

秋田県でみられるアスパラガス生育不良の原因究明

疫病の発生確認並びに発生分布の予備的調査

古屋廣光¹, 藤井直哉², 福田秀樹³, 奈良知春¹, 戸田武¹, 篠田光江²,
佐山玲², 藤晋一¹, 齋藤隆明²¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科² 秋田県農業試験場³ 秋田県平鹿地域振興局

秋田県のアスパラガス圃場において近年、原因不明の生育不良株が発生している。この生育不良株は、栽培が長期にわたる圃場あるいはその後改植した圃場でしばしば見られることから、連作に伴う障害のひとつと考えられている。本研究ではこれに関する要因の解明を病理学的な見地から行った。遺伝子診断技術 (ARISA 解析) によって生育不良株の地下部等組織の糸状菌相を解析したところ、これまで県内で報告のない疫病菌が検出された。常法に従って同菌を純粋分離し、病原性試験を行ったところ、アスパラガスに病原性が認められた。本菌は、形態的並びに分子生物学的特徴から *Phytophthora* taxon *Sisuluriver* (Clade 6) と同定された。同菌はアスパラガスの病原菌としてこれまで報告がないことから、生態や防除法については不明な点が多い。そこで *Phytophthora* 属特異的プライマーを開発し、PCR 法によって分布を調査したところ、本菌は県内の一部地域のみで検出された。分布が比較的限られていたことから、分布を拡大させない取り組みに効果がある可能性が考えられた。一方、採取した生育不良株のなかに本菌が検出されない株もあったことから、本菌以外の要因についても検討する必要があると思われる。

キーワード: アスパラガス, 連作障害, 土壌伝染性病害, 疫病, *Phytophthora* taxon *Sisuluriver*, 発生分布。

アスパラガスは秋田県の「主要野菜」であり、ネギ、ホウレンソウとともにメジャー 3 品目として振興が計られている (秋田県「農林水産業及び農山漁村に関する年次報告」)。しかし近年単位面積あたりの収量が低迷する、植え替えにともない激しい障害が発生する (連作障害) などの問題が顕在化してきている。原因については、有害物質の蓄積や排水不良などが推定されていたが詳細は明らかでない。平成 25 年度に秋田県農業試験場と連携して行った Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (以下 ARISA) による予備的調査及びその結果に基づく微生物の純粋分離によって、生育不良の要因としてアスパラガス疫病 (病原菌 *Phytophthora* sp.) が関与していることが強く示唆された (児玉不

二雄ら, 2014)。本病の発生はこれまで本県で知られていなかったことから、本研究ではこれに関する病原学的研究並びに病原菌の県内分布調査を行った。さらに、検討の過程で本病以外の病害の関与が伺われたことから、これについても予備的な調査を行った。

アスパラガス疫病の発生確認

平成 25 年度に県南部のアスパラガスから分離された疫病菌 3 菌株 (AS6-1, AS7-1, AS3-35) を、エンバク種子培地 (エンバク種子 50g, 水道水 50ml) を用いて 21 日間 25°C で培養した。増殖した菌体 150g を、パールマット (片倉チッカリン社製) と珪砂 (東

北碓砂社製)の混合土壌(1:1, v/v) 4kg に混和した。これを直径 9 cm のプラスチック製の鉢につめてアスパラガス(品種:ウエルカム)の苗を移植した。ガラス温室で栽培したところ、接種土壌に移植した苗において、若茎の湾曲、茎葉の黄化と生育不良が見られた。これらの苗は、移植から4週間後にはすべて枯死した。その後、これらの株を抜き取って観察したところ、根の量が対照区に比べてやや少なかったほか、貯蔵根の一部で、褐変、柔組織や中心柱の消失、及び鱗芽群の軟化腐敗が見られた(図1)。これらの症状は、疫病菌を接種しない土壌で栽培したアスパラガス(対照区)ではまったく見られなかった。なお、接種区において、根の全体的な著しい生育不良や褐変(根腐れ症状)はみられなかった。接種土壌で生育し、生育不良を起こした株の根やクラウンの病斑部から、接種した菌が容易に再分離さ

