

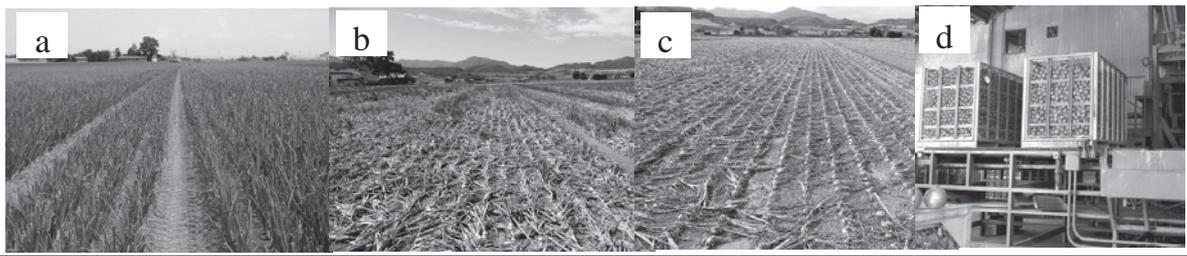
第1章 緒言

タマネギ (*Allium cepa* L.) はヒガンバナ科の草本であり、ネギ、ニラ、ニンニクなど 20 種以上の食用作物が含まれるネギ属 (*Allium*) に属する。作物としてのタマネギの起源はイランを中心とした西アジアであると考えられている。紀元前 27 - 25 世紀にはすでにエジプトで栽培されていた記録があり、現在は世界中の温帯地域で栽培されている (Shigyo and Kik 2008)。日本へは江戸時代に伝搬したが、実際の栽培は明治に入ってから、北海道開拓使がアメリカから導入したことが始まりとされる。2018 年の栽培面積は 26,200ha、年間 1,155,000t の生産量を誇る重要野菜である (農林水産省統計部 2019)。主な産地は北海道、佐賀県、兵庫県などで、中でも機械化が進んだ北海道は生産高の 6 割を占める大産地となっている。秋に播種する西日本のタマネギ栽培に対して、北海道の栽培体系では、春に苗を定植し、夏の終わりに収穫、低温貯蔵して冬を通して出荷される (Fig. 1)。

日本でタマネギに発生する病害は 35 種が知られている。このうち *Botrytis* 属菌による病害が 5 種確認されており、7 種の *Botrytis* 属菌が関与している (NARO Genebank 2020)。これらの *Botrytis* 属菌のそれぞれが引き起こす症状の特徴は異なる (逸見・丹羽 1939)。それぞれに異なる病名を与えられているものの、いずれもタマネギの葉に病原性を持ち、しばしば生育中の圃場のタマネギ葉で識別しがたい白斑状の病斑を作ることから、北海道においては *Botrytis* 属菌によって引き起こされる葉枯れを「白斑葉枯病」として扱っている。このうち鱗茎腐敗が特徴的な灰色腐敗病は、生育期間中の葉に感染して収穫期 - 貯蔵中の鱗茎で発症する (Chilvers et al. 2004)。収穫後に出荷物に直接腐敗を起こすため、多発すると農業上被害が大きい。1970 年代にはこの灰色腐敗病が北海道のタマネギ貯蔵球の 5% 程度に発生して被害をもたらした (石坂・柳田 1981)。近年では全道的に常発する病害ではないものの、1993 年の多発生を受け全道的な調査が行われた事例があるなど、突発的な多発生が懸念される病害である。しかしながら、本病の感染から発病に至る経過や発生条件については不明な部分が多く、タマネギの栽培技術も変遷する中で効率的な防除が求められた。また、灰色腐敗病の病原については国内では *Botrytis allii* Munn とされてきたが、その分類学上の扱いについては確定しておらず、ボトリチスの分類においては、*B. allii* は形態上識別が困難な *Botrytis aclada* Fresenius と同義と見なされてきた (Nielsen et al. 2001)。2003 年に Yohalem ら (2003) は *B. allii* が *B. aclada* と *Botrytis byssoidea* J. C. Walker のハイブリッド種であることを報

告し、これらを独立した種として扱うことを提案した。このことから、道内の灰色腐敗病菌についても、発生種や性状について改めて確認することが求められた。

筆者は 2010 年から 2011 年まで、北海道立総合研究機構 (道総研) 花・野菜技術センターで、2012 年から 2020 年まで同中央農業試験場において、貯蔵病害である灰色腐敗病の発生実態、病原菌の再同定および防除に関する調査・研究を行った。本報告はその結果をとりまとめたものである。



	May	June	July	August	September	October	~April
Operation	Transplantation				forced toppling	harvest	Storage · shipment
Leaf growth	Vesitative growth				neck fall		
Bulb growth		bulb initiation		development			

Fig. 1. Growth Stage of onion in Hokkaido (e.g. middle to late maturing cultivars).

a: Onion plants in early June; b: Onion field in July (bulb development period); c: Onion plants in bulb development period; d: Onion field in mid-August (neck-fall period); e: Onion plants in neck-fall period; f: Onion plants in early September (after forced toppling); g: Onion field before harvest; h: Onions sorted and shipped after harvest.

第2章 研究史

1. タマネギ灰色腐敗病

タマネギ灰色腐敗病 (onion gray - mold neck rot) は生育中の葉に感染して収穫期 - 貯蔵中の鱗茎で発症する (Chilvers et al. 2004). 本病の自然発生において、本圃で生育中の葉に病徴が確認されることはほとんどなく、収穫後に球の腐敗症状として発症が確認される。罹病球では表面から保護葉 (俗称、鬼皮) 下に病原の菌糸、菌核、分生子を豊富に形成し、内部は主に首部から灰色 - 褐色に腐敗する。病原菌は罹病球の内部まで入り込むが軟腐病のような腐敗臭はほとんどない。

石坂・柳田 (1981) は、1975 年前後における道内の *Botrytis* 属菌による貯蔵腐敗の罹病球率は 5% 前後で推移しており、その多くがタマネギ灰色腐敗病菌である *B. allii* によるものだったと報告している。本病は種子伝染することが知られているが、保菌苗を起因とした収穫後の鱗茎腐敗は確認されず (石坂 1981)、また、現在の種子供給体系下で、種子伝染を疑うような発生は見られていない。さらに、病原菌の健全タマネギへの病原力は弱く、発生には気象要因が大きく影響するとされるが、生育期間中の感染や発病条件に関する知見は乏しい。近年、本病は常発して被害をもたらす病害ではないものの、突発的に多発することや最長で半年に及ぶタマネギの貯蔵期間に一度発生すると被害が大きくなる可能性があることから、防除対象として注目される病害である。

2. タマネギ灰色腐敗病の病原

我が国では本病の病原として *B. allii* のみが記載されていた。東アジアにおいて、中国や韓国などでは gray - mold neck rot の病原として *B. aclada* も報告されている (Zhang 2010b; Hwang et al. 2016)。いずれもタマネギの鱗茎腐敗から分離される両種は形態的特徴による識別は困難である (Beever and Weeds 2007)。長らく *Botrytis* 属菌の分類において、*B. aclada* は 2 つの遺伝的に異なるサブグループ AI と AII で構成され、*B. allii* は *B. aclada* のサブグループ AII と見なされてきた (Nielsen et al. 2001; Nielsen and Yohalem 2001)。Yohalem ら (2003) は、遺伝的な解析結果に基づき *B. aclada* サブグループ AII (*B. allii*) が *B. aclada* × *B. byssoidea* のハイブリッド種であることを報告し、これらを遺伝的な変異に基づいて独立した種として扱うことを提案した。なお、*B. allii* のハイブリッド状態は、3 つの核遺伝子 (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする G3PDH, 熱ショックタンパク質 60 をコードする HSP60, DNA 依存性 RNA ポリメラーゼサブユニット II をコードする RPB2) からの DNA シー

ケンスデータに基づく系統解析によって確認されている (Staats et al. 2005)。

この他に貯蔵中の腐敗球から分離される *Botrytis* 属菌として、*B. byssoidea* (菌糸性腐敗病菌)、*B. squamosa* J. C. Walker (= *Botryotinia squamosa* Vienn.-Bourg. 小菌核腐敗病菌) および *B. tulipae* (Lib.) Lind が確認されており、北海道では、貯蔵中の腐敗球から *B. byssoidea* が分離されることも多い。また、このうち *B. squamosa* は葉枯れ症状を引き起こす主な菌であるとされ、葉枯れ症状からは灰色かび病菌の *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (= *Botrytis cinerea* Pers.) も分離される。

3. ボトリチス属菌に対する殺菌剤と薬剤耐性

一方で、*Botrytis* 属菌をはじめとする糸状菌が引き起こす多種の作物病害に対して、ベンズイミダゾール系薬剤 (MBC) による防除が 1970 年代から世界各地で行われてきた。北海道のタマネギ栽培においても、灰色腐敗病に対してベンズイミダゾール系薬剤であるベノミル水和剤あるいはチオファネートメチル水和剤が使用されてきた。ベンズイミダゾールは、 β -チューブリンタンパク質に結合することにより微小管の機能を阻害し、それにより殺菌活性を発揮する。耐性の菌株は、殺菌剤と β -チューブリンの間の結合親和性が低下しており (Davidse 1986)、分子レベルでは、 β -チューブリン遺伝子の突然変異と関連している (Koenraadt et al. 1992)。灰色かび病の病原菌 *B. cinerea* の高度耐性株 (benHR) では、198 番目のコドンが GAG (グルタミン酸) から GCG (アラニン)、GUC (バリン) または AAG (リジン) に変換され、中程度の耐性を示す菌株 (benMR) では、200 番目のコドンが TTC (フェニルアラニン) から TAC (チロシン) に変換されていたことが報告されている (Koenraadt et al. 1993; Yarden and Katan 1993)。タマネギの neck rot でも兵庫県 (Nishiguchi et al. 2000)、およびニュージーランド (Viljanen-Rolinson et al. 2007) でベンズイミダゾール耐性 *B. allii* の報告がある。また、病原菌未同定ながら佐賀県 (Yamaguchi et al. 2002) においてもタマネギの neck rot でのベンズイミダゾール耐性菌が報告されている。しかし、*B. aclada* と *B. allii* の異同については、分類学上の混乱のため、これまでに *B. aclada* と *B. allii* を正確に同定して両者の薬剤耐性系統を確認した事例はない。

4. タマネギ灰色腐敗病の防除

本病は生育期間中の葉の発病はほとんど見られず、収

穫後数か月間貯蔵された鱗茎で腐敗症状が発生するという発症経過をしばしば辿るため、制御が困難であるとされる (Chilvers et al. 2004)。実際に、北海道においても葉での感染時期や圃場での胞子の飛散時期に関する知見が少ない中で、貯蔵球の腐敗を防除することを目的として倒伏期から収穫直前まで薬剤散布が行われている。しかしながら、2003 年の冷害年に多発した時はこの防除で抑えられず、多発する経過や要因を解明した上で、それに基づく効率的な防除法の確立が求められていた。

第3章 タマネギ灰色腐敗病の発生状況

本病原菌の葉に対する病原力は弱く、被害は主に貯蔵鱗茎で起こる。タマネギ葉には複数の *Botrytis* 属菌が感染して白斑症状や水浸状病斑が生ずるため、鱗茎腐敗につながる病原菌の動態、感染から発病に至る条件については不明な部分が多い。北海道における本病の発生は1998年に多発して以降、近年は多発事例がない。このため、本病の発生実態と病原菌の動態について調査を行った。

1. 病徴

本病原菌の葉における病徴は不明瞭であり病勢の進展は緩慢である。すなわち、生育不良や下位葉の黄化、水浸状の腐敗や白斑症状などの症状 (Plate 1-A, B) を示すことがあるものの、無病徴のことも多い (Plate 1-C)。

本病は、主に貯蔵中の鱗茎上半部に発症する。はじめ鱗茎首部内部に水浸状病斑が生じるが、外観からは発見できない (Plate 2)。病勢が進むと、水浸状病斑は灰色 - 茶褐色に変色して鱗茎内部に拡大する。低温での貯蔵中に発病が進展した鱗茎では、鱗茎表面に黒褐色団塊状の菌核を形成し、ピロード状の灰色のかびを生じる (Plate 3)。腐敗臭はほとんどない。

2. 発生実態調査

(1) 方法

2011年から2013年に湧別町の15戸および2011年から2014年に富良野市の23戸の生産者により収穫されて保管庫で貯蔵されたタマネギ球について、選果場で灰色腐敗病の

発病を調査した。調査は選果における外見の腐敗症状から抽出し、腐敗球から灰色腐敗病の症状を呈した球を選別し、縦に切断して灰色腐敗病発病を判定し、計数した。生産者ごとに貯蔵される大型コンテナ単位で調査し、コンテナあたり6,000球として発病球率を算出した。湧別町では2012年3月19日に2戸、3月26日に3戸、4月13日に3戸 (いずれも2011年産タマネギを調査)、2013年4月10日に4戸 (2012年産)、2014年4月2日に3戸 (2013年産) について各戸コンテナ2 - 80基を調査した。富良野市では2012年2月3日に4戸、2月27日に3戸、4月10日に3戸 (いずれも2011年産)、2013年3月13日に3戸 (2012年産)、2013年2月27日に3戸、3月19日に3戸 (2013年産)、2015年2月3日に4戸 (2014年産) について各戸コンテナ1 - 3基を調査した。品種はすべて「北もみじ2000」。

(2) 結果

1) 湧別町では、調査したいずれの年も発生が認められた。3か年通して15戸中8戸で発生があったが、発病球は大型コンテナ1基あたり最多で0.4個、平均で0.08個とわずかだった (Table 1)。

2) 富良野市でも、調査したいずれの年も発生が認められた。3か年通して23戸中9戸で発生があったが、発病球は大型コンテナ1基あたり最多で3個、平均で0.4個とわずかだった (Table 2)。

Table 1. Incidence of gray mold neck rot of onion during the storage period (2011 - 2013, Yubetsu).

Harvest year	Farmer	Date of survey	Number of survey containers	Number of diseased bulbs	Number of diseased bulbs per container	Ratio of diseased bulbs (%)
2011	A	2012/3/19	54	8	0.1	0.00002
			80	3	0.04	0.00001
	C	2012/3/26	44	0	0	0
			36	0	0	0
			50	0	0	0
			30	0	0	0
	F	2012/4/13	40	2	0.05	0.00001
			24	5	0.2	0.00003
2012			I	2013/4/10	24	0
J		36	5	0.1	0.00002	
		28	0	0	0	
		26	10	0.4	0.00006	
		2013	M	2014/4/2	2	0
N		34	1	0.03	0.000005	
		52	8	0.2	0.00003	
		total	560	42	0.08	0.00001

Table 2. Incidence of gray mold neck rot of onion during the storage period (2011 - 2014, Furano).

Harvest year	Farmer	Date of survey	Number of survey containers	Number of diseased bulbs	Number of diseased bulbs per container	Ratio of diseased bulbs (%)
2011	A	2012/2/3	2	0	0	0
	B		2	1	0.5	0.0001
	C		2	1	0.5	0.0001
	D		2	0	0	0
	E	2012/2/27	2	2	1	0.0002
	F		2	2	1	0.0002
	G	2012/4/10	2	0	0	0
	H		3	2	0.7	0.0001
	I		3	2	0.7	0.0001
	J		2	0	0	0
2012	K	2013/3/13	2	0	0	0
	L		2	2	1.0	0.0002
	M		2	0	0	0
2013	N	2014/2/27	1	0	0	0
	O		1	1	1	0.0002
	P	2014/3/19	1	0	0	0
	Q		1	0	0	0
	R		1	0	0	0
	S		1	0	0	0
2014	T	2015/2/3	1	0	0	0
	U		1	3	3	0.001
	V		1	0	0	0
	W		1	0	0	0
total			38	16	0.4	0.00007

3. 発生における環境要因の影響

本病は発生の年次間差が大きく、突発する事例には在圃中、とくに倒伏前後から収穫にかけての多雨が影響するとも言われている。また、近年の全道的な多発事例である1993年は冷害年であった。そこで、発病に対する環境要因の影響について試験、調査した。また、葉の倒伏後、概ね2週間目に行われる根切りにより、収穫までにタマネギの地上部の枯れ上がりが促進され、鱗茎の頸部（首）が乾燥する。その後収穫時 - 収穫後に葉を切断して鱗茎（球）のみにしてコンテナで貯蔵される。そこで、貯蔵性の向上を目的として行われる根切りが発病に及ぼす影響についても検討した。

（1）連続した降雨の影響

2012 および 2014 年に、連続した降雨の影響を検証するため、散水によって降雨条件を再現し、散水の有無による発病を比較した。

1) 方法

①2012年試験

散水は1：長期間散水区（球肥大期－収穫前）7月17日－9月7日、2：生育後半散水区（倒伏期－収穫前）8月5日－9月7日を設け、ミスト式の散水装置を用いて毎日17時から15分間散水した。試験は接種条件下で実施した。接種は7月18-20日、8月6日－8日に孢子 1×10^5

spores/mL以上の病原菌分生子懸濁液を100L/10a噴霧接種した。いずれも噴霧接種は散水後に行った。試験は滝川市内圃場で行い（供試品種：「北もみじ2000」）、畦間30cm、株間13cmの1区5.52㎡の3連制とした。貯蔵中と貯蔵後の2回に分けて外見から全球の発病を調査し、腐敗球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数し、2回の調査の合計を発病球数とした。調査球数と発病球数は全反復の合計、発病球%は反復の平均を示した。調査は2012年11月4日と2013年2月27日に行った。

②2014年試験

散水は1：長期間散水区7月1日－9月1日（葉繁茂期－収穫前）、2：生育前半散水区7月1日－8月6日（葉繁茂期－倒伏期）、3：生育後半散水区7月25日－9月1日（球肥大期－収穫前）を各々設け、ミスト式の散水装置を用いて毎日17時から15分間散水した。降雨の影響を排除するため、6月20日にパイプハウスの上部にビニルを張った雨よけを設置した。接種は6月24日にKF87菌株の菌核（病原菌を接種したタマネギ球上で形成した菌核を回収）を長期間適度な水分条件に保てるように底に穴をあけたプラスチックケースに入れた海砂の上に乗せ、寒冷紗で蓋をして、1区につき外周の角2か所に1ケースずつ、試験区間の通路に均等に設置した。また、7月16日および25日、ならびに8月6日、13日および27日に、

KF72 菌株と KF87 菌株の分生子懸濁液を等量混合して 1×10^5 spores/mL 以上とし、100L/10a 噴霧接種した。いずれも噴霧接種は散水後に行った。試験は滝川市内圃場で行い(供試品種:「北もみじ2000」), 畦間 30cm, 株間 10cm の 1 区 6.09 m² の 3 連制とした。貯蔵中と貯蔵後の 2 回に分けて外見から全球の発病を調査し、腐敗球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数し、2 回の調査の合計を発病球数とした。調査球数と発病球数は全反復の合計、発病球%は反復の平均を示した。調査は 2015 年 1 月 8 日と 4 月 2 - 6 日に行った。

2) 結果

①2012年試験

2012 年 7 月 17 日 - 8 月 4 日の降水量は 70mm, 8 月 5

日 - 9 月 7 日の降水量は 167mm で、8 月 5 日以降、無散水区も断続的に自然降雨がある条件下での試験となった (Fig. 2)。このため、後半散水区と無散水区で圃場の濡れに大きな違いは認められなかった。しかし、7 月中旬から散水を始めた長期間散水区の発病は、倒伏期から散水を始めた後半散水区および無散水区よりも多かった (Table 3)。

②2014年試験

2014 年は、前半に散水を行わなかった後半散水区および無散水区は、干ばつにより倒伏期が早まり、この 2 処理は結果的に根切り遅れとなった。この条件下で、生育期後半に散水を行った長期間散水区と後半散水区での発病が多かった (Table 4)。

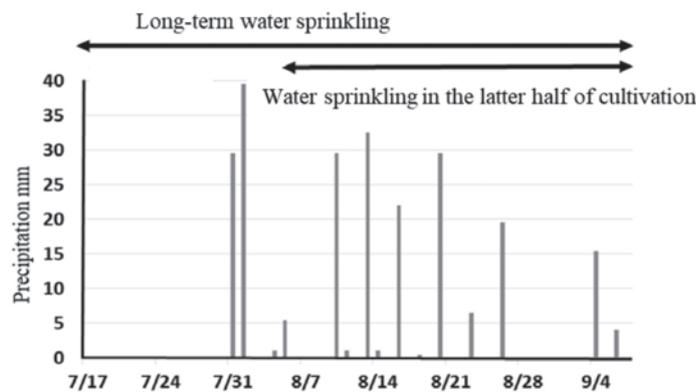


Fig. 2. Natural precipitation during the sprinkling test (AMeDAS, Takikawa 2012).

Table 3. Incidence of gray mold neck rot of onion under different watering conditions (Takikawa 2012).

water sprinkling treatment	Watering period	Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
Long-term	from 7-Jul to 7-Sep	348	47	13.5
in the latter half of cultivation	from 5-Aug to 7-Sep	248	16	6.5
without water sprinkling	-	366	26	7.2

Onions were forced toppling on 21-Aug. Bulbs were harvested on 10-Sep and stored at 5 °C. Inoculation with spore suspension on 18-Jul, 19-Jul, 20-Jul, 6-Aug, 7-Aug, 8-Aug. Water was sprinkled daily from 17:00 for 15 minutes.

