



Title	アズキ茎腐細菌病の病原細菌ならびに発生生態と防除に関する研究
Author(s)	東岱, 孝司
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第15140号
Issue Date	2022-09-26
DOI	10.14943/doctoral.k15140
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/90954">http://hdl.handle.net/2115/90954</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Todai_Takashi.pdf



[Instructions for use](#)

アズキ茎腐細菌病の病原細菌  
ならびに発生生態と防除に関する研究

北海道大学 大学院農学院  
生物資源科学専攻 博士後期課程

東岱孝司

## 目次

第 1 章	緒論	1
第 2 章	研究史	
第 1 節	<i>Pseudomonas syringae</i> 群細菌の分類	5
第 2 節	アズキ茎腐細菌病	9
	1. 発生と分布	
	2. 病徴	
	3. 病原細菌の細菌学的性質および血清学的性質	
	4. 病原細菌の宿主範囲と分類学的位置	
	5. 伝搬様式および防除対策	
第 3 章	アズキ茎腐細菌病の病原細菌の同定，分類および命名	
第 1 節	病原細菌の分離，保存および病原性の確認	18
	1. 目的	
	2. 方法	
	3. 結果	
	4. 考察	
第 2 節	比較菌株の選定	26
	1. 目的	
	2. 方法	
	3. 結果	
	4. 考察	
第 3 節	宿主範囲および病原性	30
	1. 目的	

2. マメ科植物に対する病原性 (接種試験 1)
3. 各種作物に対する病原性 (接種試験 2)
4. 比較菌株のアズキに対する病原性 (接種試験 3)
5. アズキ茎腐細菌病分離細菌と *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* の病徴の差異 (接種試験 4)
6. 宿主範囲および病原性に関する考察

第 4 節 遺伝的形質 . . . . . 50

1. 目的
2. DNA 抽出
3. *hrpZ* 遺伝子配列に基づいた分類
4. rep-PCR によるフィンガープリンティング
5. 16S rDNA の塩基配列解析
6. ハウスキーピング遺伝子による多遺伝子配列解析
7. 遺伝的形質に関する考察

第 5 節 細菌学的性質 . . . . . 81

1. 目的
2. 形態
3. 生理・生化学的性質
4. 細菌学的性質に関する考察

第 6 節 アズキ茎腐細菌病の病原細菌の同定, 分類および命名  
. . . . . 91

第 4 章 アズキ茎腐細菌病の発生生態 . . . . . 96

1. 種子伝染による病徴および発生消長
2. 二次伝染の拡大

3. 野良生えによる発病	
4. 土壌伝染	
第5章 アズキ茎腐細菌病による被害	138
1. 発病と収量の関係	
2. 病勢の伸展と子実重の関係	
3. 発生程度の異なる環境下で採種された種子による発病	
第6章 アズキ茎腐細菌病の防除対策	171
1. 種子粉衣の防除効果	
2. 茎葉散布の防除効果	
3. 茎葉散布の散布間隔および展着剤の影響	
4. 種子消毒および茎葉散布，発病株抜き取りの組み合わせによる防除効果	
5. 抜き取り範囲の検討	
6. 無発生圃場産種子の利用と二次伝染リスク低減による健全種子生産	
第7章 総合考察	215
引用文献	222
摘要	234
付録	243

## 第 1 章 緒論

アズキ (*Vigna angularis* [Willd.] Ohwi and Ohashi) は、赤飯や餡、羊羹などの菓子原料に用いられ、日本の文化、食生活に欠かせない作物である。2019 年における北海道のアズキ栽培面積および生産量は 20900 ha および 55400 t で、それぞれ国内シェアトップの 82% および 94% を占めている (農林水産省大臣官房統計部 2020)。北海道産アズキは豊富な供給量と高い品質から、実需の評価が高く、需要も大きい。アズキはかつて‘赤いダイヤ’ (梶山 1994) と呼ばれたほど収益性が高い作物であった。近年では、販売価格が下落傾向にあるものの、他のマメ科作物と同様に、畑作物全体の生産性向上に重要な輪作体系の維持に不可欠な作物のひとつである。

アズキの生産は、アズキ落葉病、アズキ萎凋病およびアズキ茎疫病といった土壌伝染性微生物による病害にしばしば脅かされてきた。2000 年代に入り、‘きたのおとめ’ および ‘しゅまり’ をはじめとした病害抵抗性品種が徐々に栽培されるようになり、土壌病害による被害が軽減されつつあった。そのような状況のなか、北海道上川地方において、アズキ茎腐細菌病が多発した。本病は、1970 年代に北海道東部を除く北海道のアズキ産地のほぼ全域に発生し (Tanii and Baba 1979)、その後も北海道胆振地方が常発地域として知られていたものの、これまで目立った発生は認められなかった。故に、筆者が初めて本病に遭遇した 2003 年の北海道留萌地方における発生事例は、当時としては非常に珍しい病害であるとみなされていた。それ以降、上川地方でしばしば発生が確認されるようになり、本研究で供試した菌株の多くを分離した 2009 年は、発生の多寡はあるも

のの、上川地方のアズキ圃場では、本病の罹病株を容易に発見できる状況であった。また、筆者が2007年に檜山地方で本病の発生を確認していたことに加えて、オホーツク地方の罹病株の提供も受けたことを鑑みると、発生報告のなかった十勝地方を除き、かつてと同様に北海道全域に発生していたものと推察される。本病は重症化すると、立枯れ症状あるいは罹病した茎が折損する‘腰折れ’症状を呈する (Tanii and Baba 1979) ため、多発すると収量に与える影響は甚大であると考えられた。また、本病は種子伝染することが知られており (Tanii and Baba 1979), ‘北海道主要農作物等の種子の生産に関する条例事務取扱要領 (2021年4月改正)’ (北海道農政部 2021) による圃場審査基準は‘発生していないこと’とされる病害であるが、2000年代は種子生産圃場における本病の発生がしばしば問題となり、防除対策が求められていた。

本病については、かつて、北海道立十勝農業試験場 (現北海道立総合研究機構農業研究本部十勝農業試験場) において、防除試験等が取り組まれたが、殺菌剤の種子粉衣および茎葉散布に効果を認めた (北海道立十勝農業試験場病虫予察科 1978) ことに止まり、本病に対する農薬登録には至らず、実行的な防除対策がない状況であった。また、Tanii and Baba (1979) が病原細菌を“*Pseudomonas adzukicola*”として新種記載しているが、国際細菌命名規約の発効により1980年に失効した (日本植物病理学会 2021)。

このため、北海道立上川農業試験場 (現北海道立総合研究機構農業研究本部上川農業試験場) において、2008年に本病の防除手段として殺菌剤の農薬登録に係る試験が実施され、引き続き2009年から2011年にかけて防除対策試験が行われるとともに、失効中であ

った病原細菌の同定が試みられた。本論文は、これらの研究成果を取りまとめたものである。

本研究を行い、とりまとめるにあたり、北海道立総合研究機構の上司、同僚の多くの方のご指導ならびご支援を賜った。アズキ茎腐細菌病の研究は 2008 年以前より安岡眞二氏が行っていたが、筆者の強い希望により、筆者が研究を引き継いで行うことを快く同意していただいた。懇切丁寧にご指導賜った三澤知央博士、日ごろから激励をいただいた柳原哲司博士にはより一層の感謝を申し上げたい。古原洋博士、中本洋氏には内外の調整にご尽力いただいた。長濱恵氏、小松勉博士、青木元彦氏、齊藤美樹博士はじめ当時の上川農業試験場職員各位には、試験遂行にあたりご理解と多大なご協力を賜った。また、田中文夫博士はじめ病害虫関係各位には適切なご助言をいただき、試験を遂行することができた。心から感謝を申し上げる。一方で、青山聡氏はじめアズキ育種担当各位には、筆者の不注意により試験圃場および選抜圃場で本病が発生し、品種育成に支障が生じてしまい、ご迷惑をかけたことを、この場を借りて改めてお詫び申し上げたい。

罹病植物の収集には、上川農業改良普及センターならびに留萌農業改良普及センター、オホーツク農業改良普及センターにご協力いただいた。また、現地試験実施にあたり、ご理解とお力添えをいただいた上川生産農業協同組合連合会の波多野享一氏、木村友昭氏、美瑛町農業協同組合の中山洋明氏、武田俊彦氏、上川農業改良普及センター大雪支所の田辺清美氏（当時）、中村浩氏（現十勝農業改良普及センター北部支所）、岡本克憲氏（現空知農業改良普及センター中空知支所）ならびに試験にご協力いただいた美瑛町の生産者



各位に深くお礼申し上げます。

静岡大学創造科学技術大学院教授 瀧川雄一博士には，病原細菌の同定に関する研修を快く受け入れていただき，現在に至るまで丁寧にご指導いただいたことに，心より感謝申し上げたい。静岡大学農学部植物病理学研究室の高橋冬実氏（現静岡県農林技術研究所），佐藤拓也氏，阿部加奈恵氏には実験の一部を担っていただいた。また，充実した研修を修めることができたのは，当時の学生諸氏のおかげである。

北海道大学大学院農学研究院教授近藤則夫博士，同大学院農学研究院教授増田税博士，同大学院農学研究院講師秋野聖之博士，静岡大学創造科学技術大学院教授瀧川雄一博士には本稿のご校閲を賜った。ここに深く感謝申し上げます。

妻の華奈と葉月，葵，蓮，葉太の4人の子どもたちからの支えにより今日まで研究に尽力することができた。心より感謝の意を表したい。

## 第 2 章 研究史

### 第 1 節 *Pseudomonas syringae* 群細菌の分類

*Pseudomonas* 属は  $\gamma$ -プロテオバクテリアのグラム陰性の桿菌で、1 本以上の極性鞭毛により運動し、好氣的に代謝を行い、キサントモナジン色素を産生しない、C10:0 3H 脂肪酸および C12:0 脂肪酸、C12:0 2OH, Q-9 ユビキノンで構成される細菌種が含まれ、大部分の種はポリ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸顆粒を蓄積せず、タイプ種は *P. aeruginosa* である細菌群である (Palleroni 2005).

*P. syringae* およびその近縁の植物病原細菌の学名をめぐる議論は混乱し、混沌とした状況は今日まで続いている。*P. syringae* は元来ライラックから分離された細菌種である (Palleroni 2005)。1960 年代までは、栄養学的あるいは培養学的性質の違いが、病原性に深く関連する代謝や遺伝的な差異を反映すると考えられていたため、形態学的、生化学的および栄養学的な数少ない試験や異なる培地上でのコロニー出現の有無に基づいて数多の *Pseudomonas* 属細菌種の学名が提案されてきた (Young 2010)。それらの *nomenspecies* (命名種) の一覧は Dye et al. (1975) によって示された。これらは、その宿主範囲が一属あるいは一科の植物に限られる場合が多いのに対し、*P. syringae* はライラック以外にも宿主植物が広範に及ぶことが明らかとなっている (Young et al. 1978)。一方、1976 年 1 月発効の ‘International Code of Nomenclature of Bacteria. Bacteriological code, 1976 revision (国際細菌命名規約の 1976 年改定)’ (Lapage et al. 1975) により、本来であれば、*P. syringae* よりも先に植物病原細菌として報告された “*P. mori*” が優先されるべきであるにも関わらず、世界

中にその名が広く認知されてきたという理由 (Young et al. 1978) で, *P. syringae* に正当性が与えられ, その近縁種の学名は *P. amygdali* など一部を除き, 1980年1月1日発行の The Approved Lists of Bacterial Names (細菌学名承認リスト) (Skerman et al. 1980) から除外された. これらの細菌学名承認リストに含まれなかった命名種の正当性を明らかにするため, Young et al. (1978) は, 命名規約に矛盾しない, かつ, 研究者にとっての利便性が維持された命名・分類体系として, pathovar (病原型) システムの導入を提唱した. 病原型とは, 種内あるいは亜種内の分類群の概念であり, serovar (血清型) および phagovar (ファージ型), biovar (生物型) と同様に命名規約の範疇外である. 病原型は主に1つ以上の宿主植物に対する特有の病原性に基づいて, 同一種内あるいは亜種内の他の系統と区別する特徴を持った系統に対して用いられる. その国際的基準は国際植物病理学会の植物病原細菌分類委員会によって示され (Dye et al. 1980), 今日ではこの基準に従って植物病原細菌の新たな病原型の提案を行うこととなっている. pathovar システムは今日でも広く認知されており, 病原型の基準を満たした *P. syringae* および近縁の細菌のかつての命名種は, *P. syringae* あるいはその近縁種の病原型として, その学名が使用されてきた.

*P. syringae* およびその近縁種の病原型も含めた *P. syringae* group bacteria (*P. syringae* 群細菌) (Anzai et al. 2000) は, *P. syringae* *sense lato* (広義の *P. syringae*) あるいは *P. syringae* complex (*P. syringae* 種複合体) とも呼ばれる. *P. syringae* 群細菌には少なくとも60以上の病原型が含まれる (Young 2010; Gomila et al. 2017). これまで, 病原型間の類縁関係を整理して, 別種へ再分類する取り組みがなされて

きた。Gardan et al. (1992) は、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる DNA の類縁性に基づいて、*P. syringae* pv. *savastanoi* (syn. [シノニム・異名同種] *P. syringae* subsp. *savastanoi*) は、*P. syringae* pv. *glycinea* および *P. syringae* pv. *phaseolicola* とともに、それぞれ *P. savastanoi* pv. *savastanoi* および *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* とすることを提案し、この学名は今日も世界中で広く受け入れられている。同様に、脂肪酸およびタンパク質分析、16S rDNA 塩基配列解析、DNA の相同性割合の結果から *P. syringae* pv. *avellanae* は新種 *P. avellanae* に再分類された (Janse et al. 1996)。また、Gardan et al. (1999) は *P. syringae* およびその近縁種の病原型を DNA の類縁性に基づいて 9 つの genomospecies に分類し、そのうち genomospecies 5 に唯一含まれた *P. syringae* pv. *tremae* をリボタイピングおよび複数の炭素源の利用性から新種 *P. tremae* であるとし、同様に genomospecies 9 に含まれる *P. syringae* pv. *cannabina* を新種 *P. cannabina* に再分類した。genomospecies 4 に含まれる *P. syringae* pv. *coronafaciens* については、DNA の類縁性および細菌の生存の根幹にかかわるハウスキーピング遺伝子である *gapI* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) および *gltA* (citrate synthase), *gyrB* (DNA gyrase subunit B, Type II topoisomerase), *rpoD* (RNA polymerase, sigma factor) の連結配列による multilocus sequence analysis (MLSA) から、復活名である新種 *P. coronafaciens* とすることが提案されており (Dutta et al. 2018), 全ゲノムの比較解析からも同様の結論が得られている (Gomolla et al. 2017)。

一方、Gardan et al. (1999) は、*P. syringae* の一部の病原型の他に *P. amygdali* および *P. ficuserectae*, *P. meliae*, *P. savastanoi* は

genomospecies 2 に含まれるとし、これらの学名はシノニムであり、最も古い正当な種の学名は *P. amygdali* であることに言及している。*P. syringae* 群細菌のハウスキーピング遺伝子 *gap1* および *gltA*, *gyrB*, *rpoD* の連結配列によって得られた系統学的な集団 phylogroup は、一部例外を除き、概ね上記のそれぞれの genomospecies に一致することが示唆されており (Bull et al. 2011), *rpoD* 配列による phylogroup も genomospecies と概ね対応関係にある (Parkinson et al. 2011). Parkinson et al. (2011) は, *P. amygdali* および *P. ficuserectae*, *P. meliae*, *P. savastanoi* は近縁であり、いずれも genomospecies 2 に相当する phylogroup 3 を形成するクラスターに含まれることを示している。*P. syringae* 群細菌の *hrpZ* 遺伝子の塩基配列の基づいた Inoue and Takikawa (2006) の *hrp* group も genomospecies と対応関係にあり、*hrp* group IA および IB は genomospecies 2 に相当する。さらに、Gomilla et al. (2017) は、全ゲノムの比較解析、あるいは、16S rDNA および *gyrB*, *rpoD* の塩基配列による系統解析から *P. syringae* 群細菌を phylogenomic branch に分類し、genomospecies 2 に相当する phylogenomic branch IV に含まれる *P. ficuserectae* および *P. meliae*, *P. savastanoi* は *P. amygdali* より後のシノニムであることを指摘している。また、Harmon et al. (2018) は、*P. syringae* の病原型を含め genomospecies 2 に含まれる学名はシノニムであり、*P. amygdali* が他の学名よりも優先権があるため、genomospecies 2 に含まれる細菌の学名は *P. amygdali* およびその病原型とするべきであると主張している。

現在、Gardan et al. (1999) の genomospecies 2 に含まれる細菌の学名が *P. amygdali* に再分類される動向がある。米国の National Center

for Biotechnology Information のホームページ内に掲載されている Taxonomy browser では、*P. syringae* pv. *mori* や *P. syringae* pv. *sesami* などかつて *P. syringae* の病原型とされていた *P. syringae* group genomospecies 2 の多くは *P. amygdali* pv. *mori* や *P. amygdali* pv. *sesami* など *P. amygdali* の病原型としてリストされているが、*P. savastanoi* およびその病原型や *P. ficuserectae*, *P. meliae* はその学名が掲載されている (Schoch et al. 2020). *P. amygdali* pv. *phaseolicola* の学名を用いる研究者 (Ramírez-Zapata et al. 2020) もいるが、2022 年現在のところ少数のようである.

## 第 2 節 アズキ茎腐細菌病

### 1. 発生と分布

アズキ茎腐細菌病は、1971 年に北海道北部上川地方の富良野市内の水田転換畑において、アズキの初生葉節あるいは第 2 節の主茎が腐敗する新種の細菌による病害として報告された (谷井ら 1973). 同様の症状が北海道中央部の石狩、空知および胆振地方でも発生しており、翌 1972 年には北海道南部で発生が確認された (谷井ら 1973). その後、十勝農業試験場により北海道内の発生分布調査が行われ、上記の他に後志地方でも確認された一方、東部の十勝および網走地方では本病の発生は認められなかった. 本調査結果から、本病は富良野市以南に分布し、いずれの年の調査でも発生が認められた胆振地方で常発していると結論された (北海道立十勝農業試験場病虫予察科 1978). Tanii and Baba (1979) は、この理由として、本病は種子伝染するため、1971 年から実施された米の生産調整により、イネからアズキへ栽培作物を転換するために様々な地域より導入さ

れたアズキ種子が発生原因となったのではないかと指摘している。一方、十勝地方で本病の発生が認められなかったのは、十勝地方は元来アズキの大産地であり、他地域より種子を導入する必要がなかったためと考察している。これまで北海道において、1981年に目立った発生が認められた（北海道立農業試験場各農試・北海道農務部農業改良課・北海道各病虫害防除所 1982）他、農作物有害動植物発生予察事業年報（北海道農務部・北海道立中央農業試験場 1983-1988）に1987年までの北海道内における発生記録が記されているが、それ以降、本研究で対象とした2000年代の発生まで目立った発生の記録はない。一方、国外では1980年にアメリカ合衆国ミネソタ州で多発したという報告がある（Kennedy and Denny 1984）。

## 2. 病徴

Tanii and Baba (1979)によると、本病は、幼苗期から生じ、初生葉あるいは第一本葉の葉身にハローを伴わない水浸状の円形小斑点および葉脈上に条斑を形成する。病斑は間もなく赤褐色となり、徐々に拡大し、葉柄を介して主茎に達するため、場合によっては、出芽直後に苗立枯れ症状を呈する。病勢の伸展が遅い場合も、罹病した茎部が強風などの物理的要因により折損する。海外において、このような症状は *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* および *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* によってインゲンマメに発生する葉焼病およびかさ枯病の‘stem girdle’あるいは‘joint rot’として知られている（Zaumeyer and Thomas 1957）。生育後半になると、多発圃場では成葉に多数の小壊死斑が認められ、莢表面に水浸状の斑点および縫合線に沿った条斑を形成するが、罹病した茎の上部の維管束褐

変は認められない。また、いずれの部位においても病斑部から細菌の滲出（菌泥）が認められ、本病の診断に有効であるとしている。

一方、アズキに発生する細菌が病原の病害にアズキ褐斑細菌病（谷井・馬場 1971）がある。病原細菌は *P. syringae* pv. *syringae* で、谷井・馬場（1971）によると、アズキ褐斑細菌病は葉身に大型のハローを伴った赤褐色円形から不整形の大きな病斑を形成し、その病斑は薄く破れやすく、菌泥は生じない。節に発病すると葉柄はもろく離脱しやすくなるとされるが、少なくともアズキ茎腐細菌病のように茎を腐敗させることはなく、両者のアズキにおける病徴は明瞭に異なる。

### 3. 病原細菌の細菌学的性質および血清学的性質

Tanii and Baba (1979) は、1971 年および 1972 年に北海道内 9 か所より罹病アズキを採集して、計 15 菌株について、細菌学的性質および血清学的性質について検討している。それによると、植物病原細菌の分離に通常用いられる肉エキス・ペプトン培地（塩化ナトリウム 0.5% 含有）で分離できず、King's B 培地 (King et al. 1954) により病原細菌が分離可能とされる。分離細菌は、グラム陰性の桿菌で、1-3 本の極鞭毛を有し、運動性であり、芽胞の形成は認められない。包のうを有せず、大きさは  $0.8-2.3 \times 0.5-0.9$  (平均  $1.4 \times 0.6$ )  $\mu\text{m}$  である。スーダンブラック B 染色によるポリ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸顆粒の蓄積は認められない。塩化ナトリウムを 0.2% あるいは 0.5% 含む肉エキス培地上では、培養 1 週間後の発育は認められず、塩化ナトリウムを含まない肉エキス・ペプトン液体培地およびペプトン水でわずかに発育する。ペプトンはポリペプトンよりもプロテオースペ



プトンのほうが発育は良い。牛乳培養では3週間後も変化がなく、リトマスを青変させ、わずかに還元する。ウシンスキー氏液およびフェルミ氏液でわずかに発育し、培養3週間後に淡黄緑色にわずかに変色する。一方、コーン氏液では発育しない。好気性で Hugh-Leifson 培地 (Hugh and Leifson 1953) でグルコースを酸化的に分解し、発酵能はない。King's B 培地上で培養2, 3日後に淡黄緑色色素を産生し、紫外光 (253.7 nm) 下で青色に発光する。5%スクロースを含む肉エキス・ペプトン培地上でレバンを産生し、オキシダーゼ活性およびジャガイモ塊茎腐敗能、アルギニンジヒドラーゼ活性はなく、タバコ過敏感反応が認められた。インドール産生および硫化水素産生、硝酸塩の還元反応、グルコン酸の酸化、ゼラチン液化、メチルレッド反応、V-P 反応、エスクリン加水分解、マーガリン加水分解、Tween80 加水分解、デンプンの糖化作用、チロシナーゼ産生、レシチナーゼ活性、硝酸呼吸、フェニルアラニンデアミナーゼ活性は陰性、アンモニア産生およびカタラーゼ活性は陽性である。ウレアーゼ活性は強力で培養2時間後に尿素を加水分解する。マロン酸ナトリウムを利用する。L-バリンおよびL-リジンは同化しないが、 $\beta$ -アラニンおよびアスパラギンを唯一の炭素源および窒素源として同化する。各種糖を1%含む Ayers et al.の培地 (Society of American bacteriologists 1957) において、キシロースおよびグルコース、マンノース、スクロース、トレハロース、グリセロール、マンニトール、ラフィノース、レブロースから酸を産生し、ガスは産生しない。15菌株中1菌株を除いて、イノシトールからも酸を産生する。一方、ラクトース、マルトース、サリシン、デンプン、イヌリン、L-ソルボース、ズルチトール、エリトリトール、エタノールか

らは酸もガスも産生しない．各種有機酸塩を 0.2% 含む Koser's 培地において，D-酒石酸および，クエン酸塩，コハク酸塩，DL-酢酸を炭素源として利用し，アルカリ反応を示すが，L-酒石酸塩および尿酸塩，馬尿酸塩，アルギン酸塩，DL-乳酸塩は利用しない．Hildebrand の方法 (Hildebrand 1971) で，ペクチン酸ナトリウムを pH 4.9–5.1 で液化するが，pH 8.3–8.5 では液化しない．塩化ナトリウム濃度耐性について，3 菌株中 1 菌株が 0.5% 塩化ナトリウム含有ペプトン水で発育せず，残り 2 菌株は 0.2% 含有でも発育しなかった．この 3 菌株の発育温度は 5–30 °C で，最適は 25–27 °C である．2–3°C，35°C では発育しない．さらに，King's A 培地でピオシアニンを生産せず， $\beta$ -グルコシダーゼ活性は陰性で，ソルビトールから酸を生産しない (北海道立十勝農業試験場病虫予察科 1978)．分離細菌 DPA (L) 3 の熱抗原を用いて作成した抗血清は本病の病原細菌に加えて供試された植物病原性 *Pseudomonas* 属菌のすべてに凝集反応を生じ，特異性は認められなかった．寒天ゲル内二重拡散法の結果から，本病分離細菌は血清学的に共通で，明瞭な 2 個の耐熱性抗原を有し，この抗原は *P. savastanoi* pv. *glycinea* にも共通であった (Tanii and Baba 1979)．ミネソタ州の分離細菌は，King's B 培地上の蛍光発光が弱く (Kennedy 1984, Kennedy and Denny 1984)，極鞭毛を有するグラム陰性の桿菌で，いくつかの一般的な培地上で乳白色のコロニーを形成し，運動性があるが，ペクチン分解能および硫化水素の産生能，シリゴマイシンの産生能はなく，タバコに過敏感反応をもたらすとされている (Kennedy 1984)．

#### 4. 病原細菌の宿主範囲と分類学的位置

Tanii and Baba (1979) の報告では、本病の分離細菌をアズキに噴霧接種すると、接種 2 週間後に葉身および茎に水浸状の病斑を形成し、原病徴が再現され、アズキ品種間では、‘暁大納言’ および ‘早生大粒 1 号’、‘アカネダイナゴン’、‘光小豆’ の感受性が高く、‘寿小豆’ および ‘茶殻早生’、‘支那七’、‘中育 2 号’、‘壮瞥在来’ は抵抗性、‘宝小豆’ および ‘高橋早生’ はその中間としており、大粒品種ほど感受性が高いとされている。インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) の ‘大正金時’ では、葉身に赤褐色小斑点および茎に赤色の壊死条斑を形成するが、‘大手亡’ には病徴を現さない。また、ササゲ (*Vigna sinensis* = *V. unguiculata*) およびフジマメ (*Dolichos lablab* = *Lablab purpureus*) の葉身にも壊疽褐点を形成するが、ダイズ (*Glycine max*) およびソラマメ (*Vicia faba*)、エンドウ (*Pisum sativum*)、ナタマメ (*Canavalis gladiata* = *Canavalia gladiata*) の感染はなかったとしている。ミネソタ州における分離菌について、圃場ではアズキのみ発病したが、温室での接種試験では、インゲンマメの ‘Manitou’ および ‘Black Turtle’ は感受性、navy bean は中程度抵抗性を示し、pinto bean およびダイズは感染しないとしている (Kennedy and Denny 1984)。

過去に発生した本病の病原細菌 (Tanii and baba 1979, Kennedy 1984, Kennedy and Denny 1984) は、グラム陰性の桿菌で、極性鞭毛を有し、蛍光色素を産生する植物病原細菌であるため、*Pseudomonas* 属細菌である。さらに、LOPAT 試験 (Lelliott et al. 1966) の結果から、植物病原性蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の Ia 群に属する、すなわち *P. syringae* 群細菌である。アズキに自然条件下で寄生する *Pseudomonas* 属細菌には、前述のアズキ褐斑細菌病を引き起こす *P.*

*syringae* pv. *syringae* (谷井・馬場 1971) がある。普通寒天培地上での生育およびレバン産生能，ゼラチン液化能，食塩耐性，数種の炭素源の利用性，アズキへの病徴において，*P. syringae* pv. *syringae* は本病の病原細菌と異なる。Tanii and Baba (1979) は，‘Bergey’s manual of Determinative Bacteriology 第7版’ (Burkholder 1957) に記載されているその他マメ科植物を侵す *Pseudomonas* 属細菌およびエンドウつる腐細菌病菌 *P. marginalis* pv. *marginalis* (後藤 1959) およびダイズの wildfire の病原細菌 *P. syringae* pv. *tabaci* (Allington 1945) ととも比較検討し，*Burkholderia andropogonis* および *Ralstonia solanacearum* は蛍光色素産生において，*P. cichorii* および *P. marginalis* pv. *marginalis* とはオキシダーゼ活性において，*P. viridiflava* とはスクロースの利用性およびジャガイモ塊茎腐敗能などの細菌学的性質において異なり，エンドウつる枯細菌病菌 *P. syringae* pv. *pisi* および *P. syringae* pv. *tabaci* についても *P. syringae* pv. *syringae* と同様の理由で区別されるとしている。一方，bean halo blight group (Schroth et al. 1971) の *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* は特殊な条件下ではアズキに自然感染し，*P. savastanoi* pv. *glycinea* も噴霧接種によりアズキに病原性を示す (谷井ら 1976) ように，病原性および細菌学的性質が本病の病原細菌と類似しているとし，クワ縮葉細菌病菌 *P. syringae* pv. *mori* を含めた bean halo blight group の3病原型と本病の病原細菌との異同について詳細に検討した。その結果，細菌学的性質において，本病の病原細菌は，*P. savastanoi* pv. *phaseolicola* と比較して，ゼラチン液化能，マンニトールおよびイノシトールの利用性の点で異なり，*P. syringae* pv. *mori* とは，リパーゼ活性およびソルビトールの利用性で異なった。一方，*P. savastanoi* pv.

*glycinea* はゼラチン非液化，リパーゼ活性 (Tween 80) およびマンニトール利用性の点で本病の病原細菌と近く，さらに，寒天ゲル内二重拡散法において，1 菌株を除き，共通の耐熱性抗原を有していたが，本病の病原細菌は，ダイズに病原性を有しない点で異なった．以上に加えて，本病の病原細菌は，食塩耐性が 0.2%あるいは 0.5%未満と低く，肉エキス・ペプトン培地上で生育しない点，腸内細菌 *Proteus vulgaris* 並の強いウレアーゼ活性を有する点，および，トレハロース，D-酒石酸およびβ-アラニンを利用するといった，他の bean halo blight group の 3 病原型とは異なる特有の性状を有していることから，本病の病原細菌は新種“*P. adzukicola*”であると提案した．

しかし，Tanii and Baba (1979) が試験に用いた菌株は現存せず，“*P. adzukicola*”の学名は無効なままであった (Bradbury 1986)．しかし，本研究の一部成果 (東岱ら 2011) により，2000 年代に分離されたアズキ茎腐細菌病の病原細菌は *P. syringae* 群細菌であることが報告され，日本植物病名目録 (2021 年 9 月版) (日本植物病理学会 2021) によると，アズキ茎腐細菌病の病原細菌は，*Pseudomonas* sp. とされている．

## 5. 伝搬様式および防除対策

本病に罹病したアズキより得られた種子，あるいは，本病の病原細菌懸濁液に浸漬したアズキ種子を播種すると自然発病と同様の症状が再現されることから，本病は確実に種子伝染し，二次伝染により拡大する (Tanii and Baba 1979)．一方，前年多発した圃場の土壤に，本病に感受性の高い‘早生大粒 1 号’を播種しても発病が認められなかったことから，土壤伝染しないとされている (Tanii and

Baba 1979).

本病の防除対策について、十勝農業試験場により、殺菌剤の種子処理および茎葉散布の検討が行われた。種子処理は、ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤の種子重量の 0.3% 種子粉衣の効果が最も高く、茎葉散布では、銅水和剤を出芽直後より約 10 日間隔で 2-3 回散布することで十分な防除効果が得られたとしているものの、本病は種子伝染することから、健全種子の使用が最善であるとしている (Tanii and Baba 1979).

### 第 3 章 アズキ茎腐細菌病の病原細菌の同定，分類および命名

アズキ茎腐細菌病は 1971 年に北海道富良野市における発生が報告され (谷井ら 1973) , その後 Tanii and Baba (1979) により本病の病原細菌は “*Pseudomonas adzukicola*” であると新種提案された。しかし，タイプ標本の指定およびその菌株を恒久的に利用できる菌株保存機関への寄託といった，国際細菌命名規約 (Lapage et al. 1975) に則った細菌の新種名称の承認の手順がなされなかった (Bradbury 1986) ため，細菌学名承認リスト (Skerman et. al. 1980) に掲載されず，すべての細菌の学名の出発点である 1980 年 1 月 1 日をもって失効した。

その後 2000 年代になると，十勝地方を除く北海道内のアズキ栽培地域で Tanii and Baba (1979) によるアズキ茎腐細菌病の記載と同様の症状が散見されるようになった。本症状はアズキ茎腐細菌病によるものと考えられたため，症状を整理するとともに，罹病アズキより細菌を分離し，病原性が確認された菌株について，既知の *Pseudomonas syringae* 病原型のほか，近縁種と多角的に比較検討し，2000 年代に発生したアズキ茎腐細菌病の病原細菌の同定を試みた。なお，本論文における植物名および病害名，それらの学名表記は，国内未発生のものを除いて，日本植物病名目録 (2021 年 9 月版) (日本植物病理学会 2021) に従った。

#### 第 1 節 病原細菌の分離，保存および病原性の確認

##### 1. 目的

2000年代に発生したアズキ茎腐細菌病の病原細菌を同定するにあたり、罹病アズキより細菌を分離・保存し、アズキに対する病原性を確認する。

## 2. 方法

Tanii and Baba (1979) に記載されたアズキ茎腐細菌病の病徴を呈した (Fig. 3-1-1) 罹病株あるいは罹病部位を採集し、病原細菌の分離を試みた。すなわち、罹病した葉あるいは茎、莢を水道水で流水洗し、ペーパータオルで水分を除いたのち、病斑部を火炎殺菌したカミソリ刃で5 mm角程度の大きさに切り取り、乳鉢で磨砕し、1%ペプトン水1 mlを加え、磨砕液とした。磨砕液をループ (白金耳) により King's B (KB) 培地 (King et al. 1954: プロテオースペプトン No. 3, 20 g; グリセリン, 10 ml;  $K_2HPO_4$ , 1.5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.5 g; 寒天, 15 g; 蒸留水, 1000 ml) 上に画線した。25 °C 3日間培養後、乳白色全縁平滑な単コロニーを KB 培地に画線し、単コロニーを得る操作を1-2回行い、単コロニー由来の菌株を得た。2009年に土別市および名寄市、剣淵町、小清水町、斜里町、上富良野町、苫前町、羽幌町、美瑛町、比布町において罹病サンプルの収集を行った。

KB培地上で25 °C 2日間培養した細菌集落を1白金耳分集菌し、ポリプロピレンチューブ内の分散媒 (滅菌した1.5%グルタミン酸ナトリウム添加10%スキムミルク溶液) 1 mlに懸濁し、-20 °Cで保存した。また、一部の菌株は凍結乾燥し、5 °Cで保存した。また、各種試験に供試する前に、西山処方のPPGA培地 (西山 1978, 西山 1991) から塩化ナトリウムを除いた改変PPGA培地 (ジャガイモ煎汁液 [ジャガイモ, 200 g/蒸留水, 1000 ml] ; ペプトン, 5 g;  $NaHPO_4 \cdot$



12H<sub>2</sub>O, 3 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g; 寒天, 15 g) で 28 °C 2–3 日間前培養した。

分離細菌のアズキへの病原性の確認は、噴霧接種あるいは穿刺接種 (puncturing) 法 (Takikawa et al. 1989) により行った。噴霧接種の接種源として、KB 培地で 28 °C 2 日間培養した細菌集落を滅菌蒸留水 (SDW) に懸濁し、分光光度計により細菌懸濁液の OD<sub>600</sub> 値を測定し、0.6–1.0 (10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> cfu/ml 相当) になるように調整した。さらに、Tween80 を 0.01% となるように加用し、第一本葉が完全展開したアズキ (品種: ‘しゅまり’) に噴霧し、25 °C の湿室に 2 晩保った。その後、温室 (約 20–30 °C) に移し、接種後 30 日頃まで随時観察した。穿刺接種は、細菌懸濁液 1 滴を葉身上に滴下し、その上から注射針 (23 G: 直径 0.6 mm) で葉身を静かに貫通させる方法により行い、細菌懸濁液の OD<sub>600</sub> を 0.6 程度 (約 10<sup>8</sup> cfu/ml) に調整し、接種に供した。接種は夕方に行い、接種後湿室には置かず温室 (約 20–30 °C) か、あるいは、接種後 1 晩湿室に保った後 25 °C 16 時間明期 8 時間暗期に設定した人工気象器 (LPH-350SP, 日本医化器械, 大阪市) に移し、随時観察した。いずれの接種法についても、アズキを 1 ポット 3 個体供試し、1 個体でもいずれかの葉身に濃緑色水浸状あるいは赤褐色水浸状の病斑を形成した場合、病原性有りとした。病斑から細菌を再分離し、培地上のコロニー形態から接種した細菌であるか否かを肉眼観察により確認した。

### 3. 結果

合計 209 菌株を得て、すべて分散媒中で -20 °C で保存し、そのうち 46 菌株を凍結保存した。噴霧接種により、アズキ葉身上にはじめ水浸状の斑点あるいは葉脈に沿った条斑が認められ、次第に赤褐

色から暗褐色を呈するか，病斑の周りに壊疽が認められた(Fig. 3-1-2a). **Puncturing** 法によっても同様に接種部の周囲がはじめ水浸状を呈し，その後赤褐色から暗褐色に変色した．病斑の周囲から壊疽となる場合もあった (Fig. 3-1-2b) . 44 菌株がアズキにそのような病徴をもたらし，接種菌は再分離された．代表菌株として，10 菌株を選抜し，安岡眞二氏より分譲された 2 菌株を加え，計 12 菌株をアズキ茎腐細菌病分離細菌 (以下，‘**BSRA 分離細菌**’ とする) として，以降の試験に供試した．**BSRA 分離細菌**は農業生物資源ジーンバンクに寄託した．また，**AZK-11** 菌株は静岡大学農学部植物病理学研究室およびニュージーランドの **International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP)**，**09Psa273** 菌株は静岡大学農学部植物病理学研究室に寄託した．**BSRA 分離細菌**の情報は Table 3-1 に示した．なお，**BSRA 分離細菌**は **KB** 培地で数日間培養すると，培地上に水溶性の黄色蛍光性色素をわずかに産生した．

一方，本病の罹病サンプル採集の過程で，**Tanii and Baba (1979)** に記載されていない病徴が認められた．すなわち，本病が蔓延した生育後期の圃場において，葉身の縁からくさび型に壊疽が進展し，葉裏の枯死斑の外周が水浸状を呈した (Fig. 3-1-1d) . さらに，葉身の基部が侵され，小葉が葉柄先端で下垂し，風に揺れる様子も観察された (Fig. 3-1-1f) . これらの病斑からも細菌が分離され，アズキに対する病原性が認められた．**09Psa289** はくさび型病斑から分離された．また，自然発生および接種した葉身上の病斑部から 10 mm 程度離れた外観健全部の組織切片から顕微鏡下で菌泥が検出され，細菌が分離されることがあった．

#### 4. 考察

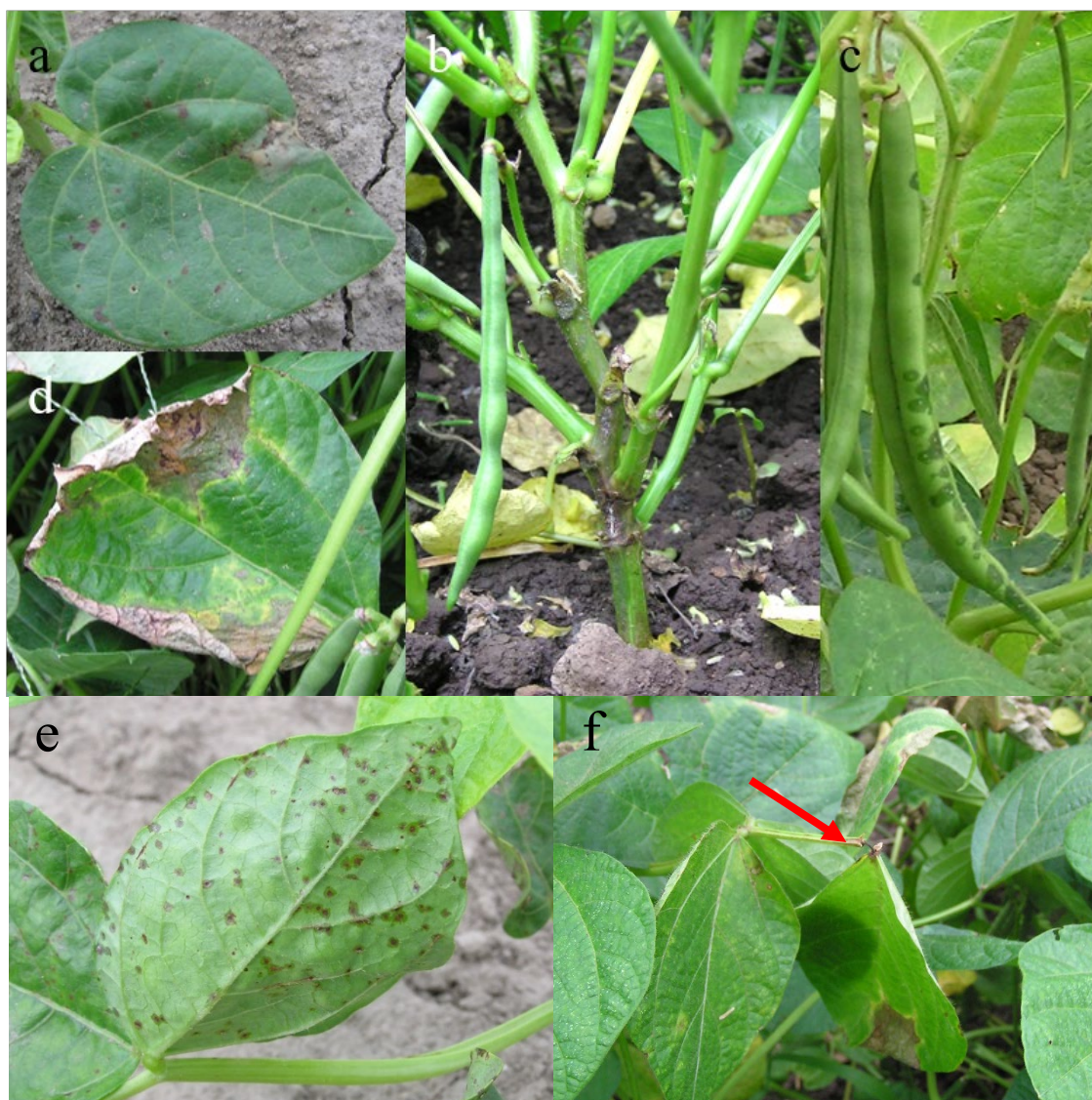
接種により認められたアズキにおける病徴が、発生圃場におけるアズキの症状および Tanii and Baba (1979) の記載と一致したことから、アズキへの病原性が認められた 44 菌株はアズキ茎腐細菌病の病原細菌であると考えられる。したがって、アズキ茎腐細菌病は 2000 年代に再び多発したことになる。

BSRA 分離菌は、多発した上川地方のほか、隣接する留萌地方および北海道東部に位置するオホーツク地方でも得られた。本病は種子伝染することが知られている (Tanii and Baba, 1979) ため、汚染種子の供給先で蔓延する可能性がある。反対に、2000 年代に発生の報告のない十勝地方および道央地方は地元産種子が供給され、汚染種子の移入がなかったものと考えられる。また、病原細菌の分離には至らなかったが、2007 年に道南地方においても本病の症状を呈するアズキを確認している。

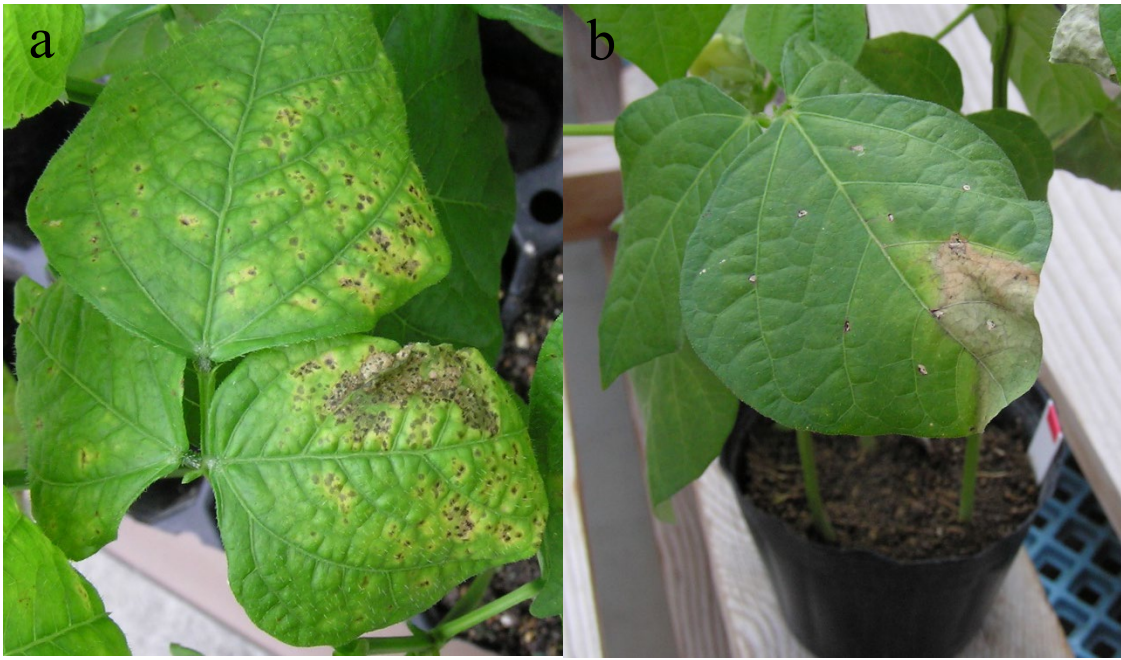
一方、罹病サンプル採集の過程で認められた‘くさび型病斑’ (Fig. 3-1-1d) や小葉基部の罹病による‘小葉の下垂’ (Fig. 3-1-1f) は、Tanii and Baba (1979) による本病の記載にはない症状であるが、アズキに発生する他の病害にはない特徴的な症状であり、本病を診断する際に有効な決め手の一つとなりうるものである。

また、病斑部から離れた外観健全部の組織切片から細菌が検出・分離されたことは、病斑部で増殖した病原細菌が葉脈などの通導組織内を移動する、あるいは、通導組織内でも増殖することができることを示唆している。

BSRA 分離細菌は KB 培地上で水溶性の黄色蛍光性色素を産生したことから蛍光性 *Pseudomonas* 属菌であることが推察された。



**Fig. 3-1-1** Field symptoms of bacterial stem rot of adzuki bean (BSRA) in Hokkaido, Japan. **a** Reddish-brown spots and necrotic lesion on primary leaf. **b** Water-soaked lesion and rot on stem. **c** Water-soaked spots on immature pods. **d** Wedge-shaped necrotic lesions on leaflets. **e** Water-soaked reddish-brown spots on abaxial side of leaflet. **f** Affected part at the base of leaflet (arrow)



**Fig. 3-1-2** Symptoms on adzuki bean caused by artificial inoculation with the bacterium isolated from adzuki bean plant exhibiting BSRA. **a** Dark brown spots caused by spray inoculation. **b** Necrotic lesion caused by puncturing method

**Table 3-1** Bacterial strains isolated from adzuki bean with bacterial stem rot and used in this study

Strains	Accession <sup>a</sup>	Collection information					Collector	Year
		Cultivar	Plant part	Location				
AZK-11	MAFF212478, SUPP2776, ICMP24382	Syumari	Leaf	Kamifurano, Hokkaido, Japan		S. Yasuoka	2007	
AZB-21	MAFF212479	Erino-shozu	Inmature pod	Biei, Hokkaido, Japan		S. Yasuoka	2005	
09Psa251	MAFF212480	Kita-no-otome	Inmature pod	Kamifurano, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	
09Psa258	MAFF212481	Erino-shozu	Leaf	Shibetsu city, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	
09Psa263	MAFF212482	Syumari	Inmature pod	Shibetsu city, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	
09Psa273	MAFF212483, SUPP2775	Syumari	Stem	Pippu, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	
09Psa275	MAFF212484	Syumari	Inmature pod	Kamifurano, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	
09Psa279	MAFF212485	Syumari	Stem	Shari, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	
09Psa289	MAFF212486	Syumari	Leaf	Koshimizu, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	
09Psa351	MAFF212487	Erino-shozu	Inmature pod	Biei, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	
09Psa355	MAFF212488	Syumari	Inmature pod	Biei, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	
09Psa361	MAFF212489	Syumari	Stem	Biei, Hokkaido, Japan		T. Todai	2009	

<sup>a</sup> MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries;

SUPP: Shizuoka University Plant Pathology;

ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants



## 第 2 節 比較菌株の選定

### 1. 目的

BSRA 分離細菌の分類学的な位置を決定するため、比較検討に適切な比較菌株を選定する。

### 2. 方法

BSRA 分離細菌は蛍光性 *Pseudomonas* 属の植物病原細菌の可能性が高いため、Lelliot et al. (1966) の LOPAT 試験を行った。すなわち、BSRA 分離細菌全 12 菌株に対し、レバン産生能およびオキシダーゼ活性、ジャガイモ塊茎腐敗能、アルギニンジヒドラーゼ活性、タバコ過敏感反応を調査した。

### 3. 結果

すべての BSRA 分離細菌はレバン産生能およびタバコ過敏感反応が陽性である一方、オキシダーゼ活性およびジャガイモ塊茎腐敗能、アルギニンジヒドラーゼ活性は陰性であったので、Lelliot et al. (1966) の LOPAT group Ia に分類された (Table 3-2-1)。

### 4. 考察

BSRA 分離細菌は Lelliot et al. (1966) の LOPAT group Ia に分類されたため、*P. syringae* 群細菌であると推察された。また、Tanii and Baba (1979) の報告から、アズキ茎腐細菌病原細菌と *P. savastanoi* pv. *glycinea* は近縁であると考えられるため、比較菌株は *P.*

*savastanoi* pv. *glycinea* と近縁の *P. syringae* 群細菌を中心に選定した。  
比較菌株は Table 3-2-2 に示した。



**Table 3-2-1** Results of LOPAT tests for BSRA isolates

BSRA Isolates	Levan production	Oxidase activity	Potato soft rot	Arginine dihydrolase activity	Tobacco hypersensitive reaction	LOPAT group <sup>a</sup>
AZK-11	+	-	-	-	+	Ia
AZB-21	+	-	-	-	+	Ia
09Psa251	+	-	-	-	+	Ia
09Psa258	+	-	-	-	+	Ia
09Psa263	+	-	-	-	+	Ia
09Psa273	+	-	-	-	+	Ia
09Psa275	+	-	-	-	+	Ia
09Psa279	+	-	-	-	+	Ia
09Psa289	+	-	-	-	+	Ia
09Psa351	+	-	-	-	+	Ia
09Psa355	+	-	-	-	+	Ia
09Psa361	+	-	-	-	+	Ia

<sup>a</sup> Lelliot et al. (1966)

**Table 3-2-2** Reference strains used in this study

Taxon	Strain <sup>a</sup>	Other strain number <sup>a</sup>	Host of origin
<i>Pseudomonas amygdali</i>	ICMP3918 <sup>T</sup>		Almond
<i>P. ficuserectae</i>	SUPP1391 <sup>T</sup>	L-7 <sup>T</sup>	Wild fig
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	ICMP4352 <sup>T,PT</sup>		Olive
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	PP8172		Kidney bean
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	SUPP191	KZ2w	Kudzu
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	SUPP1139	BQH-1	Kidney bean
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	CHUK		Soybean
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	SUPP211	daizu8101	Soybean
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	SUPP196	AVPCO8101	Oat
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	SUPP1331	90S-4	Cauliflower
<i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i>	SUPP582	mori8601	Mulberry
<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	SUPP408	U7805	Mume
<i>P. syringae</i> pv. <i>myricae</i>	SUPP166	yamamomo801	Wax myrtle
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	SUPP1662	PP105	Pea
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1-1	SUPP2781, MAFF212490	Adzuki bean
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	SUPP278	Pt7364	Tobacco
<i>P. tremae</i>	SUPP449 <sup>T</sup>	TO1 <sup>T</sup>	<i>Trema orientalis</i>
<i>P. viridiflava</i>	SUPP113	hakusai801	Chinese cabbage

<sup>a</sup> ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants; SUPP: Shizuoka University Plant Pathology; MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries; T: type strain of the species; PT: pathotype strain of the pathovar

### 第 3 節 宿主範囲および病原性

#### 1. 目的

BSRA 分離細菌の宿主範囲および病原性における近縁細菌との差異を明らかにする。

#### 2. マメ科植物に対する病原性 (接種試験 1)

##### 1) 方法

供試菌株は前項で供試した BSRA 分離細菌 12 菌株 (Table 3-1) に加えて, 比較菌株のうちダイズ斑点細菌病の病原細菌 *P. savastanoi* pv. *glycinea* SUPP211 菌株およびインゲンマメかさ枯病の病原細菌 *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP1139 菌株, アズキ褐斑細菌病の病原細菌 *P. syringae* pv. *syringae* 1-1 菌株とした。

供試したマメ科植物は, アズキ *Vigna angularis* (品種: ‘エリモシヨウズ’), ソラマメ *Vicia faba* (品種: ‘仁徳一寸’), ササゲ *V. unguiculata* (品種: ‘けごんの滝’), フジマメ *Lablab purpureus* (品種: ‘赤花鵲豆’), インゲンマメ *Phaseolus vulgaris* (品種: ‘大正金時’), リョクトウ *V. radiata* (品種不明), エンドウ *Pisum sativum* (品種: ‘北海赤花’), ダイズ *Glycine max* (品種: ‘音更大袖’), ナタマメ *Canavalia gladiata* (品種: ‘赤刀豆’) およびシカクマメ *Psophocarpus tetragonolobus* (品種不明) とした。ナタマメは 10.5 cm ポリポットに 1 粒播種し, ナタマメを除くマメ科植物は 10.5 cm ポリポットに各 3 粒播種した。各植物それぞれ 3 個体供試した。播種後, 25 °C16 時間明期 8 時間暗期に設定した人工気象器 (MLR-352, パナソニック, 門真市) 内で第一本葉が展開するまで生育させた。

KB 寒天培地上で 28 °C 2 日間培養した供試菌株の細菌集落を滅菌蒸留水に懸濁し、およそ  $10^9$  cfu/ml となるように調整後、Tween 80 を 0.01% (v/v) 加用したものを接種源とした。SDW を陰性対照とした。なお、予め分光光度計 (Nabi, MicroDigital, 城南市, 韓国) を用いて細菌懸濁液の OD<sub>600</sub> を測定した後、希釈平板法により細菌懸濁液の濃度を測定し、細菌懸濁液の所定の濃度を調整した。以降の実験も同様に行った。

接種源を噴霧接種した供試植物を 25 °C の暗所湿室に 48 時間置き、接種 48 時間後に人工気象器 (25 °C, 湿度無制御, 16 時間明期 8 時間暗期) に移した。接種 10 日および 20 日後に発病を調査した。病徴を水浸状病斑および壊疽病斑, 暗褐色病斑, 赤褐色病斑, ハロー形成, 茎部腐敗, 菌泥滲出に分類して記録した。この試験は 2 回行った。

## 2) 結果

試験結果を Table 3-3-1 に示した。

BSRA 分離細菌の菌株によって引き起こされる病徴に大きな差異は認められなかった。すなわち、供試したすべての BSRA 分離細菌はアズキに対し病原性を示し、接種 10 日後に水浸状を呈した赤褐色から暗褐色の病斑が接種葉に認められた (Fig. 3-3-1a)。病斑の周囲に明瞭なハローは認められなかった。小葉の基部が罹病した場合、その小葉は速やかに枯死した。また、葉柄および茎部に赤褐色水浸状の条斑あるいは斑点が認められた (Fig. 3-3-1b)。節が罹病した場合、病斑は腐敗へと進展した。供試したほぼすべての BSRA 分離菌株について、接種 20 日後には葉柄および茎部の病斑上に菌泥の滲

出が認められた (Fig. 3-3-1b). これらの症状は圃場で観察されるアズキ茎腐細菌病の症状と一致した.

