

．参考資料編

1．発生生態

1) 一次伝染 (生態)

(1) 卵胞子の特徴

形状

タマネギベと病菌は、タマネギの組織内に卵胞子を形成する。蔵精器 (写真 12 実線矢印) は、蔵卵器 (写真 12 破線矢印) に付着して受精する。卵胞子は、蔵卵器の中に形成され (写真 12)、球形で厚膜を有し (写真 13)、直径は 30~50 μm 程度である。

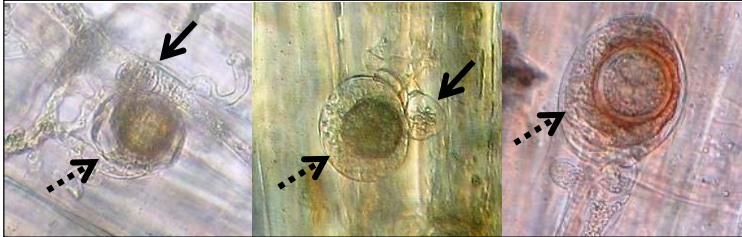


写真 12 タマネギ葉に形成中の卵胞子 (佐賀農業セ)

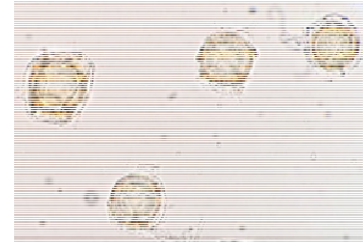


写真 13 タマネギ枯死葉から抽出した卵胞子 (佐賀農業セ)

形成部位

生育後期のタマネギにおいて、べと病罹病葉に卵胞子が形成され、これが翌年の本圃での一次伝染源となる (図 1)。これまで、卵胞子の形成は、苗床ではみられないとされてきた (高橋ら, 1958)。しかし、本プロジェクトにおいて、苗床でのタマネギ苗の罹病葉に、多数形成されている卵胞子が確認された (兵庫農総セ)。さらに、ポットに充填した人工培土に卵胞子を接種し、タマネギを播種・育苗したところ、幼苗が発病し、子葉~第 2 葉と根に、卵胞子が新たに形成された (写真 14)。

以上のことから、苗床の苗に形成された卵胞子は、定植時に本圃に持ち込まれるだけでなく、枯死葉や一部の根とともに、苗床にも残り、翌年の一次伝染源になると考えられる (図 1)。

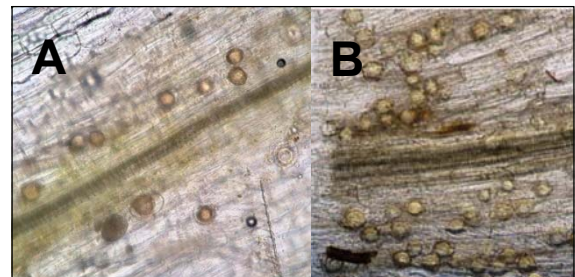


写真 14 タマネギ幼苗の第 1 葉 (A) と根 (B) に新たに形成された卵胞子 (佐賀農業セ)

生存期間

本プロジェクトにおいて、2018 年 5 月にタマネギ圃場からべと病によって枯死した葉を採取し、5 や 15 で乾燥保管したところ、枯死葉内に形成された卵胞子の生存率は、半年経過しても全く低下せず (図 18)、長期生存の可能が示された。

一方で、野外条件下では (土中や地表面)、これらの枯死葉内に形成された卵胞子の生存率は、春~秋にかけて大きく低下した (図 18、19)。乾燥保管では生存率が低下しない一方で、土中で保管した卵胞子の生存が約半年で大きく低下した点は、エンドウべと病菌卵胞子における生存率の推移 (Van der Gaag and Frinking, 1997a) とほぼ一致した。なお、タマネギべと病が多発生した圃場において、一年間タマネギを休作しても一次感染株はほとんど減少しなかったが、二年間休作した場合、激減した (「2. 対策, 1) 一次伝染, (1) タマネギ連作の回避」の項を参照)。これらのことから、野外での卵胞子の生存期間は、従来考えられていたものよりも概ね短い期間である可能性が考えられた。

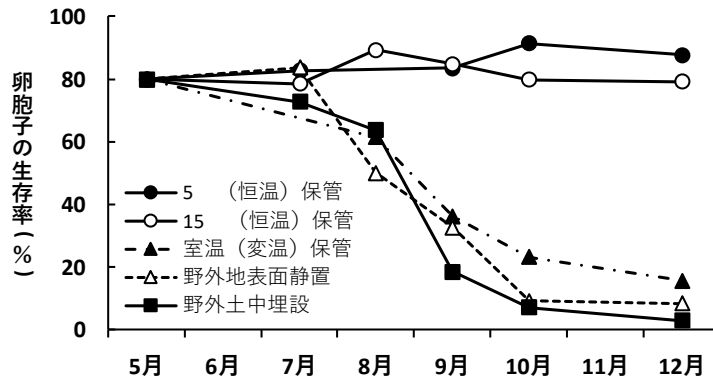


図 18 タマネギべと病菌の卵胞子の生存率の推移（2018 年、佐賀農業セ）
 注）各月のサンプルの調査日は異なる（例えば 9 月の調査日は 5 保管が 18 日、15 保管が 10 日）。NaCl 水溶液で原形質分離が誘導され、かつ、その後の蒸留水の処理によって原形質復帰した卵胞子の割合を、生存率とした。5 月の卵胞子抽出時だけ粉砕機を使用した。その後の実験で粉砕機によって生存率が約 20% 低下することが判明した。よって 5 月の生存率は、この点を考慮して補正した。なお 5 月は、室内保管区の調査しか行っていないが、これを各区共通の試験開始時の生存率とみなして図示した。

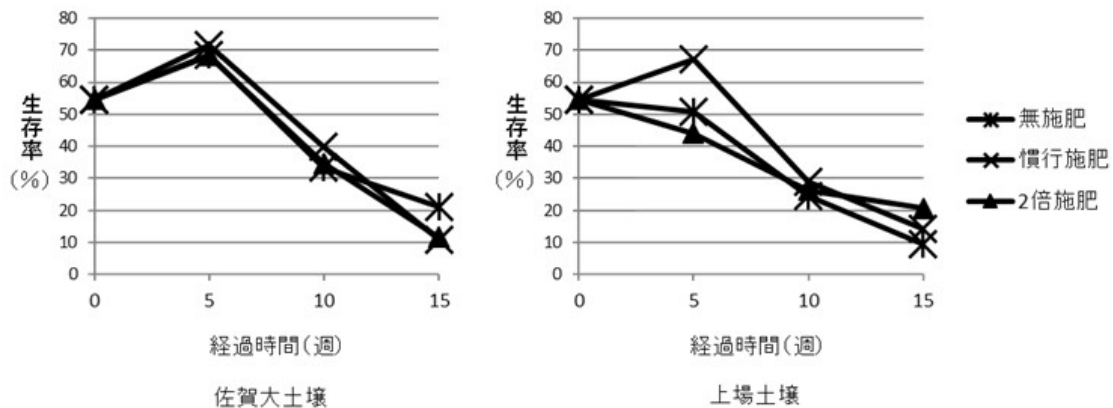


図 19 土壌条件の違いによる卵胞子生存率の変化（2018 年、佐賀大学）
 注）4M NaCl 中で原形質分離が観察された卵胞子の数から、水中で原形質分離が観察された卵胞子の数を引いたものを生存卵胞子数とした。卵胞子生存率 (%) は観察した卵胞子 300 個中の生存卵胞子数の割合。

感染能の獲得

Mckay (1957) は、タマネギべと病菌の卵胞子が感染能を獲得するには、4 年以上の成熟期間が必要としている。しかしながら、本プロジェクトにおいて、タマネギ圃場からべと病によって枯死した葉を 2017 年春期に採取し、タマネギ栽培歴がない別の圃場にすき込んだ。その圃場で秋からタマネギ栽培を開始したところ、初年目の栽培（2017 年冬期～2018 年春期）から一次感染株が発生することを確認した（佐賀大学、農研機構九沖農研、佐賀農業セ）。

また、2018 年 5 月 21 日に採取した「タマネギべと病によって枯死した葉」を野外の地表面付近に静置し（図 18 の ） 7 月 30 日に枯死葉から卵胞子を抽出した。さらに、ソルガムべと病菌卵胞子の発芽調査手法 (Pratt, 1978) を参考とし、卵胞子をメンブレンフィルターで挟み、カップの底付近の内面に貼り付けるとともに（接種）カップ内に人工培土を入れ、タマネギを播種し、15 恒温条件で管理した（試験 1）。その結果、8 月には卵胞子の発芽と考えられる現象を確認し（写真 15）、9 月にはカップ内で生育した本葉 1～2 葉期のタマネギ苗の一部で、べと病の発病を確認した（表 5、写真 16）。一方、卵胞子の無接種区では発病しなかった（表 5）。9 月には、前述の罹病残渣（図 18 の ）から取り出した卵胞子の抽出液をカップ内の底付近に灌注（接種）し、人工培土を充填してタマネギを播種し、15 恒温条件で管理した（試験 2）。その結果、11 月にはカップ内で生育したタマネギ苗の一部で発病を確認した（表 5、写真 17）。

これらの野外観察や室内試験の結果から、春期に野外で形成されたタマネギべと病菌卵胞子は、秋期にかけて生存率が大きく低下する一方で（図 18）、一部は夏期～秋期に感染能力を有した状態で（表

5) 当年の内に一次伝染源になると考えられた。

なお、Mckay (1957) や本プロジェクトでは、野外の自然条件下で保管したタマネギベと病罹病残渣から卵胞子を抽出し、発芽試験や接種試験に用いた。Van der Gaag and Frinking (1997b) は、エンドウベと病菌卵胞子において、実験室で保管した乾燥葉上の卵胞子は発芽せず、野外の自然条件下で保管した卵胞子が発芽することを確認している。そのうえで、卵胞子が発芽および感染能力を獲得するには、一定期間の自然風化(暴露)が必要であると考察している。

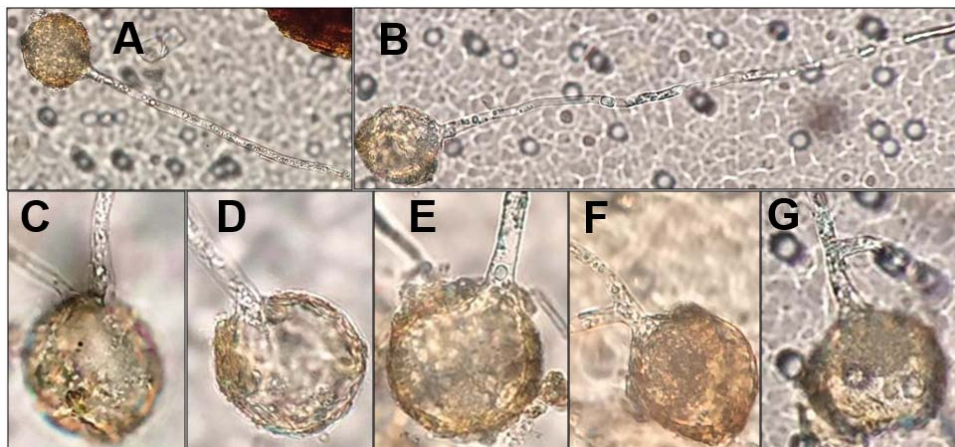


写真 15 タマネギベと病菌卵胞子の発芽と考えられる現象 (2018 年、佐賀農業セ)

注) A, B, G に小さく丸く写っているものは、メンブレンフィルターに空いている 8 μ m 径の円筒状孔。

表5 タマネギベと病菌卵胞子の土壌接種とタマネギ苗の発病(2018年、佐賀農業セ)

試験	卵胞子の抽出		卵胞子の土壌接種			タマネギ播種・管理 (15°C)	卵胞子の発芽	苗の発病
	タマネギ枯死葉の管理 ^{注1)}	枯死葉からの抽出	接種日	方法	位置			
試験1 (接種あり)	5/21~7/30 野外の地表面	7/30	7/30	メンブレンフィルター ^{注2)}	地表面下1~2cm	7/30~	○ ^{注4)} (8/18)	○ ^{注5)} (9/18)
試験1 (接種なし)	—	—	接種なし	—	—	7/30~	—	×
試験2 (接種あり)	5/21~9/26 野外の地表面	9/26	9/26	灌注 ^{注3)}	地表面下4cm	9/26~	未調査	○ ^{注6)} (11/5)

注1) 5/21に、タマネギ圃場からべと病で枯死した葉を採取し、野外地表面に静置(図18の△に対応している)。注2) メンブレンフィルターで挟み、土壌中に接種。注3) 卵胞子抽出液を灌注。注4) 回収したメンブレンフィルターに残存していた卵胞子を調査し、発芽と考えられる現象を確認(写真15)。注5) 写真16参照。注6) 写真17参照。

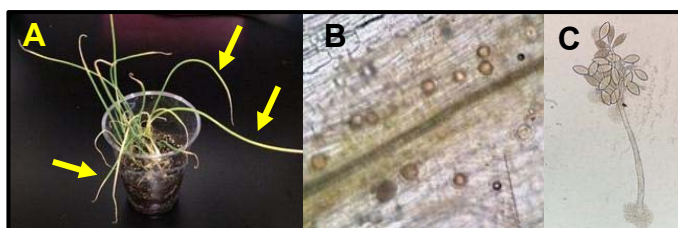


写真 16 試験 1 (表 5) の発病株 (2018 年 9 月、佐賀農業セ)
A: 発病株 (9/18)。B: 発病株に形成された卵胞子 (9/18)。
C: 発病株を高湿度条件で一晩管理し、形成された分生胞子 (9/21)。

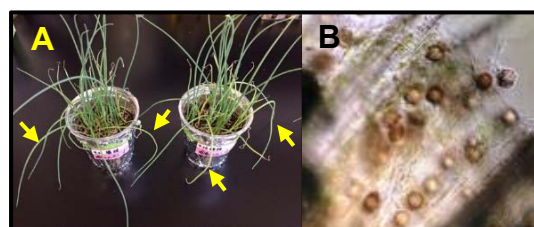


写真 17 試験 2 (表 5) の発病株 (2018 年 11 月、佐賀農業セ)
A: 発病株 (11/5)。B: 発病株に形成された卵胞子 (11/5)。

感染・発病条件

Mckay (1957) はタマネギベと病菌卵胞子の発芽を 2~20 で確認し、発芽適温は 20 であるとしている。一方、高橋ら (1958) は、卵胞子の発芽は、8~12 では確認できず、20~25、30~34 で

は相当発芽することを確認している。このように、本病菌の卵胞子の発芽適温は、必ずしも明確にされていない。さらに、卵胞子による感染・発病適温については、報告事例がないようである。

このような中、本プロジェクトでは、タマネギ播種時（または播種後）に卵胞子を土壌接種し、各恒温条件下で管理した。その結果、卵胞子による感染・発病は 10～20 前後で起こり、その適温は 15 前後であると考えられた（表 6）。

この結果は、本病菌の分生胞子による感染・発病適温（10～20 前後）と類似していた。ちなみに、他の卵菌類においても、「分生胞子と卵胞子」の発芽適温の類似性が示唆される報告がある。すなわち、*Peronospora viciae* の場合、分生胞子 1～24 で発芽し、その適温は 4～8（Pegg and Mence, 1970）であり、卵胞子は 5～20 で発芽し、その適温は 5～10（Van der Gaag and Frinking, 1997c）である。また、*Peronospora parasitica* の場合、分生胞子は 5～30 で発芽し、その適温は 20（Achar, 1998; Mehta et al., 1995; Singh, 1997）であり、卵胞子は 13～30 で発芽し、その適温は 23（Jang and Safeulla, 1990）である。

