

北海道におけるニラ白斑葉枯病菌の種構成とその季節間変動

北海道立総合研究機構 道南農業試験場 み
三
たけ
竹 さわ
澤
うち
内 とも
知
まさ
正 お
央
のぶ
信
 松山農業改良普及センター

はじめに

北海道におけるニラ栽培は、ハウス内で2.5か月間育苗した苗を6月下旬に天井無被覆のハウス（露地圃場）に定植し、その後株養成を行い、11月下旬に自然枯死した茎葉を刈り取り除去し、12月上旬にハウスにビニールを張る。翌春、再萌芽した茎葉を1.5か月間隔で3回収穫する。その後、再びビニール被覆を除去し株養成を行い、これを3年続ける（KAWAGISHI et al., 2009）。

北海道南西部の知内町では道内の70%のニラを生産しており、白斑葉枯病が北海道のニラ栽培における最重要病害である。本病の罹病葉上には大きさ0.5～1 cm × 2～4 cmの紡錘形病斑が形成され、やがて葉枯症状を呈する。株養成中の発病により翌年の収量が減少し、収穫期間中に発病した場合は発病株は出荷不能となる。

Allium 属植物に感染する *Botrytis* 属菌として8種が報告されている（HENNEBERT, 1963；ZHANG et al., 2010）。タマネギ栽培においては *Botrytis squamosa*（以下：BS）と *Botrytis allii* の2種が主要な病原であり、病害の生態・防除などの多くの知見が明らかになっている（SCHWARTZ and MOHAN, 1995；ELAD et al., 2007；CARISSE et al., 2011）。一方、ニラの場合では、BS、*B. cinerea*（以下：BC）と *B. byssoides* が病原として報告されているが（高桑ら, 1974）、研究知見は極めて少ない。

筆者らは2007～09年に、知内町内のニラ栽培圃場から罹病葉を定期的に採取し、湿室内に放置し、形成した分生子を観察した結果、夏には大きさ約10～25 μmと多様であるのに対して、秋には大きさ約20～25 μmの分生子のみを形成することを確認した。このことから我々は「菌の種構成が季節間で変動している」という仮説を立て試験を実施した。

Botrytis 属菌の種同定において、分生子の形態は重要な特徴である。しかし、種間で大きさが重複する、培養

条件により変化する等の問題点もある（ELAD et al. 2007）。そのため、本属菌の種同定においては形態観察に加えて、分子生物学的手法の併用が推奨されている（NIELSEN et al., 2001；STAATS et al., 2005）。本研究では形態観察に加えて、PCR-restriction fragment length polymorphism（RFLP）と種特異的PCR法により種同定を実施した。

I 圃場における発病調査・罹病葉採取・病原菌の分離・形態同定

北海道において本病は6～7月（夏）と9～10月（秋）の年2回発病が増加することから（三澤, 未発表）、各発病増加時期の終わりに発病調査および罹病葉の採取を行った。すなわち、2010年10月下旬、2011年7月下旬・10月下旬、2012年8月上旬・10月下旬の5回、知内町内の14圃場（圃場NI, ND, MK, MN, JN, JM, OK, OO, OS, OZ, OY, OA, OM, OT）で発病調査を行うとともに各圃場から罹病ニラ20～30葉を採取した。

発病程度は圃場間でばらつきがあったが、いずれの年次も秋は夏と比較して明らかに発病が多かった。2011年の夏は圃場OK, OZ, OMの3圃場で、2012年の夏は圃場ND, JM, OK, OZ, OMの5圃場で他の圃場より発病が多く、株当たり30～50病斑の形成が認められた。その他の圃場における発病は、株当たり1～10病斑程度であった。一方、2010～12年の秋はいずれの圃場においても病斑面積率20%以上（株当たり540～900病斑）であり、発病程度は夏の10倍以上であった。

罹病葉から常法により糸状菌を分離し、1圃場当たり単胞子由来の5菌株を得た。各菌株を滅菌ニラ培地（直径9 cmのガラスシャーレ内に長さ4～6 cmのニラ葉15～20枚を入れ、121℃で20分間オートクレーブ滅菌）上で15℃・BLBライト照射下で3週間培養した。形成した分生子の大きさを1菌株当たり50個について顕微鏡下で測定し、ELLIS（1971）の記載と比較して種の同定を行った。

