

九州病害虫研究会 第 96 回研究発表会

2018 年 11 月 7 日(水)

会場: 宮崎市民プラザ

4F ギャラリー (病害)

(宮崎市橘通西 1 丁目 1 番 2 号)

講演要旨(病害)

病害 01

○藤堂麻依¹・中原浩貴²・松添直隆^{1,2}

竹の生育年数、発酵および熱処理の有無が異なる竹粉によるトマト青枯病の防除効果

近年、竹の利用が減少し、放置された竹林が拡大することで問題になっている。本研究室では、竹の農業分野での利活用を進めるため、伐採後に破碎した竹（竹粉）を利用した病害防除法を検討している。本研究では、生育年数の異なる竹（2年生と5年生）、自然発酵の有無、熱処理（オートクレーブ 121℃, 20分）の有無が、トマト青枯病の防除効果に及ぼす影響を調査した。青枯病菌汚染土壌に生育年数、発酵および熱処理の有無が異なる竹粉（計10処理区）を混和し、2週間静置した後にトマト‘ミニキャロル’の2-3葉齢苗を移植し、青枯病の防除効果を調査した。竹の生育年数、発酵の違いで防除効果に明確な差は認められなかったが、熱処理することで青枯病の発病が抑制される傾向を示した。次に、走査型電子顕微鏡を用いて、発酵竹粉と熱処理発酵竹粉を観察したところ、発酵竹粉は竹粉の孔内に竹粉由来の菌が多数存在したが、熱処理後では孔内の菌は少なかった。現在は、熱処理後の竹粉孔内への青枯病菌の吸着が、防除効果の要因として関与しているか調査を進めている。

(¹熊本県大院環境共生・²熊本県大環境共生)

病害 02

○谷 沙世・飯山和弘・土屋健一・古屋成人

各種植物から分離された *Pseudomonas cichorii* における D-酒石酸利用性に関与する遺伝子領域の解析

我々は、これまでに *Pseudomonas cichorii* が 16S rDNA や *hrpW* 遺伝子の塩基配列に基づく解析により、2つのサブクレードに大別されることを明らかにした（谷ら, 2018）。また、サブクレードと細菌学的諸性質との関連性を検討した結果、D-酒石酸利用性の有無との間に相関が認められた。そこで、異なる宿主植物に由来する本種細菌9菌株を用いて系統間の比較ゲノム解析を行い、D-酒石酸利用性に関与する遺伝子群を探索した。その結果、D-酒石酸利用菌株のみがD-酒石酸分解酵素及びその輸送体をコードすると推定される2種の遺伝子を含む5つの遺伝子群を有していた。そこで、分解酵素及び輸送体遺伝子の特異的に検出するプライマーを用いてPCRを行ったところ、サブクレード間の系統識別に有効であることが示された。今後は、各系統におけるD-酒石酸の利用性に関与する遺伝子領域について詳細に解析する予定である。

(九大院農)

病害 03

○高木里歩・草場基章

PIRA-PCR 法によるシトクロム c オキシダーゼ I 遺伝子のタマネギベと病菌特異的一塩基多型の検出

シトクロム c オキシダーゼ I (Cytochrome c oxidase I, 以下, *CoxI*) 遺伝子はツユカビ目の種の DNA バーコードとして利用されている。種に特徴的な多型を示す本遺伝子を標的として、タマネギベと病菌 (*Peronospora destructor*) の検出に利用可能な PIRA-PCR (Primer-introduced restriction analysis-PCR) 法の開発を行ったので報告する。*Peronospora* 属菌 39 種の *CoxI* 遺伝子計 99 配列をアライメントにより比較したところ、247 番目の塩基にタマネギベと病菌特異的な一塩基多型 (C) が観察された。この一塩基多型を *ApaI* 認識サイトで標識するプライマー-PIRACOF, および, PIRACOF のアニーリングサイトを挟むプライマーセット COF/COR を設計した。ベと病罹病および健全タマネギ葉, さらに, タマネギに常在する他菌の DNA を鋳型に COF/COR, および, PIRACOF/COR で順次 PCR 増幅を行った, その結果, ベと病罹病葉のみから PIRACOF-COR 間に対応する 268bp の DNA 断片が増幅され, かつ, この DNA 断片は *ApaI* で切断されることが確認できた。

(佐賀大農)

病害 04

○岡村勇汰・中村正幸・岩井 久

CRISPR/Cas9 システムを用いたサンセベリア炭疽病菌の効率的な遺伝子破壊株の作出

バクテリアの獲得免疫システムである CRISPR/Cas9 は、DNA2 本鎖切断-修復機構を介したゲノム編集ツールとして、近年、動物や植物、昆虫、微生物などで広く利用されている。植物病原糸状菌においても、イネいもち病菌や *Fusarium* 属菌などで既に技術が確立されているが、重要病害を引き起こす種の多い *Colletotrichum* 属においては、未だその報告はない。そこで、本実験では、サンセベリア炭疽病菌(*C. sansevieriae*)を用いた CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊株の作出を試みた。標的遺伝子には、コロニーの色で識別しやすいようにメラニン合成に関わるシタロン脱水酵素遺伝子(*CsScd1*)を用い、破壊ベクターを構築した。ガイド RNA(gRNA)の発現には、本菌の U6 snRNA を推定し、Pol III プロモーターを用いた。Cas9 遺伝子には、糸状菌用にコドン最適化されたものを使用した(Nødvig *et al.* 2015)。その結果、破壊ベクターのみの導入では、破壊株作出の確率が 1.4%であったが、CRISPR/Cas9 ベクターと同時に導入したところ、90%以上の高確率で破壊株を得ることに成功した。

