

熊本県内のトルコギキョウ立枯れ発症株から分離される *Fusarium* 属菌の分布と来歴の異なる *F. oxysporum* 分離菌株の 病原性の差異

Distribution of *Fusarium* spp. Isolated from Wilted Lisianthus Plants and Differences in Pathogenicity among Isolates of *F. oxysporum* in Kumamoto Prefecture, Japan

矢北舞子・川勝恭子*
(農産園芸研究所)

Maiko YAKITA and Kyoko KAWAKATSU
(Agricultural Horticultural Research Institute)

要 約

熊本県の主要切り花であるトルコギキョウでは、県内全域で立枯れ症が問題となっている。本障害は定植以降に株全体が萎凋後、倒伏しないまま枯死に至ることが特徴であり、他道県では土壌病害（立枯病、茎腐病）の病原体である *Fusarium* 属菌の関与が疑われている。しかし、熊本県内に存在する *Fusarium* 属菌の構成種と立枯れ発症との関係性は明らかではない。そこで、熊本県内のトルコギキョウ立枯れ症発症株からの *Fusarium* 属菌検出の有無、種構成および分布を検討した。また、分離頻度が高く、分布域が広がった種の病原性を検証した。すなわち、県内7地域23ほ場より立枯れ症発症トルコギキョウ69株を採集し菌の分離を行い、形態観察ならびに塩基配列解析により同定した結果、複数種の *Fusarium* 属菌が検出された。特に、*F. oxysporum* の検出頻度が最も高く、7地域のすべてから分離された。本種が分離されたほ場の割合は全体の約8割を占め、熊本県内のトルコギキョウ立枯れ症発生ほ場に広く分布していることが明らかとなった。さらに、分離ほ場の異なる *F. oxysporum* について病原性を評価した結果、病原性を示した12菌株の発病率は40.0%~100.0%、発病度は12.5~45.0と菌株間で発病程度に差があった。また、7地域のすべての菌株が病原性を有することが確認された。以上のことから、熊本県で発生しているトルコギキョウの立枯れ症は、*F. oxysporum* による立枯病である可能性が高いことが示唆された。

キーワード：トルコギキョウ、フザリウム、トルコギキョウ立枯病

I 緒言

トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) は、リンドウ科に属するアメリカ大陸原産の一年生植物である。本種の切り花は花持ちが良く、品種開発が盛んで花の色や形のバリエーションが豊富なことから、幅広い用途で消費され、国内の出荷量は2023年産で8,430万本となっている¹⁰⁾。特に、熊本県の2023年産作付面積は48.8ha（全国1位）、出荷量は1,030万本（全国2位）で¹⁰⁾、県内各地域に産地が形成されており、トルコギキョウは本県における重要な振興品目として位置付けられている。

しかし、近年、県内全域で「立枯れ症」と呼称される障害が品種や作型を問わず継続的に発生し、その対策が

生産上の大きな課題となっている。本障害の特徴は、下位葉または株全体が萎凋した後に倒伏しないまま枯死に至るもので、その発生様相や症状の進展過程は既知の土壌病害に類似する（第1図）。現在、国内のトルコギキョウでは、青枯病、萎凋細菌病、青かび根腐病、立枯病、茎腐病等、11種類の土壌病害が報告されている³⁾。既報^{1, 2, 6, 16, 17)}によると、1道4県において本県での立枯れ症と類似する障害の発症個体から *Fusarium* 属菌 (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. avenaceum*) が分離されている。そのため、熊本県で発生している立枯れ症も同属菌による土壌病害の可能性が疑われるが、県内におけるこれら土壌病害の発生状況や *Fusarium* 属菌の地理的分布を詳細に調査した例はない。

*農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門

そこで、本研究では、県内で広く発生しているトルコギキョウ立枯れ症が *Fusarium* 属菌の関与によるものか検証するため、複数地域の発症個体から同属菌を分離・同定し、種の構成およびそれらの分布を明らかにした。さらに、最も分離頻度が高く、分布域が広い優占種については、来歴の異なる複数菌株を用いて接種試験による病原性の菌株間差異を検討した。



第1図 トルコギキョウ栽培ほ場における全体で発生した「立枯れ症」(A)、株の萎凋(B-1)および枯死(B-2)

II 材料および方法

1 立枯れ症発症株からの *Fusarium* 属菌の分離

2021年4月から5月にかけて、熊本県内7地域の23ほ場から茎葉の萎凋や黄化症状を呈しているトルコギキョウを採集した。採集は1ほ場当たり3品種以内、各品種7株を上限とし、生育ステージに関係なく根を含む植物全体を採取し、25品種から計69株を得た(第1表、一部データ省略)。採集した株は個別にポリエチレン袋に入れ、菌の分離に供するまで冷蔵庫内(5℃)で保管した。

植物体からの *Fusarium* 属菌の分離は、同属菌の選択培地である *Quintozene* 試薬を添加した駒田培地⁴⁾もしくは *Fo-G2* 培地⁹⁾ を用い、安永ら¹⁷⁾ の方法に従って以下の手順で実施した。まず、採集した株の茎を地際部から上方に約5cmの部分切り出し、その切片の表面全体に70%エタノールを噴霧後、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素1%)に5分間浸漬して表面殺菌した。その後、切片を滅菌水で3回洗浄し、紙ウェスで表面の水分を除

