

*Colletotrichum gloeosporioides*弱毒株のイチゴ苗への事前接種が *C. gloeosporioides*強毒株によるイチゴ炭疽病の発病に及ぼす影響

吉田菜々子・鈴木 健

キーワード：イチゴ，炭疽病，弱毒株，生物的防除

I 緒 言

イチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardoは葉やランナーに病斑を示すほか、クラウンに侵入すると株の萎凋・枯死を引き起こす(石川, 2005)。本病は、罹病株の残さ上に形成された子のう殻や潜在感染した親株が一次伝染源となり、感染した株上に形成された分生子がかん水や降雨により水滴とともに広がり伝染する(石川, 2005; 稲田, 2012)。病原菌の発育適温は25~30℃であるため(岡山・辻本, 1994)、夏期の育苗期間中に感染拡大して苗の不足を招く。潜在感染した苗を定植すると本圃で収穫前に枯死するなど経済的損失が大きく、我が国のイチゴ栽培において重要な病害である。

生産現場では、本病の防除のために化学合成農薬が過剰に散布される傾向にあるが、栽培が長期に及ぶため、散布する薬剤の選択の幅が狭くなる(野沢ら, 2004)。また、農林水産省の施策においても、生物農薬利用技術等の推進を図り、化学合成農薬一辺倒の防除からの脱却を目指している(農林水産省, 1999)。このため、イチゴ栽培においても、灰色かび病やうどんこ病に対する *Bacillus subtilis* 剤や、炭疽病やうどんこ病に対する *Talaromyces flavus* 剤の導入が進められている(宮井ら, 2009)。

非病原性菌を利用した生物的防除の例としては、サツマイモつる割病に対する非病原性フザリウム *Fusarium oxysporum* の利用が挙げられる。小川・駒田(1984)は、予め非病原性フザリウムを基部切り口に処理したサツマイモの苗は抵抗性が誘導され、後に接種したつる割病菌の感染が抑制されることを報告しており、過去にはこの菌株を利用した製剤が農薬として登録されている。

イチゴの病害における非病原性菌を利用した生物的防除の例として、手塚・牧野(1991)は、健全なイチゴのクラウン及びトマトから分離した非病原性 *F. oxysporum* をイチゴ苗に事前接種するとイチゴ萎黄病の発病が抑制されることを報告した。さらに、手塚・牧野(1991)が選抜した非病原性 *F. oxysporum* は、接種から2ヶ月後までイチゴに感染

し、抵抗性も保持していることから、ごく近縁の非病原性菌による生物的防除には、長期にわたる病害抑制効果が期待される。一方、現在イチゴ炭疽病及びうどんこ病の生物農薬として登録されている *T. flavus* 水和剤は、定着促進のため散布後に高湿度を保つ必要がある上、化学農薬と同程度の散布間隔を必要とする(野沢ら, 2004)。

Colletotrichum gloeosporioides は世界的に広く分布し、多くの植物に感染して炭疽病を引き起こす(佐藤・森脇, 2009)。本菌には、イチゴに感染して病徴を引き起こす菌株(以下強毒株とする)と形態的に区別できず、かつ炭疽病特有の病徴を引き起こさない菌株(以下弱毒株とする)が存在する(植松ら, 2002)。海老原ら(2007)は、千葉県安房地域の生産圃場における調査で、*C. gloeosporioides* の潜在感染が認められたにも関わらず全く発病しない圃場があり、それらの圃場から分離された菌株の多くが病原性を持たないことを報告している。

そこで本研究では、イチゴ炭疽病の新たな生物的防除方法を開発することを目的として、*C. gloeosporioides* 弱毒株のイチゴ苗への事前接種が本病の発病に及ぼす影響を調査した。

本研究を実施するにあたり、当センター暖地園芸研究所植松清次氏、海老原克介氏、鐘ヶ江良彦氏、元福岡県病害虫防除所梶谷裕二氏、三重県農業研究所鈴木啓史氏には菌株を提供いただいた。奈良県農業総合センター平山喜彦氏、地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部花・野菜技術センター角野晶大氏、栃木県農業試験場森島正二氏、静岡県農林技術研究所鈴木幹彦氏、佐賀県農業試験研究センター稲田稔氏には、菌株分離源としてのイチゴ苗を提供いただいた。また、当センター暖地園芸研究所石川正美氏、同育種研究所前田ふみ氏には接種試験に用いたイチゴ苗を提供いただいた。ここに深く感謝の意を表する。