また, 供試したすべての BSRA 分離細菌はフジマメおよびインゲンマメ, ササゲに対し病原性が認められた. すなわち, フジマメ (Fig. 3-3-1c) およびインゲンマメ (Fig. 3-3-1d) の葉身においてハローを伴わない赤褐色斑点をもたらし, ササゲに対しては主に茎部に暗褐色の病斑を形成した (Fig. 3-3-1e). フジマメおよびインゲンマメの茎部においても, 1~2mm 長の赤褐色の条斑を形成した. また, 12 菌株中 09Psa351 菌株のみ, リョクトウの葉身に赤褐色の病斑をわずかに形成することがあった (データ省略). 一方, BSRA 分離細菌はソラマメ, エンドウ, ダイズ, ナタマメおよびシカクマメに対して病原性を示さなかった.

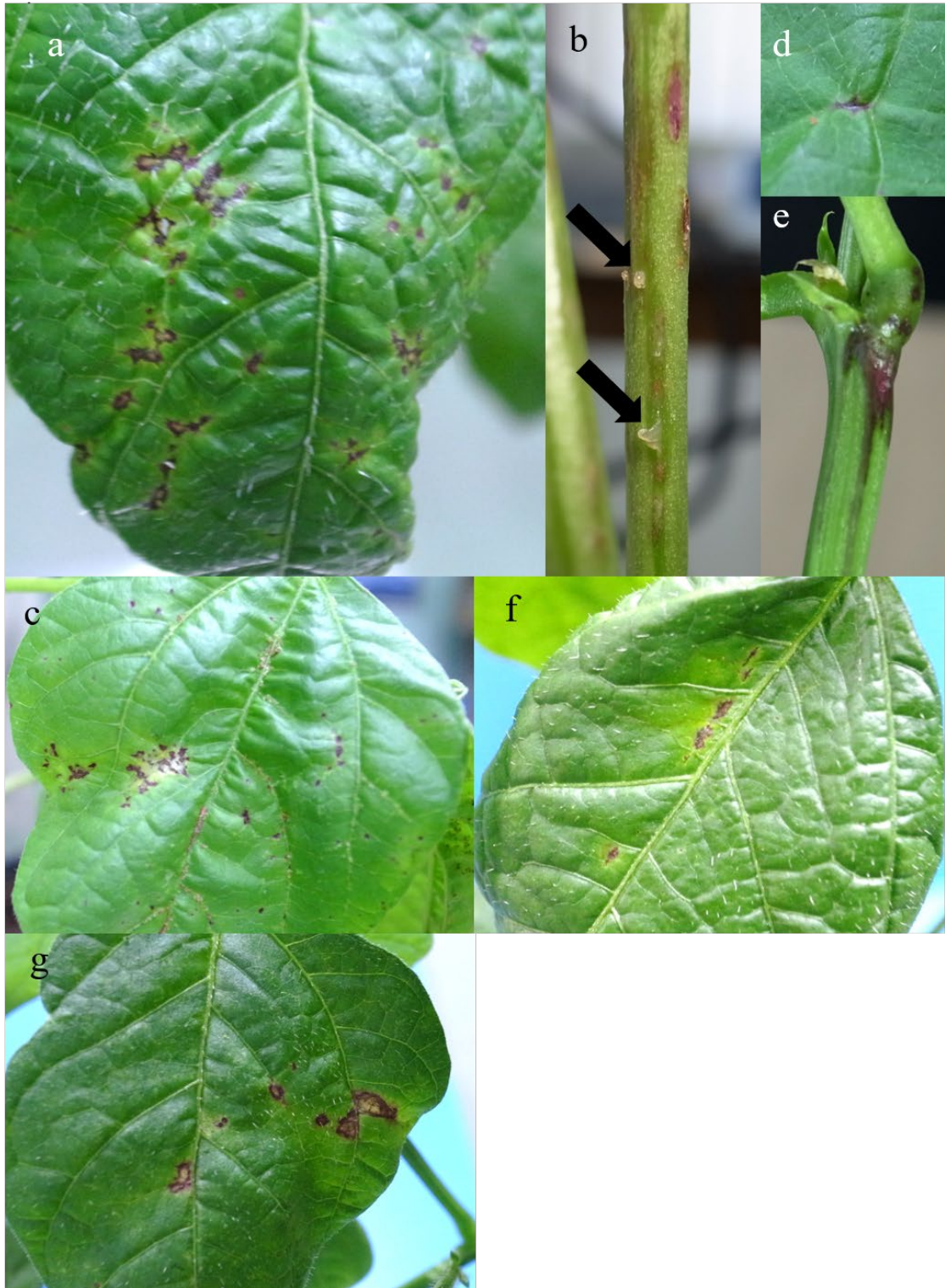
*P. savastanoi* pv. *glycinea* SUPP211 菌株は, インゲンマメ, ダイズおよびシカクマメに対して病原性を示したが, アズキに対する病原性は認められなかった. *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP1139 菌株は, アズキ (Fig. 3-3-1f), フジマメ, インゲンマメおよびシカクマメに対して病原性を示した. 本菌株はアズキ葉に退緑を伴う病斑を形成し, インゲンマメ葉では黄緑色のハローを伴う病斑を形成した. *P. syringae* pv. *syringae* 1-1 菌株はアズキ (Fig. 3-3-1g), ササゲ, フジマメ, エンドウおよびシカクマメに病原性を示した. 本菌株は, アズキ葉にはじめ直径 1mm ほどの水浸状の斑点を形成した. この症状は BSRA 分離細菌による発病初期の症状と類似した. 病斑は徐々に拡大し, 中心部が壊疽となり, その外周が褐色に明瞭に縁取られ, そのさらに外側が退緑する病斑に至り, 壊疽部分の中心部は容易に組織が崩壊した. 一方, 茎部には病変が観察されなかった.

これらの症状は圃場で観察されるアズキ褐斑細菌病の病徴と一致し、アズキに対して **BSRA** 分離細菌がもたらす病徴と明らかに異なった。

**Table 3-3-1** Pathogenicity of BSRA isolates and three reference strains on 10 Fabaceae plants (inoculation test 1)

Plant species	BSRA isolates (n=12)		Reference strains belonging to <i>P. syringae</i> group bacteria					
	Leaves	Stems	<i>pv. glycinea</i>		<i>pv. phaseolicola</i>		<i>pv. syringae</i>	
			Leaves	Stems	Leaves	Stems	Leaves	Stems
Adzuki bean ( <i>Vigna angularis</i> )	DB, N, RB, WS	BO, RB, RT, WS	-	-	DB, WS	WS	RB, N	-
Broad bean ( <i>Vicia faba</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-
Cowpea ( <i>Vigna unguiculata</i> )	DB, RB, WS	DB, WS	-	-	-	-	RB, N	-
Hyacinth bean ( <i>Lablab purpureus</i> )	RB, WS	RB, WS	-	-	RB, WS	-	RB	-
Kidney bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	RB, WS	RB	RB	-	DB, H, RB, WS	RB	-	-
Mung bean ( <i>Vigna radiata</i> )	RB (1/12)	-	-	-	-	-	-	-
Pea ( <i>Pisum sativum</i> )	-	-	-	-	-	-	-	WS
Soybean ( <i>Glycine max</i> )	-	-	DB, H, WS	WS	-	-	-	-
Sword bean ( <i>Canavalia gladiata</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-
Winged bean ( <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> )	-	-	RB	-	DB	-	DB, H	-

The BSRA isolates results did not vary among isolates, except for pathogenicity on mung bean, which had only reddish-brown spots caused by isolate 09Psa351. Reference strains: *pv. glycinea*, *P. savastanoi pv. glycinea* SUPP211; *pv. phaseolicola*, *P. savastanoi pv. phaseolicola* SUPP1139; *pv. syringae*, *P. syringae pv. syringae* 1-1  
BO, bacterial ooze; DB, dark brown lesions; H, halos; N, necrotic lesions; RB, reddish-brown lesions; RT, rot; WS, water-soaked lesions; -, non-pathogenic





**Fig. 3-3-1** Symptoms on adzuki bean, cowpea, hyacinth bean, and kidney bean plants inoculated with bacterial stem rot of adzuki bean (BSRA) isolates, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, and *P. syringae* pv. *syringae*. **a** Reddish-brown lesions on adzuki bean leaflet at 12 days post-inoculation with BSRA isolate AZK-11. **b** Reddish-brown lesions and bacterial ooze exudations (arrows) on adzuki bean stem at 27 days post-inoculation with BSRA isolate 09Psa273. **c** Reddish-brown lesions on hyacinth bean leaflet at 12 days post-inoculation with BSRA isolate AZK-11. **d** Reddish-brown lesions on kidney bean leaflet at 12 days post-inoculation with BSRA isolate AZK-11. **e** Water-soaked lesion on cowpea stem at 23 days post-inoculation with BSRA isolate 09Psa355. **f** Reddish-brown lesions on adzuki bean leaflet at 20 days post-inoculation with *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* strain SUPP1139. **g** Necrotic flecks with distinct brown margins on adzuki bean leaflet at 21 days post-inoculation with *P. syringae* pv. *syringae* strain 1-1

### 3. 各種作物に対する病原性 (接種試験 2)

#### 1) 方法

BSRA 分離細菌の宿主範囲を決定するため, 12 科 22 属 27 種の 31 植物に対する接種試験を行った.

BSRA 分離細菌は AZK-11 菌株および 09Psa273 菌株を供試した. 細菌懸濁液をそれぞれ約  $10^9$  cfu/ml に調整し, 0.01% Tween80 を加用したものを接種源とした.

草本植物は 10.5 cm ポットに 1 ポットあたり 1-3 個体とし, 播種後温室 (約 20-30 °C) で約 4 週間管理した後, それぞれ 1 ポットの植物に対して, 噴霧接種および穿刺接種 (Takikawa et al. 1989) を行った. 供試した草本植物 28 植物は以下の通りである: アズキ *V. angularis* (品種: 'エリモショウズ'), セルリー *Apium graveolens* (品種: 'トップセラー'), ミツバ *Cryptotaenia japonica* (品種: '柳川二号'), ニンジン *Daucus carota* subsp. *sativus* (品種: '向陽二号'), パセリ *Petroselinum crispum* (品種: 'カーリーパラマウント'), ゴボウ *Arctium lappa* (品種: '柳川理想'), レタス *Lactuca sativa* (品種: 'エムラップ 231'), キャベツ *Brassica oleracea capitata* group (品種: '冬駒'), ブロッコリー *B. oleracea italica* group (品種: 'ピクセル'), カリフラワー *B. oleracea botrytis* group (品種: 'バロック'), ハクサイ *B. rapa pekinensis* group (品種: '黄ごごろ 75'), コマツナ *B. rapa perviridis* group (品種: '浜ちゃん'), カブ *B. rapa rapifera* group (品種: '玉里'), ダイコン *Raphanus sativus daikon* group (品種: '夏つかさ'), ホウレンソウ *Spinacia oleracea* (品種: 'ブライトン'), スイカ *Citrullus lanatus* (品種: '祭ばやし 777'), メロン *Cucumis melo* (品種: 'ルピアレッド'), カボチャ *Cucurbita maxima* (品種:

‘えびす’), シソ *Perilla ocymoides* (品種: ‘青大葉’), タマネギ *Allium cepa* (品種: ‘札幌黄’), ネギ *Al. fistulosum* (品種: ‘元蔵’), ニラ *Al. tuberosum* (品種: ‘パワフルグリーンベルト’), アスパラガス *Asparagus officinalis* (品種: ‘ウェルカム’), オクラ *Abelmoschus esculentus* (品種: ‘ピークファイブ’), トウモロコシ *Zea mays* (品種: ‘ゆめのコーン’), ピーマン *Capsicum annuum* (品種: ‘あきの’), トマト *Lycopersicon esculentum* (品種: ‘桃太郎ファイト’), ナス *Solanum melongena* (品種: ‘くろべえ’). 接種後, 直ちにプラスチック容器 (74 × 44 × 35 cm) に移して 1 晩保ち, 翌朝ガラス温室内に移した. 接種後 1 か月間随時発病状況を観察した.

木本植物として, ウメ *Prunus mume* var. *bungo* (品種: ‘豊後梅’), モモ *Pr. persica* var. *vulgaris* (品種: ‘白鳳’) およびエゾヤマザクラ *Pr. sargentii* は 30cm ポット中の 2-3 年生の苗木 1 樹に対して, 穿刺接種法により新梢 3 本に数か所接種した. 接種後温室には置かず, ガラス温室 (約 20-30 °C) 内で管理し, 1 か月後屋外 (北海道長沼町: 43°05N, 141°76E) に移した. 2013 年 6 月から 9 月まで随時病徴の有無を観察した. この試験は 1 回のみ行った.

## 2) 結果

試験結果を Table 3-3-2 に示した.

供試した BSRA 分離細菌はいずれの接種方法においてもアズキに対してのみ病原性を示し, その他の植物に対してはいずれの接種法においても病原性を示さなかった.

**Table 3-3-2** Results of host range tests of BSRA isolates after either puncture (Takikawa et al. 1989) or spray inoculation (inoculation test 2)

Plant name	( Species)	Cultivar	No. diseased plants / No. inoculated plants			
			Isolate AZK-11		Isolate 09Psa273	
			Puncture	Spray	Puncture	Spray
Fabaceae						
Adzuki bean	( <i>Vigna angularis</i> )	Erino-shozu	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Apiaceae						
Celery	( <i>Apium graveolens</i> )	Top seller	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Japanese honeywort	( <i>Cryptotaenia japonica</i> )	Yanagawa-2	nt	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Carrot	( <i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> )	Koyo-2	0 / 1	0 / 3	0 / 1	0 / 3
Parsley	( <i>Petroselinum crispum</i> )	Curly paramount	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Asteraceae						
Edible burdock	( <i>Arctium lappa</i> )	Yanagawa-riso	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Lettuce	( <i>Lactuca sativa</i> )	M-rap 231	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Brassicaceae						
Cabbage	( <i>Brassica oleracea</i> capitata group)	Fuyukoma	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Broccoli	( <i>B. oleracea</i> italica group)	Pixel	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Cauliflower	( <i>B. oleracea</i> botrytis group)	Baroque	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Chinese cabbage	( <i>B. rapa</i> pekinensis group)	Kigokoro 75	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	( <i>B. rapa</i> perviridis group)	Hama-chan	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Turnip	( <i>B. rapa</i> rapifera group)	Tamasato	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Japanese radish	( <i>Raphanus sativus</i> daikon group)	Natsu-tsukasa	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Chenopodiaceae						
Spinach	( <i>Spinacia oleracea</i> )	Brighton	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Cucurbitaceae						
Watermelon	( <i>Citrullus lanatus</i> )	Matsuri-bayashi 777	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
Netted melon	( <i>Cucumis melo</i> )	Rupia red	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
Pumpkin	( <i>Cucurbita maxima</i> )	Ebisu	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
Lamiaceae						
Perilla	( <i>Perilla ocymoides</i> )	Ao-oba	0 / 1	0 / 3	0 / 1	0 / 3
Liliaceae						
Onion	( <i>Allium cepa</i> )	Sapporo-ki	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Welsh onion	( <i>Al. fistulosum</i> )	Motokura	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Chinese chive	( <i>Al. tuberosum</i> )	Powerful green belt	nt	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Asparagus	( <i>Asparagus officinalis</i> )	Welcome	nt	0 / 3	nt	0 / 3
Malvaceae						
Okra	( <i>Abelmoschus esculentus</i> )	Peak five	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Poaceae						
Maize	( <i>Zea mays</i> )	Yume-no-corn	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Rosaceae						
Bungo Japanese apricot	( <i>Prunus mume</i> var. <i>bungo</i> )	Bungo-ume	0 / 1	nt	0 / 1	nt
Peach	( <i>Pr. persica</i> var. <i>vulgaris</i> )	Hakuho	0 / 1	nt	0 / 1	nt
Sargent's cherry	( <i>Pr. sargentii</i> )	Ezo-yama-sakura	0 / 1	nt	0 / 1	nt
Solanaceae						
Sweet pepper	( <i>Capsicum annuum</i> )	Akino	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
Tomato	( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Momotaro-fight	0 / 1	0 / 3	0 / 1	0 / 3
Eggplant	( <i>Solanum melongena</i> )	Kurobe	0 / 1	0 / 2	0 / 1	0 / 2

nt: Not tested

#### 4. 比較菌株のアズキに対する病原性 (接種試験 3)

##### 1) 方法

BSRA 分離細菌は AZK-11 菌株および 09Psa273 菌株の 2 菌株, および, 比較菌株は Table 3-2-2 のうち, *P. amygdali*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* および *P. tremae* を除く 15 菌株を供試した. 供試菌株の細菌懸濁液はおよそ  $10^8$  cfu/ml に調整し, SDW を陰性対照とした.

アズキ (品種: ‘エリモショウズ’) を 10.5 cm ポリポットに 3 粒播種し, 約 3 週間人工気象器内で栽培し接種に供試した. 接種は穿刺接種法 (Takikawa et al. 1989) により行った. 接種したアズキは 48 時間温室に保ち, その後 25 °C, 16 時間明期 8 時間暗期に設定した人工気象器に移し, 接種後 3 週間随時病徴を観察した. 接種部位周囲の病徴を水浸状および接種部位周辺のみので壊疽, 広範囲の壊疽, ハロー形成に分類し記録した. この試験は 2 回行った.

##### 2) 結果

試験結果を Table 3-3-3 に示した.

BSRA 分離細菌 (AZK-11 菌株および 09Psa273 菌株) および *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (PP8172 菌株, SUPP191 菌株および SUPP1139), *P. syringae* pv. *syringae* 1-1 菌株はアズキに対し病原性を示した. 穿刺接種法による病徴は接種試験 1 における噴霧接種による病徴とほぼ一致した. また, *P. syringae* pv. *coronafaciens* SUPP196 菌株 (エンバクかさ枯病の病原細菌) および *P. syringae* pv. *tabaci* SUPP278 菌株 (タバコ野火病の病原細菌) は, 接種 3-4 日後には水浸状の病斑を伴わないのにもかかわらず, 接種部位の周りに明瞭なハローをもたらした (Fig. 3-3-2). いずれも速やかに接種部位の周り

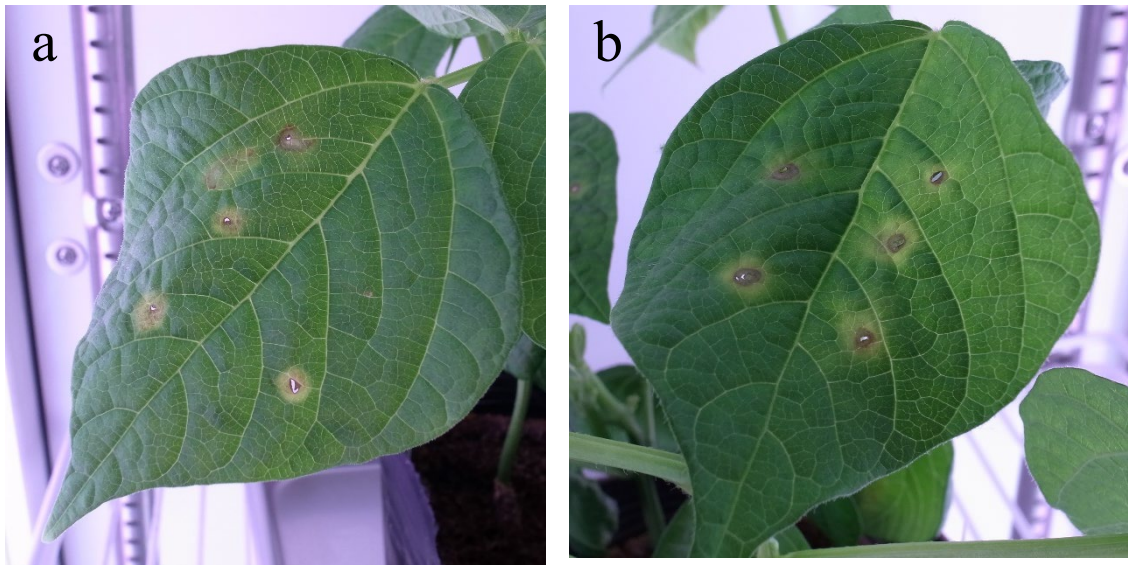
は淡褐色から暗褐色の壊疽を呈した.

その他の比較菌株についてはアズキに対する病原性は認められなかった.

**Table 3-3-3** Pathogenicity of BSRA isolates and reference strains on adzuki bean plants (inoculation test 3)

Taxon	Strains	Symptom
BSRA isolate	AZK-11	LN, SN, WS
BSRA isolate	09Psa273	LN, SN, WS
<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	SUPP1391	-
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	CHUK	-
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	SUPP211	-
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	PP8172	SN, WS
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	SUPP191	SN, WS
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	SUPP1139	SN, WS
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	SUPP196	H, SN
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	SUPP1331	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i>	SUPP582	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	SUPP408	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>myricae</i>	SUPP166	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>psi</i>	SUPP1662	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1-1	SN
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	SUPP278	H, SN
<i>P. viridiflava</i>	SUPP113	-

H, halo formation; LN, large area of necrosis; SN, small area of necrosis; WS, water-soaked lesion; -, no symptoms except for pinpoint necrosis



**Fig. 3-3-2** Halo formation on adzuki bean plant inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* and *P. syringae* pv. *tabaci*. **a** Halo formations around inoculation sites on adzuki bean leaflet at 4 days post-inoculation with *P. syringae* pv. *coronafaciens* strain SUPP196. **b** Necroses with halo formations around inoculation sites on adzuki bean leaflet at 4 days post-inoculation with *P. syringae* pv. *tabaci* strain SUPP278



## 5. アズキ茎腐細菌病分離細菌と *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* の病徴の差異 (接種試験 4)

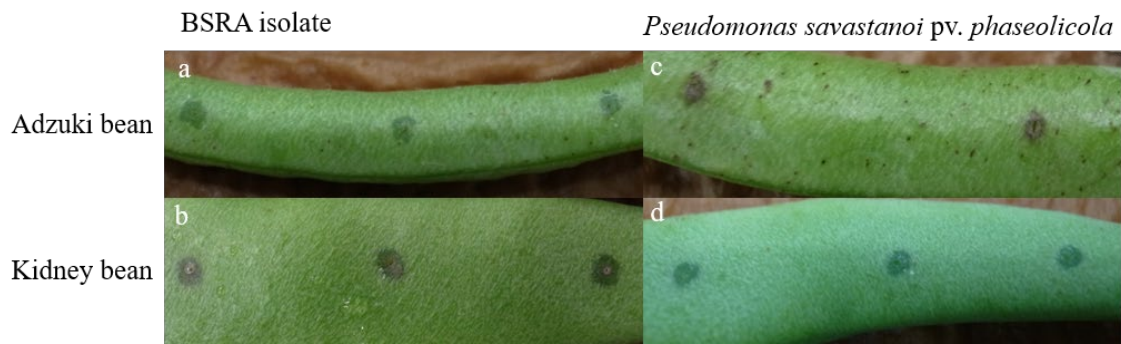
### 1) 方法

BSRA 分離細菌 AZK-11 菌株および *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP1139 菌株を供試し、細菌懸濁液を約  $10^9$  cfu/ml に調整し、接種源とした。アズキ (品種: ‘エリモショウズ’) およびインゲンマメ (品種: ‘大正金時’) の未熟莢を水道水で洗浄し、水気を除いた後 70%エタノールを吹きかけたペーパータオルで莢の表面を拭いた。1 莢に対し 3-4 か所に穿刺接種法により接種し、各菌株それぞれ 3 莢供試した。SDW を陰性対照とした。接種した莢はバット内の SDW で湿らせたペーパータオル上に静置し、バット全体をポリエチレン袋で覆い、25 °C 暗所で管理した。病徴の調査は接種 3 日後および 7 日後に行った。この試験は 2 回行った。

### 2) 結果

接種 3 日後、BSRA 分離細菌 AZK-11 菌株を接種したアズキ未熟莢および *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP1139 菌株を接種したインゲンマメ未熟莢にそれぞれ濃緑色水浸状の病斑が認められた (Fig. 3-3-3a, d)。これらの未熟莢の病徴は圃場で観察される病徴と一致した。ただし、アズキの莢が新鮮でない場合は、BSRA 分離細菌による水浸状の病斑が接種 7 日後に褐色に変色することがあった (データ省略)。同様に、インゲンマメ莢の *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* の接種部位の周囲が接種 7 日後に薄紅色に変色することもあった (データ省略)。一方、BSRA 分離細菌をインゲンマメ莢に接種すると、アズキ莢に接種した場合と同様に、接種 3 日後に濃

緑色水浸状の病斑が認められたが，水浸状の病斑は次第に光沢を失い，接種 7 日後には接種部位の周囲が赤褐色に変色した (Fig. 3-3-3b). 反対に，*P. savastanoi* pv. *phaseolicola* をアズキ莢に接種すると 3 日後に接種部位の周囲の褐変が認められた (Fig. 3-3-3c).



**Fig. 3-3-3** Symptoms on immature pods of adzuki bean cv. Erimo-shozu and kidney bean cv. Taisho-kintoki inoculated with BSRA isolate and *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. Adzuki bean (**a**) at 3 days post-inoculation (dpi) and kidney bean (**b**) at 7 dpi with BSRA isolate AZK-11. Adzuki bean (**c**) and kidney bean (**d**) at 3 dpi with *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* strain SUPP1139

## 6. 宿主範囲および病原性に関する考察

BSRA 分離細菌の宿主範囲および病原性における近縁細菌との差異を明らかにするため、一連の接種試験を行った。

接種試験を通じて BSRA 分離細菌をアズキに接種することにより Tanii and Baba (1979) が記載したアズキ茎腐細菌病の原病徴が再現され、2000 年代に分離された BSRA 分離細菌がアズキ茎腐細菌病の病原細菌として妥当であることが改めて確認された。接種試験 1 および接種試験 2 の結果から、Tanii and Baba (1979) の記載と同様に BSRA 分離細菌はアズキの他、ササゲ、フジマメおよびインゲンマメに病原性を有し、ダイズには病原性を示さないことが明らかとなった。人工接種により、インゲンマメかき枯病の病原細菌 *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* もアズキに病原性を有し、葉に類似した病斑を形成したが、壞疽に至ることはなく、茎上の病斑形成は限定的であった。一方、BSRA 分離細菌は本病の最大の特徴ともいえる茎部の腐敗をアズキにもたらし、茎および葉柄の病斑上にしばしば菌泥が観察された。したがって、アズキに対する病徴の差異により、アズキ茎腐細菌病と *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* による症状は識別可能である。さらに、接種試験 4 では、BSRA 分離細菌はアズキの未熟莢に濃緑色水浸状の病斑をもたらししたが、*P. savastanoi* pv. *phaseolicola* を接種した場合は接種部位の周囲が速やかに褐変した。BSRA 分離細菌接種による水浸状の病斑は時間の経過とともにしばしば褐色になることがあるものの、アズキ莢上の病斑形成の差異においてもアズキ茎腐細菌病の病原細菌と *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* を識別することが可能である。なお、海外では自然発生のアズキから *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* の分離された (Taylor et

al. 1996) 事例があるが，日本国内ではそのような事例は報告されていない．反対に，これまでインゲンマメからアズキ茎腐細菌病の病原細菌と考えられる細菌が分離されたという報告もない．同様に，アズキ褐斑細菌病の病原細菌 *P. syringae* pv. *syringae* もアズキに病原性を有するが，発生初期の水浸状の病斑を除いて，アズキ茎腐細菌病の病徴とアズキ褐斑細菌病の病徴（谷井・馬場 1971）は明らかに異なり，識別が可能である．そのことは接種試験 1 の結果からも支持されている．接種試験 3 において，エンバクかさ枯病の病原細菌 *P. syringae* pv. *coronafaciens* およびタバコ野火病の病原細菌 *P. syringae* pv. *tabaci* はアズキに明瞭なハローおよび壊疽症状をもたらした．両細菌はタブトキシンという植物毒素を産生することが知られている（Bender et al. 1999）．接種後まもなく接種部の周りに明瞭なハローが生じたのは，両細菌が産生するタブトキシンによりクロロシスが生じたものと推察される．*P. syringae* pv. *coronafaciens* および *P. syringae* pv. *tabaci* によるアズキの病害は現在のところ報告されていないが，海外では *P. syringae* pv. *tabaci* はインゲンマメ（Ribeiro et al. 1979）およびダイズ（Allington 1945）の Wildfire の病原細菌としても知られており，今後アズキにおいても自然発生する可能性がある．一方，BSRA 分離細菌を接種したアズキでは，接種方法によらず，明瞭なハローを伴った病斑は観察されない．以上のことから，BSRA 分離細菌を含めたアズキに何らかの症状をもたらす 5 つの植物病原細菌は，アズキに引き起こされる症状がそれぞれ異なるため，アズキに対する病原性およびその病徴により，アズキ茎腐細菌病の病原細菌は他の植物病原細菌と病原性において識別可能である．また，ダイズ斑点細菌病の病原細菌 *P. savastanoi* pv.

*glycinea* はアズキに病原性がなく，反対に BSRA 分離細菌はダイズに対する病原性は認められなかった．

現時点では，アズキ茎腐細菌病の病原細菌の自然宿主はアズキに限定され，実験的に，アズキをはじめ，マメ科植物のフジマメ，インゲンマメおよびササゲにのみ病原性があることが結論される．

## 第 4 節 遺伝的形質

### 1. 目的

アズキ茎腐細菌病の病原細菌の分類学的位置を決定するため、分子生物学的手法により遺伝的形質を明らかにする。

### 2. DNA 抽出

#### 1) 方法

BSRA 分離細菌全 12 菌株および比較菌株全 18 菌株、合計 30 菌株供試した (Table 3-1, Table 3-2-2)。

酵母エキス・ペプトン (YP: 酵母エキス, 5 g; ペプトン, 10 g; 蒸留水, 1000 ml; pH 6.8) 液体培地 5 ml で 2 日間静置培養した菌体を遠心分離 (18700 ×g, 1 分間) により集菌し、菌体ペレットを Tris-EDTA 緩衝液 (TE: 50 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁した。臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 法 (Ausubel et al. 1987) によりゲノム DNA を抽出し、1%アガロースゲルにより電気泳動を行った。抽出した DNA 溶液は TE で 1/100 に希釈し、以降の PCR テンプレートとして用いた。

#### 2) 結果

合計 30 菌株より DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動で DNA が抽出されていることを確認した (データ省略)。

### 3. *hrpZ* 遺伝子配列に基づいた分類

#### 1) 方法

BSRA 分離細菌全 12 菌株および比較菌株全 18 菌株，合計 30 菌株供試した (Table 3-1, Table 3-2-2).

Inoue and Takikawa (2006) により設計された *P. syringae* 群細菌の *hrp* group (Group IA, IB, II, III and IV) を識別する各グループに特異的なプライマーセットを用いた PCR を行った. プライマーの情報は付録 Table A1 に示した. DNA ポリメラーゼは HotStar Taq *Plus* DNA polymerase (Qiagen, Hilden, ドイツ) あるいは Gene Taq (日本ジーン, 東京) を用いた. PCR の反応液の組成および PCR 条件は Table 3-4-1 および Table 3-4-2 に示した. 増幅産物は 1%アガロースゲル電気泳動し, トランスイルミネーターでバンドの存在を確認した. なお, 増幅産物の染色は, ゲルを GelRed (Biotium, Fremont, CA, 米国) により先染めするか, あるいは, 臭化エチル溶液により後染めした.

#### 2) 結果

検出された特異的なバンドに基づいて, 供試菌株をグルーピングした結果を Table 3-4-3 に示した.

すべての BSRA 分離細菌 12 菌株, *P. amygdali* ICMP3918<sup>T</sup> 菌株, *P. savastanoi* pv. *glycinea* CHUK 菌株, SUPP211 菌株, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* PP8172 菌株, SUPP191 菌株, SUPP1139 菌株, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ICMP4352<sup>T, PT</sup> 菌株, *P. syringae* pv. *morsprunorum* SUPP408 菌株, *P. syringae* pv. *myricae* SUPP166 菌株, および *P. tremae* SUPP449<sup>T</sup> 菌株は, *hrp* group IA に特異的なプライマーセットを用いた PCR により 880 bp の増幅断片が認められた



(Fig. 3-4-1, ただし, *P. amygdali*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* および *P. syringae* pv. *tremae* についてはデータ省略). 一方, *hrp* group IA に特異的なプライマーセットを用いたにも拘らず, *P. syringae* pv. *tabaci* SUPP278 菌株では約 550 bp の増幅断片が認められた (Fig. 3-4-1). これは *P. syringae* pv. *tabaci* の *hrpZ* 遺伝子に欠失があることに起因する (Inoue and Takikawa 2006, Taguchi et al. 2001) ためであり, *P. syringae* pv. *tabaci* SUPP278 も *hrp* group IA に分類した. また, BSRA 分離細菌は他の *hrp* group (Group IB, II, III および IV) 特異的プライマーを用いた PCR で増幅断片が認められなかった (データ省略).

アズキ褐斑細菌病菌 *P. syringae* pv. *syringae* 1-1 菌株は, *hrp* group III に特異的なプライマーセットを用いた PCR により *P. syringae* pv. *pisi* SUPP1662 菌株と同様に 750 bp の増幅断片が認められた (Fig. 3-4-2).

その他の比較菌株について, *hrp* group IB, II および IV に特異的なプライマーを用いて PCR を実施したところ, *P. ficuserectae* SUPP1391<sup>T</sup> 菌株および *P. syringae* pv. *mori* SUPP582 菌株は *hrp* group IB, *P. syringae* pv. *maculicola* SUPP1331 菌株は *hrp* group II, *P. syringae* pv. *coronafaciens* SUPP196 菌株は *hrp* group IV であると期待されるサイズの増幅断片が得られた. *P. viridiflava* SUPP133 菌株はいずれも特異的プライマーセットを用いても増幅断片が得られなかった.

**Table 3-4-1** PCR mixture for *hrp* grouping

Component	Volume
PCR grade water	20.1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR buffer	1 $\mu$ l
2.5mM dNTP mixture	0.8 $\mu$ l
DNA polymerase	0.1 $\mu$ l
5 $\mu$ M Forward primer	1 $\mu$ l
5 $\mu$ M Reverse primer	1 $\mu$ l
DNA template	1 $\mu$ l
(Total	25 $\mu$ l)

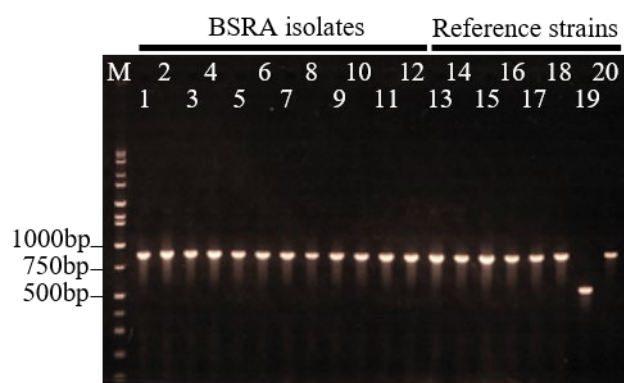
**Table 3-4-2** PCR condition for *hrp* grouping

Step	Temperature	Time
Initial denaturation	95 °C	5 min
3-step cycling:		
Denaturation	94 °C	30 s
Annealing	60 °C	30 s
Extension	72 °C	2 min
Following 30 cycles		
Final extension	72 °C	10 min

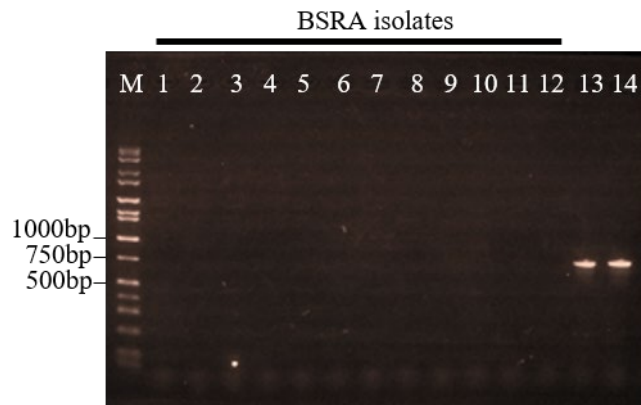
**Table 3-4-3** Results of PCR analysis with group-specific primers based on *hrpZ* gene sequences

Taxon	Strain	<i>hrp</i> group
BSRA isolate	AZK-11	IA
BSRA isolate	AZB-21	IA
BSRA isolate	09Psa251	IA
BSRA isolate	09Psa258	IA
BSRA isolate	09Psa263	IA
BSRA isolate	09Psa273	IA
BSRA isolate	09Psa275	IA
BSRA isolate	09Psa279	IA
BSRA isolate	09Psa289	IA
BSRA isolate	09Psa351	IA
BSRA isolate	09Psa355	IA
BSRA isolate	09Psa361	IA
<i>Pseudomonas amygdali</i>	ICMP3918 <sup>T</sup>	IA
<i>P. ficuserectae</i>	SUPP1391 <sup>T</sup>	IB
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	ICMP4352 <sup>T, PT</sup>	IA
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	PP8172	IA
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	SUPP191	IA
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	SUPP1139	IA
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	CHUK	IA
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	SUPP211	IA
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	SUPP196	IV
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	SUPP1331	II
<i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i>	SUPP582	IB
<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	SUPP408	IA
<i>P. syringae</i> pv. <i>myricae</i>	SUPP166	IA
<i>P. syringae</i> pv. <i>lisi</i>	SUPP1662	III
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1-1	III
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	SUPP278	IA
<i>P. tremae</i>	SUPP449 <sup>T</sup>	IA
<i>P. viridiflava</i>	SUPP113	-

T and PT indicate the type strain of the species and pathotype strain of the pathovars, respectively



**Fig. 3-4-1** Detection of *hrpZ* amplified by PCR with primer set for *hrp* group IA. Lane M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus); 1, AZK-11; 2, AZB-21; 3, 09Psa251; 4, 09Psa258; 5, 09Psa263; 6, 09Psa273; 7, 09Psa275; 8, 09Psa279; 9, 09Psa289; 10, 09Psa351; 11, 09Psa355; 12, 09Psa361; 13, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* SUPP211; 14, *P. savastanoi* pv. *glycinea* CHUK; 15, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP1139; 16, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP191; 17, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* PP8172; 18, *P. syringae* pv. *morsprunorum* SUPP408; 19, *P. syringae* pv. *tabaci* SUPP278; 20, *P. syringae* pv. *myricae* SUPP166. One microliter of each sample was electrophoresed in 1% agarose gel at 100 V



**Fig. 3-4-2** Detection of *hrpZ* amplified by PCR with primer set for *hrp* group III. Lane M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus); 1, AZK-11; 2, AZB-21; 3, 09Psa251; 4, 09Psa258; 5, 09Psa263; 6, 09Psa273; 7, 09Psa275; 8, 09Psa279; 9, 09Psa289; 10, 09Psa351; 11, 09Psa355; 12, 09Psa361; 13, *P. syringae* pv. *syringae* 1-1; 14, *P. syringae* pv. *lisi* SUPP1662. One microliter of each sample was electrophoresed in 1% agarose gel at 100 V

#### 4. rep-PCR によるフィンガープリンティング

##### 1) 方法

BSRA 分離細菌全 12 菌株 (Table 3-1) および比較菌株のうち *hrp* group IA に属する 11 菌株 (Table 3-2-2), 合計 23 菌株を供試した.

rep-PCR は, BOX (*Streptococcus pneumoniae* の BOX エLEMENT の box A サブユニットの反復 DNA 配列), ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) および REP (repetitive extragenic palindromic sequence) に対して, それぞれ BOXA1R (Versalovic et al. 1994), ERIC1R /ERIC2 (Versalovic et al. 1991) および REP1R-I/REP2-I (Versalovic et al. 1991) のプライマーセットを用い, Rademaker et al. (2004) の手順に準じて実施した. PCR プライマーの情報は Table A1 に示した. DNA ポリメラーゼは *TaKaRa Ex Taq* (タカラバイオ, 大津市) を用いた. PCR の反応液の組成および PCR 条件は Table 3-4-4 および Table 3-4-5 に示した. 増幅産物は 1.5%あるいは 2%アガロースゲル電気泳動し, UV トランスイルミネーターによりバンドの存在を確認した. なお, 増幅産物の染色は, ゲルを GelRed により先染めするか, あるいは, 臭化エチル溶液により後染めした. この実験は 2 回行った.

##### 2) 結果

rep-PCR によるバンドパターンは再現性が認められた. ERIC1R/2, BOXA1R および REP1R-I/2-I プライマーを用いた rep-PCR によって得られたバンドパターンは, それぞれ BSRA 分離細菌間で完全に一致し, 他の *hrp* group IA の比較菌株のバンドパターンとは異なった (それぞれ Fig. 3-4-3, Fig. 3-4-4 および Fig. 3-4-5, ただし, *P. amygdali*,

*P. savastanoi* pv. *savastanoi* および *P. tremae* のデータ省略).



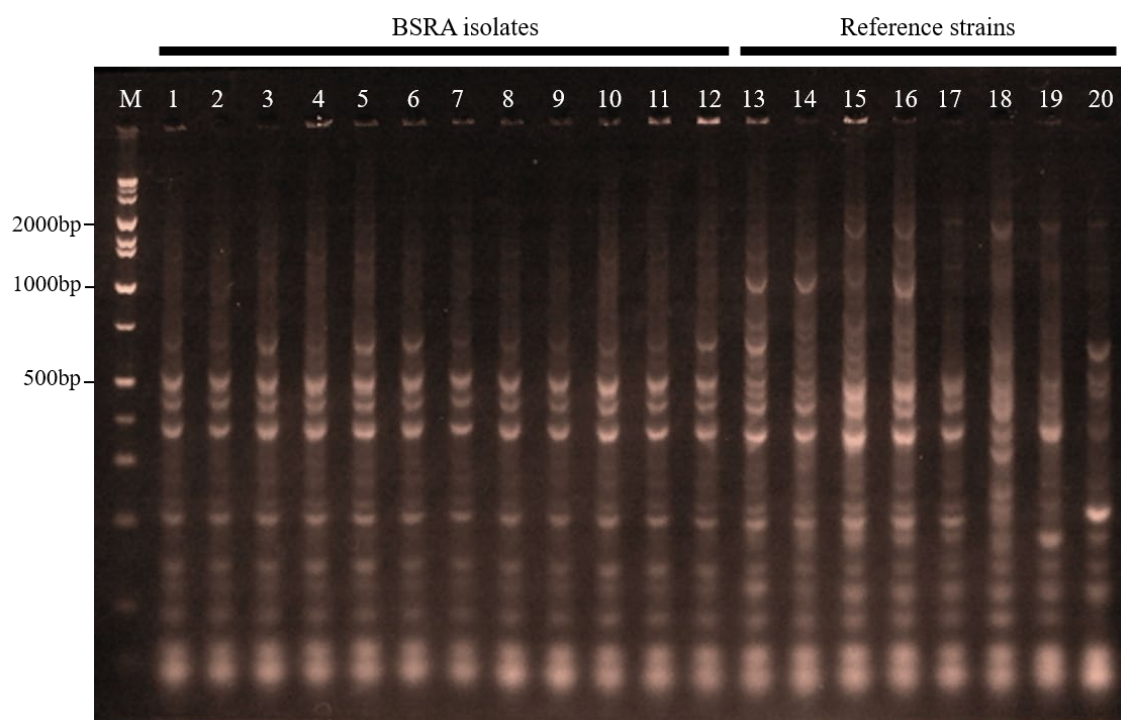
**Table 3-4-4** Reaction mixture for rep-PCR

Component	Volume	
	BOX	ERIC or REP
PCR grade water	13.65 $\mu$ l	12.65 $\mu$ l
5 $\times$ Gitschier buffer	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
2% BSA	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l
DMSO	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
2.5mM dNTP mixture	1.25 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l
DNA polymerase	0.4 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l
50 $\mu$ M BOX A1R primer	1 $\mu$ l	
50 $\mu$ M ERIC1R or REP1R-I primer		1 $\mu$ l
50 $\mu$ M ERIC2 or REP2-I primer		1 $\mu$ l
DNA template	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
	(Total 25 $\mu$ l	25 $\mu$ l)

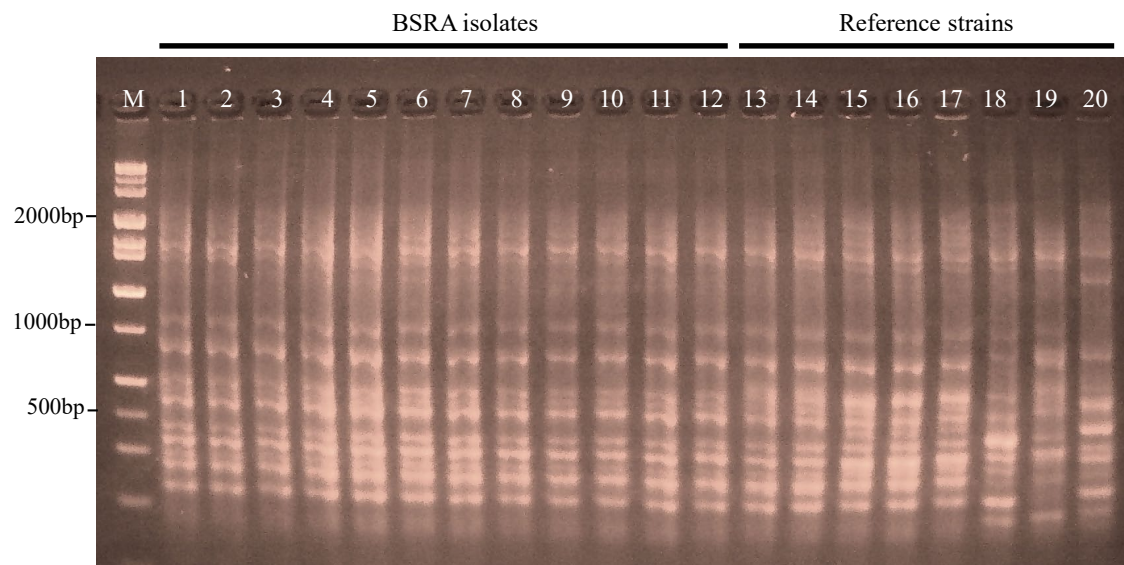
Component of 5 $\times$  Gitschier buffer is shown in Table A2 in Appendix

**Table 3-4-5** PCR conditions for rep-PCR

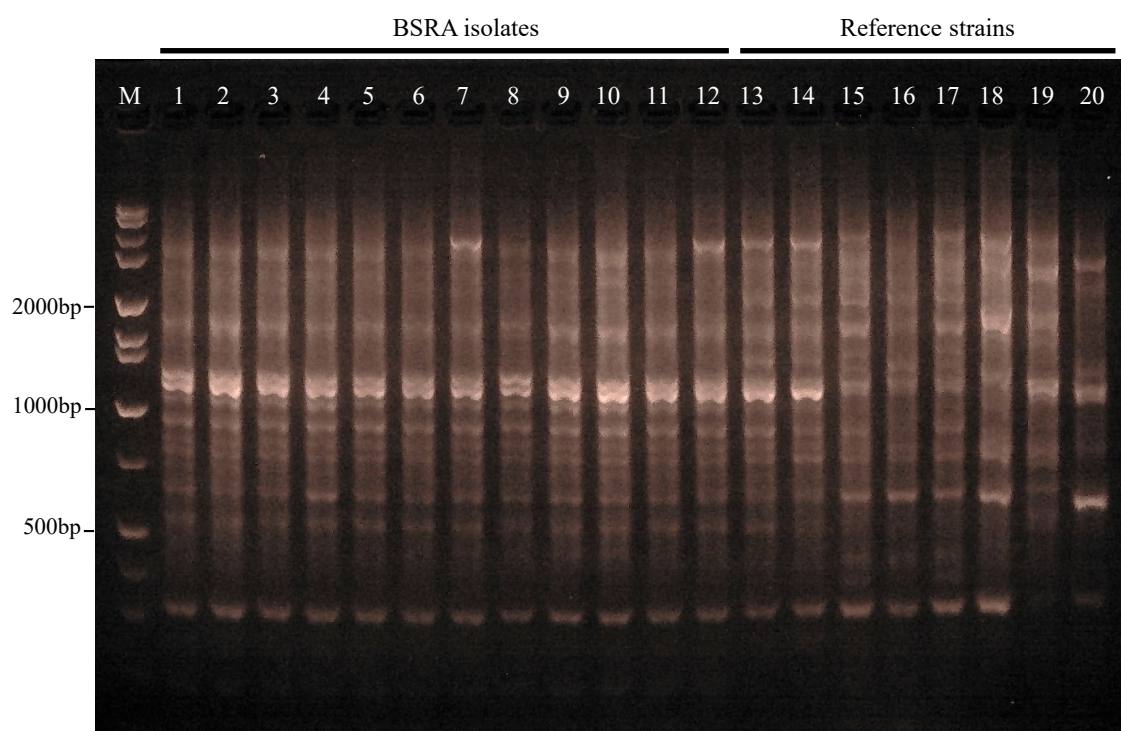
Step	Temperature		Time
	BOX or ERIC	REP	
Initial denaturation	95 °C	95 °C	2 min
3-step cycling:			
Denaturation step 1	94 °C	94 °C	3 s
Denaturation step 2	92 °C	92 °C	30 s
Annealing	50 °C	40 °C	1 min
Extension	65 °C	65 °C	8 min
Following 35 cycles			
Final extension	65 °C	65 °C	8 min



**Fig. 3-4-3** DNA fragment bands after rep-PCR using ERIC primers and DNA from BSRA isolates and reference strains of *Pseudomonas* species and pathovars. Lanes M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus); 1, AZK-11; 2, AZB-21; 3, 09Psa251; 4, 09Psa258; 5, 09Psa263; 6, 09Psa273; 7, 09Psa275; 8, 09Psa279; 9, 09Psa289; 10, 09Psa351; 11, 09Psa355; 12, 09Psa361; 13, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* SUPP211; 14, *P. savastanoi* pv. *glycinea* CHUK; 15, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP1139; 16, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP191; 17, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* PP8172; 18, *P. syringae* pv. *morsprunorum* SUPP408; 19, *P. syringae* pv. *tabaci* SUPP278; 20, *P. syringae* pv. *myricae* SUPP166. Three microliters of each sample were electrophoresed in 2% agarose gel at 50 V



**Fig. 3-4-4** DNA fragment bands after rep-PCR using BOX primer and DNA from BSRA isolates and reference strains of *Pseudomonas* species and pathovars. Lanes M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus); 1, AZK-11; 2, AZB-21; 3, 09Psa251; 4, 09Psa258; 5, 09Psa263; 6, 09Psa273; 7, 09Psa275; 8, 09Psa279; 9, 09Psa289; 10, 09Psa351; 11, 09Psa355; 12, 09Psa361; 13, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* SUPP211; 14, *P. savastanoi* pv. *glycinea* CHUK; 15, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP1139; 16, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP191; 17, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* PP8172; 18, *P. syringae* pv. *morsprunorum* SUPP408; 19, *P. syringae* pv. *tabaci* SUPP278; 20, *P. syringae* pv. *myricae* SUPP166. One microliters of each sample were electrophoresed in 2% agarose gel at 50 V



**Fig. 3-4-5** DNA fragment bands after rep-PCR using REP primers and DNA from BSRA isolates and reference strains of *Pseudomonas* species and pathovars. Lanes M, Hi-Lo DNA Marker (Bionexus); 1, AZK-11; 2, AZB-21; 3, 09Psa251; 4, 09Psa258; 5, 09Psa263; 6, 09Psa273; 7, 09Psa275; 8, 09Psa279; 9, 09Psa289; 10, 09Psa351; 11, 09Psa355; 12, 09Psa361; 13, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* SUPP211; 14, *P. savastanoi* pv. *glycinea* CHUK; 15, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP1139; 16, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP191; 17, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* PP8172; 18, *P. syringae* pv. *morsprunorum* SUPP408; 19, *P. syringae* pv. *tabaci* SUPP278; 20, *P. syringae* pv. *myricae* SUPP166. Seven microliters of each sample were electrophoresed in 1.5% agarose gel at 50 V

## 5. 16S rDNA の塩基配列解析

### 1) 方法

BSRA 分離細菌全 12 菌株 (Table 3-1) および *P. syringae* pv. *syringae* 1-1 菌株の 16S rDNA の増幅と PCR 産物の精製は, Takahashi et al. (2013) の手順に従って行った. 使用した PCR プライマーの塩基配列は Table A1 に示した. 精製した増幅産物のダイレクトシーケンスを AZK-11 菌株, 09Psa273 菌株および *P. syringae* pv. *syringae* 1-1 菌株は株式会社ベックス (東京) に, その他の菌株は北海道システムサイエンス株式会社 (札幌市) に委託した. 得られた塩基配列は, 遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX ver. 10 (株式会社ゼネテックス, 東京) を用いて, ハンドアライメントを行った. 塩基配列のデータは DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録し, アクセス番号を得た (Table 3-4-6). BSRA 分離細菌と近縁の *P. syringae* 群細菌との類縁関係を明らかにするため, AZK-11 菌株, 09Psa273 菌株および *P. syringae* pv. *syringae* 1-1 菌株の 16S rDNA の塩基配列を系統解析に供試した. また, 近縁の *P. syringae* 群細菌 28 菌株について 16S rDNA の塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースより取得し, 解析ソフトウェア MEGA X (Kumar et al. 2018) を用い, 系統解析を行った. *P. viridiflava* CFBP2107<sup>T</sup> (= ICMP2848<sup>T</sup>) 菌株の塩基配列を外群とし, Jukes-Cantor モデルで近隣接合法により系統樹を作成した.