れた。以上のことから、供試した3菌株はいずれもアスパラガスに病原性を有するものと考えられた。本実験みられた鱗芽群の軟化腐敗は圃場ではまだ確認されていない。一方、圃場では、根系の全体的な腐敗あるいは疫病によると思われる茎の病斑がしばしば観察されているが、本接種試験ではこのような症状は見られず、さらに検討が必要である。

形態学的特徴と分子生物学的特徴によって本菌の同定を試みたところ、本菌は *Phytophthora taxon Sisuluriver* と酷似した(Kodama et al., 2015)。本菌は南アフリカ共和国の河川水から分離され新種の菌であり、まだ種の形容名が与えられていない。本菌がアスパラガスに病原性があるとの報告はこれまでにない。以上のことから、本県において *Phytophthora* sp. によるアスパラガス疫病が発生していることが明らかとなった。

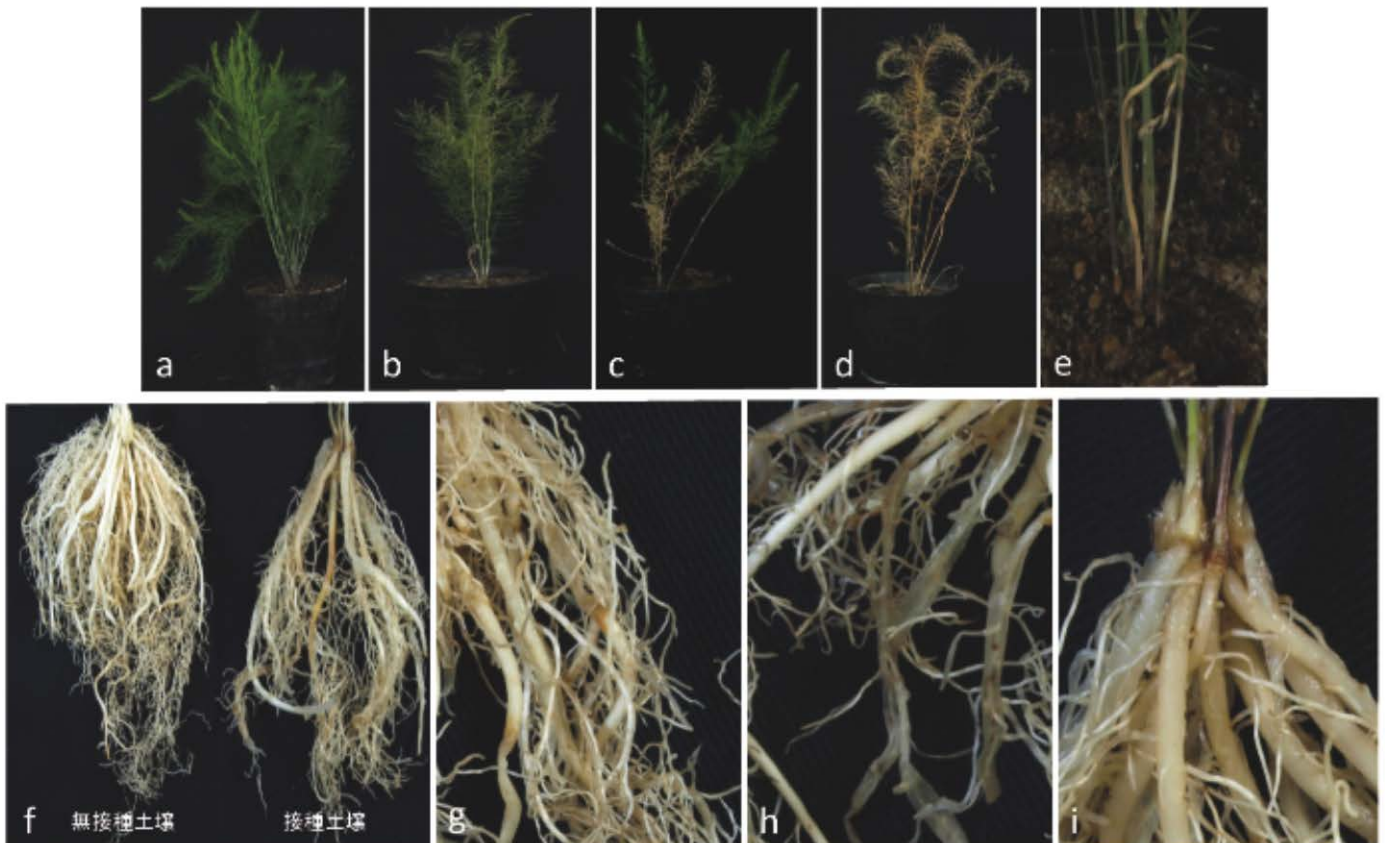


図1 *Phytophthora* sp. 接種土壌で見られたアスパラガスの症状

a: 無接種土壌, b-d: 地上部の黄化, e: 若茎の屈曲と腐敗, f: 接種土壌と無接種土壌における根の生育
g: 根の部分的褐変, h: 根の空洞化, i: 鱗芽群の軟化腐敗. 供試菌株: AS6-1, AS3-35, AS6-1.

アスパラガス疫病の発生実態の解明

本県における疫病菌の発生分布並びに他の土壌伝染性病害が関与する可能性を調査した。平成 25, 26 年に県南部を中心に 57 圃場において生育不良のアスパラガス株から 茎, 地下茎および根のいずれかあるいはすべてを採取した。採取からほぼ 2 週間以内に, 茎の病斑部, 貯蔵根, 吸収根および地下茎のいずれかの褐変部の組織をとり, DNeasy Plant Mini Kit によって DNA を抽出した。これを鋳型として, 予め設計した *Phytophthora* 属特異的プライマーを用いて PCR を行った (表 1, 戸田ら, 2015)。