

鹿児島県におけるジャガイモそうか病の原因菌
と防除に関する研究

Study on the causal *Streptomyces* species and the
control of potato scab disease in Kagoshima prefecture.

鹿児島大学大学院連合農学研究科
農水圏資源環境科学専攻

西 八束

2014

目 次

I. 緒 言	1
II. 鹿児島県および長崎県におけるジャガイモそうか病を引き起こす <i>Streptomyces</i> 属菌の分布	8
1. 材料および方法	8
1. 1. ジャガイモそうか病塊茎の採取	8
1. 2. 病原菌分離と病原性検定	8
1. 3. DNA の抽出	9
1. 4. PCR 法による菌種および Pathogenicity island (PAI) 遺伝子マーカーの判別	10
1. 5. 病原性 <i>S. scabiei</i> の 16S-23S rRNA Internal transcribed spacer (ITS) 領域における類別	10
1. 6. 孢子鎖の形態と生理学的性質	12
2. 結 果	12
2. 1. 鹿児島県および長崎県におけるそうか病の菌種, 病原性 および PAI 遺伝子マーカーの判別	12
2. 2. <i>S. scabiei</i> の 16S-23S rRNA ITS 領域における類別	13
2. 3. 孢子鎖の形態と生理学的性質	16
3. 考察	19
III. そうか病菌の定量法と生態に関する研究	23
A. そうか病菌の土壌抽出法	23
1. 材料および方法	23
1. 1. 土壌試料の調整法の検討	23
1. 2. 土壌 DNA 抽出法の検討	23
1. 3. 土壌中のそうか病菌の孢子からの効率的な DNA 抽出	25
2. 結 果	26
2. 1. 土壌試料の調整法の検討	26
2. 2. 土壌 DNA 抽出法の検討	26

2. 3. 土壌中のそうか病菌の胞子からの効率的な DNA 抽出	26
3. 考察	29
B. リアルタイム PCR 法による <i>S.scabiei</i> および <i>S.turgidiscabies</i> の定量法の開発	29
1. 材料および方法	30
1. 1. 供試菌株	30
1. 2. そうか病菌株からの DNA の抽出	30
1. 3. リアルタイム PCR 用プライマーの設計	30
1. 4. PCR によるプライマー特異性の検定	31
1. 5. リアルタイム PCR によるそうか病菌定量	31
2. 結果	33
2. 1. PCR によるプライマー特異性の検定	33
2. 2. リアルタイム PCR によるそうか病菌定量	33
3. 考察	37
C. リアルタイム定量 PCR と無底ポット栽培を利用したジャガイモそうか病菌の動態解析; 土壌 pH の 違いが <i>S. scabiei</i> および <i>S. turgidiscabies</i> の菌の増減に及ぼす影響	37
1. 材料および方法	38
1. 1. 土壌 pH の調整とそうか病菌の接種	38
1. 2. 塊茎および土壌のサンプリング	39
1. 3. ジャガイモ組織および土壌からの DNA の抽出	40
1. 4. 新生塊茎の発病調査	41
2. 結果	41
3. 考察	46
IV. そうか病の防除に関する研究	50
A. ジャガイモそうか病菌の種いも伝染と種いも消毒処理の防除効果に関する動態解析	50
A-1. ジャガイモそうか病に対する薬剤による種いも消毒	50

1. 材料および方法	50
2. 結果	51
3. 考察	51
A-2. 種いものそうか病菌の菌量と新生いもでの発病との関係	53
1. 材料および方法	53
2. 結果	54
3. 考察	56
A-3. そうか病菌に汚染した種いもからの地下部組織および土壌へのそうか菌の拡散と農薬による 種いも消毒の効果	57
1. 材料および方法	58
2. 結果	59
3. 考察	62
A-4. 種いも消毒剤に対するそうか病菌の最少生育阻止濃度	64
1. 材料および方法	64
2. 結果	65
3. 考察	67
B. そうか病に対する温湯処理による種いも消毒 と微生物資材の併用	67
B-1. そうか病菌の死滅温度条件の調査	67
1. 材料および方法	67
1. 1. 供試菌株	68
1. 2. 温度処理法と処理後のそうか病菌の生存調査	68
2. 結果	70
3. 考察	70
B-2. ジャガイモそうか病に対する温湯処理による種いも消毒試験	71
1. 材料および方法	71

1. 1. ジャガイモそうか病菌に対する温湯処理による防除効果試験	71
1. 2. 種いもの温湯処理によるそうか病病斑内の細菌数の変化	74
2. 結果	74
2. 1. ジャガイモそうか病菌に対する温湯処理による防除効果試験.....	74
2. 2. 種いもの温湯処理によるそうか病の病斑内の細菌数の変化	77
3. 考察	77
B-3. ジャガイモそうか病に対する温湯処理による種いもの消毒の改善	78
1. 材料および方法	78
2. 結果	79
3. 考察	79
C. メチルイソシアネート・D-D 油剤の土壌消毒によるジャガイモそうか病防除	81
1. 材料および方法	81
2. 結果	85
3. 考察	86
D. 太陽熱土壌消毒処理と米ぬか土壌混和処理の併用によるジャガイモそうか病の防除	87
D-1. 太陽熱土壌消毒と米ぬかおよび <i>Gliocladium</i> 属菌資材の併用効果	87
1. 材料および方法	87
2. 結果	88
3. 考察	90
D-2. 太陽熱土壌消毒処理の防除効果の高い時期と米ぬかの同時施用	91
1. 材料および方法	92
2. 結果	95
3. 考察	97
D-3. 太陽熱土壌消毒の処理期間	98
1. 材料および方法	98

2. 結果	98
3. 考察	102
D-4. 太陽熱土壌消毒, 米ぬかおよび石灰窒素の組み合わせによる総合防除	102
1. 材料および方法	103
2. 結果	103
3. 考察	106
E. そうか病抵抗性品種と肥料の組み合わせによる防除効果	107
1. 材料および方法	107
2. 結果	108
3. 考察	112
V. 総合考察	113
VI. 引用文献	119
VII. 謝辞	129
VIII. 要約	131
IX. 要約(英文)	137

I. 緒 言

そうか病は、ジャガイモ塊茎に発生すると商品価値を著しく損ない経済的な被害をもたらし、アメリカ、インド、アジアおよびアフリカなど世界各地で発生が報告されている重要な病害である。また、ジャガイモだけでなくダイコン、カブ、テンサイ、ニンジン、サツマイモなどの根菜作物に発生し、その被害は拡大している (Loria *et al.*, 1997; 田中, 2003a) 。

普通型病斑 (Common Scab) を起こすジャガイモそうか病原菌は、Thaxter により1890年にはじめて分離された(Thaxter, 1891)。分離菌株は灰色で孢子鎖の形状はらせん状であり、メラニン色素を産生する性質を持ち、*Oospora scabies*と命名されたが、保存維持されなかった。その後、Güssow (1914) により *Actinomyces scabies* へ、Waksman and Henrici (1948) により *Streptomyces scabies* へ変更され、本菌名が永く使用された。しかし、Waksman (1961) に再記載された新基準菌株は孢子鎖がらせん状でなく、メラニン色素を産生しないなど、Thaxterの原記載と一致しなかったことから、その後のそうか病菌の分類に大きな混乱を招き、1974年には不確定種となり、1980年には無効種となった(Lambert and Loria, 1989a) 。

以上のように、そうか病に関する病原菌については混乱した状態が続いたが、1989年に Lambert and Loria により *Streptomyces scabiei* (synonym *S. scabies*) の再記載がなされ、種名が復活するに至った。同時に *Streptomyces scabiei* より強酸性土壌において病原性を示すそうか病菌を *S. acidiscabies* として提案した (Lambert and Loria, 1989b) 。

その後、*S. turgidiscabies* (Kreuze *et al.*, 1999; Lehtonen *et al.*, 2004; Miyajima *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2003b) , *S. europaeiscabiei* , *S. stelliscabiei*

(Bouček-Mechiche *et al.*, 2000; Bukhalid *et al.*, 2002) , *S. bottropensis* (Bukhalid *et al.*, 2002) が記載され、さらに、カナダ (Goyer *et al.*, 1996) , 韓国 (Park *et*

al., 2003a) からも相次いで新種の病原菌が報告されている。

国内のジャガイモ産地においては、1980 年代以降、ジャガイモそうか病の発生が拡大し、生産現場では大きな問題となっている(木村, 1981; 田代ら, 1999)。

これまで、国内では、*Streptomyces scabiei* (田中, 2000, 2003b; 田代ら, 2002; Tashiro *et al.*, 2012), *S. turgidiscabies* (Miyajima *et al.*, 1998; 田中, 2000, 2003b), *S. acidiscabies* (Tashiro *et al.*, 2012; Tóth *et al.*, 2001) が病原菌として報告されている。特に、佐賀県の強酸性化土壌では、*S. acidiscabies* がそうか病の多発に関与していることが明らかにされている (田代ら, 2002; 田代, 2003; Tashiro *et al.*, 2012)。これまで、鹿児島県の奄美地域においても、耐酸性のそうか病の存在の可能性が示唆されているものの (和泉・野島, 1997), そうか病菌の詳細な調査は北海道と佐賀県に限定され、西南暖地で広く調査した事例はない。

また、そうか病菌は遺伝的に多様な種であるが、主なそうか病菌では 16S rRNA や 16S-23S rRNA Internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列の違いにより菌種の識別が行われている (Kreuze *et al.*, 1999; Lehtonen *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 1996; 田中, 2000)。また、そうか病菌の病原性には植物毒素であるサクストミンの産生能力が関与することが知られ (Goyer *et al.*, 1998; Healy *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 1990; Loria *et al.*, 1995, 2008), サクストミン合成遺伝子 (*txtAB*), トマチナーゼ (*tomA*) や necrosis-inducing protein (*nec1*) などの病原性遺伝子は Pathogenicity island (PAI) に存在することが明らかにされている。PAI は、初めに *S. turgidiscabies* で見出されたが、*S. acidiscabies* および *S. scabiei* の染色体でも確認されたことから、非病原性 *Streptomyces* 種への水平移転による病原性の獲得が示唆されている (Bukhalid *et al.*, 1998, 2002; Healy *et al.*, 1999; Kers *et al.*, 2005)。

そこで本研究では、これまで不明であった鹿児島県および長崎県に分布するジャガイモそうか病を引き起こす *Streptomyces* 属菌について把握し、両県から分離し

たそうか病菌の PAI の特徴についても調査した．さらに，両県の主要なそうか病菌である *S. scabiei* の ITS 領域の塩基配列の違いによる類別を行った．

これらについては「Ⅱ．鹿児島県および長崎県におけるジャガイモそうか病を引き起こす *Streptomyces* 属菌の分布」において記述する．

そうか病菌の定量については，これまで選択培地による希釈平板法（Conn *et al.*, 1998）や MPN-PCR 法（田中, 2000）が確立されているが，培養後に血清や PCR により菌種等を特定する必要がある，やや時間と労力を要する．これらの問題を回避するために，病原性の *Streptomyces* spp. に強い相関関係を持つ PAI 内（Bukhalid *et al.*, 1998, 2002）の *necI* 遺伝子や *txt* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR による迅速で精度の高い定量法（Cullen and Lees, 2007; Manome *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008, 2011）が開発されており，そうか病の菌種に関係なく，病原性 *Streptomyces* spp. の一元的な把握が可能となっている．しかし，そうか病菌は菌種により pH, 薬剤, 温度等の耐性が異なっていることが知られており（田中, 2000; Tashiro *et al.*, 2012），そうか病菌の生態研究や防除法の確立には菌種ごとの把握が重要である．

そうか病菌は土壌および種いもにより伝染するが（Loria *et al.*, 1977），伝染の発病に及ぼす影響については，土壌伝染が主体であり種いも伝染の役割は小さいとする報告がある（Pavlista, 1996）．一方で，土壌消毒実施圃場や造成直後の圃場など微生物相の希薄な土壌では種いも伝染の役割が大きいことが示唆されている（植松・片山, 1990 ; 田代, 2003）．また，小山（2009）は国内で使用されている見かけ上健全な種いもから $1.1 \sim 4.0 \times 10^4$ コピー/g の necrosis-inducing protein 遺伝子（*nec1*）が検出されたことを報告している．さらに，*S. scabiei* よりも酸性に耐性のある *S. turgidiscabies* や *S. acidiscabies* だけでなく（田中, 2000; Tashiro *et al.*, 2012），韓国では pH3.5 でも生育する新たなそうか病菌が報告されており（Park *et al.*, 2003），種いもによる

これらそうか病菌の伝搬は、今後のそうか病防除をさらに複雑で困難な状態にする危険性があり、新たな地域への侵入と拡大が懸念される。

これらの危険性を低減させるため、生産者が利用可能な薬剤等による種いも消毒はそうか病の基本的防除技術として非常に重要である。これまで、銅剤、ストレプトマイシン剤、フルアジナム剤ならびにマンゼブ剤などの薬剤が種いも消毒剤として利用されているが、剤によっては効果が大きく振れ、評価が定まっていない（田代ら, 2002, 2003; 植松・片山, 1990; Wilson *et al.*, 1999）。これは、そうか病の発生には、土壤水分、pH および土壤微生物相など多くの要因が関与するが（田代, 2003）、これらの要因と種いもや根圏土壤などでのそうか病菌量との関連の解明が不十分であることが大きな障害となっている。

そうか病の発病程度と土壤の性質の関係については多くの報告がある。土壤 pH については、一般的に土壤 pH5.2 以下で発病が抑制されることが知られており（Gillespie, 1918）、それ以外にカルシウム（Horsfall *et al.*, 1954; Goto, 1985; Lambert and Manzer, 1991）、交換性アルミニウム（吉田ら, 1994）等との関係についても報告されているが、これら土壤の性質と菌種との関係を明確にした報告は少ない。特に、九州のジャガイモ主要産地である鹿児島県や長崎県では pH4.8 以下の圃場が多く、土壤の酸性化が問題となっている（森, 2012）。これら低 pH 圃場では、*S. acidiscabies* がそうか病の多発生を招く主因となる危険性が指摘されている（田代ら, 1999, 2002; Tashiro *et al.*, 2012）。しかし、そうか病菌種の圃場等での挙動については、定量法が十分でないことから現在でも不明な点が多く、さらに、*S. scabiei* と *S. turgidiscabies* の両種が混在した場合における両種の競合等についての知見は少ない（Lehtonen *et al.*, 2004; Hiltunen *et al.*, 2009）。

そこで本研究では、定量で問題となる土壤からの DNA 抽出法を確立し、*S.*

*scabiei*および*S. turgidiscabies*について、種間で多型が認められている16S-23S rRNA ITS領域の塩基配列を基にそれぞれに特異的なプライマーを設計し、リアルタイムPCRによってこれら2種を特異的に定量する方法について開発した。また、精度が高く簡便な無底ポットを用いたジャガイモそうか病検定法（坂本ら, 2011）と上記で開発した定量法を利用して、異なる土壌pHが両種の菌の増減に与える影響について調査した。

これらについては「Ⅲ. そうか病菌の定量法と生態に関する研究」において記述する。また、そうか病菌の伝染で重要である種いも伝染の動態解析及び種いも消毒については「Ⅳ. そうか病の防除に関する研究」の「A. ジャガイモそうか病菌の種いも伝染と種いも消毒処理の防除効果に関する動態解析」の項目において記述する。

そうか病菌の防除については、これまで土壌 pH の制御、畑地灌漑、輪作、抵抗性品種、土壌燻蒸消毒などの防除法が開発されてきた（Stead, 2004；田中, 2000；田代ら, 2002）。特に、クロルピクリンによる土壌燻蒸処理は直接的な殺菌効果により防除効果が高いものの、処理後は被覆を必要とすることからコストや労力の問題やまた周辺環境への悪影響が懸念されている。また、本県離島などの重粘な土壌では防除効果が劣ることから、本剤に代わる土壌消毒法の確立が望まれている。クロルピクリン剤に代わる剤としては、カーバムナトリウム塩液剤が有効であることが知られている（仲川ら, 2001a）。また、環境負荷の少ない土壌消毒法として、ビニール被覆による発病土壌の太陽熱消毒が行われているが（坂口ら, 1982；早田・矢野, 1984）、効果が不安定であることから、今後の普及のためには効果的な使用条件の解明が必要である。

また、土壌消毒以外のそうか病の防除法として、各種資材の土壌施

用が検討され、ダイズ蛋白質、乾燥血粉など高タンパク質資材及びフェロサンドの施用で高い防除効果が認められている。これらの資材の防除効果は土壌 pH 低下による放線菌の増殖抑制と考えられている（田中, 2000）。他に、米ぬかの施用による発病抑制効果が認められているが（尾松ら, 2000；後藤・広谷, 1991），脱脂した米ぬかでは抑制効果が認められていない（田中, 2000）。

さらに、生物的防除については、緑肥ダイズの土壌への鋤込によりそうか病が抑制され、その土壌中からは *Bacillus subtilis* が優先的に検出された（Weinhold and Bowman, 1968）。同様に、大和田ら（2003）は食品コンポストからそうか病菌を抑制する *Bacillus subtilis* を分離し、培養菌を土壌施用または種いもに菌を包埋することでそうか病を防除する方法を報告した。また、拮抗放線菌(Liu *et al.*, 1995), *Trichoderma* 属菌（仲川ら, 2001b, 2004；大城, 2009）を利用したそうか病の防除が開発されている。

西南暖地のそうか病抵抗性品種については、「春あかり」（中尾ら, 2003）が育成され、鹿児島県においても「春あかり」が品種としての適応性が高いことが明らかとなった（森ら, 2003）。近年、「さんじゅう丸」（向島, 2012）が育成され、産地への普及が期待されている。

以上のように、多様な防除法が開発されているが、そうか病の防除には、土壌の pH 調整を基本としながら、品種や水分調整などを組み合わせるなど、時期や圃場環境に応じて複数の方法による総合的な防除対策を講じることが重要であるとされている（田中, 2000；田代ら, 2002）。

本研究のそうか病の防除については、「Ⅳ．そうか病の防除に関する研究」の「B．そうか病に対する温湯処理による種いも消毒と微生物資材の併用」、「C．メチルイソシアネート・D-D 油剤の土壌消毒によるジャガイモそうか病防除」、「D．太陽熱土壌消毒処理と米ぬか土壌混和处理の併用によるジャガイモそう

か病の防除」および「E. そうか病抵抗性品種と肥料の組み合わせによる防除効果」の項目において記述する。

鹿児島県および長崎県は国内ジャガイモの安定供給を担っている全国有数の産地でありながら、これまでの西南暖地でのそうか病防除対策を振り返ると、そうか病菌種の同定およびそうか病菌の定量技術などが困難であったことから、これまで開発された防除法と病原菌種と病原菌量の関係の把握が不十分であったことは否めない。

そこで、再度、本研究の主な目的を以下にまとめた。

第一に、これまで不明であった鹿児島県および長崎県の主要産地におけるそうか病菌種を明らかにすることを目的とした。

第二に、そうか病菌種の定量法および定量で重要となる土壌からの DNA の抽出法を開発し、防除法と菌量の関係を検証することを目的とした。また、本研究で開発したリアルタイム定量 PCR と無底ポット栽培を利用したジャガイモそうか病菌の動態解析の試みとして、そうか病の防除に関連した「異なる土壌 pH 条件下での主要なそうか病菌種の動態」および「種いも消毒とそうか病菌の動態」の 2 つを選択した。

第三に、九州と北海道は気候や圃場環境が異なることから、九州に適した、特に西南暖地に効果的な防除法の開発に取り組んだ。また、本防除法を開発するにあたって、作業や環境に対して負荷の少ない防除技術を前提に、現在主流の土壌消毒法であるクロルピクリンと同等の防除効果となる技術を目指した。

第四に、近年、消費者の減農薬への関心が高く、種子伝染性病害の防除手段として温湯処理による種子等の消毒法が見直されていることから、ジャガイモそうか病に対する種いもの温湯消毒による防除効果について明らかにすることを目的とした。

Ⅱ．鹿児島県および長崎県の主要産地におけるジャガイモそうか病を引き起こす *Streptomyces* 属菌の分布

1. 材料および方法

1. 1. ジャガイモそうか病塊茎の採取

鹿児島県の主要産地 23 圃場（1999, 2004, 2006, 2007, 2010, 2011 年）と長崎県の主要産地 16 圃場（2005～2007 年）から罹病塊茎を採取した．

1. 2. 病原菌分離と病原性検定

病原菌の分離は圃場，罹病塊茎および病斑ごとに行った．早川・野々村（1993）の方法に準じ，病斑の一部を 0.05%SDS 加用 6% YE 液体で磨砕し，上澄み液を白金耳でナリジキシ酸（20mg/l）を加用した腐植酸・ビタミン培地（HV agar; humic acid 1.0g, Na₂HPO₄ 0.5g, KCl 1.7g, MgSO₄·7H₂O 0.05g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, CaCO₃ 0.02g, thiamine-HCl 0.5mg, riboflavin 0.5mg, niacin 0.5mg, pyridoxine-HCl 0.5mg, inositol 0.5mg, Ca-pantothenate 0.5mg, p-aminobenzoic acid 0.5mg, biotin 0.25mg, シクロヘキシミド 50mg, 寒天 18g, 蒸留水 1000ml, pH7.2）に画線するか，又は Loria and Davis（1988）の方法を改変し，140 倍に希釈したフェノール水で病斑の一部を摩砕し，10 分間静置した後，シクロヘキシミド加用素寒天培地（シクロヘキシミド 500mg, 寒天 20g, 蒸留水 1000ml）に塗布した（田中，2003a）．いずれの場合も 25℃で 10～14 日間培養後，培地上で出現頻度の高い放線菌のコロニーを釣菌し，単コロニー分離を 3 回以上繰り返す，供試菌株とした．病原性検定用培地は，オートミール液体培地（ISP 培地 No.3）1000ml

とバーミキュライト 1000g を十分に混和したものを約 60g ずつ 300ml 三角フラスコに分注し、121℃で 30 分の高圧滅菌を 2 回行って作製した。分離菌株を前記の培地に接種し、25℃で約 3 週間培養した培養物 25g とクロルピクリンくん蒸剤で消毒した滅菌土 1800ml（黒ボク土，pH 6.2）を新しいビニール袋内で十分に混和し、接種濃度を土壌 1g あたり 1.2×10^6 CFU（colony forming unit）/ 生土 g 以上に調整した。接種土壌をビニールポット（直径 15cm）に充填し、70% アルコールで消毒後（田代ら, 2002; Tashiro *et al.*, 2012），水道水で約 30 分間洗浄，または，フルアジナム水和剤 100 倍に浸漬した健全な塊茎（品種：ニシユタカ）を深さ 10cm に植え付けた。定植したポットはガラスハウス内で出芽後約 10 週間栽培し、期間中の給水は最小限とした。病原性の確認は新塊茎に典型的なそうか病斑を多数形成したものを陽性と判定し、試験は 2 反復以上行った。

試験には上記に加えて、*S. scabiei* 5 菌株；佐賀県分離菌株 S-324（田代ら, 2002），北海道分離菌株 D-1-4, SKI-14, N-6-6（田中, 2005），アメリカ基準菌株 ATCC49173（Lambert and Loria, 1989a），*S. turgidiscabies* 2 菌株；北海道分離菌株 SSY-10（田中, 2005），アメリカ基準菌株 ATCC700248（Miyajima *et al.*, 1998）および *S. acidiscabies* 2 菌株；佐賀県分離菌株 S-173（田代ら, 2002），アメリカ基準菌株 ATCC49003（Lambert and Loria, 1989b）を供試した。

1. 3. DNA の抽出

DNA 抽出はアセトン法（日本放線菌学会, 2001）およびスピンドフィルターによる珪藻土法（Tanaka and Ikeda, 2002）により実施した。供試菌株はイースト・麦芽液体培地（ISP 培地 No.2）で 25℃，3 日間培養し、培養液から遠心分離で集菌した。菌体は滅菌水に再懸濁した後、遠心分離（1200rpm, 10 分）による洗

淨を 2 回繰り返す，最終的に 1 菌株あたり約 50mg の菌体を得た．菌体には 1ml 冷アセトンを加え，激しく攪拌し，遠心分離後，ピペットで上清を除き，遠心濃縮機（42℃，5 分）により残存したアセトンを除いた．この菌体にリゾチーム溶液（50mM Tris-HCl, 20mM EDTA, pH8.0, 1mg/ml リゾチーム）100μl を加え，菌体が粘性を帯びるまで静置し（37℃で 1～2 時間），タングステンビーズ（直径 3mm）を加え，ビーズ破砕機（Retsch MM300）により 20 回/秒，2 分で菌体を破砕した．その後，スピンドフィルターを用いた珪藻土法により DNA を抽出し，TE 緩衝液で定量値を 10μg/ml に調整したものを polymerase chain reaction（PCR）用の鋳型とした．

1. 4. PCR 法による菌種および Pathogenicity island（PAI）遺伝子マーカーの判別

S. scabiei, *S. turgidiscabies* および *S. acidiscabies* の 3 種について，16S-23S RNA ITS 領域で設計した菌種に特異的なプライマーセットを用いて識別した．これら 3 種の菌種判別および Pathogenicity island（PAI）に存在するサクストミン合成遺伝子（*txtAB*），necrosis-inducing protein 遺伝子（*nec1*），トマチナーゼ遺伝子（*tomA*）の検出に利用したプライマーと PCR 条件は，第 1 表に示した．なお，*txtAB* の PCR 増殖には LA Taq（タカラバイオ），それ以外には Ex Taq（タカラバイオ）を利用し，添付資料に従い試薬を調製した．予想される PCR 産物の長さに応じて 1～3% アガロースゲルを作成し，電気泳動後，エチジウムブロマイド染色により各遺伝子に特異的な PCR 産物を確認した．

1. 5. 病原性 *S. scabiei* の 16S-23S rRNA Internal transcribed spacer（ITS）領域における類別

第 1 表 そうか病菌の菌種および Pathogenicity island (PAI) 関連遺伝子の判別のための polymerase chain reaction (PCR) 用プライマーセット.

標的遺伝子	プライマー	シークエンス (5' → 3')	アニーリ ング温度 (°C)	産物の サイズ (bp)	文献
菌種判別用					
<i>S. scabiei</i>	SC-27	CGGTGGCCCAACCCGTAA	65	330	竹内 (未発表)
	SC-24	TGAAGGCAGCCATACGGCCA			
	S.s-qPCR-F01	AAGGAGCATCTAGCTGCC	55	150	本研究
	S.s-qPCR-R01	GCTTTCCACACCCACAAG			
<i>S. s-qPCR-F03</i>	GAGCACTTCTACCGATCC	55	150	本研究	
	S.s-qPCR-R01 (see above)				
<i>S. turgidiscabies</i>	TU-09	CGGAAACATCCAGAGATGGGTG	65	690	竹内 (未発表)
	TU-11	GGACAGTACTGGAAGGAGAAGAC			
<i>S. acidiscabies</i>	AC-09	GAAACGGCCAGAGATGGTTCG	65	760	竹内 (未発表)
	AC-19	ACTGGGGTCGGCATCATGAG			
PAIマーカー判別用					
<i>TxtA</i>	txtA-F2	GCCTACATCATCTACACCTC	60	418	本研究
	txtA-R2	CGTAGGCGTTACCATCGT			
<i>TxtAB</i>	StrepF	GCAGGACGCTCACCAGGTAGT	60	71	Qu <i>et al.</i> (2008)
	StrepR	ACTTCGACACCGTTGTCCTCAA			
<i>Nec1</i>	Nf	ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGA	60	700	Bukhalid <i>et al.</i> (1998)
	Nr	GCAGGTCGTACGAAGGATCG			
	nec1-F1 nec1-R1	AGGTTTCTGGCCTTTCGGTC AGGTCGTACGAAGGATCGA	58	754	本研究
<i>TomA</i>	Tom3	GAGGCGTTGGTGGAGTTCTA	55	392	Wanner (2006)
	Tom4	TTGGGGTTGTACTCCTCGTC			
シークエンス用	S-Co-St-F01 S-Co-St-R01	GACGTCAAGTCATCATGC TCAGACACCCAACAGCGT	55	558	本研究

ATCC49173 菌株の 16S-23S rRNA ITS 領域の塩基配列 (DDBJ Accession Number; AB026199) を基に, 本菌に特異的なプライマーセット (S.s-qPCR-F01/R01) を作成した. しかし, 多くの分離菌株が本プライマーセットで増幅しないことから, *Streptomyces* spp. の ITS 領域を含む 16S-23S rRNA を増幅するプライマーセット (S-Co-St-F01/R01) を作成し, 鹿児島県から分離した *S. scabiei* S58 菌株の DNA を鋳型に PCR を行い, 増幅断片のシーケンス解析を行った. その塩基配列を ATCC49173 菌株の塩基配列と比較し, S58 株に特異的なプライマーセット (S.s-qPCR-F01/F03) を作成した (第 1 表). この 2 種類のプライマーセットを用いて PCR による判定を行い, 鹿児島県, 長崎県, 佐賀県および北海道から分離された 115 菌株の病原性 *S. scabiei* を類別した.

1. 6. 胞子鎖の形態と生理学的性質

胞子鎖の形態はイースト・麦芽寒天培地, オートミール寒天培地 (ISP 培地 No.3), および松本培地 (松本, 1979) を用いて 28℃で 21 日間培養後, 胞子鎖の色は肉眼で, 胞子鎖の形状については光学顕微鏡で観察した. また, メラニン様色素の産生の有無と炭素源の利用は Pridham and Gottlieb (1948) の方法に従い, pH 耐性については田代ら (1999) の方法に従って調べた. また, 前記に加え日本放線菌学会編 (2001), 田中 (2000) および田代ら (2002) を参考に試験を実施した.

2. 結果

2. 1. 鹿児島県および長崎県の主要産地におけるそうか病の菌種, 病原性 および PAI 遺伝子マーカーの判別

鹿児島県および長崎県の主要産地のそうか病の病斑から分離した放線菌をそうか病の菌種に特異的なプライマーセットを用いて PCR 産物で分類した結果、鹿児島県分離株では *S. scabiei* が 63 菌株 (41.7%), *S. turgidiscabies* が 78 菌株 (51.7%), *S. acidiscabies* が 10 菌株 (6.6%), 合計 151 株がそうか病菌となった。一方、長崎県では *S. scabiei* が 53 菌株 (82.8%), *S. turgidiscabies* が 8 菌株 (12.5%), *S. acidiscabies* が 3 菌株 (4.7%), 合計 64 株がそうか病菌となり、鹿児島県と長崎県のそうか病菌の菌種構成は大きく異なった (第 2 表)。

さらに、菌種と病原性および PAI 遺伝子の関係について調査した結果、鹿児島県および長崎県分離株 215 菌株の内 206 菌株に病原性が認められ、この内 203 菌株 (98.5%) は PAI 遺伝子の 3 種 (*txtAB* , *necI* および *tomA*) がすべて検出され、3 菌株 (*S. acidiscabies* で長崎分離株) は *txtAB* のみ検出された。一方、病原性の認められなかった 9 菌株は、PAI 遺伝子の 3 種全てが検出されない 4 菌株と *txtAB* が陰性で *necI* と *tomA* が検出された 5 菌株 (*S. scabiei* 4 菌株, *S. turgidiscabies* 1 菌株でいずれも長崎県分離株) の 2 群に類別された (第 2 表)。

2. 2. *S. scabiei* の 16S-23S rRNA ITS 領域における類別

S. scabiei の基準菌株である ATCC49173 と S58 菌株の ITS 領域を比較した結果、塩基配列に違いが認められた (第 1 図)。そこで、菌株の塩基配列に特異的なプライマーセットを作製し、供試した病原性 *S. scabiei* を各遺伝子型に基づいて類別した。鹿児島県で分離した 62 菌株の内 ATCC49173 株由来プライマーセットのみで検出されるタイプ (T) が 5 菌株 (8.1%), S58 株由来のプライマーのみで検出されるタイプ (JK) が 54 菌株 (87.1%), 両方ともに検出されるタイプ (B) が 3 菌株 (4.8%) であった。長崎県で分離した 49 菌株の内 T タイプが 17 菌株 (34.7%), JK タイプが 28 菌株 (57.1%), B タイプが 4 菌株 (8.2%) であった。佐賀県と北海道を含めると 115 菌株の内 T タイプが 20.0%,

第 2 表 PCR によりどうか病菌と判別された鹿児島県分離株および長崎県分離株の病原性および Pathogenicity island (PAI)に関連する 3 種遺伝子マーカーによる分類．

遺伝子型 (菌種判別)		病原性	PAIの判別		分離菌株数						他県 ^{d)}		
					鹿児島県			長崎県					
			<i>txrAB</i> a)	<i>necI</i> b)	<i>tomA</i> c)	長島	徳之島	その他	合計	雲仙		南島原	その他
<i>S. scabiei</i>	+	+	+	+	18	40	4	62 (41.0) ^{e)}	25	17	7	49 (76.6)	4
	−	−	+	+	0	0	0	0 (0.0)	3	0	1	4 (6.3)	0
	−	−	−	−	0	1	0	1 (0.7)	0	0	0	0 (0.0)	0
<i>S. turgidiscabies</i>	+	+	+	+	36	30	11	77 (51.0)	6	0	1	7 (10.9)	1
	−	−	+	+	0	0	0	0 (0.0)	0	0	1	1 (1.6)	0
	−	−	−	−	0	1	0	1 (0.7)	0	0	0	0 (0.0)	0
<i>S. acidiscabies</i>	+	+	+	+	8	0	0	8 (5.3)	0	0	0	0 (0.0)	0
	+	+	−	−	0	0	0	0 (0.0)	2	1	0	3 (4.7)	1
	−	−	−	−	1	1	0	2 (1.3)	0	0	0	0 (0.0)	0
<i>Streptomyces</i> spp.					63	73	15	151 (100.0)	36	18	10	64 (100.0)	6

a) サクストミン合成オペロン(txtAB)の PCR 検定が陽性を＋，陰性を－とした．

b) necrosis-inducing protein(necI)遺伝子の PCR 検定が陽性を＋，陰性を－とした．

c) トマチナーゼ(tomA)遺伝子の PCR 検定が陽性を＋，陰性を－とした．

d) 佐賀県 2 菌株 (*S. scabiei* 1 菌株, *S. acidiscabies* 1 菌株), 北海道 4 菌株 (*S. scabiei* 3 菌株, *S. turgidiscabies* 1 菌株)．

e) パーセンテージ(%).

ATCC49173	GAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAC
S58	GAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAC

ATCC49173	CGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAGCA--TCTAGC-----TGCCGCAAG
S58	CGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAGCACTTCTACCGATCCTTTGCGGGT
	***** **** * **
ATCC49173	GCAGCCAG-GGCCACAACGTCGGCGAATGTTGACGGTGGTT-GCTCATGGGTGGAACGT
S58	GAGGTCAGAGGCCAGATCATCAGCGAACGTCTGATGCTGGTTAGCTCATGGGTGGAACGT
	* * *** ***** * * ** ***** ** * * ***** *****
ATCC49173	TGATTATTCGGCCGGTTTCGTCGGGCCGGAGGCTGTGAGTACTACCCCTTGTGGGTGTGGA
S58	TGATTATTCAGCCGGTTTCGTCGGGCCGGAGGCTGTGAGTACTACCCCTTGTGGGTGTGGA
	***** *****

第 1 図 病原性 *Streptomyces scabiei* である S58 菌株（鹿児島県分離株）と ATCC49173 菌株（アメリカ基準菌株）との 16S-23S rRNA Internal transcribed spacer（ITS）の塩基配列の比較。

ATCC49173 塩基配列のデータは DDBJ から取得した。

JK タイプが 72.2%, B タイプが 7.8%であった(第 3 表)。また, B タイプの 3 菌株(鹿児島, 長崎県および北海道)のシーケンス解析を行った結果, ATCC49173 株由来と S58 株由来の両方の ITS 領域を持っていることが確認された(データ省略)。

2. 3. 胞子鎖の形態と生理学的性質

鹿児島県, 長崎県およびその他の県で病原性が認められたそうか病菌株について, 菌種ごとに胞子鎖の形態と生理学的性質を調査した。ただし, *S. scabiei* については, 第 3 表の遺伝子型により区別して表に記載した。本研究により病原性 *S. scabiei* 115 菌株は, すべての菌株が胞子の色調は灰色で, 胞子鎖の形態はらせん状を示した。供試した 17 種類の炭素源の内, すべての菌株がグルコース, D-フルクトース, D-キシロース, L-アラビノース, マルトース, スクロース, トレハロース, D-ラフィノース, D-マンニトール, イノシトールおよびクエン酸の 11 種類を利用し, L-ソルボース, ソルビトール, リビトール(アドニトール), ダルシトール, メチル- α -D-グルコシドおよびプロピオン酸の 6 種類類は利用しなかった。また, すべての菌株が pH5.0 では生育し, pH4.5 では生育しなかった。一方, 107 菌株(93%)がメラニン色素を産生したが, 8 菌株(鹿児島県 3 菌株, 長崎県 4 菌株, 北海道 1 菌株)は産生せず, これらはすべて遺伝子型 T タイプに属した。また, 培養温度は, 37°C ではすべての菌が生育し, 38~39°C では菌株間で異なり, 40°C ではすべての菌株が生育しなかった(第 4 表)。

次に, 病原性 *S. turgidiscabies* 85 菌株は, 胞子の色調は灰色で胞子鎖の形態は直~波状を示し, メラニン色素を産生しなかった。炭素源としてグルコース, D-フルクトース, D-キシロース, L-アラビノース, マルトース, スクロース, トレハロース, D-ラフィノース, D-マンニトール, イノシトールおよびプロピオン酸の 11 種類を利用し, L-ソルボース, ソルビトール, リビトール, ダルシ

第 3 表 鹿児島県および長崎県から分離された病原性 *Streptomyces scabiei* 菌株の
16S-23S rRNA Internal transcribed spacer(ITS)領域に基づく遺伝子型によ
る類別.

rDNA タイプ	両プライマーセットによる PCRでの検出		分離菌株数			合計
	S.sF01/ R01	a) S.sF03/ b) R01	鹿児島県	長崎県	他県 ^{c)}	
T	+	—	5 (8.1) ^{d)}	17 (34.7)	1 (25.0)	23 (20.0)
JK	—	+	54 (87.1)	28 (57.1)	1 (25.0)	83 (72.2)
B	+	+	3 (4.8)	4 (8.2)	2 (50.0)	9 (7.8)
合計			62 (100.0)	49 (100.0)	4 (100.0)	115 (100.0)

a) ATCC49173 菌株特異的プライマーセット(S.s-qPCR-F01/R0)を利用した PCR で陽性
を+, 陰性を-とした.

b) 鹿児島県分離菌株 S58 菌株特異的プライマーセット(S.s-qPCR-F03/R01)を利用し
た PCR で陽性を+, 陰性を-とした.

c) 佐賀県 1 菌株および北海道 3 菌株.

d) パーセンテージ(%).