Ⅱ 材料及び方法

1. 試験1 弱毒株の事前接種によるイチゴ炭疽病発病抑制効果の確認

(1)供試菌株

*Colletotrichum gloeosporioides*強毒株として、館山市のイチゴ生産圃場より分離したS-1菌株を用いた。弱毒株として、イチゴ「とちおとめ」苗への接種により病徴を示さない*C. gloeosporioides*のうち、炭疽病菌強毒株検出プライマー対AP-f3/AP-r7を用いたPCR（鈴木ら、2008）で陽性反応を示す菌株（以下偽陽性株とする）であり、本法による特異的検出が可能なN-14菌株を用いた（第1表）。なお、N-14菌株は弱毒株の中で例外的に偽陽性反応を示すことが明らかになった最初の菌株である。

(2)イチゴ苗への弱毒株の接種

供試菌株を25℃条件下においたショ糖・ジャガイモ煎汁培地（PDB）で14日間振とう培養し、bud cellを回収した。これらを用いて濃度105個/mLに調整したbud cell懸濁液を作製し、接種源とした。この接種源を、ガラス製クロマトスプレーを用いて「とちおとめ」苗の地上部全体に株当たり5 mLを噴霧接種した。供試した「とちおとめ」の苗は、直径9 cmのポリポットに鉢上げし、葉数5枚以上の十分に生育したものである。

2009年3月及び11月には、それぞれ親株の植え付け時の処理を想定した接種を行った。2010年には、*C. gloeosporioides*の生育適期の効果を確認する目的で7月と9月に接種したが、感染が認められなかったため、試験方法の再現性を確認する目的で11月にも実施した。

2009年3月には60株、11月には20株、2010年7月及び9月には各30株、11月には50株の苗を供試した。対照区には蒸留水を噴霧した。

接種したイチゴ苗を風乾後、湿潤状態を25℃条件下で48時間保ち、その後無加温の温室に移して管理した。

(3)接種苗からの弱毒株の検出

2009年3月の試験では弱毒株の接種から50、110、170日後に、その他の試験では30日後に、PCRにより弱毒株の感染の有無を確認した。なお、2009年3月の試験の50、110日後については、供試した60株の中から無作為に20株を選んで実施した。まず、接種したイチゴ苗から、平山ら（2008）の方法により菌のDNAを抽出した。すなわち、供試したイチゴ苗の最外葉の葉柄基部を5 mm程度切り取り、滅菌水で洗浄し、70%エタノールに30秒間浸漬した後、再度滅菌水で洗浄した。次に、2mLチューブにPDB（クロラムフェニコール 100 µg/mLを含む）を1mL分注し、前述の葉柄基部を加え、28℃条件下で48時間振とう培養を行った。

48時間後に培養液を200 µLはかりとり、MagExtractor-plant genome〔東洋紡(株)製〕を用いてDNAを抽出した。この抽出液を鋳型として、鈴木ら（2008）が設計した炭疽病菌強毒株特異的プライマー対AP-BF/AP-N1及びAP-f3/AP-r7を用いたnested-PCRを行った。Taqポリメラーゼには、Go-Taq〔プロメガ(株)製〕を使用した。PCRプログラムは、1回目、2回目ともに94℃で5分間変性処理した後、94℃ 30秒・58℃ 30秒・72℃ 30秒を40サイクル繰り返して行った。反応終了後、反応液を1.5%アガロースゲル電気泳動に供し、目的とする増幅断片の有無を確認することにより、菌の有無を判定した。

(4)強毒株の接種と発病の確認

弱毒株の感染が確認されたイチゴ苗に対し、弱毒株の接種と同じ方法により強毒株を接種した（以下チャレンジ接種とする）。

2009年3月接種試験では弱毒株接種から約200日後に弱毒株の感染が確認されたイチゴ苗27株からランダムに選んだ16株に対して、2009年11月接種試験では同じく約30日後に17株からランダムに選んだ15株に対して、2010年11月接種試験では同じく約30日後に全7株に対して、チャレンジ接種を行った。チャレンジ接種後、いずれも28℃条件下で湿潤状態を維持し、接種から30～50日経過後にイチゴ苗の発病状況を観察・判定した。各接種時期の病斑形成苗率及び萎凋苗率について対照区と弱毒株接種区との間でFisherの正確確率検定を行った。

