

# *Plectosphaerella cucumerina* によるキク苗腐敗病の発生 および病原菌の生態について

佐藤 衛<sup>a)</sup>

農研機構 花き研究所

[〒305-8519 茨城県つくば市藤本 2-1]

## Cutting rot of chrysanthemum caused by *Plectosphaerella cucumerina* and its ecology

Mamoru SATOU<sup>a)</sup>

NARO Institute of Floricultural Sciences

### 1. 目的

キク属 (*Chrysanthemum*) はキク科 (*Compositae*) に属しており、30 以上の種を持つ大きなグループである。原産種はアジアから北西ヨーロッパまで分布している (Horst and Nelson, 1997)。中でもキク (*C. morifolium* Ramat.) は最も重要な栽培種であり、1 年生花きとして世界中で栽培されている。日本では主に観賞用として栽培され、花き類の中では生産出荷量は最も多い。キクには疫病、半身萎凋病、萎凋病、立枯病などの様々な糸状菌による立枯れ性病害が発生して生産阻害要因となっている。

近年、日本ではキク栽培の方法として、未発根のキクの挿し穂苗を直接土壤に挿す「直挿し法」が広く行われており (本田ら, 1996 ; 佐々木ら, 1996), これら直挿し用のキク苗の海外からの輸入が多くなっている。2008 年 9 月中旬、愛知県内でセルトレイで育苗中のキク (品種: '神馬 2 号') で生育障害が発生した。この苗はインドネシア産購入苗であり、挿し穂 10 日後も全く発根せず、穂の先端が黒変・腐敗していた。キク挿し穂において、本症状の記録は無く、新病害の可能性があると考え、病原菌の分離、培養、接種を試みた。また、合わせて、分離菌の分類・同定を行った。さらには、分離菌を既知の日本産の病原菌と比較検討を行うとともに、分離菌のキクにおける動態についても試験を行った。その結果、新病害であることが判明し (Satou et al., 2010), さらに農業生物資源ゲノムバンクに登録した供試菌株について諸特性を明らかにするとともに、本病の防除薬剤についても検討した (Satou et al., 2013)。本報告では主にそれらの成果をまとめて報告する。

---

a) (現所属) 農研機構 野菜花き研究部門 Institute of Vegetable and Floriculture Science, NARO  
[〒305-0852 茨城県つくば市藤本 2-1]

## 2. 材料および方法

### 1) キクからの分離・培養・接種

2008年9月、愛知県において生育障害が発生した海外産キク挿し穂（品種‘神馬2号’）は、挿し穂10日後も全く発根せず、穂の先端が黒変・腐敗していた（図1a）。この苗から常法により病原菌の分離を試みた。また、分離菌は単孢子分離菌株とし、1L当たり200gのジャガイモ煎汁に、20gのショ糖および寒天を加えて作成したジャガイモ煎汁ショ糖寒天培地（PSA）、同培地のショ糖の代わりに20gブドウ糖を加用したジャガイモ煎汁ブドウ糖寒天培地（PDA）あるいはジャガイモ煎汁ブドウ糖液体培地（PD）を用いて培養を行い、以下の試験に供試した。

生育温度：PSA培地に直径6mmの菌そうを置床し、5、10、15、20、25、30、35、40℃の暗黒下の恒温器内で培養し、1日当たりの菌糸生育を測定した。

接種試験：PSA培地で培養し分生子粘塊を滅菌水に懸濁し、 $10^7$  conidia/mlに調整し、接種源とした。これに、キク挿し穂‘神馬’を30分浸漬後、育苗用土を詰めたトレイに挿し、7~14日間25℃設定のガラス温室にて育苗した。

### 2) 分離菌の分類・同定

顕微鏡下で分離菌の形態等について観察、計測を行った。また、分離菌のゲノムDNAをWizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)により抽出し、Kageyama et al. (2003) に従い rDNA-ITS 領域を ITS1, ITS4 プライマー(White et al., 1990)を用いて PCR 増幅した。その後、増副産物について BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、塩基配列の解読を行った。配列データは、DDBJ/EMBL/GenBank databases に登録されている菌株との類似度を調べた。