Table 4. Incidence of gray mold neck rot of onion under different watering conditions (Takikawa 2014).

water sprinkling treatment	Watering period	Date of neck fall	Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
Long-term	from 1-Jul to 1-Sep	3-Aug	305	77	25.3
in the first half of cultivation	from 1-Jul to 6-Aug	3-Aug	314	39	12.5
in the latter half of cultivation	from 27-Jul to 1-Sep	22-Jul	294	73	24.8
without water sprinkling	-	22-Jul	304	51	16.8

From 20-Jun, test area was covered over with vinyl to eliminate the effects of rainfall. The test plot, which did not water sprinkle water in the first half, accelerated leaf fall due to drought. Onions were forced toppling on 19-Aug. Bulbs were harvested on 3-Sep and stored at 5 °C. Inoculation with sclerotium on 24-Jun and with spore suspension on 16, 25-Jul, 6, 13, 27-Aug. Water was sprinkled daily from 17:00 for 15minutes.

(2) 感染と温度の関係

1) 方法

5, 15 および 25 °C の陽光定温器内で 9cm ポットに植えた 4 - 5 葉期の苗 (供試品種: 「北もみじ 2000」) に病原菌を噴霧接種して 1 週間ビニル袋で湿度を保ち, その後温室に移して管理し, 発病を調査した. 接種源にはジャガイモデキストロース寒天 (PDA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 上 20 °C で 2 週間培養して得られた KF-Ba14 菌株 (*B. aclada*) の孢子懸濁液 (1×10^5 個/mL) を用いた. 接種 20 および 29 日後に以下の発病指数で発病を調査し, 発病度 = $100 \times \Sigma$ (程度別発病葉数 \times 指数) / $4 \times$ 調査葉数の計算式で発病度を算出した. さらに, 29 日後の発病指数が 0 だった株の葉身と葉鞘 (首部含む)

から菌の分離を行い, 発病株と無病徴で菌が分離された株の合計で感染株%を算出した. 試験は 5 株/ポット \times 3 ポットの規模で行った.

発病指数: 0, 発病なし; 1, 下位葉に枯れまたは孢子形成; 2, 上 - 中位葉にも発病; 3, 枯死

2) 結果

5, 15 および 25 °C それぞれの温度における発病度は接種 20 日後で 5, 40 および 71 であった. 29 日後では 6, 62 および 70 と接種から感染時の温度が高いほど発病度は高かった. 29 日後の感染株%はそれぞれ 70, 94, 88 で, 5 °C 接種で 29 日後に発病を認めない株でも, 地上部は高い頻度で感染していた (Table 5).

Table 5. Infection of gray mold neck rot of onion under different temperatures.

Infection temperature (°C)	Disease severity		Ratio of Infection (%)
	20 days after inoculation	30 days after inoculation	
5	5	6	70
15	40	62	94
25	71	70	88
non-inoculation	0	0	0

a Disease index 0: No disease, 1: Withered or sporulated on lower leaves, 2: Disease on upper to middle leaves, 3: Death

b Ratio of infection was calculated as the sum of disease-causing plants and plants in which the pathogen has been isolated without symptoms.

(3) 施肥の影響

施肥の影響を評価するため, 窒素肥料の施肥量を変えた試験 (通常施肥区: 18kg/10a, 減肥区: 6kg/10a) を, 2013 年に追肥の影響を評価するため, 追肥時期 (葉繁茂期, 球肥大開始期) を変えた試験を実施した.

1) 方法

① 施肥量の影響

滝川市内圃場で, 畦間 30cm, 株間 13cm の 1 区 5.52 m² の 3 連制で行った. 2011 年 5 月 19 日にタマネギ苗 (供試品種: 「北もみじ 2000」) を圃場に移植し栽培, 8 月 4 日に孢子 1×10^5 個/mL 以上の KF87 菌株病原菌孢子懸濁液を 100L/10a 噴霧接種した. 噴霧接種は夕方にミスト式の散水装置で散水後行った. 倒伏期を 8 月 9 日に迎え, 根切りを 8 月 24 日に行った後, 9 月 9 日に収穫し, 風乾後 5 °C で貯蔵した. 貯蔵中 2011 年 11 月 4 日と貯蔵後の 2012 年 2 月 27 日に外見から全球の発病を調査し, 腐敗球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数し, 2 回の調査の合計を発病球数とした. 調査球数と発病球数は全反復の合計, 発病球%は反復の平均を示した. *Botrytis* 属菌による白斑葉枯病の防除のため, 6 月 14 日フルアジナム

水和剤, 6 月 29 日ボスカリド水和剤, 7 月 13 日クレソキシムメチル水和剤を散布した.

② 施肥時期 (追肥) の影響

試験は訓子府町内圃場で, 畦間 27cm, 株間 10.5cm の 1 区 2.7 m² の 4 連制で行った. 2013 年 5 月 20 日にタマネギ苗を圃場に移植し栽培, 7 月 16 日, 8 月 6 日, 15 日, 29 日に噴霧接種孢子 1×10^5 個/mL 以上の Ya2C 菌株と KF87 菌株を等量混合した病原菌孢子懸濁液を 50L/10a 噴霧接種し, 8 月 15 日にシャーレで培養した KF-87 の菌核を 1 区につき 1 / 4 枚ずつ試験区中央に設置した. 施肥は全区に窒素分 12kg/10a を基肥として施し, 葉繁茂期の 7 月 1 日と球肥大開始期の 7 月 15 日に 6kg/10a を追肥した. 倒伏期を 8 月 9 日に迎え, 根切りを 8 月 24 日に行った後, 9 月 9 日に収穫し, 風乾後 10 °C で貯蔵した. 貯蔵中の 2014 年 1 月 14 日と貯蔵後の 4 月 3 日に外見から全球の発病を調査し, 腐敗球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数し, 2 回の調査の合計を発病球数とした. 調査球数と発病球数は全反復の合計, 発病球%は反復の平均を示した. *Botrytis* 属菌による白斑葉枯病の防除のため, 6 月 14 日フルアジナム水和剤, 6 月 29 日ボスカリド水和

剤，7月13日クレソキシムメチル水和剤を散布した。

響は判然としなかった (Table 6)。

2) 結果

①施肥量の影響

減肥区における葉先枯れ症状の発生あるいは多肥区で倒伏など施肥に起因すると考えられる作物体の損傷は認められなかった。減肥区で発病球%は19.8，多肥区で20.5と処理間差がなく，窒素施肥量の多少による発病への影

②施肥時期 (追肥) の影響

2013年の追肥時期を変えた試験では，発病球%は，追肥なし区で9.2に対し，葉繁茂期の追肥1区で7.1，球肥大開始期の追肥2区で11.0となった。処理間差がなく，追肥による発病への影響は判然としなかった (Table 7)。

Table 6. Incidence of gray mold neck rot of onion under different fertilization conditions with water sprinkling (Takikawa 2011).

Fertilization conditions	Nitrogen fertilizer application (kg/10a)	Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
with reduced fertilizer	6	308	66	19.8
with increased fertilizer	18	311	63	20.5

Onion leaves began to fall over on 9-Aug and forced toppling on 24-Aug. Bulbs were harvested on 9-Sep and stored at 5 °C. The spore suspension was inoculated after watering on the evening of 4-Aug.

Table 7. Incidence of gray mold neck rot of onion under different additional fertilization (Kunneppu 2013).

Growing stage of additional fertilizer application	Fertilization date	Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
Vegetative Growth	1-Jul	156	11	7.1
Bulb initiation	15-Jul	184	20	11.0
without additional fertilizer	-	220	20	9.2

N=12kg/10a of fertilizer was applied before planting.

Onion leaves began to fall over on 13-Aug and forced toppling on 28-Aug. Bulbs were harvested on 11-Sep and stored at 10 °C. The spore suspension was inoculated on 16-Jul and 6-Aug, 15-Aug, 29-Aug and sclerotium was placed on 15-Aug.

(4) 根切りの実施時期

タマネギは，葉が倒伏した後も地上部が枯れ上がるまでは鱗茎肥大が続く。根切り作業は，地上部の枯れ上がりを促して頸部を乾燥させ，貯蔵性を高めることを目的に，通常，倒伏から2週間後頃に行われる。しかしながら，生産現場では，枯れ上がりを遅らせて倒伏後も鱗茎肥大を継続させることを狙って根切り作業を遅らせることがある。根切り遅れは，枯葉の遅れをもたらし，倒伏したタマネギ葉や頸部の傷から病原菌が侵入する機会を増やすことが想定される。また，根切り遅れに伴い収穫も遅れると在圃期間が長くなる。そこで，以下の試験を行い，適期処理と根切りを1-2週間遅らせた処理，あるいは適期収穫と根切り・収穫とも2週間程度遅らせた処理での発病を比較した。

1) 方法

①2012年滝川試験 (散水・無散水)

タマネギ苗 (供試品種:「北もみじ 2000」) を5月15日に圃場に移植し栽培した。接種は7月18, 19, 20日，8月6, 7, 8日にKF72菌株とKF87菌株の分生子懸濁液 (1×10^5 個/mL) を等量混合して50-100L/10a噴霧接種した。

試験区は畦間30cm，株間13cmの1区5.52 m²の3連制で行い，根切り時期と散水の有無を変えた試験区を設けた。すなわち1: 根切り適期 (散水)，2: 根切り遅れ (散水)，3: 根切り適期 (無散水)，4: 根切り遅れ (無散水) とし，収穫は一斉に行った (Table 8)。収穫後は風乾し5°Cで貯蔵した。

発病を促すための散水は7月17日から9月7日まで毎日17時から15分間ミスト式の散水装置で行った。

発病調査は貯蔵中の1月と貯蔵後の3月または4月の2回に分けて外見から全球の発病を調査し，腐敗球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数し，2回の調査の合計を発病球数とした。調査球数と発病球数は全反復の合

計、発病球%は反復の平均を示した。

②2013年訓子府試験（無散水）

タマネギ苗（供試品種：「北もみじ 2000」）を5月20日に圃場に移植し栽培した。接種は7月16日、8月6日、8月15日、8月29日に Ya2C 菌株と KF87 菌株の分生子懸濁液（ 1×10^5 個/m）を等量混合して 50L/10a 噴霧接種し、8月15日に PDA 上（9cm ペトリ皿）で培養した菌核を1区あたり 1/4 枚分、試験区中央に設置した。

試験区は畦間 27cm、株間 10.5cm の 1 区 2.7 m² の 3 連制で行い、根切りと収穫時期を変えた試験区を設けた。

すなわち 1：根切り適期+収穫適期、2：根切り遅れ+収穫適期、3：根切り遅れ+収穫遅れとした（Table 9）。収穫後は風乾し 10℃で貯蔵した。

発病調査は貯蔵中の1月と貯蔵後の3月または4月の2回に分けて外見から全球の発病を調査し、腐敗球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数し、2回の調査の合計を発病球数とした。調査球数と発病球数は全反復の合計、発病球%は反復の平均を示した。

③2013年滝川試験（散水）

タマネギ苗（供試品種：「北もみじ 2000」）を5月21日に圃場に移植し栽培した。接種は6月22日に KF87 菌株の菌核（病原菌を接種したタマネギ球上で形成した菌核を回収）を底に穴をあけたプラスチックケースに入れた海砂の上に乗せ、寒冷紗で蓋をして、1区につき外周の角2か所に1ケースずつ、試験区間の通路に均等に設置した。また、7月9日、24日、8月9日、22日に KF72 菌株と KF87 菌株の分生子懸濁液（ 1×10^5 個/mL）を等量混合して 100L/10a 噴霧接種した。

試験区は畦間 30cm、株間 11.5cm の 1 区 5.25 m² の 3 連制で行い、根切りと収穫時期を変えた試験区を設けた。すなわち 1：根切り適期+収穫適期、2：根切り遅れ+収

穫適期、3：根切り遅れ+収穫遅れとした（Table 10）。収穫後は風乾し 5℃で貯蔵した。

発病を促すため、全ての試験区において7月9日から30日まで毎日17時から10分間ミスト式の散水装置で散水した。

発病調査は貯蔵中の1月と貯蔵後の3月または4月の2回に分けて外見から全球の発病を調査し、腐敗球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数し、2回の調査の合計を発病球数とした。調査球数と発病球数は全反復の合計、発病球%は反復の平均を示した。

2) 結果

①2012年滝川試験（散水・無散水）

散水による発病の助長は認められず、中 - 多発生での試験となった。処理区によって根切り時期をずらし、収穫は一斉に行ったところ、発病球%は散水の適期根切り区で 13.5、根切り遅れ区で 9.1、無散水の適期根切り区で 7.2、根切り遅れ区で 12.1 だった。根切り時期の違いと発病のとの因果関係は判然としなかった（Table 8）。

②2013年訓子府試験（無散水）

中 - 多発生での試験となった。発病球%は、根切り・収穫とも適期区で 9.2、根切り遅れ・収穫適期区で 12.4、根切り・収穫とも遅らせた区で 19.5 だった。在圃期間の長い根切り・収穫とも遅らせた区で最も発病が多かった（Table 9）。

③2013年滝川試験（散水）

散水によって発病を促し、多 - 甚発生の激発条件下での試験となった。発病球%は、根切り・収穫とも適期区で 28.6、根切り遅れ・収穫適期区で 26.3、根切り・収穫とも遅らせた区で 23.5 だった。処理間差は判然としなかった（Table 10）。

Table 8. Incidence of gray mold neck rot of onion at different watering treatment and pre-harvest cultivation treatment (Takikawa 2012).

with/without water sprinkling	Date of cultivation treatment			Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
	forced toppling		harvest			
with sprinkling	Normal ^a	21-Aug	8-Sep	348	47	13.5
with sprinkling	Delayed ^a	28-Aug	8-Sep	217	18	9.1
without sprinkling	Normal ^b	21-Aug	8-Sep	366	26	7.2
without sprinkling	Delayed ^b	28-Aug	8-Sep	290	35	12.1

a Forced toppling: "normal" is 2 weeks and "delayed" is 4 weeks after finished neck fall, respectively.

b Harvest: "normal" is 1 or 2 weeks and "delayed" is 2~3 weeks after force toppling, respectively.

From 17-Jul to 7-Sep, water was sprinkled daily from 17:00 for 15minutes. Onion leaves finished to fall over on 11-Aug. Harvested bulbs were stored at 5℃. The spore suspension was inoculated on 18, 19, 20-Jul, 6, 7, 8-Aug.

Table 9. Incidence of gray mold neck rot of onion at different pre-harvest cultivation treatment (Kunneppu, 2013).

Date of cultivation treatment				Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
Forced toppling		Harvest				
Normal ^a	28-Aug	/ normal ^b	11-Sep	220	20	9.2
Delayed ^a	4-Sep	/ normal	11-Sep	228	28	12.4
Delayed	4-Sep	/ delayed ^b	27-Sep	210	41	19.5

a Forced toppling: "normal" is 2 weeks and "delayed" is 4 weeks after finished neck fall, respectively.

b Harvest: "normal" is 1 or 2 weeks and "delayed" is 2~3 weeks after force toppling, respectively.

Onion leaves finished to fall over on 14-Aug. Harvested bulbs were stored at 10 °C. The spore suspension was inoculated on 16-Jul, 6-Aug, 15-Aug, 29-Aug and sclerotium was placed on 15-Aug.

Table 10. Incidence of gray mold neck rot of onion at different pre-harvest processing time under watering condition (Takikawa, 2013).

Date of cultivation treatment				Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
Forced toppling		Harvest				
Normal ^a	19-Aug	/ normal ^b	2-Sep	315	90	28.6
Delayed ^a	26-Aug	/ normal	2-Sep	325	86	26.3
Delayed	26-Aug	/ delayed ^b	11-Sep	300	69	23.5

a Forced toppling: "normal" is 2 weeks and "delayed" is 4 weeks after finished neck fall, respectively.

b Harvest: "normal" is 1 or 2 weeks and "delayed" is 2~3 weeks after force toppling, respectively.

From 9-Jul to 30-Jul, water was sprinkled daily from 17:00 for 10minutes. Onion leaves finished to fall over on 6-Aug. Harvested bulbs were stored at 5 °C. The spore suspension was inoculated on 9-Jul, 24-Jul, 9-Aug, 22-Aug and sclerotium was placed on 22-Jul.

4. 考察

石坂・柳田 (1981) によると、1975 から 1978 年にかけて行った調査において道内の *Botrytis* 属菌による貯蔵腐敗の発病球%が 5 前後で推移しており、その多くがタマネギ灰色腐敗病菌である *B. allii* によるものだったと報告している。2011 - 2014 年にかけて道内の 2 地域 38 戸の生産者で本病の貯蔵中の発生状況を調査したところ、発生球%は最大で 0.0001 と極めて少ない発生にとどまった。調査期間中における同地域での突発的な多発生もなかったことから (データ未掲載)、調査期間における本病の発生は極めて少なく推移していたと言える。タマネギは多くの場合同一の圃場で連作される。調査地域は石坂らが調査を行った北見、富良野地域で行っており、本調査で明らかになった発生状況から、本病の発生に関与する何らかの要因 (気象、施肥、栽培体系、病原菌等) が当時とは異なっている可能性が示唆された。

一般に本病の多発は低温多雨で起こると言われる。連続した降雨の影響を散水試験によって評価したところ、2 試験とも散水期間が長い区で発病が多くなった。生育期前半あるいは後半の散水の影響は試験によって異なり、降雨時期の影響は判然としなかった。本病による貯蔵中の鱗茎腐敗症状は、在圃期間中に病原菌の葉への感染と、葉からあるいは直接の病原菌の頸部への侵入が起こっているとされる (Chilvers et al. 2004)。本試験において、生育期前半の散水は葉への感染を、後半の散水は頸部への侵入を促すことを想定して行ったが、本試験からは発病に影響する降雨の時期は明らかにできなかった。しかし、栽培期間を通した断続的な降雨は貯蔵中の鱗茎腐敗の発生を助長することが示された。1993 年の多発要因解析では、「倒伏期や根切り作業の大幅な遅れに加え、青立ちが目立ち、天候は不順傾向であったことから、首部の乾燥が不十分となり、感染に好適した。」とされている (北

海道農政部 1994)。低温や多雨の影響によりタマネギの生育が停滞することで在圃期間が長くなり、また、倒伏後の枯葉が進まず菌が侵入しやすくなったと考えられる。このように、発生の多少には降雨等の気象条件がタマネギの生育にも影響を与えたと推察される。本試験で行った散水試験の結果、散水期間が長いほど発病が多くなったことから、降水が多いと発病を助長すると考えられた。

温度を変えて接種し、湿度を保って感染を促した試験では、その後 15 および 25 °C 区で地上部に発病が認められた。この場合、20 日後には孢子形成も認められた。自然条件下で成長した植物体の葉に病徴はほとんど認められないが、夏季に感染した場合、葉で症状が現れる場合もある。病葉は、二次感染源ともなり得ると考えられる。

また、接種温度を変えて苗の感染率を比較した試験からは、灰色腐敗病菌は 5 °C の低温でも無病徴のまま高頻度に感染することと、低温時の感染はその後温度が上がっても病勢が進展しにくいことが確認された。

施肥量および追肥時期を変えた試験では、減肥区における葉先枯れ症状の発生あるいは多肥区で倒伏など施肥に起因すると考えられる作物体の損傷は認められず、施肥と発病との関連は確認されなかった。

また、生産現場では、収穫後の貯蔵中に腐敗が起こる本病において、倒伏から収穫直前に頸部から感染することを恐れ、この時期を防除重点時期としている。本試験では、生産現場でしばしば行われる倒伏後の頸部の乾燥を促す根切りを遅らせる行為が発生を助長するかどうかを検討した。試験では収穫時の乾燥が不十分となる根切りのみ遅らせた区では発病が増加せず、根切り・収穫とも遅らせた区で多くなった。十分に乾燥が行われたこの区で発病が多くなったことから、発生の増加は在圃期間の長期化に起因し、収穫時の頸部の乾燥不足が菌の感染を促したことによるものではないと考えられた。このことから、根切りのみを遅らせることが多発を招く可能性は低いと推察された。

第4章 病原菌

本邦における灰色腐敗病の病原はこれまで *Botrytis allii* 1種が報告されていた。一方で、*Botrytis* 属菌の分類において、*B. allii* は *B. aclada* 内のサブグループとするか、独立種とするか見解が分かれていたが、Yohalem et al. (2003) は遺伝的な解析結果に基づきそれぞれ独立種として扱うことを提案した。本研究では Yohalem et al. (2003) の種概念に基づき、北海道内で発生したタマネギの鱗茎腐敗症状から分離した菌株について、分生子の核数、形態、および PCR-RFLP (Nielsen et al. 2002) による遺伝子解析から同定を行った。また、その病原性や分布についても調査した。

