

レンコン腐敗病の生態解明と土壤還元消毒法による防除

出穂 美和*・角田 佳則・上木 厚子**・石岡 巖***・佐々木一紀****
・森 伸介***・青木 博幸*****・竹原 利明*****

Mechanism of Rhizome Rot Pathogenesis in Lotus Root and its Control by Anaerobic Soil Disinfestation

IZUHO Miwa, SUMIDA Yoshinori, UEKI Atsuko, ISHIOKA Gen, SASAKI Kazunori,
MORI Shinsuke, AOKI Hiroyuki and TAKEHARA Toshiaki

Abstract: The outbreak of lotus root rhizome rot is a major cause of reduced yield and quality of crops that impair farmers' interests in Iwakuni City, Yamaguchi Prefecture, Japan. Therefore, the pathogenic mechanism of rhizome rot was investigated, and the effect of a new method of anaerobic soil disinfestation utilizing unused organic materials was confirmed. The mechanism of the manifestation of the effect by disinfestation was examined. Among the possible organic materials used for anaerobic soil disinfestation, the highly effective materials, such as sake residue and wheat bran, contain a large amount of non-fibrous carbohydrates. In addition, the input amount of organic material could be estimated from the material analysis data. When the treatment temperature in anaerobic soil disinfestation was 20-30 °C, the higher the temperature in that range, the more the input amount of organic material could be reduced. After puddling treatment, the film covering was more effective compared to water covering; however, water covering was also practical. The types of microorganisms involved in the effects of anaerobic soil disinfestation differed between film covering and water covering. The results showed that the pathogen responsible for lotus root rhizome rot was mainly *Fusarium commune*, which not only infected lotus roots at the time of planting but also infected the rhizomes during the growing season. After infection, wedge-shaped lesions were formed on the leaves due to the obstruction of some vascular bundles. The lesions appeared after July and could be observed through aerial photography using a drone, without entering the paddy field. The effect of anaerobic soil disinfestation using organic materials might be attributed to the destruction of the cell wall of pathogenic *Fusarium* associated with the increase in microorganisms, such as *Clostridium*, in the soil. In addition, the time taken for the manifestation of the effect of anaerobic soil disinfestation in laboratory experiment seemed approximately 1 week under anaerobic soil condition and at soil temperature ≥ 25 °C.

Key Words: Lotus root, Rhizome rot, *Fusarium commune*, Anaerobic soil disinfestation, Soil microbial phase, *Clostridium*

キーワード：レンコン、ハス腐敗病、フザリウムコムミュン、土壤微生物相、クロストリジウム

緒言

山口県のレンコンは、県内で約 220ha が栽培されており、全国4位の出荷量がある。特に岩国地域では1800年代から200年以上にわたって栽培されてきた歴史があり、主要な特産野菜として位置付けられている。しかしながら、近年の産地においては、土壤病害である腐敗病の発生による減収や“芯とおし症”と通称される収穫地下茎の穴の変形による品質低下事例が増加し、2014年に現地から問題解決のための研究が要望され

た。レンコンの腐敗病は、*Fusarium* 属菌や *Pythium* 属菌によって地下茎が褐変・腐敗する病害とされており、学術上の病名はハス腐敗病である（第1図）。



第1図 腐敗症状（左）と芯とおし（右）

* 周南農林水産事務所・** 山形大学・*** 農研機構西日本農業研究センター・**** 山口大学・
***** 岩国農林水産事務所・***** 農研機構中央技術支援センター

ただし、本県の発生地では、収穫されたレンコンからの病原菌の検出頻度は低く、これまで原因となる病原菌の特定は困難であった。その上、地上部における葉の症状も不明なため、被害の有無は掘り上げるまで分からず、発生予測や対策が困難であった。また、防除についても登録薬剤は無く、病原菌密度を低下させるための有効な手法を検討することが求められた。そこで、2015年度から開始された農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「中山間の未利用有機性資源を活用した人にも環境にもやさしい土壌消毒技術の実用化」プロジェクトに参加し、共同研究によって、本病の生態解明と防除技術の開発を試みた。生態解明については、生産地で生育中に葉の黄化等が認められる植物体から糸状菌を分離して病原性を確認し、主要な病原菌を明らかにし、収量・品質に及ぼす影響を明らかにするとともに、地上部の症状と地下茎の症状との関連性について調査し、発生予測の可能性について検討した。また、防除については、腐敗病に対する土壌還元消毒法の効果を確認するとともに、他機関の協力のもと、病原菌密度低減のメカニズムの解明や成分分析に基づく好適な有機質資材の解明に取り組んだ。そこで、現地において本病を防除するための参考となるいくつかの知見を得たので報告する。なお、レンコンの腐敗病の正式名称は前述のハス腐敗病であるが、可食部はレンコンとして呼称されており、蓮根腐敗病と記述する文献もあることから、本報ではレンコン腐敗病と称する。

材料および方法

1 レンコンを侵す病原菌の特定と葉および地下茎における生態の把握

1) ほ場で腐敗が認められたレンコンからの糸状菌の分離と腐敗能の確認

腐敗症状の主要因を把握するため、2015年2月に岩国市の農家ほ場において、収穫時に中心部が紫黒色に変色・腐敗した地下茎を収集し、変色部と健全部の境界部分を切り出し、有効塩素濃度約1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌し、PDA平板培地に置床して27°Cで培養した。出現した糸状菌は、PDA斜面に移し保存するとともに、菌叢を厚さ約1cmの輪切りにした健全レンコン上に置床して27°Cで7日間培養し、組織の褐変が認められた場合には、再分離した。さらに10月に掘り上げた腐敗レンコンを供試し、山口大

学において、駒田培地平板を用いた組織分離によって *Fusarium* 属菌株を分離した。これらの菌株についてリボソームDNA ITS領域、TEF-1a領域およびヒストンH3領域の塩基配列を決定し、種の同定を行った。

2) 腐敗レンコンから分離された糸状菌の病原性の確認

収穫後の健全なレンコンを腐敗させた *Fusarium* 属菌株を用い、2016年に栽培中のレンコンの葉柄および地下の根茎に対する病原性について確認した。葉柄に対する病原性の確認は、直径1mの露地コンクリートポットを用い、4月12日に定植し栽培したレンコンの葉柄に、6月1日にメスで縦に切り口を入れ、培養した菌叢を挟み込んで接種し、7日ごとに発病程度を確認した。地下茎に対する病原性については、ガラス温室に設置した直径約40cmのポリエチレン製の樽をポットとして用い、土を詰めて灌水し、6月1日に実生レンコンを定植し、8月18日に予め作成しておいたレンコンから分離した *Fusarium commune* の *nit* 変異株（硝酸塩利用能欠損変異株）のフスマ培養菌を10g混和して栽培し、11月8日に掘り上げて地下茎の発病を調査した。

3) レンコン腐敗病の葉の病徴の探索と地下茎の感染・発病の関連性の解明

2016年～2017年の各年6月～9月にかけて、山口県岩国市尾津の現地農家ほ場において生育中のレンコンの地上部の病徴を調査した。調査に当たっては、ほ場周辺からの目視による観察を行うとともに、ドローン（DJI社 Phantom3）による空撮を行った。調査後、異常を認めた葉にマークしておき、10月にその葉につながる地下茎を掘り上げた。掘り上げた株は、地下茎の節間を輪切りにし、穴の変形や腐敗などの症状を調査するとともに、切り出して駒田培地平板上で *Fusarium* 属菌を分離した。また、分離菌はレンコン切片に接種し、腐敗能の有無を調査した。さらに、山口大学において遺伝子解析による種の同定を行った。

