

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	平山 喜彦
学位授与の日付	平成30年3月31日	
論文名	イチゴ炭疽病の伝染様式の解明と診断・防除技術の確立	
論文審査委員	主査	東條 元昭
	副査	横井 修司
	副査	高野 順平

## 論文要旨

### 序章

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、原種苗増殖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苗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、葉組織中にあ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を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 7 mg/L で 10 秒間、オゾン水はオゾン濃度が 0.2 mg/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本病に対する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、本法が原種苗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。

## 審査結果の要旨

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。

本研究の目的は、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である。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章では、イチゴ炭疽病の新たな伝染源としての雑草の評価を行った。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。申請者の現場観察で、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PCR法等で調査した。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。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。

次に、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、メヒシバおよびノゲ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章では、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について検討した。本研究では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。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。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。さらに、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章では、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を行った。まず、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 7 mg/L で 10 秒間、オゾン水はオゾン濃度が 0.2 mg/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本病に対する発病抑制効果をイチゴ圃場で検証した。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。

以上のように、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、本法が原種苗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ものであり、応用生命科学分野とくに植物保護学および植物病理学の発展に大きく寄与する。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。