Pythium および Phytophthora 属菌による花き病害の 総合診断に関する研究

渡辺秀樹

岐阜県農業技術センター 501-1152 岐阜市又丸

Studies on Integrated Diagnosis of Flower Diseases Caused by Pythium and Phytophthora

Hideki Watanabe

Gifu Prefectural Agricultural Technology Center, Matamaru, Gifu, 501-1152

Synopsis

The sub-irrigation system such as Ebb & Flow has been rapidly and widely adopted in the production of potted flowers, since it provides uniform irrigation and fertilization in addition to reduced labor costs. However, the Ebb & Flow system is vulnerable to infection by *Pythium* and *Phytophthora* species, which produce large numbers of motile zoospores in water. This problem is serious in greenhouses in which the nutrient solution is re-circulated. Control of the diseases is currently performed by application of chemical fungicides after the occurrence of the disease. Excess application of the chemical fungicides should be eliminated for an environmental preservation and a cost reduction. For establishing adequate disease management strategies, it is essential to determine infection routes of these pathogens in hydroponic cultures. The objectives of this study are to develop detection method of *Pythium* and *Phytophthora* necessary for ecological study, and to identify the pathogens, and to determine infection routes of these pathogens of the several diseases of ornamental flower in Gifu prefecture.

キーワード: 花き、底面給水栽培、水媒伝染性病害、Pythium、Phytophthora、総合診断

目 次			
緒 言	8	第三章 伝染経路の解明	39
		1. バラ根腐病の発生生態と伝染環	39
第一章 新規発生病害の原因究明	9	2. カランコエ根腐病の発生生態と伝染環	44
1. カランコエ根腐病、疫病	10	3. ゼラニウム茎腐病の発生生態と伝染環	46
2. ポインセチア根腐病	15	小 括	49
3. ゼラニウム茎腐病	17		
4. バラ疫病	20	第四章 ピシウム病害の発生生態と被害助長要因	49
5. キク疫病	26	1. 給水マット栽培における病原菌の動態	49
小 括	29	2. 肥培管理による影響	51
	121	小 括	54
第二章 病原菌検出手法の開発	29		
1. 水、養液からの検出方法	29	総合考察	54
1) 捕捉法による高温性ピシウムの選択的分離法	29	摘 要	56
2) メンブレンフィルターによる遺伝子検出法	35	謝辞	57
2. 土、培養土からの検出方法	37	引用文献	59
小 括	38	Summary	60

緒。言言

近年、わが国では都市化の進展やライフスタイルの変 化などにより、生活に安らぎや潤いを与える花と緑の重 要性が再認識されている。また、最近では園芸福祉、園 芸療法として福祉・医療分野においても大きな役割を担 うようになってきている。我が国の花き産業は、生産か ら小売までを含めた経済取引ベースで 9,400 億円の規模 になる(総務省統計局「平成17年産業連関表(基本分類 表)」。農業全体で見ると、花きの作付面積は、全耕地面 積の 0.8%にあたる 3 万 6 千 ha にすぎないが、花き・花 木生産従事者数は、全農業従事者数の7%にあたる24万 6千人、花き産出額は、農業総産出額の6%にあたる4,800 億円となっている(農林水産省統計部「花木等生産状況 調査」、「耕地及び作付面積統計」、「2005農林業センサス」、 「生産農業所得統計」)。また、国際的にみると我が国の 花き生産額はアメリカ、オランダに次いで世界第3位と なっており、花き産業は日本の農業の中で重要な分野の 一つであると言える。一方、岐阜県についてみた場合、 2006年の花き栽培面積は266haで、その内訳は切花90ha、 鉢物 79ha、苗物 46ha、その他 50ha となっている。また、 生産額は90億852万円で、種類別構成比は切花15%、 鉢物 63%、苗物 17% (花壇用苗 13%、バラ苗 4%)、そ の他 5%となっており、鉢物の割合が高いのが特徴であ る。さらに、ミニバラ、セントポーリア、ベゴニア類、 シクラメン種苗およびバラ苗がいずれも全国シェアの第 1位を占めている(岐阜県農政部「平成20年度岐阜県農 業の動き」)。

鉢物生産において、かん水作業の省力化は生産効率を 改善する上で最も重要な要素の一つである。シクラメン の例では、生産に必要な労力のうち、かん水作業は40% を占める(森岡,1993)。このため、国内においても1970 年代より給水マットを使用した底面給水方式や、ひもを 利用した樋給水方式(渡辺ら,1975)が導入され、かん水 作業の省力化に大きく貢献してきた。さらに1980年代に は、海外から導入されたエブ・アンド・フロー (Ebb & Flow)方式が岐阜県や愛知県で普及しはじめ、現在では 全国に広がり鉢物生産はさらに大規模化が進んできてい る。エブ・アンド・フローは「潮の満ち引き」という意 味で、鉢が並んだベンチ内に鉢底から 2-3cm 程度に一時 的に湛水してベンチ内の鉢に一斉に給水し、徐々に排水 する方式で、その特徴からプールベンチ方式と呼ばれる こともある。また、生産出荷体制の効率化のため、容易 に移動可能なムービングベンチと本方式を合わせて導入 している生産施設も多い。本方式の原型は「腰水かん水」 として戦前から見られ、アメリカでは1970年まで採用さ れていた経緯があるが、当時の根圏管理の技術力、施肥 基準の未完成もあり十分普及することはなかった。その 後改良が進められ、Ebb & Flow 方式はヨーロッパで普及 が進み日本にも導入されてきた。本方式の特徴として3 つを挙げることができる。まず、第一にベンチに縦溝が設けられており排水性を高めていること、第二に緩慢な水位の上昇と下降によって水分の流動を引き起こし、根圏の溶存酸素の減少を回避できること、第三に養液の循環利用が可能になることである(長村、2005)。Ebb & Flow方式の原型は、もともと養液の循環方式であり、節水に対する意識の高いヨーロッパでは養液の循環利用が進んでいるが、日本においては、水が潤沢にあること、鉢物の施肥の多くが緩効性肥料を中心とした体系であったことから、水および養液を循環利用していないケースが多く見受けられる。しかしながら、近年は、国内の鉢物生産農家においても環境保全意識の高まりや肥料コストの節減などから養液の循環利用を行う事例が増加してきている。

一方で養液の循環利用により最も懸念されるのが Pythium 属菌や Phytophthora 属菌といった水媒伝染性病 害による被害の増加である。これらは、一般に水中で胞 子の一種である遊走子を多量に形成し、水を介して健全 株に次々に伝染するため、養液栽培では最も注意が必要 な病原菌である。実際に、海外の養液栽培においても多 くの報告があり (Sanogo and Moorman 1993; Stanghellini et al. 2000b; Thinggaard and Middelboe 1989; Thinggaard and Andersen 1995)、循環式養液栽培においては、時に壊滅 的な被害をもたらすことがある。国内においては、循環 式の Ebb & Flow 方式がいち早く導入された岐阜県のミ ニバラ生産施設において、1996 年に Pythium helicoides による新規の病害が発生し、大きな経済的被害をもたら した (Kageyama et al. 2002a)。このように、Ebb & Flow 方式の導入は、経営の効率化・大規模化を可能にする一 方で、水媒伝染性病害による被害が大規模化しやすいリ スクも伴っている。

従来、Pythium 属菌および Phytophthora 属菌の種の同 定は、胞子のう(遊走子のう)や有性器官などの形態的 特徴および菌糸生育特性などにより行われてきた。現在、 Pythium 属菌については、van der Plaats-Niterink (1981)の 検索表が最も一般的に使用されている。また、 Phytophthora 属菌については、Waterhouse (1963) による 検索表が主に使用されている。しかしながら、Pythium 属菌および Phytophthora 属菌については、近縁の種間で は分類基準が曖昧で判断に苦慮する場合がある。さらに Phytophthora 属菌については、雌雄異株性の種が多く、 単一培養では有性器官を形成しないため、種名が決定で きない場合が多かった。そのような中、1980年代には PCR (Polymerase-chain-reaction) 法が開発され、White et al. (1990)により rDNA の 18S、28S および ITS (Internal-transcribed-spacer) 領域を増幅するユニバーサ ルプライマーが開発されると、分類の分野で分子生物学 的手法の応用研究が急速に進んだ。植物病原菌も例外で はなく、現在では多くの植物病原菌の同定に利用されて きている。Pythium 属菌および Phytophthora 属菌では、 rDNA のシークエンス解析だけでなく、RFLP (Restriction-fragment-length-polymorphism) , RAPD (Random-amplified-polymorphic DNA) , AFLP (Amplified-fragment-length-polymorphism) などの分子生 物学的手法による分類と従来の形態分類を比較した研究 が多く報告されている (Chen et al. 1992; Chen and Hoy 1993; Wang and White 1997; Cooke et al. 1996; Cooke and Duncan 1997; Crawford et al. 1996; Matsumoto et al. 1999; Matsumoto et al. 2000; Forster et al. 2000)。最近では Levesque and de Cook (2004) によって、van der Plaats-Niterink (1981) が分類した Pythium 属菌の基準菌株 等の塩基配列を明らかにし、系統解析がなされている。 また、Phytophthora 属菌については、Park et al. (2008) に よって菌株と塩基配列のデータベース化が進められてい る。このように、Pythium 属菌や Phytophthora 属菌の同 定手法については他の植物病原菌と同様に大きな変革期 を迎えようとしている。

Pythium 属菌や Phytophthora 属菌は、様々な種類の植 物材料を用いた捕捉法により土壌中から分離できること が報告されている (Hendrix and Campbell 1970; Sanchez et al. 2000; Thinggaard and Andersen 1995; Watanabe 1981; Watanabe 1984)。また、Thinggaard and Andersen (1995) は、 Ebb & Flow 方式の循環養液中から Cedrus deodara の葉 を用いて Phytophthora cryptogeaの遊走子を捕捉できたと 報告している。また、その他の方法として抗原抗体反応 を利用した方法やフィルターを用いた方法などがある。 Kageyama et al. (2002b) は、Pythium sulcatum のモノクロ ーナル抗体を作製し、ELIZA (Enzyme-linked-immuno sorbent-assay) によりニンジン罹病組織や土壌から検出で きたと報告している。Pettit et al. (2002) はイムノアッセ イ法、フィルタリング法および捕捉法を用いて、Pythium 'group F'の遊走子を2×102 zoospores/ml の密度で検出で きたと報告している。また、Hong et al. (2002) は、9種 類の市販のメンプレンフィルターを用いて、溶液中から Pythium 属菌および Phytophthora 属菌の検出精度を比較し、 検出に適したフィルターの種類をを明らかにしている。これら 以外の手法として、最近では上述のように分子生物学的手 法を用いた研究が進められており、種特異プライマーによる PCR 検出法が開発されている(Kageyama et al. 1997; Wang et al. 2002; 銀玲ら 2007)。

近年は景気低迷により消費者の需要は落ち込んでいることから、花き産業をめぐる情勢は大変厳しく、生産現場では更なるコスト低減が求められている。そのために、病害発生による被害ロスを可能な限り少なくすることは重要な課題である。環境汚染に対する生産者および消費者の意識の高まりから、養液の循環利用に対するニーズは高まっている。しかし、その一方で必要以上の化学薬

剤の投入は安全面、経費面および耐性菌の出現からも見 直す必要がある。これまで、鉢物生産施設においては、 Pythium 属菌や Phytophthora 属菌による病害が発生した 場合、発生後に薬剤防除することが多く、十分な防除効 果が得られないことから大きな被害に繋がるケースが多 かった。また、毎年のように同様の被害が発生している のにも関わらず、その原因がどこにあるのか、病原菌は どこにいるのかといった本来は必要な情報がなく有効な 対策が見出せずにいる場合が多かった。鉢物生産施設は、 単一品目の大量生産方式や、複数種を組み合わせて周年 出荷する方式など、その生産体系は経営体によって千差 万別である。このため、水媒伝染性病害の発生様相は様々 であり、その要因を解明するのは容易なことではない。 また、Pythium 属菌は国内で確認されているもので40種、 Phytophthora 属菌は 54 種と多く、現地施設から採取した 苗、培土、水などから特定の種を検出することは、これ まで非常に困難であった。花き経営の安定化のためには、 伝染経路を明らかにして、病原菌の生態に基づいた適切 な対応をとることにより、経済被害を最小限度に抑える ことが大切である。しかしながら、これまでは検出技術 の限界などから、施設全体を考慮した発病要因の検討は あまりされてこなかった。景山ら (2007)は、従来の病原 菌を特定するだけの病害診断のあり方を見直し、その病 原菌のライフサイクル、侵入経路(第一次伝染源)や被 害拡大要因(第二次伝染)などについて、栽培環境を「総 合診断」する必要性を述べている。総合診断によって、 その施設での病害の伝染経路を明らかにし、伝染経路を 遮断することにより、効率的な防除が可能になる。最近 では、前述の分子生物学的手法に加えて、リアルタイム PCR による DNA 定量法やマイクロサテライトマーカー を用いた手法が開発されている (Yin-Ling et al. 2009)。 これらは、従来では困難であった種類の病原菌の定量を 可能にし、また同種の菌についても類縁関係がより詳細 に判定できるため、総合診断の強力なツールとして期待 されている。

そこで本研究では、花き生産施設で発生している水媒 伝染性 Pythium 属菌や Phytophthora 属菌による病害の原 因を明らかにするとともに、病原菌の検出手法を開発し、 その伝染経路を解明することにより従来の発病原因診断 に加え伝染経路診断の重要性を示すことを目的とした。

第一章 新規発生病害の原因究明

岐阜県の鉢花生産量は全国第3位であり、県の重要な 園芸品目である。鉢花生産施設では、生産性向上のため Ebb & Flow やマット給水などの底面給水方式が広く普 及しているが、Pythium 属菌や Phytophthora 属菌などの 水媒伝染性病害の対応に苦慮している。花き類の病害は、 野菜類等に比較して未報告の病害が多いため、詳細につ いて不明な場合が多い。このため、防除対策が十分に進んでいないのが現状である。そこで、2000-2008 年に岐阜県下の鉢花生産施設において新規に発生した病害の原因を明らかにした。

1. カランコエ根腐病、疫病

カランコエ(Kalanchoe blossfeldiana Poelln.)はベンケイソウ科に属するマダガスカル原産の植物で、国内生産量は岐阜県が第一位である。2000年および2001年の夏に県内の複数の鉢花生産農家で根および地際部の茎葉が水浸状に腐敗する症状が多発生した。このような症状として、国内ではPhytophthora sp.によるカランコエ疫病が知られている(栄森・飯島、1993)。そこで、本県で発生した類似症状の原因について調べた。なお、本項はJGen Plant Pathol にて既に報告した(渡辺ら2007)。

材料および方法

病原菌の分離

現地生産施設から罹病株を採集し、流水で洗浄した後に罹病組織を 5mm の切片に細断し、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に3分程度浸漬した後、滅菌水で3回洗浄した。表面殺菌した断片は滅菌ろ紙で水分を除去した後、素寒天平板培地に置床した。25℃暗黒条件下で1-3日間培養して、伸長してきた菌糸の先端をトウモロコシ煎汁寒天(CMA)斜面培地に移植した。

分離菌株の形態観察

胞子のうの大きさ、遊走子形成および有性器官などの 形態的特徴は、grass blade 法(Waterhouse, 1967)により行った。高圧蒸気滅菌したベントグラス葉を CMA 平板培地に分離菌と同時に置床した。25℃で2日間培養し、葉片に分離菌の菌糸を感染させた。ウェルプレートに入れた 0.5ml の滅菌した池水(池水:蒸留水=1:2)に感染葉片を移し、20℃で1-7日間培養して倒立顕微鏡で形態を観察した。

菌糸伸長量は、ジャガイモ・ニンジン煎汁寒天(PCA)を用いて測定した。前培養した分離菌の菌糸先端部位からコルクボーラーを用いて打ち抜いた直径 5mm の含菌寒天ディスクを培地に置床して5℃から45℃の設定温度における菌糸伸長を測定した。

DNA 抽出

供試菌を CMA 培地で 3 日間培養後、直径 1cm のコルクボーラーで打ち抜いた菌叢ディスク 3 片をポテトデキストロース培地(PDB)に置床し、25℃で 6 日間静置培養した。培養した菌体を濾紙に移し、蒸留水で数回洗浄して余剰水を除去した後、菌体を-80℃で冷凍し、予め冷凍した乳鉢で粉砕した。DNA の抽出は Lee and Taylor の方

法に準じて行った。

rDNA-ITS 領域の RFLP 解析

ITS 領域は、White et al. (1990)の方法に従い、ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') & 1TS4 (5'-TCCT CCGCTTATTGATATGC-3′)プライマーを用いて増幅した。 PCR 反応液は、各プライマーI μM、rTag DNA ポリメラ ーゼ (Takara Shuzo Co. Ltd, Shiga, Japan)を 1.25 units、 pH 8.3, 50 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂)、牛血清アルブミ ンを 0.2 μg、DNA を 100-200 ng および滅菌水を添加し て 50 µl とした。 PCR 反応は Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CN, USA)を用いて行っ た。最初に、94℃で3分間変性させ、続いて94℃で1分 間変性、55℃で1分間アニーリング、72℃で2分間 DNA 鎖の伸長反応のサイクルを 30 回繰り返した後、72℃で 10 分間伸長させた。PCR 産物は 1.5%アガロース LO3 (Takara Shuzo)を用いて電気泳動し、エチジウムブロマ イドで染色して確認した。 増幅した DNA 断片は制限酵 素を用いた解析に供試した。6種の制限酵素、Alul, Hhal, Hinfl, Mbol, Tagl, and Rsal (Toyobo Co. Ltd, Osaka, Japan) の処理方法はメーカーの説明書に従った。処理した断片 は3.5% NuSieve (3:1)アガロースゲル (FMC BioProducts, Rockland, MN, USA) を用いて電気泳動し、エチジウムブ ロマイドで染色した後に、紫外線下で断片の切断状況を 観察した。

rDNA-ITS 領域の塩基配列の解析

PCR 産物は GENECLEAN SPIN Kit (Qbiogene 社)を用いて精製した後に、Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystems Ltd.)を用いてシークエンス PCR を行った。PCR 産物は、エタノール沈殿を行った後、ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems Ltd.)を用いてシークエンスを行った。得られた配列データは、BLAST 検索を行い既知の配列データと相同性を解析した。

病原性試験

カランコエ (品種; ゴールディ)を病原性試験に供試した。試験 1 では、様々な温度条件における分離菌株の病原性について調べた。接種源の調整方法は、Tojo et al. (1993)の方法を一部改変して行った。CMA 平板培地で前培養して得られた分離菌の菌叢ディスクを、ベントグラス種子培地 (300ml のフラスコにベントグラス種子 3 gおよび蒸留水 11ml を入れオートクレーブ処理)に置床した。25℃暗黒条件下で6日間培養した後に、菌糸で覆われた種子を取り出し、ホモジナイザーで500ml の滅菌水を加えて100rpmで30秒間磨砕した。病原菌の汚染土は、オートクレーブした2Lの人工培土(BM-2)に菌糸磨砕液500mlを混和して作製した。プラグトレーで育苗した幼苗を100mlの汚染土を入れた6cmポットに移植した。

接種した植物は、12 時間日長 (photon flux density: 81 μ mol m^2 s^{-1})のグロースチャンバーで相対湿度を 90%以上に設定して、20, 25, 30, 35 および 40°C で栽培した。供試菌の無添加土壌を無処理区として設定した。10 日間培養した後、発病は以下に示す指数 0-4 の基準に従って調査した。0= 健全、1= 根腐れ、2= 地際部の茎葉がわずかに腐敗、3= 地際茎葉の腐敗、茎の中段付近まで発病、4= 上位茎葉に及ぶ著しい腐敗 また、以下の基準により発病度を求めた。発病度 = Σ (発病低程度別指数 \times 各指数別の個体数)/(最大の発病度 \times 総個体数)病原菌の再分離は Pythium 選択培地(Kageyama and Ui, 1980)を用いて行った。各処理 5 株で試験を行い、試験は 3 回繰り返した。

試験2では、各グループの代表菌株を用いて、異なった湿度条件下における病原性について調べた。接種源の調整および培養は前述のとおり行った。接種した植物は、グロースチャンバー(CFH-405, TOMY SEIKO Co. Ltd, Tokyo, Japan)を用いて60%(低湿度)および95%以上(高湿度)で管理した。発病度は接種7日後に調査した。各処理5株で試験を行い、試験は2反復とした。

結 果

現地施設での発生状況

2000 年および 2001 年の 7 月から 9 月にかけて、県内の複数の生産施設でカランコエの根および茎が水浸状に腐敗する症状が発生した (Fig.1-A)。これらの年の岐阜市の 7 月の平均気温はそれぞれ 28.1℃、28.6℃で平年より2-3℃高かった。カランコエは底面給水方式で栽培されており、給水マット、Ebb & Flow およびこれらを混合したシステムが導入されていた。暗褐色水浸状の腐敗が地際

茎および葉(Fig.I-B, C)、根(Fig.I-D)で観察された。これらの腐敗症状は高温、高湿度条件下で上位茎葉にまで進展した。高湿度条件では、病斑の表面に白色綿毛上の菌糸が認められた(Fig.I-B)。現地で栽培されている多数の品種のうち、'Goldie'、'Mie'、'Jaqueline'および'Mount-Loa'の被害が特に大きかった。被害は、当初わずかの個体で確認されたのみであったが、数日のうちにベンチ全体に急速に拡大した。

病原菌の分離

現地施設から罹病株を 57 個体採集し、無隔菌糸を有する約 300 菌株の糸状菌を分離した。これらの菌株は 3 つのグループ (A、B、C)に分類された (Table 1)。A グループの菌糸生育は早く、CMA 培地上の気中菌糸は豊富で、コロニーの模様は特になかった。B グループの菌糸生育も早く、白色綿毛上のコロニーを形成した。これらと類似したコロニーを有するが、菌糸生育が明らかに遅い菌株を C グループに分類した。施設 II では、これら全てのグループが分離されたのに対して、施設 I では B、C グループ、施設 III では A、C グループが分離された (Table 1)。施設 I および II では、2 種の病原が同一個体から分離されるケースもまれに認められた。

分離菌株の同定

A グループの代表菌株である GF-46 は、糸状または少し膨らんだ胞子のうを有し(Fig.2-A)、遊走子は球のう内部に形成した。また、大型で特徴的な房状の付着器を形成した(Fig.2-B)。蔵卵器は単一菌株の培養で形成し、表面平滑、直径は 20-32(平均 27.8) μm であった。蔵精器は蔵卵器に 3-6 個付着し、それらはしばしば異菌糸性でclock-necked (蔵精器の頂点が蔵卵器と接触している;



Fig.1 Root and crown rots of kalanchoe. A: Occurrence in subirrigation systems (*Arrow*). B, C: Water-soaked rots of stem and leaves. White mold appeared on the lesions under moist conditions (*Arrow*). D: Water-soaked root and stem rots

Greenhouse	Sampling	Number of		Isolate grouping	
	location	tested plants	Group A a	Group B b	Group C
I	Gifu City, Gifu	14	-	+	+
II	Mizuho City, Gifu	23	+	+	+
Ш	Motosu City, Gifu	20	+	·	+

Table 1 Characterization of the isolates from rotted roots and stems of kalanchoe

Fig.2-C)であった。卵胞子は非充満性で、表面平滑、直径は 15-25 (平均 21.9) μ m であった (Fig.2-D)。菌糸生育は 10-42°Cで認められ、最適は 35-38°Cであった (Fig.3)。25°C における菌糸伸長速度は 18 mm/24 hr であった (Fig.3)。これらの形態的特徴は、van der Plaats-Niterink (1981)の Pythium myriotylum の記載とよく一致した。 さらに、rDNA-ITS 領域の 6 種類の制限酵素 (Alul, HhaI, HinfI, MboI, RsaI および TaqI)による RFLPパターンは Wang and White (1997) および Kageyama et al. (2005)の報告とよく一致した (Fig.4)。 したがって、 GF-46 は P. myriotylum Drechsler と同定した。

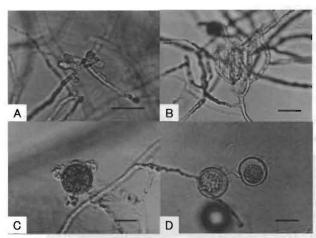


Fig. 2 Morphology of *Pythium myriotylum* (scale bars=20μm). A: Filamentous, slightly inflated sporangia. B: Typical clusters of large appressoria. C: Oogonium with several antheridia. The shape of antheridial cells is clock-necked, making apical contact with oogonia. D: Oogonium with an aplerotic oospore

B グループの代表菌株である GF-56 は、楕円形で先端に突起を有する胞子のうを形成し、胞子のう内部から新たな胞子のうを賞生 (proliferating)した (Fig.5-A)。遊走子は球のう内部に形成した (Fig.5-B)。蔵卵器は単一培養で形成し、表面平滑で直径 24-40 (平均 31.2)μm であった (Fig.5-C)。蔵精器は表面平滑で長く、蔵卵器に 1-3 個付着した。卵胞子は非充満性で表面平滑、大きさは直径

21-31 (平均 26.0) μm であった (Fig.5-C, D)。菌糸生育は 10-42℃で認められ、最適温度は 35℃であった (Fig.3)。 25℃における菌糸伸長速度は 19.5 mm / 24 hr であった (Fig.3)。これらの形態的特徴は、van der Plaats-Niterink (1981)の Pythium helicoides の記載とよく一致した。 GF-48 菌株および GF-56 菌株の 5 種類の制限酵素 (Alul, Hhal, Hinfl, MboI および TaqI)による rDNA-ITS 領域の RFLP パターンは、Hhal で一部多型が認められたものの P. helicoides の基準菌株である CBS286.31 菌株のパターンとよく一致した (Fig.6)。したがって、GF-56 菌株を P. helicoides Drechsler と同定した。

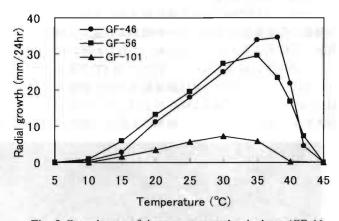


Fig. 3 Growth rate of three representative isolates (GF-46, 56, 101) on potato carrot agar at different temperatures

C グループの代表菌株 GF-101 菌株は楕円形で先端に 突起を有する胞子のうを形成し、胞子のう内部から遊走子を形成した (Fig.7-A, B)。胞子のうの大きさは平均 47.4 × 34.6 μm で、縦と横の比率は 1.4、非脱落性であった。分離菌株は雌雄異株性で、卵胞子は単一培養では形成しなかった。菌糸伸長は 5-35℃で認められ、最適温度は 28℃であった (Fig.3)。25℃における菌糸伸長速度は 6.1 mm/24 hr であった (Fig.3)。これらの形態的特徴は、Waterhouse (1963)の分類によるグループ II (胞子のうは乳頭突起を有し、雌雄異株性、蔵精器は底着性)と一致し

^a The isolates grew rapidly and developed colonies with no distinctive growth pattern.

^b The isolates grew rapidly and developed fluffy colonies.

^c The isolates grew slowly and developed fluffy colonies.