1. 遺伝学および形態学的分類による再同定

2009年から2012年にかけて道内の4地域(岩見沢市、滝川市、富良野市および中富良野町)でタマネギの鱗茎腐敗症状から10菌株を分離保存し(Table 11)、これらの菌株について、遺伝学および形態学的分類による再同定を試みた。また、農業生物系特定産業技術研究機構(NARO)農業生物資源ジーンバンク(MAFF)および独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)に保存されていた *B. allii* の2菌株(MAFF712062およびNBRC9430)と *B. byssoidea* 1菌株(NBRC9431)を参照菌株とした。

(1) 遺伝子解析による再同定

1) 方法

①菌体からのDNA抽出

菌体のDNAは、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、暗所20℃で5-7日間培養した菌糸から抽出した。抽出したDNAは50μLのTEバッファー(10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解し、使用まで-30℃で保存した。DNA濃度は、アガロースゲル電気泳動後のバンドの濃さに基づいて、0.01 - 0.1μg/μLの範囲に調整した。

②PCRによる遺伝子領域増幅と制限酵素断片長多型分析(PCR - RFLP)

Table 11の菌株および *B. byssoidea* の参照菌株(NBRC 9431)、および全ての圃場菌株を分析した。Nielsen ら(2002)によって記載された方法に基づいてボトリチス

特異的プライマー、BA2fおよびBA1rを用いたPCR増幅を行った。より多くのDNA増幅産物を得るために、Nielsen らの方法を一部改変してPCRサイクル数を増やした。サイクリング条件は、94℃で3分間、その後、94℃で30秒間の変性、60℃で30秒間のアニーリング、72℃で1分間の伸長、最後の伸長は72℃を3分間とした。メーカーの推奨に従って、PCR増幅産物(2μL)は制限酵素 *ApoI* (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA)を添加して総量10μLに調整し、37℃でインキュベーションして消化した。制限酵素処理後、DNA産物(5μL)を1.5%アガロースゲルで電気泳動後GelRedにより染色し、UVライト下で可視化した。試験は2回行った。PCR-RFLPに基づいて、タマネギの病害に関連する5つのボトリチス種が、以下のようにPCR産物の酵素消化後のDNA断片長の違いに従って識別される。すなわち、*B. aclada*, 413 bp; *B. allii*, 413 bp + 298 bp; *B. byssoidea*, 298 bp; *B. squamosa*, 269 bp; *B. cinerea*, 250 bpとなる(Nielsen et al. 2002)。

2) 結果

ボトリチス特異的プライマー、BA2fおよびBA1rを用いたPCR増幅により、全株のDNAテンプレートから413 bpのPCR増幅産物が得られた(データ省略)。*ApoI*による増幅産物の制限酵素処理後、*B. allii*参照株は2つのフラグメント(413および298 bp)を生成し、*B. byssoidea*参照株は1つのフラグメント(298 bp)を生成した。これらの結果は、Nielsen ら(2002)の説明と一致した。5菌株(KF-Ba225, BaFS12-3a, BaFss12-2e, BaI12-6, BaI12-7)では413 bpおよび298 bpのバンドが観察され、残りの5菌株(KF -Ba130, KF-Ba205, BaFS11-12, BaTH11-A, BaNW11-a)では413 bpのみのバンドが観察された(Fig. 3)。従って、菌株KF-Ba225, BaFS12-3a, BaFss12-2e, BaI12-6, およびBaI12-7は *B. allii*、菌株KF -Ba130, KF-Ba205, BaFS11-12, BaFS11-A, およびBaNW11-aは *B. aclada* であると考えられた。また、この実験では、すべてのPCR反応とその後のPCR-RFLP分析で約100 bpのバンドが現れた。アニーリング温度を下げると、60℃に比べてバンドが明確になった(データ省略)。したがって、これはNielsen ら(2002)の研究で観察されたものと同様の非特異的なバンドであると結論づけた。



Fig. 3. *ApoI* restriction digestion of the PCR product of *Botrytis* spp. from onion bulbs.

Lane 1: isolate MAFF712062 (*Botrytis allii*); Lane 2: isolate NBRC9430 (*B. allii*); Lane 3: isolate NBRC9431 (*B. byssoidea*); Lane 4: isolate KF-Ba130 (*B. aclada*); Lane 5: isolate KF-Ba205 (*B. aclada*); Lane 6: isolate BaFS11-12 (*B. aclada*); Lane 7: isolate BaTH11-A (*B. aclada*); Lane 8: isolate BaNW11-a (*B. aclada*); Lane 9: isolate KF-Ba225 (*B. allii*); Lane 10: isolate BaFS12-3a (*B. allii*); Lane 11: isolate BaFss12-2e (*B. allii*); Lane 12: isolate BaI12-6 (*B. allii*); Lane 13: isolate BaI12-7 (*B. allii*); M: 100-bp ladder.

Table 11. Identification based on morphological characteristics of conidia and results of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

Isolate	Year of isolation	Geographic origin	conidial size ^f (μm)	L/B ^g	N N ^h	PCR-RFLP ⁱ (bp)	Identification ^j
KF-Ba130	2009	Iwamizawa, Hokkaido	7.7 (1.1) \times 4.8 (0.6)	1.6	1-2	413	<i>B. aclada</i>
KF-Ba205	2009	Iwamizawa, Hokkaido	7.6 (1.9) \times 4.98 (0.6)	1.6	1-2	413	<i>B. aclada</i>
BaFS11-12	2011	Furano, Hokkaido	7.2 (1.3) \times 4.2 (0.7)	1.7	1-2	413	<i>B. aclada</i>
BaTH11-A	2011	Takikawa, Hokkaido	8.7 (1.4) \times 4.58 (0.5)	1.9	1-2	413	<i>B. aclada</i>
BaNW11-a	2011	Naka-furano, Hokkaido	11.5 (1.5) \times 4.2 (1.1)	1.3	1-2	413	<i>B. aclada</i>
KF-Ba225	2009	Iwamizawa, Hokkaido	10.1 (1.9) \times 5.7 (0.6)	1.8	1-2	413 + 298	<i>B. allii</i>
BaFS12-3a	2012	Furano, Hokkaido	10.1 (2.5) \times 6.3 (1.1)	1.6	1-2	413 + 298	<i>B. allii</i>
BaFss12-2e	2012	Furano, Hokkaido	9.1 (1.9) \times 5.3 (0.6)	1.7	1-2	413 + 298	<i>B. allii</i>
BaI12-6	2012	Iwamizawa, Hokkaido	11.1 (1.8) \times 6.6 (0.9)	1.7	1-2	413 + 298	<i>B. allii</i>
BaI12-7	2012	Iwamizawa, Hokkaido	10.2 (0.9) \times 5.8 (0.5)	1.8	1-2	413 + 298	<i>B. allii</i>
MAFF 712062 ^a	-	Hyogo, Japan	10.5 (1.5) \times 6.3 (0.6)	1.7	1-2	413 + 298	<i>B. allii</i>
NBRC 9430 ^b	1971	Hokkaido, Japan	9.8 (1.4) \times 6.3 (0.6)	1.6	1-2	413 + 298	<i>B. allii</i>
NBRC 9431 ^c	1971	Hokkaido, Japan	ns	-	-	298	<i>B. byssoidea</i>
BA1d (<i>B. aclada</i>) ^d		Denmark	9.5 \times 5.0 ^d	1.9		413 ^d	
MUCL 403 (<i>B. allii</i>) ^d		Netherlands	9.9 \times 5.3 ^d	1.9		413 + 298 ^d	
MUCL 94 (<i>B. byssoidea</i>) ^d		Culture of type specimen	ns ^d	-		298 ^d	
SAL 001 (<i>B. allii</i>) ^e		-	10.7 (1.5) \times 5.7 (0.5) ^e	1.9		ns	
SAL 003 (<i>B. allii</i>) ^e		-	8.6 (1.1) \times 4.7 (0.7) ^e	1.9		ns	
SAL 019 (<i>B. byssoidea</i>) ^e		Japan	13.0 (1.4) \times 8.3 (0.9) ^e	1.5		ns	

a MAFF 712062 was supplied as *B. allii* from the NARO GeneBank.

b, c NBRC 9430 and NBRC 9431 were supplied as *B. allii* and *B. byssoidea* from NITE, respectively. NBRC 9430 is SAL004 isolate in Shirane et al. (1989).

d Nielsen et al. (2001).

e Shirane et al. (1989), *B. allii* was identified only by morphological features.

f Average length \times width of 100 conidia. Numbers in parentheses are standard errors of the means. ns = nonsporulating in culture.

g Length and breadth ratio.

h Number of nuclei per cell.

i Fragment size of polymerase chain reaction product after *ApoI* digestion.

j Identification result based on PCR-RFLP.

(2) 形態学的分類

1) 方法

Table 11 の 10 菌株 (KF -Ba130, KF-Ba205, BaFS11-12, BaTH11-A, BaNW11-a, KF-Ba225, BaFS12-3a, BaFss12-2e, BaI12-6, BaI12-7) を暗所で 20 °C の PDA 上で 7 - 14 日間培養し分生子を形成させ、光学顕微鏡下で形状および大きさを観察した。分生子を 4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI; NucBlue Fixed Cell Stain ReadyProbes Reagent, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA) で染色し、核数 (菌株あたり 50 個の分生子) を蛍光顕微鏡下で計測した。

2) 結果

形態観察では、全ての菌株で菌糸は分枝し、隔膜を有することが観察された。分生子柄は菌糸から直接生じ、しばしば二分または三分して頂点に向かって分岐した。分生子は卵形または楕円形であり、分生子柄上に形成された分生子柄先端部の分生子形成細胞から出芽した (Plate 4)。

5 菌株 (KF-Ba130, KF-Ba205, BaFS11-12, BaTH11-A, BaNW11-a) の分生子は、長さが 7.2 - 11.5 μ m、幅が 4.2 - 4.98 μ m、分生子の長さ / 幅の比は 1.3 - 1.9 であった。各分生子には 1 - 2 個の核があった (平均 : 1.2)。これらの 5 つの菌株は、PCR - RFLP 分析に基づいて *B. aclada* として識別された (Table 11)。

他の 5 菌株 (KF-Ba225, BaFS12-3a, BaFss12-2e, BaI12-6, BaI12-7) は、PCR - RFLP 分析に基づいて *B. allii* と同定した。分生子は長さ 9.1 - 11.1 μ m、幅 5.3 - 6.6 μ m、長さ / 幅の比率は 1.6 - 1.8 で、*B. allii* の 2 つの参照菌株 (MAFF 712062 および NBRC 9430) に類似していた (Table 11)。形態学的特徴は、いずれも Nielsen ら (2001) および Shirane ら (1989) によって記載された *B. allii* 菌株と類似し、両種に明確な差は見られなかった。

(3) 分離菌の病原性

1) 方法

① 鱗茎に対する病原性

タマネギの鱗茎での病徴を比較するために、Table 12

の菌株 (KF-Ba130, KF-Ba205, BaFS11-12, BaTH11-A, BaNW11-a, KF-Ba225, BaFS12-3a, BaFss12-2e, BaI12-6, BaI12-7) を用いた。5 日齢の PDA 培養物から切り出した菌糸寒天片 (直径 6 mm) を上部で切り取った鱗茎 (切断面の直径 2 cm) に置き、10 °C の暗所で培養した。各菌株は 3 球ずつ接種した。接種 30 日後に症状を調査した。

② 葉への接種による病原性

葉への接種による鱗茎への病原性比較のために Table 13 の菌株 (BaNW11-a, BaU2-8, BaK17, BaI12-7) を用いて、屋外でプランター規模の接種試験を行った。2 か月齢のタマネギ苗を 2018 年 5 月 11 日にプランター (640 × 220 × 180mm) に 12 株ずつ移植し (品種「オホーツク 222」)、屋外で栽培した。7 月 11 日と 7 月 18 日に、分生子懸濁液 (10⁵ spores / mL) を株全体に噴霧接種して一晩ビニル袋で覆い湿度を保って感染を促した。9 月 20 日に全球を収穫して風乾、5 °C で貯蔵し、2019 年 1 月 16 日に乾腐病による腐敗球を除いた全球について発病球を調査した。試験は 1 区 12 m² の 2 連制で行った。

2) 結果

① 鱗茎に対する病原性

本研究で用いたすべての菌株で、接種されたタマネギの鱗茎に水浸状で、灰色がかかった褐色の腐敗症状を示し、これら菌株がタマネギ鱗茎に病原性を有することを示した。接種球はのちに菌糸体と分生子で覆われ、菌核が形成された (Plate 5)。*B. allii* と *B. aclada* いずれの菌株を接種した鱗茎も同様の腐敗症状を示した。

② 葉への接種による病原性

栽培期間の接種による鱗茎への病原性は、*B. aclada* で貯蔵後の発病球%が 41.7, 61.1, *B. allii* で 41.7, 60.0 と、両種間で病原力の違いは認められなかった (Table 12)。

(4) 各温度における生育と胞子形成

1) 方法

① 各温度における培地上の生育

Table 13 に示した *B. aclada* 6 菌株 (KF-Ba130,

Table 12. Pathogenicity of *Botrytis aclada* and *Botrytis allii* for growing onion.

isolate	identification	Year of isolation	Geographic origin	Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
BaNW11-a	<i>B. aclada</i>	2011	Naka-furano, Hokkaido	24	10	41.7
BaU2-8	<i>B. aclada</i>	2013	Ubetsu, Hokkaido	18	11	61.1
BaK17	<i>B. allii</i>	2013	Kunneppu, Hokkaido	24	10	41.7
BaI12-7	<i>B. allii</i>	2012	Iwamizawa, Hokkaido	20	12	60.0

KF-Ba205, BaFS11-12, BaNW11-a, BaTH11-A), *B. allii* 5 菌株 (KF-Ba225, BaFS12-3a, BaI12-6, BaI12-7, NBRC9430) および *B. squamosa* 1 菌株 (NBRC9431) を PDA 培地 (9cm ペトリ皿 25 °C 暗黒下) で前培養し, 6mm のコルクボーラーで打ち抜いた菌そうを 3 つずつ新たな PDA 培地に移植し, 2, 5, 10, 15, 20, 25 および 30 °C

の暗黒下で培養した. 3 日後に各コロニーの 2 か所についてコルクボーラーの縁からのコロニーの先端までの長さを計測し, 3 つのコロニーの平均を菌糸伸長として孢子形成の有無を目視および光学顕微鏡下 (40 倍) で確認した. 試験は 2 回行った.

Table 13. Strains used in this study for comparison of mycelial growth under different temperature conditions.

isolate	identification	Year of isolation	Geographic origin
KF-Ba130	<i>B. aclada</i>	2009	Iwamizawa, Hokkaido
KF-Ba205	<i>B. aclada</i>	2009	Iwamizawa, Hokkaido
BaFS11-12	<i>B. aclada</i>	2011	Furano, Hokkaido
BaNW11-a	<i>B. aclada</i>	2011	Naka-furano, Hokkaido
BaTH11-A	<i>B. aclada</i>	2011	Takikawa, Hokkaido
KF-Ba225	<i>B. allii</i>	2009	Iwamizawa, Hokkaido
BaFS12-3a	<i>B. allii</i>	2012	Furano, Hokkaido
BaI12-6	<i>B. allii</i>	2012	Iwamizawa, Hokkaido
BaI12-7	<i>B. allii</i>	2012	Iwamizawa, Hokkaido
NBRC9430 ^a	<i>B. allii</i>	1971	Hokkaido
NBRC9431 ^a	<i>B. byssoidea</i>	1971	Hokkaido

a NBRC 9430 and NBRC 9431 were supplied as *B. allii* and *B. byssoidea* from NITE, respectively. NBRC 9430 is SAL004 isolate in Shirane et al. (1989).

②孢子形成

Table14 に示した *B. aclada* 5 菌株 (KF-Ba130, KF-Ba205, BaFS11-12, BaNW11-a, BaTH11-A), *B. allii* 6 菌株 (KF-Ba225, BaFS12-3a, BaI12-6, BaI12-7, NBRC9430, MAFF712062) を PDA 培地で前培養し, 6mm のコルクボーラーで打ち抜いた菌そうを 1 つずつ新たな PDA 培地に移植し, 25 °C 暗黒下で培養した. 7 日後と 14 日後に各コロニーのコルクボーラーの縁から 1cm 離れた 4 か所について 6mm のコルクボーラーで打ち抜き, 20mL の蒸留水に入れてボルテックスミキサーで攪拌し (30 秒 × 2 回), 孢子を懸濁させた. 懸濁液は血球計算盤を使用して顕微鏡下で孢子数を計測し, 各菌株シャーレ 2 枚の平均から孢子濃度を算出した. 試験は 2 回行った.

2) 結果

①各温度における生育と孢子形成

異なる温度帯での生育は, いずれの種, 菌株とも 20 および 25 °C でもっとも菌糸伸長が早かった (Fig. 4). 2 °C における生育は *B. aclada* でやや遅く 3 菌株 (KF-Ba130,

BaFS11-12 および BaNW11-a) で菌糸伸長が見られなかった (5 日後には菌糸の生育を確認. データ省略). 2 種における菌糸の生育適温に違いは認められなかった.

各温度における培養中, 10, 15, 20, 25 °C にそれぞれの温度において *B. allii* は 6 菌株中 0, 2, 2, 1 菌株で, *B. aclada* は, 5 菌株中 2, 3, 4, 5 菌株で形成が確認された (データ省略).

②25°Cにおける孢子形成量

PDA 上 25 °C 暗黒下で培養した菌株は 7 日後には *B. aclada* の 5 菌株全てで孢子形成を認め, *B. allii* の 6 菌株中 3 菌株に孢子形成が確認された (Table 14, Plate 6). この場合, 孢子形成量は *B. aclada* (5 菌株 2.2×10^5 個 spores / mL) 平均で *B. allii* (7 菌株 6.3×10^3 spores / mL) よりも 5% 水準で有意に多かった (Mann - Whitney の U 検定 $p = 0.0324$). 14 日後には両種全ての菌株が孢子を形成し, 孢子形成量の有意差は認められなかった. *B. aclada* では, 培養開始から孢子形成までの期間が短い傾向が見られた.

Table 14. Amount of sporulation of *Botrytis aclada* and *Botrytis allii* cultured in the dark at 25 °C.

isolate	identification	Year of isolation	Geographic origin	Number of spores/ml	
				7 days	14 days
KF-Ba130	<i>B. aclada</i>	2009	Iwamizawa, Hokkaido	2.E+05	6.E+05
KF-Ba205	<i>B. aclada</i>	2009	Iwamizawa, Hokkaido	1.E+04	7.E+04
BaFS11-12	<i>B. aclada</i>	2011	Furano, Hokkaido	3.E+05	4.E+05
BaNW11-a	<i>B. aclada</i>	2011	Naka-furano, Hokkaido	6.E+05	6.E+05
BaTH11-A	<i>B. aclada</i>	2011	Takikawa, Hokkaido	1.E+04	7.E+05
KF-Ba225	<i>B. allii</i>	2009	Iwamizawa, Hokkaido	2.E+04	3.E+05
BaFS12-3a	<i>B. allii</i>	2012	Furano, Hokkaido	n.d.	3.E+05
BaI12-6	<i>B. allii</i>	2012	Iwamizawa, Hokkaido	1.E+04	1.E+05
BaI12-7	<i>B. allii</i>	2012	Iwamizawa, Hokkaido	n.d.	2.E+05
NBRC9430 ^a	<i>B. allii</i>	1971	Hokkaido	6.E+03	1.E+04
MAFF 712062 ^b	<i>B. allii</i>	-	Hyogo	n.d.	3.E+04

a NBRC 9430 was supplied as *B. allii* from NITE. NBRC 9430 is SAL004 isolate in Shirane et al. (1989).

b MAFF 712062 was supplied as *B. allii* from the NARO GeneBank.

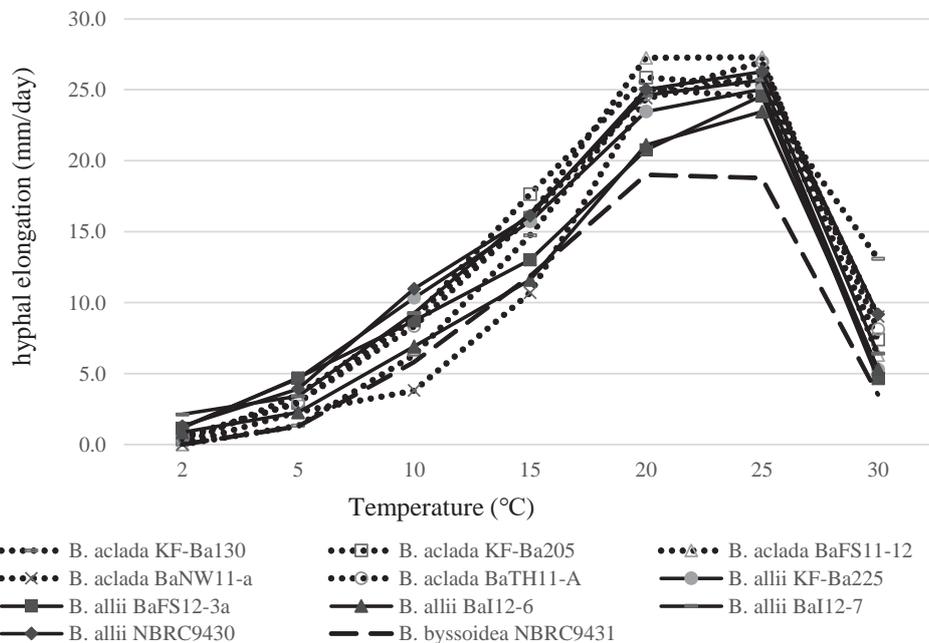


Fig. 4. Growth of *Botrytis aclada* and *Botrytis allii* under different temperature conditions.

