

## カンキツかいよう病に対する防除開始適期の再検討

武田知明・井沼 崇<sup>1</sup>

和歌山県果樹試験場

### Reexamination of the First Timing of Fungicide Application to Control Citrus Canker

Tomoaki Takeda and Takashi Inuma<sup>1</sup>

*Wakayama Fruit Tree Experimental Station*

#### 緒 言

カンキツかいよう病は *Xanthomonas citri* subsp. *citri* を病原とし、カンキツの葉、緑枝および果実に中心部がコルク化した円形の病斑を形成する重要病害である（塩谷，2010）。春先の第一次伝染源は主に前年の夏秋葉に発病した病斑（越冬病斑）と、前年の晩秋に葉に感染し潜伏越冬後に発病した病斑（潜伏越冬病斑）である（Pertier and Neal, 1918）。これらの病斑からの病原細菌の溢出は、旬平均気温が 10℃の頃にはじまり、12℃を超えると急増する（後藤，1962；芹澤，1992）。溢出した病原細菌は春葉（新葉）に感染・発病して第二次伝染源となり、果実や夏秋葉へと伝染する（後藤，1962）。そのため、春葉への感染を防ぐことが防除上重要であり（芹澤，1992）、県内産地では一般的に葉芽発芽直前の 3 月中旬頃から無機銅剤による防除を開始する（和歌山県，2019）。

一方で、2 月中旬にウンシュウミカンとナツミカンの前年に発生した夏秋葉に対して  $10^7$ cfu/ml の細菌懸濁液を接種したところ、4 月中下旬に多数の病斑を形成した事例が報告されている（小泉，1977）。この病斑は強力な伝染源となるおそれがあるため、県内の一部の産地では 2 月中旬頃から防除を開始すべきという意見があり、防除体系の見直しが検討されている。しかし、1 月～4 月上旬の樹冠流下雨水（樹の枝や幹をつたって流れる雨水）中の菌量は 10cfu/ml 未満で極めて少なく推移するため（三好・清水，2016）、この時期は旧葉（前年に発生した葉）に対する雨水による感染は起きないと考えられる。雨水以外の伝染方法として芹澤（1992）は、5 月中旬に越冬病斑の周辺に新たな病斑が形成された事例（後藤，1962）から、夜間の低温により生じた結露に細菌が溢出して越冬病斑周辺に濃厚感染する可能性を指摘している。結露中の菌量は雨水中よりも多くなると考えられるが、発芽期（3 月下旬～4 月上旬）以前に越冬病斑上に生じた結露中の菌量を調査した事例はない。また、発芽期以前に既報（小泉，1977）の  $10^7$ cfu/ml より低い濃度の接種源を用いて旧葉に対する感染の可能性を調査した事例や 2 月の無機銅剤散布による防除効果を検討した報告もない。そこで本研究では、結露状態を再現した葉の越冬病斑からの溢出菌量の定量、既報（小泉，1977）より低い濃度の接種源を用いた旧葉への接種による感染時期の解明、2 月の無機銅剤散布による防除効果の検討を行い、本病の防除開始適期について再検討した。

<sup>1</sup>現在：和歌山県農業試験場

## 材料および方法

### 1. 越冬病斑からの溢出菌量の定量（試験1）

#### 1) リアルタイム PCR 法によるカンキツかいよう病菌の定量

##### (1) DNA 抽出

Instagene DNA 精製マトリックス (Bio-Rad) を用いて DNA を抽出した。すなわち、サンプル 1ml を 1.5ml チューブに加えて 3 分間遠心し、上清 950 $\mu$ l を除去した後、Instagene DNA 精製マトリックスを 100 $\mu$ l 加え、56 $^{\circ}$ C で 30 分間、100 $^{\circ}$ C で 8 分間インキュベートした。

