

3. 課題ごとの成績

課題1. 「リンゴ主要病害に対する気象データ活用や遺伝子検定手法等による新たな発生予察法の開発」

(1) 農業・食品産業技術総合研究機構

担当機関・部署	農研機構植物防疫研究部門果樹茶病害虫防除研究領域
担当者	永坂 厚・佐々木 厚子・須崎 浩一

1. 背景および目的

リンゴの黒星病や褐斑病は春季の気温上昇を背景とした早期感染による多発生が懸念されており、その防除には予察情報の早期提供が必要である。また、これら病害の予察調査にあたっては、初期病斑の区別が難しいという課題があり、迅速かつ簡易な診断法が求められている。加えて、子う胞子飛散調査では、顕微鏡観察による胞子形状の識別への熟練が必要であり、今後人員が限られる中でより簡便に取り組める手法開発が必要である。そこで、初期病斑の識別およびトラップに捕捉された子う胞子数についてLAMP法等の遺伝子検定で調査する手法を開発する。

2. 方法

1) 初期病斑を対象としたLAMP法については既報での事例を参考に、リンゴ黒星病および褐斑病菌に対するプライマーを設計する。これらを用いて培養菌体、分生子等を対象として検出可能かを検討する。

2) 胞子トラップからの胞子の遺伝子検出を可能とする目的で、捕捉物をDNA抽出に供するための仕組みを作成する。あわせて、捕捉に用いる粘着テープ等について、捕捉能やDNA抽出への影響を検討する。

3. 結果

1) 褐斑病・黒星病は、青森県の分離株についてMagExtractor™ -Plant Genome-でDNAを抽出し、テンプレートとした。褐斑病は既報のプライマー (Zhang et al. (in press)、Ren et al. (2021)、Jun et al (unpublished)) では反応が見られなかったことから、国内 (青森、秋田、岩手、長野) の褐斑病菌の ITS の配列を用いてニッポンジーンに作成を依頼した。作成されたプライマー (表 1) を用い、_Bst_ DNA Polymerase (ニッポンジーン) および Loopamp 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学) で反応を行い、可視化したが、この反応系では EDTA で反応することから、TE に溶出したテンプレート DNA は 1/20 希釈して、EDTA が影響しない濃度で用いた。テンプレート DNA は 1/10 で段階的に希釈し、検出限界を求めたところ、0.23ng であった (図 1)。黒星病は褐斑病と同じ条件で Ortega et al (2020) のプライマーにより反応が見られたが、検出限界が 200ng であった。

2) 孢子トラップは吸い込み式のもの（長野県果樹試験場より情報提供）を用いた。孢子捕捉のためのテープ等として4種を用いた。すなわち、これまで黒星病の子のう孢子飛散消長調査に使用された実績のある透明両面テープ「No. 539R」（ニトムズ社）および「スコッチ 665-3-18」（3M社）、褐斑病の孢子捕捉およびPCR検出に用いた報告例があるワセリン、マウス等の表面からの非侵襲的なPCR用サンプリングに使用例があるメンディングテープ「スコッチ 810」（3M社）を検討材料とした。これらをDNA抽出が可能なようにトラップに組み込むため、「No. 539R」「スコッチ 665-3-18」はスライドグラスと同じ大きさに切り出した0.1mm厚の透明PVCシートへ貼り付けた。ワセリンは同じPVCシートへペンタンに希釈し吹き付けた。「スコッチ 810」は両面テープを貼り付けたスライドグラスに、粘着面を外側として貼り付けた。これにより、孢子捕捉後にテープ等を取り外してDNA抽出用バッファー等に浸漬することが可能であった（表2、図2および3）。

粘着テープ等の種類の違いが子のう孢子の捕捉能に影響するかを調べるため、インキュベーター内で加湿により落葉から黒星病の子のう孢子を放出させる実験系を用いて捕捉数を比較したところ、テープ等の種類間で統計的な有意差は認められなかった（表2）。供試した両面テープからのDNA抽出として、非破壊的手法の一つであるキレックス法（三浦, 2017）の適用を試みた。「No. 539R」および「スコッチ 810」で検討したところ、両者とも黒星病菌の分生孢子懸濁液を塗布したものからPCRテンプレートとなりうるDNAが抽出可能であることを確認した（図3）。

表1 褐斑病のLAMPプライマー

プライマー	配列
FIP	CCAGAACCAAGAGATCCGTTGCGTGATGTCTGAGTACGAT
BIP	GATGAAGAACGCGAGCGAAATGCCGCAATGTGCGTTCAAAG
F3	AGACCCCCAACTCTTTG
B3	GCCCTTCGGAATACCAAAG
LoopB	TGCAGAATTCAGTGAATCATCG

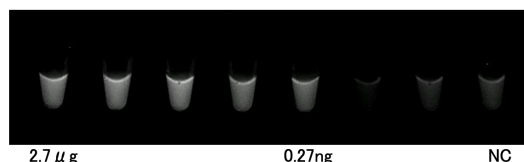


図1 褐斑病菌 DNA の LAMP 法での検出

表2 両面テープの種類および捕捉された孢子数

種類	由来等	取り付け方法	黒星病の子のう孢子数	
			平均	標準偏差
透明両面テープ「No.539R」	黒星病の子のう孢子調査で利用例	スライドグラス大のPVCシートに貼り付け	972	1496.5
透明両面テープ「スコッチ665-3-18」			2784	1534.5
ワセリン	褐斑病の孢子捕捉・検出事例 (Boutry, 2023)	ペンタンに希釈し、スライドグラス大のPVCシートに吹き付け (Boutry, 2023)	1074	310.9
メンディングテープ「スコッチ810」	生体表面等からの非侵襲的DNA抽出用サンプリングで利用例複数 (Shirota, 2017等)	両面テープを介してスライドグラスに貼り付け	1043	769.3

両面テープ等を取り付けたトラップを落葉約14gとともに半透明のプラスチック容器内に格納し、2023年秋に黒星病発生圃場から採取して越冬させた落葉を滅菌脱塩水で加湿後、17°C、12時間日長のインキュベーター内で1週間維持した。トラップからテープを取り出し、概ね20×18mmの範囲内をコットンブルー染色して、子のう孢子数を計数した。子のう孢子数はテープの種類間で負の2項分布を用いた一般化線形モデルでの有意差なし（3反復、 $\alpha=0.05$ ）。

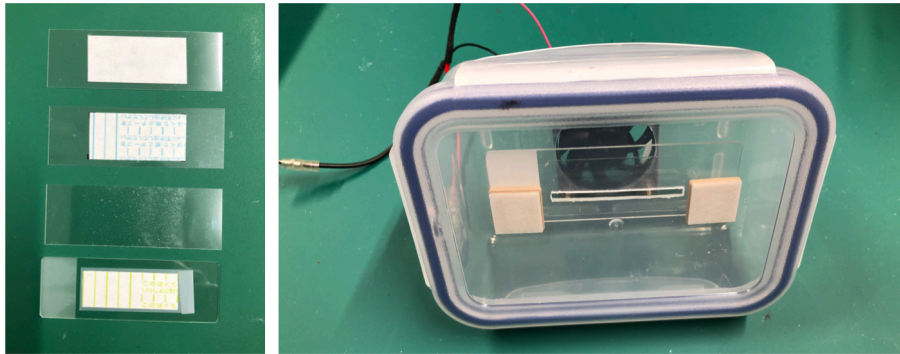


図2 試験に供した4種類の粘着テープ等(左)および比較に用いた孢子トラップ(右:長野県果樹試験場より情報提供)