第 4 表 鹿児島県および長崎県から分離された *Streptomyces scabiei* の生理学的特徴.

性質	分離菌株											
	鹿児島県				長崎県				他県 ^{c)}			ATCC49173 ^{† d)}
	T ^{a)}		JK	B	T		JK	B	T	JK	B	
	(2) ^{b)}	(3)	(54)	(3)	(13)	(4)	(28)	(4)	(1)	(1)	(2)	(1)
胞子の色 ^{e)}	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
胞子鎖の形状	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
メラニン色素の産生 ^{f)}												
ISP NO.6	+	—	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+
ISP NO.7	+	—	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+
糖および酸の利用												
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
meso-Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol(Adonitol)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Dulcitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Methyl- α -D-glucoside	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
生育												
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38°C	+	V	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+
39°C	V	—	V	V	—	—	V	—	—	—	—	—
40°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pH5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH4.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a) *S. scabiei* の遺伝子型; T: T-type, JK: JK-type, B: B-type.

b) ()内は分離菌株数.

c) 佐賀県 1 菌株および北海道 3 菌株

d) アメリカ基準菌株.

e) G: 灰色, S: らせん状.

f) +: 陽性, —: 陰性.

トール酸の 11 種類を利用し，L-ソルボース，ソルビトール，リビトール，ダルシトールおよびメチル- α -D-グルコシドの 5 種類は利用しなかったが，クエン酸の利用は菌株により異なった．また，供試菌株はすべて，37℃では生育せず，pH4.5 で生育した（第 5 表）．

病原性 *S. acidiscabies* 11 菌株は，胞子の色調が白色で胞子鎖の形態は直～波状を示し，メラニン色素を産生せず，炭素源としてグルコース，D-フルクトース，D-キシロース，L-アラビノース，マルトース，スクロース，トレハロース，D-マンニトール，イノシトール，メチル- α -D-グルコシドおよびプロピオン酸の 12 種類を利用し，L-ソルボース，ソルビトール，リビトールおよびダルシトールの 4 種類を利用しなかったが，D-ラフィノースの利用は菌株により異なった．また，供試菌株はすべて，39℃以上では生育せず，pH4.5 で生育した（第 5 表）．

3. 考察

鹿児島県および長崎県は北海道の端境期にあたる 2 月から 7 月にかけてジャガイモを生産し，国内ジャガイモの安定供給を担っている全国有数の産地である．また，九州のジャガイモ生産は，同一圃場での連作が多く，防除対策として土壌 pH を酸性に維持してきた（田代ら，1985；植松・片山，1990）．その結果，鹿児島県のジャガイモ産地においては，1986 年の定点調査の土壌 pH の平均が 5.3 であったものが，2007 年には pH4.3 となった．さらに，2007 年の鹿児島県長島町での詳細な調査では，土壌 pH が 4.8 以下の割合が 92.0%を占めた（森，2012）．また，2007 年の長崎県島原半島内の圃場調査では，土壌 pH4.8 以下が 78.4%を占め（長崎県農林技術開発センター，2008），九州の主要産地では多くの圃場で強酸性化が進んでいる実態が明らかとなった．そのため，ジャガイモの発芽障害や生育不良，さらに，後作であるサツマイモの発根不良等の生理障

第 5 表 鹿児島県および長崎県から分離された *Streptomyces turgidiscabies* および *S. acidiscabies* の生理学的特徴.

性質	分離菌株						ATCC700248 [†]	ATCC49003 [†] ^{d)}
	鹿児島県		長崎県		他県 ^{c)}			
	<i>S. t</i> ^{a)}	<i>S. a</i>	<i>S. t</i>	<i>S. a</i>	<i>S. t</i>	<i>S. a</i>		
	(77) ^{b)}	(8)	(7)	(3)	(1)	(1)		
胞子の色 ^{e)}	G	W	G	W	G	W	G	W
胞子鎖の形状	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
メラニン色素の産生 ^{f)}								
ISP NO.6	—	—	—	—	—	—	—	—
糖および酸の利用								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	—	—	—	—	—	—	—	—
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	✓	+	✓	+	+	+	—
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	—	—	—	—	—	—	—	—
meso-Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol(Adonitol)	—	—	—	—	—	—	—	—
Dulcitol	—	—	—	—	—	—	—	—
Methyl- α -D-glucoside	—	+	—	+	—	+	—	+
Citrate	✓	+	+	+	+	+	+	+
Propionate	+	+	+	+	+	+	+	+
生育								
37℃	—	+	—	+	—	+	—	+
38℃	—	+	—	+	—	+	—	—
39℃	—	—	—	—	—	—	—	—
pH5.0	+	+	+	+	+	+	+	+
pH4.5	+	+	+	+	+	+	+	+

a) *S. t*: *S. turgidiscabies*, *S. a*: *S. acidiscabies*.

b) ()内は分離菌株数.

c) 北海道 *S. turgidiscabies* 1 菌株, 佐賀県 *S. acidiscabies* 1 菌株.

d) アメリカ基準菌種, ATCC700248^T: *S. turgidiscabies*, ATCC49003^T: *S.*

acidiscabies.

e) G: 灰色, W: 白色, Rf: 直～波状.

f) +: 陽性, —: 陰性.

害を引き起こす事例が多く認められ、従来のそうか病防除対策の見直しを図る必要性が生じている。特に、そうか病菌のなかでも *S. acidiscabies* は強酸性土壌においてもそうか病の多発生を招く主因となることから（田代ら, 2002; Tashiro *et al.*, 2012）、本菌種の発生分布は防除対策上も重要な情報となる。

本研究の結果から、そうか病菌の菌種構成は、鹿児島県では *S. turgidiscabies* が約 5 割で、次いで *S. scabiei* が約 4 割であったのに対し、長崎県では *S. scabiei* が約 8 割と多数を占め、菌種の構成が大きく異なることが判明した。また、両県ともに *S. acidiscabies* は 1 割未満の発生であった。このことから、現在のところ *S. acidiscabies* の生息地域は限定的であると考えられるが、今後とも種いも伝染（田代, 2003）等による本菌の拡大を防ぐ対策が重要である。鹿児島県と長崎県の菌種の構成比が異なることは、鹿児島県の種いもが他県に依存しているのに対し、長崎県は他県だけでなく県内にも種いも産地を維持していることなど、種いも産地の影響を受けている可能性が考えられる。このことは、鹿児島県と長崎県の *S. scabiei* 内での ITS の遺伝子型の構成比が違っていたことから示唆される。ただし、鹿児島においては、近年、*S. turgidiscabies* の分離割合が高まっていることから、*S. scabiei* より低 pH で生育する *S. turgidiscabies* の動向には、注意を払う必要がある。

これまで、Tashiro *et al.* (1990) はジャガイモより分離した螺旋状孢子鎖の 2 菌群と、ジャガイモおよびテンサイより分離した直〜波状孢子鎖の 2 菌群における DNA 相同性の違いから、国内においては少なくとも 4 種の病原菌が関与していることを示唆している。また、田中（2003a,b）は *S. scabiei* と *S. turgidiscabies* の外に菌株数は少ないものの *Streptomyces* sp. を病原菌として分離している。しかし、本報では、鹿児島県および長崎県の普通型病斑を示すそうか病の病原菌は *S. scabiei*（メラニン産生系統およびメラニン非産生系統）、*S. turgidiscabies* および *S. acidiscabies* の 3 菌種で、それ以外の菌種は分離され

なかった．

さらに，菌種，病原性およびそうか病の病原性遺伝子である Pathogenicity island (PAI) の関係について調査した結果，病原性のある菌株は地域や菌種に関係なく必ずサクストミン合成遺伝子 (*txtAB*) を保有し，アメリカなどでの報告と一致した (St-Onge *et al.*, 2008; Wanner, 2006, 2007)．また，病原性のある菌株のほとんどが PAI 関連の 3 種類の遺伝子 (*txtAB*, *nec1* および *tomA*) を保有していたが，長崎県分離菌株および佐賀県分離菌株の *S. acidiscabies* は *txtAB* のみで *nec1* と *tomA* を欠いており，鹿児島県分離菌株の *S. acidiscabies* とは異なった．この *S. acidiscabies* の地域の違いは，鹿児島県と長崎県のそうか病の菌種の構成比および *S. scabiei* 内での ITS の遺伝子型の構成比の違いと同様に両県のそうか病菌の来歴に違いがあることを示唆している．

また，PCR による菌種判別と同時に菌種別に形態的および生理学的性質について調査したが，いずれの菌種も対照として用いた基準菌株および既報 (田中, 2000; 田代, 2002) とほぼ一致した．このうち，低 pH 耐性と最高生育温度は菌種間差が比較的安定しており，菌種を簡易に判定するための指標として有効であることがあらためて確認された．また，田中 (2003b) は *S. scabiei* の内，メラニン色素を産生する菌株を *S. scabiei* melanin (+) 系統，非産生菌株を *S. scabiei* melanin (−) 系統と呼称することを提案している．今回の筆者の ITS による *S. scabiei* の遺伝子型による判別では，*S. scabiei* は 2 つに類別され，さらに両タイプの ITS が共存している菌株が存在していた．菌株数は少ないものの，本類別法に従うと *S. scabiei* melanin (−) 系統はすべて T タイプ (米国型) に属していた．*S. scabiei* は種内で幅広い遺伝的多様性を示すことが報告されているが (Healy *et al.*, 1999)，今後，本判別法を用いて分離品種や保存菌株との関連を調査することにより，国内での *S. scabiei* の拡大時期や地理的背景を明らかにできると考えられる．

Ⅲ．そうか病菌の定量法と生態に関する研究

A. そうか病菌の土壌抽出法

土壌から直接 DNA を抽出する場合，2ml チューブを利用するため，土壌のサンプル量は最大 0.5g 程度であることから，均一な土壌を採取する必要がある．その一つの方法として，ブレンダーを利用する方法があるが，専用の機械が必要で，また，サンプル数が多い場合は洗浄等に労力等がかかる．そこで，簡易で均一な土壌サンプルを得るために，水で土壌を分散・攪拌し，遠心分離処理により回収する方法について検討した．

1. 材料および方法

1. 1. 土壌試料の調整法の検討(土壌サンプルの均一化と回収方法)

- ① そうか病菌 (*S.scabiei* S58 株) を接種し，28℃で7日間培養した土壌 10～20g を滅菌した乳鉢で均一に破砕した後，三角フラスコに移し，全量が 5～10 倍になるように希釈し，滅菌水を加え十分に懸濁した．
- ② 超音波処理を 20 分間行った後，軽く振とうし，土壌懸濁液 1～2ml をチューブに移し，1,200rpm で 15 分間遠心分離し，上澄みを除いたものを土壌サンプルとした．

1. 2. 土壌 DNA 抽出法の検討

○土壌 DNA 抽出法 A (Sato *et al.*, 2007 の方法:土壌線虫)

- ① チューブにビーズセット(直径 0.1mm のジルコニアビーズ 0.6g,直径 0.5mm ガラスビーズ 0.25g,直径 3mm のガラスビーズ 1 個)を加えた．
- ③ Lysis 緩衝液(0.5%SDS,100mM Tris-HCl(pH8.0),50mM EDTA(pH8.0))700 μ l に

100mg のスキムミルクを加え、タイテック社ビーズ破砕機 μ T-12 を用いて、3,200rpm で 2 分間振とうした。

- ③上澄み 700 μ l を新しい 2ml チューブに移し、5M NaCl 377 μ l, 10%CTAB (Cetyl-trimethyl ammonium bromide) 270 μ l を加え、60℃で 5 分間保温した。
- ④クロロホルム 500 μ l を添加し、ボルテックス後、14,000rpm で 15 分間遠心分離(室温)した。
- ⑤上澄み 1,100 μ l(550 μ l \times 2 回)を新しい 2ml チューブに移し、再びクロロホルム 500 μ l を添加し、強く振とう後、14,000rpm で 15 分間遠心分離(室温)した。
- ⑥上澄み 1,000 μ l を新しい 2ml チューブに移し、20%PEG(20%ポリエチレングリコール 8,000)を添加し、軽く転倒混和し、12,000rpm(4℃)で 20 分間遠心分離をした。
- ⑦上澄みを除き、70%エタノール 1ml を添加し、軽く転倒混和后、12,000rpm(4℃)で 5 分間遠心分離した。
- ⑧上澄みを除き、沈殿を軽く減圧乾燥し、100 μ l の DEPC 水もしくは TE 緩衝液を加え溶解した。

○土壌 DNA 抽出法 B (Sato *et al.*, 2007 の方法を改善)

- ①土壌に TE 緩衝液(pH8.0)に溶かしたリゾチーム溶液 (15mg/ml) 300 μ l を加え、強く攪拌後、37℃で 60 分間保温した。
- ②軽く遠心分離後、ビーズ(直径 0.2mmジルコニア 0.6g, 直径 0.6mm ガラス 0.25g, 直径 3mm ガラス 1 個), スキムミルク 20mg, 抽出緩衝液(1%SDS,100mM Tris-HCl, pH8.0, 300mM EDTA, pH8.0) 600 μ l を加えた。
- ③タイテックビーズ破砕機 μ T12 を用いて、3,500rpm, 2 分間 \times 2 回振とうした。
- ④65℃で 30 分間保温(途中、数回転倒混和)後、14,000rpm(室温)で 2 分間遠心分離した。
- ⑤新しい 2ml チューブに 10% CTAB 300 μ l, 3M 酢酸ナトリウム 500 μ l, および④

- の上清 700 μ l を入れ，強く攪拌後，軽く遠心分離した．
- ⑥クロロホルムを 500 μ l 入れ，強く攪拌後，14,000rpm, 15 分間遠心分離した．
- ⑦ 1,200 μ l (600 μ l \times 2 回) の水層を新しい 2ml チューブに移し，再度，クロロホルムを 500 μ l 入れ，強く攪拌後，14,000rpm, 15 分間遠心分離した．
- ⑧ 上部水層 1,000 μ l を新しい 2ml チューブに移し，改良した 20%PEG 溶液 (20% ポリエチレングリコール 8,000, 1.6M NaCl, 1MTris-HCl, pH8.4) 600 μ l を加え，転倒混和し，4℃で 1 時間静置後，12,000rpm, 20 分間遠心分離した．
- ⑨ 上澄みを除去し，1,000 μ l の WB (20%PEG 溶液, 5M NaCl, 滅菌ミリ Q 水) を加え，軽くチューブを転倒し，12,000rpm, 4℃で 10 分間遠心分離した (沈殿に色がない場合は、省略する) ．
- ⑩ 上澄みを除去し，1,000 μ l の 70%エタノール，グリコーゲン溶液 (20mg/ml) 1 μ l を加え，転倒混和後，12,000rpm, 4℃で 10 分間遠心分離した．
- ⑪ 上澄みを除去し，軽く減圧乾燥し，沈殿を 100 μ l の DEPC 水あるいは TE 緩衝液に溶解した．

1. 3. 土壌中のそうか病菌の胞子からの効率的な DNA 抽出

そうか病菌は，松本培地で 25℃，21 日間培養した菌 (*S.turgidiscabies* T46 菌株) を白金耳で菌体ごとにかき取り滅菌水に懸濁した．懸濁液は超音波処理 10 分後，5 μ m のメンブレンフィルターで 2 回濾過し，ろ過液を胞子懸濁液とした．一定量の懸濁液を土壌 (黒ボク土) に懸濁し，以降は上記の土壌の調整法および土壌 DNA 抽出法 B に従い作業を行った．

2. 結果

2. 1. 土壌試料の調整法の検討(土壌サンプルの均一化と回収方法)

簡易に均一化した土壌サンプルを得るために、滅菌水で土壌を分散し、遠心処理で再回収する方法の影響について検討した。その結果、ほとんどの菌が沈殿し、遠心分離した上澄みに浮遊する割合は 0.003% でほぼ 100% の回収が可能であった(第 6 表)。また、土壌の希釈倍数については 10 倍希釈よりも 5 倍希釈で、2ml チューブへ移す土壌懸濁液量については 2ml が適していた。

2. 2. 土壌 DNA 抽出法の検討

土壌抽出法 B での抽出緩衝液での SDS の濃度は 2% よりも 0.5% の方が収量は高かった(第 7 表)。そこで、改良した土壌抽出法 B と従来の土壌抽出法 A を DNA 純度で比較したところ、土壌抽出法 B がいずれの土壌でも優れる傾向が認められた。また、土壌の種類では、黒ボク土よりも赤黄色土から回収できる DNA の収量、純度が優れていた(第 8 表)。

2. 3. 土壌中のそうか病菌の胞子からの効率的な DNA 抽出

土壌中のそうか病菌胞子から DNA を効率よく回収するために、抽出の前処理としてリゾチーム溶液処理を検討した結果、処理を行った方が DNA の収量が増加した。また、リゾチーム溶液処理後に遠心分離で土壌を再回収しても DNA の収量が減少することはなかった(第 2 図)。

第 6 表 そうか病菌培養土を水で懸濁した後，遠心分離（12,000rpm で 10 分）した沈殿と上清のそうか病菌数．

	反復	生土壌1gあたりのC.F.U ^{c)}		
		土壌中の菌数(遠心前)	遠心処理後の沈殿での菌数	遠心処理後上澄みでの菌数
そうか病菌培養土壌	1	280,000,000 b)	330,000,000	8,100
	2	360,000,000	340,000,000	9,000
	平均	320,000,000	335,000,000	8,550
	比率 (%)	100.0	104.7	0.0027

a) 土壌：黒ボク土，接種菌：*S.scabiei* S58 菌株 28℃で7日間培養した．

b) 組成濃度を 100 分の 1 にした普通寒天培地（NA）で，土壌，上清みを段階希釈し培養し計数した．

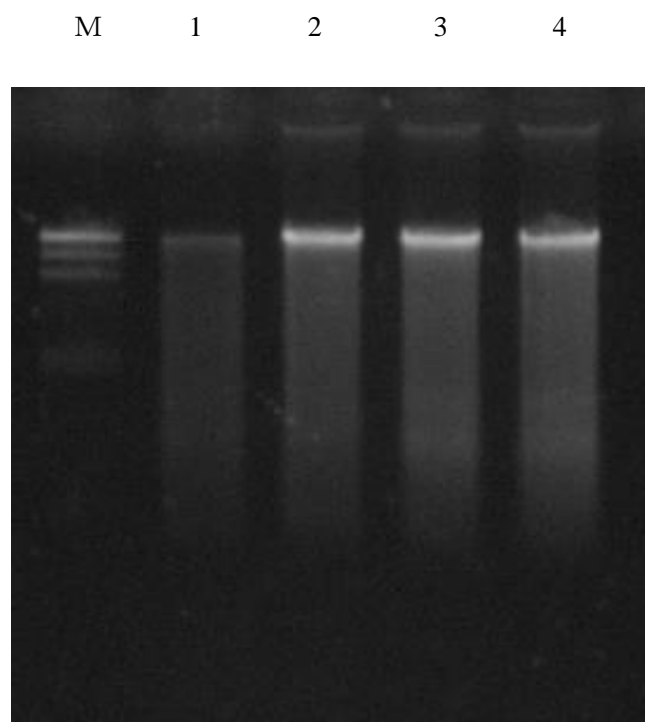
c) C.F.U：Colony forming unit．

第 7 表 土壌抽出法 B での抽出緩衝液の違いにおける DNA 純度への影響．

抽出法buffer	吸光度比	核酸量
	A260/A280	μg/ml
SOIL(日本ジーン)	1.5	26.0
100mM Tris-HCl(pH8.0),300mMEDTA,0.5%SDS	1.4	44.4
100mM Tris-HCl(pH8.0),300mMEDTA,2%SDS	1.5	28.5

第 8 表 土壌抽出法 A と土壌抽出法 B(改良)の DNA 純度の比較．

抽出法	土壌の種類	吸光度比	核酸量
		A260/A280	μg/ml
土壌抽出A	赤黄色土(長島)	1.4	38.4
	黒ボク土(場内)	1.2	29.5
土壌抽出B	赤黄色土(長島)	1.7	52.6
	黒ボク土(場内)	1.5	33.6



第 2 図 リゾチーム処理がそうか病菌胞子の DNA 抽出に与える影響.

M:マーカー, 1: 土壌の酵素処理無し→土壌 DNA 抽出 B, 2: リゾチーム溶液 (15mg/ml) 100ul に懸濁, 37℃・60 分処理→土壌 DNA 抽出 B, 3: リゾチーム溶液 (15mg/ml) 500ul に懸濁, 37℃・60 分処理→遠心 14,000rpm・10 分→沈殿→土壌 DNA 抽出 B, 4: リゾチーム溶液 (15mg/ml) 1,000ul に懸濁, 37℃・60 分処理→遠心 14,000rpm・10 分→沈殿→土壌 DNA 抽出 B.

3. 考察

土壌サンプルからの DNA 抽出には、土壌の吸着（星野(高田)・長谷, 2005)やフミン酸などの PCR を阻害する物質（Wilson, 1997）が問題となる．これらの影響を最小限にするために、本研究ではスキムミルク（Takada-Hoshino and Matsumoto, 2004），CTAB, EDTA, クロロホルム, PEG 等を利用し土壌からの DNA 抽出法（Sato *et al.*, 2007）を一部改良した．特に、そうか病菌の胞子に対しては、ビーズ破砕と SDS の組み合わせだけでは DNA の回収が不十分であったことから、土壌サンプルをリゾチーム溶液で前処理する方法を追加することで DNA 純度・収量の改良を行った．その結果、改良前と改良後で DNA 純度は黒ボク土で 1.2（A260/A280 の吸光度比）から 1.5 に、収量は 1.1 倍に、赤黄色土で DNA 純度は 1.4 から 1.7 に、収量は 1.4 倍になった（第 8 表）．

以上、土壌試料の調整法及び土壌 DNA 抽出法について検討した結果、水で土壌を分散・攪拌し、遠心処理により回収する方法及び Sato *et al.*, (2007)を改良した土壌 DNA 抽出法 B により、土壌からの DNA の直接回収が改善された．

B. リアルタイム PCR 法による *S.scabiei* および *S.turgidiscabies* の定量法の開発

ここでは、そうか病菌として重要である *S. scabiei* および *S. turgidiscabies* について、種間で多型が認められている 16S-23S rRNA ITS 領域を基にそれぞれに特異的なプライマーを設計し、リアルタイム PCR によってこれら 2 種を特異的に定量する方法について検討した．

1. 材料および方法

1. 1. 供試菌株

S. scabiei は S10, S58, S62 (鹿児島), NG1-3 (長崎), S-324 (佐賀; 田代ら, 2002), D-1-4 (北海道; 田中, 2000) および ATCC (American Type Culture Collection) 49173 の 7 菌株, *S. turgidiscabies* は T1, T5, T14, T45 (鹿児島), NG1-1 (長崎), SSY-10 (北海道: 田中, 2000) および ATCC700248 の 7 菌株, *S. acidiscabies* は A7 (鹿児島) および ATCC49003 の 2 菌株の合計 16 菌株を供試した.

1. 2. そうか病菌株からの DNA の抽出

供試菌株は松本培地 (松本, 1979) から寒天を除いた液体培地により 25℃で 2~3 日間振とう培養した. 菌体約 0.1g を乳鉢内で液体窒素により凍結・摩砕し, マイクロチューブに移した. 500μl の抽出緩衝液 (0.15M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, pH8.0, 2% SDS) を加え強く攪拌し, 60℃で 30 分間保温した後, 室温で 20,600×g, 10 分間遠心分離した. 上清に等量の PCI (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール; 25: 24: 1) を加え攪拌し, 室温で 20,600×g, 5 分間遠心分離した. この過程を 2 回繰り返した. その上清に 1/4 量の 10M 酢酸アンモニウムと等量のイソプロパノールを加え, 氷中で 10 分間静置後, 4℃で 20,600×g, 10 分間遠心分離した. 沈殿に 70%エタノールを 200μl 加え, 4℃で 20,600×g, 10 分間遠心分離後, 上澄みを除き減圧乾燥後, TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, pH8.0) を 50μl 加えた.

1. 3. リアルタイム PCR 用プライマーの設計

S.turgidiscabies についてはアメリカ基準菌株 ATCC700248 のデータベース上の 16S-23S rRNA ITS 領域の塩基配列 (DDBJ Accession Number; AB026221) を基に, *S.t-qPCR-F01* (5'-CCAGACATTGTCTGGTGG-3') / *R01*

(5'-ACACCCTTCACCGCTTCC-3') のプライマーセットを設計した. また, *S. scabiei* については *S. scabiei* の JK タイプに特異的なプライマーセット

S.s-qPCR-F01 (5'-AAGGAGCATCTAGCTGCC-3') / *F03*

(5'-GAGCACTTCTACCGATCC-3') を使用した.

1. 4. PCR によるプライマー特異性の検定

Ex Taq (タカラバイオ) を使用し, 鋳型 DNA を 10ng, プライマーの最終濃度を 0.1 μ M とし, 他の試薬量は製品の説明書に従い合計 20 μ l 量で PCR を行った. PCR の温度条件は 95 $^{\circ}$ C で 2 分の初期変性を 1 回, 95 $^{\circ}$ C で 30 秒, 55 $^{\circ}$ C で 30 秒, 72 $^{\circ}$ C で 30 秒の増幅過程を 35 回繰り返し, 最終伸長 72 $^{\circ}$ C で 5 分を 1 回行った.

また, PCR 増幅産物は 3% のアガロースゲルで電気泳動後, エチジウムブロマイド溶液で染色し, 紫外線照射により確認した.

1. 5. リアルタイム PCR によるそうか病菌定量

そうか病菌の定量には, *S. scabiei*-JK タイプに特異的なプライマーセット (*S.s-qPCR-F03* / *R01*) と *S. turgidiscabies* に特異的なプライマーセット (*S.t-qPCR-F01* / *R01*) を使用した. *S. scabiei* S58 菌株および *S. turgidiscabies* T45 菌株から抽出した DNA を 10fg~10ng (10^7 fg) / μ l に段階希釈し, それら 2 μ l を鋳型 DNA としてリアルタイム PCR を行い, 両菌種の検量線を作成した. ま

た，土壤 pH の違いが両種の菌の増減に及ぼす影響を調べるため，そうか病菌病原性遺伝子である *txtAB* オペロン遺伝子を標的としたプライマー（StrepF / R）による病原性 *Streptomyces* 属菌の定量（Qu *et al.*, 2008）も併せて実施した．さらに，下記の項で作成した *S. scabiei* あるいは *S. turgidiscabies* の単独感染塊茎および根を利用し，各菌種の ITS プライマーによって得られた定量値（ITS 定量値）と *txtAB* プライマーによって得られた定量値（*txtAB* 定量値）との関係についても調査した．PCR 機器は 7300 Real-Time System（ABI），試薬は SYBR Premix Dimer Eraser（タカラバイオ）を使用し，1 サンプルあたり 15 μ l 量（SYBR Premix Dimer Eraser（ $\times 2$ ）7.5 μ l，各プライマー（10 μ M）0.9 μ l，ROX Reference Dye 0.6 μ l，鋳型 DNA 2 μ l，DEPC 処理水 3.1 μ l）で行った．PCR 温度条件は，そうか病菌に種特異的なプライマーセット（S.s-qPCR-F03 / R01，S.t-qPCR-F01 / R01）では 95 $^{\circ}$ C で 30 秒の初期変性 1 回，95 $^{\circ}$ C で 15 秒，55 $^{\circ}$ C で 30 秒，72 $^{\circ}$ C で 34 秒の増幅過程を 40 回繰り返し，融解曲線分析を行った．*txtAB* オペロン遺伝子の定量では 95 $^{\circ}$ C で 30 秒の初期変性 1 回，95 $^{\circ}$ C で 10 秒，60 $^{\circ}$ C で 30 秒，72 $^{\circ}$ C で 34 秒の増幅過程を 40 回繰り返し，融解曲線分析を行った．なお，両菌の DNA が混在している鋳型 DNA における定量試験では，SYBR Premix Ex Taq（タカラバイオ）を使用し，1 サンプルあたり 25 μ l 量（SYBR Premix Ex Taq（ $\times 2$ ）12.5 μ l，各プライマー（10 μ M）0.5 μ l，ROX Reference Dye 0.5 μ l，鋳型 DNA 2.5 μ l，滅菌蒸留水あるいは土壤 DNA 抽出不純物液 8.5 μ l）で行った．鋳型 DNA は *S. scabiei* S58 菌株と *S. turgidiscabies* T45 菌株の抽出 DNA を 10:1～1:10 の濃度で混合した．なお，土壤 DNA 抽出不純物液とは，滅菌土壤 0.4g から後の項で抽出した最終沈殿物に滅菌蒸留水 30 μ l を加えて懸濁したものである．PCR 温度条件は，94 $^{\circ}$ C で 30 秒の初期変性 1 回，94 $^{\circ}$ C で 5 秒，58 $^{\circ}$ C で 20 秒，80 $^{\circ}$ C で 34 秒の増幅過程を 40 回繰り返し，融解曲線分析を行った．

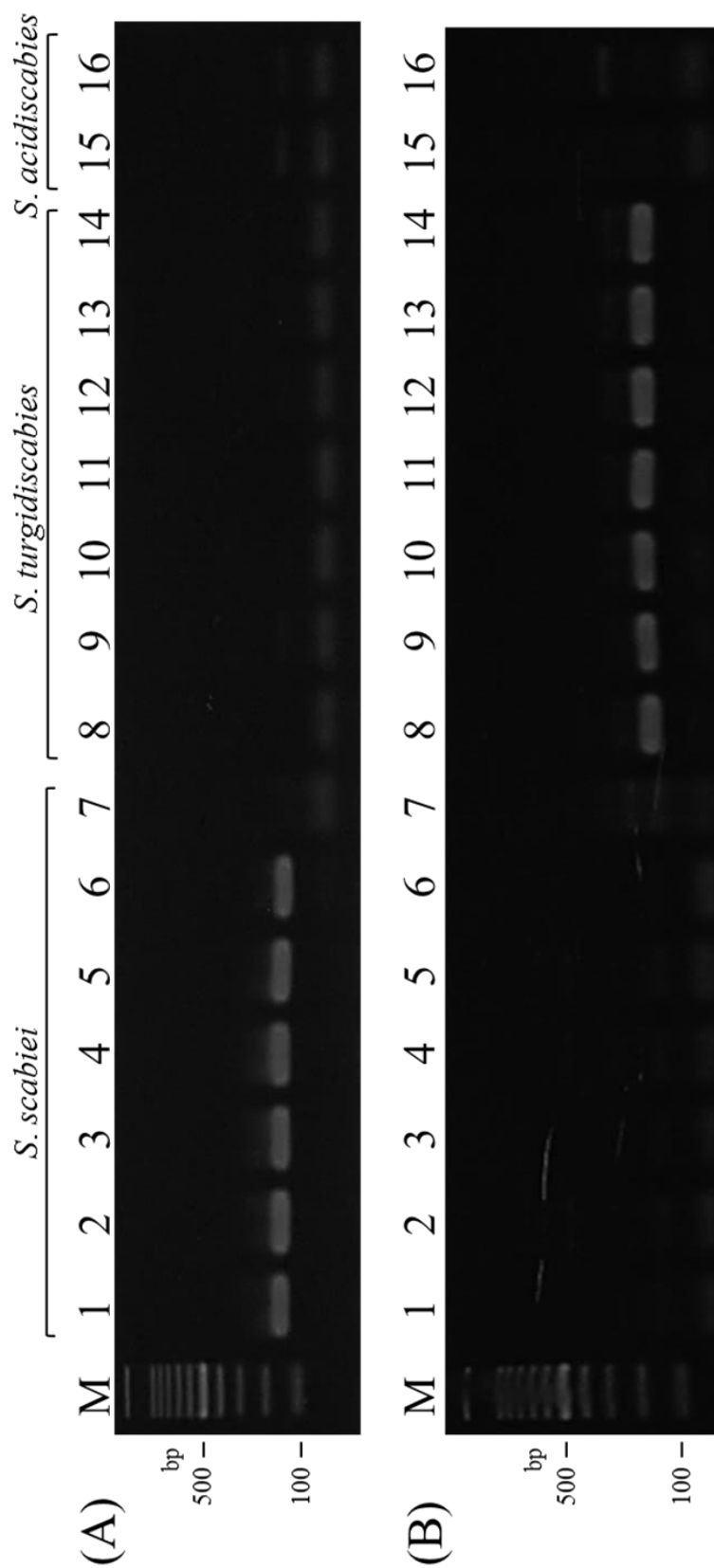
2. 結果

2. 1. PCR によるプライマー特異性の検定

S.s-qPCR-F01/F03 (*S. scabiei* の JK タイプ用) は, 供試した *S. scabiei* の中で ATCC49173 菌株を除く 6 菌株のみで目的の DNA 断片が確認され, *S. turgidiscabies* および *S. acidiscabies* では確認されなかったことから, *S. scabiei* の JK タイプに特異的なプライマーであった(第 3 図 A). また, S.t-qPCR-F01/R01 (*S. turgidiscabies* 用) は, 供試した *S. turgidiscabies* 7 菌株のすべてで目的の DNA 断片が確認され, *S. scabiei* および *S. acidiscabies* では確認されなかったことから, *S. turgidiscabies* に特異的なプライマーであった(第 3 図 B).