### 3) 分離菌および同属菌の病原性

分離菌を PD 培地で 25℃、5~7 日間培養し、培養後は 5000×g で遠心分離し、集め、滅菌水に再懸濁し、 $1\sim 5\times 10^7$  conidia/ml に調整し、接種源とした。これに、キク挿し穂‘神馬’‘神馬 2 号’‘沖の白波’を 30 分間浸漬後、育苗用土を詰めたトレイに挿した。各品種とも無接種区を設けた。25℃、12 時間照明、湿度 100%の湿室で3週間育成した。病原性は次の通り評価した。4：挿し穂末端部が腐敗；3：挿し穂末端部全体が黒変；2：挿し穂末端部半分以上が黒変；1：挿し穂末端部半分未満の黒変；0：変色無し。試験は5反復行った。統計解析は JMP 10 (<http://www.jmp.com/japan/>)で行った。

本分離菌の他、ジーンバンクに登録されていた *Plectosphaerella* 属菌（ダイコン円形褐斑病菌：MAFF 238964、カボチャ白斑病菌：MAFF 238627）を接種に用いた。各菌とも、前述同様の方法で培養して接種源とし、‘神馬’に接種を行った。試験は2反復行った。病原性の評価、統計解析についても前述同様とした。

128 穴セルトレイに MAFF 712335 の分生子を滅菌土壌 1g あたり  $1\times 10^6$  conidia となるように混合した土を 128 穴トレイに詰め、健全‘神馬’の挿し穂を挿した。分生子を混合しない土のみを対

照区とした。MAFF 712335 の分生子懸濁液に漬けた後、挿し穂した区も設けた。各区 24 本挿し穂を使用し、温室条件下で管理した。試験は 2 反復で行った。発病の評価は前述に従った。

#### 4) キク苗腐敗病菌のキク体内での動態

発根したキク挿し穂の根の先端部を切り、MAFF 712335  $1\sim 5\times 10^7$  conidia/ml の分生子懸濁液に 30 分間漬けた後、滅菌土壌を詰めたプランター(L650×W220×H190 mm)に植え付けた。対照区では、根の先端を切っただけのキク挿し穂を植えた。1 週間後、脇芽が出やすいよう頂芽を折り取った。2~3 週間毎に発生してきた脇芽を摘み取り、試験材料とした。試験は 2009 年、2010 年の 2 回行った。

2009 年 7 月 9 日、27 日、8 月 20 日、9 月 17 日、感染区‘神馬’の採穂は 24、22、24、21 本、感染区‘沖の白波’は 28、24、29、26 本、それぞれ採穂した。2010 年 6 月 21 日、7 月 2 日、8 月 23 日、感染区‘神馬’は 18、28、17 本、感染区‘沖の白波’は 30、30、16 本、それぞれ採穂した。2009 年対照区‘神馬’は 26、-, 17、16 本、対照区‘沖の白波’は 21、-, 21、14 本、それぞれ採穂した。2010 年対照区‘神馬’は 22、26、17 本、対照区‘沖の白波’は 30、23、17 本それぞれ採穂した。

常法に従って各挿し穂における *P. cucumerina* の有無を確認するため、pH4 に調整した PDA に置床した。

#### 5) キク苗腐敗病菌の薬剤防除の可能性

Brantner and Windels (1998)、木曾(1994)、Matheron and Porchas (2000)に従って、キク腐敗苗分離菌株 MAFF 712335、MAFF 712336、MAFF 712337、MAFF 712338 の薬剤感受性を調査した。チオファネートメチル (トップジン M 70%WP、日本曹達、東京)、メタラキシル (リドミル 2%GR、シンジェンタジャパン、東京)、トルクロホスメチル (リゾレックス 5%WP、住友化学、東京)、キャプタン (オーソサイド 80%WP、アリストライフサイエンス、東京)、2,4,5,6-テトラクロロイソフタロニトリル (TPN) (ダコニール 40%WP、住友化学、東京)、ベノミル (ベンレート 50%WP、住友化学、東京)、マンコゼブ (ジマンダイセン 75%WP、ダウケミカル、東京) (表 1)。予め作製・溶解し 50℃としたものに最終濃度がそれぞれ 5~500 ppm となるように各薬剤を加え、プラスチックシャーレに流し込み、試験用平板とした。3 週間培養した菌そう寒天片 (直径 6mm) を薬剤添加平板に置床した (1 菌片/シャーレ、1 薬剤 1 菌株あたり 3 枚シャーレ)。薬剤無添加の PDA を対照区とした。25℃暗黒下で 5 日間培養後菌そう直径を計測し、対照区と比較した阻止率を計算した。50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>) を JMP 10 で算出した。

