

北海道で発生した*Fusarium*属菌の花き病害（第1報） —トルコギキョウ茎腐病—^{*1}

堀田 治邦^{*2} 児玉不二雄^{*3}

北海道におけるトルコギキョウの栽培ハウスで茎が激しく腐敗する症状が認められた。病徴は茎が淡褐色に腐敗して萎凋し、やがて枯死した。茎の病斑部には白色の菌糸と淡オレンジ色のスポロドキアが形成された。病斑部から*Fusarium*属菌が分離され、カーネーション葉片寒天培地上で淡オレンジ色のスポロドキアが形成された。分離菌の大型分生子は細長く細胞壁は薄かった。その基部細胞はV字あるいは足形であった。厚膜胞子の形成は認められなかった。PDA培地を用いて分離菌を25℃で培養したところ、対照菌株の*F. avenaceum* T-16と同程度に生育は遅かった。*F. avenaceum*の種特異的プライマーでトルコギキョウ分離株のDNAを増幅させたところ、特異バンドが検出された。分離菌の大型分生子懸濁液をトルコギキョウ（品種：「あずまの波」）に噴霧接種したところ、すべての菌株で原病徴と同様の症状が認められ、*Fusarium*属菌が再分離された。以上の結果から、トルコギキョウの茎腐病を起こす病原菌は*F. avenaceum*と同定された。

緒 言

北海道における花き栽培は平成に入ってから急激な作付拡大が見られ、平成20年以降は700ha台の作付面積となっている²⁾。トルコギキョウはこの作付拡大に貢献した品目で、平成以降に花き出荷統計に記載されるようになり、平成23年では37haの作付面積を維持している。

一方、本品目では栽培当初から株の腐敗や枯死する症状が認められ、これは既にトルコギキョウ茎腐病として報告されているが³⁾、講演要旨での記載に留まっている。そこで、本報では病徴や病原菌の同定、接種試験の結果を詳細にまとめ、トルコギキョウ茎腐病菌を*Fusarium*属菌の分類体系に基づき再同定を行ったので報告したい。

試験方法

1. 病原菌の分離

罹病個体から組織分離法⁹⁾で病原菌の分離を行った。すなわち、罹病部を長さ約5mmに切断し、70%エタノールに30秒間、0.5%次亜塩素酸ナトリウム液に1分間、滅菌水に1分間（2回）それぞれ浸漬し、滅菌濾紙で吸水後、ストレプトマイシン加用ジャガイモ・デキストロース寒天（PDA）培地平板に置床した。生育した菌叢の先端部をとり、PDA培地平板で純粋培養した。分生子の形成を確認後、5mm角の菌叢を滅菌水で懸濁してPDA培地に画線し、単孢子由来の菌叢を釣菌して供試菌株とした。

2. 分離菌の培養性質、形態および温度試験

トルコギキョウから分離した全菌株について、培養性質、形態および温度試験を調査した。培地裏面の菌叢色および厚膜胞子の形成はPDA培地平板を用い、25℃、4週間培養し経時的に観察したほか、厚膜胞子は4週間後に顕微鏡で形成状況を観察した。スポロドキアの形成はカーネーション葉片寒天（CLA）培地¹¹⁾を用いた。CLA培地は素寒天培地（WA）に1%塩化ベンザルコニウムで処理したカーネーション葉片（品種：「ピンクパーバ」、約5mm）を培地固化直前に加えて作製した。同培地に各菌株を25℃、4週間培養して経時的にスポロドキアの形成を観察した。さらにスポロドキアを滅菌水に懸

2016年1月4日受理

^{*1} 本報の一部は、1995年度日本植物病理学会北海道部会で発表した。

^{*2} （地独）北海道立総合研究機構中央農業試験場、069-1395 夕張郡長沼町

E-mail: horita-harukuni@hro.or.jp

^{*3} 元道立北見農業試験場（現：北海道植物防疫協会、060-0001 札幌市）

表1 トルコギキョウ供試菌株の来歴

菌株名	採取場所	分離年
Fr-9	栗山町	1989
TOF9202, TOF9205	沼田町	1992
TOF9206, TOF9209	岩見沢市北村	1992
TOF9208	月形町	1992
TOF9501, TOF9502, TOF9503	長沼町	1995
TOF9504	岩見沢市	1995