去し、地際から長さ5~10mmの部位で横に切断し、さらに縦に2等分し、縦断面が培地に接するように選択培地の平板上に置床した。25℃、暗黒下で約7日間培養し、生育してきた菌叢を白金耳でかき取って滅菌水中に回収し、その希釈液(10~1,000倍)を駒田培地平板に塗抹した。塗抹後、25℃、暗黒下で約7日間培養し、出現した単一コロニーを釣菌して *Fusarium* 属菌を分離した。植物体1株当たり最大3菌株を分離し、*Synthetic low Nutrient Agar* (SNA)⁸⁾ の斜面培地で保存した(25℃、暗黒下)。

第1表 採集したトルコギキョウ立枯れ症株の品種名および株数

地域名(地域No.)	ほ場No.	品種名	株数	
熊本(1)	1-1	不明	3	
	1-2	セレブクリスタル	1	
	1-3	セレブクリスタル セレブイエロー	2	
上益城(3)	3-1	ボン・ボヤージュスイートピンク	2	
菊池(4)	4-1	ラズリーブルーフラッシュ ボン・ボヤージュピンク	1	
	4-2	レイナホワイト	2	
	4-3	プライムホワイト	3	
阿蘇(7)	7-1	モヒート	2	
	7-2	ミンクパッション	2	
	7-3	クラリスライトピンク	2	
	7-4	プリマラベンダー	2	
	7-5	マキアライトピンク	2	
	7-6	サルファ	2	
	7-7	セレブリッチホワイト	2	
八代(8)	8-1	セレブプリティー セレブリッチホワイト 不明	2 1 6	
	8-2	セレブグレープ セレブオーキッド ジュリアスライトピンク	2 2 2	
	球磨(10)	10-1	ロジーナラベンダー	1
		10-2	ボン・ボヤージュスイートピンク ジジ	1 1
	10-3	マキアピンク セレブオーキッド	2 1	
	10-4	ジュリアスブルー セレブクイーン	1 1	
天草(11)	11-1	セレブガーネット セレブクリスタル セレブグレープ	2 2 3	
	11-2	セレブリッチホワイト セレブガーネット	2 2	
	11-3	セレブモアピンク セレブクリスタル	2 2	

2 分離菌株の同定

全分離菌株について、培養性状および菌体の形態的特徴を達観で調査し、種を推定した。また、各植物個体からの1菌株については、Histone H3領域の塩基配列を解

析して種を同定した。同一個体から分離した他の菌株が同定した菌株と同様の培養性状と形態を呈している場合は、両者を同種と見なした。

1) 培養性状と菌体の形態

駒田ら⁵⁾の方法に従い、*Fusarium* 属菌の培養性状と特徴的な器官の形態を顕鏡により既知種と比較した。すなわち、Potato Dextrose Agar (PDA) 平板培養により表裏両面の菌叢色を、滅菌ろ紙片を置いた SNA 平板培養により気生分生子の特徴を、さらに両培地上での厚膜胞子形成の有無とその特徴(単生/連鎖, 末端生/間生)を第2表に基づき調査した。それぞれ 25°C, 暗黒下で培養し、植菌 7~8 日後に菌叢色を肉眼観察し、器官の形態は生物顕微鏡(倍率 100~400)で観察した。

2) 塩基配列による遺伝子解析および同定

安永ら¹⁷⁾の方法に従い Histone H3 領域の塩基配列を決定し、NCBI (National Center For Biotechnology Information) の登録配列との相同性を検索した。菌株は、採集した植物個体 69 株由来から各 1 菌株を選定し、さらに同一個体由来の形態が異なる 3 菌株を追加し合計 72 菌株を供試した。目的遺伝子 (Histone H3 領域) の増幅にはプライマー H3F1 (5'-TGGCAAGGCCCTCGCAAGC-3') と H3-1b (5'-GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT-3') を用いた^{11, 15)}。塩基配列の相同性検索では、95%以上の相同性を示したのものについて同種として判定した。

3 病原性の検定

最も分離頻度が高かった種 (*F. oxysporum*) について、接種試験による病原性の検定を行った。接種には異なるほ場由来の 15 菌株を供試し、検定植物には *F. oxysporum* に対して抵抗性弱の報告¹⁴⁾がある「ボレロホワイト」(株)ミヨシ)を使用し、抽苔し本葉 4~5 対に生育した苗を供試した。培土は「MKK 花用セル培土」(南九州

化学工業(株))を使用した。接種源は bud cell (出芽菌体)懸濁液とし、その調製は、Onozaki et al.¹²⁾の方法に準じて以下の手順で行った。駒田培地⁴⁾の平板で7日間(25°C, 暗黒下)培養した供試菌株の菌叢を培地ごと約 4 cm²に切り取り、Potato Sucrose (PS) 液体培地に移植して暗黒下で7日間振とう培養した(25°C, 150rpm)。培養後、培養液は2重の「キムワイプ」(日本製紙クレシア(株))でろ過して菌糸片を取り除き、ろ液を遠心分離(2°C, 5,000rpm, 15分間)して沈殿から bud cell を回収した。bud cell 沈殿を滅菌水で希釈し、所定の濃度に調整した。菌数の計測にはトーマ型血球計算盤を使用した。

接種は、2021年10月6日に1菌株当たり検定植物10株の根に対して有傷で行った。すなわち、苗の根の先端から上方約4分の1までをハサミでせん除し、培土を充填した直径60mmの鉢に移植した後、調整した bud cell 懸濁液(1.0×10⁷個/ml)を1株当たり1ml量株元にかん注接種した。接種後は、60鉢を1つのばんじゅうに配置し(反復なし)、自然光型人工気象室内(6:00~7:00;23°C, 7:00~18:00;27°C, 18:00~19:00;23°C, 19:00~6:00;17°C)で底面給水により管理した。接種陰性対照として、滅菌水を同様にかん注した。接種後は、佐藤・福田¹³⁾の方法に従い、1週間毎に発病の有無および程度を下記の基準(発病指数)により調査し、次式により発病株率と発病度を算出した。発病株率=発病株数/調査株数×100、発病度 Σ = {(発病指数別株数×発病指数) / (調査株数×4)} × 100。なお、発病指数は、「0:無発病, 1:下位葉~中位葉の萎れまたは生育不良, 2:上位葉まで萎れ, 3:株全体が青枯れまたは全身萎凋, 4:枯死」とした。統計処理は、株毎の発病指数(0~4)について、Kruskal-Wallis 検定で分散分析後、Steel-Dwass 法の多重比較検定を行った。

