

高知県におけるニラとショウガの土壌伝染性病害の
発生生態と防除に関する研究

Studies on the Epidemiology and Control of Soilborne Diseases of
Chinese Chive and Ginger in Kochi Prefecture, Japan

2014. 3

東京農工大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻

山崎 睦子

Mutsuko Yamazaki

総合序論	1
第1章 ニラ乾腐病の発生生態と防除	8
第1節 高知県におけるニラ乾腐病の発生状況	14
1. 乾腐症状を示すニラからの菌分離	
2. 分離 <i>Fusarium</i> 属菌のニラに対する病原性	
第2節 病原性 <i>Fusarium</i> 属菌の同定とその性状	23
1. <i>F. oxysporum</i>	
2. <i>F. proliferatum</i> (病原追加)	
第3節 ニラ乾腐病菌の rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域および histone H3 領域 の塩基配列に基づく分子系統	67
1. ニラ乾腐病菌とネギ萎凋病菌の分子系統比較	
2. ニラ乾腐病菌と非病原性 <i>Fusarium</i> 属菌 (NPF) の分子系統比較	
第4節 交配関連遺伝子 (<i>MAT</i> 遺伝子) の検定	81
1. <i>F. oxysporum</i>	
2. <i>F. proliferatum</i>	
第5節 病原性関連遺伝子 (<i>SIX</i> 遺伝子) の検定	89
1. <i>F. oxysporum</i>	
2. <i>F. proliferatum</i>	
第6節 乾腐病菌のニラ植物体内における分布	94
1. 汚染土壌に播種した場合のニラ乾腐病菌の植物体内における分布	
2. 汚染土壌に植付けした場合のニラ乾腐病菌の植物体内における分布	
3. 発病程度とニラ乾腐病菌の植物体内における分布	
4. ニラ乾腐病菌と非病原性 <i>Fusarium</i> 属菌の植物体内における分布	
第7節 ニラ乾腐病の簡易診断法の検討	104
第8節 ニラ乾腐病菌の死滅温度	108
第9節 ニラ乾腐病の防除法	111
1. 土壌還元消毒および太陽熱消毒	
2. 土壌くん蒸処理	
3. 殺菌剤および資材の土壌灌注処理	

第2章	ニラ紅色根腐病の発生生態と防除	122
第1節	発生状況, 病徴	123
1.	罹病ニラの採集およびニラ組織からの糸状菌の分離	
2.	分離菌のニラに対する病原性	
第2節	菌糸生育温度および発病好適温度	130
1.	菌糸の生育適温	
2.	発病好適温度	
第3節	宿主範囲	134
第4節	感染ステージと病徴	138
第5節	ニラ紅色根腐病菌とニラ乾腐病菌の複合感染	143
第6節	ニラ紅色根腐病菌の死滅温度	149
第7節	ニラ紅色根腐病の防除法	153
1.	土壌還元消毒および太陽熱消毒	
2.	土壌くん蒸処理	
3.	殺菌剤の土壌灌注処理	
第3章	ショウガ疫病(新称)の発生生態と防除	161
第1節	病原菌の同定	162
1.	ショウガに対する病原性	
2.	病原菌の培養性状, 生育温度および形態的特徴	
3.	r-DNA ITS 領域の塩基配列の相同性検索	
第2節	各種植物に対する病原性	174
第3節	発病適温	178
第4節	露地栽培条件下の発病時期	181
第5節	貯蔵中の発病の進展	187
1.	罹病根茎の発病の進展	
2.	罹病根茎から健全根茎への伝染	
3.	汚染土壌から健全根茎への伝染	
第6節	ショウガ疫病菌の死滅温度	192

第7節 ショウガ疫病の防除法	196
1. 土壌還元消毒および湛水処理	
2. 土壌くん蒸処理	
3. 殺菌剤の土壌灌注処理	
第4章 ショウガ根茎暗斑病（新称）の発生生態と防除	206
第1節 高知県における発生状況および病徴	208
第2節 病原菌の同定	211
1. 供試菌株のショウガに対する病原性	
2. 分離菌の形態観察および生育温度	
3. rDNA-ITS 領域の塩基配列	
第3節 各種植物に対する病原性	219
第4節 発病推移	223
1. 病斑数の推移	
2. 発病程度の推移	
第5節 伝染源となりやすい有機物資材の検討	227
第6節 ショウガ根茎暗斑病の防除法	231
1. 土壌くん蒸剤	
2. 殺菌剤	
第5章 総合考察	238
要旨	247
謝辞	250
引用文献	251

総合序論

植物に病気を引き起こす病原微生物には、真核生物の糸状菌をはじめ原核生物の細菌やファイトプラズマ、非生物のウイルス、ウイロイドなどがあり、日本国内で発生する植物病（線虫を除く）は、農業生物資源ジーンバンクの日本植物病名データベース（http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php, 日本植物病害目録 第2版, 2013年9月4日更新）に、9,203種類が収録されている。

植物病のうち、「土壌中に病原が存在し、土壌を通じて第一次感染が起こる病害」（植物土壌病害の事典, 1998）と定義される土壌伝染性病害は、病原菌の侵入および感染部位が主として根部または地際部の茎などであるため、空気伝染性病害のように初期病徴を正確に把握することが難しく、気付いた時には病害が進行しているケースが多い。また、植物病は、病原菌である主因、宿主植物である素因ならびに環境要因である誘因が重なって引き起こされるが、土壌伝染性病害では特に誘因である土壌の物理、化学、生物的要素が幾重にも関与するため、発病メカニズムはより複雑である。特に、土壌中には多数の腐生菌が存在するため微生物相は多種多様であり、主因である病原体を特定することは困難である。それ故、即効性のある防除法の確立が難しく、土壌伝染性病害は難防除であるとされる。

土壌伝染性病害の診断および防除対策を効果的に行うためには、病害の発生生態、病原菌の生理生態を良く理解しておくことが重要である。

また、土壌伝染性病害は、病原菌に汚染された土壌、資材および罹病植物の残渣などが栽培作業や風雨などによって生産圃場に持ち込まれたり、感染種苗が本圃へ移植されることによって被害が引き起こされる。そのため、土壌伝染性病害の被害回避または早期防除には、病原菌の発生生態に基づく予防主体の防除対策を確立することが必要不可欠である。

高知県では、温暖な気候を生かした集約的で生産効率の高い施設園芸および水田転換畑での露地栽培が盛んである。一方、県土総面積の 71 万 ha のうち約 84%は林野を占め、経営耕地面積はわずか 3%しか無い。限られた耕地を高度利用せざるを得ないため、土壌伝染性病害が発生しやすく、高品質で安定的な生産を脅かすケースがみられている。

高知県における施設野菜の代表格であるニラは、2011 年に栽培面積が 270 ha、出荷量が 15,500 t と、それぞれ全国の約 12.1%、26.7%を占めるとともに、ここ数年栽培面積が増加（2003 年 201 ha→2011 年 270 ha：農林水産省、平成 23 年度野菜生産出荷統計）している重要作目である。ニラの主要産地は高知県、栃木県、茨城県、群馬県、千葉県であり、出荷量は高知県が第 1 位である。また、高知県における主要な露地野菜であるショウガの栽培面積は、463 ha、出荷量は 18,600 t であり、それぞれ全国の約 23.7%、44.5%を占める。ショウガの主産地は高知県、千葉県、熊本県、宮崎県、和歌山県であり、出荷量は高知県が第 1 位である。このように、ニラおよびショウガは高知県の園芸を支える重要な作目であり、高知県は両作目の国内最大の産地として高品質で安定的な供給を行う使命を負っている。

ニラ (*Allium tuberosum* Rottler) はクサスギカズラ目ヒガンバナ科ネギ属（被子植物系統グループ、Angiosperm Phylogeny Group : APGIII, 2009）の多年草植物で、地下に形成される鱗茎によって繁殖する。ネギ属には約 780 種が含まれ、そのうちニラ、ネギ、タマネギ、ニンニク、リーキなどの約 20 種が食用にされ、独特の風味を持つものが多い。ニラは、緑黄色野菜としての葉ニラのほか、軟白栽培された黄ニラ、花茎と若い蕾が可食部となる花ニラなどがあり、香辛野菜として中華料理や韓国料理などの食材として知られる。原産地は中国西部とされ、わが国には 6 世紀末には渡来し、古くは加美良（かみら）、久々美良（くくみら）、彌良（みら）と呼ばれていた。

高知県におけるニラ栽培は、1954年頃に香美郡野市町（現在の香南市）に導入されたことに始まる。当時は、小型トンネルで夜間はこもで覆って保温していたが、ハウス栽培の導入や二重ビニール被覆などの技術の普及により栽培期間の延長が図られた。さらに、第一次オイルショックの1973年からは、他の施設園芸より設備投資が少なく、無加温で栽培可能な品目が望まれたため、急速に栽培面積が拡大した。宮崎県や大分県などのニラ栽培は、本県から技術導入されたといわれる。また、1988年には小袋包装や鮮度保持技術の導入による高付加価値化および品質向上がすすみ、1993年には粗生産額は78億円を突破した。その後、競合産地の栽培面積増加や野菜価格の低迷、担い手の減少などで減少傾向にあったが、他の施設園芸と比べ初期投資が少なく、軽作業であることなど理由から、新規参入や規模拡大がみられ、ここ数年間は14,000t前後の出荷量を維持している。

ニラでは、20種類の病害が報告されており、糸状菌による病害は13種類であるとされる（日本植物病名データベース、2013）。そのうち土壌伝染性病害である乾腐病や紅色根腐病は高知県内の産地において常に発生しており、収量・品質の低下を引き起こすため問題になっている。ニラの主要な作型である施設栽培は、栽培期間が約1年3～4ヶ月と長く、その間に刈取りと再生を年間5回～6回繰り返し行うため、乾腐病や紅色根腐病が一旦発生すると栽培終了まで影響を及ぼすうえ、次作でも同様の被害が生じることが多く、経済的損失が大きい。これらの病害は、生産圃場では散発的に発病が確認されており、無病徴株も潜在していると考えられる。

ニラ乾腐病については、病原として *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder et Hans. が報告されている（木嶋ら、1983）ものの、本病原菌の生理生態、分子系統学的分類、迅速な診断方法および効果的な防除法などに関する知見が少ない。

ニラ紅色根腐病については、病原として *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walker & Larson が報告されている (石川ら, 1995) が、発生時期や伝染方法など発生生態が不明であり、効果的な防除方法も明らかになっていない。

ショウガ (*Zingiber officinale* (Willd.) Rosc.) は、ショウガ科に属する単子葉植物で、地下に形成される根茎によって繁殖する多年草植物である。香辛野菜として古くから世界的に知られるが、原産地はインドから中国にかけての地域で、わが国には 3 世紀末には渡来していたとされる。古くは薑 (はじかみ) と呼ばれ、薬用、香辛料、漬物などに利用されてきた。高知県へは、明治の初年にショウガ栽培が導入され、現在の高知市など県中央部から中西部の中山間部や平坦地に産地が形成された。近年では、水田転換により水田跡地での栽培が増加し、1984 年には約 1,300 ha で栽培された。1991 年になると、中国、インドネシア、タイ、台湾などから漬物用や加工用のショウガの輸入が増加したため、1992 年には高知県の栽培面積は 900 ha 台にまで減少し、2004 年～2008 年の出荷量は低く推移した。その後、中国産の加工食品の残留農薬問題などにより国内の食品に対する安全性確保の高まりを受け、2009 年以降の出荷量は増加傾向に転じている。

ショウガは根茎の形状や大きさにより、小ショウガ、中ショウガおよび大ショウガの 3 品種群に大別されている。また、利用部位により根ショウガおよび葉ショウガなどに分けられる。高知県は、根ショウガの産地であり、国内において最も多い出荷量を誇っている。

栽培法は、露地栽培とハウス栽培に大きく分けられる。高知県では露地栽培が主流であり、4 月上旬から下旬にかけて種根茎を植付け、10 月下旬から 11 月上旬にかけて収穫する。収穫後は直ちに低温貯蔵庫または横穴で貯蔵し、12 月以降から翌年 9 月頃まで随時出荷する。一方のハウス栽培では 12 月から翌年 3 月までに植付け、5 月から 7 月にかけて収穫し、

直ちに水洗して新ショウガとして出荷する。

ショウガでは、根茎腐敗病、青枯病、立枯病、腐敗病、紅色根茎腐敗病、紋枯病などの12種類の病害が報告されている（日本植物病名データベース, 2013）。特に、露地ショウガでは、種根茎をはじめ、栽培期間中ならびに収穫以降の貯蔵期間中の根茎は、常に土壌と接しているため、根茎腐敗病を筆頭に疫病や根茎暗斑病などの種々の土壌伝染性病害による被害を受けやすく、収量や品質の低下を招いている。そのうち、疫病、根茎暗斑病は、これまで病原菌の生理生態や発病条件などが不明であったため、効果的な防除対策が取られておらず、県内では慢性的な発生がみられている。

ショウガ疫病は、病原菌が *Phytophthora* sp.（小林ら, 1999）と報告されているものの、種の同定には至っていない。また、疫病は栽培期間中や貯蔵期間中に発生する可能性が示唆されているものの、詳しい発生生態は明らかにされておらず、具体的な防除対策も検討されていない。

ショウガ根茎暗斑病は、根茎表面に黒色で不整形な病斑を生じる病害であるが、根茎内部を腐敗させることはなく、地上部には異常を生じさせない。そのため、貯蔵後の調整・出荷時に初めて発生が確認されることから、発生圃場の特定や栽培履歴の追跡が困難であり、原因究明や防除対策の難しい障害とされてきた。また、根茎に生じる黒色の斑紋がいもち病（古谷, 1995）の病斑と酷似しているため、生産現場では両病害を混同しているケースも多く見受けられる。この様な理由から、長らく本病害は、生理障害、虫害、薬害、病害のいずれであるかが特定されず、原因は不明であった。また、本病の発生生態は明らかにされておらず、防除対策も検討されていなかった。

しかし、これら土壌伝染性病害の発生原因を正しく知ることは、適切な防除対策を行う

うえで必要不可欠である。そして、病原菌の生理生態に基づいた正確な病害診断と防除は、産地の維持・発展、食の安全・安心や環境保全にも貢献することができると思う。

本研究では、高知県内の主要産地で発生している土壌伝染性病害のうち、特に原因究明や防除対策が困難とされてきたニラ乾腐病、ニラ紅色根腐病、ショウガ疫病およびショウガ根茎暗斑病を対象とし、発生生態と効果的な防除法を明らかにすることを目的とした。

ニラ乾腐病については、病原菌の宿主特異性分化を明らかにするとともに、分子系統解析を行うことで遺伝的多様性や他分化型との系統関係を検討した。また、乾腐病の病原として既に報告されている *F. oxysporum* 以外の病原性 *Fusarium* 属菌の種を同定し、新たに病原を追加した。さらに、乾腐病菌の遺伝的多様性を検討するため交配関連遺伝子 (*MAT* 遺伝子) を検定した。迅速な病害診断を目指して、乾腐病菌の病原性関連遺伝子 (*SIX* 遺伝子) の検定を行い、遺伝子診断の可能性を検討した。さらに、従来の生物検定法より短期間で診断できる簡易検定法を検討した。本病の診断に適するニラの部位を明らかにするため、*nit* 変異株 (硝酸塩利用能欠損変異株, nitrate-nonutilizing mutant) を用いて、感染時期や発病程度の異なるニラ体内における乾腐病菌の分布、乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の分布の差異について調査した。本病の防除法については、土壌中の乾腐病菌の死滅温度を明らかにするとともに、本病に対する土壌還元消毒、太陽熱消毒、土壌くん蒸剤および生育期における数種殺菌剤の防除試験を行った。なお、土壌消毒のうち、土壌還元消毒は、*Fusarium* 属菌をはじめとした土壌病害の発生抑制に効果があるとされており (新村, 2004 ; 竹内, 2004)、有機物を土壌に混和して圃場容水量が十分に維持できる条件下で、30°C 以上の地温を確保し、土壌を還元状態にさせて病原菌を死滅させる方法である (新村, 2004)。太陽熱消毒は、栽培休閑期にハウス内を密閉し、太陽熱により地温を 40~45°C 以上に確保

して、病害虫を死滅させる方法である（岡山，1999）。

ニラ紅色根腐病については、各種植物に対する宿主範囲，感染時期と発病推移，菌糸生育温度ならびに発病好適温度，死滅温度を検討するとともに，防除法として，還元土壤消毒，太陽熱消毒，土壤くん蒸剤および生育期における数種殺菌剤の防除効果を検討した。

ショウガ疫病については，病原菌の種を同定するとともに各種植物に対する病原性，発病適温ならびに死滅温度を明らかにした。そして，本病の露地栽培条件下および収穫後の貯蔵期間における発病についての知見を得た。また，本病に対する還元土壤消毒，湛水処理，土壤くん蒸剤および生育期における数種殺菌剤の防除効果を検討した。

ショウガ根茎暗斑病については，病原菌を同定するとともに，各種植物に対する病原性，本病の発生時期，ショウガ栽培に用いられる資材のうち本菌が発生しやすい有機資材を明らかにした。また，本病に対する土壤くん蒸剤および生育期における数種殺菌剤の防除効果を検討した。

本論文では，高知県で発生する土壤伝染性病害のうち，ニラに発生する乾腐病および紅色根腐病，ショウガに発生する疫病および根茎暗斑病の発生生態と防除に関する知見をとりまとめた。

第1章 ニラ乾腐病の発生生態と防除

高知県におけるニラの主要な作型である施設栽培では、2月～3月の播種からはじまり、5月～6月に苗を移植、その後約120日間の株養成期間を経て、翌年6月まで葉の刈取りと再生を繰り返す。このように栽培期間が1年3～4ヶ月と長期に亘るため、一旦土壌伝染性病害が発生すると栽培終了まで影響を及ぼすとともに、次作にも同様の被害を引き起こす恐れがある。ニラ栽培において最も重要な土壌伝染性病害である乾腐病は、県内の生産圃場で散発的に発生しており、2012年度の発生面積は48.4 ha、発生面積率は25.0%とされる（平成24年度農作物有害動植物発生予察事業年報 高知県病害虫防除所）。

ニラ乾腐病の病徴は、はじめ株の一部で葉幅が狭く、草丈が低くなりはじめ、刈取り回数が多くなるにつれて萌芽しにくくなり、時に葉先枯れや紫紅色を帯びる。地上部の生育抑制がみられる株の鱗茎の基底部（茎盤）の内部は褐変や乾腐症状を呈する。病気が進展すると、分けつが減少し、株全体が矮小となり、ついには枯死する。しかし、地上部に特徴的な病斑等は現れないため、土壌伝染性病害である紅色根腐病や、土壌肥料に由来する生育不良と混同されている事例が多い。

ニラ乾腐病の病原には、*Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder et Hansenが報告されている（木嶋ら, 1983）。*F. oxysporum* は、土壌をはじめ環境中に幅広く生息する菌類であり、多様な植物に病害を引き起こす土壌伝染性病原菌として農業上数多くの重要病害が知られている。植物に病原性を示す *F. oxysporum* については、宿主植物が120種以上あるとされる（Armstrong & Armstrong, 1981）。また、*F. oxysporum* の各菌株には、特定の植物種に限り宿主性を有する群が存在し、その宿主範囲に応じて分化型（単数形：forma specialis, 複数形：formae specialis, f. sp. あるいは f. spp. と略す）として分類される。ニラ乾腐病について

は、ニラの他にネギやタマネギにやや病原性を示すとされるが、分化型の同定には至っていない(木嶋ら, 1985). また, ニラ乾腐病には, *F. oxysporum* と同様の病徴を示す *F. moniliforme* も関与する可能性が示唆されており, ニラ, ニンニク, タマネギ, ラッキョウ, ノビルの5種類の植物への接種試験では, 同時に接種試験を行った *F. oxysporum* と同様に, 無傷接種でニラのみ, 有傷接種でニラとネギに病原性を示すとしている(森田ら, 1992). しかし, 当時の菌株が保存されていないため, 本研究によってニラに病原性があることが明らかとなった *F. proliferatum* との比較, 検討ができない. なお, Snyder and Hansen などの分類体系で *F. moniliforme* として扱われてきた種については, 近年分子系統学的解析によって分類学的な異動が著しい(青木, 2009). 本種内には生物学的種(交配群: Mating populations)が複数存在することが見出されたため, 9つの交配群と対応する有性世代により再分類され, 近年では比較形態学および分子系統学的解析により約35種(*F. verticillioides* (= *F. moniliforme*, 狭義), *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* など)から成る *Gibberella fujikuroi* 種複合体のひとつの種であるとされている. また, *F. moniliforme* として扱われてきた種は, 命名規約上で優先権を持つ *F. verticillioides* の異名であることが明らかとなったため, その種名の使用停止勧告がされている(青木, 2009). そのため, 本章では, ニラ乾腐病 *F. oxysporum* と同様の病徴を示す *Fusarium* 属菌の種を形態学および分子系統学的解析により明らかにした.

Fusarium 属菌は分類学上, 子囊菌に分類され, 鎌形から円筒形が多隔壁分生子(無性孢子)をフィアロ型に形成する特徴を持つ不完全糸状菌のひとつである. これまで長らくの間, *F. oxysporum* をはじめとする植物病原糸状菌は, 主として形態的特徴に基づく分類がされていたが(Wollenweber and Reinking, 1935; Snyder and Hansen, 1940, 1941, 1945; Booth,

1971), 近年は遺伝子 DNA の配列に基づく分子系統学的解析手法が導入され, 分類の再構築 (再編) が進められつつある (青木, 2001).

菌類の分類・同定に用いる遺伝子あるいはゲノム領域には, 全ての菌が保持しかつ適度な進化速度を示すことが必要とされるため, これらの条件を満たす遺伝子として rDNA 領域が広く用いられている. この領域には 18S (small subunit), 5.8S, 26S (large subunit) および 5S の 4 つのサブユニットをコードする遺伝子のほか, 18S と 26S の間に ITS (internal transcribed spacer) 領域および IGS (intergenic spacer) 領域が存在する. このうち, ITS 領域および IGS 領域の塩基配列は, 菌種によって異なるため, 両領域は菌類の分類・同定に用いられている (杉田ら, 2004). 特に, rDNA-IGS 領域の塩基配列は, *F. oxysporum* の種内分子系統解析に適しているとされ, Kawabe *et al.* (2005) が設計したプライマーセット (FIGS11 / FIGS12) を用いると, *F. oxysporum* や近縁の *F. sacchari* (E. J. Butler) W. Gams (teleomorph, *Gibberella sacchari*) などの *Gibberella fujikuroi* 種複合体のゲノム DNA を鋳型にした場合のみ約 600 bp の増幅断片が得られ, 同定と種内系統解析に応用可能である. EF1 α 領域の塩基配列は, 真核細胞の転写伸長因子 (O' Donnell *et al.*, 1998b; Baayen *et al.*, 2000; Skovgaard *et al.*, 2001; Jiménez-Gasco *et al.*, 2004; Lievens *et al.*, 2009a) である. histone H3 領域の塩基配列は, 真核生物にのみ存在し, 多くの翻訳後に修飾可能なアミノ酸残基を持つことから, 様々な制御機構に関与するとされ, *Fusarium* 属菌の分子系統解析に用いられている (Glass and Donaldson, 1995 ; O' Donnell *et al.*, 2004 ; Steenkamp *et al.*, 1999). また, histone H3 領域の塩基配列は, 農業生物資源ジーンバンクにける日本産 *Fusarium* 属菌種の最新の分類学的基礎に基づいた再構築にも用いられている. なお, EF1 α 領域および histone H3 領域については, *Gibberella fujikuroi* 種複合体の同定に有効とされている (青木, 2001).

また、*F. oxysporum* は、有性生殖に関係する交配型関連遺伝子座 *MAT1* の存在および各座に乗る遺伝子の発現が報告されており (Arie *et al.*, 2000 ; Yun *et al.*, 2000), *F. oxysporum* 菌株の交配型 (*MAT1-1* あるいは *MAT1-2*) は交配型遺伝子領域 (*MAT1*) が、対立する二型 (*MAT1-1*, *MAT1-2*) のどちらかであるかによって決定される (Arie *et al.*, 2000). 交配型遺伝子は、rDNA -ITS (internal transcribed spacer) 領域と比較すると変異頻度は高いが、近縁の菌株間の系統解析には適当であるとされており、日本産トマト萎凋病菌で交配型遺伝子領域に基づく分子系統解析を行った事例などがある (Kawabe *et al.*, 2005).

F. oxysporum の病原性分化については、トマト萎凋病において病原菌に感染した道管中に分泌される低分子タンパク質 (secreted in xylem, SIX) が関与することが報告されている (Rep 2004, 2005, Houterman 2008, 2009). これまでに、トマト萎凋病菌以外の他分化型の *F. oxysporum* についても病原性関連遺伝子の有無が明らかにされている (Lievens *et al.*, 2009 ; Inami *et al.*, 2012 ; Kashiwa *et al.*, 2013). さらに、*Fusarium* 属菌には、土壌中や環境中に「非病原性 *Fusarium* 属菌 (NPF)」と呼ばれる植物に対する病原性を持たないと考えられる菌株も多数分布するとされるが (Gordon *et al.*, 1997 ; Fravel *et al.*, 2003), これらについては *SIX* 遺伝子を保持しないことが明らかにされている (Lievens *et al.*, 2009). しかし、ニラ乾腐病では分子系統学的情報や宿主特異性分化に関する遺伝子については殆ど報告されていない. それゆえ、ニラ乾腐病菌とその他の病原性 *Fusarium* 属菌や、非病原性 *Fusarium* 属菌との分子系統学的な関係が不明であり、これらの識別を簡易に行うことができない.

一方、病害防除の基本は予防であり、特に土壌伝染性病害については育苗培土や本圃の土壌中の病原菌の有無を診断し、病原菌が存在した場合には防除効果の高い土壌消毒や生

育期の薬剤処理による防除や、栽培作物の変更などによる被害の回避に繋げていくことが理想である。しかし、土壌中や環境中には、病原性 *Fusarium* 属菌と非病原性 *Fusarium* 属菌が混在するため、従来の病原菌分離による診断では両方を分離してしまう可能性がある。また、これらを形態や培養性状で識別することは困難であり、判断の決め手に欠ける。そのため、罹病組織から分離された菌の病原性確認には生物検定（検定植物を用いた発病検定）に頼らざるを得ない。しかし、生物検定に係る時間は、土壌接種による生物検定では接種から約 2 ヶ月以上、分生子懸濁液の灌注接種では約 1 ヶ月以上であるため、早期発見・早期防除に繋がりにくい。また、病原性 *Fusarium* 属菌と非病原性 *Fusarium* 属菌のニラ体内における分布を調査した事例は無く、診断に適した分離部位についての検証もされていない。

また、防除に関しては、ニラの病害を対象とした土壌くん蒸剤が 4 剤、生育期間中に使用可能な殺菌剤が 28 剤あるが、そのうち乾腐病に適用がある登録農薬はそれぞれ 3 剤、1 剤である（農林水産消費安全技術センター、農薬登録情報提供システム <http://www.acis.famic.go.jp/searchF/vtllm001.html>, 2013 年 9 月時点）。この様に、乾腐病に使用可能な農薬は限られている。また、*Fusarium* 属菌による病害には、化学農薬以外の防除法として土壌還元消毒の防除効果が認められるとされる報告がある一方、効果が認められないとの報告もある（新村, 2000）。太陽熱消毒については多くの土壌伝染性の病原菌を対象に防除効果試験が行われている（岡山, 1999）。しかし、いずれの土壌消毒法ともニラ乾腐病に対する試験例はない。

これらの諸課題を解決するため、第 1 節では高知県内の主要産地において生育異常のみられるニラから菌の分離を行い、分離菌の種類と分離頻度ならびにニラに対する病徴につ

いて調査した。第2節では、ニラ乾腐病 *F. oxysporum* の各植物やニラ主要品種に対する病原性検定や rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく分子系統解析を行い、ニラ乾腐病菌の宿主特異性分化や遺伝的多様性を明らかにした。また、ニラ乾腐病 *F. oxysporum* と同様の病徴を示す *Fusarium* 属菌の種について、形態学および分子系統学的解析により検討するとともに、本病原菌の宿主範囲やニラ品種に対する病原性を明らかにした。第3節では、第2節の rDNA-IGS 領域の分子系統解析によってニラ乾腐病菌と同一のクラスターに含まれたネギ萎凋病菌との系統関係を明らかにするため、rDNA-IGS 領域、EF1 α 領域および histone H3 領域の塩基配列の解析を行った。また、ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌についても同領域の塩基配列に基づく分子系統樹を作成し、遺伝子診断の可能性を検討した。さらに、近縁と考えられるネギ萎凋病菌や非病原性 *Fusarium* 属菌との系統関係を明らかにするとともに遺伝子診断技術の可能性を探るため、第4節で交配関連遺伝子 (*MAT* 遺伝子) の検定を、第5節で病原性関連遺伝子 (*SIX* 遺伝子) の検定を行った。第6節では、乾腐病菌の *nit* 変異株を用いて感染時期または発病程度の異なるニラの植物体内における分布を調査し、罹病組織から病原菌を得るために適する診断部位を検討した。第7節では、ニラ乾腐病の迅速な病害診断を目指して簡易検定法の検討を行った。防除法に関しては、第8節では、土壌中のニラ乾腐病菌の死滅温度を明らかにし、第9節では本病に対する還元土壌消毒、太陽熱消毒、土壌くん蒸剤および生育期における数種殺菌剤の防除効果を検討した。

第1節 高知県におけるニラ乾腐病の発生状況

ニラに病害を引き起こす糸状菌の多くは、葉身に特徴的な病斑を生じさせるが、ニラ乾腐病は地上部の生育抑制やそれに伴う葉先枯れを生じさせるものの、地上部には病斑を形成しない。そのため、紅色根腐病などの土壌伝染性病害、ネダニおよびセンチュウによる被害、土壌肥料的な障害や生理障害などとの区別が難しい。しかし、高知県内の生産圃場ではニラ乾腐病が散発的に確認されており、無病徴株も潜在していると考えられる。

本節では、高知県内の主要な産地において、草丈が低く、葉梢が細く、分けつの少ない生育不良や葉先枯れ症状の認められるニラを採集し、褐変のみられる鱗茎の基底部分（以下、茎盤とする）や変色した根から分離した菌の種類、分離頻度およびニラに対する病徴を調査した。

材料と方法

1. 罹病ニラの採集

2010年2～6月および2011年4月に黒潮町6圃場、中土佐町6圃場、須崎市6圃場、佐川町8圃場、土佐市1圃場、香美市3圃場、香南市2圃場の計32圃場において、本圃で生育中のニラのうち葉先の紅変や枯れ、草丈や葉幅の抑制、分けつ異常、茎盤内部の褐変、根の障害などがみられた78株を採集した（写真 a-1, a-2, a-3）。

2. ニラ組織からの糸状菌の分離と保存

褐変のみられる茎盤や褐色や赤色に変色した根から切片をとり、70%エタノールに10秒間、2%次亜塩素酸ナトリウム液に1分間浸漬した後、pH4にしたPDA平板培地上で5～



- a-1 生産圃場におけるニラ乾腐病の病徴
- a-2 ニラ乾腐病によるニラの葉先の紅変や枯れ，草丈や葉幅の抑制の様子
- a-3 ニラ乾腐病によるニラの鱗茎の基底部分（茎盤）の褐変・乾腐症状

7 日後に生育した糸状菌を分離した。糸状菌をPDA斜面培地またはPDA平板培地で培養した菌叢の一部を白金耳でとって、滅菌水に懸濁させた後、2 %素寒天培地に画線し、出現したコロニーを単孢子分離した。

なお、分離した各菌株は PDA 平板培地および SNA 平板培地上で培養し、培養性状や形態学的特徴に基づいて簡易に同定を行い、大分生子の形成を認めた *Fusarium* 属菌を供試菌株とした。また、単孢子分離した菌株は、PDA 斜面培地および PSA 斜面培地で 23°C に設定した菌株保存室で保存した。

3. 分離 *Fusarium* 属菌のニラに対する病原性

1) 供試菌株

調査圃場の生育不良のニラから分離された *Fusarium* 属菌 76 菌株を供試した。また、参考として東京農工大学植物病理学研究室が保有する、栃木県の罹病ニラから分離された *Fusarium* 属菌 1 菌株（菌株名：840424a-1）も供試した。

2) 供試植物

高压滅菌土壤に播種したニラ‘スーパーグリーンベルト（武蔵野種苗園）’を、ガラス室内で3~4ヶ月間育苗して供試した。接種直前に、ニラ苗の根を約2 cm残して切除して用いた。

3) 接種源の調製

(1) 土壤接種

各菌株を土壤ふすま培地（大畑, 1995）で25°C、暗黒下で35 日間培養し、8 倍量の高圧滅菌土壤と混和して得られた汚染土壤を接種源とした。なお、土壤接種によって生育抑制がみ

られた*Fusarium*属菌17 菌株および840424a-1菌株については、さらに浸根接種を行った。

(2) 浸根接種

ショ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地 (PDB) で、25°C、120 rounds per minute (rpm) で7日間振とう培養して得た培養液を、滅菌ろ紙で濾し、滅菌水で3回洗浄した。ろ紙上に残った分生子などを、滅菌水で 1.0×10^7 bud cells/mlに調製した分生子懸濁液を接種源とした。

(3) 接種方法

土壌接種では、汚染土壌を詰めた直径9 cmのポリエチレンポットに、ニラを2 株ずつ植付けた。浸根接種では、ニラの鱗茎および根を分生子懸濁液に30 分間浸漬した後、高圧滅菌土壌を詰めた直径9 cmのポリエチレンポットに2 株ずつ植付けた。いずれの接種方法とも、各菌株につき2 ポットずつ用い、接種後は、最低気温を15°Cに設定したガラス室内で管理した。

(4) 調査

土壌接種では接種60～90 日後、浸根接種では接種30 日後に地下部を水道水で洗浄した後、茎盤内部や根の変色および腐敗を目視で調査した。また、異常部から菌の再分離を試みた。

結果

1. 乾腐症状を示すニラからの菌分離

調査した黒潮町、中土佐町、須崎市、佐川町、土佐市、香美市、香南市の32 圃場 (78 株)のうち、26 圃場 (69 株) の生育異常が認められたニラの茎盤や根の組織から*Fusarium*属菌76 菌株が分離された (表1)。また、同一圃場や同一ニラ株から*Fusarium*属菌と*Pyrenochaeta*属菌が分離されたケースもあった。

表 1 県内主要産地における生育不良株からの *Fusarium* 属菌の分離
(2010～2011年)

調査場所	調査圃場数 (圃場)	採集株数 (株)	分離 <i>Fusarium</i> 属菌			病原性 <i>Fusarium</i> 属菌		
			圃場数 (圃場)	株数 (株)	菌株数 (菌株)	圃場数 (圃場)	株数 (株)	菌株数 (菌株)
黒潮町	6	22	6	20	20	2	2	2
中土佐町	6	13	5	12	17	4 <1>	4 <1>	5
須崎市	6	10	5	10	10	3 <1>	4 <1>	7
佐川町	8	12	6	10	12	2 <1>	2 <1>	2
土佐市	1	9	1	8	8	0	0	0
香美市	3	9	1	7	7	1 <1>	1	1
香南市	2	3	2	2	2	0	0	0
計	32	78	26	69	76	12 <4>	13 <3>	17

注) < >内の数値は、同一圃場または同一株から *Fusarium* 属菌と *Pyrenochaeta* 属菌が分離された内数を示す。

2. 分離 *Fusarium* 属菌のニラに対する病原性

高知県内の生育不良のニラから分離された *Fusarium* 属菌 76 菌株のうち、ニラに病原性を示す *Fusarium* 属菌は 17 菌株 (Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs203, Fs162-1, Fs169-1, Fs301, Fs302, Fs306, Fs310, Fs311, Fs315, Fs316, Fs219, Fs304) であった。また、病原性 *Fusarium* 属菌と病原性 *Pyrenochaeta* 属菌の両方が同一圃場から分離されたケースが 4 例、同一ニラ株から分離されたケースが 3 例あった (表 1)。病原性を示した 17 菌株は、土壌接種および浸根接種のいずれの接種方法とも草丈が低く、分けつが少なくなるとともに新たな展開葉の葉数が減少し、鱗茎が小さくなり、症状が進むと萌芽をほとんどしなくなった (写真 b)。さらに、浸根接種で異常がみられたニラの茎盤の内部は、褐変して乾腐症状を呈した (写真 c)。いずれの菌株とも、接種試験により原病徴が再現された。なお、



- b 浸根接種によりニラに生じた生育の抑制（接種，左の2株；対照，右の2株）
- c 浸根接種によりニラの茎盤に生じた乾腐症状（接種，左；対照，右）

両接種方法とも異常のみられた株の茎盤内部の組織から接種菌が再分離された（表 2）。参考として用いた 840424a-1 も、土壌接種および浸根接種のいずれの接種方法ともニラに対して病原性を示すとともに、接種菌が再分離された（表 2）。

表2 分離*Fusarium*属菌の由来とニラに対する病原性

菌株名	採取場所	土壌接種		浸根接種	
		症状 ^{y)}	再分離 ^{z)}	症状 ^{y)}	再分離 ^{z)}
Fs62-1	黒潮町	a, b	+	a, b, c	+
Fs112-1	黒潮町	a, b	+	a, b, c	+
Fs139-1	中土佐町	a, b	+	a, b, c	+
Fs150-1	中土佐町	a, b	+	a, b, c	+
Fs169-1	中土佐町	a, b	+	a, b, c	+
Fs315	中土佐町	a, b	+	a, b, c	+
Fs316	中土佐町	a, b	+	a, b, c	+
Fs162-1	須崎市	a, b	+	a, b, c	+
Fs301	須崎市	a, b	+	a, b, c	+
Fs302	須崎市	a, b	+	a, b, c	+
Fs304	須崎市	a, b	+	a, b, c	+
Fs306	須崎市	a, b	+	a, b, c	+
Fs310	須崎市	a, b	+	a, b, c	+
Fs311	須崎市	a, b	+	a, b, c	+
Fs203	佐川町	a, b	+	a, b, c	+
Fs219	佐川町	a, b	+	a, b, c	+
Fs43-2	香美市	a, b	+	a, b, c	+
(参考)					
840424a-1	栃木県	a, b	+	a, b, c	+

y) 症状：a, 葉数の減少；b, 草丈の抑制；c, 茎盤の褐変・乾腐

z) 再分離：+, あり

これらの結果から、高知県内の生育不良のニラから分離された *Fusarium* 属菌 17 菌株 (Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs203, Fs162-1, Fs169-1, Fs301, Fs302, Fs306, Fs310, Fs311, Fs315, Fs316, Fs219, Fs304) と栃木県の罹病ニラから分離された東京農工大学植物病理学研究室保存菌株 (840424a-1) は、ニラ乾腐病菌であることが明らかとなった。

考察

高知県におけるニラ乾腐病の発生状況を明らかにするため、県内主要産地の生育不良を示すニラから糸状菌の分離および分離頻度の調査を行ったところ、調査圃場数の少なかった土佐市および香南市を除く黒潮町、中土佐町、須崎市、佐川町、香美市の圃場において病原性 *Fusarium* 属菌が分離されたことから、県内の主要産地において乾腐病が広く分布している可能性が示唆された。なお、専用の育苗圃で育苗するケースと、本圃の一部で育苗した後に育苗跡を本圃として利用するケースがあったが、そのいずれも本圃の栽培期間中の発病割合は同程度であった。前者では、育苗中に生育不良がみられた場合でも、地上部の観察のみでは本病によるものか他の原因によるものかの判断が困難なうえ、植付け時には葉身を切り取るため生育不良株の見分けがつきにくく、本圃へ感染株を持ち込む可能性があると考えられた。後者ではどの調査圃場とも本圃の土壌消毒は行われていたが、育苗跡の土壌消毒は同ハウス内で栽培しているニラへの影響を避けるため行っておらず、育苗圃と本圃との間に伝染環が成立しているものと考えられた。

生育不良株から *Fusarium* 属菌が多く分離されたものの、そのうちニラ乾腐病菌であると確認できた *Fusarium* 属菌の割合は約 1/4 と低かった。*F. oxysporum* には、「非病原性 *F. oxysporum* (NPF)」と呼ばれる植物に対する病原性を持たない菌株が環境中に多数分布す

るとされている (Gordon & Martyn, 1997 ; Fravel *et al.*, 2003). そのため, ニラ乾腐病の病徴である葉先の紫紅変や枯れ, 草丈や葉幅の抑制, 分けつ異常, 鱗茎内部の維管束の褐変, 根の障害を呈する株であっても, 植物体内等に非病原性 *Fusarium* 属菌が混在しており, それにより, 病原性 *Fusarium* 属菌の分離率が低くなる可能性が示唆された. このことは, 病害診断の精度を低くする可能性がある. また, 今回行った土壌接種では草丈, 展開葉, 鱗茎の生育抑制が確認されるまでに接種後約 2~3 ヶ月かかり, 茎盤内部の褐変が認められることは稀であった. また, 浸根接種では地上部の生育抑制と茎盤内部の褐変および乾腐症状が確認されるまでに約 1 ヶ月かかった. 両接種法とも, ガラス室内で接種を行った場合は, 秋期から冬期に行う接種では生育が緩慢になり無接種区との生育差が生じにくくなるため病原性の判定が難しかったのに対し, 春期から夏期に行う接種では無接種区と比べて展開葉の生育差が生じやすくなるため判定しやすかった. これは, 発病圃場においても冬期には発病に気付きにくく, 春期になってからはじめて発病が確認される事例が多いことと同様であると考えられる. また, ニラ乾腐病は年間を通じて認められるが, 病徴は春と秋に目立つとする木嶋ら (1985) の記述と一致した. そのため, 生物検定によるニラ乾腐病の診断は, より短期間で診断でき, かつ日長や温度の影響を受けない条件下での試験方法の検討が必要と考えた. そこで, 第 7 節で生物検定による本病の簡易診断法を検討した.

また, 本節の調査により, 同一圃場や同一ニラ株から病原性 *Fusarium* 属菌とともに *Pyrenochaeta* 属菌も分離されるケースも確認されたので, 両菌の複合感染を第 2 章で検討した.

第2節 病原性 *Fusarium* 属菌の同定とその性状

Fusarium 属菌は、分類上では真菌類-子実菌門-ボタタケ目に属し、鎌形から円筒形の多隔壁分生子（無性孢子）をフィアロ型に形成する特徴を持つ不完全糸状菌のひとつである。これまでに、*F. oxysporum* をはじめとする *Fusarium* 属の種は主に形態的特徴に基づく分類がされてきた（Wollenweber and Reinking 1935, Snyder and Hansen 1940, 1941, 1945, Booth 1971）が、近年は分子系統樹に基づく分類の再構築が進められつつある（青木, 2001）。しかし、ニラ乾腐病菌についてはこれまでに分子系統学的な検討がされていないため、本節ではニラ乾腐病菌のうち *F. oxysporum* について rDNA-IGS 領域の塩基配列の解析を行った。また、*F. oxysporum* と異なる形態を示した菌株については、菌類の分類に広く使われる rDNA-ITS 領域に加え、*F. oxysporum* の種内分子系統解析に適するとされる rDNA-IGS 領域、*Gibberella fujikuroi* 種複合体の同定に有効とされる EF1 α 領域および histone H3 領域の塩基配列の解析（青木, 2001）を行った。そして、これら領域の塩基配列に基づいて作成した分子系統樹から、系統の多様性を明らかにするとともに、宿主特異性分化と分子系統学的所属との関係について考察した。

F. oxysporum は、特定の植物種に限り宿主性を有する群が存在し、種の下位に分化型（単数形：forma specialis, 複数形：formae specialis, f. sp. あるいは f. spp. と略す）を置く。このような、宿主特異性に基づく分化型は120種類以上あると報告されている（Armstrong, 1981）いる。しかし、ニラ乾腐病の病原として報告のある *F. oxysporum* は、ニラのほかにネギやタマネギにやや病原性を示すとされるものの（木嶋ら, 1985）、各種作物に対する宿主範囲が明らかにされておらず、分化型の同定には至っていない。ここでは、高知県内から採集したニラ乾腐病菌 *F. oxysporum* と、ヒガンバナ科植物、ユリ科植物および近縁植物の病原

として報告のある各分化型の菌株を，それぞれの宿主と交接種して分化型を決定した．

本節で行ったニラ乾腐病菌 *F. oxysporum* の rDNA-IGS 領域に基づく系統解析の結果，ニラ乾腐病菌がネギ萎凋病菌およびトマト萎凋病菌（レース 3）と同じクラスターに含まれたことから，ネギとその近縁植物であるタマネギに対する病原性を詳細に調査するとともに，トマトに対する病原性についても調査した．また，ニラ乾腐病菌 *F. oxysporum* のニラ主要品種に対する病原性についても調査した．

一方，高知県内の罹病ニラから分離された *F. oxysporum* 以外の *Fusarium* 属菌は，形態的な特徴から *Gibberella fujikuroi* 種複合体の 1 種と考えられたため，詳細な形態および分子系統解析を行い，種の同定を行った．そして，ヒガンバナ科植物，ユリ科植物および近縁植物，ニラ主要品種およびその他植物に対する病原性についても調査した．

材料と方法

1. *F. oxysporum*

1) rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく分子系統解析

(1) 供試菌株

第 1 節によってニラに対する病原性が確認された *Fusarium* 属菌 18 菌株（高知県分離菌株 17 菌株，東京農工大学植物病理研究室保存菌株 1 菌株）のうち，PDA 平板培地上の培養性状や，SNA 培地のスライドカルチャー上で 25°C，暗黒下で 7 日間培養後，光学顕微鏡で気生分生子，小分生子，大分生子の形態を観察し，*F. oxysporum* と同定した 15 菌株（Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs203, Fs162-1, Fs169-1, Fs301, Fs302, Fs306, Fs310, Fs311, Fs315, Fs316）を用いた（表 3）．すなわち，次の形態を示した菌株を *F. oxysporum* とした．

表3 本研究で使用した供試菌株

菌の種類	供試菌株	分離源	採取場所	保存機関 ^{z)}	分離年
ニラ病原性 <i>F. oxysporum</i>	Fs43-2	ニラ	高知県 香美市	高知県	2010
	Fs62-1	ニラ	高知県 黒潮町	高知県	2010
	Fs112-1	ニラ	高知県 黒潮町	高知県	2010
	Fs139-1	ニラ	高知県 中土佐町	高知県	2010
	Fs150-1	ニラ	高知県 中土佐町	高知県	2010
	Fs162-1	ニラ	高知県 須崎市	高知県	2010
	Fs169-1	ニラ	高知県 中土佐町	高知県	2010
	Fs203	ニラ	高知県 佐川町	高知県	2010
	Fs301	ニラ	高知県 須崎市	高知県	2011
	Fs302	ニラ	高知県 須崎市	高知県	2011
	Fs306	ニラ	高知県 須崎市	高知県	2011
	Fs310	ニラ	高知県 須崎市	高知県	2011
	Fs311	ニラ	高知県 須崎市	高知県	2011
	Fs315	ニラ	高知県 中土佐町	高知県	2011
	Fs316	ニラ	高知県 中土佐町	高知県	2011
	ニラ病原性 <i>Fusarium</i> 属菌	Fs219	ニラ	高知県 佐川町	高知県
Fs304		ニラ	高知県 須崎市	高知県	2011
840424a-1		ニラ	栃木県	有江 力	1984
ネギ萎凋病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Fs-N1	ネギ	高知県 香南市	高知県	2011
	Fs-N4	ネギ	高知県 香南市	高知県	2011
	Fs-N8	ネギ	高知県 香南市	高知県	2011
	Fs-N9	ネギ	高知県 香南市	高知県	2011
	#1	ネギ	埼玉県 越谷	山口大学農学部	2006
	#15	ネギ	京都府 伏見	山口大学農学部	2006
	#41	ネギ	静岡県 浜松	山口大学農学部	2007
	#60	ネギ	高知県 香南市	山口大学農学部	2007
	01-1-2	ネギ	不明	鳥取県	不明
	タマネギ乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	KFoc-1205	タマネギ	北海道 夕張市	(社)北海道植物防疫協会
KFoc-2224		タマネギ	北海道 富良野市	(社)北海道植物防疫協会	2012
NRRL 22538		タマネギ	ドイツ	NRRL	
ラッキョウ乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>allii</i>	94-7-1-7	ラッキョウ	不明	鳥取県	不明
アスパラガス立枯病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	MAFF 305556	アスパラガス	北海道	農業生物資源ジーンバンク	1960
ユリ乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lilli</i>	851209k	ユリ	日本	東京農工大学	1985
チューリップ球根腐敗病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tulipae</i>	MAFF 235105	チューリップ	富山県	農業生物資源ジーンバンク	不明
グラジオラス乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	MAFF 305610	グラジオラス属	長野県	農業生物資源ジーンバンク	1956
ネギ萎凋病菌 <i>F. proliferatum</i>	#3	ネギ	埼玉県 越谷	山口大学農学部	2007
	#9	ネギ	京都府 伏見	山口大学農学部	2007

z) NRRL, Agricultural Research Service Culture Collection (ペオリア, イノイリ, アメリカ)

PDA平板培地上で早く生育して、白や紫～赤紫色に着色した菌叢を形成し、気中菌糸を作る。SNA培地上に形成する孢子のうち、小分生子には隔壁がなく、多くが楕円形であり、菌糸から伸びた短い分生子柄の先に擬頭状に形成される。大分生子は鎌形で、3つの隔壁を持つ。また、厚膜胞子は1ヶ月以上培養すると形成される。

参考として、系統樹1には、*F. oxysporum* の既知の分化型であるネギ萎凋病菌8菌株 (f. sp. *cepa*e : Fs-N1, Fs-N4, Fs-N8, #1, #15, #41, #60, 01-1-2), アスパラガス立枯病菌1菌株 (f. sp. *asparagi* : MAFF 305556), ラッキョウ乾腐病菌1菌株 (f. sp. *allii* : 94-7-1-7), チューリップ球根腐敗病菌1菌株 (f. sp. *tulipae* : MAFF 235105) およびグラジオラス乾腐病菌1菌株 (f. sp. *gladioli* : MAFF 305610), 系統樹2には後者の3菌株以外を用いた (表3)。

(2) ゲノムDNAの抽出

供試菌株をPDA平板培地で27.5°C, 7日間, 暗黒下で培養後, Saitoh *et al.* (2006) の方法を一部改変して, ゲノムDNAを抽出した。すなわち, PDA平板培地上に生育した気中菌糸を滅菌済の爪楊枝でかき取り, 500 µl の lysis buffer (400mM Tris-HCl・pH8.0, 60mM EDTA・pH8.0, 150mM NaCl, 1% ラウリル硫酸ナトリウム) の入った1.5 ml チューブに入れてよく懸濁した。これを10分間室温に置いた後, 150 µl の3M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) を加えてボルテックスした。4°C で18,000 × g, (15,000 rpm, T15AP21 ローター; 日立工機, 東京) で5分間遠心分離した後, 上清300 µl を新しいチューブに移し, 750 µl の100%エタノールを加えてDNAを沈殿させた。4°C で18,000 × g, 2分間遠心分離し, 上清を捨てた後, 250 µl の70%エタノールを加えて沈殿を洗浄, 4°C で18,000 × g, 5分間遠心分離し, DNA沈殿を回収, 吸引減圧乾燥機 (CVE-2000; 東京理化器械, 東京) でエタノールを除き, TEに溶解してDNA溶液を得た。

(3) rDNA-IGS領域の増幅

プライマーは、rDNA-IGS領域を増幅するFIGS11 (5'-GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG-3') とFIGS12 (5'-GCAAAATTCAATAGTATGGC-3') (Kawabe *et al.*, 2005) を用いた (表 4) . PCR反応溶液の調製は、1サンプル50 μ lにつき、鋳型DNA 50 ng, 10 \times Ex-Taq Buffer 5 μ l, dNTP Mixture 4 μ l, 20 pMプライマー 1 μ lずつ, TaKaRa Ex-Taq[®]polymerase 0.25 μ l (タカラバイオ) とし、PCR反応はTaKaRa PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ, 東京) またはT 100TM サーマルサイクラー (BIO RAD, 東京) を用いて、94 $^{\circ}$ C \cdot 2 分間の後、94 $^{\circ}$ C \cdot 20 秒間、58 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒間、72 $^{\circ}$ C \cdot 1 分間を35サイクル、72 $^{\circ}$ C \cdot 7 分間行った。得られたPCR産物は、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、約600 bpのバンドを生じることを確認した。

(4) DNAシーケンシング

PCR 産物を EXOSAP-IT (USB, OH, USA) で精製し、シーケンス反応の鋳型とした。シーケンス反応は、BigDye[®] Terminator v1.1/v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、反応液は1 サンプル 10 μ l につき、精製済みの鋳型溶液 1 μ l, 5 \times Buffer 2 μ l, 1.6 pM プライマー 1 μ l ずつ, BigDye[®] Terminator v1.1/v3.1 0.5 μ l で調製した。シーケンス反応は、TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ, 東京) を用いて、96 $^{\circ}$ C \cdot 1 分間の後、96 $^{\circ}$ C \cdot 10 秒間, 50 $^{\circ}$ C \cdot 5 秒間, 60 $^{\circ}$ C \cdot 25 秒間を 25 サイクル行った。塩基配列は3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析した。

(5) 分子系統解析

塩基配列は GENETYX-MAC ver.10.1/v13 (ゼネティックス, 東京) を用いて整理し、CLUSTAL X 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) で、多重アラインメントを得た。アラインメントデータに基づき、MEGA ver. 5 プログラム (Tamura *et al.*, 2011) を用いて、近隣結合法

表4 本研究で使用したプライマ, PCR反応条件

目的	プライマー名	塩基配列 (5'→3') ^{y)}	向き ^{z)}	対照領域	参考文献	
分子系統の解析	rDNA-IGS領域の塩基配列	FIGS11	GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG	F	ribosomal DNA IGS region	Kawabe <i>et al.</i> (2005)
		FIGS12	GCAAAATTCAATAGTATGGC	R	ribosomal DNA IGS region	Kawabe <i>et al.</i> (2005)
rDNA-ITS領域の塩基配列		ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	F	ribosomal DNA ITS region	White <i>et al.</i> (1990)
		ITS4	TCCGCCGCTTATTGATATGC	R	ribosomal DNA ITS region	White <i>et al.</i> (1990)
EF1 α 領域の塩基配列		EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	F	Translation elongation factor 1 α	O'Donnell <i>et al.</i> (1998b)
		EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	R	Translation elongation factor 1 α	O'Donnell <i>et al.</i> (1998b)
histone H3領域の塩基配列		H3-1a	ACTAAGCAGACGCCCGCAGG	F	histone H3	Glass and Donaldson (1995), Steenkamp <i>et al.</i> (1999)
		H3-1b	GCGGGCAGCTGGATGTCCTT	R	histone H3	Glass and Donaldson (1995), Steenkamp <i>et al.</i> (1999)
		H3F1	TGGCAAGGCCCTCGCAAGC	F	histone H3	O'Donnell <i>et al.</i> (2004), H3F1はGlass and Donaldson (1995)の補足資料 http://nrrl.ncaur.usda.gov/research/MGB-O'Donnell.html
		H3R1GENEBANK	TTGGATTGGATRGTGACACGC	R	histone H3	http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_approved.php で公開されているプライマー
交配型の検定	<i>MAT1-1</i> 検出用	Gfmat1a	GTTCATCAAAGGGCAAGCG	F	<i>MAT1-1-1</i> alpha-box in <i>MAT1-1</i>	Steenkamp <i>et al.</i> (2000)
		Gfmat1b	TAAGCGCCCTCTTAACGCCTTC	R	<i>MAT1-1-1</i> alpha-box in <i>MAT1-1</i>	Steenkamp <i>et al.</i> (2000)
<i>MAT1-2</i> 検出用		GfHMG1	TACCGTAAGGAGCGTCAC	F	<i>MAT1-2</i> HMG box in <i>MAT1-2</i>	Steenkamp <i>et al.</i> (2000)
		GfHMG2	GTAAGTGCAGCGATGTC	R	<i>MAT1-2-1</i> HMG box in <i>MAT1-2</i>	Steenkamp <i>et al.</i> (2000)
病原性関連遺伝子の検定	<i>SIX1</i> 検出用	P12-F2	GTATCCTCCGGATTTTGAGC	F	<i>SIX1(AVR3)</i>	Rep <i>et al.</i> (2004)
		P12-R1	AATAGAGCCTGCAAGCATG	R	<i>SIX1(AVR3)</i>	Rep <i>et al.</i> (2004)
	<i>SIX2</i> 検出用	SIX2-F2	CAACGCCGTTTGAATAAGCA	F	<i>SIX2</i>	van der Does <i>et al.</i> (2008)
		SIX2-R2	TCTATCCGCTTCTTCTCTC	R	<i>SIX2</i>	van der Does <i>et al.</i> (2008)
	<i>SIX3</i> 検出用	SIX3-F1	CCAGCCAGAAGGCCAGTTT	F	<i>SIX3(AVR2)</i>	van der Does <i>et al.</i> (2008)
		SIX3-R2	GGCAATTAACCACTCTGCC	R	<i>SIX3(AVR2)</i>	van der Does <i>et al.</i> (2008)
	<i>SIX4</i> 検出用	SIX4F	ACTCGTTGTTATTGCTTCGG	F	<i>SIX4(AVR1)</i>	Houterman <i>et al.</i> (2008)
		SIX4R	CGGAGTGAAGAAGAAGCTAA	R	<i>SIX4(AVR1)</i>	Houterman <i>et al.</i> (2008)
	<i>SIX5</i> 検出用	SIX5-F1	ACACGCTCTACTACTCTTCA	F	<i>SIX5</i>	Lievens <i>et al.</i> (2009)
		SIX5-R1	GAAAACCTCAACGCGCAAA	R	<i>SIX5</i>	Lievens <i>et al.</i> (2009)
	<i>SIX6</i> 検出用	SIX6-F1	CTCTCCTGAACCATCAACTT	F	<i>SIX6</i>	Lievens <i>et al.</i> (2009)
		SIX6-R1	CAAGACCAGGTGTAGGCATT	R	<i>SIX6</i>	Lievens <i>et al.</i> (2009)
	<i>SIX7</i> 検出用	SIX7-F1	CATCTTTTCGCCGACTTGGT	F	<i>SIX7</i>	Lievens <i>et al.</i> (2009)
		SIX7-R1	CTTAGCACCCCTTGAGTAACT	R	<i>SIX7</i>	Lievens <i>et al.</i> (2009)

y) RはAまたはG, SはGまたはCを示す.

z) FはForward, RはReverseを示す.

(Neighbor-Joining algorithm, NJ) (Saitou & Nei, 1987) による系統樹を作成した。次に、Kimura's two-parameter algorithm (Kimura, 1980) を計算法として採用し、NJ 法に基づく系統樹を再構築した。系統樹の各節の信頼度はブートストラップ法を用い、1,000 反復行うことで評価した。なお、系統樹 1 には、rDNA-IGS 領域の塩基配列が既に報告されている *F. oxysporum* f. sp. *allii* (ラッキョウ: NRRL 26407), f. sp. *asparagi* (アスパラガス: NRRL 28372, NRRL 28973), f. sp. *batatas* (サツマイモ: MAFF 103070), f. sp. *cepae* (タマネギ: NRRL 22538, NRRL 38481, Fus064), f. sp. *conglutinans* (キャベツ: cong:1-1), f. sp. *cucumerium* (キュウリ: Rif-1), f. sp. *fragariae* (イチゴ: 851209e), f. sp. *gladioli* (グラジオラス: NRRL 26988, NRRL 26993, CBS 136.97), f. sp. *glycines* (ダイズ: 851209m), f. sp. *lactucae* (レタス: SB1-1), f. sp. *lilii* (ユリ: NRRL 26955, NRRL 28395), f. sp. *lycopersici* race 1~3 (トマト: MAFF 103036, JCM 12575, Chz1-A, DA-1/7), f. sp. *melongenae* (ナス: MAFF 103051), f. sp. *niveum* (スイカ: MAFF 305608), f. sp. *spinaciae* (ホウレンソウ: 880803e-2), f. sp. *tulipae* (チューリップ: Fus085, NRRL 26556), f. sp. *narcissi* (スイセン: Fus107) の 17 分化型 27 菌株を加えた。系統樹 2 には、*F. oxysporum* f. sp. *allii* (ラッキョウ: NRRL 26407), f. sp. *asparagi* (アスパラガス: NRRL 28372, NRRL 28973), f. sp. *cepae* (タマネギ: NRRL 22538, NRRL 38481, Fus064), f. sp. *gladioli* (グラジオラス: NRRL 26988, NRRL 26993, CBS 136.97, CBS 137.97), f. sp. *lycopersici* race 1~3 (トマト: MAFF 103036, JCM 12575, Chz1-A, DA-1/7), f. sp. *tulipae* (チューリップ: Fus085, NRRL 26556), f. sp. *narcissi* (スイセン: Fus107) の 7 分化型 17 菌株を加えた。さらに有根系統樹とするため、*F. oxysporum* に近縁な *F. sacchari* (E. J. Butler) W. Gams (teleomorph, *Gibberella sacchari*: FGSC 7610) を外群 outgroup として加えた (表 5)。

表5 本研究で使用した比較用*F. oxysporum*の菌株

菌の種類	供試菌株	分離源	採取場所	保存機関 ^{z)}	GenBank アクセシ ョンナン バー
<i>Fusarium oxysporum</i>					
f. sp. <i>allii</i>	NRRL 26407	ラッキョウ	日本	NRRL	—
f. sp. <i>asparagi</i>	NRRL 28372	アスパラガス	アメリカ	NRRL	FJ 985533
	NRRL 28973	アスパラガス	アメリカ	NRRL	FJ 985530
f. sp. <i>batatas</i>	MAFF 103070	サツマイモ	日本	MAFF	AB 106049
f. sp. <i>cepae</i>	NRRL 22538	タマネギ	ドイツ	NRRL	DQ 831891
	NRRL 38481	タマネギ	ニュージーランド	NRRL	FJ 985634
	Fus064	タマネギ	アメリカ	G.Chastagner	FJ 972810
f. sp. <i>conglutinans</i>	cong:1-1	キャベツ	日本	吉田隆延	AB 106051
f. sp. <i>cucumerium</i>	Rif-1	キュウリ	日本	東京農工大学	AB 106052
f. sp. <i>fragariae</i>	851209e	イチゴ	日本	東京農工大学	AB 106053
f. sp. <i>gladioli</i>	NRRL 26988	グラジオラス	オランダ	NRRL	FJ 985518
	NRRL 26993	グラジオラス	イタリア	NRRL	FJ 985520
	CBS 136.97	グラジオラス	オランダ	CBS	AB 383691
	CBS 137.97	グラジオラス	オランダ	CBS	AB 383692
f. sp. <i>glycines</i>	851209m	ダイズ	日本	東京農工大学	AB 373826
f. sp. <i>lactucae</i>	SB1-1	レタス	日本	東京農工大学	AB 373825
f. sp. <i>lilii</i>	NRRL 26955	ユリ	オランダ	NRRL	FJ 985504
	NRRL 28395	ユリ	イタリア	NRRL	FJ 985534
f. sp. <i>lycopersici</i>					
race 1	MAFF 103036	トマト	日本	MAFF	AB 106020
race 2	JCM 12575	トマト	日本	JCM	AB 106027
race 3	Chz1-A	トマト	日本	東京農工大学	AB 373819
	DA-1/7	トマト	アメリカ	H.C.Kistler	AB 106047
f. sp. <i>melongenae</i>	MAFF 103051	ナス	日本	MAFF	AB 106056
f. sp. <i>niveum</i>	MAFF 305608	スイカ	日本	MAFF	AB 106057
f. sp. <i>spinaciae</i>	880803e-2	ホウレンソウ	日本	東京農工大学	AB 373824
f. sp. <i>tulipae</i>	Fus085	チューリップ	アメリカ	G.Chastagner	FJ 981682
	NRRL 22556	チューリップ	ドイツ	NRRL	
f. sp. <i>narcissi</i>	Fus107	スイセン	アメリカ	G.Chastagner	FJ 981678
<i>Fusarium sacchari</i> (teleomorph, <i>Gibberella sacchari</i>)	FGSC 7610		アメリカ	FGSC	AB 106016

z) MAFF, 農林水産省農業生物資源研究所ジーンバンク (つくば市) ; CBS, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center (ユトレヒト, オランダ) ; JCM, 理化学研究所バイオリソースセンター微生物系統保存施設 (和光市) ; NRRL, Agricultural Research Service Culture Collection (ペオリア, イノイリ, アメリカ) ; FGSC, Fungal Genetics Stock Center (カンザス大学 Medical Center, カンザスシティ, アメリカ)

2) 各種植物に対する病原性試験

(1) ヒガンバナ科植物, ユリ科植物およびその近縁植物に対する接種試験

① 供試菌株

ニラ乾腐病菌8菌株 (*F. oxysporum* : Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs162-1, Fs169-1, Fs203) を供試した (表 3). また, 比較のために *F. oxysporum* の既知の分化型であるネギ萎凋病菌 1 菌株 (f. sp. *cepa* : #60), ラッキョウ乾腐病菌 1 菌株 (f. sp. *allii* : 94-7-1-7), アスパラガス立枯病菌 1 菌株 (f. sp. *asparagi* : MAFF 305556), チューリップ球根腐敗病菌 1 菌株 (f. sp. *tulipae* : MAFF 235105), グラジオラス乾腐病菌 1 菌株 (f. sp. *gladioli* : MAFF 305610) および東京農工大学植物病理学研究室が保有するユリ乾腐病菌 1 菌株 (f. sp. *lilii* : 851209k) を供試した (表 3).

