

# リンドウ褐斑病の病原菌, 発生生態および防除法に関する研究

猫塚 修一\*<sup>1</sup>

## 目次

緒言	1	3. 考察	31
第1章 研究史	3	第5節 第一次伝染源	32
第2章 病徴および発消長	3	1. 罹病葉における越冬性	32
第1節 病徴	3	2. 前年発病株の株元土壌の伝染性	32
第2節 発消長	4	3. 前年罹病残さの伝染性	32
第3節 考察	6	4. 分生子による土壌伝染の可能性	34
第3章 病原菌の分類学的所属	7	5. 罹病葉から分離された褐斑病菌の遺伝的背景	34
第1節 研究史と分類学的な問題点	7	6. 考察	35
第2節 培養的性質	8	第6節 圃場における感染実態	35
第3節 病原学的性質	9	1. 時期別の感染量の把握	35
第4節 形態的特徴	9	2. 感染量に及ぼす各種気象要因の影響	38
第5節 分子系統解析	10	3. 考察	39
第6節 考察	14	第6章 品種と発病の関係	40
第4章 病原菌の生理学的性質	16	第1節 各品種の感受性	40
第1節 分生子の発芽	16	第2節 種間交雑種における抵抗性の遺伝様式	41
第2節 培地における菌糸生育	19	第3節 考察	41
第3節 分生子の形成誘導	20	第7章 防除法	42
第4節 考察	22	第1節 有効薬剤の検索	42
第5章 発生生態	23	第2節 薬剤散布時期と防除効果の関係	44
第1節 感染条件	23	第3節 考察	44
1. 接種濃度の影響	23	第8章 総合考察	46
2. 温度, 葉面濡れ時間および葉齢の影響	24	第1節 病原菌	46
3. 考察	24	第2節 生活環と岩手県における発生生態	47
第2節 分生子の感染動態	26	第3節 防除対策	49
1. 病斑上における分生子の発芽と付着器形成	26	摘要	51
2. 分生子の発芽と付着器の形成に及ぼす温度と葉面濡れ時間の影響	26	引用文献	54
3. 考察	26	英文摘要	58
第3節 潜伏期間	27	図版	62
1. 接種後の温度管理が潜伏期間に及ぼす影響	27		
2. 接種後の変温管理が潜伏期間に及ぼす影響	27		
3. 考察	28		
第4節 病斑上における胞子体形成と分生子の分散	28		
1. 胞子体の形成に関わる諸条件	28		
2. 分生子の分散	30		

## 緒言

リンドウ (*Gentiana* L.) はリンドウ科に属する多年生の越年草で, 葉は対生し, 花冠は一般的には青紫色で腋生または頂生する. 世界中では約 500 種が知られるが, 日本には 13

\*1 環境部病理昆虫研究室 (現 岩手県南広域振興局農政部花巻農林振興センター)

本論文は岩手大学大学院連合農学研究科審査学位論文 (平成 21 年 3 月) を基に編集・加筆したものである.

種が自生している<sup>67)</sup>。切り花リンドウは、主に仏事用として用いられ、盆と彼岸が主な需要期である。我が国で切り花リンドウが本格的に栽培されるようになったのは昭和 30 年以降である。はじめは野山に自生している株を採集しこれを圃場で栽培していたが、実生からの栽培法が確立するとともに栽培面積は徐々に増加した<sup>87)</sup>。露地切り花リンドウの栽培は、岩手、長野、福島、山形など夏期冷涼地で行われ、中でも岩手県の生産量は平成 10 年以降全国の約 60%以上を占めている<sup>31)</sup>。

品種については、はじめは採種母株の自生地の名称を取って岩手県産の矢巾系や松尾系、福島県産の吾妻系や磐梯系と呼ばれていたが、昭和 52 年に我が国で初めての品種「いわて」が育成され、現在では 200 種以上の品種が登録されている。リンドウの育種には、F<sub>1</sub> の利用と栄養系の利用がある。F<sub>1</sub> の交配親としては、エゾリンドウ (*Gentiana triflora* Pall. var. *japonica* (Kuzn.) Hara) とその変種のエゾオヤマリンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica* f. *montana* Toyokuni) (以降は「エゾリンドウ (*G. triflora*) 」と呼ぶ)、およびリンドウ (*G. scabra* Bunge var. *buengeri* (Miq.) Maxim., 以降は「ササリンドウ (*G. scabra*) 」と呼ぶ) が用いられている。エゾリンドウは、本州中部から北部および北海道等の標高地の酸性土壌の湿地帯に群生し、花卉の先端が外側には開かず、開花期は自生地では 8 月中旬～9 月下旬、平坦地で栽培すると 7 月～10 月中旬であり、現在我が国では切り花用に最も多く栽培されている<sup>87)</sup>。一方、ササリンドウは、北海道を除く本州、四国、九州の原野に点在して分布し、花卉の先端が外側に反転し、開花期は 9 月下旬～10 月とエゾリンドウに比べて遅いものが多い<sup>87)</sup>。近年は、両種の種間交雑種「アルビレオ」が岩手県園芸試験場により育成されている。