た。GF-101 菌株の rDNA-ITS 領域の塩基配列は Phytophthora nicotianae と相同性が高かった (Table 2)。GF-101 菌株と栄森・飯島 (1993)が国内で初めて Phytophthora sp.として報告した分離菌株 Phkq 1-1 および Phkq 2-1 の6種の制限酵素 (Ahul, Hhal, Hinfl, Mbol, Rsal および Taql)によるバンドパターンは Ph. nicotianae として同定されている MAFF306167、MAFF305978 および PGSI 菌株のものと一致した。さらに、カランコエから分離したこれら3菌株は Ph. nicotianae MAFF306167 (交配型 A1)との対峙培養で卵胞子を形成したのに対して、MAFF305978 (交配型 A2)とは卵胞子を形成しなかった (Fig.7-C)。したがって、これらの分離菌株を Ph. nicotianae Breda de Haan (交配型 A2)と同定した。

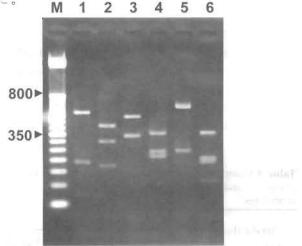


Fig. 4 Restriction banding patterns of polymerase chain reaction-amplified internal transcribed spacer of rDNA from isolates of GF-46 after digestion with *Hha* I, *Hinf* I, *Mbo* I, *Taq* I, *Alu* I and *Rsa* I. M, marker (50bp); lane 1, *Hha* I; lane 2, *Hinf* I; lane 3, *Mbo* I; lane 4, *Taq* I; lane 5, *Alu* I; lane 6, *Rsa* I

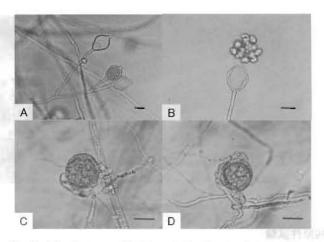


Fig. 5 Morphology of *Pythium helicoides* (scale bars=20μm). A: Sporangium proliferating from inside an old sporangial wall. B: Zoospores in vesicle. C: Oogonium with attached antheridium. Antheridial stalk is wound around hypha. D: Oogonium with an aplerotic oospore and smooth, elongate antheridia

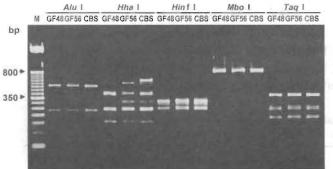


Fig. 6 Restriction banding patterns of rDNA-ITS region in GF-48, GF-56 and *Pythium helicoides*

Table2 Nucleotide sequence homology of rDNA-ITS region between the isolate from kalanchoe and Phytophthora nicotianae

Isolate	Host	Country of origin	Database accession no. ^a	Homology (%)
GF-101	Kalanchoe	Gifu, Japan	AB185112	-
IMI354395	Banksia sp.	Australia	L41383	97.1
KACC40403	Epiphyllum trucatum	Korea	AF228085	99.4
KACC40407	Lilium longiflorum	Korea	AF228086	99.4
UQ848		Australia	AF266776	99.5

^a DDBJ, EMBL and GenBank database accession number for the nucleotide sequence data

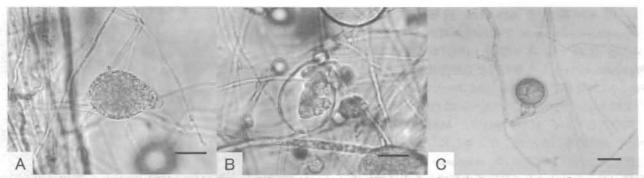


Fig. 7 Morphology of *Phytophthora nicotianae* (scale bars=20μm), A: Papillate sporangium. **B**: Zoospore release from sporangium. **C**: Oogonium with amphigy nous antheridium

病原性試験

試験 1

3 グループの代表菌株 GF-46 (P. myriotylum)、GF-56 (P. helicoides)および GF-101 (Ph. nicotianae)を接種したカランコエは、茎、葉および根の腐敗を引き起こし、現地で発生している症状が再現された。これら3種の病原による病徴の識別は困難であった。接種した個体の発病部位から、接種菌と同様の菌が再分離された。

発病適温について検討した結果、GF-46 および GF-56 を接種したカランコエは、20-30℃よりも 35-40℃で激しく発病した。一方、GF-101 菌株を接種したカランコエは 30℃以上で激しく発病した(Table 3)。

Table 3 Pathogenicity of isolates from rotted roots and stems on kalanchoe seedlings at various temperatures $^{\alpha}$

Species (Isolate no.)	Temperature	Incidence (%)	Severity 6	Reisolation (%) d
P. myriotylum	20	100.0	25.0 c *	86.7
(GF-46)	25	100.0	25.0 c	100.0
	30	100.0	41.7 b	93.3
	35	100.0	95.0 a	100.0
	40	100.0	100.0 a	93.3
P. helicoides	20	93.3	23.3 d	92.9
(GF-56)	25	100.0	26.7 d	100.0
	30	100.0	38.3 c	100.0
	35	0.001	81.7 b	100.0
	40	100.0	100.0 a	93.3
Ph. nicotianae	20	86.7	21.7 c	84.6
(GF-101)	25	100.0	31.7 c	93.3
	30	100.0	65.0 b	93.3
	35	100.0	75.0 ab	86.7
	40	100.0	81.7 a	80.0

The experiments were repeated three times. The values are means of the three experiments. b One-month-old kalanchoe seedlings were grown in soil infested with *Pythium* or *Phytophthora* in a growth chamber. c Root and stem rot severity based on a disease severity index with 0 = healthy, 1 = root rot, 2 = slight rot on the bases of stems and leaves, 3 = rot of basal and central parts of stems and leaves, 4 = severe rot of leaves and stems including apical portions, stems partly necrotic. Disease severity was calculated as: disease severity = Σ (disease severity scale x number of plants at each severity)/(maximum disease severity x total number of plants) x 100. d Five pieces of each rotted lesion were placed on AP2

medium to reisolate the fungus. ^e Values followed by the same letter within each isolate are not significantly different according to Tukey's test (*P*=0.05)

試験 2

GF-101 菌株(Ph. nicotianae)を接種したカランコエは、低湿度条件(60%)および高湿度条件(95%以上)で茎葉の水浸状病斑を進展させた。一方、GF-46 (P. myriotylum) および GF-56 (P. helicoides)の場合は、高湿度条件下では激しい病徴進展が認められたが、低湿度条件下では茎葉への病徴進展は認められなかった(Table 4)。

Table 4 Comparison of virulence to kalanchoe cv. Goldie of *Pythium* and *Phytophthora* under different humidity conditions ^a

Section (Included A	Disease severity b		
Species (Isolate no.)	Low humidity	High humidity ^c	
P. myriotylum (GF-46)	25.0 в ^д	81.3 a	
P. helicoides (GF-56)	25.0 b	71.3 a	
Ph. nicotianae (GF-101)	72.5 a	76.3 a	

The experiments were repeated twice. The values are means of the two experiments. Mean temperature: 30° C. b Root and stem rot severity based on a disease severity index with 0 = healthy, 1 = root rot, 2 = slight rot on the bases of stems and leaves, 3 = rot of basal and central parts of stems and leaves, 4 = severe rot of leaves and stems including apical portions, stems partly necrotic. Disease severity was calculated as: disease severity = Σ (disease severity scale x number of plants at each severity)/(maximum disease severity x total number of plants) x 100. c Low humidity (about 60%), high humidity (above 95%). d Values followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's test (P=0.05)

まとめ

2000 年および 2001 年に現地生産施設で発生したカランコエの根茎腐敗症状の原因は、P. helicoides、P. myriotylum および Ph. nicotianae による病害であることが明らかになった。このうち、2 種の Pythium 属菌 (P. helicoides、P. myriotylum)については、カランコエでは報告がなく新規の病害であることから、カランコエ根腐病

(Pythium rot)と提案した。また、栄森・飯島(1993)が疫病として報告した *Phytophthora* sp.については、有性器官の形成が確認できなかったとして種が特定されていなかったが、本研究において当時の菌株(phkq1-1、 phkq2-1)についても調べた結果、岐阜県で発生した菌株も含め、全て *Ph. nicotianae* であることを明らかにした。また、調査した3 施設ではこれらの病原が少なくとも2種以上関与していた。2種の *Pythium* 属菌と *Ph. nicotianae* の発病条件について検討した結果、*P. myriotylum* および *P. helicoides* は高温(\geq 35°C)と高湿度条件で接種 10 日後に激しい症状を引き起こした。一方、*Ph. nicotianae* はこれら2種の *Pythium* と比較してより広い温度域と湿度域で根茎腐敗症状を引き起こした。このように、カランコエに対して *Ph. nicotianae* は、*P. myriotylum* や *P. helicoides* より病原力が強いと考えられた。

2. ポインセチア根腐病

ポインセチア(Euphorbia pulcherrima)は、トウダイグサ科に属するユーフォルビア属の常緑性低木で、クリスマスを彩る鉢物として広く人気がある。2007年に岐阜県本巣市の生産施設で、地際茎および根が水浸状に腐敗し萎凋枯死する被害が多発生したため、その原因について調べた。

材料および方法

病原菌の分離、同定

病原菌の分離および同定は前述の方法に準じて行った。

rDNA-ITS 領域の塩基配列の解析

分離菌(GF-877)について、rDNA-ITS 領域の塩基配列の解析を行った。供試菌株を CMA 培地で 3 日間培養後、気中菌糸を採取して DNA 抽出キット (PrepMan Ultra Reagent, Applied Biosystems 社)を用いて DNA を抽出した。rDNA-ITS 領域の増幅、塩基配列のシークエンス解析の手順は前述の方法に従った。

病原性試験

分離菌(GF-877)をベントグラス種子培地で5日間培養後、滅菌水でホモジナイズして得た懸濁液を健全なポインセチア(品種;ジェスター)の地際部に灌注接種した。30℃、湿室条件で管理し、発病の有無を観察した。

結 果

現地施設での発生状況

2007年7月下旬から8月にかけて、マット給水方式の栽培施設でポインセチア(品種;ジェスター)の根および

地際茎は水浸状に褐変し、萎凋・枯死する被害が発生した(Fig.8)。被害は主に坪状に発生し、ベンチによってはほとんど出荷不可能になったものも認められた。

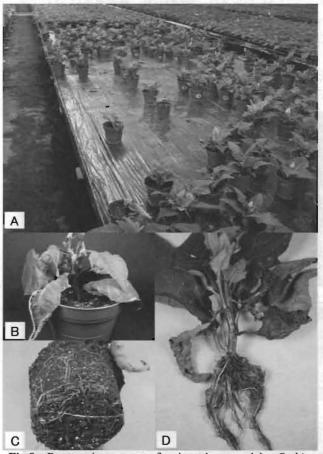


Fig.8 Root and stem rot of poinsettia caused by *Pythium aphanidermatum* A: Occurrence in mat irrigation system. B: Stem rot. C: Root rot. D: Water-soaked root and stem rot

病原菌の分離

罹病組織から無隔菌糸を有する生育の早い糸状菌が高率に分離された。CMA 培地上に白色綿毛状の気中菌糸を豊富に形成し、培地中に卵胞子が多数形成されているのが確認された。

病原性試験

分離菌(GF-877 菌株)を、健全なポインチア苗(品種: ジェスター)に接種したところ、30℃で5日後に、株全体 に萎凋症状を呈し、根は水浸状に腐敗しているのが観察 され、現地での病徴が再現された。また、罹病組織から 接種菌と同一菌が再分離された。

分離菌の同定

GF-877 菌株は、膨状の胞子のうを形成し、逸出管の先端に形成された球のうから遊走子を放出した(Fig.9 A-D)。 単一培養で有性器官を形成し、蔵卵器は主に頂生で表面 平滑、大きさは平均 24.9µm であった (Fig.9 E-H)。 蔵精器 は主に間生で、蔵卵器に 1 個付着した。 卵胞子は非充満性で、大きさは平均 19.6µm であった (Fig.9、Table 5)。 菌糸生育は 5℃から 42℃で認められ、最適温度は 35℃であった (Fig.10)。 これらの特徴は van der Plaats-Niterink (1981) の Pythium aphanidermatum の記載とよく一致した。また、rDNA ITS 領域の塩基配列の相同性検索を行ったところ、 P. aphanidermatum と相同性が最も高かった (Table 6)。

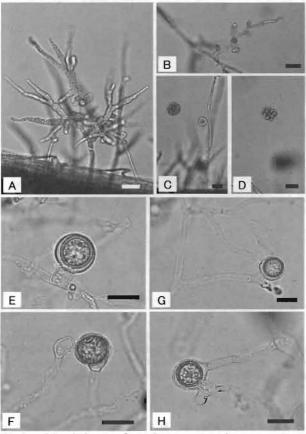


Fig.9 Morphology of *Pythium aphanidermatum* (scale bars=20μm). A,B: Sporangia (filamentous, inflated) C,D: Zoospores in vesicle. E,G: Oogonium with intercalary antheridia. F,H: Oogonium with terminal antheridia

まとめ

2007年8月に本県のポインセチアで発生した根腐症状は、Pythium aphanidermatum によるものであることが明らかになった。Pythium 属菌が関与するポインセチアの病害には、Pythium sp.による根腐病(高鳥ら、1975)が報告されているが、詳細については明らかでない。今回、本県で発生した P. aphanidermatum による症状も根腐病に含めることが適当であると考えられたため、病原追加することを提案した。高鳥らの報告では、9月から10月で被害が確認されたのに対して、P. aphanidermatum による被害発生時期は7月下旬から8月であったことから、

今後は高温時の被害についても注意が必要である。また、神頭ら(2007)は、Phytophthora nicotianae による疫病を国内で確認している。疫病は 8 月の高温期に発生し、P. aphanidermatum による根腐病と発生が同時期で、地際茎葉に水浸状腐敗を引き起こす点で両者の病徴は非常に類似している。岐阜県のポインセチア生産施設でも疫病の発生を確認しており、現地では Pythium による被害と混発している事例が認められた。今後、病原の同定に際しては注意が必要である。

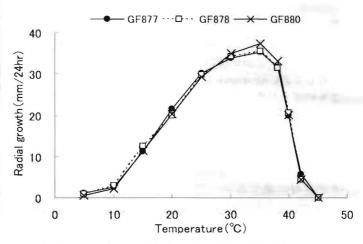


Fig. 10 Growth rate of isolates (GF-877, 878, 880) on corn meal agar at different temperatures

Table 5 Comparison of the morphological characteristics of *Pythium* isolate from poinsettia with that of *P. aphanidermatum*

	GF877	P. aphanidermatum *)
Sporangia	Add to the same of	Charles Street Control
shape	filamentous, inflated	filamentous, inflated
Oogonium	homothallic	homothallic
shape	smooth	smooth
size(µm)	20-28 (av. 24.9)	22-24 (av. 23.0)
Antheridium		
shape	broadly sac-shaped	broadly sac-shaped
terminal or intercalary	intercalary, sometimes terminal	intercalary, sometimes terminal
monoclinous or diclinous	monoclinous or diclinous	monoclinous or diclinous
Oospore		
plerotic or aplerotic	aplerotic	aplerotic
size(μm)	16-21 (av. 19.6)	20-22 (av. 20.2)

a) A. J. van der Plaats-Niterink (1981)

Table 6 Nucleotide sequence homology of rDNA-ITS region between the isolate GF877 from poinsettia and *P. aphanidermatum*, *P. delience*

	Isolate	Source	Country of origin	Database accession no.4	Homology (%)
P. aphanidermatum	Pa-05/09-1	Cucumber	Australia	L41383	100
	TOc159	Soil	Japan	AJ233438	100
	P36-3	Bent grass	Korea	AB095052	100
	66C	-	USA	EU169131	100
	CBS 118.80	1	France	AY598622	99.9
P. deliense	CBS 314.33	-		AY598674	97.2

^a DDBJ, EMBL and GenBank database accession number

3. ゼラニウム茎腐病

ゼラニウムはフウロソウ科ペラルゴニウム属に属する 多年生の植物で、本県では主にポインセチアやシクラメ ンなどの補完品目として栽培されている。2005年1-3月 に、岐阜県西濃地域の3戸の生産施設で、ゼラニウムの 地際茎が水浸状に腐敗する被害が多発生したため、その 原因について調べた。

材料および方法

病原菌の分離、同定

病原菌の分離および同定は前述の方法に準じて行った。

病原性試験

CMA 培地で培養した分離菌(GF-723、GF-730)の含菌 ディスクを健全なゼラニウムの茎および葉に接種し、 25℃湿室条件下で数日間管理して病原性の有無を調べた。

rDNA-ITS 領域の RFLP 解析

3 戸の生産施設(A、B、C)の発病株から分離した 3 菌株について、前述の方法で DNA を抽出し、ユニバーサルプライマー(ITS1、ITS4)を用いて PCR 反応を行った。増幅した DNA 断片は制限酵素を用いた解析に供試した。4種の制限酵素、EcoRI、HaeIII、Hinfl、TaqI(Toyobo Co. Ltd, Osaka, Japan)の処理方法はメーカーの説明書に従った。処理した断片は 3.5% NuSieve (3:1) アガロースゲル(FMC BioProducts、Rockland、MN、USA)を用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後に、紫外線下で断片の切断状況を観察した。

分離菌株の RAPD 解析

各生産施設の発病株から分離した 17 菌株について RAPD 解析を行った。試験には 2 つのプライマーA01 (5'-TGCACTACAACA-3', Wako Pure Chemical Industry LTD, Osaka, Japan)および OPR08 (5'-CCCGTTGCCT-3', Eurofins MWG Operon, Alabama, USA)を供試した。PCR 反応液は、各プライマー1.25 μM、rTaq DNA ポリメラーゼ (Takara Shuzo Co. Ltd, Shiga, Japan)を 0.625 units、dNTP mixture を 0.05 mM、1× PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂)、牛血清アルブミンを 10 μg、鋳型 DNA を 1μl および滅菌水を添加して 25 μl とした。PCR 反応は Gene Amp PCR system 2700(Applied Biosystems, Norwalk, CN, USA)を用いて行った。まず、94℃で3分間変性させ、続いて 94℃で1分間変性、35℃で1分間アニーリング、72℃で3分間 DNA 鎖の伸長反応のサイクルを 40 回繰り返した後、72℃で10分間伸長させた。RAPD 産物は1.2%アガロース LO3(Takara Shuzo)を用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して確認した。

結 果

現地施設での発生状況

ゼラニウムを栽培している鉢花農家 3 戸(A, B, C)で、2005 年 1-3 月、ほぼ同時に被害が発生した。これらの温室では、いずれも Ebb & Flow の底面給水方式が導入されており、施設 A および B はかけ流し方式、施設 C は養液循環方式であった。また、これらの施設ではゼラニウム以外にもガーベラ、エキザカムなど複数の品目を組み合わせた生産体系になっており、ゼラニウムは 10 月にセルトレイに播種し、冬期に育成して 2 月頃に出荷する体系がとられていた。被害は、出荷直前のゼラニウムに多発し、はじめ下葉に黄化が観察され、地際部の茎に暗褐色水浸状の変色が認められた (Fig. 11-C, D)。上位茎へ病徴が進展すると、急激に腰折れ状になる症状が観察された (Fig. 11-E)。被害株の根は、主根部の褐変は少ないものの、細根は水浸状に腐敗していた (Fig. 11-F)。栽培施設の被害株率は、20%-50%以上に及んだ。

病原菌の分離

3 戸の生産ほ場から持ち込まれた罹病株の茎および根の罹病組織からは、いずれも生育の早い Pythium 属菌が高率に分離された。生育速度、コロニー形態および培地中に形成された有性器官の形態等から、いずれも同一グループの Pythium 属菌と考えられた。

病原性試験

代表菌株の接種試験によりゼラニウムに病原性が認め られた。

分離菌の同定

分離菌は、球形の胞子のう(10-32 μ m)を形成し、逸出 管の先に形成された球のうから遊走子を放出した。また、 球形から倒卵形の Hyphal swelling を形成した。単独培養で有性器官を形成し、蔵卵器の大きさは平均 17μ m、蔵卵器表面に 1-2 個の棘が認められた。(Fig. 12)。また、蔵卵器内部に非充満性の卵胞子 1 個を形成した。蔵精器は主に同菌糸性で蔵卵器に 1-2 個付着した(Table 7)。菌糸生育は 5℃から 35℃で認められ、最適温度は 28℃であった(Fig. 13)。これらの形態的特徴は、van der Plaats-Niterink (1981)の Pythium irregulare の記載とよく一致した。

分離菌から DNA を採取し、rDNA-ITS 領域の RFLP 解析を行った結果、P. irregulare の I、II グループに分類された(Fig. 14、15)。また、RAPD 解析の結果、農家 2 から分離された菌は Matsumoto et al. (2000)の記載による P. irregulare のグループ I、農家 1 および 3 の分離菌のバンドパターンはグループ II と一致した(Fig. 15)。

まとめ

以上の結果、2005年に県内の生産施設で被害が多発生したゼラニウム茎腐症状の病原菌は P. irregulare と同定

A B D D F

Fig. 11 Root and stem rots of geranium caused by *Pythium irregulare* complex. A, B: Ebb & Flow irrigation system. C: Initial symptom (leaves wilt). D: Brown water-soaked rot of stem. E: Disease progresses rapidly several inches up the stem. F: Root rot slightly

した。海外において、ゼラニウム茎腐病(Pythium Blackleg) は古くから知られており、病原として P. aphanidermatum、 P. carolinianum、 P. debaryanum、 P. helicoides、 P. irregulare、 P. myriotylum、 P. paroecandum、 P. polytylum、 P. splendens、 P. spinosum、 P. vexans の記録がある。一方国内では、本病の病原菌として P. debaryanum(福西, 1990)、 Pythium sp. (我孫子ら, 1990)、 P. aphanidermatum、 P. splendens (植松ら, 1991)が報告されている。これらの病原による被害発生時期は 4-8 月であるのに対して、 P. irregulare による被害は 1-3 月の低温期であったことから、 今後は冬期についても注意していく必要があると考えられた (Table 8)。

近年、Garzon et al. (2007)は分子生物学的手法を用いて、従来 P. irregulare と分類されていた一部を新たに独立させ、新たな種 (P. cryptoirregulare)とすることを提唱している。本研究で分離した P. irregulare の中にも ITS-RFLP および RAPD 解析から P. cryptoirregulare に相応する菌株の存在が示唆されるが、分類については今後検討を要すると考えられる。したがって、本研究においては、これらの菌を P. irregulare complex として取り扱った。

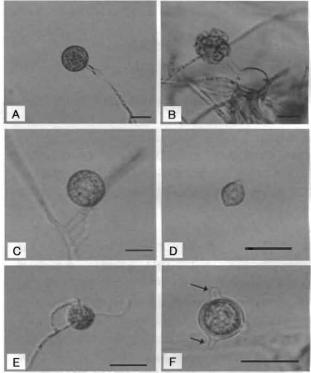


Fig. 12 Morphology of *Pythium irregulare* (scale bars=20µm). A: Globose sporangia. B: Zoospores in vesicle. C,D Hyphal swelling. E: Oogonium with monoclinous antheridium. F: Oogonium with blunt projections (*arrows*)

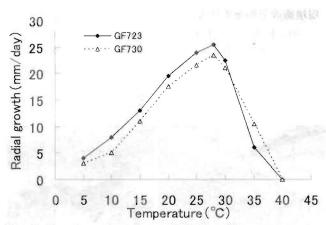


Fig. 13 Growth rate of isolates (GF-723, 730) on corn meal agar at different temperatures

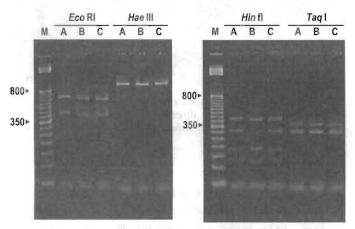


Fig. 14 RFLP analysis of rDNA-ITS regions Lane A: Isolate from greenhouse A, B: Isolate from greenhouse B, C: Isolate from greenhouse C

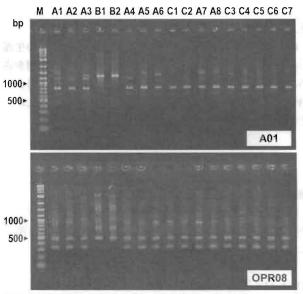


Fig. 15 RAPD analysis of isolates from geranium Lane A1-6: Isolate from greenhouse A, B1-2: greenhouse B, C1-7: greenhouse C, Primer A01(5'-TGCACTAC AACA-3', Wako Pure Chemical Industry LTD, Osaka, Japan), OPR08(5'-CCCGTTGCCT-3', Eurofins MWG Operon, Alabama, USA)

Table 8 Report of Pythium blackleg of geranium in Japan

Species	Occurrence of disease	Reference
P. debaryanum	Apr - Jun	Fukunishi (1990)
Pythium sp.	May	Abiko et al. (1990)
P. aphanidermatum	Jul - Aug	Uematsu et al. (1991)
P. splendens	Jul - Aug	Uematsu et al . (1991)
P. irregulare	Jan - Mar	

Table 7 Comparison of the morphological characteristics of Pythium isolate from geranium with that of P. irregulare

	GF- 723	GF- 730	P. irregulare a)
Sporangea		ABA	
shape	globose	globose	globose
size(µm)	10-32	10-28	10-20
proliferration			
Hyphal swellings	grobose, obovate,	grobose, obovate,	grobose, obovate,
shape	limoniform, irregular	limoniform, irregular	limoniform, irregular
size(μm)	12-29 (av. 21.8)	10-40 (av. 21.2)	>25
Oogonium	smooth or with blunt	 smooth or with blunt 	smooth or with blunt
shape	progections	progections	progections
size(μm)	16-20 (av. 17.3)	16-20 (av. 17.9)	16-21 (av. 18.5)
Antheridium			
shape	monoclinous	monoclinous	monoclinous
number per oogonium	1-2	1-2	1-2
Oospore	311 130	\$ ⁵	
plerotic or aplerotic	aplerotic	aplerotic	aplerotic
size(µm)	10-17 (av. 15.1)	10-18 (av. 14.4)	15-18 (av. 15.9)

a) A. J. van der Plaats-Niterink(1981)

4. バラ疫病

岐阜県では、バラ苗、切りバラおよびミニバラの生産が盛んで、中でもミニバラの生産量は全国の約8割を占め、県の主要な花き品目となっている。2002年3月、県内のミニバラ生産施設で生育不良症状が発生したため、その原因を検討した。

材料および方法

病原菌の分離、同定

現地栽培施設から生育不良株を約20個体採集した。根 の罹病組織を顕微鏡観察するとともに、病原菌の分離お よび同定は前述の方法に準じて行った。

rDNA-ITS 領域の RFLP 解析

ミニバラから分離した 2 菌株(GF446、GF460)および P. megasperma 3 菌株(CH95、IFO31624、IFO31016)を用いて試験を行った。前述の方法で DNA を抽出し、ユニバーサルプライマー(ITS1、ITS4)を用いて PCR 反応を行った。増幅した DNA 断片は制限酵素を用いた解析に供試した。6 種の制限酵素、Alul、Hhal、Hinfl、Mbol、Taql、and Rsal (Toyobo Co. Ltd, Osaka, Japan)の処理方法はメーカーの説明書に従った。処理した断片は3.5% NuSieve (3:1) アガロースゲル (FMC BioProducts、Rockland、MN、USA)を用いて電気泳動し、エチジウムプロマイドで染色した後に、紫外線下で断片の切断状況を観察した。

rDNA-ITS 領域の塩基配列の解析

GF460 菌株について、前述の方法に従い rDNA-ITS 領域の塩基配列を決定した。このデータと既報の Phytophthora 属菌のデータ (Table 10)を用いて系統樹を作成した。さらに、GF460 菌株と同一クレードに属する種について、Table II に示す菌株を供試して系統樹を作成した。

病原性試験

分離菌をベントグラス種子培地(3gのベントグラス種子と 12mlの水を入れて高圧蒸気滅菌)で培養し、培地全体が菌糸で覆われた段階で種子 6g当たり滅菌水を1L加えてホモジナイズして菌体磨砕液を調整した。高圧蒸気滅菌した人工培土1Lに対し、菌体磨砕液 250mlをよく混和して汚染培土を作製した。汚染培土を72穴セルトレイに入れミニバラ苗(品種;シルクレッド)を移植した。なお、病原菌の入っていない人工培土に苗を移植したものを対照として用いた。移植した苗は20℃の植物インキュベーターで管理し、病原性の有無を確認した。

結 果

現地施設での発生状況

2002 年 3 月に、本巣市の栽培施設(Ebb & Flow 方式)でミニバラの生育不良症状が多発生した。被害株の生育は著しく阻害され、プールベンチ上で坪状に発生が認められた。このような株の根は水浸状に褐変腐敗し、組織中には卵胞子が多数確認された(Fig. 16)。

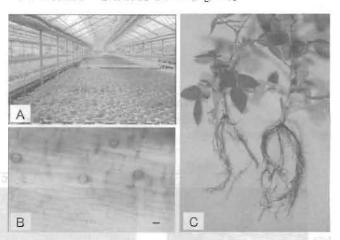


Fig. 16 Root rot of miniature rose caused by *Phytophthora* sp. A: Greenhouse where disease occurred (Ebb & Flow system). B Oospores in rotted root (scale bars=20μm). C: Water-soaked root rot