粘着テープ等は、上から「No. 539R」「スコッチ665-3-18」、ワセリン(以上3種は透明PVCシートに貼付け)、「スコッチ810」(両面テープによりスライドガラスに貼り付け)。テープには粘着面保護の剥離紙が付いており、使用時に取り除く。

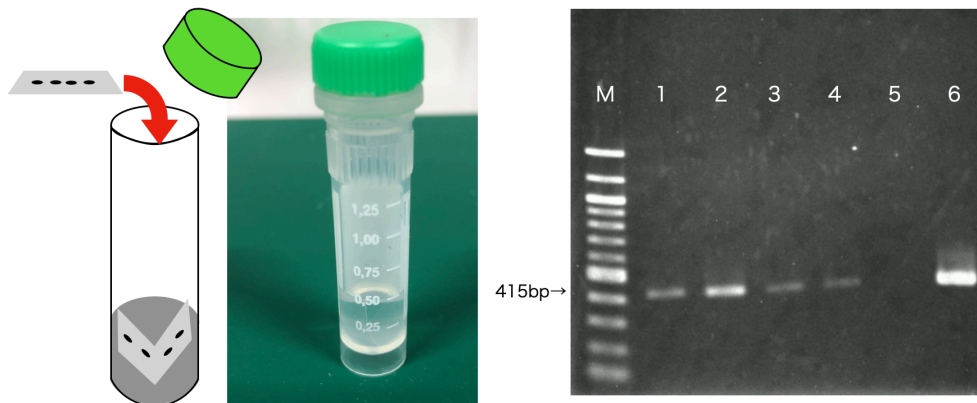


図3 テープからのキレックス法(参考:三浦,2017)による抽出の模式図および実物(左)と抽出したDNAからのアクチン標的のプライマーを用いたPCR結果(右)

(左)テープには分生孢子懸濁液(約 $4-5 \times 10^4$ 個/ml)約 $50 \mu\text{l}$ を、約 $5\text{mm} \times 2\text{cm}$ の帯状に滴下し、乾燥後DNA抽出まで -30°C で保存した。分生孢子付着部分を帯状に切り出し、2つに折り曲げて、2mlチューブ内の $500 \mu\text{l}$ の0.5%キレックス樹脂懸濁液に $35 \mu\text{l}$ の 2mg/ml プロテアーゼK溶液を加えたものへ浸漬した。これを 56°C 24hr処理後、 99.9°C 3min加熱処理して、上清をDNA溶液とした。

(右)プライマーは V_{lact}-28F と V_{lact}-442R。M:マーカー、1,2:「No.539R」(1と2は異なる菌株)、3,4:「スコッチ 810」(3と4は異なる菌株)、5:ネガティブコントロール(サンプルなしのキレックス樹脂懸濁液)、6:ポジティブコントロール(菌体から抽出したDNA)

4. 考察

国外で既報の褐斑病菌のLAMPプライマーは日本国内の褐斑病菌の検出に適用しようとしたがいずれも良好な結果を得られなかった。国内外の菌株間における標的遺伝子の配列の違いおよびプライマーの作成位置に留意する必要がある。黒星病についてはターゲット遺伝子がEF-1 α であり、ITSとコピー数が違うことから、検出限界を上げるためにはターゲットとする配列やプライマーの作成位置について再検討する必要がある。また、両病害とも試験は青森県分離株を使用したことから、他県の実験株についても検討を行う必要がある。

既存の孢子トラップに、シートへ貼り付けた両面テープ等を組み込み、孢子付着部位を切り出して、キレックス法によるDNA抽出操作を行うことは可能であると考えられた。なお、遺伝子検出には分生子を用いたことから、この方法で、特に圃場条件で補足した子とう孢子の検出が可能かは、両面テープの種類やDNA抽出条件（キレックス樹脂の濃度、プロテアーゼK反応時間等）について、検討が必要な可能性がある。

5. 今後の課題

- ・ 初期病斑からのDNA抽出条件と黒星病菌・褐斑病菌のプライマーによる識別可能性の検討
- ・ 孢子トラップに捕捉された黒星病菌・褐斑病菌の子とう孢子の検出条件の検討と最適化

6. 要約

リンゴの主要病害である黒星病や褐斑病の予察効率化を目的として、識別が難しい初期病斑やトラップに捕捉された子とう孢子数をLAMP法等の遺伝子検定に調査する手法の開発を試みた。LAMP法については既報のプライマーの性能は、黒星病菌では感度の問題から、褐斑病では国内菌株への特異性の問題から、再検討の必要があることを確認し、褐斑病については新たなプライマーを構築した。既存の孢子トラップにシートへ貼り付けた両面テープ等を組み込み、孢子付着部位を切り出して、DNA抽出操作を行うことは可能であり、今後圃場条件で捕捉した孢子の検出が可能か明らかにする必要があると考えられた。

7. 成果の公表および特許

特になし

(参考) 農研機構盛岡研究拠点における黒星病・褐斑病の初発時期について

褐斑病および黒星病の初期病斑を遺伝子検査で識別する手法を開発するためには、まず一次感染により生じた初期病斑を採取する必要がある。そのために一次感染の生じる開花期を中心に花そう葉調査を行い、初期病斑の発生を確認した。あわせて、ポット樹の暴露試験や子のう胞子の飛散消長調査により感染時期を調査するとともに、気象データによる感染推定法との関係性を確認した。

圃場の花そう葉調査(概ね半旬ごとに実施)では、黒星病と褐斑病のいずれも5/10まで確認されず、その次の5/16の調査で確認された(表1)。

暴露法および子のう胞子飛散消長から、黒星病の一次感染が生じた最初の降水日は4/25と推定された(表2、図1)。Mill's Table(濡れ時間は鈴木2003による樹体濡れ時間推定法)による感染可能性もM(中程度)であったが、翌日を起算日とした平均温度と経過日数から推定される初発日は5/8であり、花そう調査結果よりも早かった(表2)。5/10の調査で見つからなかった理由として、病斑の見落としか、病斑出現が推定よりも遅れた可能性等が考えられた。

褐斑病の一次感染が生じた最初の降水日は、4/30の降雨が猫塚(2023)による感染開始降水条件(降水による6hr以上の樹体濡れ時間および濡れ時間中平均気温13.8℃)を満たしていること、その翌日を起算日とした積算温度による初発日の推定日が5/16になることから、花そう調査結果はこれと矛盾しなかった(表1、表2)。暴露法では感染を確認できなかったが、疑似病斑が見つかり今後遺伝子検査による識別を行う予定(表2)。子のう胞子の調査では調査日あたりの捕捉数が最大で3個(6月2日、4日)と極めて少なく、初発時期を推定するための飛散ピークの検討は困難と判断した(データ省略)。

表1 花そう調査結果

調査日	黒星病	褐斑病
5/1	0	0
5/10	0	0
5/16	4	1
5/22	2	1 ²⁾
5/28	2	2 ²⁾
6/4	- ¹⁾	7 ²⁾
6/7	-	3 ²⁾

場内の黒星病と褐斑病が混発する圃場の殺菌剤無散布樹(品種「ふじ」、19年生、M9/マルバ二重台)を対象に実施。

調査数は300花そう(30花そう×10樹)