2. 試験2 炭疽病発病抑制効果の高い菌株の選抜

(1)供試菌株

試験1を通じてイチゴ苗への弱毒株の事前接種により炭疽病の発病が抑制される可能性が見出されたため、より効果の高い弱毒株を選抜する目的で試験2を実施した。弱毒株として、国内のイチゴ及び他の植物から分離し、イチゴ「とちおとめ」苗を用いた生物検定によって病原性を判定した*C. gloeosporioides*を用いた（第1表）。供試した弱毒株のうち、炭疽病菌強毒株検出プライマー対AP-f3/AP-r7で陽性反応を示さない菌株（以下陰性株とする）48菌株及び試験1で用いたN-14菌株を除く偽陽性株8菌株を用いた。強毒株には試験1と同じS-1菌株を用いた。

(2)弱毒株接種源の調製

弱毒株のうち、陰性株については菌株数が多いため、効率的なスクリーニング法が必要と考え、複数の菌株を混合して1つのバルクとしたものを接種源とし、バルク接種区No.1～11を設定した（第1表）。偽陽性株については菌株ごとに接種源とし、8つの接種区を設定した。

陰性株の接種源については、25℃条件下に置いたPDBで各菌株を7～14日間振とう培養し、芽胞状単胞の菌体または芽胞状菌体（以下bud cellとする）を回収した。第1表

第1表 供試菌株

菌株名	分離源	採取地	バルク 接種区No. ¹⁾	備考 ²⁾
S-1	イチゴ	千葉県	-	強毒株
NS-10	イチゴ	北海道	1	陰性株
NS-11	イチゴ	千葉県	1	陰性株
NS-30	イチゴ	千葉県	1	陰性株
NS-43	イチゴ	千葉県	1	陰性株
NO-5	ニチニチソウ	千葉県	1	陰性株
NS-13	イチゴ	北海道	2	陰性株
NS-19	イチゴ	北海道	2	陰性株
NS-20	イチゴ	北海道	2	陰性株
NS-52	イチゴ	香川県	2	陰性株
NO-2	センリョウ	千葉県	2	陰性株
NS-9	イチゴ	北海道	3	陰性株
NS-23	イチゴ	北海道	3	陰性株
NS-31	イチゴ	北海道	3	陰性株
NS-63	イチゴ	高知県	3	陰性株
NO-10	ビワ	千葉県	3	陰性株
NS-35	イチゴ	奈良県	4	陰性株
NS-62	イチゴ	高知県	4	陰性株
NO-9	センリョウ	千葉県	4	陰性株
NO-17	コニファー	千葉県	4	陰性株
NO-19	シンビジューム	東京都	4	陰性株
NS-32	イチゴ	千葉県	5	陰性株
NS-33	イチゴ	千葉県	5	陰性株
NS-55	イチゴ	神奈川県	5	陰性株
NS-72	イチゴ	岡山県	5	陰性株
NO-18	アボカド	不明	5	陰性株
NO-4	アボカド	不明	6	陰性株
NO-11	ユリ	千葉県	6	陰性株
NS-4	イチゴ	千葉県	7	陰性株
NS-12	イチゴ	千葉県	7	陰性株
NS-18	イチゴ	千葉県	7	陰性株
NS-41	イチゴ	千葉県	7	陰性株
NS-65	イチゴ	長野県	7	陰性株
NS-49	イチゴ	北海道	8	陰性株
NS-69	イチゴ	岡山県	8	陰性株
NO-21	ツノナス	千葉県	8	陰性株
NS-36	イチゴ	奈良県	9	陰性株
NS-58	イチゴ	岡山県	9	陰性株
NS-70	イチゴ	福岡県	9	陰性株
NS-74	イチゴ	岡山県	9	陰性株
NO-16	ネズミモチ	千葉県	9	陰性株
NS-16	イチゴ	千葉県	10	陰性株
NO-20	ツノナス	千葉県	10	陰性株
NO-1	トマト	千葉県	10	陰性株
NO-6	カキ	千葉県	10	陰性株
NS-27	イチゴ	千葉県	11	陰性株
NS-29	イチゴ	千葉県	11	陰性株
NS-53	イチゴ	千葉県	11	陰性株
NS-56	イチゴ	神奈川県	11	陰性株
N-14	イチゴ	千葉県	-	偽陽性株
245	イチゴ	千葉県	-	偽陽性株
333	イチゴ	千葉県	-	偽陽性株
404	イチゴ	奈良県	-	偽陽性株
413	イチゴ	高知県	-	偽陽性株
414	イチゴ	高知県	-	偽陽性株
415	イチゴ	佐賀県	-	偽陽性株
453	イチゴ	福岡県	-	偽陽性株
746	イチゴ	三重県	-	偽陽性株

