

## 高知県に分布するニラ白斑葉枯病菌の種類と薬剤の防除効果

矢野和孝・沖 友香・森田泰彰  
(高知県農業技術センター)

Causal Agent of Leaf Blight of Chinese Chive Distributed in Kochi  
Prefecture and the Control Effect of Fungicides against the Fungus

By Kazutaka YANO, Tomoka OKI and Yasuaki MORITA  
(Kochi Agricultural Research Center, 1100 Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan)

The casual fungi of leaf blight on Chinese chive in Kochi Prefecture were identified using the PCR-RFLP method reported by Nielsen *et al.* (2002). The results showed that most of the fungi were identified as *B. squamosa* and only one as *B. cinerea*. Therefore, the control effect of 12 fungicides against the target fungus, *B. squamosa*, was evaluated by the inoculation of the spore suspension to potted plant after spraying the fungicide solutions. Control value of penthiopyrad and fludioxonil as registered fungicide, benomyl and pyribencarb as unregistered one for the disease resulted in over 80. That of tebuconazol, which was registered for rust of Chinese chive, was 69.1 and the control effect in field test demonstrated the possibility of simultaneous control of rust and leaf blight by this fungicide.

キーワード: ニラ, 白斑葉枯病, 病原菌種の分布, 薬剤効果

### 緒 言

高知県におけるニラの生産は、栽培面積では栃木県に次いで2位であるが、生産量は全国の約3割を占める15,500t (2015年産) で、全国一である (高知県農業振興部, 2017)。その主要な産地は南国市, 香南市, 香美市, 佐川町および四万十町で、高知県の生産量の85%を産出する。このニラ栽培において最も被害の大きい病害は、冬期の施設栽培で発生する白斑葉枯病で、毎年2~3割の圃場で発生が見られ (高知県病害虫防除所, 2016)、本病が多発すると商品価値が著しく低下することから、生産者には最も恐れられている。本病の病原菌として *Botrytis byssoidea*, *B. cinerea*, *B. squamosa* の3種が報告されている (高桑ら, 1974) が、高知県におけるこれらの分布は明らかにされておらず、分布する病原菌種に対する薬剤の防除効果も明らかでない。そこで、高知県に分布するニラ白斑葉枯病の病原菌の種類につ

いて調査したところ、ほとんどが *B. squamosa* であることが明らかとなり、さらに *B. squamosa* に対する薬剤の防除効果についても検討したので、それらの概要について報告する。

### 実験材料および方法

#### 1. ニラ白斑葉枯病菌の種類

2014年2~3月に香南市, 佐川町および四万十町のニラ圃場から29菌株, 2015年2~3月には香美市, 南国市, 佐川町および四万十町から31菌株を単孢子分離し, 供試した。また, 2014年1月に農業技術センター内のナス果実から分離した灰色かび病菌2菌株を対照菌株として用いた。

PDA上で20℃, 4日間培養した供試菌株の菌叢から Saitoh *et al.* (2006) の方法に従ってDNAを抽出した。その1μlを鋳型とし, PCR-RFLP (Nielsen *et al.*, 2002) により菌種の判別を実施した。すなわち, 5種類

の *Botrytis* 属において413bpのDNA断片を増幅することができるプライマー、BA2f (5'-GTGGGGGTAGGATGAGATGATG-3') および BA1r (5'-TGAGTGCTGGCGGAAACAAA-3') をそれぞれ0.2 $\mu$ M, dNTP Mixtureを0.2mM, *Taq* DNA Polymelase (Takara Ex *Taq*) を1.5Uの最終濃度に調整し、10倍希釈した添付緩衝液を加えて反応液の全量を50 $\mu$ lとした。PCRは94 $^{\circ}$ Cで3分のプレヒートの後、94 $^{\circ}$ Cで0.5分、60 $^{\circ}$ Cで0.5分、72 $^{\circ}$ Cで1分を35サイクル、最後に72 $^{\circ}$ Cで3分反応させた。PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下で出現したバンドを観察した。PCR産物10.3 $\mu$ lに制限酵素 (ApoI) 0.5 $\mu$ lと添付の緩衝液1.2 $\mu$ lを加えて全量を12 $\mu$ lとし、50 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた。これを2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下でバンドの観察を行った。