##### (2) リアルタイム PCR

機器は LightCycler nano (Roche Applied Science) を用いた。試薬は FastStart Essential DNA Green Master (Roche Applied Science)、プライマーセットは本病原細菌の特異的プライマーである J-Rxg/J-Rxc2 (増幅産物: 179bp) (Cubero and Graham, 2002) を使用した。反応液の組成は 1 サンプルあたり Master Mix(2x) を 10 $\mu$ l, Primer forward & reverse(5 $\mu$ M) を 2 $\mu$ l, 鋳型 DNA を 5 $\mu$ l, H<sub>2</sub>O(PCR grade) を 5 $\mu$ l の計 20 $\mu$ l とした。PCR の温度条件は、95 $^{\circ}$ C で 10 分の初期変性を 1 回、95 $^{\circ}$ C で 10 秒、60 $^{\circ}$ C で 10 秒、72 $^{\circ}$ C で 15 秒の増幅過程を 45 回繰り返した後、融解曲線分析を行った。

##### (3) 検量線の作成と定量可能範囲の確認

2008 年に果樹試験場露地ほ場内のネーブルオレンジ (12 年生) の葉から常法により分離した本病原細菌 X0801 株を供試した。NA 培地により 20 $^{\circ}$ C で 3 日間培養し、滅菌水で  $1 \times 10^9$  cfu/ml に調整した細菌懸濁液を原液として、連続 10 倍希釈の系列を  $1 \sim 10^0$  cfu/ml の範囲で調整し、検量線作成用の標準試料とした。各濃度の細菌懸濁液を用いて、(1)、(2) の手法に従って DNA 抽出とリアルタイム PCR を行った。3 反復行い、各濃度の Ct 値の平均と実際の菌量から回帰式を求めて検量線を作成するとともに、本手法の定量可能範囲を確認した。

#### 2) 越冬病斑からの溢出菌量の推移

越冬病斑からの溢出菌量は春葉に比べて夏秋葉が多いため (芹澤, 1992), 病斑が認められた夏秋葉を供試した。2019 年は果樹試験場露地ほ場内の 'せとか' (10 年生) および '南津海' (10 年生) の各 1 樹を、2020 年はこれら 2 品種で夏秋葉の病斑が認められなかったため、'宮川早生' (11 年生) 1 樹を用いた。1 樹あたり病斑が多い 4~5 葉を選んでマークし、調査葉とした。1 葉あたりの病斑数は表 1 に示した。2019 年は 1 月 28 日から 'せとか' は 5 月 23 日まで、'南津海' は 5 月 1 日まで、2020 年は 1 月 16 日から 5 月 21 日まで 6~21 日間隔で 10~11 回調査を行った。結露した状態を再現するため、葉をチャック付きポリ袋 (規格: 100mm $\times$ 70mm $\times$ 0.04mm) で包み、5ml の滅菌水を加えてチャックを止め、葉全体が濡れた状態を保持した。直射日光によるポリ袋内の温度上昇を防ぐためアルミホイルを巻き付けて遮光し、24 時間後に袋を回収した。回収したポリ袋中の水から (1)、(2) の手法に従って DNA 抽出とリアルタイム PCR を行った。菌の定量は、菌数既知の 4 濃度の段階希釈液を同時に解析して作成した検量線から行い、1 葉あたりの菌量を算出した。なお、'宮川早生' では試験期間中に一部の調査葉が落葉したため、別の夏秋葉で調査を行った。各供試樹の樹冠外周部に温度測定データロガー (おんどどり Jr. TR51i, (株) ティアンドデイ) をチャック付きポリ袋で包みアルミホイルで遮光した状態で設置し、ポリ袋内の温度を 10 分間隔で測定し、ポリ袋設置中の平均温度を求めた。

表1 各供試樹の調査葉の病斑数

品種	試験年	調査葉数	各調査葉の病斑数							
			No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8
せとか	2019年	4	70	30	26	2	-	-	-	-
南津海	2019年	5	45	27	9	5	5	-	-	-
宮川早生	2020年	5	3	14	8	20	5	13	4	20

注) ‘宮川早生’では1月16日から4月2日まではNo.1～5で調査を行った。これ以降は一部調査葉が落葉したため、4月14日から27日まではNo.3～7で、5月7日から5月21日まではNo.4～8で調査した