表6 各温度条件におけるタマネギべと病菌卵胞子の土壌接種とタマネギ苗の発病^{注1)}
(2018～2019年、佐賀農業セ)

温度 ^{注2)}	発病の有無 ^{注3)} (発病株数)					
	試験1	試験2 (2反復計)	試験3 (2反復計)	試験4 (2反復計)	試験5 (2反復計)	試験6 (2反復計)
5°C	×	×	×	—	—	—
8°C	—	—	—	×	×	○
10°C	○	○	○	—	—	—
13°C	—	—	—	○	○	×
15°C	○	○	○	—	—	—
18°C	—	—	—	○	○	○
20°C	○	○	○	—	—	—
23°C	—	—	—	○	×	×
25°C	×	×	×	—	—	—

注1) 試験1、2、4、6は、カップ内の人工培土に卵胞子を接種し、その直後にタマネギを播種し、各温度で育苗した。試験3、5は人工培土を入れたカップにタマネギを播種し、約20日間、育苗した後、注射器を用いて、カップの側面から卵胞子抽出液を土壌に接種し、各温度で育苗した。各試験区(各カップ)には、タマネギを約20粒播種(2反復の場合、計約40粒播種)。試験1～6の卵胞子接種日は、それぞれ、10/29、11/13、12/6、12/17、1/7、1/22。試験1、2の調査は3/25に終了、試験3～6は4/24に終了。各区の生育苗数および発病苗数のデータは省略。

注2) 人工気象器の設定温度。各カップ内の地表面付近、底付近の温度を測定したところ、概ね、「設定温度±1°C」であった(データ略)。

注3) ○: 発病有、×: 発病無、—: 試験を実施していない。葉の黄化等の異常症状を示し、かつ、組織内に新たな卵胞子の形成を確認した株を発病株とした。発病調査は随時行い、表中には、各区における、発病株の発生有無を示した。ちなみに、10°C、13°C、15°Cの発病株の一部を、15°C高湿度条件下で、一晚管理したところ、翌朝、べと病菌の分生胞子を形成した(写真データ略)。なお、試験3(15°C)、試験4(18°C)、試験5(18°C)、試験6(18°C)では、対照として卵胞子無接種区を設置したが、これらの試験区では、全く発病が認められなかった。

(2) 苗床感染

発病時期

タマネギべと病は、前述のとおり、苗床に残存する卵胞子によって一次伝染する(図 1)。しかし、発病時期の詳細、育苗期間と発病との関係等の実態は不明であった。そこで、本プロジェクトにおいて、べと病に罹病した収穫残渣を苗床予定地にすき込み、育苗日数を変えて、本圃に定植し(図 20)、苗床感染による発病状況を調査した。

苗床で感染した株(一次感染株)は、年内に苗床で発病することがまれにある。しかし、多くの場合は、定植後に年を越してから発病するため、「越年罹病株」とも呼ばれる。本試験においても、タマネギべと病菌が苗床で感染し、翌年の2月以降に本圃で発病することを実証した(図 21 と の

比較)。また、60日育苗（適期定植）より、78日育苗（定植の遅れ）の方が、翌年2月以降の発病が多かった（図21 と の比較）。

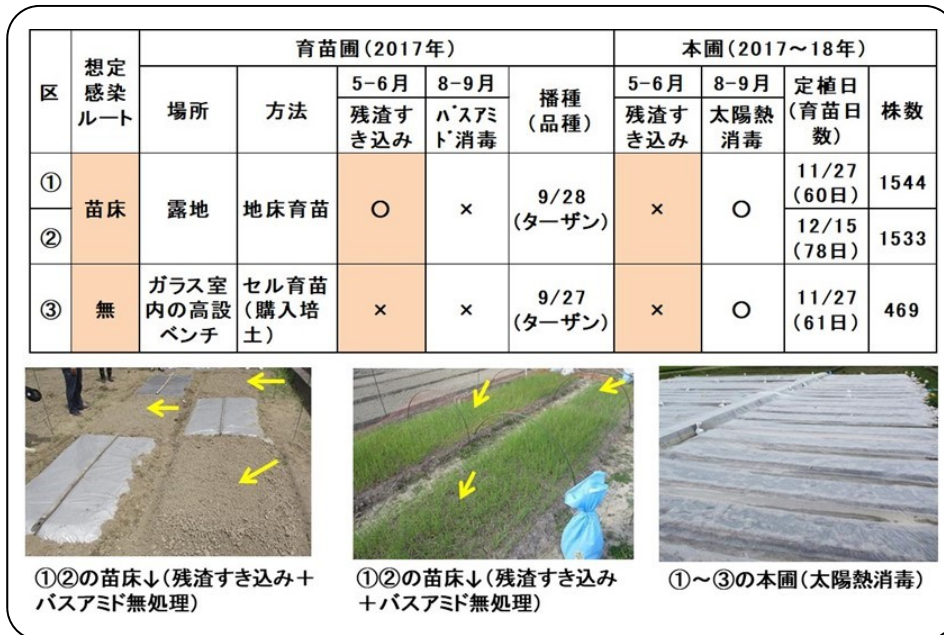


図20 苗床での感染を実証するための試験の概要（佐賀農業セ）

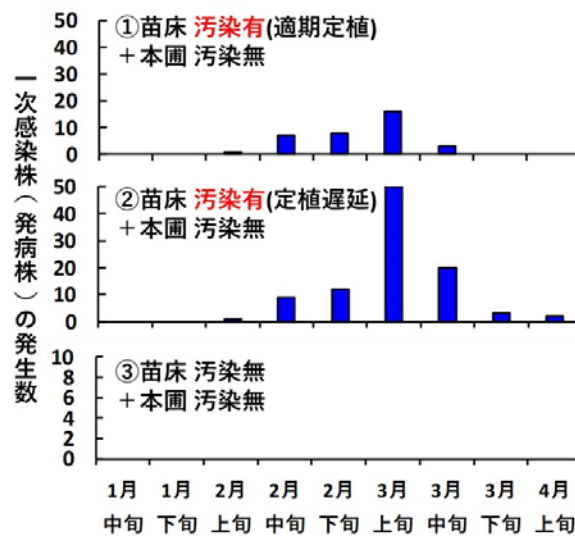


図21 苗床で一次感染し、本圃で発病した株の消長（2018年、佐賀農業セ）
注）原則として2~3日に1回、全株調査を行った。発見した発病株は、その都度抜き取り、圃場外に持ち出した。また、これらの株の一部は、分生胞子の形態観察と、べと病菌特異的PCRによる検出を行い、本症状がタマネギべと病菌（*Peronospora destructor*）によることを確認した。発病株数は、旬ごとに集計した値を図示した。

発病株の特徴

苗床で感染した一次感染株（発病株）は、感染・発病部位の特徴から「全身感染株」とも呼ばれる。これらの株の発病部位には、一定の規則性があることが知られているが（出水，1963）本プロジェクトで、その詳細を調べた。その結果、調査株の孢子形成分布には、共通した特徴がみられた（代表例を図22、23に示す）。すわなち、下位葉では葉の「基部付近」、中位葉では「基部と葉先の間付近」、上位葉では「葉先付近」での孢子形成が顕著であった。

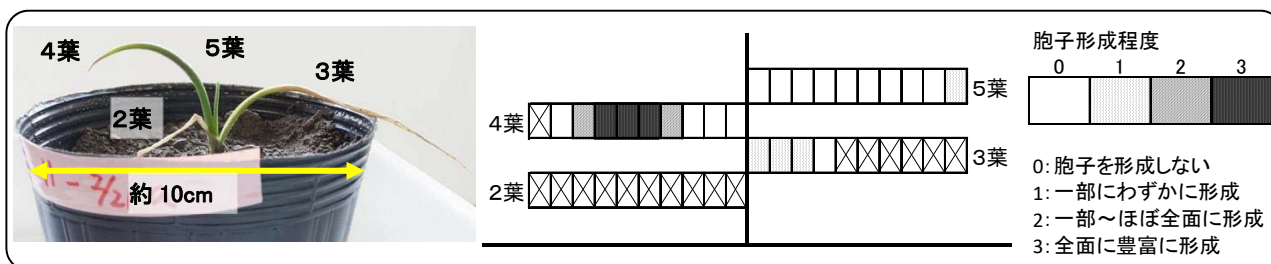


図 22 苗床で感染して本圃で発病を確認した株の葉位別に見た胞子形成程度その 1 (佐賀農業セ)
 2017 年 11 月 27 日定植 (ターザン、無マルチ)。圃場での発病を確認した 2018 年 2 月 21 日に、株を採取してポットに植替え、2 月 21 ~ 22 日に高湿度条件下で管理。2 月 22 日に、形成された分生胞子の形成程度を調査した (写真および図)。

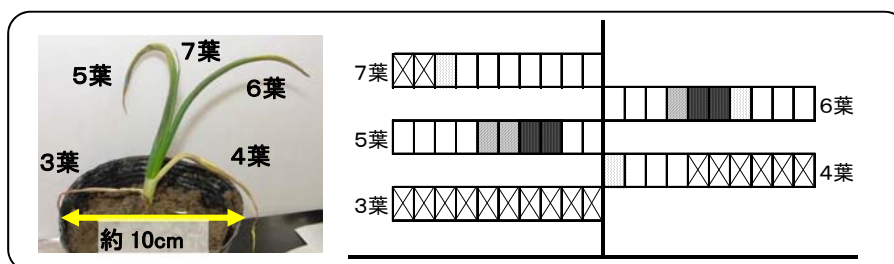


図 23 苗床で感染して本圃で発病を確認した株の葉位別に見た胞子形成程度その 2 (佐賀農業セ)
 2017 年 11 月 27 日定植 (ターザン、無マルチ)。圃場での発病を確認した 2018 年 3 月 6 日に、株を採取してポットに植替え、3 月 8 ~ 9 日に高湿度条件下で管理。3 月 9 日に、形成された分生胞子の形成程度を調査した (写真および図)。胞子形成程度の基準は図 22 を参照。

感染時期の推定

苗床での発病は、苗床での生育末期に近づいてから起こるとされている (出水, 1963)。前述の苗床を汚染させた野外試験では (図 20、21) 60 日育苗区よりも 78 日育苗区の方が、定植後の発病が多かった。これは、78 日育苗区の育苗期間が長く、苗床感染のリスクが高かったためと考えられる。また、育苗前半 (9 月下旬 ~ 10 月上旬) の気温は、卵胞子の感染・発病適温より高いと考えられ (図 2、表 6)、この点も、育苗期間の延長と感染リスクとの関係に関連している可能性がある。

(3) 本圃感染

発病時期


タマネギべと病の一次伝染は、苗床だけでなく、定植後の本圃でも起こると考えられてきた。しかし、その科学的根拠は、過去に行われた小規模なポット試験のみで (塩飽・松尾, 1972) 実態について不明な点が多かった。そこで、本プロジェクトにおいて、べと病に罹病した収穫残渣を本圃予定地にすき込み、健全苗を定植し、発病状況を調査した (図 24)。また、西日本のタマネギ栽培においては、極早生、早生品種はマルチ栽培、中晩生品種は無マルチ栽培が主体であり、本圃でのマルチ被覆の有無が一次伝染の発生に及ぼす影響も調べた (図 24)。

本圃で感染する一次感染株も、苗床感染株と同様に、発病時期の特徴から「越年罹病株」とも呼ばれる。今回の試験においても、健全苗を 11 月に汚染区に定植したところ、翌年 1 ~ 3 月に一次感染株が発生した。一方で、べと病残渣をすき込まない対照区では、一次感染株は全く発生しなかった (図 25 と の比較)。また、汚染区では、本圃でのマルチ被覆の有無にかかわらず、一次感染株が発生した (図 25 と の比較)。なお、2015 ~ 16 年、16 ~ 17 年に行った試験でも同様の結果が得られた (データ略)。


以上のことから、本病の第一次伝染は、定植前の苗床だけでなく、定植後の本圃においても、マル

チ被覆有無にかかわらず起こることが明らかになった。

区	想定感染ルート	育苗圃(2017年)			本圃(2017~18年)				
		場所	方法	播種(品種)	5-6月	8-9月	11月	定植日	株数
					残渣すき込み	太陽熱消毒	マルチ被覆		
①	本圃	ガラス室内の高設ベンチ	セル育苗(購入培土)	9/22(七宝早生7号)	○	×	マルチ	11/21	454
②				9/22(七宝早生7号)			露地	11/21	492
③				9/27(ターザン)			露地	11/27	492
④	無			9/22(七宝早生7号)	×	○	露地	11/21	401
⑤				9/27(ターザン)			露地	11/27	469



①~⑤の苗床(高設ベンチ育苗、購入培土)



①~③の本圃(5~6月に66株/m²のタマネギペと病残渣を処理。その後、すき込み。)

図24 本圃での感染を実証するための試験の概要(佐賀農業セ)

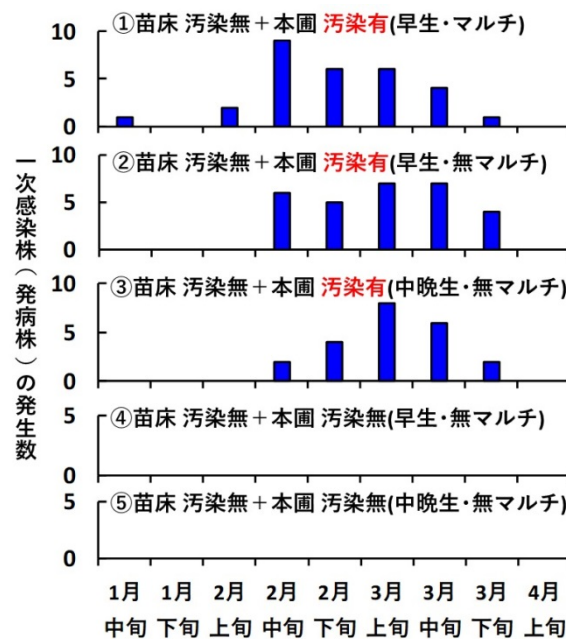


図25 本圃で一次感染し、その後発病した株の消長(2018年、佐賀農業セ)
 注)原則として2~3日に1回、全株調査を行った。発見した発病株は、その都度抜き取り、圃場外に持ち出した。また、これらの株の一部は、分生胞子の形態観察と、ペと病菌特異的PCRによる検出を行い、本症状がタマネギペと病菌(*Peronospora destructor*)によることを確認した。発病株数は、旬ごとに集計した値を図示した。

発病株の特徴

本圃で感染する一次感染株は、苗床感染株と同様に、感染・発病部位の特徴から「全身感染株」とも呼ばれ、また、株内の孢子形成に規則性がある(図26、27)。なお、一次感染株(越年罹病株)の生育はほとんど停止する一方で、健全株は4月頃から急激に発育するので、両者に顕著な生育差がみられるとされている(出水, 1963)。しかしながら、今回の調査では、タマネギの生育後期に、周辺

の健全株と同程度の生育量で、全身感染症状に至る株がみられた（図 27、写真 18A）。このような株は孢子形成量が多く、二次伝染源として、特に注意が必要である。

また、一次感染株は、発病葉が湾曲する（噴水状に反り返る）場合が多い（図 26、写真 18B）。しかし、株によっては発病葉が反り返らずに「垂れ下がる症状」を示す場合がある（写真 18C）。