農薬の効果確認試験は次の通りに行った。挿し穂末端部を 70%チオファネートメチル、2%メタラキシル、50%トルクロホスメチル、80%キャプタン、40%TPN、50%ベノミルをそれぞれ粉衣し、MAFF 712335  $1\times 10^6$  conidia/土 1 g となるように調整した土を詰めたセルトレイに挿した。前述のとおり管理し、発病調査を行った。試験は 2 回行った。発病指数から防除価を算出した。

### 3. 結果

#### 1) キクからの分離・培養・接種

病斑部 (図 1a) からはクリーム色の菌叢で表面が粘質を呈する生育の比較的遅い菌が高率に分離された (図 1b). このうちの 1 菌株 (菌株名: 1-M) について詳細な試験を行った. 本菌の分生子懸濁液にキク健全挿し穂(神馬)を浸漬接種後, トレイで育苗したところ, しおれが目立ち, 挿し穂の切断面が黒~褐変したほか, 多くは発根するものの, 一部の挿し穂は発根しないなど, 原病徴とほぼ同様の症状を示した (図 1c). 挿し穂の黒変部からは接種菌が再分離され, 本菌が病原菌であることが確認された. 本菌は PSA 上で 5~ 35°C で生育し, 適温は 25°C であった. 25°C での菌糸生育速度は 3mm/日であった. 供試菌株 1-M を MAFF 712335 として, また, 他にも分離菌株 1-2, 1-3, 1-7 をそれぞれ MAFF 712336, MAFF 712337, MAFF 712338 として農業生物資源ゲノムバンクに登録した.

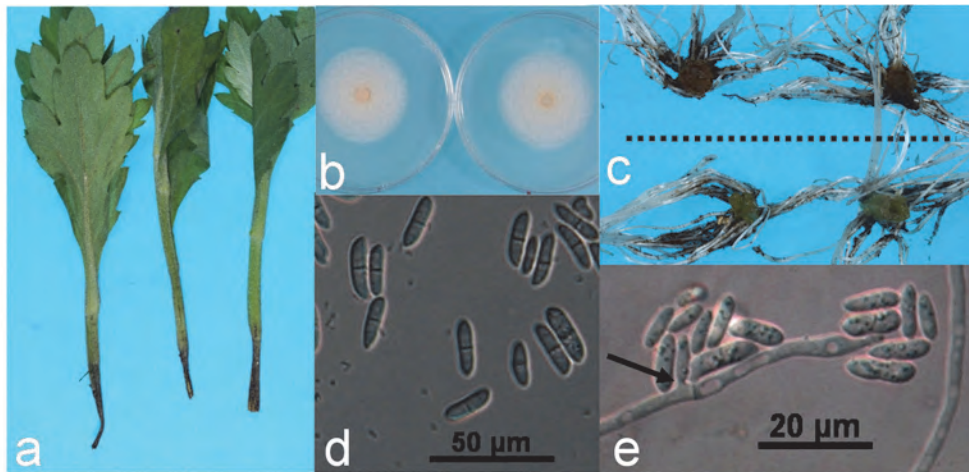


図 1. キクの病徴および分離菌株

a: キク挿し穂の病徴 (末端部が黒変), b: PDA 上での分離菌の菌叢 (左: 表面, 右: 裏面), c: 接種 14 日後の「神馬」の挿し穂先端部の黒変 (上段: 接種, 下段: 無接種), d: PDA 上での分生子, e: アデロフィアライド (矢印). (Satou et al., 2010 の Fig.1 を改変)

