

# 培養苗を使用した水耕栽培条件下における 高精度なイチゴ炭疽病耐病性評価法の確立

田口真由<sup>1)</sup>・柏谷祐樹<sup>2)</sup>・山内理沙<sup>3)</sup>・中澤佳子<sup>4)</sup>

**摘要:** イチゴ炭疽病は、イチゴ生産における最重要病害であり、耐病性品種の開発は喫緊の課題である。そこで、耐病性育種の効率化を図るため、イチゴ炭疽病耐病性 DNA マーカーの開発に着手することとした。高精度かつ多検体の表現型データを省スペースで取得するため、本研究では、培養苗を使用した水耕栽培条件下における耐病性評価法の確立を目的とした。接種分生子濃度、栽培温度、発病評価方法および栽植密度の検討を行ったところ、接種分生子濃度を  $1 \times 10^5$  個/mL、栽培温度を 25°C、発病指数を 6 段階、栽植密度を 200 穴プラグトレイで縦 1 穴および横 1 列空き (35 株/バット) とすることで、接種後 1 か月以内に耐病性または罹病性程度を判定することが可能であった。これにより、短期間に多検体を高精度に耐病性評価できる培養苗への接種条件が明らかとなり、耐病性 DNA マーカー開発に向けた安定的な耐病性検定が可能となった。

**キーワード:** イチゴ炭疽病, 水耕栽培, 耐病性評価, 培養苗

## Establishment of Method for Highly Accurate Evaluation of Strawberry Anthracnose Resistance under Hydroponic Culture with Tissue-Cultured Seedlings

Mayu TAGUCHI, Yuki KASHIWAYA, Risa YAMAUCHI and Yoshiko NAKAZAWA

**Summary:** Strawberry anthracnose is the most important diseases in strawberry production, and the development of disease resistant varieties is expected. To improve the efficiency of disease resistance breeding, we set out to develop DNA markers linked to strawberry anthracnose resistance. To obtain accurate phenotypic data, this study aimed to establish a method for evaluating disease resistance under hydroponic conditions using tissue-cultured seedlings. We investigated conidia concentration for inoculation, growing temperature, category of disease index and planting density. It was possible to determine disease resistance or susceptibility within 1 month after inoculation under these conditions that the inoculation concentration was  $1 \times 10^5$  conidia/mL, the growing temperature was 25°C, disease index was 6 categories and planting density was 1 hole and 1 row left in a 200-cell plug tray (35 plants/bat). This result defined inoculation conditions for under hydroponic conditions using tissue-cultured seedlings that enabled highly accurate disease resistance evaluation of many samples in a short period of time, and made it possible to conduct stable disease resistance tests for development of DNA markers for anthracnose resistance.

**Key words:** Disease Resistance Evaluation, Hydroponic Culture, Strawberry Anthracnose, Tissue-Cultured Seedling

1) 現栃木県芳賀農業振興事務所, 2) 現栃木県農業大学校, 3) 現栃木県塩谷南那須農業振興事務所, 4) 現栃木県下都賀農業振興事務所 (2025. 3. 25 受理)

## I 緒言

栃木県におけるイチゴ産出額は 277 億円であり、野菜産出額の 37.2%を占める最も主要な園芸品目である(令和4年農林水産省生産農業所得統計, 2021)。本県のイチゴ栽培における品種構成は、本県育成品種であるとちおとめ(石原ら, 1996)から2024年に品種登録された多収性新品種である栃木 i37号(登録商標:とちあいか, 大橋ら, 2020)が切り替わりつつある。

近年、減化学農薬・減化学肥料等の環境に配慮した農業や夏季の高温等の気候変動に対応した品種育成および栽培技術の開発が求められている。本県のイチゴ育種においても、減化学農薬や夏季の高温による病害の増加に対応するため、耐病性形質の付与がより重要となっている。栃木 i37号は、とちおとめが罹病性であったイチゴ萎黄病(病原菌:*Fusarium oxysporum* f. sp. *Fragariae*, 以後萎黄病と略す)に対して耐病性を示すが、もうひとつの重要病害であるイチゴ炭疽病(病原菌:*Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体, 以後炭疽病と略す)に対しては耐病性が付与されていない(大橋ら, 2020)。

炭疽病は、夏季育苗時に潜在感染株や発病株から、降雨や頭上かん水により分生子が水はね伝染することで感染が拡大する(石川, 2005)。防除対策は、化学的防除として定期的な農薬散布、耕種的防除として育苗時の雨よけ栽培や底面・ドリップ給水の導入等があるが、抵抗性および耐病性品種の導入が最も効果的な解決策の一つである。これまで国内で育成された抵抗性品種は、サンチーゴ(森ら, 2000)、いちご中間母本農2号(以後農2号と略す, 沖村ら, 2004)、カレンベリー(曾根ら, 2006)、かおり野(北村ら, 2015)、こいはるか(野崎ら, 2017)があり、本県においても抵抗性・耐病性育種を進めている。

炭疽病に対する抵抗性は、相加的効果を持つ複数の遺伝子に支配されていると考えられており(森, 2001)、炭疽病抵抗性品種を交配に用いても後代の抵抗性個体の出現率は低いことが知られている。内村ら(2015)は、抵抗性品種のサンチーゴおよび農2号に罹病性品種の福岡 S6号を交配した各 F<sub>1</sub> 集団に炭疽病菌を噴霧接種した結果、生存率がそれぞれ 28%と 36%であったと報告している。また、かおり野は、炭疽病菌の噴霧接種による生存系統を交配親とする世代更新を 9 世代に渡り実施し、抵抗性遺伝子を集積して育成されているが、最初の交配から品種登録出願まで 18 年と長い年月を要している(北村ら, 2015)。

このように、炭疽病抵抗性および耐病性品種の育成には、優良果実形質や収量性等の選抜と同時に接種検定による評価と抵抗性・耐病性遺伝子を集積を行うため、多大な時間と労力が必要である。そのため、育種の効率化には、検定なしに抵抗性・耐病性系統を選抜できる DNA マーカーの開発が求めら

れている。飯村ら(2012)は、とちおとめと農2号の F<sub>1</sub> 集団を用いて連鎖解析を行い、9 か所の領域に耐病性に関する量的形質遺伝子座(Quantitative Trait Locus: QTL)が検出されたことを報告している。その後、榎ら(2017)は、さちのか×農2号の F<sub>1</sub> 集団を用いて DNA アレイと QTL 解析により第 23 連鎖群に LOD 値 18.3, 寄与率 45%の遺伝子座を報告している。

近年、次世代シーケンス技術の進展により様々な農作物でゲノムシーケンスが行われ、ゲノム情報をもとにした DNA マーカーの開発が行われている。栽培イチゴ(*Fragaria* × *ananassa*, 2n=8x=56)におけるゲノムシーケンスは、Hirakawa *et al.* (2014) による麗紅の全ゲノム解読が報告されて以降、アメリカの Camarosa, 中国の Yanli などが報告され(Edger *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2023), web 上でゲノム情報が公開されている。今まで解析が困難であった炭疽病抵抗性・耐病性等の量的形質についても、解析集団の DNA 多型データと表現形質データを用い、公開ゲノム情報に対してゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study: GWAS)を行うことにより、より詳細に関連する DNA 領域を特定することが可能であると考えられる。最近では、Anciro *et al.* (2018) が SNP アレイと GWAS により、6B 染色体に抵抗性遺伝子座 *FaRCg1* (*Fragaria* resistance to *C. gloeosporioides* locus/gene 1) を報告している。しかし、抵抗性および耐病性遺伝子座は、今までの報告から QTL と推定されており、抵抗性および耐病性遺伝子の集積のためには、報告された遺伝子座以外にも関連遺伝子座を同定することが必要である。

一方、高精度な GWAS による DNA マーカーの開発のためには、ゲノム情報とともに正確な形質調査データの取得も必要となる。これまで炭疽病抵抗性・耐病性の評価は、通常、ランナー苗を採苗し、ポット育苗後、育苗した苗に対して分生子懸濁液を噴霧接種することにより行われてきたが(石川, 2005; 片山ら, 2008)、育苗ハウスや隔離ハウス、育苗管理の労力確保が必要となる。また、炭疽病菌の菌糸生育最適温度が 28℃前後であることから(石川, 2005)、接種試験は夏季に行われることが多い。そのため、抵抗性・耐病性評価の省力化や省スペース化、検定時期を選ばない手法も開発されており、培養苗(飯村ら, 2012; 平島ら, 2015)、自殖実生苗(森・北村, 2010)、葉柄(Noguchi *et al.*, 1994)、小葉(八城ら, 2015)を用いる方法が報告されている。

そこで、近年発展の目覚ましいゲノムレベルでの研究による新たな炭疽病耐病性 QTL の検出および炭疽病耐病性マーカーの開発に向け、精度が高く効率的な耐病性評価方法の確立を目指した。本研究では、飯村ら(2012)によるイチゴ培養苗を使用した水耕栽培および耐病性評価の条件について検討を行い、短期間に多検体を高い精度で耐病性評価可能な手法を確立したので報告する。