濁し、大型分生子の形態を観察し、その大きさおよび隔膜数を調査した（40分生子）。小型分生子の形成とその着生状況の観察はKCl培地（WA培地に塩化カリウムを4g/L添加）を用いた。25℃、4週間培養して小型分生子の形成と着生状況を顕微鏡下で観察した。

また、25℃および30℃条件下の菌糸伸長量を調査した。9mlの滅菌水に白金針でスポロドキアをわずかに取って懸濁した。これをWA培地にコンラージ棒で塗布し、25℃、18～20時間培養した。WA培地上で発芽が確認された大型分生子を釣菌し、PDA培地中央に置床した。培地は3反復とし、これらを25℃および30℃の恒温器に入れ、3日間（72時間）培養し、菌叢の直径を計測した。比較としてコムギから分離された*F. avenaceum* T-16株、*F. graminearum* Fr-3株、*F. culmorum* T-15株を用いた。

3. 種特異プライマーによる検出

F. avenaceum を特異的に検出するプライマーペア（JIAf/JIAr）を用いて¹²⁾、PCRによる検出を行った。供試菌株は年度や産地の異なる4菌株を選定した。PDA培地平板で24℃条件下7日間培養した菌叢先端の気中菌糸を採取し、DNeasy Plant Mini Kit（（株）キアゲン）でDNAを抽出した。これをテンプレートとしてPCRを行い、増幅した遺伝子断片の有無を調査した。

4. 接種試験

トルコギキョウから分離した全菌株について接種試験を行った。約3ヶ月間育苗したトルコギキョウ（品種：「あずまの波」）の苗に分離菌の分生子を接種し、病原性を確認した。また、多犯性菌であることを確認するため、コムギ（品種：「ハルコタカ」）の切り穂（開花期に無防除圃場より採取）にも接種した。供試植物数はトルコギキョウ苗が菌株当たり5または6株、コムギは3穂である。接種は分離菌をCLA培地で約3週間培養し、生じたスポロドキアの分生子を滅菌水に懸濁し、分生子数を約10⁴個/mlに調製後、それぞれの供試植物に十分量を噴霧接種した。対照として滅菌水を噴霧した区を設けた。トルコギキョウはそのまま温室で栽培し、コムギは切り穂全体をビニール袋で覆い、多湿条件に保った。トルコ

ギキョウは1ヶ月後、コムギは約1週間後に発病の有無を調査した。発病株から病原菌の再分離を行った。

結 果

1. 病徴と病原菌の分離

発病株には定植後から地際部の茎が淡褐色となる症状が現れた。病斑は茎から葉へ進展し、葉では樹枝状に病斑が進行し、やがて葉全体が淡褐色となった。茎部の病斑は髓部に達し、株全体が萎凋・枯死した。茎部の病斑表面に白色綿毛状の菌糸が生じ、淡オレンジ色の胞子塊が形成された（図1a）。病斑部から病原菌を分離した結果、ほぼ同一の菌叢で、同じ生育程度を示す糸状菌が高率に分離された。分離した菌株名、採取場所および分離年を表1に示す。

2. 分離菌の培養性質、形態および温度試験

PDA培地における菌叢色は菌株によって異なったが、カーマイン赤あるいは茶褐色のどちらかであった。厚膜胞子の形成は培養4週間後の顕微鏡観察で確認されなかった。CLA培地でスポロドキアの形成が認められ、その色はすべて淡オレンジ色であった（図1b）。KCl培地ではTOF9206株を除く全菌株で小型分生子がわずかに確認された。小型分生子は単独あるいは分岐した分生子柄に形成され、その先端に1個（モノフィアライド）形成された（表2）。各菌株の大型分生子は細長い針状の形態で細胞壁は薄く、分生子基部細胞の形態はV字（notched）あるいは足形（foot-shape）であった（図1c）。その大きさは34.3～82.5×2.4～5.6 μmの範囲で、隔膜数は2～8であった（表3）。トルコギキョウ分離株の25℃および30℃における菌糸生育量（cm/3 days）はそれぞれ1.7～3.4cm、0.7～2.3cmで、比較として供試した*F. avenaceum* T-16株が3.4cm、2.2cmでほぼ同程度の生育量であった（表4）。一方、*F. graminearum* Fr-3株および*F. culmorum* T-15株の生育量は25℃でトルコギキョウ分離株を上回り、異なった。また、Burgess et al.¹⁾が報告した*Fusarium* 属菌の記載と比較しても*F. avenaceum*に一致した。