14圃場から採取した罹病葉からは1事例（2012年秋の圃場OK：雑菌の混入により分離できず）を除きジャ

Species Composition of Botrytis Leaf Blight Pathogens of Chinese Chives and Their Seasonal Change in Hokkaido, Japan. By Tomoo MISAWA and Masanobu TAKEUCHI

（キーワード：ニラ, *Botrytis*, 種構成, 季節間変動）

表-1 ニラ罹病葉から分離した *Botrytis* 属菌の採取圃場・採取時期別の種構成

圃場	2010 年				2011 年				2012 年			
	10 月下旬 (秋)				7 月下旬 (夏)				8 月上旬 (夏)			
	菌株	BS : BC ^{a)}	RFLP ^{b)}		菌株	BS : BC	RFLP		菌株	BS : BC	RFLP	
NI	1NI1~5	5 : 0	S+ ^{c)}		2NI1~5	0 : 5	C+ ^{d)}		4NI1~5	0 : 5	C+	
ND	1ND1~5	4 : 1	S+, C+		2ND1~5	3 : 2	S+, C- ^{e)}		4ND1~5	5 : 0	S+	
MK	1MK1~5	5 : 0	S+		2MK1~5	5 : 0	S+		4MK1~5	5 : 0	S+	
MN	1MN1~5	5 : 0	S+		2MN1~5	0 : 5	C+		4MN1~5	3 : 2	S+, C+	
JN	1JN1~5	5 : 0	S+		2JN1~5	4 : 1	S+, C+		4JN1~5	0 : 5	C+	
JM	1JM1~5	5 : 0	S+		2JM1~5	5 : 0	S+		4JM1~5	3 : 2	S+, C-	
OK	1OK1~5	5 : 0	S+		2OK1~5	4 : 1	S+, C+		4OK1~5	4 : 1	S+, C+	分離できず
OO	1OO1~5	5 : 0	S+		2OO1~5	2 : 3	S+, C+		4OO1~5	1 : 4	S+, C+	
OS	1OS1~5	5 : 0	S+		2OS1~5	1 : 4	S+, C+		4OS1~5	2 : 3	S+, C-	
OZ	1OZ1~5	5 : 0	S+		2OZ1~5	4 : 1	S+, C-		4OZ1~5	2 : 3	S+, C+	
OY	1OY1~5	5 : 0	S+		2OY1~5	2 : 3	S+, C+		4OY1~5	3 : 2	S+, C+	
OA	1OA1~5	4 : 1	S+, C+		2OA1~5	5 : 0	S+		4OA1~5	3 : 2	S+, C+	
OM	1OM1~5	5 : 0	S+		2OM1~5	5 : 0	S+		4OM1~5	5 : 0	S+	
OT	1OT1~5	5 : 0	S+		2OT1~5	5 : 0	S+		4OT1~5	3 : 2	S+, C+	
合計	68 : 2				45 : 25				39 : 31			

^{a)} 形態的特徴に基づく同定による種構成 : BS (*Botrytis squamosa*) : BC (*B. cinerea*).

^{b)} 1 圃場当たり 1 ~ 2 菌株を *Allium* 属に感染する 5 種 *Botrytis* 属菌を識別できる PCR-RFLP 法 (NIELSEN et al. 2002) で解析.

^{c)} 形態的特徴に基づき *B. squamosa* と同定された菌株の PCR-RFLP 法による同定結果 : S+ : *B. squamosa*.

^{d, e)} 形態的特徴に基づき *B. cinerea* と同定された菌株の PCR-RFLP 法による同定結果, C+ : *B. cinerea*, C- : 同定できず.