② 供試植物

浸根接種および灌注接種には, 高圧滅菌土壌に播種したニラ‘スーパーグリーンベルト’, ネギ‘雷山’, タマネギ‘ソニック (タキイ種苗)’, ラッキョウ‘らくだ (前川種苗)’, ニンニク‘上海早生 (前川種苗)’, アスパラガス‘ウェルカム (サカタのタネ)’を約1ヶ月間育苗して供試した. 土壌接種では, 前述の6 植物に加えて, グラジオラス‘ニューウェーブ (タキイ種苗)’, チューリップ‘レッドインプレッション (タキイ種苗)’, ユリ‘日の本 (サカタのタネ)’の球根を供試した.

③ 接種源の調製

浸根接種および灌注接種では, 第1節, 3, 3), (2)と同様に, 1.0×10^7 bud cells/ml に調製した分生子懸濁液を接種源とした. 土壌接種では, 各菌株を土壌ふすま培地 (大畑, 1995) で25°C, 暗黒下で30 日間培養し, 49 倍量の高圧滅菌土壌と混和して得られた汚染土

壤を接種源とした。

④ 接種方法

浸根接種では、2011年10月4日に、供試植物の根約2 cm 残して切除し、接種源に鱗茎と根を30 分間浸漬した後、高圧滅菌土壌を詰めた直径9 cmのポリエチレンポットに3 株ずつ植付けた。接種後は、最低温度を15°Cに設定したガラス室内で管理した。灌注接種では、9月21日に、バーミキュライト12 Lをトレー（縦33×横49×深さ8 cm）に詰め、そこへニラ、ネギ、タマネギおよびアスパラガスは10 粒、ラッキョウおよびニンニクは5粒ずつ播種した後、200 mlの接種源を灌注接種した。土壌接種では、9月21日に、汚染土壌12 Lをトレー（縦33×横49×深さ8 cm）に詰め、そこへ各供試作物を播種または植付けた。各菌株につきニラ、ネギ、タマネギおよびアスパラガスは10 粒ずつ播種し、ラッキョウおよびニンニクは5 粒ずつ、グラジオラスは2 球、チューリップおよびユリは3 球ずつ植付けた。なお、無接種として、浸根接種および灌注接種には接種源の代わりに滅菌水を用い、土壌接種には汚染土壌の代わりに高圧滅菌土壌を用いた。いずれも接種後は、最低温度20°C、換気温度35°Cに設定したガラス温室内で植物を管理した。

⑤ 調査

浸根接種では11月15日（接種42 日後）、土壌接種では10月21日（接種30 日後）またはグラジオラス、チューリップ、ユリについては12月14日（接種84 日後）、灌注接種では10月21日（接種30 日後）に、地上部の病徴を5 段階の指数で評価し、発病度を次式で算出した。指数は、症状なしを0、草丈が無接種の25%未満に抑制されるものを1、25～50%を2、50～75%を3、75%以上または枯死する（土壌接種、灌注接種では不発芽を含む）を4とした。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病株数}) \div (\text{調査株数} \times 4) \times 100$$

さらに、発病度が0を－，0.1以上10.0未満を±，10.0以上33.4未満を＋，33.4以上66.7未満を++，66.7以上を+++として病原性の強さを評価した。

(2) ニラ，ネギ，タマネギに対する接種試験

①ニラ，ネギおよびタマネギに対する病原性試験（簡易診断法）

試験方法は、第7節の簡易診断法に準じて行った。

a. 供試菌株

ニラ乾腐病菌11菌株（*F. oxysporum* : Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs203, Fs310, Fs316, Fs162-1, Fs169-1, Fs306）を供試した。また、比較のためにネギ萎凋病菌8菌株（*F. oxysporum* f. sp. *cepae* : Fs-N1, Fs-N4, Fs-N8, FsN9, #1, #15, #60, 01-1-2），タマネギ乾腐病菌3菌株（*F. oxysporum* f. sp. *cepae* : NRRL 22538, KFoc-1205, KFoc-2224）を供試した（表3）。

b. 培土および供試植物

接種に用いた培土は、ネギ専用培土（タキイ種苗）と砂を1：5の割合で混和し、栽培用ガラス試験管（以下、ガラス管とする）に10 mlずつ詰め、高圧滅菌して用いた。ニラ‘スーパーグリーンベルト’，ネギ‘雷山’およびタマネギ‘ターボ（前川種苗）’の種子を10.5%次亜塩素酸ナトリウムで10分間表面殺菌した後、滅菌水で3回洗浄して、培土の入ったガラス管1本につき10粒ずつ播種した。播種後は、ガラス管1本あたり滅菌水3 mlを入れてアルミ蓋で密閉し、25°C，蛍光灯照射下（20,000 lux，14時間日長）で7日間管理した後、接種試験に供した。

c. 接種源の調製

第1節，3，3），（2）と同様に、分生子懸濁液を 1.0×10^7 bud cells/mlとした。

d. 接種方法

供試植物を栽培しているガラス管に、接種源を1 mlずつ灌注接種した。接種後は、25°C、蛍光灯照射下（20,000 lux, 14 時間日長）で管理した。なお、無接種区には、分生子懸濁液の代わりに滅菌水1 mlを用いた。各菌株につき3反復行った。

e. 調査

接種7日後に、ガラス管内の10 株について、地上部の病徴を5 段階の指数で評価し、発病度を次式で算出した。指数は、症状なしを0、草丈が無接種区の25%未満に抑制されるものを1、25～50%を2、50～75%を3、75%以上または枯死するを4とした。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病株数}) \div (\text{調査株数} \times 4) \times 100$$

②タマネギに対する病原性試験（タマネギ鱗茎接種法）

a. 供試菌株

第2節, 1, 2), (2), ①, a. と同じニラ乾腐病菌11 菌株, タマネギ乾腐病菌3 菌株およびネギ萎凋病菌9 菌株 (#41を加えた) を供試した。

b. 供試植物

70%エタノールで1 分間表面殺菌したタマネギ‘ターボ’の鱗茎を、縦に分割して接種に用いた。

c. 接種方法

供試菌株をPDA平板培地上で25°C, 暗黒条件下で7 日間培養し、菌叢の周縁部を直径5 mmのコルクボーラーで打ち抜いて得た菌叢ディスクをタマネギ鱗茎の基底部（以下、茎盤とする）に貼付した。接種後は、密閉容器に入れて滅菌水を少量加え、25°C, 暗黒下に7 日間置いた。無接種区には、無培養のPDA平板培地を用いた。各菌株につき2 反復行い、試験は2 回実施した。

d. 調査

接種7日後に、菌叢ディスクの貼付部周辺に現れた病斑を4段階の指数で評価し、発病度を次式で算出した。指数は、症状なしを0、貼付部の茎盤が黄変したものを1、貼付部の茎盤が褐変し、その周縁の鱗茎が黄～褐変したものを2、貼付部の茎盤と鱗茎の1/5～1/3が褐変したものを3とした。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病鱗茎数}) \div (\text{調査鱗茎数} \times 3) \times 100$$

(3) ニラ主要品種に対する接種試験

① 供試菌株

ニラ乾腐病菌9菌株 (*F. oxysporum* : Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs203, Fs310, Fs316, Fs162-1, Fs169-1, Fs306) を供試した。

② 供試植物

‘スーパーグリーンベルト’、‘グリーンベルト (武蔵野種苗園)’、‘パワフルグリーンベルト (武蔵野種苗園)’、‘ワンダーグリーンベルト (武蔵野種苗園)’、‘サンダーグリーンベルト (武蔵野種苗園)’、‘ワイドグリーン (サカタのタネ)’、‘タフボーイ (八江園芸)’、‘ジャイアントベルト (カネコ種苗)’を用いた。培土や供試植物の調製は第2節, 1, 2), (2),

①, bと同様に行った。

③ 接種源の調製

第1節, 3, 3), (2)と同様に、分生子懸濁液を 1.0×10^7 bud cells/mlとした。

④ 接種方法

第2節, 1, 2), (2), ①, dと同様に行った。

⑤ 調査

第2節, 1, 2), (2), ①, eと同様に行った.

(4) トマトに対する接種試験

① 供試菌株

ニラ乾腐病菌 5 菌株 (Fs43-1, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1) を接種試験に供試した (表 3). また, 比較のために東京農工大学植物病理学研究室が保有するトマト萎凋病菌 1 菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 : Chz1-A, 表 5) を, 対照としてトマトに病原性を示さない非病原性 *Fusarium* 属菌 5 菌株 (*F. oxysporum* : CE4-3916s, MCE10-F11s, MCE10-F12s, MCE10-F14s, ME-44s, 表 6) を供試した.

表 6 トマト接種試験に用いた非病原性 *F. oxysporum* の菌株

供試菌株	分離源	採取場所	分離年
CE4-3916s	土壌	チリ	2004
MCE10-F11s	土壌	メキシコ	2005
MCE10-F12s	土壌	メキシコ	2005
MCE10-F14s	土壌	メキシコ	2005
ME-44s	土壌	メキシコ	2005

② 供試植物

高圧滅菌土壌に播種し, 21 日間ガラス室で育苗したトマト ‘ポンデローザ (タカヤマシード)’ を用いた.

③ 接種源の調製

第1節, 3, 3), (2)と同様に, 分生子懸濁液を 1.0×10^7 bud cells/ml とした.

④ 接種方法

a. 灌注接種

高圧滅菌土壌を詰めた直径9 cmのポリエチレンポットに、根を約2 cm残して切除したトマトを1 ポットにつき1 株ずつ植付け、接種源2 mlを灌注した。

b. 浸根接種

トマトの根を約2 cm残して切除し、地下部を接種源に30 分間浸漬した後、高圧滅菌土壌を詰めた直径9 cmのポリエチレンポットに、1 ポットにつき1 株ずつ植付けた。

いずれの接種とも、2011年6月14日に実施し、各菌株につき5 反復行った。また、接種後はガラス室内で管理した。

⑤ 調査

灌注接種および浸根接種とも7月7日（接種23 日後）に、外部病徴を下に示した5 段階の指数を基準に地上部の生育を目視で調査した。内部病徴は、地際部から4~5 cmの茎をカミソリで切断し、切断面の導管部の褐変を5段階の指数で評価して発病度を算出した。また、導管部の褐変のみられたものを発病株とし、発病株率を算出した。さらに、地際部から4~5 cmの茎を、70%エタノールに30 秒間、2%次亜塩素酸ナトリウムに30 秒間浸漬後、滅菌水でゆすぎ、Fo-G2培地（ KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaNO_3 2 g, KCl 0.5 g, ホウ酸 0.5 g, 硝酸エコナゾール10 mg, クロラムフェニコール 0.25 g, 寒天 20 g, 蒸留水 1 L, L-ソルボース 20 g, イミノクタジン酢酸塩25%溶液 0.4 ml, トルクロホスメチル50%水和剤 3mg) へ置床し、27.5°C, 暗黒下で7~10 日後に出現する菌叢の有無を調査した。

なお、外部病徴の指数は、無病徴または茎葉がごく軽微に黄化したものを0、植物体の25%以上50%未満が黄化したものを1、50%以上75%未満のものを2、75%以上が黄化もしくは萎凋したものを3、枯死したものを4とした。内部病徴の指数は、導管の褐変がないものを0、導管が1本褐変したものを1、2本褐変したものを2、3本褐変したものを3、4本もしくは導管

の周辺まで褐変が認められるものを4とした。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病株数}) \div (\text{調査株数} \times 4) \times 100$$

(5) その他植物に対する接種試験

① 供試菌株

県内で分離されたニラ乾腐病菌4菌株 (Fs43-2, Fs112-1, Fs162-1, Fs203) を接種試験に供試した (表 3)。

② 供試植物

高圧滅菌土壌に播種し、28 日間ガラス室で育苗したキュウリ‘ズバリ163(ときわ研究場)’、オクラ‘アーリーファイブ(タキイ種苗)’、ナス‘竜馬(タキイ種苗)’、ピーマン‘みおぎ(日本園芸生産研究所)’、キャベツ‘金系201号(サカタのタネ)’、ハウレンソウ‘ミラージュ(サカタのタネ)’、インゲンマメ‘ベストクロップキセラ(雪印種苗)’を供試した。各植物につき5 反復行った。

③ 接種源の調製

第1節, 3, 3), (2)と同様に, 分生子懸濁液を 1.0×10^7 bud cells/mlとした。

④ 接種方法

2012年11月18日に, 高圧滅菌土壌を詰めた直径9 cmのポリエチレンポットに, 根を約2 cm 残して切除した各植物を1 ポットにつき1 株ずつ移植し, 接種源を1 株当たり3 ml灌注した。各植物につき5 ポットずつ用いた。また, 接種後はガラス室内で管理した。

⑤ 調査

12月18日(接種30 日後)に, 第2節, 1, 2), (1), ⑤に準じて地上部の病徴を評価した。

2. *F. proliferatum*

1) 分離菌株の形態観察および生育温度

(1) 供試菌株

高知県内の罹病ニラから分離され、ニラに対する病原性が確認された*Fusarium*属菌のうち、*F. oxysporum* と異なる培養性状を示す1 菌株 (Fs219) を供試した。また、東京農工大学植物病理研究室が保有する菌株で、ニラに対する病原性が確認され、かつFs 219と同様の培養性状を示す*Fusarium*属菌 (840424a-1) も供試した (表 3)。

(2) 培養性状の調査

供試菌株を、PDA平板培地で25°C、暗黒下で7 日間培養し、菌叢を観察した。

(3) 各器官の形態

供試菌株を、SNA培地のスライドカルチャー上で25°C、暗黒下で7 日間培養後に、光学顕微鏡で気生分生子、小分生子を、PDA平板培地で25°C、暗黒下で10 日間培養後に、大分生子の形態を光学顕微鏡で観察した。また、PDA平板培地で25°C、BLB照射下で21 日間培養し、厚膜胞子の形成の有無を観察した。

(4) 生育温度

供試菌株をPDA平板培地上で、5, 10, 15, 20, 23, 25, 28, 30, 33, 35, 38, 40°Cの各温度で5 日間、暗黒条件下で培養し、1 日当たりの菌糸伸長 (mm/日) を算出した。なお、各温度につき3反復行った。

2) rDNA-ITS 領域, rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域および histone H3 領域の塩基配列に基づく

分子系統解析

(1) 供試菌株

高知県内の罹病ニラから分離され、ニラに対する病原性が確認された*Fusarium*属菌のうち、*F. oxysporum* と異なる培養菌叢性状を示す2菌株 (Fs219, Fs304) を供試した。また、東京農工大学植物病理研究室が保有する菌株で、ニラに対する病原性が確認され、かつFs219やFs304と同様の培養性状を示す*Fusarium*属菌 (840424a-1) も供試した (表 3)。なお、rDNA-ITS領域の塩基配列の解析には1 菌株 (Fs219) を、rDNA-IGS領域、EF1 α 領域およびhistone H3領域の塩基配列の解析には3 菌株とも用いた。比較のため、農林水産省農業生物資源研究所ジーンバンク (つくば市) が保有する日本産典型菌株の*F. proliferatum* (MAFF 410715, MAFF 410716), *F. verticillioides* (MAFF 240087, MAFF 240093, MAFF 240095), *F. fujikuroi* (MAFF 238531) を供試した。さらに、3領域の塩基配列の解析には、比較のため*F. oxysporum* (ニラ乾腐病菌 : Fs43-2, Fs62-1) と*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 (トマト萎凋病菌 : Chz1-A) も供試した (表 3, 5,7)。

表 7 *F. proliferatum* の系統解析に用いた日本産典型菌株

菌の種類	供試菌株	分離源	採取場所	保存機関 ^{z)}	分離年
<i>F. proliferatum</i>	MAFF 410715	スギ	京都府	MAFF	1984
	MAFF 410716	スギ	京都府	MAFF	1984
<i>F. fujikuroi</i>	MAFF 238531	イネ	茨城県	MAFF	2001
				MAFF	
<i>F. verticillioides</i>	MAFF 240087	トウモロコシ	神奈川県	MAFF	1969
	MAFF 240093	トウモロコシ	神奈川県	MAFF	1969
	MAFF 240095	トウモロコシ	神奈川県	MAFF	1969

z) MAFF, 農林水産省農業生物資源研究所ジーンバンク (つくば市)

(2) ゲノムDNAの抽出

供試菌株をPDA平板培地で27.5°C, 7日間, 暗黒下で培養後, 第2節, 1, 1), (2)と同様に行った.

(3) rDNA-ITS領域の塩基配列の比較

プライマーは, ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') およびITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) を用いた. PCR反応は, 第2節, 1, 1), (3)と同様に行った. ただし, PCR反応は94°C・2分間の後, 94°C・30秒間, 57°C・30秒間, 72°C・1分間を35サイクル, 72°C・7分間とした. 得られたPCR産物の精製, 塩基配列の解析は, 第2節, 1, 1), (4)と(5)と同様に行い, GENETYX ver.10で日本産典型菌株6株の塩基配列との相同性を比較した. また, DDBJ/EMBL/GeneBank DNAデータベース (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) に登録されている当該遺伝子領域の塩基配列との相同性検索も行った.

(4) rDNA-IGS領域, EF1 α 領域およびhistone H3領域の塩基配列に基づく系統解析

プライマーは, rDNA-IGS領域ではFIGS11 (5'-GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG-3') と FIGS12 (5'-GCAAAATTCAATAGTATGGC-3') (Kawabe *et al.*, 2005) を, EF1 α 領域ではEF1 (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') とEF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (O'Donnell *et al.*, 1998b) を, histone H3領域ではH3-1a (5'-ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG-3') とH3-1b (5'-GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT-3') (Glass and Donaldson, 1995) を用いた (表4). PCR反応は, 第2節, 1, 1), (3)と同様に行った. ただし, 温度条件は, EF1 α 領域では94°C・5分間の後, 94°C・30秒間, 51°C・30秒間, 72°C・45秒間を30サイクル, 72°C・7分間行い, histone H3領域では94°C・2分間の後, 94°C・30秒間, 62°C・30秒間,

72°C・30 秒間を30サイクル，72°C・7 分間とした．得られたPCR産物は，1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い，rDNA-IGS領域では約600 bpに，EF1 α 領域では約670 bpに，histone H3領域では約430 bpにバンドを生じることを確認した．PCR産物の精製と分子系統解析は，第2節，1，1），（4）および（5）と同様に行った．

3) 各種植物に対する病原性検定

(1) 供試菌株

高知県内で分離された*Fusarium*属菌2 菌株 (Fs219, Fs304)，東京農工大学植物病理研究室が保有する*Fusarium*属菌1 菌株 (840424a-1) を供試した．ただし，ヒガンバナ科植物，ユリ科植物およびその近縁植物に対する接種試験にはFs219と840424a-1の2菌株を用いた．また，ニラ，ネギ，タマネギに対する接種試験では，比較として山口大学から分譲されたネギ萎凋病菌2 菌株 (*F. proliferatum* : #3, #9) を用いた (表 3) ．

(2) 接種源の調製，接種方法および調査

① ヒガンバナ科植物，ユリ科植物およびその近縁植物に対する接種試験

第2節，1，2），（1）と同様に行った．

② ニラ，ネギ，タマネギに対する接種試験

第2節，1，2），（2）と同様に行った．

③ ニラ主要品種に対する接種試験

第2節，1，2），（4）と同様に行った．

④ その他植物に対する接種試験

第2節，1，2），（5）と同様に行った．

結果

1. *F. oxysporum*

1) rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく分子系統

ニラ乾腐病菌 18 菌株の rDNA-IGS 領域の塩基配列 (527 bp または 598 bp) を分子系統解析したところ, 系統樹 1 では, 高知県の罹病ニラから分離したニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) 15 菌株は 3 つのクラスター (GA, GB, GC) に分かれ, それぞれのブートストラップ値は 99%, 93%, 90%であった. クラスターGAには, ニラ乾腐病菌 (Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs301, Fs302, Fs311, Fs315) とともにネギ萎凋病菌 (f. sp. *cepae* : Fs-N8, Fs-N9, #01, #60) およびトマト萎凋病菌レース 3 (f. sp. *lycopersici* race 3 : Chz1-A, DA-1/7) も含まれた. クラスターGBには, ニラ乾腐病菌 (Fs203, Fs310, Fs316) とともにネギ萎凋病菌 (Fs-N1, #15) およびサツマイモつる割病菌 (f. sp. *batatas* : MAFF 103070) が含まれた. クラスターGCにはニラ乾腐病菌 (Fs162-1, Fs169-1, Fs306) のみが含まれた (図 1-1). 系統樹 2 でも, 高知県の罹病ニラから分離したニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) 15 菌株は 3 つのクラスター (GA, GB, GC) に分かれ, それぞれのブートストラップ値は 99%, 95%, 65%であった. なお, クラスターGBには, ニラ乾腐病菌 (Fs203, Fs310, Fs316) とともにネギ萎凋病菌 (Fs-N1, #15) が含まれた (図 1-2). また, 今回供試したニラ乾腐病のうち中土佐町の同一株から分離した菌株 (Fs315, Fs316) のうち, Fs315 はクラスターGA に, Fs316 はクラスターGB に分かれた. 須崎市の同一株から分離した菌株 (Fs310, Fs311) のうち, Fs311 はクラスターGA に, s310 はクラスターGB に分かれた. 須崎市の同一圃場から分離した菌株 (Fs301, Fs302, Fs304, Fs306) のうち, Fs301, Fs302 はクラスターGA に, Fs306 はクラスターGC に含まれた. なお, Fs304 については *F. proliferatum* のクラスターに含まれた (図 1-1, 1-2).

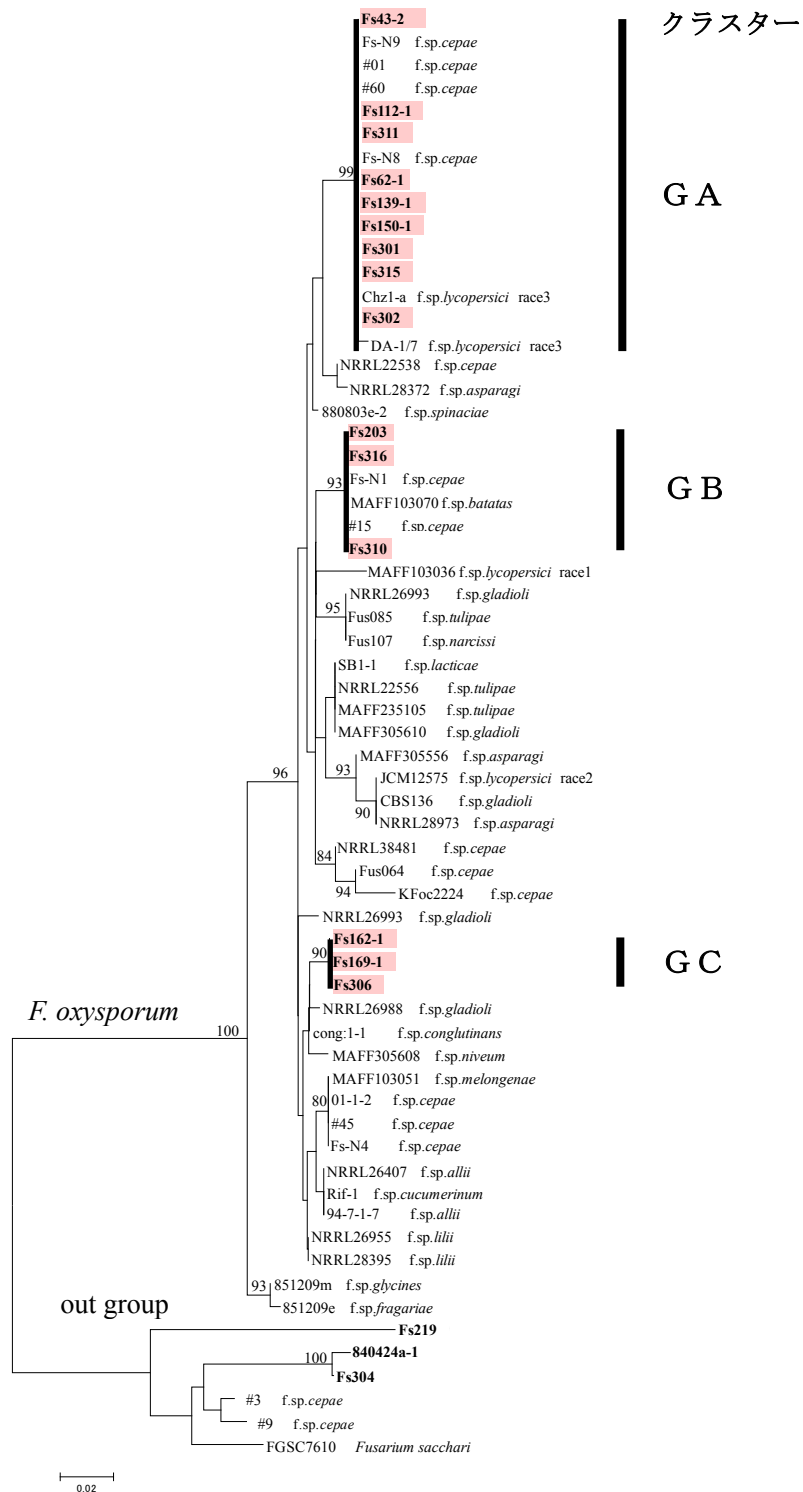


図 1-1 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) の rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく系統樹 1

(NJ 法, ブートストラップ法 : 1,000 反復)

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) :

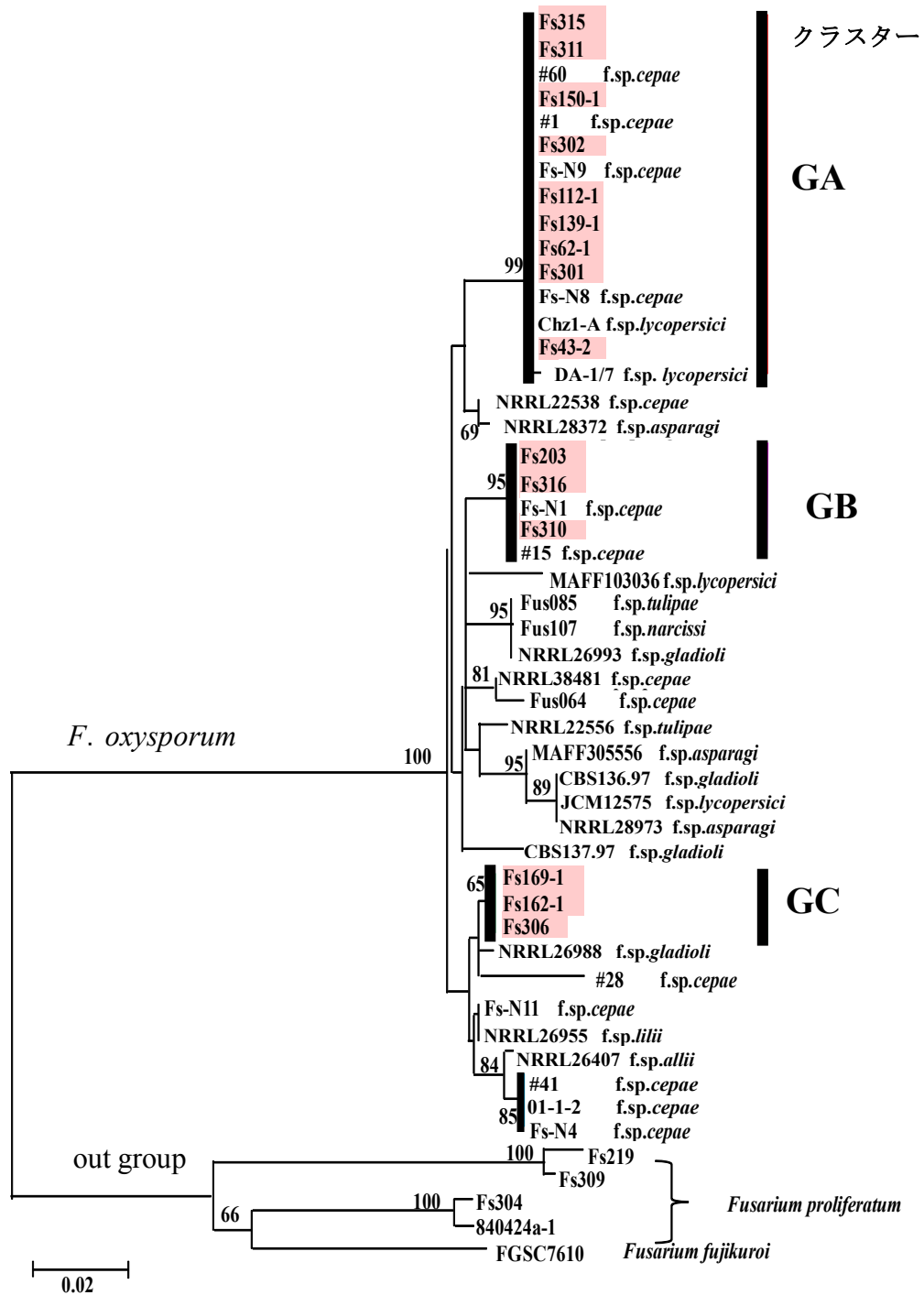


図 1-2 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) の rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく系統樹 2

(NJ 法, ブートストラップ法 : 1,000 反復)

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) :

2) 宿主範囲と分化型

(1) ヒガンバナ科植物，ユリ科植物およびその近縁植物に対する病原性

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) 8 菌株とも，ニラとネギに強い病原性が，タマネギとアスパラガスに弱い病原性がみられた。また，ニラ乾腐病菌のニラ，ネギ，タマネギ，アスパラガスに対する病原性はネギ萎凋病菌 (f. sp. *cepae*:#60) とほぼ同様の傾向であった(表 8)。

(2) ニラ，ネギ，タマネギに対する病原性

① ニラ，ネギおよびタマネギに対する病原性 (簡易診断法)

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) 11 菌株および比較に用いたネギ萎凋病菌およびタマネギ乾腐病菌のいずれの菌株とも，ニラ，ネギおよびタマネギに病原性を示した。ニラ，ネギおよびタマネギに対する病徴は，いずれの菌株とも同様であり，草丈の抑制が認められた後，徐々に病徴が進展して葉先が枯死し，やがて株全体が萎凋・枯死した。なお，ニラ乾腐病菌の rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく分子系統樹でクラスター GC に属した菌株 (Fs162-1, Fs169-1, Fs306) は，他の菌株と比べてニラに対する発病度がやや高い傾向であった。ネギに対しては，ネギ萎凋病菌のクラスター GD に含まれた菌株 (Fs-N4) が高い発病度を示したが，その他のニラ乾腐病菌，ネギ萎凋病菌およびタマネギ乾腐病菌の菌株間には一定の傾向はみられなかった。なお，タマネギに対しては，ニラ乾腐病菌はネギ萎凋病菌やタマネギ乾腐病菌より全体的に発病度の低い菌株がみられた (図 2-1~2-3)。

表 8 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) のヒガンバナ科植物, ユリ科植物およびその近縁植物に対する病原性

供試菌株	菌の種類	分化型	ニラ ²⁾			ネギ			タマネギ			アスパラガス				
			浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種		
Fs43-2	ニラ乾腐病菌	-	++	++	+	+	++	+	+	+	+	+	-	±	+	
Fs62-1			+	++	+	++	++	+	+	+	+	+	-	++	-	
Fs112-1			+	++	++	+	+++	+	-	+	±	-	+	+	+	
Fs139-1			+	++	+	++	+++	++	+	++	+	-	+	-	-	
Fs150-1			+	++	+	+	++	+	-	++	±	+	-	-	-	
Fs162-1			+++	+	++	+	+	++	+	+	±	-	-	-	-	
Fs169-1			+	++	++	+	+	+	-	+	+	-	±	+	+	
Fs203			++	++	+	+	++	+	+	+	+	-	±	+	+	
#60			ネギ萎凋病	f. sp. <i>cepae</i>	++	++	+	++	++	+	+	++	+	-	+	-
Chz1-A			トマト萎凋病レース 3	f. sp. <i>lycopersici</i> race 3	+	++	+	+	++	±	-	+	±	-	+	-
94-7-1-7	ラッキョウ乾腐病菌	f. sp. <i>allii</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	±	++	-	±		
MAFF 305556	アスパラガス立枯病菌	f. sp. <i>asparagi</i>	+	-	++	-	-	-	++	+	+	+++	+++	++		
851209k	ユリ乾腐病菌	f. sp. <i>lilli</i>	+	-	++	+	-	-	-	+	+	-	±	±		
MAFF 235105	チューリップ球根腐敗病菌	f. sp. <i>tulipae</i>	+	-	-	-	-	-	++	+	+	-	±	±		
MAFF 305610	グラジオラス乾腐病菌	f. sp. <i>gladioli</i>	-	+	-	-	-	±	-	+	+	-	±	±		
無接種			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

z) -, 病原性が無い; ±, 発病度が0.1以上10.0未満; +, 発病度が10.0以上33.4未満; ++, 発病度が33.4以上66.7未満; +++, 発病度が66.7以上

(表8の続き)

供試菌株	菌の種類	分化型	ラッキョウ			ニンニク			ユリ	チュー リップ	グラジ オラス	
			浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	土壌 接種	土壌 接種	土壌 接種	
Fs43-2	ニラ乾腐病菌	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	
Fs62-1			-	-	-	-	±	-	-	-	-	
Fs112-1			-	-	-	-	±	-	-	-	-	
Fs139-1			-	-	-	-	-	±	-	-	-	
Fs150-1			-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fs162-1			-	-	-	-	±	±	-	-	-	
Fs169-1			-	-	+	-	±	-	-	-	-	
Fs203			-	-	-	-	±	-	-	-	-	
#60			ネギ萎凋病	f. sp. <i>cepae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Chz1-A			トマト萎凋病レース 3	f. sp. <i>lycopersici</i> race 3	-	-	+	-	±	±	-	-
94-7-1-7	ラッキョウ乾腐病菌	f. sp. <i>allii</i>	+++	+	+	-	-	-	-	-		
MAFF 305556	アスパラガス立枯病菌	f. sp. <i>asparagi</i>	-	-	-	-	-	±	-	-		
851209k	ユリ乾腐病菌	f. sp. <i>lilli</i>	-	-	-	-	+	±	-	-		
MAFF 235105	チューリップ球根腐敗病菌	f. sp. <i>tulipae</i>	-	-	-	-	-	-	+++	-		
MAFF 305610	グラジオラス乾腐病菌	f. sp. <i>gladioli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+++		
無接種			-	-	-	-	-	-	-	-		

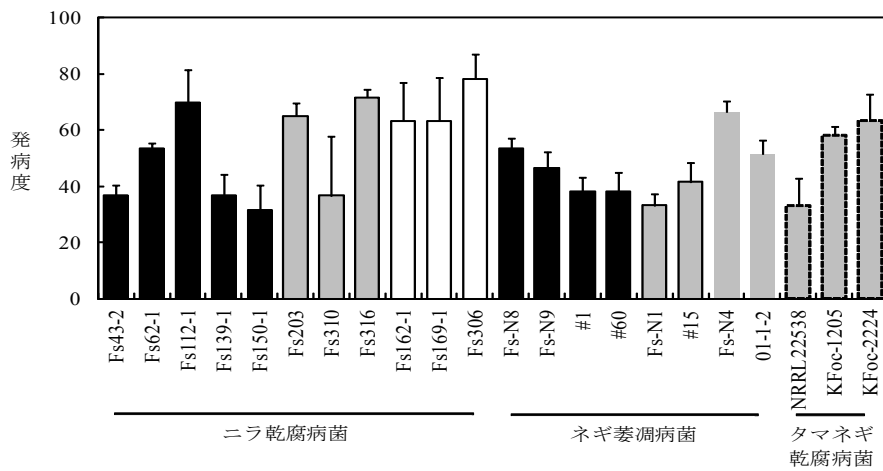


図 2-1 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) のニラに対する病原性 (簡易診断法)

注) ■, GA : □, GB : □, GC : ■, GD : ■, -
 英文字は, rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づくクラスターを示し, -は
 いずれのクラスターにも含まれないことを示す。
 注) 図中のバーは, 標準誤差を示す。

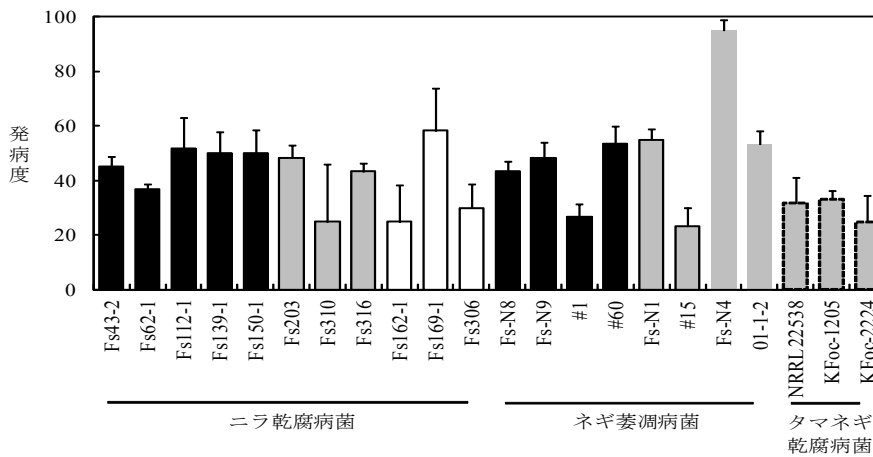


図 2-2 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) のネギに対する病原性 (簡易診断法)

注) 図 2-1 と同じ。

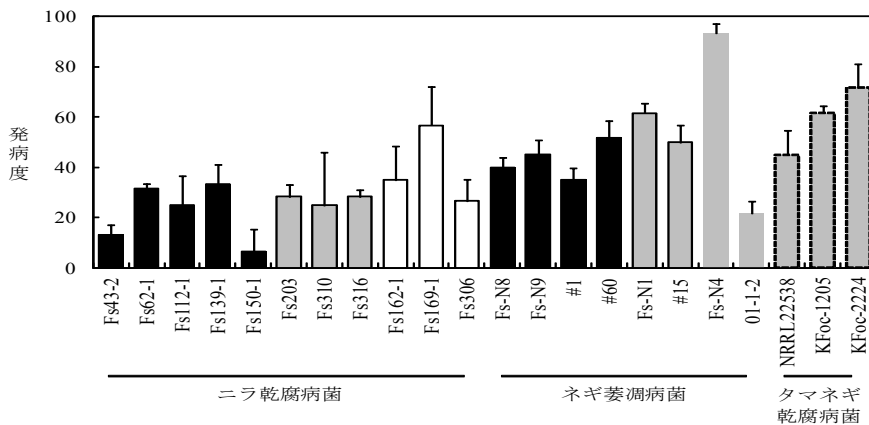


図 2-3 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) のタマネギに対する病原性 (簡易診断法)

注) 図 2-1 と同じ。

② タマネギに対する病原性（タマネギ鱗茎接種法）

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) 11 菌株は、いずれの菌株ともタマネギ鱗茎に病原性を示した。比較に用いたネギ萎凋病菌およびタマネギ乾腐病菌では発病度 100 を示す強い病原性を持つ菌株が複数ある一方、ニラ乾腐病菌では、ネギ萎凋病菌やタマネギ乾腐病菌と比較して発病度が低い菌株が多い傾向であった（表 9）。

表9 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) のタマネギ鱗茎に対する病原性

菌の種類	菌株名	1回目	2回目
ニラ乾腐病菌	Fs43-2	33.3	33.3
	Fs62-1	50.0	50.0
	Fs112-1	50.0	66.7
	Fs139-1	33.3	50.0
	Fs150-1	66.7	50.0
	Fs203	66.7	50.0
	Fs310	33.3	33.3
	Fs316	66.7	50.0
	Fs162-1	83.3	66.7
	Fs169-1	66.7	50.0
	Fs306	66.7	50.0
ネギ萎凋病菌	Fs-N8	83.3	50.0
	Fs-N9	50.0	33.3
	#1	66.7	16.7
	#60	66.7	100.0
	Fs-N1	100.0	50.0
	#15	66.7	50.0
	Fs-N4	100.0	100.0
	01-1-2	100.0	100.0
#41	100.0	66.7	
タマネギ乾腐病菌	NRRL 22538	66.7	50.0
	KFoc-1205	NT	83.3
	KFoc-2224	NT	100.0
無接種		0.0	0.0

注) 数値は発病度の2反復の平均値を示す。

注) NT: 調査していない。

(3) ニラ主要品種に対する病原性

いずれの供試菌株とも、ニラ 8 品種のうち‘タフボーイ’の発病度が最も低かった。しかし、各菌株間には、品種に対する発病度に一定の傾向はみられなかった (図 3)。

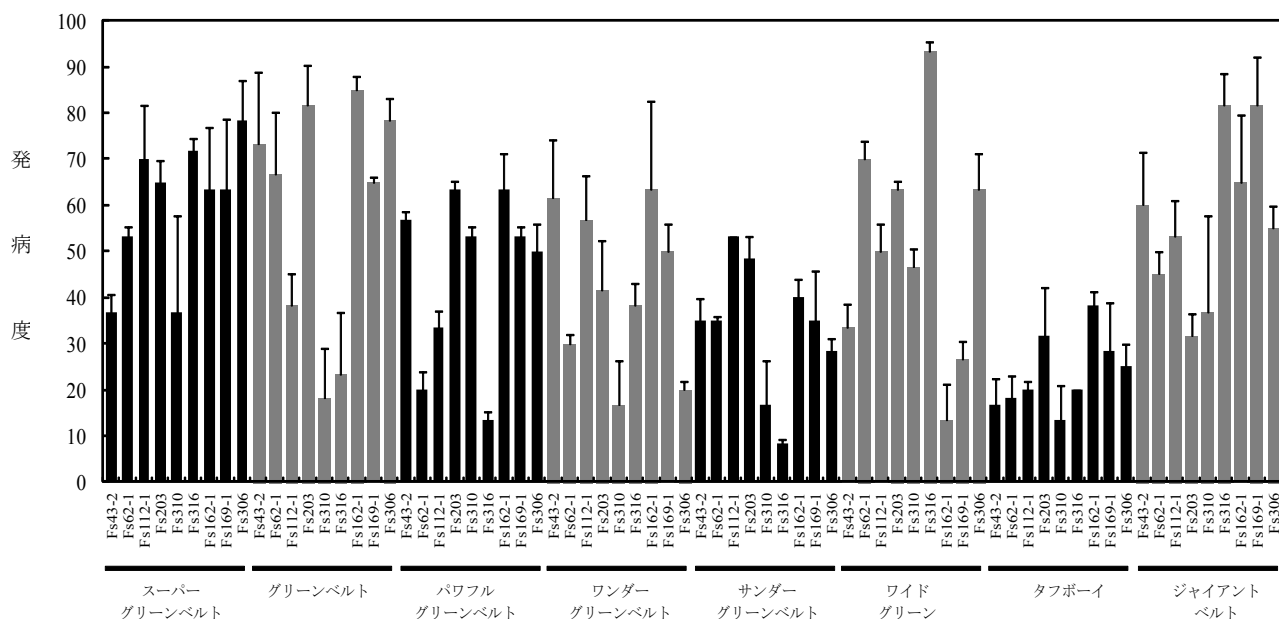


図 3 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) の主要ニラ品種に対する病原性

注) 図中のバーは標準誤差を示す。

(4) トマトに対する病原性

対照のトマト萎凋病菌レース3菌株 (Chz1-A) では発病がみられ、トマト組織から接種菌が再分離されたのに対し、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) 5菌株および非病原性 *F. oxysporum* 5菌株では発病がみられず、トマト組織から接種菌は再分離されなかった。しかし、Fs112-1, Fs150-1では草丈の極端な抑制がみられた (表 10-1)。

表 10-1 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) のトマトに対する病原性 (灌注接種)

供試菌株	菌の種類	発病株率 (%)	発病度		再分離 ²⁾	備考
			外部病徴	内部病徴		
Fs43-2		0.0	0.0	0.0	—	
Fs62-1		0.0	0.0	0.0	—	
Fs112-1	ニラ乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i>	0.0	0.0	0.0	—	5株中1株に生育の抑制がみられた
Fs139-1		0.0	0.0	0.0	—	
Fs150-1		0.0	0.0	0.0	—	5株中2株に生育の抑制がみられた
Chz1-A	トマト萎凋病菌レース3 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race 3	100.0	40.0	60.0	+	
CE4-3916s		0.0	0.0	0.0	—	
MCE10-F11s		0.0	0.0	0.0	—	
MCE10-F12s	非病原性 <i>F. oxysporum</i>	0.0	0.0	0.0	—	
MCE10-F14s		0.0	0.0	0.0	—	
ME-44s		0.0	0.0	0.0	—	
無接種	-	0.0	0.0	0.0	—	

2) 再分離：+, 有り；-, 無し

一方、浸根接種したところ、対照のトマト萎凋病菌レース3菌株 (Chz1-A) のような明瞭な発病はみられなかったが、Fs43-2, Fs62-1, Fs139-1の内部病徴の発病度は8.3~33.3であり、トマト組織から接種菌が再分離された。Fs112-1, Fs150-1では、外部病徴や内部病徴はみられなかったが、トマト組織から接種菌が再分離された (表 10-2)。また、Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1では草丈の極端な抑制がみられた。なお、非病原性*F. oxysporum* 5菌株では、発病はみられず、トマト組織から接種菌は分離されなかった。

表 10-2 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) のトマトに対する病原性 (浸根接種)

供試菌株	菌の種類	発病株率 (%)	発病度		再分離	備考
			外部病徴	内部病徴		
Fs43-2		33.3	0.0	25.0	+	3株中1株に生長点付近の葉の黄化, 3株に生育の抑制がみられた
Fs62-1		33.3	0.0	33.3	+	3株中2株に生育の抑制がみられた
Fs112-1	ニラ乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i>	0.0	0.0	0.0	+	3株中1株に生育の抑制がみられた
Fs139-1		33.3	0.0	8.3	+	3株中1株に生育の抑制がみられた
Fs150-1		0.0	0.0	0.0	+	
Chz1-A	トマト萎凋病菌レース 3 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race 3	100.0	100.0	91.7	+	
CE4-3916s		0.0	0.0	0.0	-	
MCE10-F11s		0.0	0.0	0.0	-	
MCE10-F12s	非病原性 <i>F. oxysporum</i>	0.0	0.0	0.0	-	3株中1株に生育の抑制がみられた
MCE10-F14s		0.0	0.0	0.0	-	
ME-44s		0.0	0.0	0.0	-	
無接種	-	0.0	0.0	0.0	-	

z) 再分離：+, 有り；-, 無し

(5) その他植物に対する病原性

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) 4菌株を9種の植物に接種したところ、いずれの菌株ともキュウリ、インゲンマメ、オクラ、キャベツ、レタス、ハウレンソウ、ナス、ピーマン、ニンジンに対する病原性を示さなかった (データ省略)。

2. *F. proliferatum*

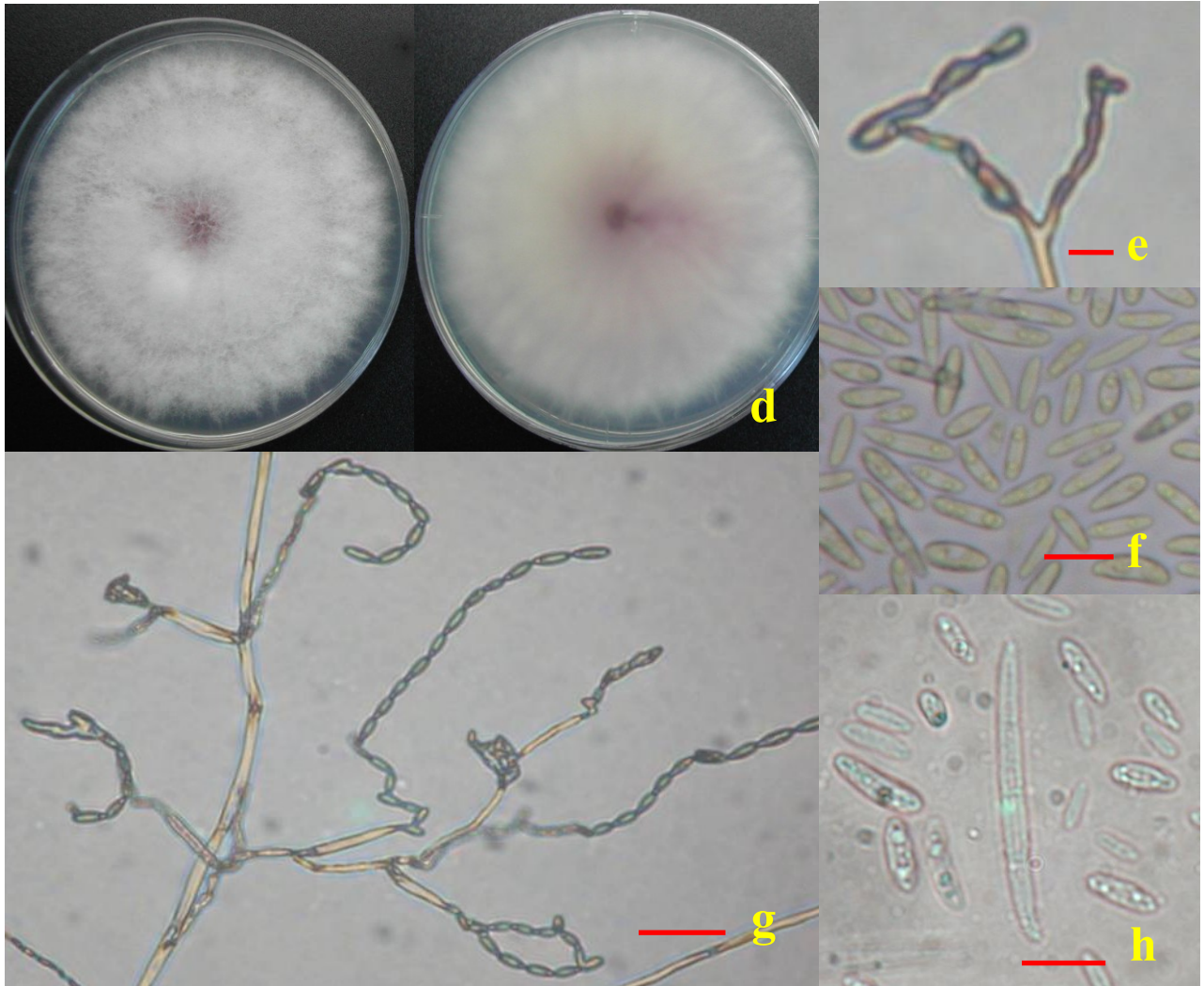
1) 形態および生育温度

ニラ乾腐病菌 (Fs219, 840424a-1) は、両菌株ともPDA平板培地上での菌糸は無色であり、菌叢は白色～淡赤紫色を呈した (写真 d)。また、両菌株ともSNA培地のスライドカルチャー上でモノフィアライドまたはポリフィアライドを形成し (写真 e)、分生子柄をプロリファレートして分枝した先端に短棍棒状または洋なし形の単胞の小分生子を連鎖状または擬頭状に形成した (写真 f)。小分生子の大きさはFs219で5.0-14.0×2.0-4.5 μm (平均7.9×2.8 μm)、840424a-1で5.0-13.5×2.0-4.0 μm (平均7.9×2.9 μm) であった (写真 g)。大分生子は両菌株ともわずかに湾曲した鎌形で、フットを有し、隔壁数は3～5であった。大きさは、Fs219で32-52×3.0-4.5 μm (平均39.5×3.6 μm)、840424a-1で22-47×2.4-4.0 μm (平均37.5×3.2 μm) であった (写真 h)。厚膜胞子の形成はみられなかった。これらの性状は、既報のツルムラサキ紫斑病菌 (菅野ら, 2003) およびNirenberg *et al.* (1998) の*F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg ex Gerlach and Nirenb. var minus Nirenbergとよく一致した (表 11)。

Fs219, 840424a-1の両菌株とも、10～35°Cで生育し、最適温度は28°Cであり、5°Cおよび40°Cでは生育しなかった (図 4)。

2) rDNA-ITS 領域の塩基配列に基づく分子系統

ニラ乾腐病菌 (Fs219) のrDNA-ITS領域の塩基配列をDDBJで検索した結果、*F. proliferatum* (MAFF 410715, MAFF 410716) および*F. fujikuroi* (MAFF 238531) と100%の相同性を示し、既報告の*F. proliferatum* (MAFF 237651, HQ 379695, HQ 607967) とも100%の相同性を示した。一方、*F. verticillioides* (MAFF 240087, MAFF 240093, MAFF 240095) とは89%の相同性であった。



d 供試菌株 (Fs219) の菌叢 (PDA 平板培地, 25°C, 10 日後, 左: 表面; 右: 裏面)
 e ポリフィアライドと小分生子 (SNA スライドカルチャー, 25°C, 10 日後)
 f プロリファレートした分生子柄と, その先端に擬頭状または連鎖状に形成された
 小分生子 (SNA スライドカルチャー, 25°C, 10 日後)
 g 小分生子 (SNA スライドカルチャー, 25°C, 10 日後)
 h 大分生子 (PDA 平板培地, 25°C, 10 日後)
 バーの長さ: e, 10 μm ; f, 10 μm ; g, 20 μm ; h, 10 μm

表11 供試菌株 (Fs219, 840424a-1) の形態

	供試菌株		既報の <i>F. proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg ex Gerlach and Nirenb. var minus Nirenberg		(参考) 既報の <i>F. oxysporum</i> Schlechtendahl
	Fs219	840424a-1	菅野ら, 2003 (ツルムラサキ紫斑病菌)	Nirenberg et al., 1998	木嶋ら, 1985 (ニラ乾腐病菌)
PDA平板培地上の菌叢	白色～淡赤紫色	白色～淡赤紫色	白色～淡紫色	灰白色, 灰色がかった 橙色～紫色	白色, 紫紅色
形成方法	連鎖状 擬頭状	連鎖状 擬頭状	連鎖状 擬頭状	連鎖状 擬頭状	擬頭状
フィアライド	モノフィアライド ポリフィアライド	モノフィアライド ポリフィアライド	モノフィアライド ポリフィアライド	モノフィアライド ポリフィアライド	モノフィアライド
小分生子 形状	短棍棒形 洋なし形	短棍棒形 洋なし形	長楕円形 洋なし形	—	卵形 楕円形
隔壁数	0	0	0-1	0-1	—
大きさ (μm)	5.0-14.0×2.0-4.5 (7.9×2.8)	5.0-13.5×2.0-4.0 (7.9×2.9)	4.8-14.0×2.4-4.5 (9.2×3.3)	7.0-11.8×2.4-3.5 (9.4×2.9)	—
小分生子柄 先端部	プロリファレート	プロリファレート	プロリファレート	プロリファレート	—
形状	鎌形 (わずかに湾曲)	鎌形 (わずかに湾曲)	三日月形 (わずかに湾曲)	鎌形	三日月形
フット	ある	ある	ある	ある	—
大分生子 隔壁数	3-5	3-5	3-5	3-5	1-4
大きさ (μm) <3隔壁>	32-52×3.0-4.5 (39.5×3.6)	22-47×2.5-4.0 (37.5×3.2)	42-65×3.0-4.7 (49.0×4.5)	—	13.9-37.4×3.2-4.4 (27.3×3.8)
厚膜胞子	なし	なし	なし	なし	—

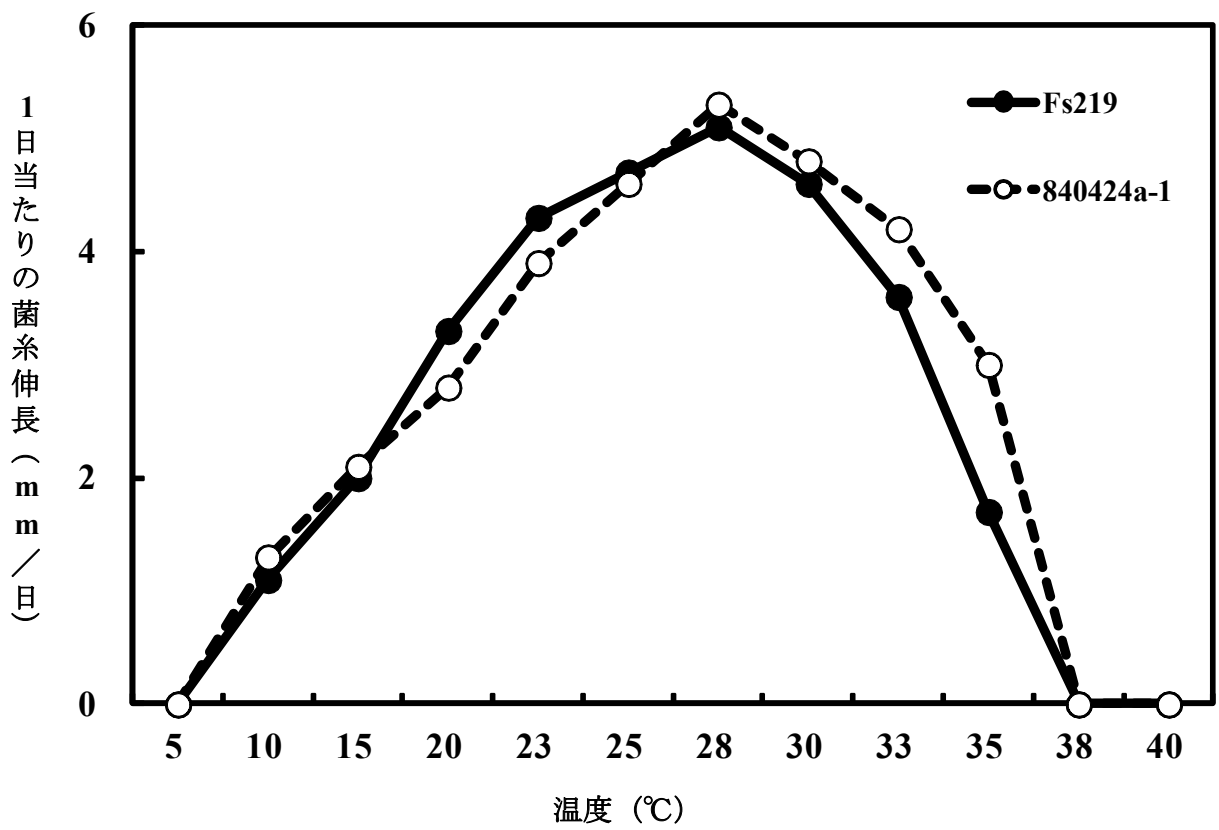


図4 供試菌株 (Fs-219 および 840424a-1) の一日当たりの菌糸伸長

3) rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域および histone H3 領域の結合塩基配列に基づく分子系統

ニラ乾腐病菌 3 菌株 (Fs219, Fs304, 840424a-1) の 3 領域の結合塩基配列に基づいた系統樹を作成した結果, ニラ乾腐病菌 3 菌株は比較に用いたジーンバンクの日本産典型菌株のうち *F. proliferatum* (MAFF 410715, MAFF 410715) に系統樹中で最も近くに位置した. 次いで *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* の順となった (図 5).