### 2) 結果

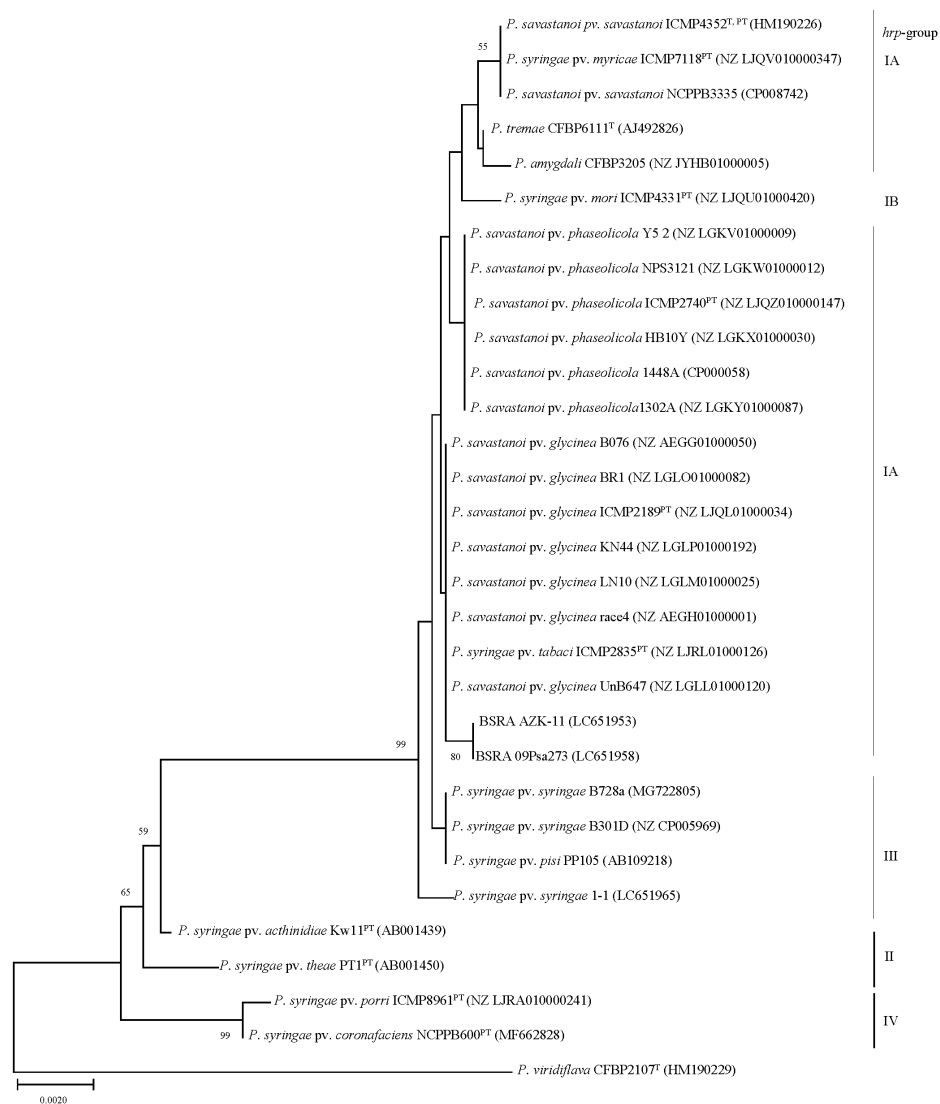
BSRA 分離細菌全 12 菌株の 16S rDNA の塩基配列 (1336 bp) は完全に一致した. AZK-11 菌株および 09Psa273 菌株と解析に供試した

*P. syringae* 群細菌の *hrp* group IA 細菌の 16S rDNA の配列 (1371 bp) との相同性は 99.6–99.9%であった。16S rDNA の塩基配列に基づく系統樹において、BSRA 分離細菌は、*P. syringae* 群細菌と同一のクラスターを形成した (Fig. 3-4-6)。

**Table 3-4-6** Accession numbers of 16S rDNA

Taxon	Strains	Accession Nos.
BSRA isolates	AZK-11	LC651953
BSRA isolates	AZB-21	LC651954
BSRA isolates	09Psa251	LC651955
BSRA isolates	09Psa258	LC651956
BSRA isolates	09Psa263	LC651957
BSRA isolates	09Psa273	LC651958
BSRA isolates	09Psa275	LC651959
BSRA isolates	09Psa279	LC651960
BSRA isolates	09Psa289	LC651961
BSRA isolates	09Psa351	LC651962
BSRA isolates	09Psa355	LC651963
BSRA isolates	09Psa361	LC651964
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1-1	LC651965





**Fig. 3-4-6** Neighbor-joining tree constructed using the Jukes–Cantor model based on 16S rDNA sequences (1371 bp) from the present isolates and related bacterial species and pathovars. T, type strain of the species; PT, pathotype strain of the pathovars. Accession numbers for the sequences from the DDBJ, EMBL, and GenBank databases are in parentheses. The vertical lines and roman numerals on the right in the figure indicate *hrp* groups of *Pseudomonas syringae* group bacteria. Numbers at nodes are bootstrap values ( $\geq 50\%$ ) expressed as percentages of 1000 replicates. Bar: 0.02 substitutions per nucleotide position

## 6. ハウスキーピング遺伝子による多遺伝子配列解析

### 1) 方法

解析材料は BSRA 分離細菌 AZK-11 菌株および 09Psa273 菌株とした。ハウスキーピング遺伝子 *gap1*, *gltA*, *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の増幅は, それぞれ Tsuji and Takikawa (2018) , Sarkar and Guttman (2004), Yamamoto et al. (1999) および Maeda et al. (2006) の記載の手順に従って行った。使用した PCR プライマーの詳細は Table A1 に示した。増幅産物の精製とクローニングは Tsuji et al. (2017) の記載の方法に従って行った。*gap1*, *gltA*, *gyrB* および *rpoD* 断片を含むプラスミドの抽出は Ausubel et al. (1987) の方法に準じて行い, シーケンスを株式会社ベックス (東京) に委託した。塩基配列のデータは DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した。取得したアクセッション番号は Table 3-4-7 に示した。近縁の *P. syringae* 群細菌との類縁関係を明らかにするため, 28 菌株について *gap1*, *gltA*, *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースより取得した。取得した塩基配列のアクセッション番号は Table 3-4-7 に示した。各ハウスキーピング遺伝子の系統解析は, 前項の 16S rDNA の解析と同様に実施し, *P. viridiflava* ICMP2848<sup>T</sup> 菌株の塩基配列を外群とし, 系統樹を作成した。さらに, 各菌株の *gap1*, *gltA*, *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列を結合して, 多遺伝子座配列解析 (Multilocus sequence analysis: MLSA) に供試し, 同様に系統樹を作成した。

### 2) 結果

BSRA 分離細菌 AZK-11 菌株と 09Psa273 菌株の *gap1* (860 bp) お

よび *gltA* 遺伝子 (573 bp) の塩基配列は完全に一致したが, *gyrB* 遺伝子 (910 bp) は 3 bp, *rpoD* 遺伝子 (804 bp) は 1 bp 異なった. BSRA 分離細菌とこれら 4 つのハウスキーピング遺伝子の相同性が最も高かった *P. syringae* 群細菌は, *P. savastanoi* pv. *glycinea* の 7 菌株 (ICMP2198<sup>T</sup> 菌株, B076 菌株, BR1 菌株, KN44 菌株, LN10 菌株, race4 菌株および UnB647 菌株) であった. *P. savastanoi* pv. *glycinea* 7 菌株間の 4 つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列は完全に一致した. BSRA 分離細菌と *P. savastanoi* pv. *glycinea* の *gapI* 遺伝子 (860 bp) および *gltA* 遺伝子 (573 bp) の塩基配列は完全に一致したが, *gyrB* 遺伝子では *P. savastanoi* pv. *glycinea* と AZK-11 菌株が 1 bp, 09Psa273 菌株が 2 bp 異なった. *rpoD* 遺伝子では AZK-11 菌株と *P. savastanoi* pv. *glycinea* は完全に一致したが, 09Psa273 菌株とは 1 bp 異なった. *gapI* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列に基づいた系統樹において, 両 BSRA 分離細菌はいずれも *P. savastanoi* pv. *glycinea* と同一のクラスターを形成した (Fig. 3-4-7, Fig. 3-4-10). *gltA* 遺伝子の塩基配列に基づいた系統樹において, 両 BSRA 分離細菌は他の *hrp* group IA に所属する *P. syringae* 群細菌と同一のクラスターを形成した (Fig. 3-4-8). *gyrB* 遺伝子の塩基配列に基づいた系統樹において, 両 BSRA 分離細菌は *P. savastanoi* pv. *glycinea* および *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* とともに独立のクラスターを形成した (Fig. 3-4-9). 一方, 4 つのハウスキーピング遺伝子を結合した塩基配列 (3147 bp) に基づく系統樹において, 両 BSRA 分離細菌は *P. savastanoi* pv. *glycinea* とともに独立したクラスターを形成した (Fig. 3-4-11).

**Table 3-4-7** DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers for housekeeping gene sequences used in this study

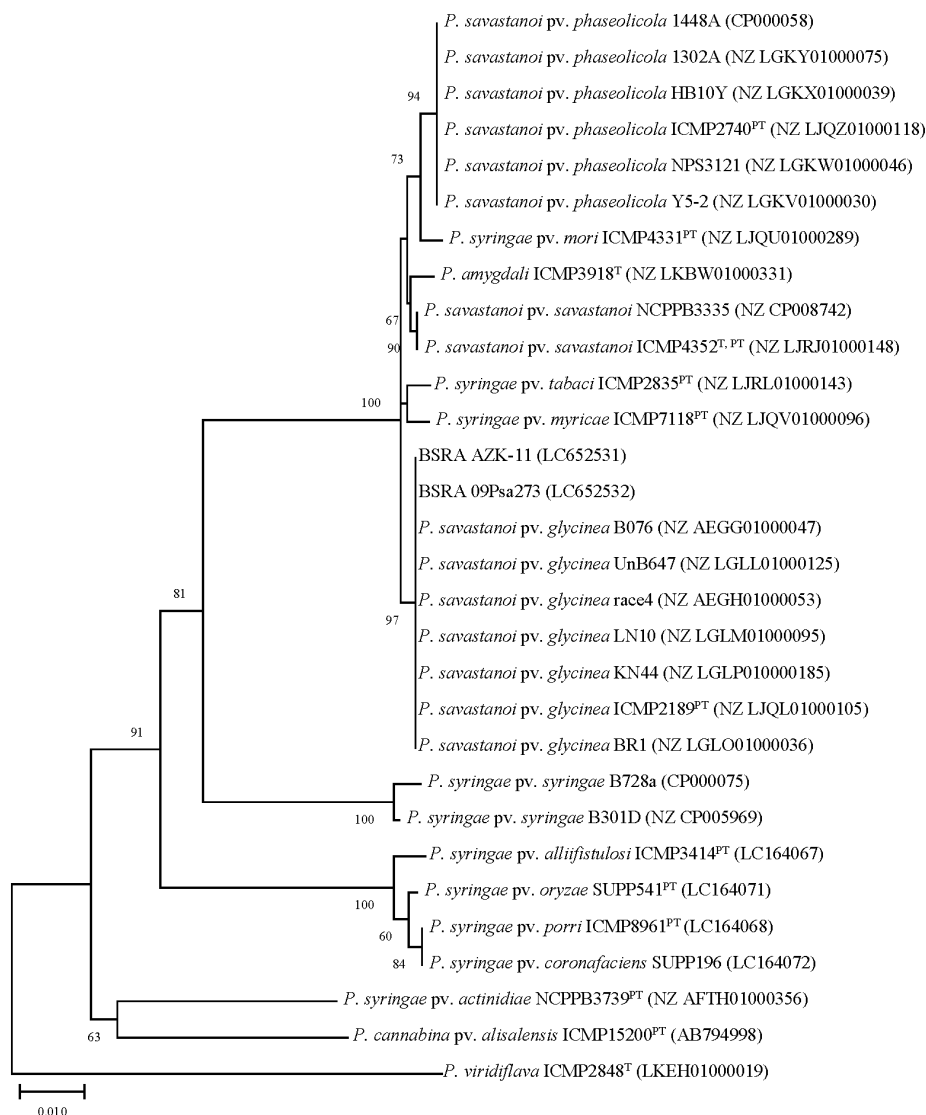
Taxon	Strain <sup>a</sup>	<i>gap1</i>	<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
BSRA isolate	AZK-11	LC652531	LC662832	LC652527	LC652529
BSRA isolate	09Psa273	LC652532	LC662833	LC652528	LC652530
<i>P. amygdali</i>	ICMP3918 <sup>T</sup>	NZ_LKBW01000331	NZ_LKBW01000235	NZ_LKBW01000287	NZ_LKBW01000268
<i>P. cannabina</i> pv. <i>alisalensis</i>	ICMP15200 <sup>PT</sup>	AB794998	AB795004	AB781098	AB795009
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	B076	NZ_AEGG01000047	NZ_AEGG01000028	NZ_AEGG01000055	NZ_AEGG01000014
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	BR1	NZ_LGLO01000036	NZ_LGLO01000094	NZ_LGLO01000035	NZ_LGLO01000054
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	ICMP2189 <sup>PT</sup>	NZ_LJQL01000105	NZ_LJQL01000223	NZ_LJQL01000215	NZ_LJQL01000285
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	KN44	NA_LGLP01000185	NA_LGLP01000157	NA_LGLP01000063	NA_LGLP01000093
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	LN10	NZ_LGLM01000095	NZ_LGLM01000002	NZ_LGLM01000103	NZ_LGLM01000073
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	race4	NZ_AEGH01000053	NZ_AEGH01000062	NZ_AEGH01000036	NZ_AEGH01000001
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	Unb647	NZ_LGLL01000125	NZ_LGLL01000121	NZ_LGLL01000143	NZ_LGLL01000007
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	1302A	NZ_LGKY01000075	NZ_LGKY01000094	NZ_LGKY01000085	NZ_LGKY01000065
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	1448A	CP000058 <sup>b</sup>	CP000058	CP000058	CP000058
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	HB10Y	NZ_LGKX01000039	NZ_LGKX01000017	NZ_LGKX01000031	NZ_LGKX01000009
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	ICMP2740 <sup>PT</sup>	NZ_LJQZ01000118	NZ_LJQZ01000122	NZ_LJQZ01000044	NZ_LJQZ01000287
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	NPS3121	NZ_LGKW01000046	NZ_LGKW01000028	NZ_LGKW01000029	NZ_LGKW01000053
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Y5-2	NZ_LGKV01000030	NZ_LGKV01000009	NZ_LGKV01000005	NZ_LGKV01000042
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	ICMP4352 <sup>T,PT</sup>	NZ_LJRJ01000148	NZ_LJRJ01000043	NZ_LJRJ01000054	NZ_LJRJ01000196
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	NCPPB3335	NZ_CP0008742 <sup>b</sup>	NZ_CP0008742	NZ_CP0008742	NZ_CP0008742
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	NCPPB3739 <sup>PT</sup>	NZ_AFTH01000356	NZ_AFTH01000103	NZ_AFTH01000501	NZ_AFTH01000502
<i>P. syringae</i> pv. <i>allii-fistulosi</i>	ICMP3414 <sup>PT</sup>	LC164067	LC164055	LC164030	LC164043
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	SUPP196	LC164072	LC164060	LC164036	LC164048
<i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i>	ICMP4331 <sup>PT</sup>	NZ_LJQU01000289	NZ_LJQU01000360	NZ_LJQU01000231	NZ_LJQU01000049
<i>P. syringae</i> pv. <i>myricae</i>	ICMP7118 <sup>PT</sup>	NZ_LJQV01000096	NZ_LJQV01000359	NZ_LJQV01000142	NZ_LJQV01000225
<i>P. syringae</i> pv. <i>oryzae</i>	SUPP541 <sup>PT</sup>	LC164071	LC164059	LC164035	LC164047
<i>P. syringae</i> pv. <i>porri</i>	ICMP89611 <sup>PT</sup>	LC164068	LC164056	LC164032	LC164044
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B301D	NZ_CP005959 <sup>b</sup>	NZ_CP005959	NZ_CP005959	NZ_CP005959
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B728a	CP000075 <sup>b</sup>	CP000075	CP000075	CP000075
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	ICMP28351 <sup>PT</sup>	NZ_LJRL01000143	NZ_LJRL01000146	NZ_LJRL01000006	NZ_LJRL01000004
<i>P. viridiflava</i>	ICMP2848 <sup>T</sup>	NZ_LKEH01000019	NZ_LKEH01000015	NZ_LKEH01000023	NZ_LKEH01000048

The *gap1*, *gltA*, *gyrB*, and *rpoD* gene sequences from BSRA strains AZK-11 and 09Psa273 were sequenced in this study and deposited.

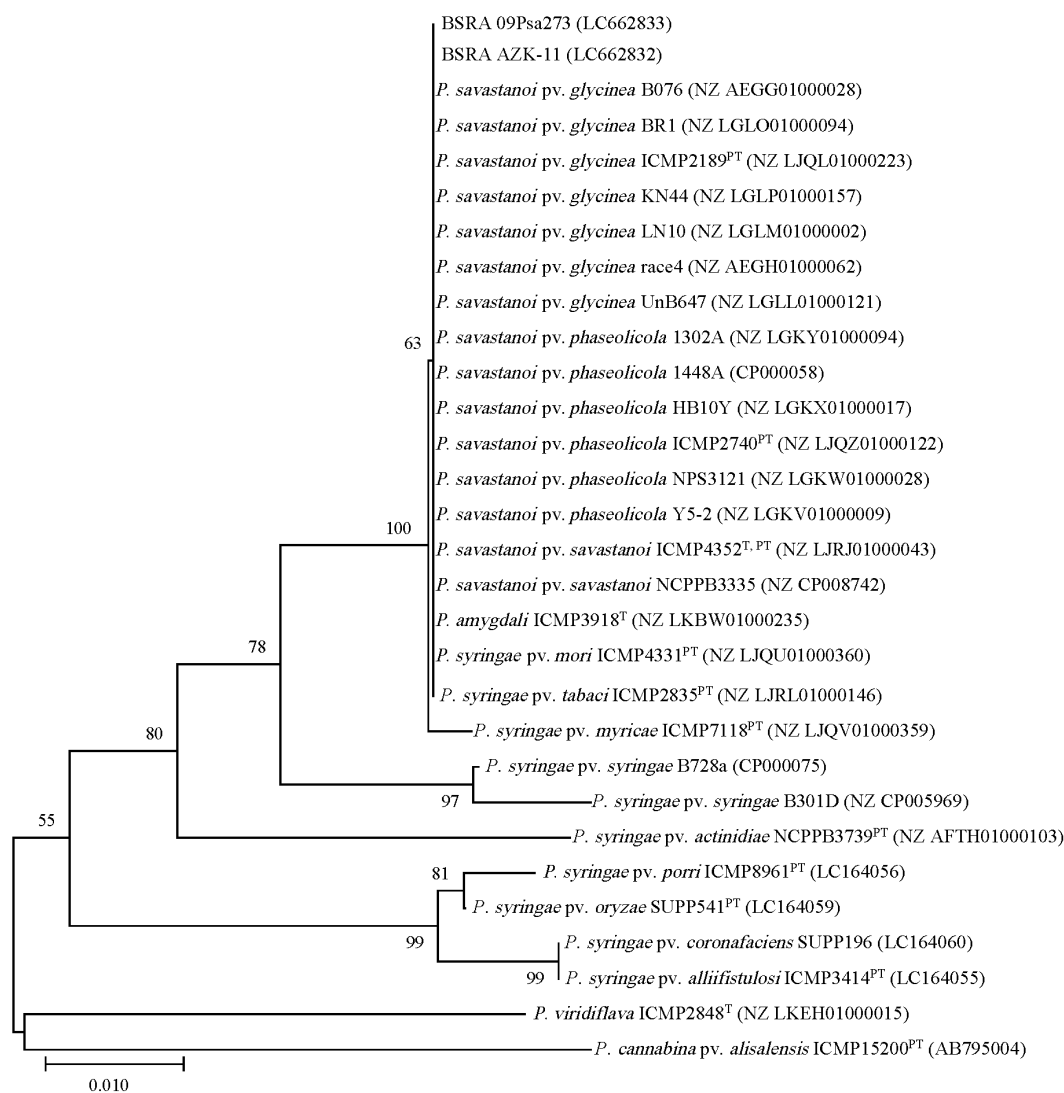
Other housekeeping genes sequences were obtained from DDBJ/EMBL/GenBank databases.

<sup>a</sup> T, Type strain of the species; PT, Pathotype strain of the pathovar

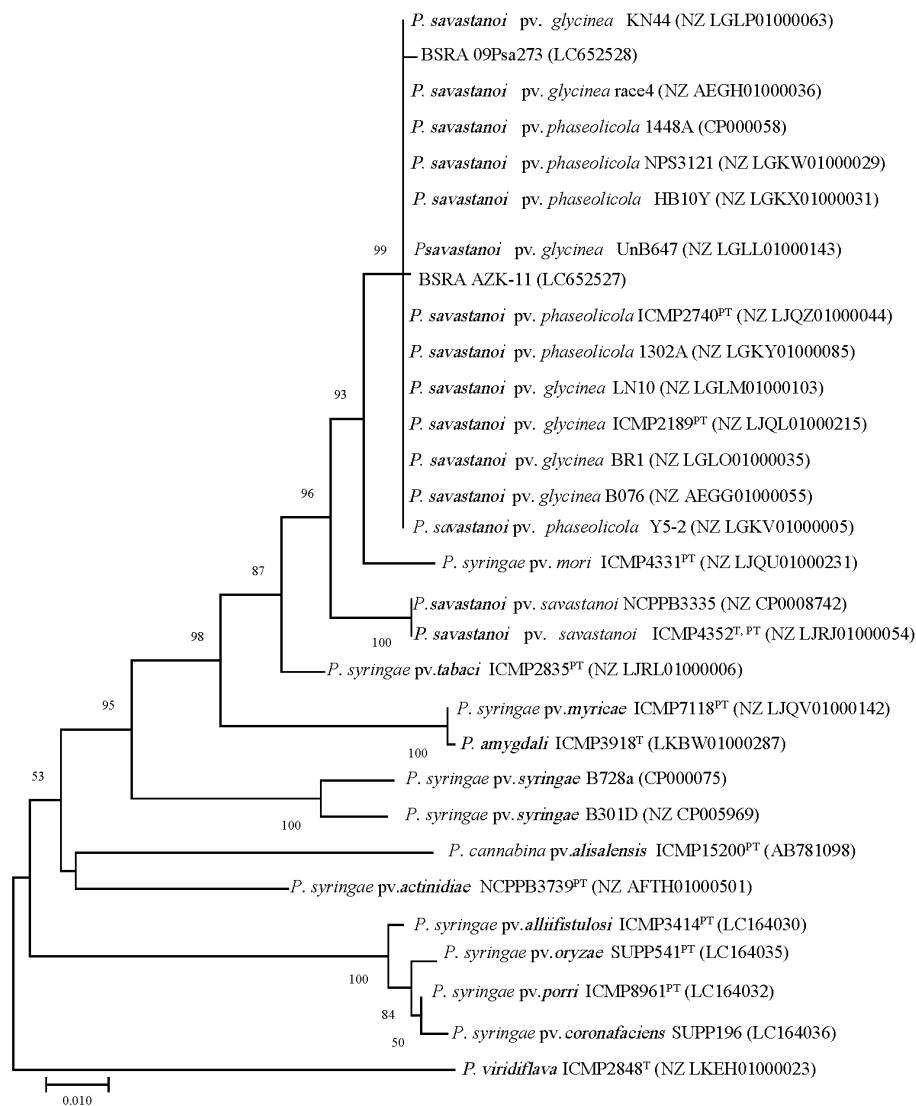
<sup>b</sup> Complete genome sequence



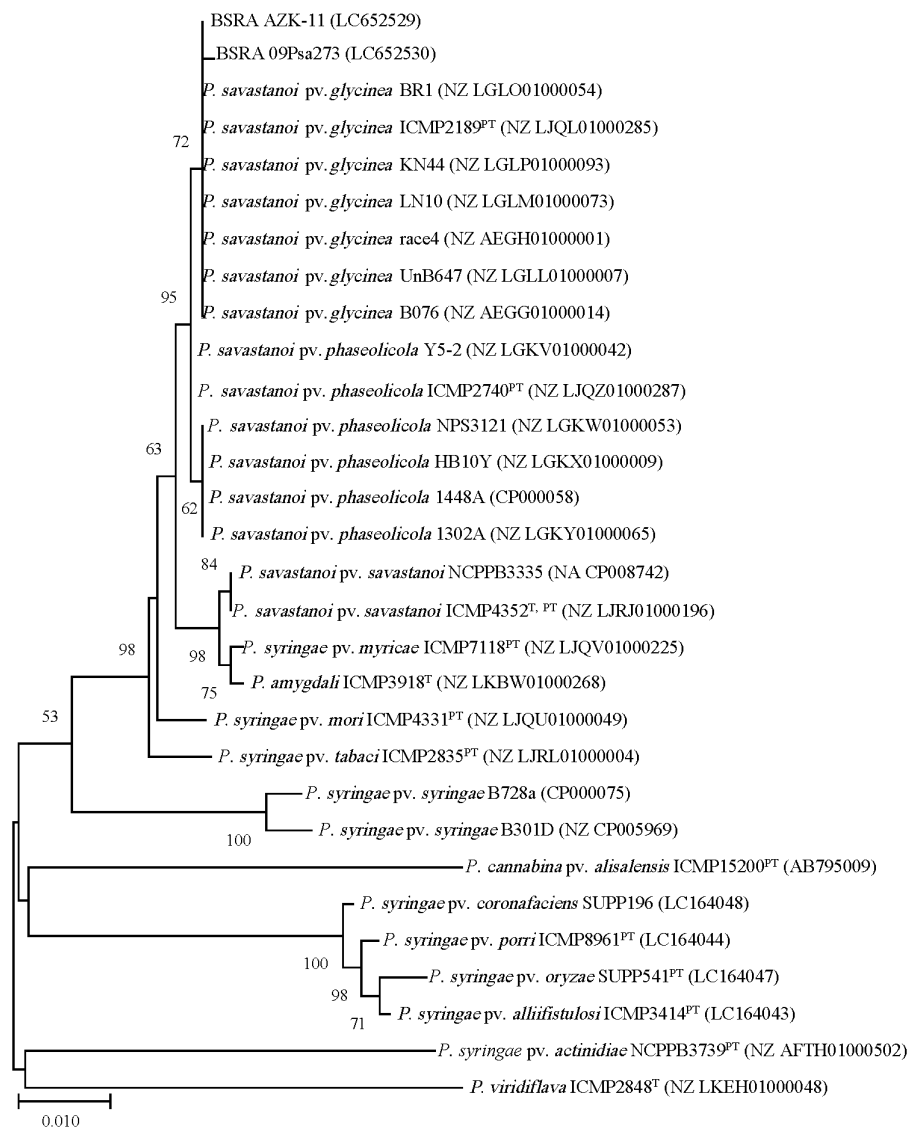
**Fig. 3-4-7** Neighbor-joining tree constructed using the Jukes–Cantor model based on *gapI* sequences (860 bp) from the present isolates and related bacterial species and pathovars. T, type strain of the species; PT, pathotype strain of the pathovars. Accession numbers of the sequences from the DDBJ, EMBL, and GenBank databases are in parentheses. Numbers at nodes are bootstrap values ( $\geq 50\%$ ) expressed as percentages of 1000 replicates. Bar: 0.01 substitutions per nucleotide position



**Fig. 3-4-8** Neighbor-joining tree constructed using the Jukes–Cantor model based on *gltA* sequences (573 bp) from the present isolates and related bacterial species and pathovars. T, type strain of the species; PT, pathotype strain of the pathovars. Accession numbers of the sequences from the DDBJ, EMBL, and GenBank databases are in parentheses. Numbers at nodes are bootstrap values ( $\geq 50\%$ ) expressed as percentages of 1000 replicates. Bar: 0.01 substitutions per nucleotide position

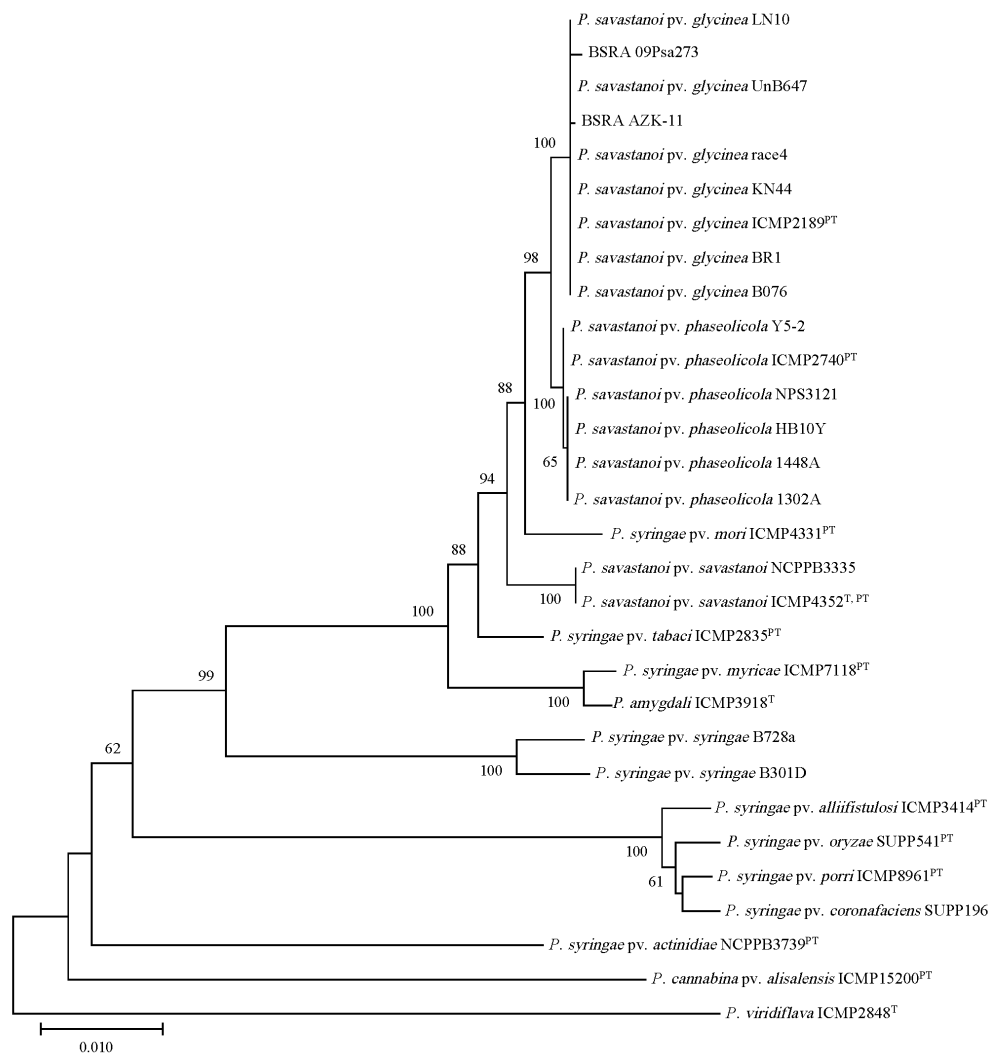


**Fig. 3-4-9** Neighbor-joining tree constructed using the Jukes–Cantor model based on *gyrB* sequences (910 bp) from the present isolates and related bacterial species and pathovars. T, type strain of the species; PT, pathotype strain of the pathovars. Accession numbers of the sequences from the DDBJ, EMBL, and GenBank databases are in parentheses. Numbers at nodes are bootstrap values ( $\geq 50\%$ ) expressed as percentages of 1000 replicates. Bar: 0.01 substitutions per nucleotide position



**Fig. 3-4-10** Neighbor-joining tree constructed using the Jukes–Cantor model based on *rpoD* sequences (804 bp) from the present isolates and related bacterial species and pathovars. T, type strain of the species; PT, pathotype strain of the pathovars. Accession numbers of the sequences from the DDBJ, EMBL, and GenBank databases are in parentheses. Numbers at nodes are bootstrap values ( $\geq 50\%$ ) expressed as percentages of 1000 replicates. Bar: 0.01 substitutions per nucleotide position





**Fig. 3-4-11** Neighbor-joining tree constructed using the Jukes–Cantor model based on concatenated sequences of the *gapI*, *gltA*, *gyrB*, and *rpoD* (3147 bp) from the representative BSRA isolates and related bacterial species and pathovars. T, type strain of the species; PT, pathotype strain of the pathovars. Accession numbers of the sequences from the DDBJ, EMBL, and GenBank databases are in parentheses. Numbers at nodes are bootstrap values ( $\geq 50\%$ ) expressed as percentages of 1000 replicates. Bar: 0.01 substitutions per nucleotide position

## 7. 遺伝的形質に関する考察

細菌種の定義は、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによって‘全染色体 DNA の定量的な DNA-DNA 類縁度が 70%以上あり，かつハイブリッドの熱安定度が 5 °C 以内に収まる菌株の集まり’とされている (Wayne et al. 1987). Gardan et al. (1999) は、*P. syringae* 群細菌を DNA の類縁性に基づいて 9 つの *genomospecies* に分類し，うち 2 つの *genomospecies* を *P. tremae* および *P. cannabina* として新種に再分類した．一方，DNA-DNA ハイブリダイゼーションは，再現性や作業性に欠点があり，また，種分類自体が実用本位であるべきであるため，国際原核生物系統分類学委員会 (International Committee on Systematics of Prokaryotes: ICSP) の特別委員会は，DNA-DNA ハイブリダイゼーションを種分類の標準的な手法としつつも，系統分類学を利用可能な手法の発達を鑑みて，新しい手法への移行を奨めている (Stackebrandt et al. 2002). ICSP の特別委員会は DNA-DNA ハイブリダイゼーションを補完する手法として，16S rDNA 塩基配列解析およびハウスキーピング遺伝子などの塩基配列の解読，rep-PCR などによる DNA プロファイリング，DNA アレイを推奨している一方で，細菌の表現性状の記載も重要であると指摘している (Stackebrandt et al. 2002). 本節では BSRA 分離細菌の分類学的位置を決定するため，様々な観点から BSRA 分離細菌の遺伝的形質を検討した．

Inoue and Takikawa (2006) は，35 の *P. syringae* 群細菌を *hrpZ* 遺伝子の塩基配列に基づいて，5 つの *hrp group* に分類し (Group IA および IB, II, III, IV)，それぞれのグループに特異的な PCR プライマーを設計した．これらのグループは Gardan et al. (1999) が提唱した

*P. syringae* 群細菌の genomospecies に概ね対応している (Inoue and Takikawa 2006).

BSRA 分離細菌を *hrp* group 特異的プライマーを用いた PCR に供試したところ、BSRA 分離細菌全 12 菌株が、*P. amygdali* および *P. savastanoi* pv. *glycinea* など Gardan et al. (1999) の genomospecies 2 に含まれる細菌と同様に *hrp* group IA に分類された。*hrp* group IA および IB は genomospecies 2 に相当する (Inoue and Takikawa 2006). したがって、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は Gardan et al. (1999) の genomospecies 2 に含まれることが推察される。一方、*P. syringae* pv. *syringae* 1-1 菌株は *hrp* group III であったことから、アズキにおける 2 つの病原、すなわち、アズキ茎腐細菌病およびアズキ褐斑細菌病の病原細菌はそれぞれ *hrp* group IA および *hrp* group III に属し、異なる *hrp* group に分類されることが明らかとなった。このことは、発生初期で病徴による識別が困難な場合に、両病害を簡易に識別するのに活用できる。

REP, ERIC および BOX 様塩基配列は細菌株ゲノム内に偏在し、その分布は細菌株のゲノム構造を反映しているとされ (Louws et al. 1994), rep-PCR により生成されたゲノムフィンガープリントにより、種および亜種、菌株レベルで識別が可能であることが知られている (Rademaker et al. 2004). *P. syringae* pv. *syringae* および *P. syringae* pv. *tomato* を比較した事例では、rep-PCR によるバンドパターンは病原型間で明確に異なったが、同時に病原型内でも多型が認められた (Louws et al. 1994).

ERIC1R/2, BOXA1R および REP1R-I/2-I プライマーを用いた rep-PCR による BSRA 分離細菌のバンドパターンは全く同一であること

から、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は遺伝的に均一であり、rep-PCRによるアズキ茎腐細菌病の病原細菌の簡易同定の可能性が示唆された。また、*hrp* group IA の比較菌株間で多型が生じ、いずれも BSRA 分離細菌のバンドパターンと異なったことから、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は *P. syringae* 群細菌の *hrp* group IA 内で遺伝的に独立の集団であると考えられた。しかし、Marques et al. (2008) の報告では、*P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 41 菌株を含む *P. syringae* 群細菌に対して行った BOX-PCR によって得られたバンドパターンは、*P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 内で多型が生じていたため、本研究においても、既知の *hrp* group IA 内細菌集団内の変異を検出していたという可能性は否定できない。rep-PCR による簡易同定の可能性も含めて、分離地の異なる保存菌株を幅広く用いて解析する必要がある。

細菌の分類は分子進化学的な立場に立って分類する系統分類方法が必要であり (大楠・江崎 2009)、系統分類の指標として用いられる最も重要な情報は、16S rDNA の塩基配列情報である (瀧川 2006)。大楠・江崎 (2009) によると、16S rDNA は細菌および高等生物細胞に共通して存在し、生物全体の進化距離を比較するのに適しており、進化速度が比較的遅いため、系統解析により、未知の菌株がどの菌種と類縁関係にあるか推定が可能である。また、16S rDNA のほぼ全塩基配列を決定し、類似度が 98.7%以上の菌種がない場合は新しい菌種の可能性が高いと言われている (大楠・江崎 2009)。

BSRA 分離細菌の 16S rDNA の塩基配列と他の *hrp* group IA の菌株との相同性は 99.6–99.9%であり、また、系統解析からも *P. syringae* 群細菌に分類されることまでは明らかとなったが、16S rDNA の塩基配列のみでは、既知の *P. syringae* 群細菌の他の分類群との識別は

できなかつた．Young (2010) は，16S rDNA は保存性が非常に高いため，16S rDNA の相同性に基づいて分類された *P. amygdali*, *P. avellanae*, *P. caricapapayae*, *P. cichorii*, *P. ficuserectae*, *P. meliae*, *P. savastanoi*, *P. syringae* および *P. viridiflava* から構成される ‘*Pseudomonas syringae* group’ (Anzai et al. 2000) 内の識別はできないとしている．アズキ茎腐細菌病の病原細菌と近縁の *P. syringae* 群細菌内の他の分類群間とを明確に区別する，あるいは，他の分類群との詳細な類縁関係を明らかにするためには，他の遺伝子領域に基づく解析が必要である．

16S rDNA の塩基配列で区別できない分類群の細菌については，複数のハウスキーピング遺伝子を用いた MLSA 法が推奨されている (Stackebrandt et al. 2002)．BSRA 分離細菌は，*gapI*, *gltA*, *gyrB* および *rpoD* の各ハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づく系統樹およびこれら 4 つのハウスキーピング遺伝子を用いた MLSA 法による系統樹において，*P. savastanoi* pv. *glycinea* と同一の独立したクラスターを形成した．このことから，アズキ茎腐細菌病の病原細菌は *P. savastanoi* pv. *glycinea* と遺伝的に近縁であり，*P. savastanoi* pv. *glycinea* を除く既知の分類群とは遺伝的に独立していると推察される．一方，前節の結果から，BSRA 分離細菌と *P. savastanoi* pv. *glycinea* では，アズキおよびダイズに対する病原性が明確に異なる．さらに rep-PCR のフィンガープリントは BSRA 分離細菌と *P. savastanoi* pv. *glycinea* の菌株群で明らかに異なり，遺伝的にも差異があると考えられることから，アズキ茎腐細菌病の病原細菌と *P. savastanoi* pv. *glycinea* は系統的には近縁であるが，それぞれ独立した病原型とすることが妥当である．

## 第5節 細菌学的性質

### 1. 目的

アズキ茎腐細菌病の病原細菌の分類学的位置を決定するため、BSRA 分離細菌の形態および生理・生化学的性質を明らかにし、近縁と考えられる既知の病原細菌と比較する。

### 2. 形態

#### 1) 方法

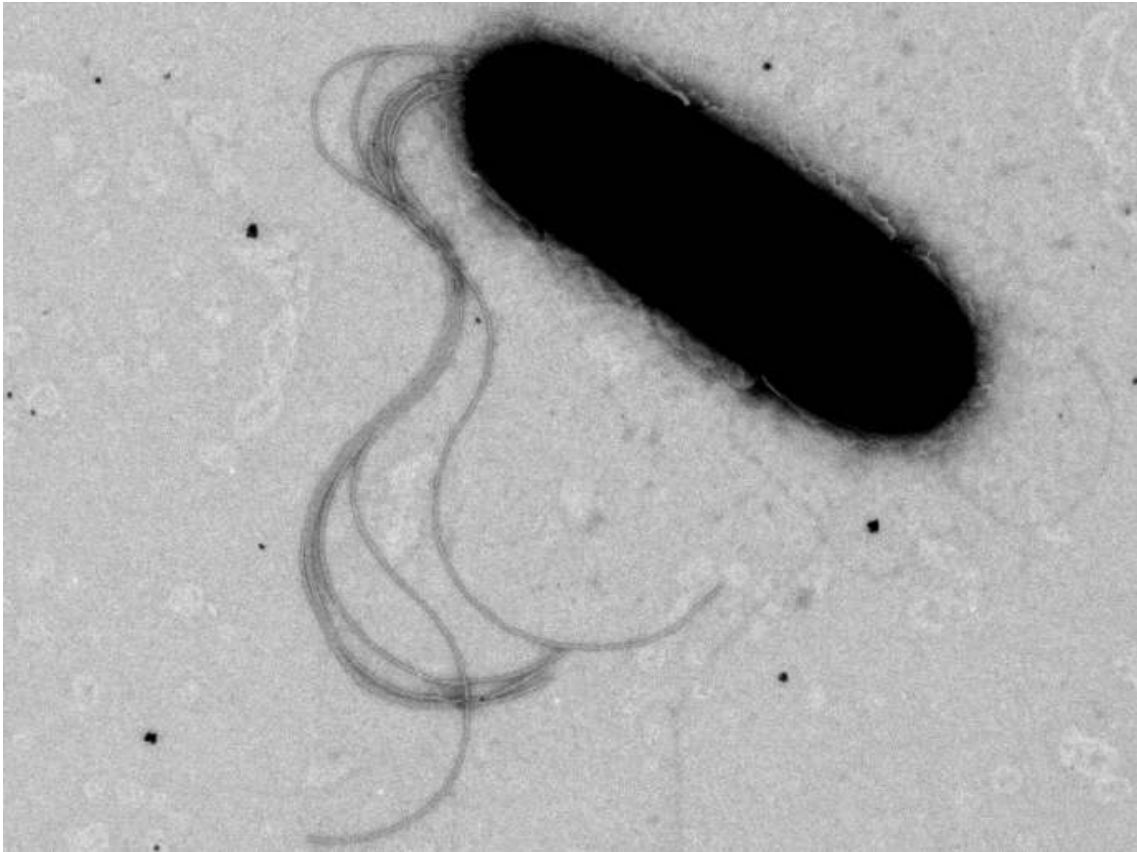
BSRA 分離細菌 AZK-11 菌株を供試した。

コロニー形態は供試菌株を YP 寒天培地上に画線し、27 °C で培養し、3 日後に観察した。透過型電子顕微鏡による観察は、培養菌体を 2%タングステンリン酸溶液で染色し、JEM-1011 EM837513 (日本電子、昭島市) を用いて行った。細胞の計測は、PPGA 上で 27 °C24 時間培養した菌体を 0.25%フェノサフラニン溶液 (フェノサフラニン 25 mg を 95%エタノール 1 ml で溶解し、蒸留水 9 ml で希釈) で染色し、光学顕微鏡下で行った。鞭毛の計数は、Tsuji and Takikawa (2018) の方法に従って行った。すなわち、PPGA 上で 27 °C24 時間培養した菌体を 1/2 濃度に調整した YP (1/2YP) 液体培地におよそ  $10^6$ - $10^7$  cfu/ml になるように懸濁し、10  $\mu$ l をカバーグラスに滴下された 1/2YP 液体培地 10  $\mu$ l に接するように滴下した。20 °C24 時間培養後、風乾し、熱固定したものを Ryu (1937) の溶液 I (5%フェノール水溶液, 10 ml; タンニン酸, 2 g; 飽和ミョウバン溶液, 10 ml) と溶液 II (12%クリスタルバイオレット-エタノール溶液) の 20 : 1 混合物により室温で 10-15 分染色した。2 分間蒸留水で洗い、光学顕

微鏡下で観察した。

## 2) 結果

BSRA 分離細菌 AZK-11 菌株は YP 寒天培地上で乳白色，円形，平滑からわずかに隆起した，直径 1-2 mm の全縁のコロニーを形成した。供試菌株の細胞は，芽胞がなく，直線状からわずかに曲がった桿状で，幅 0.4-1.0  $\mu\text{m}$  × 長さ 0.8-4.3  $\mu\text{m}$  (平均 0.6 × 2.0  $\mu\text{m}$ ) であった。透過型電子顕微鏡像を Fig. 3-5-1 に示した。数本の極鞭毛を有する桿菌の像が得られた。運動性のある 1-6 本の鞭毛が認められた。



**Fig. 3-5-1** Electron micrograph of BSRA isolate AZK-11



### 3. 生理・生化学的性質

#### 1) 方法

BSRA 分離細菌は全 12 菌株 (Table 3-1) および比較菌株は Table 3-2-2 に示した 18 菌株の合計 30 菌株を供試した。1%ペプトン水における生育温度は 30 °C および 33 °C, 34 °C, 35 °C で調査した。食塩耐性の試験は, 1%ペプトン水に NaCl を 0.1%, 0.3%, 0.5% および 1% の濃度とし, 増殖の有無を確認した。ペクチン酸ナトリウムの液化試験は Hildebrand (1971) の方法に従った。単一炭素源としての利用性について, 37 の炭水化物, 25 の有機酸および 22 のアミノ酸を各 0.1% 濃度含有する改変 Ayers et al. の培地 (Society of American Bacteriologists 1957) を用いて調査した。その他の生理・生化学的性質は, 後藤・瀧川 (1984a, 1984b, 1984c, 1984d), Takikawa et al. (1989) および Suzuki et al. (2003) に従って調査した。ゼラチン液化試験のみ 20 °C で行い, その他の試験は 25 °C で実施した。2, 4, 7, 14 および 21 日後に調査し, 目視できる生育が認められた場合のみ陽性とした。

#### 2) 結果

BSRA 分離細菌は, グラム陰性, 好氣的にグルコースを分解した。KB 培地上では, 白色半透明のコロニーを形成し, 水溶性黄色の蛍光性色素を少量産生した。LOPAT 試験において, レバン産生 (L) およびタバコ過敏反応 (T) が陽性, オキシダーゼ活性 (O), ジャガイモ塊茎腐敗能 (P) およびアルギニンジヒドラーゼ活性 (A) が陰性で, BSRA 分離細菌は蛍光色素産生性 *Pseudomonas* 植物病原細菌の LOPAT Ia 群 (Lelliott et al. 1966) に分類された。スクロースからの

還元物質の生成は陽性，グルコン酸の酸化および Tween 80 の加水分解（リパーゼ活性），硝酸塩の還元は陰性で，補助的性質による類別も LOPAT Ia 群であることを支持した．

BSRA 分離細菌の生育最高温度は 33–34 °C であった． NaCl 濃度 0.3%ですべての菌株に生育を認めた． 12 菌株中 8 菌株は 0.5%NaCl で生育したが， そのうち 4 菌株のみ 1%NaCl で生育した． ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸（PHB）顆粒は蓄積しなかった． パープルミルクにおいてアルカリを生成した． ジャガイモ塊茎切片によるコロナチン活性は認められなかった． カタラーゼ活性およびウレアーゼ活性が陽性． 以下の性質は陰性であった； エスクリン， アルブチンおよびデンプンの加水分解； チロシナーゼ活性； レシチナーゼ活性； ペクチン酸リアーゼ活性； フェニルアラニンデアミナーゼ活性； pH 5, pH 7 および pH8.5 におけるペクチン分解能； ゼラチン液化能； 硝酸呼吸（脱窒反応）； インドール， 3-ケト-ラクトースおよび硫化水素の産生； カゼインの消化能； 生長素要求性． 単一炭素源の利用性で陽性であったのは， D-グルコース， D-フルクトース， D-ガラクトース， D-マンノース， L-アラビノース， D-キシロース， D-リボース， スクロース， D-ラフィノース， グリセロール， D-アラビトール， D-マンニトール， 酢酸塩， クエン酸塩， フマル酸塩， グルコン酸塩， L-リンゴ酸塩， キナ酸， コハク酸塩， トリアセチン， L-アスパラギン， L-アスパラギン酸， L-グルタミン酸， L-グルタミンおよびトリゴネリンであった． *myo*-イノシトールは 12 菌株中 11 菌株が陽性であった． キシランおよびマロン酸塩， D-サッカリン酸塩は弱い陽性であった． ポリガラクトツロン酸塩では少量の生育を認めたが， 培地色は青変しなかった． 利用性が陰性であったのは， D-アラビノースおよび L-ラム

ノース, L-ソルボース, D-セロビオース, ラクトース, マルトース, メリビオース, D-トレハロース, D-メレジトース, エタノール, エチレングリコール, *meso*-エリトリトール, アドニトール, L-アラビトール, ズルチトール, D-ソルビトール, デキストラン, アルギン酸塩, グリコーゲン, デンプン,  $\alpha$ -メチル-D-グリコシド, サリシン, *n*-酪酸塩, カプリン酸, ギ酸塩, グルタル酸塩, グリセリン酸塩, グリコール酸塩, 馬尿酸塩, DL-乳酸塩, マレイン酸塩, メサコン酸, プロピオン酸塩, セバシン酸, D-酒石酸, L-酒石酸, *meso*-酒石酸, DL- $\alpha$ -アラニン,  $\beta$ -アラニン, L-アルギニン, DL-ホモセリン, DL-フェニルアラニン, グリシン, L-ヒスチジン, L-イソロイシン, L-ロイシン, L-リジン, L-オルニチン, サルコシン, L-セリン, L-チロシン, L-トリプトファン, L-バリン, ベタインであった.

BSRA 分離細菌の主要な細菌学的性質, および, *hrp* group IA に分類された他の比較菌株および現在は無効名である“*P. adzukicola*”の記載 (Tanii and Baba 1979) と異なる性質を Table 3-5-1 にまとめた.

