



Title	高知県における園芸作物病害の総合的な防除モデル構築に関わる病原微生物の分類学および発生生態学的研究
Author(s)	甲把（安達），理恵
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士（農学）
Dissertation Number	乙第6914号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6914
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55760
Type	doctoral thesis
File Information	Rie_Gappa.pdf



高知県における園芸作物病害の総合的
な防除モデル構築に関わる病原微生物
の分類学および発生生態学的研究

甲把(安達) 理恵

Gappa-Adachi Rie

目 次

第 1 章．緒言	1
第 2 章．研究史	7
第 3 章．トウガラシ類葉枯れ症の原因菌の特定と体系的な防除法の確立	10
第 1 節．病原菌の同定	10
第 1 項．病徴および病原菌の分離	10
第 2 項．病原性	11
第 3 項．細菌学的性質	12
第 4 項．16S rRNA に基づく分子系統解析	17
第 5 項．考察	20
第 2 節．葉枯細菌病菌の諸性質	21
第 1 項．供試菌株と接種源の調製	21
第 2 項．生育適温	21
第 3 項．発病適温	22
第 4 項．品種間の発病差異	25
第 5 項．考察	28
第 3 節．防除対策	29
第 1 項．供試植物と供試菌株および接種源の調製	29
第 2 項．予防効果を有する殺菌剤の選抜	30
第 3 項．治療効果を有する殺菌剤の選抜	33
第 4 項．考察	36
第 4 節．総合考察	37
第 4 章．ミョウガ軟腐症の原因菌の特定と諸性質	40
第 1 節．病原菌の同定	40
第 1 項．病徴および病原菌の分離	40
第 2 項．病原性	41
第 3 項．細菌学的性質	42

第 4 項．細菌学的性質に基づく Subdivision および Biobar の類別	47
第 5 項．16S rRNA に基づく分子系統解析	48
第 6 項．考察	51
第 2 節．軟腐病菌の諸性質	52
第 1 項．試験方法	52
第 2 項．花蕾への付傷の有無が発病に及ぼす影響	53
第 3 項．感染時期の調査	54
第 4 項．発病適温の調査	55
第 5 項．考察	56
第 3 節．総合考察	57
第 5 章．ルリトウワタ立枯れ症の原因菌の特定と体系的な防除法の確立 . . .	59
第 1 節．病原菌の同定	59
第 1 項．病徴および病原菌の分離	59
第 2 項．病原性	60
第 3 項．形態的特徴	61
第 4 項．rDNA 領域(ITS1, 5.8S, ITS2)の塩基配列の解析	65
第 5 項．考察	66
第 2 節．疫病菌の生育適温	67
第 3 節．疫病菌の検出法	68
第 1 項．供試菌株と接種源の調製	69
第 2 項．選択培地の検討	69
第 3 項．土壌からの検出法	72
第 4 項．考察	81
第 4 節．防除対策	84
第 1 項．殺菌剤の選抜	84
第 2 項．土壌消毒法の検討	90
第 3 項．考察	101
第 5 節．総合考察	106

第 6 章．オクラ果実黒斑病の発生に影響を及ぼす収穫後の環境要因	108
第 1 節．供試菌株とさく果	108
第 1 項．植物体からの病原菌の分離	108
第 2 項．さく果の洗浄と接種源の調製	109
第 2 節．温度の影響	111
第 1 項．分生子発芽に及ぼす影響	111
第 2 項．菌糸伸長に及ぼす影響	112
第 3 項．黒斑症状の発生に及ぼす影響	115
第 4 項．考察	117
第 3 節．ガス濃度の影響	118
第 1 項．分生子発芽に及ぼす影響	118
第 2 項．菌糸伸長に及ぼす影響	120
第 3 項．黒斑症状の発生に及ぼす影響	121
第 4 項．考察	123
第 4 節．湿度と結露の影響	125
第 1 項．黒斑症状の発生に及ぼす湿度の影響	125
第 2 項．黒斑症状の発生に及ぼす結露の影響	127
第 3 項．考察	129
第 5 節．保管温度の影響	130
第 1 項．選果場での保管温度の影響	130
第 2 項．考察	133
第 6 節．総合考察	135
第 7 章．総合考察	138
引用文献	158
摘要	169
本論文を構成する論文および口頭発表	173

第 1 章 . 緒 言

高知県は四国南部に位置し，四国の総面積の約 38%である 7,105km² を占めている(国土地理院 2012)．県北部には四国山地があるため平坦地に乏しく，県土面積の 84%が林野を占め，中山間地域の割合は 95%にも達している．このように，耕地面積は少ないものの，高知県高知市の年平均気温は 17.0℃，年間降水量 2,548mm，年間日照は 2,154 時間という夏季高温多雨，冬季温暖多照の気象となっており，作物栽培の上では大変恵まれた気象条件となっている(国土交通省気象庁 2013)．高知県では，古くからこの冬期の温暖かつ多照な気候を利用して野菜の早出し栽培に取り組み，1952 年以降のビニルハウスの急速な普及とともに，促成栽培を中心とした施設園芸が定着し，堅実な発展を遂げている(高知の園芸 2013a)．

県東部の芸西村，県中央部の南国市および県中西部の土佐市は海岸線に沿う平坦温暖部に位置し，ピーマンを基幹品目としたトウガラシ類の産地が分布している．県西部の北幡地域や津野山地域，県中北部の嶺北地域などの中山間地域では，露地および雨よけ施設での夏秋期のシシトウガラシの栽培が盛んに行われている．2012 年のピーマンとシシトウガラシの高知県の作付面積は 156ha であり，出荷量は 12,100t と全国 3 位に位置している．このうち，シシトウガラシの作付面積は 65ha，出荷量は 2,820t と全国 1 位であり，本県を代表する重要な品目となっている(農林水産省統計部 2013)．

県中西部の須崎市では，施設栽培によるミョウガの周年生産

がさかんに行われている。2010年のミョウガの作付面積は93ha、出荷量は4,382tと全国1位となっており、ミョウガも本県を代表する重要な品目の一つである（農林水産省生産局2013b）。

県東部の芸西村，県中西部須崎市など海岸線に沿った平坦温暖部では，切り花や鉢植えなど花き類の栽培がおこなわれており，多日照という有利な条件を利用した冬季出荷を主体とする生産が盛んである（高知の園芸2013c）。2012年の高知県の花き類の作付面積は490haとなっているが（高知の園芸2013c），花き類の主要産地である芸西村では施設栽培ルリトウワタ（*Tweedia caerulea* D. Don, = *Oxypetalum caeruleum* (D. Don) Decne.（塚本1994），通称「ブルースター」の切り花生産が盛んである。ルリトウワタの栽培面積は3haと少ないものの，出荷本数は340万本となり，全国一位の販売シェアを占めている（高知の園芸2013c）。また，2011年1月にドイツで開催された国際園芸見本市「IPM ESSEN 2011」の品評会では，高知県JA土佐あき芸西支所のルリトウワタ品種‘ピュアブルー’が切花部門で最優秀を受賞したことから，更に全国的に需要が高まっている。

香美市，南国市を中心とした県中央部，四万十町や宿毛市など県西部の水田地帯ではオクラの露地栽培がさかんにおこなわれている。2010年における高知県のオクラの作付面積は88ha、出荷量は1,731tで，全国2位に位置し，オクラもまた本県を代表する経済的に重要な品目の一つとなっている（農林水産省生産局2013a）。

このように，トウガラシ類，ミョウガ，ルリトウワタおよびオクラは高知県の重要な園芸品目であるが，近年，トウガラシ類，ミョウガ，ルリトウワタに原因不明の障害が発生し，オクラについては流通段階において果実黒斑病が多発し，外観品質の低下およびそれに伴う経済的な損失が発生していた．

2003年5月に高知県の露地栽培シトウガラシで，栽培期間中に葉身に黒褐色の不整円型の斑点が見られ，生長点では枯死や枝枯れが生じる障害が発生した(Morita et al. 2004)．圃場によっては50%以上の株に障害が見られ，深刻な被害が生じていた．障害部には糸状菌が認められず，多量の細菌が認められたため，細菌による新たな病害である可能性が示唆された．

2010年に高知県内の施設栽培ミョウガで，栽培期間中及び収穫後の花蕾が軟化して腐敗する障害が発生した(甲把(安達)・森田 2012)．本障害の発生は7～8月に集中し，収穫物の3割以上に発生した圃場もみられた．障害部には糸状菌が認められず，多量の細菌が認められたため，細菌による新たな病害である可能性が示唆された．

高知県内の施設栽培のルリトウワタでは，2004年頃から立枯れ性の生育障害が発生し，枯死株率が50%を超える圃場もみられるなど深刻な被害を生じるようになった(安達ら 2009)．障害株からは *Phytophthora* 属菌と思われる卵菌類が高率に分離されたが，調査当時，*Phytophthora* 属菌によるルリトウワタの病害について報告がなかった．

これらの被害は甚大であり，生産現場からは，障害の原因を特定し，防除対策を確立することを強く要望された．

オクラの果実黒斑病の病原は *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler で、収穫後の若いさく果に発生する市場病害である。本菌に感染したさく果は、初めに表皮に微細な黒点を生じ、次第に不整形の黒斑が形成され、品質が著しく損なわれる。本病原菌は圃場で分生子が飛散し、さく果へ感染することから(遠山ら 1992a,b ; Tohyama et al. 1995a,b), 本県では殺菌剤による防除が行なわれている。しかし、オクラは開花から収穫までの日数が短く、収穫期間中は次々と新しいさく果が生育してくるため、殺菌剤だけで本病の発生を抑制することは困難であり、生産現場および市場からは、果実黒斑病の発生を抑制する環境条件を明らかにし、それに基づいた保管管理技術を確立することを強く要望されていた。

加えて高知県では、従来の化学農薬に過度に依存した防除体系では病虫害の被害を抑えきれず、薬剤耐性菌の出現なども危惧されていたことから、持続的な農業生産を目指し、生産性の維持を図りつつ環境に配慮した病虫害防除法として総合的病虫害管理(Integrated Pest Management : IPM)が推進されており、化学農薬に依存した方法による病虫害の撲滅ではなく、様々な防除法を組み合わせる総合技術の実施が求められていた。しかし、複数の防除手段を相互に組み合わせて病虫害の密度を制御し、生産性の維持を図るためには病原の特定および発生生態についての知見が不可欠であった。さらに、生産者が IPM 技術を実施するためには、技術に対する十分な知識と理解が必要であり、そのための総合的な防除モデルの構築が個々の品目や病虫害ごとに求められていた。

著者は2004年から2011年まで、高知県農業技術センターにおいて、高知県の重要な園芸品目において近年特に問題となっていた障害のうち、トウガラシ類に発生した葉枯れ症状、ミョウガの花蕾に発生した軟腐症状およびルリトウワタに発生した立枯れ症状の原因の解明および防除等に関する研究、ならびにオクラ果実黒斑病の発生に影響を及ぼす収穫後の環境要因の解明に関する研究を行った。本論文はその結果をとりまとめたものである。

本論文のご校閲を賜った北海道大学大学院農学研究院教授近藤則夫博士，同増田税博士，同講師秋野聖之博士，同大学副学長上田一郎博士に心から感謝の意を表す。本論文を作成するにあたり，終始激励，ご指導を賜った独立行政法人・農業環境技術研究所農業環境インベントリーセンター長對馬誠也博士に深く感謝の意を表す。本研究を遂行するにあたり，供試菌株の分譲を賜った千葉県農林総合研究センター暖地園芸研究所植松清次氏，長野県野菜花き試験場小木曾秀紀氏，愛知県農業総合試験場三宅律幸氏，多大なご協力をいただいた独立行政法人・農業環境技術研究所吉田重信博士，北海道立総合研究機構道南農業試験場三澤知央博士，供試植物のルリトウワタ種子をご提供いただいたJA土佐あき芸西集荷場花卉部会ブルースター部会長谷岡祥造氏，試験にご協力いただいた同部会員の皆様に厚く感謝申し上げます。

また，本研究を遂行するにあたり，終始ご指導を賜った前高知県農業技術センター生産環境課病理担当チーフ竹内繁治博士（現同センター研究企画課長），現病理担当チーフ森田泰彰氏，

オクラ果実黒斑病について共同研究を実施し，適切なご助言を賜った同センター品質管理担当チーフ宮崎清宏氏，ルリトウワタ栽培について多くのご助言を賜った同センター花き担当平石真紀氏（現高知県農業振興部産地・流通支援課），一部共同研究を実施し，適切なご助言とご協力をいただいた同センター病理担当矢野和孝博士，下元祥史博士，供試植物の栽培管理および調査に際して多大なご協力を頂いた同センター病理担当諸氏，現地試験等においてご協力頂いた高知県安芸農業振興センター塹江まほ氏（現高知県農業大学校），同山崎教道氏，高知県須崎農業振興センター農業改良普及課チーフ西田修二氏はじめ高知県内各農業振興センター各位，本稿の取り纏めに際して終始激励を賜った前高知県病虫害防除所長原護氏（現高知県農業振興部副部長），現所長野中英作氏，同チーフ榎本哲也氏，野町敦志氏，平田建彦氏および高知県農業技術センター技術次長鈴木芳孝博士に厚く感謝申し上げます．

最後に，本研究の遂行と論文執筆にあたり終始激励してくれた夫・和也に感謝の意を表する．

第 2 章 . 研究 史

日本国内においてトウガラシ類に発生する細菌病には、*Ralstonia solanacearum* による青枯病、*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* による斑点細菌病、*Corynebacterium* sp.によるかいよう病、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* による軟腐病、*Bacillus* sp.による細菌病の報告がある(農業生物資源ジーンバンク 1997)。これらのうち、主に葉に病徴が表れる病害は斑点細菌病であるが、2003 年 5 月に高知県で発見された障害は、斑点細菌病の病斑と比較して大きくなる傾向が見られ、病斑中央部が白変しないなど、症状が異なることから新病害である可能性が示唆された。

ミョウガに発生する細菌病は、*Ralstonia solanacearum* による青枯病(矢野ら 2005)の報告があるが、花蕾に軟腐症状を引き起こす細菌病については世界的に報告がない。ミョウガと同じショウガ科に属するショウガでは、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* や、*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* による腐敗病の発生が国内で確認されている(農業生物資源ジーンバンク 1997)。また、オーストラリアでは、*Erwinia chrysanthemi* によってショウガに軟腐症状(soft rot)が引き起こされたとの報告がある(Stirling 2002)。

ルリトウワタ (*Tweedia caerulea* D. Don, = *Oxypetalum caeruleum* (D. Don) Decne. は、通称オキシペタラムまたはブルースターと呼ばれ、ブラジルやウルグアイなどの南米地域を原産とするガガイモ科に属する多年草である(塚本 1994)。

日本では以前には生産，流通がほとんどみられない品目であったが，花き市場での需要の多様化に伴い，花き類の種類，品種，花色などの流行がめまぐるしく変わるなかで，近年観賞用切り花として栽培され，需要が高まりつつある．高知県では 1983 年に春野町で導入され，栽培が始まった（加除式農業技術大系 1997）．その後産地が拡大し，1988 年に安芸郡芸西村へ導入されてから産地化が進んだ．産地ではオリジナル品種の育成に積極的に取り組み，花型，日持ち性など品質の高い新品種‘ピュアブルー’が誕生するなど，生産者の経営の安定化につながっている．しかし，ルリトウワタの栽培は歴史が浅く，病害虫に関する知見も少なかったため，生育中のルリトウワタが急激に萎凋し，枯死する立枯れ性の生育障害が発生し始めても，伝染性の病害によるものという認識が生産者の中で少なく，被害が拡大する傾向であった．高知県で立枯れ症の発生が見られ始めた 2004 年以前には，ルリトウワタの病害に関する報告はなかったが，長野県で *Fusarium oxysporum* による萎凋病（山岸ら 2008），2009 年に神奈川県で *Sclerotium rolfsii* による白絹病（植松ら 2009）が報告された．また，本県でも 2010 年に *Ralstonia solanacearum* による青枯病（安達ら 2012）の発生が新たに確認されているが，今回発見された障害は，いずれの報告とも異なる病原菌であった．

オクラの果実黒斑病は従来低温障害と考えられていたが，*Alternaria alternata* (Fries : Fries) Keissler による病害であることが明らかとなった（遠山ら 1992a; Tohyama et al. 1995a）．*A. alternata* は不完全菌類に属し，分生子のみを生じる．分生子は

逆棍棒状，卵形，楕円形など様々で，淡黒色，無嘴または小嘴部がある．全長 $13 \sim 63 \times 4 \sim 18 \mu\text{m}$ ，縦横に $0 \sim 8$ 個の隔壁があり，分生子柄の先端に分生子を連鎖状に生じる (Tohyama et al. 1995a)．圃場で病原菌の分生子が飛散し，立毛中のオクラのさく果表面の毛や粘性の分泌物に付着していることが観察されているが，圃場での発病はほとんど見られず (遠山ら 1992b ; Tohyama et al. 1995b)，収穫後の時間の経過とともにさく果表面に微細な黒点を生じ，部分的に融合して黒から黒褐色の不整形の斑点が形成され，品質が著しく損なわれる市場病害である (遠山ら 1992a ; Tohyama et al. 1995a)．生物由来物質による果実黒斑病抑制の試みとして，大豆レシチンやネギの揮発成分である硫化アリルを利用した研究が行われたが，十分な効果は得られていない (遠山ら 1993, 1995)．

第 3 章 . トウガラシ類葉枯れ症の原因菌の特定 と 体系的な防除法の確立

ピーマン，シシトウガラシ (*Capsicum annuum* L.) はナス科トウガラシ属の一年草で，主に青果用として果実が収穫されている．高知県内では土佐市，南国市を中心に露地および施設栽培が行われており，2011 年のピーマン，シシトウガラシの総出荷量は 12,800t と全国 3 位に位置し，高知県の園芸作物における主要品目の一つとなっている (高知県農業振興部 2013b)．

ところが，2003 年頃からトウガラシ類の葉身に黒褐色の不整円型の斑点が生じる障害が発生した．障害部には糸状菌が認められず，多量の細菌が認められたため，細菌による新たな病害である可能性が示唆された．

本章では，この葉枯れ症状を呈する罹病葉から分離した細菌について病原性の確認，同定を行うとともに分離細菌の諸性質および防除対策について検討した．

第 1 節 . 病原菌の同定

第 1 項 . 病徴および病原菌の分離

障害株では葉に黒褐色不整円形の障害が観察された (Fig. 1a)．障害部の表面にはしばしば輪紋状の模様が形成された．障害部の中心は薄く破れやすくなっており，脱落していることが多く，障害部周辺のハローは顕著ではなかった．また，茎に黒褐色条

斑状の障害が生じる場合や，生長点が枯死する場合も見られた (Fig. 1b,c).

本障害は平地農業地域よりも中山間地域で発生が多く見られ，梅雨時期に多発する．また，露地栽培トウガラシ類のみで発生が確認されており，梅雨時期であっても施設栽培での発生は確認されていない．さらに，梅雨明け以降の高温期での発生はほとんど見られない．このように，日和見的な発生であるにもかかわらず，本障害が5割以上の株に発生していた圃場もみられ，深刻な問題となっていた．

2003年6月に，高知県幡多郡大正町と十和村の露地圃場で発生したシシトウガラシ品種‘土佐じしビューティー’の障害葉を採取し，葉身の腐敗部と健全部の境界付近から小片を切り出し，滅菌水で洗浄後，70%エタノールに数秒および2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に20秒に浸漬して表面殺菌した後，再び滅菌水で洗浄し，100 μ Lの滅菌水中でつぶして YPDA (Yeast extract 10.0 g, Peptone 20.0 g, Dextrose 20.0 g, Agar 15.0 g and Distilled water 1,000 mL, pH 6.5) 平板培地上に画線して 28℃で 24 時間培養し，細菌を分離した．これらを YPDA で 3 回単コロニー分離することにより得られた 10 菌株 (KH-1, KH-3, KH-5, KH-6, KH-11, KH-13, KH-15, KH-28, KH-29 および KH-32) を以下の試験に供した．なお，供試菌株はスキムミルク分散媒 (1.5% Monosodium-L-glutamate, 10% Skim milk) に懸濁して -80℃で保存した．

第 2 項 . 病 原 性

試 験 方 法

シシトウガラスの障害部から分離した 10 菌株を，YPDA 斜面培地で 28℃，24 時間暗黒条件下で培養後，滅菌水に懸濁して 1×10^8 cfu/mL に調製し，接種源とした．直径 7.5 cm のポリエチレンポットに播種し，ガラス室内で 38 日間生育させた 9～10 葉期のピーマン品種‘京ゆたか’の葉面上に接種源をそれぞれ 20 μ L 滴下して虫針で付傷した．菌株ごとに 1 株 2 葉の葉に接種した．対照区は等量の滅菌水を滴下し，同様の処理を行った．接種後はガラス室内で管理し，調査は接種 1，3 日後に行った．なお，葉枯れ症状の認められた障害部からは接種細菌の再分離を試みた．

試 験 結 果

分離細菌を接種した葉は，接種 1 日後に接種部に淡褐色水浸状の病斑が表れた．3 日後の調査では，病斑は拡大し，黒褐色正円または不整円形となり，分離菌株を接種した全ての葉に原病徴が再現された (Fig. 1d)．滅菌水を接種した葉に発病は見られなかった．また，再現された障害部からは接種菌と同一と考えられる細菌が再分離された．このことから，分離細菌が本病害の病原細菌であることが明らかとなった．

第 3 項 . 細 菌 学 的 性 質

試 験 方 法

シシトウガラシ分離細菌10菌株を用いて Goto and Takikawa (1984a,b,c,d) に準じて細菌学的性質を調査した。なお、ゼラチンの液化は20℃で実施したが、その他の培養は生育温度に関する試験を除き、25℃で行った。予め、Nishiyama (1978) による植物病原細菌の簡易同定法に従い、分離細菌の細菌学的性質について予備調査を行ったところ、*Pseudomonas cichorii* に近縁な細菌である可能性が示唆されたため、対照として農業生物資源ジェンバンクに登録されている *P. cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 (MAFF301187) を併せて調査した。

試験結果

NA培地上のコロニーは、培養24時間後に直径1mm程度となり、白色、円形、湿光、全縁、表面平滑となった (Fig. 1e)。グラム反応は陰性、菌体は短桿状で極毛を有し、運動性が認められた。ポリ-β-ヒドロキシ酪酸 (PHB顆粒) の集積は陰性、O-F試験ではO型を示し、蛍光性色素を産生した。レバンの産生、ジャガイモの腐敗、アルギニンジヒドラーゼ活性、硝酸塩の還元、硝酸呼吸、グルコン酸の酸化、ゼラチンの液化、レシチナーゼ活性、綿実油の加水分解、硫化水素の産生は見られなかった。オキシダーゼ活性、タバコ過敏感反応、カタラーゼ活性、アンモニアの産生は陽性で、Tween80、エスクリン、アルブチンの加水分解が認められ、40℃では生育が認められなかった。

キシロース、グルコース、フルクトース、Dガラクトース、アラビノース、マンノース、マンニトール、イノシトールから

は接種2日目に酸を産生した。グリセリンからは接種4日目に酸を産生した。ラムノース，スクロース，トレハロース，マルトース，ラクトース，ラフィノース，デキストリン，デンプン，イヌリン，ソルビトール，エリトリトール，ダルシトールからは接種21日目までに酸を産生しなかった。有機酸の利用試験では，L-酒石酸，クエン酸は接種2日目に陽性になった。

これらの結果は，対照に供した *P. cichorii* と同一の性質であった (Table 1)。また，既報の *P. cichorii* の性質とも一致した (Tominaga et al. 1977; Kawarabayashi and Suyama 1990; Shirakawa and Hagiwara 2000; Kanehashi et al. 2006; Suenaga et al. 2007)。

従って，本病原細菌を *P. cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 と同定した。

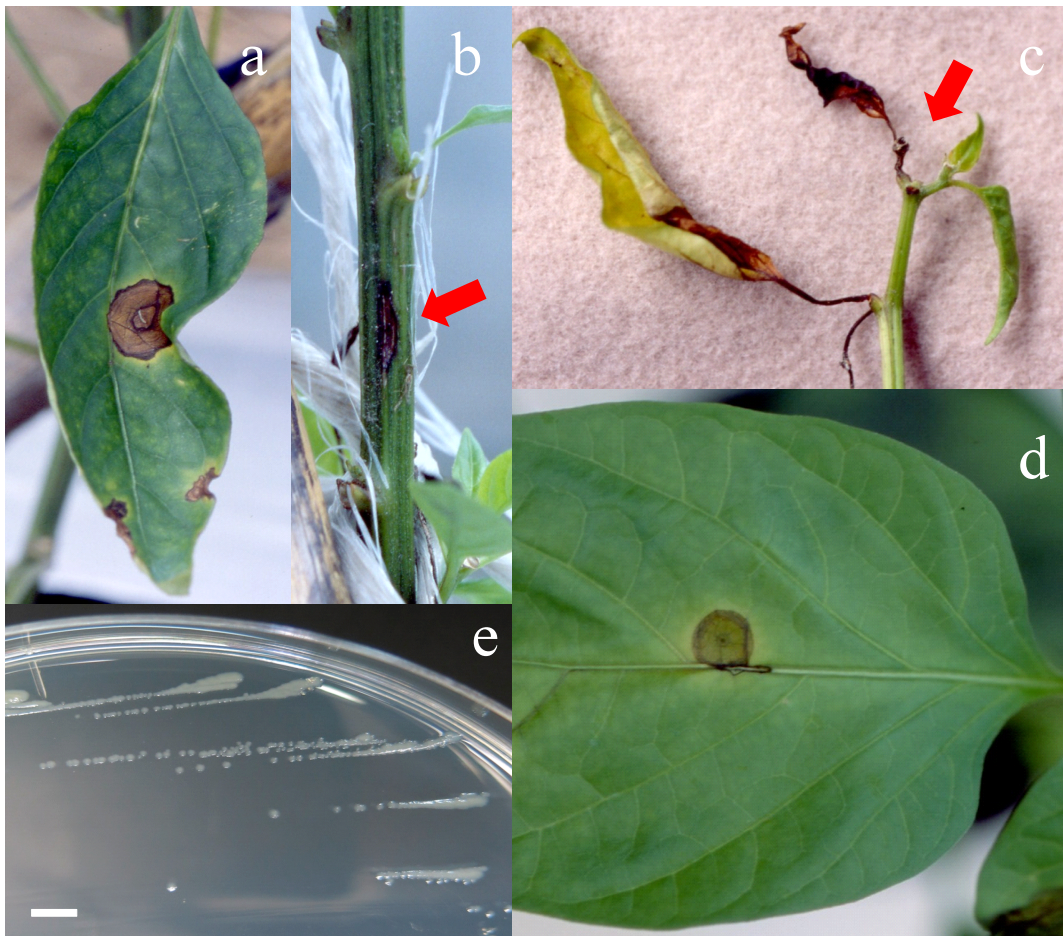


Figure 1. Symptoms of sweet pepper observed in the field (a-c) and inoculation tests (d). Diseased plants had (a) leaf spot, (b) stem blight (*arrow*), and (c) growing point blight (*arrow*). (d) Symptoms observed on leaves inoculated with the KH-32 isolate (cv. Kyo-yutaka, 3 days after inoculation). (e) The KH-13 isolate formed white, circular, glistening, entire, smooth colonies on NA after 24 h at 25° C. *Scale bar* = 5 mm

Table 1 Comparison of bacteriological characteristics among present sweet pepper (*Capsicum annuum*) leaf blight and several of *Pseudomonas cichorii* isolates

Test	Present isolates (n = 10) ^a	<i>P. cichorii</i> MAFF301187 (n = 1)	<i>P. cichorii</i> ^b				
			1	2	3	4	5
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-
Shape	short	short	short	short	short		
Polaric flagella	+	+	+	+	+		
Poly-β-hydroxybutyrate granules	-	-	-	-			
O-F test	O	O	O	O	O	O	
Fluorescent pigment on King's medium B	+	+	+	+	+	+	+
Levan formation	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase activity	+	+	+	+	+	+	+
Potato soft rot	-	-	-	-	-	-	+ ^w
Arginine dihydrolase activity	-	-	-	-	-	-	-
Hypersensitive reaction on tobacco	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	
Nitrate respiration	-	-			-	-	
Gluconate oxidation	-	-	-	-	-	-	
Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-	-	
Catalase activity	+	+		+		+	
Lecitinase activity	-	-	-	-	-	-	
Hydrolysis of							
Cotton seed oil hydrolase	-	-	-(M) ^c	-(M) ^c	-(L) ^c	-(M) ^c	
Tween 80	+ ^w	+ ^w	+	+		+	
Aesculin	+	+	+	+	+	+	
Arbutin	+	+	+	+	+	+	
Ammonia production	+	+	-	+	+	+	
Hydrogen sulfide production	-	-	-	-	-	-	
Growth at 40°C	-	-	-	-	-		
Acid production from :							
Xylose	+	+	+	+	+	+	
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	
Galactose	+	+	+	+	+	+	
Arabinose	+	+	+	+	+	+	
Mannose	+	+	+			+	
Rhamnose	-	-	-	-		-	
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-		-	-
Maltose	-	-	-	-		-	
Lactose	-	-	-	-	-	-	
Raffinose	-	-	-	-		-	
Dextrin	-	-	-		-		
Starch	-	-	-	-	-	-	
Inulin	-	-	-	-		-	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	
Glycerol	+	+	+	+	+	+	
Inositol	+	+		+	+	+	
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	
Dulcitol	-	-	-	-		-	
Use of :							
Tartrate	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+

+: positive, +^w: weak positive, -: negative, Blank space was not tested^a Number of test isolates^b 1: Tomimaga et al. (1977), 2: Kawaiyabashi and Suyama (1990), 3: Shirakawa and Hagiwara (2000), 4: Kanehashi et al. (2006), 5: Suenaga et al. (2007)^c L, Lipase; M, Margarine

第 4 項 . 16S rRNA に 基 づ く 分 子 系 統 解 析

試 験 方 法

シシトウガラシ分離細菌 10 菌株の 16S rRNA の塩基配列を Marchesi et al. (1998)の方法を参考に決定した. すなわち, 各菌株を NA 培地で 24 時間培養後, 1 白金耳かきとり, 1mL の滅菌水が入った 1.5mL のマイクロチューブ (SARSTEDT Co., Ltd, Nuembrecht1, Germany)に懸濁後, 95℃ のヒートブロック (Dry thermo unit DTU-1B ; TAITEC Co., Ltd. Japan)に 10 分間静置した. これを鋳型 DNA とし, プライマー (63f ; CAGGCCTAACACAT-GCAAGTC, 1387r ; GGGCGGWGTGTACAAGGC)をそれぞれ 10pmol, dNTP Mixture を 0.2mM, *Taq* DNA Polymerase (*TaKaRa EX Taq*®)を 5U となるように最終濃度を調整し, 10×*Ex Taq* Buffer を 1/10 量加えて全量を 50μl として PCR を実施した. 反応条件は 95℃, 2 分間の熱変性後, 95℃, 1 分間, 60℃, 1 分間, 72℃, 1.5 分間を 30 サイクル, 最後に 72℃ で 10 分間とした. 得られた約 1300bp の DNA 断片の塩基配列をシグマアルドリッチジャパン(株)に依頼して解析した.

シシトウガラシ分離細菌の塩基配列は, BLAST を使って GenBank ライブラリーで相同性検索を行ったところ, *P. cichorii* の Type strain(LMG 2162^T)の 16S rRNA 領域の塩基配列データ (Z76658) と 99% 以上の相同性を示した.

次に, シシトウガラシ分離細菌と *P. cichorii* (MAFF301187) の 16S rRNA 領域の塩基配列, DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている *Pseudomonas* 属菌の Type strain の 16S rRNA 領域の塩基

配列データ ; *P. cichorii* (LMG 2162^T ; Z76658), *P. syringae* pv. *syringae*(ICMP3023^T ; HM190217), *P. chlororaphis*(IAM12354^T; D84011) , *P. fluorescens*(IAM12022^T ; D84013) , *P. putida*(IAM1236^T; D84020), *P. aeruginosa*(LMG1242^T; Z76651), *P. stutzeri* (CCUG11256^T ; U26262) , *P. pertucinogena*(IFO14163^T; AB021380), およびアウトグループとして *E. chrysanthemi* の Type strain(LMG 2804^T; Z96093)の塩基配列データを Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5 (MEGA 5)(Tamura et al., 2011)を用いて最尤法(ML法)を用いた分子系統解析を行った. また, 系統樹における枝の信頼性を評価するためにブートストラップ法(Felsenstein 1985)を用い, 1,000 回反復によるブートストラップ値(%)を分岐点状に示した.

試験結果

その結果, シシトウガラシ分離細菌は全て *P. cichorii* (MAFF301187), *P. cichorii* の Type strain(LMG 2162^T)と同一のクレードに位置することが確認できた(Fig. 2).

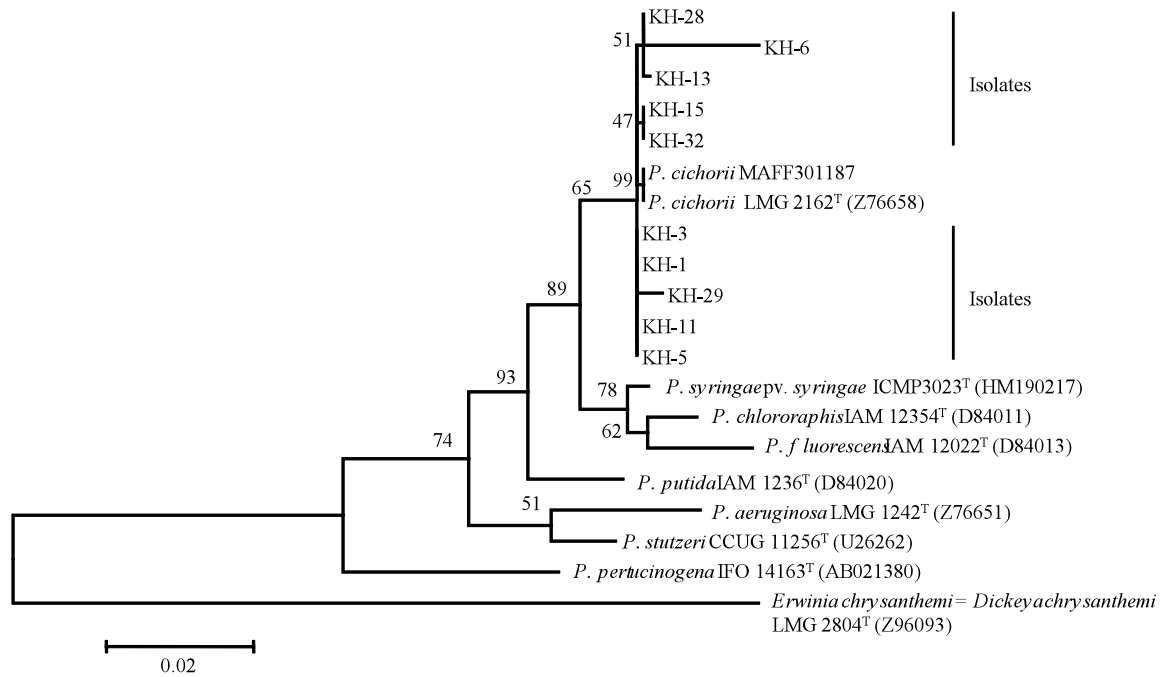


Figure 2. Maximum likelihood tree based on 16S rRNA gene sequences of some *Pseudomonas* strains. ML tree was draw by Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5 (MEGA5). Numbers on the branches represent bootstrap values obtained from 1000 replications. Following the species name indicate strain numbers. Superscript of T is type strain. Type strain of *Erwinia chrysanthemi*= *Dickeyachrysanthemi* (LMG 2804^T [Z96093]) is included as an outgroup. Numbers in parentheses indicate GenBank accession numbers. The Bar represents a phylogenetic distance of 2%

第 5 項 . 考 察

シシトウガラシ分離細菌をピーマンに接種すると，原病徴が再現され，接種菌と同様の細菌が分離されたことから，本分離細菌が葉枯れ症の病原細菌であることが明らかとなった．次に分離細菌の細菌学的性質を調査したところ，分離細菌は既報の *P. cichorii* の細菌学的性質と合致する点が多かった．よって，本分離細菌を *P. cichorii* と同定した．さらに，分離細菌の 16S rRNA 領域の塩基配列 (約 1300bp) は，最尤法 (ML 法) を用いた分子系統解析によっても，既報の *P. cichorii* と同一のクレードに位置したことから，細菌学的性質による同定を裏付ける結果が得られた．

P. cichorii のトウガラシ類への病原性は，Tsuchiya et al. (1980) がレタスから分離された腐敗病菌 (*P. cichorii*) をトウガラシ類品種 ‘カリフォルニアワンダー’ と ‘八つ房’ に有傷接種した試験によって確認されていたが，自然発生による病害の発生事例は本報告が国内外で初めてであることから，本病をトウガラシ類葉枯細菌病 (英名 : Bacterial leaf blight of sweet pepper) と命名した．なお，KH-1, KH-3, KH-5, KH-6, KH-11, KH-13, KH-15, KH-28, KH-29 および KH-32 菌株は，農業生物資源ジェンバンクにそれぞれ MAFF212042, 212043, 212044, 212045, 212046, 212047, 212048, 212050, 212051, 212053 として寄託登録し，本論文で明らかにした KH-5 菌株の 16S rRNA 領域の塩基配列は，DDBJ / EMBL / Gen Bank に AB819398 として登録した．

第 2 節 . 葉 枯 細 菌 病 菌 の 諸 性 質

本節では，葉枯細菌病の防除対策を確立するための基礎データを得ることを目的として，葉枯細菌病菌の増殖と発病に及ぼす温度の影響および高知県で栽培されているトウガラシ類主要品種での感受性差異を調査した．

第 1 項 . 供 試 菌 株 と 接 種 源 の 調 製

2003 年 6 月に，高知県幡多郡大正町と十和村で採取したシシトウガラシ品種‘土佐じしビューティー’の罹病葉から単コロニ一分離して得られた葉枯細菌病菌 KH-5 菌株および KH-32 菌株を供試菌株とし，YPDA 斜面培地を用いて暗黒条件下で 25℃，24 時間培養後，滅菌水に懸濁して 1.0×10^8 cfu/mL に調製した懸濁液を接種源とした．

第 2 項 . 生 育 適 温

試 験 方 法

直径 18 mm の試験管に 8 mL ずつ分注した YPDB (Yeast extract 10.0 g, Peptone 20.0 g, Dextrose 20.0 g, Distilled water 1,000 mL, pH 6.5) へ KH-5 菌株の懸濁液を 5 μ L 加え，直ちに 5～40℃ に設定した恒温器内へ，各温度につき 1 本の試験管を静置した．暗黒条件下で 24 時間培養後，希釈平板法により菌数を計測した．試験は 2 回行った．

試 験 結 果

葉枯細菌病菌は 30℃ 付近で最も増殖し，40℃ では死滅した

(Table 2).

Table 2. Population of isolated bacteria from sweet pepper (*C. annuum*) at different cultivation temperatures^{a)}

Experiment No.	Initial concentration of inoculant (cfu/ml)	Bacterial concentrations at different temperatures (°C)							
		5	10	15	20	25	30	35	40
1	4.1×10^4 a	7.0×10^4 a ^{b)}	4.3×10^5 a	1.6×10^6 a	3.4×10^7 b	6.2×10^7 c	6.7×10^7 c	1.1×10^7 a	0
2	6.2×10^4 a	- ^{c)}	8.2×10^5 a	1.9×10^7 a	2.7×10^7 a	6.3×10^7 b	1.6×10^8 c	1.1×10^7 a	-

a) Isolate KH-5 was grown in YPDB at 5–40°C for 24 h and the final concentrations (cfu/ml) were counted 24 h after inoculation.

b) Means followed by the same letter are not significantly different in the same experiment by Tukey's test ($\alpha = 0.05$, $n = 3$).

c) -: Not tested.

