



Title	ダイズ黒根腐病に関する研究
Author(s)	越智, 直
Citation	北海道大学. 博士(農学) 乙第6913号
Issue Date	2014-03-25
DOI	10.14943/doctoral.r6913
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/55815">http://hdl.handle.net/2115/55815</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Sunao_Ochi.pdf



[Instructions for use](#)

# ダイズ黒根腐病に関する研究

越智 直

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 研究史	4
I. ダイズ黒根腐病について	4
II. ダイズ黒根腐病の病徴	5
III. ダイズ黒根腐病菌 <i>Calonectria ilicicola</i> について	6
IV. ダイズ黒根腐病菌の産生毒素について	7
V. ダイズ黒根腐病に対する防除の取り組み	7
第3章 ダイズ黒根腐病の発生生態	12
I. ダイズ黒根腐病の発生実態調査	12
II. ダイズ黒根腐病菌の低温長期保存法の開発	17
III. 土壌中におけるダイズ黒根腐病菌の特異的検出法の開発	24
IV. 土壌中におけるダイズ黒根腐病菌の動態解析	31
V. ダイズ残渣中における黒根腐病菌の感染能力	35
VI. ダイズ黒根腐病菌の温度に対する反応	38
VII. リアルタイム PCR を用いた黒根腐病菌の特異的定量法の 開発	41
第4章 ダイズ黒根腐病菌の産生毒素の同定	47
I. ダイズ黒根腐病菌産生毒素の単離	47
II. ダイズ黒根腐病菌産生毒素の構造解析	48
III. ダイズ品種の毒物物質への反応解析	50
IV. 菌株による産生毒素量と病原力の関係解析	51
第5章 ダイズ黒根腐病の防除	61
I. 冬期湛水と晩播を組み合わせたダイズ黒根腐病の防除	61
II. 播種時期の違いによるダイズ根中の黒根腐病菌量の差異	70
III. 土壌中の黒根腐病菌への冬期湛水の影響	72
第6章 総合考察	80
I. 摘要	83
II. 参考文献	85

## 第 1 章 緒言

我が国におけるダイズの栽培面積は明治期から大正中期までは 40 万 ha 以上であり重要農産物の一つであった。その後、第二次世界大戦期までに 22 万 ha に減少したが、食糧増産政策の中で再び 40 万 ha を超えるまで増加した。しかし、海外からの輸入品に押されたこともあって、その後は減少の一途をたどり、1977 年には 7.9 万 ha にまで落ち込んだ。しかし、1978 年にダイズが水田転換の奨励作物に指定されたこともあり、1987 年には 16 万 ha まで回復した。近年は 13 万 ha から 14 万 ha で推移している (図 1-1)。

10a 当たり収量は戦前までは 100kg 前後であったが、戦後、徐々に向上し、現在は 160kg 前後となっている。

生産量でみると、戦前は 30 万 t~50 万 t で推移していたが、第二次世界大戦末期には 17 万 t まで落ち込んだ。戦後、1952 年や 1955 年には 50 万 t を回復するが、その後は減少し、1976 年には 10.9 万 t まで落ち込んだ。その後は栽培面積の増加および 10a 当たり収量の向上もあり、1987 年には 28 万 t まで向上した。近年は 22 万 t 程度となっている (図 1-1)。

一方、水田転換畑でのダイズの作付けが増加するにつれ各種病害の発生が多くなり、中でも立枯性病害の多発が問題となってきた。立枯性病害では茎疫病、白絹病、黒根腐病などが主たる病害であり、中でも黒根腐病は生育後期に顕在化する病害で、被害の大きな場合は収穫皆無となり収量への影響は著しい。

ダイズ黒根腐病は、1968 年に千葉県下で発生し、御園生・深津(1969)によって新病害として報告されたのが世界で最初の記録である。その後、アメリカ (Rowe et al. 1973)、カメルーン (Bernaux 1979)、韓国 (Sung 1980)、中国 (Ma et al. 2004) などでも発生が報告されている。

1984 年から 1993 年まで主に農林水産省のプロジェクト研究などにより精力的にダイズ黒根腐病の発生生態と防除法が研究されてきた

(西ら 1999) が、いまだに発生生態には不明な部分が多く、また現場に導入可能な有効な防除法も確立されていない。そこで本研究では、土壌中におけるダイズ黒根腐病菌の特異的検出法を開発することで、今まで不明であった土壌中におけるダイズ黒根腐病菌の動態を解析し、黒根腐病の発生しやすい栽培条件などを解明すること、また、黒根腐病菌の産生毒素を明らかにすることで、ダイズ黒根腐病の発病機作を解明すること、さらにこれらのデータから得られた情報を基に、生産現場に導入しうるダイズ黒根腐病の防除法の開発を目的とした。

本研究は独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センターで 2005 年 8 月から 2013 年 3 月にかけて行った。本研究を行うに当たり、中央農業総合研究センター仲川晃生上席研究員(現農業・食品産業技術総合研究機構本部)、同加藤雅康上席研究員、東京農工大学農学部教授夏目雅裕博士、九州沖縄農業研究センター川上顕主任研究員、北海道大学名誉教授内藤繁男博士、中央農業総合研究センター島田信二上席研究員には試験遂行に当たり有益な助言を頂いた。また、新潟県農業総合研究所黒田智久主任研究員、同前田征之主任研究員には土壌や植物サンプルを、試験期間を通じて提供して頂き、また試験遂行に当たり有益な助言・情報を頂いた。また、福島県農業総合センター二瓶直登主任研究員(現東京大学)、会津農林事務所穴澤拓未技師、福島県農業総合センター荒井義光科長、同齋藤隆研究員(現浜地域研究所)、同遠藤あかり主任研究員、会津農林事務所穴澤崇主査には現地圃場試験において多大なるご協力を頂いた。福島県会津美里町児島三雄氏には現地圃場をご提供頂いた。また食品総合研究所吉田充研究領域長、同前田郁子博士には黒根腐病菌の産生毒素解析での機器分析において多大なるご協力を頂いた。また、妻には本研究を遂行するに当たり、生活環境を整え、多くの助言を頂いた。

北海道大学農学部教授近藤則夫博士、同教授増田税博士、同講師秋野聖之博士には本稿のご校閲を賜り、貴重な助言を頂いた。

ここに記して、各位に衷心よりお礼申し上げます。

2013 年 12 月 越智 直

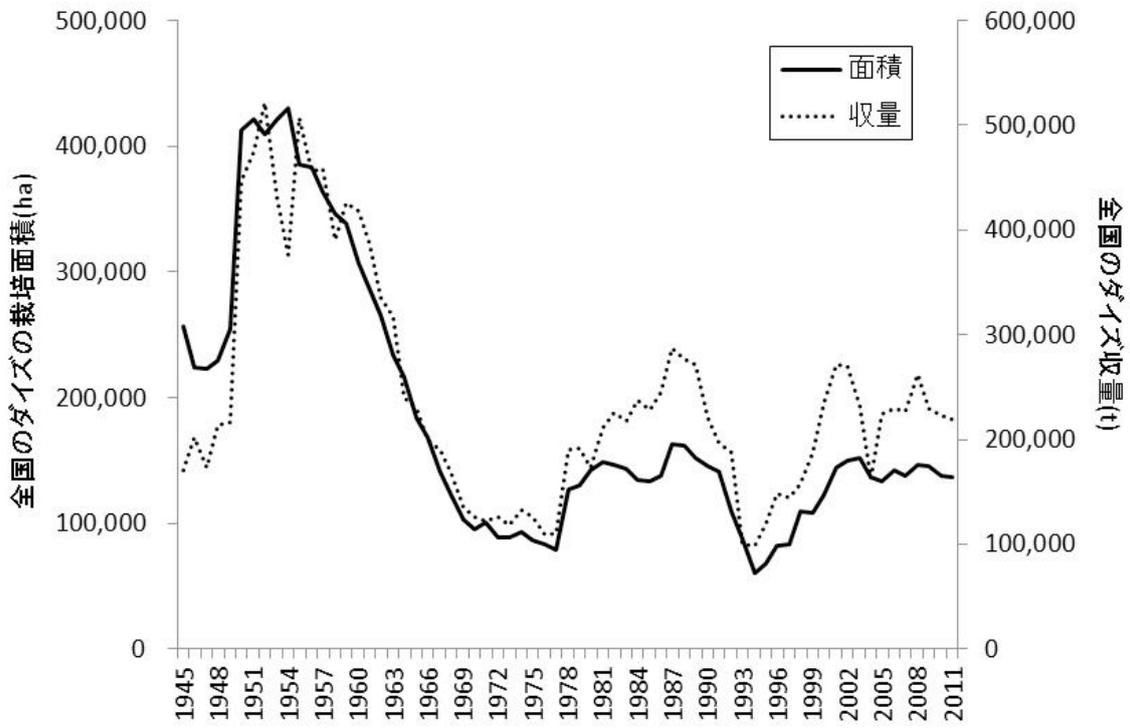


図 1-1. 全国のダイズ栽培面積と収量の推移

## 第2章 研究史

### I. ダイズ黒根腐病について

ダイズ黒根腐病は、1968年に千葉県で発生したのが世界で最初の報告である（御園生・深津 1969）。それを機に、黒根腐病への抵抗性のダイズ品種間差異や寄生性、病原菌の生理的性質、薬剤防除法などが検討されている（御園生・深津 1970, 御園生 1973）。その後、我が国でのダイズ黒根腐病に対する研究は一時中断する。そして、コメの生産調整が本格化し、転換畑が増加した1980年代に入ると研究が再開された。山形県ではダイズ黒根腐病を中心とした立枯性病害について、石灰窒素の施用効果や冬期湛水による防除の有効性を報告されている（今野ら 1984, 今野ら 1985）。西・高橋（1990a）や仲川・島田（1995）は本病の全国における発生実態を明らかにし、2002年現在では38道府県での発生が報告されている。また西ら（1985）は簡便な接種法を開発することで、黒根腐病菌がダイズのいかなるステージでも感染し得ること（西ら 1987）、トラクターなどを用いて伝染源である微小菌核が伝搬している可能性があること（西ら 1989a）、黒根腐病によるダイズの被害様式は、十分に生育できないまま、早期に熟することによる、莢数の減少及び子実の小粒化（西ら 1989b）、低土壌pHでの発生拡大（西ら 1999）や土壌水分が高い状態ほど被害は大きくなる（西ら 1999）、といった発生環境などのダイズ黒根腐病の発生生態を解析した。さらに西らは熱水土壌消毒（西ら 1990）や土壌燻蒸剤（西ら 1999）を用いた防除法を検討し、一定の効果を経験している。仲川・越智（2006）はダイズ黒根腐病に対する有効な薬剤をスクリーニングしているが、2013年10月現在、登録農薬は種子処理剤2剤のみである。ダイズ黒根腐病に対する抵抗性品種の選抜については積極的に試験されている（御園生 1973, 田中ら 1981, 東海林ら 1984, 重盛 1987, 角田ら 1988, 仲川ら 1990, 中島ら 1994）。しかし、各研究者間で試験方法が異なるためか、研究者によって品種の評価が一致しておらず、いまだに黒根腐病に対する抵抗性品種は確立さ

れていない。一方で近年、ダイズ黒根腐病の被害が各地で増加している。黒田ら（2010, 2012）は新潟県において調査した圃場のほとんどすべてで黒根腐病が発生しており、転換初年、連作に関係なく発生しているとしている。さらに2年間イネを作付すると黒根腐病は激減する、とされている（西ら 1994）が、現状では3年以上イネを作付した圃場でさえダイズ黒根腐病が激発する例が見られている。また荒井ら（2010）は福島県において調査した圃場すべてで黒根腐病の発生が観察された、としている。

アメリカにおいては1972年にダイズ黒根腐病の発生が報告され（Rowe et al. 1973）、本病の発生生態や被害解析、土壌からの黒根腐病菌の検出法を開発することによる黒根腐病菌の動態調査（Krigsvold, and Griffin 1975, Phipps et al. 1976, Griffin et al. 1977, Phipps and Beute 1979）、品種の抵抗性（Hedrik and Southards 1976）、防除法が検討されている（Berner et al. 1988, Berner et al. 1991）。また、サツマイモネコブセンチュウに感染したダイズ個体では黒根腐病の程度が甚大化することを報告している（Fortnum and Lewis 1983）。

## II. ダイズ黒根腐病の病徴

ダイズはいかなる生育ステージにおいても黒根腐病菌に対して感受性を示すが、被害は早期に感染した株ほど大きくなる（荒井ら 2011）。感染が生育初期であっても典型的な病徴は開花期以降に現れる。罹病個体は8月中旬ころから葉に退緑えそ斑（図 2-1）を生じ、早期に葉が黄化する。一方、地下部では感染した黒根腐病菌が根の組織を侵し（図 2-2）、被害の大きな個体では側根が崩壊し、「ゴボウ根」状となる。また地際部には黒根腐病菌の赤色の子のう殻を形成する場合があります。本病の診断の目安となる。黒根腐病菌は罹病ダイズの根に微小菌核を形成し、これが越冬して翌年の一次伝染源となる（Rowe et al. 1974）。

黒根腐病は病徴が現れるのが開花期以降で、地上部から見た病変としては早期の葉の黄化、枯れ上がりであり、また、被害の大きな「ゴ

ポウ根」のような個体でも株自体が枯死せず収穫に至ることが多いため、発生の気づかれにくい病害であるといえる。そのため、水田転換畑で頻発する「湿害」の一つとまとめられ、病害という認識を持たれにくい傾向がある。

黒根腐病による被害は主に莢数の減少による子実量の減少、さらに成熟期が早まるため、子実が十分に太らないことによる粒径および粒重の減少による品質の低下が挙げられる(西ら 1999, 荒井ら 2010)。被害程度別(図 2-3)にダイズの収量を調査したところ、程度 1 では収量への影響は大きくならない場合が多いが、程度 2 以上では収量への影響が著しく、程度 4 では収穫可能な子実が着いていない場合がほとんどである(荒井ら 2010)。(参考:被害程度 1;側根がわずかに褐変し腐朽している, 2;側根の腐朽が著しい, 3;側根がほとんど残っていない, 4;側根が崩壊し主根の腐朽が著しい)

### Ⅲ. ダイズ黒根腐病菌 *Calonectria ilicicola* について

ダイズ黒根腐病の病原菌 *Calonectria ilicicola* Boedijn et Reitsma (不完全世代: *Cylindrocladium parasiticum*) は 1950 年にスリランカにおいてクロタラリアの一種 *Crotalaria anagyroides* L. に根腐れ症状を引き起こす糸状菌として報告された(Loos 1950)。本菌が植物病原菌として重要視されるようになったのは、アメリカにおいてラッカセイ黒根腐病の病原菌として報告(Bell and Sobers 1966)されてからである。

本菌は従来 *Calonectria crotalariae* と表記されてきたが 1993 年に Crous et al. によって *Cylindrocladium ilicicola* の完全世代として記載されていた *Calonectria ilicicola* と *Calonectria crotalariae* と同一であることが指摘され、先に記載されていた *Calonectria ilicicola* が学名として使用されるようになった。

ダイズ以外の宿主として、我が国において自然発病が観察されている寄主植物はラッカセイ(御園生 1973)、ツルマメ(西・佐藤 1994a) アルファルファ(西・佐藤 1994b) ケンチャヤシ(Hirooka et al. 2008)

が報告されている。日本以外ではアメリカ合衆国ではダイズ以上にラッカセイの重要病害として認識されており，他ではブルーベリー (Milholland 1974)，キウイフルーツ (Krausz and Coldwell 1987) など 7 科 15 種の植物に自然発病が知られている。他の *Calonectria* 属菌と同様に，南国木本植物の苗木での報告が多いのが特徴であり，ほとんどの報告が根および地際部での被害であるが，Hirooka ら (2008) によるケンチャヤシ褐斑病のように，地上部での病害も報告されている。

#### IV. ダイズ黒根腐病菌の産生毒素について

黒根腐病はダイズ根を崩壊させ，同時に葉にもえそ斑を生じる。黒根腐病菌は葉からは分離されないため，菌の二次代謝産物が毒性を持つ可能性が示唆されており，また，過去に黒根腐病菌の培養ろ液をダイズ葉柄に吸わせることで葉の病徴を再現し，本病の病徴発現に毒素が関わっている可能性が報告されている (Kim et al. 2001)。さらに同じ菌が引き起こすラッカセイ黒根病においても同様に毒素の影響が指摘されており，菌の侵入前に胚軸 (Johnston and Beute 1975) および主根 (Harris and Beute 1982) にえそを起こすことが報告されている。また本病と類似した症状を示す *Fusarium solani* f.sp. *glycines* によるダイズ急性枯死症では培養ろ液を精製して得たタンパク質がダイズカルスを褐変させ，さらに胚軸および葉にえそを生じることから，本病害にペプチド性の毒素が関与している可能性があることを報告している (Jin et al. 1996)。

#### V. ダイズ黒根腐病に対する防除の取り組み

ダイズ黒根腐病に対する登録農薬は 2013 年 3 月現在で 2012 年 11 月に登録された種子処理剤 1 剤のみである。そのため，防除に関しては耕種的防除法，物理的防除法そして生物的防除法を中心として取り組みが行われてきた。

今野 (1982) は黒根腐病を中心としたダイズの連作障害に対して石

灰窒素が有効であることを報告した。ダイズ連作地で、冬期湛水により黒根腐病を中心とした立枯性病害の発生率が少なくなる傾向が認められ、連年湛水区ではその効果が顕著であると報告されている（今野ら 1984）。また、高畦栽培や晩播も黒根腐病防除に有効であることが報告されている（角田ら 1988）。西ら（1994）は、田畑輪換により黒根腐病の発生は抑制され、さらに水稻を 2 年以上作付けすることにより次年度の黒根腐病の発生が劇的に低下すると報告している。

西ら（1990）は物理的防除法として熱水土壤消毒を試み、ダイズ黒根腐病の発病度が著しく低下すること、また、収量も増加することを報告した。

黒根腐病に対して有効な薬剤のスクリーニングは試みられてきた。西ら（1999）は土壤燻蒸剤のクロルピクリン剤、D-D 剤の黒根腐病に対する防除効果を試験し、熱水土壤消毒より効果は劣るが、防除効果はあり、その効果はクロルピクリン剤 > D-D 剤であった、と報告している。仲川・越智（2006）は黒根腐病に対する有効な薬剤の選抜を行い、土壤燻蒸剤ではダゾメット粉粒剤が、また水和剤ではキャプタン剤、テブコナゾール剤およびクレソキシムメチル剤などで高い黒根腐病防除効果が認められている。



図 2-1. ダイズ黒根腐病による葉の退緑壊疽



図 2-2. ダイズ黒根腐病による根の病徴



図 2-3. ダイズ黒根腐病の発病程度の指標. 0; 健全, 1; 側根がわずかに褐変し腐朽している, 2; 側根の腐朽が著しい, 3; 側根がほとんど残っていない, 4; 側根が崩壊し主根の腐朽が著しい

## 第 3 章 ダイズ黒根腐病の発生生態

ダイズ黒根腐病の発生生態については、1980年から1990年にかけて精力的に研究がなされてきた。しかし、いまだ不明な点が多く、本病の解決の糸口は明らかにされていない。

### I. ダイズ黒根腐病の発生実態調査

2013年3月現在、ダイズ黒根腐病は38道府県での発生が確認されている（西ら 1999, 相馬・武田 2002）。しかし、発生は知られていても実際の発生実態調査はほとんど行われていないのが現状である。そこで、黒根腐病の被害が大きいとされている、新潟県、福島県において2009年、2010年（福島県のみ）に県内のダイズ黒根腐病の実態調査を行った。

#### 方法

##### 新潟県（2009年）

2009年10月28日および29日に、新潟県内のダイズ採種圃場を中心に黒根腐病の調査を行った。調査は上越から下越まで県内全域の23圃場で行った。手法は1圃場あたり3か所、それぞれ50株以上のダイズを抜き取り、根の発病程度を基準に発病度を算出した。発病度の計算式は以下のとおりである。

発病程度、0：無発病，1：根部あるいは地際部に褐変が認められる，2：褐変が主根または地際部全体を取り巻くほどに発達している，3：主根が腐朽し，根量も少ない，4：枯死。

$$\text{発病度} = 100 \times (\sum \text{発病指数} \times \text{程度別発病本数}) / (4 \times \text{調査本数})$$

##### 福島県（2009年）

2009年11月8日から10日に、福島県の県農業総合センター発生予察課のダイズ定点調査圃場20地点における黒根腐病の調査を行った。調査地点は浜通り地域から会津地域にまたがっている。調査の手法は

上記のとおりである。

#### 福島県（2010年）

2010年10月25日から26日に、福島県内のダイズ圃場における黒根腐病の調査を行った。調査は浜通り地域から会津地域にわたる県内全域の35か所で行った。調査の手法は上記のとおりである。

#### 結果

#### 新潟県（2009年）

県内23圃場の平均発病度は53.2と、県内全体で黒根腐病が蔓延していることが明らかになった。発病が確認されなかった圃場は1圃場のみであった。発病度の差異に地域性はなかった。発病度50を超えるような甚発生圃場は14圃場であった（図3-1-1）。また、前年まで3年連続で水稻を作付けしていた圃場でも発病度70を超える圃場もあった。

#### 福島県（2009年）

県内20圃場での平均発病度は27.2であった。発病は調査したすべての圃場で確認され、発病度50を超える甚発生圃場が4か所あった（図3-1-2）。なお、会津や中通りと比較して、浜通りでの発病度はやや低かった。

#### 福島県（2010年）

県内35圃場での平均発病度は19.8と2009年に比べると軽微であった。発病が確認された圃場は28か所で、発病度50を超える圃場が5か所あり、そのうち転作初年度の圃場が2か所であった（図3-1-3）。また、作付年数と発病度には関連は見られなかった（図3-1-4）。

#### 考察

2009年、2010年と新潟県および福島県において黒根腐病の発生実

態調査を行った。その結果、両県とも県内全域で黒根腐病は多発していることが明らかになった。中でも 2009 年の新潟県では県の平均発病度が 50 を超え、著しい被害をもたらしていることが明らかになった。黒根腐病に感染すると、発病程度 2 で 1 割から 5 割程度の減収が見られる（荒井ら 2010）ことから、新潟県では黒根腐病により 3 割程度の減収が起こっているのではないかと考えられる。

西ら（1994）は、田畑輪換により黒根腐病の発生は抑制され、さらに水稻を 2 年以上作付けすることにより次年度の黒根腐病の発生が劇的に低下すると報告している。しかし、今回の調査からは、3 年以上水稻作をした次年度でも黒根腐病は多発し、また、発病度は連作年とは関連性がないことが示唆された。このことは転換政策開始以後、ダイズ作付回数が増加することで、黒根腐病菌が蓄積し、簡単には菌量が減らなくなっていることを示している可能性がある。さらなる調査が必要と思われる。

以上のことから、黒根腐病の被害が大きいとされる新潟県、福島県では県内全域で黒根腐病が蔓延しており、甚大な被害をもたらしていることが明らかになった。一方で、九州地方や四国地方、三重県などでは現地調査を行ってもほとんど黒根腐病が確認されない地域もある（未公表）。このような違いは何が原因かは不明であるが、この違いを解明することは、黒根腐病の有効な対策技術につながると考えられる。今後も引き続き、現地の発生実態調査を続けていく必要があると考えられる。

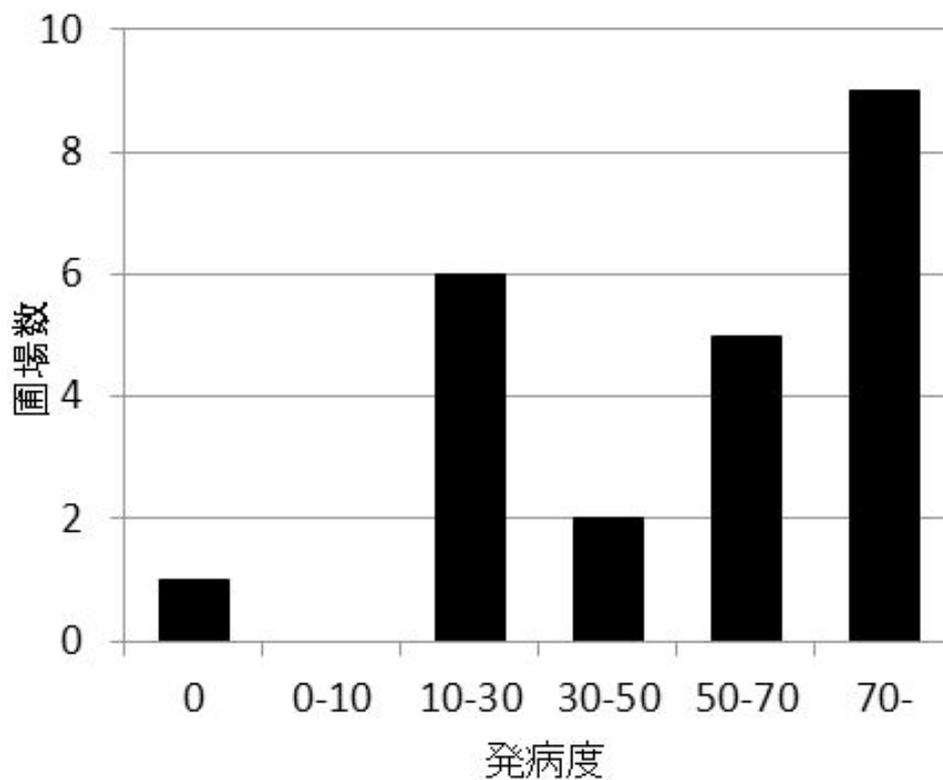


図 3-1-1. 2009 年新潟県での調査圃場の発病度の分布.  
調査圃場数は 23.