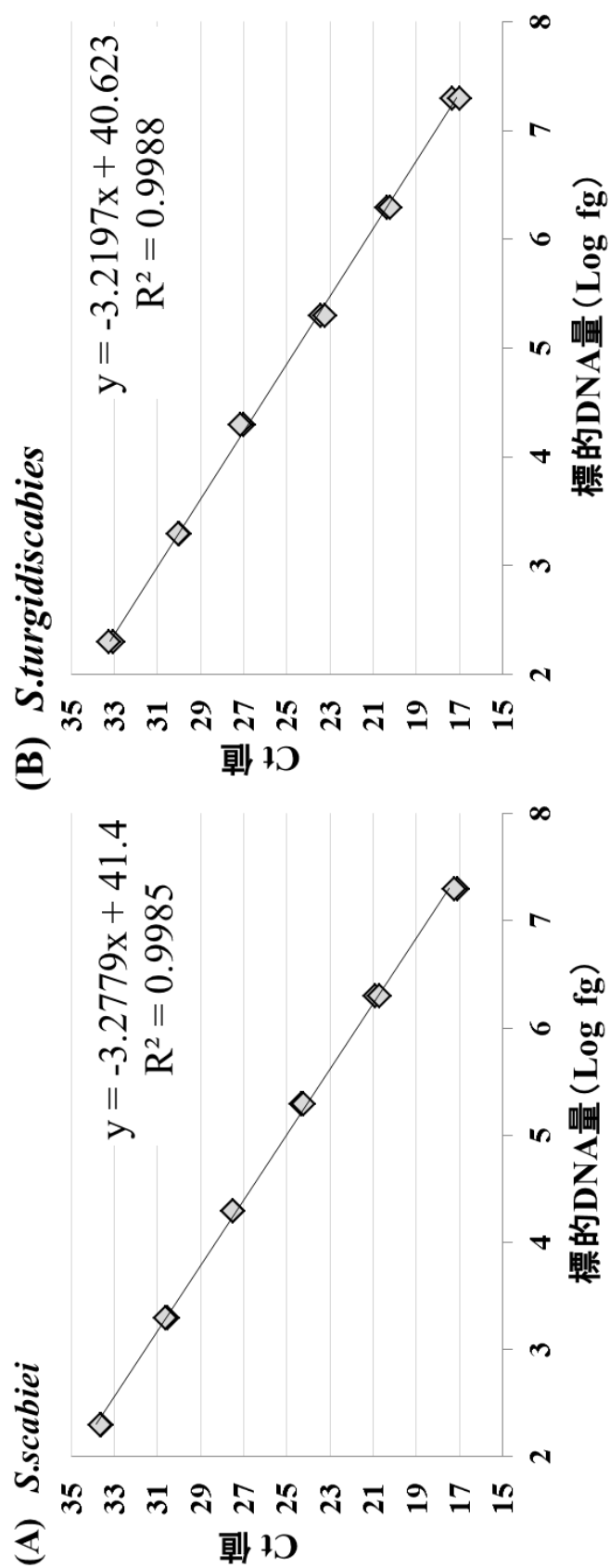
2. 2. リアルタイム PCR によるそうか病菌定量

S. scabiei の検量線は決定係数 (R^2) が 0.9985 となり(第 4 図 A), 同様に *S. turgidiscabies* の検量線は決定係数が 0.9988 となり(第 4 図 B), 両菌種とも 200fg から 20ng までの DNA 濃度の対数値と Ct 値との間に高い直線回帰が認められた. また, *S. scabiei* S58 菌株と *S. turgidiscabies* T45 菌株の鋳型 DNA を 10:1~1:10 の濃度で混合した場合でも, 定量値はそれぞれの菌の鋳型 DNA の混合比率を反映したものとなった(第 5 図 A). さらに, 土壌 DNA 抽出不純物液を加えた場合においてもほぼ同様に混合比率を反映した(第 5 図 B).



第 3 図 そうか病菌定量用プライマーの 3 種のそうか病菌での特異性の検定.

(A) *Streptomyces scabiei* JK type 特異的プライマーセット; S.s-qPCR-F01/R03, (B) *S. turgidiscabies* 特異的プライマーセット; S.t-qPCR-F01/R01. M:100pb DNA ladder markers, 1:S10, 2:S58, 3:S62 (鹿児島), 4:NG1-3 (長崎), 5:S-324(佐賀), 6:D-1-4(北海道), 7:ATCC49173(アメリカ基準菌株), 8:T1, 9:T5, 10:T14, 11:T45 (鹿児島), 12:NG1-1(長崎), 13:SSY-10(北海道), 14:ATCC700248, 15:A7(鹿児島), 16:ATCC49003.

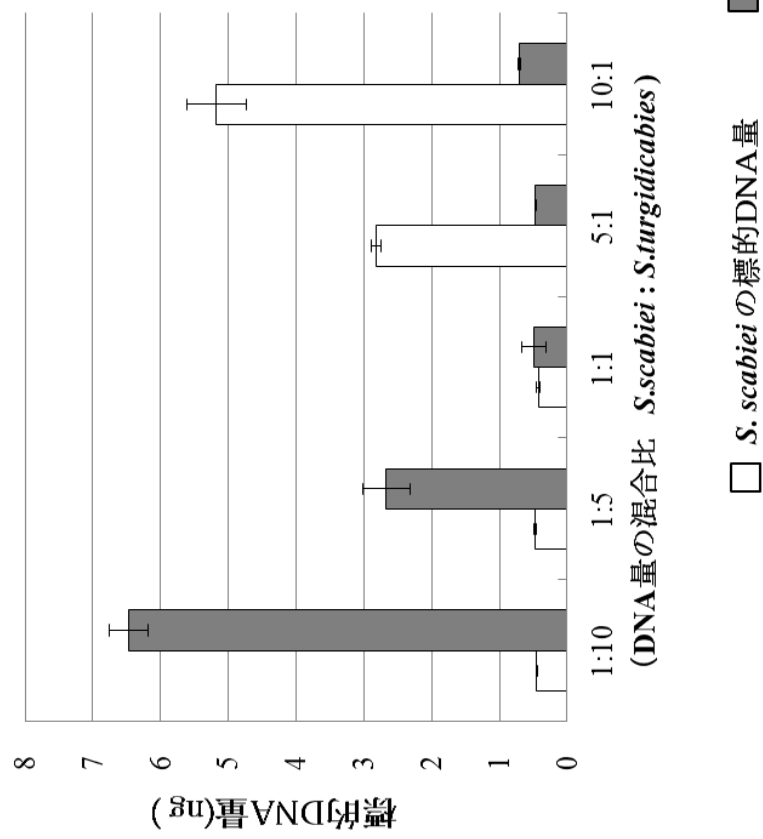


第 4 図 リアルタイム PCR (SYBR Green) の検量線.

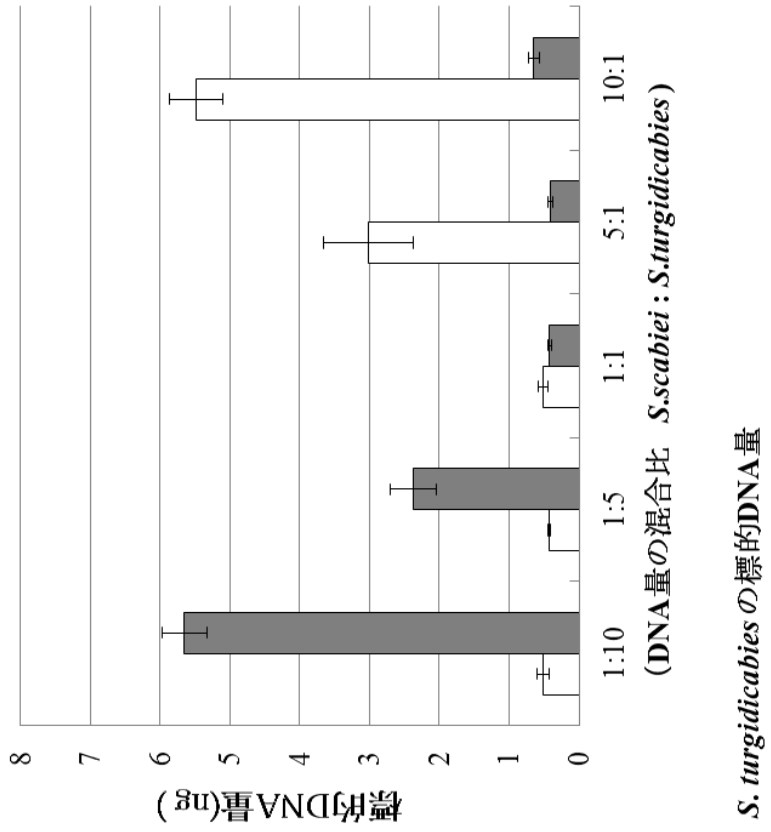
検量線は Ct 値と *Streptomyces scabiei* strain S58(A) あるいは *S. turgidiscabies* strain T45(B) から抽出した全

DNA の段階希釈液から得られた. 検量線は 2 反復の結果から作成した.

(A) 滅菌水



(B) 土壌DNA抽出不純物液



第 5 図 *Streptomyces scabiei* S58 菌株および *S. turgidicabies* T45 菌株から抽出したDNAを異なった比で混合した条件下でのリアルタイム PCR によるそうか病菌の定量.

(A)滅菌水で希釈した DNA, (B)土 壌から抽出した DNA 不純物液. プライマーセット; S.s-qPCR-F01/R03 (*S. scabiei* 用), S.t-qPCR-F01/R01 (*S. turgidiscabies* 用).

3. 考察

本研究においては、*S. scabiei* および *S. turgidiscabies* の 16S-23S rRNA ITS 領域を基に、それぞれに特異的なリアルタイム PCR 用プライマーを設計した。*S. scabiei* の定量には、鹿児島県の *S. scabiei* の調査で 9 割近くを占める *S. scabiei*-JK タイプに特異的なプライマーセット (S.s-qPCR-F03/ R01) を使用した。その結果、*S. scabiei*-T タイプを除く *S. scabiei* 菌株すべてで目的とする DNA 断片の増幅が確認された。また、*S. turgidiscabies* 用に設計したプライマーセット (S.t-qPCR-F01/ S.t-qPCR-F01) は供試した *S. turgidiscabies* 菌株のすべてで目的とする DNA 断片の増幅が確認された。両種のプライマーセットは標的菌の総 DNA 定量値が約 200fg 以上で検出が可能であり、菌の DNA 定量値の対数値と Ct 値に高い直線回帰が認められた。また、両菌種が混在した場合でも菌種ごとの定量が可能であった。また、土壌由来 DNA を含む不純物懸濁液を PCR 反応液に添加してリアルタイム PCR を実施したが、不純物を加えていない場合と同様な定量値が得られたことから、本研究で開発したリアルタイム PCR 法はそうか病の定量に有効であると考えられた。

C. リアルタイム定量 PCR と無底ポット栽培を利用したジャガイモそうか病菌の動態解析；
土壌 pH の違いが *S. scabiei* および *S. turgidiscabies* の菌の増減に及ぼす影響

ここでは、精度が高く簡便な無底ポットを用いたジャガイモそうか病検定法 (坂本ら, 2011) と本章で開発したリアルタイム定量 PCR を利用して、異なる土壌 pH が両種の菌の増減に与える影響について調査した。

1. 材料および方法

1. 1. 土壌 pH の調整とそうか病菌の接種

ジャガイモ栽培履歴のないハウス内で実施し，栽培には無底ポットを利用した．無底ポット（内径 30cm，高さ 32cm）は，耕運機で溝を掘り，ポット間隔 100cm，深さ 25cm で，ポット内に土が入らないように設置した．ポット内の土壌は，コンクリートミキサーを用いて土壌と硫黄粉末資材（商品名：ガッテンペーハー）を十分に混和して pH を調整した土壌を充填した．なお，硫黄粉末資材の添加量は，pH を 1 程度低下させるために 1 ポットあたり約 16.5g を目安とした．混和後約 1 か月間放置したのち，各ポット土壌の pH を測定し，pH 値の近いポット間の土壌を再度混和して微調整を行い，最終的に pH を 4.4, 4.6, 4.9, 5.2 の 4 段階に調整した．その後，各ポット内にクロピクテープ（4 節分）を約 15cm の深さに埋設し，厚さ 0.05mm の透明ポリマルチで 3 週間被覆した．被覆除去 3 日後の 2011 年 11 月 25 日に菌接種とジャガイモ（品種：ニシユタカ）の植え付けを行った．接種菌は *S. scabiei* S58 菌株および *S. turgidiscabies* T45 菌株を，松本培地で 28℃，21 日間培養した．接種用の孢子懸濁液は各菌の培養シャーレに 0.05% 寒天滅菌水約 5ml を加え，コンラージ棒で回収した．菌濃度は 1/100NA 培地（肉エキス 0.1g，ペプトン 0.1g，NaCl 0.03g，寒天末 16g，蒸留水，1,000 ml，pH7.2）で 28℃，3 日間，孢子懸濁液の段階希釈液を培養して 1ml あたりの生菌数（colony forming unit：CFU）を求めた．なお，孢子懸濁液は菌濃度が判明するまで 4℃で保存した．試験区は，前記の土壌 pH を 4 段階に調整したポットに *S. scabiei* または *S. turgidiscabies* を単独接種した区，*S. scabiei* と *S. turgidiscabies* を混合接種した区を設置した（土壌 pH が 4 段階×菌接種が 3 通り）．試験は 3 反復で行った．

ポット内への菌の接種は単独接種区では 2.0×10^4 CFU/ml に調整した菌液 2,000ml とポット内から取り出した土壌 17L とを十分に混和し、再びポット内へ戻した。混合接種区では *S. scabiei* 2.0×10^4 CFU/ml の菌液 1,000ml と *S. turgidiscabies* 2.0×10^4 CFU/ml の菌液 1,000ml を混合し、単独接種と同様に接種を実施した。その後、フルアジナム水和剤 100 倍で消毒した健全種いも（約 50g）を深さ 15cm に植え付けた。2012 年 3 月 14 日の収穫までの栽培中の灌水は 1 週間に 1 回程度行い、おおよそ土壌水分率 20% で管理した。なお、施肥等その他の栽培管理は実施しなかった。なお、供試土壌の土壌分析は「土壌標準分析・測定法（2003）」に従い実施した。

1. 2. 塊茎および土壌のサンプリング

収穫日にポット別に地下部、塊茎周辺土壌を採取した。なお、土壌については植え付け 33 日後（出芽 22 日後）にも採取を行った。株の地下部は水道水で土壌を十分に洗い流した。さらに、0.05% Tween 20 を加用した蒸留水を入れたビーカー内で地下部を 10 分間の超音波（28kHz）洗浄後、流水中に 30 分間置き、最後に滅菌水で 5 分間の超音波洗浄を 3 回繰り返したものを滅菌ろ紙に置き、クリンベンチ内で軽く風乾した。その後、コルクボーラとメスを用いて新生塊茎のそうか病の病斑部（直径 10mm、厚さ約 1mm）を 2 カ所切り出した。根は約 5mm の長さで切断し、十分に混和したものから 100mg を採取した。また、土壌は 1mm 角のふるいで篩った後、十分に混和した 5g を 50ml コニカルチューブに入れ、全体量が 25ml になるまで滅菌水を加え、20 分間の超音波処理（28kHz）を行い、100rpm で 30 分間振とう後、直ちに土壌懸濁液 2ml をねじ蓋式マイクロチューブに移した。その後、 $15,780 \times g$ で 15 分間遠心分離を行い、上澄みを除いたものを DNA 抽出用の土壌サンプルとした。なお、各サンプルは DNA 抽出まで -80°C で凍結保存した。

1. 3. ジャガイモ組織および土壌からの DNA の抽出

ジャガイモ塊茎及び根の組織は乳鉢を用いて摩砕し，CTAB（Cetyl trimethyl ammonium bromide）法（Murray and Thompson, 1980）により DNA を抽出した．抽出 DNA は TE 緩衝液で 10 μ g/ml に濃度を調整した．土壌からの DNA 抽出は Sato *et al.*（2007）の方法を改良して実施した．前記の土壌サンプルに 15mg/ml リゾチーム/TE 緩衝液(pH8.0) 300 μ l を加え懸濁し，37 $^{\circ}$ C で 60 分保温した．軽く遠心分離後，ビーズセット（直径 0.1mm ジルコニアビーズ 0.6g，直径 0.6mm ガラスビーズ 0.25g，直径 3mm ガラスビーズ 1 個），スキムミルク 20 mg，抽出緩衝液（1% SDS, 100mM Tris-HCl (pH8.0), 300mM EDTA (pH8.0)）700 μ l を加え，しばらく 65 $^{\circ}$ C で保温した．3,200rpm，2 分間振とう破碎（タイテック社ビーズ破碎機 μ T-12）を 2 回繰り返した．さらに，65 $^{\circ}$ C で 60 分保温後（途中，4～5 回転倒混和），室温で 11,250 \times g，2 分間遠心分離した．10% CTAB 300 μ l，3M 酢酸ナトリウム 500 μ l を予め加えた新しい 2ml のチューブに，上清を 700 μ l 移し，強く攪拌後，軽く遠心分離した．クロロホルム 500 μ l を加え，強く攪拌後，室温で 11,250 \times g，5 分間遠心分離した．上部水層 1,200 μ l（600 μ l \times 2 回）を新しい 2ml マイクロチューブに移し，再度，クロロホルム 500 μ l を加え，強く攪拌後，11,250 \times g で 15 分間遠心分離した．上部水層 1,000 μ l を新しい 2ml のチューブに移し，20%PEG 溶液（20% ポリエチレングリコール 8000, 1.6M NaCl, 1M Tris-HCl, pH8.4）600 μ l を加え，転倒混和し，4 $^{\circ}$ C で 1 時間静置後，15,780 \times g，20 分間遠心分離した．上澄みを除去し，1,000 μ l の 70%エタノール，グリコーゲン溶液（4mg/ml）5 μ l を加え，軽く混和後，4 $^{\circ}$ C で 15,780 \times g，10 分間遠心分離した．上澄みを除去し，軽く乾燥し，-80 $^{\circ}$ C で保存した．使用前に TE 緩衝液 30 μ l を加えて試験に供試した．

1. 4. 新生塊茎の発病調査

収穫時の新生塊茎はポットごとに発病面積別に分け、発病塊茎率と発病度 (Σ (発病面積別塊茎数×指数) / (調査塊茎数×6) ×100) を求めた。発病指数は、発病なしを 0、発病面積が 3%以下を 1、4～13%を 2、14～25%を 3、26～50%を 4、51～75%を 5、76%以上を 6 とした。

2. 結果

供試土壌は pH が低いほど電気伝導度(EC)は高く、塩基置換容量(CEC)は低くなった。アンモニア態窒素は 2.97～4.61mg/100g 乾土、硝酸態窒素は 18.9～30.2mg/100g 乾土といずれの区も非常に高かった。全窒素、全炭素、腐植、Ca、Mg、K はいずれの区においてもほぼ同様な値であった（第 9 表）。

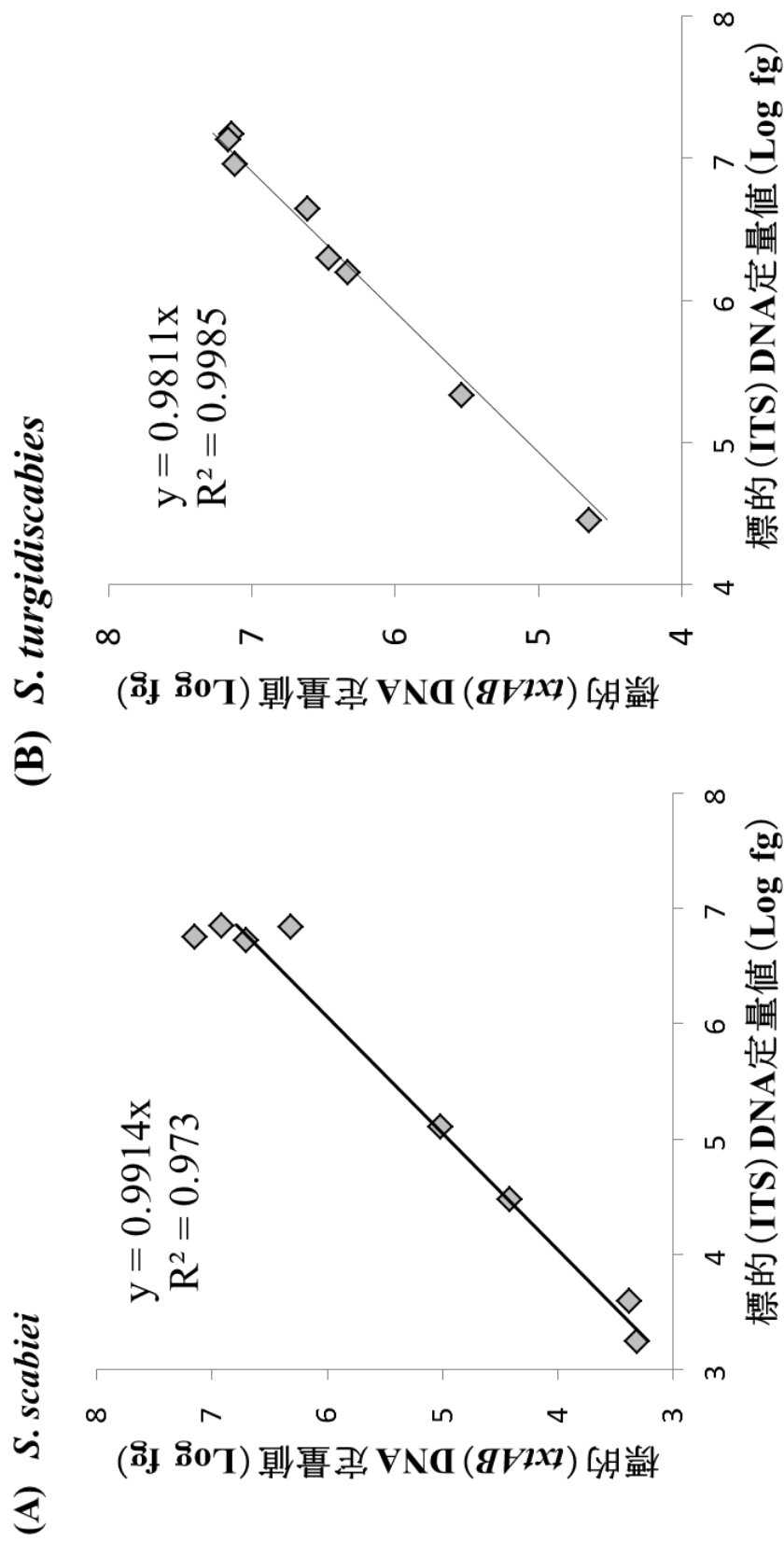
S. scabiei S58 菌株を単独接種した区および *S. turgidiscabies* T45 菌株を単独接種した区から採取した根および新生塊茎病斑から抽出した DNA 試料について、リアルタイム PCR により求められた *txtAB* 定量値とそれぞれの菌種の ITS 定量値を比較した。その結果、*txtAB* 定量値と *S. scabiei* ITS 定量値の関係 ($y = 0.9914x$, $R^2 = 0.973$, 第 6 図 A) および *txtAB* 定量値と *S. turgidiscabies* ITS 定量値の関係 ($y = 0.9811x$, $R^2 = 0.9985$, 第 6 図 B) には高い相関関係が認められ、本研究においては両菌種の ITS 定量値は概ねそうか病原菌量を反映した定量値となったものと考えられた。

第 10 表に異なる土壌 pH 条件下におけるそうか病の発病状況と菌の増減を示した。各区の土壌 pH の推移は、植え付け約 1 か月後には pH5.2 区以外では pH がやや低下し、収穫時点では pH4.7 (植え付け時) 以上の区で pH は上昇し、試

第 9 表 供試土壌の特性.

土壌pH (H ₂ O)	EC mS/cm	NH ₄ -N mg/100g	NO ₃ -N mg/100g	T-N %	T-C %	HC %	CEC cmol _c kg ⁻¹	Ca cmol _c kg ⁻¹	Mg cmol _c kg ⁻¹	K cmol _c kg ⁻¹
4.4	2.080	2.97	25.5	0.32	4.46	7.69	21.7	19.1	3.2	1.4
4.7	1.636	4.36	26.9	0.34	4.54	7.84	23.7	18.7	3.1	1.4
4.9	1.164	3.36	18.9	0.33	4.54	7.83	24.2	17.3	2.9	1.3
5.2	0.796	4.61	30.2	0.35	4.53	7.81	26.2	15.3	3.0	1.4

a) EC: 電気伝導度, NH₄-N: アンモニア態窒素, NO₃-N: 硝酸態窒素, T-N: 全窒素, T-C: 全炭素, HC: フミン酸, CEC: 陽イオン交換容量, Ca: カルシウム, Mg: マグネシウム, K: カリウム.



第 6 図 リアルタイム PCR による *txtAB* 定量値と ITS 定量値の相関．

(A) *Streptomyces scabiei* group JK 特異的プライマーセット; S.s-PCR-F01/R03, *txtAB* 特異的プライマーセット; StrepF/R . *S. scabiei* S58 菌株 (A)あるいは *S. turgidiscabies* T45 菌株に汚染させた根および塊茎から抽出した DNA 試料を利用した．試料は根 4 個，塊茎 4 個の合計 8 個．

験期間中の変動が認められた。そこで、植え付け時の土壌 pH を基準にして接種菌別に各区の収穫時の発病度や土壌や根での *txtAB* 定量値を比較した。まず、各区の発病度は、*S. scabiei* 単独区では pH が高いほど発病度が高くなり、pH5.2 で非常に高い発病度となった。*S. turgidiscabies* 単独区は pH4.7 以上で非常に高い発病度となった。両菌混合区では pH4.9 以上で非常に高い発病度となった。次に、土壌 1g 中の *txtAB* 定量値は、*S. scabiei* 単独区の植え付け約 1 か月後では、各 pH とも $10^{4.6} \sim 10^{4.7}$ fg となり、pH の違いで有意差は認められなかった。*S. scabiei* 単独区の収穫時と植え付け約 1 か月後の土壌 1g 中の *txtAB* 定量値を比較すると、pH4.7 以下では数倍程度の増加であったが、pH4.9 で約 32 倍、pH5.2 で約 63 倍の増加が認められ、収穫時になると pH4.7 以下と pH4.9 以上の間で *txtAB* 定量値に有意差が認められた。*S. turgidiscabies* 単独区の植え付け約 1 か月後の土壌 1g 中の *txtAB* 定量値は $10^{5.2} \sim 10^{6.3}$ fg 程度となり、pH の違いによる有意差は認められなかった。*S. turgidiscabies* 単独区の収穫時と植え付け約 1 か月後の土壌 1g 中の *txtAB* 定量値を比較すると、pH4.4 で約 5 倍、pH4.7 で約 25 倍、pH4.9 で約 16 倍、pH5.2 で約 63 倍となり、収穫時になると pH4.4 と pH4.7 以上の間で *txtAB* 定量値に有意差が認められた。両菌混合区の植え付け約 1 か月後の土壌 1g 中の *txtAB* 定量値は、pH4.7 以下で約 10^5 fg、pH4.9 で約 4×10^5 fg、pH5.2 で約 10^6 fg となり、pH 間で *txtAB* 定量値に有意差が認められた。両菌混合区の収穫時と植え付け約 1 か月後の土壌 1g 中の *txtAB* 定量値を比較すると、pH4.4 では約 4 倍の増加であったが、pH4.7 以上では 79~100 倍の増加を示し、pH 間で *txtAB* 定量値に有意差が認められた。また、収穫時の根の *txtAB* 定量値は、*S. scabiei* 単独区よりも *S. turgidiscabies* および両菌種混合区で高くなり、また、pH が高いほど *txtAB* 定量値が高く、各区とも pH の影響が認められた。一方、新生塊茎病斑の *txtAB* 定量値は、いずれの菌接種区でも pH による差は認められなかった。

第 10 表 異なる土壌 pH 条件下におけるそうか病の発病状況と菌の増減（無底ポット栽培試験）

病原菌 ^{a)}	土壌 pH(H ₂ O)			そうか病罹病塊茎率 (%)	発病度 ^{c)}	標的DNA量			
	植付日	生育期 ^{b)}	収穫日			生育期		収穫日	
						土壌(Log fg/生土1g)	土壌(Log fg/生土1g)	根(Log fg/全DNA10ng)	塊茎病斑(fg/全DNA10ng)
<i>S. scabiei</i>	4.4 ± 0.04	4.2 ± 0.05	4.3 ± 0.09	75.3 ± 11.8 b	18.9 ± 2.4 c	4.7 ± 0.1 a	4.9 ± 0.1 b	3.6 ± 0.4 b	6.8 ± 0.4 a
	4.7 ± 0.02	4.5 ± 0.01	4.9 ± 0.07	93.3 ± 11.5 ab	38.4 ± 16.1 c	4.7 ± 0.4 a	5.1 ± 0.1 b	3.2 ± 0.8 b	6.7 ± 0.3 a
	4.9 ± 0.03	4.7 ± 0.05	5.3 ± 0.12	100.0 ± 0.0 a	65.2 ± 5.5 b	4.6 ± 0.1 a	6.1 ± 0.5 a	4.5 ± 0.4 ab	6.9 ± 0.1 a
	5.2 ± 0.02	5.2 ± 0.09	5.9 ± 0.09	100.0 ± 0.0 a	92.6 ± 9.8 a	4.6 ± 0.2 a	6.4 ± 0.3 a	5.1 ± 0.1 a	6.8 ± 0.2 a
<i>S. turgidicabies</i>	4.4 ± 0.05	4.2 ± 0.07	4.3 ± 0.07	54.0 ± 26.1 b	23.6 ± 11.1 b	5.2 ± 0.2 a	5.9 ± 0.4 b	4.5 ± 0.3 c	6.6 ± 0.4 a
	4.7 ± 0.03	4.5 ± 0.05	4.9 ± 0.10	100.0 ± 0.0 a	97.2 ± 4.8 a	5.8 ± 0.2 a	7.2 ± 0.3 a	5.3 ± 0.5 bc	7.0 ± 0.2 a
	4.9 ± 0.01	4.7 ± 0.03	5.3 ± 0.12	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	6.3 ± 0.1 a	7.5 ± 0.1 a	6.2 ± 0.4 ab	7.2 ± 0.1 a
	5.2 ± 0.02	5.2 ± 0.07	5.8 ± 0.10	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	5.9 ± 1.1 a	7.7 ± 0.1 a	6.3 ± 0.2 a	7.1 ± 0.1 a
<i>S. scabiei</i> + <i>S. turgidicabies</i>	4.4 ± 0.05	4.2 ± 0.06	4.3 ± 0.09	77.4 ± 21.5 a	25.6 ± 5.7 b	5.0 ± 0.1 b	5.6 ± 0.4 c	3.7 ± 0.5 b	7.1 ± 0.2 a
	4.7 ± 0.01	4.5 ± 0.04	4.9 ± 0.08	87.5 ± 21.7 a	48.9 ± 19.0 b	5.0 ± 0.1 b	7.0 ± 0.1 b	5.2 ± 0.4 a	7.2 ± 0.1 a
	4.9 ± 0.01	4.7 ± 0.04	5.3 ± 0.11	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	5.6 ± 0.1 a	7.5 ± 0.2 ab	6.0 ± 0.6 a	7.3 ± 0.2 a
	5.2 ± 0.04	5.2 ± 0.08	5.9 ± 0.09	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	6.0 ± 0.3 a	7.9 ± 0.1 a	6.2 ± 0.2 a	7.1 ± 0.2 a

a) *S. scabiei* S58 菌株(接種濃度 4×10^7 CFU/ポット), *S. turgidicabies* T45 菌株(4×10^7 CFU/ポット), S58 菌株(2×10^7 CFU/ポット) + T45 菌株 (2×10^7 CFU/ポット)

b) 生育期;植付 33 日後.収穫日;植付後 111 日後

c) 発病面積別指数 0:発病なし, 1:3%未満, 2:4~13%, 3:14~25%, 4:26~50%, 5:51~75%, 6:75~100%.

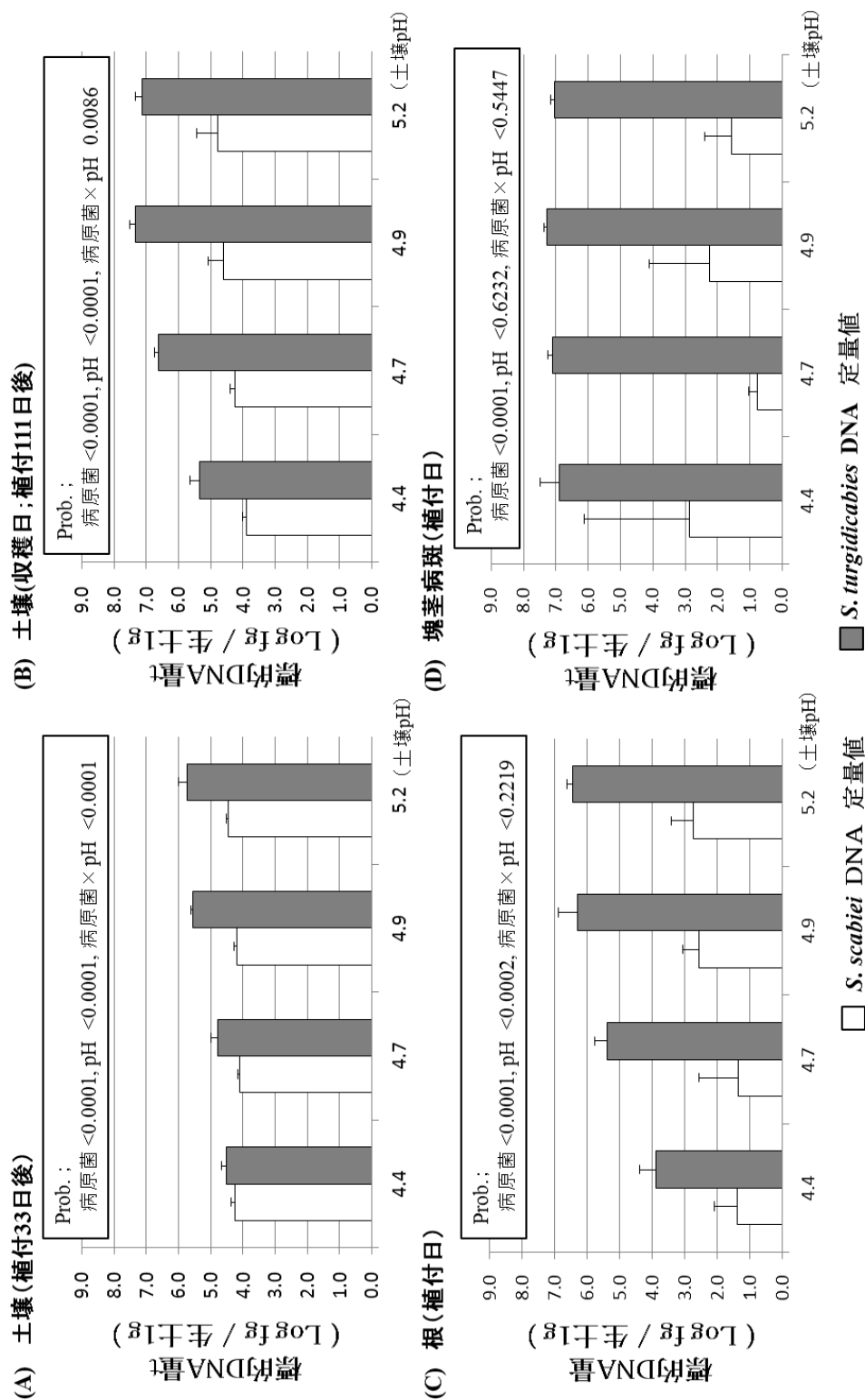
発病度 = $\Sigma(\text{指数} \times \text{発病程度別塊茎数}) / (6 \times \text{全塊茎数}) \times 100$

さらに、両菌種混合区の *S. scabiei* と *S. turgidiscabies* の菌の増減をそれぞれの ITS 定量値で比較したものを第 7 図に示した。植え付け約 1 か月後の土壌 1g 中あたり、*S. scabiei* の ITS 定量値は、すべての pH で $10^4 \sim 10^5$ fg となった。*S. turgidiscabies* の ITS 定量値は pH4.7 以下では $10^4 \sim 10^5$ fg であったが、pH4.9 以上では $10^5 \sim 10^6$ fg となった（第 7 図 A）。収穫時では、*S. scabiei* の ITS 定量値はすべての pH で $10^4 \sim 10^5$ fg となり、植え付け約 1 か月後と比べて大きな増加は認められなかった。一方、*S. turgidiscabies* の ITS 定量値はすべての pH で増加し、その程度は pH4.7 以上で大きかった（第 7 図 B）。なお、土壌では両時期とも pH と菌種間に交互作用が認められた。すなわち、両菌は土壌 pH4.4 ～5.2 の範囲において異なる反応を示し、*S. scabiei* は土壌 pH が上昇しても菌量の増加は僅かであるのに対し、*S. turgidiscabies* は土壌 pH が上昇に伴い菌量が有意に増加する傾向が認められた。

次に、収穫時の根で比較すると、菌種間と pH 間に有意差が認められ、*S. turgidiscabies* の ITS 定量値は *S. scabiei* の ITS 定量値よりも常に高く、pH の上昇に伴い増加した（第 7 図 C）。最後に、収穫時の病斑で比較すると、菌種間で有意差が認められ、pH 間では有意差が認められなかった。*S. turgidiscabies* の ITS 定量値はいずれの pH でも抽出 DNA の 10ng あたり 10^7 fg 付近であり、*txtAB* 定量値とほぼ同等であった（第 7 図 D、第 10 表）。

3. 考察

そうか病菌は塊茎等で菌種が混在していることが知られており（Lehtonen *et al.*, 2004），鹿児島県においてもそうか病の菌種として *S. turgidiscabies* と *S. scabiei* の割合がほぼ同じである。今後は、*S. scabiei* よりも低 pH 耐性のある *S. turgidiscabies* の動向に注意を払う必要があることから、本研究で開発した定



第7図 異なる土壌 pH 条件下での *Streptomyces scabiei* および *S. turgidiscabies* 接種区での両菌の増減(無底ポット栽培)。
 接種条件; *S. scabiei* S58 菌株 2×10^7 CFU/ポット + *S. turgidiscabies* T45 菌株 2×10^7 CFU/ポット. リアルタイム PCR プライマーセット; *S.s-qPCR-F01/R03* (*S. scabiei* 用), *S.t-qPCR-F01/R01* (*S. turgidiscabies* 用). データは3試料(ポット)の平均値. 統計解析は JMP software version 5.1.1.を使用し行った.