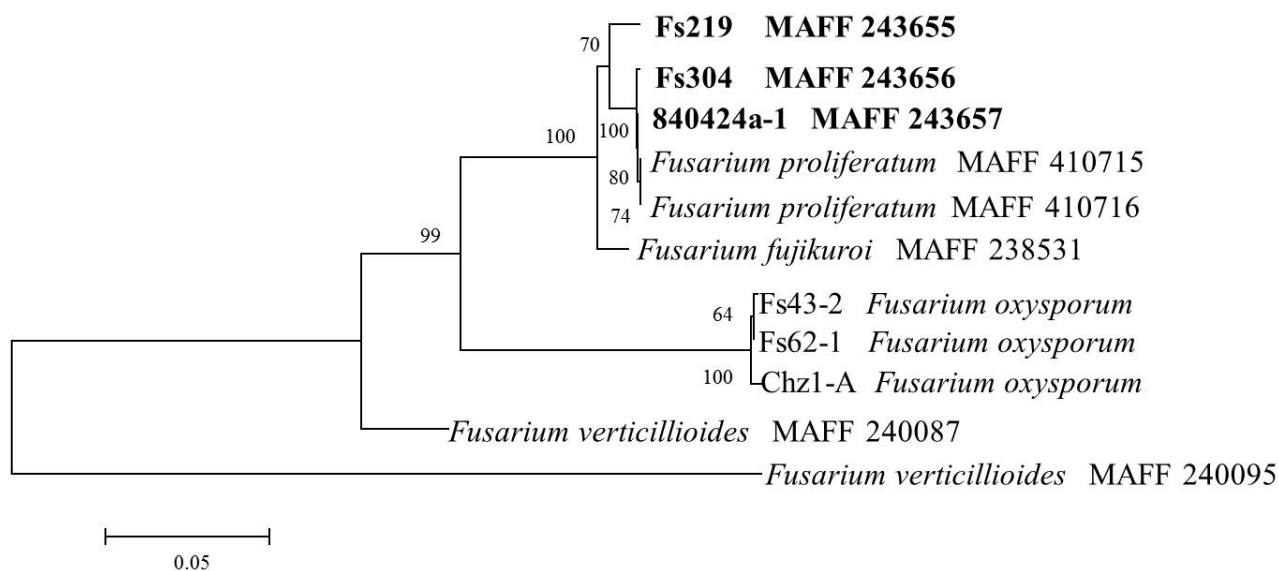


図 5 供試菌株 (Fs219, Fs304, 840424a-1) の rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域および histone H3 領域の結合塩基配列に基づく分子系統樹 (NJ 法, ブートストラップ値 : 1,000)

4) 宿主範囲

(1) ヒガンバナ科植物，ユリ科植物およびその近縁植物に対する病原性

ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) 2 菌株とも，ニラ，ネギ，タマネギ，アスパラガスに強い病原性がみられ，ニンニクに弱い病原性がみられた (表 12)。

(2) ニラ，ネギ，タマネギに対する病原性

ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) 3 菌株および比較として用いたネギ萎凋病菌のいずれの菌株とも，ニラ，ネギおよびタマネギに病原性を示した。ニラ，ネギおよびタマネギに対する病徴は，いずれの菌株とも同様であり，草丈の抑制が認められた後，徐々に病徴が進展して葉先が枯れ，やがて株全体が萎凋，枯死した。ニラに対しては，ニラ乾腐病菌がネギ萎凋病菌より発病度が高い傾向がみられた。ネギに対しては，両病原菌はほぼ同等の発病度であった。なお，タマネギに対しては，ニラ乾腐病菌はネギ萎凋病菌より発病度が低い傾向がみられた (図 6-1~6-3)。

(3) ニラ主要品種に対する病原性

ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) 3 菌株とも，ニラ 8 品種のうち‘タフボーイ’の発病度が最も低かった。しかし，各菌株間には，品種に対する発病度に一定の傾向はみられなかった (図 7)。

(4) その他植物に対する病原性

ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) 3 菌株とも，キュウリ，オクラ，ナス，ピーマン，キャベツ，ハウレンソウ，インゲンマメの 7 種の植物に対する病原性は認められなかった (データ省略)。

表12 ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) のヒガンバナ科植物, ユリ科植物およびその近縁植物に対する病原性

供試菌株	ニラ ^{z)}			ネギ			タマネギ			アスパラガス		
	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種
Fs219	++	++	++	+	+++	+	++	+	+	++	+	++
840424a-1	++	++	++	+	+	++	+	++	++	+++	++	+++
無接種	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

z) -, 病原性が無い; ±, 発病度が0.1以上10.0未満; +, 発病度が10.0以上33.4未満; ++, 発病度が33.4以上66.7未満; +++, 発病度が66.7以上

(表12の続き)

供試菌株	ラッキョウ			ニンニク			ユリ	チュー リップ	グラジ オラス
	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	浸根 接種	土壌 接種	灌注 接種	土壌 接種	土壌 接種	土壌 接種
Fs219	-	-	-	-	+	-	-	-	-
840424a-1	-	-	±	-	±	-	-	-	-
無接種	-	-	-	-	-	-	-	-	-

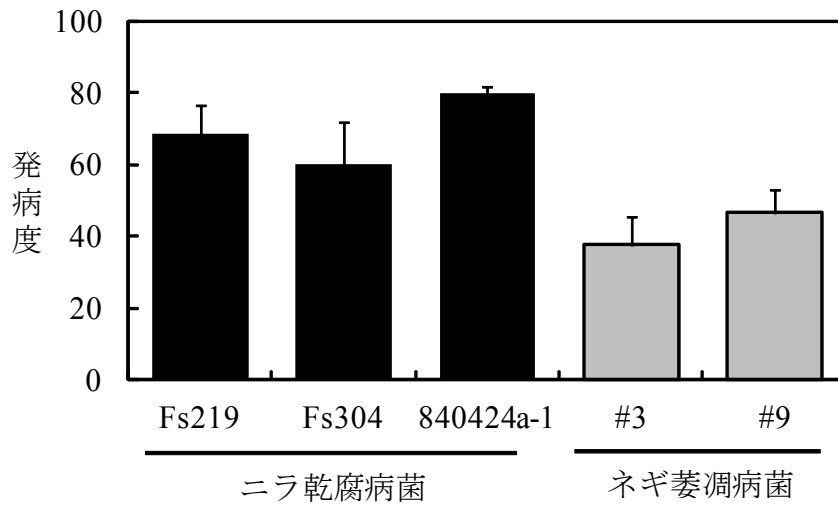


図 6-1 ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) のニラに対する病原性 (簡易診断法)

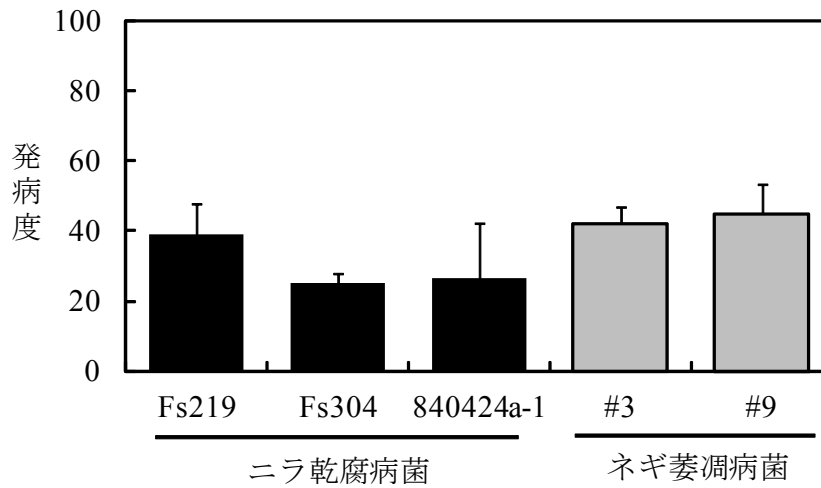


図 6-2 ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) のネギに対する病原性 (簡易診断法)

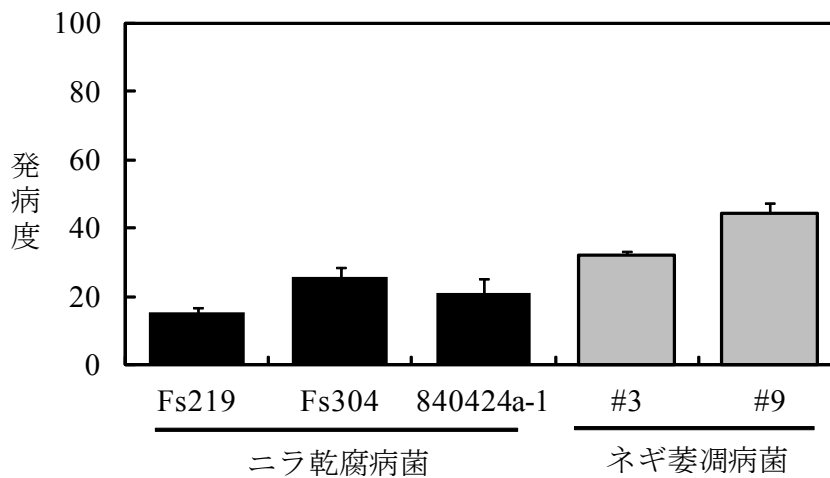


図 6-3 ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) のタマネギに対する病原性 (簡易診断法)

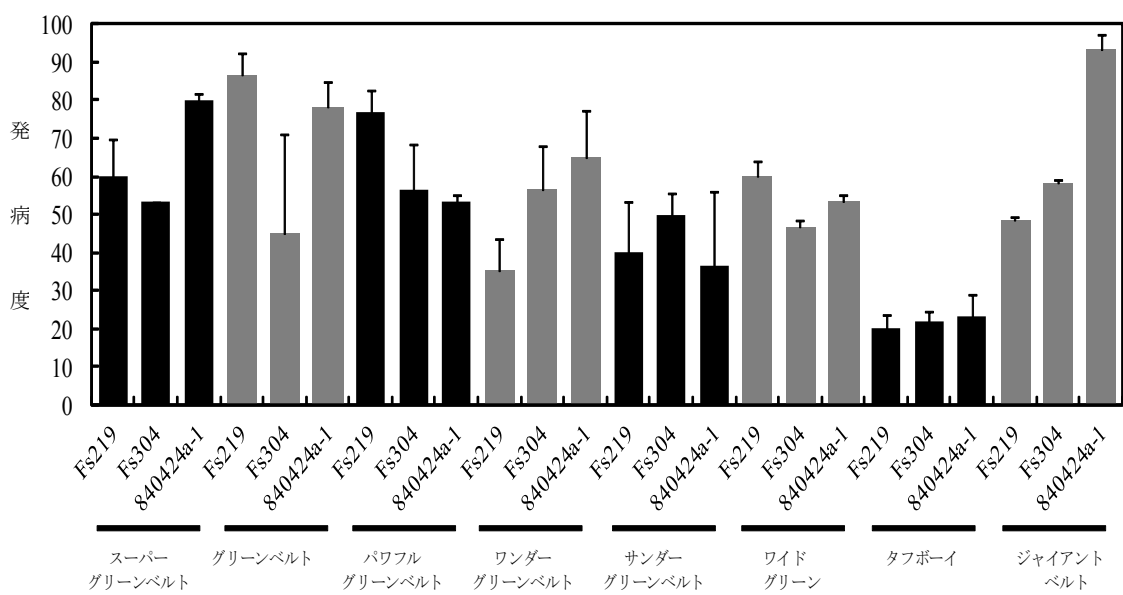


図7 ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) の主要ニラ品種に対する病原性

(注 図中のバーは標準誤差を示す.)

考察

rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づいた分子系統解析を行った結果、高知県のニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) は系統樹中で 3 つのクラスターに分かれたことから、ニラ乾腐病菌には少なくとも 3 つ以上の系統が存在し、遺伝的に多様であることが示された。また、同一圃場から採集したニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) は複数のクラスターに分散したことから、圃場内に 2 系統以上の *F. oxysporum* が混在する可能性があることも明らかとなった。

ヒガンバナ植物、ユリ科植物およびその近縁植物に対して病原性を示す *F. oxysporum* には、ネギ萎凋病菌 (f. sp. *cepaе*)、タマネギ乾腐病菌 (f. sp. *cepaе*)、ラッキョウ乾腐病菌 (f. sp. *allii*)、ニンニク乾腐病菌 (f. sp. *garlic*)、アスパラガス立枯病菌 (f. sp. *asparagi*)、グラジオラス乾腐病菌 (f. sp. *gladioli*)、チューリップ球根腐敗病菌 (f. sp. *tulipae*)、ユリ乾腐病菌 (f. sp. *lilii*) およびスイセン乾腐病 (f. sp. *narcissi*) が報告されている。そのうち、ネギ萎凋病菌の宿主範囲は、ネギ、タマネギに限られ、他の植物 (8 科 25 種) には病原性を示さない (児玉, 1977) とされたが、ニラは試験されていない。また、8 種類の分化型のタマネギに対する病原性試験では、タマネギ乾腐病菌およびネギ萎凋病菌のみが病原性を示した (高桑ら, 1977) と報告されている。一方、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) はニラのほかにネギやタマネギにやや病原性を示すとした (木嶋ら, 1985) が、分化型の同定には至っていない。そこで、ヒガンバナ科植物、ユリ科植物およびその近縁植物、各種野菜類に対するニラ乾腐病の病原性を調査し、宿主範囲を明らかするとともに分化型の同定を試みた。

その結果、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) は、ニラ、ネギ、タマネギに病原性を示し、f. sp. *cepaе* であるネギ萎凋病菌と同様の病原性を示したことから、分化型を f. sp. *cepaе* と同定した。なお、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) およびネギ萎凋病菌 (f. sp. *cepaе*) は、タマネ

ギ乾腐病菌 (*f. sp. cepae*) よりタマネギに対する病原性がやや弱い傾向がみられた。その他の植物では、アスパラガスに弱い病原性を示した。ニラ乾腐病菌の一部の菌株ではラッキョウ、ニンニクにごく弱い病原性を示したが、グラジオラス、チューリップ、ユリ、キュウリ、インゲンマメ、オクラ、キャベツ、レタス、ホウレンソウ、ナス、ピーマン、ニンジンには病原性を示さなかった。一方、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) の rDNA-IGS 領域に基づく系統解析の結果、ニラ乾腐病菌はネギ萎凋病菌およびトマト萎凋病菌 (レース 3) と同じクラスターに含まれたことから、ネギとその近縁植物であるタマネギに対する病原性を詳細に調査するとともに、トマトに対する病原性も調査した。ニラ乾腐病菌をトマトに浸根接種したところ、トマトの導管内から接種菌が分離されたことから、トマトに対して弱い病原性を持つと考えられた。しかし、今回行ったような灌注接種や浸漬接種は、自然状態では発病しない植物を宿主と判定する危険性があるとされる (西村, 2011)。本節で行ったトマトへの接種試験については、ここで記載した以外に複数回試験を行い、同様にトマトの組織内で供試菌株が分離されることを確認しているが、接種方法によっては自然発病より病徴が強く出る可能性が否定できないため、接種条件を考慮する必要があるのかもしれない。

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) の病原性の品種間差異については、各菌株間に一定の傾向はみられなかったが、各菌株とも供試した 8 品種なかで‘タフボーイ’に対する発病度が最も低いことが明らかとなった。

また、高知県内の罹病ニラから分離された *F. oxysporum* と形態の異なる *Fusarium* 属菌について、その種を明らかにするため、形態的特長や生育温度の調査を行った。さらに、真菌類の分類・同定に広く使われる rDNA-ITS 領域、*F. oxysporum* の種内の系統解析に有効

な rDNA-IGS 領域および *Gibberella fujikuroi* 種複合体の同定に有効な EF1 α 領域および histone H3 領域の塩基配列に基づく分子系統解析を行った。その結果、ニラに病原性を示す *Fusarium* 属菌は、*F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg ex Gerlach and Nirenb. var minus Nirenberg であることを初めて明らかにし、*F. proliferatum* をニラ乾腐病の新たな病原として追加報告した (山崎ら, 2012b ; Yamazaki et al., 2013)。

このことにより、ニラ乾腐病の病原菌には *F. oxysporum* f. sp. *cepa*e の他に、*F. proliferatum* が加わり、2 種類の *Fusarium* 属菌が乾腐病に関与することが明らかとなった。

なお、*F. proliferatum* は、ネギに萎凋症状を引き起こすことが報告されている (Dissanayake et al., 2009c ; 伊藤, 2009) 他、タマネギ乾腐病 (Toit et al., 2003)、ツルムラサキ紫斑病 (菅野ら, 2003)、シンビジウム黄斑病 (市川ら, 1996)、トウモロコシ赤かび病 (月星ら, 2011)、アスパラガス立枯病 (Elmer, 1990) などの病原として既に報告されている。そこで、ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) の各種植物に対する病原性を試験した結果、宿主範囲はニラ、ネギ、タマネギ、アスパラガスであり、ニンニクにも弱い病原性を認めた。なお、病原性の強さは、ニラ、ネギ、タマネギおよびアスパラガスのいずれも *F. oxysporum* より *F. proliferatum* がやや強かった。一方、キュウリ、オクラ、ナス、ピーマン、キャベツ、ホウレンソウ、インゲンマメには病原性を示さなかった。ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) の病原性の品種間差異については、各菌株とも供試した 8 品種なかで‘タフボーイ’に対する発病度が最も低かった。

これらのことから、乾腐病の病原である *F. oxysporum* および *F. proliferatum* の両種とも、ニラ、ネギ、タマネギおよびアスパラガスに病原性を有することが明らかとなり、ニラ乾腐病発生圃場には、これら 4 種類の植物を避けることが望ましいと考えられた。

また、ニラ乾腐病菌の主要ニラ品種に対する病原性については、*F. oxysporum* および *F. proliferatum* の両種とも‘タフボーイ’に対して最も弱かったことから、ニラ乾腐病菌に対する抵抗性がみられる品種‘タフボーイ’を選択することにより本病の発生を抑制できる可能性が示唆され、耕種的防除に繋がると考えられた。なお、今回の供試菌株は全て‘スーパーグリーンベルト’から分離された菌株だったが、‘タフボーイ’で発病度が低かった要因とも考えられるので、今後、色々な品種から分離した菌株を用いて病原性検定を行えば、ニラ乾腐病に対する抵抗性の品種間差異がさらに明らかになると思われる。

F. oxysporum や *F. solani* では、特定の植物種に対する宿主特異性に基づいて種内に分化型が決定される。*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* の様に、日本産トマト萎凋病に限り分化型ならびにレースと rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく系統関係に相関がみられるものがある (Kawabe et al., 2005)。一方、*F. oxysporum* f. sp. *cubense* や *F. oxysporum* f. sp. *melonis* などのように分化型内の菌株よりも他分化型の菌株と近縁性を示す菌株が存在するものもある (O'Donnell et al., 1998b ; 須賀, 2005)。ニラ乾腐病菌と同じ *F. oxysporum* f. sp. *cepae* であるネギ萎凋病菌では、複数のクラスターが存在し、あるクラスターには複数の分化型の病原菌が含まれると報告されて (Dissanayake et al., 2009b ; 伊藤, 2009) おり、本節で行ったニラ乾腐病菌の系統解析でも同様の結果が得られた (図 1)。なお、本節で行った系統解析で参考として用いた *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* や *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* についても、同様の結果であった (図 1)。これらのことは、一つの分化型が単系統 (単一祖先を起源とした集団) から成るタイプと、一つの分化型でも多系統から成るタイプがある可能性を示唆している。ニラ乾腐病菌については後者のタイプであると考えられた。

ニラ乾腐病菌の宿主特異性病原性と分子系統学的所属との関係について検討を行った結

果，今回分子系統解析に用いた rDNA-IGS 領域では，一部のクラスターにニラ乾腐病菌と他分化型の菌株が属していたことから，宿主特異性に基づく分類（分化型）と分子系統解析による系統とは必ずしも一致しないことが明らかとなった．また，ニラ乾腐病菌（*F. oxysporum*, *F. proliferatum*）の同一種内の菌株間や，*F. oxysporum* と *F. proliferatum* の菌株間においてニラに対する病徴は同様であったことから，本節で調査した領域とは異なる領域に各クラスターに共通した病原性関連遺伝子が存在する可能性が考えられる．そこで，第3節では，rDNA-IGS 領域に加えて EF1 α 領域および histone H3 領域についても解析するとともに，第4節では交配型遺伝子（*MAT* 遺伝子）を検定し，系統関係をさらに検討した．また，第5節では病原性関連遺伝子（*SIX* 遺伝子）の検定を行った．

第3節 ニラ乾腐病菌の rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域および histone H3 領域 の塩基配列に基づく分子系統

ニラ乾腐病菌については、分子系統学的情報が殆ど存在しない。第2節ではニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum*) の rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づいた系統解析を行ったが、本節では、さらに *F. oxysporum* と *Gibberella fujikuroi* 種複合体の分子系統解析に有効とされる EF1 α 領域, histone H3 領域についても塩基配列に基づく分子系統解析を行い、ニラ乾腐病菌の系統の多様性を検討した。また、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) と同じ分化型であるネギ萎凋病菌, ならびにニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) とネギ萎凋病菌 (*F. proliferatum*) の系統関係についても検討した。さらに、ニラ乾腐病菌とニラに病原性を示さない非病原性 *Fusarium* 属菌 (*F. oxysporum*, *F. proliferatum*) との系統関係についても検討を行い、遺伝子診断の可能性について考察した。

材料と方法

1. 供試菌株

高知県内で採集したニラ乾腐病菌 13 菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* 11 菌株: Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs203, Fs162-1, Fs169-1, Fs306, Fs310, Fs316, および *F. proliferatum* 2 菌株: Fs219, Fs304) と、県内のネギ萎凋病の罹病株から分離し、ニラおよびネギに病原性を確認したネギ萎凋病菌 3 菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*: Fs-N1, Fs-N4, Fs-N8), さらに県内のニラから採集し、ニラに病原性を示さない非病原性 *Fusarium* 属菌 5 菌株 (*F. oxysporum*: nonI1-1, nonI2-1, nonDBW2-1, nonDBW3-1; *F. proliferatum*: nonH1-1) の計 21 菌株を用いた (表 3, 13)。参考として、東京農工大学植物病理学研究室が保有するニラ乾腐

病菌 *F. proliferatum* 1 菌株 (840424a-1), 山口大学および鳥取県から分譲されたネギ萎凋病菌 7 菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* : #1, #15, #41, #60, 01-1-2 ; *F. proliferatum* : #3, #9) および, 比較のために *F. oxysporum* の他分化型であるラッキョウ乾腐病菌 1 菌株 (f. sp. *allii* : 94-7-1-7), アスパラガス立枯病菌 1 菌株 (f. sp. *asparagi* : MAFF 305556), ユリ乾腐病菌 1 菌株 (f. sp. *lilii* : 851209k), チューリップ球根腐敗病菌 1 菌株 (f. sp. *tulipae* : MAFF 235105) およびグラジオラス乾腐病菌 1 菌株 (f. sp. *gladioli* : MAFF 305610) を用いた (表 3). また, *F. verticillioides* (菌株名 : MAFF 240095) も加えた (表 7).

表 13 本研究で供試した非病原性 *Fusarium* 属菌株

供試菌株	分離源	採取場所	分離年
nonI1-1	健全ニラ	四万十町	2011
nonI2-1	健全ニラ	四万十町	2011
nonDBW2-1	罹病ニラ	南国市	2011
nonDBW3-1	罹病ニラ	南国市	2011
nonH1-1	健全ニラ	南国市	2010

2. ゲノムDNAの抽出

供試菌株をPDA平板培地で27.5°C, 7日間, 暗黒下で培養後, 第2節1. 1) (2)と同様に行った.

3. rDNA-IGS領域, EF1 α 領域およびhistone H3領域の増幅

プライマーは, rDNA-IGS領域ではFIGS11 (5'-GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG-3') と FIGS12 (5'-GCAAAATTCAATAGTATGGC-3') (FIGS11, FIGS12ともKawabe *et al.*, 2005) を, EF1 α

領域では EF1 (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') と EF2 (EF2 : 5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT3') (EF1, EF2とも O' Donnell et al., (1998b) および Geiser *et al.* (2004) の FUSARIUM-ID v.1.0 で使用されているプライマー) を, histone H3 領域では H3F1 (5'-TGGCAAGGCCCTCGCAAGC-3') と H3R1GENEBANK (5'-TTGGATTGGATRGTGACACGC-3') (H3F1 は Glass and Donaldson (1995) の補足資料 <http://nrnl.ncaur.usda.gov/research/MGB-O'Donnell.html> で公開されているプライマー, H3R1GENEBANK は 農業生物資源 ジーンバンク http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_approved.php で公開されているプライマー) を用いた (表 4) . rDNA-IGS 領域および EF1 α 領域の PCR 反応は, 第 2 節, 1, 1), (3) と同様に行った. ただし, histone H3 領域の PCR 反応は, PCR 反応溶液の調製を 1 サンプル 50 μ l につき, 鋳型 DNA 50 ng, 2 \times PCR Buffer for KOD Fx Neo 25 μ l, 2mM dNTPs 10 μ l, 20 μ M プライマー 0.75 μ l ずつ, KOD FX Neo 1 μ l (TOYOBO) を用い, 温度条件は 94 $^{\circ}$ C \cdot 2 分間の後, 94 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒間, 62 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒間, 72 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒間を 30 サイクル, 72 $^{\circ}$ C \cdot 7 分間行った. EF1 α 領域については, PCR 産物を Mono Fas $^{\circ}$ DNA 精製キット I (GL Sciences, JPN) で精製した後, TOPO $^{\circ}$ TA Cloning $^{\circ}$ Kit for Sequencing (invitrogen) のプロトコールに従いプラスミド DNA をもつ *Escherichia coli* を得た. さらに, カナマイシン入り LB 寒天培地により選抜して得たプラスミド DNA (カナマイシン耐性遺伝子を含む) をもつ *Escherichia coli* を 35 μ g/ml カナマイシン (Wako) 添加 LB 培地 (1% (w/v) Bacto trypton (Bacton Dickinson and Company) , 0.5% yeast extract (Bacton Dickinson and Company) , 85.6 mM 塩化ナトリウム) に植菌し, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm で 12 時間振とう培養した. GenElute $^{\text{TM}}$ Plasmid Miniprep Kit (SIGMA-ALDRICH) を用いて, プロトコールに従って培養菌体からプラスミド DNA を精製した. なお, 得られた PCR 産物は 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, rDNA-

IGS領域では約600 bpに、EF1 α 領域では約850 bp (EF1 α 領域約670 bp+プラスミド180 bp) に、histone H3領域では約430 bpにバンドを生じることを確認した。

PCR産物の精製，塩基配列の解析および分子系統解析は，第2節，1，1)，（4）および（5）と同様に行った。

結果

1. ニラ乾腐病菌とネギ萎凋病菌の分子系統比較

1) *F. oxysporum*

(1) rDNA-IGS 領域

ニラ病原性菌およびネギ萎凋病菌は，分子系統樹中で4つのクラスター（GA～GD）を形成し，ブートストラップ値はそれぞれ100%，82%，47%および66%であった。そのうち，クラスターGAにニラ乾腐病菌5菌株（Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1）とネギ萎凋病菌3菌株（Fs-N8, #1, #60）が，クラスターGBにニラ乾腐病菌3菌株（Fs203, Fs310, Fs316）とネギ萎凋病菌2菌株（Fs-N1, #15）が含まれ，2つのクラスターに両病原菌が混在した。また，クラスターGCにはニラ乾腐病菌のみの3菌株（Fs162-1, Fs169-1, Fs306）が，クラスターGDにはネギ萎凋病菌のみの3菌株（Fs-N4, #41, 01-1-2）が存在した（図8）。

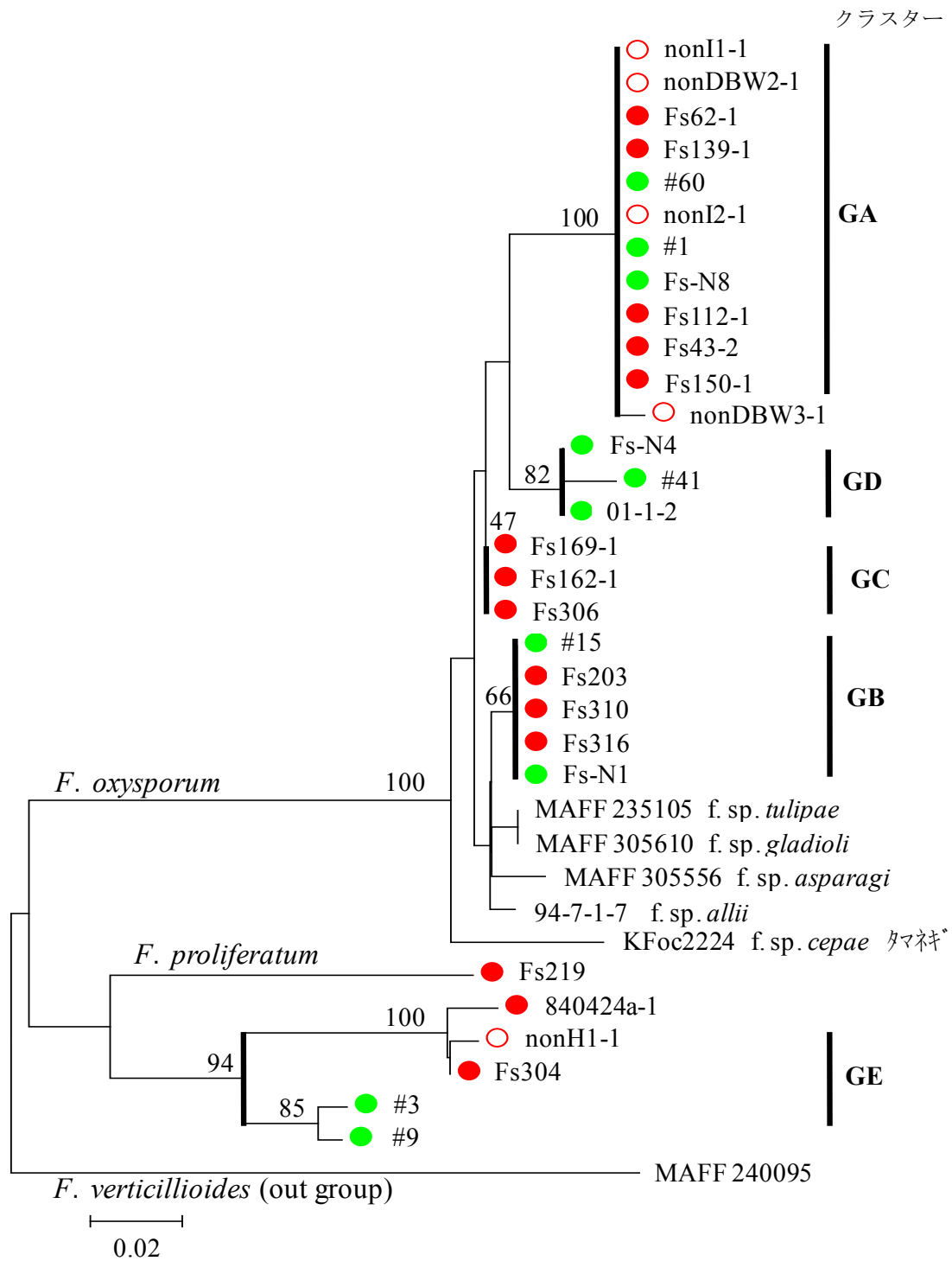


図 8 ニラ乾腐病菌，ネギ萎凋病菌および非病原性菌の rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく系統樹：*F. oxysporum*，*F. proliferatum* (NJ 法，ブートストラップ法：1,000 反復)
 ●，ニラ乾腐病菌；●，ネギ萎凋病菌；○，非病原性菌

(2) EF1 α 領域

ニラ乾腐病菌とネギ萎凋病菌は、分子系統樹中で大きく 2 つのクラスター (EA, EB) を形成し、ブートストラップ値はそれぞれ 65%, 88%であった。そのうち、クラスターEAには、ブートストラップ値 63%で支持されたニラ乾腐病菌 7 菌株 (Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs310, Fs316) とネギ萎凋病菌 2 菌株 (Fs-N1, #15) の他、ニラ乾腐病菌 1 菌株 (Fs203) とネギ萎凋病菌 3 菌株 (Fs-N8, #1, #60) が含まれた。クラスターEBには、ブートストラップ値 93%で支持されたネギ萎凋病菌 3 菌株 (Fs-N4, #41, 01-1-2) の他、ニラ乾腐病菌 3 菌株 (Fs162-1, Fs169-1, Fs306) が含まれた。2 つのクラスターとも同一クラスター内に両病原菌が混在した (図 9)。

(3) histone H3 領域

ニラ乾腐病菌とネギ萎凋病菌は、分子系統樹中で大きく 3 つのクラスター (HA~HD) を形成し、ブートストラップ値はそれぞれ 63%, 59%および 72%であった。そのうち、クラスターHAには、ブートストラップ値 94%で支持されたニラ乾腐病菌 2 菌株 (Fs310, Fs316) の他、ニラ乾腐病 5 菌株 (Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1) およびネギ萎凋病菌 5 菌株 (Fs-N1, Fs-N8, #1, #60, #15) が含まれており、同一クラスター内に両病原菌が混在した。ニラ乾腐病菌 1 菌株 (Fs203) は離れて位置した。クラスターHBには、ニラ乾腐病菌のみの 3 菌株 (Fs162-1, Fs169-1, Fs306) が位置した。クラスターHCには、ネギ萎凋病菌のみの 3 菌株 (Fs-N4, #41, 01-1-2) が位置した (図 10)。

(4) rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域, histone H3 領域の結合塩基配列に基づいた系統解析

ニラ病原性菌およびネギ萎凋病菌で 4 つのクラスター (CA~CD) を形成し、ブートストラップ値はそれぞれ 99%, 92%, 97%および 100%であった。そのうち、クラスターCA

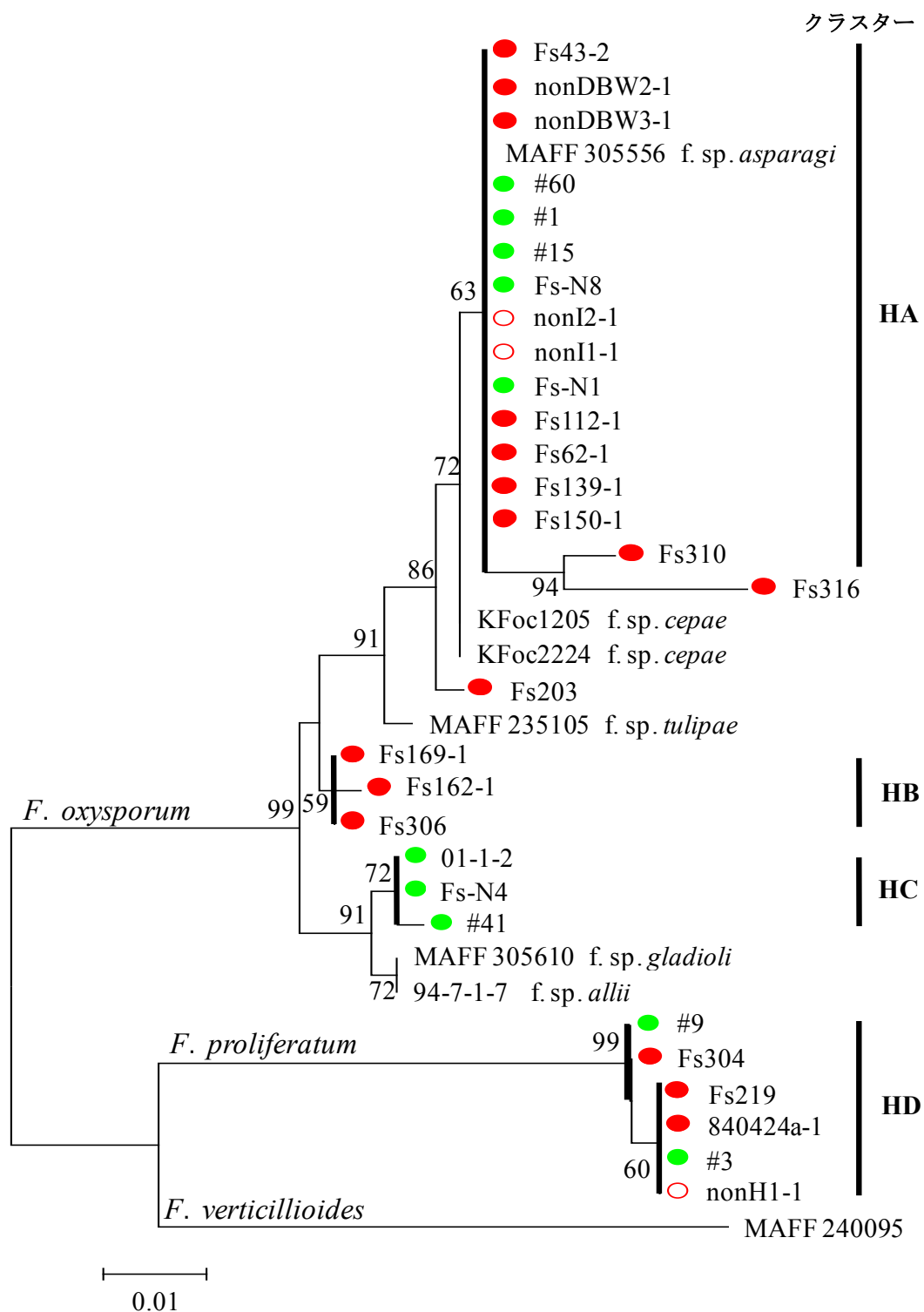


図 10 ニラ乾腐病菌，ネギ萎凋病菌および非病原性菌の histone H3 領域の塩基配列に基づく系統樹：*F. oxysporum*，*F. proliferatum* (NJ 法，ブートストラップ法：1,000 反復)
 ●，ニラ乾腐病菌：●，ネギ萎凋病菌：○，非病原性菌

にはニラ乾腐病菌 (Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1) とネギ萎凋病菌 3 菌株 (Fs-N8, #1, #60) が, クラスタ- CB にはニラ乾腐病菌 2 菌株 (Fs310, Fs316) とネギ萎凋病菌 2 菌株 (Fs-N1, #15) が含まれ, 2 つのクラスタ- に両病原菌が混在した. また, クラスタ- CC にはニラ乾腐病菌のみの 3 菌株 (Fs162-1, Fs169-1, Fs306) が, クラスタ- CD にはネギ萎凋病菌のみの 3 菌株 (Fs-N4, #41, 01-1-2) が存在した (図 11).

2) *F. proliferatum*

(1) rDNA-IGS 領域

クラスタ- GE には, ニラ乾腐病菌 2 菌株 (Fs304, 840424a-1) とネギ萎凋病菌 2 菌株 (#3, #9) の両病原菌が存在し, ブートストラップ値は 94%であった. ニラ乾腐病菌である Fs219 は, 他の供試菌株からやや離れて位置した (図 8).

(2) EF1 α 領域

クラスタ- EC には, ニラ乾腐病菌 3 菌株 (Fs219, Fs304, 840424a-1) とネギ萎凋病菌 2 菌株 (#3, #9) の両病原菌が含まれ, ブートストラップ値は 99%であった (図 9).

(3) histone H3 領域

クラスタ- HD には, ブートストラップ値 60%で支持されたニラ乾腐病菌 2 菌株 (Fs219, 840424a-1) とネギ萎凋病菌 1 菌株 (#3) の他, ニラ乾腐病菌 1 菌株 (Fs304) とネギ萎凋病菌 1 菌株 (#9) が含まれ, 両病原菌が混在した. ブートストラップ値は 99%であった (図 10).

(4) rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域, histone H3 領域の結合塩基配列に基づいた系統解析

クラスタ- GE には, ブートストラップ値 100%で支持されたニラ乾腐病菌 2 菌株 (Fs304, 840424a-1) とブートストラップ値 81%で支持されたネギ萎凋病菌 2 菌株 (#3, #9) が存在

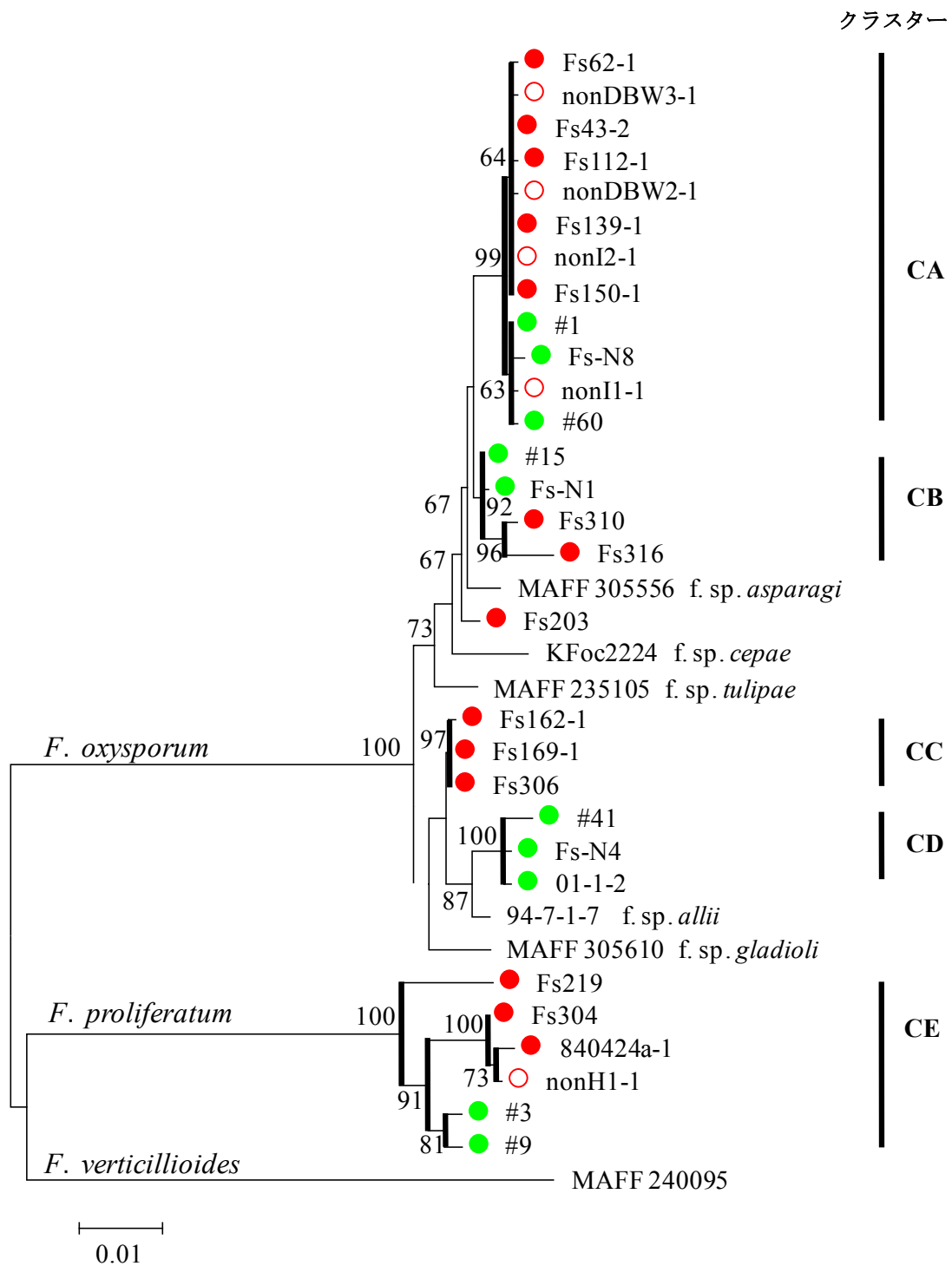


図 11 ニラ乾腐病菌，ネギ萎凋病菌および非病原性菌の rDNA-IGS 領域，EF1 α 領域，histone H3 領域の結合塩基配列に基づく系統樹

： *F. oxysporum*， *F. proliferatum*

(NJ 法，ブートストラップ法：1,000 反復)

●， ニラ乾腐病菌： ●， ネギ萎凋病菌： ○， 非病原性菌

し、ブートストラップ値は 91%であった。ニラ乾腐病菌である Fs219 は他の供試菌株からやや離れて位置した。(図 11)。

2. ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌 (NPF) の分子系統比較

1) *F. oxysporum*

(1) rDNA-IGS 領域

ブートストラップ値は 100%で支持されたクラスターGAに、ニラ乾腐病菌 5 菌株 (Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1) と非病原性 *F. oxysporum* 4 菌株 (nonI1-1, nonI2-1 : 四万十町, ニラから分離 ; nonDBW2-1, nonDBW3-1 : 南国市, ニラから分離) が含まれ, 病原性菌と非病原性菌の両方が混在した (図 8)。

(2) EF1 α 領域

ブートストラップ値 65%で支持されたクラスターEAに、ニラ乾腐病菌 7 菌株 (Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs310, Fs316) と非病原性 *F. oxysporum* 3 菌株 (nonI2-1, nonDBW2-1, nonDBW3-1) の他, ニラ乾腐病 1 菌株 (Fs203) と非病原性 *F. oxysporum* 1 菌株 (nonI1-1) が含まれ, 病原性菌と非病原性菌の両方が混在した (図 9)。

(3) histone H3 領域

ブートストラップ値は 63%で支持されたクラスターHAに、ニラ乾腐病菌 5 菌株 (Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1) と非病原性 *F. oxysporum* 4 菌株 (nonI1-1, nonI1-2, nonDBW2-1, nonDBW3-1) が含まれ, 病原性菌と非病原性菌の両方が混在した (図 10)。

(4) rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域, histone H3 領域の結合塩基配列に基づいた系統解析

ブートストラップ値は 99%で支持されたクラスターCAに、ニラ乾腐病菌 5 菌株 (Fs43-2,

Fs62-1 , Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1) と非病原性 *F. oxysporum* 4 菌株 (nonI1-1, nonI2-1, nonDBW2-1, nonDBW3-1) が含まれ, 病原性菌と非病原性菌の両方が混在した (図 11).

2) *F. proliferatum*

(1) rDNA-IGS 領域

ブートストラップ値は 94%で支持されたクラスターGE には, ニラ乾腐病菌 (Fs304, 840424a-1) と非病原性 *F. proliferatum* 1 菌株 (nonH1-1 : 南国市, ニラから分離) が含まれ, 病原性菌と非病原性菌の両方が混在した (図 8).

(2) EF1 α 領域

ブートストラップ値は66%で支持されたクラスターEC には, ニラ乾腐病菌3 菌株 (Fs219, Fs304, 840424a-1) と非病原性 *F. proliferatum* 1 菌株 (nonH1-1) が含まれ, 病原性菌と非病原性菌の両方が混在した (図 9).

(3) histone H3 領域

ブートストラップ値は99%で支持されたクラスターHD には, ニラ乾腐病菌3 菌株 (Fs219, Fs304, 840424a-1) と非病原性 *F. proliferatum* 1 菌株 (nonH1-1) が含まれ, 病原性菌と非病原性菌の両方が混在した (図 10).

(4) rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域, histone H3 領域の結合塩基配列に基づいた系統解析

ブートストラップ値は 91%で支持されたクラスターCE には, ニラ乾腐病菌 (Fs304, 840424a-1) と非病原性 *F. proliferatum*1 菌株 (nonH1-1) が含まれ, 病原性菌と非病原性菌の両方が混在した (図 11).

考察

ニラ乾腐病菌と近縁と考えられるネギ萎凋病菌との系統関係について明らかにするため、rDNA-IGS 領域、EF1 α 領域および histone H3 領域の塩基配列に基づく分子系統解析を行った。その結果、rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づいた系統樹中で、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) とネギ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) は4つのクラスターに分かれ、そのうち2つのクラスターにはニラ乾腐病菌とネギ萎凋病菌の両方が含まれた。なお、EF1 α 領域および histone H3 領域ならびに3領域の結合塩基配列に基づく系統樹でも同様であった。このことから、両病原菌は分子系統学的に近縁であると考えられた。一方、その他の2のクラスターには、それぞれニラ乾腐病菌またはネギ萎凋病菌が単独に含まれた。これらの各系統には、第4節の交配型遺伝子 (*MAT* 遺伝子) で行った検定によって単一の交配型菌株しかみられなかったことから、これらの系統は無性生殖を繰り返すことによって独立して進化した可能性も示唆された。

また、rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づいた系統樹中で、ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) とネギ萎凋病菌 (*F. proliferatum*) は同一のクラスターに含まれたことから、両病原菌は分子系統学的に近縁であると考えられた。なお、EF1 α 領域および histone H3 領域の塩基配列に基づく系統解析について調査したところ、両病原菌は同一のクラスターに含まれた。

これらの結果から、ニラ乾腐病菌とネギ萎凋病菌は分子系統学的に近縁であると考えられた。ただし、一部の菌株では、それぞれの病原菌が独立したクラスターを形成するケースもあった。これらの各系統内には、次節で行った検定の結果、単一の交配型菌株しかみられないことから、これらの系統は無性生殖を繰り返すことにより独立して進化した可能性も示唆された。いずれにせよニラ乾腐病菌は単系統由来ではないことが示唆された。

また、本節では、ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌との系統関係について明らかにするため、rDNA-IGS 領域、EF1 α 領域および histone H3 領域の塩基配列に基づく分子系統解析を行った。rDNA-IGS 領域、EF1 α 領域、histone H3 領域の塩基配列ならびに 3 領域の結合塩基配列に基づく系統樹を作成した結果、いずれもニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) と非病原性 *F. oxysporum* は同一のクラスターCA に混在し、ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) と非病原性 *F. proliferatum* も同一のクラスターCE に混在した。これらの結果から、ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌は分子系統学的に近縁であり、本節で用いた 3 領域での識別は難しいと考えられた。そのため、ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌を識別するためには、病原性関連遺伝子の特定などについて更なる検討が必要であると考えられた。

そこで、第 4 節では、ニラ乾腐病菌の各菌株間、系統樹中の各クラスター間、ネギ萎凋病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の各菌株間の交配の可能性を検討するため交配型遺伝子 (*MAT* 遺伝子) の検定を行った。第 5 節では、ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の遺伝子診断による識別の可能性について検討するため、病原性関連遺伝子 (*SIX* 遺伝子) の検定を行った。

第4節 交配関連遺伝子（MAT 遺伝子）の検定

F. oxysporum は、有性生殖が未知の種であり、交配不全性子のう菌であるが、近縁の *F. moniliformae* (*Gibberella fujikuroi* 種複合体) と同様に2種類の交配型の菌株が存在すること、交配型遺伝子座 (MAT1) の2型 (MAT1-1; MAT1-2) の対立遺伝子領域には交配型遺伝子 (MAT1-1-1; MAT1-1-2; MAT1-1-3; MAT1-2-1) が座乗していること、各遺伝子座内の遺伝子が発現することが明らかにされている (Arie *et al.*, 1999, 2000; Yun *et al.*, 2000). また、MAT1-1-1 上の DNA 結合ドメイン α -box, MAT1-2-1 上の DNA 結合ドメイン HMG-box の部分断片 (280 bp, 220 bp) を特異的に増幅するプライマーセット Gfmat1a / Gfmat1b および GfHMG1 / GfHMG2 を用いた PCR による交配型の簡易検定法も確立されている (Kawabe *et al.*, 2005). 本節ではこれらプライマーセットを用いた PCR によって、ニラ乾腐病菌の交配関連遺伝子の検定を行った。また、ニラ乾腐病菌とネギ萎凋病菌や、ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の遺伝的交流の可能性を明らかにするため、ネギ萎凋病菌や非病原性 *Fusarium* 属菌についても交配関連遺伝子の検定を行った。

材料と方法

1. 供試菌株

高知県内で分離されたニラ乾腐病菌17菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* 15菌株: Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs203, Fs162-1, Fs169-1, Fs301, Fs302, Fs306, Fs310, Fs311, Fs315, Fs316, *F. proliferatum* 2菌株: Fs219, Fs304) を用いた。また、東京農工大学植物病理学研究室が保有するニラ乾腐病菌1菌株 (*F. proliferatum*: 840424a-1) も用いた。高知県内で分離されたネギ萎凋病菌4菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*: Fs-N1, Fs-N4, Fs-N8, #60) と、他

県で分離されたネギ萎凋病菌6菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepa*e 4 菌株 #1, #15, #41, 01-1-2 ; *F. proliferatum* 2 菌株 : #3, #9) , 高知県のニラから分離したニラに病原性を示さない非病原性 *Fusarium* 属菌5菌株 (*F. oxysporum* 4菌株 : nonI1-1, nonI2-1, nonDBW2-1, nonDBW3-1 ; *F. proliferatum* 1 菌株 : nonH1-1) も用いた (表3, 13) . 参考として, *F. oxysporum* の他分化型であるラッキョウ乾腐病菌1 菌株 (f. sp. *allii* : 94-7-1-7) , アスパラガス立枯病菌1 菌株 (f. sp. *asparagi* : MAFF 305556) , ユリ乾腐病菌1 菌株 (f. sp. *lilii* : 851209k) , チューリップ球根腐敗病菌1 菌株 (f. sp. *tulipae* : MAFF 235105) , グラジオラス乾腐病菌1 菌株 (f. sp. *gladioli* : MAFF 305610) を用いた (表 3) . なお, ポジティブコントロールとして, 稲見 (2011) により既に交配型が報告されているME-44s菌株 (交配型 : *MAT1-1* ; 非病原性*F. oxysporum*, メキシコ, 土壌から分離) , Chz1-A菌株 (交配型 : *MAT1-2* ; トマト萎凋病菌レース 3, f. sp. *lycopersici* race 3, 日本, トマトから分離) を用いた (表5, 6) .

2. ゲノムDNAの抽出

供試菌株をPDA平板培地で27.5°C, 7 日間, 暗黒下で培養後, 第2節, 1, 1) , (2) と同様に行った.

3. 交配関連遺伝子 (*MAT*遺伝子) の検定

Kawabe *et al.* (2005) に準じて, *MAT1-1* の検出用および*MAT1-2* の検出用のプライマーを用いた (表 4) . PCR反応溶液の調製には, 1サンプル50 μ lにつき, 鋳型DNA 50 ng, 10 \times Ex-Taq Buffer 5 μ l, dNTP Mixture 4 μ l, 20 μ Mプライマー 1 μ lずつ, TaKaRa Ex-Taq[®] polymerase 0.25 μ l (タカラバイオ) を用いた. PCR反応は, TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (タカラバ

イオ) を用いて, 94°C・2 分間後, 94°C・30 秒間, 58°C・30 秒間, 72°C・30 秒間を35 サイクル, 72°C・6 分間とした. 得られたPCR産物を, 1.2%アガロースゲルにより電気泳動後, エチジウムブロマイド染色によって, 254 nmの紫外線下で観察した. 約280 bpにバンドを生じた菌株を*MATI-1*, 約220 bpにバンドを生じた菌株を*MATI-2*と判断した.

結果

1. *F. oxysporum*

ニラ乾腐病菌 (*F.oxysporum* f. sp. *cepae*) の交配型を検定したところ, 15 菌株には *MATI-1* または *MATI-2* の2種類の交配型が存在することが明らかとなった(表 14). なお, rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域, histone H3 領域の結合塩基配列に基づく系統樹をクラスター毎にみると, クラスターCA では5 菌株中, 3 菌株 (Fs43-2, Fs139-1, Fs150-1) の交配型は *MATI-1*, 2 菌株 (Fs62-1, Fs112-1) は *MATI-2* であり, 2 種類の交配型が存在した. クラスターCB では2 菌株 (Fs310, Fs316) は *MATI-2* であり, クラスターCB の交配型は1 種類であった. 一方, ニラ乾腐病菌のみが含まれるクラスターCC では, 3 菌株 (Fs162-1, Fs169-1, Fs306) とも *MATI-1* であり, 交配型は1 種類であった. 供試菌株のうち, 須崎市の同一圃場から採集した3 菌株 (Fs301, Fs302, Fs306) の交配型は, Fs301 と Fs302 が *MATI-2*, Fs306 が *MATI-1* であり, 同一圃場内に2 種類の交配型が存在した (図 12).

同じ分化型 (f. sp. *cepae*) であるネギ萎凋病菌では, 供試した8 菌株に *MATI-1* または *MATI-2* の2種類の交配型が存在することが明らかとなった(表 14). rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域, histone H3 領域の結合塩基配列に基づく系統樹のクラスター毎にみると, クラスターCA では, 交配型はFs-N8 が *MATI-1*, #1, #60 が *MATI-2* であり, クラスターCB では,

表 14 ニラ乾腐病菌の交配型と病原性関連遺伝子

菌の種類	供試菌株	交配型	病原性関連遺伝子 ^{z)}						
			SIX1	SIX2	SIX3	SIX4	SIX5	SIX6	SIX7
ニラ乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	Fs43-2	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs62-1	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	Fs112-1	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	Fs139-1	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs150-1	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs203	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs162-1	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs169-1	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs301	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	Fs302	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	Fs306	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs310	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	Fs311	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs315	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	Fs316	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
ネギ萎凋病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	Fs-N1	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs-N4	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	Fs-N8	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	#1	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	#15	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	#41	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	#60	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	01-1-2	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
非病原性 <i>F. oxysporum</i>	non11-1	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	non12-1	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	nonDBW2-1	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	nonDBW3-1	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
ニラ乾腐病菌 <i>F. proliferatum</i>	Fs219	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
	Fs304	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	840424a-1	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
ネギ萎凋病菌 <i>F. proliferatum</i>	#3	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
	#9	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
非病原性 <i>F. proliferatum</i>	nonH1-1	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
(参考)									
ラッキョウ乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>allii</i>	94-7-1-7	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
アスパラガス立枯病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>asparagi</i>	MAFF 305556	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-
ユリ乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lilli</i>	851209k	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
チューリップ球根腐敗病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>tulipae</i>	MAFF 235105	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	+
グラジオラス乾腐病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i>	MAFF 305610	MAT1-2	-	-	-	-	-	-	-
(対照菌株)									
トマト萎縮凋病病菌レース 3 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> race 3	Chz1-A	MAT1-2	+	+	+	-	+	+	+
トマト萎凋病病菌レース 1 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> race 1	FOLR1	MAT1-1	+	+	+	+	+	+	+
非病原性菌 <i>F. oxysporum</i>	ME-44s	MAT1-1	-	-	-	-	-	-	-

z) 病原性関連遺伝子: +, 有り; -, 無し

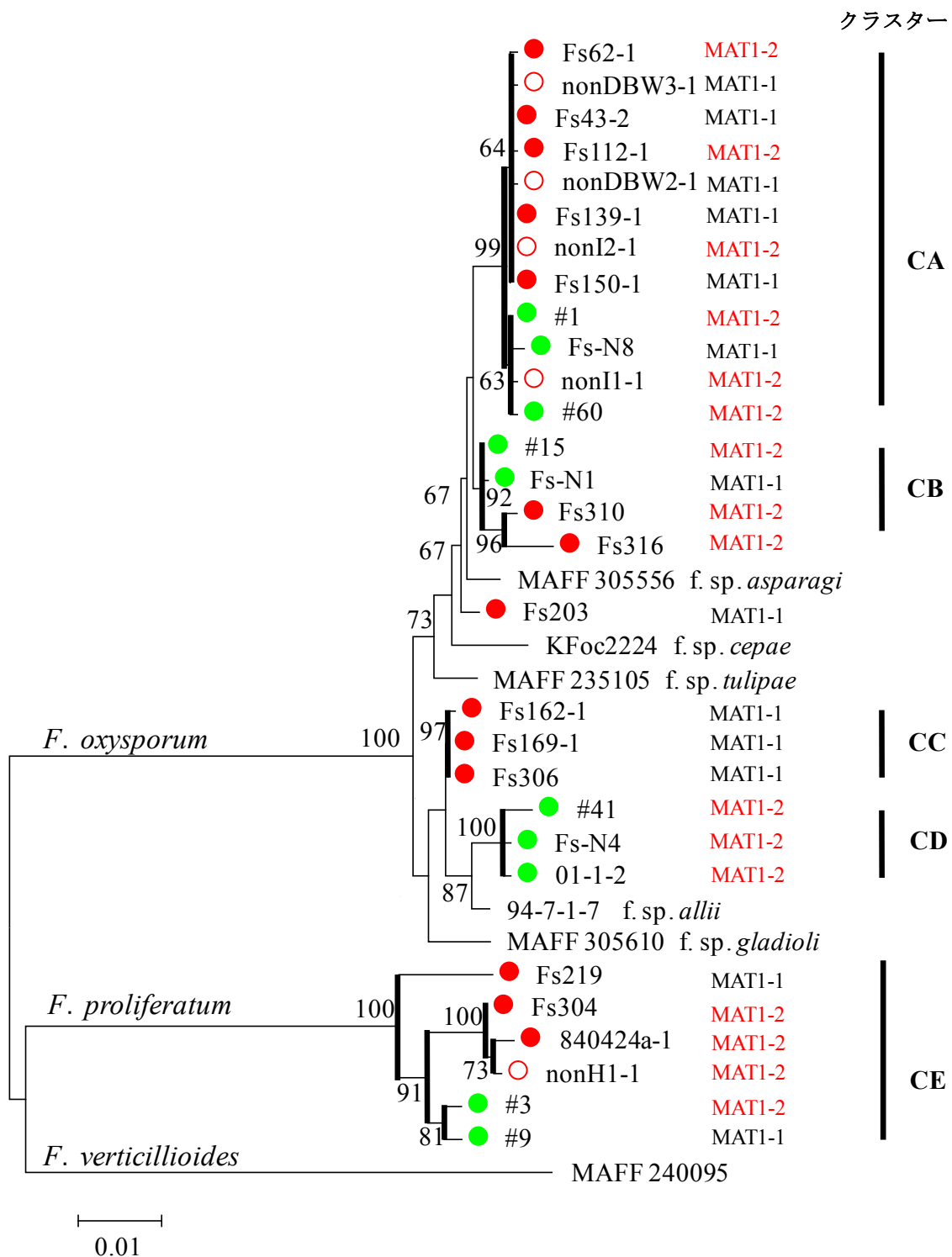


図 12 ニラ乾腐病菌，ネギ萎凋病菌および非病原性菌の rDNA-IGS 領域，EF1 α 領域，histone H3 領域の結合塩基配列に基づく系統関係と交配型 : *F. oxysporum*, *F. proliferatum* (NJ 法，ブートストラップ法 : 1,000 反復) ●，ニラ乾腐病菌 : ●，ネギ萎凋病菌 : ○，非病原性菌

#15 が *MATI-2*, Fs-N1 が *MATI-1* であった. ネギ萎凋病菌のみが含まれるクラスターCD では 3 菌株 (#41, Fs-N4, 01-1-2) とも *MATI-2* であった (図 12).