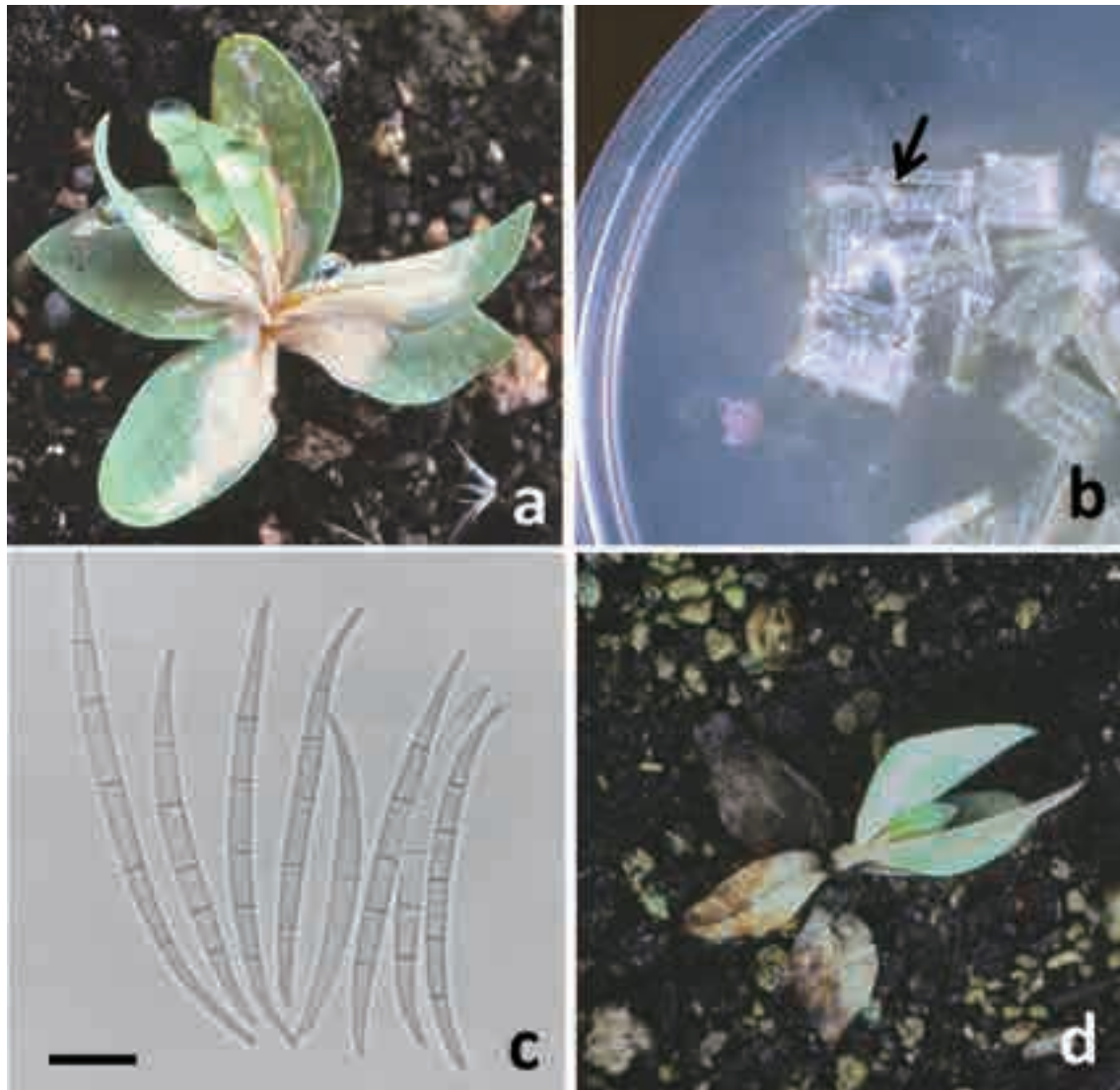


図1 トルコギキョウの茎腐症状と分離菌の形態

a：自然発生による茎腐症状，b：カーネーション葉片培地上に形成されたスポロドキア（矢印），
c：分離菌の大型分生子（Bar=10 μ m），d：接種試験による発病

