–1171
- Ishii H, Yano K, Date H, Furuta A, Sagehashi Y, Yamaguchi T, Sugiyama T, Nishimura K, Hasama W (2007) Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. *Phytopathology* 97:1458–1466
- 石川成寿・中山喜一・常見譲史・中澤靖彦 (1992) 栃木県で発生した *Colletotrichum acutatum* Simmonds によるイチゴ炭そ病. 関東病虫研報 39:129–133
- Ishikawa S (2003) Method to diagnose latent infection by *Glomerella cingulata* in strawberry plants using ethanol. *J Gen Plant Pathol* 69:372–377
- Issa-Zacharia A, Kamitani Y, Tiisekwa A, Morita K, Iwasaki K (2010) *In vitro* inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. using slightly acidic electrolyzed water. *J Biosci Bioeng* 110:308–313
- Jia GL, Shi JY, Song ZH, Li FD (2015) Prevention of enzymatic browning of Chinese yam (*Dioscorea* spp.) using electrolyzed oxidizing water. *J Food Sci* 80:C718–C728
- Katoh H, Fukuda T, Nishigawa, H, Natsuaki T (2016) Rapid detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in infected strawberry plants using loop-mediated isothermal amplification. *J Gen Plant Pathol* 82:190–198
- 越川兼行・天野昭子・長谷部健一・安田雅晴・下畑次夫 (2003) イチゴの底面給水による雨よけ高設ベンチ育苗「ノンシャワー育苗」の開発. 岐阜農技研報 3:9–17
- 小玉孝司 (1978) イチゴ炭そ病 (*Colletotrichum fragariae*) の奈良県下における初発生について. 関西病虫研報 20:89 (講要)
- 小玉孝司・福井俊男 (1982) ハウス密閉処理による太陽熱土壌消毒法について V. イチゴ萎黄病防除に対する適用. 日植病報 48:570–577
- Kubota M, Hagiwara N, Shirakawa T (2012) Disinfection of seeds of cucurbit crops infested with *Acidovorax citrulli* with dry heat treatment. *J Phytopathol* 160:364–368
- 黒田克利・鈴木啓史・坂田訓章 (2011) オゾン水によるイチゴ炭疽病の防除効果. 関西病虫研報 53:55–56
- 草刈眞一・阿知波 信夫・阿部一博・岡田清嗣 (2013) イチゴ灰色かび病およびキュウリ炭疽病に対する酸性電解水散布の防除効果. 関西病虫研報 55:17–21
- 楠 幹生・三浦 靖・十河和博・都崎芳久 (1992) イチゴ炭疽病に関する研究 第1報 香川県におけるイチゴ炭そ病のペノミル耐性菌発生と各種薬剤の効果. 香川農試研報 43:29–35
- Landschoot S, Waegeman W, Audenaert K, Vandepitte J, Haesaert G, De Baets B (2012) Toward a reliable evaluation of forecasting systems for plant diseases: A case study using Fusarium head blight of wheat. *Plant Dis* 96:889–896
- Leandro LFS, Gleason ML, Nutter FW Jr, Wegulo SN, Dixon PA (2001) Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology* 91:659–664
- Liu B, Louws FJ, Sutton TB, Correll JC (2012) A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Eur J Plant Pathol* 132:593–607
- MacKenzie SJ, Seijo TE, Legard DE, Timmer LW, Peres NA (2007) Selection for pathogenicity to strawberry in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from native plants. *Plant Dis* 97:1130–1140
- MacKenzie SJ, Mertely JC, Peres NA (2009) Curative and protectant activity of fungicides for control of crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Dis* 93:815–820
- MacKenzie SJ, Peres NA (2012) Use of leaf wetness and temperature to time fungicide applications to control anthracnose fruit rot of Strawberry in Florida. *Plant Dis* 96:522–528
- Mass JL, ed. (1998) *Compendium of Strawberry Diseases*, 2nd ed. APS Press, 128pp
- 松尾和敏・太田孝彦 (1992) イチゴ葉枯炭そ病の発生. 日植病報 58: 544 (講要)
- McCartney HA, Foster SJ, Fraaije BA, Ward E (2003)

- Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag Sci* 59:129–142
- Mertely JC, Legard DE (2004) Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. *Plant Dis* 88:407–412
- Mills PR, Sreenivasaprasad S, Brown AE (1992) Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol Lett* 98:137–143
- Monnin A, Lee J, Pascall MA (2012) Efficacy of neutral electrolyzed water for sanitization of cutting boards used in the preparation of foods. *J Food Eng* 110:541–546
- 森 利樹 (2008) かおり野. 品種登録出願 22218
- Moriwaki J, Tsukiboshi T, Sato T (2002) Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. *J Gen Plant Pathol* 68:307–320
- Mueller DS, Hung YC, Oetting RD, van Iersel MW, Buck JW (2003) Evaluation of electrolyzed oxidizing water for management of powdery mildew on gerbera daisy. *Plant Dis* 87:965–969