量法を用いて、異なる土壌 pH 条件での *S. scabiei* および *S. turgidiscabies* の土壌および植物体での菌の増減について調査した。各処理区内で比較すると、*S. scabiei* 単独区は pH4.9 以上の区で、*S. turgidiscabies* 単独区は pH4.7 以上の区で、発病度、収穫時の土壌中および根中の *txtAB* 定量値が有意に高くなった。さらに、*S. turgidiscabies* 単独接種の pH4.7 区の収穫時の土壌中の *txtAB* 定量値は、*S. scabiei* 単独接種の pH5.2 区の収穫時の土壌中の *txtAB* 定量値よりも高く、*S. turgidiscabies* は *S. scabiei* よりも低い土壌 pH でも適応性が高いことが改めて確認された。

本試験の根中および病斑の *txtAB* 定量値は、植物体に付着する土壌を十分に洗浄したことから、組織中に存在するそうか病菌量を反映しているものと考えられる。そうか病菌はジャガイモ以外に多くの作物の根や塊茎に寄生し、タバコやダイコンでは主に細胞分化の豊富な根の先端の外部、細胞内や細胞間に寄生し、細胞の肥大を招くことが明らかになっている (Joshi *et al.*, 2007; Loria *et al.*, 2008)。本試験の肉眼による観察では、根の肥大や潰瘍症状は認められなかったが、収穫時の根中の *txtAB* 定量値は土壌中の *txtAB* 定量値と同様に pH の影響が認められた。一方、新生塊茎の病斑の *txtAB* 定量値はいずれの pH でもほぼ同じ値であり、そうか病菌の感染が成立し病斑を形成した場合は、pH の影響は少ないものと考えられた。なお、病斑から抽出した総 DNA 定量値の 10ng 中の *txtAB* 定量値の一部で 10^7 fg を超えた値となった。よって現時点では、第 9 表で得られたような結果は処理区内の統計に基づき相対的評価として利用できるであろう。今後は無接種の土壌、健全根など、適切な対照区を設定することで、本プライマーに反応する標的配列に類似した未知の配列の存在比率を明確にするなど、さらに信頼度を増す工夫を行う必要がある。

これまで、そうか病菌の種間の競合についての報告は少ない。田代ら (2002) は、異なる土壌 pH における *S. scabiei* 接種土壌と *S. acidiscabies* 接種土壌での

継続的なジャガイモそうか病の発病調査の結果から, *S. acidiscabies* は時間の経過とともに発病度が減少し, *S. scabiei* よりも土壌微生物の影響を受けやすい菌種であることを示唆している. 一方, *S. scabiei* と *S. turgidiscabies* の競合関係について, Lehtonen *et al.* (2004) は貯蔵中の塊茎では *S. scabiei* よりも *S. turgidiscabies* が優先すること, Hiltunen *et al.* (2009) は培地上で *S. turgidiscabies* が *S. scabiei* の生育を抑制することなどから, スカンジナビアでは *S. turgidiscabies* が *S. scabiei* に置き換わる可能性を示唆しているが, 両菌種の定量的な報告はこれまでなかった. 本研究の結果は pH が 4.4~5.2 の範囲において, いずれの pH でも *S. turgidiscabies* が *S. scabiei* より増殖しやすく, 土壌, 根および塊茎の病斑中で *S. turgidiscabies* が *S. scabiei* に常に優先することを示し, これまでの報告を支持することができた. この結果は, 国内においても *S. turgidiscabies* に罹病した種いも等の移動により, 未発生地域に侵入した場合, *S. scabiei* よりも *S. turgidiscabies* が優勢し定着する可能性を示唆している.

ただし, そうか病の発病と土壌化学性との関係は土壌ごとに複雑で, 地域によって異なった結果を示しており (Lazarovits *et al.*, 2007), さらに, そうか病菌の菌種, 肥培管理, 作物生育時期や土壌水分等の影響を強く受けるものと考えられる (田中, 2000; 田代ら, 2002). 本研究で供試した土壌は, ハウス内の黒ぼく土壌であり, カルシウム含量等が高く (第 8 表), 菌種と pH との関係を明らかにするには, さらに多くの土質や土壌条件での事例を必要とするものと考えられた.

IV. そうか病の防除に関する研究

A. ジャガイモそうか病菌の種いも伝染と種いも消毒処理の防除効果に関する動態解析

A-1. ジャガイモそうか病に対する薬剤による種いも消毒

1. 材料および方法

種いもには、鹿児島県農業開発総合センター内のそうか病発生圃場から採取した塊茎（品種：ニシユタカ）を水洗し、3 か月ほど貯蔵した塊茎のなかで、そうか病の病斑が外見上無病徴か、1 個の病斑のあるいもから病斑部分をそぎ取った塊茎を試験に供試した。また、種いも消毒処理は、2010 年 4 月 2 日（定植 7 日前）に、ストレプトマイシン剤（20%）の 50 倍と 100 倍およびノニルフェノールスルホン酸銅剤（30%）の 25 倍と 50 倍については、いも重 1kg あたり 30ml を手動式スプレーで散布した。また、対照薬剤として銅水和剤（銅 50%）100 倍およびフルアジナム剤（50%）剤 100 倍については、所定濃度にいもを約 20 秒間浸漬した。なお、処理後は、室内で風乾した。

試験はセンター内の露地圃場で実施した（黒ぼく土，pH5.8）。圃場の土壌消毒は 3 月 12 日にクロピクテープを畝の中心に置き、管理機にて 90cm 間隔で畝を立て、マルチ（厚さ 0.03mm）で被覆して行った。上記で処理した種いもは、4 月 9 日に土壌消毒後の畝に 20cm 間隔でマルチに穴を開け、植え付けた。各処理は 1 区 15 株とし、3 反復行った。新生塊茎の発病調査は、6 月 9 日に処理区ごとに収穫し、各区 15 株の内、10 株の 30g 以上の新生塊茎を対象に発病面積ごとに分け、発病塊茎率と発病度（ \sum （発病面積別塊茎数×指数）/（調査塊茎数×4）×100）を求めた。なお、発病指数は、発病なしを 0、発病面積が 3% 以下を 1、4～13% を 2、14～25% を 3、26% 以上を 4 とした。

2. 結果

無処理の発病塊茎率は 70.6%, 発病度 27.6 となった。また, 対照の銅水和剤 100 倍の浸漬処理は発病塊茎率が 37.8%, 発病度 10.0 となり, フルアジナム水和剤 100 倍の浸漬処理は発病塊茎率が 18.9%, 発病度 4.7 となった。ストレプトマイシン剤の 50 倍あるいは 100 倍の散布処理については, 50 倍で発病塊茎率 70.6%, 発病度 24.9, 100 倍で発病塊茎率 49.4%, 発病度 19.8 となり, 処理濃度が高いほど発病度が高く, また, いずれの濃度も防除効果はほとんど認められなかった。一方, ノニルフェノールスルホン酸銅剤の 25 倍あるいは 50 倍の散布処理については, 25 倍で発病塊茎率 26.7%, 発病度 8.0, 50 倍で発病塊茎率 31.9%, 発病度 8.7 となり, 両濃度とも同等の効果であり, 対照として使用したフルアジナム水和剤 100 倍の浸漬処理よりも防除効果は低いものの, 銅水和剤 100 倍の浸漬処理よりやや優る防除効果であった(第 11 表)。

3. 考察

今回供試した種いもは, そうか病の発生圃場から採取した塊茎であり, そうか病菌が多く感染した塊茎に対する薬剤による種いも消毒試験であったと考えられた。その結果, 無処理の新生塊茎での発病塊茎率が 70.6%となる多発条件下においても九州で普及しているフルアジナム剤 100 倍浸漬処理は高い防除効果を示した。また, 銅水和剤 100 倍浸漬処理, ノニルフェノールスルホン酸銅剤の 25 倍あるいは 50 倍の散布処理についてはフルアジナム剤よりやや防除効果は劣るものの, 比較的高い防除効果を示した。

一方, ストレプトマイシン剤の 50 倍あるいは 100 倍の散布処理についてはほとんど防除効果が認められなかった。これまで, ストレプトマイシン液剤については単独での効果が不安定な場合もあり, 塩基性銅水和剤との混用で消毒効果が著しく向上することが明らかにされている(田代ら, 2002)。これは, ストレプトマイシン剤の病原菌に対する直接的

第11表 ジャガイモそうか病に対する薬剤による種いも消毒の防除効果と新生塊茎重.

薬剤名	希釈 倍数	有効成 分濃度	使用法	調査塊茎数 ^{a)} (個)	指数別塊茎個数(個)					発病塊茎率(%) ^{c)}	発病度 ^{d)}	防除価 ^{e)}	1株あたりの新生塊 茎重(g)
					0	1	2	3	4 ^{b)}				
ストレプトマイシン液剤	50	4g/l	散布 (3L/100kg)	54.0	17.3	24.7	9.7	2.3	0.0	70.6 ± 25.6 ^{a f)}	24.9 ± 11.5 ^a	9.8	388.1 ± 73.7 ^a
ストレプトマイシン液剤	100	2g/l	散布 (3L/100kg)	65.0	33.0	20.0	7.0	3.3	1.7	49.4 ± 33.2 ^a	19.8 ± 17.4 ^a	28.5	423.7 ± 58.2 ^a
ノニルフェノールスルホ ン酸銅剤	25	12g/l	散布 (3L/100kg)	59.3	45.0	12.0	2.0	0.3	0.0	26.7 ± 23.0 ^a	8.0 ± 8.1 ^a	71.0	436.8 ± 57.5 ^a
ノニルフェノールスルホ ン酸銅剤	50	6g/l	散布 (3L/100kg)	59.0	40.0	17.3	1.7	0.0	0.0	31.9 ± 16.4 ^a	8.7 ± 5.3 ^a	68.6	419.4 ± 36.0 ^a
銅水和剤	100	g/l	浸漬	57.7	36.7	20.0	1.0	0.0	0.0	37.8 ± 14.4 ^a	10.0 ± 4.5 ^a	63.9	403.4 ± 74.1 ^a
フルアジナム水和剤	100	5g/l	浸漬	56.7	47.0	9.7	0.0	0.0	0.0	18.9 ± 10.3 ^a	4.7 ± 2.6 ^a	82.9	441.9 ± 49.8 ^a
無処理	—	—	—	60.3	17.7	24.7	12.7	4.0	1.3	70.6 ± 14.5 ^a	27.6 ± 10.5 ^a	—	433.6 ± 57.0 ^a

a) 1区10株,3反復の平均.

b) 発病指数:発病なしを0,発病面積が3%以下を1,4~13%を2,14~25%を3,26%以上を4とした.

c) 平均±標準偏差.

d) 発病度 = $\Sigma(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$.

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

f) Tukey's HSD 検定 ($\alpha=0.05$) により,異なる文字は処理区間で有意あり.なお,発病塊茎率はアークサイン変換後に検定を行った.

な殺菌力は高いものの、残効性が短いことが一般的に知られており、種いも処理後のそうか病菌の再増殖などが考えられた。

今回の研究では、処理区内での発病塊茎率や発病度の偏差が大きいため、薬剤間に有意差が認められなかった。この原因として、種いもでのそうか病菌の菌量の違いが防除効果に影響したものと考えられた。このように、種いもでのそうか病菌の菌量と新生いもでの発病の関係など、種いも伝染に関するそうか病菌の動態についての知見は少なく、不明な点が多い。

今後は、そうか病菌の定量により種いも伝染におけるそうか病菌の動態を把握しながら、各薬剤の特性を明らかにすることで、そうか病に対する種いも消毒法のより効果的で効率的な処理法を開発していく必要がある。

A-2. 種いものそうか病菌の菌量と新生いもでの発病との関係

ここでは、*txt* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR (Qu *et al.*, 2008) を用いて、種いものそうか病菌量と発病の関係について調査した。

1. 材料および方法

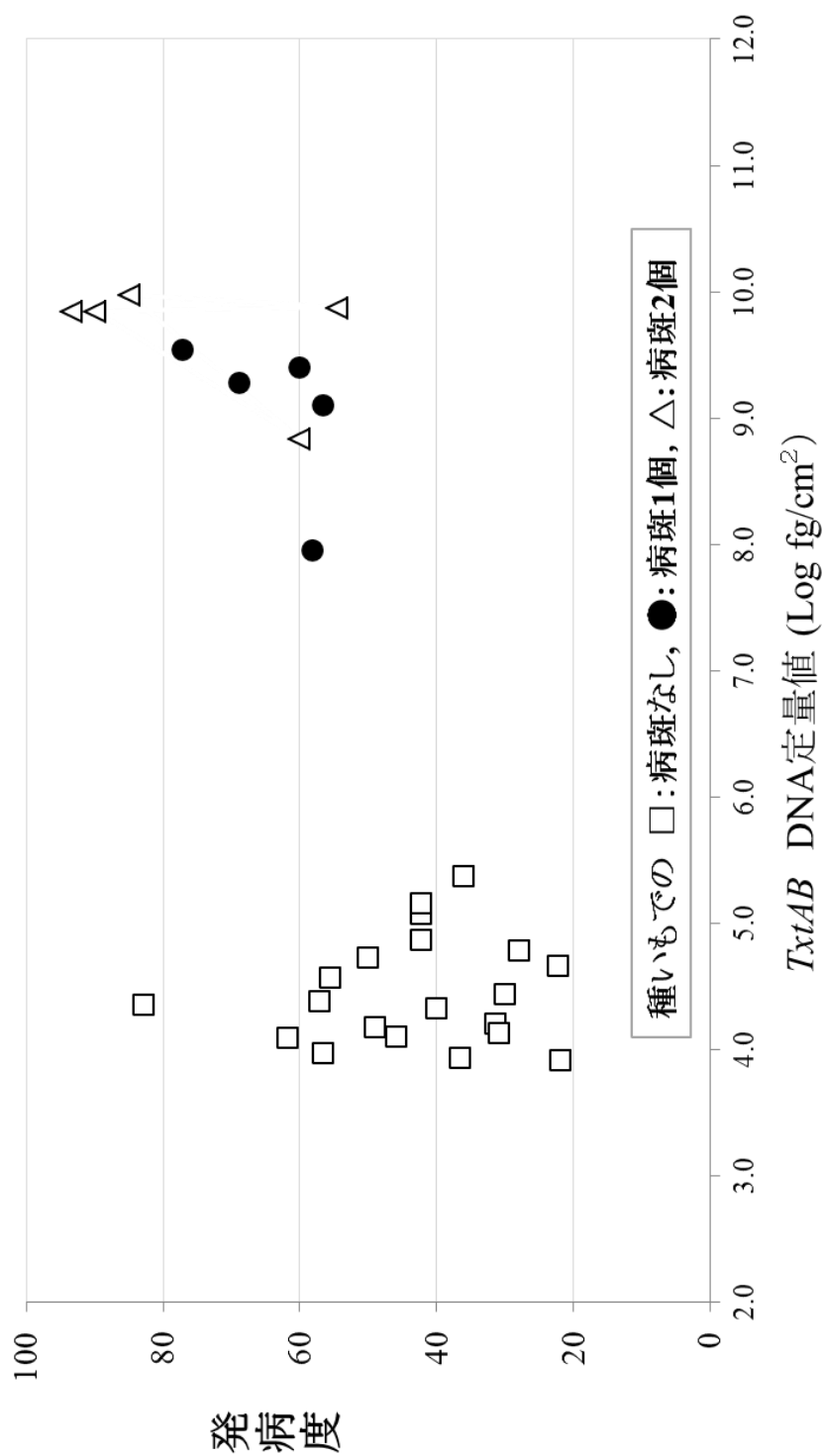
鹿児島県農業開発総合センターのそうか病の発病圃場から採取し、水洗後に3か月貯蔵した塊茎（品種：ニシユタカ）を使用した。種いもは、可能な限り大きさを揃え（平均：縦 6.4×横 7.7cm）、いもにそうか病の病斑が外見上認められないもの 20 個、直径 1cm 程度の病斑が 2 個認められるもの 5 個、直径 1cm 程度の病斑が 4 個認められるもの 5 個を用意した。これらのいもは植え付け 3 日前に縦に 2 つに切断し、半分は植え付け用に、半分はそうか病菌の定量用を使用した。その際、2 個あるいは 4 個の病斑のいもは、双方に 1 個（病斑面積率約 3%）あるいは 2 個（病斑面積率約 7%）の病斑が残るように縦に切断した。

いもの DNA 抽出のために、対になるいもの表面組織から、直径 10mm、厚さ約 1mm の大きさで 2 カ所を採取した。なお、病斑のあるいものは、病斑部分を含むように採取した。DNA 抽出は乳鉢により摩砕後、CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) により実施し、抽出 DNA は TE 緩衝液により 10 μ g/ml に調整した。

発病試験は、これまでジャガイモ栽培歴のない黒ぼく土 (pH6.4) の露地圃場において、無底ポットを利用した栽培法で行った (坂本ら, 2011)。2012 年 2 月 27 日に無底ポット (内径 30cm, 高さ 32cm) を深さ 25cm に埋設し、各ポットは縦を 50cm, 横を 100cm 程度離して配置した。また、ポット内の土壌はクロピクテープ (4 節分) を約 15cm の深さに埋没し、植え付け日まで、厚さ 0.05mm の透明ポリマルチで被覆した。3 月 26 日に被覆を除去し、各ポットに上記で調整した種いものを 1 個ずつ深さ 15cm に植え付けた。また、発病調査は 5 月 28 日に収穫し、1 株ごとに 15g 以上の新生いものを調査した。いものを発病面積で分け、発病いもの率と発病度 (Σ 発病面積別いもの数 \times 指数 / 調査いもの数 $\times 5 \times 100$) を求めた。なお、発病指数は、発病なしを 0, 発病面積が 3%以下を 1, 4~13%を 2, 14~25%を 3, 26~50%を 4, 51%以上を 5 とした。

2. 結果

そうか病汚染種いもの *txtAB* DNA 定量値と新生いもでの発病との関係に一定の相関関係は認められなかった。しかし、種いものを病斑の程度により分類すると、1cm²あたりの *txtAB* DNA 定量値は、病斑のない種いもでは $4.8 \times 10^4 \pm 5.8 \times 10^4$ fg, 病斑 1 個の種いもでは $1.8 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$ fg, 病斑 2 個の種いもでは $6.3 \times 10^9 \pm 3.3 \times 10^9$ fg となり、種いもの病斑個数の増加に伴い *txtAB* DNA 定量値が増加し、病斑のない種いもと病斑のある種いもの間で有意差が認められた。



第 8 図

ジャガイモの種いものそうか病菌量と新生いもでの発病の関係．

種いもの菌量は塊茎表面組織 (1.57cm²) から抽出した全 DNA. リアルタイム PCR での定量には *txtAB* を標的としたプライマーセット Strep F1/R1 (Qu *et al.*, 2008) を使用した. なお, *TxtAB* DNA 定量値については, 病斑のない種いもは $4.8 \times 10^4 \pm 5.8 \times 10^4$ fg/cm², 1 個の病斑に種いもは $1.8 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$ fg/cm², 2 個の病斑の種いもは $6.3 \times 10^9 \pm 3.3 \times 10^9$ fg/cm², また, 新生いもでの発病度は病斑なしの種いもで 43.2 ± 14.9 , 1 個の病斑の種いもで 64.2 ± 8.7 , 2 個の病斑の種いもで 76.6 ± 18.0 であった.

新生いもの発病度は、病斑のない種いもでは 43.2 ± 14.9 ，病斑 1 個の種いもでは 64.2 ± 8.7 ，病斑 2 個の種いもでは 76.6 ± 18.0 となり，種いもの病斑数の増加に伴い新生いもでの発病度が高まり，病斑のない種いもと病斑のある種いもの間で有意差が認められた．また，病斑 1 個の種いもの発病度の偏差は他の種いもと比較し小さかった（第 8 図）．

3. 考察

種いものそうか病菌の汚染度と新生いもでの発病について，田代ら（2002, 2003）は，一般的な圃場条件では病斑面積率が約 6%以上の罹病種いもを植え付けると新生いもでの発病が激しくなるが，土壤消毒等により土壤微生物が単純化された圃場条件では見かけ上健全な種いもや病斑面積 5%程度の罹病種いもであっても，発病が激しくなることを明らかにしている．さらに，pH5 以下の酸性土壌よりも pH6.5 でより発病が激しくなることから，そうか病菌の伝染や新生いもでの発病には種いもでのそうか病菌量，土壤微生物，そして土壤 pH 等が大きく影響することを示唆している．

そこで，本研究ではこれまで知見のない種いもでのそうか病菌量と新生いもでの発病を明らかにするために，個々の罹病種いもの *txtAB* DNA 定量値を測定後，植え付け，新生いもで発病を調査した．また，種いもからの菌の伝染をより好適にするため，土壤 pH は 6.4 とし，土壤消毒を実施した．また，今回の供試種いもは，そうか病の発病圃場から採取したため，見かけ上健全な種いもでも，約 4.8×10^3 個/cm² のそうか病菌の細胞数（*txtAB* DNA 定量値から換算；Qu *et al.*, 2008）が検出された．また，塊茎の病斑には，最低でも 10^7 個/cm² 以上のそうか病菌細胞数が存在し，病斑の存在で菌量は大幅に増加した．Wang and Lazarovits（2004）は，農家の冬期貯蔵後の塊茎病斑組織には $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$

CFU/g のそうか病菌数が存在すると見積もっており、単位は違うが近い菌数になるものと考えられた。

また、本試験はクロルピクリンで土壌消毒を行い、pH6.4 の条件で実施した結果、見かけ上健全な種いもや病斑が 1 個（病斑面積約 3%）の種いもでも、新生いもでの発病が激しくなる株が多く、田代ら（2002, 2003）の報告と一致した。

残念ながら、本研究の結果からは種いものそうか病菌量と新生いもでの発病の関係に相関関係が認められなかった。特に、見かけ上健全な種いもでは新生いもでの発病度が大きく振れる結果となった。これは、見かけ上健全な種いもでは、塊茎ごとに塊茎内のそうか病の感染位置と感染程度が異なるため、菌量測定用にサンプリングした箇所の誤差が発病度の違いに影響したものと考えられた。

ただし、種いも伝染の試験では、これまで種いものそうか病菌量と発病を揃えることが大きな課題であったが、今回の研究の結果から、病斑 1 個の種いもを使用すると種いも間のそうか病の菌量と発病度の偏差が比較的小さいことから、今後の種いも消毒試験等に活用できるものと考えられた。

A-3. そうか病菌に汚染した種いもからの地下部組織および土壌へのそうか病菌の拡散と農薬による種いも消毒の効果

txt 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR（Qu *et al.*, 2008）を用いて、そうか病菌に汚染した種いもから地下部組織および土壌への菌の動態および農薬を使用した種いも消毒による防除効果について調査した。

1. 材料および方法

ジャガイモ栽培歴のない黒ぼく土（pH6.5）の露地圃場において、クロルピクリンで土壌消毒した無底ポット内にジャガイモを栽培した。また、試験用の種いもには、そうか病の汚染程度を揃えるために、そうか病の発生圃場から収穫し、水洗後、3ヶ月間貯蔵したいものの中で、そうか病の病斑が1個みられるいも（品種：ニシユタカ）を用いた。種いも消毒は、フルアジナム水和剤（フルアジナム 50%）100倍処理区、ストレプトマイシン液剤（ストレプトマイシン 20%）100倍処理区および無処理区の3処理区を設置した。種いも消毒は植え付け3日前に各薬剤に約20秒間浸漬し、風乾後、種いもに1個の病斑が残るように切断し、重さを50gに調整した。2012年4月9日に各ポットに前記で調整した各処理種いもを1個ずつ、約20cmの深さに植え込んだ。1処理15ポット（5時期×3反復）を用意し、植え付け15日後（出芽期）、29日後、42日後、56日後、70日後にポットごとにジャガイモ地下部と周辺土壌を抜き取り採取した。採取した地下部は水道水で土壌を十分に洗い流した後、0.05% Tween 20を加用した蒸留水中で10分間の超音波洗浄を行い、その後、30分間流水中に置いた。さらに、滅菌水中で5分間の超音波洗浄を3回繰り返したものを滅菌ろ紙に置き、クリンベンチ内で軽く風乾し、種いも、地下部の茎、根、新生いも（15日後を除く）の各部位に分けた。DNA抽出用サンプルとして、茎はすべての茎から長さ1cm、幅5mm、深さ1mm程度の大きさを複数箇所を切り出し、また、根は全部をハサミで数mmに切断し、十分に混合して0.1gを採取した。種いもからは病斑のない部分を直径10mm、厚さ約1mmの大きさを2カ所採取した。さらに、株に形成したすべての新生いもから、直径5mm、厚さ約1mmに切り取り、合計10カ所を採取した。根圏土壌は1mm角篩を通し、十分に混和した土壌5gを採取した。なお、植物体のDNA抽出はCTAB法で実施し、土

壤からの DNA の抽出は Sato *et al.* (2007) の方法を改良して実施した。発病調査は植え付け 56 日後および 70 日後の株を対象に行い、1 株ごとにすべての新生いもを調査し、調査法は上記の項に従った。

そうか病菌の定量は、*txtAB* オペロン遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法により行った (Qu *et al.*, 2008)。PCR 機器は 7300 Real-Time System (ABI)，試薬は SYBR Premix Dimer Eraser (タカラバイオ) を使用し、1 サンプルあたり 15 μ l 量 (SYBR Premix Dimer Eraser ($\times 2$) 7.5 μ l, 各プライマー (10 μ M) 0.9 μ l, ROX Reference Dye 0.6 μ l, 鋳型 DNA 2 μ l, DEPC 処理水 3.1 μ l) で行った。PCR 条件は 95 $^{\circ}$ C で 30 秒の初期変性 1 回、95 $^{\circ}$ C で 10 秒、60 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 34 秒の増殖過程を 40 回繰り返し、その後、融解曲線分析を行った。

2. 結果

第 12 表に種いも消毒による新生いもでのそうか病の防除効果を示した。無処理の 56 日後の調査では発病塊茎率 87.5%，発病度 45.3 となり、70 日後の調査では発病塊茎率 84.1%，発病度 53.7 となり、両調査時期とも発病塊茎率はほぼ同等であったが、発病度は塊茎の肥大に伴い 70 日後が高くなった。一方、フルアジナム剤 100 倍の浸漬処理については、56 日後の調査では発病塊茎率 15.5%，発病度 3.7 となり、70 日後の調査では発病塊茎率 14.8%，発病度 3.7 となり、両調査時期とも発病塊茎率、発病度ともほぼ同等であった。また、フルアジナム剤は無処理と比較し、両時期とも新生いもでの発病が有意に少なく、いずれの防除価も 90 以上となった。一方、ストレプトマイシン剤 100 倍の浸漬処理については、56 日後の調査では発病塊茎率 93.3%，発病度 39.3 となり、70 日後の調査では発病塊茎率 94.9%，発病度 63.7 となり、両調査時期とも発病塊茎率は高く、塊茎の肥大に伴い 70 日後の発病度が高くなった。また、発病塊茎率および発病度は無処理と比較し有意差が認められず、防除効果も認めら

第 12 表 種いも消毒によるそうか病の防除効果.

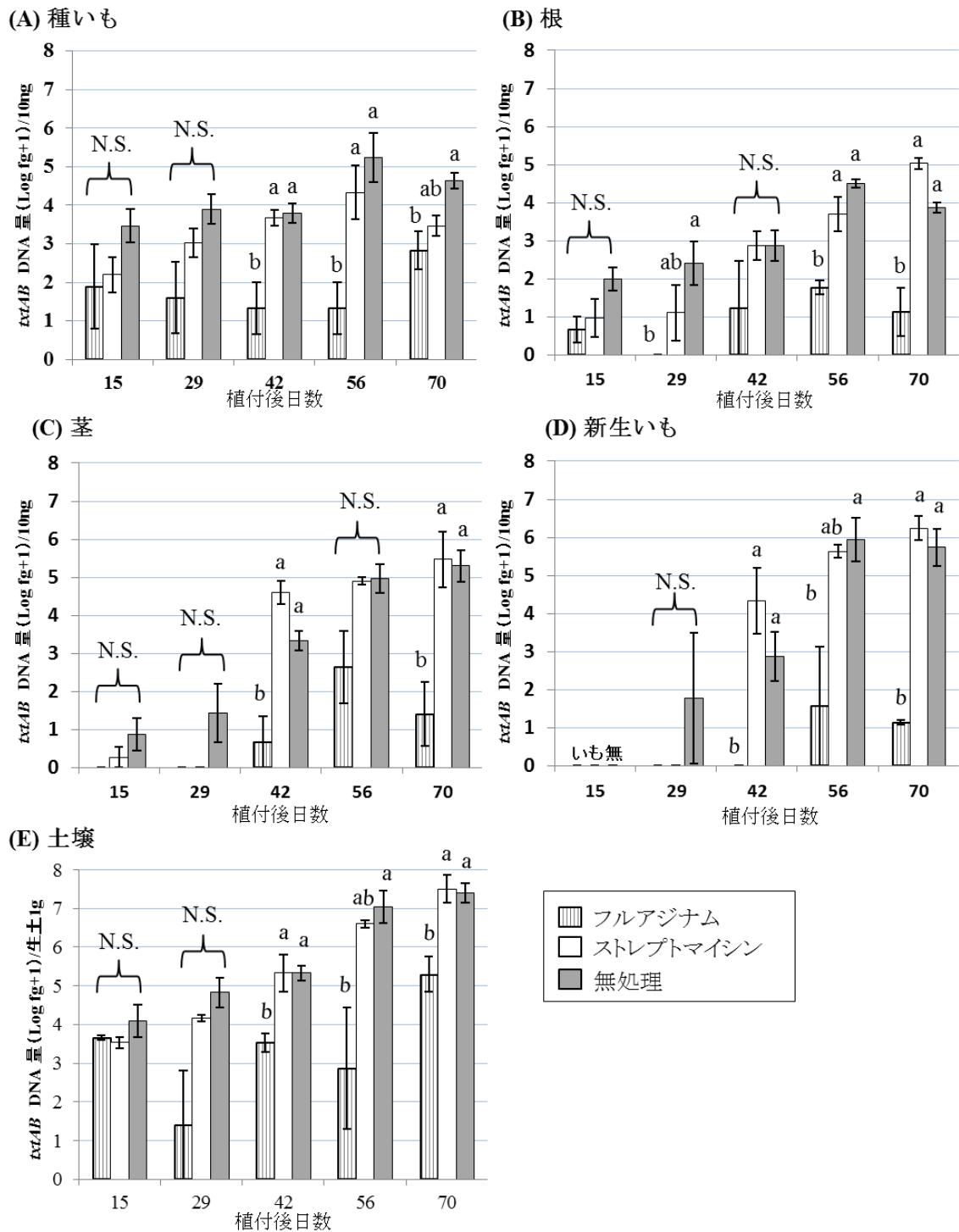
薬剤	薬量	反復	植付56日後 a)			植付70日後		
			調査塊基数	そうか病罹 病塊茎率 (%)	発病度 b) (防除価) c)	調査塊基数	そうか病罹 病塊茎率 (%)	発病度 (防除価)
フルアジナム	10g/L	I	10.0	10.0	2.0	9.0	0.0	0.0
		II	7.0	0.0	0.0	6.0	0.0	0.0
		III	11.0	36.4	9.1	9.0	44.4	11.1
		平均	9.3	15.5 b d)	3.7 b (91.8)	8.0	14.8 b	3.7 b (93.1)
ストレプトマイ シン	10ml/L	I	8.0	100.0	37.5	13.0	84.6	49.2
		II	7.0	100.0	54.3	7.0	100.0	68.6
		III	10.0	80.0	26.0	6.0	100.0	73.3
		平均	8.3	93.3 a	39.3 ab (13.3)	8.7	94.9 a	63.7 a (0.0)
無処理	—	I	14.0	100.0	62.9	7.0	85.7	62.9
		II	9.0	100.0	55.6	6.0	66.7	43.3
		III	8.0	62.5	17.5	4.0	100.0	55.0
		平均	10.3	87.5 a	45.3 a (—)	5.7	84.1 a	53.7 a (—)

a) 植付日:2012 年 4 月 9 日 (出芽期は植付 15 日後であった).

b) 発病度 = Σ (発病面積別塊基数×指数)/(調査塊基数×4)×100. 発病指数:発病なしを 0, 発病面積が 3%以下を 1, 4～13%を 2, 14～25%を 3, 26%以上を 4 とした.

c) 防除価 = (無処理区の発病度 - 処理区の発病度)/無処理区の発病度 × 100.

d) Tukey's HSD 検定 ($\alpha = 0.05$) により, 異なる文字は処理区間で有意あり. なお, 発病塊茎率はアークサイン変換後に検定を行った.