1) 調査せず

2) 5/22以降は調査時に発病葉を採取

発芽日 4/6、開花期 4/26、落花日 5/4

表2 暴露法調査結果と降水条件との関係

暴露法ポット樹調査結果 ^{a)}				ポット樹設置期間中の降水条件					Mill's Tableによる黒星病感染推定 ^{b)}		猫塚(2023)による褐斑病感染推定	
設置期間	全調査葉数	黒星病発生率(%)	褐斑病発生率(%)	降水日(降水量:mm)	降水による濡れ時間(開始-終了時刻)	濡れ時間中平均温度(°C)	可能性	初発日	可能性	初発日		
4/16-4/19	475	0.0	0.0	4/16 (0.5)	11 (4/16 21:00-4/17 7:00)	10.4	L	-	×	-		
4/19-4/26	508	0.4	0.0	4/24 (8.0) 4/25 (14.0)	14 (4/24 21:00 - 4/25 10:00)	12.6	M	5/8	×	-		
4/26-5/1	436	0.0	0.0 ^{c)}	4/30 (15.5)	8 (4/30 4:00 - 4:30 11:00)	14.0	L	5/13	○	5/16		
5/1-5/8	515	0.0	0.0	5/7 (8.5)	12 (5/7 8:00 - 5/7 19:00)	16.1	M	5/20	○	5/23		
5/8-5/14	493	0.0	0.2	5/13 (19.0)	13 (5/13 2:00 - 5/13 14:00)	16.1	M	-	○	-		
5/14-5/23	412	0.2	3.4	5/17 (5.0) 5/20 (6.5) 5/21 (0.5)	-	-	-	-	-	-		
5/23-5/30	511	0.0	1.2	5/27 (0.5) 5/28 (27.0) 5/29 (5.0)	-	-	-	-	-	-		

気象データは「東北農業研究センター気象観測データ」を利用。

a) 暴露法は花そう葉調査を実施した圃場の薬剤無散布樹近くにポット樹(品種「ふじ」、14年生、マルバ台、7号ビニールポット植え)を2鉢設置し、降水日の翌日に交換した。暴露後はガラス室内で管理し、最終の暴露終了から20日後にすべてのポット樹を調査した。

b) <https://web.uri.edu/ipm/2013/05/mills-table-apple-scab-infection-periods/>

c) 擬似病斑あり、今後遺伝子検定を予定

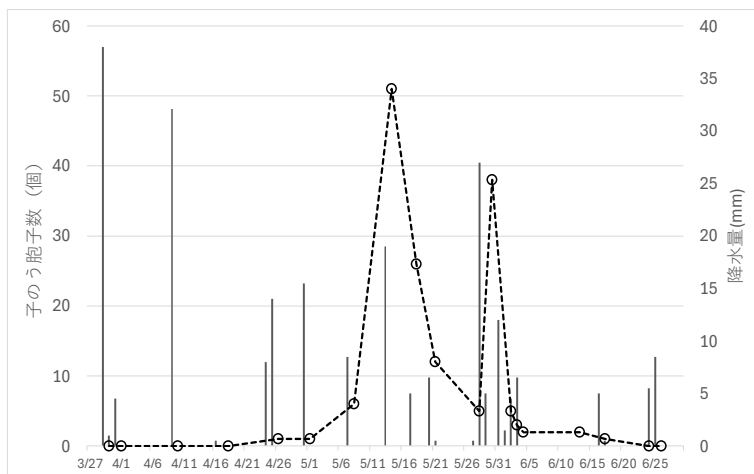


図1 子のう胞子飛散消長調査結果(黒星病菌)

棒グラフ: 降水量、点線: 子のう胞子数(調査日ごと)

前年被害落葉を1×1m、高さ60cmの枠内に敷設して越冬させたのち、簡易式吸引式トラップ(5mmφの取り入れ口でスライドガラス上の両面テープ「No. 539R」に捕捉)を10cm高に設置した。降水日の翌日にスライドガラスを交換し、18×24mmのカバークラスで覆われる範囲内をコットンブルー染色し、胞子数を計測した。胞子飛散は4/26~6/17間の調査日で認められた。

課題1. 「リンゴ主要病害に対する気象データ活用や遺伝子検定手法等による新たな発生予察法の開発」

(2) 長野県果樹試験場

担当機関・部署	長野県果樹試験場環境部
担当者	野澤堯史・島袋稚子・近藤賢一

1. 背景および目的

近年、リンゴ褐斑病では、春季の気温上昇を背景とした早期感染による多発生が顕在化しており、その発生予防には予察情報の早期提供が必要である。そこで、岩手県で開発された気象データを活用した本病の予察法(猫塚ら, 2023)について、長野県の気象条件下において従来の調査手法(子のう孢子飛散調査、花葉そう、新梢葉の発病調査)と調査精度や省力性、実用性、作業性を比較検証する。また、リンゴ黒星病についても気象データを用いた同様の予察モデル構築が可能であるか検討するため、長野県の気象条件下における従来の調査手法でのデータを取得する。

2. 方法

試験1：リンゴ褐斑病、リンゴ黒星病の初発日予測

既報告の手法から下記の条件に従い、両病害の一次感染日の把握を行った。解析に用いた気象データは場内の気象観測装置のデータを使用した。

○リンゴ褐斑病：猫塚ら(2023)の方法に従い予測を行った。

- ・1stピーク出現日予測条件：濡れ時間6時間、平均気温13.8℃(開花始期以降)
- ・初発日予測条件：1stピークから日平均気温が積算159日℃となる日(T_0 :4.6℃)

○リンゴ黒星病：濡れ時間の計測は鈴木ら(2003)、感染判定と初発日予測はMills(1944)らの方法に従い予測した。

試験2：リンゴ褐斑病菌、リンゴ黒星病菌の子のう孢子飛散消長

前年の被害落葉を野菜保存ネットに入れ、45cmポット内に静置した。ポット内のネットから5cm程度離れた場所に吸引式孢子収集機を設置し、スライドガラスに添付した透明両面テープ(No. 539R、ニトムズ社)上に補足された孢子をカバーガラス(18mm×18mm)の範囲内でカウントした。3月25日～6月30日まで降雨日毎にスライドを交換し、調査した。

試験3：苗木暴露試験によるリンゴ褐斑病の感染消長

試験場所：長野県須坂市小河原 長野県果樹試験場内

供試品種：「ふじ」/マルバカイドウ 1年生ポット苗

試験方法：被害落葉を敷き詰めたポット(試験1と同じ)中に供試ポット苗を降雨日ごとに入れ替えながら暴露し、暴露後は雨よけハウス内で管理して発病状況を調査した。なお、暴露時に完全展開している最上位の葉をマークした。

調査方法：4月15日～5月14日に暴露したものは6月7日、5月14日～6月3日に暴露したものは6月18日に調査行い、マークした葉より下位の葉を全て調査し、

発病葉率を算出した。

試験4：リンゴ褐斑病、リンゴ黒星病における樹上での発生消長

試験場所：長野県須坂市小河原 長野県果樹試験場内

供試樹：褐斑病：①「ふじ」/マルバカイドウ 25年生樹（殺菌剤無散布樹）

②「ふじ」/マルバカイドウ 2年生苗木（殺菌剤無散布樹）

黒星病：「ふじ」/M.9/マルバカイドウ 8～9年生（殺菌剤無散布樹）

試験区：褐斑病：①1区1主枝3反復、②1区5樹無反復

黒星病：1区2～3樹3反復

調査方法：褐斑病は4月19日、黒星病は4月17日から約5日間隔で調査した。

褐斑病：各区50果そう葉全葉の発病の有無と10新梢全葉の発病指数を調査

（発病指数 0：発病無し、1：病斑面積25%未満、2：病斑面積25%以上～50%未満、

3：50%以上、4：落葉1：1/4の面積に発生）

黒星病：各区50果そう、10新梢、50果の発病の有無を調査

3. 結果

当场における本年の「ふじ」の発芽は、4月1日、展葉は4月10日、開花は4月22日、落花は4月29日であった。

(1) リンゴ褐斑病

試験1：リンゴ褐斑病の初発日予測

1) 猫塚ら（2023）の手法により予測される本年の子のう胞子飛散の1stピークは4月30日であり、1stピークから予測される初発日は5月14日（±5日：5/9～19）であった（表1）。