なお、各品種・系統の炭疽病抵抗性および耐病性は、品種については既報のとおり抵抗性と表記し、本県育成系統については耐病性と表記する。

## II 試験方法

### 1. 供試材料と試験区

炭疽病抵抗性の強弱が明らかとなっている品種(農 2 号:抵抗性, Dover(Horward *et al.*, 1980):抵抗性, かおり野:抵抗性, とちおとめ:罹病性, 古都華(西本ら, 2010):罹病性)および栃木県育成系統(栃木素材 2 号:耐病性(カレンベリー由来), 栃木素材 4 号:耐病性(カレンベリー由来), 栃木 36 号:罹病性, 以降それぞれ TS2, TS4, T36 と略す)の培養苗を使用した(第 1 表)。培養苗の作製は、高野・生井(2008)の方法により、各品種および系統のランナーを 70%エタノールで 10 秒間、1%次亜塩素酸ナトリウムで 10 分間殺菌後、生長点を採取し、無機塩類を 1/2 に減じた Murashige & Skoog の培地に置床した。その後、クリーンルーム内で 23°C、12 時間日長下で培養した。培養苗は接種試験に使用するまで 30~60 日間隔で継代した。

各試験区は、飯村ら(2012)の方法を参考とし、接種分生子濃度、栽培温度、発病評価方法および栽植密度の 4 条件を検討し(第 1 表)、各品種・系統は 5 株ずつ供試した。

### 2. 接種分生子濃度の検討

無菌培養苗は、葉数を 3 枚程度に調整し、クリーンルーム内で 23°C、12 時間日長下で水道水により 7 日間馴化後、水耕栽培液(大塚 A 処方)でさらに 7 日間育苗した。接種前日に人工気象器(LH-200-RD, 日本医化器械製作所)へ移し、25°C、14 時間日長下で育苗した。育苗にはステンレス深型バット 11

号(内径 42cm×30cm×9.6cm)を用い、200 穴プラグトレイを反転したものに培養苗を挿して栽培した(第 6 図)。栽植密度は、縦 1 穴および横 1 列空きの 1 バット当たり 35 株とした(第 2 図 A)。水道水及び水耕栽培液は 2~3 L(バット底面から 2~2.5 cm)とし、週 2 回程度交換した。

炭疽病菌(*Colletotrichum fructicola*: OTT512 菌株)はポテトデキストロース寒天平面培地で 25°C、7 日間培養後、菌そう周辺部を直径 5 mm 角に切り取り、同一条件で 7 日間培養した。その後、熱した白金耳で菌そう表面を画線しヒートショックを与え、さらに 7 日間培養した。分生子形成後、滅菌蒸留水を加えて表面をかき取り、二重ガーゼでろ過した。接種分生子濃度は  $1 \times 10^4$  個/mL または  $1 \times 10^5$  個/mL とし、滅菌蒸留水で調整した。接種は、ペーパークロマトグラフ用噴霧器で 1 株当たり 1 mL となるように噴霧後、ラップで密閉し、24 時間密閉保湿条件下で感染を促した。

発病調査は、接種 7 日後から 7 日間隔で行った。発病指数は、0:発病なし、1:斑点型病斑を形成、2:葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑を形成、3:萎凋またはクラウン部の褐変化、4:枯死の 5 段階で評価し、発病度( $\{\sum(\text{発病度} \times \text{同株数}) / (4 \times \text{調査株数})\} \times 100$ )を算出した(第 1 図)。

### 3. 栽培温度が発病に及ぼす影響の検討

供試株の栽培条件および接種菌の培養方法は「2. 接種分生子濃度の検討」と同様とした。ただし、接種前日に人工気象器へ移してから温度管理は 28°C、接種分生子濃度は  $1 \times 10^5$  個/mL とした。「2. 接種分生子濃度の検討」のうち、接種分生子濃度  $1 \times 10^5$  個/mL の結果と比較した。

第 1 表 供試材料と試験区

抵抗性・耐病性/ 罹病性 <sup>1)</sup>	品種・系統名	検討項目ごとの供試品種・系統 <sup>2)</sup>				
		接種分生子濃度	栽培温度	発病評価方法	栽植密度	再現性確認
	いちご中間母本農 2 号	○	○	○	○	○
	Dover	○	○	○	○	○
抵抗性・耐病性	栃木素材 2 号	○	○	○	○	○
	栃木素材 4 号	○	○	○	○	○
	かおり野			○	○	○
	とちおとめ	○	○	○	○	○
罹病性	古都華	○	○	○	○	○
	栃木 36 号					○

1) 耐病性は、沖村ら(2004)、石川(2005)、西本ら(2010)、北村ら(2015)の報告および本農業試験場の接種試験(データ未公表)を参考に区分した

2) 試験区の○は、各試験区に供試した品種・系統を示す

#### 4. 発病評価方法の検討

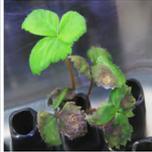
無菌培養苗は、葉数を3枚程度に調整し、クリーンルーム内で23℃、12時間日長下で水道水により6日間馴化後、人工気象器(LH-200-RD、日本医化器械製作所)へ移し、水耕栽培(大塚A処方)により25℃、14時間日長下で3日間育苗した。接種分生子濃度の調整は「3. 栽培温度の検討」と同様とし、発病調査は接種4日後から18日後まで2~3日間隔で行った。発病評価は5段階指数および6段階指数で行った。5段階指数による発病評価は「2. 接種分生子濃度の検討」と同様とし、6段階指数による発病評価は0:発病なし、1:斑点型病斑を形成、2:葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑を形成(展開葉の半分未満)、3:葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑を形成(展開葉の半分以上)、4:萎凋またはクラウン部の褐変化、5:枯死として、発病度( $(\sum(\text{発病度} \times \text{同株数}) / (5 \times \text{調査株数})) \times 100$ )を算出した(第1図)。

#### 5. 栽植密度の検討

無菌培養苗は、葉数を3枚程度に調整し、クリーンルーム内で23℃、12時間日長下で水道水により6日間馴化後、人工気象器(LH-200-RD、日本医化器械製作所)へ移し、水耕栽培(大塚A処方)により25℃、14時間日長下で6日間育苗した。発病評価は6段階指数とし、栽植密度を縦1穴および横1列空き(35株/バット)または縦横1穴空き(70株/バット)とした(第2図)。

#### 6. 再現性の確認

罹病性系統のT36を加え、最良と考えられる条件(「5. 栽植密度の検討」の栽植密度35株/バット)で再現性の確認を行った。ただし、人工気象器はLPH-220N(日本医化器械製作所)を使用し、発病調査は接種4日後から28日後まで2~3日間隔で行った。得られたデータおよび本データと同様の条件で得られた「5. 栽植密度の検討」の35株/バットのデータを用い、再現性を確認した。

		発病指数				
5段階	0	1	2*		3	4
6段階	0	1	2	3	4	5
発病なし	斑点型病斑	葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑			萎凋またはクラウン部の褐変化	枯死
		展開葉の半分未満	展開葉の過半			
						

第1図 炭疽病発病指数の判定基準(5段階および6段階)

※5段階評価における発病指数2(葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑)について、6段階評価は展開葉の半分未満で陥没病斑を認める場合を2、展開葉の過半数で陥没病斑を認める場合を3とした

A 35株/バット(縦1穴空き, 横1列空き)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	■													
2		■												
3			■											
4				■										
5					■									
6						■								
7							■							
8								■						
9									■					
10										■				

B 70株/バット(縦横1穴空き)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	■		■		■		■		■		■		■	
2		■		■		■		■		■		■		■
3	■		■		■		■		■		■		■	
4		■		■		■		■		■		■		■
5	■		■		■		■		■		■		■	
6		■		■		■		■		■		■		■
7	■		■		■		■		■		■		■	
8		■		■		■		■		■		■		■
9	■		■		■		■		■		■		■	
10		■		■		■		■		■		■		■

第2図 水耕栽培における栽植密度(35株/バットおよび70株/バット)

■は培養苗を挿したセルを表す。水耕栽培は、ステンレス深型バット11号(内径42cm×30cm×9.6cm)に水道水または大塚A処方を2~3L満たし、200穴プラグトレイを反転したものに培養苗を挿して栽培した。栽培条件は、各試験区に従った。

### Ⅲ 結果

#### 1. 接種分生子濃度の検討

接種分生子濃度を $1 \times 10^4$ 個/mLまたは $1 \times 10^5$ 個/mLとし、栽培温度 $25^\circ\text{C}$ で、接種7日後から28日後まで7日間隔で発病調査を行った。その結果、全調査日において接種分生子濃度間に1%水準で有意差が認められた(第2表)。

接種分生子濃度を $1 \times 10^4$ 個/mLとした場合は、全調査日において品種間における発病指数に有意差はなかった(第2表)。抵抗性および耐病性品種・系統の農2号およびTS4は、調査期間中の発病指数および発病度が0であり、病徴が確認されなかった(第2表、第3図)。同じく抵抗性および耐病性品種・系統のDoverおよびTS2の接種28日後の平均発病指数は、それぞれ0.60と0.80、発病度がそれぞれ15と20であり、枯死株はなかった(第2表、第3図および第3表)。罹病性品種のとちおとめおよび古都華は、それぞれ接種28日後の平均発病指数1.40と1.60、発病度35と40、枯死株率20%と0%であっ

た(第2表、第3図および第3表)。

一方、接種分生子濃度を $1 \times 10^5$ 個/mLとした場合は、接種7日後にすべての品種で病徴が確認され、発病指数が0.20~1.40、発病度が5~35であった(第2表、第3図)。接種7日後以降、抵抗性および耐病性4品種・系統は感染の進行が緩やかであり、接種28日後のDover、農2号、TS4およびTS2の平均発病指数は0.40~2.00、発病度は10~50であった(第2表、第3図)。これに対し、とちおとめおよび古都華は、日数の経過とともに病徴が進行していき、接種28日後の平均発病指数がそれぞれ3.40および3.80、発病度がそれぞれ85および95、枯死株率がともに80%であった(第2表、第3図および第3表)。抵抗性および耐病性4品種・系統と罹病性2品種を比較した結果、接種分生子濃度 $1 \times 10^5$ 個/mL、栽培温度 $25^\circ\text{C}$ の条件では、接種28日後においてとちおとめおよび古都華に対し、Doverは平均発病指数が有意に低かった(第2表)。