第2表 *Fusarium* 属菌種の分類基準とした培養性状と形成器官の特徴(駒田ら⁵⁾を改編)

菌種	PDA培地上での気中菌糸色または菌叢色	SNA培地上での気生分生子の特徴	厚膜胞子の特徴
<i>F. oxysporum</i>	気中菌糸色: 白~紫色	短い分生子柄上のモノ・フィアライドから擬頭状に形成	単生, 塊にならない
<i>F. solani</i>	菌叢色: 白~黄白~淡褐色~灰緑色分生子の形成に伴い, 黄白色の分生子座, 時には青緑色の菌糸も存在	長い気生分生子柄上のモノ・フィアライドから擬頭状に形成	単生あるいは連鎖
<i>F. avenaceum</i>	気中菌糸色: 白~淡紅色~橙紅赤色 菌叢色: 赤色系	基部にはフットあり 培養下では, 細く分枝した分生子座性分生子柄上, あるいは菌糸状に直接生じた徳利型のフィアライドから連続的に押し出され, 培地表面上にオレンジ色の粘塊を作る	形成しない
<i>F. proliferatum</i>	-	ポリ・フィアライドが高頻度に生じ, 開口部は5~6個程度まで	形成しない
<i>F. fujikuroi</i>	-	ポリ・フィアライドがまばらに生じ開口部は2~3個まで	形成しない

III 結果

1 立枯れ症発症株からの *Fusarium* 属菌の検出

熊本県内のトルコギキョウ栽培ほ場から採集した 69 株の立枯れ症発症株のうち、65 株 (95.6%) は茎内の維管束組織が褐変していた (1 株は未確認). このうち 63 株 (96.9%) から *Fusarium* 属菌が分離され、3 株 (4.6%) の茎内からは細菌泥の流出も認められた. 維管束の褐変が観察されなかった 2 株のうち、*Fusarium* 属菌が分離されたのは 1 株であった. 調査した 23 ほ場のうち 22 ほ場から *Fusarium* 属菌が検出され、発症株から同属菌が検出されなかったのは阿蘇地域の 1 ほ場のみであった (第 2 図, 第 3 表).

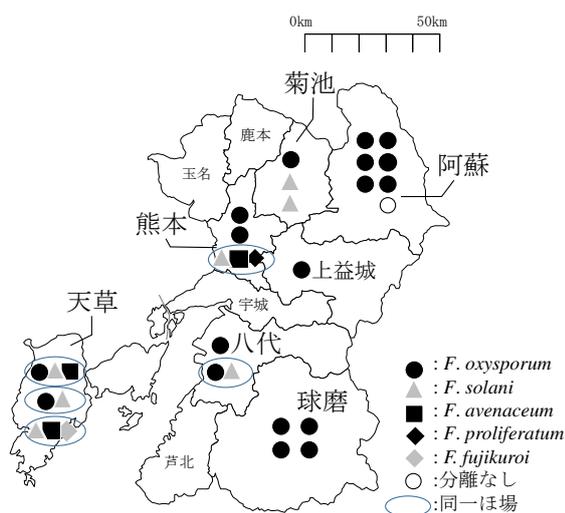
2 分離 *Fusarium* 属菌の種

分離した *Fusarium* 属菌 183 菌株の培養性状および塩基配列による同定結果を第 3 表に示した. PDA 平板上の培養色調は、表裏両面とも白色または白~紫色を示すものが多かったが、同一植物個体由来の菌株間でやや異なるものもあった. また、厚膜胞子を形成しなかった菌株も多く見られ、22 ほ場中 7 ほ場 (31.8%) 由来の菌株で観察されなかった. 分生子柄長は、PDA 上では不明瞭な菌株が多く、SNA 上での観察結果と一致しないものもあった. 一方、SNA 上での分生子柄長は短い菌株が 134 株 (73.2%), 長い菌株が 11 株 (8.2%), 長短両方観察される菌株が 25 株 (13.7%), 10 菌株 (5.5%) は確認不能で

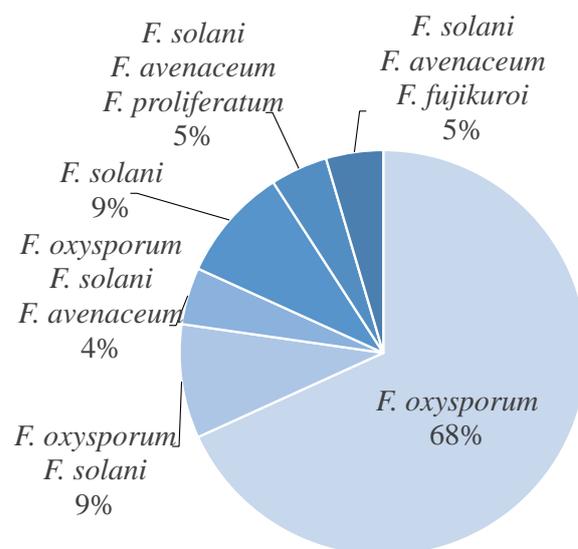
あった.