2) 展葉期から5月中旬までのうち、1stピーク以降で同条件を満たす日は5月7日、16日、20日であった。なお、4月17日、4月25日、5月13日は濡れ時間は条件を満たしたものの、濡れ時間中の平均気温が0.1～0.8℃不足する状況だった。

表1 予測モデルによるリンゴ褐斑病菌の子のう胞子飛散の1stピークと初発日

日付	濡れ時間 (hr)	濡れ時間中の平均気温 (°C)	降水量 (mm)	モデル適合*	初発日 (159日°C到達日)	初発日 ± 5日
4/17	7	13.1	1.5	△	4/30	
4/22	7	11.8	0.5	×	5/5	4/25~5/11
4/24	5	14.2	1.5	×	5/6	
4/25	11	13.0	3.5	△	5/7	5/2~12
4/30①	6	16.1	0.5	○	5/14	5/9~19
4/30②	6	20.2	5.0	○		
5/2	3	10.4	0.5	×	5/15	5/10~20
5/7	6	14.8	2.5	○	5/20	5/15~25
5/13	15	13.7	26.5	△	5/25	5/20~30
5/16	6	16.3	1.0	○	5/27	5/22~6/1
5/20	11	16.6	4.5	○	5/31	5/26~6/5

*モデル適合 ○：予測モデルの条件を満たす

△：予測モデルの条件で濡れ時間は満たすものの、日平均気温を-1.0°Cの範囲内で満たさないもの

×：予測モデルの濡れ時間、日平均気温どちらも満たさないもの

注) 展葉期以降～5月中旬までの降雨日を表に記載している

試験2：リンゴ褐斑病菌の子のう胞子飛散消長

- 1) 本年の子のう胞子飛散は4月9日～6月30日の間で認められた。
- 2) 初発散は4月9日～17日であり、最も飛散が多かった期間は5月29日～6月3日であり、この期間に捕捉された子のう胞子数は24個であった。予測モデルの考え方に基づく1stピークは4月30日～5月2日(補足数は5個で、最多補足胞子数に対する割合は20%)であり、これはモデルにより予測される1stピークと合致した。

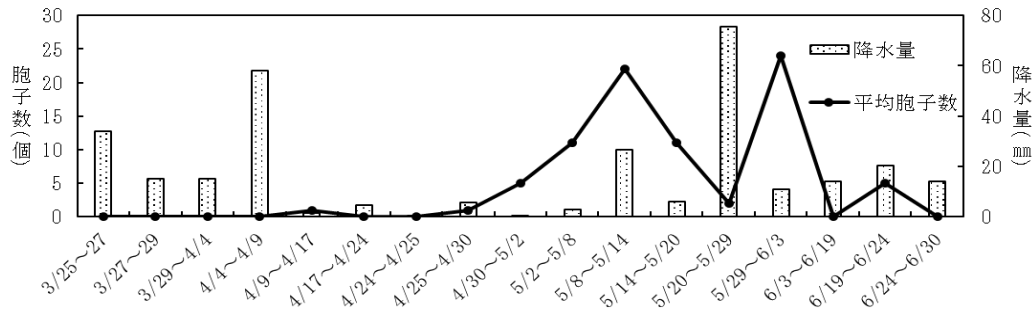


図1 リンゴ褐斑病の子のう胞子飛散消長と降水量(降水日別)

試験3：苗木暴露試験によるリンゴ褐斑病の感染消長

- 1) 4月17日～24日に感染が始まり、その後調査期間を通じて、降雨日毎に感染が認められた。感染が最多となったのは、5月8日～14日であった(図2)。

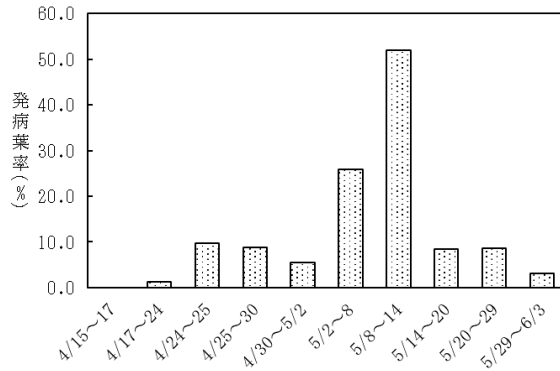


図2 暴露ポット樹におけるリンゴ褐斑病の時期別感染量

試験4：リンゴ褐斑病の発消長

1) 立木調査では、果そう葉での初発を6月11日、新梢葉での初発を6月25日に確認した(図3)。苗木調査の初発確認は立木調査よりも早く、5月21日に初発を確認した(図4)。

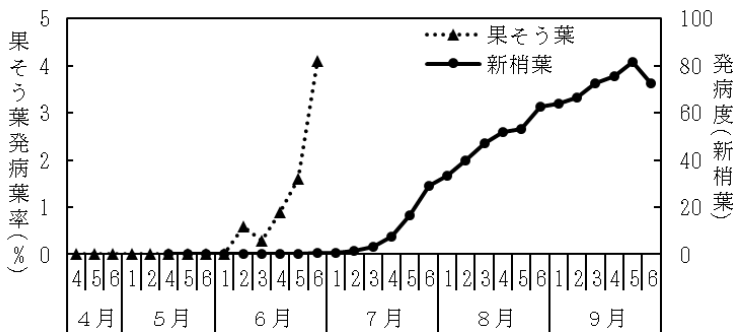


図3 立木でのリンゴ褐斑病の発生推移

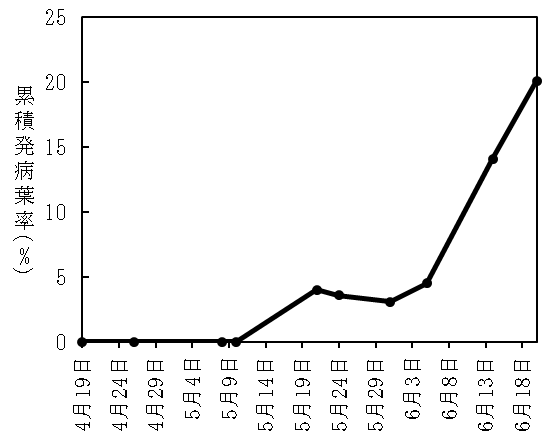


図4 苗木でのリンゴ褐斑病の発生推移

(2) リンゴ黒星病

試験1：リンゴ黒星病の初発日予測

1) Millsら(1944)の条件から予測される最初の感染好適日は4月25日であり、予測される初発日は5月9日であった。

表1 リンゴ黒星病で予測される感染好適日と初発日

日付	濡れ時間 (hr)	濡れ時間中の平均気温 (°C)	降水量 (mm)	感染レベル*	潜伏期間 (day)	推定初発日
4/17	7	13.1	1.5	×	-	-
4/22	7	11.8	0.5	×	-	-
4/24	5	14.2	1.5	×	-	-
4/25	11	13.0	3.5	L	14	5/9
4/30①	6	16.1	0.5	×	-	-
4/30②	6	20.2	5.0	×	-	-