4) レンコンから分離された *Fusarium* 属菌の土壌接種による地上部病徴の再現と被害解析

2018年にセンター内のガラス温室で、容量60Lのコンテナ容器にレンコンを栽培し、2)の試験で腐敗能の強かったレンコン分離菌3菌株 (*F. commune*, *F. solani*, *F. fujikuroi*) を供試し、土壌接種によって地上部の病徴の再現を試みた。1コンテナ当たり市販水稲用育苗培土40Lを用い、緩効性肥料 (N13-P14-K12) 50gを混和し灌水した。試験区は接種区および無接種区とし、各3反復した。接種菌は菌株をフスマ培養し、灌水前

に40g/コンテナ混和した。その後、5月18日に種レンコンを植え付け、灌水は常時かけ流しで栽培した。生育期の病徴の見取り調査を行うとともに収穫期（翌年2月）に発病程度と収量を調査した。

2 土壤還元消毒法を用いたレンコン腐敗病の防除技術の開発

1) 土壤還元消毒に用いる有機質資材と使用条件の解明

2015～2016年にかけて、未利用資源である酒粕、きくらげ廃菌床、レンコン残さ、オレンジジュース残さを供試し、還元消毒用資材としての適性と使用条件を明らかにするため、土壤への混和量および20°C、30°Cに処理温度を変えた室内試験を行った。各資材は900mLのガラス広口瓶（マヨネーズ瓶）に未滅菌の現地栽培土壌とともに詰めて、400mLの水を添加し、電動攪拌機で混和して、難透過性フィルム（0.05mm厚、商品名：バリアスターV、東罐興産株式会社）で被覆後、輪ゴムをかけて密封し、恒温器でインキュベートし発酵を促した。消毒効果の把握は、処理前に振とう培養した病原菌（*Fusarium* 菌）を乾土当りの密度が約 $1 \times 10^2 \sim 10^3$ cfu/g以上になるように加え、処理終了後に選択培地を用いた希釈平板法により菌密度を計数する方法と、健全レンコンの切片（1×2×2cm）に培養菌を着生させた人工残さを作成し、容器あたり5個投入しておき、処理終了後に掘り出し、選択培地上に置床して27°Cで培養し、保菌程度を調査する方法によって行った。

(1) 酒粕を用いた場合の消毒効果

2015年8月～9月に、岩国市のレンコン栽培ほ場で採集した土壌（未滅菌）に酒粕（山田錦大吟醸粕）を50kg～4t/10a相当添加して試験を行った。処理後の効果の確認は、土壌中の菌密度および埋め込んだ人工残さ中の残存菌の有無により把握した。

(2) きくらげ廃菌床またはレンコン残さをを用いた場合の消毒効果

2015年10月～11月にかけて、土壤にきくらげ廃菌床を50kg～4t/10a相当またはレンコン残さ（乾燥した茎葉を細かく切ったもの）400kg～2t/10a相当を加え、試験を実施した。処理後の効果は、土壌中の菌密度により評価した。

(3) オレンジジュース残さをを用いた場合の消毒効果

2016年5月～6月に、オレンジジュース残さ（しぼり粕および液状物）を供試し、土壤還元消毒試験を行った。処理後の効果は、土壌中の菌密度により評価し

た。

2) 各有機質資材の成分分析

2015年、資材の成分と土壌中での発酵との関連性を解明するため、使用した酒粕、オレンジジュース残さ等を、西日本農業研究センターに送付し、飼料分析（粗飼料・一般栄養成分）に準拠して成分分析を行った。同センターでは、共同研究機関の供試したフスマや米ぬか等の有機物についても同時に分析を行い、データを共有利用した。

3) 被覆方法の違いが消毒効果および土壤微生物相に及ぼす影響

(1) 被覆方法の違いと消毒効果

2016年4月に、2-1)と同様の手法を用い、土壤と酒粕をガラス瓶に詰めた後、土壤表面（瓶口）の被覆方法を変えて消毒効果を確認した。被覆方法は、難透過性フィルム（商品名：バリアスターV、0.05mm）、黒マルチ（0.03mm）、農ポリ（0.05mm）、紙マルチ、水封、無処理とした。処理温度は25°Cとし、各々の処理で酒粕の投入量を10a当たり0kg、400kg、800kgの3水準設けた。効果の確認は、駒田培地を用いた希釈平板法により、土壌中の*Fusarium*菌密度を計測して行った。また、土壤に0.2%ジピリジル液をかけて還元的環境で生成される二価鉄に反応して赤色を発色するジピリジル反応によって土壤の還元の有無を調べた。

(2) 被覆方法の違いと消毒後の土壌中の微生物相

被覆方法を変えて酒粕による土壤還元消毒を行った後の土壌について、（株）ファスマックにおいて、次世代シーケンサー（イルミナ社 Miseq）を用い、16SrRNAアンプリコン解析により1サンプル当たり、およそ10万～15万リードの塩基配列から土壤細菌群集構造を解析した。

4) 還元消毒のメカニズムの解明と効果発現に必要な処理日数の把握

(1) 土壤還元消毒における絶対嫌気性細菌の関与と病原 *Fusarium* 菌の死滅時間

2016年に、山形大学において酒粕およびフスマを加えたPY培地を用い、還元消毒土壌から分離した絶対嫌気性細菌 *Clostridium beijerinckii* H110株または *Clostridium* sp.TW8株の存在下で、*Fusarium* 菌（M2-1株）を20°Cで嫌氣的に共培養後、抗菌活性の発現について検討した。PY培地には、酒粕またはフスマを1%（W/V）の割合で加え、共培養開始後18日目の寒天片8個をPDA培地に移植し、*Fusarium* 菌の生育を調査した。また、グルコース（1%、W/V）を添加した

PY 培地で、分離株の *C. beijerinckii* H110 株および TB8 株、*Clostridium* sp. TW8 株と *Fusarium* 菌をそれぞれ 25°C で嫌気共培養した。この時の *Fusarium* 菌細胞の変化について、共培養開始時から 16 日後まで継続的に *Fusarium* 菌体を採取し、その細胞壁を蛍光色素カルコフロールホワイト (Sigma-Aldrich) で染色することにより、蛍光顕微鏡を用いて菌細胞の変化を観察した。

(2) 酒粕を用いた土壌還元消毒の効果発現日数の解明

2016 年 12 月に、2-1) と同様の手法を用いて土壌還元消毒を行い、効果の発現日数について確認を行った。処理温度は 25°C で、処理期間は 3 日間と 7 日間とし、混和する酒粕の量は 10a あたり 800 kg および 2t とし、被覆は難透過性フィルムと水封 (継続湛水) とし、比較のため無処理区を設けた。また、初期の病原菌密度をそろえ正確を期するため、供試病原菌はレンコンから分離した *Fusarium* 菌の *nit* 変異株を作製し、培養して土壌に混和した。消毒効果の確認は、*nit* 変異株検出用培地 (CMP 培地) (Takehara, et al., 2003) を用い、希釈平板法により土壌中の菌密度を計測した。