(鹿児島大農)

病害 05

○木口歌菜¹・田中寿樹¹・荒添貴之²・佐久間哲史³・山本 卓³・桑田 茂¹・大里修一¹

イネいもち病菌の相同組換え関連遺伝子破壊株における DNA リセクション反応検出系の構築に向けて

イネいもち病菌の体細胞相同組換えは化学物質や感染に伴うストレスにより促進され、その過程でゲノム不安定化による病原性変異が高頻度で生じると推定される。高等生物の相同組換え初期反応において、DNA 二本鎖切断が導入されると 5'末端の削り込み反応が生じることが知られている。本菌の相同組換え初期過程の特殊性に関して出芽酵母の削り込み反応に関与する RecQ helicase Sgs1 に着目して研究を進めてきた。Sgs1 のホモログである本菌 *MUSN* の破壊株では、DNA 損傷薬剤への感受性および相同組換え能の低下が認められた(平成 29 年糸状菌分子生物学研究会)。*MUSN* 破壊株を用いた削り込み反応の解析を行うにあたり、野生株でメラニン生合成経路に関わる *Scytalone dehydratase (SDH)* を標的とした人工ヌクレアーゼ TALENs を用いて DNA 二本鎖切断を導入した。その結果、9 割以上の白色コロニー株で *SDH* を含む上流および下流領域の大規模な欠損が認められた。そこで、リセクション反応検出系の確立に向け *SDH* とその周辺領域の解析を行っており、その経過を報告する。

(¹ 明治大院農・² 東理大院理工・³ 広島大院理)

病害 06

○佐藤圭・安部磨己斗・田中勝・徳永隼一・菅野善明

湛水および畑作条件土壌中におけるサトイモ疫病菌の密度推移について

2014 年、南九州地域の栽培サトイモに発生した疫病は甚大な被害をもたらした。発生は翌年以降も続いており、各県で様々な防除対策が講じられている。一方、サトイモの湛水栽培により種いもの収量が増加することが報告され、サトイモ栽培の新技术としてその普及が期待されている。本実験では土壌中から疫病菌の定量 PCR 法による検出および湛水・畑作栽培条件の土壌中における疫病菌 *Phytophthora colocasiae* の密度の推移の調査を行った。疫病菌の *gypsy* 様因子配列に設計したプライマーを用いた定量 PCR 法により疫病菌が特異的に検出された。疫病菌を混和した土壌をワグネルポットに入れ、サトイモを植え付け模擬的湛水および畑作条件下で栽培し、経時的に採取した土壌から DNA を調製し定量 PCR 法により疫病菌密度を調査した。その結果、両条件下で菌密度は日数の経過とともに減少し、畑作条件においては 46 日後、湛水条件では 46 日から 60 日後で検出限界以下となり、湛水および畑作条件土壌中における菌密度の推移に大きな差異は認められなかった。

(南九州大環境園芸)

病害 07

○横井信太郎¹・鈴木啓史²・草場基章¹

イネばか苗病菌に高温順化が生じるための培養時間

先に、イネばか苗病菌 (*Fusarium fujikuroi*) を 35℃ で振とう培養すると高温順化が生じ、得られた酵母様胞子 (以下、胞子) は通常培養 (25℃) で得られた胞子よりも熱ストレス処理後の生存数が向上することを報告した。また、この高温順化に必要な 35℃ での振とう培養時間は 24 時間以下であると推定された。そこで、本研究では高温順化が生じる 35℃ での培養時間についてさらに検討を行った。本菌 No.6 株を 25℃ で 2 日間振とう培養し、胞子懸濁液を調整した。この懸濁液を高温順化のために 35℃ で 6, 12, 18, 24, 48, 72 時間振とう培養した。また、対照として 25℃ で同様の時間の振とう培養も行った。高温順化および対照の 25℃ で培養した胞子懸濁液を 50℃ および 55℃ に 10 分間暴露する熱ストレスで処理し、胞子生存数を比較した。その結果、35℃ 培養による生存数の向上は 55℃ の熱ストレス処理に対しては 12 時間から、50℃ に対しては 6 時間から認められた。すなわち、付与される熱ストレス耐性は弱まるものの、本菌の高温順化は 35℃, 6 時間の培養でも生じることが示唆された。

(¹ 佐賀大農・² 三重中央農改セ)