第 9 図 種いも消毒処理が種いも，根，茎，新生いもおよび土壌でのそうか病菌の密度に及ぼす影響。
 種いも消毒処理は各薬剤に約 20 秒間浸漬．リアルタイム PCR の定量には *txtAB* を標的としたプライマーセット Strep F1/R1 (Qu *et al.*, 2008.) を使用．データは 3 試料の平均値．Tukey's HSD 検定 ($\alpha=0.05$) により，異なる文字は処理区間で有意差あり．

れなかった。

次に、植え付け 15 日後から 70 日後までの種いも、根、茎、新生いもおよび根圏土壌でのそうか病菌の *txtAB* DNA 定量値を、種いものフルアジナム剤 100 倍浸漬処理、ストレプトマイシン処理および無処理で比較したものを第 9 図に示す。

種いもでの *txtAB* DNA 定量値を比較すると、無処理とストレプトマイシン剤処理では、日数の経過に伴い定量値の増加が認められたのに対し、フルアジナム剤処理では 56 日後まで増加が認められず、ほぼ一定であった（第 9 図 A）。根においては、無処理とストレプトマイシン剤処理ではジャガイモ地下部の生育に伴い *txtAB* 定量値の増加が認められたが、フルアジナム剤処理では全期間を通じて、両区と比較し、定量値は低く推移した（第 9 図 B）。茎においても根と同様な傾向が認められた（第 9 図 C）。新生いもにおいて、*txtAB* DNA は、無処理では 29 日後から、ストレプトマイシン剤処理では 42 日後から検出され、新生いもの肥大にともない増加したが、フルアジナム剤処理では 56 日後に初めて検出され、70 日後でも増加は認められなかった（第 9 図 D）。土壌では、15 日後の各区の *txtAB* 定量値をみると、無処理で約 10^4 fg/g、ストレプトマイシン剤処理とフルアジナム剤処理は 10^4 fg/g 以下であったが、それ以降は植物の生育に伴い、無処理とストレプトマイシン剤処理では大幅に増加し、70 日後では両処理とも約 10^7 fg/g 以上となった。フルアジナム剤処理区では 56 日後までは概ね 10^4 fg/g 以下であったが、70 日後には約 5.5×10^5 fg/g となった（第 9 図 E）。

3. 考察

種いも消毒はそうか病防除の基本技術であることから、薬剤による種いも消

毒について処理後の各時期、各部位でのそうか病菌量を調査した。その結果、新生いもの発病度の高かった無処理またはストレプトマイシン剤処理は、塊茎形成初期である植え付け 29 日後には土壌のそうか病菌の細胞数が 10^3 個/g 以上となり、その後も指数的に増加し、56 日後には 10^5 個/g 以上となった。ストレプトマイシン剤の種いもの菌量をみると、15 日後までは無処理と比べ、フルアジナムと同様に低い菌密度であったが、29 日後には菌密度の上昇が認められており、種いもでの菌を抑制する期間が比較的短いため、種いも周辺や地下部での増殖が速やかに起こり、最終的に新生いもの発病が高くなったものと考えられた。これは、そうか病菌の感染が組織内部まで及んだ塊茎では、ストレプトマイシン剤の組織内部への殺菌効果は限定され、また、種いも表面や病斑に付着した薬剤の残効が比較的短いことから、塊茎内部に残存するそうか病菌の再増殖を抑制できないためであると考えられた。田代ら（2002）はオキシテトラサイクリン・ストレプトマイシン剤について、土壌消毒非実施区では病斑面積が 50% 以上の罹病種いもで、土壌消毒実証区では発病塊茎率 30% 以上の罹病種いもでは防除効果が著しく劣ることを認めているが、前記のようにそうか病の罹病度の高い種いもであっても、薬害の問題はあるが、ストレプトマイシン剤と銅剤を混用すると高い防除効果を示すことが知られている（相馬ら, 2002; 田代ら, 2002; 植松・片山, 1990）。これは、ストレプトマイシンの殺菌後の種いも表面および病斑でのそうか病菌の孢子形成を銅剤が長期に抑制し、ストレプトマイシンの残効性の短さを補っているためではないかと考えられた。

一方、発病度の低かったフルアジナム剤処理では 56 日後までそうか病菌細胞数が 10^3 個/g 以下であった。これは、フルアジナム剤処理により種いもからの菌の増殖、拡散が長期に抑制され、根や地下茎、そして土壌での菌の増加の抑制につながったためではないかと考えられた。特に、そうか病菌の塊茎への感染時期は塊茎肥大初期であり（孫工弥・喜多, 1977）、フルアジナム剤処理で

は塊茎肥大初期に当たる植え付け 28 日以降のそうか病菌密度の抑制が、新生いもでのそうか病の少発生に繋がったものと考えられた。Wang and Lazarovits (2005) はそうか病菌の種いも伝染を調査し、栽培期間を通して種いも周辺の土壌で病原性 *Streptomyces* の密度が最も高まり、また、根圏土壌の *Streptomyces* の密度と発病いも率との間に高い相関があることを報告しており、本結果とほぼ一致した。このことから、種いも消毒剤の効果には、罹病種いもおよびその周辺でのそうか病菌の増殖を長期に渡り抑制する能力が重要であることが示唆された。

国内の種いも生産については、植物防疫法に基づいて種いもの検査が実施されていることから、生産者が検査後の種いもを適正に利用する限り、本研究で用いたようなそうか病汚染度での種いも消毒はあり得ない。また、現行の種いも生産体制では新たなそうか病菌種の拡大を招く危険性は低いと考える。しかし、本報告は、種いも伝染と種いも消毒について、そうか病菌の伝染を定量的に調査した初報告であり、今後の種いも消毒試験等に活用できるものとする。

A-4. 種いも消毒剤に対するそうか病菌の最少生育阻止濃度

今後の種いも消毒における基礎資料とするために求めたフルアジナム剤、ストレプトマイシン剤および銅剤のそうか病菌 (*S. scabiei*, *S. turgidiscabies* および *S. acidiscabies*) に対する最小生育阻止濃度を調査した。

1. 材料および方法

そうか病菌株は *S. scabiei* 30 菌株 (鹿児島県 21 菌株, その他の産地 9 菌株), *S. turgidiscabies* 30 菌株 (鹿児島県 28 菌株, その他の産地 2 菌株), *S. acidiscabies*

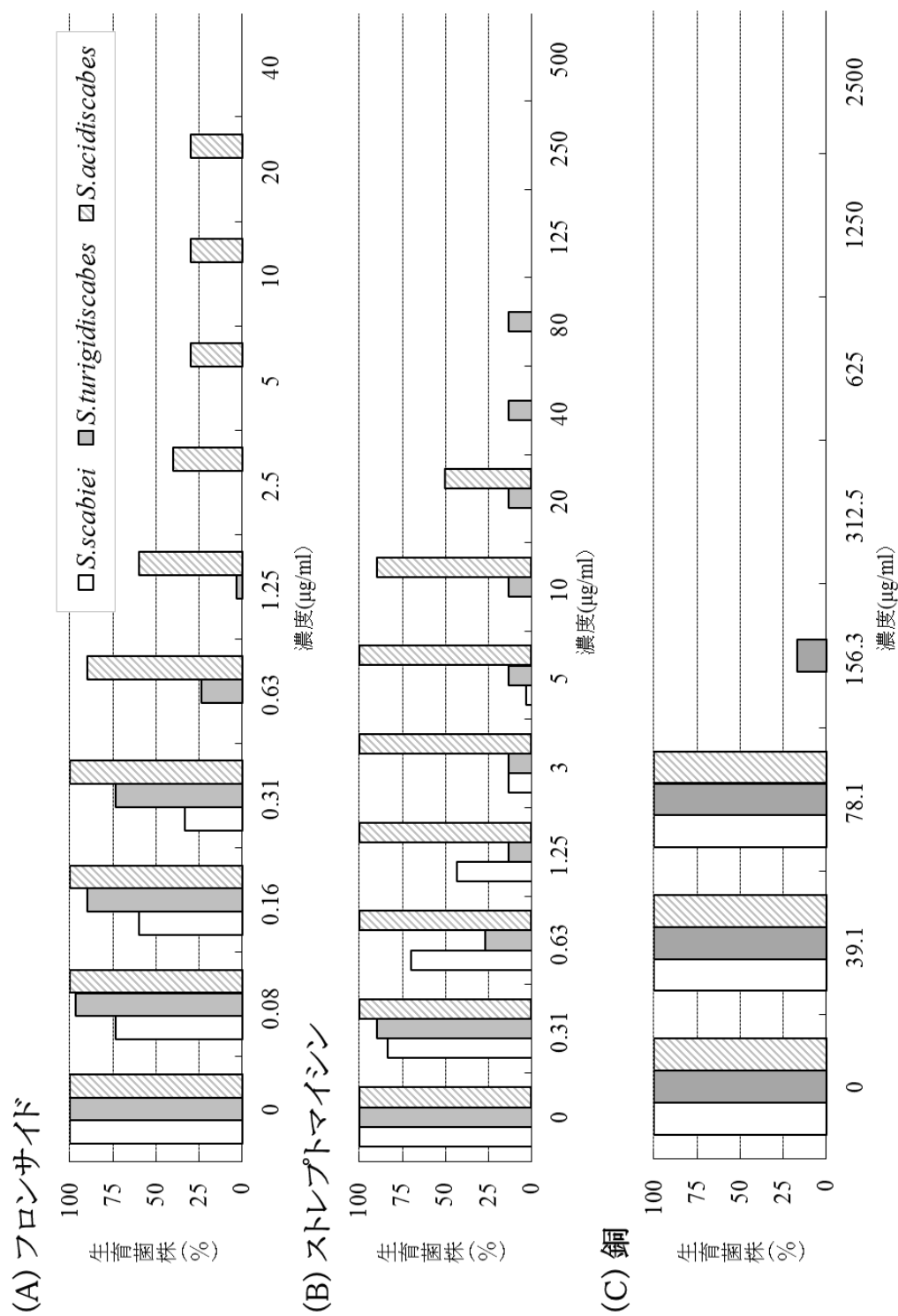
10 菌株（鹿児島県 8 菌株，その他の産地 2 菌株）を供試した．フルアジナム剤（フルアジナム 50%），ストレプトマイシン剤（ストレプトマイシン 20%），および銅剤（銅 50%）の 3 剤を種いも消毒剤として供試した．検定用培地は改変 Bennett's 培地（MBA；西，2006；田中，2000）を使用した．各薬剤はろ過滅菌（0.22μm）した後，滅菌水で 2 倍ごとに段階希釈し，フルアジナムが 0.08～40μg/ml，ストレプトマイシンが 0.31～500μg/ml，銅が 39～2,500μg/ml になるように MBA に添加した．松元平板培地（松本，1979）で 25℃，14 日間培養した菌叢に滅菌水 5ml を加え，コンラージ棒で集菌した菌懸濁液約 10μl を，上記で作成した各培地に接種した．接種後は 25℃で培養し，調査は 3 日後および 7 日後に実施し，菌の生育の有無を調査した．

2. 結果

フルアジナムの最少生育阻止濃度（MIC）は *S. scabiei* で 0.63μg/ml となり，*S. turgidiscabies* で 2.5μg/ml となった．*S. acidiscabies* については，5μg/ml で 70% の菌株の生育が阻止されたが，3 菌株についてはそれ以上の濃度で生育し，最終的なフルアジナムの MIC は 40μg/ml となった（第 10 図 A）．

ストレプトマイシンの MIC は *S. scabiei* で 10μg/ml となった．*S. turgidiscabies* については 1.25μg/ml で多くの菌株の生育が阻止されたが，4 菌株についてはそれ以上の濃度で生育し，最終的なストレプトマイシンの MIC は 125μg/ml となった．*S. acidiscabies* のストレプトマイシンの MIC は 40μg/ml となった（第 10 図 B）．

銅剤の MIC は *S. scabiei* で 156.3μg/ml，*S. turgidiscabies* で 312.5μg/ml，*S. acidiscabies* で 156.3μg/ml となり，菌種により大きな差は認められなかった（第 10 図 C）．



3. 考察

今後の種いも消毒に活用するため、フルアジナム剤、ストレプトマイシン剤および銅剤についてそうか病菌の最小生育濃度（MIC）を調査した。その結果、そうか病菌の菌種により薬剤耐性に差が認められた。

銅剤については、菌種間で MIC の値に大きな差が認められなかったが、フルアジナム剤およびストレプトマイシン剤については、*S. acidiscabies* の MIC が他の 2 種（*S. scabiei* および *S. turgidiscabies*）の MIC と比較し、高い値となる傾向が認められ、菌種間で薬剤の耐性に差が認められた。

ストレプトマイシン剤については、*S. turgidiscabies* の MIC が一部菌株において 100 倍ほど MIC が高い値となったことから、薬剤耐性菌の発生が疑われ、今後とも本剤に対する薬剤感受性の動向については注意を払う必要がある。

ただし、種いも消毒時の使用濃度はフルアジナム剤で 5,000 μ g/ml、ストレプトマイシン剤で 2,000～4,000 μ g/ml、銅剤で 5,000 μ g/ml であることから、どの薬剤も現時点ではほとんど問題のない感受性値であると考えられた。

B. そうか病に対する温湯処理による種いも消毒と微生物資材の併用

B-1. そうか病菌の死滅温度条件の調査

温湯処理による種いも消毒の基礎資料とするため、そうか病菌 3 種の死滅条件について検討した。

1. 材料および方法

1. 1. 供試菌株

S. scabiei としては S15, S18, S58(鹿児島), NG1-2(長崎), S-324(佐賀; 田代ら 2002), D-1-4, SKI-14(北海道: 田中 2000) および ATCC49173 の 8 菌株, *S. turgidiscabies* としては T3, T13, T17, T45(鹿児島), NG1-1, NG1-7 (長崎), SSY-10 (北海道: 田中 2000) および ATCC700248 の 8 菌株, *S. acidiscabies* としては A3, A4, A5, A6, A7, A8(鹿児島), S-173(佐賀; 田代ら, 2002) および ATCC49003 の 8 菌株の合計 24 菌株を供試した. 供試菌については, 25℃で 14 日間, 松本培地で培養した後, 菌叢に生理滅菌水を加え, 菌懸濁液を作製した. ほとんどの菌懸濁液の菌濃度は $10^5 \sim 2.1 \times 10^6$ CFU/ml であったが, 一部, $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml の菌株もあった. なお, 70℃の温度処理試験では, 各種 2 菌株の合計 6 菌株(S58, ATCC49173, T45, ATCC700248, A3, ATCC49003)の懸濁液を 0.5μm のフィルターで濾過した孢子懸濁液を使用した.

1. 2. 温度処理法と処理後のそうか病菌の生存調査

45℃あるいは 50℃の温度処理は, 上記で調整した菌懸濁液 50μl を PCR 用マイクロチューブ(0.2ml)に入れ, サーマルサイクラー(ASTEC P801)を用いて各温度に設定した. 45℃処理は処理 24 時間後, 48 時間後, そして 72 時間後の処理時間ごとに, 50℃処理は処理 20 分後, 30 分後, 1 時間後, 15 時間後, 24 時間後, そして 48 時間後の処理時間ごとに, PCR 用マイクロチューブを取り出した. また, 70℃処理では, 1ml の菌懸濁液を入れた試験管(直径 10mm, 長さ 135mm, ねじ切り口)を 70℃に設定したウォーターバス中で振とうし, 処理後 5 分後, 10 分後, 20 分後, そして 30 分後の処理時間ごとに試験管を取り出した.

無処理の各懸濁液 50μl および上記で取り出した各処理の菌懸濁液は全量を松本培地に塗布し, 25℃で 7 日間培養し, 菌の生育の有無を調査した.

第 13 表 45℃, 50℃および 60℃における処理時間とそうか病菌の生存菌株率.

そとか病菌種	45℃処理 の供試菌 株数		45℃での処理時間別の生存菌株率(%)					50℃処理 の供試菌 株数		50℃での処理時間別の生存菌株率(%)					70℃処理 の供試菌 株数		70℃での処理時間別の生存菌株率(%)					
	株数	8	1時間	6時間	24時間	48時間	72時間	株数	8	20分	30分	1時間	6時間	15時間	24時間	48時間	株数	2	5分	10分	20分	30分
			n.t.	n.t.	100.0	100.0	100.0			100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0			100.0	100.0	100.0	0.0
<i>S. scabiei</i> ^{a)}	8	8	n.t. ^{d)}	n.t.	100.0	100.0	100.0	8	8	100.0	100.0	100.0	100.0	n.t.	37.5	12.5	0.0	2	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>S. turgidiscabies</i> ^{b)}	8	8	100.0	100.0	62.5	12.5	0.0	8	8	100.0	100.0	87.5	25.0	n.t.	0.0	0.0	0.0	2	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>S. acidiscabies</i> ^{c)}	8	8	100.0	100.0	50.0	12.5	0.0	8	8	100.0	100.0	75.0	0	n.t.	0.0	0.0	0.0	2	0.0	0.0	0.0	0.0

a) S15, S18, S58(鹿児島), NG1-2(長崎), S-324(佐賀), D-1-4, SKI-14(北海道)および ATCC49173S15 の 8 菌株を供試した. ただし, 70℃処理では S58, ATCC49173 の 2 菌株のみ供試した.

b) T3, T13, T17, T45(鹿児島), NG1-1, NG1-7 (長崎), SSY-10 (北海道)および ATCC700248 の 8 菌株を供試した. ただし, 70℃処理では T45, ATCC700248 の 2 菌株のみ供試した.

c) A3, A4, A5, A6, A7, A8(鹿児島), S-173(佐賀)および ATCC49003 の 8 菌株を供試した. ただし, 70℃処理では A3, ATCC49003 の 2 菌株のみ供試した.

d) n.t.: 試験なし.

2. 結果

45℃, 50℃および70℃の温度とその処理時間が, そうか病菌の死滅に及ぼす影響について調査した. その結果, *S. scabiei* については, 45℃の72時間処理でもすべての菌株が生育した. 50℃の15時間処理では37.5%, 24時間処理では12.5%の菌株が生育し, 48時間処理ではすべての菌株が死滅した. 70℃の5分処理では, すべての菌株が死滅した(第13表).

S. turgidiscabies については, 45℃の24時間処理で62.5%, 48時間処理で12.5%について調査した. その結果, *S. scabiei* については, 45℃の72時間処理でもすべての菌株が生育した. 50℃の15時間処理では37.5%, 24時間処理では12.5%の菌株が生育し, 48時間処理ではすべての菌株が死滅した. 70℃の5分処理では, すべての菌株が死滅した(第13表).

S. acidiscabies については, 45℃の24時間処理で50%, 48時間処理で12.5%の菌株が生育し, 72時間処理ではすべての菌株が死滅した. 50℃の6時間処理ではすべての菌株が死滅した. 70℃の5分処理では, すべての菌株が死滅した(第13表).

3. 考察

そうか病菌に対し, 温湯処理による種いも消毒の基礎資料とするため, そうか病菌3種の死滅条件について検討した. これまで, 温湯処理による種いも消毒試験は, 輪腐病菌に対して僅かに報告されている(田杉ら 1952, 1954; 向ら 1951, 1952). それによると, ジャガイモ(品種:紅丸)の種いも内部の輪腐病菌は50℃では30分内外で, 48℃では40分から50分で死滅し, 46℃では60分以上でも死滅しなかった. また, 温湯処理の種いもの発芽への影響は, 48℃の1時間処理で100%発芽し, 50℃の30分処理では発芽率50%以下であり, 50℃の40分処理では発芽率10%内外となることから, 本研究では

種いもの発芽に影響しないと考えられる 45℃と、発芽に影響はあるが殺菌効果の高いと考えられる 50℃、および多くの細菌が死滅する 70℃の3処理で処理時間を変えて試験を実施した。その結果、*S. scabiei* は、50℃では 48 時間ですべての菌が死滅したが、45℃では 72 時間でも死滅しなかった。*S. turgidiscabies* は、50℃では 24 時間で、45℃では 72 時間ですべての菌が死滅した。*S. acidiscabies* は、50℃では 6 時間、45℃では 72 時間ですべての菌が死滅した。以上のことから、そうか病菌は菌種により死滅温度条件に差が認められるものの、そうか病菌の死滅には、50℃で 24 時間以上、45℃で 48 時間以上の処理が必要であることから、温湯処理により種いもの発芽への影響を考慮すると、そうか病菌に対し温湯処理だけによる種いもの消毒は効果が低いことが予想された。

B-2. ジャガイモそうか病に対する温湯処理による種いもの消毒試験

1. 材料および方法

1. 1. ジャガイモそうか病菌に対する温湯処理による防除効果試験

本試験には、鹿児島県農業開発総合センター内のそうか病発生圃場から採取した塊茎(品種:ニシユタカ)を水洗し、3 か月ほど貯蔵した塊茎のなかで、外見上無病徴か、そうか病の病斑が1個の種いものを供試した。種いもの温湯処理および薬剤処理は、平成 21 年 9 月 17 日(植え付け8日前)に実施した。温湯処理は、48℃の温水に 30 分間浸漬した区(48℃-30 分温湯処理区)、あるいは、60 分間浸漬した区(48℃-60 分温湯処理区)の2処理区を設けた。対照として、銅水和剤(銅 50%)100 倍に約 20 秒間浸漬した区(銅水和剤 100 倍区)、フルアジナム水和剤(フルアジナム 50%)100 倍に約 20 秒間浸漬した区(フルアジナム水和剤 100 倍区)の2つの薬剤処理区および無処理区を設けた。処理後は室内で風乾後、植え付けまで保管した。試験は1区あたり10株とし、

3 反復実施した.

センター内の露地圃場(黒ぼく土, pH6.0)において試験を実施した. 土壌消毒は9月11日(植え付け14日前)にクロピクテープを畝の中心に置き, 管理機にて90cm間隔で畝を立て, マルチ(厚さ0.03mm)で被覆した. 上記で処理した種いもを, 9月25日に土壌消毒後の畝に20cm間隔で, 植え付けた. ただし, 48℃-60分間温湯処理区は, 処理により芽が障害を受けたことから, 再萌芽した10月6日に植え付けを行った.

新生塊茎の発病調査については, 12月17日に区ごとに収穫した30g以上(48℃-60分温湯処理区は10g以上)の新生塊茎を対象に発病面積ごとに分け, 発病塊茎率と発病度($\sum(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$)を求めた. なお, 発病指数は, 発病なしを0, 発病面積が3%以下を1, 4~13%を2, 14~25%を3, 26%以上を4とした.

また, 48℃の30分間温湯処理区の新生塊茎に生じたそうか病の病斑から分離されるそうか病菌の菌種を調査した. 病斑(直径5mm, 厚さ2mm)を切り取り, 10倍量の滅菌水を加え, 乳鉢で磨砕し, ナリジキシ酸を4 μ l/ml, シクロヘキシミドを50 μ l/mlとなるように1/100NA培地に加用した培地に磨砕液を白金耳で画線した. 25℃で14日間培養後, 培地上で出現頻度の高い放線菌のコロニーを釣菌し, 松本培地で単コロニーの分離を3回くり返した. 分離した放線菌は爪楊枝で菌叢をわずかにかきとり, 1.5mlのマイクロチューブ内の500 μ lの滅菌水に懸濁した. その後, マイクロチューブを10分間熱湯中に静置し, 12,000rpmで10分間遠心分離した上精2 μ lをPCRの鋳型とした.

なお, そうか病菌種は第1表の*S. scabiei*, *S.turgidiscabies* および *S.acidiscabies* の3種に特異的なプライマーを利用し, PCRにより判別した.

(A) 無処理



(B) 48℃の30分間温湯処理



(C) 48℃の60分間温湯処理



(D) 銅剤100倍浸漬処理



(E) フルアジナム剤100倍浸漬処理



第 11 図 種いも温湯処理 7 日後の種いもの萌芽状況.

1. 2. 種いもの温湯処理によるそうか病病斑内の細菌数の変化

そうか病罹病塊茎を供試し、温湯処理前の病斑部、および、48℃、30 分間の温湯消毒後の病斑部を、直径 5mm、厚さ 2mm で切り取り、10 倍量の滅菌水を加え、乳鉢で磨砕した。磨砕液を 10 倍ごとに段階希釈し、各希釈液を 1/10NA に塗布し、28℃、10 日間培養後、培地に出現したコロニーを細菌と放線菌に分け計数した。なお、試験は 8 反復行った。

2. 結果

2. 1. ジャガイモそうか病菌に対する温湯処理による防除効果試験

銅剤区、フルアジナム区および 48℃の 30 分間温湯処理では芽の一部が黒色する症状が認められたが、植え付け日（処理 7 日後）には無処理とほぼ同等の萌芽状況となった。しかし、48℃の 60 分間温湯処理区は処理 1 日後に芽が黒変したため、無処理に比べ萌芽が遅くなった（第 11 図）。そのため、9 月 25 日に植え付けた各区の出芽期は 10 月 13 日となったが、48℃の 60 分間温湯処理区は 10 月 6 日に植え付けとなり、出芽期は他の区比較し 1 週間ほど遅くなり、温湯処理による萌芽障害が認められた。

新生塊茎でのそうか病の発病は、無処理の発病塊茎率は 35.6%、発病度 10.1 であった。対照の薬剤による種いも消毒は、銅剤 100 倍の浸漬処理区で発病塊茎率 4.1%、発病度 1.2、防除価 90.0、フルアジナム水和剤 100 倍の浸漬処理区で発病塊茎率 7.2%、発病度 1.8、防除価 84.6 といずれも高い防除効果を示した。一方、48℃の温湯処理は、30 分処理で発病塊茎率 49.7%、発病度 19.6、60 分処理で発病塊茎率 70.1%、発病度 32.5 となり無処理よりも高い発病となり、防除効果は認められなかった（第 14 表）。また、48℃の 60 分間温湯処理区の 1 株あたりの新生塊茎重は、他の区と

第 14 表 ジャガイモそうか病に対する各処理による種いも消毒の防除効果と新生塊茎重.

処理区名	調査塊茎数 ^{a)} (個)	指数別塊茎個数(個)				発病塊茎率 (%)	発病度 ^{c)}	防除価 ^{d)}	1株あたりの新 生塊茎重(g)
		0	1	2	3	4 ^{b)}			
48℃,30分温湯処理	56.7	31.7	17.3	5.7	2.0	0.0	ab ^{e)}	51.6	301.8 ^a
48℃,30分温湯・pH4処理	65.0	35.7	23.0	5.7	0.3	0.3	ab	56.8	327.3 ^a
48℃, 30分後温湯処理 ＋バチルス剤100倍浸漬	69.7	51.7	15.7	1.3	0.7	0.3	bc	75.1	346.7 ^a
バチルス剤100倍浸漬	64.3	18.7	26.7	12.0	5.0	2.0	ab	6.6	385.2 ^a
フルアジナムSC100倍浸漬	65.3	64.0	1.0	0.3	0.0	0.0	c	97.9	381.5 ^a
無処理	53.3	16.0	20.0	10.7	4.3	2.3	a	—	334.4 ^a

a) 1 区 10 株, 3 反復の平均.

b) 発病指数: 発病なしを 0, 発病面積が 3%以下を 1, 4~13%を 2, 14~25%を 3, 26%以上を 4 とした.

c) 発病度 = Σ (発病面積別塊茎数×指数)/(調査塊茎数×4)×100. 発病指数: 発病なしを 0, 発病面積が 3%以下を 1, 4~13%を 2, 14~25%を 3, 26%以上を 4 とした.

d) 防除価 = (無処理区の発病度 - 処理区の発病度)/無処理区の発病度×100.

Tukey's HSD 検定 ($\alpha=0.05$) により, 異なる文字は処理区間で有意あり. なお, 発病塊茎率はアークサイン変換後に検定を行った.

第 15 表 ジャガイモそうか病に対する各処理による種いも消毒の防除効果と新生塊茎重.

48℃,30分の温湯処理	塊茎病斑での生菌数(CFU/直径5mm) ^{a)}		放線菌数/全細菌数の比率(%)
	全細菌数 ^{b)}	放線菌数	
温湯処理前の病斑	$2.4 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^7$	$3.9 \times 10^5 \pm 8.5 \times 10^5$	1.6
温湯処理後の病斑	$4.5 \times 10^5 \pm 7.3 \times 10^5$	$3.4 \times 10^5 \pm 6.2 \times 10^5$	75.6
処理後/処理前の比率(%)	1.9	86.5	

a) 8 反復の平均値±標準偏差, CFU:コロニー形成数.

b) 全細菌数は放線菌数も含む.

比較して減少し、有意差が認められた(第 14 表)。

さらに、48℃の 30 分間温湯処理区の新生塊茎の病斑から分離したそうか病菌の菌種を調査した結果、90%が *S.scabiei* で、10%が *S.turgidiscabies* であった(データ省略)。

2. 2. 種いもの温湯処理によるそうか病の病斑内の細菌数の変化

48℃の 30 分間温湯処理による種いものそうか病の病斑の細菌数の変化を調査した結果、直径 5mm の病斑内の平均の全細菌数は、処理前が 2.4×10^7 CFU で、処理後は 4.5×10^5 CFU となり、処理前と比較し約 2%に減少した。一方、放線菌数は処理前 3.9×10^5 CFU から処理後は 3.4×10^5 CFU となったが、処理前の約 87%であり、ほとんど減少しなかった(第 15 表)。

3. 考察

そうか病に対し、温湯処理による種いもの消毒の防除効果を圃場試験により検討した。これまで向ら(1951,1952)の報告では、48℃、60 分間の温湯処理では 100%発芽したが、本試験において 48℃、60 分間の温湯処理では、種いもの萌芽障害と新生塊茎の収量の減少が認められた。これは、品種の違いや温湯処理時の種いもの生理状態の違いが影響したかもしれない。しかし、鹿児島県では種いものを他県から購入に依存しているため、種いもの消毒時期は植え付け前の萌芽に近い時期となることが多く、萌芽に悪影響を及ぼす 48℃、60 分間の温湯処理条件は不適であると考えられる。

また、48℃、30 分または 60 分のいずれの温湯処理を行っても、無処理よりもそうか病の発病度が高くなり、防除効果は認められなかった。

さらに、温湯処理によるそうか病の病斑の細菌数の変化を調査したところ、温湯処理

により細菌数が大きく減少するが、放線菌はほとんど減少しなかった。これは、前項の「C. そうか病菌の死滅温度条件の調査」において、そうか病菌の死滅には、50℃の温度条件で、*S. scabiei* は48時間、*S. turgidiscabies* は24時間、*S. acidiscabies* は6時間の処理が必要であることが判明している。そのため、48℃の温度条件では、種いも病斑中のそうか病菌の多くが生存し、そうか病菌に競合する細菌等が大幅に減少したことが、新生塊茎でのそうか病の発生の増加の一因であるものと考えられた。

一方、銅水和剤およびフルアジナム剤の種いも浸漬処理は高い防除効果を示した。

以上のことから、ジャガイモそうか病に対しては、温湯処理だけでは種いもの消毒効果は低いものと考えられた。

B-3. ジャガイモそうか病に対する温湯処理による種いも消毒の改善

1. 材料および方法

種いもには、鹿児島県農業開発総合センター内のそうか病発生圃場から採取した塊茎（品種：ニシユタカ）を水洗し、3 か月ほど貯蔵した塊茎のなかで、外見上無病徴か、病斑が1個の種いもを供試した。種いもの温湯処理および薬剤処理は、平成23年3月11日（植え付け5日前）に実施した。温湯処理は、48℃で30分間浸漬した区（48℃-30分温湯処理単独区）、水道水を6N HClでpH4.0に調製し、48℃で30分間処理した区（48℃-30分温湯・pH4処理区）、48℃で30分間浸漬した後、バチルス水和剤（市販農薬：*Bacillus subtilis* 生芽胞 5×10^9 CFU/g）100倍に浸漬した区、対照としてバチルス水和剤100倍に浸漬した区（バチルス剤 SC100 浸漬区）、フルアジナムフロアブル剤（フルアジナム 39.5%）100倍に浸漬した区（フルアジナム SC100 倍浸漬区）および無処理区の6処理を設けた。なお、温湯処理後は直ちに流水により5分間冷却した後、室内で風乾した。また、薬剤処理後についても室内で十分に風乾した。

試験はセンター内の露地圃場で実施した(黒ぼく土, pH6.0). 圃場の土壌消毒は 2 月 7 日にクロピクテープを畝の中心に置き, 管理機にて 90cm 間隔で畝を立て, マルチ(厚さ0.03mm)で被覆して行った. 上記で処理した種いもは, 3月16日に土壌消毒後の畝に 20cm 間隔で, 植え付けた. 各処理は 1 区 15 株とし, 3 反復行った. 新生塊茎の発病調査は, 6 月 9 日に処理区ごとに収穫し, 各区 15 株の内, 13 株の 30g 以上の新生塊茎を対象に発病面積ごとに分け, 発病塊茎率と発病度 ($\Sigma(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$) を求めた. なお, 発病指数は, 発病なしを 0, 発病面積が 3%以下を 1, 4~13%を 2, 14~25%を 3, 26%以上を 4 とした.

2. 結果

新生塊茎でのそうか病の発病は, 無処理の発病塊茎率は 71.5%, 発病度 30.6 であった. また, 対照のフルアジナム SC100 倍浸漬区の発病塊茎率は 2.0%, 発病度 0.6 となり, 無処理に比較して高い防除効果が認められたが, 生物防除剤であるバチルス剤 100 倍浸漬区の発病塊茎率は 71.1%, 発病度 28.6 となり, 防除効果はほとんど認められなかった(第 16 表).

48℃で 30 分間温湯処理の単独区の発病塊茎率は 43.3%, 発病度 14.8 となり, また, 水を pH4.0 に調整した 48℃-30 分温湯・pH4.0 処理区の発病塊茎率は 42.5%, 発病度 13.2 となり, 両処理区とも無処理に比較し防除効果は認められるものの, その効果は低かった. しかし, 48℃-30 分温湯処理後にバチルス剤 100 倍に浸漬処理を併用することで, 発病塊茎率は 25.3%, 発病度 7.6 となり, 温湯処理単独よりも高い防除効果となった(第 16 表).

3. 考察

第16表 ジャガイモそうか病に対する各処理による種いも消毒の防除効果と新生塊茎重.

処理区名	調査塊茎数 ^{a)} (個)	指数別塊茎個数(個)				発病塊茎率 (%)	発病度 ^{c)}	防除価 ^{d)}	1株あたりの新 生塊茎重(g)
		0	1	2	3	4 ^{b)}			
48℃,30分温湯処理	56.7	31.7	17.3	5.7	2.0	0.0	ab ^{e)} 14.8	51.6	301.8 ^a
48℃,30分温湯・pH4処理	65.0	35.7	23.0	5.7	0.3	0.3	ab 13.2	56.8	327.3 ^a
48℃, 30分後温湯処理 +バチルス剤100倍浸漬	69.7	51.7	15.7	1.3	0.7	0.3	bc 7.6	75.1	346.7 ^a
バチルス剤100倍浸漬	64.3	18.7	26.7	12.0	5.0	2.0	ab 28.6	6.6	385.2 ^a
フルアジナムSC100倍浸漬	65.3	64.0	1.0	0.3	0.0	0.0	c 0.6	97.9	381.5 ^a
無処理	53.3	16.0	20.0	10.7	4.3	2.3	a 30.6	—	334.4 ^a

a) 1 区 13 株,3 反復の平均.

b) 発病指数:発病なしを 0, 発病面積が 3%以下を 1, 4~13%を 2, 14~25%を 3, 26%以上を 4 とした.

c) 発病度 = $\sum(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$.

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

e) Tukey's HSD 検定 ($\alpha=0.05$) により, 異なる文字は処理区間で有意あり. なお, 発病塊茎率はアークサイン変換後に検定を行った.

種いもの 48℃ の 30 分温湯処理は、対照薬剤のフルアジナム剤と比較し防除効果は劣り、無処理と比較すると防除効果は低かった。そこで、そうか病等は酸性に弱いことから、水を pH4.0 に調整し温湯処理を行ったが防除効果の向上は認められなかった。また、これまでの試験結果から、温湯処理による種いも消毒では、そうか病菌の減少は少ないのに対し、その他の細菌が大幅に減少するなど、塊茎上の微生物の競合関係の低下が防除効果の低下の原因と考えられたことから、温湯処理後に微生物剤を利用することを試みた。拮抗微生物に関しては、ジャガイモそうか病菌の抑制に、*Bacillus subtilis* が関与していることを報告していることから(大和田ら, 2003; Weinhold and Bowman, 1968), 利用が容易な市販のバチルス剤を供試した。

その結果、バチルス剤単用だけでは防除効果がほとんど認められなかったが、温湯処理と併用した場合、防除効果の大幅な向上が認められた。これは、温湯処理による拮抗細菌の減少を、バチルス剤で補った効果であると考えられた。

C. メチルイソシアネート・D-D 油剤の土壌消毒によるジャガイモそうか病防除

ジャガイモそうか病に対して、クロルピクリン剤は有効な土壌消毒剤であるが、刺激臭などにより作業者への負担が大きく、また、成分の空気中への拡散を抑制するため被覆が必要であり、ジャガイモ等の露地野菜で利用できる場面は限られる。そのため、本病に効果が高く、クロルピクリンを有効成分としない土壌消毒剤の登録が望まれている。

ジャガイモには現在未登録であるが、サツマイモとの輪作で問題となるセンチュウに対して高い効果が期待できる、メチルイソシアネート・D-D 油剤(20%+40%)について、検討を行った。

1. 材料および方法

そうか病菌に対するメチルイソシアネート・D-D 油剤の効果的な土壌消毒法を確立す

るため、本剤の土壌への処理量と処理間隔について検討した。試験は農業開発総合センター露地圃場(土壌:黒ボク土)において、2008年から2010年まで3か年間実施した。

2008年3月11日の試験では、土壌消毒には手動式土壌点注機を用い、メチルイソシアネート・D-D油剤は1穴あたり4mlを30cm間隔(千鳥)で15cmの深さに点注した区、または1穴あたり2mlを15cm間隔で15cm深さに点注した区の2処理を行った。対照薬剤のクロルピクリン剤(80%)は1穴あたり3mlを30cm間隔(千鳥)間隔で15cmの深さに点注した。処理後直ちに、0.05mm透明ポリマルチで被覆した。被覆除去(被覆14日後)は3月25日に、ガス抜きは3月28日に実施した。また、健全な種いも(品種:ニシユタカ)をストレプトマイシン液剤(20%)の100倍に瞬間浸漬処理したものを使用した。なお、土壌消毒時の土壌はpH5.8で、土壌水分率は26%であった。また、被覆期間中の地温(深さ15cm)は、最低で12.4℃、最高で22.3℃、平均で16.4℃であった。ジャガイモの植え付けは、4月1日に畝間90cm、株間20cmとし、収穫は6月12日に行った。試験は1区あたり17株とし、3反復実施した。発病調査は収穫時に、各区10株について、30g以上の新生塊茎を対象に発病面積ごとに分け、発病塊茎率と発病度($\sum(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$)を求めた。なお、発病指数は、発病なしを0、発病面積が3%以下を1、4~13%を2、14~25%を3、26%以上を4とした。

2008年9月9日の試験では、手動式土壌点注機を用い、メチルイソシアネート・D-D油剤は、1穴あたり2mlを30cm条間の15cm間隔(千鳥)で15cmの深さに点注した区、または1穴あたり1mlを15cm間隔で15cm深さに点注した区の2処理を行った。また、対照薬剤のクロルピクリン剤(80%)は1穴あたり3mlを30cm間隔(千鳥)で15cm深さに点注した。処理後直ちに、0.05mm透明ポリマルチで被覆した。被覆除去(被覆13日後)とガス抜きは9月22日に実施した。なお、土壌消毒時の土壌はpH5.9であった。健全種いも(品種:デジマ)をフルアジナム水和剤(50%)の100倍に瞬間浸漬処理したも

のを使用した。植え付けは、10月2日に畝間90cm、株間20cmで行い、収穫は12月15日に行った。試験は1区あたり15株とし、3反復実施した。発病調査は収穫時に、各区12株について、25g以上の新生塊茎を対象に、上記試験と同様に行った。

2009年8月17日の試験では、手動式土壌点注機を用い、メチルイソシアネート・D-D油剤は、1穴あたり2mlを30cm条間の15cm間隔(千鳥)で15cmの深さに点注した区、または1穴あたり1.3mlを20cm条間の15cm間隔(千鳥)で15cmの深さに点注した区の2処理を行った。また、対照薬剤のクロルピクリン剤(99.5%)は1穴あたり3mlを30cm間隔(千鳥)で15cm深さに点注した。処理後直ちに、0.03mm透明ポリマルチで被覆した。被覆除去(被覆15日後)とガス抜きは9月1日に実施した。なお、土壌消毒時の土壌はpH6.1で、土壌水分率は24.8%であった。健全な種いも(品種:デジマ)をフルアジナム水和剤(50%)の100倍に瞬間浸漬処理したものを使用した。植え付けは、9月7日に畝間90cm、株間20cmで行い、収穫は11月12日に行った。試験は1区あたり14株とし、3反復実施した。発病調査は収穫時に、各区12株について、30g以上の新生塊茎を対象に、上記試験と同様に行った。

2010年9月14日の試験では土壌消毒後の無被覆の効果を調べるために、手動式土壌点注機を用い、メチルイソシアネート・D-D油剤は1穴あたり1.3mlを20cm条間の15cm間隔(千鳥)で15cmの深さに点注した。処理後は、鎮圧のみを行い被覆なしの区(無被覆区)と、処理後直ちに、0.03mm透明ポリマルチで被覆した区(被覆区)を設置した。また、対照薬剤のクロルピクリン剤(99.5%)は1穴あたり3mlを30cm間隔(千鳥)で15cmに深さに点注し、処理後直ちに、0.03mm透明ポリマルチで被覆した。被覆した区については9月28日(被覆14日間後)に被覆を除去した。また、耕耘・畝立は9月30日に行った。なお、土壌消毒時の土壌はpH5.5で、土壌水分率は21.3%であった。健全な種いも(品種:デジマ)をフルアジナム水和剤(50%)の100倍に瞬間浸漬処理したものを使用した。植え付けは、10月4日に畝間90cmで株間20cmで行い、収穫は12月16日に行った。試験は1区あたり15株とし、3反復実施した。発病調査は収穫時

第 17 表 ジャガイモそうか病に対するメチルイソシアネート・D-D 油剤の防除効果と新生塊茎重.