非病原性 *F. oxysporum* については, 4 菌株中 2 菌株 (nonDBW2-1, nonDBW3-1) が *MATI-1*, 2 菌株 (nonI1-1, nonI2-1) が *MATI-2* であり, 2 種類の交配型が存在した (表 14). なお, rDNA-IGS 領域, EF1 α 領域, histone H3 領域の結合塩基配列に基づく系統樹のクラスター毎にみても, クラスターGA に含まれた非病原性 *F. oxysporum* 4 菌株には, *MATI-1* または *MATI-2* の 2 種類の交配型が存在した (図 12).

2. *F. proliferatum*

ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) の交配型を検定した結果, 3 菌株 (Fs219, Fs304, 840424a-1) には *MATI-1* または *MATI-2* の 2 種類の交配型が存在することが明らかとなった. ネギ萎凋病菌の 2 菌株 (#3, #9) は, それぞれ *MATI-1* または *MATI-2* であり, 2 種類の交配型が存在した (表 14).

非病原性 *F. proliferatum* については, 5 菌株中, 4 菌株 (nonT2-1, nonT4-1, nonN1-1, nonN4-1) が *MATI-1*, 1 菌株 (nonH1-1) が *MATI-2* であり, 2 種類の交配型が存在した (表 14).

考察

ニラ乾腐病菌の交配型を検定したところ, ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*), ネギ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) および非病原性 *F. oxysporum* には, それぞれ *MATI-1* または *MATI-2* の両方の交配型が存在した.

rDNA-IGS 領域に基づく系統樹中のクラスターCA と CB には, ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) とネギ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) の両方が含まれ, それぞれに *MAT1-1* または *MAT1-2* の 2 種類の交配型が存在した. これらのことから, ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) とネギ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) は互いに遺伝的な交流があり, 遺伝的性質が同じである可能性が高いと考えられた. なお, 高知県ではニラとネギの栽培圃場が混在する地域が複数あるため, これらの地域ではニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) とネギ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) の菌株間で遺伝的に交流する素地がある.

一方, ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) 単独から成るクラスターCC には, *MAT1-1* の 1 種類の交配型しか存在せず, ネギ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) 単独から成るクラスターCD には, *MAT1-2* の 1 種類の交配型しか存在しなかった. また, 第 2 節の結果では, クラスターCC に属する菌株 (Fs162-1, Fs169-1, Fs306) は他の菌株と比べてニラに対する病原性がやや高く, ネギ萎凋病菌のクラスターCD に含まれた菌株はネギに対して高い傾向を示した. これらのことから, クラスターCC および CD の系統は, 無性生殖を繰り返すことによって独立系統として進化した可能性が考えられる.

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) やネギ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) の存在する生産圃場では, 単一宿主植物 (ニラまたはネギ) の栽培の繰り返えしによって, ニラ栽培圃場ではニラに強い病原性を示す菌株が, ネギ栽培圃場ではネギに強い病原性を示す菌株が, それぞれ優先して存在するケースが生じているのではないかと考えられた.

非病原性 *F. oxysporum* については, ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) が含まれた同一のクラスターCA に属する菌株があり, かつ交配型は *MAT1-1* と *MAT1-2* の 2 種類が存在したことから, 非病原性菌 *F. oxysporum* とニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) は圃

場内で交配して、より多様な系統が生み出される可能性が示唆された。

ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*)、ネギ萎凋病菌 (*F. proliferatum*) および非病原性 *F. proliferatum* についても、それぞれに *MATI-1* または *MATI-2* の両方の交配型が存在したことから、ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*)、ネギ萎凋病菌 (*F. proliferatum*) および非病原性菌 *F. proliferatum* についても、それぞれが互いに交配している可能性があると考えられた。

第5節 病原性関連遺伝子（*SIX* 遺伝子）の検定

第2節, 1, 1) で作成した r-DNA IGS 領域の塩基配列に基づく系統樹中で, ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) の一部の菌株は, トマト萎凋病菌レース3 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3) と同じクラスターに含まれた。そのため, ニラ乾腐病菌がトマト萎凋病菌レース3と同様にトマト萎凋病菌で報告されている病原性決定因子 (*Six*) をコードする遺伝子 (*SIX* 遺伝子) を保持することを期待した。また, 仮にニラ乾腐病が *SIX* 遺伝子していた場合は, ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の識別が可能となると考えた。そこで, ニラ乾腐病菌が *SIX1*~7 遺伝子を保持するか否かを調査した。さらに, ニラ乾腐病菌と同じ分化型であるネギ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) についても, *SIX1*~7 遺伝子を保持するか否かを調査した。

また, ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) についても, ニラに対する病徴がニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) と同様であることから, 共通の病原性関連遺伝子保持することを想定して *SIX1*~7 遺伝子の検定を行った。

材料と方法

1. 供試菌株

県内で分離されたニラ乾腐病菌17菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* 15 菌株 : Fs43-2, Fs62-1, Fs112-1, Fs139-1, Fs150-1, Fs203, Fs162-1, Fs169-1, Fs301, Fs302, Fs306, Fs310, Fs311, Fs315, Fs316, *F. proliferatum* 2 菌株 : Fs219, Fs304) を用いた。また, 東京農工大学植物病理学研究室が保有するニラ乾腐病菌1 菌株 (*F. proliferatum* : 840424a-1) も用いた。高知県のニラから分離したニラに病原性を示さない非病原性 *Fusarium* 属菌5 菌株 (*F. oxysporum* : non11-1,

nonI2-1, nonDBW2-1, nonDBW3-1 ; *F. proliferatum* : nonH1-1) と, ネギ萎凋病菌10 菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* 8 菌株 : Fs-N1, Fs-N4, Fs-N8, #1, #15, #41, #60, 01-1-2 ; *F. proliferatum* 2 菌株 : #3, #9) も用いた (表 3, 13) . また, r-DNA IGS領域の塩基配列に基づく系統樹中でニラ乾腐病菌*F. oxysporum* f. sp. *cepae*の一部の菌株と同じクラスターに含まれ, *SIX1*~3および5~7を持つとされるトマト萎凋病菌レース3 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 (Chz1-A) も用いた (表5) . その他, 参考として, *F. oxysporum*の他分化型であるラッキョウ乾腐病菌1 菌株 (f. sp. *allii* : 94-7-1-7) , アスパラガス立枯病菌1 菌株 (f. sp. *asparagi* : MAFF 305556) , ユリ乾腐病菌1 菌株 (f. sp. *lilii* : 851209k) , チューリップ球根腐敗病菌1 菌株 (f. sp. *tulipae* : MAFF 235105) , グラジオラス乾腐病菌1 菌株 (f. sp. *gladioli* : MAFF 305610) および非病原性*F. oxysporum* (ME-44s) を用いた (表 3, 6) . なお, ポジティブコントロールとして, 対象とする遺伝子 (*SIX1*~7) を全て保有するFOLR1菌株 (トマト萎凋病菌レース1, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1, 日本, トマトから分離) を用いた.

2. ゲノムDNAの抽出

供試菌株をPDA平板培地で27.5°C, 7 日間, 暗黒下で培養後, 第2節, 1, 1) , (2) と同様に行った.

3. 病原性関連遺伝子 (*SIX* 遺伝子) の検出

病原性関連遺伝子 (*SIX1*~7) の特異プライマーセットを用いた (表 4) . PCR反応溶液の調製は, *SIX 1, 4, 5* では, 1サンプル25 μ l につき, 鋳型DNA 25 ng, 10 \times Ex-Taq Buffer 2.5 μ l, dNTP Mixture 2 μ l, 20 pMプライマー 0.5 μ lずつ, TaKaRa Ex-Taq®polymerase 0.125 μ l (タカ

ラバイオ) とした. *SIX*2, 3, 6, 7 では, 1サンプル20 µlにつき, 鋳型DNA 20 ng, 20 pMプライマー 0.4 µlずつ, GoTaq® Master Mix (Promega, WI) 10 µlを用いた. PCR反応は, TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ) を用いた. PCRの温度条件は, *SIX*1~4 は 94°C・2分間の後, 94°C・30秒間, 55°C・30秒間, 72°C・30秒間を32サイクル, 72°C・7分間とし, *SIX*5~7 は, 94°C・5分間の後, 94°C・30秒間, 54°C・30秒間, 72°C・1分間を30サイクル, 72°C・7分間とした. 得られたPCR産物は, 1.2%アガロースゲルを用いて電気泳動後, エチジウムブロマイド染色によって, 254 nmの紫外線下で観察し, 目的とするバンドが出現した菌株を, それぞれの*SIX*遺伝子を保持する菌株とした.

結果

1. *F. oxysporum*

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) の病原性関連遺伝子 (*SIX*1~7) の検定をしたところ, 全ての供試菌株は *SIX*1~7 遺伝子を保持していなかった. また, ネギ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*), 非病原性 *F. oxysporum* の全ての菌株も, *SIX*1~7 遺伝子を保持していなかった. なお, 参考として用いたトマト萎凋病菌レース3 (Chz1-A) は, *SIX*1~3 および 5~7 遺伝子を, ポジティブコントロールのトマト萎凋病菌レース1 (FOLR1) は, *SIX*1~7 遺伝子を保持していた (表 14).

2. *F. proliferatum*

ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) の病原性関連遺伝子 (*SIX*1~7) の検定をしたところ, 全ての供試菌株は *SIX*1~7 遺伝子を保持していなかった. また, ネギ萎凋病菌 (*F. proliferatum*),

非病原性 *F. proliferatum* 全ての菌株も、*SIX1*~7 遺伝子を保持していなかった (表 14).

考察

Rep (2004, 2005) および Houterman (2007, 2008) は、トマト萎凋病菌に感染したトマト道管液のプロテオーム解析によって、感染過程で道管内中に分泌される低分子タンパク質 (secreted in xylem, SIX) が病原性に関係することを見出した。また、Van Der Does (2008) は、病原性決定因子 (Six1) をコードする遺伝子 (*SIX1*) を含む 8 kb 以上のゲノム領域がトマト萎凋病菌 (f. sp. *lycopersici*) の菌株に保持されており、各菌株の系統樹中の位置や VCG に依らないことを明らかにした。また、トマト根腐萎凋病菌 (f. sp. *radicis-lycopersici*) を含む他分化型や非病原性菌株 (系統樹上ではトマト萎凋病菌と非常に近縁な株も含む) はこの遺伝子領域を保持しないことを明らかにした (Lievens *et al.*, 2009)。その後の研究により、*SIX1*~3 および 5~7 は f. sp. *lycopersici* の全レースが、*SIX4* は f. sp. *lycopersici* のレース 1 と高知産レース 3 (ただし、トランスポゾン挿入によって変異している) および f. sp. *conglutinans* が、*SIX6* は f. sp. *melonis*, f. sp. *radicis-cucumerinum*, f. sp. *vasinfectum* が、*SIX7* は f. sp. *lilii* が保持していることが確認されている (Lievens *et al.*, 2009 ; Inami *et al.*, 2012 ; Kashiwa *et al.*, 2013)。近年では、f. sp. *cepae* であるタマネギ乾腐病菌のうち、特にタマネギに強い病原性を示す系統のみが *SIX3*, 5, 7 を保持し、その他の系統は *SIX1*~7 遺伝子を保持しないとの報告がある (伊藤, 2013)。また、ネギ萎凋病菌についても *SIX1*~7 遺伝子を保持しないとされる (伊藤, 2013)。

今回、ニラ乾腐病菌の病原性関連遺伝子の検定をした結果、ニラ乾腐菌病菌 (*F.*

oxysporum)はいずれの遺伝子(*SIX 1*~*7*)とも保持しなかった。また、同じ分化型(*f. sp. cepae*)であるネギ萎凋菌病菌 (*F. oxysporum*) も、いずれの遺伝子 (*SIX 1*~*7*) を保持しておらず、伊藤 (2013) の報告と一致した。ニラ乾腐菌病菌 (*F. proliferatum*) およびネギ萎凋菌病菌 (*F. proliferatum*) についても、いずれの遺伝子 (*SIX 1*~*7*) も保持しなかった。これにより、rDNA-IGS 領域で同じクラスターGAに含まれたニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum f. sp. cepae*) とトマト萎凋菌レース 3 (*F.oxysporum f. sp. lycopersici race 3*) とは、病原性に関与する遺伝子が異なると考えられた。

非病原性菌については*SIX*遺伝子を保持しないことが報告されており (Lievens et al., 2009), 今回供試した非病原性 *Fusarium* 属菌 (*F. oxysporum* および *F. proliferatum*) も遺伝子 (*SIX 1*~*7*) を保持しなかった。これらの結果から、*SIX 1*~*7* 遺伝子によるニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌 (*F. oxysporum f. sp. cepae* および *F. proliferatum*) との識別はできないと考えられた。そのため、ニラ乾腐病の簡易診断技術の開発には、今回調査した以外の病原性関連遺伝子の探索を行う必要がある。なお、ニラ乾腐病菌は *F. oxysporum f. sp. cepae* と *F. proliferatum* の2種から成るとともに、*F. oxysporum f. sp. cepae* は少なくとも3つ以上の多系統から成るが、いずれの種および系統ともニラに生じさせる病徴は同様であることから、*F. oxysporum f. sp. cepae* および *F. proliferatum* は共通の病原性関連遺伝子を保持する可能性があると考えられた。

第6節 ニラ乾腐病菌のニラ植物体内における分布

*Fusarium*属菌には、土壤中や環境中に非病原性*Fusarium*属菌が多数分布するとされる (Gordon and Martyn, 1997 ; Fravel *et al.*, 2003) . また、ニラ乾腐病が発生している栽培圃場では、ニラ乾腐病菌 (病原性*Fusarium*属菌 : *F. oxysporum* f. sp. *cepae*および*F. proliferatum*) と非病原性*Fusarium*属菌が混在していると考えられ、ニラ植物体内から菌分離する際にニラ乾腐病菌と非病原性*Fusarium*属菌の両方が同時に分離してしまい、病害診断を誤る可能性がある。

そこで、本研究では、診断に適するニラ植物体の分離部位を明らかにするため、ニラ乾腐病菌の*nit*変異株を利用してニラ植物体内におけるニラ乾腐病菌の分布を調査した。すなわち、ニラ乾腐病菌の*nit*変異株を用いて汚染した土壤にニラを播種し、ニラの植物体内におけるニラ乾腐病菌分布を調査するとともに、汚染土壤に植付けした場合についても調査した。さらに、発病程度の違いによるニラ植物体内のニラ乾腐病菌の分布や、非病原性*Fusarium*属菌の分布についても調査した。本節では、ニラの栽培暦のない圃場中に存在する*Fusarium*属菌を非病原性*Fusarium*属菌とした。

なお、*nit*変異株とは、自然界に存在する野生株を塩素酸塩 (KClO_3) を含む培地上で培養すると出現する、硝酸塩を利用できない栄養要求性変異株であり、野生株と異なり塩素酸塩に対する耐性を獲得している。*nit*変異株の形態や培養性状、病原性は元の野生株と同じである。*Fusarium*属菌の*nit*変異株については、既に*F. oxysporum*やその近縁の*F. moniliforme*で詳細な調査がされている (Correll *et al.*, 1987 ; Cove, 1976 ; 竹原, 1992 ; 竹原ら, 1994) . 通常、自然界には*Fusarium*属菌の*nit*変異株は土壤中に存在しないため、*nit*変異株を土壤中に投入し、塩素酸塩を含む選択培地で分離することによって、特定の*Fusarium*属菌をモニタリングでき

る（竹原, 1992 ; 竹原ら, 1994）. また, 選択培地には, 野生株と*nit*変異株が混在する土壌から*nit*変異株のみを分離するFo-N培地, 野生株のみを分離するFo-W培地および両方を分離するFo-G培地がある（Nishimura, 2007 ; 西村, 2008）. さらに, 土壌中の菌密度に応じて, 100 倍希釈懸濁液から分離するためのFo-N1培地, Fo-W1培地およびFo-G1培地, 土壌の10 倍希釈懸濁液から分離するためのFo-N2培地, Fo-W2培地およびFo-G2培地がある（Nishimura, 2007 ; 西村, 2008）. 本節では, ニラ植物体からニラ乾腐病菌（*nit*変異株）のみを分離するためにFo-N2培地を, 非病原性*Fusarium*属菌（野生株）のみを分離するためにFo-W2培地を用いた.

材料と方法

1. *nit* 変異株の作出と供試菌株の選出

ニラ乾腐病菌（*F. oxysporum* f. sp. *cepa*e : Fs43-2, Fs112-1, Fs169-1, *F. proliferatum* : 840424a-1 ; 表 1）を, PDA平板培地で27.5°C, 7 日間, 暗黒下で培養後, 菌叢を直径5 mmのコルクボーラーで打ち抜いて菌叢ディスクを得た. 菌叢ディスクをMMC培地（ショ糖 30 g, NaNO₃ 2 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, L-アスパラギン 1.6 g, KClO₃ 15 g, 寒天 20 g, 微量元素溶液0.2 ml, 蒸留水 1 L）に置き, 27.5°C, 暗黒下で静置して3~5 日後に出現した菌糸の先端を切り取り, MM培地（ショ糖 30 g, NaNO₃ 2 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, 寒天 20 g, 微量元素溶液 0.2 ml, 蒸留水 1 L）に移植し, MM培地上で菌糸の旺盛な伸長が見られなかった菌株を*nit* 変異株（Fs43-2n, Fs112-1n, Fs169-1n, 840424a-1n）とした. また, *nit* 変異株4菌株のニラに対する病原性を第1節, 3, 3), (1) ~ (4) と同様に土壌接種と浸根接種を行い, いずれの菌株とも病原性を有することを確認した後, 供試菌株として用いた.

2. 汚染土壌の調製

ニラ乾腐病菌の*nit* 変異株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* : Fs43-2n, Fs112-1n, Fs169-1n, *F. proliferatum* : 840424a-1n) を、それぞれ土壌ふすま培地 (大畑, 1995) で暗黒下, 27.5°C, 7 日間培養し, 49 倍量の高圧滅菌土壌と混和して汚染土壌とした。

3. 接種

1) 播種時接種

2011年6月6日に、各供試菌株の汚染土壌を詰めたコンテナ内 (縦41×横61×深さ20 cm, 面積 0.25 m², 容積60 L) にニラ ‘スーパーグリーンベルト’ を10 粒播種して播種時接種有り区とした。なお、汚染土壌の代わりに高圧滅菌土壌を用いた播種時接種無し区も設けた。播種後は、最低温度15°C に設定したガラス室内で10月14日まで育苗した。

2) 植付け時接種

2011年10月14日に、高知県南国市の農業技術センター内にある、ニラの栽培暦のないビニールハウスで試験を行った。ビニールハウス内の畦の植穴に、汚染土壌 (Fs43-2n) を200 ml ずつ入れて軽く混和し、根を2 cm残して切断したニラ苗を1 植穴につき1 株ずつ植付けした。なお、汚染土壌 (Fs43-2n) に播種して育苗したニラ苗を移植したものを播種時接種有り・植付け時接種有り区、高圧滅菌土壌に播種して育苗したニラ苗を移植したものを播種時接種無し・植付け時接種有り区とした。また、植付け時に、汚染土壌を植穴に入れずにニラ苗を移植した、播種時接種有り・植付け時接種無し区、播種時接種無し・植付け時接種無し区も設けた。1区64 株, 2 反復とし、植付け後は最低温度を15°Cに設定したビニールハウス内で管理した。

4. 調査

1) 汚染土壤に播種した場合のニラ乾腐病菌の植物体内における分布 (試験1)

2011年8月5日(播種60日後)および10月3日(119日後)に、各区から任意の8株を掘取った。掘り取ったニラは、1株のなかで最も草丈の低い1茎を選び、茎盤とそれに続く葉鞘および葉を用いた。ニラの地下部を水道水で洗浄した後、茎盤を厚さ約0.5 cmに、茎盤から2~3 cm上の葉鞘および葉をそれぞれ長さ約1 cmに切り出して分離に用いた。

2) 汚染土壤に植付けした場合のニラ乾腐病菌の植物体内における分布 (試験2)

2011年11月17日(植付け34日後)、12月22日(69日後)、2012年2月17日(126日後)および4月5日(174日後)に、各区の任意の8株を2反復掘り取った。掘り取ったニラは、1株のなかで最も草丈の低い1茎を選び、茎盤とそれに続く葉鞘および葉を用いた。ニラの地下部を水道水で洗浄した後、茎盤を厚さ約0.5 cmに、茎盤から3~4 cm上の葉鞘および葉をそれぞれ長さ約1 cmに切り出して分離に用いた。

3) 発病程度とニラ乾腐病菌の植物体内における分布 (試験3)

2012年4月5日(174日後)に、試験圃場からニラを掘り取り、次に示す発病指数で評価した。地上部の発病指数は、第2節、1、2)、(2)、①、eと同様に評価し、地下部の発病指数は、症状なしを0、茎盤内部の一部が淡く褐変したものを1、茎盤内部が全体に淡く褐変したものを2、茎盤内部が全体に濃く褐変したものを3、茎盤とその鱗茎の内部が乾腐状に腐敗したものを4とした。地上部の発病指数 - 地下部の発病指数が0-0のニラを9株、0-1を47株、0-2を27株、0-3を20株、0-4を16株、1-0を1株、1-1を7株、1-2を3株、1-3を6株、1-4を1株、2-2を2株、2-3を2株、3-0を1株、3-3を1株用いた。分離に用いたニラの各部位は、第6節、4、3)と同様に切り出して分離に用いた。

4) ニラ乾腐病菌と非病原性*Fusarium*属菌の植物体内における分布 (試験4)

2012年4月5日 (植付け174 日後) に, 地上部および地下部の病徴指数が0-0, 1-1, 2-1および3-1を呈する株を, 各病徴につき10 株用いた. 植物体内からの菌分離および地上部と地下部の病徴の評価は, 第6節, 5, 3) と同様に行った. なお, 切り出した各部位は, それぞれ縦に2分割して, 各選択培地に置いた.

5. 選択培地を用いたニラ植物体内からの菌分離

各ニラの部位を, 70%エタノールに30 秒間, 2%次亜塩素酸ナトリウムに30 秒間浸漬した後, 滅菌水でゆすいで表面殺菌し, ニラ乾腐病菌の*nit* 変異株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepa*:Fs43-2n, Fs112-1n, Fs169-1n, *F. proliferatum* : 840424a-1n) の分離にはFo-N2平板培地 (KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaNO₃ 2 g, KCl 0.5 g, クエン酸水素二アンモニウム 2 g, ホウ酸 0.5 g, 硝酸エコナゾール10 mg, クロラムフェニコール 0.25 g, 寒天 20 g, 蒸留水 1 L, KClO₃ 10 g, L-ソルボース 20 g, イミノクタジン酢酸塩25%溶液 0.4 ml, トルクロホスメチル50%水和剤 3 mg) を, 非病原性*Fusarium*属菌の分離にはFo-W2平板培地 (KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, クエン酸水素二アンモニウム 2 g, ホウ酸 0.5 g, 硝酸エコナゾール10 mg, クロラムフェニコール 0.25 g, 寒天 20 g, 蒸留水 1 L, L-ソルボース 20 g, イミノクタジン酢酸塩25%溶液 0.4 ml, トルクロホスメチル50%水和剤 3 mg) に置床した. 27.5°C, 暗黒下で7~10 日後に出現する菌叢の有無を調査した.

結果

1. 汚染土壤に播種した場合のニラ乾腐病菌の植物体内における分布（試験1）

8月5日調査（播種60日後）では、Fs43-2n 菌株と Fs112-1n 菌株はニラの茎盤および葉鞘から分離され、Fs169-1n 菌株と 840424a-1n 菌株は茎盤から分離された。10月3日調査（播種119日後）では、Fs112-1n 菌株と Fs169-1n 菌株が茎盤および葉鞘から分離され、Fs43-2n 菌株と 840424a-1n 菌株は茎盤のみから分離された（表15）。なお、どの供試菌株もニラの茎盤や鱗茎の内部に褐変や乾腐症状を生じなかったものの、草丈ならびに鱗茎や茎の太さが抑制される傾向がみられた。

表15 汚染土壤に播種した場合のニラ乾腐病菌の植物体内における分布（試験1）

供試菌株)	菌の種類	8月5日（播種60日後）			10月3日（119日後）		
		茎盤	葉鞘	葉	茎盤	葉鞘	葉
Fs43-2n	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	100.0	12.5	0.0	100.0	0.0	0.0
Fs112-1n	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	87.5	12.5	0.0	100.0	37.5	0.0
Fs169-1n	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	100.0	0.0	0.0	100.0	50.0	0.0
840424a-1n	<i>F. proliferatum</i>	75.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
無接種	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

注) 数値は分離率（%）を示す。

注) 接種は、2011年6月6日に行った。

2. 汚染土壤に植付けした場合のニラ乾腐病菌の植物体内における分布

（試験2）

11月17日（植付け34日後）以降の全ての調査日において、ニラの茎盤からニラ乾腐病菌（*F. oxysporum* f. sp. *cepae* : Fs43-2n）がほぼ100%分離された。また、葉鞘、葉からも分

離されたものの、接種時期と分離率との間に一定の傾向は見られなかった(表 16)。なお、播種時と植付け時の両方で接種した場合は、播種時のみまたは植付け時のみで接種した場合と比べて、草丈の抑制、茎盤および鱗茎の内部の褐色や腐敗がより強くなる傾向がみられた。

表 16 汚染土壌に植付けした場合のニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*:Fs43-2n) の植物体内における分布 (試験2)

接種		11月17日 (植付け34日後)			12月22日 (69日後)			2月17日 (126日後)			4月5日 (174日後)		
播種時	植付け時	茎盤	葉鞘	葉	茎盤	葉鞘	葉	茎盤	葉鞘	葉	茎盤	葉鞘	葉
有り	有り	100.0	18.8	50.0	100.0	87.5	50.0	100.0	75.0	43.8	100.0	87.5	81.3
有り	無し	100.0	43.8	50.0	100.0	68.8	62.5	100.0	68.8	93.8	100.0	75.0	93.8
無し	有り	100.0	25.0	68.8	100.0	81.3	75.0	100.0	87.5	81.3	93.8	81.3	56.3
無し	無し	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

注) 数値は、分離率 (%) の2反復 (8株/区) の平均値を示す。

注) 播種時接種は、2011年6月6日、植付け時接種は、10月14日に行った。

3. 発病程度とニラ乾腐病菌の植物体内における分布 (試験3)

地上部および地下部がいずれの発病指数であってもニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*:Fs43-2n) が茎盤から高い頻度で分離された。地上部の発病指数が0であっても地下部の発病指数が2以上の場合や、地上部の発病指数が1以上の場合では、茎盤からの供試菌株の分離割合は100%であった。なお、発病程度(地上部-地下部)が0-0でも、ニラ乾腐病菌は茎盤から高い割合で分離され、葉鞘や葉からも低い頻度であるものの分離された。また、地上部の発病程度が0の場合は、地下部の発病度が高くなるほど葉鞘や葉からの分

離頻度が高くなる傾向がみられた。しかし、地上部の発病程度が1以上になると、地下部の発病程度に関わらず葉鞘や葉からニラ腐病菌が分離されないケースがあり、葉鞘や葉の分離頻度には一定の傾向は認められなかった（表 17）。

表 17 発病程度とニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepa* e:Fs43-2n) の植物体内における分布 (試験3)

分離部位	地上部の発病指数 - 地下部の発病指数									
	0-0	0-1	0-2	0-3	0-4	1-0	1-1	1-2	1-3	1-4
茎盤	9/9 ^{z)}	46/47	27/27	20/20	16/16	1/1	7/7	3/3	6/6	1/1
葉鞘	5/9	31/47	24/27	16/20	16/16	1/1	7/7	2/3	6/6	1/1
葉	2/9	18/47	20/27	18/20	16/16	0/1	6/7	2/3	2/6	1/1

z) 数値は、分離株数/調査株数を示す。

(表 17の続き)

分離部位	地上部の発病指数 - 地下部の発病指数			
	2-2	2-3	3-0	3-3
茎盤	2/2	2/2	1/1	2/2
葉鞘	2/2	2/2	1/1	2/2
葉	2/2	2/2	1/1	2/2

4. ニラ乾腐病菌と非病原性*Fusarium*属菌の植物体内における分布 (試験4)

地上部および地下部の病徴がいずれの発病指数であっても、茎盤からはニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepa* : Fs43-2n) と非病原性 *Fusarium* 属菌の両方が高い割合で分離された。葉鞘や葉からもニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の両方が分離され、いずれの発病程

度であってもニラ乾腐病菌より非病原性 *Fusarium* 属菌の分離頻度が高い傾向であった (表 18)。

表 18 ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*:Fs43-2n) および
非病原性 *Fusarium* 属菌のニラ植物体内における分布 (試験4)

分離部位	0 - 0 ^{x)}		1 - 1		2 - 1		3 - 1	
	Fo-N2 ^{y)}	Fo-W2 ^{y)}	Fo-N2	Fo-W2	Fo-N2	Fo-W2	Fo-N2	Fo-W2
茎盤	7 / 10 ^{z)}	9 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
葉梢	5 / 10	8 / 10	4 / 10	10 / 10	5 / 10	9 / 10	8 / 10	8 / 10
葉	2 / 10	8 / 10	4 / 10	10 / 10	6 / 10	8 / 10	6 / 10	8 / 10

x) 地上部の発病指数 - 地下部の発病指数を示す。

y) Fo-N2培地, *nit* 変異株 (ニラ乾腐病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, Fs43-2n) の分離用培地 ; Fo-W2培地, 野生株 (非病原性 *Fusarium* 属菌) の分離用培地

z) 数値は, 分離株数 / 調査株数 (2反復の合計) を示す。

考察

病害診断に適するニラ分離部位を明らかにするため, ニラ乾腐病菌の *nit* 変異株を利用して, ニラ植物体内におけるニラ乾腐病菌の分布を調査した。その結果, ニラ乾腐病菌の汚染土壤にニラを播種して 60 日後以降に, ニラ乾腐病菌の一部の菌株で葉鞘まで達する場があったものの, 播種 60 日後と 119 日後のいずれの調査日とも茎盤に高率に分布することが明らかとなった。また, *F. oxysporum* f. sp. *cepae* と *F. proliferatum* とも, 茎盤に高率に分布することが明らかとなった。なお, 一般的なニラの育苗期間は約 120 日である。そのため, 育苗圃場でニラ乾腐病の発病暦のある場合や, 隣接圃場で発生がみられる場合, あるいはニラ苗が生育不良で感染が疑われる場合の診断には, ニラ乾腐病菌が高率に存在す

る茎盤が適すると考えられた。

また、ニラ乾腐病菌を植付け時に接種した場合は、ニラ乾腐病菌は植付け約1ヶ月後には茎盤に高率に存在し、その後速やかに葉鞘や葉に移行していくと考えられた。ただし、ニラ乾腐病菌は茎盤から100%の割合で分離されるのに対し、葉鞘や葉の分離率はやや低かった。これらのことから、育苗期間および本圃栽培期間とも、ニラから *Fusarium* 属菌を分離するには茎盤を用いることが適当と考えられた。

発病程度とニラ乾腐病菌のニラ植物体内における分布を調査した結果、無病徴のニラでも茎盤に病原菌が存在した。地上部では草丈の抑制がみられないが、茎盤に褐色や腐敗を生じた株では、その症状が激しくなるほど葉鞘や葉からの病原菌の分離頻度が高くなる傾向がみられたが、いずれにせよ分離頻度は茎盤が最も高かった。地上部に草丈の抑制などの症状を生じたニラでは、葉からの分離頻度が一定ではなかったものの、茎盤と葉鞘からほぼ100%の割合で分離された。このことから、本圃栽培期間では、ニラからのニラ乾腐病菌の分離には茎盤を用いることが適当であり、草丈の抑制がみられる株からは葉鞘を用いることも可能であると考えられた。

ただし、いずれにせよニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の両方が同一ニラの茎盤、葉鞘および葉に高率に存在することが明らかとなったため、両者を特定の分離部位や分離の有無により区別することは困難であると考えられた。そこで、茎盤から分離した *Fusarium* 属菌のニラに対する病原性を効率よく確認する必要があるため、第7節において簡易診断法に取り組んだ。

第7節 ニラ乾腐病の簡易診断法の検討

病害防除の基本は予防であり，土壤伝染性病害については育苗培土や圃場での病原菌の有無を診断し，病原菌が存在した場合には，土壤消毒や生育期の薬剤処理による防除，栽培作物の変更などにより被害の回避に繋げていくことが理想である．

しかし，土壤伝染性病害であるニラ乾腐病の診断には，地下部にある鱗茎内部の褐変や，根の異常を確認する必要があるため，発病の確認に手間がかかり，初発見が見逃されやすい．さらに，罹病部位からの病原菌分離による診断では，土壤中や栽培環境下に広く生息している非病原性 *Fusarium* 属菌も同時に分離される可能性が高いうえ，ニラ乾腐病菌と培養性状による区別が難しく，判断の決め手に欠けることが多い．第6節において，ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の両者はともにニラ植物体内に分布していることが明らかとなった．また，ニラから分離された *Fusarium* 属菌の病原性の有無については，第5節において *SIX1*~7 遺伝子での診断はできなかったので，現在のところ生物検定（検定植物を用いた発病検定）に頼らざるを得ない．しかし，検定に係る時間は，土壤接種による生物検定で接種から約2ヶ月以上，分生子懸濁液の灌注接種で約1ヶ月以上かかり，早期発見・早期防除に繋がりにくい．

ここでは，ニラから分離される *Fusarium* 属菌のニラに対する病原性の有無を短期間で診断するのに適した接種条件を検討した．

材料と方法

1. 供試菌株

ニラ乾腐病菌2菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* : Fs43-2および *F. proliferatum* : Fs219) を供

試した.

2. 培土および供試植物

接種に用いた培土の作製および供試植物の管理は、第2節、1, 2), (2), ①, bと同様に行い、接種試験に供した. なお、供試植物は、ニラ‘スーパーグリーンベルト’とした.

3. 接種源の調製

第1節、3, 3), (2)と同様の方法によって得た分生子懸濁液を、滅菌水を用いて 1.0×10^1 , 1.0×10^3 , 1.0×10^5 , 1.0×10^7 bud cells/ml に調製した.

4. 接種方法

供試植物を栽培しているガラス試験管に、各濃度に調製した接種源 1 ml を灌注接種した. なお、無接種区には、接種源の代わりに滅菌水 1 ml を灌注した. 接種後は、25°C, 蛍光灯照射下 (20,000 lux, 14 時間日長) で管理した.

5. 調査

接種 7, 14, 21 日後に、第2節、1, 2), (2), ①, eと同様に地上部の病徴を評価するとともに、発病度を算出した.

結果

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. cepae) は、分生子懸濁液の接種濃度が 1.0×10^5 bud cells/ml および 1.0×10^7 bud cells/mlの場合、接種 7 日後の発病株率はそれぞれ90.0%, 100%, 発病度は65.3, 80.7, 接種14 日後の発病株率はそれぞれ96.0%, 100%, 発病度は72.7, 82.0となった.

一方、ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) は、接種濃度が 1.0×10^5 bud cells/mlおよび 1.0×10^7 bud cells/mlの場合、接種7日後の発病株率はそれぞれ48.0%、76.0%、発病度は28.7、56.7、接種14日後の発病株率はそれぞれ72.0%、82.0%、発病度は46.0、64.0となった。両菌株とも、接種濃度が 1.0×10^7 bud cells/ml、接種7日後においてニラに対する病原性を判断できた。なお、両菌株とも、 1.0×10^3 bud cells/ml以下では発病株率や発病度が低くなった。また、接種濃度が 1.0×10^5 bud cells/mlおよび 1.0×10^7 bud cells/mlの場合、接種21日以降になるとニラの葉が黄化し始めるとともに、接種菌の気中菌糸が過剰に発生して観察が困難となった。無接種株については、接種35日後においても生育抑制や黄化は観察されなかった(表19)。

これにより、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*および*F. proliferatum*) のニラに対する病原性の有無を短期間で簡易に判定するには、分生子懸濁液の接種濃度は 1.0×10^7 bud cells/ml、調査時期は接種7~14日後が適すると考えられた。

表19 ニラ乾腐病菌の接種濃度と発病株率(%)および発病度

菌株	菌の種類	接種濃度 (bud cells/ml)	接種7日後		14日後		21日後	
			発病株率 (%)	発病度	発病株率 (%)	発病度	発病株率 (%)	発病度
Fs43-2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	1.0×10^1	38.0	25.3	58.0	42.7	84.0	84.0
		1.0×10^3	40.0	32.0	62.0	48.7	92.0	90.7
		1.0×10^5	90.0	65.3	96.0	72.7	100.0	100.0
		1.0×10^7	100.0	80.7	100.0	82.0	100.0	100.0
Fs219	<i>F. proliferatum</i>	1.0×10^1	26.0	12.0	42.0	23.3	62.0	62.0
		1.0×10^3	40.0	20.7	48.0	32.0	72.0	70.0
		1.0×10^5	48.0	28.7	72.0	46.0	80.0	78.7
		1.0×10^7	76.0	56.7	82.0	64.0	86.0	86.0
滅菌水	滅菌水	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

注) 数値は、5反復の平均値を示す。

考察

病害診断では、罹病組織などから*Fusarium*属菌を分離し、その病原性を確認する手法を用いる。しかし、土壌中や周辺環境中には多くの*Fusarium*属菌が存在しているうえ、本研究の第6節によって、ニラ植物体内においてもニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*および*F. proliferatum*)と非病原性*Fusarium*属菌の両方が茎盤内に高頻度に存在することが明らかとなった。そのため、検定したいニラから複数の*Fusarium*属菌を分離し、効率よくニラに対する病原性を確認する必要がある。

そこで、生物検定より時間を短縮でき、簡便に診断できる簡易診断法を確立するため、接種条件を検討したところ、接種濃度は 1.0×10^7 bud cells/ml, 調査時期は接種 7~14 日後が適することが明らかとなった。

これにより、従来の土壌接種では分離菌培養期間と接種後の管理期間を合わせて 3 ヶ月以上、分生子懸濁液の灌注接種では 1.5 ヶ月程度の診断期間が必要であったが、簡易診断法によって 2~3 週間となり、大幅に診断期間を短縮できた。また、ガラス試験管を用いることによって省スペースとなり、一度に多くの分離菌を扱うことが可能となった。この簡易診断法によって、ニラ乾腐病菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の識別が迅速かつ簡易に行うことが可能になると考えられた。

第8節 ニラ乾腐病菌の死滅温度

*Fusarium*属菌などの植物病原菌の死滅温度は、土壌中のキュウリつる割病菌、トマト萎凋病菌およびイチゴ萎黄病菌で60°C, 10分間(吉野ら, 1972), スイカつる割病菌は湿熱で55°C, 40分間(村田ら, 1936)などと報告されている。病原菌の死滅温度に基づいて、温湯や太陽熱などを利用して行われる病害防除には、種子消毒, 土壌消毒, 各種資材の消毒などがある。これらの方法は、化学合成農薬を使わないため、環境負荷の少ない防除法といえる。

ここでは、熱を利用した防除の基礎的データを得るため、ニラ乾腐病菌の死滅温度の調査を行った。

材料と方法

1. 供試菌株

ニラ乾腐病菌2 菌株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepaе* : Fs43-2, Fs203, Fs162-1 ; *F. proliferatum* : Fs219) を用いた。

2. 培養土の調製

あらかじめPDA平板培地で前培養した供試菌株の菌叢を細断して、土壌ふすま培地が入った三角フラスコ内に入れた後、25°C, 暗黒下で35 日間培養した。

3. 熱処理の方法

容量600 μ lのマイクロチューブに培養土200 μ lを入れ、滅菌水400 μ lを加えた。30, 35, 40, 45, 50°Cに設定した恒温器(三洋電機)と、45, 50°Cに設定した乾燥器(タバイ エスペッ

ク) に0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168, 226, 504, 672 分間保った。処理後は、直ちに水道水に入れて冷却した。また、対照として25°Cに設定した恒温器内で0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168, 226, 504, 672 時間保った。なお、各処理とも反復なしとした。

4. 病原菌の分離

西村培地 (Fo-G2) に、処理後の培養土約20 µlを8カ所に置床し、25°C、10 日間培養後、菌叢の出現の有無を調査した。

結果

ニラ乾腐病の死滅温度を検討したところ、*F. oxysporum* f. sp. *cepae* (Fs43-2, Fs203, Fs162-1) のいずれの菌株とも、30および35°Cを672 時間処理、40°Cを120 時間処理、45°Cを24 時間処理および50°Cを6 時間処理しても検出されたが、40°Cを168 時間以上、45°Cを72 時間以上および50°Cを12 時間以上処理すると検出されなくなった (表 20)。*F. proliferatum* (Fs219) は、30および35°Cを672 時間処理、40°Cを120 時間処理、45°Cを24 時間処理および50°Cを0.5 時間処理しても検出されたが、40°Cを168 時間以上、45°Cを72 時間以上および50°Cを1 時間以上すると検出されなくなった (表 20)。

考察

以上の結果から、汚染土壌中のニラ乾腐菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) は、温湯条件下で40°Cでは168 時間以上、45°Cでは72 時間以上、50°Cでは12 時間以上で、ニラ乾腐菌 (*F. proliferatum*) は、温湯条件下で40°Cでは168 時間以上、45°Cでは72 時間以上、50°Cでは

表 20 ニラ乾腐病菌の培養土壌中の病原菌の死滅温度

供試菌株	菌の種類	クラスター ^{x)}	処理温度 (°C)	処理時間 (h)													
				0	0.5	1	3	6	12	24	72	120	168	226	504	672	
Fs43-2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	CA	25	100 ^{y)}	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
			30	— ^{z)}	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
			35	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
			40	—	100	100	100	100	100	100	100	100	37.5	0	0	0	0
			45	—	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
			50	—	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Fs162-1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	CB	25	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
			30	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
			35	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
			40	—	100	100	100	100	100	100	100	100	25.0	0	0	0	
			45	—	100	100	100	100	100	12.5	0	0	0	0	0	0	
			50	—	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fs316	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	CC	25	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
			30	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
			35	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
			40	—	100	100	100	100	100	100	55.5	25.0	0	0	0		
			45	—	100	100	100	100	100	87.5	0	0	0	0	0		
			50	—	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0		
Fs219	<i>F. proliferatum</i>	CE	25	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
			30	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
			35	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
			40	—	100	100	100	100	100	100	100	25.0	0	0	0		
			45	—	100	100	100	100	100	25.0	0	0	0	0	0		
			50	—	37.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

x) rDNA-IGS領域, EF1α領域, histone H3領域の結合塩基配列に基づく系統樹中において属したクラスターを示す。

y) 乾腐病菌の検出率 (%) = 菌叢の出現した数 ÷ 調査数 × 100

z) —は試験を行っていないことを示す。

1時間以上で全てが死滅すると考えられた。

なお、菌類の細胞は60°C、10分間程度の短時間によって死滅するとされる一方、イチゴ萎黄病やキュウリつる割病の病原菌である*Fusarium*属菌は、厚膜胞子を形成するため耐熱性が強く、湿熱条件下では、40°Cで8~10日間、50°Cでは2日間で死滅するとされたが(岡山, 1999)、ニラ乾腐病菌ではこれらよりやや短い処理期間で死滅した。

これらニラ乾腐病菌の死滅温度条件は、鱗茎の温湯処理や汚染圃場の太陽熱消毒による防除の基礎資料として活用できると考える。なお、鱗茎の温湯処理によるニラの生育の影響については、厳密な温度管理が要求されると考えられるため、さらなる検討を要する。

第9節 ニラ乾腐病の防除法

Fusarium 属菌による病害は土壌伝染するとともに空気伝染、種子伝染、種苗伝染するなど、多様な伝染環を持つ。そのため、土壌中や圃場に取り残された前作罹病残渣内で生存する病原性 *Fusarium* 属菌の菌密度を抑制させるためには、苗床（育苗圃）での播種前および本圃での植付け前の土壌消毒が必須となる。

2013年9月時点で農薬登録されている、ニラの各種病虫害および雑草に使用可能な土壌くん蒸剤は、クロルピクリン液剤（商品名：クロールピクリン、クロピクフロー）、クロルピクリン錠剤（クロルピクリン錠剤）、クロルピクリンテープ（クロピクテープ）、ダゾメット粉粒剤（ガスタード微粒剤、バスアミド微粒剤）およびカーバムナトリウム塩液剤（キルパー液剤）がある。そのうちニラ乾腐病に適用のある農薬は、クロルピクリン液剤（クロピクフロー）、ダゾメット粉粒剤（ダゾメット粉粒剤、バスアミド微粒剤）およびカーバムナトリウム塩液剤である。しかし、個々の防除効果を調査した事例はあるが、同一条件下で各剤の防除効果を比較した事例はない。また、ニラの栽培栽培では紅色根腐病、白絹病、白斑葉枯病、葉腐病などの複数の土壌伝染性病害が併発する可能性があるため、乾腐病以外の病害に適用があり、かつクロルピクリン液剤より省力化が期待できるクロルピクリン錠剤、クロルピクリンテープについても乾腐病に対する防除効果を確認する必要がある。そのため、本節では、育苗圃や本圃の第一次伝染源の防除に有効な土壌消毒法として、総合序論でも記した土壌還元消毒と太陽熱消毒のニラ乾腐病に対する防除効果を検討した。さらに、ニラ乾腐病の土壌くん蒸剤として紅色根腐病に登録のあるクロルピクリンテープおよび白絹病に登録のあるクロルピクリン錠剤の防除効果も検討した。

また、本圃の一部で育苗するため植付け前の土壌消毒ができない場合や、土壌くん蒸処

理をしたにもかかわらず感染苗の移植や管理作業などにより本圃に持ち込まれた病原性 *Fusarium* 属菌による二次伝染を防ぐためには、生育期の殺菌剤の土壌灌注処理が有効と考えられる。しかし、ニラを適用作物として農薬登録されている殺菌剤は、9 病害に対し 11 剤（2013 年 9 月時点）であり、そのうち生育期に土壌灌注処理が可能な殺菌剤はチオファネートメチル水和剤（トップジンM水和剤）の 1 剤のみである。ニラ乾腐病は土壌伝染性病害であるため、病原菌が土壌中に生息し、植物の根や鱗茎から感染して導管内で増殖する。そのため、生育期の殺菌剤の場合は、地上部への散布では効果が不十分であると考えられる。ニラ乾腐病に対する殺菌剤は土壌による吸着が無く、浸透（吸収）移行性が高く、抵抗誘導が発揮されることが望まれる。化学合成農薬以外では、亜リン酸肥料が作物に抵抗性誘導を引き起こすとの報告がある（Guest *et al.*, 1990）が、ニラ乾腐病に対する試験報告はない。そこで、生育期の防除法として、ニラ乾腐病に既に登録のあるチオファネートメチル水和剤、他作物でフザリウム病に登録されているベノミル水和剤（ベンレート水和剤）とヒドロキシイソキサゾール液剤（タチガレン液剤）、作物に抵抗性誘導を促すと考えられるバリダマイシン液剤（バリダシン液剤 5）ならびに亜リン酸液体肥料（ホスプラス）の灌注処理による防除効果についても検討した。

材料と方法

1. 土壌還元消毒および太陽熱消毒

1) 汚染土壌の作製

ニラ乾腐病菌 2 菌株の *nit* 変異株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*: Fs43-2n; *F. proliferatum*: Fs219n) を、それぞれ土壌ふすま培地で暗黒下、27.5°C、39 日間培養し、49 倍量の高圧滅菌土壌と

混和して汚染土壌とした。汚染土壌を、水抜き用の穴をゴム栓で塞いだ1/5,000 aのワグネルポットに5 Lずつ詰めて供試した。なお、*nit* 変異株の作出と選抜は、第6節、1と同様に行った。

2) 土壌還元消毒および太陽熱消毒

2012年8月23日に、ポットあたり20 gのふすま(1 t/10 a相当)を加えて土壌とよく混和した後、ポット内に水を溜めてから10月2日まで0.05 mm厚の透明ポリエチレンシート(以下、シートとする)で空気になるべく入らないように密閉し、土壌還元消毒区とした。

また、ポットあたり稲わら約20 g(1 t/10 a相当)および石灰窒素2 g(100 kg/10 a相当)を混和した後、ポット内に水を溜めてから10月2日までシートで空気になるべく入らないように密閉し、太陽熱消毒区とした。なお、処理を行わず10月2日までシートを被覆した無処理区も設けた。いずれの区とも、8月23日から9月5日まで屋外に置いた後、9月5日以降は最低温度を15°Cに設定したガラス室に置いた。10月2日にポット内の水を落水させた後、土壌をよく混和した。

3) 酸化還元電位および温度の測定

8月23日から10月2日の間、深さ10 cmの地温を20分間隔で測定した。9月18日および10月2日に、各ポットの深さ8 cmの酸化還元電位をORPメーター(RM-10P, TOA Electro-nics Ltd.)で測定し、各区の平均値を求めた。

4) ニラの植付け

10月5日にニラ(品種:‘スーパーグリーンベルト’)を1ポット1株ずつ植付けた後、ガラス室で管理した。なお、各区につき5ポットずつ用いた。

5) 調査方法

2013年1月7日、2月1日に、第2節、1、2）、（1）、⑤と同様に地上部の発病度を評価するとともに、発病度を算出した。発病度（地上部）から無処理区に対する防除価を次式により算出した。また、次式により発病株率を算出した。

$$\text{防除価} = (1 - \text{処理区の発病度} \div \text{無処理区の発病度}) \times 100$$

$$\text{発病株率} (\%) = \text{発病株数} \div \text{調査株数} \times 100$$

2. 土壌くん蒸処理

1) 汚染圃場

高知県南国市の農業技術センター内のビニールハウスの土壌を、2010年にニラ乾腐病菌の *nit* 変異株 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* ; Fs43-2n) で汚染し、ニラ ‘スーパーグリーンベルト’ を2010年および2011年の2作栽培した後、ニラを除去して用いた。施肥には、くみあいCDU 複合燐加安S555号 (N:P:K=15 : 15 : 15) 100 kg/10 aを用いた。

2) 供試薬剤とくん蒸剤処理

クロルピクリン錠剤、クロルピクリンテープ、ダゾメット粉粒剤およびカーバムナトリウム塩液剤の4剤を用いた。2012年7月31日に、各薬剤を処理した区をそれぞれクロルピクリン錠剤区、クロルピクリンテープ区、ダゾメット粉粒剤区、カーバムナトリウム塩液剤区、無防除区として、あらかじめ畦たてした畦、1区1畦（畦幅1.7 m、長さ5.6 m、面積9.5 m²）反復なしで処理した。クロルピクリン錠剤区は地表面に1万個/10 a相当を施用した後、鍬で混和し、直ちに厚さ0.05 mmのシートで被覆して、水封ダクトで固定した。クロルピクリンテープ区は110 m/10 a相当を畦に埋没処理し、ダゾメット粉粒剤区は30 kg/10 a相当を表面散布して鍬で混和した後、直ちにシートで被覆し、水封ダクトで固定した。

カーバムナトリウム塩液剤区は、原液 60 L/10 a 相当の 65 倍希釈液をジョロで地表面に散布した後、直ちにシートで被覆し、水封ダクトで固定した。いずれの処理区とも、8月14日にシートを除去し、耕起によるガス抜きは行わなかった。無防除区は、畦立て後からニラ植付け直前までそのままの状態に保った。なお、くん蒸処理前の土壌の含水率（3地点の平均）は 22.8%であった。

3) 耕種概要

8月21日に、あらかじめ高圧滅菌土壌で約3ヶ月間育苗したニラ‘スーパーグリーンベルト’の根を2 cm残して切除し、畦幅1.7 m、長さ5.6 m、条間28 cm、株間28 cm、4条で植付けた。1畦につき68株、反復無しとした。植付け後はビニールハウス内を最低温度15°Cに設定して栽培した。

4) 調査方法

12月17日、2013年1月7日に、第2節、1、2）、（1）、⑤と同様に地上部の発病度を評価するとともに、発病度を算出した。防除価と発病株率については、第9節、1、5）と同様に算出した。

3. 殺菌剤および資材の土壌灌注処理

1) 汚染土壌の作製とニラの植付け

ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* : Fs43-2および*F. proliferatum* : Fs219) を、土壌ふすま培地で暗黒下、27.5°C、7日間培養し、49倍量の高圧滅菌土壌と混和して汚染土壌とした。汚染土壌を、直径10.5 cmのポリエチレンポットに詰めた。2011年11月25日に、あらかじめ高圧滅菌土壌で約3ヶ月間育苗したニラ‘スーパーグリーンベルト’の根を2 cm残して切

除し、1ポットにつき1株を植付けた。植付け後は、最低温度15°Cに設定したガラス室内で栽培した。

2) 供試薬剤と処理方法

チオファネートメチル水和剤、ベノミル水和剤、ヒドロキシイソキサゾール液剤、バリダマイシン液剤、亜リン酸液体肥料を供試した。各処理区には、11月25日、12月6日、16日、2012年4月24日、5月1日、8日、6月26日、7月3日、10日の計9回、各薬剤の1,000希釈液を所定濃度の3 L/m²の割合で土壌灌注した。薬剤を処理しない無処理区も設けた。各処理区および無処理区とも各区につき5ポットを用いた。

3) 生育および発病調査

8月28日（植付け277日後）に、全生重（g）、草丈（cm）、葉数（枚）、分けつ数および地下部の発病度を調査した。なお、発病度は、下に示した指数を基準に評価し、次式により発病度を算出した。地下部の指数は、症状なしを0、根が褐変や腐敗したものを1、茎盤が褐変したものを2、茎盤が乾腐状に腐敗したものを3とした。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病株数}) \div (\text{調査株数} \times 3) \times 100$$

結果

1. 土壌還元消毒および太陽熱消毒の防除効果

処理期間（2012年8月23日～10月2日）の地温は、土壌還元消毒区では平均で26.6°C、30°C以上の時間が92時間であり、太陽熱消毒区では平均で26.9°C、30°C以上が117時間であった。処理開始26日後（9月18日）の酸化還元電位は、*F. oxysporum* f. sp. *cepaе* の土壌還元消毒区では-23.2 mV、太陽熱消毒区では-104.6 mV、*F. proliferatum* の土壌還元消毒区では-24.0

mV, 太陽熱消毒区では-104.2m Vであった。処理開始40 日後（10月2日）は, *F. oxysporum* f. *sp. cepae*の土壤還元消毒区では, 93.4 mV, 太陽熱消毒区では94.8 mV, *F. proliferatum* の土壤還元消毒区では88.9 mV, 太陽熱消毒区では99.0 mVであった。

F. oxysporum f. *sp. cepae* に対する防除価は, 土壤還元消毒区はいずれの調査日とも0.0であり, 太陽熱消毒区はいずれの調査日とも80.0であった(表 21)。*F. proliferatum* に対する2013年1月7日および2月1日の防除価は, 土壤還元消毒区でそれぞれ75.0, 53.8, 太陽熱消毒区で83.3, 84.6であった(表 21)。

表 21 ニラ乾腐病に対する土壤還元消毒および太陽熱消毒の防除効果 (2012年)

菌の種類 (菌株名)	試験区	1月7日			2月1日		
		発病株率 (%)	発病度	防除価	発病株率 (%)	発病度	防除価
<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cepae</i> (Fs43-2n)	土壤還元消毒	60.0	25.0	0.0	60.0	25.0	0.0
	太陽熱消毒	20.0	5.0	80.0	20.0	5.0	80.0
	無処理	60.0	25.0	—	60.0	25.0	—
<i>F. proliferatum</i> (Fs219n)	土壤還元消毒	40.0	15.0	75.0	80.0	30.0	53.8
	太陽熱消毒	40.0	10.0	83.3	40.0	10.0	84.6
	無処理	100.0	60.0	—	100.0	65.0	—

注) 2012年10月5日に, 各処理を行ったポットに健全ニラを植え付けた。

2. 各種土壤くん蒸剤の防除効果

無防除区の2012年12月17日および2013年1月7日の発病株率はそれぞれ58.8%, 47.1%, 発病度は29.4, 25.0の多発条件下での試験であった。クロルピクリン錠剤区では, 発病株率はそ

れぞれ50.0%, 42.6%, 発病度は27.6, 24.3と高く, 防除価は6.2, 2.9と低くかった. クロルピクリンテープ区では, 発病株率は45.6%, 42.6%, 発病度は27.2, 23.9と高く, 防除価は7.5, 4.4と低くかった. ダゾメット粉粒剤区では, 発病株率は22.1%, 25.0%, 発病度は14.0, 13.6とやや低く, 防除価は52.5, 45.6とやや高くかった. カーバムナトリウム塩液剤区では, 発病株率は26.6%, 22.1%, 発病度は14.0, 10.7とやや低く, 防除価は52.5, 57.4とやや高くかった (表 22) .

表 22 ニラ乾腐病に対する各種土壌くん蒸剤の防除効果 (2012年)

試験区	処理量	12月17日			1月7日		
		発病株率 (%)	発病度	防除価	発病株率 (%)	発病度	防除価
クロルピクリン錠剤	10,000 錠/10 a	50.0	27.6	6.2	42.6	24.3	2.9
クロルピクリンテープ	110 m/10 a	45.6	27.2	7.5	42.6	23.9	4.4
ダゾメット粉粒剤	30 kg/10 a	22.1	14.0	52.5	25.0	13.6	45.6
カーバムナトリウム塩液剤	60 L/10 a	26.5	14.0	52.5	22.1	10.7	57.4
無処理	—	58.8	29.4	—	47.1	25.0	—

注) 2012年7月31日～8月14日に各土壌消毒を処理し, 8月21日に各処理を行ったポットに健全ニラを植付けた.

注) 調査株数は, 各区につき68株とした.

3. 生育期の殺菌剤および資材の土壌灌注処理の防除効果

F.oxysporum f. sp. *cepae* (Fs43-2) および *F.proliferatum* (Fs219) とも, 無処理区より処理区のほうが, ニラに対する生育の抑制軽減がみられた. また, 3 菌株とも無処理区で根の褐変が観察されたが, いずれの処理区とも根や鱗茎内部の異常はみられなかった. 3 菌株とも, 生育や地下部の発病に, 薬剤間における一定の傾向は見られなかった (表 23).