図2 特異プライマーを用いたPCRによる *Fusarium avenaceum* の検出

M：サイズマーカー（200bp ladder），1-4：トルコギキョウ分離株（1：TOF9202，
2：TOF9206，3：TOF9208，4：TOF9504），5：*Fusarium avenaceum*（T-16），
6：*Fusarium graminearum*（Fr-3），7：*Fusarium culmorum*（T-15）

表2 分離株の培養性質

菌株名	培地の着色 ^{a)}	厚膜胞子 ^{a)}	スボロドキア ^{b)}	小型分生子の着生 ^{c)}
Fr-9	茶褐色	—	淡オレンジ	モノフィアライド
TOF9202	カーマイン赤	—	淡オレンジ	モノフィアライド
TOF9205	茶褐色	—	淡オレンジ	モノフィアライド
TOF9206	カーマイン赤	—	淡オレンジ	—
TOF9208	茶褐色	—	淡オレンジ	モノフィアライド
TOF9209	カーマイン赤	—	淡オレンジ	モノフィアライド
TOF9501	カーマイン赤	—	淡オレンジ	モノフィアライド
TOF9502	茶褐色	—	淡オレンジ	モノフィアライド
TOF9503	茶褐色	—	淡オレンジ	モノフィアライド
TOF9504	茶褐色	—	淡オレンジ	モノフィアライド

a) PDA培地で試験

b) CLA培地で試験

c) KCl培地で試験

d) —は形成されなかったことを示す

表3 大型分生子の大きさと隔膜数

菌株名	長さ×幅 (μm)		隔膜数
	平均	(大きさの範囲)	
Fr-9	60.4×3.5	(48.9~70.4×3.0~4.0)	3~8
TOF9202	53.7×3.8	(38.9~64.4×3.0~4.4)	4~6
TOF9205	61.4×4.5	(43.5~70.9×3.7~5.6)	4~8
TOF9206	57.1×4.5	(43.6~82.5×3.6~5.2)	4~9
TOF9208	64.0×3.9	(51.9~81.6×3.2~4.7)	3~5
TOF9209	56.8×4.5	(44.4~68.7×3.6~5.4)	5~7
TOF9501	64.9×4.3	(53.4~82.3×3.4~5.2)	3~6
TOF9502	65.3×3.6	(51.6~79.5×2.9~4.3)	2~6
TOF9503	63.1×3.8	(54.0~73.4×3.2~4.6)	3~6
TOF9504	50.6×3.2	(34.3~70.9×2.4~4.2)	2~5

表4 分離株の各温度における菌糸伸長

菌株名・菌種	菌糸伸長 (cm / 3 days)	
	25℃	30℃
Fr-9	2.8	1.7
TOF9202	2.1	0.7
TOF9205	2.5	1.4
TOF9206	2.5	1.4
TOF9208	3.3	2.2
TOF9209	3.4	2.3
TOF9501	3.4	2.2
TOF9502	2.8	1.7
TOF9503	3.0	1.6
TOF9504	1.7	1.2
<i>Fusarium avenaceum</i> (T-16)	3.4	2.2
<i>Fusarium graminearum</i> (Fr-3)	4.1	2.1
<i>Fusarium culmorum</i> (T-15)	6.0	2.4
<i>Fusarium avenaceum</i> ^{a)}	2.8~4.0	0.5~2.5
<i>Fusarium graminearum</i> ^{a)}	3.9~6.1	0.5~2.5
<i>Fusarium culmorum</i> ^{a)}	5.5~6.8	1.5~2.5

a) Burgess et al.¹⁾

3. 種特異プライマーによる検出

*F. avenaceum*の種特異検出プライマーを用いてPCRによる検出を行ったところ、予想される増幅断片(220bp)がトルコギキョウから分離した全供試株で得られた(図2)。対照菌株では*F. avenaceum* T-16株のみで増幅断片が認められ、その他菌種のFr-3株およびT-15株では認められなかった。

4. 接種試験

トルコギキョウでは分離菌株のすべてで発病が認められ、発病株率は60~100%で菌株により変動が大きかった(表5)。その症状は地際部から淡褐色病斑を形成して腐敗したことから、原病徴が再現された(図1d)。コムギ穂に対する接種ではいずれの菌株でも発病が認められ、100%の発病穂率であった。トルコギキョウおよびコムギへの滅菌水接種区では発病が認められなかった。発病株から病原菌を再分離したところ、接種菌と同様の菌叢を持つ*Fusarium*属菌が再分離された。