病原菌の分離

罹病組織から I 種類の糸状菌が高率に分離された。胞子のうの形態等から疫病菌の I 種と考えられたが、PDA培地、CMA培地での生育は非常に遅かった。これに対して V8 培地では良好な生育を示した(Fig. 17)。

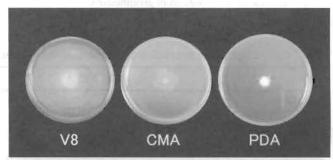


Fig. 17 Colony of isolate cultured on different mediums at 25°C for 15 days

病原性試験

分離菌を接種したミニバラは、接種 10 日後に地上部の 葉が黄化し、著しい生育不良症状が認められた。また根 は水浸状に褐変し、現地での病徴が再現された(Fig. 18)。 罹病組織からは接種菌と同様の糸状菌が再分離された。

分離菌の同定

分離菌株の遊走子のうは、乳頭突起を有し主に卵形で やや変形するものも認められた。大きさの平均は31×23

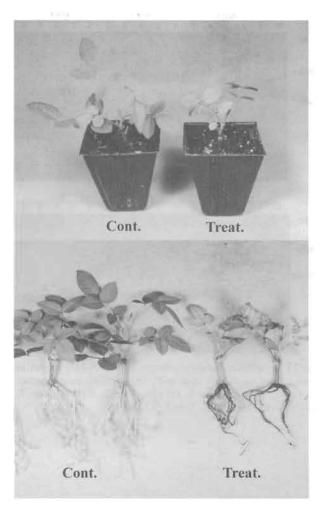


Fig. 18 Root rot of miniature rose by inoculation of isolate GF460 at 20°C for 10 days

 μ m、 L/B 値は 1.3 で非脱落性であった。また、単一培養で有性器官を形成し、蔵卵器は表面平滑、大きさは平均 29μ m で基部がやや漏斗状を呈するものも認められた。蔵精器は主に蔵卵器基部に側着し、卵胞子の大きさは平均 26μ m であった (Fig. 19、Table 9)。菌糸の生育は 7.5-30℃で認められ、最適温度は 25℃前後であった (Fig. 20)。これらの形態的特徴は、既報のバラ疫病菌 P. megasperma とは明らかに異なっており、P. citricola 等と類似性が高く、乳頭突起を有する遊走子のうを有することから、Waterhouse (1963)の疫病菌の分類グループ I あるいは皿に属すると考えられた。

分離菌から DNA を採取し、rDNA-ITS 領域の RFLP 解析を行った結果、P. megasperma とは異なるバンドパターンが認められた。また、供試した P. megasperma の 3 菌株の間でも多型が認められた(Fig. 21)。さらに、塩基配列から Phytophthora 属菌の系統樹を作成した結果、GF446 菌株は P. megasperma とは異なる clade に属していることが明らかになった(Fig. 22)。Cooke et al. (2000)は50種 234 菌株の Phytophthora 属菌の rDNA-ITS 領域の塩

基配列から系統樹を作成し、10種の clade に分類している。このうち、P. citricola を中心としたグループは clade2 として位置付けられており、GF446 菌株はこの clade に位置付けられた。そこで、これら7種の Phytophthora 属菌と GF446 菌株について、さらに検討した結果、同じ種は各々まとまったグループを形成したが、clade2 の中でも、GF446 は独立した位置にあった (Fig. 23)。

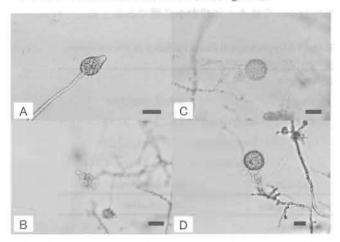


Fig. 19 Morphology of *Phytophthora* sp. (scale bars=20μm). A: Papillate sporangia. B: Zoospores in vesicle. C, D: Sexual organs, antheridia are all or nearly all paragynous. Funnel shaped oogonium

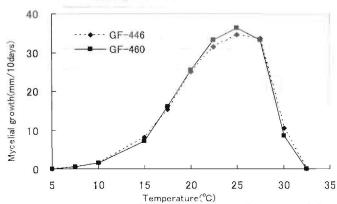


Fig. 20 Growth rate of isolates (GF-446, 460) on V8 juice agar at different temperatures

まとめ

2002年3月に本県のミニバラ生産施設で発生した生育不良症状は Phytophthora 属菌の I 種によるものであることが明らかになった。国内では、バラに根腐症状を引き起こす病害として主に 3 つが知られている。第 1 に Phytophthora megasperma による疫病である (Nagai et al., 1978)。本病は 5-6 月に発生し主に地際茎に被害が認められる。第 2 に Pythium helicoides による根腐病であり、7-9 月の夏季高温時に被害が多発する (Kageyama et al., 2002a)。そして第 3 に Rhizoctonia 属菌による根茎腐敗病

であり、9-10 月頃に被害が認められる (Priyatmojo et al., 2001)。本菌による病徴は、P. megasperma による疫病と比較して、主に根を犯す点でやや異なっていた。また、分離菌の形態学的特徴、分子生物学的手法による同定の結果、Waterhouse (1963)の疫病菌の分類グループ I あるいは皿に属し、分子系統樹では Cooke et al. (2000)のクレード2に属することは明らかになったが、完全に一致する種はなく、今後さらに検討が必要であると考えられた。

Table 9 Morphological characteristics of *Phytophthora* isolate from miniature rose

Sporangia		
shape		ovoid, papillate
size	length(µm)	22-42 (av. 31.1)
	breadth(µm)	17-31 (av. 23.2)
	L:B ratios	1.18-1.56 (av. 1.34)
caducity		non caducous
Sexual organ	ıs	homothallic
Oogonium		100
shape		smooth sometimes funnell shape
size	(µm)	25-36 (av. 29.1)
Antheridiun	1	allmost paragynous
Oospore		
size	(µm)	22-30 (av. 26.4)
Temperatur	e	7.5-30°C

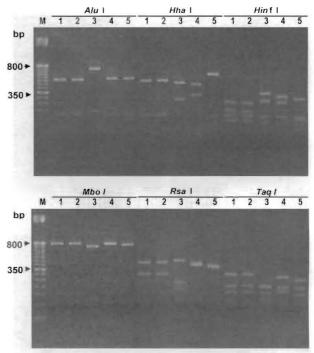


Fig. 21 Restriction banding patterns of rDNA-ITS region in isolates from miniature rose and *Phytophthora megasperma*. M, marker (50bp); lane 1, GF446; lane 2, GF460; lane 3, CH95; lane 4, IFO31624; lane 5, IFO31016

Table 10 Isolates used in phylogenic analysis

Species	Database		Drigins	
	Accession no. 13	Host	Country	Date
P. arecae	IMI348342	Cocos nucifera	Indonesia	1991
P. batemanensis	AF271223			
P. hoehmeriae	AF228076	Ailanthus altissima		
P. hotryosa	IMI136915	Hevea brasiliensis leaf	Malaysia	1966
P. cactorum	AF087480	Pyrus sinensis		
P. cajani	AF266765	Cajanus cajani	India	
P. cambivora	AF087479	Malus Pumila		
P. capsici	AF266787	Piper nigrum	India	1989
P. cinnamomi	AF087478	Japanese larch		
P. citricola	AF228080	Zizyphus jujuba		
P. citrophthora	AF467086		Indonesia	
P. clandestina	IMI287317	Trifolium subterranea	Australia	1985
P. colocasiae	AF363009			
^p . cryptogea	CBS113-19			
P. drechsleri	ATCC44388			
P. erythroseptica	CBS956-87	Solanum tuberosum	U.S.A	
P. europaea	AF449491	Quercus sp. soil	France	1998
P. fragariae v.fragariae	AF266762	Fragaria X ananassa	Scotland	1979
P. fragariae v.rubi	AF266761	Rubus idaeus	Sweden	
P. gonapodyides	ATCC34302	Pseudotsuga menziesii		
P. heveae	IMI180616	Hevea brasiliensis	Malaysia	1929
P. humicola	IMI302303	citrus orchard soil Via	Taiwan	198
P. idaei	IDA3	Rubus idaeus	Scotland	1986
P. ilicis	AJ131990	Ilex aquilifolium	UK	
P. infestance	AF228084	Lycopersicon esculentum		
P. inflata	IMI342898	Syringa		
P. insolita	IMI288805	Soil	Taiwan	1979
P. iranica	IMI158964	Solanum melongena	Iran	1969
P. katsurae	IMI360596	Cocos nucifera	Ivory Corst	1993
P. lateralis	IMI040503	Chamaecyparis	U.S.A	1942
P. macrochlamydospora	IMI183280	Chanactyparis	Capaci	17.14
P. medicaginis	AF266799	Medicago sativa	Australia	1987
P. megakaya	IMI337104	Theobroma cacao	Ghana	1990
P. megasperma	AF403500	Pinus	Iran	1770
r . megasperma P. melonis	AF228094	Cucumis melo	Taiwan	
r . meionis P. mirabilis	CBS678-85	Mirabilis jalapa	Mexico	
			The Netherlands	1004
P. multivesiculata	CB\$545-96	Cymbidium	The Netherlands	199:
P. nicotianae	AF228085	Epiphyllum trucatum		
P. palmivora	AF228087	Chrysalidocarpus lutescens		
P. phaseoli	ATCC60171	Phaseolus lunatus		
P. porri	CBS782-97	Brassica chinensis	The Netherlands	[994
P. primulae	CBS620-97	Primura acaulis	Germany	199
P. pseudotsugae	IMI331662	Pseudotsuga menziesii	U.S.A	pper manifestation and
P. psychrophila	AF449494	Quercus robur soil	Germany	199:
P. quercina	AJ131986	Quercus robur	Germany	199
P. richardiae	IMI340618	Zantedeschia	The Netherlands	
P. sinesis	ATCC46838	Cucumis sativa	China	
P. sojae	AF228089	Glycine max		
P. syringae	IMI296829	Rubus idaeus	Scotland	1985
P. tentaculata	CBS552-96	Chrysanthemum leucanth.	Germany	1992
P. trifolii	UQ2143	Trifolium		
P. uliginosa	AF449495	Quercus robur soil	Poland	1998
P. vigane	UQ136	Vigna sinensis	Australia	1988
GF446	-	Rosa hybrida	Japan	2003
Pythium ultimum	D86515	Sugar beet	Japan	

a) DDBJ, EMBL and GenBank database accession number of the rDNA-ITS regions

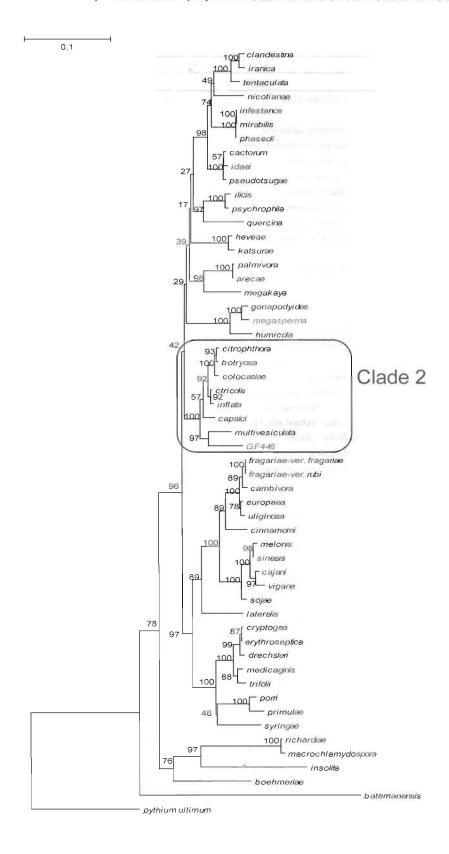


Fig. 22 Phylogenic tree of *Phytophthora* from rDNA-ITS regions Proportions of 1000 bootstrap replicates are given on the branches

Table 11 Isolates used in phylogenic analysis (clade 2)

Phytophthora	Database	Orig	gins
species	Accession no. (a)	Host	Country
P. colocasiae	AF363009		
P. colocasiae	IMI368918	Colocasia esculenta	Malaysia
P. citrophthora	AF467086	PATTER STATE AT	Indonesia
P. citrophthora	IMI332632	Actinidia chinensis	Chile
P. citrophthora	AF228081	Citrus sinensis	
P. citrophthora	L76536		
P. citricola	AF228080	Zizyphus jujuba	
P. citricola	AF266788	Rubus idaeus	Ireland
P. citricola	L41375		
P. citricola	PC17370		
P. inflata	IMI342898	Syringa	
P. capsici	AF266787	Piper nigrum	India
P. capsici	AF467083		Brazil
P. capsici	AF467084		Cote d'Ivoire
P. capsici	AF467085		India
P. capsici	AF228078	Capsicum annum	
P. capsici	AF228079	Lesculentum	
P. multivesiculata	CBS545	Cymbidium	Netherlands
GF446	2	Rosa hybrida	Japan
P. cactorum	AF087480	Pyrus sinensis	

a) DDBJ, EMBL and GenBank database accession number of the rDNA-ITS regions

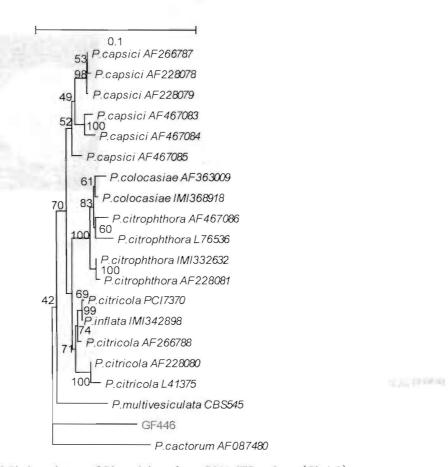


Fig. 23 Phylogenic tree of *Phytophthora* from rDNA-ITS regions (Clade2) Proportions of 1000 bootstrap replicates are given on the branches

5. キク疫病

岐阜県内のポットマム生産施設で、2003-2004 年の夏 期(7 月上-8 月下旬)に地際茎が暗褐色水浸状に腐敗する 被害が発生した。そこで、本症状の原因について明らか にした。

材料および方法

病原菌の分離、同定

現地栽培施設から被害株を採集した。病原菌の分離および同定は前述の方法に準じて行った。

rDNA-ITS 領域の塩基配列の解析

分離菌(GF-749 菌株)について、前述の方法に従い rDNA-ITS 領域の塩基配列を決定した。このデータと既 報の Phytophthora 属菌のデータ(Table 13)を用いて系統 樹を作成した。

病原性試験

GF749 菌株を CMA 培地で 14 日間培養後、含菌寒天片を健全なポットマム(3 品種:ダークビザリア、ロンポック、ミラマ、各品種3 鉢)の地際部に無傷で接種した。30℃、湿室条件で管理し、地際からの病徴進展節位を接種9日後まで経時的に調べた。

結 果

現地施設での発生状況

2003 年および 2004 年の 7 月上旬から 8 月下旬に、中 濃地域の生産施設でポットマムの地際茎が暗褐色水浸状 に腐敗、枯死する被害が多発生した。被害株の根および 地際茎は水浸状に褐変し、萎凋・枯死する株が認められ た(Fig. 24)。同施設では、マット給水方式および Ebb & Flow 方式で栽培されており、いずれの方式でも被害が認 められた(Fig. 24)。

病原菌の分離

罹病組織から生育の遅い Phytophthora 属菌が高率に分離された。胞子のうの形態等から疫病菌の 1 種と考えられ、PDA 培地、CMA 培地および V8 培地上で良好な生育を示した(Fig. 25)。

病原性試験

健全なポットマムに分離菌を接種した結果、接種3日後から地際茎に暗褐色水浸状の病徴が認められ、日数の経過とともに上位節にまで病徴が進展した。供試した3品種はいずれも発病が認められたが、ロンポックの発病程度が最も大きかった(Fig. 26)。罹病組織からは接種菌と同様の糸状菌が再分離された。

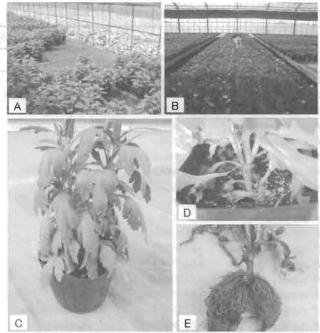


Fig. 24 Root and stem rot of chrysanthemum caused by *Phytophthora* sp. A: Occurrence in a mat irrigation system. B: Occurrence in an Ebb & Flow irrigation system. C: Initial symptom (leaves wilt). D: Brown water-soaked rot of stem. E: Root and stem rot

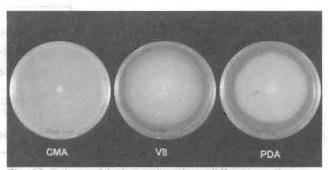


Fig. 25 Colony of isolate cultured on different mediums at 25°C for 12 days

分離菌の同定

分離菌の遊走子のうは、卵形で乳頭突起がなく非脱落性で遊走子のう内部から新たな遊走子のうを貫性した (Fig. 27、Table 12)。また、球形の厚膜胞子および不定形の Hyphal swellings を豊富に形成した。単独培養で有性器官を形成し、蔵卵器は表面平滑、大きさは平均 37 μ m で、蔵精器は主に蔵卵器基部に側着した。菌糸生育は 5-35℃で認められ、最適温度は 28℃前後であった (Fig. 28)。これらの特徴は既報のキク疫病菌 P. cactorum とは明らかに異なり、Waterhouse (1963)の疫病菌の分類グループVに属すると考えられた。分離菌から DNA を採取し、rDNA-ITS 領域の塩基配列から Phytophthora 属菌の系統樹を作成した結果、GF749 菌株は P. cactorum とは異なるclade に属しており、Cooke et al. (2000)の分類 (clade 1-10)

のうち、clade9,10 に近い位置に分類されたが、完全に一 致する種は認められなかった(Fig. 29)。

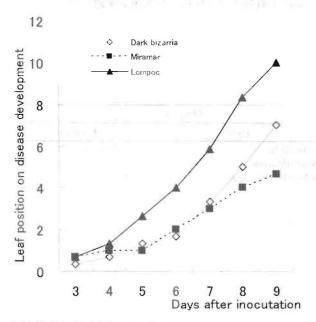


Fig. 26 Comparison of pathogenicity of GF749 between three chrysanthemum cultivars

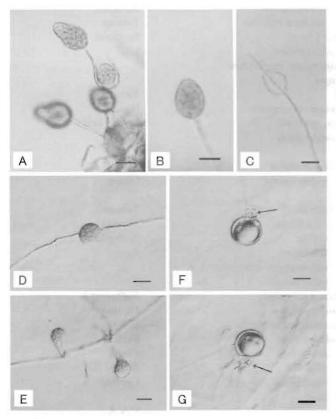


Fig. 27 Morphology of *Phytophthora* sp. (scale bars=20μm). A, B: Sporangia (non papillate). C: Proliferation of sporangia. D: Chlamydospore. E: Hyphal swellings (irregular shape). F, G: Sexual organs, antheridia are all or nearly all paragynous (*arrows*)

Table 12 Morphological characteristics of *Phytophthora* isolate from chrysanthemum

Sporangia				
shape		ovoid, non papillate		
size	length(µm)	24-44 (37.8)		
	breadth(µm)	20-32 (28.2)		
	L:B ratios	1.2-1.47 (1.34)		
caducity		non caducous		
proliferation		proliferated		
Chlamydospore		globose		
Hyphal swellings		irregular shape		
Sexual org	ans	homothallic		
Oogonium				
shape		smooth		
size	(µm)	31-52 (37.6)		
Antheridium		allmost paragynous		
Oospore				
size	(µm)	26-36 (30.2)		
Temperatu	re	5-35°C, optimum28°C		

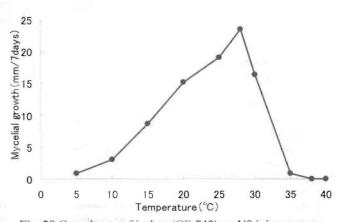


Fig. 28 Growth rate of isolate (GF-749) on V8 juice agar at different temperatures

まとめ

2003、2004年の7-8月に本県のポットマム生産施設で発生した被害はPhytophthora属菌の1種によるものであることが明らかになった。国内では、キクの疫病菌としてP. cactorum が知られている。しかしながら、ポットマ

ムに発生した疫病は、P. cactorum とは形態的、分子生物 学的にも異なる種であることが明らかになった。築尾ら (2007)も露地キクで同様の疫病菌を確認しており、これ らも含めて新種の可能性もあることから、詳細について は今後検討していく必要がある。

Table 13 Isolates used in phylogenic analysis

Phytophthora species	Database	Origins		
Phytophinora species	Accession no. a)	Host	Country	
P. arecae	AF266781	Cocos nucifera	Indonesia	
P. boehmeriae	AF228076	Ailanthus altissima		
P. botryosa	AF266784	Hevea brasiliensis leaf	Malaysia	
P. cactorum	AB217671		Japan	
P. cajani	AF266765	Cajanus cajani	India	
P. cambivora	AF087479	Malus Pumila		
P. capsici	DQ464056	Capsicum annuum L.	U.S.A	
P. cinnamomi	AB217675			
P. citricola	AB217676		Japan	
P. citrophthora	AF266785	Actinidia chinensis	Chile	
P. colocasiae	AF266786	Colocasia esculenta	Malaysia	
P. cryptogea	AF266796	Lycopersicon esculentum	New Zealand	
P. drechsleri	AF266798	Beta vulgaris	U.S.A	
P. fragariae v.fragariae	AF266762	Fragaria X ananassa	Scotland	
P. gonapodyides	AF228102	- Committee of the comm		
P. heveae	IMI180616	Hevea brasiliensis	Malaysia	
P. humicola	AF266792	citrus orchard soil <i>Via</i>	Taiwan	
P. idaei	AF266773	Rubus idaeus	Scotland	
P. ilicis	AJ131990	Ilex aquilifolium	UK	
P. infestance	AF228084	Lycopersicon esculentum		
P. inflata	AF266789	Syringa		
P. insolita	AF271222	Soil	Taiwan	
P. iranica	AJ131987	Solanum melongena	Iran	
P. katsurae	AF266771	Cocos nucifera	Ivory Corst	
P. lateralis	AF266804	Chamaecyparis	U.S.A	
P. macrochlamydospora	L41367	onandocypus as		
P. medicaginis	AF266799	Medicago sativa	Australia	
P. megakaya	AF266782	Theobroma cacao	Ghana	
P. megasperma	AF266794			
P. melonis	AF228094	Cucumis melo	Taiwan	
P. mirabilis	AF266777	Mirabilis jalapa	Mexico	
P. multivesiculata	AF266790	Cymbidium	Netherlands	
P. nicotianae	AB217682	Kalanchoe	Japan	
P. palmivora	AF228087	Chrysalidocarpus lutescens		
P. phaseoli	AF266778	Phaseolus lunatus		
P. porri	AF266801	Brassica chinensis	Netherlands	
P. primulae	AF266802	Primura acaulis	Germany	
P. pseudotsugae	AF266774	Pseudotsuga menziesii	U.S.A	
P. ramorum	AY845186	Rhododendron	France	
P. sinesis	AF266768	Cucumis sativa	China	
P. sojae	AB217683	A STATE OF THE STA	Japan	
P. tentaculata	AF266775	Chrysanthemum leucanth.	Germany	
P. trifolii	AF266800	Trifolium	- visioniy	
P. tropicalis	DQ464057	A STATE OF THE STA	U.S.A	
P. uliginosa	AF449495	Quercus robur soil	Poland	
P. vigane	AF266766	Vigna sinensis	Australia	
GF749		Chrysanthemum	Japan	
Pythium helicoides	H5sz1C14	Rose	Japan	

a) DDBJ, EMBL and GenBank database accession number of the nucleotide sequence data

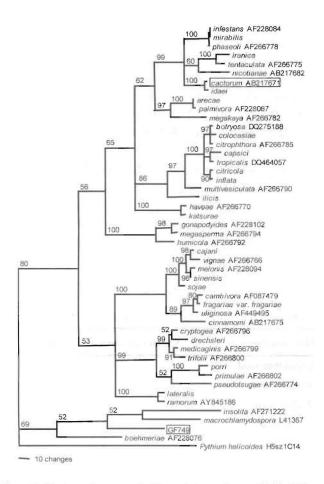


Fig. 29 Phylogenic tree of *Phytophthora* from rDNA-ITS regions

小 括

本章では、県内の鉢花生産施設で新規に発生が認めら れた被害の原因を明らかにした。カランコエについては、 P. myriotylum および P. helicoides による根腐病(Root and stem rot) として病名登録された。また、これまで種が不 明であったカランコエ疫病の病原菌については、Ph. nicotianae であることを明らかにした。次に、ポインセチ アの根腐症状については、P. aphanidermatum が原因であ ることを明らかにし、根腐病(Root rot)として既報の病 原菌に追加された。また、ゼラニウムについては、P. irregulare が原因であることを明らかにし、茎腐病 (Pythium blackleg) の病原として追加された。なお、現 在本菌については、種の細分化が一部で進められており、 ゼラニウム分離菌の分類については検討が残されている。 さらに、ミニバラについては、1種の Phytophthora 属菌 が原因であることを明らかにし、疫病(Phytophthora disease)の病原として追加された。分離菌については、形 態学的特徴および分子生物学的手法を用いた同定の結果、 一致する種がなかったことから、分類についてはさらに

検討が必要である。最後にキク(ポットマム)については、 Phytophthora 属菌の1種が原因であることを明らかにし、 疫病(Phytophthora rot)の病原として病原追加を提案中で ある。なお、本菌についてもミニバラと同様に既報の種 の中には完全に一致する種が見当たらなかったことから、 新種の可能性があり今後さらに検討が必要であると考え られた。

近年、分子生物学的手法の発展は目覚しいものがあり、多くの植物病原菌の同定作業に利用されつつある。本研究においても、Pythium 属菌および Phytophthora 属菌の種の同定に際して、形態学的特徴の観察と分子生物学的手法を併用した。Pythium 属菌および Phytophthora 属菌については、これまで形態学的特徴をもとに種の分類が進められてきたが、近縁の種間では分類基準が曖昧な場合があった。また、特に Phytophthora 属菌については、雌雄異株性の種が多く、単一培養では有性器官を形成しないため、種名が決定できない場合が多かった。近年の研究から Pythium 属菌および Phytophthora 属菌において、分子系統解析による分類は、従来の形態分類をよく反映した結果となることが報告されてきており、今後は形態学的特徴による同定を補佐するツールとして必須の技術であると考えられる。

第二章 病原菌検出手法の開発

県内の鉢物生産は、ミニバラやカランコエに代表される単一品目の大量生産方式や、複数種を組み合わせて周年出荷する方式など、その生産体系は経営体によって千差万別である。このため、水媒伝染性病害の発生様相は様々であり、その要因を解明するのは容易なことではない。花き経営の安定化のためには、伝染経路を明らかにして、病原菌の生態に基づいた適切な対応をとることにより、経済被害を最小限度に抑えることが大切である。

しかし、Pythium 属菌は国内で確認されているもので40種、Phytophthora 属菌は54種と多く、現地施設から採取した苗、培土、水などから特定の種を検出することは、これまで非常に困難であった。そこで、本章では県内の生産施設で問題となっている病原菌を対象として、その検出手法について検討した。なお、本項の一部はJGen Plant Pathol にて既に報告した(渡辺ら 2008)。

1. 水、養液からの検出方法

1) 捕捉法による高温性ピシウムの選択的分離法

Pythium helicoides は、ミニバラやカランコエの根腐病を引き起こすことから、Ebb & Flow システムを導入した 栽培施設においては、最も重要な病原菌の一つである (Kageyama et al. 2002, 2003; Watanabe et al. 2007)。また、 本菌による被害はロックウール栽培の切りバラでも発生 している。最近では、イチゴやキクの根腐や立ち枯れを引き起こすことが報告されている(鈴木ら 2005; 渡辺ら 2005; Tsukiboshi et al. 2007)。また、P. aphanidermatum や P. myriotylum はキュウリやトマト、タバコ、bell pepper、floral crops、レタス、アーティチョークや多くの作物の養液栽培の重要な病原として知られている(Moulin et al. 1994; Jenkins and Averre 1983; Anderson et al. 1997; Chellemi et al. 2000; Moorman et al. 2002; Stanghellini et al. 1998, 2000a)。これら3種のPythium 属菌は、40℃の高温でも生育可能な種として知られており、野菜や花きの養液栽培において主に夏期に深刻な被害を引き起こす。

水媒伝染性病害の防除対策を構築するためには、養液中の病原菌をモニタリングする必要があり、そのためには簡易かつ感度の高い検出手法が必要である。捕捉法は、土壌から Pythium 属菌や Phytophthora 属菌を分離するために従来から使用されてきている(Hendrix and Campbell 1970; Matsumoto and Sato 1979; Watanabe 1984)。 しかし、養液中の病原菌の検出に関する報告は少ない。そこで、本研究では、捕捉法をベースにして養液中から高温性 Pythium 属菌を効率的に検出する方法を開発し、現地施設での実用性を評価した。

材料および方法

供試菌株

Table 1 に示す菌株を供試した。 このうち、Pythium helicoides、P. aphanidermatum および P. myriotylum は 40℃以上の高温条件下で菌糸生育が可能である。

Table 1. Pythium isolates used in this study

Species	Isolate *1	Host	Geographic origin	Year
P. helicoides	MAFF238913	Miniature rose	Gifu, Japan	2000
	MAFF238916	Kalanchoe	Gifu, Japan	2000
P. aphanidermatum	SSB7-1	Bent grass	Hyogo, Japan	2000
	NBRC 100101	Carrot field soil	Gifu, Japan	1994
P. myriotylum	MAFF238918	Kalanchoe	Gifu, Japan	2000
	Fuk kat3	Soybean	Fukui, Japan	2004

^{*} Isolates beginning with "MAFF" was from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. Isolates beginning with "NBRC" were from the NITE Biological Resource Center.