#### 2) 分離菌の分類・同定

分離菌株 1-M はアデロファイアライドを含むモノファイアライド (Gams, 1971) 先端に分生子を擬頭状に形成した (図 1d,e). 分生子は無色, 平滑, 紡錘形で中央 1 隔壁の 2 細胞が多く, 時に単細胞, 大きさは 2 細胞のものが平均  $13.5 \times 4.4 \mu\text{m}$ , 1 細胞のものが平均  $8.1 \times 2.4 \mu\text{m}$  であるなど, Sato et al. (2005), Palm et al. (1995), Seifert (1996) などの報告した *Plectosphaerella* 属菌と一致した (表 1). また, Carlucci et al. (2012), Usami et al. (2012, 2015), 廣岡ら (2016) は, ITS および 28S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域による *Plectosphaerella* 属菌の同定の検証を行っており, 既報の菌株が新種や未記載種に再同定されている. しかしながら, 本分離菌の rDNA-ITS 領域の塩基配列は *P. cucumerina* (KC756835 他) と 99.8% (466/467bp) 一致し, *Plectosphaerella cucumerina*

(Lindf.) W. Gams と同定された。塩基配列データは AB537556 として DDBJ に登録した。

キク挿し穂での腐敗症状は記録が無く新病害と考えられたため、*Plectosporium tabacinum* (*P. cucumerina*) による「キク苗腐敗病」(cutting rot of chrysanthemum) とした (Satou et al., 2010)。

表 1. 既知 *Plectosphaerella* 属菌とキク分離菌株との比較

菌株	分離源	分離地	PDA上での菌そう	菌糸生育 (mm/日 20°C)	フィアライド	分生子の大きさ (μm) および形態	
						1 細胞	2 細胞
FLS63 (Sato et al., 2005)	カボチャ	鹿児島	平滑で気中菌糸はまれ、 クリーム～鮭肉～淡褐色	2.6-4.0	Monophialide, adelophialide <sup>a)</sup>	4.0-9.0 × 1.6-2.4 楕円～長楕円	5.0-11.0 × 2.0-3.2 楕円～長楕円
RA1 (Sato et al., 2005)	ランキュラス	香川	平滑で気中菌糸はまれ、 クリーム～鮭肉～淡褐色	4.0-4.4	Monophialide, adelophialide	4.0-6.0 × 1.0-2.2 楕円～長楕円	5.5-11.0 × 1.2-2.5 楕円～長楕円
<i>P. cucumerina</i> (Palm et al., 1995)	-	-	灰～褐、ややオレンジ、 半透明で湿った感じ、気 中菌糸わずか	1.9-5.3	Monophialide, adelophialide	4.6-10.9(-13.6) × (1.8-)2.3-3.1 楕円	7.3-13.6 × (2.3-)2.7 -3.6 楕円
<i>P. cucumerina</i> (Seifert, 1996)	-	-	凸～平滑で気中菌糸はま れ、白～クリーム～鮭肉 色	2.1-5.6	Monophialide, adelophialideま れに polyphialide	6.0-12.0 × 2.0-3.0 楕円～長楕円	7.5-14.0 × 2.5-3.5 楕円～長楕円
1-M	キク	愛知 <sup>b)</sup>	湿った感じ、平滑で気中 菌糸はまれ、クリーム～ 鮭肉色	2.5	Monophialide, adelophialide	6-11.8 × 1.4-3.4 (平均 8.1 × 2.4) 紡錘～楕円	10.9-16.2 × 3.4-7.0 (平均 13.5 × 4.4) 紡錘～楕円

a) 図1参照.

b) インドネシアからの輸入.