2. 灰色腐敗病菌の道内分布

(1) 病原体の採集と分離

1) 方法

2011年から2017年に、道内の主要なタマネギ産地8地域（富良野市、中富良野町、三笠市、岩見沢市、滝川市、訓子府町、北見市および湧別町）の50圃場で、貯蔵中のタマネギの鱗茎腐敗症状から菌株を採取した（Fig. 5）。

菌株を取得するために、各圃場につき貯蔵用コンテナ1基分（およそ6,000個）のタマネギ球を調査した。外見で腐敗球を選別し、タマネギを縦に切断して内部の腐敗を観察した。罹病組織を約5×5 mmに切断、滅菌蒸留水で洗浄し、1% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で1分間表面消毒し、滅菌蒸留水で2回洗浄後、滅菌濾紙上で乾燥させた。これらの切片を直径9 cmのPDA培地に置き、20℃で3 - 5日間培養し、コロニーから菌糸の先端をPDA平板に移した。分生子形成を促進するために、菌糸体を暗所25℃で14日間培養した。顕微鏡下で単一の分生子を採集し、新たにPDA上に移して分離菌株を得た。菌株は使用するまで4℃においてPDAスラント上で維持した。

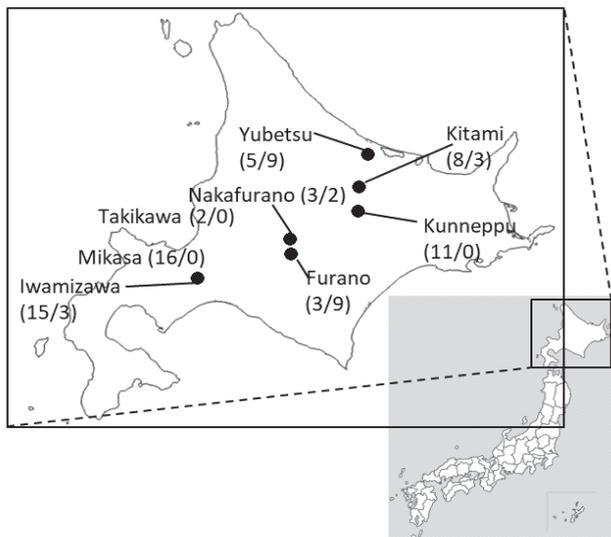


Fig. 5. Geographic location of diseased onion sample collection in Hokkaido.

The numbers in parentheses are the number of isolates identified in this study (*Botrytis allii*/ *Botrytis aclada*).

2) 結果

2011年から2017年の道内8地域の50圃場から採取した腐敗球は、水浸状で、内部の変色を伴う腐敗症状を示し、鱗茎と保護葉の間には白色から灰色の菌糸が観察された。鱗茎内部の腐敗は暗褐色から黒色で、扁平な菌核

が球の頸部と肩に形成されることがあった（Plate 7）。これらの症状は、タマネギ灰色腐敗病に関する先行研究の記述と一致していた（松尾 1978）。北海道の8地域から収集されたこのようなタマネギの鱗茎腐敗症状から2011年に3菌株、2012年に2菌株、2013年に18菌株、2014年に8菌株、2017年に58菌株の合計89菌株を得た（Table 15）。

Table 15. Number of field isolates obtained from gray-mold neck rot in eight regions in Hokkaido.

Year	Location (city, prefecture)	No. of isolates ^a	
		<i>B. allii</i>	<i>B. aclada</i>
2011	Takikawa, Hokkaido	2	0
	Naka-furano, Hokkaido	0	1
2012	Naka-furano, Hokkaido	2	0
	Mikasa, Hokkaido	10	0
2013	Furano, Hokkaido	0	7
	Naka-furano, Hokkaido	0	1
	Iwamizawa, Hokkaido	3	2
2014	Furano, Hokkaido	1	2
	Iwamizawa, Hokkaido	12	1
2017	Mikasa, Hokkaido	6	0
	Furano, Hokkaido	2	0
	Naka-furano, Hokkaido	1	0
	Kitami, Hokkaido	8	3
	Kunneppu, Hokkaido	11	0
	Yubetsu, Hokkaido	5	9
	total		63

a Isolates were collected from one to seven fields in each region.

Species identification was based on morphological features and results of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.

(2) 分離菌の同定

1) 方法

前項で得られた89菌株について、前述の「1. 遺伝学的分類と形態学的分類による再同定」と同様にしてPCR-RFLP解析を行い、種を同定した。

2) 結果

89菌株をPCR-RFLP分析した結果、2つのグループに分類された。63菌株は413および298 bpの2つのフラグメントを生成し、26菌株は413 bpの1つのフラグメントを生成した。Yohalemら（2003）に従い、前者を*B. allii*、後者を*B. aclada*としてそれぞれ同定した（Table 15）。

道内の*B. allii*と*B. aclada*の比率は、2011年に2/1、2012年に2/0、2013年に10/8、2014年に4/4、2017年に45/13だった。2011年と2012年は分離菌株数が少なく、種構成を推定できなかった。ほぼ同数の菌株が2013

年と2014年に両方の種で得られ、2017年は *B. allii* 菌株が *B. aclada* 菌株より高頻度に分離された。2017年には、6地域（岩見沢市、三笠市、富良野市、中富良野町、北見市および訓子府町）で *B. allii* が優勢だったのに対して、*B. aclada* は湧別町でのみ優勢だった。このように、種の構成は年次と場所によって異なった。

3. 考察

本試験の結果は、*B. allii* と *B. aclada* の両方が北海道のタマネギの灰色腐敗病に関連していることを示している。これまで本病の病原は国内では *B. allii* のみが報告されていたが、*B. aclada* も病原であることが確認された（なお、このことについては2014年の植物病理学会北海道部会で報告し（野津・児玉 2014）、日本植物病名目録に本病の病原として *B. allii* と *B. aclada* の2種が記載されるに至っている）。

B. allii と *B. aclada* はそれぞれ北海道の8地域と6地域から分離され、両方の種がタマネギ生産地域に広く分布していることが明らかとなった。優占種は地域や年次で異なったが、総じて *B. allii* が一般的に優勢で分離菌株の71%（63菌株）となり、これに対して *B. aclada* は29%（26菌株）だった。ただし、両方の種が同じ圃場から同時に分離されることは少なく（50圃場のうち3圃場）、病原体の発生は年次と場所によって異なった。同じく道内の貯蔵腐敗から分離される *B. byssoidea* を含むこれらのボトリチス種の正確な構成を明らかにするには、今後の研究でより多くの菌株を採集する必要がある。

本研究では、北海道のみのボトリチス種集団を調査した。兵庫県では、松尾（1978）が形態学的特徴に基づいてタマネギ灰色型首腐病の病原体を *B. allii* として同定したが、その時点では分子特性に基づく分類法が採用されていなかったため、*B. allii* として同定された菌株には、症状や形態だけでは識別が困難な *B. aclada* が含まれている可能性がある。本研究においても形態学的特徴において、両種に明確な差は見られなかった。兵庫県と佐賀県を含む日本国内のこれらの病原体の現在の分布と種構成を明らかにするために、PCR-RFLPなどの分子生物学的手法を用いて灰色腐敗病の病原を特定することは重要であると考えられる。

また、本病は夏季生育期間中の葉に感染し、秋季から冬季の貯蔵中に低温下で発病する。夏季生育期間中の接種試験では、2種は同程度の発病球%となり、病原力に差は認められなかった。貯蔵中の温度に相当する5℃における培地上の生育および鱗茎に対する病原性についても、2種の違いは認められなかった。しかしながら、各温度での生育や病原性を確認したところ、*B. aclada* で25℃における孢子形成開始が早い傾向にあった。無性世代

しか確認されていない両種の生活環において、夏季の気温に近い温度での孢子形成の早さの違いが2種の発生生態や進化において何らかの影響を与える可能性も考えられ、今後の知見が待たれる。

第5章 病原菌の薬剤耐性

北海道のタマネギ灰色腐敗病には、*B. allii* と *B. aclada* の両方が関与していることが明らかとなった。このことが本病の薬剤防除に与える影響を明らかにするため、薬剤に対する感受性について試験した。

1. タマネギ切片を用いた検定による薬剤の効果

(1) 方法

B. allii 4 菌株と *B. aclada* 4 菌株を用いて、8 薬剤 (Table 16) の実用濃度における効果をタマネギ鱗茎の切片 (鱗片) 上で検定した。薬剤は、タマネギ灰色腐敗病に登録のある 7 薬剤 (フルアジナム水和剤 (グループ名: フェニルピリミジン), ボスカリド水和剤 (グループ名: SDHI), テブコナゾール水和剤 (グループ名: DMI), イミノクタジナルベシル酸塩水和剤 (グループ名: ビスグアニジン), クレソキシムメチル水和剤 (グループ名: QoI), チオファネートメチル水和剤およびベノミル水和剤 (いずれもグループ名: MBC) を用い、対照として本病に効果がないとされている 1 薬剤 (マンゼブ水和剤 (グループ名: ジチオカーバメート)) を用いた。

タマネギ鱗片を 2 - 3 cm 幅に切断して表皮組織を剥離し、1% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 2 分殺菌後、実用濃度の各薬液に 1 分間浸漬し、風乾した。滅菌濾紙を滅菌蒸留水で湿らせてガラスシャーレに敷き、鱗片を 3 つ置床した。暗黒下 20 °C で 7 日間培養した病原菌を 8 mm のコルクボーラーで打ち抜き、鱗片にのせ、20 °C で培養した。

また、*B. allii* 3 菌株と *B. aclada* 3 菌株 (Table 17) について、含菌寒天と分生子懸濁液をそれぞれ接種源として、鱗片上でクレソキシムメチルの効果を比較した。対照としてイミノクタジナルベシル酸塩区を設けた。分生子懸濁液は、各菌株を PDA 培地暗黒下 20 °C で 2 週間培養し、得られた分生子を 1×10^5 spores/mL の濃度になるよう滅菌蒸留水に懸濁して、薬液を処理した鱗片に 10 μ L 滴下した。

処理 5 日後、3 つの鱗片について以下の発病指数を用いて調査し、発病度 = $100 \times \Sigma$ (程度別発病鱗片数 \times 指数) / 4 \times 調査鱗片数の計算式で薬液ごとの発病度を算

出した。試験は 2 回行い、平均値を算出した。

発病指数: 0, 発病なし; 1, 病原菌が僅かに鱗片に侵入; 2, 明瞭な病斑; 3, 病斑が鱗片の背面に貫通; 4, 病斑または菌糸が全面に拡大

(2) 結果

全ての菌株が、無処理の鱗片に病原性を示した。発病度は *B. aclada* で 67 - 92, *B. allii* で 67 - 88 と、鱗片に対する病原性は同程度だった。灰色腐敗病に効果がないとされるマンゼブでも *B. aclada* で 83 - 92, *B. allii* で 71 - 88 と同程度だった。

B. aclada および *B. allii* 両種の各薬剤処理での発病度はそれぞれ、フルアジナムで 38 - 46 および 21 - 46, ボスカリドで 25 - 42 および 0 - 29, テブコナゾールで 0 - 13 および 0, イミノクタジナルベシル酸塩で 0 - 8 および 0 - 8 となり、無処理に比べて発病度が低かった。これに対して、クレソキシムメチルでは 46 - 83 および 71 - 83 と無処理とほぼ同程度だった。また、ベンズイミダゾール系薬剤であるチオファネートメチルとベノミルでは 88 および 0 - 4, ならびに 46 - 92 および 0 - 42 と発病度が大きくばらつき (Table 16), 鱗片上で病原菌が旺盛に生育しているのが観察された (Plate 8)。

クレソキシムメチルは、ストロビルリン系の殺菌剤 (QoI) であり、その作用機構は、ミトコンドリア内のチトクローム電子伝達系阻害により、分生子発芽、菌糸伸長および分生子形成を抑制するとされる。QoI 剤であるクレソキシムメチル処理した鱗片での発病度を異なる接種源で比較したところ、分生子懸濁液接種で *B. aclada* 0 - 8, および *B. allii* 0, ならびに含菌寒天接種で *B. aclada* 8 - 25 および *B. allii* 25 - 58 と、分生子懸濁液接種ではほとんど発病しなかった (Table 17)。イミノクタジナルベシル酸塩水和剤では、いずれの接種源でも発病度は 0 だった。この結果から、イミノクタジナルベシル酸塩水和剤は両菌株に対して効果を有すると考えられた。

Table 16 Responses of *Botrytis aclada* and *Botrytis allii* to various fungicides on onion pieces.

Isolete	Group name	Disease severity									
		Phenyl-pyridinamine	SDHI	DMI	Bis-guanidines	QoI	Methyl Benzimidazole Carbamates	Dithiocarbamates	Distiled water		
		Common name	fluazinam	boscalid	tebuconazole	guazatine iminocadine	kresoxim-methy	thiophanate-methyl	benomyl	manzeb	Inoculated
ppm	1000	1000	2000	1000	2000	1000	2000	500	-	-	
<i>Botrytis aclada</i>	KF-Ba130	38	29	0	0	58	88	75	88	67	0
<i>Botrytis aclada</i>	KF-Ba205	42	25	0	4	79	88	92	92	79	0
<i>Botrytis aclada</i>	BaFS11-12	46	42	4	4	46	88	46	88	92	0
<i>Botrytis aclada</i>	BaNW11-a	38	33	13	8	83	88	79	83	75	0
<i>Botrytis allii</i>	KF-Ba225	38	0	0	0	71	0	8	88	88	0
<i>Botrytis allii</i>	BaFS12-3a	42	25	0	4	83	4	42	88	71	0
<i>Botrytis allii</i>	BaI12-6	46	29	0	0	79	0	8	71	67	0
<i>Botrytis allii</i>	MAFF 712062 ^a	21	17	0	8	75	0	0	75	67	0

a Disease index; 0: No disease; 1: Pathogens slightly invade onion tissue; 2: Clear water-soaking rot; 3: Water-soaking rot penetrates onion slices; 4: Water-soaking rot or hyphae spread over the entire surface.

b MAFF 712062 was supplied as *B. allii* from the NARO GeneBank.

Table 17. Response of *Botrytis aclada* and *Botrytis allii* to fungicides on onion pieces with different inoculum.

Isolete	Group name	Disease severity						
		QoI		Bis-guanidines		Distiled water		
		Common name	kresoxim-methy	guazatine iminocadine	Inoculated		Non-inoculate	
		ppm	2000	1000	-	-	-	
Inoculum	Spore suspension	Mycelial agar disc	Spore suspension	Mycelial agar disc	Spore suspension	Mycelial agar disc	-	
<i>Botrytis aclada</i>	KF-Ba130	8	17	0	0	83	92	0
<i>Botrytis aclada</i>	KF-Ba205	0	25	0	0	83	75	0
<i>Botrytis aclada</i>	BaFS11-12	0	8	0	0	58	67	0
<i>Botrytis allii</i>	KF-Ba225	0	50	0	0	75	92	0
<i>Botrytis allii</i>	BaI12-6	0	58	0	0	33	75	0
<i>Botrytis allii</i>	MAFF 712062 ^a	0	25	0	0	58	92	0

a Disease index 0: No disease; 1: Pathogens slightly invade onion tissue; 2: Clear water-soaking rot; 3: Water-soaking rot penetrates onion slices; 4: Water-soaking rot or hyphae spread over the entire surface.

b MAFF 712062 was supplied as *B. allii* from the NARO GeneBank.

2. 培地検定による各薬剤への反応

タマネギ鱗片上で効果が得られない事例が見られた QoI と MBC 系薬剤について、培地検定を行った。QoI については、培地での試験方法が確立されているアゾキシストロピン水和剤を用いた。

(1) 方法

アゾキシストロピン、チオファネートメチル、ベノミルの 3 薬剤について、オートクレーブした PDA に各薬剤の実用濃度 2000 倍に相当するよう調整して添加し、検定

培地を作製した。すなわち、アゾキシストロピンは 100ppm になるようアミスター 20 フロアブル (アゾキシストロピン 20% 含有, Syngenta) と 4mM の 没食子酸 (DMSO 液溶媒) を 10mL/L 添加, チオファネートメチル添加培地は PDA にトップジン M 水和剤 (チオファネートメチル 70% 含有, 日本曹達) を用いて 350ppm になるよう添加, ベノミルはベンレート水和剤 (ベノミル 50% 含有, 住友化学) を用いて 250ppm になるよう添加し, 分注した。PDA 培地 (25 °C 暗黒下) で前培養した菌株 (Table 18) を 6mm のコルクボーラーで打ち抜いた菌そうを 3 つずつ移植し, 20 °C 暗黒下で培養した。5 日後に各コロニーの 2 か所に

ついてコルクボーラーの縁からのコロニーの先端までの長さを計測し、3つのコロニーの平均を菌糸伸長とした。試験は2回行った。

(2) 結果

対照の PDA 培地上で各菌株は 9.2 - 41.6mm の菌糸伸長だった。アゾキシストロビンでは、いずれの菌株も生育しなかった。ベンズイミダゾール系薬剤では、*B. allii* は 4

菌株全てで生育しなかったのに対し、*B. aclada* の 4 菌株ではチオファネートメチルで 9.9 - 19.3mm、ペノミルで 8.0 - 19.4mm の生育となった (Table 18)。各培地上では、10 日後には分生子形成が見られた。この結果から、*B. aclada* の 4 菌株はいずれもベンズイミダゾール耐性である可能性が高いと推察された。

Table 18. Responses of *Botrytis aclada* and *Botrytis allii* to fungicides on PDA.

Isolete	Group name	Hyphal elongation (mm)			PDA	
		Methyl		QoI		
		Benzimidazole	benomyl			
		Carbamates		azoxystrobin		
Common name	thiophanate-methyl					
<i>Botrytis aclada</i>	KF-Ba130		11.3	10.6	0	23.0
<i>Botrytis aclada</i>	KF-Ba205		9.9	8.0	0	24.0
<i>Botrytis aclada</i>	BaFS11-12		19.3	19.9	0	41.6
<i>Botrytis aclada</i>	BaNW11-a		10.3	10.4	0	24.2
<i>Botrytis allii</i>	KF-Ba225		0	0	0	25.3
<i>Botrytis allii</i>	BaFS12-3a		0	0	0	9.2
<i>Botrytis allii</i>	BaI12-6		0	0	0	15.1
<i>Botrytis allii</i>	MAFF 712062 a		0	0	0	28.2

a MAFF 712062 was supplied as *B. allii* from the NARO GeneBank.

3. 菌種とベンズイミダゾール耐性菌の分布頻度

PDA 培地上で *B. aclada* の生育が確認されたベンズイミダゾール系薬剤について、第 4 章の道内分離株を用いて耐性の獲得状況を検証した。

(1) 方法

2009 年から 2017 年道内のタマネギから分離した灰色腐敗病菌について、チオファネートメチル水和剤に対する感受性を培地上で検定した。分離菌株は第 4 章で分離し、PCR - RFLP 法で同定した菌株のうち、生育の悪い *B. allii* 1 菌株と *B. aclada* 2 菌株を除いた *B. aclada* 29 菌株と *B. allii* 66 菌株を用いた。菌株は 2009 年に 2 菌株、2011 年に 6 菌株、2012 年に 6 菌株、2013 年に 18 菌株、2014 年に 8 菌株および 2017 年に 55 菌株を使用し、これらは全て北海道の主要なタマネギ生産地を含む 8 地域(富良野市、中富良野町、三笠市、岩見沢市、滝川市、訓子府町、北見市および湧別町)で貯蔵中に発生した鱗茎腐敗症状から分離したものである。

PDA 培地上で前培養した菌株を、0.39 - 1600 μ g / mL の 13 段階 (0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.24, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 および 1,600 μ g/mL) のチオファネートメチル濃度になるようにトップジン M 水和剤(チオファネートメ

チル 70%) を添加した PDA 培地に、6mm のコルクボーラーで打ち抜いた菌そうを 3 つずつ移植し、20 $^{\circ}$ C 暗黒下で培養した。7 日後に各コロニーの 2 か所についてコルクボーラーの縁からのコロニーの先端までの長さを計測し、3つのコロニーの平均を菌糸伸長とした。試験は2回行った。

(2) 結果

培地検定を用いた耐性試験の結果と菌株の地理的起源を Table 19 に示した。*B. aclada* 29 菌株、*B. allii* 66 菌株を検定したところ、最低生育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) の頻度分布は、*B. aclada* では 17 菌株 (59%) が MICs > 1,600 μ g / mL、残りの 12 菌株 (41%) <0.39 μ g/mL と両極在性を示した。*B. allii* は 66 菌株全てで MIC が 0.39 μ g/mL \geq だった。Koenraadt ら (1993) によると、高度耐性株は 500 μ g/ mL 以上で生育し、中程度耐性株は 5 μ g/ mL で生育するが 50 μ g/ mL では生育せず、感受性株は 0.5 μ g/ mL では生育できないと分類している。この基準に基づいて、MIC が 1,600 μ g/mL を超える 17 の *B. aclada* 菌株は高度耐性、MIC が 0.39 μ g/mL 未満の 78 菌株 (*B. aclada* 12 菌株および *B. allii* 66 菌株) は感受性とした。*B. aclada* が分離された 6 地域のうち湧別町を除く 5 地域で広く耐性菌が確認された。

Table 19. Geographic origin of gray-mold neck rot pathogen used in this study and their sensitivity to benzimidazole.