第 3 項 . 発 病 適 温

試 験 方 法

トウガラシ類‘京ゆたか’および‘土佐じしビューティー’の 2 品種を試験に供した。両品種ともに直径 7.5 cm のポリエチレンポットで育苗し，‘京ゆたか’は，播種 27 日後の苗 3 株，‘土佐じしビューティー’は播種 69 日後の苗 4 株を用いた。接種には KH-5 菌株を供試し，懸濁液約 20 μ L を各供試株の完全に展開した本葉の葉身へ滴下し，この上から虫針で 1ヶ所に刺傷をつけた。1 株につき 2 葉に接種した。対照区は等量の滅菌水を滴下し，同様の処理を行った。接種後はポリエチレン袋で株全体を被覆して多湿条件とし，15～30°C に設定した照明付恒温器 (SANYO MLR350 Plant Growth Chamber, Sanyo Electric Co., Ltd., Japan) 内において 12 時間明期－12 時間暗期条件で管理した。なお，温度・湿度データロガー (TR-71UI, T&D CORPORATION) を用いて恒温器内部の温度とポリエチレン袋内の接種葉付近の温度を記録した。各温度につき 2ヶ所ずつ記録し，平均温度を求めた。

発病の調査は接種 1～13 日後に行い，形成された病斑の直径を測定した。ただし，病斑が楕円形となった場合は，短径と長

径の平均値を測定した。

試験結果

12時間明期－12時間暗期に設定した照明付恒温器内と，ポリエチレン袋で被覆された株の接種葉表面付近の24時間の温度変化をFig. 3に示した。各所定温度に設定した恒温器内の温度は，ほぼ設定温度を維持した。一方，暗期中のポリエチレン袋内の接種葉付近の温度は恒温器の設定温度とほぼ同じ温度であったが，照明点灯中の接種葉付近の温度は，恒温器の設定温度よりも約4℃高かった (Fig. 3)。

接種葉での発病は，‘京ゆたか’および‘土佐じしビューティー’の両品種ともに25℃設定区(25-29℃)で接種1～2日後までは最も病斑が大きかったが，30℃設定区(30-34℃)では，接種6日後以降の病斑の拡大は見られなかった。一方，15℃設定区(15-19℃)では病斑は拡大し続け，接種8日後以降は各調査温度の中で最大の病斑を形成した (Table 3)。

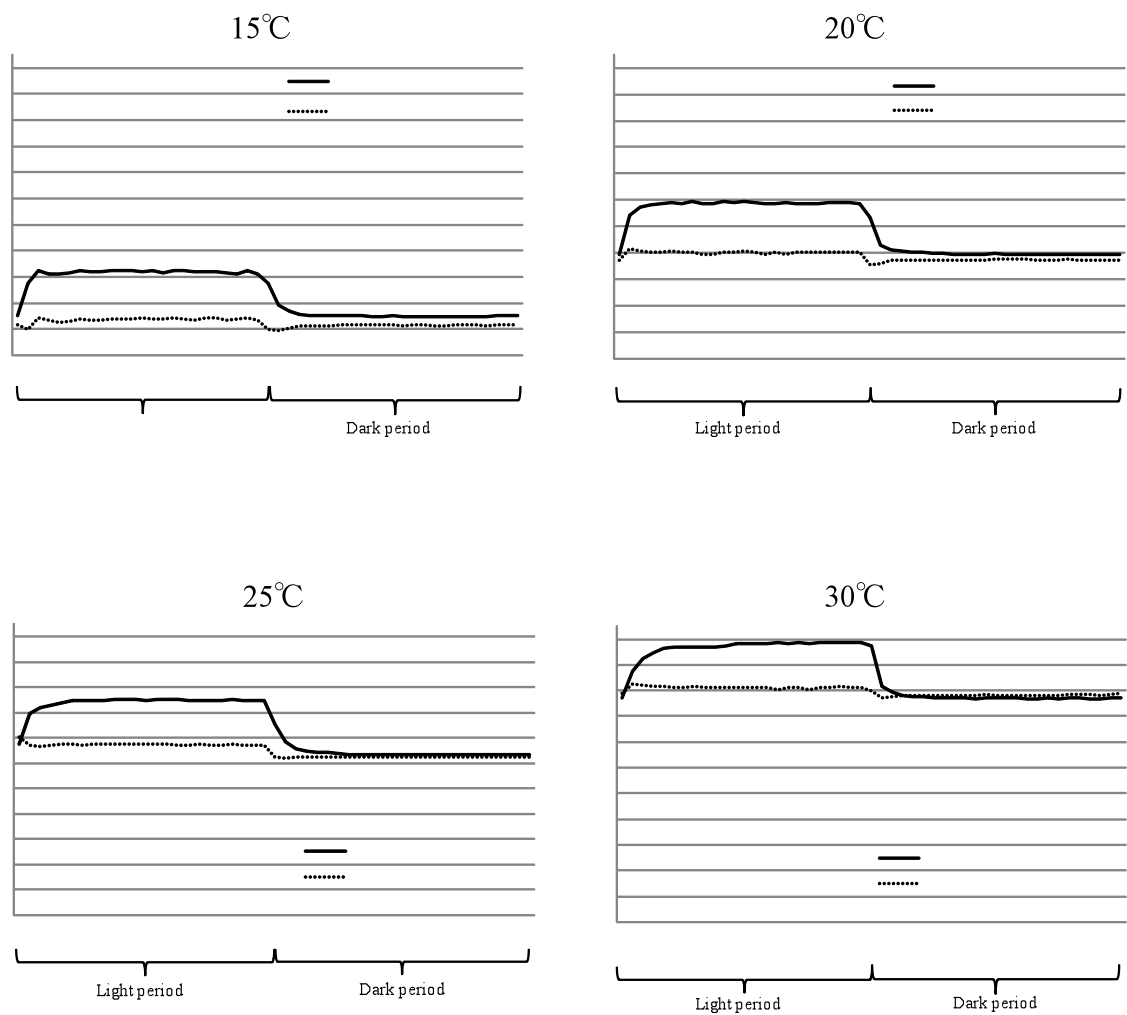


Figure. 3 The progressions of temperatures inside of growth chamber and neighborhood of leaf side (12h light-12h dark)

Table 3. Sweet pepper (*C. annuum*) leaf blight disease development at different temperatures

Cultivar	°C (Fluctuation of temperature)	Disease severity ^{a)}					
		1 ^{b)}	2	4	6	8	13
Kyo-yutaka	15 (15-19)	1.2a ^{c)}	2.5a	4.3ab	4.7a	5.7b	7.2c
	20 (20-24)	2.2b	3.8ab	4.5b	4.7a	4.7ab	4.7ab
	25 (25-29)	4.2c	4.8b	4.8b	4.8a	4.8ab	4.8b
	30 (30-34)	2.2b	2.5a	2.5a	2.8a	2.8a	2.8a
Tosajishi beauty	15 (15-19)	1.3a	1.8a	4.9b	7.1b	9.1c	10.1c
	20 (20-24)	1.3a	3.3bc	5.3b	6.3b	7.6bc	8.6bc
	25 (25-29)	2.2b	3.8c	4.6b	5.1b	5.6b	6.1b
	30 (30-34)	2.1b	2.2ab	2.2a	2.2a	2.2a	2.2a

a) We used cvs.Kyo-yutaka, and Tosajishi beauty, the KH-5 isolate for this test. All plantlets were transferred to an incubator at 15–30°C after inoculation

b) Days after inoculation

c) Diameter of necrotic lesions (mm). Means followed by the same letter are not significantly different in the same day by Tukey's test ($\alpha = 0.05$, Kyo-yutaka $n = 6$, Tosajishi beauty $n = 8$).

第 4 項 . 品 種 間 の 発 病 差 異

試 験 方 法

供 試 品 種 は , ト ウ ガ ラ シ 類 18 品 種 (ピ ー マ ン 13 品 種 ; ‘ 京 ゆ た か ’ , ‘ ベ ル マ サ リ ’ , ‘ ベ ル ホ マ レ ’ , ‘ ト サ ヒ メ ’ , ‘ さ ら ら ’ , ‘ オ リ ジ ナ ル ’ , ‘ ア メ ジ ス ト ’ , ‘ 新 さ き が け 2 号 ’ , ‘ 土 佐 ひ か り D ’ , ‘ 土 佐 ひ か り D S u p e r ’ , ‘ み は た 1 号 ’ , ‘ み は た 2 号 ’ , ‘ み お ぎ ’ , シ シ ト ウ ガ ラ シ 5 品 種 ; ‘ 土 佐 じ し ’ , ‘ 土 佐 じ し ビ ュ ー テ ィ ー ’ , ‘ つ ば き グ リ ー ン ’ , ‘ 南 海 じ し ’ , ‘ 葵 し し と う ’) で , い ず れ も 直 径 7.5 c m の ポ リ エ チ レ ン ポ ッ ト に 定 植 し , ガ ラ ス 室 内 で 37 日 間 育 苗 し た .

接 種 に は K H - 5 菌 株 お よ び K H - 32 菌 株 を 供 試 し , 同 節 第 3 項 発 病 適 温 の 調 査 と 同 様 に 接 種 を 行 っ た . 各 品 種 と も 菌 株 ご と に 4 株 ず つ 供 試 し , 接 種 後 は ガ ラ ス 室 内 で , ビ ニ ル 被 覆 し て 多 湿 条 件 と し た 育 苗 棚 に 静 置 し て 管 理 し た .

調 査 は 接 種 5 日 後 に 行 い , 発 病 程 度 を 次 に 示 し た 指 数 に 従 っ て 調 査 し , 発 病 度 を 算 出 し た .

[指 数] 0 : 無 病 徴 (付 傷 部 の み 変 色) , 1 : 付 傷 部 か ら 2 m m 未 満 の 範 囲 が 変 色 , 2 : 2 m m ~ 5 m m 未 満 の 範 囲 が 変 色 , 3 : 5 m m 以 上 変 色 , 4 : 落 葉

発 病 度 = Σ (程 度 別 発 病 葉 数 $\times$ 指 数) / (調 査 葉 数 $\times$ 4) $\times$ 100

試 験 結 果

KH-5, KH-32 菌 株 接 種 区 と も に 全 て の ト ウ ガ ラ シ 類 品 種 で 病 斑 が 形 成 さ れ , 接 種 葉 の 萎 凋 落 葉 や , 葉 柄 か ら 茎 へ の 病 勢 の 進 展 も 認 め ら れ た . 品 種 に よ っ て は 菌 株 ご と の 発 病 度 が 異 な る 場 合 が 見 ら れ , 品 種 間 の 感 受 性 の 強 弱 に つ い て は 判 然 と し な い も の が 多 か っ た が , ピ ー マ ン 品 種 の ‘さ ら ら’ は , 両 菌 株 接 種 区 と も に 最 も 発 病 程 度 が 低 か っ た . 一 方 , KH-5 菌 株 接 種 区 に お い て シ シ ト ウ ガ ラ シ 5 品 種 の う ち 4 品 種 (‘つ ば き グ リ ー ン’ , ‘葵 し し と う’ , ‘土 佐 じ し ビ ュ ー テ ィ ー’ , ‘南 海 じ し’) で ‘さ ら ら’ よ り 発 病 度 が 有 意 に 高 か っ た . ま た , KH-32 接 種 区 に お い て も シ シ ト ウ ガ ラ シ 品 種 は 発 病 度 が 高 い 傾 向 が 認 め ら れ た (Fig. 4) .

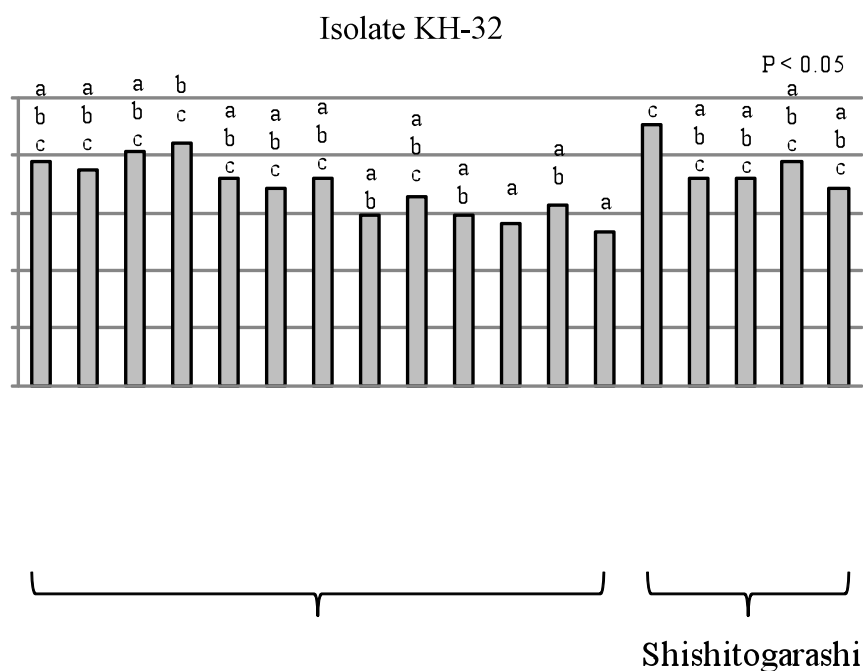
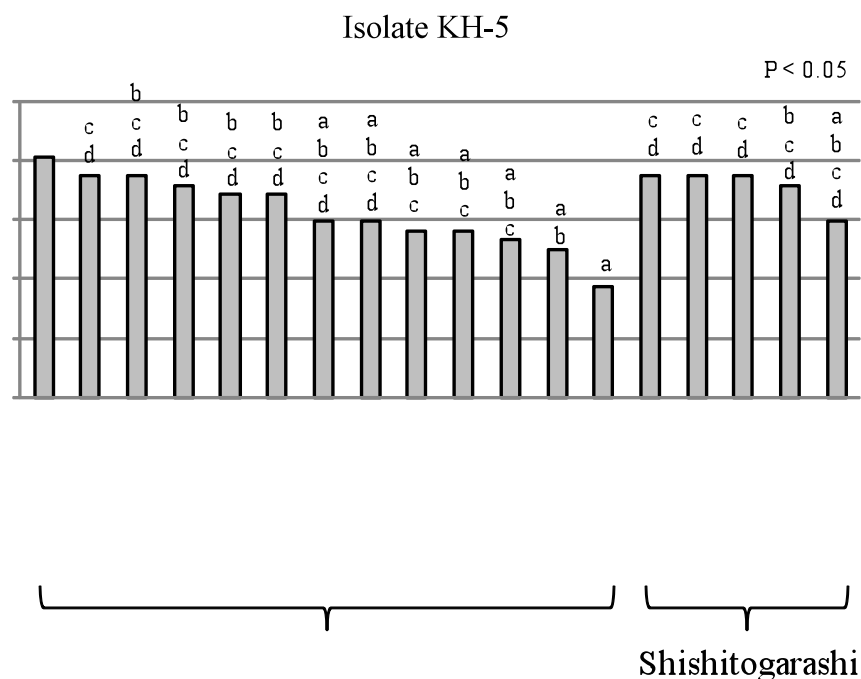


Figure 4. Disease severity of sweet pepper (*C. annuum*) leaf blight on various cultivars. All the plantlets were inoculated with the isolates KH-5 and KH-32, transferred to a glass-house, and kept under high humidity conditions for 5 days after inoculation. The disease index (0–4) shown is based on the radius of necrotic lesions on the leaf (0, no symptoms; 1, up to 2 mm; 2, 2–5 mm; 3, 5 mm; 4, leaf fall). Means followed by the same letter are not significantly different by Tukey's test ($\alpha = 0.05$, $n = 6$ for inoculated isolate KH-5, and $n = 4$ for inoculated isolate KH-32 to 'Shin sakigake no. 2', $n = 8$ for others).

第 5 項 . 考 察

本試験の結果から，葉枯細菌病菌の最適増殖温度は30℃付近であり，発病においては初期には25～29℃で病勢の進展が早い，後期は15～19℃でより早く進むことが明らかとなった．以上の結果は本病原菌の生育適温と発病適温は異なる可能性があることを示唆している．

トウガラシ類は，ナス科作物の中でも特に高温を要求する植物であり，ピーマンは最低夜温18℃以上，シシトウガラシは20℃以上を必要とし，15℃以下では生育が著しく劣る（加除式農業技術大系 1974）．本試験においても、15～19℃の温度条件では植物自体が衰弱していることから，低温で発病が増加した要因の一つとして、葉枯細菌病に対する抵抗力の低下が考えられた．

高知県での本病害の発生は中山間地域の露地圃場で多く，梅雨時期に被害が拡大する．高知県の中山間地域は，平地農業地域よりも昼夜の寒暖差が大きく，本病害の発生が多く見られる産地内にあるアメダス観測地点の江川崎（高知県四万十市西土佐）において，過去30年の最低気温の日ごとの平年値は，5月には最低気温が15℃を上回る日はなく，6月27日までは20℃以下である（国土交通省気象庁 2013）．このように，高知県の中山間地域の露地圃場では，5月以降，特に梅雨入り後は葉枯細菌病の発生に好適な温湿度条件となっている可能性が考えられる．本研究で得られた知見は，葉枯細菌病の発生が多い中山間地域で，なぜ梅雨時期に最も多発するのかという疑問を解明する一つの手掛かりになるのではないかと考えている．

葉枯細菌病に対する品種間の感受性差異について調査したところ，試験に供した18品種全てで発病が見られたが，その程度は接種菌により差が見られ，感受性の品種間差は判然としないものが多かった．しかし，ピーマン品種‘さらら’は最も発病程度が低く，一方，シシトウガラシ各品種は高い傾向を示した．

中山間地域のうち，本病害の発生が多い産地ではシシトウガラシ品種‘土佐じしビューティー’を栽培している圃場が多く見られる．本試験の結果，‘土佐じしビューティー’は葉枯細菌病に対する感受性が比較的高いと考えられたため，本病害が多発する産地ではこれらの感受性が高い品種の栽培は避け，‘さらら’のような比較的发病の少ない品種を選定していくことは，本病害の発生低減へとつながると考えられる．

第 3 節 . 防除対策

葉枯細菌病に対する生育期間中に使用できる有効な薬剤に関する知見はなく，本病の体系的な防除法を確立するには至っていない．

そこで，本節では葉枯細菌病に対する生育期間中の薬剤処理の効果を検討し，防除に有効な薬剤を明らかにした．

第 1 項 . 供試植物と供試菌株および接種源の調製

供試植物は，本県で比較的多く栽培されているピーマン品種の中から‘京ゆたか’を選び，試験に用いた．接種には KH-5 菌株を供試し，YPDA 斜面培地を用いて暗黒条件下で 25℃，24 時間

培養後，滅菌水に懸濁し， 1.0×10^8 cfu/mL に調製した懸濁液を接種源とした．

第 2 項． 予 防 効 果 を 有 す る 殺 菌 剤 の 選 抜

試 験 方 法

供試薬剤は，ピーマンまたは野菜類に登録のある薬剤を選定し，Table 4に示した10剤を用いた．薬剤処理は，直径9.0cmのポリエチレンポットに定植し，ガラス室内で64日間育てたピーマンの株全体に，所定濃度に希釈した各薬剤を10mL/株の割合で噴霧した．噴霧後はガラス室内の直射日光の当たらない場所で薬液を乾燥させた．対照には滅菌水を同様に処理した．接種は薬剤散布の翌日に行い，接種源の懸濁液をハンドスプレーにより約1mL/株の割合で株全体に噴霧した．接種後はガラス室内の育苗棚に置き，育苗棚全体をポリフィルムで被覆して多湿条件として管理した．各薬剤につき6株ずつ供試した．調査は接種6日後および11日後に行い，8葉/株について発病程度を次に示した指数に従って調査し，発病株率および発病度を算出するとともに，発病度から防除価を算出した．薬害は適宜肉眼観察した．

[指数] 0：病斑なし， 1：わずかに病斑を認める， 2：葉の1/4未満に病斑を認める， 3：葉の1/4以上1/2未満に病斑を認める， 4：葉の1/2以上に病斑を認める，または落葉

発病度 = $\Sigma (\text{発病程度} \times \text{程度別発病葉数}) / (4 \times \text{調査葉数}) \times 100$

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

試験結果

供試した10剤のうち、カスガマイシン・銅水和剤は病原菌接種11日後の防除価が58.8と最も高い防除効果を示した。炭酸水素ナトリウム・銅水和剤は防除価52.6、銅水和剤（有効成分50%；以下銅水和剤A）は防除価50.0、銅水和剤（有効成分32%；以下銅水和剤B）は防除価43.7となり、試験に供した全ての銅水和剤および銅と殺菌剤との混合剤に防除効果が認められた。シアゾファミド水和剤やキノキサリン系水和剤でも防除効果が認められたがその効果は低かった。その他の薬剤の防除効果は低かった。いずれの薬剤も薬害は認められなかった (Table 4)。

Table 4. Protective effects of several fungicides against bacterial leaf blight of sweet pepper^{a)}

Fungicide	Dosage forms ^{b)}	Dilution	6 days after inoculation		11 days after inoculation		
			Disease incidence (%)	Severity ^{c)}	Disease incidence (%)	Severity	Protective value ^{d)}
Kasugamycin (5.0%) • Copper oxychloride (75.6% ; Copper (45.0%))	WP	1000	47.9	16.2±2.7	100.0	41.2±2.2	58.8
Sodium hydrogen carbonate (46.0%) • Copper (II) sulfate (30.0% ; Copper (12.0%))	WP	1000	70.8	22.4±2.5	100.0	47.4±2.6	52.6
Copper hydroxide (A) (76.8% ; Copper (50.0%))	WP	1000	45.8	15.1±2.7	97.9	50.0±3.6	50.0
Tetracopper hexahydroxide sulfate (B) (58.0% ; Copper (32.0%))	WP	500	45.8	16.7±2.9	100.0	56.3±3.5	43.7
Cyazofamid (9.4%)	WP	2000	85.4	43.2±3.5	100.0	76.6±4.3	23.4
Quinoxaline (25.0%)	WP	2000	89.6	53.6±4.6	100.0	86.5±2.9	13.5
Tetrachloroisophthalonitrile (TPN) (40.0%)	WP	1000	95.8	59.4±4.2	100.0	90.1±2.7	9.9
Triflumizol (30.0%)	WP	3000	97.9	79.7±4.1	100.0	96.4±1.8	3.6
Sodium hydrogen carbonate (80.0%)	SP	800	93.8	77.1±4.6	100.0	97.4±1.3	2.6
Procymidone (50.0%)	WP	1000	95.8	88.5±3.6	100.0	99.0±1.0	1.0
Distilled Water (Control)	-	-	97.9	96.4±2.2	100.0	100.0±0.0	-

a) All the plantlets (cv. Kyo-yutaka) were inoculated with the isolates KH-5 1 day after spraying fungicides and transferred to a glass-house, and kept under high humidity conditions. Each treatment was performed on 48 leaves of 6 plantlets (eight leaves per plantlet)

b) WP = Wettable powder, SP = Water soluble powder

c) Disease severity = Σ (disease index $\times$ number of leaf) / (total number of leaf $\times$ 4) $\times$ 100

The disease index (0-4) was determined by the radius of necrotic lesions on the leaf (0, no symptoms, 1, tiny symptom, 2, up to 1/4th of leaf, 3, 1/4th - 1/2th, 4, more than 1/2th or leaf fall).

d) Protective value calculated it than the mean of the disease severity

e) -: Not appeared

第 3 項 . 治 療 効 果 を 有 す る 殺 菌 剤 の 選 抜

試 験 方 法

直 径 9.0 c m の ポ リ エ チ レ ン ポ ッ ト に 定 植 し , ガ ラ ス 室 内 で 7 6 日 間 育 て た ピ ー マ ン の 株 全 体 に , ハ ン ド ス プ レ ー を 用 い て 病 原 菌 の 懸 濁 液 を 約 1 m L / 株 の 割 合 で 噴 霧 し た . 接 種 後 は 育 苗 棚 全 体 を ポ リ フ ィ ル ム で 被 覆 し て 多 湿 条 件 と し , 1 7 時 間 静 置 し た . 被 覆 を 除 去 し て 3 時 間 後 , 菌 液 の 乾 燥 を 確 認 し た 後 , 同 節 第 2 項 の 予 防 効 果 を 有 す る 殺 菌 剤 の 選 抜 で 供 試 し た 薬 剤 を そ れ ぞ れ 所 定 濃 度 に 希 釈 し て , 約 1 0 m L / 株 の 割 合 で 株 全 体 に 噴 霧 し た . 各 薬 剤 に つ き 5 株 ず つ 供 試 し た . 噴 霧 後 は 約 3 時 間 ガ ラ ス 室 内 で 薬 液 を 乾 燥 さ せ た 後 , 再 び ポ リ フ ィ ル ム で 被 覆 し て 多 湿 条 件 と し て 管 理 し た .

調 査 は 薬 剤 散 布 6 日 後 と 1 0 日 後 に 行 い , 予 防 効 果 の 評 価 試 験 と 同 様 に , 発 病 葉 率 , 発 病 度 お よ び 防 除 価 を 算 出 し た . 薬 害 は 適 宜 肉 眼 観 察 し た .

試 験 結 果

供 試 し た 1 0 剤 の う ち , カ ス ガ マ イ シ ン ・ 銅 水 和 剤 と 銅 水 和 剤 B は 薬 剤 散 布 1 0 日 後 の 防 除 価 が 8 4 . 2 と 最 も 高 い 防 除 効 果 を 示 し た . 銅 水 和 剤 A も 防 除 価 7 3 . 7 と 高 い 防 除 効 果 を 示 し た . 炭 酸 水 素 ナ ト リ ウ ム ・ 銅 水 和 剤 は 防 除 価 5 1 . 4 と 防 除 効 果 が 認 め ら れ , 試 験 に 供 し た 全 て の 銅 水 和 剤 お よ び 銅 と 殺 菌 剤 と の 混 合 剤 に も 防 除 効 果 が 認 め ら れ た . そ の 他 の 薬 剤 に つ い て は , T P N 水 和 剤 に や や 防 除 効 果 が 見 ら れ た が そ の 効 果 は 低 く , そ の 他 の 殺

菌剤には防除効果は見られなかった．なお，いずれの薬剤も薬害は認められなかった (Table 5)．

Table 5. Curative effects of several fungicides against bacterial leaf blight of sweet pepper^{a)}

Fungicide	Dosage forms ^{b)}	Dilution	6 days after spraying fungicide		10 days after spraying fungicide		Phytotoxicity ^{c)}
			Disease incidence (%)	Severity ^{d)}	Disease incidence (%)	Protective value ^{d)}	
Kasugamycin (5.0%) • Copper oxychloride (75.6% ; Copper (45.0%))	WP	1000	15.0	3.8±1.4	30.0	7.5±1.8	84.2
Sodium hydrogen carbonate (46.0%) • Copper (II) sulfate (30.0% ; Copper (12.0%))	WP	1000	42.5	11.9±2.4	85.0	23.1±1.9	51.4
Copper hydroxide (A) (76.8% ; Copper (50.0%))	WP	1000	27.5	7.5±2.0	47.5	12.5±2.2	73.7
Tetracopper hexahydroxide sulfate (B) (58.0% ; Copper (32.0%))	WP	500	10.0	3.8±1.9	25.0	7.5±2.2	84.2
Cyazofamid (9.4%)	WP	2000	67.5	38.8±5.5	92.5	79.4±4.7	0
Quinoxaline (25.0%)	WP	2000	72.5	31.3±3.7	77.5	52.5±5.9	0
Tetrachloroisophthalonitrile (TPN) (40.0%)	WP	1000	45.0	23.8±5.3	67.5	38.8±5.8	18.3
Triflumizol (30.0%)	WP	3000	75.0	43.1±5.7	85.0	61.9±5.7	0
Sodium hydrogen carbonate (80.0%)	SP	800	82.5	48.1±5.1	97.5	78.8±4.6	0
Procymidone (50.0%)	WP	1000	75.0	36.9±4.9	85.0	54.4±6.1	0
Distilled Water (Control)	-	-	67.5	29.4±4.3	85.0	47.5±5.7	-

a) All the plantlets (cv. Kyo-yutaka) were inoculated with the isolates KH-5 20 h before spraying fungicides and transferred to a glass-house, and kept under high humidity conditions. Each treatment was performed on 40 leaves of 5 plantlets (eight leaves per plantlet)

b, c, d, e) See Table 4. for details

第 4 項 . 考 察

忠・小笠原 (2010) や加藤ら (2003) は *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* によるモモせん孔細菌病, 石原ら (2006) は *Xanthomonas* 属菌によるカシ・ナラ類枝枯細菌病, 秦谷ら (2001) は *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* によるアズキ褐斑細菌病, 芹澤・井上 (1982a,b) は *Xanthomonas campestris* pv. *citri* によるカンキツかいよう病に対し, 銅水和剤や銅を含む混合剤が高い効果を示すことを報告している. 今回の試験結果でも, 銅水和剤や銅を含む混合剤は高い防除効果を示し, 既報の細菌病に対する防除試験と同様の傾向を示した. 銅水和剤は抗菌スペクトルが広い薬剤であることから, 本病害にも防除効果を発揮したと考えられ, 葉枯細菌病に対し予防効果の高い殺菌剤であることが明らかとなった.

次に, 感染後の発病や病勢の進展抑止を目的として, 病原菌の潜伏期間中に殺菌剤を散布したところ, 予防効果の評価試験と同様に銅水和剤や銅を含む混合剤が比較的高い防除効果を示した. 細菌性病害は, 感染後の防除が困難であるものが少なくない (田部井ら 1991a) が, 葉枯細菌病に対し, 銅水和剤や銅を含む混合剤は感染初期の散布でも防除効果を有することが示唆された. なお, 治療効果試験では, 多くの薬剤防除区で無処理区よりも発病度が高くなったが, これは薬剤散布区の方が無処理区よりも葉の濡れ時間が長くなったためと考えられた. 葉枯細菌病菌と同種の *P. cichorii* によるレタス腐敗病は降雨, 多湿状態が好適発生条件である (田部井ら 1991b). トウガラシ類

葉枯細菌病についても，葉の濡れ時間が短かった薬剤無処理(水無散布)区で発生が少なかったことから，多湿条件で発生しやすいと推察される．本試験において，予防効果試験で防除効果が低かったシアゾファミド水和剤，キノキサリン系水和剤，TPN水和剤，トリフルミゾール水和剤，炭酸水素ナトリウム水溶液およびプロシミドン水和剤は，治療効果試験において薬剤無処理区(水散布をしていないため，濡れ時間が薬剤散布区よりも短い)よりも発病度が高かった．このことは，多湿条件下で葉枯細菌病に対して殺菌効果が少ない薬剤を散布した場合，葉の濡れ時間が長くなることにより発病が増加し，かえって被害が拡大する可能性を示唆している．

以上の結果から，トウガラシ類葉枯細菌病の防除に対しては，銅水和剤および銅を含む混合剤が効果的であり，病原菌感染の前後いずれの散布でも効果があるが，殺菌剤散布後は植物体の濡れ時間ができるだけ短くなるよう，植物体が乾燥しやすい晴天日を選んで防除することが望ましいと考えられた．

第 4 節． 総 合 考 察

高知県内の露地栽培トウガラシ類に発生していた葉枯れ症は，*P. cichorii* による細菌病であることを明らかとし，病名をトウガラシ類葉枯細菌病(英名：Bacterial leaf blight of sweet pepper)と命名した．

本試験の結果から，葉枯細菌病菌の最適増殖温度は30℃付近，発病においては初期には25～29℃で病勢の進展が早い，後期

は15～19℃でより早く進むことが明らかとなった。以上の結果は葉枯細菌病菌の生育適温と発病適温は異なる可能性を示唆しており、温度の影響による病原細菌の増殖だけでなく、宿主の病原細菌に対する抵抗力の温度反応も病勢の進展に影響したと考えられた。

本病害は30℃以上の温度条件下で発病後期の病勢の進展が最も遅かった。高知県内の施設栽培トウガラシ類の栽培圃場では、冬期はビニルハウスを三重張りし、夜温20℃以上の設定で加温している圃場が多く、日中は厳寒期でもハウス内気温が30℃近くになることから、本県の施設栽培トウガラシ類で葉枯細菌病の発生が確認されないのは、このような高温環境下で病勢の進展が抑止され、実際には罹っているものの発生が目立たないために発見されていないと考えられる。

葉枯細菌病に対する品種間の感受性差異について調査したところ、感受性の品種間差は接種菌株によって異なり、判然としないものが多かったが、ピーマン品種‘さらら’は最も発病程度が低かった。一方、シシトウガラシ各品種は高い傾向であった。よって、本病害が多発する産地では、感受性が高い品種の栽培を避け、‘さらら’のような比較的発病の少ない品種を選定していく取組みは、本病害の発生低減へとつながると考えられた。

また、トウガラシ類葉枯細菌病の防除に対しては、銅水和剤および銅を含む混合剤が効果的であり、病原菌感染の前後いずれの散布でも効果があることが明らかとなった。ただし、薬剤散布後の葉の濡れ時間が長くなると、発病が助長され、被害が

拡大する可能性が考えられるため、殺菌剤散布後は植物体の濡れ時間ができるだけ短くなるよう、植物体が乾燥しやすい晴天日を選んで防除することが望ましいと考えられた。

以上の結果から、本病害の防除対策として、トウガラシ類の栽培期間中に圃場内気温が20℃以下の温度条件になる時期があり、本病害が多発する産地では、感受性が高い品種の栽培を避け、比較的発病の少ない品種を選定することが望ましい。また、葉枯細菌病が多発する入梅前のタイミングで、予防を目的とした銅水和剤および銅を含む混合剤の散布を行うことも葉枯細菌病の発生低減につながると考えられる。入梅後に発病が確認された場合は、速やかに銅水和剤および銅を含む混合剤の散布を行うことが望ましいが、殺菌剤の散布により生じた植物体表面の濡れが長時間持続されると、発病が助長される可能性が考えられるため、植物体ができるだけ早く乾くように、散布のタイミングは曇雨天日を避け、晴天日に行うことにより、発生が低減されることが考えられる。

第 4 章 . ミ ヨ ウ ガ 軟 腐 症 の 原 因 菌 の 特 定 と 諸 性 質

ミ ヨ ウ ガ (*Zingiber mioga* (Thunb.) Rosc.) は シ ヨ ウ ガ 科 の 多 年 草 で , 主 に 地 下 の 根 茎 か ら 生 じ る 花 茎 を 食 用 に す る . 東 ア ジ ア が 原 産 と さ れ て い る が , 日 本 で は 古 く か ら 全 国 で 自 生 ま た は 栽 培 さ れ て お り , 独 特 の 香 り が 好 ま れ , 薬 味 や 生 食 用 と し て 広 く 利 用 さ れ て い る . 2010 年 の 国 内 で の ミ ヨ ウ ガ の 栽 培 面 積 は 526ha , 収 穫 量 は 5,484t と な っ て い る . こ の う ち 高 知 県 産 ミ ヨ ウ ガ の 収 穫 量 は 4,382t と 全 国 の 約 80% を 占 め , 本 県 の 重 要 な 品 目 と な っ て い る (農 林 水 産 省 生 産 局 2013b) . し か し , 2010 年 に 高 知 県 内 の 施 設 栽 培 ミ ヨ ウ ガ で , 栽 培 期 間 中 お よ び 収 穫 後 の 花 蕾 が 軟 化 し て 腐 敗 す る 障 害 が 発 生 し , 深 刻 な 問 題 と な っ て い た . 障 害 部 に は 糸 状 菌 が 認 め ら れ ず , 多 量 の 細 菌 が 認 め ら れ た た め , 細 菌 に よ る 新 た な 病 害 で あ る 可 能 性 が 示 唆 さ れ た . そ こ で , 罹 病 植 物 か ら 細 菌 を 分 離 し , 接 種 試 験 お よ び 分 離 細 菌 の 同 定 を 行 う と と も に , 本 病 原 菌 の 諸 性 質 に つ い て 調 査 し た .

第 1 節 . 病 原 菌 の 同 定

第 1 項 . 病 徴 お よ び 病 原 菌 の 分 離

栽 培 期 間 中 お よ び 収 穫 後 の 花 蕾 が , 一 部 か ら 淡 褐 色 ~ 褐 色 に 変 色 し て , や が て 花 蕾 全 体 が 水 浸 状 に 軟 化 し て 腐 敗 し た . 症 状 の 進 展 は 早 く , 高 温 時 は 3 日 間 程 度 で 花 蕾 全 体 が 腐 敗 し た . 悪 臭 の 発 生 は ほ と ん ど な か っ た . ま た , 花 蕾 が 腐 敗 し て も 花 蕾 以 外 へ の 腐 敗 の 進 展 は ほ と ん ど 見 ら れ な か っ た . 本 障 害 の 発 生 は

7～8月に集中し，収穫物の3割以上に発生した圃場もみられた．

2010年7月に高知県須崎市のビニルハウスで発生した腐敗花蕾を採取し，花蕾の腐敗部と健全部の境界付近から小片を切り出し，滅菌水で洗浄後，少量の滅菌水中でつぶしてNA (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan)平板培地上に画線して28℃で培養し，細菌を分離した．これらをNAで2回単コロニー分離することにより得られた10菌株(MB1-1, MB2-1, MB3-1, MB10-11, MB10-12, MB10-23, MB10-R121, MB10-R122, MB10-R123 および MB10-R124)を以下の試験に供した．なお，供試菌株はスキムミルク分散媒(1.5% Monosodium-L-glutamate, 10% Skim milk)に懸濁して-80℃で保存した．

第2項．病原性

試験方法

ミョウガ花蕾の障害部から分離した10菌株をNA斜面培地で28℃，48時間培養後，滅菌水に懸濁して 1×10^9 cfu/mLに調整し，立毛中(養液栽培)のミョウガ品種‘夏ミョウガ’の花蕾に20μL滴下して虫針で付傷した．対照区は等量の滅菌水を滴下し，同様の処理を行った．接種3日後に調査し，腐敗の認められた花蕾からは接種菌の再分離を行った．

試験結果

分離菌株を接種した花蕾は，接種1日後に全ての接種部が淡褐色～褐色に変色し，水浸状に軟化した．接種3日後には花蕾

部分のほとんどが腐敗し，原病徴が再現された(Figs. 5a,b). 滅菌水を接種したミョウガに発病は見られなかった．また，再現された腐敗花蕾から接種菌と同一と見られる細菌が再分離された．このことから，本分離菌株が本病害の病原細菌であることが明らかとなった．

第 3 項 . 細菌学的性質

試験方法

ミョウガ花蕾の障害部から分離した10菌株を用いて Goto and Takikawa (1984a,b,c,d)に準じて分離菌の細菌学的性質を調査した．なお，ゼラチンの液化は20℃で実施したが，その他の培養は生育温度に関する試験を除き，25℃で行った．予め，Nishiyama (1978)による植物病原細菌の簡易同定法に従い，分離細菌の細菌学的性質について予備調査を行ったところ，*Erwinia chrysanthemi*に近縁な細菌である可能性が示唆されたため，対照として農業生物資源ジェンバンクに登録されている *E. chrysanthemi* の3菌株 (MAFF106501, MAFF301677, MAFF311098) と，*Pseudomonas cichorii* (MAFF301187)，*Pantoea ananatis* (MAFF301714)，*Erwinia herbicola* pv. *milletiae* (MAFF301740)，*Erwinia rhapontici* (MAFF301337)，*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (MAFF301629)を併せて調査した．

試験結果

NA培地上のコロニーは，培養2日目に直径1mm程度となり，

白色，円形，全縁，中高，表面平滑，バター質となった (Fig. 5c). グラム反応は陰性，O-F試験ではF型を示し，硝酸塩を還元し，インドールを産生した．レシチナーゼ活性は陽性，メチルレッド試験とフェニルアラニン・デアミナーゼ活性は陰性であり，アミノ酸脱炭酸酵素活性はアルギニン，リジン，オルニチン，グルタミン酸で陰性であった．ゼラチンは接種2日目から液化し始め，アセトインを産生し，エリスロマイシン (15 µg) に感受性であった．ジャガイモの腐敗は接種1日後に陽性を確認し，0.015% KCN耐性の試験では接種7日後に生育が認められ，5%耐塩性の試験では生育が認められなかった．39℃では生育が認められた．グルコース，フルクトース，キシロース，L-アラビノース，D-アラビノース，マンノース，リボース，メリビオース，スクロース，ラフィノース，マンニトール，イノシトール，サリシンからは接種2日目に酸を産生した．セロビオース，エタノールからは接種7日目に酸を産生し，ラクトースからは接種14日目に酸を産生した．マルトース，トレハロース，メレジトース，パラチノース，ダルシトール，デンプン，イヌリンおよびα-メチルグリコシドからは接種21日目までに酸を産生しなかった．デキストリンは供試した10株のうち2株が陽性，8株が陰性を示し，有機酸の利用試験では，L-酒石酸は接種1日目，クエン酸，マロン酸，およびグルコン酸は接種2日目に陽性になった．これらの結果は，対照に供した *E. chrysanthemi* と同一の性質であった (Table 6). また，既報の *E. chrysanthemi* の性質とも一致した (Burkholder et al. 1953; Mizuno et al. 1993; Thomson et al.