捕捉基質

試験には8種類の捕捉用基質を供試した(Table 2)。各素材は0.3mm 目合いのナイロン性の網袋(15×15 mm)に入れた。ベントグラスおよびバラの葉は3×7 mm に裁断し、その他の素材は種子のまま供試した。各素材は30mg 計量してナイロン袋へ詰め、1.5%素寒天平板培地の端へ寒天が固まる直前に置床した。捕捉用基質を入れていないナイロン袋を対照として供試した。遊走子は

Waterhouse (1967)の方法に準じて以下の方法で調整した。供試菌株を接種したトウモロコシ煎汁寒天培地 (CMA)に高圧蒸気滅菌したベントグラス葉を置床した。25℃で2日間培養した後に供試菌が感染したベントグラス葉片を50mlの池水(池水:蒸留水=1:2、高圧蒸気滅菌処理)に移した。20℃で24時間培養した後、ガーゼでろ過して葉片を除去し遊走子懸濁液を得た。10 spores/mlに調整した遊走子懸濁液 5mlを、ナイロン袋を置床した培地中央部へ静かに分注した。25℃暗黒条件下で3日間培養し、以下の基準で遊走子の捕捉力を0から4の指数(0=基質周囲に肉眼で菌糸が確認できない、1=わずかな菌糸が認められる、2=基周囲に菌糸が認められる、3=基質周囲に豊富な菌糸が認められる、4=基質周囲に気中菌糸が非常に豊富に観察される)で評価した。本試験は2反復で試験を行った。

Table 2. Bait materials used in this study

Bait material	Amount of material per plate a
Cucumber seed	
Tomato seed	10
Radish seed	2
Hemp seed	2
Perila seed	6
Millet seed	4
Bent grass leaf	2 cm ²
Miniature rose leaf	2 cm ²

^a Amount equivalent to 30mg

ベントグラス葉片トラップを用いた検出感度

上記の試験において、ベントグラス葉は供試した全て の菌の遊走子に対して捕捉力が高かった。そのため、以 降の実験ではベントグラス葉を捕捉基質として使用し、 以下の手順でベントグラス葉トラップ(BLT)を作成し た。ベントグラス葉を 5-7mm の長さに裁断し、9.5×7 cm の不織布袋に葉片 50 枚を入れ、121℃20 分間高圧蒸気滅 菌した。 Pythium helicoides MAFF238913、 aphanidermatum NBRC100101 および P. myriotylum Fuk Kat3 について、3 段階の濃度(4×10³, 4×10², 4×10 spores/l) に調整した遊走子懸濁液1Lの入ったプラスチックボト ルに BLT を入れた。ボトルは 25℃で 1、3 および 7 日間 培養しトラップ内部の葉片を回収した。葉片は水分を十 分に取り除いた後に、Pythium 選択培地(CMA に 5 mg/l pimaricin、 100 mg/l agrimycin および 100 mg/l pentachloronitrobenzene を添加; Kageyama and Ui 1980) に30切片を置床した。25℃で24時間培養した後に、供 試菌の分離頻度を求めた。分離頻度は菌糸生育が認めら れた葉片の割合から求めた。試験は3反復で行った。

捕捉基質からの分離温度

捕捉用基質からの最適な分離温度を決定するため、以下の実験を行った。本試験には P. helicoides MAFF238913、P. aphanidermatum NBRC100101 および P. myriotylum Fuk Kat3 を供試した。プラスチックボトル(φ9cm × 16cm)に BLT および供試菌の遊走子懸濁液 IL (80 spores/I)を入れた。25℃で 3 日間培養した後に、葉変を回収して前述の方法により Pythium 選択培地に 30 切片置床し、25、35、38、40、42、45℃で 24 時間培養した。各培養温度における分離頻度を求めた。試験は 2 回行った。

ほ場での実用性試験

現地ほ場における BLT の実用性を評価するため、以下の試験を行った。いずれの試験においても、回収した BLT は Pythium 選択培地に 30 切片置床し、38℃で培養して分離頻度を求めた。また、van der Plaats-Niterink (1981)の検索表に従い、分離菌の形態的特徴を観察して種を同定した。

はじめに、岐阜県農業技術センター内の温室で以下の 試験を行った。1つの養液タンク(200L)を共有する2 つの栽培ベンチ(90×180×5cm)からなる循環式の Ebb & Flow システムを使用した。病原菌の汚染土壌は以下のよ うに作成した。CMA 培地で前培養したバラ根腐病菌 P. helicoides の菌叢ディスクをベントグラス種子培地(3g のベントグラス種子に 11ml の水を添加して高圧蒸気減 菌; 東條ら 1993)に移植して 25℃暗黒条件下で 6 日間 培養した。感染種子は、ワーリングブレンダーを用いて 500ml の滅菌水とともに 100rpm で 30 秒間磨砕した。高 圧蒸気滅菌した 2L の人工培土 (BM-2) に 500ml の菌磨 砕液を混和して汚染土壌を作成した。栽培システムの片 方のベンチには、病原菌汚染土壌に鉢上げした 100 鉢の ミニバラを設置し、もう一方のベンチには健全なミニバ ラを100 鉢設置した。かん水は1日に2回行った。BLTによる養液中の病原菌の捕捉調査は、試験開始50日後まで8回調査を行った。BLTは養液中に3日間設置し、回収してP. helicoidesの分離頻度を求めた。また、試験期間中の発病株率を定期的に調べた。

次に3農家の生産施設で、養液中から病原菌の検出を 試みた。養液の循環利用を行っているトマトの栽培施設 (羽島市)では、2003年9月にBLTを養液中に3日間 設置した。当施設では、2系統の栽培システムがあり、 それぞれのシステムで試験を行った。養液に利用してい る井戸水についても調査した。Ebb & Flow システムを導 入している2戸のカランコエ農家(kalanchoe-1; 岐阜市、 kalanchoe-2; 本巣市)では、2002年7月に各排液にBLT を7日間設置した。

さらに、以前に P. helicoides による被害を受けたミニバラおよびカランコエの生産施設において、循環養液中の病原菌を経時的にモニタリングした。BLT は温室内の大型の地下タンク(容量 50kl)内の循環養液中に7日間設置した後に回収した。ミニバラ施設(本巣市)は2000年から2001年に、カランコエ施設(岐阜市)では、2004年の5月から8月に調査を行った。

結 果

捕捉用基質のスクリーニング

3種の Pythium 属菌の遊走子に対する 8種の材料の捕捉力を比較した。捕捉用材料は素寒天平板培地の端に設置し、培地中央部に遊走子懸濁液を滴下した。捕捉力は、各材料周囲の菌糸生育程度(培養 3 日後)で評価した。その結果、ベントグラス葉は、供試した 8種の材料の中で基質周囲の菌糸密度が最も高く、キュウリ種子、キビ種子、トマト種子よりも明らかに優れていた(Table 3)。この傾向は 3種の Pythium 属菌で同様であった。一方、

Table 3	Comparison of bait materials in their ability to attract zoospores of Pythium spec	iec
Lable J.	Comparison of part materials in their ability to attract 2003pores of 1 vintum spec	100

Bait material		M	ycelial density	around baits a		
	hel-1 ^b	hel-2 b	aph-1 b	aph-2 b	myr-1 b	myr-2 b
Cucumber seed	2.0 d	2.0 cd	2.3 bc	2.3 bc	2.0 c	1.3 bc
Hemp seed	3.0 bc	3.3 ab	3.3 ab	3.3 ab	3.3 a	3.3 a
Perila seed	2.7 cd	2.7 abc	2.7 bc	3.0 abc	3.0 ab	3.1 a
Millet seed	1.0 e	1.0 de -	0.7 d	1.0 de	0.7 d	0.3 cd
Tomato seed	2.7 cd	2.3 bc	2.0 c	2.0 cd	2.0 c	1.7 b
Radish seed	3.0 bc	3.7 a	2.7 bc	3.0 abe	2.3 bc	3.3 a
Bent grass leaf	4.0 a	3.7 a	4.0 a	3.7 a	3.0 ab	3.7 a
Rose leaf	3.7 ab	3.3 ab	3.3 ab	3.7 a	3.0 ab	2.0 b
Control (Nylon mesh bag)	0.0 f	0.0 e	0.0 d	0.0 e	0.0 d	0.0 d

^a 0=hyphae cannot be seen with the naked eye, 1=a few hyphae observed, 2=hyphae observed around the bait, 3=abundant mycelia around the bait, 4=extremely abundant aerial mycelia over the bait. ^b hel-1 (*P. helicoides* MAFF238913), hel-2 (*P. helicoides* MAFF238916), aph-1 (*P. aphanidermatum* SSB7-1), aph-2 (*P. aphanidermatum* NBRC100101), myr-1 (*P. myriotylum* MAFF238918), myr-2 (*P. myriotylum* Fuk Kat3). Values followed by the same letters within each isolate are not different according to Tukey's test (*p*=0.05)

対照として用いたナイロン袋は、供試菌の菌糸を確認で きなかった。

検出感度

BLT を用いた捕捉法の検出感度を評価するため、BLT を異なる遊走子密度の溶液中に 1、3、7日間設置した。1日設置後に回収した BLT の場合、供試菌の遊走子密度が高いほど分離頻度は高かった(Fig. 1)。遊走子密度が 4×10^3 zoospores/1 の場合、P aphanidermatum および P myriotylum の分離頻度は設置 1 日後に 100%であった。いずれの遊走子密度においても、BLT の設置期間が長くなるほど分離頻度は高くなった。設置 7 日後には、いずれの遊走子密度においても分離頻度は 100%であった (Fig. 1)。

BLT の培養温度

生産環境において、病原菌を検出する際に病原性と非病原性の Pythium 属菌を区別することは重要である。本研究の対象は 40° C以上でも生育可能な高温生育性の Pythium 属菌である。それゆえ、BLT からこれらの種だけを選択的に分離可能な温度について検討した。 P. helicoides、 P. aphanidermatum および P. myriotylum が捕捉された BLT からの再分離頻度は、25、35、38 および 40° Cにおいては 90° 以上であった(Fig. 2)。一方、 42° C および 45° C では、分離頻度は有意に低下した。したがって、これら 3 種の Pythium 属菌の選択的分離に適した温度は 38° Cであると判断して、以降の実験では分離温度を 38° C とした。

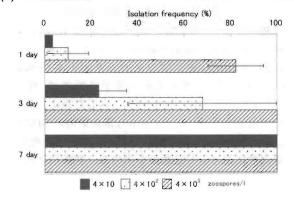
Ebb & Flow システムにおけるモニタリング試験

養液循環式の Ebb & Flow システムにおいて捕捉法の評価をするため、2 つのプールベンチと 1 つの養液タンクからなるシステムを使用して試験を行った。病原菌を接種したミニバラを一方のベンチに設置し、もう一方のベンチには健全なミニバラを設置した。P. helicoides は、循環養液から試験開始 6 日後に検出され、分離頻度は47%であった。分離頻度は徐々に増加し、試験開始 18日後には100%になった(Fig. 3)。病原菌は、無接種ベンチで発病が確認される 20 日以上前に養液中から検出された。

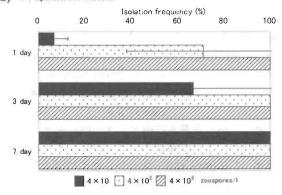
現地施設における病原菌の検出

現地栽培施設において、BLT を用いた高温生育性 Pythium 属菌の検出試験を行った。試験は、トマトの養液栽培施設およびEbb & Flowシステムを導入した2つのカランコエ生産施設で行った。トマトの養液栽培施設では、P. aphanidermatum、P. myriotylum が2系統の養液からそれぞれ検出された(Table 4)。対照として、養液に使用されている原水をコンテナに引き込み、BLT を設

(a) P. helicoides



(b) P. aphanidermatum



(c) P. myriotylum

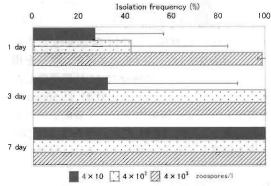
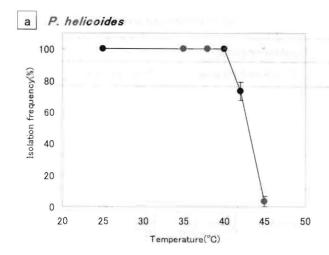
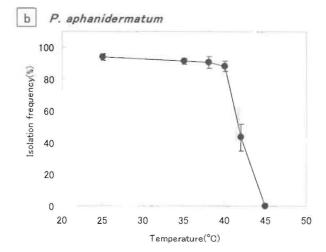


Fig. 1 Effects of trapping period and zoospore density on the isolation frequency of high-temperature-growing *Pythium* species using bent grass leaf traps (BLTs). The BLTs were exposed to zoospore suspensions of 4 x 10, 4 x 10² and 4 x 10³ zoospores/I for 1, 3 and 7 days. The pathogens were then re-isolated from the leaf segments by incubation on *Pythium* selective medium at 25°C. Isolation frequencies are the percentages of leaf segments from which fungal mycelia grew. The experiment was performed using: *P. helicoides* (a), *P. aphanidermatum* (b), and *P. myriotylum* (c). Error bars show standard deviations.

置して分離頻度を求めたところ、Pythium 属菌は検出されなかった。2つのカランコ工生産施設では、P. helicoides あるいは P. myriotylum のどちらかが検出された(Table 4)。トマトの生産施設では、本試験を行った後に約40%のトマトが発病した。カランコエの1施設では約5%が、





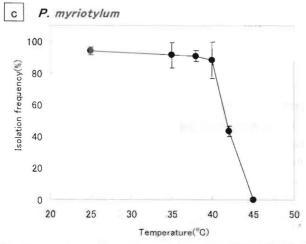
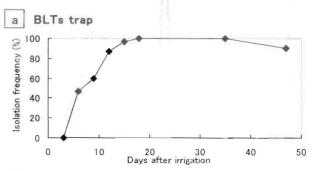


Fig. 2 Effect of incubation temperature on isolation frequency of high-temperature-growing *Pythium* species using bent grass leaf traps. The bent grass leaf traps were exposed to zoospore suspensions (80 spores/I) and then the pathogens were re-isolated from the bent grass leaf segments using incubation temperatures of 25, 35, 38, 40, 42 and 45°C. Isolation frequencies are the percentages of leaf segments from which fungal mycelia grew. The experiment was performed using: *P. helicoides* (a), *P. aphanidermatum* (b), and *P. myriotylum* (c). Error bars show standard deviations.

もう 1 つの施設では約 3%の植物が発病した。これらの 施設では、発病した植物の根からも病原菌が分離され、 これらの種は BLT から分離された種とそれぞれ一致し た。

現地施設における P. helicoides のモニタリング

ミニバラの生産施設において、BLT を P. helicoides の モニタリング調査に使用した。本施設においては、2 年間継続して調査を行い、7 日間隔で BLT を Ebb & Flow 施設の循環養液中に設置した。その結果、病原菌は 2000年5月および 2001年の 4-5月に検出された (Fig. 4)。同施設において、ミニバラの発病はいずれの年も 6-9月に観察された。また、2004年の 5-8月にかけて、カランコエの Ebb & Flow 施設の循環養液についても同様にモニタリング調査を行った。P. helicoides の分離頻度は 5月中旬に 23%であったが、6 月上旬に 100%に達し、秋には分離頻度が低下した (Fig. 5)。同施設においては、カランコエの根および地際茎の腐敗症状は 7月上旬に観察されはじめ、10月には観察されなくなった。



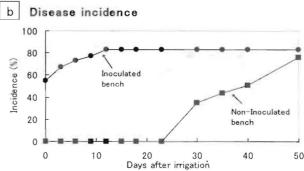


Fig. 3 Isolation frequency of *Pythium helicoides* using bent grass leaf traps and the spread of rose root rot disease in a re-circulated Ebb & Flow irrigation system. The irrigation system consisted of two cultural benches and one nutrient solution tank. Miniature roses inoculated with *P. helicoides* were put on one bench (inoculated bench), and non-inoculated miniature roses were put on the other bench (non-inoculated bench). a: Isolation frequencies of *Pythium helicoides* from the bent grass leaf traps (BLTs) were determined periodically for 48 days after the irrigation system was set up. b: Rose root rot disease incidence on the inoculated and non-inoculated benches was determined periodically for 50 days after the system was set up.

Table 4. Detection of high-temperature-growing Pythium species using bent grass leaf traps in commercial greenhouses

Nursery	and the same	Isolation frequency (%) *	
	P. helicoides	P. aphanidermatum	P. myriotylum
Tomato (hydroponic system)		*	
recirculated nutrient water 1	0	100	0
recirculated nutrient water 2	0	80	93
well water	0	0	0
Kalanchoe-1 (ebb & flow system)			
drain water	87	0	0
Kalanchoe-2 (ebb & flow system)			
drain water	0	0	77

a Data showed isolation frequency of each Pythium species from 30 segments of bent grass leaves

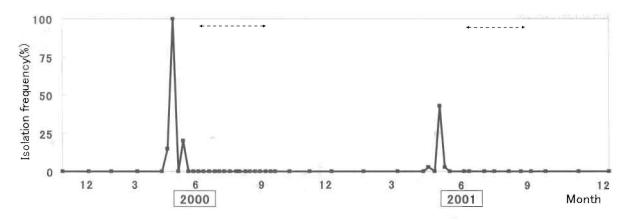


Fig. 4 Monitoring of *Pythium helicoides* in a miniature rose greenhouse with an Ebb & Flow irrigation system. During 2000 and 2001, bent grass leaf traps (BLTs) were placed periodically in the nutrient solution, and used to determine the zoospore isolation frequency. Arrows with dotted lines indicate the periods of root rot disease occurrence in the greenhouse.

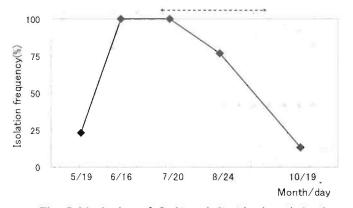


Fig. 5 Monitoring of *Pythium helicoides* in a kalanchoe greenhouse with an Ebb & Flow irrigation system. Bent grass leaf traps (BLTs) were placed periodically in the nutrient solution, and used to determine the zoospore isolation frequencies, between May 19 and October 19, 2004. The arrow and dotted line indicate the period of root and stem rot disease occurrence in the greenhouse.

まとめ

Pythium 属菌や Phytophthora 属菌は、様々な種類の植 物材料を用いて土壌中から捕捉できることが報告されて いる (Hendrix and Campbell 1970; Sanchez et al. 2000; Thinggaard and Andersen 1995; Watanabe 1981; Watanabe 1984)。また、Thinggaard and Andersen (1995)は、Ebb & Flow 方式の循環養液中から Cedrus deodara の葉を用い て Phytophthora cryptogea Pethyb. & Laff.の遊走子を捕捉 できたと報告している。本研究において、アサ、エゴマ、 ダイコンの種子、バラ葉、とりわけベントグラス葉が効 率的に Pythium 属菌の遊走子を捕捉できることを見出し た。Kraft et al. (1967)は、P. aphanidermatum の遊走子は 成熟したベントグラスの葉に引き寄せられると報告して いる。加えて、ベントグラス葉は Pythium 属菌の種の同 定のための形態観察に広く用いられている(Waterhouse 1967)。これらのことから、ベントグラス葉は Pythium 属 菌の捕捉用基質として適していると考えられた。

Pettit et al. (2002)は、イムノアッセイ法、フィルタリング法および捕捉法を用いて、Pythium 'group F'の遊走子を 2×10^2 zoospores/ml の密度で検出できたと報告している。本研究では、BLT の検出感度について検討した。本法により、P. helicoides、P. aphanidermatum および P. myriotylum の遊走子を 4×10 zoospores/l の密度で検出できた。これらの Pythium 属菌の分離頻度は、遊走子懸濁液への BLT の設置期間を長くするほど高くなった。それゆえ、より高い検出感度が必要であるならば、BLT の設置期間を長くすれば良いし、相対的に菌密度の増減を比較するのであれば、BLT の設置期間を短くすればよいと考えられる。

水耕液中には病原性 Pythium だけでなく、非病原性あ るいは病原性のごく弱い種も同時に生息している。した がって、捕捉用基質から病原性の種だけを選択的に分離 できることが望ましい。本研究で対象としたのは高温生 育性の Pythium 属菌である。 P. helicoides、 P. aphanidermatum、P. myriotylum は生育適温が 35℃前後で 40℃でも生育可能であることが知られている。選択培地 を用いた高温培養による選択的分離は以前にも報告があ る (Lumsdsen et al. 1976; Watanabe 1981)。Burr and Stanghellini (1973) は、土壌中の P. aphanidermatum は 35℃条件で容易に分離可能であったと報告している。本 研究において、BLT に捕捉された P. aphanidermatum, P. helicoides および P. myriotylum の分離率は 38-40℃でもほ とんど低下しなかった。現地のミニバラおよびカランコ エの生産施設の養液中に設置した BLT は、回収した葉片 を選択培地に置床して高温培養(38℃)することにより、 病原性の高温生育性 Pythium 属菌を選択的に分離するこ とが可能であった。ただし、38℃で培養した場合、選択 培地上では他の Pythium 属菌が全く分離されないわけで はないが、高温生育性でない Pythium 属菌の場合は、生 育量が非常に少なくなる。これに対して3種の高温生育 性 Pythium 属菌の菌糸生育量は、2 日で 30mm 以上であ り容易に区別が可能である。これらのことから、これら の高温生育性 Pythium 属菌は、BLT による捕捉法と選択 培地上での高温培養により、選択的に検出可能であると 判断した。

バラおよびカランコエの根腐病の発病好適温度は35℃以上であり、夏季高温時に被害が発生する(Kageyama et al. 2002a; Watanabe et al. 2007)。しかし、P. helicoides の遊走子は25-30℃で最も形成量が多くなる(Kageyama et al. 2002a)。P. aphanidermatum や P. myriotylum を含む多くの種で、遊走子の形成適温は、それぞれの発病適温よりも低い(van der Plaats-Niterink AJ, 1981)。これらのことは、高温生育性 Pythium 属菌は、病害が発生する夏季よりも前のより低温期に循環養液中に遊走子を多量に放出していることを示唆している。本研究において、バラ根腐病を用いた接種試験において、病

徴が現れる 23 日前に循環養液から病原菌を検出した。また、現地の生産施設でも発病が認められる 30 日以上前に、循環養液から病原菌を検出することができた。これらのことから、BLT を用いた定期的なモニタリング調査は、養液栽培における高温生育性 Pythium 属菌の予察に利用可能であると考えられた。

2) メンブレンフィルターによる遺伝子検出法

水および養液から水媒伝染性病原菌を検出する場合、 捕捉法は生育の早い Pythium 属菌にとっては有用な手法 であるが、 Pythium 属菌 と比較して生育が遅い Phytophthora 属菌等への適用は困難である。 Hong et al. (2002)は、9 種類の市販のメンブレンフィルターを用い て、溶液中から Pythium 属菌および Phytophthora 属菌の 検出精度を比較した結果、Durapore ® メンブレン(孔 径 5μm)が優れていることを明らかにした。そこで、本 メンブレンフィルターと遺伝子診断を組み合わせた手法 について検討した。

材料および方法

供試菌株

本試験には、カランコエ疫病菌 Phytophthora nicotianae GF-101 菌株を供試した。

検出感度の検討

供試菌の遊走子懸濁液を約 1×103 個/ml に調整し、 滅菌水1Lに5_μl、10_μl および100_μl 添加後、吸引ろ過ユ ニット(6連式マニホールドおよび47mmガラスウェア; 3M 製、吸引ポンプ V-500; BUCHI 製) を用いてメンブレ ンフィルター (Millipore 社 Durapore® 5µm, 47mm) でろ 過した。回収したフィルターをハサミで裁断し、Fig. 6 の手順で DNA を抽出した後に、GENECLEAN SPIN Kit (Qbiogene 社)で DNA を精製した。精製した DNA サ ンプルは浅野・景山ら(2003)の Ph. nicotianae 検出用プラ イマー (APN-F: GTGAGCCCTATCAAAAAAAA, APN-R: CAGCCGGTCCGAAGACCAAT) を用いて PCR を行った。PCR 反応液は、各プライマー0.5 μM、Fast Start Tag DNA ポリメラーゼ (Roche Applied Science, USA)を 1.25 units, dNTP mixture ≥ 0.2 mM, 1× PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂)、牛血清 アルブミンを 400ng/μl、DNA を 1μl および滅菌水を添加 して 50 µl とした。PCR 反応は Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CN, USA)を用いて行っ た。まず、95℃で5分間変性させ、続いて94℃で30秒 間変性、65℃で30秒間アニーリング、72℃で1分間 DNA 鎖の伸長反応のサイクルを 40 回繰り返した後、72℃で 10 分間伸長させた。次に、電気泳動により目的断片の増 幅の有無を確認した。また、供試した遊走子懸濁液中の 最終濃度を確認するため、顕微鏡観察により遊走子数を調査した。また、メンプレンフィルターによる供試菌遊走子の回収率は、以下のように調べた。処理前菌量は、CMA 平板培地に遊走子 30μl および滅菌水 1ml を添加し培地表面に広げ、25℃で 48 時間培養後にコロニー数を調べた。処理後の菌量は、滅菌水 1 L に遊走子 30μl を添加し上述の方法でろ過後にメンブレンの表面を下にしてCMA 平板培地に置床し25℃で 48 時間培養後にメンブレンを除去し、Ph. nicotianae のコロニー数を調べた。

現地ほ場における検出試験

現地のカランコエ生産施設において、メンブレンフィルター法による検出試験を行った。2004年6月に岐阜市のカランコエ生産施設(A施設、B施設)の循環養液および栽培ベンチ排液を各1L採取した。採取したサンプル溶液各1Lを、上記の方法でろ過、DNA抽出、PCR反応および電気泳動を行った。

結 果

メンブレンフィルター法の検出感度

供試した懸濁液の遊走子濃度は、顕微鏡観察による計数の結果、平均 5.5 個 $/5\mu$ l であった。また、メンブレンフィルターによる生存遊走子の回収率は 53%であった(Table 5)。Ph. nicotianae の遊走子を捕捉したメンブレンフィルターは、Fig. 6 に示す DNA 抽出、精製、種特異的プライマーを用いた PCR を行うことで、遊走子懸濁液 5μ l/L 添加区(ろ過前の推定遊走子濃度 5 個/L)でも検出が可能であった(Fig. 7)。

Table 5 Recovery of *Phytophthora nicotianae* zoospores by filtering method

Number o	D (0/)		
Cont.	Treat.	— Recovery (%)	
15	8	53.3	

Membrane; Durapore® 5µm, 47mm

現地ほ場における検出試験

2004年6月にカランコ工生産施設の循環養液および栽培ベンチ排液から、Ph. nicotianae の検出を試みた結果、A施設のベンチ排液およびB施設の本タンクおよび予備タンク内の循環養液から検出された(Fig. 8)。これらの施設では、7月に疫病の発生が確認された。

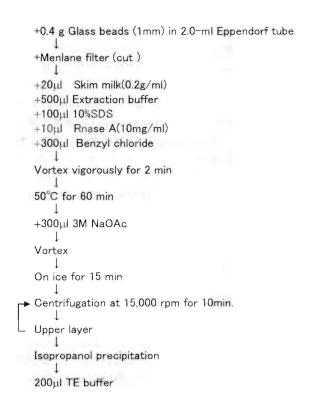


Fig. 6 Protocol for DNA extraction from membranes

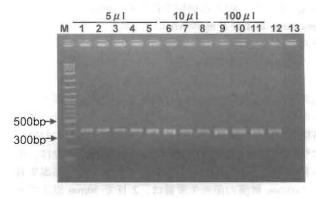


Fig. 7 Detection of *Phytophthora nicotianae* from zoospore solution of different concentration by filtering method. Zoospore solution (1 zoospore/μl) added 1L of distilled water. Lane designations: M=100 bp ladder, 1-5=5μl zoospore solution added 1L water (5 zoospores/L), 6-8= 10μl zoospore solution added 1L water (10 zoospores/L), 9-11=100μl zoospore solution added 1L water (100 zoospores/L), 12= DNA extraction from 5μl of zoospore solution, 13=membrane filter (positive cont.)