表5 トルコギキョウ分離株の接種試験結果

菌株名	発病株数/接種株数	
	トルコギキョウ ^{a)}	コムギ ^{b)}
Fr-9	4/5	3/3
TOF9202	5/6	3/3
TOF9205	4/5	3/3
TOF9206	4/6	3/3
TOF9208	6/6	3/3
TOF9209	5/6	3/3
TOF9501	5/5	3/3
TOF9502	4/5	3/3
TOF9503	3/5	3/3
TOF9504	3/5	3/3
Control ^{c)}	0/5	0/3

a) 品種:「あずまの波」

b) 品種:「ハルユタカ」

c) Controlは滅菌水を噴霧接種

表6 トルコギキョウ分離株と *Fusarium avenaceum* の比較

性状	トルコギキョウ株	<i>F. avenaceum</i>		
		Burgess et al. ^{a)}	Leslie and Summerell ^{b)}	Nelson et al. ^{c)}
培地着色	カーマイン赤, 茶褐色	灰バラ色, burgundy	灰バラ色, burgundy	カーマイン赤, 褐色～濃褐色
菌糸生育量	1.7～3.4cm (25℃, 3日)	2.8～4.0cm (25℃, 3日)	—	7cm以上 (10～14日)
スポロドキア	淡オレンジ	オレンジ, 茶色	淡オレンジ	オレンジ
大型分生子	細長く針状 細胞壁薄い	細長く針状 細胞壁薄い	細くて長い, 細胞壁薄い 隔膜数は5 (3または4もある)	細長く針状 細胞壁薄い
基部の形態	V字 (notched) まれに足形 (foot-shape)	通常notched, またはfoot-shape	通常notched, 一部foot-shape	foot-shape, notched
小型分生子の形成	ほとんどなし	一部形成	一部菌株でのみ形成	まれに形成
分生子柄	分枝, モノフィアライド	分枝, モノフィアライド	単形成, モノフィアライド またはポリフィアライド	分枝, モノフィアライド
厚膜胞子	なし	なし	なし	なし

a) Burgess et al.¹⁾b) Leslie and Summerell⁶⁾c) Nelson et al.⁷⁾

考 察

Fusarium 属菌の分類は過去に多くの分類学者によって体系化がなされてきたが、現在は形態的差異に加え、遺伝子の系統分類学的解析も用いられるようになった^{1, 6, 7)}。トルコギキョウ茎腐病の病原菌は岩田ら⁵⁾によって初めて *F. roseum* として報告されたが、本報告では現在の *Fusarium* 属菌の分類体系^{1, 6, 7)} と培養的、形態的照合を行い、さらに種特異プライマーを用いたPCRによる検出を行って病原菌の種名について再検討を試みた。

トルコギキョウ分離菌は培地着色がカーマイン赤および茶褐色を示し、大型分生子が細長く針状で、菌糸生育量 (3日間) も1.7～3.4cmと緩慢であったことから、既報文献の *F. avenaceum* の記載と一致した (表6)。以上の結果から、トルコギキョウ茎腐病の病原菌は *F. avenaceum* と同定された。本試験の一部は既に報告 (講演要旨) したが³⁾、本報にその詳細を記載した。

北海道で *F. avenaceum* はコムギ赤かび病を起こす病原菌として認知され、道内では普遍的に存在する菌種である。同菌による病害はコムギ以外の植物でも発生し、日本植物病名目録での記載では27植物に達する⁸⁾。この中でコムギと同様の赤かび症状で報告されている植物は6種と少なく、大多数は地際部から感染し、立枯症状となる土壌伝染病が多い。トルコギキョウでもハウス外のイネ科、マメ科などの感染植物から分生子が飛散して空気伝染する場合とハウス内で土壌伝染する場合が考えられるが、発病は定植直後の苗から起っていることから、土壌伝染が疑われ、この対策が重要であると考えられる。土壌伝染については、ハウス栽培が想定されるカーネーション、ストックなどで本病菌による病害が発生するため、これら植物との輪作を行う場合には本病の発生に注意が必要である。事実、トルコギキョウ茎腐病が多発し