1981). 以上から, 本病原菌を *E. chrysanthemi* Burkholder,
McFadden and Dimock 1953と 同 定 し た .

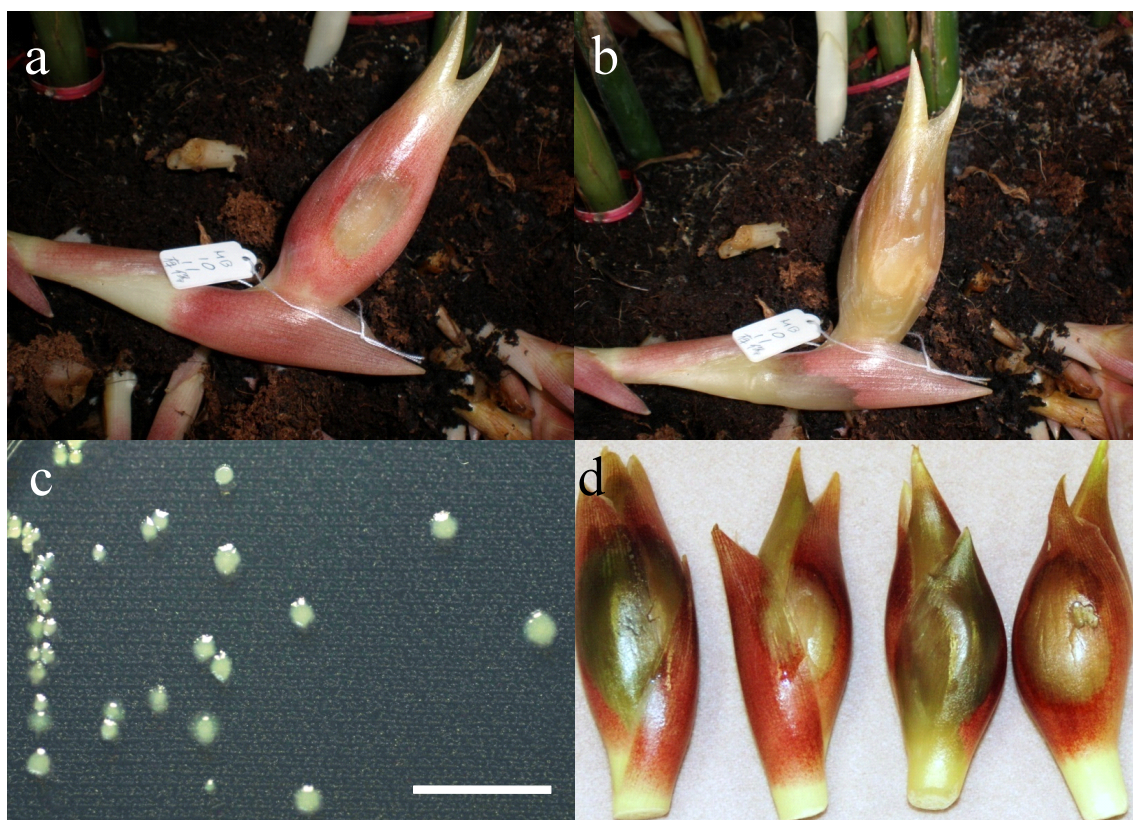


Figure 5. Bacterial rot was observed on the flower buds 1 day (a) and 3 days (b) after inoculation with isolate MB10-11 in the field at the time of flower bud differentiation. (c) Isolate MB1011 formed white, circular, entire, convex, smooth, and butyrous colonies on NA after 2 days at 25° C. *Scale bar* 5 mm. (d) Bacterial rot was observed 2 days after inoculating to harvested flowerbuds with isolate MB10-12 and the flower buds and incubating at 25° C.

Table 6. Comparison of bacteriological characteristics among present isolates of bacterial soft rot of myoga (*Z. mioga*) and several bacteria

Test	Present isolates (n=10) ^{a)}	<i>E. chrysanthemi</i> (n=3) ^{b)}	<i>Pantoea</i> <i>ananatis</i> MAFF301714 (n=1)	<i>E. herbicola</i> pv. <i>milletiae</i> MAFF301740 (n=1)	<i>E. rhapontici</i> MAFF301337 (n=1)	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> MAFF301629 (n=1)	<i>Pseudomonas</i> <i>cichorii</i> MAFF301187 (n=1)
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-
O-F test	F	F	F	F	F	F	O
Nitrate reduction	+	+	-	+	+	+	-
Lecithinase	+	+	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	-	+	-
Sensitivity to erythromycin (15 μ g)	+	+	-	+	+	+	+
KCN tolerance	+	2+/1-	+	+	+	+	-
Potato soft rot	+	+	-	-	-	+	-
Acetoin production	+	+	+	+	+	-	-
Methyl red test	-	-	-	-	-	+	-
Indole production	+	+	-	-	-	-	-
Gluconate oxidation	-	-	+	+	+	-	-
Ammonia production	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 36°C	+	+	+	+	-	-	-
Growth at 39°C	+	2+/1-	-	-	-	-	-
Growth in 5%NaCl	-	-	+	+	+	+	-
Phenylalanine deaminase	-	-	-	+	-	-	+
Amino acid decarboxylase							
L-Arginine	-	-	-	-	-	-	-
L-Lysine	-	-	-	-	-	-	-
L-Ornithine	-	-	-	-	-	-	-
L-Glutamic acid	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from :							
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	+	+	+	+	+	-	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	-	-	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	-	+	+	-
Trehalose	-	-	+	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+	+	-
Palatinose	-	-	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	2+/8-	1+/2-	+	+	+	+	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	-
α -Methylglucoside	-	-	-	-	-	+	-
Ethanol	+	+	+	-	+	-	-
Utilization of :							
L-Tartrate	+	1+/2-	-	-	-	-	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+
Malonate	+	+	(+) ^{c)}	+	+	-	+
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+

Symbols : + ; positive, - ; negative

a) Number of test isolates

b) MAFF311098;Takeuchi and Komada (1992), MAFF301677;Tominaga and Ogasawara (1979), MAFF106501;Uematsu et al. (1985)

c) pseudo-positive

第 4 項 . 細菌学的性質に基づく Subdivision および Biovar の類別

Dickey (1979)は, *E. chrysanthemi* は 13 の細菌学的性質から 5 つの subdivision に類別されると報告した. さらに, Dickey and Victoria (1980)はそれらと異なる新たな性質を示す菌株を認め, subdivision VI とした. また, Samson et al. (1990)は, 8 つの細菌学的性質から 9 つの biovar に類別されると報告した.

この類別法に本試験で供試した *E. chrysanthemi* を当てはめると, ミョウガ分離細菌は subdivision IV, biovar 3 に類別された (Table 7, 8).

Table 7. Comparison of bacteriological characteristics among present isolates of bacterial soft rot of myoga and reference strains with subdivision of *E. chrysanthemi*

Test	Present isolates (n=10) ^{a)}	Subdivision ^{b)}					
		I	II	III	IV	V	VI ^{c)}
Acid production from :							
Mannitol	+	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	NT	+	+	+	+	+	-
D-Arabinose	+	+	-	-	+	-	+
Melibiose	+	-	+	+	+	V	+
Raffinose	+	-	+	+	+	V	+
Inulin	-	-	-	+	-	+	-
Utilization of sodium tartrate	+	+	+	-	+	+	+
Lecithinase activity	+	+	+	+	+	V	-
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	V	-
KCN tolerance	+	+	+	-	V	-	-
Growth at 39°C	+	V	+	+	V	-	+
Indole production	+	+	+	+	+	+	+
L-Arginine decarboxylase activity	-	-	-	-	-	V	-

Symbols : + ; positive, - ; negative, V, variable reaction, NT, not tested

a) Number of test isolates

b) Dickey (1979); I = *diffenbachiae*, II = *parthenii*, III = *chrysanthemi*, IV = *zeae*, V = *dianthicola*

c) Dickey and Victoria (1980); VI = *paradisica*

Table 8. Comparison of bacteriological characteristics among present isolates of bacterial soft rot of myoga and reference strains with biovars of *E. chrysanthemi*

Test	Present isolates (n=10) ^{a)}	biovars ^{b)}								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Growth at 39°C	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
L-Arginine decarboxylase activity	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Acid production from :										
D-Arabinose	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Inulin	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Raffinose	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Utilization of D- Tartrate	NT	+	-	-	+	-	-	+	-	+

Symbols : + ; positive, - ; negative, NT, not tested

a) Number of test isolates

b) Samson et al. (1990)

第 5 項 . 16S rRNA に 基 づ く 分 子 系 統 解 析

試 験 方 法

ミ ヨ ウ ガ 分 離 細 菌 10 菌 株 の 16S rRNA の 塩 基 配 列 を Marchesi et al.(1998)の 方 法 を 参 考 に 決 定 し た . す な わ ち , 各 菌 株 を NA 培 地 で 24 時 間 培 養 後 , 1 白 金 耳 か き と り , 1mL の 滅 菌 水 が 入 っ た 1.5mL の マ イ ク ロ チ ュ ー ブ (SARSTEDT Co., Ltd, Nuembrecht1, Germany)に 懸 濁 後 , 95℃ の ヒ ー ト ブ ロ ッ ク (Dry thermo unit DTU-1B ; TAITEC Co., Ltd. Japan)に 10 分 間 静 置 し た . こ れ を 鋳 型 DNA と し , プ ラ イ マ ー (63f ; CAGGCCTAACACATGCAAGTC, 1387r ; GGGCGGWGTGTACAAGGC)を そ れ ぞ れ 10pmol, dNTP Mixture を 0.2mM, *Taq* DNA Polymerase (*TaKaRa EX Taq*®)を 5U と な る よ う に 最 終 濃 度 を 調 整 し , 10×*EX Taq* Buffer を 1/10 量 加 え て 全 量 を 50μl と し て PCR を 実 施 し た . 反 応 条 件 は 95℃ , 2 分 間 の 熱 変 性 後 , 95℃ , 1 分 間 , 60℃ , 1 分 間 , 72℃ , 1.5 分 間 を 30 サ イ ク ル , 最 後 に 72℃ で 10 分 間 と し た . 得 ら れ た 約 1300bp の DNA 断 片 の 塩 基 配 列 を シ グ マ ア ル ド リ ッ チ ジ ャ パ ン (株)に 依 頼 し て 解 析 し た .

ミ ヨ ウ ガ 分 離 細 菌 の 塩 基 配 列 は , BLAST を 使 っ て GenBank ラ イ ブ ラ リ ー で 相 同 性 検 索 を 行 っ た と こ ろ , *E. chrysanthemi* の Type strain(LMG 2804^T ; Z96093)の 16S rRNA 領 域 の 塩 基 配 列 デ ー タ (Z96093)と 98% の 相 同 性 を 示 し た . 次 に , ミ ヨ ウ ガ 分 離 細 菌 と *E. chrysanthemi* の Type strain(LMG 2804^T ; Z96093)の 16S rRNA 領 域 の 塩 基 配 列 デ ー タ (Z96093), 同 節 第 3 項 の 細 菌 学 的 性 質 の 調 査 で 供 試 し た *E. chrysanthemi* の 3 菌 株 (MAFF106501,

MAFF301677, MAFF311098)と, *E. rhapontici* (MAFF301337), *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (MAFF301629)の 16S rRNA の塩基配列を Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5 (MEGA 5)(Tamura et al., 2011)を用いてアライメントした後, 最尤法 (ML 法)を用いた分子系統解析を行った. また, 系統樹における枝の信頼性を評価するためにブートストラップ法 (Felsenstein, 1985)を用い, 1,000 回反復によるブートストラップ値 (%)を分岐点状に示した.

試験結果

ミョウガ分離細菌は全て既報の *E. chrysanthemi* と同一のクレードに位置することが確認できた (Fig. 6).

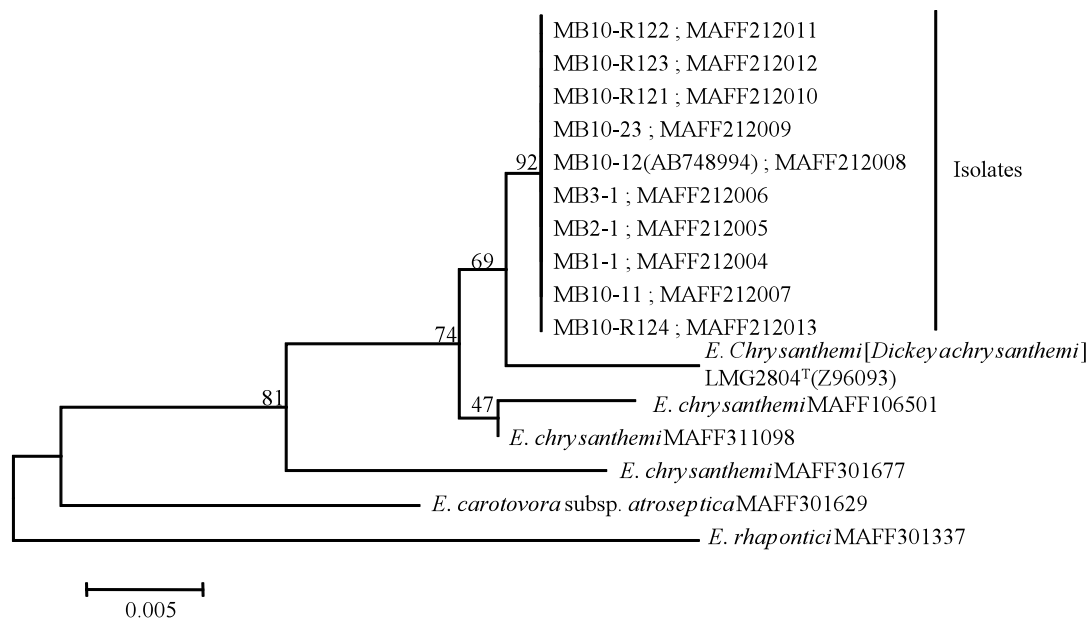


Figure 6. Maximum likelihood tree based on 16S rRNA sequences of some *Erwinia* strains. Numbers on the branches represent bootstrap values obtained from 1000 replications. MAFF numbers following the species name and isolate name indicate NIAS Genbank accession numbers of isolates. Numbers in parentheses indicate GenBank accession numbers. LMG2804^T(Z96093) is the type strain of *E. chrysanthemi* (*D. chrysanthemi*).

第 6 項 . 考 察

ミ ヨ ウ ガ 分 離 細 菌 の 細 菌 学 的 性 質 を 調 査 し た と こ ろ , 分 離 細 菌 は , 既 報 の *E. chrysanthemi* と ほ ぼ 合 致 し た . よ っ て , 本 分 離 細 菌 を *E. chrysanthemi* と 同 定 し た . さ ら に , 本 分 離 細 菌 は *E. chrysanthemi* の subdivision IV, biovar 3 に 類 別 さ れ る こ と が 明 ら か と な っ た . ま た , ミ ヨ ウ ガ 分 離 細 菌 の 16S rRNA 領 域 の 塩 基 配 列 (約 1300bp) は , 最 尤 法 (ML 法) を 用 い た 分 子 系 統 解 析 に よ っ て も , 既 報 の *E. chrysanthemi* と 同 一 の ク レ ード に 位 置 し た こ と か ら , 細 菌 学 的 性 質 に よ る 同 定 を 裏 付 け る 結 果 が 得 ら れ た .

E. chrysanthemi は , 国 内 で は 21 種 の 作 物 (ア ス タ ー , ア ワ , イ チ ゴ , イ ネ , オ ン シ ジ ウ ム , カ ー ネ ー シ ョ ン , カ ボ チ ャ , カ ラ ン コ エ , サ ツ マ イ モ , サ ト イ モ , ジ ャ ガ イ モ , チ コ リ ー , ツ ル ム ラ サ キ , ト ウ モ ロ コ シ , ナ シ , ナ ス , ネ ギ , バ ン ダ , フ ァ レ ノ プ シ ス , マ ン ゴ ー , ヤ ー コ ン) の 病 原 細 菌 と し て の 報 告 が あ り (農 業 生 物 資 源 ジ ー ン バ ン ク 1997), オ ー ス ト ラ リ ア で は , ミ ヨ ウ ガ と 同 じ シ ヨ ウ ガ 科 に 属 す る シ ヨ ウ ガ で *E. chrysanthemi* に よ っ て 軟 腐 症 状 (soft rot) が 引 き 起 こ さ れ た と の 報 告 が あ る (Stirling 2002). し か し , ミ ヨ ウ ガ で の 発 生 事 例 は 本 報 告 が 国 内 外 で 初 め て で あ る こ と か ら , 本 病 を ミ ヨ ウ ガ 軟 腐 病 (英 名 : Bacterial soft rot of myoga) と 命 名 し た . な お , MB1-1, MB2-1, MB3-1, MB10-11, MB10-12, MB10-23, MB10-R121, MB10-R122, MB10-R123 お よ び MB10- R124 菌 株 は , 農 業 生 物 資 源 ジ ー ン バ ン ク に そ れ ぞ れ MAFF212004, 212005, 212006, 212007, 212008, 212009, 212010, 212011, 212012, 212013 と し て 寄 託 登 録 し ,

本論文中で明らかにした MB10-12 菌株の 16S rRNA 領域の塩基配列は, DDBJ / EMBL / Gen Bank に AB748994 として登録した.

第 2 節 . 軟腐病菌の諸性質

本病害は収穫期間が 7~8 月の高温期にあたる作型で発生が多いが, その原因については不明であった. そこで, 本病原細菌の感染方法, 感染時期および発病好適温度域について調査した.

第 1 項 . 試験方法

供試菌株と接種源の調製, 病原菌の接種および調査方法については, 特に記載しない限り次に示した方法で行った.

1. 供試菌株と接種源の調製

接種には MB10-12 菌株を供試し, PSA 半合成平板培地 (Potato broth (Potato 300.0g) 1.000mL, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0g, Peptone 5.0g, Sucrose 20.0g, Agar 15.0g, pH6.8~7.0) で 25℃, 24 時間培養し, 滅菌水で $1 \times 10^7 \text{cfu/mL}$ に調整して接種源とした.

2. 病原細菌の接種

ミョウガ品種 ‘夏ミョウガ’ の収穫後の花蕾を水道水で洗浄して接種に供した. 無傷接種については, 前述の接種源 $100 \mu\text{L}$ を花蕾へ滴下した. 有傷接種は, 接種源を同様に滴下し, 菌液の付着した花蕾表面を虫針で深さ 1mm 程度, 5ヶ所に刺傷をつ

けた．対照区は等量の滅菌水を滴下し，同様の処理を行った．
接種後はプラスチックケース（ $22 \times 31 \times 11 \text{ cm}$ ）に入れて密閉した．

3. 調査方法

次に示した指数に従い発病程度を調査し，発病度を算出した．
[指数] 0：無病徴，1：花蕾表面積の25%未満が腐敗，2：花蕾表面積の25%以上50%未満が腐敗，3：花蕾表面積の50%以上75%未満が腐敗，4：花蕾表面積の75%以上が腐敗
$$\text{発病度} = \Sigma(\text{程度別発病花蕾数} \times \text{指数}) / (\text{調査花蕾数} \times 4) \times 100$$

第2項．花蕾への付傷の有無が発病に及ぼす影響

試験方法

前述の方法で無傷，有傷接種したミョウガを5，10，15，20，25，30および35℃に設定した恒温器内に静置した．各処理あたり3～4個の花蕾を用い，接種2日後に発病程度を調査して発病度を算出した．

試験結果

有傷接種した花蕾は，15℃以上で発病が見られた．一方，無傷接種した花蕾は35℃に静置した花蕾が1個腐敗したのみで他は全て腐敗しなかった．なお，無傷接種で腐敗した花蕾を実体顕微鏡で観察したところ，腐敗部分に微小な傷口が観察された（Table 9）．滅菌水を接種したミョウガは腐敗しなかった．

Table 9. Occurrence of soft rot of myoga by the inoculation with puncture or non-puncture^{a)}

Temperature (°C)	Puncture		Non-puncture	
	Disease insidence (%)	Severity ^{b)}	Disease insidence (%)	Severity
5	0	0a	0	0a
10	0	0a	0	0a
15	33.3	8.3a	0	0a
20	100	50.0b	0	0a
25	100	75.0c	0	0a
30	100	100d	0	0a
35	100	75.0c	(33.3) ^{c)}	(16.7a)

a) We used Myoga (cv. Natsu-Myoga) isolate MB10-12 for this test

b) Disease severity = $\frac{\Sigma(\text{disease index} \times \text{number of flower buds})}{\text{total number of flower buds} \times 4} \times 100$

The disease index (0-4) was the percentage of surface area covered by rot lesions
(0, no symptoms; 1, up to 25%; 2, 26–50%; 3, 51–75%; 4, 76–100%)

Means followed by same letter are not significantly different in the same day by Tukey's test ($\alpha=0.05, n=3$).

c) A small wound was found in the rot lesion

第 3 項 . 感 染 時 期 の 調 査

試 験 方 法

ミ ヨ ウ ガ の 花 蕾 表 面 を 虫 針 で 深 さ 1 m m 程 度 , 5 ヶ 所 に 刺 傷 し , 室 温 に 0 , 2 , 4 , 6 時 間 静 置 後 に 接 種 源 を 付 傷 部 に 滴 下 し た .
こ れ ら の 花 蕾 を プ ラ ス チ ッ ク ケ ー ス に 入 れ て 密 閉 し て 2 5 ° C 暗 黒 条 件 下 に 静 置 し , 接 種 1 ~ 5 日 後 ま で 1 日 毎 に 発 病 程 度 を 調 査 し た . 各 処 理 あ た り 2 ~ 3 個 の 花 蕾 を 用 い た .

試 験 結 果

ミ ヨ ウ ガ の 花 蕾 へ 付 傷 し , 一 定 時 間 経 過 し て か ら 病 原 細 菌 を 接 種 す る と , 付 傷 か ら 1 日 で 花 蕾 に 腐 敗 が 見 ら れ た . た だ , 付 傷 か ら 6 時 間 経 過 し た 後 に 接 種 し た 花 蕾 は 腐 敗 症 状 の 進 展 が 遅 く , 接 種 4 日 後 ま で は 付 傷 か ら 0 , 2 , 4 時 間 経 過 し た 後 に 接 種 し た 花 蕾 よ り も 有 意 に 発 病 程 度 が 低 か っ た . し か し , 接 種 5 日 後

には全ての花蕾が腐敗し，他の接種区との有意差は見られなかった（Table 10）．なお，滅菌水接種区のミョウガに発病は見られなかった．

Table 10. Time from puncture to an inoculation and occurrence of bacterial soft rot of myoga^{a)}

Time from puncture to an inoculation (h)	Days after inoculation									
	1		2		3		4		5	
	Disease incidence (%)	Severity ^{b)}	Disease incidence (%)	Severity	Disease incidence (%)	Severity	Disease incidence (%)	Severity	Disease incidence (%)	Severity
0	100	25.0a	100	50.0b	100	75.0b	100	100b	100	100a
2	100	25.0a	100	50.0b	100	75.0b	100	100b	100	100a
4	100	25.0a	100	50.0b	100	75.0b	100	100b	100	100a
6	33.3	8.3a	33.3	8.3a	33.3	8.3a	66.7	16.7a	100	66.7a

a) We used Myoga (cv. Natsu-Myoga) isolate MB10-12 for this test

b) Disease severity = $\frac{\sum(\text{disease index} \times \text{number of flower buds})}{\text{total number of flower buds} \times 4} \times 100$

The disease index (0-4) was the percentage of surface area covered by rot lesions (0, no symptoms; 1, up to 25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4, 76-100%)

Means followed by same letter are not significantly different in the same day by Tukey's test ($\alpha=0.05, n=2$ or 3)

第 4 項 . 発 病 適 温 の 調 査

試 験 方 法

有傷接種したミョウガを 5，10，15，20，25，30 および 35℃ に設定した恒温器内に静置した．試験は 2 回実施し，1 回目は各処理あたり 4 個，2 回目は 3 個の花蕾を用い，接種 2 および 7 日後に発病程度を調査し，発病度を算出した．また，20℃ 以下に静置した花蕾については接種 7 日後の調査後に 25℃ に設定した恒温器内に移し，接種 9 日後（25℃ に移して 2 日後）に発病の有無を調査した．

試 験 結 果

有傷接種したミョウガの花蕾は，15℃ 以上の温度域で発病が見られ，30℃ で病勢の進展が早かった（Table 11, Fig. 5d）．10℃

以下に静置した全ての花蕾には発病がみられなかった (Table 11). しかし, 20℃以下に静置して発病の認められなかった花蕾を, 接種7日後から25℃でさらに2日間静置すると, 多くの花蕾が腐敗した (Table 11). なお, 滅菌水接種区のミョウガに発病は見られなかった.

Table 11. Disease incidence and severity of flower buds of Myoga (*Z. mioga*) at different temperature^{a)}

Temperature (°C)	Days					
	2		7		9	
	Disease incidence (%)	Disease severity ^{b)}	Disease incidence (%)	Disease severity	Disease incidence (%)	Disease severity
5 (25) ^{c)}	0	0a	0	0a	28.6	7.1a
10 (25)	0	0ab	0	0ab	57.1	25.0a
15 (25)	42.9	10.7b	42.9	14.3b	42.9	21.4a
20 (25)	100	39.3c	100	78.6c	100	78.6b
25	100	64.3cd	100	100c	- ^{d)}	-
30	100	82.1d	100	100c	-	-
35	100	57.1cd	100	100c	-	-

a) We used Myoga (cv. Natsu-Myoga) isolate MB10-12 for this test (Two replicates).

b) Disease severity = $\frac{\sum(\text{disease index} \times \text{number of flower buds})}{\text{total number of flower buds} \times 4} \times 100$

The disease index (0-4) was the percentage of surface area covered by rot lesions (0, no symptoms; 1, up to 25%; 2, 26–50%; 3, 51–75%; 4, 76–100%)

Means followed by same letter are not significantly different in the same day by Tukey's test ($\alpha=0.05, n=7$).

c) All the plants were transferred to an incubator at 25°C 7 days after inoculation.

d) Not tested.

第 5 項 . 考 察

以上の結果から, 本病原細菌は傷口から花蕾へ侵入することが明らかとなった. 無傷接種区で腐敗した花蕾が1個認められたが, 腐敗部に傷口が観察されたことから, 傷口から感染したものと考えられた. また, 本病原細菌は付傷から6時間後でも感染することが明らかとなった.

本病害の発病は, 25~35℃の温度条件下で旺盛で, 10℃以下では発病が抑制された. しかし, 10℃以下で静置していた花蕾

は，25℃の温度条件下に移すと発病したことから，本病害の発病を抑制するためには，ミョウガを10℃以下で保管することが望ましいと考えられた．

第 3 節． 総 合 考 察

高知県内の施設栽培ミョウガおよび貯蔵中のミョウガに発生していた軟腐性の障害は，*E. chrysanthemi*による軟腐病であることを明らかとし，ミョウガ軟腐病(英名：Bacterial soft rot of myoga)と命名した．Dickey (1979)は，*E. chrysanthemi*は13の細菌学的性質から5つのsubdivisionに類別されるとしており，さらに，Dickey and Victoria (1980)はそれらと異なる新たな性質を示す菌株を認め，subdivision VIとした．この類別法に供試細菌の性質を当てはめると，ミョウガ分離細菌はsubdivision IVに類別された．さらに，Samson et al. (1990)は，8つの細菌学的性質から9つのbiovarに類別されることを認めている．この類別法に供試細菌の性質を当てはめると，ミョウガ分離細菌はbiovar 3に類別された．近年，*E. chrysanthemi*は再分類され，6種から構成されるDickeya属に含まれるとされており(Samson et al., 2005)，本病原細菌もこの新しい分類に照合するとDickeya *chrysanthemi*となる．しかし，現在のところ*E. chrysanthemi*はDickeya属よりもErwinia属として周知されていると思われることから，本病原細菌の学名は*E. chrysanthemi*として報告した．

本病害はミョウガの花蕾に生じた付傷部から感染し，傷がなければ感染する可能性は低いと考えられた．本病害は付傷から

6時間後でも感染することから、収穫作業時だけでなく出荷作業時および輸送中に罹病花蕾が健全花蕾に接触することによっても感染する可能性が考えられるため、罹病の可能性のある花蕾はできるだけ除去し、収穫後は余計な傷をつけないよう気をつけ、ミョウガ花蕾に触れる手を清潔に保ち、収穫用のコンテナなども定期的に洗浄または消毒することが望ましいと考えられた。

本病害の好適発病温度を調査したところ、発病適温は25～35℃であることが明らかとなった。生産現場での軟腐病の発生は7～8月に集中している。7月および8月におけるミョウガ産地(高知県須崎市)の月別の平均気温はそれぞれ26.0℃、27.0℃と、一年の中でも特に高くなっている(国土交通省気象庁 2013)。よって7～8月に軟腐病の発生が集中する原因の一つに、生育中のミョウガ付近の気温が発病の好適温度条件となっており、発病が助長されている可能性が考えられる。一方、本病害は10℃以下の低温条件下で発病が抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、本病害の発生低減のためには、収穫後はミョウガ花蕾に余計な傷をつけず、花蕾の付傷部が病原細菌と接触しないように努め、収穫後は速やかに10℃以下で保管することが望ましいと考えられた。

第 5 章 . ルリトウワタ立枯れ症の原因菌の特定 と体系的な防除法の確立

2004 年頃から高知県内の施設栽培のルリトウワタに立枯れ性の生育障害が発生し、枯死株率が 50% を超える圃場もみられるなど深刻な被害を生じるようになった。障害株からは *Phytophthora* 属菌と思われる卵菌類が高率に分離されたが、調査当時、*Phytophthora* 属菌によるルリトウワタの病害について報告がなかった。

そこで、本章ではこの病徴を呈する発病株から分離した菌株について病原性の確認、同定を行うとともに土壌からの検出法と防除対策を検討した。

第 1 節 . 病原菌の同定

第 1 項 . 病徴および病原菌の分離

初め，下位葉の黄化がみられ (Fig. 7a)，地際部は褐変し，水浸状に軟化する．次第に株全体の葉が水分を失い，葉の黄化が進むとともに下位葉から落葉し，やがて株全体が萎凋して枯死に至る (Fig. 7b)．幼苗期に感染，発病すると，地際部が褐変して水浸状にくびれ，急速に萎凋，枯死する．地下部では，根が褐変して根腐れを起こし，表皮が容易に剥離する (Fig. 7c)．病勢の進展は速やかで，発症から通常 7～14 日程度で枯死に至る．

高知県では，ルリトウワタの定植から約 1 カ月後となる 9 月以降に本症状の初発が認められることが多く，栽培終了期の 5～6 月頃には発病株率が 50%を超える圃場もみられる．本障害は排水不良な低湿地での発生が多く，大雨などにより圃場の浸冠水が起これると壊滅的な被害が生じる場合がある．

茎，地際および根の罹病部を生物顕微鏡で検鏡すると，無隔壁の菌糸および *Phytophthora* 属菌のものと思われる遊走子のうや卵胞子，厚壁胞子が観察された．

2006 年 12 月に，高知県安芸郡芸西村で立枯れ症の発生した 2 圃場から発病株を採取し，根部をメスで切り取った後，70% エタノールに数秒間，次いで 2% 次亜塩素酸ナトリウムに数秒間浸漬して表面殺菌を行い，滅菌水で十分に洗浄後，PDA (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 平板培地へ置床した．その結果，いずれの圃場からも PDA 平板培地上で気中菌糸を豊富に産生する

菌と，ほとんど作らない菌の2種が分離された．そこで，それぞれのグループの菌をWA平板培地に再度移植した後，定法に従い単菌糸分離を行い，PDA平板培地上で気中菌糸を豊富に産生するグループから分離した菌をPP1-1菌株，ほとんど作らないグループから分離した菌をPP3菌株とし，これら2菌株を以下の試験に供した．

第2項．病原性

試験方法

PP1-1菌株およびPP3菌株を，滅菌濾紙を敷いたV8ジュース平板培地(V8 juice (Campbell Soup Co, Camden, NJ, USA) 200mL, CaCO_3 3.0g, Agar 20.0g, Distilled water 800mL)上で，25℃，暗黒条件下で10日間培養後，菌糸が付着した濾紙をはがし，滅菌水中で3回洗浄し，少量の滅菌水中に浮かべた．これを25℃，20,000lux，14時間日長条件下に2日間静置後に得られた遊走子懸濁液を接種源とした．直径7.5cmのポリエチレンポットで育てた8～10葉期のルリトウワタ苗(品種‘コエルレウム セレクト’)を1Lの蒸留水が入った容器に地際部付近まで浸水するように入れ， 1×10^3 個/mLに調整した遊走子懸濁液を1mL注いだ．25℃の恒温器内で24時間保った後，水から引き上げ，25℃，20,000lux，14時間日長条件下で管理した．

試験結果

PP1-1, PP3菌株とも接種3日後からルリトウワタの地際部の

褐変や下葉の黄化が観察され，次第に下葉から落葉した．接種株からは接種菌と同様な糸状微生物が再分離された．

第 3 項 . 形態的特徴

PP1-1, PP3 菌株を V8 ジュース寒天培地上で培養し，形態的特徴を観察した．

PP1-1 菌株は，菌糸は無隔壁で膨潤せず，豊富な気中菌糸を形成した (Fig. 7d)．厚壁胞子の直径は $35\sim 50\mu\text{m}$ であった (Fig. 7i)．遊走子のう柄の長さは $4.5\mu\text{m}$ ，形成様式はシンポジオ型，遊走子のうは脱落性があり，乳頭突起は顕著で，卵～球形，楕円，ときに倒洋梨形，長さ (L) $25.0\sim 83.8\mu\text{m}$ × 幅 (B) $17.5\sim 47.5\mu\text{m}$ ，L/B 比 $1.2\sim 3.6$ であった (Fig. 7f)．

PP3 菌株は，菌糸は無隔壁で膨潤せず，気中菌糸はほとんど形成しなかった (Fig. 7e)．厚壁胞子の直径は $30.0\sim 45.0\mu\text{m}$ であった．遊走子のう柄の長さは $2.0\mu\text{m}$ ，形成様式はシンポジオ型，遊走子のうは脱落性があり，乳頭突起は顕著で，卵～楕円，倒洋梨形，長さ (L) $35.0\sim 63.8\mu\text{m}$ × 幅 (B) $20.0\sim 45.0\mu\text{m}$ ，L/B 比 $1.3\sim 2.1$ であった (Fig. 7g)．

両菌株とも単独では有性器官を形成しなかったが，PP1-1 菌株と PP3 菌株を対峙培養すると有性器官を形成した．造精器は造卵器に底着し (Fig. 7j)，造精器の大きさは長さ $10.0\sim 21.3$ × 幅 $10.0\sim 17.5\mu\text{m}$ ，造卵器の直径は $27.5\sim 37.5\mu\text{m}$ で，卵胞子は造卵器内で充満せず，直径は $17.5\sim 32.5\mu\text{m}$ であった (Table 12)．

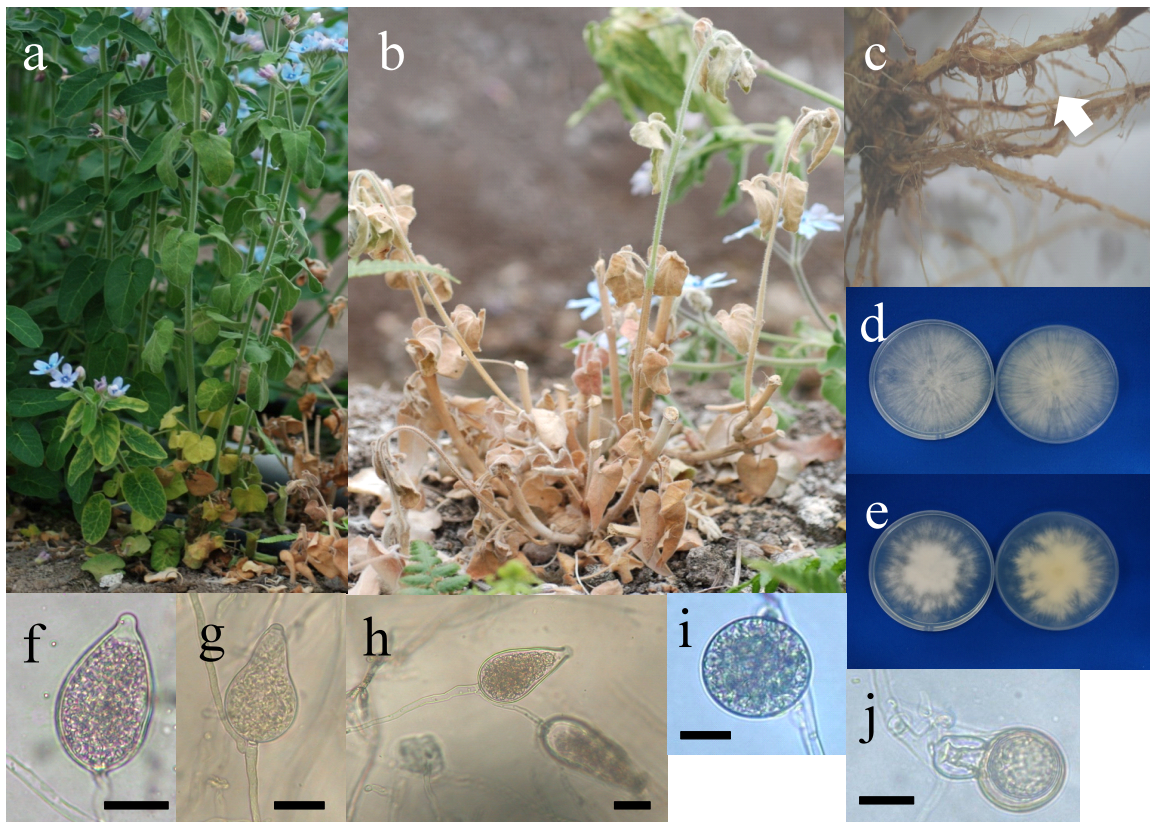


Figure 7. Symptoms of *Phytophthora* blight on southern star (*Oxypetalum caeruleum*) and morphology of the causal fungus, *P. palmivora*.