## 2. 旧葉への接種による感染時期の解明 (試験 2)

2019年は‘せとか’(10年生) , ‘林温州’(17年生) およびレモン(14年生) , 2020年は‘林温州’(18年生) を用いた。2019年は2月15日から4月5日(発芽期)まで, 2020年は2月17日から3月31日(発芽期)まで概ね10日間隔で, 10~15枚の旧葉(前年に発生した春葉)に対する付傷接種を行った。すなわち,  $1 \times 10^4$ cfu/ml または  $1 \times 10^6$ cfu/ml に調整した X0801 株の細菌懸濁液をハンドスプレーで葉裏に噴霧し, ただちに1葉あたり2箇所針で菌液を貫通するようにせん刺した。2019年は5月30日, 2020年は5月29日に発病箇所数を調査し, 発病箇所率を算出した。試験は1区1樹4反復(2019年)もしくは3反復(2020年)で行った。

## 3. 2月の無機銅剤散布による防除効果 (試験 3)

2020年に‘はるみ’(18年生) を用いて試験を実施した。試験区は, IC ボルドー66D の40倍希釈液を2月26日と3月23日(発芽期の11日前)に散布した2回散布区, 3月23日のみに散布した1回散布区, 無処理区の3区を設けた。散布は動力噴霧機を用いて8L/樹で行った。6月11日(初発から7日後)に任意の100葉(新葉)について発病葉数を程度別に調査し, 発病葉率および発病度を算出した。発病度は次式に基づいて計算し, 発病度から防除価を計算した。試験期間中の降雨量は果樹試験場内の気象観測装置で測定した。試験は1区1樹4反復で行った。

発病度 =  $\Sigma$  (程度別発病数 × 指数) × 100 ÷ (調査数 × 7)

指数 0 : 病斑がないもの, 1 : 病斑が3個未満のもの, 3 : 病斑が4~10個のもの,

5 : 病斑が11~20個のもの, 7 : 病斑が21個以上のもの

## 結 果

### 1. 越冬病斑からの溢出菌量の定量 (試験 1)

#### 1) リアルタイム PCR 法によるカンキツかいよう病菌の定量

検量線の回帰直線は  $1 \times 10 \sim 1 \times 10^8$ cfu/ml の範囲で強い直線性 ( $R^2=0.9998$ ) が認められた(図1)。PCR 効率率は 88.2% (傾き:  $-3.64$ ) となり, 適正とされている範囲内(80~120%)であった(北條, 2008)。一方, 1cfu/ml からは増幅が認められず,  $1 \times 10^9$ cfu/ml からは増幅は認められるものの, その Ct 値はこの回帰直線からやや外れたため, 本手法による定量可能範囲は  $1 \times 10 \sim 1 \times 10^8$ cfu/ml であった。

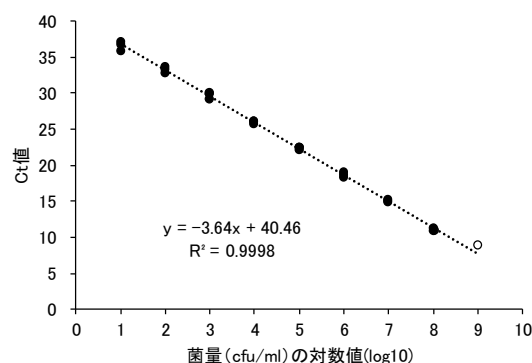


図1 リアルタイムPCR法によるかいよう病菌定量のための検量線  
注)  $1 \times 10^9$  cfu/ml のサンプル(白抜き○)からも増幅が認められたが, その Ct 値は回帰直線からやや外れる

## 2) 越冬病斑からの溢出菌量の推移

1葉あたりの溢出菌量について、2019年はポリ袋内の平均温度13℃未満で推移した1月28日から4月11日までは‘せとか’，‘南津海’ともに $1 \times 10^3$ cfu/ml以下で推移したが、約20℃となった4月23日に増加し、これ以降は $1 \times 10^4$ cfu/ml以上で推移した(図2)。2020年は、平均気温が2.0~13.9℃と寒暖差が大きかった1月16日から4月2日までは、‘宮川早生’において概ね $10^3$ cfu/ml以下で推移したが、約15℃となった4月27日に増加し、これ以降は概ね $10^5$ cfu/mlの菌量で推移した。最も菌量が多かった調査葉は、2019年2月28日における‘せとか’のNo.1(病斑数70)で、 $5.8 \times 10^3$ cfu/mlであった。なお、ポリ袋内の平均温度は野外の平均気温(果樹試験場気象観測装置による観測)とほぼ同じであった(データ省略)。