**Table 3-5-1** Comparison of bacteriological characteristics among the examined BSRA isolates, “*Pseudomonas adzukicola*,” and *hrp* group IA strains of *P. syringae* bacteria

Characteristics	BSRA isolates (n=12)	Pad (n=15) <sup>a</sup>	Pa	Psag (n=2)	Psapb (n=2)	Psapk	Psas	Psymo	Psymy	Psyt	Pt
Fluorescent pigment production	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Levan production	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Oxidase activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potato soft rot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrase activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobacco hypersensitive reaction	+	+	nt	+	+	+	nt	+	+	+	nt
Esculin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Arbutin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Tween 80 hydrolysis	-	-	+	-	+	-	w+	-	+	+	+
Litmus milk	K	K	K	K	K	K	K	K	K	KD	K
Tyrosinase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Utilization of											
<i>myo</i> -Inositol	+(11/12)	nt	+	+	-	-	+	-	+	+	w+
D-Mannitol	+	+	w+	+	-	+	+	+	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
D-Trehalose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tartaric acid	-	+	w <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	+	-	w <sup>b</sup>
L-Tartaric acid	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>meso</i> -Tartaric acid	-	nt	-	-	-	-	-	w+	+	+	-
DL- $\alpha$ -Alanine	-	nt	-	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Alanine	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L-Histidine	-	nt	-	+	-	-	-	+	+	w+	-
L-Serine	-	nt	-	-	+	+	+	-	+	+	-

+: Positive; w+: weakly positive, weak reaction or later reaction than positive strain; -: negative; nt: not tested; D: digestion; K: alkalization

<sup>a</sup> Results from Tanii and Baba (1979)

<sup>b</sup> Growth but no color change to blue in media

Results did not vary among the examined BSRA isolates except for *myo*-inositol utilization, for which 09Psa351 was negative.

Reference strains: Pad, “*P. adzukicola*” (now invalid); Pa, *P. amygdali* ICMP3918<sup>T</sup>; Psag, *P. savastanoi* pv. *glycinea* CHUK and SUPP211; Psapb,

*P. savastanoi* pv. *phaseolicola* PP8172 and SUPP1139 (isolated from kidney bean); Psapk, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* SUPP191 (kudzu); Psas, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ICMP4352<sup>T, PT</sup>; Psymo, *P. syringae* pv. *morsprunorum* SUPP408; Psymy, *P. syringae* pv. *myricae* SUPP166; Psyt, *P. syringae* pv. *tabaci* SUPP278; Pt, *P. tremae* SUPP449<sup>T</sup>; T, type strain of the species; PT, pathotype strain of the pathovar

#### 4. 細菌学的性質に関する考察

BSRA 分離細菌は、グラム陰性かつ好気性である。AZK-11 菌株の形態的特徴から、極鞭毛を有する桿菌で、白色のコロニーを形成することから、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は *Pseudomonas* 属細菌である。さらに、BSRA 分離細菌は、KB 培地で蛍光性色素を少量産生し、LOPAT 試験 (Lelliott et al. 1966) の結果から、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は *P. syringae* 群細菌であることも示された。

BSRA 分離細菌とともに *P. syringae* 群細菌の *hrp* group IA に分類された比較菌株と細菌学的性質を比較すると、*P. amygdali*, *P. syringae* pv. *morsprunorum* および *P. tremae* とは、KB 培地における蛍光色素産生性で異なり、*P. savastanoi* pv. *savastanoi* とはレバン産生能で異なった。*P. syringae* pv. *myricae* および *P. syringae* pv. *tabaci* は Tween 80 の加水分解が陽性で、D-ソルビトールおよび L-酒石酸、*meso*-酒石酸をはじめとして多くの有機物を炭素源として利用する点で BSRA 分離細菌と明らかに異なる。*P. savastanoi* pv. *phaseolicola* は DL- $\alpha$ -アラニンおよび L-セリンを利用するが、*myo*-イノシトールを利用しない。*P. savastanoi* pv. *glycinea* は BSRA 分離細菌と細菌学的性質における共通点が最も多かったが、DL- $\alpha$ -アラニンと L-ヒスチジンの利用性が異なった。以上のことから、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は、*hrp* group Ia に分類される他の *P. syringae* 群細菌と細菌学的性質において識別可能である。

かつて、Tanii and Baba (1979) は、細菌学的性質、宿主範囲および血清学的性質から、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* および *P. syringae* pv. *syringae* と異なるとして、アズキ茎腐細菌病の病原細菌を “*P. adzukicola*” (現

在は無効名) と命名した. 本研究における BSRA 分離細菌の細菌学的性質は, Tanii and Baba (1979) による “*P. adzukicola*” の記載と比較して, 食塩耐性, および, D-トレハロースおよび  $\beta$ -アラニン, D-酒石酸の利用性を除いて一致した. Tanii and Baba (1979) によると “*P. adzukicola*” の食塩耐性は 0.2–0.5% と BSRA 分離細菌よりやや低いものの, BSRA 分離細菌の食塩耐性が低いことに変わりはない.

“*P. adzukicola*” の保存菌株が存在しないため, BSRA 分離細菌と直接比較することは困難であるが, 病徴や病原性を鑑みると, BSRA 分離細菌と “*P. adzukicola*” はアズキ茎腐細菌病の病原細菌として同一であると考えられる.

## 第 6 節 アズキ茎腐細菌病の病原細菌の同定，分類および命名

本章における一連の多面的な解析により，供試した BSRA 分離細菌は明確に他の *P. syringae* 群細菌と異なった．アズキ茎腐細菌病の病原細菌は，細菌学的性質および MLSA により *P. savastanoi* pv. *glycinea* と最も近縁であると考えられたが，病原性の差異，rep-PCR による遺伝的な差異，および，一部の炭素源の利用性の差異により，*P. syringae* 群細菌のなかで独立した分類群であることが明らかとなった．すなわち，アズキ茎腐細菌病の病原細菌は，*P. syringae* 群細菌の新たな病原型として認識されるべきであるという結論に至った．

Gardan et al. (1992) は，DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験の結果と細菌学的性質に基づいて，*P. syringae* subsp. *savastanoi* を *P. savastanoi* として種レベルへの格上げを提案した．その際に，*P. savastanoi* には *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* および *P. savastanoi* pv. *savastanoi* が含まれるとし，その主張は現在も広く受け入れられている．その後，Gardan et al. (1999) は，DNA-DNA ハイブリダイゼーションを用いたゲノム比較に基づいて *P. syringae* 群細菌を 9 つの genomospecies に分類し，そのうち genomospecies 2 に *P. savastanoi* を置き，*P. savastanoi* は *P. ficuserectae* および *P. meliae* とともに *P. amygdali* のシノニムであると報告した．また，*P. syringae* 群細菌のなかで，*P. savastanoi* の病原型が含まれる *hrp* group IA および *hrp* group IB の細菌は，genomospecies 2 に相当する (Inoue and Takikawa 2006)．*rpoD* 遺伝子の塩基配列による系統解析 (Parkinson et al. 2011) および比較ゲノム解析 (Gomila et al. 2017) においても，*P. amygdali*, *P. ficuserectae*,



*P. meliae* および *P. savastanoi* はともに genomospecies 2 に相当する、それぞれ、phylogroup 3 および phylogenomic branch VI のメンバーであることが確認されている。さらに、Gomila et al. (2017) も *P. ficuserectae*, *P. meliae* および *P. savastanoi* は *P. amygdali* より後のシノニムであることを認めている。*P. amygdali* が genomospecies 2 に含まれる細菌の最も古い正当性のある種名であるため、Harmon et al. (2018) は genomospecies 2 に含まれる細菌の正しい学名は *P. amygdali* であり、genomospecies 2 に含まれる細菌および新たな病原型の種名は *P. amygdali* とするべきであると述べた。

本研究の結果は、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は *P. amygdali* が含まれる *hrp* groups IA のメンバー、すなわち、Gardan et al. (1999) の genomospecies 2 のメンバーであり、それらのうち *P. savastanoi* pv. *glycinea* が最も近縁であることを示した。単純に考えれば、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は *P. savastanoi* の新たな病原型とするところではあるが、*P. savastanoi* が *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* および *P. savastanoi* pv. *savastanoi* で構成されること自体が不適當であると考えられる。その理由は以下のとおりである：① *P. syringae* pv. *myricae* や *P. syringae* pv. *cerasicola* など木本植物に癌腫やこぶを形成する多くの *P. syringae* 群細菌が *P. savastanoi* に含まれていない；②前述のように、多くの研究者が *P. savastanoi* は *P. amygdali* のシノニムであることを示唆しており (Gardan et al. 1999, Gomila et al. 2017, Harmon et al. 2018), これらの学名は本来統一されるべきである；③前述のとおり, *P. syringae* 群細菌の genomospecies 2 の最も古く正当性のある種名は *P. savastanoi* ではなく *P. amygdali* である。これらの理由から *P. savastanoi* の学名は不適切であり、現

在 *P. savastanoi* の病原型として認識されている *P. savastanoi* pv. *glycinea* および *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* も本来 *P. amygdali* に移すべきである。しかしながら、本研究の主題は、アズキ茎腐細菌病の病原細菌の分類学的な位置を正しく記載することであるので、ここでは *P. savastanoi* の学名の変更は提案しない。結論として、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は *P. amygdali* の新たな病原型として認識されるべきであり、ここに *Pseudomonas amygdali* (syn. *Pseudomonas savastanoi*) pv. *adzukicola* pv. nov. と命名することを提案し、タイプ標本として、AZK-11 (= SUPP2776, MAFF212478, ICMP24382) を指定する。記載は以下のとおりである。

**Description of *Pseudomonas amygdali* (syn. *Pseudomonas savastanoi*) pv. *adzukicola* pv. nov.**

*Pseudomonas amygdali* (syn. *Pseudomonas savastanoi*) pv. *adzukicola* pv. nov. (*adzukicola*, inhabiting adzuki bean [*Vigna angularis*]). Gram-negative aerobic bacteria. Cells are non-sporulating, straight to slightly curved rods, 0.4–1.0  $\mu\text{m}$  wide, 0.8–4.3  $\mu\text{m}$  long (average: 0.6  $\times$  2.0  $\mu\text{m}$ ), and motile, with 1–6 polar flagella. Colonies on yeast peptone agar plates are creamy-white in color, circular, with smooth surfaces, flat or slightly convex, and 1–2 mm in diameter, with an entire margin. Translucent white colonies form on King's medium B agar plates, and produce small amounts of fluorescent pigment. Strains are negative for oxidase activity, potato soft rot, and arginine dihydrolase activity, and positive for levan production and tobacco hypersensitive reaction. The maximum growth temperature is 33–34 °C. Polyhydroxybutyrate granules are not

accumulated. The strains metabolize glucose oxidatively and exhibit alkali production in purple milk. The strains exhibit positivity for the reduction of substances from sucrose; and catalase and urease activity; as well as negativity for gluconate oxidation; Tween 80, esculin, arbutin, and starch hydrolysis; nitrate reduction; lecithinase, pectate lyase, phenylalanine deaminase, and tyrosinase activity; pectolysis at pH 5, 7, and 8.5; gelatin liquefaction; nitrate respiration; indole, 3-keto-lactose and H<sub>2</sub>S production; casein decomposition; and growth factor requirement. Coronatine-like activity is not observed on potato slices. NaCl tolerance is low, with a maximum at 0.3–1.0% concentration in 1% peptone water. Strains exhibit positivity for the utilization of D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-mannose, L-arabinose, D-xylose, D-ribose, sucrose, D-raffinose, glycerol, D-arabitol, D-mannitol, acetate, citrate, fumarate, gluconate, L-malate, quinic acid, succinate, triacetin, L-asparagine, L-aspartate, L-glutamate, L-glutamine, and trigonelline. *Myo*-inositol utilization differs among strains. Xylan, malonate, and D-saccharate utilization are weakly positive. Little strains growth occurs on media containing poly-galacturonate, and with no color change. Strains exhibit negativity for the utilization of D-arabinose, L-rhamnose, L-sorbose, D-cellobiose, lactose, maltose, melibiose, D-trehalose, D-melezitose, ethanol, ethylene glycol, *meso*-erythritol, adonitol, L-arabitol, dulcitol, D-sorbitol, dextrin, alginate, glycogen, starch,  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, salicin, *n*-butyrate, capric acid, formate, glutarate, glycerate, glycolate, hippurate, DL-lactate, maleate, mesaconic acid, propionate, sebacic acid, D-tartaric acid, L-tartaric acid, *meso*-tartaric acid, DL- $\alpha$ -

alanine,  $\beta$ -alanine, L-arginine, DL-homoserine, DL-phenylalanine, glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-ornithine, sarcosine, L-serine, L-tyrosine, L-tryptophan, L-valine, and betaine. Pathogenic to *Vigna angularis* from natural infection and to *V. unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, and *Lablab purpureus* after inoculation. The pathotype strain is AZK-11 (SUPP2776, MAFF212478, ICMP24382).

## 第4章 アズキ茎腐細菌病の発生生態

### 1. 種子伝染による病徴および発生消長

アズキ茎腐細菌病は 1980 年代以降目立った発生がなく，突如多発した 2000 年代当時は，生産者のみならず研究機関および指導機関においても本病に対する認知度が低かった．さらに，アズキ茎腐細菌病は茎部にも病斑形成するため，しばしばアズキ茎疫病と混同されることがあった．アズキにおける細菌を病原とする病害には *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* によるアズキ褐斑細菌病（谷井・馬場 1971）もあり，混同を避けるため，精密な観察によりアズキ茎腐細菌病の病徴を整理する必要がある．

また，本病は種子伝染する（Tanii and Baba 1979）ことが知られている．伝搬の要因も検討するため，種子伝染由来の発生消長および経時的な圃場内の面的な蔓延様相を明らかにすることが防除対策を講じるうえで有効であると考えた．

#### 1) 目的

アズキ茎腐細菌病の種子伝染による病徴を詳細に記録し，発生消長を明らかにする．

#### 2) 方法

試験は 2009 年および 2010 年に北海道立総合研究機構農業研究本部上川農業試験場（北緯 43° 86′ 東経 142° 48′ . 北海道比布町に所在．以降，‘上川農試’と略す）場内圃場において実施した．発病程度の調査基準を Table 4-1 のように定め，発病株数および発病程度

を経時的に調査し、発病株率および次式により発病度 (DSI) を算出した。

$$\text{発病度 (DSI)} = \Sigma(\text{発病程度}) / (4 \times \text{調査株数}) \times 100$$

2009年は前年発生圃場産のアズキ品種‘エリモショウズ’種子 (収穫時莢発病度平均 8.3) を 5 月 26 日に播種した。2010 年は前年発生圃場産の‘しゅまり’種子 (収穫時発病莢率平均 1.9%) を 6 月 2 日播種した。病斑部切片を顕微鏡下で観察し、組織からの細菌の漏出を確認することによりアズキ茎腐細菌病であると判断した症状を観察・記録した。1 区あたり面積は 2009 年が 23 m<sup>2</sup>、2010 年は 21 m<sup>2</sup> とし、それぞれ 3 区内の全株を調査対象とした。細菌病に対する防除は行わなかった。

以降、特筆すべき場合を除き、害虫防除のためチアメトキサムフロアブルを種子重量 1 kg に対し 4 ml 塗抹処理した。ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤等を種子粉衣する場合は、まずチアメトキサムフロアブルを塗抹処理し、風乾後に粉衣処理を行った。圃場試験の栽植密度は、畦間 60 cm 株間 20 cm の 3 粒まきの後 2 本立てとし、欠株の補植は行わなかった。施肥は基肥のみで 10 a あたり N:P:K=3 kg:12 kg:7 kg とした。中耕は小型管理機を用い、小型管理機に葉が触れないように行った。中耕を除く栽培管理は上川農試慣行とした。

さらに、各区における発病株の位置関係から得られる分布様式を判定するため、圃場の 1 畦を 2009 年は 6 株および 2010 年は 5 株に区分けし、それぞれ 32 および 40 のコドラートとして、 $I_B$  (Morisita 1962) を算出し、集中度の解析を行った。なお、 $I_B$  は空間内における個体の集中度を示す指標として知られる  $I_\delta$  (Morisita 1959) を二項分布に従う調査対象に調整された指数で、以下の式で示される。

$$I_{\delta} = q \sum_{i=1}^n x_i(x_i-1)/[N(N-1)]$$

$$I_B = I_{\delta}(N-1/q)/(N-1)$$

本試験では、

$q$ : コドラート数

$N$ : ある調査時の総発病株数

$x_i$ :  $i$  番目のコドラート内の発病株数

とした。また、 $I_B$ と分布の関係は、 $I_B < 1$ であれば一様分布、 $I_B = 1$ であればランダム分布（ポアソン分布）、 $I_B > 1$ であれば集中分布と判断される（Morisita 1962）。さらに得られた  $I_B$  の数値がランダム分布 ( $I_B = 1$ ) から統計学的に有意に離れているかの判定を Morisita (1962) の方法に従って  $F$  検定により行った。すなわち、以下の式により  $I_B$  を  $F$  値に変換し、得られた  $F$  値を自由度  $n_1 = q - 1$ ,  $n_2 = \infty$  の  $F$  値と比較した。

$$F = [I_B \cdot (N-1) + q - N] / (q-1)$$

### 3) 結果

確認されたアズキ茎腐細菌病の病徴を Fig. 4-1, Fig. 4-2, Fig. 4-3 および Fig. 4-4 に、発生消長および日降水量の推移を Fig. 4-6 および Fig. 4-7 に示した。また、試験区内の発病株の面的な拡大の様相を Fig. 4-8 および Fig. 4-10 に図示した。

#### (1) 初発時期

2009 年は播種 27 日後（出芽揃 14 日後）の 6 月 22 日、2010 年は播種 19 日後（出芽揃 7 日後）の 6 月 21 日に初発を認めた。いずれ

の年次も発病個体は初生葉が完全に展開し，第一本葉が抽出あるいは展開していた。

### (2) 初発病斑

初発時の病斑はいずれの年次も初生葉に認められた。すなわち，葉脈に沿った褐色から赤褐色のやや水浸状の条斑が多く (Fig. 4-1a)，葉の裏の病斑部は暗緑色で明瞭な水浸状を呈していた (Fig. 4-1b)。葉脈沿いあるいは葉脈間には褐色～赤褐色 1-2 mm 大の斑点上の病斑を形成し，病斑の周りがやや退緑する場合があったが，明瞭なハローは伴わなかった (Fig. 4-1c)。発病が激しい場合，病斑が胚軸に進展し，早期に立枯れた。一方，しばしば葉の表側の病斑が不明瞭な場合があったが，葉裏の水浸状病斑は明瞭で，かつ，罹病葉は晴天にもかかわらず閉じている場合が多かった（‘閉じた初生葉’，Fig. 4-1a の破線矢印）。一方，葉身の病斑中央部にわずかな淡褐色の壊疽が生じ (Fig. 4-5a)，アズキ褐斑細菌病の初発病斑 (Fig. 4-5b) に類似する場合もあった。時折，初生葉節部には暗緑色あるいは赤褐色水浸状の病斑が認められることがあった (Fig. 4-1d) が，葉に発病を認めず，胚軸のみに病斑形成することは極めてまれであった。初生葉に発病が認められず，第一本葉に病斑が認められる場合もまれに生じた。

### (3) 二次伝染

初発直後は種子伝染によると考えられる発病株が増加し，これらに隣接する株の上位展開葉の多くに二次伝染によると推察される病斑が認められた (Fig. 4-8, Fig. 4-10)。この場合，下位葉では発病が認められないか，あるいは，病斑が不明瞭であった。その後，播種後 30-50 日にかけて，急激に発病株が増加した (Fig. 4-6, Fig. 4-7)。



#### (4) 二次伝染の病徴

発生初期では葉の表側が一見無病徴の場合があった (Fig. 4-2a), が, 罹病葉の裏面には明瞭な暗緑色の水浸状の病斑が確認された (Fig. 4-2b). 病斑は次第に褐色から赤褐色あるいは暗褐色を帯び, 周りがやや退緑した直径 1-2 mm 大の斑点状の病斑となったが, 明瞭なハローは認められなかった (Fig. 4-2c). 発病が激しい場合, 病斑の周りから壊疽が生じ (Fig. 4-3a), 融合して枯死に至った. また, 降雨後, 健全部との境界が不明瞭なモザイク状の病斑を形成することがあった (Fig. 4-3b). 登熟期間には, 葉の周縁からくさび型に切れ込むような壊死斑を形成し, やがて枯死する症状が目立った (‘くさび型病斑’, Fig. 4-3c). 小葉の基部から葉枕が罹病すると葉の運動性が失われ, 小葉が風であおられる旗のようになる様子が観察された (‘小葉の下垂’, Fig. 4-3d). 一方, 葉柄では赤褐色から暗褐色水浸状の条斑を形成し, 節部に進展した. 茎に形成された病斑は褐色から暗褐色水浸状を呈し, その後, 典型的な茎腐れ (Fig. 4-4a) となった. 腐敗が上位に進展し立枯れるか, あるいは, 病斑部が腐敗によって軟弱となり, 風や自重に耐えきれなくなって折損した (Fig. 4-4b). 未熟莢には円形から不整形の暗緑色水浸状の病斑を形成したが (Fig. 4-4c), 莢が成熟すると病斑部は黒変し, 他の要因による変色との識別が困難となった. また, 葉が繁茂し, 圃場内が多湿になると, しばしば, 葉の裏面あるいは茎部, 未熟莢に形成された病斑部から白色から乳白色の菌泥が漏出した (Fig. 4-4c).

#### (5) 種子伝染における発病株の分布様式

2009 年および 2010 年の総発病度に対する  $I_B$  および  $F$  値の推移, および調査日ごとの  $I_B$  の推移をそれぞれ Fig. 4-9 および Fig. 4-11 に

示した.

2009年の総発病株数に対する  $I_B$  は播種後 31 日では、発病株が少なく  $I_B$  が算出されなかった。播種後 38 日の  $I_B$  は試験区によって異なったが、播種後 49 日以降の  $I_B$  の推移の傾向はほぼ同一であった。すなわち、播種後 49 日以降は一様分布と判断された。播種後 49 日以降の  $F$  値の推移も各区共通しており、発病株の分布の分散性が高いと判断された。調査日ごとの発病株数の分布は、播種後 49 日に発病株が集中して分布したと判断されたことを除いて、試験区間に共通する一定の傾向は見いだせなかった。

2010年の総発病数に対する  $I_B$  および  $F$  値の推移の傾向は各区で共通していた。すなわち、播種後 19 日は発病株数が少なく、 $I_B$  が算出されなかったが、播種後 26 日および 33 日は発病株が有意に集中して分布し、以降ランダムあるいは一様に分布した。一方、調査日ごとの発病株数の分布について、試験区間に共通する一定の傾向は見いだせなかった。

#### 4) 考察

2 か年を通じた前年発生圃場産種子を播種による初発から茎葉および莢における病徴は一部の症状を除き Tanii and Baba (1979) によるアズキ茎腐細菌病の病徴の記載と一致した。

2 か年の観察の結果、前年発生圃場産種子由来の初発は播種後 19 日あるいは 27 日に認められた。播種から初発までの日平均気温を比較すると、2009 年は  $14.4^{\circ}\text{C}$  (平年差  $-0.7^{\circ}\text{C}$ ) でやや低温傾向、一方、2010 年は  $18.1^{\circ}\text{C}$  (平年差  $+2.8^{\circ}\text{C}$ ) は高温傾向であり、積算降水量は 2009 年が  $48\text{ mm}$  (平年差  $-9.8\text{ mm}$ )、2010 年が  $35\text{ mm}$  (平年差  $-6.2$

mm) で兩年ともやや少雨傾向であったが、小豆の生育に影響を与える程ではなかった。以上のことから、種子伝染による本病の初発時期は、播種後の気象条件や小豆の生育にほとんど左右されず、播種 20-30 日後 (出芽 7-14 日後) であると考えられた。

初発病斑の多くは初生葉に認められたが、まれに胚軸部のみ、あるいは、初生葉に病斑形成せず、第一本葉に初発病斑が認められる場合があった。したがって、初発を検出する際は初生葉を重点的に、かつ同時に植物体全体を観察する必要がある。アズキの葉身には、生理的要因によると考えられる褐点がしばしば観察される。アズキ茎腐細菌病による病斑は葉の表側で不明瞭な場合があるが、葉裏には明瞭な水浸状の病斑が観察されるため、他の要因による褐点と識別が可能である。また、マメ科植物は、日中に葉を開き、夜間は葉を閉じて眠るという、概日性リズムに従った運動 (就眠運動) を行う (上田ら 2002)。アズキにおいても通常晴天時は陽光に向かって葉を開き、夜間や雨天および曇天時は葉身が下垂し、葉が閉じた様子が観察される。しかし、アズキ茎腐細菌病に罹病した初生葉は晴天時でも下垂し、閉じている場合が多い (Fig. 4-1a 破線矢印)。就眠運動は葉身の基部の葉枕部に含まれる運動細胞が膨潤、収縮することで起こる (上田ら 2002) ことから、罹病した初生葉が閉じたままになっているのは、この運動細胞が病原細菌に侵され、細胞の膨張が生じなくなったものと推察される。この‘閉じた初生葉’は種子伝染による初発確認の目安になる本病の重要な特徴であると考えられる。

いずれの年次においても、播種後 30 から 50 日に急激に二次伝染による発病が増加した。いずれの年次においても、初発から発病株

率が 100%に達するまでにまとまった降雨があり (Fig. 4-6, Fig. 4-7), 風雨によって伝播し, 二次伝染による発病が蔓延したと推察された. 加えて, 植物体の生育に伴い, 発病株への直接的な接触によって伝播することも発病株増加の要因の一つと考えられた. 試験では, 中耕時に管理機が植物体に触れないよう行ったが, 実際の生産圃場では管理作業中の人および農業機械によって伝播することも予想される.

種子伝染からの本病の蔓延の様相をとらえるため, 発病株の分布様式を  $I_B$  (Morisita 1962) によって解析した. 本病の第一次伝染源は汚染種子である (Tanii and Baba 1979) ことから, 初期の発病株はランダムに分布することは容易に想像できる. その後, 二次伝染により発病株が増加するが, その分布様式について, 比較的発病株の増加が緩慢であった 2009 年 A 試験区 (Fig. 4-8 Plot A) および 2010 年 (Fig. 4-10) は発病株を中心とした二次伝染による発病の増加を集中分布としてとらえることができた. 一方, 2009 年の試験区 B および C は播種後 38 日に試験区内の広範囲に発病株が増加した (Fig. 4-8 Plot B, C) ため, 比較的発生初期の発病株の分布も一様分布として判断される解析結果となった. 時間の経過とともに, 試験区内を発病株が埋め尽くすような形で蔓延したため, いずれの年次も結果的に一様分布となった. 本病の蔓延の様相, すなわち, 発病株の分布様式を正確にとらえるには, 1 個体の発病からどのくらい二次伝染により伝播するか, あるいは, より広範囲で発病の推移を調査する必要がある.

二次伝染の発生初期でも葉の表側が一見無病徴の場合があり, 発生を見過ごすことも懸念されたが, 葉裏の水浸状の病斑の有無を確

認することが発生の判断材料となる。また、高温かつ乾燥時を除いて、罹病葉の裏面には水浸状の病斑が確認されたため、銅を含む薬剤の茎葉散布による薬害 (Fig. 4-2d), あるいは、その他の要因による褐点との識別が可能であると考えられた。生育後期に観察された‘くさび型病斑’, および、葉枕が罹病することによって生じる‘小葉の下垂’は、圃場内で目を引く症状であると同時に本病の特徴的な病徴であるため、圃場観察する際の着眼点となる。

病名の由来となっている茎部の腐敗および病斑部の菌泥は、アズキにおける他の病害では認められない、本病の典型的かつ特異な病徴であり、本病を診断する際に決定的な病徴であると言える。一方、‘閉じた初生葉’および‘くさび型病斑’, ‘小葉の下垂’に類する症状は Tanii and Baba (1979) の記載にはなかったが、2000年代の本病の発生圃場では普遍的に認められる症状で、本病に特有の症状であると考えられた。

本病に類似する病害として、アズキ褐斑細菌病とアズキ茎疫病がある。*P. syringae* pv. *syringae* によって引き起こされるアズキ褐斑細菌病は、葉身では退緑あるいは黄緑色のハローを伴った淡褐色から赤褐色の円形から不整形の大型病斑を形成し、病斑の中央部が脆く、破れやすい (Fig. 4-5c)。莢には褐色を帯びた水浸状の病斑が形成される。典型的な病徴はアズキ茎腐細菌病とアズキ褐斑細菌病とで異なり、病徴による識別も可能であるが、アズキ茎腐細菌病の初発病斑の中央部に淡褐色の壊疽を生じる場合 (Fig. 4-5a), アズキ褐斑細菌病の初発病斑 (Fig. 4-5b)と酷似しており、外観上識別することは困難である。それぞれ典型的な病徴は異なるため、両病害を識別するには、経過を観察し、進展した病徴で判断するか、あるいは、病

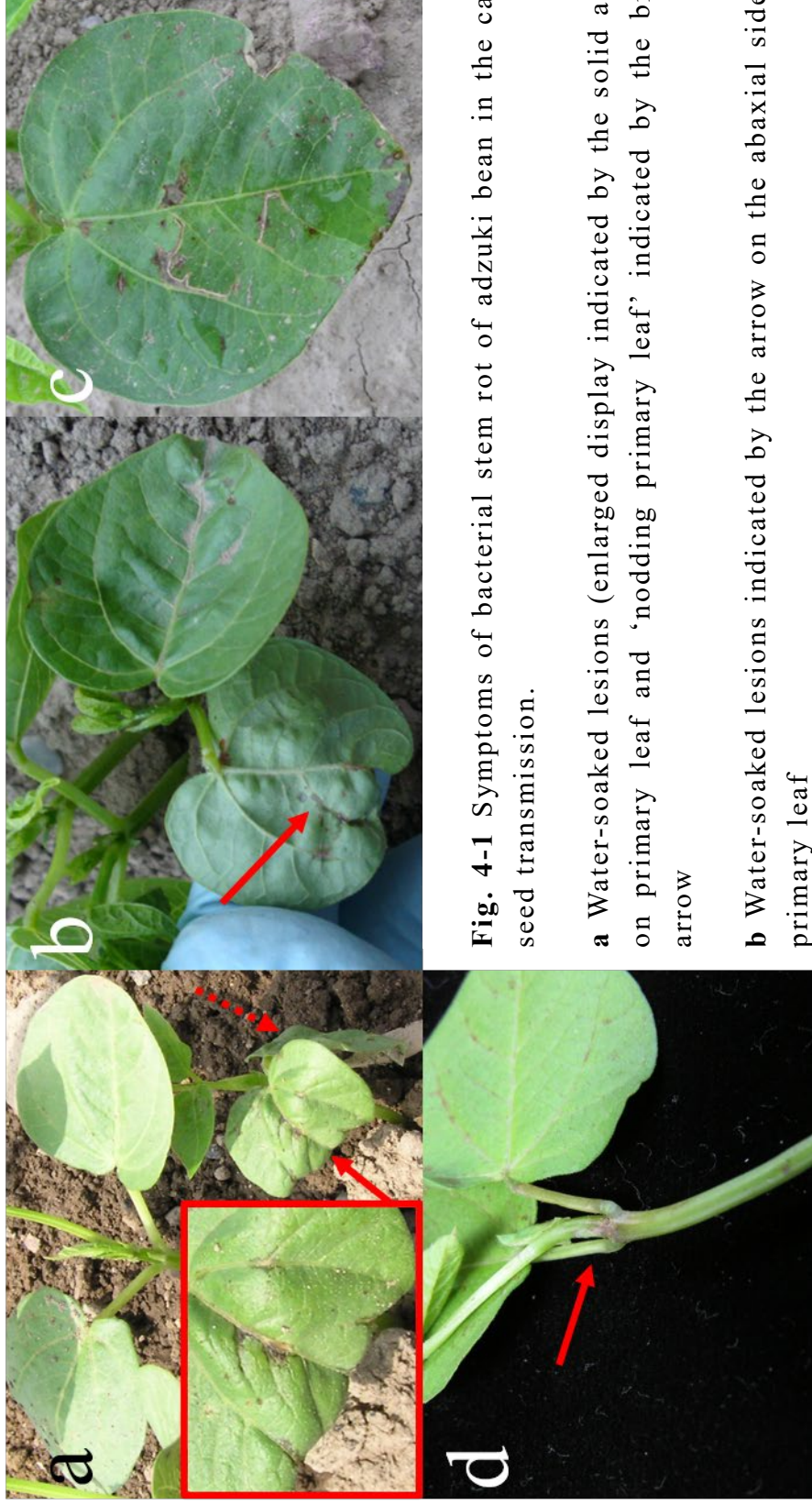
原細菌を分離し、同定する必要がある。一方、糸状菌 *Phytophthora vignae* f. sp. *adzukicola* によって引き起こされるアズキ茎疫病は、主茎地際部あるいは下位分枝節に濃緑色水浸状の病斑を形成するため、アズキ茎腐細菌病の茎における初期の病徴と類似する (Fig. 4-5d)。時間が経過すると、アズキ茎疫病は病斑部がやや萎縮し、赤褐色から赤紫色を帯びるのに対し、アズキ茎腐細菌病の病斑は褐色から暗褐色となり腐敗する。アズキ茎腐細菌病の場合、茎の発病の多くは葉柄からの進展によるため、葉柄および節部の発病の有無、さらに、葉の病徴、菌泥の漏出の有無により識別が可能と考えられる。

**Table 4-1** Degrees of severity of the bacterial stem rot of adzuki bean

Degrees	Leaves and stems	Pods
0	No symptom	no symptom
1	A small numbers of lesions are found on leaves	less than 30 % of diseased pods were found
2	Lesions are easily found on leaves, and a small number of leaflets are dead	less than 50 % of diseased pods were found
3	A large number of leaflets are dead, and water-soaking lesions are found on stems	less than 70 % of diseased pods were found
4	Dumping off, almost leaves are dead, or stem rots are found	more than 70 % of diseased pods were found

Disease severity index (DSI)

$$= \Sigma (\text{degrees of severity of disease}) / (\text{total numbers of observed plants} \times 4) \times 100$$



**Fig. 4-1** Symptoms of bacterial stem rot of adzuki bean in the case of seed transmission.

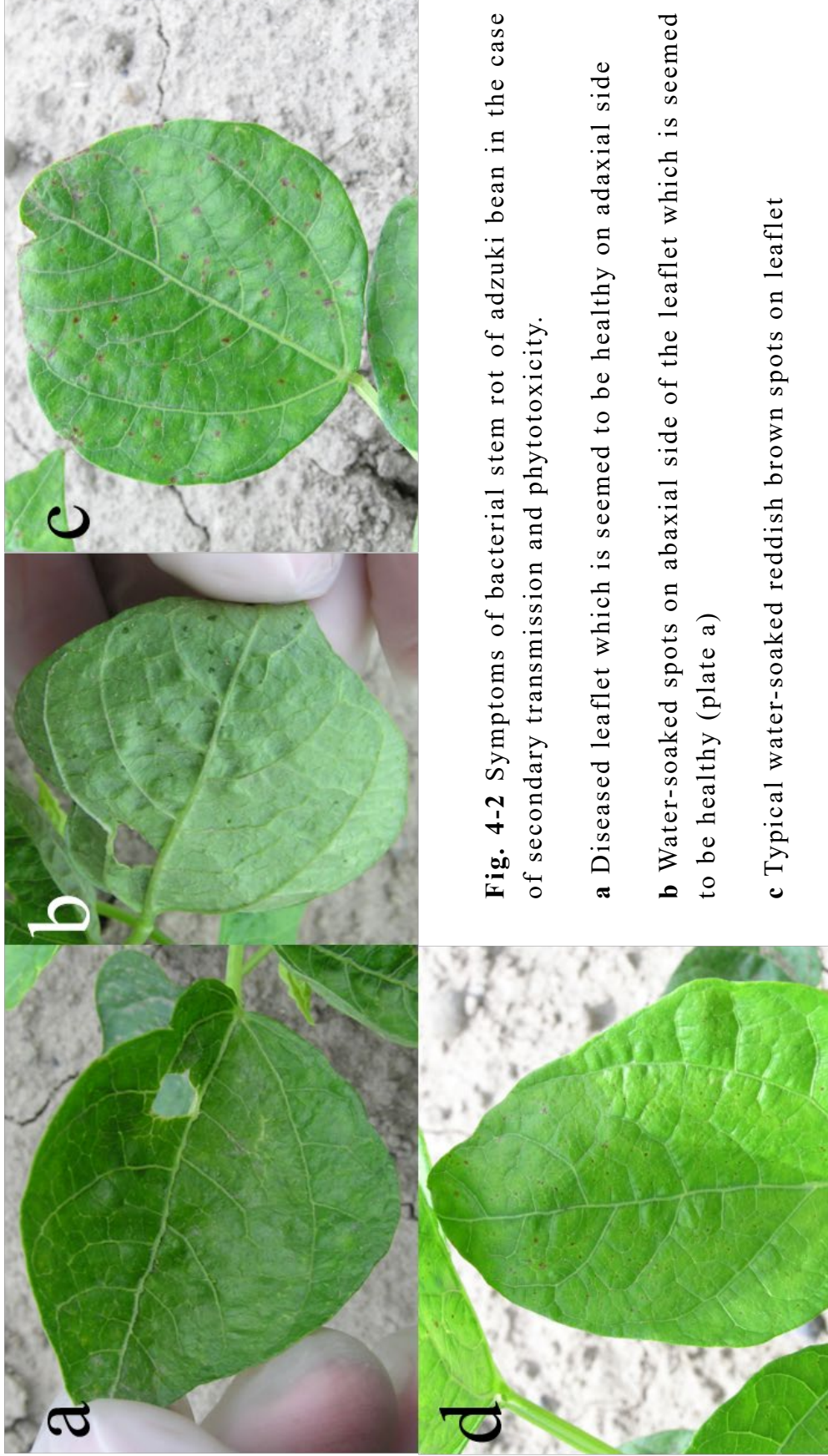
**a** Water-soaked lesions (enlarged display indicated by the solid arrow) on primary leaf and ‘nodding primary leaf’ indicated by the broken arrow

**b** Water-soaked lesions indicated by the arrow on the abaxial side of a primary leaf

**c** Water-soaked reddish brown spots and necrotic lesion on a primary leaf

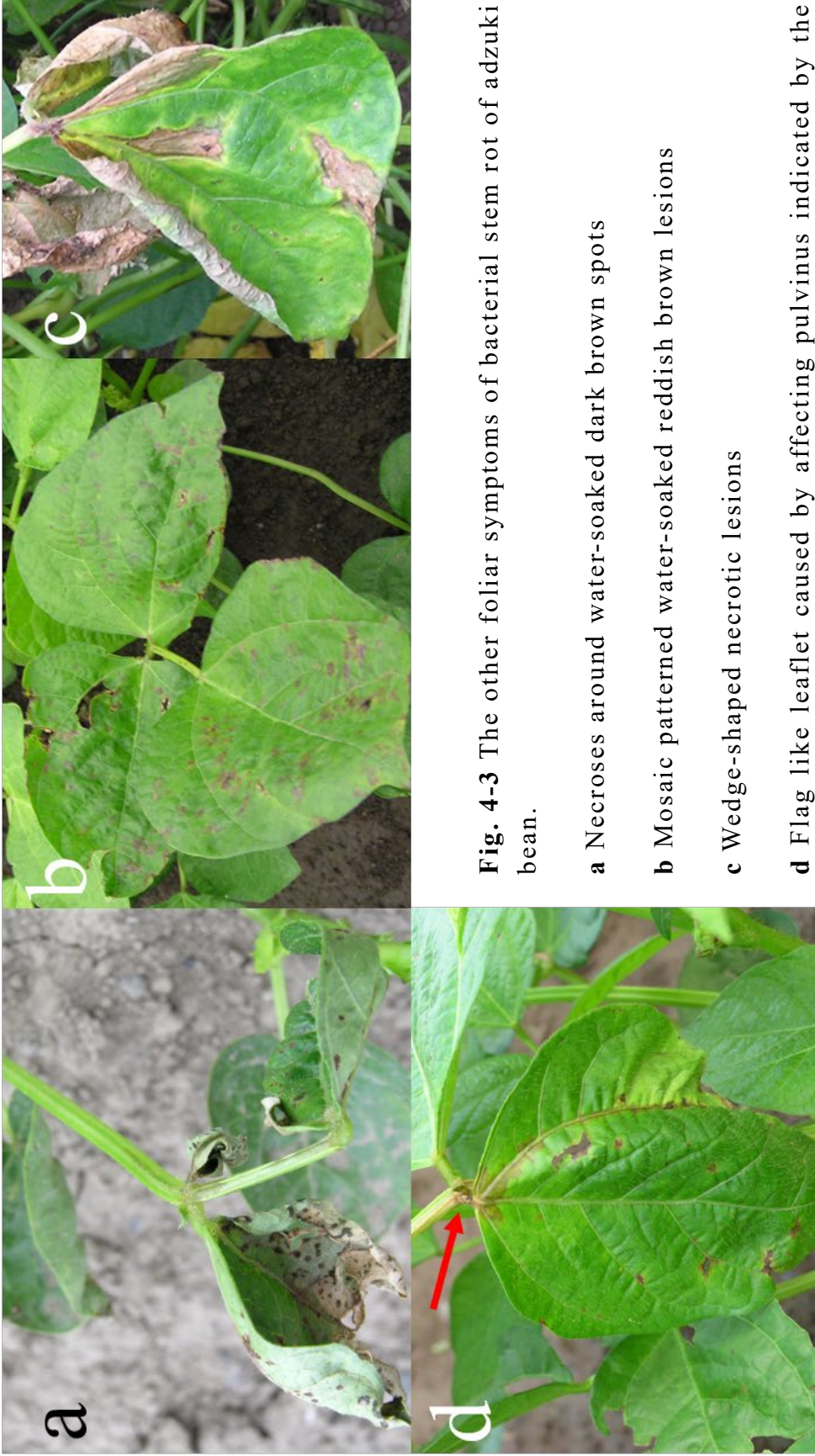
**d** Water-soaked lesion at node indicated by the arrow





**Fig. 4-2** Symptoms of bacterial stem rot of adzuki bean in the case of secondary transmission and phytotoxicity.

- a** Diseased leaflet which is seemed to be healthy on adaxial side
- b** Water-soaked spots on abaxial side of the leaflet which is seemed to be healthy (plate a)
- c** Typical water-soaked reddish brown spots on leaflet
- d** Phytotoxicity caused by copper spraying (reddish brown pinpoint spots)



**Fig. 4-3** The other foliar symptoms of bacterial stem rot of adzuki bean.

**a** Necroses around water-soaked dark brown spots

**b** Mosaic patterned water-soaked reddish brown lesions

**c** Wedge-shaped necrotic lesions

**d** Flag like leaflet caused by affecting pulvinus indicated by the arrow





**Fig. 4-4** Symptoms on stems and pods of bacterial stem rot of adzuki bean.

**a** Stem rot and water-soaked lesion on main stem

**b** Breakage caused by stem rot

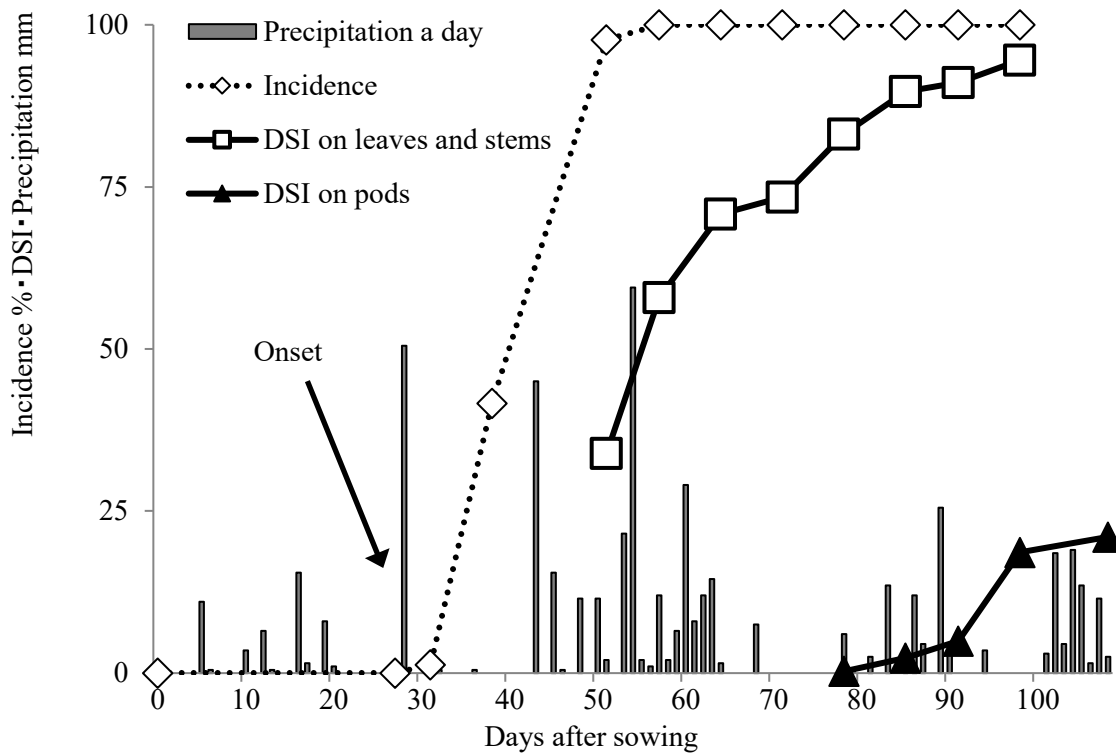
**c** Water-soaked spots and bacterial ooze on immature pods



**Fig. 4-5** Similar disease symptoms to bacterial stem rot on adzuki bean.

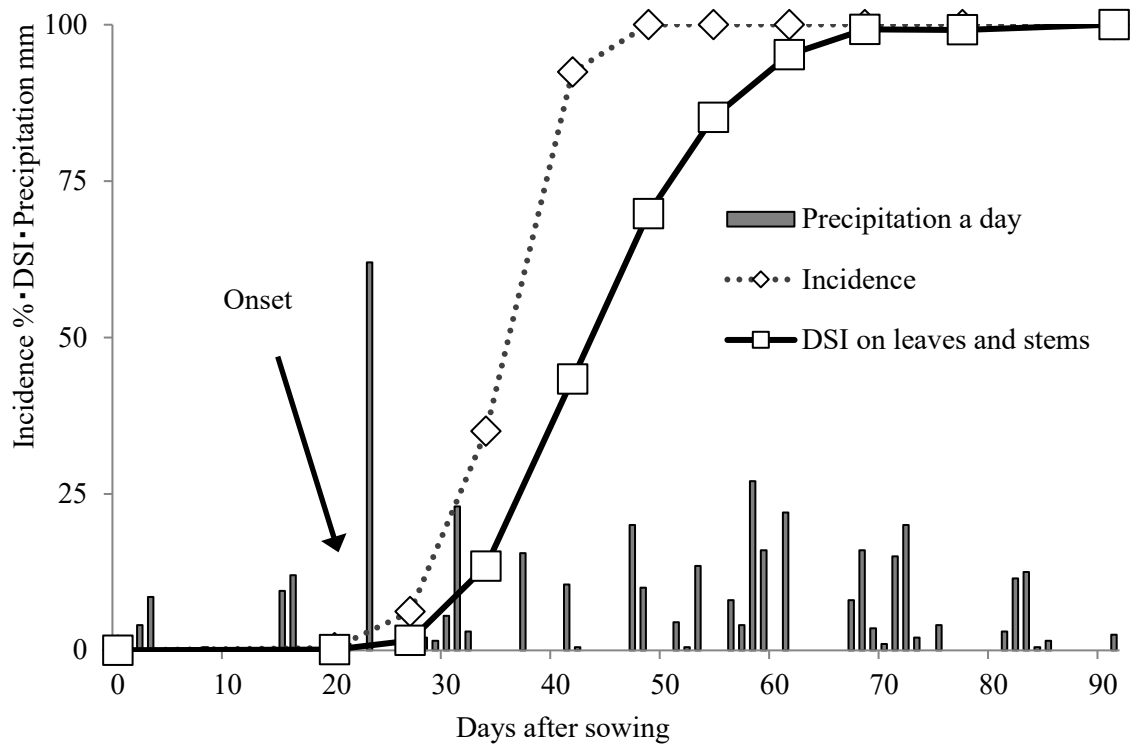
- a** Initial leaf spot of bacterial stem rot disease developed from naturally infected seed
- b** Initial leaf spots of bacterial brown spot disease developed from artificially inoculated seed
- c** Typical symptom of bacterial brown spot disease caused by natural infection
- d** Lesion on stem of Phytophthora root rot disease caused by natural infection





**Fig. 4-6** Disease progress of bacterial stem rot of adzuki bean in 2009 when adzuki bean Erimo-shozu seeds, produced in the infested field in previous year, were sowed, and precipitation a day.

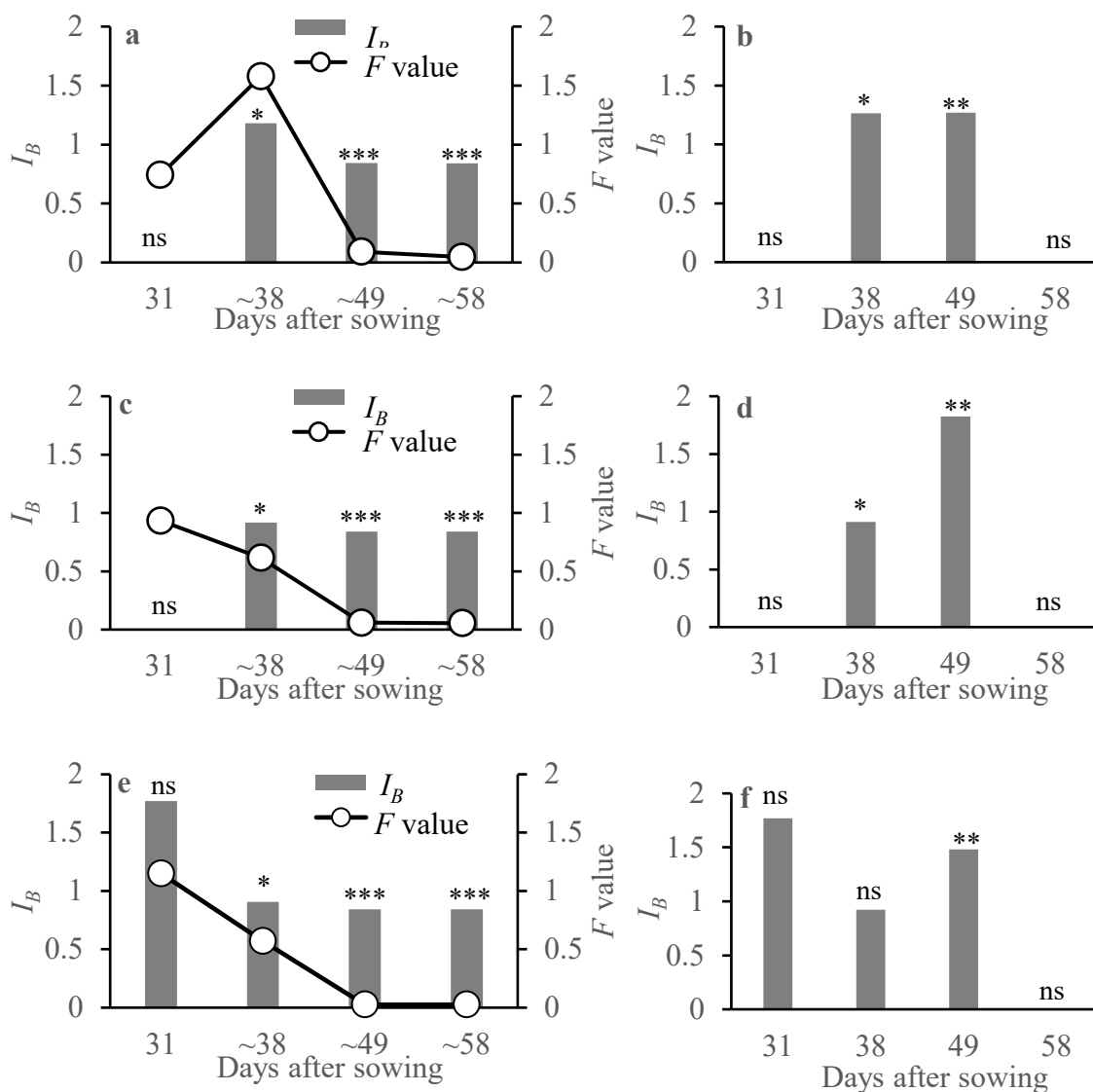
*DSI* Disease severity index



**Fig. 4-7** Disease progress of bacterial stem rot of adzuki bean in 2010 when adzuki bean Syumari seeds, produced in the infested field in previous year, were sowed, and precipitation a day.