(a) Typical damping-off, moderate symptoms in a commercial greenhouse.

(b) Typical damping-off, severe symptoms in a commercial greenhouse.

(c) Roots epidermis easily peeled off (arrow).

(d,e) Colonies of *P. palmivora* on PDA after 7 days at 25° C in the dark (d, PP1-1; e, PP3).

(f,g) Sporangia formed on V8 juice agar (f, PP1-1; g, PP3).

(h) Sporangiphores formed sympodially on V8 juice agar (PP3).

(i) Chlamydospores formed on V8 juice agar (PP3).

(j) Oospores formed on V8 juice agar after mating between PP1-1 and PP3.

Scale bar = 20 μ m.

Table 12. Morphological comparison of two isolates, PP1-1 and PP3 obtained from southern star, with previous descriptions of *Phytophthora palmivora*

Characteristics	PP1-1	PP3	<i>P. palmivora sensu</i> Butler (MF1) ^{a)}	<i>P. palmivora</i> (Butler) Butler ^{b)}
Chlamydospore size (µm)	35.0–50.0 (40.1) ^{c)}	30.0–45.0 (37.5)	30–45	30–35
Sporangioophore branching	Sympodial	Sympodial	Sympodial	Sympodial
Sporangia				
Caducity	Caducous	Caducous	Caducous	Caducous
Pedicel length (µm)	(4.5)	(2.0)	2–5	< 5
Shape	Ovoid-globose, ellipsoid, sometimes obpyriform	Ovoid - ellipsoid, obpyriform	Ellipsoid, ovoid, with broad base	Ellipsoid, ovoid
Size (µm)	25.0–83.8 (52.9) ×	35.0–63.8 (49.9) ×	35–60 (55.5) ×	35–60 ×
L : B ratio	17.5–47.5 (32.1) 1.2–3.6 (1.7)	20.0–45.0 (31.2) 1.3–2.1 (1.6)	20–40 (33) 1.7–1.9	20–40 no data
Papillation	Markedly papillate	Markedly papillate	Markedly papillate	Markedly papillate
Sex organs				
Type	Heterothallic	Heterothallic	Heterothallic	Heterothallic
Position of antheridia	Amphigynous	Amphigynous	Amphigynous	Amphigynous
Size of antheridia (µm)	10.0–21.3 × 10.0–17.5 (15.7 × 12.4)		15 × 14	15 × 14
Size of oogonia (µm)	27.5–37.5 (32.1)		21 × 40 (29.5)	(30)
Size of oospores (µm)	17.5–32.5 (25.0)		16 × 30 (23)	No data
Compatibility type	A ₂ ^{d)}	A ₁ ^{e)}	Predominantly A ₂ (A ₁ uncommon)	-

a) Brasier and Griffin (1979), Erwin and Riberio (1996b)

b) Stamps (1985)

c) Parentheses indicate the average.

d) PP1-1 and *P. palmivora* (ATCC46622, Compatibility type A1) produced sexual organs when grew together.

e) PP3 and *P. palmivora* (ATCC46611, Compatibility type A2) produced sexual organs when grew together.

第 4 項 . rDNA 領域 (ITS1, 5.8S, ITS2) の塩基配列の解析

試験方法

PP1-1 菌株および PP3 菌株の rDNA の ITS 領域の塩基配列を Wang and White (1997) の改変法により調査した。すなわち、両菌株を V8 ジューズ寒天平板培地上で 25℃, 10 日間培養後、気中菌糸約 200mg をスパチュラでかき取り、-80℃で一晩凍結させた。-80℃で冷却しておいた乳棒と乳鉢を用いて凍結菌糸を磨碎し、CTAB 緩衝液 (1% CTAB, 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4M NaCl, 20mM EDTA・pH 8.0, 2% PVP-10, 0.5% 2-メルカプトエタノール) 1mL に懸濁して DNA を抽出した。クロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) による精製とイソプロパノールによる沈殿後、TE100μL に溶解させた。この 1μL を鋳型とし、プライマー (ITS1 : TCCGTAGGTGAACCTGCGG , ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC) を、それぞれ 0.2μM, dNTP Mixture を 0.2mM, *Taq* DNA Polymerase (Takara Bio Inc, Japan) を 5U となるように最終濃度を調整し、メーカー添付バッファーを 1/10 量加えて全量を 50μL とし、PCR を実施した。反応条件は、94℃で 2 分間の熱変性後、94℃で 0.5 分間、52℃で 0.5 分間、72℃で 1 分間を 30 サイクル、最後に 72℃で 7 分間とした。得られた約 800bp の DNA 断片の塩基配列をシグマアルドリッチジャパン(株)に依頼して解析した。分離菌の塩基配列は BLAST を使って GenBank のライブラリーで相同性検索を行った。

試験結果

供試した PP1-1 菌株の rDNA 領域の塩基配列は、DDBJ に登録されている *P. palmivora*(GU992938) と、PP3 菌株は *P. palmivora*(HQ237481) の塩基配列との類似度が 100% であった。

第 5 項 . 考 察

立枯れ症状を呈したルリトウワタから分離された PP1-1 菌株と PP3 菌株をルリトウワタ健全株に接種したところ、原病徴が再現された。なお、両菌株とも病原性に差は認められなかった。さらに、接種株からは接種菌と同様な卵菌類が分離されたことから、本分離菌株が病原であることが明らかとなった。

分離菌の形態的特徴を観察したところ、PP1-1 菌株と PP3 菌株は、ともに既報の *P. palmivora* と合致する点が多かった (Stamps 1985 ; Erwin and Ribeiro 1996b)。PP1-1 菌株と PP3 菌株は、遊走子のうの柄の長さや形態などにいくつか違いがみられたが、宿主を同じくする *P. palmivora* の培養性状に菌株間で差がみられることは少なくないことから (Brasier and Griffin 1979)、分離された PP1-1 菌株と PP3 菌株をいずれも *P. palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler と同定した。

さらに、PP1-1 菌株、PP3 菌株の rDNA 領域 (ITS1, 5.8S, ITS2) の塩基配列 (約 800bp) は、DDBJ に登録されている *P. palmivora* との塩基配列の類似度が 100% であり、形態による同定を裏付ける結果が得られた。

P. palmivora は、国内では 17 種の作物 (イチジク, オンシジウム, カカオ, カキ, カンキツ, カンラン, ココヤシ, コシヨ

ウ，サトウヤシ，ストレリチア，ディネマ，ドリアン，パイナップル，パパイア，パラゴムノキ，フェニックス類，マンゴー)の病原菌としての報告があるが(農業生物資源ジーンバンク1997)，ルリトウワタでの発生事例は本報告が国内外で初めてであることから，本病をルリトウワタ疫病(英名：Phytophthora blight of southern star)と命名した．PP1-1菌株とPP3菌株は農業生物資源ジーンバンクにMAFF242759，242760として寄託登録し，本論文中で明らかにしたrDNA領域の塩基配列は，DDBJ / EMBL / Gen BankにそれぞれAB619795，AB619796として登録した．なお，2008年に神奈川県で*P. citrophthora*による疫病の発生が確認され，佐藤ら(2012)により病原追加の報告がされている．

第2節．疫病菌の生育適温

試験方法

PDA平板培地で25℃，暗黒条件下で7日間前培養したPP1-1菌株，PP3菌株の菌叢の周縁部を直径6mmのコルクボーラで打ち抜き，直径9cmの浅型プラスチックシャーレ内のPDA平板培地の中央へ置床した．直ちに5℃，10℃，15℃，20℃，25℃，30℃，35℃および40℃の暗黒条件下に移し，7日間静置後，菌叢の直径を調査し，1日当たりの菌叢拡大の平均(mm)を算出した．なお，試験は1回行い，全ての温度区にシャーレ3枚を供試した．

試験結果

PDA培地上でのPP1-1菌株の菌糸の生育は、10～30℃で認められ、PP3菌株の菌糸の生育は、15～30℃で認められた。PP1-1菌株、PP3菌株ともに適温は25～30℃付近であると考えられた (Fig. 8)。

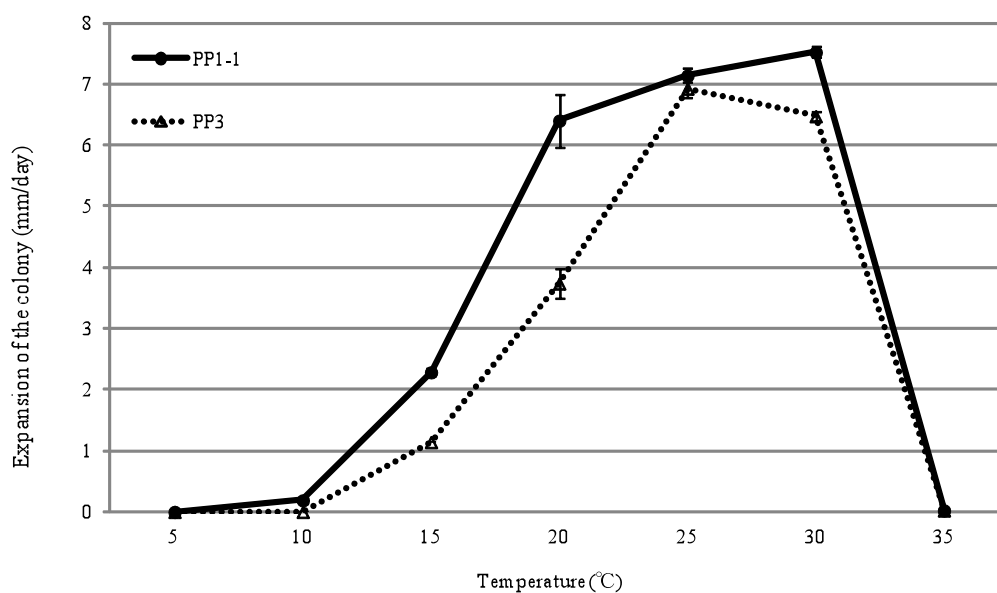


Figure 8. Expansion of the colony (mm/day) of isolates PP1-1 and PP3 at various temperature on PDA. Vertical bar indicates Standard Error (SE) of the mean

第 3 節 . 疫 病 菌 の 検 出 法

土 壌 から 直 接 *Phytophthora* 属 菌 を 捕 えて 検 出 す る 方 法 は , Zentmyer et al. (1960) が ア ボ カ ド を 侵 す *P. cinnamomi* に つ い て 行 っ た 実 験 や , 桂 (1968) が *P. melonis* や *P. nicotianae* var. *parasitica* を 土 壌 から 捕 え 分 離 す る 方 法 に つ い て 検 討 し た 報 告 が あ る が , ル リ ト ウ フ タ 疫 病 菌 の 検 出 に つ い て は 検 討 さ れ て い な い . 本 研 究 で は 土 壌 中 の ル リ ト ウ フ タ 疫 病 菌 を 選 択 的 に 検 出 す る 方 法 を 検 討 し た .

第 1 項 . 供 試 菌 と 接 種 源 の 調 製

PP1-1 菌株および PP3 菌株を供試した．接種源の調製については，特に記載しない限り次に示した方法で行った．

プラスチックシャーレ中の V8 ジュース寒天培地へ各供試菌株を移植し，25℃，暗黒条件下で 7～12 日間前培養した後，室内の日光の当たる場所に 1～3 日間置いて遊走子のうを形成させた．シャーレへ滅菌水を 10mL ずつ分注し，煮沸滅菌した筆で菌叢をなでることにより，遊走子のう懸濁液を作製した．さらに，5℃で 1 時間静置して遊走子のうから遊走子を十分放出させ，遊走子懸濁液とした．なお，必要に応じて Thoma EKDS 血球計算盤を用いて懸濁液中の遊走子のうまたは遊走子濃度を計測した．

第 2 項 . 選 択 培 地 の 検 討

1. ルリトウワタ疫病菌を識別可能な培地の選定

試 験 方 法

Ferrin and Mitchell(1986)による疫病菌の定量的検出法に準じてルリトウワタ疫病菌の検出を試みた．すなわち，抗生物質を添加した 0.3%寒天液(Rifampicin 10μg/mL, Pimaricin 10μg/mL, Ampicillin 250μg/mL, Hymexazol 50μg/mL 添加)200mL へ，遊走子のう濃度を 1.0×10^4 個/mL に調整し，5℃で 1 時間静置することにより遊走子を放出させた PP3 菌株と PP1-1 菌株の遊走子懸濁液をそれぞれ 1mL ずつ加え，攪拌した．これらの寒天液を既報の *Phytophthora* 属菌選択培地 PBNRH (Erwin and Ribeiro

1996a), P₅VPP-BH (Papavizas et al. 1981), PBNC (Erwin and Ribeiro 1996a)と, 対照のPDA培地上に1mLずつ滴下してコンラージ棒で塗抹し, 30℃, 暗黒条件下で培養した. 5日後に, 出現した疫病菌の菌叢数を計測するとともに, 菌叢の形態を観察した. 各培地ともに3枚のプレートを用いた.

試験結果

PBNRH培地上では, PP1-1菌株の菌叢は出現したがPP3菌株は出現しなかった. P₅VPP-BH培地では2菌株ともに菌叢が出現したが, 菌叢の形態には疫病菌である特徴が乏しく, 疫病菌を明確に識別することが困難であった. PBNC培地上では2菌株とも出現しなかった (Table 13).

Table 13. The number of colony formed on a selective media previously reported

Isolates	PBNRH	P ₅ VPP-BH	PBNC	PDA
PP1-1	9.0±0.6 ^{a)}	13.7±2.2 ^{b)}	0±0	8.0±0
PP3	0±0	11.7±1.2 ^{b)}	0±0	15.0±1.7

a) Mean number of colony by each plate ± SE

b) It was difficult to identify the *Phytophthora* sp. by the form of colony

2. PBNRH培地中の抗生物質の種類が疫病菌の生育に及ぼす影響

試験方法

直径9cmのプラスチックシャーレに分注したPBNRH培地, PBNRHからNeomycin sulfate (100ppm)を除いた培地, PBNRHからRifampicin (90ppm)を除いた培地の中央へ, V8ジュース寒天培地で25℃, 暗黒条件下で7日間培養後, 日光の当たる室内

に移して 3 日間前培養した PP1-1 菌株および PP3 菌株の菌叢の周縁を，直径 3mm のコルクボーラで打ち抜いて各培地の中央に置床した．25℃，暗黒条件下に 7 日間静置した後，菌叢の長径と短径を計測して平均値を求め，1 日当たりの菌糸伸長量を算出した．各培地につき 3 枚のプレートを用いた．

試験結果

供試した 2 菌株とも PBNRH 培地から Neomycin sulfate を除いた培地上で最もよく生育した．一方，PBNRH 培地から Rifampicin を除いた培地上での菌糸の生育は，Rifampicin を除かない培地と同等であった (Table 14)．

Table 14. Effect of antibiotics on expansion of the colony

Isolate	Medium		
	PBNRH	PBNRH-neomycin sulfate ^{a)}	PBNRH-rifampicin ^{b)}
PP1-1	3.9±0.1 ^{c)}	10.4±0.2	4.5±0.6
PP3	2.0±0.3	7.8±0.0	2.2±0.1

a) The medium except neomycin sulfate from PBNRH

b) The medium except rifampicin from PBNRH

c) Expansion of the colony (mm/day) of isolates PP1-1 and PP3 at various medium ± SE

3. PBNRH 培地中の Neomycin sulfate 濃度の検討

試験方法

PBNRH 培地中の Neomycin sulfate の濃度を 20, 40, 60, 80ppm に改変した PBNRH 培地と，対照の PDA 培地を直径 9cm のプラスチックシャーレに分注した．直径 4mm のコルクボーラで打ち抜いて菌叢ディスクを作成したこと以外は，本項の 2. PBNRH 培地中の抗生物質の種類が疫病菌の生育に及ぼす影響と同様に

行った。

試験結果

PBNRH培地上では供試した2菌株ともに菌糸の伸長がみられた。ただし，PBNRH培地中に含まれるNeomycin sulfateの濃度が60ppm以上になると，PP3菌株の菌糸伸長は強く抑制された(Table 15)。

Table 15. Effect of concentration of neomycin sulfate on expansion of the colony

Isolates	Concentration of neomycin sulfate in PBNRH ^{a)}					PDA
	20ppm	40ppm	60ppm	80ppm	100ppm	
PP1-1	8.6±0.0 ^{b)}	9.3±0.4	6.7±0.1	8.1±0.2	6.0±1.0	9.9±0.2
PP3	8.3±0.3	7.8±0.0	3.2±0.2	4.0±0.3	4.1±0.6	8.8±0.1

a) Reference concentration = 100ppm

b) Expansion of the colony (mm/day) of isolates PP1-1 and PP3 on various medium ± SE

第3項．土壌からの検出法

1. ルリトウワタ疫病菌を土壌から直接検出する方法

試験方法

同節第2項の1. ルリトウワタ疫病菌を識別可能な培地の選定と同様に調製したPP1-1菌株とPP3菌株の遊走子懸濁液を，200mLの0.3%寒天液へそれぞれ1mL加え，高知県農業技術センター内の露地圃場から採取した非滅菌土壌(灰色低地土)を50gずつ加えた。150rpm,30分間振とうして得られた土壌懸濁液1mLを，Neomycin sulfateを0, 20, 40, 60, 80ppmに改変したPBNRH培地を分注した直径9cmのプラスチックシャーレへ1mLずつ滴下して塗抹した。25℃，暗黒条件下で培養し，3日後に出現した疫病菌の菌叢数を計測するとともに菌叢の形態を観察

した．各培地ともに３枚のプレートを用いた．

試験結果

土壌からは，PBNRH培地中のNeomycin sulfateの濃度に関係なく疫病菌の生育が認められたが，疫病菌以外の糸状菌も出現し，隣接した菌叢が接合したことから，疫病菌の菌叢数を計測することは困難であった (Table 16)．

Table 16. Number of colony isolated by non-sterile soil added zoospores of *P. palmivora*

Isolate	Concentration of neomycin sulfate in PBNRH ^{a)}					
	0ppm	20ppm	40ppm	60ppm	80ppm	100ppm
PP1-1	NC ^{b)}	NC	NC	NC	NC	NC
PP3	NC	NC	NC	NC	NC	NC

a) Reference concentration = 100ppm

b) Colony of fungi except of *Phytophthora* sp. adjacent it and uncountable

２．捕捉法の検討

(１) ルリトウワタ疫病菌の捕捉法の検討

試験方法

桂 (1968) の疫病菌捕捉法を参考に，ルリトウワタ疫病菌の検出方法を検討した． 1.0×10^2 個/mL に調整した PP3 菌株の遊走子の懸濁液を，5℃ で 1 時間静置することにより遊走子を放出させ，100 mL 容のガラスビーカーへ 50 mL ずつ分注した．その中へ，121℃ で 60 分間高圧滅菌して，十分に冷ました滅菌土壌 (灰色低地土) を 20 g 添加し，土塊が無くなるまで攪拌して，土壌懸濁液を作製した．対照として，遊走子懸濁液のかわりに滅菌水へ前述の滅菌土壌を懸濁したものをを用いた．

リンゴ果実，レモン果実およびキュウリ果実を $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 5\text{cm}$ の棒状に切った果肉の切片と，茎頂から 5cm の位置で切りとったルリトウワタ品種‘コエルレウム セレクト’の茎の先端を土壌懸濁液の入ったビーカーへ挿し， 20°C の暗黒条件下で4日間静置した．各植物につき懸濁液を入れたビーカーを2つ用意し，ビーカー1個につき切片及び茎をそれぞれ3本ずつ挿した．処理後の切片および茎は水道水で洗った後，水面境界部を 5mm 程度切り取り，ルリトウワタ疫病菌選択培地 (Neomycin sulfate の濃度を 40ppm に変更した PBNRH 培地，以下，改変 PBNRH 培地) に置床した． 25°C ，暗黒条件下に4日間静置後，日光照射下の室内に移して2日間静置し，遊走子のうを形成させてから顕微鏡観察を行った．

試験結果

汚染土壌からの疫病菌の検出率は，ルリトウワタおよびリンゴを用いたもので 100% ，キュウリでは平均で 66.7% ，レモンでは 0% であった．なお，滅菌土壌からは，疫病菌は検出されなかった (Table 17)．

Table 17. Selection of the plant further adapted for a trap method

Capture plant	Sterile soil which added <i>P. palmivora</i>				Sterile soil			
	Replication	Number of the test	Number of the capture ^{a)}	Detection rate ^{b)} (%)	Replication	Number of the test	Number of the capture ^{a)}	Detection rate ^{b)} (%)
Southern ster	1	3	3	100	1	3	0	0
	2	3	3	100	2	3	0	0
	Mean	3	3	100		3	0	0
Apple	1	3	3	100	1	3	0	0
	2	3	3	100	2	3	0	0
	Mean	3	3	100		3	0	0
Cucumber	1	3	3	100	1	3	0	0
	2	3	1	33.3	2	3	0	0
	Mean	3	2	66.7		3	0	0
Lemon	1	3	0	0	1	3	0	0
	2	3	0	0	2	3	0	0
	Mean	3	0	0		3	0	0

a) Number of detected *P. palmivora*b) Detection rate of *P. palmivora*

(2) 疫病菌の検出限界と発病の有無

① 疫病菌汚染土壌の作成

試験方法

高知県農業技術センター内の露地圃場から採取して 121℃ , 60 分間高圧滅菌して十分に冷ました灰色低地土と, 同圃場から採取した滅菌していない非滅菌土壌, および高知県安芸郡芸西村のルリトウワタ栽培圃場のうち疫病未発生圃場の 2 圃場から採取した細粒黄色土を供試した. それぞれの土壌をプラスチックトレー上に広げ, PP3 菌株の遊走子懸濁液を霧吹きで噴霧しながら均一に混和して, 汚染土壌を作製した. なお, 遊走子懸濁液の濃度を調整することで, 土壌中の遊走子濃度を 1.0×10^3 個/g, 1.0×10^2 個/g, 1.0×10^1 個/g, 1.0×10^0 個/g, 1.0×10^{-1} 個/g および 1.0×10^{-2} 個/g にした.

② 疫 病 菌 の 検 出

試 験 方 法

100mL 容 の ガ ラ ス ビ ー カ ー へ 各 汚 染 土 壤 20g ま た は 対 照 と し て 滅 菌 水 20mL を 加 え , 土 塊 が 無 く な る ま で 攪 拌 し た . そ こ へ ル リ ト ウ ワ タ 品 種 ‘ピ ュ ア ブ ル ー ’の 茎 を 5cm の 長 さ に 切 断 し た も の , ま た は 1cm×1cm×5cm の 拍 子 切 り に し た リ ン ゴ 果 肉 片 を 挿 し , 28℃ の 恒 温 器 内 で 4 日 間 暗 黒 条 件 下 に 静 置 し た . 各 汚 染 土 壤 に つ き ル リ ト ウ ワ タ 茎 お よ び リ ン ゴ 片 を 5 本 ま た は 10 本 挿 し た . そ の 後 , 茎 を 水 道 水 で 洗 い , 水 面 境 界 部 を 切 り 取 り , 改 変 PBNRH 培 地 に 置 床 し た . 25℃ , 暗 黒 条 件 下 に 4 日 間 静 置 後 , 日 光 照 射 下 の 室 内 に 2 日 間 静 置 し て 遊 走 子 の う を 形 成 さ せ て , 顕 微 鏡 観 察 し た .

③ 汚 染 土 壤 で の 発 病 調 査

試 験 方 法

高 知 県 農 業 技 術 セ ン タ ー 内 の 露 地 圃 場 か ら 採 取 し た 土 壤 (灰 色 低 地 土)由 来 の 各 汚 染 土 壤 を , 直 径 12cm の 黒 ポ リ ポ ッ ト に 1 鉢 ず つ 充 填 し , 直 後 に 播 種 60 日 後 の ル リ ト ウ ワ タ 品 種 ‘ピ ュ ア ブ ル ー ’の 苗 を 1 鉢 に つ き 10 株 ず つ 植 え 付 け た . 植 え 付 け 13 日 後 ま た は 14 日 後 と , 31 日 後 の 2 回 , 発 病 を 次 に 示 し た 指 数 に 従 っ て 調 査 し , 発 病 度 を 算 出 し た .

[指 数] 0 : 無 病 徴 , 1 : 葉 の 褐 変 , 2 : 全 身 の 萎 凋 , 3 : 枯 死

発 病 度 = $\Sigma(\text{程 度 別 発 病 株 数} \times \text{指 数}) / (\text{調 査 株 数} \times 3) \times 100$

試験結果

滅菌土壌由来の汚染土壌では，ルリトウワタの茎を用いた場合，土壌中の遊走子濃度が 1.0×10^1 個/g 以上の濃度で検出可能であった．また，遊走子濃度が 1.0×10^3 個/g の汚染土壌に植え付けたルリトウワタは，植え付け 31 日後には全株が枯死し， 1.0×10^2 個/g および 1.0×10^1 個/g の汚染土壌に植え付けたルリトウワタは，定植 31 日後には発病度がそれぞれ 73.3，53.3 となった． 1.0×10^0 個/g 以下では疫病菌は検出されず，発病もみられなかった (Table 18)．

非滅菌土壌由来の汚染土壌からは，ルリトウワタの茎を用いた場合，土壌中の *Pythium* 属菌が捕捉され，疫病菌の確認が困難であった．一方，リンゴ果肉片を用いることで *Pythium* 属菌の捕捉を防ぐことができ，土壌中の遊走子濃度が 1.0×10^2 個/g の濃度で検出可能であったが， 1.0×10^3 個/g の濃度では *Rhizopus* 属菌の混入により，計測不能であった．また， 1.0×10^2 個/g 以上の濃度で，植え付けた苗に疫病の発生がみられた． 1.0×10^1 個/g 以下では疫病菌は検出されず，発病もみられなかった (Table 19)．

栽培圃場から採取した土壌由来の疫病菌汚染土壌からは，A 圃場ではルリトウワタとリンゴ果肉片ともに 1.0×10^3 個/g の汚染土壌から疫病菌が検出された (Table 20)．B 圃場では，ルリトウワタでは 1.0×10^2 個/g 以上の汚染土壌から，リンゴ果肉片では 1.0×10^3 個/g の汚染土壌から疫病菌が検出された (Table 20)．いずれの圃場もルリトウワタを用いて捕捉したほうが，検出率

が高かった (Table 20).

Table 18. Detection of *P. palmivora* by a trap method using southern star from sterile soil added zoospores of *P. palmivora*, and occurrence of Phytophthora blight

Concentrations of zoospores in soil (number/g)	Detection rate ^{a)}	Occurrence of Phytophthora blight			
		Number of the test	13 day after planting		31 day
			Incidence (%)	Severity ^{b)}	Incidence (%)
1.0×10 ³ /g	3/5	10	100	86.7	100
1.0×10 ² /g	4/5	10	60.0	50.0	73.3
1.0×10 ¹ /g	2/5	10	20.0	13.3	53.3
1.0×10 ⁰ /g	0/5	10	0	0	0
1.0×10 ⁻¹ /g	0/5	10	0	0	0
1.0×10 ⁻² /g	0/5	10	0	0	0
Control	0/5	10	0	0	0

a) Number of the capture / All number of the test

b) Disease severity = $\frac{\sum(\text{disease index} \times \text{number of southern star})}{\text{total number of southern star} \times 3} \times 100$

The disease index (0-3) was determined by the symptom of southern stars (0, no symptoms ; 1, browning of stem and leaf ; 2, wilt ; 3, damping off)

Table 19. Detection of *P. palmivora* by a trap method using southern star or apple from non-sterile soil added zoospores of *P. palmivora*, and occurrence of Phytophthora blight

Concentrations of zoospores in soil (number/g)	Detection rate ^{a)}		Occurrence of Phytophthora blight			
	Southern star	Apple	Number of the test	14 day after planting		31 day
				Incidence (%)	Severity ^{b)}	
1.0×10 ³ /g	NC ^{c)}	NC (R)	10	80.0	76.7	100
1.0×10 ² /g	NC	2/10	10	10.0	6.7	10.0
1.0×10 ¹ /g	NC	0/10	10	0	0	0
1.0×10 ⁰ /g	NC	0/10	10	0	0	0
1.0×10 ⁻¹ /g	NC	0/10	10	0	0	0
1.0×10 ⁻² /g	NC	0/10	10	0	0	0
Control	NC	0/10	10	0	0	0

a. b) See Table 18. for details

c) NC: Not countable because of contamination of *Pythium* sp. ; NC(R): Not countable because of contamination of *Rhizopus* sp. which existed in air

Table 20. Detection of *P. palmivora* from soil of southern star fields added zoospores of *P. palmivora* by a trap method

Green house	Concentrations of zoospores in soil (number/g)	Detection rate of <i>P. palmivora</i> by a trap method ^{a)}	
		Southern star	Apple
A	1.0×10^3 /g	5/5	1/5
	1.0×10^2 /g	0/5	0/5
	1.0×10^1 /g	0/5	0/5
	1.0×10^0 /g	0/5	0/5
	1.0×10^{-1} /g	0/5	0/5
	1.0×10^{-2} /g	0/5	0/5
	Control	0/5	0/5
B	1.0×10^3 /g	4/5	3/5
	1.0×10^2 /g	1/5	0/5
	1.0×10^1 /g	0/5	0/5
	1.0×10^0 /g	0/5	0/5
	1.0×10^{-1} /g	0/5	0/5
	1.0×10^{-2} /g	0/5	0/5
	Control	0/5	0/5

a) Number of the capture / All number of the test

(3) 現地発病圃場からの疫病菌の検出と発病の有無

① 疫病発生圃場における疫病菌の検出

試験方法

高知県安芸郡芸西村のルリトウワタ栽培圃場3圃場で、疫病が発生した畝から土壌(細粒黄色土)を採取した。対照には、高知県農業技術センター内の露地圃場から採取して121℃、60分間高圧滅菌して十分に冷ました灰色低地土を用いた。疫病菌の検出については、同項2.(2)疫病菌の検出限界と発病の有無と同様に行った。

② 汚染土壌での発病調査

試験方法

汚染土壌での発病調査は同項2.(2)疫病菌の検出限界と発病の有無と同様に行った。対照には、高知県農業技術センター内

の露地圃場から採取して 121℃，60 分間高圧滅菌して十分に冷ました灰色低地土を用いた。

試験結果

疫病の発病がみられた畝から採取した全ての土壌から疫病菌が検出され，植え付けたルリトウワタに疫病の発生が認められた (Table 21)。圃場 B では，リンゴ果肉片を用いて捕捉した場合とルリトウワタを用いて捕捉した場合の検出率はほとんど同じであったが，A,C の圃場では，ルリトウワタを用いて捕捉したときの検出率が高かった (Table 21)。

Table 21. The detection of *P. palmivora* by a trap method from contaminated soil of southern star fields, and occurrence of Phytophthora blight

Green house	Detection rate ^{a)}		Number of the test	Occurrence of Phytophthora blight			
	Southern star	Apple		14 day after planting		31 day	
				Incidence (%)	Severity ^{b)}	Incidence (%)	Severity
A	9/10	5/10	10	90.0	90.0	100	100
B	5/10	6/10	10	10.0	6.7	50.0	50.0
C	10/10	1/10	10	90.0	90.0	100	100
Control	0/10	0/10	10	0	0	0	0

a, b) See Table 18. for details

第 4 項 . 考 察

Phytophthora 属菌の土壌からの検出は，主として捕捉法と選択培地による 2つの方法が用いられている (Zentmyer et al. 1960；桂 1968；Papavizas et al. 1981；Ferrin and Mitchell 1986；Erwin and Ribeiro 1996a)。捕捉法は，目的とする菌を選択的に検出できる点で優れているが，定量の点では劣っている。一方，選択性の高い培地を用いて土壌から直接疫病菌を検出する方法

は，定量の点で優れているが，他属の糸状菌だけでなく，別種の *Phytophthora* 属菌も同時に検出する可能性があり，培地上での同属間の区別が難しいことに注意しなければならない．

今回，ルリトウワタ疫病菌 (*P. palmivora*) の検出に適した選択培地を検討した結果，本病原菌の検出には PBNRH 培地が比較的適していると考えられたが，PBNRH 培地に含まれる 100 ppm 濃度の Neomycin sulfate に対する薬剤感受性が異なる菌株が存在することが明らかとなった．そこで，Neomycin sulfate の濃度を変えた培地で調査したところ，濃度を 40 ppm とした改変培地を用いることで，感受性がやや異なる菌株も併せて選択的に検出できる可能性が示唆された．

次に，ルリトウワタ疫病菌を，改変 PBNRH 培地を用いて土壌から直接検出する方法を試みたが，病原菌以外の糸状菌が出現し，隣接する菌叢が接合するなどにより，病原菌の菌叢数を計測することが困難であった．そこで，定量の点では劣るが，雑菌との混合が甚だしい材料についても適用できる，捕捉法による検出について検討した．

桂 (1968) によると，捕捉に用いる植物体は，被害植物と同じ種類か近縁のものが望ましいとされている．本病害の被害植物であるルリトウワタはガガイモ科の植物であり，近縁の植物体 (サクララン，トウワタなど) を入手することは困難であると考えられた．そこで，被害植物であるルリトウワタおよび比較的安価で入手しやすい数種の植物体を用いて捕捉を試みたところ，ルリトウワタ茎とリンゴ果肉片を用いると高率

に検出可能であった。ルリトウワタは土壤に *Pythium* 属菌が存在すると捕捉が困難であるが、捕捉率は高く、一方、リンゴ果肉片は、ルリトウワタよりも疫病菌の捕捉率がやや劣るものの、*Pythium* 属菌が存在する土壤においては、疫病菌を選択的に捕捉することに適していると考えられた。

さらに、ルリトウワタ疫病菌の検出限界濃度について調査したところ、滅菌土由来の疫病菌汚染土壤からの遊走子の検出限界濃度は 1.0×10^1 個/g 程度、非滅菌土由来の疫病菌汚染土壤からの遊走子の検出限界濃度は 1.0×10^2 個/g 程度となり、滅菌土由来の疫病菌汚染土壤のほうが、遊走子の検出感度が高かった。また、疫病の発生についても、滅菌土由来の疫病菌汚染土壤では、土壤中に混和した遊走子濃度が 1.0×10^1 個/g、非滅菌土由来の疫病菌汚染土壤では、土壤中に混和した遊走子濃度が 1.0×10^2 個/g 以上で発病が見られた。これは、滅菌土壌中には疫病菌と競合する微生物が少なかったことから、疫病菌が高率に捕捉され、非滅菌土壌よりも低濃度の混和でも発病しやすい環境となっていたと考えられた。

また、灰色低地土からの遊走子の検出限界濃度は 1.0×10^2 個/g 程度、細粒黄色土からの疫病菌の検出限界濃度は 1.0×10^2 個/g $\sim$ 1.0×10^3 個/g 程度であると考えられた。また、疫病菌が検出された土壤へ植え付けた苗には、植え付け 1 カ月以内に疫病の発生がみられたが、捕捉されなかった土壤に植え付けたルリトウワタでは発病しなかったことから、本法によりルリトウワタ疫病の発生を予測することが可能と考えられた。

これらのことから，ルリトウワタ茎およびリンゴ果肉片を用いた捕捉法は，ルリトウワタ疫病の発生予察に利用できると考えられる．土壤中の本病原菌の分布状況を確認することにより，その結果に基づく土壌処理，栽培計画の立案への寄与が期待され，病害による被害の低減へとつなげられると考えられる．

第 4 節 . 防 除 対 策

本節では，ルリトウワタ疫病に対して有効な殺菌剤の選抜と処理方法の検討，ならびに土壌消毒法の効果を検討した．

第 1 項 . 殺 菌 剤 の 選 抜

1. 供 試 植 物 と 接 種 源 の 調 製

全ての試験にルリトウワタ品種‘ピュアブルー’を用いた．PP3菌株を供試菌株とし，V8 ジュース寒天平板培地で暗黒条件下25℃，5～7日間培養後，日光が当たる室内で1～10日間静置した菌叢に滅菌水を加えて得られた遊走子のうを 1×10^4 個/mLに調整した懸濁液を接種源とした．

2. 予 防 効 果 を 有 す る 殺 菌 剤 の 選 抜

試 験 方 法

供試薬剤は，他の作物で疫病に登録のある薬剤を中心に選定し，Table 22に示した30剤とした．直径7.5cmのポリエチレンポットで生育させた本葉8～12葉期のルリトウワタの株元に，所定濃度に希釈した各薬剤または滅菌水(無処理区)を100mLずつ灌

注した。病原菌の接種は、薬剤処理の直後に本菌の遊走子の懸濁液を5mLずつ株元に灌注して行い、接種後はガラス温室内で管理した。各処理区とも5株ずつ供試した。調査は28日後に行い、発病程度を次に示した指数に従って調査して発病株率および発病度を算出するとともに、発病度から防除価を算出した。薬害は適宜肉眼観察した。なお、試験は6回に分けて実施した。

[指数] 0：無病徴，1：茎葉の褐変，2：全身の萎凋，3：枯死

発病度 = Σ (程度別発病株数 × 指数) / (調査株数 × 3) × 100

防除価 = (1 - 処理区の発病度 / 無処理区の発病度) × 100

試験結果

供試した30剤のうち、マンゼブ水和剤、マンゼブを含む混合剤、ポリカーバメート水和剤、ジメトモルフ・銅水和剤、ホセチル水和剤、シモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤、フルアジナム水和剤など14剤は調査期間を通じて発病株が全く見られず、防除価100と高い効果を示した。シモキサニル・ファモキサドン水和剤、イミノクタジン酢酸塩・銅水和剤はそれぞれ防除価93.3、オキシリニック酸・有機銅水和剤は防除価80.0と比較的高い効果を示した。銅水和剤および銅を含む混合剤は、防除価60～100と効果を認めたが、効果にばらつきがあった。

薬害については、シモキサニル・マンゼブ水和剤およびマンネブ水和剤は生育遅延が見られたが、その他の薬剤については認められなかった (Table 22)。

Table 22. Protective effects of several fungicides against Phytophthora blight of southern star