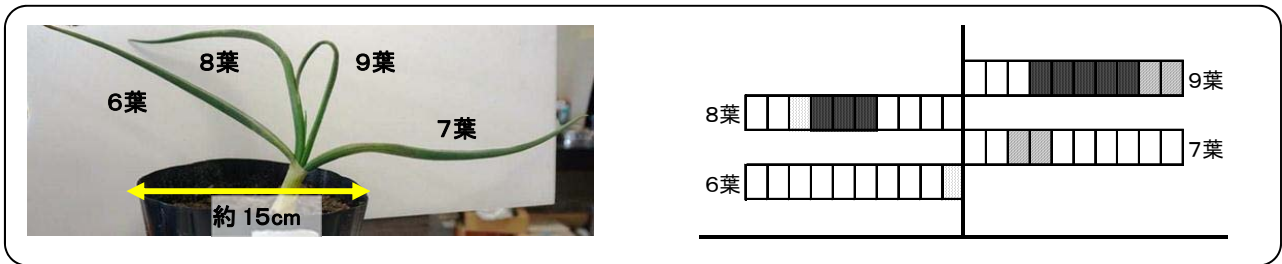


図 26 本圃感染し、その後発病を確認した株の葉位別に見た孢子形成程度その 1（佐賀農業セ）
2016 年 11 月 22 日定植（七宝早生 7 号、無マルチ）。圃場での発病を確認した 2017 年 3 月 19 日に、株を採取してポットに植替え、4 月 20～21 日に高湿度条件下で管理。2017 年 3 月 21 日に、形成された分生孢子の形成程度を調査した（写真および図）。孢子形成程度の基準は図 22 を参照。

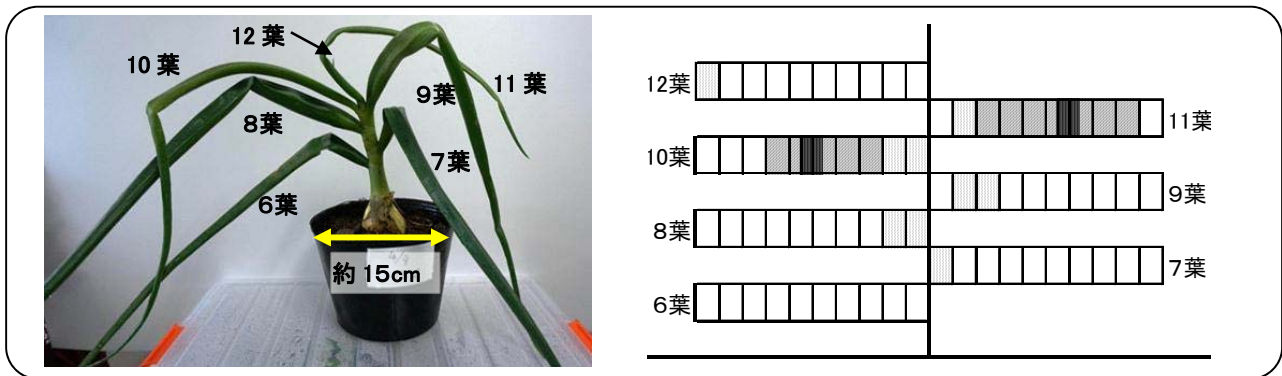


図 27 本圃感染し、その後発病を確認した株の葉位別に見た孢子形成程度その 2（佐賀農業セ）
2016 年 11 月 22 日定植（七宝早生 7 号、マルチ）。圃場での発病を確認した 2017 年 4 月 9 日に、株を採取してポットに植替え、4 月 10～11 日に高湿度条件下で管理。2017 年 4 月 11 日に、形成された分生孢子の形成程度を調査した（写真および図）。孢子形成程度の基準は図 22 を参照。

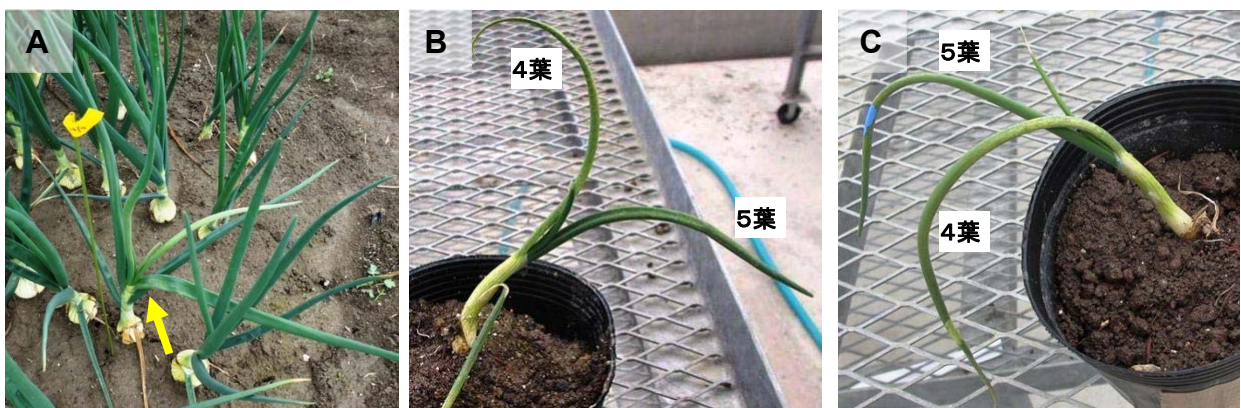


写真 18 本圃でタマネギベと病菌に感染し、本圃で発病した株（佐賀農業セ）
A：2016 年 11 月 22 日定植（七宝早生 7 号、無マルチ）。2017 年 4 月 9 日撮影。
B：2017 年 11 月 21 日定植（七宝早生 7 号、無マルチ）。C：2017 年 11 月 21 日定植（七宝早生 7 号、マルチ）。
注）B と C は、圃場で発病を確認後、ポットに植え替えて撮影（2018 年 2 月 16 日）。

感染時期の推定

本圃感染の時期は、苗の定植後であるが、その詳細は不明であった。そこで本プロジェクトにおいて、苗の定植時期と一次伝染による全身発病株との関係を調べた。その結果、「11 月下旬～12 月上旬

定植」「12月中旬～下旬定植」「1月上旬～中旬定植」の順に、発病時期が早く、発病株数も多かった。また、「1月上旬～中旬定植」の発病株は極わずかであり、「2月上～中旬定植」では、発病は確認されなかった（佐賀上場営農セ、データ略）。

また、前述のとおり、卵胞子による感染・発病適温は10～20 と考えられ（表6）、1～2月の気温は、これを下回る場合が多い（図2）。以上のことから、タマネギべと病の本圃感染（一次感染）は、主に11～12月頃に起こると考えられた。

（4）診断・実験法

卵胞子の抽出と生死判別

a) 卵胞子の抽出法

【葉からの抽出法】

タマネギべと病の一次伝染の生態解明を進めるうえでは、卵胞子を安定的に確保する必要がある。しかし、本病菌は絶対寄生菌であることから、培地上での培養によって卵胞子を形成させることができない。罹病葉に形成された卵胞子を抽出し、試験に用いる必要がある。本プロジェクトでは、エンドウの葉および莢からべと病菌卵胞子を抽出する方法（Van der Gaag and Frinking, 1996）の一部を改変し、タマネギ罹病葉から卵胞子を安定的に抽出する手法を確立した（図28）。本法では、植物組織を破碎して卵胞子を遊離させるために、ミルサーおよび超音波破碎、Cellulase による細胞壁分解等の処理を行い、純度が高い卵胞子抽出液を得ることができる。

また、本法ほど純度は高くないものの（抽出液に植物組織が混じる）、簡易的な方法でも卵胞子の抽出が可能である（図29、写真19）。抽出される卵胞子の数は、植物組織内の卵胞子の形成程度によって大きく変動する。しかし、罹病葉の一部を事前に顕微鏡観察し、卵胞子の形成を確認したサンプルを供試することで、両抽出法ともに、罹病組織2gから 1×10^5 個以上の卵胞子を得ることが期待できる。

1. 乾燥重2g～4gの罹病葉を水道水で洗浄
2. 罹病葉を4の蒸留水130mLに氷20mLを加えた中に入れる
3. ミルサー破碎（5分）^{注1）}
4. 破碎液を200mLビーカーに移す
5. 破碎液を10になるまで氷で冷やす
6. 氷中にビーカーを入れて超音波破碎（10分, Out put power: 0.03W）^{注2）}
7. 破碎液を目開き75 μ mの篩で濾過し、濾過液を回収
8. 濾過液を目開き20 μ mの篩で濾過し、篩上の残渣を蒸留水に懸濁して回収^{注3）}
9. 残渣懸濁液を50mL遠心管に入れ、遠心分離（2000g, 3分）
10. 上清を捨てて、沈殿を回収
11. 滅菌蒸留水40mLに沈殿を懸濁し、遠心分離（2000g, 3分）
12. 上清を捨てて、沈殿を回収
13. 11-12の遠心洗浄を1回繰り返す
14. 沈殿を滅菌蒸留水10mLに懸濁し、Cellulase液（4mg/mL, Onozuka R-10, 0.1M 酢酸ナトリウム pH 4.6）10mLと混合
15. 20で2時間培養し、罹病葉に由来する残渣を分解する
16. 遠心分離（2000g, 3分）し、上清を捨てて、沈殿を回収
17. 11-12の遠心洗浄を4回繰り返す
18. 沈殿を滅菌蒸留水5mLに懸濁 **卵胞子の抽出完了**
19. 抽出液2 μ L中の卵胞子数を3回計数し、平均値から卵胞子濃度を算出する^{注4）}

注1：破碎時の加熱を防ぐため途中1分間の破碎を休止し、破碎液を氷中で冷やす。

注2：超音波破碎（5-6）は省略可能。

注3：残渣を蒸留水で洗い流してビーカー等を集める。

注4：滴下した液中の全数を数えやすくするため、カバーグラスを使用しない。

図28 ベと病罹病タマネギ葉からの卵胞子の抽出法（佐賀大学）

- 罹病葉（乾燥重 2g）をビニル袋に入れ、袋ごと手で揉み砕く
- 砕いた葉をピーカーに移し、蒸留水を加え 10 分間浸漬する
- 柔らかくなった葉を、目開き 250 μ m の篩に強く擦りつけながら蒸留水で洗い流し、懸濁液（累計約 1,000 mL）を回収する（篩上に残った植物繊維は処分）
- 懸濁液を目開き 75 μ m の篩で濾過し、蒸留水で洗い流しながら濾過液を回収する
- 濾過液を目開き 20 μ m の篩で濾過し、蒸留水で洗いながら篩上の残渣を回収する
- 4-5 の工程を 3 回繰り返す、最終的に目開き 20 μ m の篩上の残渣を、蒸留水とともに 15~20 mL 回収する **卵胞子の抽出（粗抽出）完了**
- 粗抽出液（例えば 10 μ L）の卵胞子数を複数回計数し、卵胞子濃度を算出する



写真 19 卵胞子の篩抽出
左側の 75 μ m 篩は通過し、右側の 20 μ m 篩上に残る（佐賀農業セ）。

図 29 ベと病罹病タマネギ葉からの卵胞子の簡易抽出法（佐賀農業セ）

【葉からの抽出に当たっての留意事項】

Van der Gaag and Frinking (1996) は、エンドウの葉と莢からの卵胞子の抽出に当たって、ミルサー（Waring blender）破碎、超音波破碎、Cellulase 処理、遠心分離を行い、～ は卵胞子の発芽に影響を与えないとしているが、～ の与える影響については報告していない。そこで、本プロジェクトにおいて、ミルサー、超音波および人力破碎（写真 20）の影響を調べたところ、ミルサー処理によって卵胞子の生存率が、やや低下した（表 7）。よって、卵胞子を抽出する目的によっては（生存率を正確に把握する等）、抽出時の葉の破碎工程を人力で行う等の工夫が必要と考えられる。

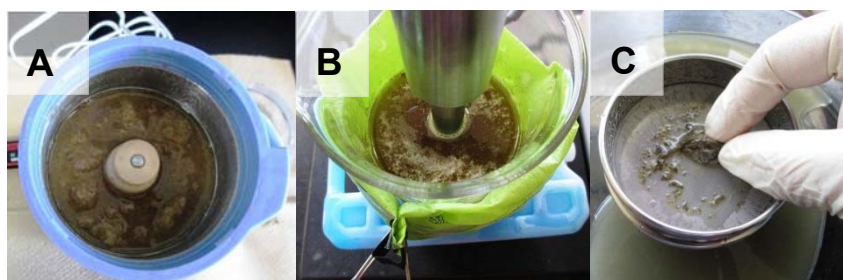


写真 20 タマネギ葉の粉碎手段（佐賀農業セ）

A:ミルサー破碎（図 28 の工程 3）、B:超音波破碎（図 28 の工程 6）、
C:人力による破碎（図 29 の工程 3）。

表 7 タマネギべと病の罹病葉から抽出した卵胞子の生存率(2018年、佐賀農業セ)

試験	タマネギ葉の保管		卵胞子抽出日	タマネギ葉の粉碎手段			卵胞子の生死判定		
	場所	温度		ミルサー	超音波	人力	卵胞子数(個)		生存率 (%) ^{注1)}
							調査対象	原形質分離 + 原形質復帰	
1	恒温室	5 $^{\circ}$ C	7/6	×	×	○	115	95	82.6 a
			7/4	○	×	×	77	50	64.9 b
			7/9	○	○	×	187	100	53.5 b
2	恒温室	15 $^{\circ}$ C	7/26	×	×	○	139	109	78.4 a
			7/24	○	×	×	109	63	57.8 b
			7/23	○	○	×	122	64	52.5 b
3	室内	室温(空調設備無し)	8/3	×	×	○	174	107	61.5 a
			8/2	○	×	×	179	71	39.7 b
			8/2	○	○	×	139	60	43.2 b
4	室内	室温(空調設備無し)	10/15	×	×	○	117	27	23.1 a
			10/16	○	×	×	109	6	5.5 b
			10/16	○	○	×	107	6	5.6 b

注1)同じ添え字(アルファベット)は、多試料 χ^2 検定と角変換の後、Tukey-typeの多重比較(Zar, 1999)によって、5%水準で有意差がないことを示す。

【土壌からの抽出と菌密度の推定（直接検鏡法）】

タマネギベと病の一次伝染の生態解明や土壌のリスク評価を進めるためには、土壌から卵胞子を抽出する手法の確立が欠かせない。本プロジェクトでは、Van der Gaag and Frinking (1997d)の方法を一部改変し、タマネギベと病菌汚染土壌から卵胞子を抽出する手法を確立した(図 30、31)。抽出の原理は、基本的には植物組織からの場合と同じであり、ミルサー・超音波破碎により土壌粒子からの卵胞子を遊離させ、さらに篩による抽出、遠心分離による精製を行う。ただし、土壌からの抽出にはシヨ糖中での遠心分離が加えられており、これが土壌粒子の除去に重要となっている。これらの工程によって、純度が高い卵胞子抽出液を得ることができる(写真 21)。