岩手県では、リンドウが夏期冷涼地の酸性土壌で育つ特性から、中山間地の水田転換作物として作付けされてきた。平成 20 年における作付面積は 358 ha で、品種構成は 8 月上旬咲きの早生種が最も多く、次いで 9 月上旬咲きの晩生種の順であるが、近年は首都圏の新盆向けに 7 月咲きの極早生種の作付けも増えており、7 月から 10 月まで収穫期間が途切れることがない。

リンドウに発生する病害は、栽培当初から葉枯病<sup>60)</sup>と花腐菌核病<sup>28,29,66)</sup>があり、これらを対象として薬剤防除が行われてきた。このような中で、1983 年に岩手県軽米町で葉に灰白色の斑点を生じ、後に葉枯れを生じる新たな病害が発生した。1985 年になると沢内村 (現在の西和賀町) でも同様の病害の発生が確認され、その翌年にはこの地方を中心に多発生した。当時の薬剤散布体系では全く防除できなかったため、出荷停止を余儀なくされた圃場が続出した。これと同じ頃に、岡山県<sup>36)</sup>や福岡県 (梶谷, 私信) でもこの病害が発

生し、岡山県の粕山・出射<sup>36)</sup>により褐斑病と命名された。岩手県園芸試験場では 1987 年に本病に効果の高い防除薬剤を明らかにし<sup>51)</sup>、翌年には薬剤防除が徹底されたことにより発生が終息し (仲谷, 私信)、その後は本病の発生が認められなくなった。しかし 1999 年に、岩手県軽米町と花巻市で本病の発生が再確認され、時を同じくして福島県でも発生した。岩手県内における本病の発生実態は、岩手県病害虫防除所がリンドウの病害虫発生予察を開始した 2000 年から記録がある (岩手県病害虫防除所, 2000～2008)。図 1 に岩手県における本病の発生面積と被害面積の推移を示すが、2001 年には発生面積 78 ha、2002 年には 98 ha であり、そのうち被害面積はそれぞれ 30ha、38ha に達している。

以上のような背景に基づき、著者は 2000 年以降リンドウ褐斑病の研究に着手した。研究当初は、病原菌の接種方法が未確立であったため、本病が多発生している農家圃場において曝露試験と防除試験を実施し、圃場における感染実態に基づく防除適期を明らかにした。さらに 2007 年からは岩手大学大学院連合農学研究科に籍を置き、弘前大学農学生命科学部において、病原菌の分類学的所属、感染条件および生活環の解明に関する研究を行った。本論文は 2000 年から 2003 年および 2007 年から 2009 年の 7 年間にわたるリンドウ褐斑病に関する研究成果のうち、病原菌の分類学的所属、発生生態および防除法についてとりまとめたものである。その一部は既に発表した<sup>52,53,56,57,58)</sup>。

本論文をとりまとめるにあたって、弘前大学農学生命科学部教授佐野輝男博士、山形大学農学部教授生井恒雄博士、岩手大学農学部教授吉川信幸博士、弘前大学農学生命科学部准教授田中和明博士には、懇切なご指導とご校閲を賜った。弘前大学名誉教授原田幸雄博士、弘前大学農学生命科学部助教藤田隆氏、北海道農業研究センター松本直幸博士、岩手県植物防疫協会 (元岩手県農業研究センター生産環境部長) 仲谷房治博士、岩手県農業研究センター勝部和則博士には懇切なご助言を賜った。さらに、仲谷房治博士、勝部和則博士には本論文のご校閲を賜った。(財)岩

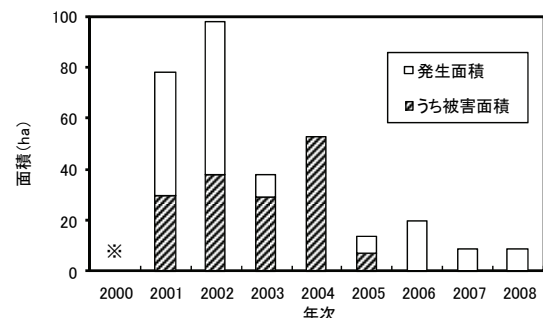


図 1 岩手県におけるリンドウ褐斑病の発生推移 (岩手県病害虫防除所, 2000～2008 年)。

※発生は記録はあるが発生面積と被害面積の記載なし。

手生物工学研究センター(現 愛媛大学農学部)小林括平博士には遺伝子解析の労を賜った。八幡平市花き研究開発センター所長日影孝志氏には切り花リンドウを分譲していただいた。岩手県農業研究センター川村浩美氏(現 中央農業改良普及センター)、星伸枝氏、千葉賢一氏(現 大船渡農業改良普及センター)、中里崇氏、赤坂志保氏、宍戸貴洋氏(現 県南広域振興局)には供試植物の提供等のご協力をいただいた。大学院での研究にあたっては、岩手県農業研究センター宮下慶一郎前所長、武田眞一元所長、太田義信元所長をはじめとする上司・同僚からは多大のご配慮と激励をいただいた。実験等に際しては、同センター非常勤職員小野寺政子氏には多大なる労を賜った。ここに記して深甚なる謝意を表すしである。