注1) 試験2の陰性株接種試験で設定した試験区、同じNo.の菌株を混合し接種した。

2) 偽陽性株：生物検定では病徴を示さないが炭疽病菌強毒株検出プライマー対AP-f3/r7によるPCRで陽性反応を示す菌株。陰性株：生物検定で病徴を示さず炭疽病菌強毒株検出プライマー対AP-f3/r7によるPCRでも陽性反応を示さない菌株。

のバルク接種区No.に示す組み合わせで各菌株のbud cell濃度が105個/mLとなるように調整したbud cell懸濁液を接種源とした。偽陽性株の接種源は試験1と同様に作製した。

(3)イチゴ苗への弱毒株の接種

試験1と同様の方法でイチゴ苗への接種を行った。

陰性株のバルク接種区における接種時期は、No.1～3, No.4～6, No.7及び8, No.9及び10, 及びNo.11でそれぞれ、2010年10月, 同12月, 2011年3月, 同5月及び同7月とした。偽陽性株の接種については全て2011年とし、No.404及び414は8月, No.413, 415, 453及び746は9月, No.245及び333は12月にそれぞれ実施した。

陰性株では各バルク接種区10株, 偽陽性株については各5株のイチゴ苗にそれぞれ接種した。対照区には蒸留水を噴霧した苗を同数供試した。

(4)弱毒株の感染の確認

接種約30日後に、PCRによりイチゴ苗に対する弱毒株の感染の有無を確認した。試料の調整・前培養・DNA抽出及びPCRについては試験1と同様の方法で行った。ただし、陰性株のPCRについては、炭疽病菌強毒株特異的プライマー対の代わりにITS1/ITS4 (White et al., 1990) 及び*C. gloeosporioides*特異的プライマー対CgInt/ITS4 (Mills et al., 1992) を用いたnested-PCRによった。PCRプログラムは、1回目, 2回目ともに94℃で5分間変性処理した後、94℃30秒・55℃30秒・72℃30秒を40サイクル繰り返して行った。

反応終了後、反応液を1.5%アガロースゲル電気泳動に

供し、目的とする増幅断片の有無を確認することにより、菌の有無を判定した。

(5)強毒株の接種と発病の確認

各試験区について弱毒株の感染を確認した後、1週間以内に各試験区及び対照区のイチゴ苗に対し試験1と同様の方法でチャレンジ接種を行った。チャレンジ接種後は、28℃条件下で湿潤状態を維持し、イチゴ苗の発病状況を観察した。陰性株接種区では、各バルク接種区全体の萎凋苗率及び弱毒株が検出された苗の萎凋苗率について、同時に試験した区間でそれぞれFisherの正確確率検定またはBonferroni-Holmの補正によるFisherの正確確率検定を行った。偽陽性株接種区については、検出苗率、萎凋苗率ともにBonferroni-Holmの補正によるFisherの正確確率検定を行った。

Ⅲ 結 果

1. 試験1 弱毒株の事前接種によるイチゴ炭疽病発病抑制効果の確認

(1)接種苗からの弱毒株の検出

2009年3月接種の試験では、弱毒株接種50日後に95%、110日後に85%、170日後に53%の苗から*C. gloeosporioides*が検出され、11月接種の試験では、弱毒株接種から30日後に85%の苗から検出された(第2表)。これに対し、2010年7月及び9月に接種した苗からは弱毒株は検出されず、11月に接種した苗では接種から30日後に14%の苗から検出さ