(Satou et al., 2010のTable 1を改変)

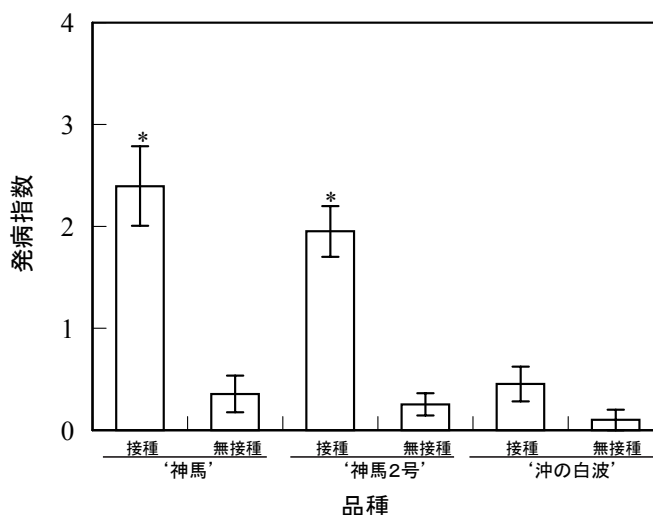
### 3) 分離菌および同属菌の病原性

キク苗腐敗病菌 *P. cucumerina* (1-M) は、‘神馬’、‘神馬 2 号’に感染・発病させた (図 2)。穂を菌体懸濁液に浸してから挿し穂した場合と菌体懸濁液を混和した土壤に挿し穂をした場合、いずれにおいても発病が認められた (図 3)。ダイコンおよびカボチャ由来の *Plectosphaerella* 属菌により、キクは発病した (図 4)。

図 2. *Plectosphaerella cucumerina* (1-M) のキク品種に対する病原性

図中の「\*」は、Wilcoxon rank sum test にて有意差あり ( $P < 0.05$ ) .

(Satou et al., 2013 の Fig.1 を改変)



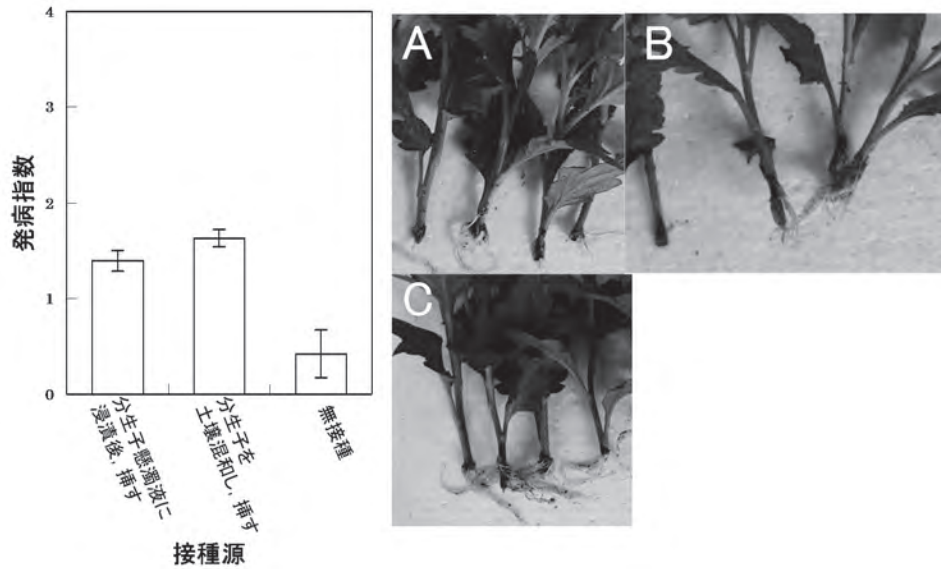


図3. *Plectosphaerella cucumerina* の接種方法の違いによるキク‘神馬’に対する病原性  
 A : 分生子懸濁液に浸漬後に挿す, B : 分生子を土壌混和した後に挿す, C : 無接種.  
 (Satou et al., 2013 の Fig.2 を改変)

