

## 総合序論

現在、国内の植物に発生する病害は、農業生物資源ジェンバンクの日本植物病名データベースによれば 10,298 件あり、そのうち菌類(糸状菌)による病害が最も多く 7,797 件で、全病害の 3/4 以上を占め(佐藤, 2013)、各種病原の中でも特に重要な存在である。

糸状菌による病害は、その伝染方法の違いによって土壌伝染性病害と空気伝染性病害の 2 種類に大きく分けられる。土壌伝染性病害(土壌病害)は「植物病害の中で、土壌中に生存する病原が植物の土壌と接する部分から侵入して起こる病気」(「新版土壌病害の手引」編集委員会編, 1984)とされ、空気伝染性病害は「地上部の感染植物体から病原体が風によって運ばれる病気」(久能ら, 1999)とそれぞれ定義されている。土壌病害は、土壌中の病原が植物の根や地際部から侵入するため、地上部の黄化や萎凋、枯死などの症状が発生して初めて病気を疑うことも多く、発生後の防除対応は困難であり、いわゆる難防除病害と呼ばれるものが多い。また、空気伝染性病害は、風雨等により病原菌の胞子が飛散し宿主への侵入、感染を経て病徴発現に至る。このように糸状菌病は、伝染方法が大きく異なる病原菌を含み、農作物の重要病害となっていることが多い。また、その効果的な防除対策の構築に当たっては、病原菌の分離、同定やその発生生態を究明することが極めて重要である。

さて、栃木県の平成 28 年農業産出額は、2,863 億円で全国第 9 位である(農林水産省, 2018)。その農業産出額を、米麦、園芸、畜産、その他と大きく分けると、特に園芸、畜産の産出額がそれぞれ 1,000 億円を超えており、野菜、果樹、花など園芸生産が着実に伸びている。品目別にみると、1 位は米の 608 億円、2 位は生乳の 349 億円、3 位にイチゴの 285 億円、8 位にトマトの 114 億円と続いている。

トマト(*Solanum lycopersicum*)は、南アメリカのアンデス山脈高原地帯を原産とするナス科ナス属の植物で、野菜では世界で最も栽培されている品目である。日本での生産量は約 74 万tで、栃木県の作付面積は 378ha、収穫量は 36,400tで、全国第6位で(農林水産省, 2017)、栃木県ではイチゴに次ぐ野菜品目として重要な位置を占めている。

また、イチゴの栽培種(*Fragaria* × *ananassa*)は、北米原産の *Fragaria virginiana* と南米原産の *F. chiloensis* が交雑されたもので、江戸時代にオランダから日本に入ってきたとされる。栃木県では戦後からしだいに栽培が活発となり、栃木県農業試験場による品種「女峰」、「とちおとめ」などの開発や、その栽培技術の確立、普及により、イチゴ生産は大きく発展した。栃木県のイチゴ生産は、作付面積 586ha、収穫量 25,100 tで(農林水産省, 2017)、産出額の 285 億円も含めて、それぞれ日本一であり、栃木県の園芸品目の中でも極めて重要

な位置づけにある。

リンドウ(*Gentiana trifloral*)は、リンドウ科リンドウ属の植物である。日本では古くから薬草として利用されてきた以外に、観賞用として切り花や鉢植えとして品種改良しつつ栽培されてきた。リンドウの主要産地には岩手県、秋田県、山形県、福島県、長野県などが知られている。近年、栃木県ではリンドウ(エゾ系)の品種開発に取り組み、「るりおとめ(商標)」や品種「栃木 r2 号(愛称:るりおとめ 月あかり)」などを開発し、全国で最も早出し出荷の産地となっている。また、リンドウは花き栽培農家における栽培品目の一つであるだけでなく、水稻栽培農家の複合品目としても農業経営上、有用な品目となっており、栃木県でのリンドウの栽培面積は漸増傾向で産地化の形成も進みつつある。

本研究では、栃木県におけるトマト、イチゴ、リンドウという主要な園芸作物で発生した各種糸状菌病について、効果的な防除対策の構築に資するため、原因菌の分離、同定ならびに、その発生生態などを解明することを目的とした。

第 1 章のトマトフザリウム株腐病については、2004 年に栃木県のトマト圃場で発生した立枯症状の病徴、発生状況、病原菌の所属を明らかにした。また、トマト花器、果実および茎に対する病原性を検討し、本菌の土壌伝染以外の伝染経路の存否を検討するとともに、薬剤感受性、嫌氣的発酵処理による不活化についても検討した。さらに、本菌のトマトに対する病原性を実験室内の素寒天培地地上で簡便かつ短期間のうちに検定する方法や、ジャガイモマイクロチューバーを用いて本菌を土壌から簡易に検出する方法の開発を試みた。

第 2 章のトマト綿腐病については、2006 年に栃木県の土耕栽培トマトの育苗中に根腐症状を伴う生育不良が発生したため、その根部罹病組織から病原菌を分離し、トマトへの接種による病徴の再現性の確認、その形態的な特徴、種特異的なプライマーによる PCR 検定等により病原菌を同定した。

第 3 章のイチゴピシウム根腐病については、2007 年に栃木県のイチゴ圃場で主に下葉の葉柄が小豆色に変色し、生育の停滞や萎凋、枯死を呈する病害が発生したため、その根部罹病組織から病原菌を分離し、イチゴへの接種による病徴の再現性の確認、その形態的な特徴、rDNA ITS 領域の塩基配列解析、種特異的なプライマーによる PCR 検定等により病原菌を同定した。

第 4 章のリンドウ炭疽病については、2001 年および 2002 年に栃木県のリンドウ圃場で茎葉に斑点を生じ、病勢が進展すると激しい株枯症状を呈する病害が発生したため、その病斑部から病原菌を分離し、リンドウへの接種による病徴の再現性の確認、その形態的な特徴、種特異的なプライマーによる PCR 検定等により病原菌を同定した。

以上のように、本論文では栃木県の主要園芸作物で発生

した糸状菌病のうち、トマトに発生したフザリウム株腐病、綿腐病、イチゴに発生したピシウム根腐病およびリンドウに発生した炭疽病について、病原菌の同定ならびにその発生生態等

に関する知見をとりまとめ、日本の植物病名目録の充実を図った。

## 第1章 トマトフザリウム株腐病の発生 (新称)

2004年5~6月、栃木県宇都宮市および真岡市の施設栽培トマト(土耕栽培, 促成長期どり栽培)で, 主根が激しく褐変腐敗し, 病勢が進展すると立枯症状を呈する病害が発生した。茎または主根の病斑部からは *Fusarium* 属菌が高率に分離された。分離菌株はその形態的特徴から *F. solani* に属すと考えられた。そこで, 本病の病徴, 病原菌の所属, 宿主範囲等について検討した。

本病では, 摘葉に伴う茎の傷口から感染し発病に至ったと考えられる病斑がまれにみられる。さらに, この病斑部から組織分離により *F. solani* 種複合体に属す菌株が分離される。また, トマトの主要な土壌病原菌の一種であるトマト根腐萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*; 駒田ら, 1989) は, トマト果実腐敗症の原因菌であることが報告されている(富川, 1987)。一方, 本菌についてはトマト花器および果実への病原性に関する知見はない。そこで, 本菌の土壌伝染以外の伝染経路の存否を明らかにするため, トマト茎, 花器および果実に対する病原性を検討した。

また, 今後の防除対策に役立てるため, トマトに農薬登録のある主要薬剤を供試し本菌の薬剤感受性を検討した。

Sanchez et al. (1975) に準じ, 本菌のトマトに対する病原性を実験室内の素寒天培地上で簡便かつ短期間に検定する方法についても検討した。

トマト作付前に栽培圃場が本菌に汚染されているかどうか判定する技術の開発は, 本病の防除対策を構築するうえで極めて有用性が高い。これまでに, 各種病原菌で土壌からの簡易な検出技術開発への取組が行われている。鑑谷ら(1963)はヤナギ等の枝を圃場に一定期間挿すことで紫紋羽病菌 (*Helicobasidium monpa*) を, 糸井ら(1964)は同様にクワの枝で白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*) を, Eguchi et al. (2009) はクワ枝でナンおよびリンゴの白紋羽病菌を, 原ら(2010), 森田ら(2013)および森田ら(2014)はイチジクの枝でイチジク株枯病菌 (*Ceratocystis fimbriata*) を, 圃場からそれぞれ検出している。また, Merz(1993)は, トマト苗がジャガイモ粉状そうか病菌 (*Spongospora subterranea*) の土壌からの検出に有効であることを明らかにしている。Nakayama et al. (2007) および中山・眞岡(2008)は, トマト苗を利用したジャガイモ粉状そうか病菌の検出技術を確立している。今回, 栃木県のトマトから得られた分離菌株は, トマトのみでなくジャガイモにも病原性を有し, その茎基部に褐色で腐敗した病斑を生じた(中山・青木, 2010)。また, ジャガイモのマイクロチューバーは, ジャガイモの組織培養苗から培養器内で生産された病原体フリーの塊茎であり大量生産が可能となっている。そこで, 本研究ではジャガイモマイクロチューバーを用いて本菌を土壌から

簡易に検出する方法を検討した。

また, 植物病害の防除対策上, 罹病残渣の適切な処理は病原菌の伝染環を断ち切る有効な手段の一つである。その事例として, 罹病残渣の嫌氣的発酵によってダイコン萎黄病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *raphani*) が不活化されるとの報告がある(萩原・竹内, 1982; 萩原・竹内, 1983)。石川ら(1990)は, 嫌氣的発酵処理がイチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) の罹病残渣処理に有効であることを明らかにしている。そこで, これら事例をもとに, 本菌の不活化についても検討した。

### 1 発生状況, 病徴

2004年5~6月, 宇都宮市および真岡市の施設栽培トマト(穂木品種「ハウス桃太郎」, 台木品種「がんばる根3号」または「がんばる根11号」)で立枯症状が発生した。

#### 1) 自然発生圃場での発生状況

材料および方法

2006年2月17日から5月26日まで, 宇都宮市の自然発生圃場(促成長期どり栽培, 土耕栽培; 穂木品種「マイロック」, 台木品種「ブロック」, 2005年7月21日播種, 9月1日定植)において, 本病の発生状況を経時的に調査した。

なお, 発病調査は以下により行った。

発病指数; 0: 病徴なし, 1: 地際部付近に褐色病斑,  
2: 褐色病斑が上位に進展, 3: 萎凋, 4: 枯死

$$\text{発病度} = \left[ \frac{\sum (\text{発病程度別株数} \times \text{指数})}{(4 \times \text{調査株数})} \right] \times 100$$

また, 2006年10月16日から2007年6月7日まで, 宇都宮市の自然発生圃場(促成長期どり栽培, 土耕栽培; 穂木品種「マイロック」, 台木品種「ブロック」, 2006年7月10日播種, 8月3日定植)において, 前記と同様に発病状況を経時的に調査した。

#### 結果

2006年調査では, 2月17日に発病株率1.0%, 発病度0.5, 4月以降になると発病株率が徐々に高まり, 最終調査の5月26日に発病株率11.8%, 発病度4.1に達した(図1-1, 図1-2)。

2006~2007年調査では, 10月下旬から発生が始まり, 翌春の4月下旬以降, 発病株率が急激に高まり, 6月上旬に地上部の発病株率が41.7%となった(図1-3)。なお, 圃場内の全株を抜き取り, 地下部の発病状況を調査したところ, 発病株率は68.0%に達した。

#### 2) 病徴

本病はトマトの根および茎に病徴を示した。根では, はじめ主根の表面に淡褐色で不整形の病斑が形成され, しいに

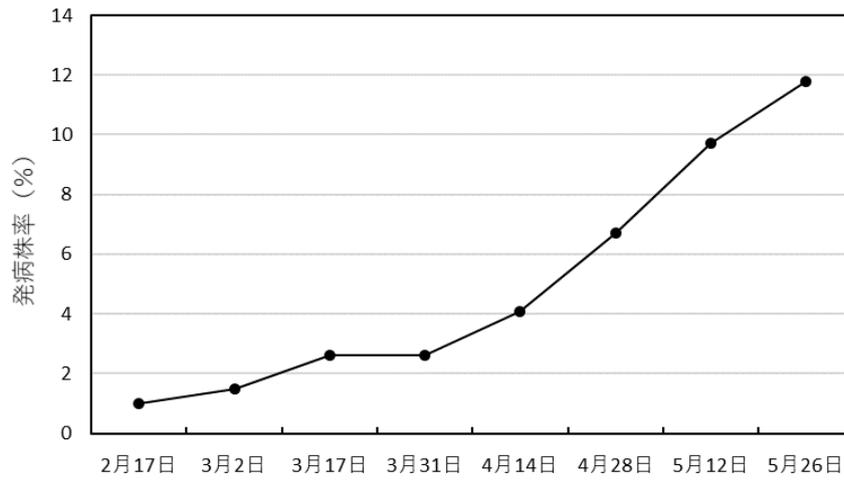


図1-1 自然発生圃場でのトマトフザリウム株腐病 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) 発病株率の推移 (2006)  
(品種; 穂木「マイロック, 台木「ブロック」)

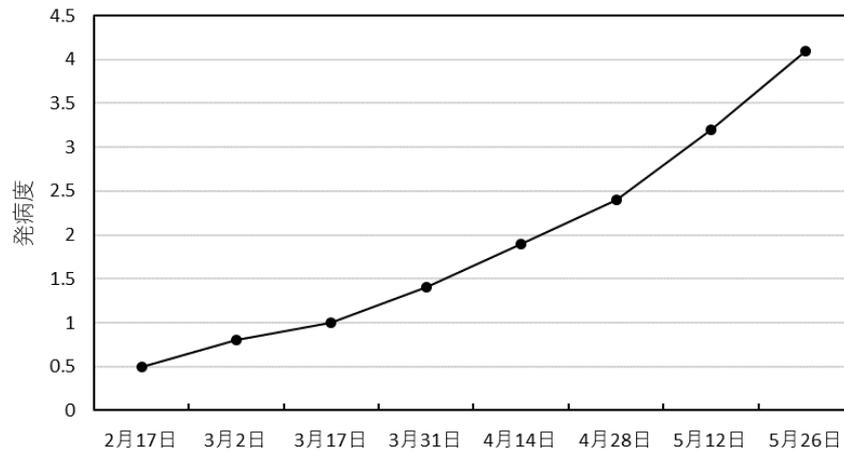


図1-2 自然発生圃場でのトマトフザリウム株腐病 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) 発病度の推移 (2006)  
(品種; 穂木「マイロック」, 台木「ブロック」)

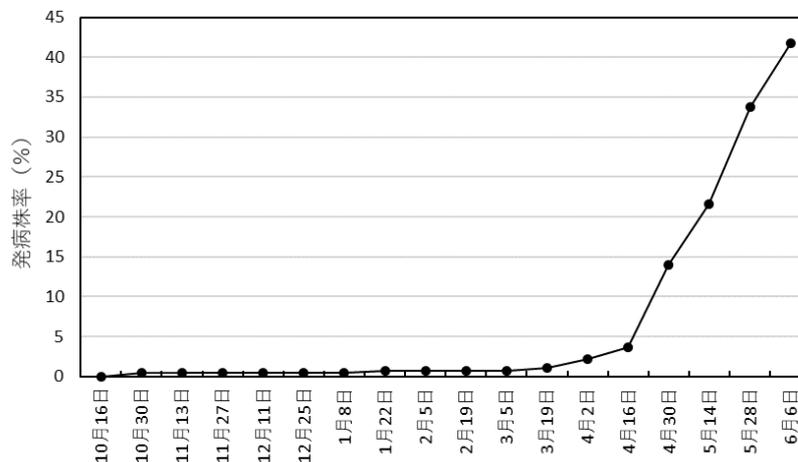


図1-3 自然発生圃場でのトマトフザリウム株腐病 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) 発病株率の推移 (2006-2007)  
(品種; 穂木「マイロック」, 台木「ブロック」)



図1-4 トマトフザリウム株腐病 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) の病徴  
a: 葉の黄化, 萎れ, b: 地際部の褐変腐敗, c: 根部の褐変腐敗  
(品種: 穂木「マイロック」, 台木「ブロック」)

拡大しながら褐変腐敗した大型病斑となった。また、主根の病斑部から伸びている側根の付け根付近に褐変腐敗が認められたが、大部分の側根には病徴は認められなかった。主根の病斑はしだいに上下へ拡大伸展し、地際部付近の茎の褐変腐敗となって現れた。まれに、地際部から 50~100cm 上位まで病斑が進展し、茎の表面が褐色条斑を呈する病斑を形成した。葉は下葉から黄化し、しだいに萎凋、枯死した。根および地際部の褐変腐敗が激しい場合、株が立枯症状を呈した(図 1-4)。

## 2 病原菌

### 1) 形態

#### (1) 病原菌の分離

地際部付近の茎を水道水で十分に水洗した後、罹病部組織を約 5mm 角に切り取り、この切片を 70%エタノールに約 30 秒間浸漬して表面殺菌し、殺菌蒸留水で洗浄し殺菌濾紙で水滴を取った後、ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天(Potato Dextrose Agar; PDA)培地に置床した。25°C、暗条件で培養した後、単分生子分離を行って供試菌株とした。分離菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 は、農業生物資源ジーンバンク(農研機構遺伝資源センター)にそれぞれ MAFF240345, MAFF240346, MAFF240347 として寄託登録した。

#### (2) 病原菌の形態

##### 材料および方法

##### ア) 供試菌株

分離菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 の 3 菌株を供試した(表 1-1)。

##### イ) 形態計測

分離菌株を合成低栄養寒天(Synthetic Low Nutrient Agar; SNA)培地(Nirenberg and O'Donnell, 1998)で 25°C、暗条件で 14 日培養後に形成された分生子の形、隔壁数、厚壁胞子の有無、分生子形成細胞の形態およびその分生子形成様式を光学顕微鏡で観察した。また、分生子の大きさについては、分生子の種類と隔壁数を区別し、菌株ごとにそれぞれ 30 個ずつを計測した。

##### 結果

小分生子は楕円~紡錘形で 0 から 1 隔壁であった。SNA 上での 0 隔壁の小分生子は 3.5-18.5×1.5-6(菌株ごとの平均値の範囲: 8.5-9×2.7-2.8) μm であった。小分生子柄は長く、非分枝あるいは分枝し、モノフィアライドから擬頭状に分生子を形成した。大分生子柄は比較的短く、分枝あるいは非分枝で、モノフィアライドから分生子を形成した。大分生子は鎌形で 1 から 5 隔壁、基部に脚胞を有していた。3 隔壁の大分生子は、PDA 上では 27-43.5×3-5.5(菌株ごとの平均値の範囲: 35-38.8×4.4-4.7) μm, 5 隔壁は 35.5-49.5×3.5

-6.5(菌株ごとの平均値の範囲: 42.6-45.2×4.8-4.9) μm であった。厚壁胞子は球形、間生または頂生で、単生もしくは連鎖、表面平滑または粗で、SNA 上では大きさは 7.5-15×7.5-8.8(平均値 10.1×8.6) μm であった(表 1-2)。

分離菌株は、小分生子を擬頭状に形成し、小分生子柄が長く、まばらに分枝し、その形態数値は Gerlach and Nirenberg (1982) の記載による *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. とほぼ一致した。また、Nirenberg and Brielmaier-Liebetanz (1996) および Rossman et al. (1999) による *Fusarium striatum* Sherb. (完全世代名: *Haematonectria ipomoeae* (Halst.) Samuels et Nirenberg) の記載と比較したところ、本菌の 5 隔壁大分生子は明らかに短く、形態的に一致しなかった(表 1-2)。

### 2) 病原性

#### (1) トマトに対する病原性

##### <試験 I >

##### 材料および方法

##### ア) 供試菌株

分離菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 の 3 菌株を供試した。

##### イ) 供試トマト品種

台木品種「がんばる根 3 号」を供試した。

##### ウ) 接種

分離菌株を SNA 培地、25°C、暗条件で 7 日間培養し、分生子を殺菌蒸留水に懸濁し、10<sup>5</sup>個/ml の孢子懸濁液を作製した。これを接種源として、「がんばる根 3 号」苗(第 6 葉期)に浸根接種(Wellman, 1939)し、1/5000a ワグネルポット中の殺菌土壌に移植した。

##### エ) 調査

接種 78 日後に株を抜き取り根部の発病状況を調査した。また、接種植物の病斑部から接種菌の再分離を行った。

##### 結果

分離菌株の浸根接種により、トマト台木品種「がんばる根 3 号」の接種株のすべてで根部に原病徴が再現され、病斑部から接種菌が再分離された(表 1-3)。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

##### <試験 II >

##### 材料および方法

##### ア) 供試菌株

分離菌株 04T-2 を供試した。

##### イ) 供試トマト品種

穂木品種は「麗容」、「マイロック」、「桃太郎はるか」、「ハウス桃太郎」の 4 品種、台木品種は「ブロック」、「ジョイント」、「がんばる根 3 号」、「がんばる根 11 号」、「ドクター K」、「サポート」、「マグネット」、「プロテクト 3」の 8 品種、計 12 品種を供試した。

表1-1 供試菌株(トマト分離菌株)

分離菌株	MAFF No.	分離場所	分離年	品種(穂木/台木)	栽培様式
04T-1	MAFF240345	栃木県宇都宮市	2004	ハウス桃太郎/がんばる根3号	土耕栽培
04T-2	MAFF240346	栃木県宇都宮市	2004	ハウス桃太郎/がんばる根3号	土耕栽培
04T-3	MAFF240347	栃木県真岡市	2004	ハウス桃太郎/がんばる根11号	土耕栽培

表1-2 トマト分離菌株04T-2と既知種との形態比較

	04T-2	<i>F. solani</i> <sup>a)</sup>	<i>F. solani</i> <sup>b)</sup>	<i>F. striatum</i> <sup>c,i)</sup>	<i>F. striatum</i> <sup>d,j)</sup>
大分生子					
隔壁数	1-5		3-5(-7)	3-5(-7)	
大きさ(3隔壁) (μm)	27-43.5 × 3-5.5 <sup>e)</sup> (35.0-38.8 × 4.4-4.7) <sup>k)</sup>	36 × 5.5	27-50 × 4.2-6 (36 × 5.3)		
大きさ(5隔壁) (μm)	35.5-49.5 × 3.5-6.5 <sup>e)</sup> (42.6-45.2 × 4.8-4.9) <sup>k)</sup>	48 × 5.7	34-55 × 4.2-6 <sup>h)</sup> (41 × 5.3)	45.8-68 × 4.8-6 <sup>f,i)</sup> (49.2-60.3 × 5.2-5.9)	49-64 × 4.8-5.9
小分生子					
隔壁数	0-1		0-1	0-3(-5)	
大きさ(0隔壁) (μm)	3.5-18.5 × 1.5-6 <sup>f)</sup> (8.5-9.0 × 2.7-2.8) <sup>k)</sup>		8-13 × 3.2-4 (10 × 3.5)	6.5-15 × 2-4 <sup>f,i)</sup> (7-11.4 × 2.2-3.4)	9.8-14.5 × 4.5-5
小分生子柄					
大きさ (μm)	≤ 255 × 2.5-5.5 <sup>f)</sup>				
厚壁胞子					
大きさ (μm)	7.5-15 × 7.5-8.8 <sup>f)</sup> (10.1 × 8.6) <sup>k)</sup>		6-11		

a) Snyder and Hansen (1941)

b) Gerlach and Nirenberg (1982)

c) Nirenberg and Brielmaier-Liebetanz (1996)

d) Rossman et al. (1999)

e) PDA上

f) SNA上

g) 1-4隔壁

h) 4-5隔壁

i) 近紫外線照射(暗黒12hr/照射12hr)

j) ホモタリック

k) 各30個/菌株

表1-3 トマト分離菌株のトマトに対する病原性

分離菌株	発病株数/供試株数 <sup>a)</sup>
04T-1	5/5
04T-2	5/5
04T-3	5/5
無処理	0/5

a) 供試品種: がんばる根3号

ウ)接種

接種は、分離菌株 04T-2 をマングビーン培地で 25℃、10 日間培養し、殺菌蒸留水で孢子様菌体の濃度を  $2.8 \times 10^5$  bud cell/ml に調整し接種源とした。接種は、ペロペット(軟質 PE 製)により 1/5000a ワグネルポット中のトマト各品種の株元に 1 株当たり 30ml ずつかん注接種した。なお、供試株数は、各品種とも接種区が各 10 株、無接種区が各 5 株とした。

エ)調査

接種 67 日後に株を抜き取り、発病状況を調査した。また、接種植物の病斑部から接種菌の再分離を行った。

結果

分離菌株 04T-2 のトマト各品種に対するかん注接種の結果、「サポート」、「マグネット」を除いた計 10 品種で発病が認められた。台木品種の発病株率は 0~70.0%で、特に品種「ジョイント」は 70.0%と高かった(表 1-4)。なお、無接種区では病徴

は認められなかった。

<試験Ⅲ>

材料および方法

ア)供試菌株

分離菌株 04T-2 を供試した。

イ)供試トマト品種

穂木品種は「麗容」、「マイロック」、「桃太郎はるか」、「ハウス桃太郎」の 4 品種、台木品種は「ブロック」、「ジョイント」、「がんばる根 3 号」、「がんばる根 11 号」、「ドクターK」、「サポート」、「マグネット」、「プロテクト 3」の 8 品種、計 12 品種を供試した。

ウ)接種

接種は、分離菌株 04T-2 を土壌ふすま培地(松尾ら, 1980)で 25℃、40 日間培養し、1/5000a ワグネルポット中の殺菌土壌に重量で 1%の割合で混和し保菌土壌とした後、殺菌土壌で育苗したトマト苗(2.0~2.5 葉期)を移植した(土壌接種)。なお、供試株数は、各品種とも接種区が各 10 株、無接種区が各 5 株とした。

表1-4 トマト分離菌株04T-2のトマト品種に対する病原性(かん注接種)

処理区	品種名	発病株率(%) <sup>a)</sup>	発病度 <sup>b)</sup>
接種	麗容	50.0	37.5
	マイロック	30.0	7.5
	桃太郎はるか	10.0	7.5
	ハウス桃太郎	20.0	5.0
	ブロック	10.0	7.5
	ジョイント	70.0	32.5
	がんばる根3号	20.0	5.0
	がんばる根11号	40.0	15.0
	ドクターK	10.0	7.5
	サポート	0	0
	マグネット	0	0
	プロテクト3	10.0	2.5
	無接種	麗容	0
マイロック		0	0
桃太郎はるか		0	0
ハウス桃太郎		0	0
ブロック		0	0
ジョイント		0	0
がんばる根3号		0	0
がんばる根11号		0	0
ドクターK		0	0
サポート		0	0
マグネット	0	0	
プロテクト3	0	0	

a) (発病株数/調査株数) × 100

b) 発病度 = [Σ(発病程度別株数 × 指数) / (4 × 調査株数)] × 100

(発病指数 0: 病徴なし, 1: 主根の一部が褐変腐敗, 2: 主根の大部分が褐変腐敗, 3: 褐変腐敗が莖に進展, 4: 枯死)

エ) 調査

移植 84 日後に株を抜き取り、発病状況を調査した。また、接種植物の病斑部から接種菌の再分離を行った。

結果

分離菌株 04T-2 のトマト各品種に対する土壌接種の結果、供試した計 12 品種のすべてで発病が認められ、高度な抵抗性を示す品種は見当たらなかった。台木品種の発病株率は 40.0~100%、発病度は 20.0~55.0、穂木品種の発病株率は 30.0~40.0%、発病度は 10.0~17.5 であり、台木品種の発病株率や発病度が穂木品種のそれに比較して全般に高かった(表 1-5)。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

(2) ジャガイモに対する病原性

< 試験 I >

材料および方法

ア) 供試菌株

分離菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 の 3 菌株を供試した。

イ) 供試植物・品種

ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) 品種「男爵薯」およびトマト

品種「ジョイント」を供試した。

ウ) 接種

分離菌株を土壌ふすま培地で室温下、54 日間培養し、1/5000a ワグネルポット中の殺菌土壌に 1%の割合で混合し保菌土壌とした後、品種「男爵薯」のマイクロチューバーおよびトマト品種「ジョイント」苗(3.5~4.0 葉期)を移植した(土壌接種)。

エ) 調査

移植 62 日後または 71 日後に株を抜き取り、発病状況を調査した。また、接種植物の病斑部から接種菌の再分離を行った。

結果

ジャガイモに対する病原性を調査したところ、分離菌株を接種した品種「男爵薯」の茎の基部が褐変腐敗した(図 1-5)。塊茎では、その表面の一部が淡褐色に変色し亀裂が入り、しだいに亀裂が内部に進展し、内部が褐変腐敗した(図 1-5, 表 1-6)。病斑部からは接種菌が再分離された。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

