

高知県の園芸植物に発生する連作障害の原因菌の解明とその対策

Elucidation of the causative fungi of monocropping disorders occurring
in horticultural plants in Kochi Prefecture and their countermeasures

東京農工大学

生物生産科学専攻

生物制御科学大講座

沖 友香

目 次

第 1 章	緒論	4
1.1	高知県の農業	4
1.2	高知県内で発生する主要な植物病	5
第 2 章	葉枯症状を示すセンリョウから分離された糸状菌の病原性解析 ...	8
2.1	センリョウに発生した葉枯症状	8
2.2	材料および方法	9
2.3	結果	20
2.4	考察	33
第 3 章	ユズエクボ症の原因および防除法の検討	36
3.1	ユズ黄玉貯蔵中に発生した果皮の陥没障害	36
3.2	材料および方法	38
3.3	結果	47
3.4	考察	58
第 4 章	ミョウガに発生した立枯症状の原因究明	63
4.1	ミョウガに発生した立枯症状	63
4.2	材料および方法	66

4.3	結果	73
4.4	考察	86
第 5 章	トルコギキョウの作型に合わせた立枯病防除法の確立	88
5.1	トルコギキョウ立枯病と土壌消毒による防除	88
5.2	材料および方法	92
5.3	結果	111
5.4	考察	141
第 6 章	総合考察	143
謝辞	150
引用文献	154
公表論文目録	173

第 1 章 緒論

1.1 高知県の農業

高知県は四国の南部に位置し、北は四国山地で、徳島、愛媛の両県に接し、南は太平洋に面して細長い扇状を呈している。その県土面積（約 7,100 km²）の約 84%が林野であり、中山間地域の割合は約 95%にも達する（高知県農業振興部 2021）。本県の気象の特徴として、温暖で気温が高く、南寄りの気流の入りやすい春から秋にかけて雨量が多いこと、また、冬の晴天が多く、夏から秋にかけて台風が襲来することなどが挙げられる（池上 1986）。年平均気温 17.0℃、年降水量 2,548 mm、日照時間の年合計は 2,154 時間（気象庁アメダス「高知」平均値：1981-2010）という気象は天恵として、農業発展の要因となっている。

平坦地が少ない中で、冬季の温暖・多照な気候を利用して古くから野菜の早出し栽培に取り組み、昭和 30 年代にはビニールハウスの急速な普及によって、施設栽培を中心とした野菜園芸が定着し、堅実な発展を遂げた。本県の野菜作付け面積は約 4,520 ha（2016 年）、野菜の粗生産額は約 715 億円となっており、野菜園芸は本県農業の柱である（高知県農業振興部 2021）。その結果、全国でも主要な農業県であり、農業産出額（2019 年）は約 882 億円（農林水産省 2021a）と全国 15 位、農耕地面積（2018 年）は全国の約 3.8%に相当（農林水産省 2021b）する。表 1-1 に、高知県の主要農作物の全国生産動向と本県の位置を示

す。

野菜園芸の中心である施設野菜は、海岸線に沿う平坦温暖部に産地が形成されており、県東部のナス、県中央部のニラ、中西部のミョウガ等を基幹品目とした大型産地が分布する。露地野菜は、県中央部を中心に、ショウガ、オクラ等地域の特性を生かした栽培が行われ、重要品目である（表 1-1；高知県農業振興部 2021）。

1.2 高知県内で発生する主要な植物病

高知県内の普通畑の作目利用は野菜類が最も多く、令和元年度の農業産出額のうち野菜の占める割合は約 64%である（高知県農業振興部 2021）。本県では昭和 27 年頃からビニールハウスが導入され、ピーマン、ナス等の栽培面積が大幅に増加した。それに伴い、日本で未報告の病害の発生も増加し、例えば、キュウリの黄化えそ病（竹内ら 2001）、ピーマン黒枯病（安達ら 2009）、ナスフザリウム立枯病（下元ら 2012）、トマトホモプシス茎枯病（山崎ら 2018）は高知県が本邦初報告となった。近年では連作に伴う土壌病害の発生も深刻化しており、対応に苦慮している。連作障害は全国でも深刻な問題となっており、関東東山の野菜指定産地における指定野菜の 10 a あたり収量の 5 年間の動きを分析したところ、連作障害を主要な要因とする収量の低下減少が認められる産地は、全体の約 50.2%に達していた（農林水産省統計情報部 1983 年）。

表 1-1 高知県の主要品目の全国動向と本県の位置

品目	順位	作付面積(ha)	割合(%)	収穫量(t)	割合(%)	出荷量(t)	シェア(%)
ナス	1	324	3.7	40,800	13.5	38,700	16.2
キュウリ	6	152	1.5	24,600	4.5	23,300	4.9
ピーマン (シトウを含む)	3	125	3.9	13,800	9.5	13,200	10.2
ミョウガ	1	105	43.4	4,885	90.7	4,885	90.9
ニラ	1	248	12.4	14,500	24.9	14,000	26.5
オクラ	2	91	10.9	1,882	16.1	1,882	17.6
ショウガ	1	435	25.0	19,600	42.2	15,800	43.4

(農林水産省, 2021b)

一部の土壌病害については、他県と協力して対策技術の開発を行っており、ショウガ青枯病は「圃場・種イモの診断に基づくショウガ青枯病防除標準作業手順書」として（国研）農研機構でマニュアルが公開されている（農業・食品産業技術総合研究機構 2021a）。前述の手順書には県内で行った土壌消毒の事例が多く記載されているが、県内でも場所や条件によって効果にばらつきがあることから、病害や産地に合わせた対策技術の開発が必要である。

第2章 葉枯症状を示すセンリョウから分離された糸状菌の病原性解析

2.1 センリョウに発生した葉枯症状

センリョウ (*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai) は、果実付きの枝葉が主に正月の飾り花として使用される日本の伝統的な花きであり、高知県では竹すだれや寒冷紗で遮光した施設内で栽培されている。2020年度の作付け面積は約 10.5 ha で (高知県農業振興部 2021)、県内の花き栽培の中でも重要な品目のひとつである。

従来から、センリョウ栽培において葉枯れや茎枯れを呈する障害が発生していたが、高知県内では、それらの原因について詳細な調査は行われていなかった。センリョウに発生する病害として、炭疽病、疫病、白紋羽病等が報告されている (日本植物病理学会 2021) が、症状による判断は難しい。

そこで本研究では、県内で発生しているセンリョウ葉枯症状の原因究明と対策を目的とし、栽培圃場で発生した障害株から病原菌の分離を試みるとともに、接種試験等により病原菌の特定を行った。なお、本研究の一部は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業(うち地域戦略プロジェクト)」の「日本の伝統花きセンリョウの輸出を見据えた輸送及び病害虫対策技術の確立」によって実施した。

2.2 材料および方法

2.2.1 供試サンプルおよび糸状菌の分離

2016年6月2日, 7月21日, 12月8日, 2017年11月29日に, 室戸市のセンリョウ栽培圃場数カ所から葉の黒変や黒色斑点, 茎の黒変や斑点, 株全体に萎れのある個体を採取した(図2-1). 各障害部から切り出した切片を70% (v/v) エタノールに1分間浸し, その後滅菌水で洗浄して表面殺菌した後, PDA培地(日水製薬株式会社)平板に置床し, 25°Cで2日間培養した. 成長してきたコロニーから単孢子あるいは単菌糸分離を繰り返し, 菌株として確立した.

2.2.2 分離菌の形態観察

分離頻度が比較的高い3種類の菌を, PDA培地平板上の菌叢(コロニー)の性状に基づいて, A, B, Cとし, それぞれ形態を観察した.

分離菌 A: PDA平板培地上で25°C, 10日間培養し, 菌叢および分生子の性状を観察した. また, 単孢子分離株 SESHc76, K4BS3-2 について, ジャガイモ・ニンジン煎汁寒天培地(PCA: みじん切りにしたジャガイモとニンジン各20 g/lを10分間煮沸後, 煎汁1 lに寒天15 g添加)を用いたスライドカルチャーによって付着器を形成させ, 光学顕微鏡で形態を観察した.

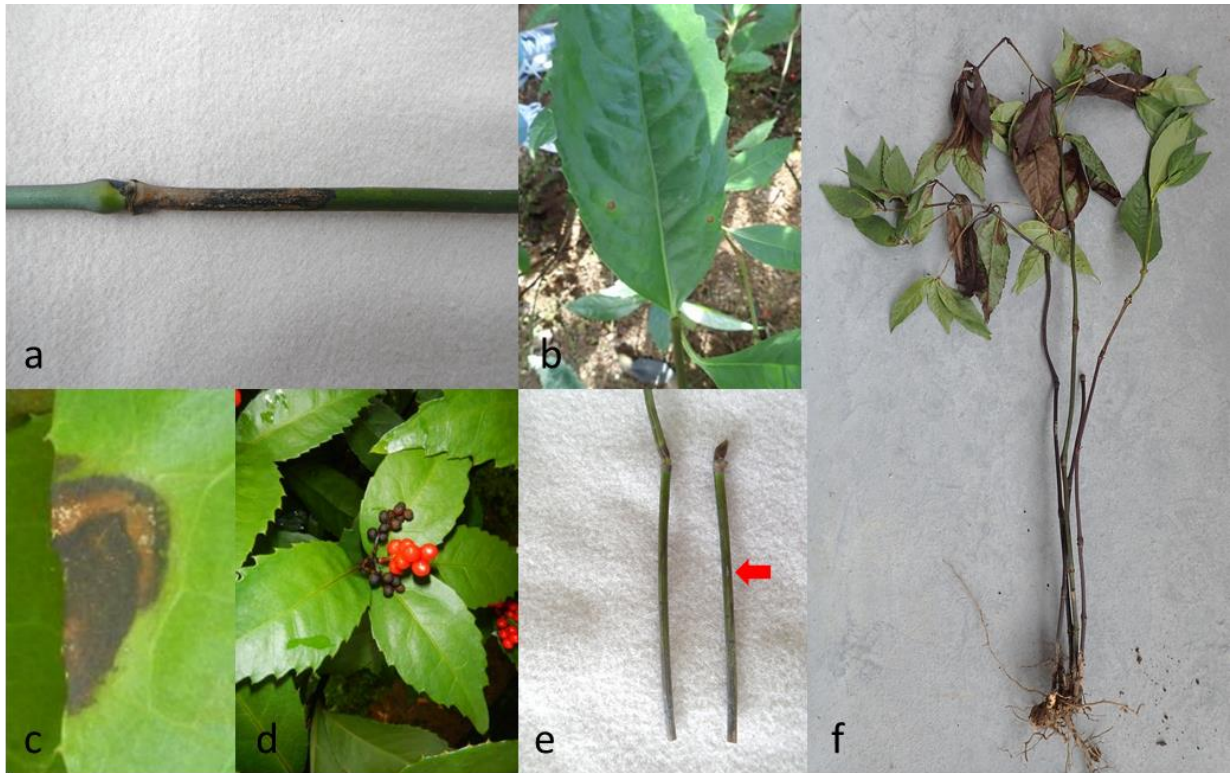


図 2-1 分離源となったセンリョウの各種症状

a: 茎の黒変, b: 葉の斑点, c: 葉の黒点, d: 実の黒変, e: 茎の斑点 (矢印部分) , f: 株の萎れ

分離菌 B: PDA 平板培地上で 25°C, 10 日間培養し, 菌叢の性状を観察した. また, 単菌糸分離株 SESKm11, SESKm62 を V8 ジュース寒天培地平板上に置床して 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いて 2 日間培養した. その後, アサの種子を滅菌シャーレに移し, 孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌した河川水を入れ, 25°C, 蛍光灯照射下に置いて 2 日間培養後に形成された遊走子嚢の形状等を光学顕微鏡で観察した.

分離菌 C: PDA 平板培地上で 25°C, 7 日間培養し, 菌叢の性状を観察した. また, 単菌糸分離株 13-Pm11-1, SESSm51, Nr-1, Nr-2, Nr-3 について, 25°C, 暗黒下で 4 日間培養後, BLB 照射下で 7 日間および 2 ヶ月間培養し, 形成された分生子殻内の分生子形成細胞, 未熟分生子および成熟分生子の形状等を光学顕微鏡で観察した.

2.2.3 接種による病原性の検定

分離菌 A, B, C について, 次の方法によってセンリョウに接種を行い, 病原性を検定した. なお, いずれの接種にも, 播種後約 18 ヶ月経過したポット植えセンリョウを用い, 接種後はポリ袋で密閉したクリアケースに移し, 25°C, 照度 5000 lx, L:D=16:8, 湿度約 98% の多湿条件下で管理した. 調査は, 接種 14 日後まで適宜行った. 対照区は, 菌叢の貼付接種では無菌の PDA 培地平板を 5 mm のコルクボーラーで打ち

抜いたディスクを，噴霧接種では水道水を用いた．

分離菌 A: PDA 平板培地上で 25°C, 14 日間培養して得られた菌叢を，5 mm のコルクボーラーで培地ごと打ち抜き，茎にカミソリで切れ込みを入れた（付傷）センリョウの付傷部分に挟み込み，薄膜フィルム（Parafilm； Bemis Com, Wisconsin, USA）で覆って付傷菌叢接種とした．また，150 ml のジャガイモ煎汁液体培地で 25°C，3 日間振とう培養し， 1×10^4 個/ml に調整した分生子懸濁液を，ガラス製噴霧器を用いてセンリョウの株全体に噴霧し，無傷噴霧接種とした．

分離菌 B: PDA 平板培地上で 25°C，14 日間培養して得られた菌叢を 5 mm のコルクボーラーで培地ごと打ち抜き，付傷していないセンリョウの茎に貼り付け，薄膜フィルムで覆って付傷菌叢接種とした．また，山本ら（2010）の方法に従って V8 ジュース寒天培地を用いて形成させた遊走子を 1×10^2 個/ml に調整し，ガラス製噴霧器を用いてセンリョウの株全体に噴霧し，無傷噴霧接種とした．

分離菌 C: PDA 平板培地上で 25°C，14 日間培養して得られた，分生子を形成していない菌叢を 5 mm のコルクボーラーで培地ごと打ち抜き，付傷センリョウの付傷部位に挟み込み，薄膜フィルムで覆って付傷菌叢接種とした．また，PDA 培地平板上で 25°C，14 日間培養した菌叢を，25°C，BLB 照射下で 14 日間培養して分生子を形成させ，5 mm のコルクボーラーで培地ごと打ち抜き，センリョウの付傷部位に挟み込み，薄

膜フィルムで覆って付傷分生子接種とした。

2.2.4 分子系統解析用フラグメント増幅とシーケンシング

分離菌 A: PDA 平板培地上で 25°C, 4 日間培養した菌叢から, ISOPLANT キット (ニッポンジーン) を用い, プロトコルはキットに従って DNA を抽出した。これを鋳型として PCR を行った。増幅部位は Actin, β -Tubulin (TUB), Chitin synthase, Calmodulin, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Glutamine synthase (GS), Ribosomal DNA internal transcribed spacer (rDNA-ITS) の 7 領域とし, 使用プライマーは表 2-1 のとおり, 酵素は Blend *Taq* (東洋紡ライフサイエンス) を使用し, 滅菌蒸留水 12.5 μ l, 10 \times PCR buffer 2 μ l, 2 mM dNTPs 2 μ l, primer (forward, reverse 10 μ M) 各 1 μ l, 鋳型 1 μ l, Blend *Taq* 0.5 μ l を混合し, 反応液の total volume を 20 μ l とした。PCR 条件は 94°C 2 分間, 30 サイクル (94°C 30 秒間, 55°C 30 秒間, 72°C 1 分間), 72°C 7 分間とした。得られた増幅産物は, FastGene ゲル /PCR 抽出キット (日本ジェネティクス) を用いて精製し, ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems R3500; ライフテクノロジーズジャパン) で塩基配列を解析した。

アライメントは手動で行った。次に, MEGA X v.10.2 (Kumer et al. 2018) を用いて, Tamura and Nei 1993 に基づく最尤法にて系統関係を

表 2-1 センリョウ分離菌 A の配列を増幅するために使用したプライマーのリスト

Gene	Product	Primer	Sequence (5' -3')	Reference
ACT	Actin	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone and Kohn (1999)
		ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
		Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	
TUB2	β -tublin	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass and Donaldson (1995)
		CL1C	GAATTCAAGGAGGCCTTCTC	
CHS	Chitin synthase	CL1C	CTTCTGCATCATGAGCTGGAC	Weir et al. (2012)
		CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGAAGAAG	
CAL	Calmodulin	CHS-345R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	Carbone and Kohn (1999)
		GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GDR	GGGTGGAGTCGTACTIONGAGCATGT	Templeton et al. (1992)
		GSF1	ATGGCCGAGTACATCTGG	
GS	Glutamine synthetase	GSR1	GAACCGTCGAAGTTCCAC	Stephenson et al. (1997)
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS	Internal transcribed spacer	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al. (1990)

推定した。系統解析に使用した塩基配列数は、アライメントギャップを含めて 2,924 bp であった。最尤法で得られた系統樹の各枝の支持率は、ブートストラップ検定 (Felsenstein 1985) を 1000 回反復し、評価を行った。ブートストラップ値は、75% 以上を信頼性の高い値として残した。分子系統樹上の * はタイプ菌株を表し、*Colletotrichum boninense* Moriwaki, Sato and Tsukiboshi (表 2-2) をアウトグループとした。

分離菌 B: PDA 平板培地上で 25°C, 7 日間培養した菌叢から、アルカリ抽出法 (菌叢から白金耳でごま粒程度の菌糸を掻き取り, 50 mM NaOH を添加して 100°C で 10 分間加熱処理した。その処理液に 1 M Tris-HCl (pH 7.0) を加えて中和し, 遠心上清 (10,000×g, 10 分間, 室温) を検体とした) によってゲノム DNA を抽出した。これを鋳型として, KOD FX Neo を用いて PCR を行った。増幅部位は rDNA-ITS (ITS4, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC ; ITS5, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG ; White et al. 1990), および, cyclooxygenase (COX1; FMnem-1, 5'-AATAAAATTAATTTTAATATATAATTAG, FMnem-3, 5'-TATGTTTAATATCTGTAAATAATAG ; Mchau et al. 1994) の 2 領域とした。滅菌蒸留水 12.5 μl, 10×PCR buffer 2 μl, 2 mM dNTPs 2 μl, primer (forward, reverse 10 μM) 各 1 μl, 鋳型 1 μl, Blend Taq

表2-2 系統解析に使用した株の一覧

Species	Culture*	Host	Country	ITS	GAPDH	GenBank accession number				
						CAL	ACT	CHS-1	GS	TUB2
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608*	Persea americana	Israel	JX010244	JX010044	JX009683	JX009443	JX009774	JX010078	JX010389
<i>C. aeschynomenes</i>	ICMP 17673*, ATCC 201874	Aeschynomene virginica	USA	JX010176	JX009930	JX009721	JX009483	JX009799	JX010081	JX010392
<i>C. alatae</i>	CBS 304.67*, ICMP 17919	Dioscorea alata	India	JX010190	JX009990	JX009738	JX009471	JX009837	JX010065	JX010383
<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18632	Vitex lucens	New Zealand	JX010220	JX009906	JX009614	JX009544	JX009764	JX010108	JX010421
<i>C. asianum</i>	IMI 313839, ICMP 18696	Mangifera indica	Australia	JX010192	JX009915	JX009723	JX009576	JX009753	JX010073	JX010384
<i>C. boninense</i>	MAFF 305972*, ICMP 17904, CBS 123755, strain LF644	Crinum asiaticum var. sinicum	Japan	JX010292	JX009905	JX009741	JX009583	JX009827	KJ955039	KJ955336
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658*	Clidemia hirta	USA, Hawaii	JX010265	JX009989	JX009645	JX009537	JX009877	JX010129	JX010438
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581*, CBS 130416	Coffea arabica	Thailand	JX010165	JX010033	FJ917508	FJ907426	JX009866	JX010095	JX010405
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878*, ICMP 17821, CBS 112999	Citrus sinensis	Italy	JX010152	JX010056	JX009731	JX009531	JX009818	JX010085	JX010445
<i>C. henanense</i>	strain SHB5a, strain CMF043	Malus domestica	USA	MT492140	MT513015	MT512982	MN685846	MN685852	MT513050	MT513080
<i>C. jiangxiense</i>	strain LPSU20120251, LF684	Saxifraga stolonifera	China	KX009037	KX009035	KX009040	KX009031	KX009033	KJ955048	KX009039
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	ICMP 18639*	Olea europaea	Australia	JX010230	JX009966	JX009635	JX009523	JX009800	JX010132	JX010434
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	ICMP 12952	Persea americana	New Zealand	JX010214	JX009971	JX009648	JX009431	JX009757	JX010126	JX010426
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>migrans</i>)	CBS 237.49(*), ICMP 17922	Hypericum perforatum	Germany	JX010238	JX010042	JX009636	JX009450	JX009840	JX010120	JX010432
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella rufomaculans</i> var. <i>vaccinii</i>)	CBS 124.22(*), ICMP 19122	Vaccinium sp.	USA	JX010228	JX009950	JX009744	JX009536	JX009902	JX010134	JX010433
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>kahawae</i>	CBS 982.69, ICMP 17915	Coffea arabica	Angola	JX010234	JX010040	JX009638	JX009474	JX009829	JX010125	JX010435
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>kahawae</i>	IMI 301220, ICMP 17811	Coffea arabica	Malawi	JX010233	JX009970	JX009641	JX009555	JX009817	JX010131	JX010430
<i>C. nupharicola</i>	CBS 469.96, ICMP 17938	Nuphar lutea subsp. polysepala	USA	JX010189	JX009936	JX009661	JX009486	JX009834	JX010087	JX010397
<i>C. psidii</i>	CBS 145.29*, ICMP 19120	Psidium sp.	Italy	JX010219	JX009967	JX009743	JX009515	JX009901	JX010133	JX010443
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 18566	Olea europaea	Australia	JX010282	JX009953	JX009593	JX009496	JX009801	JX010071	JX010376
<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. fragariae</i>)	CBS 142.31(*), ICMP 17927	Fragaria × ananassa	USA	JX010286	JX010024	JX009592	JX009516	JX009830	JX010064	JX010373
<i>C. ti</i>	ICMP 5285	Cordylone australis	New Zealand	JX010267	JX009910	JX009650	JX009553	JX009897	JX010124	JX010441
<i>C. xanthorrhoeae</i>	BRIP 45094*, ICMP 17903, CBS 127831	Xanthorrhoea preissii	Australia	JX010261	JX009927	JX009653	JX009478	JX009823	JX010138	JX010448
<i>Glomerella cingulata</i> "f.sp. <i>camelliae</i> "	ICMP 18542	Camellia sasanqua	USA	JX010223	JX009994	JX009628	JX009488	JX009857	JX010118	JX010429
<i>Glomerella cingulata</i> "f.sp. <i>camelliae</i> "	ICMP 10643	Camellia × williamsii	UK	JX010224	JX009908	JX009630	JX009540	JX009891	JX010119	JX010436

* = ex-type or authentic culture, (*) = ex-type or authentic culture of synonymised taxon.

0.5 μ l を混合し，反応液の total volume を 20 μ l とした．PCR 条件は 94°C 2 分間，30 サイクル（94°C 30 秒間，50°C 30 秒間，72°C 1 分間），72°C 7 分間とした．得られた増幅産物の塩基配列をジェネティックアナライザーで解析した．

アライメントは手動で行った．次に，MEGA X v.10.2 (Kumer et al. 2018) を用いて，Tamura and Nei 1993 に基づく最尤法にて系統関係を推定した．系統解析に使用した塩基配列数は，アライメントギャップを含めて 2869bp であった．最尤法で得られた系統樹の各枝の支持率は，ブートストラップ検定 (Felsenstein 1985) を 1000 回反復し，評価を行った．ブートストラップ値は，75% 以上を信頼性の高い値として残した．分子系統樹上の * はタイプ菌株を表し，*Colletotrichum boninense* J. Moriwaki, Toy. Sato et T. Tsukiboshi (ICMP:17904) (表 2-2) をアウトグループとした．

分離菌 C: PDA 平板培地上で 25°C, 7 日間培養した菌叢から, PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems) によって DNA を抽出した．これを鋳型として，Go Taq Green Master Mix (プロメガ) を用いて PCR を行った．増幅部位は rDNA-ITS, translation elongation factor 1- α (*TEF1 α*), TUB, RNA polymerase II subunit (RPB2) (Yang et al. 2017) の 4 領域とし，使用したプライマーは表 2-3 に示した．反応液 (15 μ L) の組成は，1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 1 \times Buffer,

表 2-3 センリョウ分離菌 C の配列を増幅するために使用したプライマーのリスト

Gene	Product	Primer	Sequence (5' -3')	Reference
LSU	Large subunit ribosomal ribonucleic acid	LR0R	ACCCGCTGAACCTAAGC	Rehner and Samuels (1994)
		LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	
TUB2	β -tublin	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass and Donaldson (1995)
		Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
tef1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone and Kohn (1999)
		EF1-986R	TACTTGAAGGAACCTTACC	
ITS	Internal transcribed spacer	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990
		ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	

1 μ M 各プライマー, 0.25 U FastStart *Taq* Polymerase (Roche), 1.5 μ L の鋳型, および滅菌水である. 増幅条件は 95°C 5 分間, 35 サイクル (95°C 60 秒間, 55°C 80 秒間, 72°C 90 秒間), 72°C 5 分間とした.

得られた増幅産物の塩基配列をジェネティックアナライザーで解析し, ブラスト検索した. さらに, MAFFT version 7 with E-INS-i (Katoh and Standley 2013) および Mesquite version 3.2 (Maddison and Maddison 2017) を用いてアライメントを行った. 編集したアライメントデータを RAxML BlackBox9) を用いて, 最尤法による分子系統解析を行った. ブートストラップ値は, 75% 以上を信頼性の高い値として残した. 分子系統樹上の * はタイプ菌株を表し, *Botriosphaeria corticis* (Demaree & Wilcox) Arx & E.Müll. (CBS 119047) および *B.dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not. (CBS 115476) をアウトグループとした.

2.3 結果

2.3.1 センリョウから分離された糸状菌

供試サンプル毎に様々な糸状菌が分離されたが，その中でも，PDA 平板培地上で白～灰褐色の菌叢を形成し，鮭肉色で粘塊状の分生子塊を形成する分離菌 A，白色の菌叢を形成し，菌糸に隔壁を有しない分離菌 B，はじめ白色，後に黒色の菌叢を形成する分離菌 C の分離頻度が高かった（表 2-4）。

2.3.2 形態的特徴

分離菌 A: PDA 平板培地上の菌叢は始め白色で，後に明るい灰褐色，黒色等に変化した。また，培地上に鮭肉色の分生子粘塊を多数形成したが，菌核は形成しなかった。分生子はフィアロ型に形成され，無色，単胞，長楕円形で両端が丸みを帯びていた。付着器は褐色，不整形～棍棒形であった。これらの形態的特徴は *Colletotrichum* 属と一致した（図 2-2）。

分離菌 B: PDA 平板培地上の菌叢は白色放射状，気中菌糸をわずかに形成した（図 2-3a）。遊走子嚢の形成様式はシンポジオ型で外部増殖性，形は球形～楕円形等変化に富み，顕著な乳頭突起を 1～2 個有し，非脱落性であった（図 2-3b）。遊走子嚢の大きさは，SESKm11 で $38.2-70.9 \times 22.8-35.5 \mu\text{m}$ （平均 $50.3 \times 31.1 \mu\text{m}$ ），SESKm62 で $28.9-$

表 2-4 センリョウから分離された菌

採取日	症状	切片	分離菌			
			分離菌 A	分離菌 B	分離菌 C	その他
2016/6/2	茎の黒変	67	13	41	1	4
	茎の斑点	10	0	0	10	0
	葉の黒色斑点	8	0	0	0	0
	葉の黒変	0	0	0	0	0
	株のしおれ	0	0	0	0	0
2016/7/21	茎の黒変	0	0	0	0	0
	茎の斑点	0	0	0	0	0
	葉の黒色斑点	16	0	0	4	0
	葉の黒変	32	1	0	6	0
	株のしおれ	56	1	0	1	17
2016/12/8	茎の黒変	25	21	0	0	0
	茎の斑点	0	0	0	0	0
	葉の黒色斑点	23	2	0	11	8
	葉の黒変	0	0	0	0	0
	株のしおれ	0	0	0	0	0
2017/11/29	茎の黒変	58	18	0	29	3
	茎の斑点	0	0	0	0	0
	葉の黒色斑点	0	0	0	0	0
	葉の黒変	35	15	0	7	5
	株のしおれ	5	5	0	0	0

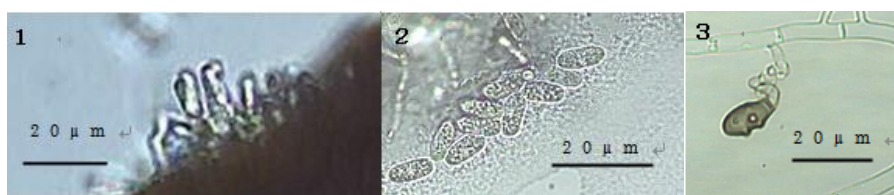


図 2-2 分離菌 A の形態

1. 分生子層, 2. 分生子, 3. 附着器

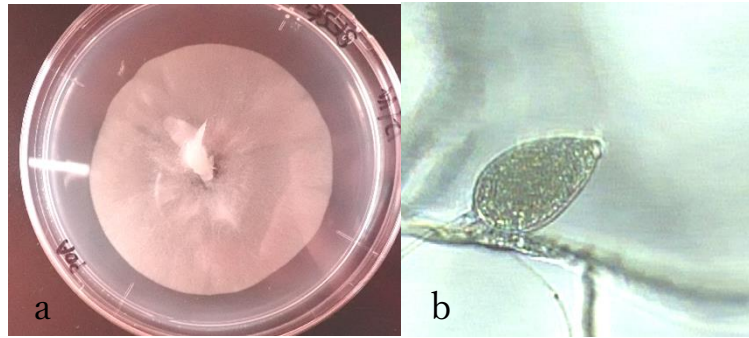


図 2-3 分離菌 B の PDA 平板培地上の菌そうおよび遊走子のう

58.0×19.0–36.2 μm(平均 44.2×27.4 μm), L/B 比はそれぞれ 1.3–2.3 μm(平均 1.6 μm), 1.2–2.0 μm (平均 1.6 μm), いずれも孔口は小さく, 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, 既報 (Erwin et al. 1996; Geoffrey 1993; Mchau et al. 1994; Rahman 2014) の *Phytophthora citrophthora* (Smith and Smith) Leonian と一致した (表 2-5).