## 2. ポットにおける *B. squamosa* に対する薬剤の防除効果

供試薬剤はペンチオピラド水和剤2,000倍、フルジオキシニル水和剤2,000倍、クレソキシムメチル水和剤3,000倍、ポリオキシシン水溶剤1,500倍、アゾキシストロピン水和剤2,000倍、テブコナゾール水和剤1,000倍、トリフルミゾール水和剤2,000倍、ベノミル水和剤3,000倍、ピリベンカルブ水和剤2,000倍、ボスカリド水和剤1,000倍、メパニピリム水和剤2,000倍およびフェンピラザミン水和剤2,000倍の12薬剤とした。試験は2~3月に2回に分けて実施し、各薬剤の所定濃度液を直径10.5cm、高さ20cmのポリエチレンポットで栽培したニラ (品種:スーパーグリーンベルト) 全体に散布後、風乾させた。オートクレーブ滅菌したニラ葉上で、ニラ白斑葉枯病菌 (*B. squamosa*, 菌株番号:204-1) を15 $^{\circ}$ C, BLB照射下で15日間以上培養後、分生子を0.05% tween20溶液に懸濁し、約2 $\times$ 10<sup>5</sup>個/mlに調整した。これを2%ショ糖液と等量混合後、薬剤散布と同じ日にニラ株全体に10ml/株の割合で噴霧接種した。3日間多湿条件下で管理した後、最低温度15 $^{\circ}$ Cに設定したガラス温室内に移動させた。接種7日後に薬害の発

生と全葉の発病を5段階の指数別に調査し、発病率と発病度 =  $\Sigma$  (発病指数別葉数 $\times$ 発病指数) / (調査葉数 $\times$ 4)  $\times$ 100の算出式により発病度を求め、発病度から防除価を算出した。試験1の発病指数は0; 発病を全く認めない, 1; 1葉当たりの病斑数が数個未満, 2; 1葉当たりの病斑数が10個未満, 3; 1葉当たりの病斑数が10個以上30個未満, 4; 1葉当たりの病斑数が30個以上とし、試験2では0; 発病を全く認めない, 1; 病斑面積が葉面積の5%未満, 2; 病斑面積が葉面積の5%以上25%未満, 3; 病斑面積が葉面積の25%以上50%未満, 4; 病斑面積が葉面積の50%以上とした。なお、各処理とも2鉢ずつ供試し、無散布区では薬剤無散布のニラに噴霧接種した。

## 3. 圃場におけるテブコナゾール水和剤の防除効果

供試薬剤はテブコナゾール水和剤1,000倍、対照薬剤はフルジオキシニル水和剤2,000倍とし、農業技術センター内のビニールハウス内で試験を実施した。2015年5月15日に播種したニラ (品種:スーパーグリーンベルト) を2015年8月26日に畝幅1.7m、株間28cm、条間28cm、4条植えで定植した。1区4.3 $\text{m}^2$  (1.7 $\times$ 2.5m)、36株、3連制とし、2016年2月10日、17日、25日および3月3日の合計4回、肩掛け式噴霧器を用いて109~223L/10aの割合で散布した。最終散布7日後の3月10日に、各区任意の4株の全葉について薬害の発生と病斑数を調査し、100葉当たりの病斑数を算出後、防除価を求めた。なお、初回薬剤散布前日の2月9日に地上部を全て刈り取った。第2回薬剤散布 (2月17日) の直後には、*B. squamosa* による発病ニラ葉を圃場から採集し、10茎/区の割合で株間に置いて間接接種を行った。

## 結 果

### 1. ニラ白斑葉枯病菌の種類

供試菌株から抽出したDNAを鋳型としてPCRを実施したところ、全ての菌株で413bpのDNA断片が観察された。これを制限酵素処理すると、ほとんどのニラ分離菌株では269bpと