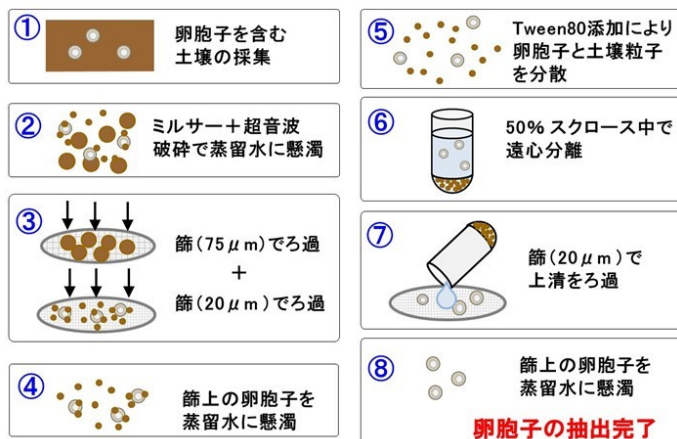


図 30 土壌からの卵胞子抽出のイメージ図（佐賀大学）

また、本法ほど純度は高くないものの、簡易的な方法でも卵胞子の抽出が可能である(図 32、写真 22)。

1. 4 の蒸留水 130mL に氷 20mL を加え、その中に土 10~20g を懸濁
 2. ミルサー粉碎 (2分)
 3. 破碎液を 200mL ビーカーに移す
 4. 破碎液を 10℃ になるまで氷で冷やす
 5. 水中にビーカーを入れて超音波破碎 (10分, Out put power: 0.03W) 注1)
 6. 破碎液を目開き 75µm の篩で濾過し、濾過液を回収
 7. 濾過液を目開き 20µm の篩で濾過し、篩上の残渣を蒸留水に懸濁して回収 注2)
 8. 残渣懸濁液を 50mL 遠心管に入れ、遠心分離 (2000 g, 3分)
 9. 上清を捨て、沈殿を 12mL の蒸留水に懸濁
 10. 1% Tween80(V/V)を 80µL 添加して混合
 11. 70% sucrose 液(W/V)を 30mL 添加して混合 (最終濃度 50%)
 12. 遠心分離(1,000 g, 3分)し、上清をビーカー等に回収
 13. 回収上清を目開き 20µm の篩で濾す
 14. 篩に残った残渣に滅菌蒸留水を注ぎ洗浄
 15. 篩上の残渣を滅菌蒸留水に懸濁して回収 注3)
 16. 遠心分離(2,000 g, 3分)し、上清を捨てて、沈殿を回収 注4)
 17. 沈殿を滅菌蒸留水 2mL に懸濁 **卵胞子の抽出完了**
 18. 懸濁液 2µL 中の卵胞子数を 3 回計数し、平均値から卵胞子濃度を算出する 注5)
- 注 1: 超音波破碎 (4-5) は省略可能
 注 2: 残渣を蒸留水で洗い流してビーカー等に集める
 注 3: 注 2 と同じ作業を行うが、ここでは必ず滅菌蒸留水を使う
 注 4: 細菌の混入が気になる場合は、遠心洗浄 (2000 g, 3分) を 2~3 回行う
 注 5: 滴下した液中の全数を数えやすくするため、カバーグラスを使用しない

図 31 土壌からのタマネギベと病菌卵胞子の抽出法（佐賀大学）

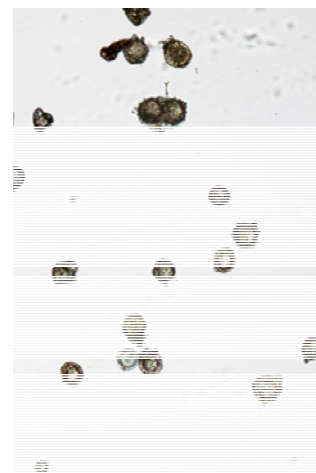


写真 21 土壌から抽出した卵胞子（佐賀大学）

1. 細かく砕いた土 10g をビーカーに入れ、蒸留水を加えて懸濁し、10 分間静置する
2. 土（懸濁液）を、目開き 250 μ m の篩に擦りつけながら蒸留水で洗い流し、篩を通過した懸濁液（累計約 3,000 mL）を回収する（写真 22A）
3. 懸濁液を目開き 75 μ m の篩で濾過し、蒸留水で洗い流しながら濾過液を回収する（写真 22B）
4. 濾過液を目開き 20 μ m の篩で濾過し、篩上の残渣を回収する（3-4 の工程を 3 回繰り返す）（写真 22C）
5. 最終的に目開き 20 μ m の篩上の残渣を、62.5% sucrose 液^{注1}とともに遠心管へ 35ml 回収し^{注2}、1% Tween80 を 80 μ L 添加する（写真 22D, E, F）
6. 遠心分離後（600g, 3 分）、上清を目開き 20 μ m の篩で、蒸留水で洗いながら濾す（写真 22G, H, I, J）
7. 沈殿物が残った遠心管に 62.5% Sucrose 液を加え、6 の工程を繰り返す（1 回目と 2 回目に濾した残渣をまとめ、工程 8 に使用する）^{注3}
8. 篩上の残渣を、蒸留水とともに遠心管へ 15~20 mL 回収する（写真 22K, L）
9. 遠心分離後（1200g, 3 分）、沈殿物を中心に 2 mL 回収する（写真 22M, N） **卵胞子の抽出完了**
10. 抽出液（例えば 10 μ L）の卵胞子数を複数回計数し、卵胞子濃度を算出する

注 1：62.5% Sucrose 液とは蒸留水 9 mL に sucrose 15g の割合で湯煎にかけて溶かしたもの（工程 5 と 7 における土壌が、1~2 g であると仮定した場合、sucrose 濃度は約 60% となる）
 注 2：残渣は、葉さじで遠心管に移すと同時に、62.5% sucrose 液で洗い流して回収する
 注 3：卵胞子の抽出効率はや低下するが、工程 7 は省略してもよい

図 32 土壌からのタマネギベと病菌卵胞子の簡易抽出法（佐賀農業セ）



写真 22 卵胞子の簡易抽出の工程（佐賀農業セ）

A: 土（懸濁液）を、目開き 250 μ m の篩に擦りつける。B: 懸濁液を目開き 75 μ m の篩で濾過。C: 濾過液を目開き 20 μ m の篩で濾過。D: 20 μ m の篩上の残渣を、小さじを使って回収。E~F: 20 μ m の篩上に残った残渣を、sucrose 液とともに遠心管へ回収。G~H: 遠心分離（600g）を実施。I~J: 上清を目開き 20 μ m の篩で、蒸留水で洗いながら濾す。K~L: 篩上の残渣を、蒸留水とともに遠心管に回収。M~N: 遠心分離後（1200g）沈殿物を中心に回収する。

【土壌からの卵胞子抽出に当たっての留意事項】

エンドウベと病菌 (*P. viciaef. sp. pisi*) の卵胞子を、シルト質植壤土から抽出したところ、抽出効率は75%であった (Van der Gaag and Frinking, 1997d)。一方、本プロジェクトにおいて、佐賀県内のタマネギ主産地の土壌である重粘土から、前述の方法 (図31, エンドウでの抽出法に類似している) で卵胞子を抽出したところ、抽出効率は10~12%に留まった (表8)。抽出過程には、目開き75 μ mの篩による土壌懸濁液の濾過が含まれる (図31)。この操作の際、重粘土では粘土粒子による篩の目詰まりが頻繁に生じるため、卵胞子の抽出効率が著しく低下したものと考えられる。

また、佐賀市川副町の土壌 (細粒質普通低地水田土) に卵胞子を人工的に接種したうえで、簡易抽出法 (図32) によって卵胞子を抽出したところ (試験1~3、標準区) 抽出効率は55~61%であった (表9)。さらに、抽出過程で、遠心分離機の遠心力を高め設定した場合 (試験4~6、遠心力高め) の抽出効率は19~45%であり、sucrose濃度を薄めに設定した場合 (試験7~9、sucrose薄め) の抽出効率は2~7%、遠心分離機の遠心力を高め設定し、かつsucrose濃度を薄めに設定した場合 (試験10~12、遠心力高め・sucrose薄め) の抽出効率は、2~3%であった (表9)。なお、標準区 (試験1~3) よりも遠心分離機の遠心力を高めるか、sucrose濃度を薄めると、抽出効率は低下するが、より純粋な卵胞子抽出液を得ることができた (微小な土壌粒子等が少ない)。

このように、土壌の種類、遠心分離機の遠心力、sucrose濃度によって抽出効率が異なることから、異なる地域 (土壌) の菌密度を比較するような場合は、それぞれの土壌において、あらかじめ抽出効率を調べておくことが望ましい。

また、本手法 (図31、32) で土壌から抽出した卵胞子を顕微鏡で計数し、土中の菌密度を推定する場合 (直接検鏡法) タマネギベと病菌以外の卵菌類の卵胞子が含まれる可能性がある。土壌を採取した圃場の状況 (タマネギの作付け状況、ベと病の発生状況) を把握するとともに、必要に応じて、定量PCRの手法 (後述) などと組み合わせる必要がある。

表8 土壌からの卵胞子抽出効率 (佐賀大学)

土壌中の卵胞子数 ^{注1)}	抽出された卵胞子数 ^{注2)}	抽出効率 (%)
1000	120	12
1000	100	10
1000	120	12

注1) 土壌10gに、卵胞子1000個を添加した。

注2) 卵胞子抽出液20 μ L中の卵胞子数 (3回計測の平均値) から、全2mL中の卵胞子数を推定した。

表9 接種した卵胞子数および接種後に土壌から簡易抽出法によって抽出した卵胞子数 (佐賀農業セ)

試験	土壌10gからの卵胞子抽出				卵胞子の計数		
	遠心力 (図31の 工程6)	遠心力 (図31の 工程9)	sucrose濃度 (図31の工程 5, 7)	備考	土壌10gに 接種した卵 胞子数...A	土壌10gから 抽出した卵 胞子数...B	抽出効率 (B/A) × 100
1					1157	700	60.5%
2	600g	1200g	62.5% ^{注1)}	・標準	326	184	56.4%
3					641	350	54.6%
4					1114	270	24.2%
5	1000g	2000g	62.5% ^{注1)}	・遠心力高め	484	219	45.2%
6					513	96	18.7%
7					487	10	2.1%
8	600g	1200g	52.6% ^{注2)}	・sucrose薄め	2030	136	6.7%
9					1197	30	2.5%
10					1964	67	3.4%
11	1000g	2000g	52.6% ^{注2)}	・遠心力高め ・sucrose薄め	1818	46	2.5%
12					427	9	2.1%
13					0	0	—
14	600g	1200g	62.5% ^{注1)}	・標準	0	0	—

注1) 図31の工程5と7における土壌が、1~2gであると仮定した場合、sucrose濃度は約60%となる。

注2) 図31の工程5と7における土壌が、1~2gであると仮定した場合、sucrose濃度は約50%となる。

b) 卵胞子の生死判定

【原形質分離を指標とした判定】

タマネギペと病菌卵胞子の生死判定に当たって、本プロジェクトでは、MTT (Tetrazolium bromide) 染色、トリパンブルー染色、および 4M 塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液中での原形質分離の観察の手法を検討した。その結果、4M NaCl 水溶液中での原形質分離の観察が、本菌の卵胞子の生死判別を最も正確に行うことができた (写真 23)。細胞膜が半透過性の生細胞は、浸透圧が高い液中では、水分流出によって原形質が収縮する。NaCl 水溶液中での原形質分離は、この収縮の結果生じるものであり、原形質分離は生細胞の標識となる。原形質分離の観察法を、図 33 に示す。

原形質分離を指標として生死判別を行う際に問題となるのは、卵胞子の中には、変形して原形質分離のようにみえるものが含まれることである。このような「見かけ上の原形質分離」による卵胞子生存率の過大評価を防ぐため、まず、水に懸濁しただけの状態を観察し、「見かけ上の原形質分離」を示す卵胞子の数を記録する。そして、この数を 4M NaCl 水溶液中での原形質分離が観察された卵胞子の数から差し引き、卵胞子の生存率を推定することが望ましい。

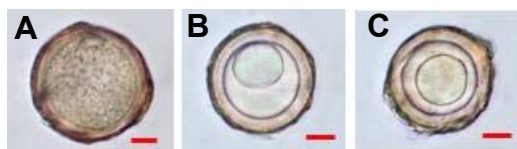


写真 23 A: 蒸留水中のタマネギペと病菌の卵胞子。B と C: 4M 塩化ナトリウム水溶液中で原形質分離が生じたタマネギペと病菌卵胞子。 - , 10 μm (佐賀大学)

1. 卵胞子懸濁液の孢子濃度を 100 ~ 200 個/ μL に調整
2. 卵胞子懸濁液 500 μL を 1.5mL 遠心管に入れる
3. 遠心分離 (2000g, 5 分)
4. 上清を完全に除去し、沈殿を回収
5. 沈殿を 4M 塩化ナトリウム水溶液 500 μL に懸濁
6. 室温静置 (45 分)
7. 20 μL をスライドグラスに滴下、カバーグラスをかけて観察

図 33 卵胞子の原形質分離の観察法 (佐賀大学)

【原形質分離と復帰を指標とした判定】

生きている卵胞子を、NaCl 水溶液 (浸透圧が高い液) に浸すと、原形質が収縮し、「原形質分離」が起きる (図 34 ~)。この卵胞子を蒸留水に浸し、外部溶液の浸透圧を低めると、原形質が元の状態に戻る現象、すなわち「原形質復帰」が起きる (図 34 ~)。

前述のとおり、卵胞子の中には NaCl 処理前から、変形して原形質分離のようにみえるもの (見かけ上の原形質分離) がある。あるいは NaCl 処理によって原形質分離はするが (図 34) その後の蒸留水処理によって原形質復帰 (図 34) しない卵胞子も観察される。これらのことから、「原形質分離」と「原形質復帰」の両方を指標とすることで、卵胞子の生死判定を正確に行うことができる (図 35、写真 24)。

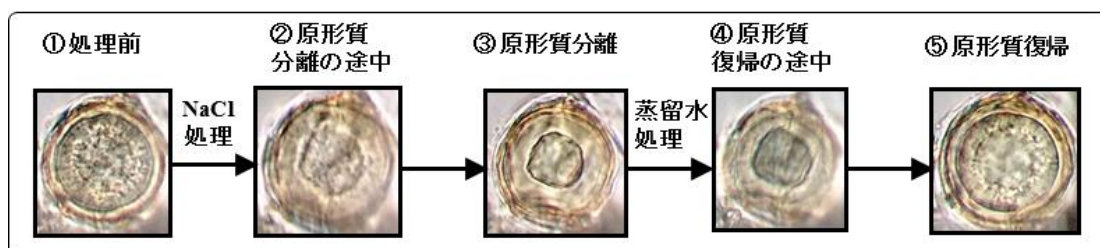


図 34 塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液中で原形質分離が誘導され、かつ、蒸留水処理によって原形質復帰した卵胞子 (佐賀農業セ)

1. 卵胞子抽出液をスライドグラス上に載せた 70 μ m メッシュ上に滴下し（写真 24A），カバーグラスをかける
2. 顕微鏡で視野を固定し（200 倍），視野内の卵胞子の位置，卵胞子の状態（みかけ上の原形質分離の有無）を記録する（写真 24B, 写真 24D 上段）
3. スライドグラスとカバーグラスの隙間から，4M 塩化ナトリウム水溶液を滴下し（写真 24C），約 15 分静置した後，記録していた各卵胞子の原形質分離の有無を追記する（写真 24D 中段）^{注1}
4. スライドグラスとカバーグラスの隙間から，細かく切った濾紙を用い，NaCl 水溶液を吸い取る
5. スライドグラスとカバーグラスの隙間から蒸留水を滴下し，5～10 分静置した後，記録していた各卵胞子の原形質復帰の有無を追記する（写真 24D 下段）^{注2}
6. 1 回の調査（工程 1～5）で 10～20 個程度の卵胞子を対象とし，原則として調査個体が 100 個以上になるまで工程 1～5 を繰り返す
7. NaCl 水溶液中で原形質分離が誘導され（工程 2 と 3 による結果の対比），かつ，蒸留水処理によって原形質復帰した（工程 3 と 5 による結果の対比）卵胞子を生存個体とし，その割合を生存率として算出する