3 ほ場における土壌還元消毒効果の確認試験

1) センター内ほ場における土壌還元消毒効果の確認

2015 年～2016 年にかけて、センター内の水田でレンコンを栽培し、試験を行った。現地の条件に近付けるため、2015 年 5 月にレンコンを定植し、1 作栽培後の 10 月に掘り上げ、収穫後にほ場に残った残さ (茎葉、地下茎) を鋤き込んだ後、11 月下旬から 2016 年 2 月下旬まで土壌還元消毒を行い、3 月中旬に調査を行った。試験区の規模は、水田を畦畔板で仕切り、1 区 6m×3m とした。各区の処理は、残さをフレールモアで粉碎した後に鋤き込む処理と未粉碎のままロータリーで鋤き込む処理を設け、それぞれを酒粕またはフスマ資材を散布した後、代かき後難透過性フィルムで被覆した。酒粕は散布しやすいように相当量を水に溶いて散布した。資材鋤き込み区の他に対照として、代かきのみ区および無処理区を設けた。処理後の効果の判定は、処理前に 2-1) と同様の方法で人工的に作成した罹病残さをポリエチレン製の網袋 (野菜ネット) に入れて土壌中に埋設しておき、処理後に掘り出して平板培地に置床して培養し、*Fusarium* 菌の生残の有無を調査した。その他、還元消毒の前後に土壌を採取し、pH、全炭素 (T-C)、全窒素 (T-N)、無機態窒素量を測定するとともに、消毒期間中の酸化還元電位 (Eh) (地表下 20 cm) を測定した。

2) 現地ほ場における土壌還元消毒効果の確認

2017 年 9 月～10 月にかけて、岩国市尾津の農家ほ場 (約 600m²) において、酒粕 800kg/10a を 10 倍量の水に溶いて動力ポンプで散布し、トラクターで丁寧に混和し代かきして、3 週間継続して湛水した。その後、そのまま放置し、2018 年 4 月にレンコンを植え付け、慣行管理によって栽培した。調査は 2019 年 2 月の収穫時に、栽培者の同席のもと、収量および品質を見取りによって行った。

結果

1 レンコンを侵す病原菌の特定と葉および地下茎における生態の把握

1) ほ場で腐敗が認められたレンコンからの糸状菌の分離と腐敗能の確認

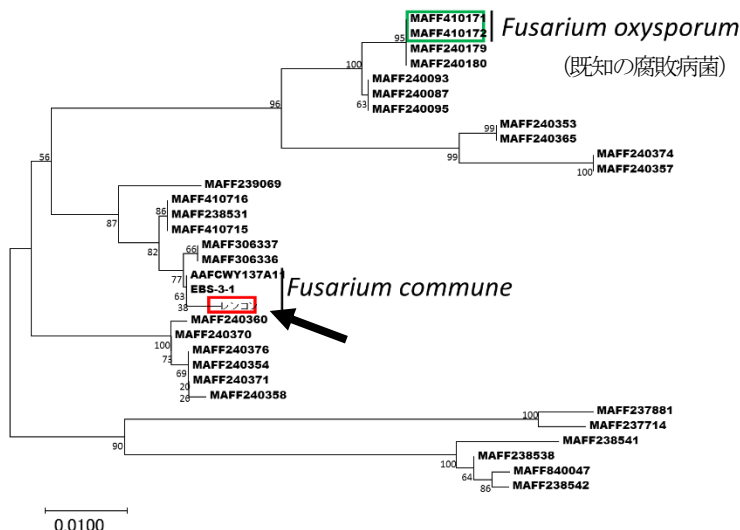
2015 年 2 月に分離を試みた腐敗レンコン 54 サンプルから糸状菌を分離した結果、レンコン組織に腐敗能を示した菌株は 5 菌株で、いずれも *Fusarium* 属菌であった。また、10 月に掘り上げたサンプルから山口大学において分離した *Fusarium* 属菌 25 菌株と合わせ、PCR によるグループ分けを行った結果、供試菌株は各プライマーによるバンドの形成と色素産生能から大きく 4 グループに分類され、最も大きなグループは 12 菌株で、レンコンに腐敗能を示す 5 菌株も含まれた。これらの菌株は、リボソーム DNA ITS 領域、TEF-1a 領域およびヒストン H3 領域の塩基配列から、*F. commune* と同定された (第 2 図)。

2) 腐敗レンコンから分離された糸状菌の病原性の確認

生育中の葉柄に接種した *Fusarium* 属菌は、いずれも葉柄を褐変させる病原性を示し、病斑が広がった 7 日後に、健全部との境界部分を駒田培地平板で組織分離したところ、同じ菌が分離され、病原性が確認された。また、*nit* 変異株を混和したポットにおいては、地上部の萎凋を確認した。また、レンコン地下茎にも褐変・腐敗を認め、組織分離を行った結果、5 か所のうち 2 か所から *nit* 変異株が CMP 培地で再分離され、地下茎への感染が確認された。

3) レンコン腐敗病の葉の病徴の探索と地下茎の感染・発病の関連性の解明

ほ場調査の結果、レンコン腐敗病の被害葉と想定される症状としては、葉の中心から外縁にかけて一部がクサビ状に黄化したもの、葉の外縁が垂れ下がって枯死するものなどが認められた。これらの症状は、ドロ



第2図 リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列を基にした系統樹

注) 矢印がレンコンから分離した菌

ーンによる空中撮影によって、7月中旬以降、ほ場内にスポット状あるいは連続して発生し、増加していくことが観察された(第3図)。これらの葉柄がつながった地下茎には、“芯とおし症”と一般に呼ばれる穴の変形や中心部の褐変症状が確認されるとともに、全ての株の地下茎から *Fusarium* 属菌が分離検出された(第4図)。地下茎から分離した31菌株の *Fusarium* 属菌について、種の同定を行った結果、*F. solani* (45%)、*F. commune* (42%)、*F. fujikuroi* (13%) の3種に分類された。そのうち、*F. commune* 5菌株、*F. solani* 2菌株、*F. fujikuroi* 1菌株について、レンコン切片に対する腐敗性を調査したところ、いずれも腐敗性であった。

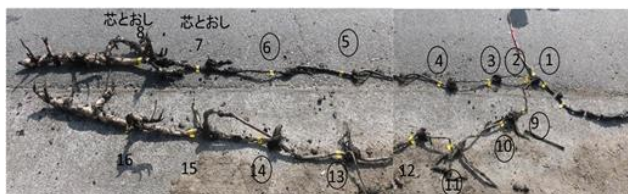


第3図 ドローンによる空中撮影

4) レンコンから分離された *Fusarium* 属菌の土壌接種による地上部病徴の再現と被害解析

ハウスにおけるコンテナ栽培では、*F. commune* を接種した区においてのみ、8月初旬の調査で葉の一部がくさび形に黄化する病徴が確認された(第5図)。

収穫調査では、無接種区では障害茎は0%であったが、*F. commune* 接種区では約44%の発生を確認した。株当たりの平均収量は、無接種区では約1,800gで、接種区では約680gと大きく減収した(第6図、第1表)。



第4図 葉の一部が黄化した株の地下茎を掘り取った様子
注) 数字が病原菌の分離を行った箇所を示し、○は *Fusarium* を検出した箇所



第5図 葉の一部がくさび形の病徴



第6図 収穫調査

注) *Fusarium* 菌接種区と無接種区の各3反復調査

レンコン腐敗病の生態解明と土壌還元消毒法による防除

第1表 収穫調査

	収穫調査（径3 cm以上のものを計測）					
	収穫本数	腐敗・芯とおし数	平均収穫節数	平均節長 (cm)	平均最大径 (cm)	株当たり収量 (g)
無接種1	10	0	1.9	21.7	40.3	2,120
無接種2	9	0	3.4	24.7	39.2	1,810
無接種3	9	0	2.6	19.2	44.0	1,543
<i>Fusarium</i> 接種1	2	2	3.0	21.3	45.4	354
<i>Fusarium</i> 接種2	5	2	2.4	13.3	37.5	432
<i>Fusarium</i> 接種3	9	3	2.6	19.2	44.0	1,267