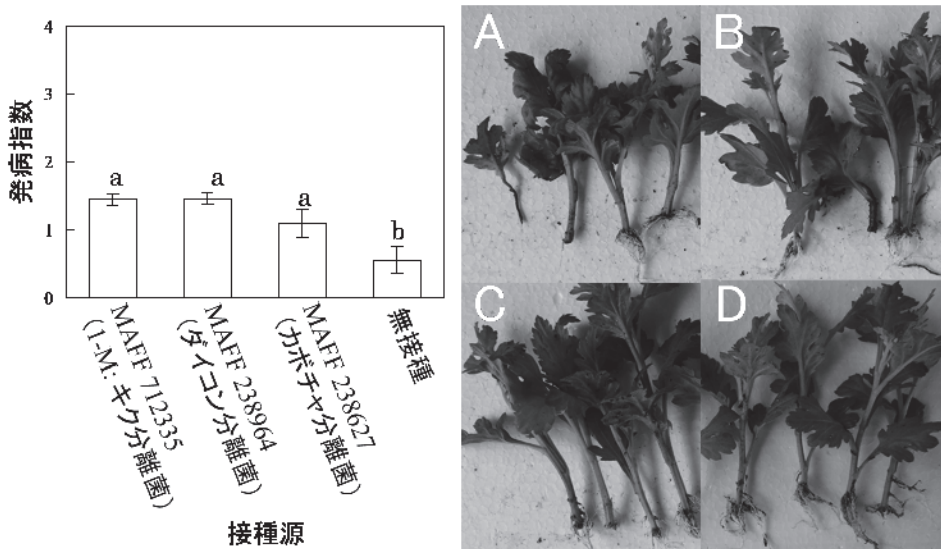


図4. *Plectosphaerella* 属菌のキク‘神馬’に対する病原性  
 A : MAFF 712335, B : MAFF 238964, C : MAFF 238627, D : 無接種, 図中のアルファベットが異なるものはSteel-Dwass 検定において有意差あり ( $P=0.05$ ).  
 (Satou et al., 2013 の Fig.3 を改変)

#### 4) キク苗腐敗病菌のキク体内での動態

あらかじめ本菌を接種した株より発生した脇芽から *P. cucumerina* が分離されることから, *P. cucumerina* は, 導管を通じてキク体内を移動すると考えられた (図5).

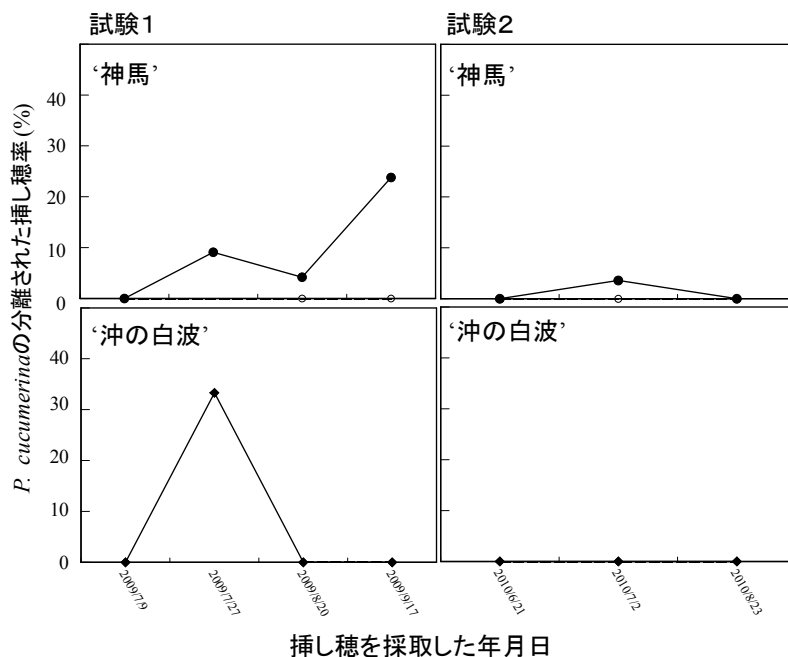


図 5. *Plectosphaerella cucumerina* を接種したキク 2 品種より発生した脇芽からの本菌の分離  
 左：2009 年，右：2010 年，●：*P. cucumerina* 接種区（神馬），○：対照無接種区（神馬），◆：*P. cucumerina* 接種区（沖の白波）◇：対照無接種区（沖の白波）.  
 (Satou et al., 2013 の Fig.4 を改変)