第1表 PCR-RFLP法で調査した高知県に分布するニラ白斑葉枯病菌の種類

年	市町村名	圃場名	調査菌株数	病原菌の種類	
				<i>B. squamosa</i>	<i>B. cinerea</i>
2014年	香南市	A	8	8	0
		B	3	3	0
	佐川町	C	4	4	0
		D	4	4	0
	四万十町	E	4	4	0
		F	3	3	0
		G	3	3	0
	合計		29	29	0
2015年	香美市	H	5	5	0
	南国市	I	6	6	0
		J	5	5	0
	佐川町	K	9	9	0
	四万十町	L	6	5	1
	合計		31	30	1

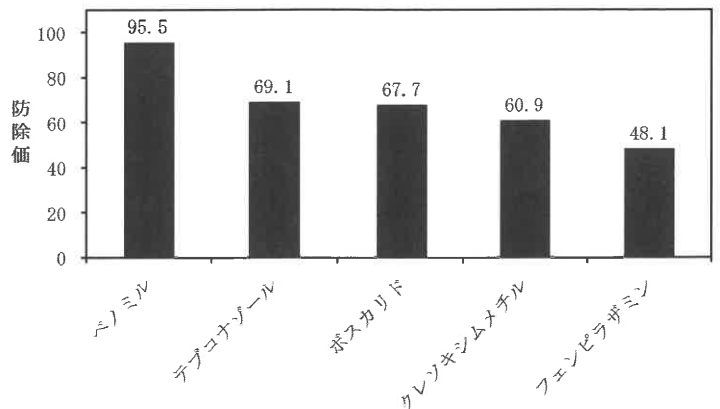
144bpのDNA断片に、ナス分離菌株では250bpと163bpのDNA断片に消化され（データ省略）、前者は*B. squamosa*、後者は*B. cinerea*と判定された。2014年に調査した菌株は全て*B. squamosa*であった。2015年には四万十町において1菌株だけ*B. cinerea*が検出されたが、その他は全て*B. squamosa*であった（第1表）。

## 2. ポットにおける*B. squamosa*に対する薬剤の防除効果

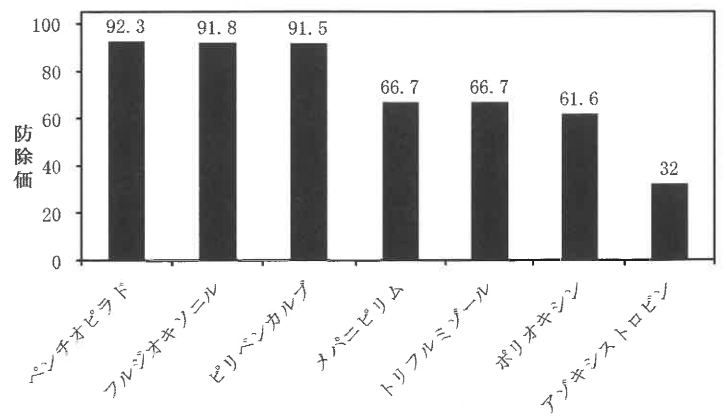
試験1および試験2の無散布区における発病葉率はそれぞれ42.2%、65.5%、発病度は13.3、33.2であった。供試した12薬剤の中では、ベノミル水和剤の防除価が最も高かった。次いで、ペンチオピラド水和剤、フルジオキソニル水和剤、ピリベンカルブ水和剤の順に防除価が高かった（第1、2図）。なお、いずれの薬剤も薬害の発生は認められなかった。

## 3. 圃場におけるテブコナゾール水和剤の防除効果

間接接種を行って発病を促したが、第3回薬剤散布時に無散布区で病斑がわずかに見られる程度の発病であった。その後の発病の進展も緩慢で、無散布区の100葉当たりの病斑数が13.5と少発生条件下での試験となった。テブコナゾール水和