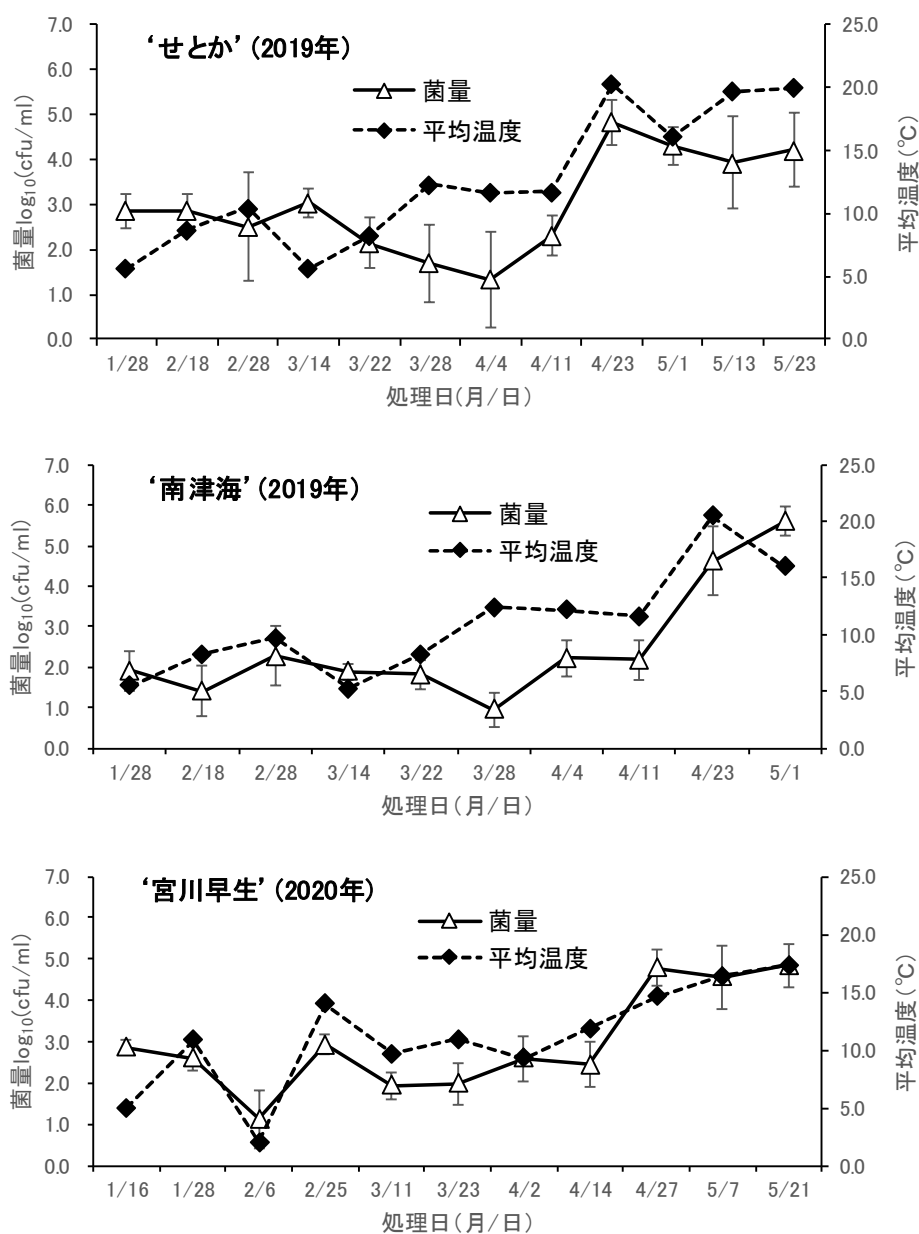


図2 越冬病斑からの溢出菌量の推移

注) 図中の縦棒は標準誤差を示す(せとか:n=4, 南津海:n=5, 宮川早生:n=5)