注 1：原形質分離だけで生死判定する場合は，NaCl 処理 45 分後に判定するが（図 33），長時間の NaCl 水溶液浸漬が，卵胞子の生存（原形質復帰）に影響を与える可能性を否定できないこと，ハウレンソウと病菌の卵胞子では，4M NaCl を処理して 15 分以内に原形質分離が起こること（Kunjeti et al., 2016）を考慮し，NaCl を処理して約 15 分後に調査することとしている

注 2：上記のハウレンソウの場合（Kunjeti et al., 2016），蒸留水を処理して 30 秒以内に原形質復帰が起こるとされていることを考慮し，蒸留水を処理して 5～10 分後の調査としている

図 35 卵胞子の原形質分離および復帰を指標とした生存率調査の方法（佐賀農業セ）

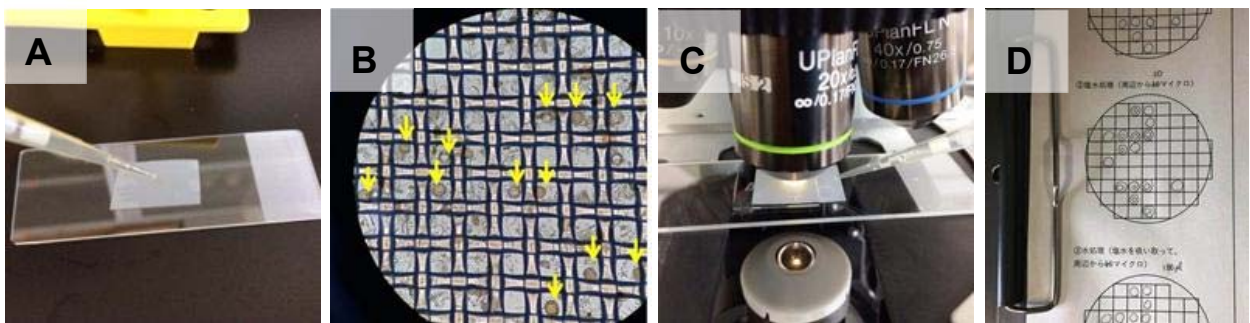


写真 24 卵胞子の原形質分離および復帰の観察（佐賀農業セ）

- A：卵胞子の抽出液を，スライドグラス上に載せた 70 μ m メッシュ上に滴下。カバーグラスをかけ、顕微鏡で観察。
 B：70 μ m メッシュを通して見えるべと病の卵胞子（200 倍）。
 C：NaCl を処理し、原形質分離の有無を観察。
 D：NaCl 処理前（上段）、処理後（中段）、蒸留水処理後（下段）の各卵胞子の状態を記録。

定量 PCR による土中菌密度の測定

a) 定量 PCR の手順

本プロジェクトにおいて、定量 PCR による土壌中のべと病菌菌密度測定法を開発した。その概要は、土壌サンプルを 75 μ m 目以下～20 μ m 目以上の篩処理により得られた土壌画分から抽出した全 DNA を鋳型に定量 PCR を行うことで、土壌中のべと病菌が検出可能である（図 36）。

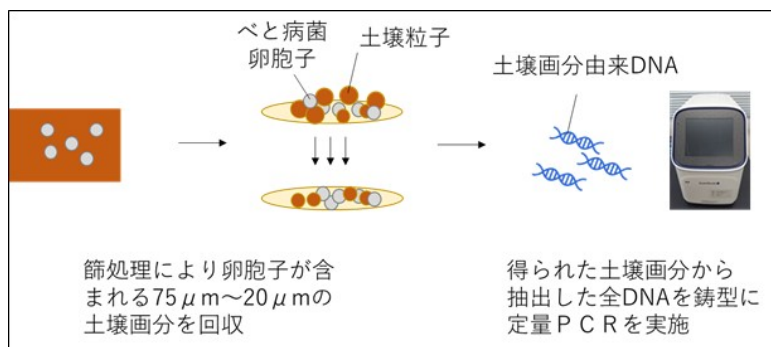


図 36 定量 PCR による土中菌密度の測定の概要（農研機構九沖農研）

作業手順としては、土壌サンプル 20g をミルサーで粉碎(30 秒、2 回)した後、50 ml の蒸留水に懸濁し、再度ミルサーで粉碎した(30 秒、2 回)。ボルテックス処理を 10 分間行った後に遠心分離(10,000 g、5 分間) を行い、上清を除去した後に沈殿物を 50ml の蒸留水で再懸濁した。ボルテックス処理以降の工程を 3 回繰り返した後、沈殿物を 150ml の蒸留水に懸濁し、超音波処理(強度 80W、5 分間処理)を行った。粒径 75 μ m ~ 20 μ m のふるいで得られた土壌画分を、濾紙 (Whattman, No.1) 上で水分を除去し、乾燥させた土壌サンプルを解析に用いた。得られた土壌画分全量を Extrap Soil DNA kit (日鉄住金環境) を用いて DNA を抽出し、精製した後に 100 μ l の TE バッファーに溶出した。抽出した全 DNA を鋳型に、サイバークリーン法 (TOYOBO 社、KOD SYBR qPCR Mix) によるリアルタイム PCR (98 2 分の後、98 10 秒、68 10 秒、68 30 秒を 45 サイクル) を実施し、融解曲線はポジティブコントロールの T_m 値 \pm 0.5 (Pd_ITS-F2n/R-N3 プライマー) で評価した。ネガティブコントロールとして九州農研合志拠点のタマネギ栽培歴のない水田土壌の抽出 DNA を供試した。手順については図 37 に示す。

DNA 抽出前の土壌処理

1. 土 20g に含まれる小石やゴミを取り除く (タマネギ残渣と考えられる植物片は残す)
2. 土 20g をミルサーで 30 秒 \times 2 回で粉碎する
3. 粉碎した土に氷 40 ml を加え、蒸留水で 100 ml にメスアップしたものをミルサーで 30 秒 \times 2 回で再度粉碎する
4. 3 で得られた粉碎液を 50 ml ずつシリコンチューブ 2 本に分注し、ボルテックスを 10 分間行う
5. 5 分 10,000g で遠心分離し、上清を捨てる
6. 得られたペレットに蒸留水を加えて 50ml にまでメスアップし、ボルテックスを 10 分間行う
7. 5 と 6 を 3 回繰り返す
8. 300 ml 容ビーカーに全量を移し、150 ml 以上にメスアップする
9. 超音波破碎を 5 分間行う (Out put power: 0.03W) (温度が上がらないように氷で冷やしながら行う)。
10. 75 μ m 目のふるいで濾し、ろ過液を回収する
11. ろ過液を 20 μ m 目のふるいで濾す
12. 20 μ m 目のふるいに残った土を蒸留水で洗ながら、ろ紙 (advantech 5A) に回収する
13. ろ紙上で土を風乾する



DNA 抽出およびリアルタイム PCR

14. 13 で風乾した土 1g を、Extrap Soil DNA kit (日鉄住金環境) を用いて全 DNA を抽出する (抽出工程は、Extrap Soil DNA kit プロトコルを参照)
15. 抽出 DNA を、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) で精製した後に、100 μ L の TE バッファーに溶出する (精製工程は、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up プロトコルを参照)
16. 得られた DNA と 1/10 希釈 DNA をそれぞれ鋳型として、プライマーセット Pd_ITS-F2n/R-N3 を用いて、サイバークリーン法 (TOYOBO 社、KOD SYBR qPCR Mix) によるリアルタイム PCR (98 2 分の後、98 10 秒、68 10 秒、68 30 秒を 45 サイクル) を行う
融解曲線は、ポジティブコントロールの T_m 値 \pm 0.5 で評価する

図 37 定量 PCR による土中菌密度の測定の手順 (農研機構九州農研)

b) 定量 PCR による菌密度と一次感染による発病程度

タマネギ栽培歴がある佐賀県および兵庫県内の 22 圃場から、タマネギ植付け前の土壌中のべと病菌菌密度 (2017 年 11 月 ~ 2018 年 12 月) と一次感染による発病 (2017 年 12 月 ~ 2018 年 5 月、18 年 12 月 ~ 2019 年 5 月の発病株率を 0% ~ 3% の範囲で集計) との関連を調べた。供試した土壌サンプルのうち 19 サンプルからべと病菌が検出され、菌密度の上昇に伴い発病株率が高くなる傾向が認められた (図 38)。一方で、50 cells/g の菌密度でべと病菌が検出される圃場では、発病株率は 1% 以下を示す傾向があったものの、無防除の場合には発病株率が高くなることが認められた。また、湛水処理圃場では、べと病菌が 50 cells/g 以上の高菌密度で検出されるものの、発病は認められなかった (未記載データ)。栽培体系が、べと病発病に及ぼす影響が示唆され、菌密度と発病との間に一定の相関が認められた ($R^2 = 0.73$)。以上の結果より、本手法によって測定した土壌中のべと病菌菌密度は、一次感染の発病リスクを評価する指標の一つに成り得る可能性が示唆された。

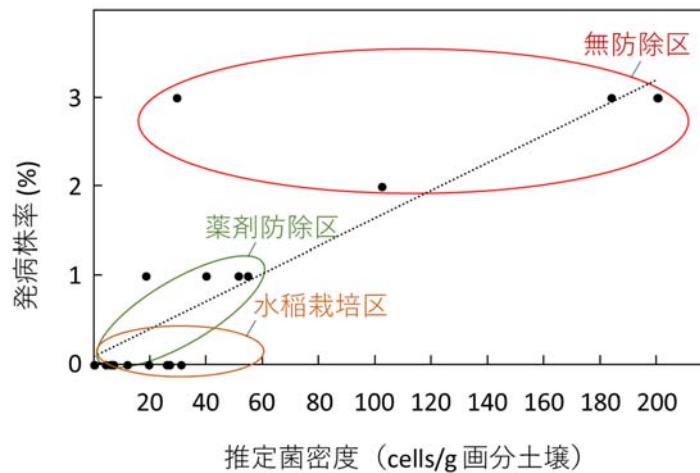


図 38 タマネギ植付け前の土中の菌密度と一次感染株の発病株率との関係 (2017～19年、農研機構九冲農研)

c) 定量 PCR による菌密度測定に当たっての留意事項

【卵胞子の抽出効率】

定量 PCR による菌密度の測定に当たっては、その前処理として、篩を用いて土壌中から卵胞子を粗抽出しておく必要がある(図 37 の 1～13 の工程)。この粗抽出の工程の違いで、その後の定量 PCR の値が異なる。よって、本手法で菌の定量を行う場合、前処理としてどの程度の精度で卵胞子の抽出を行うのか、またその場合の抽出効率がどの程度であるか(表 9) あらかじめ調べておくことが望ましい。

【圃場条件の違いによる測定誤差】

前述のとおり、本手法で測定した菌密度とべと病発病との間には、一定の相関が認められた。しかし、夏期に湛水処理を行った圃場においては、秋に一定量のべと病菌が PCR で検出されるものの、その後の発病が認められない事例があった。この原因として、死滅した卵胞子に由来する DNA を検出していることが考えられる。土壌中のべと病菌卵胞子の生死判別評価については、顕微鏡観察により解析を行う(図 33、35)。また、土壌の種類によって、土壌中の夾雑物の影響により PCR 反応が阻害される場合があるため、必要に応じて顕微鏡観察により菌密度の補正を行う。

生物検定

a) 生物検定の手順

本プロジェクトでは、生物検定の手法も検討した。すなわち、検定する土壌をビニルポットに充填してタマネギを播種し、その後、幼苗におけるべと病の発病を指標として、土壌の汚染程度を推定した(図 39、写真 25)。汚染土壌では、播種 40～50 日後頃から、一部の苗に、葉の黄化や湾曲症状がみられる場合がある(写真 26)。この症状の原因がタマネギべと病菌である場合、子葉～第 1 葉あるいは一部の根に新たな卵胞子が形成され、また、株を高湿度条件(15 前後)で一晩管理すると、翌朝、葉上に分生胞子を確認することができる(写真 16)。

1. 検定する土壌を、目開き 4mm 前後の篩にかけ、土壌粒子を細かくする^{注1)}
2. その土壌を、直径 10cm 前後のビニルポットに充填し、タマネギを 40 粒ほど播種し、浅く覆土する^{注2)}
3. 播種したビニルポットを、15 前後に設定した人工気象器内で管理する
4. 播種後の約 10 日間は、適正な発芽・苗立ちを確保するために、こまめに灌水する
5. その後は、土壌の乾き具合をみながら、毎日あるいは 1 日おきに灌水する
6. 播種 40~50 日後から、タマネギ苗の子葉~第 2 葉に黄化・湾曲症状がみられるかどうか観察する
7. このような症状がみられた場合、代表的な株を抜き取り、葉および一部の根に、卵胞子が形成されているかどうか顕微鏡で観察する
8. 最終的には、「株を 15 高湿度条件で一晩管理したうえでの分生胞子の形態観察」「べと病菌特異的 PCR による検出」などを行い、本症状がタマネギべと病菌 (*Peronospora destructor*) によることを確認する
9. 必要に応じ、各ポット (検定土壌) における発病株の割合を調べる

注 1: 対照として、タマネギ栽培歴がない圃場の土、あるいは人工培土を用意する

注 2: ポットの大きさによって、タマネギの播種量を調整する

図 39 タマネギ幼苗におけるべと病の発病を指標とした土壌の生物検定法 (佐賀農業セ)



写真 25 各土壌にタマネギを播種し、検定を開始したところ (佐賀農業セ 白石分場)

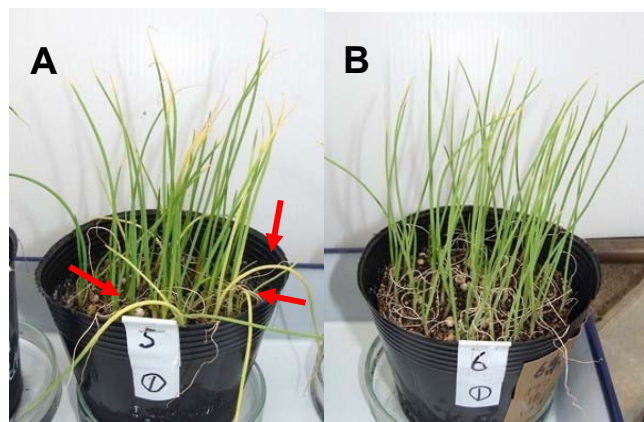


写真 26 タマネギを播種して 49 日後の状況 (佐賀農業セ)

A: 汚染土壌で育苗し、一部の苗が発病 (矢印)

B: 非汚染土壌で育苗し、異常株の発生なし

b) 生物検定に当たっての留意事項

前述の生物検定の一例として、2018 年春期に、佐賀県内のタマネギ栽培終了後の圃場 (べと病が多発生) から土壌を採取した。同年夏に、その土壌をポットに充填してタマネギを播種し、人工気象器で育苗した。その結果、播種後 30 日頃から苗の一部が黄化し始め、同 50 日頃から葉の黄化・湾曲症状を呈し、べと病を発病した。しかしながら、この多発生圃場 (夏期に耕種的防除を行っていない) から、同年秋に再度、採取した土壌では、生物検定を行っても発病株が確認されない事例があった (佐賀農業セ、データ略)。