*DSI* Disease severity index



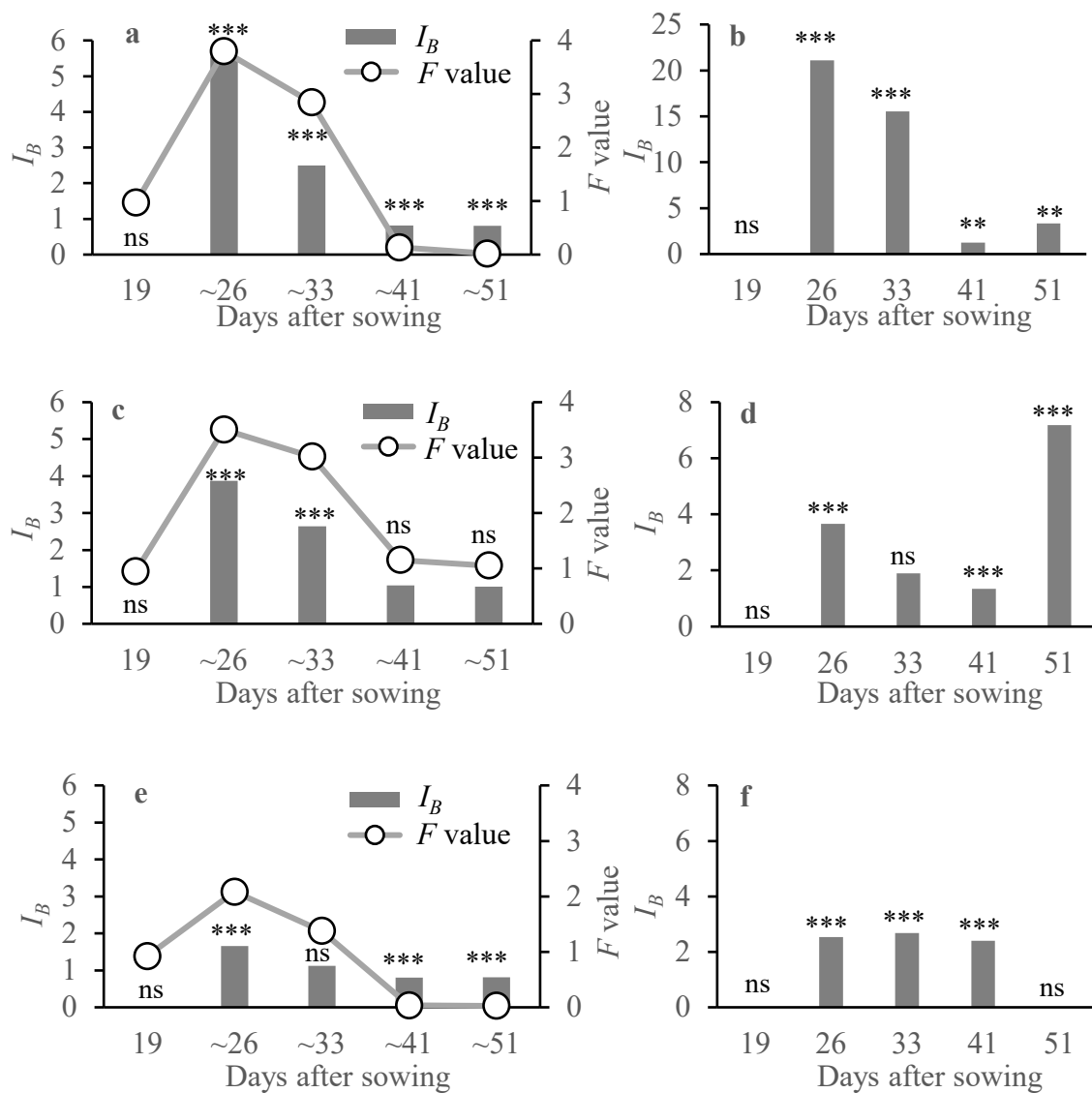


**Fig.4-9** Morisita's  $I_B$  and  $F$  values for diseased plants with bacterial stem rot of adzuki bean in the test fields which naturally infected seeds were sown, in 2009.

Based on the data in Fig. 4-8,  $I_B$  values were calculated. *Asterisks* indicate  $I_B$  value differed significantly from 1.0 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns,  $P > 0.05$ ) according to Morisita's  $F$ -test method (Morisita 1962). **a, c, and e** Total number of hills including diseased plants in the plot A, B and C, respectively. **b, d, and f** Number of hills including diseased plants at each observation in the plot A, B, and C, respectively.







**Fig.4-11** Morisita's  $I_B$  and  $F$  values for diseased plants with bacterial stem rot of adzuki bean in the test fields which naturally infected seeds were sown, in 2010.

Based on the data in Fig. 4-9,  $I_B$  values were calculated. *Asterisks* indicate  $I_B$  value differed significantly from 1.0 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns,  $P > 0.05$ ) according to Morisita's  $F$ -test method (Morisita 1962). **a,c,** and **e** Total number of hills including diseased plants in the plot A, B and C, respectively. **b, d,** and **f** Number of hills including diseased plants at each observation in the plot A, B, and C, respectively.

## 2. 二次伝染の拡大

前項で種子伝染による発病個体を伝染源として、二次伝染により急激に蔓延することが観察された。発病個体の存在が本病のその後の発生の寡多に与える影響が大きいことが予想される。圃場内での蔓延に対する発病個体の影響を詳細に検討する必要がある。

### 1) 目的

圃場内での本病の蔓延に対する発病個体の関与について検討するため、発病個体から圃場内でどのように拡大するか明らかにする。

### 2) 方法

試験は 2009 年および 2010 年に上川農試場内圃場で実施した。本病が発生していない北海道立総合研究機構農業研究本部十勝農業試験場（以下、‘十勝農試’と略す）産のアズキ品種‘しゅまり’の種子に ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤を種子重量の 0.3% 量を粉衣し、2009 年が 5 月 26 日に、2010 年は 6 月 2 日に播種した。出芽後、他の試験区で発生した種子伝染由来の発病株を 2009 年が 6 月 30 日（播種後 35 日後）に 2 株、2010 年は 6 月 29 日（同 27 日後）に 1 株を試験区中央部に伝染源として移植した。面積および区制は 2009 年が 44.2 m<sup>2</sup> の 2 区制、2010 年は 21 m<sup>2</sup> の 3 区制とした。本病に対する茎葉散布は行わず、試験区内の全株について経時的に発病調査を行った。調査時は植物体になるべく触れないようにし、病斑に触れた場合は随時ゴム手袋を交換した。

さらに、各区における発病株の位置関係から得られる分布様式を判定するため、圃場の 1 畦を 2009 年は 7 株および 2010 年は 5 株に

区分けし、それぞれ 32 および 40 のコドラートとして、 $I_B$  を算出し、集中度の解析を行った。

### 3) 結果

2009 年および 2010 年の試験区内における発病株の増加の推移をそれぞれ Fig. 4-12 および Fig. 4-14 に示した。

2009 年は伝染源移植 14 日後、2010 年は同 8 日後に、それぞれ伝染源に隣接する株に発病を認めた。いずれの年においても、はじめ、伝染源と同一畦上の隣接株が発病し、その後、畦に沿って発生が拡大し、次第に圃場全体に拡がる様子が観察された。2010 年は伝染源を移植 22 日後までに試験区内の大部分が発病し、急速に蔓延したのに対し、2009 年は伝染源の移植から隣接株における発病確認まで 14 日を要し、その後の発生拡大も比較的緩慢であった。また、2009 年は伝染源移植 27 日以降に伝染源から数 m 離れた場所にある株でも本病の発病が認められた。

2009 年における総発病株数に対する  $I_B$  および  $F$  値の推移は試験区により異なったが、伝染源移植後初期は  $I_B$  が高く、発病株の集中度が有意に高いが、発病株の増加に伴い、 $I_B$  が減少、すなわち、集中度が低下し、ランダム分布に収束する傾向が共通した (Fig. 4-13a, c)。一方、調査日ごとの  $I_B$  の推移については一定の傾向が認められなかった (Fig. 4-13b, d)。2010 年における総発病株数に対する  $I_B$  および  $F$  値の推移、および、発病日ごとの発病株数に対する  $I_B$  は試験区間で同様の傾向が認められた (Fig. 4-15)。すなわち、伝染源移植後、伝染源周辺の発病株の分布は集中度の高い集中分布と判断され、以降、集中度が急激に低下し、伝染源移植後 22 日にはランダム分布

あるいは一様分布に収束した。調査日ごとの発病株数に対する  $I_B$  の推移も同様の傾向であった。

試験期間中のアメダス比布（北緯  $43^{\circ} 87'$  ，東経  $142^{\circ} 48'$  ）における 2009 年 6 月 30 日から 8 月 18 日までの間および 2010 年 6 月 29 日から 7 月 21 日までの間の平均気温の平年差は，それぞれ平均  $-0.5^{\circ}\text{C}$  および  $+2.6^{\circ}\text{C}$  であった。同期間の期間降水量の平年比はそれぞれ 170% および 119% であった。2010 年は伝染源移植から隣接株が発病する 8 日間に 22.5 mm の降雨があったが，2009 年は伝染源移植後最初の 7 日間の降雨が 0.5 mm とごくわずかであった。さらに，2009 年は伝染源の移植後 15–22 日間は低温（平年差  $-6.0$ – $-0.5^{\circ}\text{C}$ ）で推移した。

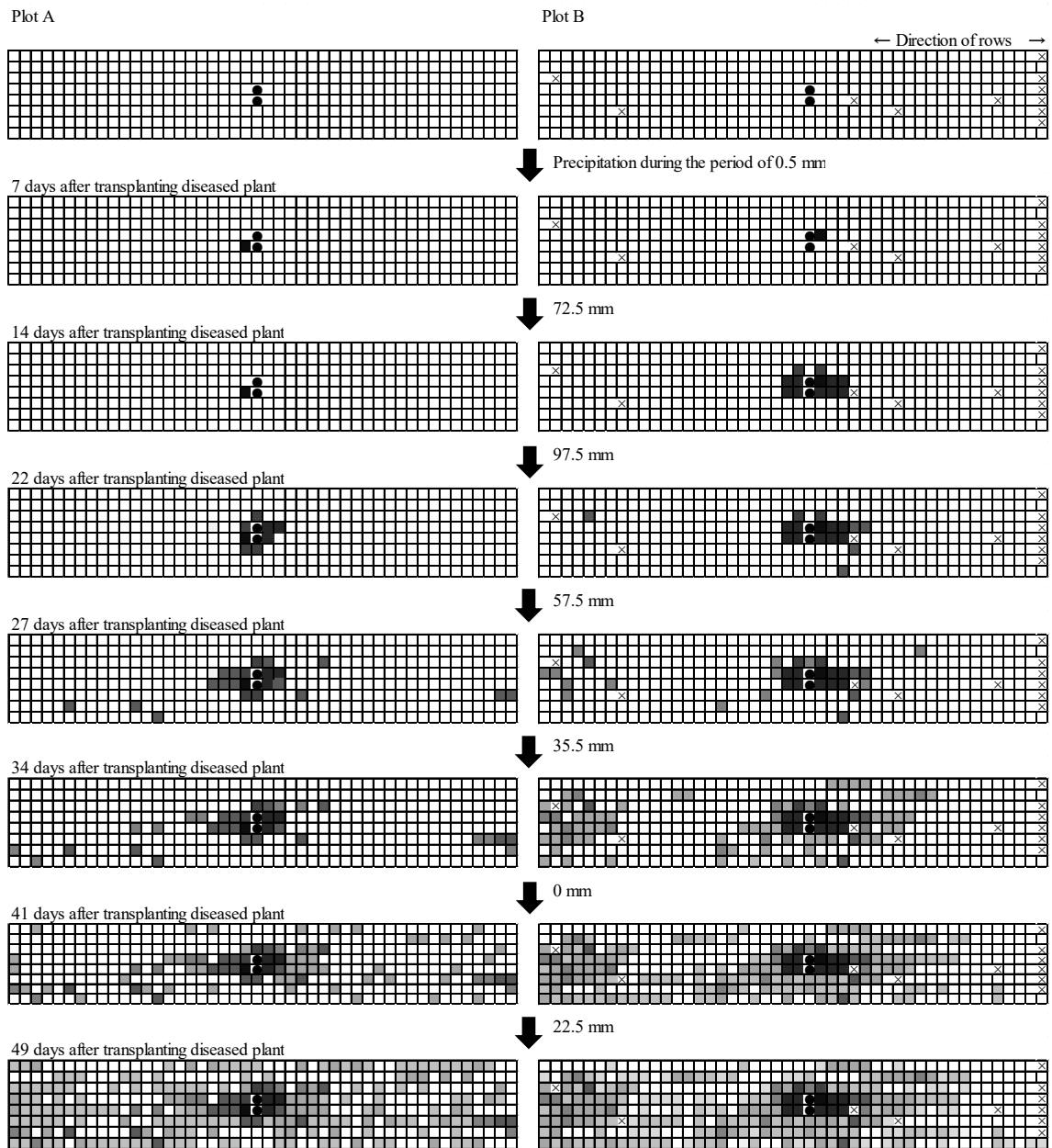
#### 4) 考察

いずれの年も移植した発病株に隣接した株に発病を認め，その後数日間は発病株に隣接した株以外の発病は認められなかったため，試験区内に播種したアズキ品種‘しゅまり’は本病の汚染がなく，かつ，移植した発病株を除く発病は二次伝染によるものと判断できる。年次によって試験区内での蔓延の速度は異なったものの，試験区中心部に移植した伝染源を中心に試験区全体に発生拡大したことから，発病株が次々に伝染源となり，たった 1 株の発病でもかなりの面積にわたって発病する可能性がある。このことは，いずれの年次も伝染源移植後初期は  $I_B$  が著しく高く，発病株が集中して分布したことが判断されること，試験区内全体に発病が蔓延するころには  $I_B$  がランダム分布あるいは一様分布と判断される値となったことから支持される。本病と生態的に類似すると考えらえるインゲンマ

メかさ枯病では、1 エーカー (約 40.5 a) あたり 12 粒以下の感染種子 (内部まで病原細菌が侵入している種子) により深刻な蔓延をもたらすことが報告されている (Walker and Patel 1964).

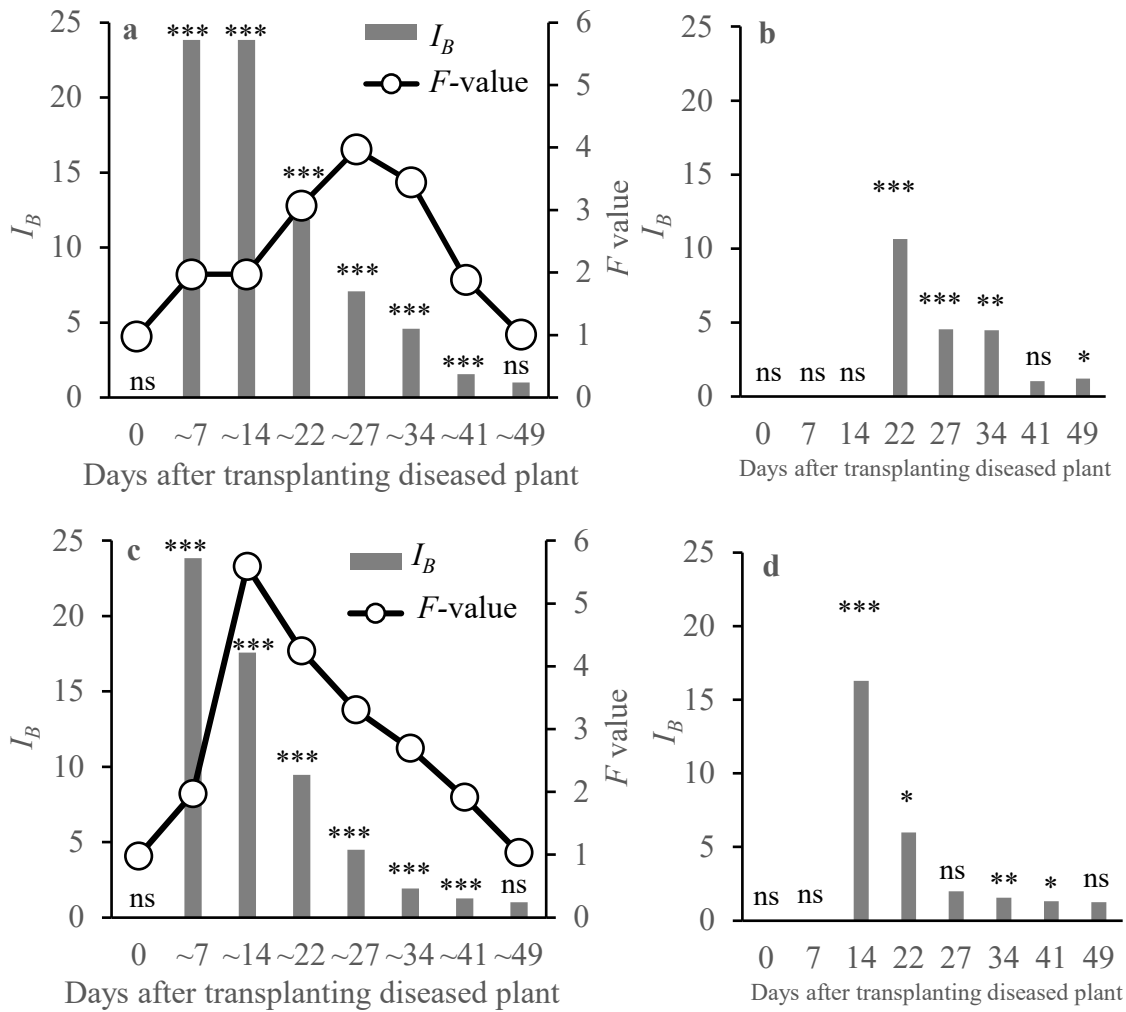
インゲンマメかさ枯病の蔓延については、降雨 (谷井ら 1976), あるいは、降雨中の卓越風 (ある一地方で、ある特定の期間に吹く、最も頻度が多い風向の風) によるしぶきの拡散 (Walker and Patel 1964) の影響が大きいことが指摘されている。本試験における年次によるアズキ茎腐細菌病の蔓延速度の違いは、気象条件によるものと推察された。すなわち、2010 年は期間中の平均気温が高く、降雨も多かったことから、伝染源を中心に隣接株への伝播し、速やかに試験区全体に蔓延した。一方、2009 年は期間中の降水量はかなり多かったものの、伝染源移植直後の降雨がほとんどなく、かつ、伝染源に隣接する株に発病を認めるまでの期間が、かなり低温で推移したことから、伝播に必要な病原細菌の増殖が抑制されたものと推察される。その後、気温は平年並みに推移し、適度な降雨があったことから、試験区内に蔓延した。

谷井ら (1976) は、インゲンマメかさ枯病の伝播に関して、飛来する昆虫の可能性を指摘している。本研究において、昆虫からの病原細菌の分離・検出は行っておらず、推測の域を脱しないが、2009 年で認められた発病株から 1-3 m 離れた場所での発病は、風雨による伝搬あるいは罹病植物から飛来した昆虫類の関与が疑われる。



**Fig. 4-12** Disease progress pattern of secondary dissemination in 2009.

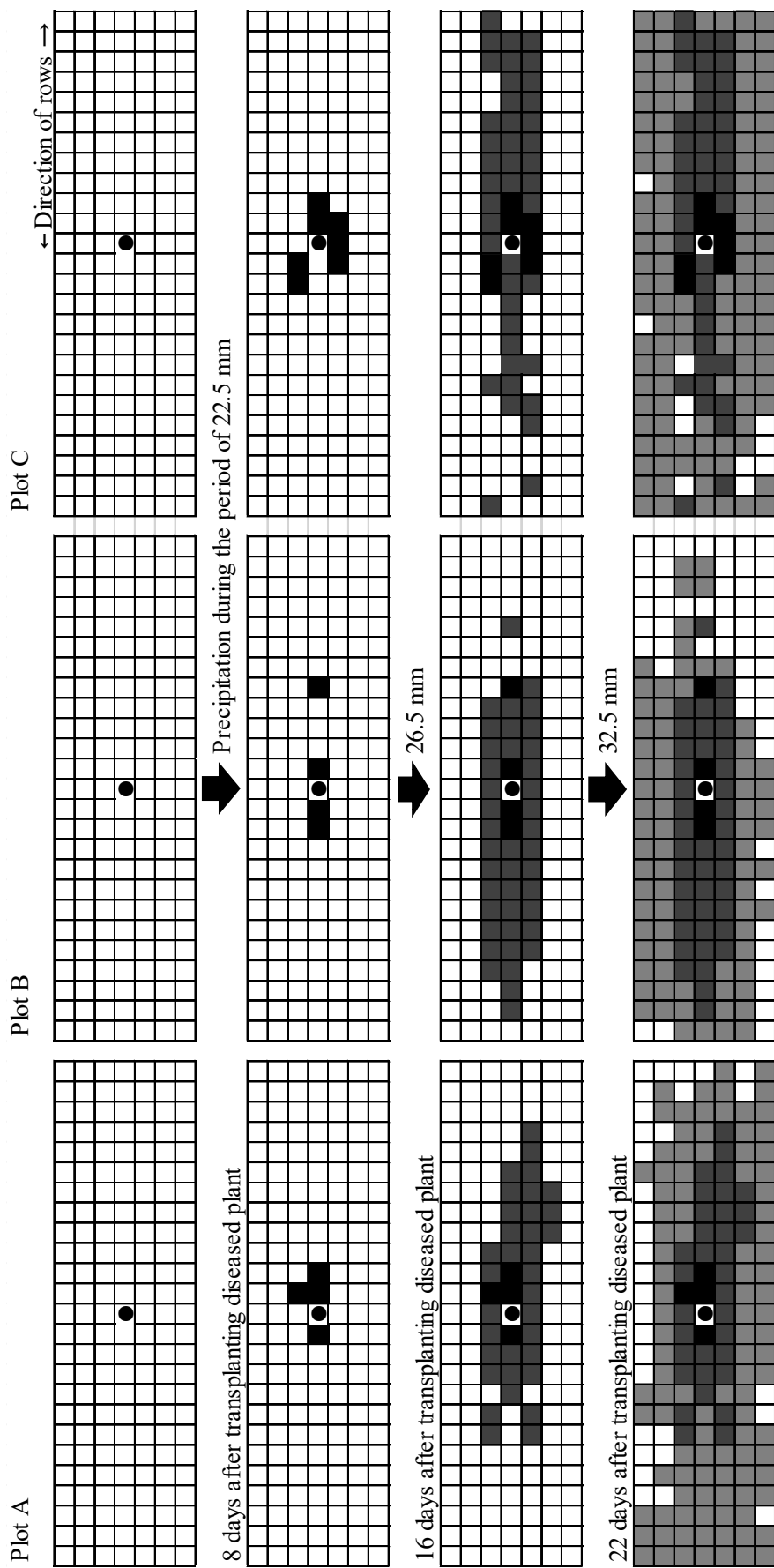
One cell corresponds to one hill of adzuki bean plants. ● indicates source of infection. × indicates vacant hill of plants. Black to gray colored cell means hill of diseased plant newly found.



**Fig.4-13** Morisita's  $I_B$  and  $F$  values for diseased plants with bacterial stem rot of adzuki bean in the test fields which diseased plants were transplanted, in 2009.

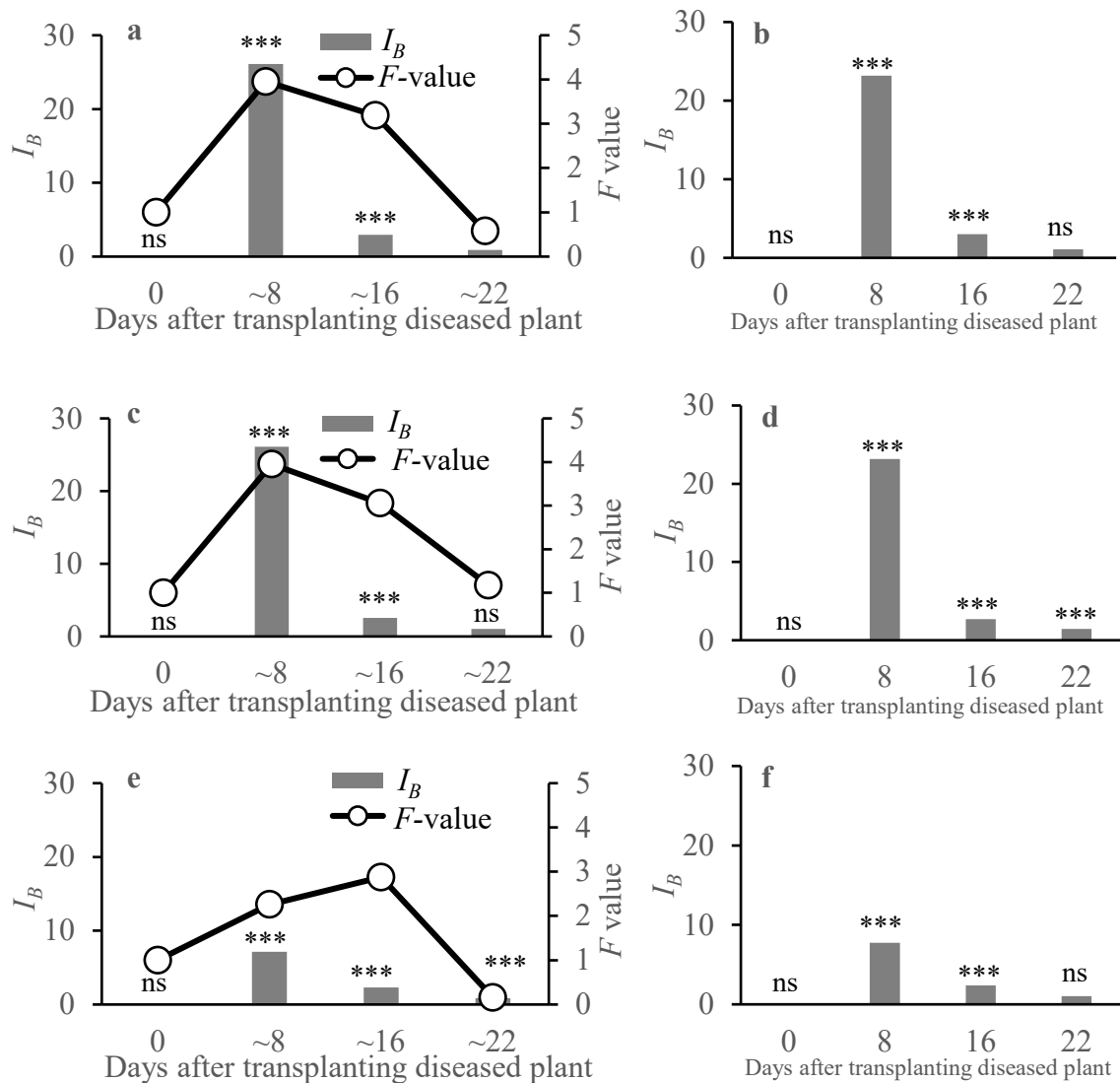
Based on the data in Fig. 4-12,  $I_B$  values were calculated. *Asterisks* indicate  $I_B$  value differed significantly from 1.0 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns,  $P > 0.05$ ) according to Morisita's  $F$ -test method (Morisita 1962). **a** and **c** Total number of hills including diseased plants in the plot A and B, respectively. **b** and **d** Number of hills including diseased plants at each observation in the plot A and B, respectively.





**Fig. 4-14** Disease progress pattern of secondary dissemination in 2010.

One cell corresponds to one hill of adzuki bean plants. ● indicates source of infection. Black to gray colored cells mean hills of diseased plant newly found.



**Fig.4-15** Morisita's  $I_B$  and  $F$  values for diseased plants with bacterial stem rot of adzuki bean in the test fields which diseased plant were transplanted, in 2010.

Based on the data in Fig. 4-14,  $I_B$  values were calculated. *Asterisks* indicate  $I_B$  value differed significantly from 1.0 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns,  $P > 0.05$ ) according to Morisita's  $F$ -test method (Morisita 1962). **a, c,** and **e** Total number of hills including diseased plants in the plot A, B and C, respectively. **b, d,** and **f** Number of hills including diseased plants at each observation in the plot A, B, and C, respectively.

### 3. 野良生えによる発病

前項までの試験を含め、本病の蔓延は種子伝染由来の発病個体に由来することは明確である。アズキ栽培跡の圃場では、収穫後の残渣に含まれる子実および収穫しきれなかった子実が圃場内に残存し、翌年以降長期にわたり出芽し雑草化する、いわゆる‘野良生え’が問題となる。したがって、本病が発生した圃場で生じた保菌子実が残存し、野良生えアズキとなることは必然である。そこで、野良生えアズキが発病し、伝染源となりうるか明らかにする必要がある。

#### 1) 目的

本病発生圃場跡における野良生えアズキが発病し、伝染源となりうるか検討する

#### 2) 方法

試験は 2010 年および 2011 年に上川農試場内圃場で実施した。2010 年は 2009 年実施本病試験圃場跡の一部あるいは全体、2011 年は 2009 年および 2010 年実施試験圃場跡 (1296 m<sup>2</sup>, 茎葉発病度 41–100) 全体に生じた野良生えアズキを抜き取り、発病の有無を調査した。そのうち、2010 年に実施した 2009 年発生圃場跡の調査は、7 月 14 日に前年茎葉発病度 31–87 であった試験圃場跡 132.5 m<sup>2</sup>, 7 月 23 日および 8 月 2 日に前年茎葉発病度 99–100 であった試験圃場跡 129.6 m<sup>2</sup> の野良生えを調査対象とした。また、2009 年実施の試験圃場跡全体 437.55 m<sup>2</sup> を 8 月 6 日にプラウで耕耘した後生じた野良生えを対象に 9 月 8 日に調査した。

初生葉および初生葉節に病徴が認められた場合は種子伝染による

発病とし、第1本葉より上位の葉身にのみ病斑が認められた場合は、野良生え個体間における二次伝染による発病とした。2011年の試験は種子伝染による発病のみ計数した。

### 3) 結果

試験結果を Table 4-2 および Table 4-3, Table 4-4 に示した。

2009年発生圃場跡では、翌2010年は野良生え個体間の二次伝染による発病も含まれていたが、8.9%という高い割合で野良生えアズキに種子伝染と判断される発病が認められた。翌々年の2011年の野良生えの発生が少なかったが、種子伝染由来の発病が1.6%検出された (Table 4-3)。

2010年発生圃場跡では、翌2011年に、約34000の野良生えアズキのうち0.4%の個体で種子伝染由来の発病が認められた。

### 4) 考察

本病発生圃場跡において、翌年、野良生えアズキは大量に生じ、そのうち8.9%あるいは0.4%の個体に種子伝染由来の発病が認められた。インゲンマメかさ枯病の圃場での種子伝染による発病は土壌の温度と湿度によって大きく左右される、すなわち低温および過湿土で発生が多くなることが知られている (北海道立北見農業試験場1972)。アズキ茎腐細菌病の場合、播種前の種子に病原細菌を浸漬接種しても、すべてが発病するわけではない (第6章参照)。したがって、野良生えアズキにおける発病の年次間差は、残存種子の保菌の状況に加えて、野良生えとなった当年の気象状況等、種子伝染由来の発病が生じる条件が年次により異なったことが推察された。一方、

試験の翌々年の7月に生じた野良生えにおいても発病が認められたことから、残存種子内外に存在する病原細菌は少なくとも1年以上自然条件下で生存し、発病に関与することが明らかとなった。インゲンマメかさ枯病の場合、谷井ら(1976)は、インゲンマメ種子表面上の病原細菌は15℃恒温で12-24か月以上生存し、病原性を有することを報告している。インゲンマメの場合、北海道内で越冬後野良生えが生じることはほとんどないが、アズキは少なくとも後作3作以降も長期間にわたって野良生えが生じる。圃場内に残存した種子が病原細菌を保菌している場合、長期にわたり伝染源となる可能性がある。

以上のことから、本病が発生した圃場跡に生じる野良生えアズキは、少なくとも2作後まで伝染源になることが示唆された。病原細菌に汚染された種子が長期間残存し、次作のアズキ栽培において本病の伝染源となる可能性があるため、適切に管理する必要がある。

**Table 4-2** Incidence of bacterial stem rot on adzuki bean seedlings voluntarily developed in 2010 from seeds which were remained in the field soil since the previous year

DSI in previous year	Date of investigation	The number of investigated plants	Rate of diseased plants %	
			Seed-borne	Secondary infection
31—87	July 4	1750	4.3	3.4
99—100	July 23	500	14.4	36.4
	August 2	1000	19.4	47.3
31—100	September 8	720	1.4	0
Total			8.9	18.0

*DSI* Disease severity index

**Table 4-3** Incidence of bacterial stem rot on adzuki bean seedlings voluntarily developed in 2011 from seeds which were remained in the field soil since 2009

Date of investigation	The number of investigated plants	Rate of diseased plants %
June 13	26	0
June 22	23	0
July 28	21	9.5
August 11	3	0
August 22	31	0
September 13	12	0
September 20	5	0
September 26	4	0
October 4	1	0
Total		1.6

**Table 4-4** Incidence of bacterial stem rot on adzuki bean seedlings voluntarily developed in 2011 from seeds which were remained in the field soil since the previous year

Date of investigation	The number of investigated plants	Rate of diseased plants %
June 13	1316	0.1
June 16	1163	0.0
June 22	4136	0.0
July 12	4582	0.3
July 21	9125	1.0
July 28	536	1.1
August 11	550	0.7
August 22	4983	0.1
August 31	2577	0.7
September 7	2899	0.1
September 13	1555	0.1
September 20	382	0.0
September 26	67	4.5
October 4	364	0.8
Total		0.4



#### 4. 土壌伝染

Tanii and Baba (1979) によると，本病の主要な伝染源は種子伝染による発病個体であり，土壌伝染しないとされる．一方，インゲンマメかさ枯病は，病原細菌が乾燥罹病葉で生存し，13 か月以上感染力が保たれていることが示されている (Grogan and Kimble 1967). 本病における罹病残渣を含めた土壌伝染の可能性について，改めて検討する必要がある．

##### 1) 目的

本病の土壌伝染による発生の有無を明らかにする．

##### 2) 方法

試験は 2011 年に上川農試場内柀圃場で (1.8×1.8 m<sup>2</sup>) 実施した．土壌伝染の有無を検討するため，前年の 2010 年 9 月 8 日に以下の処理区を設けた．

- ① 2010 年に本病が発生．初生葉節以上の地上部を刈り取り，試験区外に搬出した (胚軸，根部および落葉した葉は試験区内に残存)．12 区設置した．
- ② ①の状態に加え，罹病茎葉を生重 8 kg (約 2.5 t/10 a に相当) すき込んだ．3 区設置した．
- ③ ①の状態に加え，脱穀後の乾燥罹病残渣を乾物重 3.3 kg (約 1 t/10 a に相当) すき込んだ．3 区設置した．

すき込んだ罹病残渣はいずれも品種‘しゅまり’である．翌 2011 年にこれらの試験区に本病の病原細菌の汚染が無いと考えられる十勝農試産のアズキ品種‘斑小粒系-1’を畦間 66cm，株間 20cm，4 粒

の栽植密度で播種し、継時的に発病状況を調査した。‘しゅまり’の野良生えは随時抜き取った。なお、‘しゅまり’の胚軸色および葉柄色が緑色であるのに対し、‘斑小粒系-1’は暗紫色であるため、両品種の識別は可能である。試験は3回行った。試験Ⅰは5月31日に播種し、6月28日、7月7日および16日に調査を行い、7月20日に地際を刈り、地上部を全て搬出した。同一の試験区に試験Ⅱとして、試験Ⅰと畦方向を同一とし、7月21日に播種し、8月17日および24日に発病調査を行い、8月30日に全株抜き取り、搬出した。さらに、引き続き試験Ⅲとして、試験Ⅰおよび試験Ⅱと垂直の畦方向で8月30日に播種し、9月13日、20日および26日に発病調査を行った。

### 3) 結果

一部試験区において、アズキ褐斑細菌病が発生したため、当該試験区の数値を除き、アズキ茎腐細菌病による病徴を呈した発病個体率のみ Table 4-5 に示した。両病害は病徴により識別した。

前年罹病アズキの落葉、胚軸および根部が残存する処理区（処理①）においてすべての試験を通じて発病個体が認められた（Fig. 4-16）。乾燥罹病残渣を追加し、すき込んだ処理区（処理③）においても試験Ⅲを除き発病個体が認められた。一方、罹病茎葉をすき込んだ処理区（処理②）では発病が認められなかった。

### 4) 考察

すべての試験で発病が認められた処理①の土壌中には落葉した罹病葉および胚軸以下根部が含まれている。土壌中に移行した病原細菌

菌が伝染源となった、出芽までに罹病残渣に接触して感染した、あるいは、出芽後に土壌からの跳ね上がりなどより感染したといった伝染源と感染のタイミングが推察されるものの、病徴などから判断することは難しく、詳細は定かではない。インゲンマメかさ枯病では罹病葉上で感染力を保持したまま病原細菌が生存する (Grogan and Kimble 1967) ことから、本試験でも同様に罹病残渣上で感染力を保持した病原細菌が生存し、伝染源となったことが考えられる。また、前年‘しゅまり’の野良生えの発病もわずかに認められた(データ省略)が、同一枠内の‘斑小粒系-1’には発病が認められなかったため、野良生えが伝染源となった可能性は低い。一方、乾燥罹病残渣を追加した処理③では、一部発病が助長されている場合があったが、定性的な傾向ではなく、追加した罹病残渣の発病への関与は不明である。また、生罹病残渣を追加した処理②で発病が認められなかったのは、比較的水分の高い生残渣をすき込んだことにより、植物組織を分解する土壌中の微生物が活性化し、本病の病原細菌の生存に影響を与えたことが考えられるが、詳細は定かではない。

Tanii and Baba (1979) は、ポットに詰めた前年に多発した圃場の土壌にアズキを播種し、発病を認めなかったことから、本病は土壌伝染しないと考察している。本病は茎に発病し、水浸状の病斑や腐敗は胚軸にも及ぶことが観察されている。生産現場では、大部分の葉が落葉あるいは完全に落葉してから、胚軸以下を残して刈り取るため、本試験ではこのような条件を再現したといえる。罹病残渣が含まれない土壌中の病原細菌が発病を引き起こすという、純粋な意味での土壌伝染の有無については明らかとはならなかったが、病原細菌を含む土壌、あるいは、土壌中に残存した罹病残渣が伝染源と

なり，本病の発病に関与することが示された．したがって，過去に本病が発病した圃場では，野良生えに加えて，罹病残渣を含む土壌が伝染源となって，再び発病する恐れがあることが示唆された．

**Table 4-5** Incidence of bacterial stem rot of adzuki bean seemed to be soil-borne

Treatment to the soil in the field where bacterial stem rot of adzuki bean occurred in previous year	Trial I		Trial II		Trial III	
	The number of investigated plants	Rate of diseased plants %	The number of investigated plants	Rate of diseased plants %	The number of investigated plants	Rate of diseased plants %
Residue of hypocotyl and root from diseased plants	670	1.5	706	3.0	700	2.4
Residue of hypocotyl and root from diseased plants in addition to flesh diseased leaves and stems	146	0	158	0	154	0
Residue of hypocotyl and root from diseased plants in addition to dry diseased plant residue	85	5.9	106	10.4	155	0



**Fig. 4-16** Reddish brown and necrotic lesions on primary leaf on cv. Buchi-shoryu-line-1 seemed to be infected from diseased plant residue in the soil in the field where bacterial stem rot of adzuki bean occurred in previous year

## 第5章 アズキ茎腐細菌病による被害

### 1. 発病と収量の関係

本病の発生圃場を観察すると、アズキ生育後期には、罹病葉の早期落葉のみならず、茎部の罹病による立枯れ症状や折損が認められ、収量に与える影響は甚大であると推察された。本病の収量に与える影響は明らかでなく、この解明は防除対策を講じるうえで重要な知見となる。

#### 1) 目的

本病のアズキ収量へ与える影響を明らかにする。

#### 2) 方法

試験は2009年および2010年に上川農試場内圃場で実施した。

播種は2009年が5月26日に、2010年は6月2日に行った。2009年は前年発生圃場産の品種‘エリモショウズ’および病原細菌の汚染がないと考えられる十勝農試産の品種‘しゅまり’の2品種を供試し、2010年は前年発生圃場産の品種‘しゅまり’あるいは十勝農試産の品種‘しゅまり’を供試した。本病の発生程度が試験区ごとに異なるように、病原細菌の接種、発病株の移植あるいは抜き取り、種子消毒、殺菌剤の茎葉散布等の感染圧および防除圧が異なる処理を実施した。殺菌剤には展着剤（商品名‘グラミンS’、ホクサン株式会社）を10000倍加用した。処理の詳細はTable 5-1、Table 5-2、Table 5-3 および Table 5-4 に示した。

発病調査は茎葉と莢に分けて行った。試験区内全株を対象とし、

株毎に Table 4-1 に従って、出芽直後から継時的に調査し、発病株率および発病度を算出した。

生育および収量調査は 1 区あたり生育の中庸な 40 株を対象とした。成熟期 (2009 年は 9 月 14-19 日, 2010 年は 9 月 2-7 日) に主茎長および株あたりの着莢数を調査後、地上部を刈り取り、風乾した後脱穀、4.2 mm 篩で調製し、子実重および百粒重、屑粒率を調査した。子実重および百粒重は水分率 15%の補正值とした。

解析は試験に供試した種子の由来ごとに区分して行った。すなわち、2009 年は、(I) 2008 年富良野市発生圃場より得られた‘エリモショウズ’ (以下, 試験 I), および, (II) 種子を病原細菌懸濁液 (AZK-11 菌株,  $1.6 \times 10^9$  cfu/ml) に 3 時間浸漬するか, あるいは, 発病株とともに栽培した本病無発生の十勝農試産‘しゅまり’ (以下, 試験 II), 2010 年は, (III) 2009 年上川農試内の発生圃場より得られた‘しゅまり’ (以下, 試験 III), および, (IV) 伝染源である発病株とともに栽培した本病無発生の十勝農試産‘しゅまり’ (以下, 試験 IV) に区分した。発病度と収量構成要素等との相関はピアソンの積率相関係数を算出し、解析した。発病と子実重比は一次回帰分析を行った。

### 3) 結果

調査時期別の発生程度とアズキ子実重とのピアソンの積率相関係数  $r$  を試験区分ごとに Table 5-5, Table 5-6, Table 5-7 および Table 5-8 に示した。試験期間を通じて、子実重と発病株率および茎葉発病度との間には概ね有意 ( $P < 0.05$ ) な負の相関が認められた。特に、茎葉発病度との相関が高く、試験 I では播種後 49 日 ( $r = -0.94$ ), 試験



II は播種後 42 日 ( $r=-0.97$ ), 試験 III は播種後 54 日 ( $r=-0.87$ ) および試験 IV は播種後 68 日 ( $r=-0.92$ ) において相関係数の絶対値が最大であった。一方, アズキ子実重と莢発病度との間には一定の相関関係は認められなかった。

上記の播種後日数における各試験の処理区の発病度とアズキの生育および一莢内粒数を除く各収量構成要素のデータを試験区分ごとにそれぞれ Table 5-9, Table 5-10, Table 5-11 および Table 5-12 に示した。さらに, 茎葉発病度と収量構成要素とのピアソンの積率相関係数を Table 5-13 に示した。茎葉発病度と百粒重および着莢数との間に負の相関が認められ, 屑粒率とは正の相関が高かった。

開花期 (2009 年は播種後 59 日, 2010 年は播種後 47 日) 近日における茎葉発病度およびアズキ子実重の散布図を Fig. 5-1 に示した。茎葉の発病度の増加に伴って, アズキ子実重は直線的に減少し, 発病度 50 以上の場合, 2009 年は 30% 以上, 2010 年は 50% 以上子実重が減少した。

#### 4) 考察

防除処理等の違いによりアズキ茎腐細菌病の発生が異なる条件下における発病とアズキ子実重の関係について, 種子の由来別に 4 区分し, 解析した。その結果, 茎葉の発病度の増加に伴って, アズキ子実重は直線的に減少した。また, 2009 年は発病度と子実重との相関が開花期前でより高く, 一方, 2010 年は開花期後で相関がより高い傾向であった。これは 2009 年と 2010 年で種子伝染由来の発病の初発日がやや異なった (Fig. 4-6 および Fig. 4-7) のと同時に, その年の気象条件により, 全体の発病の伸展が異なったことに起因する

と考えられるが、開花期における茎葉発病度と子実重との相関が概ね高かった。そこで開花期を目安にして、本病の発病がアズキ子実重に与える影響を検討したところ、開花期近日の発病度が 50 以上の場合、2009 年は子実重が 30%以上減少し、2010 年は 50%以上減少した。年次によって傾向はやや異なったが、いずれにしても子実重の減少は大きく、本病の発生によるアズキの減収被害は甚大であることが明らかとなった。また、茎葉発病度と各収量構成要素との相関関係から、本病の発生により着莢数が減少し、さらに、子実の登熟が阻害されることによって減収すると推察された。なお、‘エリモシヨウズ’および‘しゅまり’との品種間で明瞭な差は認められなかった。

**Table 5-1** Treatments to analyze the yield loss by bacterial stem rot on cv. Erimo-shozu in 2009 (Trial I)

Treatment	DSI on pods in previous year	Seed dressing	Removing diseased plant <sup>a</sup>	Period of foliage application <sup>b</sup>	The area of a plot m <sup>2</sup>	The number of plots
A	8.3	EKT <sup>c</sup>	Yes	35–97	23.0	3
B	8.3	EKT	Yes	35–52	23.0	3
C	8.3	EKT	Yes	44–80	23.0	2
D	8.3	EKT	No	Not applied	11.5	3
E	8.3	No	Yes	Not applied	23.0	3
F	8.3	DKT	No	Not applied	11.5	3
G	0	No	No	Not applied	23.0	3
H	40.0	No	No	Not applied	23.0	3

*DSI* Disease severity index

<sup>a</sup> Diseased plants were continued to remove until 41 days after sowing

<sup>b</sup> Period indicates days after sowing. Foliage application was rotated with kasugamycin and copper wettable powder, copper granular wettable powder, or dimethomorph and copper wettable powder

<sup>c</sup> 3 g ECP, kasugamycin and thiuram powder per 1 kg of seeds

<sup>d</sup> 3 g diazinon, kasugamycin and thiuram powder per 1 kg of seeds

**Table 5-2** Treatments to analyze the yield loss by bacterial stem rot on cv. Syumari in 2009 (Trial II)

Treatment	Source of infection	Seed dressing	Removing diseased plant	Period of foliage application <sup>a</sup>	The area of a plot m <sup>2</sup>	The number of plots
I	Seed <sup>b</sup>	EKT <sup>d</sup>	No	Not applied	14.4	3
J	Seed	DKT <sup>e</sup>	No	Not applied	14.4	3
K	Seed	No	No	Not applied	14.4	3
L	Diseased plant <sup>c</sup>	EKT	No	35–56	22.0	3
M	Diseased plant	EKT	No	35–97	22.0	3
N	Diseased plant	EKT	No	Not applied	22.0	2

<sup>a</sup> Period indicates days after sowing. Foliage application was rotated with kasugamycin and copper wettable powder, copper granular wettable powder, or dimethomorph and copper wettable powder

<sup>b</sup> Healthy seeds were soaked in bacterial suspension of BSRA isolate AZK-11, and then were sowed

<sup>c</sup> Eight diseased plants were transplanted at equal intervals in the plot

<sup>d</sup> 3 g ECP, kasugamycin and thiuram powder for 1 kg of seeds

<sup>e</sup> 3 g diazinon, kasugamycin and thiuram powder per 1 kg of seeds

**Table 5-3** Treatments to analyze the yield loss on infected seeds with bacterial stem rot in 2010 (Trial III)

Treatment	Rate of diseased pods in previous year %	Seed dressing <sup>a</sup>	Removing diseased plant <sup>b</sup>	Removing both adjacent plants to diseased one	Period of foliage application <sup>c</sup>	The area of a plot m <sup>2</sup>	The number of plots
a	1.9	Yes	Yes	Yes	20–62 <sup>d</sup>	21	1
b	1.9	Yes	Yes	No	14–62 <sup>d</sup>	21	3
c	1.9	Yes	Yes	No	14–62 <sup>e</sup>	21	3
e	1.9	Yes	Yes	Yes	14–41 <sup>d</sup>	21	3
g	1.8	No	No	No	Not applied	21	2
h	0	No	No	No	Not applied	21	1
i	17.0	No	No	No	Not applied	21	2

<sup>a</sup> Dressing with 3 g ECP, kasugamycin and thiuram powder for 1 kg of seeds

<sup>b</sup> Diseased plants were continued to remove until 48 days after sowing

<sup>c</sup> Period indicates days after sowing. Foliage application was rotated with copper granular wettable powder or dimethomorph and copper wettable powder

<sup>d</sup> Application at intervals of 6 or 7 days

<sup>e</sup> Application at intervals of 10 days

**Table 5-4** Treatments to analyze the yield loss by secondary infection<sup>a</sup> with bacterial stem rot in 2010 (Trial IV)

Treatment	Seed dressing <sup>b</sup>	Target of removing plant <sup>c</sup>	Period of foliage application <sup>d</sup>	The area of a plot m <sup>2</sup>	The number of plots
j	Yes	21 plants around a source of infection	13–69	21	2
k	Yes	Diseased plant	13–55	21	3
l	Yes	Only source of infection	13–70	21	3
m	Yes	21 plants around a source of infection	Not applied	21	3

<sup>a</sup> Diseased plant as a source of infection was transplanted at the center of plot

<sup>b</sup> Dressing with 3 g ECP, kasugamycin and thiuram powder for 1 kg of seeds

<sup>c</sup> Target plants were removed at 6 days after transplanting a source of infection

<sup>d</sup> Period indicates days after sowing. Foliage application was rotated with copper granular wettable powder or dimethomorph and copper wettable powder

**Table 5-5** Pearson's correlation coefficient between weight of harvested pulses of adzuki bean and incidence or disease severity index of bacterial stem rot on several treatments on cv. Erimo-shozu in 2009 (Trial I)

Date of investigation	( Days after sowing )	Incidence of disease	DSI on leaves and stems	DSI on pods
June 22	( 27 )	-0.76 *** <sup>a</sup>	-0.71 ***	
July 5	( 40 )	-0.75 ***	-0.76 ***	
July 14	( 49 )	-0.79 ***	-0.94 ***	
July 23	( 58 )	-0.65 ***	-0.91 ***	
July 29	( 64 )	-0.58 **	-0.90 ***	
August 5	( 71 )	-0.58 **	-0.86 ***	
August 12	( 78 )	-0.44 *	-0.83 ***	0.16
August 19	( 85 )	-0.48 *	-0.81 ***	0.27
August 24	( 90 )	-0.40	-0.73 ***	0.42 *
August 31	( 97 )	-0.42 *	-0.70 ***	0.31

n=23

*DSI* Disease severity index

<sup>a</sup> Asterisks \*, \*\* and \*\*\* indicate to be significant at the level of 5%, 1% and 0.1%, respectively

**Table 5-6** Pearson's correlation coefficient between weight of harvested pulses of adzuki bean and incidence or disease severity index of bacterial stem rot on several treatments on cv. Syumari in 2009 (Trial II)

Date of investigation	( Days after sowing )	Incidence	DSI on leaves and stems	DSI on pods
June 22	( 27 )	-0.81 *** <sup>a</sup>	-0.80 ***	
July 1	( 36 )	-0.96 ***	-0.96 ***	
July 7	( 42 )	-0.93 ***	-0.97 ***	
July 14	( 49 )	-0.79 ***	-0.96 ***	
July 23	( 58 )	-0.71 **	-0.93 ***	
July 29	( 64 )	-0.73 ***	-0.93 ***	
August 5	( 71 )	-0.72 **	-0.91 ***	
August 12	( 78 )	-0.76 **	-0.88 ***	-0.14
August 19	( 85 )	-0.71 **	-0.86 ***	-0.27
August 24	( 90 )	-0.70 **	-0.81 ***	-0.07
August 31	( 97 )	-0.69 **	-0.80 ***	0.27

n=17

*DSI* Disease severity index

<sup>a</sup> Asterisks \*, \*\* and \*\*\* indicate to be significant at the level of 5%, 1% and 0.1%, respectively



**Table 5-7** Pearson's correlation coefficient between weight of harvested pulses of adzuki bean and incidence or disease severity index of bacterial stem rot on several treatments in 2010 using infected seeds (Trial III)

Date of investigation	( Days after sowing )	Incidence of disease	DSI on leaves and stems	DSI on pods
June 21	( 19 )	-0.19	-0.20	
June 28	( 26 )	-0.64 ** <sup>a</sup>	-0.65 **	
July 5	( 33 )	-0.75 **	-0.71 **	
July 13	( 41 )	-0.83 **	-0.80 ***	
July 20	( 48 )	-0.68 **	-0.85 ***	
July 26	( 54 )	-0.58 *	-0.87 ***	
August 2	( 61 )	-0.33	-0.86 ***	
August 9	( 68 )	-0.21	-0.83 ***	
September 2	( 92 )	N. A. <sup>b</sup>	-0.80 ***	0.77 ***

n=15

*DSI* Disease severity index

<sup>a</sup> Asterisks \*, \*\* and \*\*\* indicate to be significant at the level of 5%, 1% and 0.1%, respectively

<sup>b</sup> Not analyzed

**Table 5-8** Pearson's correlation coefficient between weight of harvested pulses of adzuki bean and incidence or disease severity index by secondary infection with bacterial stem rot on several treatments in 2010 (Trial IV)

Date of investigation	( Days after sowing )	Incidence of disease	DSI on leaves and stems	DSI on pods
July 13	( 41 )	-0.61 * <sup>a</sup>	-0.60 *	
July 20	( 48 )	-0.63 *	-0.66 *	
July 26	( 54 )	-0.69 *	-0.69 *	
August 2	( 61 )	-0.76 **	-0.88 ***	
August 9	( 68 )	-0.65 *	-0.92 ***	
September 2	( 92 )	N. A. <sup>b</sup>	-0.62 *	0.20

n=11

*DSI* Disease severity index

<sup>a</sup> Asterisks \*, \*\* and \*\*\* indicate to be significant at the level of 5%, 1% and 0.1%, respectively

<sup>b</sup> Not analyzed

**Table 5-9** Analytical data for correlation between yield components or growth of adzuki bean and disease severity at 49 days after sowing on cv. Erimo-shozu in 2009 (Trial I)

Treatment	Incidence %	DSI	Weight of harvested pulses kg/a	Weight per one hundred pulses g	Rate of weight of imperfect pulses %	Height of main stem cm	The number of pods per hill
A	14.2	3.5	29.9	11.2	1.1	40.4	49.6
A	23.0	5.7	27.9	11.4	0.9	46.9	48.3
B	21.4	6.2	27.7	11.3	2.9	38.8	46.4
B	37.5	9.4	33.0	10.9	3.7	38.8	55.6
B	32.7	10.2	28.8	10.7	6.6	38.5	52.3
A	44.8	12.6	26.9	10.3	1.8	42.6	48.3
C	50.7	13.3	27.0	10.1	2.2	36.5	49.8
D	76.5	21.2	28.0	11.1	1.9	42.5	47.6
E	74.4	23.4	20.3	9.6	2.5	31.9	42.2
D	83.1	24.2	26.5	10.5	1.6	46.2	46.1
F	84.0	25.0	23.7	10.7	1.2	44.2	42.5
D	78.9	26.3	22.6	9.9	9.1	43.0	43.8
F	92.7	28.4	20.9	10.0	8.1	44.3	44.0
F	96.4	28.9	25.0	10.5	9.0	46.8	45.6
E	97.2	31.4	19.5	10.1	7.9	37.7	38.2
C	89.6	36.1	19.6	9.8	2.2	37.0	37.3
E	100	44.1	17.2	9.3	7.4	35.3	36.9
G	100	40.2	20.2	9.8	2.5	N. A. <sup>a</sup>	N. A.
G	98.4	45.2	13.0	9.4	7.3	N. A.	N. A.
G	100	48.0	17.7	9.2	3.9	N. A.	N. A.
H	99.5	50.4	12.2	8.7	4.8	N. A.	N. A.
H	100	52.9	12.8	8.5	10.9	N. A.	N. A.
H	100	54.3	10.3	7.9	11.1	N. A.	N. A.