表1-5 トマト分離菌株04T-2のトマト品種に対する病原性(土壌接種)

処理区	品種名	発病株率(%) <sup>a)</sup>	発病度 <sup>b)</sup>
接種	麗容	40.0	10.0
	マイロック	30.0	17.5
	桃太郎はるか	30.0	10.0
	ハウス桃太郎	30.0	12.5
	ブロック	60.0	25.0
	ジョイント	100	55.0
	がんばる根3号	40.0	20.0
	がんばる根11号	70.0	25.0
	ドクターK	70.0	32.5
	サポート	80.0	42.5
	マグネット	60.0	27.5
	プロテクト3	60.0	27.5
無接種	麗容	0	0
	マイロック	0	0
	桃太郎はるか	0	0
	ハウス桃太郎	0	0
	ブロック	0	0
	ジョイント	0	0
	がんばる根3号	0	0
	がんばる根11号	0	0
	ドクターK	0	0
	サポート	0	0
	マグネット	0	0
	プロテクト3	0	0

a) (発病株数/調査株数) × 100

b) 発病度 = [ ∑ (発病程度別株数 × 指数) / (4 × 調査株数) ] × 100

(発病指数 0: 病徴なし, 1: 主根の一部が褐変腐敗, 2: 主根の大部分が褐変腐敗, 3: 褐変腐敗が茎に進展, 4: 枯死)

表1-6 トマト分離菌株のジャガイモに対する病原性

分離菌株	ジャガイモ <sup>a)</sup>	トマト <sup>b)</sup>
04T-1	12/20 <sup>c)</sup>	5/5 <sup>c)</sup>
04T-2	19/20	5/5
04T-3	16/20	4/5
無処理	0/20	0/5

a)品種「男爵薯」. 接種71日後に発病調査を行った.

b)品種「ジョイント」. 接種62日後に発病調査を行った.

c)発病株数/供試株数

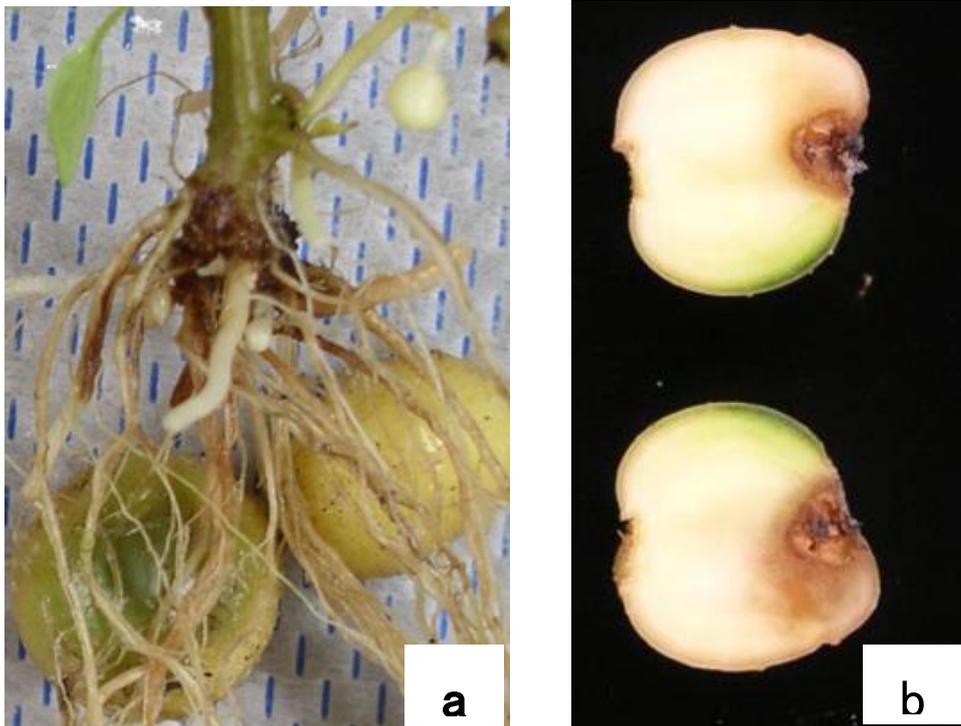


図 1-5 トマト分離菌株 04T-2 のジャガイモ品種「男爵薯」での病徴

a: 茎基部の褐変腐敗, b: 塊茎の褐変腐敗

表1-7 トマト分離菌株04T-2のジャガイモ茎葉に対する病原性

処理区	接種法	発病株数/供試株数 <sup>a)</sup>
接種	有傷	0/11
	無傷	0/12
無接種	有傷	0/12
	無傷	0/12

a)品種「男爵薯」. 接種36日後に発病調査を行った.

接種したトマトでは、品種「ジョイント」の主根の一部に褐変腐敗がみられ、茎に病斑が進展している株も認められた(表 1-6)。また、その病斑部からは接種菌が再分離された。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

#### <試験Ⅱ>

##### 材料および方法

###### ア) 供試菌株

分離菌株 04T-2 を供試した。

###### イ) 供試ジャガイモ品種

品種「男爵薯」を供試した。

###### ウ) 接種

ジャガイモ茎葉への病原性調査は、品種「男爵薯」のマイクロチューバーを黒ポリポット(直径 15cm)中の殺菌土壌に植え付け、その 19 日後に分離菌株 04T-2 を PDA 平板培地で 25°C、暗条件で 13 日間培養し調整した  $7.3 \times 10^5$  個/ml の分生子懸濁液をペーパークロマトグラフ用噴霧器で接種した。なお、接種は有傷区および無傷区を設けた。有傷区は、殺菌した針の束(昆虫針 4 号、約 60 本)でジャガイモ茎葉を軽く押して傷を付けた。

###### エ) 調査

接種後は 16 時間温室状態を保ち、接種 36 日後に発病状況を調査した。

##### 結果

分離菌株の分生子懸濁液をジャガイモ茎葉へ接種したところ、有傷接種および無傷接種とも病徴は認められなかった(表 1-7)。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

#### (3) 各種植物に対する病原性

#### <試験Ⅰ>

##### 材料および方法

###### ア) 供試菌株

分離菌株 04T-2 を供試した。

###### イ) 供試植物・品種

分離菌株の宿主範囲調査には、トウモロコシ(*Zea mays*)品種「ハニーバンダム」、ダイズ(*Glycine max*)品種「富貴」、インゲンマメ(*Phaseolus vulgaris*)品種「初みどり 2 号」、ササゲ(*Vigna sinensis*)品種「赤種三尺大長」、ソラマメ(*Vicia faba*)品種「讃岐長莢早生蚕豆」、ナス(*Solanum melongena*)品種「はやぶさ」、キュウリ(*Cucumis sativus*)品種「鈴成四葉」、カボチャ(*Cucurbita moschata*)品種「みやこ」、ユウガオ(*Lagenaria siceraria*)品種「相生 FMT」、ハクサイ(*Brassica campestris*)品種「金将二号」、シュンギク(*Chrysanthemum coronarium*)品種「きわめ中葉春菊」、オクラ(*Abelmoschus esculentus*)品種「大和グリーンオクラ」の計 12 種 12 品種を供試した。

###### ウ) 接種

接種は、分離菌株 04T-2 をマングビーン液体培地で 25°C、11 日間培養し、殺菌蒸留水で孢子様菌体の濃度を  $1.7 \times 10^5$  bud cell/ml に調整し接種源とした。接種は、ベロペットにより殺菌土壌で育苗した供試植物に 1 株当たり 30ml ずつ株元にかん注接種した。

なお、供試株数は、各品種とも接種区が各 7 株(ただし、トウモロコシは 5 株)、無接種区が各 5 株(ただし、トウモロコシは 3 株)とした。

###### エ) 調査

移植 63 日後に株を抜き取り、発病状況を調査した。また、接種植物の病斑部から接種菌の再分離を行った。

##### 結果

接種植物では、インゲンマメ品種「初みどり 2 号」およびソラマメ品種「讃岐長莢早生蚕豆」にのみ病原性が認められ、トウモロコシなど 10 種 10 品種には病原性は認められなかった(表 1-8)。また、発病株の根の病斑部から接種菌が再分離された。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

#### <試験Ⅱ>

##### 材料および方法

###### ア) 供試菌株

分離菌株 04T-2 を供試した。

###### イ) 供試植物・品種

分離菌株の宿主範囲調査には、トウモロコシ品種「ハニーバンダム」、ダイズ品種「富貴」、インゲンマメ品種「本金時」、「初みどり 2 号」、ササゲ品種「赤種三尺大長」、ソラマメ品種「讃岐長莢早生蚕豆」、ナス品種「はやぶさ」、キュウリ品種「鈴成四葉」、カボチャ品種「みやこ」、ユウガオ品種「相生 FMT」、ハクサイ品種「金将二号」、シュンギク品種「きわめ中葉春菊」、オクラ品種「大和グリーンオクラ」の計 12 種 13 品種を供試した。

###### ウ) 接種

接種は、分離菌株 04T-2 を土壌ふすま培地で、25°C、27 日間培養し、1/5000a ワグネルポット中の殺菌土壌に 1% の割合で混和し保菌土壌とした後、殺菌土壌で育苗した供試植物を移植した(土壌接種)。なお、供試株数は、各品種とも接種区が各 7 株、無接種区が各 5 株とした。

###### エ) 調査

移植 57 日後に株を抜き取り、発病状況を調査した。また、接種植物の病斑部から接種菌の再分離を行った。

##### 結果

接種植物では、インゲンマメ品種「初みどり 2 号」およびソラマメ品種「讃岐長莢早生蚕豆」にのみ病原性が認められ、トウモロコシなど 10 種 10 品種およびインゲンマメ品種「本金時」には病原性は認められなかった(表 1-9)。また、発病株の根

表1-8 トマト分離菌株04T-2の各種植物に対する病原性(かん注接種)

処理区	植物名	品種名	発病株率(%) <sup>a)</sup>	発病度 <sup>b)</sup>
接種	トウモロコシ( <i>Zea mays</i> )	ハニーバンダム	0	0
	ダイズ( <i>Glycine max</i> )	富貴	0	0
	インゲンマメ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	初みどり2号	85.7	42.9
	ササゲ( <i>Vigna sinensis</i> )	赤種三尺大長	0	0
	ソラマメ( <i>Vicia faba</i> )	讃岐長莢早生蚕豆	42.9	21.4
	ナス( <i>Solanum melongena</i> )	はやぶさ	0	0
	キュウリ( <i>Cucumis sativus</i> )	鈴成四葉	0	0
	カボチャ( <i>Cucurbita moschata</i> )	みやこ	0	0
	ユウガオ( <i>Lagenaria siceraria</i> )	相生FMT	0	0
	ハクサイ( <i>Brassica campestris</i> )	金将二号	0	0
	シュンギク( <i>Chrysanthemum coronarium</i> )	きわめ中葉春菊	0	0
	オクラ( <i>Abelmoschus esculentus</i> )	大和グリーンオクラ	0	0
	無接種	トウモロコシ	ハニーバンダム	0
ダイズ		富貴	0	0
インゲンマメ		初みどり2号	0	0
ササゲ		赤種三尺大長	0	0
ソラマメ		讃岐長莢早生蚕豆	0	0
ナス		はやぶさ	0	0
キュウリ		鈴成四葉	0	0
カボチャ		みやこ	0	0
ユウガオ		相生FMT	0	0
ハクサイ		金将二号	0	0
シュンギク		きわめ中葉春菊	0	0
オクラ		大和グリーンオクラ	0	0

a) (発病株数/調査株数)×100

b) 発病度=[Σ(発病程度別株数×指数)/(4×調査株数)]×100

(発病指数 0: 病徴なし, 1: 主根, 側根の一部が褐変腐敗, 2: 主根, 側根の大部分が褐変腐敗,

3: 褐変腐敗が茎に進展, 4: 枯死)

表1-9 トマト分離菌株04T-2の各種植物に対する病原性(土壌接種)

処理区	植物名	品種名	発病株率(%) <sup>a)</sup>	発病度 <sup>b)</sup>
接種	トウモロコシ	ハニーバンダム	0	0
	ダイズ	富貴	0	0
	インゲンマメ	本金時	0	0
	インゲンマメ	初みどり2号	85.7	21.4
	ササゲ	赤種三尺大長	0	0
	ソラマメ	讃岐長莢早生蚕豆	71.4	17.9
	ナス	はやぶさ	0	0
	キュウリ	鈴成四葉	0	0
	カボチャ	みやこ	0	0
	ユウガオ	相生FMT	0	0
	ハクサイ	金将二号	0	0
	シュンギク	きわめ中葉春菊	0	0
	オクラ	大和グリーンオクラ	0	0
	無接種	トウモロコシ	ハニーバンダム	0
ダイズ		富貴	0	0
インゲンマメ		本金時	0	0
インゲンマメ		初みどり2号	0	0
ササゲ		赤種三尺大長	0	0
ソラマメ		讃岐長莢早生蚕豆	0	0
ナス		はやぶさ	0	0
キュウリ		鈴成四葉	0	0
カボチャ		みやこ	0	0
ユウガオ		相生FMT	0	0
ハクサイ		金将二号	0	0
シュンギク		きわめ中葉春菊	0	0
オクラ		大和グリーンオクラ	0	0

a) (発病株数/調査株数) × 100

b) 発病度=[Σ(発病程度別株数×指数)/(4×調査株数)] × 100

(発病指数 0:病徴なし, 1:主根, 側根の一部が褐変腐敗, 2:主根, 側根の大部分が褐変腐敗,  
3:褐変腐敗が茎に進展, 4:枯死)

の病斑部から接種菌が再分離された。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

(4) Sanchez 法の改変によるトマトに対する病原性検定

農作物病害の原因究明の過程では、病斑部から分離した菌株の分離源植物に対する病原性確認が必要となる。接種方法には、菌糸片での接種、ふすまや穀粒などで培養し接種する方法、胞子で接種する方法などがあるが(「新版土壌病害の手引」編集委員会編, 1984), 接種から病徴発現に至るまで一定期間を必要とし、病原菌かどうかの判定には長期間を要する場合もある。

トマトの土壌病原菌の一種であるトマトフザリウム株腐病菌では、本菌を土壌ふすま培地(松尾ら, 1980)で培養した後、保菌土壌を作製し、そこにトマト苗を移植(土壌接種)して病原性の有無を確認している(中山・青木, 2010)。本菌の場合、トマトへの土壌接種から地際部に病徴が現れるまで通常 1～2 か月を要する。

Sanchez et al. (1975) は、病原菌を接種したトマト品種「Bonny Best」の種子を素寒天培地上に置床し、発芽した幼植物体の病徴によりトマト根腐萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) (山本ら, 1974; 駒田ら, 1989) を他の病原菌と識別する方法を開発している。また、黒田ら(1996) は、素寒天培地上で非病原性フザリウム菌のトマト根腐萎凋病菌に対する発病抑制効果をトマト幼植物胚軸部の褐変程度により判定している。

そこで、トマトフザリウム株腐病菌について、トマトに対する病原性を実験室内の素寒天培地上で簡便かつ短期間のうちに検定する方法を検討した。

<試験 I >

材料および方法

ア) 供試菌株

分離菌株 04T-2 を供試した。

イ) 供試トマト品種

穂木品種は「麗容」、「マイロック」、「ハウス桃太郎」の 3 品種、台木品種は「ブロック」、「ジョイント」、「がんばる根 3 号」、「マグネット」の 4 品種、計 7 品種を供試した。

ウ) 接種

04T-2 菌株を SNA 培地, 20°C, 暗条件で培養した菌糸片(約 3mm 角)を接種源とした。その菌糸片を 1.75%素寒天培地が入ったペトリ皿(直径 9cm)の中央に置床した。次に、Sanchez et al. (1975) の方法に準じ、トマト各品種の種子を流水で洗浄、浸種し、次亜塩素酸ナトリウム液(有効成分 1%)で 5 分間表面殺菌した。次に、種子を殺菌蒸留水で洗浄し殺菌濾紙で水滴を取った後、菌糸片の周囲 20～25mm の距離に、ペトリ皿当たり 4～6 粒ずつほぼ等間隔になるように置床した。各品種当たりペトリ皿は 2 枚供した。

エ) 調査

接種後、25°C, 照明下で培養し、接種 6 日後、10 日後および 14 日後にトマト幼植物体の発病状況を調査した。

表1-10 トマト各品種に対するトマト分離菌株04T-2の病原性(試験 I )<sup>a)</sup>

処理区	品種名	供試数	発芽数	発病数		
				接種6日後	接種10日後	接種14日後
接種	麗容	8	8	0	4	5(62.5) <sup>b)</sup>
接種	マイロック	9	9	0	3	6(66.7)
接種	ハウス桃太郎	10	10	0	3	8(80.0)
接種	マグネット	11	11	0	3	9(81.8)
接種	ブロック	10	10	0	1	9(90.0)
接種	ジョイント	11	10	0	8	8(80.0)
接種	がんばる根3号	12	12	0	4	9(75.0)
無接種	麗容	9	7	0	0	0(0)
無接種	マイロック	7	7	0	0	0(0)
無接種	ハウス桃太郎	9	9	0	0	0(0)
無接種	マグネット	9	9	0	0	0(0)
無接種	ブロック	10	10	0	0	0(0)
無接種	ジョイント	10	10	0	0	0(0)
無接種	がんばる根3号	11	11	0	0	0(0)

a) Sanchez et al. (1975) の方法に準じ、1.75%素寒天培地上に04T-2菌株とトマト各品種の種子を置床し発病状況を調査した。

b) カッコ内は発病率(%)を示す。

$$\text{発病率} = (\text{発病数} / \text{発芽数}) \times 100$$

表1-11 トマト各品種に対するトマト分離菌株04T-2の病原性(試験Ⅱ)<sup>a)</sup>

品種名	反復	接種7日後		接種14日後		無接種7日後		無接種14日後	
		発病率 <sup>b)</sup>	発病度 <sup>c)</sup>	発病率	発病度	発病率	発病度	発病率	発病度
麗容	I	100%	52.8	100%	100	0%	0	0%	0
	II	100	38.9	100	100	0	0	0	0
	III	100	41.2	100	100	0	0	0	0
	平均	100d	44.3	100	100	0	0	0	0
マイロック	I	100	27.8	100	100	0	0	0	0
	II	100	53.1	100	100	0	0	0	0
	III	87.5	23.4	100	100	0	0	0	0
	平均	95.8d	34.8	100	100	0	0	0	0
桃太郎はるか	I	100	47.1	100	100	0	0	0	0
	II	100	39.7	100	100	0	0	0	0
	III	100	33.3	100	100	0	0	0	0
	平均	100d	40.0	100	100	0	0	0	0
ハウス桃太郎	I	94.1	48.5	100	100	0	0	0	0
	II	100	53.1	100	100	0	0	0	0
	III	100	48.4	100	100	0	0	0	0
	平均	98.0d	50.0	100	100	0	0	0	0
マグネット	I	93.8	40.6	100	100	0	0	0	0
	II	100	55.6	100	100	0	0	0	0
	III	100	38.2	100	100	0	0	0	0
	平均	97.9d	44.8	100	100	0	0	0	0
ブロック	I	94.4	40.3	100	100	0	0	0	0
	II	100	50	100	100	0	0	0	0
	III	100	27.8	100	100	0	0	0	0
	平均	98.1d	39.4	100	100	0	0	0	0
ジョイント	I	88.2	41.2	100	100	0	0	0	0
	II	100	57.4	100	100	0	0	0	0
	III	94.1	25	100	100	0	0	0	0
	平均	94.1d	41.2	100	100	0	0	0	0
がんばる根3号	I	100	51.5	100	100	0	0	0	0
	II	100	45.6	100	100	0	0	0	0
	III	100	52.9	100	100	0	0	0	0
	平均	100d	50.0	100	100	0	0	0	0
がんばる根11号	I	100	48.5	100	100	0	0	0	0
	II	100	69.4	100	100	0	0	0	0
	III	100	45.8	100	100	0	0	0	0
	平均	100d	54.6	100	100	0	0	0	0
ドクターK	I	100	43.8	100	100	0	0	0	0
	II	100	46.9	100	100	0	0	0	0
	III	94.1	38.2	100	100	0	0	0	0
	平均	98.0d	43.0	100	100	0	0	0	0
サポート	I	100	63.3	100	100	0	0	0	0
	II	100	56.9	100	100	0	0	0	0
	III	100	47.1	100	100	0	0	0	0
	平均	100d	55.8	100	100	0	0	0	0

a) Sanchez et al. (1975)の方法に準じ、1.75%素寒天培地上に04T-2菌株の分生子懸濁液に浸漬したトマト各品種の種子を置床し発病状況を調査した。

b) 発病率(%) = (発病数/発芽数) × 100

c) 発病度 = [Σ(発病程度別株数 × 指数) / (4 × 調査株数)] × 100

発病程度; 0:発病なし, 1:胚軸の基部付近が褐変腐敗, 2:胚軸の1/2未満が褐変、腐敗,

3:胚軸の1/2以上が褐変、腐敗, 4:萎凋、枯死

※ 表中の同一英文字はTukeyの多重比較により危険率1%で有意差がないことを示す。

結果

04T-2 菌株の菌糸片によりトマト各品種に接種したところ、接種 6 日後では供試した全品種で発病は認められなかったが、接種 10 日後には全品種の幼植物体胚軸の基部、特に根との境界付近が褐変腐敗を呈した。接種 14 日後には、発病率は穂木品種の「麗容」、「マイロック」、「ハウス桃太郎」で 62.5~80.0%、台木品種の「マグネット」、「ブロック」、「ジョイント」、「がんばる根 3 号」で 75.0~90.0%となった(表 1-10)。なお、無接種区では各供試品種に病徴は認められなかった。

<試験 II >

材料および方法

ア) 供試菌株

分離菌株 04T-2 を供試した。

イ) 供試トマト品種

穂木品種は「麗容」、「マイロック」、「桃太郎はるか」、「ハウス桃太郎」の 4 品種、台木品種は「ブロック」、「ジョイント」、「がんばる根 3 号」、「がんばる根 11 号」、「ドクターK」、「サポート」、「マグネット」の 7 品種、計 11 品種を供試した。

ウ) 接種

トマト各品種の種子を流水で洗浄、浸種し、70%エタノールで 30 秒間表面殺菌した。次に、種子を殺菌蒸留水で洗浄し殺菌濾紙で水滴を取った後、04T-2 菌株の分生子懸濁液 ( $10^5$ 個/ml) に浸漬した。なお、接種源の分生子は、04T-2 菌株を SNA 平板培地で 20°C、暗条件で 8~12 日間培養し形成されたものを供試した。

次に、種子から殺菌濾紙で水滴を取り、1.75%素寒天培地上にペトリ皿当たり 9 粒ずつ置床した。接種区は各品種当たりペトリ皿 2 枚ずつ供した。

エ) 調査

接種後、25°C、照明下で培養し、接種 7 日後および 14 日後にトマト幼植物体の発病状況を調査した。なお、試験は 3 回実施した。

結果

04T-2 菌株の分生子懸濁液によりトマト各品種に接種したところ、接種 4~5 日後には幼植物体胚軸の基部、特に根との境界付近に褐変腐敗が認められた。接種 7 日後には全品種で発病がみられ、穂木品種の「麗容」、「マイロック」、「桃太郎はるか」、「ハウス桃太郎」では発病率 95.8~100%、発病度 34.8~50.0 であった。台木品種の「マグネット」、「ブロック」、「ジョイント」、「がんばる根 3 号」、「がんばる根 11 号」、「ドクターK」、「サポート」では発病率 94.1~100%、発病度 39.4~55.8 であった。発病率は、全品種間に有意な差は認められなかった。なお、接種 14 日後には全幼植物体が萎凋、枯死し、各品種とも発病率 100%、発病度 100 となった(表 1-11)。なお、無接種区では各供試品種に病徴は認められなかった。

3) 培養的性質

(1) 菌糸生育と温度との関係

材料および方法

ア) 供試菌株

分離菌株 04T-1, 04T-2 の 2 菌株を供試した。

イ) 生育温度

菌糸の生育温度は、分離菌株を PDA 平板培地で 25°C、暗条件で前培養した後、コルクボーラー(直径 4mm)で打ち抜いた菌叢片を PDA 平板培地上に置床し、5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 37°Cの各温度で暗条件、6 日間培養後の菌叢直径を調査した。

結果

分離菌株の菌糸の生育は 10~37°Cで認められ、適温は 28~30°C付近であった(図 1-6)。

(2) 完全時代形成の検討

材料および方法

ア) 供試菌株

分離菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 の 3 菌株を供試した。

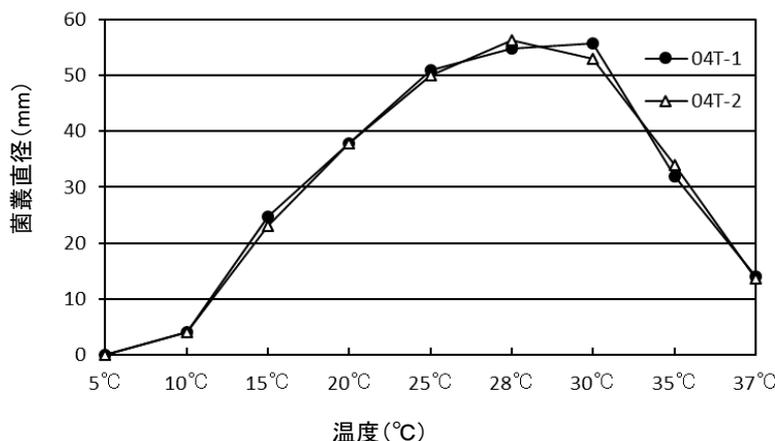


図 1-6 トマト分離菌株 04T-2 の菌糸生育と温度との関係(PDA 上)

#### イ) 調査

分離菌株を PDA 平板培地へ移植し、室温、散光下で培養し、それぞれの菌株について完全世代形成の有無を調査した。最終調査は培養開始から 95 日後に行った。

#### 結果

供試した 3 菌株とも、子のう殻、子のう、子のう胞子の形成はみられず、完全世代の形成は認められなかった(データ略)。

#### 4) 分子系統解析

##### (1) rDNA ITS 領域の解析

##### 材料および方法

##### ア) 供試菌株

分離菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 の 3 菌株を供試した。

##### イ) 解析

分離菌株をそれぞれ SNA 培地上に接種した後に、殺菌濾紙片を 5mm 直径の円盤に打ち抜いて 3~5 枚重ねにしたものを SNA 培地上に接着して培養した。菌集落が生育し紙円盤を覆ったことを確認後、紙円盤をエッペンドルフ・チューブに回収し、PCI(Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol = 25: 24: 1) 処理により菌体から全 DNA を抽出し、遠心分離後の上清に 3M 酢酸ナトリウム水溶液 1/10 容量と 100%エタノール 2.5 倍容量を加え、さらに遠心分離し DNA を沈殿させ、乾燥、Tris バッファー (pH8.0) 25 $\mu$ l に溶解して、その 1 $\mu$ l を鋳型 DNA として、rDNA ITS 領域の塩基配列の解析に供した。PCR 増幅にはプライマー ITS5 と NL4 (White et al., 1990; O'Donnell, 1996) を用いた。それぞれプライマー ITS2, ITS5, NL1, NL3 および NL4 (White et al., 1990; O'Donnell, 1996) を用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。また、近縁菌種の当該遺伝子領域の DNA 塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank のデータベースよりダウンロードするとともに、日本産典型菌株として、*F. striatum* の 3 菌株 (MAFF237667, MAFF237668, MAFF238974) と *F. solani* f. sp. *radicicola* の 1 菌株 (MAFF731042)、加えて *F. striatum* の 1 菌株 (MAFF240020) と *F. solani* f. sp. *pisi* の 1 菌株 (MAFF840047) について rDNA ITS 領域を塩基配列決定し、そのデータも比較のために用いた。供試菌株より得た DNA 塩基配列は比較のための塩基配列データとともに、Clustal X (Thompson et al., 1997) でアライメントした。配列上のギャップおよび不明瞭に決定された配列部分はすべて除去し、分子系統解析した。分子系統解析および分子系統樹の作成はソフトウェア PAUP\*4.0b10 (Swofford, 2002) を用いた。一部菌株については、ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体 (Potato dextrose broth; PDB) 培地に移植した分離菌株を室温で 11 日間振とう培養し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Sciences, Germantown, USA) を用いて抽出した DNA に基づいて解析

した。本研究で明らかにした DNA 塩基配列は DDBJ に登録した (Accession Nos. AB498980-AB498985, AB513841, AB513843-AB513849, AB513851, AB513852)。