まとめ

以上の結果、メンプレンフィルターを用いて水や養液中から Ph. nicotianae の遊走子を回収し、遺伝子診断により検出することが可能であった。本法は他の疫病菌、Pythium 属菌をはじめ、培養困難な根こぶ病菌等の迅速診断にも今後利用可能と考えられた。

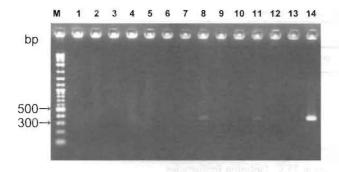


Fig. 8 Detection of *Phytophthora nicotianae* by filtering method in a kalanchoe greenhouse with an Ebb & Flow irrigation system. Re-circulated nutrient solution (1L) was sampled from two greenhouses (A, B) at June 23, 2004. Lane designations: M=100 bp Jadder, 1-3=greenhouse A, nutrient solution from tank, 4-5=greenhouse A, nutrient solution from bench ①, 6-7= greenhouse A, nutrient solution from bench ②, 8-10= greenhouse B, nutrient solution from tank, 11-12= greenhouse B, nutrient solution from pre-tank ①, 13= greenhouse B, nutrient solution from pre-tank ②, 14=*Ph. nicotianae* (positive cont.)

2. 土、培養土からの検出方法

花き類の養液栽培施設において、水媒伝染性病原菌は 土や培養土等を通じて施設内へ侵入する可能性が考えら れる。従来から、土壌中の Pythium 属菌や Phytophthora 属菌は、様々な種類の植物材料を用いて土壌中から捕捉 できることが報告されている(Hendrix and Campbell 1970; Sanchez et al. 2000; Thinggaard and Andersen 1995; Watanabe 1981; Watanabe 1984)。本研究において、キュウ リ種子、アサ種子、エゴマ種子、ベントグラス葉など9 種の材料を用いて、Pythium helicoides など数種の Pythium 属菌に対する捕捉程度を調べた結果、ベントグラス葉、 アサ種子、エゴマ種子等で捕捉程度が高く、中でもベン トグラス葉が最も優れていた。このため、水や養液中か らの検出にはベントグラス葉が最も適していると考えら れた。土壌中の Pythium 属菌の検出にベントグラス葉を 用いて予備的に試験を行ったところ、長期間の設置は土 壊中に存在する豊富な微生物、微小動物によりベントグ ラス葉の分解が急速に進むことから、土壌からの検出に はベントグラス葉は適さないと考えられた。そこで、種 子の大きさが適当で取り扱い、入手の容易なエゴマ種子 を用いて、土壌中からの検出を試みた。

材料および方法

供試菌株

本研究には、バラ根腐病菌 *P. helicoides* MAFF238913 菌株およびゼラニウム茎腐病菌 *P. irregulare* GF723 菌株 を供試した。

培土からの検出

CMA 平板培地で前培養して得られた分離菌の菌叢デ ィスクを、ベントグラス種子培地 (300ml のフラスコに ベントグラス種子3gおよび蒸留水 llmlを入れオートク レーブ処理) に置床した。25℃暗黒条件下で6日間培養 した後に、菌糸で覆われた種子を取り出し、ホモジナイ ザーで 500ml の滅菌水を加えて 100rpm で 30 秒間磨砕し た。流水下で種子を十分に洗浄して、種子表面の余剰菌 糸を除去した後に、日陰で風乾させ病原菌汚染種子を作 成した。高圧蒸気滅菌した 100g の人工培土(BM-2)に病 原菌汚染種子を1、10、100個混和して、汚染培土を作成 した。500ml のプラスチックボトルに汚染培土 100g およ び滅菌水を 500ml 入れ、エゴマ種子トラップ 1 個を入れ、 25℃暗黒条件下で3日間培養した。培養後にエゴマ種子 を回収し、Pythium 選択培地 (VP2) に30 個を置床して、 25℃暗黒条件で2日間培養して各菌の分離頻度を調べた。 なお、各区3 反復で試験を行った。

現地ほ場における検出試験

2005年5月、岐阜県神戸町のゼラニウム生産農家において、鉢上げ用に準備していた調整培土を採取した。エゴマ種子トラップを用い、前述の方法に準じて試験を行った。分離菌は、前述の方法を用いて胞子のう等の形態観察を行い、種を同定した。

結 果

培土からの検出

エゴマ種子トラップを用いて、病原菌の密度を3段階に設定した調整培土からの検出を試みた。その結果、P. helicoides の場合は低密度(1unit/100g 培土)の培土から

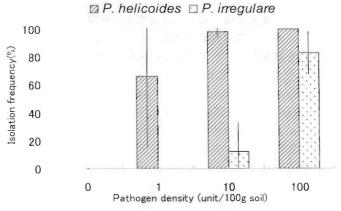


Fig. 9 Detection of *Pythium helicoides* and *P. irregulare* from potting mixture using perila seed traps. The traps were exposed to soil (potting mixture) suspensions for 3 days. The pathogens were then re-isolated from the seeds by incubation on *Pythium* selective medium at 25°C. Isolation frequencies are the percentages of seed from which fungal mycelia grew. Error bars show standard deviations.

and a second	0 1 1			
Table 6 Detection	of Pythium species	from potting mixture	in commercial	oreenhouse

C	Isolation frequency	Species			
Sumple	(%)	P. irregulare	P. myriotylum	Pythium sp.	
1	2		the transfer of the same		
2	2	+			
3	28	+			

The perila seed traps were exposed to soil (potting mixture) suspensions for 7 days. The pathogens were then re-isolated from the seed by incubation on *Pythium* selective medium at 25°C. Isolation frequencies are the percentages of seed from which fungal mycelia grew.

も 7-97%の頻度で分離され、中密度 (10unit/100g 培土) および高密度 (10unit/100g 培土) の条件では、高頻度で 検出された (Fig. 9)。一方、P. irregulare の場合は、低密 度 (1unit/100g 培土) では検出されず、中密度 (10unit/100g 培土) の培土の一部から検出され、高密度 (10unit/100g 培土) で 67-97%の頻度で分離された (Fig. 9)。

現地ほ場における検出試験

ゼラニウム生産農家から採取した鉢上げ用の調整培土3点から、Pythium 属菌が検出され、形態的特徴により同定した結果、2点のサンプルは P. irregulare、1点は P. myriotylum であった (Table 6)。

まとめ

以上の結果、培養土などに存在する Pythium 属菌はエゴマ種子を用いた捕捉法によって検出可能であることが明らかになった。

小 括

近年、養液栽培においては培養液の循環利用が進めら れつつあり、環境負荷の低減に役立っている。一方で、 養液を循環利用すると Pythium 属菌や Phytophthora 属菌 のような水媒伝染性病原菌の被害リスクが高くなる (Sanogo and Moorman 1993; Stanghellini et al. 2000b; Thinggaard and Middelboe 1989; Thinggaard and Andersen 1995)。近年、地球規模で温暖化傾向が続いており、特に 高温生育性 Pythium 属菌による被害が今後拡大すること が懸念されている(Anderson et al. 1997; Chellemi et al. 2000; Kageyama et al. 2002b)。実際に P. helicoides によっ て引き起こされる病害は、1996年にミニバラで初めて報 告されて以降、切りバラ、カランコエ、キク、イチゴ、 ガーベラ、ベゴニアなどで相次いで報告されている (Watanabe et al. 2007; Tsukiboshi et al.2007; 鈴木ら 2005; 渡辺ら 2005; 鈴木ら 2009; 宮崎ら 2009)。 それゆ え、循環式養液栽培において高温生育性 Pythium 属菌の

モニタリング技術をはじめとした病害対策を確立することは非常に重要である。そこで本研究では、ベントグラス葉による捕捉法と選択培地による高温培養(38℃)を組み合わせて、高温性 Pythium 属菌を選択的に検出する方法を確立した。本法を用いて、循環養液中の病原菌の有無を定期的に調べることで、発病前から養液中に病原菌を検出できたことから、現地栽培施設おける発生予察に利用可能であると考えられた。また、培土などからの検出については、エゴマ種子を用いることで対応可能であることを示した。ベントグラス葉およびエゴマ種子による検出法は、高温培養が可能であることから、対象病原菌が P. helicoides、P. aphanidermatum および P. myriotylum の高温性 Pythium である場合には、水や養液および培土などから選択的に検出でき、現地栽培施設においても実際に検出が可能であった。

また、高温性 Pythium 属菌以外の Pythium 属菌および Phytophthora 属菌については、捕捉法あるいはメンブレンフィルター法を用いて病原菌を捕捉し、遺伝子診断との組み合わせにより対応可能であると考えられた。

第三章 伝染経路の解明

県内の鉢物生産は、ミニバラやカランコエに代表される単一品目の大量生産方式や、複数種を組み合わせて周年出荷する方式など、その生産体系は経営体によって千差万別である。このため、水媒伝染性病害の発生様相は様々であり、その要因を解明するのは容易なことではない。花き経営の安定化のためには、伝染経路を明らかにして、病原菌の生態に基づいた適切な対応をとることにより、経済被害を最小限度に抑えることが大切である。

本研究において、ベントグラス葉やエゴマ種子を用いた捕捉法、メンブレンフィルター法および遺伝子診断技術を用いて、現地で問題となっている病原菌を中心として Pythium 属菌や Phytophthora 属菌を検出する手法について検討した。

そこで、本章では、岐阜県内で発生している水媒伝染 性病害の具体的事例をとりあげ、その発生生態と伝染環 について検討した。

1. バラ根腐病の発生生態と伝染環

バラ根腐病は P. helicoides によって引き起こされる病 害で、Ebb & Flow 方式のミニバラ生産施設で 1996 年に 初めて確認された (Kageyama et al. 2002)。本菌によるバ ラの病害は海外でも報告がなく、日本においてバラ根腐 病は P. helicoides が初めて病原として認知された病害で ある。本菌による被害はロックウール栽培の切りバラで も発生している。また、最近になって国内ではカランコ エ、イチゴおよびキクで本菌による被害が報告されてき ている (Watanabe et al. 2007; 鈴木ら 2005; 渡辺ら 2005; Tsukiboshi et al. 2007)。本菌は、高温条件下でも生育可能 な Pythium 属菌の一種である。近年、国内では夏期の異 常高温が半ば常態化しつつある中で、高温性 Pythium 属 菌による被害の拡大が懸念されている。そこで、ミニバ ラ栽培施設(本巣市)における本病の発生生態と伝染環 について検討した。なお、本項の一部は、植物防疫にお いて既に報告済みである (渡辺 2008)。

材料および方法

培土の保菌調査

2001年4月から10月に使用前の混合培土を計28サンプル採取した。培土からのPythium属菌の検出は、前述の方法に準じてベントグラス葉を用いた捕捉法により行った。培土はILのプラスチックボトルに約500mlを入れ、滅菌水を加えてILとした。トラップをI個容器内に投入して、25℃暗黒条件下で7日間静置し、トラップ内部のベントグラス葉を回収した。葉切片は水分を十分に取り除いた後に、Pythium選択培地(CMAに5mg/lpimaricin、100 mg/l agrimycinお1.び 100 mg/l

pentachloronitrobenzene を添加; Kageyama and Ui 1980) に30 切片を無作為に置床した。25℃で24-48 時間培養した後に、*Pythium* 属菌の有無を調べた。

原水からの病原菌の検出

2001年6月から10月にかけて2つの施設で使用している原水(地下水)の保菌調査を行った。2つの施設(A,B)の水栓から水道ホースを介して原水を15Lのポリ容器に入れ、連続的に流水状態にして、ベントグラス葉トラップ(BLT)を設置し、1週間ごとにトラップを回収・交換した。なお、ポリ容器の上部は密閉して、周囲から土等が混入しないようにした。回収したトラップからベントグラス葉を取り出し、水分を滅菌ろ紙で除去した後に、Pythium 選択培地に30切片を置床した。25℃で24時間培養した後に、Pythium 属菌および P. helicoidesの分離頻度を求めた。

循環養液中の病原菌のモニタリング

循環養液中の P. helicoides のモニタリングを 1999 年から 2001 年にかけて連続的に行った。2 つの施設(A, B)の大型の地下タンク(容量 50kl)内の循環養液中にベントグラス葉トラップ(BLT)を設置し、1 週間ごとにトラップを回収・交換した。回収したトラップからベントグラス葉を取り出し、水分を滅菌ろ紙で除去した後に、Pythium 選択培地に 30 切片を置床した。38℃で 24 時間培養した後に、P. helicoides の分離頻度を求めた。

また、ミニバラの鉢内に温度ロガー(おんどとり、株式会社ティアンドデイ)を設置し、経時的に鉢内温度を 計測した。

冬期越冬株および春挿し木株の保菌調査

循環養液中の病原菌のモニタリング調査結果と、現地施設の栽培体系について検討した結果、前年に施設 Aで栽培された株の一部は、冬期に露地ほ場で越冬させ施設 Bに再搬入されることが明らかになったため、この冬期越冬株に着目して P. helicoides の保菌の有無を調べた。冬期に露地ほ場で管理されていた越冬株 9 品種計 225 株(各品種 25 株)を 2001 年 3 月中旬-下旬に採集した。各株の根を流水下で十分に洗浄し、常法により表面殺菌した後に、ピシウム選択培地に置床し、25℃で培養して Pythium 属菌を分離した。分離菌は、40℃培養での生育の有無、形態的特徴から判断して各品種の P. helicoidesの分離株率を調べた。また、施設 B で春以降に新たに挿し木増殖された苗を 2001 年 7 月に採集し、これらについても同様に調べた。

結 果

培土の保菌調査

2001年.4月から10月に現地のミニバラ生産施設から 採取した使用前の混合培土28サンプルのうち、18サン プルから Pythium 属菌が検出された。形態的特徴、高温 生育性などにより分離菌を簡易に同定した結果、調査し たサンプル中にはP. helicoides は認められなかった(Table 1)。

Table 1 Detection of *Pythium* species from potting mixture soil

SOH				
Lot No.	Sampling date	Delivery date	Pythium . spp	P. helicoides
1	4/10	8	-	-
2	4/10	-	+	-
3	5/25	-	+	
4	6/4	-	+	
5	6/11	-	+	-
6	6/6	-	+	_
 T	6/27	-	+	-
8	6/29	2001.5	+	=
9	6/29	2001.5	+	-
10	7/6	2001.5	+	-
11	7/12	2001.5	+	-
12	7/14	2001.5	+	-
13	7/18	2001.5	+	
14	7/30	2001.7	-	-
15	7/31	2001.7	+	i=
16	8/1	2001.7	-	-
17	8/6	2001.7	-	i. -
18	8/8	2001.7	+	-
19	8/9	2001.7	. 	.
20	8/17	2001.8	=	:-
21	8/27	2001.8	-	, -
22	8/28	2001.8	-	r -
23	8/31	2001.7	+	-
24	9/5	2001.7	-	
25	9/7	2001.7	+	-
26	9/14	2001.7	+	-
27	9/21	2001.7	+	-
28	10/15	2001.1	:-	-

原水からの病原菌の検出

2001 年 6 月から 10 月に、2 つの施設(A, B)で使用している各原水について BLT を用いた捕捉法により Pythium 属菌を検出した結果、施設 A では 7/7-7/13 に、施設 B では 6/30-7/6 に Pythium 属菌が検出されたが、P. helicoides とは明らかに異なる種であった。一方、その他の調査期間ではいずれの施設でも Pythium 属菌は検出されなかった(Table 2)。

循環養液からの病原菌の検出

1999年6月から2001年12月にかけて循環養液中のP. helicoides をモニタリングした結果、施設Aでは1999年9月上旬および2001年8月下旬に検出された。一方、施設Bでは2000年5月および2001年の4月下旬-5月に検出された(Fig. 1)。当施設において、施設Aは主に出荷前の育成用、施設Bは挿し木および幼苗育成用に使用されていた(Fig. 4)。ミニバラの発病はいずれの年も施設Aにおいて6-9月に観察された。

鉢内の温度推移

2001年3月から11月にかけてミニバラ鉢内の温度について経時的に調べた結果、3月から5月および10月から11月の平均培地温は20℃前後であった。一方、7月および8月の平均培地温は27℃であった(Fig. 2, Table 3)。

冬期越冬株および春挿し木株の保菌調査

2000 年に施設 A で管理した後に、露地ほ場で越冬させたミニバラの根は、多くが暗褐色を呈しており腐敗症状が認められるものがあった(Fig 3 C-D)。これらの根から P. helicoides が高率に分離された。特に、6-9 月に生産した苗の保菌率は 57.4%と非常に高かった(Table 4)。

 Table 2
 Isolation frequency of Pythium species from well water in greenhouses

Toronto a contrat	Greenhouse A		Green	house B
Trapping period	Pythium . spp	P. helicoides	Pythium . spp	P. helicoides
6/9-6/15	0	0	0	0
6/16-6/22	0	0	0	0
6/30-7/6	0	0	67	0
7/7-7/13	33	0	0	0
7/14-7/19	0	0	0	0
7/20-7/27	0	0	0	0
7/28-8/4	0	0	0	0
8/5-8/10	0	0	0	0
8/11-8/17	0	0	0	0
8/18-8/24	0	0	0	0
8/25-8/31	0	0	0	0
9/1-9/7	0	0	0	0
9/8-9/14	0	0	0	0
9/15-9/22	0	0	0	0
9/23-9/28	0	0	0	0
9/29-10/5	0	0	0	0

Data are frequencies of each Pythium species from 30 segments of bent grass leaves

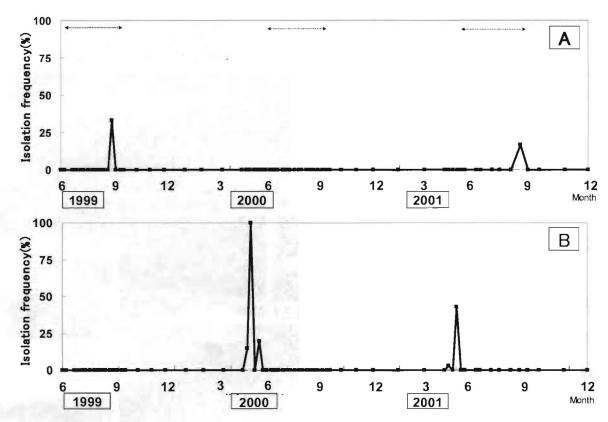


Fig. 1 Monitoring of *Pythium helicoides* in two miniature rose greenhouses with an Ebb & Flow irrigation system. During 1999 and 2001, bent grass leaf traps (BLTs) were placed periodically in the nutrient solution, and used to determine the zoospore isolation frequency. Arrows with dotted lines indicate the periods of root rot disease occurrence in the greenhouse.

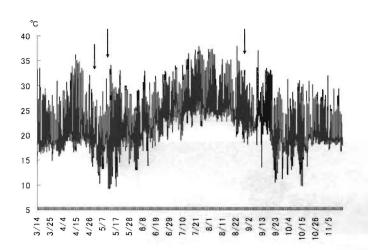


Fig. 2 Temperature of potting soil in miniature rose greenhouse. 2001.3-2001.11. Arrows indicate the periods of detection of *P. helicoides* in nutrient solution.

これらの根を顕微鏡観察したところ、組織中には卵胞子が多数形成されていた(Fig 3-E)。また、腐敗した根から P. helicoides のほかに P. dissotocum や Phytophthora megasperma なども分離された。一方、10 月以降に生産した苗から P. helicoides は分離されなかった。また、施設 B で 2001 年の春以降に挿し木された苗の保菌状況に

ついて調べた結果、3月中に挿し木された苗の保菌率は75%-85%と非常に高かった。一方、4月以降に挿し木された苗から P. helicoides は分離されなかった(Table 5)。

Table 3 Temperature of potting soil in greenhouse

-	Month a	Average	Minimum	Max
	Mar.	20.3	14.6	33.5
	Apl.	21.2	13.8	36.2
	May	20.0	9.2	34.1
	Jun.	22.8	13.0	32.9
	Jul.	27,4	19.1	37.9
	Aug.	27.2	22.8	37.3
	Sep.	22.4	10.5	37.0
	Oct.	20.0	9.9	31.3
	Nov.	20.3	16.8	32.0

^a 2001.3-2001.11, Mar.: 3/14-31, Nov.: 11/1-16

Table 4 Isolation frequency of *Pythium helicoides* from roots of miniature roses of an dormancy state at outdoors

Cutting date	Cultivars	Isolation frequency (%) a	Sampling date
2000 Jun.21	White Run	100	2001 Mar.29
2000 Jul. I	Teddy Bear	75	2001 Mar.29
2000 Aug.25	Teddy Bear	60	2001 Mar.14
2000 Aug.29	Cock Tail	3	2001 Mar.29
2000 Sep.20	Pinocchio A-2	90	2001 Mar.29
2000 Sep.27	Pinocchio B-2	16	2001 Mar.14
2000 Oct. 5	Loving Touch	0	2001 Mar.29
2000 Oct.10	Purple	0	2001 Mar.14
2000 Nov. 1	Pinocchio	0	2001 Mar.14

^a 25 samples were investigated, respectively.

Table 5 Isolation frequency of *Pythium helicoides* from roots of miniature roses which carried out the cutting in spring

Cutting date	Cultivars	Isolation frequency (%) a	Sampling date
2001 Mar.23	Ben Moon	75	2001 Jun.20
2001 Mar.29	Pinocchio	85	2001 Jun.20
2001 Apr.17	White Run	0	2001 Jun.20
2001 Apr.24	Mannish	0	2001 Jun.20
2001 Apr.24	Easter	0	2001 Jun.20
2001 Aug.10	Ben Moon	0	2001 Sep.18
2001 Aug.10	Easter	0	2001 Sep.18
2001 Aug.12	White Run	0	2001 Sep.18
0	1-1		

^a 25 samples were investigated, respectively.

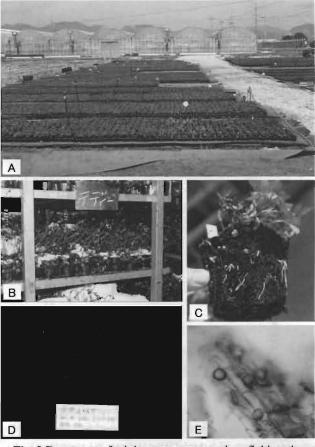
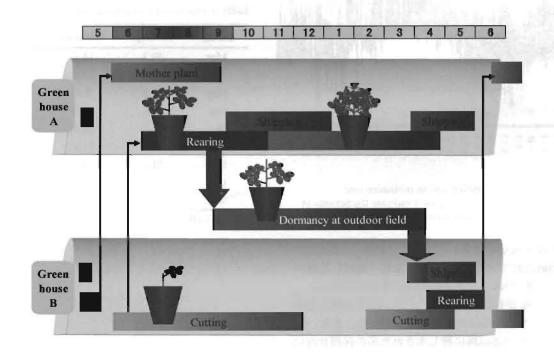


Fig. 3 Dormancy of miniature roses at outdoor field, and infection of *Pythium helicoides*. A: Miniature roses at outside of greenhouse. B: Miniature roses put into greenhouses just before. C-D: Rotted roots of miniature roses. E: Oospores of *P. helicoides* in infected roots.



5

5 6 7 8 9 10 11 12

Green house A Shipping Shipping Cutting Cutting

Fig. 5 Disease cycle of root rot of miniature rose caused by Pythium helicoides.