第2表 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の発病指数の変化(接種分生子濃度および栽培温度比較)

接種分生子濃度	栽培温度	品種・系統	抵抗性・耐病性/ 罹病性	発病指数 <sup>1)</sup>				
				接種7日後	接種14日後	接種21日後	接種28日後	
$1 \times 10^4$ 個/mL	$25^\circ\text{C}$	農2号	抵抗性	0.00	a <sup>3)</sup> 0.00	a 0.00	a 0.00	a 0.00
		Dover	抵抗性	0.00	a 0.00	a 0.60±0.54	a 0.60±0.54	a 0.60±0.54
		TS2	耐病性	0.40±0.22 <sup>2)</sup>	a 0.60±0.36	a 0.80±0.44	a 0.80±0.44	a 0.80±0.44
		TS4	耐病性	0.00	a 0.00	a 0.00	a 0.00	a 0.00
		とちおとめ	罹病性	0.2±0.18	a 0.60±0.54	a 1.40±0.78	a 1.40±0.78	a 1.40±0.78
		古都華	罹病性	1.0±0.28	a 1.6±0.36	a 1.60±0.36	a 1.60±0.36	a 1.60±0.36
$1 \times 10^5$ 個/mL	$25^\circ\text{C}$	農2号	抵抗性	0.20±0.18	b 0.40±0.22	ab 0.80±0.52	ab 1.00±0.69	ab 1.00±0.69
		Dover	抵抗性	0.20±0.18	b 0.20±0.18	b 0.40±0.22	b 0.40±0.22	b 0.40±0.22
		TS2	耐病性	1.00±0.00	ab 1.00±0.00	ab 2.00±0.00	ab 2.00±0.00	ab 2.00±0.00
		TS4	耐病性	0.60±0.22	ab 0.60±0.22	ab 0.80±0.33	ab 1.00±0.49	ab 1.00±0.49
		とちおとめ	罹病性	1.00±0.00	ab 2.40±0.61	a 2.80±0.52	ab 3.40±0.54	a 3.40±0.54
		古都華	罹病性	1.40±0.22	a 2.00±0.28	ab 3.00±0.40	a 3.80±0.18	a 3.80±0.18
$1 \times 10^5$ 個/mL	$28^\circ\text{C}$	農2号	抵抗性	1.00±0.00	b 2.80±0.52	a 3.20±0.44	a 3.20±0.44	a 3.20±0.44
		Dover	抵抗性	1.00±0.00	b 1.60±0.36	a 2.20±0.66	a 2.20±0.66	a 2.20±0.66
		TS2	耐病性	2.00±0.00	a 2.60±0.22	a 3.80±0.18	a 3.80±0.18	a 3.80±0.18
		TS4	耐病性	1.20±0.18	b 1.80±0.18	a 2.80±0.33	a 2.80±0.33	a 2.80±0.33
		とちおとめ	罹病性	2.00±0.00	a 2.80±0.44	a 3.40±0.36	a 3.40±0.36	a 3.40±0.36
		古都華	罹病性	2.00±0.00	a 3.00±0.28	a 3.80±0.18	a 3.80±0.18	a 3.80±0.18
分散分析 <sup>4)</sup>		分生子濃度	(A)	**	**	**	**	**
		栽培温度	(B)	**	**	**	**	**
		品種	(C)	**	**	**	**	**
		(A)×(C)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
		(B)×(C)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

1) 発病指数は、5段階(0:発病なし、1:斑点型病斑の形成、2:葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成、3:萎凋またはクラウン部褐変、4:枯死)で評価した

2) 数値は平均値±標準誤差(n=5)を示す

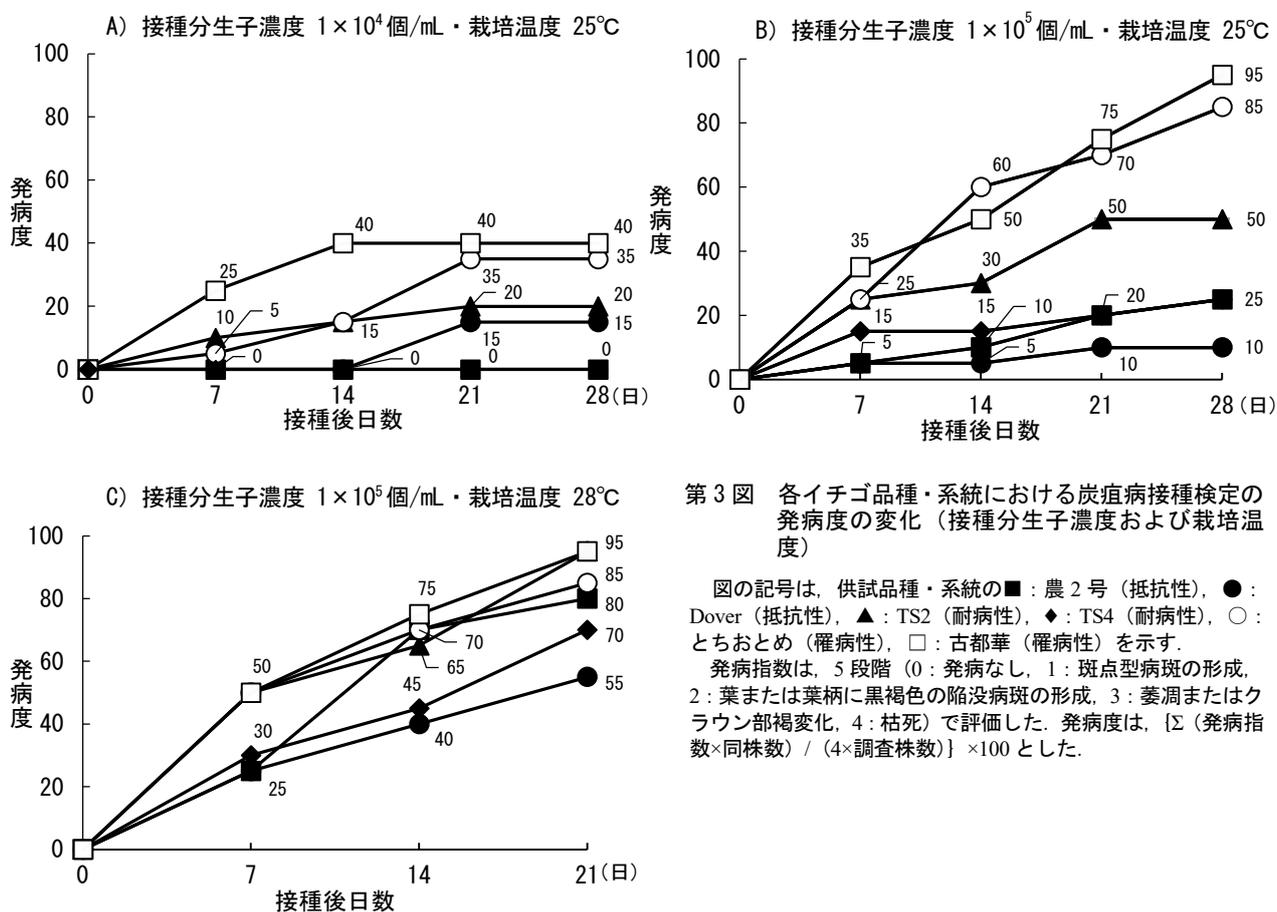
3) 同一接種分生子濃度または同一栽培温度の異英文字間には、Tukeyの多重検定により5%水準で有意差あり

4) 分散分析の\*\*は1%水準で有意差あり、n.s.は有意差なし

第3表 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の枯死株率の変化（接種分生子濃度および栽培温度比較）

接種分生子濃度	栽培温度	品種・系統	抵抗性・耐病性/ 罹病性	枯死株率(%)			
				接種7日後	接種14日後	接種21日後	接種28日後
1×10 <sup>4</sup> 個/mL	25℃	農2号	抵抗性	0	0	0	0
		Dover	抵抗性	0	0	0	0
		TS2	耐病性	0	0	0	0
		TS4	耐病性	0	0	0	0
		とちおとめ	罹病性	0	0	20	20
		古都華	罹病性	0	0	0	0
1×10 <sup>5</sup> 個/mL	25℃	農2号	抵抗性	0	0	0	20
		Dover	抵抗性	0	0	0	0
		TS2	耐病性	0	0	0	0
		TS4	耐病性	0	0	0	0
		とちおとめ	罹病性	0	40	40	80
		古都華	罹病性	0	0	40	80
1×10 <sup>5</sup> 個/mL	28℃	農2号	抵抗性	0	40	60	
		Dover	抵抗性	0	0	40	
		TS2	耐病性	0	0	80	
		TS4	耐病性	0	0	20	
		とちおとめ	罹病性	0	40	60	
		古都華	罹病性	0	20	80	

1) 枯死株率は、枯死株数/供試株数×100とした  
2) 網掛けは、枯死株率が60%を超えていることを示す



第3図 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の発病度の変化（接種分生子濃度および栽培温度）

図の記号は、供試品種・系統の■：農2号（抵抗性）、●：Dover（抵抗性）、▲：TS2（耐病性）、◆：TS4（耐病性）、○：とちおとめ（罹病性）、□：古都華（罹病性）を示す。  
発病指数は、5段階（0：発病なし、1：斑点型病斑の形成、2：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成、3：萎凋またはクラウン部褐変、4：枯死）で評価した。発病度は、 $\{\sum(\text{発病指数} \times \text{同株数}) / (4 \times \text{調査株数})\} \times 100$ とした。