分離菌 C: PDA 培地平板上の菌叢は, はじめ白色でのちに黒色に変化した (図 2-4a). 暗黒下では胞子を形成しなかったが, 25°C, BLB 照射下で 7 日間培養すると分生子殻を形成し, その中に分生子を形成した. 分生子は無色, 単胞, 円筒形~紡錘形 (図 2-4b), 分生子の大きさは (17.6–)19.7–23.3(–26.6)×(4.9–)5.4–6.4(–7.0) μm であった (表 2-6). 25°C で 2 ヶ月間培養後の成熟した分生子は, 楕円形~円筒形, 0–2 隔壁, 薄茶色, 分生子の大きさは, (13.8–)14.0–18.2(–17.4)×(5.4–)5.6–7.4(–8.4) μm であった. これらの特徴は, 既報 (Pamela et al. 2017; Pennycook and Samuels 1985) の *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & Phillips の特徴と一致した (表 2-6).

2.3.3 接種試験による病原性の確認

分離菌 A: 菌叢の貼付接種では, 接種 5 日後から接種部位周辺が黒変し, 圃場で観察された病徴が再現された. 分生子の噴霧接種では, 接種

表 2-5 分離菌 B と既報の *Phytophthora citrophthora* の形態

器官	供試菌株		<i>P.citrophthora</i> ^{a)}	<i>P.citrophthora</i> ^{b)}	
	SESKm11	SESKm62			
形状	楕円, 広い卵形	楕円, 広い卵形	楕円, 広い卵形, レモン形	楕円, 広い卵形, 球形	
遊走子の う	大きさ(μ m)	38.2-70.9× 22.8-35.5	28.9-58.0× 19.0-36.2	35-70×30-50	27±3.4 to 65.3±13.9× 18.9±1.8 to 40.4±5.6
L/B 比	1.3-2.3(1.6)	1.2-2.0(1.6)	1.2-1.5(1.0-2.0)	1.3:1±0.2 to 1.8:1±0.1	
乳頭 突起	1つあるいは2つ	1つあるいは2つ	1つあるいは 2つ	1つあるいは 2つ	
脱落性	非脱落性	非脱落性	非脱落性	非脱落性	
卵胞子	-	-	-	-	

a) Geoffrey (1993), b) Mchau and Coffey (1994)

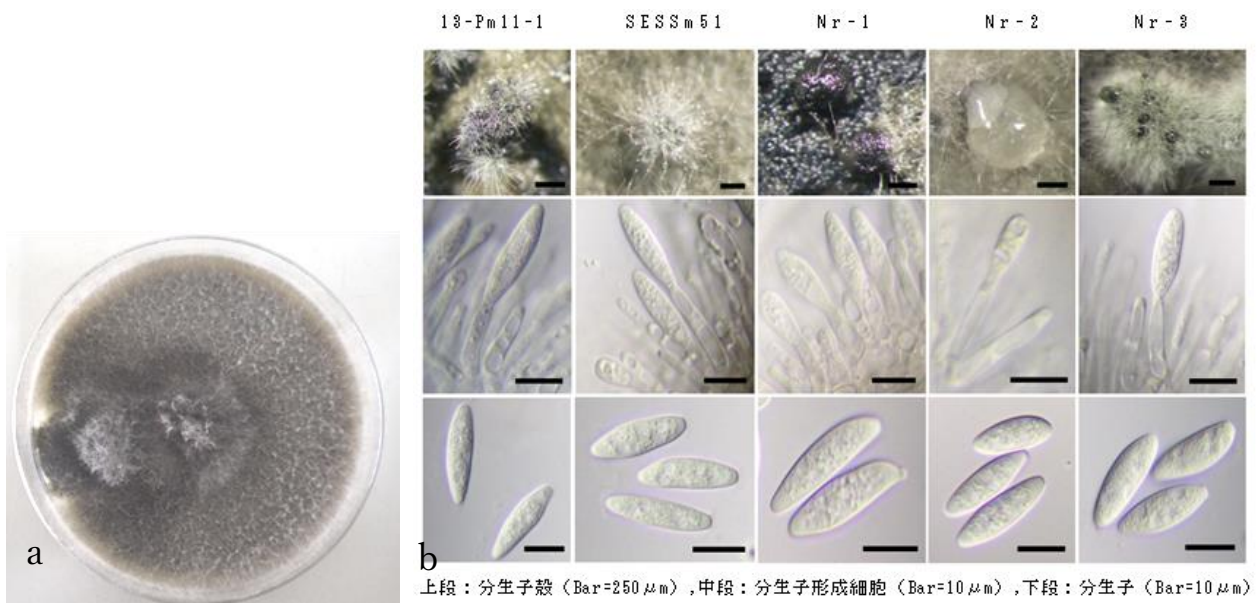


図 2-4 分離菌 C の PDA 平板培地上の菌叢および分生子

表 2-6 分離菌 C と既報の *Neofusicoccum parvum* の形態

器官	13-Pm11-1	<i>N.parvum</i> ^{a)}	<i>N.parvum</i> ^{b)}
分生子	円筒形～やや紡錘形 無色, 基部は切形 (17.6-)19.7-23.3(-26.6)× (4.9-)5.4-6.4(-7.0) μm	円筒形, 先端は丸く, 基部は平滑 (11-)14-18(-23)× 5-7(-10) μm	円筒形, 先端は丸く, 基部は平滑
成熟した分生子	楕円形～円筒形, 0-2 隔壁 薄茶色 (13.8-)14.0-17.4(-18.2)× (5.4-)5.6-7.4(-8.4) μm	薄茶色, 1-2 隔壁	薄茶色, 1-2 隔壁 中央細胞が最も濃い (12-)13.5-21(-24)× 4-6(-10) μm

a) Pennycook & Samuels (1985), b) Phillips et al. (2013)

4 日後から葉に黒点が生じた。病斑部からは、接種菌と同様の培養性状を持つ菌が再分離された。

分離菌 B: 菌叢の貼付接種では、接種 5 日後から接種部位周辺が黒変し、その後接種部位より上部が枯死して、圃場で観察された病徴が再現された。遊走子の噴霧接種では、接種 14 日後から葉に黒点が生じ、その後葉全体が枯死した。病斑部からは、接種菌と同様の培養性状を持つ菌が再分離された。

分離菌 C: 分生子を形成していない菌叢ディスクを接種した株は、観察終了時まで健全な状態であった。分生子を含む菌叢ディスクを接種した株は、接種 4 日後から接種部位周辺が褐変し、その後株全体が枯死して圃場で観察された病徴が再現された。病斑部からは、接種菌と同様の培養性状を持つ菌が再分離された。

いずれも対照区は、観察終了時まで健全な状態であった。

2.3.4 DNA シーケンスに基づく同定

分離菌 A: DNA の 7 領域の塩基配列を決定して BLAST 検索を行った結果、既登録の *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo 種複合体と高い相同性が示された。分離 2 菌株 (c32, c76) とそれらに近縁と考えられた *Colletotrichum* 属 17 種 23 菌株およびアウトグループ 1 菌株の合計 24 菌株のデータを用いた分子系統解析の

結果, c32 株および c76 株は *C. gloeosporioides* 種複合体の *C. jiangxiense* Liu & Cai と近縁であった (図 2-5).

分離菌 B: rDNA-ITS 領域および COX I 遺伝子の塩基配列を決定して BLAST 検索を行った結果, *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian と 100% の相同性を示した (表 2-7).

分離菌 C: rDNA-ITS 領域の塩基配列を決定して BLAST 検索を行った結果, *Neofusicoccum parvum* (Pennycook et Samuels) Crous, Slippers & Phillips, *N. umdonicola* Pavlic, Slippers & Wingf および *N. occulatum* Sakalidis & Burgess と 99% の相同性を示した. rDNA-ITS, EF, TUB, RPB2 における最尤法を用いた系統樹を作成した結果, 分離菌 C は *N. parvum* と同一のクレードに位置した (図 2-6).

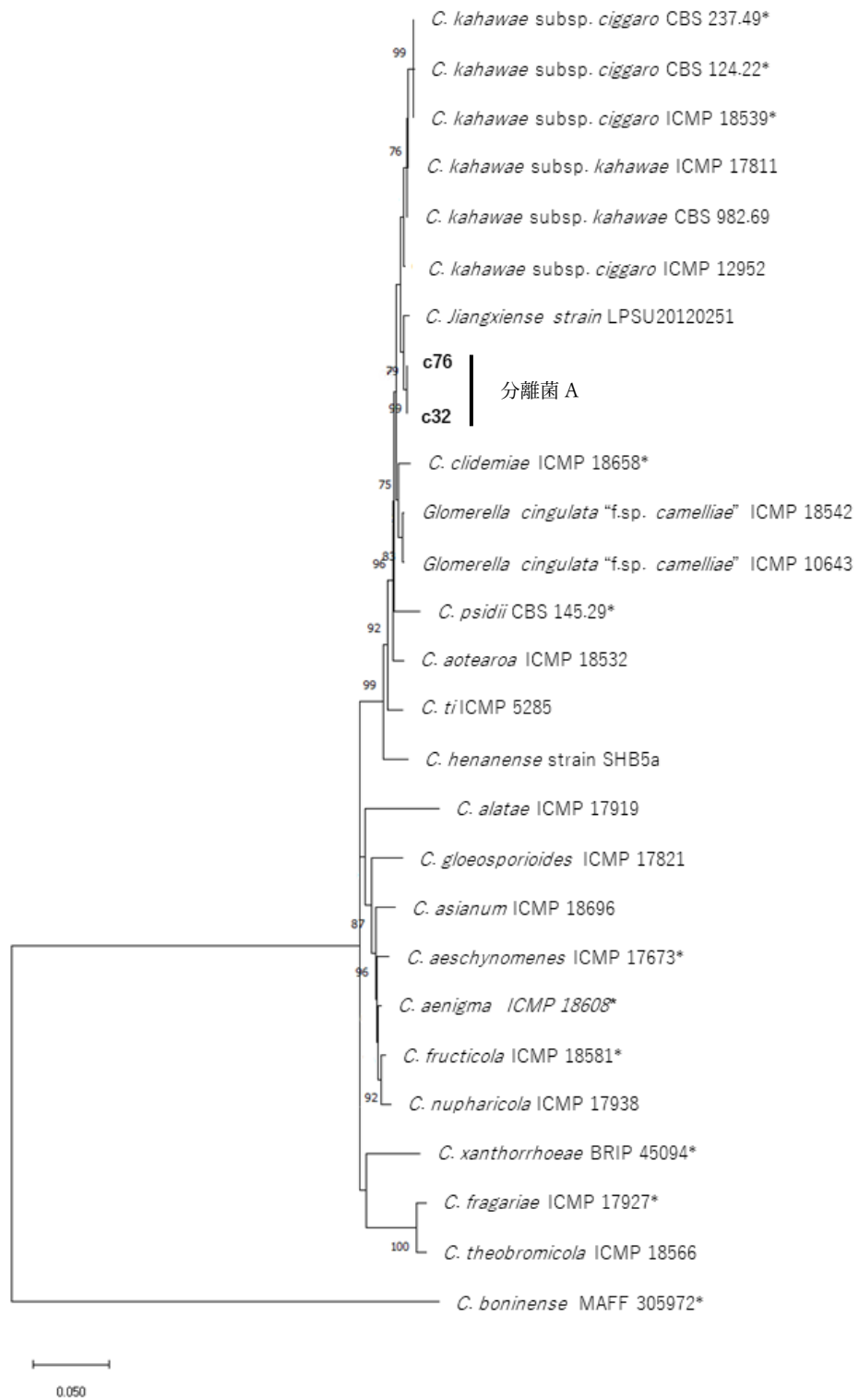


図 2-5 分離菌 A を含む *Colletotrichum* 属菌の最尤法系統樹. 枝の値は, ブートストラップ法 1000 回の反復の支持率を示す.

C. boninense をアウトグループとした.

表 2-7 分離菌 B と *P. citrophthora* の相同性

増幅部位		相同性
rDNA-ITS	777/777	100%
COX I	659/659	100%

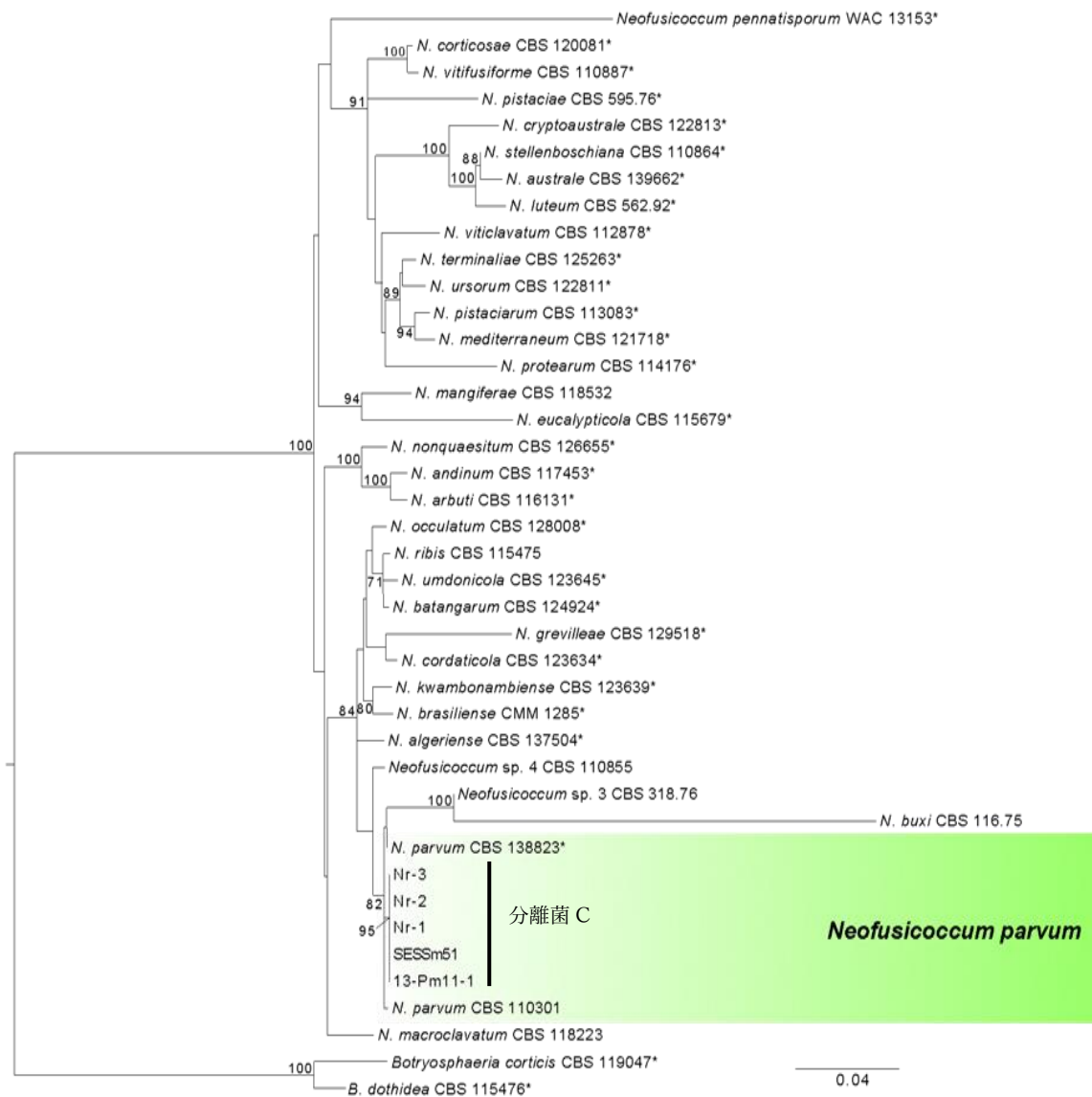


図 2-6 分離菌 C を含む *Neofusicoccum* 属菌の最尤法系統樹

2.4 考察

分離菌 A は，形態的特徴とシーケンス解析の結果から，*C. gloeosporioides* 種複合体内の *C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo と同定した．沖ら（2019）は，7 領域の DNA 塩基配列が，狭義の *C. kahawae* J.M. Waller & Bridge の登録塩基配列（MK512736, KJ954701, KU642552, MK512734, KJ955000, MK298297, MF033882）と 99%以上の相同性を示すことを報告した．さらに，Hattori et al. (2021), Weir et al. (2012) および Liu et al. (2015) を参考に分子系統解析を行ったところ，*C. jiangxiense* Liu & Cai と最も近縁であることが示された（図 2-5）．*C. jiangxiense* は中国のユキノシタ（*Saxifraga stolonifera* Curtis）とチャノキ（*Camellia sinensis* (L.) Kuntze）から分離された報告がある（Yang et al. 2017；Liu et al. 2015）．また，茨城県で発生したセンリョウ炭疽病菌についても，塩基配列（GS および TUB 領域）と分生子の特徴から，本県と同じ *C. jiangxiense* である可能性が高いことが示唆されている（渡辺 私信）．*C. gloeosporioides* 種複合体はセンリョウ炭疽病の原因菌として既に報告（塚本 2007）されており，今回の調査によって，種複合体内の *C. jiangxiense* がセンリョウ炭疽病の病原である可能性が示唆されるとともに，高知県内産地で炭疽病が発生していることが明らかとなった．

分離菌 B は，形態的特徴と有性器官の形成に関わる性状（Erwin and

Ribeiro 1996), シーケンス解析の結果から, *Phytophthora citrophthora* と同定した. 本菌は病名目録への記載はないが (日本植物病理学会 2021; 植松ら 2007), センリョウから分離された報告があり (海老原ら 2003), さらに, 接種試験等からセンリョウ疫病の病原の 1 つであるとされている (植松 私信). 本研究では 2016 年 6 月 2 日のサンプルからのみ分離されたが, 梅雨期の圃場において頻発している可能性が示唆された. 本研究の結果に基づき, センリョウ疫病の病原として, 新たに *P. citrophthora* を追加したい.

分離菌 C は, rDNA-ITS 領域の解析結果から, *Neofusicoccum* Crous, Slippers & Phillips 属菌と高い相同性が示された. *Neofusicoccum* 属の形態的特徴は狭義の *Botryosphaeria* Ces. & De Not. 属菌と酷似し, 明確に識別することは困難であると報告されている (Crous et al. 2006; Phillips et al. 2013). そこで, 本研究では, Yang et al. (2017) を参考に分子系統解析を行った. その結果, 本菌は *N. parvum* (Pennycook et Samuels) Crous, Slippers & Phillips CBS138823 と同一のクレードを形成, *N. parvum* と同定した.

センリョウの障害部からは, 今回の調査では様々な菌が分離されたが, その種類は採集日によってばらつきがあった (表 2-4). しかしながら, *Colletotrichum* 属菌と *Neofusicoccum* 属菌についてはいずれの採取日においても分離されたことから, センリョウに普遍的に感染し, 障害の

要因になっていると考えられた。分離菌の病原性を調査したところ、*Phytophthora* 属菌、*Colletotrichum* 属菌は菌叢ディスクの貼付接種によって発病が確認されたが、*Neofusicoccum* 属菌については分生子を形成していない菌叢の貼付接種では発病せず、分生子を形成させた菌叢を接種することで発病が確認され、さらに病勢の進展が非常に緩慢であった。*N. parvum* による病害として報告があるモミジバスズカケノキ (*Platanus × acerifolia* (Aiton) Willd.) 胴枯病では、有傷接種でのみ初期病徴が再現され、病原性が確認された（本橋ら 2016）ことから、有傷部位から感染すると考えられる。センリョウにおける *N. parvum* の病原性や発病時期等の詳細については、さらなる検討が必要と考えられた。

第3章 ユズエクボ症の原因および防除法の検討

3.1 ユズ黄玉貯蔵中に発生した果皮の陥没障害

ユズ (*Citrus junos* Sieb ex. Tanaka) は高知県における中山間地域の基幹品目であり，2018年度の栽培面積は約870 ha，出荷量約11,112 tで，全国のシェアは約52.8%である（高知県農業振興部 2021）。果実の収穫は着色前の青玉果と着色後の黄玉果に分けて行われる。黄玉果は10月下旬から11月に収穫し，12月上中旬まで5℃前後で短期間貯蔵して，市場出荷されている。この黄玉果の果実にエクボ症と呼ばれる果皮が陥没して褐変する障害が発生し，問題となっている（図3-1）。エクボ症は主として貯蔵中に発生し，障害果実は加工仕向けにも回せずに廃棄処分されるうえ，市場出荷後に発症する場合もあり，市場評価を下げる要因にもなっている。また，多発時には樹上での発症もみられ，加工仕向け用果実の品質低下につながっている。エクボ症を呈する果実からは *Colletotrichum* 属菌が高確率で分離されることから，本障害には本菌の関与が強く疑われていた。

そこで今回，接種試験等によりエクボ症の原因菌を明らかにするとともに，薬剤による防除対策を検討した。



図 3-1 ユズエクボ症障害果

3.2 材料および方法

3.2.1 樹上での接種による病徴再現

3.2.1.1 障害果からの菌の分離

2014年11～12月に、エクボ症を発症したユズ果実から病斑部を含む果皮の切片を切り出し、70%エタノールで表面殺菌した後、PDA平板培地上に静置し、25℃で1週間程度培養した。

3.2.1.2 接種

高知県農業技術センター-果樹試験場（高知市朝倉）のユズ22年生3樹に接種した。接種は2016年8月22日に、次に示す菌叢接種および培養枝接種によって行った。

菌叢接種区では、あらかじめPDA平板培地で25℃、10日間培養した供試菌株を、培地ごと1cm角程度に切り取って樹上のユズ果実の側面に貼り付け、その上から濡らしたガーゼで押さえ、さらにパラフィルムを巻いて固定した。各菌株とも1樹あたり6果、計18果の果実に接種した。なお、対照果実には、PDA培地のみを貼り付けた。

培養枝接種区では、ウンシュウミカンの小枝を水洗後2cm程度に切ってオートクレーブ滅菌（121℃、30分間）したものをPDA平板培地上に並べ、供試菌株を移植して25℃、10日間培養した。培養後の枝を果実直上の枝に針金で固定した。各菌株とも1樹あたり6果、計18果

の果実に接種した。なお、対照果実では、菌を培養していない枝を同様に固定した。

3.2.1.3 調査

2016年11月2日に果実を収穫して、11月4日に5°Cの貯蔵庫へ搬入し、12月15日に貯蔵庫から出して常温に置いた。12月21日に各果実におけるエクボ症の発生を以下の指数別に調査して、発生果率および発生度を算出した。

0、発生なし；1、小斑点（直径5 mm未満）が散見される；2、小斑点が広範囲に認められるまたは大型斑点（5 mm以上）が1～2個認められる；3、大型斑点が3個以上認められるまたは斑点部分から腐敗している。

発生度 = Σ （指数 × 指数別発生果数） / （3 × 調査果数） × 100

3.2.1.4 障害果からの菌の再分離

分離は「3.2.1.1 供試菌株および供試樹」の項と同様の方法で行った。得られた菌株の形態的特徴を、接種菌株と比較した。

3.2.1.5 シークエンス解析

PDA平板培地上で25°C、4日間培養した菌叢から、ISOPLANT（ニ

ッポンジーン) を用いて DNA を抽出し, これを鋳型として, KOD FX Neo (東洋紡ライフサイエンス) を用いて PCR を行った. プロトコルはキット付属のものに従った. 増幅部位は actin(ACT), β -tubulin(TUB2), chitin synthase(CHS), calmodulin(CAL), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), glutamine synthetase(GS), ribosomal DNA-internal transcribed spacer (rDNA-ITS) の 7 領域とし, 増幅用プライマーは表 3-1 に示した. 滅菌蒸留水 12.5 μ l, 10 \times PCR buffer 2 μ l, 2 mM dNTP s 2 μ l, primer (forward, reverse 10 μ M)各 1 μ l, 鋳型 1 μ l, Blend *Taq* (東洋紡ライフサイエンス) 0.5 μ l を混合し, 反応液の total volume を 20 μ l とした. PCR 条件は 94 $^{\circ}$ C 2 分間, 30 サイクル (94 $^{\circ}$ C 30 秒間, 55 $^{\circ}$ C 30 秒間, 72 $^{\circ}$ C 1 分間), 72 $^{\circ}$ C 7 分間とした. 得られた増幅産物の塩基配列をジェネティックアナライザー (Applied Biosystems R3500; ライフテクノロジーズジャパン) で解析して連結し, データベースに対してブラスト検索した(表 3-2). 次に, MEGA X v.10.2 (Kumer et al. 2018) を用いて, Tamura and Nei (1993) に基づく最尤法で系統関係を推定した. 系統解析に使用した塩基配列数は, アライメントギャップを含めて 2,879 bp であった. 最尤法で得られた系統樹の各枝の支持率は, ブートストラップ検定 (Felsenstein 1985) を 1,000 回反復し, 評価を行った. ブートストラップ値は, 75% 以上を信頼性の高い値として残した. 分子系統樹上の * はタイプ菌株を表し,

表 3-1 ユズエクボ症菌の配列を増幅するために使用したプライマーのリスト

Gene	Product	Primer	Sequence (5' -3')	Reference
ACT	Actin	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone and Kohn (1999)
		ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
		Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	
TUB2	β -tublin	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass and Donaldson (1995)
		CL1C	GAATTCAAGGAGGCCTTCTC	
CHS	Chitin synthase	CL1C	CTTCTGCATCATGAGCTGGAC	Weir et al. (2012)
		CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGAAGAAG	
CAL	Calmodulin	CHS-345R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	Carbone and Kohn (1999)
		GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GDR	GGGTGGAGTCGTACTIONGAGCATGT	Templeton et al. (1992)
		GSF1	ATGGCCGAGTACATCTGG	
GS	Glutamine synthetase	GSR1	GAACCGTCGAAGTTCCAC	Stephenson et al. (1997)
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS	Internal transcribed spacer	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al. (1990)