第2表 酒粕による消毒後の*Fusarium*菌密度と残さからの検出

温度°C	被覆資材	有機質資材		<i>Fusarium</i> 菌密度 ×10 ² cfu/乾土1g	罹病残さからの <i>Fusarium</i> 菌検出 の有無 ^(注)
		資材名	施用量 (10a当たり 換算)		
20	難透過性フィルム	無		2.1	+++
	難透過性フィルム	酒粕	50 kg	0.7	+++
	難透過性フィルム	酒粕	100 kg	2.2	+++
	難透過性フィルム	酒粕	200 kg	1.6	+++
	難透過性フィルム	酒粕	400 kg	2.7	+++
	難透過性フィルム	酒粕	800 kg	0.6	+++
	難透過性フィルム	酒粕	1 t	0.5	+++
	難透過性フィルム	酒粕	2 t	< 0.1	++-
	難透過性フィルム	酒粕	4 t	< 0.1	---
30	難透過性フィルム	無		0.7	+++
	難透過性フィルム	酒粕	50 kg	1.2	+++
	難透過性フィルム	酒粕	100 kg	0.1	+++
	難透過性フィルム	酒粕	200 kg	< 0.1	---
	難透過性フィルム	酒粕	400 kg	< 0.1	++-
	難透過性フィルム	酒粕	800 kg	< 0.1	---
	難透過性フィルム	酒粕	1 t	< 0.1	---
	難透過性フィルム	酒粕	2 t	< 0.1	---
	難透過性フィルム	酒粕	4 t	< 0.1	---

注) 罹病残さは消毒後、3個(1×2×2cm)を培地に置床し、+は罹病残さから*Fusarium*菌が認められた。
-は*Fusarium*菌が認められなかった

2 土壌還元消毒法を用いたレンコン腐敗病の防除技術の開発

1) 土壌還元消毒に用いる有機質資材と使用条件の解明

(1) 酒粕を用いた場合の消毒効果

酒粕を用いた土壌消毒試験では、処理21日後に、土壌温度20°Cでは罹病残さからの*Fusarium*菌の検出は2t/10aまで認められたが、土壌中の菌密度は酒粕の投入量800kg/10a以上で低下し、消毒効果が認められた。また、土壌温度30°Cでは罹病残さからの検出は400kg/10aまで認められたが、土壌中の菌密度は100kg/10aから低下し、200kg/10a以上では検出限界以下となった(第2表)。

(2) きくらげ廃菌床またはレンコン残さを用いた場合の消毒効果

きくらげ廃菌床については、20°C、21日間処理後の土壌中の*Fusarium*菌は4t/10aでも検出された。30°Cでは200kg/10a以上でやや低下したものの不安定で、4t/10aでも検出限界には至らなかった。レンコン残さを用いた消毒試験では、20°Cの場合、土壌中の菌密度は投入量が増加すれば少なくなるものの2t/10aでも検出限界に至らなかったが、30°Cでは800kg/10a以上投入することで検出限界以下となり、消毒効果が認められた(第3表、第4表)。

第3表 廃菌床による消毒後の *Fusarium* 菌密度

温度°C	被覆資材	有機質資材		<i>Fusarium</i> 菌密度 ×10 ² cfu/乾土1g	酸化還元反応
		資材名	施用量 (10a 当たり 換算)		
20	無	無		32.0	++
	難透過性フィルム	無		16.0	++
	難透過性フィルム	廃菌床	50 kg	9.1	++
	難透過性フィルム	廃菌床	100 kg	8.8	++
	難透過性フィルム	廃菌床	200 kg	16.0	++
	難透過性フィルム	廃菌床	400 kg	9.9	++
	難透過性フィルム	廃菌床	800 kg	12.0	++
	難透過性フィルム	廃菌床	1 t	16.0	++
	難透過性フィルム	廃菌床	2 t	5.3	++
	難透過性フィルム	廃菌床	4 t	3.4	++
30	無	無		67.0	±
	難透過性フィルム	無		6.7	++
	難透過性フィルム	廃菌床	50 kg	2.5	++
	難透過性フィルム	廃菌床	100 kg	2.1	上3 cm-、++
	難透過性フィルム	廃菌床	200 kg	< 0.1	上3 cm-、++
	難透過性フィルム	廃菌床	400 kg	1.4	++
	難透過性フィルム	廃菌床	800 kg	< 0.1	++
	難透過性フィルム	廃菌床	1 t	0.3	上3 cm-、++
	難透過性フィルム	廃菌床	2 t	0.3	++
	難透過性フィルム	廃菌床	4 t	0.3	++

注) 酸化還元反応の基準: ++は即時鮮明に呈色、±はしばらくたつと弱く呈色

第4表 レンコン残さによる消毒後の *Fusarium* 菌密度

温度°C	被覆資材	有機質資材		<i>Fusarium</i> 菌密度 ×10 ² cfu/乾土1g	酸化還元反応
		資材名	施用量 (10a 当たり 換算)		
20	無	無		32.0	++
	難透過性フィルム	無		16.0	++
	難透過性フィルム	レンコン残さ	400 kg	19.0	++
	難透過性フィルム	レンコン残さ	800 kg	4.1	++
	難透過性フィルム	レンコン残さ	1 t	15.0	++
	難透過性フィルム	レンコン残さ	2 t	0.7	++
30	無	無		67.0	±
	難透過性フィルム	無		6.7	++
	難透過性フィルム	レンコン残さ	400 kg	3.1	++
	難透過性フィルム	レンコン残さ	800 kg	< 0.1	++
	難透過性フィルム	レンコン残さ	1 t	< 0.1	++
難透過性フィルム	レンコン残さ	2 t	< 0.1	++	

注) 酸化還元反応の基準: ++は即時鮮明に呈色、±はしばらくたつと弱く呈色

(3) オレンジジュース残さを用いた場合の消毒効果

しぼり粕を用いた消毒では、20°C 処理の場合、無処理に比べ菌密度は著しく低下したが、400kg~2 t/10a の間で差は認められなかった。しかし、30°C 処理では800kg/10a 以上で菌密度は検出限界以下となった。液状残さを用いた場合には、20°C 処理では菌密度の低下は認められるものの、処理した 400 kg~2 t/10a の間で差は無く、30°C 処理では400 kg/10a 以上の処理で検出限界以下となった(第5表、第6表)。

2) 各有機質資材の成分分析

使用した各有機物の成分分析結果では、酒粕はフスマや米ぬかと同程度の非繊維性炭水化物(デンプンや糖など)を26%含み、オレンジジュースのしぼり粕は約11%含み、微生物の栄養源として優れていることがわかった。また、それらはソルゴーやエンバク、イタリアンライグラスなどの牧草類、ススキなどの雑草類に比べて多いことが分かった(第7図)。