Experiment	Fungicide	Dosage forms ^{a)}	Dilution	Disease incidence (%)	Severity ^{b)}	Protective value ^{c)}	Phytotoxicity ^{d)}
1	Mancozeb (75.0%)	WP	600	0	0	100	-
	Cymoxanil (12.0%) • Mancozeb (65.0%)	WP	1,000	0	0	100	+
	Simeconazole (2.4%) • Mancozeb (65.0%)	WP	800	0	0	100	-
	Polycarbamate (85.0%)	WP	800	0	0	100	-
	Dimethomorph (15.0%) • Copper oxychloride (58.8% ; Copper (35.0%))	WP	400	0	0	100	-
	Iminoctadine Albesilate (10.0%) • Mancozeb (55.0%)	WP	500	0	0	100	-
	Procymidone (15.0%) • Mancozeb (50.0%)	WP	600	0	0	100	-
	Cyazofamid (9.4%)	WP	500	60.0	53.3	42.9	-
	Distilled Water (Control)			100	93.3		
	Cymoxanil (30.0%) • Famoxadone (22.5%)	WP	1,500	20.0	6.7	93.3	-
2	Thiophanatemethyl (20.0%) • Maneb (50.0%)	WP	400	100	33.3	66.7	-
	Propanocarb hydrochloride (64.0%)	L	400	60.0	46.7	53.3	-
	Amobam (53.5%)	L	1,500	80.0	60.0	40.0	-
	Hydroxy isoxazole (30%)	L	500	100	100	0	-
	Distilled Water (Control)			100	100		
	Copper hydroxide (61.4% ; Copper (40.0%))	DF	1,000	0	0	100	-
3	Sulfur (25%) • Dicopper trihydroxide chloride (61.0% ; Copper (35%))	WP	400	0	0	100	-
	Iminoctadine triacetate (2.5%) • Dicopper trihydroxide chloride (73.5% ; Copper (44%))	WP	500	20.0	6.7	93.3	-
	Oxolinic acid (10.0%) • Copper 8-hydroxyquinoline (50.0%)	WP	1,000	20.0	20.0	80.0	-
	Kasugamycin (5.0%) • Copper oxychloride (75.0% ; Copper (45.0%))	WP	1,000	40.0	26.7	73.3	-
	Dithianon (13.0%) • Copper oxychloride 42.0% ; Copper (25.0%))	WP	500	60.0	33.3	66.7	-
	Sodium hydrogen carbonate (46.0%) • Copper (II) sulfate (30.0% ; Copper (12.0%))	WP	1,000	60.0	40.0	60.0	-
	Copper 8-hydroxyquinoline (80.0%)	WP	800	80.0	80.0	20.0	-
	Distilled Water (Control)			100	100		
	Fosetyl-aluminium (80.0%)	WP	800	0	0	100	-
	Cymoxanil (60.0%) • Benthiavalcab-isopropyl (10.0%)	WDG	2,000	0	0	100	-
4	Fluaznam (50.0%)	WP	100	0	0	100	-
	Mancozeb (55.0%) • Metalaxyl (10.0%)	WP	1,000	0	0	100	-
	Capitan (80.0%)	WP	800	40.0	26.7	73.3	-
	Streptomycin (20.0%)	WP	1,000	100	86.7	13.3	-
	Oxytetracycline (1.5%) • Streptomycin (15.0%)	WP	1,000	100	100	0	-
	Distilled Water (Control)			100	100		
5	Mancozeb (80.0%)	WP	500	0	0	100	-
	Maneb (75.0%)	WP	400	100	33.3	66.7	+
	Distilled Water (Control)			100	100		
6 ^{e)}	Copper hydroxide (61.4% ; Copper (40.0%))	DF	1,000	40.0	33.3	66.7	-
	Sulfur (25%) • Dicopper trihydroxide chloride (61.0% ; Copper (35%))	WP	400	20.0	6.7	93.3	-
	Distilled Water (Control)			100	100		

a) WP = Wettable powder ; L = Liquid formulation ; DF = Dry flowable ; WDG = Water dispersible granule

b) Disease severity = $\frac{\sum \text{Disease index} \times \text{number of southern star}}{\text{total number of southern star}} \times 100$

The disease index (0-3) was determined by the symptom of southern star: (0, no symptoms ; 1, browning of stem and leaf ; 2, wilt ; 3, damping off)

c) Protective value calculated from the mean of the disease severity

d) - : Not appeared, + : Growth delay

e) Experiment 6 is re-examination

3. 治療効果を有する殺菌剤の選抜

試験方法

供試薬剤は，予防効果の評価試験において防除価100を示し，薬害が見られなかった殺菌剤のうち，Table 23に示した10剤を用いた．接種は，直径7.5cmのポリエチレンポットで生育させた本葉約13～17葉期のルリトウワタの株元に遊走子の懸濁液を株あたり5mLずつ灌注した．薬剤処理は，接種1日後に，株元に所定濃度に希釈した各薬剤または滅菌水（無処理区）を株あたり100mLずつ灌注し，処理後はガラス温室内で管理した．各処理区とも9株を供試した．

調査は接種28日後に行い，同項2. 予防効果を有する殺菌剤の評価試験と同様に，発病株率，発病度および防除価を算出した．薬害は適宜肉眼観察した．

試験結果

供試した10剤のうち，シモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤とマンゼブ・メタラキシル水和剤はそれぞれ防除価100と高い効果を示した．その他の薬剤については，防除効果がほとんど見られなかった．なお，いずれの薬剤も薬害は認められなかった(Table 23)．

Table 23. Curative effects of several fungicides against Phytophthora blight of southern star

Fungicide	Dosage forms ^{a)}	Dilution	Disease incidence (%)	Severity ^{b)}	Protective value ^{c)}	Phytotoxicity ^{d)}
Cymoxanil (60.0%)・Benthiavalicarb-isopropyl (10.0%)	WDG	2,000	0	0	100	-
Mancozeb (55.0%)・Metalaxyl (10.0%)	WP	1,000	0	0	100	-
Procymidone (15.0%)・Mancozeb (50.0%)	WP	600	77.8	77.8	4.5	-
Fosetyl-aluminium (80.0%)	WP	800	88.9	85.2	0	-
Iminoctadine Albesilate (10.0%)・Mancozeb (55.0%)	WP	500	100	92.6	0	-
Mancozeb (75.0%)	WP	600	100	100	0	-
Simeconazole (2.4%)・Mancozeb (65.0%)	WP	800	100	100	0	-
Polycarbamate (85.0%)	WP	800	100	100	0	-
Dimethomorph (15.0%)・Copper oxychloride (58.8% ; Copper (35.0%))	WP	400	88.9	88.9	0	-
Fluazinam (50.0%)	WP	100	100	100	0	-
Distilled Water (Control)			88.9	81.5		

a, b, c, d) See Table 22. for details

4. 有効薬剤の処理回数と処理量の検討

試験方法

供試薬剤は，治療効果の評価試験において，防除価が100で薬害の見られなかった殺菌剤のシモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤2,000倍とマンゼブ・メタラキシル水和剤の代替薬剤であるマンゼブ・メタラキシルM水和剤1,000倍を用いた．汚染土壌は，9Lの殺菌土を充填した水切り可能なプラスチックトレイ（縦36cm×横51cm×高さ10cm）に，直径7.5cmのポリエチレンポットで生育させたルリトウワタへ本菌の遊走子懸濁液を灌注して枯死させた罹病株3鉢をポットの土壌ごと混和して作製した．薬剤は，汚染土壌の入ったプラスチックトレイに1，3，5，7L/m²の割合で，じょうろを用いて均一に灌注処理し，その直後に，殺菌土を充填した200穴セルトレイで27～34日間育苗したルリトウワタの健全苗を，株間8cm，条間10cmの3条植でプラスチックトレイあたり13～15株ずつ移植し，処理後はガラス温室内で管理した．なお，移植14，28日後にも各薬剤

を同様に灌注する3回処理区も設けた。

調査は移植77日後に行い、同項2. 予防効果を有する殺菌剤の評価試験と同様に、発病株率、発病度および防除価を算出した。薬害は適宜肉眼観察した。

試験結果

シモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤の3回処理の場合では、3, 5, 7L/m²で灌注を行うと防除価100と高い効果を示したが、1L/m²では防除価71.4とやや劣る効果であった。1回処理の場合では、3, 5, 7L/m²で灌注を行うと防除価59.5～90.5と効果にばらつきがみられ、1L/m²では防除効果が低かった。薬害については、5, 7L/m²で3回灌注を行うと生育遅延がみられた。

マンゼブ・メタラキシル M 水和剤については、3回処理の場合では、3, 5, 7L/m²で灌注を行うと防除価96.7～100と高い効果を示したが、1L/m²では、防除価77.3とやや劣る効果であった。1回処理では、3, 5, 7L/m²で灌注を行うと防除価54.6～90.9と効果にばらつきがみられ、1L/m²では、ほとんど防除効果が認められなかった。いずれの処理も薬害は認められなかった (Table 24)。

Table 24. Effect of the number of using time and quantity of fungicide on the development of Phytophthora blight of southern star

Fungicide	Dosage forms ^{a)}	Dilution	The number of using time	Quantity of fungicide (L/m ²)	Disease incidence (%)	Severity ^{b)}	Protective value ^{c)}	Phytotoxicity ^{d)}
Cymoxanil (60.0%) + Benthiavalicarb-isopropyl (10.0%)	WDG	2,000	1	1	66.7	62.2	33.3	-
				3	46.7	37.8	59.5	-
				5	13.3	8.9	90.5	-
				7	26.7	20.0	78.6	-
			3	1	26.7	26.7	71.4	-
				3	0	0	100	-
				5	0	0	100	+
				7	0	0	100	+
Distilled Water (Control)					93.3	93.3		
Mancozeb (64.0%) + Metalaxyl (3.8%)	WP	1,000	1	1	78.6	66.7	9.0	-
				3	21.4	19.0	74.1	-
				5	38.5	33.3	54.6	-
				7	20.0	6.7	90.9	-
			3	1	28.6	16.7	77.3	-
				3	7.1	2.4	96.7	-
				5	0	0	100	-
				7	0	0	100	-
Distilled Water (Control)					73.3	73.3		

a,b, c, d) See Table 22. for details

第 2 項 . 土 壤 消 毒 法 の 検 討

1. 試 験 圃 場

高知県南国市の農業技術センター内のビニルハウス(面積 192m², 礫質灰色低地土, 土性CL)で試験を実施した。試験圃場は次の方法で疫病菌汚染圃場とした。

PP3 菌株を V8 ジュース寒天平板培地で 25℃, 暗黒条件下で 44 日間静置培養後, 日光照射下の室温で 5 日間培養した菌叢を滅菌水に浸漬し, 遊走子の濃度を 1×10³ 個/mL に調整した懸濁液を作成した。これを直径 27cm の黒色ポリポットへ 2 株ずつ植え付けた播種 192 日後のルリトウワタ(茎長 40~50cm)の株元へ, ポット当たり 50mL ずつ灌注接種した。接種後は 15 日間ガラス室内で管理し, 全身の萎凋または枯死が見られるまで発病させた。これらの 40 ポットの土を罹病残渣とともに圃場全面へ混和し, 汚染圃場とした。

2. 耕種概要

ルリトウワタ品種‘ピュアブルー’の種子を，殺菌土を充填した128穴セルトレイに播種し，ガラス室内で19～65日間育苗して子葉または本葉2枚が展開した苗を株間15cm，条間15cmの4条植えで定植した．施肥(元肥のみ)はCDU複合燐加安S555(N:P:K=15:15:15，チッソ旭肥料)を120kg/10aの割合で施用し，その他の栽培管理については農家慣行とした．

3. 土壌くん蒸剤の処理方法

化学薬剤による土壌消毒については，ダゾメット粉粒剤(98.0%)とクロルピクリンくん蒸剤(99.5%)を供試した．

ダゾメット粉粒剤は30kg/10aの割合で均一に散布し，小型管理機(こまめ，Honda)を用いて地下約25cmまでの土壌と混和した．クロルピクリンくん蒸剤は，手動注入器を用いて1穴当たり3mLを，30cm千鳥で地下15cmに注入した．

いずれの処理についても，処理後は直ちに0.05mm厚のポリエチレンシートで被覆し，ポリエチレンシートの端は水を満たしたポリエチレングラクトで固定してくん蒸した．

4. 土壌還元消毒の処理方法

フスマ，またはエタノールを用いた土壌還元消毒を行った．

フスマを用いた土壌還元消毒の処理は，新村(2002)による処理法に準じた．すなわち，フスマを1t/10aの割合で処理区へ均一に散布し，小型管理機(こまめ，Honda)を用いて地下約25cm

までの土壌と混和した．直ちに灌水チューブ(エバーフロー，MKVドリーム)を設置し，0.05mm厚のポリエチレンシートで被覆して，シートの端を水を満たしたポリエチレンダクトで固定した後に，地表面が浸水するまで灌水した．

エタノールを用いた土壌還元消毒の処理については，小原ら(2007)による処理法に準じた．すなわち，耕耘後の圃場表面に灌水チューブ(エバーフロー，MKVドリーム)を設置して0.05mm厚のポリエチレンシートで被覆し，シートの端を水を満たしたポリエチレンダクトで固定した後，エタノール(エスミールWK65(エタノール65%)，信和アルコール)を液肥混入器のドサトロン(DOSATRON®，2.5m³/h-0.2-1.6%)を用いてエタノール濃度が0.7%または0.5%となるように調整し，地表面が浸水するまで灌注した．

5. 調査方法

各土壌消毒期間中には，温度・湿度データロガー(TR-71UI，T&D CORPORATION)を設置して地温を記録した．センサーは各区内の中央とサイドの2地点について地表面から深度20cmに設置した．

土壌水分含量については，処理前の土壌を採取して重量を測定し，乾熱滅菌器(MOV-1125，SANYO)で105℃，48時間乾燥させた後に，再度重量を測定することにより算出した．

定植59～349日後に，発病程度を次の指数に従って調査し，発病度を算出した．防除価は各試験での最終調査日の調査結果か

ら算出した．薬害は適宜観察した．

[指数] 0：無病徴，1：茎葉の褐変，2：全身の萎凋，3：枯死

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

6. 土壌消毒試験

試験1ではダゾメット粉粒剤とクロルピクリンくん蒸剤による土壌くん蒸処理，試験2ではフスマと0.7%エタノールによる土壌還元消毒処理，試験3では低温時のダゾメット粉粒剤による土壌くん蒸処理ならびにフスマおよび0.5%エタノールによる土壌還元消毒処理を行って防除効果を比較した．

(1) 試験1

試験方法

1区 8.3 m^2 ($1.5\text{ m} \times 5.5\text{ m}$)とし，2反復で行った．定植株数は1区当たり120株とした．2008年7月25日(定植24日前)に畦立てとくん蒸処理を実施し，7日後の8月1日(定植17日前)に被覆シートを除去した．ダゾメット粉粒剤処理区については8月4日(定植14日前)と8月6日(定植12日前)の2回，鍬を用いて耕起し，ガス抜きを行った．クロルピクリンくん蒸剤の処理区については，耕起によるガス抜きは行わなかった．定植は8月18日に行い，2009年2月9日(定植175日後)および7月30日(定植349日後)に，同項の5.調査方法に従って区内の全株について調査した．

試 験 結 果

ダゾメット粉粒剤区の処理時の土壌水分含量は 16.1%，被覆中の地温は，最高 51.6℃，最低 25.6℃，平均 39.6℃，クロルピクリンくん蒸剤区の処理時の土壌水分含量は 15.3%，被覆中の地温は，最高 52.1℃，最低 25.7℃，平均 39.2℃であった．

ダゾメット粉粒剤処理区の防除価は 91.1 と効果が高かった．一方，クロルピクリンくん蒸剤は区間差が大きかったが，平均すると防除価 61.8 となり，ダゾメット粉粒剤処理区と比較して効果が劣った．いずれの処理区にも薬害はみられなかった (Table 25)．

Table 25. Effects of several soil fumigants against Phytophthora blight of southern star (Experiment 1)

Soil fumigant	Method ^{b)}	Replication	February 9 (175 days after planting)			July 30 (349 days after planting)			Phytotoxicity ^{d)}
			The number of investigated plants	Disease incidence (%)	Severity ^{b)}	The number of investigated plants	Disease incidence (%)	Severity	
Dazomet	30kg/10a	A	115	1.7	1.2	115	6.1	6.1	-
		B	120*	0	0	119	2.5	0.8	-
		Mean		0.9	0.6		4.3	3.5	91.1
Chloropicrin	3mL/pit	A	119*	0.8	0.3	118	1.7	0.8	-
		B	120*	2.5	2.5	117	33.3	29.1	-
		Mean		1.7	1.4		17.5	15.0	61.8
Control	inject	A	120	5.8	1.9	120	25.0	24.4	
		B	120	0.8	0.3	120	55.8	54.2	
		Mean		3.3	1.1		40.4	39.3	

a) Soil fumigant day : July 25, 2008 ; Planting day : August 18

b) Disease severity = $\frac{\Sigma(\text{disease index} \times \text{number of southern star})}{\text{total number of southern star} \times 3} \times 100$

The disease index (0-3) was determined by the symptom of southern star (0, no symptoms ; 1, browning of stem and leaf ; 2, wilt ; 3, damping off)

c) Protective value calculated it than the mean of the disease severity

d) -; Not appeared

*) In treatment of dazomet B, Chloropicrin A and B, some southern star was lost for a cause except of Phytophthora blight

(2) 試験 2

試験方法

1 区 12.8 m^2 ($1.5\text{ m} \times 8.5\text{ m}$)とし，3 反復で行った．定植株数は 1 区当たり 34～59 株とした．2010 年 6 月 8 日(定植 59 日前)に土壤還元消毒を実施し，フスマを用いた土壤還元消毒区は 180 L/m^2 の割合で灌水し，エタノールを用いた土壤還元消毒区は，0.7%濃度に調整したエタノールを 180 L/m^2 の割合で灌注した．いずれも 22 日間被覆し，6 月 30 日(定植 37 日前)に被覆シートを除去し，7 月 26 日(定植 11 日前)に施肥および畦立てを行った．定植は 8 月 6 日に行い，10 月 4 日(定植 59 日後)に前述の試験 1 と同様に調査した．

試験結果

フスマを用いた土壤還元消毒区の被覆中の地温は，最高 51.3°C ，最低 24.0°C ，平均 35.1°C ，0.7%エタノールによる土壤還元消毒区は最高 55.1°C ，最低 22.8°C ，平均 35.8°C であった．フスマを用いた土壤還元消毒区では，調査期間を通じて発病が見られなかった．0.7%エタノールによる土壤還元消毒区は，防除価 95.4 と効果が高かった．いずれの処理区にも薬害はみられなかった (Table 26)．

Table 26. Effects of several biological soil disinfestations against Phytophthora blight of southern star at high temperature conditions (Experiment 2)

Material	Quantity of material ^{a)} (Quantity of poured water)	Replication	The number of investigated plants	October 4 (59 days after planting)			Phytotoxicity ^{d)}
				Disease incidence (%)	Severity ^{b)}	Protective value ^{c)}	
Wheat bran	1t/10a (180L/m ²)	A	36	0	0		—
		B	36	0	0		—
		C	37	0	0		—
		Mean		0	0	100	
Ethanol	0.7% dilute solution 180L/m ²	A	34	0	0		—
		B	35	0	0		—
		C	50	6.0	6.0		—
		Mean		2.0	2.0	95.4	
Control	-	A	40	62.5	49.2		
		B	40	70.0	53.3		
		C	59	39.0	27.7		
		Mean		57.2	43.4		

a) Biological soil disinfestations day : June 8, 2010 ; Planting day : August 6

b, c, d) See Table 25. for details

(3) 試験 3

試験方法

1 区 12.8 m^2 ($1.5\text{ m} \times 8.5\text{ m}$) とし，3 反復で行った．定植株数は 1 区当たり 52 株とした．2010 年 11 月 15 日 (定植 39 日前) にダゾメット粉粒剤によるくん蒸処理，11 月 16 日 (定植 38 日前) にフスマおよびエタノールを用いた土壌還元消毒を実施した．フスマを用いた土壌還元消毒区は 72 L/m^2 の割合で灌水し，エタノールを用いた土壌還元消毒区は，0.5% 濃度に調整したエタノールを 97 L/m^2 の割合で灌注した．ダゾメット粉粒剤処理区は 22 日間，フスマおよびエタノールを用いた土壌還元消毒区は 21 日間被覆し，12 月 7 日 (定植 17 日前) に全処理区の被覆シートを除去し，12 月 14～15 日 (定植 9～10 日前) に施肥および畦立てを行った．定植は 12 月 24 日に行い，2011 年 3 月 24 日 (定植 90 日後) に試験 1 と同様に区当たり 20～52 株を調査した．

試験結果

ダゾメット粉粒剤区の処理時の土壌水分含量は 18.5%，被覆中の地温は，最高 26.5°C ，最低 19.8°C ，平均 22.7°C ，フスマを用いた土壌還元消毒区の被覆中の地温は，最高 28.7°C ，最低 17.9°C ，平均 22.9°C ，0.5% エタノールによる土壌還元消毒区は最高 27.7°C ，最低 19.7°C ，平均 22.9°C であった．

ダゾメット粉粒剤区は，防除価 83.6 と効果が高かったが，フスマを用いた土壌還元消毒区は防除効果が得られなかった．0.5% エタノールによる土壌還元消毒区は，防除価 31.1 と効果

は低かった．全ての処理区で薬害は見られなかった (Table 27)．
なお，同圃場で別試験を実施していたため，本試験での区当たりの調査株は 20～52 株とばらつきがあった．

Table 27. Effects of soil fumigants and biological soil disinfestations against Phytophthora blight of southern star at low temperature conditions (Experiment 3)

Soil fumigant or material	Quantity of soil fumigant or material ^{a)} (Quantity of poured water)	Replication	The number of investigated plants	March 4 (70 days after Planting)		March 24 (90 days after planting)		Protective value ^{c)}	Phytotoxicity ^{d)}
				Disease incidence (%)	Severity ^{b)}	Disease incidence (%)	Severity		
Dazomet (98%)	30kg/10a	A	32	6.3	2.1	6.3	2.1		-
		B	32	3.1	1.0	3.1	1.0		-
		C	40	0	0	0	0		-
		Mean		3.1	1.0	3.1	1.0	83.6	
Wheat bran	1t/10a (72L/m ²)	A	40	0	0	45.0	30.8		-
		B	36	2.8	2.8	11.1	8.3		-
		C	52	9.6	8.3	32.7	21.8		-
		Mean		4.1	3.7	29.6	20.3	0	
Ethanol	0.5% dilute solution 97L/m ²	A	27	7.4	2.5	7.4	4.9		-
		B	32	3.1	1.0	3.1	1.0		-
		C	44	4.5	4.5	6.8	6.8		-
		Mean		5.0	2.7	5.8	4.2	31.1	
Control	-	A	20	5.0	5.0	5.0	5.0		
		B	20	10.0	10.0	10.0	10.0		
		C	20	0	0	5.0	3.3		
		Mean		5.0	5.0	6.7	6.1		

a) Soil fumigant day : November 15, 2010 ; Biological soil disinfestation day : November 16 ; Planting day : December 24

b, c, d) See Table 25 for details

第 3 項 . 考 察

ポリエチレンポット栽培のルリトウワタを用いて各種殺菌剤の予防効果を検討したところ、薬害もみられず、防除価 90 以上の高い防除効果を示す薬剤は、30 剤中 15 剤となった。加藤ら（1974）はピーマン疫病に対して銅水和剤およびマンネブ水和剤の防除効果が高いことを報告している。今回の試験結果では、銅水和剤および銅を含む混合剤は、防除価 60～100 と効果を認めたが、剤により効果にばらつきがあった。また、マンネブ水和剤およびマンネブを含む混合剤は、防除価 66.7 とやや効果が劣った。よって、銅水和剤、銅を含む混合剤およびマンネブ水和剤は、本疫病に対して安定した効果が得られないと考えられた。一方、マンネブ水和剤と同系統の有機硫黄殺菌剤であるマンゼブ水和剤、マンゼブを含む混合剤およびポリカーバメート水和剤は、防除価 100 と高い効果を示し、本疫病に対して予防効果が高いと考えられた。また、向畠（2008）はダイズ茎疫病に対してジメトモルフ・銅水和剤、マンゼブ・メタラキシル水和剤、ベンチアバリカルブイソプロピル・TPN 水和剤の防除効果が高いことを報告している。今回の試験結果では、ジメトモルフ・銅水和剤、マンゼブ・メタラキシル水和剤およびベンチアバリカルブイソプロピルを含むシモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤は、防除価 100 と高い効果を示し、この報告と同様の傾向を示した。このことから、これらの薬剤も本疫病に対して予防効果が高いと考えられた。

次に、治療効果を検討したところ、シモキサニル・ベンチア

バリカルブイソプロピル水和剤とマンゼブ・メタラキシル水和剤は本疫病菌を接種した1日後に灌注した場合にも高い防除効果を示した。古田・山口（2006）はイチゴにおいて、疫病菌を接種後、メタラキシル粒剤を処理することで防除効果が認められることを報告しており、本試験においてもマンゼブ・メタラキシル水和剤が高い防除効果を示したことから、本疫病に対してもメタラキシルを含有する薬剤は治療効果を有することが示唆された。さらに、シモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤も、本疫病に対して治療効果を有すると考えられた。

シモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤と、マンゼブ・メタラキシルM水和剤について処理量および処理回数を検討したところ、両薬剤ともに 3L/m^2 以上の割合で3回以上灌注することで、高い防除効果を示した。しかし、シモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤については 5L/m^2 以上で3回灌注すると薬害と思われる生育遅延がみられたことから、 5L/m^2 以上の処理は適さないと考えられた。

殺菌剤の灌注に要する労力を最小限にするためには、灌注処理は1回が望ましい。しかし、1回処理では防除効果が安定しないため、殺菌剤のコストおよび灌注に要する労力を抑えて安定した防除効果を発揮させるためには、両薬剤ともに 3L/m^2 の割合で3回灌注することが適していると考えられた。

次に、ルリトウワタ疫病に対する土壌消毒法を検討したところ、高温期、低温期に関わらず、いずれの処理時期もダゾメッ

ト粉粒剤はルリトウワタ疫病に対し高い防除効果を示した。森田ら（2006）は、ピーマン疫病やユリ疫病に対するダゾメット粉粒剤の効果を検討しているが、防除効果が低い場合や薬害が発生する場合が認められたため、効果を安定させるためには処理時の土壌水分含量や土塊の大きさなどに留意することが必要と報告している。漆原ら（2004）は、土壌水分含量が10%の乾燥状態でダゾメット粉粒剤を処理した場合、激しい薬害を生じ、土壌水分含量が22%であれば防除効果が高く、薬害も生じないことを報告している。本研究において、試験1のダゾメット粉粒剤処理時の土壌水分含量は16.1%、試験3では18.5%であり、いずれの試験においても土壌水分含量は22%に達しないものの10%以上であったことから、高い防除効果が得られたと推察した。また、ダゾメット粉粒剤については、地温10℃以上で使用し、15℃以下では適宜マルチ期間を延長することが推奨されている。試験1の平均地温は39.6℃、試験3では22.7℃と、両試験ともにルリトウワタ疫病に対して十分な防除効果が発揮される温度条件下であった。

一方、土壌還元消毒について、フスマを用いた土壌還元消毒は高温期に実施した試験において高い防除効果を示したものの、低温期に実施した試験では防除効果が得られなかった。新村（2002）は、土壌還元消毒期間のアメダスの平均気温が15～18℃以上あれば防除効果が得られると推定しており、米本ら（2006）は、土壌還元消毒を行うための地温は30℃前後が必要であるとしている。高温期に実施した試験2では、フスマを用いた土壌還

元消毒区の被覆中の平均地温は35.1℃と地温は30℃以上あり、土壌還元消毒に適した温度条件を満たしていたことから高い防除価が得られたとみられ、本試験とは別に実施した高温時のフスマを用いた土壌還元消毒においても、定植112日後の最終調査日まで発病が見られず、高い効果が確認された(データ省略)。

一方、低温時に実施した試験3で防除効果が得られなかったことは、土壌還元消毒時の被覆中の平均地温が22.9℃で、地温が30℃以下であったことが原因と考えられた。また、低温時にフスマを用いた土壌還元消毒区は、無処理区よりも発病度が高かった。これは、土壌還元消毒の効果が得られない低温条件下で実施したことと、ルリトウワタ疫病菌が生育可能な10℃以上で湛水状態となったために、疫病菌が増殖して土壌中の菌密度が高まった結果、発病が対照区並に増加したのではないかと推察された。

エタノールを用いた土壌還元消毒について検討したところ、高温期の0.7%濃度処理は本病害に対して高い防除効果を示した。一方、低温期の0.5%濃度処理では十分な効果が認められなかった。Momma et al. (2010) は、トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 汚染土壌へ低濃度のエタノール(0.5, 1.0, 2.0%)を灌注して30℃に静置したところ、エタノールの濃度にかかわらず、全ての濃度で一定期間後に厚壁胞子が死滅したが、20℃に静置した場合は全ての濃度区で厚壁胞子が死滅せず検出され、土壌の還元化が地温により変動したことを報告している。この現象は疫病菌の死滅でも起こり得るものと考えられる。すなわち、本試験において0.7%濃度のエタノール

処理時の平均地温は35.8℃であり，平均地温が30℃以上であったため，土壌の還元化が促進され，高い防除効果が得られたと推察され，一方，0.5%濃度のエタノール処理時の平均地温は22.9℃と30℃以下であったため，土壌の還元化が促進されず，十分な防除効果が得られなかったと推察された．なお，Momma et al. (2010) の試験では，30℃の温度条件下ではエタノール濃度が0.5，1.0%，2%のいずれでもトマト萎凋病菌の厚壁胞子が十分死滅していたことから，試験2と試験3のエタノールの濃度の差は防除効果に影響しないと推察された．

以上の結果から，ルリトウワタ疫病に対して有効な土壌消毒法は，ダゾメット粉粒剤を用いた土壌消毒と，フスマおよびエタノールによる土壌還元消毒であるが，処理時の温度条件によって土壌消毒法を選択する必要があると考えられた．

高知県のルリトウワタ生産圃場では，ほとんどの圃場で6月上旬から8月上旬にかけて土壌消毒が実施されるが，早期収穫を目的として4月上旬に土壌消毒を行う圃場もあり，実施時期は様々である．新村(2002)は，土壌還元消毒の効果が発揮される気温を18℃以上としているが，ルリトウワタの主要産地である高知県安芸地区においては，5月第1半旬～10月第5半旬に，平均気温の平年値が18℃を上回ることから(高知県病害虫防除所 2013)，この時期は，ダゾメット粉粒剤とともにフスマを用いた土壌還元消毒も有効であると考えられる．

フスマを用いた土壌還元消毒は，処理時に作業者が化学薬剤を被曝する危険性はなく，資材コストもダゾメット粉粒剤と同

程度の約4万円/10aと試算され，実用性は高いと考えられる．特に，梅雨明け後など晴天に恵まれ，気温が高い時期に実施する場合は有効な土壌消毒法となる．

一方，エタノールによる土壌還元消毒は作業が簡便であり，高温時には防除効果が高く，フスマを用いた土壌還元消毒と同様に作業者が化学薬剤を被曝する危険性はないことから，有望な防除法となる．しかし，本試験のように0.7%濃度のエタノールを1m²当たり180L灌注する場合，フスマを用いた土壌還元消毒やダゾメット粉粒剤よりもコストがかなり高くなり，使用者への経済的な負担が大きくなる．今後エタノールによる土壌還元消毒の実用化に向けては，土性に応じて安定した効果を確保できる最低限の処理濃度を探索していく取り組みが必要と考える．

第5節．総合考察

高知県内の施設栽培ルリトウワタに発生していた立枯れ性の生育障害は，*P. palmivora*による病害であることを明らかとし，病名をルリトウワタ疫病(英名：Phytophthora blight of southern star)と命名した．本病原菌は，本研究により改変した捕捉法によって土壌からの検出が可能で，圃場における疫病菌汚染状況の評価が可能となった．また，本病害に対して効果的な殺菌剤とその処理方法は，シモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤またはマンゼブ・メタラキシルM水和剤の各3L/m²の3回株元灌注処理であることを明らかとし，効果的な

土 壌 消 毒 法 は ， ダ ズ メ ッ ト 粉 粒 剤 を 用 い た 土 壌 消 毒 と ， 高 温 期 に 実 施 す る フ ス マ お よ び エ タ ノ ール に よ る 土 壌 還 元 消 毒 で あ る こ と を 明 ら か と し た ．

以 上 の 結 果 か ら ， ル リ ト ウ ワ タ 生 産 現 場 で の 本 病 害 防 除 の 対 策 と し て ， 土 壌 消 毒 前 に 捕 捉 法 に よ る 疫 病 菌 の 検 出 に よ っ て 本 病 原 菌 の 分 布 状 況 を 確 認 し ， ダ ズ メ ッ ト 粉 粒 剤 を 用 い た 土 壌 消 毒 ま た は ， フ ス マ お よ び エ タ ノ ール を 用 い た 土 壌 還 元 消 毒 を 効 果 的 な 条 件 下 で 行 う こ と に よ り ， 土 壌 中 の 疫 病 菌 の 菌 密 度 を 低 下 さ せ ， 定 植 後 に 疫 病 が 発 生 し た 場 合 は シ モ キ サ ニ ル ・ ベ ン チ ア バ リ カ ル ブ イ ソ プ ロ ピ ル 水 和 剤 ， ま た は マ ン ゼ ブ ・ メ タ ラ キ シ ル M 水 和 剤 の 各 3 L/m^2 の 3 回 株 元 灌 注 処 理 を 行 う こ と を 推 奨 し た い ．

た だ し ， こ れ ら の 体 系 防 除 を 普 及 さ せ る た め に は ， 現 在 花 き 類 ま た は ル リ ト ウ ワ タ の 疫 病 に 対 し て 農 薬 登 録 が 無 い ダ ズ メ ッ ト 粉 粒 剤 ， シ モ キ サ ニ ル ・ ベ ン チ ア バ リ カ ル ブ イ ソ プ ロ ピ ル 水 和 剤 お よ び マ ン ゼ ブ ・ メ タ ラ キ シ ル M 水 和 剤 に つ い て ， 早 期 の 適 用 登 録 が 望 ま れ る ．

第 6 章 . オクラ果実黒斑病の発生に影響を及ぼす収穫後の環境要因

オクラ果実黒斑病は 1992 年に遠山らによって報告された市場病害である(遠山ら 1992a ; Tohyama et al. 1995a). 遠山らは病原菌の生育適温は 20℃ 以上, 発病は低温下で旺盛であったと報告している. しかし, 現在までのところ, 本病の発生に影響する保管温度, 湿度, 環境ガス濃度および結露の影響についての知見はほとんどなかった. そこで, 本章では果実黒斑病の発生を抑制する収穫直後から市場までの適正な保存管理技術を確立するため, 病原菌の生育と黒斑症状の発生に影響を及ぼす環境要因についての試験を実施した.

第 1 節 . 供試菌株とさく果

第 1 項 . 植物体からの病原菌の分離

2007 年から 2008 年に, 高知県内の出荷場で黒斑症状を呈し

たオクラのさく果を採取し，病斑部をメスで切り取った後，70%エタノールに10秒間，次いで2%次亜塩素酸ナトリウムに30秒間浸漬後，滅菌水で十分に洗浄して表面殺菌を行い，浅型プラスチックシャーレ内のPDA(Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)平板培地へ置床して糸状菌を分離した．伸長してきた菌をPDA平板培地に移植して7日間培養後，滅菌水5mLを加え，煮沸滅菌した筆で菌叢の表面を掻き取って分生子懸濁液を作成した．分生子懸濁液100 μ Lを素寒天平板培地(Agar 15g, Distilled water 1L)へ滴下し，コンラージ棒で表面に広げた．1日後に実体顕微鏡下で分生子を釣菌して単孢子分離を行った．単孢子分離後に，オクラへの病原性を確認した4菌株(Susaki 1, Yamada 804, Yamada 811, Nankoku 925)を以下の試験に供した．

第2項．さく果の洗浄と接種源の調製

さく果の洗浄，分生子懸濁液の調製，培養濾液の調製と接種は，特に記載しない限り次に示した方法で行った．

1．さく果の洗浄

試験前日に収穫した外観健全なオクラ‘アーリーファイブ’のさく果を，水道水中で20分間超音波洗浄し(途中1回水を交換)，ペーパータオル(コンフォートサービスタオル：日本製紙クレシア)で残った水分を拭きとった．なお，自然感染により発病させる場合は，試験当日に‘アーリーファイブ’のさく果を収穫し，洗浄は行わずに試験に供した．

2. 分生子懸濁液の調製

各供試菌株を PDA 平板培地に移植して 25℃，暗黒条件下で 5～10 日間前培養したシャーレに滅菌水を加え，煮沸消毒した筆またはコンラージ棒で菌叢の表面を掻き取って分生子懸濁液を作製した．Thoma EKDS 血球計算盤を用いて懸濁液中の分生子数を測定し， 1×10^4 conidia/mL に調整して分生子懸濁液とした．

3. 培養濾液の調製

Tanaka (1933) は，本病原菌と同種のナシ黒斑病菌が，菌糸伸長の際に生じる分泌物によって宿主に壊死斑を生じさせることを報告している．そこで，本病原菌の分泌物がオクラのさく果へ壊死斑を形成させるかを調査するために，本病原菌の分泌物を含む培養濾液を調製し，試験に供した．

各供試菌株を PDA 平板培地に移植して 25℃，暗黒条件下で前培養した菌叢を直径 3mm のコルクボーラで打ち抜き，試験管内に 10mL ずつ分注した Richards 氏培地 (KNO_3 10.0g, KH_2PO_4 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5g, Sucrose 50.0g Distilled water 1L) 中に 5 個ずつ移植した．次に 25℃ 暗黒条件下で静置培養し，7～14 日後に培養液を濾紙で濾過して菌叢マットを取り除いた後， $0.45\mu\text{m}$ のミリポアフィルターで濾過して培養濾液とした．

4. 病原菌の培養濾液による病徴の再現

試験方法

外觀健全なオクラのさく果を洗浄して風乾した後，Susaki 1 菌株の培養濾液をさく果全体に噴霧し，プラスチックケース (21cm×30cm×10cm)内に密封して 15℃暗黒条件下に 4 日間静置し，黒斑の発生状況を調査した．また，菌を培養していない Richards 氏培地 (無培養培地)を噴霧したさく果を対照とした．試験は 1 回行い，さく果は各処理当たり 4 または 5 果を供試した．発生程度は次に示した指数に従って調査した．++ :黒斑が処理部位の全面に多数発生，+ :黒斑が少数発生，- :黒斑の発生なし

試験結果

Susaki 1 菌株の培養濾液を噴霧したさく果は，さく果全面に多数の黒斑を生じた．対照の無培養培地を噴霧したさく果にも黒斑が認められたものがあったが，その程度は培養濾液を噴霧したさく果よりも明らかに低かった (Table 28)．

Table 28. Black lesions occurred on okra pods following inoculation with metabolic products

Inoculation	Total number (okra pods)	number of okra pods each degree of black lesions ^{a)}		
		++	+	-
Susaki 1	5	5	0	0
Control ^{b)}	4	0	1	3

a) ++: Almost surface of okra pod was covered with black lesions ; +: A little surface of okra pod was covered with black lesions ; -: no symptom

b) Okra pods were sprayed with Richards medium

第 2 節．温度の影響

第 1 項．分生子発芽に及ぼす影響

試験方法

浅型プラスチックシャーレ内の素寒天平板培地へ Susaki 1 菌株，Yamada 804 菌株の分生子懸濁液をそれぞれ

100 μ L ずつ滴下してコンラージ棒で表面に拡げ，培地表面を風乾した後，直ちに 5℃，10℃，15℃，20℃，25℃，30℃，35℃ の暗黒条件下に静置した．24 時間後に顕微鏡観察を行い，発芽の有無を調査し，発芽管が分生子の長径よりも長く伸長したものを発芽とみなした．なお，試験は 1 回行い，全ての温度区にシャーレ 1 枚を供試し，1 枚につき 200 個程度の分生子の発芽について調査した．

試験結果

Susaki 1 菌株および Yamada 804 菌株は 5～35℃ の全ての温度域で発芽した．10～35℃ では発芽率が 90% 以上でほとんど差がみられなかったが，5℃ では Susaki 1 菌株で 68.0%，Yamada 804 菌株で 78.5% と発芽率が低かった (Fig. 9)．

