

土壤中のシヨウガ根茎腐敗病菌 (*Pythium myriotylum*) 検出のための 選択培地による直接検出法, 捕捉法およびPCR法の比較

矢野和孝・岡田知之・景山幸二*・森田泰彰
(高知県農業技術センター・*岐阜大学流域圏科学研究センター)

Comparison of detection methods between direct detection using selective media, bait method and PCR for *Pythium myriotylum* causing root rot of ginger from soil

By Kazutaka YANO, Tomoyuki OKADA, Koji KAGEYAMA* and Yasuaki MORITA
(Kochi Agricultural Research Center, 1100 Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan; *River Basin Research Center, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, Gifu 501-1193, Japan)

For direct detection and quantification of *Pythium myriotylum* causing root rot on ginger, modified PARP (contained pimarin, ampicillin, rifampicin and PCNB) medium was applied in this study. The results using this medium from soil revealed that it was difficult to distinguish *P. myriotylum* and *P. aphanidermatum*, and showed lower detectivity, although the two *Pythium* spp. could be distinguished with NARF (contained nystatin, ampicillin, rifampicin and fluzinam) medium. The bait method was performed as follows; corn grains and barley seeds were placed on the surface of wet soil at 35 °C for 2 days, then transferred to the NARF medium and kept at the same temperature for 2-3 days. *P. myriotylum* was successfully detected from highly or moderately infested soil, but was sometimes not detected when at low levels in soil. Even if the first trial of the bait method failed to detect *P. myriotylum*, the same results sometimes did not appear on the retrial from the same samples. We have demonstrated that *P. myriotylum* was unevenly distributed in soil. Polymerase chain reaction (PCR) using the primers PyF and kkMYRR reported by Ishiguro *et al.* (2013) was useful for the specific detection of *P. myriotylum* from soil. However, the detection sensitivity of PCR was lower than the bait method.

緒 言

シヨウガ (*Zingiber officinale* (Willd.) Rosc.) は多年生の草本で、根シヨウガと呼ばれる地下の根茎や芽シヨウガと呼ばれる発芽して間もない偽茎が食用や薬用に利用されている (川勝, 1990; 鈴木, 2001)。高知県では、大シヨウガと呼ばれる根茎が大きい根シヨウガの栽培が盛んで、その生産量は全国一を誇る (高知県農業振興部, 2013)。このシヨウガ栽培において最も被害が大きい病害は根茎腐敗病であり、高知県では毎年3割程度の圃場で発生が見られ (高知県, 2013),

本病の激発により収穫皆無となる圃場も少なくない。本病の病原菌は *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum* (一谷・新須, 1977) と *P. zingiberis* M. Takahashi (桂・谷岡, 1967) の2種類が報告されているが、高知県では前者による発生は確認されておらず、後者により発生するものとみられている。なお、近年シヨウガ根茎腐敗病を引き起こす *P. zingiberis* は、分子系統解析や寄生性などから多犯性の *P. myriotylum* Drechsler と同一種に処理されている (鈴木ら, 2011)。ところで、本菌は前年の発病後の残渣中に卵胞子を形成し、土壌中に残存して土壌伝染する。また、前年に発病し

た圃場の根茎を種として使用すると、根茎やその周囲に付着した土壤に病原菌が残存していた場合には次作の伝染源となり、種根茎伝染する。さらに、本菌は遊走子を形成して水媒伝染することから、2次伝染によって被害が拡大しやすく、灌漑水に病原菌が混入していたり、大雨による冠水によって発病が見られる場合もある(新須, 1984)。

本病の防除対策には、植付前の土壤消毒や生育中の薬剤処理が有効である。しかし、本病に対して卓効を示す臭化メチルが全廃され、ダゾメットやクロロピクリンなどのくん蒸剤に頼らざるを得なくなっている。これら代替剤は、費用や作業性、根茎腐敗病に対する効果に差が見られている(竹内ら, 2000; 山崎ら, 2011) ことから、適切な防除資材を選択するためには、現場で使える判断基準が必要とされている。また、近年の農産物価格の低下による農業経営の圧迫から防除経費の節減が、また環境問題に対する意識の高揚から減農薬栽培による環境負荷の低減が求められている。これらの要求に応えるためには、土壤中の根茎腐敗病菌の菌密度を調査し、推定される汚染程度から適切な防除資材を選択することが有効と考えられる。しかしながら、実際には前年の発病の有無や発病程度により次作の発病を予測しているのが現状であり、前年にショウガを栽培しなかった場合には、汚染程度を把握することは困難とされており、過剰防除を余儀なくされている。そこで、選択培地による土壤中の *Pythium* 属菌の定量、捕捉法およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いた土壤中の根茎腐敗病菌の検出について検討したところ、捕捉法の検出感度が最も高く、土壤の汚染程度も推定可能と考えられたので、その概要について報告する。