レンコン腐敗病の生態解明と土壌還元消毒法による防除

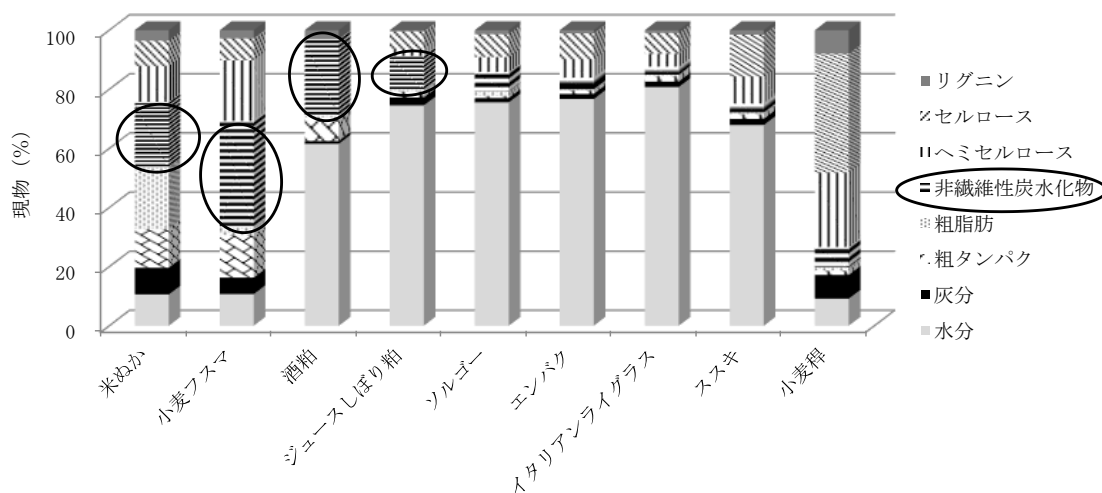
第5表 オレンジジュース残さ（しぼり粕）による消毒後の *Fusarium* 菌密度

温度°C	被覆資材	有機質資材		<i>Fusarium</i> 菌密度 ×10 ² cfu/乾土1g
		資材名	施用量 (10a当たり 換算)	
20	無（水も無し）	無	無	85.0
	難透過性フィルム	しぼり粕	400 kg	0.1
	難透過性フィルム	しぼり粕	800 kg	0.2
	難透過性フィルム	しぼり粕	1 t	0.3
	難透過性フィルム	しぼり粕	2 t	0.2
30	無（水も無し）	無	無	39.0
	難透過性フィルム	しぼり粕	400 kg	0.2
	難透過性フィルム	しぼり粕	800 kg	<0.1
	難透過性フィルム	しぼり粕	1 t	<0.1
	難透過性フィルム	しぼり粕	2 t	<0.1

第6表 オレンジジュース残さ（液状物）による消毒後の *Fusarium* 菌密度

温度°C	被覆資材	有機質資材		<i>Fusarium</i> 菌密度 ×10 ² cfu/乾土1g
		資材名	施用量 (10a当たり換 算)	
20	無（水も無し）	無	無	85.0
	難透過性フィルム	液状物	400 kg	0.2
	難透過性フィルム	液状物	800 kg	0.5
	難透過性フィルム	液状物	1 t	0.1
	難透過性フィルム	液状物	2 t	2.4
30	無（水も無し）	無	無	39.0
	難透過性フィルム	液状物	400 kg	<0.1
	難透過性フィルム	液状物	800 kg	<0.1
	難透過性フィルム	液状物	1 t	<0.1
	難透過性フィルム	液状物	2 t	<0.1

注) 処理期間：2016年5月23日～6月14日（22日間）



第7図 各有機質資材の成分分析

3) 被覆方法の違いが消毒効果および土壤微生物相に及ぼす影響

(1) 被覆方法の違いと消毒効果

処理温度を 25°C の一定とし、被覆資材と酒粕の施用量を変えて処理した結果、水封（継続湛水）、難透過性フィルム、黒マルチによる被覆では、400kg/10a 以上の施用で *Fusarium* 菌の菌密度が検出限界以下で安定した効果が認められた。ただし、紙マルチおよび農ポリ被覆では、処理中のガス発生によりフィルムが破損し、密閉が損なわれたため、400kg/10a と 800kg/10a の施用量で効果の逆転が認められた（第7表）。

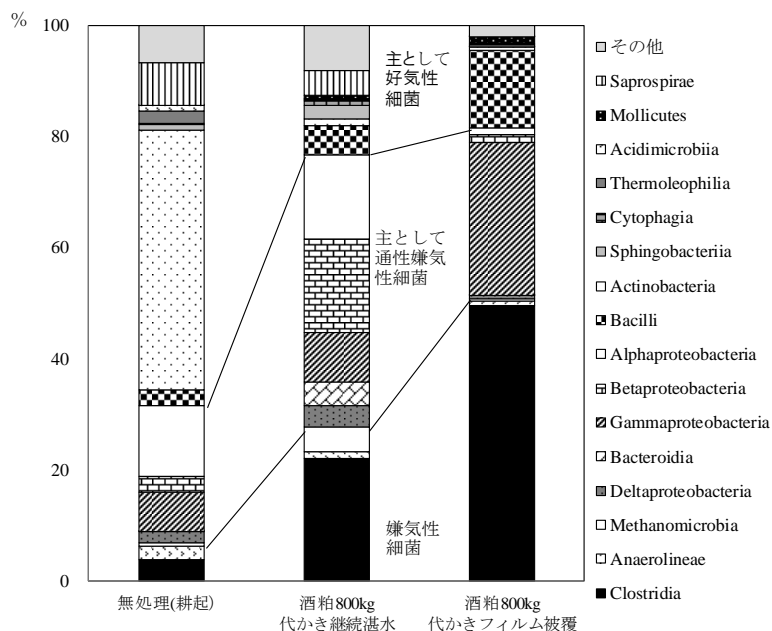
(2) 被覆方法の違いと消毒後の土壤中の微生物相

土壤中の微生物相は、耕起のみ区（無処理区）では、好気性細菌群（主として好気性細菌）が約7割、通性嫌気性細菌群（主として通性嫌気性細菌）が約2割を占めた。これに対し、酒粕 800 kg/10a を混和し代かき後、難透過性フィルム被覆した還元消毒区では、好気性細菌群が約2割に減少し、通性嫌気性細菌群が約3割、嫌気性細菌が約5割を占めるようになった。また、酒粕を混和し代かき後湛水した区は、好気性細菌群が約2割、嫌気性細菌が約3割、通性嫌気性細菌群が約5割を占めた（第8図）。

第7表 被覆資材別の消毒後の *Fusarium* 菌密度と酸化還元反応

温度°C	被覆	有機質資材		<i>Fusarium</i> 菌密度 ×10 ² cfu/乾土1g	菌密度 減少率%	酸化還元反応
		資材名	施用量 (10a当たり 換算)			
25	無	無		15.5	-	-
	水封	酒粕	0	0.7	95.5	++
		酒粕	400 kg	<0.1	100	++
		酒粕	800 kg	<0.1	100	++
	紙マルチ	酒粕	0	0.7	95.4	++
		酒粕	400 kg	<0.1	100	++
		酒粕	800 kg	4.4	71.5	底のみ++
	難透過性フィルム	酒粕	0	0.7	95.3	++
		酒粕	400 kg	<0.1	100	++
		酒粕	800 kg	<0.1	100	++
	黒マルチ	酒粕	0	2.1	86.2	++
		酒粕	400 kg	<0.1	100	++
		酒粕	800 kg	<0.1	100	++
	農ポリ	酒粕	0	9.2	40.8	++
		酒粕	400 kg	<0.1	100.0	++
		酒粕	800 kg	1.5	90.6	++

注1) 酸化還元反応の基準：++は即時鮮明に呈色、底のみ++は底5cm呈色したがそれ以外は呈色しなかった。
注2) 処理期間：2016年4月1日～4月22日（21日間）