## 第1章 研究史

粕山・出射<sup>36)</sup>は、1984年に岡山県内のオヤマリンドウ(*Gentiana makinoi* Kuzn)における未報告病害の発生を記載し、リンドウ褐斑病と命名することを提案した。なお、オヤマリンドウは、吉池<sup>87)</sup>によればエゾオヤマリンドウ(エゾリンドウの変種)と形態的に区別できないとしている。一方、東北地域では、仲谷・高橋<sup>51)</sup>や堀越ら<sup>26)</sup>が岩手県と福島県における本病の発生を報告した。また、小林ら<sup>40)</sup>は岡山県のササリンドウ(*G. scabra*)における本病の発生を報告している。

病原菌の分類学的所属については、箒状の繁殖体を形成するという特徴的な形態から、本病の初発生の報告時<sup>36)</sup>から新種であることが示唆されていた。粕山・出射<sup>36)</sup>は *Taeniolina* 属類似菌とし、横山は新属新種の *Thallosporiella gentianae* Yokoyama et Kasuyama の学名を提案した<sup>37,85)</sup>。しかし、その後には本菌の正式記載はなされず、非合法名のままとなっていた<sup>40)</sup>。小林ら<sup>40)</sup>は、ササリンドウから分離した病原菌の発病葉上での孢子体の形態から、原<sup>23)</sup>が創設した不完全菌の *Mycochaetophora* 属に所属させるのが妥当とし、*Mycochaetophora gentianae* Tak. Kobay., Kasuyama et Nasu を記載した。

本病の病徴や圃場における発生の特徴については、いくつか記載がある<sup>1,35,50,51,70)</sup>。本病が初発する時期は岩手県では8月上旬であり<sup>51)</sup>、福島県では7月中旬である<sup>26,70)</sup>。仲谷・高橋<sup>51)</sup>は本病の流行様相について詳細な調査を実施しており、それによると、本病は8月上旬に初発した後、8月中旬にかけて急激にまん延すること、上位葉における発生は少なく下位葉ほど多発すること、発病は畦の内側(条間)で多く陽の当たる外側では少ないことなどを報告している。また、前年発生圃場では翌年も必ず発生する特徴もある<sup>50)</sup>。このように、本病の発生生態を示唆するいくつかの特徴

は観察されているが、病原菌の生活環や感染生態については全く知見がなく、発生生態は明らかでない。

防除法については、粕山ら<sup>37)</sup>や仲谷・高橋<sup>51)</sup>が本病に有効な薬剤としてマンネブ水和剤、銅水和剤、TPN 水和剤等を提示している。岩手県における防除時期として、仲谷・高橋<sup>51)</sup>は6月上旬～8月上旬の薬剤散布で高い防除効果を認めているが、本病の発生生態に基づく防除法とは言い難い。

本病は、1980年代に甚大な被害をもたらしたにも関わらず、その後の研究がほとんど行われて来なかった。これは、1987年以降に防除対策が徹底されたことにより本病の発生が問題とならなくなったためと考えられる。

## 第2章 病徴および発消長

### 第1節 病徴

本病の病徴は、粕山・出射<sup>36)</sup>、仲谷・高橋<sup>51)</sup>により報告されているが、その記載には全体的に違いがある。すなわち、粕山・出射<sup>36)</sup>は、葉枯病に似た径約5mmの輪郭明瞭な淡褐色の斑点を生じるとしている。一方、仲谷・高橋<sup>51)</sup>は、はじめ葉の表側に灰白色の小斑点が形成され、しだいに拡大し5～6mmの円形病斑となった後、病斑の周囲は黄色を帯び、やがて褐変するとしている。これら記載の違いを検証するために、岩手県内で数種品種に発生した本病の病徴を観察し比較した。

### 材料および方法

2005～2009年に岩手県内で発生した本病の自然病徴を観察した。発生病種と調査地は以下のとおりである。「ジョバンニ」(花巻市農家圃場)、「イーハトーヴォ」(北上市、岩手県農業研究センター内のコンテナ栽培)、「蒼い風」(西和賀町農家圃場)、「衣川プリンセス」(奥州市衣川区農家圃場)。なお、各品種の発病葉から、常法にしたがい素寒天培地を用いて病原菌を分離し、本病であることを確認した。

### 結果

ジョバンニ:はじめ葉の表側表面に灰白色の微細な斑点が形成された。この斑点はしだいに大きくなり、直径5mmを超える円形病斑となった。病斑の周囲は黄色になり、やがて褐色に腐敗した(図版I-A～D)。