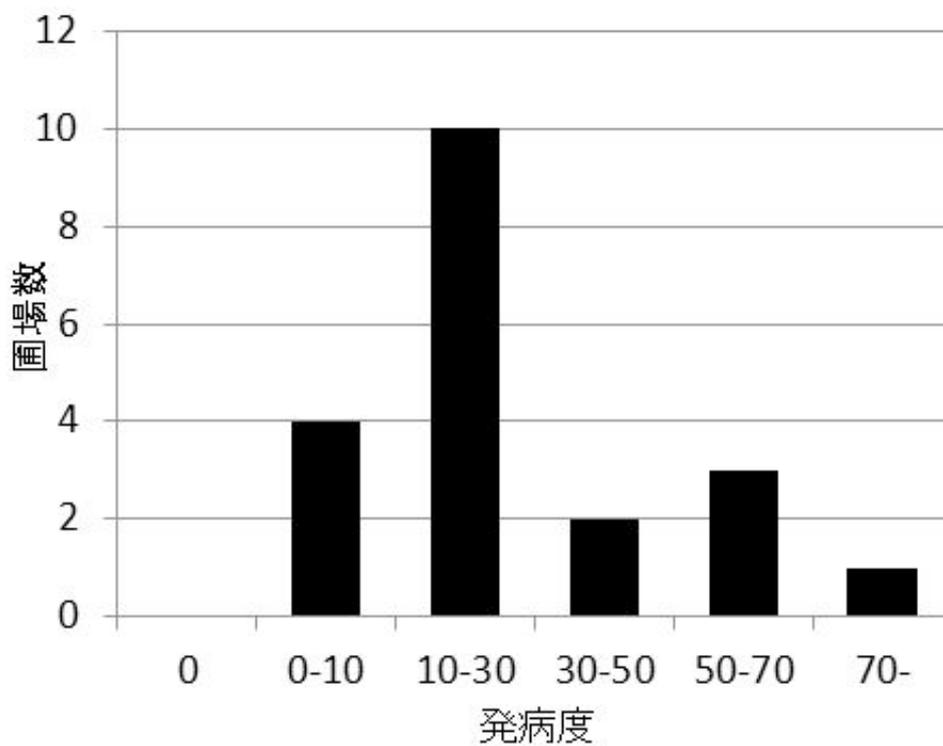


図 3-1-2. 2009 年福島県での調査圃場の発病度の分布.  
調査圃場数は 20.

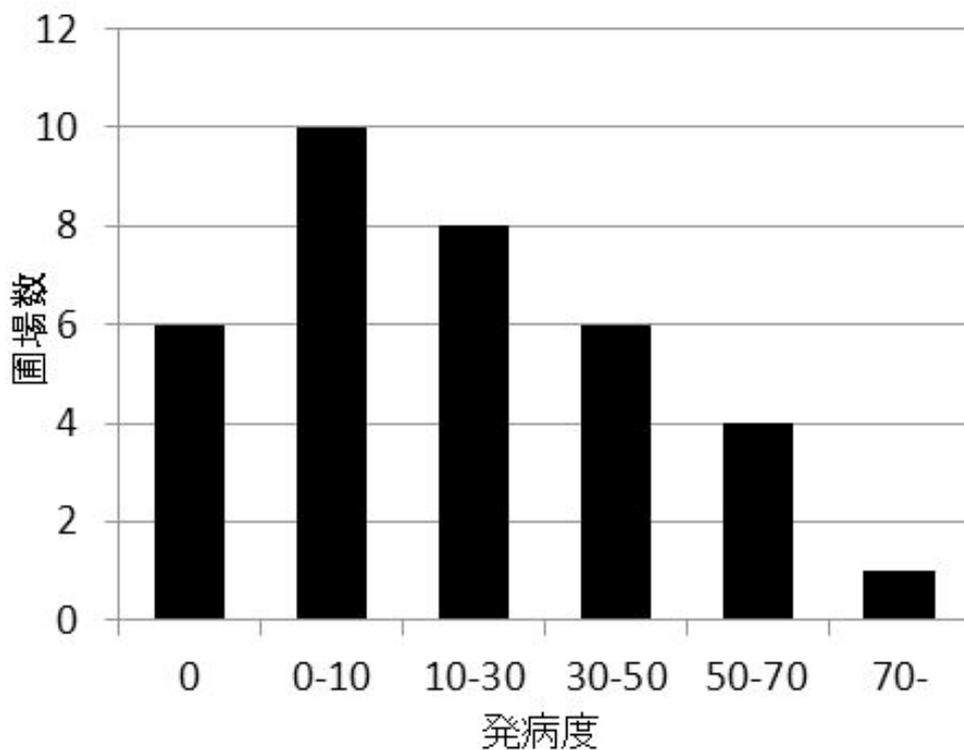


図 3-1-3. 2010 年福島県での調査圃場の発病度の分布.  
調査圃場数は 35.

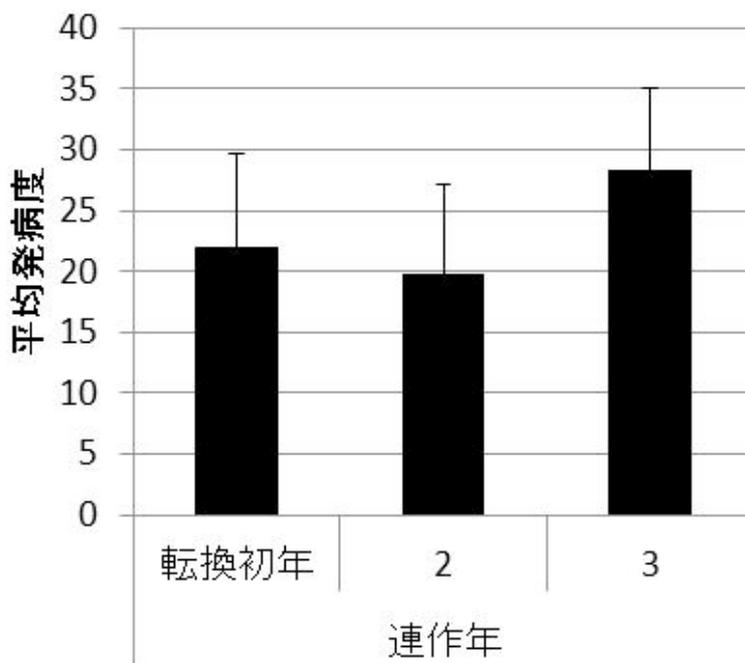


図 3-1-4. 2010 年福島県における発病実態調査での連作年数と発病度の関係. なお, 平均発病度は, 転換初年は 11 圃場, 2 年連作は 9 圃場, 3 年連作は 10 圃場の発病度の平均値. エラーバーは標準偏差を示す.

## II. ダイズ黒根腐病菌の低温長期保存法の開発

ダイズ黒根腐病研究は 1990 年代まで盛んであったが、その後途絶えており、過去に試験に使用された菌株は死滅しているか適切に保存されておらず、継続的な研究に支障をきたしている。

現在、試験用菌株は斜面培地での継代培養により菌株を保存しているが、継代を繰り返すことにより菌の生理的性質には変異が生じやすく、また、継代を怠り死滅させる可能性も非常に高い。さらに長期保存を目的に斜面培地において 5°C で保存すると、一年程度で多くの菌株が死滅することがわかっている（西ら 1990b）。

内藤ら(1993)は培養大麦粒を用いることで *Rhizoctonia* 属菌 -20°C で 10 年以上保存できることを明らかにしている。この手法による菌株の生理的な変異はなく、さらにそのまま病原力試験に用いることが可能としている。そこで本研究では、黒根腐病菌の培養大麦粒を用いた低温長期保存法の開発を目的とした。また併せて培養大麦粒の病原力試験への適用も調査した。

### 方法

#### 黒根腐病菌の培養大麦粒の作成とその安定性

供試菌株として MAFF102001, MAFF102002, MAFF102004, NI2-2-1, NI2-7-3, NI3-4-1, UH2-3 および UH3-5 の 8 菌株を用いた（表 3-2-1）。培養大麦粒による菌の保存方法は Gaskill (1968) および内藤ら (1993) の方法を改変して行った。すなわち 50ml のフラスコに大麦粒 10g と蒸留水 10ml を加え、綿栓をし、121°C 20 分間オートクレーブした。その後、PDA 培地で生育させた菌株の含菌寒天片を大麦粒培地に移植し、25°C で 1 ヶ月間培養した。その際、気中菌糸により大麦粒が塊状にならないように、大麦粒に菌糸が蔓延するたびに適宜フラスコを振り、塊状になるのを避けた。培養後、大麦粒を 9cm シャーレに広げ、30°C に設定した乾燥機で 24 時間乾燥させた。乾燥させた大麦粒をビニール袋に入れ、4°C の冷蔵庫、-20°C 及び -80°C の冷凍庫に入れ保存した。保存開始 1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、12

ヶ月後，24 カ月後，36 ヶ月後にそれぞれの温度で保存していた培養大麦粒を乳酸加用素寒天培地に 15 粒ずつ置床し，25℃で 5 日間培養し，黒根腐病菌の生存を確認した．

#### 培養大麦粒保存菌株の生育と病原力の確認

培養大麦粒保存が黒根腐病菌の菌糸生育に支障がないか調査するために，3 年間培養大麦粒で保存した菌株および斜面培地で 3 年間保存した菌株（1 回継代）の菌糸生育を比較した．大麦保存菌株は乳酸加用 PDA（Difco）で大麦から再分離したのち，PDA に植菌し，7 日後の菌糸生育を計測した．斜面培地保存菌株は同様に乳酸加用 PDA で再分離したのち，PDA に植菌し，7 日後の菌糸生育を計測した．

また，保存中に菌株の病原力が失われる可能性があるので，保存開始前菌株，-80℃で培養大麦保存 3 年菌株および斜面培地 3 年保存菌株（1 回継代）の病原力を比較した．それぞれ PDA で再分離した菌株を，バーミキュライト，ふすま，蒸留水を重量比 1:1:3 で混合し，オートクレーブ滅菌したバーミキュライトふすま培地に接種し，1 ヶ月間 25℃で培養し，接種源を作成した．滅菌した園芸培土に 1%重量のそれぞれ接種源を混和し，9cm ポットにつめ，ダイズ品種タチナガハをポットあたり 3 粒播種した．試験は 25℃に設定された温室で 1 菌株当たり 3 反復行った．コントロールには培養していないバーミキュライトふすま培地を 1%重量混和し，タチナガハを播種した．発病調査は播種 3 週間後に行い，幼苗の発病程度を前述の 0～4 の 5 段階のスケールで評価した．

#### 培養大麦粒の接種源としての可能性

3 年間-80℃で保存した NI2-2-1 菌株の培養大麦粒を接種源として用いた．対照には 3 年間斜面培地で保存した NI2-2-1 菌株（一回継代）をバーミキュライトふすま培地に接種し，25℃で 1 ヶ月間培養したものを接種源として用いた．ともに接種源が 1%，0.5%および 0.1%重量となるように滅菌園芸培土に混和接種し，それぞれ 3 ポットにつめ，

ダイズ品種タチナガハをポットあたり 3 粒播種した。試験は 25℃に設定された温室で 3 反復行った。発病調査は播種 3 週間後に行い、幼苗の発病程度を 0~4 の 5 段階で評価した。0, 健全；1, 根の褐変；2, いくつかの側根の亡失；3, 多くの側根の亡失；4, 立枯れ。

## 結果

### 黒根腐病菌の培養大麦粒の作成とその安定性

-80℃で保存していた培養大麦粒では 3 年後においてもほぼすべての菌株で 100%再分離され、生存が確認された（表 3-2-2）。また 4℃に保存していた培養大麦粒は保存日数がたつごとに生存率が低下し、24 ヶ月後には多くの菌株で死滅することが明らかになった。-20℃に保存していた培養大麦粒では、多くの菌株が 100%生存していたが、24 ヶ月後から生存率が下がってくることを明らかになった。これらのことから、培養大麦粒を-80℃で保存することが黒根腐病菌を長期保存に有効であることが確認された。

### 培養大麦粒保存菌株の生育と病原力の確認

培養大麦粒保存による菌糸生育には大きな差は見られなかった（図 3-2-1）。

大麦保存菌株の病原力は保存開始前菌株の病原力と同等であった。またスラント保存菌株については UH2-3 において保存開始前と比較して病原力が劣った。（図 3-2-2）。

### 培養大麦粒の接種源としての可能性

1%, 0.5%, 0.1%接種ともに培養大麦粒接種および定法接種において差はなかった（図 3-2-3）。

## 考察

ダイズ黒根腐病菌の培養大麦粒は-80℃に保存することで 3 年以上の長期にわたり保存が可能であることが明らかになった。一方で 4℃

では 24 か月間保存することで、ほとんどの菌株は死滅した。このことは西・高橋（1990b）の結果と一致している。-20℃保存では保存開始 24 か月後に生存の低下が見られた。

-80℃で 3 年間保存した菌株の菌糸生育、病原力は維持されており、本手法が菌株の生理的特性に影響を及ぼさないことが明らかになった。また、本研究で用いていない他の多くの菌株においても同様の手法で保存しているが、ほとんどの菌株において生存している。そのため、本手法が黒根腐病菌の長期保存に適していると考えられる。

また培養大麦粒の病原力試験への適用について、定法接種と比較して差がなかったため、培養大麦粒は直接、病原力試験へ用いることが可能であることが示唆された。このことは *Rhizoctonia* 属菌における培養大麦粒の保存と同様で、ひとたび大量に培養し保存しておけば、いつでも使用可能であるので、接種試験における準備時間の大幅な短縮となる。

現在までダイズ黒根腐病菌の長期的に安定した保存法がなかったため、古く重要な菌株はほとんど残っていない。本研究で開発した培養大麦粒を用いた低温長期保存法は黒根腐病菌の長期的な個体群解析や、疫学的な研究を促進させるものと期待される。

表 3-2-1. 培養大麦粒保存試験で用いた菌株

菌株名	分離源	分離地
MAFF102001	ダイズ	岩手
MAFF102002	ダイズ	岩手
MAFF102004	ダイズ	群馬
NI2-2-1	ダイズ	熊本県合志市
NI2-7-3	ダイズ	熊本県合志市
NI3-4-1	ダイズ	熊本県合志市
UH2-3	ダイズ	兵庫県篠山市
UH3-5	ダイズ	兵庫県篠山市

表 3-2-2. 異なる温度で 1~36 か月保存した培養大麦粒中の黒根腐病菌の生存率

保存温度	菌株名	生存率 (%)					
		1か月後	3か月後	6か月後	12か月後	24か月後	36か月後
4°C	MAFF102001	100	93.3	86.7	66.7	26.7	0
	MAFF102002	100	100	80.0	66.7	6.7	0
	MAFF102004	86.7	93.3	93.3	93.3	66.7	0
	NI2-2-1	100	100	100	60.0	0	0
	NI2-7-3	86.7	93.3	86.7	40.0	0	0
	NI3-4-1	100	100	93.3	100	0	0
	UH2-3	93.3	86.7	100	26.7	0	0
	UH3-5	73.3	100	53.3	26.7	0	0
-20°C	MAFF102001	100	100	100	100	100	93.3
	MAFF102002	100	100	100	100	100	60.0
	MAFF102004	100	100	100	100	100	73.3
	NI2-2-1	100	100	100	100	100	100
	NI2-7-3	100	100	100	100	66.7	60.0
	NI3-4-1	100	100	93.3	100	100	100
	UH2-3	100	100	100	100	40.0	53.3
	UH3-5	100	100	100	100	40.0	40.0
-80°C	MAFF102001	100	100	100	100	100	100
	MAFF102002	100	100	100	100	100	100
	MAFF102004	100	100	100	100	100	100
	NI2-2-1	100	100	100	100	100	100
	NI2-7-3	100	100	100	100	100	100
	NI3-4-1	100	100	100	100	100	100
	UH2-3	100	93.3	100	100	100	100
	UH3-5	100	100	100	100	100	100

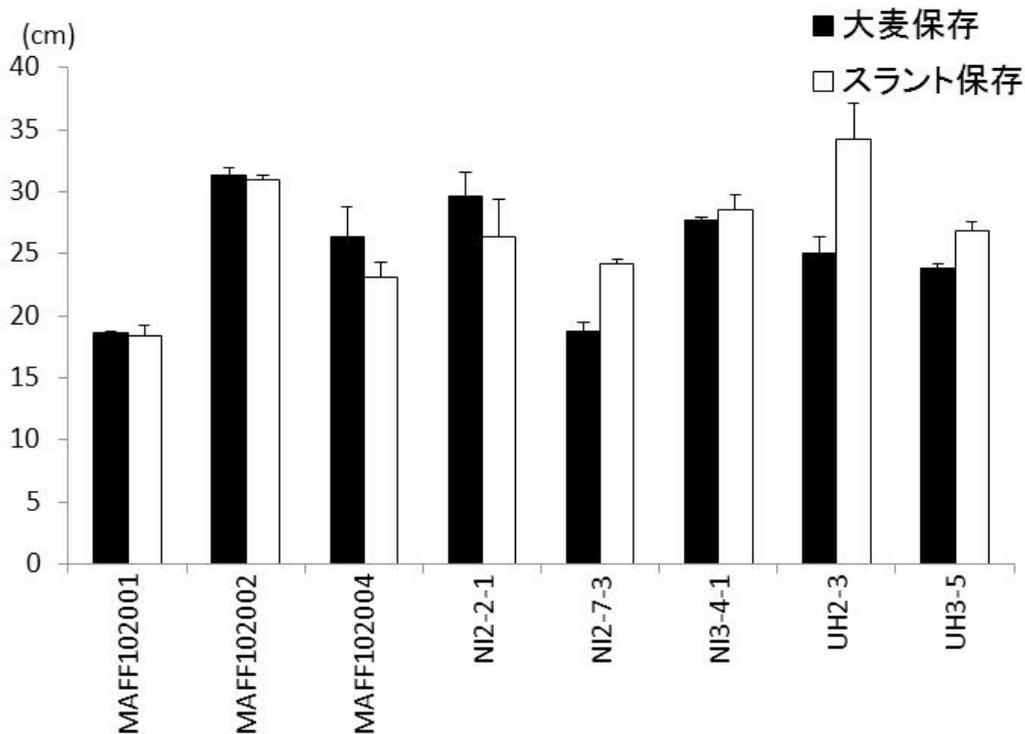


図 3-2-1. 培養大麦粒で 3 年間保存した菌株とスラントで 3 年間保存した菌株の菌糸生育の差異. エラーバーは標準偏差を示

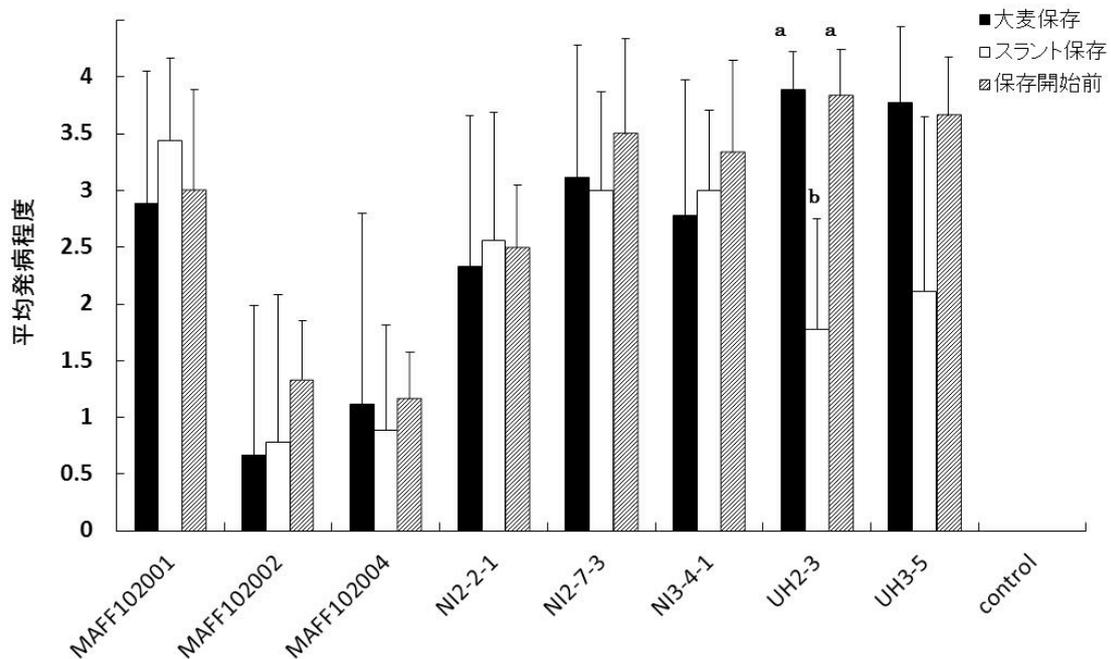


図 3-2-2. 培養大麦粒で 3 年間保存した菌株, スラントで 3 年間保存した菌株と保存開始前の菌株の病原力の差異. エラーバーは標準偏差を示す. 異なる文字は Welch の  $t$  検定 ( $P < 0.01$ ) で有意な差があったことを示す.

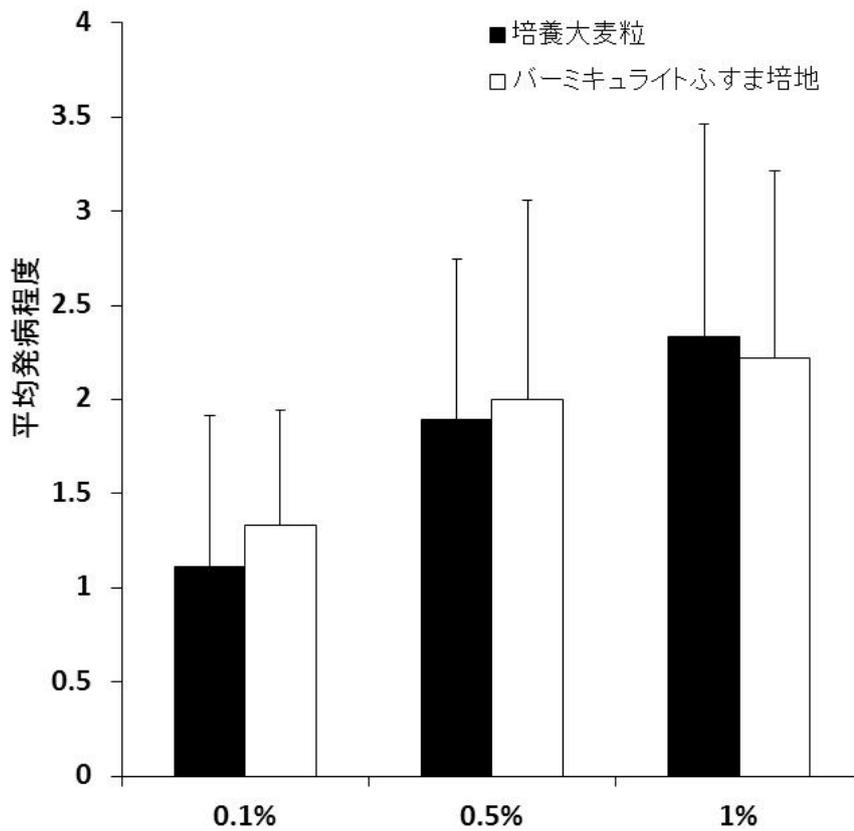


図 3-2-3. 3 年間保存した培養大麦粒の接種源としての病原力と 3 年間スラントで保存した菌株から作成したバーミキュライトふすま培地接種源の病原力の差異. エラーバーは標準偏差を示す.