#### 結果

供試 3 菌株より得られた rDNA ITS 領域の DNA 塩基配列を GenBank に登録されている *F. solani* 種複合体の典型菌株のデータおよび日本産典型菌株のデータを併せて解析し、最大節約法で系統樹を作成した(図 1-7)。ギャップ配列は除去して解析を行った。その結果、分離菌株は O'Donnell による *F. solani* 種複合体のクレード 1~3 のうちクレード 3 に属していたが、これまでに知られている *F. solani* 種複合体の交配群 (MP I ~VII) のいずれとも異なる系統学的位置であった。

分離菌株は、Romberg and Davis (2007) がアメリカ、カリフォルニアで発生したジャガイモの *Eumartii wilt* およびトマトの Foot rot の原因菌とした *F. solani* f. sp. *eumartii* 菌株と rDNA ITS 領域の塩基配列 (525 塩基対分) が 98.8~99.8% と高い相同性が認められた。さらに、分離菌株は Romberg and Davis (2007) による *F. solani* f. sp. *eumartii* と同一のクレードに所属した。

##### (2) TEF1- $\alpha$ 遺伝子の解析

##### 材料および方法

##### ア) 供試菌株

分離菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 の 3 菌株を供試した。

##### イ) 解析

rDNA ITS 領域の解析と同様に分離菌株から全 DNA を抽出し鋳型 DNA を調整した後、翻訳伸長因子 (Translation Elongation Factor; TEF) 1- $\alpha$  遺伝子の塩基配列の解析に供した。PCR 増幅にはプライマー EF1 と EF2 (O'Donnell et al., 1998) を用いた。それぞれプライマー EF1 と EF2 を用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。また、近縁菌種の当該遺伝子領域の DNA 塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank のデータベースよりダウンロードするとともに、日本産典型菌株として、*F. striatum* の 3 菌株 (MAFF237667, MAFF237668, MAFF238974) と *F. solani* f. sp. *radicicola* の 1 菌株 (MAFF731042) について TEF1- $\alpha$  遺伝子領域を塩基配列決定し、そのデータも比較のために用いた。供試菌株より得た DNA 塩基配列は比較のための塩基配列データとともに、Clustal X (Thompson et al., 1997) でアライメントした。配列上のギャップおよび不明瞭に決定された配列部分はすべて除去し、分子系統解析した。分子系統解析および分子系統樹の作成はソフトウェア PAUP\*4.0b10 (Swofford, 2002) を用いた。本研究で明らかにした DNA 塩基配列は DDBJ に登録した (Accession Nos. AB498980-AB498985, AB513841, AB513843-AB513849, AB513851, AB513852)。

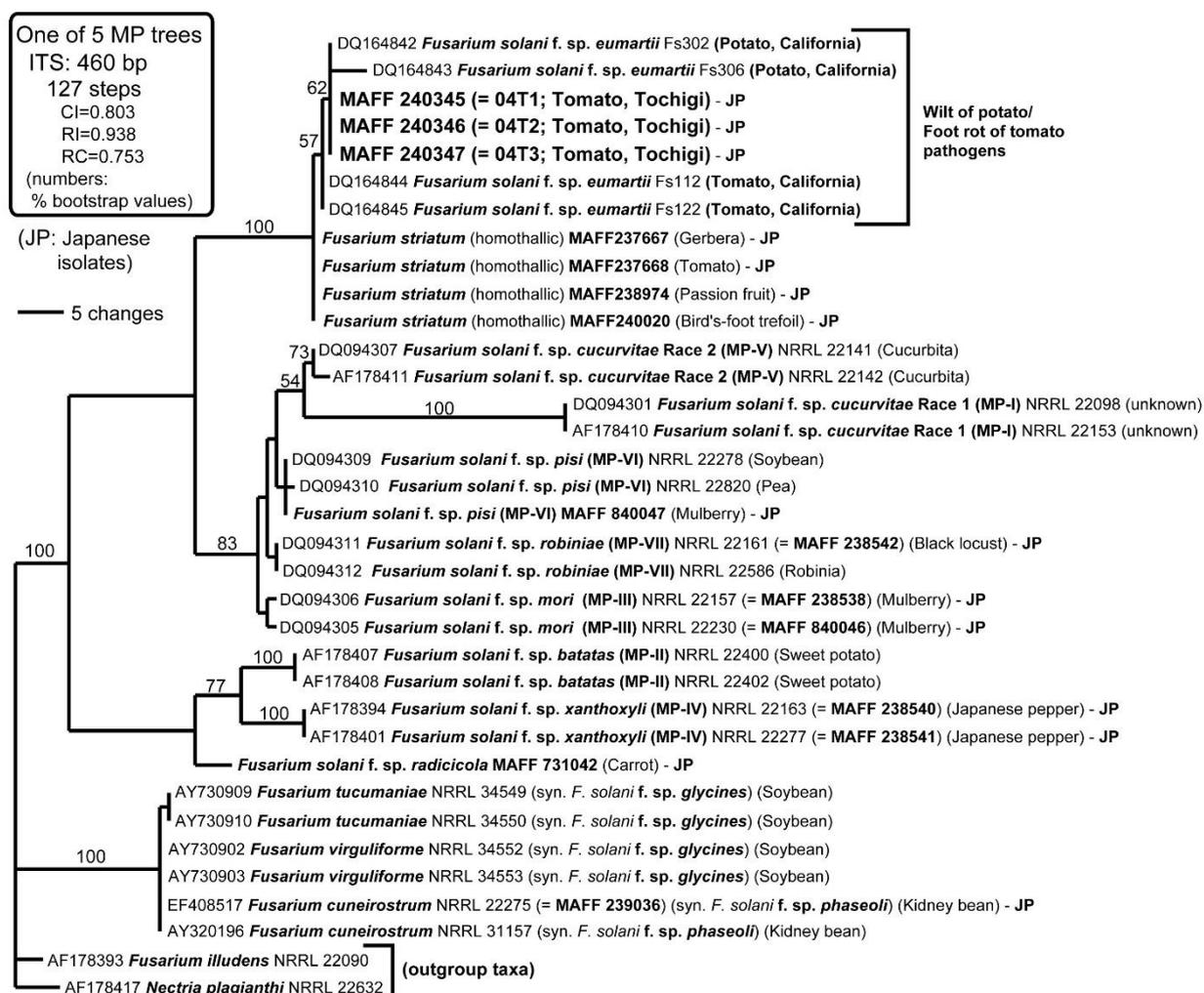


図 1-7 rDNA ITS 領域の DNA 塩基配列に基づいた最大節約系統樹

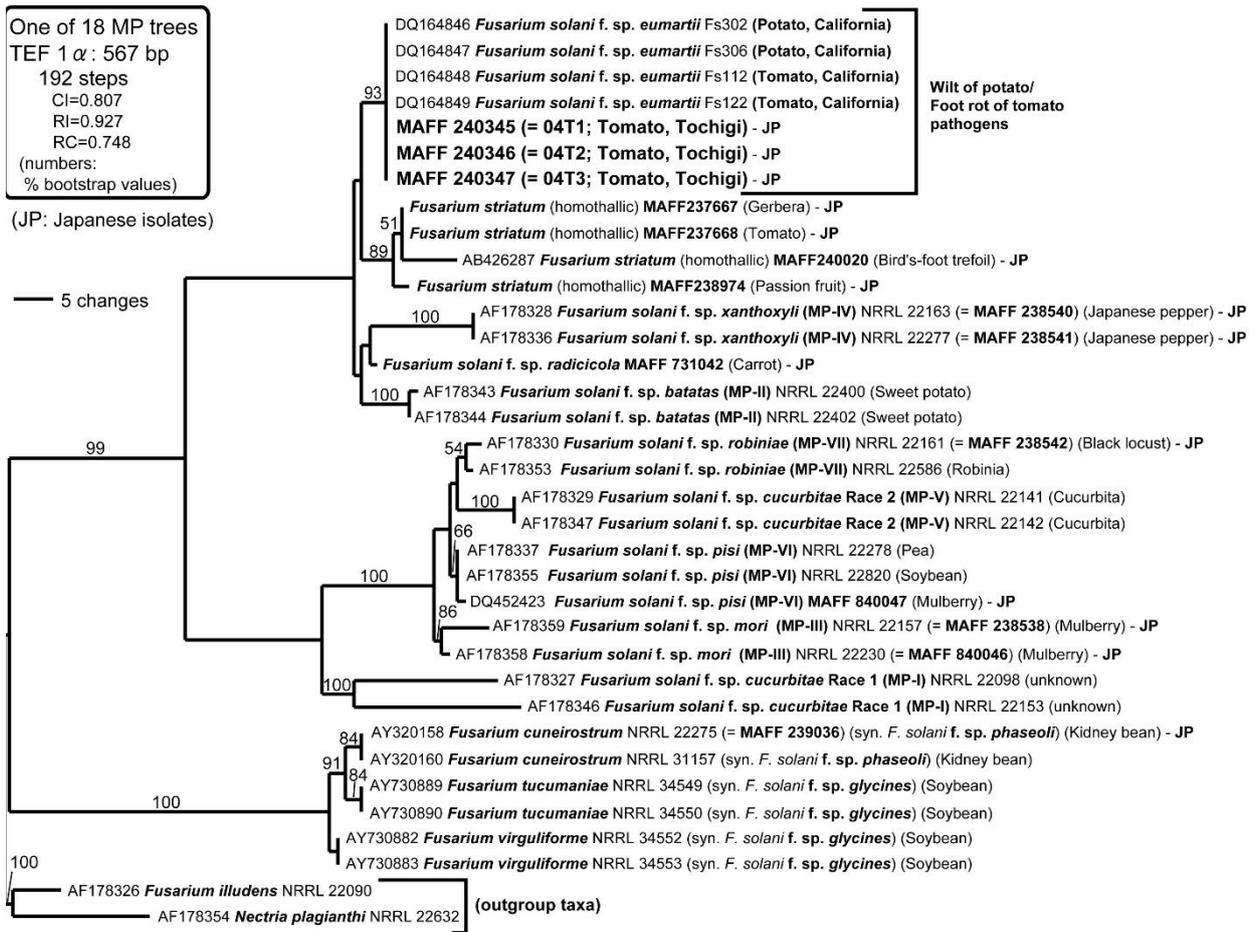


図 1-8 TEF-1  $\alpha$  遺伝子の DNA 塩基配列に基づいた最大節約系統樹

## 結果

供試 3 菌株より得られた TEF1- $\alpha$  遺伝子の DNA 塩基配列を GenBank に登録されている *F. solani* 種複合体の典型菌株のデータおよび日本産典型菌株のデータを併せて解析し、最大節約法で系統樹を作成した(図 1-8)。ギャップ配列は除去して解析を行った。その結果、分離菌株は O'Donnell による *F. solani* 種複合体のクレード 1~3 のうちクレード 3 に属していたが、これまでに知られている *F. solani* 種複合体の交配群(MP I ~ VII)のいずれとも異なる系統学的位置であった。分離菌株は, Romberg and Davis (2007) がアメリカ, カリフォルニアで発生したジャガイモの *Eumartii wilt* およびトマトの Foot rot の原因菌とした *F. solani* f. sp. *eumartii* 菌株とその TEF1- $\alpha$  遺伝子 (597 塩基対分) の塩基配列が完全に一致あるいは 99.8% 相同であった。分離菌株は Romberg and Davis (2007) による *F. solani* f. sp. *eumartii* と同一のクレードに所属した。

### 5) 小括

トマト立枯症状から分離した菌株は、トマトに対する病原性が認められ、原病徴が再現され、その形態的特徴から *F. solani* species-complex に属すと考えられた。さらに、ジャガイモに対する病原性、rDNA ITS 領域や TEF1- $\alpha$  遺伝子の解析結果から、*F. solani* f. sp. *eumartii* と同定した。本菌によるトマト病害の報告は本邦初であり、病名をトマトフザリウム株腐病と提案した(中山・青木, 2010)。

## 3 発生生態

### 1) 分生子の発芽

#### 材料および方法

#### ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

#### イ) 分生子の発芽

分離菌株を PDA 平板培地, 25°C, 暗条件で 22 日間培養し、菌叢上に形成された分生子を殺菌蒸留水に懸濁し、 $4.2 \times 10^6$ 個/ml または  $4.2 \times 10^4$ 個/ml の分生子懸濁液とした。これを PDA 平板培地に滴下しクリーンベンチ内で 30 分間乾燥させた後、培地をメスで切り取ってスライドグラス上に置床し、それをペトリ皿に入れ湿室状態にしてふたを閉じた。

その後、25°C, 暗条件で処理 3~12 時間後まで 100 個以上の分生子の発芽状況を経時的に観察した。処理 3~9 時間後の観察には  $4.2 \times 10^6$ 個/ml, 10~12 時間後の観察には  $4.2 \times 10^4$ 個/ml の分生子懸濁液をそれぞれ供試した。試験は 3 反復で行った。なお、分生子の発芽率は、発芽管がわずかでも伸長した分生子を発芽分生子として算出した。

#### 結果

分生子の発芽は、25°C, 暗条件で処理 3 時間後では認められなかった。処理 4 時間後に発芽率が 4.0% となり、その後

急激に発芽率が高まり、6 時間後に 54.4%, 8 時間後に 80.2%, 12 時間後には 96.1% に達した(図 1-9)。

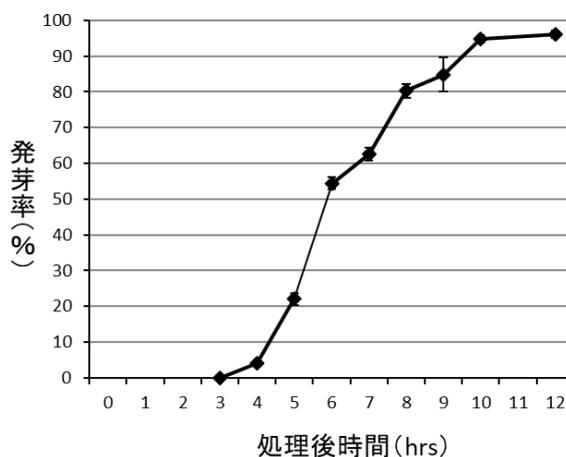


図1-9 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2菌株) の分生子発芽率(PDA上) 図中のバーは標準誤差を示す。

### 2) トマト茎に対する病原性

#### <試験 I >

#### 材料および方法

#### ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

#### イ) 供試トマト品種

品種「麗容」および「ジョイント」を供試した。

#### ウ) 接種

分離菌株を土壌ふすま培地(松尾ら, 1980)で、68 日間室温下で培養し接種源とした。ガラス温室内の 1/2000a ワグネルポットで栽培した品種「麗容」および「ジョイント」の茎(高さ約 40~70cm)に土壌ふすま培養菌を 1 か所当たり約 20mg ずつ接種し、接種部位をパラフィルム(PARAFILM® M, Pechiney Plastic Packaging Inc. Chicago, Illinois)で被覆した。接種は有傷区、無傷区を設けた。有傷区は、トマト茎を殺菌した針の束で数回軽く押しつけて傷を付けた。なお、無接種区はパラフィルムで被覆した。供試した品種「麗容」および「ジョイント」は、接種時はそれぞれ播種 68, 78 日後で、それぞれ 15, 19 葉期であった。

#### エ) 調査

接種 14 日後にパラフィルムを取り除き、接種 22 日後に接種部位での発病状況を調査し、接種菌の再分離を行った。

#### 結果

分離菌株 04T-2 土壌ふすま培養菌のトマト茎への接種により、有傷接種だけでなく無傷接種でも品種「麗容」および「ジョイント」の茎に褐色で不整形の病斑を形成し原病徴が再現され(図 1-10)、病斑部から接種菌が再分離された。また、両品

種とも茎の無病徴部位からも接種菌が再分離され、接種菌は茎の全接種部位から分離された。

供試品種の比較では、無傷接種、有傷接種とも台木品種「ジョイント」の発病率が、穂木品種「麗容」に比較してやや高かった(表 1-12)。なお、無接種区では両品種とも茎に病徴は認められなかった。

<試験Ⅱ>

材料および方法

ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

イ) 供試トマト品種

品種「麗容」および「ジョイント」を供試した。

ウ) 接種

分離菌株 04T-2 を PDA 平板培地, 25°C, 暗条件で 8 日間培養し, 分生子を殺菌蒸留水に懸濁し  $8.0 \times 10^5$  個/ml の分生子懸濁液とした。これを接種源とし, ガラス温室内の 1/2000a ワグネルポットで栽培した品種「麗容」および「ジョイント」の茎にペーパークロマトグラフ用噴霧器で無傷接種し, 接種部位をパラフィルムで 24 時間被覆した。対照としてパラフィルムで被覆しない区を設けた。なお, 無接種区は殺菌蒸留水を噴霧した。

エ) 調査

接種 28 日後に接種部位での発病状況を調査し, 接種菌の再分離を行った。供試した品種「麗容」および「ジョイント」

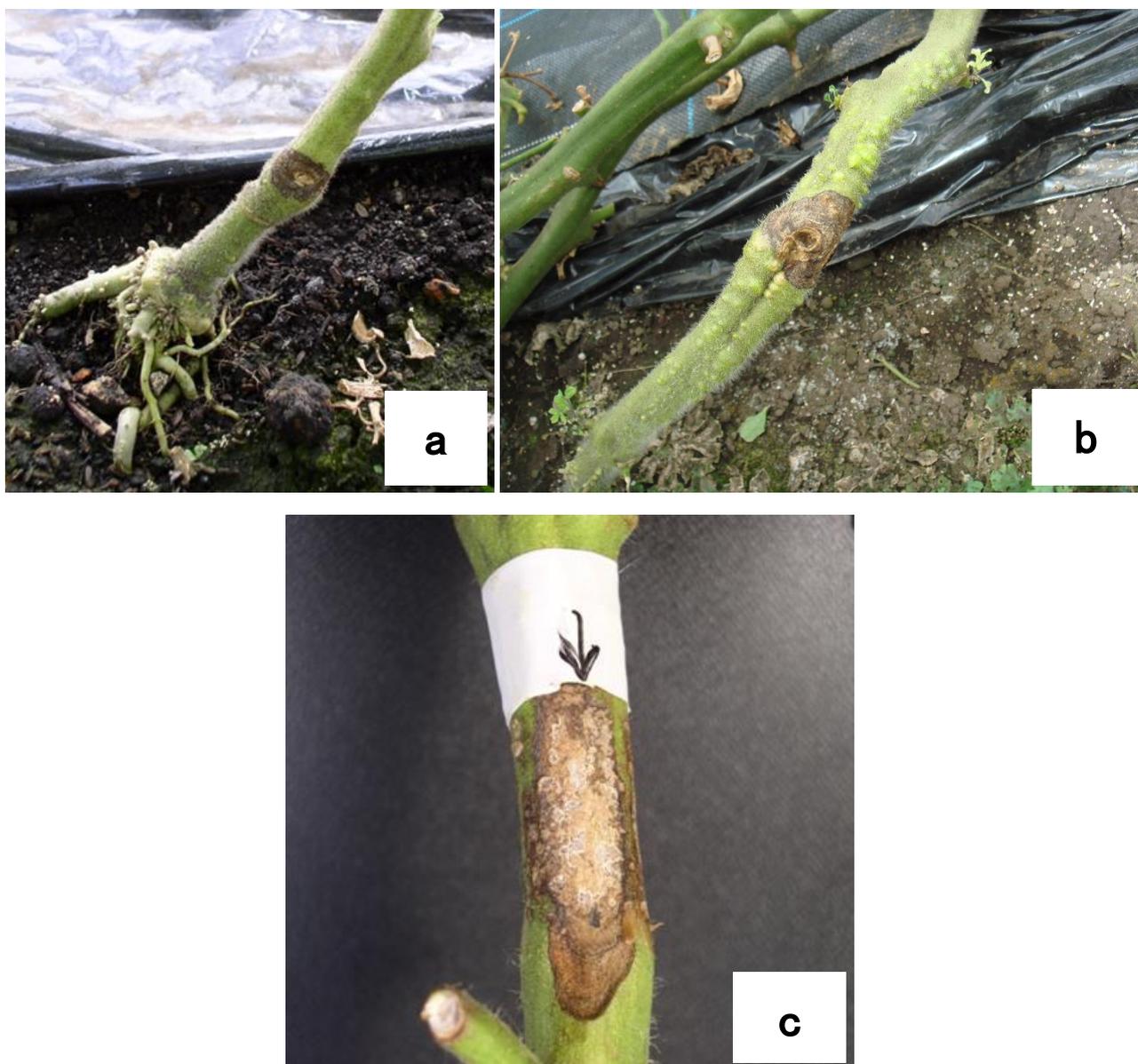


図 1-10 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2 菌株) によるトマト茎での原病徴再現 (a, b: 自然発生したトマト茎での褐変症状. a: 穂木「マイロック」, 台木「ブロック」, b: 穂木「CF 桃太郎はるか」, 台木「ブロック」), c: 接種したトマト茎での病徴. 穂木品種「麗容」)

表1-12 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2菌株) 土壌ふすま培養菌のトマト茎に対する病原性

処理区	品種名	接種法	接種か所数	発病数 <sup>a)</sup>	無病徴・再分離数 <sup>a, b)</sup>	無感染数 <sup>a, c)</sup>
接種	麗容	有傷	10	5(50)	5(50)	0(0)
	麗容	無傷	10	4(40)	6(60)	0(0)
	ジョイント	有傷	10	8(80)	2(20)	0(0)
	ジョイント	無傷	10	5(50)	5(50)	0(0)
無接種	麗容	有傷	10	0	— <sup>d)</sup>	— <sup>d)</sup>
	麗容	無傷	10	0	—	—
	ジョイント	有傷	10	0	—	—
	ジョイント	無傷	10	0	—	—

- a)カッコ内の単位は%を表す.
- b)無病徴だが接種菌が再分離されたもの.
- c)無病徴で接種菌も再分離されないもの.
- d)接種菌の再分離は未実施.

表1-13 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2菌株) 分生子懸濁液のトマト茎に対する病原性(無傷接種)

処理区	品種名	被覆	接種か所数	発病数 <sup>a)</sup>	無病徴・再分離数 <sup>a, b)</sup>	無感染数 <sup>a, c)</sup>
接種	麗容	有	15	2(13.3)	3(20.0)	10(66.7)
	麗容	無	15	0	0	15(100)
	ジョイント	有	15	5(33.3)	5(33.3)	5(33.3)
	ジョイント	無	15	0	1(6.7)	14(93.3)
無接種	麗容	有	10	0	— <sup>d)</sup>	— <sup>d)</sup>
	ジョイント	有	10	0	—	—

- a)カッコ内の単位は%を表す.
- b)無病徴だが接種菌が再分離されたもの.
- c)無病徴で接種菌も再分離されないもの.
- d)接種菌の再分離は未実施.

は、接種時は播種 62 日後で両品種とも 20 葉期であった。

#### 結果

分離菌株 04T-2 分生子懸濁液の茎への無傷接種により、品種「麗容」、「ジョイント」の両品種ともパラフィルムで被覆した区では茎の接種部位に褐色で不整形の病斑がそれぞれ 13.3%、33.3% 形成された(表 1-13)。茎の病斑部からは接種菌が再分離された。なお、両品種とも病徴が認められない接種部位からも接種菌が再分離された。

パラフィルムで接種部位を被覆しなかった区では、両品種とも病斑の形成は認められなかった。ただし、品種「ジョイント」では、1 か所の接種部位から接種菌が再分離された。品種「ジョイント」は、品種「麗容」に比較して接種部位の発病率、無病徴な部位から接種菌が再分離された割合ともやや高かった(表 1-13)。なお、無接種区では両品種とも茎に病徴は認

められなかった。

#### 3) トマト花器、果実に対する病原性

##### < 試験 I >

#### 材料および方法

##### ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

##### イ) 供試トマト品種

品種「麗容」を供試した。

##### ウ) 接種

分離菌株 04T-2 を PDA 平板培地、25℃、暗条件で 10 日間培養し、分生子を殺菌蒸留水に懸濁し 7.5×10<sup>5</sup>個/ml の分生子懸濁液とした。これを接種源にして、殺菌土壌を詰めた 1/2000a ワグネルポットで栽培したトマト品種「麗容(穂木品種)」の花器および果実(直径 20~30mm) にペーパークロマト

グラフ用噴霧器で接種した。

供試した品種「麗容」は、接種時は播種 72 日後で 12~13 葉期のものとした。接種は有傷区および無傷区を設けた。有傷区は、殺菌した針の束(昆虫針 4 号, 約 60 本, 以下同じ)で果実の果頂部を数回軽く押して傷を付けた。花器は無傷区のみとした。対照は殺菌蒸留水を花器および果実へ噴霧した。接種後、花器および果実をポリエチレン袋で 21 時間覆い、温室状態とした。その後、ポリエチレン袋を取り除き、ガラス温室内で管理した。

エ) 調査

接種 13 日後に果実, 21 日後に花器での発病状況をそれぞれ調査し、接種菌の再分離を行った。なお、接種菌の再分離は果頂部位を約 3mm 角に切り取り、または花器の雌蕊を長さ約 3mm に切断し、それを 70%エタノールに約 30 秒間浸漬して表面殺菌し、殺菌蒸留水で洗浄し殺菌濾紙で水滴をとった後、PDA 培地へ置床した。以後の試験においても接種菌の再分離は同様に行った。

結果

分離菌株 04T-2 の接種により、品種「麗容」の花器では柱頭付近から褐変がはじまり、しだいに枯死し落花するものが認められた。接種に供試した花器の 80.8%で発病が認められ、病斑部から接種菌が再分離された。また、花器では、無病徴であるが接種菌の再分離された個体が供試した花器の 3.8%で確認された(表 1-14)。対照とした無接種区の花器では病徴は認められなかった。

果実については、有傷接種では供試した品種「麗容」の全果実で果実腐敗がみられたのに対し、無傷接種では発病率が 12.5 %であり、有傷接種に比較して発病率は著しく低かった。果実での病徴は、はじめ果頂部の花柱基部付近に水浸状の褐変した病斑を生じ、しだいに果梗部へ拡大し果実腐敗を呈した(図 1-11)。発病果実の病斑部からは接種菌が再分

離された。また、無傷接種において、病徴が認められない果実の花柱基部付近からも接種菌が再分離され、その割合は供試果実の 50.0%に達した(表 1-14)。なお、対照とした無接種区の果実では病徴は認められなかった。

< 試験 II >

材料および方法

ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

イ) 供試トマト品種

品種「麗容」を供試した。

ウ) 接種

分離菌株 04T-2 の  $5.5 \times 10^5$  個/ml に調整した分生子懸濁液を、殺菌土壌を詰めた 1/2000a ワグネルポットで栽培した品種「麗容」の異なる大きさの果実(小:直径 30~45mm, または中:50~65mm)にペーパークロマトグラフ用噴霧器でそれぞれ無傷接種した。供試した品種「麗容」は、接種時は播種 99 日後で 21~22 葉期のものとした。接種した果実をポリエチレン袋で 18 時間覆い、温室状態で保持した。

その後、ポリエチレン袋を取り除き、ガラス温室内で管理した。

エ) 調査

接種 7 日後に果実での発病状況を調査し、接種菌の再分離を行った。

結果

試験 I で無傷接種した果実においても病原性が認められたことから、それを再確認するために試験 II を実施した。分離菌株 04T-2 を品種「麗容」の異なる大きさの果実に無傷接種したところ、供試果実「小(直径 30~45mm)」, 「中(直径 50~65mm)」のそれぞれ 9.1%, 34.8%に病徴が認められ、病斑部から接種菌が再分離された(表 1-15)。

接種に供試した果実のうち、病徴が認められない果実から

表1-14 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2 菌株) のトマト<sup>a)</sup>花器, 果実に対する病原性

処理区	接種部位	接種法	供試数	発病数 <sup>b)</sup>	無病徴・再分離数 <sup>b,c)</sup>	無感染数 <sup>b,d)</sup>
接 種	花器	無傷	26	21(80.8)	1(3.8)	4(15.4)
	果実	有傷	26	26(100)	0(0)	0(0)
	果実	無傷	24	3(12.5)	12(50.0)	9(37.5)
無接種	花器	無傷	35	0	0	35
	果実	有傷	21	0	0	21
	果実	無傷	20	0	— <sup>e)</sup>	— <sup>e)</sup>

a) 品種「麗容」を供試した。

b) カッコ内の単位は%を表す。

c) 無病徴だが接種菌が再分離されたもの。

d) 無病徴で接種菌も再分離されないもの。

e) 接種菌の再分離は未実施。

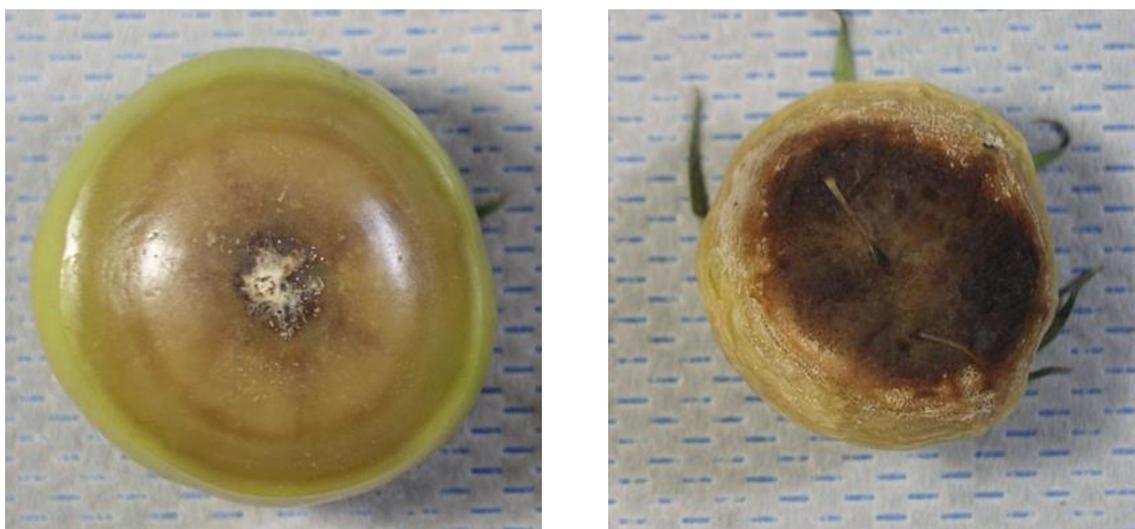


図 1-11 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2 菌株) を接種したトマト果実での病徴(品種「麗容」)

表1-15 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2 菌株) の異なる大きさのトマト果実(品種「麗容」)に対する病原性(無傷接種)

処理区	果実の大きさ <sup>a)</sup>	供試数	発病数 <sup>b)</sup>	無病徴・再分離数 <sup>b, c)</sup>	無感染数 <sup>b, d)</sup>
接種	30-45mm	22	2(9.1)	9(40.9)	11(50.0)
	50-65mm	23	8(34.8)	6(26.1)	9(39.1)
無接種	30-45mm	26	0	— <sup>e)</sup>	— <sup>e)</sup>
	50-65mm	21	0	—	—

a) 果実の直径.

b) カッコ内の単位は%を表す.

c) 無病徴だが接種菌が再分離されたもの.

d) 無病徴で接種菌も再分離されないもの.

e) 接種菌の再分離は未実施.