ガイモ・ブドウ糖寒天 (PDA) 平板培地上で淡褐色～灰褐色のコロニーを呈する糸状菌が高率に分離され, 合計 345 菌株を得た (表-1)。

分離菌は培地上で分生子および分生子柄を形成した。分生子柄は単生し, 基部は淡褐色で先端部は色が薄く, 先端部付近で複数回分岐し, 分生子形成細胞の先端は膨潤し, その表面から房状に全出芽により分生子を形成した。これらの形態的特徴から分離菌を *Botrytis* 属菌と同定した。

各分離菌の平均分生子サイズを図-1 に示した。分離菌は分生子が大きい (平均 $17.0 \sim 26.5 \times 11.8 \sim 17.8 \mu\text{m}$, 縦横比 1.23 ~ 1.66) 菌株群・285 菌株と分生子が小さい (平均 $10.3 \sim 15.1 \times 6.5 \sim 9.6 \mu\text{m}$, 縦横比 1.30 ~ 1.64) 菌株群・60 菌株に分かれた。ELLIS (1971) の記載 (BS の分生子 : $10 \sim 26 \times 10 \sim 18 \mu\text{m}$, 縦横比 1.25 ~ 1.45, BC の分生子 : $6 \sim 18 \times 4 \sim 11 \mu\text{m}$, 縦横比 1.35 ~ 1.5) に基づき前者を BS, 後者を BC と同定した。

採取時期別の BS と BC の構成比は, 2010 年 10 月が 68 : 2, 2011 年 7 月が 45 : 25, 2011 年 10 月が 68 : 2, 2012 年 8 月が 39 : 31, 2012 年 10 月が 65 : 0 であり (表-1), 夏 (7 ~ 8 月) には BS と BC の両方が分離されるが,

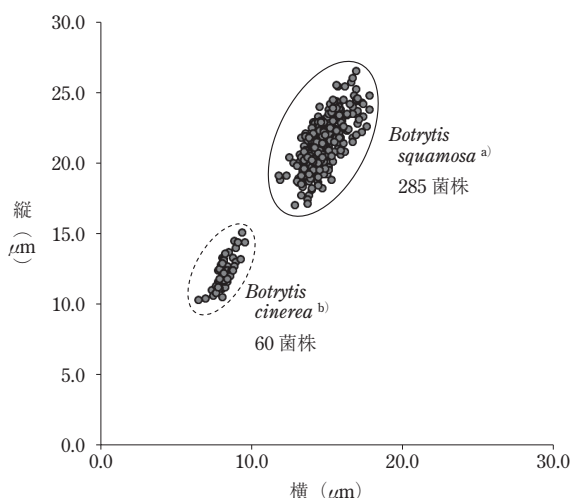


図-1 2010 ~ 12 年に 14 圃場から採取した発病ニラ葉から分離した *Botrytis* 属菌の分生子の大きさ (50 個の平均値)

^{a)} *Botrytis squamosa* : 分生子の大きさおよび縦/横比は ELLIS (1971) の *B. squamosa* の記載 (大きさ $10 \sim 26 \times 10 \sim 18 \mu\text{m}$, 縦横比 1.25 ~ 1.45) と一致.

^{b)} *Botrytis cinerea* : 分生子の大きさおよび縦/横比は ELLIS (1971) の *B. cinerea* の記載 (大きさ $6 \sim 18 \times 4 \sim 11 \mu\text{m}$, 縦横比 1.35 ~ 1.50) と一致.

秋（10月）にはBSが優占する傾向が認められた。すなわち、本研究を開始するきっかけとなった「病原菌の種構成が季節間で変動している」という仮説が形態観察に基づく種同定結果から支持された。

14圃場の圃場別の種構成では、圃場NIでは夏にはBCのみが、秋にはBSのみが分離された。一方、圃場MK, OMの2圃場では、5回のいずれの採取時期においてもBSのみが分離された。その他の11圃場では、夏にはBCとBSが分離され、秋にはほぼBSのみが分離された（表-1）。

II PCR-RFLP 解析および *Botrytis cinerea* 特異的 PCR

1圃場当たり1～2菌株については、菌体からDNAを抽出し、*Allium* 属植物に感染する5種の *Botrytis* 属菌（BS, BC, *Botrytis aclada*, *B. allii*, *B. byssoides*）を識別できる NIELSEN et al. (2002) の PCR-RFLP 法で解析を行い種同定を行った。PCR-RFLP 解析は *Botrytis* 属菌特