なお、本研究は農林水産省委託プロジェクト「気候変動に対応した循環型食料生産等の確立のためのプロジェクト」において実施した。本研究で用いた改変 PARP 培地および土壤からの直接検出方法は大阪府立大学の東條元昭博士に御教授いただいた。ここに敬礼申し上げる。

材料および方法

1. 供試土壤

2011および2012年に高知県農業技術センター内

の露地圃場および高知県内のショウガ栽培圃場から土壤を採集し、以下の試験に供試した。根茎腐敗病菌の検出に用いる場合には、圃場の発病株付近の5ヶ所を選定し、地表面から5~15cmの深さの土壤を1ヶ所につき200g程度採集して混合後、2mmの篩を通した。検定までは室温で最長8ヶ月程度保存した。PCRに用いる場合には4℃で冷蔵保存した。栽培試験では1cmの篩に通したものを直ちに供試した。なお、供試土壤の土性は殆どが灰色低地土であったが、一部は褐色森林土や黄色土であった。

2. *P. myriotylum* の検出方法

1) 選択培地による直接検出

Pythium 属菌の選択培地である改変 PARP (Corn meal agar 17g, 寒天23g, 水1000mL, ピマリシン5ppm, アンピシリン250ppm, リファンピシン10ppm, PCNB100ppm, ローゼベンガル2.5ppm), PARF, NARF, NARM, PARP (Morita and Tojo, 2007) の各培地を用いて病原菌を検出した。供試土壤の50gを0.35%の素寒天液250mLに入れ、ホモジナイザーで10,000rpm, 5分間攪拌後、その1mLを選択培地上にガラス棒で広げ、35℃, 24時間培養した。流水で培地表面の土壤を洗い流した後、培地表面の水滴がなくなる程度まで風乾し、出現した *Pythium* 属菌の菌そう数を計数した。また、さらに35℃, 24時間培養し、菌そう数を再確認した。なお、1サンプルにつき直径9cmのペトリ皿10枚を供試した。

2) 捕捉法による検出

供試土壤50gを直径9cmのペトリ皿に入れた後、滅菌水を20~25mL加え、最大容水量以上の水分量に保った。飼料として用いられているトウモロコシ粒(品種名不明)およびオオムギ種子(品種名: 'ニシノチカラ')をそれぞれ20粒ずつ土壤表面に置き、35℃, 2日間培養後、NARF培地上に移した。35℃で2~3日間培養後、出現する根茎腐敗病菌の菌そうの有無を調査した。

3) ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出

土壤からのDNAの抽出およびPCRによる *P. myriotylum* の検出は、Ishiguro *et al.* (2013)の方法に従った。供試土壤0.2gに直径1mmのガラ

スピーズを0.2g, 0.2g/mL スキムミルクを80 μ L, 抽出用緩衝液 (100mM TrisHCl pH9.0, 40mM EDTA) を250 μ L, 10%SDS を50 μ L および塩化ベンジルを150 μ L 加え, 1分間激しく攪拌後, 60°C で15分間静置した。3M 酢酸ナトリウム150 μ L を加えて攪拌後, 氷上で15分間静置してから遠心分離し, 得られた上清を Mag Extractor-Plant Genome (Toyobo) を用いて DNA を抽出した。PCR は得られた抽出 DNA (50 μ L) の一部をテンプレートとし, *P. myriotylum* を特異的に検出できるプライマー PyF (5'-CTGTTCTTTTCCTTGA GGTG-3') と kkMYRR (5'-GGAGCCGAAACTCT CACAAGAC-3'), 正常な PCR 反応の確認のため, 真核生物を検出できるユニバーサルプライマー 18S69F (5'-CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGT -3') と 18S1118R (5'-GGTGGTGCCTTCCGTCAA -3') を用いて実施した。すなわち, 10 \times PCR 緩衝液を1.5 μ L, 25mM の MgCl₂ を1.5 μ L, 10mM の dNTP Mixture を0.3 μ L, 4mg/ μ L の BSA を1.5 μ L, *P. myriotylum* を特異的に検出できるプライマーを10 μ M と真核生物を検出できるユニバーサルプライマーを2 μ M に調整したマルチプレックスプライマーを0.75 μ L, 5U/ μ L の Fast-Start Taq DNA ポリメラーゼ (Roche Applied Science, Germany) を0.12 μ L に蒸留水を混合後, 抽出 DNA のテンプレートを1.8 μ L 加えて全量を15 μ L に調整した。PCR 反応は95°C で5分間の熱変成の後, 95°C で0.5分間, 64°C で0.5分間, 72°C で1分間を35サイクル, 最終伸長は72°C で10分間とした。PCR 産物は2% アガロース (Agarose S, ニッポンジーン) ゲルで電気泳動してエチジウムブロマイドによる染色後, 出現するバンドの有無を確認した。