第2表 弱毒株N-14の「とちおとめ」苗からの検出率

	弱毒株接種時期						
	2009年3月			2009年11月	2010年7月	2010年9月	2010年11月
接種後経過日数 (調査日)	50日後	110日後	170日後	30日後	30日後	30日後	30日後
検出苗率(%)	95 (20) ^{1,2)}	85 (20) ²⁾	53 (51) ³⁾	85 (20)	0 (30)	0 (30)	14 (50)

注 1) 供試苗数

2) 供試した60株の中から無作為に20株を選んで実施した。

3) 炭疽病以外の原因により60株中9株が欠株となったため、51株で計算した。

第3表 弱毒株N-14を事前に接種した後、強毒株を接種した時のイチゴ「とちおとめ」苗の炭疽病の発生

調査項目	弱毒株接種時期					
	2009年3月 ¹⁾		2009年11月 ²⁾		2010年11月 ³⁾	
	弱毒株接種区	対照区	弱毒株接種区	対照区	弱毒株接種区	対照区
病斑形成苗率(%)	100 (16) ⁴⁾	100 (15)	100 (15)	100 (15)	100 (7)	100 (7)
萎凋苗率(%)	25 (16) **	73 (15)	27 (15) **	93 (15)	100 (7)	71 (7)

注1) 弱毒株接種から約200日後に強毒株を接種しその40日後に判定した。

2) 弱毒株接種から約30日後に強毒株を接種しその50日後に判定した。

3) 弱毒株接種から約30日後に強毒株を接種しその30日後に判定した。

4) 供試苗数

5) **は対照区との間に有意差あり (Fisherの正確確率検定, $p < 0.01$)。

れた。

(2)弱毒株感染苗に強毒株を接種した場合の炭疽病発病状況

チャレンジ接種を行った弱毒株接種区の炭疽病発病状況を第3表に示した。2009年3月接種では、チャレンジ接種40日後にはすべての供試苗で小葉に炭疽病菌特有の病斑が確認された。しかし、萎凋苗率は、弱毒株接種区では25%と対照区の73%に比べ有意に低かった (Fisherの正確確率検定, $p < 0.01$)。2009年11月接種では、3月接種と同様にすべての供試苗で小葉に病斑が確認されたが、萎凋苗率は弱毒株接種区では27%であり、対照区の93%と比較して有意に低く (Fisherの正確確率検定, $p < 0.01$)、3月接種と同様の傾向が認められた。

弱毒株接種区では接種後に新葉が伸張した苗が多く見られた。また、弱毒株接種区で枯死しなかった苗のクラウン内部には褐変等の炭疽病の症状が認められず、健全な状態であった (データ省略)。

一方、2010年11月接種では、強毒株接種から30日後に全ての苗に病斑形成と萎凋が認められ、病斑形成苗率、萎凋苗率とも対照区との間に有意な差は認められなかった (Fisherの正確確率検定, $p > 0.05$)。

2. 試験2 炭疽病発病抑制効果の高い菌株の選抜

(1)陰性株のイチゴ苗への感染率と強毒株接種後の炭疽病発病状況

バルクに調製した陰性株について、イチゴ苗からの検出率とチャレンジ接種による炭疽病の発病状況を調査した (第4表)。陰性株の検出率は、バルク接種区No.1, No.2, No.7, No.8で高かった。これに対し、No.5, No.9では低く、No.10では全く検出されなかった。

バルク調製した陰性株の接種苗に対してチャレンジ接種を行った結果、各バルク試験区の萎凋苗率には若干の違いがみられたものの、いずれも統計的に有意な差ではなかった (Fisherの正確確率検定, $p > 0.05$)。

(2)偽陽性株のイチゴ苗への感染率と強毒株接種後の炭疽病発病状況

偽陽性株のイチゴ苗での検出率は、0又は20%と低い菌株が多く、最大で菌株No.245の60%であった。チャレンジ接種による萎凋苗率は、弱毒株No.404, No.414, No.415接種区でそれぞれ0%, No.245及びNo.333接種区でそれぞれ20%, No.413接種区で80%, No.453及びNo.746接種区でそれぞれ100%, 対照区では80%であったが (第5表)、偽陽性株検出苗率、萎凋苗率ともに、区間に有意な差は認められなかった (Fisherの正確確率検定, $p > 0.05$)。葉の病斑は全ての区の全ての苗で見られた。