- 中村 浩・小林和彦・山田英一 (1981) 各種野菜種子の耐熱性について. *野菜試報* A8: 33-51
- 中澤靖彦・山田正和・大塚範夫・石川成寿・築尾嘉章・小林紀彦 (1993) イチゴ炭そ病菌 (*Glomerella cingulate*, *Colletotrichum acutatum*) のベノミル, ジエトフェンカルブおよびピテルタノールに対する感受性. *日植病報* 59:102–103 (講要)
- Nam MH, Lee IH, Kwon KH, Kim HG (2004) Significance and detection of quiescent infection of *Colletotrichum gloeosporioides* on strawberry. *Kor J Horti Sci Technol* 22:294–297
- Nam MH, Jeong SK, Choi JM, Kim HG (2006) Effects of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium nutrition on strawberry anthracnose. *Plant Pathol* 55:246–249
- 奈尾雅浩 (2005) 愛媛県におけるイチゴ炭疽病 (*Glomerella cingulata*) に対する薬剤の防除効果. *愛媛農試研報* 39:50–59
- 西本登志・木矢博之・信岡尚・矢奥泰章・前川寛之・米田祥二 (2007) イチゴのベンチ無仮植育苗における培地と施肥量の検討. *奈良農総セ研報* 38:5–10
- Nishimura (2007) Selective media for *Fusarium oxysporum*. *J Gen Plant Pathol* 73:342–348
- Norman DJ, Strandberg JO (1997) Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leatherleaf fern. *Plant Dis* 81:1177–1180
- 農林水産省 (2016a) 生産農業所得統計 http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/nougyou_sansyutu/ [アクセス 2017年12月]
- 農林水産省 (2016b) 野菜出荷統計 http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/index.html#r [アクセス 2017年12月]
- 農林水産省 (2017) 農林水産物輸出入概況 http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/houkoku_gaikyou.html#r28 [アクセス 2017年12月]
- 農林水産省・環境省 (2013) 特定農薬 (特定防除資材) を定める告示について http://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_tokutei/pdf/h26_kokuji.pdf [アクセス 2017年12月]
- Ntahimpera N, Wilson L, Ellis M, Madden L (1999) Comparison of rain effects on splash dispersal of three *Colletotrichum* species infecting strawberry. *Phytopathology* 89:555–563
- O'Donnell C, Tiwari BK, Cullen PJ, Rice RG (2012) Status and trends of ozone in food processing. In: O'Donnell C, Tiwari BK, Cullen PJ, Rice RG (eds) *Ozone in Food Processing*. Wiley-blackwell, New Jersey
- Okayama K (1993) Effect of rain shelter and capillary watering on disease development of symptomless strawberry plants infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *Ann Phytopath Soc Jpn* 59:514–519
- 岡山健夫 (1993) 加温によるイチゴ炭そ病潜在感染株の検定. *奈良農試研報* 24:41–46
- 岡山健夫 (1994) イチゴ炭そ病菌 *Glomerella cingulate* (= *Colletotrichum gloeosporioides*) の分生子の飛散および障壁による防除効果. *日植病報* 60:113–118
- 岡山健夫・辻本 昭 (1994) *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et Schrenk によるイチゴ炭そ病の発生とその病原性. *日植病報* 60:617–623
- 岡山健夫・平山喜彦・西崎仁博 (2007) 選択培地によるベノミル耐性イチゴ炭疽病菌 *Glomerella cingulata* の潜在感染株及び育苗培養土からの検出. *日植病報* 73:155–161
- 岡山健夫・平山喜彦 (2011) イチゴ炭疽病の育苗培養土汚染による発生と薬剤防除効果. *日植病報* 77:83–87
- 岡山健夫・平山喜彦 (2013) イチゴ苗の長期冷蔵処理による炭疽病菌 (*Glomerella cingulate*) 潜在感染株の低減. *日植病報* 79:269–274

- 沖村 誠・曾根一純・野口祐司・望月龍也・北谷恵美 (2007) カレンベリー. 品種登録出願 22564
- Parikka P, Lemmetty A (2004) Tracing latent infection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry by PCR. Eur J Plant Pathol 110:393–398
- Peres NA, Timmer LW, Adaskaveg JE, Correll JC (2005) Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. Plant Dis 89:784–796
- Pérez-Hernández O, Nam MH, Gleason ML, Kim HG (2008) Development of a nested polymerase chain reaction assay for detection of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. Plant Dis 92:1655–1661
- Promptutha I, Lumyong P, Dhanasekaran V, McKenzie EHC, Hyde KD, Jeewon R (2007) A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. Microb Ecol 53:579–590
- Rahman M, Ojiambo P, Louws F (2015) Initial inoculum and spatial dispersal of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of strawberry anthracnose crown rot. Plant Dis 99:80–86
- Ristaino JB, Thomas W (1997) Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole: can we fill the gaps? Plant Dis 81:964–977
- Samuelian SK, Greer LA, Savocchia S, Steel CC (2011) Detection and monitoring of *Greeneria uvicola* and *Colletotrichum acutatum* development on grapevines by real-time PCR. Plant Dis 95:298–303