病害 08

○大迫佳奈¹・Myo Zaw²・飯山和弘¹・古屋成人¹・松元 賢²

アスパラガス属野生種のハマタマボウキの斑点性病斑から分離された *Alternaria* 属菌について

アスパラガス属野生種のハマタマボウキ (*Asparagus kiusianus*) の主茎部に、黒色～褐色の斑点性病斑を呈する病気の発生が、2017 年 6 月に佐賀県虹の松原で認められた。そこで、常法に従い罹病部からポテトデキストロース寒天培地を用い病原菌の分離を試みた。その結果、黒色の菌そうが優占的に分離された。分離菌の菌そうをコルクボーラーで打ち抜き、菌糸体を含むディスクをカーボランダムによる主茎付傷部位に貼付した。接種 2 週間後に接種部位に原病徴が再現された。また、接種病斑部からは接種菌が再分離された。分離菌の分生子は、0～3 個の縦隔壁と 1～5 個の横隔壁を有し、淡褐色で、大きさ 51.8-111.0×28.0-50.7μm であり、*Alternaria* 属菌と形態的特徴が一致した。さらに、ITS 領域の塩基配列に基づく系統解析においても *Alternaria* 属菌であることが示された。一方、Alt a 1 遺伝子の塩基配列に基づく解析から、分離菌は複数種あることが推定された。今後はこれらの分離菌の種レベルでの同定を試みる予定である。

(¹ 九大院農・² 九大熱研セ)

病害 09

○藤森沙羅・田場聡・本田レオ・関根健太郎

Colletotrichum tropicale および *Phomopsis* sp. によるカニステル葉枯病の発生 (新称)

2017 年 3 月、沖縄県西原町のカニステルに葉枯れ症状を呈する病害が発生した。罹病葉から性状の異なる 2 種糸状菌 (NKC1 および NKP1) が分離され、両菌株において病原性が確認された。NKC1 の形態観察を行った結果、*C. gloeosporioides* 種複合構成種であると推定された。そこで TUB2, GAPDH および GS 領域の相同性検索を行ったところ、*C. tropicale* と 99～100% の一致率を示し、分子系統樹においても *C. tropicale* (ex-type culture) と同一のクレードを形成した。また形態的特徴が *C. tropicale* とほぼ一致したことから、*C. tropicale* Rojas, Rehner & Samuels であると同定した。一方、NKP1 では ITS 領域を用いた遺伝子解析を行った結果、*Phomopsis* sp., *Diaporthe ohasaeolorum*, *D. eugeniae* と近縁であることが示されたが、分生子形成が認められず形態比較が不可能であったため *Phomopsis* sp. とした。以上より、カニステルの葉枯れ症状は *C. tropicale* と *Phomopsis* sp. の 2 種病原菌によって引き起こされることが明らかとなったことから、本病をカニステル葉枯病と命名することを提案したい。

(琉球大農)

病害 10

○小林優大¹・増田 稔²・竹下 稔¹

アシベンゾラル S メチルは植物における *SAGT* の転写活性を抑制する (3)

先の大会でアシベンゾラル S メチル (ASM) がサリチル酸 (SA) 配糖化酵素遺伝子 (*SAGT*) の転写活性を抑制することを報告した。今回は *Nicotiana benthamiana* の展開葉 1 枚に対し 0.12 mM ASM を 5 秒間浸漬処理し、処理葉と非処理上位葉における *SAGT* および抵抗性誘導の指標遺伝子である *PR1a* の転写産物の蓄積量を相対定量 RT-PCR により比較解析した。その結果、ASM 処理後 48 時間において、ASM 非処理上位葉における *SAGT* 転写産物の相対蓄積量は水処理区よりも低い傾向にあった。一方で、ASM 処理後 48 時間における *PR1a* 転写産物の相対蓄積量は水処理区よりも高い傾向にあった。しかしながら、ASM 非処理上位葉における *PR1a* 遺伝子転写産物の相対蓄積量の増加は ASM 処理葉よりも低いレベルであった。以上の結果から、ASM による *SAGT* の転写活性の抑制は非処理上位葉においても一定程度生じるが、抵抗性誘導は低減すると推察された。

(¹宮大院農・²北大院農)

病害 11

○東桃香・岡田尚己・篠田尚希・菅野善明

マルチプレックス RT-PCR 法によるラナンキュラス微斑モザイクウイルス (RanMMV) およびラナンキュラス奇形葉ウイルスの検出

わが国の栽培ラナンキュラスには複数種のウイルスの発生が確認され、その中でもラナンキュラス微斑モザイクウイルス (RanMMV) およびラナンキュラス奇形葉ウイルス (仮称: RnLDV) が広く発生していることが明らかになっている。本実験ではこれら 2 種のウイルスを一度に診断可能なマルチプレックス RT-PCR 法の確立を試みた。RanMMV および RnLDV の増幅用プライマーはそれぞれの外被タンパク質遺伝子領域配列に異なる大きさの産物が増幅されるように設計した。RT-PCR 反応は Prime Script One Step RT-PCR Kit (Takara) を用いて行った。ウイルス感染葉から調製した RNA を検定試料として検出を行ったところ、単独感染試料ではそれぞれ感染ウイルス特異的に単一バンドとして、重複感染試料では両ウイルス由来の 2 本のバンドが特異的かつ明瞭に増幅された。検定試料として簡易に調製した汁液を用いたところ、RNA を試料とした場合と同様に 2 種ウイルスの診断が可能であった。