表1-16 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2 菌株) 接種後の経過時間とトマト果実<sup>a)</sup>発病(有傷接種)

処理区	供試数	発病数 <sup>b)</sup>					
		12	24	36	48	72	96hrs <sup>c)</sup>
接種	20	0	0	0	8(40.0)	17(85.0)	19(95.0)
無接種	20	0	0	0	0	0	0

a) 品種「麗容」

b) カッコ内の単位は%を表す.

c) 接種後の経過時間を表す.

も接種菌が再分離され、その割合はそれぞれ供試果実の 40.9%, 26.1%であった。発病果実および無病徴であるが接種菌の再分離された果実の合計は、供試果実のうち「小」が 50.0%, 「中」が 60.9%であった(表 1-15)。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

#### <試験Ⅲ>

##### 材料および方法

###### ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

###### イ) 供試トマト品種

品種「麗容」を供試した。

###### ウ) 接種

ガラス温室内の 1/5000a ワグネルポットで栽培した品種「麗容」の果実(直径約 35mm)を採取し、それらに分離菌株 04T-2 を有傷接種した。有傷接種は、果実の果頂部を殺菌した針の束で数回軽く押しつけて傷を付け、 $2.0 \times 10^6$ 個/ml に調整した分生子懸濁液を果実当たり 40~60 $\mu$ l ずつ果頂部に滴下し行った。なお、対照区は殺菌蒸留水を果頂部へ滴下した。

###### エ) 調査

接種後、直ちに温室状態とし、25 $^{\circ}$ C、暗条件下に置き、12、24、36、48、72 および 96 時間後に発病状況を調査した。

##### 結果

採取した品種「麗容」の果実に分離菌株 04T-2 の分生子懸濁液を接種し、25 $^{\circ}$ C、暗条件下での発病状況を経時的に調査したところ、接種 12~36 時間後までは発病がみられなかったが、接種 48 時間後には供試果実の 40.0%に接種部位である果頂部から果実腐敗が認められ、72 時間後には 85.0%、96 時間後には 95.0%となった(表 1-16)。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

#### 4) トマト市販種子からの分離

##### 材料および方法

市販種子であるトマト台木品種「がんばる根 3 号」の種子を種子袋からピンセットで取り出し、それぞれ駒田培地(駒田, 1980)および PDA 平板培地に置床し、25 $^{\circ}$ C、暗条件下で培養し、置床 14 日後に種子からの *Fusarium* 属菌の検出状況を調査した。駒田培地には計 308 粒、PDA 平板培地には計 293 粒を供試した。なお、種子袋にはキャプタン剤処理済との記載があった。

##### 結果

駒田培地、PDA 平板培地のいずれの培地とも、置床した種子からの *Fusarium* 属菌の検出は認められなかった。

#### 4 薬剤感受性

トマトフザリウム株腐病菌については、これまで有効な防除薬剤に関する知見はない。そこで、今後の防除

対策に役立てるため、トマトに農薬登録のある主要薬剤を供試して本病菌の薬剤感受性を検討した。

#### 1) 最小生育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration : MIC)

##### 材料および方法

###### ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 の 3 菌株を供試した。

###### イ) 供試薬剤

ベノミル水和剤、チオファネートメチル水和剤、イプロジオン水和剤、トリフルミゾール水和剤、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤、アゾキシストロビン水和剤およびキャプタン水和剤の計 7 薬剤を供試した。

###### ウ) 検定

分離菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 を PDA 培地で前培養し、それぞれの菌叢をコルクボーラー(直径 4mm)で打ち抜き、薬剤添加培地へ菌叢面を下にして置床し、25 $^{\circ}$ C、暗条件下で培養した。なお、薬剤添加培地は、供試薬剤の有効成分がそれぞれ 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 $\mu$ g/ml となるように 2 倍段階希釈により PDA 培地で作製した。対照は供試菌株を薬剤無添加培地(PDA 培地)へ置床した。1 処理当たりペトリ皿は 1 枚供した。

###### エ) 調査

置床 2 日後および 5 日後に供試菌株の菌糸伸長の有無を調査し、最小生育阻止濃度(MIC)を判定した。

##### 結果

各薬剤添加培地への置床 2 日後、供試した 3 菌株の MIC は、ベノミル水和剤、チオファネートメチル水和剤がそれぞれ 25 $\mu$ g/ml、トリフルミゾール水和剤が 400 $\mu$ g/ml であった。イプロジオン水和剤、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤、アゾキシストロビン水和剤およびキャプタン水和剤は 3 菌株とも 1600 $\mu$ g/ml で菌糸伸長が認められ、MIC は 1600 $\mu$ g/ml より大きいと判定した。なお、置床 5 日後では、供試した 3 菌株はいずれの供試薬剤とも MIC が 1600 $\mu$ g/ml より大きかった(表 1-17)。

#### 2) チオファネートメチル剤に対する感受性

##### 材料および方法

###### ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-1, 04T-2, 04T-3 および他の県内分離菌株 13 菌株を用いた。なお、この 13 菌株についてはトマト主要産地から発病株を採取し、常法により病原菌を分離し単胞子分離した後、菌の形態観察およびトマトに対する病原性を確認した。

###### イ) 供試薬剤

チオファネートメチル水和剤を供試した。

ウ) 検定

供試菌株(計 16 菌株)を PDA 培地で前培養し、それぞれの菌叢をチオファネートメチル水和剤の有効成分が 100µg/ml, 400µg/ml になるように添加した PDA 平板培地へ菌叢面を下にして置床し、25°C, 暗条件で培養した。対照は供試菌株を PDA 平板培地へ置床した。1 処理当たりペトリ皿は 3 枚供した。

エ) 調査

置床 6 日後に供試菌株の菌糸伸長の有無を調査した。

結果

MIC の置床 5 日後調査では、ベノミル水和剤およびチオファネートメチル水和剤とも MIC は 1600µg/ml より大きいと判定されたが、置床 2 日後調査ではベノミル水和剤およびチオファネートメチル水和剤とも有効成分 25µg/ml で供試菌株の菌糸伸長が認められなかった。そのため、ベノミル水和剤およびチオファネートメチル水和剤は供試菌株 04T-1, 04T-2 および 04T-3 以外の菌株に対して実用濃度付近で菌糸伸長を抑制する可能性もあると考えられた。そこで、チオファネートメチル水和剤を供試薬剤とし、計 16 菌株を供試して有効成分 100µg/ml, 400µg/ml における菌糸伸長の有無を調査した。

その結果、供試した計 16 菌株は、いずれもチオファネートメチル水和剤の 100µg/ml, 400µg/ml で菌糸伸長がみられ、分離菌株の違いによって感受性に差は認められなかった(表 1-18)。なお、供試菌株は、両濃度での菌糸伸長は認められたが、それぞれの菌糸伸長量は強く抑制されていた。

3) 菌糸伸長抑制率

材料および方法

ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

イ) 供試薬剤

ベノミル水和剤、チオファネートメチル水和剤、イプロジオン水和剤、トリフルミゾール水和剤、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤、アゾキシストロビン水和剤、キャプタン水和剤の計 7 薬剤を供試した。

ウ) 検定

分離菌株 04T-2 を PDA 培地で前培養し、その菌叢をコルクボーラー(直径 4mm)で打ち抜き、各薬剤がそれぞれ実用濃度となるように添加した PDA 平板培地へ菌叢面を下にして置床し、25°C, 暗条件で培養した。実用濃度として、ベノミル水和剤 2000 倍(有効成分 250µg/ml に相当、以下同じ)、チオファネートメチル水和剤 1500 倍(467µg/ml)、イプロジオン水和剤 3000 倍(167µg/ml)、トリフルミゾール水和剤 3000 倍(100µg/ml)、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤 2000 倍(200µg/ml)、アゾキシストロビン水和剤 2000 倍(100µg/ml)、キャプタン水和剤 800 倍(1000µg/ml)にそれぞれ設定した。

対照は供試菌株を PDA 平板培地へ置床した。1 処理当たりペトリ皿は 5 枚供した。

エ) 調査

置床 5 日後にそれぞれの菌叢直径を計測し、次式により菌糸伸長抑制率を算出した。

$$\text{菌糸伸長抑制率} = 100 - \left[ \frac{\text{各処理区の菌叢直径} - 4\text{mm}}{\text{対照区の菌叢直径} - 4\text{mm}} \right] \times 100$$

結果

分離菌株 04T-2 は、前記の主要薬剤を実用濃度に設定した各薬剤添加培地において菌糸の伸長が認められた。菌糸伸長抑制率は、アゾキシストロビン水和剤で 35.6%と低かったが、トリフルミゾール水和剤、キャプタン水和剤はそれぞれ 94.0%、ベノミル水和剤、チオファネートメチル水和剤はそれぞれ 91.8%、86.8%と高かった(表 1-17)。

4) 分生子の発芽抑制

材料および方法

ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

イ) 供試薬剤

ベノミル水和剤、チオファネートメチル水和剤、イプロジオン水和剤、トリフルミゾール水和剤、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤、アゾキシストロビン水和剤、キャプタン水和剤の計 7 薬剤を供試した。

ウ) 検定

分離菌株 04T-2 を PDA 培地で前培養し殺菌蒸留水を加えて分生子懸濁液の濃度を 10<sup>6</sup> 個/ml に調整した。これを 0.5µl ずつ実用濃度(3)のウ)に同じ)に設定した各薬剤添加培地へ滴下した。対照は分生子懸濁液を PDA 培地へ滴下した。1 処理当たりペトリ皿は 5 枚供した。

エ) 調査

25°C, 暗条件で 5 日間培養した後、それぞれ 100 個以上の分生子について発芽の有無を調査した。なお、発芽管がわずかでも伸長した分生子を発芽分生子とした。

結果

分離菌株 04T-2 は、キャプタン水和剤を実用濃度に設定した PDA 培地上では分生子の発芽が認められなかった(表 1-17)。他の薬剤では、調査した分生子のすべてで発芽が確認され、供試薬剤の違いによって発芽率に差は認められなかった。

表1-17 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) の薬剤感受性

供試薬剤	最小生育阻止濃度 (μg/ml) <sup>a)</sup>		菌糸伸長抑制率 (%) <sup>b) c)</sup>	分生子発芽 <sup>b) d)</sup>
	2日後	5日後		
ベノミル水和剤	25	1600<	91.8	+
チオファネートメチル水和剤	25	1600<	86.8	+
イプロジオン水和剤	1600<	1600<	65.2	+
トリフルミゾール水和剤	400	1600<	94.0	+
イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤	1600<	1600<	68.5	+
アゾキシストロピン水和剤	1600<	1600<	35.6	+
キャプタン水和剤	1600<	1600<	94.0	-
対照				+

a) 分離菌株04T-1, 04T-2, 04T-3を供試した。

b) 分離菌株04T-2を供試した。

c) 各薬剤添加培地への置床5日後に調査した。

d) 分生子の発芽が認められたものを+, 認められなかったものを-とした。

表1-18 栃木県内から分離したトマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) のチオファネートメチル剤に対する感受性

供試菌株	対照 <sup>a)</sup>	チオファネートメチル水和剤 <sup>a)</sup>	
		100μg/ml	400μg/ml
04T-1	+	+	+
04T-2	+	+	+
04T-3	+	+	+
07KT-1	+	+	+
07MT-1	+	+	+
07MT-2	+	+	+
07MT-3	+	+	+
07ST-5	+	+	+
07ST-6	+	+	+
07UT-1	+	+	+
07UT-2	+	+	+
07UT-3	+	+	+
07UT-4	+	+	+
07UT-5	+	+	+
07UT-6	+	+	+
07UT-7	+	+	+

a) 菌糸の伸長が認められたものを+とした。

## 5 ジャガイモ利用による他土壌病原菌との識別

トマトフザリウム株腐病は、土壌病害のため発病後の防除手段は限られている。そのため、トマト作付前に栽培圃場が本菌に汚染されているかどうかを判定する技術の開発は、本病の防除対策を構築するうえで極めて有用性が高いと考えられる。

第1章の冒頭部分で述べたように、これまで各種病原菌で土壌からの簡易な検出技術開発への取り組みが行われてきた。しかし、現状ではトマト栽培圃場における本菌の有無を簡易に判定できる有効な手段はない。

トマトフザリウム株腐病菌は、トマトのみでなくジャガイモに対しても病原性を有し、その茎基部に褐色で腐敗した病斑を生ずる (Romberg and Davis, 2007; 中山・青木, 2010)。そこで、ジャガイモマイクロチューバーを用いて本菌を土壌から簡易に検出する方法の開発に取り組んだ。

### 1) ジャガイモ各品種に対する病原性

材料および方法

ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

イ) 供試ジャガイモ品種

品種「男爵薯」、「ニシユタカ」、「農林1号」および「メークイン」の計4品種を供試した。

ウ)接種

分離菌株 04T-2 を土壌ふすま培地で 25℃, 27 日間培養後, 殺菌土壌(110℃, 70 分, オートクレーブ処理)に重量で 0.5%の割合で混和し, 保菌土壌を作製した. ジャガイモ各品種のマイクロチューバーを, 保菌土壌を入れた黒ポリポット(直径 15cm, 以下同じ)にそれぞれ植え付けた.

供試したマイクロチューバーは, 品種「男爵薯」が直径 10~12mm, 品種「ニシユタカ」が 12~13mm, 品種「農林 1 号」が 12~13mm, 品種「メークイン」が 14~18mm×7~10mm であった. 試験はガラス温室内(15~35℃, 以下同じ)で行った. マイクロチューバーは各品種とも 13 個ずつ供試した. 対照として, 本菌を含まない殺菌土壌を用いて各品種 5 個ずつ供試した.

エ)調査

接種 35 日後に株を抜き取り地下部の発病状況を調査した. また, 病斑がみられたすべての接種植物について, 病斑部から接種菌の再分離を行った. 再分離は, 病斑部を水道水で十分に洗浄した後, 約 3mm 角に切り取り, 70%エタノールに約 30 秒間浸漬後, 殺菌蒸留水で洗浄し, 殺菌濾紙で水滴を取り除いてから PDA 培地に置床した. 分離菌の形態的な特徴から接種菌と同一かどうかを判定した.

結果

「男爵薯」, 「ニシユタカ」, 「農林1号」, 「メークイン」のいずれの品種とも, マイクロチューバーから萌芽した植物体の茎基部と根の境界付近, または植え付けたマイクロチューバーが淡褐色~褐色に変色し腐敗した. 植え付け35日後における各品種の発病率は, 「男爵薯」, 「メークイン」が100%, 「ニシユタカ」が92.3%, 「農林1号」は23.1%であった(表1-19). 接種植物の病斑部から接種菌が再分離された. なお, 無接種区では, いずれの品種も病徴は認められなかった.

2) 土壌の保菌程度と発病

材料および方法

ア)供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した.

イ)供試ジャガイモ品種

品種「男爵薯」を供試した.

ウ)接種

分離菌株04T-2を土壌ふすま培地で室温, 31日間培養後, 殺菌土壌にそれぞれ0, 0.05, 0.1, 0.5, 1%の割合で混和し, 保菌土壌を作製した. 品種「男爵薯」のマイクロチューバーをそれぞれの保菌土壌を入れた黒ポリポットに植え付けた(土壌接種). 試験はガラス温室内で行った.

エ)調査

接種55日後に株を抜き取り地下部の発病状況を調査した. マイクロチューバーは各区15個ずつ供試した. 病斑がみられたすべての接種植物について, 病斑部から接種菌の再分離を行った.

結果

本菌の殺菌土壌への混和割合が 0.05~1%のいずれにおいても, 品種「男爵薯」のマイクロチューバーから萌芽した植物体の茎基部と根の境界付近が淡褐色~褐色となり腐敗した. 混和割合に応じて発病率が高くなる傾向がみられた(表 1-20). また, 接種植物の病斑部から接種菌が再分離された.

3) 保菌土壌への植え付け後日数と発病

材料および方法

ア)供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した.

イ)供試ジャガイモ品種

品種「男爵薯」を供試した.

表1-19 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2菌株) のジャガイモ各品種に対する病原性

処理区	品種名	供試数	発病数 <sup>a)</sup>	発病率(%)
接種	男爵薯	13	13	100
	ニシユタカ	13	12	92.3
	農林1号	13	3	23.1
	メークイン	13	13	100
無接種	男爵薯	5	0	0
	ニシユタカ	5	0	0
	農林1号	5	0	0
	メークイン	5	0	0

a)ジャガイモの茎基部と根との境界付近, または植え付けたマイクロチューバーに病徴が認められたもの.

表1-20 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2菌株)の保菌程度とジャガイモ「男爵薯」の発病状況

処理区 <sup>a)</sup>	供試数	発病数 <sup>b)</sup>	発病率(%)
1%	15	12	80.0
0.5%	15	13	86.7
0.1%	15	6	40.0
0.05%	15	4	26.7
0%	15	0	0

a)分離菌株04T-2土壌ふすま培養菌の殺菌土壌への混和割合を表す。

b)ジャガイモの茎基部と根との境界付近、または植え付けたマイクロチューバーに病徴が認められたもの。

表1-21 トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*)<sup>a)</sup> 保菌土壌へのジャガイモ植え付け後日数と発病状況

	発病数/供試数 <sup>b)</sup>			
	14日後 <sup>c)</sup>	20日後 <sup>c)</sup>	27日後 <sup>c)</sup>	35日後 <sup>c)</sup>
接種	8/13(61.5)	12/13(92.3)	12/13(92.3)	13/13(100)
無接種	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)

a)分離菌株04T-2

b)品種「男爵薯」のマイクロチューバーを供試した。

c)ジャガイモの茎基部と根との境界付近、または植え付けたマイクロチューバーに病徴が認められたもの。カッコ内は%を表す。

表1-22 供試菌(トマト各種土壌病原菌)

病名	病原菌名	菌株名	MAFF No.	採集地
トマトフザリウム株腐病	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>eumartii</i>	04T-2	240346	栃木県
トマト萎凋病	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	宇都宮	103042	栃木県
トマト根腐萎凋病	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	RJN1	238905	岐阜県
トマト立枯病	<i>Haematonectria ipomoeae</i> ( <i>F. striatum</i> )	MTN-4	239972	宮崎県
トマト株腐病	<i>Rhizoctonia solani</i>	O1-1	241953	北海道

ウ)接種

分離菌株 04T-2 を土壌ふすま培地で 25°C, 27 日間培養後、殺菌土壌に 0.5%の割合で混和し、保菌土壌を作製した。保菌土壌を入れた黒ポリポットに品種「男爵薯」のマイクロチューバーを植え付けた(土壌接種)。試験はガラス温室内で行った。マイクロチューバーは各区 13 個ずつ供試した。対照として、本菌を含まない殺菌土壌を用いた。

エ)調査

接種 14, 20, 27, 35 日後に株を抜き取り、地下部の発病状

況を調査した。病斑がみられたすべての接种植物について、病斑部から接種菌の再分離を行った。

結果

マイクロチューバーの保菌土壌への植え付け14日後には、マイクロチューバーの表面に直径1~3mmのほぼ円形でやや陥没した灰褐色の病斑が形成され、萌芽した植物体の根部の一部に褐変が認められた。植え付け20日後では、植え付けたマイクロチューバーでの病徴がさらに進展し軟化腐敗を呈するとともに、萌芽した植物体の茎基

部に褐変腐敗が認められた。植え付け20日後以降、ほぼすべての株に病徴がみられた(表1-21)。また、接種植物の病斑部から接種菌が再分離された。なお、無接種区では病徴は認められなかった。

#### 4) 各種土壌病原菌のジャガイモに対する病原性

##### <試験I>

##### 材料および方法

##### ア) 供試菌

トマトフザリウム株腐病菌, トマト萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*), トマト根腐萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*), トマト立枯病菌 (*Haematonectria ipomoeae*: 異名 *F. striatum*) およびトマト株腐病菌 (*Rhizoctonia solani*) を供試した(表 1-22)。

##### イ) 供試ジャガイモ品種

品種「男爵薯」を供試した。

##### ウ) 接種

各種土壌病原菌を土壌ふすま培地で25°C, 25日間培養後, 1/5000aワグネルポット中の殺菌土壌にそれぞれ1%の割合で混和し, 品種「男爵薯」のマイクロチューバーを植え付けた(土壌接種)。試験はガラス温室内で行った。マイクロチューバーは各区14~16個ずつ供試した。

##### エ) 調査

接種41日後に株を抜き取り地下部の発病状況を調査した。病斑がみられたすべての接種植物について, 病斑部から接種菌の再分離を行った。

##### 結果

供試した5種土壌病原菌のうち, トマトフザリウム株腐病菌, トマト立枯病菌およびトマト株腐病菌は, 品種「男爵薯」に対する病原性が認められた(表1-23)。トマト立枯病菌は, 品種「男爵薯」の萌芽した植物体の茎基部, 特に根部との境界付近にトマトフザリウム株腐病菌による病徴と類似した淡褐色~褐色に変色する腐敗を呈し, 病徴の違いによる両菌の識別は困難であった(図1-12)。トマト株腐病菌は, 品種「男爵薯」の匍枝に褐色で条状の病斑が形成された。また, 接種植物の病斑部から接種菌が再分離された。なお, 無接種区では病徴は認められなかった。

##### <試験II>

##### 材料および方法

##### ア) 供試菌

トマトフザリウム株腐病菌およびトマト立枯病菌を供試した。

##### イ) 供試ジャガイモ品種

品種「男爵薯」を供試した。

##### ウ) 接種

トマト立枯病菌の品種「男爵薯」に対する病原性を再確認するため, トマトフザリウム株腐病菌およびトマト立枯病菌をそ

れぞれ土壌ふすま培地で25°C, 70日間培養し, 1/5000aワグネルポット中の殺菌土壌にそれぞれ1%の割合で混和し保菌土壌とした後, 品種「男爵薯」のマイクロチューバーを植え付けた(土壌接種)。マイクロチューバーは各区12個ずつ供試した。

##### エ) 調査

接種36日後に株を抜き取り地下部の発病状況を調査した。病斑がみられたすべての接種植物について, 病斑部から接種菌の再分離を行った。

##### 結果

トマトフザリウム株腐病菌, トマト立枯病菌のジャガイモへの土壌接種の結果, 両菌とも品種「男爵薯」の茎基部, 特に根部との境界付近が褐変腐敗を呈し, 発病率はそれぞれ58.3%, 33.3%であった(表 1-24)。また, 接種植物の病斑部から接種菌が再分離された。なお, 無接種区では病徴は認められなかった。

## 6 嫌氣的発酵処理による不活化

植物病害の防除対策上, 罹病残渣の適切な処理は病原菌の伝染環を断ち切る有効な手段の一つである。第 1 章の冒頭部分で述べたように, 他の病害では罹病残渣中の病原菌の不活化に嫌氣的発酵処理が有効であるとの報告がある。

そこで, 嫌氣的発酵処理によるトマトフザリウム株腐病菌の不活化について検討した。

### 1) トマトフザリウム株腐病罹病切片の作製

#### 材料および方法

##### ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

##### イ) 供試罹病切片の作製

トマトへの接種は, 分離菌株 04T-2 を土壌ふすま培地で25°C, 59日間培養し, それを1/2000aワグネルポット中の殺菌土壌に重量で1%の割合になるよう混和し保菌土壌とした後, 殺菌土壌で育苗したトマト苗(品種「ジョイント」, 約2.0葉期)を移植した(土壌接種)。接種137日後に株を抜き取り, トマトの主根に形成された病斑を約3mm×3mm×1mmに切り出して罹病切片とした。

罹病切片を不織布の袋(ふんわりお茶パック®M, 9.5×7.0cm; 株式会社トキワ工業, 四国中央)に9切片ずつ詰め, それをポリ袋に入れて冷蔵庫(6°C)内で保存し, 以後の試験に供した。



図 1-12 ジャガイモ品種「男爵薯」の地下部病徴

左: トマトフザリウム株腐病菌 (04T-2 菌株) 接種, 右: トマト立枯病菌 (MTN-4 菌株) 接種

表 1-23 トマト各種土壌病原菌のジャガイモ品種「男爵薯」に対する病原性 (土壌接種)

病原菌名	菌株名	供試数	発病数 <sup>a)</sup>	発病率 (%)
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>eumartii</i>	04T-2	16	8	50.0
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	宇都宮	15	0	0
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	RJN1	16	0	0
<i>F. striatum</i>	MTN-4	14	5	35.7
<i>Rhizoctonia solani</i>	O1-1	15	7	46.7
無接種	—	16	0	0

a) ジャガイモの茎基部と根との境界付近に病徴が認められたもの。ただし, *Rhizoctonia solani* 接種区では匍枝に病徴が認められたものを示す。

表 1-24 2種 *Fusarium* 属菌のジャガイモ品種「男爵薯」に対する病原性 (土壌接種)

病原菌名	菌株名	供試数	発病数 <sup>a)</sup>	発病率 (%)
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>eumartii</i>	04T-2	12	7	58.3
<i>F. striatum</i>	MTN-4	12	4	33.3
無接種	—	12	0	0

a) ジャガイモの茎基部と根との境界付近に病徴が認められたもの。

2) 嫌氣的発酵処理による不活化

<試験 I>

材料および方法

ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

イ) 不活化

トマト栽培圃場から採取した葉をポリ袋(ポリ規格袋 No. 11, 0.03×200×300mm; 株式会社シモジマ, 台東区)に 350g ずつ詰め, その中心部に罹病切片入りの袋を置いた。なお, トマト葉は, 嫌氣的発酵処理による本菌不活化の実用場面を想定し供試した。ポリ袋にはトマト葉の重さの 50%となるよう 175ml の水道水を添加した区と添加しない区を設けた。

嫌氣的発酵区では, ポリ袋内の空気を排出し, ひもで口を縛って密封した。それを同規格のポリ袋に入れ, 空気を排出し, ひもで口を縛って密封した。対照区は, ポリ袋の口をひもで縛らず開放状態とした。これを 20℃または 25℃で, 暗条件に設定したインキュベーター内に置いた。

処理期間は 0, 14, 28, 42, 56 日間の 5 段階とした。処理後, 各ポリ袋から罹病切片を入れた袋を取り出し, 罹病切片から殺菌濾紙で水滴を取った後, 罹病切片を Fo-G2 培地(西村, 2008)に置床した。20℃, 暗条件で 14 日間培養し, 罹病切片からの菌糸伸長や分生子形成の有無を調査し, 本菌の生存の有無を判定した。