表 23 ニラ乾腐病に対する各種資材（1,000倍希釈液）の灌注処理による防除効果（2012年）

菌の種類 (菌株名)	供試資材 (区)	全生重 ^{z)} (g)	草丈 ^{z)} (cm)	葉数 ^{z)} (枚)	分けつ数 ^{z)}	発病度
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> (Fs43-2)	チオファネートメチル水和剤	33.5	36.2	11.6	2.0	0.0
	ベノミル水和剤	28.2	35.4	13.2	2.2	0.0
	ヒドロキシイソキサゾール液剤	26.8	38.0	12.0	2.0	0.0
	バリダマイシン液剤	25.3	41.9	11.8	2.0	0.0
	亜リン酸液体肥料	28.3	39.3	11.4	2.0	0.0
	無処理	18.1	34.5	8.8	2.0	33.3
<i>F. proliferatum</i> (Fs219)	チオファネートメチル水和剤	29.9	30.4	9.4	2.2	0.0
	ベノミル水和剤	28.4	34.1	11.6	2.2	0.0
	ヒドロキシイソキサゾール液剤	29.5	35.1	11.0	2.2	0.0
	バリダマイシン液剤	25.3	37.4	11.0	2.2	0.0
	亜リン酸液体肥料	25.0	31.5	9.8	2.0	0.0
	無処理	21.5	29.4	8.4	2.0	33.3

注) 各区とも3 L/m²相当を灌注処理した。なお、処理は2011年11月25日（ニラの植付け直後）から2012年7月10日までに9回行った。

注) 調査は、2012年8月28日（植付け277日後）に行った。

z) 数値は、5株の平均値を示す。

考察

土壌伝染を防止する方法として、土壌還元消毒と太陽熱消毒を検討したところ、ニラ乾腐病菌 *F. oxysporum* に対する土壌還元消毒の防除効果は認められなかったものの、太陽熱消毒の防除効果は高かった。一方、ニラ乾腐病菌 *F. proliferatum* に対しては、両処理とも有効と考えられた。なお、第2節において、同一圃場に *F. oxysporum* と *F. proliferatum* の両病原菌が混在するケースがあり得ることが確認されたので、両種の病原菌に有効な太陽熱消毒はニラ乾腐病の防除法として有効であると考えられた。なお、今回行った試験は、ガラス室内で行ったポット試験であったが、太陽熱処理期間の地温は40°C以下と低い温度で推移した。また、土壌中のニラ乾腐病菌は、湿熱で30°C処理した場合、672時間後でも生存することが、第8節のニラ乾腐病菌の死滅温度の試験で確認されている。本来の太陽熱消毒では、40°C以上の地温確保が前提となっているにもかかわらず、本研究で高い防除効

果が得られた理由としては、石灰窒素による殺菌効果や土壌 pH の上昇が病原菌密度を抑制したことに起因するものと考えられた。高知県における施設ニラ栽培では、土壌消毒に必要な地温確保に適した時期に実施できない場合や天候によって地温確保が難しい場合もあると想定されるため、本研究により地温が 40°C 以下の場合でも十分な防除効果が認められた太陽熱消毒は、ニラ乾腐病の防除に有効と考えられた。

ニラ乾腐病に対する土壌くん蒸剤の防除効果を調査したところ、クロルピクリン錠剤およびクロルピクリンテープの防除効果は低く、ダゾメット粉粒剤およびカーバムナトリウム塩液剤については効果が認められるものの、その程度はやや低かった。省力化と他病害との同時防除を期待してクロルピクリン錠剤およびクロルピクリンテープの防除効果を試験したが、ニラ乾腐病に登録のあるクロピクフローの有効成分濃度が 80.0%に対し、それぞれ 70.0%、55.0%と低いため、防除効果が低くなったと考えられた。今後はニラ乾腐病に対する防除効果が十分確保できる処理量や設置方法の検討が必要と考えられる。

次に、栽培期間中の数種資材のニラ乾腐病に対する防除効果を検討した。なお、本研究では、即効性を狙ったものではなく、生育期に複数回の灌注処理を行うことにより、ニラ乾腐病菌汚染圃場におけるニラの生育抑制軽減を目的とした。供試したチオファネートメチル剤やベノミル剤は、植物体への吸収移行性に優れており、導管病であるフザリウム病には有効であるとされている。また、ヒドロキシイソキサゾール液剤は、イネやキュウリなどの苗立枯病（フザリウム菌）に農薬登録されており、播種時や育苗時に施用することで根の発育を促進するとされている。バリダマイシン剤は、レタス根腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*) に対し、直接的な殺菌作用はないものの防除効果が認められており、レタスに処理することによって全身獲得抵抗性を誘導すると推測されている (Ishikawa *et al.*, 2007)。亜リン酸液体

状肥料（ホスプラス）は、作物に抵抗性誘導を引き起こし、病害抵抗性を向上させるとの報告がある（Guest *et al.*, 1990）。また、土壌病害に対する発生抑制効果については、トマト根腐病、ダイズ茎枯病、ネギ根腐病、ジャガイモそうか病、ジャガイモ緋色腐敗病、ゼラニウム青枯病などで報告されており、ネギ萎凋病では土壌消毒との併用により発生抑制効果が認められるとともに、品質や収量の増大効果が確認されている（佐古ら, 2012）。本研究の結果、供試した5 資材のニラ乾腐病に対する防除効果の高低は判然としなかったが、いずれの資材とも発病抑制効果はみられた。今回の試験では、チオファネートメチル剤やベノミル剤以外の資材についてもニラ乾腐病に対する防除効果が得られたので、これら資材については薬効以外の副次的な発病抑制効果が発揮された可能性が考えられた。なお、慣行のニラ栽培では、ニラを植付けた後に畦全体をポリエチレンシートなどで被覆する。そのため、ニラの株元に効率的に灌注処理するためには、灌水チューブの利用などを検討する必要があると考える。

第2章 ニラ紅色根腐病の発生生態と防除

Pyrenochaeta terrestris (Hansen) Gorenz, Walker & Larson によって引き起こされるニラ紅色根腐病は、ニラの葉鞘や鱗茎表面に紅色の変色、根に紅色の変色や亀裂、腐敗を生じる病害である(石川ら, 1995)。一方、地上部には特徴的な病斑を生じさせず、徐々に草丈の抑制や分けつ減少などの生育抑制を引き起こすため、早期発見が難しい。また、本病は土壌伝染性病害のため、病原菌が一旦圃場内に侵入すると長期間に亘って生息し、次作にも影響を及ぼすことになる。高知県内の各産地では、本病害が散発して問題となっている。その理由としては、本圃の一部を育苗圃と兼ねるケースでは植付け前の土壌くん蒸処理が行えないこと、土壌くん蒸処理している場合であっても処理時の条件が適切でなかったため十分な防除効果が得られていないこと、あるいは本圃を土壌くん蒸処理したにもかかわらず感染苗を植付けることによって病原菌を持ち込んだことなどが考えられる。

また、第1章第1節では、栽培圃場において紅色根腐病菌単独感染だけでなく、乾腐病菌との複合感染も確認された。

一方、防除対策については、ニラ紅色根腐病に登録されている農薬は土壌くん蒸剤1剤のみ(2013.9時点)である。

しかし、これまでにニラ紅色根腐病の詳しい発生生態は明らかにされておらず、防除対策も検討されてこなかった。

そのため、本章では、本病の発生生態を明らかにするため、発生状況、伝染方法、寄主範囲、ニラ乾腐病菌と複合感染した場合の病徴および死滅温度を明らかにするとともに、本病に対する土壌還元消毒、太陽熱消毒、土壌くん蒸剤および生育中の数種資材の防除効果を検討した。

第1節 発生状況, 病徴

ニラ紅色根腐病によって罹病したニラは、地下部に生じる病徴が特徴的であるにもかかわらず、地上部では生育抑制の他、わずかに見える地際部の葉鞘の紅変や葉先の枯れを呈するのみである。そのため、地下部を掘り出さなければ本病による病害かどうか診断ができない。また、乾腐病と同様に、ネダニやセンチュウによる被害、生理障害などとの区別が難しい。

今回、高知県内の主要な産地において、草丈が低く、葉梢が細く、分けつの少ない生育不良や葉先枯れ症状の認められるニラを採集し、莖盤や根から分離した菌の種類、分離頻度およびニラに対する病徴を調査した。

材料と方法

1. 罹病ニラの採集, ニラ組織からの糸状菌の分離および保存

第1章, 第1節, 1と同様に、2010年2~6月および2011年4月に黒潮町6圃場, 中土佐町6圃場, 須崎市6圃場, 佐川町8圃場, 土佐市1圃場, 香美市3圃場, 香南市2圃場の計32圃場において、生育異常のみられたニラを採集した(写真 i)。紅色に変色した鱗茎または根から切片をとり、70%エタノールに10秒間、2%次亜塩素酸ナトリウム液に1分間浸漬後、pH 4.0にしたPDA平板培地上で糸状菌を分離した。糸状菌をPDA斜面培地またはPDA平板培地で培養した菌叢の一部を白金耳でとり、滅菌水に懸濁させた後、2%素寒天培地に画線し、出現したコロニーを単孢子分離した。単孢子分離後は、PDA斜面培地に移植して23°C設定の菌株保存室で保存した。



- i 生産圃場でニラに生じたニラ紅色根腐病の病徴
- j-1 麦稈上に形成されたニラ紅色根腐病菌 (Ps167-1) の分生子殻
- j-2 ニラ紅色根腐病菌 (供試菌株 : Ps167-1) の分生子殻と分生子
- j-3 ニラ紅色根腐病菌 (Ps167-1) の分生子, バーの長さ : j-2, 40 μm ; j-3, 10 μm
- k-1 ニラ紅色根腐病菌 (Ps167-1) の土壌接種によりニラに生じた紅変
- k-2 ニラ紅色根腐病菌 (Ps167-1) の浸根接種によりニラに生じた紅変

2. 分離菌のニラに対する病原性

1) 供試菌株

第2章, 第1節, 1で, 単孢子分離した12菌株 (Ps86, Ps91, Ps177-1, Ps187, Ps167-1, Ps55, Ps221, Ps206, Ps213, Ps217, Ps223, Ps195) を用いた.

2) 供試植物

高圧滅菌土壌に播種したニラ‘スーパーグリーンベルト’を約1ヶ月間育苗して供試した. 接種直前に, ニラの根を約2cm残して切除して用いた.

3) 接種源の調製

(1) 土壌接種

供試菌株を土壌ふすま培地 (大畑; 1995) で25°C, 31日間培養し, 29倍量の高圧滅菌土壌と混和して汚染土壌とした.

(2) 浸根接種

供試菌株のうち, 土壌接種によって生育抑制のみられた菌株を, PDB液体培地で25°C, 120rpmで7日間振とう培養し, 滅菌水を用いて分生子懸濁液を 1.0×10^7 bud cells/mlとした.

4) 接種方法

(1) 土壌接種

汚染土壌を詰めた直径9cmのポリエチレンポットに, ニラを2株ずつ植付けた.

(2) 浸根接種

分生子懸濁液にニラの鱗茎および根を15分間浸漬した後, 高圧滅菌土壌を詰めた直径9cmのポリエチレンポットに2株ずつ植付けた. なお, いずれの接種方法とも, 各菌株につき2ポットずつ用い, 接種後は最低温度を15°Cに設定したガラス室内で管理した.

5) 調査

土壌接種では接種30 日後，浸根接種では接種10 日後に地下部を水道水で洗浄した後，鱗茎や根の変色および腐敗を目視で調査した．また，異常のみられた鱗茎や根の組織から接種菌の再分離を試みた．

結果

1. 罹病ニラの採集およびニラ組織からの糸状菌の分離

調査圃場32圃場（78株）のうち，黒潮町1 圃場，中土佐町2 圃場，須崎市1 圃場，佐川町2 圃場，土佐市1 圃場，香美市1 圃場，香南市1 圃場の計9 圃場で採取した12 株のニラの根から*Pyrenochaeta*属菌が分離された．なお，*Pyrenochaeta*属菌が分離された株は，葉先に紅変や枯れ，草丈や葉幅の抑制，分けつ異常，葉鞘や鱗茎の表面に紅色の変色，根に紅変や腐敗などが共通してみられた．また，調査圃場のう同一圃場から*Pyrenochaeta*属菌と乾腐病菌が分離されるケースや，同一のニラ株から*Pyrenochaeta*属菌と乾腐病菌の両方が分離されるケースがあった（表 24）．

また，罹病ニラから分離された供試菌株を，PDA平板培地で培養し，培養性状や形態学的特徴に基づいて簡易に同定を行った．いずれの供試菌株とも，PDA平板培地上の菌叢は暗灰色から淡紅色を呈し，裏面は赤色から紅色を帯びた．また，PDA平板培地で麦稈とともにBLB照射下で培養すると，麦稈上に亜球形，淡褐色から暗褐色で剛毛を有する分生子殻を形成した（表25，写真 j-1，j-2）．分生子殻内には，多無色，単胞，長楕円形で2 油滴を有する分生子を形成した（表25，写真 j-3）．供試した12菌株は，石川ら（1995）によって報告されているニラ紅色根腐病菌の培養性状や形態学的特徴と一致したことから，*P. terrestris*とした．

表 24 高知県内の主要産地における生育不良株からの *Pyrenochaeta* 属菌の分離
(2010~2011)

調査場所	調査圃場数 (圃場)	採集株数 (株)	分離 <i>Pyrenochaeta</i> 属菌			病原性 <i>Pyrenochaeta</i> 属菌		
			圃場数 (圃場)	株数 (株)	菌株数 (菌株)	圃場数 (圃場)	株数 (株)	菌株数 (菌株)
黒潮町	6	22	1	2	2	1	2	2
中土佐町	6	13	2	2	2	2 <1>	2 <1>	2
須崎市	6	10	1	1	1	1 <1>	1 <1>	1
佐川町	8	12	2	2	2	2 <1>	2 <1>	2
土佐市	1	9	1	3	3	1	3	3
香美市	3	9	1	1	1	1 <1>	1	1
香南市	2	3	1	1	1	1	1	1
計	32	78	9	12	12	9 <4>	12 <3>	12

注) <>内の数値は、同一圃場または同一株からニラ乾腐病菌と *Pyrenochaeta* 属菌が分離された内数を示す。

表25 罹病ニラから分離された供試菌株の形態

	供試菌株		既報の <i>P. terrestris</i>
	Ps167-1	Ps177-1	石川ら, 1995 (ニラ紅色根腐病菌)
PDA平板培地上の菌叢	表, 暗灰色~淡紅色 裏, 赤色~紅色	表, 暗灰色~淡紅色 裏, 赤色~紅色	表, 暗灰色~淡紅色 裏, 赤色~紅色
分生孢子	色 無色	色 無色	色 無色
分生子殻	形状 単胞, 長楕円形, 2油滴を有する	形状 単胞, 長楕円形, 2油滴を有する	形状 単胞, 長楕円形, ソーセージ形, 2油滴を有する
	色 淡褐色~暗褐色	色 淡褐色~暗褐色	色 淡褐色~褐色
	形状 壘球形, 剛毛が密生	形状 壘球形, 剛毛が密生	形状 壘球形, 剛毛が密生

2. 分離菌のニラに対する病原性

分離された供試菌株12菌株 (*P. terrestris*) をニラに、土壌接種および浸漬接種を行ったところ、のいずれの方法とも、供試した全ての菌株で、地上部の生育抑制、鱗茎や根の紅変がみられ、鱗茎や根から接種菌が再分離された (表 26, 写真 k-1, k-2) .

表 26 分離菌 (*P. terrestris*) のニラに対する病原性

菌株名	採集場所	土壌接種		浸漬接種	
		症状 ^{z)}	再分離	症状 ^{z)}	再分離
Ps86	黒潮町	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps91	黒潮町	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps177-1	中土佐町	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps187	中土佐町	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps167-1	須崎市	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps55	佐川町	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps221	佐川町	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps206	土佐市	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps213	土佐市	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps217	土佐市	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps223	香美市	a, b, c	+	a, b, c	+
Ps195	香南市	a, b, c	+	a, b, c	+

z) 症状 : a, 鱗茎の赤変 ; b, 根の赤変 ; c, 草丈の抑制

考察

高知県内の主要な産地の生育不良ニラから分離した菌の種類，分離頻度およびニラに対する病徴を調査した結果，*Pyrenochaeta* 属菌が高率で分離された．この *Pyrenochaeta* 属菌を，培養性状や形態観察によりニラ紅色根腐病菌の *P. terrestris* と同定した．*P. terrestris* を土壤接種や浸根接種すると，ニラの根や鱗茎の紅変や根の腐敗といった病徴を示し，ニラに対する病原性が確認された．また，同一圃場内でニラ紅色根腐病とニラ乾腐病の併発が確認された他，同一のニラ株から病原性を有する *P. terrestris* とニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* または *F. proliferatum*) の両方が分離されるケースも確認された．

第2節 菌糸生育温度および発病好適温度

P. terrestris により引き起こされるメロン紅色根腐病やグロリオサ紅色根腐病では、培地上の病原菌の生育適温が明らかにされている（佐藤ら, 1993 ; 高橋ら, 1997）。また、ショウガ紅色根茎腐敗病では菌糸生育温度と発病適温の関係が調べられている（矢野ら, 2004 ; 山崎ら, 2011d, 2012d）。一方、ニラ紅色根腐病菌ではこの様な報告例が無いため、本節では菌糸生育温度と発病好適温度について調査した。

材料と方法

1. 供試菌株

ニラ紅色根腐病菌 (*P. terrestris* : Ps167-1, Ps177-1) を用いた。

2. 菌糸生育適温

供試菌株を、PDA平板培地上で25°C、暗黒下、14日間培養後、菌叢の周縁部を直径5 mmのコルクボーラーで打ち抜いて得た菌叢ディスクをPDA平板培地に置床した。暗黒条件下で5, 10, 15, 20, 23, 25, 28, 30, 33, 35, 38および40°Cに設定した恒温器内に静置し、7日後に菌叢の直径を測定して、1日当たりの菌糸伸長 (mm/日) を求めた。なお、各温度につき3反復行った。

3. 発病好適温度

(1) 汚染土壌の調製

供試菌株を、土壌ふすま培地（大畑, 1995）で暗黒下、25°C、29日間培養し、49倍量の

高圧滅菌土壌と混和して汚染土壌とした。

(2) 接種

汚染土壌を直径12 cmの黒色ポリポットに0.7 Lずつ詰め、ニラ ‘スーパーグリーンベルト’ (59 日苗) の根を鱗茎から2 cm残して切除し、1 ポットにつき1 株ずつ植付けた。なお、各温度につき4 ポットずつ用いた。植付け後は15, 20, 25, 30°Cに設定した人工気象器内(20,000 lux , 16 時間日長) で管理した。

4. 調査

接種 41 日後に根および鱗茎の紅変の有無、地上部の最大葉長 (cm)、最大根長 (cm)、葉数 (枚)、全生重量 (g)、地上部および地下部の生重量 (g) を調査した。なお、葉数については、最大葉の葉長の 1/2 以上のものを 1 枚、1/2 未満のものを 0.5 枚とした。

結果

1. 菌糸の生育適温

供試した2菌株 (Ps167-1, Ps177-1) とともに10~35°Cで菌糸生育が認められ、5°C, 38°Cおよび40°Cでは生育しなかった。菌糸伸長の最適温度は28°Cであった (図 13)。

2. 発病好適温度

調査を行った15~30°Cのいずれの温度でも、根や鱗茎に紅変が認められたが、25°Cが最も強く現れた。発病株率は15~25°Cで高かった。接種有り区は接種無し区と比べて、ニラの最大葉長が短く、全生重、地上部生重および地下部生重がやや軽かった (表 27)。

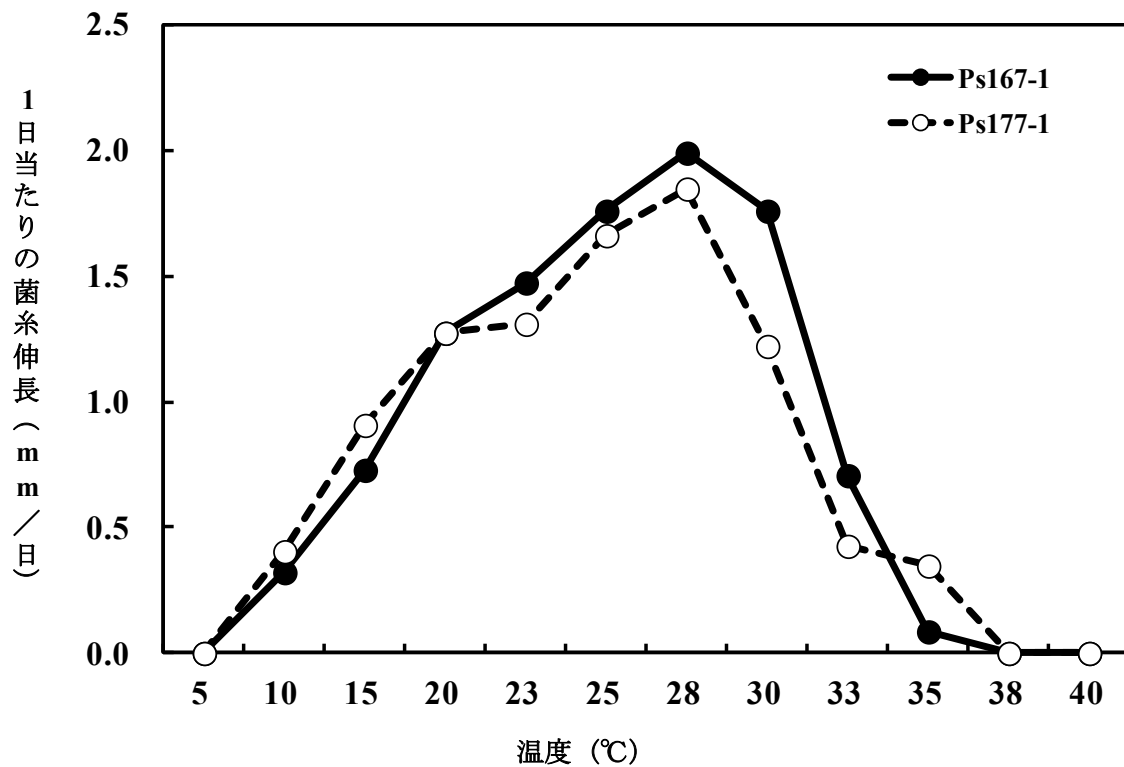


図 13 ニラ紅色根腐病菌 (Ps167-1, Ps177-1) の一日当たりの菌糸伸長

表 27 ニラ紅色根腐病の発病好適温度

接種	温度 (°C)	病徴 ^{y)}		発病株 ^{z)} 率 (%)	最大葉 ^{z)} 長 (cm)	最大根 ^{z)} 長 (cm)	葉数 ^{z)} (枚)	全生重 ^{z)} (g)	地上部 ^{z)} 生重 (g)	地下部 ^{z)} 生重 (g)
		根	鱗茎							
有り	15	4/4	2/4	100.0	11.4	16.1	2.8	0.3	0.1	0.2
	20	4/4	3/4	100.0	12.2	13.2	2.9	0.4	0.2	0.2
	25	4/4	4/4	100.0	17.3	13.4	2.6	0.6	0.3	0.2
	30	2/4	2/4	50.0	15.6	10.5	1.8	0.3	0.2	0.1
無し	15	0/4	0/4	0.0	12.5	16.1	2.8	0.4	0.2	0.2
	20	0/4	0/4	0.0	14.7	15.7	2.9	0.7	0.3	0.4
	25	0/4	0/4	0.0	19.8	14.5	3.1	0.8	0.5	0.3
	30	0/4	0/4	0.0	23.3	11.7	2.0	0.4	0.3	0.1

y) 数値は病徴を呈した株数/調査株数を示す.

z) 数値は4株の平均値を示す.

考察

ニラ紅色根腐菌の生育温度は10～35℃であり、生育適温は28℃であった。なお、メロン紅色根腐菌、グロリオサ紅色根腐菌およびショウガ紅色根茎腐敗菌の生育適温は、それぞれ28℃から30℃、25℃から27.5℃および28℃から30℃と報告されており、ほぼ同様の傾向であった。また、汚染土壌を用いた発病調査の結果、ニラ紅色根腐病は15～30℃で発病し、発病適温は25℃付近であることが明らかとなった。

第3節 宿主範囲

P. terrestris を病原とするネギ紅色根腐病， トマト紅色根腐病の宿主範囲は， 両病害とも宿主植物の他にタマネギ， ニンニク， ジャガイモであり（佐藤ら，1993；高橋ら，1997）， ショウガ紅色根茎腐敗病の宿主範囲は， メロン， トマト， ニラ， ネギ， グロリオサと報告されている（山崎ら，2011d）． 本節では， ニラ紅色根腐病菌の各種植物 15 種類に対する病原性を調査した．

材料と方法

1. 供試菌株

ニラ紅色根腐病菌（*P. terrestris* : Ps167-1）を用いた． ショウガ根茎への接種には， 参考としてショウガ紅色根茎腐敗病菌（*P. terrestris* : 高幡2-1）を用いた．

2. 接種源の調製と接種

第2節， 3， （1）と同様に汚染土壌を作製した． なお， 培養期間を28～130 日間とし， 汚染土壌は49 倍量の高圧滅菌土壌と混和して接種源とした． これを直径10.5 cmの黒色ポリポットに0.4 Lずつ詰め， 2010年7月8日にニラ‘スーパーグリーンベルト’（35 日苗）， ネギ‘雷山’（35 日苗）， トマト‘ハウス桃太郎（タキイ種苗）’（14 日苗）， ナス‘竜馬’（14 日苗）， オクラ‘アーリーファイブ’（14 日苗）， キュウリ‘ZQ-7（埼玉原種育成会）’（14 日苗）， キャベツ‘金系201号’（14 日苗）， ハクサイ‘無双（タキイ種苗）’（14 日苗）， サヤインゲン‘ベストクroppキセラ’（14 日苗）， ヤマノイモ（14 日苗）， グロリオサ‘ミサトレッド’（43 日苗）， 8月19日にリンドウ‘チベットリンドウ’（49 日苗），

10月13日にメロン‘アールス雅春秋系（横浜植木）’（14日苗），ショウガ‘土佐一’（51日苗），ミョウガ‘夏ミョウガ’（94日苗）を1ポットにつき1株植付けた。対照として高圧滅菌土壌にも同様に植付け，無接種区とした。各供試植物につき5ポットとし，ガラス室内で栽培した。さらに，ショウガについては，供試菌株をPDA平板培地で25°C，暗黒下で14日間培養した菌叢を直径4mmのコルクボーラーで打ち抜いて菌叢ディスクを接種源とし，カミソリで表皮を傷つけた根茎へ貼付した。なお，対照には無培養のPDA平板培地を用いた。密閉容器内（縦13×横20×深さ8cm）で15°C，多湿条件下で10日間静置した。供試菌株につき3根茎を用いた。

3. 調査

8月13日（接種36日後）にニラ，ネギ，トマト，ナス，オクラ，キュウリ，キャベツ，ハクサイ，サヤインゲン，ヤマノイモ，グロリオサ，9月23日（接種35日後）にリンドウ，11月17日（接種35日後）にメロン，ショウガ，ミョウガについて地下部の紅変ならびに地上部の草丈（cm），葉数（枚），地上部および地下部の生重量（g）を調査した。葉数については，最大葉の葉長の1/2以上のものを1枚，1/2未満のものを0.5枚とした。また，菌叢ディスクによる貼付試験については，接種7日にショウガ根茎表面の紅変および根茎内部の褐変の有無を調査した。なお，紅変部から菌の再分離を試みた。

結果

ニラ紅色根腐病菌の各種植物15種類に対する病原性を調査した結果，ニラの他，ネギ，トマト，オクラ，キュウリ，サヤインゲン，ヤマノイモ，グロリオサ，ショウガ，ミョウ

ガの地下部に紅変を示し、紅変部から接種菌が再分離された。一方、ナス、キャベツ、ハクサイ、リンドウ、メロンは地下部の紅変はみられなかった。また、接種したキュウリ、グロリオサ、メロン、ショウガおよびミョウガは、無接種と比較して葉数が少なく、地上部および地下部の生量が少なかった。サヤインゲン、ヤマノイモは、地上部および地下部の生量が少なかった。キャベツ、ハクサイでは、接種による生育抑制は認められなかった(表 28-1)。

表 28-1 ニラ紅色根腐病菌の各植物に対する病原性および生育への影響

供試植物	品種または系統	接種	紅変 ^{x)}	発症部位	再分離 ^{y)}	生育量 ^{z)}			
						草丈 (cm)	葉数 (枚)	地上部 生重 (g)	地下部 生重 (g)
ニラ	スーパーグリーン ベルト	有	+	根, 鱗茎	+	45.3	10.4	21.3	42.1
		無	-	-	NT	49.2	10.4	16.9	42.8
ネギ	雷山	有	+	根, 鱗茎	+	32.0	2.6	1.7	0.3
		無	-	-	NT	29.6	3.3	1.3	0.2
キュウリ	ZQ-7	有	+	根	+	ND	9.8	26.1	8.6
		無	-	-	NT	ND	14.1	37.6	21.5
メロン	アールス雅春秋系	有	-	-	NT	24.0	2.5	0.5	0.3
		無	-	-	NT	27.2	3.8	0.8	0.4
トマト	ハウス桃太郎	有	+	根	+	34.8	8.6	23.1	6.1
		無	-	-	NT	43.6	8.1	28.9	6.0
ナス	竜馬	有	-	-	NT	21.4	10.1	9.6	7.8
		無	-	-	NT	27.4	10.2	13.7	5.9
オクラ	アーリーファイブ	有	+	根	+	35.8	5.3	15.0	7.7
		無	-	-	NT	46.8	5.7	23.5	7.7
キャベツ	金系201号	有	-	-	NT	ND	7.5	10.8	2.6
		無	-	-	NT	ND	5.5	9.7	1.3
ハクサイ	無双	有	-	-	NT	ND	13.4	ND	ND
		無	-	-	NT	ND	11.0	ND	ND
サヤインゲン	ベストクロップ キセラ	有	+	根	+	ND	ND	17.9	10.8
		無	-	-	NT	ND	ND	21.9	14.9
ショウガ	土佐一	有	+	根	+	ND	11.2	34.4	6.8
		無	-	-	NT	ND	12.0	37.9	8.6
ミョウガ	夏ミョウガ	有	+	根	+	38.7	10.0	7.5	22.5
		無	-	-	NT	53.7	11.0	9.8	39.4
ヤマノイモ	-	有	+	根	+	ND	ND	5.9	7.7
		無	-	-	NT	ND	ND	6.0	12.0
グロリオサ	ミサトレッド	有	+	根	+	ND	6.0	0.9	0.4
		無	-	-	NT	ND	6.6	1.0	0.7
リンドウ	チベットリンドウ	有	-	-	NT	7.4	5.6	0.6	0.2
		無	-	-	NT	8.2	5.4	0.6	0.2

x) 紅変：+, している；-, していない

y) 再分離：+, あり；-, 無し；NT, 再分離を行っていない

z) 数値は5株の平均値を示す。ND；データなし

ニラ紅色根腐病菌をショウガ根茎へ接種した結果、参考としたショウガ紅色根茎腐敗病菌と同様に、根茎表面に紅変および根茎内部に水浸状の褐変を生じた（表 28-2）。

表 28-2 ニラ紅色根腐病菌のショウガ根茎に対する病原性

供試菌株 (分離源)	病徴	発症部位 (症状)	再分離
Ps167-1 (ニラ)	+	根茎表面 (紅変), 根茎内部 (褐色水浸状)	+
<参考> 高幡2-1 (ショウガ)	+	根茎表面 (紅変), 根茎内部 (褐色水浸状)	+

考察

ニラ紅色根腐病菌の各種植物に対する病原性を調査した結果から、ニラ紅色根腐敗病菌は、ニラの他、ネギ、トマト、オクラ、キュウリ、サヤインゲン、ヤマノイモ、グロリオサ、ショウガ、ミョウガに病原性があると考えられた。なお、これら植物には、地下部に紅変を生じさせるが、さらに、ニラ、キュウリ、グロリオサおよびショウガには地上部や地下部の生育を抑制することも明らかとなった。本病原菌は、メロンの地下部に紅変を生じさせなかったが、生育を抑制したことから、メロンについても潜在的な寄生性を示す可能性がある。また、本病原菌はショウガ根茎の根茎表面に紅変を生じさせるとともに根茎内部を水浸状に褐変させることが明らかとなった。

これらの結果から、ニラ紅色根腐病の発生圃場では、ニラ、キュウリ、グロリオサ、ショウガおよびメロンの作付けを避けることが望ましいと考えられた。

第4節 感染ステージと病徴

施設ニラ栽培では、専用の育苗ハウスを用いる場合と、本圃の一部を育苗圃とする場合がある。特に後者では、本圃に移植したニラの栽培期間中には、土壌消毒や土壌くん蒸剤が使用できないため、土壌中に生存するニラ紅色根腐病菌が同一圃場内で行き来する可能性がある。しかし、育苗圃で感染した場合や、本圃で感染した場合、あるいは両圃場で感染した場合とで、罹病株の症状に違いがあるかは不明であった。

ここでは、ニラ紅色根腐病菌の汚染土壌を用いて播種時や植付け時に接種し、ニラ紅色根腐病菌が育苗圃や本圃で感染した場合の病徴について検討した。

材料と方法

1. 供試菌株

紅色根腐病菌 (*P. terrestris* : Ps167-1) を用いた。

2. 接種源の調製と接種

1) 汚染土壌の作製

第2節, 3, (1)と同様にして汚染土壌を作製した。なお、培養期間は21日間とした。

2) 接種

(1) 播種時接種

2010年5月27日に、汚染土壌を詰めたコンテナ内（縦41×横61×深さ20 cm, 面積0.25m², 容積60L）にニラ‘スーパーグリーンベルト’を400粒播種し、播種時接種有り区とした。

また、高圧滅菌土壌にも同様に播種し、播種時接種無し区とした。播種後は、8月26日まで

最低温度を15°Cに設定したガラス室内で栽培した。

(2) 植付け時接種

高知県南国市の農業技術センター内のビニールハウスに、1区あたり畦幅1.8 m、長さ4 m、面積7.2 m²の畦を作った。8月26日に、1植穴につき汚染土壌を200 ml入れ、そこへ根を2 cmの位置で切断したニラ苗(播種時接種有りまたは播種時接種無し)2本を1株として植付けた。それぞれを播種時接種有り・植付け時接種有り区、播種時接種無し・植付け時接種有り区とした。また、植穴に汚染土壌を入れずにニラ苗を移植し、それぞれを播種時接種有り・植付け時接種無し区、播種時接種無し・植付け時接種無し区とした。各区とも48株(条間28 cm、株間28 cm、4条植え)、2反復とした。植付け後は、最低温度を25°Cで管理した。

3. 調査

8月25日(移植前日)、10月27日(63日後)、12月8日(105日後)、1月18日(146日後)、3月8日(195日後)、4月8日(226日後)に調査した。

発病調査は、地上部および根の病徴をそれぞれ下記に示した指数を基準に評価し、発病度を算出した。地上部の指数は、症状なしを0、鱗茎が紅変するものを1、一部の株の草丈に抑制がみられるものを2、葉先枯れが見られるものを3、株の縮小がみられるものを4とした。

$$\text{地上部の発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病株数}) \div (\text{調査株数} \times 4) \times 100$$

また、根の指数は、症状なしを0、根の1/3未満が紅変したものを1、根の1/3以上、2/3未満が紅変したものを2、根の2/3以上が紅変したものを3とした。

$$\text{根の発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病株数}) \div (\text{調査株数} \times 3) \times 100$$

なお、8月25日の調査については、播種時接種有り区および播種時接種無し区のそれぞれ

10 本を，10月27日以降の調査については各区につき4 株，2反復を調査した．

生育調査は，地上部の最大葉長（cm），葉数（枚），分けつ数を計測した．なお，8月25日の調査については，播種時接種有り区および播種時接種無し区のそれぞれ10 本を，10月27日以降の調査については各区につき16 株，2反復を調査した．

結果

8月25日（移植前日）の調査では，播種時に接種しなかった苗には病徴が認められなかったのに対し，接種した苗では鱗茎や根に紅変を生じた．10月27日（移植63日後）以降の調査では，播種時接種無し×植付け時接種無し区では地上部や根に病徴がみられなかったのに対し，その他の区ではいずれも病徴がみられ，12月8日以降の調査では全株が発病した．なお，接種時期による発病度の差は明瞭でなかった（表 29-1）．また，いずれの区においても接種時期とニラの地上部の生育との間には一定の傾向は見られなかった（表 29-2）．

表 29-1 ニラ紅色根腐病の播種時および植付け時の接種と病徴（2010年）

接種		8月25日 ^{y)}			10月27日 ^{z)}			12月8日		
播種時	植付け時	発病度		発病株率 (%)	発病度		発病株率 (%)	発病度		発病株率 (%)
		地上部	根		地上部	根		地上部	根	
有り	有り	15.0	26.7	80.0	9.4	6.3	25.0	50.0	29.2	100.0
有り	無し				23.2	41.7	75.0	31.2	29.2	100.0
無し	有り	0.0	0.0	0.0	18.8	16.7	62.5	25.0	41.2	100.0
無し	無し				0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

y) 数値は、播種時接種有り区と播種時接種無し区の各区10本の平均値を示す。

z) 数値は、1区4株、2反復の平均値を示す。

注) 2010年5月27日に播種時接種，8月26日に植付け時接種を行った。

(表29-1の続き)

接種		1月18日			3月8日			4月8日		
播種時	植付け時	発病度		発病株率 (%)	発病度		発病株率 (%)	発病度		発病株率 (%)
		地上部	根		地上部	根		地上部	根	
有り	有り	31.3	54.2	100.0	31.5	62.5	100.0	34.4	58.4	100.0
有り	無し	31.3	54.2	100.0	37.5	33.4	100.0	37.5	54.2	100.0
無し	有り	34.4	54.2	100.0	25.1	45.8	100.0	25.1	45.8	100.0
無し	無し	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 29-2 ニラ紅色根腐病の播種時および植付け時の接種と生育への影響 (2010年)

接種		10月27日			10月27日			12月8日		
播種時	植付け時	最大葉長 (cm)	葉数 (枚)	分けつ 数	最大葉長 (cm)	葉数 (枚)	分けつ 数	最大葉長 (cm)	葉数 (枚)	分けつ 数
有り	有り	22.0	3.0	2.0	36.7	26.1	3.8	38.2	61.1	9.5
有り	無し				34.7	20.3	3.3	36.4	58.1	8.3
無し	有り	19.8	2.9	2.0	35.2	24.2	3.6	36.7	55.7	8.9
無し	無し				35.3 ^{z)}	27.2	3.5	36.4	56.5	9.0

y) 数値は、播種時接種有り区と播種時接種無し区の各区10本の平均値を示す。

z) 数値は、各区16株、2反復の平均を示す。

注) 2010年5月27日に播種時接種、8月26日に植付け時接種を行った。

(表29-2の続き)

接種		1月18日			3月8日			4月8日		
播種時	植付け時	最大葉長 (cm)	葉数 (枚)	分けつ 数	最大葉長 (cm)	葉数 (枚)	分けつ 数	最大葉長 (cm)	葉数 (枚)	分けつ 数
有り	有り	37.1	55.1	11.6	28.2	88.3	15.6	27.2	62.9	17.3
有り	無し	36.4	58.4	10.5	28.8	77.2	17.8	25.4	62.9	18.6
無し	有り	37.5	52.3	10.2	27.2	84.6	16.6	25.9	71.1	18.6
無し	無し	36.3	63.1	11.0	27.6	76.3	16.3	25.1	65.0	17.7

考察

以上の結果から、ニラ紅色根腐敗病は、播種時または本圃植付け時のいずれの感染時期であっても、ニラの鱗茎や根に紅変を生じるさせるものの、ニラに生じる病徴やその程度に差はほとんどないことが明らかになった。また、ニラ紅色根腐病の感染の有無によるニラの地上部の生育に対する影響については、第2節で行った室内試験の結果ほどの明らかな差はなかったことから、感染後の環境要因によっては大きくないと考えられた。また、感染時期によるニラの生育への影響についても、ほとんど差異はないと考えられた。

第5節 ニラ紅色根腐病菌とニラ乾腐病菌の複合感染

紅色根腐病菌 (*Pyrenochaeta terrestris*) と乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) の複合感染については, *Pyrenochaeta* 属菌がタマネギ乾腐病の発生を助長する (Kreutzer, 1941 ; Link *et al.*, 1926 ; Davis *et al.*, 1937) との報告があるが, 児玉 (1983) の報告ではこれを否定している. 第1節の結果では, ニラ紅色根腐病菌 (*P. terrestris*) が単独で分離されるケースの他, ニラ紅色根腐病菌とニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae* または *F. proliferatum*) が同一株から分離されるケースも確認されたことから, ニラでは乾腐病菌と紅色根腐病菌が複合感染することが明らかとなった. 本研究では, ニラ紅色根腐病菌によってニラ乾腐病の病徴が助長される, あるいはニラ乾腐病菌によってニラ紅色根腐病が助長されるか否かは不明であったため, ニラ紅色根腐病菌とニラ乾腐病菌の複合感染について検討した.

材料と方法

1. 供試菌株

ニラ紅色根腐病菌には, 第2章で高知県内の罹病ニラから分離されニラに対する病原性が確認された *P. terrestris* (Ps167-1) を, ニラ乾腐病菌には, *F. oxysporum* f.sp.*cepae* (Fs43-2) と *F. proliferatum* (Fs219) を用いた (表 3, 26).

2. 汚染土壌の調製

供試菌株を, それぞれ土壌ふすま培地で暗黒下, 27.5°C, 28 日間培養し, 49 倍量の高圧滅菌土壌と混和して汚染土壌とした. 汚染土壌は, コンテナ (縦40×横72×深さ26 cm, 面積0.29 m², 容積50 L) に詰めた. 含菌ふすま培地として, *P. terrestris* (Ps167-1) のみ用い

たものを*P. terrestris*区, *F. oxysporum* f.sp.*cepae* (Fs43-2) のみ用いたものを*F. oxysporum*区, *F. proliferatum* (F219) のみ用いたものを*F. proliferatum* 区, *P. terrestris* (Ps167-1) および *F. oxysporum* f.sp.*cepae* (Fs43-2) を半量ずつ用いたものを*P. terrestris*+*F. oxysporum* 区, *P. terrestris* (Ps167-1) および*F. proliferatum* (F219) を半量ずつ用いたものを*P. terrestris*+*F. proliferatum*区とした. 汚染土壌の代わりに高圧滅菌土壌を用いたものを無接種区とした.

3. 接種

1) 試験1: 播種時接種

2013年4月19日に, 汚染土壌にニラ‘スーパーグリーンベルト’を1 穴につき10 粒ずつ播種したものを1 株とした. 汚染土壌を詰めたコンテナに播種して接種区を設けた. 対照として高圧滅菌土壌を詰めたコンテナにニラ種子を同様に播種した無接種区とした. 各区につき10 株ずつ用いた. 播種後は, 最低温度15°Cに設定したガラス室内で栽培した.

2) 試験2: 植付け時接種

2013年4月19日に, あらかじめ高圧滅菌土壌で約4ヶ月間育苗して得たニラ‘スーパーグリーンベルト’を1 株につき3 茎ずつ, 汚染土壌を詰めたコンテナに植付けして接種区とした. なお, ニラは, 葉鞘を2 cm, 根を2 cm残して切除して用いた. 対照として高圧滅菌土壌を詰めたコンテナにニラ苗を同様に植付けした無接種区を設けた. 各区につき9 株ずつ用いた. 植付け後は最低温度15°Cに設定したガラス室内で栽培した.

4. 調査

1) 試験1: 播種時接種

5月24日（接種35日後）に発芽率（%）を，9月9日（植付け153日後）に葉数（枚），分けつ数，草丈（cm），全重（g），根重（g）を調査した。

2) 試験2：植付け時接種

9月9日（植付け153日後）に第5節，4，1）と同様に調査した。

結果

1. 育苗期における紅色根腐病菌と乾腐病菌の複合感染の病徴

播種時接種した場合，5月24日（接種35日後）では，無接種区の発芽率が96.0%であったのに対し，単独接種の *P. terrestris* 区は84.0%，*F. oxysporum* 区は83.0%，*F. proliferatum* 区は85.0%，複合接種の *P. terrestris*+*F. oxysporum* 区および *P. terrestris*+*F. proliferatum* 区はいずれも84.0%となった。

9月9日（植付け153日後）では，単独接種間を比較すると，*P. terrestris* 区は *F. oxysporum* 区と比べて草丈が高く，全重および根重が重く，両区に有意差が認められた。*P. terrestris* 区は，*F. proliferatum* 区と比べて草丈が高く，有意差が認められた。

複合接種と単独接種とを比較すると，*P. terrestris*+*F. oxysporum* 区は，*P. terrestris* 区と比べて根重が軽く，有意な発病差異が認められた。*P. terrestris*+*F. proliferatum* 区は，*P. terrestris* 区と比べて草丈が低く，根重が軽く，両区に有意な発病差異が認められた。一方，*P. terrestris*+*F. oxysporum* 区と *F. oxysporum* 区の間，および *P. terrestris*+*F. proliferatum* 区と *F. proliferatum* 区の間にはいずれの調査項目とも有意差は認められなかった（表 30-1）。なお，*P. terrestris* 区，*P. terrestris*+*F. oxysporum* 区および *P. terrestris*+*F. proliferatum* 区ではニラの鱗茎と根に紅変が確認されたが，*F. oxysporum* 区と *F. proliferatum* 区では確認されなかった。

表 30-1 ニラ紅色根腐病菌 (*P. terrestris*) とニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *F. proliferatum*) の複合感染とニラの生育 (播種時接種, 2013年)

試験区	5月24日		9月9日			
	発芽率 (%)	葉数 (枚)	分けつ数 (本)	草丈 (cm)	全重 (g)	根重 (g)
<i>P. terrestris</i>	84.0	44.2 ^a	9.1 ^a	48.1 ^a	29.3 ^a	6.8 ^{ab}
<i>F. oxysporum</i>	83.0	37.0 ^a	8.9 ^a	44.1 ^b	20.5 ^b	4.2 ^d
<i>F. proliferatum</i>	85.0	42.0 ^a	9.0 ^a	42.9 ^b	28.2 ^a	5.7 ^{bc}
<i>P. terrestris</i> + <i>F. oxysporum</i>	84.0	43.0 ^a	8.7 ^a	45.8 ^{ab}	24.7 ^{ab}	3.9 ^d
<i>P. terrestris</i> + <i>F. proliferatum</i>	84.0	41.4 ^a	9.2 ^a	41.9 ^b	25.7 ^{ab}	5.5 ^c
無接種	96.0	43.6 ^a	9.8 ^a	43.8 ^b	26.1 ^{ab}	7.9 ^a

注) 数値は10株の平均値を示す.

注) Tukey多重比較検定により同一アルファベット間には5%水準で有意差なしであることを示す.

2. 植付け時以降における紅色根腐病菌と乾腐病菌の複合感染の病徴

植付け時接種した結果, 9月9日(植付け153日後)の発病調査の結果, 供試菌株の単独接種間での比較では, *P. terrestris*区は, *F. oxysporum*区と比べて根重が重く, 有意差が認められた. *P. terrestris*区は, *F. proliferatum*区と比べて葉数および分けつ数が多く, 草丈が高く, 根重が重く, これらに有意差が認められた.

複合接種と単独接種とを比較すると, *P. terrestris*+*F. oxysporum*区は, *P. terrestris*区と比べて根重が軽く, 有意差が認められた. *P. terrestris*+*F. proliferatum*区は, *P. terrestris*区と比べて葉数, 分けつ数, 草丈, 全重および根重に抑制がみられ, それらのいずれにも有意

差が認められた。*P. terrestris*+*F. oxysporum* 区は、*F. oxysporum* 区と比べて根重が軽く、有意差が認められた。*P. terrestris*+*F. proliferatum* 区は、*F. proliferatum* 区と比べて根重が軽く、有意差が認められた（表 30-2）。

なお、*P. terrestris* 区、*P. terrestris*+*F. oxysporum* 区および *P. terrestris*+*F. proliferatum* 区では、ニラの鱗茎と根に紅変が確認されたが、*F. oxysporum* 区と *F. proliferatum* 区には、根の紅変は確認されなかった。

表 30-2 ニラ紅色根腐病菌 (*P. terrestris*) とニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *F. proliferatum*) の複合感染とニラの生育 (植付け時接種, 2013年)

試験区	葉数 (枚)	分けつ数 (本)	草丈 (cm)	全重 (g)	根重 (g)
<i>P. terrestris</i>	41.1 ^a	5.8 ^a	49.8 ^{ab}	53.1 ^a	8.6 ^a
<i>F. oxysporum</i>	32.6 ^{ab}	4.4 ^{ab}	50.5 ^a	46.8 ^a	6.6 ^b
<i>F. proliferatum</i>	24.4 ^{bc}	3.4 ^b	41.9 ^e	25.3 ^{ab}	4.8 ^c
<i>P. terrestris</i> + <i>F. oxysporum</i>	34.6 ^{ab}	4.7 ^{ab}	48.8 ^{abc}	41.1 ^{ab}	4.5 ^c
<i>P. terrestris</i> + <i>F. proliferatum</i>	17.8 ^c	3.0 ^b	42.1 ^{de}	13.3 ^b	2.3 ^d
無接種	35.8 ^{ab}	5.8 ^a	45.7 ^{cd}	43.2 ^{ab}	10.1 ^a

注) 数値は9株の平均値を示す。

注) Tukey多重比較検定により同一アルファベット間には5%水準で有意差なしであることを示す。

考察

F. oxysporum f.sp.*cepae* と *P. terrestris* の複合感染については、ニラと同じヒガンバナ科植物であるタマネギでの報告がある。Davis *et al.* (1937) によると、タマネギ乾腐病は根の基部や茎盤に傷がある場合や *P. terrestris* などの他の病原菌の侵入により引き起こされるとされる。一方、児玉 (1983) の報告では、*Pyrenochaeta* 属菌によるタマネギ乾腐病の発病促進は認められず、それぞれの病原菌は独立してタマネギを侵すとされた。このように、両病原菌の複合感染については未解決である。

ニラについては、本研究の第1章、第1節において、高知県内産地で、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f.sp.*cepae* または *F. proliferatum*) とニラ紅色根腐病菌 (*P. terrestris*) の両方が同一のニラから分離される事例が確認されたことから、それぞれの病原菌に単独感染した場合と両病原菌を複合感染させた場合のニラの病徴を比較、検討した。

播種時接種の結果、育苗期に紅色根腐病菌と乾腐病菌に複合感染した場合、紅色根腐病菌単独感染や乾腐病菌単独感染した場合と同程度の発芽抑制を引き起こすが、複合感染によって発芽抑制が助長することは無いと考えられた。また、複合感染によって紅色根腐病菌が乾腐病菌の病徴を助長する可能性は低く、むしろ乾腐病菌によって紅色根腐病菌単独感染より強い生育抑制が引き起こされると考えられた。

植付け時接種の結果、植付け時以降に紅色根腐病菌と乾腐病菌に複合感染した場合は、紅色根腐病菌単独や乾腐病菌単独の場合と比べて根重の抑制が認められた。また、複合感染によって生じるニラの生育抑制は、紅色根腐病菌よりも乾腐病菌によって強く助長される可能性が示唆された。なお、複合感染の場合は、*F. oxysporum* f.sp.*cepae* と比べて *F. proliferatum* のほうがニラの生育をより抑制する傾向がみられた。

第6節 ニラ乾腐病の死滅温度

ニラ栽培では、栽培終了後にニラの鱗茎や根などの残渣を完全に取り除くことが難しいため、圃場内にそれらを鋤きこむことが多い。ニラ紅色根腐病は土壌伝染性病害であるので、本病が発生した圃場では罹病した鱗茎や根が次作の伝染源となる可能性がある。土壌病害の防除法には、汚染土壌を熱処理する太陽熱消毒（岡山, 1999）や熱水土壌消毒（北ら, 2004）などがあるが、ニラ紅色根腐病に対する防除効果は不明である。また、育苗圃で感染した苗を本圃に植付けした場合は、病原菌を本圃に持ち込むことになるため、感染苗が第一次伝染源となる。育苗圃と本圃間の伝染環を断つための方法として、種苗の温湯処理がイネなどで一般的に行われているが、ニラ紅色根腐病を対象とした研究報告はない。

そこで、土壌の太陽熱消毒や種苗の温湯消毒などの基礎的データを得ることを目的に、ニラ紅色根腐病の菌叢ディスク、分生子液および培養土を用いた温湯処理や乾熱処理を行い、本菌の死滅温度を明らかにした。

材料と方法

1. 供試菌株

ニラ紅色根腐病菌（*P. terrestris* : Ps167-1）を用いた。

2. 菌叢ディスク、分生子液および培養土の調製

菌叢ディスクは、供試菌株をPDA平板培地上に移植して25°C、暗黒下で14日間培養し、菌叢を直径4 mmのコルクローラーで打ち抜いて得た。なお、菌叢ディスクを顕微鏡観察した結果、菌糸のみであることを確認した。分生子液は、Watson麦桿培地に供試菌株の菌叢片を

置床して25°C, BLB照射下で21 日間培養し, 麦稈上に形成された分生子殻を滅菌水中で潰して得られた分生子懸濁液を滅菌水で 1.0×10^3 個/mlに調製し, 滅菌したガーゼで濾して得た. 培養土は, あらかじめPDA平板培地で前培養した供試菌株の菌叢を, 土壤ふすま培地(大畑, 1995) 100 mlの入った三角フラスコ内に細断して入れ, 25°C, 暗黒下で66 日間培養した. なお, 熱処理直前の培養土の土壤水分率は46.6%であった.

3. 熱処理

乾熱処理の場合は, 容量200 μ lのマイクロチューブに菌叢ディスク1枚または培養土を160 μ l入れた. 温湯処理では, 容量200 μ lのマイクロチューブに分生子液を160 μ lまたは菌叢ディスク1 枚に滅菌水を150 μ l, 培養土100 μ lに滅菌水100 μ lを加えた. 40, 45, 50, 55°Cに設定したサーマルサイクラー(TaKaRa)に菌叢ディスクあるいは培養土を入れたチューブを1, 3, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 720, 1,440 分間, 分生子液を入れたチューブを1, 3, 5, 10, 30, 60, 120 分間保った. 処理後は, 直ちにチューブを水道水に入れて冷却した. また, 対照として25°Cに設定した恒温器内で菌叢ディスクおよび培養土は0または1,440 分間, 分生子液は0または120 分間の処理を行った. なお, 各処理につき菌叢ディスクは4 反復, 分生子液および培養土は反復なしとした.

4. 供試菌株の検出

1N-HC でpH 4.0にしたPDA平板培地に, 処理後の菌叢ディスクを置床し, 分生子液は10 μ lを8 カ所に滴下または培養土約25 μ lを4 カ所に置床し, 25°C, 7 日間培養後に菌叢の出現の有無を調査した.

結果

菌叢ディスクの場合は、乾熱処理では40°Cで120 分間以上、45°Cで10 分間以上、50°Cおよび55°Cで5 分間以上、温湯処理では40°Cで180 分間以上、45°Cで30 分間以上、50°Cおよび55°Cは5 分間以上の処理で病原菌は検出されなくなった。分生子液の場合は、40°Cでは120 分間で死滅しなかったが、45°Cで10 分間以上、50°Cで3 分間以上および55°Cで1 分間以上の処理で病原菌は検出されなくなった。培養土の場合は、乾熱処理では40°Cで1,440 分間以上処理しても死滅しなかったが、45°Cで360 分間以上、50°Cで10 分間以上および55°Cで3 分間以上、温湯処理では40°Cで1,440 分間以上処理しても死滅しなかったが、両処理とも45°Cで300 分間以上、50°Cで10 分間以上および55°Cで3 分間以上で病原菌は検出されなくなった（表 31）。

表 31 ニラ紅色根腐病菌の死滅温度

供試資材 (供試菌株の形態)	処理方法	処理 温度 (°C)	処理時間 (分)													
			0	1	3	5	10	30	60	120	180	240	300	360	720	1,440
PDA菌叢ディスク (菌糸)	乾熱	25	100 ^{z)}	— ^{y)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
		40	—	100	100	100	100	100	75	0	0	0	0	0	0	0
		45	—	100	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		50	—	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		55	—	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	温湯	25	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
		40	—	100	100	100	100	100	100	75	0	0	0	0	0	0
		45	—	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		50	—	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		55	—	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
分生子液 (分生子)	温湯	25	100	—	—	—	—	—	—	100	—	—	—	—	—	—
		40	—	100	100	100	100	100	100	100	—	—	—	—	—	—
		45	—	100	100	100	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		50	—	100	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		55	—	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
培養土 (菌糸他)	乾熱 (土壌 水分率 46.6%)	25	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
		40	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		45	—	100	100	100	100	100	100	100	100	25	25	0	0	0
		50	—	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		55	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	温湯	25	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
		40	—	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		45	—	100	100	100	100	100	100	100	100	25	0	0	0	0
		50	—	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		55	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

z) 紅色根茎腐敗病菌の検出率 (%) = 菌そうの出現したディスク数 ÷ 調査ディスク数 × 100

y) —は試験を行っていないことを示す。

考察

ニラ紅色茎腐敗病菌の死滅温度を試験した結果、菌糸は、乾熱条件下では40℃では120 分間以上、45℃では10 分間以上、50℃および55℃では5 分間以上、温湯条件下では40℃では180 分間以上、45℃では30 分間以上、50℃および55℃では5 分間以上で死滅すると考えられた。分生子については、45℃では10 分間以上、50℃では3 分間以上および55℃では1 分間以上で死滅すると考えられた。また、汚染土壌中のニラ紅色根腐病菌は、乾熱条件下では45℃では360 分間以上、50℃では10 分間および55℃では3 分間以上、温湯条件下では45℃では300 分間以上、50℃では10 分間および55℃では3 分間以上で死滅すると考えられ、汚染圃場の太陽熱消毒による防除や種苗の熱消毒の基礎資料が得られた。なお、ニラの苗の生育に対する熱処理の影響については更なる検討が必要と考える。

第7節 ニラ紅色根腐病の防除法

P. terrestris によるニラ紅色根腐病は、土壤伝染する。そのため、土壤中に存在する病原菌の密度を抑制させるには、育苗圃および本圃の土壤消毒が必須となる。

土壤消毒のうち、土壤還元消毒や太陽熱消毒、化学農薬による土壤くん蒸処理については、本病に対するそれぞれの防除効果を調査した事例はあるが、同一条件下で防除効果を比較した事例はない。なお、ニラ紅色根腐病に適用のある土壤くん蒸剤は、クロルピクリンくん蒸剤（商品名；クロールピクリン液剤，クロピクテープ）、ダゾメット粉粒剤（ガスタード微粒剤，バスアミド微粒剤）のみである。しかし、ニラ栽培では、乾腐病，白絹病，白斑葉枯病，葉腐病などの複数の土壤伝染性病害が併発する可能性があるため，紅色根腐病以外の病害に適用のあるクロルピクリン錠剤，カーバムナトリウム塩液剤についても防除効果を確認する必要がある。

さらに，感染苗のの植付けや管理作業などにより本圃に持ち込まれた *P. terrestris* の二次伝染を防ぐためには，生育期の殺菌剤の土壤灌注処理が有効であると考えられる。しかし，ニラを対象に農薬登録されている生育期に土壤灌注処理が可能な殺菌剤は，ニラ乾腐病に適用のあるチオファネートメチル水和剤（商品名：トップジン M 水和剤）の1剤のみであり，ニラ紅色根腐病にはない。

ここでは，育苗圃や本圃の第一次伝染源の防除に有効な土壤消毒法の検討として，土壤還元消毒と太陽熱消毒の防除効果について検討した。また，化学農薬による土壤くん蒸剤の防除効果についても検討した。さらに，二次感染の抑制効果を明らかにするため，生育期における殺菌剤の灌注処理による防除効果についても検討した。

材料と方法

1. 土壌還元消毒および太陽熱消毒

1) 供試菌株

ニラ紅色根腐病菌 (*P. terrestris* : Ps167-1) を用いた.

2) 汚染土壌の作製

土壌ふすま培地で暗黒下, 27.5°C, 45 日間培養し, 49 倍量の高圧滅菌土壌と混和して汚染土壌とした. また, 罹病残さの有無による防除効果への影響を比較するため, 供試菌株で汚染した圃場に植付けて発病させたニラ ‘スーパーグリーンベルト’ を掘取り, その鱗茎および根を約1 cmに細断したものを罹病残さとして用いた. 1/5,000 aのワグネルポットに汚染土壌5 Lのみを詰めた汚染土壌区と, 汚染土壌5 Lと罹病ニラの残さ200 mlを詰めた汚染土壌+残さ区を設けた.

3) 土壌還元消毒および太陽熱消毒とニラの植付け

2012年9月5日に, ポットあたり20 gのふすま (1 t/10 a相当) を加えて土壌とよく混和した後, ポット内に水を溜めてから10月15日まで0.05 mm厚の透明ポリエチレンシートで空気なるべく入らないように密閉し, 土壌還元消毒区とした. また, ポットあたり稲わら約20 g (1 t/10 a相当) および石灰窒素2 g (100 kg/10 a相当) を混和した後, ポット内に水を溜めてから10月15日までシートで空気なるべく入らないように密閉し, 太陽熱消毒区とした. なお, 処理を行わず10月15日までシートを被覆した無処理区も設けた. いずれのポットとも, 最低温度を15°Cに設定したガラス室に置いた. 10月15日に, ポット内の水を落水させた後, 土壌をよく混和した. 10月25日に, ニラ ‘スーパーグリーンベルト’ を1 ポットにつき1 株ずつ植付けた後, ガラス室で管理した. なお, 各区につき5 ポットずつ用いた.

4) 酸化還元電位および温度の測定

9月5日から10月15日の間、深さ10 cmの地温を20 分間隔で測定した。9月18日および10月2日に、各5 ポットの深さ8 cmの酸化還元電位をORPメーターで測定し、各区の平均値を求めた。

5) 調査

2013年1月7日、2月1日に、第4節、3と同様に地上部の病徴を評価して、発病度を算出するとともに、発病株率については次式によって算出した。また、地上部の発病度から無処理区に対する防除価を次式によって算出した。

$$\text{発病株率 (\%)} = \text{発病株数} \div \text{調査株数} \times 100$$

$$\text{防除価} = (1 - \text{処理区の発病度} \div \text{無処理区の発病度}) \times 100.$$

2. 土壌くん蒸処理

1) 試験圃場

高知県南国市の農業技術センター内のビニールハウスの土壌を、2010年にニラ紅色根腐病 (*P. terrestris* : Ps167-1) で汚染し、ニラ‘スーパーグリーンベルト’を2010年および2011年の2 作栽培した後、ニラを除去して用いた。

2) 供試薬剤とくん蒸剤処理

第1章、第9節、2、2)と同様に行った。ただし、試験は1 区につき1 畦 (畦幅1.7 m, 長さ4.2 m, 面積7.1 m²) , 反復なしとした。くん蒸処理前の土壌の含水率 (3 地点の平均) は22.5%であった。

3) 耕種概要

第1章, 第9節, 2, 3)と同様とした。ただし, 畦幅1.7 m, 長さ4.2 m, 条間28 cm, 株間28 cm, 4条で植付け, 1畦につき52株, 反復なしとした。

4) 調査

2012年12月17日, 2013年1月7日に, 第4節, 3と同様に地上部の病徴を評価して, 発病度を算出するとともに, 第7節, 1, 5)と同様に発病株率, 防除価を算出した。

3. 殺菌剤の土壌灌注処理

1) 試験圃場

2010年にニラ紅色根腐病菌 (*P. terrestris* : Ps167-1) を接種してニラを栽培し, 発病が認められた高知県南国市の農業技術センター内のビニールハウスを用いた。2011年8月19日に, くみあいCDU複合燐加安S555 (15, 15, 15) 100 kg/10 aを元肥に施用した。

2) 耕種概要

2011年9月9日に, あらかじめ高圧滅菌土壌で約3ヶ月間育苗したニラ‘スーパーグリーンベルト’の根を2 cm残して切除し, 1穴につき1株ずつ汚染圃場に植付けた。なお, 1畦につき48株, 7.2 m², 畦幅1.8 m, 長さ4 m, 条間28 cm, 株間28 cm, 4条で植付けた。植付け後は, 最低温度25°Cで管理した。

3) 供試薬剤と処理方法

チオファネートメチル水和剤の1,000倍希釈液, ベノミル水和剤の1,000倍希釈液, トリフルミゾール水和剤 (トリフミン水和剤) の2,000倍希釈液を供試した。各処理区には, 9月16日, 10月7日, 28日の計3回, ジョウロを用いて所定濃度の供試薬剤を3 L/m²の割合で土壌灌注した。また, 薬剤を処理しない無処理区も設けた。各区につき2反復とした。

4) 調査

12月21日（植付け103 日後）に鱗茎の病徴を下記に示した指数を基準に評価し，発病度を次式によって算出した．根の発病度は第4節，3と同様に算出した．発病株率，防除価は，第7節，1，5）と同様に算出した．薬害については調査時に肉眼で適宜観察した．なお，各区につき任意の8 株を調査した．

鱗茎の指数は，症状なしを0，鱗茎の表面の1/4未満に紅変がみられるものを1，1/4以上1/2未満を2，1/2以上3/4未満を3，3/4以上を4とした．

$$\text{鱗茎の発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病株数}) \div (\text{調査株数} \times 4) \times 100$$

結果

1. 土壌還元消毒および太陽熱消毒

処理期間（2012年9月5日～10月15日）中の地温は，土壌還元消毒処理では平均で25.7°C，30°C以上の時間が129 時間であり，太陽熱消毒処理ではそれぞれ25.8°C，144 時間であった．処理開始13 日後（9月18日）の酸化還元電位は，土壌還元消毒処理では，汚染土壤区で-43.8 mV，汚染土壤+残さ区で-40.4 mV，太陽熱消毒処理は汚染土壤区で-96.0 mV，汚染土壤+残さ区で-85.4 mVであった．処理開始27 日後（10月2日）は，土壌還元消毒処理では，汚染土壤区で57.6 mV，汚染土壤+残さ区で74.4 mV，太陽熱消毒処理で汚染土壤区は57.2 mV，汚染土壤+残さ区は55.4 mVであった．

土壌還元消毒処理の1月7日および2月1日の防除価は，汚染土壤区で90.9，100.0，汚染土壤+残さ区でそれぞれ80.0，90.0であった（表 32）．太陽熱消毒処理の1月7日および2月1日の防除価は，汚染土壤区で72.7，87.5，汚染土壤+残さ区で60.0，80.0であった（表 32）．

表 32 ニラ紅色根腐病に対する土壤還元消毒および太陽熱消毒の防除効果 (2012年)

試験区	処理	1月7日			2月1日		
		発病株率 (%)	発病度	防除価	発病株率 (%)	発病度	防除価
土壤還元消毒	汚染土壤	20.0	5.0	90.9	0.0	0.0	100.0
	汚染土壤+残さ	40.0	15.0	80.0	20.0	5.0	90.0
太陽熱消毒	汚染土壤	40.0	15.0	72.7	20.0	5.0	87.5
	汚染土壤+残さ	60.0	30.0	60.0	40.0	10.0	80.0
無処理	汚染土壤	100.0	55.0	—	100.0	40.0	—
	汚染土壤+残さ	100.0	75.0	—	100.0	50.0	—

注) 各処理は、ワグネルポット (1/5000a) を用いて2012年9月5日から10月15日までガラス室内で行った。10月25日に、健全なニラをポットに植付けた後、ガラス室内で管理した。

注) 数値は5ポットの平均値を示す。

2. 土壤くん蒸処理

2012年12月17日および2013年1月7日の無防除区の発病株率がそれぞれ80.8%, 86.5%, 発病度が50.5, 44.7の多発生条件下での試験となった。クロルピクリン錠剤区では、12月17日から2013年1月7日の発病株率はそれぞれ1.9%から7.7%, 発病度は0.5から3.8, 防除価は99.0から91.4に推移した。クロルピクリンテープ区では、発病株率は7.7%から9.6%, 発病度は2.4から2.9, 防除価は95.2から93.5に推移した。ダズメット粉粒剤区では、発病株率は1.9%から7.7%, 発病度は0.5から2.9, 防除価は99.0から93.5と推移した。カーバムナトリウム塩液剤区では、発病株率は11.5%から23.1%, 発病度は3.4から6.3, 防除価は93.3から86.0に推移した (表 33)。

表 33 ニラ紅色根腐病に対する各種土壌くん蒸剤の防除効果 (2012年)

試験区	処理量	12月17日			1月7日		
		発病株率 (%)	発病度	防除価	発病株率 (%)	発病度	防除価
クロルピクリン錠剤	10,000 錠/10 a	1.9	0.5	99.0	7.7	3.8	91.4
クロルピクリンテープ	110 m/10 a	7.7	2.4	95.2	9.6	2.9	93.5
ダゾメット粉粒剤	30 kg/10 a	1.9	0.5	99.0	7.7	2.9	93.5
カーバムナトリウム塩液剤	60 L/10 a	11.5	3.4	93.3	23.1	6.3	86.0
無処理	—	80.8	50.5	—	86.5	44.7	—

注) 2012年7月31日～8月14日に各土壌消毒を処理し, 8月21日に各処理を行ったポットに健全ニラを植付けた. 調査株数は, 各区につき52株とした.