(南九州大環境園芸)

病害 12

○平野優徳・松岡弘記・大島一里

東アジア諸国におけるカブモザイクウイルスの組換え体について

カブモザイクウイルス (TuMV) が感染していた最古の植物はドイツの野生ランであり、本ウイルスの出現中心は地中海沿岸そして中東諸国と考えられている。その地域で本ウイルスは様々なアブラナ科野生植物と農作物に適応後、今から 800 年前頃からユーラシア大陸を西から東へ横断し、東アジア諸国に侵入してきたと考えられている。しかし東アジア諸国における TuMV ゲノムの組換え解析は詳細にされていない。そこで本研究では、新たにゲノム解析した東アジア分離株に既報の分離株を加えた合計約 520 分離株の全ゲノム配列について、組換え解析を行った。その結果、東アジア諸国における優勢な集団は、例えば中国では basal-BR や world-B 分子系統型グループの非組換え体が多く認められたのに対して、日本では Asian-BR と world-B 分子系統型グループの塩基配列を親型に持つ組換え体などが多く認められた。以上から、国毎に優勢な集団が異なったことから、国毎の農業環境や栽培農作物に TuMV は影響されながら、拡散し病気を起こしてきたと思われた。

(佐賀大農)

病害 13

○具志堅優也¹・富高保弘²・富田麗子¹・玉代勢優奈³・島田涼子⁴・眞境名元次³・田場 聡¹・関根健太郎¹

スイカ灰白色斑紋ウイルスによるピーマンえそ輪紋病（新称）

2016 年、沖縄県八重瀬町で、株の萎縮、葉のえそ輪紋または退緑斑紋、茎のえそ症状、果実の奇形を呈するピーマンが確認された。網羅的 RNA ウイルス検出技術 DECS 法の結果、*Watermelon silver mottle orthospovirus* (WSMoV) と相同性を持つ配列のみが検出され、既報の検出プライマーを用いた RT-PCR 法によっても感染が確認された。*Tospoviridae* 科の分類基準に用いられる *N* 遺伝子の塩基配列を解読した結果、WSMoV の WS-O 分離株と 99 % の同一性を示したため、本ウイルスを WSMoV 沖縄ピーマン系統 (WSMoV-OP) とした。また接種試験により病原性を確認したところ、輪紋または退緑症状が確認された。加えて、2017 年に沖縄本島内の八重瀬町を含む 4 地域から本症状を呈するピーマンが発生した。これらについて WSMoV 感染の有無を検定すると、すべての罹病個体が陽性を示した。以上の結果から、沖縄県で発生したピーマン葉にえそ輪紋または退緑斑紋を呈する病害の病原体として、WSMoV-OP を同定した。併せて、本病をピーマンえそ輪紋病と呼称することを提案する。

(¹琉球大農・²九州沖縄農研・³沖縄病害虫防技セ・⁴神奈川農技セ)

病害 14

富田麗子¹・佐藤行人²・齋藤星耕^{2,3}・藤本真悟²・田場 聡¹・○関根健太郎¹

次世代シーケンスデータから植物ウイルスゲノムを検出するインフォマティクスツールの構築

次世代シーケンサーによるメタゲノム解析は、植物ウイルスの検定において強力なツールである。ウイルスゲノムを検出するインフォマティクスツールを構築するため、ニガウリ異常症発症株の全 RNA シークエンスデータを得た。イルミナ社 MiSeq で得られた 6,478,007 ペアエンドリードを NCBI のウイルスゲノムリファレンスデータベースにマッピングすると、458,176 リードが既知のウイルス様配列として抽出された。このリードを *de novo* アセンブルし、136 コンティグを得た。BLAST 検索したところ、*Orthospovirus* 属のスイカ灰白色斑紋ウイルス (*Watermelon silver mottle orthospovirus*; WSMoV) が高頻度で検出された。本ウイルスが新種、新属、新科、または新目である場合を想定して、データベースから WSMoV, *Orthospovirus* 属, *Tospoviridae* 科、または *Bunyavirales* 目を除いた仮想データベースを作出し、マッピング解析に用いた。その結果、仮想新目ウイルスは検出できず、仮想新科ウイルスを検出できた。上記の解析作業を自動化するパイプラインを構築したので、併せて報告する。

(¹琉球大農・²琉球大戦略 PJ・³現沖縄大経済)

病害 15

○Yu Yu Khaing, Kobayashi, Y., Takeshita, M.

Involvement of the 2b gene coding region of cucumber mosaic virus in induction of shoestring-like leaf blade in tomato.