3. 土壌の汚染程度と発病程度の関係 (試験1)

栽培試験は2011年8月1日に高知県農業技術センター内の露地圃場2ヶ所 (高知1: 前年ショウガ栽培圃場, 高知2: 前年無栽培) から採集した自然汚染土壌を1/5,000a のワグネルポットに詰め, そこにショウガ (品種名: '土佐一') を植え付けて実施した。また, 人工汚染土壌にも同様に植え付けた。すなわち, ショウガから分離した根茎腐敗病菌 (菌株名: MY 株) を直径9 cm のペトリ皿に12mL ずつ分注した500ppm 小麦胚芽

油添加トウモロコシ寒天 (CMA) 平板培地上で, 30°C, 約30日間培養後, ホモジナイザーで細断した培養菌体をオートクレーブ滅菌した土壌 (高知2) と混和した。汚染程度は高, 中および低とし, 培養菌体の混和量は1/5,000a のワグネルポット当たり, それぞれペトリ皿10枚, 2枚および0.5枚とした。試験は, いずれも10鉢ずつ用いて8月2日にショウガを植え付けた。なお, 培養菌体を土壌に混和する前に, 培地中に形成された卵胞子数を計数してペトリ皿1枚当たりの卵胞子数を算出し, 人工汚染土壌1g 当たりの卵胞子数を求めた。また, 各供試土壌から改変 PARF 培地を用いて, *Pythium* 属菌の直接検出を実施した。発病調査は, ショウガの発芽後, 適宜地上部の発病の有無を確認した。なお, 最終調査時の未発芽株は種根茎が腐敗していれば発病株とみなした。

4. 選択培地の検討

PARF, NARF, NARM, PARP の各選択培地を用いて, 前項の自然汚染土壌 (高知1, 高知2) およびペトリ皿10枚の培養菌体を混和して作製した人工汚染土壌から *Pythium* 属菌を検出した。

5. 土壌の汚染程度と発病程度の関係 (試験2)

試験1と同様に, 2012年5月から人工汚染土壌を作製して実施した。ただし, 土壌はオートクレーブ滅菌したものと無滅菌のものを用い, 汚染程度は中, 低および微とした。なお, 培養菌体の混和量は1/5,000a のワグネルポット当たり, それぞれペトリ皿2枚, 0.5枚および0.1枚とした。汚染土壌からの根茎腐敗病菌の検出は捕捉法により実施した。発病調査は7月13日に実施し, 発病株率を算出した。

6. 現地圃場で採集した土壌からの *P. myriotylum* の検出

2011および2012年に高知県内のショウガ栽培圃場で採集した土壌を用いて, NARF 培地を用いた根茎腐敗病菌の直接検出, 並びに捕捉法および PCR 法を用いた根茎腐敗病菌の検出を実施した。なお, 各調査圃場の発病程度は現地の発病実態を参考にして設定し, 肉眼観察により5段階 (無: 発病株率0%, 微: 同1%未満, 少: 同1~5%未満, 中: 5~20%未満, 多: 20%以上) に類

別した。また、発病圃場であるにも関わらず、捕捉法およびPCR法で検出できなかった場合には再調査を実施した。

結 果

1. 土壌の汚染程度と発病程度の関係 (試験1)

自然汚染土壌から改変 PARF 培地を用いて *Pythium* 属菌を検出したところ、いずれの土壌からも *P. aphanidermatum* が検出され、*P. myriotylum* は全く検出されなかった。その密度は、前年にシオウガを栽培していた土壌 (高知1) よりも無栽培の土壌 (高知2) で高かった。発病調査では、高知1で発病が見られ、高知2では発病が見られなかった。人工汚染土壌では、高汚染土壌で *P. myriotylum* が検出されたが、中および低汚染土壌では検出されなかった。高汚染土壌から選択