試験開始 年/月/日	薬剤名 (成分%)	点注処理方法	処理量 10aの処 (ml/穴) 理量(L)	被覆 ^{a)}	調査地茎 数(個) ^{b)}	発病塊 茎率 ^{c)} (%)	発病度 ^{c)}	防除価 ^{d)}	1株あたり の塊茎重 (g)	消毒開始時 の土壌のpH と水分
2008/3/11	メチルイソシアネート・D-D油剤(20+40)	30cm間隔	4	40	有	85.0 ab ^{e)}	98.9 a	64.1 a	10.3	685.5 ab
	メチルイソシアネート・D-D油剤(20+40)	15cm間隔	2	80	有	72.3 ab	55.1 b	15.8 b	77.9	492.3 b
	クロルピクリン(80)	30cm間隔	3	30	有	87.0 a	51.8 b	21.6 b	69.8	908.0 a
	無処理	—	—	—	—	70.0 b	98.6 a	71.4 a	0.0	543.0 b
2008/9/9	メチルイソシアネート・D-D油剤(20+40)	30cm条間の15cm間隔	2	40	有	59.3 b	13.3 b	3.3 b	83.0	487.7 a
	メチルイソシアネート・D-D油剤(20+40)	15cm間隔	1	40	有	62.0 b	6.5 b	1.6 b	91.8	498.3 a
	クロルピクリン(80)	30cm間隔	3	30	有	60.3 b	2.7 b	0.7 b	96.4	508.0 a
	無処理	—	—	—	—	46.0 a	65.6 a	19.6 a	0.0	373.0 b
2009/8/17	メチルイソシアネート・D-D油剤(20+40)	30cm条間の15cm間隔	2	40	有	83.3 a	9.4 b	2.4 b	91.5	548.7 a
	メチルイソシアネート・D-D油剤(20+40)	20cm条間の15cm間隔	1.3	40	有	85.7 a	5.4 b	1.4 b	95.1	561.0 a
	クロルピクリン(99.5)	30cm間隔	3	30	有	88.3 a	1.5 b	0.4 b	98.7	565.7 a
	無処理	—	—	—	—	63.7 a	83.3 a	27.8 a	0.0	339.7 b
2010/9/14	メチルイソシアネート・D-D油剤(20+40)	20cm条間の15cm間隔	1.3	40	無	86.3 ab	12.4 c	3.3 ab	71.0	734.8 b
	メチルイソシアネート・D-D油剤(20+40)	20cm条間の15cm間隔	1.3	40	有	88.7 ab	0.0 b	0.0 b	100.0	772.7 at
	クロルピクリン(99.5)	30cm間隔	3	30	有	100.3 a	0.0 c	0.0 b	100.0	878.2 a
	無処理	—	—	—	—	71.3 b	41.4 a	11.3 a	0.0	570.4 c

- a) 被覆の資材は, 2008 年(3 月および 9 月)は透明ポリマルチの厚さが 0.05mm, 2009 年と 2010 年は厚さ 0.03mm.
- b) 調査塊茎数は 2008 年 3 月と 2010 年は 10 株, 2008 年 9 月と 2009 年は 12 株を調査.
- c) 発病度 = Σ (発病面積別塊茎数×指数)/(調査塊茎数×4)×100. 発病指数: 発病なしを 0, 発病面積が 3%以下を 1, 4 ~13%を 2, 14~25%を 3, 26%以上を 4 とした.
- d) 防除価 = (無処理区の発病度 - 処理区の発病度)/無処理区の発病度×100.
- e) Tukey's HSD 検定 ($\alpha=0.05$) により, 異なる文字は処理区間で有意差あり. なお, 発病塊茎率はアークサイン変換後に検定を行った.

に、各区の 10 株について、30g 以上の新生塊茎を対象に、上記試験と同様に行った。

2. 結果

第 17 表に 3 か年間分のメチルイソシアネート・D-D 油剤の土壌処理結果を示す。2008 年 3 月の試験では、メチルイソシアネート・D-D 油剤は 1 穴あたり 4ml を 30cm 間隔(千鳥)で 15cm の深さに点注した区、または 1 穴あたり 2ml を 15cm 間隔で 15cm 深さに点注した区の 2 処理を検討した結果、1 穴あたり 2ml を 15cm 間隔で 15cm 深さに点注した区の新成塊茎では、発病塊茎率が 55.1%、発病度 15.8 となり、対照のクロルピクリン剤処理区の発病塊茎率 51.8%、発病度 21.6 と比較して防除効果はほぼ同等で、無処理区の発病塊茎率 98.6%、発病度 71.4 と比較して高い防除効果を示した。しかし、メチルイソシアネート・D-D 油剤は 1 穴あたり 4ml を 30cm 間隔(千鳥)で 15cm の深さに点注した区では、発病塊茎率 98.9%、発病度 64.1 となり、ほとんど防除効果は認められなかった。また、クロルピクリン処理区で新塊茎数および塊茎重の増加が認められた。

そこで、2008 年 9 月の試験では、15cm 間隔で 1 穴 2ml 処理を半量にした 15cm 間隔の 1 穴 1ml 処理区、または 30cm 条間の 15cm 間隔(千鳥)の 1 穴 1.3ml 処理区の 2 処理について検討した結果、15cm 間隔の 1 穴 1ml 処理区の発病塊茎率 6.5%、発病度 1.6 となり、対照のクロルピクリン剤処理区の発病塊茎率 2.7%、発病度 0.7 と比較してほぼ同等の防除効果を示し、無処理区の発病塊茎率 65.6%、発病度 19.6 と比較して高い防除効果を示した。また、30cm 条間の 15cm 間隔の 1 穴 2ml 処理区では発病塊茎率 6.5%、発病度 1.6 となり、対照のクロルピクリン剤処理区と比較しやや防除効果は劣るものの、無処理区と比較し高い防除効果を示した。さらに、メチルイソシアネート・D-D 油剤およびクロルピクリン剤による土壌消毒区では無処理区に比較し新成塊茎数および塊茎重が有意に増加した。

2009 年の試験では、30cm 条間の 15cm 間隔の 1 穴 1.3ml 処理区に加え、効果の高かった 15cm 間隔処理よりも処理穴数の少ない 20cm 条間の 15cm 間隔の 1 穴 1.3ml 処理区について検討した結果、30cm 間隔の 1 穴 2ml 処理区の発病塊茎率 9.4%、発病度 2.4 となり、対照のクロルピクリン剤処理区の発病塊茎率 1.5%、発病度 0.4 と比較して防除効果はやや劣るものの、無処理区の発病塊茎率 83.3%、発病度 27.8 と比較して高い防除効果を示した。また、20cm 条間の 15cm 間隔の 1 穴 1.3ml 処理区では発病塊茎率 5.4%、発病度 1.4 となり、30cm 条間よりも防除効果が向上した。なお、土壌処理区では無処理区と比較して塊茎重が有意に増加した。

2010 年は労力とコストの削減の観点から、本剤処理後の被覆を省く条件（無被覆）での防除効果の検討を行った。これまでの試験結果から高い効果の確認された 20cm 条間の 15cm 間隔で 1 穴 1.3ml の点注処理を行い、処理後に被覆あり区と被覆なし区を設けた結果、被覆なし区では発病塊茎率が 12.4%、発病度 3.3 となったが、対照の被覆あり区およびクロルピクリン剤処理区では発病が認められなかった。対照の処理と比較して防除効果はやや劣ったものの、無処理区の発病塊茎率 41.4%、発病度 11.3 と比較して高い防除効果を示した。

3. 考察

ジャガイモそうか病に対して、クロルピクリンは有効な土壌消毒剤であるが、刺激臭などにより作業員への負担が大きく、また、被覆が必要なため、ジャガイモ等の露地野菜で利用できる場面は限られる。そのため、本病に効果が高いが、クロルピクリンを有効成分としない土壌消毒剤の登録が望まれていることから、メチルイソシアネート・D-D 油剤（ジャガイモに未登録）について検討を行ってきた。その結果、本剤 1～1.3ml を 15～20cm 間隔で深さ 15cm に点注処理後、ポリマルチで被覆することで、従来の処理量（40L/10a）を増やすことなく、クロルピクリン剤と同等の高い防除効果が得られた。これは、主な殺菌

成分であるメチルイソシアネートの土壌中での横への拡散が10～15cm以内であると考えられた。

以上のことから、そうか病の発生が少発生条件(発病度 11 程度)であれば、ディ・トラペックス油剤の20cm条間、15cmの間隔で深さ15cmに、1.3ml/穴を点注処理することで、処理後に土壌鎮圧のみのでも比較的高い防除効果が認められた。なお、本処理による薬害や収量の減収は認められなかった。

D. 太陽熱土壌消毒処理と米ぬか土壌混和处理の併用によるジャガイモそうか病の防除

D-1. 太陽熱土壌消毒と米ぬかおよび *Gliocladium* 属菌資材の併用効果

ジャガイモそうか病の生物資材は、単剤処理においては防除効果が十分でない事例が多い。一方、土壌消毒と資材を組み合わせた場合は高い防除効果が認められている。しかし、単作ごとの防除ではコスト高となる問題が生じる恐れがある。そこで、ジャガイモを連作における、太陽熱土壌消毒と各資材を組み合わせた防除法について調査した。

1. 材料および方法

試験は農業試験場内露地圃場(土壌:灰色低地土)で実施した。太陽熱土壌消毒処理は2002年8月8日に耕耘後0.05mmポリマルチで被覆して開始した。クロルピクリン剤による土壌消毒は8月21日に1穴あたり3mlを30cm間隔(千鳥)で15cmの深さに点注し、土壌を鎮圧後直ちに0.05mmポリマルチで被覆した。被覆は秋作の植え付け前日まで行った。太陽熱土壌消毒処理区およびクロルピクリン土壌消毒処理区については、植え付け前に *Gliocladium* 資材を10aあたり300kg相当量で散布し、15cmの深

さに土壌混和した区(太陽熱処理 + *Gliocladium* 区, あるいはクロルピクリン処理 + *Gliocladium* 区), 米ぬかを 10a あたり 300kg 相当量で散布し, 15cm の深さに土壌混和した区(太陽熱処理 + 米ぬか区, あるいはクロルピクリン処理 + 米ぬか区), 太陽熱消毒処理のみの区(太陽熱処理単独区), クロルピクリン剤土壌消毒のみの区(クロルピクリン処理単独区)および土壌消毒と資材散布を実施していない区(無処理区)の 7 処理区を設けた.

防除効果については, 連作での持続効果を調査するため, 秋作は 2002 年 10 月 11 日に植え付け, 2003 年 1 月 14 日に収穫し, 新生塊茎の発病調査を行った. 続けて, 春作は 2003 年 2 月 17 日に同じ処理区に植え付け, 5 月 27 日に収穫し, 新生塊茎の発病調査を行った. 両作とも健全な種いも(品種: ニシユタカ)をフルアジナム水和剤(50%)100 倍に約 20 秒間浸漬し, 十分に風乾したものを供試した. 試験は 1 区 40 株(畝間 80cm, 株間 20cm)とし, 3 反復行った. 新生塊茎の発病調査は, 収穫日に処理区ごとに収穫し, 各区 20 株の 30g 以上の新生塊茎を対象に発病面積ごとに分け, 発病塊茎率と発病度($\sum(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$)を求めた. なお, 発病指数は, 発病なしを 0, 発病面積が 3%以下を 1, 4~13%を 2, 14~25%を 3, 26%以上を 4 とした.

2. 結果

太陽熱処理区での最高地温は, 深さ 10 cm で 57.8℃となり, 50℃以上が 4 時間以上持続する日が 2 日あった. また, 栽培期間中の土壌の pH は 5.1~5.9, 土壌水分率は 19.8~23.7%の間で変動し, 区間により大きな差は認められなかった(データ省略).

第 18 表に結果を示す. 無処理区では, 秋作で発病塊茎率 75.0%, 発病度 36.8, 春作で発病塊茎率 99.2%, 発病度 74.1 となり, 連作により甚発生となった.

対照のクロルピクリン処理単独区では, 秋作で発病塊茎率 0.4%, 発病度 0.2, 春作

第 18 表 太陽熱処理と米ぬか、微生物製剤の組み合わせによるそうか病の防除効果.

処理区名	秋作				春作													
	調査塊茎数 (個)	a) 発病塊茎率 (%)	b) 発病度 (%)	c) 防除価	1株あたりの新 生塊茎重(g)	調査塊茎数 (個)	発病塊茎率 (%)	発病度 (%)	防除価	1株あたりの新 生塊茎重(g)								
太陽熱処理＋ Gliocladium	133.0	a d)	2.7	c	0.7	c	98.2	a	457.6	203.3	a	29.4	bc	9.9	cd	86.7	ab	866.6
太陽熱処理＋米ぬか	140.3	a	3.1	c	0.8	c	97.9	a	469.1	152.3	a	35.4	b	11.7	c	84.2	ab	708.3
太陽熱処理単独	141.3	a	27.7	b	8.2	b	77.8	a	466.2	162.0	a	55.9	b	22.0	b	70.4	ab	676.5
クロルピクリン処理 ＋Gliocladium	151.7	a	0.6	c	0.2	c	99.6	a	532.0	193.7	a	2.3	d	0.6	d	99.1	ab	776.7
クロルピクリン処理 ＋米ぬか	135.3	a	0.2	c	0.1	c	99.8	a	476.7	210.7	a	5.3	d	2.2	cd	97.0	a	959.9
クロルピクリン処理単独	163.0	a	0.4	c	0.2	c	99.6	a	537.2	180.0	a	10.4	cd	3.2	cd	95.7	ab	836.2
無処理	144.3	a	75.0	a	36.8	a	—	a	461.0	151.7	a	99.2	a	74.1	a	—	b	603.3

a) 1 区 20 株, 3 反復の平均.

b) 発病度 = Σ (発病面積別塊茎数 × 指数) / (調査塊茎数 × 4) × 100.

c) 防除価 = (無処理区の発病度 - 処理区の発病度) / 無処理区の発病度 × 100. 発病指数: 発病なしを 0, 発病面積が

3% 以下を 1, 4~13% を 2, 14~25% を 3, 26% 以上を 4 とした.

d) Tukey's HSD 検定 ($\alpha=0.05$) により, 異なる文字は処理区間で有意あり. なお, 発病塊茎率はアークサイン変換後に検定を行った.

で発病塊茎率 10.4%, 発病度 3.2 となった。また, 防除価は 99.6 ならびに 95.7 で高い効果が認められた。また, クロルピクリン処理 + *Gliocladium* 区では, 秋作で発病塊茎率 0.6%, 発病度 0.2, 春作で発病塊茎率 2.3%, 発病度 0.6 となった。また, 防除価は 99.6 ならびに 99.1 で高い効果が認められた。クロルピクリン処理 + 米ぬか区では, 秋作で発病塊茎率 0.2%, 発病度 0.1, 春作で発病塊茎率 5.3%, 発病度 2.2 となり, 防除価は 99.8 ならびに 97.0 で効果が認められた。

このような発病状況で, 太陽熱処理単独区では, 秋作で発病塊茎率 27.7%, 発病度 8.2, 春作で発病塊茎率 55.9%, 発病度 22.0 となった。また, 連作により, 防除価は 77.8 から 70.4 と低下した。

一方, 太陽熱熱処理 + *Gliocladium* 区では, 秋作で発病塊茎率 2.7%, 発病度 0.7, 春作で発病塊茎率 29.4%, 発病度 9.9 となった。また, 防除価は 98.2 から 86.7 と低下したが, 単独処理より持続効果が認められた。同様に太陽熱熱処理 + 米ぬか区では, 秋作で発病塊茎率 3.1%, 発病度 0.8, 春作で発病塊茎率 35.4%, 発病度 11.7 となった。また, 防除価は 97.9 から 84.2 と低下したが, 単独処理より持続効果が認められた。

また, 1 株あたりの塊茎重については, 秋作では処理区間で有意差が認められなかったが, 春作ではクロルピクリン処理 + 米ぬか区は無処理区と比べ有意に増加した。

3. 考察

微生物資材の場合, 定着が重要となるが, 多様な土壌微生物フローラのなかでは定着が困難であることが予想される。そこで, 単純化した環境での微生物の定着を図ることを目的として, 太陽熱処理やクロルピクリン処理後に, *Gliocladium* 資材や米ぬかなどを施用することで, 防除効果の改善を検討した結果, 太陽熱熱処理は, 単独処理においては比較的高い防除効果であったが, *Gliocladium* 資材や米ぬかを併用することで, より高い防除効果を示した。持続効果をみると, 単独区の発病塊茎率が約 56%であった

のに対し、*Gliocladium* 資材や米ぬか併用区では約 30%前後と低く抑えたが、前作の発病程度の影響を受け、両区とも発病が上昇した。経済的許容水準である発病塊茎率 20%以下を前提とすると、本研究では太陽熱消毒単独処理は、処理後の作での効果は高いが、次作までの効果は不十分と考えられた。

クロルピクリン区では、いずれの処理でも高い防除効果を示した。また、連作後も効果は高かったが、これは、前作の発病が非常に少なかったためであると考えられた。しかし、造成直後の畑やクロルピクリン処理後の希薄な微生物フローラの土壌では、種いもにより病原菌が持ち込まれた場合など多発することが報告されていることから(田代ら, 2002), 種いも伝染や農機具によるそうか病菌の圃場への持ち込みについては十分に注意する必要がある。

米ぬか施用による防除効果は、鹿児島、長崎(後藤,1995)では高い効果を示しているが、脱脂の米ぬかを使用した北海道の試験(田中ら,1997)では発病を助長しており、資材や地域の違いで防除効果に振れがみられる。

また、そうか病の微生物防除に関しては、*Trichoderma* 属菌の施用、緑肥ダイズ鋤込み後の *Bacillus subtilis* の優占、種いも処理の蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌、拮抗放線菌などの報告があるが、米ぬか施用の効果は、米ぬかを栄養源とし、増殖する微生物が関与している可能性が高い。今後は米ぬかで変化する微生物フローラの解明が必要と考えれる。

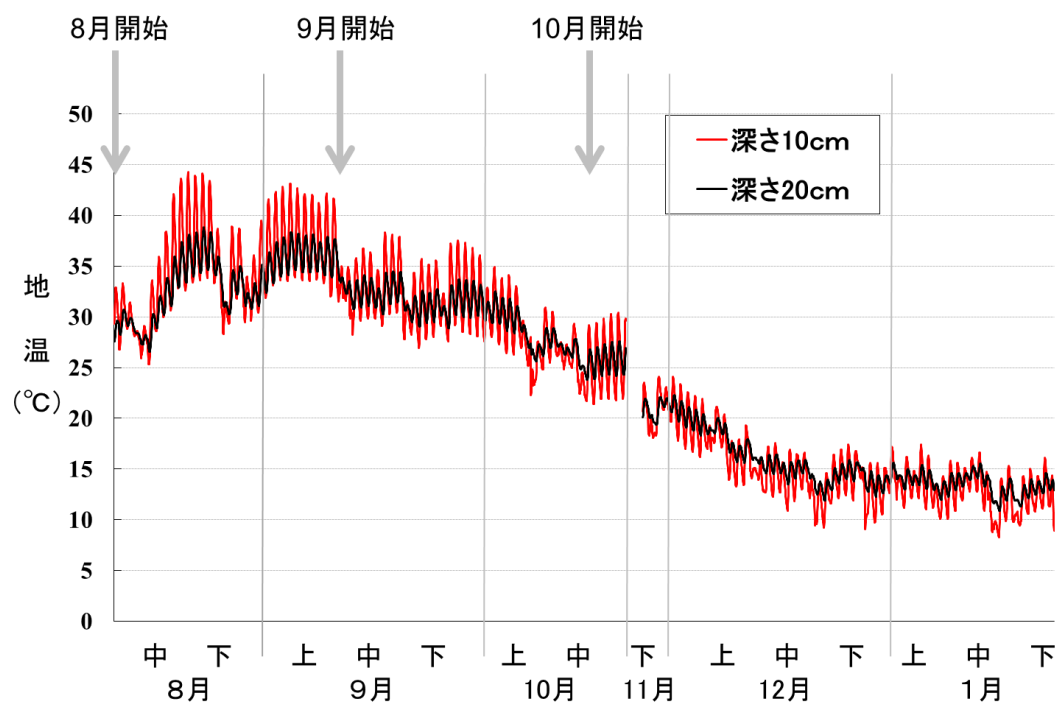
D-2. 太陽熱土壌消毒処理の防除効果の高い時期と米ぬかの同時施用

太陽熱処理の防除効果の高い処理開始時期を明確にし、また、通常はジャガイモの植え付け前に処理する米ぬかを、防除効果の向上を目的として太陽熱消毒処理と同時に施用した場合の防除効果について検討した。

1. 材料および方法

試験は農業試験場内露地圃場(土壌:灰色低地土)で実施した。太陽熱土壌消毒処理を2003年8月11日から開始した区(8月処理開始区),9月11日から開始した区(9月処理開始区),同日に米ぬか300kg/10a相当量を全面に散布し,耕運機にて15cmの深さに土壌混和した直後に太陽熱消毒処理をした区(9月米ぬか同時処理区),太陽熱土壌消毒処理を10月17日から開始した区(10月処理開始区),同日に米ぬか上記と同様な条件で処理した区(10月米ぬか同時処理区)および無処理区の6処理を設けた。太陽熱消毒処理区は0.05mmポリマルチで被覆し,畝立て時の2004年1月22日に被覆を除去した。作式は1条植え,畝間90cm,株間20cmのマルチ栽培とした。健全な種いも(ニシユタカ)をフルアジナム水和剤(50%)100倍に約20秒間浸漬し,室内で風乾した。2月3日に植え付け,5月12日に収穫を行った。試験は1区20株とし,3反復実施した。新生塊茎の発病調査は,収穫日に処理区ごとに収穫し,各区15株の30g以上の新生塊茎を対象に発病面積ごとに分け,発病塊茎率と発病度($\sum(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$)を求めた。なお,発病指数は,発病なしを0,発病面積が3%以下を1,4~13%を2,14~25%を3,26%以上を4とした。

また,土壌の微生物の調査のため,各太陽熱処理開始前から種いも植付および収穫時に土壌を採取した。土壌は,収穫時は新塊茎周辺の土壌から,それ以外の時期については畝表面から深さ20cmまでの土壌を直径10cmの採土管を用いて10カ所を採取し,よく混和したものを試料とした。各20gの土壌を10倍量の滅菌水に懸濁し,15分間超音波処理をした後,適宜希釈し,菌密度を計数した。糸状菌はローズベンガル培地,細菌は1/10普通寒天培地(NA),放線菌はデンプン培地(K_2HPO_4 0.3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, NaCl 5.0g, NaN_3 1.0g,可溶性デンプン 10.0g,寒天 20.0g,蒸留水 1,000ml)を使用した。なお,各時期に採取した土壌は「土壌標準分析・測定法」に従い土壌pHと土壌水分を調査した。



第 12 図 太陽熱消毒処理の期間中の地温の推移。

矢印は太陽熱消毒処理開始時期を示す。被覆資材は透明のポリマルチ(厚さ 0.05mm)。

第 19 表 太陽熱消毒の処理開始時期と米ぬか同時施用のそうか病の防除効果と新生塊茎重.

処理区名	開始月日	調査塊茎 数(個) ^{b)}	指数別塊茎個数(個)				発病塊茎率(%) ^{d)}	発病度 ^{e)}	防除価 ^{f)}	1株あたりの新生塊 茎重(g)
			0	1	2	3	4 ^{e)}			
8月処理開始 ^{a)}	8月11日	140.7	130.3	9.0	0.3	0.7	0.3	7.4 ± 8.1 ^{a g)}	2.3 ± 2.9 ^a	948.2 ± 88.9 ^a
9月処理開始	9月11日	99.3	50.0	26.3	13.3	6.3	3.3	46.1 ± 37.2 ^a	19.4 ± 21.1 ^a	736.6 ± 105.7 ^a
9月米ぬか同時処理	9月11日	95.3	65.7	24.3	4.0	1.0	0.3	31.1 ± 2.0 ^a	9.6 ± 0.3 ^a	782.1 ± 148.2 ^a
10月処理開始	10月17日	114.3	39.3	37.3	23.7	10.3	3.7	64.5 ± 24.2 ^a	27.8 ± 14.0 ^a	773.2 ± 132.7 ^a
10月米ぬか同時処理	10月17日	95.7	22.0	29.0	17.0	16.7	11.0	75.9 ± 29.0 ^a	40.6 ± 31.6 ^a	706.4 ± 29.8 ^a
無処理	—	128.0	46.7	31.7	23.0	17.7	9.0	63.8 ± 43.1 ^a	32.7 ± 28.9 ^a	805.6 ± 63.6 ^a

a) 太陽熱消毒処理の被覆資材：透明ポリマルチ(厚さ 0.05mm)，米ぬか施用量：300kg/10a.

b) 1 区 15 株,3 反復の平均.

c) 発病指数：発病なしを 0，発病面積が 3%以下を 1，4～13%を 2，14～25%を 3，26%以上を 4 とした.

d) 平均 ± 標準偏差.

e) 発病度 = Σ (発病面積別塊茎数×指数)/(調査塊茎数×4)×100.

f) 防除価 = (無処理区の発病度－処理区の発病度)/無処理区の発病度×100.

g) Tukey's HSD 検定 ($\alpha=0.05$)により，異なる文字は処理区間で有意あり. なお，発病塊茎率はアークサイン変換後に検定を行った.

2. 結果

太陽熱消毒期間中の深さ 10cm の地温は、8 月中旬から 9 月上旬までは 25～44℃ (平均 34.9℃) の範囲を、9 月中旬から 10 月上旬のはじめまでは 21～38℃ (平均 30.3℃) の範囲を、その後 10 月中旬からは 22～30℃ の範囲を推移した。また、40℃ 以上の地温となった日数では、8 月中旬から 9 月上旬までは 16 日、それ以降は全くなかった。

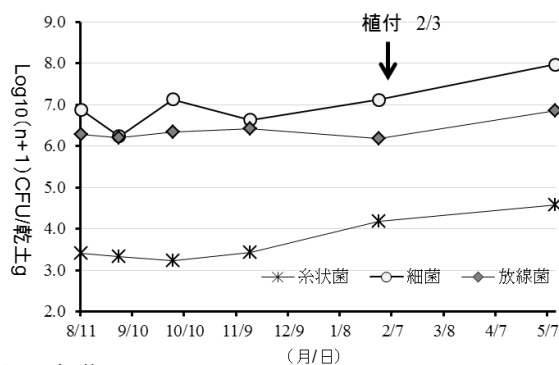
また、深さ 20cm の地温は 8 月中旬から 9 月上旬までは 24～37℃ (平均 30.3℃) の範囲を、9 月中旬から 10 月上旬のはじめまでは 21～37℃ (平均 30.3℃) の範囲を、その後 10 月中旬からは 28℃ 以下で推移した(第 12 図)。

試験期間中の土壌 pH は、全区とも 5.4～6.3 の範囲で推移し、土壌水分率は、13～25% の範囲で推移した(データ省略)。各区の発病程度を比較すると(第 19 表)、無処理区は発病塊茎率 63.8%、発病度 32.7 に対し、8 月処理区は 7.4%、2.3、9 月処理区は 46.1%、19.4、9 月米ぬか同時処理区は 31.1%、9.6、10 月処理区は 64.5%、27.8、10 月処理時米ぬか同時処理区は 75.9%、40.6 となり、無処理と比較し 8 月処理区は 92.9 と高い防除効果を示し、次いで 9 月米ぬか同時処理区が 70.6 と比較的高い防除効果を示し、9 月処理区が 40.6 と低い防除効果であった。10 月処理区では防除効果は非常に低く、10 月米ぬか同時処理区はやや発病度が増加した。しかし、区間の偏差が大きく、発病塊茎率、発病度では有意差が認められなかった。また、1 株あたりの塊茎重には区間での有意差は認められなかった。

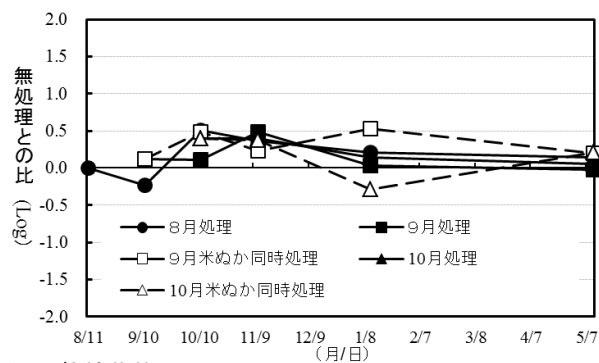
無処理の土壌中の微生物数をみると、糸状菌数の推移は植え付け前まで $10^3 \sim 10^4$ CFU/乾土 g の範囲で推移し、収穫時は約 4×10^4 CFU/乾土 g となった(第 13 図 A,B)。細菌数は、植付け前まで $10^6 \sim 10^7$ CFU/乾土 g の範囲で推移し、収穫時は 10^8 CFU/乾土 g となった(第 13 図 A,C)。放線菌は、植え付けまで $10^6 \sim 3 \times 10^6$ CFU/乾土 g の範囲で推移し、収穫時は 10^7 CFU/乾土 g となった(第 13 図 A,D)。

また、糸状菌数および細菌数は、いずれの処理区も試験期間を通して無処理の菌数

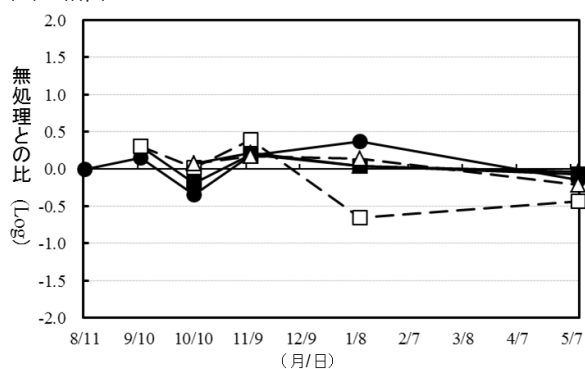
(A) 無処理



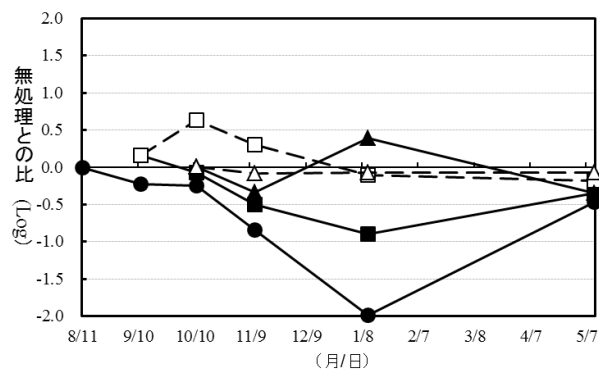
(B) 糸状菌



(C) 細菌



(D) 放線菌数



第 13 図 太陽熱消毒処理における無処理区の糸状菌数，細菌数および放線菌数と各区の微生物の無処理との比．

CFU:colony forming unit, A:無処理区での糸状菌数，細菌数および放線菌数，B:糸状菌の無処理との比較，C:細菌数の無処理区との比較，D:放線菌数の無処理区との比較．

と比較し 1/10～10 倍の範囲で、大きな違いは認められなかった(第 13 図 B,C). 一方、放線菌数は 8 月処理区では 11 月期に、無処理区の約 14%, 翌年 1 月期に 1%, また 9 月処理区では、1 月期に 13%に減少した(第 13 図 D).