まとめ

Pythium helicoides によるバラ根腐病が 1996 年に多発生 した現地のミニバラ生産施設において、その発生要因と伝 染環について検討を行った。第一次伝染源として混合培土、 原水が考えられたため、ベントグラス葉を用いた捕捉法に より調べた結果、いずれからも P. helicoides は検出されな かった。しかし、他の Pythium 属菌は培土から高頻度に検 出され、原水からは一部検出された。培土については、高 頻度で Pythium 属菌が検出されたことから、発生当初に P. helicoides の第一次伝染源であった可能性は否定できない。 また、培土調査の結果から、ロットによって保菌状況に差 が認められたことから、培土の購入先や商品を新たに変更 した場合などについては特に注意を要すると考えられた。 P. helicoides は、国内ではバラ根腐病が初めて病原として 認知された病害であるが、1996年以前に国内の土壌中か ら分離されていることから、海外からの培土による侵入の 可能性の他、ほ場周辺の土壌中に存在していたものがバラ に感染した可能性も考えられる。Yin-Ling et al. (2009) は、 P. helicoides のマイクロサテライトマーカーを開発した。 本マーカーにより、同種菌株間の類縁性が評価できること から、今後、海外の菌株と国内の分離菌株を比較すること により第一次伝染経路が明らかにできる可能性がある。

前述のように、当施設で使用している培土から P. helicoides は検出されなかったが、本菌による被害は毎年施設内で確認された。このことから、当施設では一度侵入した病原菌が施設内に残存して被害を引き起こしている可能性が考えられた。そこで、循環養液中の病原菌のモニタリング調査を経時的に行った結果、施設 B では 4 月下旬から 5 月上旬、施設 A では 8 月下旬から 9 月上旬に P. helicoides が検出された。当生産施設において、A 施設は主に出荷前の調整施設として、B 施設は挿し木および幼苗の育成施設として使用されており、A 施設で前年に栽培された株の一部は、冬期に露地ほ場で越冬

させ翌春に B 施設に再搬入される体系がとられていた (Fig. 4)。そこで、冬期越冬株の保菌状況を調べた結果、高頻度で潜在感染が確認された。これらの苗の B 施設への搬入時期と B 施設の養液中からの P. helicoides の検出時期が概ね一致したことから、これらの株によって養液内の病原菌密度が高まった可能性が高いと考えられた。さらに、 B 施設で挿し木、育苗中の苗について調べた結果、5 月の養液交換前までに育成されていた若苗から高頻度で P. helicoides が分離されたことから、循環養液を介して若苗に伝染した可能性が高いと考えられた。これらの結果から、当施設においては冬期越冬株の施設内への再搬入によって病原菌が経年伝染している可能性が高いと考えられた (Fig. 5)。

また、モニタリング調査の結果から、本病の発病が認め られる 6-9 月より 1ヶ月以上前から、循環養液中の病原菌 密度が高まっていることが明らかになった。バラ根腐病の 発病適温は 35℃前後であるが、遊走子の形成適温はそれ より低い (Kageyama et al. 2002)。本菌は20-25℃で盛んに 遊走子形成が認められ、30℃以上では遊走子形成数が低下 する。鉢内温度について経時的に調べた結果、循環養液中 に P. helicoides が検出された 4 月下旬から 5 月上旬および 9月の平均培地温は20℃前後であった。特に4月下旬頃は 暖房機の稼動が停止するため、昼夜の急激な温度変化が認 められ、日中の温度格差も著しく大きかった。このように、 感染株の再搬入と遊走子の形成に好適な条件が重なった ことが循環養液の菌密度を高めた要因であることが示唆 された。一方で、発病盛期である夏期高温時には養液中か ら P. helicoides は検出されなかった。7月および8月の培 地温度は平均で27℃、最高は37℃であったことから遊走 子形成が抑制されている可能性が考えられた。以上のこと から、本病は発病適期の夏期前後の時期に遊走子を盛んに 形成して伝染を拡大する一方で、夏期高温時には感染個体 の発病は顕著になるものの遊走子形成による二次伝染は

抑制される可能性が示唆された。この点についてはさらに 検討が必要である。

認するため、水を使ってブラシで洗浄したベンチおよび未 洗浄ベンチ各5枚について同様の方法で P. helicoides の分

当施設では現在、育苗施設に越冬株の再搬入を行わないように改善し、伝染環の遮断に努めている。また、本菌の二次伝染は発病盛期よりも早い段階で起こっていると考えられることから、モニタリングによる早期発見、防除により被害を軽減可能であると考えられた。

2. カランコエ根腐病の発生生態と伝染環

近年、循環式 Ebb & Flow 栽培システムを導入している 現地のカランコエ生産施設 (Fig. 6-A) では、夏期に根腐 病(病原菌: P. helicoides、P. myriotylum) の被害が発生して いる。本病は夏期高温時にのみ被害が発生するが、施設内 での年間を通じた菌の動態等は不明である。そこで、岐阜 市のカランコエ生産施設 (P. helicoides による被害) にお いて本病の発生要因について調査し、有効な防除対策につ いて検討した。

材料および方法

培土の保菌調査

2005 年 6 月に使用前の培土をサンプル採取した。当施設では数種の材料を施設内で混和して培土を調整していたため、材料ごとに採取した。培土からの Pythium 属菌の検出は、前述のエゴマ種子を用いた捕捉法により行った。培土は IL のプラスチックボトルに約 500ml を入れ、滅菌水を加えて IL とした。トラップを 1 個容器内に投入して、25℃暗黒条件下で7日間静置し、トラップ内部の種子を回収した。種子は水分を十分に取り除いた後に、Pythium 選択培地 (VP₂培地) に 50 種子を無作為に置床した。25℃で24-48 時間培養した後に、Pythium 属菌の有無を調べた。

原水からの病原菌の検出

かん水用の水源として用いている地下水を 20L 採取し、メンブレンフィルター (Millipore 社、Durapore 5μ m) でろ過した。フィルターを VP_2 培地に置床し、40℃で 1-2 日培養して P. helicoides の分離の有無を調べた。

循環養液中の病原菌のモニタリング

当施設の2温室(A,B)において、2004年から2005年に循環養液中のP. helicoidesをモニタリングした。施設Aでは各ベンチからの排液を回収する樋の部分に1Lの容器を設置し、内部にエゴマトラップを入れた(Fig. 6-C)。また、施設Bではベンチ排液を一時的に回収する予備タンク2箇所にトラップを設置した(Fig. 6-D)。トラップは概ね7日間設置し、回収したトラップから種子を取り出し、水分を滅菌ろ紙で除去した後に、Pythium選択培地に30切片を置床した。38℃で1-2日間培養してP. helicoidesの分離頻度を求めた。

資材からの病原菌の検出

当施設では、挿し木した若苗を同一施設で育成しており、これらは発根するまで循環養液を使用せず、頭上かん水を行っている(Fig. 6-B)。そこで、若苗を育成中のベンチの保菌状況を調べるため、ベンチ 25 枚の排水口にトラップを設置し、上述の方法で P. helicoides の分離の有無を調べた(Fig. 6-E)。また、出荷終了後のベンチ洗浄の効果を確

認するため、水を使ってブラシで洗浄したベンチおよび未洗浄ベンチ各5枚について同様の方法でP. helicoides の分離の有無を調べた。さらに、出荷後にポット用トレイも再利用されることから、任意のトレイ6ヶについて付着培土を採取し、トラップを用いてP. helicoides の分離の有無を調べた。

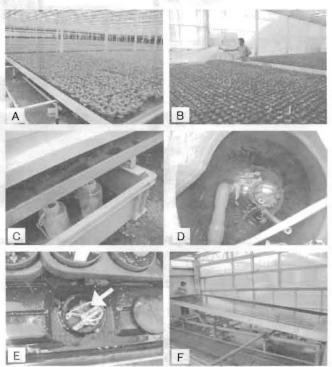


Fig. 6 Detection of *Pythium helicoides* from cultivation environment of the kalanchoe. A: Ebb & Floe irrigation culture of kalanchoe. B: Cultivation of kalanchoe seedlings by overhead watering. C: Traps set on to drainpipe. D: Reservoir tank in front of main tank. E: Drain water on cultivated young seedling bench (arrow= perilla seed trap). F: Wash the bench with water.

結 果

培土・原水からの検出

サンプリングした培土材料からは、Pythium 属菌は検出されなかった(Table 6)。また、原木からも Pythium 属菌は検出されなかった。

Table 6 Detection of Pythium from potting mixture soil

C	Peat	moss	Coconut	Comment	C 4	
Sample -	Λ	В	husk	Compost	Sand	
1	-	-	-	-	-	
2	=	-	~	ē	-	
3	=	_	-	V-41	3.	

Detection test was conducted by bait method using perilla seed traps

循環養液中のモニタリング

カランコエ根腐病による被害は、7月上旬頃より発生し始め8月に盛期となり、9月中旬以降次第に減少し10月中旬以降はほとんど認められなかった。循環排液中のP. helicoides をモニタリング調査した結果、本菌は循環養液から年間を通じて高頻度に検出された(Table 7、8)。循環養液中からは、ほぼ年間を通じてP. helicoides が検出された。施設Aの成苗ベンチからの排液については5月中旬に23%、6月上旬に100%に達し、秋には分離頻度が低下する傾向を示したが、冬期にも高頻度で検出され、分離頻度には他の調査地点も含め一定の傾向が認められなかった。また、施設Aでは挿し木育成中のベンチからもP. helicoides が検出された。これらのベンチは循環養液を使用しておらず、頭上かん水されていた(Fig. 6-B)。

資材からの検出

施設内の挿し木用ベンチは、苗が活着するまでの期間、 循環養液を使用せず頭上かん水を行っているにも関わら ず、25枚のベンチのうち6枚から P. helicoides が検出され た(Table 9)。

また、ベンチ洗浄の有無による P. helicoides の分離頻度を 調べた結果、ベンチを洗浄しない場合は 38%であったの に対して、洗浄したベンチでは 3%と著しく低下した (Table 10)。なお、洗浄ベンチ 5 枚について洗浄した液を 調べた結果、4 枚の洗浄液から P. helicoides が検出された (データ略)。また、ポットトレイに付着した残さからも 本菌が検出された (Table 11)。

まとめ

2000 年以降、カランコ工根腐病は県内の複数のカランコ工 生産施設で夏期に被害が発生している。本項で調査対象とし た岐阜市内の生産施設は、カランコエの単一経営で、年間を 通じてカランコエのみを生産出荷している。ところが、毎年のよ うに夏期に根腐病の被害が発生していた。カランコ工根腐病 には P. myriotylum および P. helicoides の2 種類が関係してい ることが分かっており、施設によって病原の種類が異なるが、 本施設の主要な病原は P. helicoides であった。そこで、本施 設における発生要因について検討した。

第一次伝染源として考えられる培土、水について調査した。 当施設で使用している培土は、ピートモス、ココナッツハスク、 しめじ堆肥および砂を施設内で混合して用いられていたため、 これらを個別にサンプル収集し、捕捉法を用いて Pythium 属 菌の検出を行ったところ、いずれのサンプルからも検出されな かった。また、養液に使用している地下水についても同様に 検出されなかった。これらの結果および毎年同種の病原 Pythium によって被害が発生している現状から、施設内で伝 染環が形成されている可能性が考えられた。そこで、 2004-2005 年の 2 年間、当施設の2施設(A、B)において、循 環養液(A 施設はベンチ排液、B 施設は予備タンク)中の P helicoides の消長を捕捉法により調査した。根腐病による被 害は、7月上旬頃より発生し始め8月に盛期となり、9月 中旬以降次第に減少し10月中旬以降はほとんど認められ なかった。これに対して、循環養液中からは、ほぼ年間を通 じて P. helicoides が検出された。施設 A の排液については 5 月中旬に23%、6月上旬に100%に達し、秋には分離頻度 が低下

Table 7 Monitoring of Pythium helicoides in two kalanchoe greenhouses with an Ebb & Flow irrigation system (2004)

Greenhouse	Place	5/19- 5/26	6/16- 6/23	7/20- 7/26	8/24- 9/1	10/19- 10/26	11/26- 12/7	1/18- 1/26	2/23
A	Mature seedling lane	23	100	100	77	13	43	93	7
	Young seedling lane I	3	20	0	40	23	0	50	0
	Young seedling lane 2	50	12	43	87	10	0	73	20
В	Reservoir tank 1	ш	100	7	27	97	40	77	97
	Reservoir tank 2	-	3	43	0	83	0	13	100

Data are frequencies of P. helicoides from 30 segments of bent grass leaves

Table 8 Monitoring of Pythium helicoides in two kalanchoe greenhouses with an Ebb & Flow irrigation system (2005)

Greenhouse	Place	5/16- 5/24	6/24-	7/20- 7/27	8/23- 8/30	9/27- 10/4	11/1- 11/8	12/19- 12/26
Α	Mature seedling lane	73	97	97	17	100	100	100
	Young seedling lane 1	23	0	83	0	n.t.	47	93
	Young seedling lane 2	10	13	0	0	43	100	100
В	Reservoir tank 1	98	100	97	77	100	97	100
	Reservoir tank 2	70	97	100	100	100	97	77

Data are frequencies of P. helicoides from 30 segments of perilla seeds

Table 9 Detection of *Pythium helicoides* in re-circulated nutrient solution from young seedling bench

Number of bench	Detection bench
25	6

Detection test was conducted by bait method using perilla seed traps

Table 10 Isolation frequency of Pythium helicoides from bench drain water

Washing of honob	Consecutive bench numbers					
Washing of bench -	1	2	3	4	5	- Average
Non-washed	87	100	0	3	0	38.0
Washed	0	0	17	0	0	3.3

Data showed isolation frequency (%) from perilla seeds

Table 11 Detection of Pythium helicoides from surface soil of culture tray

Number of tray	Detection	Detection frequency (%)
6	I	16.7

Detection test was conducted by bait method using perilla seed traps

する傾向を示したが、冬期にも高頻度で検出され、分離頻度には一定の傾向が認められなかった。本調査のトラップ設置期間は7日間であり、概ね高頻度で検出されたことから、養液中のP. helicoides の菌密度は常に高い状態であったと考えられる。室内試験の結果から、P. helicoides は養液中の遊走子密度が40個/L以上の場合、7日間のトラップ設置で分離頻度は100%に達したことから、おそらくその程度の菌密度であったことが推察される。従って、本施設の場合、トラップの設置期間を短くすれば、もう少し定量的な評価ができた可能性が考えられた。ただ、いずれにしても当施設の循環養液中からは、年間を通じてP. helicoides が高頻度で検出されたことから、第二次伝染源として大きな役割を果たしていると考えられた。

カランコエは一般的に挿し木増殖によって生産され、同施設でも多量の挿し穂を施設内で挿し木して育成し出荷していた。挿し木した苗は、発根するまでの期間は循環養液を与えず、ベンチごとに頭上かん水してかん水管理されていた。モニタリング調査において、成苗のベンチ排液以外に、これら若苗の排液からも P. helicoides が高頻度で検出された。先の調査において培土や原水から病原菌は検出されなかったことから、それ以外の要因が考えられた。そこで、挿し

木に使用していた 25 枚のベンチについて個別に調査した 結果、6 枚のベンチ排液から P. helicoides が検出された。 また、ベンチの洗浄の有無による検出頻度について調べた 結果、ベンチを洗浄しない場合の分離頻度は 38%であっ たのに対して、洗浄したベンチでは 3%と著しく低下した。 また、ポットトレイに付着した残さからも本菌が検出され た。これらの結果から、P. helicoides は未洗浄ベンチやト レイなどの資材表面に付着した培土残さを通じて、新たに 生産される若苗に感染し、さらに循環養液を通じて施設内 全体へ伝染拡大している可能性が高いと考えられた。

以上の結果から、本病の発生を抑制するには第一に出荷後のベンチや資材の洗浄・殺菌により若苗への感染機会を減らすこと、第二に養液中の病原菌密度を低減し施設全体への拡散を抑制する必要があると考えられた。また、これら対策とあわせて薬剤防除、温度管理など総合的な対策をとることによって発病軽減が可能であると考えられた。

3. ゼラニウム茎腐病の発生生態と伝染環

2005 年 2-3 月に岐阜県内の複数の鉢花生産施設でゼラニウム茎腐症状が多発した。分離菌株は、形態的特徴から Pythium irregulare complex と同定され、有性器官の形態および生育温度はいずれも極めて類似していた。一方、RAPD解析およびrDNA-ITS 領域のシークエンス解析から、分離菌株は P. irregulare s.s. および P. cryptoirregulare に相当した。そこで、本項では岐阜県で発生した Pythium irregulare complex による被害の発生要因について検討した。

材料および方法

ゼラニウム生産施設3戸(A, B, C)において、2005年2

植物体からの検出

月にゼラニウムの発病個体を採集し、前述の方法で Pythium 属菌を分離し、P. irregulare complex の分離頻度を 調べた。また、施設 B においては、2005 年 10 月に鉢上げ前の購入セル苗を無作為にサンプリングし、NARM 培地 (Morita and Tojo 2007) を用いて P. irregulare complex の分離頻度を調べた。また、施設 B ではゼラニウム以外にエキザカム (Exacum affine) が、施設 C ではエキザカムおよびガーベラ (Garbera L.) が栽培されており、これらの一部で 2005 年 4 月、2006 年 3 月に萎凋株が発生したため、罹病株を採集し病原菌の分離・同定を行った (Fig. 7 E-G)。 さらにガーベラについては、当該施設のゼラニウム発病株より分離した P. irregulare GF745 菌株を健全苗に接種し、

土壌からの検出

各施設で鉢上げ用に使用している混合培土を 2005 年 4 月、5 月、11 月および 12 月に無作為にサンプリングした。 培土からの Pythium 属菌の検出は、前述のエゴマ種子を用いた捕捉法により行った。エゴマ種子を 9.5×7 cm の不織布袋に 50 個入れ、 $121^{\circ}20$ 分間高圧蒸気滅菌して捕捉用トラップ (PST) を作成した。培土は 1L のプラスチックボトルに約 500ml を入れ、滅菌水を加えて 1L とした。PSTを 1 個容器内に投入して、 25° 0 暗黒条件下で 7 日間静置し、

28℃で管理して病原性の有無を確認した。

トラップ内部のエゴマ種子を回収した。種子は水分を十分に取り除いた後に、NARM 培地に30 個を無作為に置床した。25℃で24 時間培養した後に、Pythium 属菌を分離し、P. irregulare complex の分離頻度を求めた。試験は各サンプル3 反復で行った。また、施設 A においては、鉢上げ用培土の近くに堆積してあった使用済み培土および栽培施設周辺の土壌を2006 年1月にサンプリングし、前述の方法でP. irregulare complex の分離頻度を調べた (Fig. 7 A-B)。

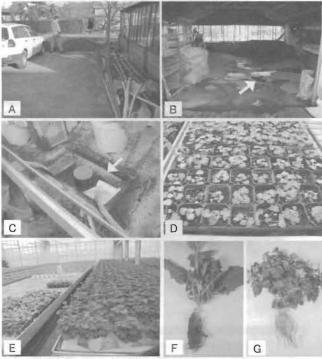


Fig. 7 Detection of *Pythium irregulare* complex from cultivation environment of the geranium.

A: Used potting soil which is put near greenhouse., B: Unused potting soil (arrow= water invades from the outside)., C: Drain water on cultivated bench (arrow= perilla seed trap)., D: Geranium seedlings which infected P. irregulare complex., E: Gerbera and geranium in a greenhouse that re-circulated nutrient solution., F: Gerbera which P. irregulare complex were infected., G: Exacum which P. irregulare complex were

infected.

原水、排液からの検出

かん水用の水源として用いている地下水を各施設から20L採取し、Hong et al. (2002)の方法を参考にしてメンブレンフィルター (Millipore 社、Durapore® $5\mu m$) で吸引ろ過後、フィルターを NARM 培地に置床し、25℃で 1-2 日培養して P. irregulare complex の分離の有無を調べた。なお、調査は 2005 年 11 月および 2006 年 1 月の 2 回行った。また、2006 年 1 月、各施設でゼラニウムを育成中のプールベンチの排水口に PST を設置し、7 日後に回収してNARM 培地に置床し、25℃で 1-2 日培養して P. irregulare complex の分離の有無を調べた(Fig. 7 C)。

結 果

2005年2-3月に被害が多発した3戸の温室において、第一次伝染源および第三次伝染源の調査を行った。第一次伝染源として考えられる地下水、培養土および施設周辺土壌、セル苗について調べた結果、地下水からはいずれの施設でも P. irregulare complex は検出されなかったが、施設 A においては使用済み培養土および施設周辺土壌から高率に検出された。さらに、使用前培養土については、施設 A および B から検出され、特に施設 A では 23 試料中 14 試料から検出された(Table 12)。また、施設 B においては、苗業者から購入直後のセル苗から P. irregulare complex が 7.5%の頻度で検出された(Table 13)。

次に、第二次伝染源として考えられるベンチ内排液、輪作作物について調べた。その結果、いずれの施設においてもベンチ内排液から高頻度にP. irregulare complex が検出された。また、ゼラニウムの出荷前後に同一温室で栽培されていたエキザカム、ガーベラにも根腐症状が認められ、これらの根からもP. irregulare complex が高率に検出された(Table 14)。このうち、エキザカム分離菌について RAPD解析を行った結果、全て type II(P. cryptoirregulare)であり、同一施設のゼラニウム分離菌の種と一致した(Table

Table 12 Isolation frequency of Pythium irregulare complex from cultivation environment of the geranium

	Isolatio	n frequency (isolated/	sample)			
Sample	Greenhouse					
	A	В	C			
Plants						
Geranium	5/5	5/5	· 7/7			
Exacum affine	-	2/2	4/4			
Gerhera L.	=	-	5/5			
Soil						
Potting soil (unused)	14/23	1/14	0/18			
Potting soil (used)	5/5	=	=			
Soil around greenhouse	8/8	-	-			
Water						
Well water	0/2	0/2	0/2			
Drain water	5/6	4/5	6/6			

14)。さらに、ゼラニウムから分離された P. irregulare GF745 菌株を、健全なガーベラ苗に接種した結果、接種 8 日後に病原性が認められ、最終的に枯死した (Fig. 8)。

Table 13 Isoration frequency of *Pythium irregulare* complex from the seedlings of geranium

Geranium cv.	Number of test seedlings	Isolated seedlings	Isolation frequency (%)
Multi bloom lavender	10	1	10.0
Multi bloom pink	17	4	23.5
Multi bloom white	11	0	0.0
Multi bloom bright rose	14	0	0.0
Multi bloom scarlet eye	14	I	7.1
Multi bloom red	40	2	5.0
計	106	8	7.5

¹⁾ Greenhouse B

まとめ

2005年2-3月に多発生した P. irregulare complex による ゼラニウム茎腐病の伝染経路について調べた。使用前の培 養土については、施設 A および B から検出され、特に施 設 A で高頻度に検出された。また、施設 A においては、 使用済み培養土および施設周辺土壌からも高率に検出さ れた。また、施設 B においては、苗業者から購入したセ ル苗から P. irregulare complex が検出された。Pythium 属菌 は、広く世界中の土壌に分布している。Hendrix & Campbell (1970)は、アメリカ各地の土壌試料を捕捉法と希釈平板法 を用いて Pythium 属菌の分離を行ったところ、90%の試料 から P. irregulare-P. debaryanum の複合種が検出され、総分 離菌株数 10,566 菌株の 55%を占めたと報告している。ま た、Watanabe (1981)は日本国内の48地点の土壌試料のう ち、96%の試料から Pythium 属菌が分離されたと報告して いる。このように、Pythium 属菌は土壌中に普遍的に存在 し、中でも P. irregulare complex は優占種の一つと考えら れる。本研究において、調整培土やセル苗から高頻度で検



Fig. 8 Pathogenicity to garbera of *Pythium irregulare s. l. (P. cryptoirregulare)* GF745 which isolated from geranium. A: Control., **B:** Inoculation.

出されたのは、培土の調整作業、保管場所の環境、育苗環境が大きく影響していると考えられ、衛生管理に細心の注意が必要であると考えられた。

次に、第二次伝染源として考えられるベンチ内排液、輪 作作物について調べた。その結果、いずれの施設において もベンチ内排液から高頻度に P. irregulare complex が

Table 14 Isolation frequency of Pythium irregulare complex from geranium and exacum

	Isolation frequency (isolated number/sampling number)					
Greenhouse	Geranium ^a		se Geranium "		Exa	icum ^a
	P. irregulare s.s.	P. cryptoirregulare	P. irregulare s.s.	P. cryptoirregulare		
A	5/5	0/5	-	-		
В	0/5	5/5	0/2	2/2		
C	0/7	7/7	0/4	4/4		

^a Sampling time: geranium 2005.2, exacum 2005.4

検出されたことから、かん水作業を通じて同一ベンチ内の 健全株へ伝染し、養液の循環利用施設では他のベンチへ伝 染が拡大していると考えられた。また、ゼラニウムの出荷 前後に同一温室で栽培されていたエキザカム、ガーベラに も根腐症状が認められ、これらの根からも P. irregulare complex が高率に検出された。エキザカム分離菌は RAPD 解析の結果、同一施設のゼラニウム分離菌の種と一致した。 さらに、ゼラニウム分離菌はガーベラ苗にも病原性が認め られた。これらの結果から、P. irregulare complex は養液を 介して施設内全体へ広がり、ゼラニウムの栽培期間以外に も輪作作物を宿主としながら施設内の伝染環が形成され ていると考えられた。以上の結果、ゼラニウムの栽培施設 において、P. irregulare complex は混合培土、苗を通じて施 設内へ容易に侵入し、かん水作業によって二次伝染してい ると考えられ、他品目への感染も認められた。P. irregulare complex は、多犯性の種であり、鉢物経営にとっては多く の品目に病害を引き起こす可能性がある。このため、第一 に施設内への本菌の侵入をできる限り少なくすることが 必要である。本菌は環境中に広く生息しており、施設内へ の侵入を完全に遮断することは不可能であると考えられ るが、混合培土の調整時の衛生管理あるいは殺菌培土の使 用、施設内への苗導入時の薬剤散布などにより、そのリス クを低減させることは可能である。一方で近年、Pythium 属菌については、メタラキシルやプロバモカルブ剤の耐性 菌が報告されており (Moorman et al. 2002, Taylor et al. 2002, Moorman et al. 2004)、安定生産のためには耐性菌のモニタ リングも必要であると考えられた。

小 括

本章では、岐阜県内で発生している水媒伝染性病害の具体的事例をとりあげ、その発生生態と伝染環について検討した。

バラ根腐病の事例では、購入培土から Pythium 属菌が分 離されることから、第一次伝染源の一つとして培土により 病原菌が施設内に侵入した可能性が考えられた。循環養液 のモニタリングの結果、発病時期より30日以上前に養液 中の病原菌密度が高くなっており、バラへの感染は早い段 階で起こっている可能性が考えられた。この結果と現地の 施設利用体系とを比較したところ、前年に感染した潜在感 染株の施設内への再搬入によって循環養液中の病原菌密 度が高まり、新たな苗へ感染して伝染環が形成されている 可能性を示した。また、カランコエ根腐病の事例では、循 環養液中には年間を通じて病原菌が存在していることが 分かった。施設の利用体系を検討したところ、出荷終了し たベンチの洗浄が十分にされないまま新たな苗の挿し木 作業が行われていることが判明し、これらのベンチおよび 資材について調べた結果、付着した培土残さ等には高頻度 で病原菌が存在していることが明らかになった。したがっ て、汚染資材を通じて新たな苗へ病原菌が伝染し、循環養 液を通じて施設全体へ伝染している可能性が考えられた。 そして、ゼラニウム茎腐病の事例では、実際に培土が病原 菌によって高頻度に汚染されている事例が認められた。こ の農家では、施設周囲の土壌からも高頻度に病原菌が検出 された。また、別の農家においてはセル苗からも病原菌が 持ち込まれている可能性も示された。さらに、ゼラニウム

生産は他品目と組み合わせた年間出荷体系がとられてお り、ゼラニウム茎腐病菌と同一種が同一施設内の別品目か らも分離されたことから、これらの品目を通じて施設内を 経年伝染している可能性も考えられた。

以上の結果、鉢花の底面給水栽培施設においては、培土や苗を通じて施設内へ病原菌が侵入するリスクが高いことが明らかになった。施設周囲にも病原菌が生息している事例があったことから、培土の保管場所、調整場所にも細心の注意が必要である。また、施設内へ一度侵入した病原菌は、潜在感染苗や輪作品目などを通じて施設内を経年伝染する可能性があること、出荷後のベンチや資材の洗浄が不十分な場合は、それによって新たな苗へ伝染するリスクが高いことが明らかになった。したがって、伝染環を遮断するためには、施設の利用体系や組み合わせ品目の選定、ほ場衛生にもなどにも注意する必要があることが示唆された。

第四章 ピシウム病害の発生生態と被害助長要因

鉢物類の底面給水方式には、主に Ebb & Flow 方式、マット給水方式およびヒモ給水方式があり、岐阜県内においては、Ebb & Flow 方式が全生産面積の 21%であるのに対して、マット給水方式は 45%を占めている。 Ebb & Flow 方式は、前述のように大規模生産施設で主に普及しており、Pythium 病害などによる被害が大きくなりやすい。一方で、マット給水方式の栽培施設においても、Pythium 属菌等による被害が発生している。しかし、本方式における Pythium 属菌の動態については不明な点が多い。

また、鉢物生産施設では、緩効性の固形肥料や循環養液による施肥が一般的に行われているが、鉢物栽培における肥培管理とPythium病害の関係について明らかにした報告は少ない。このため、本章ではこれらの点について検討した。

1. 給水マット栽培における病原菌の動態

近年、鉢花の生産は大規模化が進み、灌水作業の省力化 のため Ebb & Flow 方式、マット給水方式およびヒモ給水 方式などの底面給水方式が広く導入されている。中でも、 マット給水方式は低コストで汎用性が高く、C鋼に溜めた 水を上部のマットヘヒモで給水するタイプ(本項ではこれ をマット給水方式とよぶ)が普及している。Ebb & Flow 方式は、栽培ベンチに一時的に湛水することによって一度 に多数の鉢に水を供給できるが、Pythium 属菌や Phytophthora 属菌による被害が一般的に大きくなりやす い。それと比較して、マット給水方式は湛水状態にはなら ないことから被害が大きくなることは少ないと考えられ る。しかしながら、実際には現地栽培施設で被害が多発す るケースは珍しくない(渡辺ら 2006, Watanabe et al. 2007)。 その要因として、種苗や培土および原水からの病原菌の持 ち込みが考えられるが、マットを介した病原菌の挙動につ いては不明な点が多い。また、現地ではマット上に鉢ある いはセルトレイを配置してしばらくの期間は頭上かん水 を併用する場合があり、この頭上かん水が発病助長に関与 している可能性が考えられる。そこで、これらの点につい て検討した。なお、本項は関西病虫害研究会報にて既に報 告した (渡辺ら 2007)。

材料および方法

試験1

苗や培土から病原菌を持ち込んだ場合の灌水管理によ る病原菌の動態と隣接株への伝染の可能性を調べるため、 以下の試験を行った。栽培装置の概要を Fig. 1 に示した。 ポリスチレン製のトレイ(750×603×106mm)を湛水にし、 給水ヒモを通じて上部に設置した給水マット(ユニチカ (株: ラブマット U) へ給水されるようにした。慣行区は給 水マットの上面を有孔ポリマルチ (大倉工業株式会社)で 被覆した。頭上かん水併用区は、試験開始から約3ヶ月間、 頭上かん水を2-3目に1回併用して行った。また、防根シ ート区は、給水マットと有孔ポリマルチとの間に防根シー ト (旭化成株式会社:エルタス) を加えた。平成17年7 月4日に各区の給水マットの上に、ミニバラ苗(品種シル クレッド:3号ポリポット)を30株配置した。このうち 中央2株はバラ根腐病菌(Pythium helicoides)汚染培土に ミニバラを鉢上げした接種苗を設置し、7月24日には新 たな接種苗に交換した。対照として病原菌の無接種区を設 けた。なお、各区2反復で試験を行った。各区の湛水液中 の病原菌の消長を調べるため、試験開始 1、2、3、4、お よび6週間後まで湛水液中にエゴマ種子トラップを各々3 日間設置後回収し、NARM 培地(Morita and Tojo 2007)に 種子を無作為に30ヶ置床して、P. helicoides の分離頻度を 調べた。また、各区の発病を随時観察するとともに、平成 18年3月6日(試験開始245日後)に各区の無接種株(28 株)の根を株あたり5本採取し、NARM 培地に置床して P. helicoides の保菌株率を調べた。

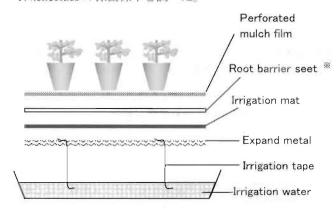


Fig. 1 Mat irrigation system

** Only an experimental plot of "subirrigation
+ root barrier seet"

試験2

原水由来あるいはマットからの移動により湛水液中に 病原菌が存在する場合の底面からの給水がマット上の苗 の感染発病へ及ぼす影響について調べるため、以下の試験 を行った。栽培装置は試験1と同様で、試験区の構成は慣 行区、防根シート区および無接種区とした。平成17年6 月20日に各区の給水マット上へ健全なミニバラ苗(品種 シルクレッド:3号ポリポット)を各30株配置した。平 成17年7月21日に慣行区および防根シート区の湛水中に P. helicoides の遊走子を約30cfu/mlの密度になるよう添加 した。さらに、8月2日、8月17日に本菌の遊走子をそれ ぞれ60cfu/ml、80cfu/mlになるよう追加接種した。各区の 発病を随時観察するとともに、平成18年3月6日(接種 228日後)に各区の根の保菌株率を試験1と同様の方法で 調べた。

結果

試験 1

湛水中のバラ根腐病菌の捕捉率を Table 1 に示した。慣行区および無接種区では、接種 3 週間後まで、湛水中から根腐病菌は捕捉されなかった。防根シート区では、接種 1 週間後にごく僅かに捕捉されたが、2、3 週間後には捕捉されなかった。慣行区および防根シート区では、接種 4 週間後から湛水中に根腐病菌が捕捉され、6 週間後にも高率で捕捉された。一方、頭上かん水併用区では、接種 1 週間後の湛水から根腐病菌が捕捉され(平均捕捉率41.7%)、接種 6 週間後まですべての調査時点で捕捉された。地上部の発病は調査期間を通じて観察されなかったため、試験終了時(試験開始 245 日後)に根の感染株率を調べた(Table 2)。慣行区、防根シート区および無接種区では、感染株は全く認められなかった。一方、頭上かん水併用区では、46.4%の株に感染が認められた。

試験2

湛水中にバラ根腐病菌の遊走子を添加し、底面からの給水により245日間栽培を行った。その結果、いずれの区の根からも本病の感染は全く認められなかった(Table 3)。245日後の調査で、慣行区および無接種区においては鉢底からマット内への根の伸長は認められたが、湛水中への伸長は認められなかった。防根シート区は給水マットへの根の進展は認められなかった。

Table 1 Effect of irrigation process on the isolation frequency of Pythium helicoides from irrigation water

Towns			Weeks		
Treatment	1	2	3	4	6
Subirrigation	0	0	0	61.7	56.7
Subirrigation + root barrier seet	0.3	0	0	56.7	63.3
Subirrigation + overhead irrigation	41.7	2.3	16.7	68.3	48.3
Control (non-inoculation)	0	0	0	0	0

Data showed isolation frequency(%) from perilla seeds.