### Ⅲ. 土壌中におけるダイズ黒根腐病菌の特異的検出法の開発

土壌病害において自然土壌中の目的の病原菌数を計測することは病害のリスクを予測する上で重要である。

既に *C. ilicicola* の土壌からの特異的検出法は報告されている (Krigsvold and Griffin 1975, Phipps et al. 1976, Griffin 1977)。しかし、検出効率が不十分で、また他の菌との識別が困難であり、検出培地に用いる試薬が入手困難であるなど問題点が多い。

そこで本研究では黒根腐病菌 *C. ilicicola* の自然土壌中からの特異的検出法を新たに開発することとした。

#### 方法

##### 検出培地の開発

新規検出培地として YLS 培地を開発した。組成は以下のとおりである。培地 1L あたり、L-ソルボース 20g, イーストエキストラクト 4g, フルトラニル 12.5mg, チアベンダゾール 1.5mg, クロルテトラサイクリン塩酸塩 40mg, クロラムフェニコール 10mg, ターゲットール typeNP-7 (Sigma-Aldrich) および寒天 20g である。本培地では *C. ilicicola* が識別の指標となるオレンジ色の微小菌核を多量に形成する。予備試験における検出培地に適する炭素基質のスクリーニングより、L-ソルボース添加により *C. ilicicola* 以外の雑菌の生育が遅くなり、なおかつ *C. ilicicola* の生育が優れていることが認められ、また L-ソルボースは接合菌類の生育を抑制する (Awuah and Lorbeer 1986) とされることから、炭素基質として L-ソルボースを選択した。イーストエキストラクトの添加により *C. ilicicola* の微小菌核の形成数が増加する。フルトラニルは担子菌類の生育を阻害する。チアベンダゾールは過去の報告でも使用されており、フザリウム属菌やトリコデルマ属菌など雑菌の生育を抑制する (Krigsvold and Griffin 1975, Phipps et al. 1976, Griffin 1977) とともに、*C. ilicicola* の生育も若干抑制する。クロルテトラサイクリン塩酸塩およびクロラムフェニコールは細菌の生育阻害目的で添加した。ターゲットールは菌糸の生育を抑制し、

コロニー化しやすくさせるとともに、表面張力が小さくなるため、培地を薄く延ばしやすくなる。

#### 土壌処理法の検討

土壌処理法の検討で用いた土壌は、ダイズ黒根腐病の発生している新潟県の現地圃場 3 か所からサンプリングした。圃場内のランダムに選んだ 5 か所の 0~15cm の深さから土壌を採取し、これらを混合しサンプルとした。それぞれ土壌サンプル 5g を 300ml のフラスコに入れ、100ml の滅菌蒸留水を添加し、200rpm で 20 分間振とうし、蒸留水中に土壌を拡散させた。予備試験において、本病原菌は土壌中における密度が低く、希釈平板法では検出不可能であったため、Krigsvold and Griffin (1975) や Phipps et al. (1976), Griffin (1977) と同様に土壌を適切なふるいを通して、土壌中における菌密度を相対的に増加させることにした。黒根腐病菌の微小菌核を回収するために最もよい篩を調査するために、目開き 0.71mm, 0.425mm, 0.25mm, 0.1mm, 0.038mm および 0.02mm のふるいを重ねて用いた。この調査は 3 反復行った。流水でふるった後、ふるい上に残った土壌を有効塩濃度 0.25% の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 30 秒間表面殺菌した。この土壌を滅菌水でよく洗い、回収し、滅菌水を用いて 50ml にメスアップした。このうち 400 $\mu$ l を 10 枚の 9cm シャーレそれぞれに分注し、その上から約 50°C に冷やした検出培地を注いだ。固化した後、シャーレを 25°C で 8 日間培養し、生育した菌叢を確認した。

#### 過去の検出方法との比較

今回開発した検出方法と過去に開発された Krigsvold and Griffin (1975) や Phipps et al. (1976) の検出方法の黒根腐病菌の検出効率を比較検討した。他にも報告されていた手法はあったが、使用している試薬が入手困難であったため、今回はこの 2 つの方法と比較した。新しい手法と比較して、過去の手法は用いるふるいのサイズ、表面殺菌の時間および選択培地の構成が異なっていた。Krigsvold and

Griffin(1975)の手法では 0.15mm および 0.044mm のふるいを用い、表面殺菌は有効塩濃度 0.25%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 30 秒間処理である。Phipps et al. (1976) の手法は 0.425mm および 0.038mm のふるいを用い、表面殺菌は有効塩濃度 0.25%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 1 分間処理である。

比較に用いた土壌サンプルは、3 種類の自然発病農家圃場土およびネガティブコントロールとして黒根腐病の発生していない農家圃場土 1 種類である。菌の検出にそれぞれの土壌 5g を用い、黒根腐病菌の乾土 1g 当たりの菌量を計算した。これらの処理は 3 反復行った。

#### 定量の正確性

開発した手法の黒根腐病菌の定量性を確認するために、人工汚染土壌を用いた。PDA で黒根腐病菌を 2 週間培養し、適量の滅菌水とともにホモジナイザーで攪拌した。懸濁液を 0.25mm および 0.038mm のふるいに通し、0.038mm 上の残渣を流水でよく洗い、回収し、滅菌水で 50ml にメスアップし、微小菌核液を調整した。その後、微小菌核液 1ml, 500 $\mu$ l, 200 $\mu$ l および 50 $\mu$ l を黒根腐病菌に汚染されていない 5g の土壌と混和し、人工汚染土壌とした。この土壌を用いて、開発した手法と Krigsvold and Griffin (1975) および Phipps et al. (1976) が開発した手法の黒根腐病菌の回収効率を比較した。この試験は 1 処理につき 10 枚のシャーレを用いてそれぞれ 3 反復行った。

微小菌核液における生存微小菌核数は、YLS 培地上に微小菌核液 50 $\mu$ l, 20 $\mu$ l および 10 $\mu$ l を広げ、菌糸が生育した数量を計測して決定した。この処理は 3 反復行った。

### 結果と考察

#### 土壌の処理法

Griffin ら (1978) は 0.103mm および 0.025mm のふるいを用いることで 90%の微小菌核を回収可能である、としている。用いたふるいの試験結果は表 3-3-1 に示した。それによると 0.25mm および

0.038mm のふるいを用いることで 90%以上の微小菌核を回収できることが明らかになった。

また、Papavizas (1972) は有効塩濃度 0.25%次亜塩素酸ナトリウム水溶液での表面殺菌は雑菌の生育を抑えるもっとも効率の良い方法であるとしている。一方、Griffin (1977) では次亜塩素酸ナトリウム水溶液での表面殺菌を省いた手法を開発しているため、次亜塩素酸ナトリウム水溶液での表面殺菌の有効性を確認したところ、今回開発した手法では次亜塩素酸ナトリウム水溶液での表面殺菌処理を省くと黒根腐病菌の判別が困難となったため、この処理は必要であると判断した (表 3-3-2)。

#### 過去の検出方法との比較

表 3-3-2 に結果を示した。新しく開発した手法は過去の 2 種類の手法と比較して黒根腐病菌の検出効率が高いことが明らかになった。YLS 培地上では、黒根腐病菌のコロニーは表面が白く円形をしており、裏面は濃いオレンジ色を呈した (図 3-3-1)。このオレンジ色の着色は微小菌核の形成によるもので、同定の指標となるものである。さらに、新しい手法ではおよそ培養 5 日後に着色による同定が可能であるが、Phipps et al. (1976) および Krigsvold and Griffin (1975) の手法では着色が遅いため、同定するためにはそれぞれ約 8 日間、約 10 日間かかる。さらに開発した手法では雑菌の生育が最も少ない結果となった。

#### 定量の正確性

結果は図 3-3-2 に示した。新しい手法で検出した黒根腐病菌数は土壌の微小菌核数に比例した ( $R^2 = 0.9926$ ,  $P < 0.01$ )。この結果は新しい手法は土壌中から定量的に黒根腐病菌を検出するのに有効であることを示している。しかしながら検出効率は 33.8%と低い値になった。この結果はプロトコール中で多くの微小菌核を損失していることを示唆している。大きな損失の原因は次亜塩素酸ナトリウム水溶液による表面殺菌によると考えられる。この処理は雑菌の生育を抑えるとともに

に、黒根腐病菌の微小菌核にも影響を与える。今回開発した手法は比較した 2 つの手法よりも微小菌核回収率が高い結果となった。Krigsvold and Griffin (1975) によると、微小菌核回収率は 58.0～81.1%であったとしているが、今回の結果では 20.7%であった。この回収率の差は使用した土壌が異なるため原因は不明である。今回の結果は新しい手法が土壌中から黒根腐病菌を検出するのに最も効果的であることを明らかにした。

今回新たに開発した黒根腐病菌の土壌中からの検出法は、過去の手法と比較して最も検出効率がよく、かつ、雑菌の生育が少ないことが明らかになった。さらに、黒根腐病菌のコロニーの識別が容易で、かつ、識別可能になるまでの生育時間が短い。したがって、本手法を用いることで、ダイズ栽培期間中の黒根腐病菌の土壌中における動態の解析や、環境要因が土壌中の菌密度へ与える影響を解析することが容易となった。さらに、本手法は黒根腐病の防除試験の効果の評価に用いることが可能である。今後はさらに手順および培地を改良し、選択性を高めていく必要があると思われる。

手法	乾土1gあたりの黒根腐病菌検出数				乾土1gあたりの雑菌数			
	圃場1	圃場2	圃場3	圃場4	圃場1	圃場2	圃場3	圃場4
新規検出法	174.2 <sup>a</sup> ± 49.3* (149.2 ± 22.5**)	34.5 <sup>a</sup> ± 1.4	189.4 <sup>a</sup> ± 8.5	0	23.1 <sup>a</sup> ± 7.6 (3903.1 ± 307.5**)	91.9 <sup>a</sup> ± 10.0	288.3 <sup>ab</sup> ± 14.1	32.4 <sup>a</sup> ± 4.8
Phippsら(1976)の手法	141.8 <sup>a</sup> ± 13.4	24.6 <sup>ab</sup> ± 4.9	108.8 <sup>b</sup> ± 12.7	0	70.9 <sup>a</sup> ± 6.7	116.5 <sup>a</sup> ± 24.2	450.8 <sup>a</sup> ± 52.3	80.2 <sup>b</sup> ± 4.8
KnigsvoldとGriffin(1975)の手法	154.0 <sup>a</sup> ± 18.3	11.1 <sup>b</sup> ± 1.2	73.9 <sup>b</sup> ± 13.7	0	302.2 <sup>b</sup> ± 45.7	299.0 <sup>b</sup> ± 28.3	148.4 <sup>b</sup> ± 28.4	8.9 <sup>c</sup> ± 3.3

異なる文字はTukey-Kramer test (圃場1の雑菌数の比較のみScheffe's F test) で手法間に有意な差(P < 0.05)があったことを示す  
\* 標準誤差を示す  
\*\* 0.25%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による表面殺菌処理を除いた土壌サンプル

表 3-3-1. ふるいの目のサイズごとのダイズ黒根腐病菌の微小菌核回収率.

ふるいの目のサイズ (mm)	微小菌核の回収率(%)			
	1*	2*	3*	平均
>0.710	0	0	7.5	2.5
0.710-0.425	6.0	0	1.2	2.4
0.425-0.250	0	4.0	1.2	1.7
0.250-0.100	29.4	15.9	23.8	23.0
0.100-0.038	64.6	76.1	66.3	69.0
0.038-0.020	0	4.0	0.0	1.3

\*土壌サンプルは自然発病圃場より採集. 試験は2反復で行った.

表 3-3-2. 自然発生圃場土を用いた新規検出法と過去の検出法との黒根腐病菌の検出効率の比較 (3 反復の平均値).

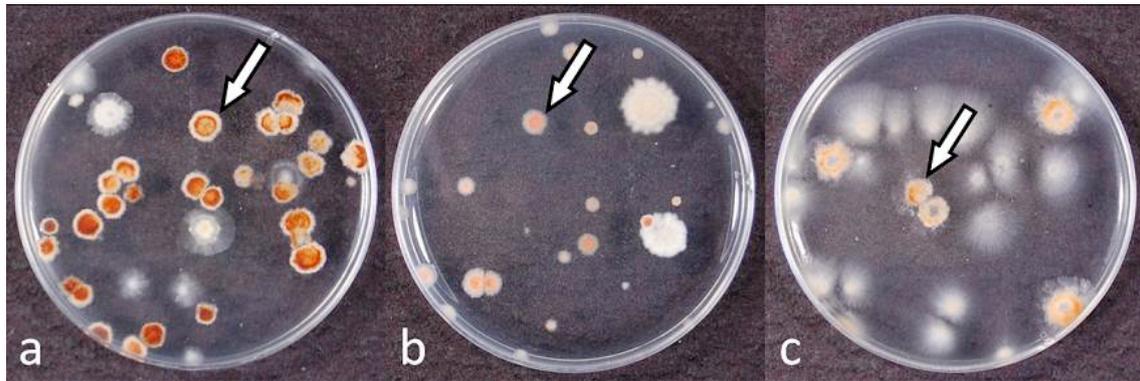


図 3-3-1. 培養 8 日目の検出培地上の黒根腐病菌のコロニー(矢印). a.新規検出法. b.Krigsvold と Griffin(1975)の手法. c.Phipps ら(1976)の手法

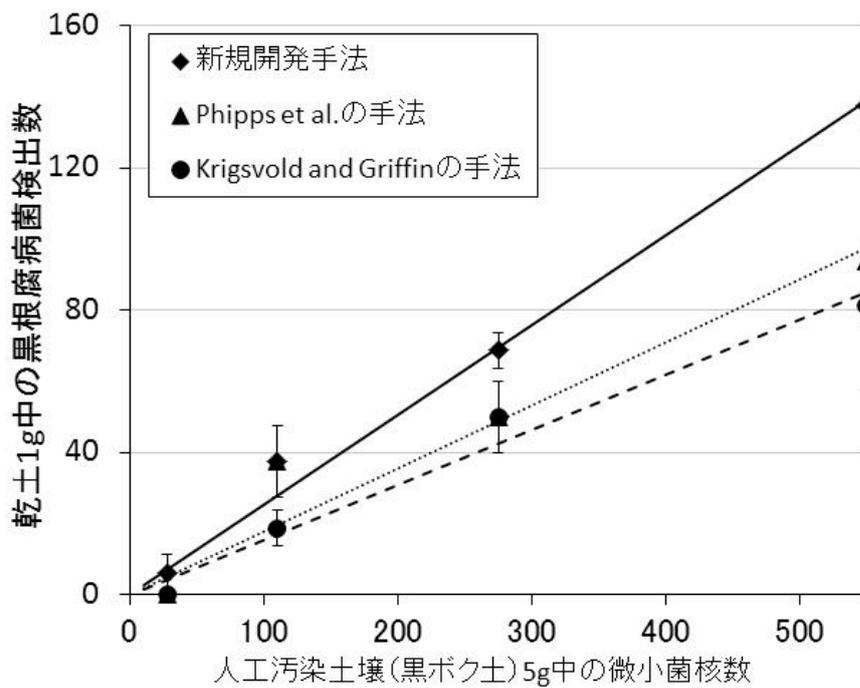


図 3-3-2. 過去の手法との検出効率の比較(黒ボク土での試験, 3 反復の平均値)

#### IV. 土壌中におけるダイズ黒根腐病菌の動態解析

現在までに栽培環境および栽培履歴などから黒根腐病の発生リスクを調査した報告はなく，どのような要因で黒根腐病が多発するかは明らかでない．そこで，作付体系の異なるダイズ栽培圃場土から黒根腐病菌数を経時的に調査した．

#### 方法

##### サンプル土壌の採集

2010年から2011年にかけて新潟県から由来の異なる5つのダイズ作付圃場から1年間にわたり土壌のサンプリングを行った．サンプリングの手法は，1つの圃場あたり5か所から土壌を採集し，それらを混合し，1つのサンプルとして用いた．それぞれの圃場の概略は表3-4-1に示した．サンプリングした日付はダイズ播種直後の6/11-17，7/8-9，8/13，9/6，収穫後の11/8，そして年をまたいで4/1の6回サンプリングを行った．

##### サンプル土壌中の黒根腐病菌の菌数計測

サンプル土壌から，上述のダイズ黒根腐病菌の特異的検出法を用いて菌数計測を行った．それぞれの土壌について3反復試験し，乾土1g当たりの黒根腐病菌の菌数を計測した．

##### 土壌の発病度

圃場土をそれぞれ9cmポットにつめ，ダイズ品種タチナガハを3粒播種し，25℃一定の温室で生育させた．2週間後に発病調査を行い，それぞれの土壌の発病度を算出した．3反復行った．

#### 結果

##### 土壌中における菌数

土壌中の菌数の推移は図3-4-1に示した．ダイズを初めて作付けした鬼木3圃場では年間を通して黒根腐病菌は検出されなかった．連作

圃場である藤井 2, 藤井 8 圃場では播種日近辺の菌数は比較的高かったものの, 年間を通じて菌数の増減は少なかった. ダイズ輪作初年度の藤川 48 圃場および鬼木 15 圃場では播種日近辺の菌数は少なかったものの, 徐々に増加し, ダイズの開花期を過ぎた 9 月頃から急激に菌数が増加した. 冬を越した 4 月の採集土では鬼木 15 圃場土で菌数は大きく低下したが, その他の土壌については 11 月採集土と比較して変化は少なかった.

#### サンプル土壌の発病度

サンプル土壌の発病度は図 3-4-2 に示した. 発病度と土壌中の黒根腐病菌数の相関係数 (スピアマンの順位相関係数, 危険率 1%) を算出すると 0.90 であった (図 3-4-3). この数字は 2 つの変数に有意に相関関係があることを示しているため, 土壌中の黒根腐病菌数および発病度には有意に相関関係があることが明らかになった. また単回帰分析を行ったところ, 回帰直線は有意であり, 土壌中の黒根腐病菌数はサンプル時点での土壌の発病度を反映していることが明らかになった.

#### 考察

栽培期間中の黒根腐病菌の菌数増加は, 栽培初期の菌数に左右されないことが明らかになった. 一般に連作圃場では黒根腐病の発生は甚大化する, とされている (西 1999) が, 今回の試験では連作圃場土で菌数および発病度の増加は少なく, むしろ, 転換初年度において菌数が増加する可能性があることが明らかになった. このことは水田土壌では微生物層が貧弱になるため, 黒根腐病菌にとって競争相手が少なく, 増殖しやすくなっている可能性が考えられるが, 詳細は不明である. 今回の結果からは栽培初期の菌数を計測することでその圃場の黒根腐病の発生リスクを推定するのは困難であることが明らかになった.

今回の試験は 5 か所の圃場を一年間にわたって経時的に黒根腐病菌数を調査したが, 今後もデータを積み重ねて, 黒根腐病菌と環境や栽培要因の関連性を調査していく必要があると思われる.

表 3-4-1. 土壤採集圃場の概略

採集地	備考
長岡市藤川48	転換初年ダイズ初作
三条市鬼木15	転換初年ダイズ初作
三条市鬼木3	転換初年ダイズ未作付け
柏崎市藤井2	ダイズ2年連作地
柏崎市藤井8	ダイズ8年連作地

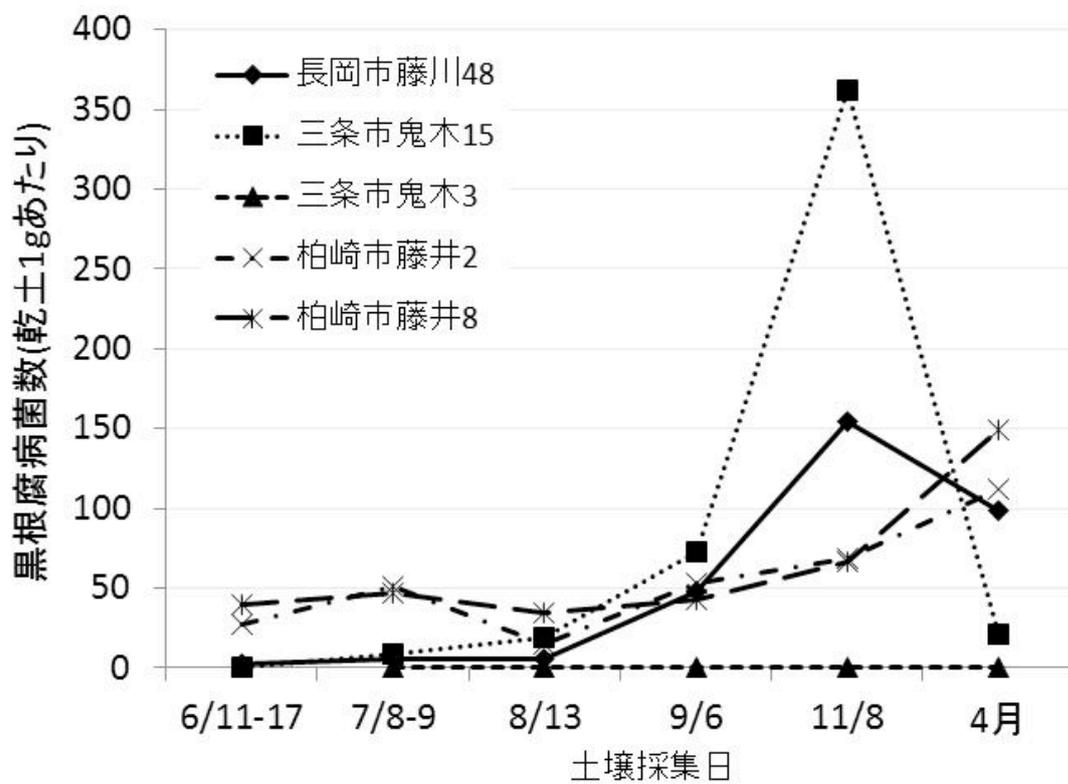


図 3-4-1. サンプル土壤からの黒根腐病菌検出数の推移.