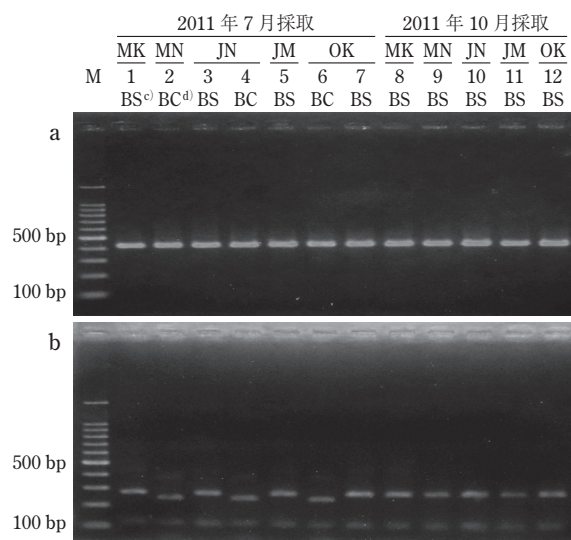


図-2 2011年7月と10月に採種したニラ罹病葉から分離した *Botrytis* 属菌から抽出したDNAのPCR産物のアガロースゲル電気泳動像

Botrytis 属菌特異的 BA2f/BA1r プライマーを用いて PCR 法を実施。

制限酵素ApoIで切断前(a)および切断後(b)のPCR産物。レーン1～7: 2011年7月に分離した2MK1株, 2MN1株, 2JN1株, 2JN5株, 2JM1株, 2OK1株, 2OK2株から抽出したDNA。

レーン8～12: 2011年10月に分離した3MK3株, 3MN4株, 3JN5株, 3JM1株, 3OK2株から抽出したDNA。

レーンM: 100-bp ラダー・マーカー。

c, d) 各菌株の形態的特徴に基づく同定結果; BS: *Botrytis squamosa*, BC: *B. cinerea*。

異的に設計された BA2f/BA1r プライマーで PCR 反応を行ったのちに、PCR 産物を制限酵素 ApoI で切断した。PCR-RFLP で種同定ができなかった菌株については、BC 特異的な BC₁₀₈⁺/BC₅₆₃⁻ プライマーを用いた PCR 法 (RIGOTTI et al., 2006) で解析した。

形態的特徴から BS と同定された 65 菌株、BC と同定された 23 菌株の合計 88 菌株を PCR-RFLP 法で解析した結果、全菌株で BA2f/BA1r プライマーにより予測された 420 bp の DNA 断片が増幅され (図-2a), これらの菌株が *Botrytis* 属に属することが分子生物学的な手法によっても確認された。形態的特徴から BS と同定された 65 菌株は制限酵素処理後に BS に特異的な 270 bp の DNA 断片が認められ、PCR-RFLP 解析によっても BS と同定された (図-2b; 表-1)。一方、形態的特徴から BC と同定された 23 菌株中 19 菌株では、制限酵素処理後に BC に特異的な 250 bp の DNA 断片が認められ (図-2b), PCR-RFLP 解析によっても BC と同定された。しかし、残り 4 菌株 (2ND1 株, 2OZ5 株, 4JM4 株, 4OS3 株) は PCR-RFLP 法では種同定ができなかった (表-1)。これらの 4 菌株は BC 特異的な BC₁₀₈⁺/BC₅₆₃⁻ プライマーを用いた PCR 法で予測された 480 bp の DNA 断片の増幅が確認され (図-3), これら 4 菌株も BC と同定さ

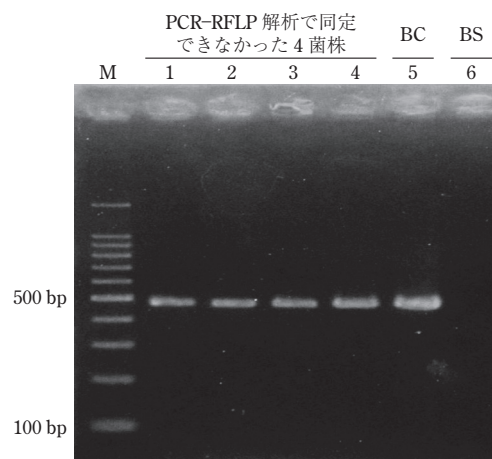


図-3 PCR-RFLP 解析で種同定ができなかった *Botrytis* 属菌から抽出したDNAのPCR産物のアガロースゲル電気泳動像

Botrytis cinerea 特異的 BC₁₀₈⁺/BC₅₆₃⁻ プライマーを用いて PCR 法を実施。

レーン1～4: 2ND1株, 2OZ5株, 4JM4株, 4OS3株から抽出したDNA。

レーン5, 6: *B. cinerea* 2MN1株 (レーン5) と *B. squamosa* 2OY1株 (レーン6) から抽出したDNAを陽性対照および陰性対照として供試した。