*DSI* Disease severity index on leaves and stems

<sup>a</sup> Not analyzed

**Table 5-10** Analytical data for correlation between yield components or growth of adzuki bean and disease severity at 42 days after sowing on cv. Syumari in 2009 (Trial II)

Treatment	Incidence %	DSI	Weight of harvested pulses kg/a	Weight per one hundred pulses g	Rate of weight of imperfect pulses %	Height of main stem cm	The number of pods per hill
M	0	0.0	27.3	10.7	1.7	62.7	45.3
M	0	0.0	26.5	10.5	5.4	68.0	45.0
L	0	0.0	29.3	10.2	1.4	63.8	49.6
M	0	0.0	25.4	10.8	2.9	64.8	43.3
L	2.8	0.3	24.0	10.3	2.0	62.6	42.3
L	1.4	0.3	26.6	10.4	2.9	65.5	45.0
N	8.5	1.6	28.3	10.4	2.2	58.2	47.1
N	11.3	2.5	26.9	10.7	1.6	66.4	44.1
I	34.6	26.3	18.1	9.0	7.9	N. A. <sup>a</sup>	N. A.
I	24.2	28.0	19.4	9.0	3.7	N. A.	N. A.
I	41.4	32.9	20.6	9.2	6.4	N. A.	N. A.
J	45.3	34.1	16.8	8.6	8.9	N. A.	N. A.
J	45.8	37.0	19.0	8.9	5.1	N. A.	N. A.
J	47.9	37.1	16.7	8.7	9.0	N. A.	N. A.
K	52.2	46.3	11.2	7.7	10.3	N. A.	N. A.
K	60.6	56.4	10.3	7.9	11.8	N. A.	N. A.
K	61.3	60.7	7.2	7.3	13.3	N. A.	N. A.

*DSI* Disease severity index on leaves and stems

<sup>a</sup> Not analyzed

**Table 5-11** Analytical data for correlation between yield components or growth of adzuki bean cv. Syumari and disease severity at 54 days after sowing on infected seed in 2010 (Trial III)

Treatment	Incidence %	DSI	Weight of harvested pulses kg/a	Weight per one hundred pulses g	Rate of weight of imperfect pulses %	Height of main stem cm	The number of pods per hill
e	33.3	10.0	21.8	10.0	5.2	75.6	45.9
b	67.4	21.3	26.3	9.4	5.3	65.6	45.9
c	64.6	23.7	23.7	9.6	5.3	71.0	41.3
c	71.1	26.4	21.7	10.5	5.9	72.6	44.6
a	86.0	33.8	16.1	8.9	7.4	74.3	37.9
b	99.0	39.3	21.2	9.3	4.5	69.6	42.1
e	96.6	42.9	21.0	8.8	9.8	67.0	43.3
e	98.8	44.4	15.8	9.4	7.9	78.1	41.4
c	99.3	49.1	22.6	9.0	4.4	67.6	45.0
h	100	57.0	19.3	8.8	8.0	65.6	41.5
g	100	76.1	11.5	7.3	8.9	68.0	27.9
g	100	83.3	11.2	7.9	13.0	71.1	35.3
g	100	92.1	10.2	7.5	14.0	68.4	29.6
i	100	93.0	12.8	7.9	10.0	64.0	31.2
i	100	94.5	12.3	7.6	12.0	66.6	33.6

*DSI* Disease severity index on leaves and stems

**Table 5-12** Analytical data for correlation between yield components or growth of adzuki bean cv. Syumari and disease severity by secondary infection at 68 days after sowing in 2010 (Trial IV)

Treatment	Incidence %	DSI	Weight of harvested pulses kg/a	Weight per one hundred pulses g	Rate of weight of imperfect pulses %	Height of main stem cm	The number of pods per hill
j	77.9	44.2	32.0	9.0	3.6	50.3	59.6
j	86.1	46.4	34.9	9.7	4.1	69.9	61.6
l	82.3	59.5	21.1	9.8	3.7	66.9	33.8
k	87.2	63.9	22.2	9.6	3.3	70.8	34.0
l	92.6	66.6	18.7	8.9	6.1	67.7	40.6
k	97.4	68.4	18.4	9.2	8.5	73.5	32.3
l	100	72.2	21.4	9.7	4.9	63.9	34.8
m	100	72.4	16.8	8.5	8.2	68.6	32.5
k	97.5	77.7	17.1	8.5	9.5	66.8	33.7
m	99.0	78.4	16.3	9.0	11.4	66.8	33.5
m	100	89.7	14.0	8.3	9.1	71.1	25.4

*DSI* Disease severity index on leaves and stems

**Table 5-13** Pearson's correlation coefficient between disease severity index of bacterial stem rot and the yield components or growth of adzuki bean

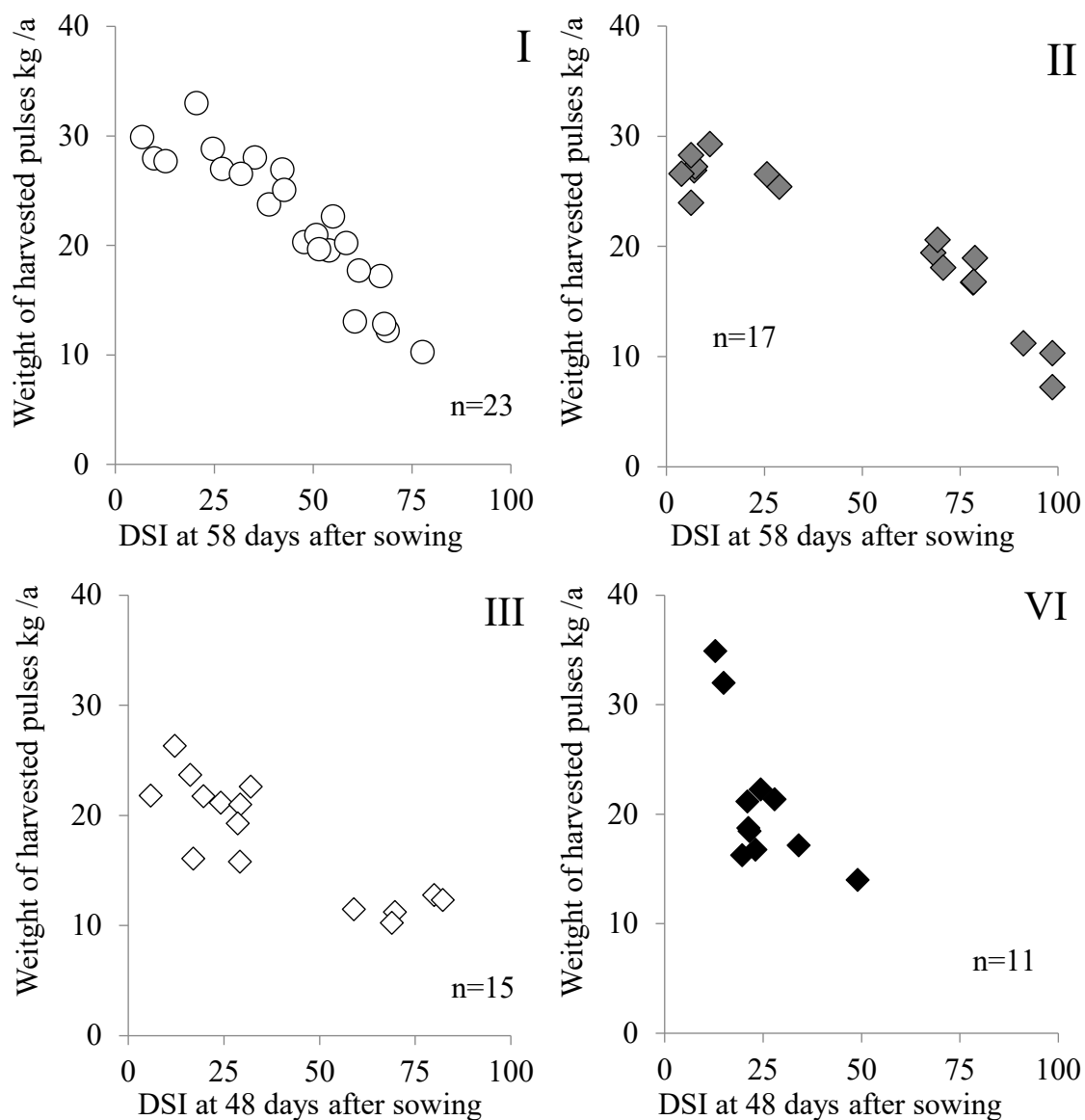
Trial	Year	Cultivar	Source of infection	Days after sowing <sup>a</sup>	Weight per one hundred pulses	Rate of weight of imperfect pulses	The number of pods per hill	Height of main stem
I	2009	Erimo-shozu	Infected seeds	49	-0.90 *** <sup>b</sup> (n=23) <sup>c</sup>	0.57 ** (n=23)	-0.84 *** (n=17)	-0.14 (n=17)
II	2009	Syumari	Inoculated seeds or Diseased plant	42	-0.98 *** (n=17)	0.91 *** (n=17)	N. A. <sup>d</sup>	N. A.
III	2010	Syumari	Infected seeds	54	-0.92 *** (n=15)	0.84 *** (n=15)	-0.86 *** (n=15)	-0.48 (n=15)
IV	2010	Syumari	Diseased plant	68	-0.57 (n=11)	0.77 ** (n=11)	-0.88 *** (n=11)	0.49 (n=11)

<sup>a</sup> The timing when Pearson's correlation coefficient between weight of harvested pulse and disease severity index of bacterial stem rot is maximum

<sup>b</sup> Asterisks \*, \*\* and \*\*\* indicate to be significant at the level of 5%, 1% and 0.1%, respectively

<sup>c</sup> The numbers of analyzed plots are indicated in parentheses

<sup>d</sup> Not analyzed



**Fig. 5-1** Correlations between DSI on leaves and stems at the date near flowering period and weight of harvested pulses.

I: cv. Erimo-shozu in 2009 (●). II: cv. Syumari in 2009 (◆). III: cv. Syumari in 2010 which tested seeds were produced in infested field (◇). IV: cv. Syumari which diseased plants as source of infection were transplanted in the plots (◆). DSI indicates disease severity index on leaves and stem. The numbers in the graphs indicate the numbers of analyzed plots.



## 2. 病勢の伸展と子実重の関係

発病調査にあたり，Table 4-1 のとおり発病程度を 0-4 の 5 段階設定した．本病の病徴は，葉の軽微な病斑形成から早期落葉，茎部の腐敗および折損，立枯れと変化に富む．防除対策を講じるうえで，防除目標，すなわち，いつの時点でどのくらいの発病程度を許容するかが重要な観点となる．そこで，特定の時期の発病程度とそれ由来するアズキ収量に着目して解析し，防除目標の設定を試みた．

### 1) 目的

特定の発病程度に達した時期別の本病の減収被害を明らかにする．

### 2) 方法

無防除下において，二次伝染由来の発病の早晚による減収被害を検討するため，あるいは，重症化の早晚による減収被害を検討するため，それぞれ，茎葉発病程度 2 あるいは茎葉発病程度 4 に達した播種後日数別に，無作為に 5 株一単位でサンプルを収穫し，水分率 15% に補正した子実重を求めた．すなわち，前項の試験 I の処理 E-H (Table 5-1) および試験 II の処理 I-K および処理 N (Table 5-2) から茎葉発病程度 2 のサンプルを取得し，試験 I の処理 E-H および試験 III の処理 g-i から茎葉発病程度 4 のサンプルを得た．また，茎葉発病程度 2 の比較対象として試験 II において成熟期の茎葉発病程度が 0 であったサンプルを収穫した．同様に，試験 III において播種後 77 日に茎葉発病程度 3 であったサンプルを同様に収穫し，茎葉発病程度 4 の比較対象として供試した．茎葉発病程度 2 に達した播種後日数由来のサンプルの子実重に対して Kruskal-Wallis の検定を実施し

た．一方，茎葉発病程度 4 に達した播種後日数由来のサンプルの子実重に対して Tukey-Kramer の HSD 検定を実施した．

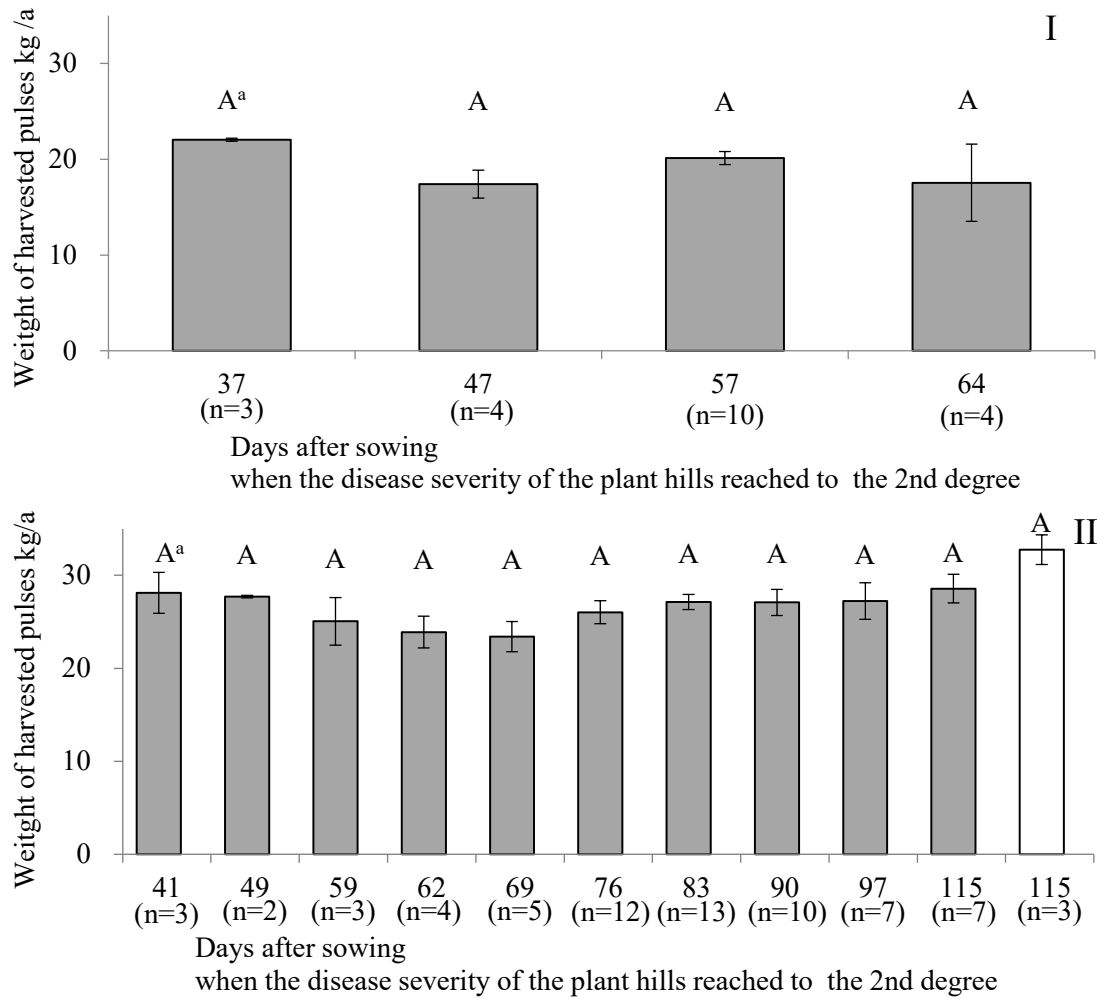
### 3) 結果

茎葉発病程度 2 に達した播種後日数由来のサンプルの子実重および成熟期に茎葉発病程度 0 であったサンプルの子実重を Fig. 5-2 に，茎葉発病程度 4 に達した播種後日数由来のサンプルの子実重および 2010 年に播種後 77 日に茎葉発病程度 3 であったサンプルの子実重を Fig. 5-3 に示した．試験 I および試験 II，試験 III の開花期は，それぞれ播種後 59 日および 59 日，47 日であった．本病無防除下において，いずれの試験においても，茎葉発病程度 2 を確認した播種後日数の子実重に統計学的な有意差は認められなかった．一方，茎葉発病程度 4 に達した播種後日数に対する子実重を比較すると，いずれの試験においても茎葉発病程度 4 に達した播種後日数が早い程，子実重が減少する傾向であった．特に，開花期前に茎葉発病程度 4 に達した場合の子実重の減少が著しく，開花期以降に茎葉発病程度 4 に達した場合と比較して子実重が有意に小さかった．また，試験 III において播種後 77 日に茎葉発病程度 3 であったサンプルの子実重は茎葉発病程度 4 であったサンプルの子実重と比較して統計学的に有意に大きかった．

### 3) 考察

無防除下において，二次伝染による発病の早晩の目安として茎葉発病程度 2 に達した時期別の子実重を得たが，子実重に差は認められなかった．さらに，成熟期の茎葉発病程度 0 のサンプルの子実重

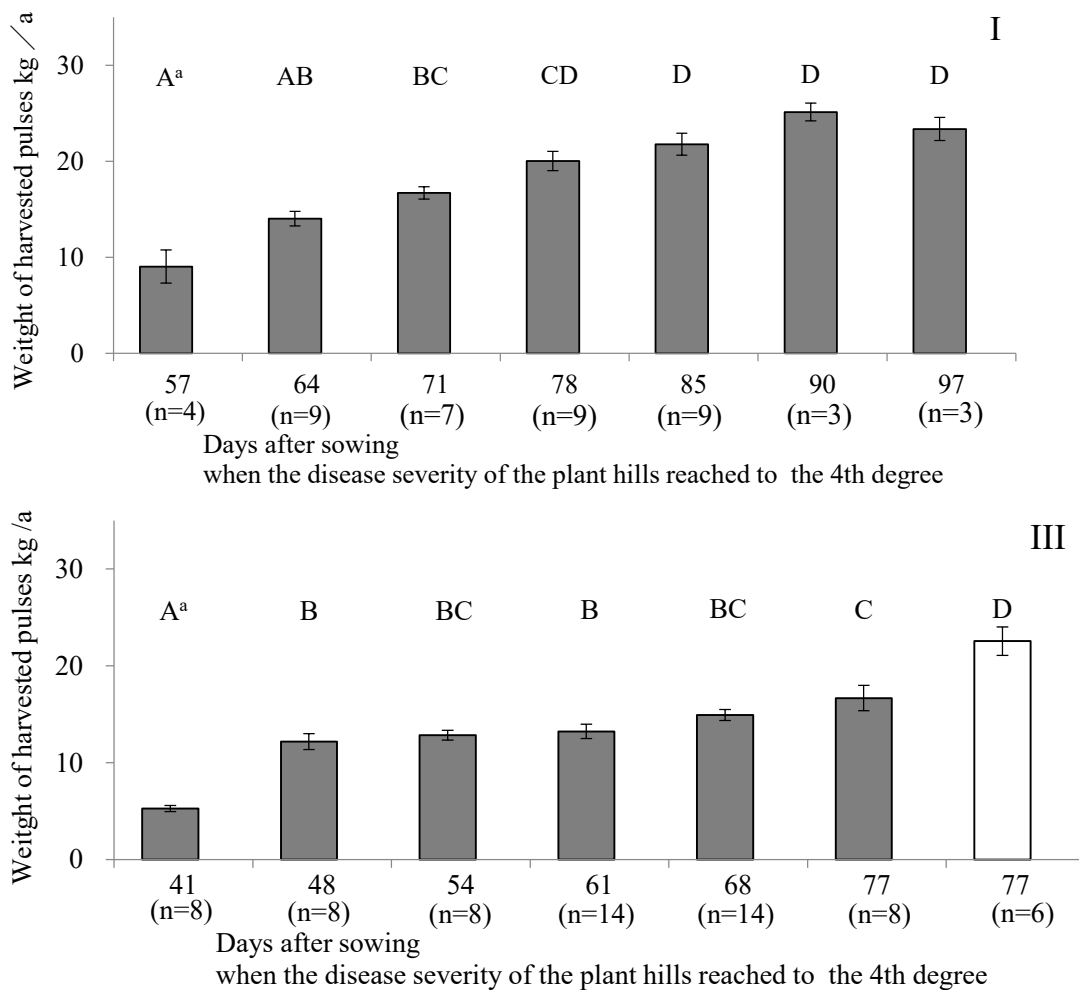
との間にも有意差は認められなかった。また、茎葉発病程度 2 のように葉での病斑形成に止まった場合、減収被害は軽微であると考えられるが、その後の発病の伸展次第で減収被害の程度は異なると考えられることから、茎葉発病程度 2 を目安に防除目標を設定することは困難であると考えられた。一方、茎葉発病程度 4 に達する時期が早い程、すなわち、主茎の病斑が茎を半分以上取り囲むような重篤な病徴を呈する時期が早い程、子実重の減少が大きかった。以上のことから、病徴発現の早晚よりも、その後の病勢の伸展による重症化の早晚の方が、本病による減収被害を及ぼす影響が大きいと考えられた。また、生育後期でも茎葉発病程度 3 と茎葉発病程度 4 の株に由来する子実重の差は明瞭であり、可能な限り重症化しないように発病を抑制することが重要であると考えられる。特に、開花期以前に茎葉発病程度 4 に達した場合の減収が著しいため、本病による著しい減収被害を回避するためには、少なくとも開花期前に茎葉発病程度 4 に達しないように防除する必要があると考えられた。



**Fig. 5-2** Weight of harvested pulses proceeded from plant hills showed the 2nd degree of severity on leaves and stems at a certain day after sowing.

I: cv. Erimo-shozu in 2009. II: cv. Syumari in 2009. White colored bar indicates the weight of harvested pulses proceeded from the plant hills showed no symptom at harvesting period. The numbers of sample units are showed in parentheses. Error bar indicates standard error of the mean.

<sup>a</sup> There is not significant difference on the weight of harvested pulses among days after sowing with the same letter, according to the Kruskal-Wallis test ( $P=0.05$ )



**Fig. 5-3** Weight of harvested pulses proceeded from plant hills showed the 4th degree of severity on leaves and stems at a certain day after sowing.

I: cv. Erimo-shozu in 2009. III: cv. Syumari in 2010. White colored bar indicates the weight of harvested pulses proceeded from the plant hills showed the 3rd degree of disease severity at 77 days after sowing. The numbers of sample units are showed in parentheses. Error bar indicates standard error of the mean.

<sup>a</sup> There is not significant difference on the weight of harvested pulses among days after sowing with the same letter, according to the Tukey-Kramer HSD test ( $P=0.05$ )

### 3. 発生程度の異なる環境下で採種された種子による発病

本病の主要な一次伝染源は病原細菌に汚染された種子であるとされている (Tanii and Baba 1979). 前項において, 発病個体を伝染源とした二次伝染により容易に圃場内に蔓延することが示されたが, 種子の汚染程度の違いが発病に与える影響は明らかでない.

#### 1) 目的

種子の汚染程度の違いが発病や蔓延に与える影響を明らかにする.

#### 2) 方法

試験は 2009 年および 2010 年に上川農試場内圃場で実施した.

2009 年 5 月 26 日に前年収穫時の莢発病度が 0, 8.3 および 40.0 であった試験区から得た品種 ‘エリモショウズ’ の種子をそれぞれ 1 区 23m<sup>2</sup> の試験区 3 区画内に播種した. 同様に 2010 年 6 月 2 日に前年収穫時の発病莢率が平均 0%, 1.8%, 1.9% および 17.6% であった試験区から得た品種 ‘しゅまり’ をそれぞれ 1 区 21 m<sup>2</sup> の試験区 2-3 区画に播種した. なお, 発病莢率 1.8% であった試験区は開花期以降銅顆粒水和剤 500 倍液により成熟期まで防除した.

また, 2010 年 6 月 2 日に 2009 年に本病の発生地域である北海道上川総合振興局管内 A 町の種子生産圃場で生産された一般購入種子 (品種 ‘しゅまり’), および, 本病の未発生地域である十勝総合振興局管内 B 町における種子生産圃場で生産された一般購入種子 (品種 ‘エリモショウズ’) をそれぞれ 388.8 m<sup>2</sup> (40.5 m × 9.6 m) の圃場に播種した. なお, 両圃場は約 30 cm 深の明渠を隔てて, 長辺で隣接しており, 最外畦間の距離は約 7 m であった. いずれの試験にお

いても殺菌剤による種子粉衣および茎葉散布は行わなかった。さらに、‘しゅまり’圃場における発病株の位置関係から得られる分布様式を判定するため、2畦×6株の12株に区分けし、240のコドラーとして、 $I_B$ を算出し、集中度の解析を行った。

### 3) 結果

前年発生圃場産の種子を供試した2009年の試験結果はFig. 5-4に示した。発病個体の病徴および発病株の分布から判断すると、播種後30日の発病個体率は種子伝染による発病で、播種後39日以降は二次伝染による発病個体も含まれると考えられた。播種後30日における種子伝染による発病は、前年収穫時の莢発病度0, 8.3および40.0であった試験区由来の種子で、それぞれ平均2.1%, 1.4%および2.2%と大きな差がなかった。以降、いずれの試験区においても発病が蔓延し、播種後49日にはいずれの試験区においても発病株率がほぼ100%に達した。

前年発生圃場産の種子を供試した2010年の試験結果はTable 5-14に示した。前年収穫時の発病莢率が0%, 1.8%, 1.9%および17.6%であった試験区由来の種子の播種後26日における種子伝染による発病個体率は、それぞれ平均0.3%, 1.8%, 1.0%および5.4%と、前年の発生程度が高いほど種子伝染による発病個体率が高い傾向であった。また、前年開花期以降の銅水和剤DFによる茎葉散布により防除した発病莢率1.8%であった試験区由来の種子と、前年開花期以降無防除で、発病莢率が1.9%であった試験区由来の種子の種子伝染による発病に大きな差はなかった。一方、前年無病徴の個体から採種した種子からも種子伝染によると推察される発病個体が認められ、

以降、二次伝染により急速に試験区内に伝播し、結果的に多発となった。一部の試験区では種子伝染による発病が認められず、他の試験区において既に二次伝染による発病が認められた播種後 33 日まで発病が認められなかった。しかし、播種後 41 日に他の試験区からの飛び込みによると推察される発病が認められ、以降、急速に伝播し、播種後 48 日には他の試験区と同様に発病株率がほぼ 100%に達した。

本病の発生地域および未発生地域で生産された種子における発病調査の結果を Table 5-15 および Fig. 5-5 に示した。本病の発生地域である A 町内の種子生産圃場で生産された‘しゅまり’では、播種後 20 日に初発を認めた。種子伝染による発病株率は播種後 40 日の時点で 0.31%であった。一方、本病の未発生地域である B 町で生産された‘エリモショウズ’は播種後 61 日まで発病が確認されなかったが、播種後 68 日に隣接する A 町産‘しゅまり’の試験圃場からの飛び込みによると推察される発病株を確認した。この時点で、A 町産‘しゅまり’での落葉は認められなかった。‘しゅまり’圃場における総発病株数に対する  $I_B$  および  $F$  値の推移、および、調査日毎の発病株数に対する  $I_B$  の推移を Fig. 5-6 に示した。第 4 章 Fig. 4-15 と同様に総発病株数および調査日毎の発病株数に対する  $I_B$  は播種後 31 日に著しく高く、播種後 40 日に低下したが、いずれも集中分布と判断された。一方、総発病株数に対する  $I_B$  の  $F$  値は増加傾向であり、集中分布の有意性が増加していることから、発病株の集中点が増加し、発病株が増加していると判断される解析結果となり、調査結果と一致した。

#### 4) 考察



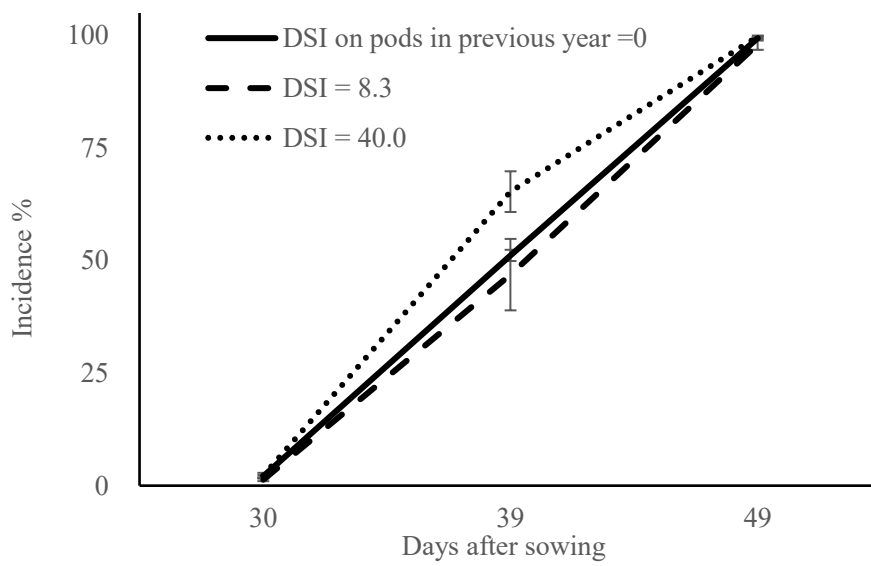
種子伝染による発病が、前年収穫時の発病の多少に関わらずほぼ一定の割合で発生する場合と、前年収穫時の発病の多少に従って発生する場合とあり、年次により傾向が異なった。この要因は定かではないが、重要なことは、いずれの年次においても前年収穫時に発病が認められなかった試験区あるいは株から得られた種子において種子伝染による発病が認められたことである。これらの発病が認められなかった試験区あるいは株は本病の発生圃場内に存在した。このことは、外観無病徴でも圃場内あるいは近隣に伝染源が存在するとその種子は病原細菌に汚染される可能性があることを示唆している。‘北海道主要農作物等の種子の生産に関する条例事務取扱要領’(北海道農政部 2021 年)によると、種子生産圃場では、本病が‘発生していないこと’とされているが、2000 年代の後半の上川地方における本病の蔓延状況および本試験において種子伝染による発病が認められたことを鑑みると、近隣の発生圃場から飛び込んできた病原細菌により種子生産圃場の種子が汚染されたことが推察される。

また、2010 年の前年発病率 0%の一部の試験区で見られたように、圃場内に種子伝染による発病が認められなくても、圃場外からの飛び込みによる二次伝染によりひとたび発病すると、急速に蔓延する可能性がある。

一方、本病の未発生地域で生産された種子を播種した圃場では、種子伝染による発病が認められず、開花期(播種後 47 日)以降に、隣接する発生圃場からの飛び込みによる発病個体が発生するまで、長期にわたり発病が認められなかった。このことから、一般圃場では、他に伝染源がなければ、無発生圃場産種子の使用により、本病は発生しない、少なくとも発生を低く保たれることが期待されるた

め、本病による深刻な被害を回避できると考えられる。

以上のことから、圃場内における一次伝染による発病株の存在および他の圃場からの飛び込みによる発病は、二次伝染による本病の多発に直結し、さらに、外観無病徴個体由来の種子でも病原細菌を保菌していることが示唆された。反対に、伝染源とならない無発生圃場産種子を用い、さらに、周辺圃場からの飛び込みなどによる二次伝染リスクを低減すれば、本病は発生しない、あるいは、発生しても発生は低く抑えられ、生産上の問題にならないと考えられる。



**Fig. 5-4** Changes in the incidence of bacterial stem rot of adzuki bean after sowing the seeds which were produced in the plots to be different DSI on pods in previous year, in 2009.

*DSI* Disease severity index at harvesting period

**Table 5-14** Changes in the incidence of seed transmission and secondary infection of bacterial stem rot of adzuki bean after sowing the seeds which produced in the plots to be different status of disease in previous year, in 2010.

DSI <sup>a</sup> in previous year	Rate of diseased pods in previous year	Plots	Incidence at the days after sowing %					
			Seed transmission		Secondary infection			
			19	26	26	33	41	48
0	0% <sup>b</sup>	1	0.0	0.5	1.0	28.0	74.0	100
		2	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0 <sup>d</sup>	99.0
		Ave.	0.0	0.3	0.5	14.0	44.5	99.5
41.9	1.8% <sup>c</sup>	1	0.5	1.0	7.6	38.2	89.9	100
		2	0.5	2.5	11.7	49.5	99.0	100
		Ave.	0.5	1.8	9.6	43.8	94.5	100
47.9	1.9% <sup>b</sup>	1	0.3	0.4	2.9	21.3	93.4	100
		2	0.4	0.7	5.0	22.3	84.8	100
		3	0.5	2.1	10.6	61.3	99.0	100
		Ave.	0.4	1.0	6.2	35.0	92.4	100
85.6	17.6% <sup>b</sup>	1	1.7	5.2	20.6	64.5	100	100
		2	1.0	5.6	17.5	85.5	100	100
		Ave.	1.4	5.4	19.1	75.0	100	100

<sup>a</sup> Disease severity index on leaves and stems at harvesting period

<sup>b</sup> No application with bactericide after flowering period in previous year

<sup>c</sup> Copper granular wettable powder was applied from flowering period to mature period in previous year

<sup>d</sup> These diseased plants in this plot seems to be infected with the source of infection disseminated from the other plots

**Table 5-15** Changes in the incidence of seed transmission and secondary infection of bacterial stem rot of adzuki bean after sowing the seeds which produced in affected area or non-affected area in previous year, in 2010

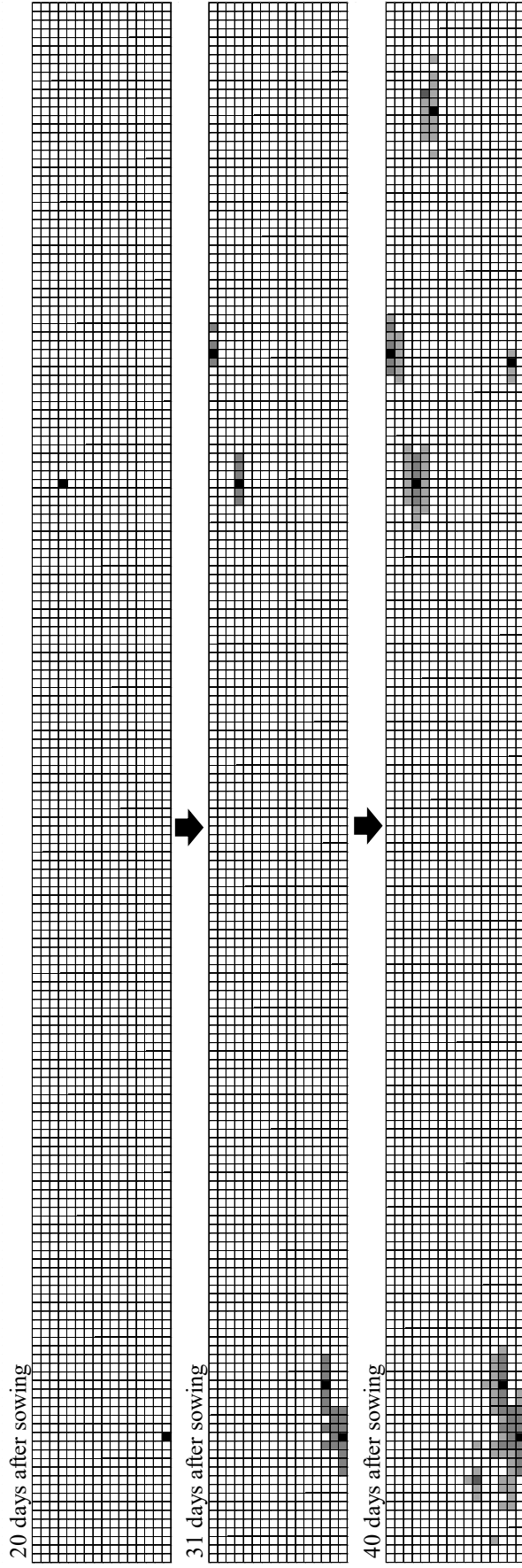
Seed lot	Incidence at the day after sowing %							
	Seed transmission			Seed transmission and secondary infection				
	20	31	40	20	31	40	61	68
Syumari <sup>a</sup>	0.07	0.14	0.31	0.07	1.11	3.82	N. S. <sup>c</sup>	N. S. <sup>c</sup>
Erimo-shozu <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0.03 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Seeds were produced in A town in which bacterial stem rot of adzuki bean is seemed to be spread

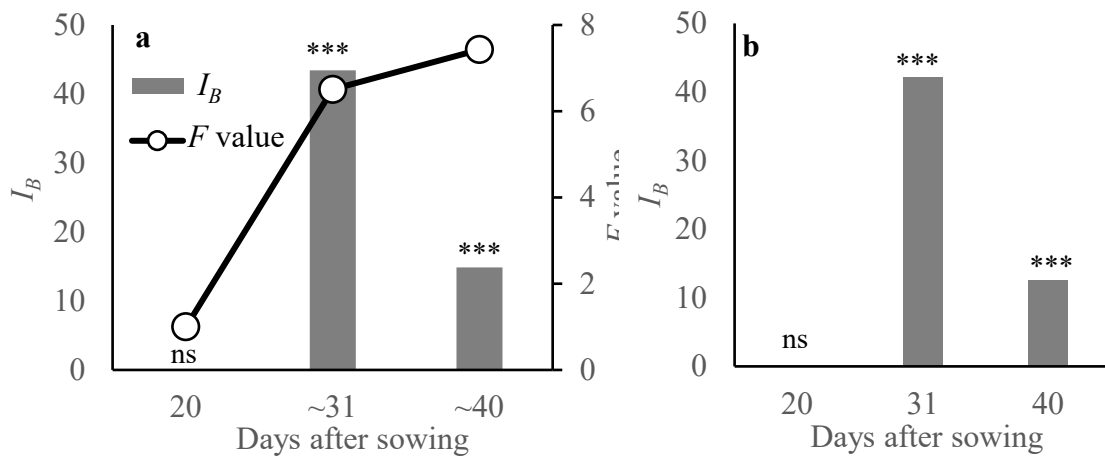
<sup>b</sup> Seeds were produced in B town in which bacterial stem rot of adzuki bean has not been occurred

<sup>c</sup> Not surveyed but a lot of diseased plants were observed in the field

<sup>d</sup> It seems that the source of infection flew into this field from adjacent field planted Syumari



**Fig. 5-5** Distribution of plants infected bacterial stem rot of adzuki bean in the field after sowing the seeds, cv. Syumari, which produced in affected area in previous year, in 2010. The area of this field is 388.8 m<sup>2</sup> (40.5 m × 9.6 m). One cell indicates one hill of adzuki bean plants. Diseased plants seemed to be caused by seed transmission are shown as black painted cells. Cells painted out in gray indicate disease plant seemed to be caused by secondary infection



**Fig.5-6** Morisita's  $I_B$  and  $F$  values for diseased plants with bacterial stem rot of adzuki bean in the natural infested field.

Based on the data in Fig. 5-5,  $I_B$  values were calculated. *Asterisks* indicate  $I_B$  value differed significantly from 1.0 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns,  $P > 0.05$ ) according to Morisita's  $F$ -test method (Morisita 1962). **a** Total number of hills including diseased plants. **b** Number of hills including diseased plants at each observation.

## 第 6 章 アズキ茎腐細菌病の防除対策

### 1. 種子粉衣の防除効果

本病の主要な一次伝染源は病原細菌に汚染された種子であるため、種子消毒は有効な手段であると考えられる。Tanii and Baba (1979) は、いくつかの候補の中で ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤の 0.3% 種子粉衣処理が本病に対し最も効果的であったとしている。しかし、本剤は 2011 年 9 月 25 日をもって日本における農薬登録が失効した。したがって、代替薬剤であるダイアジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤 (25%・3%・25%, 商品名 ‘粉衣用ペアーカスミン D’) の防除効果について検討した。

#### 1) 目的

種子伝染による発病に対する種子粉衣剤の防除効果を明らかにする。

#### 2) 方法

試験は 2009 年および 2010 年に上川農試場内圃場において実施した。

前年発生圃場産種子あるいは病原細菌懸濁液に浸漬接種した種子にダイアジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤 (25%・3%・25%, 商品名 ‘粉衣用ペアーカスミン D’), あるいは, ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤 (25%・3%・47%, 商品名 ‘粉衣用ペアーカスミン’) を播種直前に種子重量の 0.3%になるように粉衣処理し, 出芽



後、全株を対象に発病個体率を調査した。立ち枯れた個体は調査対象としなかった。詳細は以下に記したとおりである。

試験 I：汚染種子として、前年収穫時の莢発病度 8.3 であった試験区から得た品種‘エリモショウズ’を供試した。2009 年 5 月 26 日に薬剤を粉衣処理し、同日 1 区 12 m<sup>2</sup> (無処理は 23 m<sup>2</sup>) の試験区各 3 区画に播種した。6 月 25 日および 7 月 3 日に調査を行った。

試験 II：播種前日に品種‘しゅまり’種子を AZK-11 菌株の細菌懸濁液 (1.6×10<sup>9</sup> cfu/ml) に 3 時間浸漬処理後風乾し、汚染種子として供試した。2009 年 5 月 26 日に薬剤を粉衣処理し、同日 1 区 9 m<sup>2</sup> の試験区各 3 区画に播種した。6 月 22 日および 7 月 1 日に調査を行った。

試験 III：汚染種子として、前年収穫時の発病莢率 1.9% であった試験区から得た品種‘しゅまり’を供試した。2010 年 6 月 2 日に粉衣処理し、同日 1 区 12 m<sup>2</sup> (無処理は 24 m<sup>2</sup>) の試験区各 3 区画に播種した。6 月 28 日に調査を行った。

### 3) 結果

試験結果を Fig. 6-1 に示した。

試験 I について、播種後 30 日における無処理区の発病個体率は 1.3% であったのに対し、ダイアジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤および ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤処理区の発病は認められなかった。播種後 38 日には、いずれの処理区においても二次伝染によると推察される発病個体が急激に増加した。

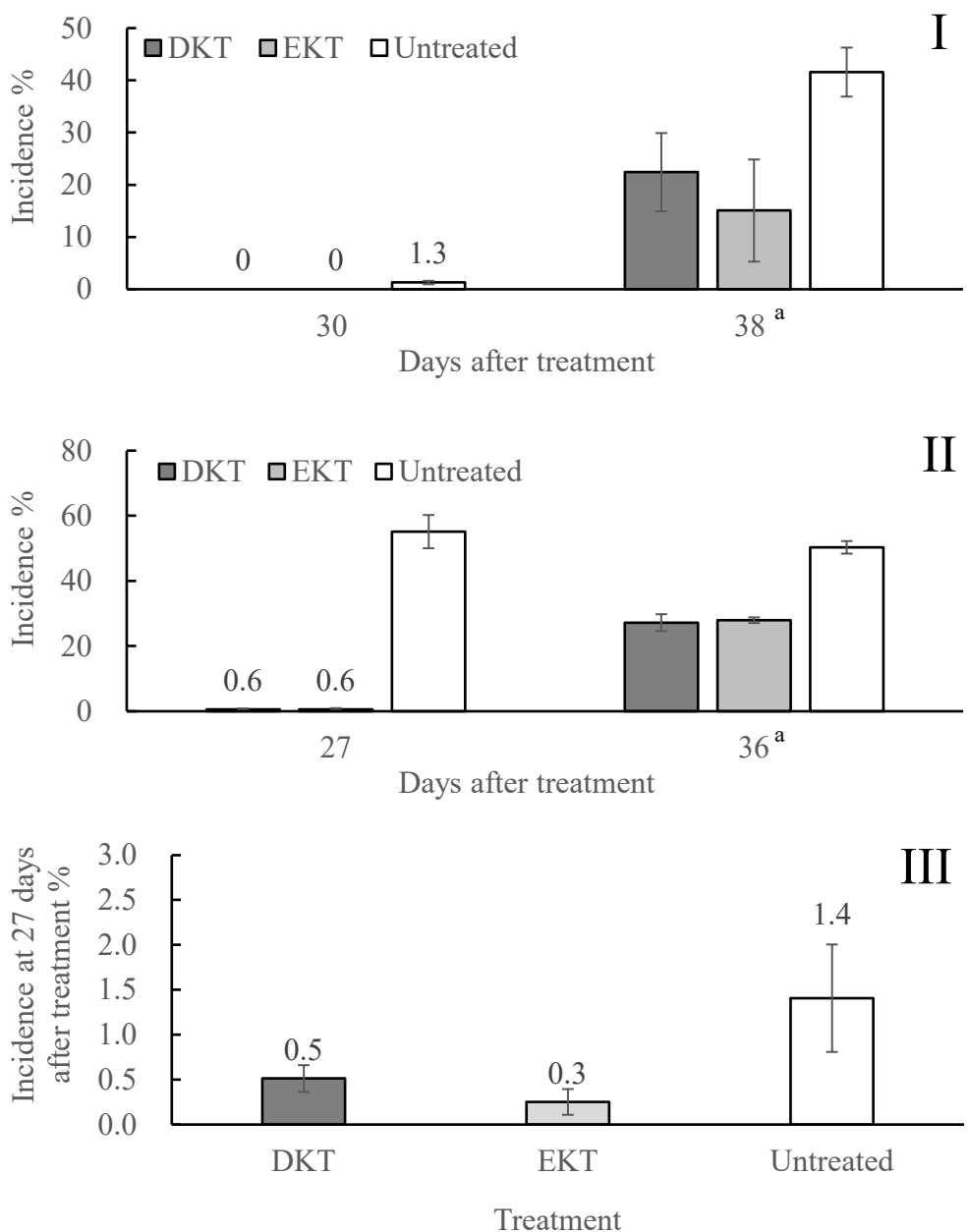
試験 II について、播種後 27 日における無処理区の発病個体率は 55.1%と試験 I と比較して高かったのに対し、ダイアジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤および ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤処理区では、発病個体率はいずれも 0.6%であった。播種後 36 日には、無処理区において立ち枯れた個体が散見された。試験 I と同様に種子粉衣処理区において、二次伝染によると推察される発病個体が急激に増加した。

試験 III について、播種後 27 日における無処理区の発病個体率が 1.4%であったのに対し、ダイアジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤処理区は 0.5%、および、ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤処理区は 0.3%であった。

#### 4) 考察

試験 I および II におけるそれぞれ播種後 38 日および 36 日の発病個体率は二次伝染によると推察される発病が含まれるため、種子伝染による発病に対する種子粉衣剤処理の効果を評価するには、それぞれ播種後 30 日および 27 日の発病個体率を用いることが適当であると考えられた。ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤処理は、Tanii and Baba (1979) による記載と同様に、いずれの試験においても無処理よりも発病個体率が低く、種子伝染による発病に対して概ね防除効果が認められた。ダイアジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤についても ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤と同程度の防除効果が認められた。いずれの薬剤も薬害は認められなかった。しかし、いずれの試験においても薬剤の種子粉衣処理の発病抑制は不完全であり、抑制しきれなかった発病個体が伝染源となり、二次伝染によ

る発病が試験 I および II において増加したと推察された。したがって、病原細菌による汚染が懸念される種子に対しては、ダイアジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤等の種子粉衣処理による種子伝染由来の発病抑止に加え、二次伝染防止を目的とした殺菌剤の茎葉散布も必要であると考えられた。



**Fig. 6-1** Effects of seed dressing agrochemicals for bacterial stem rot of adzuki bean.

I: Trial for infected seeds which were obtained from the infested field in previous year, in 2009. II: Trial for seeds inoculated with the causal organism in 2009. III: Trial for infected seeds which were obtained from the infested field in previous year, in 2010. A numerical value above each bar graph indicates the incidence of bacterial stem rot disease. Bar

indicates standard error. *DKT* Diazinon, kasugamycin, and thiuram powder. *EKT* ECP, kasugamycin, and thiuram powder.