Geographic origin in Hokkaido	Number of strains					
	<i>Botrytis allii</i>			<i>Botrytis aclada</i>		
	Total	S	R	Total	S	R
Takikawa	2	2	0	1	0	1
Naka-furano	1	1	0	2	0	2
Mikasa	16	16	0	0	0	0
Furano	5	5	0	10	3	7
Iwamizawa	19	19	0	4	0	4
Kitami	8	8	0	3	0	3
Kunneppu	11	11	0	0	0	0
Yubetsu	4	4	0	9	9	0
Total	66	66	0	29	12	17

a All strains were isolated and identified using PCR-RFLP.

b S: sensitive to benzimidazole (Minimum inhibitory concentration against thiophanate-methyl is $\leq 0.39\mu\text{g/mL}$).

c R: highly resistant to benzimidazole (Minimum inhibitory concentration against thiophanate-methyl is $> 1600\mu\text{g/mL}$).

4. 圃場試験によるベンズイミダゾール耐性の確認

(1) 方法

培地検定で耐性を示した *B. aclada* KF87 菌株を用いた。滝川市内の試験圃場に 2 か月間ビニルハウス内で育てたタマネギ苗（供試品種：「北もみじ 2000」）を、2013 年 5 月 14 日に露地圃場に移植し、栽培した。倒伏後、分生子懸濁液を株全体に噴霧接種した（1 回目（7 月 30 日、 2×10^5 spores/mL, 100L/10a, 2 回目 8 月 5 日（ 4×10^5 spores/mL, 100L/10a), 3 回目 8/14（ 5×10^5 spores/mL, 100L/10a)）。接種は 16 - 17 時に行い、感染を促すため、

接種前にタマネギ圃場に適宜散水した。薬剤は 7 月 22 日および 29 日、8 月 5 日および 13 日に、チオファネートメチル水和剤（商品名：トップジンM水和剤）1000 倍液、ベノミル水和剤（商品名：ベンレート水和剤）1000 倍液、フルアジナム水和剤（商品名：フロンサイド水和剤）1000 倍液をそれぞれ 150L/10a 散布した。8 月 26 日に区の中央の 120-140 球を収穫して風乾し、5℃で貯蔵し、2014 年 1 月 16 日に発病球を調査し、発病球%と防除価（防除価 = $100 - (\text{処理区の発病球率} / \text{無処理区の発病球率}) \times 100$) を算出した。試験は 1 区 12.6 m² の 3 連制で行った。

Table 20. Control effectiveness of benzimidazole fungicides against gray-mold neck rot^a (Takikawa 2013).

Fungicides	replicates	Number of survey bulbs	Incidence of diseased bulbs (%)	Control effectiveness ^e
Thiophanate methyl wettable powder ^b	1	129	7.0	31
	2	117	3.4	
	3	132	1.5	
	Avg.	126	4.0	
Benomyl wettable powder ^c	1	127	13.4	0
	2	133	0.8	
	3	145	6.2	
	Avg.	135	6.8	
Fluazinam wettable powder ^d	1	140	1.4	75
	2	133	2.3	
	3	150	0.7	
	Avg.	141	1.5	
Non-application control	1	135	5.9	-
	2	134	4.5	
	3	127	7.1	
	Avg.	132	5.8	

a Highly resistant strain *B. aclada* KF-Ba130 was used as inoculum.

b A solution of thiophanate-methyl wettable powder diluted 1000 times was sprayed.

c Benomyl wettable powder diluted 2000 times was sprayed.

d Fluazinam wettable powder diluted 1000 times was sprayed.

e Control effectiveness = $(1 - \text{incidence of diseased bulbs in each plot} / \text{incidence of diseased bulbs in non-application control plot})$.

(2) 結果

培地上で耐性を示した菌株 (*B. aclada* BaKF-87) を用いて圃場で薬剤の効果を試験したところ、防除価はフルアジナム水和剤が75だったのに対し、チオファネートメチル水和剤が21、ベノミル水和剤が0であり、ベンズイミダゾール系薬剤に防除効果は認められなかった (Table 20). 本研究により、培地上で認められたチオファネートメチル耐性が圃場レベルでも確認された。

5. ベンズイミダゾール耐性菌のβ-チューブリン遺伝子解析

(1) 方法

ベンズイミダゾール耐性に関連するとされるβ-チューブリン遺伝子を解析するため、*B. aclada* 6菌株、*B. allii* 2菌株を用いた (Table 21).

1) 菌体からのDNA抽出

菌体からのDNAの抽出は、PDA培地で7日間培養した菌そうを掻き取り、DNeasy Plant Mini Kitを用いて行った。抽出したDNAは50μLのTEバッファーに溶解し-30℃で使用まで保存した。DNA濃度はアガロースゲルで電気泳動して確認し、0.01 - 0.1μg/μLに調整した。

2) PCR増幅

B. cinerea のβ-チューブリン部分配列、コドン198 - 200を含むように設計されたプライマーセット Bcb-F (5'-CACTGAGGGTGCTGAGCTTGT3') + Bcb-R (5'-GAAGCGCCATCATGTTCTTA-3') を用いて Zhang

ら (2010a) に従ってPCRを行った。PCR産物はQIAquick PCR Purification Kitを用いて純化した。純化したPCR産物は北海道システム・サイエンス株式会社によってシーケンスし、得られた配列は解析ソフト MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>) を用いてアライントし、曖昧な配列を含む領域は除外した。結果のシーケンスは、DDBJ / EMBL / GenBank に LC576599, LC576600, LC576601, LC576602, LC576603, LC576604, LC576605, LC576606 として登録した。

(2) 結果

Fig. 6に、*B. aclada* 6菌株、*B. allii* 2菌株、および参照の*B. cinerea* 4菌株のβ-チューブリン遺伝子 (594 bp) の部分配列を示した。5つの感受性株 (3つの*B. aclada* および2つの*B. allii* 株) は、感受性の*B. cinerea* 株と同様に、コドン198にGAGが確認された。*B. aclada* の3つの高度耐性株はコドン198がAAGであり、高度耐性の*B. cinerea* SD-2株と同じだった。したがって、コドン198におけるGAGからAAGへの変異が、*B. aclada* に見られる高度耐性の原因と考えられる。

供試した8菌株全てがコドン200にTTCを有しており、中程度の耐性に対応するコドン200のTTCからTACへの置換は確認されなかった (Koenraad et al. 1992; Yarden and Katan 1993; Duan et al. 2018)。この結果は、培地検定で中程度のMICを示す耐性株がなかったことと一致した。

Table 21. Strains used in this study for β-tubulin sequence analysis.

Strains	Year of isolation	Geografic origin in Hokkaido	Species ^a	Culture medium assay
KF-Ba225	2009	Iwamizawa	<i>B. allii</i>	S ^b
BaI12-7	2012	Iwamizawa	<i>B. allii</i>	S
KF-Ba130	2009	Iwamizawa	<i>B. aclada</i>	R
BaNW11-a	2011	Naka-furano	<i>B. aclada</i>	R ^c
BaTH11-A	2011	Takikawa	<i>B. aclada</i>	R
BFU1310	2013	Furano	<i>B. aclada</i>	S
BFU1316	2013	Furano	<i>B. aclada</i>	S
BaU2-8	2013	Yubetsu	<i>B. aclada</i>	S

a All strains were isolated and identified using PCR-RFLP.

b S: sensitive to benzimidazole (Minimum inhibitory concentration against thiophanate-methyl is ≤ 0.39μg/mL).

c R: highly resistant to benzimidazole (Minimum inhibitory concentration against thiophanate-methyl is > 1,600 μg/mL).

Table 22. Strains used in this study for Heat shock protein 60 sequence analysis.

Strains	Year	Region	Identification ^a	Sensitivity for benzimidazole	Genotype description ^b
KF-Ba130	2009	Hokkaido Iwamizawa	<i>B. aclada</i>	HR ^c	E198K
BaNW11-a	2011	Hokkaido Naka-furano	<i>B. aclada</i>	HR	E198K
BaTH11-A	2011	Hokkaido Takikawa	<i>B. aclada</i>	HR	E198K
BFU1310	2013	Hokkaido Furano	<i>B. aclada</i>	S ^d	Wild-type
BFU1316	2013	Hokkaido Furano	<i>B. aclada</i>	S	Wild-type
BaU2-8	2013	Hokkaido Yubetsu	<i>B. aclada</i>	S	Wild-type
KF-Ba225	2009	Hokkaido Iwamizawa	<i>B. allii</i>	S	Wild-type
BaI12-7	2012	Hokkaido Iwamizawa	<i>B. allii</i>	S	Wild-type
NBRC 9430 ^e	1971	Hokkaido	<i>B. allii</i>	S	Wild-type
NBRC 9431 ^f	1971	Hokkaido	<i>B. byssoidea</i>	S	Wild-type

a All strains isolated and identified by morphological features and PCR-RFLP.

b E198K means point mutation at codon198. Amino acid position 198 changed from E (wild type) to K.

c HR: highly resistant to benzimidazole fungicides.

d S: susceptible to benzimidazole fungicides.

e, f NBRC 9430 and NBRC 9431 were supplied as *B. allii* and *B. byssoidea* from NITE, respectively.

a

Species/ strain Name	Sequence	
	codon	198 200
1. <i>B.allii</i> KF-Ba225 (S)	C T C T G A C	G A G A C C T T C T G T A T C G A T
2. <i>B.allii</i> BaI12-7 (S)	C T C T G A C	G A G A C C T T C T G T A T C G A T
3. <i>B.aclada</i> KF-Ba130 (R)	C T C T G A C	A A G A C C T T C T G T A T C G A T
4. <i>B.aclada</i> BaNW11-a (R)	C T C T G A C	A A G A C C T T C T G T A T C G A T
5. <i>B.aclada</i> BaTH11-A (R)	C T C T G A C	A A G A C C T T C T G T A T C G A T
6. <i>B.aclada</i> BFU1310 (S)	C T C T G A C	G A G A C C T T C T G T A T C G A T
7. <i>B.aclada</i> BFU1316 (S)	C T C T G A C	G A G A C C T T C T G T A T C G A T
8. <i>B.aclada</i> BaU2-8 (S)	C T C T G A C	G A G A C C T T C T G T A T C G A T
9. <i>Botrytis cinerea</i> strain SD2(MG949128)	C T C T G A C	A A G A C C T T C T G T A T C G A T
10. <i>Botrytis cinerea</i> strain Bt4-1(MG949125)	C T C T G A C	G A G A C C T T C T G T A T C G A T
11. <i>Botrytis cinerea</i> strain GCY004 (MG949127)	C T C T G A C	G C G A C C T T C T G T A T C G A T
12. <i>Botrytis cinerea</i> strain B20 (MG949129)	C T C T G A C	G A G A C C T A C T G T A T C G A T

b

Species/ strain Name	amino acid position	190	198	200	210
		S V H Q L V E N S D	E T	F C I D N E A L Y D I C	
1. <i>B.allii</i> KF-Ba225 (S)	
2. <i>B.allii</i> BaI12-7 (S)	
3. <i>B.aclada</i> KF-Ba130 (R)		.	K	.	.
4. <i>B.aclada</i> BaNW11-a (R)		.	K	.	.
5. <i>B.aclada</i> BaTH11-A (R)		.	K	.	.
6. <i>B.aclada</i> BFU1310 (S)	
7. <i>B.aclada</i> BFU1316 (S)	
8. <i>B.aclada</i> BaU2-8 (S)	
9. <i>Botrytis cinerea</i> strain Bt4-1(MG949125)	
10. <i>Botrytis cinerea</i> strain GCY004 (MG949127)		.	A	.	.
11. <i>Botrytis cinerea</i> strain SD2(MG949128)		.	K	.	.
12. <i>Botrytis cinerea</i> strain B20 (MG949129)		.	.	Y	.

Fig. 6. Partial sequences of the β -tubulin genes of strains of *Botrytis* spp., strains of onion gray-mold neck rot pathogen collected in Hokkaido.

a DNA, b Amino acid.

DNA sequences of at codon 198 and amino acid position 198 is boxed 1 - 8 Onion gray-mold neck rot pathogens collected in Hokkaido , 9 *B. cinerea* strain SD2 (highly resistant to benzimidazole), 10 *B. cinerea* strain Bt4-1 (sensitive to benzimidazole), 11 *B. cinerea* strain GCY004 (highly resistant to benzimidazole), 12 *B. cinerea* strain B20 (moderately resistant to benzimidazole).

6. ベンズイミダゾール耐性株を含む *Botrytis aclada* の系統解析

高頻度に耐性株が検出される *B. aclada* と耐性が見つかっていない *B. allii* の道内分離株について、 β -チューブリン遺伝子とヒートショックプロテイン (HSP60) 遺伝子の塩基配列から系統解析を行った。

(1) 方法

B. aclada 6 菌株, *B. allii* 2 菌株と NITE 分譲株の *B. allii* 1 菌株および *B. byssoidea* 1 菌株を用いた (Table 23)。

β -チューブリン遺伝子については、前述 3. 菌種とベンズイミダゾール耐性菌の分布頻度で得られた配列を用いた。

ヒートショックプロテインの部分配列を増幅するように設計されたプライマーセット HSP60f (5'-CAACAATTGAGATTTGCCCAAG-3') + HSP60r (5'-GATGGATCCAGTGGTACCGAGCAT-3') (Staats et al.

2005) を用い、Staats ら (2005) に従って PCR を行い、前述 3. 菌種とベンズイミダゾール耐性菌の分布頻度と同様にして塩基配列を得た。得られた配列は解析ソフト MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>) を用いてアライ

メントし、曖昧な配列を含む領域を除外して最尤法により系統樹を作成した (ブートストラップ値 1000 回)。

参照配列として、DDBJ から *B. cinerea* の 4 菌株, アウトグループとして *Monilinia fructicola* の 1 菌株の配列を得た。

(2) 結果

β -チューブリン遺伝子領域の 594bp および HSP60 遺伝子領域の 1,058bp の配列を得、それぞれの領域の配列に基づいた系統樹を作成した。 β -チューブリン遺伝子領域は *B. allii* と *B. aclada* 全てで非常に相関性が高く、系統樹では、*B. allii*, *B. aclada* および *B. byssoidea* 1 菌株を含む大きなクレードにおいて、*B. aclada* の耐性株と感受性の *B. allii*, *B. aclada* および *B. byssoidea* を分けるノードが存在した。各ノードの遺伝的距離は近かった。参考に用いた *B. cinerea* はそれぞれベンズイミダゾール耐性に関わる遺伝型が異なるが、同一のクレード内に位置した (Fig. 7)。

HSP60 遺伝子領域に基づく系統樹でも、*B. aclada* の耐性株と感受性の *B. allii*, *B. aclada* および *B. byssoidea* を分ける強力なノードが存在した (Fig. 8)。

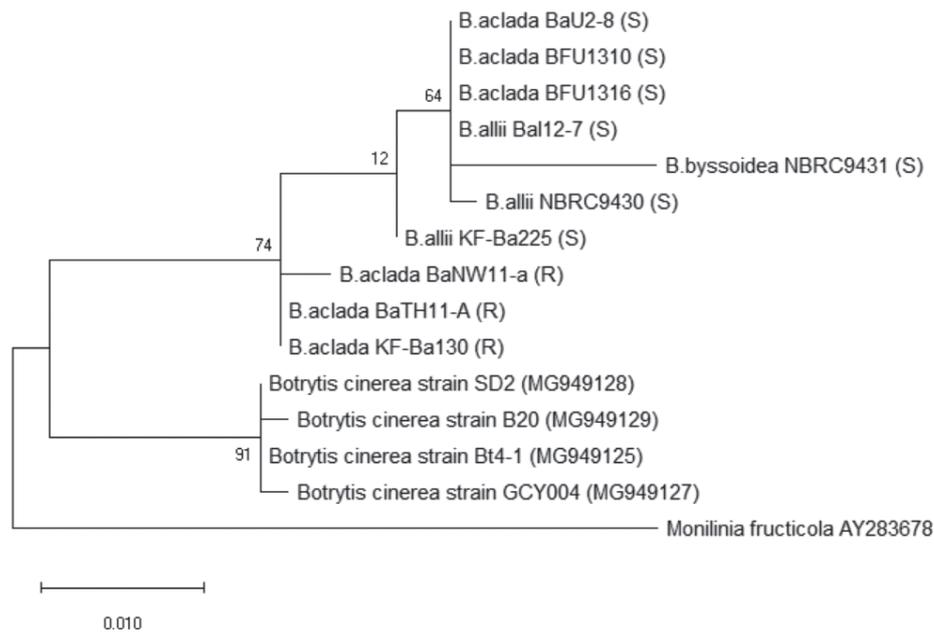


Fig. 7. A phylogenetic tree based on β -tubulin partial sequence of Hokkaido isolates of gray-mold neck of onion and DDBJ database.

NBRC 9430 and NBRC 9431 were supplied as *B. allii* and *B. byssoidea* from NITE, respectively.

Monilinia fructicola was used as an outgroup.

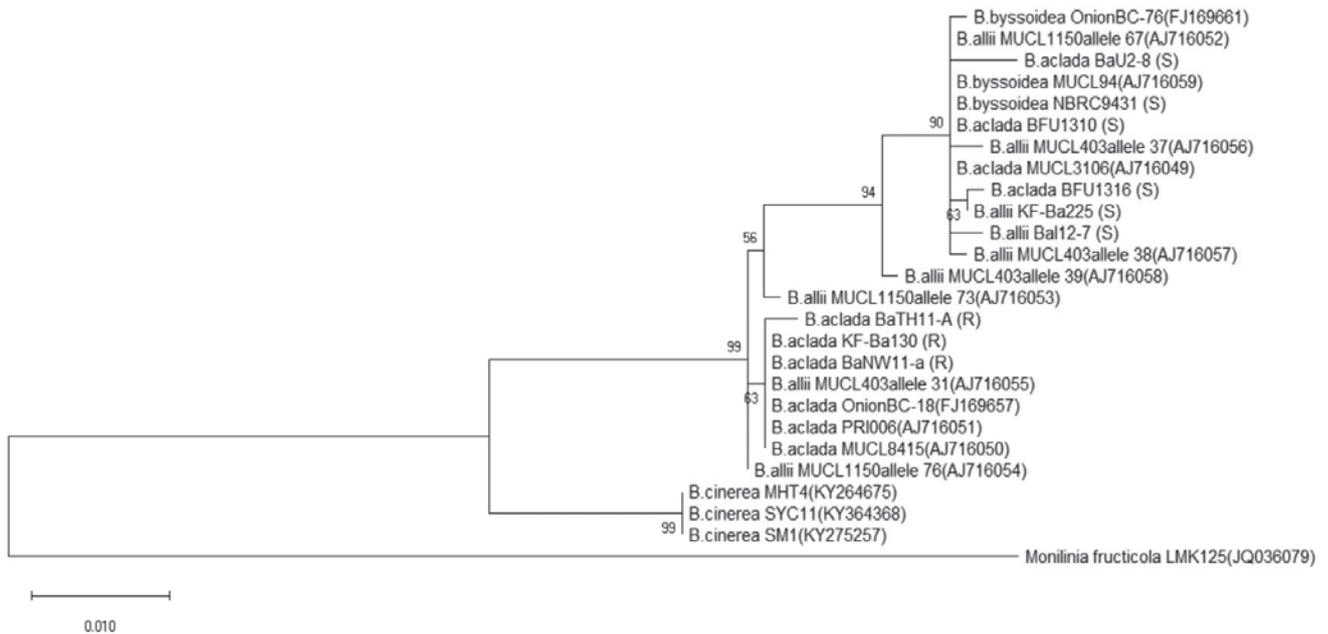


Fig. 8. A phylogenetic tree based on HSP60 partial sequence of Hokkaido isolates of gray-mold neck of onion and DDBJ database. NBRC 9430 and NBRC 9431 were supplied as *B. allii* and *B. byssoidea* from NITE, respectively. *Monilinia fructicola* was used as an outgroup.