第 2 表に基づいた *F. oxysporum* および *F. solani* の形成器官の特徴判別結果と塩基解析の結果とは 79.7% が一致した (*F. oxysporum* 81.1%, *F. solani* 72.7%, データ省略). 一方、Histone H3 領域の塩基配列を解析した結果では、72 菌株のうち 46 菌株 (63.9%) が *F. oxysporum*, 19 菌株 (26.4%) が *F. solani*, ならびに 5 菌株 (6.9%) が *F. avenaceum* と同定された. *F. oxysporum* はすべてが発症した各植物から単独検出されたが、*F. solani* と *F. avenaceum* は同一植物個体からの検出が 1 例あった. この他、トルコギキョウの病原として記載がない³⁾ *F. proliferatum* が *F. solani* と同個体から、また、*F. fujikuroi* が単独で検出された植物個体が各々 1 例認められた.

供試 72 菌株における Histone H3 領域の相同性解析結果は、培養上の気中菌糸色または菌叢色および厚膜胞子の特徴 (第 2 表) と矛盾しなかった. このため、遺伝子解析により同定した菌株と同一植物個体由来かつ形態が同様の菌株は、同一種であると判定し、分離 183 菌株の菌種構成をほ場別に整理した. その結果、*F. oxysporum* を分離したほ場が 22 ほ場中 18 ほ場 (81.8%) と最も多く、全 7 地域に本種の生息が確認された. また、*F. solani* は 4 地域で計 7 ほ場 (31.8%), *F. avenaceum* は 2 地域で計 3 ほ場 (13.6%) に存在していた. このうち 5 ほ場 (22.7%) では、複数の種が検出された (第 2 図, 第 3 表).



第 2 図 熊本県におけるトルコギキョウ立枯れ症株から分離された *Fusarium* 属菌種とほ場の地域分布



第 3 図 トルコギキョウ立枯れ症株から分離された *Fusarium* 属菌のほ場ごとの構成種とほ場の割合 (n = 22)

第3表 熊本県内のトルコギキョウ立枯れ症株から分離された *Fusarium* 属菌の同定結果

採集地域	ほ場 No.	導管褐変 ^{a)}	細菌泥流出 ^{a)}	菌糸発生 ^{a)}	菌株No.	同定結果	PDA培地表面着色 ^{b)}	PDA培地裏面着色 ^{b)}	厚膜胞子 ^{a, c)}	分生子柄長等の特徴 ^{a, b)}		塩基配列解析の有無 ^{a)}		
										PDA培地	SNA培地			
熊本	1-1	○	×	○	01-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	単生	×	短	×		
					01-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	頂単	×	短	○		
					01-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~赤	頂単	×	短	×		
		1-2	○	×	○	01-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	頂単	×	短	○	
						01-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	頂単	×	短	×	
						01-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	頂単	×	短	×	
	1-3		○	×	○	01-3-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	頂単	×	短	○	
						01-3-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	頂単	×	短	×	
						01-3-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	頂単	×	短	×	
		1-5	○	-	○	01-4-1	<i>F. oxysporum</i>	白~薄赤	白	頂単	×	短	○	
						01-4-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	頂単	×	短	×	
						01-4-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	頂単	×	短	×	
	01-5-1-1					<i>F. solani</i>	白	白	頂連, 間連	×	長	×		
	01-5-1-2					<i>F. solani</i>	白	白	頂単, 間単, 頂連	×	長	○		
	01-5-1-3					<i>F. proliferatum</i>	白~赤	白~赤	×	×	長, 短	○		
	1-6		○	×	○	01-5-2-1	<i>F. avenaceum</i>	白~橙	茶	×	×	大型分生子あり	○	
						01-5-2-2	<i>F. avenaceum</i>	白~橙	茶	×	×	大型分生子あり	×	
						01-5-2-3	<i>F. avenaceum</i>	白~橙	茶	×	×	大型分生子あり	×	
			1-7	○	-	○	01-6-1-1	<i>F. solani</i>	白	白~茶	頂単, 頂連	×	長, 短	○
							01-6-1-2	<i>F. solani</i>	白~紫	白~紫	頂単, 頂連	長, 短	長, 短	×
							01-6-1-3	<i>F. solani</i>	白~紫	白~紫	頂単, 頂連	短	長, 短	○
	1-8	○		○	○	01-6-2-1	<i>F. proliferatum</i>	白~紫	紫	×	×	長, 短	○	
						01-6-2-2	<i>F. proliferatum</i>	白~紫	白~紫	×	短	長, 短	×	
						01-6-2-3	<i>F. proliferatum</i>	白~紫	白~紫	×	短	長, 短	×	
上益城		3-1	○	×	○	03-1-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	×	短	○	
						03-1-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	×	短	×	
						03-1-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	×	短	×	
	3-2		○	×	○	03-1-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	×	短	○	
						03-1-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	×	短	×	
						03-1-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	×	短	×	
		4-1	○	×	×	-	菌糸が発生せず	-	-	-	-	-	-	
						04-2-1	<i>F. solani</i>	白	白	頂連	短	長, 短	○	
						04-2-2	<i>F. solani</i>	白	白	×	短	長, 短	×	
	菊池		4-2	○	×	○	04-2-3	<i>F. solani</i>	白	白	×	短	長, 短	×
							04-3-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	○
							04-3-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	×	短	短	×
4-3		○		×	○	04-3-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	×	短	短	×	
						04-3-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	短	短	○	
						04-3-2-2	<i>F. oxysporum</i>	紫	白~紫	×	短	短	×	
		4-4	○	×	○	04-3-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	紫	×	短	短	×	
						04-4-1	<i>F. solani</i>	白	黄	×	短	長, 短	○	
						04-4-2	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	長, 短	×	
4-5			○	×	○	04-4-3	<i>F. solani</i>	白	白	×	短	長	×	
						04-5-1	<i>F. solani</i>	白~黄	黄	×	×	長	○	
						04-5-2	<i>F. solani</i>	白~黄	黄	×	×	長	×	
	4-6	×	×	×	04-5-3	<i>F. solani</i>	白~黄	黄	×	短	長, 短	×		
					-	菌糸が発生せず	-	-	-	-	-	-		
					07-2-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	○		
7-1		○	×	○	07-2-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	頂単	短	短	×		
					07-2-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×		
					07-2-2-1	<i>F. oxysporum</i>	紫	白~紫	頂単	短	短	○		
	07-2-2-2				<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	短	短	×			
	07-2-2-3				<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	間単	短	短	×			
	07-3-1-1				<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	○			
	7-2	○	×	○	07-3-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	長, 短	短	×		
					07-3-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	短	短	×		
					07-3-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	短	短	○		
		7-3	○	×	○	07-3-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	短	短	×	
						07-4-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	○	
						07-4-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	×	
7-4	○		×	○	07-4-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	短	短	×		
					07-4-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	○		
					07-4-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	頂単	短	短	×		
	7-5	○	×	×	07-4-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×		
					-	菌糸が発生せず	-	-	-	-	-	-		
					-	菌糸が発生せず	-	-	-	-	-	-		
7-6		○	×	○	07-6-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	間単	短	短	×		
					07-6-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	長, 短	短	○		
					07-6-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×		
	7-7	○	×	○	07-6-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×		
					07-6-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	○		
					07-6-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×		
7-8		○	×	○	07-7-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白~赤	白~赤	×	短	短	×		
					07-7-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	短	短	○		
					07-7-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	×		
	7-9	○	×	×	-	菌糸が発生せず	-	-	-	-	-	-		
					07-8-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	○		
					07-8-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	×		
7-10		○	×	○	07-8-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	×		
					07-8-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	○		
					07-8-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×		
	7-11	○	×	○	07-8-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	×		