<sup>a</sup> An incidence of each at these days after sowing contains the diseased plants originated from both seed transmissions and secondary infections

## 2. 茎葉散布の防除効果

本病に対する殺菌剤の茎葉散布の期待される効果として、主に圃場内の罹病アズキから健全アズキへの二次伝染の防止、および、圃場外からの飛び込みによる伝染源の侵入から保護ことが挙げられる。Tanii and Baba (1979) は本病に対し、出芽直後から銅水和剤を 10 日間隔で 2-3 回散布すると十分な防除効果が得られるとしている。そこで、数種の殺菌剤について本病に対する茎葉散布の防除効果を検討した。

### 1) 目的

茎葉散布の防除効果を明らかにする。

### 2) 方法

試験は 2008 年および 2009 年に行った。

供試薬剤とその希釈倍数は、カスガマイシン・銅水和剤 (5%・45%, 商品名 ‘カスミンボルドー’) の 1000 倍、銅顆粒水和剤 (40%, 商品名 ‘ドイツボルドー DF’) の 500 倍およびジメトモルフ・銅水和剤 (15%・35%, 商品名 ‘フェスティバル C 水和剤’) の 600 倍とした。試験の詳細は以下に記したとおりである。

2008 年試験 I は富良野市農家圃場で実施した。播種当日に病原細菌懸濁液 (AZK-11 菌株,  $1.1 \times 10^9$  cfu/ml) に 2 時間浸漬後風乾した品種 ‘エリモショウズ’ と無接種種子を等量混合し、5 月 12 日に畦間 60 cm, 株間 21 cm の栽植密度で播種した。殺菌剤による種子粉衣は行わなかった。1 区 12 m<sup>2</sup> とし、それぞれ 3 区画設置した。施肥量および栽培管理は農家慣行とした。出芽揃い以降 7 日間隔で、す

なわち 6 月 2 日, 9 日, 16 日, 23 日および 30 日に 10 a あたり 100 L の割合で散布した。7 月 7 日に各区約 70 株について発病の有無を調査した。

2008 年試験 II は美瑛町農業技術研修センター圃場で実施した。播種当日に病原細菌懸濁液 (AZB-21 菌株,  $2.0 \times 10^8$  cfu/ml) に 2 時間浸漬後風乾した品種 ‘エリモショウズ’ と無接種種子を等量混合し, 6 月 3 日に畦間 60 cm, 株間 21 cm の栽植密度で播種した。殺菌剤による種子粉衣は行わなかった。1 区 15 m<sup>2</sup> とし, それぞれ 3 区画設置した。施肥量および栽培管理はセンター慣行とした。出芽揃い以降約 7 日間隔で, すなわち 6 月 20 日, 27 日, 7 月 4 日, 10 日, 16 日, 25 日, 8 月 1 日および 7 日に 10 a あたり 100 L の割合で散布した。8 月 14 日に各区約 60 株について発病の有無を調査した。

2009 年は上川農試場内圃場で実施した。十勝農試産品種 ‘しゅまり’ を ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤により種子粉衣し 5 月 26 日に播種した。1 区 22.1 m<sup>2</sup> とし, それぞれ 2 区画設置した。各薬液に展着剤 (商品名 ‘グラミン S’, 10000 倍) を加用し, 6 月 30 日, 7 月 7 日, 14 日および 21 日に 10 a あたり 100 あるいは 150 L の割合で散布した。初回の 6 月 30 日の散布後, 伝染源として, 他の試験で発生した発病株を試験区内に均等に 8 か所に移植し, 二次伝染による伝搬の再現を試みた。試験期間中移植した発病株は除去しなかった。7 月 22 日および 27 日に各区 72 株について茎葉の発病程度 (Table 4-1) を調査した。

### 3) 結果

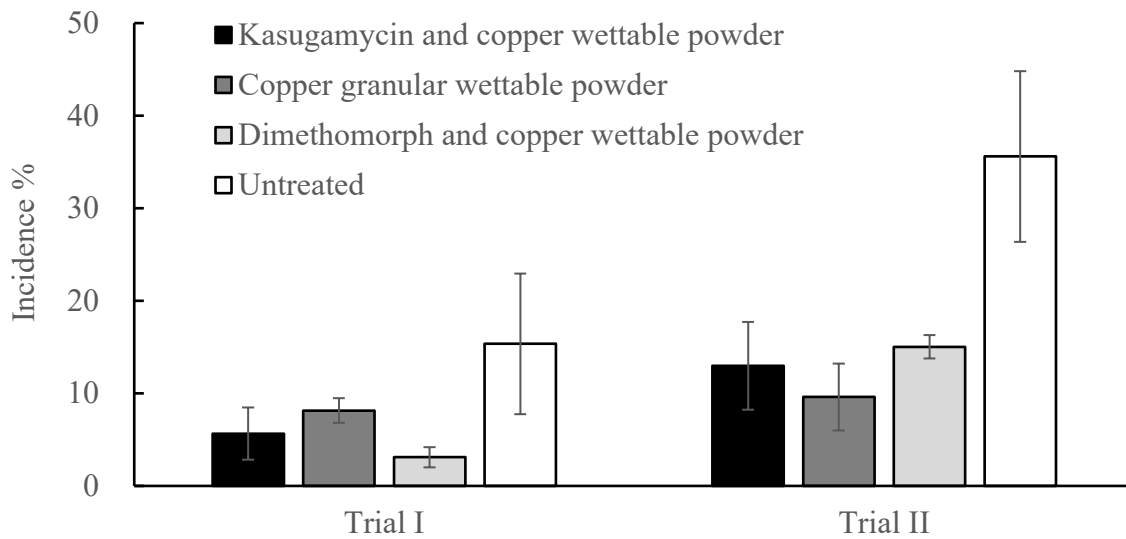
2008年試験Ⅰおよび試験Ⅱの結果を Fig. 6-2 に示した。試験Ⅰの初発は6月18日に認められた。無処理区の発病個体率の平均値は15.3%であったのに対し、カスガマイシン・銅水和剤、銅顆粒水和剤およびジメトモルフ・銅水和剤処理区はそれぞれ5.6% (防除価 63), 8.1% (同 47) および 3.1% (同 80) であり、いずれの薬剤についても防除効果が認められた。一方、試験Ⅱの初発は6月28日に認められた。無処理区の発病個体率の平均値は35.6%であったのに対し、カスガマイシン・銅水和剤、銅顆粒水和剤およびジメトモルフ・銅水和剤処理区はそれぞれ13.0% (防除価 64), 9.6% (同 73) および 15.0% (同 58) であり、試験Ⅰと同様に、いずれの薬剤についても防除効果が認められたが、銅顆粒水和剤とジメトモルフ・銅水和剤の防除効果の優劣の傾向が試験Ⅰと試験Ⅱで異なった。いずれの試験においても、すべての薬剤において、散布した葉身に赤褐色の斑点が生じる薬害が認められた。

2009年の試験結果を Fig. 6-3 に示した。伝染源の周囲の株における初発は7月6日に認められた。無処理区の発病株率は7月22日 (最終散布1日後) の88.8%から7月27日 (最終散布6日後) の96.5%という推移であったのに対し、この期間の薬剤処理区の発病株率はいずれも概ね倍増した。最終散布1日後から6日後の茎葉発病度の増加傾向も同様であった。最終散布6日後の無処理区における茎葉発病度は34.3であったのに対し、カスガマイシン・銅水和剤、銅顆粒水和剤およびジメトモルフ・銅水和剤処理区はそれぞれ15.6 (防除価 54), 12.3 (同 64) および 11.9 (同 65) であった。2008年の試験と同様に、すべての薬剤において、散布した葉身に赤褐色の斑点が生じる薬害が認められた。



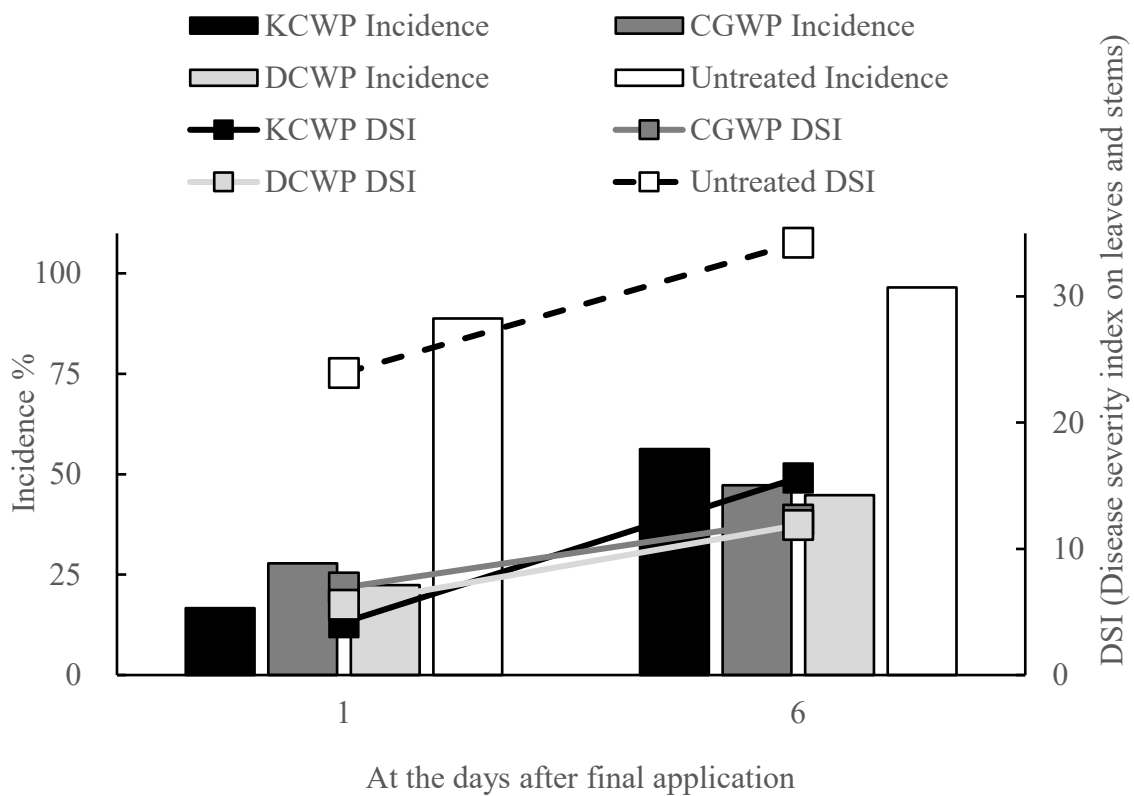
#### 4) 考察

カスガマイシン・銅水和剤の 1000 倍液，銅顆粒水和剤の 500 倍液およびジメトモルフ・銅水和剤の 600 倍液の茎葉散布は，本病に対し，いずれの試験においても一定の防除効果が認められた．試験によって傾向はやや異なったが，本病に対する防除効果は 3 剤とも同程度であると考えられた．本病に対する茎葉散布の効果は，2009 年の試験結果から，二次伝染の拡大を抑制する効果であると判断される．2008 年の試験はいずれも種子伝染による発病も含まれるが，調査時期は初発から 1 か月ほど経過しており，無処理区における発病株の大部分は二次伝染による発病であると推察される（データなし）ことから，これらの試験についても殺菌剤の茎葉散布により，二次伝染による発生拡大を抑制したと考えられる．しかし，茎葉散布を実施した試験区であっても，時間の経過とともに発病株率および茎葉発病度が増加した (Fig. 6-3) ことから，伝染源となる罹病アズキが圃場内に存在するかぎり，茎葉散布のみでは，本病の発生拡大を完全に抑制することは困難であると考えられた．なお，すべての殺菌剤において認められた薬害によるアズキの生育への影響はないものと考えられる（データなし）．



**Fig. 6-2** Effects of bactericide spraying against bacterial stem rot of adzuki bean in 2008.

A mixture of equal parts of healthy seeds and seeds inoculated with causal organism was used. Kasugamycin and copper wettable powder was diluted to 1000 times with tap water. In like manner, Copper granular wettable powder, and, dimethomorph and copper wettable powder were diluted to 500 times, and, to 600 times, respectively. Trial I and II were done in Furano city and Biei town, Hokkaido, respectively. Phytotoxicities which reddish pinpoint spots were appeared on the leaflets applicated with bactericides of all were observed in both trials, but it does not seem to suppress growth of plants. Bar indicates standard error



**Fig. 6-3** Effects of bactericide spraying against bacterial stem rot of adzuki bean in 2009

*KCWP* Kasugamycin and copper wettable powder diluted to 1000 times. *CGWP* Copper granular wettable powder diluted to 500 times. *DCWP* Dimethomorph and copper wettable powder diluted to 600 times. DSI Disease severity index on leaves and stems. Eight diseased plants as source of infection were transplanted at equal intervals in each plot. Phytotoxicities which reddish pinpoint spots were appeared on the leaflets applied with bactericides of all were observed, but it does not seem to suppress growth of plants

### 3. 茎葉散布の散布間隔および展着剤の影響

Tanii and Baba (1979) は本病に対し、銅水和剤の 10 日間隔 2-3 回散布で十分な防除効果が得られるとしているが、前項では 7 日間隔でも時間の経過とともに発病の増加が認められた。したがって、茎葉散布における適切な散布間隔を精査する必要がある。また、細菌による病害は防除効果が期待できる薬剤に限られ、一般的に高い防除効果を期待することは難しい。一方、展着剤の加用により、薬剤の残効性が向上する、あるいは、散布水量を減らしても防除効果が変わらないという事例があり (富濱 2009)、防除効果を向上させる可能性がある。そこで、茎葉散布における殺菌剤への展着剤の加用の効果について検討した。

#### 1) 目的

茎葉散布の適切な散布間隔および展着剤の加用効果を明らかにする。

#### 2) 方法

試験は 2010 年に上川農試場内枠圃場で行った。

1 m<sup>2</sup> 枠圃場に ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤を粉衣した十勝農試産品種‘しゅまり’を畦間 60 cm, 株間 15 cm (2 畦, 7 株) の栽植密度で 3 粒播種し、後に間引きし、株あたり 2 個体とした。施肥は 10 a あたり N:P:K=9 kg:36 kg:21 kg を全層施用した。初回散布翌日の 7 月 1 日に伝染源として、本病に罹病した‘しゅまり’を畦間に 1 区あたり 2 個体移植した。試験期間中伝染源は除去しなかった。

6月30日に銅顆粒水和剤(40%, 商品名‘ドイツボルドーDF’)の500倍液を散布し, 以降7日間隔散布処理として, 7月7日, 14日, 21日, 27日および8月3日に10aあたり200L相当量を散布した。展着剤は加用しなかった。同様に10日間隔散布処理として, 7月11日, 21日および31日に, 14日間隔散布処理として, 7月14日および7月31日に散布した。比較として, カスガマイシン・銅水和剤(5%・45%, 商品名‘カスミンボルドー’)1000倍液を10日間隔で散布した処理区を設けた。各処理5区設置した。

また, 展着剤加用の防除効果に与える影響を検討するため, 銅顆粒水和剤(40%, 商品名‘ドイツボルドーDF’)の500倍液に以下の展着剤を所定の希釈倍数で加用し, 上記10日間隔散布処理の日程で10aあたり200L相当量を散布した。各処理5区設置した。

商品名, ‘アプローチBI’, 2000倍

商品名, ‘ニーズ’, 2000倍

商品名, ‘まくびか’, 3333倍

商品名, ‘グラミンS’, 3333倍

全ての処理について, 8月10日に区内全14株の茎葉の発病程度(Table 4-1)を調査した。

### 3) 結果

接種源の罹病アズキを移植した10日後の7月11日に初発を確認した。無処理区の発病度が91であったのに対し, 銅顆粒水和剤500倍液を7日間隔(最終散布7日後), 10日間隔(同10日後)および14日間隔(同10日後)散布した処理区の茎葉発病度は, それぞれ, 64, 83および86であった(Fig. 6-4)。また, カスガマイシン・銅

水和剤 1000 倍液を 10 日間隔で散布した処理区の茎葉発病度 68 であった (Fig. 6-4).

銅顆粒水和剤 500 倍液に展着剤無加用, 展着剤アプローチ BI 2000 倍, ニーズ 2000 倍, まくぴか 3333 倍およびグラミン S 3333 倍を加用した試験区における茎葉発病度 (最終散布 10 日後) は, それぞれ, 83, 81, 71, 80 および 78 であった (Fig. 6-5) .

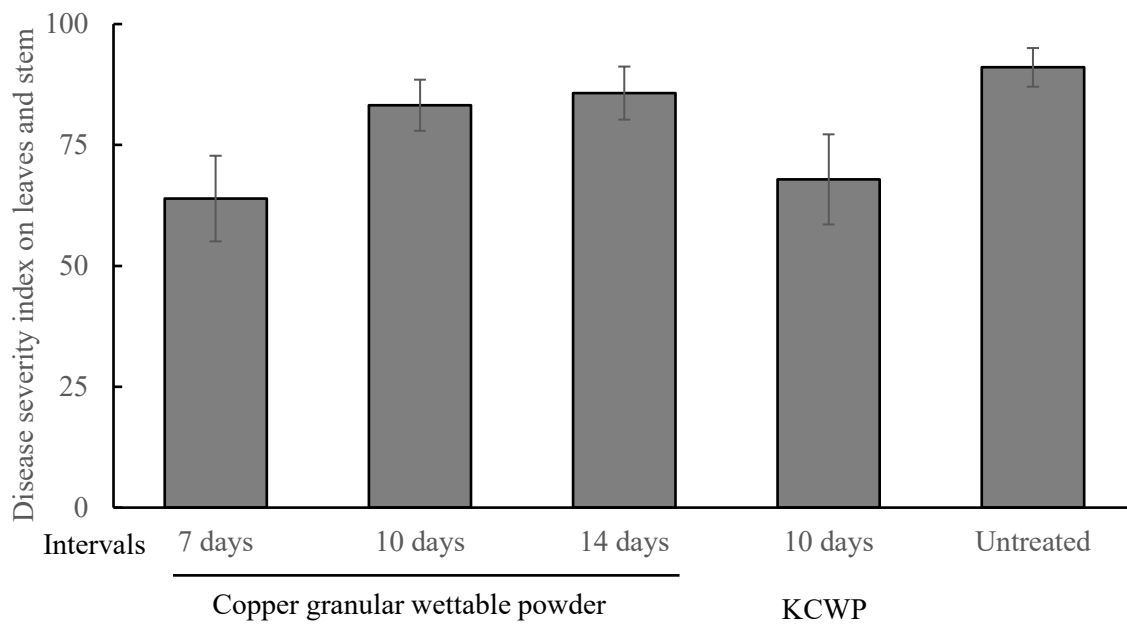
#### 4) 考察

銅顆粒水和剤 500 倍液の散布間隔を比較したところ, 10 日間隔および 14 日間隔よりも 7 日間隔散布処理が最も茎葉発病度が低く, より高い防除効果を得るためには散布間隔を短くするべきであると考えられた. しかし, 無処理区の茎葉発病度が 91 とかなり高く, 最も防除効果が認められた銅顆粒水和剤の 7 日間隔処理でも防除価が 30 であり, 防除効果としては不十分であった. 試験期間中伝染源を除去しなかったため, 感染圧が高く, 実施条件としては厳しい条件であったと推察される.

銅顆粒水和剤 500 倍液への展着剤の加用については, 加用した展着剤の種類に関わらず, 加用区の発病度は展着剤無加用区とほぼ同程度であった. 展着剤無加用の 10 日間隔散布でほとんど防除効果が得られない程, 感染圧が高かったと考えられ, 展着剤加用の効果については判然としなかった.

散布後に伝染源を設置し, 予防的な防除をしたにも関わらず, いずれの試験区においても十分な防除効果が得られなかったことから, 本試験のような圃場内に伝染源が存在し, かつ, 蔓延しやすい時期

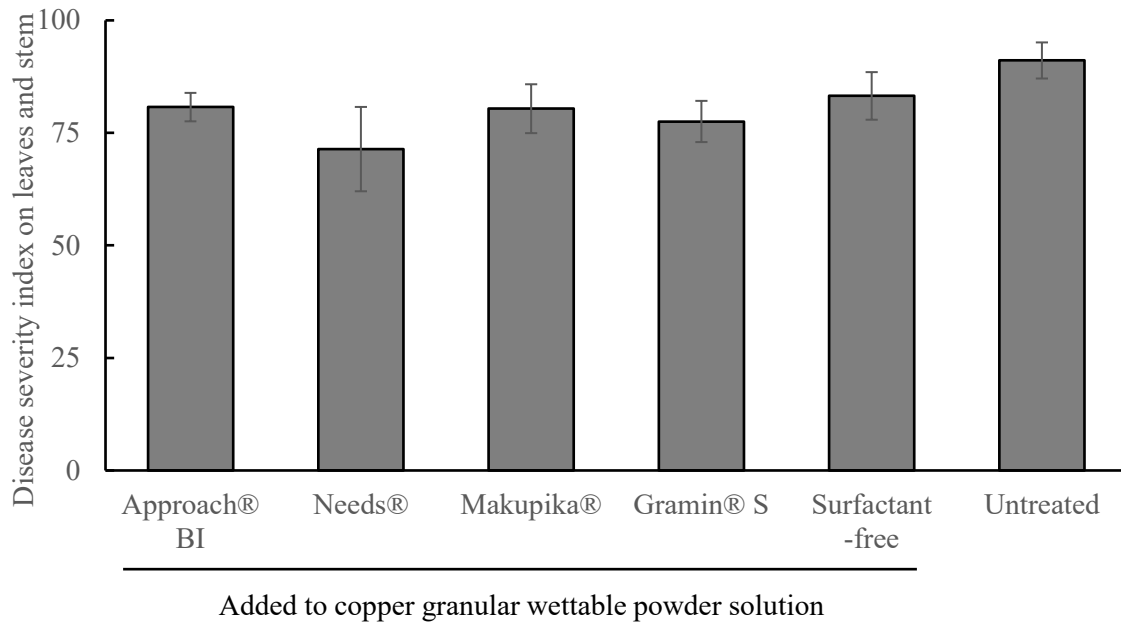
において，茎葉散布によって防除効果を得ることは極めて難しいことと考えられた。



**Fig. 6-4** Effects by different intervals of spraying with copper granular wettable powder diluted to 500 times against bacterial stem rot of adzuki bean.

*KCWP* Kasugamycin and copper wettable powder diluted to 1000 times. Two diseased plants as source of infection were transplanted at the center of furrow in the plot. Bar indicates standard error.





**Fig. 6-5** Effects of agricultural surfactants added to the copper granular wettable powder solution diluted to 500 times against bacterial stem rot of adzuki bean.

Two diseased plants as source of infection were transplanted at the center of furrow in the plot. Bar indicates standard error.

#### 4. 種子消毒および茎葉散布，発病株抜き取りの組み合わせによる防除効果

第4章および第5章より，アズキ茎腐細菌病は圃場内で急速に蔓延し，被害が甚大であることが明らかとなった．一方，本病に対する種子粉衣および茎葉散布といった薬剤防除は一定の防除効果は認められるものの，完全な防除効果は期待できず，圃場内に伝染源が残存し，蔓延を許す気象条件下では，発病の進展を抑制することは困難であると考えられた．そこで，種子生産の場面におけるダイズ斑点細菌病およびアズキ褐斑細菌病対策（北海道立中央農業試験場クリーン農業部総合防除科 2009）を参考にして，伝染源となる罹病アズキを除去と薬剤防除を組み合わせた抑制効果について検討した．

##### 1) 目的

殺菌剤による種子粉衣および茎葉散布，発病株の抜き取りを組み合わせた防除体系の本病に対する防除効果を明らかにする．

##### 2) 方法

試験は2009年および2010年に上川農試場内圃場において行った．いずれも前年発生圃場産種子を用いた．ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤（25%・3%・47%，商品名‘粉衣用ペアーカスミン’）の種子重量0.3%種子粉衣の有無，発病株あるいは発病株を含む前後3株を抜き取りの有無，茎葉散布の有無あるいは異なる散布期間，散布間隔の組み合わせが異なる試験区を設置した．茎葉散布はカスガマイシン・銅水和剤（5%・45%，商品名‘カスミンボルドー’）1000

倍液，銅顆粒水和剤（40%，商品名‘ドイツボルドーDF’）500倍液あるいはジメトモルフ・銅水和剤（15%・35%，商品名‘フェスティバルC水和剤’）600倍液を10 aあたり100 L相当量散布とした．処理内容の詳細はTable 6-1およびTable 6-2に示した．2009年は前年収穫時莢発病度8.3であった品種‘エリモショウズ’を供試し，播種を5月26日に行った．1区23 m<sup>2</sup>とし，各処理3区画設置した．6月22日（播種後27日），7月5日（同39日）および7月7日（同41日）に発病株を抜き取った．2010年は前年収穫時発病莢率1.9%であった品種‘しゅまり’を供試し，播種を6月2日に行った．1区21 m<sup>2</sup>とし，各処理3区画設置した．発病株あるいは発病株を含む前後3株を6月21日（播種後19日），6月28日（同26日），7月5日（同33日）および7月13日（同41日）に抜き取った．発病調査は区内全株を対象に経時的に発病程度を調査した．

### 3) 結果

各処理における発病の推移をFig. 6-6およびFig. 6-7に示した．

2009年は，種子粉衣の有無にかかわらず，初発が6月22日（播種後27日）に認められた．種子粉衣および発病株の抜き取り，生育初期からの茎葉散布の組み合わせ（処理AおよびB）により，発病は軽減したが，新たな発病株の発生および発病株における病徴の進展は完全に抑制することができなかった．種子粉衣のみ（処理D）の発病株率は種子粉衣なし（処理F）とほぼ同じ推移であったが，茎葉発病度の推移は低く抑えられた．薬剤防除をしない場合，抜き取り（処理E）の効果は認められなかった．種子粉衣の実施かつ播種後41日まで抜き取り処理した条件で，播種後35日から茎葉散布

を実施した場合（処理 A および B），播種後 44 日以降茎葉散布を実施した場合（処理 C）と比較して，発病株率および茎葉発病度はともに低く推移した．開花期（播種後 59 日）以降も茎葉散布を継続した場合（処理 A），開花期前で茎葉散布を打ち切った場合（処理 B）と比較して，開花期以降の発病株率の推移はかなり低く抑えたが，茎葉発病度はやや低く抑えた程度であった．

2010 年は，種子粉衣の有無にかかわらず，初発は 6 月 21 日（播種後 19 日）に認められた．種子粉衣および発病株の抜き取り，生育初期からの茎葉散布の組み合わせ（処理 a, b および c）により，発病は軽減したが，2009 年と同様に新たな発病株の発生および発病株における病徴の進展は完全に抑制することができなかった．茎葉散布の散布間隔を 7 日間隔（処理 b）および 10 日間隔（処理 c）とした処理区の発病の推移は同様であった．また，処理 a において，播種後 33 日後および 41 日後に発病株を含む前後 3 株を抜き取ったが，播種 48 日後までに発病株が急激に増加し，その効果は判然としなかった．

いずれの年次も発病株を抜き取り，速やかに茎葉散布を実施しても，その数日後には抜き取った周囲の株で発病を認める事例が多かった（Fig. 6-8, Fig. 6-9, Fig. 6-10）．また，一定期間発病個体数 0 で経過した後，突如半数以上の株に発病が認められる事例があった（Fig. 6-9 の Plot II）．

#### 4) 考察

アズキ褐斑細菌病およびダイズ斑点細菌病では，前年発生圃場産種子を ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤により種子粉衣処理し，

その後生じた発病株の抜き取り直後とその1週間後に銅水和剤などの有効薬剤で茎葉散布すると発病株が増加しない（北海道立中央農業試験場クリーン農業部総合防除科 2009）。アズキ茎腐細菌病についても，アズキ褐斑細菌病およびダイズ斑点細菌病と同様に，種子消毒および発病株の抜き取り，茎葉散布の組み合わせによる防除対策を適用できるか検討したところ，無処理と比較して発病を低く抑えたが，新たな発病の出現ならびに発病の増加を抑制することができなかった。本病の場合，殺菌剤の種子粉衣で抑制しきれずに発生した発病株を除去し，茎葉散布を実施しても，その数日後には抜き取った周囲の株に発病を認める場合が多かった。これは，細菌病という本病の性質上，殺菌剤による茎葉散布により本病の発生を完全に抑制することは根源的に難しいことに加え，本病の場合は新たな発病株を認めた時点で，すでに周囲の株でも感染しており，茎葉散布による予防効果が十分に得られなかったためであると推察される。2010年は播種後33日に発病株を含む連続した3株を抜き取った場合，播種後41日に，抜き取った株の同一畦上の隣接株（発病株からの距離40 cm）が発病したのは6株中2株であったが，それ以上に抜き取った株の隣の畦（距離60 cm）で発病するケースが多く，伝染源となる発病株から四方八方に容易に伝搬することが示された（Fig. 6-9）。いずれにしても，発病株の周辺には同時に無病徴感染株が存在すると考えられ，二次伝染を抑制するためには，発病株を中心に一定程度の範囲の株を抜き取らなければならないと考えられた。

2009年の試験結果から，茎葉散布を継続すれば，発病の増加を抑制することは困難なものの著しい減収被害は回避できると考えられるが，合理的な防除対策とは言えない。また，Tanii and Baba (1979)

は‘銅水和剤を出芽直後より約 10 日間隔で 2-3 回散布することで十分な防除効果が得られた’としているが、2010 年の試験はそれを否定する結果となった。本病の主要な一次伝染源は病原細菌に汚染された種子による種子伝染であるため、病原細菌に汚染されていない健全種子を地域全体で使用する事が、圃場内だけでなく圃場外からの伝搬を防ぐ、現実的で経済的な対策と言える。一方、第 5 章で示されたように、圃場内あるいは周辺で本病が発生しており、容易に伝搬するような状況にあれば、無病徴であっても、その個体から得られた種子はすでに病原細菌に汚染されている可能性があり、種子伝染による発病をもたらす恐れがある (Fig. 5-4, Table 5-14, Table 5-15)。種子生産を如何に清浄な環境の下で行うかが、本病の対策として極めて重要であるが、アズキ褐斑細菌病およびダイズ斑点細菌病に対する健全種子生産の手法 (北海道立中央農業試験場クリーン農業部総合防除科 2009) は、残念ながら本病に適用できないことが示された。

**Table 6-1** Tested treatments by combining removing diseased plant, and seed dressing and spraying with bactericides in 2009

Treatment	Seed dressing <sup>a</sup>	Removing diseased plants <sup>b</sup>	At the days after sowing applicated with bactericides								
			35	44	52	59	64	71	80	86	97
A	Do	Do	K <sup>c</sup>	K	D <sup>d</sup>	C <sup>e</sup>	C	C	C	C	C
B	Do	Do	K	K	D	× <sup>f</sup>	×	×	×	×	×
C	Do	Do	×	K	D	C	C	C	C	×	×
D	Do	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
E	×	Do	×	×	×	×	×	×	×	×	×
F	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

<sup>a</sup> With ECP, kasugamycin, and thiuram powder, 0.3% (w/w) of seed weight

<sup>b</sup> Hills containing diseased plants were continuously removed from the plots until 41 days after sowing

<sup>c</sup> Kasugamycin and copper wettable powder diluted to 1000 times was applicated

<sup>d</sup> Dimethomorph and copper wettable powder diluted to 600 times was applicated

<sup>e</sup> Copper granular wettable powder diluted to 500 times was applicated

<sup>f</sup> Not applicated or not done

**Table 6-2** Tested treatments by combining removing diseased plant, and seed dressing and spraying with bactericides in 2010

Treatment	Seed dressing <sup>a</sup>	Removing diseased plants <sup>b</sup>	At the days after sowing applied with bactericides					
			14	20	27	30	34	41
a	Do	<b>Do</b>	× <sup>c</sup>	C <sup>d</sup>	C	×	C	C
b	Do	Do	C	C	C	×	C	C
c	Do	Do	C	C	×	C	×	C
d	Do	<b>Do</b>	×	×	×	×	×	×
f	×	×	×	×	×	×	×	×

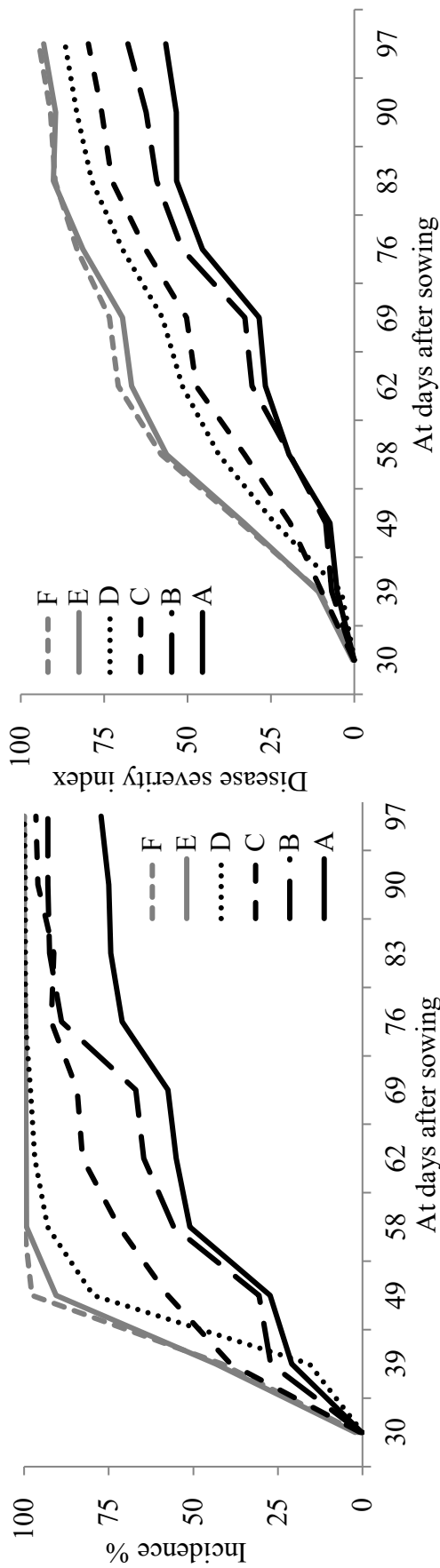
<sup>a</sup> With ECP, kasugamycin, and thiuram powder, 0.3% (w/w) of seed weight

<sup>b</sup> Hills containing diseased plants were continuously removed from the plots until 41 days after sowing. Bold character means that 3 sequence hills including diseased plants were removed at 33 and 41 days after sowing

<sup>c</sup> Not applicated or not done

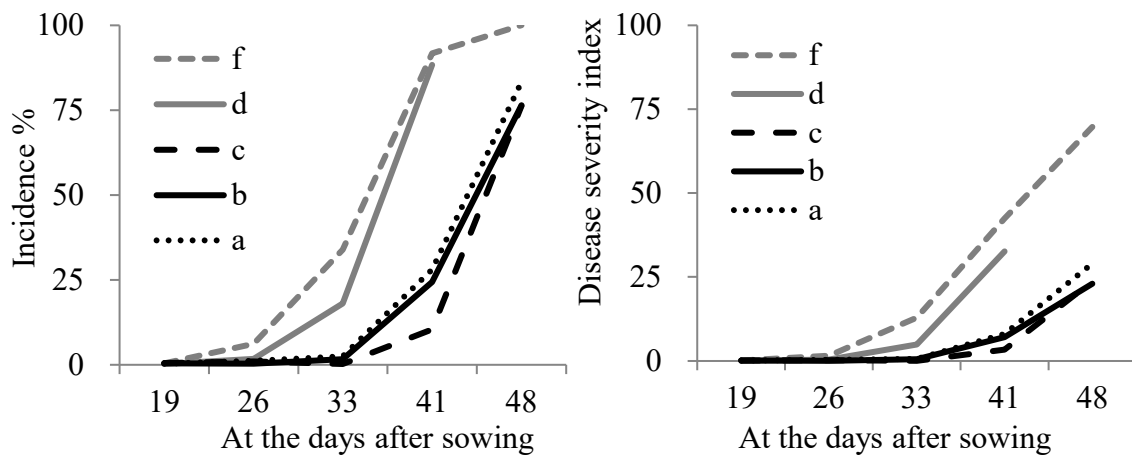
<sup>d</sup> Copper granular wettable powder diluted to 500 times was applicated





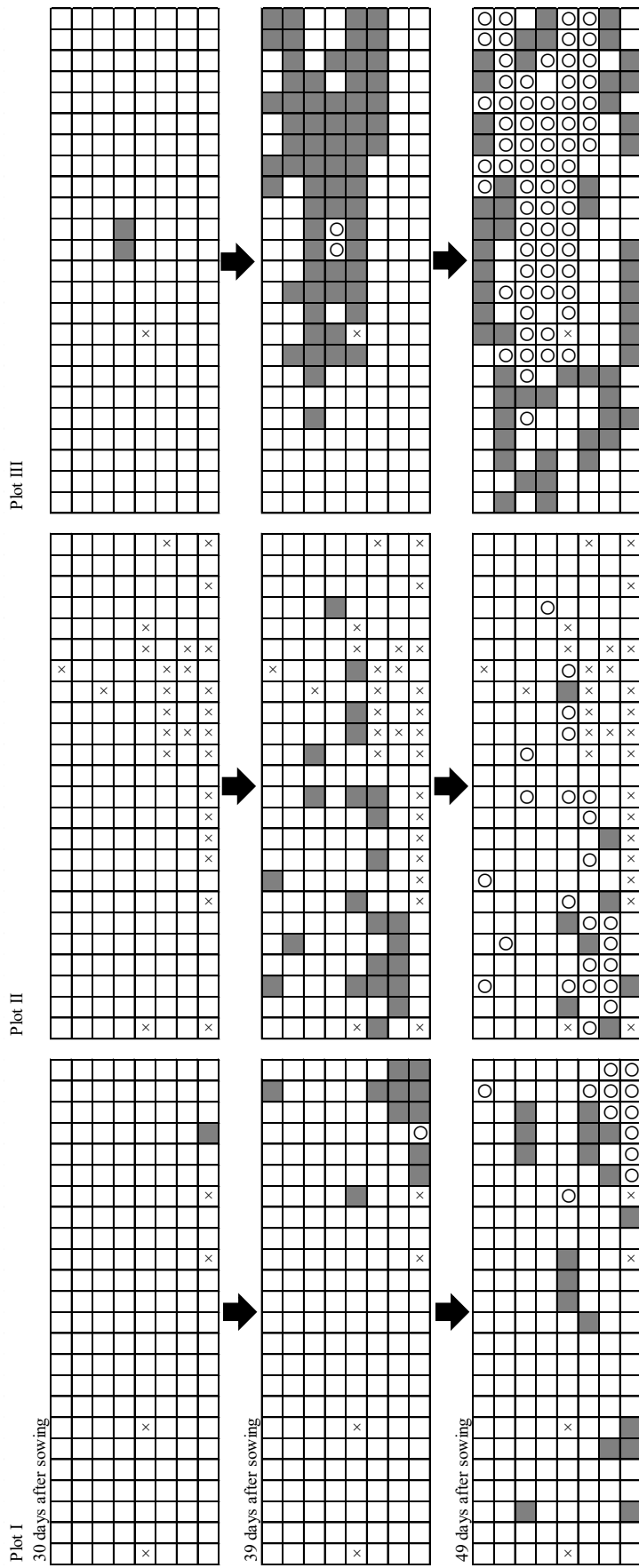
**Fig. 6-6** Effects by combining removing diseased plant, and seed dressing and spraying with bactericides for bacterial stem rot in 2009.

Left graph indicates change in incidence of bacterial stem rot on each treatment, and right indicates disease severity index on leaves and stems. Hills containing diseased plants were removed from the plot until 41 days after sowing. Treatment A, removing diseased plants, seed dressing, and spraying from 35 to 97 days after sowing; B, removing diseased plants, seed dressing, and spraying from 35 to 52 days after sowing; C, removing diseased plants, seed dressing, and spraying from 44 to 80 days after sowing; D, seed dressing only; E, removing diseased plants only; and, F, did nothing



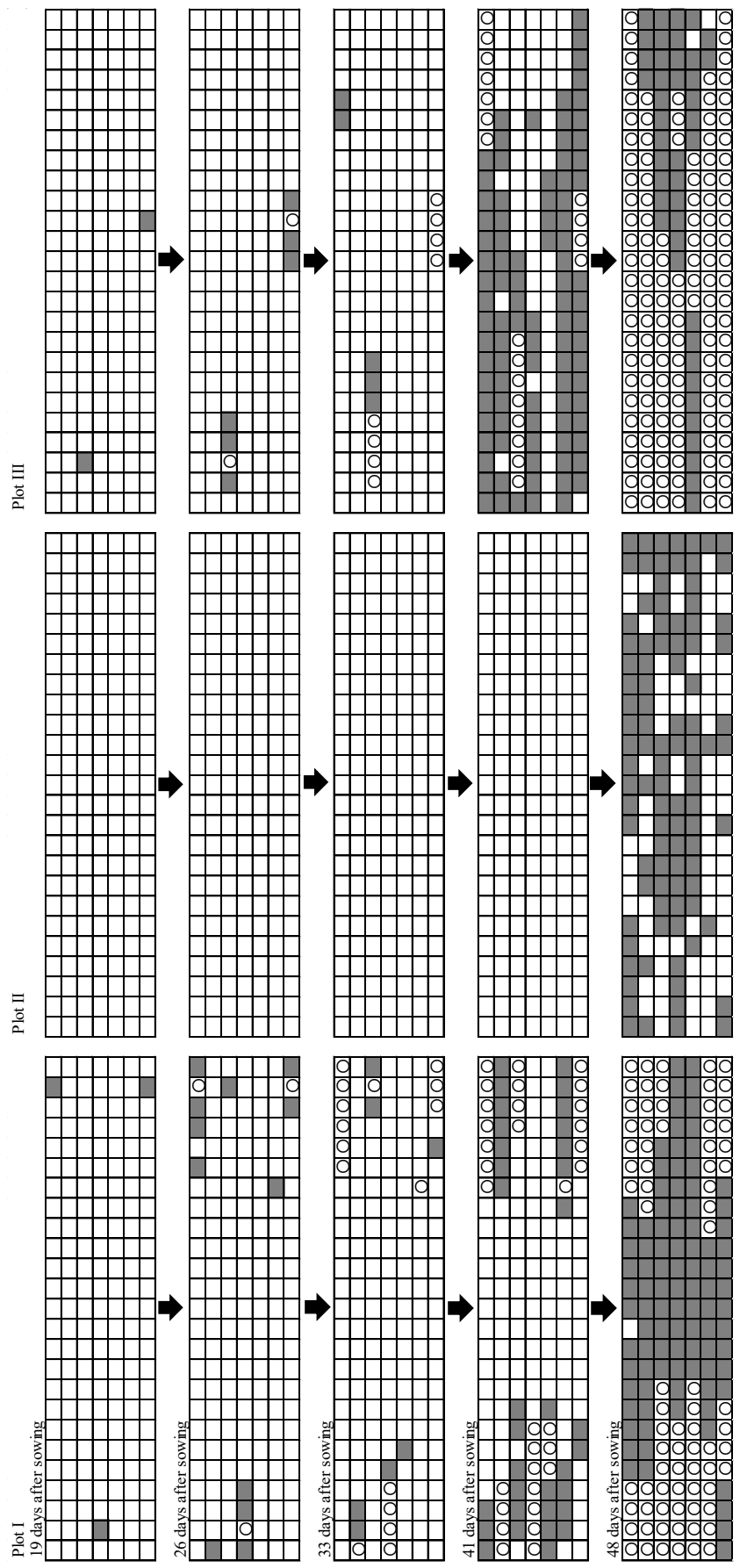
**Fig. 6-7** Effects by combining removing diseased plant, and seed dressing and spraying with bactericides for bacterial stem rot in 2010.

Left graph indicates change in incidence of bacterial stem rot on each treatment, and right indicates disease severity index on leaves and stems. Treatment a, removing hills containing diseased plants at 20 and 27 days, and 3 sequence hills including diseased plants at 34 and 41 days, seed dressing, and spraying from 20 to 41 days after sowing; b, removing hills containing diseased plants until 41 days, seed dressing, and spraying from 14 to 62 days after sowing; c, removing hills containing diseased plants, seed dressing, and spraying with a 10 days interval from 44 to 80 days after sowing; d, removing hills containing diseased plant at 20 and 27, seed dressing, and 3 sequence hills including diseased plant at 34 and 41 days; and, f, did nothing



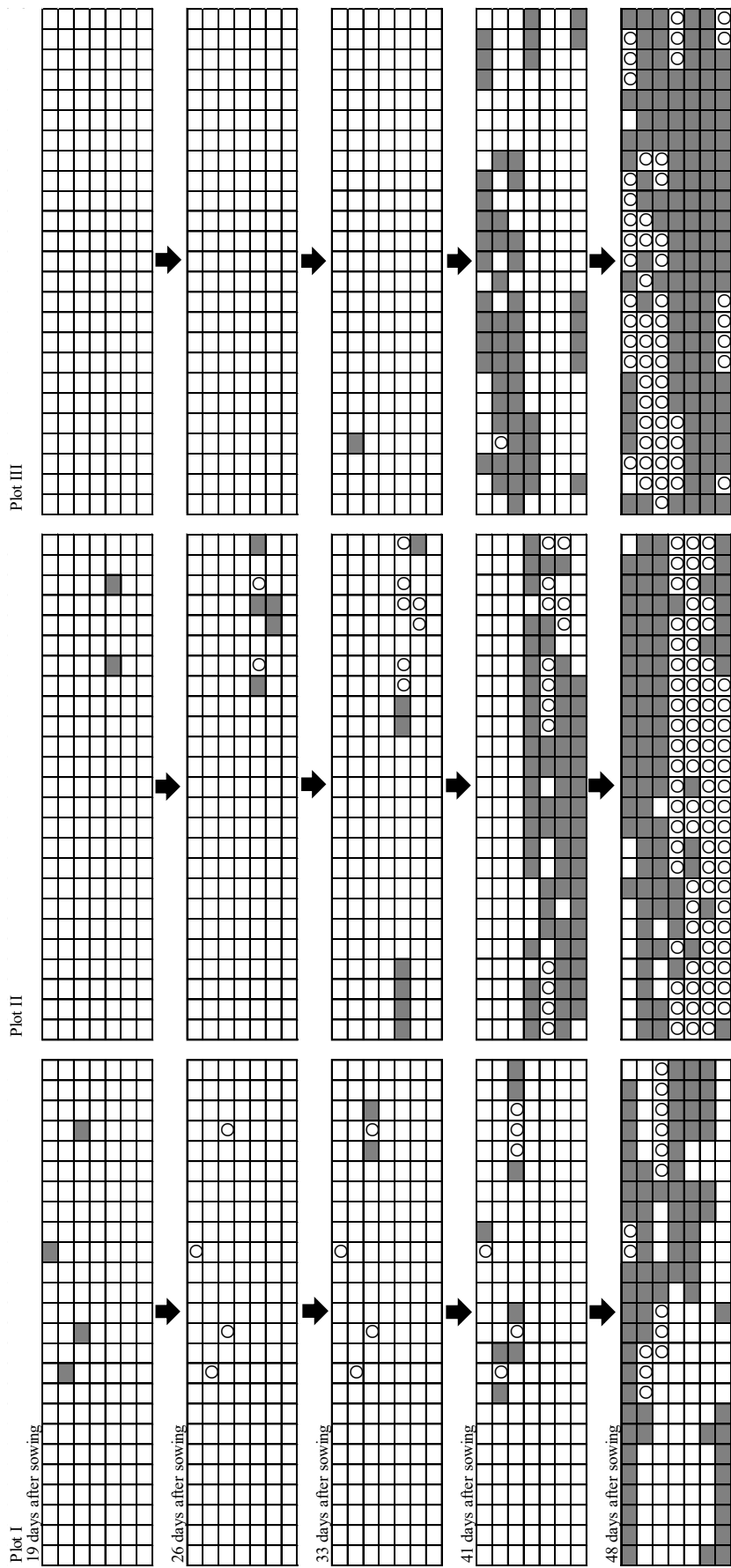
**Fig. 6-8** Example of occurrences of diseased plants on treatment A in 2009.

One cell corresponds to one hill of adzuki bean plants. × indicates a vacant hill of plants. Gray colored cell means a hill containing diseased plants newly found. ○ indicates a removed hill from the plots.



**Fig. 6-9** Example of occurrences of diseased plants on treatment a in 2010.

One cell corresponds to one hill of adzuki bean plants. Gray colored cell means a hill containing diseased plants newly found. O indicates a removed hill from the plots.



**Fig. 6-10** Example of occurrences of diseased plants on treatment b in 2010.

One cell corresponds to one hill of adzuki bean plants. Gray colored cell means a hill containing diseased plants newly found. ○ indicates a removed hill from the plots.

## 5. 抜き取り範囲の検討

発病株およびその周辺の無病徴感染株をある程度の範囲で抜き取らなければ、茎葉散布によって二次伝染を抑制することが困難であると考えられた。発病株を含む連続 3 株では不十分であった (Fig. 6-7, Fig. 6-9) ため、より広範に抜き取ることによって、圃場内に新たな発病株を発生させない手段を検討した。

### 1) 目的

発病株が生じた際に、茎葉散布によって新たな発病を生じさせない抜き取り範囲を明らかにする。

### 2) 方法

試験は 2010 年に上川農試場内圃場において行った。

十勝農試産品種‘しゅまり’に ECP・カスガマイシン・チウラム粉剤 (25%・3%・47%, 商品名‘粉衣用ペアーカスミン’) を種子重量の 0.3% 量を種子粉衣し、6 月 2 日に 1 区あたり 21 m<sup>2</sup> に播種した。銅顆粒水和剤 (40%, 商品名‘ドイツボルドー DF’) 500 倍液に展着剤 (商品名‘グラミン S’, 10000 倍) を加用し、出芽後の 6 月 13 日から 7 日間隔で 5 回茎葉散布した。6 月 29 日の 3 回目の散布後に試験区中央に他の試験区で罹病した‘しゅまり’を 1 株移植し、移植 6 日後の 7 月 5 日に隣接株が発病した時点で、伝染源を含む伝染源の前後左右 5 株合計 21 株を抜き取った。その翌日の 7 月 6 日に銅水和剤の 4 回目の散布を実施した。さらに、7 月 13 日の 5 日回目の散布前にも発病株を除去した。同様の処理を行った試験区を 3 区設置した。区内の発病状況を経時的に観察し、7 月 20 日 (最終散布 7

日後) に全株について発病の有無を調査した。

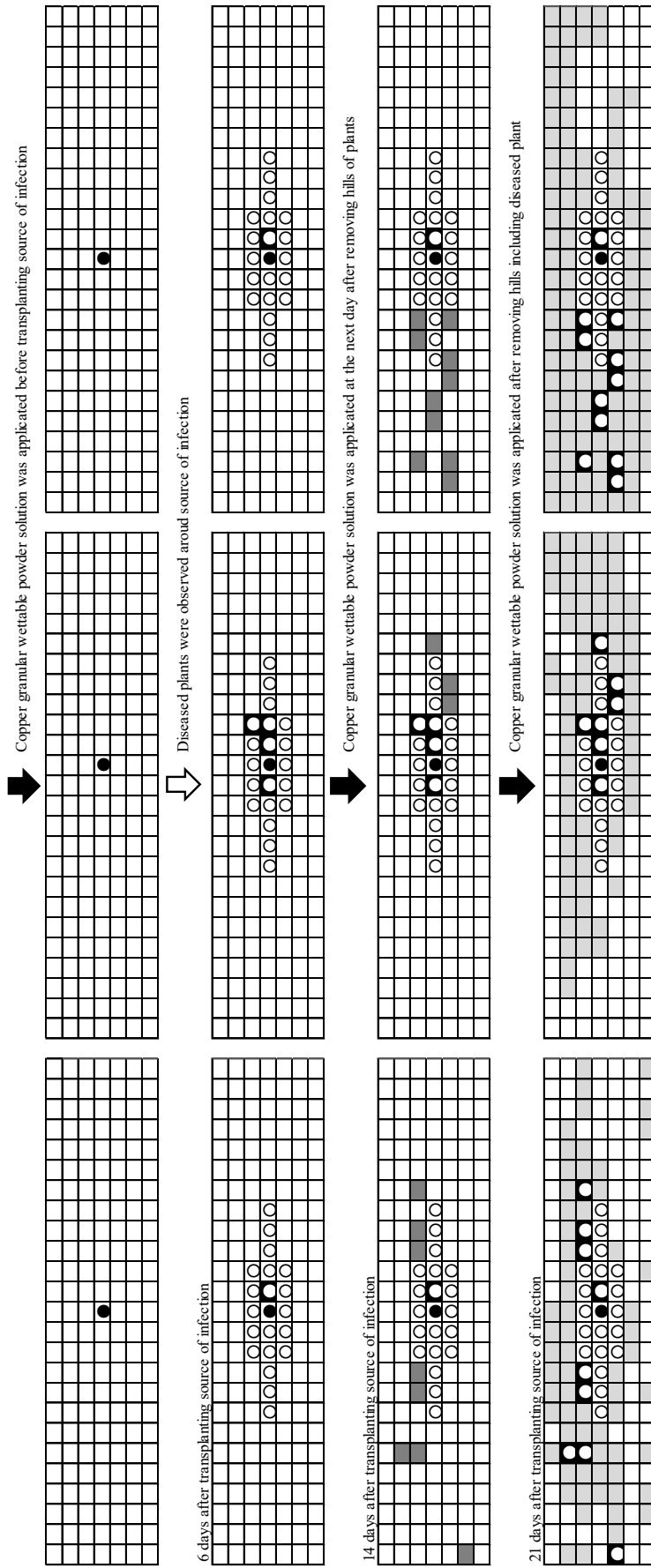
### 3) 結果

試験区の除去した株および発病株の発生状況を Fig. 6-11 に示した。

伝染源を中心とした 21 株を抜き取り，銅顆粒水和剤を散布した翌週に，抜き取った周囲の株に発病が認められた。発病株を抜き取った後に銅水和剤を散布したが，さらにその翌週に新たな発病株が多数発生し，最終散布 7 日後の発病株率は 57.6%となった。

### 4) 考察

伝染源を中心とした前後左右 5 株合計 21 株の抜き取りでは，二次伝染による新たな発病の出現を防止するには不十分であった。初発を認めた時点ですでに抜き取り対象外の株に感染してしたものと推察される。



**Fig. 6-11** Occurrences of bacterial stem rot of adzuki bean around removed hills.

One cell corresponds to one hill of adzuki bean plants. ● means a diseased plant as source of infection. ○ indicates a removed hill from the plots. Black colored background means to contain diseased plants. Gray colored cell indicates a hill containing diseased plants newly found around removed hills.