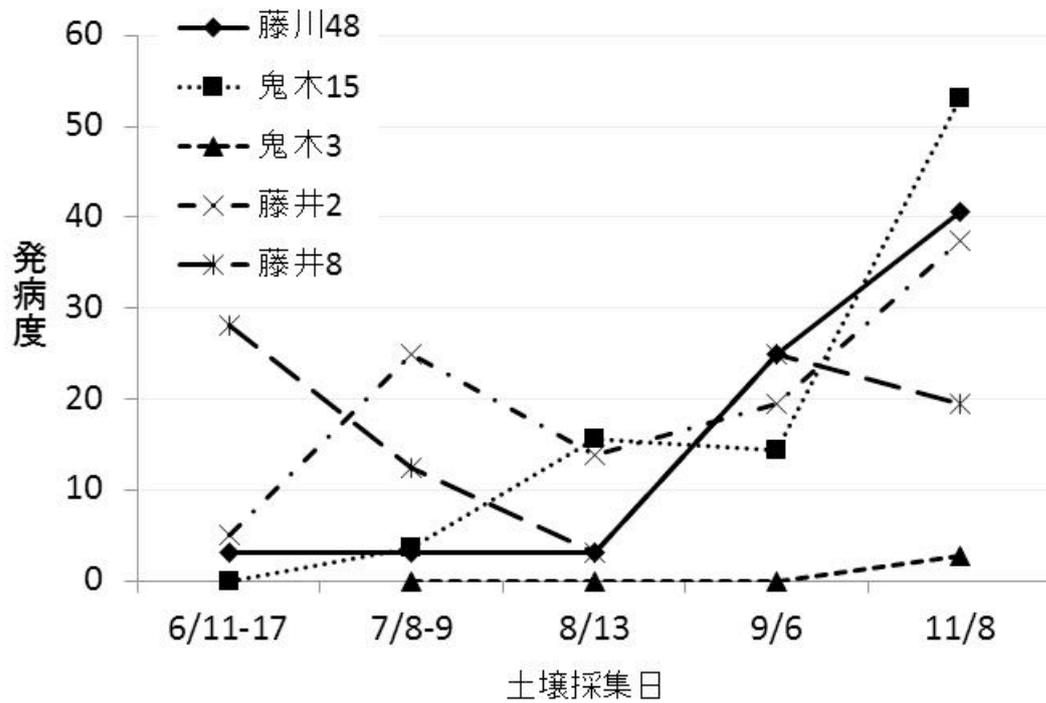


図 3-4-2. サンプル土壌の黒根腐病発病度の推

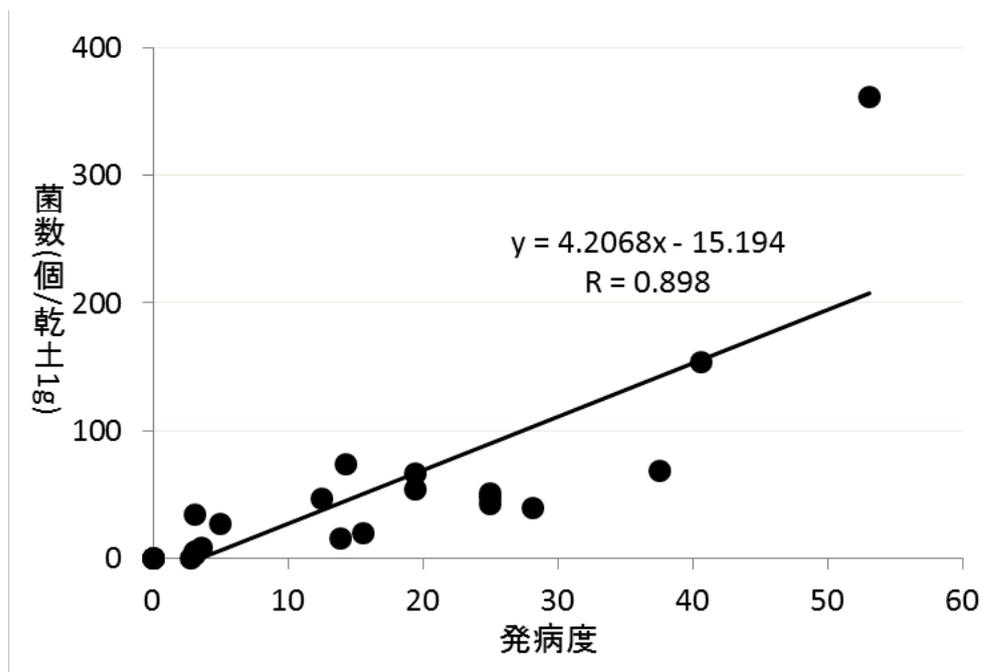


図 3-4-3. サンプル土壌中の黒根腐病菌数と発病度の関係解析

## V. ダイズ残渣中の黒根腐病菌の感染能力

ダイズ黒根腐病は連作によって発生が高くなるため、田畑輪換は本病の防除に有効とされているが、水田からの転換初年目でも黒根腐病が激発する圃場が頻繁に観察されるのが現状である。また、前節のように、栽培初期には土壌中から黒根腐病菌が全く検出されなくても黒根腐病が多発する可能性があることが明らかになっている。そのため、転換畑における黒根腐病菌の生存箇所は土壌中だけでなくダイズ残渣中の可能性も考えられる。そこで、黒根腐病が激発した圃場において水稲一作後の土壌中に残存しているダイズ根残渣中の黒根腐病菌の感染能力について試験した。

### 方法

#### ダイズ残渣

ダイズ残渣は 2011 年 12 月上旬に福島県白河市の圃場より採集した（図 3-5-1）。試験には 2 通りの圃場由来のダイズ根残渣を用いた。すなわち、2010 年にダイズ黒根腐病が多発し、2011 年には水稲を作付けした圃場中の残渣と、2011 年にダイズ黒根腐病が多発した圃場中の残渣である。

#### 残渣中の黒根腐病菌のダイズに対する感染能力の確認

9cm ビニールポットの底に滅菌園芸培土を敷き、十分に水洗し、約 1cm に切断したダイズ根残渣（1 本分）を敷き詰めた。その上に滅菌園芸培土を詰め、ダイズ（タチナガハ）をポットあたり 4 粒播種した。ポットは 25℃ に設定されたガラス温室で栽培した。播種 3 週間後にダイズ株を抜き、根を切り取った。根を 70% エタノールに 5 秒、次いで有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 分間浸漬することで表面殺菌し、さらに滅菌蒸留水でよく洗浄した後に酸性 WA に置床した。3 日後の黒根腐病菌の生育の有無で本病原菌の感染を確認した。両残渣とも 2 回試験を行い、1 回の試験につき 16 残渣を用いた。

## 結果

結果は表 3-5-1 に示した。黒根腐病が多発した直後の圃場残渣からは 2 試験平均で 28.1%の割合で黒根腐病菌の感染が確認された。また、1 年間水稲作付けを行った後の残渣からも 2 試験平均で 9.4%の割合で黒根腐病菌の感染が確認された。

## 考察

圃場から採集したダイズ根残渣は黒根腐病に罹病したものを回収したものではなく、ランダムに回収したものである。その中でダイズ栽培直後とはいえ 30%近くの残渣中の黒根腐病菌にダイズに対する感染能力があることが明らかになり、次年度以降の強力な一次伝染源となっている可能性が示唆された。また、黒根腐病が多発した次の年に水稲を作付けしても圃場内に残るダイズ根の黒根腐病菌は死滅しないことが明らかになった。このことは水田の輪作体系において、ダイズ黒根腐病が多発した圃場では、一年間水田に戻しただけでは本病が再び多発する可能性があることを示唆している。西ら（1994）は黒根腐病が多発した圃場において 2 年間水稲を作付けすると本病は激減する、としている。今後は複数年水稲を作付けした黒根腐病多発圃場からダイズ根残渣を回収して、残渣中の黒根腐病菌がどれくらいの期間生存し得るのか確認することが水田転換畑の輪作体系構築に必要と思われる。



図 3-5-1. 圃場から採集したダイズ根残渣

表 3-5-1. ダイズ幼苗根からの黒根腐病菌分離

	黒根腐病菌分離率(%, 16残渣中)		
	1反復目	2反復目	平均
水稻作付け 後の残渣	18.8	0	9.4
ダイズ作直 後の残渣	18.8	37.5	28.1

## VI. ダイズ黒根腐病菌の温度に対する反応

病害の発生には環境要因が密接に関わっている。黒根腐病についても環境条件により発病が助長されたり、抑制されたりしていると考えられる。西ら（1999）は土壌温度、土壌水分、地下水位、土壌 pH などによる影響を詳細に調査している。そのうち土壌温度については、15～30℃の範囲内のあらゆる温度で発病し、発病程度については、土壌温度 15℃で低く、20～30℃で高くなった、と報告している。一方、黒根腐病の一次伝染源は土壌中における微小菌核であるが（Rowe et al. 1974）、微小菌核からの黒根腐病菌の生育に適した温度はあまり知られていない。微小菌核からの生育適温を調査することは、黒根腐病菌のダイズへの感染適温の解明につながると考えられる。そこで、微小菌核からの黒根腐病菌の生育適温を調査した。

### 方法

黒根腐病発生 2 圃場（一圃場目は新潟県の発生圃場で、二圃場目は福島県の発生圃場）から土壌のサンプリングを行った。サンプリングの手法は、圃場表面をはぎ取り、そこから地下 15cm までの部分をサンプリングし、1 つの圃場あたり 5 か所から土壌を採集し、それらを混合し、1 つのサンプルとして用いた。

サンプル土壌を、上述のダイズ黒根腐病菌の特異的検出法を用いて培地と混合し、シャーレに広げた後、10、16、20、25、30、35℃で 10 日間、培養分離し、土壌中における黒根腐病菌微小菌核からの菌の生育への温度影響を調査した。それぞれの土壌について 3 反復試験し、乾土 1g 当たりの黒根腐病菌の菌数を計測した。

### 結果

結果は図 3-6-1 に示した。新潟県からサンプリングした圃場土は、16℃から 35℃の間で黒根腐病菌が検出された。20℃において最も黒根腐病菌の分離菌数が多く乾土 1g あたり 204 個が検出され、温度が上昇すると菌数が低下し、30℃では 135 個程度になった。35℃で培養す

ると黒根腐病菌はほとんど検出されなかった。また 16℃でも乾土 1g あたり 73 個程度が検出された。

福島県からサンプリングした圃場土においては 20℃～30℃において黒根腐病菌が検出され、20℃での黒根腐病菌検出数が最も多く 68 個が検出された。

#### 考察

Kuruppu ら (2004b) はアメリカにおけるダイズ黒根腐病菌の微小菌核からの生育適温について調査しており 25℃が最適温度との結果を報告している。また Phipps ら (1977) はラッカセイ黒根腐病から分離した同じ *C. ilicicola* についての微小菌核からの生育適温について調査しており、同様に 25℃が最適温度との結果を報告している。

今回の結果では黒根腐病菌の微小菌核からの生育には 20℃培養が最も適温であることを明らかにした。この結果の差異の原因については、土壌が異なり、また生息している黒根腐病菌もその土地の環境条件に適していると考えられるため、はっきりとしたことはわからない。

Kuruppu ら (2004a) らはダイズの播種時期を遅らせることで黒根腐病への感染率が低下すると報告している。その原因としては黒根腐病菌微小菌核からので菌の生育適温時期へのダイズの露出時間の低減が考えられると推察している。日本においては黒根腐病の被害の大きい東北、北陸地域の播種時期は 5 月下旬から 6 月上旬である。この時期の最高気温の平均は 20℃前後で、今回の結果は、これらの地域において、播種時期を遅らせることで黒根腐病菌の微小菌核の生育適温時期へのダイズの露出時間の低減できる可能性があることを示している。

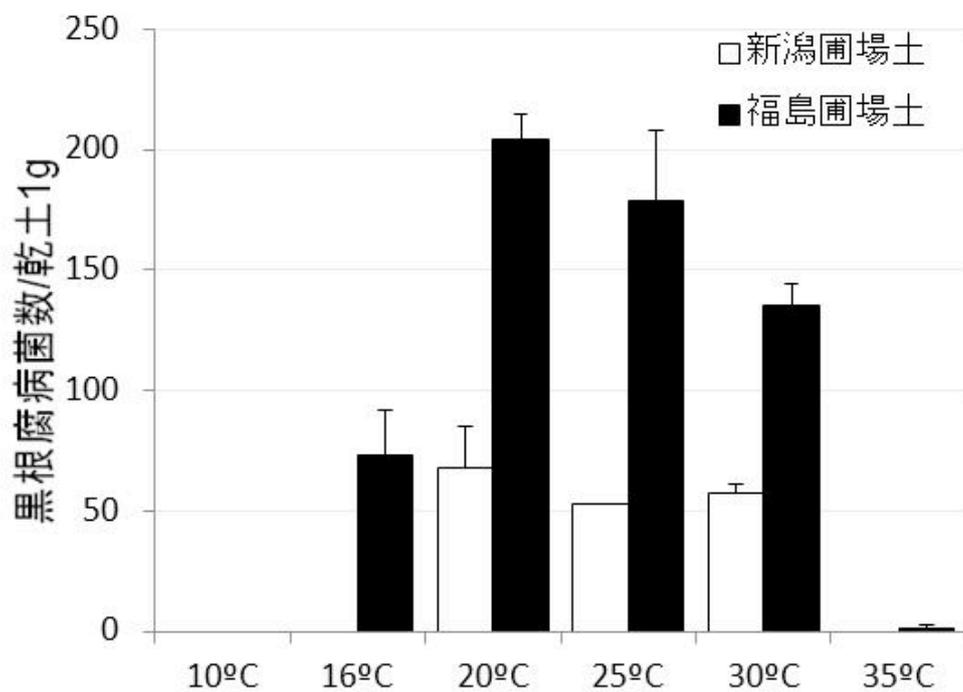


図 3-6-1. 土壌からの黒根腐病菌検出数の培養温度による差異. エラーバーは標準誤差を示す.

## VII. リアルタイム PCR を用いた黒根腐病菌の特異的定量法の開発

本章 II において、培地を用いたダイズ黒根腐病菌の土壌中からの定量的分離を開発した。しかし、一度に多くのサンプルを試験するには手間と時間がかかる。一方、これまでに様々な土壌病原菌について、リアルタイム PCR を用いた有効な特異的定量法が開発されている (Ashizawa et al. 2010, Inami et al. 2010, Shishido et al. 2012)。また、リアルタイム PCR は一度に多くのサンプルを試験するのに適している。そこでリアルタイム PCR を用いた黒根腐病菌の特異的定量法を開発することを目的とした。

### 方法

#### 菌株と土壌サンプル

本試験で用いた菌株は表 3-7-1 に示した。3 菌株は *C. ilicicola* で残りの 14 菌株は同属他種菌および本プライマーで増幅される領域の配列と似た配列を持つ菌種、また、土壌中から一般的に分離される菌である。

土壌サンプルは本章 III で用いたサンプルを用いた。

#### DNA 抽出

菌体の DNA 抽出については DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) を使用した。PDB 培地で、1 菌株あたり 9cm シャーレで 2 枚ずつ、25℃ で静置培養し、菌糸がシャーレの 7 割程度を覆ったところで吸引濾過し、-80℃ で保存した。凍らせた菌体を乳鉢と乳棒を使って液体窒素下で細かくすりつぶした。以下は DNeasy Plant Mini Kit のプロトコールにしたがって DNA を抽出した。

土壌サンプルからの全 DNA 抽出については ISOIL for Beads Beating Kit (ニッポンジーン) を使用した。土壌採集法については第 3 章 II に記述してある通りである。サンプル土壌 0.5g を用いて、ISOIL for Beads Beating Kit のプロトコールにしたがって DNA を抽出した。

### リアルタイム PCR のプライマーおよびプローブ設計と特異性

リアルタイム PCR のプライマーを設計するため、プライマーセット CNL12 = 5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3' (Appel and Gordon 1995) および IGS2 = 5'-AATGAGCCATTCGCAGTTTC-3' (Mahuku et al. 1998) を用いた。これらのプライマーセットはリボソーマル DNA の Intergenic Spacer (IGS) 領域を増幅するプライマーで、本領域のシーケンス解析を行った。シーケンス解析の結果からリアルタイム PCR 用のプライマーセット (CiIGSF (forward) = 5'-TCCATTGCCTCTATTTATCCTGC-3' , CiIGSR (reverse) = 5'-GCGTAAAGATTTTCCAACCCG-3') およびプローブ (CiPro = 5'-ACCACAGCACAACACGCACAAC-3') を委託設計した (医学生物学研究所)。このプローブは 5'末端を蛍光色素 Fluorescein (FAM) および 3'末端を Iowa Black Fluorescent Quencher (IBFQ) で、さらに中間部分を ZEN クエンチャーで修飾されている。このプライマーおよびプローブセットは *C. ilicicola* の IGS 領域に特異的な 146bp を増幅する。

このプライマーおよびプローブセットの有効性を確認するため、上記の 17 菌株を用いて下記のプロトコールにしたがってリアルタイム PCR を行い、本セットの黒根腐病菌への特異性を確認した。

### リアルタイム PCR による土壌中の黒根腐病菌の経時的定量と検量線

検量線は、あらかじめ濃度の分かっている *C. ilicicola* の KR3-1 菌株の DNA を 5 段階希釈し、希釈系列を用いてリアルタイム PCR を行うことで作成した。Threshold Cycle (C<sub>T</sub>) 値は Mx3000P (STRATAGENE) により自動的に算出され、検量線を C<sub>T</sub> 値とそれぞれの希釈液濃度の対数値との交点をプロットし、作成した。

### リアルタイム PCR を用いた土壌からの黒根腐病菌の経時的定量

上記 5 圃場土から得た土壌サンプルの抽出 DNA を、上記プライマ

一およびプローブセットによりリアルタイム PCR を行った。反応液の構成は、抽出 DNA を  $0.5 \mu\text{l}$ 、それぞれのプライマー（医学生物学研究所）を  $500\text{nM}$ 、プローブ（医学生物学研究所）を  $300\text{nM}$ 、iQ supermix（バイオラッド）を  $500\text{nM}$ 、これに超純水で  $10 \mu\text{l}$  までメスアップした。反応には Mx3000P を用い、反応条件は  $95^\circ\text{C}$  10 分間を 1 サイクルし、続いて  $95^\circ\text{C}$  15 秒間、 $60^\circ\text{C}$  30 秒間を 50 サイクル行った。すべて 3 反復行った。リアルタイム PCR の結果から土壌中における乾土  $1\text{g}$  中の黒根腐病菌量を算出した。その結果を本章 III の検出培地を用いて定量した結果と比較した。

## 結果

### 設計したプライマーおよびプローブの特異性

増幅されたのは *C. ilicicola* のみで他の菌は増幅されなかった。したがって、今回設計したプライマーおよびプローブは *C. ilicicola* を特異的に増幅することが明らかになった。

### 検量線の作成とリアルタイム PCR を用いた土壌からの黒根腐病菌の経時的定量

検量線は図 3-7-1 に示した。土壌 DNA を用いてリアルタイム PCR を行った結果は図 3-7-2 に示した。この結果は検出培地を用いて土壌から分離した黒根腐病菌菌数と高い相関が見られ、本手法は土壌中の黒根腐病菌の菌量を推定するのに有効であることが示唆された(図 3-7-3)。

## 考察

開発したリアルタイム PCR の手法により、土壌中の黒根腐病菌を定量できることが明らかになった。これにより多サンプルを効率よく定量することが可能となり、土壌中における黒根腐病菌の動態解析の研究が促進されると思われる。一方で、黒根腐病菌の発病程度と土壌中の菌数との関連には、菌の状態や土壌の性質、環境要因など様々な要

因が大きく影響を及ぼすとされているため (Inami et al. 2010), 発生予察を目的とした定量については慎重に検討する必要がある.

また, 本手法は土壌中だけでなく, 植物体中の黒根腐病菌の定量にも応用することが可能である. 黒根腐病防除試験において, ダイズ根中の黒根腐病菌を経時的や処理ごとに定量することで, その作用機作の解明に利用できると考えられる.

表 3-7-1. リアルタイム PCR 用プライマーとプローブを設計するために使用した菌株および特異性を試験するために使用した菌株.

学名	菌株名
<i>Calonectria ilicicola</i>	KR3-1
<i>Calonectria ilicicola</i>	UH2-1
<i>Calonectria ilicicola</i>	NI3-4-1
<i>Nectria rigidiuscula</i>	MAFF305034
<i>Cylindrocladiella parva</i>	MAFF425305
<i>Cylindrocladium colhounii</i>	MAFF425360
<i>Cylindrocladiella camelliae</i>	MAFF425363
<i>Cylindrocladium scoparium</i>	MAFF425364
<i>Cylindrocladium tenue</i>	MAFF425366
<i>Rhizoctonia solani</i> AG 1- I A	IA-61
<i>Pythium spinosum</i>	PyS1
<i>Pythium</i> sp.	Py3
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	MAFF239215
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>spinaciae</i>	MAFF103061
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i>	MAFF103058
<i>Fusarium globosum</i>	MAFF237512
<i>Gibberella fujikuroi</i>	MAFF305129

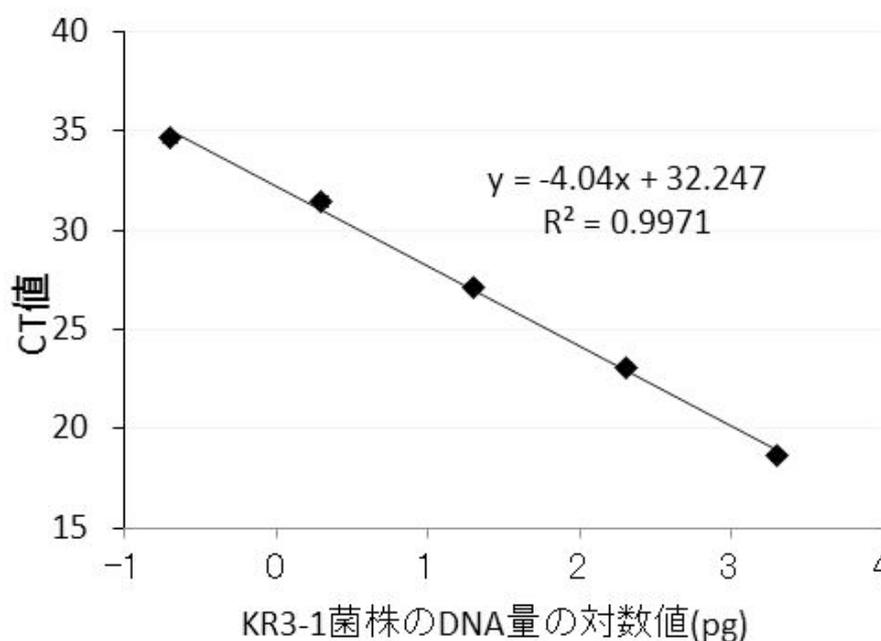


図 3-7-1. リアルタイム PCR 用による黒根腐病菌株 DNA の検量線

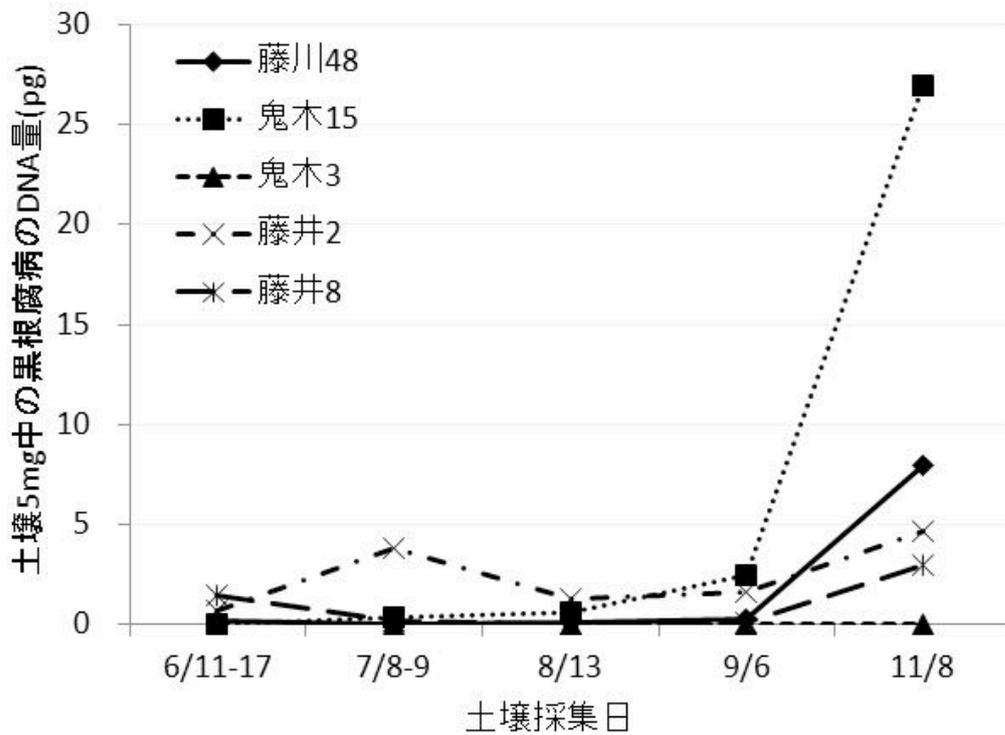


図 3-7-2. リアルタイム PCR を用いたサンプル土壌 DNA 中の黒根腐病菌量の推移.