3. 殺菌剤の土壌灌注処理

無処理区では発病株率が56.3%, 発病度が鱗茎で7.9, 根で11.0であったのに対し, チオファネートメチル水和剤区ではそれぞれ37.5%, 4.7, 7.9, 防除価は33.4, ベノミル水和剤区では, 25.0%, 3.1, 3.2, 防除価は55.6であった. トリフルミゾール水和剤区での発病は認められず, 防除価は100であった. なお, いずれの薬剤も薬害は認められなかった (表 34).

表 34 ニラ紅色根腐病に対する殺菌剤の灌注処理による防除効果 (2011年)

試験区	希釈倍率 (処理量)	発病株 率 (%)	発病度		防除価	薬害 ^{z)}
			鱗茎	根		
チオファネートメチル水和剤	1,000倍 (3 L/ m ²)	37.5	4.7	7.9	33.4	—
ベノミル水和剤	1,000倍 (3 L/ m ²)	25.0	3.1	3.2	55.6	—
トリフルミゾール水和剤	2,000倍 (3 L/ m ²)	0.0	0.0	0.0	100.0	—
無処理	—	56.3	7.9	11.0	—	—

z) 薬害:—, 無し

注) 2011年9月9日に, 健全なニラをビニールハウス内に植付けた.

注) 各薬剤の3 L/m²相当を, 9月16日, 10月7日, 10月28日の計3回灌注処理した.

注) 調査は, 2011年12月21日(植付け103日後)に行った.

注) 数値は, 発病株率では各区につき48株の2反復, 発病度では各区につき8株の2反復の平均値を示す.

考察

ニラ紅色根腐病に対する土壌消毒, 土壌くん蒸剤および生育期の殺菌剤の防除効果を調査した結果, 土壌還元消毒および太陽熱消毒の防除効果が認められ, 両処理とも罹病残さが無い方が防除効果が高い傾向であった. また, ニラ紅色根腐病の高汚染圃場における土壌くん蒸剤の防除効果は, クロルピクリン錠剤, クロルピクリンテープ, ダゾメット粉粒剤, カーバムナトリウム塩液剤とも高いと考えられた. さらに, 生育期の殺菌剤については, 今回供試した3剤のうちトリフルミゾール水和剤(2,000倍希釈液, 3 L/m²)の土壌灌注処理が最も高く, 次いでベノミル水和剤(1,000倍希釈液, 3 L/m²)の土壌灌注処理が高いことが明らかとなった.

第3章 ショウガ疫病（新称）の発生生態と防除

1997年6月に高知県高知市および南国市の露地栽培ショウガ (*Zingiber officinale* Rosc.) で、生育中の偽茎の地際部が水浸状に腐敗して倒伏する障害が発生した。また、同年産のショウガ根茎が、収穫後の低温貯蔵中に褐変・腐敗した。2004年10月にも高知市の生育中の露地ショウガに偽茎の地際部に水浸症状を伴う障害が発生した。このような症状を呈するショウガの病害として、*Pythium zingiberis* (*P. myriotylum* と同じ) による根茎腐敗病(桂・谷岡, 1967), *Ralstonia solanacearum* による青枯病(土屋ら, 1999), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* などによる腐敗病(中沢・加藤, 1953) などがすでに知られている。しかし、本障害は、根茎腐敗病や青枯病のように夏期の高温期に発生して急速に周辺株に拡大することではなく、発症時期がやや低温期であること、また、青枯病に特有の偽茎からの細菌泥の流出がなく、腐敗病に特有の悪臭を伴っていないことなどから、これらの病害とは異なると考えられた。

そこで、本研究では、罹病部から病原菌を分離し、それをショウガに接種して病原性の確認と分類学的所属について調査を行い、本障害が *Phytophthora citrophthora* (R. E. Smith and E. H. Smith) Leonian による病害であることを明らかにし、ショウガ疫病として報告した。

ショウガ疫病は、生育期間中のみならず貯蔵中および調整・出荷後においても発生するため、詳しい発生生態は明らかにされておらず、防除対策も検討されていなかった。そこで、本研究ではショウガ疫病菌の発病適温、露地栽培条件下や貯蔵期間中の発生調査、各種植物に対する病原性調査を行い、ショウガ疫病の発生生態を明らかにするとともに、土壌還元消毒、湛水処理、土壌くん蒸剤および生育中の殺菌剤の防除効果を明らかにした。

第1節 病原菌の同定

露地栽培のショウガで、偽茎の地際部が暗緑色の水浸状となるとともに、葉が黄化し、根茎や根が褐変する障害が発生した（写真 l）。根茎内部は水浸状の淡褐色を呈し、症状がすすむと軟化・腐敗した（写真 m）。また、収穫後の 15°C 貯蔵中のショウガや出荷後のショウガにおいても、根茎が腐敗する事例が発生した（写真 n）。

そこで、露地栽培されたショウガ根茎の罹病部から糸状菌を分離し、分離菌をショウガポット苗およびショウガ根茎に接種して病原性の確認を行うとともに、分類学的所属の調査を行った。

材料と方法

1. 供試菌株（病原菌の分離と保存）

小林・松岡（1999）が高知県高知市および南国市のショウガ根茎の罹病組織から分離し、農業生物資源研究所ジーンバンクに寄託した 4 菌株（MAFF 238158, MAFF 238159, MAFF 238160, MAFF 238161）を供試菌株とした。また、2004 年 10 月に高知県高知市、2008 年 6 月に徳島県名西郡石井町でそれぞれ採取したショウガ根茎の罹病部と健全部の境界部分から小片を切り取り、70%エタノールに 30 秒間、2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 60 秒間浸漬した後、滅菌水で水洗し、滅菌ろ紙で水分を拭き取って 2%寒天培地に置いて単菌糸分離した後、さらに単遊走子分離した 2 菌株（ZPM-22, T-1-3）も供試菌株とした（表 35）。



- l 生産圃場でショウガの偽茎に生じたショウガ疫病の病徴
- m 生産圃場でショウガの根茎に生じたショウガ疫病の病徴
- n 出荷後にショウガの根茎に生じたショウガ疫病の菌糸

表 35 供試菌株の由来

供試菌株	分離作物	罹病植物の採取地	分離年月日
MAFF 238158	ショウガ	高知県南国市	1998.6
MAFF 238159	ショウガ	高知県南国市	1998.6
MAFF 238160	ショウガ	高知県南国市	1998.6
MAFF 238161	ショウガ	高知県南国市	1998.6
ZPM-22	ショウガ	高知県南国市	2004.1
T-1-3	ショウガ	徳島県名西郡石井町	2008.6

2. 病原性試験

1) ショウガポット苗への接種

(1) 接種源の調製

供試菌株を V-8 ジュース寒天平板培地上に置いた滅菌ろ紙（直径 9 cm のろ紙を扇型に 6 等分したもの 5 枚）に移植し、25°C、暗黒下で 14 日間培養後、ろ紙を剥がして滅菌水で 3 回洗浄した。このろ紙を直径 9 cm のペトリ皿中の滅菌水 20 ml に浸漬し、25°C、蛍光灯照射下（20,000 lux, 16 時間日長）で 1 日間静置した後、さらに 5°C に 1 時間静置して遊走子を放出させ、滅菌水を用いて 1.0×10^3 個/ml に調製した遊走子懸濁液を接種源とした。

(2) 接種

直径 9 cm のポリエチレンポットで栽培した 7 葉期のショウガ（大ショウガ，土佐一）の偽茎の地際部と根茎に針で数 mm の深さの傷を 5 ヶ所付け、遊走子懸濁液を 20 ml 灌注した。各菌株につきショウガ 3 株を用い、接種後は 25°C、蛍光灯照射下（20,000 lux, 16 時間日長）の人工気象器内で管理した。なお、対照として遊走子懸濁液の代わりに滅菌水を

同様に処理した.

2) ショウガ根茎への接種

(1) 接種源の調製

第3章, 第1節, 2, 1), (1) と同様に行った.

(2) 接種

あらかじめ 30°C の恒温器内に約 2 週間置いて萌芽させたショウガ根茎を各供試菌株の遊走子懸濁液に浸漬し, 23°C, 暗黒下で 1 日間静置後, ビニール袋内に密閉して 25°C, 暗黒下に保った. 対照として遊走子懸濁液の代わりに滅菌水を用いた.

3) 病原菌の培養性状, 生育温度および形態的特徴

(1) 培養性状

供試菌株を, PDA 平板培地上で 25°C, 暗黒下で 6 日間前培養し, 菌叢の周縁部を直径 6 mm のコルクボーラーで打ち抜いた菌叢ディスクを PDA 平板培地の中央に置床し, 23°C, 10 日後に目視により観察した.

(2) 生育温度

供試菌株を, PDA 平板培地上で 25°C, 暗黒下で 6 日間前培養し, 菌叢の周縁部を直径 6 mm のコルクボーラーで打ち抜いた菌叢ディスクを PDA 平板培地の中央に置床した後, 5, 10, 15, 20, 23, 25, 28, 30, 35, 40°C, 暗黒下で培養し, 4 日後に菌叢の直径を測定して 3 反復の平均値から 1 日当たりの菌糸伸長 (mm/日) を算出した.

(3) 形態観察

供試菌株を, V-8 ジュース寒天平板培地上で 25°C, 暗黒下, 7 日間培養後, 滅菌済みのアサ (*Cannabis sativa* L.) の種子を菌叢上に置き, さらに 2 日後, 菌糸で覆われた種子を取

り出して滅菌水の入ったシャーレに移し、0.2 μm のメンブレンフィルターで濾過した河水を入れ、25°C、蛍光灯照射下（20,000 lux、16 時間日長）に置いて 2 日後に観察した。

4) rDNA-ITS 領域の塩基配列の相同性検索

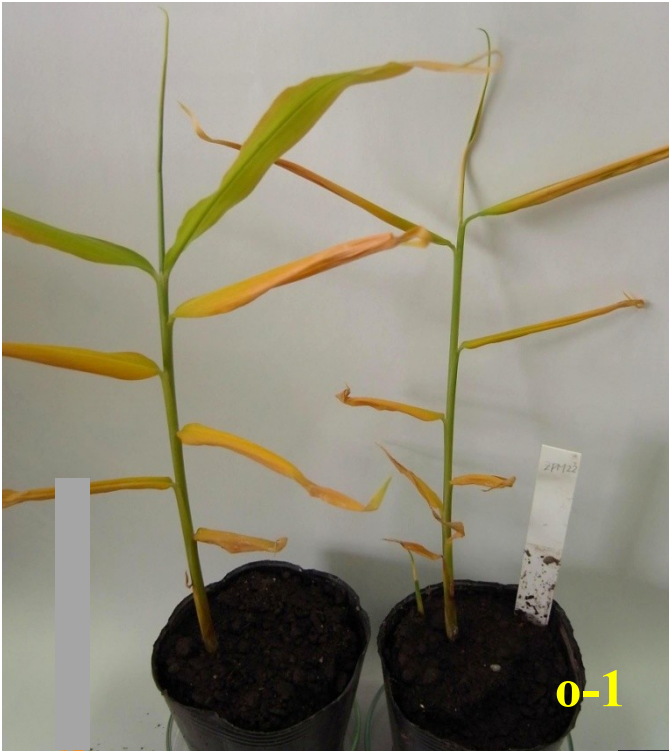
Wang and White (1997) の方法を一部改変して供試菌株の DNA を抽出した。すなわち、V-8 ジュース寒天培地上で 25°C、10 日間培養後、スパチュラで気中菌糸を約 200 mg かき取り、-80°C で一晩凍結させた。これを-80°C に冷却した乳棒と乳鉢を用いて粉碎し、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 緩衝液 (1% CTAB, 100 mM Tris-HCl・pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA・pH 8.0, 2% PVP-10, 0.5% 2-メルカプトエタノール) 1 ml に懸濁させた。クロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) による精製とイソプロパノールによる沈殿後、トリス-EDTA 緩衝液 100 μl に溶解させて鋳型 DNA とした。White *et al.* (1990) の方法に従ってプライマー ITS1 および ITS4 を用いて rDNA-ITS 領域を PCR (TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, タカラバイオ) で増幅した。得られた約 800 bp の DNA 断片の塩基配列を、シグマアルドリッチジャパン (株) に依頼して解析し、DDBJ に登録されている塩基配列との相同性検索を実施した。

結果

1. ショウガに対する病原性

1) ショウガポット苗に対する病原性

いずれの供試菌株を接種したショウガとも、接種 7 日後には地際部が褐色水浸状に変色し、症状が進行すると下葉の葉縁から黄化し、中肋を境にして葉裏側へ湾曲して萎れた (写真 o-1, o-2)。さらに症状が進行すると、上位葉にも黄化がみられ、接種 14 日目には地際



- o-1 灌注接種（供試菌株：ZPM-22）によりショウガの偽茎に生じた病徴
- o-2 灌注接種（MAFF 238159）によりショウガポット苗に生じた病徴
- p-1 浸漬接種（T-1-3）によりショウガの根茎表面や萌芽部に生じた菌糸
- p-2 浸漬接種（T-1-3）によりショウガの根茎内部に生じた褐色水浸状の腐敗

を顕微鏡観察すると無隔壁の菌糸が観察された。

2) ショウガ根茎に対する病原性

いずれの供試菌株を接種した根茎とも、接種 2 日後には芽が淡褐色に変色し、接種 7 日後には萌芽部や根茎表面が白色の菌糸で覆われた (写真 p-1)。根茎を切断すると内部は褐色水浸状に腐敗し (写真 p-2)、罹病組織を顕微鏡観察すると無隔壁の菌糸が確認された。

これらの症状はいずれも原病徴と一致し、病斑部からは接種菌と同様な糸状菌が再分離された。以上のことから、分離菌が本障害の病原であることが明らかになった。

2. 病原菌の培養性状、生育温度および形態的特徴

1) 培養性状

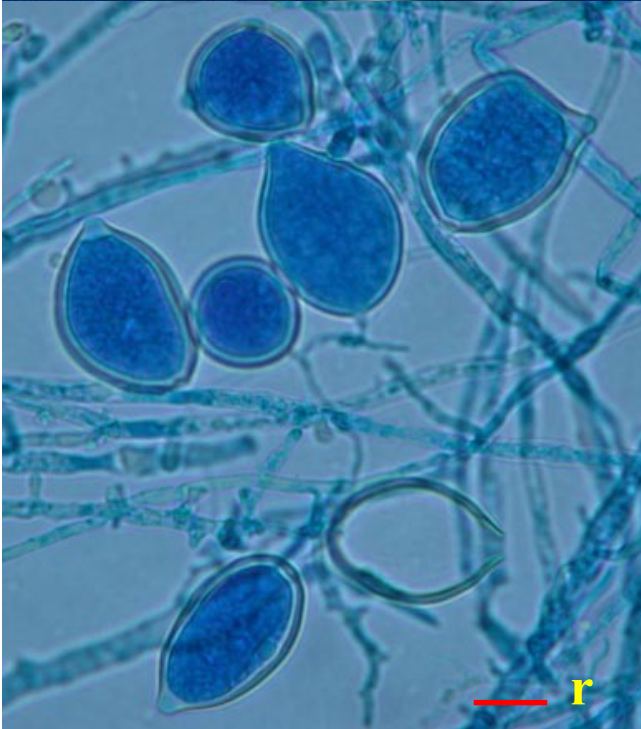
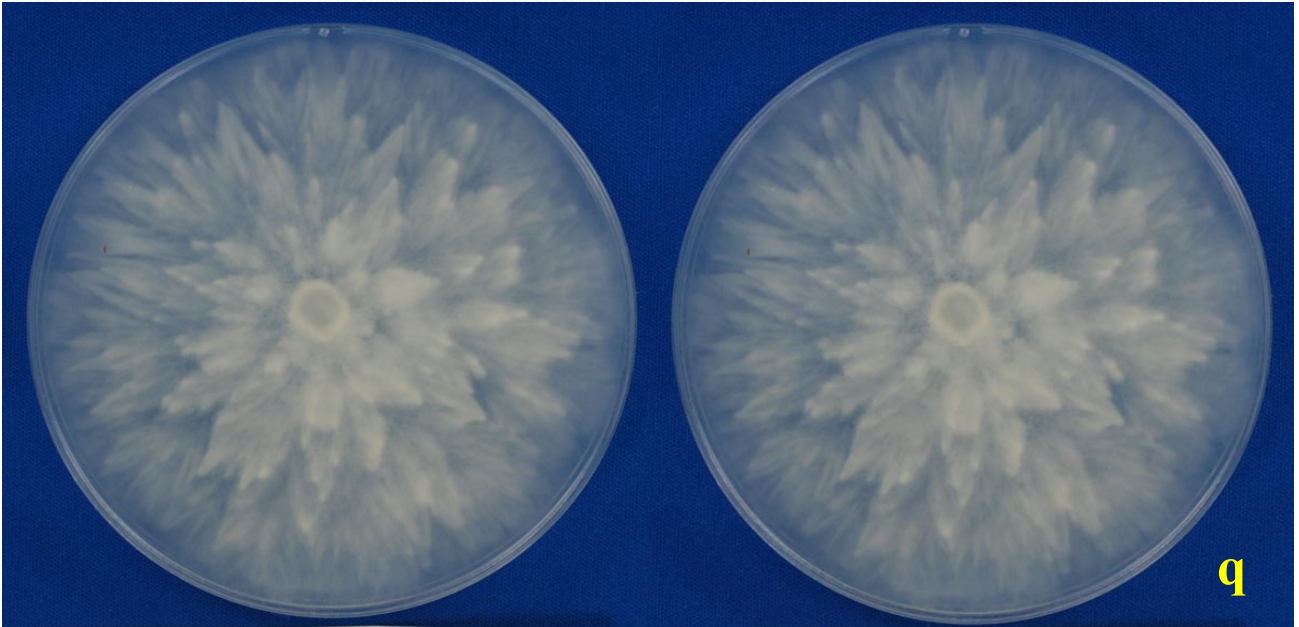
いずれの供試菌株とも、菌糸に隔壁が認められず、PDA 平板培地上で、白色、放射状の菌叢を形成し、気中菌糸をわずかに形成した (写真 q)。

2) 生育温度

いずれの供試菌株とも、10~30°C で菌糸の伸長がみられ、23°C が生育適温であった (図 14)。

3) 形態

いずれの供試菌株とも遊走子のうの形は球形、楕円形など変化に富み、顕著な乳頭突起を 1~2 個有した。大きさは、MAFF 238158 で 35-90×20-50 μm (平均 56.1×32.6 μm)、MAFF 238159 で 35-85×20-45 μm (平均 53.5×31.2 μm)、ZPM-22 で 30-65×20-40 μm (平均 50.0×25.0 μm)、T-1-3 で 30-65×20-50 μm (平均 55.0×30.0 μm)、L/B 比はそれぞれ 1.1-3.0 (平均 1.7)、1.1-3.0 (平均 1.7)、1.0-2.2 (平均 1.6)、0.9-2.3 (平均 1.5) であった。また、



- q 供試菌株 (T-1-3) の菌叢 (PDA 培地, 23°C, 10 日後, 左: 表面; 右: 裏面)
- r 供試菌株 (T-1-3) の遊走子のう (ラクトフェノール コットンブルーによる染色)
バーの長さ: r, 20 μ m

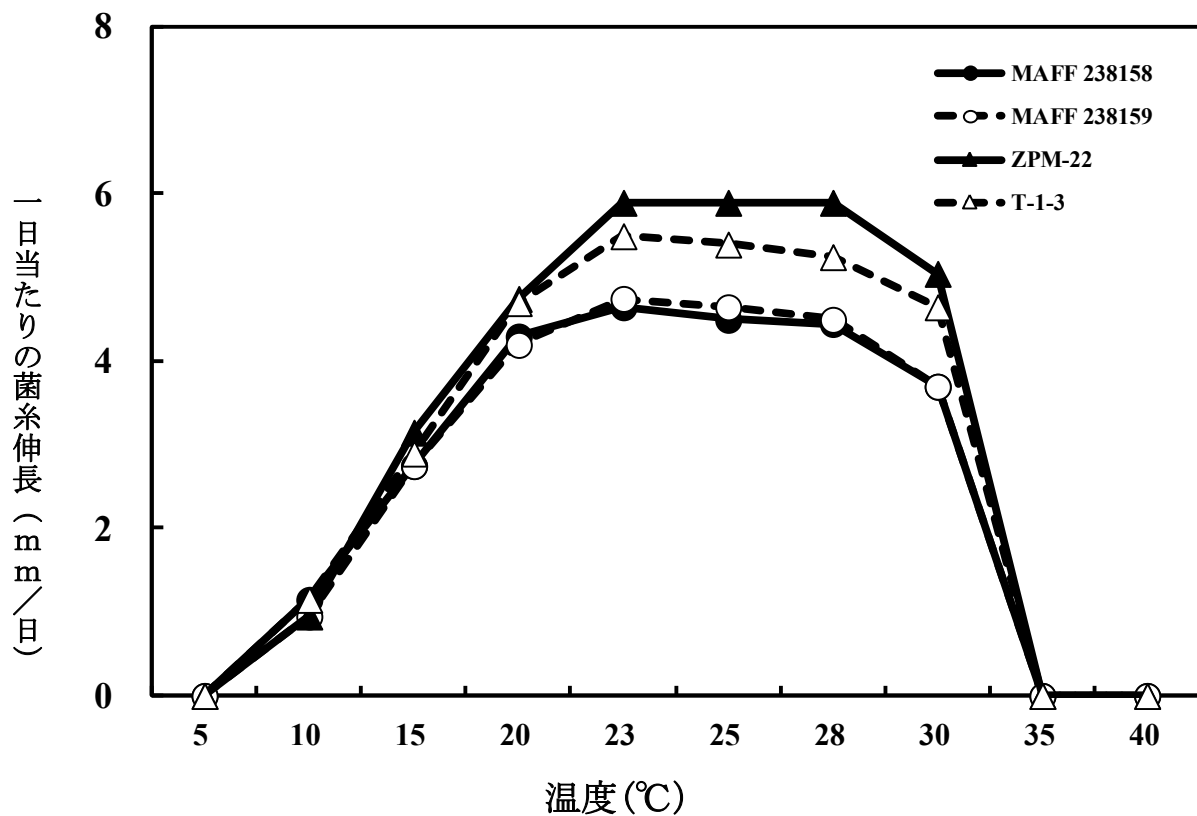


図 14 供試菌株 (MAFF238158, MAFF238159, ZPM-22, T-1-3) の一日当たりの菌糸伸長

孔口は小さく，非脱落性であった．遊走子のうの形成様式はシンポジオ型で外部増殖性であった．(写真 r)．いずれの菌株も単独培養では有性器官を形成しなかった．

これら形態的特徴は Mchau and Coffey (1994) が報告した *Phytophthora citrophthora* (R. E. Smith and E. H. Smith) Leonian とよく一致し，生育温度や有性器官の形成に係わる性状も Erwin and Ribeiro (1996) の記載と一致した (表 36)．

表 36 供試菌株 (MAFF 238158, MAFF 238159, ZPM-22, T-1-3) の形態

	供試菌株				既報の <i>Phytophthora citrophthora</i>
	MAFF 238158	MAFF 238159	ZPM-22	T-1-3	Mchau and Coffey (1994)
形	球形, 卵形, 楕円形, 卵形, 肝臓形など (多様)	球形, 卵形, 楕円形, 卵形, 肝臓形など (多様)	球形, 卵形, 楕円形, 卵形, 肝臓形など (多様)	球形, 卵形, 楕円形, 卵形, 肝臓形など (多様)	球形, 楕円形, 卵形, レモン形, ときにゆがんだ形など (多様)
大きさ ^{z)}	35-90×20-50 (56.1×32.6)	35-85×20-45 (53.5×31.2)	30-65×20-40 (50.0×25.0)	30-65×20-50 (55.0×30.0)	27±3.4 - 65.3 ± 13.9 × 18.9 ± 1.8 - 40.4±5.6
L/B比	1.1-3.0(1.7)	1.1-3.0(1.7)	1.0-2.2(1.6)	0.9-2.3(1.5)	1.3:1±0.2 - 1.8:1±0.1
遊走子のう					
乳頭突起	顕著 1つまたは2つ形成	顕著 1つまたは2つ形成	顕著 1つまたは2つ形成	顕著 1つまたは2つ形成	1つ, まれに2つある いは複数形成される場合もある
脱落性	非脱落性	非脱落性	非脱落性	非脱落性	非脱落性
孔口	小さい	小さい	小さい	小さい	—
形成様式	外部増殖性 シンボジオ形	外部増殖性 シンボジオ形	外部増殖性 シンボジオ形	外部増殖性 シンボジオ形	— シンボジオ形

z) 数値は遊走子のう100個の平均値を示す。

3. rDNA-ITS 領域の塩基配列の相同性検索

MAFF 238158 (AccseeinNO.AB 646231) および MAFF 238159 (AB 646232) の rDNA-ITS 領域の塩基配列は, 両菌株とも既報の *P. citrophthora* (AF 266785 ; Cooke *et al.*, 2000) の配列と 624bp のうち 619bp が一致し, 99.2%の相同性が認められた. ZPM-22 (AB 644402) および T-1-3 (AB 644403) は, 両菌株とも既報の *P. citrophthora* (AF 266785 :Cooke *et al.*, 2000) の配列と 668 bp のうち 663 bp が一致し, 99.3%の相同性が認められた. 以上の形態的特徴と rDNA-ITS 領域の塩基配列から, 本菌を *P. citrophthora* と同定した.

なお, 本研究で明らかとなった DNA 塩基配列は DDBJ/EMBL/GeneBankDNA データベースに Accession NO.AB 646231 (菌株名 : MAFF 238158), AB 646232 (菌株名 : MAFF 238159), AB 644402 (菌株名 : ZPM-22) および AB 644403 (T-1-3) として登録した.

考察

罹病ショウガから分離された菌株を接種した結果、生育中におけるショウガ疫病の病徴は、はじめ偽茎の地際部が褐色の水浸状を呈し、その後葉は徐々に黄化し、やがて中肋を境にして葉裏側へ湾曲して萎れ、最後には地際部から倒伏した。根茎や根は褐変し、根茎内部は淡褐色を呈し、症状が進むと軟化・腐敗した。貯蔵中の根茎の病徴は、芽が淡褐色に変色しは萌芽部や根茎表面が白色の菌糸で覆われ、根茎内部は褐色水浸状に腐敗した。これらの結果から、罹病ショウガから分離された菌株は、栽培期のショウガならびに貯蔵中のショウガ根茎に対して病原性を有することが明らかとなった。

また、本節において、罹病ショウガから分離された病原菌を、培養性状、形態観察および系統解析により *P. citrophthora* であることが明らかとなった。日本国内における *P. citrophthora* による病害については、オウレン（伊阪・岡本, 1982 ; 伊阪・岡本, 1983）、トルコギキョウ（植松ら, 1996）、キウイフルーツ（植松ら, 1998）、カナリーキツタ（植松ら, 1998）、カキ（三好・清水, 2006）、イチジク（桂・山本, 1969）およびカンキツ類で発生の報告があり、カンキツ類では発生する部位により褐色腐敗病（瀧元, 1941）、疫病（横山・吉田, 1960）およびすそ腐れ症状（入江・神納, 1978）の病名が用いられている。また、*P. citrophthora* は海外では果樹などの病原菌として報告されている（Erwin and Riberio, 1996）が、ショウガでの報告はない。なお、*P. nicotianae* var. *parasitica* によるショウガの腐敗がブラジルで報告されている（Pimentel *et al.*, 1991）が、*P. citrophthora* の報告は認められなかった。このように、本研究によって、*P. citrophthora* によるショウガの病害が初めて明らかになったことから、本病名を新たにショウガ疫病と命名した。また、英名については、Pimentel *et al.*（1991）および小林・松岡（1999）は soft rot を提案しており、日本植物病名目録（日

本植物病理学会, 2000) にも同様に記載されているが, **soft rot** は軟腐病の英名として用いられることが多い。海外では *Pythium* 属菌によるショウガの根茎腐敗の病名として用いられており (Dohroo, 2005) 混乱を招きやすい。キュウリやメロンなどの疫病には *Phytophthora rot* が用いられることが多いことから, ショウガ疫病の英名を *Phytophthora rot* とすることを併せて提案した (山崎ら, 2009a ; 山崎ら, 2011a)。

第2節 各種植物に対する病原性

Phytophthora 属菌には、観賞用植物、果樹、材木など 44 科 83 属以上に自然感染する *P. cactorum* や、カカオ、ゴム、パイナップルなど 138 属以上に自然感染する *P. palmivora* の様に多犯性の種もあるが、ウリ科とナス科にのみの *P. capsici*, ナス科の一部のみの *P. infestans* などの様に宿主範囲が限定されている種もある (渡邊, 1998).

本節では、ショウガ疫病菌である *P. citrophthora* の宿主範囲について調査した.

材料と方法

1. 供試植物

ウコン「春ウコン」、クルクマ「クルクマ・シャローム (俗名)」, ミョウガ「夏ミョウガ」, キュウリ「ZQ-2」, メロン「アールス雅春秋系」, トマト「ハウス桃太郎」, ナス「竜馬」, ピーマン「京波」, オクラ「アーリーファイブ」, ハクサイ「無双」, キャベツ「金系 201 号」, サヤインゲン「ベストクroppキセラ」, ニラ「スーパーグリーンベルト」, ネギ「雷山」を 2008 年 9 月 5 日に高圧滅菌土壌に播種または植付けし、ガラス室内で育苗した.

2. 供試菌株

ショウガ疫病菌 (*P. citrophthora* : T-1-3) を用いた (表 35).

3. 接種源の調製

第3章, 第1節, 2, 1), (1) と同様に行った. なお, 遊走子懸濁液の濃度は 5.0×10^2 個/ml とした.

4. 接種

9月26日にはウコン、キュウリ、メロン、ハクサイ、オクラ、サヤインゲンを、10月1日にはクルクマ、ミョウガ、トマト、ナス、キャベツを、10月15日にはピーマン、ニラ、ネギを、直径9または12 cmのポリエチレンポットに1株ずつ移植した。接種は、供試作物の地際部5ヶ所に針で付傷させた後、遊走子懸濁液を5 L入れた接種槽(縦40 ×横47 ×深さ22cm)に、植物の地際部が浸る深さになるようポットごと入れて、室温で24時間浸漬して行った。各植物とも5ポットずつ用いた。接種後は、接種槽からとり出してガラス室内で栽培した。なお、対照区には、遊走子懸濁液の代わりに滅菌水を用いた。

5. 調査

接種開始から5, 10, 14, 18日後に病徴の有無を観察し、発病がみられた植物については、18日後に病斑部から供試菌株の再分離を試みた。

結果

ショウガ疫病菌の宿主範囲を明らかにするため、遊走子懸濁液を用いて14植物に対する接種試験を行った結果、接種5日後に、ミョウガでは地際部および花蕾が水浸症状を呈し、ナスでは地上部が萎凋、枯死した。キャベツ、サヤインゲンでは地際部が黒変してくびれを生じた。ウコン、クルクマ、オクラでは付傷部が変色したが、調査期間中には地上部の異常はみられなかった。一方、キュウリ、メロン、トマト、ピーマン、ハクサイ、ニラ、ネギでは接種14, 18日後においても異常はみられなかった。なお、ミョウガ、ナス、キャベツおよびサヤインゲンの病徴部からは接種菌が再分離された(表37)。

表 37 ショウガ疫病の各植物に対する病原性

作物名	品種名	病徴	再分離 ^{z)}
ウコン	春ウコン	—	NT
クルクマ	クルクマ・シャローム (俗名)	—	NT
ミョウガ	夏ミョウガ	地際部および花蕾が水浸 状に腐敗	+
キュウリ	ZQ-2	—	NT
メロン	アールス雅春秋系	—	NT
トマト	ハウス桃太郎	—	NT
ナス	竜馬	地際部の黒変, くびれ 症状が進むと萎凋, 枯死	+
ピーマン	京波	—	NT
オクラ	アーリーファイブ	—	NT
ハクサイ	無双	—	NT
キャベツ	金系201号	地際部の黒変, くびれ	+
サヤインゲン	ベストクroppキセラ	地際部の黒変, くびれ	+
ニラ	スーパーグリーンベルト	—	NT
ネギ	雷山	—	NT

z) 再分離：+, あり；-, なし；NT, 再分離を行っていない。

考察

ショウガ疫病菌と同じ *P. citrophthora* による病害として, 日本国内ではオウレン (伊阪・岡本, 1982; 伊阪・岡本, 1983), トルコギキョウ (植松ら, 1996), キウイフルーツ (植松ら, 1998), カナリーキツタ (植松ら, 1998), カキ (三好・清水, 2006), イチジク (桂・山本, 1969)

およびカンキツ類に発生の報告があるが、いずれも宿主範囲に関する報告はない。

そこで、ショウガ疫病菌の宿主範囲を調査した結果、ショウガ、ナス、キャベツ、サヤインゲンには病原性を示し、キュウリ、メロン、トマト、ピーマン、ハクサイ、ニラ、ネギには病原性が認められなかった。ショウガは水田の転換作物として栽培される場合が多いが、ショウガ疫病が発生した圃場の後作や転作には、ショウガの他、ミョウガ、ナス、キャベツ、サヤインゲンを栽培することは避ける必要があると考えられた。

第3節 発病適温

ショウガ疫病の発病時期は年2回あるとされているものの、明確な報告はされていなかった（小林ら, 1999）。また、ショウガ疫病は、露地ショウガで最も被害の大きいショウガ根茎腐敗病菌と同様の病徴を示す（山崎, 2011b）が、発病適温等については明らかにされていなかった。

そのため、生育中のショウガにショウガ疫病菌が伝染することを想定して、ショウガ疫病の遊走子懸濁液をショウガに浸漬接種し、各温度条件下での発病調査を行った。

材料と方法

1. 供試作物

直径9 cm のポリエチレンポットで栽培した7葉期のショウガ（大ショウガ，土佐一）のを用いた。

2. 供試菌株

ショウガ疫病菌（*P. citrophthora* : T-1-3）を用いた（表 35）。

3. 接種源の調製

第3章，第1節，2，1），（1）と同様に行った。

4. 接種

ショウガの偽茎の地際部に針で傷をつけ，500 ml 容のビーカーに入れた後，地際部が浸

る深さになるように遊走子懸濁液 250 ml を注入し，10，15，20，25，30°C に設定した人工気象器（20,000 lux1，6 時間日長）に 24 時間置いた．その後，ポットをビーカーから出して，引き続き同温度の人工気象器内で管理した．各温度につき 3 ポットずつ用いた．

5. 調査

接種開始から 10 日後に，病徴をそれぞれ下記に示した指数を基準に評価し，発病度を次式により算出した．また，発病株率を次式により算出した．指数は，症状なしを 0，地際部が褐変または水浸状となるを 2，地上部が萎凋するを 3，地上部が枯死するを 4 とした．

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病株数}) \times 100 \div (\text{調査株数} \times 4)$$

$$\text{発病株率} (\%) = \text{発病株数} \div \text{調査株数} \times 100$$

結果

シヨウガ疫病菌の遊走子懸濁液を接種した結果，調査した接種時および接種後の管理度が 10°C～30°C の範囲において全株に発病がみられ，発病度は 20°C で最も高かった（表 38）．

表 38 シヨウガ疫病の発病適温

接種および 管理温度(°C)	接種10日後	
	発病株率 (%)	発病度
10	100.0	33.3
15	100.0	66.7
20	100.0	100.0
25	100.0	66.7
30	100.0	58.3

考察

ショウガの栽培期間中における発病

温度を明らかにするため、ショウガ疫病の発病適温を調査した結果、発病温度は 10°C～30°C、発病適温は 20°C であった。

栽培期間中のショウガにショウガ疫病と同様な病徴を示す病害として、ショウガ根茎腐敗病(病原:*Pythium zingiberum* (*P. myriotylum* と同一種とされる. Lévesque and De Cock , 2004; Villa *et al.*, 2006)) があるが、ショウガ幼苗によるポット試験の結果、ショウガ根茎腐敗病は 20°C 以上で発病し、25°C と比べて 32°C での発病進展が著しい(山崎, 2011b) と報告されていることから、本研究によって、ショウガ疫病はショウガ根茎腐敗病より低い温度で発病し始め、発病適温も低いことが明らかとなった。

これらの結果は、露地圃場にけるショウガ疫病の発病時期の目安となるとともに、類似病害であるショウガ根茎腐敗病との発病時期の違いを明らかにできる考えられた。なお、露地栽培条件下のショウガ疫病の発病時期については第 5 節で述べる。

第4節 露地栽培条件下の発病時期

ショウガ疫病は、生育中の露地ショウガの偽茎の地際部に水浸症状を伴うが、類似の病徴を示す病害として、*Pythium zingiberis* (= *P. myriotylum*) による根茎腐敗病（桂・谷岡, 1967）, *Ralstonia solanacearum*による青枯病（土屋ら, 1999）, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*などによる腐敗病（中沢・加藤, 1953）などがすでに知られている。特に、同じ卵菌類に属するショウガ根茎腐敗病は、地上部や根茎の病徴がショウガ疫病と酷似しており、病徴での判別は困難である。また、両病害とも種根茎伝染、土壌伝染、水媒伝染する。なお、高知県の露地栽培では、ショウガ根茎腐敗病は、年によって多少の早晚はあるものの概ね6月中下旬から発生がみられ始め、7月から8月にかけて急増する。そして、気温の低下に伴って新たな発生がみられなくなる。また、ショウガ根茎腐敗病は、貯蔵中に根茎を腐敗させることはないとされている。一方、ショウガ疫病については、栽培期間中の発病時期は年2回あり、貯蔵中にも発生すると報告されているものの（小林ら, 1999）、詳細な調査事例はない。

そのため、本節では、ショウガ疫病の露地栽培条件下における発病時期について、露地圃場での発病調査を行った。

材料と方法

2008年4月8日に、前年度に疫病が発生した当センター内露地圃場（85.6 m²）にショウガを290株植付けた。土壌消毒は行わず、元肥として土根壤[®]（N-P-K=8-10-8）275 kg/10a、鶏糞450 kg/10aを施用し、その他の管理は慣行に従った。5月17日から10月15日までほぼ7日間隔で地上部の発病の有無を目視により調査し、新たに発生した発病株の発病株率を算出した。

なお、初夏では調査の度に発病株の抜き取りを行ったが、秋期では行わなかった。また、試験期間中の地温（畦の表面から深さ15 cm）を測定するとともに、アメダス（後免）の気温と降水量データを用い、温度および降雨と発病時期との関係を検討した。

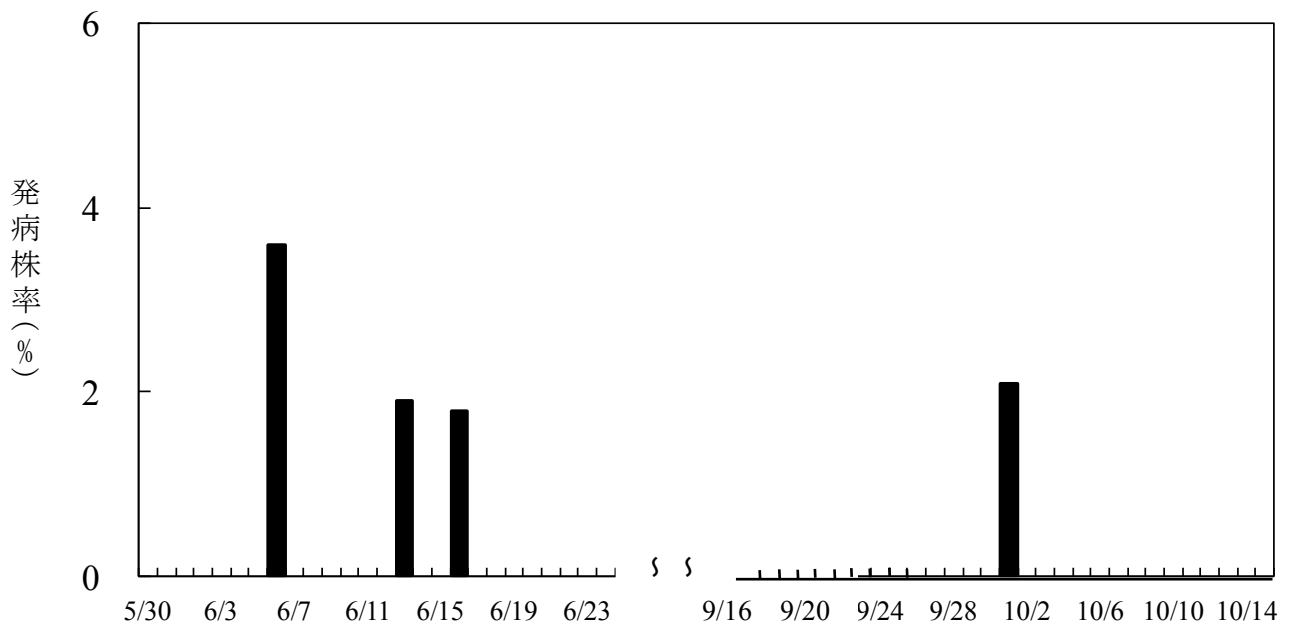
結果

露地圃場におけるショウガ疫病の病徴を調査した結果、はじめ偽茎の地際部が暗緑色の水浸状に変色して腐敗し、葉は徐々に黄化し、やがて中肋を境にして葉裏側へ湾曲してしおれ、最後には倒伏した（写真 s）。根茎や根は褐変し、根茎内部は水浸状の淡褐色を呈し、症状がすすむと軟化・腐敗した（写真 t）。

また、露地ショウガにけるショウガ疫病の発病時期を調査した結果、6月6日に初発を確認した後、6月13、16日の調査で新たな発病が認められた。その後、10月1日の調査まで発病はみられなかった。10月1日に再び発病を確認したが、その後、調査終了時の10月15日まで新たな発病は認められなかった（図 15-1）。本病原菌の発病適温調査の結果から、接種時および接種後の管理温度が20°Cの場合、接種開始から2日後には発病が確認されたため、発生確認2日前から発生確認日までの3日間の平均地温、平均気温および積算降水量について調査したところ、発病が初夏の初発確認日である6月6日の平均地温（15 cm）は21.8°C、平均気温は20.7°C、積算降水量は68.0 mmであった。なお、初発日以降は、6月13日ではそれぞれ21.5°C、23.5°C、51.0 mm、6月16日では21.8°C、23.0°C、17.0 mmであった。また秋期の初発確認日である10月1日ではそれぞれ22.0°C、21.9°C、60.0 mmであった（図 15-2）。

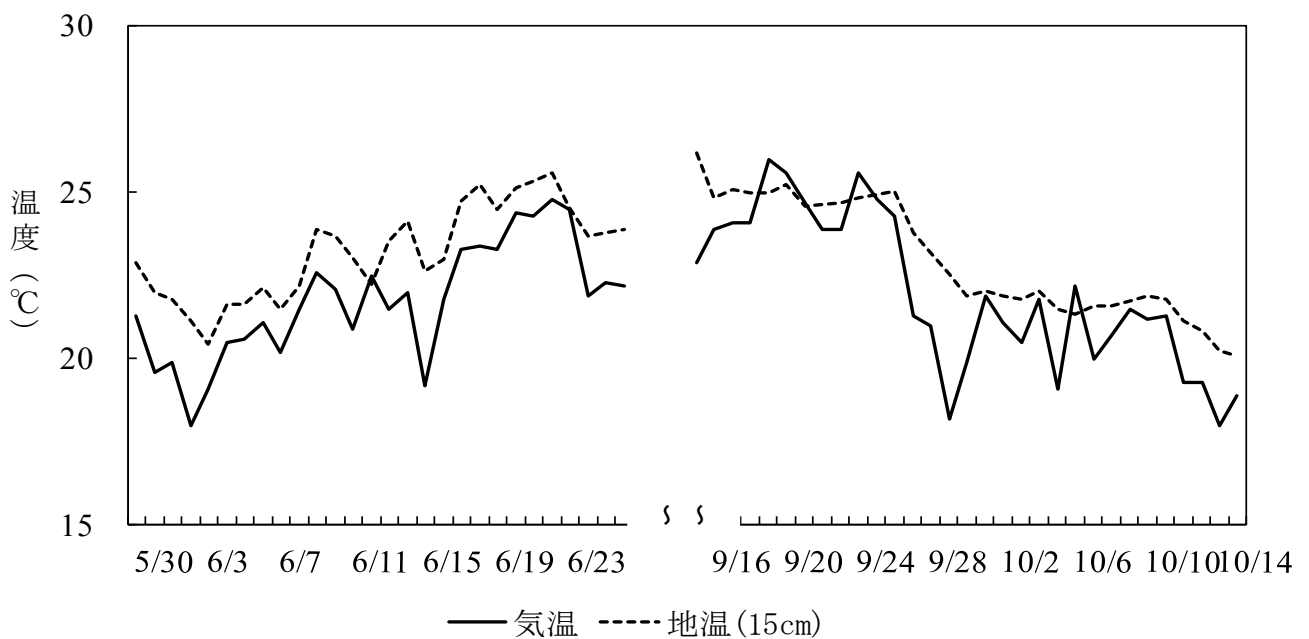


- s 露地圃場におけるショウガ疫病の発病の様子
- t 露地圃場でショウガ疫病に罹病したショウガ根茎に生じた病徴



注) 初夏の発病株は調査ごとに除去し，秋期は除去しなかった。

図 15-1 露地圃場でのショウガ疫病の発生推移(2008)



注) 調査地点：アメダス（後免）

図15-2 調査期間中の平均気温，地温（深さ15cm）および降水量の推移（2008）

考察

ショウガ疫病の露地栽培条件下での発生時期、発病条件および病徴を明らかにするため、前作発病圃場における自然発生状況を調査した。その結果、2008年の露地栽培のショウガ疫病の発病時期は、生育初期の6月上旬から中旬および収穫前の10月初旬の2回あることが確認された。小林ら(1999)の報告でも年2回の発病時期が確認されており、本研究の結果と同様であった。また、気温および地温(深さ15 cm)が21~22°Cで推移し、かつ降雨が連続した場合に発生する傾向が認められた。このことは、本章4節で明らかにしたショウガ疫病の発病適温が20°Cであることや、本病原菌が属する *Phytophthora* 属菌が水中で遊走子のうから遊走子を放出して水媒伝染し発病を拡大させることと一致した。これらのことから、ショウガ疫病の発病は、初夏や秋期の発病適温下において、連続した降雨によって助長されることが示唆された。

なお、第7節で2008年に行った殺菌剤の土壌灌注処理の試験では、発病圃場を冠水させた場合に、無処理区において10月中旬から11月中旬まで新たな発病が確認された。また、2009年に行った土壌くん蒸剤の試験では、無処理区において9月上旬から11月上旬まで新たな発病がみられた。これらのことから、ショウガ疫病の発生時期には、気温や降雨などによる年次変動があると考えられ、特に栽培後期の降雨によって発病時期が収穫期まで延長する可能性があると考えられた。

露地栽培条件下での、ショウガ疫病菌の病徴は、はじめ偽茎の地際部が褐色の水浸状を呈し、葉は徐々に黄化し、やがて中肋を境にして畳まれるように萎れ、最後には地際部から倒伏した。根茎や根は褐変し、根茎内部は淡褐色となり、さらに症状が進むと軟化・腐敗した。

なお、同じ卵菌類に属し、ショウガ疫病と類似の病徴を示すショウガ根茎腐敗病は、ショウガ疫病菌と6月上旬から中旬、10月中旬頃に発生時期が重なるため、両病害が併発した圃場では判別が困難となる。両病原菌とも菌糸に隔壁が無いため、罹病組織内の顕微鏡観察だけでは識別が難しい。

しかし、ショウガ疫病によって発病したショウガは、罹病根茎を水道水でよく洗浄し、罹病部と健全部の境を切り出した根茎小片を、水道水中に浸漬して室温に2~3日静置しておく、特徴的な遊走子のうが形成されるので、診断の決め手となり得る(山崎, 2013b)。また、ショウガ疫病菌の菌糸は、菌糸形態が類似するショウガ根茎腐敗病菌と比べて低い温度で伸長し易いため、本菌を罹病組織や土壌から分離する際には培養温度を25°Cとし、第1節に示した1日当たりの菌糸伸長を参考に判断するとよい。一方、ショウガ根茎腐敗病菌は、培養温度34~35°Cでは菌糸の生育速度が速いため、約2日間で直径9cmのシャーレの端まで菌糸が伸長する点で大きく異なる。罹病組織からの菌分離による診断では、これらの特徴の違いを踏まえて診断するとよいと考える。

第5節 貯蔵中の発病の進展

ショウガ疫病は、生育期間中のみならず貯蔵中および調整・出荷後においても発生する。貯蔵中に腐敗した場合は、出荷時にはじめて気づくことになるため、被害が拡大しやすい。また、調整時に罹病根茎を見逃した場合、出荷後の輸送中や店頭で腐敗事故を引き起こす。しかし、露地ショウガの収穫後の貯蔵中の病害について調査された事例は無く、ショウガ疫病の貯蔵中の発生生態や病勢進展については不明であった。

そのため、ショウガ疫病の貯蔵中における罹病根茎の発病の進展、罹病根茎から健全根茎への伝染、ならびに汚染土壌から健全根茎への伝染について調査した。

材料と方法

1. 供試作物

2007年11月22日に、高知県南国市の農業技術センター内のショウガ疫病を発病した圃場から掘り上げた、根茎の一部に根茎内部の褐変のある罹病株または罹病根茎を用いた。汚染土壌は、センター内のショウガ疫病発生圃場から採取した土壌を用いた。健全根茎は、高知県内の産地から購入した見かけ上健全なショウガ根茎を用いた。

2. 試験1：罹病根茎の発病の進展

1) 接種

罹病株3株(1株約1.2kg)を厚さ0.025mmのポリエチレンフィルムの袋へ1株ずつ入れ、15°Cに設定した定温庫内で貯蔵した。

2) 調査

貯蔵当日, 15, 34, 54, 69 日後に病斑の拡大の様子と, 1 株あたりの発病根茎数について調査し, 発病根茎率を次式により算出した.

$$\text{発病根茎率 (\%)} = \text{発病根茎数} \div \text{調査根茎数} \times 100$$

3. 試験 2 : 罹病根茎から健全根茎への伝染

1) 接種

罹病根茎 1 個 (約 200 g) を健全根茎 5 個 (1 個あたり約 200 g) とともに厚さ 0.025 mm のポリエチレンフィルムの袋へ入れ, 15°C に設定した定温庫内で貯蔵した. 試験は 2 反復で行った. なお, 対照として, 罹病根茎の代わりに健全根茎を用いた.

2) 調査

貯蔵当日, 35, 69, 99 日後に根茎の発病の有無について調査した.

4. 試験 3 : 汚染土壌から健全根茎への伝染

1) 接種

汚染土壌約 20 g を, 健全根茎 5 個 (約 200 g) とともに厚さ 0.025 mm のポリエチレンフィルムの袋へ入れ, 15°C に設定した定温庫内で貯蔵した. 対照として, 汚染土壌を加えない健全根茎を用いた.

2) 調査

貯蔵当日, 29, 63 日後に根茎の発病の有無について調査した.

結果

1. 罹病根茎の発病の進展

貯蔵開始時の発病根茎率は平均 28.4%であった。12月26日（貯蔵34日後）になると、発病根茎率は、貯蔵開始時の2倍以上となった。貯蔵期間が長くなるにしたがって、健全根茎の芽は黒変したり、白色の菌糸が発生した。根茎表面は褐色に変色し、やがて全体が白色の菌糸で覆われた。根茎内部は褐色水浸状に変色し、発病根茎から健全根茎に向かって褐変、軟化していく様子が観察された。根茎は最後には表皮を残して腐敗し、内部が空洞化した。貯蔵69日後には平均発病根茎率は82.0%となった（表39）。

表39 貯蔵中におけるショウガ疫病の病斑の進展（試験1）

反復	調査 根茎数	1株当たりの発病根茎率（%）				
		11月22日 （貯蔵当日）	12月6日 （15日後）	12月26日 （34日後）	1月15日 （54日後）	1月30日 （69日後）
I	19	31.6	31.6	73.7	84.2	94.7
II	21	28.6	38.1	61.9	66.7	76.2
III	12	25.0	25.0	58.3	66.7	75.0
平均	17.3	28.4	31.6	64.6	72.5	82.0

注) 2007年11月22日に、汚染土壌から掘上げた罹病ショウガ3株を0.025 mm厚のポリエチレンフィルムの袋へ1株ずつ入れて、15°Cで貯蔵した。

2. 罹病根茎から健全根茎への伝染

健全根茎に罹病根茎を混入させて15°Cで貯蔵した場合、I反復区では貯蔵69日後の調査から、II反復区では99日後の調査で健全根茎に発病が認められた（表40）。発病した健全根茎は、芽が軟化するとともに、根茎内部の褐変、軟化がみられた。

表 40 貯蔵中における罹病根茎から健全根茎への伝染（試験2）

罹病株	反復	発病根茎数／調査根茎数			
		11月22日 (貯蔵当日)	12月26日 (35日後)	1月30日 (69日後)	2月29日 (99日後)
混入	I	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
	II	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
無混入	対照	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

3. 汚染土壌から健全根茎への伝染

汚染土壌を付着させたショウガ根茎を 15°C で貯蔵した場合、貯蔵 63 日後には全ての根茎が発病した（表 41）。

表 41 貯蔵中における汚染土壌から健全根茎への伝染（試験3）

汚染土壌	発病根茎数／調査根茎数		
	11月28日 (貯蔵当日)	12月26日 (29日後)	1月30日 (63日後)
添加	0 / 5	0 / 5	5 / 5
無添加	0 / 5	0 / 5	0 / 5

考察

ショウガ疫病の、貯蔵中の伝染貯蔵中における罹病根茎の発病の進展、罹病根茎から健全根茎への伝染、および汚染土壌から健全根茎への伝染について調査した。

その結果、貯蔵開始時にショウガ根茎の一部にショウガ疫病の病徴が生じていた根茎は、貯蔵中に芽が黒変したり、白色の菌糸が発生し、病徴の進展が確認された。根茎表面は褐色に変色し、やがて全体が白色の菌糸で覆われた。根茎内部は褐色水浸状に変色し、次第に褐変、軟化した。最後には根茎の表皮を残して腐敗し、内部が空洞化した。なお、貯蔵約1ヶ月後には、貯蔵開始時より2倍以上、貯蔵約2ヶ月後には、貯蔵開始時より約3倍の発病根茎数となった。

掘取り時に根茎の一部が発病している根茎は、貯蔵期間中に発病根茎から健全根茎に向かって感染し、罹病根茎と連結している健全根茎も貯蔵約2ヶ月後には発病に至った。

また、健全根茎に汚染土壌を付着させても、貯蔵約2ヶ月後には発病した。

これらことから、ショウガ疫病の被害は、罹病根茎の病勢の進展、罹病根茎から健全根茎への感染、汚染土壌から健全根茎により被害が拡大していくと考えられた。

第6節 ショウガ疫病菌の死滅温度

罹病した種根茎は第一次伝染源となる。ショウガの種根茎は、通常の野菜種子と異なり、表面に土壌が付着しているため、殺菌剤による病原菌の防除が困難である。また、露地ショウガの場合、栽培面積 10 a 当たり 600~800 kg の種根茎を用いるので、大量の殺菌剤が必要となる。露地ショウガ栽培では、通常圃場に土壌くん蒸剤を処理するが、くん蒸処理に係る費用に種根茎の消毒の費用が上乗せされることになり、経済的な負担が大きくなる。なお、ショウガの種根茎消毒剤として適用のある登録農薬は、根茎腐敗病を対象としたアミスルブロム水和剤（商品名：ボルテックス FS）とキャプタン水和剤（オーソサイド水和剤 80）の2剤のみである（2013年9月時点）。化学合成農薬以外の防除対策については、ショウガ疫病と同じ卵菌類に属するショウガ根茎腐敗病で、熱を利用した防除法として種根茎の温湯消毒（寺見ら, 2010；寺見, 2012a, 2012b）や土壌の太陽熱消毒（小玉ら, 1979）の防除試験が報告されている。

そこで、種根茎の温湯消毒や太陽熱消毒などの防除効果の基礎的データを得ることを目的に、ショウガ疫病の菌叢ディスク、遊走子懸濁液および培養土壌を用いた温湯処理を行い、本菌の死滅温度を調査した。

材料と方法

1. 供試菌株

ショウガ疫病菌 (*P. citrophthora* : T-1-3) を用いた (表 35)。

2. 試料の調整

1) 菌叢ディスク

供試菌株を PDA または V8 ジュース寒天平板培地で、25°C、暗黒下で 14 日間培養した。培養して得られた菌叢を直径 4 mm のコルクボーラーで打ち抜き、菌糸のみを含む PDA 菌叢ディスクおよび菌糸と遊走子のうを含む V8 菌叢ディスクとした。なお、ショウガ疫病菌は、25°C、暗黒下で 14 日間培養した場合、PDA 寒天平板培地上では菌糸のみ、V8 ジュース寒天平板培地では菌糸と遊走子の両方を形成する特徴があることが確認されている（山崎ら、2009a）。

2) 汚染土

第 1 節、2、1)、(1) の方法によって調製した遊走子懸濁液 5 ml を、高圧滅菌消毒した土壌ふすま培地（土：ふすま=4:1）50 g に滴下し、25°C、暗黒下で 24 日間培養して汚染土とした。

3) 熱処理の方法

容量 200 μ l のマイクロチューブにそれぞれ、①菌叢ディスク 4 枚と滅菌水 60 μ l、②遊走子懸濁液 100 μ l または③汚染土 10 ml と 10 ml の滅菌水を入れてよく混和した汚染土懸濁液 100 μ l を入れた。それぞれを 40、45、50°C に設定したサーマルサイクラー（TaKaRa PCR Thermal Cycle MP, TaKaRa Biomedicals 社製）に 1、3、5、10、30、60、120、180、240、300 分間保った。処理後直ちにマイクロチューブごと水道水（23°C）に入れて冷却した。また、対照としてそれぞれ 25°C に設定した恒温器内で 0、300 分間保ったものを用いた。なお、菌叢ディスクは 2 チューブずつ、遊走子懸濁液および汚染土懸濁液は 1 チューブずつ用いた。

4) 調査

熱処理後、PARP 平板培地（Corn meal 17 g、寒天 23 g、蒸留水 1,000 ml、ピマリシン 5 ppm、

アンピシリン250 ppm, リファンピシン10 ppm, PCNB100 ppm, ローゼベンガル2.5 ppm) (Erwin *et al.*, 1996) に各処理後の菌叢ディスク8枚もしくは汚染土懸濁液約10 µlまたは遊走子懸濁液10 µlをそれぞれ8ヶ所に置床し, 22.5°C, 暗黒下で4日間培養した後, 菌叢出現の有無を調査し, 次式により検出率(%)を算出した. 検出率(%) = 菌叢出現数 ÷ 調査数 × 100.