PCR に用いた試薬は特異的プライマーのほか, AmpliTaqGold DNA polymerase with GeneAmp 10 X PCR Buffer (Applied Biosystems 社製), GenAmp dNTP MIX (Applied Biosystems 社製) および牛血清アルブミンとし, これらを AmpliTaqGold DNA polymerase のプロトコールを参考にして混合した。PCR 条件は 95°C で 10 分間を 1 サイクル, 95°C で 1 分間, 55°C で 1 分間, 72°C で 2 分間を 35 サイクル, 72°C で 7 分間を 1 サイクルに設定した。PCR 後に 2%アガロースゲル電気泳動を行い, 増幅断片を検出した。*Phytophthora* sp. (アスパラガス株) の菌体から抽出した DNA を鋳型として同様に PCR と電気泳動を行い, これを参考にして同菌検出の有無を判断した。

調査の結果, 18 圃場で採取した株が陽性, 39 圃場の株が陰性であった (表 2, 3)。陽性株 (疑陽性を含む) が採取された圃場は県南の一行政区域内に限られていた (図 2)。このことから, 秋田県内における疫病菌の分布は現時点で限定的である可能性が示唆された。*Phytophthora* 属菌には生態的に宿主依存性が高い種が多い。このような菌は一般に腐生的

表 1 *Phytophthora* 属菌特異的プライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列
PhytF	CGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAG
PhytoLR	ATAGACTACAATTCGCCGCG

表 2 アスパラガス生育不良株からの疫病菌検出調査¹⁾ 結果 (秋田県)