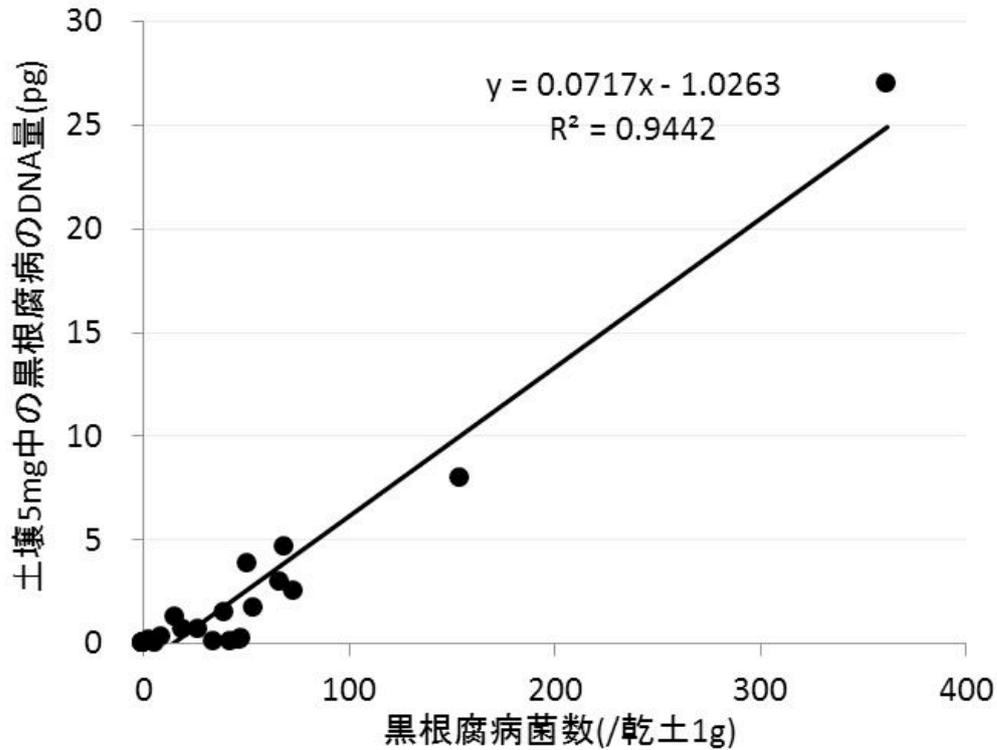


図 3-7-3. リアルタイム PCR を用いたサンプル土壌 DNA 中の黒根腐病菌量と検出培地を用いたサンプル土壌からの黒根腐病菌検出数の比較.

## 第4章 ダイズ黒根腐病菌の産生毒素の同定

ダイズ黒根腐病の発病機構についてはいまだ不明な点が多い。黒根腐病は根の崩壊と葉の壊疽の2つの病徴を引き起こす。発病株の根からは栽培初期から菌が分離されるが、葉からは菌は分離されない。このことは菌の二次代謝産物が病徴の進展に何らかの影響を及ぼしていることを示している。Kim et al. (2001) は黒根腐病菌の培養濾液の処理がダイズ葉に萎凋をもたらすことを明らかにしたが、現在までに活性物質の同定には至っていない。同じ *C. ilicicola* が引き起こすラッカセイ黒根病においては、病気の進展に毒素物質が関与する、と推測されている。菌が侵入する前に胚軸 (Johnston and Beute 1975) や主根 (Harris and Beute 1982) に壊疽が生じるからである。また *Fusarium solani* f. sp. *glycines* によるダイズ急性枯死症では葉に黒根腐病と類似に症状を示し、ダイズのカルスを褐変化し、胚軸や葉に壊疽を生じる単一のタンパク質が培養濾液から分離されている (Jin et al. 1996)。

多くの植物病害の発病機構において植物毒素の果たす役割が報告されている (Meehan and Murphy 1947, Ueno et al. 1975a, Kawai et al. 1983, Lawrence et al. 1990)。そこで、黒根腐病菌の産生毒素を単離・同定し、本病の発病機構における黒根腐病菌の産生毒素の役割を調査した。

### I. ダイズ黒根腐病菌産生毒素の単離

#### 材料と方法

##### 菌株

ダイズ黒根腐病菌 *C. ilicicola* 菌株 UH2-1 を産生毒素単離・同定試験に用いた。病原力と毒素生産量の相関解析には UH2-1 を含む各地の罹病ダイズ根より分離した黒根腐病菌を 17 菌株 (表 4-1) 用いた。

#### 産生毒素の単離と生物活性

UH2-1 は PDA 培地において 5 日間 25°C で培養した。その後 3L のフラスコに 1L の PDB 培地を入れたものを 12 個用意した。それぞれに含菌寒天片を添加し、2 週間 25°C で培養した。培養後、それぞれフラスコには 2L のアセトンを追加し、一日以上静置し、その後菌体を吸引濾過することで取り除き、ロータリーエバポレーターを用いてアセトンを揮発させた。残った水画分をそれぞれ 333ml の酢酸エチルで 3 回抽出した。抽出物は図 4-1 のようなステップで精製し、単離した。分取 HPLC の条件は以下のとおりである：カラム，ODS-UG-5(250×20mm)(野村化学); 溶媒，70%アセトニトリル水溶液; 流速，10ml/min; 検出，200nm 紫外線。

分画後のバイオアッセイではアルファルファを用いた。アルファルファを用いた理由はマメ科で *C. ilicicola* に対して感受性であり、また、簡易試験には扱いやすい大きさであるからである。底直径 3cm のサンプル管にメタノールに溶かした 100ml 培養物換算量のサンプルを処理し、完全に風乾させ、その後、1ml の滅菌水を注入し、無菌発芽させたアルファルファ 5 個体を入れ、5 日後の生育阻害活性を指標とした。

## 結果

毒素物質の精製プロセスは図 4-1 に示した。酢酸エチル抽出はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで行った。その結果、20%アセトン-ベンゼン画分が最もアルファルファ幼苗への生育阻害活性が強く、この画分を、異なる溶媒系を用いたカラムクロマトグラフィーで 3 回分画した (図 4-1)。そして活性画分を分取 ODS-HPLC で活性ピーク 8.1min で単離した。12L から活性画分を 8.12mg 得た。

## II. ダイズ黒根腐病菌産生毒素の構造解析

### 材料と方法

#### 単離した毒素の構造解析

単離した物質は LC-TOF-MS (liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry) (JMS-T100LC, JEOL) (カラム，

ODS-UG-5(150×2mm)；溶媒，55%アセトニトリル水溶液；流速，0.2ml/min；カラム温度，40℃；イオン化法，ESI-positive)で分子量を測定した．さらに NMR (Avance 800 system, Bruker BioSpin)により構造解析を行った．

#### 単離毒素による病原力試験

ダイズへの病原力を確認するため単離した毒素をダイズ品種タチナガハの根および葉に処理した．根の生育阻害試験では，ダイズ種子を70%エタノールで30秒洗浄した後，有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で8分間表面殺菌した．その後，種子は滅菌水で2回洗浄し，湿らせたろ紙上で，1日間無菌状態で静置した．単離毒素50，100，200，500  $\mu$ gをメタノールに溶解して3cm直径のサンプル管に注入した．また対照としてメタノールだけを注入したサンプル管を作成した．メタノールを風乾後，それぞれのサンプル管を1mlの滅菌蒸留水で懸濁した．サンプル管それぞれに無菌発芽処理をした3粒のダイズを置床し，25℃で4日間，室内蛍光灯下で培養した．根の生重量を測り，対照と比較して阻害率を計算した．それぞれ3反復設けた．

葉への毒素処理の影響を試験するために，メタノールに溶解した10，40，80  $\mu$ gの単離毒素をそれぞれ3cm直径のサンプル管に注入した．またコントロールとしてメタノールを注入したサンプル管を設けた．メタノールは風乾し，1mlの滅菌蒸留水を添加し，毒素物質と混合した．ダイズの第一本葉をサンプル管に入れ，葉柄から毒素物質を吸収させ，25℃で1週間，室内蛍光灯下で培養した．それぞれ3反復設けた．

## 結果

#### 単離した毒素の構造解析

毒素物質の分子量はLC-TOF-MSから568 ( $m/z$  569 (M + H)<sup>+</sup>)と推定された．また高精度LC-TOF-MSの結果 ( $m/z$  569.31031)から分子式はC<sub>31</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>と推定された．

毒素物質の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでは 5 種のカルボニル基が存在することを示した。そのうち 4 種はエステルもしくはアミドカルボニル基と推測される 170.23-174.20ppm にピークを示し、1 種はケトン基と推測される 207.57ppm であった (図 4-2a)。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルは 4 種の  $\alpha$ -プロトンの存在を示した (4.50-4.86ppm) (図 4-2b)。これらは 4 種のアミノ酸からなるペプチドであることを示唆している。アミノ酸の側鎖の構造は DQF-COSY (Double Quantum Filtered-Correlated Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) および HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) で解析し、フェニルアラニン, イソロイシン, ピペコリン酸, 2-アミノ-9,10-エポキシ-8-オキソデカン酸 (Aoe) であることを明らかにした。アミノ酸の並び方は HMBC より解析した。その結果, 本毒素物質は PF1070A (cyclo (Ile-Pip-Aoe-Phe)) (図 4-3) であることを明らかにした。本毒素物質の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータは過去の PF1070A のスペクトルデータと一致した (表 4-2)。PF1070A は抗腫瘍物質として *Humicola* 属菌より単離・同定された物質であり (Yoshida et al. 1993), また, マウスにおいてメタロチオネイン生合成誘導能を持つことが明らかにされている物質であった (Asahi et al. 1999)。

#### 単離毒素による病原力試験

PF1070A はダイズ品種タチナガハの根を濃度依存的に抑制し (図 4-4), 葉にも病徴を示した (図 4-5)。このことから PF1070A を植物病原毒素と確認した。本物質の植物毒性は初の報告である。

### Ⅲ. ダイズ品種の毒素物質への反応解析

#### 材料と方法

ダイズは品種により黒根腐病菌への抵抗性が異なることが知られている (仲川ら 1990, 中島ら 1994, Kim et al. 1998)。一方でその抵抗性評価は安定せず, 現在までに黒根腐病に対する抵抗品種はない。

そこで、本物質が品種抵抗性検定に適用できることを期待し、品種間で本毒素物質に対する反応が異なるかどうか調査した。我々は根の生育阻害活性にフクユタカ（強）、エンレイ（中）、Harosoy（弱）の3品種を用いた。活性検定法は上述した手法により行った。

#### 結果

処理4日後にサンプル管よりダイズを取り出し、根を切り取り、生重量を測った（図4-4）。各品種とも毒素の濃度を増加させると根の阻害活性は高まった。その活性はIC<sub>50</sub>ではフクユタカが721 $\mu$ g/ml、エンレイが741 $\mu$ g/ml、Harosoyが754 $\mu$ g/mlであった。今回の結果から、品種による毒素への反応には差がみられず、黒根腐病に弱いHarosoyであってもフクユタカ、エンレイと同等であった。

### IV. 菌株による産生毒素量と病原力の関係解析

#### 材料と方法

##### 黒根腐病菌株の病原力調査

黒根腐病菌17菌株を試験に用いた。それぞれの菌株を大麦ふすま培地（ふすま：バーミキュライト：水=1：1：3，w/w）で25 $^{\circ}$ C、1カ月間培養した。それぞれの培養物は滅菌した園芸培土（クレハ）に重量比1%で混合接種した。直径9cmのプラスチックポットに接種土壌を詰め、ダイズ品種タチナガハを3粒播種した。無接種の大麦ふすま培地をコントロールとした。25 $^{\circ}$ C一定に保った自然光の温室で培養した。3反復行った。3週間後、根を掘り取り、発病程度を確認した。発病程度は以下の基準で区分した：0，健全；1，根の褐変；2，いくつかの側根の亡失；3，多くの側根の亡失；4，立枯れ。発病度は以下の計算式から算出した。

発病度 =  $\Sigma$ （それぞれの発病程度の株数 × 発病程度） × 100 ÷ （総株数 × 4）

##### 黒根腐病菌株の毒素産生力調査

毒素産生力試験では病原力試験と同じ菌株を用いた。それぞれの菌株は PDA で 5 日間培養した。培養した含菌寒天片を 100ml の PDB が入った 300ml フラスコに接種し、25°C で 1 カ月培養した。それぞれの培養物に 200ml のアセトンを添加し、一日以上静置し、その後菌体を吸引濾過することで取り除き、ロータリーエバポレーターでアセトンを揮発させた。残った水画分をそれぞれ 33ml の酢酸エチルで 3 回抽出した。精製プロセスは改変した。つまりシリカゲルカラムクロマトグラフィー1回（アセトン-ベンゼン）を行い、C18 カラムクロマトグラフィー1回（アセトニトリル-水）を行った。シリカゲルカラムおよび C18 カラムに関しては Sep-Pak Vac（500mg, ウォーターズ）を用いた。その後、ODS-HPLC 解析（カラム, Develosil ODS-UG-5 150 × 2.0mm; 溶媒, 55%アセトニトリル水溶液; 流速, 0.2ml/min; 検出, UV 波長 200nm）により、PF1070A の標準物質とピーク面積からサンプルにおける PF1070A 量を推定した。

## 結果

17 菌株の病原力は 2.8 から 89.3 の幅広い数字を示した。毒素生産量は 100ml あたり 0.01-4.46mg の量を示した（表 4-1）。それぞれの菌株について発病度を縦軸に、毒素生産量を横軸に散布図を作成した（図 4-6）。この二つの数値の相関係数（スピアマンの順位相関係数、危険率 1%）を算出すると 0.69 であった。この数字は 2 つの変数に有意に相関関係があることを示しているため、産生毒素量および病原力には有意に相関関係があることが明らかになった。また単回帰分析を行ったところ、回帰直線は有意であり、産生毒素量は病原力の推定に有効であることが明らかになった。

## 考察

ダイズ黒根腐病菌の産生毒素を同定した。この毒素は 4 つのアミノ酸からなる特徴的な環状ペプチド PF1070A であった。Yoshida et al. (1993) は PF1070A が抗腫瘍能力を持っていると報告し、その後、

PF1070A は金属結合性たんぱく質であるメタロチオネインを誘導する機能を持つことが明らかになっている (Asahi et al. 1999). しかし, 植物病原物質としての報告は初めてである.

Kim ら (2001) は, 黒根腐病菌の培養ろ液に対するダイズ品種の葉の反応には差がなかったと報告している. しかし, 黒根腐病の最も重要な症状は根部の崩壊であるため, 我々は黒根腐病菌の培養ろ液への反応にはダイズ根を使用した. しかし今回の試験でも Kim らの結果と同様であった. この結果から品種反応性は毒素の吸収によって左右されるものではないと予測される.

さらに Kim ら (2001) は培養ろ液の病原力が菌株の病原力と相関関係がなかったことから, 本菌の培養ろ液はあくまでも病害の 2 次決定因子であると結論付けている. しかし, 今回の結果では産生毒素量と病原力には有意に相関があった. このことから, PF1070A は黒根腐病菌における病原力の強弱を決定していると考えられる. 圃場では葉の病徴と根の病徴は必ずしも結びつかないことが経験的に知られている. このことから葉の病徴発現にはさらに他の要因があると考えられる.

本物質の同じような 4 つのアミノ酸から構成される環状ペプチドで植物病原毒素として報告されているものは複数ある. すなわち, トウモロコシ北方斑点病菌の毒素 HC-Toxin (cyclo(L-Ala-D-Ala-L-Aoe-D-Pro)) (Kawai et al. 1983), 黒根腐病菌と同属の *C. kyotensis* が生産する Cyl-1 (cyclo(L-Aoe-D-O-MeTyr-L-Ile-L-Pro)) および Cyl-2 (cyclo(L-Aoe-D-O-MeTyr-L-Ile-L-Pip)) (Hirota et al. 1973) である. これら 3 つの植物病原毒素は PF1070A と同様に L-Aoe (2-アミノ-8-オキソ-9,10-エポキシデカン酸) をもつ. さらに類似したリンゴ斑点落葉病の AM-Toxin も 4 つのアミノ酸から構成される環状ペプチドである. (Ueno et al. 1975a, Ueno et al. 1975b). この中で HC-Toxin や AM-Toxin は発病機構の主導因子として働いていることが明らかになっている (Scheffer and Ullstrup 1965, Ueno et al. 1975a). 類似構造を持つ HC-Toxin では病気における毒素の働きおよび宿主の反応の

解析が進んでいる。HC-Toxin を処理された感受性宿主の胚芽，組織培養物において過剰アセチル化したヒストンが検出され，HC-Toxin 生産菌である *C. carbonum* レース 1 を接種し罹病した葉からも過剰アセチル化したヒストンが検出されたことから，HC-Toxin について細胞増殖抑制やアポトーシスの誘導を引き起こすヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤としての活性が病原性に関与していることが明らかになった（Ransom and Walton 1997）。同様にエポキシド（3員環のエーテル）をもつ Trapoxin A（cyclo(L-Phe-L-Phe-D-Pip-L-Aoe)）においても HDAC 阻害活性を持つことが明らかになっている（Yoshida and Sugita 1992）。またトウモロコシ品種の *C. carbonum* への感受性や抵抗性は抵抗性品種が持つ *Hm* 領域に支配されていると報告されている（Meeley and Walton 1991）。この領域は HC-Toxin 還元酵素をコードしており（Johal and Briggs 1992），HC-Toxin はこの還元酵素によってエポキシドが還元されて活性を失うことが明らかになっている（Meeley et al. 1992）ため，HC-Toxin の HDAC としての活性部位はエポキシドにあると考えられる。今回同定した PF1070A も同様に 4 つのアミノ酸から構成され，エポキシドを持つ環状ペプチドであることから同様の働きをもっていると考えられ，さらに PF1070A に対するダイズ品種の抵抗性に差がなかった原因が，ダイズが *Hm* 遺伝子領域や同等の働きを持った遺伝子領域を持っていないことによることの可能性があるが，これらについては今後試験していく必要がある。

今回の研究から我々は黒根腐病における *C. ilicicola* の毒素が PF1070A であることを明らかにした。Rudolph(1976)は一つの毒素，要因でその特徴的な病徴を示す可能性は低いとしている。今後は PF1070A の化学的な働きを調査することで，ダイズの感受性と PF1070A の関連性を解析する必要がある。

表 4-1. 用いた黒根腐病菌の病原力と毒素産生量

菌株名	分離場所	病原力	毒素産生量 (mg/100ml)
MAFF102001	岩手	36.1	0.11
MAFF102006	埼玉	52.8	1.92
MAFF102009	茨城	16.7	1.30
NI1-1-1	熊本	59.4	1.49
NI2-1-3	熊本	66.7	1.39
UH2-1	兵庫	78.1	3.78
AY-1	京都	77.8	2.01
KA1-47	茨城	78.6	1.74
KA1-67	茨城	37.5	1.74
YW6-1	茨城	89.3	1.46
NG1-4	新潟	56.3	2.52
SB1-6	新潟	55.5	3.34
AD16	福島	88.9	4.46
YZ2-3	山形	22.2	0.62
YZ2-15	山形	33.3	1.06
KR2-1	岩手	2.8	0.07
KR3-1	岩手	17.5	0.01

表 4-2. PF1070A と単離毒素の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  の NMR スペクトルデータの比較.

		$^1\text{H}$		$^{13}\text{C}$	
		Yoshida <i>et al.</i> (1993)	測定値	Yoshida <i>et al.</i> (1993)	測定値
Ile <sup>a</sup>	CO(1)	-	-	171.5	171.42
	CH(2)	4.5	4.53	53.5	53.49
	CH(3)	1.9	1.86	36.1	36.11
	CH <sub>2</sub> (4)	1.1, 0.8	1.06, 0.75	23.9	23.92
	CH <sub>3</sub> (5)	0.7	0.69	11.0	11.00
	CH <sub>3</sub> (6)	0.8	0.76	15.8	15.90
	NH	6.2	6.28	-	-
Pip <sup>b</sup>	C(7)	-	-	174.3	174.20
	CH(8)	4.9	4.86	57.2	57.18
	CH <sub>2</sub> (9)	1.6, 2.5	1.63, 2.44	26.9	26.85
	CH <sub>2</sub> (10)	1.3, 1.7	1.24, 1.71	20.7	20.65
	CH <sub>2</sub> (11)	1.4, 1.8	1.37, 1.76	25.0	24.95
	CH <sub>2</sub> (12)	2.8, 4.6	2.70, 4.50	40.7	40.66
Aoe <sup>c</sup>	CO(13)	-	-	174.0	174.18
	CH(14)	4.6	4.50	54.2	54.13
	CH <sub>2</sub> (15)	1.3	1.28, ND	28.7	28.65
	CH <sub>2</sub> (16)	1.3	1.28, 1.62	25.5	25.44
	CH <sub>2</sub> (17)	1.7	1.63, 1.80	27.7	27.69
	CH <sub>2</sub> (18)	2.3	1.52, 1.57	22.8	22.87
	CH <sub>2</sub> (19)	2.3, 2.4	2.25, 2.40	36.2	36.23
	C(20)	-	-	207.5	207.57
	CH(21)	3.4	3.40	53.4	53.40
	CH <sub>2</sub> (22)	2.8, 3.0	2.86, 2.97	46.1	46.13
	NH	6.2	6.28	-	-
Phe <sup>d</sup>	C(23)	-	-	170.3	170.23
	CH(24)	4.6	4.61	56.3	56.04
	CH <sub>2</sub> (25)	2.9, 3.2	2.86, 3.22	35.2	35.02
	C(1')	-	-	136.6	136.59
	CH(2'),(6')	7.2	7.16, 7.19	129.3	129.26
	CH(3'),(5')	ND	7.17, 7.19	128.4	128.39
	CH(4')	ND	7.16	126.6	126.70
	NH	6.5	6.28	-	-

注釈: <sup>a</sup>Ileはイソロイシン. <sup>b</sup>Pipはピペコリン酸. <sup>c</sup>Aoeは2-アミノ-9,10-エポキシ-8-オキシデカン酸. <sup>d</sup>Pheはフェニルアラニン.

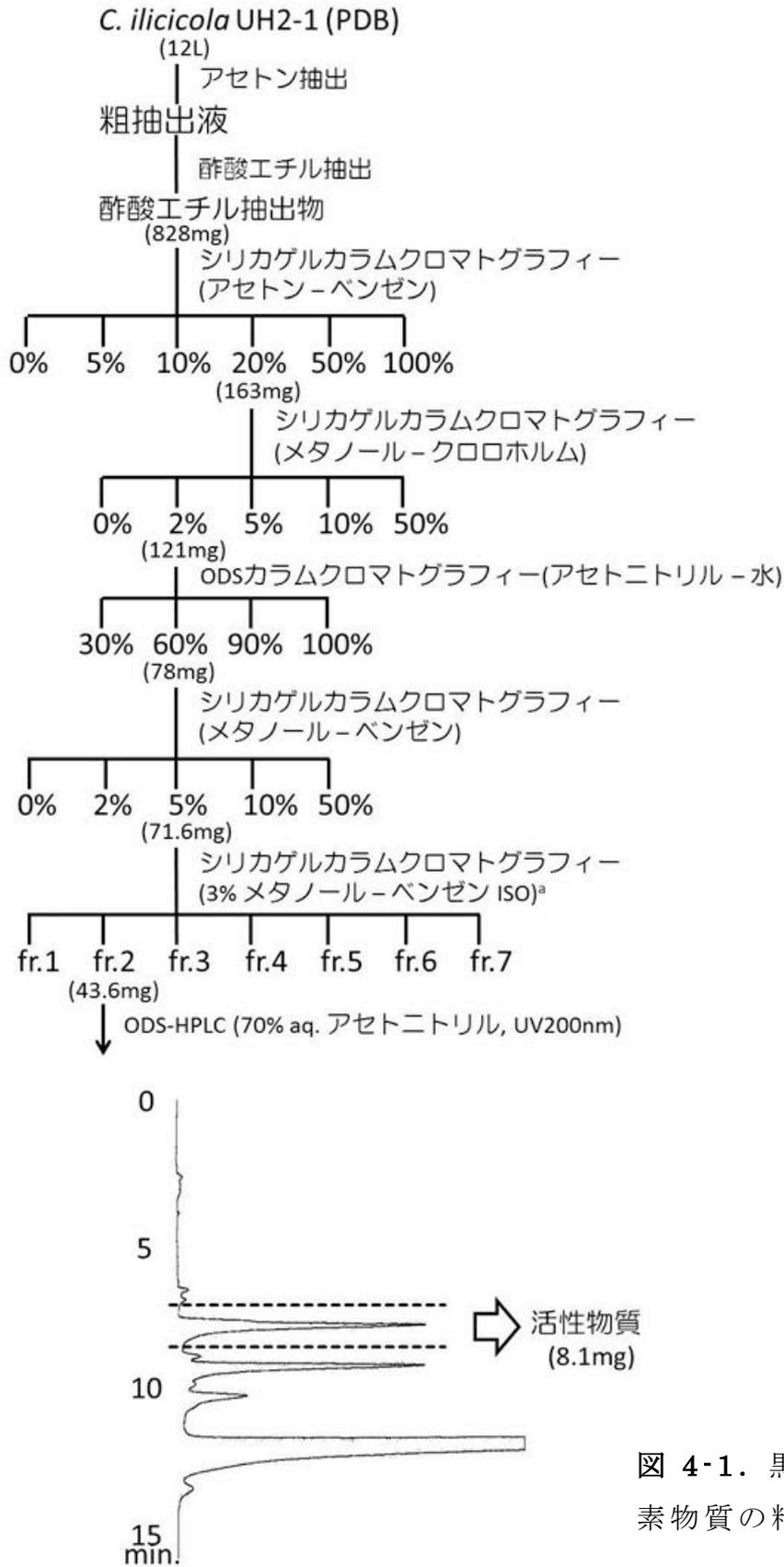


図 4-1. 黒根腐病菌の毒素物質の精製プロセス.