7. 考察

本試験の結果、北海道におけるタマネギ灰色腐敗病菌のベンズイミダゾール耐性が確認された。病原菌種別にみると、*B. allii* 66株はすべて感受性だったが、*B. aclada*株の59% (29のうち17)は高度耐性だった。このことから、薬剤耐性*B. aclada*が道内に広く分布すること、および*B. allii*と*B. aclada*でベンズイミダゾール耐性の発生は異なることが明らかとなった。さらに、チオファネートメチルとペノミルは、圃場試験で効果がないことを確認した。

*B. allii*のベンズイミダゾール耐性は、国内では兵庫県(松尾ら1978)とニュージーランド(Viljalinnen-Rollinson et al. 2007; Khan et al. 2010)で報告されているが、どちらの研究でも病原菌種が明確に特定されていない。このため、本研究は、タマネギ灰色腐敗病菌についてベンズイミダゾール耐性を有する*B. aclada*を分子生物学的手法を用いて正確に同定した最初の事例である。また、両種間の殺菌剤耐性の違いを明らかにした報告としても初めてである。

ベンズイミダゾールは β -チューブリンタンパク質に結合することで殺菌活性を発揮するが、耐性の菌株では殺菌剤と β -チューブリン間の結合親和性の低下を示す(Davidse 1986)。分子レベルでは、 β -チューブリン遺伝子のコドン198におけるGAGからAAGへの1塩基置換

は、*B. cinerea*を含む多くのベンズイミダゾール耐性の糸状菌で報告されている(Koenraadt et al. 1992; Yarden and Katan 1993; Ma et al. 2003; Maymon et al. 2006; Zhang et al. 2010a)。ここでは、*B. aclada*の高度耐性株の β -チューブリン遺伝子のコドン198の変異により、アミノ酸がグルタミン酸からリジンに置き換わっていることを確認した。

チオファネートメチルとジエトフェンカルブの混合物であるゲッター水和剤(含有量チオファネートメチル52.5%およびジエトフェンカルブ12.5%、日本曹達)は、タマネギ灰色腐敗病に登録のあるN-フェニルカルバメート系殺菌剤である。一般に、ベンズイミダゾールの高度耐性株は、ジエトフェンカルブに感受性がある(Leroux et al. 2002)。しかしながら、ジエトフェンカルブに対して交差耐性を有する*B. cinerea*のベンズイミダゾール耐性フィールド分離株が検出されている(Malandrakis et al.

2011; Meng et al. 2015)。コドン198がこれら2つの殺菌剤の標的部位であり、コドン198におけるGAGからAAGへの置換が起きた株ではジエトフェンカルブに対して交差耐性を有することが明らかになっている。本研究ではベンズイミダゾール耐性株についてジエトフェンカルブ感受性は試験しなかったが、本研究で得られた*B. aclada*のベンズイミダゾール耐性株はジエトフェンカルブに交差耐性を示す可能性がある。

石坂・柳田(1981)は1980年前後に道内のタマネギ灰色腐敗病の発病球%が5%前後で推移していたと報告している。我々が実施した2009 - 2017年の調査では5%を超えるような多発圃場は認められなかった。本研究における圃場試験では、薬剤耐性 *B. aclada* の接種条件下でベンズイミダゾール系薬剤の防除効果が著しく低くなった。道内では耐性菌が広く分布しているにもかかわらず、本病が多発していない要因について以下に考察した。

北海道では、タマネギが5月上旬に畑に移植された後、ベンズイミダゾールを含むさまざまな作用機序の殺菌剤が、収穫前の7 - 9月に散布され(池谷ら2017)、*Botrytis* 属による葉枯性病害と鱗茎腐敗を対象にした防除が行われている。このため、ベンズイミダゾール以外の殺菌剤が、耐性菌の存在する地域でも灰色腐敗病を実際に抑制していると考えられる。現在のところ耐性菌発生に起因する灰色腐敗病の多発は認められていないが、年次や地域によっては *B. aclada* の割合が高くなることから、本研究の結果は今後も菌種毎に耐性菌率をモニタリングしていく重要性が示唆された。

β -チューブリン遺伝子部分配列から得られた系統樹では、耐性株と感受性株を分けるノードが存在し、コドン198以外でも耐性株と感受性株は遺伝的に距離が離れていることを示した。HSP60部分配列から得られた系統樹においても、耐性株は分離地にかかわらず感受性の灰色腐敗病菌や *B. byssoidea* とは別のクラスターに属した。このことから、道内で検出された耐性 *B. aclada* 株はタマネギの貯蔵腐敗から検出される病原の中では異なる遺伝的背景を持った集団に由来する可能性が示唆された。

第6章 タマネギの生育ステージと感受性

タマネギ灰色腐敗病は生育期間中の葉に感染して収穫期 - 貯蔵中の鱗茎で発症する (Chilvers et al. 2004) とされるが、本病の自然発生において、在圃期間に葉で病徴が確認されることはほとんどなく、収穫後に球の腐敗症状として発症が確認される。本病の感染から発病に至る経過や発生条件については不明な部分が多いが、これまで防除時期は、生育後半の倒伏期から収穫直前に重点が置かれている。

本研究では、効率的な防除体系を構築するため、タマネギが本病に感染しやすい時期や生育ステージを明らかにすることを目的として成植物体への接種試験を行った。

1. 接種部位の違いが発病に及ぼす影響

(1) 方法

2012年に滝川市の圃場において、1区30株3連制で行った。5月19日に定植し(供試品種:「北もみじ2000」)、接種時期を①球肥大期接種区は7月18日、②倒伏期接種区は8月9日に行った。接種部位はいずれも葉に行い、接種源をしみこませた3重ガーゼを1株ずつ葉先(中位4

葉)または地上5-10cm高さの葉鞘に巻き付けビニルで1日被覆し、当該部位にのみ接種源が接触するようにして接種した。接種源はPDA平板培地上で2週間培養した菌体(KF-Ba205菌株: *Botrytis aclada*)から分生子を回収、106個/mLに調整した分生子懸濁液を用いた。

圃場では8月4日に倒伏が始まり、8月11日に倒伏揃となった。根切りを8月24日に行い、9月9日に収穫、風乾後10月3日から5℃で貯蔵した。翌2013年1月23日に全球を切断し、発病球%を算出した。

(2) 結果

結果をTable 23に示した。発病率は7月下旬の葉鞘接種区で10.1%、葉先接種区で4.4%、8月上旬の葉鞘接種区で1.1%、葉先接種区で2.2%だった。球肥大期の7月下旬に葉鞘に接種した区で発病が最も多かった。いずれの区も在圃中に葉身・葉鞘に明瞭な病徴・標徴は認められなかった。いずれの接種時期の葉先接種区でも貯蔵鱗茎で発病があり、7-8月期の葉に感染した病原菌が収穫時には首部 - 鱗茎に到達し発病に至ることが示された。

Table 23. Incidence of gray mold neck rot of onion at different inoculation times and site (Takikawa 2012).

Growth stage of onion	Inoculation date	Inoculation site	Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
bulb development	18-Jul	Leaf sheath	89	9	10.1
	18-Jul	Leaf tip	90	4	4.4
neck fall	9-Aug	Leaf sheath	90	1	1.1
	9-Aug	Leaf tip	90	2	2.2
non-inoculation	-	-	89	0	0

Onion leaves began to fall over on 4-Aug and forced topping on 24-Aug. Bulbs were harvested on 9-Sep and stored from 3-Oct at 5℃.

2. 接種時期が発病に及ぼす影響

(1) 方法

試験は、2011および2012年に、滝川市内圃場で行った(供試品種:「北もみじ2000」)。

供試菌株としてKF-Ba130 (*B. aclada*)を用いた。接種は、*Botrytis*属菌による白斑葉枯病の初発時期である移植約1か月後から、球肥大開始期、球肥大期、倒伏始、倒伏期、倒伏揃、根切り期および収穫直前までの各時期に分生子懸濁液の噴霧接種により行った。接種源の作成に当たっては、タマネギ鱗茎の頂部を切断し、その切断面

に、PDA培地で20℃2週間培養して形成された分生子を噴霧接種し、接種鱗茎を15℃で培養して分生子形成させた。分生子濃度は 1×10^5 spores/mL以上に調整し、Tween 20を0.02% (v/v)になるように加用して、100 mL/m²(噴霧接種によりタマネギ葉が十分に濡れる量)を葉全体に噴霧接種した。接種は生育ステージ毎に、3日間続けて行い(Table 24, 25)、接種後は自然乾燥とした。また、降雨や乾燥が感染の適否に影響することが懸念されたため、その影響を抑えるために、2011年は7月7日から9月1日まで、2012年は7月17日から9月17日

までの期間、毎日夕方15分間ミスト式の散水装置で散水した。噴霧接種は散水後に行った。

収穫後のタマネギは風乾し5℃で貯蔵した。貯蔵途中の1月に全球について外観から発病の有無を調査し、腐敗球のみを縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数した。貯蔵終了は生産現場で概ね貯蔵が終了する3-4月とし、すべての球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数し、2回の調査の合計を発病球数として発病球%を算出した。灰色腐敗病の症状が認められた球は、腐敗部分の大きさ

に関わらずすべて発病球とした。

(2) 結果

2011年は球肥大開始期-倒伏期の接種により発病球%が高くなり、根切り期との間に有意な差が認められた(Table 24)。2012年は、球肥大期の接種による発病が高い傾向がみられた(Table 25)。また、いずれの接種でも、生育期間中に灰色腐敗病の病徴は認められず、本病による欠株はなかった。

Table 24. Incidence of gray mold neck rot of onion at different inoculation timing (Takikawa 2011).

Growth stage of onion	Inoculation date	Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
bulb initiation	7/11,12,13	287	96	33.8 a
bulb development	7/25,26,27	326	131	40.1 a
neck fall	8/10,11,12	362	108	29.7 ab
after forced toppling	8/24,25,26	322	17	5.2 b
just before harvest	9/6,7,8	323	48	14.8 ab

Onion leaves began to fall over on 4-Aug and forced toppling on 24-Aug. Bulbs were harvested on 9-Sep and stored from 3-Oct at 5℃.

There is no significant difference at the 5% level in the Tukey method in the sections with the same lowercase letters.

Table 25. Incidence of gray mold neck rot of onion at different inoculation timing (Takikawa 2012).

Growth stage of onion	Inoculation date	Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
bulb development	7/18,19,20	251	34	13.5 a
neck fall	8/6,7,8,	253	14	5.6 ab
forced toppling	8/21,22,23	271	9	3.5 ab
just before harvest	9/3,4,5	248	11	4.5 ab
non-inoculation	-	239	1	0.4 b

Onion leaves began to fall over on 2-Aug and forced toppling on 21-Aug. Bulbs were harvested on 10-Sep and stored from 5-Oct at 5℃.

There is no significant difference at the 5% level in the Tukey method in the sections with the same lowercase letters.

3. 考察

接種時期および部位の違いが発病に及ぼす影響を比較したところ、球肥大期-倒伏期の葉身に感染した病原菌が収穫時には首部-鱗茎に到達し、貯蔵中の鱗茎での発病に至ることが示された。接種時期は倒伏期よりも球肥大期で、接種部位は葉先よりも株元近くの葉鞘で発病球率が高かった。松尾(1971)は、本病の苗での感染、発病株に起因する貯蔵腐敗は認められないとしているが、球肥大期以降の地上部感染は貯蔵腐敗につながることを示された。

また、タマネギが灰色腐敗病に感染しやすい時期・生育ステージを明らかにするための接種試験を行った結果、

根切り期-収穫直前よりも、球肥大開始期-倒伏期の接種で発病球率が高くなることが明らかとなった。松尾(1971)は、収穫後風乾貯蔵中の灰色腐敗病発生のメカニズムを生育期間中に飛散し付着した本病原菌の分生子が収穫後の葉鞘部の傷や汁液の溢出等によりタマネギに侵入するためとしている。この知見によると、収穫時には葉鞘部に傷がつき易いため収穫直前接種の方が病原菌の侵入には有利と考えられる。しかしながら、本試験では、散水によって降雨や乾燥などの気象条件が感染に与える影響を小さくして、いずれの生育ステージでも感染に好適な高水分条件を保って接種したところ、生育期である球肥大開始期-倒伏期の接種で発病球%が高かった。

このことは、植物の老化や作業による傷みの他に感染に適した生育ステージがあることを示しており、松尾の知見とは異なる発生メカニズムが存在するものと考えられる。これまで灰色腐敗病の防除時期は倒伏期－収穫直前に重点が置かれているが、タマネギの本病に対する感染のしやすさからみると、それより前の球肥大開始期－倒伏期が防除時期として重要と考えられる。

第7章 防除対策

本病は第3章で示したように、近年多発していない状況にある。にもかかわらず、貯蔵中の突発的な多発の懸念から、収穫前を防除重点時期とした薬剤散布がなされている状況にある。第6章で示したように、本病の多発につながる感染時期は、根切り期－収穫直前よりも、球肥大開始期－倒伏期であることが明らかとなったことから、多発を回避するための効率的防除法確立に向け薬剤散布時期を検討した。試験には自然条件での孢子飛散時期が不明であることから、タマネギの生育ステージを通して接種を行った。

薬剤散布はいずれの試験でもタマネギの主要な防除対象病害である白斑葉枯病の初発時期から開始した。薬剤には白斑葉枯病と灰色腐敗病の両方に登録のある薬剤から選び、フルアジナム水和剤（商品名：フロンサイド水和剤）1000倍、クレソキシムメチル水和剤（商品名：ベルクト水和剤）1000倍、ボスカリド水和剤（商品名：カンタスドライフロアブル）1000倍を用いて、150L/10a（展着剤としてグラミンS加用）を散布した。

なお、ベンズイミダゾール耐性の発生状況から、チオファネートメチル水和剤（商品名：トップジンM水和剤）およびペノミル水和剤（商品名：ベンレート水和剤）は供試しないこととした。

1. 薬剤散布時期と防除効果

（1）無散水条件下での試験

1) 方法

①2013年滝川試験

5月21日に定植し、接種は6月26日にKF87株（*Botrytis aclada*）の菌核を1区につき外周の角2か所に1ケースずつ、試験区間の通路に均等に設置し、7月9、10、24および25日、ならびに8月9および22日にKF72株（*Botrytis allii*）とKF87株の分生子懸濁液（ 1×10^5 spores/mL）を等量混合して50 - 100L/10a噴霧接種した。試験区は畦間30cm、株間11.5cmの1区14.4㎡の3連制とした。倒伏は7月24日に始まり、8月12日に根切りを行った。8月27日に収穫後、風乾し5℃で貯蔵した。

散布月日と各日の使用薬剤はTable 27に示した。各薬剤は展着剤（商品名：グラミンS）を3000倍で加用して散布した。

翌2014年1月15および16日に貯蔵途中の全球について外観から発病の有無を調査し、4月2および3日に全球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数した。

②2013年訓子府試験

5月20日に定植し、接種は7月16日、8月6、15、29日にYa2C株（*B. aclada*）とKF87株の分生子懸濁液（ 1×10^5 spores/mL）を等量混合して50L/10a噴霧接種し、8月15日にKF87の菌核をPDA上（9cmシャーレ）で培養し、1区あたり1/4枚分、試験区中央に設置した。試験区は畦間27cm、株間10.5cmの1区4.32㎡の4連制とした。倒伏は8月5日に始まり、8月28日に根切りを行った。9月11日に収穫後、風乾し10℃で貯蔵した。

薬剤の散布月日と各日の使用薬剤はTable 27に示した。各薬剤は展着剤（商品名：グラミンS）を3333倍で加用して散布した。

翌2014年1月14日に貯蔵途中の全球について外観から発病の有無を調査し、4月3日に全球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数した。

③2014年訓子府試験

5月14日に定植し、接種は6月24日、7月17日、8月4、12、27日および9月10日にYa2C株の分生子懸濁液（ 1×10^5 spores/mL）を50L/10a噴霧接種した。試験区は1区4.32㎡の4連制とした。倒伏は8月8日に始まり、8月27日に根切りを行った。9月11日に収穫後、風乾し10℃で貯蔵した。

薬剤の散布月日と各日の使用薬剤はTable 28に示した。各薬剤は展着剤（商品名：グラミンS）を3333倍で加用して散布した。

翌2015年1月14日に貯蔵途中の全球について外観から発病の有無を調査し、4月2日に全球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数した。

2) 結果

①2013年滝川試験

2013年滝川試験の結果をTable 26に示した。無防除区で発病球%27.3の甚発生条件下での試験となった。倒伏前の葉繁茂期に防除を打ち切った区では防除効果が得られなかったが、倒伏期の散布をした区で防除効果が認められ、それ以降収穫直前まで散布を行っても防除効果は向上しなかった。また、葉繁茂期まで防除をせずに倒伏期から散布を開始した区でも同様の効果が得られ、倒伏期に散布をした全ての区で防除効果が得られた。

②2013年訓子府試験

2013年訓子府試験の結果をTable 27、28に示した。無防除区で発病球18.7%の多発生条件下での試験となった。球肥大開始期で散布を打ち切った区では防除効果が得ら

れたものの、その効果はやや低かった。倒伏期の散布をした区で防除効果が認められ、それ以降収穫直前まで散布を行っても防除効果は変わらなかった。

Table 26. Incidence of gray mold neck rot of onion at different timing to stop fungicide application (Takikawa, 2013).

Timing to stop application	dates of fungicide applications						Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
	6/24	7/8	7/24	8/8	8/22				
	F	K	B	F	B				
bulb development	○	○	-	-	-	-	515	164	31.7
neck fall	○	○	○	-	-	-	512	27	5.3 **
forced toppling	○	○	○	○	-	-	513	27	5.3 **
just before harvest	○	○	○	○	○	○	521	18	3.5 **
after neck fall	-	-	○	○	○	○	488	23	4.7 **
Non-application	-	-	-	-	-	-	495	134	27.3

Fungicide F: fluazinam wettable powder, K: kresoxim-methyl wettable powder, B: boscalid wettable powder.

Onion leaves began to fall over on 24-Jul and forced toppling on 12-Aug. Bulbs were harvested on 27-Aug and stored at 5 °C.

Inoculation with spore suspension on 9, 10, 24, 25-Jul, 9, 22-Aug and with sclerotium on 26-Jun.

In the * and ** sections, there is a significant difference between each treatment and non-application at the 5% and 1% levels in the χ^2 test, respectively.

Table 27. Incidence of gray mold neck rot of onion at different timing to stop fungicide application (Kunneppu, 2013).

Timing to stop application	dates of fungicide applications							Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
	6/19	7/5	7/17	7/31	8/15	8/29	9/9			
	F	K	B	F	K	F	B			
bulb development	○	○	○	-	-	-	-	220	20	9.2 **
before neck fall begins	○	○	○	○	-	-	-	286	16	5.6 **
neck fall	○	○	○	○	○	-	-	292	16	5.5 **
forced toppling	○	○	○	○	○	○	-	291	13	4.5 **
just before harvest	○	○	○	○	○	○	○	289	11	3.8 **
Non-application	-	-	-	-	-	-	-	180	34	18.7

Fungicide F: fluazinam wettable powder, K: kresoxim-methyl wettable powder, B: boscalid wettable powder.

Onion leaves began to fall over on 5-Aug and forced toppling on 28-Aug. Bulbs were harvested on 11-Sep and stored at 10 °C.

Inoculation with spore suspension on 16-Jul, 6, 15, 29-Aug and with sclerotium on 15-Aug.

In the * and ** sections, there is a significant difference between each treatment and non-application at the 5% and 1% levels in the χ^2 test, respectively.

③2014年訓子府試験

2014年訓子府試験の結果を Table 28 に示した。無防除区で発病球率 31.6%の甚発生条件下での試験となった。球肥大開始期で散布を打ち切った区では防除効果が得られなかった。倒伏期の散布をした区で、低いながらも防除効果が認められた。それ以降収穫直前まで散布を行っても防除効果は大きく向上しなかった。

(2) 散水条件下での試験

1) 方法

試験は、2013年に滝川市内圃場で行った。降雨や乾燥が感染の適否に影響することを排除するために、7月上旬から倒伏までの期間、毎日夕方10分間ミスト式の散水装置で散水した。噴霧接種は散水後に行った。

5月21日に定植し、接種は6月26日にKF87株の菌核を1区につき外周の角2か所に1ケースずつ、試験区間の通路に均等に設置し、6月24日、7月9日、24日、8月9日、22日にKF72株とKF87株の分生子懸濁液(1×

10⁵ spores/mL) を等量混合して 50L/10a 噴霧接種した。試験区は1区 5.25 m² の3連制とした。

倒伏は7月30日に始まり、8月6日に倒伏揃いを迎えた。8月19日に根切りを行い、9月5日に収穫後、風乾し5℃で貯蔵した。

薬剤の散布月日と各日の使用薬剤は Table 29 に示し

た。各薬剤は展着剤(商品名: グラミン S) を3000倍で加用して散布した。

翌2014年1月15、16日に貯蔵途中の全球について外観から発病の有無を調査し、4月2、3日に全球を縦に切断して灰色腐敗病発病球を計数した。

Table 28. Incidence of gray mold neck rot of onion at different timing to stop fungicide application (Kunneppu, 2014).

Timing to stop application	dates of fungicide applications							Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
	6/24 F	7/8 K	7/22 B	8/6 F	8/11 K	8/27 F	9/9 B			
bulb development	○	○	○	-	-	-	-	228	87	38
before neck fall begins	○	○	○	○	-	-	-	297	52	17.6 *
neck fall period	○	○	○	○	○	-	-	303	50	16.3 **
forced toppling	○	○	○	○	○	○	-	303	47	15.5 **
just before harvest	○	○	○	○	○	○	○	319	48	15.1 **
non-control	-	-	-	-	-	-	-	239	77	31.6 a

Fungicide F: fluazinam wettable powder, K: kresoxim-methyl wettable powder, B: boscalid wettable powder.