第8図 消毒後の土壤中の微生物相の変化（2016）

4) 還元消毒のメカニズムの解明と効果発現に必要な処理日数の把握

(1) 土壌還元消毒における絶対嫌気性細菌の関与と病原 *Fusarium* 菌の死滅時間

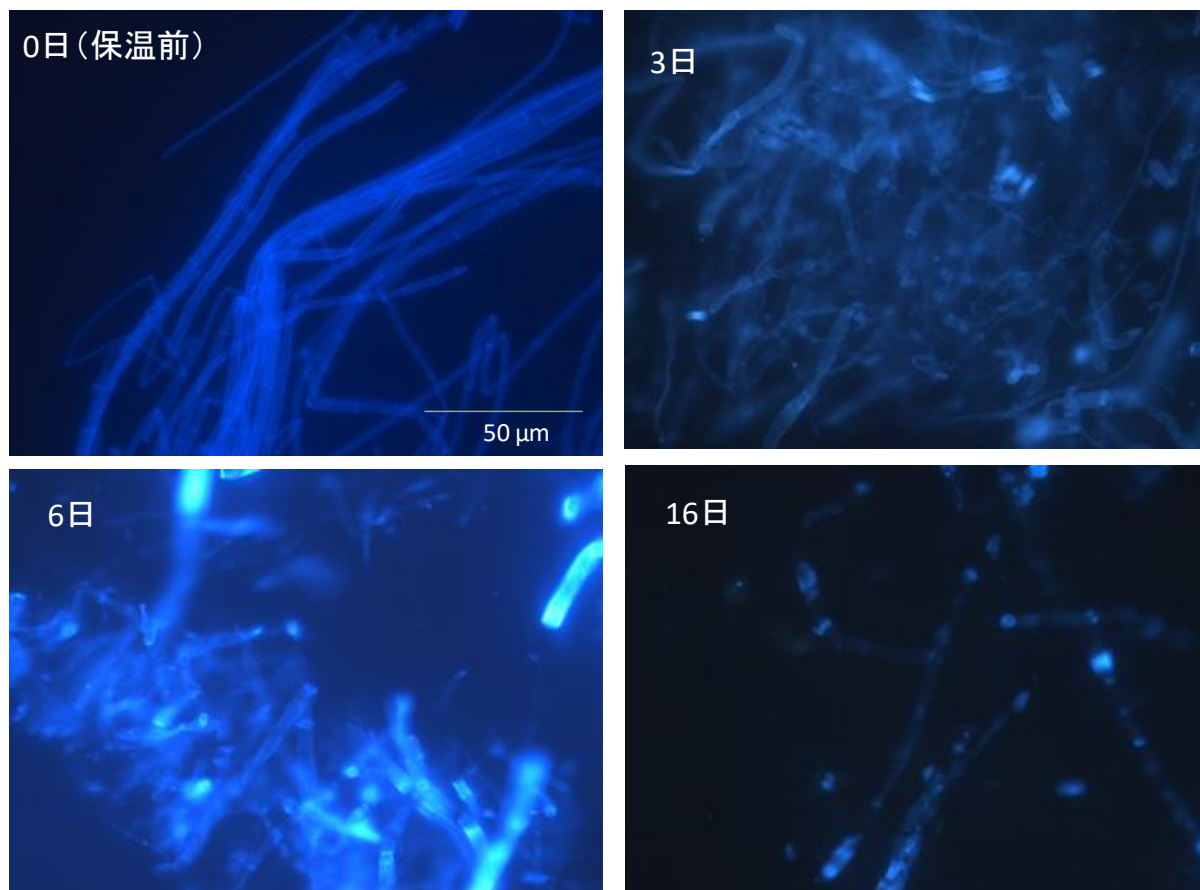
Fusarium 菌と *Clostridium* 属細菌を酒粕またはフスマを含む PY 培地で共培養した後の寒天片を PDA 培地に移植した結果、資材を加えなかった PY 培地寒天片は、*Clostridium* 属細菌の存在の有無に関わらず PDA 培地上で *Fusarium* 菌が生育し、生残が確認された。一方、酒粕またはフスマを加えた培地では、*Fusarium* 菌の生育抑制が確認され、特に *C. beijerinckii* H110 株を加えた培地は、TW8 株を加えたもので 2 日目以降

生育が認められたのに対し、3 日後でも全く生育が認められなかった (第 8 表)。また、共培養した *Fusarium* 菌細胞の蛍光顕微鏡観察の結果、*C. beijerinckii* H110 株または TB8 株いずれの菌株の存在下においても、25°C で 2~3 日共培養経過後には *Fusarium* 属菌の細胞壁は破壊され、その後菌体がほとんど消滅するのが確認された。第 9 図には *C. beijerinckii* TB8 株と共培養した場合の蛍光顕微鏡観察の結果を示した。H110 株や TB8 株とは系統の異なる *Clostridium* sp. TW8 株と共培養した場合には、このような顕著な細胞壁破壊は観察されなかった。

第 8 表 有機資材を添加した PY 培地で *Clostridium* 属菌との共培養 18 日後における、*Fusarium* 菌の生残状況

培養培地	<i>Fusarium</i> 菌のみ	共培養	
		H110菌株	TW8菌株
PY単独培地	8/8	8/8	8/8
PY培地+酒粕1% (W/V) 添加	8/8	0/8	0/8(4/8)
PY培地+フスマ1% (W/V) 添加	8/8	0/8	1/8(2/8)

注1) PDA に置床 2 日後に生育確認した結果を示す。括弧内は置床 3 日目に生育確認した結果を示す。
注2) 生残率は置床した 8 個の寒天小片のうちコロニーが増殖した寒天小片の割合



第 9 図 TB8 株接種下で 25°C 培養した *Fusarium* 菌 M2-1 株細胞の変化

(2) 酒粕を用いた土壤還元消毒の効果発現日数の解明

難透過性フィルム被覆区も水封区も、処理 24 時間後にはガスの発生が確認され、有機物である酒粕の分解が始まっていることが確認された。3 日間処理の場合、難透過性フィルム被覆区では、無処理区と比較して酒粕の混和量 800 kg/10a 以上で顕著な *Fusarium* 菌密度の抑制効果が認められ、水封では混和量 800 kg/10a では抑制効果は認められるが、難透過性フィルム被覆に比べその程度は低かった。7 日間処理では、難透過性フィルム被覆区 4、水封区ともに処理量にかかわらず *Fusarium* 菌密度はほぼ検出限界となった(第 9 表)。

3 ほ場における土壤還元消毒効果の確認試験

1) センター内ほ場における土壤還元消毒効果の確認

酸化還元電位 (Eh) の値は、レンコン残さ未粉碎+耕起(無処理)区は土壤還元消毒期間中を通じ酸化状態で推移し、消毒区においては若干の値の違いはあるものの、おおむね 0 以下に推移し、還元状態が保たれ

た。消毒開始から 1 週間程度の Eh の値は残さ粉碎+酒粕 2t 処理区で最も低く、残さ粉碎+フスマ 1t 区、残さ粉碎+代かきのみ区の順で高くなった。人工的に作成し土壤中に埋め込んだ罹病残さからの *Fusarium* 菌の検出は、有機物を投入した区で少ない傾向が認められた(第 10 表)。