イーハトーヴォ:病斑は葉の両面に生じた。葉表の病斑は、中央部が灰白色～淡褐色を呈し、円形で直径およそ5mm、周囲は黄色を帯びた。葉裏の病斑は、灰白色の円形で直径およそ5mmの斑点となり、しだいに淡桃色～淡褐色を呈した。この病斑の葉表は退緑斑紋を生じ、その中央部は赤紫

色となった(図版 I-E~G)。

蒼い風:はじめ葉の表側表面に褐色~灰白色の斑点を生じ、病斑の周囲が濃紫色を帯びた。褐色の病斑は輪紋状に拡大し、直径 5~10 mm 程度の病斑となり中央部には灰白色の斑点を有した。病斑の周囲は黄色~オリーブ色を呈した(図版 I-H~J)。

衣川プリンセス:はじめ葉の表側表面に退緑を呈し、中心部に灰白色~淡褐色の斑点を生じた。のちに直径 5 mm 前後の輪郭の明瞭な褐色の輪紋になった。病斑の周囲はわずかに黄色を帯びた。病斑の中心は脱落し穴があくこともあった(図版 I-K, L)。

## 第 2 節 発生病消長

本病の発生病消長は、仲谷・高橋(1991)が 1987 年に岩手県沢内村で調査しているのみである。そこで、岩手県で作付面積が多い晩生種「ジョバンニ」(9 月咲き)における本病の発生病消長を経年調査した。

### 1. 圃場における発生病消長

#### 材料および方法

圃場における発生病消長は 2000 年~2003 年の 4 ヶ年調査した。調査は、岩手県花巻市農家圃場の品種「ジョバンニ」(4~7 年生)を用いて実施した。調査区内は、葉枯病の発生を防止するために、6 月~8 月末まで本病に効果のないチオファネートメチル水和剤(1,500 倍)をおよそ 10 日間隔で散布した。各年次ともに初発生を確認後、発病株 20~30 株の各 1 茎を対象に、発病程度を葉位別に調査し、以下の発病程度別に指数を与え、発病度を求めた。

発病度 =  $\Sigma(\text{程度別発病葉数} \times \text{発病指数}) / (5 \times \text{総調査葉数}) \times 100$ 。発病程度別指数 0:発病なし, 1:病斑数が 1~3, 3:病斑数が 4~10, 5:病斑数が 11 以上。

#### 結果

2000 年~2003 年の 4 ヶ年における発生病消長と葉位別の発生病推移を図 2 に示す。2000 年の初発生は 8 月 4 日に確認した。発病進展は、下位葉(第 6~10 位葉)を中心に漸増し、8 月 18 日になると中位葉(第 11~15 位葉)で発病が急激に増加した。上位葉(第 21~25 位葉)の発病は認められなかった。8 月 18 日時点では発病葉率 51.2%, 発病度 26.2 であった。

2001 年の初発生は 8 月 7 日に確認した。発病進展は、8 月 14 日までは漸増した。8 月 20 日に中位葉(第 11~15 位葉)でも発病が増加し、9 月 3 日には下位葉~中位葉で発

病がまん延した。上位葉(第 21~25 位葉)の発病は認められなかった。9 月 3 日時点では、発病葉率 39.6%, 発病度 22.6 であった。

2002 年の初発生は 8 月 5 日に確認した。発病進展は、初発生確認時で中位葉の上段(第 16~20 位葉)にも認められた。8 月 22 日までは漸増した後、8 月 28 日に下位葉、中位葉ともに急激に増加し、上位葉(第 21~25 位葉)まで進展した。9 月 5 日時点では、発病葉率 69.7%, 発病度 62.9 であった。

2003 年の初発生は 8 月 1 日に確認した。発病進展は、最終調査の 9 月 12 日まで漸増したが、急激な発病増加は認められなかった。9 月 12 日時点では、発病葉率 20.8%, 発病度 11.8 であった。

## 2. 圃場内における発生病分布の推移

### 材料および方法

2001 年に前項 1. の無防除区(3 反復)における発生病分布調査を実施した。各区約 10m<sup>2</sup>内の 98~120 株を対象に定期的に発病の有無を調査し、プロットした。調査はおおよそ 7 日間おきに 4 回実施した。

### 結果

2001 年における圃場内での発病株の分布を表 1 に示す。初発生を認めた 8 月 7 日時点で、試験区間で発病のばらつきが認められた。8 月 7 日から 8 月 14 日にかけて各区ともに発病株率が増加した。さらに、8 月 20 日から 9 月 3 日にかけて各区とも発病株率が増加し、圃場内にまん延した。

試験区 1 における圃場内の発生病分布の推移を図 3 に示す。初発生時(8 月 7 日)は 1 株だけの発生であったが、8 月 14 日には発病株が散在した。8 月 20 日から 9 月 3 日にかけて、発病株に隣接する株で新たに発生するとともに、発病が見られなかった畦でも発生した。本病の初発生と発病増加は畦の条間で認められた。