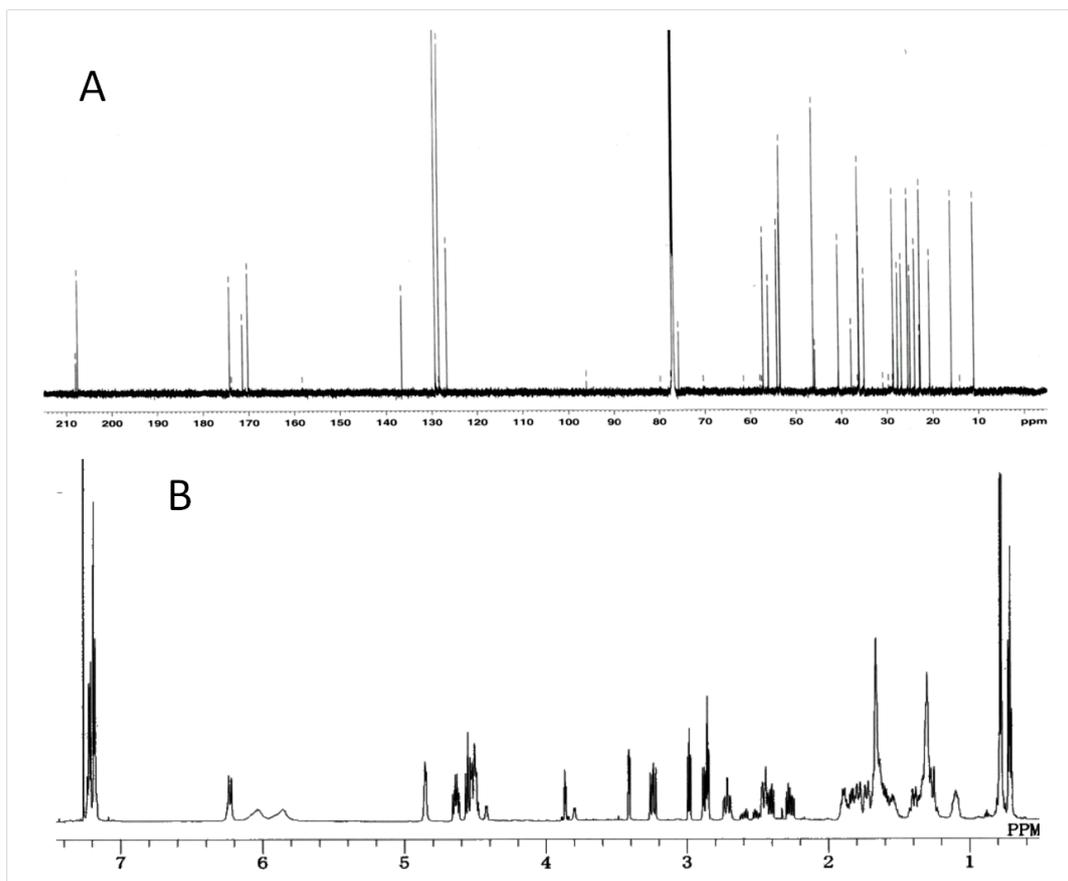


図 4-2. 黒根腐病菌から単離された毒素物質の  $^{13}\text{C}$ (A)および  $^1\text{H}$ (B)のスペクトルデータ.

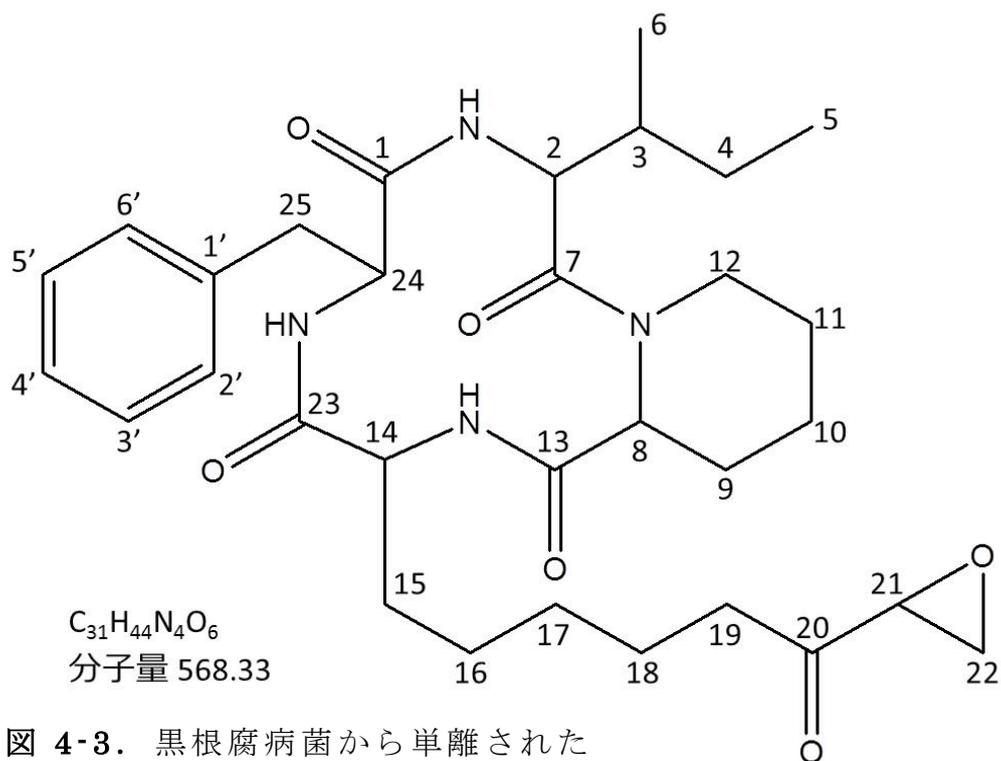


図 4-3. 黒根腐病菌から単離された PF1070A の構造式.

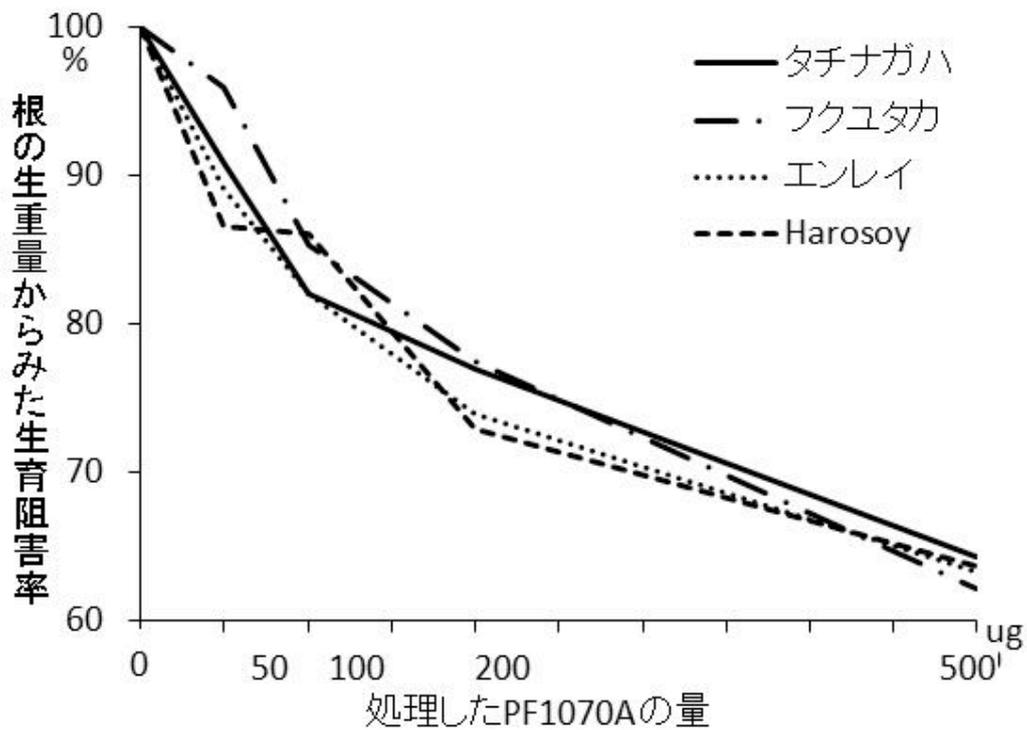


図 4-4. PF1070A に対するタチナガハおよびダイズ 3 品種（フクユタカ：強，エンレイ：中，Harosoy：弱）の反応。

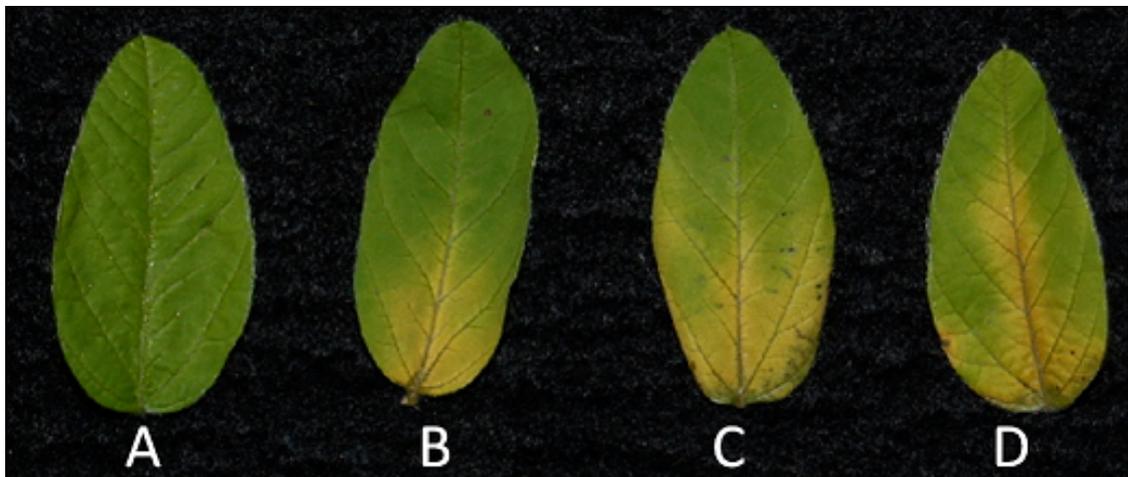


図 4-5. PF1070A 処理による葉の病徴. A.無処理, B.PF1070A を  $10 \mu\text{g}$  処理, C. PF1070A を  $40 \mu\text{g}$  処理, D.PF1070A を  $80 \mu\text{g}$  処理. PF1070A 所定量を 1ml の滅菌蒸留水に溶解し, 3cm 直径のガラス管に注入し, ダイズ初生葉を置床し, 葉柄から毒素を吸収させた. 写真は処理 1 週間後の様子.

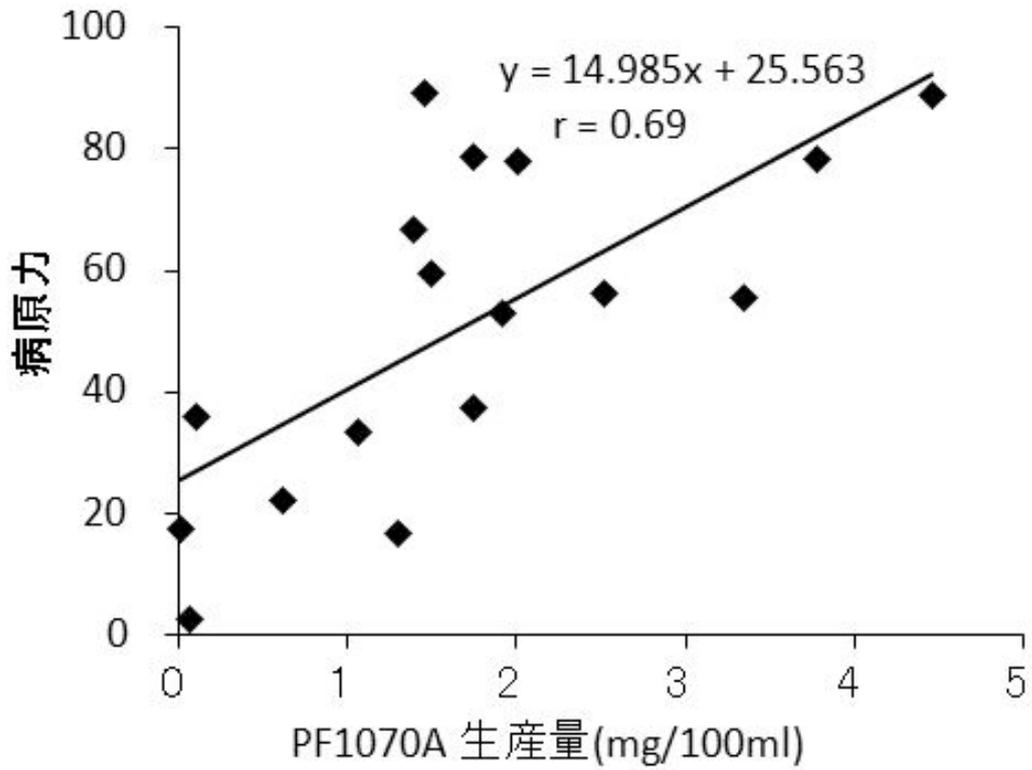


図 4-6. 黒根腐病菌 17 菌株の病原力と PF1070A 生産能力の関係解析

## 第 5 章 ダイズ黒根腐病の防除

現在までに各種薬剤の黒根腐病に対する防除試験がなされている（仲川・越智 2006）が，2013 年 10 月現在までに登録農薬は種子処理剤 2 剤である．また，黒根腐病の激発した圃場において 3 年間水稻を作付すると，黒根腐病の発生は著しく減少する（西ら 1999），とされているが，近年では 3 年以上水稻を作付していても黒根腐病が激発する圃場がしばしば見られており，黒根腐病の有効な防除法の確立が急務となっている．

そこで本報告では，処理費用をほとんど必要とせず，さらに手間をほとんど必要としない，現状のダイズ作に対応できる防除法として，播種時期の変更と冬期湛水を組み合わせることによる黒根腐病防除を試験した．また，播種時期を変更することによるダイズ根中の黒根腐病菌量の差異，さらに土壌中の黒根腐病菌への冬期湛水の影響を調査した．播種時期の変更は，播種時期を遅らせることで黒根腐病の発病程度が軽減し（角田ら 1988），また，黒根腐病菌による感染を少なくすることができる，との報告が過去になされており（Kuruppu et al. 2004a），その理由として黒根腐病菌の温度に対する感受性を挙げている（Kuruppu et al. 2004b）．また，第 3 章 VI においても播種時期を遅らせることで黒根腐病の感染を軽減できる可能性があることを示した．冬期湛水については，過去の報告でダイズ連作地において，冬期湛水により立枯性病害の発生率が少なくなる傾向が認められ，連年湛水区ではその効果が顕著であると報告されている（今野ら 1984）．また，その他の病害においても防除の報告があり，その理由としては伝染源量の低下とされている（Cintas and Webster 2001）．一方，効果のない病害も報告されており，その原因としては水温および土壌温度が挙げられている（Pullman and DeVay 1981）．また，そのほかの効果として，畑雑草の減少などが知られている．

### I．冬期湛水と晩播を組み合わせたダイズ黒根腐病の防除

## 材料と方法

### 圃場

2009～2010年、2010～2011年および2011年～2012年にかけて福島県大沼郡会津美里町のダイズ黒根腐病発生圃場で播種時期と冬期湛水の組み合わせによる黒根腐病の防除効果を検討した。試験は30a 2圃場で行い、うち、1圃場は冬期湛水処理を行い、さらにその半面には土壌還元消毒の効果を検討するため、ふすまを鋤き込んだ。ただし、2011～2012年にかけては給水せず、排水を止め、自然の降雨および融雪による湛水で代替し、ふすま処理も省略した(図5-1-1, 図5-1-2)。播種時期は湛水処理圃場および無湛水圃場ともにそれぞれ標準播種、晩播、極晩播の3回に分け、現地慣行品種「あやこがね」を播種した。試験圃場は2009年度でダイズ連作3年目であり、2009年度に黒根腐病が激発し、それぞれの圃場の黒根腐病発病度は冬期湛水処理圃場が69、無湛水圃場が65であった。なお発病度の算出方法は第3章Iに記述した通りである。

### 2009-2010年

2009年12月25日に湛水処理圃場では半面の15aにふすまを1t/10a鋤き込んだ後、湛水を開始した。圃場周辺は積雪のため湛水期間中の土壌の酸化還元電位については計測不可能であった。2010年4月21日に排水処理をした。その後、播種までにロータリーで2回耕うんした。播種は標準播種を6月4日、晩播を6月18日、極晩播を7月23日に行った。晩播、極晩播の播種量は標準播種と比較して2倍量播種した。播種は全て畝立て播種機で行い、種子はチウラム水和剤を粉衣した。施肥および各種薬剤散布管理は現地慣行で行った(N:P:K=7.5:6:6kg/10a)。なお、ふすま処理区については窒素分を除いた施肥を行った。生育調査は開花期や成熟期を達観調査し、成熟期調査として10月25日に区あたり20本をランダムに抜き取り、主茎長や子実重、百粒重などを調査し、さらに全刈収量調査を行った。収量については、コンバイン収穫したダイズを700kg用のフレキシブルコン

テナに入れ，ダイズ上面をならして各 4 カ所の高さを測定し，収量を推定した．発病調査は 10 月 25 日に区当たり 50 株を抜き取り，第 3 章 I の基準で調査した．

#### 2010-2011 年

2010 年 11 月 22 日に湛水処理圃場では半面の 15a にふすまを 0.5t/10a 鋤き込んだ後，湛水を開始した．ふすまの投入量を半分にしたのは，前年のふすま区において倒伏が目立ったためである．圃場周辺は積雪のため湛水期間中の土壌酸化還元電位については計測不可能であった．2011 年 4 月 22 日に排水処理をした．その後の管理作業は前年と同様に行った．播種は標準播種を 6 月 3 日に，晩播を 6 月 21 日，極晩播を 7 月 6 日に行った．極晩播のみ標準播種と比較して 2 倍量播種した．調査は生育調査として成熟期を達観調査し，成熟期調査として 10 月 25 日に区あたり 20 本をランダムに抜き取り，主茎長や子実重，百粒重などを調査し，さらに全刈収量調査を行った．収量の推定は前年同様に行った．発病調査は 10 月 25 日に区当たり 150 株を抜き取り，上記の基準で調査した．

#### 2011-2012 年

2011 年 12 月 22 日に湛水処理圃場では明きょおよび暗きょ栓を閉め，水の流れを止めた．なお，給水は行っていない．現地は冬期間に圃場表面を覆うのに十分な積雪があり，融雪の際は，圃場全面がほぼ冠水状態であった．またふすま処理は，ダイズが倒伏しない量を施用した前年の試験において黒根腐病防除効果が確認されなかったため，省略した．圃場周辺は積雪のため湛水期間中の土壌酸化還元電位については計測不可能であった．2012 年 4 月 24 日に明きょおよび暗きょ栓を解放し，排水した．その後の管理作業は前年までと同様に行った．播種は標準播種を 6 月 4 日に，晩播を 6 月 18 日，極晩播を 7 月 5 日に行った．極晩播のみ標準播種と比較して 2 倍量播種した．生育調査はサンプリング個体による開花期調査および 11 月 19 日に全刈収量調査

を行い、収量を推定した。発病調査は10月23日に区当たり150株を抜き取り、上記の基準で調査した。

## 結果

### 2009-2010年

ダイズ黒根腐病の発病度は表5-1-1に示した。2010年の標準播種・無湛水区の黒根腐病の発病度は36.3の多発生であった。それに対して、晩播・無湛水区の防除価は54.5であった。また、標準播種・湛水区の防除価は24.2であった。また、これらを組み合わせた晩播・湛水区の防除価は65.6であった。ふすま+湛水区は、いずれの播種時期においても湛水区よりさらに防除効果が高まった。一方、極晩播は湛水、無湛水に関わらず発病度が1.0程度であり、顕著な防除効果が確認された。また、分散分析の結果からも播種時期の変更がダイズ黒根腐病の発病度および発病株率に与える影響が有意であることが支持された。

生育・収穫期調査および収量調査の結果は表5-1-2に示した。試験期間中、ダイズの生育は順調であった。晩播および極晩播区は標準播種区と比較して播種が遅いこと、2倍量を播種していることから、1本当たりの生育量は劣っていた。なお、湛水区およびふすま+湛水区の収量は作業工程の都合上、合算した。標準播種・無湛水区で155.9kg/10aであったのに対して標準播種・湛水区では168.6kg/10aであった。また、晩播・無湛水区では162.3kg/10aであった。一方、晩播・湛水区では195.7kg/10aと無湛水区と比べて若干向上した。

### 2010-2011年

ダイズ黒根腐病の発病度は表5-1-3に示した。2011年の標準播種・無湛水区の黒根腐病の発病度は50.9の甚発生であった。それに対して、晩播・無湛水区の防除価は27.7であった。また、標準播種・湛水区の防除価は45.4であった。また、これらを組み合わせた晩播・湛水区の防除価は77.0であった。ふすま+湛水区は湛水区と比較して防除効果の向上は認められなかった。一方、極晩播の防除価は無湛水で95.7、

また湛水区およびふすま+湛水区でそれぞれ 72.5, 74.1 であり, 高い防除効果が確認された。しかし, 分散分析の結果からは, 播種時期の変更および湛水処理, ふすま+湛水処理ともに黒根腐病の発病度および発病株率に与える影響は有意ではなかった。

生育および収量調査の結果は表 5-1-4 に示した。標準播種では, 播種後, 無湛水圃場および湛水処理圃場ともに湿害を受け, 雑草が繁茂したため収量が大きく減少した。極晩播区は標準播種区と比較して 2 倍量を播種しているため, 1 本当たりの生育量は劣っていた。推定収量については, 晩播・無湛水区では 184.1kg/10a であった。それに対し, 晩播・湛水区では 182.3kg/10a と晩播・無湛水区と同等であった。

#### 2011-2012 年

ダイズ黒根腐病の発病度は表 5-1-5 に示した。2012 年の標準播種・無湛水区の黒根腐病の発病度は 32.5 の多発生であった。それに対して, 晩播・無湛水区の防除価は 53.8 であった。また, 標準播種・湛水区の防除価は 20.6 であった。また, これらを組み合わせた晩播・湛水区の防除価は 49.2 であった。2012 年は冬期湛水による防除効果は確認されなかった。一方, 極晩播の防除価は無湛水で 17.5, また湛水区で 12.3 であり, 防除効果は確認されなかった。また分散分析の結果, 播種時期の変更が黒根腐病の発病株率に有意に影響を与えていることが明らかになった。

開花期調査および収量調査の結果は表 5-1-5 に示した。極晩播では, 湛水, 無湛水圃場ともに全面に生育初期に除草剤が散布され多くが枯死してしまったため, 収量が劣った。標準播種・無湛水区の収量は 132.0kg/10a であったのに対して, 標準播種・湛水区では 163.2kg/10a であり, 晩播・無湛水区では 126.9kg/10a であった。これらを組み合わせた, 晩播・湛水区では 177.1kg/10a であった。標準播種および晩播区ともに無湛水区と比較して冬期湛水区での収量が多い結果となった。

表 5-1-1. 2010 年のダイズ黒根腐病発病調査結果.

播種時期	処理	調査株数	発病程度					発病株率 <sup>a)</sup>	発病度 <sup>b)</sup>	防除価
			0	1	2	3	4			
標準播種 (6/4)	無湛水	51	7	20	18	6	0	86.3	36.3	—
	湛水	50	13	20	16	1	0	74.0	27.5	24.2
	ふすま+湛水	51	27	12	9	3	0	47.1	19.1	47.4
晩播 (6/18)	無湛水	50	29	11	9	0	1	42.0	16.5	54.5
	湛水	50	29	17	4	0	0	42.0	12.5	65.6
	ふすま+湛水	50	34	16	0	0	0	32.0	8.0	80.0
極晩播 (7/23)	無湛水	50	49	1	0	0	0	2.0	0.5	98.6
	湛水	50	48	2	0	0	0	4.0	1.0	97.2
	ふすま+湛水	50	49	1	0	0	0	2.0	0.5	98.6
分散分析	播種時期							*	*	
	処理							ns	ns	

a): 角変換後の分散分析で, \*: 5%水準で有意差あり, ns: 5%水準で有意差なし.

b): フリードマン検定で, \*: 5%水準で有意差あり, ns: 5%水準で有意差なし.