表3-2 系統解析に使用した株の一覧

Species	Culture	Host	Country	GenBank accession number						
				ITS	GAPDH	CAL	ACT	CHS	GS	TUB
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608*	Persea americana	Israel	JX010244	JX010044	JX009883	JX009443	JX009774	JX010078	JX010389
<i>C. aeschynomenes</i>	ICMP 17673*	Aeschynomene virginica	USA	JX010176	JX009930	JX009721	JX009483	JX009799	JX010081	JX010392
<i>C. alatae</i>	CBS 304.67*, ICMP 17919	Dioscorea alata	India	JX010190	JX009990	JX009738	JX009471	JX009837	JX010065	JX010383
<i>C. aoteaerao</i>	ICMP 18532	Vitex lucens	New Zealand	JX010220	JX009906	JX009614	JX009544	JX009764	JX010108	JX010421
<i>C. asianum</i>	IMI 313839, ICMP 18696	Mangifera indica	Australia	JX010192	JX009915	JX009723	JX009576	JX009753	JX010073	JX010384
<i>C. boninense</i>	MAFF 305972*, ICMP 17904, CBS 12375, s	Crinum asiaticum var. sinicum	Japan	JX010292	JX009905	JX009741	JX009583	JX009827	KJ955039	KJ955336
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18658*	Vitis sp.	USA	JX010265	JX009989	JX009645	JX009537	JX009877	JX010129	JX010438
<i>C. fragariae</i>	ICMP 17927*	Fragaria X ananassa	USA	JN936968	JX010024	JX009592	JX009516	JX009830	JN937001	JX010373
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18581*, CBS 130416	Coffea arabica	Thailand	JX010165	JX010033	FJ917508	FJ907426	JX009866	JX010095	JX010405
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18613	Limonium sinuatum	Israel	JX010167	JX009998	JX009675	JX009491	JX009772	JX010077	JX010388
<i>C. glaucosporioides</i>	IMI 356878*, ICMP 17821, CBS 112999	Citrus sinensis	Italy	JX010152	JX010056	JX009731	JX009531	JX009818	JX010085	JX010445
<i>C. henanense</i>	strain SHB5a, strain CMF043	Malus domestica	USA	MT492140	MT513015	MT512982	MN685846	MN685852	MT513050	MT513080
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	ICMP 18539*	Olea europaea	Australia	JX010230	JX009966	JX009635	JX009523	JX009800	JX010132	JX010434
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>kahawae</i>	IMI 301220, ICMP 17811	Coffea arabica	Malawi	JX010233	JX009970	JX009641	JX009555	JX009817	JX010131	JX010430
<i>C. nupharicola</i>	CBS 469.96, ICMP 17938	Nuphar lutea subsp. polysepala	USA	JX010189	JX009936	JX009661	JX009486	JX009834	JX010087	JX010397
<i>C. psidii</i>	CBS 145.29*, ICMP 19120	Psidium sp.	Italy	JX010219	JX009967	JX009743	JX009515	JX009901	JX010133	JX010443
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 18566	Olea europaea	Australia	JX010282	JX009953	JX009593	JX009496	JX009801	JX010071	JX010376
<i>C. ti</i>	ICMP 5285	Cordyline australis	New Zealand	JX010267	JX009910	JX009650	JX009553	JX009897	JX010124	JX010441
<i>C. xanthorrhoeae</i>	BRIP 45094*, ICMP 17903, CBS 127831	Xanthorrhoea preissii	Australia	JX010261	JX009927	JX009653	JX009478	JX009823	JX010138	JX010448
<i>Glomerella cingulata</i> "f.sp. <i>camelliae</i> "	ICMP 18542	Camellia sasanqua	USA	JX010223	JX009994	JX009628	JX009488	JX009857	JX010118	JX010429
<i>Glomerella cingulata</i> "f.sp. <i>camelliae</i> "	ICMP 10643	Camellia x williamsii	UK	JX010224	JX009908	JX009630	JX009540	JX009891	JX010119	JX010436

Colletotrichum boninense J. Moriwaki, Toy. Sato et T. Tsukiboshi
(ICMP:17904) をアウトグループとした。

3.2.2 感染時期の検討

3.2.2.1 供試果実

高知県果樹試験場に栽植の 22 年生ユズ 4 樹の樹冠外縁から、2016 年 7 月 12 日および 8 月 12 日に外観健全な果実を 1 樹あたり 3 果ずつ採取した。また、同年 7 月 19 日に香美市物部町、7 月 22 日に高知市土佐山のユズ現地実証圃で摘果した果実のうち、傷や虫害などが少ない果実を 9 果ずつ選んで供試した。

3.2.2.2 糸状菌の分離

各果実の表皮から 5 カ所（萼周辺 1 カ所、果頂部 1 カ所および赤道面 3 カ所）の小片をカミソリで切り取り、70%エタノールに 1 分間、次いで次亜塩素酸ナトリウム溶液（塩素濃度約 2%）に 2 分間浸漬した後、滅菌蒸留水で洗浄した。さらに滅菌したメスで細断し、得られた 2 切片ずつを、直径 9 cm のシャーレに分注した PDA 平板培地に置床した。25℃暗黒条件で 7 日間培養したのち、培地上で生育した糸状菌の菌叢の性状を肉眼観察し、菌叢上に鮭肉色の分生子塊が認められたもの、または顕微鏡観察によって特徴的な分生子が認められたものを

Colletotrichum 属菌と判断した。なお、分離は果樹試験場と土佐山の果実は採取当日、物部町の果実は翌日に行った。

3.2.3 未熟果実（青玉）に対する病原性

3.2.3.1 供試菌および分生子懸濁液の調製

果樹試験場に栽植されているユズの外観健全な果実から、2016年7月6日に分離した *Colletotrichum* 属菌（単孢子分離未実施）を供試した。PDA 平板培地で 25°C、8～15 日間培養した菌叢に滅菌水を加えて分生子を懸濁させ、 1.0×10^5 個/ml に調製した。

3.2.3.2 接種方法

2016年8月に果樹試験場内で採取した青玉果実の表面に、コルクボーラーで直径約 5 mm、深さ約 2 mm のリング状の傷を 1 果当たり 4 カ所付ける、または、千枚通しで深さ約 2 mm の傷を 1 カ所 3 点ずつ、1 果当たり 4 カ所付けたうえで、傷の部分に分生子懸濁液を 10 μ l ずつ滴下した。また、付傷処理を行わない果実にも同様に分生子懸濁液を滴下した。いずれも対照として滅菌水を同様に滴下した。各処理区につき 1 果ずつ供試した。

接種後は水を含んだペーパータオルとともにビニール袋またはタッパー内に果実を密封した。25°C、多湿条件に 7 日間保った後、接種部

位から拡大した褐変部の長径と短径を計測した。

3.2.4 薬剤防除効果の検討

3.2.4.1 処理区の概要

果樹試験場に栽植されているユズ 9 樹を供試した。試験区として、使用回数に関する登録内容にかかわらず期間中継続的に殺菌剤を 2 剤混用散布する徹底防除区、一般的な防除暦を参考に散布する参考防除区、無処理区の 3 区を設け、それぞれ 3 樹ずつ使用した。徹底防除区では、2017 年 7 月 19 日から 10 月 13 日まで、13～15 日間隔で 7 回、参考防除区では、2017 年 7 月 19 日から 9 月 29 日まで、13～15 日間隔で 6 回、表 5 に示した薬剤を約 3～4 L/樹の割合で散布した。薬剤の詳細などは表 3-3 に示す。薬液には展着剤（商品名：クミテン、5,000 倍）を加用した。無処理区へはこれらの薬剤散布は行わなかった。なお、いずれの区も処理期間中は試験薬剤以外の殺菌剤は処理しなかったが、試験開始前まで慣行の栽培で処理される殺菌剤を散布した（表 3-3）。また、10 月 30 日に青かび病などの貯蔵病害対策として、無処理区を含む全ての区にイミノクタジン酢酸塩液剤（2,000 倍、日本曹達）を散布した。

3.2.4.2 病原菌の接種

表 3-3 薬剤防除試験における散布日と使用薬剤

散布日	薬剤名	成分含有率 (%)	希釈倍率 (倍)	徹底防除区	参考防除区	薬剤省力区
4月13日	ジチアノ水和剤	40.0	1000	○	○	○
5月23日	シプロジニル・フルジオキシニル水和剤	37.5 25.0	2000	○	○	○
6月1日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	○	○
6月20日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	○	○
7月3日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	○	○
7月19日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	○	×
〃	イミノクタジンアルベシル酸塩液剤	30.0	1000	○	×	×
8月2日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	×	×
〃	ビリベンカルブ水和剤	40.0	2000	○	×	×
〃	クレソキシムメチル水和剤	50.0	2000	×	○	×
8月17日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	×	×
〃	イミベンコナゾール水和剤	30.0	4000	○	×	×
〃	ホセチル水和剤	80.0	400	×	○	×
8月30日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	×	×
〃	ベノミル水和剤	50.0	4000	○	×	×
〃	イミベンコナゾール水和剤	30.0	4000	×	○	×
9月14日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	×	×
〃	クレソキシムメチル水和剤	50.0	2000	○	×	×
〃	ペンチオピラド水和剤	20.0	1500	×	○	×
9月29日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	×	×
〃	イミノクタジンアルベシル酸塩液剤	30.0	1000	○	×	×
〃	クレソキシムメチル水和剤	50.0	2000	×	○	×
10月13日	マンゼブ水和剤	80.0	600	○	×	×
〃	ビリベンカルブ水和剤	40.0	2000	○	×	×
10月30日	イミノクタジン酢酸塩液剤	25.0	2000	○	○	○

注 1) ○は散布したことを, ×は散布しなかったことを示す.

注 2) 徹底防除区では 2 薬剤を混用して散布した.

発病を促すために、2017年7月21日、8月10日、9月1日、9月25日の計4回、培養枝接種を行った。接種には09KNM41と10FKM43の2菌株を用い、「2. 樹上での接種による病徴再現」と同様の方法で培養した培養枝を、ユズの樹冠内の枝に1樹あたり各菌株を5本ずつ（計10本）針金で固定した。

3.2.4.3 調査

2017年11月7日に33~40果/樹を収穫し、11月8日に5℃の貯蔵庫へ搬入した。12月20日に貯蔵庫から出して常温に置いた後、12月21日に調査した。各果実におけるエクボ症の発生を「3.2.1 樹上での接種による病徴再現」の項と同様に指数別に調査して、発生果率および発生度を算出した。また、無処理区に対する防除価を次式によって求めた。

防除価 = (1 - 処理区の発生度 / 無処理区の発生度) × 100

3.3 結果

3.3.1 樹上での接種による病徴再現

PDA平板培地上に発生した糸状菌を新たなPDA培地上に移し、鮭肉色の分生子塊が見られるまで25℃で培養後、単孢子分離して3菌株（菌株名：09KNM41、10FKM43、12NIH12）を得た。菌叢接種区では菌叢

を貼付した部分，培養枝接種区では果梗部周辺に，エクボ症特有の陥没症状が再現された（図 3-2）．発生果率は菌叢接種（17.6-38.9%）よりも培養枝接種（38.9-66.7%）で高かった（表 3-4）．各区の対照果実にもエクボ症が発生したが，接種によって本病の発生果率や発病指数が増加した（09KNM41 の菌叢処理を除く）ため，接種の結果であると判断した．

供試菌株を接種したユズ果実のうち，エクボ症を呈したものの果皮からは高率（7割程度）に接種菌と同様の形態を示す *Colletotrichum* 属菌が再分離された（データ省略）．

3.3.2 DNA シーケンスに基づく同定 DNA シーケンスに基づく同定接種に用いた菌株のうち，10FKM43 および 12NIH12 について，7領域の塩基配列を接続し，解析した結果，既登録の *C. gloeosporioides* 種複合体の数種と高い相同性が示された（10FKM43: MT508637, KJ954710, MF668114, KM053194, JN211099, FJ455525, MK390653; 12NIH12: LC494273, MK087349, MN525860, MH463893, MK681395, MG832426, MK087242）．特に，分離 2 菌株とそれらに近縁と考えられた *Colletotrichum* 属 17 種 20 菌株およびアウトグループ 1 菌株，および第 2 章で検討したセンリョウ炭疽病菌 2 菌株の合計 23 菌株のデータを用いた分子系統解析の結果，10FKM43 は *C. gloeosporioides*,

供試菌株接種

無接種

培養枝接種



菌そう接種



図 3-2 樹上での接種による病徴再現

表 3-4 接種によるエクボ症の再現

供試菌株	接種方法	調査果数 ^{a)}	指数別発生果数				発生果率(%)	発生度
			0	1	2	3		
09KNM41	菌そう	17	14	2	0	1	17.6	9.8
	培養枝	18	6	2	4	6	66.7	51.9
10FKM43	菌そう	18	11	2	2	3	38.9	27.8
	培養枝	14	5	0	2	7	64.3	59.5
12NIH12	菌そう	18	13	2	2	1	27.8	16.7
	培養枝	18	11	3	4	0	38.9	20.4
対照	菌そう	18	13	2	2	1	27.8	16.7
	培養枝	10	8	1	1	0	20.0	10.0

a)各処理区ともそれぞれ 18 果実を供試したが、褐色腐敗病の発生などのため調査果数が減少した区があった。

12NIH12 は *C. fructicola* と近いクレードに所属することが明らかとなった (図 3-3).

3.3.3 樹上果実からの *Colletotrichum* 属菌分離

7月12日と8月12日に、現地3圃場でユズ果実を採取し、果皮から分離を行った結果、検出率には圃場間差が認められたが、いずれの圃場でも *Colletotrichum* 属菌が検出された (表 3-5). *Colletotrichum* 属菌の検出率は、7月12日は朝倉で75%、物部で11.1%、土佐山で77.8%、8月12日は朝倉で66.7%であった (データ省略).

3.3.4 未熟果実 (青玉) に対する病原性

コルクボーラーと千枚通しを用いて付傷し、分離した *Colletotrichum* 属菌を有傷接種した結果、いずれの方法による付傷でも、接種約7日後に、中央部に菌叢が伴う褐色病斑を生じた (表 3-6, 図 3-4). 一方、無傷接種では病斑を生じなかった. なお、対照区 (滅菌水) でも付傷部に褐変が認められた.

3.3.5 薬剤防除効果の検討

徹底防除区 (表 3-3) は対照とした薬剤省力区に比して防除価 79.9 と高い防除効果を示した. 参考防除はやや効果が認められたが、徹底防除

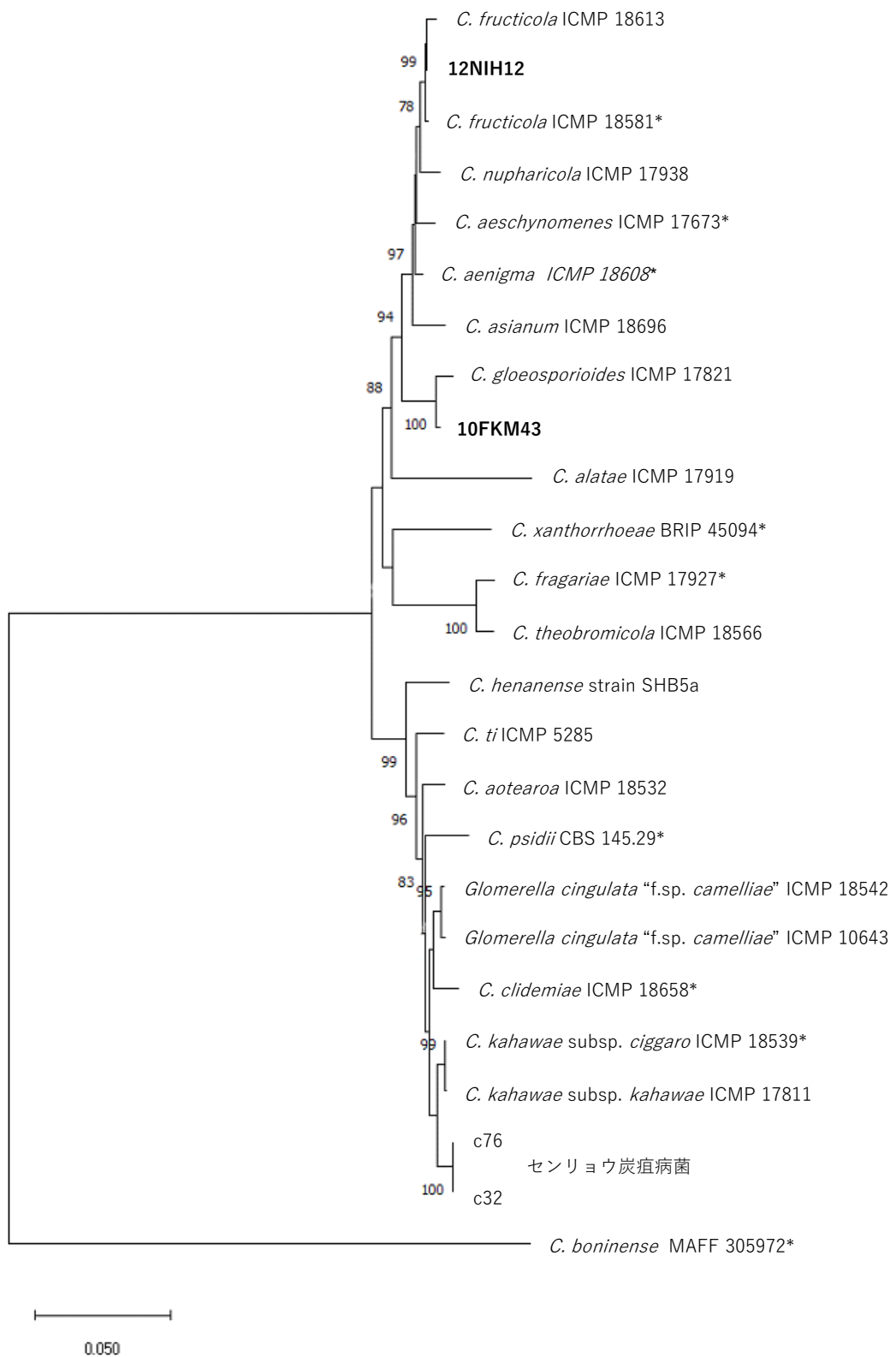


図 3-3 センリョウ炭疽病菌を含む *Colletotrichum* 属菌の最尤法系統樹. 枝の値は、ブートストラップ法 1000 回の反復の支持率を示す. *C. boninense* をアウトグループとした.

表 3-5 *Colletotrichum* 属菌の検出頻度

採取地	分離時期	調査果実数	検出果実数	検出率(%)
高知市朝倉	7月12日	12	9	75.0
	8月12日	12	8	66.7
香美市物部町	7月20日	9	1	11.1
高知市土佐山	7月22日	9	7	77.8

表 3-6 未熟果実（青玉）に対する病原性

接種法	接種場所	褐変部の大きさ (mm)			
		分生子懸濁液		滅菌蒸留水	
		長径	短径	長径	短径
コルクボーラーによる有傷接種	I	19.7	13.9	4.8	4.2
	II	34.9	13.1	4.6	4.6
	III	16.0	13.6	6.4	6.4
	IV	17.2	13.5	5.4	5.2
千枚通しによる有傷接種	I	6.3	6.3	6.5	5.7
	II	9.5	8.9	7.1	7.1
	III	13.2	9.3	6.8	3.4
	IV	8.0	6.5	8.9	8.2
無傷	I	0.0	0.0	0.0	0.0
	II	0.0	0.0	0.0	0.0
	III	0.0	0.0	0.0	0.0
	IV	0.0	0.0	0.0	0.0

有傷

無傷

千枚通し

コルクボレー

分生子懸濁液

滅菌水



図 3-4 未熟果実への接種によって生じた病斑

区と比較すると防除価が低かった(表 3-7).

3.4 考察

エクボ症を呈するユズ果実から *Colletotrichum* 属菌が高頻度に分離され、また、分離した *Colletotrichum* 属菌の果実への樹上接種によってエクボ症が再現され、再現された病斑からは接種菌が再分離された。供試菌の菌叢接種果実では接種部の直下に、また、培養枝接種果実では接種枝直下の果実にエクボ症が発生した（データ省略）。一方、両区の対照（無接種）果実においても同様にエクボ症が発生したが、発症部位に一定の傾向がなかったこと、また、培養枝接種では接種果実の方が明らかに発症率、発症度が高かったことから、対照果実での発症は自然感染によるものと考えられ、圃場でのエクボ症の潜在感染頻度の高さを示唆した。これらのことから、エクボ症が *Colletotrichum* 属菌の感染によって生じる炭疽病の一症状であることが明らかになった。*Colletotrichum* 属菌によるカンキツ炭疽病の症状として、中晩生カンキツの果皮に生ずるさび果、日焼けが原因で早生温州に生ずる炭疽病、貯蔵中に腐敗する炭疽病が報告されている（山口・大竹 1986）。しかしながら、ユズ果実に果皮陥没障害を起こすエクボ症の病原が炭疽病菌であることはこれまで報告されていなかった。今回の試験によって、ユズでは、*C. gloeosporioides* や *C. fructicola* に近縁の炭疽病菌によってエクボ症が引き起こされていることを初めて明らかにした。

山口・大竹によると、カンキツ炭疽病菌は葉、果実、樹皮などの健全

組織に潜在しており、枯枝上に形成された孢子が伝染源となるとされる。また、孢子の形成、飛散、感染にはいずれも雨滴が関与し、さび果の感染期間は6～10月、主な感染期間は9月とされる（山口・大竹 1986）。一方、貯蔵中に発生する炭疽病は、果皮に炭疽病菌の付着器が大量に形成され、ストレスなどの障害を受けて組織が壊死したり、生理機能が低下したりすると発病するとされる（Brown 1975, Brown and Barmore 1977）。今回の調査では、7月中旬に分離を行った外観健全な果実から高率に *Colletotrichum* 属菌が分離されたこと、また、未熟果に対して行った接種試験において、有傷接種すると褐変を生じるが、無傷接種では全く褐変しなかった。しかしながら、無接種の対照果実でもエクボ症の症状を示すものがあった。カンキツ炭疽病菌は、果実、葉、枝に生息し、日焼けで障害を生じるなど、何らかの原因でカンキツ側が衰弱して発病するとされており（足立 2014）、ユズエクボ症でも既報のカンキツ炭疽病菌と同様に、7月以前から果実で潜在感染し、果皮の生理機能の低下等によって障害が発生すると推察された。カンキツ類の貯蔵病害は、炭疽病の他にも *Penicillium italicum* Wehmer による青かび病、*P. digitatum* (Persoon) Saccardo による緑かび病、*Geotrichum candidum* Ferraris var. *citri-aurantii* Ciferri & F. Ciferri による白かび病、*Alternaria citri* Ellis & N. Pierce による黒腐病などが報告されている（日本植物病理学会 2021）。このうち青かび病については、気孔や表皮

にできた傷口から侵入し、適切な温度と水分の条件が揃うと発病するとされる (Ghooshkhaneh et al. 2018). Lafuente et al. (2018) によると、非連続的な青色発光ダイオード (LBL) の照射により、カンキツ類の *P. digitatum* の生存率と感染能力が低下することが明らかになっている。LBL は真菌の胞子形態の異常や細胞質の暗色化を引き起こすことから、収穫後の腐敗能力を低下させる有力な選択肢と考えられる。

Colletotrichum 属菌については、2009 年以降、分子系統解析に基づく種分割が行われてきた結果、これまでに置かれていた種の多くが種複合体であることが判明するとともに、形態的に類似していたために明らかになっていなかった隠蔽種が次々に独立してきた (Damm et al. 2012a; 2012b; 2013; 2014; Liu et al. 2013; Tao et al. 2013; Weir and Damm 2012). これまで、炭疽病の防除は病原菌の属か種複合体まで分かれば可能な場合がほとんどと思われてきたが、*C. gloeosporioides* 菌株間で薬剤耐性が異なること (Peres et al. 2004) や、近年、同じ種複体内でも病原性や薬剤耐性の獲得傾向が異なることが明らかになりつつある (Fujinaga et al. 2011, 澤岬ら 2015, 横澤ら 2015). 以前の報告 (沖ら 2020) では、得られた部分配列情報のみでは構成種を詳細に識別することは困難であった (表 3-8) ため、分子系統解析を行ったところ、10FKM43 は *C. gloeosporioides*, 12NIH12 は *C. fructicola* と近いクレードに所属することが明らかとなった (図 3-2). 世界的に見て、

表 3-8 ユズエクボ症分離株の Blast 検索結果

増幅部位		10FKM43	12NIH12
Actin	相同性	234 nt/235 nt(99%)	-
	菌種名	<i>C. gloeosporioides</i>	-
β -tublin 2	相同性	390 nt/390 nt(100%)	670 nt/670 nt(100%)
	菌種名	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. fructicola</i> (<i>C. gloeosporioides</i> 種複合体)
Chitin synthase	相同性	225 nt/225 nt(100%)	-
		<i>C. gloeosporioides</i>	
	菌種名	<i>C. viniferum</i> (<i>C. gloeosporioides</i> 種複合体)	-
Calmodulin		<i>C. acutatum</i>	
	相同性	693 nt/693 nt(100%)	692 nt/692 nt(100%)
	菌種名	<i>C. gloeosporioides</i>	
GAPDH		<i>C. viniferum</i> (<i>C. gloeosporioides</i> 種複合体)	<i>C. fructicola</i> (<i>C. gloeosporioides</i> 種複合体)
		<i>C. acutatum</i>	
	相同性	-	-
GS	菌種名	-	-
	相同性	769 nt/769 nt(100%)	699 nt/699 nt(100%)
rDNA-ITS		<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. fructicola</i> (<i>C. gloeosporioides</i> 種複合体)
	相同性	483 nt/483 nt(100%)	484 nt/484 nt(100%)
	菌種名	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
			<i>C. fructicola</i> (<i>C. gloeosporioides</i> 種複合体)

カンキツ炭疽病を引き起こす *Colletotrichum* 属菌はいくつかの種複合体で報告されており，例えば，*C. gloeosporioides* は日本で（佐藤ら 2017），*C. fructicola* は中国で報告されている（Peng et al. 2012, Huang et al. 2013, Hu et al. 2019）。

前述の様に，エクボ症の病原菌が 7 月中旬以前から果実に潜在感染している可能性が高いと考えられたことから，4.3.4 では早期から継続して薬剤散布を行う防除体系案を構築した。登録内容にかかわらず継続的にマンゼブ水和剤を散布した徹底防除区でのみ防除効果が高く，一般的な防除体系である参考防除区では十分な防除効果が得られなかった。病原菌は樹上の枯れ枝などに常在しており，長期間感染リスクがあるため，マンゼブ水和剤の高い耐雨性が発病抑制に寄与したと考えられる。しかしながら，マンゼブ水和剤は使用回数や収穫前日数に制限があり，秋期のエクボ症防除薬剤として用いることは困難である。今後，マンゼブ水和剤以外の剤を活用した効果的な防除体系の開発が必要と考えられる。また，前述のように，エクボ症の発生は果実の生理機能低下と関係している可能性があることから，呼吸やエチレン生成などによる生理機能低下を抑制する貯蔵方法などについても検討する必要がある。

第4章 ミョウガに発生した立枯症状の原因究明

4.1 ミョウガに発生した立枯症状

ミョウガ (*Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe) は、東アジアが原産のショウガ科 (*Zingiberaceae*) の多年草である (Makino et al. 1961, Ohwi 1965). 日本では主に β -ピネン類の独特の香りを持つ (Kobayashi et al. 1991) 食用の花 (花蕾を食用とする) として栽培され、中国では食用および薬用として栽培されている (Wu and Larsen 2000; Ohba 2016). 日本では北海道を除いて自生しているが、いずれも 5 倍体であることから、古い時代に中国から渡来し、栽培品が逸出して野生化したものと考えられている (阿部 2019, 小林ら 2013). ミョウガはショウガと同様に偽茎を持ち、地下に形成された赤い花蕾を食用とする. 7 月から 10 月にかけて花芽が形成され、淡い黄色の花を咲かせるが、5 倍体であるため実や種子が形成されることはまれである (Maeda 1988). 花蕾のほかにも、土を盛るなどして軟白栽培した偽茎をミョウガタケとして食用する (Cole and Nürnberger 2014). 高知県におけるミョウガの栽培状況は、栽培面積 105 ヘクタール、出荷量 4,885 トンで、2018 年の全国シェアの 90.6% を占める県内有数の農作物である (農林水産省 2020a). ミョウガは一般的に土耕栽培されてきたが、近年、高知県では土壌病害の発生や生産量向上の観点から、固形培地での水耕栽培が盛んに行われ

ている。

2014年6月、高知県四万十町で水耕栽培していたミョウガ数株に、葉鞘が褐変する症状が見られた(図4-1a, b)。2018年4月にも、高知県南国市の施設で水耕栽培しているミョウガに同様の症状が見られた。発病初期には、地表から10~50 cmのところまで葉鞘が褐変した(図4-1c)。発病が進むと、変色した葉鞘の上に形成された葉身が枯れ、最終的には株全体が枯死した。変色した葉鞘には黒褐色の子嚢果(偽子嚢殻)の形成が認められた(図4-1d)。2021年現在、国内で報告されているミョウガの病害は11種類存在する(日本植物病理学会 2021)。そのうち、葉鞘が腐敗する症状を示す病害として紋枯病、根茎腐敗病、軟腐病が報告されているが、本病害の症状はいずれの既知病害の症状とも一致しなかった。

そこで今回、障害株から病原菌の分離を試みるとともに、接種試験等によって病原菌の特定を行った。



図 4-1 高知県四万十町で発病したミョウガで見られた症状. 2014 年 6 月に撮影.

(a) 葉鞘の黄化. (b) 株全体の枯れ. (c) 葉鞘の縁からの褐色腐敗. (d) 葉鞘の病変部に形成された偽子嚢殻.