表 1 無防除区における発生病推移

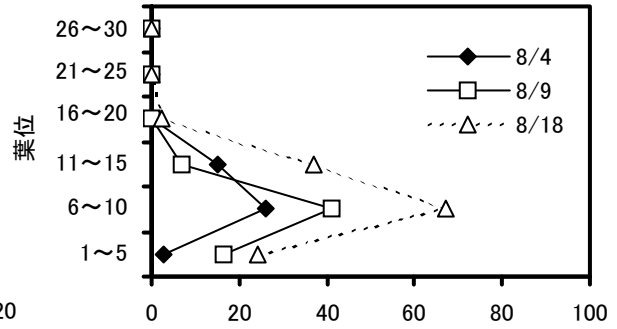
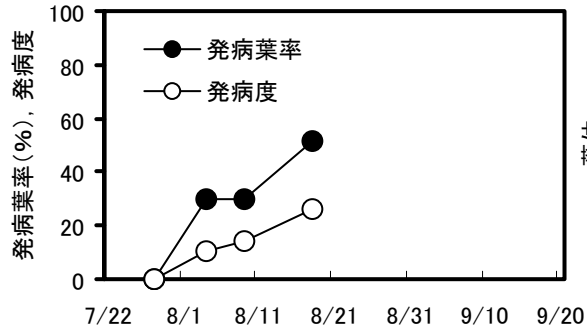
調査日 <sup>1)</sup>	発病株率 <sup>2)</sup> (%)			
	1区	2区	3区	平均
8/7	1.0	1.5	35.0	12.5
8/14	10.2	7.5	64.2	27.3
8/20	12.2	10.5	68.3	30.4
9/3	40.8	62.4	96.7	66.6

1) 調査は、2001年に岩手県花巻市の農家圃場で実施

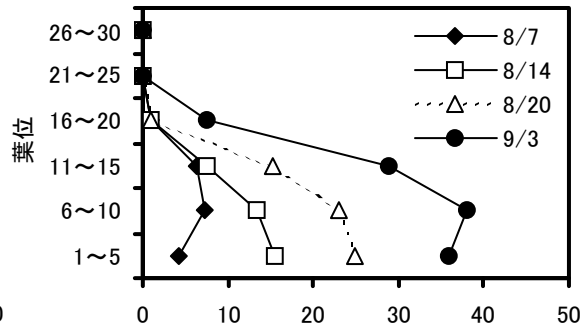
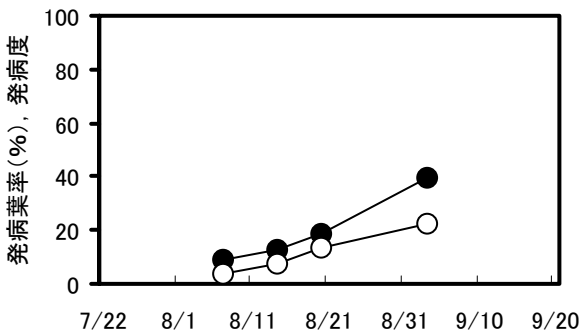
2) 調査株数は、1区:98株, 2区:133株, 3区:120株



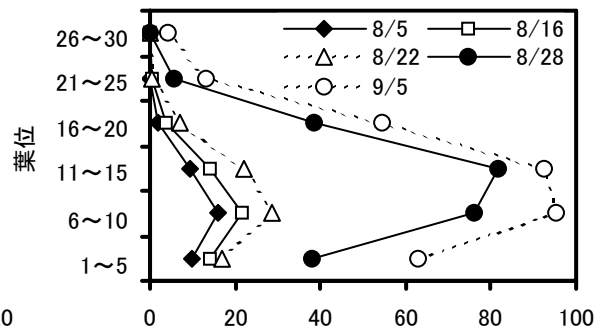
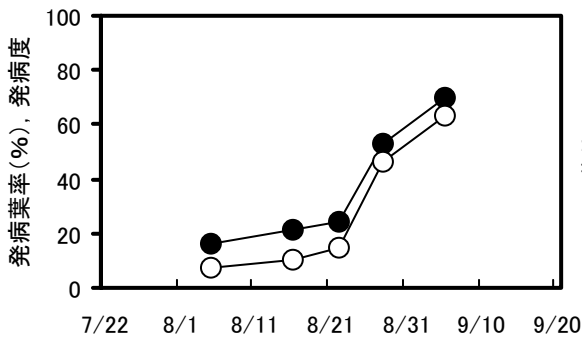
2000年