*感染レベル H：重度、M：中度、L：軽度、×：条件満たさない
注) 展葉期以降～4月下旬までの降雨日を表に記載している

試験 2：リンゴ黒星病の子のう孢子飛散消長

- 1) 本年の子のう孢子飛散は3月29日～6月30日の間で認められた。
- 2) 初飛散は3月29日～4月4日であり、飛散ピークは5月8日～14日であった(図5)。

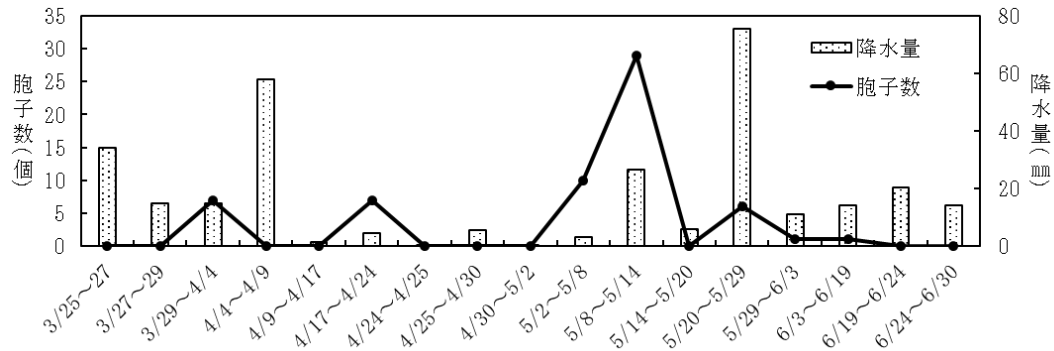


図5 リンゴ黒星病の子のう孢子飛散消長と降水量(降水日別)

試験 4：リンゴ黒星病における樹上での発生消長

- 1) 立木の調査で5月7日に初発を確認した。果そう葉、新梢葉ともに5月中旬から発生が多くなった(図6)。

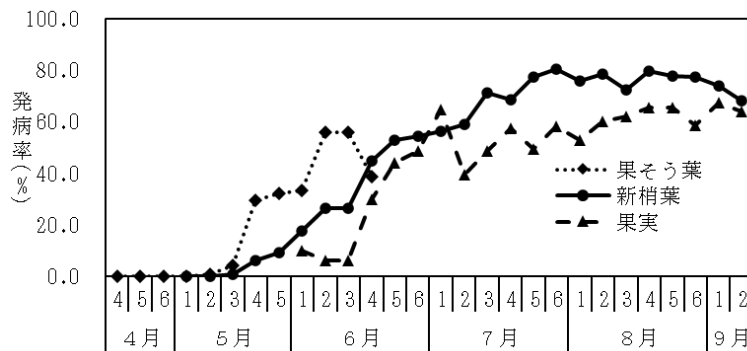


図6 立木でのリンゴ黒星病の発生推移

4. 考察

(1) リンゴ褐斑病

- 1) モデルにより予測された1stピーク(一次感染開始日)は子のう孢子飛散調査における1stピークと一致した。

一方、初発時期については、モデルから予測される初発日は5月14日であったが、ほ場での初発は(苗木調査:5月22日)であり、一致しなかった。本年は生育前半に少雨傾向であったことから、立木調査における果そう葉での発生も6月中旬まで少発生であった。このことから、ほ場での初発を的確にとらえられなかった可能性を含め、予測モデルの精度についてさらなる検証が必要と考える。

- 2) 2001年、2023年に実施した調査により、暴露試験によって発病量が最も多くなる時期は、子のう孢子の飛散量が当該年ではじめて多くなる時期と一致することが確認されている。本年の調査においても同様の結果であった(データ省略)。

(2) リンゴ黒星病

- 1) 予測される感染好適日は4月25日であり、そこから予測される初発日は5月9日であった。ほ場での初発は5月7日であり、誤差2日でほぼ一致している。予測モデルと従来からの立木での発生予察調査手法で初発を十分捉えられていると考えられる。

5. 今後の課題

- ・リンゴ褐斑病感染予測モデルのさらなる精度検証
- ・リンゴ褐斑病の初発を正確に捉えられるほ場での発生予察調査手法の検討
- ・リンゴ黒星病感染予測モデルを利用した予察システムの構築

6. 要約

リンゴ褐斑病について感染予測モデルで予測される1stピークは子のう胞子飛散調査での1stピークと一致した。一方、初発日はモデルによる予測日とほ場での初発日との間に差があった。今後、調査規模を増やすなどほ場での初発日についての的確な把握を行った上で、予測モデルによる初発日の精度について検証が必要と考える。リンゴ黒星病については、感染予測モデルで予測される感染好適日、初発日と実際の初発日には2日程度の差しかなく、モデルにおける予測とほ場での発病実態が合致していた。

7. 成果の公表および特許

課題1. 「リンゴ主要病害に対する気象データ活用や遺伝子検定手法等による新たな発生予察法の開発」

(3) 岩手県農業研究センター

担当機関・部署	岩手県農業研究センター・生産環境研究部
担当者	猫塚修一

1. 背景および目的

岩手県において、気象データを用いた子のう胞子飛散ピークと初発日の推定結果と、従来法（子のう胞子飛散調査および発病状況調査）による実測結果を比較検証する。また、リンゴ黒星病について気象データを用いた感染日の推定モデルを検討する。

2. 方法

(1) 気象データを用いた褐斑病の感染開始日と初発日の推定と実測との比較検証

ア 気象データを用いた推定

猫塚ら(2023)に基づき、アメダス北上地点の時別値を用いて推定した。

イ 子のう胞子飛散調査（実測①）

前年被害落葉上に吸引式胞子採集器を設置し、降水日毎にスライドグラスを回収・交換した。調査は2反復、調査期間は令和6年4月1日～5月27日とした。

ウ 曝露試験（実測②）

無防除樹（ふじ/M.26（28年生））の樹冠下に、ポット植えリンゴ樹（シナノスイート/M.26、ふじ/JM7、1年生）4～10樹を配置し、降水日毎に回収した。発病調査は回収約1ヶ月後に出現した病葉を計数し、発病葉率を算出した。曝露期間・回数は2024年4月12日～5月21日、計7回とした。

エ 無防除樹での発病調査（実測③）

ふじ/M.26（28年生、殺菌剤無散布）を用い、5月3半旬～6月6半旬まで半旬毎に実施した。果（葉）そう葉は目通りすべて、新梢葉は40新梢を対象に、発病の有無を計数し、発病そう率および発病葉率を算出した。

(2) 気象データを用いた黒星病の感染日予測モデルの開発

ア 子のう胞子飛散調査結果：6県7地点で実施された35事例を収集した。このうち、飛散ピークが明瞭で3ヵ年以上データが揃っている4県5場所の32事例を解析に用いた。

イ 累積飛散割合の推定モデル：Gadoury et al. (2004)に基づき、積算温度から累積飛散割合を推定するモデルを5地点（青森、秋田・横手、同・鹿角、山形、長野）について作成し、累積25%、50%および75%に達する積算温度を求めた。作成したモデルは、累積飛散割合を①総飛散量および②落花期までの飛散量とする2種類とした。

ウ 胞子飛散ピーク出現の推定モデル：北東北地域（青森、秋田・横手、同・鹿角）の飛散調査結果および気象データを用い、降水日（202事例）における飛散ピークの有無（有：79事例、無：123事例）と降水条件（日照の有無、感染好適条件、生育ステージ）の関係をロジスティック回帰分析により解析した。感染好適条件は猫塚ら（2019）に準じて、降水日における温度、濡れ時間から改変Mills Tableを用いて感