4.2 材料および方法

4.2.1 供試サンプルおよび糸状菌の分離

発育不良のミョウガから病変部と偽子嚢殻を含む葉鞘の小切片（約 3×3 mm）を切り取り，70%（v/v）エタノールで表面殺菌した後，ポテトデキストロース寒天（PDA）平板培地に載せ，25°Cで約 1 週間培養した．PDA 平板培地上に形成された各コロニーの端から菌糸の先端部分を切り取り，25°Cで培養した．約 7 日間培養した後，単一の菌糸の先端を別の新鮮な PDA 平板培地に移し，単一の菌糸の分離株として確立した．2014 年に採取したサンプルから単離株 ML1-1, 2-1, 3-1, 4-1 を，2018 年に採取したサンプルから単離株 ML11-1, 12-1, 13-1 を得たが，いずれも PDA 培地平板上でほぼ同じ特性を示した．

4.2.2 分離株の病原性検定

得られた単離株のうち，ML1-1, ML2-1, ML3-1, ML4-1 について，ミョウガに対する病原性を調査した．分離された菌を PDA 平板培地上で 25°Cの暗所で 7 日間培養した．コルクボーラーを用いてコロニーの周囲から PDA 培地を含む直径 6 mm のディスクを打ち抜き，これを接種源とした．接種試験には，室温 20～25°Cのガラス温室で 1/2000 ワグネルポット（アズワン，大阪）中の滅菌土壌に植えて数ヶ月間維持したミョウガを用いた．Le et al. (2010)に修正を加えた方法で，滅菌した爪

楊枝を用いてミョウガの地上約 10 cm の葉鞘に針接種した。すなわち、菌糸を含むディスクを、傷つけた葉鞘（有傷接種）と傷つけない葉鞘（無傷接種）の上に置いた。また、対照として菌糸を含まない PDA ディスクを用いた。ディスクが動かないように、また乾燥を防ぐために、Parafilm で覆った。接種後、植物体を約 25°C のガラス温室で維持した。病原性検定は、4 枚の葉鞘を用いて、単離株ごと、処理ごとに病徴を評価した。各植物の発病度は、外見上の症状に基づいて次のように評価した（0-4）。0, 症状なし；1, 直径 6 mm の菌糸体を含む直径 1 cm 未満の褐色の斑点；2, 直径 1 cm 以上 2 cm 未満の病斑；3, 2 cm 以上 5 cm 未満の病斑；4, 5 cm 以上の病斑または葉鞘の枯死。

各処理について、4 つのサンプルの平均指数を算出した。

4.2.3 性状観察

得られた単離株はいずれも PDA 平板培地上に移植、25°C で 10 日間生育させ、菌叢を観察した。単離株のうち、ML2-1 および ML13-1 について、5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C に設定した恒温器室内における PDA 培地平板上での菌糸生育を観察した。この試験は 3 連で行った。PDA 培地平板上で 25°C, 14 日間生育させた菌叢の周縁部を 5 mm 径のコルクローラーで打ち抜き、PDA 培地に静置した。これらを各温度帯で培養し、14 日目に菌叢ディスクの外縁部から伸長した菌糸の先端部

までの長さを計測し（3反復）、最長と最短の平均値を菌糸伸長量として各温度帯ごとの1日あたりの菌糸伸長量を算出した。また、培地上では子嚢果を形成しなかったため、偽子嚢殻および子嚢胞子の形態は2018年4月に採取した植物体サンプル上に形成されたものを採取し、観察した。

4.2.4 種特異的プライマーによるPCR

Kaminskiら（2005）が報告した *O. agrostidis* Dern., M.P.S. et al.を国内で病原菌としての報告がある（日本植物病理学会 2021）*Ophiosphaerella* 属の3種（*O. herpotricha* (Fr.) J. Walker, *O. korrae* (J.Walker & A.M.Sm.bis) Shoemaker & C.E.Babc., *O. narmari* (Walker et Smith bis) Wetzal et al.）と区別して特異識別するためのプライマーセット OaITS1（5'-AGCAATACAGCCCAAAGGCCTC-3'）と OaITS2（5'-AAAGGCTTAATGGACGCGAGTG-3'）を用いたPCRを行った。OaITS1+OaITS2プライマーセットは、*O. agrostidis* の rDNA-ITS 領域（445または446 bp）を増幅する。

まず、Saito et al. (2021) および Saitoh et al. (2006) の手順に従って、単離株 ML2-1, ML3-1, ML4-1, ML11-1, ML12-1 および ML13-1, ならびにクレーピングベントグラスのデッドスポット病の病原菌である *O. agrostidis* GRA-03 および SAG-03（理研グリーン）の菌糸体か

らゲノム DNA (gDNA) を精製した。PCR 反応液 (20.0 μ l) の組成は、1.0 μ l の精製 gDNA (\sim 50 μ g/ μ l), 10.0 μ l の 2 \times PCR Buffer for KOD FX Neo (東洋紡), 0.4 mM (各) dNTPs (東洋紡), 150 nM (各) プライマー, 0.4 U KOD FX Neo ポリメラーゼ (東洋紡) である。PCR は、T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて、94 $^{\circ}$ C 2 分間, [98 $^{\circ}$ C 10 秒間 ; 55 $^{\circ}$ C 30 秒間 ; 68 $^{\circ}$ C 1 分間] \times 35 サイクルの条件で行った。コントロールとして、*O. korrae* のゲノム DNA を用いた。

4.2.5 シーケンス解析

次に、単離 2 株の所属を明らかにするために、EF1 α , rDNA-ITS, ラージリボソームサブユニット DNA (LSU), スモールリボソームサブユニット DNA (SSU) の 4DNA 断片を、プライマーセット EF1-1018F+EF1-1620R (Stielow et al. 2015), ITS4+ITS5 (White et al. 1990), LR0R+LR5 (Vilgalys and Hester 1990; Rehner and Samuels 1994), NS1+NS4 (White et al. 1990) をそれぞれ用いて増幅し、塩基配列を決定した。得られた配列は、DDBJ/EMBL/GenBank のデータベースに、表 4-1 に示すアクセッション番号で登録した。各単離株の EF1 α (465bp), rDNA-ITS (482bp), LSU (47bp), SSU (877bp) の各配列を連結し、MEGA X v.10.2 (Kumer et al. 2018) を用いて解析を行った。また、rDNA-ITS の配列データを用いた分子系統解析に使用したアクセ

表 4-1 4 遺伝子系統解析に使用した株の一覧

Species	Strain/ Voucher no.	GenBank accession no. (fragment used for phylogenetic analyses)			
		LSU	SSU	ITS	<i>EFl</i> α
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i>	MFLUCC 12-0007	KM434282 (nt. 359-836)	KM434291 (nt. 46-923)	KM434272 (nt. 44-506)	KM434300 (nt. 47-529)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i>	MFLUCC 11-0152	KM434281 (nt. 308-785)	KM434290 (nt. 1-879)	KM434271 (nt. 10-473)	KM434299 (nt. 47-529)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i> (mioga isolate)	MAFF 247514	LC647344 (nt. 330-807)	LC654408 (nt. 28-905)	LC633283 (nt. 42-505)	LC633281 (nt. 47-529)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i> (mioga isolate)	MAFF 247515	LC647345 (nt. 330-807)	LC654409 (nt. 28-905)	LC633284 (nt. 42-505)	LC633282 (nt. 47-529)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i> (creeping bentgrass isolate)	GRA-03	LC647346 (nt. 319-796)	LC654410 (nt. 28-905)	LC653150 (nt. 40-503)	LC653524 (nt. 93-575)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i> (creeping bentgrass isolate)	SAG-03	LC647347 (nt. 317-794)	LC654411 (nt. 28-905)	LC653151 (nt. 49-507)	LC653525 (nt. 93-575)
<i>Ophiosphaerella aquatica</i>	MFLUCC 14-0033	KX767089 (nt. 1-475)	KX767090 (nt. 26-904)	KX767088 (nt. 46-508)	MG520911 (nt. 71-553)
<i>Ophiosphaerella herpotricha</i>	KS28	KP690992 (nt. 3286-3763)	KP690992 (nt. 7-1221)	KP690992 (nt. 2418-2878)	KP691016 (nt. 77-559)
<i>Ophiosphaerella korrae</i>	ATCC 56289	KC848509 (nt. 3303-3780)	KC848509 (nt. 20-1238)	KC848509 (nt. 2435-2895)	KC848515 (nt. 78-560)
<i>Ophiosphaerella narmari</i>	ATCC 64688	KC848510 (nt. 4421-4898)	KC848510 (nt. 20-1235)	KC848510 (nt. 3553-4013)	KC848516 (nt. 78-560)
<i>Ophiosphaerella taiwanensis</i>	MFLU 18-2534	MT321815 (nt. 319-796)	MT321808 (nt. 11-888)	MT321801 (nt. 32-495)	MT328758 (nt. 1-483)
<i>Equiseticola fuisipora</i>	MFLUCC 14-0522	KU987669 (nt. 357-834)	KU987670 (nt. 24-902)	KU987668 (nt. 42-503)	MG520895 (nt. 71-553)

ツション番号の一覧を表 4-2 に示した.

表 4-2 r-DNA ITS 系統解析に使用した株の一覧

Species	Strain/Voucher no.	GenBank accession no. (fragment used for phylogenetic analyses)
		ITS
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i>	MFLUCC 12-0007	KM434272 (nt. 61-506)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i>	MFLUCC 11-0152	KM434271 (nt. 27-473)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i> (mioga isolate)	MAFF 247514	LC633283 (nt. 59-505)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i> (mioga isolate)	MAFF 247515	LC633284 (nt. 59-505)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i> (creeping bentgrass isolate)	GRA-03	LC653150 (nt. 57-503)
(creeping bentgrass isolate)	SAG-03	LC653151 (nt. 61-507)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i>	<i>OpOH-1</i>	AF191550 (nt. 165-611)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i>	OpVa-1(ex-type)	AF191548 (nt. 27-472)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i>	ZJ5	KJ572127 (nt. 47-492)
<i>Ophiosphaerella agrostidis</i>	MFLUCC 16-0895	MF351996 (nt. 71-517)
<i>Ophiosphaerella aquatica</i>	MFLUCC 14-0033(ex-type)	KX767088 (nt. 63-508)
<i>Ophiosphaerella aquatica</i>	A107	MK737612 (nt. 1-445)
<i>Ophiosphaerella herpotricha</i>	KS28	KP690992 (nt. 3333-2878)
<i>Ophiosphaerella korrae</i>	ATCC 56289	KC848509 (nt. 2454-2895)
<i>Ophiosphaerella narmari</i>	ATCC 64688	KC848510 (nt. 3572-4013)
<i>Ophiosphaerella taiwanensis</i>	MFLU 18-2534	MT321801 (nt. 49-495)
<i>Ophiosphaerella taiwanica</i>	NTUCC 17-024	MN082417 (nt. 66-508)
<i>Equiseticola fusispora</i>	MFLUCC 14-0522(ex-type)	KU987668 (nt. 61-503)

4.3 結果

4.3.1 ミヨウガから分離した糸状菌の菌叢性状

分離菌の PDA 培地平板上での菌叢は，菌糸は密綿毛状，表面は淡い赤色～白色を呈し，裏面は濃い緑色で，白く縁取りされていた（図 4-2）。

4.3.2 形態的特徴

分離菌の生育温度を調査した結果，5～35°C の温度範囲で菌糸が成長した．生育適温は約 25°C であった（図 4-3）．植物体上に偽子囊殻が多数形成され，半没入型の球形で，色は黒～黒褐色，直径 216-383 μm ，乳頭状の突起を有していた（図 4-4）．偽子囊殻の内部には，子囊および無色で糸状の偽側糸が観察された．なお，内部に周糸は認められなかった．子囊は棍棒状で基部に向って細くなり，長さは 68-124 \times 7-11 μm で，8 個の子囊胞子を内包していた．子囊胞子は糸状で互いにねじれ合って存在し，淡褐色で隔壁があり，49-111 \times 2.1-3.6 μm ，6～15 の隔壁を有していた（表 4-3）．また，PDA 培地上で 25°C で生育させた場合，分生子，偽子囊殻，子囊，子囊胞子は観察されなかった．

これらの特徴は，Shoemaker and Babcock (1989) が *Ophiosphaerella* Speg. 属について記述した特徴とよく一致した．さらに，表 4-2 の *Ophiosphaerella* spp. との比較では，本分離株は，Câmara et al. (2000)

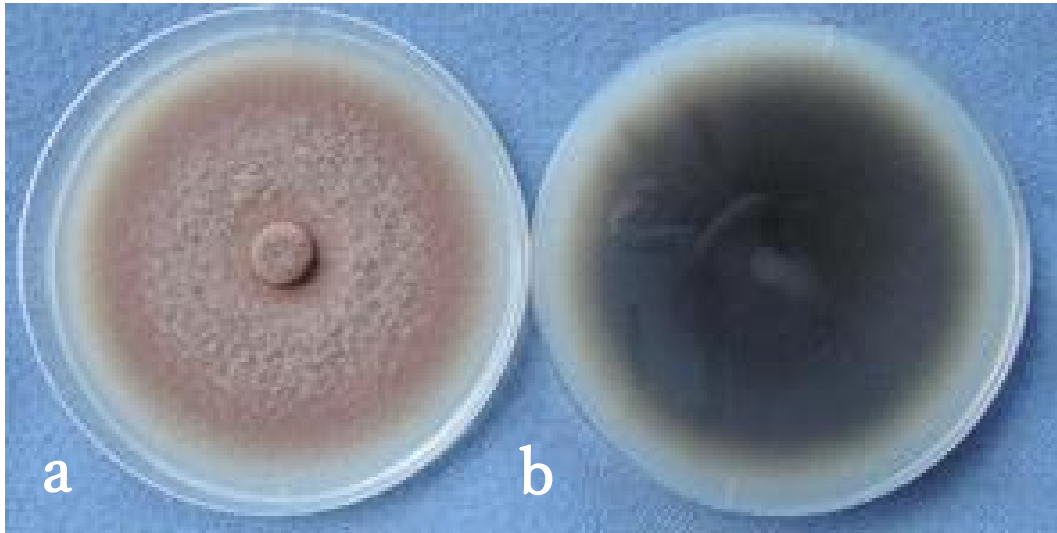


図 4-2 分離菌 ML13-1 の特徴

a: PDA 培地上における菌そう（表面） b: PDA 培地上における菌そう（裏面）

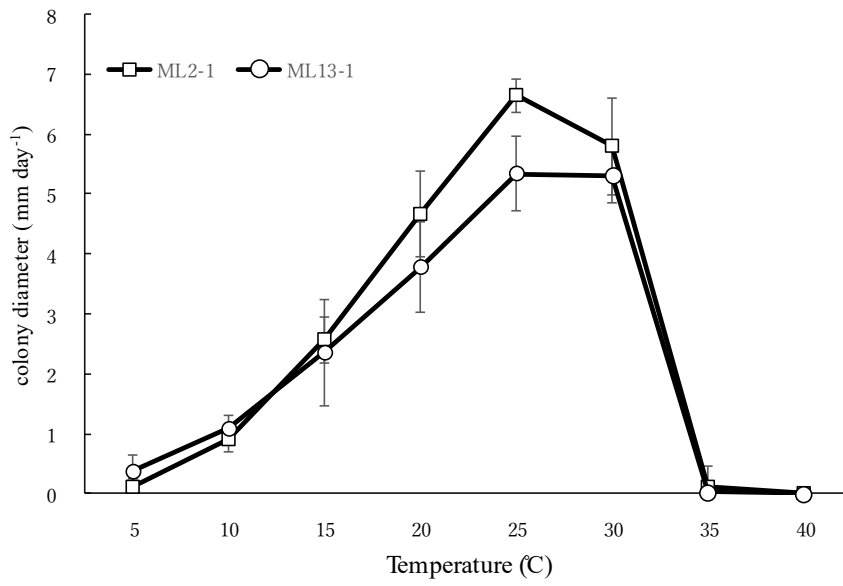


図 4-3 ML2-1 および 13-1 の生育温度

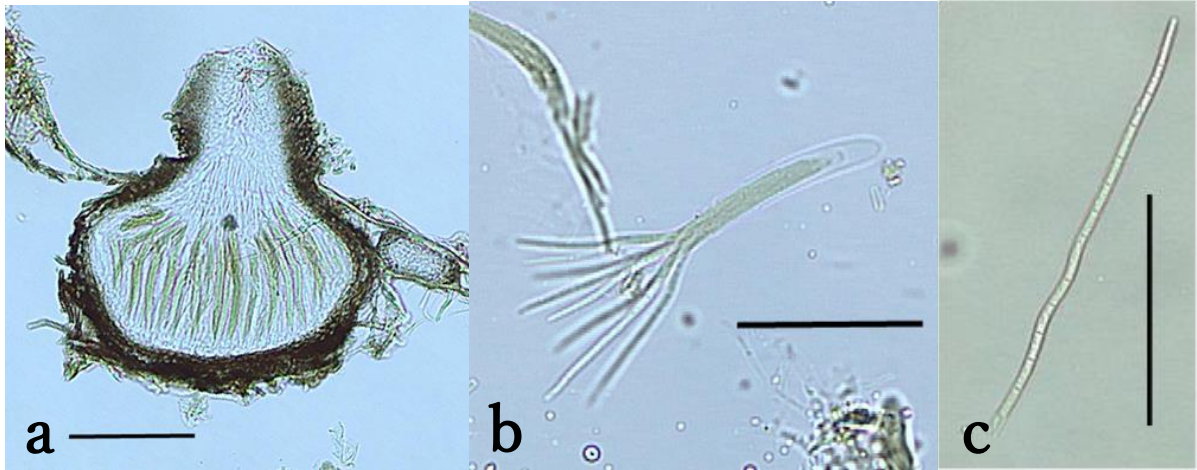


図 4-4 ミョウガ植物体上に形成された偽子嚢殻と子嚢, 子嚢胞子

a:偽子嚢殻の垂直断面図, b:子嚢と子嚢胞子, c子嚢胞子, バーは100 μ m (c), 50 μ m (d,e).

表 4-3 ミヨウガ植物体上に形成された偽子嚢殻と各種 *Ophiosphaerella* 属菌との比較

Species	Pseudo- thecia Diameter (μm)	Periphyses	Asci		Ascospores		
			Length (μm)	Width (μm)	Septa	Length (μm)	Width (μm)
<i>O. agrostidis</i> ¹⁾	216–383	Absent	68–124	7–11	6–15	49–111	2.1–3.6
<i>O. agrostidis</i> ²⁾	130–350	Absent	100–230	10–15	6–15	75–150	2–2.5
<i>O. agrostidis</i> ³⁾	175–310	Absent	98–130	7–9 (–11)	15	98–130	2–2.5
<i>O. aquatica</i> ⁴⁾	265–360	Present	146–174	10–12.5	–	143–162	2.5–3.5
<i>O. graminicola</i> ²⁾	300–350	Present	120–135	7–10	12–20	110–140	(–1.5) 2–2.5
<i>O. herpotricha</i> ²⁾	300–400	Absent	150–190	7–9	12–16	140–180	2–2.5
<i>O. korrae</i> ²⁾	370–500	Present	120–170	14–17	7	100–140	4–6
<i>O. narmar</i> ²⁾	450–500	Present	100–140	12–17	5	40–58	5–6
<i>O. taiwanensis</i> ⁵⁾	220–260	Present	115–140	8.5–10	12–13	110–132	2.2–2.7
<i>O. taiwanica</i> ⁴⁾	190–330	Present	123–157	5–8	10–13	100–134	1.8–2.5

1) This study.

2) [Camara et al. \(2000\)](#).

3) [Phookamsak et al. \(2014\)](#).

4) [Ariyawansa et al. \(2015; 2019\)](#).

5) [Tennakoon et al. \(2020\)](#).

および Phookamsak et al. (2014) がそれぞれ記載した *O. agrostidis* Dernoeden, Camara, O'Neil, vanBerkum & Palm の特徴とよく一致した。また、前述の生育温度についても、Kaminski et al. (2002) の記載と一致した。

4.3.3 病原性

単離菌 ML1-1, ML2-1, ML3-1, ML4-1 のミョウガに対する病原性検定の結果を表 4-4 に示した。4 菌株ともほぼ同様の病原性を示し、接種後約 5 週間で葉鞘は褐変し始め、現地圃場での障害株と類似の症状を示した (図 4-5)。無傷接種および有傷接種の発病度は、2.3 から 3.8 の範囲であった。対照では症状が見られなかった。

接種した植物の葉鞘上の病斑から病原菌を分離したところ、接種したものと類似した菌が得られた (データなし)。

これらの結果から、単離菌 ML1-1, ML2-1, ML3-1, ML4-1 がミョウガ葉鞘腐敗の病原体であることが示すことができた。

また、ベントグラスに接種した場合も、病原性が認められた (図 4-6)。

4.3.4 種特異的 PCR

種特異的プライマーを用いた PCR によって、ミョウガ単離菌 ML2-

表 4-4 分離菌のミヨウガに対する病原性

Isolate	Disease severity (0-4)		Control
	Inoculation		
	Injured-inoculation	Uninjured-inoculation	
ML1-1	3.5* ± 0.4	3.3* ± 0.2	0.0
ML2-1(MAFF 247514)	3.0* ± 0.6	2.5* ± 0.4	0.0
ML3-1	3.5* ± 0.4	2.3* ± 0.4	0.0
ML4-1	2.8* ± 0.2	3.8* ± 0.2	0.0

*presents significant difference compared to the control by t-test ($P \leq 0.05$).



図 4-5 ミョウガに対する病原性

a: 有傷接種 b: 無傷接種 c: コントロール 矢印は接種部位を示す.

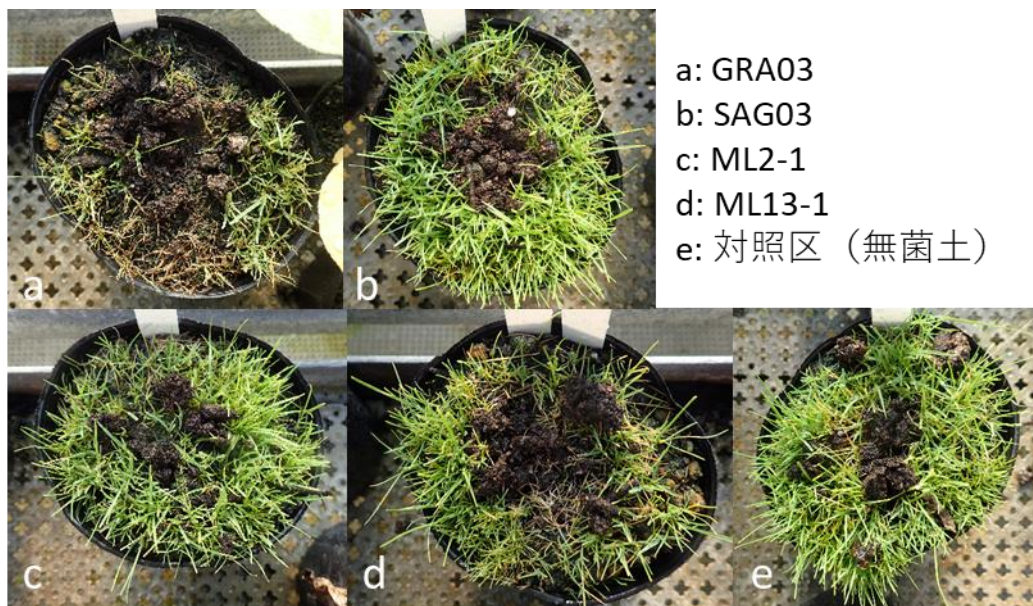


図 4-6 ベントグラスに対する病原性

1, ML3-1, ML4-1, ML11-1, ML12-1, ML13-1 からは, *O. agrostidis* GRA-03, SAG-03 とともに, 約 450 bp の断片が増幅された. 対照の *O. korrae* からは増幅されなかった (図 4-7).

4.3.5 分離菌株のシーケンシング

2 つの単離株 (ML2-1, ML13-1) および, *O. agrostidis* GRA-03, SAG-03 の 4DNA 領域のシーケンスを決定, 連結の上比較したところ, これら 4 株間で高い (99% 以上) 相同性を示し, さらにこれら 4 株の塩基配列は *O. agrostidis* MFLUCC 11-0152 (Tennakoon et al. 2020) の配列と高い相同性を示した (図 4-8).

O. agrostidis, *O. aquatica*, *O. taiwanensis*, *O. taiwanica* など複数株を加えた rDNA-ITS に基づく系統樹は, ML2-1 と ML13-1 が, *O. agrostidis* MFLUCC 11-0152 を含む *O. agrostidis* の 6 株に近縁であることを示した (図 4-9).

単離株 ML2-1 と ML13-1 は, それぞれ 247514 と 247515 のアクセッション番号で農林水産省 Genbank に寄託した.

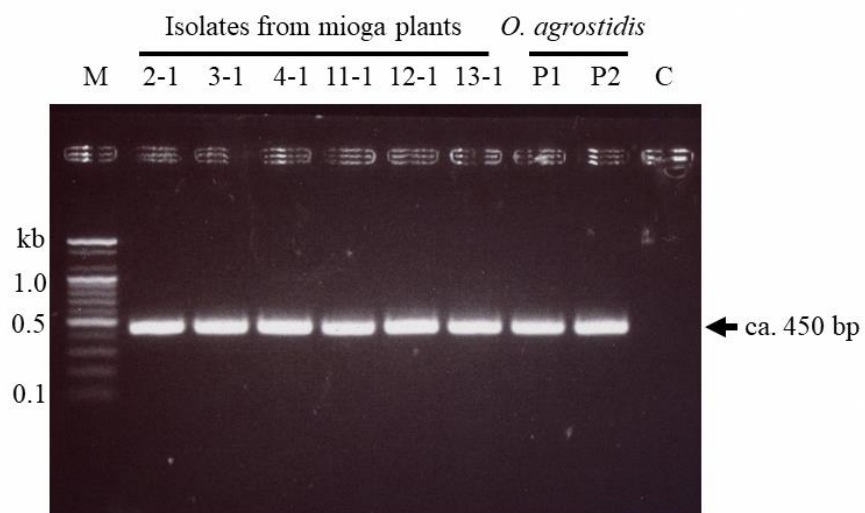


図 4-7 *O. agrostidis* 種特異的プライマーによる PCR 増幅電気泳動写真

C は *O. korrae* のゲノムを鋳型に使用した。

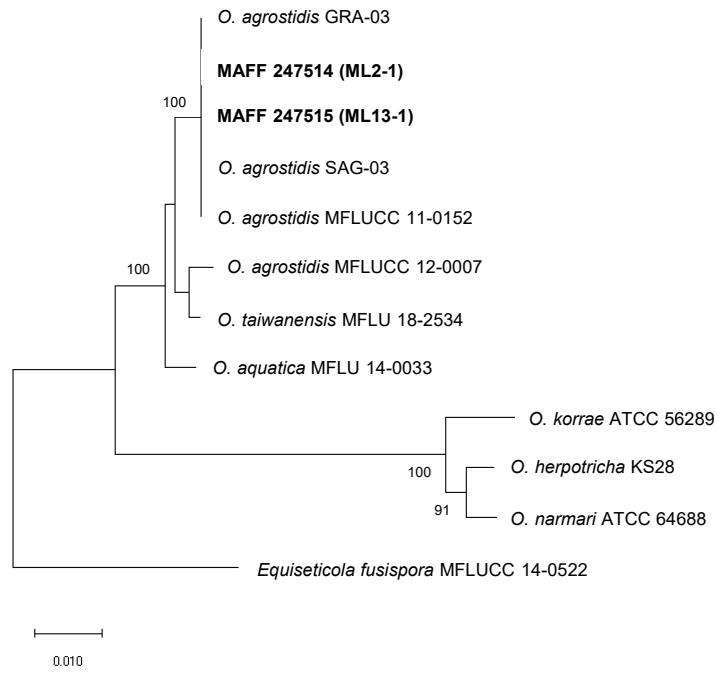


図 4-8 4 遺伝子 (rDNA-ITS, EF1 α , LSU, SSU) の配列データを基にした最尤法の系統樹

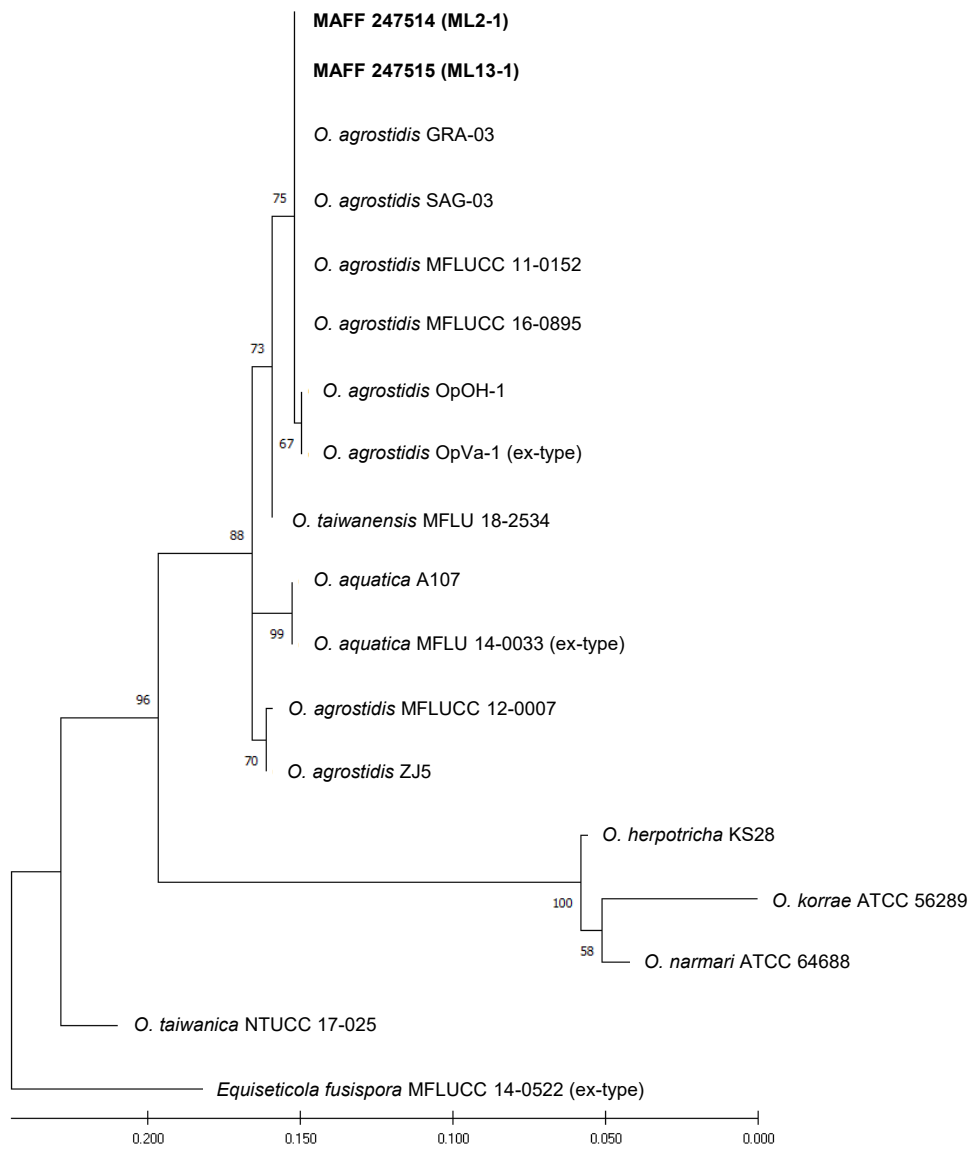


図 4-9 rDNA-ITS 領域の配列データを基にした最尤法の系統樹

4.4 考察

4DNA 領域連結および rDNA-ITS のどちらの系統樹でも，*O. agrostidis* は多系統であった（図 4-8-9）．しかしながら，ミョウガ葉鞘腐敗症状を引き起こす病原体は，いずれの系統樹でも *O. agrostidis* MFLUCC 11-0152 と同一のクレードを形成した（図 4-8-9）ため，*O. agrostidis* sensu Phookamsak と同定した．*O. agrostidis* がミョウガの病原菌であるとした報告は初である．そこで，本病害を「葉鞘腐敗病」（英名：leaf sheath rot）と新称した（Oki et al. 2022）．