3. 考察

本研究では効果的な太陽熱消毒処理時期を明らかにするため、処理時期を 8 月から順次おこなった。その結果、無処理は発病塊茎率 63.8%, 発病度 32.7 と高い発病であったが、8 月処理区では発病を低く抑え、十分な防除効果が得られた。9 月処理区については、4 割程度発病を抑制したが、効果は不十分であった。10 月処理区は無処理とほぼ同等で防除効果はなかった。また、太陽熱消毒処理を補強するために、米ぬか土壌施用後に太陽熱処理を行う区を設けたが、9 月米ぬか同時処理区では、そうか病の防除効果が安定し、高まる傾向があった。しかし、10 月同時処理区ではやや発病が高まった。

ジャガイモの栽培の作土層は比較的浅いことから、深さ 10cm での地温をみると、防除効果の高かった 8 月処理の平均地温が約 35℃であり、40℃以上の地温となった日数は 16 日であった。実際に、8 月処理では放線菌が減少しているのに対し、糸状菌、細菌には大きな変化は少なかったが、比較的高温性の微生物の増加など、微生物相の変化が起こっているものと考えられた。

同様に、9 月処理では深さ 10cm の平均地温は約 30℃であり、地温上昇によるそうか病菌の減少効果は少ないものの、米ぬかの施用により、僅かであるが糸状菌、細菌および放線菌など、太陽熱処理の温度帯に適応するそうか病菌以外の微生物が増加し、そうか病菌の抑制につながったものと考えられた。

今後はそうか病菌の密度との関連や米ぬか施用による拮抗微生物の特定などが必要であると考えられた。

D-3. 太陽熱土壌消毒の処理期間

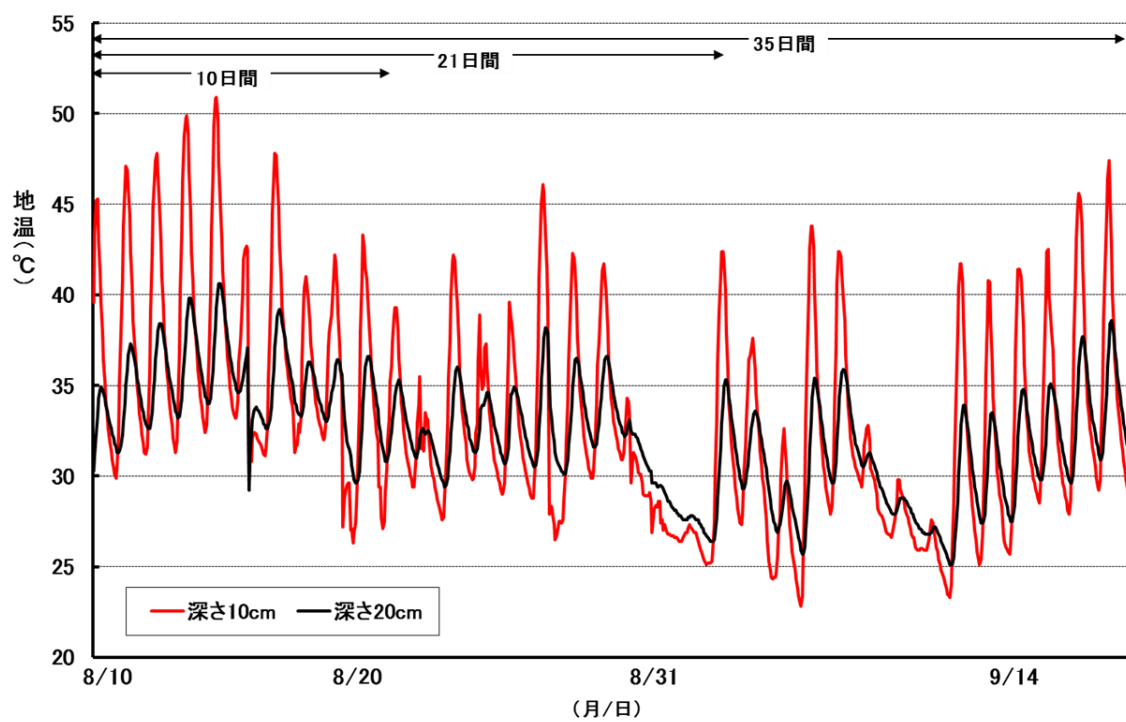
そうか病に対する太陽熱消毒処理の開始時期は8月までが高い防除効果が得られるが、この時期における太陽熱消毒の処理（被覆）期間を明確にする。

1. 材料および方法

試験は場内露地圃場（土壌：灰色低地土）で実施した。太陽熱土壌消毒処理に関して、2004年8月10日から、8月20日まで被覆した区（10日間処理区）、8月31日まで被覆した区（21日間処理区）、9月14日まで被覆した区（35日間処理区）および無処理区に加え、植え付けに各処理区に米ぬか 10a あたり 300kg を散布し、耕運機にて 15cm の深さに土壌混和した区（10日間処理後米ぬか施用区、21日間処理後米ぬか施用区、35日間処理後米ぬか施用区、無処理米ぬか施用区）の 8 処理区を設置した。太陽熱消毒処理区は 0.03mm ポリマルチで被覆した。すべての区は9月14日に耕耘、畝立て（1条植え、畝間 90cm、株間 20cm のマルチ栽培）を行った。

健全な種いも（ニシユタカ）をフルアジナム水和剤（50%）100 倍に約 20 秒間浸漬し、室内で風乾した。植え付けは 10 月 1 日、収穫は 2005 年 1 月 14 日に行った。試験は 1 区 20 株とし、3 反復実施した。新生塊茎の発病調査は、収穫日に処理区ごとに収穫し、各区 10 株の 30g 以上の新生塊茎を対象に発病面積ごとに分け、発病塊茎率と発病度（ $\sum(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$ ）を求めた。なお、発病指数は、発病なしを 0、発病面積が 3% 以下を 1、4～13% を 2、14～25% を 3、26% 以上を 4 とした。

2. 結果



第 14 図 太陽熱消毒処理の期間別の地温の推移。

矢印は太陽熱消毒処理期間を示す。被覆資材は透明のポリマルチ(厚さ 0.05mm)。

太陽熱処理期間中の地温を比較すると、深さ 10cm の平均地温は 10 日間処理区で約 37℃, 21 日処理区で約 34℃, 35 日処理区で約 34℃であった。また、50℃以上を示す日数が 10 日間処理区, 21 日処理区, 35 日処理区とも 1 日, 45℃以上では 10 日間処理区で 6 日, 21 日処理区で 7 日, 35 日処理区で 9 日, 40℃以上では 10 日間処理区で 10 日, 21 日処理区で 15 日, 35 日処理区で 23 日となった。

深さ 20cm の平均地温は 10 日間処理区で約 35℃, 21 日処理区で約 33℃, 35 日処理区で約 33℃であった。40℃以上を示す日数はいずれの処理区も 1 日であった(第 14 図)。

土壌水分率は、各区とも太陽熱消毒処理始時で約 18%, 植え付け1ヵ月後で 21~23%であった。また、土壌 pH は、全区とも 5.6 から 6.0 で推移し、発病には好適な条件であった(データ省略)。

発病状況は、無処理区は発病塊茎率 83.3%, 発病度 58.1 の甚発生となり、無処理米ぬか区では発病塊茎率 61.6%, 発病度 27.9(防除価 52.0)となった。これに対し、太陽熱 10 日間処理区は発病塊茎率 56.7%, 発病度 28.8(防除価 50.4), 10 日間処理後米ぬか区は発病塊茎率 21.1%, 発病度 8.9(防除価 84.8), 21 日間処理区は発病塊茎率 64.1%, 発病度 30.6(防除価 47.2), 21 日間処理後米ぬか区は発病塊茎率 22.3%, 発病度 8.2(防除価 85.9), 35 日間処理区は発病塊茎率 58.1%, 発病度 31.9(防除価 45.1), 35 日間処理後米ぬか区は発病塊茎率 39.9%, 発病度 18.1(防除価 68.8)となった。米ぬか無施用と施用には発病塊茎率で有意差が認められた。太陽熱処理の効果は処理期間に関わらず、いずれも防除価 45~50 強となり、太陽熱消毒の処理期間による有意差は認められなかった。

一方、米ぬか施用の効果はいずれの区でも防除価 50 以上となり、また、太陽熱処理 10 日間及び 21 日間との組み合わせでは防除価 85 前後の比較的高い防除効果が認められた(第 20 表)。

収量は、21 日間処理後米ぬか区, 35 日間処理後米ぬか区, 無処理米ぬか区, 10

第 20 表 太陽熱消毒処理期間と植え付け時米ぬか処理によるそうか病の防除効果.

処理区名	植え付け時米ぬか施用なし					植え付け時米ぬか施用あり ^{f)}				
	調査塊茎 数(個) ^{b)}	発病塊茎率 (%) ^{c)}	発病度 ^{d)}	防除価 ^{e)}	1株あたりの新生 塊茎重(g)	調査塊茎 数(個)	発病塊茎率 (%)	発病度	防除価	1株あたりの新生 塊茎重(g)
10日間処理 ^{a)}	62.0	56.7 ± 47.8	28.8 ± 32.4	50.4	833.5 ± 137.5	64.0	21.1 ± 20.1	8.9 ± 9.4	84.8	879.5 ± 143.0
21日間処理	68.0	64.1 ± 35.2	30.6 ± 28.5	47.2	862.1 ± 68.2	65.3	22.3 ± 17.2	8.2 ± 7.0	85.9	916.8 ± 103.8
35日間処理	58.7	58.1 ± 43.0	31.9 ± 32.0	45.1	776.6 ± 64.3	65.0	39.9 ± 33.2	18.1 ± 16.5	68.8	913.7 ± 83.3
無処理	57.3	83.3 ± 26.3	58.1 ± 37.7	0.0	636.9 ± 96.6	68.7	61.6 ± 25.5	27.9 ± 18.0	52.0	890.3 ± 72.5
t検定/米ぬか施用 ^{e)}	a	a	a	—	b	a	b	a	—	a

a) 太陽熱消毒開始の年月日:2004年8月10日,被覆資材:透明ポリマルチ(厚さ0.05mm).

b) 1区10株,3反復の平均.

c) 平均±標準偏差.

d) 発病度 = Σ (発病面積別塊茎数×指数)/(調査塊茎数×4)×100, 発病指数:発病なしを0, 発病面積が3%以下を1, 4~13%を2, 14~25%を3, 26%以上を4とした.

e) 防除価 = (無処理区の発病度－処理区の発病度)/無処理区の発病度×100.

f) 米ぬか施用量:300kg/10aに全面に散布後耕転畝立て.

g) 最小2乗平均差の Student の t 検定 ($\alpha=0.05$)により,異なる文字は処理区間で有意あり.なお,発病塊茎率はアークサイン変換後に検定を行った.

日間処理後米ぬか区, 21 日間処理区, 10 日間処理区, 35 日間処理区, 無処理区の順で多く, 米ぬか施用と無施用には有意差が認められ, 米ぬか施用による増収効果が認められた(第 20 表).

3. 考察

本研究は太陽熱消毒の効果の高い時期である 8 月での被覆期間を明確にするために実施したが, 35 日間処理でも防除価は約 45 となり, 効果は不十分であった.

これは, 無処理での発病が甚発生であったことから, そうか病菌の菌密度が高い圃場条件下での試験であったこと, また, 被覆資材が 0.03mm のポリマルチであり, 地温が 8 月中旬以降は台風の影響と気温の低下の影響を受け, 深さ 10cm で地温 45℃ 以上を示す日数が, 35 日間処理でも 9 日, 深さ 20cm では 1 日も確保できなかったことが影響したものと考えられた. 太陽熱処理の期間に関しては, 気温の上昇する 7 月中旬から実施すると, 被覆期間の影響が明らかにできたものと考えられる.

ただし, 8 月上旬に太陽熱消毒を開始すると, そうか病の甚発生圃場であっても, 10 日間以上の被覆処理で約 50 の防除効果が期待できるものと考えられた.

さらに, 米ぬかを施用した場合は, 無処理区でも防除価 50 以上となり, 35 日間処理区以外では太陽熱処理後に米ぬかを施用した区では防除価 85 前後の比較的高い防除効果が認められたことから, 8 月に 10 日以上被覆による太陽熱処理を行い, 畝立て時に米ぬかを施用すると, 比較的高い防除効果が得られるものと考えられた.

今後は, 米ぬか施用によるそうか病の抑制要因について明らかにする必要があるものと考えられる.

D-4. 太陽熱土壌消毒, 石灰窒素および米ぬかの組み合わせによる総合防除

1. 材料および方法

試験は農業試験場内露地圃場で実施した。太陽熱土壌消毒処理に関して、2005年8月2日から、8月22日まで被覆した区(太陽熱20日間処理区)、9月1日まで被覆した区(太陽熱30日間処理区)に加え、植え付け前に米ぬか300kg/10a相当量を施用した2処理区(太陽熱20日+米ぬか処理区あるいは太陽熱30日+米ぬか処理区)、さらに、太陽熱処理前(8月2日)に石灰窒素50kg/10a相当量を施用した2区(太陽熱20日+石灰+米ぬか処理区あるいは太陽熱30日+石灰+米ぬか処理区)、また、植え付け前に米ぬかのみを処理した区(米ぬか処理単用区)、そして、無処理区の8処理区を設置した。太陽熱消毒処理区は0.03mmポリマルチで被覆した。すべての区は9月1日に耕耘、畝立て(1条植え、畝間90cm、株間20cmのマルチ栽培)を行った。健全な種いも(ニシユタカ)をフルアジナム水和剤(50%)100倍に約20秒間浸漬し、室内で風乾した。植え付けは9月12日、収穫は2006年1月8日に行った。試験は1区15株とし、3反復実施した。新生塊茎の発病調査は、収穫日に処理区ごとに収穫し、各区5株の30g以上の新生塊茎を対象に発病面積ごとに分け、発病塊茎率と発病度($\sum(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$)を求めた。なお、発病指数は、発病なしを0、発病面積が3%以下を1、4~13%を2、14~25%を3、26%以上を4とした。

2. 結果

太陽熱消毒処理開始から20日間の地温の推移をみると、深さ10cmでの最高地温が45℃以上を示した日数は7日、40℃以上~45℃未満が10日で、晴天日はほとんど40℃以上となった。また、深さ10cmでの地温と全天日射量、平均気温、最高地温との関係には、ある程度の相関関係が認められた。すなわち、深さ10cmでの地温40℃以上確保するには、全天日射量では17.2MJ/m²以上、平均気温では28.4℃以上、最高気

第 21 表 試験期間中の天候、気温及び地温の関係(2005 年)。

月日	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12
天候	曇	晴	晴	晴	晴	曇	曇/晴	晴	晴	晴/曇	晴
全天日射量(MJ/m ²)	17.4	25.2	27.8	25.2	27.4	24	20	22.5	23.8	22.9	24.5
平均気温(℃)	29.2	29.8	30.4	30.2	29.5	29.3	29.8	29.8	30.4	30.1	30.2
最高気温(℃)	32.6	33.2	33.9	33.6	33.6	33.4	32.7	34.5	35.6	34.8	35.1
被覆最高地温(深さ10cm)	-	40.4	44.1	44.1	46.1	45.5	43.2	41.6	46.5	45.7	46.7
被覆最高地温(深さ20cm)	-	32.9	36.5	36.5	37.6	37.8	37.2	36.3	38.4	38.6	38.9
月日	8/13	8/14	8/15	8/16	8/17	8/18	8/19	8/20	8/21	8/22	8/23
天候	晴	曇	晴	曇	曇	晴	雨/曇	雨	雨/晴	曇	雨
全天日射量(MJ/m ²)	21.8	18.7	23.6	17	22.5	24.2	8.1	4.9	20.1	13.9	7.2
平均気温	30.5	30.3	30.2	29.9	29.6	29.3	25.9	25.1	27.5	27.7	26.9
最高気温	35.5	34.4	35.2	34.8	34.5	32.6	29.1	27.1	32.3	30.2	29.8
被覆最高地温(深さ10cm)	46.8	43.8	44.3	43.1	44.6	45.4	36.3	28.4	36.7	35.6	31.9
被覆最高地温(深さ20cm)	39.3	38	38.2	37.5	37.9	38.4	37.1	28.2	30.7	31.4	30.9

深さ 10cm の地温 (y) と各要因 (x) との回帰式 ; x を全日射量で計算 : y (深さ 10cm 地温) = $0.661X + 28.627$ ($R^2 = 0.6844$), x を平均気温 (X) で計算 : $y = 2.8157X - 39.983$ ($R^2 = 0.8109$), x を最高気温で計算 : $y = 2.1659X - 30.576$ ($R^2 = 0.7535$).

第 22 表 太陽熱処理，石灰窒素および米ぬかによるそうか病の防除効果．

処理区名 ^{a)}	調査塊茎数 (個) ^{b)}	指数別塊茎個数(個)				発病塊茎率(%) ^{d)}	発病度 ^{e)}	防除価 ^{f)}
		0	1	2	3	4 ^{e)}		
太陽熱20日間処理	40.3 ^{a, g)}	3.0	17.5	15.5	3.8	0.5	38.9 ± 12.7 ^b	47.8
太陽熱20日＋米ぬか処理	43.0 ^a	27.0	12.3	3.3	0.0	0.5	12.1 ± 4.8 ^c	83.8
太陽熱20日＋石灰窒素＋米ぬか処理	36.5 ^a	23.3	11.8	1.5	0.0	0.0	10.4 ± 5.5 ^c	86.0
太陽熱30日間処理	43.8 ^a	10.8	23.3	8.5	1.3	0.0	25.6 ± 10.5 ^{bc}	65.6
太陽熱30日＋米ぬか処理	41.8 ^a	26.3	12.8	2.8	0.0	0.0	11.2 ± 6.0 ^c	84.9
太陽熱30日＋石灰窒素＋米ぬか処理	47.0 ^a	36.3	9.8	1.0	0.0	0.0	6.0 ± 6.4 ^c	91.9
米ぬか処理単用	45.8 ^a	9.0	15.3	14.5	4.0	3.0	36.6 ± 6.8 ^b	50.9
無処理	45.3 ^a	0.5	3.8	9.3	14.5	17.3	74.4 ± 11.4 ^a	0.0

a) 太陽熱消毒開始の年月日：2005 年 8 月 2 日，被覆資材：透明ポリマルチ（厚さ 0.05mm），石灰窒素：太陽熱処理開始時に 50kg/10a，米ぬか：植付時に 300kg/10a．

b) 1 区 5 株，4 反復の平均．

c) 発病指数：発病なしを 0，発病面積が 3%以下を 1，4～13%を 2，14～25%を 3，26%以上を 4 とした．

d) 平均±標準偏差．

e) 発病度＝ $\sum(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$ ．

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

g) Tukey's HSD 検定 ($\alpha=0.05$) により，異なる文字は処理区間で有意あり．なお，発病塊茎率はアークサイン変換後に検定を行った．

温では 32.0℃ 以上, 地温 45℃ 以上を確保するには, 全天日射量では 24.8MJ/m²以上, 平均気温では 30.2℃ 以上, 最高気温では 34.6℃ 以上の値が目安となった(第 21 表).

各処理区の発病程度を比較すると(第 22 表), 無処理区は発病塊茎率 98.9%, 発病度 74.4 の甚発生下で, 米ぬか処理単用は発病塊茎率 79.5%, 発病度 36.6(防除価 50.9)となった.

太陽熱 20 日間処理区は発病塊茎率 92.7%, 発病度 38.9(防除価 47.8), 太陽熱 30 日間処理区は発病塊茎率 76.0%, 発病度 25.6(防除価 65.6)と太陽熱処理期間が長いほど, 防除効果は高くなる傾向が認められたが, 米ぬか処理単用と同程度の防除効果であり, 無処理区と有意差が認められた.

一方, 太陽熱 20 日処理区+米ぬか施用区は発病塊茎率 37.2%, 発病度 12.1(防除価 83.8), 太陽熱 30 日処理区+米ぬか施用区は発病塊茎率 38.2%, 発病度 11.2(防除価 84.9)となり, 太陽熱処理の期間に関係なく畝立時の米ぬか施用により防除価が高くなり, 大幅に防除効果が向上し, 太陽熱処理単用と有意差が認められた.

さらに, 被覆直前に石灰窒素(50kg/10a)の施用を行った場合は, 太陽熱 20 日処理+石灰窒素施用+米ぬか施用区は発病塊茎率 37.5%, 発病度 10.4(防除価 86.0), 太陽熱 30 日処理+石灰窒素施用+米ぬか施用区は発病塊茎率 22.0%, 発病度 6.0(防除価 91.9)となり, 石灰窒素の施用により僅かに防除効果が向上し, 太陽熱処理の期間が長いほどその効果は高かったが, 太陽熱と米ぬか併用処理との有意差は認められなかった.

また, 無発病塊茎率は, 太陽熱処理では僅かに, 米ぬか施用では大幅に無発病塊茎率が明らかに増加した. また, 石灰窒素処理は太陽熱処理期間と関係し, 太陽熱 30 日処理+石灰窒素+米ぬか区においては, 最も無発病の塊茎率が高くなった(第 22 表).

3. 考察

本研究は、従来の太陽熱処理＋米ぬか処理に加えて太陽熱処理の被覆前に石灰窒素を施用することで、石灰窒素処理による微生物相の改善と有機物残さの分解促進により、さらなる防除効果の改善を図ることを目的に実施した。本研究の試験圃場はそうか病が甚発生の圃場であったが、太陽熱 20 日間処理区＋米ぬか処理と併用で防除価 86、また、太陽熱 30 日間処理区＋米ぬか処理と併用で防除価 92 といずれも高い防除効果を示した。また、その防除効果は太陽熱処理期間が長いほど高くなる傾向が認められ、30 日間処理では、石灰窒素無処理に比較し、発病度が半分程度に抑制された。

以上のことから、石灰窒素を太陽熱処理前に処理することで、従来の太陽熱処理＋米ぬか施用と同等以上の高い防除効果が得られるものと考えられた。

E. そうか病抵抗性品種と肥料の組み合わせによる防除効果

そうか病の総合的防除体系を構築する上で、環境負荷の少ないそうか病抵抗性品種の利用は重要である。そうか病抵抗性品種については、近年、西南暖地に適性のある「春あかり」や「さんじゅう丸」が育成され、産地への普及が期待されている。

また、土壌環境制御の一つとして、土壌を酸性に調整する肥料や土壌改良資材の施用によるそうか病の防除法の開発が試みられている。

そこで、本研究ではそうか病抵抗性品種「春あかり」を供試し、土壌 pH 調整を目的として、肥料である硫酸アンモニウムとの併用効果について検討した。

1. 材料および方法

農業試験場内露地圃場(土壌:灰色低地土)において試験は実施した。施肥の窒素成分は、硫酸アンモニウム(窒素成分 21%)、または、硝酸アンモニウム(窒素成分 32%)を用いて 10a あたりの 14 kg 相当量に、その他の成分については、苦土入り PK40 号

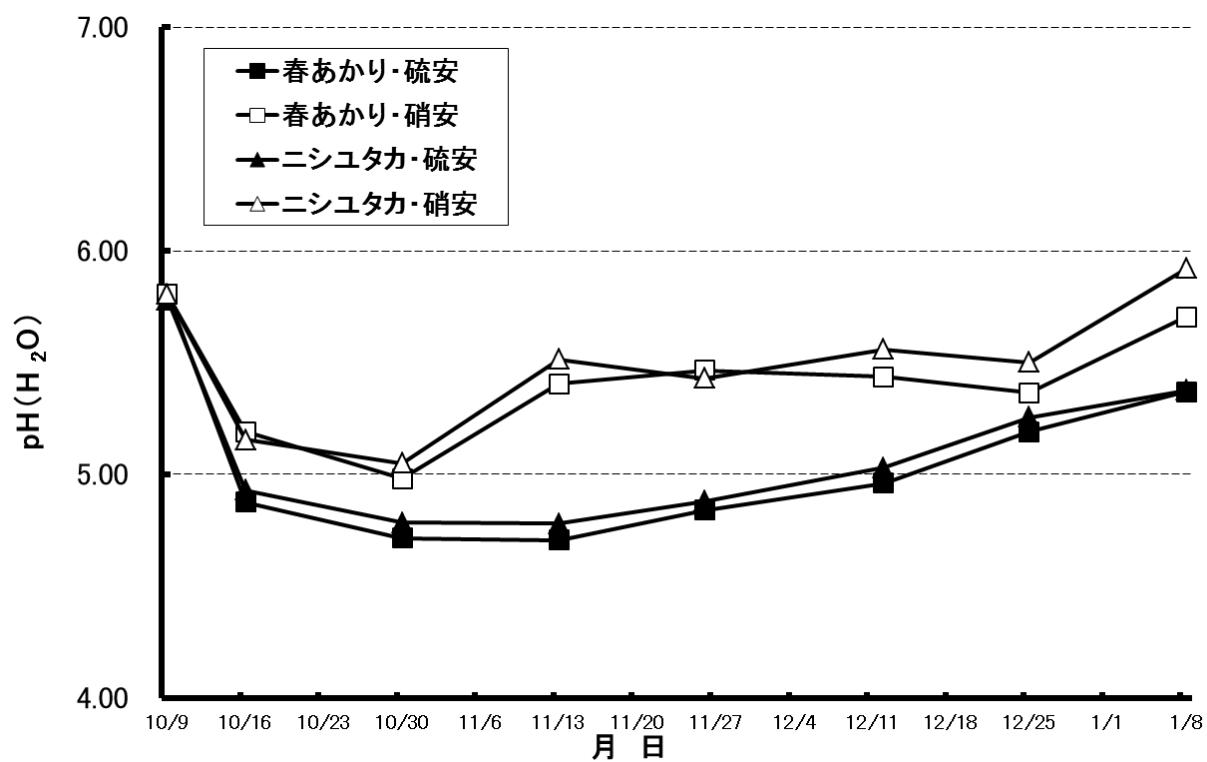
(N:P:K=0-20-20)を使用し、10a あたり 14 kg 相当量に調整し、各区に施用した。また、品種「春あかり」と「ニシユタカ」の健全塊茎を、フルアジナム水和剤(50%)100倍に約20秒間浸漬し、室内で風乾したものを種いもとした。

処理区は硫酸アンモニウム施用区と硝酸アンモニウム施用区に、それぞれ上記の2品種を植え付けた4処理区(「春あかり」・硫安区,「春あかり」・硝安区,「ニシユタカ」・硫安区および「ニシユタカ」・硝安区)を設けた。すべての区は2003年10月9日に耕耘,畝立て,植え付けを行った(1条植え,畝間90cm,株間20cmのマルチ栽培)。試験は1区21株とし,3反復実施した。施肥直前,施肥7日後から約2週間ごとに各区の土壌100gを採取し,処理区ごとに十分に混和したものから,土壌水分とpHを測定した。pHは土20gに蒸留水50mlを加え,1時間振とうした後,測定した。

収穫は2004年1月8日に行った。新生塊茎の発病調査は,収穫日に処理区ごとに収穫し,各区15株の30g以上の新生塊茎を対象に発病面積ごとに分け,発病塊茎率と発病度($\sum(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$)を求めた。なお,発病指数は,発病なしを0,発病面積が3%以下を1,4~13%を2,14~25%を3,26%以上を4とした。

2. 結果

試験期間中の土壌pHを比較すると,品種に関係なく硝酸アンモニウムを施用した区では,施用前のpH5.8から施用7日後にpH5.2に,処理約20日後にはpH5.0程度と最も低くなったが,その後は徐々に上昇し,収穫時にはpH5.5となった。一方,硫酸アンモニウムを施用した区では施肥7日後にはpH4.9程度まで低下し,約20日後にpH4.7と最も低くなったが,その後は徐々にpHが上昇したが,硝酸アンモニウム施用区と比較し,低く推移した。特に,両施用区のpHの差は,施用約30~40日後で0.7と最大となった(第15図)。また,土壌水分率は,11~25%の間を推移した(データ省略)。



第 15 図 ジャガイモ栽培期間中の土壌 pH の推移.

硫安:硫酸アンモウム, 硝安:硝酸アンモニウム. 植付日:2003 年 10 月 9

日, 収穫日:2004 年 1 月 8 日.

第 23 表 そうか病抵抗性品種「春あかり」と硫酸アンモニウムの組み合わせによりそうか病の防除効果．

窒素肥料名	春あかり				ニシユタカ			
	調査塊茎 数(個) ^{b)}	発病塊茎 率(%)	発病度 ^{c)}	防除価 ^{d)}	調査塊茎 数(個)	発病塊茎 率(%)	発病度	防除価
硫酸アンモニウム ^{a)}	93.7	1.3	0.3	97.7	78.3	26.5	7.9	44.8
硝酸アンモニウム	94.3	1.0	0.3	98.2	84.0	40.6	14.4	0.0
品種平均 ^{f)}	81.2	^a 1.3	^b 0.3	^a	94.6	^b 26.5	^a 11.2	^a

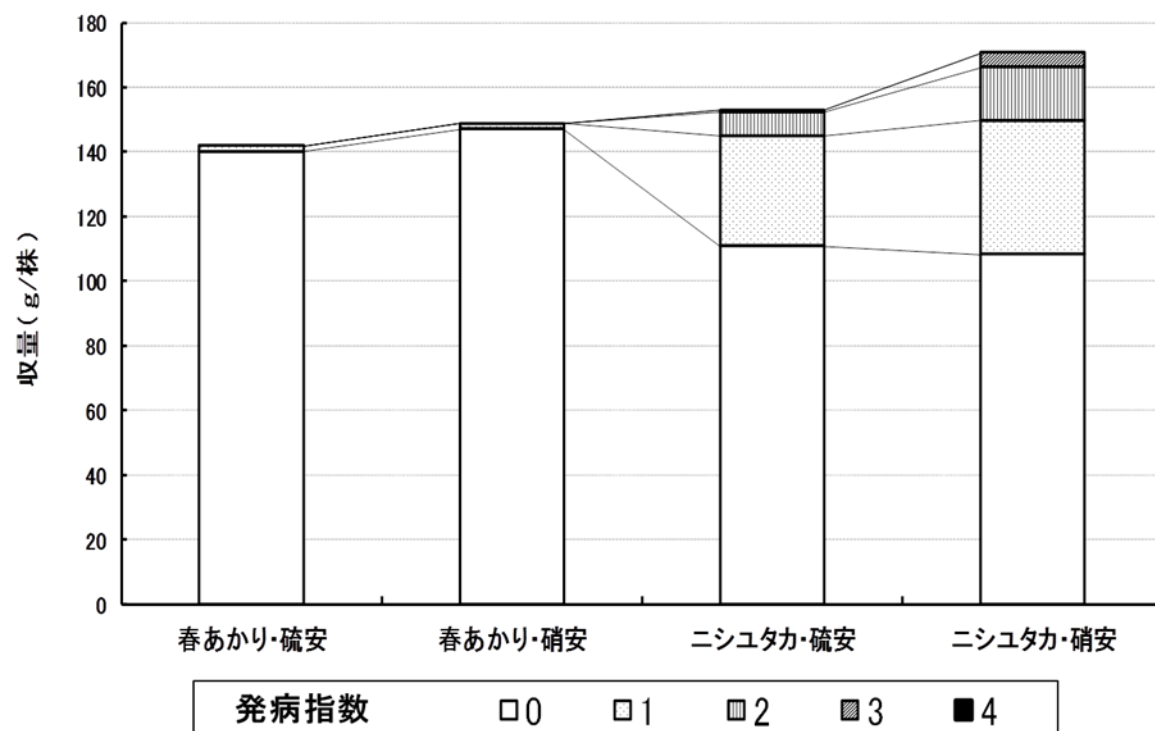
a) 10a あたり窒素成分として 14kg 相当量を散布した．

b) 1 区 15 株,3 反復の平均．

c) 発病度 = $\Sigma(\text{発病面積別塊茎数} \times \text{指数}) / (\text{調査塊茎数} \times 4) \times 100$, 発病指数: 発病なしを 0, 発病面積が 3%以下を 1, 4
～13%を 2, 14～25%を 3, 26%以上を 4 とした．

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

e) 最小 2 乗平均差の Student の t 検定 ($\alpha=0.05$) により, 異なる文字は処理区間で有意あり．なお, 発病塊
茎率はアークサイン変換後に検定を行った．



第 16 図 各処理区におけるそうか病の発病程度別の塊茎重.

発病指数: 発病なしを 0, 発病面積が 3% 以下を 1, 4~13% を 2, 14~25% を 3, 26% 以上を 4 とした.

各区の発病程度は、「春あかり」・硫安区は発病塊茎率 1.3%, 発病度 0.3, 「春あかり」・硝安区は 1.0%, 0.3 であった。一方, 「ニシユタカ」・硫安区は 26.5%, 7.9, 「ニシユタカ」・硝安区は 40.6%, 14.4 であった。「春あかり」は, 肥料の種類に関係なくそうか病を低く抑え, 「ニシユタカ」はやや硫安施用区で発病が低くなる傾向があった。「春あかり」と「ニシユタカ」では発病塊茎率で有意な差が認められた(第 23 表)。

各区の収量を比較すると, 「ニシユタカ」・硝安区が最も多く, 次いで, 「ニシユタカ」・硫安区, 「春あかり」・硝安区, そして, 「春あかり」・硫安区の順で少なくなったが, 各処理区に有意差は認められなかった。

しかし, 無発病塊茎の収量について比較すると, 「春あかり」・硝安区が最も多く, 次いで, 「春あかり」・硫安区, 「ニシユタカ」・硫安区, そして, 「ニシユタカ」・硝安区となり, 品種の平均で比較すると「春あかり」は「ニシユタカ」の約 1.3 倍の収量となった(第 16 図)。

3. 考察

ジャガイモそうか病の防除対策として, 土壌 pH の酸度矯正による防除法が各種実施されているが, その一つの方法として, 硫酸アンモニウムによる畝溝に施肥する施肥法が報告されている(水野, 2001)。今回は, 全面施用であったが, 硫酸アンモニウム区では, 施肥後(20~40 日後)には植え付け時の pH から 1 程度の低下が認められ, 「ニシユタカ」で約 45%の発病の低減が認められた。

一方, 「春あかり」では肥料の種類に関係なく発病が低く, 「ニシユタカ」の発病度が 35 程度までの発病条件であれば, 「春あかり」を植え付けることで, そうか病の発病を十分に抑制することが可能と考えられた。特に, そうか病の発生圃場では, 「ニシユタカ」よりも無病徴の塊茎の収量が多いことから, 今後のそうか病発病圃場での対策には, 重要な手段となるものと考えられる。今後は, 局所施用との組み合わせた防除法についても検討する必要がある。

V. 総合考察

本研究の第一の目的である鹿児島県および長崎県の主要産地におけるそうか病菌種の分布については、鹿児島県では *S. turgidiscabies* が約 5 割で、次いで *S. scabiei* が約 4 割であったのに対し、長崎県では *S. scabiei* が約 8 割と多数を占め、そうか病菌の菌種の構成が大きく異なることを明らかにした。また、強酸性土壌で問題となる *S. acidiscabies* については、両県とも発生は 1 割未満であり、生息地域が限定的であることを明らかにした。今後も種いも伝染による耐酸性そうか病菌の拡大を防止することが重要であり、植物防疫法に基づいた種いもの生産体制を遵守し、健全いもの使用とそうか病菌の侵入予防としての種いも消毒を徹底することの必要性をあらためて示した。

S. scabiei は、ITS の遺伝子型で 3 種類 (T, JK, B) に類別されたが、*S. scabiei* のメラニン非産生株はすべてその内の T タイプに属することは興味深い。さらに、*S. scabiei* 内での ITS 遺伝子型の構成比は両県で違いが認められたこと、また、*S. acidiscabies* についても、鹿児島県分離菌株は 3 つの PAI 関連遺伝子 (*txtAB*, *nec1*, *tomA*) を保持していたのに対し、長崎県分離菌株および佐賀県分離菌株は *txtAB* のみであったことから、鹿児島県と長崎県および佐賀県では、そうか病菌の来歴に違いがあることが示された。

特に、*S. scabiei* は種内で幅広い遺伝的多様性を示すことから (Healy *et al.*, 1999), 菌株の遺伝子調査を産地、品種、あるいは分離年等と関連付けることで、そうか病菌の侵入・拡大の時期や要因などを推定できるものと考ええる。

第二の目的であるそうか病菌種の定量法については、そうか病の主要な菌種である *S. scabiei* および *S. turgidiscabies* の 16S-23S rRNA ITS 領域を基に、それぞれに特異的なリアルタイム PCR (YBER Green) 用プライマーを設計した。本法により両菌種が混在した場合でも菌種ごとの定量が可能となった。また、本研究で開発した定量 PCR 法 (SYBER Green) は他の定量 PCR 法と比較し、コストが安く、最低限の機能を備えた機器で行えることは魅力である。

なお、リアルタイムPCRを利用した定量法は、インターカラー法と蛍光標識プローブ法に大別される。前者の主流であるSYBER Greenアッセイの場合には、標的配列に類似した未知の配列が土壌中にどの程度存在しているか予想がつかないため、融解曲線分析によってPCRの特異性が十分に担保できない恐れが指摘されている(澤田ら, 2008)。本研究で開発したプライマーセットはそうか病菌のITS領域を標的としていることから、病原菌と非病原菌の識別や菌株によるITSのコピー数の違いなど定量に関する課題が存在する。そこで、本研究ではサクストミン合成遺伝子を標的とした定量を同時に実施することで上記の課題の補完を行った結果、両菌種のITS定量値と*txtAB*定量値がほぼ同等の値となり、そうか病原菌を反映していると考えられた。

定量時に重要となる土壌サンプルからのDNA抽出には、Sato *et al.* (2007)の方法を基本に、リゾチーム溶液で前処理を加え、各工程の試薬のpHや量などを改良した結果、DNA純度は黒ボク土で1.2(A260/A280の吸光度比)から1.5で収量は1.1倍に、赤黄色土ではDNA純度は1.4から1.7で、収量は1.4倍になり、市販の土壌抽出キットと比較して同等以上のDNA純度となり、本土壌抽出法と本研究で開発したリアルタイムPCR法を組み合わせることで土壌中のそうか病菌の定量が可能となった。ただし、抽出効率に起因する過小評価の可能性のある定量値をいかに補正するかは今後の課題である。したがって、現段階では、本法は、土壌中における被検菌の増減を相対的に定量し、評価するための手法として利用すべきであると考えられる。

本研究では、そうか病菌の動態の一つ目のモデルとして、条件を揃えやすい無底ポットを利用したジャガイモ栽培によるそうか病の試験法(坂本ら, 2011)を利用し、異なる土壌pH条件での*S. scabiei* および*S. turgidiscabies*の土壌および植物体での菌の増減について調査した。

その結果、*S. turgidiscabies*は*S. scabiei*よりも低いpH4.7以上で土壌中の菌量が高くなった。また、両菌の存在下では、pHが4.4~5.2の範囲において、いずれのpHでも*S. turgidiscabies*が*S. scabiei*より増殖しやすく、土壌、根および塊茎の病斑中で*S.*

turgidiscabies が *S. scabiei* に常に優先することを示した。この結果は、国内においても、*S. turgidiscabies* が、罹病した種いも等の移動により、未発生地に侵入した場合は、*S. scabiei* よりも優勢して定着する可能性を示唆している。

二つ目のモデルとして、そうか病の防除で基本となる薬剤による種いも消毒について処理後の各時期および各部位でのそうか病菌量を調査した。

本研究では最初に種いものそうか病菌の菌量と新生いもでの発病度の関係について調査したが、今回の研究では相関関係が認められなかった。これは、種いもからの試料採取の面積が少なかったことに起因していると考えられた。ただし、病斑が 1 個（直径 1cm 程度）存在する種いもを使用することで、新生いもの発病度を揃えられることが判明した。

そこで、病斑 1 個の種いもを供試し、種いも消毒試験を実施し、防除効果とそうか病菌の動態を調査した。その結果、新生いもでの発病度の高かった無処理およびストレプトマイシン剤処理は、種いも周辺や地下部において速やかにそうか病菌が増殖したのに対し、防除効果の高かったフルアジナム剤は植え付けから植え付け 56 日後まで病原菌の増殖が抑制された。特に、そうか病菌の塊茎への感染時期は塊茎肥大初期であり（孫工弥・喜多，1977）、この時期の病原菌量は防除効果を左右するものと考えられた。