## 2. 旧葉への接種による感染時期の解明（試験 2）

1×10<sup>4</sup>cfu/ml の細菌懸濁液で接種した場合，2019 年は 3 品種とも 3 月 27 日接種まで発病が認められず，4 月 5 日（発芽期）接種において発病箇所率 1.6～6.7%と発病が認められた（図 3）．2020 年は，‘林温州’において 3 月 9 日接種まで発病が認められず，3 月 19 日以降の接種で発病箇所率 5.0～6.7%と発病が認められた．1×10<sup>6</sup>cfu/ml で接種した場合，2019 年は‘林温州’のみ 3 月 6 日接種で発病箇所率 1.3%と発病が認められ，3 月 15 日以降の接種では 3 品種とも発病し，4 月 5 日（発芽期）接種において発病箇所率 17.3～52.4%と最も高くなった．2020 年は，3 月 9 日接種で発病が認められ，3 月 30 日（発芽期）接種において 46.5%と最も高くなった．

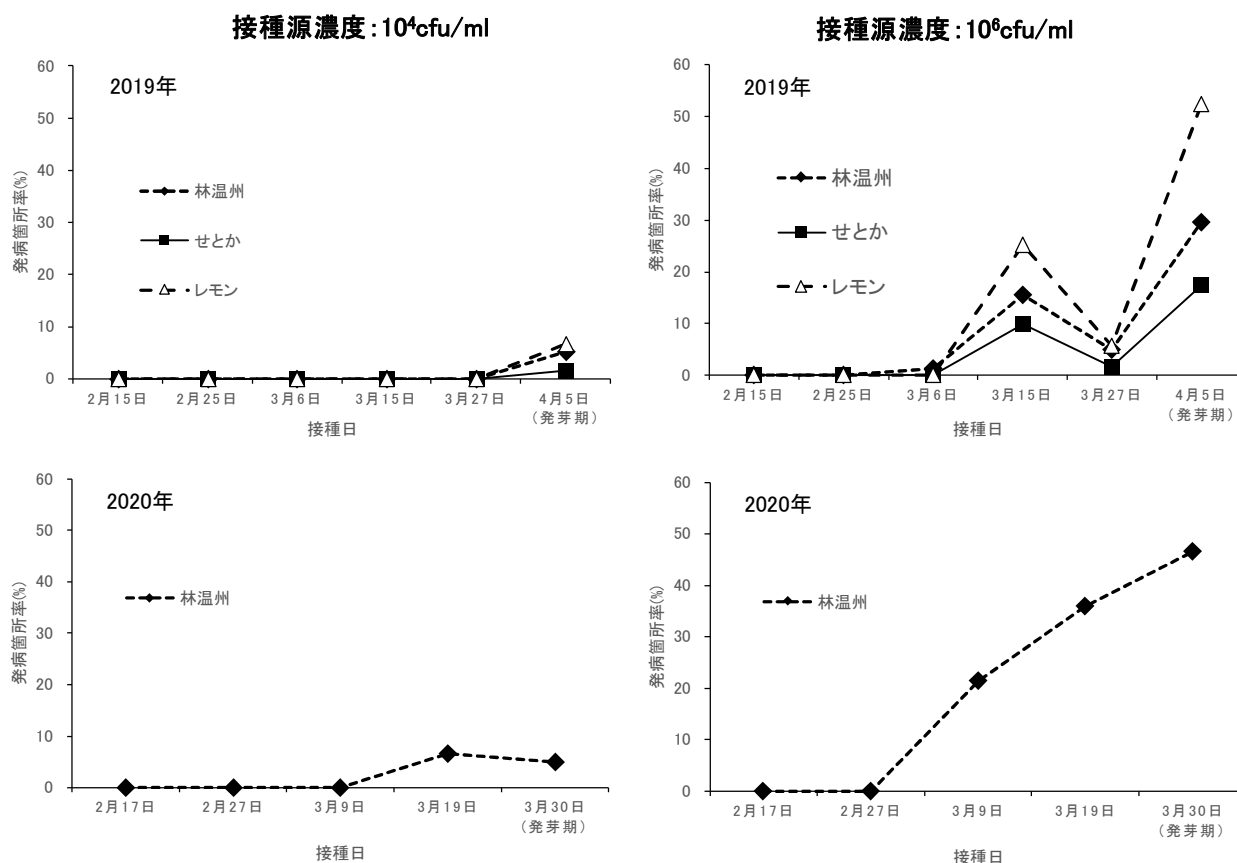


図3 時期別接種による旧葉への感染時期

## 3. 2月の無機銅剤散布による防除効果（試験 3）

試験期間中の降雨状況は，2月26日（1回目散布日）から3月23日（2回目散布日）までは降水量 94.5mm，降雨日数 10日，3月23日から6月11日（調査日）までは降水量 297mm，降雨日数 22日であった（表 2）．無処理区の発病葉率は 3.9%，発病度は 0.8 で少発生条件下での試験となった．2回散布区および1回散布区の発病葉率，発病度はともに 0 で，防除価は両区ともに 100 であった（図 4）．

表2 試験期間中の降雨状況（2020年）

	2月26日	3月23日	6月11日
降水量(mm)	94.5	297	
降雨日数(日)	10	22	