2001年



2002年



2003年

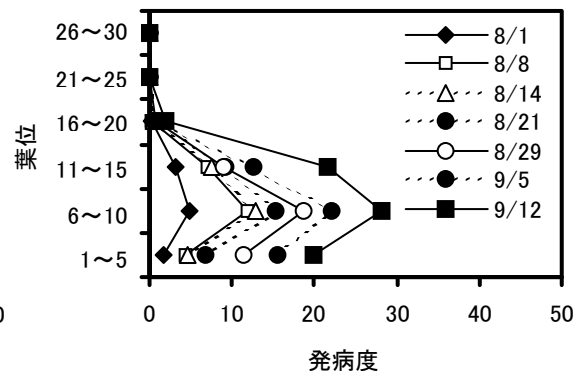
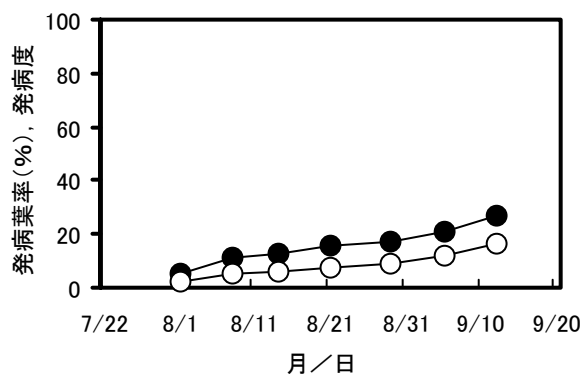


図 2 2000~2003 年における発生生長(左)と葉位別の発生推移(右).

岩手県花巻市の6~7月を無防除とした圃場(品種「ジョバンニ」)において調査した。

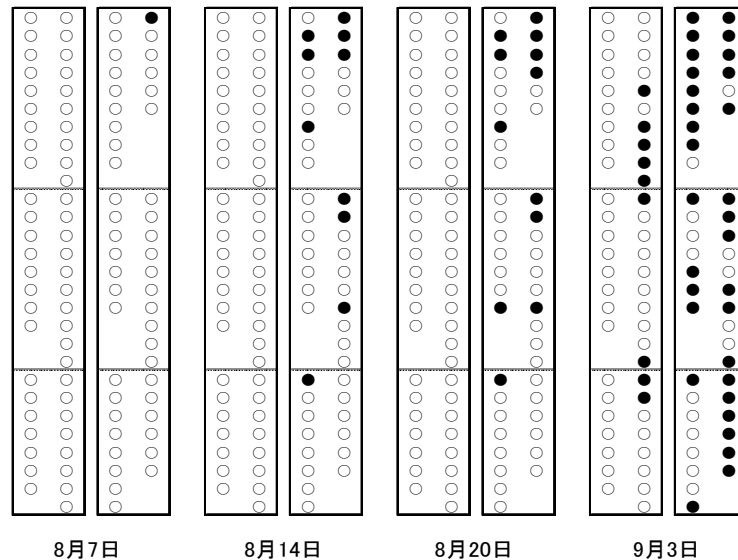


図 3 圃場内における流行様相.

表 1 に示した 1 区について、隣接する 2 畦内の 98 株を対象に発病の有無を調査した。図中の○は健全株、●は発病株を示す。

### 第 3 節 考察

#### 1. 病徴

今回調査した 4 品種の病徴は、灰白色の斑点を生じることと、病勢進展すると病斑の周囲が黄色を帯びる点で一致したが、病徴にはいくつかの差異が認められた。エブリンドウ 2 品種「ジョバンニ」と「イーハトーヴォ」の病徴は全体的にはほぼ一致したが、「イーハトーヴォ」では葉裏にも灰白色の斑点が認められた。この葉裏病斑は一般栽培圃場では従来まで確認されていない病徴である。葉裏の病斑について小林ら<sup>40)</sup>は、本病の多発時には葉の両面に初めうどんこ病に似た直径数 mm の斑点を多数生じるとしている。本事例では、畦畔から採取した土壌を培土として栽培した 2 年株であるが、葉裏に病斑が発生した原因について明らかにすることはできなかった。なお、岩手県では仲谷・高橋<sup>51)</sup>の報告に基づき葉表に形成される灰白色の斑点を本病の標徴として診断に用いてきたため、葉裏の病斑は見過ごされてきた可能性がある。一方で、「蒼い風」と「衣川プリンセス」の病徴は、褐色の病斑を明瞭に生じる特徴があり、灰白色の病斑は目立たないかほとんど認められなかった。この病徴は、粕山・出射<sup>36)</sup>が記述した「輪郭明瞭な淡褐色の斑点」とよく一致した。したがって、既報<sup>36,51)</sup>における病徴記載の違いは、本病の発生を記録した品種の違いを反映している可能性が高い。

近年、小林ら<sup>40)</sup>は本病の病徴について、「初め小さな退緑斑や、中心部に白点を伴った赤紫色の斑点を生じ、しだいに淡桃色から淡褐色に変わり、のちに直径 5 mm 前後の輪郭の明瞭な淡褐色～灰白色の輪紋になる、あるいは灰白色の円状で 5～10 mm 大、周囲褐色～紫褐色帯に囲まれた病斑を生じる」と記載している。この記載は、今回調査した

4 品種における病徴を網羅していると考えられる。

#### 2. 発生消長

圃場における初発生は、いずれの試験年次も 8 月上旬であった。この結果は、仲谷・高橋<sup>51)</sup>が岩手県沢内村(現在、西和賀町)で調査した初発生時期と一致している。一方で、福島県では本病の初発生が 7 月中旬であり<sup>26,70)</sup>、初発生時期は本県より 20 日程度早い。このことから、発生時期の違いには地理的立地を反映した気象条件が関係していることが示唆される。