これまで，日本では，*O. agrostidis* による病害は，クリーピングベントグラスのデッドスポット病のみが報告されている（Hayakawa et al. 2007）．本研究では，ミョウガの単離株 ML13-1，ならびにクリーピングベントグラス病原菌 GRA-03 および SAG-03 をクリーピングベントグラス（cv. Penncross）に接種したところ，ML13-1 は GRA-03 および SAG-03 と同等の病原性を示した．GRA-03 および SAG-03 のミョウガに対する病原性は確認できていないが，クリーピングベントグラスを含む近隣のイネ科植物で発生した偽子嚢殻がミョウガへの感染源となっている可能性が示された．

一方，クリーピングベントグラスのデッドスポット病用にペンチオピラド，チオファネートメチル水和剤，フルジオキシニル水和剤が日米で有効な殺菌剤として登録されているが（Clarke et al. 2020；農林水

産省 2021), これらの殺菌剤はミヨウガには登録されていない。今後、
本病の防除対策を検討する必要がある。

第5章 トルコギキョウの作型に合わせた立枯病防除法の確立

5.1 トルコギキョウ立枯病と土壌消毒による防除

トルコギキョウ (*Eustoma* Salisb. spp.) 立枯病は長野県下で原田によって発見，報告されたもので，夏秋出しのハウス栽培では6月初旬ごろから発生がみられるようになり，7～8月の切花最盛期に特に多いとされる．始め日中に萎凋症状がみられ，やがて枯死して株全体が立枯症状を呈す．障害株を抜き取ると，根および地際部が褐変しているが，その部位は維管束に限られ，髓部までの褐変は見られない．連作で発生が激しくなり，過乾・過湿条件下や多肥栽培で多発するとされる（駒田1980）．

トルコギキョウにおけるフザリウム の発生生態については，十分な研究が行われていない．トルコギキョウ立枯病の原因菌は *F. oxysporum* と *F. solani* とされる（日本植物病理学会 2021）が，栽培品種のそれぞれの菌に対する感受性／抵抗性が明らかになっていないなど，問題点が多い．

高知県のトルコギキョウの2020年作付面積は約16.9 ha，生産量の実績は約4,380千本（反収約26千本/10a）で，2019年産の出荷量のシェアは約3.9%で，全国8位である（高知県 2021）．近年，本県でもフザリウム属菌による立枯病の発生が問題となってきた．圃場によって被

害程度に差はあるものの、9割以上の農家で発生があり、一番花に比べ二番花での発生が多い。被害は、平均で全体の1割程度で発生し、約9,600千円程度と推定されている（被害本数3000本/10a×被害面積1.6ha×単価200円/本）（普及員情報）。ハウスのサイド面周辺での立枯れや下位葉の黄化等の生育不良が見られる。特に発蕾前後の萎凋や生育不良、一番花収穫直後の株枯れや枯死などが見られる。

高知県では古くから土壌病害に対して臭化メチルによる土壌消毒が行われてきており、1992年に県内の農業用臭化メチルの使用状況を調査した際は、露地ショウガで約407,500kg、施設メロンで約96,400kg、施設キュウリで約56,500kg、施設ピーマンで約55,700kg、その他約324,400kgの使用実績があった（竹内2006）。臭化メチルは、広範囲の土壌病原菌、線虫、雑草、土壌害虫、ウイルスなどに安定した防除効果を示すことに加え、安価で処理が簡単という特性があることから、土壌病害対策に広く使用されてきた（西2008）。しかしながら、1992年の第4回オゾン層破壊物質に係るモントリオール議定書締約国会合において、臭化メチルがオゾン層破壊物質として指定され、その後の締約国会合の議論の中で、先進国においては、2005年に検疫処理および出荷前処理を除き全廃することが決定した（農林水産省消費・安全局植物防疫課2012）。高知県においても、2000～2004年に、補助金事業（高知県臭化メチル緊急対策事業）を実施し、代替技術の模索を行った。現在で

は、施設栽培を中心に太陽熱消毒が広く行われており、次いで化学農薬による土壌消毒が実施されている（竹内 2006）。短期間のうちに収穫を行わなければならない場合や低温期の土壌消毒に対しては、蒸気土壌消毒が活用されていたが、近年は機械の老朽化や燃料の高騰などにより実施農家数は減少している。

一方で、臭化メチルによる土壌燻蒸が唯一の土壌伝染防止策とされてきたトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）によるピーマンモザイク病に対しては、臭化メチル以外の土壌消毒法では防げないことが明らかになっており（竹内 2000）、病気や実施時期に合わせた土壌消毒の検討が必要となっている。

県内トルコギキョウ農家は、立枯病対策として土壌消毒や土作りを行うが、夏場の天候不良等で土壌還元消毒等での地温が確保できない年や豪雨によるハウス内への浸水などによって被害が拡大する場合があります、一度被害が拡大すると、毎年立枯病が多発し、経営的に大きなダメージとなる。冬春作型の産地より、夏作を行う中山間地域での被害が大きい傾向である。県内のトルコギキョウ農家が栽培前に行う土壌消毒は、主に土壌燻蒸剤（クロルピクリン、バスアミド等）、フスマ・米糠による土壌還元消毒、太陽熱消毒、蒸気消毒などがあげられる。また、微生物資材（放線菌、腐植促進資材）の施用の事例も多い。このうち、安価なフスマや米糠による土壌還元消毒が最も普遍的である。しかしながら、

フスマや米糠の施用量は、窒素成分の過剰施用による切り花品質の低下を考慮して、300 kg/10 a程度と通常の施用量（1 t /10a）に比べ少ない。本消毒法は、野菜等で普及した技術であるが、本県のような冬春作型の産地では品質低下の懸念から少ない施用量で実施されており、処理量と効果および花き品質への影響について、今後検証が必要である。また、本県の中山間部で取り組まれている夏秋作型では、夏期が栽培期にあたり秋～冬期に土壌消毒を行うことになる。そのため、低地温時期の効果的な病害対策の確立が必要である。

そこで、立枯病に対して、安定して高い防除効果が期待できる土壌消毒法を開発するとともに、抵抗性品種の探索を行う。

5.2 材料および方法

5.2.1 供試サンプル

2019年4月11日に香南市の現地圃場で萎凋症状を示すトルコギキョウから内部の茎の褐変部位を含む切片を切り出し、70%エタノールで表面殺菌した後、PDA平板培地上に静置し、25°Cで1週間程度培養した。生育してきた糸状菌に形成された胞子を白金耳でかき取り、3 ml RO水で懸濁後、1.5%素寒天培地上に塗布した。25°Cで24時間培養後、単胞子分離を行い、12菌株を得た。また、4月19日に安芸郡芸西村の現地圃場から20菌株、5月10日に土佐郡土佐町の現地圃場から6菌株を得た。さらに、2020年4月3日に安芸郡芸西村の現地圃場から8菌株、8月4日に土佐郡大川村からも同様の方法で16菌株を得た。

5.2.2 接種による病原性の確認

5.3.1で得られた各菌株について、品種‘レイナホワイト (ver. 2)、サカタのタネ’および‘ジュリアスラベンダー、カネコ種苗’各2個体を用いて病原性検定を行った。各分離株をPDA平板培地上で25°C、7日間培養後、培地切片をPotato Sucrose Broth (PSB)培地（外側・青木 2011）200 mlに投入し、25°C、4日間振とう（170 r/min）培養した。得られた胞子懸濁液を2重の滅菌ガーゼでろ過し、分生子濃度を 1×10^6 に調整後、植物1個体あたり20 mlを使用した。土壌ふすま培地（土壌（土

太郎, 住友林業緑化): ふすま = 4 : 1) を ϕ 10.5 cm ポリポットに 50 ml 敷き詰め, その上に孢子懸濁液 20 ml を投入後, 断根した植物体を植え付け, 25°C 管理のガラスハウスで 1 ヶ月間, 生育させた. 1 ヶ月目までに 1 個体以上の植物が萎凋あるいは枯死した接種菌を病原性菌株とした. また, 得られた菌株について rDNA-ITS 領域 (White et al. 1990) および rDNA-IGS 領域 (Edel et al. 1995)断片を PCR で増幅, それぞれの塩基配列を決定して BLAST 検索を行った.

5.2.3 簡易試験による土壌消毒法の検討

門馬ら (2011)の手法を参考に, トルコギキョウ立枯病菌に対する低濃度エタノール土壌還元消毒の効果についてポット試験で確認した. 病原菌株は G-T1-4 を用い, PDA 平板培地上で 25°C, 7 日間, 培養後, 培地片を切り出して, PSB 培地 200 ml に投入, 25°C, 4 日間, 振とう培養した. 次に, 培養液を土壌ふすま培地 10 L に均一に投入し, 25°C で 4 週間, 培養して汚染土壌とした. 試験にはプラントボックス 125 ml (アズワン) の底に電動ドリルで 5 mm 径の穴を開けた容器を使用し, 汚染土壌を 100 ml 投入後, 1% (v/v) あるいは 2% に調整したエタノールを 100 ml 加え, ラップで土壌表面を覆った後, 余剰液を下部の穴から流出させた. 穴をガムテープで塞ぎ, 蓋を被せた後, ビニルテープで蓋を固定し, 15, 20, 30°C の恒温器内で 13 あるいは 21 日間, 維持した

(表 5-4). 2019 年 4 月 2 日に処理土壌を 9 cm ポリポットに移し, 品種‘レイナホワイト’1 株を定植し, 5 月 29 日まで 25°C のガラスハウス内で管理した. 発病検定は, 5 月 29 日に各処理土壌に植えた植物体の枯死株数を計測し, 発病株とした.

5.2.4 2 重被覆による地温維持の検討

土壌還元消毒に適した地温を確保するため, 被覆を厚くすることで地温を維持できるか試験を行った. 試験場所は安芸郡芸西村の現地圃場(ビニールハウス), 圃場面積は 2 a, 2 連棟ハウスの片側を農業用ポリエチレン(農ポリ)透明 0.05 mm で一重被覆し, もう片側を二重被覆した. 温度計 RT-14 (エスペックミック) をハウスの中ほどのサイド側, 中央側, ボイラー側, それぞれ地上から 10 cm, 20 cm, 地下にセンサー一部を設置した. 温度測定は 15 分ごとに行った. 計測期間は 2019 年 8 月 10 日 16:00~8 月 24 日 16:00 とした.

5.2.5 冬春出し栽培圃場における土壌消毒法の検討

高知県の平坦部で主に行われている作型である冬春出し栽培に適した土壌消毒法を検討するため, 有機物として低濃度エタノールあるいは米ぬかを用い, 土壌還元消毒法の立枯病発病抑制効果を検討した.

5.2.5.1 低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒

試験場所は安芸郡芸西村の現地 2 圃場（ビニールハウス）、圃場面積は試験 A（9 a）、試験 B（12 a）とした。いずれの圃場も前作に *F. oxysporum* によるトルコギキョウ立枯病が発生していた。本試験はトルコギキョウの栽培が終了した後のハウスを試験に供した。

試験 A；6 連棟ハウスのうち、図 5-1 に示した右の 3 連棟を試験に使用した（図 5-1）。土壌を耕起後、均平化し、灌水チューブを設置、0.05 mm 厚のポリエチレンフィルムで被覆して 80 L/m² 量の 1.0%（v/v）エタノールを処理した。処理は 2020 年 7 月 1 日に行い、フィルムによる被覆は 2020 年 7 月 1 日～8 月 1 日までとした。

試験 B；土壌を耕起後、均平化し、灌水チューブを設置後、0.05 mm 厚のポリエチレンフィルム（大倉工業）で被覆して 40 L/m² 量の 1.2% エタノール（日本アルコール産業）を処理した。処理は 2020 年 8 月 5 日に行い、フィルムによる被覆は 2020 年 8 月 5 日～8 月 26 日までとした。

菌密度調査は、試験 A では処理開始前の 5 月 21 日（消毒前）とフィルム除去後の 8 月 7 日（消毒後）、試験 B では処理開始前の 5 月 21 日（消毒前）とフィルム除去後の 9 月 1 日（消毒後）に土壌を採取し、選択培地を用いた土壌希釈平板法によって供試土壌中の *F. oxysporum* 菌数を求めた。土壌は、試験 A では直径 5.5 cm の採土器を用いて任意の地点 1～3 の地表から 0～30 cm、および試験 B では直径 4.0 cm の採土

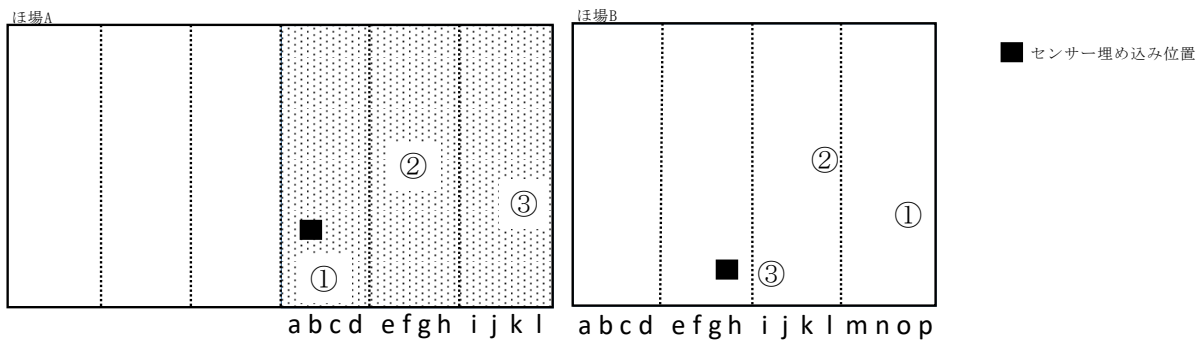


図5-1 ハウス見取り図

器を用いて地表から 30～60 cm から採取した（図 5-1）. 採取した土壌はそれぞれ十分に混和し, そのうちの 10 g を 90 ml 滅菌水の入った 200 ml 容三角フラスコに加えた. 三角フラスコの口を 2 重アルミ箔で封し, オータビルシェーカーで振盪し, 25°C で 24 時間混和したものを試料原液 (0.1 g 生土/ml) とした. 試料原液, 1/10 希釈試料原液, 1/100 希釈試料原液をそれぞれ 100 μ L ずつ駒田培地 (駒田 1976) と混合し, 固化, 平板化した. 培地は 15～25°C の明るい室内に倒置し, 培養 5 日目に培養表側が白色で隆起した気中菌糸を持つ円形のコロニーであり, なおかつ, 裏側が淡桃～淡赤紫～淡紫色を呈するものを *F. oxysporum* としてカウントした. 1 コロニーを分生子等 1 個に由来するとして, 生土 1 g あたりの菌数として示した.

地温および酸化電位の測定は, 処理開始時にポータブルイオン・pH 計 IM-32P 型 (東亜ディーケーケー) のセンサーを地下 20 cm および 50 cm に埋め込み, 被覆期間中に 1 時間間隔で地温および酸化電位を測定した (図 5-1).

試験 A は処理後の 8 月 21 日に処理ハウス内へトルコギキョウを 3 万株, 試験 B は処理後の 9 月 24 日に 4 万株定植し, 生育状況や枯死株率を 2 週間おきに調査した. 枯死の原因の調査は, 圃場の萎凋株を持ち帰り, 導管褐変の有無と菌泥流出の有無で判断した.

5.2.5.2 米ぬかを用いた土壌還元消毒

試験はコンクリート型枠（12.6 m×0.8 m）で行い、米ぬかを 500 kg/10 a 相当処理する区、米ぬかを 1,000 kg/10 a 相当処理する区、無処理区の 3 区を設けた。2020 年 8 月 7 日に米ぬかを小型耕うん機（こまめ F220, 本田技研工業）で土壌に混和、耕うん後、灌水チューブ（四万十チューブ、ピッチ幅 20 mm）を設置した後、0.05 mm 厚の農ポリ（大倉工業）で被覆し、水 80 L/m²を灌水チューブを用いて土壌中に灌注した。処理は 2020 年 8 月 7 日に行い、フィルムによる被覆は 2020 年 8 月 7 日～8 月 28 日までとした。処理開始前の 8 月 5 日（消毒前）とフィルム除去直後の 8 月 31 日（消毒後）に各処理区の土壌を採取した。地表から 0～30 cm は直径 5.5 cm の採土器を用い、30～60 cm は直径 4.0 cm の採土器を用いた。菌密度測定および地温および酸化電位の測定は 5.3.5.1 に従った。

処理後の 9 月 24 日に、各処理区に 13 品種を 200 株ずつ定植し、生育状況や枯死株率を 2 月 3 日まで調査した。

5.2.6 夏秋出し栽培圃場における土壌消毒法の検討

高知県の山間部で主に行われている作型である夏秋出し栽培に適した土壌消毒法を検討するため、クロルピクリンを用いた土壌還元消毒法およびクロピクフローによる土壌還元消毒法の検討を行った。

5.2.6.1 クロルピクリンの剤型の違いおよび被覆資材による土壤消毒効果の検討

試験場所は土佐郡土佐町の現地圃場（ビニールハウス）で、圃場面積は 6 a で、前作で *F. oxysporum* によるトルコギキョウ立枯病が発生していた。本試験はトルコギキョウの栽培が終了した後の 2 連棟ハウスを試験に供した。耕うん後、1 m×60 m の畝を成形し、ハウスの 1 棟はクロルピクリン錠剤（クロルピクリン 70.0%，以下錠剤）の 2 条すじまき処理（10 錠/m²），もう 1 棟は南海クロールピクリン（クロルピクリン 99.5%，以下液剤）の注入処理（自走式土壤消毒機で 30×30 cm ほどの深さ約 15 cm，1 穴あたり 3 ml）を行った。また，1 棟を半分に分割（1 区画 1.8 a）し，一方を 0.05 mm 厚の農ポリもう一方を 0.05mm 厚のガスバリア性フィルム（バリアスターV，東罐興産）で被覆した（図 5-2）。薬剤処理は 2020 年 2 月 17 日に行い，フィルムによる被覆は 2020 年 2 月 17 日～3 月 16 日までとした。処理開始前の 2 月 12 日（消毒前）とフィルム除去直後の 3 月 16 日（消毒後）に土壤を採取した。地表から 0～30 cm は直径 5.5 cm の採土器を用い，30～60 cm は直径 4.0 cm の採土器を用いた。（図 5-2）。菌密度測定は 5.3.5.1 に従った。処理開始時に温度センサー RT-14（エスペックミック）を各土壤採取地点の地下 20 cm に埋め込み，2 月 17 日～3 月 16 日まで 15 分間隔で地温を測

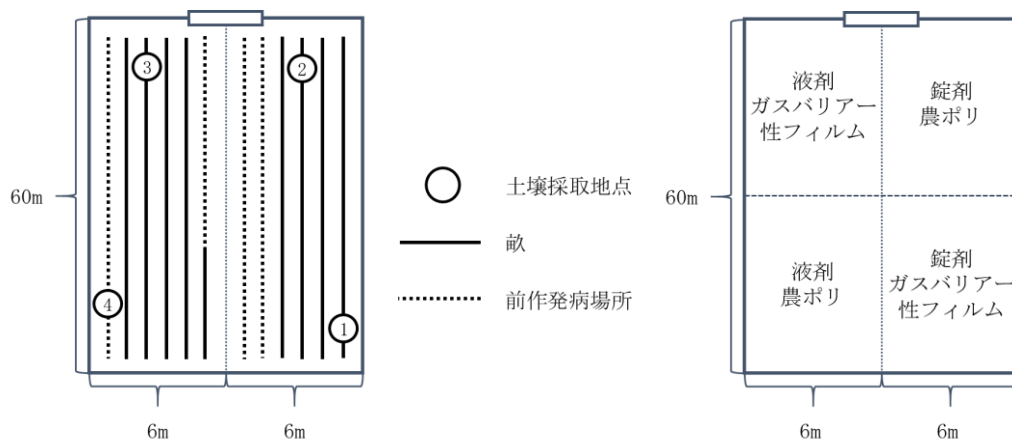


図5-2 ハウス見取り図

定した（図 5-2）。

発病調査は、処理後の 4 月上旬から順次定植を行い、例年と比較した生育状況や枯死株率を農家達観で聞き取り調査した。

5.2.6.2 クロピクフローによる土壌消毒効果の検討

試験場所は土佐郡土佐町の現地圃場（ビニールハウス）で、圃場面積は 6 a，トルコギキョウの栽培が終了した後の 2 連棟ハウスを試験に供した。耕うん後 1 m×60 m の畝を成形し、灌水チューブを 1 畝あたり 2 本設置後、0.05 mm 厚の農ポリで被覆した。クロピクフロー（日本化薬株式会社）をメジャー・ミックス（MM-100S，サンホープ）を用いて注入した。最終注入量はフロー 18 L，水 3600 L，フローの倍率は 200 倍とした。薬剤処理は 2021 年 2 月 15 日に行い、フィルムによる被覆は 2021 年 2 月 15 日～3 月 18 日までとした。処理開始前の 2 月 8 日（消毒前）とフィルム除去直後の 3 月 19 日（消毒後）に土壌を採取し、それぞれ直径 5.5 cm の採土器を用いて各区画の指定した 1 地点（地点 1～6）の 0～30 cm，および直径 4.0 cm の採土器を用いて地表から 30～60 cm から行った（図 5-3）。菌密度測定は 5.3.5.1 に従った。処理開始時に温度センサー RT-14 を各土壌採取地点の地下 20 cm に埋め込み、2 月 15 日～3 月 18 日まで 1 時間間隔で地温を測定した（図 5-3）。

発病調査は、処理後の 4 月上旬から表 5-14 に示す品種を順次定植し、

地点

- ① 33° 42' 23.4"N 133° 32' 47.2"E
- ② 33° 42' 22.8"N 133° 32' 47.8"E
- ③ 33° 42' 22.1"N 133° 32' 48.4"E
- ④ 33° 42' 23.2"N 133° 32' 47.0"E
- ⑤ 33° 42' 22.7"N 133° 32' 47.6"E
- ⑥ 33° 42' 22.0"N 133° 32' 48.2"E

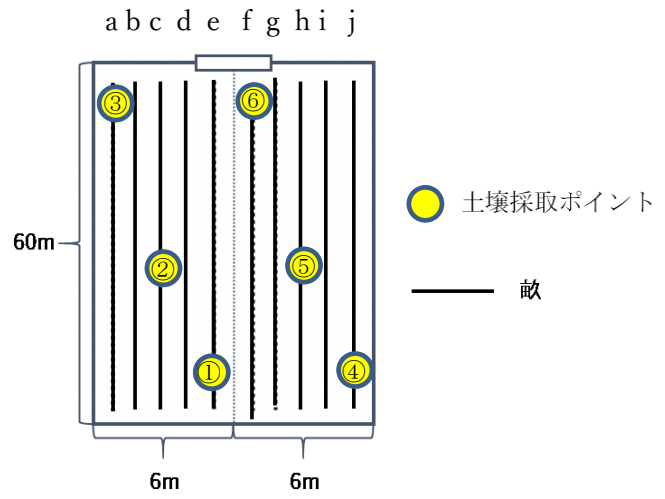


図5-3 ハウス見取り図

6月2日から枯死株率を約2週間間隔で調査した。

5.2.7 トルコギキョウ品種の立枯病菌3菌株に対する抵抗性程度の評価

試験は、高知県南国市の高知県農業技術センター内ガラス温室で実施した。試験は3回行い、1回目は20品種、2回目は18品種、3回目は9品種を用いた(表5-1)。植物体は播種から約4ヶ月後、播種約3ヶ月目から直径7.5 cmポリポットで管理したものを、プラスチック製のプランター(380×700×高さ250 mm)に植え替えて供試した。1菌株あたり各品種とも3株ずつ供試した。試験にはG-T1-4, ov3-1, ov4-3の3菌株を使用した。各菌株をPSB培地(ジャガイモ2個を1 cm角に切り刻み、1 lの蒸留水で1時間煮た後、2重にしたガーゼ(ツムラ)で濾過して煮汁を得、1 lにメスアップしたのちスクロース5 gを加え121°C、15分間オートクレーブしたもの)200 mlで25°C、暗黒下で1週間、振とう培養し、ガーゼで菌糸を取り除いて 2×10^7 個/mlの分生子懸濁液を調製した。培養土(土太郎、住友林業緑化)7.5 lに対し分生子懸濁液を250 ml、ふすまを2.5 L加え混和して作製した汚染土壌をプランターの底に敷き、その上に培養土を5 L入れて均平化した後にポリポットから外したトルコギキョウを並べ、隙間に培養土を敷き詰めた。1菌株あたりプランターA, Bをセットにして試験に供した(図

表 5-1 供試品種

番号	1回目	2回目	3回目
	品種名	品種名	品種名
1	レイナラベンダー	チュールピンク	グレイスライトピンク
2	セレブオーキッド	アンバーダブルバーボン	セレブリッチホワイト
3	セレブリッチホワイト	セレブプリンセス	セレブアブリコット
4	コナツプリンセス	フィーノブルー	コスタホワイト
5	ソニアラベンダー	コナツホワイト	エグゼラベンダー
6	リリックホワイト	ボヤージュ (2型) イエロー	セレブモアグリーン
7	セレブピンク	コロソホワイト	マキアピンク
8	セレブクリスタル	ジジ	ボヤージュ(2型)ブルー
9	ジュリアスラベンダー	セレブリッチホワイト	ボヤージュホワイト
10	マキア 2型ピンク	セレブオーキッド	
11	ブリマラベンダー	マキアライトピンク	
12	レイナホワイト(var.2)	エピカホワイト	
13	ハビネスブルー-2型	エリフルキャンディ	
14	セレブイエロー	セレブラベンダー	
15	グラナスブルー	モンロー	
16	セレブモアグリーン	ボヤージュミドリ	
17	デュールラベンダー	ボヤージュ (2型) グリーン	
18	クリスハート	マキアラベンダー	
19	ボヤージュ (2型) グリーン		
20	ボヤージュミドリ		