結果

対照区では, 20℃, 25℃とも水添加の有無にかかわらず, 0, 14, 28, 42, 56 日経過後も罹病切片から Fo-G2 培地上での本菌の菌糸伸長が認められた。同様に, 嫌氣的発酵区のいずれの処理区も, 罹病切片から本菌の菌糸伸長が認められた(表 1-25)。

<試験 II>

材料および方法

ア) 供試菌株

トマトフザリウム株腐病菌の分離菌株 04T-2 を供試した。

イ) 不活化

本試験では, トマト栽培圃場から採取した葉を試験 I と同規格のポリ袋に 300g ずつ詰め, その中心部に罹病切片入りの袋を置いた。ポリ袋にはトマト葉の重さの 50%となるよう 150ml の水道水を添加した区と添加しない区を設けた。以後の処理は試験 I に準じ, 嫌氣的発酵区と対照区を設けた。また, 処理期間は 0, 28, 56, 84, 112, 140 日間の 6 段階とした。

結果

対照区では, 20℃, 25℃のいずれも水添加の有無にかかわらず, 0, 28, 56, 84, 112, 140 日経過後, Fo-G2 培地上で罹病切片からの本菌の菌糸伸長が認められた(表 1-26)。

嫌氣的発酵区については, 20℃では処理 140 日後でも罹病切片から本菌の菌糸伸長が認められた。25℃では, 処理 112 日後まで本菌の菌糸伸長がみられたが, 140 日後には水添加の有無にかかわらず, Fo-G2 培地上で罹病切片からの本菌の菌糸伸長は認められなかった(表 1-26)。

7 考察

2004 年 5~6 月, 栃木県宇都宮市および真岡市の施設栽培トマトで茎の基部および主根が激しく褐変腐敗し, 病勢が進展すると立枯症状を呈する病害が発生した。病斑部から *Fusarium* 属菌が高率に分離され, 分離菌株の土壤接種によりトマトでの原病徴が再現され, 接種菌が再分離された。また, 分離菌株は, 土壤接種によりジャガイモ茎の基部や塊茎の表

表1-25 嫌氣的発酵処理のトマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2 菌株) に対する防除効果(試験 I)

処理区	処理温度 (°C)	水添加 の有無	処 理 日 数				
			0日	14日後	28日後	42日後	56日後
嫌氣的発酵	25	有	+ <sup>a)</sup>	+	+	+	+
	25	無	+	+	+	+	+
	20	有	+	+	+	+	+
	20	無	+	+	+	+	+
対 照	25	有	+	+	+	+	+
	25	無	+	+	+	+	+
	20	有	+	+	+	+	+
	20	無	+	+	+	+	+

a)Fo-G2培地(西村, 2008)上で罹病切片から菌糸伸長が認められたものを+とした。

表1-26 嫌氣的発酵処理のトマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, 04T-2菌株) に対する防除効果(試験Ⅱ)

処理区	処理温度 (°C)	水添加 の有無	処 理 日 数					
			0日	28日後	56日後	84日後	112日後	140日後
嫌氣的発酵	25	有	+ <sup>a)</sup>	+	+	+	+	- <sup>b)</sup>
	25	無	+	+	+	-	+	-
	20	有	+	+	+	+	-	+
	20	無	+	+	+	+	+	+
対 照	25	有	+	+	+	+	+	+
	25	無	+	+	+	+	+	+
	20	有	+	+	+	+	+	+
	20	無	+	+	+	+	+	+

a)Fo-G2培地(西村, 2008)上で罹病切片から菌糸伸長が認められたものを+とした。

b)Fo-G2培地(西村, 2008)上で罹病切片から菌糸伸長が認められなかったものを-とした。

面に褐変腐敗を生じさせ、ジャガイモに対する病原性が確認された。

分離菌株は、小分子子を擬頭状に形成し、小分子子柄が長く、まばらに分枝することなどから、形態的に *F. solani* (Gerlach and Nirenberg, 1982) に属すると判断された。*F. solani* 種複合体(O'Donnell, 2000)には交配群 I~VII が知られているが、分離菌株は翻訳伸長因子(TEF)1- $\alpha$  遺伝子および rDNA ITS 領域の DNA 塩基配列に基づく分子系統解析を行ったところ、既知の交配群には属していなかった。また、現時点では、分離菌株の完全時代は植物体上および培地上とも得られておらず、少なくともホモタリックではないと推察される。

*Fusarium* 属菌では種分類の有力な情報として、TEF1- $\alpha$  遺伝子や rDNA ITS 領域等の解析およびその分子系統解析が行われており、*F. solani* でも重要な分子データとして活用されている。本分離菌株の TEF1- $\alpha$  遺伝子は、Romberg and Davis (2007) がアメリカ、カリフォルニアで発生したトマトの Foot rot、ジャガイモの Eumartii wilt から分離した *F. solani* f. sp. *eumartii* と 100% 一致あるいは 99.8% の相同と判明し、rDNA ITS 領域での相同性も 98.8~99.8% と高かった。さらに、分離菌株は両遺伝子領域とも Romberg and Davis (2007) による *F. solani* f. sp. *eumartii* と同一のクレード(単系統群)に所属し、分子系統学的に良く対応することを示していた(図 1-7, 図 1-8)。

Carpenter (1915) はジャガイモ塊茎の腐敗した部分から *Fusarium* 属菌を分離し、分離菌株を *F. eumartii* と呼ぶことを提案した。Goss(1940)はジャガイモから *F. solani* を分離している。その後、*F. eumartii* はその病原性に基づいて *F. solani* の一分化型である f. sp. *eumartii* に、当初は品種(f. *eumartii*)

として組み換えられた(Snyder and Hansen, 1941)。Romberg and Davis (2007) は、トマト、ジャガイモから菌を分離し、それぞれに対する病原性を確認し、*F. solani* f. sp. *eumartii* と同定した。本報告での分離菌株もトマト、ジャガイモへの病原性を有し、その病徴は Romberg and Davis (2007) の報告とよく一致していた。

以上より、栃木県のトマトから分離した菌株は、トマトやジャガイモに対する病原性、形態的な特徴、TEF1- $\alpha$  遺伝子および rDNA ITS 領域に関する分子データの解析結果に基づき *F. solani* f. sp. *eumartii* と同定した。

これまで *F. solani* に関係したトマト病害としては、大嶋・多賀(1991)が水耕栽培のトマトから *Nectria haematococca* を分離し、今村ら(2000b)は施設栽培トマト(土耕栽培)から同様の菌を分離し立枯病と命名された。後にこれらの菌は分子系統学的な解析や核型解析等に基づき *Haematonectria ipomoeae* (異名 *F. striatum*) と改名された(多賀ら, 2006)。本報告での分離菌株は、Nirenberg and Brielmaier-Liebetanz (1996) および Rossman et al. (1999) による *F. striatum* の記載と比較したところ、本菌の 5 隔壁大分子子は長さが短く、形態的に一致しないことから別の菌種であると判断した。また、病徴については、*H. ipomoeae* による立枯病は発病株の地際部や露出根部に赤~橙色の子のう殻を表生する場合が多く、台木品種の髓部黒変が認められるが(今村ら, 2000b)、本病ではいずれも観察されず、病徴が異なっている。さらに、立枯病はトマト根腐萎凋病のように主根、側根を含めた激しい根腐れが認められ(漆原, 私信)、この点でも本病の病徴とは大きく異なっている。農業生物資源研究所ジーンバンク微生物部門(MAFF)に保存される大嶋・多賀(1991)によるトマト

とガーベラ由来の菌株(当初, *Nectria haematococca* として登録)を含めた日本産の *F. striatum* 4 菌株について分子系統解析を行ったところ, 本報告での分離菌株は, rDNA ITS 領域の解析では *F. striatum* 菌株と 2 塩基の違いで比較的近い位置関係にあったが(図 1-7), TEF1- $\alpha$  遺伝子では互いに高いブートストラップ確率で支持される異なったクレードへと分離し(図 1-8), 分子系統学的観点からも本分離菌株と *F. striatum* は別個の種であると判断された。

本病と類似の病害に *Rhizoctonia solani* によるトマト株腐病がある。株腐病では, 収穫期に株が青枯れる症状が発生し, 発病株の地際部は外側から褐変, 軟化するが(三澤, 2007), 褐変は主根からではなく地際部付近から始まる(三澤, 私信)。本病と株腐病の病徴は, 地際部の褐変, 軟化が類似しているが, 株腐病の株が青枯れを呈し褐変は地際部付近から始まる点で異なっている。また, その病原菌も大きく異なる糸状菌である。

本報告での分離菌株は, トマト, ジャガイモ以外ではインゲンマメ, ソラマメに対する病原性も認められた。本邦では, インゲンマメの根腐病(*Fusarium root-rot*)の病原菌として, *F. solani*(Martius)f. sp. *phaseoli*(Burkh.) Snyder et Hansen(日本植物病理学会編, 2000)(= *F. cuneirostrum* O'Donnell et T. Aoki; Aoki et al., 2005)の報告はあるが, *F. solani* f. sp. *eumartii* による病害の報告はない。また, ソラマメでは, 立枯病(Stem wilt, Root rot)の病原菌として, *F. avenaceum*(Fries) Saccardo, *F. oxysporum* Schlecht. : Fries f. sp. *fabae* Yu et Fang が知られており, *F. solani*(Martius)Saccardo も分離されるとある(日本植物病理学会編, 2000)。本研究では, GenBank からの *F. solani* 種複合体の典型菌株の TEF1- $\alpha$  遺伝子および rDNA ITS 領域のデータに併せて, 日本産 *F. solani* f. sp. *radicicola*(MAFF731042)と *F. solani* f. sp. *pisi*(MAFF840047)から決定した塩基配列についても分子系統解析を行った。その結果, 本報告での分離菌株はこれらの菌株のいずれとも異なる分子系統学的位置にあった(図 1-7, 1-8)。今後, インゲンマメおよびソラマメについても本菌の発生活動向に注意を払う必要があると考える。

以上のことから, 本邦では *F. solani* f. sp. *eumartii* によるトマトの病害発生の報告はなく, 本病を *F. solani* f. sp. *eumartii* によるトマトフザリウム株腐病と呼ぶことを提案した。

なお, *F. solani* 種複合体については, *F. solani* (Mart.) Sacc. のタイプがエピタイプとして再指定されるなど, 再分類が急速に進められつつある(Schroers et al., 2016)。今後, 本分化型についても独立した種に格上げされる可能性がある。

Sanchez 法の改変によるトマトに対する病原性検定については, 試験 I では, 接種 14 日後でも無病徴の幼植物体が複数認められ, 接種源とした 04T-2 菌株から発病が回避された可

能性が考えられた(Sanchez et al., 1975)。一方, 試験 II では, 接種 7 日後には全品種とも 94%以上の発病率となり, 接種 14 日後には供試した 11 品種の全幼植物体とも萎凋枯死した。本菌の土壌ふすま培養菌をトマト各品種に土壌接種したところ, 台木品種の発病株率が穂木品種に比較し全般に高かったが(中山・青木, 2010), 試験 II では接種 7 日後, 接種 14 日後とも台木品種と穂木品種との間に明瞭な発病の差は認められなかった。試験 II の接種方法には, 本菌のトマトに対する病原性確認だけでなく, トマト各品種での耐病性検定への有効性を期待したが, 今回の試験結果からそれは困難であることが示唆された(中山, 2013)。以上のことから, トマトフザリウム株腐病菌の同定を進めていく過程で, 分離菌株のトマトに対する病原性の有無を検定する方法として, 試験 II の接種方法は実験室内の WA 培地上で検定でき, 土壌接種法と比較し病徴発現までの日数や接種に係る労力を大幅に削減でき, 有効性が高いと考えられた。

*Fusarium* 属菌によるトマトの果実腐敗については, 土壌病原菌の一種であるトマト萎凋病菌レース J3(現在のトマト根腐萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*: 駒田ら, 1989)によって起こることが報告されている(富川ら, 1985; 富川ら, 1986; 富川, 1987)。トマト果実腐敗症は主として柱頭とそれに続く果頂部でみられ, 原因菌は柱頭から侵入することが多いとされる。この果実腐敗症の原因菌とトマト根腐萎凋病菌の性質が一致したことから, 富川(1987)は果実腐敗症をトマト根腐萎凋病菌による一症状と結論づけている。

今村ら(2000a)は, トマト品種「スーパーファースト」で柱頭と果実内部維管束の黒変を伴う果実腐敗症状から *F. oxysporum* を分離している。分離菌株は, トマト萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* およびトマト根腐萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* とは病原性が異なるため, *F. oxysporum* によるトマト黒すじ実腐病として報告された。また, 今村ら(2002)は, ピーマンの土壌病原菌である立枯病菌(*Haematonectria ipomoeae* = *F. striatum*: 多賀ら, 2006)がピーマン実腐症状の原因菌であり, 本症状は柱頭部から腐敗がはじまり果梗部に広がる場合が多いとしている。これらの知見により, *Fusarium* 属菌はトマト, ピーマンの土壌病原菌としてだけでなく, それら宿主の果実腐敗の原因菌となることが明らかになっている。

そこで, 根茎部の病害であるトマトフザリウム株腐病菌(*F. solani* f. sp. *eumartii*)においても, 今後の防除対策を構築する上でトマト花器および果実に対する病原性の有無を明らかにする必要があると考え, トマト果実等への接種試験を行った。なお, 本菌の分生子懸濁液を供試し 25°C, 暗条件での分生子発芽率を検討したところ, 処理 12 時間後には分生子の発芽率が 96.1%に達した。そのため, 接種試験では接種後 12

時間以上、温室状態を保つことが良いと判断した。果実等への接種試験の結果、本菌は無傷接種でトマト品種「麗容」の花器に病原性が認められ、柱頭付近からの褐変や枯死、落花を引き起こしたり、果実果頂部にある花柱基部付近から果実に水浸状で褐変した病斑を形成した。また、無傷接種では供試果実の9.1~34.8%に果実腐敗が認められた。さらに、無病徴の果実からも組織分離により接種菌が再分離されることから、接種菌が果実組織内に侵入、感染している可能性が高いと考えられる。果実の大きさの違いとトマト果実腐敗症状との関連については、「小(直径30~45mm)」と「中(直径50~65mm)」の品種「麗容」の果実で比較したところ、発病率はそれぞれ9.1%、34.8%、無病徴で接種菌が再分離された果実はそれぞれ40.9%、26.1%であり、両者を合わせた割合はそれぞれ50.0%、60.9%であった。中型の果実が小型の果実と比較して本菌に対する感受性が高い傾向が見受けられた。採取したトマト果実への有傷接種では、25℃、暗条件で、接種48時間後には果実腐敗が認められ、96時間後には95.0%の発病率となった。これらのことから、本菌は無傷接種条件下でトマト花器および果実に対する病原性を有するとともに、有傷部がある場合、接種48時間後には果実腐敗がはじまると考えられる。

これまで圃場内で果実腐敗を呈するトマト果実から組織分離を試みているが、現在までのところ本菌は分離されていない。しかし、地際部付近のトマト茎の病斑上には分生子が多数形成されることから、それらが伝染源となりトマト花器や果実が発病に至ることも考えられる。今後、現地栽培圃場での発生に注意が必要と考える(中山ら, 2010a)。

また、本病の病徴には栽培管理の一つである摘葉に伴う茎の傷口から自然感染し発病に至ったと推測される病斑がときに観察される。そこで、本菌のトマト茎に対する病原性を検討したところ、土壌ふすま培養菌または分生子懸濁液のいずれの接種とも、茎の接種部位に褐色、不整形でやや陥没した病斑を形成し原病徴が再現された。本菌の分生子懸濁液の無傷接種では、品種「麗容」の接種部位の13.3%で病斑形成が認められるなどトマト茎に対する病原性が確認され、本菌が茎から自然感染し発病に至る場合があることが裏付けられた。また、土壌ふすま培養菌による接種では、供試した両品種とも有傷接種が無傷接種に比較して発病率が高い傾向が見受けられ、栽培管理に伴って生じるトマト茎の傷口から本菌が侵入しやすいことを示唆していた。発病率は、品種「ジョイント」が「麗容」に比較してやや高く、本菌に対する感受性がやや高いと考えられた(中山ら, 2010a)。このことは本菌の土壌接種によるトマト各品種への病原性調査でも「ジョイント」など台木品種が「麗容」など穂木品種に比較し発病率が全般に高かった(中山・青木, 2010)ことと一致していた。以上より、本菌

がトマトの花器および果実に対する病原性を有することを明らかにするとともに、摘葉など管理作業に伴う茎の傷口から発病したと考えられる原病徴を再現することができた。これらは本菌の土壌伝染以外の伝染経路として、トマト茎だけでなく花器、果実など地上部からの自然感染の可能性を示唆していると考えられた。

県内から採集したトマトフザリウム株腐病菌の各分離菌株は、トマト主要薬剤での最小生育阻止濃度(MIC)が1600µg/mlより大きかった。しかし、供試薬剤の中で、トリフルミゾール水和剤、キャプタン水和剤は本菌の菌糸伸長抑制率がそれぞれ94.0%、ベノミル水和剤、チオファネートメチル水和剤はそれぞれ91.8%、86.8%と高かった。また、キャプタン水和剤では本菌の分生子発芽が著しく抑制された。以上より、キャプタン水和剤は本菌の菌糸伸長や分生子発芽を著しく抑制し、本病の防除薬剤として有効である可能性が高いと考えられた(中山ら, 2010b)。

本菌保菌土壌に植え付けたジャガイモ4品種のマイクロチューバーの発病率は、品種「男爵薯」、「メークイン」が100%、品種「ニシユタカ」が92.3%、「農林1号」が23.1%であり、本菌に対する感受性には品種間差があると考えられた。特に、品種「男爵薯」および「メークイン」は本菌に対する感受性が高く、土壌からの本菌の検出に適していると考えられた。品種「男爵薯」マイクロチューバーの発病率は、本菌の土壌への混和割合が0.5%以上では80%以上となったが、0.1%で40.0%、0.05%で26.7%と低くなり、菌密度の推定に利用できる可能性が示唆された。また、品種「男爵薯」マイクロチューバーの発病率は、本菌保菌土壌への植え付け後日数に応じて高まり、植え付け14日後には発病率61.5%であったが、20日後には92.3%に達した。本菌保菌土壌からの検出にあたっては、植え付け20日後に地下部での発病状況を調査することが望ましいと考えられた。

トマトの主要な土壌病原菌について、ジャガイモマイクロチューバーに対する病原性を調査したところ、トマト立枯病菌が萌芽した植物体の茎基部と根の境界付近にトマトフザリウム株腐病菌による病徴と類似した淡褐色~褐色の病斑を形成した。両者のジャガイモ病徴での識別は困難であった。一方、トマト株腐病菌は、匍枝の表面に褐色で条状の病斑を形成するが、萌芽した植物体の茎基部と根の境界付近に病徴はみられなかった。なお、トマト萎凋病菌およびトマト根腐萎凋病菌は、品種「男爵薯」に対する病原性は認められず、トマトフザリウム株腐病菌と識別可能であると考えられた。

トマトフザリウム株腐病菌は、トマトの地下部に明瞭な病徴を呈するまで通常1か月以上を要する。そのため、

接種試験は植物体の維持管理の面から1/5000a～1/2000aワグネルポットでの試験となる。これに対してジャガイモマイクロチューバーは、直径15cm程度の黒ポリポットで栽培が可能であり、品種「男爵薯」のマイクロチューバーを利用し本菌を土壌中から簡易に検出できる可能性が示唆された(中山ら, 2016)。今回の試験は、本菌の土壌ふすま培養菌を殺菌土壌に混和して行った試験であり、栽培圃場が本菌に汚染されているかどうか判定する技術の確立に向けては、無殺菌土壌に本菌の土壌ふすま培養菌を混和した保菌土壌を作製し今回と同様の試験を行うとともに、現地栽培圃場での実用性を検証する必要がある。

萩原・竹内(1982)は、ダイコン萎黄病罹病残渣の堆積発酵試験を行い、本病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*)が嫌氣的発酵の過程で活性を失ったと推定している。また、10～30°Cの範囲内では、本病菌の不活化速度は温度が高いほど速やかであるとされる(萩原・竹内, 1983)。イチゴ炭疽病菌

では、その菌糸、分生孢子および子のう殻とも、15°Cまたは25°Cの7～30日処理で不活化されることが明らかになっている(石川ら, 1990)。一方、Ebihara and Uematsu(2014)は、嫌気条件下でイチゴ萎黄病菌(*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*)の生存状況を検討し、25°Cでは約500日前後で本病菌が死滅することを報告している。我々の試験では、罹病切片中の本菌(*F. solani* f. sp. *eumartii*)は25°C、140日間の嫌氣的発酵処理により不活化し、嫌氣的発酵処理下での不活化に要する日数は病原菌の種類によって異なると考えられた(中山・青木, 2014)。また、イチゴ萎黄病菌とトマトフザリウム株腐病菌は、いずれも*Fusarium*属菌の一種であるが、嫌気条件下と嫌氣的発酵処理下での不活化に要する日数は大きく異なった。今後、現場レベルでの嫌氣的発酵処理による本菌の防除効果や実用性を検討する必要がある。

## 第2章 トマト綿腐病の発生 (病徴追加)

トマトの育苗中に根腐症状を伴う生育不良が発生した。地上部の主な症状は葉の黄化や生育の停滞であった。また、発病株を圃場に定植しても多くは生育が停滞したままであった。発病株の根部罹病組織からは *Pythium* 属菌が高率に分離された。

そこで、今後の防除対策の資とするため、病原菌の分離、接種による病徴の再現性の確認および病原菌の同定を行った。

### 1 発生状況、病徴

2006年6月、那須塩原市のトマト(土耕栽培)の育苗中に発病株の発生が認められた。発病株は、接木苗で穂木品種は「麗夏」、台木品種は「ブロック」であった。育苗中のトマト苗の根部は根腐症状を呈し(図2-1)、地上部の主な症状は葉の黄化や生育の停滞であった。また、発病株は圃場に定植しても、多くの苗は生育が停滞したままであった。



図2-1 現地でのトマト発病株の根部病徴  
(品種:穂木「麗夏」、台木「ブロック」)

### 2 病原菌の同定

#### 1) 病原菌の分離

2006年6月、那須塩原市のトマトで葉の黄化や生育の停滞を呈する発病株(ポット苗)を採取し、台木品種「ブロック」の根部罹病組織から常法によりWA平板培地で病原菌を分離した後、単菌糸分離して供試菌株を得た。

#### 2) トマトに対する病原性

材料および方法

##### (1) 供試菌株

トマト発病株から分離した分離菌株 TO-01 および TO-02 の2菌株を供試した。

##### (2) 供試トマト品種

品種「麗夏」および「ブロック」を供試した。

##### (3) 接種

接種は東條ら(1993)の方法に準じて行った。ベントグラス種子3gに蒸留水12mlを加え、オートクレーブで殺菌して作製した培地上で分離菌株を25℃、暗条件で10日間前後培養した後、500mlの殺菌蒸留水を入れ、ホモジナイザーで30秒間粉碎し、約20の殺菌土と混合して保菌土壌を作製した。

接種は、殺菌土壌にトマト品種をそれぞれ播種し、育苗した約2.5葉期のトマト苗を保菌土壌に移植して行った(土壌接種)。なお、トマト2品種に対する分離菌株の接種試験は2回実施した。

また、トマト品種「麗夏」および「ブロック」の種子を直接、保菌土壌に播種する区も設定した。

##### (4) 調査

接種後はガラス温室で管理し、発病の有無を調査した。



図2-2 トマト分離菌株 (*Pythium* sp.) のトマト接種株での根部病徴  
(上:穂木品種「麗夏」、下:台木品種「ブロック」)

結果

トマトからの分離菌株 TO-01, TO-02 は、トマト品種「麗夏」および「ブロック」に萎凋、枯死を引き起こし、トマトに対する病原性が確認された。また、接種株では、地上部が無病徴であっても全株に根腐症状が認められ(図 2-2, 表 2-1), 接種株の根部罹病組織から接種菌が再分離された。なお、無接種区では両品種とも病徴は認められなかった。

第 2 回目の接種試験では、接種 45 日後まで地上部は無病徴であったが、株を掘りあげて観察すると、接種株の全株

で根腐症状が認められ、原病徴が再現された(表 2-2)。また、接種株の根部罹病組織から接種菌が再分離された。なお、無接種区では両品種とも病徴は認められなかった。

保菌土壌にトマトの種子を播種したところ、無接種区に比較して発芽率が大きく低下し、発芽前立ち枯れが確認された(表 2-3)。さらに、保菌土壌での発芽苗をポットに移植し、約 1 か月後に掘り上げたところ、根部が淡褐色に変色し、その罹病組織から接種菌が再分離された。

表2-1 トマト分離菌株 (*Pythium* sp.) のトマトに対する病原性-1

供試菌株	供試品種	9月6日 (5日後)	9月13日 (12日後)	9月20日 (19日後)	9月27日 (26日後)	10月5日 (34日後)
TO-01	麗夏	2/7 <sup>a)</sup>	2/7	2/7	3/7	3/7(7/7) <sup>b)</sup>
	ブロック	1/7	1/7	1/7	1/7	1/7(7/7)
TO-02	麗夏	3/7	3/7	3/7	3/7	3/7(7/7)
	ブロック	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7(7/7)
無接種	麗夏	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7(0/7)
	ブロック	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7(0/7)

播種日: 2006年8月13日

接種日: 2006年9月1日

a) 発病株数 / 供試株数

b) 根部病徴から判断

表2-2 トマト分離菌株 (*Pythium* sp.) のトマトに対する病原性-2

供試菌株	供試品種	10月31日 (7日後)	11月7日 (14日後)	11月13日 (20日後)	11月21日 (28日後)	11月28日 (35日後)	12月5日 (42日後)	12月8日 (45日後)
TO-01	麗夏	0/10 <sup>a)</sup>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10 <sup>b)</sup>
	ブロック	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10
TO-02	麗夏	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10
	ブロック	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10
無接種	麗夏	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	ブロック	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

播種日: 2006年9月1日

接種日: 2006年10月24日

a) 発病株数 / 供試株数

b) 根部病徴から判断

表2-3 トマト分離菌株 (*Pythium* sp.) のトマト  
に対する病原性-3

供試菌株	供試品種	発芽率(%)
TO-01	麗夏	25.0(3/12) <sup>a)</sup>
	ブロック	50.0(6/12)
無接種	麗夏	66.6(8/12)
	ブロック	91.6(11/12)

接種日(播種日): 2006年9月25日

調査日: 2006年10月5日

a)発芽苗数/播種粒数

### 3) 分離菌株の形態

材料および方法

結果

#### (1) 供試菌株

分離菌株 TO-01 を供試した。

#### (2) 形態

分離菌株を Corn Meal Agar (CMA) 平板培地上のシバ葉で培養後、殺菌した雨水にシバ葉を入れて胞子のうおよび有性器官の形態を調査した。

分離菌株 TO-01 は、膨状の胞子のうを形成した。有性器官は単一菌株で形成され、造卵器の大きさは 22-28(平均値 25.7)  $\mu\text{m}$  で、表面は平滑であった。造精器は主に間生で頂生も認められ、側着で、同菌糸性または異菌糸性であった。また、造卵器柄は造精器に傾いていなかった。卵胞子の大きさは 18-24(平均値 20.7)  $\mu\text{m}$  で、非充満性であった(表 2-4)。

表2-4 トマト分離菌株 (*Pythium* sp., TO-01 菌株) と *Pythium aphanidermatum*  
との形態比較

	TO-01	<i>P. aphanidermatum</i> <sup>a)</sup>
<b>胞子のう</b>		
形態	膨状	膨状
有性器官	単一菌株で形成	単一菌株で形成
<b>造卵器</b>		
形態	表面平滑	表面平滑
大きさ( $\mu\text{m}$ )	22-28 (25.7)	22-24 (23.0)
<b>造精器</b>		
形態	主に間生, 頂生も認められる	主に間生, 頂生も認められる
造卵器への付着	側着	側着
	同菌糸性, 異菌糸性	同菌糸性, 異菌糸性
	造卵器柄は蔵精器に傾かない	造卵器柄は造精器に傾かない
<b>卵胞子</b>		
充満性	非充満性	非充満性
大きさ( $\mu\text{m}$ )	18-24 (20.7)	20-22 (20.2)

a) van der Plaats-Niterink(1981)