Cucumber mosaic virus strain D8 (CMV-D8) is a natural pseudorecombinant virus consisting of RNA1 and RNA2 in subgroup IB and RNA3 in subgroup IA, whereas CMV strain Y (CMV-Y) belongs to subgroup IA. In this study, we focused on distinct host-specificity between CMV-D8 and CMV-Y in tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Sekaiichi). Symptom expression was weekly recorded and green/yellow mosaics were observed in the tomato plants inoculated with CMV-D8 and CMV-Y at an early infection stage (1 week post inoculation; wpi). CMV-D8 enhanced severe systemic symptoms by causing shoestring-like malformation of the newly emerged leaves, whereas CMY-Y induced severe yellow mosaics with stunting at 3 wpi. Pseudorecombination and recombination analyses between CMV-D8 and CMV-Y genomic RNAs revealed that the 2b coding region in CMV-D8 RNA2 is involved in development of the shoestring-like leaf blade. The results suggested that the 2b gene of CMV in subgroup IB plays an important role in formation of shoestring-like symptoms.

(Fac. Agri. Univ. Miyazaki)

病害 16

○米田恵美¹・富高保弘²・石松敏樹¹

ホオズキモザイク病に対する種子乾熱処理の防除効果

大分県のホオズキ産地では、2002 年頃から茎葉、がくにモザイク症状等を呈する病害が発生し、その病原の一つはタバコ微斑モザイクウイルス(TMGMV)であることが明らかとなっている。本病の対策として、トマトとピーマンの種子消毒(長井 1981)に準じ、種子の乾熱処理が行われているが、ホオズキでの効果は確認されていない。そこで、TMGMV 感染株から採取した種子を 70℃、75℃、80℃の乾熱で 1~5 日間処理し、発芽率と TMGMV 残存率を評価した。発芽率は、無処理区が 12.7%、70℃処理区が 22.7%、75℃処理区が 17.7%、80℃処理区が 21%であり、乾熱処理による発芽率の低下は見られなかった。TMGMV 残存率を *Nicotiana glutinosa* を用いた生物検定により評価したところ、無処理区では局部病斑が認められたが、乾熱滅菌処理した種子からは、すべての温度処理区において病斑は認められなかった。また、発芽した幼苗について、RT-PCR により TMGMV 感染の有無を検定したが、無処理を含むすべての区において TMGMV は検出されなかった。

(¹ 大分農林水研花き・² 農研機構・九沖農研)

病害 17

○森脇丈治

福岡県で栽培されたコリアンダーより分離された細菌の同定

2016 年 4 月、福岡県内でコリアンダーの葉身に葉脈に囲まれた水浸状~黒褐色の斑点を形成し、ひどい場合は穴があいたり、黒くしおれたりし、また葉柄に黒褐色の斑点を形成する病害が発生した。病斑部を鏡検すると、病斑切断面から細菌の漏出が観察された。分離細菌を無傷で噴霧接種(約 10⁸cfu/ml)したところ、葉に同様の病斑を形成し、接種細菌が再分離された。分離細菌はグラム陰性、O/F は O 型、蛍光色素を産生しなかった。簡易同定 96-API 法ではプロファイルインデックス 0047451、96-MUC 法では 1300、LOPAT 試験は+---+で、いずれも *Pseudomonas syringae* 群と判定された。また 16SrDNA、*gyrB*、*rpoD* 遺伝子の塩基配列は *P. syringae* pv. *coriandricola* の千葉県分離細菌と 99.9~100%の高い相同性を示した。以上から本細菌を *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* と同定した。本細菌によるコリアンダー斑点細菌病は静岡県で確認されて以来、千葉県や埼玉県でも報告されており、広範囲に発生していると考えられた。

(九沖農研)

病害 18

○西 菜穂子¹・堀田光生²・西 八束¹

鹿児島県で発生した *Ralstonia solanacearum* によるオリーブ立枯病

2017 年 9 月、鹿児島県内のオリーブ栽培ほ場(A、B)でオリーブの葉が萎凋または落葉し、枝、根の維管束部が黒変する立枯症状が確認され、変色した維管束部から菌泥の漏出が見られた。変色部位から常法により細菌を分離し、ナス、トマトおよびオリーブ苗木に有傷接種した結果、いずれも地上部に萎凋・立枯症状を起こした。分離細菌は普通寒天培地上で白色、流動性の集落を形成し、グラム陰性、アルギニンジヒドロラーゼ活性は陰性、オキシダーゼ活性は陽性であり、青枯病菌の可能性が推測された。そこで既報のマルチプレックス PCR 法等を用いて解析した結果、本細菌は *Ralstonia solanacearum* phylotype1 と同定された。また、炭素源からの酸の産生能および *egl* 遺伝子情報に基づく解析により、A ほ場分離株は biovar 4, sequevar 15, B ほ場分離株は biovar 3, sequevar 34 であった。両ほ場から分離された系統は、いずれも国内で普遍的に存在し、ナス科作物等各種植物を犯すことが報告されており、これらが今回オリーブにも感染し、発病させたと考えられた。

(¹ 鹿児島農開セ・² 農研機構農環研)