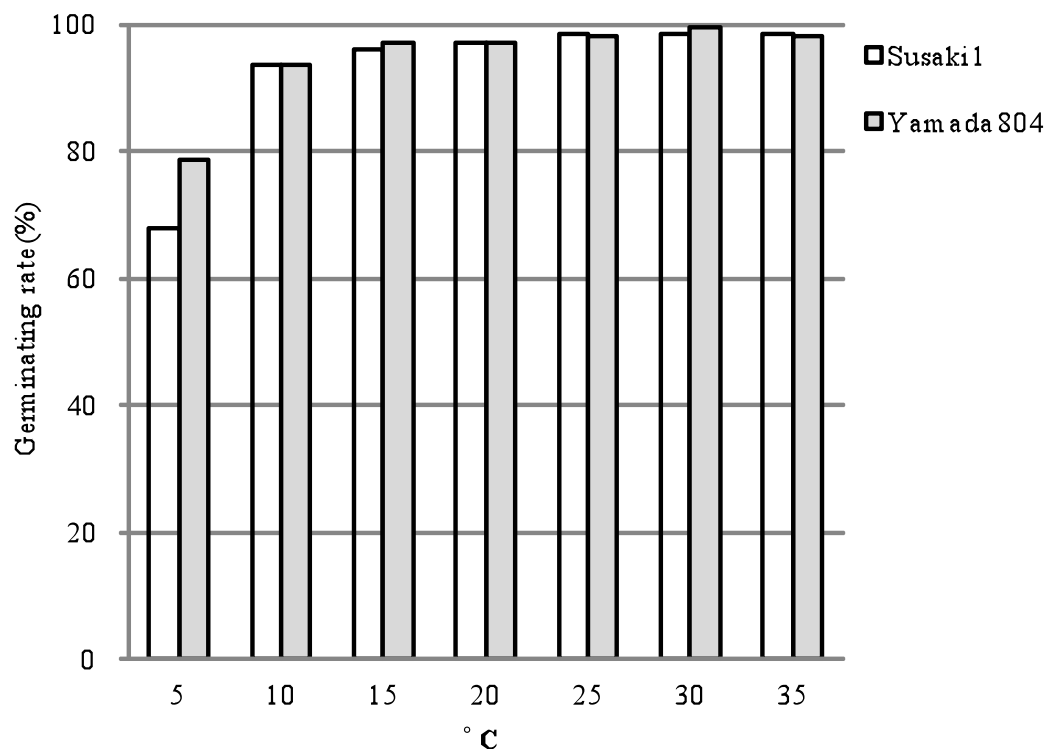


Figure 9. Effect of temperature on germinate of conidia of the pathogen

第 2 項 . 菌 糸 伸 長 に 及 ぼ す 影 響

試 験 方 法

PDA 平板培地で 25℃，暗黒条件下で 7 日間前培養した Susaki 1 菌株，Yamada 804 菌株，Yamada 811 菌株，Nankoku 925 菌株の菌叢の周縁部を直径 6mm のコルクボーラで打ち抜き，直径 9cm の浅型プラスチックシャーレ内の PDA 平板培地の中央へ置床した．直ちに 5℃，10℃，15℃，20℃，25℃，30℃，35℃の暗黒条件下で 7 日間静置後，菌叢の直径を調査し，1 日当たりの菌叢の拡大 (mm) を算出した．なお，試験は 1 回行い，全ての温度区にシャーレ 3 枚を供試した．

試験結果

供試したいずれの菌株も，25～30℃付近で菌糸が最も旺盛に伸長した．また，いずれの菌株も15℃以下で菌糸伸長は著しく抑制され，有意差がみられた．35℃では菌糸の生育が抑制される傾向がみられたが，Yamada 804菌株の菌糸は他の菌株よりも比較的旺盛に伸長し，菌株ごとに差がみられた (Fig. 10a-d)．

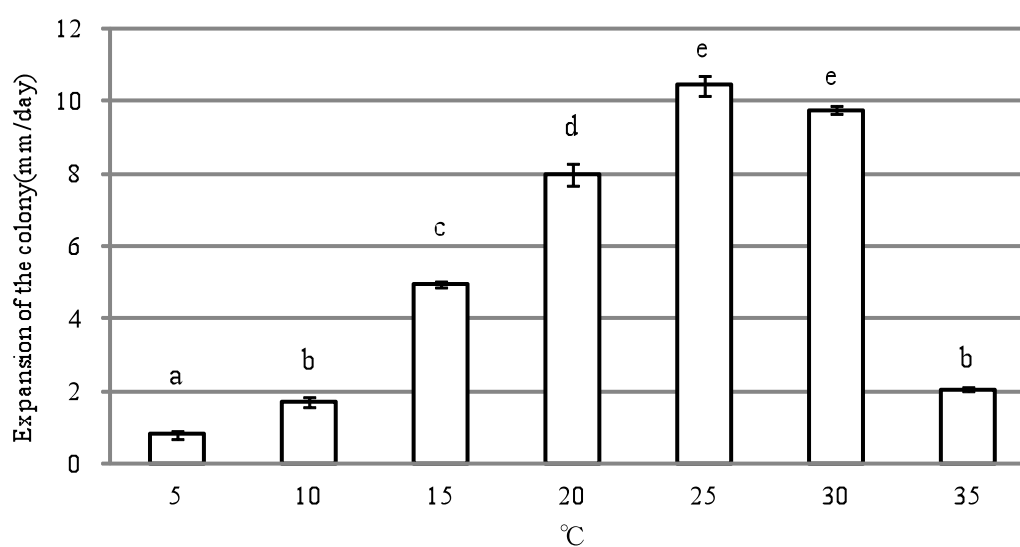


Figure 10a. Effect of temperature on the expansion of the colony of isolate Susaki 1 on PDA.
Vertical bar indicates SE of the mean

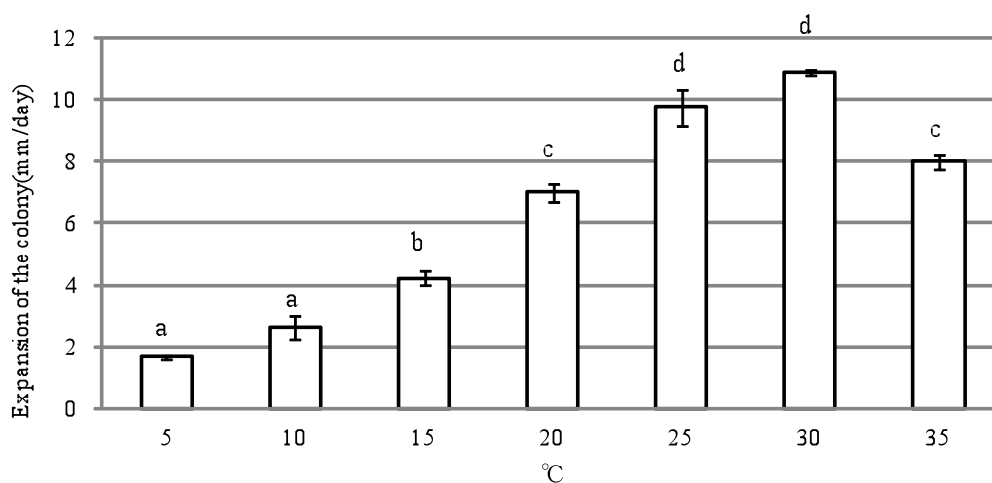


Figure 10b. Effect of temperature on the expansion of the colony of isolate Yamada 804 on PDA.
Vertical bar indicates SE of the mean

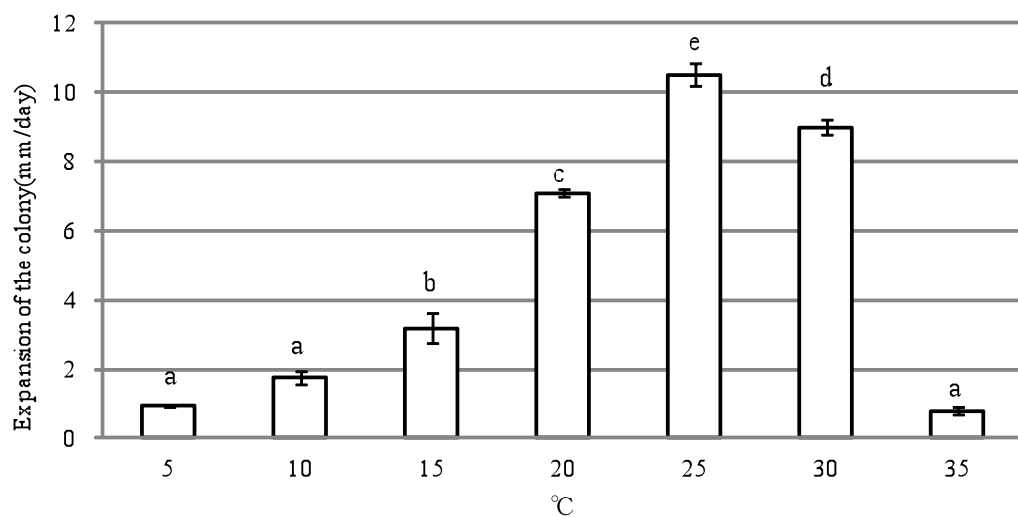


Figure 10c. Effect of temperature on the expansion of the colony of isolate Yamada 811 on PDA.
Vertical bar indicates SE of the mean

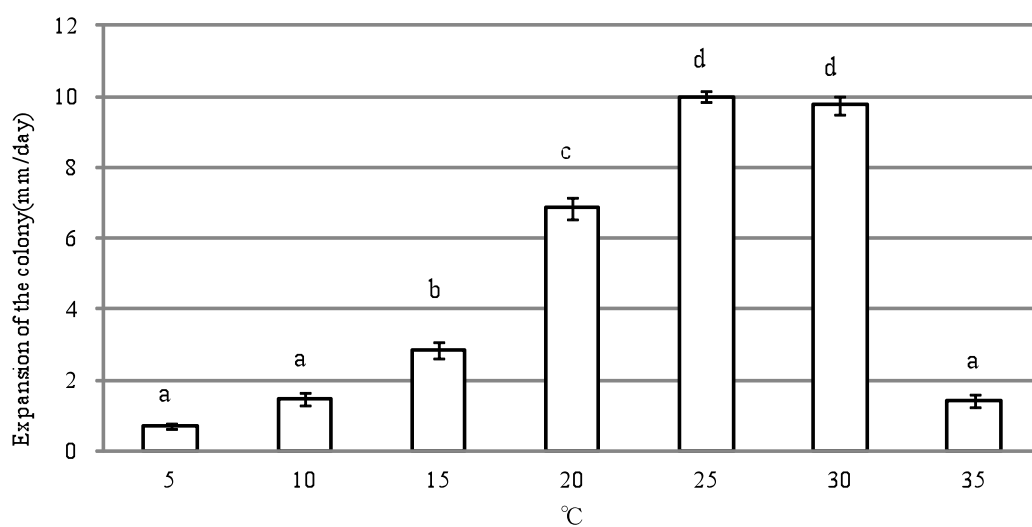


Figure 10d. Effect of temperature on the expansion of the colony of isolate Nankoku 925 on PDA.
Vertical bar indicates SE of the mean

第 3 項 . 黒 斑 症 状 の 発 生 に 及 ぼ す 影 響

1. 分 生 子 の 接 種

試 験 方 法

Susaki 1 菌株， Yamada 804 菌株 の 分 生 子 懸 濁 液 を さ く 果 へ 噴 霧 し ， ポ リ エ チ レ ン 袋 に 密 封 し て 5℃ ， 10℃ ， 15℃ ， 20℃ ， 25℃ ， 30℃ ， 35℃ の 暗 黒 条 件 下 に 保 っ た ． ま た ， 滅 菌 水 を 噴 霧 し た さ く 果 を 対 照 と し た ． 試 験 は 1 回 行 い ， 各 処 理 当 た り さ く 果 は 3 果 ず つ 供 試 し た ． 処 理 2 日 後 に 黒 斑 の 発 生 状 況 を 次 に 示 し た 指 数 に 従 っ て 調 査 し ， 発 病 度 を 算 出 し た ．

0：無病徴， 1：さく果表面の 50%未満に黒斑が発生， 2：さく果表面の 50%以上に黒斑が発生

発病度 = $\Sigma(\text{指数別黒斑発生さく果数} \times \text{指数}) / (\text{調査さく果数} \times 2)$
 $\times 100$

試 験 結 果

両菌株とも，分生子懸濁液を噴霧したさく果は，20℃以上で黒斑症状が顕著に現れ，15℃以下で抑制された．対照の滅菌水を噴霧したさく果については，いずれの温度条件下でも黒斑症状は認められなかった (Fig. 11).

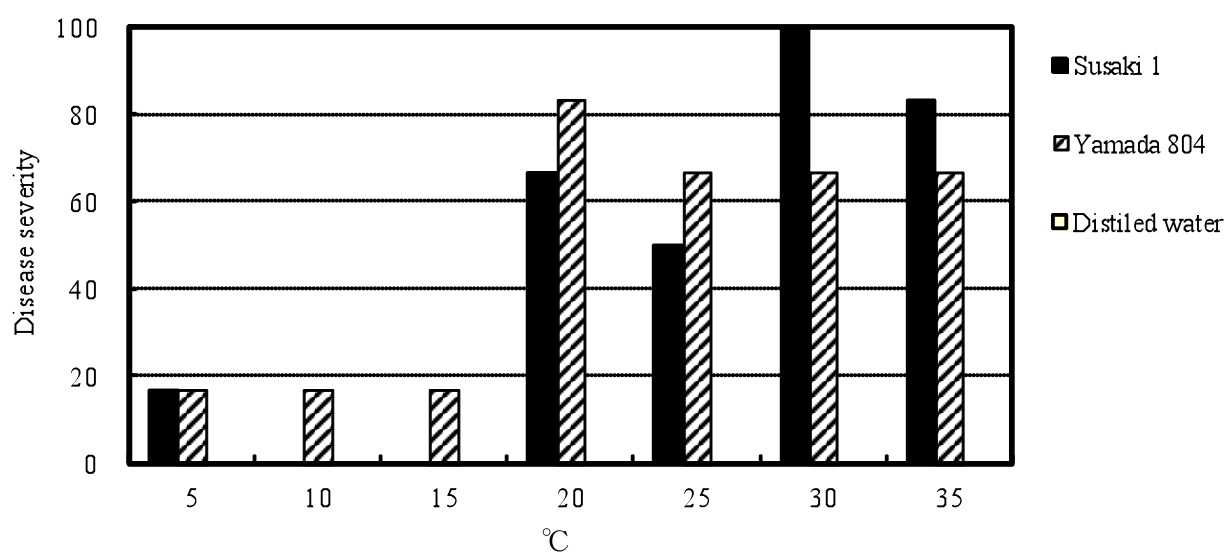


Figure 11. Effect of temperature on the development of black lesions on okrapods following inoculation with conidial suspensions

Disease severity was investigated on 2 days after inoculation and calculated by the following formula:

$$\Sigma (\text{disease index} \times \text{number of okra pods}) / (\text{total number of okra pods} \times 2) \times 100$$

The disease index (0–2) was determined by the area of black lesions on the surface of okra pods (0, no symptoms; 1, less than 50%; 2, over 50%)

2. 培養濾液の接種

試験方法

Susaki 1 菌株， Yamada 804 菌株， Yamada 811 菌株 の 培養 濾 液 を さ く 果 へ 噴 霧 し た 。 ま た ， Richards 氏 培 地 (無 培 養 培 地) を 噴 霧 し た さ く 果 を 対 照 と し た 。 試 験 は 1 回 行 い ， 各 処 理 当 た り さ く 果 は 3 果 ず つ 供 試 し た 。 処 理 2 日 後 に 同 項 1. 分 生 子 の 接 種 と 同 様 に 処 理 ， 調 査 を 行 っ た 。

試験結果

いずれの菌株とも培養濾液を噴霧したさく果は， 20℃ 以上で黒斑症状が顕著に現れ， 15℃ 以下で抑制された。 対照の滅菌水を噴霧したさく果については， 全ての温度条件下で黒斑症状は

認められなかった (Fig. 12).

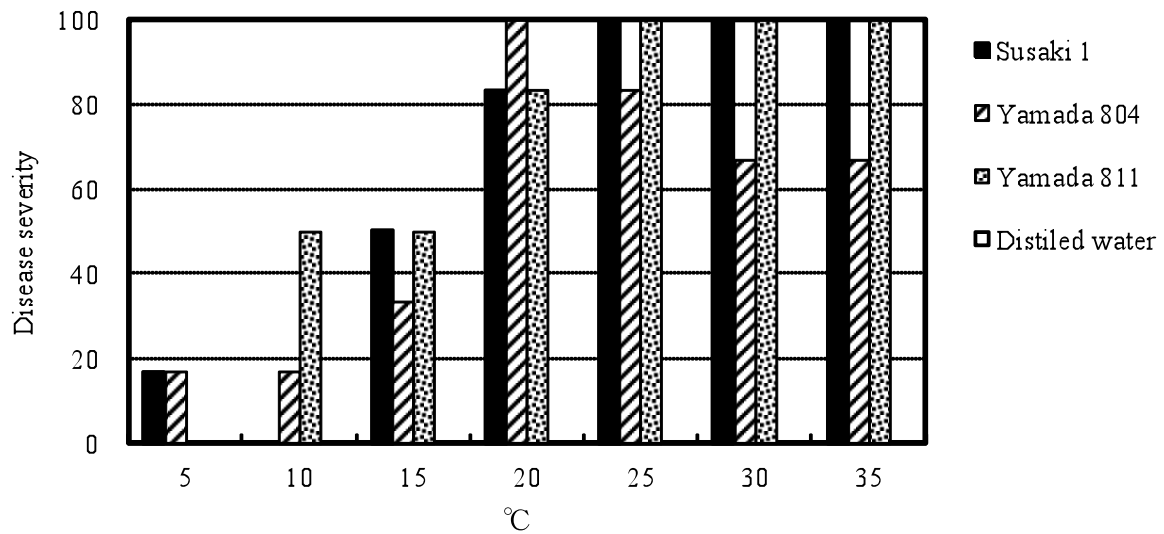


Figure 12. Effect of temperature on the development of black lesions on okrapods following inoculation with metabolic products

Disease severity was investigated on 2 days after inoculation and calculated by the following formula:

$$\Sigma (\text{disease index} \times \text{number of okra pods}) / (\text{total number of okra pods} \times 2) \times 100$$

The disease index (0-2) was determined by the area of black lesions on the surface of okra pods (0, no symptoms; 1, less than 50%; 2, over 50%)

第 4 項 . 考 察

病原菌の分生子発芽率は，10～35℃で24時間後に90%を越えたことから，発芽適温は10～35℃であると考えられた．また，菌糸の生育適温は25℃～30℃であると考えられた．従って，分生子の発芽は5℃以下，菌糸の伸長は10℃以下で有意に抑制されると考えられた．さく果の黒斑症状の発生は15℃以下の低温で抑制されており，これは本病原菌の菌糸伸長の抑制温度とほぼ一致していた．一方，培養濾液を噴霧したさく果も，温度条件により黒斑症状の発生程度に差が見られ，15℃以下の低温で抑制された．このことから，温度による黒斑症状の発生程度の違いは，病原菌の生育だけでなく，

病原菌の分泌物に対するオクラの反応も温度の影響を受けていると考えられた。

第 3 節 . ガス濃度の影響

収穫後のガス環境は青果物の鮮度と密接に関わっており（鈴木ら 2004）、ニラやネギでは酸素と二酸化炭素を鮮度保持に有効なバランスに保つ特殊な包装技術が開発されている（鈴木ら 2005）。果実黒斑病は呼吸に伴う鮮度の低下ではないが、収穫後のガス環境は病原菌の生育にも影響を及ぼすことが予想される。そこで、収穫後のガス環境が果実黒斑病の発生に及ぼす影響を調査した。

第 1 項 . 分生子発芽に及ぼす影響

試験方法

Susaki 1 菌株の分生子懸濁液を素寒天平板培地へ塗布した後、直ちにガス濃度調整器（GASCON, 型番:GM-3B: KOFLOC 社製）を用いて、Table 29 に示した 5 通りのガス環境（流量 200 mL / min で通気）に調整した容量 8.2 L のアクリル製チャンバー内に入れ、20℃暗黒条件下に 24 時間静置した。試験は 1 回行い、各処理区につきシャーレ 1 枚を供試し、1 枚につき 200 個程度の分生子の発芽について調査した。調査方法は同章第 2 節第 1 項の分生子発芽に及ぼす影響に準じた。その後、室温の大気条件下に移して 24 時間静置し、再び発芽の有無を調査した。

Table 29. Gas concentration of each treatment

Treatment	Gas concentration	
	O ₂	CO ₂
LowO ₂ -NonCO ₂	2%	0%
NonO ₂ -HighCO ₂	0%	20%
HighCO ₂	20%	20%
LowO ₂ -HighCO ₂	2%	20%
Atmosphere	21%	0% (0.04%)

試験結果

分生子の発芽は，NonO₂-HighCO₂条件下で著しく抑制されたが，他のガス環境では発芽率が90%以上であった (Fig. 13). なお，ガス環境を調整したチャンバーから取り出し，大気中に静置すると NonO₂-HighCO₂条件下で抑制された分生子は発芽した (データ省略).

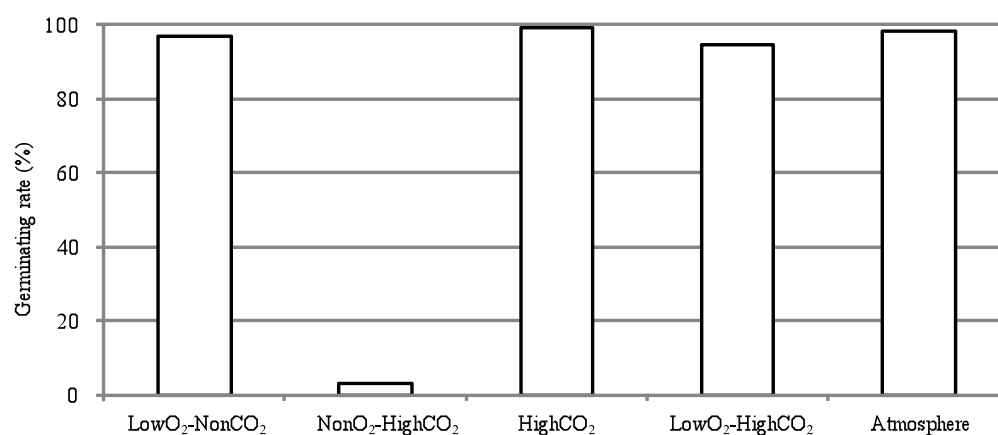


Figure 13. Effect of gas concentration on the isolate 'Susaki 1' germination of conidia

第2項. 菌糸伸長に及ぼす影響

試験方法

PDA 平板培地で前培養した Susaki 1 菌株の菌叢の周縁部

を直径 6 mm のコルクボーラで打ち抜き，直径 9 cm の浅型プラスチックシャーレ内の PDA 平板培地の中央へ置床した．Table 2 に示した 5 通りのガス環境に調整したチャンバー内に入れ，20℃ の暗黒条件下に 7 日間静置した後，菌叢の直径と短径を調査し，1 日当たりの菌叢の拡大 (mm) を算出した．なお，試験は 1 回行い，全ての温度区にシャーレ 3 枚を供試した．その後，室温の大気条件下に移して 2 日間静置し，菌糸の伸長状況を観察した．

試験結果

NonO₂-HighCO₂ 条件下で，菌糸は全く伸長しなかった．LowO₂-HighCO₂ 条件下では，大気条件よりも有意に菌糸の伸長が抑制された．HighCO₂ 条件でも菌糸の伸長が抑制されたが，大気条件との間に有意差はみられなかった (Fig. 14)．なお，ガス環境を調整したチャンバーから取り出して大気中に静置すると，NonO₂-HighCO₂ 条件下で抑制された菌糸は伸長した (データ省略)．

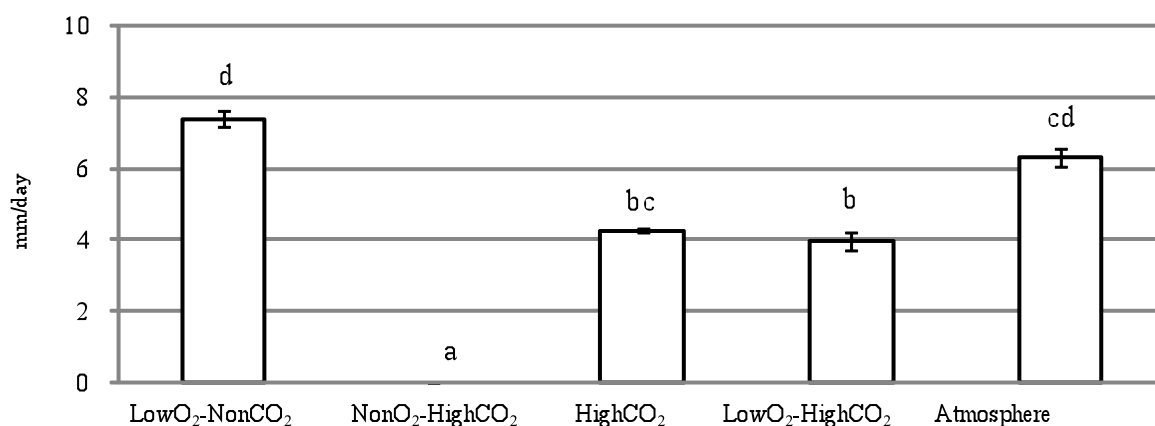


Figure 14. Effect of temperature on the expansion of the colony of isolate 'Susaki 1'

第 3 項 . 黒 斑 症 状 の 発 生 に 及 ぼ す 影 響

1. 分 生 子 の 接 種

試 験 方 法

Susaki 1 菌株 , Yamada 804 菌株 , Yamada 811 菌株 の 分生子懸濁液をさく果へ噴霧した後 , Table 29 に示した 5 通りのガス環境に調整したチャンバー内に入れ , 20℃ の暗黒条件下に静置した . なお , 滅菌水を噴霧したさく果を対照とした . 試験は 1 回行い , 各処理につき , さく果は 5 果ずつ供試した . 3 日後に黒斑の発生状況を調査した . 調査方法は同章第 2 節第 3 項 1. 分生子の接種に準じた . また , チャンバー開封時に異臭の発生の有無を臭覚により判定した .

試 験 結 果

分生子懸濁液を噴霧したさく果は , NonO₂-HighCO₂ 条件下で全く黒斑症状が発生せず , 次に LowO₂-HighCO₂ 条件下で黒斑

の発生が抑制された。LowO₂-NonCO₂条件とHighCO₂条件下では、黒斑症状の発生は抑制されなかった(Fig. 15)。しかし、その一方でNonO₂-HighCO₂条件下ではさく果に異臭の発生が認められた。

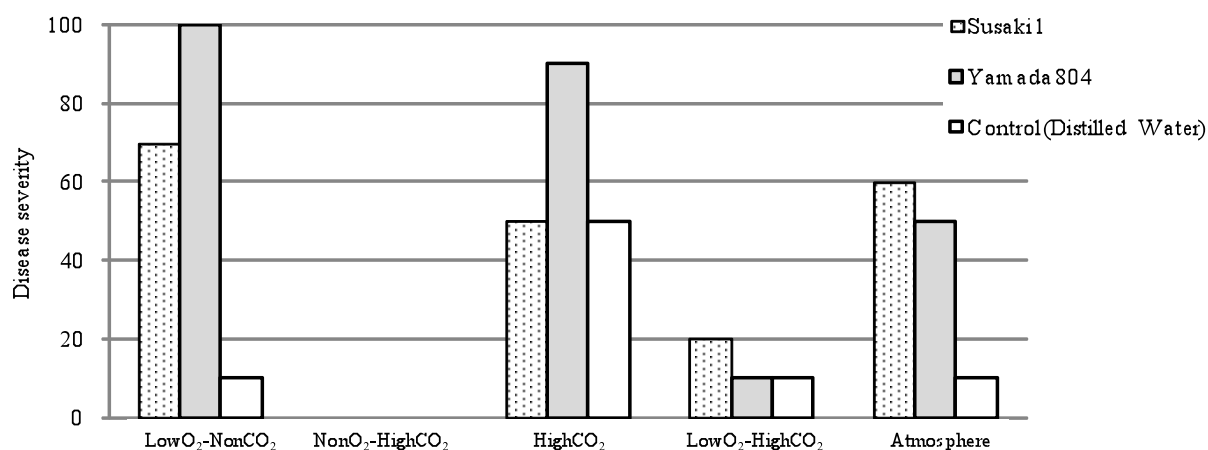


Figure 15. Effect of gas concentration on the development of black lesions on okra pods following inoculation with conidial suspensions

Disease severity was investigated on 3 days after inoculation and calculated by the following formula:

$$\Sigma (\text{disease index} \times \text{number of okra pods}) / (\text{total number of okra pods} \times 2) \times 100.$$

The disease index (0-2) was determined by the area of black lesions on the surface of okra pods (0, no symptoms; 1, less than 50%; 2, over 50%).

2. 培養濾液の接種

試験方法

Susaki 1 菌株，Yamada 804 菌株，Yamada 811 菌株の培養濾液をさく果へ噴霧した後，Table 29 に示したガス環境に調整したチャンバー内に入れ，20℃の暗黒条件下に静置した。なお，菌を培養していない Richards 氏培地(無培養培地)を噴霧したさく果を対照とした。試験は 1 回行い，各処理につき，さく果は 5 果を供試した。4 日後に黒斑の発生状況を調査した。調査方法は同章第 2 節第 3 項 1.分生子の接種に準じた。また，チャンバー開封時に異臭の発生の有無を臭覚により判定した。

試験結果

NonO₂-HighCO₂ 条件下で黒斑症状が全く発生せず，LowO₂-HighCO₂ 条件下で黒斑の発生が抑制された (Fig. 16)．しかし，その一方で NonO₂-HighCO₂ 条件下ではさく果に異臭の発生が認められた．

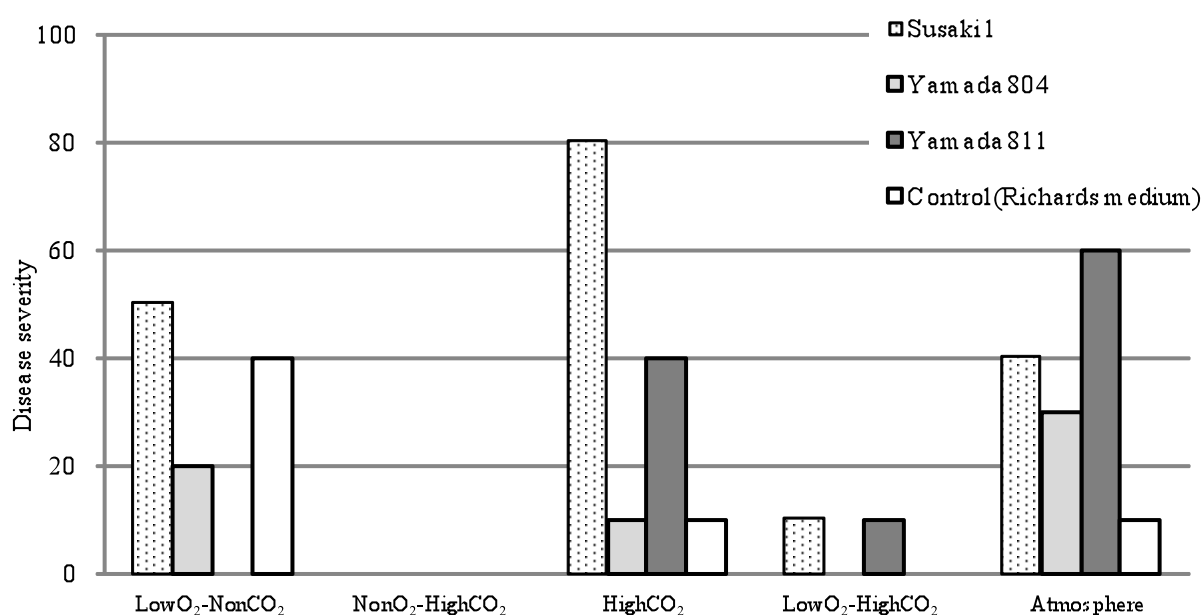


Figure 16. Effect of gas concentration on the development of black lesions on okra pods following inoculation with metabolic products

Disease severity was investigated on 4 days after inoculation and calculated by the following formula:

$$\Sigma (\text{disease index} \times \text{number of okra pods}) / (\text{total number of okra pods} \times 2) \times 100.$$

The disease index (0–2) was determined by the area of black lesions on the surface of okra pods

(0, no symptoms; 1, less than 50%; 2, over 50%).

第 4 項 . 考 察

Couey and Wells (1970)は，*Botrytis* 属，*Rhizopus* 属による輸送中のイチゴへの障害は，環境ガス濃度を低酸素もしくは高二酸化炭素条件下に保つことで抑制されると報告している．そこで，本病原菌に対する環境ガス濃度の影響を調査した結果，本病原菌の分生子発芽と菌糸の生育は，無酸素 (NonO₂) 条件下で著し

く抑制されることが明らかとなった。また、 HighCO_2 条件は菌糸伸長をある程度抑制するが、分生子発芽には影響を及ぼさないことが明らかとなった。一方、分生子懸濁液を噴霧したさく果の黒斑症状の発生は、 $\text{NonO}_2\text{-HighCO}_2$ 条件下で顕著に抑制され、次いで $\text{LowO}_2\text{-HighCO}_2$ 条件下で抑制された。 $\text{NonO}_2\text{-HighCO}_2$ 条件は病原菌の分生子発芽や菌糸伸長を強く抑制したことから、この条件ではさく果表面に付着した病原菌の活動が強く抑制され、黒斑症状が生じなかった可能性があると考えられた。一方、 $\text{LowO}_2\text{-HighCO}_2$ 条件が病原菌の生育に及ぼす影響は、 HighCO_2 条件とほぼ同じであったにもかかわらず、両条件での黒斑症状の発生程度は明らかに異なり、 HighCO_2 条件では黒斑症状は抑制されなかった。さらに、培養濾液を噴霧したさく果も、分生子懸濁液を噴霧した場合と同様で、 $\text{NonO}_2\text{-HighCO}_2$ 条件下で顕著に抑制され、 $\text{LowO}_2\text{-HighCO}_2$ 条件下でも抑制されたが、 HighCO_2 条件下ではほとんど抑制されなかった。これらのことから、環境ガス濃度の違いによる黒斑症状の発生程度の違いには、病原菌の生育に加え、オクラさく果の反応が大きく影響している可能性が示唆された。しかし、最も黒斑症状の発生を抑制した $\text{NonO}_2\text{-HighCO}_2$ 条件では、さく果に異臭が発生した。Dan et al. (1997)は、嫌気条件下で貯蔵したブロッコリーから発生した異臭の構成物質はエタノール、アセトアルデヒド、メタンチオール、ジメチルジスルフィドで、このうち異臭の主要な原因は硫黄化合物のメタンチオール、ジメチルジスルフィドであり、こ

これらの揮発性物質は，嫌気条件下における植物体の生態膜の機能低下に伴う局在性の破壊によって酵素と基質が接触して生成されると考察している．よって，嫌気条件となっている NonO₂-HighCO₂ 条件下では，オクラのさく果にも同様の現象が生じたため異臭が発生した可能性が考えられる．

以上の結果から，NonO₂-HighCO₂ 条件は，果実黒斑病を顕著に抑制するが，さく果の保管には不適當であり，ガス環境制御による果実黒斑病の発生抑制は困難であると考えられた．

第 4 節．湿度と結露の影響

本節以降，さく果への果実黒斑病菌の接種は行わず，自然感染による発病を調査した．

第 1 項．黒斑症状の発生に及ぼす湿度の影響

試験方法

湿度処理として高湿区，中湿区，低湿区の 3 区を設定した．処理時の温度は室温とし，各区 30 果ずつを，高湿区 (High humidity) はさく果を濡れたティッシュペーパーと一緒にポリエチレン袋に入れて密封した．中湿区 (Medium humidity) は相対湿度を 90% (以下，90% RH と表記) に設定したインキュベーター内に，低湿区 (Low humidity) は湿度調整しないインキュベーター内に，さく果をトレイ上に並べて静置した．いずれの処理も 20℃，暗黒条件下で 7 日間貯蔵した．さく果周辺の湿度を温湿度カードロガー (CHINO 社製，本体；MR6662，センサー；

MR9202, 以下同型を使用)で15分おきに測定した。また, さく果表面の黒斑の発生面積率(%)を1日後から7日後まで調査した。

試験結果

貯蔵中のさく果周辺の湿度は, 高湿度区は全期間100% RHで推移した。中湿度区は50~90% RHで変動し平均湿度は86% RH, 低湿度区は43~98% RHで変動し平均湿度は78% RHであった(Table 30)。

発病面積率は, 高湿度区では1日後から高く, 7日後には32%となったのに対して, 中湿度区では14%, 低湿度区では12%と低かった(Fig. 17)。

Table 30. Relative humidity of preservation time ^{a)}			
Treatment	Humidity (%RH)		
	Mean	Maximum	Minimum
High humidity	100	100	100
Medium humidity	86	90	50
Low humidity	78	98	43

a) We recorded relative humidity around okra pods every 15 minutes

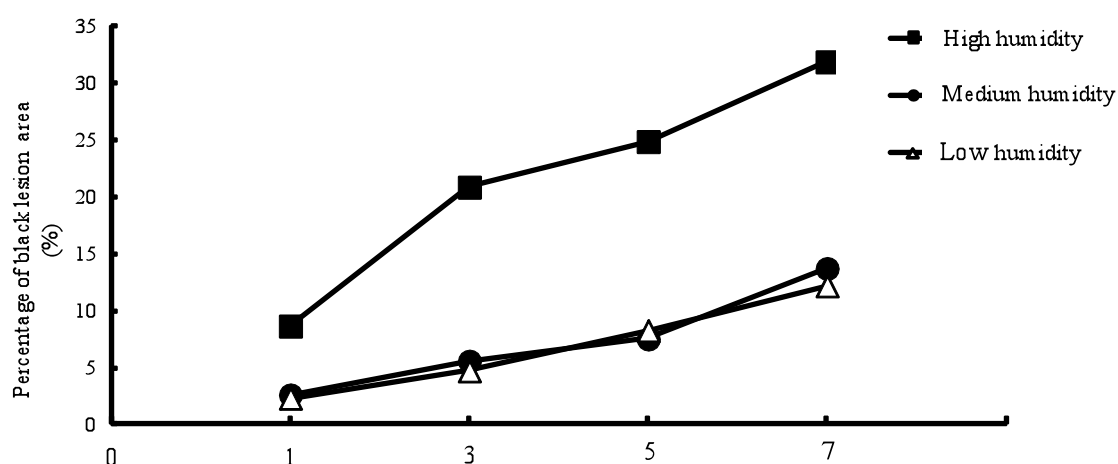


Figure 17. Effect of preservation humidity on the development of black lesions on okra pods

第 2 項 . 黒 斑 症 状 の 発 生 に 及 ぼ す 結 露 の 影 響

1. 結 露 回 数 が 黒 斑 の 発 生 に 及 ぼ す 影 響

試 験 方 法

結露回数を変えた 1 回結露区, 2 回結露区, 3 回結露区および無処理区を設定し, 各区 30 果を供試した. 結露処理は以下の方法で行った. すなわち, 10 果ずつネット詰めし, 段ボール箱に入れて暗黒の室温下で貯蔵したさく果を 7℃ のインキュベーターに 30 分間入れて品温を低下させた後, 加湿器で加湿して庫内を 100% RH とした 30℃ のインキュベーターに 20 分間置いた. 処理後は達観でさく果表面の結露を確認した後, 室温に戻した. 1 回結露区は貯蔵 2 日後に処理し, 2 回結露区は 2 日後および 3 日後に処理した. 3 回結露区は 1 日後から 3 日後まで毎日 1 回ずつ処理した. 無処理区は常時室温 (17.1~23.8℃) で貯蔵した. 4 日後にさく果表面の黒斑の発生面積率 (%) を調査した.

試 験 結 果

発病面積率は, 無処理区の 2.9% に比べて 1 回結露区で 7.6%, 2 回結露区で 7.2%, 3 回結露区では 8.3% と結露処理ではいずれも高かったが, 結露回数による差は認められなかった (Fig. 18).