表 5-1-2. 2010 年のダイズの生育および収量調査結果.

処理	開花期	成熟期	地上部重		成熟期調査				推定収量 (kg/10a)	
			8/18 (g/本)	主茎長 (cm)	稔実莢数 (/本)	粗子実重 (g/本)	篩上重* (g/本)	百粒重 (g)		
標準播種 (6/4)	無湛水		37.9	55.9	68.7	25.3	24.3	29.7	155.9	
	湛水	7/21	9/30	40.9	56.2	48.0	21.7	21.0	28.1	168.6
	ふすま+湛水			42.7	58.7	45.0	22.4	22.0	30.8	
晩播 (6/18)	無湛水		22.9	55.8	38.0	15.4	14.8	25.0	162.3	
	湛水	8/1	10/8	18.1	56.9	43.3	16.1	15.6	25.5	195.7
	ふすま+湛水			16.5	55.0	37.4	13.6	13.0	23.6	
極晩播 (7/23)	無湛水		3.0	53.8	31.2	12.8	12.5	28.6	92.5	
	湛水	8/24	10/25	3.4	54.7	31.5	12.9	12.6	28.8	122.5
	ふすま+湛水			2.9	47.1	35.3	11.8	11.5	27.0	

\*篩6.7mm以上の子実重

表 5-1-3. 2011 年のダイズ黒根腐病発病調査結果

播種時期	処理	調査株数	発病程度					発病株率 <sup>a)</sup>	発病度 <sup>b)</sup>	防除価
			0	1	2	3	4			
標準播種 (6/3)	無湛水	151	13	27	55	53	3	91.4	50.9	-
	湛水	153	56	46	31	19	1	63.4	27.8	45.4
	ふすま+湛水	151	48	64	29	9	1	68.2	25.3	50.3
晩播 (6/21)	無湛水	150	53	36	13	33	15	64.7	36.8	27.7
	湛水	150	103	27	17	3	0	31.3	11.7	77.0
	ふすま+湛水	150	64	28	24	25	9	57.3	31.2	38.7
極晩播 (7/6)	無湛水	151	139	10	1	1	0	7.9	2.2	95.7
	湛水	150	95	34	16	2	3	36.7	14.0	72.5
	ふすま+湛水	150	101	29	11	8	1	32.7	13.2	74.1
分散分析	播種時期							ns	ns	
	処理							ns	ns	

a): 角変換後の分散分析で, ns: 5%水準で有意差なし.

b): フリードマン検定で, ns: 5%水準で有意差なし.

表 5-1-4. 2011 年のダイズの生育および収量調査結果

播種時期	処理	成熟期	成熟期調査				推定収量 (kg/10a)
			主茎長 (cm)	稔実莢数 (/本)	粗子実重 (g/本)	篩上重* (g/本)	
標準播種 (6/3)	無湛水		35.3	42.2	32.0	30.9	80.8
	湛水	10/6	31.0	44.7	32.7	31.7	26.0
	ふすま+湛水		30.1	48.9	32.9	31.9	25.8
晩播 (6/21)	無湛水		58.3	52.5	39.5	38.6	30.5
	湛水	10/11	48.3	43.3	32.4	31.9	27.6
	ふすま+湛水		51.7	42.0	30.0	29.0	26.4
極晩播 (7/6)	無湛水		54.7	26.6	21.3	21.0	27.9
	湛水	10/16	40.7	30.0	16.4	13.6	24.3
	ふすま+湛水		53.6	23.0	15.3	14.2	26.7

\*篩6.7mm以上の子実重

表 5-1-5. 2012 年のダイズ黒根腐病発病調査結果とダイズの生育および収量調査結果

播種時期	処理	推定開花日	調査株数	発病程度					発病株率 <sup>a)</sup>	発病度 <sup>b)</sup>	防除価	推定収量 (kg/10a)
				0	1	2	3	4				
標準播種 (6/4)	無湛水	7/24	146	38	45	44	19	0	73.9	32.5	-	132.0
	湛水		155	48	66	30	10	1	69.0	25.8	20.0	163.2
晩播 (6/18)	無湛水	8/2	147	73	61	12	1	0	50.5	15.0	53.8	126.9
	湛水		146	72	53	20	1	0	50.7	16.5	49.2	177.1
極晩播 (7/5)	無湛水	8/8	150	53	46	38	13	0	64.7	26.8	17.5	78.9
	湛水		149	51	44	38	14	2	65.8	28.5	12.3	48.8
分散分析	播種時期								*	ns		
	処理								ns	ns		

a): 角変換後の分散分析で, \*: 5%水準で有意差あり. ns: 5%水準で有意差なし.  
 b): フリードマン検定で, ns: 5%水準で有意差なし.

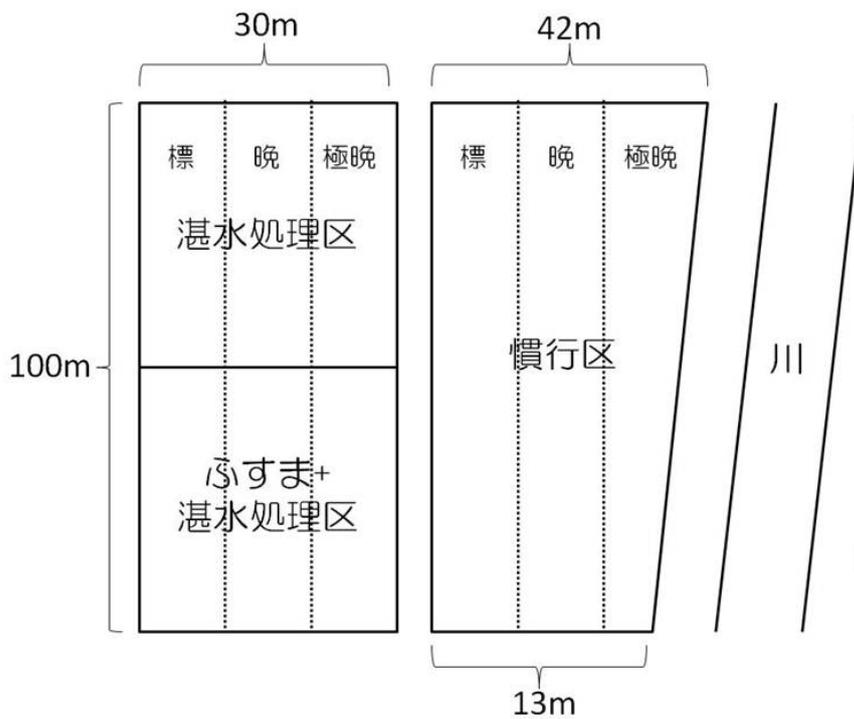


図 5-1-1. 試験圃場の構成



図 5-1-2. 湛水開始前にふすまを散布し，ロータリーで鋤き込んでいる様子（2009年12月25日撮影）

## II. 播種時期の違いによるダイズ根中の黒根腐病菌量の差異

### 材料と方法

#### ダイズサンプル

試験は 2011 年の現地圃場におけるダイズサンプルを用いた。標準播種，晩播，極晩播それぞれ播種 4 週間後のダイズ株を抜き取り，根中の黒根腐病菌 DNA 量を第 3 章 VII で開発したリアルタイム PCR で定量した。播種 4 週間後としたのは，圃場では播種後 2~4 週間後に黒根腐病菌がダイズ根に感染する（西ら，1999），とされているからである。それぞれダイズ 3 個体を用い，1 個体からサンプルを 3 つ抽出した。

#### DNA 抽出およびリアルタイム PCR

ダイズの根をよく水洗し，5mm 程度に切断し，混合した。そこから 50mg を測りとり，乳鉢と乳棒を用いて液体窒素下で細かくすりつぶした。以下は DNeasy Plant Mini Kit のプロトコールにしたがって DNA を抽出した。抽出 DNA を第 3 章 VII のプロトコールに従い，黒根腐病菌の DNA 量を定量した。リアルタイム PCR は 3 反復 2 回繰り返して行った。根中の DNA 量はあらかじめ DNA 量の分かっている 4 種類の濃度のポジティブコントロール DNA を PCR に加え，その  $C_T$  値を参考にして算出した。

### 結果

結果は図 5-2-1 に示した。播種 4 週後のダイズ根中の黒根腐病菌量は標準播種と比較して晩播，極晩播では有意に少ないことが明らかになった（Scheffe's F test,  $P < 0.01$ ）。極晩播と晩播との比較では極晩播の方が若干菌量が少なかったが，その差は有意ではなかった。

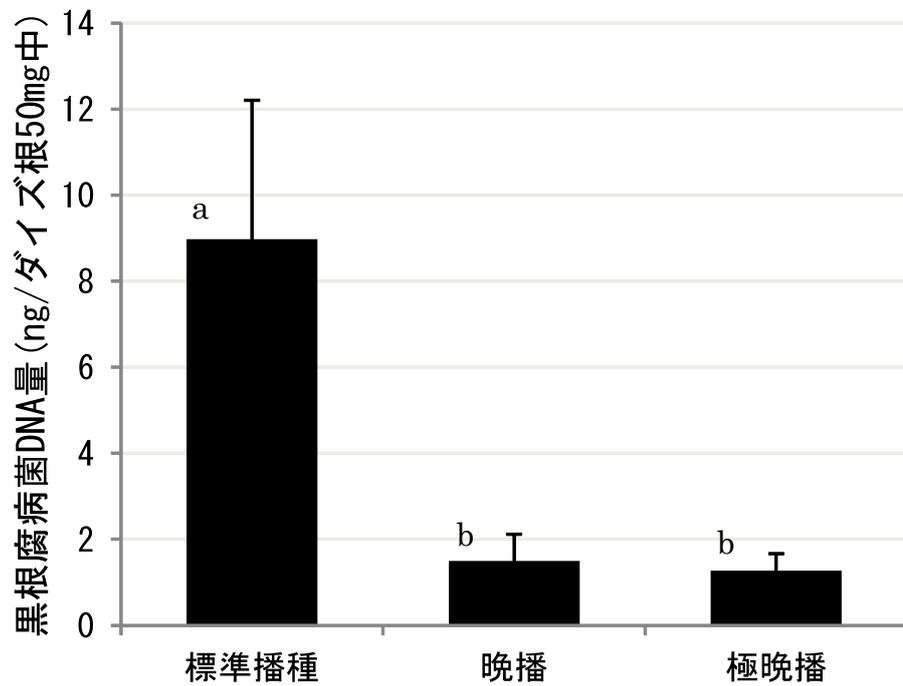


図 5-2-1. 播種時期ごとの播種 4 週間後のダイズ根中の黒根腐病菌 DNA 量の比較. 異なるアルファベットは Scheffe's F test ( $P < 0.01$ ) において有意な差があることを示す. エラーバーは標準誤差を示す.

### Ⅲ． 土壌中の黒根腐病菌への冬期湛水の影響

#### 材料と方法

2011年から2012年にかけて各試験区について土壌をサンプリングし、土壌中の黒根腐病菌数を調査した。土壌の採集法は第3章Ⅳに従った。調査は黒根腐病菌検出培地を用いて行った。1サンプルあたり2反復試験した。

#### 結果

結果は表5-3-1に示した。第3章Ⅳと同様、栽培後期になると土壌中の黒根腐病菌は増加した。また播種時期による菌数の差、また冬期湛水処理の有無による菌数の差に傾向は認められなかった。

表 5-3-1. 2011 年から 2012 年までの現地試験圃場における黒根腐病菌数の推移

		乾土1gあたりの黒根腐病菌数			
		2011年		2012年	
		6/3	7/6	10/25	6/4
慣行	標播	19.4	2.8	29.4	8.8
	晩播	-	0	128.9	7.1
	極晩播	-	-	122.3	4.1
湛水	標播	19.2	7.0	49.5	20.8
	晩播	40.5	7.1	74.2	42.5
	極晩播	-	-	0	15.3
心すま	標播	24.3	3.3	10.9	-
	晩播	3.1	4.2	236.5	-
	極晩播	-	-	290.9	-

注：-は試験していないことを示す

## 考察

ダイズ黒根腐病は栽培期間中に目に見える病変は早期黄化程度で、気づかれにくい病害であり、現在も病害であるとの認識が非常に少ない病害である。しかし、転換畑ダイズ作が増加している現在、潜在的な発生面積は非常に大きいと考えられ、本病の発生生態の解明、防除法の確立によりダイズ収量は確実に増加するものと考えられる。

2009～2010年、2010～2011年の冬期湛水圃場では統計的に有意な差はなかったが、両年ともに極晩播を除き、防除効果は確認された。2010～2011年試験において極晩播・ふすま＋湛水区および極晩播・湛水区ではともに極晩播・無湛水区と比較して発病度、収量ともに劣った。極晩播の播種当日に湛水試験圃場では土壌水分が多く播種作業が困難であったため、湿害の影響を受けた可能性があるが、はっきりした原因は明らかではない。2011～2012年の試験では冬期湛水による防除効果は確認されなかった。この年の試験では圃場に給水をせず、排水を止めたのみであったため、湛水効果が十分でなかった可能性が考えられる。現実には冬期に用水を確保することが困難であることから、現場に沿った試験を行う目的で給水をしなかったものである。今後は試験を重ねて解析を行う必要がある。また、この年は冬期湛水区が無湛水区の収量を著しく上回った。無湛水区では雑草害が目立ったためと考えられ、冬期湛水そのものの効果かどうかは不明である。

Cintas and Webster (2001)によると、*Sclerotium oryzae* では冬期湛水することにより伝染源が減少すると報告している。一方、効果のない病害も報告されており、その原因としては水温および土壌温度が挙げられている (Pullman and Devay 1981)。冬期湛水による黒根腐病菌の土壌中の伝染源量の推移について、2011年から2012年にかけて調査した結果、冬期湛水の有無で土壌中の黒根腐病菌数の違いは認められなかった。2011年から2012年にかけては排水を止めただけで、湛水が不十分だった可能性もあるため、今後調査する必要がある。今回の試験結果では冬期湛水の黒根腐病に対する防除効果は卓越したものではなかったが、黒根腐病に対する有効な防除法がない現状では

積極的に適用すべき方法であると考えられる。また、冬期湛水の効果として、無湛水圃場と比較して湛水圃場では雑草による被害が軽減された（図 5-4-1）。このことは、ダイズ生産において大きな問題となっている雑草害の軽減にもつながると思われる。

2009～2010 年の試験において湛水区の半面にはふすまを 1t/10a 処理した。標準播種、晩播ともに防除効果は認められた（極晩播は無湛水でも発病が低かったため差はなかった）が、倒伏が目立った。冬期間では温度が足りず、十分に分解しなかったため、と考えられる。そこで、2010～2011 年は分量としたが、防除効果は認められなかった。そのため、現況のダイズ生産において、およそ 35 円/kg（2009 年現在）の費用がかかるふすま処理はコストに見合うだけの効果がないと判断し、翌年はふすま処理を中止した。

2010 年および 2012 年において播種時期の変更が有意に黒根腐病の発生に影響を与えることが明らかになった。2011 年においても、有意ではなかったが、播種時期が遅いほど黒根腐病の発生は少なかった。Kuruppu ら（2004b）は温度の差による黒根腐病菌の感染率の違いを指摘している。すなわち、ダイズの根に黒根腐病菌が感染するための好適な温度は 20℃～30℃であるとしており、感染率は 35℃では著しく低下すると報告している。第 3 章 VI の結果からでも同様のことが示唆されている。現地圃場至近の会津若松市の試験期間におけるアメダスデータ（図 5-4-2）によると、標準播種と比べ、晩播、極晩播では黒根腐病菌にとっての感染適温期間が短いため、黒根腐病菌の感染から回避できている可能性があると考えられる。また、標準播種、晩播、極晩播における播種 4 週間後のダイズ根中の黒根腐病菌 DNA 量は、播種が遅いほど少ない結果となった。このことから播種を遅くすることで感染する時期が遅くなっているか、もしくは感染しても根中で黒根腐病菌が増加することが難しい状態となっていることが示唆された。

さらに今回の防除試験による 3 年間の発病株率および発病度をまとめ、繰り返しのある二元配置分散分析を行った結果、播種時期および

湛水処理の有無による交互作用はなく、播種時期による発病株率および発病度には差があり、また湛水処理の有無による発病株率および発病度には差がないことがない傾向にあることが明らかになった ( $P<0.05$ ) (表 5-4-1)。播種が遅いほど発病は減少することは明らかになったが、同時にダイズは基本的には減収する。今回の試験結果からは、極晩播では著しく減収するため、標準播種より 2 週間程度遅らせた晩播が現実的であると思われる。今後は、黒根腐病無発生圃場で収量に影響を与えない晩限の播種時期を明らかにすることが必要である。その結果と本研究の結果を合わせることにより、黒根腐病を防除でき、さらに収量も確保できる播種適期を見つけることができると考えられる。

ダイズ黒根腐病に対する晩播および冬期湛水それぞれを試験した報告は過去にある (角田ら 1999, 今野ら 1984)。しかし、これらを組み合わせる試験した報告はいまだない。今回、晩播および冬期湛水を組み合わせる試験した結果、それぞれの単独処理よりも効果が上回る可能性が示唆された。上述のとおり、現状では黒根腐病に対する有効な防除法は開発されていない。黒根腐病に効果のある技術をいくつか組み合わせることで被害を抑制していくことが重要であると考えられる。また、黒根腐病発生圃場においては適期から 2 週間ほど播種時期を遅らせた晩播程度であれば、収量にはマイナスの影響はないことが明らかになった。しかし、問題点は多い。まず、1 地域での 3 年間の試験のため、汎用性があるのか不明であり、今後は他場所にて試験を行い、データを重ねる必要がある。また、冬期に用水が使える圃場が限られているため、2011~2012 年に行ったような、圃場の排水を止めて降雨や降雪を圃場に溜める、などによる代替試験の有効性を確認する必要があると考えられる。また、播種時期を遅らせることによる黒根腐病防除の機構のさらなる解析、播種時期を遅らせることによりダイズの生育期間は短くなり、収量は減少するため、適切な播種時期を解明する必要がある。

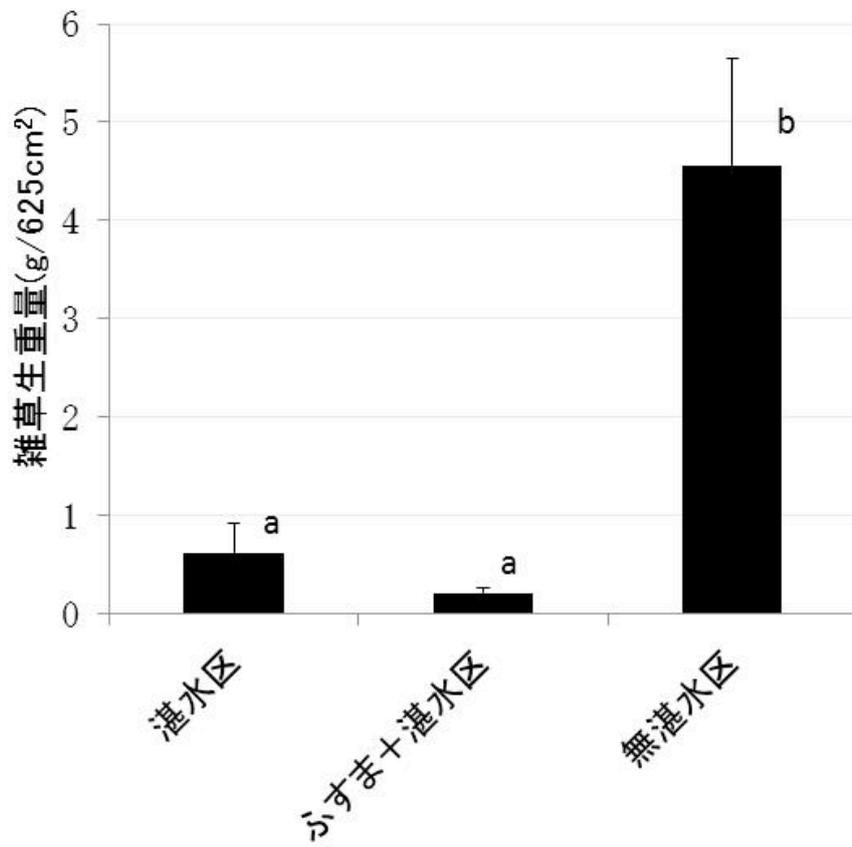


図 5-4-1. 1区 25cm 四方の雑草の生重量を比較. 3 反復行  
 った(2011年 6月 21日調査). 異なる文字は Sheffe's F test  
 で処理間に有意な差 ( $P < 0.01$ ) があったことを示す.

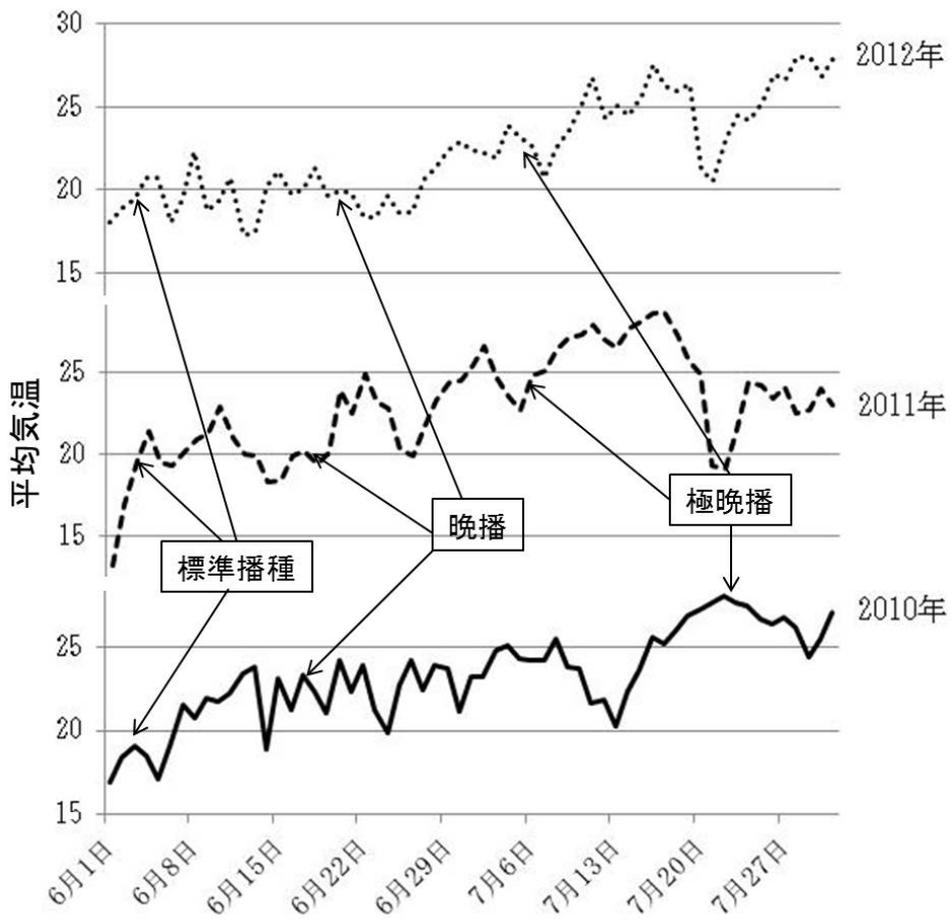


図 5-4-2. 現地圃場至近の会津若松市の試験期間におけるアメダスデータ。データから平均気温を抜粋しグラフにまとめた。

表 5-4-1. 3年間の防除試験における播種時期および湛水の有無による防除効果の解析

播種時期	処理	発病株率 <sup>a)</sup>			発病度 <sup>b)</sup>		
		2010	2011	2012	2010	2011	2012
標準播種	無湛水	86.3	91.4	73.9	36.3	50.9	32.5
	湛水	74.0	63.4	69.0	27.5	27.8	25.8
晩播	無湛水	42.0	64.7	50.5	16.5	36.8	15.0
	湛水	42.0	31.3	50.7	12.5	11.7	16.5
極晩播	無湛水	2.0	7.9	64.7	0.5	2.2	26.8
	湛水	4.0	36.7	65.8	1.0	14.0	28.5
分散分析	播種時期			*			*
	処理			ns			ns

a): 角変換後の繰り返しのある二元配置分散分析で, \*: 5%水準で有意差あり. ns: 5%水準で有意差なし.

b): 繰り返しのある二元配置分散分析で, \*: 5%水準で有意差あり. ns: 5%水準で有意差なし.