#### 4) 菌糸の生育温度

材料および方法

##### (1) 供試菌株

分離菌株 TO-01 を供試した。

##### (2) 生育温度

分離菌株を CMA 平板培地で 25℃、暗条件で前培養した後、コルクボーラー(直径 5mm)で打ち抜いた菌叢片を CMA 平板培地上に置床し、5、10、15、20、25、30、35、38、40、42、45℃の各温度で、暗条件、24 時間培養後の菌叢直径を調査した。1 処理当たりペトリ皿は 3 枚供試した。

結果

菌糸の生育は、CMA 培地上では 10℃～42℃で認められ、適温は 35～38℃付近であった。なお、24 時間当たりの菌糸伸長量は、38℃では 40.0mm であった(図 2-3)。

#### 5) 種特異的プライマーによる PCR 検定

材料および方法

##### (1) 供試菌株

分離菌株 TO-01 を供試した。

##### (2) PCR 検定

分離菌株を CMA 平板培地で 25℃、暗条件で 5 日間培養し、PrepMan Ultra Reagent (Applied Biosystems 社製)を用いて全 DNA を抽出後、松本ら(1999)の方法に準じて、*Pythium aphanidermatum* に種特異的なプライマー APH1/APH2 を用いて PCR 検定を行った。

結果

*P. aphanidermatum* に種特異的なプライマーを用いた PCR 検定の結果、対照とした岐阜県各務原市のニンジンからの分離菌株 TOc159(NBRC100101)と同様に、730bp 付近に本菌に特異的な増幅断片が認められた(図 2-4)。

### 3 考察

土耕栽培トマトの育苗中に根腐症状を伴う生育不良が発生し、その根部罹病組織から *Pythium* 属菌が高率に分離されたため、病原菌の分離、接種による病徴の再現性の確認および病原菌の同定を行った。分離菌株 TO-01 は、トマト品種「麗夏」および「ブロック」に萎凋、枯死を引き起こし、罹病組織から接種菌が再分離された。

分離菌株は、膨状の胞子のうを形成し、有性器官は単一菌株で形成され、造卵器の大きさは平均 25.7 μm で、表面は平滑であった。造精器は主に間生で頂生も認められ、側着で、同菌糸性または異菌糸性であった。卵胞子の大きさは平均 20.7 μm で、非充満性であった。また、*P. aphanidermatum* に特異的なプライマーを用いた PCR 検定の結果、本菌に特異的な増幅断片が認められた。菌糸の生育は、CMA 培地上では 10～42℃で認められ、適温は 35～38℃であった。これらの特徴を van der Plaats-Niterink(1981)の検索表および形態数値と比較するとともに、PCR 検定の結果と併せて、分離菌株を *P. aphanidermatum* と同定した(中山ら, 2007)。

トマトでの *P. aphanidermatum* による病害としては、楠元(1950)が地面に近接した果実が白色綿状の菌糸で覆われ、その軟化腐敗した部位から本菌を分離しており、病名を「トマト綿腐病」と命名した。また、草刈・田中(1982, 1987)は、トマト水耕栽培での根腐性病害の原因を究明し、病原として *P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. dissotocum* を報告している。今回の栃木県での発生は、土耕栽培トマトの育苗中に発生した根腐症状であり、*P. aphanidermatum* によるトマトでの根腐症状を伴う苗の生育不良として初めての報告である(中山ら, 2007)。

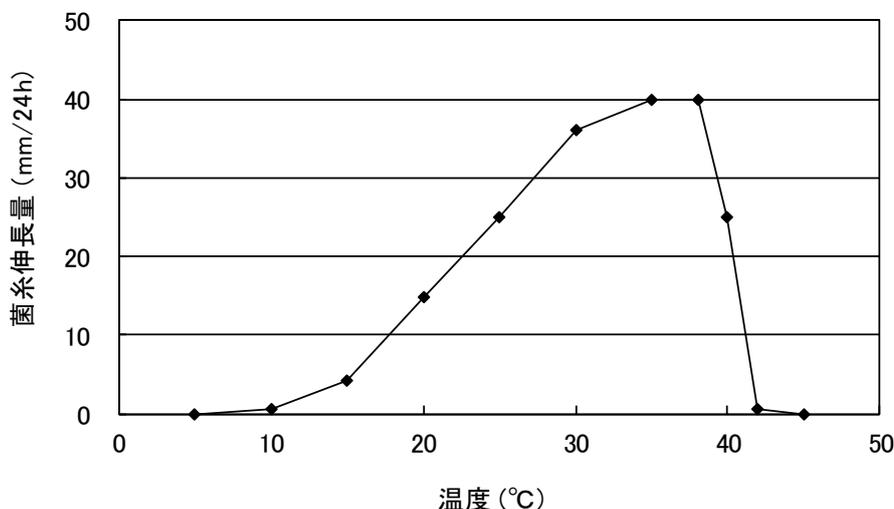


図2-3 トマト分離菌株 (*Pythium* sp., TO-01 菌株) の菌糸生育と温度との関係 (CMA上)

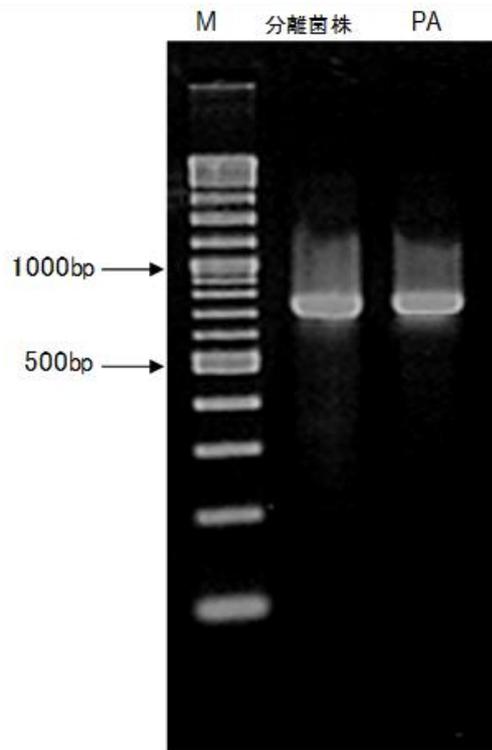


図2-4 種特異的なプライマーによるトマト分離菌株(*Pythium* sp.)のPCR増幅  
M: 100bpラダー  
分離菌株: TO-01  
PA: *Pythium aphanidermatum* TOc159菌株

### 第 3 章 イチゴピシウム根腐病の発生 (病原追加)

イチゴ圃場で品種「とちひとみ」、「とちおとめ」の下葉の葉柄が小豆色に変色し、生育の停滞や萎凋、枯死を呈する病害が発生した。発病株の根は黒色～暗褐色水浸状に腐敗し、クラウンにも病徴の進展が認められた。発病株の根部罹病組織からは *Pythium* 属菌が高率に分離された。

これまでイチゴに発生する *Pythium* 属菌には、*P. myriotylum* (Watanabe, 1977), *P. ultimum* (草刈・田中, 1985; Watanabe et al., 1977) の報告がある。近年では、静岡県、岐阜県における *P. helicoides* によるイチゴピシウム根腐病の発生報告がある(鈴木ら, 2005; 渡辺ら, 2005)。

そこで、本症状の原因を究明し今後の防除対策の資とするため、病原菌の分離、接種による病徴の再現性の確認および病原菌の同定を行った。



図 3-1 現地でのイチゴ発病株の病徴(品種「とちひとみ」)

#### 1 発生状況、病徴

2007 年 5 月、那須塩原市のイチゴ栽培圃場(土耕栽培)の品種「とちひとみ」、佐野市のイチゴ栽培圃場(土耕栽培)の品種「とちおとめ」で、下葉の葉柄が小豆色に変色し、生育の停滞や萎凋枯死を呈する病害が発生した。発病株の根は黒色～暗褐色水浸状に腐敗し、クラウンにも病徴の進展が認め

られた(図 3-1)。

#### 2 病原菌の同定

##### 1) 病原菌の分離

2007 年 5 月、那須塩原市のイチゴ栽培圃場の品種「とちひとみ」、佐野市のイチゴ栽培圃場の品種「とちおとめ」の生育停滞や萎凋、根腐症状を呈する株を採取し、根部罹病組織から WA 培地を用いて常法により病原菌を分離した。その後、WA 培地上で単菌糸分離を行い、供試菌株とした(表 3-1)。分離菌株 07KST-1, 07KST-2, 07KST-3, 07KST-5, 07SST-4 は、農業生物資源ジーンバンク(農研機構遺伝資源センター)にそれぞれ MAFF241782, MAFF241783, MAFF241784, MAFF241786, MAFF241785 として寄託登録した。

##### 2) イチゴに対する病原性

材料および方法

###### (1) 供試菌株

分離菌株 07KST-1, 07KST-2, 07KST-3, 07KST-5 および 07SST-4 の計 5 菌株を供試した(表 3-1)。

表 3-1 供試菌株(イチゴ分離菌株)

菌株	分離場所	栽培様式	分離源(品種)
07KST-1	栃木県那須塩原市	土耕栽培	とちひとみ
07KST-2	栃木県那須塩原市	土耕栽培	とちひとみ
07KST-3	栃木県那須塩原市	土耕栽培	とちひとみ
07KST-5	栃木県那須塩原市	土耕栽培	とちひとみ
07SST-4	栃木県佐野市	土耕栽培	とちおとめ

###### (2) 供試イチゴ品種

品種「とちひとみ」および「とちおとめ」を供試した。

###### (3) 接種

接種は、東條ら(1993)の方法に準じて行った。ベントグラス種子 3g に蒸留水 12ml を加え、オートクレーブで殺菌して作製した培地上で分離菌株を 25℃、暗条件で 7 日間培養した後、500ml の殺菌蒸留水を加えてホモジナイザーで 30 秒間粉碎し、4ℓ の殺菌土(鹿沼土、くん炭を 2:1 で混和)と混和し保菌土壌とした。接種には、それぞれ殺菌土壌で育苗したイチゴ苗を保菌土壌に移植した(土壌接種)。

イチゴ苗の管理や接種は、ガラス温室(15～35℃)で行った。

###### (4) 調査

接種 50 日後にイチゴでの発病状況を調査した。

#### 結果

供試した 5 菌株のいずれも、イチゴ品種「とちひとみ」、「とちおとめ」の両品種において、発病株では葉の葉脈や葉柄が小豆色になり、しだいに萎凋、枯死症状を呈した(図 3-2)。



図 3-2 イチゴ分離菌株 (*Pythium* spp.) のイチゴ接種株での病徴 (品種「とちひとみ」)

上: 葉脈が小豆色に変色

中: 萎凋

下: 根部の黒変



表3-2 イチゴ分離菌株 (*Pythium* spp.) のイチゴ品種に  
対する病原性

供試菌株	とちひとみ	とちおとめ
07KST-1	3/5 <sup>a)</sup>	1/5
07KST-2	5/5	2/5
07KST-3	5/5	2/5
07KST-5	5/5	0/5
07SST-4	5/5	4/5
無接種	0/5	0/5

a) 発病株数 / 供試株数

両品種の発病状況を比較すると、「とちひとみ」は「とちおとめ」に比較して、発病株率が高い傾向にあった(表 3-2)。両品種の接種株を掘り上げて観察すると、発病株の根は黒変しており、原病徴が再現された。また、その根部罹病組織から接種菌が再分離された。なお、無接種区では両品種とも病徴は認められなかった。

3) 分離菌株の形態

材料および方法

(1) 供試菌株

分離菌株 07KST-1, 07KST-2, 07KST-3, 07KST-5 および 07SST-4 の計 5 菌株を供試した。

(2) 形態

殺菌したシバ葉に分離菌株を CMA 平板培地上で感染させ、感染したシバ葉を殺菌した雨水に入れて無性器官および有性器官の形態を調査した (Waterhouse, 1967)。

結果

分離菌株 07KST-1, 07KST-5 は、遊走子のうは形成せず、球形の Hyphal swelling を形成した。有性器官は単独培養では形成されず、両菌株とも *Pythium sylvaticum* の雌株と反応し、反応部分に有性器官を多く形成していた(図 3-3)。造卵器の大きさは 14.9–26.6(平均値 21.7) μm で、表面は平滑であった。造精器は異菌糸性であった。卵胞子の大きさは 13.2–22.4(平均値 18) μm で、非充満性で多くは成熟せず退化した(図 3-4, 表 3-3)。

分離菌株 07KST-2, 07KST-3 は、遊走子のうは形成せず、球形の Hyphal swelling を形成した。造卵器の大きさは 15–22.4(平均値 17.7) μm で、表面には指状の棘が認められた。造精器は同菌糸性であった。卵胞子の大きさは 12.7–21.3(平均値 16.3) μm で、充満性であった(図 3-4, 表 3-3)。

分離菌株 07SST-4 は、球形、亜球形で乳頭状の突起のある遊走子のうを形成した。造卵器の大きさは 23.4–38.9(平均値 33.4) μm で、表面は平滑であった。造精器は異菌糸性で、造精器柄が造卵器柄にコイリングしていた。卵胞子の大きさは 18.6–31.5(平均値 28.0) μm で、非充満性であった(表 3-3)。

表3-3 イチゴ分離菌株 (*Pythium* spp.) と既知種の形態比較

供試菌株・既知種	遊走子のう	有性器官	造卵器		造精器の形状	卵胞子	
			形成様式	大きさ(μm) (平均)		形状	大きさ(μm) (平均)
07KST-1	形成しない	雌雄異株性	頂生, 間生, 平滑	14.9–26.6 (21.7)	異菌糸性	球形 非充満	13.2–22.4 (18)
07KST-5	形成しない	雌雄異株性	頂生, 間生, 平滑		異菌糸性	球形 非充満	
07KST-2	形成しない	同一菌株で形成	頂生, 間生, 指状の棘あり	15–22.4 (17.7)	同菌糸性	球形 充満	12.7–21.3 (16.3)
07KST-3	形成しない	同一菌株で形成	頂生, 間生, 指状の棘あり		同菌糸性	球形 充満	
07SST-4	形成する	同一菌株で形成	頂生, 間生, 平滑	23.4–38.9 (33.4)	異菌糸性	球形 非充満	18.6–31.5 (28)
<i>P. sylvaticum</i> <sup>a)</sup>	形成しない	雌雄異株性	頂生, 間生, 平滑	18–20 (19.3)	異菌糸性	球形 非充満	15–18 (16.5)
<i>P. spinosum</i> <sup>a)</sup>	形成しない	同一菌株で形成	頂生, 間生, 指状の棘あり	17–21 (18.5)	同菌糸性	球形 充満	15–19 (17.2)
<i>P. helicoides</i> <sup>a)</sup>	形成する	同一菌株で形成	頂生, 間生, 平滑	31–38 (33.5)	異菌糸性	球形 非充満	27–32 (30.5)

a) van der Plaats-Niterink(1981)

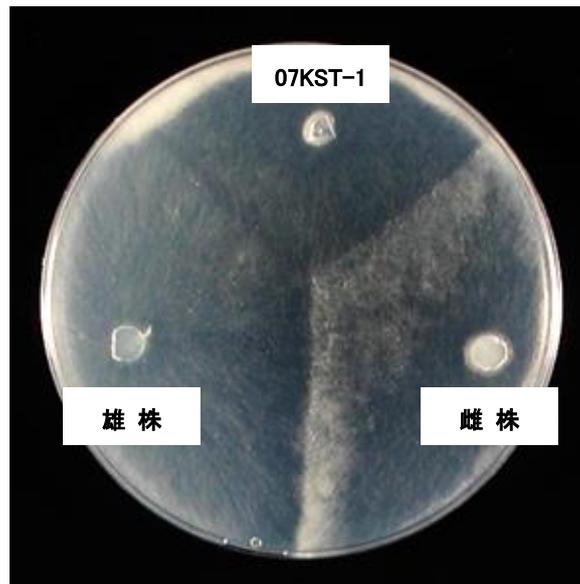


図 3-3 イチゴ分離菌株 07KST-1 と *Pythium sylvaticum* の雌雄菌株との対峙培養

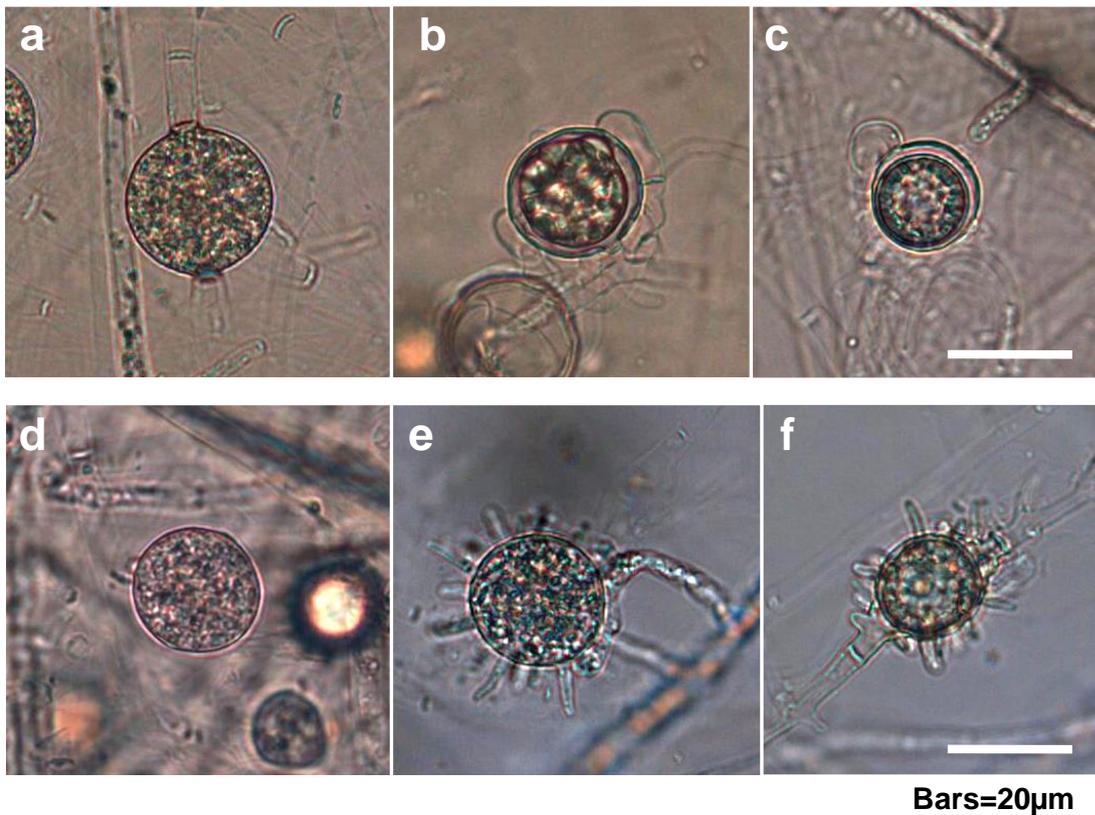


図 3-4 イチゴ発病株から分離された *Pythium* 属菌の形態

a-c. 07KST-1 菌株, a. Hyphal swelling, b. c. 造卵器, 造精子器, 非充満性卵胞子

d-f. 07KST-2 菌株, d. Hyphal swelling, e. 棘のある造卵器, 同菌糸性造精子器, f. 棘のある造卵器, 充満性卵胞子

4) 菌糸の生育温度

材料および方法

(1) 供試菌株

分離菌株 07KST-1, 07KST-2, 07KST-3, 07KST-5 および 07SST-4 の計 5 菌株を供試した.

(2) 生育温度

分離菌株を CMA 平板培地で 25°C, 暗条件で前培養した後, 菌叢をコルクボーラー(直径 4mm)で打ち抜き CMA 平板培地上に置床した. それを 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 37, 40, 42, 45°Cの各温度で, 暗条件, 24 時間培養した後, 菌糸伸長を測定した. 1 処理当たりペトリ皿は 3 枚供試した.

結果

分離菌株 07KST-1, 07KST-2, 07KST-3 および 07KST-5 は, いずれも 5~35°Cで菌糸の生育が認められ, 適温はそれぞれ 28~30°C付近であった. 分離菌株 07SST-4 は, 20~42°Cで菌糸の生育が認められ, 適温は 37°C付近であった(図 3-5).

5) rDNA ITS 領域の塩基配列の相同性検索

材料および方法

(1) 供試菌株

分離菌株 07KST-1, 07KST-2 を供試した.

(2) 相同性検索

分離菌株を V8 ジュース寒天培地上で 25°C, 暗条件で 7 日間培養し, 伸長した気中菌糸より Prepman Ultra

Reagent (アプライドバイオシステムズジャパン, 東京) を用いて全 DNA を抽出した. rDNA ITS 領域の PCR は, White et al. (1990) の方法に準じ, プライマー-ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') によりサーマルサイクラー (Gene Amp PCR system 2700, アプライドバイオシステムズジャパン, 東京) で行った. PCR 産物を GeneElute PCR Clean-up Kit (シグマアルドリッチジャパン, 東京) で精製後, BigDye Terminator v. 3.0 (アプライドバイオシステムズジャパン, 東京) でシーケンシング PCR を行い, 常法に従い ABI3700 DNA sequencer (アプライドバイオシステムズジャパン, 東京) を用いて塩基配列を決定した. 得られた塩基配列について DDBJ の BLAST による相同性検索を行った.

結果

分離菌株の rDNA ITS 領域の塩基配列を調べ, DNA データベース登録菌株との相同性検索を行ったところ, 分離菌株 07KST-1 は既報の *P. sylvaticum* 菌株と 99.8%以上, 分離菌株 07KST-2 は既報の *P. spinosum* 菌株と 99.5%以上の相同性を示した(表 3-4). 分離菌株 07KST-1 の塩基配列を AB906339, 07KST-2 のものを AB906340 として DNA データベースに登録した.

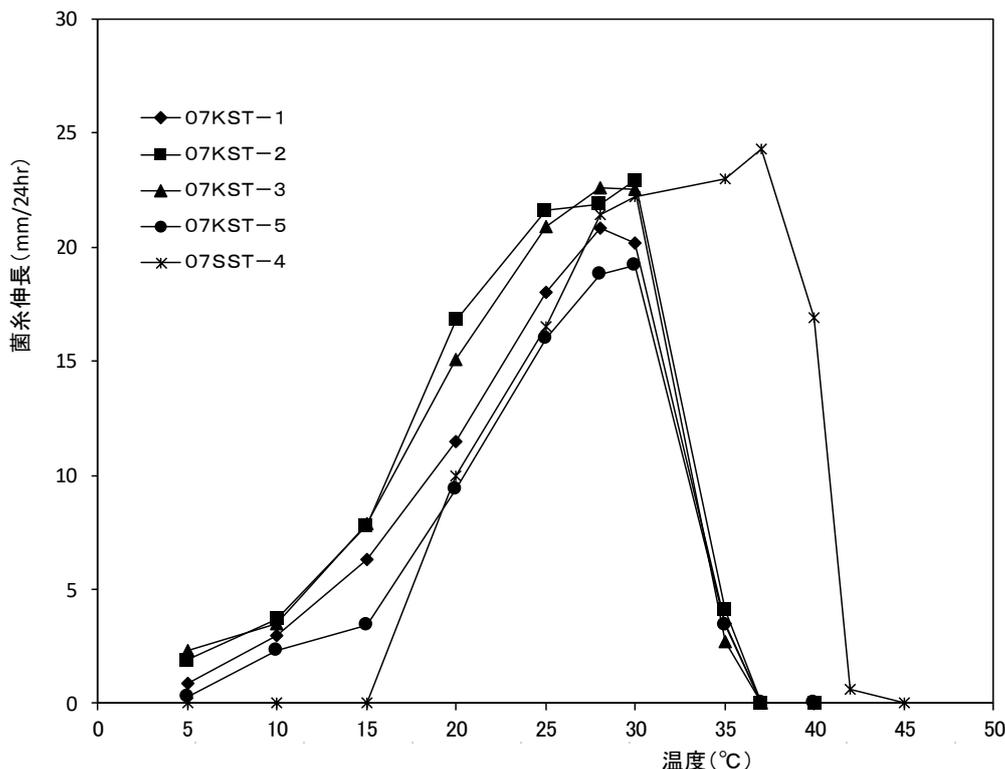


図3-5 イチゴ分離菌株 (*Pythium* spp.) の菌糸生育と温度との関係 (CMA上)

表3-4 イチゴ分離菌株 (*Pythium* spp.) のrDNA ITS領域のDNAデータベース登録菌株との相同性

供試菌株・既知種	登録番号	菌株名	分離場所	相同性(%)
07KST-1				
<i>P. sylvaticum</i>	AB259316	MAFF712264	日本	99.9
<i>P. sylvaticum</i>	AB108008	Py77	日本	99.9
<i>P. sylvaticum</i>	AY598645	CBS453.67	アメリカ	99.8
07KST-2				
<i>P. spinosum</i>	AJ233457	OD231	日本	99.8
<i>P. spinosum</i>	AB108007	TN254	日本	99.6
<i>P. spinosum</i>	DQ437648	CBS290.31	南アフリカ	99.5

### 6) 種特異的プライマーによるPCR検定

#### 材料および方法

#### (1) 供試菌株

分離菌株 07SST-4 を供試した。

#### (2) PCR 検定

分離菌株を PDA 平板培地で 25°C, 暗条件で 3 日間培養し, PrepMan Ultra Reagent (Applied Biosystems 社製) を用いて全 DNA を抽出後, 銀ら(2007)の方法に準じて, *Pythium helicoides* に種特異的なプライマー hel-F2/hel-R4 を用いて PCR 検定を行った。

#### 結果

*P. helicoides* に特異的なプライマーによる PCR 検定の結果, 分離菌株 07SST-4 は, 対照としたミニバラからの分離菌株 H5 と同様に, 300bp 付近に特異的な増幅断片が認められた(図 3-6)。

### 3 考察

イチゴ圃場(土耕栽培)で品種「とちひとみ」および「とちおとめ」の下葉の葉柄が小豆色に変色し, 生育の停滞や萎凋, 枯死を呈する病害が発生した。その根部罹病組織から *Pythium* 属菌が高率に分離されたため, 病原菌の分離, 接種による病徴の再現性の確認および病原菌の同定を行った。分離菌株は, 品種「とちひとみ」および「とちおとめ」の葉の葉脈や葉柄が小豆色になり, しだいに萎凋, 枯死を引き起こし, 根部罹病組織から接種菌が再分離された。

分離菌株 07KST-1 および 07KST-5 は, 遊走子のうは形成せず, 球形の Hyphal swelling を形成した。有性器官は単独培養では形成されず, *P. sylvaticum* の雌株と反応し, 反応部分にて有性器官を多く形成した。造卵器の大きさは平均 21.7 μm で, 表面は平滑であった。造精子器は異菌糸性であった。卵胞子の大きさは平均 18 μm で, 非充満性で多くは成熟せず退化した。菌糸の生育は, CMA 培地上では 5~35°C で認められ,

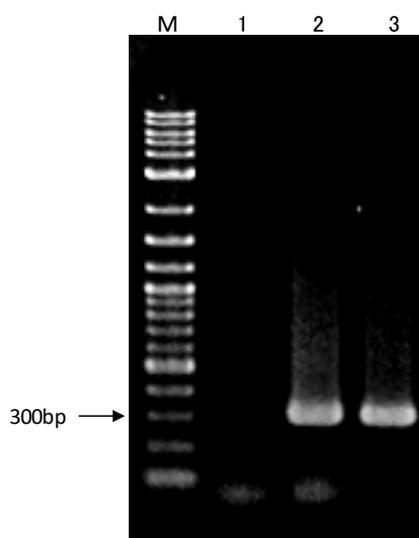


図3-6 種特異的なプライマーによるイチゴ分離菌株07SST-4 (*Pythium* sp.) のPCR増殖

M: 100bpラダー  
1: 対照  
2: 07SST-4菌株  
3: H5(対照菌株)

適温は 28~30°C であった。また, rDNA ITS 領域の塩基配列は, 既報の *P. sylvaticum* 菌株と 99.8% 以上の相同性を示した。以上から, 分離菌株を van der Plaats-Niterink (1981) の検索表および形態数値, rDNA ITS 領域の DNA データベース登録菌株との相同性等から *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix と同定した(中山ら, 2008; 中山ら, 2014)。

分離菌株 07KST-2 および 07KST-3 は, 遊走子のうは形成せず, 球形の Hyphal swelling を形成した。造卵器の大きさは平均 17.7 μm で, 表面には指状の棘が認められた。造精子器は同菌糸性であった。卵胞子の大きさは平均 16.3 μm で, 充満性であった。菌糸の生育は, CMA 培地上では 5~35°C で認められ, 適温は 28~30°C であった。また, rDNA ITS 領域の塩基配列は, 既報の *P. spinosum* 菌株と 99.5% 以上の相同性を