## 2. 栽培温度が発病に及ぼす影響の検討

より短期間で耐病性が評価可能か検討するため、馴化した培養苗を人工気象器に移動後、栽培温度を 25℃または 28℃として発病を比較した。その結果、全調査日において栽培温度間に 1%水準で有意差が認められた(第 2 表)。

栽培温度を 25℃とした場合は、「2. 接種分生子濃度の検討」に記載のとおり、抵抗性および耐病性品種の病徴の進行は緩やかであった。また、接種 28 日後においては、罹病性品種より抵抗性品種の Dover の平均発病指数が有意に低かった(第 2 表)。

一方、栽培温度を 28℃とした場合は、接種 7 日後にすべての供試品種・系統で発病が認められ、農 2 号、Dover および TS4 の平均発病指数は 1.00~1.20、発病度は 25~30 であり、とちおとめおよび古都華より有意に低かった(第 2 表、第 3 図)。しかし、日数の経過とともに供試した全品種で感染の進行が見られ、接種 14 日後には農 2 号は発病度が 70、枯死株率が 40%となった(第 3 図、第 3 表)。接種 14 日後以降、抵抗性および耐病性品種・系統と罹病性品種間で平均発病指数に有意差は認められなかった(第 2 表)。

## 3. 発病評価方法の検討

感染初期の病徴をより詳細に評価するため、接種 4 日後から接種 18 日後まで 2~3 日間隔で 5 段階指数および 6 段階指数による発病調査を行い、比較した。その結果、接種 4 日後を除く調査日において発病評価区分間に 1%水準で有意差が認められた(第 4 表)。また、接種 18 日後において、農 2 号および Dover は枯死株率が 0、発病度が 5 段階指数では 25、6 段階指数では 20 であったのに対し、古都華およびとちおとめは枯死株率がそれぞれ 100 および 80、発病度が 5 段階指数では 100 および 90、6 段階指数では 100 および 88 であった(第 5 表、第 4 図)。また、接種 18 日後における平均発病指数は、6 段階評価の場合、農 2 号および Dover が 1.00、とちおとめおよび古都華がそれぞれ 4.40 と 5.00 であり、有意差が認められた(第 4 表)。かおり野、TS2 および TS4 については、他の抵抗性および罹病性品種と差はなく、中間の値を示した(第 4 表)。一方、5 段階評価における平均発病指数では、接種 14 日以降、TS4 は農 2 号および Dover と比較して発病指数が有意に高く、罹病性 2 品種とは有意差が認められなかった(第 4 表)。

第 4 表 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の発病指数の変化(発病指数区分比較)

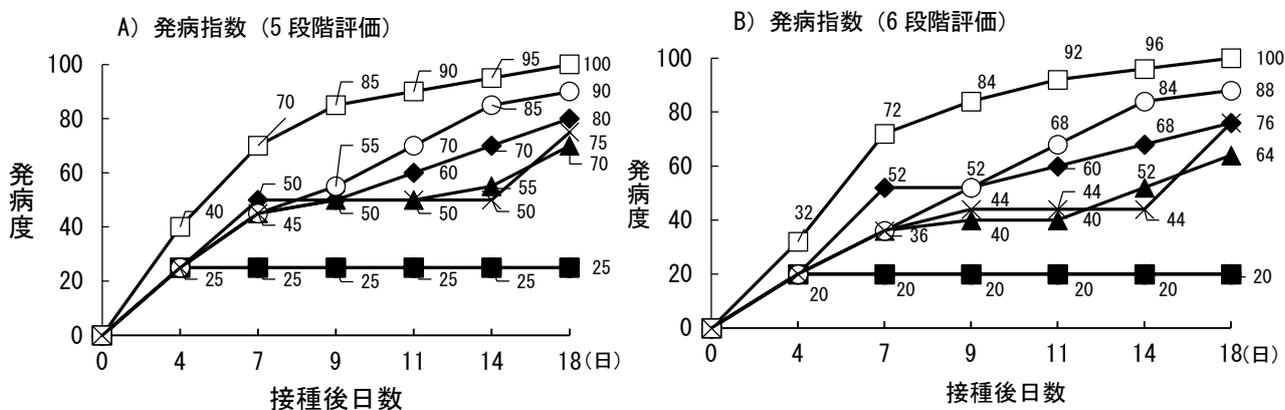
発病指数区分	品種・系統	抵抗性・耐病性/ 罹病性	発病指数 <sup>1)</sup>							
			接種4日後	接種7日後	接種9日後	接種11日後	接種14日後	接種18日後		
5段階指数	農2号	抵抗性	1.00±0.00 <sup>2)</sup>	1.00±0.00 <sup>3)</sup>	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	Dover	抵抗性	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	かおり野	抵抗性	1.00±0.00	1.80±0.18	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	3.00±0.28	3.00±0.28	3.00±0.28
	TS2	耐病性	1.00±0.00	1.80±0.18	2.00±0.00	2.00±0.00	2.20±0.18	2.80±0.44	2.80±0.44	2.80±0.44
	TS4	耐病性	1.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.40±0.22	2.80±0.44	3.20±0.44	3.20±0.44	3.20±0.44
	とちおとめ	罹病性	1.00±0.00	1.80±0.18	2.20±0.18	2.80±0.33	3.40±0.36	3.60±0.36	3.60±0.36	3.60±0.36
	古都華	罹病性	1.60±0.22	2.80±0.33	3.40±0.36	3.60±0.36	3.80±0.18	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00
6段階指数	農2号	抵抗性	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	Dover	抵抗性	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	かおり野	抵抗性	1.00±0.00	1.80±0.18	2.20±0.18	2.20±0.18	2.20±0.18	3.80±0.44	3.80±0.44	3.80±0.44
	TS2	耐病性	1.00±0.00	1.80±0.18	2.00±0.00	2.00±0.00	2.60±0.36	3.20±0.66	3.20±0.66	3.20±0.66
	TS4	耐病性	1.00±0.00	2.60±0.22	2.60±0.22	3.00±0.40	3.40±0.61	3.80±0.66	3.80±0.66	3.80±0.66
	とちおとめ	罹病性	1.00±0.00	1.80±0.18	2.60±0.36	3.40±0.54	4.20±0.52	4.40±0.54	4.40±0.54	4.40±0.54
	古都華	罹病性	1.60±0.22	3.60±0.46	4.20±0.52	4.60±0.36	4.80±0.18	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
発病指数区分 (A)			n.s.	**	**	**	**	**	**	
分散分析 <sup>4)</sup> 品種 (B)			**	**	**	**	**	**	**	
(A)×(B)			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

- 1) 発病指数は、5 段階 (0: 発病なし, 1: 斑点型病斑の形成, 2: 葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成, 3: 萎凋またはクラウン部褐変, 4: 枯死), 6 段階 (0: 発病なし, 1: 斑点型病斑の形成, 2: 葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成 (展開葉枚数の半分未満), 3: 葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成 (展開葉枚数の半分以上), 4: 萎凋またはクラウン部褐変, 5: 枯死) で評価した
- 2) 数値は平均値±標準誤差 (n=5) を示す
- 3) 同一発病指数区分の異なる文字間には Tukey の多重検定により 5%水準で有意差あり
- 4) 分散分析の\*\*は 1%水準で有意差あり, n.s.は有意差なし

第5表 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の枯死株率の変化（発病指数区分比較）

品種・系統	抵抗性・耐病性/ 罹病性	枯死株率(%)					
		接種4日後	接種7日後	接種9日後	接種11日後	接種14日後	接種18日後
農2号	抵抗性	0	0	0	0	0	0
Dover	抵抗性	0	0	0	0	0	0
かおり野	抵抗性	0	0	0	0	0	20
TS2	耐病性	0	0	0	0	0	40
TS4	耐病性	0	0	0	0	40	60
とちおとめ	罹病性	0	0	0	20	60	80
古都華	罹病性	0	20	60	80	80	100

- 1) 枯死株率は、枯死株数/供試株数×100とした
- 2) 網掛けは、枯死株率が60%を超えていることを示す



第4図 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の発病度の変化（発病指数区分）

図の記号は、供試品種・系統の■：農2号（抵抗性）、●：Dover（抵抗性）、×：かおり野（抵抗性）、▲：TS2（耐病性）、◆：TS4（耐病性）、○：とちおとめ（罹病性）、□：古都華（罹病性）を示す。

発病指数は、5段階（0：発病なし、1：斑点型病斑の形成、2：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成、3：萎凋またはクラウン部褐変、4：枯死）、6段階（0：発病なし、1：斑点型病斑の形成、2：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成（展開葉枚数の半分未満）、3：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成（展開葉枚数の半分以上）、4：萎凋またはクラウン部褐変、5：枯死）で評価した。発病度は、5段階評価が  $\frac{\sum (\text{発病指数} \times \text{同株数})}{(4 \times \text{調査株数})} \times 100$ 、6段階評価が  $\frac{\sum (\text{発病指数} \times \text{同株数})}{(5 \times \text{調査株数})} \times 100$  とした。

#### 4. 栽植密度の検討

多検体の供試材料に対し安定した耐病性評価を行うため、1バット当たりの株数を35株（縦1穴および横1列空き）または70株（縦横1穴空き）として比較した。発病調査は、接種5日後から接種21日後まで2~3日間隔で行った。その結果、接種19日後では5%水準、そのほかの調査日では1%水準で栽植密度間に有意差が認められた（第6表）。