第4表 バルク接種により陰性株を事前接種したイチゴ「とちおとめ」苗における陰性株の検出率と強毒株接種後の炭疽病の発生

バルク 接種区No.	陰性株検出 苗率(%) ¹⁾	陰性株接種区の 萎凋苗率(%) ²⁾	陰性株が検出された 苗の萎凋苗率(%)	対照区の萎凋 苗率(%) ³⁾
1	90 (10) ⁴⁾	44 (9)	44 (9)	
2	90 (10)	56 (9)	56 (9)	50 (10)
3	70 (10)	100 (7)	100 (7)	
4	70 (10)	80 (10)	71 (7)	
5	30 (10)	40 (10)	33 (3)	70 (10)
6	60 (10)	70 (10)	50 (6)	
7	100 (10)	70 (10)	70 (10)	70 (10)
8	90 (10)	50 (10)	44 (9)	
9	40 (10)	50 (10)	75 (4)	60 (10)
10	0 (10)	70 (10)	—	
11	70 (10)	40 (10)	43 (7)	70 (10)

注1) 陰性株接種30日後にCgInt/ITS4を用いたPCRで葉柄基部から陰性株が検出された苗の割合。

2) バルク接種区No.1～3では陰性株が検出された供試苗に、その他の区では全ての供試苗に強毒株を接種し、30日後までに萎凋した苗の割合。

3) 蒸留水噴霧30日後に強毒株を接種し30日後までに萎凋した苗の割合 (バルク接種区No.1～3, No.4～6, No.7及び8, No.9及び10はそれぞれ同時に試験したため対照区が共通)。

4) 供試苗数

5) 陰性株検出苗率、全体の萎凋苗率及び陰性株が検出された苗の萎凋苗率は、同時に試験した全ての区間で有意差なし (Fisherの正確確率検定またはBonferroni-Holmの補正によるFisherの正確確率検定, $p > 0.05$)。

第5表 偽陽性株を事前接種したイチゴ「とちおとめ」苗における偽陽性株の検出率と強毒株接種後の炭疽病の発生

	偽陽性株No.	偽陽性株検出苗率 ²⁾ (%)	萎凋苗率 ³⁾ (%)
偽陽性株 接種区 ¹⁾	404	0	0
	414	20	0
	415	40	0
	245	60	20
	333	0	20
	413	0	80
	453	20	100
	746	20	100
対照区	-	0	80

注1) 供試株数は5株.

2) 偽陽性株接種30日後に強毒株検出プライマー対AP-f3/AP-r7を用いたPCRで葉柄基部から偽陽性株が検出された苗の割合.

3) 偽陽性株接種30日後に強毒株を接種し30日後までに萎凋した苗の割合.

4) 偽陽性株検出苗率及び萎凋苗率は全ての区間で有意差なし (Bonferroni-Holmの補正によるFisherの正確確率検定, $p > 0.05$).

Ⅳ 考 察

弱毒株としてN-14菌株を用いた試験1では、2009年3月と11月に接種した試験で弱毒株の感染率が高く、炭疽病菌強毒株による発病が抑制された。しかし、2010年に行った試験では、7月と9月に接種した苗で弱毒株の感染が認められなかった。今回用いたPCRによる検出法では、最外葉の葉柄基部を培養してクラウンに感染した菌を検出する。しかし、夏季は検出率がやや低くなる(鈴木ら、未発表)。そこで、確認のために、2011年に行った試験の供試苗について、ショ糖・ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA培地) に表面殺菌したクラウンを置床し菌の分離を試みたが、*C. gloeosporioides*は検出されなかった。これらのことから、原因は不明であるが、夏季には弱毒株の感染率が低いため、弱毒株の処理時期として、秋及び春の親株植え付け時が適していると考えられた。一方、2010年11月にN-14菌株を接種し感染が確認された苗では、発病抑制効果が認められず、弱毒株の事前接種による炭疽病発病抑制効果は不安定であった。この要因として、供試苗の生産時や弱毒株接種から強毒株接種までの間に無加温の温室で管理していたことにより、イチゴ苗の生育状態に差が生じ、これが影響した可能性が挙げられる。