病害 19

○中村吉秀¹・江頭桃子¹・堀田光生²

菌液浸漬法による青枯病菌表面汚染ショウガ根茎の作成と温湯処理の殺菌効果

ショウガ青枯病の種根茎による伝染防止技術を確立するため、温湯処理法による根茎表面生息青枯病菌に対する殺菌効果を調べた。まず、表面汚染根茎の人工的な作出法を検討した。ショウガ根茎を滅菌土に埋設後、 10^8 cfu/ml の青枯病菌液を灌注し、ガラス室で保管する方法では、処理直後～14 日後まで根茎表面の菌密度が $10^3 \sim 10^5$ cfu/g で維持されていた。一方、 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml の菌液に 10 分間浸漬し、 15°C 多湿条件下で保管する方法では、処理直後～20 日後まで $10^4 \sim 10^5$ cfu/g の菌密度であった。作業の効率性等を考慮した場合、菌液浸漬法が表面汚染根茎の大量作出に適していると考えられた。これら汚染根茎を、根茎腐敗病菌に対する消毒効果が報告されている 50°C 、10 分の条件で温湯処理した結果、根茎表面および温湯処理液中の青枯病菌量は検出限界 (2.7×10^2 cfu/g) 以下となった。以上の結果から、本温湯処理法は根茎腐敗病だけでなく青枯病対策としても有望と考えられた。

(¹長崎農技セ・²農研機構農環研)

病害 20

○波部一平

本邦のジャガイモから採取された青枯病菌のジャガイモ品種への病原力による類別

本邦で採取されたジャガイモ青枯病菌 26 菌株 (phylogroup I; biovar 3 および 4, phylogroup IV; biovar N2) を供試し、接種後の培養温度条件を 24°C または 28°C に設定した *in vitro* 検定法 (Habe, 2018) で圃場抵抗性のジャガイモ育成系統「西海 35 号」と罹病性の品種「アイユタカ」の発病指数を調査した。その結果、ジャガイモ 2 品種・系統に対する発病指数は菌株によって異なり、「西海 35 号」に対しても高い値を示す菌株が確認された。また、菌株によって接種後の培養温度間で発病の程度に違いが認められ、 24°C での発病指数が 28°C での発病指数より低い菌株、 24°C での発病指数が 28°C での発病指数より高い菌株、温度に関係なく高い菌株などが認められた。発病指数に基づいて非階層クラスター分析を行ったところ、供試菌株は 5 つの型に類別され、「西海 35 号」に対する発病指数が高く、 28°C よりも 24°C で発病指数が高い 4 菌株は全て phylogroup I; biovar 3 に属するなど、一部の菌株群と病原力との間に関連性が認められた。

(長崎農技セ)

病害 21

○西岡一也¹・児玉真一朗²・西 八束¹・湯田達也¹・景山幸二³

サトイモ疫病に感染した種イモは水浸漬で選別できる ―種イモによるリスク軽減技術の確立―

Phytophthora colocasiae によるサトイモ疫病 (以下、疫病) は伝染環等の詳細な生態が不明なため、伝染には種イモの潜在感染も考えられる。また、現場では種イモが保管中に軟化・腐敗する事例が多発し、安定生産の妨げになっている。本研究では、掘り取り直後の種イモを用い、種イモの洗浄→選別→殺菌剤消毒の行程のどこで疫病菌が検出されるかを調査した。疫病菌の検出は、種イモの管理行程ごとに取り出した球茎と電子レンジで消毒したエゴマ種子を蒸留水に 25°C で 6 日間浸し、エゴマ種子に捕捉された菌を NARM 培地で培養 (25°C 、2 日間) した。生育してきた菌叢から簡易に DNA を抽出し、疫病菌を特異的に検出できる LAMP 法を用いて、その有無を確認した (ベイト+LAMP 法)。その結果、種イモの水浸漬による選別で浮く球茎には、疫病菌だけでなく、乾腐病を引き起こす *Fusarium* 属菌の寄生も認められ、沈む球茎からは認められないことがわかった。このことから、種イモを水浸漬する選別作業は、感染種イモの除去に役立ち、疫病の発生を軽減できる可能性が示された。

(¹鹿児島農総セ・²鹿児島県沖永良部事務所・³岐阜大学流域研セ)

病害 22

○鈴木 智範・岡本 潤・佐藤 通浩

大分県におけるイネ稻こうじ病の発生状況

近年稻こうじ病による被害が大分県で増加しており、現況を把握するため発生実態調査を行った。2017年9月から10月にかけて県内45地点、87ほ場について、1ほ場あたり25株または100株を調査し発病株率を求めた。87ほ場中、発病株率16%以上が2ほ場、6~15%は8ほ場、1~5%は11ほ場であった。また、19ほ場では調査区外に発病株が確認された。残りの47ほ場では発生が認められなかった。ある集落では発生の多いほ場と発生が認められないほ場が不規則に混在していたため、集落内での稻こうじ病の発生状況および耕作状況を調査した。傾穂期に、ほ場の周囲から稻こうじ病の発病株を目視で確認した結果、25ほ場中、発病が確認されたほ場が14ほ場、確認されなかったほ場は11ほ場であった。ほ場あたり15株以上の発病を認めた5ほ場について内訳を調べた結果、2ほ場の耕作者がA氏、2ほ場がB氏であった。調査結果から稻こうじ病は県内全域で発生していること、また集落内の稻こうじ病の発生状況は、耕作者により偏りが生じていることが明らかになった。

(大分農林水研)