サンプル No.	サンプル採取/受領日	検出結果 ²⁾		
		地下茎	根	茎
H25年				
1	7月	NT	+	+
2	7月	NT	+	+
3	9月	—	+	+
4	10月	NT	—	—
H26年				
5	5.23	NT	+	NT
6	5.23	NT	—	NT
7	6.16	NT	+	+
8	6.19	NT	+	—
9	6.23	NT	+	NT
10	6.23	NT	+	—
11	7.02	NT	—	NT
12	8/8	NT	+	—
13	8/8	NT	—	NT
14	8/8	NT	—	—
15	8/8	NT	—	—
16	8/8	NT	+	—
17	8/8	NT	—	—
18	8/8	NT	—	—
19	8/8	—	±	—
20	8/8	NT	±	—
21	8/8	NT	—	—
22	8/8	NT	±	—
23	8/8	NT	±	NT
24	8/8	NT	+	+
25	8/8	NT	NT	—
26	8/8	NT	NT	—
27	8/8	—	—	—
28	8/8	NT	—	—
29	8/8	NT	—	—
30	8/8	NT	—	—
31	8/8	NT	+	—
32	8/8	NT	+	—
33	8/8	NT	—	—
34	9/19	NT	NT	—
35	9/19	NT	NT	—
36	9/19	NT	—	—
37	9/19	NT	—	—
38	9/19	NT	—	—
39	9/19	NT	—	—
40	9/19	NT	—	—
41	9/19	+	NT	+
42	9/19	+	NT	±
43	9/19	—	NT	+
44	9/19	+	NT	+
45	9/19	—	NT	—
46	9/19	NT	±	—
47	9/19	—	NT	—
48	9/19	+	NT	—
49	9/19	+	+	NT
50	9/19	NT	NT	—
51	9/19	NT	NT	—
52	9/29	—	—	—
53	9/29	—	+	+
54	9/29	—	+	+
55	9/29	+	—	—
56	9/29	NT	NT	—
57	9/29	NT	NT	—
58	9/29	NT	NT	—
59	9/29	NT	NT	—
60	9/29	NT	NT	—
61	9/29	NT	NT	—
62	9/29	—	—	NT
63	9/29	NT	NT	—
64	9/29	NT	NT	+
65	9/29	NT	—	NT
66	12/2	—	—	—

1) 生育不良株を採取し, 病斑部から抽出した DNA を鋳型として疫病菌属特異的プライマーを用いた PCR 法によって解析した。

2) 結果の表示

+: シグナル強度 100 以上あるいは明確なバンド, ±: シグナル強度 100 未満あるいは薄いバンド, —: シグナル強度 100 未満あるいは薄いバンド, —: 陰性, NT: 未検査。

表3 秋田県アスパラガス圃場からの疫病菌検出調査¹⁾結果 (H25, 26年度)

地域	調査圃場数	陽性圃場数	陰性圃場数
県北	3	0	3
県中央	2	0	2
県南	52	18	34
計	57	18	39

1) 圃場内から生育不良株を採取し、主に地下茎を対象として、疫病菌属特異的プライマーを用いたPCR法によって解析した。

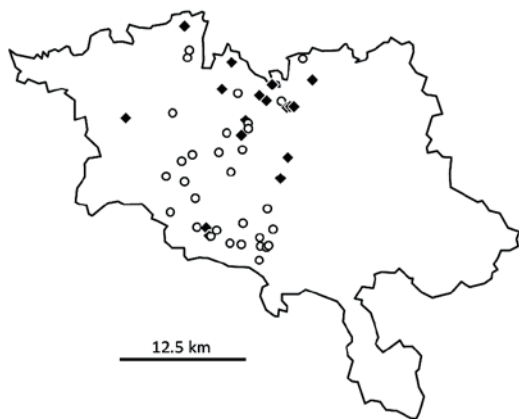


図2 疫病菌(遺伝子)検出調査によって陽性となったアスパラガスが採取された圃場分布(H25, 26年)

生存が困難で、宿主から離れて長く生存することができない。本菌がこの種の菌であれば分布を拡大させることが重要である。なお、本研究で用いた病原菌検出技術の実用的な感度と精度については調査を積み重ねてさらに検証する必要がある。