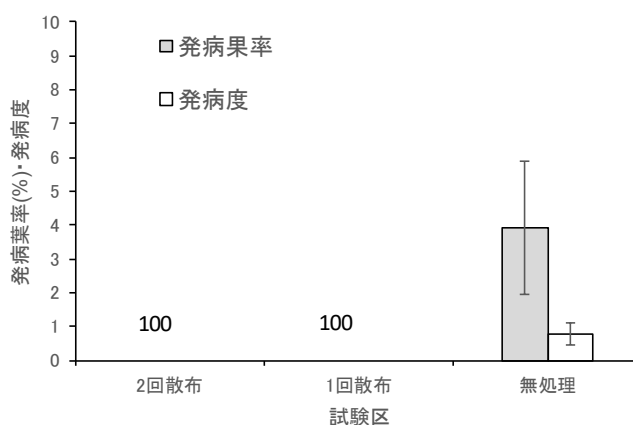


図4 銅剤の散布時期が発病に及ぼす影響

注) 図中の縦棒は標準誤差を示す(n=4)

図中の数字は防除値を示す

## 考 察

果樹の病害を防除するうえでは、発芽前に薬剤散布を実施し初期の発生を抑えることが重要である(田代, 2007)。カンキツかいよう病においても発芽前防除の重要性は高く(三好・清水, 2016; 芹澤, 1992)、本県では3月中旬が防除開始適期だとされている(和歌山県, 2019)。しかし、発芽前の防除適期について詳細に検討した事例はないため、2019～2020年にいくつかの試験を行い、本病の防除開始適期を再検討した。

まず、結露状態を再現した葉の越冬病斑からの溢出菌量の推移を調査した。菌量の定量に用いたリアルタイムPCR法は、 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mlの範囲内では高い精度で定量が可能であったため、実用性は高いと考えられた。本手法により、2019年は‘せとか’および‘南津海’、2020年は‘宮川早生’の旧葉(夏秋葉)について溢出菌量の推移を調査した。その結果、発芽期(2019年:4月5日、2020年3月25日)以前の菌量はいずれの品種においても $1 \times 10^3$ cfu/ml以下の低い値で推移した。最も溢出菌量が多かった葉(2019年2月28日処理の‘せとか’のNo. 1, 病斑数70)においても、菌量は $5.8 \times 10^3$ cfu/mlであった。しかも本試験では葉全体が濡れた状態を24時間保持したが、実際の結露は夜から翌朝までである。これらのことから、発芽期以前に生じた結露中の菌量は、多くても $1 \times 10^4$ cfu/ml未満だと考えられた。