Table 2 Effect of irrigation process on the infection frequency of *Pythium helicoides*

Treatment	Infection frequency(%)
Subirrigation	0
Subirrigation + root barrier seet	0
Subirrigation + overhead irrigation	46.4
Control (non-inoculation)	0

Data showed isolation frequency(%) from miniature roses, and were determined 245days after the irrigation system was set up.

Table 3 Effect of *Pythium helicoides* in the irrigation water on infection frequency to miniature roses in mat irrigation system

Treatment	Infection frequency(%)
Subirrigation	0
Subirrigation + root barrier seet	0
Control (non-inoculation)	0

Data showed isolation frequency(%) from miniature roses, and were determined 228days after the irrigation system was set up.

まとめ

C鋼を利用したマット給水栽培において、バラ根腐病菌は感染株から湛水中へ移動することが明らかになった。特に、頭上かん水を併用した場合にその程度は顕著であった。しかしながら、本試験では湛水中にバラ根腐病菌が存在しても、底面からの給水のみではマット上のバラ苗への感染は認められず、頭上かん水を併用した場合にのみ感染が認められた。これらのことから、底面給水のみの場合、根腐病菌は感染株から湛水中への下方の移動はあるものの、上方へ積極的に移動することは少なく、健全株へ感染するリスクは比較的低いものと考えられた。一方、頭上かん水を行った場合には、隣接する健全株へ感染が拡大するリスクが高いことが明らかになった。その要因として、感染株から放出された病原菌の遊走子が、かん水時のマット表面の水の移動により隣接株へ水平進展している可能性が高いと考えられた。

また、今回の試験においては、慣行区と防根シート区で 感染株率に差は認められなかった。しかし、慣行区のマッ ト中には根の伸長が認められたことから、感染した根がマットに存在する場合にはマットを介して他の株へ伝染す る可能性は否定できない。現場では、同じマットを 5-10 年以上連用することが多い。このため、防根シートを利用 してマットへの根の侵入を防ぐことは有用な手段である と考えられる。

本試験ではバラ根腐病菌を用いて試験を行ったが、他の Pythium 属菌の場合も同様の傾向が高いと考えられる。マット給水栽培において Pythium 病害が多発する一要因として、種苗や培土から持ち込まれ感染発病した個体から頭上 灌水によって被害が拡大している場合があることが示唆 されたことから、給水マット上での頭上灌水は極力避ける とともに播種・鉢上げ時の薬剤防除等の予防対策が重要で あると考えられた。

2. 肥培管理による影響

バラ根腐病は、1996 年に岐阜県のミニバラ生産施設 (Ebb & Flow 方式)で初めて確認されたが、本病が多発 生した施設では、循環養液と固形肥料を併用した肥培管理 が行われていた。一般に、肥培管理が病害の発生程度に影 響を及ぼすことは知られているが、バラ根腐病では明らか にされていない。そこで、本項ではこの点について検討し た. なお、本項は関西病虫害研究会報にて既に報告した(渡 辺ら 2008)。

材料および方法

試験は、2006年6-8月(試験1)および2007年6-8月 (試験2)の計2回行った。いずれの試験もほぼ同様の条 件で行った。試験区は、養液単用区および固形肥料併用区 とし、それぞれに病原菌接種および無接種区を設けた。試 験には養液循環式の Ebb & Flow 栽培装置を用い、試験 1 では2 反復、試験2では3 反復した。栽培トレイ(750× 603×106mm) 上に、健全なミニバラ鉢(品種:シルクレ ッド、3 本挿し/鉢、3 号ポット) を各 24 鉢並べた。養液 単用区および固形肥料併用区の養液には市販液肥 (N20:P20:K20) の 1000 倍希釈液を用いた。固形肥料併用 区は、緩効性固形肥料 (N13:P11:K13、70 日タイプ) を試 験1は2006年6月19日、試験2は2007年6月22日に鉢 当たり2g施用した。かん水は1日2回行い、鉢の底面に 約30分間2-3cm程度養液が滞水するようにした。病原菌 は、試験1は2006年8月9日、試験2は2007年8月9 日に各区 (病原菌接種) の養液中へ P. helicoides MAFF238913 菌株の遊走子を最終密度が20個/mlとなるよ う接種した。地上部の発病調査は、試験1は2006年8月 28日、試験2は2007年8月20日に行い、地下部(根) はそれぞれ 2006 年 8 月 28 日、2007 年 9 月 12 日に行った。 地上部の発病程度は、0:健全、1:下葉の一部が黄化、2: 株の50%未満の葉が黄化・落葉、3:株の50%以上の葉が 黄化・落葉、4:萎凋・枯死とした。同様に地下部の発病 程度は、0:根の水浸状褐変なし、1:根の 25%未満が水 浸状に褐変腐敗、2:同25-50%が褐変腐敗、3:同50-75% が褐変腐敗、4:同75%以上が褐変腐敗とした。発病度は Σ (発病指数×同株数) / (4×調査株数) ×100によ り算出した。

また、試験 2 では養液単用区および固形肥料併用区 (病原菌無接種) の土壌溶液の塩類濃度を経時的に調べた。各区の 5 株について、鉢内上部 (表面から 1cm の深さ) および鉢内下部 (底面から 1cm の深さ) の土壌溶液をスポイトで採取し小型測定装置 (HORIBA、Conductivity Meter B-173) を用いて測定した。さらに、各試験区 (病原菌無接種) の葉色は、葉緑素計 (MINOLTA、 SPAD-502) を用いて 2007 年 8 月 20 日に調べた。

結果

固形肥料を併用した場合、いずれの試験においても養液 単用区と比較して下葉の黄化および著しい萎凋症状が認 められた(Table 4)。養液単用区では、下葉の黄化が散見

Table 4 Effect of fertilizer application on disease of rose root rot caused by Pythium helicoides (disease symptom)

	Exp. b	Inoculated		Uninoculated	
Treatment "		Disease incidence (%)	Disease ^c Severity	Disease incidence (%)	Disease ^c Severity
Solid fertilizer + nutrient solution	Exp. 1	97.9	69.3	0	0
	Exp. 2	88.9	83.0	0	0
Nutrient solution	Exp. 1	6.3	3.1	0	0
	Exp. 2	20.8	6.9	0	0

^a Liquid fertilizer (N20: P20: K20, x 1000), Solid fertillizer (N13: P11: K13, 70 days type 2g per 9cm pot)

Table 5 Effect of fertilizer application on disease of rose root rot caused by Pythium helicoides (root)

	Exp. b	Inoculated		Uninoculated	
Treatment ^a		Disease incidence (%)	Disease ^c Severity	Disease incidence (%)	Disease ^c Severity
Solid fertilizer + nutrient solution	Ехр. 1	100.0	99.5	0	0
	Exp. 2	100.0	99.0	0	0
Nutrient solution	Exp. l	79.2	29.2	0	0
	Exp. 2	77.8	39.6	0	0

^a Liquid fertilizer (N20: P20: K20, x 1000), Solid fertillizer (N13: P11: K13, 70 days type 2g per 9cm pot)

されるものの、枯死する株は認められなかった。また、病 原菌無接種の場合は、固形肥料を併用した場合でも全く発 病が認められなかった。

また、固形肥料併用区の根は著しい褐変腐敗症状が認められた (Table 5)。一方、養液単用区は77%以上の株で根腐病の発病が確認されたものの、その程度は明らかに軽微であった。また、地上部の場合と同様に病原菌無接種の場合は、固形肥料を併用した場合でも全く発病が認められなかった。

鉢土内土壌溶液の塩類濃度は、養液単用区では7月10日(試験開始18日後)まで、鉢内培土の上部および下部で塩類濃度に大きな差は認められなかったが、7月18日(試験開始26日後)から上部の濃度が高く推移し、鉢上部の培土中に塩類が集積してきているものと考えられた(Fig. 3)。一方、固形肥料併用区の鉢内上部では、7月2日(試験開始10日後)に急激な塩類濃度の上昇が認められ、以降は概ね5mS/cmと高く推移した。各区の根を観察した結果、養液単用区では鉢内全体に根が分布していたのに対して、固形肥料併用区では、鉢内上部への根の伸長阻

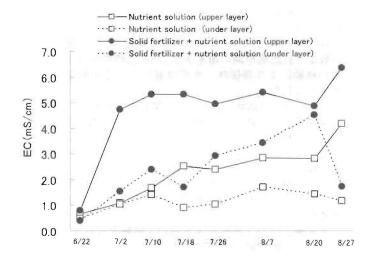


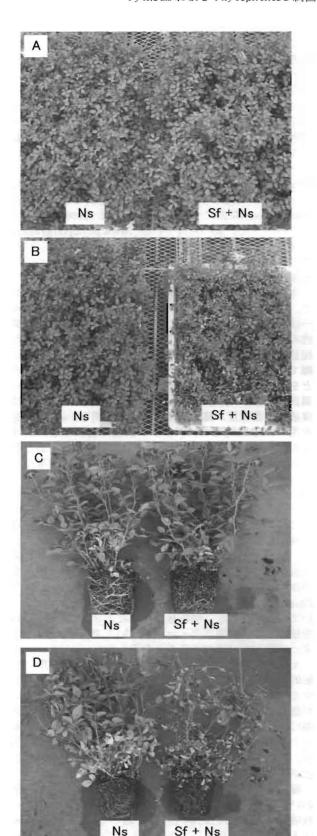
Fig. 2 Salt concentration in potting soil

^b Exp. 1: 2006, Exp. 2: 2007

^c Disease severity scale 0: no symptoms, 1: some leaf yellowing, 2: leaf yellowing or fall less than 50%, 3: leaf yellowing or fall more than 50%, 4: dead plants, Disease severity = Σ (disease severity scale x number of plants for each severity score)/(4 x total number of plants) x 100.

^b Exp. 1: 2006, Exp. 2: 2007

^c Disease severity scale 0: no symptoms, 1: water soaked rot less than 25%, 2: water soaked rot less than 50%, 3: lwater soaked rot less than 75%, 4: water soaked rot more than 75% Disease severity = Σ (disease severity scale x number of plants for each severity score)/(4 x total number of plants) x 100.



Fig, 3 Effect of fertilizer application on disease symptom of rose root rot caused by *Pythium helicoides*Ns: Nutrient solution, Sf: Solid fertilizer
A: Uninoculated, B: Inoculated (19 days after inoculation), C: Uninoculated, D: Inoculated (12 days after inoculation).

Table 6 Comparison of leaf greenness

Treatment	SPAD score a		
Solid fertilizer + nutrient solution	41.1		
Nutrient solution	38.1		

^a MINORTA SPAD-502, 2007/8/20

害が認められた。地上部の生育は、固形肥料併用区で葉色がやや濃い傾向が認められたが(Table 6)、最終調査まで生育量に大きな差は認められなかった。

まとめ

以上の結果から、バラ根腐病は緩効性固形肥料の追加施 用によって被害が助長されることが明らかになった。窒素 肥料と土壌病害の発病との関係については、古くから研究 が盛んに行われ、コムギ立枯病やエンドウ根腐病、マメ立 枯病など多くの報告がある(Huber 1974)。特に窒素形態が 発病に大きく影響することが知られており、Pythium aphanidermatum による病害は、エンドウやトウモロコシで は NO3-N によって発病が増加し(Huber 1974)、キュウリで は NH₄-N により顕著に発病する (Kawase et. al 1970)。 施肥 が発病に及ぼすメカニズムは、病原と作物との関係で様々 であると考えられ、主なものとして多肥によるストレスに 起因する植物側の抵抗力の低下や、根圏に生息する微生物 バランスの変化、土壌 pH の変化などが考えられている(植 物病理学大事典 1995)。Smiley and Cook (1973)は、施肥と コムギ立枯病の発病との関係について調べ、発病には根圏 の pH が大きく影響していることを報告している。また、 養液栽培においては、草刈ら(1986)が、養液の塩類濃度を 高くすることでホウレンソウのPythium病害の発病を抑制 可能で、その要因として塩類濃度が高い条件下では Pythium 属菌の胞子のう形成の抑制および遊走子の被のう 化による病原菌の感染力の低下が関与していることを報 告している。ホウレンソウは耐塩性が高い作物であること も、養液の高濃度化による防除が適用可能な要因であろう。

バラは、20℃前後の気温が生育に適しており、夏期高温 時は適温をはるかに超えている。また、土壌溶液は 2.0mS/cm 以下で管理するのが望ましいとされている。こ れらのことを考慮すると、バラ根腐病が1996年頃に多発 した一要因として以下のように考えることができる。まず、 第一に夏期の高温によるストレスに加え、緩効性固形肥料 の追加施用により鉢内培土の塩類集積が進み、植物体の抵 抗力がさらに低下したこと、そして高濃度の土壌塩類によ り根からの水や養分の吸収阻害を引き起こした結果、被害 が助長されたという可能性である。また、窒素肥料の形態 による影響についても興味深く、これらの点について今後 さらに検討が必要である。

底面給水方式による鉢物生産はPythium属菌などの水媒 伝染性病原菌による被害が発生しやすい。一方で、この方 式は培土の塩類集積が発生しやすい特徴がある。今後、バ ラ根腐病だけでなく他品目のPythium病害においても適正 な肥培管理によって経済的な被害を低減可能と考えられ る。

小 括

本章では、給水マット栽培における病原菌の動態と、肥培管理の違いがバラ根腐病の発病に及ぼす影響について明らかにした。その結果、給水マット方式において、Pythium 菌は、感染株から湛水中への下方の移動はあるものの、上方へ再度積極的に移動することは少なく、湛水中から健全株へ感染するリスクは比較的低いものと考えられた。一方、頭上かん水を行った場合には、隣接する健全株へ感染が水平的に拡大するリスクが高いことが明らかになった。したがって、マット給水方式では、特に頭上灌水を併用する育苗時に注意する必要がある。

また、肥培管理の試験において、バラ根腐病は緩効性固形肥料の追加施用によって被害が著しく助長されることが明らかになった。このことは、適正な肥培管理をすれば、被害が軽減できることを示している。花き類で水媒伝染性病害を対象に使用できる薬剤はほとんどないのが現状であり、ピシウム病を防除するには、前述のように伝染源、伝染環を断つこと以外に、停滞水をできるだけ作らないような水管理、ほ場周辺の衛生管理など発病を未然に防ぐ対策が重要である。しかしながら、前章で述べたように、連作ほ場においては、病原菌が散在していると考えられ、開放系の施設である以上ほ場衛生管理に限界があるのも事実である。このため、施設内の病原菌を皆無にすることは困難であり、肥培管理をはじめとした発病軽減対策を組み合わせて総合的に被害を低減することが必要である。

総合考察

本研究では、花き生産施設で発生している水媒伝染性 Pythium 属菌や Phytophthora 属菌による病害の原因を明ら かにするとともに、病原菌の検出手法を開発し、その伝染 経路を解明することを目的とした。

まず、県の主要な鉢花品目であるミニバラ、カランコエ、 ゼラニウム等を対象にして、新規に発生した病害について 同定を行った。カランコエ生産施設では、新規の根腐病が 発生しており同定の結果、病原菌は Pythium myriotylum お よび P. helicoides であることを明らかにした。また、バラ (ミニバラ) およびキク (ポットマム) では、国内でこれ までに報告のない疫病菌による被害が発生していること を明らかにした。これらの種については、新種の可能性が 考えられた。さらに、ポインセチア根腐病およびゼラニウ ム茎腐病については、それぞれ P. aphanidermatum、P. irregulare によることを明らかにした。従来、Pythium 属菌 および Phytophthora 属菌の種の同定は、胞子のう(遊走子 のう)や有性器官などの形態的特徴および菌糸生育特性な どにより行われてきた。Pythium 属菌については、van der Plaats-Niterink (1981)の検索表が最も一般的に使用されて いる。Dick(1990)の検索表については、主に各器官の大き さによって分類がなされており、現在あまり一般的に使用 されていないのが現状である。また、Phytophthora 属菌に ついては、Waterhouse (1963) による検索表が主に使用され ている。しかしながら、いずれの検索表も提案されてから 年月を経ており、最近新たに発表された新種については対 応していない。また、Pythium 属菌および Phytophthora 属 菌については、近縁の種間では分類基準が曖昧で判断に悩

む場合があった。さらに Phytophthora 属菌については、雌 雄異株性の種が多く、単一培養では有性器官を形成しない ため、種名が決定できない場合が多かった。そのような中、 近年の分子生物学的手法の発展には目覚しいものがあり、 多くの植物病原菌の同定作業に利用されつつある。近年の 研究から、Pythium 属菌および Phytophthora 属菌の分子系 統解析による分類は、従来の形態分類をよく反映した結果 となることが報告されてきている。Pythium 属菌について は、Levesque and de Cook (2004) によって、van der Plaats-Niterink (1981)に掲載されている菌株の塩基配列が 調べられ、現在データベースに登録されている。また、 Phytophthora 属菌については、Park et al. (2008)によってデ ータベース化が進められている (www.phytophthoradb.org)。 今後、Pythium 属菌および Phytophthora 属菌の同定作業は、 より信頼度を高くするため形態と分子系統解析の併用が 必須であると考えられる。

水耕養液や土壌からの病原菌の検出法について検討した。養液からの検出には捕捉法およびメンブレンフィルター法を用いた。その中で、近年発生が増加傾向にある高温性の Pythium 属菌については、ベントグラス葉を用いた捕捉法と選択培地による高温(38℃)培養により選択的に分離でき、現地栽培施設においても実際に検出可能であることを明らかにした。本研究において、高温生育性 Pythium 属菌は、夏期の病害発生盛期より前の比較的低温期に循環養液中の菌密度が高まっていることを明らかにし、捕捉法を用いた定期的なモニタリング調査は養液栽培における高温生育性 Pythium病害の発生予察に利用可能であると考えられた。本法は、トラップと選択培地および簡単なインキュベーターがあれば、調査が可能であるため生産農家やJA、農業改良普及センターなどで利用可能である。

一方、高温性以外の Pythium 属菌の場合はトラップを用いて捕捉可能であるものの、25℃前後の培養では生育可能な種が非常に多いので、同定作業が非常に煩雑になる。また、 Phytophthora 属菌は一般的に Pythium 属菌よりも菌糸生育が遅いため、両者が混在する養液からの特異的な検出が困難である。 そのため、高温性以外の Pythium 属菌や Phytophthora 属菌については、メンブレンフィルターを用いて養液をろ過し、菌が捕捉されたメンブレンから DNA を抽出して種特異プライマーを用いた PCR を行うことによって検出が可能であることを示した。

土壌からの検出については、ベントグラス葉を用いて予備的に試験を行ったところ、長期間の設置は土壌中に存在する豊富な微生物、微小動物によりベントグラス葉の分解が急速に進むことから、土壌からの検出にはベントグラス葉は適さないと考えられた。そのため、ベントグラス葉よりも分解しにくいエゴマ種子を供試して試験を行った結果、現地の土壌サンプルからも Pythium 属菌を検出することが可能であった。

現地のミニバラ、カランコエ、ゼラニウムの生産施設において伝染経路について検討したところ、鉢花の底面給水 栽培施設においては、培土や苗を通じて施設内へ病原菌が 侵入するリスクが高いことが明らかになった。施設周囲に も病原菌が生息している事例があったことから、培土の保 管場所、調整場所にも細心の注意が必要であると考えられ た。また、施設内へ一度侵入した病原菌は、潜在感染苗や 輪作品目などを通じて施設内を経年伝染する可能性があ ること、出荷後のベンチや資材の洗浄が不十分な場合は、 それによって新たな苗へ伝染するリスクが高いことが明らかになった。したがって、伝染環を遮断するためには、 施設の利用体系や組み合わせ品目の選定、ほ場衛生にもな どにも注意する必要があることが示唆された。

近年、病害虫による被害を抑えるための手段を総合的に 講じ、人の健康へのリスクと環境への負荷を軽減するため の概念として、総合的病害虫管理 (Integrated Pest Management: IPM) が国際的に提唱されている。具体的に は、第一に輪作体系、抵抗性品種の導入、種子消毒の実施、 土着天敵の活用、伝染源植物の除去、化学農薬、フェロモ ン剤などによる「予防的措置」、第二に発生予察情報の活 用、圃場状況の観察等による防除時期等の「判断」、第三 として生物的防除(天敵等)、物理的防除(粘着板等)、化 学的防除(化学農薬)等の多様な防除手段を組み合わせた 「防除」の三点を組み合わせた取り組みを行うことである。 この IPM の概念は、国内の農家および農業関係者に浸透 しており、その必要性は概ね理解されてきている。また、 最近は GAP 手法(Good Agricultural Practice)の導入が推 進されており、農業者自らが、(1)農作業の点検項目を決 定し、(2) 点検項目に従い農作業を行い、記録し、(3) 記 録を点検・評価し、改善点を見出し、(4) 次回の作付けに 活用するという一連の「農業生産工程の管理手法」を体系 化することによって、消費者に信頼される農産物生産を行 おうとするものである。花き生産農家へもこの考え方の導 入が推進されている。しかしながら、自らの栽培環境にお いて発生している病害についてもその病名および病原に ついて理解されてはいるものの、「どこから病原菌はきた のか」、「いつごろ感染しているのか」、「どうして毎年発生 するのか」といった発生生態についてはほとんど理解され ていないのが現状である。本来ならばその発生生態が明ら かにできないと、防除のポイントが定まらないまま化学農 薬に依存した農業生産を続けざるを得ないことになる。そ こで、本研究では病害の同定「診断」だけでなく、現地の 病害発生施設において第一次伝染源および第二次伝染源 の調査を行い、防除のポイントを総合的に診断した。この 「総合診断」こそが、IPM および GAP 推進の基礎にある べきであると考える。指導者は総合診断によっていくつか の防除ポイントを費用対効果も含めて示し、農業者はその 内容について自ら十分理解した上で取り組める技術を選 択、実践することが望ましい。

花き類で水媒伝染性病害を対象に使用できる薬剤はほ とんどないのが現状である。そのため、伝染環の遮断をは じめ、病原菌の生態を踏まえた複数の防除対策を組み合わ せることにより、被害リスクを可能な限り減らすことが必 要である。伝染環を遮断する以外にまず考えられることは 水管理である。Pythium 属菌や Phytophthora 属菌は土壌間 隙に自由水があると胞子のうや遊走子のうを形成し、短時 間のうちに遊走子を放出する。バラ根腐病菌は罹病した根 を水中に置くと早い場合には30分後から遊走子の放出が 見られる (データ略)。このため、鉢物栽培では鉢底に停 滞水が長時間生じないようにすることが大切である。プー ルベンチの水平レベルの再確認も重要なポイントである。 次に肥培管理である。鉢物は培地量が限られているため、 気温や水分変動、塩類濃度などの影響を受けやすく根痛み を生じやすい。特に夏期は鉢内温度が非常に高くなること から、これらの影響を特に受けやすく、病原菌による被害 が助長されることがある。Ebb & Flow 栽培において、バ

ラ根腐病は液肥のみの管理と比較して液肥と固形肥料を 併用した場合に著しく発病した (渡辺ら 2009)。次に循環 養液の菌密度低減である。循環養液中の病原菌密度を低下 させることは、施設全体への二次伝染リスクの軽減につな がる。バラ根腐病菌の場合、循環養液中の菌密度が50個 /1以上で発病し、それ以下では発病しない。養液の殺菌技 術にはこれまでにもオゾン、光触媒・酸化チタン、UFろ 過膜、銀担持繊維フィルターなど国内でも多数の研究事例 がある (草刈ら 1992; 黒田ら 2002, 植松ら 2006, 草刈・ 山下 2007; 平野 2008; 黒田ら 2009)。岐阜県農業技術セ ンターでは、(株) TYK、岐阜大学と共同で銀セラミック スを用いた除菌技術の実用化研究を行ってきた。銀セラミ ックスはセラミックス表面に無機銀系抗菌剤をコーティ ングしたもので、銀イオンはほとんど溶出しない接触型の 資材である(加藤ら 2006)。本材を充填した装置に Pythium 属菌および Phytophthora 属菌の遊走子懸濁液を複数回通 過させると生存菌数は徐々に減少し、10 回通過後には生 存菌数を1/100以下に低下させることが可能である(渡辺 ら 2008)。本装置は、多量の養液の除菌が可能で、鉢物の 生産施設で試験導入が進められつつある。また、ほ場衛生 も重要なポイントである。鉢物経営では、施設の利用効率 を高めるため周年生産体系がとられている。このため、野 菜栽培のように土壌消毒等で一度リセットすることは困 難である。Pvthium 属菌は土壌中から普遍的に分離され、 寄主植物がなくても腐生的に長期間生存可能である(渡邊、 1998)。銀玲ら(2007)は P. helicoides の種特異プライマーを 開発し、これを用いてバラ根腐病が発病している施設内お よび施設周辺土壌から P. helicoides の検出を試みた結果、 プールベンチ下の土壌や養液タンク周辺および施設周辺 の土壌から本菌が検出されたと報告している。したがって、 Ebb & Flow 栽培では出荷終了時にベンチ表面、給水マッ ト栽培ではマット表面等の残さを可能な限り洗浄、除去し てからスタートすべきである。資材用の消毒資材で殺菌す ることが望ましいが、水洗だけでも発病リスクは低減可能 であった。また、前述のようにピシウム菌は施設周辺土壌 等にも広く生存していることから、購入培士等が汚染され ないよう管理に注意することも大切であろう。