レーンM: 100-bp ラダー・マーカー。

れた。以上のように、PCR-RFLP 解析および BC 特異的プライマーを用いた PCR 法により解析した全 88 菌株は形態同定結果が支持された (表-1)。

前述のように *Botrytis* 属菌の種同定には、形態観察に加えて分子生物学的手法の併用が必要であるが、本研究では分子生物学的手法で解析した全菌株において形態同定種が支持されたことから、形態のみで種同定を行った菌株についても正しく同定できていると判断した。すなわち、本病菌の種構成の季節間変動が立証された。

III 夏と秋を想定した条件下での接種試験における *Botrytis squamosa* と *B. cinerea* のニラに対する病原力

知内町における日平均気温は 6 月下旬が 18℃、7 月中旬が 20℃、7 月下旬が 22℃であり、8 月中旬に最高 23℃に達する。その後、徐々に低下し、8 月下旬で 21℃、9 月下旬で 15℃、10 月下旬で 9℃となる。本研究では気温の変化が種構成に影響を及ぼしていると考え、7 月中旬 (夏) と 9 月下旬 (秋) を模して 20℃と 15℃で接種試験を行った。また、ニラの地上部は夏には直立しているが、9 月下旬～10 月上旬から徐々に倒伏する。倒伏の発病に対する影響も調査するために、夏を想定した 20℃条件下での試験は直立した葉に対してのみ接種を行ったのに対して、圃場で倒伏が始まる秋を想定した 15℃条件下での試験は直立と倒伏した葉に対して接種を行った。接種試験には、2007 年に知内町のニラから分離した BS・SK-1 株および BC・SMT1 株を用いた。

検定には 1/5000 a ワグネル・ポットで 5 か月間栽培したニラを供試し、葉の中位を紙製の棒 (檜木産業「ミニピンパー」: 直径 2.5 mm × 長さ 10 cm) で挟み、棒の両端をセロファンテープで止め地上部全体を固定し

た。葉を直立させた検定植物 (図-4a) と、葉を紐で引っ張り水平にした検定植物 (図-4b) を準備した。7 cm 四方の二重ガーゼを葉の上に置き、病原菌の分生子懸濁液 (1.0×10^5 個/ml + 0.1% Tween-20) 4 ml を滴下した。接種葉は、30 cm 幅の食品用ラップで被覆し、さらに株全体をビニール袋で被覆し温室状態を維持し、15℃または 20℃・16 時間日長で制御した人工気象器内で管理した。接種 5 日後にガーゼ・被覆を除去し、同条件下で管理し、接種 7 日後に接種部位における病斑面積率を調査した。試験は 1 区 3 ポットで実施した。

15℃条件下での BS および BC 接種株の病斑面積率は倒伏させた葉では 35.0%および 11.7%であり、直立した葉では 18.3%および 3.3%であり (表-2)、BS は BC より病原力が強く、葉の倒伏は発病を助長させることが明

表-2 秋(15℃)と夏(20℃)を想定した条件下での接種試験における *Botrytis squamosa* と *Botrytis cinerea* のニラに対する病原力

接種温度	葉の向き	接種菌株	病斑面積率(%)
15℃	倒伏	<i>B. squamosa</i> SK-1 株	35.0 ± 7.1 ^a
		<i>B. cinerea</i> SMT1 株	11.7 ± 2.4 bc
		無接種	0.0 ± 0.0 d
	直立	<i>B. squamosa</i> SK-1 株	18.3 ± 2.4 b
		<i>B. cinerea</i> SMT1 株	3.3 ± 1.2 cd
		無接種	0.0 ± 0.0 d
20℃	直立	<i>B. squamosa</i> SK-1 株	3.7 ± 0.9 cd
		<i>B. cinerea</i> SMT1 株	0.7 ± 0.2 d
		無接種	0.0 ± 0.0 d