熊本県農業研究センター研究報告 第32号

採集地域	ほ場 No.	導管 褐変 ^{a)}	細菌泥 流出 ^{a)}	菌糸 発生 ^{a)}	菌株No.	同定結果	PDA培地 表面着色 ^{b)}	PDA培地 裏面着色 ^{b)}	厚膜孢子 ^{a,c)}	分生子柄長等の特徴 ^{a,b)}		塩基配列 解析の有無 ^{a)}
										PDA培地	SNA培地	
八代	8-1	○	×	○	08-1-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白	頂単, 間単	×	短	○
					08-1-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~クリーム	間単	×	短	×
					08-1-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~クリーム	頂単	×	短	×
					08-1-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~クリーム	頂単	×	短	○
					08-1-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~クリーム	頂単	×	短	×
					08-1-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白~濃紫	白~クリーム	頂単	×	短	×
					08-2-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	頂単	×	短	○
					08-2-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	クリーム	頂単	×	短	×
					08-2-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	クリーム	頂単	×	短	×
					08-2-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	頂単	×	短	○
	8-2	○	×	○	08-2-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白~薄赤	白~クリーム	頂単, 間単	×	短	×
					08-2-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白~薄赤	白	間単	×	短	×
					08-3-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	頂単	×	短	○
					08-3-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~クリーム	頂単	×	短	×
					08-3-3	<i>F. oxysporum</i>	白~薄赤	白~クリーム	頂単	×	短	×
					08-4-1	<i>F. oxysporum</i>	白~薄赤	白~クリーム	頂単, 間単	×	短	○
					08-4-2	<i>F. oxysporum</i>	白~薄赤	白~クリーム	頂単	×	短	×
					08-4-3	<i>F. oxysporum</i>	白~薄赤	クリーム	頂単	×	短	×
					08-5-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	頂単, 間単	×	短	○
					08-5-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	頂単	×	短	×
	8-3	○	×	○	08-5-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	頂単	×	短	×
					08-6-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	頂単	×	短	○
					08-6-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白~クリーム	頂単, 間単	×	短	×
					08-6-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~クリーム	頂単	×	短	×
					08-7-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白~クリーム	頂単	×	短	○
					08-7-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~赤	頂単	×	短	×
					08-7-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	間単	×	短	×
					08-8-1-1	<i>F. solani</i>	白	白	頂単	×	長, 短	○
					08-8-1-2	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	短	○
					08-8-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	頂単	×	短	○
	8-4	○	×	○	08-9-1-1	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	長, 短	○
					08-9-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	×	短	○
					08-9-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	×	短	○
					08-9-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	×	短	×
					08-10-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	×	短	○
					08-10-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	×	短	×
					08-10-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	×	短	×
					08-10-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	×	短	○
					08-10-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	頂単	×	短	×
					08-10-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	×	短	×
10-1	○	×	○	10-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	○	
				10-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	長, 短	○	
				10-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	長, 短	×	
				10-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	頂単	×	長	○	
				10-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	長, 短	長	×	
				10-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	長	×	
				10-3-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	長	○	
				10-3-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	長	×	
				10-3-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	長	×	
				10-4-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	長, 短	○	
10-2	○	×	○	10-4-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	×	×	
				10-4-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白~赤	×	短	×	×	
				10-4-2-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	○	
				10-4-2-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	×	短	×	
				10-4-2-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	×	短	×	
				10-5-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	○	
				10-5-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×	
				10-5-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×	
				10-6-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	○	
				10-6-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×	
10-3	○	×	○	10-6-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	短	短	×	
				10-7-1	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	紫	×	短	短	○	
				10-7-2	<i>F. oxysporum</i>	白~紫	白~紫	×	短	短	×	
				10-7-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白~紫	×	短	短	×	
				11-1-1-1	<i>F. avenaceum</i>	白~橙	茶	×	×	×	○	
				11-1-1-2	<i>F. avenaceum</i>	白~橙	茶	×	×	×	×	
				11-1-1-3	<i>F. avenaceum</i>	白~赤	茶	×	×	×	×	
				11-1-2-1	<i>F. solani</i>	白	黄	×	×	短	○	
				11-1-2-2	<i>F. solani</i>	白	黄	×	×	短	×	
				11-1-2-3	<i>F. solani</i>	白	白~黄	×	×	短	×	
11-1	○	×	○	11-2-1-1	<i>F. avenaceum</i>	茶	茶	×	×	×	○	
				11-2-1-2	<i>F. avenaceum</i>	茶	茶	×	×	×	×	
				11-2-1-3	<i>F. avenaceum</i>	茶	茶	×	×	×	×	
				11-2-2-1	<i>F. solani</i>	白~赤	白~赤	×	×	長, 短	○	
				11-2-2-2	<i>F. solani</i>	白~赤	白~赤	×	×	長, 短	×	
				11-2-2-3	<i>F. solani</i>	白~赤	白~赤	×	×	長, 短	×	
				11-3-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	×	短	○	
				11-3-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	×	短	○	
				11-3-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白	白	×	×	長, 短	○	
				11-3-2-1	<i>F. solani</i>	白	白	頂単	×	短	○	
天草	○	×	○	11-3-2-2	<i>F. solani</i>	白	白	頂単	×	短	×	
				11-3-2-3	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	短	×	
				11-4-1	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	長, 短	○	
				11-4-2	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	長, 短	×	
				11-4-3	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	短	×	