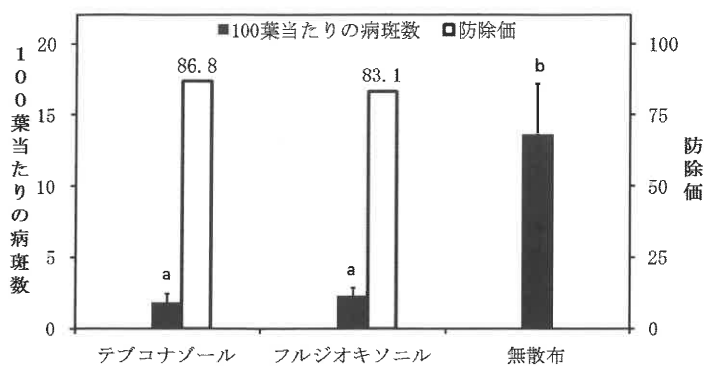


第1図 ニラ白斑葉枯病に対する薬剤の防除効果（試験1）



第2図 ニラ白斑葉枯病に対する薬剤の防除効果（試験2）

剤の1,000倍散布は、対照薬剤のフルジオキソニル水和剤とほぼ同等の防除価を示した（第3図）。なお、薬害の発生は認められなかった。



第3図 圃場におけるテブコナゾール水和剤のニラ白斑葉枯病に対する防除効果  
(図中の異なる英小文字はTukey法で検出の有差を示す。バーは標準誤差を示す)

## 考 察

*Botrytis* 属菌の類別については、形態的特徴である分生子の大きさや菌糸生育速度が指標になることが示されている (Chilvers and du Toit, 2006)。今回、ニラから分離された *Botrytis* 属菌の一部を調査すると、ナス果実から分離された *B. cinerea* と思われる菌株よりも明らかに分生子が大きく、菌糸生育速度が遅いので、*B. squamosa* に該当する可能性が高いと思われた (未発表データ)。しかし、多数の菌株についてこれらと比較するのは多大な労力を要し、また *B. cinerea* と *B. squamosa* の中間的な特徴を有する *B. byssoidea* との判別が困難であると予想されたので、PCR-RFLP 法 (Nielsen et al., 2002) を用いて種を判別することにした。その結果、ほとんどのニラ分離株は269bp と144bp の DNA 断片に消化され、*B. squamosa* であることが明らかとなった。対照菌株として用いたナス分離株および2015年に四万十町のニラから分離された1菌株は、250bp と163bp の DNA 断片に消化され、*B. cinerea* であることが確認された。なお、298bp と115bp に消化される *B. byssoidea* は検出されなかった。三澤・竹内 (2016) も、北海道におけるニラ白斑葉枯病菌の種構成を調査し、季節的な変動はあるものの、検出されるのは *B. squamosa* と *B. cinerea* で、*B. byssoidea* は検出されなかったことを報告している。以上のことから、高知県におけるニラ白斑葉枯病の防除は、*B. squamosa* を対象に実施すべきであることが明らかとなった。

そこで、*B. squamosa* による白斑葉枯病に対す

る薬剤の防除効果について検討した。現在、ニラ白斑葉枯病に対して登録されている散布薬剤は9剤であるが、高い防除効果が見込めない銅剤や微生物剤を除いたベンチオピラド水和剤、フルジオキシニル水和剤、クレソキシムメチル水和剤、ポリオキシシン水溶剤、アゾキシストロビン水和剤の5剤を供試した。また、ニラのさび病に登録されているテブコナゾール水和剤、トリフルミゾール水和剤も供試した。さらに、ニラには登録はないが、他の作物の *B. cinerea* による灰色かび病に登録されているベノミル水和剤、ピリベンカルブ水和剤、ボスカリド水和剤、メパニピリム水和剤およびフェンピラザミン水和剤も供試し、今後の農薬登録につなげたいと考えた。試験は、ポット植えのニラを用いて分生子懸濁液を噴霧接種する方法で実施したが、最初は発病が安定せず、ほとんど発病しない場合もあった。*B. cinerea* では、ショ糖加用ジャガイモ煎汁液に分生子を懸濁することでキュウリ子葉などが発病するようになる (Shirane and Watanabe, 1985) ことから、本研究においてはショ糖液を加えることで改善を図った。それにも関わらず、試験1では試験2よりも発病が少なく調査基準の変更を余儀なくされたが、40%程度の発病率であることから、防除効果の判定には支障がないと考えている。筆者らは培養した分生子が古くなると発芽率が極端に低下することを確認しており (未発表データ)、今回の試験における供試菌株の培養日数を記録していないが、このことにより試験ごとに発病程度に差が出た可能性もあると考えられる。