^a 数値は 3 反復の平均値 ± 標準誤差。

^b 同じアルファベットを付した数値間では、アークサイン変換後に Tukey の多重比較検定 (5%水準) で有意差がないことを示す。



図-4 ニラ白斑葉枯病菌の接種方法

葉を紙製の棒で挟み地上部全体を固定。接種部位に二重ガーゼを乗せ、直立した葉(a)と紐で引っ張り倒伏させた葉(b)への接種。

らかとなった。20℃条件下での直立した葉における BS および BC 接種株の病斑面積率は 3.7% および 0.7% であり、15℃条件下と比較していずれも病原力が弱かった (表-2)。

考 察

夏にはほとんどの圃場から BS と BC が分離され、各圃場における BS と BC の種構成比は 0:5 ~ 5:0 と多様であった。接種試験では夏を想定した 20℃における接種では両種ともに病原力が弱かった。このことから、夏における圃場間の種構成の違いは両種の病原力の差ではなく、各圃場における伝染源密度などの他の要因により感染する種が決定されていると考えられた。

一方、秋は全 14 圃場からほぼ BS のみが分離された。秋を想定した 15℃における接種試験により、BS が BC より病原力が強く、倒伏が発病を助長することが明らかとなった。このことから、15℃における BS の強い病原力と株の倒伏が夏～秋にかけて BC が BS に置き換わる要因であると考えられた。

BS は罹病葉上に菌核を形成して越冬し、翌春、菌核上に多量の分生子を形成する (三澤, 2014)。このことからこの分生子が本病の一次伝染源であり、BS の生活環はニラ圃場で完結していると推察している。また、BS が *Allium* 属植物以外には感染しないこと、および知内町ではニラ以外の *Allium* 属植物が栽培されていないことから、BS の生活環はニラ圃場で完結していると

考えられる。

一方、BC は秋にはほとんど分離されなかったにもかかわらず、翌年の夏には 9 (2011 年) ~ 11 圃場 (2012 年) から分離された。この結果から、BC はどこで越冬し、何が一次伝染源となっているのか、という疑問が浮上する。

さらに、タマネギの *Botrytis* 属菌による病害の場合は、罹病葉上に形成した分生子が重要な二次伝染源であるとされているが (CARISSE et al., 2011)、ニラの場合は罹病葉上での分生子の形成は認められなかった (データ未記載)。今後、ニラ白斑葉枯病菌の生活環を明らかにし、最終的には防除対策を確立するために、BC の越冬場所・一次伝染源および BS と BC の二次伝染源を解明する必要がある。

引 用 文 献

- 1) CARISSE, O. et al. (2011): Plant Dis. **95**: 504 ~ 514.
- 2) ELAD, Y. et al. (2007): Botrytis: biology, pathology and control, Springer, Dordrecht, 403 pp.
- 3) ELLIS, M. B. (1971): Dematiaceous hyphomycetes, CAB Publishing, Wallingford, p.178 ~ 184.
- 4) HENNEBERT, G. L. (1963): Meded. Landbouwhogeschool. Opzoekingsstn. Staat Gent **28**: 851 ~ 876.
- 5) KAWAGISHI, K. et al. (2009): Sci. Hortic. **119**: 197 ~ 202.
- 6) 三澤知央 (2014): 日植病報 **80**: 58 (講要).
- 7) NIELSEN, K. et al. (2001): Phytopathology **91**: 527 ~ 533.
- 8) ——— et al. (2002): Plant Dis. **86**: 682 ~ 686.
- 9) RIGOTH, S. et al. (2006): Phytopathol. Mediterr. **45**: 253 ~ 260.
- 10) SCHWARTZ, H. F. and S. K. MOHAN (1995): Compendium of onion and garlic diseases, APS Press, St. Paul, 54 pp.
- 11) STAATS, M. et al. (2005): Mol. Biol. Evol. **22**: 333 ~ 346.
- 12) 高桑 亮ら (1974): 道立農試集報 **29**: 1 ~ 6.
- 13) ZHANG, J. et al. (2010): Mycoscience **51**: 421 ~ 431.

農林水産省プレスリリース (28.5.16 ~ 6.15)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。

<http://www.maff.go.jp/j/press/syoutan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

◆「平成 28 年度病害虫発生予報第 2 号」の発表について
(5/24) /syokubo/160524.html

◆「第 3 回ミカンコミバエ種群の防除対策検討会議」議事概要
(5/31) /syokubo/keneki/k_kokunai/mibae/mikan_gaiyou
3.htm