70株/バットとした場合、接種14日後以降、農2号、DoverおよびTS4と罹病性2品種間の発病指数に有意差が認められたが、かおり野およびTS2と罹病性2品種間に有意差は認められなかった（第6表）。かおり野およびTS2は、それぞれ接

種7日後と9日後から枯死株が見られ、接種21日後にはともに枯死株率が80%、発病度がそれぞれ96と88に達した（第7表、第5図）。

一方、35株/バットとした場合、接種16日後以降、農2号およびDoverと古都華の発病指数に品種間差が認められた（第6表）。調査最終日の接種21日後において、農2号、DoverおよびTS4は、枯死株率が0%、発病度が32~40であったのに対し、とちおとめおよび古都華は、枯死株率がそれぞれ60と80、発病度が88と96であった。（第7表、第5図）。かおり野およびTS2の発病度は、これら抵抗性品種および罹病性品種の発病度の中間的な値となった（第5図）。

第6表 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の発病指数の変化（栽植密度比較）

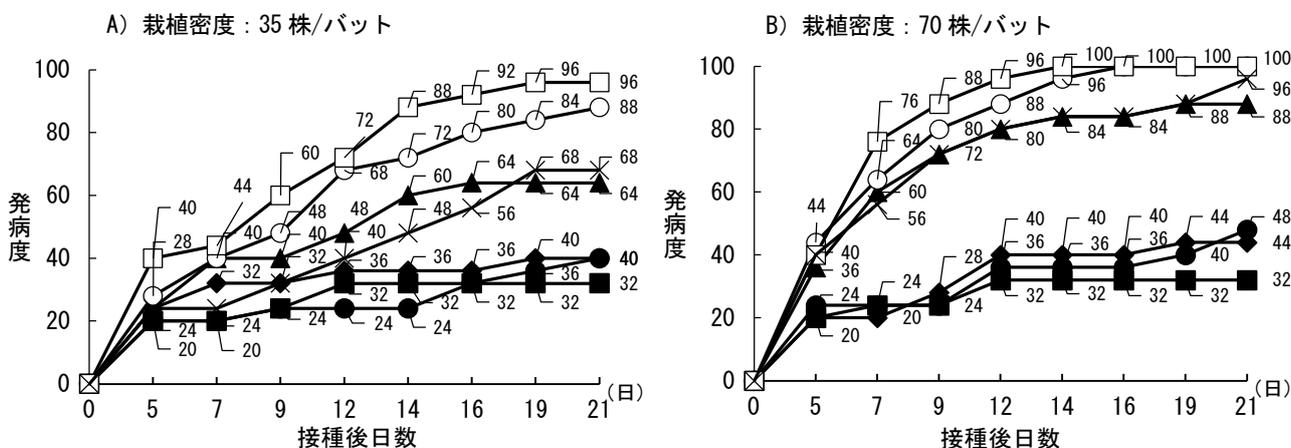
栽植密度	品種・系統	抵抗性・耐病性/ 罹病性	発病指数 <sup>1)</sup>							
			接種5日後	接種7日後	接種9日後	接種12日後	接種14日後	接種16日後	接種19日後	接種21日後
35株/バット	農2号	抵抗性	1.00±0.00 <sup>a)</sup>	1.00±0.00 <sup>b)</sup>	1.20±0.18 <sup>b)</sup>	1.60±0.22 <sup>ab)</sup>	1.60±0.22 <sup>ab)</sup>	1.60±0.22 <sup>b)</sup>	1.60±0.22 <sup>b)</sup>	1.60±0.22 <sup>c)</sup>
	Dover	抵抗性	1.00±0.00 <sup>a)</sup>	1.00±0.00 <sup>b)</sup>	1.20±0.18 <sup>b)</sup>	1.20±0.18 <sup>b)</sup>	1.20±0.18 <sup>b)</sup>	1.60±0.22 <sup>b)</sup>	1.80±0.18 <sup>b)</sup>	2.00±0.00 <sup>c)</sup>
	かおり野	抵抗性	1.20±0.18 <sup>a)</sup>	1.20±0.18 <sup>ab)</sup>	1.60±0.22 <sup>ab)</sup>	2.00±0.28 <sup>ab)</sup>	2.40±0.46 <sup>ab)</sup>	2.60±0.54 <sup>ab)</sup>	3.40±0.54 <sup>ab)</sup>	3.40±0.54 <sup>abc)</sup>
	TS2	耐病性	1.40±0.22 <sup>a)</sup>	2.00±0.00 <sup>ab)</sup>	2.00±0.00 <sup>ab)</sup>	2.40±0.22 <sup>ab)</sup>	3.00±0.57 <sup>ab)</sup>	3.20±0.66 <sup>ab)</sup>	3.20±0.66 <sup>ab)</sup>	3.20±0.66 <sup>abc)</sup>
	TS4	耐病性	1.20±0.18 <sup>a)</sup>	1.60±0.22 <sup>ab)</sup>	1.60±0.22 <sup>ab)</sup>	1.80±0.18 <sup>ab)</sup>	1.80±0.18 <sup>ab)</sup>	1.80±0.18 <sup>ab)</sup>	2.00±0.00 <sup>b)</sup>	2.00±0.00 <sup>bc)</sup>
	とちおとめ	罹病性	1.40±0.22 <sup>a)</sup>	2.00±0.28 <sup>ab)</sup>	2.40±0.46 <sup>ab)</sup>	3.40±0.54 <sup>ab)</sup>	3.60±0.61 <sup>ab)</sup>	4.00±0.57 <sup>ab)</sup>	4.20±0.44 <sup>ab)</sup>	4.40±0.36 <sup>ab)</sup>
	古都華	罹病性	2.00±0.00 <sup>a)</sup>	2.20±0.18 <sup>a)</sup>	3.00±0.28 <sup>a)</sup>	3.60±0.36 <sup>a)</sup>	4.40±0.36 <sup>a)</sup>	4.60±0.22 <sup>a)</sup>	4.80±0.18 <sup>a)</sup>	4.80±0.18 <sup>a)</sup>
70株/バット	農2号	抵抗性	1.00±0.00 <sup>b)</sup>	1.20±0.18 <sup>b)</sup>	1.20±0.18 <sup>b)</sup>	1.60±0.22 <sup>c)</sup>	1.60±0.22 <sup>b)</sup>	1.60±0.22 <sup>b)</sup>	1.60±0.22 <sup>b)</sup>	1.60±0.22 <sup>b)</sup>
	Dover	抵抗性	1.20±0.18 <sup>b)</sup>	1.20±0.18 <sup>b)</sup>	1.20±0.18 <sup>b)</sup>	1.80±0.18 <sup>c)</sup>	1.80±0.18 <sup>b)</sup>	1.80±0.18 <sup>b)</sup>	2.00±0.28 <sup>b)</sup>	2.40±0.36 <sup>b)</sup>
	かおり野	抵抗性	2.00±0.28 <sup>ab)</sup>	2.80±0.59 <sup>ab)</sup>	3.60±0.61 <sup>ab)</sup>	4.00±0.57 <sup>abc)</sup>	4.20±0.52 <sup>a)</sup>	4.20±0.52 <sup>a)</sup>	4.40±0.36 <sup>a)</sup>	4.80±0.18 <sup>a)</sup>
	TS2	耐病性	1.80±0.18 <sup>ab)</sup>	3.00±0.28 <sup>ab)</sup>	3.60±0.46 <sup>ab)</sup>	4.00±0.57 <sup>abc)</sup>	4.20±0.52 <sup>a)</sup>	4.20±0.52 <sup>a)</sup>	4.40±0.54 <sup>a)</sup>	4.40±0.54 <sup>a)</sup>
	TS4	耐病性	1.00±0.00 <sup>bc)</sup>	1.40±0.22 <sup>ab)</sup>	1.40±0.22 <sup>ab)</sup>	2.00±0.00 <sup>bc)</sup>	2.00±0.00 <sup>b)</sup>	2.00±0.00 <sup>b)</sup>	2.20±0.18 <sup>b)</sup>	2.20±0.18 <sup>b)</sup>
	とちおとめ	罹病性	2.20±0.18 <sup>a)</sup>	3.20±0.52 <sup>ab)</sup>	4.00±0.49 <sup>ab)</sup>	4.40±0.36 <sup>ab)</sup>	4.80±0.18 <sup>a)</sup>	5.00±0.00 <sup>a)</sup>	5.00±0.00 <sup>a)</sup>	5.00±0.00 <sup>a)</sup>
	古都華	罹病性	2.00±0.00 <sup>ab)</sup>	3.80±0.18 <sup>a)</sup>	4.40±0.36 <sup>a)</sup>	4.80±0.18 <sup>a)</sup>	5.00±0.00 <sup>a)</sup>	5.00±0.00 <sup>a)</sup>	5.00±0.00 <sup>a)</sup>	5.00±0.00 <sup>a)</sup>
分散分析 <sup>4)</sup>	栽植密度区分 (A)		**	**	**	**	**	**	*	**
	品種 (B)		**	**	**	**	**	**	**	**
	(A) × (B)		*	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

- 1) 発病指数は、6段階（0：発病なし、1：斑点型病斑の形成、2：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成（展開葉枚数の半分未満）、3：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成（展開葉枚数の半分以上）、4：萎凋またはクラウン部褐変、5：枯死）で評価した
- 2) 数値は平均値±標準誤差（n=5）を示す
- 3) 同一栽植密度区における異なる品種間、Tukeyの多重検定により5%水準で有意差あり
- 4) 分散分析の\*\*は1%水準で有意差あり、\*は5%水準で有意差あり、n.s.は有意差なし