### 5) キク苗腐敗病菌の薬剤防除の可能性

キク挿し穂を用いた本病の防除効果試験においては，キャプタン，TPN，チオファネートメチルの効果が高かった（図 6）．50%効果濃度（EC<sub>50</sub>）はキャプタンおよび TPN の防除効果において，適用可能と考えられる薬剤の濃度が示された（表 2）．

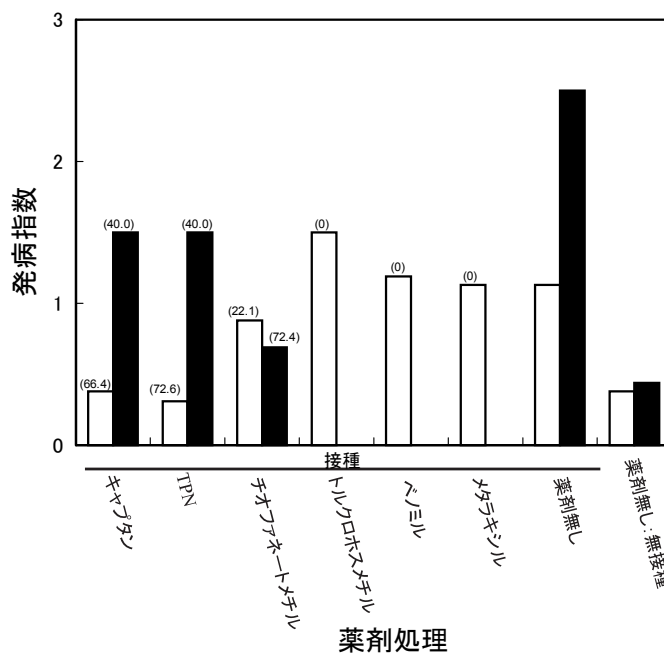


図 6. 各薬剤のキク苗腐敗病に対する防除効果  
 □ 試験 1, ■ 試験 2. ( ) 内の数値は各試験における，薬剤無処理に対する防除価.  
 (Satou et al., 2013 の Fig.5 を改変)

表 2. キク分離 *Plectosphaerella cucumerina* 各菌株の殺菌剤成分に対する 50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>)

MAFF 番号	菌糸生育抑制の50%効果濃度 (EC <sub>50</sub> , ppm)						
	キャプタン	TPN	チオファネート メチル	メタラキシル	トルクロホス メチル	ベノミル	マンコゼブ
712335	118.4 <sup>a</sup>	505.6	- <sup>b</sup>	-	-	>1000	>1000
712336	52.6	5.2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
712337	26.5	8.8	-	>1000	>1000	>1000	>1000
712338	45.3	34.1	-	-	>1000	>1000	>1000

<sup>a</sup> JMP 10 (<http://www.jmp.com/japan/>) により計算.

<sup>b</sup> 計算不能.

(Satou et al., 2013のTable 2を改変)

#### 4. 考察

感染穂が海外から日本に入ってきたのか、日本国内で感染発病したのかは明らかではないが、*P. cucumerina* によって発病することが明らかとなり、本病をキク苗腐敗病と命名した (Satou et al., 2010). 本病は、‘神馬 2 号’で発生し、品種比較では‘沖の白波’よりも‘神馬’、‘神馬 2 号’での発生率が高かった。日本では‘神馬’‘神馬 2 号’の栽培が多いため、本病に対する注意が必要である。

予め病原菌を混ぜた土に挿し穂した場合と、挿し穂を菌体懸濁液に浸漬した後に挿した場合のいずれでも発病したことから、挿し穂による伝染、土壌での伝染いずれも可能性があると考えられた。また、土壌伝染の可能性を示す結果として、*Plectosphaerella* 属菌と同定されているダイコン円形褐斑病菌 (MAFF 238964) (佐藤, 2008), カボチャ白斑病菌 (MAFF 238627) (Sato et al., 2005) ともキク苗腐敗病菌と同様にキクに対して病原性を示すことが明らかとなった。また、あらかじめ *P. cucumerina* を接種した植物体から得られた挿し穂より本菌が分離されたことから、挿し穂による伝染が示唆された。海外からの侵入、在来菌のいずれもキク苗腐敗病の原因となることが考えられることから、十分な注意が必要である (Satou et al., 2013)。