本病の発生量は、8 月中旬までは漸増し、8 月下旬～9 月上旬にかけて急激に増加した。また、発病の垂直分布は、はじめは下位葉に発病が多く、後に中位葉に病勢進展し、上位葉での発病は少なかった。この発生推移は、仲谷・高橋<sup>51)</sup>の観察とほぼ一致した。このことから、岩手県における本病の発生消長は、8 月上旬に初発生し、発病が漸増した後、8 月下旬～9 月上旬に急激に増加することが明らかになった。

圃場内における発生は、はじめ散在し、後に発病株に隣接する株で新たに発病しまん延した。また、畦内での発病位置は、既報<sup>51)</sup>と同様に畦の条間で多かった。これらのことは、本病の発生特徴のひとつである発病位置、すなわち日当たりの悪い畦の内側で主に発生することを強く支持する結果である。また、図 3 で示すように、無病であった畦でも 8 月 20 日から 9 月 3 日にかけて、既発生の畦に面した株でのみ新たに発生した。これら発生分布の調査結果から、本病は発病株から二次伝染している可能性が強く示唆される。

### 第3章 病原菌の分類学的所属

#### 第1節 研究史と分類学的な問題点

本病の病原菌は，初報告<sup>36)</sup>以来，その分類学的所属について不詳であった。近年，小林ら<sup>40)</sup>はササリンドウ (*G. scabra*) から分離した病原菌について，不完全菌 *Mycochaetophora* 属の新種 *M. gentianae* Tak. Kobay., Kasuyama & Nasu を記載している。*Mycochaetophora* 属は，無色の箒状の孢子体 (sporophore) を形成することを特徴とし，本病菌を含めて2種の記録がある。本属のタイプ種である *M. japonica* Hara & Ogawa はケヤキ円星病菌である<sup>23)</sup>。小林ら<sup>40)</sup>によるとこのタイプ標本 (国立科学博物館に保管) に含まれている病葉上では菌体が認められず，原<sup>23)</sup>の記載をタイプとして比較に用いている。

*Mycochaetophora* 属の分類学的所属について，原<sup>23)</sup>はその形態に基づき広義の *Cercospora* 属の隣に位置すると予想している。*Cercospora* 属の完全世代は *Mycosphaerella* 属であり，植物病原菌として葉に斑点，葉枯れ，すす状の病斑を生じる。*Cercospora* 属は分生子形成様式 (conidiogenesis) と分生子離脱痕 (conidial scar) の構造の特徴に基づき再分類され<sup>7,8,13)</sup>，分生子の分離痕が厚くなく目立たない特徴を有する数種が *Pseudocercospora* 属に転属されている<sup>7,13)</sup>。Braun<sup>7)</sup>は *Pseudocercospora* 属に類似した孢子形態を持つ属を関連菌群として取扱い，そのモノグ

ラフの中で，*Pseudocercospora* 属を含む16属をグループ化している (*Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類；*Pseudocercospora*-like hyphomycetes)。これら多くの菌群はテレオモルフが不明であるが，近年の分子系統解析からいくつかの属はカプノディウム目 (Capnodiales)，ビョウタケ目 (Helotiales)，プレオスポラ目 (Pleosporales) に位置することが明らかにされている<sup>11,12,19,20,24,68)</sup>。表2には *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類の系統学的所属を示した。

*Mycochaetophora* 属の分生子形成様式について，原<sup>23)</sup>は出芽状 (blastic) としているが，Kirk et al.<sup>38)</sup>は本属の個体発生様式 (ontogeny) や離脱様式 (conidium secession) については不詳としている。また，*M. gentianae* の系統学的な位置づけについて，小林ら<sup>40)</sup>はビョウタケ目のアナモルフ *Cadophora* 属と関連性はあるが，その分生子の形態は *M. gentianae* とは著しく異なるとしている。

以上をまとめると，*Mycochaetophora* 属の分類学上の問題点として，不完全菌を分類する上で重要な分生子形成様式の記述が不詳であり，本属のタイプ種 *M. japonica* のタイプ標本は現存しない。次に，不完全菌の完全世代を明らかにすることは菌類の系統分類における重要な研究課題の一つである<sup>2)</sup>が，本属の完全世代は見つかっていない。また，本菌と形態的並びに系統学的に近縁な菌群も不明であり，本属の系統学的な位置付けも明らかでない。

表2 *Pseudocercospora*様不完全糸状菌類<sup>1)</sup>および *Mycochaetophora gentianae*の系統学的所属<sup>2)</sup>