## 第 6 章 総合考察

ダイズ黒根腐病は、ダイズの開花期が始まる 8 月下旬頃に葉に退緑壊疽斑を生じるのが最初の病徴である。しかし、必ずしも感染株に退緑壊疽斑が生じるわけでもなく、また被害の大きい個体でも枯死することはまれで、他のダイズ個体よりも早期に枯れあがるのが特徴であるため、気付かれにくい病害である。そのため、現在の被害実態はほとんど明らかになっていない。しかし、転換畑ダイズ作が増加している現在、潜在的な発生面積は非常に大きいと考えられ、本病の発生生態の解明、防除法の確立によりダイズ収量は確実に増加するものと考えられる。

ダイズ黒根腐病の土壌中からの特異的検出法を開発し、この手法を用いて黒根腐病発生圃場において経時的な黒根腐病菌の動態を調査した。その結果、栽培期間中の黒根腐病菌の菌数増加は、栽培初期の菌数に左右されず、連作圃場よりむしろ、転換初年度において黒根腐病菌数が劇的に増加する可能性があることが明らかになった。その原因としては、水田にすることや、近年の有機質肥料投入の減少による、土壌微生物層の貧弱化により、黒根腐病菌に対する競合微生物が減少している可能性が考えられるが、詳細は不明であり、今後調査する必要がある。また、黒根腐病菌の生存箇所は土壌中だけでなくダイズ残渣中の可能性も考えられ、黒根腐病が激発した圃場において、水稻一作後の土壌中に残存しているダイズ根残渣中の黒根腐病菌の感染能力について試験した。その結果、約 1 割の残渣で感染能力を確認し、水稻を一年作付しても残渣中の黒根腐病菌は死滅せず、次年度の一次伝染源となりうることが明らかになった。また、土壌中の黒根腐病菌の微小菌核の発芽適温は  $20^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$  と広い温度範囲であることが明らかになった。過去の報告 (Kuruppu et al. 2004b) とは異なる結果ではあるが、日本においては黒根腐病の被害の大きな東北、北陸地域の播種最盛期の最高気温が  $20^{\circ}\text{C}$  前後であることから、播種時期と黒根腐病菌の発芽時期の重なりが被害を甚大にしている可能性が示唆された。

しかし、発生生態にはいまだに不明な点が多い。例えば黒根腐病菌への感染はダイズ播種後の早いうちから始まるにも関わらず、病徴が現れるのは開花期以降になるのはなぜか。3年以上水稻作をしている圃場の転換初年でも大発生することがあるが、伝染源はどのような状態で生存しているのかは未だに不明である。どのような条件で病気が多発するのか、また発生が少なくなるのか、圃場観察を行いながら今後も調査する必要がある。

ダイズ黒根腐病菌の産生毒素を同定した。この毒素は4つのアミノ酸からなる環状ペプチド PF1070A であった。Yoshida et al. (1993) は PF1070A が抗腫瘍能力を持っていると報告し、その後、PF1070A は金属結合性たんぱく質であるメタロチオネインを誘導する機能を持つことが明らかになっている (Asahi et al. 1999)。しかし、植物病原物質としての報告は初めてである。

本物質と類似した構造を持つ HC-toxin について細胞増殖抑制やアポトーシスの誘導を引き起こすヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤としての活性が病原性に関与していることが明らかになっており (Ransom and Walton 1997)、同様に Trapoxin A (cyclo(L-Phe-L-Phe-D-Pip-L-Aoe)) においても HDAC 阻害活性を持つことが明らかになっている (Yoshida and Sugita 1992)。これらはともにエポキシド (3員環のエーテル) をもっており、HDAC 活性はエポキシドによるものと明らかにされている。今回同定した PF1070A も同様に4つのアミノ酸から構成され、エポキシドを持つ環状ペプチドであることから HDAC 阻害活性を持ち、このことが黒根腐病の発病機作に関与していると考えられるが、今後 PF1070A の化学的な働きを調査する必要がある。

現在までに有効な黒根腐病抵抗性品種を開発するため、多くの試験がなされている (中島ら 1994) が、黒根腐病に対するダイズ品種の反応が曖昧なことが多く、試験者により品種の評価が分かれ、有効な抵抗性品種は確立されていない。また、黒根腐病に対して現在までに有効な防除法は確立されていない。登録農薬については、各種薬剤の

黒根腐病に対する防除試験がなされている（仲川・越智 2006）が、種子処理剤 1 剤（2013 年 3 月現在）と防除研究は進んでいない現状である。一方、過去に報告されてきたような、3 年間水稲を作付すると、黒根腐病の発生は著しく減少する（西ら, 1999）、などの知見は、近年では 3 年以上水稲を作付していても、転換初年目に黒根腐病が激発する圃場がしばしば見られており、現在では通用しなくなっている。一刻も早い黒根腐病の有効な防除法の確立が求められている。

そこで、処理費用をほとんど必要とせず、さらに手間をほとんど必要としない、現状のダイズ作に対応できる新しい防除法として、冬期湛水および播種時期の変更を組み合わせることによる黒根腐病防除を試験した。その結果、これら単体および組み合わせることにより黒根腐病を防除し、そして若干増収できることが明らかになった。冬期湛水については防除効果が低く、その処理前後で土壌中の黒根腐病菌数の変化が無処理と比較して差がなかったが、晩播に関しては防除効果も大きく、標準播種と比較して晩播、極晩播ではダイズ根中の DNA 量が少なく、感染の遅延、もしくは感染しても根中で黒根腐病菌が増殖困難な状態になっていると推察される。今後は本手法の汎用性を確認するため、他場所にて試験を行い、データを重ねる必要がある。冬期湛水については冬期に用水が使用できる圃場が限られ、鳥インフルエンザなど諸般の事情から実施できない地域もある。したがって今後は代替技術も検討する必要がある。また、晩播については、ダイズは播種時期が遅くなるとその分生育期間が短くなり、収量は下がる傾向にあるため、収量と病気による被害の関係を見極め、適用する必要がある。したがって本手法はあくまでも確実な防除法がないための黒根腐病回避法と考えられる。今後は、より確実な抵抗性品種や有効な農薬の開発が急務と考えられる。

## I. 摘要

1. 新潟県（2009年）および福島県（2009年，2010年）のダイズ黒根腐病の発生実態を調査したところ，両県とも県内全域で黒根腐病が蔓延しており，甚大な被害をもたらしていることが明らかになった．

2. 培養大麦粒を用いたダイズ黒根腐病菌の低温長期保存法を開発した． $-80^{\circ}\text{C}$ で保存することで，黒根腐病菌は3年以上継代不要で生存すること，また，培養大麦粒はそのまま病原力試験に用いることが可能であった．

3. 土壌中におけるダイズ黒根腐病菌の特異的検出法を開発し，その1年間における動態解析を行った．その結果，栽培期間中の黒根腐病菌の菌数増加は，栽培初期の菌数に左右されないことが明らかになった．また，黒根腐病が激発した圃場において，水稻一作後の土壌中に残存しているダイズ根残渣中の黒根腐病菌は死滅せず，次年度の一次伝染源となり得ることが明らかになった．また本手法を用いて，本病の一次伝染源である土壌中における黒根腐病菌の微小菌核からの生育適温を解析したところ， $20^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ 程度であることが明らかになった．

4. ダイズ黒根腐病菌のリアルタイム PCR を用いた黒根腐病菌の特異的定量法を開発した．本手法は，検出培地を用いて土壌から分離した黒根腐病菌菌数と高い相関が見られ，土壌中の黒根腐病菌の菌量を推定するのに有効であることが示唆された．

5. ダイズ黒根腐病菌の産生毒素を，特徴的な環状ペプチドである PF1070A と同定した．本物質は金属結合性たんぱく質であるメタロチオネインを誘導する機能を持つことが明らかになっている．しかし，植物病原物質としての報告は初めてである．本毒素に対するダイズ品種の反応には差がなかったが，黒根腐病菌の病原力と毒素産生量には相関があった．これらのことから PF1070A は黒根腐病菌の病原力に

関与していることが示唆された。

6. 2009～2012 年にかけてダイズ黒根腐病発生圃場で冬期湛水と晩播による黒根腐病の抑制効果について検証した。2 圃場のうち 1 圃場を冬期湛水し，翌春ダイズを標準播種（6 月上旬），晩播（6 月下旬），極晩播（7 月）で播種し，黒根腐病の抑制効果および収量を調べた。標準播種・無湛水区に対する標準播種・冬期湛水，晩播・無湛水および極晩播・無湛水の防除価はばらつきが大きいものの 3 ヶ年の平均で 29.9，45.3，70.6 であった。一方，冬期湛水と晩播を組み合わせた場合，平均 63.9 で冬期湛水と晩播の単独処理に比較し，防除効果が高まる傾向が認められた。極晩播は，防除効果は高いものの，収量が著しく低下することから実用性がないと考えられた。晩播は標準播種と比較し，ほぼ同等の収量であった。また，冬期湛水により，標準播種と晩播ともに収量が増加する傾向が認められた。冬期湛水についてはその前後において土壌中の黒根腐病菌量に変化がなかったため，効果は判然としなかったが，晩播に関しては防除効果も大きく，播種が遅いほどダイズ根中の DNA 量が少なく，感染の遅延，もしくは感染しても根中で黒根腐病菌が増殖困難な状態になっていると推察される。

## II. 参考文献

Appel, D. J. and T. R. Gordon (1995) Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Exp. Mycol.* 19 (2) : 120-128

荒井義光・二瓶直登・遠藤あかり・越智直 (2010) 福島県における大豆黒根腐病の発生状況と被害程度. *日作東北支部報.* 53 : 47-48

荒井義光・遠藤あかり・二瓶直登 (2011) 福島県における大豆黒根腐病の発病時期別の生育と収量. *日作東北支部報.* 54 : 43-44

Asahi, I., N. Miura, Y. Yamabe, H. Toyoda, N. Imura, M. Koyama and A. Naganuma (1999) PF1070A, a novel and potent inducer of the synthesis of metallothionein. *Biochem.* 38 : 10415-10423

Ashizawa, T., M. Takahashi, J. Moriwaki and K. Hirayae (2010) Quantification of the rice false smut pathogen *Ustilaginoidea virens* from soil in Japan using real-time PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 128(2) : 221-232

Awuah, R. T. and J. W. Lorbeer (1986) A sorbose-based selective medium for enumerating propagules of *Fusarium oxysporum* f.sp *apii* race-2 in organic soil. *Phytopathol.* 76(11) : 1202-1205

Bell, D. K. and E. K. Sobers (1966) A peg pod and root necrosis of peanuts caused by a species of *Calonectria*. *Phytopathol.* 56(12) : 1361-1364

Bernaux, P. (1979) Identification of some diseases of soybean in Cameroon. *Agronomie Tropicale.* 34 : 301-304

Berner, D. K., G. T. Berggren, J. P. Snow and E. P. White (1988) Distribution and Management of Red Crown Rot of Soybean in Louisiana. *Appl. Agric. Res.* 3(3) : 160-166.

Berner, D. K., G. T. Berggren and J. P. Snow (1991) Effects of glyphosate on *Calonectria crotalariae* and red crown rot of soybean. *Plant Dis.* 75(8) : 809-813

Cintas, N. A. and R. K. Webster (2001) Effects of rice straw management on *Sclerotium oryzae* inoculum, stem rot severity, and yield of rice in California. *Plant Dis.* 85(11) : 1140-1144

Crous, P. W., M. J. Wingfield and A. C. Alfenas (1993) *Cylindrocladium parasiticum* sp-nov, a new name for *C. crotalariae* *Mycological Res.* 97(7) : 889-896

Fortnum, B. A. and S. A. Lewis (1983) Effects of growth regulators and nematodes on *Cylindrocladium* black root rot of soybean. *Plant Dis.* 67(3) : 282-284

Gaskill, J. O. (1968) Breeding for *Rhizoctonia* resistance in sugarbeet. *J. Amer. Sugar Beet Tech.* 15 : 107-119

Griffin, G. J. (1977) Improved selective medium for isolating *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia from naturally infested soils. *Can. J. Microbiol.* 23(6) : 680-683

Griffin, G. J., D. A. Roth and N. L. Powell (1978) Physical factors that influence the recovery of microsclerotium populations of

*Cylindrocladium crotalariae* from naturally infested soils .  
Phytopathol. 68(6) : 887-891

Harris, N. E. and M. K. Beute (1982) Histological responses of peanut germplasm resistant and susceptible to *Cylindrocladium crotalariae* in relationship to inoculum density. Phytopathol. 72 : 1250-1256

Hedrik, M. L. and C. I. Southards (1976) Reaction of soybean cultivars to *Meloidogyne incognita*, *Sclerotium rolfsii* and *Cylindrocladium crotalariae* (Abstract). J Nematol. 8 : 287

Hirooka, Y., J. Takeuchi, H. Horie and K. T. Natsuaki (2008) *Cylindrocladium* brown leaf spot on *Howea belmoreana* caused by *Calonectria ilicicola* (anamorph : *Cylindrocladium parasiticum*) in Japan. J. General Plant Pathol. 74(1) : 66-70

Hirota, A., A. Suzuki, H. Suzuki and S. Tamura (1973) Isolation and biological activity of Cyl-2, a metabolite of *Cylindrocladium scoparium*. Agric. Biol. Chem. 37 : 643-647

Inami, K., C. Yoshioka, Y. Hirano, M. Kawabe, S. Tsushima, T. Teraoka and T. Arie (2010) Real-time PCR for differential determination of the tomato wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and its races. J. Gen. Plant Pathol. 76(2) : 116-121

Jin, H., G. L. Hartman, C. D. Nickell and J. M. Widholm (1996) Characterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. Phytopathol. 86 : 277-282

Johal, G. S. and S. P. Briggs (1992) Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. *Science*. 258 : 985-987

Johnston, S. A. and M. K. Beute (1975) Histopathology of *Cylindrocladium* black rot of peanut. *Phytopathol.* 64 : 649-653

Kawai, M., D. H. Rich and J. D. Walton (1983) The structure and conformation of HC-toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111 : 398-403

Kim, K. D., J. S. Russin and J. P. Snow (1998) Susceptibility to *Calonectria ilicicola* in soybean grown in greenhouse and field. *Korean J. Crop Sci.* 43 : 239-244

Kim, K. D., J. S. Russin, J. P. Snow and K. E. Damann Jr. (2001) Toxic culture filtrates produced by *Calonectria ilicicola*, causal agent of red crown rot of soybean. *Phytoparasitica.* 29 : 115-123

今野周・鈴木泉・大沼彪 (1984) 大豆連作地に対する冬期湛水効果. *東北農業研究.* 35 : 83-84

今野周・阿部吉克・鈴木泉・大沼彪 (1985) 転換畑大豆の連作障害と冬期湛水効果. *山形農試研報.* 19 : 73-82

今野隆光 (1982) 大豆の連作障害に対する石灰窒素の施用効果. *石灰窒素だより.* 116 : 1-5

Krausz, J. P. and J. D. Caldwell (1987) *Cylindrocladium* root rot of kiwifruit. *Plant Dis.* 71(4) : 374-375

Krigsvold, D. T. and G. J. Griffin (1975) Quantitative isolation of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia from naturally infested peanut and soybean field soils. Plant Dis. Rep. 59(7) : 543-546

黒田智久・前田征之・越智直・岩田大介・石川浩司・仲川晃生 (2010) ダイズ黒根腐病の根の発病経過と新潟県における発生実態 (講要). 日植病報. 76(3) : 207

黒田智久・岩田大介・石川浩司 (2012) ダイズ黒根腐病がダイズの生育, 子実収量および品質に及ぼす影響 (講要). 日植病報. 78(3) : 204

Kuruppu, P. U., R. W. Schneider and J. S. Russin (2004a) Factors affecting soybean root colonization by *Calonectria ilicicola* and development of red crown rot following delayed planting. Plant Dis. 88(6) : 613-619

Kuruppu, P. U., R. W. Schneider and J. S. Russin (2004b) Effects of soil temperature on microsclerotia of *Calonectria ilicicola* and soybean root colonization by this fungus. Plant Dis. 88(6) : 620-624

Lawrence, C. H., M. C. Clark and R. R. King (1990) Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by vivotoxin, Thaxtomin. Phytopathol. 80 : 606-608.

Loos, C. A. (1950) *Calonectria theae* n. sp. –The perfect stage of *Cercospora theae* Petch. Trans. Brit. Mycol. Soc. 33 : 13-18

Ma, Z. H., Z. D. Zhang, Y. X. Wang and X. B. Yang (2004) *Cylindrocladium crotalariae* causing red crown rot of soybean in

China. *Plant Pathol.* 53(4) : 537

Mahuku, G. S., T. Hsiang and L. Yang (1998) Genetic diversity of *Microdochium nivale* isolates from turfgrass. *Mycol. Res.* 102 : 559-567

Meehan, F. and H. C. Murphy (1947) Differential phytotoxicity of metabolic by products of *Helminthosporium victoriae*. *Science.* 106 : 270-271

Meeley, R. B. and J. D. Walton (1991) Enzymatic detoxification of HC-toxin, the host-selective cyclic peptide from *Cochliobolus carbonum*. *Plant Physiol.* 97 : 1080-1086

Meeley, R. B., G. S. Johal, S. P. Briggs and J. D. Walton (1992) A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. *Plant Cell.* 4 : 71-77

Milholland, R. D. (1973) Stem and root rot of blueberry caused by *Calonectria crotalariae*. *Phytopathol.* 64 : 831-834

御園生尹 (1973) *Calonectria crotalariae* によって起こるダイズとナンキンマメの新病害「黒根腐病」. *植物防疫.* 27 : 77-82

御園生尹・深津量栄 (1969) ダイズの新病害根腐病について (講要). *日植病報.* 35 : 107

御園生尹・深津量栄 (1970) ダイズ根腐病の発病の品種間差異. *関東病虫研報.* 17 : 34

内藤繁男・山口武夫・杉本利哉・本間善久（1993）*Rhizoctonia* 属菌の培養大麦粒による簡易長期保存法について．北日本病虫研報．44：20-23

仲川晃生・越智直（2006）ダイズ黒根腐病防除に有効な薬剤の選抜と処理方法について．関東病虫研報．53：13-21

仲川晃生・島田信二・山口武夫（1990）ダイズ黒根腐病に関する研究（第3報）黒根腐病がダイズの生育収量等に及ぼす影響とその品種間差異．関西病虫研報．32：1-8

仲川晃生・島田信二（1995）近畿中国地域におけるダイズ立枯性病害の発生実態．中国農試研報．15：19-27

中島隆・酒井真次・五味唯孝・菊池彰夫（1994）ダイズ黒根腐病抵抗性検定法の開発と抵抗性遺伝資源の探索．東北農試研報．88：39-56

西和文・国安克人・高橋廣治（1990）熱水土壤消毒によるダイズ黒根腐病の防除．菌蕈研究所研報．28：321-333

西和文・佐藤文子・唐澤哲二・佐藤剛・福田徳治・高橋廣治（1999）ダイズ黒根腐病の発生生態と防除．農業研究センター研究報告．30：11-109

西和文・佐藤文子・唐澤哲二・高橋廣治（1985）ダイズ黒根腐病菌の土壤接種法．関東病虫研報．32：59-60

西和文・佐藤文子・唐澤哲二・高橋廣治（1987）ダイズ黒根腐病菌の感染時期と微小菌核の形成時期．関東病虫研報．34：38-39

西和文・佐藤文子・唐澤哲二・高橋廣治（1989a）農耕機に付着して運ばれる病土によるダイズ黒根腐病汚染の拡大．関東病虫研報．36：35-36

西和文・佐藤文子・唐澤哲二・高橋廣治（1989b）ダイズの収量および収量構成要素に及ぼす黒根腐病の影響．関東病虫研報．36：37-38

西和文・佐藤剛（1994a）*Calonectria crotalariae* によるツルマメの自然発病．関東病虫研報．41：47-49

西和文・佐藤剛（1994b）*Calonectria crotalariae* によるアルファルファの地際茎および根の褐変症状．関東病虫研報．41：185-188

西和文・高橋廣治（1990a）ダイズ立枯性病害の発生実態と診断同定の手引き．農林水産省農業研究センター．32p

西和文・高橋廣治（1990b）ダイズ黒根腐病の低温保存特性．関東病虫研報．37：51-53

西和文・佃和民・佐藤剛・萩原廣（1994）田畑輪換によるダイズ黒根腐病の防除．関東病虫研報．41：51-54

Papavizas, G. C. (1972) Isolation and enumeration of propagules of *Sclerotium cepivorum* from soil. *Phytopathol.* 62(5) : 545-549

Phipps, P. M., M. K. Beute and K.R. Barker (1976) An elutriation method for quantitative isolation of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia from peanut field soil. *Phytopathol.* 66(10) : 1255-1259

Phipps, P. M. and M. K. Beute (1979) Population-dynamics of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia in naturally-infested soil. *Phytopathol.* 69(3) : 240-243

Pullman, G. S. and J. E. Devay (1981) Effect of soil flooding and paddy rice culture on the survival of *Verticillium dahliae* and incidence of Verticillium wilt in cotton. *Phytopathol.* 71(12) : 1285-1289

Ransom, R. F. and J. D. Walton (1997) Histone hyperacetylation in maize in response to treatment with HC-Toxin or infection by the filamentous fungus *Cochliobolus carbonum*. *Plant Physiol.* 115 : 1021-1027

Rowe, R. C., M. K. Beute, J. C. Wells and J. C. Wynne (1973) *Cylindrocladium* black rot of peanuts in North-Carolina – 1972. *Plant Dis. Repr.* 57 : 387-389

Rowe, R. C., S. A. Johnston and M. K. Beute (1974) Formation and dispersal of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia in infected peanut roots. *Phytopathol.* 64(10) : 1294-1297

Rudolph, K. (1976) Non-specific toxins. In R. HEITEFUSS, & P.H. WILLIAMS (Eds.), *Physiol. Plant Pathol.* pp. 270-315. Berlin : Springer Verlag

Scheffer, R. P. and A. J. Ullstrup (1965) A host-specific toxic metabolite from *Helminthosporium carbonum*. *Phytopathol.* 55 : 1037-1038

重盛勲（1987）わが国におけるマメ類の育種（小島睦夫編，総合農業研究業書 10）．農業研究センター． p.108-123

Shishido, M., I. Kubota and H. Nakamura (2012) Development of real-time PCR assay using Taq Man probe for detection and quantification of *Rosellinia necatrix* in plant and soil. J. Gen. Plant Pathol. 78(2) : 115-120

相馬潤・武田尚隆（2002）北海道におけるダイズ黒根腐病の発生．北日本病虫研報． 53 : 101-104

角田佳則・杉山正樹・中田栄一郎・大井安夫（1988）転作大豆の黒根腐病防除．山口農試研報． 40 : 80-88

Sung, J. M. (1980) An investigation of undescribed black root rot of soybean caused by *Cylindrocladium (Calonectria) crotalariae* in Korea. Korean J. Mycol. 8 : 53-57

田中孝・斉藤隆・竹田富一・江口憲雄・布施寛・佐藤政太郎・木村和夫（1981）水田転換畑の病害虫．山形農試研報． 15 : 55-68

東海林久雄・竹田富一・荒垣憲一・三浦春夫（1984）山形県におけるダイズ黒根腐病の発生実態と 2, 3 の知見．北日本病虫研報． 35 : 46-49

Ueno, T., Y. Hayashi, T. Nakashima, H. Fukami, S. Nishimura, K. Kohmoto and A. Sekiguchi (1975a) Isolation of AM-toxin I, new phytotoxic metabolite from *Alternaria mali*. Phytopathol. 65 : 82-83

Ueno, T., T. Nakashima, Y. Hayashi and H. Fukami (1975b) Structures of AM-toxin I and II, host specific phytotoxic

metabolites produced by *Alternaria mali*. Agric. Biol. Chem. 39 : 1115-1122

Yoshida, H. and K. Sugita (1992) A novel tetracyclic peptide, trapoxin, induces phenotypic change from transformed to normal in sis-oncogene-transformed NIH3T3 cells. Japn. J. Cancer Res. 83 : 324-328

Yoshida, S., M. Yoshioka, T. Yaguchi, M. Nagasawa and M. Koyama (1993) PF1070A and B, new antitumour antibiotics produced by *Humicola* sp. Sci. Rep. Meiji Seika Kaisha. 32 : 58-63