採集地域	ほ場 No.	導管 褐変 ^{a)}	細菌泥 流出 ^{a)}	菌糸 発生 ^{a)}	菌株No.	同定結果	PDA培地 表面着色 ^{b)}	PDA培地 裏面着色 ^{b)}	厚膜胞子 ^{a,c)}	分生子柄長等の特徴 ^{a,b)}		塩基配列 解析の有無 ^{a)}
										PDA培地	SNA培地	
天草	11-2	○	×	○	11-5-1-1	<i>F. oxysporum</i>	白～紫	白～紫	×	×	短	○
					11-5-1-2	<i>F. oxysporum</i>	白～紫	白～紫	×	×	短	×
					11-5-1-3	<i>F. oxysporum</i>	白～紫	白～紫	×	×	短	×
		○	×	○	11-5-2-1	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	長, 短	○
					11-5-2-2	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	短	○
					11-5-2-3	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	短	○
		○	○	○	11-6-1-1	<i>F. solani</i>	白	白	頂単	短	短	○
					11-6-1-2	<i>F. solani</i>	白	白	×	短	短	×
					11-6-1-3	<i>F. solani</i>	白	白	頂単	短	短	×
		○	○	○	11-6-2-1	<i>F. solani</i>	白	黄	頂単	短	短	○
					11-6-2-2	<i>F. solani</i>	白	白～黄	×	長, 短	短	×
					11-6-2-3	<i>F. solani</i>	白～黄	黄	頂単	長, 短	短	×
	○	×	×	-	菌糸が発生せず	-	-	-	-	-	-	-
	11-3	○	×	○	11-7-2-1	<i>F. avenaceum</i>	白～橙	白～黄～橙	×	×	×	○
					11-7-2-2	<i>F. avenaceum</i>	白～橙	白～黄～橙	×	×	短	×
					11-7-2-3	<i>F. avenaceum</i>	白～黄	白～黄	×	長, 短	×	×
		○	×	○	11-8-1-1	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	短	○
					11-8-1-2	<i>F. solani</i>	白	白	×	短	短	×
					11-8-1-3	<i>F. solani</i>	白	白	×	×	短	×
		○	×	○	11-8-2-1	<i>F. fujikuroi</i>	白	白～赤	×	短	短	○
					11-8-2-2	<i>F. fujikuroi</i>	白	白～紫	×	短	短	×
					11-8-2-3	<i>F. fujikuroi</i>	白	白～紫	×	短	短	×

a) ○：有り，×：無しまたは確認不能，-：観察なし

b) PDA 培地：Potato Dextrose Agar 平板培地，SNA 培地：Synthetic low Nutrient Agar 平板培地

c) 頂単：頂生で単生，間単：間生で単生，頂連：頂生で連鎖，間連：間生で連鎖

第4表 分離した *Fusarium oxysporum* 菌株のトルコギキョウに対する病原性検定の結果

立枯れ症株 採集地域	立枯れ症株 採集ほ場No.	接種菌株No.	発病株率 (%)	発病度	発病指数別株数 (株)					
					0	1	2	3	4	
熊本	1-1	01-1-1	100.0	32.5	0	7	3	0	0	ab ^z
	1-2	01-4-1	80.0	30.0	2	4	4	0	0	ab
上益城	3-1	03-1-1-1	100.0	30.0	0	8	2	0	0	ab
菊池	4-2	04-3-1-1	50.0	12.5	5	5	0	0	0	bc
阿蘇	7-1	07-2-1-1	0.0	0.0	10	0	0	0	0	c
	7-2	07-3-1-1	0.0	0.0	10	0	0	0	0	c
	7-3	07-4-1-1	100.0	40.0	0	4	6	0	0	a
	7-5	07-6-1-1	40.0	10.0	6	4	0	0	0	bc
	7-6	07-7-1-1	100.0	45.0	0	3	6	1	0	a
	7-7	07-8-1-1	100.0	35.0	0	6	4	0	0	ab
八代	8-1	08-1-1-1	100.0	35.0	0	6	4	0	0	ab
球磨	10-1	10-1-1	100.0	25.0	0	10	0	0	0	ab
	10-4	10-6-1	90.0	25.0	1	8	1	0	0	ab
天草	11-1	11-3-1-1	50.0	17.5	5	3	2	0	0	ac
	11-2	11-5-1-1	0.0	0.0	10	0	0	0	0	c
分散分析 ^y			-	-	-	-	-	-	-	*