結果

ショウガ疫病菌の死滅温度を調査した結果, PDA菌叢ディスク中の菌糸は, 40°Cでは120分間以上, 45°Cおよび50°Cでは10分間以上の熱処理で死滅した. V8菌叢ディスク中の菌糸および遊走子のうは, 40°Cでは240分間以上, 45°Cでは30分間以上, 50°Cでは5分間以上の熱処理で死滅した. 遊走子懸濁液の遊走子は, 40°Cでは120分間以上, 45°Cでは10分間以上, 50°Cでは3分間以上の熱処理で死滅した. 汚染土中の病原菌は, 40°Cでは180分間以上, 45°Cでは10分間以上, 50°Cでは3分間以上の熱処理で死滅した(表42).

考察

ショウガ疫病の防除のための基礎的データを得るため, 病原菌の死滅温度を検討した. その結果, 40°Cでは240分間以上, 45°Cでは30分間以上, 50°Cでは10分間以上の温湯処理で菌糸, 遊走子のうおよび遊走子とも死滅すると考えられた. 一方, 汚染土中の病原菌は, 40°Cでは180分間以上, 45°Cでは10分間以上, 50°Cでは3分間以上の温湯処理で死滅すると考えられた. ショウガ疫病菌は土壌中で罹病残さの組織内に菌糸や遊走子のうの形態で存在すると考えられるが, 今回供試した汚染土中の疫病菌の形態は未確認である. また, 今回供試した汚染土は圃場の土壌と比べ, 水分条件や栄養状態等が異なるため, 汚染土中の病原菌

表 42 ショウガ疫病菌の死滅温度

供試資材 (供試菌の形態)	処理 温度	処理時間 (分)											
		0	1	3	5	10	30	60	120	180	240	300	
PDA菌そうディスク (菌糸)	25°C	100 ^{z)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
	40°C	—	100	100	100	100	50.0	37.5	0	0	0	0	0
	45°C	—	100	100	100	0	0	—	—	—	—	—	—
	50°C	—	100	87.5	25.0	0	0	—	—	—	—	—	—
V-8菌叢ディスク (菌糸および 遊走子のう)	25°C	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
	40°C	—	100	100	100	100	100	87.5	50.0	25.0	0	0	0
	45°C	—	100	100	100	12.5	0	—	—	—	—	—	—
	50°C	—	100	75.0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
遊走子懸濁液 (遊走子)	25°C	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
	40°C	—	100	100	100	100	100	87.5	0	0	0	0	0
	45°C	—	100	37.5	12.5	0	0	—	—	—	—	—	—
	50°C	—	25.0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
汚染土	25°C	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
	40°C	—	100	100	100	100	100	100	75.0	0	0	0	0
	45°C	—	100	100	100	0	0	—	—	—	—	—	—
	50°C	—	100	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—

z) 疫病菌の検出率 (%) = 菌そう出現数 ÷ 調査数 × 100

y) —は試験を実施していないことを示す。

の形態が本来の病原菌より不安定な状態であった可能性があり、菌糸や遊走子のうより汚染土での死滅温度が低い結果になったと考えられた。なお、*P. citrophthor*は厚膜胞子や卵胞子を形成しないとされており (Erwin *et al.*, 1996), ショウガ疫病菌についてもPDAやV-8ジュース寒天平板培地上で厚膜胞子や卵胞子の形成はみられなかった(山崎ら, 2009b; 山崎ら, 2011a)。そのため、本病の発病歴のある栽培圃場においては、菌糸、遊走子のうおよび遊走子とも死滅する40°Cで240分間以上、45°Cで30分間以上、50°Cで10分間以上が、太陽熱や蒸気を利用した土壌消毒の際の温度条件として参考になると考えられた。

第7節 ショウガ疫病の防除法

露地ショウガでは、土壌病害、雑草、センチュウ等の防除対策として作付け前の土壌くん蒸処理が慣行的に行われている。それにもかかわらず、ショウガ根茎腐敗病をはじめとする土壌病害の発生が依然としてみられている。そのため、ショウガ栽培においては各病害に対する化学合成農薬を用いた土壌くん蒸剤のみならず、物理的防除法や生育期の殺菌剤の防除効果も明らかにしておく必要がある。ショウガ疫病と同じ卵菌類を病原菌とするショウガ根茎腐敗病では、臭化メチル代替くん蒸剤と生育期の殺菌剤を組み合わせた体系防除（山崎ら, 2011c）や、各種殺菌剤の予防または治療効果（山崎ら, 2012c）についての報告はあるが、ショウガ疫病の防除に関する知見は無い。

ここでは、ショウガ疫病に対する防除効果を明らかにするため、土壌還元消毒と湛水処理の防除効果について検討した。また、土壌くん蒸剤の防除効果についても検討した。さらに、二次感染の抑制効果を明らかにするため、生育期における各種殺菌剤の灌注処理による防除効果についても検討した。

材料と方法

1. 土壌還元消毒および湛水処理

1) 汚染土壌の作製

2009年7月10日に、あらかじめショウガ疫病菌（菌株名：T-1-3）の遊走子懸濁液の浸漬接種により発病させたショウガの9 cmポット苗を1株ずつナイロンネットに入れ、高圧滅菌土壌を詰めた1/2,000 aのワグネルポット（約15 L）の深さ約15 cmに埋没した。その12日後に、発病ショウガの入ったネットを引き上げてポット内の土壌を混和したものを残さ無し区、ネッ

ト内の罹病ショウガをポットに残してポット内の土壌と混和したものを残さ有り区とした。

2) 土壌消毒

7月22日に両区のワグネルポットに ふすま50 g (1 t/10 aに相当) を入れて混和した後、ポット内に水を満たしてから厚さ0.05 mmの透明ポリエチレンシートで表面を被覆し、土壌還元消毒区（残さ有り、残さ無し）とした。また、シートで表面を被覆しない湛水処理区と水を溜めない無処理区（残さ有り、残さ無し）を設けた。なお、無処理区は土壌が乾燥しないように適宜かん水した。8月15日に土壌還元消毒区のシートを除去し、ワグネルポット内の水を抜いた。また、湛水処理区についてもワグネルポット内の水を抜いた。8月26日に各処理区のワグネルポット内の土壌を移植ごてで混和後、健全根茎（約150 g）を1ポットにつき1株ずつ植付けて屋外で栽培した。各区とも3～4ポットずつ用いた。

3) 調査

10月5日から概ね7日間隔で地上部の発病の有無を調査し、発病株率を第3節、5と同様に算出した。

また、処理期間中の7月22日から8月23日の間、土壌還元消毒区ならびに無処理区の深さ8 cmの地温および気温を15分間隔で測定した。また、還元処理開始1日後の7月23日および処理終了2日前の8月21日にORPメーターを用いて土壌還元消毒（残さ有り）区および湛水処理（残さ有り）区の深さ8 cmにおける酸化還元電位を測定した。

2. 土壌くん蒸処理

1) 供試薬剤

クロルピクリン液剤99.5% (30 L/10 a), メチルイソチオシアネート・D-D油剤 (30 L/10 a),

ダゾメット粉粒剤（30 kg/10 aおよび60 kg/10 a）を供試した。

2) 土壌くん蒸処理

2009年4月7日に、高知県南国市の農業センター内の汚染圃場を耕耘，畦立てし，12.6 m²（幅2.1 m，長さ6.0 m）の畦を作った。クロルピクリン液剤とメチルイソチオシアネート・D-D油剤は手動式土壌注入器を用いて，30 cm千鳥で深さ15 cmに点注処理し，直ちに厚さ0.05 mmの透明ポリエチレンシートで被覆した。ダゾメット粉粒剤は，30 kg/10 aまたは60 kg/10a の割合で試験区全面に散布し，小型管理機で深さ約15 cmまでの土壌と十分混和した後，シートで被覆した。無処理区もシートで被覆した。いずれの試験区も4月23日（処理16 日後）にシートを除去し，無処理区以外の試験区では耕起によるガス抜きを行った。5月7日に，健全根茎（約150 g）を植付けた。なお，各区につき30株，2 反復とした。

3) 調査

5月29日から11月9日までほぼ7 日間隔で発病の有無を調査し，発病株率を第3節，5と同様に算出した。

また，くん蒸処理直前に，各処理区の3 カ所から土壌を採取し，土壌水分（含水率）を測定した。また，くん蒸期間中のクロルピクリン液剤区の地温（深さ15 cm）を測定した。

3. 殺菌剤の土壌灌注処理

1) 供試薬剤

シアゾファミド水和剤（商品名：ランマンフロアブル）は500 倍希釈液を3 L/m²の割合で土壌灌注，プロパモカルブ塩酸塩液剤（プレビクールN 液剤）は400 倍希釈液を3 L/m²の割合で土壌灌注，アゾキシストロビン+メタラキシルM 粒剤（ユニフォーム粒剤）は9 kg/10

aの割合で土壌表面散布した。

2) 土壌灌注処理

(1) 試験1：ポット試験

地際部5ヶ所に針で付傷した7葉期のショウガポット苗(9 cm)を、500 ml容のビーカーに入れ、遊走子懸濁液を地際部が浸る深さになるよう250 ml入れて、25°C、蛍光灯照射下(20,000 lux, 16 時間日長)に設定した人工気象器内に24 時間静置した。その後ポット苗をビーカーから取り出し、同条件で管理した。薬剤処理は、接種前日または1 日後に行い、シアゾファミド水和剤は500 倍希釈液を3 L/m²の割合で土壌灌注、プロパモカルブ塩酸塩液剤は400 倍希釈液を3 L/m²の割合で土壌灌注、アゾキシストロビン+メタラキシルM粒剤は9 kg/10 aの割合で土壌表面散布した。なお、各処理区とも4 ポットずつ用いた。

(2) 試験2：圃場試験

前年度に疫病が発生した当センター内露地圃場を、ダズメット粉粒剤 30 kg/10a で土壌消毒した後、ショウガを 2008 年 4 月 8 日に植付けた。なお、元肥として土根壤[®](N-P-K=8-10-8)を 278 kg/10 a, 鶏糞を 450 kg/10 a 施用し、その後の管理は慣行に従った。

10月1日に疫病の発病を確認後、10月17日に農業用水を入水させ、畦の肩付近まで冠水した状態を翌日まで保ち、発病の拡大を促した。10月15日(冠水処理2 日前)または10月18日(冠水処理1 日後)にシアゾファミド水和剤(500 倍希釈液, 3 L/m², 土壌灌注), プロパモカルブ塩酸塩液剤(400倍希釈, 3 L/m², 土壌灌注), アゾキシストロビン+メタラキシル-M粒剤(9 kg/10a, 土壌表面散布)を各1 回施用した。なお、各処理区とも5.9 m²(20 株植え)で2 連制とした。無処理区については、7.4 m²(25 株)で2 連制とした。

3) 調査

(1) 試験1：ポット試験

接種9および15日後に、第4節、5と同様に病徴を評価し、発病度を算出した。また、第3節、5と同様に発病株率を算出した。また、各処理区の発病度から無処理区に対する防除価を次式により算出した。

$$\text{防除価} = (1 - \text{処理区の発病度} \div \text{無処理区の発病度}) \times 100$$

(2) 試験2：圃場試験

10月15日から7日間隔で地上部の発病の有無を調査し、第3節、5と同様に発病株率を算出した。また、防除価を第7節、3、3)、(2)と同様に算出した。

結果

1. 土壌還元消毒および湛水処理

2009年11月16日の発病株率は、無処理（残さ有り）区、無処理（残さ無し）区で50%であったのに対し、土壌還元消毒（残さ有り）区、土壌還元消毒（残さ無し）区、湛水処理（残さ有り）区とも0%であった（表43）。なお、酸化還元電位は、処理開始1日後（7月23日）では土壌還元消毒区-330 mV、湛水処理区-298 mV、処理終了2日前（8月21日）ではそれぞれ109.7 mV、247.7 mVであった。地温の30°C以上の遭遇時間は、土壌還元消毒区で215.5時間、無処理区で151.5時間であった。

表 43 ショウガ疫病に対する土壌還元消毒および湛水処理の防除効果（2009年）

処理区	発病株 の残さ	調査 株数	発病株率（%）				
			10月5日	10月16日	10月27日	11月9日	11月16日
土壌還元消毒	有り	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	無し	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
湛水	有り	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
無処理	有り	4	25.0	50.0	50.0	50.0	50.0
	無し	4	0.0	0.0	25.0	25.0	50.0

注) 各処理は、ワグネルポット（1/2,000a）を用いて2009年7月22日から8月15日まで野外で行った。8月26日に健全なショウガをポットに植付けた後、屋外で管理した。

2. 土壌くん蒸処理

無処理区での発病は2009年9月7日に初めて確認され、11月9日の発病株率は11.7%であった。クロルピクリン液剤（30 L/10 a）区では10月13日の調査から、メチルイソチオシアネート・D-D油剤（30 L/10 a）区では10月26日の調査から、ダズメット粉粒剤（30 kg/10 aおよび60 kg/10 a）区では9月24日の調査から発病が確認されはじめ、11月9日の発病株率は、それぞれ3.3%、1.7%、1.7%、1.7%と無処理区と比べて低かった（表44）。いずれの処理区とも薬害はみられなかった。なお、くん蒸剤処理時（4月7日）の土壌水分（含水率）は21.3%、くん蒸期間中の地温（地表面下10 cm）は最高31.1°C、最低15.5°C、平均23.7°Cであった。

表 44 ショウガ疫病に対する土壌くん蒸剤の防除効果 (2009年)

試験区	処理	発病株率 (%)										
		8月 31日	9月 7日	9月 14日	9月 24日	9月 28日	10月 5日	10月 13日	10月 19日	10月 26日	11月 2日	11月 9日
クロルピクリン液剤	30 L/10 a	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	1.7	1.7	1.7	3.3
メチルイソチオシアネート・D-D油剤	30 L/10 a	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	1.7	1.7
ダゾメット粉粒剤 (30kg/10a)	30 kg/10 a	0.0	0.0	0.0	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
ダゾメット粉粒剤 (60kg/10a)	60 kg/10 a	0.0	0.0	0.0	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
無処理	—	0.0	3.3	3.3	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	10.0	10.0	11.7

注) 2009年4月7日～4月23日に各土壌消毒を処理し、5月7日に各処理を行ったポットに健全ショウガを植え付けた。

注) 調査株数は、各区30株とした。

3. 殺菌剤の土壌灌注処理

1) ポット試験

病原菌の接種前日に処理した場合、シアゾファミド水和剤では接種15日後においても発病がみられなかった。プロパモカルブ塩酸塩液剤、アズキシストロビン+メタラキシルM粒剤の15日後の防除価はそれぞれ83.3, 75.0であった。病原菌の接種1日後に処理した場合、15日後の防除価はアズキシストロビン+メタラキシルM粒剤が66.7, シアゾファミド水和剤, プロパモカルブ塩酸塩液剤がいずれも41.7であった。いずれの薬剤とも病原菌の接種1日後の処理より接種前日に処理した場合の防除価が高かった。なお、いずれの薬剤とも薬害は認められなかった (表 45)。

表 45 ショウガ疫病に対する各種殺菌剤の接種前および接種後処理の防除効果：ポット試験

処理時期	供試薬剤 (希釈倍率, 処理量, 処理方法)	接種9日後			15日後		
		発病株 率 (%)	発病度	防除価	発病株 率 (%)	発病度	防除価
接種前日	シアゾファミド水和剤 (500倍希釈, 3L/m ² , 土壌灌注)	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0
	プロパモカルブ液剤 (400倍希釈, 3L/m ² , 土壌灌注)	0.0	0.0	100.0	50.0	16.7	83.3
	アゾキシストロビン+メタラキシルM粒剤 (9kg/10a, 土壌表面散布)	25.0	8.3	85.8	25.0	100.0	75.0
接種1日後	シアゾファミド水和剤 (500倍希釈, 3L/m ² , 土壌灌注)	75.0	41.7	28.5	75.0	58.3	41.7
	プロパモカルブ液剤 (400倍希釈, 3L/m ² , 土壌灌注)	75.0	41.7	28.5	75.0	58.3	41.7
	アゾキシストロビン+メタラキシルM粒剤 (9kg/10a, 土壌表面散布)	50.0	33.3	42.9	50.0	33.3	66.7
無処理	—	100.0	58.3	—	100.0	100.0	—

2) 圃場試験

冠水前に処理したシアゾファミド水和剤500倍希釈液の土壌灌注処理区での発病株率が最も低く、2008年11月12日の防除価は67.7であった。冠水前に処理したプロパモカルブ塩酸塩液剤の400倍希釈液の土壌灌注処理区およびアゾキシストロビン+メタラキシルM粒剤9 kg/10 aの土壌表面散布区では、防除効果が認められなかった。冠水後に処理した場合は、いずれの薬剤とも防除効果が認められなかった。なお、いずれの薬剤とも薬害は認められなかった(表 46)。

表46 湛水前または後に処理した数種薬剤のショウガ疫病に対する防除効果：ほ場試験（2008年）

処理時期	供試薬剤 (希釈倍率, 処理量, 処理方法)	10月15日		10月22日		10月29日		11月5日		11月12日	
		発病株 率 (%)	防除価	発病株 率 (%)	防除価	発病株 率 (%)	防除価	発病株 率 (%)	防除価	発病株 率 (%)	防除価
冠水前	シアゾファミド水和剤 (500倍希釈, 3 L/m ² , 土壌灌注)	0.0	100.0	2.6	70.1	5.3	39.1	5.3	78.1	10.6	67.7
	プロパモカルブ液剤 (400倍希釈, 3L/m ² , 土壌灌注)	2.8	0.0	5.6	35.6	11.1	0.0	19.4	19.8	33.3	0.0
	アゾキシストロビン+メタラキシルM粒剤 (9 kg/10 a, 土壌表面散布)	2.9	0.0	5.9	32.2	11.4	0.0	28.3	0.0	36.8	0.0
冠水後	シアゾファミド水和剤 (500倍希釈, 3 L/m ² , 土壌灌注)	0.0	100.0	5.9	32.2	8.4	3.4	28.8	0.0	41.0	0.0
	プロパモカルブ液剤 (400倍希釈, 3L/m ² , 土壌灌注)	0.0	100.0	5.9	32.2	20.6	0.0	20.6	14.9	60.9	0.0
	アゾキシストロビン+メタラキシルM粒剤 (9 kg/10 a, 土壌表面散布)	5.3	0.0	10.5	0.0	21.1	0.0	34.2	0.0	44.7	0.0
	無処理	2.3		8.7		8.7		24.2		32.8	

注) 各農薬は, 2008年10月15日(冠水処理2日前)や18日(冠水処理当日)に処理した。

注) 調査株数は, 処理区は20株とし, 無処理区は25株とした。

考察

土壌還元消毒は *Fusarium* 属菌をはじめとした土壌病害の発生抑制に効果がある（新村, 2004 ; 竹内, 2004）とされ, 湛水処理は水稻の後作に土壌伝染する菌核病や *Fusarium* 属菌による病害およびセンチュウ類の発生抑制に効果があることが報告（梅川, 1989）されている。今回, ショウガ疫病に対する効果を検討したところ, 土壌還元消毒, 湛水処理とも発病株残さの有無に関わらず高い防除効果が認められた。このことから, 栽培終了後の土壌還元消毒や湛水処理あるいは水稻の作付けによって, 発病が軽減できると考えられた。

また, 土壌病害の耕種的防除法のひとつである太陽熱消毒では 40~45°C 以上の地温を確保する必要があるが, 土壌還元消毒では, 有機物を土壌に混和して圃場容水量が十分に維持できる条件下であれば 30°C 以上の地温の確保によって土壌が還元状態となり, 病原菌の死滅を促進する（新村, 2000）とされている。今回の試験は, ワグネルポットを用いて行ったため, 土壌還元消毒, 湛水処理とも処理期間中にポットからの落水がほとんど無く, ま

た処理前半の好天により 30°C 以上の地温が 212.5 時間確保されたことから、通常の栽培条件より還元化が保たれ、防除効果が高くなったものと考えられた。そのため、土壌還元消毒や湛水処理の効果については今後さらに、圃場での実証を行っていく必要があると考えられる。

圃場で使用可能な土壌消毒剤には、*Phytophthora*属菌による病害であるイチゴ、トウガラシ類およびピーマンの疫病にクロルピクリンくん蒸剤が農薬登録されているが、ショウガ疫病を対象とした登録農薬はない。そこで、根茎腐敗病や一年生雑草、センチュウ類などを対象にショウガに作物登録のある土壌くん蒸剤のうち、臭化メチル剤の代替剤として導入が進んでいるクロルピクリンくん蒸剤、クロルピクリン・D-Dくん蒸剤およびダゾメット粉粒剤の防除効果を検討した。その結果、クロルピクリン・D-Dくん蒸剤30 L/10 aやクロルピクリンくん蒸剤30 L/10 aの点注処理、ダゾメット粉粒剤30 kg/10 aおよび60 kg/10 aの土壌表面散布混和処理は本病に対する高い防除効果が認められ、3剤ともにショウガ疫病の防除薬剤として有望と考えられた。

また、生育期の処理剤としてショウガ根茎腐敗病に登録のある殺菌剤のうちシアゾファミド水和剤、プロパモカルブ塩酸塩液剤およびアゾキシストロビン+メタラキシル M 粒剤について、本病に対する防除効果をポット試験により検討した。その結果、いずれの薬剤とも防除効果が認められ、病原菌の接種後より接種前の処理で防除効果が高い傾向が認められた。そこで、これらの剤を用いて汚染圃場における防除試験を実施したところ、冠水前にシアゾファミド水和剤を土壌灌注処理した場合にのみ高い防除効果がみられた。このことから、生育期の防除薬剤としては、シアゾファミド水和剤の予防的な処理が有効と考えられた。

第4章 ショウガ根茎暗斑病（新称）の発生生態と防除

2007年5月に高知県高知市および土佐市をはじめとする県内の露地ショウガ (*Zingiber officinale* Rosc.) 栽培地域において、貯蔵中のショウガ根茎の表面に黒色で不整形の斑紋を生じる症状（俗称：黒シミ症）が発生した。本症状は、ショウガ根茎の外観を損ね、商品価値を著しく低下させることから、産地での大きな問題となった。

ショウガ根茎表面に黒色の病斑を生じる病害には、*Pyricularia zingiberi* によるいもち病がすでに報告されている（古谷, 1995）。しかし、今回発生した症状は、いもち病のように生育期の葉、茎および根茎に病斑を形成することはなく、収穫した根茎を予冷貯蔵した後の出荷・調製時に確認されること、また、いもち病に罹病した根茎で特徴的にみられる褐色の病斑やその上に輪生する黒色の菌核様構造物、根茎内部の腐敗を伴わないことなどから、いもち病とは異なると考えられた。

そこで、高知県内のショウガ主要産地の発生状況を調査するとともに、症状の根茎罹病部から病原の分離を試み、高頻度で分離された糸状菌のショウガに対する病原性と分類学的所属について調査を行った。

その結果、根茎に生じる黒色の斑紋の原因が、*Myrothecium verrucaria* (Albertini et Schweinitz) Ditmar (Tulloch, 1972 ; Murakami *et al.*, 2005) であることを明らかにした。

M. verrucaria によって引き起こされる病害には、国内では唯一クワ暗斑病の報告 (Murakami *et al.*, 2005) があるが、*M. verrucaria* がショウガの病原菌として同定されたのは初めてであった。そのため、*M. verrucaria* によりショウガ根茎に引き起こされる障害をショウガ根茎暗斑病（英名 *Myrothecium rhizome spot*）と提唱した。一方、本菌は海外ではトウダイグサ類、メロン、スイカ、キュウリなど多くの植物の病原として報告されている (Yang and Jong, 1995a,

1995b ; Belisario *et al.*, 1999, 2006 ; Raymond *et al.*, 1959). しかし、いずれの病害とも、病徴が現れるのは地上部のみであり、ショウガのような地下部での病徴は確認されていない。そこで、ショウガから分離された *M. verrucaria* の宿主範囲を確認するため、各植物に対する接種試験を行い、地上部と地下部の病徴の有無を調査し、病原性を明らかにした。

ショウガは、根茎を収穫した後は洗浄せずに、直ちに根茎に土壌が付着したまま貯蔵するため、収穫時に病徴が見つかることはなく、貯蔵後、出荷前に根茎を洗浄して初めて発見される。そのため、ショウガ根茎暗斑病の病斑は、栽培終了時まで形成されるのか、貯蔵中に形成されるのかが不明であった。そのため、ショウガ根茎暗斑病の発生時期ならびに貯蔵中の発病の進展の検討を行った。

また、*Myrothecium* 属菌は、有機質の高い土壌に多く存在し、セルロース分解能に富むとされる (宇田川ら, 1978)。ショウガ栽培では、土づくりやマルチの資材として多量に有機物を用いるため、圃場に投入される有機物がショウガ根茎暗斑病の伝染源や生息場所になる可能性が考えられた。そこで、主な有機物資材のうち繁殖しやすい資材を明らかにした。

M. verrucaria に対する防除対策は、海外においてサトイモ科の観葉植物のシンゴニウム (Chase, 1990) の試験例があるものの、地上部の散布を想定したのもであり、ショウガ根茎暗斑病の様に地下部に病斑を生じさせる病害に対する防除試験は無い。そのため、第一次伝染源に成り得る汚染土壌の消毒、ならびに生育中の根茎への感染や被害拡大の防止のため、土壌くん蒸剤と生育期の殺菌剤の灌注処理の防除効果を検討した。

第1節 高知県における発生状況および病徴

高知県内では、2007年にショウガの根茎表面に黒色の斑紋が生じる障害が発生して問題となった。しかし、ショウガ根茎表面には、いもち病による黒あざ症（古谷, 1995）、収穫時の作業によりできた傷や虫の食害跡などによる変色など類似の障害が混在しているため、本症状の原因は特定できていなかった。

そのため、高知県内の主要な産地の出荷場での発生調査や、診断のために持ち込まれたサンプルなどの調査を行い、県内の発生状況と、ショウガに生じる症状を明らかにした。

材料および方法

2007年7月に、高知県内の主要な4出荷場において、前年度栽培され2006年秋に収穫・貯蔵されたショウガ根茎を、貯蔵庫から取り出し、水洗いした後、根茎表面に生じた障害別に発生割合を調査した。発生調査には、各出荷場につき50個用いた。また、2007年～2012年までに調整中や出荷後に本症状が確認されたショウガ根茎について、症状の詳細な観察を行った。

結果

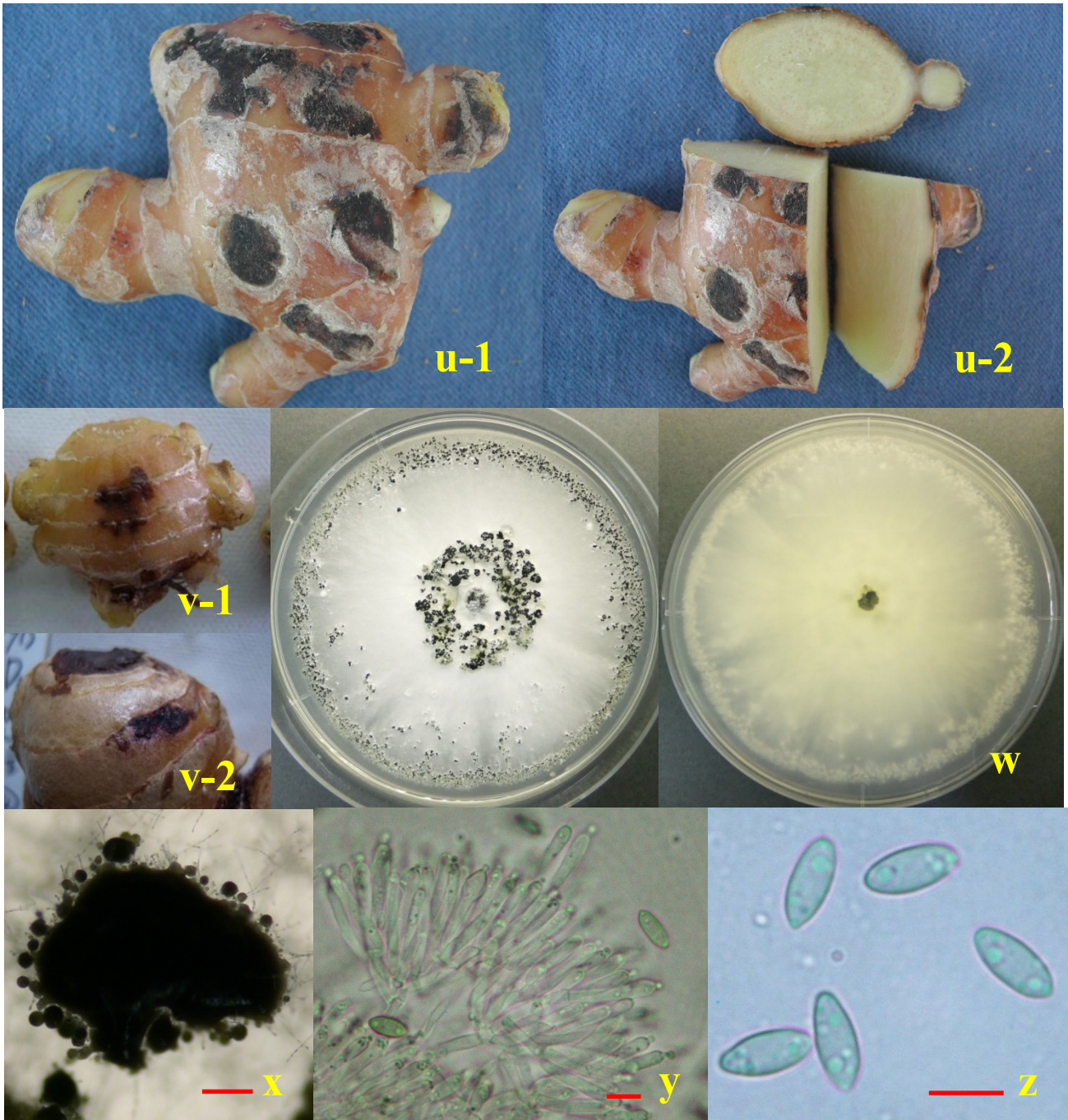
県内の主要産地の出荷場で、調整・出荷されるショウガ根茎の調査を行ったところ、ショウガ根茎暗斑病の発生割合は出荷場により異なったが、調査した全て出荷場で本病害の発生が確認された。調査対象とした障害以外には、いもち病や紅色根茎腐敗病の病斑や収穫時に出来た傷や虫の食害跡により変色が根茎表面に確認された。

出荷場や持ち込みによるサンプル調査の結果、ショウガ根茎暗斑病は、高知県内の露地

栽培地域で10月下旬から11月中旬の間に収穫され、15℃の予冷庫で貯蔵されたショウガ根茎に発生していた。根茎表面には、約1~3 cmの大型で不整形の黒色の斑紋が認められた(写真 u-1)。斑紋は、健全部との境界が明瞭で、根茎の節と節の間に形成された。変色は根茎表面下約1 mmまでの表層しか生じておらず、ピンセットなどで軽く擦ると容易に除去でき、根茎内部の腐敗は認められなかった(写真 u-2)。なお、光学顕微鏡観察では、病斑直下のごく浅い表皮組織に菌糸が確認されるが、深部には侵入していなかった。

考察

高知県内の主要な出荷場での発生状況調査を行った結果、調査を行った全ての出荷場でショウガ根茎暗斑病が確認された。なお、今回行った調査は、一時期でありかつ限られた圃場で栽培された根茎を対象にしているため、全てを把握できたとは言い切れないが、これまでの診断持込みや被害状況の聞き取りなどから、ショウガ根茎暗斑病は県内のほぼ全域において発生している可能性が示唆された。また、調整・出荷時のショウガ根茎には、本病の他に傷による褐変、虫の食害、いもち病の病斑など複数の障害が混在しており、そのことが生産現場や調整・出荷においてショウガ根茎暗斑病とその他の障害との区別を困難にしていると考えられた。ショウガいもち病は、根茎表面に褐色の病斑やその上に輪生する黒色の菌核様構造物を形成し根茎内部を腐敗させるが、今回の研究により、ショウガ根茎暗病の病斑は、根茎の節と節の間に形成され、根茎表面下のごく浅い表層のみが黒色となり、根茎内部への菌糸の侵入や腐敗を伴わないことが明らかとなったので、両病害の区別が可能となり、適切な防除対策の一助になると考えられた。



- u-1 貯蔵後のショウガの根茎表面に生じたショウガ根茎暗斑病の病徴
u-2 ショウガ根茎暗斑病に罹病したショウガの根茎内部の様子
v-1 菌叢ディスク貼付下のショウガ根茎表面に生じた黒斑
v-2 灌注接種によりショウガ根茎表面に生じた黒斑
w 供試菌株 (D2) の菌叢 (PDA 培地, 25°C, 21 日後, 左: 表面; 右: 裏面)
x 供試菌株 (D2) の分生子塊 (PDA 培地, 25°C, 21 日後)
y 供試菌株 (D2) の分生子柄から分枝したフィアライド
z 供試験菌株 (D2) の分生子
バーの長さ: x, 100 μm ; y, 5 μm ; z, 5 μm

第2節 病原菌の同定

ショウガ根茎表面に黒色の病斑を生じる病害のうち，地上部には症状を生じさせず，また，根茎内部を腐敗させない既知ものはない．そのため，高知県内の露地ショウガで採取された，根茎表面に黒斑症状を示す根茎の罹病部から病原の分離を試み，高頻度で分離された糸状菌のショウガに対する病原性と分類学的所属について検討した．

材料および方法

1. 供試菌株

2007年6月に高知県土佐市の出荷場で採集した罹病ショウガ根茎の罹病部と健全部の境界部分から小片を取り，70%エタノールに30秒間，2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に60秒間浸漬して表面殺菌した後，2%素寒天培地に置き，生育したコロニーから単孢子分離し，供試菌株（D2）とした．

2. 供試菌株のショウガに対する病原性

1) 菌叢ディスクによる貼付接種

供試菌株（D2）を，PDA 平板培地に移植し，25℃，暗黒下で10日間培養後，菌叢の周縁部を直径3 mmのコルクボーラーで打ち抜いて菌叢ディスクを得た．接種に用いるショウガの根茎は，あらかじめ30℃の恒温器内で萌芽させた種根茎を，萌芽部を含めて約3 cm角に切り分けて，高圧滅菌土壌を詰めた直径9 cmのポリエチレンポットに1つずつ植付け，ガラス室で約3ヶ月間栽培した後に掘り上げたものを用いた．根と偽茎を除去して調製した根茎を水道水で洗浄後，70%エタノールに1分間浸漬して表面を殺菌し，滅菌水で洗浄

した. この根茎表面に菌叢ディスクを1枚ずつ, 菌叢面が根茎に密着するように貼り付け, 密閉容器 (縦 20×横 13×深さ 8 cm) 中で, 15°C, 多湿条件下に 10 日間置いた後, 根茎表面を観察した. なお, 対照として, 根茎に PDA 培地ディスクのみを貼り付けた.

2) 菌叢磨砕液による灌注接種

供試菌株 (D2) を, 直径 9 cm のシャーレ中の PDA 平板培地上で 25 °C, 暗黒下, 14 日間培養した後, シャーレ 1 枚につき滅菌水 200 ml を加え, 培地ごとホモジナイザーで磨砕して得た菌叢磨砕液を接種源として用いた. ショウガは, 高圧滅菌土壌を詰めた 1/5,000 a ワグネルポットに, 1 ポットにつき無病のショウガ根茎 (約 150 g) 1 個を植付け, 屋外で約 6 ヶ月間栽培して 3 次茎の発生を確認した後, 試験に用いた. 2010 年 10 月に, 1 ポット当たり菌叢磨砕液 170 ml を灌注し, 引き続き屋外で管理した. 対照として, 菌を生育させていない PDA 培地の磨砕液を用いた. 接種 105 日後にショウガ根茎を掘り上げ, 根と偽茎を除去して調製した根茎を水道水で洗浄し, 表面を観察した後, さらに 0.02 mm 厚のビニール袋に入れて密閉して, 暗黒下, 15 °C で貯蔵した. 貯蔵 63 日後に, 根茎表面を観察した.

3) 分生子懸濁液による噴霧接種

供試菌株 (D2) を, PDA 平板培地で 25°C, 28 日間培養した菌叢に, 滅菌水を加えて滅菌済みのコンラージで軽くなでた後, 滅菌したガーゼでこし, さらに滅菌水を加えて分生子の濃度を 1.0×10^6 個/ml に調製して分生子懸濁液とした. ショウガは, 高圧滅菌土壌を詰めた 1/5,000 a ポットに, 1 ポットにつき無病のショウガ根茎 (約 150 g) 1 個を植付け, 1 次茎の葉が約 12 枚展開したものを用いた. 2012 年 2 月 27 日に, ショウガの地上部に分生子懸濁液を滴り落ちる程度に噴霧した. なお, 対照区には滅菌水を用いた. 接種後は, 夜間にポット全体をポリエチレンシートで覆って多湿状態を保った. ポットは, 最低温度 20°C, 換気温度

35°Cに設定したガラス室内に置いた。9月11日（接種後197日後）に、ショウガを掘上げて根茎を水洗いした後、葉、偽茎および根茎を観察した。

3. 分離菌の培養性状、形態観察および生育温度

1) 培養性状の調査

供試菌株（D2）を、PDA 平板培地上で、25°C 暗黒下で 10 日間培養し、菌叢を観察した。

2) 各器官の形態

供試菌株（D2）を、PDA 平板培地上で、25°C 暗黒下で 30 日間培養後、光学顕微鏡で形態観察した。

3) 生育温度

供試菌株（D2）を、PDA 平板培地上で 25 °C、暗黒条件下で 14 日間 前培養し、菌叢の周縁部を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いた含菌寒天を PDA 平板培地の中央に置床した後、5、10、15、20、23、25、28、30、33、35、40°C、暗黒下で培養し、10 日後に菌叢の直径を測定して 3 反復の平均値から 1 日当たりの菌糸伸長（mm/日）を算出した。

4. rDNA-ITS 領域の塩基配列

供試菌株（D2）を、PDA 平板培地上で 25 °C、暗黒条件下で 30 日間培養後、ゲノム DNA の抽出を、第 2 節、1、1）、（2）と同様に行った。プライマーは、ITS1（5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'）および ITS4（5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'）（White *et al.*, 1990）を用いて、PCR 反応を第 2 節、1、1）、（3）と同様に行った。ただし、PCR 反応は 94°C・2 分間の後、94°C・30 秒間、57°C・30 秒間、72°C・1 分間を 35

サイクル, 72°C・7 分間とした. 得られた PCR 産物の精製は, 第 2 節, 1, 1), (4) と同様に行い, 約 560 bp の DNA 断片の塩基配列を 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析した. 塩基配列の解析は, および第 2 節, 1, 1), (5) と同様に行い, 塩基配列の相同性を比較した. また, DDBJ/EMBL/GeneBank DNA データベース (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) に登録されている ITS 遺伝子領域の塩基配列との相同性検索も行った.

結果

1. 供試菌株のショウガに対する病原性

1) 菌叢ディスクによる貼付接種

供試菌株 (D2) を接種したショウガ根茎は, 菌叢ディスクの貼付下およびその周辺に黒変を生じた (写真 v-1). この黒変部の内部には腐敗はみられなかった. なお, 黒変部からは接種菌と同一の糸状菌が再分離された. 対照区では病変は認められなかった.

2) 菌叢磨砕液による灌注接種

供試菌株 (D2) を接種したショウガは, 掘り取り直後には葉や偽茎および根茎表面に異常が見られなかったが, 根茎を多湿状態で 15°C に 63 日間置いた後には表面に不整形の黒変病斑を形成した (写真 v-2). 黒変部の根茎内部の腐敗はみられなかった. なお, 黒変部からは, 接種菌と同一の糸状菌が再分離された.

3) 分生子懸濁液による噴霧接種

供試菌株 (D2) を接種したショウガの葉や偽茎および根茎表面に異常はみられなかった.

2. 分離菌の形態観察および生育温度

供試菌株 (D2) は, PDA 平板培地上で, 白色, 綿毛状の菌叢を形成し, 25°C 暗黒下で培養すると, 約 10 日後に黒色の分生子塊を形成した (写真 w). 培養後 30 日後に菌叢上に形成された分生子座の直径は 114~954 μm , 高さは 165~305 μm であり, 凸型の隆起部に暗緑色~黒色の分生子塊が形成された. 分生子座内の分生子柄は分岐し, 各分枝上のフィアライド上に分生子を形成した (写真 y). 分生子は, 大きさ 5.0~7.5 \times 2.0~3.0 μm , 無色~淡緑色, 紡錘形, 単胞, 一端が切断状で他方の一端がやや突出していた (表 47, 写真 z). また, 供試菌株 (D2) は, 10~35°C で菌糸の伸長がみられ, 30°C が生育適温であった (図 16).

3. rDNA-ITS 領域の塩基配列

供試菌株 (D2) の rDNA の ITS 領域の塩基配列は, 既報の *M. verrucaria* の配列 (GQ 131886; Manici and Caputo, 2010) と 100 % の相同性が認められた.

考察

罹病したショウガ根茎から分離された供試菌株 (D2) を用いた菌叢ディスクによる貼付接種および菌叢磨砕液による灌注接種により再現された症状は, 根茎の原症状と一致した. また, 病斑が再現された罹病組織から接種菌が再分離されたことから, 供試菌株が本症状の病原であることが明らかになった. なお, ショウガの地上部への噴霧試験では, 葉身や偽茎などへの病斑の形成は認められなかった.

供試菌株 (D2) の培養性状および形態観察を行った結果, Tulloch (1972) および Murakami

表 47 ショウガ分離菌株 (D2) と *Myrothecium verrucaria* の形態

	D2 ^{w)}	<i>M. verrucaria</i> ^{x)} (クワ暗斑病)	<i>M. verrucaria</i> ^{y)}	
分生子座	形	円筒形～半球状，周縁を白色の菌糸が取り巻く	平らまたは凸状，周縁に白色の菌糸が付く	凸状，周縁が白色で密集した綿毛状の菌糸で覆われる
	色	暗緑色	緑がかった黒色	0
	大きさ (μm)	直径：114-953 高さ：165-305	直径：110-250	直径：150-750 高さ：50-150
分生子形成細胞	形	分生子柄は分岐し，各分枝のフィアライド上に分生子を擬頭状に形成する	—	— ^{z)}
	大きさ (μm)	11-17.5×1.5-2.5	10.5-15.0×1.5-2.0	10.5-14.5×1.5-2.0
分生子	形	紡錘形，単胞，一端が切断状で他方の一端がやや突出	単胞，概ね楕円形からレモン型，表面は滑らか	概ね紡錘形
	色	無色～淡緑色	無色～淡緑色	—
	大きさ (μm)	7.5-5.0×2.0-3.0	7.5-9.0×2.5-3.0 7.5-8.8×2.0-3.0	6.5-8.0×2.0-3.5
生育温度 (適温)	10-35°C (30°C)	5-35°C (30°C)	5-35°C (30°C)	

w) PDA培地上 (25°C, 暗黒下, 30 日間)

x) 分生子の大きさは宿主上；それ以外はPDA培地上，村上ら (2005)

y) 宿主上，Tulloch (1972)

z) —は記載なしを示す。

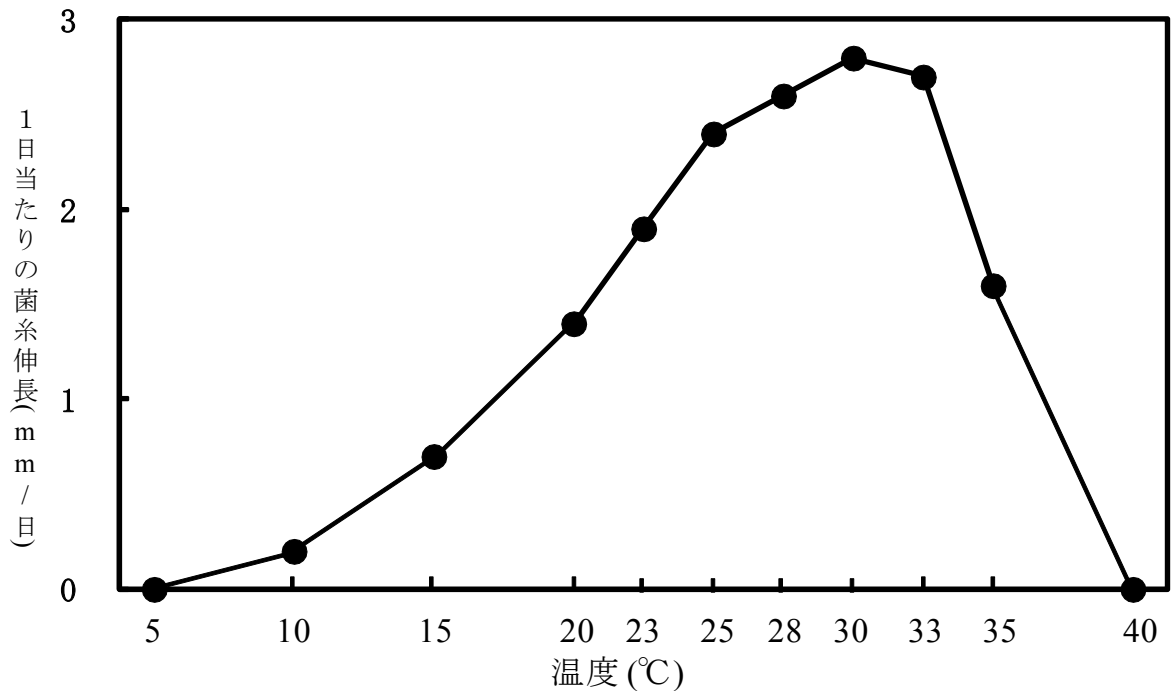


図 16 供試菌株 (D2) の一日当たりの菌糸身長

et al. (2005) が報告した *Myrothecium verrucaria* (Albertini et Schweinitz) Ditmar の菌叢の培養性状および分生子座, 分生子柄, 分生子の形態的特徴とよく一致した (表 47). なお, Tulloch (1972) が報告した *M. roridum* の分生子は棒状または幅の狭い楕円形であり, 供試菌株 (D2) とは異なった.

これら培養性状, 形態的特徴および rDNA の ITS 領域の塩基配列から, 供試菌株 (D2) を *M. verrucaria* と同定した.

わが国において *M. verrucaria* は, 唯一, クワ暗斑病の病原としての報告 (Murakami *et al.*, 2005) がある. 海外ではトウダイグサ類, メロン, スイカ, キュウリなどの葉などに病斑や壊死症状を引き起こす病原として多くの植物に報告されている (Yang and Jong, 1995a,

1995b ; Belisario *et al.*, 1999, 2006 ; Raymond *et al.*, 1959) が, ショウガでの報告はない.

このように, *M. verrucaria* によるショウガの病害は初めての報告であることから, 本病をショウガ根茎暗斑病 (英名 *Myrothecium rhizome spot*) と提唱した (山崎ら, 印刷中).

なお, 根茎の病徴が酷似するいもち病は, 古谷 (1995) によると, 地表面に露出した根茎にのみ病斑を形成し, 地中に埋もれた根茎には認められない. また, 病斑は収穫時にはすでに形成しており, 貯蔵中の病斑の拡大は無いとされる. 不整形な病斑あるいは根茎の節に沿った条斑が形成され, 後に同心輪紋となり, やがて病斑上に 1~2 mm の黒色でなめし皮状の菌核様構造物が形成される. また, 病斑部の根茎内部の腐敗を伴う. 分けつ初期の芽も侵され, 褐変し, 菌核様構造物が形成される. また, 栽培期間中にも発病し, 葉身, 葉鞘, 葉舌にも病徴が現れる. これに対し, 本病の病斑は, 収穫時には形成されずに貯蔵後約 1 ヶ月頃から徐々に褐色から黒色の不整形の病斑が現れ, 貯蔵期間が長くなるにつれて病斑の拡大, 数の増加が確認された. 黒色の不整形の病斑は, 根茎の節と節の間に形成されることが多く, 節に沿った条斑や菌核様構造物は形成されない. 病斑は根茎のごく表層にしか達しておらず, 根茎内部は腐敗しない. また, 栽培期間中は, 地上部の病徴は認められない. 高知県内の産地では, いもち病と根茎暗斑病が混在しているうえ, 両病害を混同している事例がみられたが, 本研究で明らかになった特徴により, 両病害の区別が可能となった.

第3節 各種植物に対する病原性

M. verrucaria は、植物病害として国内でクワ暗斑病に報告 (Murakami *et al.*, 2005) があり、海外では野菜類、果樹類をはじめハーブ類の病害としても知られている。また、同じ *Myrothecium* 属菌である *M. roridum* は、国内でクワ暗斑病、カラシコエ褐斑病、デルフィニウム根腐萎凋病、ブーバルジア暗斑病などの病原菌として報告されている (高橋ら, 1993 ; 堀之内ら, 1999 ; 西川, 2004 ; 竹内ら, 2009)。しかし、ショウガ根茎暗斑病菌 *M. verrucaria* の宿主範囲については不明である。

そのため、ショウガ根茎暗斑病の宿主範囲を明らかにするため、各種植物に対する接種試験を行った。

材料と方法

1. 供試菌株

第2節, 1で、ショウガ根茎暗斑病菌 *M. verrucaria* と同定したD2菌株を用いた。

2. 供試植物

キュウリ‘ZQ-2’, メロン‘アールス雅夏系2号’, トマト‘桃太郎’, ナス‘竜馬’, ピーマン‘みおぎ’, ハクサイ‘無双’, キャベツ‘金系201号’, ホウレンソウ‘オーライ (タキイ種苗)’, ニラ‘スーパーグリーンベルト’, ネギ‘雷山’を、高圧滅菌土壌を詰めたトレーで22日間育苗した後、4月30日に高圧滅菌土壌を詰めたコンテナ (縦72 × 横40 × 深さ26 cm, 容量40 L) に、1コンテナにつき4作物を5株ずつ移植した。また、オクラ‘アーリーファイブ’, ダイコン‘春蒔き総太り’, ニンジン‘時なし五寸’は、3月1日に、高圧滅菌土壌を詰めたコンテナに

5 粒ずつ播種した。供試植物は、接種までガラス室内で栽培した。

3. 接種源の調製

供試菌株をPDA平板培地で25°C、28 日間培養した菌叢に、滅菌水を加えてコンラージ棒で軽くなでた後、ガーゼで濾し、滅菌水を用いて分生子懸濁液を 1.0×10^6 個/mlに調製した。

4. 接種方法

4月30日、5月14日に、各植物体の地上部に分生子懸濁液を滴り落ちる程度に噴霧するとともに、株元にも1株につき1mlずつ灌注した。さらに、ダイコン、ニンジンには5月21日に1株につき分生子懸濁液を10mlずつ灌注した。なお、対照として、分生子懸濁液の代わりに滅菌水を用いた無接種区を設けた。接種後は、夜間にコンテナ全体をポリエチレンシートで覆って多湿状態を保った。コンテナは、最低温度20°C、換気温度35°Cに設定したガラス室内に置いた。

5. 調査

接種開始から2、24、43日後に、供試植物の地上部を観察するとともに、43日後に地下部を水洗後、根の病徴の有無を観察した。発病がみられた植物は、病斑部から接種菌の再分離を試みた。

結果

接種2日後に、ハクサイ、キャベツ、ホウレンソウ、オクラ、ダイコンの葉に、微小で円

形または不整形，中心部が白色で縁が褐色から黒褐色の病斑を生じた。オクラでは，葉のほか，茎，がくおよびさく果に同様の病斑が認められた。また，オクラについては，無接種区と比較して草丈が低く葉幅が小さく，生育の抑制が確認された。接種24 日後には，上記の他にニンジンにも葉に同様の病斑が認められた。ハクサイやキャベツでは，中肋に大型で黒色のカスリ状の病斑も認められた。接種43 日後の調査では，ダイコンでは，根の表面に黒色，不整形のカスリ状の病斑も認められた。なお，いずれの病徴部からも接種菌が再分離された。一方，キュウリ，メロン，トマト，ナス，ピーマン，ニラおよびネギでは，接種43 日後においても異常はみられなかった（表 48）。

表 48 ショウガ根茎暗斑病菌 (*M. verrucaria*) の各種植物に対する病原性

作物名	品種名	症状 ^{y)}	再分離 ^{z)}
キュウリ	ZQ-2	—	NT
メロン	アールス雅夏系 2 号	—	NT
トマト	桃太郎	—	NT
ナス	竜馬	—	NT
ピーマン	みおぎ	—	NT
ハクサイ	無双	a, b	+
キャベツ	金系201号	a, b	+
ハウレンソウ	オーライ	a	+
ニラ	スーパーグリーンベルト	—	NT
ネギ	雷山	—	NT
オクラ	アーリーファイブ	a, c, d, e	+
ダイコン	春蒔き総太り	a, f	+
ニンジン	時なし五寸	a	+

y) 症状：a；葉に中心部が白色で縁が赤褐色～暗褐色，円形～不正形の病斑を生じる，b；中肋に黒色のカスリ状の病斑を生じる，c；茎または葉柄に病斑を生じる，d；さく果やガクに病斑を生じる，e；草丈の抑制がみられる，f；根部に黒色の病斑を生じる

z) 再分離：+；あり，—；なし，NT；再分離を行っていない

考察

今回行った調査では、ショウガ根茎暗斑病菌は、ハクサイ、キャベツ、ホウレンソウ、オクラ、ダイコンおよびニンジンに病原性を示し、キュウリ、メロン、トマト、ナス、ピーマン、ニラおよびネギには病原性を示さないことが明らかとなった。なお、海外での報告では、キュウリ、メロンに同菌種による病害の報告があるが、本調査では確認できなかった。村上ら（2005）によると、クワ暗斑病の感染には品種差異があるとされており、キュウリ、メロンについては複数の品種を用いる必要があるのかもしれない。

本研究によって、ショウガ根茎暗斑病の宿主範囲が明らかとなり、本病害の発生圃場に講じる耕種的防除対策として、ハクサイ、キャベツ、ホウレンソウ、オクラ、ダイコン、ニンジンの輪作を避けることが有効であると考えられた。

第4節 発病推移

ショウガは、露地圃場で栽培された後、10月下旬から11月中旬にかけて根茎を掘取る。根茎は、土壌が付着した状態で低温庫などに貯蔵され、12月以降から順次調整・出荷される。根茎は、出荷前に、調整するために水洗いされるが、その時に初めて根茎に生じた病斑が確認されることになる。そのため、本病害の発生時期や発生程度の経過は不明であった。

そこで、本研究では、前年度にショウガ根茎暗斑病が多発した圃場から掘取ったショウガ根茎を用いて、貯蔵直前から貯蔵後の根茎表面を経時的に観察し、ショウガ根茎暗斑病の発病推移を調査した。

材料と方法

1. 供試ショウガ

2007年11月に、前作にショウガ根茎暗斑病が発生したJA高知市朝倉支所管内の2圃場から収穫したショウガ根茎をそれぞれA区、B区とし、JA土佐市戸波支所管内の2圃場から収穫したショウガ根茎をC区、D区とした。対照として、前作にショウガ根茎暗斑病の発生がみられなかったJA高知市朝倉支所管内の露地圃場で収穫したショウガ根茎をE区とした。各区とも2コンテナ（16kg/コンテナ）分を用いた。

2. 貯蔵方法

2007年11月9日にA区、B区、E区、11月7日にC区、11月15日にD区のコンテナを15°Cに設定した予冷庫へ静置した。

3. 調査

1) 試験1：1 茎当たりに形成される病斑数

貯蔵開始日、12月12日、1月11日、2月12日に、各区のコンテナから無作為に根茎1.2 kgを取り出し、次の指数により1 茎当たりに形成される病斑数を評価し、次式によって発病度を算出した。調査済みの根茎はコンテナに返さなかった。1 茎当たりに形成される病斑数の指数は、異常なしを0、1カ所を1、2～3カ所を2、4～5カ所を3、6カ所以上を4とした。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病茎数} \times \text{指数}) \div (\text{調査茎数} \times 4) \times 100$$

2) 試験2：1 茎当たりに形成される発病程度

調査開始日にあらかじめ各区の1.2 kgの根茎を定期調査用の根茎として印をし、貯蔵開始日、12月12日、1月11日、2月12日に、次の指数によって1 茎当たりの発病程度を評価し、次式によって発病度を算出した。調査済みの根茎はコンテナへ戻し、次回の調査に供した。1 茎当たりに形成される発病程度の指数は、異常なしを0、傷およびその周縁が黒変を1、表面に褐色のシミを伴わない小黒点がわずかにみられる、または、褐色のシミを生じ、その周縁や内部の1/3未満に黒点がみられるを2、褐色のシミを生じ、その周縁や内部の1/3以上1/2未満が黒変するを3、褐色のシミを生じ、その周縁や内部の1/2以上が黒変するを4とした。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発生茎数}) \div (\text{調査茎数} \times 4) \times 100$$

結果

1. 病斑数の推移

前年度にショウガ根茎暗斑病の発生した圃場や発生しなかった圃場で採取したショウガの病斑数を調査した結果、1 茎当たりに形成される病斑数は、いずれの区とも貯蔵開始前には

シヨウガ根茎暗斑病は発病していなかったが、12月12日調査ではA区、B区、C区およびD区、1月11日調査ではA区、C区およびE区で発病し、2月12日調査では全ての区で発病した。また、根茎当たりの病斑数の発病度は、A区とC区で高い傾向であった。なお、E区では1月11日以降にシヨウガ根茎暗斑病の発病がみられたが、他の区と比べて総じて少なかった（表 49）。

2. 発病程度の推移

前年度にシヨウガ根茎暗斑病の発生した圃場や発生しなかった圃場で採取したシヨウガの発病程度を調査した結果、前年度に発病のみられた圃場で採集されたA区、B区、C区およびD区でシヨウガ根茎暗斑病の発生がみられた。発病度はA区とC区で高く、B区とD区で低い傾向であった。なお、E区では全ての調査日でシヨウガ根茎暗斑病の発生はみられなかった（表 49）。

表 49 シヨウガ根茎暗斑病の発病推移

採取圃場	前年度 ^{y)} の発生	病斑数				発病程度			
		11月 (貯蔵日)	12月12日 (27～35日 後)	1月11日 (57～65日 後)	2月12日 (89～97日 後)	11月 (貯蔵日)	12月12日 (27～35日 後)	1月11日 (57～65日 後)	2月12日 (89～97日 後)
A	有	0.0	10.1	8.1	25.0	0.0	16.0	18.8	20.1
B	有	0.0	2.6	0.0	1.4	0.0	2.7	2.7	NT
C	有	0.0	5.0	7.5	12.3	0.0	0.0	6.4	13.6
D	有	0.0	1.5	0.0	9.7	0.0	0.5	0.5	2.0
E	無	0.0	0.0	0.9	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0

注) NT: 根茎の一部に腐敗が生じたため、調査をしていない

考察

前年度にショウガ根茎暗斑病が発生した圃場から収穫したショウガ根茎を用いて、貯蔵直前から貯蔵後の根茎表面を経時的に観察した結果、ショウガ根茎暗斑病は貯蔵開始1ヶ月後の12月中旬に現れ始めるとともに、貯蔵期間が長くなるにつれて病斑数や発病程度が高くなる傾向がみられた。これにより、ショウガ根茎暗斑病は、ショウガを露地圃場から収穫した直後には病斑を根茎表面に生じさせないこと、病斑は貯蔵約1ヶ月から生じ始めること、貯蔵期間が長くなるほど病斑数や病斑の色が濃くなっていくことが明らかとなった。また、栽培圃場により発病の程度に違いがあることも明らかになった。

第5節 伝染源となりやすい有機物資材の検討

ショウガの根茎は、栽培期間中のみならず、収穫後も直ちに土壌が付着した状態で貯蔵される。また、種根茎ともなると、採種圃場の掘取りから次作の植付け収穫・貯蔵に至るまで土壌から切り離されることは無い。長期にわたり土壌に接触しており、根茎が水洗いされ、表面の異常に気がつくのは調整・出荷の段階になってからである。

栽培期間中に大量に施用される有機物資材は、土壌伝染性病害を媒介する可能性があるため、被害を拡大させる伝染源と成り得る。ショウガでは、稲わらやケイントップ（サトウキビの残渣）など有機物資材を、本圃の土作りを目的に次作の栽培前に投入したり、雑草の発生抑制、畦内の水分保持、地温上昇抑制などの効果を期待してショウガ植付け後の畦上に敷き詰める。

通常、土づくり用の有機物資材を投入後に土壌消毒することが多いが、本病害が土壌くん蒸で防除可能かは不明であった。また、有機物資材のうちマルチとして使用されるものは、土壌消毒後に圃場に持ち込まれるため、病原菌を運び込む恐れがある。また、有機物資材が土壌消毒により生き残った病原菌の生息の温床となる可能性もある。

Myrothecium 属菌は、世界中に広く分布し、土壌、多様な植物性の基質、繊維、穀物、種子、靴、紙などに存在し、日本全国の土壌からも採取され、特に、有機質の高い土壌に多く存在し、セルロース分解能に富むとされる（宇田川ら, 1978）。

そこで、有機物資材がショウガ根茎暗斑病菌の伝染源となる可能性を明らかにするため、ショウガ圃場において主に施用される3資材を用いて、本病原菌の繁殖について調査した。

材料と方法

1. 供試菌株

第2節, 1) でショウガ根茎暗斑病菌 *M. verrucaria* と同定したD2菌株を用いた。PDA平板培地で、25°C, 暗黒下で21日間培養し、菌叢を直径4 mmのコルクボーラーで打ち抜いて得た菌叢ディスクを用いた。

2. 供試資材

稲わら, 麦わら, ケイントップの葉および茎を、長さ4 × 幅1 cmに細断し、高圧滅菌して用いた。なお、ケイントップは、含有する石灰窒素の影響を避けるため、あらかじめ10分間水道水をかけ流しながら洗ってから用いた。

3. 接種

直径9 cmのシャーレにひいたWA平板培地の中央に菌叢ディスクを置き、その四方を囲むように1シャーレにつき供試資材4片を置床した。その後、25°C, 暗黒下に静置した。各資材の部位ごとに2シャーレ8片ずつ用いた。

4. 調査

試験開始から随時、分生子塊の形成を観察し、140日後に各資材の葉および茎の表面に形成された分生子塊の個数を計数した。また、各資材の葉および茎を置床した4シャーレのWA平板培地上に形成された分生子塊の個数を計数した。

結果

いずれの供試資材とも、置床 13 日後には資材表面に菌糸の伸長が、置床 22 後には分生子塊の形成が観察された。置床 140 日後になると、分生子塊は、稲わらの葉には 1.8 個、茎には 1.8 個形成され、稲わらを置床した WA 平板培地上では 0.0 個であった。稲わらでは、葉と茎に形成される分生子塊の形成数に差はなかったが、麦わらの葉では 4.3 個、茎では 0.0 個であり、ケイントップの葉では 6.1 個、茎では 2.9 個と差がみられた。また麦わらを置床した WA 平板培地上では 0.5 個、ケイントップでは 23.0 個の分生子塊が形成された (表 50)。

表 50 有機物資材に形成された *M. verrucaria* の分生子塊数

	葉 ^{y)}	茎 ^{y)}	WA平板培地上 ^{z)}
稲わら	1.8	1.8	0.0
麦わら	4.3	0.0	0.5
ケイントップ	6.1	2.9	23.0

y) 数値は、8片の平均値を示す。

z) 数値は、4シャーレの平均値を示す。

考察

ショウガの栽培期間中に用いられる有機物資材のうち、ケイントップの葉および茎が最も *M. verrucaria* の分生子塊を形成しやすかった。なお、供試資材の葉と茎を別々に調査した結果、稲わらでは両者に差がみられなかったが、麦わらおよびケイントップでは茎より葉に分生子塊が形成されやすい傾向がみられた。また、ケイントップでは、ケイントップ

を置床した WA 平板培地上にも多数の分生子塊を形成したことから、ケイントップは *M. verrucaria* が繁殖しやすい資材であると考えられた..