病害 23

○土屋健一¹・佐藤豊三²・櫛間義幸³・市川和規⁴・秋田 優⁵・高橋一哉⁵

宮崎県都井岬におけるソテツ葉枯れ症の発生と原因糸状菌について

宮崎県串間市の都井岬は、ソテツの北限自生地として国の特別天然記念物に指定されている。2017年春、自生地から約1km離れた植栽地で約290本のソテツ樹に変色を伴う葉枯れが確認され、深刻な被害拡大が懸念されたことから、原因究明と対策を検討した。被害ソテツ樹は、経年葉を含む生長段階の異なる全葉またはその一部に葉枯れが認められ、小葉上に多数の病斑が観察された。樹幹内部に腐朽はなく、標徴から植物病原糸状菌による葉枯れと診断された。罹病葉には周縁が暗褐色で淡褐色の病斑と灰白色病斑の2症状が見られ、分生子果の形成も認められた。両病斑上の分生子果および各病斑から分離された糸状菌の顕微鏡観察の結果、それぞれ*Pestalotiopsis* 属菌および *Leptothyrium* 属菌の関与が示唆され、さらにITS領域の塩基配列に基づき菌種を調べた。昨年、罹病葉の切除処理をしたソテツ樹では、新葉の軽微な病斑形成に留まったことから、当面の被害軽減策が示唆された。一方、外見健全として切除されなかった越冬樹の葉には多数の病斑が認められ、葉枯れに至る場合もあった。

(¹九大院農・²農研機構遺資セ・³宮崎総農試・⁴東大院農・⁵串間市役所)

病害 24

○渡邊幸子¹・菖蒲信一郎¹・福永正照²・中島寿亀³・田代暢哉⁴

べと病多発生土壌で育成したタマネギ幼苗におけるべと病菌卵胞子の形成

タマネギべと病菌の卵胞子は春期のタマネギ収穫頃に発病葉中に形成され、これが土中に残って越冬し、次作の一次伝染源になると考えられている。2018年7月に、べと病が多発した現地タマネギ圃場の土をビニルポットに充填し、タマネギを播種して、人工気象器で育成した。対照として、購入培土を充填したポットを用いた。温度は20℃に設定し、播種3週間後から15℃とした。その結果、汚染土壌のポットでのみ、播種後30日頃から苗の一部が黄化し始め、同50日頃から葉の湾曲症状が出現した。黄化苗からDNAを抽出し、*Peronospora destructor* を特異的に検出するPCRで増幅を確認した。さらに、15℃・高湿度条件下で、黄化苗上にべと病菌の分生子が形成されることを確認した。黄化苗を検鏡したところ、葉と根の一部にべと病菌の卵胞子を確認した。特に子葉や第1葉では、菌糸の伸長とともに、卵胞子が豊富に観察された。また、蔵卵器中の卵胞子も高頻度で観察された。以上のことから、これらの卵胞子は、土壌から感染した幼苗中で、新たに形成されたものと考えられた。

(¹佐賀農研セ・²佐賀農研セ白石・³佐賀農技防・⁴佐賀上場営農セ)

病害 25

○菖蒲信一郎・渡邊幸子

タマネギベと病の胞子飛散および関連する気象条件

2018年4～5月に、タマネギベと病の二次伝染株が発生したタマネギ圃場内にグリセリンゼリーを塗布したスライドガラスを静置し、1日1回（胞子飛散時は1～3時間間隔）で交換することで、分生胞子の飛散状況を調べた。ベと病の胞子の飛散は、9～16時頃を中心にみられ、夕方～夜間に飛散する場合もあったが、その量は少なかった。4月12, 18, 19, 20日は、晴天の条件下で胞子が飛散し、4月11, 14, 17, 24日および5月8日は雨天の条件下で胞子が飛散した。胞子が飛散しやすいのは「晴れた日」とする報告と「曇雨天の日」とする報告があるが、本研究ではその両方が確認された。湿度との関連については、胞子飛散は「湿度の低下と連動する」とする報告と「高湿度条件で起こる」とする報告があるが、本研究では晴天の日は、湿度の低下に伴って胞子飛散が増加する傾向がみられ、雨天時は、高湿度条件下で断続的に胞子が飛散した。風との関連については、晴天、雨天を問わず、胞子飛散は風が弱い条件で多い傾向がみられ、これは過去の報告と一致した。

（佐賀農業セ）

病害 26

○田代暢哉¹・浦川綾子¹・園田亮一²・川上 顕^{2,3}・中山伸一¹・宮崎尚子¹・藤原和樹²・田中義樹¹・宮坂 篤²

タマネギベと病菌の分生子発芽に及ぼす温度、pH、光の影響

タマネギ株上で継代保存している北海道株（H-YUNI1）と佐賀上場株（SUPd-1）の2菌株を供試した。各菌株の分生子懸濁液（10⁴個/mL）を素寒天培地（WA）に滴下し、3～30℃までの各温度に暗黒条件下で保持し、経時的に発芽の有無を調べた。発芽した分生子については発芽管長を計測した。発芽は両菌株ともに10℃で最も早く、2時間後から始まった。発芽温度域はH-YUNI1では3～20℃まで、SUPd-1では3～25℃までで、7時間後以降に発芽する分生子は少なかった。発芽割合は両菌株ともに10℃で最も高く、次いで7℃、12℃の順であった。一つの分生子から2本の発芽管が伸長する割合は10℃前後で高かった。発芽管長は両菌株ともに10℃で最も長かった。高圧蒸気滅菌後のpHが4から10になるように調整したWAに分生子懸濁液を滴下し、10℃での発芽状況を調べた結果、両菌株ともにpH7～9で良好な発芽を示した。酸性域での発芽は不良で、pH4.5では発芽しなかった。光照射は分生子発芽に対して促進、阻害のいずれの影響も与えなかった。