示した。以上から、分離菌株を van der Plaats-Niterink (1981) の検索表および形態数値、rDNA ITS 領域の DNA データベース登録菌株との相同性等から *P. spinosum* Sawada と同定した(中山ら, 2008; 中山ら, 2014)。

これまでにイチゴピシウム根腐病の病原として、*P. helicoides* が報告されており(鈴木ら, 2005; 渡辺ら, 2005)、本病の病原に *P. sylvaticum* および *P. spinosum* を追加することを提案した(中山ら, 2008; 中山ら, 2014)。

また、品種「とちおとめ」からの分離菌株 07SST-4 は、乳頭状の突起のある遊走子のうを形成した。造卵器の大きさは平均 33.4  $\mu\text{m}$  で、表面は平滑であった。造精器は異菌糸性で、

造精器柄が造卵器柄にコイリングしていた。卵胞子の大きさは平均 28.0  $\mu\text{m}$  で、非充満性であった。菌糸の生育は、CMA 培地上では 20~42°C で認められ、適温は 37°C 付近であった。*P. helicoides* に特異的なプライマーによる PCR 検定の結果、300bp 付近に特異的な増幅断片が認められた。以上から、分離菌株を van der Plaats-Niterink (1981) の検索表および形態数値、PCR 検定結果等から *P. helicoides* Drechsler と同定した。*P. helicoides* は、既報ではイチゴ養液栽培での発生報告であったが、今回初めて土耕栽培での発生を報告した (Ishiguro et al., 2014)。

## 第4章 リンドウ炭疽病の発生（新称）

リンドウ（エゾ系）圃場で夏季に葉枯れや激しい株枯症状が発生し問題となった。また、その病斑部からは *Colletotrichum* 属菌が高率に分離された。

そこで、今後の防除対策の資とするため、病原菌の分離、接種による病徴再現および病原菌の同定を行った。



図 4-1 *Colletotrichum* spp. によるリンドウ現地発病株の病徴  
(a: 葉の斑点症状, b: 激しい株枯症状)

### 1 発生状況、病徴

2001 年および 2002 年の夏季(特に 8 月下旬以降)に、県北部のリンドウ産地である那須町の現地圃場において、茎葉に斑点を生じ、病勢が進展すると激しい株枯症状を呈した。症状は、葉、茎および花の各部位に認められた。葉では、はじめ円形でやや褐色を帯びた壊死斑が形成され、しだいにそれぞれの病斑が融合拡大して大型病斑となり、葉枯れや茎壊疽を呈した。さらに、病勢が進展すると株枯症状に至った(図 4-1)。本病は夏季に発生するが、圃場内での蔓延や株枯症状は主に 8 月下旬以降、急激に進展がみられた。

### 2 2001 年分離菌株の同定

#### 1) 病原菌の分離

2001 年 8 月に那須郡那須町のリンドウ圃場から発病株を採取し、葉の病斑部から常法により病原菌を分離したのち、分生子を単孢子分離し供試菌株とした。分離菌株 01R-A2, 01R-B の 2 菌株を以後の試験に用いた。分離菌株 01R-A2 は、農業生物資源ジーンバンク(農研機構遺伝資源センター)に MAFF241877 として寄託登録した。

#### 2) リンドウに対する病原性

材料および方法

#### (1) 供試菌株

分離菌株 01R-A2, 01R-B の 2 菌株を供試した。

#### (2) 供試植物

接種試験には、リンドウ(エゾ系)の一系統である 99D02-5S, 99D02-7M を供試した。

#### (3) 接種

分離菌株を PDA 平板培地で 25℃, 暗条件で 8 日間培養後、それぞれ殺菌蒸留水で  $10^4$ 個/ml に調整した分生子懸濁液をペーパークロマトグラフ用噴霧器で、リンドウの各系統に接種した。接種は、有傷接種区と無傷接種区を設けた。接種後、2 日間は温室下に置き、その後は人工気象器(30℃, 湿度 80%, 24 時間照明)またはガラス温室で管理した。

#### (4) 調査

接種 30 日後に、リンドウでの発病状況を調査した。

#### 結果

分離菌株 01R-A2, 01R-B は、その分生子懸濁液の噴霧接種により接種 2 週間後頃から有傷接種および無傷接種とも茎に褐色の壊死斑が形成され、リンドウに対する病原性が認められ、原病徴が再現された(図 4-2, 表 4-1)。また、その病斑部から接種菌が再分離された。なお、無接種区では病徴は認められなかった。



図 4-2 リンドウ分離菌株 (*Colletotrichum* sp., 01R-B 菌株) のリンドウ接種株での病徴

表4-1 2001年リンドウ分離菌株 (*Colletotrichum* sp.) のリンドウに  
対する病原性

供試菌株	リンドウ(99D02-5S) <sup>a)</sup>		リンドウ(99D02-7M) <sup>a)</sup>	
	有傷	無傷	有傷	無傷
01R-A2	4/4 <sup>b)</sup>	4/4	4/4	1/4
01R-B	0/4	1/4	4/4	1/4
無接種	— <sup>c)</sup>	0/5	—	0/5

a)カッコ内はリンドウの系統名

b)発病株数/供試株数

c)未実施

### 3) イチゴ、シクラメンに対する病原性

材料および方法

#### (1) 供試菌株

分離菌株 01R-A2, 01R-B の 2 菌株を供試した。

#### (2) 供試植物

イチゴ品種「とちおとめ」および「女峰」、シクラメン (*Cyclamen persicum*) 品種「シュトラウス」を供試した。

#### (3) 接種

分離菌株を PDA 平板培地で 25℃, 暗条件で 8 日間培養後, それぞれ殺菌蒸留水で 10<sup>5</sup>個/ml に調整した分生子懸濁液をペーパークロマトグラフ用噴霧器で, イチゴおよびシクラメンの各品種に接種した。接種後, 2 日間は湿室下に置き, その後は人工気象器 (28℃, 湿度 80%, 24 時間照明) またはガラス温室で管理した。

#### (4) 調査

接種 31 日後に, 供試植物での発病状況を調査した。

結果

分離菌株 01R-A2, 01R-B は, イチゴ品種「とちおとめ」,

「女峰」に対する病原性は認められなかったが, シクラメン品種「シュトラウス」に葉縁からやや円形で褐色を帯びた壊死斑や花柄の軟化腐敗が認められた (図 4-3, 表 4-2)。さらに, シクラメン接種株の病斑部から接種菌が再分離された。なお, 無接種区ではイチゴ, シクラメンとも病徴は認められなかった。



図 4-3 リンドウ分離菌株 (*Colletotrichum* sp., 01R-A2 菌株) のシクラメン品種「シュトラウス」接種株での病徴

表4-2 2001年

シクラ

供試菌株

01R-A2

01R-B

無接種

a)発病株数

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

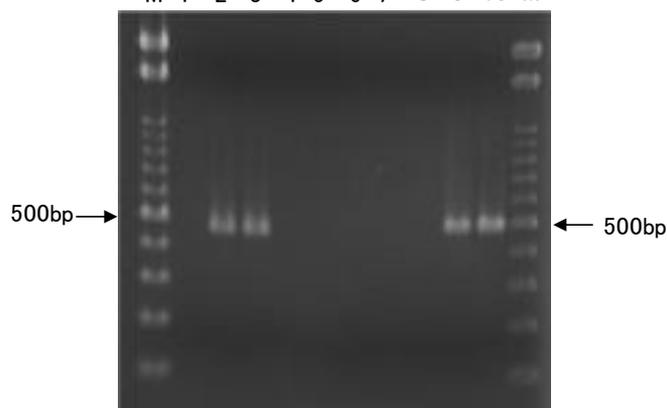


図4-5 種特異的プライマーによるリンドウ分離菌株 (*Colletotrichum* spp.) のPCR増幅

表4-3 2001年

菌株または既

01R-A2

01R-B

*C. gloeospori*

M: 100bpラダー  
 1~5: CgInt/ITS4 (450bp)  
 6~10: CaInt2/ITS4 (490bp)  
 1, 6: H<sub>2</sub>O  
 2, 7: 01R-A2 4, 9: 02R-3A  
 3, 8: 01R-B 5, 10: 02R-3C

径(μm)<sup>a)</sup>

—10

.6)

—10

.9)

—12

a)PCA培地上の測定値。( )は平均値

b)PDA培地上の測定値。( )は平均値

c)Sutton (1992)

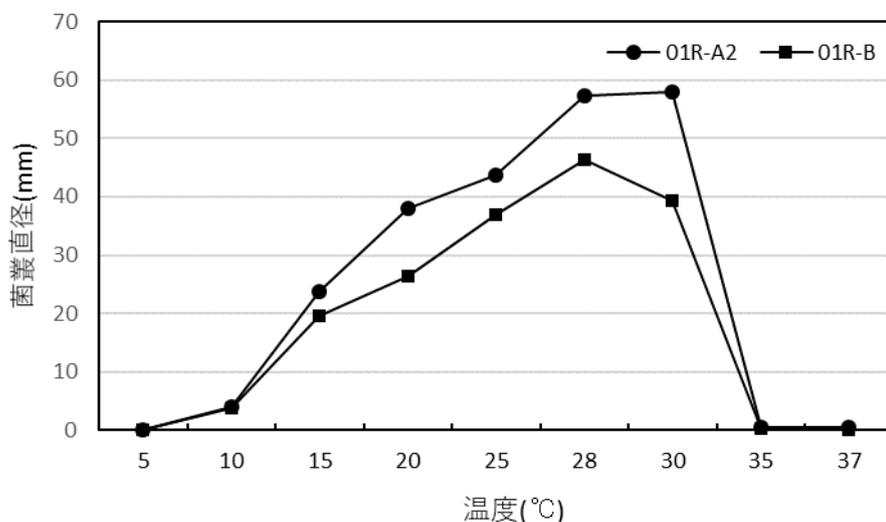


図4-4 2001年リンドウ分離菌株 (*Colletotrichum* sp.) の菌糸生育と温度との関係(PDA上)

4) 分離菌株の形態

材料および方法

(1) 供試菌株

分離菌株 01R-A2, 01R-B の 2 菌株を供試した。

(2) 形態

分離菌株を PDA 平板培地で、25℃、暗条件で 5~8 日間培養し、形成された分生子の形態を調査した。さらに、分離菌株の付着器の形態は、ジャガイモ・ニンジン煎汁寒天(PCA)

平板培地(Sutton, 1980)または WA 平板培地上で調査した。

結果

分離菌株 01R-A2 の分生子は、無色、単胞で両端が丸い円筒形で、大きさは 11.3-19.5×5-7.5(平均値 14.0×5.8) μmであった。PCA 培地上での付着器は、暗褐色、不整形で、大きさ 7.5-15×5-10(平均値 11.5×7.6) μmであった(表 4-3)。

5) 菌糸の生育温度

#### 材料および方法

##### (1) 供試菌株

分離菌株 01R-A2, 01R-B の 2 菌株を供試した。

##### (2) 生育温度

分離菌株を 25℃, 暗条件, PDA 平板培地で前培養した後, コルクボーラー(直径 4mm)で打ち抜いた菌叢片を PDA 平板培地上に置床し, 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 37℃の各温度で, 暗条件, 5 日間培養後の菌叢直径を調査した。1 処理当たりペトリ皿は 3 枚供した。

#### 結果

菌糸の生育は 10~37℃で認められ, 適温は 28~30℃であった(図 4-4)。

### 6) 種特異的プライマーによる PCR 検定

#### 材料および方法

##### (1) 供試菌株

分離菌株 01R-A2, 01R-B の 2 菌株を供試した。

##### (2) PCR 検定

分離菌株をブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体(Potato Dextrose Broth:PDB)培地で 25℃, 暗条件で 5 日間振とう培養し, DNA 抽出キット(QIAGEN 社製)を用いて全 DNA を抽出後, Peter et al.(1992)の方法に準じて, *C. gloeosporioides* を特異的に識別するプライマーを用いて PCR 検定を行った。

#### 結果

*C. gloeosporioides* に特異的なプライマー(CglInt, ITS4)を用いた PCR 検定の結果, 分離菌株 01R-A2, 01R-B は 450bp 付近にそれぞれ特異的な増幅断片が認められた(図 4-5)。

### 3 2002 年分離菌株の同定

#### 1) 病原菌の分離

2002 年 8 月に那須郡那須町の lindo 圃場から発病株を採取し, 茎の病斑部から常法により病原菌を分離したのち, 分生子を単孢子分離し供試菌株とした。分離菌株 02R-3A, 02R-3C の 2 菌株を以後の試験に用いた。分離菌株 02R-3A, 02R-3C は, 農業生物資源ジーンバンク(農研機構遺伝資源センター)にそれぞれ MAFF241878, MAFF241879 として寄託登録した。

#### 2) lindo 等に対する病原性

#### 材料および方法

##### (1) 供試菌株

分離菌株 02R-3A, 02R-3C およびイチゴ炭疽病菌(*C. acutatum*)Na91-016 菌株(石川ら, 1992)の 3 菌株を供試した。

##### (2) 供試植物

接種試験には, lindo(エゾ系)の一系統である 99D02-7S, 99D02-6S, 02D05-S, イチゴ品種「とちおとめ」, トマト品種「マイロック」を供試した。なお, 築尾ら(1993)は *Gromerella*

*cingulata* と *C. acutatum* の判別にトマト品種「桃太郎」に対する病原性の有無を利用しており, 本試験ではトマト品種「マイロック」を供試した。

##### (3) 接種



図 4-6 lindo 分離菌株 (*Colletotrichum* sp., 02R-3A 菌株) のイチゴ品種「とちおとめ」接種株での病徴

分離菌株および Na91-016 菌株を PDA 平板培地で 25℃, 暗条件で 9 日間培養後, それぞれ殺菌蒸留水で  $10^6$  個/ml に調整した分生子懸濁液をペーパークロマトグラフ用噴霧器で, lindo, イチゴおよびトマトの各品種・系統に接種した。なお, Na91-016 菌株は  $10^7$  個/ml とした。また, 接種は, 有傷接種区と無傷接種区を設けた。接種後, 2 日間は温室下に置き, その後は人工気象器(30℃, 湿度 80%, 24 時間照明)またはガラス温室で管理した。

##### (4) 調査

接種 42 日後に供試植物での発病状況を調査した。

#### 結果

分離菌株 02R-3A, 02R-3C は, その分生子懸濁液の噴霧接種により接種 2 週間後頃から茎に褐色の壊死斑が形成され, lindo に対する病原性が認められ, 原病徴が再現された(表 4-4)。また, その病斑部から接種菌が再分離された。無傷接種区では lindo に対する病原性は認められなかった。

また, Na91-016 菌株は, 有傷接種で lindo に対する病原性が認められたが, 無傷接種では lindo に対する病原性は認められなかった(表 4-4)。なお, 無接種区では病徴は認められなかった。

分離菌株 02R-3A, 02R-3C は, イチゴ品種「とちおとめ」に葉縁から赤褐色で不整形の病斑を形成した(図 4-6, 表 4-5)。さらに, 接種株の病斑部から接種菌が再分離された。両分離菌株は, トマト品種「マイロック」茎葉に明瞭な病徴は認められなかった(表 4-5)。なお, 無接種区では病徴は認められな

った。

### 3) 分離菌株の形態

材料および方法

#### (1) 供試菌株

分離菌株 02R-3A, 02R-3C の 2 菌株を供試した。

#### (2) 形態

分離菌株を PDA 平板培地で、25°C、暗条件で 5~8 日間培養し、形成された分生子の形態を調査した。さらに、分離菌株の付着器の形態は、PCA 平板培地 (Sutton, 1980) または WA 平板培地上で調査した。

結果

分離菌株 02R-3C の分生子は、無色、単胞で紡錘形~両端が尖った長楕円形で、大きさは 10-17.5×3.8-6.5 (平均値 13.5×5.1) μm であった。PCA 培地上での付着器は、暗褐色、棍棒形で、大きさ 7.5-12.5×5-8.8 (平均値 9.2×6.2) μm であった (表 4-6)。

### 4) ベノミル添加培地での生育度

材料および方法

#### (1) 供試菌株

分離菌株 02R-3A, 02R-3C およびイチゴ炭疽病菌 (*C. acutatum*) Na91-016 菌株 (石川ら, 1992) の 3 菌株を供試した。

#### (2) 生育度

ベノミル添加培地での生育度 (佐藤, 1996) は、PDA 培地にベノミルが 1250ppm になるよう添加し、25°C、PDA 平板培地で前培養した分離菌株および Na91-016 菌株をコルクボー

ラー (直径 4mm) で打ち抜き、薬剤添加培地へ菌叢面を下にして置床した。25°C、暗条件で 5 日間培養後の菌叢直径を調査し、次式により算出した。

表4-7 2002年リンドウ分離菌株 (*Colletotrichum* sp.) の性状

供試菌株	生育度 <sup>a)</sup>		ジエフエンカルブ添加培地上での生育			
	(%)					
02R-3A	30.3		+			
02R-3C	28.7		+			
Na91-016 <sup>b)</sup>	29.7		+			

a) 佐藤 (1996)	リンドウに対する病原性					
	b) イチゴ炭疽病菌 (石川ら, 1992)		リンドウ			
	(99D02-7S)		(99D02-6S)		(02D05-S)	
	有傷	無傷	有傷	無傷	有傷	無傷
02R-3A	1/3 <sup>a)</sup>	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3
02R-3C	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Na91-016 <sup>b)</sup>	2/3	0/3	2/3	0/3	-	-
無接種	- <sup>c)</sup>	0/3	-	0/3	-	0/3

a) 発病株数/供試株数

b) イチゴ炭疽病菌 (石川ら, 1992)

c) -: 未実施

表4-5 2002年リンドウ分離菌株 (*Colletotrichum* sp.) の  
イチゴ、トマトに対する病原性

供試菌株	イチゴ	トマト <sup>a)</sup>
	「とちおとめ」	「マイロック」
02R-3A	3/3 <sup>b)</sup>	0/3
02R-3C	1/3	0/3
無接種	0/3	0/3

a) 品種「がんばる根3号」に接ぎ木

b) 発病株数/供試株数

表4-6 2002年リンドウ分離菌株 (*Colletotrichum* sp.) および既知種の形態

菌株または既知種	分生子の形態	分生子の大きさ(μm)	付着器の大きさ(μm)
02R-3A	紡錘形	10.5-17.5 × 4.3-6.3 <sup>c)</sup> (13.2 × 5.0)	5-12.5 × 4.3-6.5 <sup>d)</sup> (8.5 × 5.1)
02R-3C	紡錘形	10-17.5 × 3.8-6.5 <sup>c)</sup> (13.5 × 5.1)	7.5-12.5 × 5-8.8 <sup>e)</sup> (9.2 × 6.2)
<i>C. acutatum</i> <sup>a)</sup>	紡錘形	8.3-14.4 × 2.5-4	—
<i>C. acutatum</i> <sup>b)</sup>	紡錘形	8.5-16.5 × 2.5-4	8.5-10 × 4.5-6

a) Simmonds(1965)

b) Sutton(1980)

c) PDA培地上の測定値. ( )は平均値

d) WA培地上の測定値. ( )は平均値

e) PCA培地上の測定値. ( )は平均値

生育度=[(25°C5日間ベノミル添加 PDA 平板培地上で生育した菌叢直径)/(同無添加 PDA 平板培地上での菌叢直径)]×100

また、PDA 培地にジエトフェンカルブが 625ppm になるように添加し、ベノミル添加培地での生育度調査と同様に 25°C、暗条件で 5 日間培養後に菌糸伸長の有無を調査した。

#### 結果

ベノミル添加培地での生育度は、分離菌株 02R-3A, 02R-3C がそれぞれ 30.3%, 28.7%となり、*C. acutatum* の特徴とされる 20%以上の数値を示した(表 4-7)。対照とした Na91-016 菌株は 29.7%であった。また、いずれの菌株もジエトフェンカルブ添加培地で菌糸伸長が認められた(表 4-7)。

#### 5) 菌糸の生育温度

材料および方法

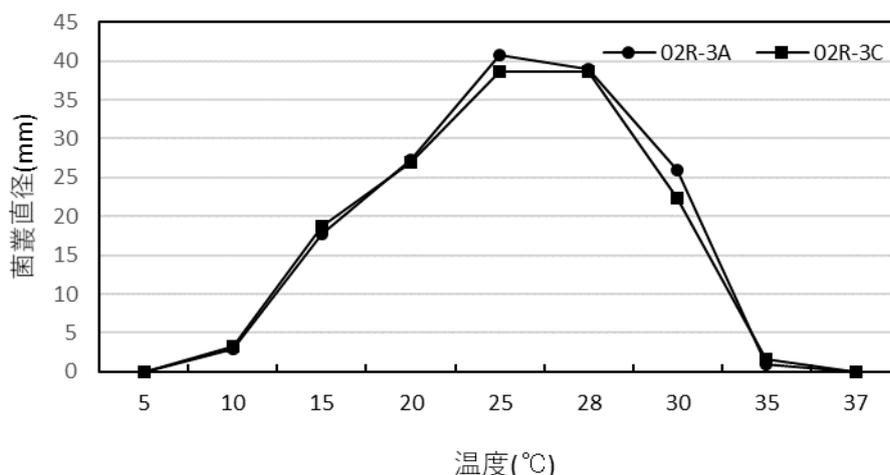


図 4-7 2002 年リンドウ分離菌株 (*Colletotrichum* sp.) の菌糸生育と温度との関係 (PDA 上)

(1) 供試菌株

分離菌株 02R-3A, 02R-3C の 2 菌株を供試した。

(2) 生育温度

分離菌株を 25°C, 暗条件, PDA 平板培地で前培養した後, コルクボーラー (直径 4mm) で打ち抜いた菌叢片を PDA 平板培地上に置床し, 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 37°C の各温度で, 暗条件, 5 日間培養後の菌叢直径を調査した。1 処理当たりペトリ皿は 3 枚供した。

結果

菌糸の生育は 10~35°C で認められ, 適温は 25~28°C であった (図 4-7)。

6) 種特異的プライマーによる PCR 検定

材料および方法

(1) 供試菌株

分離菌株 02R-3A, 02R-3C の 2 菌株を供試した。

(2) PCR 検定

分離菌株を PDB 培地で 25°C, 暗条件で 5 日間振とう培養し, DNA 抽出キット (QIAGEN 社製) を用いて全 DNA を抽出後, Sreenivasaprasad et al. (1996) の方法に準じて, *C. acutatum* を特異的に識別するプライマーを用いて PCR 検定を行った。

結果

*C. acutatum* に特異的なプライマー (Calnt2, ITS4) を用いた PCR 検定の結果, 分離菌株 02R-3A, 02R-3C は 490bp 付近にそれぞれ特異的な増幅断片が認められた (図 4-5)。

4 考察

リンドウ圃場で夏季に葉枯れや激しい株枯症状が発生し,

その病斑部から *Colletotrichum* 属菌が高率に分離されたため, 病原菌の分離, 接種による病徴の再現性の確認および病原菌の同定を行った。分離菌株はリンドウ (エゾ系) の茎に褐色の壊死斑を形成し, 原病徴が再現され, 病斑部から接種菌が再分離された。

2001 年にリンドウから得られた分離菌株 01R-A2, 01R-B は, イチゴ品種「とちおとめ」, 「女峰」に対する病原性は認められなかったが, シクラメン品種「シュトラウス」に葉縁からやや円形で褐色を帯びた壊死斑や花柄の軟化腐敗を引き起こし, 病斑部から接種菌が再分離された。分離菌株の分生子は, 無色, 単胞, 両端が丸い円筒形で, 大きさは平均 14.0×5.8 μm であった。PCA 培地上での付着器は, 暗褐色, 不整形で, 大きさは平均 11.5×7.6 μm であった。菌糸の生育は, PDA 培地上では 10~37°C で認められ, 適温は 28~30°C であった。*C. gloeosporioides* に特異的なプライマーを用いた PCR 検定の結果, 本菌に特異的な増幅断片が認められた。以上から, 2001 年分離菌株は, Sutton (1992) の検索表および形態数値, PCR 検定結果等から, *C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo と同定した (中山, 2005; 中山ら, 2004a; 中山ら, 2004b)。

2002 年にリンドウから得られた分離菌株 02R-3A, 02R-3C は, イチゴ品種「とちおとめ」に葉縁から赤褐色で不整形の病斑を形成し, 病斑部から接種菌が再分離された。分離菌株の分生子は, 無色, 単胞, 紡錘形~両端が尖った長楕円形で, 大きさは平均 13.5×5.1 μm であった。PCA 培地上での付着器は, 暗褐色, 棍棒上で, 大きさは平均 9.2×6.2 μm であった。分離菌株のベノミル添加培地での生育度 (佐藤, 1996) は, 28.7% または 30.3% となり, *C. acutatum* の特徴とされる 20%

以上を示した。さらに、ジエトフェンカルブ添加 PDA 平板培地での生育が認められた。菌糸の生育は、PDA 培地上では 10～35℃で認められ、適温は 25～28℃であった。C. *acutatum* に特異的なプライマーを用いた PCR 検定の結果、本菌に特異的な増幅断片が認められた。以上から、2002 年分離菌株は、Simmonds (1965), Sutton (1980) の検索表および形態数値、PCR 検定結果等から、C. *acutatum* Simmonds ex Simmonds と同定した(中山, 2005; 中山ら, 2004a; 中山ら,

2004b)。

2001 年分離菌株は C. *gloeosporioides*, 2002 年分離菌株は C. *acutatum* と同定し、現地の lindou 株枯症状の原因菌と判断した。赤坂(1993)が「炭そ病(病名, 病原菌とも未報告)」として紹介しているが、*Colletotrichum* 属菌による lindou 病害に関する正式な報告はない。そこで、病名を lindou 炭疽病と呼称し、病原菌に C. *gloeosporioides* および C. *acutatum* を併記することを提案した(中山ら, 2004a; 中山ら, 2004b)。

## 総合考察

本研究では、栃木県におけるトマト、イチゴ、リンドウという主要な園芸作物で発生した各種糸状菌病について、効果的な防除対策の構築に資するため、原因菌の分離、同定ならびに、その発生生態の解明等を目的とした。

トマトフザリウム株腐病については、施設栽培トマト(土耕栽培)で主根が激しく褐変し、しだいに立枯症状を呈する病害が発生し、地際部付近の茎の病斑部から分離した菌株により原病徴が再現され、その形態的特徴から *Fusarium solani* species-complex に属すと考えられた。さらに、ジャガイモに対する病原性、rDNA ITS 領域や TEF1- $\alpha$  遺伝子の解析結果は、Romberg and Davis (2007) の報告した *F. solani* f. sp. *eumartii* とよく一致しており、分離菌株を *F. solani* f. sp. *eumartii* と同定した。本菌によるトマト病害の報告は本邦初であり、病名をトマトフザリウム株腐病と提案した。

トマトの各種土壌病害では、台木品種が実用的な防除手段として広く普及している。本菌のトマト各品種に対する病原性を検討したところ、高度な抵抗性を示す品種は見当たらなかった。特に、台木品種が穂木品種に比較して発病株率、発病度とも高い傾向であり、現時点では台木品種を用いた本病の防除は困難である。本菌に対する抵抗性遺伝子の存在は不明だが、今後、本病に対して高い抵抗性を発揮する台木品種の育成に期待したい。

Sanchez et al. (1975) に準じ、本菌のトマト品種に対する病原性を実験室内の WA 培地上で簡便かつ短期間に検定する方法の有効性を明らかにした。本法は土壌接種法と比較して病徴発現までの日数や接種に係る労力を削減でき有効な接種方法と考えられた。

本菌は、トマト、ジャガイモだけでなく、インゲンマメ、ソラマメにも病原性を示すことを明らかにした。トマト栽培では、通常、他作物を同一の圃場に混作あるいは輪作することはないが、隣接圃場等においてジャガイモやインゲンマメ、ソラマメを栽培することは本病の防除対策上、避けた方がよいと考えられる。

本病は土壌病害であるが、トマト茎から自然感染し発病に至る場合があることを明らかにした。分生子の飛散やかん水に伴う土壌の跳ね上がり(土壌中に存在する厚壁胞子等)によるトマト茎への本菌の感染が考えられるが、主たる伝染源については今後の検討課題である。また、本菌の分生子が伝染源となってトマトの花器や果実が発病に至る可能性があることを明らかにした。

トマトの主要薬剤の一つであるキャプタン水和剤は、本菌の菌糸伸長や分生子発芽を著しく抑制し、本病の防除薬剤として有効性が高いと考えられた。しかし、現時点で本病に対する農薬登録はない。今後、トマト植物体上でキャプタン水和