5-4). 病原菌の接種は，1回目は2020年11月13日，2回目は2021年1月6日，3回目は2021年6月17日に行った．

発病調査は1回目は12月21日，2回目は3月30日，3回目は8月27日に行った．各個体の病徴はOnozaki et al. (2020)を参考に以下の発病指数で表し(図5-5)，発病度を算出した．

発病指数0，健全；1，下葉の一部が褐変している；2，上位葉にも葉の褐変が見られる；3，茎の一部が褐変，あるいは株全体が萎凋している；4，株全体が枯死．

発病度 = Σ (指数別発生株数 × 指数) / (調査株数 × 4) × 100

5.2.8 分子系統解析用フラグメント増幅とシーケンシング

PSB培地200 mlで25°C，7日間培養した供試菌株の孢子懸濁液を用い，CTAB法によるtotal DNA抽出を行った．振とう培養液を8,000 rpm，5分間，室温，遠心して上清を除去した．ペレットをペーパータオルで押しつぶして水分を除いた後，乳鉢に液体窒素を加えながら乳棒でペレットを粉末状にした．粉末状の菌体に2×CTAB (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl pH8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA) 5 ml, 0.5% (v/v)メルカプトエタノールを加え，融解するまで乳棒で混和した．60°Cのウォーターバスで60分間，インキュベート後，5 mlのCIA (クロロホルム：イソアミルアルコール=24：1 (v：v))を加え，ボルテックス後，11,000

1回目および2回目の試験

1つのプランターにつき30株のトルコギキョウを1列あたり10株ずつ、3列に分けて並べ、上から土壌を被せて均平化した。
1菌株につきプランターA、Bを1セットで供試した。

プランターA

1	20	15
2	11	19
3	2	7
4	8	17
5	14	1
6	3	18
7	9	12
8	17	5
9	7	16
10	13	11

プランターB

11	16	4
12	6	10
13	12	20
14	4	6
15	18	13
16	15	3
17	5	9
18	19	2
19	10	8
20	1	14

3回目の試験

1つのプランターに27株のトルコギキョウを1列あたり9株ずつ、3列に分けて並べ、上から土壌を被せて均平化した。
1菌株につきプランターを1つ供試した。

1	8	3
2	6	1
3	2	7
4	7	5
5	9	8
6	3	4
7	5	2
8	1	9
9	4	6

注) プランター内の数字は表 5-2 に示した品種番号に対応する。

図5-4 試験区の詳細



1:下葉の一部が萎れている



2:上位葉にも葉の褐変が見られる



3:株全体が萎凋している



4:株全体が枯死

図 5-5 発病指数の判定基準

rpm, 30 分間, 室温, 遠心分離した. 上層を回収し, 0.7 倍容の 2-プロパノールを加えた後, 転倒混和して 11,000 rpm, 30 分間, 室温, 遠心分離した. 上清を除去し, 70% エタノールを 5 ml 加え, 11,000 rpm, 30 分間, 室温, 遠心分離した. ペレットが半透明になるまで風乾後, 500 μ l の TE でペレットを溶解した. これを鋳型として, TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いて PCR を行った. 増幅部位は *TEF1 α* (EF-1 ATGGGTAAGARGACAAGAC, EF-2 GGARGTACCAGTSATCATGTT) (O'Donnell et al. 1998a, 1998b), *pg1* (endoF CCAGAGTGCCGATACCGATT, endoR2 GCTTAGYGAACA KGGAGTG) (Hirano and Arie 2009), *pg5* (PG2F AGATGCAAGGCCGATGATGT, PG2R TCCATGTACTTCTCCTCACC) (Hirano and Arie 2009) の 3 領域とした. 滅菌蒸留水 13.3 μ l, 10 \times Ex Taq buffer 2 μ l, 2 mM dNTPs 1.6 μ l, primer (forward, reverse 10 μ M) 各 1 μ l, 鋳型 1 μ l, 5U/ μ l Ex Taq 0.1 μ l を混合し, 反応液の total volume を 20 μ l とした. PCR 条件は 98 $^{\circ}$ C 2 分間, (98 $^{\circ}$ C 10 秒間, *TEF1 α* :58 $^{\circ}$ C, *pg1*:52 $^{\circ}$ C, *pg5*:56 $^{\circ}$ C 30 秒間, 72 $^{\circ}$ C 2 分間) \times 30 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 7 分間とした. 得られた増幅産物は, FastGene ゲル /PCR 抽出キット (日本ジェネティクス) を用いて精製し, ユーロフィンジェノミクスに依頼して解析した. アライメントは手動で行った. 3 領域を連結して分子系統解析を行った. MEGA X v.10.2 (Kumer et al. 2018) を用いて, Tamura and Nei 1993 に基づく最

尤法にて系統関係を推定した。系統解析に使用した塩基配列数は、アライメントギャップを含めて 2,850 bp であった。最尤法で得られた系統樹の各枝の支持率は、ブートストラップ検定 (Felsenstein 1985) を 1000 回反復し、評価を行った。ブートストラップ値は、75% 以上を信頼性の高い値として残した。解析に使用した遺伝子のアクセッション番号を表 5-2 に示した。

表 5-2 系統解析に使用した株の一覧

Species	Culture	Host	Country	TEF	PG1	PG5
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	MAFF744005	<i>Cucumis sativus</i>	Japan	FJ985379	FJ985379	AB256844
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	MAFF305946	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Japan	FJ985284	AB256758	AB256846
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	MAFF744009	<i>Fragaria x ananassa</i>	Japan	AB256760	AB256849	DQ452425
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>actucae</i>	MAFF744029	<i>Lactuca sativa</i>	Japan	DQ837657	AB256851	JX010421
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	MAFF103038	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Japan	HM057317	AB256858	JX010384
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melongenae</i>	MAFF103051	<i>Solanum melongena</i>	Japan	FJ985382	KJ955039	KJ955336
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	MAFF305122	<i>Cucumis melo</i>	Japan	AB256777	AB256866	FJ985357
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	MAFF305543	<i>Citrullus vulgaris</i>	Japan	FJ985340	AB256868	JX010405
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	NBRC9970	<i>Phaseolus angularis</i>	Japan	DQ016286	AB256871	JX010445
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Saitama rly	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Japan	HM057326	AB256786	AB256875
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	MAFF103058	<i>Raphanus sativus</i>	Japan	FJ985441	AB256787	AB256876
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i>	MAFF731044	<i>Spinacia oleracea</i>	Japan	AF246849	AB256790	AB256878
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	MAFF235726	<i>Vigna unguiculata</i>	Japan	FJ985343	AB256792	AB256880
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tulipae</i>	MAFF235105	<i>Tulipa gesneriana</i>	Japan	FJ985275	AB256793	AB256881
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>eustomae</i>	3/07	<i>Eustoma grandiflorum</i>	Italy	KJ361575	KJ361521	KJ361548
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>eustomae</i>	52/09A	<i>Eustoma grandiflorum</i>	Italy	KJ361598	KJ361544	KJ361571
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>eustomae</i>	31/09	<i>Eustoma grandiflorum</i>	Italy	KJ361590	KJ361536	KJ361563

5.3 結果

5.3.1 トルコギキョウ立枯病菌の同定

現地から採取した罹病株から菌を分離し、接種試験を行った結果、2019年4月19日採取サンプルからは1株（G-T1-4）、2020年4月3日採取サンプルからは2株（Gs20-12, Gs20-43）、8月4日採取サンプルからは3株（ov2-2, ov3-1, ov4-3）の病原性を示す分離株を得た（表5-3）。得たトルコギキョウに病原性を示す菌株の培養性質および形態を観察した。培地上の菌叢観察にはPDA培地を用い、大型分生子および小型分生子の観察にはSNA（synthetic low nutrient agar）培地（Nirenberg and O'Donnell 1998）を用いた。PDA培地上での菌叢は、いずれの菌株も白色でまれに淡桃色を呈した。SNA培地上では小型分生子および大型分生子、厚壁胞子の形成が観察された（図5-6）。G-T1-4, Gs20-12, ov2-2, ov3-1, ov4-3の5菌株のrDNA-ITS領域およびrDNA-IGS領域の配列は、既報の*F. oxysporum* Schlechtendal（EU313440, EU313440）と100%の相同性を示した。

5.3.2 低濃度エタノール土壌還元消毒の立枯病発病抑制効果

低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒のポットレベルの試験の結果、エタノール濃度1%、30°C、処理期間を2週間以上とることで発病抑制効果が認められた（表5-4。一方、20°C以下の場合、処理期間を3

表 5-3 得られた病原菌株一覧

菌株名	採種年月日	分離場所	分離源
G-T1-4	2019年4月19日	安芸郡芸西村	ボヤージュさくら
Gs20-12	2020年4月3日	安芸郡芸西村	レイナホワイト var.2
Gs20-43			
ov2-2	2020年8月4日	土佐郡大川村	セレブリッチホワイト
ov3-1			
ov4-3			



図 5-6 G-T1-4 の SNA 培地上での形態

表 5-4 簡易試験による土壌消毒法の検討

EtOH 濃度	温度 (°C)	期間	Fe ²⁺			pH	発病株	
			I	II	III		5月15日	5月29日
1%	30	3weeks	50	125	125	6~7	0/3	0/3
1%	30	13日	50-125	125	50-125		0/3	0/3
1%	20	3weeks	5-20	5-20	5-20		0/3	2/3
1%	15	3weeks	0	0-5	0		2/3	2/3
2%	20	3weeks	20-50	20-50	20		2/3	2/3
2%	15	3weeks	0	0-5	5		3/3	-

週間とっても発病抑制効果は不十分であった。また、エタノール濃度を2%に高めた場合でも、20°C以下では発病を抑えることが出来なかった（表 5-4）。

5.3.3 2重被覆による地温維持の検討

1重被覆と2重被覆の最低地温は、地下10あるいは20 cm、計測場所にかかわらずほぼ同等であったが、地下20 cmにおけるの最高地温は2重被覆で高い傾向にあった（表 5-5）。また、1重被覆と2重被覆の平均地温の差は、地下10 cmより地下20 cmでより大きかった（表 5-5, 図 5-5, 5-6）。

5.3.4 冬春出し栽培における土壌還元消毒の有効性

5.3.4.1 低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒

低濃度（1%, 1.2%）エタノールによる土壌還元消毒処理後、圃場 A、圃場 B の各土壌採取地点の *F. oxysporum* は検出限界値以下となった（表 5-6, 5-7）。また、処理中の地温はいずれの圃場も処理48時間後から被覆除去直前まで30°C以上を維持でき、処理3日後には全ての測定地点で酸化還元電位が-200 mV以下を示し、その後被覆除去まで-200 mVを維持した（図 5-7, 5-8）。

圃場 A では11月26日から萎凋細菌病の発病が確認されたものの、

表 5-5 各設置場所の温度データ

設置場所		最高温度	最低温度	平均温度
中央 1 重	10cm	56.4	22.2	42.5
	20cm	47.9	22.0	41.0
中央 2 重	10cm	55.2	22.3	43.4
	20cm	50.9	22.3	42.7
サイド 1 重	10cm	55.4	22.3	42.5
	20cm	46.8	21.8	40.5
サイド 2 重	10cm	55.3	22.2	44.0
	20cm	48.4	22.4	42.7
ボイラ-1 重	10cm	52.7	21.9	41.1
	20cm	46.6	21.9	40.1
ボイラ-2 重	10cm	54.0	22.1	42.6
	20cm	51.5	22.3	42.4
室温		71.3	22.3	40.2

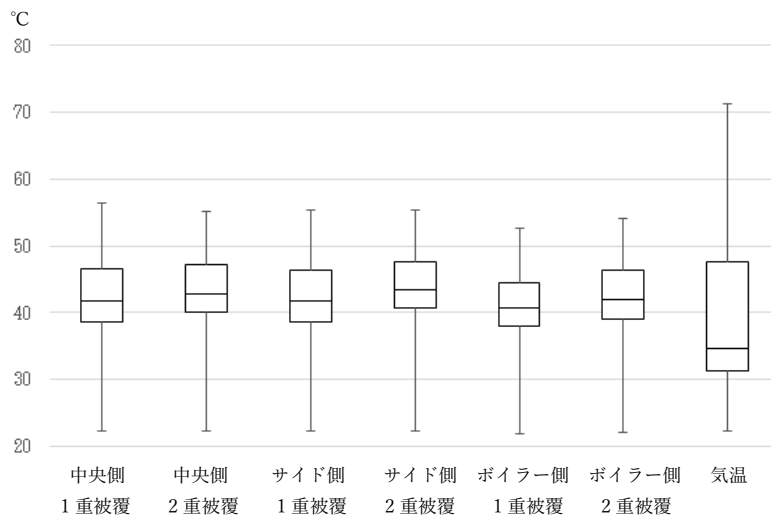


図 5-5 ハウス内の各地点における被覆中の温度データの箱ひげ図 (地下 10 cm)

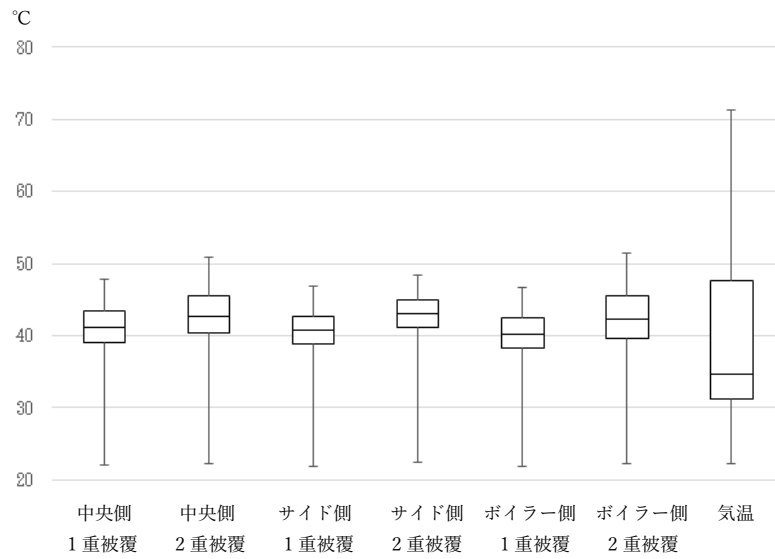


図 5-6 ハウス内の各地点における被覆中の温度データの箱ひげ図 (地下 20 cm)

表 5-6 安芸地域の現地ほ場 A における *F. oxysporum* の土壌中生菌密度

処理	地点	深度	生土 1g あたりの菌数(cfu)	
			消毒前	消毒後
エタノール濃度 1.0%	入り口	0-30cm	2.3×10^3	nd
		30-60cm	3.5×10^4	nd
	中央	0-30cm	5.3×10^3	nd
		30-60cm	2.1×10^4	nd
	サイド	0-30cm	nd	nd
		30-60cm	nd	nd

表 5-7 安芸地域の現地ほ場 B における *F. oxysporum* の土壌中生菌密度

処理	地点	深度	生土 1g あたりの菌数(cfu)	
			消毒前	消毒後
エタノール濃度 1.2%	入り口	0-30cm	5.7×10^3	nd
		30-60cm	4.0×10^4	nd
	中央	0-30cm	7.3×10^3	nd
		30-60cm	1.9×10^4	nd
	サイド	0-30cm	9.3×10^3	nd
		30-60cm	3.3×10^3	nd

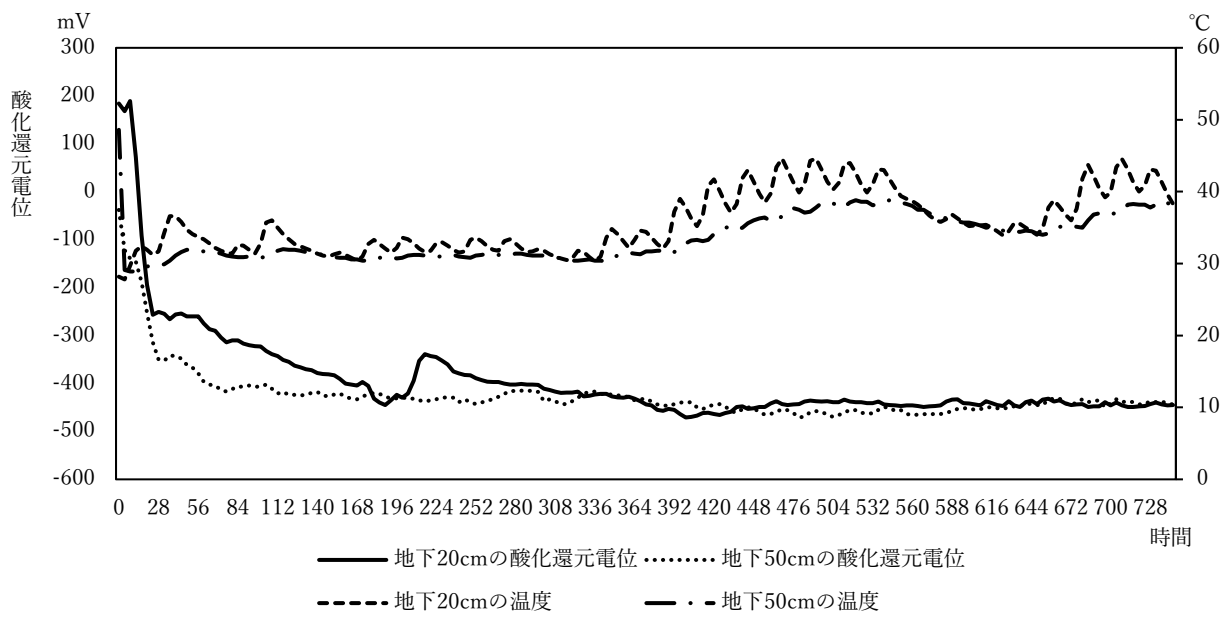


図 5-7 圃場 A の土壌還元消毒処理中の地温および土壌酸化還元電位の推移

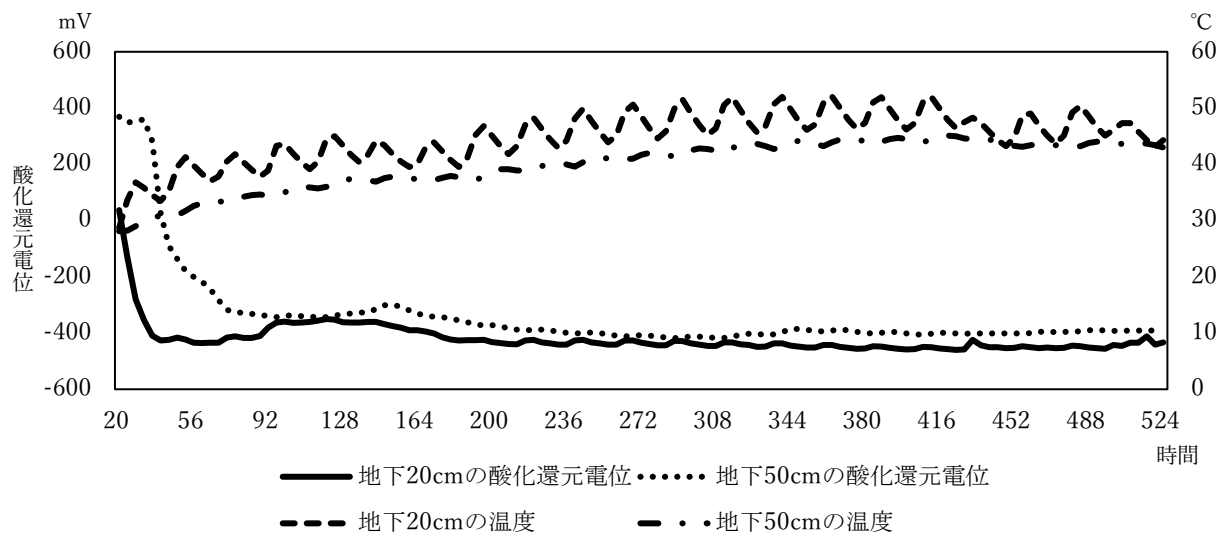


図 5-8 圃場 B の土壤還元消毒処理中の地温および土壌酸化還元電位の推移

拡大はみられず、*F. oxysporum* による立枯病の発病もほとんどみられなかった（図 5-9）。一部、資材の周辺で *F. solani* の立枯病の発病がみられた（表 5-8）。

圃場 B では 12 月 11 日ごろから立枯病が発生し、最終的に圃場のトルコギキョウの 4.0% が *F. oxysporum* による立枯病によって消失した（図 5-10）。特に、ハウス 1 棟目（a, b, c, d）およびサイド側（a, p）での発病が多くみられた（表 5-9）。

5.3.4.2 米ぬかを用いた土壌還元消毒

米ぬかを用いた土壌還元消毒処理後、各土壌採取地点の *F. oxysporum* は検出限界値以下となった（表 5-10）。また、処理中の地温は処理 24 時間後から被覆除去直前まで 30℃ 以上を維持した。米ぬか 500 kg/10 a 処理土壌では処理後 16 時間で酸化還元電位が -300 mV まで低下したものの、処理 13 日後から酸化還元電位が上昇した。米ぬか 1,000 kg/10 a 処理土壌では、処理後 48 時間で酸化還元電位が -200 mV まで低下し、その後被覆除去まで -200 mV を維持した。一方、水のみ処理した土壌では処理後 400 時間で -200 mV に低下した（図 5-11）。

生育調査では土壌消毒法の対照として用意した 1% エタノール処理土壌での枯死株率が最も低く、米ぬか 500 kg/10 a 処理土壌での枯死株率は高かった。したがって、米ぬかを用いた土壌還元消毒は米ぬかの施用

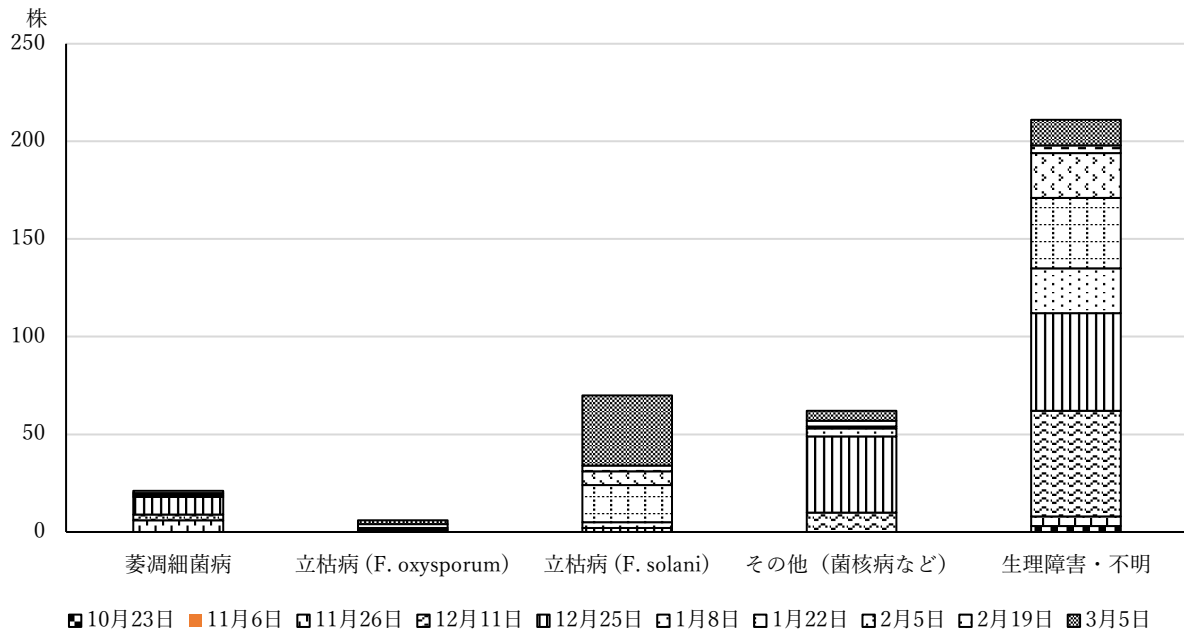


図 5-9 圃場 A の病害別生育調査

表 5-8 ほ場 A のうね別枯死株数

枯死原因	枯死株数													枯死株率
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	計	
枯死原因不明	17	17	25	20	32	32	15	11	10	6	8	44	237	0.79
立枯病 (<i>F. oxysporum</i>)	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	5	0.02
立枯病 (<i>F. solani</i>)	3	0	7	24	27	1	4	28	5	2	7	7	115	0.38
萎凋細菌病	2	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	6	12	0.04
IYSV、菌核病など	9	11	10	30	2	7	3	3	0	0	0	0	75	0.25

注)a から l はうねの場所を示す (図 5-1 を参照)。

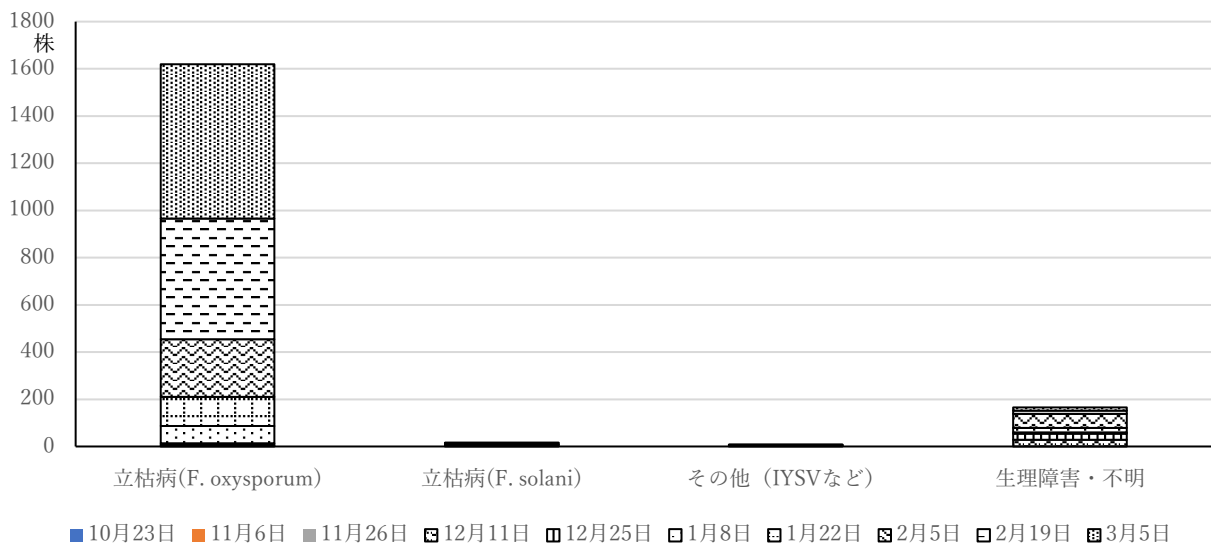


図 5-10 圃場 B の病害別生育調査

表 5-9 ほ場 B のうね別枯死株数

枯死原因	枯死株数																枯死株率	
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p		計
枯死原因不明	13	4	6	9	13	6	4	3	3	5	5	9	4	45	8	42	179	0.45
立枯病 (<i>F. oxysporum</i>)	611	195	89	151	68	90	69	29	36	29	17	18	23	35	28	127	1615	4.04
立枯病 (<i>F. solani</i>)	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	6	0	1	1	1	0	13	0.03
IYSV、菌核病など	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0	3	7	0.02

注) a から p はうねの場所を示す (図 5-1 を参照)。

表 5-10 場内ほ場における *F. oxysporum* の土壌中生菌密度

処理方法	深度	生土 1g あたりの菌数(cfu)	
		消毒前	消毒後
米ぬか 0.5t/10a	0-30cm	1.6×10^3	nd
	30-60cm	3.0×10^3	nd
米ぬか 1.0t/10a	0-30cm	4.0×10^3	nd
	30-60cm	3.6×10^3	nd
エタノール 1.0%(v/v)	0-30cm	6.7×10^2	nd
	30-60cm	3.3×10^1	nd
無処理	0-30cm	3.3×10^2	nd
	30-60cm	3.0×10^1	nd