染強度（軽度、中度、重度感染）を判定した。

3. 結果

(1) 褐斑病の感染開始日と初発日の推定と実測との比較検証

ア 感染開始日と初発日の推定：子のう胞子飛散の1st ピークは4/25（開花始）、2nd ピークは4/30（満開期）、それぞれ初発日は5/9、5/15と推定された（表1）。本推定の所要時間は延べ40分であった（表2）。

イ 胞子飛散調査（実測①）：1st ピーク（4/25）と2nd ピーク（4/30）の出現日は、気象データによる予測と一致した（表1）。本調査は延べ10時間を要した（表2）。

ウ 曝露試験（実測②）：曝露樹ではいずれも発病が認められなかった（表1）。本調査には延べ5時間を要した（表2）。

エ 無防除樹での発病調査（実測③）：5/15に花葉そうで初発生し（表1）、2nd ピークの初発推定日（5/15）と一致した。本調査には延べ5時間を要した（表2）。

オ まとめ：胞子飛散の1st ピークと2nd ピークは推定と実測が一致した。初発日（推定）は、1st ピーク（4/25）は実測と一致せず、2nd ピーク（4/30）と一致した。

表1 気象データを用いた推定日と圃場調査（実測）の適合性の検証

気象データ（推定）		圃場調査（実測）			実測との比較			（備考） 生育 ステージ ⁶
感染開始日 （濡れ条件 ¹⁾ ）	初発日 ²⁾	実測① 胞子飛散 ピーク	実測② 曝露 試験	実測③ 無防除樹	実測 ①	実測 ②	実測 ③	
4/25 (13.8℃、11h)	5/9	4/25	— ³⁾	5/15	○	—	×	開花始
4/30 (14.1℃、6h)	5/15	4/30	—	5/15	○	—	○	満開期

1) 濡れ時間中平均気温、濡れ時間、2) 感染開始日から159日℃到達日、3) —：無発生

表2 一次感染開始日と初発日の推定と実測の所要時間

推定／実測	気象データ（推定）		圃場調査（実測）		
	感染 開始日	初発日	感染開始日		初発日
調査項目／方法			飛散ピーク （実測①）	曝露試験 （実測②）	無防除樹 （実測③）
所要時間 （作業内容・回数）	40分 （推定：2回）		10時間 （交換・調査： 10回）	5時間 （交換：7回、 調査：3回）	5時間 （調査：5回）

(2) 黒星病の感染日予測モデルの開発

ア 累積胞子飛散割合の推定モデルの検討

・積算温度（起算：発芽日）と累積飛散割合は、5地域すべてのモデルにおいて1%水準で有意な相関が見られた（ $R^2=0.676\sim 0.837$ ）。

・累積飛散25%に到達する積算温度は、青森・秋田（横手、鹿角）が138～262日℃に

対して長野・山形は328～370日℃であり、地域間差が見られた（図1）。

- ・累積飛散25%に達する積算温度について開花日と比較すると、青森では-116日℃、秋田（横手）では-89日℃、山形では-52日℃、長野では-6日℃であった（図2）。該当する生育ステージは、秋田（鹿角）では展葉1週後、青森では展葉7～14日後、秋田（横手）・山形では展葉14日後、長野では開花直前であった。

イ 子のう孢子飛散ピーク出現の推定モデルの検討

- ・ロジスティック回帰モデルにおいて、飛散ピークの出現と有意な関連が見られた降水条件は、生育ステージ、感染好適（中度、重度感染）を伴う降水日、日照を伴う降水日であった（データ省略）。

- ・生育ステージ別では、展葉8日後～落花期で飛散ピークの出現割合が高かった。一方、飛散ピークの中では感染好適を伴わない降水日の比率が高かった（図3）。

- ・感染好適日では、飛散ピークの出現割合が50～90%と高かった（図4）。

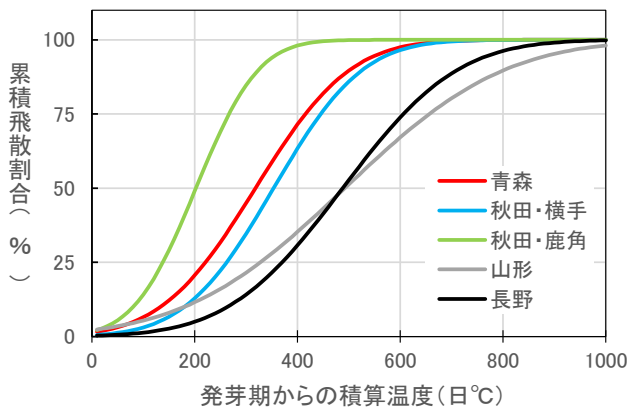


図1 有効積算温度による黒星病の累積飛散割合の推定モデル（総飛散量モデル）

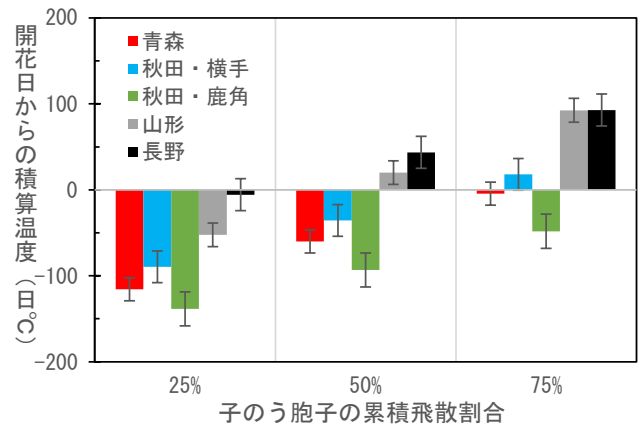


図2 黒星病の累積飛散割合別の有効積算温度 ※ 落花期までの飛散量モデル

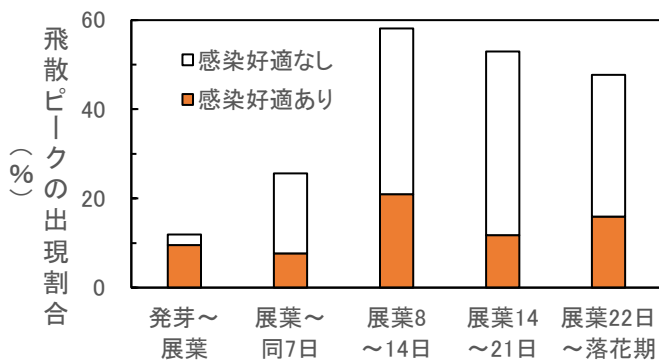


図3 降水日に占める飛散ピークの出現割合と感染好適の関係

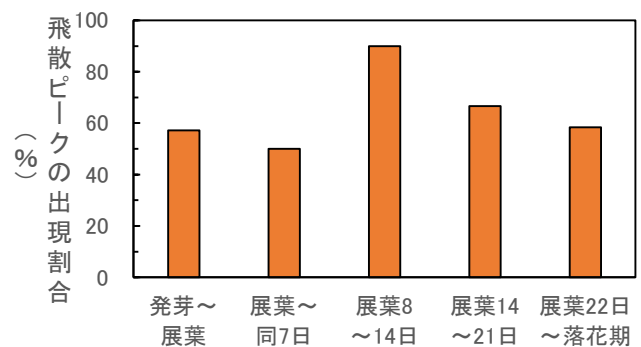


図4 感染好適日に占める飛散ピークの出現割合

4. 考察

(1) 褐斑病の感染開始日と初発日の推定と実測との比較検証

- ・子のう胞子飛散の1stピークの出現は、予測と実測は一致することが検証された。
- ・1stピーク（4/25、開花始）では樹上で発病しなかった。開花始には副梢が未展開であるので、この生育ステージでは感染できなかつた可能性がある。
- ・曝露試験では無発病であった。曝露期間中は濡れが10時間以上継続する降水日が無かつたため、感染に不適であったと考えられる。