試験の結果、ベノミル水和剤、ベンチオピラド水和剤、フルジオキシニル水和剤およびピリベンカルブ水和剤の防除値が80以上で、防除効果が高いと考えられた。ベノミル水和剤およびピリベンカルブ水和剤はニラに対して未登録であることから、早期の登録が望まれる。QoI 剤であるクレソキシムメチルは、これらの薬剤と比較すると防除効果がやや低く、アゾキシストロビンは著しく低かった。三澤 (2010) は、病原菌の種は不明であるが、ニラ白斑葉枯病に対してアゾキシストロビンやクレソキシムメチルの効果が高いことを報告しているが、ニンニク白斑葉枯病を引き起こす *B.*

*squamosa* では QoI 剤に対する耐性菌の発生が報告されている (山下, 2015)。このことから, ニラ白斑葉枯病を引き起こす *B. squamosa* においても QoI 剤に対する感受性低下を疑ったが, ニンニク白斑葉枯病において報告されているような EC<sub>50</sub>が100ppm を超える菌株は見つからなかった (未発表データ)。今回の試験における QoI 剤のニラ白斑葉枯病に対する防除効果の低下の原因は不明であるが, 感染圧の強い接種条件下では防除効果が不十分になる可能性も考えられる。ニラのさび病に登録されているテブコナゾール水和剤は, 防除価が70程度であったことから圃場試験も実施した。その結果, フルジオキソニル水和剤とほぼ同等の防除効果が認められたことから, ニラさび病と同時に白斑葉枯病の防除効果も期待できると考えられた。

## 摘 要

高知県の施設ニラに発生する白斑葉枯病の病原菌の種類を Nielsen *et al.* (2002) の方法に従って PCR-RFLP 法で調査した。その結果, ほとんどは *B. squamosa* で, 1 菌株だけ *B. cinerea* が見つかった。このことから, 高知県におけるニラ白斑葉枯病の防除は, *B. squamosa* を対象に実施すべきことが明らかとなった。12 薬剤を用いてポット栽培のニラに所定濃度液を散布後, *B. squamosa* の分生子懸濁液を噴霧接種する方法で防除効果を検討したところ, ニラに登録を有する農薬ではペンチオピラド水和剤およびフルジオキソニル水和剤, ニラに対して未登録の農薬ではベノミル水和剤およびピリベンカルブ水和剤の防除価が80以上で, 効果が高いと考えられた。ニラさび病に農薬登録を有するテブコナゾールは, 防除価が69.1で, 圃場試験においても防除効果が認められたことから, さび病の防除と併せて白斑葉枯病に対しても防除効果が期待できると考えられた。

## 引用文献

- Chilvers, M. I. and L. J. du Toit (2006) : Detection and identification of *Botrytis* species associated with neck rot, scape blight, and umbel blight of onion. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2006-1127-01-DG.
- 高知県病害虫防除所 (2016) : 平成27年度 農作物有害動植物発生予察事業年報. p. 135.
- 高知県農業振興部 (2017) : 高知県の園芸 : 22.
- 三澤知央 (2010) : *Botrytis squamosa* によるニラ白斑葉枯病に対する数種化学農薬および生物農薬の防除効果と残効期間. 北日本病虫研報 61 : 85~89.
- 三澤知央・竹内正信 (2016) : 北海道におけるニラ白斑葉枯病菌の種構成とその季節変動. 植物防疫 70 : 467~471.
- Nielsen, K., D. S. Yohalem and D. F. Jensen (2002) : PCR detection and RFLP differentiation of *Botrytis* species associated with neck rot of onion. Plant Dis. 86:682~686.
- Saitoh, K., K. Togashi, T. Arie And T. Teraoka (2006) . A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. J Gen Plant Pathol 72:348-350.
- Shirane, N. and Y. Watanabe (1985) . Comparison of infection process of *Botrytis cinerea* on cucumber cotyledon and strawberry petal. Ann. Phytopath. Soc. Japan 51:501-505.
- 高桑 亮・斎藤 泉・谷井昭夫・田村 修 (1974) : タマネギおよびニラの白斑葉枯病. 北海道立農試集報 29 : 1~6.
- 山下一夫 (2015) : 青森県におけるニンニク白斑葉枯病菌及び葉枯病菌の薬剤耐性菌の出現. 第25回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集 22~32.