本報告の結論をまとめると次の通りとなる。(1) *P. cucumerina* はキクの重要品種に感染、発病させる (2) 挿し穂、土壌いずれでも伝染する (3) 他植物から分離した *Plectosphaerella* 属菌はキクを発病させる可能性がある (4) *P. cucumerina* はキク体内を移行する (5) キャプタン, TPN, チオファネートメチルは本病の抑制に効果がある。

本病の発生を抑制するためには、変色等罹病の疑われる挿し穂は使用しない、発病の疑われる親株から挿し穂は採取しない等の他、圃場衛生をはじめ、土壌消毒にも気を配る必要がある。

#### 5. 謝辞

本研究は、元農研機構花き研究所の築尾嘉章氏、農研機構野菜花き研究部門の松下陽介氏および住友克彦氏との共同研究として実施した。ここに記して深謝の意を表す。



## 6. 参考文献

- Brantner, J. R. and Windels, C. E. (1998). Variability in sensitivity to metalaxyl *in vitro*, pathogenicity, and control of *Pythium* spp. on sugar beet. *Plant Dis.* 82: 896–899.
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Santos, J. and Phillips, A. J. (2012). *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia* 28: 34–48.
- Gams, W. (1971). *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart.
- 廣岡裕吏・竹内 純・柴田 葵・堀江博道・佐藤豊三 (2016). 我が国における植物寄生性 *Plectosphaerella* 様菌類の分子系統解析. *日植病報* 82: 26. (講要)
- 本田孝志・藤田政良・上島良純 (1996). スプレーギクにおける直挿し栽培と砂上げ苗栽培の生育, 開花. *園学雑* 65 別 1: 448–449. (講要)
- Horst, R. K. and Nelson, P. E. (1997). *Compendium of chrysanthemum disease*. 62p., APS Press. St. Paul MN, USA.
- Kageyama, K., Komatsu, T. and Suga, H. (2003). Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 153–160.
- 木曾 皓 (1994). 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル (6) 野菜類灰色かび病菌. *植物防疫* 48: 42–46.
- Matheron, M. E. and Porchas, M. (2000). Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-Al, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. *Plant Dis.* 84: 454–458.
- Palm, M. E., Gams, W. and Nirenberg, H. I. (1995). *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. *Mycologia* 87: 397–406.
- 佐々木厚・山田有子・小野寺英一・佐藤泰征 (1996). キクの直挿し栽培法. *東北農業研究* 49: 229–230.
- Sato, T., Inaba, T., Mori, M., Watanabe, K., Tomioka, K. and Hamaya, E. (2005). *Plectosporium* blight of pumpkin and ranunculus caused by *Plectosporium tabacinum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 127–132.
- 佐藤豊三 (2008). 近年国内で各種病害を起こすことが明らかとなった不完全糸状菌 *Plectosporium tabacinum*. *植物防疫* 62: 490–495.
- Satou, M., Chikuo, Y., Matsushita, Y. and Sumitomo, K. (2010). Cutting rot of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) caused by *Plectosporium tabacinum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 76: 225–228.
- Satou, M., Sumitomo, K. and Chikuo, Y. (2013). Cultivar resistance, infection sources, and effective fungicides identified to control Chrysanthemum cutting rot caused by *Plectosporium tabacinum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 168–174.

- Seifert, K. A. (1996). *Plectosporium tabacinum*. Fungi Can No. 333. Can. J. Plant Pathol. 18: 309–311.
- Usami, T., Morii, S., Matsubara, C. and Amemiya, Y. (2012). Plectosphaerella rot of lettuce, coriander, and chervil caused by *Plectosphaerella pauciseptata*. J. Gen. Plant Pathol. 78: 368–371.
- Usami, T., Matsubara, C., Kashiwazaki, Y., Shito, T., Kanegae, Y. and Ebihara, Y. (2015). Leaf and spathe spot of calla lily caused by an undescribed species of *Plectosphaerella*. J. Gen. Plant Pathol. 81: 291–296.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J. and White, T.J. (eds) PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.