z 異なる英小文字間には，発病指数別株数に Steel-Dwass 法の多重比較検定により 5%水準で有意差あり (n=10)

y *は 5%水準で有意差あり

3 病原性の評価

接種後 49 日目の発病株率および発病度を第4表に示した。供試した *F. oxysporum* 15 菌株中 12 菌株が‘ボレロホワイト’に病原性を示した。それらの発病株率は 40.0～100.0%，発病度は 10.0～45.0 と菌株間で差異があった。また，3 菌株が病原性を示さなかったが，

それらと同じ地域（阿蘇地域，天草地域）の別ほ場からの分離菌株では病原性が確認された。発病菌株間の地域内での差は，阿蘇地域で有意な差がみられた一方，熊本，球磨および天草地域では有意な差はみられなかった。

IV 考察

本研究では、熊本県下で問題となっているトルコギキョウ立枯れ症について、その原因として、北海道と他県^{1, 2, 6, 16, 17)}でも同類似障害への関与や既知病害³⁾の病原とされている *Fusarium* 属菌が一因となっている実態が明らかとなった。2021年4～5月に立枯れ症を発症していた69株を23ほ場から採取し、このうち22ほ場の63株(91.3%)の茎から *Fusarium* 属菌が分離された。分離された菌株の大多数が既知病害³⁾の病原と同一種 (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. avenaceum*)であり、分離されたほ場の割合は、*F. oxysporum* が78.3%と *F. solani* (30.4%), *F. avenaceum* (13.4%) に比して著しく高かった。また、菅原ら¹⁶⁾は、山形県内のトルコギキョウにおいて *F. oxysporum* による立枯病が85%のほ場で確認されたことを報告している。安永ら¹⁷⁾は、立枯れ、萎凋等が認められる植物体を採集した福岡県内の生産ほ場において *F. oxysporum* と *F. solani* が各地で分離されたことから、これらが同県内に広く分布し、トルコギキョウの生育不良や立枯症状の発生に大きく関与していることを推察している。本研究結果からも熊本県のトルコギキョウ立枯れ症発生ほ場においては同様に広範囲に *F. oxysporum* が存在し、分布すると考えられた。また、*F. avenaceum* は、トルコギキョウでは茎腐病の病原として知られている³⁾。茎腐病は、熊本県では2019年に初めて確認された比較的新しく発生頻度が低い病害であり⁷⁾、本研究においても *F. avenaceum* の分離ほ場率は比較的低かった(13.4%)ことから、立枯れ症に関与する可能性は高くないと考えられる。この他にも *F. proliferatum* と *F. fujikuroi* が分離されたが、両種ともトルコギキョウに対する病原としての記録はなく、それぞれ1ほ場のみの分離頻度であったため、これらも立枯れ症との関係性は低いと考えられる。なお、*F. proliferatum* が分離された茎内からは、細菌泥の流出も確認されており、立枯れ症と既知病害³⁾を症状によって識別することは非常に困難であることに留意する必要がある。

また、熊本、菊池、八代および天草地域では複数の種が分離されたほ場があった一方、上益城、阿蘇および球磨地域のほ場からは全て単一の菌種が分離された。ほ場ごとの菌種数に地域ごとに差が見られたものの、地理的要因は判然としなかった。

立枯れ症発症株からの検出頻度が最も高かった *F. oxysporum* について、異なったほ場由来の15菌株を用いて病原性の比較を行った。‘ボレロホワイト’に対する接種試験では、供試菌株間で発病株率、発病度ともに差が認められ、その病徴は立枯れ症と酷似した症状

であった。同一地域における発病の程度は、阿蘇地域では分離ほ場が異なる菌株間で有意差がみられたものの、他の地域における菌株間の有意な差はなかった。

なお、複数菌株を同一ばんじゅうで底面給水にて管理したことから、菌株ごとの発病に影響があった可能性が考えられる。しかし、‘F1ミンク’ (タキイ種苗(株))へ接種し、菌株ごとに底面給水トレイを分けて管理した試験で同様の傾向があることを確認している(データ省略)。これらのことから、熊本県内に存在し、トルコギキョウに感染する *F. oxysporum* は、ほ場または菌株によって、今回供試した品種に限定されるものの、病原性に違いがあることが示唆された。

以上のことから、*F. oxysporum* による立枯病では、発生地の菌株によってトルコギキョウに対する病原性が異なることが示された。また、熊本県内で広く発生しているトルコギキョウ立枯れ症の多くは、本菌種による立枯病である可能性が非常に高いと考えられた。今後は、立枯れ発症株および土壌からの *Fusarium* 属菌分離によるほ場単位の菌種構成や地域レベルでの分布の調査、およびその結果に応じた的確な対策技術の開発が期待される。