第7表 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の枯死株率の変化（栽植密度比較）

栽植密度	品種・系統	抵抗性・耐病性/ 罹病性	枯死株率(%)							
			接種5日後	接種7日後	接種9日後	接種12日後	接種14日後	接種16日後	接種19日後	接種21日後
35株/バット	農2号	抵抗性	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dover	抵抗性	0	0	0	0	0	0	0	0
	かおり野	抵抗性	0	0	0	0	0	0	20	20
	TS2	耐病性	0	0	0	0	20	40	40	40
	TS4	耐病性	0	0	0	0	0	0	0	0
	とちおとめ	罹病性	0	0	0	20	40	60	60	60
	古都華	罹病性	0	0	0	20	60	60	80	80
70株/バット	農2号	抵抗性	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dover	抵抗性	0	0	0	0	0	0	0	0
	かおり野	抵抗性	0	20	40	60	60	60	60	80
	TS2	耐病性	0	0	20	60	60	60	80	80
	TS4	耐病性	0	0	0	0	0	0	0	0
	とちおとめ	罹病性	0	20	40	60	80	100	100	100
	古都華	罹病性	0	0	60	80	100	100	100	100

- 1) 枯死株率は、枯死株数/供試株数×100とした
- 2) 網掛けは、枯死株率が60%を超えていることを示す



第5図 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の発病度の変化（栽植密度）

図の記号は、供試品種・系統の■：農2号（抵抗性）、●：Dover（抵抗性）、×：かおり野（抵抗性）、▲：TS2（耐病性）、◆：TS4（耐病性）、○：とちおとめ（罹病性）、□：古都華（罹病性）を示す。

発病指数は、6段階（0：発病なし、1：斑点型病斑の形成、2：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成（展開葉枚数の半分未満）、3：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成（展開葉枚数の半分以上）、4：萎凋またはクラウン部褐変、5：枯死）で評価した。発病度は、 $\frac{\sum(\text{発病指数} \times \text{同株数})}{(5 \times \text{調査株数})} \times 100$ とした。

### 5. 再現性の確認

1~4の検討結果をもとに、接種分生子濃度を $1 \times 10^5$ 個/mL、栽培温度を25°C、発病評価を6段階指数、栽植密度35株/バットとし、再現性の確認を行った。発病調査は、接種4日後から28日後まで2~3日間隔で実施した。

接種7日後以降、抵抗性品種(農2号, Dover)と罹病性品種(とちおとめ, 古都華, T36)の発病指数に品種間差が認められた(第8表)。また、接種14日後における枯死株率は、罹病性品種が40%~100%であったのに対し、抵抗性品種および耐病性系統は0%であった(第9表, 第6図)。かおり野およびTS4に枯死株が見られたのはそれぞれ接種23日後と25日後であり、農2号およびDoverは調査期間中に枯死する株はなかった(第9表, 第6図)。さらに、接種14日後における発病度は、罹病性品種が72~100であったのに対し、抵抗性品

種および耐病性系統は20~44であり、罹病性と抵抗性・耐病性を判別可能であった(第8表, 第7図)。接種21日後以降は、各品種・系統で感染の進行が停滞した(第8表, 第9表, 第6図, 第7図)。

本データと同様の条件である「4. 栽植密度の検討」の35株/バットのデータでは、接種14日後の枯死株率は罹病性品種が40~60%、抵抗性品種および耐病性系統が0~20%であった。また、発病度は罹病性品種が72~88、抵抗性品種および耐病性系統が24~60であり、枯死株率、発病度ともに本データと同等の結果であった(第7表, 第5図A)。接種21日後においても両データは枯死株率、発病度ともに同等の値をとっており、本条件下において、安定して接種14日~21日後に耐病性の強弱が判定可能であることが示された。

第8表 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の発病指数の変化(再現性試験)

品種・系統	抵抗性・耐病性/ 罹病性	発病指数 <sup>1)</sup>										
		接種4日後	接種7日後	接種9日後	接種11日後	接種14日後	接種16日後	接種18日後	接種21日後	接種23日後	接種25日後	接種28日後
農2号	抵抗性	1.00±0.00 <sup>2)</sup> <sub>b</sub>	1.00±0.00 <sub>b</sub>	1.00±0.00 <sub>c</sub>	1.00±0.00 <sub>d</sub>	1.00±0.00 <sub>c</sub>	1.00±0.00 <sub>b</sub>	1.00±0.00 <sub>c</sub>	1.00±0.00 <sub>c</sub>	1.00±0.00 <sub>c</sub>	1.20±0.18 <sub>b</sub>	1.40±0.22 <sub>b</sub>
Dover	抵抗性	1.00±0.00 <sub>b</sub>	1.00±0.00 <sub>b</sub>	1.00±0.00 <sub>c</sub>	1.00±0.00 <sub>d</sub>	1.00±0.00 <sub>c</sub>	1.00±0.00 <sub>b</sub>	1.40±0.22 <sub>c</sub>	1.40±0.22 <sub>c</sub>	1.40±0.22 <sub>c</sub>	1.40±0.22 <sub>b</sub>	1.60±0.22 <sub>b</sub>
かおり野	抵抗性	1.00±0.00 <sub>b</sub>	2.00±0.00 <sub>ab</sub>	2.00±0.00 <sub>bc</sub>	2.00±0.00 <sub>cd</sub>	2.20±0.18 <sub>bc</sub>	2.20±0.18 <sub>b</sub>	2.20±0.18 <sub>bc</sub>	2.60±0.36 <sub>c</sub>	2.80±0.52 <sub>bc</sub>	2.80±0.52 <sub>ab</sub>	2.80±0.52 <sub>ab</sub>
TS4	耐病性	1.00±0.00 <sub>b</sub>	1.00±0.00 <sub>b</sub>	1.00±0.00 <sub>c</sub>	1.60±0.22 <sub>d</sub>	1.80±0.18 <sub>c</sub>	2.00±0.00 <sub>b</sub>	2.20±0.18 <sub>bc</sub>	2.80±0.33 <sub>bc</sub>	2.80±0.33 <sub>bc</sub>	3.00±0.49 <sub>ab</sub>	3.00±0.49 <sub>ab</sub>
とちおとめ	罹病性	1.20±0.18 <sub>b</sub>	2.20±0.44 <sub>a</sub>	2.40±0.46 <sub>b</sub>	2.80±0.33 <sub>bc</sub>	3.60±0.54 <sub>ab</sub>	3.80±0.44 <sub>a</sub>	3.80±0.44 <sub>ab</sub>	4.40±0.36 <sub>ab</sub>	4.40±0.36 <sub>ab</sub>	4.40±0.36 <sub>a</sub>	4.60±0.36 <sub>a</sub>
古都華	罹病性	1.40±0.22 <sub>ab</sub>	3.00±0.00 <sub>a</sub>	4.20±0.18 <sub>a</sub>	4.80±0.18 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>
T36	罹病性	2.00±0.00 <sub>a</sub>	3.00±0.00 <sub>a</sub>	3.20±0.18 <sub>ab</sub>	3.80±0.18 <sub>ab</sub>	4.60±0.36 <sub>ab</sub>	4.60±0.36 <sub>a</sub>	4.60±0.36 <sub>a</sub>	4.80±0.18 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>	5.00±0.00 <sub>a</sub>
分散分析 <sup>4)</sup> (品種・系統間)		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

- 1) 発病指数は、6段階(0:発病なし, 1:斑点型病斑の形成, 2:葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成(展開葉枚数の半分未満), 3:葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成(展開葉枚数の半分以上), 4:萎凋またはクラウン部褐変, 5:枯死)とした
- 2) 数値は平均値±標準誤差(n=5)を示す
- 3) 異英文字間にはTukeyの多重検定により5%水準で有意差あり
- 4) 分散分析の\*\*は1%水準で有意差あり

第9表 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の枯死率の変化(再現性試験)

品種・系統	抵抗性・耐病性/ 罹病性	枯死株率(%)										
		接種4日後	接種7日後	接種9日後	接種11日後	接種14日後	接種16日後	接種18日後	接種21日後	接種23日後	接種25日後	接種28日後
農2号	抵抗性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dover	抵抗性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
かおり野	抵抗性	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20
TS4	耐病性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20
とちおとめ	罹病性	0	0	0	0	40	40	40	60	60	60	80
古都華	罹病性	0	0	20	80	100	100	100	100	100	100	100
T36	罹病性	0	0	0	0	80	80	80	80	100	100	100