培地で検出された *P. myriotylum* 数は汚染に用いた卵胞子数の1%程度であった。発病調査では、いずれの汚染程度でもシオウガの発病が見られ、発病株率が高かった (第1表)。

2. 選択培地の検討

4種類の選択培地を用いて土壌中から *Pythium* 属菌を直接検出したところ、NARF培地上における *P. myriotylum* の菌そうは菌糸の密度が粗く菌そう周縁で密となる特徴を示し、*P. aphanidermatum* と区別可能であった (第1図)。また、NARF培地では、NARMおよびPARFの各培地上での菌そうよりもやや小さかったが、雑菌の生育数が少なかった。しかし、いずれの培地においても、検出される *P. myriotylum* 数はほぼ同じで、検出感度には差が認められなかった (データ省略)。

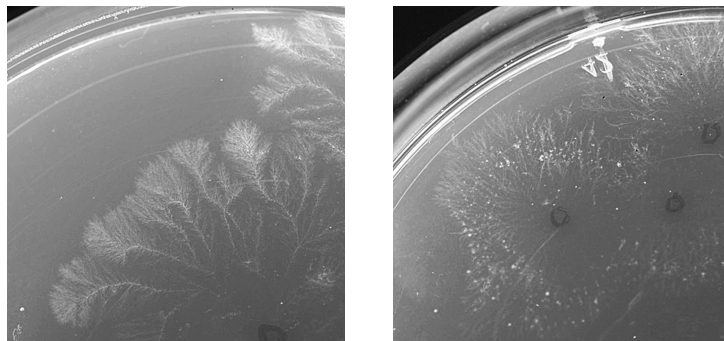
第1表 土壌からのシオウガ根茎腐敗病菌の菌密度と発病の関係 (試験1)

土壌サンプル名	菌密度 ^{c)}	発病株率 (%)			
		9/5	9/12	9/26	
自然汚染土壌 ^{a)}	高知1	nd (0.6)	10	40	60
	高知2	nd (22.2)	0	0	0
人工汚染土壌 ^{b)}	高	10.0	100	100	100
	中	nd	90	90	90
	低	nd	50	60	80

a) 高知1：前年シオウガ栽培圃場，高知2：無栽培圃場

b) 高：培養ペトリ皿10枚/鉢 (1,000卵胞子/g土壌に相当) で汚染，中：同2枚/鉢 (200卵胞子/g土壌に相当)，低：同0.5枚/鉢 (50卵胞子/g土壌に相当)

c) 選択培地を用いた直接検出法による土壌1g当たりの *P. myriotylum* の菌数，()内は *P. aphanidermatum* の菌数，nd：検出限界以下



第1図 NARF培地上での生育菌そうの特徴
左：*P. myriotylum*，右：*P. aphanidermatum*

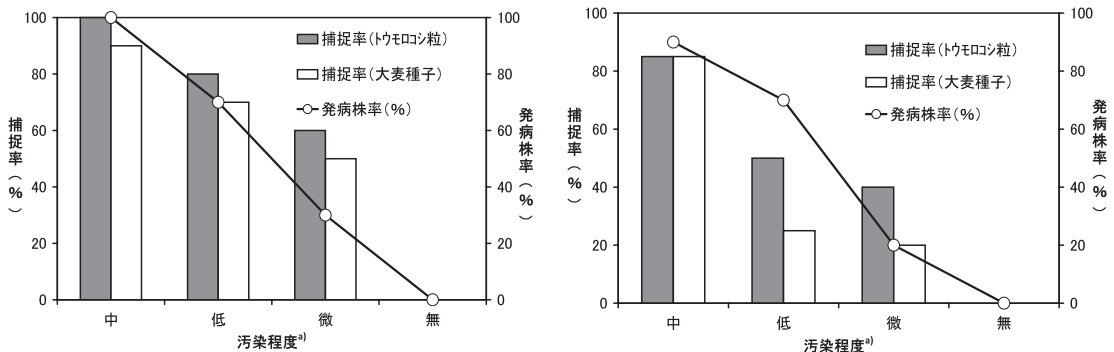
3. 土壌の汚染程度と発病程度の関係 (試験 2)