疫病菌検出検査で陰性であった一圃場で採取した株の地下茎から常法にしたがって *Fusarium* 属菌を分離したところ、*F. oxysporum* と *F. proliferatum* が分離された。簡易試験の結果、これらの一部はアスパラガスに病原性を有すると考えられた(五十嵐ら, 2015)。両者はそれぞれアスパラガスに立枯病と株腐病を起こす菌として知られている。さらに、疫病菌検出検査で陰性だった 34 圃場のサンプルから抽出した DNA を対象として ARISA 法(前出)によって糸状菌相を解析したところ、多くのサンプルからこれらの菌と思われるピークが検出された。これらのことから、本県では両病害も併せて発生している可能性が強く伺われた。これらの病害はアスパラガス生産に大きな影響があることから、今後さらに検証

する必要があると思われた。

謝辞

本研究は、秋田県病害虫防除所および地域振興局(平鹿地域振興局ほか)と連携、協力して実施された。また多くの、農業協同組合並びにアスパラガス生産者の協力を得た。記して謝意を表する。

文献

- 五十嵐裕平, 奈良知春, 藤井直哉, 福田秀樹, 戸田武, 藤 晋一, 古屋廣光(2015). 「秋田県のアスパラガスに発生する数種土壌病害について」. 第 68 回北日本病害虫研究発表会 山形市 H27 年 2 月 19, 20 日
- 児玉不二雄, 古屋廣光, 岡田貴, 園田高広, 河村倫希, 藤井直哉, 戸田武, 藤晋一(2014). 「*Phytophthora* sp. によるアスパラガス疫病の発生」. H26 年度日本植物病理学会, 札幌市, H26, 6 月 2-4 日.
- Kodama, F., Sonoda, T., Okada, Nara, C., T., Fujii, N., Kawamura, T., Igarashi, Y., Toda, T., Fuji, S., and Furuya, H. (2015). First report of blight disease of asparagus by *Phytophthora* sp. in Clade 6 in Japan. *Plant Disease*. (in printing)
- 戸田武, 奈良知春, 藤晋一, 古屋廣光(2014). 「属特異的プライマーを使用した Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) 法による *Phytophthora* 属菌の検出」. 環境微生物系学会合同大会, 浜松 10 月 22-24 日.

〔平成 27 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 27 年 7 月 31 日受理〕

First report of blight disease of asparagus caused by *Phytophthora* sp. in Clade 6 in Akita, Japan.

Hiromitsu Furuya¹, Naoya Fujii², Hideki Fukuda³, Chiharu Nara¹, Mitsue Shinoda²,
Takeshi Toda¹, Akira Sayama², Shin-ich Fuji¹, Takaaki Saito²

¹ Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

² Agricultural Experiment Station, Akita Prefecture

³ Hiraka Regional Office of Development, Akita Prefecture

A previously unreported disease(s) affecting asparagus (*Asparagus officinalis* L.) has appeared in southern Akita prefecture over the last decade. The disease caused severe damage, particularly in fields where asparagus plants were re-planted after 10 - 25 years of asparagus cultivation. A species of *Phytophthora* was detected using the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) technique, and the pathogen's signal was found in roots, crowns and/or stems of asparagus plants collected in 2013. The ARISA technique enables comprehensive detection of eukaryotic organisms, especially fungi, in environmental DNA samples. *Phytophthora* isolates, belonging to Stramenopiles (Heterokonta) and not to a fungal kingdom, were successfully obtained from the necrotic tissues of the field plants. Asparagus (var. *Welcome*) grown in soils artificially infested with these isolates showed symptoms similar to those found in the commercial fields, and the isolates were easily re-isolated from the diseased plants. Based on morphological and molecular characteristics, these isolates were identified as *Phytophthora* sp., which had not previously been reported as an asparagus pathogen. Asparagus plants showing restricted growth were collected from 57 commercial fields in 2013 and 2014. Polymerase chain reaction (PCR) using a genus *Phytophthora*-specific primer set was performed with DNA extracted from the necrotic tissues of the storage roots, feeder roots, crowns and stems of these plants. The *Phytophthora* signal was detected in asparagus plants collected in 18 fields. Because the pathogenic microorganism was detected only in a limited area of southern Akita prefecture, preventing the spread of the pathogenic microorganism is necessary to avoid further infections and crop damage.

Keywords: asparagus, *Phytophthora* taxon, detection, distribution.