- 1) 枯死株率は、枯死株数/供試株数×100とした
- 2) 網掛けは、枯死株率が60%を超えていることを示す

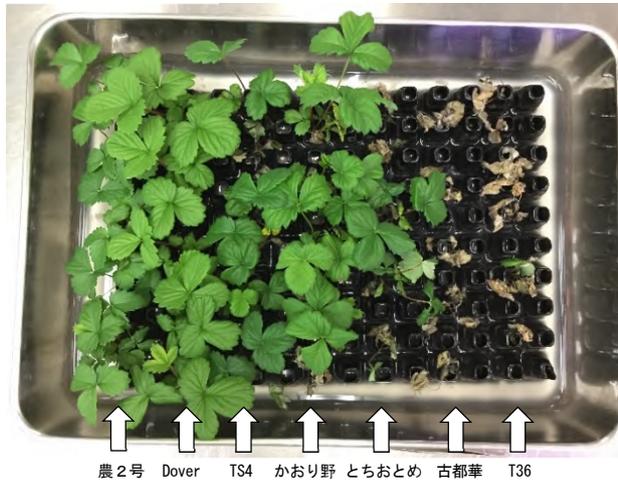
A) 接種7日後



B) 接種14日後



C) 接種21日後

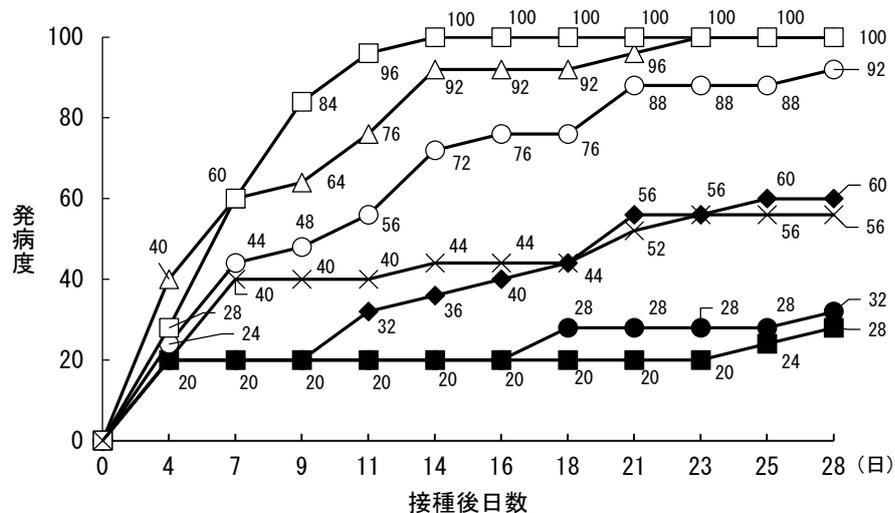


D) 接種28日後



第6図 各イチゴ品種・系統における培養苗を用いた炭疽病接種検定の発病の様子（再現性試験）

品種・系統は、写真の矢印が示すとおり左から農2号（抵抗性）、Dover（抵抗性）、TS4（耐病性）、かおり野（抵抗性）、とちおとめ（罹病性）、古都華（罹病性）およびT36（罹病性）。写真は接種7日後、14日後、21日後、28日後の発病調査時に撮影した。



第7図 各イチゴ品種・系統における炭疽病接種検定の枯死株率および発病度の変化（再現性試験）

図の記号は、供試品種・系統の■：農2号（抵抗性）、●：Dover（抵抗性）、×：かおり野（抵抗性）、◆：TS4（耐病性）、○：とちおとめ（罹病性）、□：古都華（罹病性）、△：T36（罹病性）を示す。

発病指数は、6段階（0：発病なし、1：斑点型病斑の形成、2：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成（展開葉枚数の半分未満）、3：葉または葉柄に黒褐色の陥没病斑の形成（展開葉枚数の半分未満）、4：萎凋またはクラウン部褐変、5：枯死）で評価した。発病度は、 $\{\sum(\text{発病指数} \times \text{同株数}) / (5 \times \text{調査株数})\} \times 100$ とした。

#### IV 考察

*C. fructicola* によって引き起こされるイチゴ炭疽病は、イチゴ生産における重要病害の1つである。抵抗性・耐病性検定は、通常、ランナー苗を用いた隔離温室内での検定となり、検定材料の親株養成、ランナーの採苗と育苗に加え、栽培ほ場の確保と育苗作業の労力が必要となる。また、検定期間となる夏季の環境要因によっても発病が大きく左右される。炭疽病耐病性 DNA マーカーを開発するためには、時期や環境要因に左右されず、年次変動のない安定的な耐病性評価を実施する必要がある。そこで、省スペースで大量の植物体管理ができ、均一な植物体を確保できる培養苗を供試材料とし、人工気象器内で耐病性検定を行うこととした。また、栽培管理は、培土への植え付けが不要な水耕栽培とした。イチゴにおける培養苗と水耕栽培による耐病性検定手法は、炭疽病と萎黄病で報告がある(飯村ら, 2012; 飯村ら, 2021)。本研究では、ゲノムワイドな解析手法を用いた炭疽病耐病性因子の解明を可能とするため、飯村ら(2012)の接種検定試験をより高精度な検定手法とすることを旨とした。具体的には、抵抗性および耐病性程度の異なるイチゴ品種・系統を用いて接種分生子濃度、栽培温度、発病評価方法および栽植密度の検討を行い、イチゴ炭疽病耐病性評価に最適な検定条件を明らかにした。

接種分生子濃度の検討は、 $1 \times 10^4$ 個/mL および  $1 \times 10^5$ 個/mL で実施した。平島ら(2015)は、培土に馴化した培養苗を抵抗性評価に用いた場合、接種分生子濃度  $1 \times 10^4$ 個/mL で品種間差が明確となり、抵抗性の識別に適していると報告している。しかしながら、本研究では接種分生子濃度を  $1 \times 10^4$ 個/mL とした場合、罹病性品種の枯死株率が 0~20%にとどまり(第3表)、明らかに感染の進行が抑えられた。これは、平島ら(2015)と本研究では供試菌株や接種条件、栽培様式が異なることが要因として考えられる。本研究で用いた水耕栽培による耐病性評価では、接種分生子濃度  $1 \times 10^5$ 個/mL が適当であると考えられた。一方、品種と接種分生子濃度との間には有意な交互作用は認められなかったが、このことは片山ら(2008)の報告と一致した。

栽培温度が発病に与える影響を検討するため、25°Cと28°Cで比較した。栽培温度28°Cでは、接種14日後以降、抵抗性品種および耐病性系統の発病度が急激に高くなり、罹病性品種と同程度となった(第3図)。*C. fructicola* 菌糸の最適生育温度は28°Cであるため(石川, 2005)、栽培温度28°Cでは抵抗性品種であっても発病が抑えきれず、枯死株が多くなったと考えられる。既報においても、ランナー苗に接種後、温度条件が高いほど病斑の進行が早いことや実生幼苗に接種後、処理温度が高いほど枯死株率が急激に増加することが報告されており(片山ら, 2008; 森, 1998)、本研究の結果はこれらと一致する。よって、耐病性評価としての栽培温度は25°Cが適していると考え

えられた。

発病評価は当初5段階で行っていたが、発病指数2に分類される表現型が抵抗性品種と耐病性系統間で大きく異なることから、発病評価の見直しを行った。同一株を用いて5段階指数および6段階指数で発病評価した結果、同様の傾向を示したが、6段階指数でわずかに発病度が低くなった。また、TS2とTS4の発病度を比較すると(第4図)、6段階評価の方がより中間的な発病を高精度に評価できると考えられた。さらに、発病調査の観察では、1本の葉柄のみで葉柄折損や陥没病斑が認められる株は感染の進行が停滞するが多いのに対し、複数葉柄でそれらの症状が認められる株は、枯死に至る傾向が見られた。耐病性分離集団を検定する際には、集団内の様々な個体の耐病性をより高精度に評価する必要がある。このことから、6段階指数での評価が有効であると考えられた。

耐病性分離集団を検定する際には、多検体の供試材料に対し安定した耐病性評価を行えるとともに、省スペースで検定できる必要がある。栽植密度は、縦1穴および横1列空き(35株/バット)または縦横1穴空き(70株/バット)とし、発病の推移を比較した。70株/バットでは抵抗性品種のかおり野や耐病性系統のTS2の発病度が罹病性品種と同程度で推移し(第5図)、耐病性と罹病性を正しく判別することができなかった。炭疽病の発病は、イチゴ株の濡れ時間と関係しており、濡れ時間が長いほど発病が激しくなる(石川, 2005)。本試験では70株/バットとした場合、接種時から各個体の葉身が重なっていたため、接種後の株の濡れ時間を長くした可能性がある。また、培養苗の生育状況により隣接株で葉の重なる個体と重ならない個体が混在し、正しい耐病性評価ができない可能性が考えられた。一方、栽植密度を35株/バットとした場合の接種21日後における発病度は、抵抗性品種および耐病性系統が32~68、罹病性品種が88~96であり(第5図A)、検体数は減るものの、35株/バットとすることで安定した耐病性評価が可能であると考えられた。そこで、同様の条件で再度接種試験を行ったところ、枯死株率および発病度ともに再現性のある結果が得られた(第9表, 第7図)。

本研究では、根の伸長を考慮し、接種前の馴化および栽培期間を9~14日とし、苗齢や馴化期間における比較試験は行っていない。苗齢における炭疽病発病の影響については、森(1998)が25連結ポットへ移植15日後の幼苗と移植37日後の成苗に対して接種試験を行った結果、幼苗は接種8~11日後に急激に病徴が進行したが、幼苗と成苗間の枯死株率は高い相関を示し、幼苗時においても苗を揃えることにより抵抗性を評価できることを報告している。また、培養苗の馴化期間については、Namai *et al.* (2013)が、抵抗性品種である農2号の培養苗を用いて培土への馴化後0日、3日、9日および15日に接種試験を行った結果、接種34日後の発病度が馴化後0

日で 90, 馴化後 15 日で 39.2 であり, 馴化期間が長いほど耐病性が向上することを報告している. 本研究では, 水耕栽培条件下であるが, 抵抗性品種の農 2 号および Dover の枯死株率は, 接種分生子濃度  $1 \times 10^5$  個/mL, 栽培温度 25°C, 栽植密度縦 1 穴および横 1 列空き (35 株/バット) の条件下では 0% であり, 信頼性の高い耐病性検定が可能であると考えられた (第 9 表). 一方, 耐病性系統の TS4 は, 馴化後の栽培期間により枯死株率が異なり, 馴化から接種までの栽培期間を 9 日間とした場合は, 接種 18 日後で 60%, 馴化から接種までの栽培期間を 12 日間とした場合は, 接種 18 日後で 0% であった (第 5 表, 第 9 表). このことから, 馴化後の栽培期間が発病に影響を与えていると推察されたため, 馴化後 12 日間以上とすることが必要であると考えられた.