人工汚染土壌から捕捉法で *P. myriotylum* を検出したところ、汚染程度が高いほど捕捉率が上昇する傾向が見られ、滅菌土では無滅菌土よりもやや高かった。発病調査では、根茎腐敗病菌の接種菌量が多くなるほど発病が多くなる傾向が見られたが、滅菌土と無滅菌土の差はほとんど認められなかった (第 2 図)。

4. 現地圃場から採集した土壌からの *P. myriotylum* の検出

選択培地による直接検出には NARF 培地を用いたが、調査を実施した2011年の採集土壌からは *P. myriotylum* を全く検出できなかった。捕捉法では、中程度以上の発病圃場で *P. myriotylum* をほぼ検出できた。少および微の発病圃場では、検出できない場合も見られた。なお、発病圃場であるにも関わらず検出されない場合には、再度検出を試みたところ、検出される場合があった。PCR 法では、中程度以上の発病圃場で *P. myriotylum* が検出されない場合があり、捕捉法よりも検出感が低かった。また、捕捉法で検出されなかった少および微の発病圃場や無発病圃場においても検出される場合があった (第 2 表)。

土壌中の *Pythium* 属菌を選択培地上で直接検出し、定量する試みは古くから実施されており、このための選択培地もいくつか開発されている (Jeffers and Martin, 1986; 景山・宇井, 1980; Morita and Tojo, 2007; Shimizu and Ichitani, 1984)。一谷・新須(1981)は、ショウガ根茎腐敗病発生ハウスの周辺土壌から根茎腐敗病菌を検出しているが、一方で *P. myriotylum* は土壌中で卵胞子が休眠状態となり、発芽率が著しく低い (Ayers and Lumsden, 1975) ために直接検出できない場合もある (景山・宇井, 1983)。本研究において実施した試験では、最初、改変 PARP 培地を用いて根茎腐敗病菌の検出を試みた。しかし、予想に反して、無発病土壌での *Pythium* 属菌の検出率が発病土壌よりも高かったことから、出現した *Pythium* 属菌の ITS 領域を含む rDNA の塩基配列解析を行ったところ、いずれもショウガには病原性がないとされる *P. aphanidermatum* の塩基配列と高い相同性を示した。*P. aphanidermatum* は日本の温暖地帯の土壌中に広く分布し (渡辺, 1983), *P. myriotylum* と同様な好高温性であることから、本菌の菌そうが出現したものとみられるが、今回の結果からは、本選択培地上に出現



第 2 図 人工汚染土壌における捕捉法を用いたショウガ根茎腐敗病菌の検出と発病の関係 (試験 2, 左: 滅菌土壌, 右: 無滅菌土壌)

a) 中: 培養ペトリ皿 2 枚/鉢 (116 卵胞子/g 土壌に相当) で汚染, 低: 同 0.5 枚/鉢 (29 卵胞子/g 土壌に相当), 微: 同 0.1 枚/鉢 (6 卵胞子/g 土壌に相当)

第2表 現地圃場から採集した土壌からのシヨウガ根茎腐敗病菌の検出

調査年	発病程度 ^{a)}	土壌番号	市町	直接検出 ^{b)}	捕捉法 ^{c)}		PCR法 ^{d)}
					トウモロコシ粒	オオムギ種子	
2011	無	1	香南市	nd	0	0	—
		2	香美市	nd	0	0	—
		3	高知市	nd	0	0	—
		4	土佐市	nd	0	0	—
		5	四万十町	nd	0	0	—
	微	6	南国市	nd	0(0)	0(0)	—(—)
		7	土佐市	nd	10	5	—(—)
		8	四万十町	nd	35	55	—(—)
	少	9	高知市	nd	30	15	—(—)
		10	土佐市	nd	50	30	—(—)
		11	土佐市	nd	0(35)	0(30)	—(—)
	中	12	南国市	nd	20	10	+
		13	土佐市	nd	0(40)	0(10)	—(—)
		14	四万十町	nd	100	95	+
	多	15	四万十町	nd	80	50	+
2012	無	16	南国市	nt	0	0	+
		17	南国市	nt	0	0	—
		18	高知市	nt	0	0	—
		19	土佐市	nt	0	0	—
		20	四万十町	nt	0	0	—
	微	21	南国市	nt	0(0)	0(0)	—(—)
		22	土佐市	nt	0(0)	0(0)	+
	少	23	香南市	nt	0(0)	0(0)	+
	中	24	南国市	nt	0(0)	0(5)	—(—)
		25	高知市	nt	30	30	—(—)
		26	土佐市	nt	35	30	+
		27	四万十町	nt	5	0	—(+)