この原因として、土中の卵胞子の生存率が春~秋に大きく低下する (図 18、19) ことが関係している可能性がある。秋にサンプリングした土壌の場合、生物検定による (小規模なポットでの検定) 評価は難しい可能性があり、この点は今後の検討を要する。

2) 二次伝染(生態)

(1) 分生孢子の特徴

形状

べと病の罹病葉では、気孔から分生子柄が抽出し、先端に洋梨形ないし紡錘形、灰色ないし暗紫色の分生孢子を形成する(写真27)。分生孢子は、長さ約30~70 μm、幅約20~30 μmである。



写真27 タマネギべと病菌の分生子柄(A~Dの矢印)および分生孢子(B~E)(佐賀農業セ)

孢子形成

a) 形成前日の条件

孢子形成前日の平均気温(8:00~20:00)は、24 以下(Hiderbrand and Sutton, 1982)とされている。本プロジェクトで、2017~2018年に罹病株上に孢子形成を確認した35例(形成程度「少」が28例、「中」が7例)について気象解析を行った。その結果、形成前日(35例)の日平均気温は、6~22 であり(図40)過去の報告とほぼ一致した。よって、二次伝染推定モデルの構築に当たっては、孢子形成の前日の条件として、「前日の日平均気温(例えば24 以下)」をモデルに組み込む必要があると考えられた。

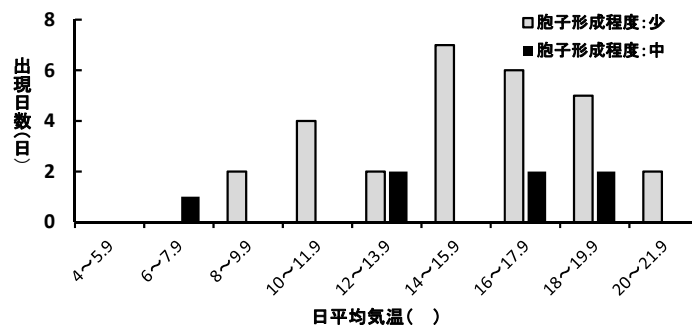


図40 孢子が形成された前日(35例)の日平均気温の頻度分布(2017-2018年、佐賀農業セ)

b) 形成当日の条件

【形成時刻】

Yarwood(1943)によると、孢子は、深夜から早朝6時頃にかけて形成される。また、出水(1963)は、深夜2時~4時半頃に孢子が形成されるとしている。

【温度】

孢子的形成温度は5~25 (Yarwood,1943) 6~19 (出水,1963)であり、形成適温は13~15 (Yarwood, 1943; 出水,1963)である。形成時の夜間の平均気温は、4.7~20.4 (Hiderbrand and Sutton, 1982)である。本プロジェクトで前述の35例について調べたところ、孢子形成当日(1~6時)の気温は4~22 であり(図41)過去の知見とほぼ一致した。よって、二次伝染推定モデルの因子として、孢子形成当日(1~6時)の気温として4~24 を組み込んでよいと考えられた。

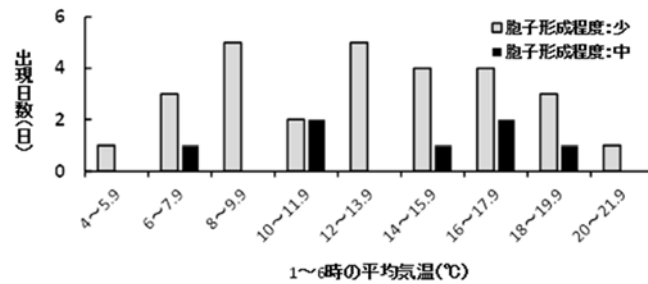


図 41 胞子が形成された頃 (35 例) の平均気温の頻度分布 (2017-2018 年、佐賀農業セ)

【湿度】

胞子は、湿度 90%以上で形成される(Develash and Sugha 1996; Yarwood 1943)。また、出水(1963)によると、胞子が顕著に形成された日の午前 1 時~5 時の相対湿度は 86~94%であり、Hiderbrand and Sutton (1982) の報告では、胞子形成日の午前 2 時~6 時の相対湿度は 95%以上であった。さらに、Gilles et al. (2004) によると、湿度 93%以上で 100%に近づくにつれて胞子形成量が増加する。

本プロジェクトで利用した湿度データは、市街地(气象台)の観測値であることから、実際の圃場より値が低く見積もられたと考えられる。このような条件下で、胞子形成が顕著であった日は湿度 80%以上であり、さらに、湿度が 90%以上で胞子形成がより顕著となる傾向がみられた(図 42)。よって、二次伝染推定モデルでは、胞子形成当日(1~6 時)の高湿度を重要因子とし、さらに、形成程度を判定するのであれば「高湿度の程度(例えば湿度 90%以上)」を因子として組み込む必要があると考えられた。

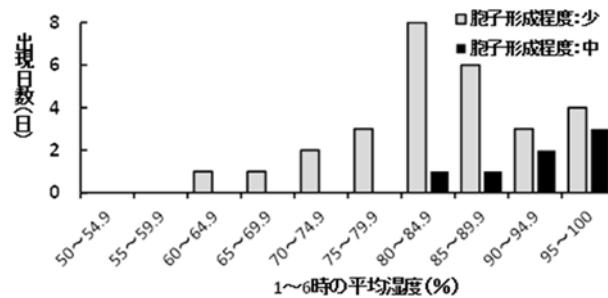


図 42 胞子が形成された頃 (35 例) の平均湿度の頻度分布 (2017-2018 年、佐賀農業セ)

【風速】

本プロジェクトでは、胞子形成が顕著であった日(1~6 時)は、風が弱い傾向(風速 1.0~3.4m/s)にあった(図 43)。よって、二次伝染推定モデルで胞子の形成程度を判定するのであれば、胞子形成当日(1~6 時)の風の弱さ(例えば 3m/s 未満)を因子として組み込む必要があると考えられた。

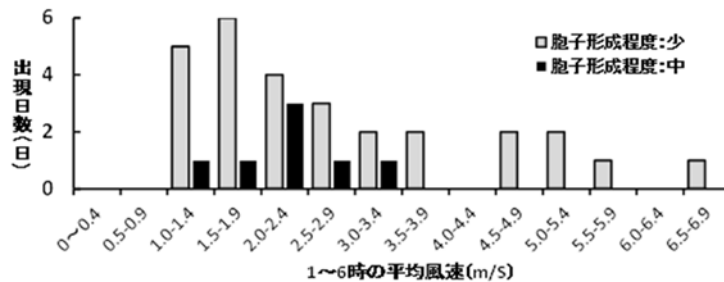


図 43 胞子が形成された頃 (35 例) の平均風速の頻度分布 (2017-2018 年、佐賀農業セ)

孢子飛散

a) 飛散の時間帯

孢子は日中に飛散する (Yarwood,1943)。また、孢子飛散は、日の出 1.5 時間後頃に始まり、晴れた日は午前中にピークとなる。曇天の日には、ピークが遅れ、10~14 時頃にみられる (Hiderbrand and Sutton,1982) とされている。

本プロジェクトにおいて、2018 年に、べと病の分生孢子の飛散状況を調べたところ、飛散は 9~16 時頃を中心にみられ、夕方~夜間に飛散する場合もあったが、その量は少なかった (図 44)。これら結果は過去の報告とほぼ一致した。

b) 飛散と気象条件

Hiderbrand and Sutton (1982) は、雨が降らない日、概して晴れた日に、孢子は飛散することが多いとしている。一方、高津ら (1957) は、孢子の飛散量は、曇天が続いた場合か、降雨のあった翌日、あるいは翌々日に多い傾向を認めている。また、Hughes (1970) は、孢子は、風や雨滴等の跳ね上がりで飛散するとしている。Leach et al.(1982) は、湿度の低下 (60%以下に低下) と連動して孢子は飛散し、また、これと比べて飛散量は多くないものの、低湿度から高湿度 (あるいは飽和状態) になる場合も孢子が飛散するとしている。

本プロジェクトでは、2018 年 4 月 12、18、19、20 日は、晴天の条件下で孢子が飛散し、4 月 11、14、17、24 日および 5 月 8 日は雨天の条件下で孢子が飛散した。また、晴天の日は、湿度の低下に伴って孢子飛散が増加する傾向がみられ、雨天時は、高湿度条件下で断続的に孢子が飛散した。前述のとおり、孢子が飛散しやすいのは「晴れた日」とする報告と「曇雨天の日」とする報告があるが、本プロジェクトではその両方が確認された (図 44)。また、湿度との関連性は、Leach et al.(1982) の報告と、ほぼ一致した。

以上のことから、特に曇雨天日は、日中の段階で孢子の発芽が始まる可能性があり、二次伝染推定モデルでは、感染開始可能時刻を「孢子飛散当日の日中」とした方がよいのではないかと考えられた。

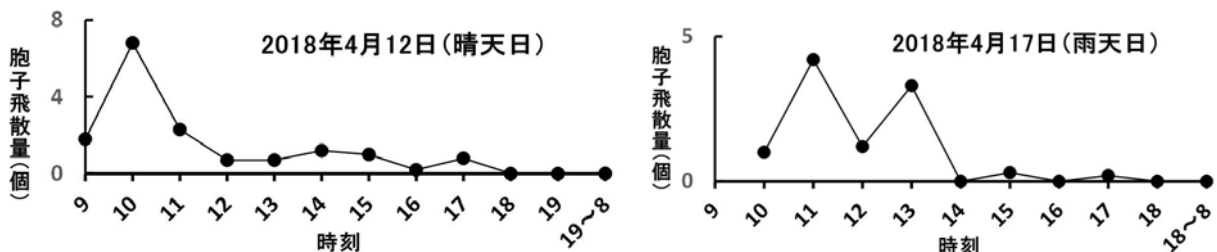


図 44 孢子飛散量の推移 (2018 年、佐賀農業セ)

注) 各時刻の数値は、前 1 時間の飛散量 (スライドグラス 6 枚の平均値) だ。ただし、調査間隔が 2 時間以上の場合の飛散量は、その間の飛散量を調査間隔 (時間数) で割った値。

孢子飛散 ~ 感染

孢子は、空気湿度が低い場合には、わずか数時間でほとんど発芽能力を失うのに対して、空気湿度が高い場合には、形成後 12 時間を経ても、高い発芽率を維持する (出水,1963)。また、孢子の発芽率は、湿度 33% では急激に発芽率が低下するが、湿度 53% (10) では 48 時間後の発芽率は 70% 以上であり、湿度 53% (25) では 24 時間後の発芽率は 30% 以上である (Bashi and Aylor, 1983)。

本プロジェクトにおいて、2016、2017、2018 年の 3~5 月に、タマネギべと病に感染した可能性が高い日として 27 例を抽出した。これらの日の日中 (9 時~18 時) の平均湿度を調べたところ、55~95% であった (図 45)。以上のことから、二次伝染推定モデルでは、飛散した孢子が発芽能力を維持するための「感染日の日中の平均湿度 (例えば 55% 以上)」をモデルに組み込む必要があると考えられた。

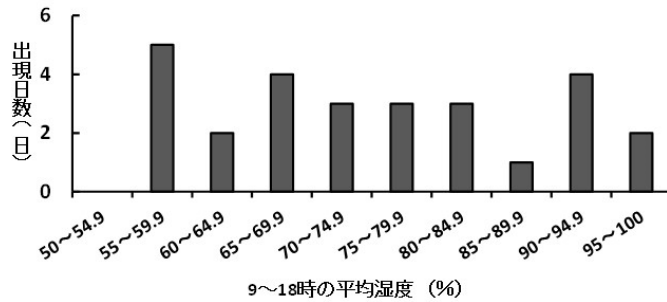


図 45 推定感染日の日中 (27 例) の平均湿度の頻度分布 (2016-2018 年、佐賀農業セ)

感染

【水滴・湿度・降雨】

胞子の発芽・感染には、水滴（結露）が必要である（出水,1963；Viranyi,1981；Hiderbrand and Sutton, 1982；Develash and Sugh, 1996）。また、感染条件として、夜間には葉面に露が形成される程度の多湿状態が必要で、できれば適度の小雨があれば一層理想的である（出水,1963）とされている。

【気温】

胞子は 2～25 で発芽し、その適温は 10 前後である（Yarwood,1943；出水,1963）。また、濃厚感染日は、最低気温 11.2～17.2 であった（出水,1963）。今回、前述の 27 例について、当日の 20 時～翌日 6 時の平均気温は、11～19 であり（図 46）出水（1963）の結果とほぼ一致した。

よって、二次伝染推定モデルで、感染の有無だけでなく、感染の程度を判定するのであれば、感染時間帯の適温（例えば 10～20）も因子として組み込んでよいと考えられた。

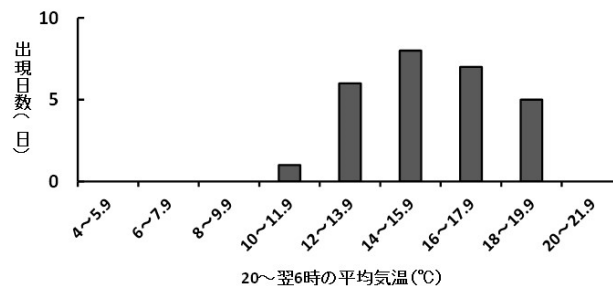


図 46 推定感染日の当日 20 時～翌日 6 時 (27 例) の平均気温の頻度分布 (2016-2018 年、佐賀農業セ)

【風速】

Hiderbrand and Sutton (1982) は、風速 0.3-1.0m/s で胞子が多く飛散し、飛散の上限は多くの場合、風速 1.0-1.5m/s であるとしている。一方、Kennedy and Wakeham (2006) は、風速が 1.4m/s に達すると胞子が飛散する。ただし、風が強いと飛散量は増えないとしている。

本プロジェクトにおいて、感染の可能性が高い 27 例における、当日 20 時～翌日 6 時の風の状態を調べたところ、風速は弱い場合 (1.5～2.4m/s) が多かった (図 47)。この結果は、過去の報告と比べると、風速がやや異なるものの「弱い風で胞子飛散が多い」という点で、一致した。よって、二次伝染推定モデルで、感染の有無だけでなく、感染の程度を判定するのであれば、感染時間帯の風の弱さ (例えば 3m/s 未満) も因子として組み込んでよいと考えられた。

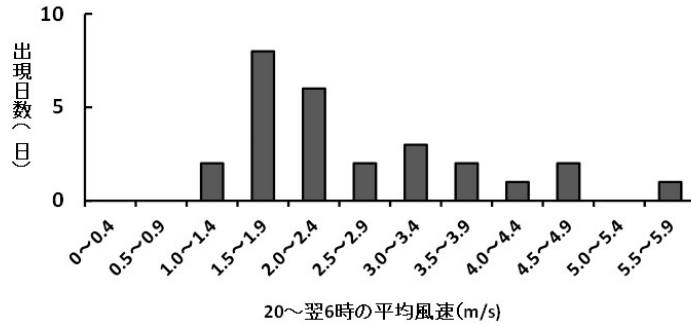


図 47 推定感染日の当日 20 時～翌日 6 時（27 例）の平均風速の頻度分布（2016-2018 年、佐賀農業セ）

【感染所要時間（濡れ、または高湿度の継続時間）】

感染所要時間（葉面の濡れの継続時間）については、出水（1963）は 6 時間前後とし、Yarwood（1943）は、約 7 時間で安定した発病を示すとしている。12、16 では少なくとも 8 時間以上、5、8、20 では少なくとも 12 時間以上（Anonymous, 2002）とする報告もある。また、出水（1963）は濃厚感染時の気象をみると、最高湿度 94～98%を示し、最低湿度も 60～83%と非常に高いと報告している。