本研究により, 接種分生子濃度を  $1 \times 10^5$  個/mL, 栽培温度を 25°C および栽植密度を縦 1 穴および横 1 列空き (35 株/バット) とすることで, 抵抗性品種および耐病性系統を枯死させることなく, 罹病性品種を枯死に至らせ, 接種 14~21 日後で精度の高い耐病性評価が可能となった. また, 培養苗を用いた本法では, 平島ら (2015) の報告と同様, 多検体の供試材料に対し, 安定した耐病性評価ができるだけでなく, 拮抗性作用を示すような微生物感染による影響も最小限にとどめることができる. また, 人工気象器を用いるため, 季節を問わず周年で耐病性検定が可能となる. 平島ら (2015) の報告では, 72 穴セルトレー利用時に約 243 株/m<sup>2</sup> の高密度で管理可能としているが, 本法も同等規模で検定可能であった.

本研究では, ランナー苗に対する接種比較試験は実施していない. しかし, 再現性確認試験において, 農 2 号および Dover は, 発病指数が 1 (斑点型病斑), 枯死株率が 0% であり (第 8 表, 第 9 表), ランナー苗を使用した石川 (2005) の報告と同様の結果であった (第 8 表, 第 9 表). かおり野は枯死株率が 20% であった (第 9 表), ランナー苗を用いた北村ら (2015) が枯死株率 0~20% と報告しており, ほぼ同様の結果であった (第 9 表). 一方, 再現性確認試験において古都華およびちちおとめは, 枯死株率がそれぞれ 100% と 80% であった (第 9 表). 西本ら (2010) および石原ら (1996) の報告における枯死株率は, それぞれ 83~70% と 54.5% であり, 本報告における検定方法の枯死株率の方が高い傾向にあった. これは, 実生苗と培養苗とで異なるが, 森ら (1998) と同様に幼苗を用いたことにより発病が進んだものと考えられる. TS2 および TS4 についても, 本農業総合センターのランナー苗による接種検定結果とほぼ一致している (データ未公表). これらのことから, 本法は, ランナー苗による接種試験と同等の精度の耐病性検定方法と考えられる.

本検定方法は, 気象状況に影響されず安定した, 省スペースで多検体の検定が可能であることから, 今後進められるであ

ろう炭疽病耐病性に関するゲノム情報解析に, 大きく貢献すると考えられる. 今後, 様々な炭疽病耐病性遺伝資源を用いた分離集団の耐病性評価に活用され, 耐病性ゲノム領域や耐病性遺伝子が同定や複数の耐病性遺伝子を集積した高度耐病性の品種・系統の作出が期待される.

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり, 栃木県農業総合研究センター生物工学研究室をはじめ関係者の方々には貴重なご助言, ご指導をいただいた. また, 生物工学研究室の技術員ならびに会計年度任用職員の皆様には, 供試材料の準備および管理等において多大なるご尽力をいただいた. ここに記して心から感謝の意を表する.

## 引用文献

- Anciro A., Mangandi J., Verma S., Peres N., Whitaker V. M. and Lee S. (2018) *FaRCgl*: a quantitative trait locus conferring resistance to *Colletotrichum* crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in octoploid strawberry. *Theor. Appl. Genet.* 131: 2167-2177.
- Edger P. P., Poorten T. J., VanBuren R., Hardigan M. A., Colle M., McKain M. R., Smith R. D., Teresi S. J., Nelson A. D. L., Wai C. M., Alger E. I., Bird K. A., Yocca A. E., Pumplun N., Ou S., Ben-Zvi G., Brodt A., Baruch K., Swale T., Shiue L., Acharya C. B., Cole G. S., Mower J. P., Childs K. L., Jiang N., Lyons E., Freeling M., Puzey J. R. and Knapp S. J. (2019) Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nat. Genet.* 51: 541-547.
- 榎 宏征・西村 哲・水藤百江・布目 司・野口裕司 (2017) イチゴ属植物の炭疽病抵抗性関連マーカーとその利用. 特許第 6253132 号.
- Hirakawa H., Shirasawa K., Kosugi S., Tashiro K., Nakayama S., Yamada M., Kohara M., Watanabe A., Kishida Y., Fujishiro T., Tsuruoka H., Minami C., Sasamoto S., Kato M., Nanri K., Komaki A., Yanagi S., Guoixin Q., Maeda F., Ishikawa M., Kuhara S., Sato S., Tabata S. and Isobe S. N. (2014) Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genomes of *Fragaria* species. *DNA Res.* 21: 169-181.
- 平島敬太・片山貴雄・石井貴明・柴戸靖志・三井寿一 (2015) イチゴ実生の組織培養苗を用いた効率的な炭疽病抵抗性評価法. *園学研* 14: 1-6.
- 本田藤雄 (1978) イチゴ新品種「てるのか」の育成. *農業技術* 33: 506-508.

- Howard C. M. and Albrechts E. E. (1980) 'Dover' strawberry. *HortScience* 15: 540.
- 飯村一成・田崎公久・中澤佳子・天谷正行(2012) QTL 解析によるイチゴ炭疽病耐病性遺伝子領域の検索. *育種学研究* 15: 90-97.
- 飯村一成・田崎公久・中澤佳子・森島正二・生井 潔・天谷正行(2021) イチゴ栽培種における萎黄病抵抗性 QTL の検索. *育種学研究* 23: 101-108.
- 石原良行・高野邦治・植木正明・栃木博美(1996) イチゴ新品種「とちおとめ」の育成. *栃木農試研報* 44:109-123.
- 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.
- 片山貴雄・末信真二・三井寿一・浜池勇次(2008) 噴霧接種を用いたイチゴ炭疽病抵抗性の評価方法. *福岡農総試研報* 27: 39-43.
- 北村八祥・森 利樹・小堀 純・山田信二・清水秀巳(2015) 極早生性を有するイチゴ炭疽病抵抗性品種「かおり野」の育成と普及. *園学研* 14:89-95.
- Mao J., Wang Y., Wang B., Li J., Zhang C., Zhang W., Li X., Li J., Zhang J., Li H. and Zhang Z. (2023) High-quality haplotype-resolved genome assembly of cultivated octoploid strawberry. *Hortic. Res.* 10: uhad002.
- 森 利樹(1998) 実生幼苗を利用したイチゴ炭そ病抵抗性の選抜に及ぼす管理温度の影響. *園学雑* 67: 934-938.
- 森 利樹・戸谷 孝・藤原孝之(2000) 炭そ病抵抗性イチゴ新品種「サンチーゴ」の育成. *三重農技セ研報* 27: 27-36.
- 森 利樹(2001) イチゴにおける炭そ病抵抗性の遺伝と選抜反応. *三重農技セ研報* 28: 15-21.
- 森 利樹・北村八祥(2010) イチゴ自殖実生を用いた後代検定による炭疽病耐病性評価法の開発. *園学研* 9: 137-141.
- 内藤 潔(1982) はつくに. *品種登録* 290.
- Namai K., Matsushima Y., Morishima M., Amagai M. and Natsuaki T. (2013) Resistance to anthracnose is decreased by tissue culture but increased with longer acclimation in the resistant strawberry cultivar. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 402-411.
- 西本登志・信岡 尚・前川寛之・後藤公美・東井君枝・泰松恒男・木矢 博・吉村あみ・平山喜彦・峯岸正好・佐野太郎・米国祥二(2010) イチゴの新品種「古都華」の育成とその特性. *奈良農総セ研報* 41: 1-10.
- Noguchi Y., Mochizuki T. and Yamakawa O. (1994) Petiole dip inoculation is a convenient method for screening strawberry for resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae*. *Bull. Natl. Res. Inst. Veg., Ornam. Plants & tea. Japan A* 9: 13-26.
- 野崎克弘・壹岐怜子・早日隆則・加藤三郎・黒木尚・力武弘・日高修二(2017) 炭疽病抵抗性イチゴ新品種「こいはるか」の育成. *宮崎総農試研報* 51: 27-35.
- 大橋 隆・小林泰弘・重野 貴・畠山昭嗣・中西達郎・飯村一成・植木正明・豊田明奈・鶴見理沙・永嶋麻美・齋藤容徳・小島夏実・大橋幸雄(2020) イチゴ新品種「栃木 i37 号」の育成. *栃木農試研報* 81: 83-103.
- 沖村 誠・野口裕司・望月龍也・曾根一純・北谷恵美(2004) 炭そ病抵抗性の「いちご中間母本農 2 号」の育成とその特性. *園学研* 3: 257-260.
- 曾根一純・門間勇太・壇 和弘・沖村 誠・北村恵美(2006) 4 病害複合的抵抗性で果実揃いに優れる新品種「カレンベリー」(旧系統名 イチゴ久留米 58 号). 平成 18 年度九州沖縄農業研究成果情報.
- 高野純一・生井 潔(2008) イチゴ品種「とちおとめ」のカルス誘導および再分化条件. *栃木農試研報* 63: 9-16.
- 内村要介・林田達也(2016) イチゴ炭疽病抵抗性で早生や高果実糖度の個体を高率に作出する自殖第一代の交配母本の育成. *福岡農林総試研報* 2: 1-6.
- 八城和敏・堀井 学・金 會澤・石井亮二(2015) イチゴの小葉を用いた炭疽病抵抗性簡易検定法の開発. *茨城農総セ生工研報* 14:17-21