2) 現地ほ場における土壤還元消毒効果の確認

現地ほ場における消毒効果の確認では、1 区画のほ場を処理区ごとに波板(高さ 30 cm)で仕切り、処理後 21 日まで 7 日ごとの地温と酸化還元電位 (Eh) を計測した。調査期間中は、各処理区とも地温は 20~25°C に推移し、Eh は -100 以下に推移して還元状態が維持できたことが確認された。定植後については、レンコンが波板の下で区をまたいで生育したことから、各区間の差を確認することは困難となったため、ほ場全体での収量を農家の記録している収量と比較した。その結果、腐敗病、芯とおし症の発生が減少し前年比の約 40% の増収となり、還元消毒の効果が確認された。

第 9 表 還元消毒処理日数の *Fusarium* 菌密度 (25°C)

処理日数	被覆資材	有機質資材		<i>Fusarium</i> 菌密度 ($\times 10^2$ cfu/乾土 1g 換算)
		資材名	施用量 (10a 当たり)	
3日間	無	無		67.2
	水+難透過性フィルム	酒粕	800 kg	1.1
	水+難透過性フィルム	酒粕	2 t	0.6
	水封	酒粕	800 kg	11.7
	水封	酒粕	2 t	2.6
7日間	無	無		24.8
	水+難透過性フィルム	酒粕	800 kg	0
	水+難透過性フィルム	酒粕	2 t	0
	水封	酒粕	800 kg	0.4
	水封	酒粕	2 t	0

注 1) 水封による被覆は、処理中随時水を足した。

注 2) 撰取には *nit* 変異株を使用し、CMP 培地で土壤分離した。

第 10 表 還元消毒副資材や処理量の違いによる還元消毒後の土壤化学性変化と消毒効果

処理区	罹病残さ (3か所 $\times 4$ 個) からの検 出率%	pH (H ₂ O)	T-C (%)	T-N (%)	無機態 N (mg/100g)
処理前 (11月 12日)	n d	6.4	1.86	0.16	0.9
処理後	100	-	-	-	-
次作作付前	8.3	6.5	1.85	0.16	2.0
(3月 15日)	0	6.3	1.78	0.16	2.2
レンコン未粉碎+酒粕 2t/10a	16.7	6.4	1.71	0.16	2.5
レンコン未粉碎+耕起 (無処理)	100	6.9	1.59	0.14	0.5

注) 処理は 2015 年 11 月 19 日~2016 年 3 月 23 日 (処理 96 日) に実施した。

消毒処理前は 2015 年 11 月 12 日に土壤採取し、次作作付前の 2016 年 3 月 15 日に土壤採取した。

考 察

レンコンにおける腐敗病の被害は、収穫時の地下茎の腐敗による収量低下と地下茎横断時の穴の変形（芯とおし症）による品質低下であるが、腐敗したレンコンはほ場で廃棄され、穴の変形した被害地下茎は原因究明を求めて持ち込まれるものの、病原菌は殆ど分離できず発生要因は不明であった。西沢（1960）は、腐敗したレンコンから *Fusarium* 属菌と *Pythium* 属菌以外にも細菌類や *Rhizopus* 属菌など多くの微生物が検出され関与することを報告しているが、近年では山本（2011）が述べているように、レンコン腐敗病の主たる病原菌として、*Fusarium* 属菌では *F. oxysporum* と *F. solani* が関与し、これらに *Pythium* 菌が加わるとするのが一般的と考えられる。そこで、本県のレンコンの障害についてもこれらの病原菌が関与していると考え、収穫後のレンコンから病原菌を分離するだけでなく、生育期の根茎を掘り上げて分離を行い、検出された病原菌の同定を行うとともに生育期の病徴との関連性を調査した。その結果、産地で収集した腐敗地下茎から分離された菌株で健全レンコンの葉柄や地下茎に腐敗能が認められたものと、生育中の地下茎から分離され腐敗能の認められたものの多くが、同定の結果 *Fusarium commune* であった。生育中の地上部の症状については、葉の一部がクサビ状に黄化または枯死する特徴的な症状が観察され、この症状を示す株を掘り上げ、地下茎の各節から菌の分離を試みた結果、*F. commune* の検出と根茎の穴の変形を確認した。また、地下茎から分離した *F. commune* と *F. solani*、*F. fujikuroi* の3菌株をフスマ培養して混和した汚染土に各々レンコンを植え付けたところ、*F. commune* のみで葉に特徴的なくさび形の症状が再現された。葉に症状の認められた株は、その後、枯死するとともに地下茎中心部の褐変と穴の変形が認められた。発病株の収量は無接種株と比較し約 1/3 に減収した。これらのことから、現地におけるレンコンの減収と品質低下の原因には、*F. commune* による腐敗症状が大きく関与していると考えられた。なお、調査の過程では、植え付けた種バスから地下茎先端に至る途中で、菌の検出ができない場合があり、南川ら（1959）が述べているように、本病については、種バスからの感染のみでなく、生育途中における節位部の吸収根からの感染の可能性が示唆された。さらに、生育期の感染による特徴的なくさび形の病徴は、病原菌が地下茎および葉柄の一部

の維管束を閉塞するために生じると考えられるが、本症状は7月中旬以降に現れ、ほ場に踏み込めない場合でも、空撮によって発生を確認できることから、確認された蔓延状況によっては、収穫期の前進化や次年度対策の準備を行うなど、生産計画の指標として活用が可能と考えられた。

レンコン腐敗病の対策としては、これまでほ場の冬期湛水などの耕種的手法（南川ら、1959）の他、石灰窒素の施用（西門ら、1956、西沢、1960）や太陽熱土壌消毒（沢田ら、2017）などの報告がある。本県においては、石灰窒素施用のみが導入されているが、腐敗病防除のために多量投入すると窒素過多となる問題もあり、生産者からは、より環境に優しく効果の高い防除技術を望む声が強かった。そこで、新村（2009）、小原（2013）らによって近年開発された土壌還元消毒技術に着目し、県内で産業廃棄物として廃棄されていた酒粕などいくつかの資材を用い、炭素源として低濃度アルコールに代えて土壌中に鋤き込み、レンコン腐敗病に対する消毒効果が得られないかと考え、実験を開始した。土壌還元消毒技術は、門馬（2013）が述べているように、土壌中の *Clostridium* 属菌等の絶対嫌気性微生物の存在下で成立する消毒技術と考えられることから、実験に当たっては、できるだけ土壌中の酸素を排除するため、有機物の投入後は水を加えた後の代かきを基本とした。実験の結果、有機質資材の種類については、酒粕や小麦フスマなどを用いた場合の消毒効果が安定して高く、オレンジジュースのしぼり粕も実用上問題ないと考えられたが、きくらげ廃菌床やレンコン残さのみでは消毒効果は低かった。資材ごとの効果は、成分分析による非繊維性炭水化物の含有量と比例する傾向があり、実際の消毒に当たっては成分分析値が資材投入量の目安になると考えられた。効果の認められた資材は、投入量が増加するほど効果が安定する傾向があり、地温は20℃から30℃の間では温度が高いほど効果が安定した。また、温度が高ければ資材量は減少しても効果が安定する傾向が認められた。

土壌還元消毒を行うには、ほ場中の酸素を代かきによって追い出した後の一定期間、大気と遮断する必要があるが、レンコンのほ場は広い上に深いため、フィルム被覆には多大の資材費と労力を要する。そのため、農家からは、何とか低コスト省力で消毒したいとの要望があり、被覆資材について検討した。その結果、地温25℃の場合、難透過性フィルムによる被覆は安定して効果が高いが、水封のみでも効果が得られること