V 謝辞

本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業 (JPJ007097)」の支援を受けて行った。

VI 引用文献

- 1) Hanagasaki, T., A. Ajitomi, E. Miwa and T. Kiyuna. (2023): Field survey of *Fusarium* stem rot of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivated in Okinawa, Japan. *Journal of Plant Protection Research*, 63 (3): 71-279.
- 2) 堀田治邦・児玉不二雄 (2016): 北海道で発生した *Fusarium* 属菌の花き病害 (1). 北海道立総合研究機構農試集報, 100, 15-21.
- 3) 「日本植物名目録 (2024.8 版)」。一般社団法人日本植物病理学会, 東京, <https://www.ppsj.org/wp-content/uploads/mokuroku202408.pdf> (2024年9月5日閲覧)
- 4) 駒田 但・草野新太郎・草野昌彦・駒場雅彦 (2004): Quintozene 試薬を添加した駒田培地の調製法。植物防疫, 58(3), 117-119.
- 5) 駒田 且・小川 奎・青木孝之 (2011)「フザリウム 分類と生態・防除」, 全国農村教育協会.
- 6) 近藤 亨・佐藤 衛 (2013): 青森県の根腐症状を

- 呈したトルコギキョウから分離される糸状菌. 北日本病虫研報, 64, 89-92.
- 7) 熊本県病害虫防除所 (2020): 令和2年度 (2020年度) 発生予察特殊報第2号.
- 8) Nirenberg, H. I. (1981). A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Can. j. Bot.*, 59 (9): 1599-1606.
- 9) 西村範夫 (2008): PCNB を用いない *Fusarium oxysporum* 用選択培地. 植物防疫 62 (3), 164-168.
- 10) 「令和5年産花きの作付 (収穫) 面積及び出荷量」. 農水省大臣官房統計部生産流通消費統計課, 東京, https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka_gaiyou/sakumotu/sakkyou_kaki/sakutuke/r5/index.html (2024年7月12日閲覧)
- 11) O'Donnell, K., H. C. Kistler, B. K. Tacke and H. H. Casper. (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *PNAS*, 97 (14): 7905-7910.
- 12) Onozaki, T., M. Satou, M. Azuma, M. Kawabe, K. Kawakatsu and N. Fukuta. (2020). Evaluation of 29 lisianthus cultivars (*Eustoma grandiflorum*) and one inbred line of *E. exaltatum* for resistance to two isolates of *Fusarium solani* by using hydroponic equipment. *The Hort. J.*, 89 (4), 473-480.
- 13) 佐藤 衛・福田直子 (2016): アゾキシストロビン・メタラキシル M 粒剤処理による水耕栽培におけるトルコギキョウ根腐病の防除. 日植病報, 82 (2), 93-100.
- 14) 瀬戸山修二・安永智希・佐藤 衛・川部眞登・川勝恭子 (2021): 福岡県のトルコギキョウから分離された *Fusarium oxysporum* 菌株の病原性検定および抵抗性の品種間差異. 園学研, 20 (別1), 114
- 15) Steenkamp, E., H. Britz, T. Coutinho, B. Wingfield, W. Marasas and M. Wingfield. (2000). Molecular characterization of *Fusarium* subglutinans associated with mango malformation. *Mol. Plant Pathol.*, 1 (3): 187-193.
- 16) 菅原 敬・渡部由理・黒坂美穂・高橋佳孝 (2022): トルコギキョウ立枯病発生圃場における土壌消毒前後および栽培後の立枯病菌密度と発病の推移. 北日本病虫研報, 73, 48-54.
- 17) 安永智希・瀬戸山修仁・近藤孝治・川勝恭子・川部眞登・佐藤 衛・小野崎隆 (2020): 福岡県におけるトルコギキョウ立枯病菌の同定と地域分布. 九病虫研会報, 66, 33-39.

Summary

Distribution of *Fusarium* spp. Isolated from Wilted Lisianthus Plants and Differences in Pathogenicity among Isolates of *F. oxysporum* in Kumamoto Prefecture, Japan

Maiko YAKITA, Kyoko KAWAKATSU

The major cut flower *Eustoma* (Lisianthus) in Kumamoto Prefecture is being affected by wilt disease throughout the region, characterized by the entire plant wilting and dying without collapse after planting. In the wilt disease observed other prefectures, the involvement of *Fusarium* species, which are pathogens of soil-borne diseases (wilt and stem rot), is suspected. The relationship between the *Fusarium* species that are present in Kumamoto Prefecture and the occurrence of wilt disease is not clear. We conducted the present study to evaluate the presence, species composition, and distribution of *Fusarium* species from wilt-affected *Eustoma* plants in Kumamoto Prefecture. We also investigated the pathogenicity of species that have been frequently isolated and widely distributed in the prefecture. We collected 69 wilt-affected *Eustoma* plants from 23 fields in seven regions within the prefecture and then isolated the plants' fungi and identified them through morphological observation and a sequence analysis. Multiple *Fusarium* species were detected, with *F. oxysporum* being the most frequently detected and isolated from all seven regions. The proportion of fields where *F. oxysporum* was isolated accounted for about approx. 80% of the total, indicating its widespread distribution in wilt-affected *Eustoma* fields in Kumamoto Prefecture. Our evaluation of the pathogenicity of *F. oxysporum* isolated from different fields revealed that the disease incidence rate of the 12 pathogenic strains observed ranged from 40.0% to 100.0%, and the disease-severity value ranged from 12.5 to 45.0, showing variation in disease severity among the strains. It was confirmed that all of the *F. oxysporum* strains from the seven regions were pathogenic. These

findings suggest that the wilt disease affecting *Eustoma* plants in Kumamoto Prefecture is likely caused by *Fusarium* wilt due to *F. oxysporum*.

Key words : *Eustoma grandiflorum* *Fusarium* Root rot