Onion leaves began to fall over on 8-Aug and forced toppling on 27-Aug. Bulbs were harvested on 11-Sep and stored at 10 °C.

Inoculation with spore suspension on 24-Jun, 17-Jul, 4, 12, 27-Aug and 10-Sep.

In the * and ** sections, there is a significant difference between each treatment and non-application at the 5% and 1% levels in the χ^2 test, respectively.

2) 結果

倒伏期に灌水を打ち切ったが、8月中旬は多雨で経過し、圃場は過湿条件となった。無防除区で発病球率44.7%の甚発生条件下での試験となった(Table 29)。球肥大期および倒伏期で散布を打ち切った区では、発病球率がそれぞれ20.4%および22.1%だった。根切り期あるいは収

穫直前まで散布を行った区ではそれぞれ10.4%および10.8%だった。倒伏期-根切り期に防除を行った区で防除効果が高かった。収穫直前の薬剤散布による効果の向上は認められなかった。

Table 29. Incidence of gray mold neck rot of onion at different timing to stop spraying fungicide under watering conditions (Takikawa 2013).

Onion growth stage to stop application	dates of fungicide applications						Number of survey bulbs	Number of diseased bulbs	Ratio of diseased bulbs (%)
	6/24 F	7/8 K	7/24 B	8/8 F	8/21 K	9/2 B			
bulb development	○	○	○	-	-	-	218	44	20.4 *
neck fall	○	○	○	○		-	226	51	22.1 *
forced toppling	○	○	○	○	○		233	24	10.4 **
just before harvest	○	○	○	○	○	○	225	25	10.8 **
non-control	-	-	-	-	-	-	143	65	44.7

Fungicide F: fluazinam wettable powder, K: kresoxim-methyl wettable powder, B: boscalid wettable powder.

Onion leaves began to fall over on 30-Jul and forced toppling on 19-Aug. Bulbs were harvested on 5-Sep and stored at 5 °C.

Inoculation with spore suspension on 9, 24-Jul, 9, 22-Aug and with sclerotium on 26-Jun.

Water was sprinkled every day from 17:00 from 7-Jul to 7-Aug.

Only the non-spraying section was tested in a two-section system.

There is a significant difference between the 5% level and the 1% level of no control of the χ^2 method in the * and ** sections.

2. 考察

自然気象下の圃場試験において、葉繁茂期で防除を打ち切った区では防除効果が得られなかったが、倒伏期に防除をした区では防除効果が得られた。薬剤の残効が切れていると考えられる時期に病原菌を接種しても、倒伏期より後（根切り期、収穫直前）の防除による効果の向上は認められなかった。

これに対して、散水により収穫直前まで圃場が過湿条件となっていた試験では、倒伏期までの散布では防除効果が劣り、根切り期以降も防除することで効果が向上した。これは、圃場あるいは作物体が常に湿っている状態により薬液の付着が不十分になる等、散水処理が防除効果の低下をもたらしたためと考えられた。

第6章でタマネギの灰色腐敗病菌に対する感受性は球肥大開始期－倒伏期に高いことが明らかとなった。本章の試験結果からは、倒伏前後に薬剤散布を行った区で防除効果が得られており、倒伏期は灰色腐敗病の重点防除時期であることが明らかとなった。

現在、本病の防除は倒伏期－収穫直前に重点が置かれている。これは主に「ボトリチス属菌によるタマネギ貯蔵腐敗の発生生態」（北海道農政部 1985）に示された知見に基づいている。この当時、タマネギは倒伏後、しばしば完全枯葉前にタッピングされて収穫・貯蔵されており、これが灰色腐敗病の感染を促すことが唆されていた。現在は倒伏後に根切りを行って完全枯葉後に収穫する体系が導入されており、倒伏期以降の感染リスクは当時と異なると考えられる。

本試験においても倒伏後の本病原菌の噴霧接種でも発病は認められ、倒伏後にも条件が整えば感染、発病の可

能性は残ると考えられる。第3章の発生実態に関する試験からも、多雨条件は本病の発病を助長することが示されており、噴霧接種を行うことで感染源が充分存在していた条件下では、根切り期の防除が必要となったと推察される。

なお、本研究を通したいずれの圃場試験においても、分生子懸濁液による強い接種を繰り返し行ったが、甚発生条件下であっても、隣接する無接種区での発生はごくわずかしか発病球を認めていない。このことは、(1)本病の発生には感染株あるいは残渣に由来する分生子あるいは菌糸が必要であること、(2)接種を行った7月上旬以降の感染株による2次感染が多発をもたらすリスクは極めて低いことを示している。本州のタマネギ灰色腐敗病の感染源として、圃場付近に葉ごと吊されたタマネギなどの存在や選果場の残渣からの病原菌分生胞子の飛散が指摘されている。道内でもかつては、連作されるタマネギにおいて、前年収穫時のタッピングした残渣や腐敗球がすき込まれることなく春まで圃場表面に放置されている事例が見受けられた。しかし、現在の道内におけるタマネギ栽培状況では、倒伏期の圃場周辺で感染源となる罹病球や残渣が大量に放置されている場面はほとんどなく、このような多発条件となるリスクは実際には低いと考えられる。

以上のことから、本病の防除重点時期は、球肥大開始期－倒伏期であると判断した。この時期は、タマネギの重要病害である白斑葉枯病の防除時期とほぼ重なることから、白斑葉枯病と同時に灰色腐敗病にも効果のある薬剤を選択して防除することで、散布回数を増やすことなく効率的に多発を回避できると考えられる (Fig. 9)。

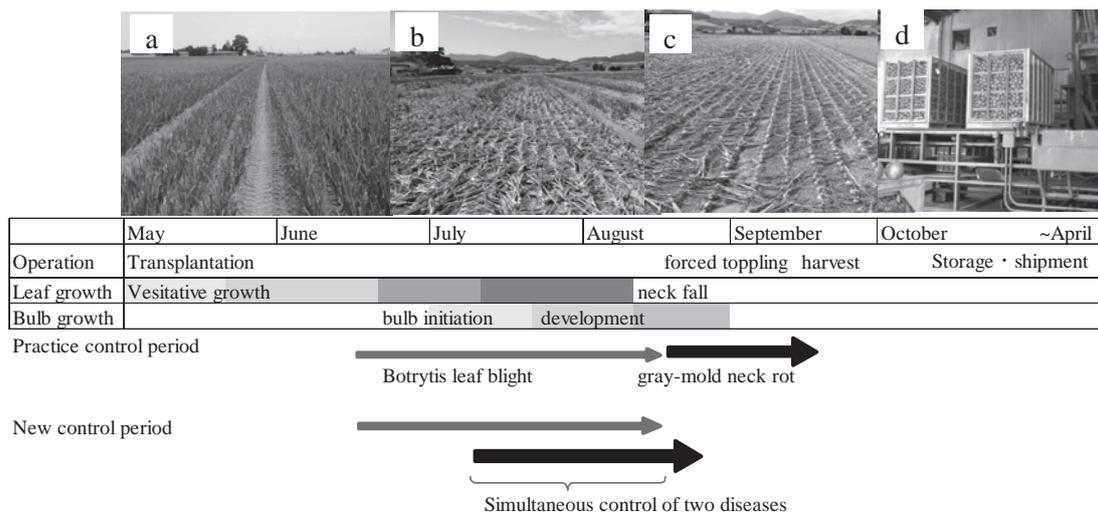


Fig. 9. Important control period for avoiding gray mold neck rot of onion frequent occurrence.

a: Onion field in July (bulb development period); b: Onion field in mid-August (neck fall period); c: Onion field before harvest; d: Onions sorted and shipped after harvest.

第8章 総合考察

1. タマネギ灰色腐敗病の発生

貯蔵中の鱗茎で発症する灰色腐敗病は、多発すると農業上被害が大きい。1980年前後に道内の *Botrytis* 属菌による貯蔵腐敗の発病球率が5%前後で推移していた(石坂・柳田 1981)。しかしながら、国内でタマネギに病原性を持つ *Botrytis* 属菌は7種報告されており(NARO Genebank 2020)、それぞれに異なる病名を与えられているものの、いずれもタマネギの葉に病原性を持ち、識別しがたい白斑状の病斑を作ることから、灰色腐敗病の病原菌の感染から発病に至る経過や発生条件については不明な部分が多い。本研究における現地の発生実態調査において、多発事例は認められず、研究を行った2010年から2020年の間に多発した事例は見つからなかった。また、種子伝染する本病であるが、近年種子由来を疑うような発生もない。このことから本病は、近年は常発する病害ではなくなっていると言える。

しかしながら、現在でも生産現場では突発的な多発生を懸念して石坂らの知見(石坂 1978, 石坂 1979, 石坂・柳田 1981, 北海道農政部 1985)をもとに生育後半の倒伏期—収穫直前に重点が置かれ、慣行では、生育期間中の感染状況が不明なまま倒伏期、根切り期、収穫前を目安に3回薬剤散布が行われている(池谷ら 2017)。このため、タマネギの栽培技術が大きく変遷した今、現在の栽培体系、発生実態に即した効率的な防除を構築する必要があった。

また、産地によっては5月下旬に灰色腐敗病の発生を警戒する防除暦も存在する。2017年にオホーツクおよび十勝管内において、移植後のタマネギが早期に腐敗、萎凋し欠株となる症状が発生して大きな被害となった(北海道農政部 2020)。この主原因となった *Botrytis byssoidea* は菌糸性腐敗病の病原菌であり、*Botrytis* 属菌が起こす貯蔵腐敗の病原でもある。近年の温暖化傾向の中で、タマネギが移植後低温に遭遇する頻度は低くなっており、タマネギ栽培においても移植の早期化が進んでいる。しかしながらこの年は、4月4日、5半月に低温状態が続き、特に移植が早かった早生品種で5月から6月に立枯症状発生した。発症株は鱗茎の腐敗による萎凋症状を呈し、苗での感染が疑われた。その後7月にかけて枯死し欠株となったものの、発病株は増加せず、収穫後の腐敗にもつながらなかった。5月下旬に灰色腐敗病を警戒する産地でかつて発生していた病害は、この *B. byssoidea* による症状であった可能性が考えられる。

2. 病原菌の同定

本研究では、これまで道内では *Botrytis allii* がタマネギ灰色腐敗病の病原菌として扱われてきたが、実際には *B. allii* と *Botrytis aclada* の2種が混在しており、新たに確認された *B. aclada* は広範囲に分布していることを明らかにした。調査を実施したごく少発生状況下で、2種の分離頻度は年と場所によって異なったが、全体として道内では *B. allii* が優勢であった。同じ接種条件で比較した場合、両種の病原性は、葉および鱗茎上において同様であり、両種の温度に対する反応にも差異は認められなかった。多発時に両種がどう関わっているのかについて本研究では明らかにできなかったが、今後新たな知見が待たれるところである。

また、本研究では道内分離株を対象として調査を行っており、国内他地域の分布については調査していない。Shirane et al. は1989年の報告の中で *B. allii* として7菌株(SAL001, SAL002, SAL003, SAL004, SAL005, SAL006, SAL007)の形態と染色体数を観察しており、このうち染色体数が16である4菌株(SAL003(Table 12), SAL005, SAL006, SAL007)は *B. aclada*、染色体数32で倍数体である3菌株(SAL001(Table 12), SAL002 および SAL004=NBRC9430)は *B. aclada* と *B. byssoidea* (染色体数16)のハイブリッドである *B. allii* であったと推察される。SAL005は兵庫県立農業試験場、SAL006 および SAL007は北海道立農業試験場の保存菌株であると説明されていることから、いずれの地域においても1989年以前から *B. aclada* が存在していた可能性が高い。

なお、中国で近年発生が確認された *Botrytis sinoallii* (Zhang et al. 2010b) は道内では確認されなかった。

3. ベンズイミダゾール耐性

薬剤に対する感受性については、北海道のタマネギから分離した灰色腐敗病菌のうち *B. aclada* と *B. allii* では、ベンズイミダゾール耐性の出現頻度が大きく異なった。*B. aclada* では道内に広く耐性株が認められるのに対し、*B. allii* では全く認められなかった。両種の胞子形成能力を比較すると10—25℃において、*B. aclada* の胞子形成速度が早く、形成量が多かった(Table 14)。無性世代しか確認されていない両種の生活環において、遺伝子変異が起こるのは通常胞子形成時であり、変異の結果として薬剤耐性獲得が起こる確率も高くなると考えられる。*Aspergillus fumigatus* Fresenius では、豊富に形成される無性世代の胞子が薬剤耐性突然変異の表現型発現に不可欠であると考えられている(Zhang et al. 2015)。このことから、短期間での胞子形成能力の高い *B. aclada* の方が

遺伝的変異が起こりやすく、薬剤耐性株の出現につながった可能性が考えられる。加えて、進化の過程でよく保存されているとされるヒートショックプロテインの部分配列 (Staats et al. 2005) から作成した系統樹 (Fig. 8) では、異なる3地域から分離した *B. aclada* の耐性株がいずれも感受性株や *B. byssoidea* とは異なる同一の大きなクラスターに属し、遺伝的距離が離れていた。このことは本研究で明らかにしたベンズイミダゾール耐性は、遺伝的に異なる背景を持つ *B. aclada* 集団に由来する可能性が示唆される。

4. 効率的防除

タマネギの慣行栽培における農薬使用回数は30回で、他の主要作物と比較しても極めて多い作物である (北海道農政部 2003)。灰色腐敗病は常発病害ではなくなったものの、突発的な多発生リスクに対する対応が課題として残され、タマネギの減農薬栽培を困難にする一因となってきた。本研究でタマネギの本病に対する感受性が生育時期により異なることが明らかとなったことから、多発を回避するための防除重点時期を絞ることが可能になるものと考えられる。本研究で示した新しい灰色腐敗病防除 (Fig. 9) は、タマネギの主要防除対象である白斑葉枯病の防除時期と重なり、両病害に効果の高い薬剤を使用することで、散布回数を削減しつつ灰色腐敗病の多発を回避することが可能と考えられる。

本研究の成果が北海道のタマネギ栽培の発展に裨益することを願ってやまない。

摘 要

1. 2011 - 2014 年にかけて道内のタマネギ産地 2 地域 38 戸の生産者で本病の貯蔵中の発生状況を調査したところ、発病球は大型コンテナ 1 基あたり最多で 3 個、平均で 0.1 個とわずかだった。発生要因に関する試験から、栽培期間を通した断続的な降雨は貯蔵中の鱗茎腐敗の発生を助長することが示された。また、灰色腐敗病菌は 5 °C の低温でも無病徴のまま高頻度に感染すること、低温時の感染はその後温度が上がっても病勢が進展しにくいことが確認された。施肥による発病への影響、根切り作業の遅れによる発病助長の有無は判然としなかった。

2. 形態的特徴と PCR - RFLP の結果に基づいて、道内の灰色腐敗病菌を再同定した。*Botrytis allii* と *Botrytis aclada* の両種が北海道のタマネギの灰色腐敗病に関連していることを明らかにし、病原として *Botrytis aclada* を新たに追加した。道内 8 地域のタマネギ産地で貯蔵中の発病を調査したところ、*B. allii* は 8 地域すべて、*B. aclada* は 6 地域で確認された。両種はしばしば混在し、*B. aclada* も広く分布していることが明らかとなった。優占種は地域や年次で異なったが、総じて *B. allii* が優勢だった。両種は形態学的特徴、各温度における生育、病原性において明確な差は認められなかったが、25 °C における孢子形成は *B. aclada* で早い傾向が認められた。

3. 北海道におけるタマネギ灰色腐敗病菌のベンズイミダゾール耐性が確認された。*B. allii* はすべて感受性、*B. aclada* 株では高度耐性が高頻度に分離されたことから、薬剤耐性 *B. aclada* が道内に広く分布すること、および *B. allii* と *B. aclada* でベンズイミダゾール耐性の発生は異なることが明らかとなった。さらに、チオファネートメチルとベノミルは、圃場試験で効果がないことを確認した。多くのベンズイミダゾール耐性の糸状菌で報告されている β -チューブリン遺伝子のコドン 198 における 1 塩基置換が確認され、耐性株では GAG から AAG への変異が明らかとなった。*B. cinerea* を含む HSP60 部分配列から得られた系統樹では、耐性株と他の感受性の *B. allii* と *B. aclada* や *B. byssoidea* が含まれる大きなクラスターとを分ける強力なノードが存在し、道内で検出された耐性 *B. aclada* 株はタマネギの貯蔵腐敗から検出される病原の中では異なる遺伝的背景を持った集団に由来する可能性が示唆された。

4. 接種時期・部位の違いによる発病を比較したところ、球肥大期 - 倒伏期の葉身に感染した病原菌が収穫時には

首部 - 鱗茎に到達し貯蔵中の鱗茎での発病に至ることを確認した。タマネギが灰色腐敗病に感染しやすい時期・生育ステージを明らかにするための接種試験を行った結果、根切り期 - 収穫直前よりも、球肥大開始期 - 倒伏期の接種で発病球率が高くなることが明らかとなった。これまで灰色腐敗病の防除時期は倒伏期 - 収穫直前に重点が置かれているが、タマネギの本病に対する感染のしやすさからみると、それより前の球肥大開始期 - 倒伏期が防除時期として重要であることを示唆した。

5. 効果的な防除時期を検討した圃場試験において、倒伏期まで防除をした区では防除効果が得られた。倒伏期より後（根切り期、収穫直前）の防除による効果の向上は認められず、倒伏期までが灰色腐敗病の重点防除時期であることが明らかとなった。この時期は、タマネギの重要病害である白斑葉枯病の防除時期とほぼ重なることから、白斑葉枯病と同時に灰色腐敗病にも効果のある薬剤を散布することで、散布回数を増やすことなく効率的に灰色腐敗病の多発を回避できる防除体系を構築した。

Studies on pathogens and control of gray-mold neck rot of onion.

Ayumi Notsu

Summary

Hokkaido is a major onion-producing area in Japan that accounts for 60% of domestic production. Typically, seedlings are grown in a greenhouse and transplanted into open fields as 2-month-old seedlings in late April to early May; plants are then harvested from August to September, while in many areas of Japan, except in Hokkaido, onions are planted in the field in autumn and harvested in spring.

There are 35 known onion diseases in Japan. Of these, there are five diseases caused by *Botrytis* species, and seven species have been identified as the causal agent.

In Hokkaido, several *Botrytis* species are associated with diseases on onion leaves. Of these *Botrytis* species, *Botrytis allii* Munn is known as the causal agent of gray-mold neck rot. *Botrytis* leaf blight occurs in the field from late June to September, whereas gray-mold neck rot occurs on harvested onions during storage. In the 1970s, gray-mold neck rot occurred in about 5% of onion storage bulbs in Hokkaido and caused economic damage.

Although the damage caused by this disease is rare in recent years, it is a disease for which sudden outbreaks are a concern, such as the outbreak in 1993.

Gray-mold neck rot is difficult to control because it occurs mainly during storage, and bulbs stocked for several months after harvest often produce symptoms if minor leaf symptoms appeared in the field during the growing season. Efficient control of this disease was required. *B. allii* and *B. aclada* are not easily distinguished based on their conidial morphology. Therefore, in the classification of *Botrytis*, *B. allii* has been regarded as a synonym of *B. aclada*. Yohalem et al. (2003) reported that *B. allii* was a hybrid of *B. aclada* and *B. bysoidea* J. C. Walker, and proposed that they were independent species. For this reason, it was necessary to clarify the distribution of onion gray-mold neck rot pathogens in Hokkaido.

1. From 2011 to 2014, a survey of 38 producers in two onion producing areas during storage revealed that the maximum number of diseased bulbs per large container was 3, with an average of 0.1. Studies on meteorological factors have shown that intermittent rainfall during the growing season promotes the development of bulb rot during storage. In addition, it was confirmed that the pathogen often infects asymptotically even at a low temperature of 5 °C, and that leaf infection does not easily progress at low temperatures even if the temperature rises thereafter. It was unclear whether delayed root cutting and fertilization would promote the disease.

2. Based on the morphological characteristics and the results of PCR-RFLP, we identified isolates of onion gray-mold neck rot in Hokkaido. It was revealed that both *B. allii* and *B. aclada* are associated with this disease. This is the first report of *B. aclada* causing this disease in Japan, and we propose to add *B. aclada* as a new pathogen of the disease.

B. allii and *B. aclada* were isolated from eight and six regions of Hokkaido, respectively, indicating that both species are widely distributed in the onion-producing regions. Although pathogen occurrence varied according to year and location, *B. allii* was generally dominant. There were no clear differences in morphological characteristics, growth at each temperature, or pathogenicity between the two species, but sporulation at 25 °C tended to be faster in *B. aclada*.