が判明した。処理後の土壌の微生物相を解析したところ、難透過性フィルム被覆区では *Clostridia* を中心とする絶対嫌気性菌群が約半数を占め、通性嫌気性菌群が約3割で、病原菌を含む好気性菌群が無処理の約7割から約2割に減少していた。一方、水封区では絶対嫌気性菌群と通性嫌気性菌群の割合が逆転するものの、好気性菌群の割合に大きな変化はなかった。このことから、難透過性フィルム被覆と水封では抑制メカニズムは異なるものの、結果的に類似の防除効果が得られることが判明した。

土壌還元消毒の効果発現のメカニズムについては、*Clostridium* 属菌等の絶対嫌気性細菌の介在が指摘されており、本研究では山形大学において、酒粕や小麦フスマ等の有機物を投入した環境下での *Clostridium* 属菌の *Fusarium* 菌に対する作用について検証を行った。有機物を添加または無添加の培地で、両菌を 20°C で 18 日間嫌氣的に共培養した結果、無添加の培地では *Clostridium* の菌株に関わらず *Fusarium* 菌が生残したのに対し、有機物を添加した培地では、菌株によって程度の差はあるものの、*Fusarium* 菌に対する殺菌効果が確認された。25°C で共培養したものを蛍光顕微鏡で観察した結果、2~3 日目には *Fusarium* 菌の菌糸の減少が認められ、7 日目にはほぼ消滅した。このことから、*Clostridium* 属菌には糸状菌細胞壁成分分解性の菌株が存在し、これらが土壌還元消毒のメカニズムの一部を構成していることが示唆された (Ueki, et al., 2020)。また、本実験において数日で病原菌細胞の変化が観察されたことから、土壌に有機物を投入した場合の還元消毒の効果発現までの日数について検証した。その結果、土壌中の *Fusarium* 菌密度は処理 3 日後には、難透過性フィルム被覆、水封とも減少し、7 日後にはどちらもほぼ検出限界となり、培地上での共培養によって得られた結果と一致した。ほ場において、有機物を投入した土壌還元消毒では、25°C 以上の十分な地温が確保できれば、消毒期間は 1 週間程度まで短縮できる可能性がある。

酒粕を用いた場内ほ場での土壌還元消毒効果確認試験では、処理が 11 月中旬からの処理であったが、植え付け前の 2 月の調査において、酒粕 1~2t/10a 区、小麦フスマ 1t/10a 区の全てで罹病残さからの検出が少ないことが確認された。なお、処理後の土壌の pH や全炭素、全窒素には処理によって大きな差は無く、翌年の作付けへ影響は少ないと考えられた。

また、最終年の 2017 年 9 月に岩国市の農家ほ場で

実施した土壌還元消毒では、翌年にレンコンを植え付けた後、2019 年 2 月に収穫を行った。その結果、レンコンの区間をまたぐ生育により、処理区ごとの差は確認不能となったものの、農家の記録で前年比 40% の増収となり、土壌還元消毒の有効性が確認された。

以上のことから、還元消毒には微生物増殖のための炭素源として非繊維性炭水化物を多く含むものを利用すると消毒効果が高く、酒粕を利用した場合、代かき後フィルム被覆での消毒効果が最も高いが、25°C 以上確保できれば 800kg/10a の施用することで代かき後、継続的に湛水処理した場合でも効果が認められ、その効果は処理 7 日後には現れると考えられた。

本研究においては、レンコン腐敗病を対象として未利用有機物を活用した土壌還元消毒の効果とそのメカニズムについて検討を行ったが、発生生態では腐敗病の病徴の特定や病原菌の再確認など、防除においては資材選択の基準や消毒のメカニズムの解明などにおいて新たな知見を得ることができた。これらの知見は、レンコンだけでなく他の畑作物の土壌伝染性病害の防除においても応用可能と考えられる。今後は、本技術を人にも環境にも優しい防除対策技術として、普及させていきたいと考えている。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術 研究推進事業 27016C「中山間の未利用有機性資源を活用した人にも環境にもやさしい土壌消毒技術の実用化」の中で行った。実施するに当たっては、現地の栽培農家の方々および JA 岩国市 (現 JA 山口県岩国統括本部) の担当者にお世話になった。ここに記し謝意を表す。

摘 要

山口県の特産作物であるレンコンにおいては、レンコン腐敗病が発生し減収や品質低下の原因となっている。そこで、腐敗病の発生生態について調査するとともに、未利用の有機資材を活用した新たな土壌還元消毒技術の効果を調べた。また消毒効果発現の仕組みについて検証した。調査の結果、レンコン腐敗病の病原菌は主として *Fusarium commune* と考えられた。病原菌は生育期にも感染し、感染後は一部の維管束の閉塞によって葉にくさび形の病斑を形成した。病斑は、7 月以降に出現し、ドローンによる空撮ではほ場に入らなくても観察が可能である。土壌還元消毒に有効な有機資材の種類では、酒粕や小麦フスマ等の非繊維性炭水化物を多く含む資材の効果が高く、投入量は資材の成分

分析データからある程度推定できると考えられた。処理温度は 20~30°C では高いほど有機物の投入量を低減できた。代かき処理後の被覆では、難透過性フィルム被覆の効果が高いが、水封でも代用できる。水封の場合では、微生物相は難透過性フィルム被覆の場合と比べてやや異なっていた。有機資材を用いた土壌還元消毒では、*Clostridium* 属菌が増加することにより、病原菌の細胞壁が破壊されることも、効果に寄与している可能性が考えられた。土壌還元消毒の効果は、室内試験では地温が 25°C 以上かつ空気と遮断された条件であれば、1 週間程度で発現した。

708-709.

山本勉・金磯泰雄 1977. 水管理, とくに夏季の落水がハス腐敗病の発生に及ぼす影響. 四植防研. 12. 39-42.

引用文献

- 小原裕三. 2013. 低濃度エタノールを利用した土壌還元作用による土壌消毒技術実施マニュアルの紹介. 植物防疫. 67(4). 1-6.
- 南川勝次・西沢正洋・斎藤久男. 1959. 食用蓮に関する研究 (第 2 報) 蓮根腐敗病の防除について. 園学雑. 28(4). 241-256.
- 門馬法明. 2013. 土壌還元消毒法によるトマト萎凋病菌の密度低減効果のメカニズム解析. 植物防疫. 67(4). 18-21.
- 西門義一・渡辺清志. 1956. 蓮根腐敗病防除試験. 農学研究. 44(2). 56-64.
- 西沢正洋. 1960. 蓮根の腐敗病に関する研究. 九農試彙報. 6(1). 1-75.
- 沢田英司・阿部成人. 2017. 徳島県のレンコン栽培における病害虫の発生状況と対策. 植物防疫. 71(12). 1-4.
- 新村昭憲. 2000. 土壌還元消毒法. 農業技術大系土壌施肥編 5-①. 畑 212 の 6-9. 農文協. 東京.
- Takehara T, Kuniyasu K, Mori M, Hagiwara H. 2003. Use of a nitrate-nonutilizing mutant and selective media to examine population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* in soil. *Phytopathology* 93: 1173-1181.
- Ueki A, Takehara T, Ishioka G, Kaku N, and Ueki K. 2020. β -1,3-Glucanase production as an anti-fungal enzyme by phylogenetically different strains of the genus *Clostridium* isolated from anoxic soil that underwent biological disinfestation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104: 5563-5578.
- 山本 勉. 2011. ハス腐敗病. フザリウム - 分類と生態・防除 -. 駒田旦ら編. 全国農村教育協会. 東京.