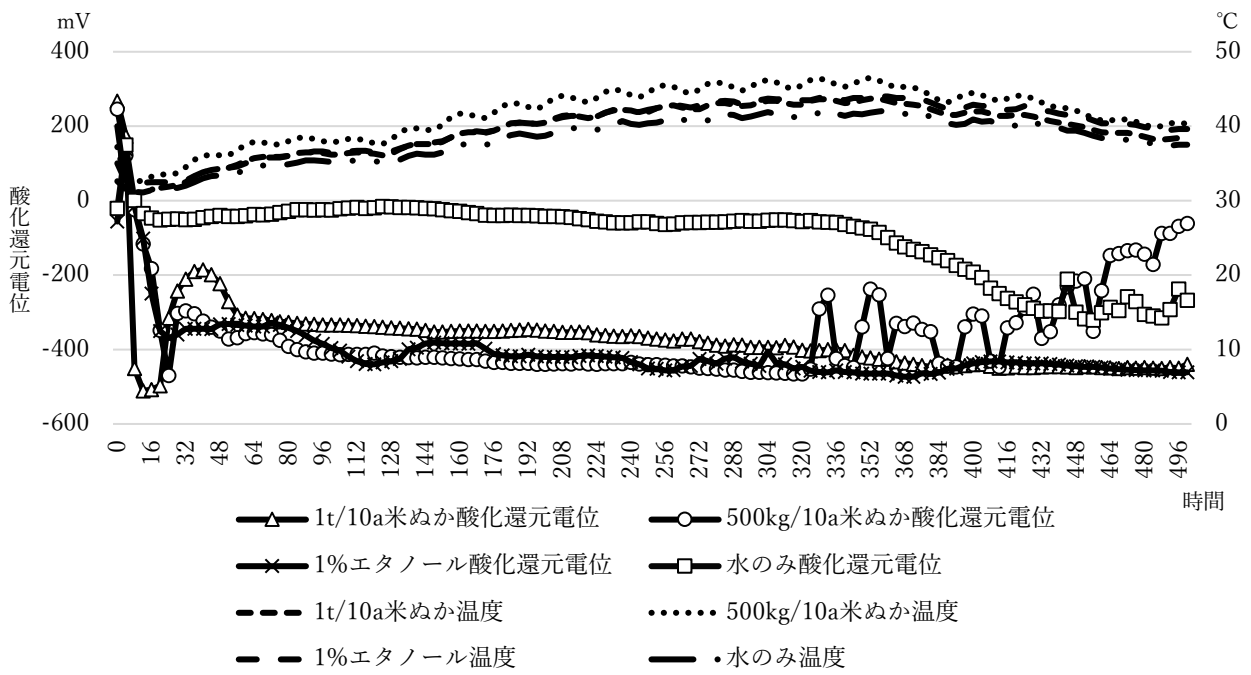


図 5-11 米ぬかによる土壌還元消毒処理中の地温および土壌酸化還元電位の推移

量を減らすと効果が低くなると考えられた（表 5-11）。

5.3.5 夏秋出し栽培における土壤消毒法の立枯病発病抑制効果

5.3.5.1 クロルピクリンの剤型の違いおよび被覆資材による土壤消毒効果

試験期間中の地温はクロルピクリンが十分な効果を発揮するとされる 7°C 以上をほぼ維持していた（表 5-12）。クロルピクリン錠剤を処理したハウスでは、地点 1 の 0~30 cm 土壤サンプルにおいて消毒後の土壤からも消毒前とほぼ同程度の菌が検出された。クロルピクリン液剤を処理したハウスでは消毒後に菌は検出されなかった（表 5-12）。被覆資材によって土壤燻蒸剤の効果が向上するかについては、今回の試験では判然としなかった（表 5-12）。

作期中の発病については、クロルピクリン錠剤を処理したハウスではいずれの地点でも発病が確認された。クロルピクリン液剤を処理したハウスでも一部の地点で発病が確認された。

5.3.5.2 クロピクフロ-による土壤消毒効果

試験期間中の地温はクロルピクリンが十分な効果を発揮するとされる 7°C 以上を維持していた（表 5-13）。消毒後の各地点の土壤から菌は検出されなかった（表 5-13）。

表 5-11 各処理区の枯死株率

処理区	枯死株率(%)	
	12月21日	2月3日
ふすま 500kg/10a	3.9	9.7
ふすま 1t/10a	4.4	3.9
1%エタノール	1.9	2.9
水のみ (無処理区)	5.8	7.3

表 5-12 剤形と被覆資材の相違によるフザリウム属菌に対するクロルピクリンの薬効比較

剤型	被覆資材	地点 ^{a)}	深さ	生土 1g あたりの菌数(cfu)		地温(°C)		
				消毒前	消毒後	最高	最低	平均
錠剤	ガスバリア性	1	0-30cm	1.7×10^4	8.3×10^3	28.9	10.9	18.3
	フィルム		30-60cm	1×10^3	nd ^{c)}			
	農ポリ	2	0-30cm	8.3×10^3	nd	26.7	10.4	16.6
	フィルム		30-60cm	- ^{b)}	nd			
液剤	ガスバリア性	3	0-30cm	1.6×10^4	nd	31.9	7.4	18.9
	フィルム		30-60cm	6.6×10^2	nd			
	農ポリ	4	0-30cm	1.8×10^4	nd	38.3	6.4	19.1
	フィルム		30-60cm	-	nd			

a)地点は図 5-2 に示した土壌採取地点を参照

b)-は土壌採集ができなかったことを示す

c)nd は検出限界値以下であったことを示す

表 5-13 クロピクフロ-処理前後の土壌中の *Fusarium oxysporum* 菌数

地点	深度	生土 1g あたりの菌数(cfu)		気温(°C)			地温(°C)		
		消毒前	消毒後	最高	最低	平均	最高	最低	平均
①	0-30cm	3.3×10^2	nd	40.6	-2.9	12.8	25.2	9.9	17.1
	30-60cm	1.4×10^3	nd						
②	0-30cm	2.3×10^3	nd						
	30-90cm	3.7×10^3	nd						
③	0-30cm	2.0×10^3	nd						
	30-60cm	4.3×10^3	nd						
④	0-30cm	1.7×10^3	nd						
	30-60cm	3.0×10^3	nd						
⑤	0-30cm	8.0×10^3	nd						
	30-60cm	1.2×10^4	nd						
⑥	0-30cm	6.7×10^2	nd						
	30-60cm	2.7×10^3	nd						

7月13日頃から *F. oxysporum* による立枯病が発生し、最終的に圃場全体の6.3%が枯死した(表5-14)。枯死株は東側のハウス(a~e)で多く確認された(図5-12)。

5.3.6 トルコギキョウ品種の立枯病抵抗性程度

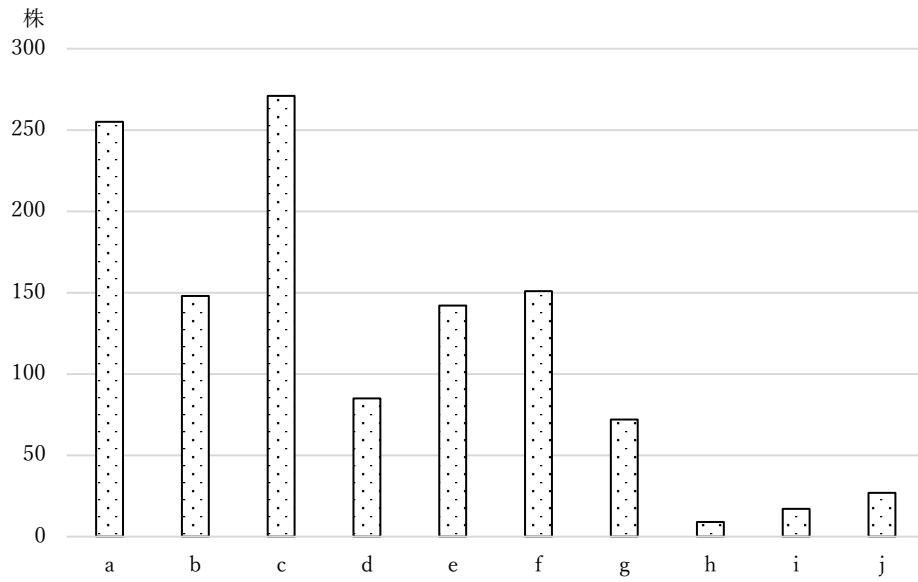
3回の試験の結果、品種によって立枯病の発病程度に差が見られたが、供試菌株によっても品種の発病程度に差が見られた(表5-13)。1回目の試験では‘レイナラベンダー’は試験期間中いずれの株も発病しなかった。平均発病度が30以下の品種は‘レイナラベンダー’、‘セレブオーキッド’、‘セレブリッチホワイト’、‘コナツプリンセス’、‘ソニアラベンダー’で、発病度が70以上の品種は‘セレブモアグリーン’、‘デュールラベンダー’、‘クリスハート’、‘ボヤージュ(2型)グリーン’、‘ボヤージュミドリ’であった(表5-15)。

2回目の試験では‘チュールピンク’、‘アンバーダブルバーボン’は試験期間中いずれの株も発病せず、発病度が50以上の品種は‘ボヤージュ(2型)グリーン’、‘マキアラベンダー’であった(表5-15)。

3回目の試験で平均発病度が20以下の品種は‘マキアピンク’、‘ボヤージュ(2型)ブルー’、‘ボヤージュホワイト’で、発病度が50以上の品種は‘セレブアプリコット’、‘エグゼラベンダー’、‘コスターホワイト’であった(表5-15)。

表 5-14 定植した品種名と欠株率

畝番号	品種名	会社名	欠株数	定植数(概算)	欠株率(%)
	TU968	-	37	268	13.8
a	ピンクフィズ	カネコ	114	768	14.8
	ブルーフィズ	カネコ	104	816	12.7
b	ジュリアスラベンダー	カネコ	48	1072	4.5
	シェリーライトブルー	カネコ	100	804	12.4
c	コロソホワイト?	サカタ	199	1076	18.5
	プリマラベンダー	タキイ	72	808	8.9
d	ボンボヤージュ 2 型ベビーピンク	サカタ	13	1064	1.2
	NF アッシュ	ナカソネ	72	808	8.9
e	チアライトピンク	ミヨシ	142	1864	7.6
f	グレイスライトピンク	スミカ	43	528	8.1
	マキアライトピンク	サカタ	104	528	19.7
	ソロブルーピコティ	サカタ	4	816	0.5
g	NF シュガーホワイト	ナカソネ	7	100	7.0
	マキアライトピンク?	サカタ	13	160	8.1
	アンバーダブルショコラ	サカタ	52	1612	3.2
h	NF シュガーホワイト	ナカソネ	9	1876	0.5
i	海しずか	スミカ	4	812	0.5
	NF シュガーホワイト	ナカソネ	1	544	0.2
	セレブアプリコット	スミカ	12	508	2.4
j	セレブリッチホワイト	スミカ	15	1720	0.9
	ジュリアスラベンダー	カネコ	12	140	8.6
定植全体			1177	18692	6.3



注) a~j はハウスのうねを示す (図 5-3 参照).

図 5-12 クロピクフロー処理後のうね別枯死株数

表 5-15 トルコギキョウ立枯病 (*F. oxysporum*) 3 菌株 (G-T1-4, ov3-1, ov4-3) に対する発病度

1 回目			2 回目			3 回目		
発病度	発病株数	品種名	発病度	発病株数	品種名	発病度	発病株数	品種名
0	0	レイナ ラベンダー	0	0	チュールピンク	11.1	1	マキアピンク
2.8	1	セレブ オキッド	0	0	アンバーダブル バボン	11.1	1	ボヤージュ(2型) ブルー
13.9	4	セレブ リッチホワイト	2.8	1	セレブプリンセス	19.4	3	ボヤージュ ホワイト
16.7	4	コナツ プリンセス	5.6	1	フィノブルー	22.2	2	セレブ モアグリーン
22.2	3	ソニア ラベンダー	5.6	1	コナツホワイト	25.0	3	セレブ リッチホワイト
30.6	3	リリック ホワイト	11.1	2	ボヤージュ (2型) イエロー	30.6	3	グレイス ライトピンク
38.9	5	セレブピンク	11.1	2	コロンホワイト	52.8	5	セレブ アプリコット
38.9	8	セレブ クリスタル	13.9	2	ジジ	55.6	6	エグゼラベンダー
38.9	6	ジュリアス ラベンダー	16.7	2	セレブ リッチホワイト	77.8	8	コスターホワイト
41.7	4	マキア 2型ピンク	16.7	2	セレブオキッド			
41.7	6	プリマ ラベンダー	19.4	3	マキア ライトピンク			
41.7	4	レイナホワイト(var.2)	27.8	3	エビカホワイト エリフル			
47.2	5	ハビネスブルー-2型	33.3	6	キャンディ			
55.6	9	セレブイエロー	44.4	7	セレブラベンダー			
58.3	8	グラナスブルー セレブ	44.4	5	モンロー			
75.0	8	モアグリーン	44.4	6	ボヤージュミドリ			
75.0	9	デュール ラベンダー	55.6	6	ボヤージュ (2型) グリーン			
86.1	8	クリスハート	69.4	8	マキアラベンダー			
88.9	9	ボヤージュ (2型) グリーン						
97.2	9	ボヤージュミドリ						

5.3.7 圃場由来の立枯病菌の分子系統

Bertoldo ら(2015)の分類を参考に、県内で分離されたトルコギキョウに病原性を示す *F. oxysporum* 7 菌株を *TEF1α*, *pg1*, *pg5* の塩基配列を連結して分子系統解析した結果、全ての株が Bertoldo ら(2015)の提案する”グループ 2”に属した(図 5-13)。また、7 菌株のうち、ov2-2 からは *pg1* の増幅が見られなかった(図 5-14)。

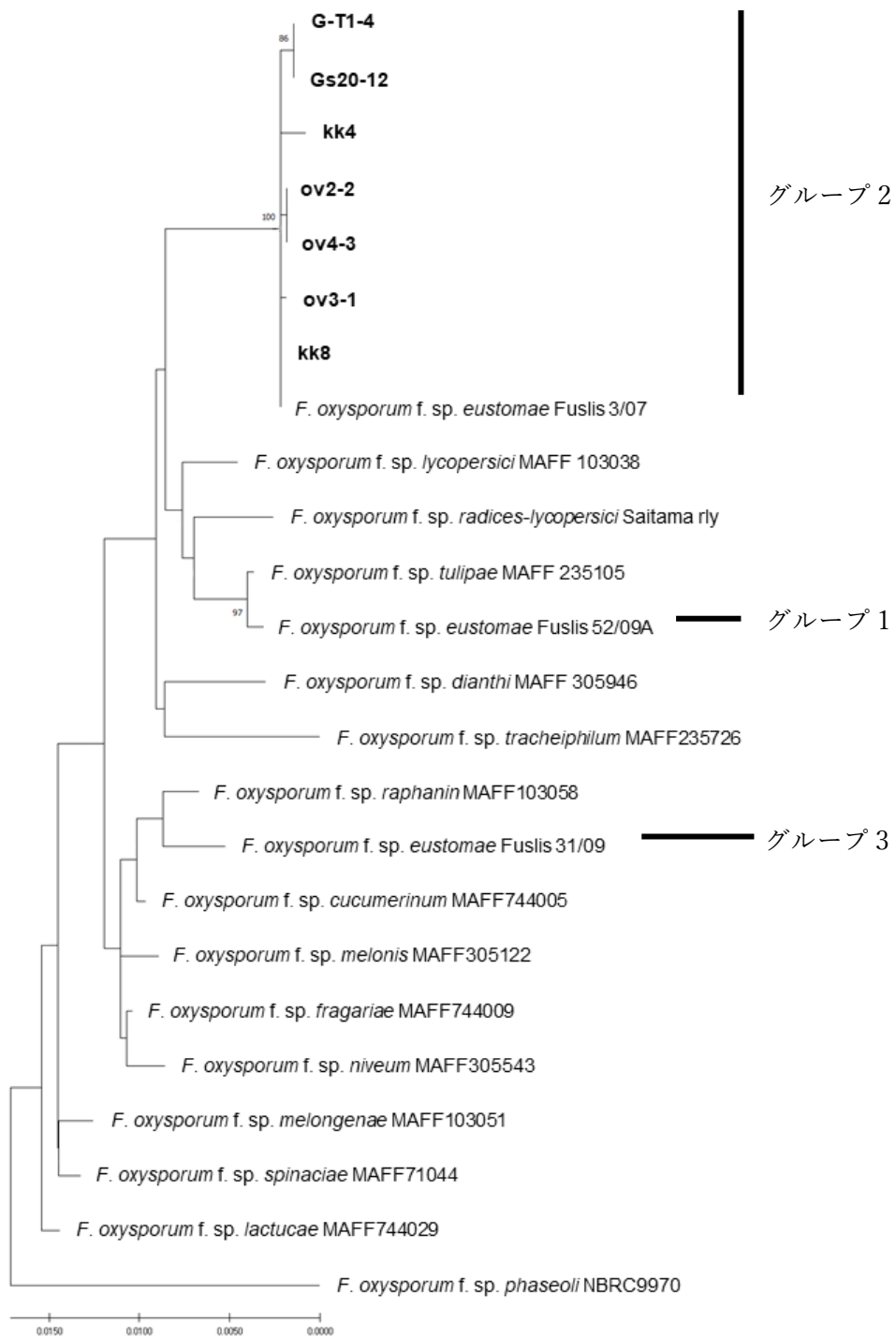
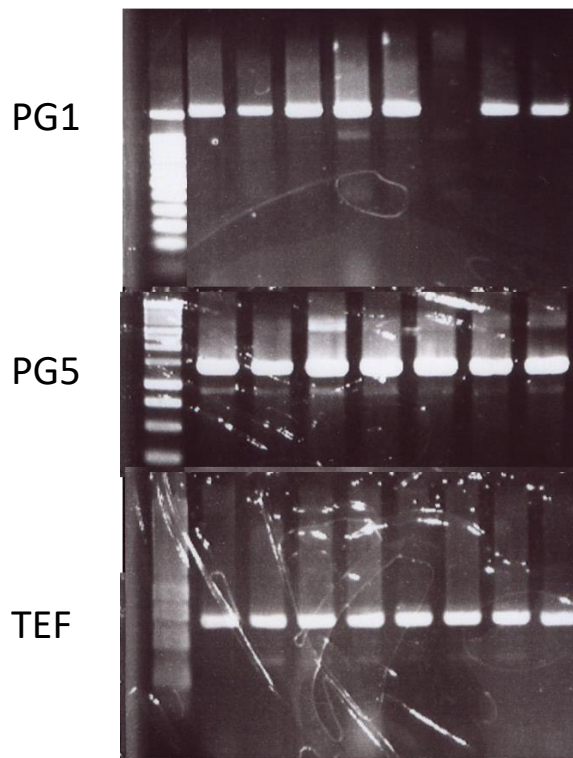


図 5-13 *F. oxysporum* 属菌の TEF1 α , PG1, PG5 を連結した配列に基づく系統樹.

トルコギキョウ立枯病菌

OV4-3
OV3-1
OV2-2
KK8
KK4
GS20-12
G-T1-4
JCM12575



JCM12575: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* レース2

図5-14 県内で分離したトルコギキョウ立枯病菌の TEF, PG1, PG5 の PCR 増幅産物泳動写真.

5.4 考察

低濃度エタノールを利用した土壌還元消毒法は、Kobara et al. (2007)が開発した手法であり、熊本県でトルコギキョウ立枯病に対して実施されているが、成功事例と失敗事例があり、地域に合わせた処理方法を検討する必要がある（熊本県花き協会 2019）。また、本法については、低温期の北海道での成功事例がある（小原 私信）が、今回の 5.4.2 簡易試験による土壌消毒法の検討では、消毒時期が低温期である夏秋出し栽培の消毒には適さないと考えられた。しかしながら、本研究の結果、冬春出し栽培における土壌消毒法としては適していると考えられた。

クロルピクリンの剤型による消毒効果については、錠剤、液剤ともに次作にトルコギキョウ立枯病が発生したものの、液剤を処理したハウスでは昨年の同時期と比較して発病程度は約 2 割低かった（データ省略）。クロピクフロー処理は、夏秋出し栽培で効果が比較的高く、夏秋出し栽培の消毒法として適していると考えられたが、発病を完全に抑えることは出来なかった。今回の試験で東側のハウス（a～e）の枯死株数が多かった原因として、前作の試験（5.3.6.1）の影響が考えられる。発病の多い圃場に対しては、休作し、冬春出し栽培の圃場と同様に低濃度エタノールを利用した土壌還元消毒法を検討する必要がある。

*Fusarium*3 菌株（G-T1-4, ov3-1, ov4-3）に対するトルコギキョウ 40 品種の発病株数、発病度には顕著な品種差異が認められた。‘セレブリ

ッチホワイト'は3回の試験でいずれも発病度25未満であり、強抵抗性を示した。3菌株間の発病程度を比較すると、土佐郡大川村で分離された ov3-1, ov4-3 は安芸郡芸西村で分離された G-T1-4 よりも発病株数や発病度が高い傾向にあった。発病の傾向は3菌株間で類似しており、異なるレースに属する可能性は低いと考えられた。

TEF1α, *pg1*, *pg5* を用いた系統解析により、本県で発生しているトルコギキョウ立枯病がグループ2に属していることが明らかになったが、Bertoldoら(2015)によると、グループ2に属する菌株は、気温20°Cで強い病原性を示し、30°Cでは病原性が低下すると示唆されている。本県におけるトルコギキョウ立枯病の発生時期は、平地で1~6月、山地で6~8月となっており、各代表地点のアメダス平均気温は安芸で14.3°C、本山が23.3°C(アメダス1991~2020の統計)である。トルコギキョウの管理は日中25°C以下、夜間15°C管理を行っているため、消毒が不十分な土壤に定植した場合は、作物のステージに関わらず発病するリスクがあると考えられる。

第 6 章 総合考察

高知県では温暖な気候を生かした施設園芸植物栽培が盛んであるが、県土面積の 84 % を林野が占める地形であり、農業可能耕地面積が少なく、効率的に耕地を使用する機会が多い。また、大規模市場への大量・継続・安定出荷による銘柄確立を目的に、産地ごとに単一の品目栽培が主流であることから、同じ圃場で単一の植物を連作する傾向にある。そのため、各種園芸植物で連作障害の発生が深刻化している。高知県では以前から連作障害の原因究明や対策のための試験を行ってきており、例えば、ナスフザリウム立枯病の耕種的防除（下元ら、2012）、ショウガ産地で適切な防除資材を選択するためにショウガ根茎腐敗病菌検出方法の開発（矢野ら、2013）、ルリトウワタ疫病の体系的な防除法の確立（安達ら 2009）などによって産地の維持を図ってきた。本研究では、県内産地で連作障害が発生しているセンリョウ、ユズ、ミョウガ、トルコギキョウを対象とし、障害の原因菌を明らかにするとともに、対策技術の確立を試みた。

室戸地区のセンリョウ産地で発生していた葉枯症状を呈する障害については、葉や茎の黒変や斑点障害部から、*Colletotrichum* 属菌、*Phytophthora* 属菌、*Neofusicoccum* 属菌が高率で分離された。分離された菌のうち、*Colletotrichum* 属菌 2 菌株を rDNA-ITS 領域の塩基配

列に基づいて分子系統解析したところ、*C. jiangxiense* と近縁であることが判明した。*Phytophthora* 属菌 2 菌株の形態的特徴と rDNA-ITS, COX I の相同性から、いずれも *P. citrophthora* であると同定した。*Neofusicoccum* 属菌 5 菌株の形態的特徴と rDNA-ITS, EF1 α , TUB, RPB2 を用いた系統解析から、いずれも *N. parvum* であると同定した。接種試験によって、*Colletotrichum* 属菌 2 菌株、*Phytophthora* 属菌 2 菌株、*Neofusicoccum* 属菌 5 菌株はいずれもセンリョウに病原性を示し、現病徴である葉枯症状を再現できたため、これらの菌がいずれも病原であることを証明できた。ただし、4 回の調査では、*Colletotrichum* 属菌と *Neofusicoccum* 属菌についてはいずれの採取日においても分離されたことから、センリョウに普遍的に感染し、障害を起こす病原菌になっていると考えられた。なお、*P. citrophthora* によるセンリョウの病害の報告はこれまでなかったため、*P. citrophthora* をセンリョウ疫病の新たな病原として追加した。

高知市などのユズ産地で発生していたエクボ症とよばれる果皮が陥没して褐変する障害については、障害果から *Colletotrichum* 属菌が高率で分離され、分離菌を樹上の果実に接種することで病徴が再現されたため、*Colletotrichum* 属菌の感染によって生じる炭疽病の一症状であることを明らかにした。さらに、Actin, β -tubulin, Chitin synthase, Calmodulin, GAPDH, GS, rDNA-ITS の 7 領域を用いた分子系統解析に

よって、県内で発生しているエクボ症には、*C. gloeosporioides* や *C. fructicola* に近縁の種の 2 種が関与していることを示唆した。薬剤防除体系を検討した結果、マンゼブ水和剤散布が有効であることを見出した。しかしながら、マンゼブ水和剤は使用回数や使用時期に制限があるため、マンゼブ水和剤以外の剤も活用した効果的な防除体系の開発が必要と考えられた。

須崎市などのミョウガ産地で発生していたミョウガの葉鞘が褐変し、その後腐敗枯死する障害については、障害部位から *Ophiosphaerella* 属菌が高率で分離され、分離菌を葉鞘に接種することで病徴が再現された。顕微鏡的性状、*O. agrostidis* 特異的プライマーを用いた PCR で陽性、rDNA-ITS, EF1 α , LSU, SSU の 4 領域を用いた分子系統解析によって、*O. agrostidis* が葉鞘腐敗症状の原因であると断定した。国内で *O. agrostidis* が引き起こす病気としてベントグラスデッドスポット病が報告されており、本分離菌をベントグラスに接種したところ、ベントグラスデッドスポット病菌と同様にベントグラスに対し病原性を示した。*O. agrostidis* によるミョウガ病害の報告はこれまでになく、ミョウガ葉鞘腐敗病として記載した。

香南市等のトルコギキョウに発生した萎凋症状については、障害株から高率で *Fusarium* 属菌が分離された。病徴が再現された分離菌 5 菌株の rDNA-ITS 領域および rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づき、*F.*

oxysporum と同定した。 *F. oxysporum* によるトルコギキョウ立枯病は既報であった。 7～8 月に消毒を行う冬春出しの山地では、低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒法の効果が高く、有用な手法であると考えられた。 また、1～3 月に消毒を行う夏秋出しの山地では、クロピクフロアを用いた土壌消毒の効果が高かった。 さらに、現地で栽培されている主要 47 品種を用いて *F. oxysporum* の接種試験を実施したところ、‘レイナラベンダー’、‘セレブオーキッド’、‘セレブリッチホワイト’、‘コナツプリンセス’、‘ソニアラベンダー’、‘チューールピンク’、‘アンバーダブルバーボン’、‘マキアピンク’、‘ボヤージュ（2 型）ブルー’、‘ボヤージュホワイト’の 10 品種が他品種と比較して発病度が低く、抵抗性であると考えられた。 産地ごとに適した消毒法と抵抗性品種を栽培することで、病害の発生を抑えることが可能であると考えられた。

本研究では、これまで障害の原因が明らかでなかったセンリョウ、ユズ、ミョウガの連作障害の原因菌を明らかにし、トルコギキョウについては産地ごとの防除対策を確立した。 センリョウの障害のうち、炭疽病については、茨城県と共同で開発した防除技術が技術マニュアルとして公開されている（農業・食品産業技術総合研究機構 2019）。

ユズエクボ症では、貯蔵中に発生する陥没症状が炭疽病菌によるものであることを明らかにした。 従来カンキツで問題となっていた炭疽病の貯蔵病害は、日焼けなどに伴う傷によって腐敗症状を引き起こすもので

あり（足立 2014）、ユズでみられる症状とは異なっていた。今回原因菌が明らかになったことで、既存のカンキツ炭疽病で行われている防除対策を応用できる可能性が示された。しかしながら、一般的に行われる薬剤散布での発病抑制効果は低く、マンゼブ水和剤散布の複数回の処理が効果的であった。

ミョウガ葉鞘腐敗病では、葉鞘の褐変、株の枯死症状が *Ophiosphaerella agrostidis* によることを明らかにした。早川ら（2007）によると、本菌と同種のベントグラスデッドスポット病菌は中～高確率で植物体上に偽子嚢殻の形成が認められたが、本研究で偽子嚢殻が確認されたのは南国市のサンプル 1 株のみであり、接種試験でも偽子嚢殻の形成は認められなかった。ベントグラスデッドスポット病は比較的高温期に発病が多いとされているが、ミョウガは年間を通し一定した環境の施設で栽培されており、野外で生育するベントグラスとは異なる環境条件であるためと考えられる。ミョウガ分離株がベントグラスにも病原性を示したため、ベントグラスが感染源になっている可能性を示した。

トルコギキョウ立枯病については、全国各地で問題となっている（農業・食品産業技術総合研究機構 2021b）が、土壌消毒の効果が得られない事例があるなど、土壌消毒の種類や実施場所によって効果に幅があることから、県内産地において適した土壌消毒方法を確立する必要がある。本研究によって、産地に合わせた防除方法を提案することが可能に