## 6. 無発生圃場産種子の利用と二次伝染リスク低減による健全種子生産

これまでの試験により、アズキ茎腐細菌病は被害が甚大であり、圃場内外に伝染源が存在する場合、一般的な防除手段である殺菌剤の茎葉散布は、栽培期間を通じて行うことにより、本病の被害軽減に一定の効果があると考えられるが、発病株の除去と組み合わせても、本病の蔓延を制御することは極めて困難であり、合理的な手段ではないと考えられた。一方、健全種子を利用することによって本病の発生を低く抑えることが可能であることを示唆する事例があり、本病の対策として、健全種子生産とその利用が合理的な手段であると判断した。そこで、無発生圃場産種子を使用し、かつ、本病の発生源となる恐れのある圃場から隔離された二次伝染リスクが低い生産環境による健全種子生産の可能性を実証した。

### 1) 目的

アズキの原種圃、採種圃およびモデル試験圃場において、アズキ茎腐細菌病の無発生圃場産種子の利用および二次伝染のリスク低減により、アズキ茎腐細菌病が発生しない健全種子生産が可能であることを実証する。

### 2) 方法

試験は 2011 年に北海道美瑛町内に設置された原種を生産するための原種圃 7 圃場および種子を生産するための採種圃 2 圃場において行った。なお、原種圃には 1970 年代以降アズキ茎腐細菌病の発生記録がない滝川市に所在するホクレン滝川種苗生産センターで生産

された原原種が供給されている。一方、対象とした採種圃には本病の発生記録の無い十勝地方産の原種が供給されている。なお、美瑛町内における原種圃および採種圃の設置に関して、市場に流通する子実が生産される一般圃場から隔離されていることが条件とされている。調査圃場の概要は Table 6-3 に示した通りである。施肥量および栽植密度、防除、その他栽培管理は農家慣行とした。出芽以降、約 2 週間間隔で計 6 回圃場内全株について発病の有無を調査した。また、8 月 3 日に H 圃場の品種‘きたろまん’において、アズキ茎腐細菌病の発生が認められたため、翌 8 月 4 日に発病株を中心に 4.5 m 四方の株を抜き取り (Fig. 6-12)、抜き取った外周の株について、収穫直前まで、随時本病の発生状況を調査した。さらに、抜き取った株のうち最も外側に位置する Fig. 6-13 に示した 10 株を 1 株ずつ 1/5000 a ワグネルポットに移植し、上川農試場内で発病の有無について経過を観察した。加えて、8 月 10 日および 9 月 1 日に H 圃場に隣接する採種圃で栽培されている品種‘サホロショウズ’、および、9 月 1 日に H 圃場の品種‘きたろまん’と同一の原種を播種した I 圃場および H 圃場に舗装道路を隔てて位置する J 圃場 (一般圃場) の‘きたろまん’について、それぞれ全株に対して本病の発生状況を調査した。

さらに、モデル試験圃場として、上川農試場内の 10 a の圃場に本病の発生記録のない十勝地方で採種された品種‘エリモショウズ’を 5 月 31 日に播種した。なお、播種前にアブラムシ類および糸状菌による苗立枯病防除を目的に、チアメトキサムフロアブルによる種子塗抹処理およびチウラム粉剤による種子粉衣処理を行った。アズキ茎腐細菌病を対象とした防除は行わず、中耕は小型管理機により

生育初期に 1 回のみ行った。全株を対象に出芽後から収穫期まで 1 週間間隔で計 10 回発病状況を調査した。

### 3) 結果

原種圃および採種圃における実証試験結果を Table 6-4 に、上川農試場内におけるモデル試験結果を Table 6-5 に示した。

美瑛町内の原種圃および採種圃を調査した結果、8 月 3 日に H 圃場の品種‘きたろまん’において、連続する 2 株のみ本病の発生を認めた (Fig. 6-14a, b)。発病株は 9 節まで生長しており、第 2 本葉の発病が最も激しく、大型壊死斑を形成していた (Fig. 6-14c)。病徴は第 1 本葉および第 3 本葉 (壊疽)、第 5 本葉 (壊疽～斑点)、第 4 本葉 (斑点) の順に激しかった。第 6 本葉より上位葉に発病は認められなかった。また、胚軸部に赤褐色斑点状の病斑がわずかに認められたが、落葉後の初生葉節に病斑は認められなかった (Fig. 6-14d)。また、隣接する‘サホロショウズ’採種圃および同一の原種が播種された生産者 I の‘きたろまん’、発病が認められた生産者 H の採種圃‘きたろまん’圃場から舗装道路を挟んで斜向かいに位置する生産者 J 圃場の一般生産の‘きたろまん’圃場においても本病の発生が認められなかった。

一方、その他の原・採種圃 8 圃場、および、上川農試場内のモデル試験圃場において本病の発生は認められなかった。

また、本病が発生した H 圃場では、抜き取り処理 (Fig. 6-12) 以降、本病の発生が認められず、抜き取り後ポットに移植した株 (Fig. 6-13) にも発病は認められなかった (データ無し)。

#### 4) 考察

本病の発生が唯一認められた H 圃場の品種‘きたろまん’について、第二本葉の発病が最も激しかったこと、および、初生葉は落葉しており、初生葉での発病の有無は定かではないが、初生葉節に病斑が認められなかったこと、6月27日から7月27日までの過去3回の調査時に発病が認められなかったことから、種子伝染による発病の可能性は極めて低いと考えられた。さらに、生産者 H の‘きたろまん’圃場と同一ロットの種子が播種された I 圃場においても本病の発生が認められなかったことから種子伝染の可能性が低いことが裏付けられる。また、関係者からの聞き取り調査の結果、今回発病が認められた生産者 H の圃場において過去に本病が発生したことが無かったことから、野良生えおよび罹病残渣が伝染源となった可能性も低い。したがって、本発生事例は種子や残渣を介した一次伝染ではなく、圃場外からの飛び込みなどによる二次伝染による発病であると推察された。しかし、近接するアズキ圃場において本病の発生はなく、また、見渡す範囲で J 圃場以外に周囲にアズキ圃場は無かったため、本事例における伝染源の特定には至らなかった。本事例が二次伝染による発病であると仮定すると、病原細菌をアズキに噴霧接種すると未展開から不完全展開の葉の感受性が高い傾向がある（データなし）ため、第2本葉が未展開から不完全展開時に感染したと考えられる。

一方、その他の原・採種圃 8 圃場、および、上川農試場内のモデル試験圃場において本病の発生が認められなかったことから、無発生圃場産種子の利用、および、一般圃場から隔離するなどの二次伝染リスクの低減により健全種子生産が可能であることが実証された。

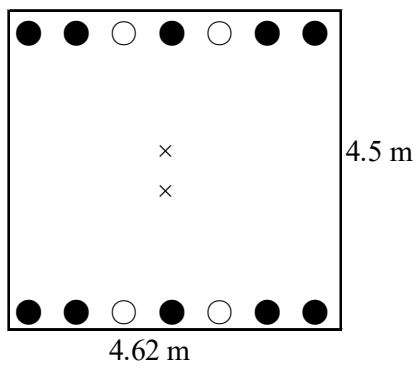
また、本病が発生した生産者 H の‘きたろまん’圃場において、抜き取った株の周辺および抜き取った株について発病が認められなかったことから、発生確認後、速やかに、発病株を中心に 4–5 m 四方の範囲の株を抜き取ることが、二次伝染による新たな発病の防止に有効であると考えられた。

**Table 6-3 Information of research field producing adzuki bean seeds in Biei town, Hokkaido, in 2011**

Farmers	Kinds of products	Cultivars	Cultivation area	Supplied source	The number of times of bactericide application	Cultivation history in				
						2010	2009	2008	2007	
A	Registered seed	Sahoro-shozu	40 a	Foundation seed produced in Takikawa, Hokkaido	7	White mustard	Wheat	Wheat	Wheat	Corn
B	Registered seed	Syumari	40 a	Foundation seed produced in Takikawa, Hokkaido	7	Wheat	Potato	Sugar beet	Sugar beet	Wheat
C	Registered seed	Erimo-shozu	40 a	Foundation seed produced in Takikawa, Hokkaido	8	Sugar beet	Wheat	Wheat	Wheat	Potato
D	Registered seed	Kita-no-otome	30 a	Foundation seed produced in Takikawa, Hokkaido	4	Potato	Wheat	Wheat	Wheat	Potato
D	Certified seed	Akane-dainagon	80 a	Registered seed produced in Tokachi region, Hokkaido	4	Potato	Wheat	Wheat	Wheat	Potato
E	Registered seed	Syumari	40 a	Foundation seed produced in Takikawa, Hokkaido	9	Corn	Sugar beet	Kidney bean	Soybean	Soybean
F	Registered seed	Kita-no-otome	40 a	Foundation seed produced in Takikawa, Hokkaido	10	Potato	Sugar beet	Wheat	Wheat	Green manure
G	Registered seed	Erimo-shozu	40 a	Foundation seed produced in Takikawa, Hokkaido	9	Wheat	Wheat	Wheat	Wheat	Unknown
H	Certified seed	Kitaroman	100 a	Registered seed produced in Tokachi region, Hokkaido	6	Potato	Sugar beet	Sugar beet	Wheat	Potato
H	Certified seed	Sahoro-shozu	200 a	Registered seed produced in Biei, Hokkaido	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
I	Certified seed	Kitaroman	100 a	Registered seed produced in Tokachi region, Hokkaido	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
J	Commercial products	Kitaroman	400 a	Certified seed produced in Biei, Hokkaido	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown



**Fig. 6-12** Picture of farmer H's field after removing adzuki bean plants cv. Kita-roman around diseased plants



**Fig. 6-13** An extent of removed plants around bacterial stem rot diseased plants in farmer H's field

× indicates diseased plant exhibiting symptoms of bacterial stem rot of adzuki bean. ● indicates the hill of the plant to locate inside the boundary of an extent of removed plant, and to be transplanted in Wagner's pot. ○ indicates the hill of the plant not to be transplanted in Wagner's pot



**Table 6-4** Results of investigation of bacterial stem rot of adzuki bean in adzuki bean seed production fields in Biei town, Hokkaido, in 2011

Farmers	Kinds of products	Cultivars	The numbers of plants exhibiting symptoms of bacterial stem rot of adzuki bean							
			June 27	July 8	July 27	August 3-4	August 9-10	August 26	September 1	
A	Registered seed	Sahoro-shozu	0	0	0	0	0	0	0	—
B	Registered seed	Syumari	0	0	0	0	0	0	0	—
C	Registered seed	Erimo-shozu	0	0	0	0	0	0	0	—
D	Registered seed	Kita-no-otome	0	0	0	0	0	0	0	—
D	Certified seed	Akane-dainagon	0	0	0	0	0	0	0	—
E	Registered seed	Syumari	0	0	0	—	—	—	—	0
F	Registered seed	Kita-no-otome	0	0	0	—	—	—	—	0
G	Registered seed	Erimo-shozu	0	0	0	0	0	0	0	0
H	Certified seed	Kitaroman	0	0	0	2 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	—	—	0
H	Certified seed	Sahoro-shozu	— <sup>a</sup>	—	—	—	0	—	—	0
I	Certified seed	Kitaroman	—	—	—	—	—	—	—	0
J	Commercial products	Kitaroman	—	—	—	—	—	—	—	0

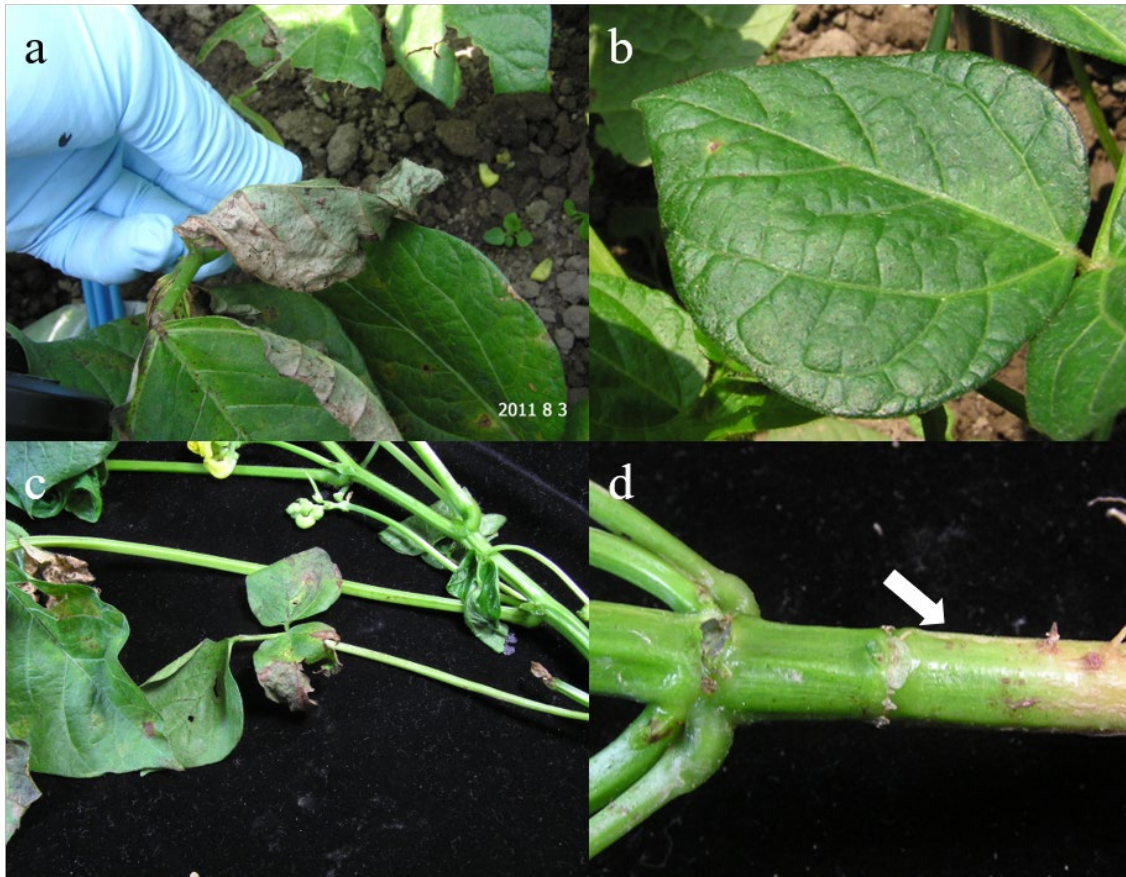
<sup>a</sup> Not investigated

<sup>b</sup> Plants around diseased plants were removed within the extent of 4.5 m × 4.62 m after discovery of diseased plants (see Fig. 6-12 and Fig. 6-13)

<sup>c</sup> The only plants to be outside of removed plants were investigated

**Table 6-5** Results of investigation of bacterial stem rot of adzuki bean (BSRA) in the field, which certified seeds produced in Tokachi region were sown, in Kamikawa Agricultural Experiment Station in 2011

Date	The numbers of plants exhibiting symptoms of BSRA
June 22	0
June 30	0
July 8	0
July 15	0
July 23	0
August 1	0
August 8	0
August 15	0
August 23	0
September 5	0



**Fig. 6-14** Symptoms of bacterial stem rot of adzuki bean observed on cv. Kita-roman in farmer H's field. **a** Wilt and necrosis of leaflet on finding. **b** Reddish-brown spot on leaflet on finding. **c** Necrotic lesions on second leaves. **d** No symptom at the node of primary leaf. Arrow indicates reddish-brown lesion on hypocotyl

## 第7章 総合考察

アズキ茎腐細菌病は、1971年に北海道富良野市の水田転換畑で発生が初めて確認された(谷井ら 1973, Tanii and Baba 1979)。本病は北海道石狩および空知, 後志, 胆振地方でも発生し, 翌1974年には北海道南部でも発生が確認された(谷井ら 1973, Tanii and Baba 1979)。その後, 1987年まで継続して発生が記録されており(北海道農務部・北海道立中央業試験場 1988), その間1981年(北海道立農業試験場各農試・北海道農務部農業改良課・北海道各病虫害防除所 1982)を除いて目立った発生がなかった。

アズキ茎腐細菌病の病原細菌は, Tanii and Baba (1979)が“*Pseudomonas adzukicola*”と命名したものの, 国際細菌命名規約により1980年以降しばらくの間失効したが, 最新の‘日本植物病名目録(2021年9月版’(日本植物病理学会 2021)では, *Pseudomonas* sp.とされている。そこで, 2000年代に得たアズキ茎腐細菌病の病原細菌について, 細菌学的性質, 遺伝的性質に関する詳細な試験を行い, 本病原細菌は, LOPAT試験および16SrDNA, *gyrB*, *rpoD*の塩基配列から *P. syringae* 群細菌に属すると考えられ, Inoue and Takikawa (2006)の *hrp* group IAに分類された(東岱ら 2011)。細菌学的性質に関する詳細な検討およびハウスキーピング遺伝子(*gapI* および *gltA*, *gyrB*, *rpoD*)の塩基配列を用いた系統解析から, 本病原細菌は, ダイズ斑点細菌病の病原細菌である *P. savastanoi* pv. *glycinea* と極めて近縁であると考えられたが, 病原性の差異および rep-PCRによる遺伝的な差異, 一部の炭素源の利用性の差異により, Gardan et al. (1999)の *P. syringae* 群細菌 genomospecies 2に関連する細菌のなかで *P. savastanoi* pv. *glycinea* と異なる独立した分類群で

あると推察された。genomospecies 2 に所属する細菌の学名のうち *P. amygdali* に先名権があること、さらに、*P. savastanoi* の学名の不適切性から、アズキ茎腐細菌病の病原細菌を *Pseudomonas amygdali* (syn. *P. savastanoi*) pv. *adzukicola* pv. nov. と命名し、提案するという結論に至った。

アズキ茎腐細菌病は、既往の報告 (Tanii and Baba 1979) および本研究から種子伝染性の病害であることは明確である。特に圃場内の発病株が強力な伝染源となって、二次伝染により急激かつ広範に伝播し、甚大な減収被害に至ることが明らかとなった。甚大な被害を回避するために、殺菌剤による防除は一定の効果があると考えられる一方、本病が発生していない地域で生産された種子を用いた試験では、初発が極めて遅く、かつ、その発病も隣接する試験区からの飛び込みによる発病であったと推察された。言い換えると、病原菌に汚染されていない無病種子を用いれば、本病の発病を完全に回避、あるいは、圃場外から伝搬したとしても、圃場内に伝染源が存在し、徹底的に殺菌剤による茎葉散布を行うよりは、被害が軽く、経済的にも労働生産的にも極めて有利であることが予想された。したがって、本病の対策として、無病種子の利用は必須であり、種子生産圃場における健全種子の生産は本病発生地域において至上命題となった。

同じくアズキにおける種子伝染性の細菌病害であるアズキ褐斑細菌病は、発病株を抜き取った直後およびその 1 週間後の茎葉散布による防除技術により、新たな発生が抑制され、健全種子生産が可能であることが示されている (北海道立中央農業試験場クリーン農業部総合防除科 2009)。一方、アズキ茎腐細菌病については、本研究

から、生育初期からの茎葉散布および発病株の抜き取りによって、被害軽減は期待できるものの、二次伝染による新たな発病を防止することは困難で、圃場内および近隣に伝染源が存在する場合、健全種子生産は不可能であると判断された。反対に、伝染源が無い、すなわち、病原細菌による汚染の可能性が極めて低い無発生圃場産種子を用い、周辺に発生圃場が無く、飛び込みによる発病などの二次伝染リスクの低い生産環境であるならば、本病はアズキ生産上ほとんど問題にならず、健全種子生産が可能であることが、美瑛町内のアズキ原・採種圃場および上川農試場内のモデル試験において実証された。また、発病を認めた圃場においても、発病株を中心に 4.5 m 四方の株を速やかに抜き取ることによって、二次伝染による新たな発病が認められなかった。このことから、発病株の周辺の無病徴感染株を除去するためには、発病株を中心とした 4-5 m 四方の範囲の株を抜き取ることが有効であると考えられた。

実際、2011 年は美瑛町のすべての原種圃および採種圃において上記の事例以外の本病の発生は最終的に確認されず、これらの圃場では健全種子が生産されたものと推察される。しかし、種子の再汚染や二次伝染リスクは皆無でないことから、種子生産圃場では従来通りの薬剤防除が不可欠である。また、どのくらいの期間伝染源となりえるか不明であるが、発生圃場跡に生じた野良生えアズキ、および、土壌中に残存した罹病残渣が伝染源となることが懸念されることから、過去に発生した圃場における種子生産は避けることが望ましい。さらに、豆類における他の細菌病害と同様に農作業（人や農機具など）を介して伝播することも想定されるため、農機具の洗浄および作業体系などに留意する必要がある。

試験で供試した A 町内の種子生産圃場は、現在一般圃場と隔離することが徹底指導されているが、過去に種子生産圃場において本病の発生が散見される年もあり、本病の発生により審査に不合格となった事例が生じたことを関係者からの聞き取り調査で得た。また、原種圃は小面積であるため、採種圃と通路 (4-5 m) を隔てて設置される場合が多い。本研究においては、茎葉散布による防除を実施しなかったが、約 7 m の距離で飛び込みによる発病が生じる事例があった。飛び込みによる発病が皆無となる伝染源からの距離は明らかでないが、過去の種子生産圃場における発生状況を考慮すると、原種圃は採種圃からも隔離して設置する必要があると考えられる。

また、前年の発病度および発病莢率 0% の個体、すなわち、外観無病徴の個体由来の種子でも、翌年には種子伝染と推察される発病が認められた。このことから、本病においても、インゲンマメかさ枯病 (谷井ら 1975) と同様に無病徴感染により病原細菌を保菌することが示唆された。聞き取り調査の結果、2009 年 A 町では‘しゅまり’採種圃 4 圃場のうち 3 圃場で本病の発生が認められた。発病株は抜き取られ、無病徴株から採種されたが、保菌した種子が 2009 年 A 町産‘しゅまり’種子に混入したのが原因で、本研究中の試験において種子伝染による発病が生じたと推察される。

以上のことを踏まえ、アズキ茎腐細菌病発生地域の種子生産圃場における健全種子生産スキームを考案した (Fig. 7)。すなわち、過去に本病の発生の無い隔離圃場を設置し、周囲の一般圃場からの飛び込みによる発病などの二次伝染リスクを低減する。さらに、原種圃は採種圃からも隔離する。種子伝染による発病の可能性の低い無発生圃場産種子を用い、さらに種子の再汚染を防止するため、ダイア

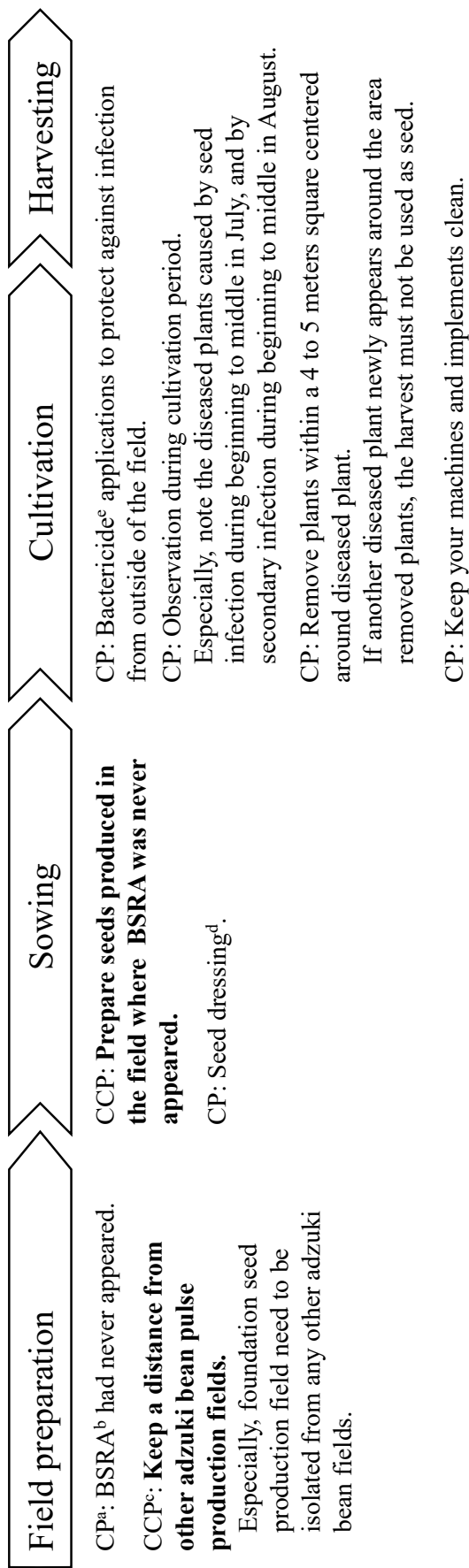
ジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤 (25%・3%・25%, 商品名‘粉衣用ペアーカスミン D’) による種子粉衣を行う。また、圃場内における伝播および飛び込みによる発病などの二次伝染を抑制するため、本病に対する登録薬剤による茎葉散布を生育初期から実施する。管理作業は種子生産圃場を優先して行い、器具の洗浄を行うなどの圃場衛生を心がける。本病の典型的な病徴の他に、‘閉じている初生葉’、‘くさび型病斑’ および ‘小葉の下垂’ を目安に、圃場内を観察し、発病株の早期発見に努める。特に、7月上旬から中旬 (主に種子伝染による発病) および 8月上旬から中旬 (二次伝染による発病) は全株調査し、重点的に発病の有無を確認する。発病が認められた場合は、速やかに、発病株を中心に 4-5 m 四方の株を抜き取り、圃場外に持ち出し、適切に処分する。収穫までに、抜き取った株の周囲に新たな発病が無ければ採種可能とし、発病が認められる場合は、種子として用いるべきではない。

本病は生態的な特徴がかつて道内で猛威をふるったインゲンマメかさ枯病に酷似する。インゲンマメかさ枯病に対し、銅水和剤による茎葉散布は有効である (真野ら 1966) が、被害を軽減することはできても、消滅にはつながらない (谷井ら 1975)。インゲンマメかさ枯病の第一次伝染源は種子に依存している (谷井・高桑 1968) ことから、無病種子生産の重要性が訴えられ、1967-1971 年に実施された無病種子の緊急増殖事業が功を奏し、健全種子の有効性が証明された (谷井ら 1975)。さらに、インゲンマメかさ枯病は種子検定法 (谷井ら 1975, Kurowski et al. 2008) が確立されており、種子における保菌の確認が可能である。本病についても種子における病原細菌検出法の確立が今後の課題である。また、本病が二次伝染に



より急速に蔓延することは興味深い特徴である。病原細菌が宿主であるアズキにおいて急激に増殖し、感染、発病を繰り返すことが推察されるが、急激な蔓延を特徴づける性質はどのようなところにあるのか、他の細菌病と比較してどのような点が異なるかを含め、検討に値する点である。さらに、抜き取りによる本病の制御を困難としたのが、無病徴感染とその後の発病であった。病原細菌の感染から発病に至る過程に関する知見が本病の制御する手段を講じるきっかけになるかもしれない。いずれにしても、本病の生態的特徴および病原細菌の生理的な特徴をさらに明らかにすることが、本病への理解と効率的な防除につながるものと考えられる。

当面は、種子生産圃場における健全種子生産の取り組みに加えて、一般圃場において種子更新が徹底され、種子の再汚染および飛び込みによる発病の防止を目的に薬剤防除されることによって、地域の病原細菌の密度が次第に低下し、本病がアズキ生産上の阻害要因ではなくなることが期待される。



**Fig. 7** The scheme of non-infested seed production in the area affected by bacterial stem rot of adzuki bean disease.

<sup>a</sup> Control point

<sup>b</sup> Bacterial stem rot of adzuki bean

<sup>c</sup> Critical control point

<sup>d</sup> Using with diazinon, kasugamycin and thiuram powder

<sup>e</sup> Solution of kasugamycin and Copper wettable powder, copper granular wettable powder, or dimethomorph and copper wettable powder

## 引用文献

- Allington WH (1945) Wildfire disease of soybeans. *Phytopathology* 35: 857–869
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1563–1589
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) *Current protocols in molecular biology*, vol 1. Wiley, New York
- Bender CL, Alarcón-Chaidez F, Gross DC (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 266–292
- Bradbury JF (1986) *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew
- Bull CT, Clarke CR, Cai R, Vinatzer BA, Jardini TM, Koike ST (2011) Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* 101:847–858
- Burkholder WH (1957) Genus *Pseudomonas*. In: Breed RS, Murray EDG, Smith NR (eds) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, P88–152
- Dutta B, Gitaitis R, Agarwal G, Coutinho T, Langston D (2018)

*Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto-bacterial species  
diverse from *Pseudomonas syringae*. Plos ONE 13:e0208271

Dye DW, Bradbury JF, Dickey RS, Goto M, Hale CN, Hayward AC,  
Kelman A, Leriott RA, Patel PN, Sands DC, Schroth MN, Watson  
DRW, Young JM (1975) Proposals for a reappraisal of the status of  
the names of plant-pathogenic *Pseudomonas* species. Int J Sys  
Bacteriol 25:252–257

Dye DW, Bradbury JF, Goto M, Hayward AC, Leriott RA, Schroth MN  
(1980) International standards for naming pathovars of  
phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype  
strains. Rev Plant Pathol 59:153–168

Gardan L, Bollet C, Abu Ghorrah M, Grimont F, Grimont PAD (1992)  
DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas*  
*syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of  
*Pseudomonas savastanoi* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 42:606–612

Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont PAD (1999)  
DNA relatedness among the pathovar of *Pseudomonas syringae* and  
description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas*  
*cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). Int J Syst Bacteriol  
49:469–478

Gomila M, Busquets A, Mulet M, Garcia-Valdés E, Lalucat J (2017)  
Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae*  
species group based on a phylogenomic analysis. Front Microbiol  
8:2422

後藤正夫 (1959) 豌豆の蔓腐性細菌病について. 植物防疫 13 : 167-

- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984a) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (1). 植物防疫 38: 339-344
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984b) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (2). 植物防疫 38: 385-389
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984c) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (3). 植物防疫 38: 433-437
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984d) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (4). 植物防疫 38: 479-484
- Grogan RG, Kimble KA (1967) The role of seed contamination in the transmission of *Pseudomonas phaseolicola* in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 57: 28-31
- Harmon CL, Timilsina S, Bonkowski J (2018) Bacterial gall of *Loropetalum chinense* caused by *Pseudomonas amygdali* pv. *loropetali* pv. nov. *Plant Dis* 102:799-806
- Hildebrand AC (1971) Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens. *Phytopathology* 61:1430-1436
- 北海道農務部・北海道立中央農業試験場 (1983) 昭和 57 年度 (1982) 農作物有害動植物発生予察事業年報
- 北海道農務部・北海道立中央農業試験場 (1984) 昭和 58 年度 (1983) 農作物有害動植物発生予察事業年報
- 北海道農務部・北海道立中央農業試験場 (1985) 昭和 59 年度 (1984) 農作物有害動植物発生予察事業年報
- 北海道農務部・北海道立中央農業試験場 (1986) 昭和 60 年度 (1985)

農作物有害動植物発生予察事業年報

北海道農務部・北海道立中央農業試験場 (1987) 昭和 61 年度 (1986)

農作物有害動植物発生予察事業年報

北海道農務部・北海道立中央農業試験場 (1988) 昭和 62 年度 (1987)

農作物有害動植物発生予察事業年報

北海道農政部 (2019) 北海道における主要農作物等の種子の生産と供給について.

<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/ns/nsk/syusi/joureisetimeisiryoushi0415.pdf> 2021 年 5 月 6 日閲覧

北海道農政部 (2021) 北海道主要農作物等の種子の生産に関する条例事務取扱要領 令和 3 年 (2021 年) 4 月改正.

<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/ns/nsk/syusi/3.pdf> 2021 年 5 月 6 日閲覧

北海道立北見農業試験場 (1972) 昭和 46 年度病虫害に関する試験成績書. p12-14.

北海道立農業試験場各農試・北海道農務部農業改良課・北海道各病虫害防除所 (1982) 昭和 56 年度の発生にかんがみ注意すべき病虫害. 北海道農務部農業改良課編. 昭和 57 年普及奨励ならびに指導参考事項. pp 205-217

北海道立十勝農業試験場病虫害予察科 (1978) 小豆茎腐細菌病防除. 北海道農務部農業改良課編. 昭和 53 年普及奨励ならびに指導参考事項. pp 54-56

北海道立中央農業試験場クリーン農業部総合防除科 (2009) 種子生産圃場におけるダイズ斑点細菌病およびアズキ褐斑細菌病の防除対策. 北海道農政部食の安全推進局技術普及課編. 平成 21 年

普及奨励ならびに指導参考事項. pp 67–69

Hugh R, Leifson E (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by various gram negative bacteria. *Journal of bacteriology* 66: 24–26

Inoue Y, Takikawa Y (2006) The *hrpZ* and *hrpA* genes are variable, and useful for grouping *Pseudomonas syringae* bacteria. *J Gen Plant Pathol* 72:26–33

Janse JD, Rossi P, Angelucci L, Scortichini M, Derks JHJ, Akkermans ADL, De Vrijer R, Psallidas PG (1996) Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. nov.), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Syst Appl Microbiol* 19:589–595

梶山季之 (1994) 赤いダイヤ 上. 集英社, 東京

Kennedy BW (1984) Bacterial stem rot, a devastating disease of adzuki bean in Minnesota. *Ann Rep Bean Improv Coop* 27:160

Kennedy BW, Denny R (1984) Bacterial stem rot, a new disease of adzuki bean in Minnesota. *Plant Dis* 68:167

King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44:301–307

Kumar 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

Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seeliger HPR, Clark WA (1975) International code of nomenclature of bacteria.

Bacteriological code, 1976 revision. Am Soc Microbiol, Washington DC

Lelliott RA, Billing E, Hayward AG (1966) A Determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. J Appl Bacteriol 29: 470–489

Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl Environ Microbiol 60: 2286–2295

Maeda Y, Shinohara H, Kiba A, Ohnishi K, Furuya N, Kawamura Y, Ezaki T, Vandamme P, Tsushima S, Hikichi Y (2006) Phylogenic study and multiplex PCR detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. Int J Syst Evol Microbiol 56:1031–1038

真野豊・三宅力雄・高桑亮 (1966) インゲンかさ枯病の防除薬剤. 北日本病虫研報 17: 108

Marques ASA, Marchaison A, Gardan L, Samson R (2008) BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*-*P. viridiflava* group. Gen Mol Biol 31:106–115

Morisita M (1959) Measuring of the dispersion of individuals and analysis of the distributional patterns. Mem Fac Sci Kyusyu Univ Ser E (Biol) 2:215–235

Morisita M (1962)  $I_{\delta}$ -index, a measure of dispersion on individuals. Res Popul Ecol 4:1–7

農林水産省大臣官房統計部 (2020) 令和元年耕地及び作付面積統計.



- 農林水産省大臣官房統計部編．農林統計協会，東京
- 日本植物病理学会 (2021) 日本植物病名目録 (2021 年 9 月版) 日本植物病理学会編，東京，  
<https://www.ppsj.org/pdf/mokuroku/mokuroku202109.pdf> 2021 年 5 月 5 日閲覧
- 西山幸司 (1978) 植物病原細菌簡易同定法の試案．植物防疫 32:283–288
- 西山幸司 (1991) 3. 病原細菌の分離と同定．田部井英夫・高橋幸吉・高梨和雄・西山幸司編集．作物の細菌病 診断と防除．日本植物防疫協会，東京，pp. 12–56
- 大楠清文・江崎孝行 (2009) 分子系統解析に基づいた細菌の分類と同定．Sysmex J Web 10:1–12
- Palleroni NJ (2005) Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237<sup>AL</sup> (*Nom. Coms., Opin. 5 of the Jud. Comm. 1952, 121*). In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition, Volume two The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria. Springer, Boston, pp 323–379
- Parkinson N, Bryant R, Bew J, Elphinstone J (2011) Rapid phylogenetic identification of member of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. *Plant Pathol* 60:338–344
- Rademaker JLW, Louws FJ, Versalovic J, de Bruijn FJ (2004) Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans ADL, van Elsas JD (eds) *Molecular microbial ecology manual*, Second edition. Kluwer, Dordrecht, Chap.

5.3.2, pp 1–33

- Ramírez-Zapata D, Ramos C, Aguilera S, Bardaji L, Martínez-Gil M, Murillo J (2020) Two homologues of the global regulator Csr/Rsm redundantly control phaseolotoxin biosynthesis and virulence in the plant pathogen *Pseudomonas amygdali* pv. *phaseolicola* 1448A. *Microorganisms* 8:1536
- Ribeiro RdeLD, Hagedorn DJ, Durbin RD, Uchytel TF (1979) Characterization of the bacterium inciting bean wildfire in Brazil. *Phytopathology* 69: 208–212
- Ryu E (1937) A simple method of staining bacterial flagella. *Kitasato Arc Exp Med* 14: 218–219
- Sarkar SF, Guttman DS (2004) Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Environ Microbiol* 70:1999–2012
- Schoch CL, Ciuffo S, Domrachev M, Hottel CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)* 2020:baaa062
- Schroth MN, Vintanza VB, Hildebrand DC (1971) Pathogenic and nutritional variation in the halo blight group of fluorescent *Pseudomonads* of bean. *Phytopathology* 61: 852–857
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA (1980) Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 30: 225–420
- Society of American Bacteriologists (1957) *Manual of microbiological*

methods. McGraw-Hill, New York, p54

Suzuki A, Togawa M, Ohta K, Takikawa Y (2003) Occurrence of white top of pea caused by a new strain of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Plant Dis 87:1404–1410

Stacketbrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swing J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Sys Evol Microbiol 52: 1043–1047

Taguchi F, Tanaka R, Kinoshita S, Ichinose Y, Imura Y, Andi S, Toyoda K, Shiraishi T, Yamada T (2001) Harpin<sub>psta</sub> from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* is defective and deficient in its expression and HR-inducing activity. J Gen Plant Pathol 67:116–123

Takahashi F, Ogiso, H, Fujinaga, M, Ishiyama Y, Inoue Y, Shirakawa T, Takikawa Y (2013) First report of bacterial blight of crucifers caused by *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* in Japan. J Gen Plant Pathol 79:260–269

瀧川雄一 (2006) 植物防疫基礎講座：植物病原菌の分子系統樹 そのシステムと見方 細菌編 (1) 総論：細菌における系統分類の発展と植物病原細菌. 植物防疫 60 : 81–85

Takikawa Y, Serizawa S, Ichikawa T, Tsuyumu S, Goto M (1989) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. Ann Phytopath Soc Jpn 55: 437–444

Tanii A, Baba T (1979) Bacterial stem rot of adzuki bean (*Phaseolus radiatus* var. *aurea* Prain) caused by *Pseudomonas adzukicola* A.

Tanii et T. Baba nov. sp. Bull Hokkaido Pref Agric Exp Stn 42: 29–42

谷井昭夫・馬場徹代 (1971) 北海道における植物細菌病 1.

*Pseudomonas syringae* van Hall によるアズキの褐斑細菌病. 北海道立農業試験場集報 23 : 90–97

谷井昭夫・馬場徹代 (1974) アズキ茎腐細菌病の病原細菌について.

日植病報 40 : 202–203 (講要)

谷井昭夫・成田武四・赤井純・馬場徹代 (1973) 小豆の茎腐細菌病

(新称) とその病原細菌. 日植病報 39 : 151 (講要)

谷井昭夫・高桑亮 (1968) 蛍光抗体によるインゲンかさ枯病菌の検

出. 北日本病虫研報 19 : 27

谷井昭夫・高桑亮・馬場徹代・田北辰雄 (1976) インゲンのかさ枯病

に関する研究. 北海道立十勝農業試験場資料 6 : 1–66

Taylor JD, Teverson DM, Allen DJ, Pastor-Corrales MA. (1996)

Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. Plant Pathol 45: 469–478

東岱孝司 (2012) アズキ茎腐細菌病がアズキの子実重に与える影響.

北日本病虫研報 63 : 32–36

東岱孝司・高橋冬実・安岡眞二・瀧川雄一 (2011) 近年分離されたア

ズキ茎腐細菌病の病原細菌について. 日植病報 77 : 246–247 (講要)

富濱毅 (2009) チャ赤焼病防除における展着剤の活用. 植物防疫 63:

218–221

Tsuji M, Ohta K, Tanaka K, Takikawa Y (2017) Comparison among

- Japanese isolates of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causal agent of olive knot disease. *J Gen Plant Pathol* 83:152–161
- Tsuji M, Takikawa Y (2018) *Pseudomonas syringae* pv. *allii-fistulosi* pv. nov., the causal agent of bacterial leaf spot of onions. *J Gen Plant Pathol* 84:343–358
- 上田実, 杉本貴謙, 高田晃, 山村庄亮 (2002) 植物の運動を支配する鍵物質. *化学と生物* 40 : 578–584
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl Acids Res* 19:6823–6831
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth Mol Cell Biol* 5:25–40
- Walker JC, Patel PN (1964) Splash dispersal and wind as factor in epidemiology of halo blight of bean. *Phytopathology* 54: 140–141
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr M, Trüper HG (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37:463–464
- Yamamoto S, Bouvet PJM, Harayama S (1999) Phylogenetic structures of the genes *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA–DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 49:87–95
- Yan S, Liu H, Mohr TJ, Jenrette J, Chiodini R, Zaccardelli M, Setubal JC,

- Vinatzer BA (2008) Role of recombination in the evolution of the model plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, a very atypical tomato strain. *Appl Environ Microbiol* 74:3171–3181
- Young JM (2010) Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *J Plant Pathol* 92 (1, Supplement): S5–S14
- Young JM, Dye DW, Bradbury JF, Panagopoulos CG, Robbs CF (1978) A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand J Agric Res* 21:153–177
- Zaumeyer WJ, Thomas HR (1957) Bacterial diseases of main importance. In A monographic study of bean diseases and methods for their control. *USDA Tech Bull* 68. pp 65–84

## 摘要

1. 2000年代に分離されたアズキ茎腐細菌病の病原細菌は、アズキの他に、人工接種によりササゲおよびフジマメ、インゲンマメに病原性を有した。*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* はアズキに病原性を示さず、*P. savastanoi* pv. *phaseolicola* はアズキ茎腐細菌病の病原細菌とは宿主範囲が異なり、アズキに対する病徴が異なった。また、アズキ茎腐細菌病の病原細菌と *P. savastanoi* pv. *glycinea* は DL- $\alpha$ -アラニンおよび L-ヒスチジンの利用性が異なった。アズキ茎腐細菌病の病原細菌は *P. syringae* 群細菌の genomospecies 2 に相当する *hrp* group IA に分類され、*gap1* および *gltA*, *gyrB*, *rpoD* 遺伝子の塩基配列に基づいた系統解析により *P. savastanoi* pv. *glycinea* と遺伝的に近縁であることが示唆されたが、rep-PCR により得られたアズキ茎腐細菌病の病原細菌のバンドパターンは、*P. savastanoi* pv. *glycinea* を含む他の *P. syringae* 群細菌と明らかに異なった。これらのことから、アズキ茎腐細菌病の病原細菌は genomospecies 2 に含まれる細菌の独立した分類群、すなわち新しい病原型であることが示唆された。*P. amygdali* は genomospecies 2 に含まれる細菌のなかで先名権があり、*P. savastanoi* は *P. amygdali* のシノニムとして扱われるべきであることから、アズキ茎腐細菌病の病原細菌を *P. amygdali* (syn. *P. savastanoi*) pv. *adzukicola* pv. nov. と命名することを提案し、タイプ標本として、AZK-11 (SUPP2776, MAFF212478, ICMP24382) を指定した。

2. アズキ茎腐細菌病の病徴は、葉身における赤褐色水浸状の病斑お

よび壊疽病斑，および，茎における水浸状の病斑，腐敗および折損，未熟莢における濃緑色水浸状の病斑，病斑上に認められる菌泥など原病徴として記載されている典型的な病徴の他に，発生初期の‘閉じた初生葉’および生育後期の‘くさび型病斑’，‘小葉の下垂’といった原病徴の記載に無い症状が観察された．これらの症状は典型的な病徴とともに圃場観察の際の本病発生の目安となる．種子伝染による初発は出芽 7-14 日後の第一本葉が抽出から展開した個体の概ね初生葉に認められた．種子伝染による発病個体から隣接する株の上位展開葉の多くに二次伝染と推察される病斑が認められた．その後，播種後 30-50 日にかけて，急激に発病株が増加した．二次伝染の蔓延は風雨により助長され，低温により蔓延が抑制されることが考えられた．また，本病発生圃場跡に残存した子実による翌年および翌々年の野良生えアズキに発病が認められ，野良生えアズキが伝染源になることが明らかとなった．土壌中に存在する病原細菌あるいは土壌中の罹病残渣を介して，本病が土壌伝染することが示唆された．

3. 本病の茎葉発病度とアズキ子実重との間には有意な ( $P < 0.05$ ) 負の相関が認められ，概ね開花期において相関係数の絶対値が最大となった．茎葉発病度と百粒重および層粒重率，着莢数との間には概ね有意な ( $P < 0.05$ ) 負の相関が認められ，本病に罹病すると，莢数が減少し，子実の登熟が阻害されることによって減収することが推察された．‘エリモショウズ’と‘しゅまり’で子実重の減少程度に明瞭な差は認められなかったが，年次間で減収程度は異なった．開花期近日の茎葉発病度が 50 以上になると，アズキ子実重は 30-



50%以上減少した。茎葉発病程度 2 (葉に明瞭な発病が認められ、少数の小葉が枯死する) に達した日別の子実重に統計学的な有意差は認められなかった。一方、茎葉発病程度 4 (病斑が完全に茎を取り囲む) に達した日が早いほど子実重の減少し、特に開花期以前に達した場合が著しかった。このことから、病徴発現の早晚よりも、その後の病勢の伸展による重症化の早晚の方が本病による減収リスク要因として大きいと考えられたため、本病による著しい減収被害を回避するためには少なくとも開花期前に茎葉発病程度 4 に達しないように防除する必要がある。周囲に伝染源が存在する場合、外観無病徴の個体から得られた種子は病原細菌に汚染されている可能性がある。本病未発生地域で生産された種子では、種子伝染による発病が認められず、隣接する発生圃場からの飛び込みによって発病するまで長期にわたり圃場内の発病が認められなかったことから、種子伝染由来の発病で伝染源とならない無発生圃場産種子を用い、さらに、周辺圃場からの飛び込みなどによる二次伝染リスクを低減すれば、本病は発生しない、あるいは、発生しても発生は低く抑えられ、生産上の問題にならないと考えられる。

4. ダイアジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤の種子重量 0.3% の種子粉衣処理はアズキ茎腐細菌病の種子伝染由来の発病抑制に有効であるが、その効果は不完全であり、抑制しきれなかった発病個体が伝染源となり、その後二次伝染により発病が急激に増加する可能性がある。カスガマイシン・銅水和剤 1000 倍液あるいは銅顆粒水和剤 500 倍液、ジメトモルフ・銅水和剤 600 倍液の茎葉散布はいずれも本病の二次伝染拡大に対して防除効果が認められたが、伝染源

となる罹病個体が圃場内に存在するかぎり、茎葉散布のみでは、本病の発生拡大を完全に抑制することは困難であると考えられた。また、銅顆粒水和剤 500 倍液により、より高い防除効果を期待するには 7 日間隔で散布すべきであると考えられた。一方、銅顆粒水和剤 500 倍液に加用する展着剤の種類による防除効果の優劣は判然としなかった。前年発生圃場産種子に対するダイアジノン・カスガマイシン・チウラム粉剤による種子粉衣処理およびを行い、発病株の抜き取りおよび茎葉散布を組み合わせた防除体系は、無処理と比較して発病を低く抑えたが、新たな発病の出現ならびに発病の増加を抑制することができなかった。さらに、茎葉散布との組み合わせで、伝染源の前後左右 5 株+伝染源の合計 21 株を除去しても、新たな発病の出現を防止することができなかった。本病の防除対策として、効果的かつ合理的と判断された健全種子生産とその利用に関して、無発生圃場産の種子を使用し、かつ、飛び込みなどの二次伝染が生じる可能性の低い生産環境が再現された圃場において、健全種子生産が可能であることが明らかとなった。また、種子生産圃場において発病が認められた場合でも、発病株を中心に 4-5 m の範囲で周囲の株を圃場外へ搬出することにより、以降新たな発病の出現を認めないことを示した。これらのことを踏まえ、アズキ茎腐細菌病発生地域の種子生産圃場における健全種子生産スキームを示した。

## Abstract

1. The isolates, which were obtained from the plants exhibiting bacterial stem rot of adzuki bean (BSRA) in the 2000s, were compared with related *Pseudomonas* spp. The BSRA isolates artificially caused symptoms on adzuki bean, cowpea, hyacinth bean, and kidney bean. *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* did not affect adzuki bean, whereas *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* caused distinct symptoms on adzuki bean and had a different host range from the BSRA isolates. According to their bacteriological characteristics, the BSRA isolates were like *P. savastanoi* pv. *glycinea* but differed in their utilization of DL- $\alpha$ -alanine and L-histidine. Phylogenetic analyses based on four housekeeping genes suggested that the BSRA isolates were closely genetically related to *P. savastanoi* pv. *glycinea*, belonging to *P. syringae* genomospecies 2 and *hrp* group IA. However, the results of rep-PCR distinguished the BSRA isolates from *P. savastanoi* pv. *glycinea* and the other *Pseudomonas* spp. These results suggest that the BSRA agent is an independent taxon among genomospecies 2 bacteria and that the BSRA agent represents a new pathovar. Because *P. amygdali* is the oldest legitimate name of the genomospecies 2 bacteria, *P. savastanoi* should be treated as synonym of *P. amygdali*. Therefore, the name *P. amygdali* (syn. *P. savastanoi*) pv. *adzukicola* pv. nov. for the BSRA pathogen, as pathotype strain AZK-11 (SUPP2776, MAFF212478, ICMP24382), was proposed.

2. Typical BSRA symptoms: water-soaked reddish-brown lesions and

necroses on leaves; dark greenish water-soaked lesions on stems and immature pods; stem rot; stem breakage; and bacterial ooze on their lesions; were observed in the infested fields. The other distinctive symptoms: 'nodding primary leaf' in early stage; and 'wedge-shaped necrotic lesions' and 'flag like leaflet' in later stage; were also discovered. These symptoms are seemed to be signs when BSRA was investigated, however, these were not described in the original paper. If the infected seeds are sown, first BSRA symptom will be appeared at 7–14 days after emergence. Lesions were observed on upper extending leaves of adjacent plants to seed-borne diseased plant; these lesions were seemed to be caused by secondary dissemination. Thereafter, diseased plants severely increased from 30–50 days after sowing. Wind and rain splash seems to promote secondary dissemination spreading, but low temperature seems to inhibit. It was revealed that the adzuki bean seedlings voluntarily developed from seeds remained in the soil in the fields which 1 or 2 years had passed since BSRA disease occurred were source of infection, because the BSRA symptoms were appeared on them. Moreover, it was suggested that BSRA was also soil-borne disease in which BSRA pathogen cell or BSRA plant residue in soil involved.

3. Negative correlation between BSRA disease severity index on stems/leaves and adzuki bean yield is significant ( $P < 0.05$ ); the correlation coefficients at the days near flowering period is maximum in each trial. In most trials, BSRA disease severity index on stems/leaves are significantly correlated with weights per pulse, the numbers of pods

per hill, and rates of weight of imperfect pulse ( $P < 0.05$ ). From these facts, it is inferred that affected adzuki bean plants were caused reduction of the numbers of pods and suppression to ripen. In yield reduction rate, clear difference was not appeared between adzuki bean cv. Erimo-shozu and cv. Syumari, but was done among years. From the above, it is estimated that BSRA will reduce adzuki bean yield more than 30–50% by, if disease severity index reaches to more than 50 until near flowering period. It was not significant difference ( $P=0.05$ ) among adzuki bean yield of each plant unit harvested based on the day reaching to second grade degrees of disease severity on stems/leaves which lesions are easily found on leaves and a small number of leaflets are dead. On the other hand, the earlier water-soaked lesion or stem rot surrounds main stem, namely BSRA symptom reach to fourth grade degree of disease severity on stems and leaves, the smaller adzuki bean yield is. Especially, if the BSRA symptom reached to fourth grade degree on stems/leaves before flowering period, yield loss was the most severe. Because it is considered to be more important for adzuki bean yield when symptom develops severe than when disease occurs, it should be controlled to prevent BSRA symptom from developing to four grade degree on stems/leaves in order to avoid serious yield loss. When the infection sources exist around healthy plants in appearance, it will be possible that the seeds sourced from them were infected or contaminated with BSRA pathogen. Alternatively, the healthy seeds produced in non-infected regions developed seedlings not appearing BSRA symptoms by seed infection. It is considered that the adzuki bean plants developed from healthy seeds

grow free from BSRA symptoms for long time if BSRA disease does not occur in the adjacent fields. Therefore, it is the conclusion for yield loss by BSRA that it seems to be not trouble due to no or a little occurrence of BSRA with sowing healthy seeds produced in the fields to be free from BSRA and decreasing risks of secondary dissemination from around the fields.

4. Seed dressing treatment used with, 3% (w/w) of seed weight, diazinon, kasugamycin, and thiuram powder suppressed the BSRA occurrences by seed infection, however, its effect was inadequate, and disease plants remained as source of infection. It is possible that disease plants severely increase by secondary dissemination. Foliage application sprayed with each solution of kasugamycin and copper wettable powder diluted to 1000 times, copper granular wettable powder diluted to 500 times, or dimethomorph and copper wettable powder diluted to 600 times suppressed spreading by secondary dissemination, respectively. However, it is considered to be difficult to completely suppress BSRA spreading, if the BSRA diseased plants as infection sources exist in the fields. Seven days interval application should be done in order to obtain a better effect sprayed with solution of copper granular wettable powder diluted to 500 times. It seemed that any agricultural surfactants added to the copper granular wettable powder solution diluted to 500 times did not heighten a control effect against bacterial stem rot of adzuki bean. BSRA severity was decreased by combination of control method against BSRA to dress BSRA infected seeds with bactericide, to applicate bactericide for foliage,

and to remove diseased plants treatment, but the appearance of new diseased plants and increasing BSRA severity could not be suppressed completely. Combination of foliage application with bactericide and removal of twenty-one hills consisted of infection source and plant hills around infection source also could not suppressed new disease plants emerging. Therefore, it was concluded that healthy seed production and its usage were the most effective to control of BSRA. It was demonstrated that healthy seeds could be produced in the field to be sown with the seeds produced in BSRA free fields and to be avoided from secondary dissemination of BSRA. Additionally, it was proved that new diseased plant was not appeared by removing adzuki bean plants within extent of 4–5 m around disease plant, even if diseased plants were discovered in seed production fields. Based on these results, the healthy seed providing scheme in seed production field located in BSRA affected area was proposed.

## 付録

本研究で供試した PCR プライマー情報を Table A1 に示した.

第 3 章第 4 節 4 の rep-PCR で用いた 5×Gitschier バッファの組成を Table A2 に示した.



**Table A1** PCR primers used in this study

Purpose	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	References
<i>hrpZ</i> grouping	PS IA-F	CAGCTTGCCCCAGGAGCTGAC	880	Inoue and Takikawa (2006)
	PS IA-R	ATGTTGACCCAGCAGCAAGGC		
	PS IB-F	TTGGCTCAAGAGTTGACCCCG	850	Inoue and Takikawa (2006)
	PS IB-R	GCGCGTTGACCAGCAAGTTG		
	PS II-F	GCTGTGATCGATCAGCTGGT	1000	Inoue and Takikawa (2006)
	PS II-R	TCAGGCCACAGCCTGGTTAG		
	PS III-F	AGCTGGCCGAGGAACCTGATG	750	Inoue and Takikawa (2006)
	PS III-R	AACTGGTCAAAGATCCTGAGC		
	PS IV-F	ATGCTCGCAAAATCGATGGC	780	Inoue and Takikawa (2006)
	PS IV-F	TGACTGGCCGTATTGCCAAT		
16S rDNA	fdI-sat	AGAGTTTGATCCTGGTCAG	1500	Takahashi et al. (2013)
	rP2-sat	ACGGCTACCTTGTACGACTT		
BOX-PCR	BOXA1R	CTACGGCAAGGCACGCTGACG		Versalovic et al. (1994)
	ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTTCAG		Versalovic et al. (1991)
ERIC-PCR	ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
	REP1R-1	IIICGICGICATCIGGC		Versalovic et al. (1991)
REP-PCR	REP2-1	ICGICTTATCIGGCCCTAC		
	gap-1-F	CGTATCGCAATCAACGGTTT	940	Yan et al. (2008)
<i>gapI</i>	gapA-Rps	CCCAATCGTTGTCGTACCA		Sarkar and Guttman (2004)
	cts-Fp	AGTTGATCATCGAGGGCGCWGCC	618	Sarkar and Guttman (2004)
<i>gltA</i>	cts-Rp	TGATCGGTTTGATCTCGCACGG		
	UP-1E	GAGGAAACAGCTATGACCAYGSNNGGNAARITTYRA	940	Yamamoto et al. (1999)
<i>gyrB</i>	AprU	TGTAAAACGACGGCCAGTGCNGGRTCYTTYTCYTGRCA		
	70F2	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMNGARATGGG	843	Maeda et al. (2006)
<i>rpoD</i>	70R2	ATAGAAATAACCAGACGTAAAGTTNGTRTAYTTYTTNGCDAT		

Table A2 Component of 5 × Gitschier buffer used for rep-PCR

Component	Volume	Final concentration
1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16.6 ml	83 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1 M Tris-HCl (pH 8.8)	67 ml	335 mM Tris-HCl
1 M MgCl <sub>2</sub>	6.7 ml	33.5 mM MgCl <sub>2</sub>
1: 100 dilution of 0.5 M EDTA (pH 8.8)	1.3 ml	33.5 μM EDTA
14.4 M β-mercapto-ethanol	2.08 ml	150 mM β-mercapto-ethanol
Dnase free water	106 ml	
(Total 200 ml )		

Store at -20 °C in 1 ml aliquots