3. *B. aclada* and *B. allii* isolated in Hokkaido, were tested for sensitivity to benzimidazole. Of the *B. aclada* strains, 59% were highly resistant and the remaining 41% were sensitive; all strains of *B. allii* were sensitive. Resistant strains were widespread in Hokkaido. Furthermore, we confirmed that thiophanate-methyl and benomyl had no effect in field tests involving the inoculation of plants with resistant strains (data not shown). We analyzed the sequences of the β -tubulin gene of resistant strains and detected the replacement of glutamic acid (GAG) by lysine (AAG) at codon 198. In the phylogenetic tree obtained from the HSP60 partial

sequence, there is a strong node that separates resistant strains from other susceptible *B. allii* and large clusters containing *B. aclada* and *B. byssoidea*. It was suggested that the resistant strains detected in *B. aclada* may be derived from a population with a different genetic background among the pathogenicities detected from the storage rot of onions.

4. Inoculation was performed at different times and sites, and it was confirmed that the pathogens that infect the leaf blades during the bulb initiation period to the leaf fall period reached the neck to the bulbs at the time of harvest and led to the occurrence of the disease in the bulbs during storage. As a result of the inoculation test, inoculation from the start of bulb initiation to the leaf fall period causes more bulb rot in during storage than the inoculation from the forced toppling period to just before harvest. As a result of the inoculation test, it was revealed that the inoculation from the beginning of bulb initiation period to the leaf fall period causes more bulb rot in during storage than the inoculation from the forced toppling period to just before harvest. Although it was considered that the control of this disease was important after the leaf fall period, but it was suggested that the beginning of bulb initiation period to the leaf fall period was important as the control period. Although the important period for controlling this disease has been considered to be from the leaf fall period to just before harvest, it was suggested that the period from the bulb initiation period to the leaf fall period is important.

5. As a result of the field trial, the control effect was obtained in the treatment which was sprayed until the leaf fall period. No improvement in the control effect after the leaf fall period was observed, indicating that the time until leaf fall is the priority spraying period for gray-mold neck rot. Since this time is almost the same as the time to control leaf blight, which is an important disease of onions, spraying fungicides, which is effective against both diseases, can control gray rot without increasing the number of sprays.

As described above, in this study, we examined the meteorological factors and cultivating factors that can cause frequent occurrence of gray-mold neck rot of onion. In addition, by clarifying the growth stage at which onions are susceptible to this disease, the priority period for control was shown. In addition, I re-identified the pathogens, revealed the involvement of unreported fungi in Japan, and revealed the distribution and resistant strains to benzimidazole. Based on these findings, the control period for this disease, which was thought to be just before harvesting, was reviewed, and an efficient control system was established.

謝 辞

本研究を行うに当たり、多くの方のご指導、ご支援を賜った。北海道植物防疫協会児玉不二雄博士には終始懇切なご指導と激励をいただいた。本病害の対策にともに取り組み、終始適切なお助言をいただいた池谷美奈子博士、白井加代氏には本報告において貴重なデータをご提供いただいた。衷心より感謝申し上げます。また、論文執筆に当たって根気強く励まし、ご助言頂いた三澤知央博士、課題遂行に多大なご理解と適切な指導を賜った角野晶大氏、西脇由恵氏、橋本直樹博士、圃場試験遂行にご尽力いただいた梶山幸道氏に深くお礼申し上げます。

加えて、現地調査に当たって多大なご支援、多くの情報をいただいたふらの農業協同組合阿部晴夫氏、JA きたみらい庄子隆之氏、いわみざわ農業協同組合松本秀則氏、東井秀和氏、網走農業改良普及センター遠軽支所伊東 健氏（現十勝農業改良普及センター）、上川農業改良普及センター富良野支所柿崎由紀氏（現胆振農業改良普及センター東胆振支所）をはじめとした各農業改良普及センターの方々にご深くお礼申し上げます。

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター教授近藤則夫博士（大学院農学研究院教授兼務）、同大学院農学研究院教授鈴木卓博士、同大学院農学研究院教授増田税博士、同大学院農学研究院講師秋野聖之博士には本稿のご校閲を賜った。ここに深く感謝申し上げます。

引用文献

- Beever, R. E., Weeds, P. L. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and Botryotinia. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds) *Botrytis: biology, pathology and control*. Springer, Dordrecht, pp 29-52 (2007)
- Chilvers, M. I., Hay, F. S., Wilson, C. R. Survey for *Botrytis* species associated with onion bulb rot in northern Tasmania, Australia. *Australasian Plant Pathol.* 33:419-422 (2004)
- Davidse, L. C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Ann Rev Phytopathol* 24: 43-65 (1986)
- Duan, Y., Yang, Y., Chen, C., Zhou, M. Development and application of a simple, rapid, and sensitive method for detecting moderately carbendazim-resistant isolates in *Botrytis cinerea*. *Ann Appl Biol* 172: 355-365 (2018)
- 逸見武雄, 丹羽 静子. 灰色黴類の侵害に基づく貯蔵葱頭の腐敗病に就きて. *日植病報* 8(4):309-326 (1939)
- 北海道農政部. ボトリチス属菌によるタマネギ貯蔵腐敗の発生生態. 平成6年普及奨励ならびに指導参考事項 (1985)
- 北海道農政部. 平成5年度の発生に鑑み注意すべき病害虫. 平成6年普及奨励ならびに指導参考事項 pp 192-202 (1994)
- 北海道農政部. クリーン農業技術体系. (2003)
- 北海道農政部. 移植たまねぎの早期立枯症状の原因と耕種的対策. 令和2年普及奨励ならびに指導参考事項 (2020)
- Hwang, S. K., Lee, S. Y., Back, C. G., Kang, I. K., Lee, H. B., Jung, H. Y., Ohga, S. No reported species, *Botrytis aclada* causing gray-mold neck rot disease on onion bulbs in Korea. (2016)
- 池谷美奈子, 野津あゆみ, 白井佳代. 異なる接種時期からみたタマネギの灰色腐敗病に感染しやすい生育ステージ. *北日本病虫研報* 67:108-111 (2016)
- 石坂信之. *Botrytis* 属菌によるタマネギの貯蔵腐敗: 腐敗鱗茎より分離された菌の種類と分布. *日植病報* 44:73 (講要) (1978)
- 石坂信之. 北海道における *Botrytis* 属菌によるタマネギの貯蔵腐敗について. *日植病報* 45:522 (講要) (1979)
- 石坂信之・柳田騏策. *Botrytis* 属菌によるタマネギの貯蔵腐敗に対するチオファネートメチル剤の防除効果. *北日本病虫研報* 32:134-135 (1981)
- Khan, I., Marroni, V., Keenan, S., Mackay, J., Viljanen-Rollinson, S., Scott, I., Bulman, S. Detecting benzimidazole resistance in *Botrytis allii* using molecular techniques (abstract). *New Zealand Plant Protection* 63:271 (2010)
- Koenraadt, H., Somerville, S. C., Jones, A. L. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354 (1992)
- Koenraadt, H., Jones, A. L. Resistance to benomyl conferred by mutations in codon 198 or 200 of the beta tubulin gene of *Neurospora crassa* and sensitivity to diethofencarb conferred by codon 198. *Phytopathology* 83: 850-854 (1993)
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., Gredt, M. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protect* 18:687-697 (1999)
- Leroux, P., Debieu, L. F. D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., Chapeland, F. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag Sci* 58:876-888 (2002)
- Ma, Z., Yoshimura, M. A., Michailides, T. J. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Appl Environ Microbiol* 69: 7145-7152 (2003)
- Malandrakis, A., Markoglou, A., Ziogas, B. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. *Pestic Biochem Physiol* 99: 118-124 (2011)
- 松尾綾男. タマネギボトリチス病の疫学的研究. *兵庫農総セ特研報* 1:1-10 (1978)
- 松尾綾男, 合田 薫, 入江和己, 塩飽邦子, 山田憲一. 兵庫県におけるチオファネートメチル剤耐性 *Botrytis* 属菌の発生. *兵庫農総セ研報* 27:39-42 (1978)
- Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., Freeman, S. Identification and Characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonim* spp.). *Phytopathology* 96: 542-548 (2006)
- Meng, C., Dong, L., Lei, C., Yang, B., Lu, X., Xi-li, L. M233I Mutation in the β -tubulin of *Botrytis cinerea* confers resistance to Zoxamide. *Scientific Reports* 5:16881 (2015)
- NARO Genebank. Database of plant diseases in Japan. (2020)
- https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php. Cited 28 Aug 2020

- Nielsen, K., Justesen, A. F., Jensen, D. F., Yohalem, D. S. Universally primed polymerase chain reaction alleles and internal transcribed spacer restriction fragment length polymorphisms distinguish two subgroups in *Botrytis aclada* distinct from *B. byssoidea*. *Phytopathology* 91:527-533 (2001)
- Nielsen, K., Yohalem, D. S. Origin of a polyploid *Botrytis* pathogen through interspecific hybridization between *Botrytis aclada* and *B. byssoidea*. *Mycologia* 93:1064-1071 (2001)
- Nielsen, K., Yohalem, D. S., Jensen, D. F. PCR detection and RFLP differentiation of *Botrytis* species associated with neck rot of onion. *Plant Dis* 86:682-686 (2002)
- Nishiguchi, S., Kanto, T., Irie, K., Osada, Y., Kyuno, T. Detection of benzimidazole resistant strain of *Botrytis allii* (onion gray-mold neck rot) (abstract in Japanese) *Jpn J Phytopathol* 66: 305 (2000)
- 野津あゆみ, 児玉不二雄. 北海道におけるタマネギ灰色腐敗病菌の再同定. *日植病報* 80: 62 (講要) (2014) 農林水産省統計部. 令和元年産指定野菜 (秋冬野菜等) 及び指定野菜に準ずる野菜の作付面積, 収穫量及び出荷量. (2019)
- https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/index.html#y1
- Cited 28 Aug 2020
- Shigyo, M., Kik, C. Onion. In: Prohens J., Nuez F. (eds) *Vegetables II*. Handbook of Plant Breeding, vol 2. Springer, New York, NY. (2008) https://doi.org/10.1007/978-0-387-74110-9_4 . Cited 28 Aug 2020
- Shirane, N., Masuko, M., Hayashi, Y. Light microscopic observation of nuclei and mitotic chromosomes of *Botrytis* species. *Phytopathology* 79:728-730 (1989)
- Staats, M., van Baarlen, P., van Kan, J. A. L. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol Biol Evol* 22:333-346 (2005)
- Viljanen-Rolinson, S. L. H., Marroni, M. V., Butler, R. C. Reduced sensitivity to carbevdamizim in isolates of *Botrytis allii*. *New Zealand Plant Protection* 60:108-113 (2007)
- Yamaguchi, J., Mikuriya, H., Matsuzaki, M. Occurrence of thiophanate-methyl resistant strains of onion gray-mold neck rot pathogen and its chemical control (abstract in Japanese). *Kyushu Pl Pro Res* 48:97 (2002)
- Yarden, O., Katan, T. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478-1483 (1993)
- Yohalem, D. S., Nielsen, K., Nicolaisen, M. Taxonomic and nomenclatural clarification of the onion neck rotting *Botrytis* species. *Mycotaxon* 85:175-182 (2003)
- Zhang, Q. C., Liu, H. Y., Zhu, N. G. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. *Euro J Plant Pathol* 126:509-515 (2010a)
- Zhang, J., Zhang, L., Li, G. Q., Yang, L., Jiang, D. H., Zhuang, W. Y., Huang, H. C. *Botrytis sinoallii*: a new species of the grey mould pathogen on *Allium* crops in China. *Mycoscience* 51:421-431 (2010b)
- Zhang, J., Debets, A. J. M., Verweij, P. E., Melchers, W. J. G., Zwaan, B. J., Schoustra, S. E. Asexual sporulation facilitates adaptation: The emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 69(10):2573-86 (2015)

図 版

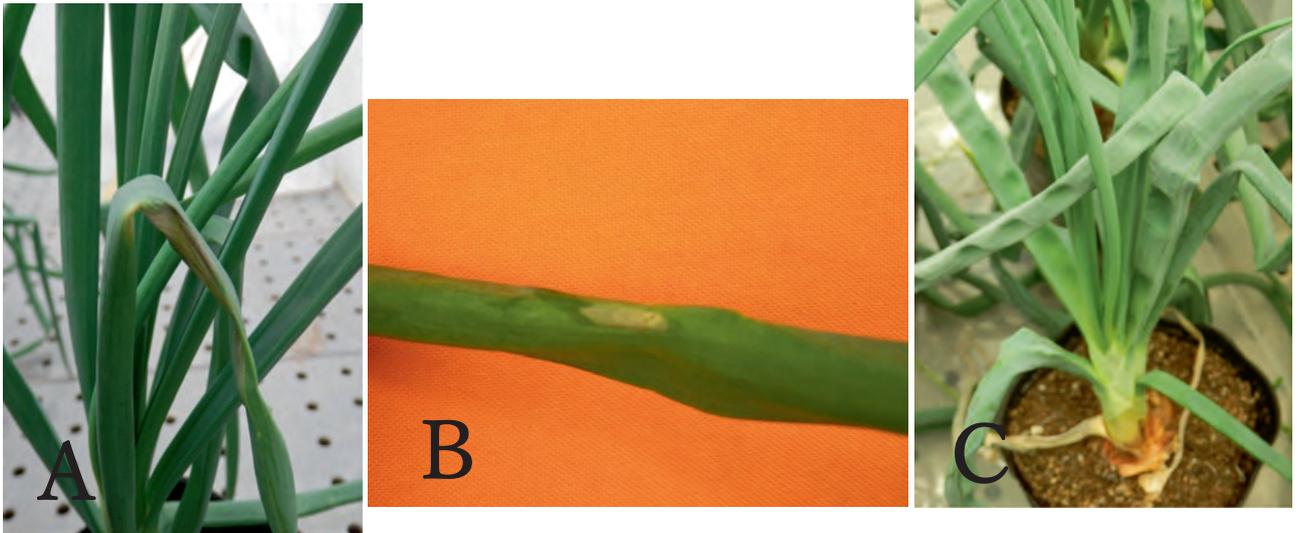


Plate 1

Symptoms appearing on the inoculated leaves.

- A. Water-soaking rot.
- B. Blight.
- C. Asymptomatic infected onion (1 month after inoculation).



Plate 2

Symptoms appearing on bulbs.

- A. Early symptom on the top of bulbs: Hard to see from the outside.
- B. Early symptom on bulb: Water-soaking rot from neck.

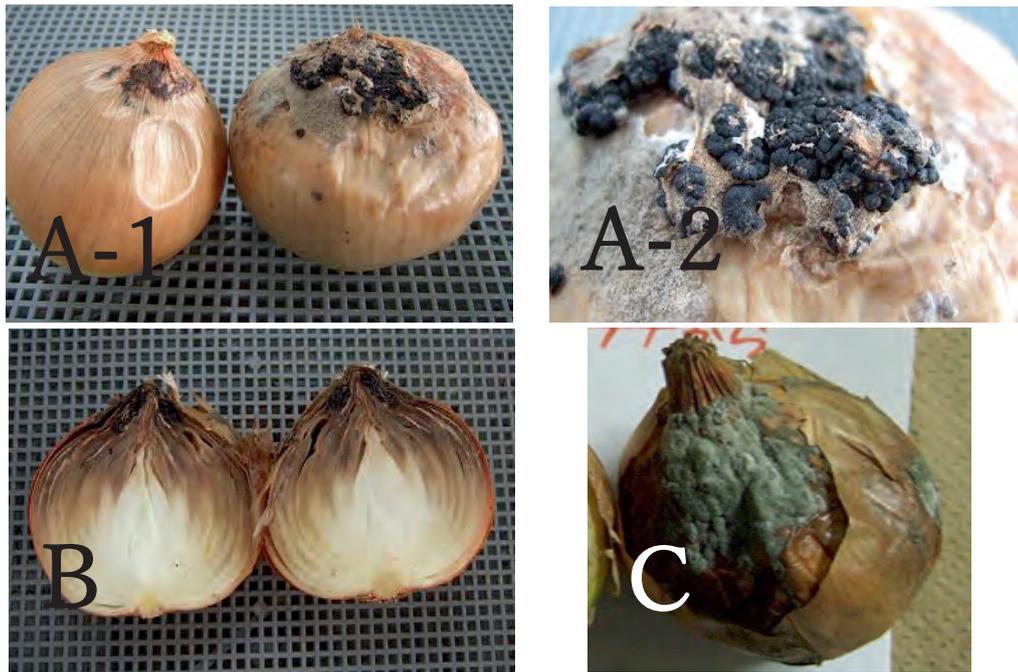


Plate 3

Symptoms appearing on the bulbs after storage.

- A. Appearance of diseased bulbs (A-1) and black sclerotium forms on the surface of the bulbs (A-2).
- B. Water-soaking lesions turned gray to brown and expanded inside of the bulbs.
- C. Velvety gray mold on the outside of the bulb.



Plate 4

Fig. 7. Conidia of *Botrytis* spp. grown on PDA for 14 days at 20 °C in the dark.

- a *B. aclada* BaTH11-A. b *B. allii* KF-Ba225 (scale bar: 20 μm).

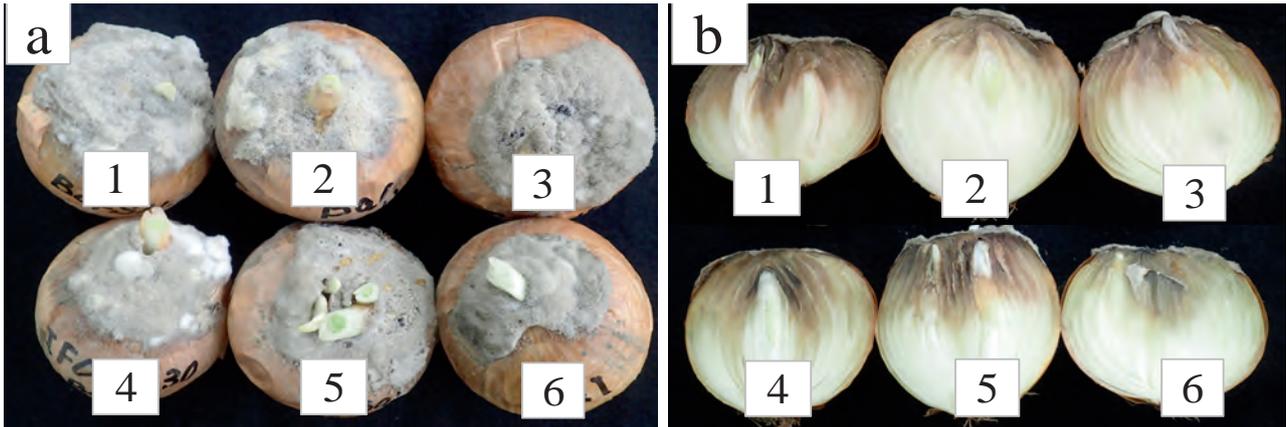


Plate 5

Symptoms on the neck of onion bulbs 30 days after inoculation and culturing at 10 °C.

The upper row was inoculated with *B. aclada* (1 BaFS11-12, 2 BaTH11-A and 3 KF-Ba205) and the bottom row was inoculated with *B. allii* (4 NBRC9430, 5 KF-Ba225 and 6 BaI12-6).

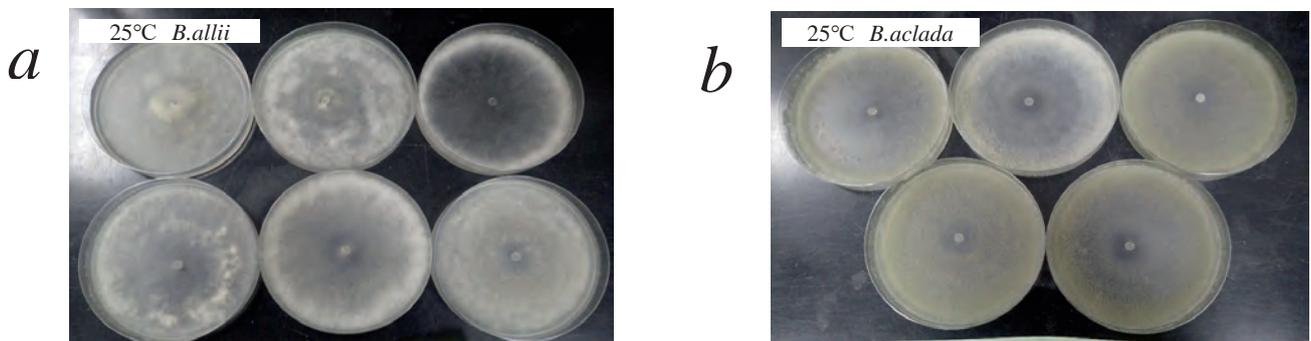


Plate 6

Colony of *B. allii* and *B. aclada* at 25 °C in the dark after 7 days on PDA.

Isorates of *B. allii*: KF-Ba225, BaI12-7, BaFS12-3a, BaI12-6, NBRC 9430 and *B. aclada*: KF-Ba130, BaNW11-a, BaTH11-A, KF-Ba205, BaFS11-12.

a *B. allii* cultivated in the dark at 25 °C after 7 days (PDA).

b *B. aclada* cultivated in the dark at 25 °C after 7 days (PDA).