すなわち、種いも表面での薬剤の残効性は薬剤の防除効果を評価するうえで重要となるものと考えられた。

これらの二つのモデルの試験結果から、無底ポットを利用したジャガイモ栽培によるそうか病の試験法と本研究で開発したリアルタイムによる *S. turgidiscabies* と *S. scabiei* の定量技術は、対象となるそうか病菌種の増減を効率的に把握できる方法であり、種いも消毒試験や防除効果試験など、同一試験系における各そうか病菌種量を相対的に評価する場合に有効な方法であると考ええる。

ただし、上記 2 つの試験はジャガイモ未栽培圃場を使用し、土壌消毒を実施した土壌にそうか病菌を導入しているため、微生物等のバックグラウンドは非常に低い条件での圃

場試験であったものと考えられたことから、今後は本プライマーに反応する標的配列に類似した未知の配列の存在比率を明確にするために、無接種の土壌や根など植物体を対照区として設定することで、さらに本定量法の精度を向上できるものと考えられた。

第三の目的である環境負荷の大きいクロルピクリンの代替技術として、メチルイソシアネート・D-D油剤と物理的防除法である太陽熱消毒の使用条件について検討し、使用条件と効果を明らかにした。

これまで、そうか病防除においては個々の防除技術だけでは限界があり、複数の防除手段を講じることが防除効果の向上に重要であることから、本試験では透明マルチ等の被覆による太陽熱消毒と米ぬか施用との組み合わせによる防除試験を行った。その結果、太陽熱処理後の畝立時に米ぬかを施用した区は、クロルピクリンくん蒸剤処理とほぼ同等の高い防除効果を示した。

そこで、防除効果を左右する太陽熱消毒処理の処理時期および期間を検討した結果、夏季の7月から8月中旬までに10～20日間程度被覆し、定植前に米ぬかを施用することで比較的高い防除効果が得られることが判明した。地温については深さ10cmの最高地温が45℃以上に達する期間を数日確保すると、防除価50程度の効果が得られることが判明した。これは、そうか病菌密度の高い生息場所が地表10cmまでであること(孫工弥ら, 1975)および後述するそうか病菌の死滅条件(50℃で24時間以上, 45℃で48時間以上の処理)と概ね一致した。

また、太陽熱処理時に石灰窒素を施肥すると防除効果が高まり、太陽熱処理の期間が長い(30日間)ほど高い防除効果を示した。さらに、畝立て時に米ぬかを施用すると防除価90程度の防除効果が得られた。この原因として、残さの分解および熱による病原菌密度の減少、加えて米ぬか散布によるジャガイモの根、塊茎およびその周辺土壌での拮抗する微生物相の増加などが大きく影響しているものと考えられる。

今後は、米ぬか処理によるそうか病抑制効果について解明することが必要である。

鹿児島県のジャガイモ栽培品種は「ニシユタカ」をはじめとしてほとんどの品種がそうか病に感受性である。そのため、今後はそうか病の防除対策を持続的かつ効果的に展開していくには、品種の選択が重要となる。

そこで、鹿児島県において、適合性の高いそうか病抵抗性の品種「春あかり」と土壌 pH を低下させる硫酸アンモニウムを組み合わせる試験を行った結果、「ニシユタカ」の発病度が 35 程度までの発病条件であれば、「春あかり」を植え付けることで、そうか病の発病を十分に抑制することが可能と考えられた。今後は近年育成されたそうか病抵抗性のある西南暖地向け品種「さんじゅう丸」を利用し、米ぬかとの併用の効果について検討していく必要がある。

第四に、ジャガイモそうか病に対する種いもの温湯消毒による防除効果について検討した結果、菌種により死滅温度条件に差が認められるが、そうか病菌の死滅には、50℃で24時間以上、45℃で48時間以上の処理が必要であることが判明した。

実際にそうか病に感染した種いもの使用し、温湯処理を行った結果、48℃の 60 分間処理では、萌芽・出芽遅延および大幅な収量の減少が認められた。また、48℃の 30 分間または 60 分間のいずれの処理においても、無処理よりも発病度が高くなったことから、種いもの温湯消毒によるそうか病の防除効果は低いと考えられた。この原因として、塊茎上のそうか病菌と競合する細菌数が温湯処理により大幅に減少することが一因と考えられたが、種いもの 48℃の 30 分間温湯処理後にバチルス剤 100 倍浸漬処理を併用した場合、対照薬剤のフルアジナム剤と比較し防除効果は劣るが、無処理と比較すると防除効果が認められた。そうか病の防除効果に影響する塊茎の微生物相については今後の解明が待たれる。

以上のように、本研究では、鹿児島県のそうか病菌の原因菌を特定でき、長崎県との違いについても明らかにできた。さらに、そうか病菌の定量も概ね可能となった。

今後は、そうか病菌の定量に基づき、そうか病の防除技術を評価することが可能となり、より効果的で安定的な防除法の開発やそうか病菌の菌種と密度を定量することで、総合的な防除体系の構築に数値的な根拠を付加できるもの考えられる。

防除については、pH 制御や既存の化学的防除法に替わる、環境負荷の少ない太陽熱消毒や米ぬか利用などを組み合わせた総合的な防除体系を提案できたものとする。

また、本研究の成果は、同じ環境下にある九州、四国、中国などの他県のジャガイモ栽培地にも寄与するものとする。

VI. 引用文献

- 相馬潤・田中文夫・田村修（2002）. *Streptomyces turgidiscabies* によるジャガイモそうか病に対するストレプトマイシン系薬剤と銅剤の混用による種間消毒の効果. 北海道立農試集報 82: 121-124.
- Bouček-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P. and Jouan, B. (2000). DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: Description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 91-99.
- Bukhalid, R. A., Chung, S. Y. and Loria, R. (1998). *nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 960-967.
- Bukhalid, R. A., Takeuchi, T., Labeda, D. and Loria, R. (2002). Horizontal transfer of the plant virulence gene, *nec1*, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the Diastatochromogenes cluster. Appl. Environ. Microbiol. 68: 738-744.
- Conn, K. L., Leci, E., Kritzman, G. and Lazarovits, G. (1998). A quantitative method for determining soil populations of *Streptomyces* and differentiating potential potato scab-inducing strains. Plant Dis. 82: 631-638.
- Cullen, D. W. and Lees, A. K. (2007). Detection of the *nec1* virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. J. Appl. Microbiol. 102: 1082-94.
- Gillespie, L. J. (1918). The growth of the potato scab organism at various hydrogen ion concentrations as related to the comparative freedom of acid soils from the

- potato scab. *Phytopathology* 8: 257-269.
- Goto, K. (1985). Relationships between soil pH, available calcium and prevalence of potato scab. *Soil Sci. Plant Nutr.* 31: 411-418.
- 後藤孝雄・広谷 弘 (1991). ジャガイモそうか病に対する有機物資材施用の発生抑制効果(講要). 九病虫研会報. 37:217.
- Goyer, C., Faucher, E. and Beaulieu, C. (1996). *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Quebec, Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:635-639.
- 早川正幸・野々村英夫 (1993). 土壌放線菌の選択分離法(日本放線菌学会). pp16-38, 学会出版センター, 東京.
- 早田隆典・矢野文夫 (1984). ばれいしょ畑土壌の微生物相に及ぼす有機物施用および陽熱処理の影響. 長崎総農林試研報 12: 59-70.
- Healy, F. G., Wach, M., Krasnoff, S. B., Gibson, D. M. and Loria, R. (2000). The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 38:794-804.
- Hiltunen, L. H., Ojanpera, T., Kortemaa, H., Richter, E., Lehtonen, M. J. and Valkonen, J. P. T. (2009). Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strains co-occurring in potato scab lesions. *J. Appl. Microbiol.* 106: 199-212.
- 和泉勝一・野島秀伸 (1997). 奄美地域におけるジャガイモそうか病の発生実態 (講要). 九病虫研会報 43:130.
- Joshi, M., Rong, X., Moll, S., Kers, J., Franco, C. and Loria, R. (2007). *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *Mol. Plant-Microbe Interact* 20: 599-608.
- 片山克己・木村貞夫 (1987). ジャガイモ青枯病の発生生態と防除に関する研究 第 2

- 報 各種防除法およびその体系化. 長崎県農林試研報 15:29-57.
- Kers, J., Cameron, K., Joshi, M., Bukhalid, R., Morello, J., Wach, M., Gibson, D. and Loria, R. (2005). A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.* 55: 1025-1033.
- 木村貞夫 (1981). 放線菌病研究の現状と今後の課題.植物防疫 35: 115-118.
- 小山修(2009). 土壌診断と拮抗微生物によるジャガイモそうか病防除技術. 土と微生物 63, 84-88.
- Kreuze, J. F., Suomalainen, S., Paulin, L. and Valkonen, J. P. T. (1999). Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *nec1* gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. *Phytopathology* 89:462-469.
- Lacey, M. J. and Wilson, C. R. (2001). Relationship of common scab incidence of potatoes grown in Tasmanian ferrosol soils with pH, exchangeable cations and other chemical properties of those soils. *J. Phytopathol.* 149: 679-683.
- Lambert, D. H. and Loria, R. (1989a). *Streptomyces scabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 387-392.
- Lambert, D. H. and Loria, R. (1989b). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:393-396.
- Lambert, D. H. and Manzer, F. E. (1991). Relationship of calcium to potato scab. *Phytopathology.* 81: 632-636.
- Lawrence, C. H., Clark, M. C. and King, R. R. (1990). Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* 80:606-608.
- Lazarovits, G., Hill, J., Patterson, G., Conn, K. L. and Crump, N. S. (2007). Edaphic Soil Levels of Mineral Nutrients, pH, Organic Matter, and Cationic Exchange

- Capacity in the Geocaulosphere Associated with Potato Common Scab.
Phytopathology. 97: 1071-82.
- Lehtonen, M. J., Rantala, H., Kreuze, J. F., Bang, H., Kuisma, L., Koski, P.,
Virtanen, E., Vihlman, K. and Valkonen, J. P. T. (2004). Occurrence and survival
of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: Quick
diagnosis based on a PCR-based assay. Plant Pathol. 53: 280-287.
- Loria, R. and Davis, J.R.(1989). *Streptomyces scabies*. In: Shaad, N.W. (Ed.),
Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd ed. APS
Press, St. Paul, pp.114-119.
- Loria, R., Bignell, D.R., Moll, S., Huguet-Tapia, J.C., Joshi, M.V., Johnson, E.G.,
Seipke, R.F. and Gibson, D.M. (2008). Thaxtomin biosynthesis: the path to plant
pathogenicity in the genus *Streptomyces*. Antonie van Leeuwenhoe 94: 3-10.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Creath, R. A., Leiner, R. H., Olivier, M. and Steffens,
J. C. (1995). Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces*
species in vitro. Phytopathology 85:537-541.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A. and King, R. R. (1997). Plantpathogenicity in
the genus *Streptomyces*. Plant Dis. 81:836-846.
- Loria,R., Bignell,D. R. D. , Moll,S., Huguet-Tapia,J. C.,Joshi ,M. V. , Johnson,E.
G. , Seipke,R. F.and Gibson,D. M. (2008). Thaxtomin biosynthesis: the path to
plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. Antonie van Leeuwenhoek 94:3-10
- Manome, A., Kageyama, A., Kurata, S., Yokomaku, T., Koyama, O., Kanagawa, T.,
Tamaki, H., Tagawa, M. and Kamagata, Y. (2008). Quantification of potato
common scab pathogens in soil by quantitative competitive PCR with fluorescent
quenching-based probes. Plant Pathol. 57: 887–896.
- 松本和夫 (1979). ジャガイモそうか病菌の胞子形成培地と菌の長期保存法.植

物防疫 33:461-463.

Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T. and Kuninaga, S. (1998). *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 495-502.

森清文 (2012). 西南暖地における青果用ばれいしょ栽培土壌の実態から観た
問題点と今後の対策. グリーンレポート 54:12-13.

森清文・西八束・露重美義・上妻道紀 (2003). 鹿児島県におけるバレイショ
のそうか病抵抗性品種の適応性. 九州農業研究 65: 42.

向島信洋・森一幸・坂本悠・田宮誠司・草原典夫・石橋祐二・中尾敬 (2012). バレイ
ショ新品種「さんじゅう丸」. 長崎農林技セ研報 3:27-51.

Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular
weight plant DNA. Nucleic Acids Res.8: 4321-4325.

長崎県農林技術開発センター 2008 年度普及技術情報. 強酸性下バレイショ圃
場における被覆硝酸カルシウムを用いた施肥改善.

(<http://www.n-nourin.jp/nougi/theme/result/H20seika-jouhou/shidou/S-20-24.pdf>, 2013 年 11 月 アクセス).

仲川晃生・伊豆進・菅康弘・迎田幸博 (2004). トリコデルマ菌属を用いたジャガイモそう
か病の生物的防除. 馬鈴しょそうか病に関する国際シンポジウム要旨集. 325-326.

仲川晃生・菅康弘・迎田幸博 (2001a). カーバムナトリウム塩液剤のジャガイモそうか病
防除効果. 関東東山病害虫研究会報 48:13-17.

仲川晃生・菅康弘・迎田幸博 (2001b). 九州沖縄農業研究成果情報 2000:
176-177.

中尾敬・向島信洋・森一幸・石橋祐二・茶谷正孝・森元幸 (2003). バレイショ新品種
「春あかり」. 長崎総農林試研報 29:1-32.

日本土壤肥料科学会土壌標準分析測定法委員会編. (2003). 土壌標準分析・測定
法. 日博友社. 東京 pp.1-354.

- 日本放線菌学会編 (2001). 放線菌の分類と同定. 日本学会事務センター. 東京
pp.3-148.
- 西八束・尾松直志 (2006) .銀担持ゼオライト剤の種いも消毒によるジャガイモそうか病の防除効果. 九病虫研会報 52: 24-27.
- 西八束・野島秀伸・牟田辰朗 (2003). ジャガイモそうか病の防除～生物的・物理的手法を利用した試み～ (講要). 土と微生物 57: 145.
- 尾松直志・鳥越博明・外菌幸夫 (2000) . ジャガイモそうか病防除有機資材投入後の土壌微生物相の変化 (講要). 九病虫研会報. 46: 145.
- 大城篤・照屋寛由・河野伸二・澤岨哲也・亀川藍・仲里富雄・仲村伸次 (2009) . 各種植物根から分離した *Trichoderma* 属菌の土壌病害に対する効果. 沖縄県農業研究センター研究報告 3: 17-20.
- 大和田琢二・杉本尚美・佐伯雄史・松元信也・増田宏志 (2003) . *Bacillus subtilis* による馬鈴薯そうか病の生物防除. 土と微生物 57. 146.
- Park, D. H., Kim, J. S., Kwon, S. W., Wilson, C., Yu, Y. M., Hur, J. H. and Lim, C. K. (2003a). *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:2049-2054.
- Park, D. H., Yu, Y. M., Kim, J. S., Cho, J. M., Hur, J. H. and Lim, C. K. (2003b). Characterization of streptomycetes causing potato common scab in Korea. Plant Dis. 87:1290-1296.
- Pavlista, A. D. (1996) . How important is common scab in seed potatoes? Am. Potato J. 73:275-278.
- Pridham T. G. and Gottlieb D (1948). The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. J Bacteriol 56:107-114
- Qu, X. S., Wanner, L. A. and Christ, B. J. (2011). Multiplex real-time PCR (Taq

- Man) assay for the simultaneous detection and discrimination of potato powdery and common scab diseases and pathogens J. Appl. Microbiol. 110: 769–777.
- Qu, X. S., Wanner, L. A. and Christ, B.J. (2008) . Using the *txtAB* operon to quantify pathogenic *Streptomyces* in potato tubers and soil. Phytopathology 98: 405–412.
- Qu, X., Wanner, L. A. and Christ, B. J. (2008). Using the *txtAB* operon to quantify pathogenic *Streptomyces* in potato tubers and soil. Phytopathology 98:405-412.
- 坂口 荘一・豊村順・松原徳行 (1982). 夏季, ほ場のビニール被覆によるジャガイモそうか病ならびに青枯病発生防止効果. 九病虫研会報 28:34-36.
- 坂本悠・平田憲二・森一幸・向島信洋・小川哲治・大井義弘・田宮誠司・草原典夫・中尾敬 (2011). 無底ポットを用いたジャガイモそうか病抵抗性検定法. 九病虫研会報 57:14–18.
- Sato, E., Min, Y. Y., Shirakashi, T., Wada, S. and Toyota, K. (2007). Quantitative detection of the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*, from a nematode community using real-time PCR. Jap. J. Nemat. 37: 87-92.
- Stead, D. (2004). Non-water control measures for potato common scab. UK Potato Council. 1-50.
- 澤田宏之・野口雅子・吉田隆延・染谷信孝・土屋健一 (2008). 定量 PCR 法による土壌細菌の絶対定量. 植物防疫 62: 611–617.
- 孫工弥寿雄・喜多孝一 (1977) .ジャガイモそうか病菌の接種条件と発病. 日植病報 43:117 (講要) .
- St-Onge,R., Goyer, C., Coffin, R. and Filion M. (2008). Genetic diversity of *Streptomyces* spp. causing common scab of potato in eastern Canada. Syst. App. Microbiol. 31: 474-484.
- Takada-Hoshino,Y. and Matsumoto, N. (2004). An improved DNA extraction

- method using skim milk from soils that strongly absorb DNA. *Microbes Environ.* 19: 13-19.
- 星野(高田)裕子・長谷部亮(2005). 土壌からの DNA 抽出法. 環境バイオテクノロジー学会誌 5: 43-53.
- Takeuchi, T., Sawada, H., Tanaka, F. and Matsuda, I. (1996). Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:476-479
- Tanaka, J. and Ikeda, S. (2002). Rapid and efficient DNA extraction method from various plant species using diatomaceous earth and a spin filter. *Breed Sci.* 52:151-155.
- 田中文夫(2000). ジャガイモそうか病菌の同定と識別・定量ならびに土壌環境制御による防除に関する研究. 北海道立農業試験場報告 96: pp1-62.
- 田中文夫 (2003a). 土壌病害の見分け方(10) 放線菌による病害.植物防疫 57: 563-568.
- 田中文夫 (2003b). ジャガイモそうか病菌の同定・識別と発病機構.土と微生物 57 : 69-77.
- 田代暢哉・宮下清貴・松尾良満 (1999). 強酸性土壌におけるジャガイモそうか病の多発生とそれに関与する *Streptomyces* 属菌. 日植病報 65: 197-203.
- 田代暢哉・松尾良満・山本平三・角博・三好芳彦(2002). ジャガイモそうか病に関与する *Streptomyces* 属菌の類別と生態並びに制御技術の開発に関する研究. 佐賀県上場営農センター研究報告 2:pp3-76.
- 田代暢哉 (2003). ジャガイモそうか病の種いも伝染と強酸性土壌での発生の実態. 土と微生物 57: 79-86.
- Tashiro, N., Manabe, K., Saito, A.and Miyashita, K. (2012). Identification of potato scab-causing *Streptomyces* sp. occurring in strongly acidic soils in Saga

- Prefecture in Japan. J Gen Plant Pathol 78: 353–359.
- Thaxter, R. (1891). The potato scab. Conn. Agric. Expt. Sta. Rept. 1890:81-95.
- Tóth, L., Maeda, M., Tanaka, F. and Kobayashi, K. (2001). Isolation and identification of pathogenic strains of *Streptomyces acidiscabies* from netted scab lesions of potato tubers in Hokkaido (Japan). Acta Microbiol.Immuno. Hung. 48:575-585
- 植松勉・片山克己（1990）.ジャガイモの連作下におけるそうか病の発生生態と防除対策. 長崎県総合農林試験場報告 18: 61-115.
- Wang, A. and Lazarovits, G. (2004) . Enumeration of plant pathogenic *Streptomyces* on postharvest potato tubers under storage conditions. Canadian Journal of Plant Pathology 26: 563-572.
- Wang, A. and Lazarovits, G. (2005) . Role of seed tubers in the spread of plant pathogenic *Streptomyces* and initiating potato common scab disease. Am. J. Potato Res. 82 : 221-230.
- Wanner, L. A. (2006). A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. Phytopathology 96:1363-1371.
- Wanner, L. A. (2007). A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato. Plant Dis. 91:352-359.
- Weinhold, A. R. and Bowman, T. (1968). Selective inhibition of the potato scab pathogen by antagonistic bacteria and substrate influence on antibiotic production. Plant Soil 28:12-24.
- Wilson, C. R., Ransom, L. M. and Pemberton, B. M. (1999). The relative importance of seed-borne inoculum to common scab disease of potato and the efficacy of seed tuber and soil treatments for disease control. J. Phytopathol. 147: 13
- Wilson,I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl.

Environ. Microbiol. 63: 3741-3751.

山内寅好, 伊藤智尚 (1984). 太陽熱利用によるジャガイモそうか病発病防止効果 (講要). 関東東山病虫研報, 31:25.

吉田穂積・山田武志・水野直治 (1994). ジャガイモそうか病の発生における土壌の交換性アルミニウムと可溶性ケイ酸の影響. 日植病報 60: 630-635.

吉田穂積・水野直治・松浦英和 (1997). 施肥法の改良によるジャガイモそうか病の発生抑制効果. 日植病報 63: 57-63.

VII. 謝辞

本研究を遂行しまとめるにあたり終始温かい激励とご指導を賜りました鹿児島大学農学部教授 岩井 久 博士には心より感謝申し上げます。博士論文の審査において佐賀大学農学部教授 大島一里博士，鹿児島大学農学部教授 津田勝男博士，鹿児島大学農学部准教授 中村正幸博士ならびに佐賀大学農学部准教授 草場基章博士には副査として多大なるご指導を受け賜り，心より感謝申し上げます。

本研究の遂行や投稿論文の作成にあたり，佐賀県上場営農センター 田代暢哉博士，地方独立行政法人・北海道立総合研究機構 竹内徹博士，中央農業総合研究センター 鈴木文彦博士，長崎県防除所 菅康弘博士，岩井真理子氏の多大なるご指導を受け賜り，心より感謝申し上げます。

本研究において地方独立行政法人・北海道立総合研究機構 田中文夫博士，独立行政法人・食品産業技術総合研究機構 仲川晃生博士，北海道農業研究センター 池田成志博士，新潟県農業総合研究所 前田征之博士には多大なるご助言を受け賜り心から感謝申し上げます。また，長崎県の平田憲二氏には貴重な試料をご提供頂き，ここに厚くお礼申し上げます。

本研究の鹿児島県での遂行にあたり，鹿児島県農業開発総合センター 松元順博士，井上栄明博士，末永博氏には懇意なるご指導・ご助言を賜り，心から感謝いたします。また，尾松直志氏，田布尾尚子氏，樋口康一博士，中西善裕氏，松比良邦彦氏，福田健氏，上室剛氏，大園正史氏には多大なるご助言とご支援を頂き，ここに厚くお礼申し上げます。和泉勝一氏，牟田辰朗氏，上和田秀美氏，森田重則氏，中村孝久氏には研究全体を通したご指導・ご協力を賜り心より感謝申し上げます。小峠雄輝氏，山下みな子氏，大迫まゆみ氏，荒殿廣海氏，馬場幸典氏，吉岡弘司氏，寺脇光秀氏には本研究の遂行を力強く支援して頂きました。厚くお礼申しあげます。

元鹿児島大学農学部教授 荒井啓博士，元鹿児島県茶業試験場長 野中壽之氏

には研究姿勢をご教授頂き、心より感謝申し上げます。

野島秀伸氏，山口卓宏博士には研究面だけでなく精神面でも常に心温まるご指導とご支援を頂き、心よりお礼申し上げます。

また、長崎県 小川哲治博士，鹿児島県の森清文氏，富濱毅博士のご指導とご支援なくして、本研究は遂行できませんでした。ここに心より感謝申し上げます。

最後に、年老いても常に私のことを心してくれる母に、また、どのような状況においても応援してくれる妻 久美子に心より感謝します。

VIII. 要約

1. 鹿児島県および長崎県におけるジャガイモそうか病を引き起こす *Streptomyces* 属菌の分布

全国有数のジャガイモ産地である鹿児島県および長崎県のそうか病菌の菌種と病原性およびその遺伝子的特徴を明らかにした。鹿児島県は *S. turgidiscabies*, *S. scabiei* の 2 種がそうか病菌の主体であったが、長崎県は *S. scabiei* が多数を占め、両県とも *S. acidiscabies* の発生は一部であった。また、分離株の病原性と Pathogenicity island (PAI) の関連を調査したところ、病原性を示した菌は *S. scabiei*, *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies* のいずれかの菌種となり、すべての菌株がサクストミン合成遺伝子 (*txtAB*) を保有していた。ほとんどの菌株は *txtAB*, トマチナーゼ遺伝子 (*tomA*) と necrosis-inducing protein 遺伝子 (*nec1*) を保有していたが、長崎県および佐賀県から分離された *S. acidiscabies* 菌株については *txtAB* のみで、*tomA* と *nec1* を欠いていた。また、病原性 *S. scabiei* については 16S-23S rRNA ITS (internal transcribed spacer) 領域で大きく 2 つの遺伝子型 (T タイプと JK タイプ) に分けられた。また、一部の菌株ではこれら 2 つの ITS を保有するタイプ (B) が存在することが明らかとなった。特に、*S. scabiei* のメラニン非産生株はすべて T タイプに属していた。さらに、菌種ごとに菌の形態と生理学的性質を調査した結果、いずれの菌種も基準菌株およびこれまで報告された菌株とほぼ一致した。

2. そうか病菌の定量法と低 pH 土壌での動態に関する研究

ジャガイモそうか病は *Streptomyces* spp.により引き起こされる病害である。

これまで、そうか病菌の定量には PAI 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法が開発されているが、そうか病菌は菌種により性質が異なり、特に、低 pH 耐性はそうか病の防除に直結する。効率的な防除対策のためには、菌種ごとの定量技術を開発することが必要である。そこで、国内で主要な菌種である *S. scabiei* と *S. turgidiscabies* について、16S-23S rRNA ITS 領域を標的としたリアルタイム PCR 法 (SYBR Green) による定量技術を開発した。本定量法は *S. scabiei* の JK タイプ (Ssj) および *S. turgidiscabies* (St) に特異的であり、両菌種とも 200fg から 20ng までの DNA 濃度の対数値と Ct 値との間に高い直線回帰が認められた (Ssj : $R^2 = 0.9985$, St : $R^2 = 0.9988$)。また、両種が混在した状態の植物や土壌からも特異的に両菌種の定量が可能であった。

さらに、無底ポット内の黒ボク土壌の異なる pH 条件下 (植え付け時の pH4.4 ~ 5.2) でのジャガイモ栽培を行い、*S. turgidiscabies* 単独接種区、*S. scabiei* 単独接種区、および両菌混合接種区を設けた。収穫時を中心に両菌の菌量およびサクトミン毒素 (*txtAB*) 量によりそうか病原菌量を調査した結果、*S. turgidiscabies* は *S. scabiei* よりも低い pH4.7 以上で土壌中の菌量が高くなった。

また、両菌を接種した条件下では、土壌、根および病斑のすべてで *S. turgidiscabies* が優先していた。

3. ジャガイモそうか病菌の種いも伝染と種いも消毒処理の防除効果に関する動態解析

そうか病菌の種いも伝染について、*txtAB* を標的としたリアルタイム PCR により定量的な調査を行った。最初に、種いもでのそうか病菌量と新生いもでの発病の関係について調査した結果、明確な相関関係は認められなかった。これは、菌密度測定用のサンプリング位置の誤差の影響が強いと考えられたが、病

斑 1 個（約直径 1cm）の種いもを使用すると，種いも間のそうか病の菌量と発病度の偏差が比較的小さく，今後の種いも消毒試験等に活用できるものと考えられた．また，そうか病発病圃場から採取した塊茎は見かけ上健全であっても平均で $4.8 \times 10^4 \text{ fg/cm}^2$ ，病斑のある種いもでは 10^8 fg/cm^2 以上の *txtAB* 定量値が検出された．

次に，そうか病の基本防除技術である種いも消毒処理について，地下部組織および土壌の *txtAB* 定量値を調査した．植え付け 15 日後の土壌では，無処理で約 10^4 fg/g ，ストレプトマイシン剤処理とフルアジナム剤処理は 10^4 fg/g 以下であったが，70 日後には発病度の高かった無処理区およびストレプトマイシン剤処理では 10^7 fg/g 以上となり，植物の生育に伴い *txtAB* 定量値が大幅に増加した．

一方，発病度の低かったフルアジナム剤処理では 56 日後までは概ね 10^4 fg/g 以下であり，そうか病菌の感染しやすい塊茎肥大期の菌密度が低かった．これは，種いも消毒剤の効果として，種いもおよびその周辺のそうか病菌密度を長期に抑制する能力が重要であると考えられた．

また，3 種のそうか病菌種の最小生育阻止濃度（MIC）を調査した結果，フルアジナムの MIC は *S. scabiei* で $0.63 \mu\text{g/ml}$ ，*S. turgidiscabies* で $2.5 \mu\text{g/ml}$ ，*S. acidiscabies* では 70% の菌株が $5 \mu\text{g/ml}$ であったが，一部の菌株で $40 \mu\text{g/ml}$ となった．ストレプトマイシンの MIC は *S. scabiei* で $10 \mu\text{g/ml}$ ，*S. acidiscabies* で $40 \mu\text{g/ml}$ ，*S. turgidiscabies* では約 87% の菌株が $1.25 \mu\text{g/ml}$ であったが，一部の菌株は $125 \mu\text{g/ml}$ となり，他の株の 100 倍の耐性を示した．銅の MIC は *S. scabiei* で $156.3 \mu\text{g/ml}$ ，*S. turgidiscabies* で $312.5 \mu\text{g/ml}$ ，*S. acidiscabies* で $156.3 \mu\text{g/ml}$ となり，菌種間に差はなかった．

4. ジャガイモそうか病に対する温湯処理による種いも消毒の防除効果

そうか病菌 3 種の死滅温度条件について検討した結果, *S.scabiei* は, 50℃では 48 時間ですべての菌が死滅したが, 45℃では 72 時間でも死滅しなかった. *S.turgidiscabies* は, 50℃では 24 時間, 45℃では 72 時間ですべての菌が死滅した. *S.acidiscabies* は, 50℃では 6 時間, 45℃では 72 時間ですべての菌が死滅したことから, 菌種により死滅温度条件に差が認められるものの, そうか病菌の死滅には, 50℃で 24 時間以上, 45℃で 48 時間以上の処理が必要であることが判明した.

実際にそうか病菌に感染した種いもを使用し, 温湯処理を行った結果, 48℃の 60 分間処理では, 萌芽・出芽遅延および大幅な収量の減少が認められた. また, 48℃の 30 分または 60 分間のいずれの処理においても, 無処理よりも発病度が高くなったことから, 種いもの温湯消毒によるそうか病の防除効果は低いと考えられた. この原因として, 塊茎表面のそうか病菌と競合する細菌数が, 温湯処理により大幅に減少することが一因と考えられた.

そこで, 温湯消毒によるそうか病の防除効果の改善を行うため, 水の pH を 4.0, あるいはバチルス製剤を利用した結果, 温湯水の pH を低くしても防除効果の向上は認められなかった. 一方, 種いものバチルス剤 100 倍浸漬処理だけでは防除効果は認められなかったが, 種いもの 48℃の 30 分間温湯処理後にバチルス剤 100 倍浸漬処理を併用した場合, 対照薬剤のフルアジナム剤と比較し防除効果は劣るものの, 無処理と比較すると高い防除効果が認められた.

5. メチルイソシアネート・D-D 油剤の土壌消毒によるジャガイモそうか病防除効果

ジャガイモそうか病に対して, ディ・トラペックス油剤 (ジャガイモでは未登録) について効果的な使用法について検討を行った結果, 本剤 1~1.3ml を 15~20cm 間隔で深さ

15cmに灌注処理(処理後被覆条件)することで、従来の処理量(40L/10a)を増やすことなく、クロルピクリン剤と同等の高い防除効果が得られた。

また、ディ・トラペックス油剤の無被覆での処理について検討した結果、20cm 条間、15cm の間隔で深さ 15cm に、1.3ml/穴を点注処理をすることで、そうか病が少発生の圃場においては比較的高い防除効果が認められた。

6. 太陽熱土壌消毒処理と米ぬか土壌混和処理の併用によるジャガイモそうか病の防除

化学農薬の代替法として、太陽熱処理による土壌消毒法の検討を行った結果、太陽熱処理と米ぬか 300kg/10a の土壌混和処理の併用は、クロルピクリンくん蒸剤とほぼ同等の高い防除効果を示した。また、太陽熱処理は、8月中旬までに10～20日間程度被覆し、定植前に米ぬかを施用すると、安定した高い防除効果が得られた。さらに、従来の太陽熱処理と植え付け前の米ぬか土壌混和処理に加えて、太陽熱処理の被覆前に石灰窒素を施用することで、防除効果の向上が図られた。本試験圃場はそうか病が甚発生の圃場であったが、太陽熱 20 日間処理区＋米ぬか処理と併用で防除価 86、また、太陽熱 30 日間処理区＋米ぬか処理と併用で防除価 92といずれも高い防除効果を示した。また、その防除効果は太陽熱処理期間が長いほど高くなる傾向が認められた。

7. そうか病抵抗性品種と肥料の組み合わせによる防除効果

硫酸アンモニウム区では、施肥後(20～40 日後)には植え付け時の pH から 1 程度の低下が認められたが、「ニシユタカ」で約 45%の発病の低減が認められた。一方、「春あかり」では肥料の種類に関係なく発病が低く、「ニシユタカ」の発病度が 35 程度までの発病条件であれば、「春あかり」を植え付けることで、そうか病の発病を十分に抑制すること

が可能と考えられた。特に、そうか病の発生圃場では、「ニシユタカ」よりも無病徴の塊茎の収量が多いことから、今後のそうか病発病圃場での対策には、重要な手段となるものと考えられた。

IX. 要約(英文)

Common scab is a serious disease of potatoes and other root crops, affecting crop quality and market value. In this study, I surveyed species of *Streptomyces* isolates causing potato common scab in Kagoshima prefecture (pref.) and Nagasaki pref., one of the major potatoes-production areas in Japan. Isolates used in this study were classified into three *Streptomyces* species by polymerase chain reaction (PCR) based on the species-specific primers in the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS). About 42% and 52% of the isolates from Kagoshima pref. belonged to *S. scabiei* and *S. turgidiscabies*, respectively. However about 83% of the isolates from Nagasaki pref. belonged to *S. scabiei*. All isolates pathogenic on potato belonged to *S. scabiei*, *S. turgidiscabies* or *S. acidiscabies* and they had genes for biosynthesis of the pathogenicity determinant thaxtomin. There were some *S. acidiscabies* isolates from Nagasaki pref. and Saga pref. that lacked two genes (*tomA* and *nec1*) of the pathogenicity island. Pathogenic *S. scabiei* isolates were distinguished into two genotypes (T type and JK type) based on the sequences of variable regions in the 16S-23S rRNA ITS. Some isolates had both genotypes (B type). All strains of *S. scabiei* not producing melanin belonged to T type. Pathogenic *Streptomyces* species have different characters depending on species, and low-pH tolerance is important especially in order to control potato common scab. Therefore, we developed new primer sets for SYBR Green quantitative real-time PCR targeting 16S-23S rRNA ITS, to distinguish *S. scabiei* and *S. turgidiscabies*. In this method, the detection sensitivity of DNA from both species (*S. scabiei* and *S. turgidiscabies*.) were not affected even by mixing plant tissue or soil. Additionally, I investigated the population dynamics of these species at different soil pH (4.4~5.2 at planting

date), using the quantitative real-time PCR. Potato was planted with non-bottom frame pots in a greenhouse, and each pot was inoculated with *S. scabiei*, *S. turgidiscabies* or both pathogens. *S. turgidiscabies* tolerates lower soil pH than *S. scabiei* and can grow well in a pH greater than 4.7. In all pots inoculated with the mix of *S. scabiei* and *S. turgidiscabies*, *S. turgidiscabies* was always superior to *S. scabiei* in soil, roots and scab lesions. A seed tuber treatment is an important control that prevents the seed transmission of the disease. Therefore, to estimate the chemical effects, I investigated the dynamics of the pathogenic *Streptomyces* by real-time quantitative PCR. As a result, the population densities of pathogenic *Streptomyces* was kept low in seed tubers and the rhizosphere zone for a long period. We examined the minimum inhibitory concentration (MIC) of chemicals. The MIC of fluazinam or streptomycin against *S. acidiscabies* isolates was higher than that of the other two species. A few *S. turgidiscabies* isolates were tolerant against streptomycin. Hot-water disinfection of the seed tubers is one of the physical control, but the effect of its single treatment is very low. However, it was found that a prevention effect was improved remarkably by treating a microbiologic agent after the hot-water treatment of the seed tubers. In addition, I constructed the effective integrated pest management with the combination of soil solarization and application of rice bran in the soil before planting, or the combination of resistant varieties and fertilizers.