高知県のショウガ栽培では、以前は有機物資材として稲わらを使用することが殆どであったが、栽培規模の拡大や 1997 年の口蹄疫の発生による台湾産稲わらの規制などによる供給不足のため、稲わらの代替としてケイントップの利用が多くなっている。今回供試したケイントップは水洗して用いたが、商品には石灰窒素が添加されている。石灰窒素による *M. verrucaria* への影響は不明であるが、商品に本病原菌が付着している可能性は低いと考えられる。そのため、他のルートで持ち込まれた本病原菌が、降雨や灌水などによりケイントップの石灰窒素が流亡した後に付着・繁殖することが想定された。

第6節 ショウガ根茎暗斑病の防除法

ショウガ根茎は、栽培期間のみならず貯蔵期間においても、常に土壌が付着した状態であるため、本病害の発生が見過ごされやい。さらに、調整・出荷時には複数の障害が混在しており、ショウガ根茎に生じる他の障害との区別ができていない。

本研究により、ショウガ根茎暗斑病の病徴が明らかにされるとともに、病原菌が *M. verrucaria* と同定された。これにより、ショウガ根茎暗斑病と他障害との判別ができるようになると考えられた。また、本病原菌が同定されたことで、ショウガ根茎暗斑病が土壌伝染性病害であり、かつ有機物資材で繁殖して伝染源となる可能性も示唆された。そのため、ショウガ根茎暗斑病を防除するには、土壌くん蒸処理の他、生育期の殺菌剤の灌注処理が有効であると考えられた。

ここでは、ショウガに農薬登録されている土壌くん蒸剤の殺菌効果ならびに作用機作の異なる数種の殺菌剤のショウガ根茎暗斑病に対する防除効果を検討した。

材料と方法

1. 土壌くん蒸剤

1) 供試薬剤

ダゾメット粉粒剤 (60 kg/10 a) , クロルピクリンくん蒸剤 (10,000 錠/10 a) , クロルピクリン・D-Dくん蒸剤 (30 L/10 a) およびカーバムナトリウム塩液剤 (30 L/10 a) を供試した。

2) 供試菌株と汚染麦稈の作製

第2節, 1) でショウガ根茎暗斑病菌 *M. verrucaria* と同定したD2菌株を用いた。第3節,

3と同様に分生子懸濁液を調整し、あらかじめ長さ4 cm×幅1 cmに裁断した高圧滅菌済み麦稈500 gにつき50 mlを噴霧した。その後、密閉容器に入れ、25°C、暗黒下で35日間培養し、麦稈1片に10個以上の分生子塊を形成したものを汚染麦稈とした。あらかじめ高圧滅菌した不織布に、1包につき汚染麦稈3片を包んで用いた。

3) 接種と薬剤処理

2013年4月26日に、排水口に栓をした1/2,000 aのワグネルポットに高圧滅菌土壌15Lを詰め、ポットの中央（地表面から深さ約10～15 cm）に汚染麦稈を1包ずつ埋没した。ダゾメット粉粒剤は、ポット内の土壌表面に散布し、移植ごとで深さ0～15 cmの土壌と混和した。クロルピクリンくん蒸剤は、地表面から15 cmの深さに埋没した。クロルピクリン・D-Dくん蒸剤とカーバマナトリウム塩液剤は、手動式土壌注入器を用い、地表面から15 cmの深さに1穴につき1.5 mlを点注処理した。いずれの薬剤区のポットとも、施用後直ちに厚さ0.05 mmの透明ポリエチレンシート（以下、シートとする）で被覆した。無処理区のポットもシートで被覆した。5月10日（処理14日後）に全ての薬剤区および無処理区のポットのシートを除去した。各区につき5ポット用いた。

4) 調査

土壌くん蒸処理14日後に、各区から回収した麦稈3片をPDA培地に置床し、25°C、暗黒下に静置した。静置14日後の菌叢の形成の有無を調査し、菌叢を形成したものを生存しているとした。分生子塊の生存率は、次式により算出した。

分生子塊の生存率 (%) = 菌叢を形成した麦稈片数 ÷ 調査麦稈片数。

2. 殺菌剤

1) 供試薬剤

イプロジオン水和剤（商品名：ロブラール水和剤）、キャプタン水和剤、トリフルミゾール水和剤、ベノミル水和剤、マンゼブ水和剤（ジマンダイセンフロアブル）、TPN 水和剤（ダコニール 1000）、ミクロブタニル水和剤（ラリー水和剤）、クレソキシムメチル水和剤（ストロビーフロアブル）、シアゾファミド水和剤、プロパモカルブ塩酸塩液剤、バリダマイシン液剤、フルトラニル水和剤（モンカットフロアブル 40）、チオファネート水和剤、ヒドロキシイソキサゾール液剤の 14 種類の薬剤を、有効成分濃度が 0.05 %になるよう希釈して用いた。

2) 供試菌株と接種源の調製

第 2 節, 1) でショウガ根茎暗斑病菌 *M. verrucaria* と同定した D2 菌株を用いた。供試菌株を PDA 平板培地に移植し、25°C, 暗黒下で 10 日間培養後、菌叢の周縁部を直径 3 mm のコルクボーラーで打ち抜いて菌叢ディスクを得た。

3) 供試薬剤の処理方法と接種

各供試薬剤の希釈液を浸漬後、風乾させた後に、菌叢ディスクを貼付した。

4) 供試ショウガ

接種に用いるショウガ根茎は、あらかじめ 30°C の恒温器内で萌芽させたショウガ根茎を萌芽部を含む約 3 cm 角に切り分けて、高圧滅菌土壌を詰めた直径 9 cm のポリエチレンポットに 1 つずつ植付け、ガラス室で約 3 ヶ月間栽培した後に掘り上げたものを用いた。根と偽茎を除去して調製した根茎を水道水で洗浄後、70 %エタノールに 1 分間浸漬して表面を殺菌し、滅菌水で洗浄して用いた。

5) 接種

根茎表面に菌叢ディスクを1枚ずつ、菌叢面が根茎に密着するように貼り付け、密閉容器（縦20×横13×深さ8 cm）中で、15 °C、多湿条件下に10日間置いた。なお、対照として、ショウガ根茎にPDA培地ディスクのみを貼り付けた。

6) 調査

接種14日後、ショウガ根茎を洗浄し、菌叢ディスクの貼付部を次に示した指数に基づいて評価し、次式により発病度を算出した。なお、薬害は根茎表面に生じる異常の有無を目視により観察した。指数は、異常なしを0、貼付部の根茎表面が薄黒色の水浸状となるを1、貼付部およびその周辺の根茎表面が薄黒色の水浸状となるを2、貼付部の根茎表面が黒変するを3、貼付部およびその周辺の根茎表面が黒変するを4とした。

$$\text{発病度} = \Sigma (\text{指数} \times \text{指数別発病根茎数}) \div (\text{調査根茎数} \times 4) \times 100$$

結果

1. 土壌くん蒸剤

土壌くん蒸剤のショウガ根茎暗斑病に対する防除効果を明らかにするため、土壌くん蒸剤処理後の麦稈上の*M. verrucaria*の生存率を調査した結果、無処理区の生存率が100%であったのに対し、ダズメット粉粉剤区とカーバムナトリウム塩液剤区が0.0%、クロルピクリン錠剤区が6.7%、クロルピクリン・D-Dくん蒸剤区が20.0%であった（表 51）。

表 51 土壌くん蒸処理後の汚染麦稈上の*M. verrucaria*の生存率 (%)

区	処理	生存率 (%)					平均
		1	2	3	4	5	
ダゾメット粉粒剤	60 kg/10 a	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
クロルピクリンくん蒸剤	1 万錠/10 a	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	6.7
クロルピクリン・D-Dくん蒸剤	30 L/10 a	0.0	0.0	66.7	33.3	0.0	20.0
カーバムナトリウム塩液剤	30 L/10 a	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
無処理	—	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

2. 殺菌剤

殺菌剤のショウガ根茎暗斑病に対する防除効果を明らかにするため、殺菌剤を浸漬処理したショウガ根茎に*M. verrucaria*の菌叢ディスクを接種した結果、ベノミル水和剤処理では発病度が41.7で低く、最も高い防除効果を示した。次いで、トリフルミゾール水和剤処理、チオファネートメチル水和剤処理の発病度が低く、防除効果が認められた。なお、いずれの薬剤も薬害は認められなかった（表 52）。

表 52 各種殺菌の浸漬処理によるショウガ根茎暗斑病菌
(*M. verrucaria*) に対する防除効果

供試薬剤	有効成分 の濃度 (%)	有効成分の濃度を 0.05%とした場合 の希釈倍率	発病度	薬害 ^{z)}
イプロジオン水和剤	50.0	1000	66.7	—
キャプタン水和剤	80.0	1600	83.3	—
トリフルミゾール水和剤	30.0	600	50.0	—
ベノミル水和剤	50.0	1000	41.7	—
マンゼブ水和剤	20.0	400	83.3	—
TPN水和剤	40.0	800	75.0	—
ミクロブタニル水和剤	10.0	200	66.7	—
クレソキシムメチル水和剤	44.2	884	100.0	—
シアゾファミド水和剤	9.4	188	91.7	—
プロパモカルブ塩酸塩液剤	64.0	1280	83.3	—
バリダマイシン液剤	5.0	100	75.0	—
フルトラニル水和剤	40.0	800	83.3	—
チオファネート水和剤	70.0	1400	58.3	—
ヒドロキシイソキサゾール液剤	41.5	830	100.0	—
無処理			100.0	—

z) 薬害: +;あり, -;なし

考察

作物登録のある土壌くん蒸剤のうち、臭化メチル剤の代替剤として導入が進んでいるダゾメット粉粒剤、クロルピクリンくん蒸剤、クロルピクリン・D-Dくん蒸剤、カーバムナトリウム塩液剤があるが、ショウガ根茎暗斑病を対象とした登録薬剤はない。また、生育期のショウガに土壌灌注処理できる殺菌剤は、ショウガ根茎腐敗病に登録のあるシアゾファミド水和剤、プロパモカルブ塩酸塩液剤およびアゾキシストロビン+メタラキシルM粒剤、アミスルブロム水和剤の4剤のみであり、ショウガ根茎暗斑病にはない。なお、海外では、*M. verrucaria*

と同属の*M. roridum*に対し、イプロジオン水和剤、キャプタン水和剤の防除効果が高く、次いでトリフルミゾール水和剤の効果があり、ベノミル水和剤、マンゼブ水和剤は効果が劣ると報告されている (Chase, 1990) . しかし、*M. verrucaria*と対して防除効果のある薬剤は不明である.

そこで、ショウガに農薬登録されている土壤くん蒸剤4剤を用いてショウガ根茎暗斑病菌の分生子塊の生存率を調査したところ、ダゾメット微粉剤 (30 kg/10 a, 土壤表面散布混和処理) とカーバムナトリウム塩液剤 (30 L/10 a, 点注処理) の有効性が示唆された. また、殺菌剤14 剤について、浸漬処理したショウガ根茎にショウガ根茎暗斑病菌の菌叢ディスクを接種した結果、ベノミル水和剤、トリフルミゾール水和剤およびチオファネートメチル水和剤が有効であることが示唆された. 現在、ショウガ根茎暗斑病を対象に登録農薬された土壤くん蒸剤や殺菌剤はないため、本研究の結果は本病に有効な防除薬剤の基礎的データとして有効であると考え. なお、土壤くん蒸剤と殺菌剤とも農薬登録を進めるにあたっては発生圃場での試験を実施するなど更なる検討が必要と考える.

第5章 総合考察

高知県では、温暖で多照な気候を利用して古くから園芸作物の早期栽培に取り組み、バラエティーに富んだ施設野菜の栽培が盛んに行われている。また、県中央部や西部では水田地域を中心に露地野菜が栽培されている。なかでも、本県は施設ニラや露地ショウガの国内一の生産量を誇る産地となっている。一方、県土面積の84%は林野が占めているため、農業生産は限られた耕地面積で集約的に行わなければならない。年間を通じて多種多様な病害の発生が問題となっている。特に、農地の高度利用によって、県内産地では土壤伝染性病害が慢性的に発生し、園芸作物の収量や品質に影響を及ぼしている。土壤伝染性病害は、地上部病害より多くの発生要因が関与するため、病原菌の特定や生理生態の把握に困難を伴うことが多く、防除対策も総合的に講じなければならない。限られた農地を有効利用し、生産力の維持や品質の向上を目指すためには、これら土壤伝染性病害の発生生態や病原菌の生理生態を明らかにし、それらを理解したうえで、効率の良い病害診断の開発や有効な防除技術を選択する必要がある。

本研究では、高知県で発生する土壤伝染性病害のうち、これまでに詳細な発生生態の報告のなかったニラ乾腐病、ニラ紅色根腐病ならびに病原菌が不詳であったショウガ疫病およびショウガ根茎暗斑病の発生実態を解明した。また、生産現場において最も必要とされる防除法については、耐性のある植物や品種による耕種的防除に加えて、土壤還元消毒、太陽熱消毒および湛水処理による土壤消毒法、土壤くん蒸処理、生育期の殺菌剤による土壤灌注処理について、それぞれに有効な方法を明らかにした。さらに、ニラ乾腐病については、本病原菌の分子系統解析を行い、近縁と考えられるネギ萎凋病菌や、非病原性 *Fusarium* 属菌との系統関係を明らかにした。加えて、病原性 *Fusarium* 属菌と非病原性 *Fusarium* 属

菌は培養性状や形態では識別が困難であること、生育不良の原因を植物体からの菌分離のみに頼る現行の診断では信憑性を欠くことから、両菌を区別することのできる病害診断の開発に取り組んだ。

ニラ乾腐病では、これまでに病原は *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder et Hansen と報告されていた（木嶋ら, 1983）が、病原菌の生理生態、分子系統学的分類に関する知見が少なかった。本研究によって、ニラ乾腐病には既報告の *F. oxysporum* の他に *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg ex Gerlach and Nirenberg var. *minus* Nirenberg も関与することが明らかとなった。また、本病は高知県の主要産地で発生しており、病原菌は *F. oxysporum* が優先種であること、一部の圃場では乾腐病菌と紅色根腐病菌が複合感染する事例があることが確認された。また、ニラが属するヒガンバナ科ほか、数種の植物への接種試験によって宿主範囲を明らかにするとともに、*F. oxysporum* の分化型をタマネギ乾腐病やネギ萎凋病と同じ *f. sp. cepae* と同定した。

さらに、同じ分化型 (*f. sp. cepae*) であるニラ乾腐病菌とネギ萎凋病菌の系統関係を明らかにするため、rDNA-IGS 領域、EF1 α 領域および histone H3 領域の結合塩基配列に基づく分子系統解析と交配型遺伝子 (*MAT* 遺伝子) 検定を行った。その結果、両病原菌の一部は同じクラスター CA に含まれるとともに、*MAT1-1* と *MAT1-2* の 2 種類の交配型が存在した。また、ニラ乾腐病菌 (*F. proliferatum*) とネギ萎凋病菌 (*F. proliferatum*) も同じクラスター CE に属するうえ、2 種類の交配型が存在した。これにより、両病原菌の間で遺伝的な交流がある可能性が示唆された。なお、本県では香南市、香美市、越知町などニラとネギが同一地区で栽培されているケースが多く、両病原菌が会う素地は十分にあると考える。そのため、ニラおよびネギの産地における両病害の発生状況を把握しておくことが必要である

と考える.

また, ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) と非病原性 *F. oxysporum* についても 3 領域の結合塩基配列に基づく系統中で同じクラスターCAに属するとともに2種類の交配型が存在し, ニラ乾腐病菌 (*F. proliertum*) と非病原性 *F. proliertum* についても同様であった.

このことから, 例えば, 非病原性 *Fusarium* 属菌が病原性を獲得する, またその逆の現象が生じることもあり得るのではないかと考える. このクラスターCA, CEに含まれる両菌の遺伝的な相違を解明することで, 病原性獲得のメカニズムや両菌を識別することができる遺伝子領域が明らかになるのではないかと考える.

なお, *F. oxysporum* f. sp. *cepae* であるタマネギ乾腐病菌やネギ萎凋病菌には複数の系統が存在することが報告されている (Southwood *et al.*, 2012; Dissannayake *et al.*, 2009a, 2009b; 伊藤, 2009). ニラ乾腐病菌についても, 本研究の結果, 先に述べた 3 領域の結合塩基配列に基づく分子系統樹中で複数の系統が存在した. また, そのうち一部の系統では, ネギ萎凋病菌とトマト萎凋病菌レース 3 も含まれた. トマト萎凋病菌をはじめとする病原性 *F. oxysporum* の分化型には病原性関連遺伝子 (*SIX* 遺伝子) (Rep 2004, 2005, Houterman 2008, 2009, Lievens *et al.*, 2009 ; Inami *et al.*, 2012 ; Kashiwa *et al.*, 2013) が存在するとされている. 一方, 非病原性 *F. oxysporum* は, *SIX* 遺伝子を保持しない (Lievens *et al.*, 2009) と報告されている. そこで, ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) と非病原性 *F. oxysporum* を識別する指標として *SIX* 遺伝子が有望であると考えた. そこで, ニラ乾腐病菌に病原性関連遺伝子 (*SIX* 遺伝子) が存在することを期待して, これまでに他分化型で報告のある *SIX1*~*7* の検定を行ったが, ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*) および健全ニラから分離された非病原性 *F. oxysporum* の両方とも, いずれの *SIX* 遺伝子も保持しなかった. また, ニラ

乾腐病菌 (*F. proliferatum*) および健全ニラから分離された非病原性 *F. proliferatum* の両方とも、いずれの *SIX* 遺伝子も保持しなかった。これにより、*SIX1*~7 による病原性 *Fusarium* 属菌と非病原性 *Fusarium* 属菌の識別は困難であることが明らかとなった。しかし、*F. oxysporum* f. sp. *cepae* であるニラ乾腐病菌とネギ萎凋病菌は *SIX1*~7 を保持しないものの、ニラやネギに対する病徴や宿主範囲が同じであることから、*SIX1*~7 以外の共通の病原性関連遺伝子を有する可能性が考えられる。なお、ニラと同じ分化型である f. sp. *cepae* については、ネギ萎凋病菌はいずれの系統とも *SIX1*~7 を保持しないが、タマネギ乾腐病菌のタマネギに強い病原性を示す一部の系統では *SIX3*, 5, 7 を保持することが伊藤 (2013) により報告された。本研究において、rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく分子系統樹中でクラスターGC に属したニラ乾腐病菌の菌株は、他の菌株と比べてニラに対する発病度がやや高く、クラスターGD に含まれたネギ萎凋病菌の菌株はネギに対して高く、タマネギ乾腐病菌の菌株はタマネギに対して高い傾向がみられたことから、f. sp. *cepae* には、ニラ、ネギおよびタマネギに対する病原性にバリエーションが存在するのではないかと考える。ただし、ニラ乾腐病菌については、*F. oxysporum* f. sp. *cepae* のクラスター間や、*F. oxysporum* f. sp. *cepae* と *F. proliferatum* の間に、ニラに対する病徴に違いはなく、病原力についても生産現場で問題になるほどの大きな差異はないと判断されることから、今のところ圃場において系統や種をあえて区別する必要はないと考える。

診断法については、分離菌がニラに病原性を有するか否かを、従来の検定法より短期間で、かつ省力的に病害診断することができる簡易検定法を確立した。この方法により、一度に多くのスクリーニングが可能となることから、生理障害や他病害との区別が困難な場合や、土壌中の病原菌の有無を調査する場合などに活用でき、防除対策を策定する際の

助になると考える。また、ニラ植物体内からのニラ乾腐病菌の分離部位を調査したところ、感染時期や病徴の進展に関わらず茎盤が最も分離率が高く、非病原性 *Fusarium* 属菌も茎盤から高率に分離された。ニラ乾腐病菌（病原性 *Fusarium* 属菌）と非病原性 *Fusarium* 属菌の分離部位が異なることを期待したが、両菌のニラ植物体内の分布には大きな違いはなかったため、分離部位による病害診断は困難であると考えられる。そのため、現在のところ、ニラ茎盤から分離した *Fusarium* 属菌を本研究で確立した簡易検定法によって病原性を確認することが有効であると考えられる。

防除法では、ニラ品種のうち‘タフボーイ’が最も乾腐病に対して強く、耕種的防除への活用が期待された。また、太陽熱消毒は、本病に対して有効であった。本研究では、太陽熱処理期間中にポット内温度が 40°C を越えることはなかったが、石灰窒素による殺菌効果や土壌 pH の上昇によってニラ乾腐病菌密度が抑制された結果、防除効果が得られるものと推察される。土壌くん蒸処理では、既に本病に登録のあるダゾメット粉粒剤、カーバムナトリウム塩液剤には防除効果が認められたものの、省力化を期待したクロルピクリン蒸剤とクロルピクリンテープの防除効果が低いことが明らかとなった。また、生育期の殺菌剤では、既にニラに農薬登録のあるチオファネートメチル剤の他、ニラに使用適用のないベノミル水和剤、ヒドロキシイソキサゾール水和剤、バリダシン液剤、亜リン酸液体肥料の土壌灌注処理の防除が有効であることが明らかとなった。土壌伝染性病害の防除には土壌消毒を基幹防除とすることが理想と考えるが、休耕期間が短い、あるいは本圃の一部を育苗圃とするケースのように土壌消毒ができない栽培体系では、栽培終了までニラの生育維持を目的とした生育期の殺菌剤などの土壌灌注処理が有効であると考えられる。

ニラ紅色根腐病については、病原として *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walker &

Larson が報告されていた（石川ら, 1995）が、発生時期や伝染方法など発生生態が不明であり、効果的な防除方法も明らかになっていなかった。本研究により、ニラ紅色根腐病の発生状況を調査した結果、県内の主産地において発生が認められた。また、一部の圃場では紅色根腐病菌と乾腐病菌の複合感染が確認されたので、感染時期別の病徴について調査した。その結果、ニラの発芽は単独感染と複合感染とも同程度に抑制され、本圃では単独感染より乾腐病菌との複合感染によって強い生育抑制が引き起こされることが明らかとなった。

ニラ紅色根腐病菌の宿主範囲は、ニラのほか、キュウリ、グロリオサ、ショウガおよびメロンであり、本病の発生圃場ではこれらの作付けを避けるといった作付計画を示すことが可能となった。その他、本菌の生育適温や死滅温度、本病の発病適温など、生理生態に関する基礎的データを得られた。

防除法では、土壌消毒では土壌還元消毒や太陽熱消毒、土壌くん蒸剤ではダゾメット粉粒剤、カーバムナトリウム塩酸剤、クロルピクリン錠剤およびクロルピクリンテープのいずれの剤も本病に対して防除効果が高く、生育期の殺菌剤ではトリフルミゾール水和剤の土壌灌注処理が有効であることを明らかにした。また、ニラ乾腐病とニラ紅色根腐病が併発した圃場においては、太陽熱消毒、クロルピクリン蒸剤やクロルピクリンテープによる同時防除（2013年9月時点の両剤の農薬登録上の適用範囲は、ニラ乾腐病のみである）が有効であると考えられた。なお、生育期の土壌灌注処理の使用が農薬登録により認められている殺菌剤はチオファネートメチル水和剤のみであるので、今後の適用拡大が望まれる。

ショウガ疫病は、生育期のみならず収穫後の貯蔵中においても発生し、根茎の腐敗を引き起こす。また、流通過程および店頭販売時において発生した場合には腐敗事故として扱われるため、原因菌の特定と発生生態ならびに防除法の確立が望まれていた。ショウガ疫

病の病原は *Phytophthora* sp. であり発生時期も示されていたが (小林ら, 1999), 種の同定には至っておらず, 詳しい発生生態は不明で, 具体的な防除対策は検討されていなかった.

本研究によって, 病原菌を *Phytophthora citrophthora* (R. E. Smith and E. H. Smith) Leonian と同定し, 宿主範囲や発病適温などの生理生態を明らかにするとともに, 本病の露地栽培条件下や貯蔵中の発生生態, ならびに具体的な防除対策を示すことができた. 防除法は, 土壌消毒では土壌還元消毒や湛水処理, 土壌くん蒸剤ではチルイソチオシアネート・D-D 油剤, クロルピクリン液剤およびダゾメット粉粒剤による土壌くん蒸処理, 生育期の予防的なシアゾファミド水和剤の土壌灌注処理が本病に対して防除効果が高いことを示した. また, 露地ショウガでの本病の発生時期は初夏と秋期の年 2 回であった. なお, 高知市の 5 月下旬~6 月上旬と 10 月上旬~中旬の平均気温の平年値はそれぞれ 20.5~21.8°C, 21.3~19.5°C であり, 本研究によって明らかにしたショウガ疫病の発病時期や発病適温とほぼ一致した. この時期に圃場が浸冠水して, 疫病菌が流入・拡散すると発病の可能性が高まるため, 降雨が予想される場合には, 予防的なシアゾファミド水和剤の土壌灌注処理による本病の発生抑制効果が高いと考える. 特に, 栽培後期の適切な防除は, 生育期の発病のみならず, 貯蔵中の腐敗を抑制する効果が期待できる. なお, ショウガ疫病は新病害であるため, 2013 年 9 月時点では本病を対象とした登録農薬はないが, 先に述べた農薬であれば, 同じ卵菌類であるショウガ根茎腐敗病との同時防除が可能である. 今後は, ショウガ疫病を対象とした, 収穫前日数の短い土壌灌注剤の適用拡大が望まれる. ショウガ疫病は栽培から貯蔵までの長期に亘って発生する病害であるため, 本研究で明らかにした本圃での土壌消毒, 生育期の殺菌剤の土壌灌注処理および収穫時の罹病根茎の除去や発病株周辺の土壌の混入を避けるといった複数の防除法を講じることによって, 本病の発生軽減が期待で

きると考える。

なお、ショウガ疫病の生育期の病徴はショウガ根茎腐敗病と類似するため、これまでに見落とされていた可能性がある。近年では、熊本県や鹿児島県でも発生が確認されており（森山；西，私信），今後の国内における発生拡大が懸念される。ショウガ疫病とショウガ根茎腐敗病は，第3章第4節の考察に記述した方法によって識別することが可能である。

ショウガ根茎暗斑病は，生育期に地上部や地下部に異常を生じさせないが，収穫され貯蔵を経て調整・出荷される際にはじめて発生が確認されることや，黒色の大型不整形の病斑を形成して外観を著しく損なうために等階級を落とさざるを得ないことから，産地で大きな問題となっていた。これまで，ショウガ根茎暗斑病による知見はなく，生産や流通の現場では，病斑を他病害や生理障害などと間違って認識されていたため，病原菌，発生生態および防除法が不明であり，十分な対策ができていなかった。本研究の結果，本病原菌が *Myrothecium verrucaria*(Albertini et Schweinitz) Ditmar であることを初めて明らかにし，病名をショウガ根茎暗斑病とした。これまで，海外での *M. verrucaria* による病害は多くの植物に報告されている（Yang and Jong, 1995a, 1995b ; Belisario *et al.*, 1999, 2006 ; Raymond *et al.*, 1959）が，国内ではクワ暗斑病の病原としての報告（Murakami *et al.*, 2005）のみであり，本菌によるショウガの病害報告は国内ならびに海外でも初めてであった。さらに，本菌の宿主範囲や伝染源となりうる有機質資材についても明らかにし，生理生態の一端を示すことができた。有機質資材であるケイントップは，1997年の口蹄疫以降に被覆資材である稲わらの代替として高知県内の露地ショウガで慣行的に使用されており，生育期に本病原菌の温床となる可能性が懸念される。また，本研究によって，これまで全く手付かずであった本病貯蔵中の発病推移についても調査し，本病が収穫直後に病斑を形成しないことや収

穫後の貯蔵後に病斑形成が進むことを初めて明らかにした。今後は、本病の感染時期を特定し、防除適期を明らかにしたい。本病に対する防除法としては、海外において種子消毒や殺菌剤の試験例があるが、土壌くん蒸処理に関する報告はなく、殺菌剤については *M. verrucaria* と同属の *M. roridum* には試験事例はあるが (Chase, 1990), *M. verrucaria* にはなかった。本研究によって、土壌消毒ではダズメット微粉剤とカーバムナトリウム塩液剤による土壌くん蒸処理が、殺菌剤ではベノミル水和剤、トリフルミゾール水和剤およびチオファネートメチル水和剤が有効であることを明らかにした。これらの結果は、新病害であるショウガ根茎暗斑病を対象とした農薬登録の礎になると期待される。

なお、本研究で扱った土壌伝染性病害については、いずれの防除法をもってしても単独で完全に防ぐことは困難であると考え。これは、土壌伝染性病害が難防除病害といわれる所以のひとつであるが、本研究により明らかとした有効な防除法を効果的に組み合わせ、総合防除体系を実施することで被害を抑制できると考える。

本研究によってニラ乾腐病の病原追加、ショウガ疫病の病原菌の種同定と英名の提案、ショウガ根茎暗斑病の病原菌の同定と病名提案をし、報告することができた(山崎ら, 2009a, 2013c, 2013d ; Yamazaki *et al.*, 2013)。また、本研究で得られた知見の一部を、論文、情報誌および生産部会の講習会などで情報発信し、植物防疫関係者や生産現場の指導者、生産者などに周知することができた(山崎ら, 2012e ; 山崎, 2013b)。なお、これら病害の診断技術や防除法については、今後更なる実証を重ねて、生産現場で活用できるように努めることを忘れてはならないと考える。

本研究の成果が、高知県ならびに同じ作目を栽培する産地に活用され、高品質安定生産に結びつくことをここに真に願う。

要旨

高知県はニラやショウガの国内最大の産地である。ニラでは乾腐病や紅色根腐病、ショウガでは疫病や根茎暗斑病といった土壌伝染性病害が慢性的に発生しており、収量・品質の低下を招くため問題となっている。そこで本研究では、これら土壌伝染性病害の発生生態の解明と防除技術の構築を試みた。

ニラ乾腐病は、茎盤部が褐変し、地上部の萎縮、黄化、枯死する病害で、高知県内で広域に発生していた。ニラ乾腐病には2種の *Fusarium* 属菌が関与していることを明らかにした。そのうち、*F. oxysporum* は、ニラ、ネギ、タマネギ、アスパラガスに病原性を示し、タマネギ乾腐病菌やネギ萎凋病菌と同じ分化型 f. sp. *cepae* (Hanz.) Snyder and Hans. と同定した。rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づく分子系統解析によって、ニラ乾腐病菌である *F. oxysporum* には複数の系統が存在することを明らかにした。一方、*F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg ex Gerlach and Nirenb. var *minus* Nirenberg もニラ乾腐病の病原であることを新たに見出し、記載した。*F. proliferatum* は、ニラ、ネギ、タマネギ、アスパラガス、ニンニクに病原性を示した。ニラ乾腐病菌である *F. proliferatum* は、ネギ萎凋病菌として報告のある *F. proliferatum* と分子系統学的に近縁であった。

乾腐病に罹病したニラ植物組織や罹病圃場の土壌からは、*F. oxysporum* でも *F. proliferatum* でも、病原性を持つ菌株に併せて非病原性の菌株が高頻度に分離されるため、病原性菌株の識別技術の確立を試みた。病原性菌株と非病原性菌株は分子系統学的に近縁であるうえ、病原性菌株が特有に保持する病原性関連遺伝子等を見出すことができなかったため、分子生物学的識別技術は確立できなかった。一方、ガラス試験管内で発芽させた品種‘スーパーグリーンベルト’に 1.0×10^7 bud cells/ml の分生子懸濁液を 1 ml 灌注接種し、7~14 日後に病

原性を評価することで病原性菌株と非病原性菌株を識別できることを見出した。

乾腐病に強いニラ品種を 8 品種を対象に探索したところ、‘タフボーイ’が *F. oxysporum* および *F. proliferatum* のいずれにも耐病性であることを見出し、推奨することとした。また、太陽熱消毒、ダゾメット粉粒剤、カーバムナトリウム塩液剤による土壌くん蒸処理および生育期におけるベノミル水和剤、チオファネートメチル水和剤、ヒドロキシイソキサゾール液剤、バリダマイシン液剤および亜リン酸液体状肥料の土壌灌注処理で両病原による乾腐病に対する防除効果が認められた。

ニラ紅色根腐病は、根と鱗茎が紅変し、地上部がやや生育不良となる *Pyrenochaeta terrestris* による病害である。本病原菌は、ニラのほか、ネギ、トマト、オクラ、キュウリ、サヤインゲン、ヤマノイモ、グロリオサ、ショウガ、ミョウガに病原性を示した。本病原菌の生育温度は 10～35℃ であり、生育適温は 28℃ であった。発病は気温 15～30℃ でみられ、発病適温は 25℃ 付近であった。また、ニラ乾腐病菌 (*F. oxysporum* または *F. proliferatum*) との複合感染によって発病が助長されることが明らかになった。汚染土壌中の本病原菌は、45℃ で 300 分間、50℃ で 10 分間、あるいは、55℃ で 3 分間以上の温湯処理で死滅した。本病に対する土壌還元消毒、太陽熱消毒、クロルピクリン錠剤、クロルピクリンテープ、ダゾメット粉粒剤、カーバムナトリウム塩液剤による土壌くん蒸処理およびトリフルミゾール水和剤による土壌灌注処理の防除効果は高かった。

ショウガ疫病は、生育期および根茎の貯蔵中に主に根茎内部が淡褐色に腐敗する病害で、病原菌を *Phytophthora citrophthora* (R. E. Smith and E. H. Smith) Leonian と同定、新病害として報告した。本病原菌は、ショウガのほか、ナス、キャベツ、サヤインゲンに病原性を示した。発病温度は 10～30℃、適温は 20℃ であった。露地栽培での発病時期は、栽培初期の 6 月上

中旬と、栽培後期の10月初旬以降の年2回であった。貯蔵中の被害は、罹病根茎の病勢の進展、罹病根茎から健全根茎への感染、汚染土壌から健全根茎への感染によって拡大した。汚染土壌中の病原菌は、40°Cで180分間、45°Cで10分間、或いは、50°Cで3分間以上の温湯処理で死滅した。本病に対する還元土壌消毒、湛水処理、メチルイソチオシアネート・D-D油剤、クロルピクリン液剤やダゾメット粉粒剤による土壌くん蒸処理、生育期の予防的なシアゾファミド水和剤の土壌灌注処理の防除効果は高かった。

ショウガ根茎暗斑病は、貯蔵中の根茎表面に黒色で不整形の病斑を形成する病害で、病原菌を *Myrothecium verrucaria* (Albertini et Schweinitz) Ditmar と同定、新病害として報告した。本病原菌は、ショウガの他、ハクサイ、キャベツ、ホウレンソウ、オクラ、ダイコン、ニンジンに病原性を示した。発生時期は貯蔵開始約1ヶ月後以降であり、貯蔵期間が長くなるほど病斑数は多く、黒斑が濃くなった。ショウガ栽培に用いられる有機資材のケイントップ上で本病原菌の分生子塊を形成しやすく、病原の温床となることが示唆された。本病に対しては、ダゾメット粉粒剤やカーバムナトリウム塩液剤による土壌くん蒸処理およびベノミル水和剤、トリフルミゾール水和剤およびチオフアネートメチル水和剤の防除効果が認められた。

謝辞

この論文を草するに当たり、本学大学院農学研究院の有江力教授には、著者の主指導教官としてご懇切な研究指導とご校閲を賜った。そして、お忙しい時間を割いてアドバイスして下さるなど、常に著者へのご配慮とご激励を賜った。ここに衷心より感謝の意を表す。また、寺岡徹教授には、幅広い知識や卓越したものの見方を示していただくとともに、温かい励ましを賜った。ここに深甚なる感謝の意を表す。

第1章と第2章の研究では、高知県各農業振興センターの普及指導員各位には、サンプル採集に際して多大のご協力を頂いた。さらに第1章では、山口大学の伊藤真一教授、北海道植物防疫協会の児玉不二雄博士、鳥取県西部総合事務所の佐古勇氏、同県農林総合研究所の安田文俊氏には、貴重な菌株を分譲頂くとともに有益なアドバイスを頂いた。また、本学大学院の稲見圭悟博士(現ブリヂストン)、柏毅氏をはじめとする病理学研究室の方々には実験技術や研究に対するご理解とご協力を頂いた。第3章のショウガ疫病菌の同定では、徳島県立農林水産総合技術支援センターの吉岡茂樹氏、同県元職員の松岡弘明氏および小林達男氏、同県農業技術センターの竹内繁治氏、矢野和孝氏に罹病標本や菌株を分譲して頂くとともにアドバイスをいただいた。また、千葉県農林総合研究センターの植松清次氏には分類同定に関する適切なお助言を賜った。全ての章に亘り、県内産地の生産者ならびに営農指導員の各位には多くのご協力を頂いた。ここに謹んで心より感謝申し上げます。

また、高知県農業技術センター病理担当チーフの森田泰彰氏には、著者が本学大学院に進むきっかけを作って頂いた。厚く感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行と論文執筆にあたり、始終陰ながら支えてくれた夫・栄と家族に心から感謝する。

引用文献

- Appel DJ, Gordon TR. 1996.** Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9** : 125-138.
- Arie T, Gouthu S, Shimazaki S, Yamaguchi I. 1998.** Immunological detection of endo polygalacturonase secretion by *Fusarium oxysporum* in plant tissue and sequencing of its encoding gene. *Annals of Phytopathological Society of Japan* **64** : 7-15.
- Arie T, Yoshida T, Shimizu T, Kawabe M, Yoneyama K, Yamaguchi I. 1999.** Assessment of *Gibberella fujikuroi* mating type by PCR. *Mycoscience* **40** : 311-314.
- Arie T, Kaneko I, Yoshida T, Noguchi M, Nomura Y, Yamaguchi I. 2000.** Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13** : 1330-1339.
- Armstrong GM, Armstrong JK. 1981.** Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* : 391-399.
- Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJM, Cigelnik E, Kroon L, Roebroek EJA, Waalwijk C. 2000.** Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* **90** : 891-900.
- Belisario E, Forti E, Corazza L. 1999.** First report of *Myrothecium verrucaria* from muskmelon seeds. *Plant Disease* **83** : 589. (Abstract)
- Belisario BG, Lokesh S, Raghavendra VB, Prakash H S, Shetty HS. 2006.** First report of the occurrence of *Myrothecium verrucaria* in watermelon seeds from India. *Australasian Plant Pathology Society* **1** : 3-4.
- Chase A R. 1990.** Controlling *Myrothecium* petiole rot of *Syngonium podophyllum*. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* **103** : 194-195.

- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM. 2000.** A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30 : 17-32.
- Correll JC, Klittich CJR, Leslie JF. 1987.** Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77 : 1640-1646.
- Cove DJ. 1976.** Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans* : the selection and characterization of chlorate resistant mutants. *Heredity* 36 : 191-203.
- Davis GN, Henderson WJ. 1937.** The interaction of the pathogenicity of a *Phoma* and a *Fusarium* on onion. *Phytopathology* 27 : 763-772.
- Dissanayake MLMC, Kashima R, Tanaka S, Ito S. 2009a.** Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75: 37-45.
- Dissanayake MLMC, Kashima R, Tanaka S, Ito S. 2009b.** Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* isolated from wilted Welsh onion in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75 : 125-130.
- Dissanayake MLMC, Tanaka S, Ito S. 2009c.** Fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* strains isolated from *Allium fistulosum* plants and seeds in Japan. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology* 48:598-604.
- Dohroo NP. 2005.** Ginger-The genus *Zingiber*. Diseases of Ginger. : *In Medicinal and aromatic plants-industrial profiles*. Vol. 41(Ravindaran, P. N. and Babu, K. N.). pp. 305-340, CRC Press, United States.
- Elmer WH. 1990.** *Fusarium proliferatum* as a causal agent in Fusarium Crown and root rot of asparagus. *Plant Disease* 74 : 938.
- Erwin DC, Ribeiro OK. 1996.** Phytophthora diseases worldwide. *Plant Disease* pp.39, 96-144, 288-295, 100.
- Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. 2003.** *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157 : 493-502.

- Flor HH. 1956.** The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics* **8** : 29-54.
- Galvan GA, Koning-Boucoiran CFS, Koopman WJM, Burger-Meijer K, Gonzalez PH, Waalwijk C, Kik C, Scholten OE. 2008.** *European Journal of Plant Pathology* **121** : 499-512.
- Geiser DM, Jimenez-Gasco MD, Kang SC, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K.. 2004.** FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* **110** : 473-479.
- Glass NL, Donaldson GC. 1995.** Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **61** : 1323-1330.
- Gordon TR, Martyn RD. 1997.** The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Reviews in Phytopathology* **35** : 111-128.
- Guest DI, Bompeix G. 1990.** The complex mode of action of phosphonates. *Australasian Plant Pathology* **19** : 113-115.
- Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M. 2008.** Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens* **4** : e1000061.
- Houterman P, Ma L, Van Ooijen G, De Vroomen M, Cornelissen B, Takken F, Rep M. 2009.** The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal* **58** : 970-978.
- Inami K, Yoshioka-Akiyama C, Morita Y, Ymasaki M, Teraoka T. 2012.** A genetic mechanism for emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* : inactivation of avirulence gene *AVR1* by transposon insertion. *PLOS ONE* **7**: e44101.
- Ishikawa R, Shirouzu K, Nakashita H, Teraoka T, Arie T. 2007.** Control efficacy of validamycin a against *Fusarium* wilt correlated with the severity of phytotoxic necrosis formed on tomato tissues. *Journal of Pesticide Science* **32** : 83-88.

- Jiménez-Gasco M, Navas-Cortés J, Jiménez-Díaz R. 2004.** The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris/Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology* **7** : 95-104.
- Kanno H, Aoki T . 2003.** Purple spot of malabar nightshade (*Basellarubra* L.) caused by *Fusarium proliferatum*. *Annu Rep Plant Prot North Japan* **54** : 54-57.
- Kashiwa T, Inami K, Fujinaga M, Ogiso H, Yoshida T, Teraoka T, Arie T . 2013.** An avirulence gene homologue in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race *I* functions as a virulence gene in the cabbage yellows fungus *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *Journal of General Plant Pathology* **79** : 412-421.
- Kawabe M, Kobayashi Y, Okada G, Yamaguchi I, Teraoka T, Arie T. 2005.** Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, *MAT1*, and *pg1*, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. *Journal of General Plant Pathology* **71** : 263-272.
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16** : 111-120.
- Kreutzer WA. 1941.** Host-parasite relationships in pink root of *Allium cepae*. The action of *Phoma terrestris* on *Allium cepae* and other hosts. *Phytopathology* **31** : 907-915.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R. 2007.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23** : 2947-2948.
- Lievens B, Van Baarlen P, Verreth C, Van Kerckhove S, Rep M, Thomma B. 2009.** Evolutionary relationships between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* isolates inferred from mating type, elongation factor-1 [alpha] and exopolysaccharuronase sequences. *Mycological Research* **113** : 1181-1191.
- Link GKK, Bailey A. 1926.** Fusaria causing bulb rot of onions. *Journal of Agricultural Research* **33** : 929-952.

- Mchau GRA, Coffey MD. 1994.** An integrated study of morphological and isozyme patterns found within a worldwide collection of *Phytophthora citrophthora* and a redescription of the species. *Mycological Research* **98** : 1269-1299.
- Manici LM, Caputo F. 2010.** Soil fungal communities as indicators for replanting new peach orchards in intensively cultivated areas. *European Journal of Agronomy* **33** : 188-196.
- Murakami R, Kobayashi T, Takahashi K. 2005.** Myrothecium leaf spot of mulberry caused by *Myrothecium verrucaria*. *Journal of General Plant Pathology* **71** : 153-155.
- Nirenberg HI, O'Donnell K. 1998.** New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90** : 434-458.
- Nishimura N. 2007.** Selective media for *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Plant Pathology* **73** : 341-348.
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI . 1998a.** Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90** : 465-493.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. 1998b.** Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc National Acad Sciences* **95** : 2044-2049.
- O'Donnell K, Ward TJ, Geiser DM, Kistler HC, Aoki T. 2004.** Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology* **41** : 600-623.
- Pimentel CPV, Feitosa MI, Oliveira VP, Feichtenberger E. 1991.** Soft rot of ginger (*Zingiber officinale*) rhizomes incited by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. *Plant Disease* **16** : 132-134.
- Raymond FL, Etchells JL, Bell TA, Masley PM. 1959.** Filamentous fungi from blossoms, ovaries, and fruit of pickling cucumbers. *Mycologia* **51** : 492-511.
- Rep M, Van Der Does H, Meijer M, Van Wijk R, Houterman P, Dekker H, De Koster C, Cornelissen B. 2004.** A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular microbiology* **53** : 1373-1383.

- Rep M. 2005.** Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters* **253** : 19-27.
- Saitoh K, Togashi K, Arie T, Teraoka T. 2006.** A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *Journal of General Plant Pathology* **72** : 348-350.
- Saitou N, Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4** : 406-425.
- Skovgaard K, Nirenberg H, O'Donnell K, Rosendahl S. 2001.** Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. *Phytopathology* **91** : 1231-1237.
- Southwood MJ, Viljoen A, Mostert L, Rose LJ, McLeod A. 2012.** Phylogenetic and biological characterization of *Fusarium oxysporum* isolates associated with onion in south Africa. *Plant Disease* **96** : 1250-1261.
- Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO. 1999.** Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. *American Society for Microbiology* **65**: 3401-3406..
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28** : 2731-2739.
- Toit LJ, Inglis DA, Pelter GQ. 2003.** *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulb in Washioton. *Plant Disease* **87** : 750.
- Tulloch M. 1972.** The genus *Myrothecium* Tode ex Fr. *Myco. Papers* **130**:1-42.
- Van Der Does HC, Lievens B, Claes L, Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M. 2008a.** The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology* **10** : 1475-1485.
- Van Der Does HC, Duyvesteijn R, Goltstein P, Van Schie C, Manders E, Cornelissen BJC, Rep M. 2008b.** Expression of effector gene *SIX1* of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genetics and Biology* **45** : 1257-1264.

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press, San Diego* pp 315-322.
- Yamazaki M, Morita Y, Kashiwa T, Teraoka T, Arie T. 2013.** *Fusarium proliferatum*, an additional bulb rot pathogen of Chinese chive. *Journal of General Plant Pathology* **79** : 431-434.
- Yang S, Jong S C. 1995a.** Host range determination of *Myrothecium verrucaria* isolated from leafy spurge. *Plant Disease* **79** : 994-997.
- Yang S, Jong S C. 1995b.** Factors influencing pathogenicity of *Myrothecium verrucaria* isolated from *Euphorbia esula* on species of *Euphorbia*. *Plant Disease* **79** : 998-1002.
- Yun, SH, Arie T, Kaneko I, Yoder OC, Turgeon BG. 2000.** Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology* **31** : 7-20
- Lévesque C. A., A. W. A. M. de Cock, 2004.** Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* **108** : 1363-1383 pp.
- Villa, N.O., Kageyama K., Asano T., Suga H. 2006.** Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia* **98** : 410-422 pp.
- Wang PH, White JG. 1997.** Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Physiol. Molecul. Plant Pathology* **51** : 129-143.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds.), Academic Press, San Diego : pp315-322.
- 青木孝之. 2001.** フザリウム属菌および関連子囊菌類の分類. *日本植物病理學會報* **67** : 235-247.
- 青木孝之. 2009.** *Fusarium*属の分類法. *Microbiol. Cult. Coll.* **25** : 1-12.

- 稲見圭悟. 2011. トマト萎凋病菌の病原性進化とレース特異識別技術に関する研究. 博士学位論文.
- 入江和巳, 神納 浄. 1978. *Phytophthora citrophthora*によるナルトミカンのすそ腐れ症状について. *日本植物病理學會報* 44 : 371 (講要).
- 伊阪実人, 岡本 博. 1982. *Phytophthora citrophthora* (R. E. Smith et E. H. Smith) Leonian の寄生によるオウレン疫病とその分布. *日本植物病理學會報* 48 : 108 (講要).
- 伊阪実人, 岡本 博. 1983. 薬用植物の病害に関する研究 3. *Phytophthora citrophthora*に起因するオウレンの疫病. *福井県立短期大学研究紀要* 8 : 9-24.
- 石川和則, 青木孝之. 1996. シンビジウム黄斑形成菌と黒斑形成菌の形態的再検討. *日本植物病理學會報* 62 : 261 (講要).
- 石川成寿, 大野義文, 山崎周一郎. 1995. *Pyrenochaeta terrestris*によるニラ紅色根腐病 (新称). *日本植物病理學會報* 61 : 604 (講要).
- 伊藤真一. 2009. ネギから分離される*Fusarium*属菌の病原性と遺伝的分化. *植物防疫* 63 : 624-629.
- 伊藤真一. 2013. ネギ類に感染する*Fusarium*の遺伝的多様性. ネギ属野菜の需要の変化に対応した育種・栽培に関する諸問題. 平成25年度 野菜茶業課題別研究会資料 62-68.
- 植松清次, 赤山喜一郎, 大久保博人, 鈴木孝仁, 塩田あづさ, 堀江博道. 1998. キウイフルーツ疫病 (新称) とキツタ (ヘデラ) 類疫病 (病原菌追加). *日本植物病理學會報* 64 : 433 (講要).
- 植松清次, 大久保博人, 鈴木孝仁, 塩田あづさ, 千葉恒夫. 1996. *Phytophthora* spp. によるトルコギキョウ疫病 (新称). *日本植物病理學會報* 62 : 266 (講要).
- 宇田川俊一, 椿 啓一, 堀江義一, 三浦宏一郎, 箕浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山竜夫, 渡辺昌平. 1978. *Myrothecium*属菌. *講談社サイエンティフィック* 1071-1072.
- 梅川 学. 1989. 灌水利用による病害防除. *農耕と園芸*. 64 : 194-198.
- 大畑寛一. 1995. 病原菌の接種法. 作物病原菌研究技法の基礎—分離・培養・接種—. 東京. *日本植物防疫協会* 15-18.

- 岡山健夫. 1999. 太陽熱土壌消毒. 農業技術体系 土壌肥料編5-①. 東京. 農山魚村文化協会 畑213-216の1の4.
- 桂 琦一, 谷岡義春. 1967. *Pythium*によっておこるショウガおよびミョウガの根茎腐敗病. 関西病虫研報 9 : 46-55.
- 桂 琦一, 山本弘平. 1969. イチジクを侵す疫病菌2種の比較. 京都府大学術報告 21 : 24-31.
- 木嶋利男, 有江 力, 長 修, 小林光雄, 片山栄助, 橋田弘一, 鈴木正光, 尾田啓一, 手塚徳弥. 1985. ニラの新病害 乾腐病, 白絹病, 黒腐菌核病及び株腐細菌病. 栃木農業試験研究報告 31 : 67-76.
- 木嶋利男, 手塚徳弥, 小林光雄. 1983. ニラの乾腐病 (新称). 日本植物病理學會報 49 : 78-79.
- 北 宜裕, 岡本昌広. 2004. 熱水土壌消毒. 農業技術体系 土壌肥料編5-①. 東京. 農山魚村文化協会 畑216の7の2-216の7の7の4.
- 児玉不二雄, 菅原之雄, 横山竜夫. 1975. *Pyrenochaeta terrestris*によるタマネギ紅色根腐病 (新称) について. 日本植物病理學會報 41 : 264 (講要).
- 児玉不二雄. 1983. タマネギ乾腐病とその防除に関する研究. 北海道農業試験場報告 39.
- 古谷眞二. 1995. ショウガのいもち病に関する研究. 高知県農業技術センター研究報告 2 : 1-69.
- 小林達男, 松岡弘明. 1999. *Phytophthora* sp.によるショウガ疫病 (新称) の発生. 日本植物病理學會報 65 : 679-680 (講要).
- 佐古 勇, 井上 浩, 田村佳利, 佐藤 毅. 2012. 土壌くん蒸剤処理と亜リン酸粒剤肥料の施用によるネギ萎凋病の発生抑制効果について. 関西病虫害研究会報 54 : 143-146.
- 佐藤豊三, 香川晴彦, 深見正信, 佐藤京子. 1993. メロン紅色根腐病の病原菌 (*Pyrenochaeta terrestris*) について. 日本植物病理學會報 59 : 97. (講要)
- 重松統. 児玉不二雄, 寺中理明, 奥田誠一, 夏秋和英. 1985. *Pyrenochaeta terrestris*によるネギおよびトマトの紅色根腐病 (新称). 日本植物病理學會報 51 : 95 (講要).
- 新村昭憲. 2000. 土壌還元消毒法. 農林技術体系 土壌肥料編5-①. 東京. 農山魚村文化協会: 212の6-9.

- 新村昭憲. 2004. 土壤還元消毒の原理と効果. *土壤伝染病談話会レポート* 22: 2-12.
- 須賀晴久. 2005. *Fusarium*菌 植物防疫基礎講座:植物病原菌の分子系統樹—そのシステムと見方—(5). *植物防疫* 59: 355-360.
- 菅野博英, 青木孝之. 2003. *Fusarium proliferatum*によるツルムラサキ紫斑病 (新称). *日本植物病理學會報* 54: 54-57.
- 杉田 隆, 西川朱貫. 2004. DNA塩基配列解析による病原真菌の分類・同定. *第47回日本医真菌学会総会資料 真菌誌* 45: 55-58.
- 杉山 悟. 1989. ナガイモ紅変病 (新称) について. *日本植物病理學會報* 55: 85 (講要).
- 中沢雅典, 加藤喜重郎. 1953. 薑腐敗病の防除について (I). *植物防疫* 7: 87-92.
- 西村範夫. 2008. PCNBを用いない*Fusarium oxysporum*用選択培地. *植物防疫* 62: 164-167.
- 西村範夫. 2011. 第3節*Fusarium*菌の分化型・レースによる分類. 駒田 且, 小川奎, 青木孝之編著. フザリウム—分類と生態・防除—. 東京. *全国農村教育協会* 84-101.
- 高桑 亮, 石坂信之, 児玉不二雄, 齊藤 泉. 1977. タマネギ乾腐病菌の宿主範囲. *日本植物病理學會報* 43: 479-481.
- 高橋尚之, 森田泰彰, 矢野和孝, 佐藤豊三, 富岡啓介, 小金澤碩城. 1997. *Pyrenochaeta terrestris*によるグロリオサ紅色根腐病. *日本植物病理學會報* 63: 526.
- 瀧元清透. 1941. 無花果の疫病菌と柑橘の褐色腐敗病菌との関係に就いて. *病虫害雑誌* 28: 184-185.
- 竹内妙子. 2004. 千葉県における土壤還元消毒法による土壤病害防除. *土壤伝染病談話会レポート* 22: 13-21.
- 竹原利明. 1992. 植物防疫基礎講座糸状菌における*nit*変異株の作出と利用. *植物防疫* 46: 395-399.
- 竹原利明, 國安克人. 1994. *nit*変異株を用いたフザリウム病の発生生態の解明 I. *Fusarium oxysporum*の各分化型の*nit*変異株の作成. *日本植物病理學會報* 60: 699-704.

- 田中 敬, 入江和巳, 藤富正昭. 1990. タマネギ紅色根腐病の防除について. 兵庫県立中央農業技術センター研究報告 (農業編) 38 : 69-72.
- 月星隆雄, 上垣隆一, 岡部郁子, 菅原幸哉. 2011. *Fusarium fujikuroi* および *F. proliferatum* のトウモロコシ赤かび病への病原追加. 日本植物病理學會報 77 : 203 (講要).
- 土屋健一, 矢野和孝, 堀田光生, 森田泰彰, 川田洋一. 1999. わが国におけるシヨウガ青枯病 (Bacterial wilt : 新称) の初発生. 日本植物病理學會報 65 : 363 (講要).
- 寺見文宏, 窪田昌春. 2010. シヨウガ根茎腐敗病に有効な根茎消毒薬剤の室内試験による検討. 関西病虫害研究会報 : 52 : 95-97.
- 寺見文宏. 2012a. シヨウガ根茎腐敗病防除のために種根茎の温湯消毒を短時間で実施するための温度条件について. 関西病虫害研究会報 : 54 : 135-137.
- 寺見文宏. 2012b. シヨウガ根茎腐敗病防除のための種根茎消毒技術. 植物防疫 : 66 : 45-50.
- 三好孝典, 清水伸一. 2006. カキ疫病 (新称) の病原について. 日本植物病理學會報 72 : 72 (講要).
- 村上理都子, 平館俊太郎, 白田 昭. 2005. クワ暗斑病菌 *Myrothecium verruvaria* の産生する毒性成分のクワ病葉からの検出と病原性に果たす役割について. 日本植物病理學會報 71 : 166-178.
- 森田鈴美, 挟間 渉, 加藤徳弘. 1992. ニラの乾腐病類似症状から分離した *Fusarium* 属菌. 九州農業研究 54 : 99.
- 矢野和孝, 川田洋一. 2004. *Pyrenochaeta terrestris* によるシヨウガ紅色根茎腐敗病. 四国植物防疫研究 39 : 11-17.
- 山崎睦子, 矢野和孝, 植松清次, 竹内繁治. 2009a. シヨウガ疫病の同定. 日本植物病理學會報 75 : 72 (講要).
- 山崎睦子, 矢野和孝, 竹内繁治. 2009b. シヨウガ疫病菌の発生消長と薬剤防除および病原菌 *Phytophthora citrophthora* の病原性. 日本植物病理學會報 75 : 184 (講要)
- 山崎睦子, 松岡弘明, 矢野和孝, 森田泰彰, 植松清次, 竹内繁治, 有江 力. 2011a. *Phytophthora citrophthora* によるシヨウガ疫病 (新称). 日本植物病理學會報 77 : 299-303.

- 山崎睦子. 2011b. ショウガ根茎腐敗病とその防除. *植物防疫* 65 : 93-97.
- 山崎睦子, 竹内繁治, 森田泰彰. 2011c. 臭化メチル代替くん蒸剤と生育中の殺菌剤を組み合わせた防除体系のショウガ根茎腐敗病に対する防除効果. *日本植物病理學會報* 77 : 160 (講要).
- 山崎睦子, 矢野和孝, 竹内繁治. 2011d. ショウガ紅色根茎腐敗病の発生生態と防除法. *高知県農業技術センター研究報告* 20 : 9-17.
- 山崎睦子, 森田泰彰, 稲見圭悟, 寺岡 徹, 有江 力. 2012a. 乾腐症状を示すニラ罹病株から分離した*Fusarium* 属菌の分子系統と病原性. *日本植物病理學會報* 78 : 56-57 (講要).
- 山崎睦子, 森田泰彰, 稲見圭悟, 寺岡 徹, 有江 力. 2012b. ニラ乾腐病を引き起こす*Fusarium oxysporum* の病原性と病原としての*F. proliferatum*の追加. *日本植物病理學會報* 78 : 186 (講要).
- 山崎睦子, 森田泰彰. 2012c. ショウガ根茎腐敗病に対する各種殺菌剤の予防または治療効果の判定. *四国植物防疫研究* 46 : 1-5.
- 山崎睦子, 矢野和孝, 竹内繁治. 2012d. ショウガ紅色根茎腐敗病の発生生態と防除法. *四国植物防疫研究* 43 : 53. (講要)
- 山崎睦子, 矢野和孝, 森田泰彰, 竹内繁治. 2012e. ショウガ疫病菌の発生生態と防除法. *高知県農業技術センター研究報告* 21 : 7-16.
- 山崎睦子, 森田泰彰, 柏 毅, 寺岡 徹, 有江 力. 2013a. ニラ乾腐病菌 *Fusarium oxysporum*の分化型の同定とネギ萎凋病菌との系統関係. *日本植物病理學會報* 79 : 182 (講要).
- 山崎睦子. 2013b. ショウガ疫病菌の発生生態と防除法. *植物防疫* 67 : 104-107.
- 山崎睦子, 森田泰彰, 有江 力. 2013c. *Myrothecium verrucaria*によるショウガ根茎暗斑病 (新称). *四国植物防疫研究* 46 : 9 (講要).
- 山崎睦子, 森田泰彰, 有江 力. 2013d. *Myrothecium verrucaria*によるショウガ根茎暗斑病 (新称). *日本植物病理學會報* 80 : 9-13.
- 横山佐太郎, 吉田桂輔. 1960. カンキツ苗の疫病. *九州病虫研究会報* 6 : 91.

吉野正義, 島崎 豊. 1972. キュウリつる割病に対する熱風利用の土壌消毒効果. 関東東山病害虫研究会年報 19 : 32.

渡邊恒雄. 1998. 植物土壌病害の事典. 教文堂