a) 肉眼観察による圃場全体の発病程度、無：0%，微：1%未満、少：1～5%未満、中：5～20%未満、多：20%以上

b) 選択培地の NARF 培地による土壌からの直接検出、nd：検出限界以下、nt：未調査

c) 捕捉法による捕捉率（%）、（ ）内は2回目の結果

d) +：バンドが出現した、—：バンドが出現しなかった、（ ）内は2回目の結果

する根茎腐敗病菌を他の *Pythium* 属菌と識別することは困難と考えられた。また、土壌中に接種した根茎腐敗病菌の検出率は1%以下となり、著しく低かった。そこで、適用可能な選択培地の種類について検討したが、検出率の向上は認められず、選択培地を用いた直接検出法ではシヨウガ根茎腐敗菌を検出することは困難と判断した。

一方、土壌中の *Pythium* 属菌や *Phytophthora* 属菌を検出する方法として、植物の種子や葉片を用いた捕捉法が知られている（渡辺，1984；正子，1984）。そこで、鳥の餌として市販されているト

ウモロコシ粒とオオムギ種子を用いて捕捉法による根茎腐敗病菌の検出を試みたところ、いずれを用いても検出可能であった。捕捉法では発病土壌の再調査で検出できる場合があったことから、土壌中での病原菌の分布が不均一であり、土壌の採集方法が根茎腐敗病菌の検出に大きく影響を及ぼす可能性が示唆された。但し、捕捉法は、選択培地による直接検出法ではほとんど不可能であった土壌中の根茎腐敗病菌の検出を可能にする有用な検出方法になると考えられる。また、汚染程度と捕捉率には相関が見られる傾向を示したことが

ら、土壤の汚染程度も推定可能と考えられた。さらに、選択培地の検討において見出した NARF 培地を用いることで、しばしば出現する *P. aphanidermatum* と根茎腐敗病菌を識別することが容易になることを確認できた。

Wang and Chang (2003) は PCR を用いて土壤中の *P. myriotylum* を検出できることを報告している。本研究において実施した PCR でも土壤中の根茎腐敗病菌を検出できたが、発病土壤であるにも関わらず検出できない場合が多く、捕捉法よりも検出感度は低いと考えられた。また、未発病土壤においても目的のバンドが見られる場合があり、非特異反応が疑われる事例があった。今後は、このような DNA 断片が *P. myriotylum* のものかどうか検討する必要があると考えられる。PCR は捕捉法よりも少量の土壤で調査することから、土壤中の分布が不均一であることが予想される根茎腐敗病菌を検出するためには、捕捉法と同様に土壤の採集方法を検討する必要がある。

ショウガ栽培では、これまで前年の発病の有無や発病程度からしか土壤の汚染程度を推定する方法がなく、前年にショウガを栽培しなかった圃場では汚染程度を知ることが困難であった。また、根茎腐敗病は難防除病害に該当し、発病してから対策を実施しても十分な効果が期待できないことから、過剰防除を余儀なくされ、このことが農家の経済的、精神的負担を大きくしている。本研究に用いた捕捉法は、土壤の汚染程度を把握する有力な手段となる可能性が示唆されたことから、本法を実用化することで、将来的に必要最小限の防除手段で確実な根茎腐敗病対策が可能となることを期待したい。すなわち、現地に適用できる検定技術の開発には信頼性や再現性の高い調査法に改変して行くことが不可欠であり、このことが今後の課題となる。

摘 要

Pythium 属菌を選択的に分離できる改変 PARF 培地を用いて土壤中のショウガ根茎腐敗病菌の定量を試みたところ、目的の *P. myriotylum* を *P. aphanidermatum* と区別することができず、検出感度が低かった。選択培地の種類について検討したが、NARF 培地において *P. aphanidermatum* と