（¹佐賀上場営農セ・²農研機構九州沖縄農研・³現：農研機構西日本農研）

病害 27

○江頭桃子・中村吉秀

イチゴ「さちのか」、 「ゆめのか」におけるUV-B照射と天敵を組み合わせた減化学農薬防除体系

2017年9月～2018年5月にイチゴ「さちのか」、 「ゆめのか」土耕栽培において夜間3時間のUV-B照射（22:00～1:00、「ゆめのか」は1月31日～3月15日は22:00～0:00）と天敵放飼（11月中旬：ミヤコカブリダニ、2月上旬：チリカブリダニ）を組み合わせた減化学農薬防除体系（UV-B防除体系）の防除効果を検討した。UV-B防除体系区の化学農薬使用回数は、慣行防除と比較して「さちのか」でうどんこ病60%減、ハダニ67%減、「ゆめのか」でうどんこ病50%減、ハダニ67%減となり、防除効果は両品種とも慣行と同等であった。UV-B照射による総収量への影響は、「さちのか」では6%の収量減であったのに対し、「ゆめのか」では1月下旬～2月に裂皮果の発生が助長されたため14%減少した。以上の結果から、本体系はUV-B照射による果実品質への影響が少ない品種では、減化学農薬防除体系として有効と考えられた。なお、本研究は内閣府戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）「次世代農林水産業創造技術」において実施した。

（長崎農技セ）

病害 28

○澤岬哲也¹・與儀喜代政²・仲村昌剛¹・松村まさと¹

未硬化葉を用いたマンゴー炭疽病の簡易病原性検定法とマンゴー遺伝資源における抵抗性品種の選抜

我が国のマンゴーの主要品種‘アーウィン’は炭疽病に弱いため、収穫までに年数回の薬剤防除が行われるが、労力・コストの負担軽減と安心・安全な食料要求の高まりから、本病に強い抵抗性品種の開発が求められている。しかし、当支所で進めているマンゴー新品種の育成では、炭疽病抵抗性を評価した事例はなく、育種現場で活用できる抵抗性検定法は未確立である。そこで、本病の簡易で正確な病原性検定法を確立するとともに、当支所保存のマンゴー遺伝資源の炭疽病抵抗性を評価し、本病に強い育種素材の選抜を行った。その結果、SPAD 値が 20 以下のマンゴー未硬化葉を接種葉とし、病原菌接種時の分生子濃度は 10^4 個/ml 以上、培養温度を 25～30℃として 5 日間培養することで、安定した病斑形成を示した。そこで、遺伝資源 27 品種について本法と果実接種による評価を比較した結果、両接種間の発病度に正の相関が認められ、本病に強い抵抗性品種として‘ゴールデンナゲット’が明らかになった。以上より、本法を活用することで効率的なマンゴー炭疽病の抵抗性品種の選抜が可能である。
(¹ 沖縄農研セ名護・² 沖縄農研セ)

病害 29

○櫛間義幸¹・阿万暢彦¹・久野公子²・倉永知佳¹・若杉潤也³

Pseudomonas chichorii による施設栽培マンゴーの枝枯症状の発生

2016 年秋、宮崎県日南市の施設栽培マンゴー(品種：アーウィン)に、新梢が褐変枯死する障害が発生した。病徴は、緑枝先端の表面や上位展開葉の葉脈基部が褐～黒変を呈し、進展すると後に落葉、枯死にいたり、マンゴー枝枯細菌病(宮原ら, 2008)に酷似した。常法により病原菌の分離を行った結果、黒変部位からは淡黄～白色の集落を形成する細菌が高率に分離された。分離細菌のマンゴー緑枝・展開葉への付傷接種により、原病徴が再現され、同一細菌が再分離された。分離菌株はグラム陰性、黄緑色蛍光色素を産生し、硝酸塩の還元、アルギニンジヒドロラーゼ活性、ゼラチン液化は陰性、オキシダーゼ活性、タバコ過敏反応は陽性であった。API テスト及び 16S- r DNA 塩基配列の相同性検索の結果から *Pseudomonas chichorii* と同定した。*P. chichorii* は多犯性で、オクラに対しても病原性を有することが知られている。そこで、オクラ葉枯細菌病菌(MAF211996)を供試してマンゴー分離菌株との病原性の比較試験を行った結果、マンゴー分離菌株もオクラに対して強い病原性を示した。

(¹ 宮崎総農試、² 宮崎県中部農林振興局、³ 元宮崎総農試)