(2) 黒星病の感染日予測モデルの開発

- ・累積胞子飛散割合の推定モデル：累積飛散25%に到達する時期は、各県における現在の防除開始時期（青森：展葉7日後、山形：展葉10日後、長野：開花直前）と概ね一致しており、各県の飛散パターンを反映していると考えられる。
- ・胞子飛散ピーク出現の推定モデル：飛散ピークは感染好適を伴わない降水日にも出現し、飛散ピークの推定では感染日を予測できないと考えられた。一方、感染好適日には飛散ピークの出現頻度も高く、感染日として予測できると考えられた。
- ・以上から、黒星病の感染日予測は、気象データを用いて展葉1週間後～落花期における感染好適の出現状況を把握するのが良いと考えられた。

5. 今後の課題

- (1) 褐斑病：推定モデルでは「ふじ」の開花始期以降を推定期間としているが、生育初期における花葉そうでの感受性が不明である。そこで、生育ステージ別の感受性を評価し、これをモデルに組み込むことで、推定期間の精緻化を図る。
- (2) 黒星病：他地域における感染好適の出現時期を検証する。

6. 要約

令和6年、岩手県における褐斑病の感染開始日は「ふじ」の満開期であると推定された。開花始期にも子のう胞子飛散ピークが見られたが、その後の発病には至らなかつた。気象データを用いることで、無防除樹での初発時期の調査を効率的に実施できた。黒星病の感染日予測モデルとして、有効積算温度による累積胞子飛散割合の推定モデル（4県5地域）と、子のう胞子飛散ピークの推定モデルを作出した。

7. 成果の公表および特許

- (1) 猫塚修一・藤田章宏（2024）「リンゴ褐斑病の開花期感染が広域的な発生に及ぼす影響」日植病報90:14-21.
- (2) 猫塚修一（2024）「気象データを用いたリンゴ褐斑病の一次感染開始日と初発日の推定」東北農業研究成果情報（研究）.
- (3) 猫塚修一（2024）「気象データを用いたリンゴ褐斑病の一次感染開始日と初発日の推定」植物防疫78(8): 461-467.
- (4) 猫塚修一（2024）「春期温暖化によるリンゴ病害の発生生態の変化と今後の防除対策」果実日本79(10):72-76

課題1. 「リンゴ主要病害に対する気象データ活用や遺伝子検定手法等による新たな発生予察法の開発」

(4) 地方独立行政法人青森県産業技術センターりんご研究所

担当機関・部署	りんご研究所病害虫管理部
担当者	平山和幸・八木橋素良

1. 背景および目的

褐斑病の一次感染時期の早期化は、気象データに基づく一次感染開始日推定モデルからも示唆されているがその実態は不明である。そこで、一次伝染源となる子う胞子の飛散消長を調査し、感染時期を明らかにする。また、樹上における褐斑病及び黒星病の発生消長を調査し、黒星病については気象条件に基づく感染危険度の評価も行う。

2. 方法

(1) 褐斑病の初発日推定

猫塚ら(2023)のモデルに基づき推定した。濡れ時間については、鈴木(2003)についても検討した；「濡れ」計測は降雨から開始し、日中では降雨終了2時間後まで、日没後では日の出2時間後まで継続しカウントした。また、降雨終了2時間以内又は日の出後2時間以内の降雨は、連続する濡れ時間とした。

(2) 褐斑病菌の子う胞子飛散消長

りんご研究所内の殺菌剤無散布圃に吸引式胞子採集器を地面から約10cm高で設置した。胞子採集器は回転式で粘着テープを用いて最長7日まで時間別に胞子回収が可能である。粘着テープは約1週間ごとに交換し、交換したテープは1日分の長さ(1cm×4cm)に切り、テープ上の付着胞子数を光学顕微鏡を用いて計数した。

(3) 暴露苗木及び立ち木における褐斑病初発調査

1/2000ワグネルポット植え‘ふじ’2樹を4月19日から5月23日まで約一週間間隔で所内殺菌剤無散布圃に暴露し発病の有無を調査した。また、同圃場において、5月20日から2～3日間隔で28年生の‘ふじ’/マルバカイドウ3樹を対象に、花そう葉を1樹あたり50個について褐斑病の発病の有無を調査した。

(4) 褐斑病の新梢葉における発生消長

殺菌剤無散布圃の28年生の‘ふじ’/マルバカイドウを3樹供試し、1樹あたり10新梢として30新梢を対象に、その全葉について発病葉率と落葉率を調査した。発病による落葉は、調査葉と発病葉に含めた。調査は6月上旬～9月下旬に、約5日おきに行った。

(5) 黒星病の子う胞子飛散消長

褐斑病の子う胞子飛散調査に準じて調査した。

(6) 黒星病の新梢葉における発生消長と感染危険度の評価

ア 発生消長

殺菌剤無散布圃の28年生の‘ふじ’/マルバカイドウを3樹供試し、1樹当たり10新梢として30新梢を対象に、その全葉について発病葉率を調査した。調査は5月中旬～7月上旬に、約5日おきに行った。

イ 感染危険度の評価

小型温湿度記録計（おんどとり RTR-507SL）を供試し、温湿度センサー部分を両側の穴に農業用不織布を貼った塩化ビニル製のT字管に入れて固定した。小型温湿度記録計を所内圃場（黒石市）に設置し、1時間ごとの気温・湿度を計測した。湿度90%以上を‘葉の濡れ’として評価した。計測されたデータを感染危険度の評価システム「Duthie(1997)によるナシ黒星病発病予測モデル」に入力し感染危険度を算出した。算出した感染危険度の値から、 $0 < \text{軽度感染(L)} < 15$ 、 $15 \leq \text{中程度感染(M)} < 40$ 、 $40 \leq \text{重度感染(S)} \leq 73.9$ と判定した。

3. 結果

(1) 褐斑病の初発日推定

ア. 子のう胞子飛散の実測値に基づく1st

ピークは4月30日、推定初発日は5月16日であった。

イ. 猫塚ら（2023）の1stピーク推定モデル

に基づく1stピークは5月7日、推定初発日は5月22日であった。

ウ. 圃場における‘ふじ’花そう葉での初発

は6月3日であり、モデル条件を満たす中で5月13日を1stピーク（感染日）とし、推定初発日5月27日が最も近かった。

(2) 褐斑病菌の子のう胞子飛散消長

子のう胞子飛散の初飛散日は4月25日、最も飛散量が多い最盛日は6月3日、終息日は8月13日であった。

表1 褐斑病モデルの適合性評価

日付	子のう胞子飛散数	対P _{max} *1 (%)	濡れ時間	平均気温	推定初発日	モデル適合性
4月24日	14	2.8	6	14.6	5月11日	×
4月30日	47	9.5	6	12.4	5月16日	×
5月6日	3	0.6	5	16.0		×
5月7日	25	5.1	12	16.8	5月22日	○
5月8日	4	0.8	13	8.5		×
5月9日	2	0.4	4	7.3		×
5月13日	116	23.5	12	14.6	5月27日	○
5月17日	1	0.2	6	13.6		×
5月28日	87	17.6	6	13.1		×
5月29日	152	30.8	13	12.5		×
6月2日	17	3.4	3	16.8		×
6月3日	493(P _{max})		12	13.4		×