の区別が可能であったものの、検出感度の向上にはつながらず、現地の発病土壤からは全く検出できなかった。そこで、捕捉法と PCR 法を試みた結果、トウモロコシ粒およびオオムギ種子を用いて *P. myriotylum* を捕捉後に NARF 培地上に置床し、35℃、2～3日間培養したところ、発病程度が高い土壤では検出可能であったが、低い土壤では検出できない場合があった。また、検出できなかったサンプルを再調査すると検出できる場合があったことから、土壤中の病原菌の分布は不均一である可能性が示唆された。土壤から抽出した DNA をテンプレートとし、*P. myriotylum* を特異的に検出できる既報のプライマー (PyF + kkMYRR) を用いて PCR を実施したところ、期待される 150bp の DNA 断片が増幅され、根茎腐敗病菌を検出可能であったが、検出感度は捕捉法よりも低かった。

引用文献

- Ayers, W. A. and R. D. Lumsden (1975) : Factors affecting production and germination of oospores of three *Pythium* species. *Phytopathology*, 65: 1094~1100.
- 一谷多喜郎・新須利則 (1977) : ショウガの立枯れと根茎腐敗をおこす *Pythium* 属菌. *日植病報*, 43 : 337~338 (講要).
- 一谷多喜郎・新須利則 (1981) : 連作ハウス周辺土壤からのショウガ根茎腐敗病菌 *Pythium zingiberum* の検出. *日植病報*, 47 : 158~165.
- Ishiguro, Y., T. Asano, K. Otsubo, H. Suga and K. Kageyama (2013) : Simultaneous detection by multiplex PCR of the high-temperature-growing *Pythium* species: *P. aphanidermatum*, *P. heliciodes* and *P. myriotylum*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 79: 350~358.
- Jeffers, S. N. and S. B. Martin (1986) : Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium*. *Plant Dis.*, 70: 1038~1043.
- 景山幸二・宇井格生 (1980) : *Pythium* spp. の選択分離培地. *日植病報*, 46 : 542~544.
- 景山幸二・宇井格生 (1983) : インゲンおよびダイズの連作障害に関係する *Pythium myriotylum* と未同定の *Pythium* sp. の寄主範囲および分

- 布. 日植病報, 49:148~152.
- 桂琦一・谷岡義春 (1967): *Pythium* によっておこるシヨウガおよびミヨウガの根茎腐敗病. 関西病虫研報, 9:49~55.
- 川勝義人 (1990): 園芸植物大辞典 2 (塚本洋太郎監修), 小学館, 東京:563~565.
- 高知県農業振興部 (2013): 高知県の園芸:23.
- 高知県 (2013): 平成23年度 農作物有害動植物発生予察事業年報.
- 正子朔 (1984): 種々の病原と分離と同定 2) 疫病菌. 新版 土壤病害の手引, 日本植物防疫協会, 東京:75~79.
- Morita, Y. and M. Tojo (2007): Modification of PARP medium using fluazinam, miconazole, and nystatin for detection of *Pythium* spp. in soil. Plant Dis., 91: 1591~1599.
- Shimizu, T and T. Ichitani (1984): Selective medium for quantitative detection and observation of propagules of *Pythium zingiberum* in soil. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 50: 289~293.
- 新須利則 (1984): シヨウガ病害, 根茎フハイ病 農業総覧 原色病害虫診断防除編 4, 追録15号, 3~7.
- 鈴木健司 (2001): シヨウガ. 新野菜づくりの実際 軟化・芽物 ー誰でもできる露地・トンネル・無加温ハウス栽培ー, 農山漁村文化協会, 東京:65~67.
- 鈴木幹彦・伏見典晃・景山幸二・東條元昭 (2011): *Pythium zingiberis* と *P. myriotylum* の各種作物に対する病原性の比較. 日植病報, 77:201~202 (講要).
- 竹内繁治・川田洋一・古谷眞二 (2000): 臭化メチル代替くん蒸剤によるシヨウガ根茎腐敗病の防除. 高知農技セ研報, 9:17~24.
- Wang, P. H. and C. W. Chang, (2003): Detection of the low-germination-rate resting oospores of *Pythium myriotylum* from soil by PCR. Letters in applied microbiology, 36: 157~161.
- 渡辺恒雄 (1983): 土壤病原菌 *Pythium aphanidermatum* とその生態の研究法. 植物防疫, 37:215~222.
- 渡辺恒雄 (1984): 種々の病原と分離と同定 3) *Pythium* 菌. 新版 土壤病害の手引, 日本植物防疫協会, 東京:79~82.
- 山崎睦子・竹内繁治・森田泰彰 (2011): 臭化メチル代替くん蒸と生育中の殺菌剤を組み合わせた防除体系のシヨウガ根茎腐敗病に対する効果. 日植病報, 77:160 (講要).