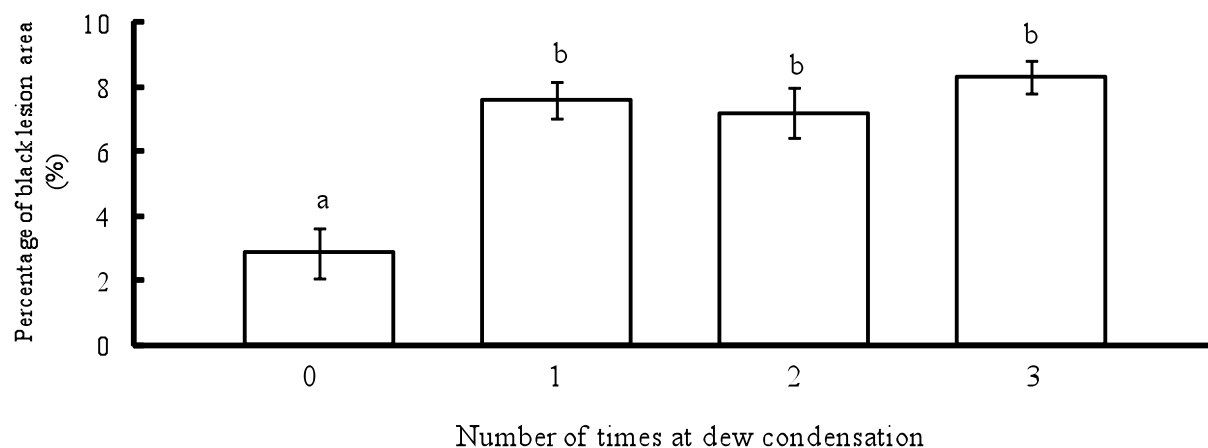


Figure 18. Effect of the number of times at dew condensation on the development of black lesions on okra pods

Means followed by the same letter are not significantly different by Steel-Dwass test ($\alpha = 0.01$, $n = 30$)
 Vertical bar indicates standard error of the mean.

2. 結露の時期が黒斑の発生に及ぼす影響

試験方法

結露処理法および処理後の管理は，同節第2項1. 結露回数が黒斑の発生に及ぼす影響の試験に準じ，1日後結露区は貯蔵1日後に，2日後結露区は2日後に，3日後結露区は3日後に各1回結露処理した．対照として無処理区を設け，各区30果を供試した．4日後にさく果表面の黒斑の発生面積率(%)を調査した．

試験結果

発病面積率は，無処理区の4.6%に比べて1日後区で8.8%，2日後区では10.1%と高かったが，3日後区では5.3%と無処理と同等であった (Fig. 19).

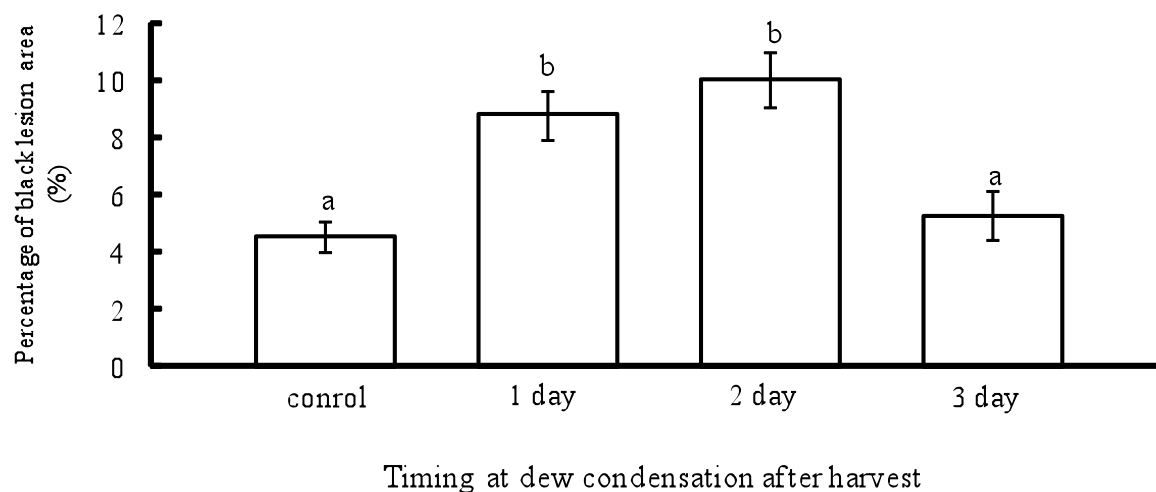


Figure 19. Effect of the timing at dew condensation after harvest on the development of black lesions on okra pods
Means followed by the same letter are not significantly different by Steel-Dwass test ($\alpha = 0.01$, $n = 30$)
Vertical bar indicates standard error of the mean.

第 3 項 . 考 察

貯蔵中の湿度条件を検討した結果， 20°C では $100\% \text{RH}$ で発病が助長されるが， $50 \sim 90\% \text{RH}$ (平均湿度 $86\% \text{RH}$)では抑制された．発病を助長する湿度と抑制する湿度の境界となる条件は本試験からは明らかとはならなかったが，野菜用の予冷库は乾燥による鮮度低下を抑制するために高湿度になるように設計されているものが多く，庫内は黒斑病の好適発生条件となっている可能性が考えられる．

また，収穫後のさく果の結露は発病を助長することが明らかとなった．これは，結露によりさく果表面に水分が付着して病原菌の生育が助長されたためと考えられた．また，貯蔵中の結露処理を3日後に行うと発病程度は無処理と同等であったのに対し，1日または2日後で発病が助長されたのは，結露時期が

早いほど病原菌の生育が早くから開始され，活動時間が長くなって症状を進行させたものと推察された．一方，結露回数が1回から3回処理のいずれも無処理に比べて発病程度が大きかったのも，1回目の結露から調査までいずれも2日以上経過しており，症状が進行するには十分な時間があったものと考えられた．

第5節．保管温度の影響

第1項．選果場での保管温度の影響

試験方法

2009年9月15日に収穫した露地栽培品を用いて，高知はた農協宿毛出荷場から東京都築地市場(以下，東京市場)までの輸送試験を行った．午前中に出荷場に持ち込まれて室温下に置かれたさく果を午後に10果ずつネット詰めし，翌朝まで10℃，17℃および室温の温度条件下に各区10ネットずつ出荷用のカゴに入れて保管した．室温区は出荷場内の室温下に，10℃区および17℃区は各温度に設定した出荷用予冷库に入れた．翌朝に各処理品を一つのカゴに詰め合わせ，番外品を含めた45ネットを加えて梱包した後，東京市場への通常の流通法で出荷した．すなわち，9月16日の朝に出荷場から20℃に温度調整されたトラックで高知市の園芸流通センターに運搬し，夕方に再び13℃に調整されたトラックで東京市場へ輸送した．9月17日の午後，東京市場に到着して荷下ろしされた後は，翌朝まで平均温度が17.8℃のセリ場に置かれた．

さく果周辺の温湿度はデータロガーで30分おきに測定した。さく果表面の黒斑の発生は，セリ日の3日後に各区任意の50果について調査した。さく果の減量は，荷造り時およびセリ日の3日後にネットごとの重量を測定し，減量率 $((\text{荷造り時の重量} - 3\text{日後の重量}) \div \text{荷造り時の重量} \times 100)$ で示した。

試験結果

荷造りから翌朝までの温度は，室温区は27.0℃から18.3℃まで低下し平均22.5℃，17℃区は19.2℃から13.3℃まで低下し平均17.3℃，10℃区では11.9℃から9.5℃まで低下して平均10.0℃であった(Fig. 20)。また平均湿度は，室温区は平均75.6% RH，17℃区は平均91.1% RH，10℃区では平均91.4% RHであった(Fig. 21)。なお出庫時の気温は18.1℃，湿度は86% RHであった。出荷場から流通センターへの輸送時の温度は17.4℃から19.8℃まで上昇し，到着時には約25℃となった。東京市場までのトラック内では約12～16℃で推移し，市場到着後は徐々に上昇して翌朝のセリ時には20℃程度となった。出荷場から流通センターへの輸送時の湿度は79～86%，東京市場までのトラック内では約92%で推移し，市場到着後から翌朝のセリ時までほぼ84%で推移した。

さく果表面の黒斑発生面積率は10℃区で高かったが，室温区では低く，17℃区はその中間であった(Fig. 22)。一方，さく果の減量率は発病面積率とは逆に，10℃区で低く，室温区で高かった(Fig. 23)。

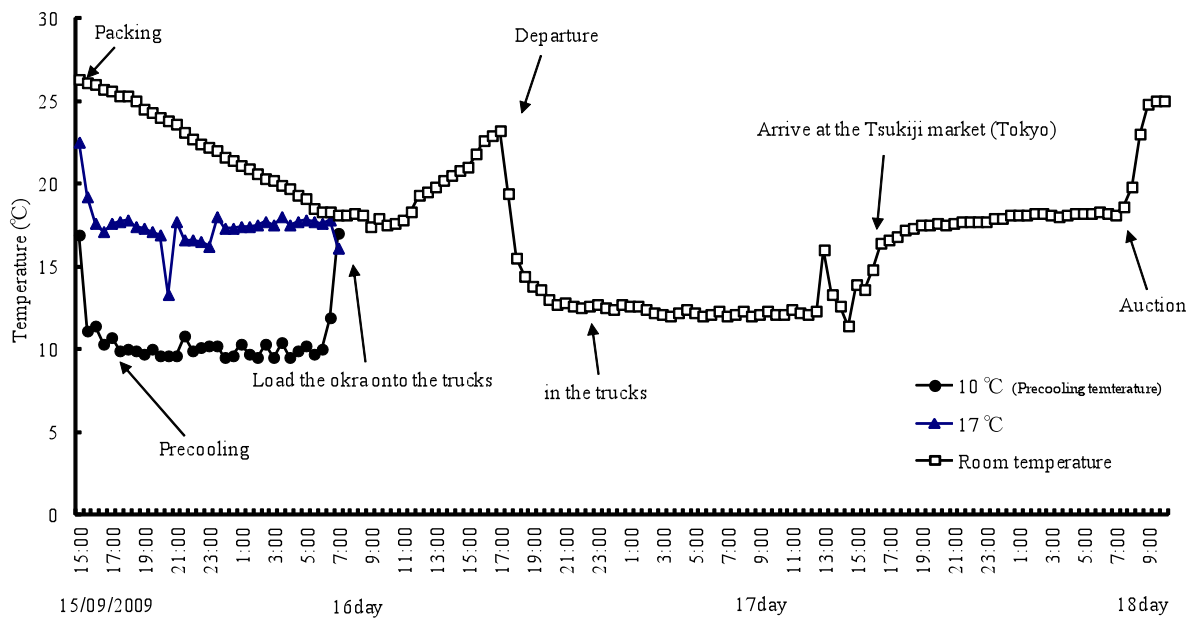


Figure 20. Temperature during transportation from Sukumo city, Kochi prefecture to Tokyo

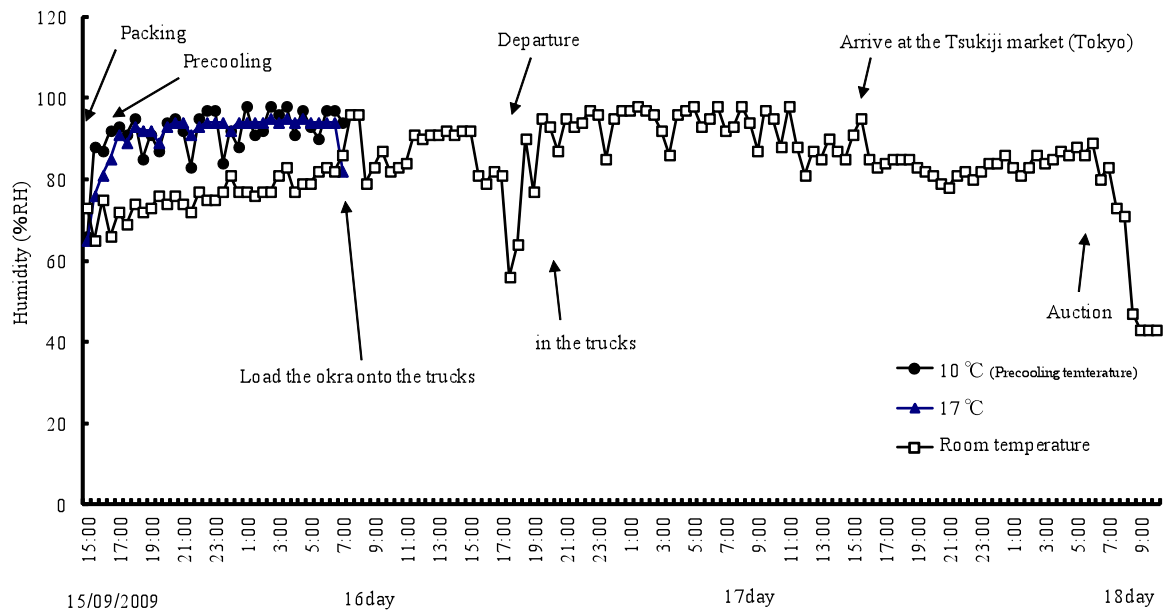


Figure 21. Humidity during transportation from Sukumo city, Kochi prefecture to Tokyo

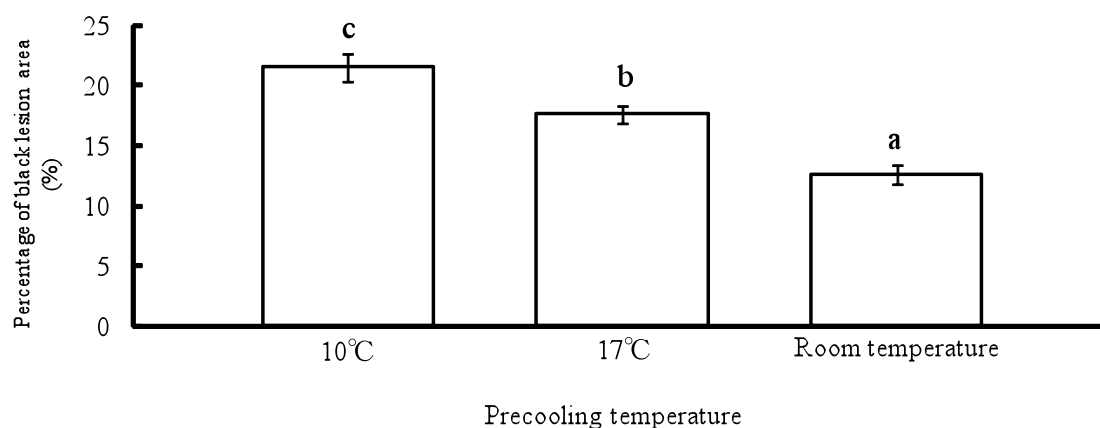


Figure 22. Effect of the precooling temperature on the development of black lesions on okra pods

Means followed by the same letter are not significantly different by Steel-Dwass test ($\alpha = 0.01$, $n = 30$)
Vertical bar indicates standard error of the mean.

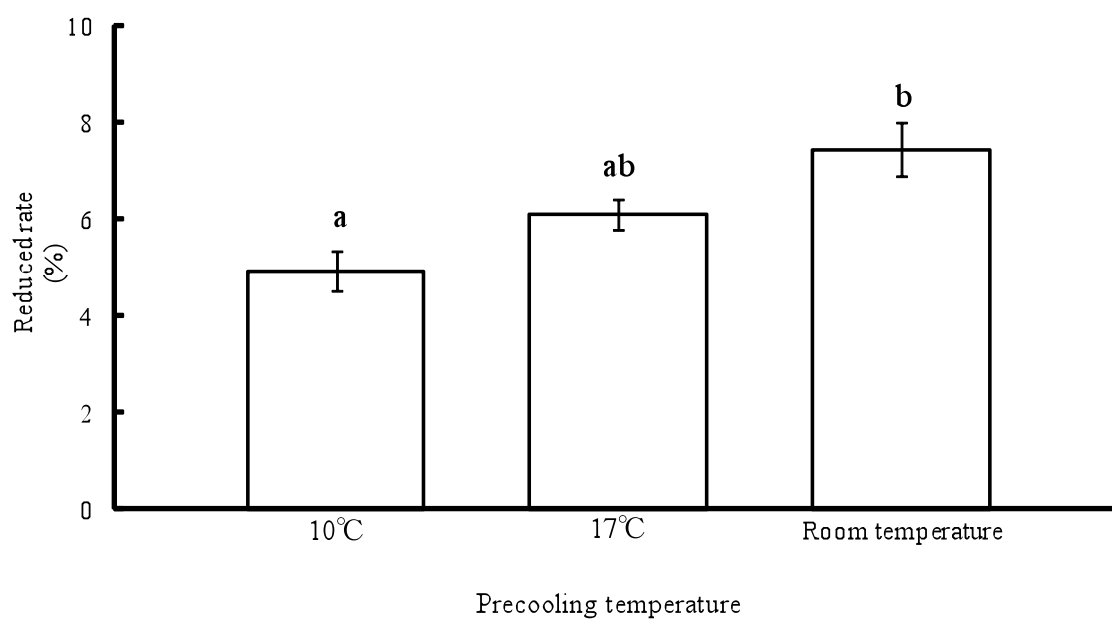


Figure 23. Effect of the precooling temperature on the weight loss of okra pods

Means followed by the same letter are not significantly different by Steel-Dwass test ($\alpha = 0.01$, $n = 50$)
Vertical bar indicates standard error of the mean.

第 2 項 . 考 察

高知県からのオクラの流通では，予冷库の入出庫や温度管理

した輸送トラックの積み降ろしなどで急激な温度変化に遭遇した場合に果実の結露が起きていると考えられる．高知県では選果場から出荷される際には複数の園芸品目を混載することが多く，輸送以降はオクラに最適な温湿度管理は困難である．そこで，輸送試験において荷造り後から翌日の出荷までの保管法を検討した結果，9月の東京市場への輸送試験では，セリ時の発病は10℃で多く，室温では少ないという結果が得られた．本試験では荷造り時の選果場内の温度は約28℃，湿度約60％であり，この時の露点温度は19.5℃であることから，10℃の予冷库内へオクラを入れた際に結露したものと考えられた．果実黒斑病菌の分生子は10℃でも発芽率が高いことから，予冷库内では果実表面に付着した病原菌の分生子が十分に発芽したものと推察される．さらに，翌朝の出庫時の外気は温度約18℃，湿度86％であり，この場合の露点温度は15℃程度であることから，この際にも結露が発生し，その後のセリまでの平均温度が16.6℃と病原菌の菌糸の伸長が可能な温度域であったことから症状が進行したものと考えられた．これに対して室温保管では，翌朝までの果実周辺の湿度は最高83％RH，平均76％RHの比較的低く推移したことに加えて結露もなかったため，病原菌の活動が抑制されたものと考えられた．これまで高知県内の選果場におけるオクラの保管温度は10℃～16℃が一般的であったが，これらの比較的低温条件下での保管が出荷行程の比較的初期の段階で結露を誘発し，市場での発病に影響を及ぼしていた可能性が考えられた．一方，オクラの鮮度に着目すると保管温度が高いほ

ど減量が著しくなっていて鮮度が低下した．このため，発病を抑制しつつ鮮度を保持するためには，露点温度以上のなるべく低い温度で保管することが適当と考えられた．

第 6 節． 総 合 考 察

オクラ果実黒斑病菌の培養濾液をさく果に噴霧したところ，多数の黒斑症状が発生し，オクラの黒斑症状は果実黒斑病菌の分泌物によって誘導されることが明らかになった．Tanaka (1933)は，オクラ果実黒斑病菌と同じ *A. alternata* であるナシ黒斑病菌の培養濾液には，菌糸伸長の際に生じた分泌物が含まれており，この物質が宿主に壊死斑を形成させると報告していることから，果実黒斑病菌の培養濾液にもオクラのさく果表面に壊死斑を形成させる物質が含まれている可能性が示唆された．

温度の影響試験の結果から，収穫後のさく果を 15℃ 以下の低温で保管することで，果実黒斑病の発生を抑制できることが明らかとなった．病原菌の生育も低温ほど抑制される傾向であったが，オクラは 6℃ 以下で保管すると，さく果に低温障害が現れることが明らかにされていることから（鈴木・岡林，2001），保管にあたっては厳密な温度管理が必要である．

ガス環境の影響試験の結果から，果実黒斑病菌は NonO₂-HighCO₂ 状態では生育できず，果実黒斑病も発生しないことがわかった．さらに，果実黒斑病菌の代謝物質による黒斑の発生も抑制された．しかし，無酸素状態ではさく果から

異臭が生じるため，保管には不適當であり，ガス環境制御による果実黒斑病の発生抑制は困難であると考えられた．

貯蔵中の湿度および結露条件を検討した結果，黒斑症状は高湿度(100% RH)で発生が助長され，収穫2日以内にさく果表面に1回以上結露が生じると，発生程度が高くなることが明らかとなった．高知県の選果場で使用されている予冷库は鮮度保持のために高湿度に設定されており，庫内湿度が90% RHを超える予冷库が多いため，予冷库にオクラを保管する場合には，除湿器の導入などによって庫内湿度を低下させるなど，さく果の結露を回避させるための対策を講じる必要があると考えられた．

選果場での保管条件を調査した結果，10℃保管区のさく果は，さく果表面の温度と外気温との急激な差により表面に結露が生じた可能性が考えられた．さらに，翌朝の出庫時の際にも，さく果と外気温との間に急激な温度差が生じ，結露が発生したと推察され，これらのことが黒斑症状の発生を助長したと推察された．一方，室温保管では結露が生じなかったため，黒斑症状の発生が抑制されたと考えられた．

以上のことから，現在の高知県の輸送体系では一貫した低温管理は困難であり，一時的に低温保管すると，逆にさく果表面の結露を誘導し，発病を助長することがわかった．一方，室温での保管は低温保管と比較して減量率が高く，鮮度保持の点では低温保管が望ましいことが確認された．

よって，発病を抑制しつつ鮮度を保持するためには，6℃以上

の露点に達しない低温条件で保管し，輸送することが望ましいと考えられた．

高知県の生産者の間では，さく果への果実黒斑病菌の感染を防ぐために，収穫用コンテナを洗浄する，またはコンテナ底部に敷くシートをこまめに交換するなど，収穫や運搬に用いる器具を清潔に保つ取り組みが行われており，発病の抑制に有効と考えられている．これらに併せて流通時の適正な温湿度管理に取り組むことは，果実黒斑病の発生をさらに減少させ，生産現場での果実黒斑病感染予防の取り組みとの相乗効果が期待される．

第 7 章 . 総 合 考 察

2011 年の高知県の農業産出額は 958 億円で、このうち野菜は 540 億円 (56.4%)、花きは 68 億円 (7.1%)となっている (農林水産省統計部 2012)。このように、高知県の農業産出額に占める野菜産出額の割合は高い比率を占め、野菜園芸は本県農業の基幹となっている。野菜産出額のうち、産出額の多い野菜を品目別にみると、4 位にミョウガ、6 位にピーマン、7 位にシシトウガラシ、11 位にオクラが位置していることから、これらの野菜は経済的にも重要な品目である。一方、高知県の農業産出額の 7.1%を占める花きでは、収益性の高い園芸農業を目指した高品質花き生産や、新品目の導入、オリジナル品種の振興によるブランド化の取り組みの一環として、ルリトウワタの産地化が進められている。

高知県の重要な品目であるピーマン、シシトウガラシ、ミョウガおよびルリトウワタに発生した原因不明の障害による収量の減少と、収穫後のオクラに発生した果実黒斑病による外観品質の低下に伴う経済的な損出は甚大であった。そこで、本研究では、トウガラシ類に発生した葉枯れ症状、ミョウガの花蕾に発生した軟腐症状およびルリトウワタに発生した立枯れ症状の原因の解明および防除等に関する研究、ならびにオクラ果実黒斑病の発生に影響を及ぼす収穫後の環境要因の解明に関する研究を行った。

近年、病虫害防除に対する取り組みは、従来の徹底防除から様々な管理を組み合わせることによる管理・抑制へと転換しつ

つある。2005年3月に閣議決定された新たな「食糧・農業・農村基本計画」では、「環境保全を重視した施策の展開」を図ることが改革に当たっての基本的視点として位置づけられ、我が国の農業生産全体の在り方を、環境保全を重視したものに転換することを推進し、農業生産活動に伴う環境への負荷の低減を図ることとされた。安定した農業生産を実現するためには、病虫害を適切に防除し、農作物被害を防止することは不可欠である。このため、従来から病虫害による被害を抑えるための手段を総合的に講じ、人の健康へのリスクと環境への負荷を軽減するための概念として、総合的病虫害管理(Integrated Pest Management : IPM)が国際的に提唱され、我が国においてもIPMに向けた取り組みが行われてきた。具体的には、第一に輪作体系、抵抗性品種の導入、種子消毒の実施、土着天敵の利用、伝染源植物の除去、化学農薬、フェロモン剤などによる「予防的措置」、第二に発生予察情報の活用、圃場状況の観察による防除時期および手段等の「判断」、第三として生物的防除(天敵等)、物理的防除(粘着板等)、化学的防除(化学農薬)等の多様な防除手段を組み合わせた「防除」の三点を組み合わせた取り組みを行うことである。IPMは、経済性を考慮しつつ、適切な防除手段を総合的に講じるものであるが、その際、病虫害の発生に応じて、化学農薬等の使用を含む多様な防除手段の中から最も適当なものを選択して、適切に講じることが求められる。病虫害の発生状況に対応した最適な防除手段には、経済的に受け入れ可能なコストにより、安全で消費者に信頼される農作物の安定

した生産を確保できるという生産者側のメリットがある。高知県内の果菜類生産者の間では、アザミウマ類、コナジラミ類などの害虫を対象とした防虫ネット等による物理的防除、土着天敵を活用した生物的防除および天敵に影響の少ない殺虫剤による化学的防除を組み合わせた IPM への取り組みが既に行われていることから、IPM の概念は生産者および農業関係者に浸透しており、その必要性は概ね理解されていると考えられる。また、最近では GAP 手法 (Good Agricultural Practice) の導入が推進されている。GAP 手法とは、生産者自らが、(1)農作業の点検項目を決定し、(2)点検項目に従い農作業を行い、(3)記録を点検・評価し、改善点を見出し、(4)次回の作付けに活用するという一連の「農業生産工程の管理手法」を体系化することによって、消費者に信頼される農作物生産を行おうとするもので、高知県の農業生産者へもこの考え方の導入が推進されている。しかし、害虫防除への取り組みについてはこれらの概念が進んでいるものの、病害防除については、生産者自身の圃場において、「病原菌は何か」、「いつ頃感染するのか」、「どのような環境で発生しやすいか」、「どうして毎年発生するのか」といった病原菌に関する認識が少ないことが多々ある。本来であれば、病害の同定「診断」やその発生生態が明らかにできなければ、防除のポイントが定まらないまま化学農薬に依存した農業生産を続けざるを得ないことになる。そこで、本研究では病害の同定だけでなく、有効な防除方法等を明らかにし、防除のポイントを総合的に評価した。この「総合評価」こそが、IPM および

GAP 推進の基礎にあるべきと考える。

葉枯れ症状を呈したトウガラシ類から分離された細菌は、コッホの原則を満たすことから本病の病原であることが確認できた。また、トウガラシ類分離細菌はグラム陰性、極毛の短桿菌で、グルコースを酸化的に分解し、黄緑蛍光色素を産生する植物病原細菌であったため、*Pseudomonas*属菌と考えられた。トウガラシ類に自然状態で発生する細菌病のうち、*Pseudomonas*属菌による病害の報告はなく、本報告が国内外で初めてであった。自然状態でトウガラシ類の葉に病徴が現れる病害に、

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*による斑点細菌病(農業生物資源ジーンバンク 1997)があるが、本病の病斑は斑点細菌病の病斑と比較して大きくなる傾向が見られ、病斑中央部が白変しないなど、症状が異なった。一方、細菌学的性質においても、*X. campestris* pv. *vesicatoria*はNA培地上で黄色のコロニーを形成し、黄緑蛍光色素を産生せず、オキシダーゼ活性は陰性、スクロースから酸を産生する(Nishiyama 1978)のに対し、トウガラシ類分離細菌はNA培地上で白色のコロニーを形成し、黄緑蛍光色素を産生し、オキシダーゼ活性は陽性、スクロースから酸を産生しないことから、病徴と性質において、斑点細菌病と区別できた。

トウガラシ類分離細菌の細菌学的性質を調査したところ、トウガラシ類分離細菌は対照として供試した*P. cichorii*および既報の*P. cichorii*の細菌学的性質と合致する点が多かった

(Tominaga et al. 1977 ; Kwarabayashi and Suyama 1990 ;

Shirakawa and Hagiwara 2000 ; Kanehashi et al. 2006 ; Suenaga et

al. 2007). さらに， トウガラシ類分離細菌の16S rRNA領域の塩基配列は， 最尤法(ML法)を用いた分子系統解析によっても， 既報の *P. cichorii* および *P. cichorii* の Type strain (LMG 2162^T; Z76658) と同一のクレードに位置したことから， 細菌学的性質による同定を裏付ける結果が得られたため， トウガラシ類分離細菌を *P. cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 と同定した．

以上の結果から， 高知県内の露地栽培トウガラシ類に発生していた葉枯れ症は， *P. cichorii* による細菌病害であることを明らかにし， 病名を「トウガラシ類葉枯細菌病： bacterial leaf blight of sweet pepper」と命名した．

葉枯細菌病菌の最適増殖温度は30℃付近であり， 発病においては初期には25～29℃で病勢の進展が早い， 後期は15～19℃でより早く進むことが明らかとなった． 以上の結果は葉枯細菌病菌の生育適温と病勢の進展最適温度は異なることを示唆している． 山口(2002)は， ナスすすかび病菌の菌糸伸長適温は25℃， 発病は18℃で旺盛であり， 病原菌の生育適温よりも発病適温の方が低かったと報告している． 山口(2002)はさらに， ナスは高温性の作物であり， 生育適温は22～30℃前後で， 17℃以下では生育が鈍るため， すすかび病はナスの体質が弱まる低温域で発病し， その後進展しやすいものと考察している． このように， 宿主と病原菌は異なるが， トウガラシ類と葉枯細菌病菌の間にも， 類似した現象が生じたと考えられる． トウガラシ類はナス科作物に属し， ナス科の中でも特に高温を要求する植物であることから(加除式農業技術大系 1974)， 15～19℃の温度条件では

宿主が衰弱した状態であり，葉枯細菌病に対する抵抗力も弱まったために，より病斑が拡大したと考えられ，温度は葉枯細菌病菌の増殖だけでなく，トウガラシ類の葉枯細菌病菌に対する抵抗力などに影響したのではないかと推察した．

葉枯細菌病は30℃以上の温度条件下で発病後期の病勢の進展が最も遅かった．高知県内の施設栽培トウガラシ類の栽培圃場では，冬期はビニルハウスを三重張りし，夜温20℃以上の設定で加温している圃場が多く，ハウス内の気温は厳寒期でも日中は30℃近くになることから，本県の施設栽培トウガラシ類で葉枯細菌病の発生が確認されないのは，高温条件下で病勢の進展が抑制され，実際には罹っているものの発生が目立たないために発見されないと推察した．葉枯細菌病菌と同種の *P. cichorii* によるレタス腐敗病においては，降雨，多湿状態が好適発生条件となっている（田部井ら 1991b）．このことから，施設栽培で発生が少ない原因として，降雨による葉面の濡れが生じにくく，葉枯細菌病菌にとっても生育が困難な環境となっていることが考えられた．

葉枯細菌病に対する感受性の品種間差は接種菌株によって異なり，判然としないものが多かったが，ピーマン品種‘さらら’は最も発病程度が低かった．それに比べ，シシトウガラシ各品種は高い傾向であった．

葉枯細菌病の殺菌剤による防除に対しては，銅水和剤および銅を含む混合剤が効果的であり，病原菌感染の前後いずれの散布でも効果があることが明らかとなった．ただし，殺菌剤の散

布により生じた植物体表面の濡れが長時間持続されると，発病が増加する可能性が考えられるため，散布のタイミングは曇雨天日を避け，晴天日に行うことにより，植物体をできるだけ早く乾燥させることが，葉枯細菌病の発生低減につながると考えられる．

以上の結果から，降雨の影響がある露地圃場において，栽培期間中に長時間多湿かつ 20℃ 以下の低温条件にされされる地域では，感受性の高い品種の栽培を避けることが望ましい．特に葉枯細菌病が多発する圃場では‘さらら’のような比較的発病の少ない品種を選定していくことも，防除手段の一つとして有効と考える．さらに，葉枯細菌病が多発する入梅前のタイミングで，予防を目的とした銅水和剤および銅を含む混合剤の散布を行うことも効果的と考えられ，入梅後に発病が確認された場合は，速やかに銅水和剤および銅を含む混合剤の散布を行うことが望ましい．ただし，殺菌剤の散布により生じた植物体表面の濡れが長時間持続されると，発病が助長される可能性が考えられるため，植物体表面ができるだけ早く乾くよう，散布は晴天日に合わせて行うことで，発生が低減されると推察した．

本研究により得られた知見から，トウガラシ類葉枯細菌病の IPM による防除モデルを作成し，Table 31 に示した．

Table 31. トウガラシ類葉枯細菌病のIPMによる防除モデル(中山間地域露地圃場)

栽培管理		播種、育苗	定植	生育中	収穫		栽培終了	
時期		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月
天候		低温期		梅雨期間 (葉枯細菌病多発期間)		梅雨明け	高温期	
気温		夜温20℃以下		夜温20℃以上				
ステップ1 葉枯細菌病の 発生しにくい環境を整備	備考	圃場規模に応じた適正な 栽植密度で定植する。 (栽植密度が高いと、圃場内が多湿 になりやすく、隣接した株が密着 することにより、感染が拡大しや すくなる。)		罹病葉、枝などを摘葉、整枝した場合は、 圃場内に放置せず圃場外に持ち出す。				
	葉枯細菌病が発生しなければ、 防除は不要。 圃場内外の衛生管理は適切に行 う。	多発圃場では、発病程度の 少ない品種・さちらなどを選 択する。 健全苗の育成に取り組む。 (過度の灌水を避けるなど、多湿に ならないよう注意する。)						
ステップ2 発生状況を把握し、 防除が必要であるか 判断する	葉枯細菌病の発生が確認された 場合、どの程度発生しているか を確認することは、防除手段を 選択するうえで重要。	中山間地域では、育苗期は低温期と重なり、好適感 染条件となっている可能性があるため、早期発見が 重要。 発病が見られた場合は、発生の規模から防除手段の 選択を行う。		梅雨時期は、中山間地域 の露地圃場内の夜温は 20℃以下かつ多湿条件と なり、葉枯細菌病の好適 感染条件が整っていると 考えられ、発病の確認に 細心の注意を払う。		梅雨明け以降の高温期は、葉枯細菌病の 発生が少なくなると予想されるが、冷夏 の年は多発する可能性がある。 現在の発生状況を確認しながら、前年や 近隣圃場での発生状況を考慮に入れ、防 除の必要性を判断する。		
ステップ3 最適な防除方法を選択する	葉枯細菌病の発生が確認された 場合、発生密度に応じて最も有 効と考えられる防除法を選 択し、実行する。 間違った方法を選択すると防除 効果が上がらない可能性がある ため、選択には注意を要する。	発病が見られた場合、発生密度および発生株が少な ければ、罹病葉の摘葉または罹病株を廃棄し、育苗 床での感染拡大を防ぐ。 発生状況に応じて、銅および銅を含む殺菌剤による 防除を行う。 発病苗は定植に用いない。		入梅前に銅および銅を含む 殺菌剤の予防散布を行 うことが望ましい。 葉の濡れ時間を短縮する ために、薬剤散布は晴天日 に実施する		発病が見られた場合、低密度であれば、 罹病葉を除去し、その後の発生を観察す る。 発生密度が高い場合や罹病葉を除去して も発生の拡大が見られた場合は、銅およ び銅を含む殺菌剤の散布を行う。 葉の濡れ時間を短縮する為に、薬剤散布 は晴天日に実施する。		

高知県内の施設栽培ミョウガおよび貯蔵中のミョウガで軟腐症状を呈した花蕾から分離された細菌は，コッホの原則を満たすことから本病の病原であることが確認できた．また，ミョウガ分離細菌は細菌学的性質において，グラム陰性，発酵性，硝酸塩の還元，レシチナーゼ活性，ゼラチンの液化，アセトインの産生，36℃の生育，ジャガイモの腐敗は陽性，メチルレッド試験は陰性を示し，デキストリンからの酸の産生では菌株による差異が認められたが，その他の炭水化物からの酸の産生では，対照として供試した *E. chrysanthemi* および既報の *E.*

chrysanthemi の性質と合致する点が多かった (Burkholder et al. 1953; Mizuno et al. 1993; Thomson et al. 1981)．さらに，ミョウガ分離細菌の 16S rRNA 領域の塩基配列は，最尤法 (ML 法) を用いた分子系統解析によっても，既報の *E. chrysanthemi* および *E. chrysanthemi* の Type strain と同一のクレードに位置し，細菌学的性質による同定を裏付ける結果が得られたため，分離細菌を *E. chrysanthemi* Burkholder, McFadden and Dimock 1953 と同定した．

Burkholder et al. (1953) は，キクに Bacterial blight を引き起こす病原細菌 6 菌株と，セルリーとオオベンケイソウの病原細菌として報告されていた *E. carotovora* と，グアユールゴムの病原細菌として報告されていた *E. carotovora* f. sp. *parthenii* の細菌学的性質を比較したところ，キク，セルリー，オオベンケイソウおよびグアユールゴムから分離された細菌は，ラクトースからの酸の産生が他の *E. carotovora* より遅いこと，アセトインの産生が陽性であること，メチルレッド試験，5% 耐塩性が陰性

であることなど細菌学的性質が *E. carotovora* と異なる項目があったことから，これらを *E. carotovora* から独立させ，新たに *E. chrysanthemi* とすることを提唱した．ミョウガ分離細菌も，ラクトースからは14日目と比較的遅くに酸の産生がみられ，アセトインの産生が陽性，メチルレッド試験，5%耐塩性が陰性であることなど細菌学的性質が Burkholder et al. (1953)の報告と一致した．Dickey (1979)は，*E. chrysanthemi* は13の細菌学的性質から5つの subdivision に類別されると報告した．さらに，Dickey and Victoria (1980)はそれらと異なる新たな性質を示す菌株を認め，subdivision VI とした．この類別法に供試細菌の性質を当てはめると，ミョウガ分離細菌は subdivision IV に類別された．さらに，Samson et al. (1990)は，8つの細菌学的性質から9つの biovar に類別されると報告している．この類別法に供試細菌の性質を当てはめると，ミョウガ分離細菌は biovar 3 に類別された．

Samson et al. (2005)は，*E. chrysanthemi* は，6種から構成される *Dickeya* 属に含まれるとしており，ミョウガ分離細菌をこの分類に照合すると *Dickeya chrysanthemi* となる．しかし，現在のところ *E. chrysanthemi* は *Dickeya* 属よりも *Erwinia* 属として周知されていると思われることから，本病原細菌の学名は *E. chrysanthemi* として報告した．

以上の結果から，高知県内の施設栽培ミョウガおよび貯蔵中のミョウガに発生していた軟腐性の障害は，*E. chrysanthemi* の Subdivision IV, Biovar 3による細菌病害であることを明らかと

し、「ミ ヨ ウ ガ 軟 腐 病 : bacterial soft rot of myoga」と命名した。

軟腐病はミ ヨ ウ ガの花蕾に生じた付傷部から感染し、傷がなければ感染する可能性は低いと考えられた。しかし、収穫作業では摘蕾するため、花蕾を付傷させないことは不可能である。また、軟腐病菌はミ ヨ ウ ガ花蕾の付傷から6時間後でも感染することから、収穫作業時だけでなく選別や出荷作業時にも健全花蕾が軟腐病菌に感染する可能性が考えられる。