鉢物類の養液栽培において、水媒伝染性病害をマネジメントすることは安定生産上欠かすことができない。そのためには、各栽培環境における伝染環を明らかにしてそれを可能な限り遮断するだけでなく、かん水、肥培管理などを適正にするなど発病しにくい環境づくりを総合的に組み合わせて被害リスクを低減することが大切である。

本研究において、鉢物類の底面給水栽培で発生する水媒 伝染性病害の「総合診断」に取り組んだ。これから全国の 施設園芸農家において IPM および GAP の導入を進めてい くためにも、「総合診断」は必須のものとなろう。そのた めには、今後さらに多くの病原菌の検出を可能にすること、 また検出手法をマニュアル、体系化することにより、現場 で広く活用してくことが望まれる。

摘要

近年、景気低迷による消費者の購買意欲の低下や原油・ 生産資材の高騰などにより、花き生産をめぐる現状は大変 厳しくなっている。国内の鉢物生産施設では、1990年代 から Ebb & Flow 方式をはじめとする底面給水方式が広く 普及しはじめ、経営の大規模化が進められてきた。しかし ながら、これらの施設では Pythium 属菌や Phytophthora 属 といった水媒伝染性病原菌による被害が多く発生してい るのが現状である。最近、環境への配慮のため養液の循環 利用が増加しており、このような施設で特に深刻な問題と なっている。従来の防除法は、発生してから化学薬剤によ り防除することが多く、十分な防除効果が得られずに大き な被害に繋がるケースが多い。また、無駄な化学薬剤の投 入は安全面、経費面からも見直す必要がある。一方で、鉢 物生産施設は、単一品目の大量生産方式や、複数種を組み 合わせて周年出荷する方式など、その生産体系は経営体に よって千差万別である。このため、水媒伝染性病害の発生 様相は様々であり、その要因を解明するのは容易ではない。 花き経営の安定化のためには、伝染経路を明らかにして、 病原菌の生態に基づいた適切な対応をとることにより、経 済被害を最小限度に抑制することが大切である。そこで本 研究では、花き生産施設で発生している水媒伝染性病害の 原因を明らかにするとともに、病原菌の検出手法を開発し、 その伝染経路を解明することにより従来の発病原因診断 に加え伝染経路診断の重要性を示すことを目的とした。

岐阜県内の鉢花生産施設で新規に発生が認められた 5 品目 6 種類の被害の原因を明らかにした。同定に際して、 従来の形態学的手法に加えて近年研究が進められてきて いる分子生物学的手法を用いた。カランコエの根茎腐敗症 状について、P. myriotylum および P. helicoides による病害 であることを明らかにした。これらの菌によるカランコエ の病害は本報告が初めてであるため、本病を根腐病 (Root and stem rot) とした。また、カランコエ疫病は、これまで 種が不明であったが、分子生物学的手法を用いて、Ph. nicotianae であることを明らかにした。次に、ポインセチ アの根腐症状について、P. aphanidermatum が原因であるこ とを明らかにし、病名を根腐病(Root rot)とした。ゼラ ニウムの茎腐症状について、P. irregulare complex が原因で あることを明らかにし、本病を茎腐病 (Pythium blackleg) とした。ミニバラおよびキク(ボットマム)の根腐症状に ついて、それぞれ1種の Phytophthora 属菌が原因である ことを明らかにし、疫病 (Phytophthora disease) の病原と した。両分離菌はとも形態的にも分子系統学的にも新種の 可能性が考えられた。

水耕養液や土壌からの水媒伝染性病原菌の検出法について検討した。養液からの検出には捕捉法およびメンブレンフィルター法を用いた。近年発生が増加傾向にある高温性の3種類のPythium属菌(P. helicoides、P. aphanidermatumおよびP. myriotylum)について、ベントグラス葉を用いたトラップ(BLT)を用いた捕捉法と選択培地による高温(38℃)培養により選択的に分離可能で、現地施設において実用性を確認した。高温性以外のPythium属菌やPhytophthora属菌については、養液を0.5μmのメンブレンフィルターでろ過し、メンブレンからDNAを抽出して種特異プライマーを用いたPCRを行うことにより検出が可能となった。さらに、土壌からP. helicoides およびP. irregulareを検出するためエゴマ種子を用いた捕捉法を開発した。

岐阜県内で発生している水媒伝染性病害の3事例について、その発生生態と伝染環について調べた。バラ根腐病の事例では、購入培土からPythium属菌が分離されたこと

から、第一次伝染源の一つとして培土により病原菌が施設 内に侵入した可能性が考えられた。また、循環養液のモニ タリング調査の結果、養液中の病原菌密度は発病時期より 30 日以上前に高くなっており、バラへの感染は早い段階 で起こっていることが示唆された。この結果と現地の施設 利用体系とを比較することにより、前年に感染した潜在感 染株の施設内への再搬入によって循環養液中の病原菌密 度が高まり、新たな苗へ感染して伝染環が形成されている 可能性が考えられた。

カランコエ根腐病の事例では、循環養液中には年間を通じて病原菌が存在していることが分かった。施設の利用体系を調査したところ、出荷終了したベンチの洗浄が十分にされないまま新たな苗の挿し木作業が行われていた。これらのベンチおよび資材について調べた結果、付着した培士機さ等には高頻度で病原菌が存在していることが明らかになった。したがって、汚染資材を通じて新たな苗へ病原菌が伝染し、循環養液を通じて施設全体へ伝染している可能性が考えられた。

ゼラニウム茎腐病の事例では、実際に培土が病原菌によって高頻度に汚染されている事例が認められた。この農家では、施設周囲の土壌からも高頻度に病原菌が検出された。一方、別の農家においてはセル苗からも病原菌が持ち込まれている可能性も示された。また、ゼラニウム生産は他品目と組み合わせた栽培体系がとられており、ゼラニウム茎腐病菌が同一施設内の別品目にも感染している可能性が考えられた。そこで、これらの品目の根から Pythium 属菌を分離したところ、同一菌が分離された。したがって、これらの品目を通じて施設内を経年伝染している可能性も考えられた。

以上の結果、鉢物の底面給水栽培施設においては、培土や苗を通じて施設内へ病原菌が侵入するリスクが高いことが明らかになった。施設周囲にも病原菌が生息している事例があったことから、培土の保管場所、調整場所にも細心の注意が必要である。また、施設内へ一度侵入した病原菌は、潜在感染苗や輪作品目などを通じて施設内を経年伝染する可能性があること、出荷後のベンチや資材の洗浄が不十分な場合は、それによって新たな苗へ伝染するリスクが高いことが明らかになった。これらの診断は、伝染環を遮断するためには、施設の利用体系や組み合わせ品目の選定、ほ場衛生に注意する必要があり、これにより防除の効率化が可能となることを示唆している。

本研究により、植物病害防除に繋がる一歩進んだ診断と して、従来の病害の原因菌診断に加え、生産施設の安全性 診断・第二次伝染経路診断という総合的な診断の必要性を 実証することができた。

謝辞

本研究を行うにあたり、現地試験等にご協力頂きました 各生産農家の皆様および農業改良普及センター(現 農林 事務所普及課)、農業技術課等関係者の皆様に心より御礼 申し上げます。

また、本論文を草するにあたり、終始にわたり貴重なご指導、ご助言を頂きました岐阜大学流域圏科学研究センター教授 景山幸二博士には、謹んで深甚なる感謝の意を表します。さらに、本研究を行うにあたり、貴重なご助言や激励を賜りました岐阜大学応用生物科学部 百町満朗教授、福井博一教授、元 岐阜県農政部農業技術課 田口義広博士 (現 出光興産株式会社)、独立行政法人 花き研究所 築尾嘉章博士、千葉県農林総合研究センター 植松清次氏、大阪府環境農林水産総合研究所 草刈眞一博士をはじめ、各都道府県の植物病理関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 我孫子和雄,石井正義,岸田 平 (1990) 観葉植物の新病 害 (IV).関西病虫害研究会報 32:78
- Anderson MG, Fortnum BA, Martin SB (1997) First report of *Pythium myriotylum* in a tobacco seedling float system in south Carolina. Plant Dis 81:227
- Burr TJ, Stanghellini ME (1973) Propagule nature and density of *Pythium aphanidermatum* in field soil. Phytopathology 63:1499-1501
- Chellemi DO, Mitchell DJ, Kannwischer-Mitchell ME, Rayside PA, Rosskopf EN (2000) Pythium spp. associated with bell pepper production in Florida. Plant Dis 84:1271-1274
- Chen W, Hoy JW, Schneider RW (1992) Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five Pythium species. Exper Mycol 16:22-34
- Chen W, Hoy JW (1993) Molecular and morphological comparison of *Pythium arrhenomanes* and *P. graminicola*. Mycol Res 97: 1371-1378
- 築尾嘉章, 守川俊幸, 景山幸二 (2007) Phytophthora sp.によるキク疫病(病原追加). 日本植物病理学会報 73:180
- Cooke DEL, Kennedy DM, Guy DC, Russell J, Unkles SE, Duncan JM (1996) Relatedness of Group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. Mycol Res 100: 297-303
- Cooke DEL, Duncan JM (1997) Phylogenetic analysis of Phytophthora species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA repeat. Mycol Res 101: 667-677
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomicetes. Fungal Genetics and Biology 30: 17-32
- Crawford AR, Bassam BJ, Drenth AD, Maclean DJ, Irwin JAG (1996) Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis. Mycol Res 100: 437-443
- Dick MW (1990) Keys to Pythium. Reading, England.
- 栄森弘己, 飯嶋 勉(1993). カランコエに発生した疫病 (新称). 日本植物病理学会報 59,289.
- Forster H, Cummings MP, Coffey MD (2000) Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS I DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI. Mycol Res 104: 1055-1061

- 福西 務 (1990) 新しい病害虫 No.11, p.1124 全国農村教育協会. 東京.
- Garzon CD, Yanez JM, Moorman GW (2007) Pythium cryptoirregulare, a new species within the P. irregulare complex. Mycologia 99: 291–301.
- Hendrix FF, Campbell WA (1970) Distribution of *Phytophthora* and *Pythium* species from soil. Can J Bot 48:377-384
- 平野 哲司 (2008) 底面給水鉢花栽培における光触媒・酸 化チタンを利用した養液の殺菌技術. 植物防疫 62: 205-208
- Hong C., Richardson P. A. and Kong P. (2002). Comparison of membrane filters as a tool for isolating Pythiaceous species from irrigation water. Phytopathology 92: 610-616.
- Huber D M (1974) Nitrogen form and plant disease. Ann. Rev. Phytopathol. 12: 139-165
- Jenkins SF Jr, Averre CW (1983) Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in North Carolina greenhouses. Plant Dis 67:968-969
- Kageyama K, Ui T (1980) A selective medium for isolation of Pythium spp. Ann Phytopathol Soc Jpn 46:542-544
- Kageyama K, Ohyama A, Hyakumachi M (1997) Detection of Pythium ultimum using polymerase chain reaction with species specific primers. Plant Dis 81: 1155-1160
- Kageyama K, Aoyagi T, Sunouchi R, Fukui H (2002a) Root rot of miniature roses caused by *Pythium helicoides*. J Gen Plant Pathol 68:15-20
- Kageyama K, Kobayashi M, Tomita M, Kubota N, Suga H, Hyakumachi M (2002b) Production and evaluation of monoclonal antibodies for the detection of *Pythium sulcatum* in soil. J Phytopathol 150: 97-104
- Kageyama K, Suzuki M, Priyatomojo A, Oto Y, Ishiguro K, Suga H, Aoyagi T, Fukui H (2003) Characterization and identification of asexual strains of *Pythium* associated with root rot of rose in Japan. J Phytopathol 151:485-491
- 景山幸二, 千田昌子, 浅野貴博 (2007) 養液栽培での病害 の総合診断. 農業技術体系 花卉編 3 680 の 2-11
- Kawase Y, Ichitani T, Takahashi M (1970) Ecologic and taxonomic studies on *Pythium* as pathogenic soil fungi: IX. Effect of inorganic nitrogen on vertical distribution and pathogenicity of several soil-borne plant pathogens. Bull. Univ. Osaka Pref., Ser B. 22: 95-102.
- 神頭武嗣, 植松清次, 相野公孝 (2007) Phytophthora nicotianae によるポインセチア疫病(新称). 日本植物病 理学会報 73:112-113
- 加藤吉成, 丹羽智彦, 上野 麗, 蛭子博志, 百町満朗 (2006) 燐酸系結晶化ガラスを担体とした無機銀系抗菌 剤の抗菌原理に関する一考察. 日本植物病理学会報 72: 272
- Kraft JM, Endo RM, Erwin DC (1967) Infection of primary roots of bentgrass by zoospores of *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology 57:86-90
- 草刈眞一,田中寛 (1986) 高濃度水耕培養液中における Pythium butreli 遊走子の被のうとホウレンソウ苗枯病発 生への影響について.日本植物病理学会報 52:1-7
- 草刈眞一、岡田清嗣、中曽根渡、川端利昭、岡村 昭、圓藤英雄 (1992) Pythium aphanidermatum 遊走子に対する オゾン水の殺菌効果. 日本植物病理学会報 58: 579
- 草刈 眞一, 山下博之 (2007) 銀担持繊維を用いた積層濾 過式フィルターによる養液栽培培養液殺菌効果. 日本 植物病理学会報 73: 258-259
- 黒田克利, 冨川 章, 佐藤法子 (2002) オゾンによる循環

- 式養液栽培における培養液殺菌システムの開発. 日本 植物病理学会報 68:210
- 黒田克利, 鈴木啓史, 坂田訓章 (2009) オゾン養液生成装 置による養液殺菌技術の開発. 日本植物病理学会報 75: 245-246
- Lee SB, Taylor JW (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White T.J (eds) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, pp 282-287
- Levesque CA, De Cock AWAM (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus Pythium. Mycol Res 108: 1363-1383
- Lumsden RD, Ayers WA, Adams PB, Dow RL, Lewis JA, Papavizas GC, Kantzes JG (1976) Ecology and epidemiology of *Pythium* species in field soil. Phytopathology 66:1203-1209
- Matsumoto C, Kageyama K, Suga H, Hyakumachi M (1999) Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. Mycoscience 40: 321-331
- Matsumoto C, Kageyama K, Suga H, Hyakumachi M (2000) Intraspecific DNA polymorphisms of *Pythium irregulare*. Mycol Res 104:1333-1341
- Matsumoto N, Sato T (1979) Phytophthora cryptogea Pethyb.
 & Laff. found in alfalfa-field soil. Ann Phytopath Soc Japan 45:362-368
- 宮崎暁喜、渡辺秀樹、景山幸二 (2009) Pythium helicoides Drechsler によるベゴニア根腐病 (新称) 関西病虫害研 究会報 51:53-54
- Moorman GW, Kang S, Geiser DM (2002) Identification and characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. Plant Dis 86:1227-1231
- Moorman, G. W. and Kim, S. H. (2004). Species of *Pythium* from greenhouses in Pennsylvania exhibit resistance to propamocarb and mefenoxam. Plant Dis. 88: 630-632.
- 森岡公一(1993). 底面マット給水. 農業技術体系 花卉編 2: 509-511.
- Morita Y. and Tojo M., (2007). Modifications of PARP medium using fluazinam, miconazole, and nystatin for detection of Pythium spp. in soil. Plant Dis. 91: 1591-1599.
- Moulin F, Lemanceau P, Alabouvette C (1994) Pathogenicity of Pythium species on cucumber in peat-sand, rockwool and hydroponics. Eur J Plant Pathol 100:3-17
- Nagai Y, Takeuchi T, Watanabe T (1978) A stem blight of rose caused by *Phytophthora megasperma*. Phytopathology 68: 684-688
- 長村智司(2005). エブ・アンド・フローシステムのメリットと世界の動向. 農業技術体系 花卉編 2 追録第7号: 376の2-376の5.
- 日本植物病理学会編 (1995) 植物病理学大事典 養賢堂, 東京, pp. 747-764
- Park J, Park B, Veeraraghavan N, Jung K, Lee YH, Blair JE, Geiser DM, Isard S, Mansfield MA, Nikolaeva E, Park SY, Russo J, Kim SH, Greene M, Ivors KL, Balci Y, Peiman M, Erwin DC, Coffey MD, Rossman A, Farr D, Cline E, Grünwald NJ, Luster DG, Schrandt J, Martin F, Ribeiro OK, Makalowska I, Kang S (2008) *Phytophthora* Database: A forensic database supporting the identification and monitoring of *Phytophthora*. Plant Dis. 92: 966-972
- Pettitt TR, Wakeham AJ, Wainwright MF, White JG (2002) Comparison of serological, culture, and bait methods for

- detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. Plant Pathol 51:720-727
- Priyatmojo A, Yotani Y, Hattori K, Kageyama K, Hyakumachi M (2001) Characterization of *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of miniature rose. Plant Dis 85: 1200-1205
- Sanchez J, Sanchez-Cara J, Gallego E (2000) Suitability of ten plant baits for the rapid detection of pathogenic *Pythium* species in hydroponic crops. Eur J Plant Pathol 106:209-214
- Sanogo S, Moorman GW (1993) Transmission and control of Pythium aphanidermatum in an ebb-and-flow subirrigation system. Plant Dis 77:287-290
- Smiley, RW and Cook RJ (1973) Relationship between take-all of wheat and rhizosphere pH in soils fertilized with ammonium vs. nitrate-nitrogen. Phytopathology 63: 882-890.
- Stanghellini ME, Kim DH, Rakocy J, Gloger K, Klinton H (1998) First report of root rot of hydroponically grown lettuce caused by *Pythium myriotylum* in a commercial production facility. Plant Dis 82:831
- Stanghellini ME, Vilchez M, Kim DH, Aguiar JL, Armendariz J (2000a) First report of root rot caused by Pythium aphanidermatum on artichoke. Plant Dis 84:811-811
- Stanghellini ME, Nelson CJ, Kim DH, Rasmussen SL, Rorbaugh PA (2000b) Influence of subversus top-irrigation and surfactants in a recirculating system on disease incidence caused by *Phytophthora* spp. in potted pepper plants. Plant Dis 84:1147-1150
- 鈴木幹彦, 外側正之, 米山千温 (2005) Pythium helicoides によるイチゴビシウム根腐病(新称). 日本植物病理学 会報 71:209
- 鈴木幹彦, 景山幸二, 市川 健, 内山 徹 (2009) Pythium helicoides によるガーベラビシウム根腐病 (新称). 日本 植物病理学会報 75:237
- 高鳥四郎, 菊池隆壽, 荒川 昭, 工藤 忠, 阿部善三郎 (1975) ポインセチア根腐症の防除. 関東東山病害虫研 究会年報 22:73
- Taylor RJ, Salas B, Secor GA, Rivera V, Gudmestad NC (2002). Sensitivity of North American isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (metalaxyl). Plant Dis. 86:797-802.
- Thinggaard K, Middelboe AL (1989) *Phytophthora* and *Pythium* in pot cultures grown on ebb and flow bench with recirculating nutrient solution. J Phytopathol 125:343-352
- Thinggaard K, Andersen H (1995) Influence of watering frequency and electrical conductivity of the nutrient solution on *Phytophthora* root rot in pot plants of Gerbera. Plant Dis 79:259-263
- 東條元昭, 藤田百合子, AWAD HM, 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 接種源の製法. 関西病虫害研究会報 35:1-5
- Tsukiboshi T, Chikuo Y, İto Y, Matsushita Y, Kageyama K (2007) Root and stem rot of chrysanthemum caused by five *Pythium* species in Japan. J Gen Plant Pathol 73:293-296
- 植松清次, 行方朋英, 林 角郎, 善林六郎, 赤山喜一郎 (1991) ゼラニウムに発生した Pythium aphanidermatum と P. splendens による茎腐病. 関東東山病害虫研究会年 報 38: 111-112
- 植松清次,三輪千華,中村謙治,邱 延峰,宮崎泰光 (2006) ロックウール循環式養液栽培におけるバラ疫病 およびトマト青枯病に対する UF ろ過膜,簡易サンドフ ィルターおよび紫外線殺菌装置による防除効果.日本

植物病理学会報 72: 248-249

- van der Plaats-Niterink AJ (1981) Monograph of the genus Pythium. Study Mycol 21:1-242
- Wang PH, White JG (1997) Molecular characterization of Pythium species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. Physiol Mol Plant Path 51:129-143
- Wang PH, Boo LM, Lin YS, Yeh Y (2002) Specific detection of Pythium aphanidermatum from hydroponic nutrient solution by booster PCR with DNA primers developed from mitochondrial DNA. Phytoparasitica 30: 473-485
- 渡辺秀樹, 堀之内勇人, 棚橋一夫, 景山幸二 (2005) Pythium helicoides によるイチゴピシウム根腐病(新称) の発生と各種作物に対する病原性. 日本植物病理学会 報 71:209-210
- 渡辺秀樹、堀之内勇人、市原志信、桑原圭司、山田貴子、 景山幸二 (2006) ゼラニウム茎腐病菌 Pythium irregulare の伝染環、日本植物病理学会報 72: 223-224
- 渡辺秀樹、景山幸二 (2007) 鉢花のマット給水栽培における頭上かん水が Pythium 病害の発病に及ぼす影響. 関西病虫研報 49: 35-36
- Watanabe H, Taguchi Y, Hyakumachi M, Kageyama K (2007) Pythium and Phytophthora species associated with root and stem rots of kalanchoe. J Gen Plant Pathol 73:81-88
- Watanabe H, Kageyama K, Taguchi Y, Horinouchi H, Hyakumachi M (2008) Bait method to detect *Pythium* species that grow at high temperatures in hydroponic solutions. J Gen Plant Pathol 74: 417-424
- 渡辺秀樹(2008) バラ根腐病の発生生態と防除. 植物防疫 62: 597-600
- 渡辺秀樹, 加藤吉成, 亀島 哲, 丹羽智彦, 上野 麗, 堀 之内勇人, 田口義広, 景山幸二, 百町満朗 (2008) 鉢花 の底面給水栽培における銀セラミックスを用いた水媒 伝染性病害の防除, 関西病虫研報 50:87-89
- 渡辺秀樹,砂川 匡,堀之内勇人,加藤高伸,景山幸二 (2009) 肥培管理がバラ根腐病の発病に及ぼす影響. 関 西病虫研報 51:49-51
- 渡辺恒雄(1998) 土壌病害の事典、朝倉書店 東京、 p110-131
- Watanabe T (1981) Distribution and populations of *Pythium* species in the northern and southern part of Japan. Ann Phytopath Soc Japan 47:449-456
- Watanabe T (1984) Detection and quantitative estimations of Pythium aphanidermatum in soil with cucumber seeds as a baiting substrate. Plant Dis 68:697-698
- 渡辺公敏、藤井正己、上松達三(1975) 鉢物の灌水省力化 に関する試験. 岐阜農試花き試験成績書. p48
- Waterhouse GM (1963) Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute, Mycol Papers 92:22
- Waterhouse GM (1967) Key to Pythium Pringsheim. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute. Mycol Papers 109:1-15
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White T.J (eds) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. pp 315-322. Academic Press, New York.
- 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

本植物病理学会報 73:86-93

Yin-Ling, Zhou W, Motohashi K, Suga H, Fukui H, Kageyama K (2009) Development of microsatellite markers for *Pythium helicoides*. FEMS Microbiology Letters 293: 85-91

Summary

Recently, flower production becomes tight because of various factors such as cooling of the market and soaring of oil-materials prices. The sub-irrigation system such as Ebb & Flow has been rapidly and widely adopted in the production of potted flowers, since it provides uniform irrigation and fertilization in addition to reduced labor costs. However, the Ebb & Flow system is vulnerable to infection by *Pythium* and *Phytophthora* species, which produce large numbers of motile zoospores in water. This problem is serious in greenhouses in which the nutrient solution is re-circulated. Control of the diseases is currently performed by application of chemical fungicides after the occurrence of the disease. Excess application of the chemical fungicides should be eliminated for an environmental preservation and a cost reduction. For establishing adequate disease management strategies, it is essential to determine infection routes of these pathogens in hydroponic cultures. The objectives of this study are to develop detection method of *Pythium* and *Phytophthora* necessary for ecological study, and to identify the pathogens, and to determine infection routes of these pathogens of the several diseases of ornamental flower in Gifu prefecture.

We identified the causal agents of diseases in five ornamental flowers which occurred in Gifu prefecture. In this study, *Pythium* and *Phytophthora* species were identified by molecular phylogenetic analysis as well as by morphological characteristics. The pathogens of root and stem rot of kalanchoe were identified as *P. myriotylum* and *P. helicoides*. This was the first report of kalanchoe disease caused by these *Pythium* species. Therefore, we proposed the name negusare-byo (Root and stem rot). Additionally, the pathogen of Phytophthora rot of kalanchoe as previously reported was identified as *Ph. nicotianae*. The pathogen of root rot of poinsettia was identified as *P. aphanidermatum*. The pathogens of root and stem rot of geranium were identified as *P. irregulare* complex. The pathogens of miniature rose and chrysanthemum causing root rot were identified as *Phytophthora* sp., respectively. These isolates were considered new species of *Phytophthora*.

We developed detection methods of *Pythium* and *Phytophthora* species from nutrient solution and soil. Bait and filter methods were used for detection from nutrient solution. In particular, three *Pythium* species, i. e. *P. helicoides*, *P. aphanidermatum* and *P. myriotylum*, that grow at high temperatures were detected semi-selectively by bait method which used bent grass leaf traps (BLTs) and high temperature incubation (38°C). *P. helicoides* was detected 30 days before the disease occurred in a commercial greenhouse. The other *Pythium* and *Phytophthora* species were detected by filter method. DNA was extracted directly from the membrane filter (0.5 μ m) which filtered nutrient solution, and PCR with the species specific primers was conducted. Furthermore, the bait method which used perilla seed traps (PSTs) allowed the detection of *P. helicoides* and *P. irregulare* from artificially inoculated mixture soil.

We examined the disease cycle of the pathogens of the diseases (3 examples) which occurred in greenhouses in Gifu prefecture. In the root rot of miniature rose, the potting mixture soil was considered to be one of the primary infection sources, because *Pythium* species was detected from them. *P. helicoides* was also detected from re-circulated nutrient solution 30 days before the disease occurrence in the commercial greenhouse, suggesting that the pathogen would infect to roses in early stages. By comparing monitoring data with the production system, the latently infected seedlings were seemed to be the one of the important factors in the disease cycle.

In the root rot of kalanchoe, *P. helicoides* was detected from the re-circulated nutrient solution throughout the year. In the greenhouses, the used pool benches were not cleaned before next use. *P. helicoides* was detected in high frequency from soil which remained on the surface of the benches. These results suggest that the used benches contaminated with the pathogen will be the one of the important factor of the disease cycle in the green house.

In root rot of geranium, the pathogen was detected in high frequency from a soil mixture before the use. Additionally, the pathogen was detected from soil around the greenhouse. In another greenhouse, the pathogen was detected from cell seedlings which were commercially purchased, indicating that the pathogen would invade through outside of the greenhouse. Furthermore, the pathogen was detected from other ornamental flowers after the geranium production in the greenhouse re-circulating nutrient solution. The result suggests that the pathogen would also remain in the greenhouse beyond the geranium cropping season through the rotated flower plants.

In conclusion, *Pythium* and *Phytophthora* species will be introduced easily with a soil mixture or a seedling in greenhouse. We must pay attention an infestation in a storage and preparation space of the mixture soil. In addition, once the pathogens invaded to a greenhouse the pathogen will have a whole life cycle in the greenhouse by the latently infected seedlings or other ornamental plants. Furthermore, the used benches or other materials contaminated with the pathogen will have the risk of infection to young seedlings. Therefore, we must take care of a culture system, a combination of growing cultivars and a sanitation of a greenhouses for cutting the disease cycle.