試験2においては、陰性株のバルク接種によって発病抑制効果の高い区が認められれば、バルクを構成する陰性株について株ごとに選抜試験を行う予定であった。しかし、供試苗からの弱毒株検出率が90や100%と高い区でもチャレンジ接種による炭疽病の発病を抑制する効果は認められなかったため、株ごとの選抜試験は行わなかった。

一方、偽陽性株には葉柄基部からの検出率が低いものが多かったが、このうち3菌株では炭疽病の発病が抑制され

た。葉柄基部から弱毒株が検出された苗はクラウン内部に弱毒株が感染していると判断されるが、弱毒株が検出されなかった苗でも強毒株接種後に発病しない現象が認められた。このことから、弱毒株がクラウンに存在しない、または非常に少ない場合でも発病抑制効果は発現可能であると考えられた。

微生物による病害抑制の作用機作については、抗菌 (食菌)、競合、植物への病害抵抗性誘導、植物の成長調節等が挙げられている (有江, 2003)。小川・駒田 (1986) は、サツマイモ苗の基部切り口に非病原性 *F. oxysporum* を接種した後、離れた組織につる割病菌を接種した場合でも発病が抑制されることを明らかにし、全身的な抵抗性が誘導された可能性を指摘している。このような非病原性菌や、壊死病斑を誘導する病原体、病害抵抗性を誘導する物質、生育促進根圏細菌等に植物が前もって曝された場合に、エリシターや病原菌に対する応答が通常に比べて迅速かつ強く誘導される現象は、プライミングと呼ばれている (伊予住ら, 2006; Jung et al., 2009)。本研究においては、イチゴへの抵抗性誘導を示すデータは得られていないが、クラウン内部での競合の可能性は低く、弱毒株がクラウン以外の部位へ感染すること、またはイチゴが弱毒株のbud cell懸濁液に曝露されることにより、イチゴにプライミングが生じた可能性がある。

本研究では、陰性株は、イチゴ苗のクラウン部に感染できることが明らかになったものの、接種による炭疽病発病抑制効果は認められず、一部の偽陽性株の接種のみで発病抑制効果が認められた。Suzuki et al. (2010) は、全国のイチゴ産地から収集した *C. gloeosporioides* について rep-PCR による解析を行い、イチゴから分離した *C. gloeosporioides* を5グループに分類し、強毒株はほぼ1つのグループに位置づけられることを報告した。炭疽病菌強毒株検出プライマー対AP-

f3/AP-r7はこのグループの菌株を識別するプライマーであり、本プライマーによるPCRで検出される偽陽性株は遺伝子レベルでは強毒株と近縁であると考えられる。これに対し、陰性株はこのグループに含まれない菌株であると推察される。

以上の結果から、強毒株と遺伝的に近い弱毒株を用いて接種試験を行う事により、事前接種による炭疽病発病抑制効果を持つ菌株を選抜できる可能性が高まると考えられた。

本研究により、*C. gloeosporioides* 弱毒株をイチゴ苗に事前接種することで、その後強毒株を接種した場合に炭疽病の発病が抑制される現象が明らかとなった。しかし、その程度は菌株によって異なり、発病抑制効果の発現は不安定であった。安定した発病抑制効果が期待できる技術として確立するためには、接種強度や時期等について、より詳細な調査が必要である。

V 摘 要

イチゴに感染しても病徴を示さない *Colletotrichum gloeosporioides* (弱毒株) の「とちおとめ」苗への事前接種がイチゴ炭疽病菌 (強毒株) による発病に及ぼす影響を調査し、以下の点が明らかとなった。

1. 供試した弱毒株の一部は、「とちおとめ」苗への接種後数か月間にわたりイチゴ苗のクラウン内部に高率で感染した。
2. 弱毒株を事前接種したイチゴ苗では、小葉に病斑はみられたものの、接種していない苗と比較して強毒株による萎凋症状が抑制される傾向が認められた。
3. 事前接種による炭疽病の発病抑制効果は、強毒株と遺伝的に近い弱毒株で高く、遠縁と考えられる菌株で低かった。

VI 引用文献

有江力 (2003) 生物防除資材の定性解析と作用機構解析の行方. 拮抗微生物による作物病害の生物防除 (百町満朗監修). pp.238-244. クミアイ化学工業株式会社. 東京.