よって、圃場で罹病の可能性のある花蕾を発見した場合は速やかに除去することにより、圃場内での感染拡大を防ぎ、収穫時には罹病花蕾が収穫コンテナに混入しないよう努め、収穫以降の作業で花蕾に余計な傷をつけないこと、花蕾に触れる手を清潔に保つこと、収穫用のコンテナなども定期的に洗浄または消毒することが望ましいと考えられた。

軟腐病の好適発病温度を調査したところ、発病適温は25～35℃であることが明らかとなった。軟腐病の圃場での発生が7～8月に増加する原因として、この時期は栽培期間の中でもハウス内気温が比較的高温になるため、生育中のミ ヨ ウ ガ付近の気温が発病の好適温度条件となっており、発病が助長されている可能性が考えられた。

一方、軟腐病は10℃以下の低温条件下で発病が抑制されることが明らかとなった。本試験で軟腐病菌を接種したミ ヨ ウ ガ花蕾は、接種後直ちに10℃以下で保管すると、7日後の調査で全く発病が見られず、その後25℃に2日間静置しても、20℃以上の保管区よりも発病が有意に少なかった。

ミョウガの鮮度保持のためには低温保管が望ましく，保管適温は0℃付近とされている(大久保 1982)．よって，ミョウガの鮮度保持のためだけでなく，軟腐病の抑制のためにも10℃以下の低温で保管することが望ましい．

以上の結果から，本病害の発生低減のためには，収穫作業時に生じた花蕾の付傷部が病原細菌と接触しないように努め，収穫以降は花蕾に余計な傷をつけず，速やかに10℃以下で保管することが軟腐病の発生低減につながると考えられた．

本研究により得られた知見からミョウガ軟腐病のIPMによる防除モデルを作成し，Table 32に示した．

Table 32. ミヨウガ軟腐病のIPMによる防除対策モデル

時期	栽培期	収穫作業	選別	集出荷	予冷	発送
ステップ1 軟腐病の発生および伝染しにくい環境を整備	花蕾に余計な傷をつけない。 花蕾に触れる手やコンテナはこまめに洗浄するなど可能な限り清潔にし、感染の拡大を防ぐ。					
	発病花蕾に触れた手や器具で、健全花蕾に触れない。 発病花蕾は圃場内に放置せず、圃場外へ持ち出す。		10℃以下のできる限り低温で保管する。			
	圃場規模に応じた適正な栽植密度で定植する。 (栽植密度が高いと、隣接した花蕾間で感染が拡大しやすくなる)	感染の疑いがある花蕾の収穫は避け、収穫コンテナに感染株が混入することを防ぐ。				
	ステップ2 発生状況を把握する	発病花蕾の早期発見に努める。				
ステップ3 最適な防除方法を選択する	罹病花蕾は早期に除去し、圃場内での感染拡大を防ぐ。 野菜類の軟腐病に登録がある銅および銅を含む殺菌剤は、本病害にも効果があると考えられるため、前年度軟腐病が多発した圃場では予防散布を行い、発生圃場では罹病花蕾の除去後に散布すれば防除効果が期待される。		罹病花蕾は早期に除去し、収穫後から流通までの感染拡大を防ぐ。			

高知県内の施設栽培ルリトウワタに発生していた立枯れ性の生育障害株では，無隔壁の菌糸および *Phytophthora* 属菌のものと思われる遊走子のうや卵胞子，厚壁胞子が観察された．障害部からは，PDA 平板培地上で気中菌糸を豊富に産生する菌と，ほとんど作らない菌の 2 種が分離された．そこで，それぞれのグループの菌について単菌糸分離を行い，気中菌糸を豊富に産生するグループから分離した菌を PP1-1 菌株，気中菌糸をほとんど作らないグループから得られた菌を PP3 菌株とし，それぞれをルリトウワタに接種したところ，いずれもコッホの原則を満たしたことから本病の病原であることが確認できた．PP1-1, PP3 菌株について形態的特徴を観察したところ，PP1-1 菌株の菌糸は無隔壁で膨潤せず，豊富な気中菌糸を形成した．厚壁胞子を形成し，形成様式はシンポジオ型，遊走子のうは脱落性があり，乳頭突起は顕著で，卵～球形，楕円，ときに倒洋梨形であった．一方，PP3 菌株の菌糸は無隔壁で膨潤せず，気中菌糸はほとんど形成しなかった．厚壁胞子を形成し，形成様式はシンポジオ型，遊走子のうは脱落性があり，乳頭突起は顕著で，卵～楕円，倒洋梨形であった．両菌株とも単独では有性器官を形成しなかったが，PP1-1 菌株と PP3 菌株を対峙培養すると有性器官を形成した．造精器は造卵器に底着し，卵胞子は造卵器内で充満しなかった．以上の結果を Stamps (1985) や Erwin and Ribeiro (1996b) の記載と比較すると，PP1-1 菌株と PP3 菌株は，ともに *P. palmivora* と合致する点が多かった．PP1-1 菌株と PP3 菌株は，菌叢の形態，遊走子のうの形態および各器官の大きさ

に違いがみられたが，宿主を同じくする *P. palmivora* の培養性状に菌株間で差がみられることは少なくないことから (Brasier and Griffin 1979)，分離された PP1-1 菌株と PP3 菌株を *P. palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler と同定した．さらに，PP1-1 菌株，PP3 菌株の rDNA 領域 (ITS1, 5.8S, ITS2) の塩基配列 (約 800bp) は，DDBJ に登録されている *P. palmivora* の rDNA 領域の塩基配列との類似度が 100% であったことから，形態による同定を裏付ける結果が得られた．

以上の結果から，高知県内の施設栽培ルリトウワタに発生していた立枯れ性の障害は，*P. palmivora* による病害であることを明らかとし，病名を「ルリトウワタ疫病：Phytophthora blight of southern star」と命名した．

ルリトウワタ疫病菌は，本研究により改変した捕捉法によって土壌からの検出が可能で，圃場における疫病菌汚染状況の評価が可能となった．本法は，捕捉に用いるルリトウワタまたはリンゴと選択培地があれば調査が可能であるため，生産者や JA，農業振興センターなどで利用可能である．捕捉法を用いた定植前のモニタリング調査は疫病の発生予察に利用できると考えられた．

ルリトウワタ疫病に対して効果的な殺菌剤とその処理方法は，シモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤，またはマンゼブ・メタラキシル M 水和剤の各 3 L/m² 以上量の 3 回株元灌注処理であることを明らかとし，効果的な土壌消毒法は，ダゾメット粉粒剤を用いた土壌消毒と，高温期に実施する

フスマおよびエタノールによる土壌還元消毒であることを明らかにした。

以上の結果から，ルリトウワタ生産現場での疫病防除の対策として，土壌消毒前に捕捉法による疫病菌の検出によって本病原菌の分布状況を確認し，ダゾメット粉粒剤を用いた土壌消毒または，フスマおよびエタノールを用いた土壌還元消毒を効果的な条件下で行うことにより，土壌中の疫病菌の菌密度を低下させ，栽培期間中に疫病が発生した場合はシモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤，またはマンゼブ・メタラキシルM水和剤の各 3 L/m^2 以上量の3回株元灌注処理を行うことが効果的であると考えている。

ただし，これらの体系防除を普及させるためには，現在花き類またはルリトウワタの疫病に対して農薬登録が無いダゾメット粉粒剤，シモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤およびマンゼブ・メタラキシルM水和剤について，早期の適用登録が望まれる。

本研究により得られた知見からルリトウワタ疫病のIPMによる防除モデルを作成し，Table 33に示した。

Table 33. ルリトウワタ疫病のIPMによる防除対策モデル

栽培管理		前年度作栽培終了	土壌消毒	耕耘	畝立て	定植	生育期	収穫期～栽培終了
ステップ1 疫病の発生しにくい環境を整備	備考		選択した土壌消毒法が最も効果的に表れる圃場環境を整える。 ダゾメット粉粒剤 ⁹⁾ ：殺菌成分のMITCが土壌中で十分拡散されるよう、処理前に一度耕耘し、大きな土塊は崩しておく。土壌水分含量についても確認する(22%が良い：土を握ると、塊ができるがすぐに崩れる程度が目安)。処理後は隙間のないよう被覆する。 フスマまたはエタノールによる土壌還元消毒：圃場全体が十分に灌水されるよう、処理前に耕耘し、圃場を均しておく。還元反応が促進されるために、隙間なく被覆する。 太陽熱利用土壌消毒処理：太陽光に面する表面積をできるだけ多く確保するため、高うねにする。疫病菌の死滅温度まで地温を上昇させるために、3週間以上被覆する。 (高知県病害虫および雑草防除改善協議会 2012, 2013)			圃場規模に応じた適正な栽植密度で定植する(栽植密度が高いと、圃場内が多湿になりやすく、株間が隣接することにより、感染が拡大しやすくなる)。 灌漑水などは病原菌を運んでくる可能性があるため、灌水には利用しない。		
	ステップ2 発生状況を把握し、防除が必要であるか判断する	前年度作で発生した罹病株は、次年度作の感染源となりうるため、栽培終了時に疫病の発生状況を把握する。			捕捉法による疫病菌の検出を行う。	現在の疫病の発生状況を確認しながら、前年や近隣圃場での発生状況を考慮に入れ、防除の必要性を判断する。		
ステップ3 最適な防除方法を選択する		疫病の発生を確認した場合、どの程度発生しているかを確認すること、は、防除手段を選択するうえで重要。	前年度作で発生した罹病株は、次年度作の感染源となりうるため、栽培終了時に疫病の発生状況を把握する。	処理時期(気温、天候)を考慮し、最も適当と考えられる土壌消毒法を下記より選択して実施する。 通年：ダゾメット粉粒剤 ⁹⁾ 地温30℃以上となる時期：フスマまたはエタノールによる土壌還元消毒 梅雨明け以降の晴天が続く高温期：太陽熱利用土壌消毒処理	捕捉法により疫病菌が検出された場合は、定植時にメタラキシル粒剤を処理する。	感染株は早期除去し、圃場外へ持ち出す(根まで完全に除去したほうが良い)。 発生密度が高い場合は、シモキサニル・ペンチアアバ ⁹⁾ カルブアイソプロピル水和剤 ⁹⁾ またはマンゼブ・メタラキシルM水和剤 ⁹⁾ を3L/m ² 灌注する。		

a, b, c) 現在ルリトウワタまたは花き類の疫病に対して農薬登録がない。

オクラ果実黒斑病の発生に影響を及ぼす収穫後の環境要因を調査したところ、オクラの黒斑症状は果実黒斑病菌の分泌物によって誘導されることが明らかとなった。

果実黒斑病に対する温度の影響試験の結果から、収穫後のさく果を 15℃ 以下の低温で保管することで、果実黒斑病の発生を抑制できることが明らかとなった。果実黒斑病菌の生育も低温ほど抑制される傾向であったが、オクラは 6℃ 以下で保管すると、さく果に低温障害が現れることが明らかにされていることから（鈴木・岡林 2001）、保管にあたっては厳密な温度管理が必要である。

ガス環境の影響試験の結果から、果実黒斑病菌は NonO₂-HighCO₂(O₂:0%, CO₂:20%)状態では生育できず、果実黒斑病も発生しないことがわかった。さらに、果実黒斑病菌の代謝物質による黒斑の発生も抑制された。しかし、無酸素状態ではさく果から異臭が生じるため、保管には不適當であり、ガス環境制御による果実黒斑病の発生抑制は困難であると考えられた。

貯蔵中の湿度および結露条件を検討した結果、黒斑症状は 100% RH で発生が助長され、86% RH 以下で黒斑の発生が抑制されることが明らかとなった。収穫 2 日以内にさく果表面に 1 回以上結露が生じると、発生程度が高くなることが明らかとなった。高知県の選果場で使用されている予冷库は鮮度保持のために高湿度に設定されている場合が多いため、予冷库にオクラを保管する場合には、さく果の結露を回避させるための

対策を講じる必要がある．

選果場での保管条件を調査した結果，10℃保管区のさく果は，さく果の品温と外気温との急激な差により表面に結露が生じた可能性が考えられた．さらに，翌朝の出庫時の際にも，さく果の品温と外気温との間に急激な温度差が生じ，結露が発生したと推察され，これらのことが黒斑症状の発生を助長したと推察された．一方，室温保管では結露が生じなかったため，黒斑症状の発生が抑制されたと考えられた．

以上のことから，現在の高知県の輸送体系では一貫した低温管理は困難であり，一時的に低温保管すると，逆にさく果表面の結露を誘導し，発病を助長することがわかった．一方，室温での保管は低温保管と比較して減量率が高く，鮮度保持の点では低温保管が望ましいことが確認された．従って，発病を抑制しつつ鮮度を保持するためには，低温障害が生じない6℃以上かつ露点に達しない低温条件で保管し，輸送することが望ましいと考えられ，流通時の適正な温湿度管理に取り組むことは，果実黒斑病の発生リスクを減少させると考えられた．

本研究により得られた知見からオクラ果実黒斑病の収穫後の防除モデルを作成し，Table 34に示した．

Table 34. オクラ果実黒斑病の収穫後の防除対策モデル

管理	果実黒斑病対策	オクラの鮮度保持	本研究の結果	高知県で可能な対応
温度	15℃以下で抑制	6℃以上(鈴木・岡林 2001) 10℃が適当(大久保 1982)	ガス濃度の調整により，果実黒斑病の抑制とオクラの鮮度を同時に保つことは困難.	高知県の輸送体系では，一貫した低温管理は困難.
ガス濃度	O ₂ :0%; CO ₂ :20%条件下で抑制	無酸素条件下で保管すると，さく果に異臭が生じて品質が損なわれる.	オクラさく果の保管は，外気湿度85%RH，外気温，さく果の品温共に10℃に保つことが望ましい. (外気湿度が85%RHであれば，外気温と品温が10℃でさく果表面に結露を生じない.)	一時的に低温保管すると，トラックへの積み込みや出荷時に，外気温とオクラさく果の品温に急激な差が生じ，さく果表面の結露が誘導され，発病が助長される可能性がある.
湿度	86%RH以下で抑制	85～90%RHが適当 (大久保 1982)		
結露	収穫後2日以内に1回以上結露させない	結露させない (大久保 1982)		さく果は露点に達しない低温条件下で保管し，輸送することが望ましい.

以上，本研究で得られた知見から，トウガラシ類葉枯細菌病，ミョウガ軟腐病，ルリトウワタ疫病および収穫後のオクラ果実黒斑病の防除のポイントについて総合的に評価した．農業指導者は，これらの総合評価によっていくつかの防除ポイントを費用対効果も含めて示し，生産者はその内容について自ら十分理解した上で取り組める技術を選択，実践することが望ましいと考える．高知県のピーマン，シシトウガラシ，ミョウガ，オクラ，ルリトウワタ生産者において，総合評価に基づいたIPMおよびGAPの導入を進めていくことは，高品質安定生産に貢献されと考えている．

引用文献

- 安達理恵・矢野和孝・植松清次・竹内繁治 (2009) *Phytophthora palmivora*によるルリトウワタ(ブルースター, *Tweedia caerulea* D. Don (= *Oxypetalum caeruleum* D. Don)) 疫病 (新称). 日植病報 75: 72 (講要)
- 安達理恵・矢野和孝・森田泰彰 (2012) *Ralstonia solanacearum*によるルリトウワタ(ブルースター, *Oxypetalum caeruleum*) 青枯病(新称)の発生. 日植病報 78:56 (講要)
- Brasier CM, Griffin MJ (1979) Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. Trans Br Mycol Soc 72:111-143
- Burkholder WH, McFadden LA, Dimock AW (1953) A bacterial blight of chrysanthemums. Phytopathology 43:522-526
- 忠英一・小笠原博幸 (2010) モモせん孔細菌病の秋季防除における銅水和剤の効果検証. 東北農業研究 63:123-124
- Couey HM and Wells JM (1970) Low-oxygen or high-carbon dioxide atmospheres to control postharvest decay of strawberries. Phytopathology 60: 47-49
- Dan K, Todoriki S, Nagata M, Yamashita I (1997) Formation of volatile sulfur compounds in Broccoli stored under anaerobic condition. J Japan Soc Hort Sci 65(4):867-875
- Dickey RS (1979) *Erwinia chrysanthemi*: a comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. Phytopathology 69:324-329
- Dickey RS, Victoria JI (1980) Taxonomy and emended description of strains of *Erwinia* isolated from *Musa paradisiaca* Linnaeus.

Int J Syst Bacteriol 30:129-134

Erwin DC, Ribeiro OK (1996a) *Phytophthora* Diseases Worldwide.

APS Press, St. Paul, MN, APS Press, pp. 28-29, 39-41.

Erwin DC, Ribeiro OK (1996b) *Phytophthora* Diseases Worldwide.

APS Press, St. Paul, MN, pp. 415-416

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an

approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791

Ferrin DM, Mitchell DJ (1986) Influence of Initial Density and

Distribution of Inoculum on the Epidemiology of Tobacco Black

Shank. *Phytopathology*. 76: 1153-1158

古田明子・山口純一郎 (2006) イチゴ苗立枯症防除技術の確立

佐賀県研究技術情報資料 33:100-104

甲把 (安達) 理恵・森田泰彰 (2012) ミヨウガ軟腐病 (仮称) の

発生. 四国植防 46:10 (講要)

Goto M, Takikawa Y (1984a) Methods for identification of plant

pathogenic bacteria (1) (in Japanese). *Shokubutsu Boueki*

[Plant Prot] 38:339-344

Goto M, Takikawa Y (1984b) Methods for identification of plant

pathogenic bacteria (2) (in Japanese). *Shokubutsu Boueki*

[Plant Prot] 38:385-389

Goto M, Takikawa Y (1984c) Methods for identification of plant

pathogenic bacteria (3) (in Japanese). *Shokubutsu Boueki*

[Plant Prot] 38:432-437

Goto M, Takikawa Y (1984d) Methods for identification of plant

pathogenic bacteria (4) (in Japanese). *Shokubutsu Boueki*

[Plant Prot] 38:479-484

秦谷敏之・齊藤美奈子・角野晶大・阿部秀夫・土屋貞夫 (2001)

カスガマイシン・銅水和剤によるアズキ褐斑細菌病の防除．

北日本病虫研報 52:30-33

家村浩海・土屋行夫 (1989) ガーベラ斑点細菌病病原細菌の細菌

学的性質と発病に及ぼす温度の影響．関西病虫研報

31:7-10

石原誠・秋庭満輝・佐橋憲生・津田城栄・小河誠司 (2006) カシ・

ナラ類枝枯細菌病に対する有効薬剤の探索．九州森林研究

59:94-96

加除式農業技術大系 (1997) 花卉編 5. 農山漁村文化協会．東京．

330 の 1 の 54-58

加除式農業技術大系 (1974) 野菜編 5. 農山漁村文化協会．東京．

ピーマン 基 6 の 2, 基 37(第 5 表), 基 39 トウガラシ類 基

13

Kanehashi K, Ebihara Y, Uematsu S, Negishi H, Matsuyama N,

Suyama K (2006) Bacterial black spot of basil caused by

Pseudomonas cichorii (Swingle 1925) Stapp 1928, newly found

in Japan (in Japanese with English summary). J Agric Sci Tokyo

Univ Agric 51:14-20

加藤喜重郎・廣田耕作・中神喜郎 (1974) ピーマン疫病に対す

る薬剤の防除効果と使用法について．愛知農総試験報

B6:12-18

加藤光弘・太田光樹・伏見典晃 (2003) 静岡県におけるモモセ

- ん孔細菌病の発生実態と薬剤防除体系．静岡柑試研報
32:7-14
- 桂琦一（1968）土壌から疫病菌を捕え分離する方法．関西病虫
研報 10:101-103
- Kawarabayashi S, Suyama K (1990) Bacterial blight of gerbera
caused by *Pseudomonas cichorii* newly found in Japan (in
Japanese with English summary). J Agric Sci Tokyo Univ Agric
34:194-201
- 小原裕三・佐藤充克・坂本勝己・上別府史郎・佐藤理恵子・阿
部倉博通・植松清次・三平東作・三輪千華（2007）特許
4436426号
- 国土交通省気象庁（2013）気象統計情報，平年値（年・月ごとの
値）
- 国土地理院（2012）全国都道府県市区町村別面積調
- 高知県病虫害および雑草防除改善協議会（2012）平成23年度
病虫害専門部会成績書．JA全農こうち．pp. 4-11
- 高知県病虫害および雑草防除改善協議会（2013）平成24年度
病虫害専門部会成績書．JA全農こうち．pp. 9-17
- 高知県病虫害防除所（2013）平成24年度農作物有害動植物発
生予察事業年報．高知県．高知．pp. 165-166
- 高知県農業振興部（2013a）高知県の園芸．高知県農業振興部．
高知．p. 5
- 高知県農業振興部（2013b）高知県の園芸．高知県農業振興部．
高知．p. 16

高知県農業振興部(2013c) 高知県の園芸. 高知県農業振興部.
高知. pp. 27-30

Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ,
Dymock D, Wade WG (1998) Design and evaluation of useful
bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for
bacterial 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 64:795-799

Mizuno A, Nakanishi T, Nishiyama K (1993) Bacterial wilt of
yacon strawberry caused by *Erwinia chrysanthemi* (in Japanese
with English abstract). Ann Phytopathol Soc Japan 59:702-708

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

Morita Y, Takeuchi S, Kawada Y (2004) Occurrence of bacterial
leaf blight of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) caused by
Pseudomonas cichorii (Abstract in Japanese). Jpn J Phytopathol
70:76

森田泰彰・川田洋一・竹内繁治 (2006) 臭化メチル代替くん蒸
剤による数種土壌病害の防除. 高知農技セ研報 15:1-10

向畠博行 (2008) 土壌伝染性病害のダイズ茎疫病およびリゾク
トニア根腐病の発生生態と防除. 植物防疫 62: 465-471

Nishiyama K (1978) Simplified identification for plant
pathogenic bacteria (in Japanese). Shokubutsu Boueki [Plant
Prot] 32:283-288

農業生物資源ジーンバンク(1997) 日本植物病名データベース

農林水産省生産局 (2013a) 地域特産野菜の生産状況 (野菜生産状況表式調査結果), 平成22年産, 3-1 野菜の品目別, 都道府県別生産状況 作物面積収穫量等, オクラ.

農林水産省生産局 (2013b) 地域特産野菜の生産状況 (野菜生産状況表式調査結果), 平成22年産, 3-1 野菜の品目別, 都道府県別生産状況 作物面積収穫量等, 花みょうが.

農林水産省統計部(2012) 平成23年生産農業所得統計, 都道府県別推計統計表, 3 都道府県別農業産出額及び生産農業所得, 実額.

農林水産省統計部(2013) 平成24年産春野菜, 夏秋野菜等の作付面積, 収穫量及び出荷量, 併載: 平成24年産きゅうり, なす, トマト, ピーマンの年間計.

大久保増太郎 (1982) 野菜の鮮度保持. 養賢堂. 東京. p. 171

Papavizas GC, Bowers JH, Johnston SA (1981) Selective Isolation of *Phytophthora capsici* from Soils. *Phytopathology* 71: 129-133

Samson R, Ngwira N, Rivera N (1990) Biochemical and serological diversity of *Erwinia chrysanthemi*. In: Klement Z (ed) *Proceedings of the 7th international conference on plant pathogenic bacteria*. Budapest, pp. 895-900

Samson R, Legendre JB, Christen R, Saux MF, Achouak W, Garden L (2005) Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiacal* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov.

- and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 55:1415-1427
- 佐藤 衛・築尾 嘉章・松下 陽介 (2012) *Phytophthora citrophthora* によるルリトウワタ疫病(病原追加). 関東病虫研報 59:79-80
- 芹澤 拙夫・井上 一男 (1982a) カンキツかいよう病に関する研究 第5報 低濃度ボルドー液および銅水和剤の散布間隔と防除効果. 静岡柑試研報 18:37-48
- 芹澤 拙夫・井上 一男 (1982b) カンキツかいよう病に関する研究 第7報 低濃度ボルドー液, 銅水和剤とマシン油乳剤, マンゼブ水和剤を混用並びに近接散布した場合の防除効果と薬害. 静岡柑試研報 18:73-83
- 新村 昭憲 (2002) 還元消毒法の原理と効果. 土壌伝染病談話会 レポート 22:2-12
- Shirakawa T, Hagiwara H (2000) Occurrence of bacterial brown spot of bellflower (*Campanula* spp.) caused by *Pseudomonas cichorii* (in Japanese with English summary). Jpn J Phytopathol 66:239-241
- Stamps DJ (1985) *Phytophthora palmivora*. C. M. I. descriptions of pathogenic fungi and bacteria, no. 831. The Cambrian News, Great Britain
- Stirling AM (2002) *Erwinia chrysanthemi*, the cause of soft rot in ginger (*Zingiber officinale*) in Australia. Australas Plant Pathol 31:419-420

Suenaga H, Kawaguchi A, Sasaki S, Inoue K, Nasu H (2007)

Bacterial rot of endive (*Cichorium endivia* L.) caused by

Pseudomonas cichorii (in Japanese with English summary). Jpn

J Phytopathol 73:172-174

鈴木 芳孝・岡林 秀典 (2001) 市場病害オクラ黒斑病の発生に及ぼす収穫後の温湿度および環境ガス条件の影響. 高知農技セ研報 10:21-26

鈴木 芳孝・永田 雅靖・今堀 義洋・上田 悦範 (2004) ニラの呼吸と品質に及ぼす低酸素, 高二酸化炭素およびエチレンの影響. 日食保蔵誌 30:173-177

鈴木 芳孝・今堀 義洋・上田 悦範 (2005) パーシャルシール包装による葉ネギの鮮度保持技術. 日食保蔵誌 31:25-29

田部井 英夫・高梨 和雄・高橋 幸吉・西山 幸司 (1991a) 作物の細菌病－診断と防除－. 日本植物防疫協会 東京 p. 74

田部井 英夫・高梨 和雄・高橋 幸吉・西山 幸司 (1991b) 作物の細菌病－診断と防除－. 日本植物防疫協会 東京 p. 239

Takeuchi T, Kodama F (1992) Bacterial stalk rot of corn caused by *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* (Sabet) Victoria, Arboleda et Muñoz occurred in Hokkaido, Japan (in Japanese with English abstract). Annu Rep Soc Plant Prot North Japan 43:42-44

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739

Tanaka S (1933) Studies on black spot disease of the Japanese

pear (*Pirus serotina* REHD.). Mem Coll Agr Kyoto Imp Univ 28:
1-31

Thomson SV, Hildebrand DC, Schroth MN (1981) Identification
and nutritional differentiation of the *Erwinia* sugar beet
pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia*
chrysanthemi. Phytopathology 71:1037-1042

遠山明・林邦博・成瀬知詠子・小沢佳子・獅山慈孝・津田盛也
(1992a) *Alternaria alternata* によるオクラの果実黒斑病(新
称)1 病原菌と発生条件. 日植病報 58:132 (講要)

遠山明・林邦博・獅山慈孝・津田盛也(1992b) *Alternaria alternata*
によるオクラの果実黒斑病(新称)2. 莢の保菌経路. 日植病報
58:132 (講要)

遠山明・早川佳子(1993) オクラ果実黒斑病防除の試み. 日植病
報 59:281-282 (講要)

遠山明・早川佳子・井上雪絵(1995) オクラ果実黒斑病の生物防
除の試み. 滋賀県立短期大学学術雑誌 48:7-15

Tohyama A, Hayashi K, Taniguchi N, Naruse C, Ozawa Y,
Shishiyama J, Tsuda M (1995a) A new post-harvest disease of
Okra pods caused by *Alternaria alternata*. Ann Phytopathol Soc
Japan 61:340-345

Tohyama A, Hayashi K, Taniguchi N, Tsuda M (1995b) Infection
sources and causal agents of *Alternaria* rot of Okra pods. Ann
Phytopathol Soc Japan 61:346-349

Tominaga T, Nishiyama K, Yamamoto T (1977) Necrotic leaf spot
of egg plant caused by *Pseudomonas cichorii* (in Japanese with

- English summary). Jpn J Phytopathol 43:569-574
- Tominaga T, Ogasawara K (1979) Bacterial stem rot of potato caused by *Erwinia chrysanthemi* (in Japanese with English summary). Ann Phytopathol Soc Japan 45:474-477
- Tsuchiya Y, Ohata K, Shirata A (1980) Pathogenicity of the causal bacteria of head rot of lettuce, *Pseudomonas cichorii*, *P. marginalis*, *P. viridiflava*, to various crop plants (in Japanese with English summary). Bull Natl Inst Agric Sci C 34:51-73
- 塚本 洋 太 郎 (1994) 園 芸 植 物 大 事 典 . 小 学 館 , 東 京 1:399-400
- 植 松 清 次 ・ 田 中 千 華 ・ 鈴 木 健 ・ 築 尾 嘉 章 ・ 佐 藤 衛 (2009) アン
ゲ ロ ニ ア , ハ ナ ト ウ ガ ラ シ , ト レ ニ ア , ニ チ ニ チ ソ ウ , ブ ル
ー ス タ ー お よ び ヒ メ ツ ル ニ チ ニ チ ソ ウ に 発 生 し た 白 絹 病 (新
称) 関 東 病 虫 研 報 56:137(講 要)
- Uematsu T, Tagami M, Takeuchi T, Kato H (1985)
Characterization of the bacterium inciting rice foot rot in Mie
and Chiba prefectures (in Japanese). Annu Rep Kanto Tosan
Plant Prot Soc 32:30-32
- 漆 原 寿 彦 ・ 酒 井 宏 ・ 白 石 俊 昌 (2004) ク ロ ル ピ ク リ ン 錠 剤 お よ
び ダ ゾ メ ッ ト 粉 粒 剤 に よ る 床 土 消 毒 の 効 果 に 及 ぼ す 土 壌 水 分
の 影 響 . 関 東 病 虫 研 報 51: 141-143
- Wang PH, White JG (1997) Molecular characterization of *Pythium*
species based on RFLP analysis of the internal transcribed
spacer region of ribosomal DNA. Physiol Mol Plant Pathol
51:129-143

- 山岸 菜穂・伊藤 陽子・江口 直樹・松下 陽介 (2008) オキシペタ
ラム立枯症状から分離された *Fusarium oxysporum*
Schelechtendahl:Fries. 関東病虫研報 55:190(講要)
- 山口 純一郎 (2002) ナスすすかび病の発生生態と防除に関する
研究. 佐賀農技セ研報 pp. 14-16, p. 43
- 矢野 和孝・川田 洋一・土屋 健一・堀田 光生 (2005) *Ralstonia*
solanacearum によるミョウガ青枯病(新称). 日植病報
71:179-182
- 米本 謙悟・広田 恵介・水口 晶子・坂口 謙二 (2006) 露地におけ
る土壌還元消毒法の利用方法とイチゴ萎黄病に対する効果.
四国植防 41: 15-24
- Zentmyer GA, Gilpatrick JD, Thorn WA (1960) Methods of
isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil and from host
tissue. Phytopathology 50:87

摘 要

高知県の重要な品目であるピーマン、シシトウガラシ、ミョウガおよびルリトウワタに発生した原因不明の障害による収量の減少と、収穫後のオクラに発生した果実黒斑病による外観品質の低下に伴う経済的な損出は甚大であった。そこで、本研究では、トウガラシ類に発生した葉枯れ症状、ミョウガの花蕾に発生した軟腐症状およびルリトウワタに発生した立枯れ症状の原因の解明と防除等に関する研究、ならびに収穫後のオクラ果実黒斑病の発生に影響を及ぼす環境要因に関する研究を行った。

1. トウガラシ類葉枯れ症の原因菌の特定と体系的な防除法の確立

高知県内の露地栽培トウガラシ類に発生していた葉枯れ症は、*Pseudomonas cichorii* による細菌病であることを明らかとし、病名をトウガラシ類葉枯細菌病(英名: Bacterial leaf blight of sweet pepper)と命名した。

葉枯細菌病菌の最適増殖温度は30℃付近であるのに対して、病勢進展は初期には25～29℃付近で最も早く進んだが、後期は15～19℃でより早く進んだ。病原菌の増殖と病勢進展の適温が著しく異なることを明らかにした。

トウガラシ類葉枯細菌病に対する品種間の感受性差異について調査したところ、感受性の品種間差は接種菌株によって異なり、判然としないものが多かったが、ピーマン品種‘さらら’は最も感受性が低かった。一方、シシトウガラシ各品種の感受性

は高い傾向を示した。

トウガラシ類葉枯細菌病に対して，銅水和剤および銅を含む混合剤が効果的であり，病原菌感染の前後であればいずれの時期の散布でも高い防除効果を示すことを明らかにした。

2. ミョウガ軟腐症の原因菌の特定と諸性質

高知県内の施設栽培ミョウガおよび貯蔵中のミョウガに発生した軟腐性の障害は，*Erwinia chrysanthemi* による軟腐病であることを明らかにし，ミョウガ軟腐病(英名：Bacterial soft rot of myoga)と命名した。また，分離細菌は *E. chrysanthemi* の Subdivision IV, Biovar 3 に類別された。

本病害はミョウガの花蕾に生じた付傷部から感染し，付傷から6時間後でも感染することを明らかにした。

本病害の発病適温は25～35℃であることを明らかにするとともに，本病の発病は10℃以下の低温条件下で抑制されることを示し，防除対策の一つとして提案した。

3. ルリトウワタ立枯れ症の原因菌の特定と体系的な防除法の確立

高知県内の施設栽培ルリトウワタに発生していた立枯れ性の生育障害は，*Phytophthora palmivora* による病害であることを突き止め，ルリトウワタ疫病(英名：Phytophthora blight of southern star)と命名した。

ルリトウワタ疫病菌の土壌からの検出に適した改変捕捉法を

開発した．この改変捕捉法は選択培地法より実用的であった．
これにより圃場における疫病菌汚染状況の評価が可能になった．

本病害に対してシモキサニル・ベンチアバリカルブイソプロピル水和剤またはマンゼブ・メタラキシルM水和剤の各 3 L/m^2 の3回株元灌注処理が最も効果的であることを明らかにした．

同様に，本病害に対してダゾメット粉粒剤を用いた土壌消毒と，高温期に実施するフスマおよびエタノールによる土壌還元消毒が高い効果を示すことを明らかにした．ただし，ダゾメット粉粒剤を用いた土壌消毒とフスマを用いた土壌還元消毒の資材コストは約4万円/10aと試算され，実用性は高いと考えられるが，エタノールによる土壌還元消毒はダゾメット粉粒剤やフスマを用いた土壌還元消毒よりもコストがかなり高くなる可能性がある．

4. オクラ果実黒斑病の発生に影響を及ぼす収穫後の環境要因

オクラの黒斑症状は，果実黒斑病菌の分泌物によって誘導されることを明らかにした．

収穫後のさく果での果実黒斑病の発生は， 15°C 以下の低温保管で抑制されることを示し，対策の一つとして提案した．

果実黒斑病菌は $\text{NonO}_2\text{-HighCO}_2$ 状態 ($\text{O}_2:0\%$ ， $\text{CO}_2:20\%$) では生育できず，果実黒斑病を発生しないことと，果実黒斑病菌の代謝物質による黒斑の発生も抑制されることを示した．しか

し，無酸素状態でさく果から異臭が生じたことから無酸素処理は実用的ではないと判断した．

果実黒斑病は高湿度(100% RH)で発生が助長され，収穫2日以内にさく果表面に1回以上結露が生じると，発生程度が高くなることが明らかとなった．さらに，選果場の10℃保管区で結露ができる可能性を考察した．

以上のように，本研究では，トウガラシ類に発生した葉枯れ症状，ミョウガの花蕾に発生した軟腐症状およびルリトウワタに発生した立枯れ症状の原因の解明と防除等に関する研究，ならびに収穫後のオクラ果実黒斑病の発生に影響を及ぼす環境要因を解明し，本研究で得られた知見から，トウガラシ類葉枯細菌病，ミョウガ軟腐病，ルリトウワタ疫病および収穫後のオクラ果実黒斑病の防除のポイントについて総合的に評価して防除対策の一部として提案した．

本論文を構成する論文および口頭発表

1. 本論文を構成する論文

1) 主要論文

- (1) **Gappa-Adachi R**, Yano K, Takeuchi S, Morita Y, Uematsu S (2012) Phytophthora blight of southern star (*Oxypetalum caeruleum*) caused by *Phytophthora palmivora* in Japan. J Gen Plant Pathol 78:39-42
- (2) **Gappa-Adachi R**, Morita Y (2013) Bacterial soft rot of myoga (*Zingiber mioga*) caused by *Erwinia chrysanthemi*. J Gen Plant Pathol 79, 270-276
- (3) **Gappa-Adachi R**, Morita Y, Shimomoto Y, Takeuchi S (2014) Bacterial leaf blight of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) caused by *Pseudomonas cichorii* in Japan. J Gen Plant Pathol 80: (in press)

2) 参考論文

- (1) **安達理恵**・矢野和孝・竹内繁治・森田泰彰 (2010) ルリトウワタ (ブルースター) 疫病に対する殺菌剤の防除効果. 四国植防 45: 27-32
- (2) **安達理恵**・竹内繁治・宮崎清宏・森田泰彰 (2011) オクラ果実黒斑病の発生に及ぼす保存環境要因. 高知農技セ研報 20:19-25
- (3) **甲把(安達)理恵**・宮崎清宏・竹内繁治 (2012) オクラ果実黒斑病の発生に影響を及ぼす収穫後の環境要因. 植物防疫 66:596-603

- (4) 宮崎清宏・政岡由紀・松本久美・安達理恵・鈴木芳孝 (2012)

収穫後の保管条件がオクラ果実黒斑病の発生に及ぼす影響.

高知農技セ研報 21:33-38

- (5) 甲把(安達)理恵・森田泰彰 (2013) トウガラシ類葉枯細菌病の発病に及ぼす温度の影響と品種間の感受性差異. 四国植防 47 (in press)

- (6) 甲把(安達)理恵・森田泰彰 (2013) トウガラシ類葉枯細菌病に対する殺菌剤の防除効果. 四国植防 47 (in press)

- (7) 甲把(安達)理恵・森田泰彰・竹内繁治 (2013) ルリトウワタ(ブルースター)疫病の土壌からの検出. 高知農技セ研報 22:13-20

- (8) 甲把(安達)理恵・森田泰彰 (2013) ルリトウワタ(ブルースター)疫病に対する各種土壌消毒の防除効果. 四国植防 47 (in press)

- (9) 甲把(安達)理恵 (2013) *Phytophthora palmivora*によるルリトウワタ疫病. 植物防疫 67:581-584

2. 本論文を構成する口頭発表

- (1) 安達理恵・矢野和孝・植松清次・竹内繁治 (2009)

*Phytophthora palmivora*によるルリトウワタ(ブルースター,

Tweedia caerulea D. Don (= *Oxypetalum caeruleum* D. Don)) 疫病 (新称).

日植病報 75:72 (講要)

- (2) 安達理恵・矢野和孝・竹内繁治 (2009) ルリトウワタから

分離された *Phytophthora palmivora* の性質と土壌からの検出

法．日植病報 75：185（講要）

- (3) 安達理恵・矢野和孝・森田泰彰（2011）捕捉法によるルリトウワタ疫病菌 (*Phytophthora palmivora*) の土壌からの検出と現地汚染圃場での実用性の評価．日植病報 77：166（講要）
- (4) 安達理恵・矢野和孝・森田泰彰：ブルースター疫病に対する殺菌剤の効果的な施用方法の検討と圃場での効果．四国植防 45:37（講要）
- (5) 甲把（安達）理恵・森田泰彰（2012）ミョウガ軟腐病（仮称）の発生．四国植防 46:10（講要）
- (6) 甲把（安達）理恵・矢野和孝・森田泰彰（2012）ルリトウワタ（ブルースター）疫病に対する各種土壌消毒ならびに殺菌剤の併用効果．四国植防 46:10（講要）