- Sato T, Moriwaki J (2009) Casual fungi of plant anthracnose (1), Microbiol Cult Coll 25 (1) :27–32
- Schlatter D, Burke I, Paulitz TC (2017) Succession of fungal and oomycete communities in glyphosate-killed wheat roots. Phytopathology doi: 10.1094/PHYTO-06-17-0212-R
- Smith BJ, Black LL (1987) Resistance of strawberry plants to *Colletotrichum fragariae* affected by environmental condition. Plant Dis 71:834–837
- Smith BJ, Black LL (1990) Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Dis 74:69–76
- Sreenivasaprasad S, Averil EB, Mills PR (1993) DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. Physio Plant Pathol 41:265–281
- Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown AE, Mills PR (1996) PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathol 45:650–655
- Subbarao KV, Kabir Z, Martin FN, Koike ST (2007) Management of soilborne diseases in strawberry using vegetable rotations. Plant Dis 91:964–972
- Suga H, Hirayama Y, Morishima M, Suzuki T, Kageyama K, Hyakumachi M. (2013) Development of PCR primers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Plant Disease 97:619–625
- Sutton BC (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*, In Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Waningford p. 1–26
- 鈴木 健・飯嶋直人・花田 薫・吉井幸子 (2005) RT-PCR法を用いたイチゴマイルドイエローエッジアソシエートウイルスの検出と千葉県内の系統. 千葉農総研研報 4:125–133
- 鈴木 健・田中千華・伊東靖之・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)
- Suzuki T, Tanaka-Miwa C, Ebihara Y, Ito Y, Uematsu S (2010) Genetic polymorphism and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry (*Fragaria×ananassa* Duchesne) . J Gen Plant Pathol 76:247–253
- Thompson JR, Jelkmann W (2003) The detection and variation of Strawberry mottle virus. Plant Dis 87:385–390
- Torlak E (2014) Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples by neutral electrolyzed water. Int J Food Microbiol 185:69–72
- Tu JC (1985) An improved Mathur's medium for growth, sporulation and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. Microbios 44:87–93
- 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) 北海道の田畑輪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)
- Ureña-Padilla AR, Mitchell DJ, Legard DE (2001) Oversummer survival of inoculum for *Colletotrichum* crown rot in buried strawberry crown tissue. Plant Dis 85:750–754

- Van Hemelrijck W, Debodeb J, Heungensb K, Maesb M, Creemers P (2010) Phenotypic and genetic characterization of *Colletotrichum* isolates from Belgian strawberry fields. *Plant Pathol* 59:853–861
- Weir BS, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud Mycol* 73:115–180
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322 in: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. DH Gelfand, MA Innis, JJ Sninsky, TJ White, eds. Academic Press, San Diego, CA
- Whiting EC, Roncadori RW (1997) Occurrence of *Colletotrichum gloeosporioides* on pokeweed and sicklepod stems in Georgia and pathogenicity on black locust. *Can J Plant Pathol* 19:256–259
- Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63:3741–3751
- Wilson LL, Madden LV, Ellis MA (1990) Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 80:111–116
- Xiao CL, Mackenzie SJ, Legard DE (2004) Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* from strawberry and noncultivated hosts. *Phytopathology* 94:446–453
- 山本勉 (1971) イチゴの新病害「炭そ病」. *植物防疫* 25:61–64
- Yang X, Wilson LL, Madden L, Ellis MA (1990) Rain splash dispersal of *Colletotrichum acutatum* from infected strawberry fruit. *Phytopathology* 80:590–595
- 米本謙吾・三木敏史・広田恵介・板東一宏 (2008) 親水性不織布を利用した灌水法のイチゴ炭疽病に対する防除効果. *日植病報* 74:328–334
- Yoshida Y (2012) Strawberry production in Japan: History and progress in production technology and cultivar development. *Inter J Fruit Sci* 13:103–113