剤の本病に対する予防効果や治療効果を明らかにしていく必要がある。

また、本菌はジャガイモに対して病原性を有し、その茎基部に褐色で腐敗した病斑を生じた。特に品種「男爵薯」は本菌に対する感受性が高く、本菌を土壌中から簡便かつ短期間で検出できる可能性が示唆された。さらに、本菌は品種「男爵薯」での病徴の有無等から、トマト萎凋病菌、トマト根腐萎凋病菌、トマト株腐病菌との識別が可能であった。一方、本菌とトマト立枯病菌の品種「男爵薯」での病徴はよく似ており、両菌の識別は困難であった。また、本技術の実用化に当たっては、無殺菌土壌に本菌を混和した保菌土壌を作製し今回と同様の試験を行うとともに、現地栽培圃場での実用性を検証する必要がある。

罹病残渣の適切な処理は、病原菌の伝染環を断ち切る上で有効な手段である。罹病切片中の本菌は、25°C、140 日の嫌氣的発酵処理により不活化した。今後、栽培の現場において本病罹病残渣の嫌氣的発酵処理による防除効果を検証する必要がある。

本研究で得られた知見から以下のような防除対策が考えられる。まず、トマト育苗用セルの消毒または新たなセルを使用するとともに、培土の消毒または消毒済み培土を使用することが前提となる。本病は土壌病害であり、土壌中の菌密度を低下させるうえでクロルピクリン剤による土壌消毒や土壌還元消毒が有効と考えられる。本病はトマトの促成長期どり栽培で新たに発生した病害であり、本作型は収穫期間が約 10 か月にもわたるため、根が土壌深くまで分布している。そのため、フスマや米ぬかを用いる通常の土壌還元消毒法に比べて、土壌のより深くまで防除効果を発揮する、糖蜜または低濃度エタノールを用いる方法が有効と考えられる。また、本病が本圃で発生した場合、発病株を早めに抜き取り、圃場外で適切に処分することが重要である。その手段として、罹病残渣の嫌氣的発酵処理による不活化が有効と考えられる。以上のように育苗用資材や培土に注意を払いながら、土壌消毒処理、罹病残渣の適切な処理など総合的な防除対策が本病の発生を抑制するうえで有効と考えられる。

トマト綿腐病については、土耕栽培トマトの育苗中に根腐症状を伴う生育不良が発生し、その根部罹病組織から分離した *Pythium* 属菌により原病徴が再現された。分離菌株は、その形態的な特徴、PCR 検定の結果等から *P. aphanidermatum* と同定し原因菌と判断した。これまで本菌はトマト果実腐敗の原因菌として報告があるが(楠元, 1950)、トマトでの根腐症状を伴う苗の生育不良として初めての報告である。本菌は耐久器官として卵胞子を形成し、遊走子が水を媒介として植物体への感染を拡大するなど、本菌の発生生態や防除に関するこれまでの知見を参考にすると、以下のような防除対策が考

えられる。本病が発生した農業者は同一の黒ボリポットを他品目と共用しながら数年間使用していたことから、黒ボリポットは他品目と共用はせず、トマト育苗用の黒ボリポットの消毒または新たな黒ボリポットを使用するとともに、培土の消毒または消毒済み培土を使用することが前提となる。併せて、栽培圃場の排水対策の徹底や適正なかん水管理により、土壌の水分過多の回避に努めることが必要不可欠である。さらに、本病が育苗中または本圃で発生した場合、圃場内等への蔓延防止のため発病株を早めに抜き取り、圃場外で適切に処分することが重要である。これらの総合的な防除対策が本病の発生を抑制するうえで有効であると考えられる。

イチゴピシウム根腐病については、イチゴ圃場(土耕栽培)で品種「とちひとみ」および「とちおとめ」の生育停滞や萎凋、枯死が発生し、その根部罹病組織から分離した *Pythium* 属菌により原病徴が再現された。分離菌株は、その形態的な特徴、rDNAITS 領域の塩基配列の解析、PCR 検定の結果等から、*P. sylvaticum*、*P. spinosum*、*P. helicoides* とそれぞれ同定し原因菌と判断した。これまでイチゴピシウム根腐病の病原として、*P. helicoides* が報告されており(鈴木ら, 2005; 渡辺ら, 2005)、本病の病原に *P. sylvaticum* および *P. spinosum* を追加することを提案した。また、*P. helicoides* については、イチゴ土耕栽培での初めての発生報告である。本病は、前記のトマト綿腐病菌(*P. aphanidermatum*)と同じく *Pythium* 属菌による病害であることから、以下のような防除対策が考えられる。健全な親株から子苗を採苗し、育苗用セルの消毒または新たなセルを使用するとともに、培土の消毒または消毒済み培土を使用することが前提となる。併せて、栽培圃場の排水対策の徹底や適正なかん水管理により、土壌の水分過多の回避に努めることが必要不可欠である。さらに、本病が育苗中または本圃で発生した場合、圃場内等への蔓延防止のため発病株を早めに抜き取り、圃場外で適切に処分することも重要である。これらの総合的な防除対策が本病の発生を抑制するうえで有効であると考えられる。

リンドウ炭疽病については、リンドウ圃場で夏季に葉枯れや激しい株枯症状が発生し、その病斑部から分離した *Colletotrichum* 属菌により原病徴が再現された。分離菌株は、その形態的な特徴、PCR 検定の結果、ベノミル添加 PDA 培地での生育度(佐藤, 1996)などから、*C. gloeosporioides*、*C. acutatum* とそれぞれ同定し原因菌と判断した。これまで *Colletotrichum* 属菌によるリンドウ病害に関する正式な報告は

なく、病名をリンドウ炭疽病と呼称し、病原菌に *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* を併記することを提案した。両菌は降雨等により分生子が飛散し植物体への感染が拡大するなど、本菌の発生生態や防除に関するこれまでの知見を参考にすると、以下のような防除対策が考えられる。本菌の植物体への感染には一定の濡れ時間が必要であり、それを回避するためイチゴ炭疽病防除で実用化されている雨よけ栽培(石川ら, 1989)が最も有効な防除手段と考えられる。また、チウラム剤が本病の防除薬剤として農業登録となっており(2019年2月現在)、発生初期の防除対応への効果が期待できる。本病が発生した場合、圃場内での蔓延防止のため発病株を早めに抜き取り、圃場外で適切に処分することが重要である。その手段として、イチゴ炭疽病罹病残渣処理で高い防除効果が明らかになっている嫌氣的発酵処理(石川ら, 1990)が有効である。これらの総合的な防除対策が本病の発生を抑制するうえで重要と考えられる。

農作物栽培の現場では、さまざまな農業生産上の課題が見受けられる。中でも、病害虫の発生は、農業者の所得確保や農業経営の安定化、さらには産地の維持・発展の面で大きな阻害要因となっている。栽培現場で原因不明の生育不良株が発生した場合、通常、農業者は各県等にある最寄りの普及指導センターに相談し、普及指導センターを通じて農業試験研究機関または病害虫防除所に生育不良株が持ち込まれ、その診断作業がスタートする。

農作物の病害研究は、生育不良株などの原因を究明し、その病原の発生生態等を明らかにするとともに、それらの知見を総合して農業者が経営的に成り立つような処方箋(防除対策)の策定・提案に大きく貢献するものである。農作物の生育不良株などと向き合う第一歩が「診断」という作業であり、正確で迅速な「診断」のためには病徴の詳細な記載や病原の分離、同定に関する知見の集積が必要不可欠である。その意味において、栽培現場に近い位置にいる各県等農業試験研究機関の研究者の役割は大きいと考える。

本研究は、栃木県の主要な園芸作物であるトマト、イチゴおよびリンドウに新たに発生した糸状菌病について、栽培現場からの強い要望に対応するため、病原菌の分離、同定、発生生態の解明等に取り組み、それらの成果を取りまとめたものである。ここで得られた知見が、現場段階での効果的な防除対策の構築や園芸作物の生産安定につながり、農業者の経営安定に貢献できれば幸いである。

## 要旨

トマト、イチゴおよびリンドウは、栃木県の園芸生産の中で重要な品目となっている。現地圃場では、これら品目の生育不良や萎凋、枯死など糸状菌による病害が発生し、安定生産上の大きな阻害要因となっている。そこで、病原菌の分離、同定、その発生生態の解明等に取り組んだ。

トマトフザリウム株腐病は、トマトの根が褐変腐敗し、地上部がしだいに萎凋、枯死する病害である。地際部付近の茎の病斑部から *Fusarium* 属菌が高率に分離され、接種試験により原病徴の再現、分離菌株の形態的な特徴、ジャガイモに対する病原性、rDNA ITS 領域や TEF1- $\alpha$  遺伝子の解析結果から、分離菌株を *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* と同定した。本菌によるトマト病害の報告は本邦初であり、病名をトマトフザリウム株腐病と呼称することを提案した。本菌は、トマトの他、インゲンマメ、ソラマメに病原性を示した。菌糸の生育は 10~37°C で認められ、適温は 28~30°C 付近であった。圃場では、摘葉に伴う茎の傷口から感染し発病に至ったと考えられる病斑も見受けられる。本菌のトマト茎への接種により、茎に褐色病斑を形成し原病徴が再現された。また、本菌のトマトに対する病原性を簡便かつ短期間に検定する方法として、トマト種子を分生子懸濁液に浸漬した後、WA 培地に置床し、その幼植物体での病徴の有無で病原性を検定する方法が有効であった。トマトに登録のある主要薬剤を供試し、本菌の最小生育阻止濃度 (MIC) を検討したところ、いずれの薬剤も MIC は 1600 $\mu$ g/ml より大きかった。各薬剤の実用濃度での菌糸伸長抑制率は、トリフルミゾール水和剤、キャプタン水和剤が 94.0% と高かった。また、キャプタン水和剤は、分生子の発芽を著しく抑制し、本病の防除薬剤として有効である可能性が高いと考えられた。ジャガイモマイクロチューバーを用いて本菌の土壌からの検出を試みた。その結果、品種「男爵薯」は本菌に対する感受性が高く、萌芽した植物体の茎基部と根の境界付近に形成される淡褐色~褐色の腐敗症状を目印として、本菌を土壌から検出できる可能性が示唆された。さらに、

嫌氣的発酵処理による本菌の不活化を検討したところ、25°C、140 日処理で本菌が不活化したと考えられた。

トマト綿腐病は、地面に近接したトマト果実が白色綿状の菌糸で覆われ、その軟化腐敗した部位から *Pythium aphanidermatum* が分離され命名された病害である(楠元, 1950)。今回、栃木県の土耕栽培トマトの育苗中に根腐症状を伴う生育不良が発生し、根部罹病組織から *Pythium* 属菌が高率に分離された。接種試験による原病徴の再現、分離菌株の形態的な特徴、種特異的プライマーによる PCR 検定等により、分離菌株を *P. aphanidermatum* と同定した。*P. aphanidermatum* によるトマトでの根腐症状を伴う苗の生育不良として初めて報告した。

イチゴピシウム根腐病は、イチゴが根腐症状を伴って下葉の葉柄が小豆色に変色し、生育が停滞、萎凋する病害である。生育不良株の根部罹病組織から *Pythium* 属菌が高率に分離され、接種試験による原病徴の再現、分離菌株の形態的な特徴、rDNA ITS 領域の塩基配列、種特異的プライマーによる PCR 検定等により、分離菌株を *P. spinosum*, *P. sylvaticum*, *P. helicoides* とそれぞれ同定した。*P. helicoides* によるイチゴピシウム根腐病の報告(鈴木ら, 2005; 渡辺ら, 2005)があることから、*P. spinosum*, *P. sylvaticum* についてはイチゴピシウム根腐病への病原追加を提案した。なお、*P. helicoides* は、既報ではイチゴ養液栽培での発生報告であったが、今回初めて土耕栽培での発生を報告した。

リンドウ炭疽病は、リンドウ茎葉に斑点を生じ、病勢が進展すると株枯症状を呈する病害である。茎葉の病斑部から *Colletotrichum* 属菌が高率に分離され、接種試験による原病徴の再現、分離菌株の形態的な特徴、種特異的プライマーによる PCR 検定等により、分離菌株を *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* とそれぞれ同定した。これまで、リンドウ病害では *Colletotrichum* 属菌による正式な報告はなく、本病の病名をリンドウ炭疽病と呼称し、病原菌に *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* を併記することを提案した。

## 謝辞

この論文を草するに当たり、法政大学生命科学部の石川成寿教授には、ご懇切な研究指導とご校閲を賜った。また、ご多用であるにもかかわらず、種々のアドバイスをいただき、常に著者へのご配慮と激励を賜った。ここに衷心より感謝の意を表す。

第 1 章の研究では、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構遺伝資源センターの青木孝之博士には著者の共同研究者であるだけでなく、ご懇切なご指導ならびに有益なアドバイスを終始いただくなど多大なご支援ご協力を賜った。地方独立行政法人北海道総合研究機構道南農業試験場の三澤知央博士には貴重な菌株を分譲していただくとともに、有益なアドバイスをいただいた。宮崎県総合農業試験場の今村幸久氏には貴重な菌株を分譲していただいた。また、キリンホールディングス株式会社フロンティア技術研究所の大西 昇氏にはジャガイモ各品種のマイクロチューバーを分譲していただいた。第 2 章、第 3 章では、岐阜大学流域圏科学研究センターの景山幸二教授、岐阜県農業技術センターの渡辺秀樹博士にはトマト綿腐病菌、イチゴピシウム根

腐病菌の同定について、著者の共同研究者であるとともに、ご指導ならびに有益なアドバイスをいただいた。第 4 章では、栃木県農業試験場の石川成寿博士(現在、法政大学生命科学部)には病原菌の同定について丁寧にご指導をいただいた。栃木県農業試験場黒磯分場(現在、黒磯農場)の藤田雅一氏(現在、栃木県農政部経営技術課)にはリンドウの接種植物を準備、提供していただいた。また、全ての章にわたり、各地域で活動している普及指導員の方々には現地調査等で多くのご協力をいただいた。ここにこれらの方々に対し、衷心より感謝申し上げる。

また、栃木県農業試験場研究開発部病理昆虫研究室の福田 充室長をはじめ、小山田浩一氏(元栃木県農業試験場)、山城 都氏(現在、栃木県河内農業振興事務所)、和氣貴光氏(現在、栃木県畜産酪農研究センター)、森島正二氏(栃木県農業試験場)、青木久美氏(元栃木県農業試験場)には実験の円滑な遂行に多大なご協力をいただいた。ここに深甚なる感謝の意を表す。さらに、本研究の実験補助に労を惜しまずご協力いただいた元栃木県農業試験場の齋藤芳彦氏に厚く感謝申し上げる。

## 引用文献

- 鏡谷大節・鈴木孝仁・赤井 純 (1963) 北海道におけるアスパラガスの病害について. 北農 30: 12-24.
- 赤坂安盛 (1993) リンドウ病害の発生と防除. 日本植物防疫協会「平成5年度野菜病害虫防除研究会現地検討会」講演要旨 11-18.
- Aoki T., O'Donnell K. and Scandiani M.M. (2005) Sudden Death Syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience* 46(3): 162-183.
- Carpenter C. W. (1915) Some potato tuber-rots caused by species of *Fusarium*. *J. Agric. Res.* 5: 183-209.
- 築尾嘉章・小林紀彦・秋田 滋 (1993) イチゴ葉枯炭そ病(仮称)菌の宿主範囲ならびに他作物から分離された *Colletotrichum acutatum* のイチゴに対する病原性. 丸病虫研会報 39:32-35.
- Ebihara Y. and Uematsu S. (2014) Survival of strawberry-pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Phytophthora cactorum* and *Verticillium dahliae* under anaerobic conditions. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 50-58.
- Eguchi N., Kondo K. and Yamagishi N. (2009) Bait twig method for soil detection of *Rosellinia nacatrix*, causal agent of white root rot of Japanese pear and apple, at an early stage of tree infection. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 325-330.
- Gerlach W. and Nirenberg H. (1982) The Genus *Fusarium*-a Pictorial Atlas. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-u. Forstw.* (Berlin-Dahlem) 209: 364-368, 373-376.
- Goss R. W. (1940) A dry rot of potato stems caused by *Fusarium solani*. *Phytopathology* 30: 160-165.
- 萩原 廣・竹内昭士郎 (1982) 罹病残さの好氣的または嫌氣的発酵処理によるダイコン萎黄病菌の不活化. 日植病報 48: 688-690.
- 萩原 廣・竹内昭士郎 (1983) 罹病残さの嫌氣的発酵によるダイコン萎黄病菌の不活化に対する発酵時の温度の影響. 日植病報 49: 713-715.
- 原 敬和・森田剛成・軸丸祥大 (2010) イチジクの枝を用いた株枯病保菌土壌の簡易診断法. 日植病報 76: 205(講要).
- 糸井節美・安村作郎・久保村安衛・井上昭司・中山賢三 (1964) クワ枝による白紋羽病菌の簡易土壌検診法について. 日蚕雑 33: 161-166.
- 今村幸久・青木孝之・竹原利明・佐藤豊三 (2000a) *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl: Fries によるトマトの黒すじ実腐病(新称). 日植病報 66:94(講要).
- 今村幸久・川越洋二・佐藤豊三・三浦猛夫 (2000b) 施設トマトに発生した *Nectria haematococca* Berkeley & Broome によるトマト立枯病(新称). 日植病報 66: 255 (講要).
- 今村幸久・川越洋二・三浦猛夫 (2002) ピーマン立枯病菌による実腐症状の発生と同病の種子伝染性の解明. 日植病報68: 47 (講要).
- Ishiguro Y., Otsubo K., Watanabe H., Suzuki M., Nakayama K., Fukuda T., Fujinaga M., Suga H. and Kageyama K. (2014) Root and crown rot of strawberry caused by *Pythium helicoides* and its distribution in strawberry production areas of Japan. *J Gen Plant Pathol* 80:423-429.
- 石川成寿・萩原 廣・中山喜一・国安克人 (1990) 罹病残渣の嫌氣的発酵によるイチゴ炭そ病菌の不活化. 関東病虫研報 37: 111-112.
- 石川成寿・中山喜一・常見讓史・中澤靖彦 (1992) 栃木県で発生した *Colletotrichum acutatum* Simmonds によるイチゴ炭そ病. 関東病虫研報 39: 129-133.
- 石川成寿・田村恭志・中山喜一・大兼善三郎 (1989) イチゴ炭そ病の育苗期の雨よけ栽培による防除効果. 関東病虫研報 36:87.
- 駒田 旦・山本 磐・国安克人・斎藤 正・江塚昭典 (1989) トマト萎ちよう病(根腐萎ちよう)病原菌の分化型ならびに病名の改訂について. 植物防疫 43: 645-646.
- 久能 均・白石友紀・高橋 壮・露無慎二・眞山滋志 (1999) 新編植物病理学概論. 養賢堂 p205.
- 黒田克利・竹原利明・萩原 廣 (1996) 非病原性フザリウム菌のトマト萎ちよう病発病抑制効果の判定のための室内検定法. 日植病報 62: 278(講要).
- 草刈真一・田中 寛 (1982) 養液栽培において発生した *Pythium dissotocum* によるトマトの根腐れ症. 日植病報 48: 349(講要).
- 草刈真一・田中 寛 (1985) *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum* によるイチゴ果実腐敗病. 日植病報 51:39-42.
- 草刈真一・田中 寛 (1987) 水耕栽培において発生した *Pythium* 属菌によるトマトの根腐病. 関西病虫研報 29: 31-34.
- 楠元 司 (1950) 南瓜及び蕃茄果実の綿腐病を基因する *Pythium* について. 日植病報 15: 17-20.
- 松本智恵子・景山幸二・須賀晴久・百町満朗 (1999) *Pythium aphanidermatum*, *P. vanterpoolii* および *P. sulcatum* の種特異的プライマーを用いた PCR による検出. 日植病報 65: 414-415(講要).
- 松尾卓見・駒田 旦・松田 明(編) (1980) 作物のフザリウム病.

- pp. 366, 369. 全国農村教育協会, 東京.
- Merz U (1993) American Society of Sugar Beet Technologists, Denver, USA, pp. 103–106.
- 三澤知央(2007) *Rhizoctonia solani* によるトマト株腐病(新称). 日植病報 73: 76(講要).
- 森田剛成・原 敬和・中野道治・軸丸祥大(2013)枝挿し法によるイチジク株枯病菌の土壌からの検出. 関東病虫研報 55: 71–75.
- 森田剛成・軸丸祥大・原 敬和(2014)イチジク圃場の土壌から株枯病菌を簡易に検出する「枝挿し法」. 植物防疫 68: 79–83.
- 中山喜一(2005) *Colletotrichum* 属菌 2 種によるリンドウ炭疽病(新称). 今月の農業(化学工業日報社)12月号 18–22.
- 中山喜一(2013)素寒天培地上でのトマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) のトマトに対する病原性検定. 関東病虫研報 60: 49–51.
- 中山喜一・青木久美(2014)嫌氣的発酵処理によるトマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) の不活化. 関東病虫研報 61: 35–36.
- 中山喜一・青木孝之(2010) *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* によるトマトフザリウム株腐病(新称). 日植病報 76:7–16.
- 中山喜一・青木孝之・漆原寿彦・渡辺秀樹・堀之内勇人・福田 充・石川成寿(2006)栃木県, 群馬県および岐阜県のトマト立枯株から分離した *Fusarium solani*-complex 菌株とその分子系統解析. 日植病報 72:205–206(講要).
- 中山喜一・後藤知昭・野沢英之・石川成寿(2004a) *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* によるリンドウ炭疽病(新称). 日植病報 70:218(講要).
- 中山喜一・後藤知昭・野沢英之・石川成寿(2004b) *Colletotrichum* 属菌 2 種によるリンドウ炭疽病(新称). 関東病虫研報 51:101–104.
- 中山喜一・景山幸二・渡辺秀樹・福田 充・石川成寿(2008) *Pythium spinosum* および *P. sylvaticum* によるイチゴピシウム根腐病の発生(病原菌追加). 日植病報 74:177(講要).
- 中山喜一・景山幸二・渡辺秀樹・福田 充・石川成寿(2014) *Pythium spinosum* および *P. sylvaticum* によるイチゴピシウム根腐病(病原追加). 関東病虫研報 61:40–42.
- 中山喜一・和氣貴光・青木孝之・森島正二・福田 充(2010a) トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) のトマト花器, 果実および茎に対する病原性. 日植病報 76:135–141.
- 中山喜一・和氣貴光・森島正二・福田 充(2010b) トマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) の薬剤感受性. 関東病虫研報 57:105–106.
- 中山喜一・和氣貴光・山城 都(2012a) ジャガイモを利用したトマトフザリウム株腐病菌の土壌からの検出. 日植病報 78: 196(講要).
- 中山喜一・和氣貴光・山城 都(2012b) ジャガイモマイクロチューバーを用いた土壌からのトマトフザリウム株腐病菌 (*Fusarium solani* f. sp. *eumartii*) の検出. 関東病虫研報 63:48–51.
- 中山喜一・渡辺秀樹・福田 充・景山幸二(2007) *Pythium aphanidermatum* による土耕栽培トマトの育苗中に発生した根腐症状. 関東病虫研報 54:1–4.
- Nakayama T., Horita M. and Shimanuki T. (2007) *Spongospora subterranea* soil contamination and its relationship to severity of powdery scab on potatoes. J. Gen. Plant Pathol. 73: 229–234.
- 中山尊登・眞岡哲夫(2008) おとり植物を利用したジャガイモモップトップウイルスの土壌診断. 農業および園芸 83: 475–480.
- 日本植物病理学会編(2000) 日本植物病名目録. pp. 34, 39. 日本植物防疫協会, 東京.
- Nirenberg H. I. and Brielmaier-Liebetanz U. (1996) *Nectria ipomoeae* Halst., anamorph: *Fusarium striatum* Sherb., on *Passiflora edulis* Sims. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 48: 207–275.
- Nirenberg H. I. and O'Donnell K. (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 434–458.
- 西村範夫(2008) 植物防疫基礎講座 PCNB を用いない *Fusarium oxysporum* 用選択培地. 植物防疫 62: 164–167.
- 農林水産省(2017) 平成 28 年産野菜生産出荷統計.
- 農林水産省(2018) 平成 28 年生産農業所得統計.
- O'Donnell K. (1996) Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium*. Sydowia 48(1): 57–70.
- O'Donnell K. (2000) Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* species complex. Mycologia. 92: 919–938.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Cigelnik E. and Ploetz R. C. (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2044–2049.
- 大嶋聡子・多賀正節(1991) 水耕栽培のトマトとガーベラの根腐れ症状株から分離されたホモタリクな *Nectria haematococca* について. 日植病報 57: 396 (講要).

- Peter R. M., Sreenivasaprasad S. and Brown A. E. (1992) Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. FEMS Microbiology Letters 98: 137–144.
- Romberg M. K. and Davis R. M. (2007) Host Range and Phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from Potato and Tomato in California. Plant Disease 91: 585–592.
- Rossman A.Y., Samuels G.J., Rogerson C.T. and Lowen R. (1999) Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). Stud. Mycol. 42: 1–248.
- Sanchez L. E., Endo R. M. and Leary J. V. (1975) A Rapid Technique for Identifying the Clones of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Causing Crown- and Root-rot of Tomato. Phytopathology 65: 726–727.
- 佐藤豊三(1996)炭疽病菌の分類の問題点と同定法. 植物防疫 50:273–280.
- 佐藤豊三(2013)我が国の植物病害と病原微生物. 日本微生物資源学会誌 29: 79–90.
- Schroers HJ, Samuels GJ, Zhang N, Short DPG, Juba J, Geiser DM. (2016) Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. Mycologia 108: 806–819.
- Simmonds J. H. (1965) A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Qd. Jl. Agric. Anim. Sci. 22:437–459.
- 「新版土壌病害の手引」編集委員会(編)(1984)新版土壌病害の手引. 日本植物防疫協会 pp1, 215–221.
- Snyder W.C. and Hansen H.N. (1941) The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. Amer. J. Bot. 28: 738–742.
- Sreenivasaprasad S., Sharada K., Brown A. E. and Mills P. R. (1996) PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathology 45:650–655.
- Sutton B. C. (1980) The Coelomycetes. Commonwealth Mycol. Inst., Kew. pp. 523–537.
- Sutton B. C. (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford, 1–26.
- Swofford D. L. (2002) PAUP: phylogenetic analyses using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 鈴木幹彦・外側正之・米山千温(2005) *Pythium helicoides* によるイチゴピシウム根腐病(新称). 日植病報 71:209(講要).
- 多賀正節・久野公子・今村幸久(2006)植物病原菌として分離された日本産ホモタリク *Nectria haematococca* の学名変更について. 日植病報 72: 206 (講要).
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24: 4876–4882.
- 東條元昭・藤田百合子・Hani M. A. ・一谷多喜郎(1993)鉢試験のためのベントグラス種子を用いた *Pythium* 属菌接種源の作製法. 関西病虫研報 35: 1–5.
- 富川 章(1987)トマト果実腐敗症の発生とその原因. 植物防疫 41:56–61.
- 富川 章・田上征夫・山本敏夫(1985)トマト果実腐敗症(仮称)の発生について. 日植病報 51:76(講要).
- 富川 章・田上征夫・山本敏夫(1986)トマト果実腐敗症の発生環境について. 日植病報 52:520(講要).
- van der Plaats-Niterink A. J. (1981) Monograph of the genus *Pythium*. Stud. Mycol. 21:1–242.
- 渡辺秀樹・堀之内勇人・棚橋一雄・景山幸二(2005) *Pythium helicoides* によるイチゴピシウム根腐病. 日植病報 71:209–210(講要).
- Watanabe T. (1977) Pathogenicity of *Pythium myriotylum* Isolated from Strawberry Roots in Japan. 日植病報 43:306–309.
- Watanabe T., Hashimoto K. and Sato M. (1977) *Pythium* Species Associated with Strawberry Roots in Japan, and Their Role in the Strawberry Stunt Disease. Phytopathology 67:1324–1332.
- Waterhouse G. M. (1967) Key to *Pythium* Pringsheim. Commonwealth Mycological Institute, Kew UK Mycological Papers 109:1–15.
- Wellman F. L. (1939) A technique for studying host resistance and pathogenicity in tomato *Fusarium* wilt. Phytopathology 29: 945–956.
- White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A. et al. (eds.) PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- 山本 磐・駒田 旦・国安克人・斎藤 正・江塚昭典(1974)トマトの根腐萎ちょうを起すトマト萎ちょう病菌の新レーズ. 関西病虫研報 16: 17–29.

銀 玲・景山幸二・浅野貴博・千田昌子・渡辺秀樹・須賀晴  
久・福井博一(2007)種特異的プライマーを用いた PCR

による花き生産環境からの *Pythium helicoides* の検出.  
日植病報 73: 86-93.