感染の可能性が高い 27 例において、当日 12 時～翌日 6 時の中で、湿度 80%以上が継続した時間の頻度分布を図 48 に示す。前述のとおり、利用した湿度データは、市街地（气象台）の観測値であることから、実際の圃場の値はもっと高かったと推測される。このような条件下で、感染推定日は、27 例中 6 例で 6～9 時間、16 例で 10 時間以上、高湿度が継続した（図 48）。

以上のことから、二次伝染推定モデルでは、当日 12 時～翌日 6 時の中での濡れの継続時間（例えば 6 時間以上）が、重要な因子になると考えられた。感染の有無だけでなく、感染の程度を判定するのであれば、さらに長い濡れの継続時間（例えば 10 時間以上）を因子として組み込んでよいと考えられた。

なお、濡れ時間のデータが入手できない場合は、「降雨、霧、朝露等による濡れが継続するのは、高湿度条件が継続するときである」との前提のもと、湿度データ（例えば湿度 80%以上の継続時間）での代用がある程度可能と考えられる。この場合、湿度観測地点の立地条件（市街地にあるかどうか等）を十分把握しておく必要がある。

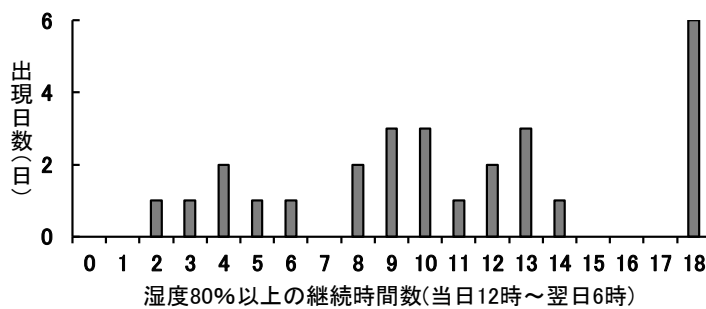


図 48 推定感染日の当日 12 時～翌日 6 時（27 例）における湿度 80%以上の継続時間の頻度分布（2016-2018 年、佐賀農業セ）

(2) 二次感染株の特徴

潜伏期間と発病

べと病菌は、感染後、タマネギ組織内で菌糸を蔓延させる（写真 28）。春期の潜伏期間は 10～15 日程度であるが、その期間の気温が低いと、15 日より長くなる（図 49）。これらの結果と、海外（イギリス）における研究プロジェクト成果（Anonymous, 2002）の Figure.7 を参考に、各温度条件における潜伏日数を設定した（表 10）。なお、Anonymous（2002）では、タマネギべと病菌による感染日を

起点とし、日々の気温に対応した潜伏日数の逆数（例えば、20 では 1/10、10 では 1/25）を毎日積算し、その積算値が「1」に達した日に、べと病が発病するとされている。

以上のような潜伏期間を経て、本病菌の二次感染株は発病する。二次感染株の病斑は、一次感染株とは異なり、局部的である（写真 29）。

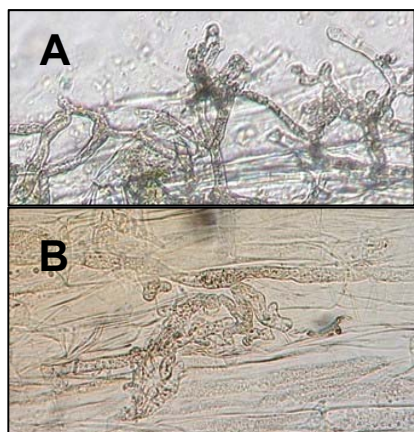


写真 28 タマネギべと病菌の菌糸 (A、B)(佐賀農業セ)

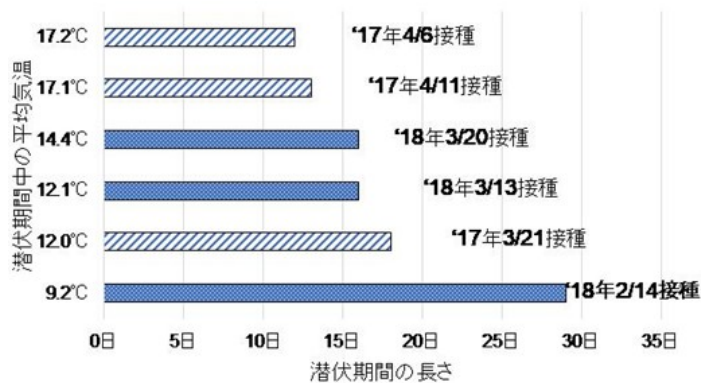


図 49 接種試験により得られた潜伏期間とその期間中の平均気温（2017-2018年、佐賀農業セ）

表10 各温度条件におけるタマネギべと病菌の潜伏期間^{注1)}
(佐賀農業セ、図49およびAnonymous (2002)のFigure.7を基に作成)

潜伏期間 (日数)	温度(°C)																				
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21-25				
	60日	51日	45日	35日	30日	25日	22日	18日	15日	13日	12日	11日	11日	10日	10日	10日	10日				

注1)タマネギべと病菌による感染日を起点とし、日々の気温に対応した潜伏日数の逆数(例えば、20°Cでは1/10、10°Cでは1/25)を毎日積算し、その積算値が「1」に達した日に、べと病が発病するとされている(Anonymous, 2002)。



写真 29 タマネギベと病菌による二次感染株の病斑(A~C)(佐賀農業セ)

各年次の主要感染・発病時期

2016~2019年に、佐賀県内で早晩性が異なるタマネギを栽培する圃場に、べと病無防除区を設置し、本病の発病状況を調べた。さらに、気象解析や孢子形成調査の結果とあわせ、感染時期を推定した。

【2016年】

2016年は(図50)極早生および菌密度が高かった早生では、感染が3月上~中旬に起こり()、3月下旬~4月上旬に発病が増加した。また、上記以外の早生や一部の中晩生では、感染が4月上旬頃に起こり()、4月中~下旬に発病が増加した。さらに、中晩生では、感染が4月下旬頃に起こり()、5月上~中旬に発病が増加した。

前述のとおり、2016年産タマネギではべと病が大発生し、中晩生品種を中心に甚大な被害を受けた。出水(1963)によると、タマネギの鱗茎肥大期以降に感染可能な気象条件が繰り返されると濃厚感染が起こり、本病の大流行が起こる。海外(カナダ)の報告でも、タマネギべと病の孢子形成および感染を助長する気象条件の頻発は、継続的な感染サイクルを維持し、本病の流行につながるとされている(Hildebrand and Sutton, 1982)。また、本病について出水(1963)は、「通常は比較的狭い範囲に集団をなして発病することが多い」とする一方で、西日本各地で本病が激発した1955年は「広範囲に分生孢子が分散、発病した事例に接した」と報告している。さらに、レタスの事例ではあるが、作期をずらしながら切れ目のない栽培を行っているアメリカのカリフォルニア州では、レタスべと病が発生した生育後期の圃場から、生育初・中期の他圃場に本病が広がる‘green bridge’(緑の架け橋)が形成され、本病の伝染環が形成されている点が指摘されている(Wu et al., 2001; Gilles, 2004)。

以上のことから、早晩性の異なるタマネギが混在して栽培される佐賀県において、2016年は以下のような経過をたどったものと考えられる。

[ステップ1]

極早生から早生を中心に、一次感染株上に形成された孢子を起点とした最初の感染が3月上~中旬に起こり(図50)、その後の潜伏期間を経て3月下旬~4月上旬に発病が増加。

[ステップ2]

同じ4月上旬頃に感染好適条件が頻発したことで、発病株上に形成された孢子が飛散して早生を中心に濃厚感染が起こり(図50)、その後の潜伏期間を経て4月下旬頃に発病がさらに増加。

[ステップ3]

同じ4月下旬頃に感染好適条件が頻発したことで、発病株上に形成された孢子が大量飛散して中晩生で濃厚感染が広域に起こり(図50)、その後の潜伏期間を経て5月中旬以降、県内各地の中晩生で本病が大発生。

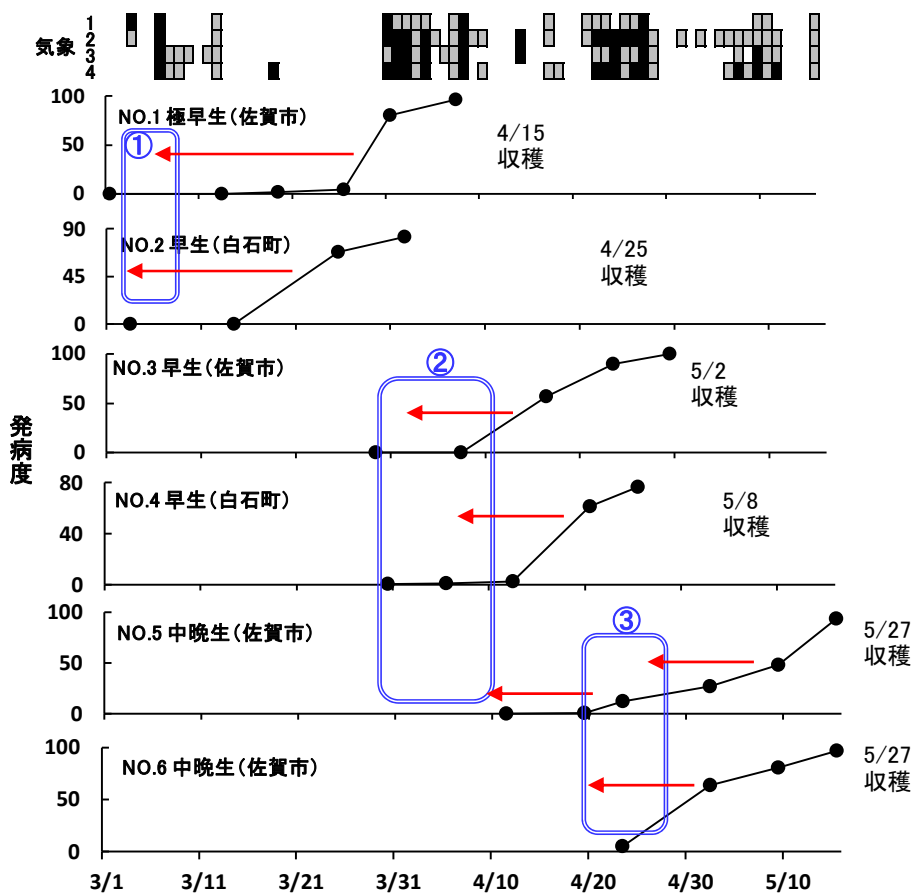


図 50 2016 年のタマネギペと病の発病度()、発病増加時期から潜伏期間をさかのぼった感染時期(の到達点)、感染好適気象条件(は好適、 は準好適)、および総合的に推定した主要感染時期(青色の二重枠)(佐賀農業セ)注)潜伏期間は、「佐賀市の日平均気温」と「各温度条件下での潜伏日数(表 10)」から算出。感染好適気象条件は、高湿度継続時間を指標とした二次伝染推定モデル(図 60)より判定(1 は佐賀市、2 は長崎県佐世保市、3 は福岡市、4 は熊本市の気象観測値より、それぞれ算出)。

【2017年】

次に2017年の発生消長を図51に示す。この年は、べと病の分生胞子の形成状況も毎日調査したことから、2016年よりも詳細に感染時期を推定することができた。すなわち2017年は、1回目の感染が早生、中晩生とも4月7～11日に起こり（ ）4月20～25日に発病が増加した。さらに、2回目の感染が中晩生で4月26～27日（ ）に起こり、5月11日から再び発病が増加した。

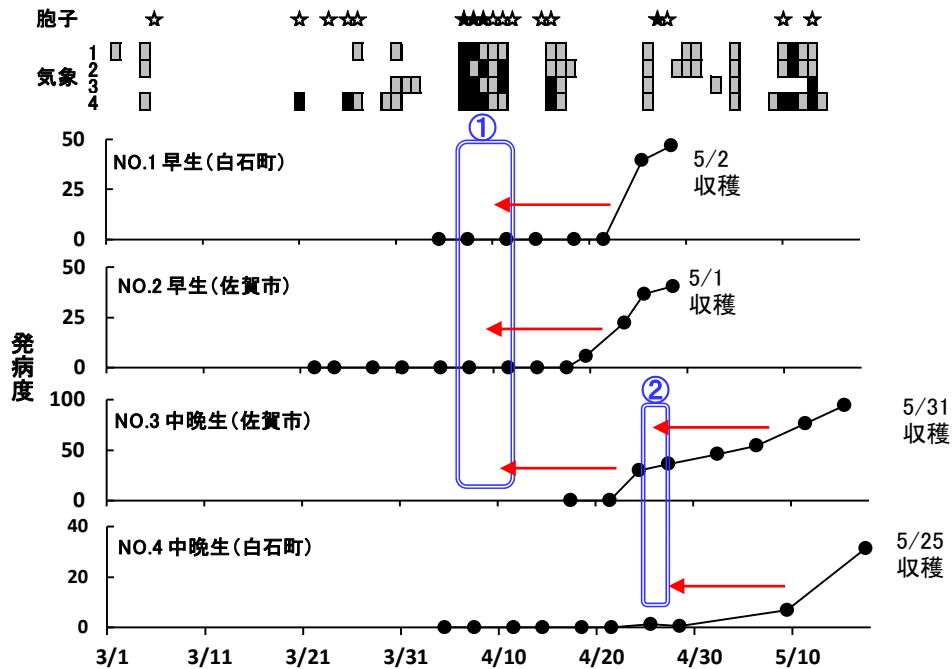


図51 2017年のべと病の感染と発病（少、中：発病株上での胞子の形成程度。他の説明は、図50を参照）（佐賀農業セ）

【2018年】

2018年は（図52）早生では3月15日頃に感染が起こり（ ）4月2～3日頃に発病が始まった。その後、早生、中晩生とも4月4～5日頃に感染が起こり（ ）4月16～18日頃に早生では発病が増加し、中晩生では発病が始まった。さらに、中晩生では4月17～18日頃に感染が起こり（ ）4月30日～5月1日頃に発病が増加した。