なった．また，*F. solani*によるトルコギキョウ立枯病の品種抵抗性については Onozaki ら(2020)によって研究されていたが，*F. oxysporum*によるトルコギキョウ立枯病の品種抵抗性については検討がなされていなかった．本研究により，*F. oxysporum*によるトルコギキョウ立枯病においても，品種により病原性が異なることが明らかにされ，抵抗性品種を選抜できた．この他の植物病原菌として，安芸郡芸西村のトルコギキョウ圃場で枯死株から *Pestalotiopsis* 属菌が分離され，菌叢ディスクの接種により病徴が再現された．*Pestalotiopsis* 属菌は現在トルコギキョウに病原登録されていないが（日本植物病理学会 2021），佐藤(2003)によると，宿根スターチスペスタロチア病菌の病原として報告されており、接種試験によってトルコギキョウに病原性を示すことが報告されている．

本研究では，センリョウ、ユズ、ミョウガ、トルコギキョウの障害の原因を明らかにしたものの，作期を通した防除暦の作成には至っていない．本研究の対象作物はいずれもマイナー作物であり，農薬需要量が少ないことから，使用可能な農薬が少ない傾向にある．ユズはカンキツとして，センリョウは樹木類としてグループ化されており，既存の登録薬剤を防除対策に用いることができるが，ミョウガについては登録のある農薬は少なく，ほとんどの薬剤が収穫前日数の長い散布登録となっている．ミョウガは1週間間隔で収穫するため，ミョウガ葉鞘腐敗病のよう

に 4～6 月の作後期に発生する病害に対しての防除対策が取りづらい。今後は、本研究で得られたデータをもとに薬剤登録を推進する必要がある。さらに、既存の登録農薬を組み合わせた防除暦の作成や、水が少なく低濃度エタノールを利用した土壌還元消毒法が利用できない地域などに対し、別の防除方法を提案できるように実証事例を増やしていく必要がある。これらの課題の解決には各々の対策技術導入が可能な条件の整理を行い、普及や営農指導員などとの連携が不可欠である。

謝辞

本研究のとりまとめにあたり，東京農工大学連合農学研究科生物生産科学専攻の有江力教授には多くのご指導を賜りました．心より御礼申し上げます．また，東京農工大学小松健准教授，茨城大学中島雅己教授には指導教官としてご助言とご校閲を賜りました．謹んで厚くお礼を申し上げます．また，東京農工大学植物病理学研究室の方々には，実験上のご援助やご助言を賜り，深く感謝を申し上げます．本研究は著者が高知県農業技術センターにおいて主に行った研究内容をとりまとめたものであり，同センターの森田泰彰氏には懇切なご指導を賜りました．勤務先で，本研究に理解とご協力をいただいた高知県農業技術センターの方々に心から感謝を申し上げます．また，クリーピングベントグラスから分離した *Ohiosphaerella agrostis* は，株式会社理研グリーンよりご提供いただきました．本研究の一部は，日本学術振興会の科学研究費補助金（TA (19H00939)），科学技術振興機構（JST）の企業・研究機関・大学との連携によるオープンイノベーションプラットフォームプログラム（OPERA, JPMJOP1833）の支援を受けて行った．最後に，私の研究者としての基礎を築いて下さった茨城大学遺伝子実験施設古谷綾子氏はじめ，今までお世話になった全ての皆様に感謝申し上げます．

令和 3 年 11 月 30 日 沖友香

摘 要

高知県では温暖な気候を利用して古くから施設栽培を中心とした野菜園芸の栽培が盛んである。しかし、県土の 84%を森林が占め、耕地の比率が 4.2%と低く、限られた耕地を効率的に活用しなくてはならないため、連作による障害の発生が深刻な問題となっている。そこで本研究では、県内の園芸植物産地で発生している障害の原因を明らかにするとともに、防除対策を構築した。

室戸地区でセンリョウに発生していた葉枯症状を呈する障害について、作期中に計 4 回調査を行い、葉や茎の黒変や斑点障害部から糸状菌を分離したところ、*Colletotrichum* 属菌、*Phytophthora* 属菌、*Neofusicoccum* 属菌が高率で分離された。分離された菌のうち、*Colletotrichum* 属菌 2 菌株を Actin, β -tubulin, Chitin synthase, Calmodulin, GAPDH, GS, rDNA-ITS の 7 領域に基づき分子系統解析したところ、*C. jiangxiense* と近縁であった。*Phytophthora* 属菌 2 菌株の形態的特徴と rDNA-ITS, COXI の相同性から、いずれも *P. citrophthora* であると同定した。*Neofusicoccum* 属菌 5 菌株の形態的特徴と rDNA-ITS, EF1 α , β -tubulin, RPB2 を用いた系統解析から、いずれも *N. parvum* であると同定した。接種試験で、3 種ともセンリョウに病原性を示し、葉枯症状の原因であると断定した。このうち、*P.*

citrophthora はセンリョウの新たな病原であり、センリョウ疫病の新たな病原として追加した。

高知市などのユズ産地で発生していたエクボ症とよばれる果皮が陥没して褐変する障害については、障害果から *Colletotrichum* 属菌が高率で分離され、分離菌を樹上の果実に接種することで病徴が再現されたため、*Colletotrichum* 属菌の感染によって生じる炭疽病の一症状であることが明らかになった。さらに、Actin, β -tubulin, Chitin synthase, Calmodulin, GAPDH, GS, rDNA-ITS の 7 領域に基づき分子系統解析したところ、*C. gloeosporioides* や *C. fructicola* に近縁の複数種が関与していることが示唆された。薬剤防除体系を検討した結果、マンゼブ水和剤散布が有効であることを見出した。しかしながら、マンゼブ水和剤は使用回数や使用時期に制限があるため、マンゼブ水和剤以外の剤も活用した効果的な防除体系の開発が必要と考えられた。

須崎市などのミョウガ産地で発生していた葉鞘が褐変し、その後腐敗枯死する障害については、障害部位から *Ophiosphaerella* 属菌が高率で分離され、分離菌を葉鞘に接種することで病徴が再現された。顕微鏡的性状、*O. agrostidis* 特異的プライマーを用いた PCR で陽性、また、rDNA-ITS, EF1 α , LSU, SSU の 4 領域を用いた分子系統解析によって、分離菌が *O. agrostidis* であると同定され、*O. agrostidis* が葉鞘腐敗症

状の原因であると断定した。*O. agrostidis* によるミョウガ病害の報告はこれまでなく、ミョウガ葉鞘腐敗病として記載した。

香南市等のトルコギキョウに発生した萎凋症状については、障害株から高率で *Fusarium* 属菌が分離された。病徴が再現された分離菌 5 菌株の rDNA-ITS および rDNA-IGS 領域の塩基配列に基づき、*F. oxysporum* と同定した。*F. oxysporum* によるトルコギキョウ立枯病は既報であった。7～8 月に消毒を行う冬春出しの山地では、低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒法の効果が高く、また、1～3 月に消毒を行う夏秋出しの山地では、クロピクフローを用いた土壌消毒の効果が高かった。さらに、現地で栽培されている主要 47 品種を用いて *F. oxysporum* の接種試験を行ったところ、‘レイナラベンダー’など 10 品種が他品種と比較して発病度が低く抵抗性であると考えられた。産地ごとに適した消毒法と抵抗性品種を栽培することで、病害の発生を抑えることが可能であると考えられた。

引用文献

安達理恵, 矢野和孝, 植松清次, 竹内繁治 (2009) *Phytophthora palmivora* によるルリトウワタ (ブルースター, *Tweedia caerulea* D. Don (= *Oxypetalum caeruleum* D. Don)) 疫病 (新称). 日植病報 75:72.

(講演要旨)

足立嘉彦 (2014) 特集 カンキツの後期病害対策. 植物防疫 68:563-564.

阿部雅子 (2019) ミョウガの辛味関連化合物に関する研究. 日本調理科学会誌 52:1-7.

Ariyawansa HA, Hyde KD, Jayasiri SC, Buyck B, Chethana KWT, Dai DQ, Dai YC, Daranagama DA, Jayawardena RS, Lücking R, Ghobad-Nejhad M, Niskanen T, Thambugala KM, Voigt K, Zhao RL, Li G, Doilom M, Boonmee S, Yang ZL, Cai Q, Cui Y, Bahkali AH, Chen J, Cui BK, Chen JJ, Dayarathne MC, Dissanayake AJ, Ekanayaka AH, Hashimoto A, Hongsanan S, Jones EBG, Larsson E, Li WJ, Li Q, Liu JK, Luo ZL, Maharachchikumbura SSN, Mapook A, McKenzie EHC, Norphanphoun C, Konta S, Pang KL, Perera RH, Phookamsak R, Phukhamsakda C, Pinruan U, Randrianjohany E, Singtripop C, Tanaka K, Tian CM, Tibpromma S, Abdel-Wahab MA, Wanasinghe

DN, Wijayawardene NN, Zhang J, Zhang H, Abdel-Aziz FA, Wedin M, Westberg M, Ammirati JF, Bulgakov TS, Lima DX, Callaghan TM, Callac P, Chang C, Coca LF, Dal-Forno M, Dollhofer V, Fliegerová K, Greiner K, Griffith GW, Ho H, Hofstetter V, Jeewon R, Kang JC, Wen T, Kirk PM, Kytövuori I, Lawrey JD, Xing J, Li H, Liu ZY, Liu XZ, Liimatainen K, Lumbsch HT, Matsumura M, Moncada B, Nuankaew S, Parnmen S, de Azevedo Santiago ALCM, Sommai S, Song Y, de Souza CAF, de Souza-Motta CM, Su HY, Suetrong S, Wang Y, Wei S, Wen TC, Yuan HS, Zhou LW, Réblová M, Fournier J, Camporesi E, Luangsa-ard JJ, Tasanathai K, Khonsanit A, Thanakitpipattana D, Somrithipol S, Diederich P, Millanes AM, Common RS, Stadler M, Yan JY, Li X, Lee HW, Nguyen TTT, Lee HB, Battistin E, Marsico O, Vizzini A, Vila J, Ercole E, Eberhardt U, Simonini G, Wen H, Chen X, Miettinen O, Spirin V, Hernawati (2015) Fungal diversity notes 111-252-taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Divers* 75:27-274.

Ariyawansa HA, Gareth JEB (2019) Additions to Taiwan fungal flora 2: *Ophiosphaerella taiwanica* sp. nov. *Phytotaxa* 413:39–48.

Bertoldo C, Gilardi G, Spadaro D, Gullino ML, Garibaldi A (2015) Genetic diversity and virulence of Italian strains of *Fusarium*

oxysporum isolated from *Eustoma grandiflorum*. Eur J Plant Pathol. 141:83–97.

Brown GE (1975) Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. Phytopathology 65:404–409.

Brown GE and Barmore CR (1977) The effect of ethylene on susceptibility of Robinson tangerines to anthracnose. Phytopathology 67:120–123.

Câmara MP, O’Neill NR, Berkum PV, Dernoeden PH, Palm ME (2000) *Ophiosphaerella agrostis* sp. nov. and its relationship to other species of *Ophiosphaerella*. Mycologia 92:317–325.

Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91:553–556.

Clarke BB, Vincelli P, Koch PK, Munshaw G (2020) Chemical Control of Turfgrass Diseases 2020. University of Kentucky, Lexington, KY.
<http://www2.ca.uky.edu/agcomm/pubs/ppa/ppa1/ppa1.pdf>

Cole TCH, Nürnberger S (2014) Zingiber mioga and its cultivars. Plantsman 14:226–229.

Crouch JA, Clarke BB, White JFJ, Hillman BI (2009) Systematic

analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warmseason grasses. *Mycologia* 101:717–732.

Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WF, Philips AJ, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Stud Mycol* 55:235–253.

海老原克介・植松清次・中村仁・松本直幸 (2003). センリョウに発生した3種病害 (疫病, 白絹病, 白紋羽病). *日植病報* 69:39. (講演要旨).

Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG, Crous PW (2012a) The *Colletotrichum boninense* species complex. *Stud Mycol* 73:1–36.

Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Crous PW (2012b) The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73: 37-113.

Damm U, Cannon PF, Liu F, Barreto RW, Guatimosim E, Crous PW (2013) The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. *Fungal Divers* 61:29–59.

Damm U, O'Connell RJ, Groenewald JZ, Crous PW (2014) The *Colletotrichum destructivum* species complex - hemibiotrophic

- pathogens of forage and field crops. *Stud Mycol* 79:49–84.
- Edel V, Steinberg C, Avelange I, Laguerre G, Alabouvette C (1995) Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85:579–585.
- Erwin DC and Ribeiro OK (1996) *Phytophthora* Diseases Worldwide. pp. 96–144, 288–295. APS Press, St. Paul.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fujinaga M, Yamagishi N, Ogiso H, Takeuchi J, Moriwaki J, Sato T (2011) First report of celery stunt anthracnose caused by *Colletotrichum simmondsii* in Japan. *J Gen Plant Pathol* 77:243–247.
- Geoffrey H (1993) An integrated approach to the analysis of variation in *Phytophthora nicotianae* and a redescription of the species. *Mycol Res* 97:559–574.
- Ghooshkhaneh NG, Golzarian MR, Mamarabadi M (2018) Detection and classification of citrus green mold caused by *Penicillium digitatum* using multispectral imaging. *J Sci Food Agric* 98:3542–3550.
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous

ascomycetes. Appl Environ Microbiol 61:1323–1330.

Hattori Y, Nakashima C, Kitabata S, Naito K, Hieno A, Alvarez LV, Motohashi K (2021) Identification of the *Colletotrichum* species associated with mango diseases and a universal LAMP detection method for *C. gloeosporioides* species complex. Plant Fungal Res 4:2–13.

Hayakawa T, Kobayashi M, Sasaki N, Yaguchi S (2007) Bentgrass dead spot caused by *Ophiosphaerella agrostis* in Japan. J Jpn Soc Turfgrass Sci 36:12–19.

Hirano Y, Arie T (2009) Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolates based on nucleotide sequences of polygalacturonase genes. Microbe Environ 24:113-120.

Hu WL, Ma YZ, Chen JZ (2019) First report of *Citrus sinensis* anthracnose caused by *Colletotrichum fructicola* in China. Plant Dis 103:1018.

Huang F, Chen GQ, Hou X, Fu YS, Cai L, Hyde KD, Li HY (2013) *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. Fungal Divers 61:61–74.

池上 亘 (1986) 高知県稲作技術史. 個人発行.

Kaminski JE, Dernoeden PH (2002): Geographic distribution, cultivar

susceptibility, and field observations on bentgrass dead spot, Plant Dis 86:1253–1259.

Kaminski JE, Dernoeden PH, O'Neill NR, Henry C, Wetzel III (2005) A PCR-based method for the detection of *Ophiosphaerella agrostis* in creeping bentgrass. Plant Dis 89:980–985.

Katoh T and Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol 30:772–780.

小泉丈晴，石澤昌彦，山田文典，日戸正敏，祖父江順（2013）群馬県内に在来するミョウガの特性．群馬県農業技術センター-研究報告 10:41–45.

Kobara Y, Uematsu S, Tanaka-Miwa C, Sato R, Sato M (2007) Possibility of the new soil fumigation technique with ethanol solution. In: Obenauf GL (ed) Proceedings of 2007 annual international research conference on methyl bromide alternatives and emissions reductions. 74(1-4).

Kobayashi Y, Sakakibara H, Yanai T, Yajima I, Hayashi K (1991) Volatile flavor compounds of myoga (*Zingiber Mioga*). Agric Biol Chem 55:1655–1657.

駒田旦（1976）野菜のフザリウム病菌 *Fusarium oxysporum* の土壤中に

おける活性評価技術に関する研究. 東海近畿農業試験場報告 29:184-187.

駒田旦 (1980). 作物のフザリウム病 (松尾卓見ほか編). p472. 全国農村教育協会, 東京

高知県農業振興部 (2021) 高知県の園芸. 高知県

高知県農業振興部 (2017) 高知県の園芸 p 29. 高知県

熊本県花き協会 (2019) トルコギキョウ及び宿根カスミソウにおける低濃度エタノールを利用した土壌還元消毒活用マニュアル.
<https://k-engei.net/kakikyokai/contents/news/2019/03/post-65.html>

Kumer S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547-1549.

Lafuente MT, Alférez F, González-Candelas L (2018) Light-emitting diode blue light alters the ability of *Penicillium digitatum* to infect citrus fruits. *Photochem Photobiol* 94:1003-1009.

Le MT, Arie T, Teraoka T (2010) Population dynamics and pathogenic races of rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* in the Mekong Delta in Vietnam. *J Gen Plant Pathol* 76:177-182.

Liu F, Damm U, Cai L, Crous PW (2013) Species of the *Colletotrichum*

gloeosporioides complex associated with anthracnose diseases of Proteaceae. Fungal Divers 61:89–105.

Liu, F., Weir, B.S., Damm, U., Crous, P.W., Wang, Y., Liu, B., Wang, M., Zhang, M. and Cai, L. (2015). Unravelling *Colletotrichum* species associated with Camellia: employing ApMat and GSloci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. Persoonia 35:63–86.

Maeda K (1988) Mioga. Nogyo gizyututaikei yasai hen 11(in Japanese). Rural Culture Association. Tokyo, pp 579–598.

Maddison WP and Maddison DR (2017) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.31. Available at <http://mesquiteproject.org>

Makino T, Maekawa F, Hara H, Tuyama T (1961) Makino's New Illustrated Flora of Japan. Rev. ed. Hokuryukan, Tokyo, p1057.

Mchau, GRA and 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. Mycol Res 98:1269–1299.

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2020) Survey of local specialty vegetable production. https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_yasai/. Cited 14

Sep 2021.

Momma N, Momma M, and Kobara, Y (2010) Biological soil disinfection using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. J Gen Plant Pathol 76:336–344.

本橋慶一，吉野聡一郎，樋口裕仁，二階堂由紀，浮田茂郎，神田多
(2016). *Neofusicoccum parvum* によるモミジバスズカケノキ胴枯
病. 樹木医学研究 20:187–196.

日本植物病理学会 (2021) 日本植物病名目録 .
https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php

西和文 (2008) 臭化メチル問題と今後の土壌病害対策. 関西病虫研報
50:25–27.

Nirenberg HI and O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and
combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex.
Mycologia 90:434–458.

農業・食品産業技術総合研究機構 (2019) センリョウ技術マニュアル.
https://www.naro.go.jp/PUBLICITY_REPORT/publication/files/201903nivfs_senryou_tec_manual.pdf(2021年11月15日現在)

農業・食品産業技術総合研究機構 (2021a) 圃場・種イモの診断に基づ
くショウガ青枯病防除標準作業手順書.

https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/naro

/sop/141207.html (2021年11月15日現在)

農業・食品産業技術総合研究機構 (2021b) トルコギキョウの立枯病対策事例集.

https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/138739.html(2021年11月15日現在)

農林水産省統計 (2021a) 全国農業地域別農業産出額及び生産農業所得実額. 生産農業所得統計.

https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/nougyou_sansyutu/

農林水産省統計 (2021b) 耕地面積及び耕地の拡張・かい廃面積耕地面積田畑別耕地面積. 作物統計調査.

農水省統計情報部 (1983) 昭和57年度野菜作農家意向調査報告. 農林水産統計報告58-2.園統-1.

<https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/menseki/>

農林水産省消費・安全局植物防疫課 (2012) 不可欠用途臭化メチルの全廃に向けて. 植物防疫 66:123-127.

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 Natl Acad Sci USA 95:2044–2049.

Ohba H (2016) Zingiberaceae. In Flora of Japan, Vol. IVb. Angiospermae Monocotyledoneae. Iwatsuki, K., D. E. Boufford and H. Ohba (eds.), Kodansha, Tokyo. pp 187–191.

Ohwi, J (1965) Flora of Japan. Publ. Smithsonian Institution, Washington DC.

Pamela, G., Nanako, N., Takeshi, S., Ken, S. (2017). Markers to differentiate species of anthracnose fungi identify *Colletotrichum fructicola* as the predominant virulent species in strawberry plants in Chiba Prefecture of Japan. J Gen Plant Pathol 83:14-22.

沖友香, 蓑島綾華, 森田泰彰, 廣岡裕吏 (2019) 高知県のセンリョウに感染する病原性糸状菌の探索. 高知県農業技術センター-研究報告 28: 5-12.

沖友香, 森田泰彰, 山下翔人, 竹内繁治 (2020) ユズエクボ症の原因および防除法の検討. 高知県農業技術センター-研究報告 29:7-13.

Oki T, Yano K, Komatsu K, Shimomoto Y, Arie T, Morita Y (2022) *Ophiosphaerella agrostidis* causes leaf-sheath rot of *Zingiber mioga*. J Gen Plant Pathol : in press

Onozaki T, Satou M, Azuma M, Kawabe M, Kawakatsu K, Fukuta N

- (2020) Evaluation of 29 Lisianthus cultivars (*Eustoma grandiflorum*) and one inbred line of *E. exaltatum* for resistance to two isolates of *Fusarium solani* by using hydroponic equipment. Hort. J. 89:473–480.
- Peng L, Yang Y, Hyde KD, Bahkali AH, Liu Z (2012) *Colletotrichum* species on citrus leaves in Guizhou and Yunnan Provinces, China. Cryptogam Mycol 33:267–283.
- Pennycook SR, Samuels GJ (1985) *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. Mycotaxon 24:445–458.
- Peres NAR, Souza NL, Peever TL, Timmer LW (2004) Benomyl Sensitivity of Isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from Citrus. Plant Disease 88:125-130.
- Phillips AJ, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. Study in Mycology.76:51–167.
- Phookamsak R, Liu JK, McKenzie EHC, Manamgoda DS, Ariyawansa HA, Thambugala KM, Dai DQ, Camporesi E, Chukeatirote E, Wijayawardene NN, Bahkali AH, Mortimer PEXJC, Hyde KD (2014) Revision of *Phaeosphaeriaceae*. Fungal Divers. 68:159–238.
- Rahman MZ, Uematsu S, Coffey MD, Uzuhashi S, Suga H, Kageyama K

- (2014). Re-evaluation of Japanese *Phytophthora* isolates based on molecular phylogenetic analyses. *Mycoscience* 55:314–327.
- Rehner SA, Samuels GJ (1994) Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol Res* 98:625–634.
- Saito H, Sasaki M, Nonaka Y, Tanaka J, Tokunaga T, Kato, A, Thuy TTT, Vang LV, Tuong LM, Kanematsu S, Suzuki T, Kurauchi K, Fujita N, Teraoka T, Komatsu K, Arie T (2021) Spray application of nonpathogenic fusaria onto rice flowers controls bakanae disease (Caused by *Fusarium fujikuroi*) in the next plant generation. *Appl Environ Microbiol* 87:e01959–20
- Saitoh K, Togashi K, Arie T, Teraoka T. (2006) A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *J Gen Plant Pathol* 72:348–350.
- 佐藤豊三，森脇丈治，青木孝之，根本博（2017）*Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体所属菌株の分子再同定に基づく複数作物炭疽病の病原学名変更．日植病報 83:43．（講演要旨）
- 澤岷哲也，新崎千江美，大城篤，佐藤豊三（2015）マンゴー炭疽病を引き起こす *Colletotrichum acutatum* 種複合体菌株の再同定．日植病報 81:206．（講演要旨）
- 佐藤俊次（2003）宿根スターチスペスタロチア病菌の性質(1)．九病虫

研究会報 49:61–65.

Shoemaker RA, Babcock CE (1989) *Phaeosphaeria*. Can J Bot 67:1500–1599.

下元祥史, 森田泰彰, 廣岡裕吏 (2012) *Fusarium striatum* (*Haematonectria ipomoeae*) によるナスフザリウム立枯病 (新称). 日植病報 78:186 (講演要旨).

Stephenson SA, Green JR, Manners JM, Maclean DJ (1997) Cloning and characterisation of glutamine synthetase from *Colletotrichum gloeosporioides* and demonstration of elevated expression during pathogenesis on *Stylosanthes guianensis*. Current Genetics 31(5):447–454.

Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Iriny L, Smits D, Renfurm R, Verkley GJ, Groenewald M, Chaduli D, Lomascolo A, Welti S, Lesage–Meessen L, Favel A, Al–Hatmi AM, Damm U, Yilmaz N, Houbraken J, Lombard L, Quaedvlieg W, Binder M, Vaas LA, Vu D, Yurkov A, Begerow D, Roehl O, Guerreiro M, Fonseca A, Samerpitak K, van Diepeningen AD, Dolatabadi S, Moreno LF, Casaregola S, Mallet S, Jacques N, Roscini L, Egidi E, Bizet C, Garcia–Hermoso D, Martín MP, Deng S, Groenewald JZ, Boekhout T, de Beer ZW, Barnes I, Duong TA, Wingfield MJ, de Hoog GS, Crous

PW, Lewis CT, Hambleton S, Moussa TA, Al-Zahrani HS, Almaghrabi OA, Louis-Seize G, Assabgui R, McCormick W, Omer G, Dukik K, Cardinali G, Eberhardt U, de Vries M, Robert V (2015) One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*. 35:242–63.

竹内繁治 (2000) Capsicum 属植物におけるトバモウイルス病の発生生態とその防除に関する研究. 高知農技セ特報 3:1–53.

竹内 繁治, 奥田 充, 花田 薫, 川田 洋一, 亀谷 満朗 (2001) メロン黄化えそウイルス (Melon yellow spot virus) によるキュウリ (*Cucumis sativus*) の黄化えそ病. 日植病報 67:46–51.

竹内繁治 (2006) 高知県における臭化メチル代替技術普及の取り組み. 野菜茶業研究集報 3:17–20.

Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition–transversion and G + C–content biases. *Mol Biol Evol*. 9:678–687.

Tamura K and Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol* 10:512–526.

Tao G, Liu ZY, Gao YH, Cai L (2013) Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of

seven new species. *Fungal Divers* 61:139–164.

Templeton MD, Rikkerink EHA, Solon SL, Crowhurst RN (1992) Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 122:225–230.

Tennakoon DS, Thambugala KM, Wanasinghe DN, Gentekaki E, Promputtha I, Kuo CH, Hyde KD (2020) Additions to *Phaeosphaeriaceae* (Pleosporales): *Elongaticollum* gen. nov., *Ophiosphaerella taiwanensis* sp. nov., *Phaeosphaeriopsis beaucarnea* sp. nov. and a new host record of *Neosetophoma poaceicola* from Musaceae. *MycoKeys* 70:59–88.

外側正之・青木孝之（2011）フザリウム 分類と生態・防除（駒田旦ほか編）。p 559, 全国農村教育協会, 東京

塚本俊秀（2007）センリョウに発生した *Colletotrichum* sp.による炭疽病（新称）および *Phoma* sp.による輪紋病（新称）。日植病報. 73:178.
（講演要旨）。

植松清次・海老原克介・宇佐見俊行・田中千華・宍戸雅宏（2007）センリョウから分離された *Phytophthora nemorosa*（日本新産）。日植病報. 73:180.（講演要旨）。

Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping

- of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J Bac 172:4238–4246.
- Weir BS, Johnston PR and Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Stud Mycol 73: 115–180.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols A guide to methods and applications 315–322.
- Wu TL and Larsen K (2000) Zingiberaceae. In Flora of China, Vol. 24. Flagellariaceae through Marantaceae. Wu, Z.-Y. and P. H. Raven (eds.), Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO. Pp. 322–377.
- 山口昭，大竹昭朗 編(1986). 果樹の病害虫-診断と防除-. p 86–88.
- 山本亮，中村卓司，島村聡，兼松誠司，小松節子 (2010) ダイズ茎疫病菌 *Phytophthora sojae* の簡便な遊走子調製法. 日植病報 76:44.
- 山崎淳紀，矢野和孝，佐藤敦彦，朝比奈泰史，森田泰彰 (2018) *Phomopsis* sp. によるトマトホモプシス茎枯病 (新称). 日植病報 84:32 (講演要旨) .
- Yang T, Groenewald JZ, Cheewangkoon R, Jami F, Abdollahzadeh J, Lombard L, Crous PW (2017) Families, genera and species of Botryosphaerales. Fungal Biol 121: 322–346.

- 矢野和孝，岡田知之，影山幸二，森田泰彰（2013）土壤中のショウガ根
茎腐敗病菌（*Pythium myriotylum*）検出のための選択培地による
直接検出法，捕捉法および PCR 法の比較．四国植防 47:21-28.
- 横澤志織，佐藤豊三，近藤賢一（2015）長野県のリンゴとブドウより
分離された *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体菌株の同定
と特性．日植病報 81:206.（講演要旨）

公表論文目録

沖友香, 蓑島綾華, 森田泰彰, 廣岡裕吏 (2019) 高知県のセンリョウに感染する病原性糸状菌の探索. 高知県農業技術センター研究報告 28 5-12. (第 2 章に記載)

沖友香, 森田泰彰, 山下翔人, 竹内繁治 (2020) ユズエクボ症の原因および防除法の検討. 高知県農業技術センター研究報告 29:7-13.(第 3 章に記載)

Tomoka Oki, Kazutaka Yano, Ken Komatsu, Yoshifumi Shimomoto, Tsutomu Arie, Yasuaki Morita (2021) *Ophiosphaerella agrostidis* causes leaf-sheath rot of *Zingiber mioga*. J Gen Plant Pathol: in press. (第 4 章に記載)