海老原克介・染谷 肇・宮原秀一・小林敏満・星野勲・上堀内里紗・橋本威・鐘ヶ江良彦・金森啓介・鈴木康雄・野宮左近・山口勇・飯嶋直人・鈴木健・田中千華・植松清次 (2007) 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).

平山喜彦・鈴木健・伊東靖之・岡山健夫・西崎仁博・松谷幸子 (2008) 病原菌特異的プライマーを用いたPCRによる潜在感染株からのイチゴ炭疽病菌の検出. 日植病

報. 74:198 (講要).

稲田稔 (2012) 潜在感染株からの降雨および灌水によるイチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) の飛散. 植物防疫. 66:388-392.

石川成寿 (2005) イチゴ炭疽病の病原菌, 生態ならびに環境に配慮した防除技術開発. 栃木農試研報. 54:1-187.

伊予住浩幸・加藤公彦・影山智津子・稲垣栄洋・古瀬勝美・馬場康司・土屋広司 (2006) イネ培養細胞における病害抵抗性誘導物質の違いによるプライミング効果の差異. 日植病報. 72:195-199.

Jung, Ho Won, Timothy J. Tschaplinski, Lin Wang, Jane Glazebrook and Jean T. Greenberg (2009) Priming in systemic plant immunity. *Science*. 324:89-91.

Mills, Peter R., S. Sreenivasaprasad and Averil E. Brown (1992) Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 98:137-143.

宮井俊一・河合 章・萩原 廣・高橋賢司・吉田幸二・吉富 均 (編) (2009) 生物機能を活用した病害虫・雑草管理と肥料削減: 最新技術集. 中央農業総合研究センター. つくば. 225pp.

農林水産省 (1999) 「持続性の高い農業生産方式の導入の促進に関する法律」第2条第3号

野沢英之・石川成寿・中山喜一・尾川新一郎・伊豆進 (2004) タラロマイセスフラバス水和剤を基軸にしたイチゴ炭疽病, うどんこ病の防除体系. 関東病虫研報. 51:37-42.

小川奎・駒田旦 (1984) 非病原性 *Fusarium oxysporum* によるサツマイモつる割病の生物防除. 日植病報. 50:1-9.

小川奎・駒田旦 (1986) 非病原性 *Fusarium oxysporum* によるサツマイモつる割病に対する全身的な抵抗性の誘導. 日植病報. 52:15-21.

岡山健夫・辻本明 (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.

佐藤豊三・森脇丈治 (2009) 連載「農業関連微生物」第6回植物炭疽病菌(1). *Microbiol. Cult. Coll.* 25(1):27-32.

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., C. Tanaka M., Y. Ebihara, Y. Ito and S. Uematsu (2010) Genetic polymorphism and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from

- strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne). *J. Gen. Plant Pathol.* 76:247-253.
- 手塚信夫・牧野孝宏 (1991) 非病原性 *Fusarium oxysporum* によるイチゴ萎黄病の生物的防除. 日植病報. 57:506-511.
- 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).
- White, T. J., Bruns T. D., Lee S. and Taylor J.T. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications* (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. eds.). pp.315-322. Academic Press. San Diego, CA., USA.

Effects of Preinoculation of Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne) with Weakly Virulent *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates on Pathogenesis of Strawberry Anthracnose

Nanako YOSHIDA and Takeshi SUZUKI

Key words : anthracnose, biological control, strawberry, weakly virulent isolate

Summary

We preinoculated strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne ‘Tochiotome’) nursery plants with weakly virulent isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, which do not produce disease symptoms. We then investigated the effect of the inoculation on the pathogenesis of strawberry anthracnose, which is caused by highly virulent isolates. The following results were obtained:

1. One of the weakly virulent isolates persisted inside the crowns of the Tochiotome nursery plants at high rates for several months after inoculation.
2. Preinoculation of the strawberry plants with some weakly virulent isolates controlled wilting after infection with a highly virulent isolate, unlike the case in plants that were not preinoculated, although lesions were still found on the leaves.
3. The effect of preinoculation on control of strawberry anthracnose was strong when we used weakly virulent isolates that were closely related to the highly virulent isolates and weak with the use of isolates considered to be distant relatives.