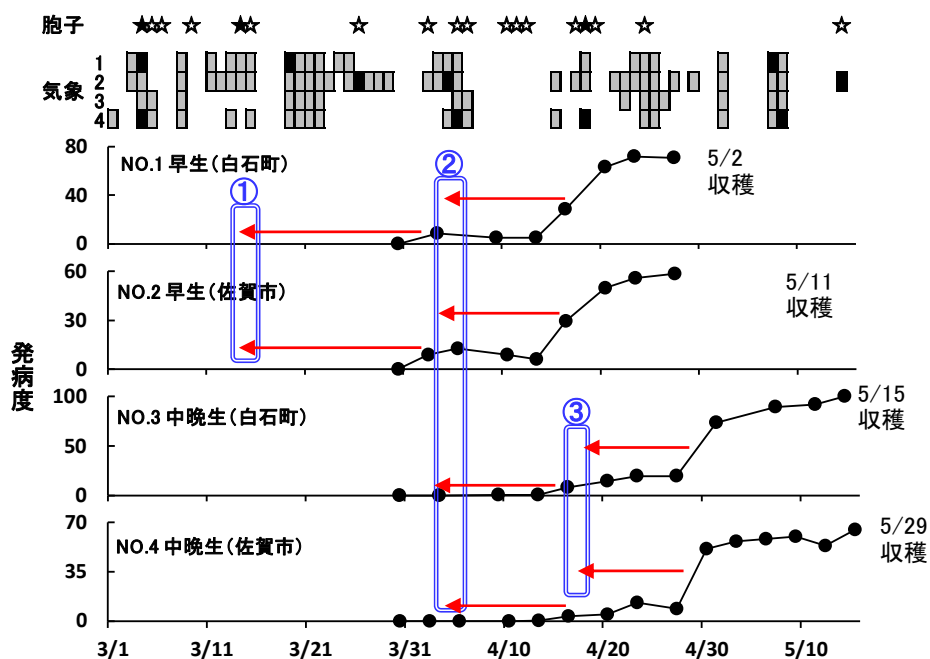


図52 2018年のべと病の感染と発病（説明は、図50、51を参照）（佐賀農業セ）

【2019年】

2019年は(図53) 早生では感染が3月3~4日頃に起こり() 3月22日頃に発病が増加した。さらに、早生および一部の中晩性で、感染が4月7日頃に起こり() 4月18~20日頃に発病がやや増加した。その後、中晩生では、感染が4月24~25日頃() 4月29日~5月1日頃() に起こり、それぞれ5月5~7日頃、5月11~14日頃に発病が増加した。

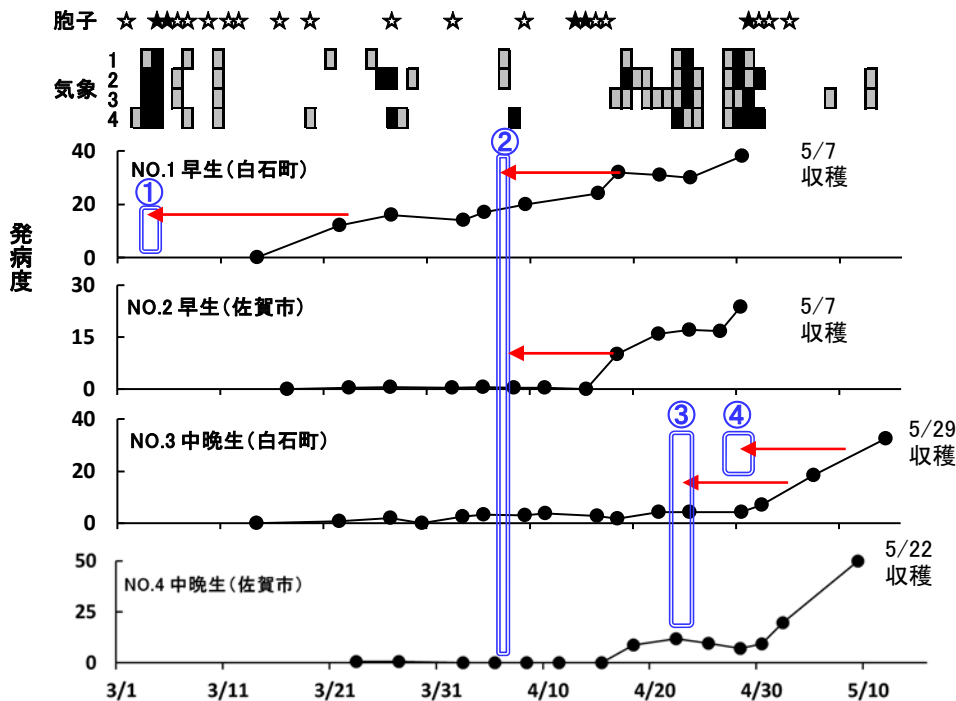


図53 2019年のべと病の感染と発病(説明は、図50、51を参照)(佐賀農業セ)

4年間の結果を総合すると、主要感染時期は、早生の方が中晩生より早く、早生では3月上旬~4月上旬、中晩生では3月下旬~4月下旬の間を中心に感染が起きたと推定された(図54)。ただし、暖冬で経過した2019年は、一部の中晩性では3月下旬には、わずかながら発病がみられたことから(図53のNO.3圃場)、3月上旬に軽微な感染が起きたと推定される。以上のことから、春期におけるタマネギべと病の主要感染期は、早生では3月上旬~4月上旬、中晩生では3月下旬~4月下旬となるが、暖冬年を中心に、これより早い時期から軽微な感染は起こる場合があると考えられた。

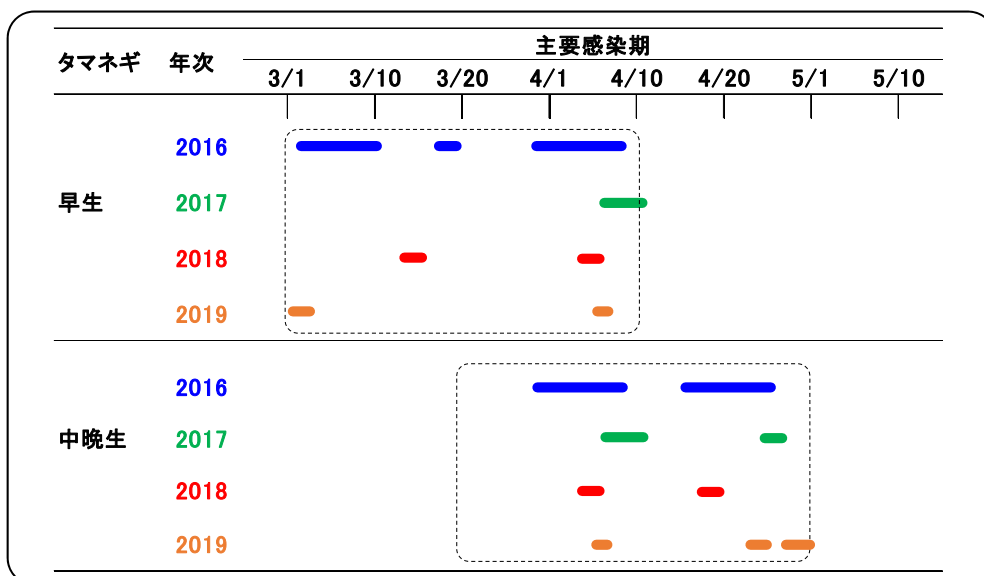


図54 佐賀県におけるタマネギべと病の春期の主要感染期(2016~2019年、佐賀農業セ)

感染・発病部位および感染時の葉の熟度など

【感染・発病部位】

病斑が確認された発生初期の時点での二次病斑は、株内の連続した特定の葉身に形成されており、病斑の位置には規則性が認められた（佐賀上場営農セ、データ略）。二次病斑が形成されたタマネギ葉身から、ベと病菌特異的 PCR による検出を試みたところ、病斑部以外の部位から本菌が検出されることはなかった（佐賀上場営農セ、佐賀大学、データ略）。このことは、病原菌は、葉身にランダムに感染しているわけではなく、特定の部位に感染して病斑を形成していることを示していると考えられた。

また、2018年の早生タマネギにおいて、「タマネギベと病菌の推定感染日」と「タマネギ各葉位の出葉時期」と「各葉位の発病部位」を照合したところ、ベと病の感染時に「出葉し始めの葉身（ n 葉）」、「出葉途中の葉身（ $n-1$ 葉）」であった葉身は、その後、葉身先端部付近を中心に病斑がみられた。一方、感染時に「その下位葉（ $n-2, n-3$ 葉）」であった葉身では、その後、葉身中部～葉身基部を中心に病斑がみられた（佐賀農業セ、図55）。

以上のことから、タマネギの葉身抽出部（葉身基部）付近が、主要な感染部位と考えられた。感染した時点では各葉身の感染部位は近接している場合が多い。しかし、その後は葉位によって葉身の伸長度合が違ってくるので、離れた部位に病斑が形成されることになると考えられた（佐賀上場営農セ）。

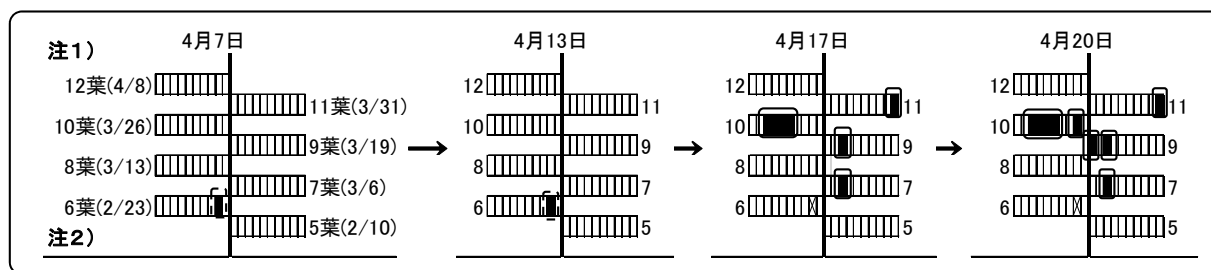


図55 タマネギの葉位別にみた病斑の形成位置の一例（2018年、七宝早生7号、佐賀農業セ）

注1) 各葉位の右側の（ ）の日付は、生育調査（約50株実施）の結果から推定した、平均的な出葉日を示す。

注2) 各葉位の黒塗りの部分は、二次病斑の形成位置を示す。黒塗りを点線で囲ったところは、3月15日頃に感染し、その後、発病が進展したと推定される病斑。黒塗りを実線で囲ったところは、4月4～5日頃に感染し、その後、発病が進展したと推定される病斑。×印は、葉が枯死したことを示す。

【感染・発病部位の空間分布】

前述のとおり、2018年に早生タマネギ（七宝早生7号）において、「タマネギベと病菌の推定感染日」と「タマネギ各葉位の出葉時期」と「各葉位の発病部位」を照合した（図55）。加えて、中晩生タマネギ（ターザン）では、「タマネギベと病菌の推定感染日」と「タマネギ各葉位の発病開始時期」を照合した（表11）。その結果、感染・発病部位の分布には、以下の二つのパターンがみられた。

[パターン]

上～中位葉の段階で感染後、潜伏期間中に新葉が数枚展開した。その後、感染葉が中～下位葉となった状態で、発病が進展した（例えば、図55に示す早生の4月7日時点での第6葉、表11に示す中晩性の4月25日時点での第6～7葉）。

[パターン]

上～中位葉の段階で感染したが、この頃には、既に葉身の分化が完了した（これ以上、新葉が展開しない）。その後、感染葉は潜伏期間を経ても、上～中位葉のままの状態、発病が進展した（例えば、図55に示す早生の4月20日時点での第10～11葉、表11に示す中晩生の5月13～14日時点での第12～13葉）。

出水（1963）は、「葉の熟度が進むにしたがって感染しやすくなる」「一株の葉の中では、早く成熟した下位の葉から発病する」と報告している。しかし、これら考察は上記の「パターン」とのうちの、

のパターン」だけに着目し、しかも「感染時ではなく、発病時の観察結果」に重点を置いて導き出された可能性がある。今回の結果から、実際には「パターン と の両方」があり、また、「両方のパターンともに、発病葉が感染した時点では、上～中位葉(比較的若い葉)であった」もの考えられた。

表11 タマネギの各葉位に出現したべと病の病斑長の推移(2018年、品種ターザン、佐賀農業セ)

株	月日	病 斑 長 (cm)																	
		第6葉	第7葉		第8葉			第9葉			第10葉				第11葉			第12葉	第13葉
		病 斑 1	病 斑 1	病 斑 2	病 斑 1	病 斑 2	病 斑 3	病 斑 1	病 斑 2	病 斑 3	病 斑 1	病 斑 2	病 斑 3	病 斑 4	病 斑 1	病 斑 2	病 斑 3	病 斑 1	病 斑 1
NO.1	4月25日	7			8														
	4月26日	7			8														
	4月27日	7			9														
	4月28日	8			10														
	4月29日	8			10														
	4月30日	10			11	5	9		6			5							
	5月1日	枯	5		12	9	7		6	8		6	6	5	4		6	6	5
	5月2日		6		枯	10	9		6	8		6	6	5	4		枯	6	5
	5月3日		6		23			注1)	6	8		24			注1)		6	5	
	5月4日		枯		23				7	9		24					6	5	
	5月5日				23				7	9		24					6	5	
	5月6日				23				7	9		24					6	5	
	5月7日				23				20	10		24					6	5	
	5月8日				24				20	10		24					6	5	
5月9日				枯				20	10		24					6	5		
5月10日								20	10		24					6	5		
5月11日								20	10		24					6	5		
5月12日								20	10		24					6	5		
5月13日								20	10		24					6	5		
5月14日								20	10		24					6	5	4	
NO.2	4月25日		4	5	5														
	4月26日		5	5	5														
	4月27日		5	5	6														
	4月28日		5	5	6														
	4月29日		5	5	6							6	4	6		7			
	4月30日		枯	枯	6	9		21			6	10	13		17				
	5月1日				6	9		23			6	10	13		17				
	5月2日				7	9		23			6	10	14		17				
	5月3日				枯	枯		23	4		枯	枯	枯		18				
	5月4日							25	4						18				
	5月5日							25	4	3					18				
	5月6日							25	4	3					18				
	5月7日							25	4	4					18				
	5月8日							25	4	4					18				
5月9日							25	4	4					18					
5月10日							25	4	4					18					
5月11日							25	4	4					18		2			
5月12日							25	4	4					18		2			
5月13日							25	4	4					18		10	8	注2)	
5月14日							25	4	4					18		10	8		

注1) 近接病斑が癒合した場合、癒合病斑の長さを測定した。注2) 点線で囲ったところは4月4～5日頃の感染(主要感染1)、実線で囲ったところは4月17～18日頃の感染(主要感染2)、二重線で囲ったところは5月2日頃の感染(軽微な感染)で、それぞれ発病したと推定される病斑。

【感染時の葉の熟度】

前述のとおり、出葉中～出葉が完了した葉身が、若い上～中位葉の状態の時に、タマネギベと病菌に感染しやすいと考えられた。

タマネギベと病菌 (*Peronospora destructor*) については、タマネギの成熟葉 (老化葉) に感染しやすいとされている (出水, 1963; Hausbeck, 2010)。一方、エンドウベと病菌 (*Peronospora viciae*)、ダイズベと病菌 (*Peronospora manshurica*)、トルコギキョウベと病菌 (*Peronospora chlorae*) については、それぞれ、エンドウ (Mence and Pegg, 1971)、ダイズ (Ryley, 2015)、トルコギキョウ (O' Neill et al., 2003) の若い葉に感染しやすいとされている。今回の結果では、比較的若い葉の方が感染しやすいと考えられたことから、過去のタマネギにおける報告とは異なり、エンドウ、ダイズ、トルコギキョウにおける報告と一致した。

【防除上留意すべき事項】

以上の結果から、タマネギベと病の二次伝染期において、タマネギの出葉始めの葉身 (n 葉) では「n 葉の先端付近 (n-1 ~ n-2 葉の葉身基部) が主要感染部位」となり、出葉途中の葉身や、出葉が完了した若い葉身では「葉の中央部～基部付近が主要感染部位」となると考えられた。よって、薬剤は、株全体にむらなく散布することを基本とし、感染予防の観点から、株元 (葉身基部) 付近まで十分量を散布することが重要である。