た圃場で後作のキクに同菌による赤かび病が発生した事例もあることから⁴⁾、感受性植物の栽培を回避する必要がある。やむをえず感受性植物を栽培する場合は本病に対する物理的防除法として、散水を伴う蒸気消毒法で本病菌の死滅が報告されていることから¹⁰⁾、これらを必ず実施するなどの対策も必要である。

最後に本試験で供試した代表菌株は農業生物資源ジェンバンクに寄託した。TOF9202株, TOF9206株, TOF9208株およびTOF9504株はそれぞれMAFF245306, MAFF245307, MAFF245308, MAFF245309として登録された。

引用文献

- 1) Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., Backhouse, D. Laboratory manual for *Fusarium* research. University of Sydney, Sydney, 1988. pp. 56-149
- 2) 北海道農業協同組合中央会・ホクレン農業協同組合連合会編. 北海道フラワーガイド その21. 北海道農業協同組合中央会・ホクレン農業協同組合連合会, 札幌, 2013. pp. 1-4.
- 3) 堀田治邦, 児玉不二雄. トルコギキョウ茎腐病を起こす *Fusarium avenaceum* について. 日植病報. 61, 646 (1995)
- 4) 堀田治邦, 児玉不二雄. キクに発生した赤かび病 (新称). 北日本病虫研報. 47, 75-77 (1996)
- 5) 岩田康広, 近藤則夫, 児玉不二雄. *Fusarium roseum* および *Fusarium oxysporum* によるトルコギキョウの萎ちよう症状について. 日植病報. 57, 123 (1991)
- 6) Leslie, J. F. and Summerell, B. A. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell, Iowa, 2006. pp. 1-388

- 7) Nelson, P. E., Toussoum, T. A., Marasas, W. F. O.
Fusarium species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania state University Press, Pennsylvania, 1983. pp. 80-83
- 8) 農研機構遺伝資源センター. 日本植物病名データベース.
http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php
- 9) 佐藤昭二, 後藤正夫, 土居養二. 植物病理学実験法.
講談社サイエンティフィク, 東京, 1983. p. 230.
- 10) 鈴木幹彦, 外側正之, 佐藤展之. 散水を伴う蒸気土
壌消毒がトルコギキョウの土壌伝染病菌に与える影響.
静岡農試報告. 48, 29-33 (2003)
- 11) 外側正之. CLA培養による*Fusarium*属菌の孢子形
成に及ぼす, カーネーション葉の滅菌方法, 品種・葉
令の影響. 日本菌学会報. 33, 385-393 (1992)
- 12) Turner, A. S., Lees, A. K., Rezanoor, H. N.,
Nicholson, P. Refinement of PCR-detection of
Fusarium avenaceum and evidence from DNA
marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium*
tricinctum. PlantPathology 47, 278-288 (1998)

Fusarium diseases on ornamental plants occurred in Hokkaido (1). - Lisianthus stem rot -

Harukuni HORITA^{*1}, and Fujio KODAMA^{*2}

Summary

A severe stem rot disease has been observed in the greenhouses-planted lisianthus in Hokkaido. Diseased plants showed pale brown stem discoloration, wilting, and death. White mycelia and pale orange sporodochia were also commonly observed on diseased stems. *Fusarium* isolates collected from diseased plants produced sporodochia on CLA. Macroconidia were long, slender, and thin-walled. The basal cell of macroconidia was notched or foot-shaped. No isolates produced chlamydospores. Growth at 25°C of all isolates on PDA were slow, and the criteria were similar to those of the reference isolate *F. avenaceum* T-16. The species-specific primers for *Fusarium avenaceum* yielded specific bands from DNA templates of the represented isolates from diseased lisianthus isolates. Pathogenicity tests were conducted in the greenhouse on lisianthus plants, cv. Azuma-no-nami by drops of a conidial suspension. All plants developed typical disease symptoms and *Fusarium* were reisolated from the plants. Based on the results of morphology, growth characteristics, banding pattern using species-specific primers, causal fungus was identified to *F. avenaceum*.

^{*1} Hokkaido Research Organization, Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan

E-mail: horita-harukuni@hro.or.jp

^{*2} Hokkaido Kitami Agricultural Experiment Station (present: Hokkaido Plant Protection Association, Sapporo, 060-0001 Japan)