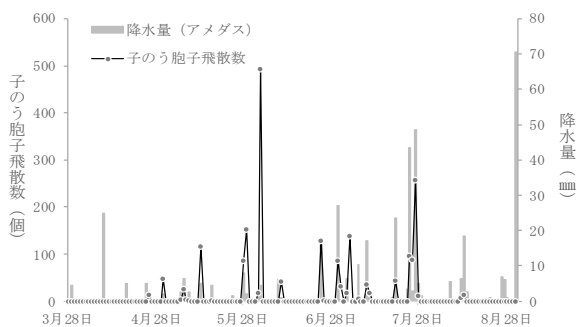


図1 褐斑病の子のう胞子飛散消長

(3) 暴露苗木及び立ち木における褐斑病初発調査

ア. 苗木の暴露試験では、いずれも発病が認められなかった（未記載）。

イ. 立ち木試験では、6月3日に初発を確認した。しかし、病斑は数mmとやや大きく、本当の初発日は本確認日より早いものと推測された。

(4) 褐斑病菌の新梢葉における発生消長

褐斑病の発生は8月の第2半旬に急増しており、この急増期が到来した早さは、過去5年の中では前年に次いで早かった。

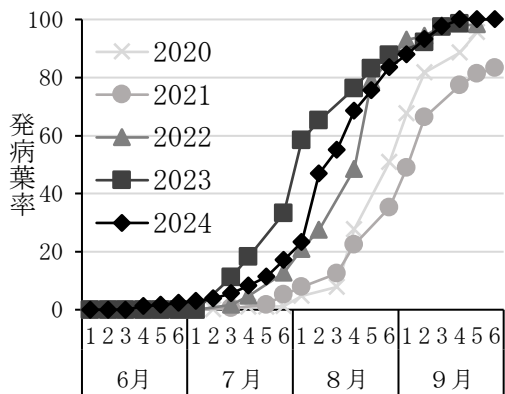


図2 2020～2024年の新梢葉における褐斑病発病葉率（6半旬）

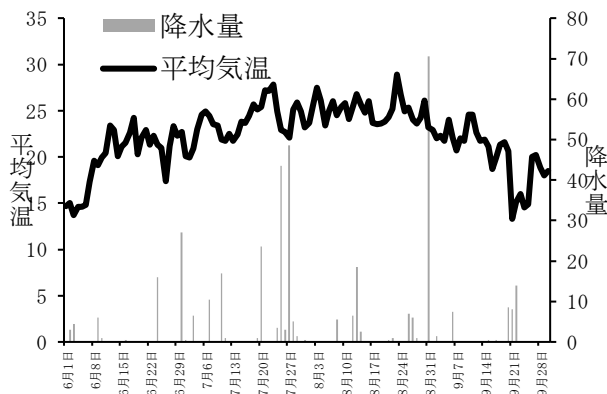


図3 試験期間中の気象条件（2024年）

(5) 黒星病の子のう胞子飛散消長

子のう胞子の初飛散日は4月9日、最も飛散量が多い最盛日は4月24日～25日及び5月7日、終息日は6月3日であった。

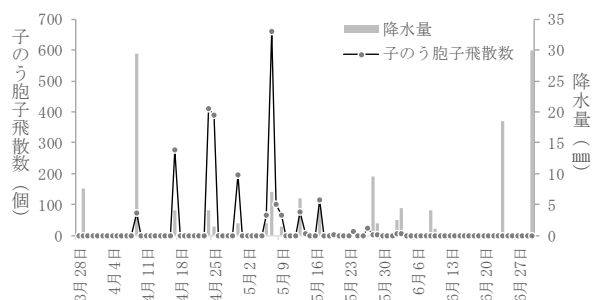


図4 黒星病の子のう胞子飛散消長

(6) 黒星病の新梢葉における発生消長と感染危険度の評価

5月1日に初めの重度感染の判定が出たものの、実際の発生量増加にはつながらなかった。5月13～14日に次の重度感染の判定が出ており、実際にも5月の第5～6半旬から発病が増加し始めた。その後は中程度感染の判定が数回出たものの、重度感染の判定は6月9日の1回に留まっており、実際の発生についても目立った急増期が見られず、前年に比べ低く推移し、平年に比べ同程度以下で推移した。

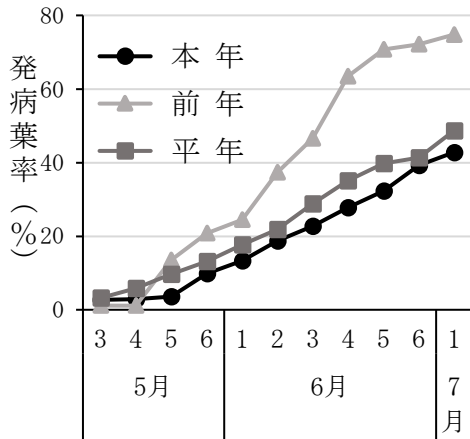


図5 新梢葉における黒星病の発生推移 (6半旬)

注) 平年値は2014~2023年の平均値。

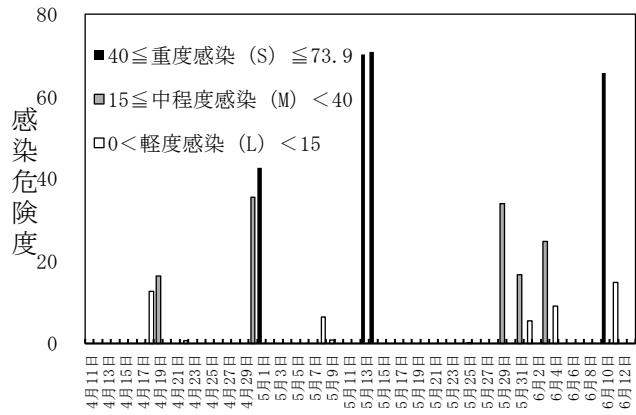


図6 試験期間中の黒星病感染危険度 (2024年)

4. 考察

(1) 褐斑病

‘ふじ’の開花直前頃から子とう胞子の飛散が確認され、8月にかけて長期的な飛散が認められた。猫塚ら(2023)の1stピーク推定モデルと子とう胞子飛散の実測値には誤差があった。一方、本モデルに基づく推定初発日は実初発日と近似していた。感染には“子とう胞子の飛散”と“感染条件を満たすこと”が必要であり、本モデルで1stピーク推定に使用される濡れ時間と気温の条件は感染条件に近いことが推測され、初発日推定として有用であると考えられた。

(2) 黒星病

伝染源である子とう胞子の飛散と気象条件に基づく感染条件の充足度を示す感染危険度判定は必ずしも一致しないことが改めて示唆された。いずれかのみでは感染は起こらず、感染には伝染源と感染条件の両方を満たしていることが必要となる。

5. 今後の課題

6. 要約

褐斑病の1stピーク推定モデルは実測の1stピークとは一致しなかった。しかし、推定の1stピークを感染日とし、そこから算出される初発日は実際の初発日と近いことが示唆され、初期感染日・初発日の推定モデルとして一定の精度を示した。

7. 成果の公表および特許

「農なび青森」への掲載：りんご黒星病の感染危険度情報、黒星病の発生推移