次に、既報(小泉, 1977)の接種源濃度 $10^7$ cfu/mlよりも低い濃度の細菌懸濁液を用いて、2月中旬から発芽期までの期間に旧葉に対する時期別の付傷接種を行った。試験時は発芽期以前に生じた結露中の菌量が不明であったため、 $1 \times 10^4$ cfu/mlまたは $1 \times 10^6$ cfu/mlで試験した。その結果、発病が認められたのは、 $1 \times 10^6$ cfu/mlでは3月上旬以降、 $1 \times 10^4$ cfu/mlでは3月中旬以降の接種であった。 $1 \times 10^7$ cfu/mlでは2月中旬の接種で発病が認められた(小泉, 1977)事例を考慮すると、接種源濃度が低いほど旧葉に感染可能な時期は遅くなると考えられた。すなわち、 $1 \times 10^7$ cfu/mlであれば2月中旬以降、 $1 \times 10^6$ cfu/mlでは3月上旬以降、 $1 \times 10^4$ cfu/mlでは3月中旬以降に感染・発病すると思われた。発芽期以前に生じた結露中の菌量は $1 \times 10^4$ cfu/ml未満なので、早くとも3月中旬以降でないが芹澤(1992)が指摘した結露による越冬病斑周辺への感染は成立しないと考えられた。

最後に、発芽期以前の防除の必要性を明らかにするため、2月の無機銅剤〔ICボルドー66D(40倍

希釈液)〕散布による防除効果を検討した。供試薬剤を2月26日と3月23日(発芽期の11日前)に散布した2回散布区と3月23日のみ散布した1回散布区の間で防除効果を比較したところ、両区ともに防除価100と差は認められなかった。これらのことから、2月下旬に無機銅剤を散布する必要はないと考えられた。ただし、本試験は少発生条件下であったため、多発条件下でも検討を行う必要がある。

以上の結果から、本病の防除開始適期は従来通りの3月中旬頃でよいと考えられる。

## 摘 要

カンキツかいよう病の防除開始適期を再検討した。

1. 結露状態を再現した旧葉(夏秋葉)の越冬病斑からの溢出菌量は、発芽期以前は $1 \times 10^3$ cfu/ml以下の低い値で推移し、最も多かった旧葉においても $5.8 \times 10^3$ cfu/mlであった。
  2. 2濃度の接種源を用いて2月中旬から発芽期までの期間に旧葉に対する時期別の付傷接種を行ったところ、 $1 \times 10^6$ cfu/mlでは3月上旬以降、 $1 \times 10^4$ cfu/mlでは3月中旬以降の接種で発病が認められた。発芽期以前の結露中の溢出菌量は $10^4$ cfu/ml未満であるため、早くとも3月中旬以降でない結露による越冬病斑周辺への感染は成立しないと考えられた。
  3. 無機銅剤〔ICボルドー66D(40倍希釈液)〕を2月26日と3月23日(発芽期の11日前)に散布した2回散布区と3月23日のみ散布した1回散布区の間で防除効果を比較した結果、両区間に差は認められなかった。そのため、2月下旬に無機銅剤を散布する必要はないと考えられた。
- 以上の結果から、本病の防除開始適期は従来通りの3月中旬頃でよいと考えられる。

本研究の実施期間中に試験の補助をして下さった小澤まり子さんにお礼申し上げます。

## 引用文献

- Cubero, J and Graham, J. H. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3):1257-1264.
- 後藤正夫. 1962. カンキツかいよう病に関する研究(I). 静大農研報 12:3-72.
- 北條浩彦. 2008. 原理からよくわかるリアルタイムPCR実験ガイド. p. 41. 羊土社. 東京
- 小泉銘冊. 1977. カンキツかいよう病における spring canker の発生要因. 果樹試験場報告 B 興津 4:115-129.
- 三好孝典・清水伸一. 2016. 宮内イヨカンにおける樹冠流下雨水中のカンキツかいよう病の病原細菌量と発病との関係および銅水和剤を用いた春先の防除適期について. 植物防疫 70(6):375-381.
- Pertier, G. L. and Neal, D. C. 1918. Overwintering of the citrus-canker organism in the bark tissue of hardy citrus hybrids. *Ibid.* 14:523-524.
- 芹澤拙夫. 1992. カンキツかいよう病の生態と防除に関する研究. 静岡柑橘試特別報告 5:1-153.
- 塩谷浩. 2010. カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 微生物遺伝資源利用マニュアル 29:1-11.

田代暢哉. 2007. 果樹の病虫害防除. 農文協. 東京. p. 52.

和歌山県農林水産部. 2019. 平成31年度農作物病虫害及び雑草防除指針. p. 135. 和歌山県.