分類群	テレオモルフ	目	引用
<i>Anguillospora</i>	—	—	—
<i>Cylindrocladiopsis</i>	—	—	—
<i>Mastigosporium</i>	—	—	—
<i>Microdochium</i>	<i>Monographella</i>	Xylariales	Braun (1995)
<i>Miuraea</i>	<i>Mycosphaerella</i>	Capnodiales	Braun (1995)
<i>Monodidymaria</i>	—	—	—
<i>Mycocentrospora</i>	—	<b>Pleosporales</b>	Goodwin et al. (2001)
<i>Neoramularia</i>	—	—	—
<i>Pseudocercospora</i>	<i>Mycosphaerella</i>	Capnodiales	Braun (1995)
<i>Ramulispora</i>	—	<b>Capnodiales</b>	Crous et al. (2003)
<i>Helgardia</i> (= <i>Ramulispora</i> )	<i>Oculimacula</i>	<b>Helotiales</b>	Crous et al. (2003)
<i>Rhexocercosporidium</i>	—	<b>Helotiales</b>	Shoemaker et al. (2002); Harrington and Mcnew (2003)
<i>Rhynchosporium</i>	—	<b>Helotiales</b>	Goodwin et al. (2001); Harrington and Mcnew (2003)
<i>Rhynchosporina</i>	—	—	—
<i>Spermospora</i>	—	—	—
<i>Spermosporina</i>	—	—	—
<i>Thegonia</i>	—	<b>Helotiales</b>	Crous et al. (2007)
<i>Mycochaetophora</i>	—	<b>Helotiales</b>	小林ら (2009)

1) Braun (1995)のグループ分けに基づく

2) 太字は分子系統解析に基づく系統学的な位置を示す

本章では、第一に、岩手県内のエゾリンドウ (*G. triflora*) から分離された菌株を、岡山県内のササリンドウ (*G. scabra*) から分離された *M. gentianae* のタイプ菌株と比較し同定した。第二に、*M. gentianae* の分生子形成様式の特徴を明らかにした。第三に、リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) 3 領域および internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列に基づき、*M. gentianae* の系統学的な位置を明らかにした。

## 第 2 節 培養的性質

病原菌の生育に及ぼす培養温度の影響について調査した。

### 材料および方法

供試菌株とその採取地は、表 3 に示す。MAFF 239231 株と MAFF 239234 株は NIAS ジーンバンク (独立行政法人農業生物資源研究所, 茨城県つくば市) から分譲を受けた。J4 株 (MAFF 241067) と K18 株 (MAFF 241068) は、2006 年 9 月に岩手県浄法寺町と軽米町のリンドウ (*G. triflora*) の罹病葉からそれぞれ分離した。罹病葉からの分離は常法に従い以下のとおり実施した。分離源は、灰白色の病斑が 1 mm

程度で病斑周辺が褐変していない組織を選び用いた。病患部と健全部との境界組織片を 5 mm 角に切り出し、この切片を 70% エタノールで数秒間表面殺菌した後、滅菌水で 2 回洗浄し、葉表が上面となるように素寒天平板培地 (WA) に置床した。この培地を 20°C で 7 日間培養した後、伸長した菌叢から単菌糸分離を行い、PDA (ジャガイモ 200g, ブドウ糖 20g, 寒天 15g/1000ml) に移植して分離株を得た。分離株は、使用するまで 4°C の冷蔵庫内で保存した。

V8 ジュース寒天培地で前培養した菌叢から直径 5 mm コルクボーラーで一部を切り出し、PDA に移植した後、5~35°C で暗黒下、14 日間培養した。調査は、菌叢の長径と短径を計測してその平均を求めた。実験は 3 反復とし、これを 2 回実施した。

## 結果

K18 株および MAFF 239231 株における菌叢生育と温度との関係を図 4 に示す。両菌株ともに 5~30°C の範囲で生育し、32.5°C 以上では生育しなかった。生育適温は 20~23°C であった。

表3 供試菌株およびDNAシーケンス (SSU, LSUおよびITS) のアクセッションナンバー

供試菌株	分類群	宿主植物と採取地	DDBJ/GenBank/EMBL アクセッションNo. <sup>1)</sup>		
			SSU	LSU	ITS <sup>2)</sup>
K18 (= MAFF 241068)	<i>Mycochaetophora</i> sp.	<i>Gentiana triflora</i> var. <i>japonica</i> , 岩手県軽米町 <sup>4)</sup>	<b>AB469687</b>	<b>AB469686</b>	<b>AB469685</b>
J4 (= MAFF 241067)	<i>Mycochaetophora</i> sp.	<i>Gentiana triflora</i> var. <i>japonica</i> , 岩手県浄法寺町 <sup>4)</sup>	—	—	<b>AB469684</b>
MAFF239231 <sup>3)</sup>	<i>Mycochaetophora gentianae</i>	<i>Gentiana scabra</i> var. <i>buengeri</i> , 岡山県山陽町 <sup>5)</sup>	<b>AB496936</b>	<b>AB496937</b>	AB434661
MAFF239284	<i>Mycochaetophora gentianae</i>	<i>Gentiana scabra</i> var. <i>buengeri</i> , 岡山県山陽町 <sup>5)</sup>	—	—	AB434662
CBS 418.65 <sup>3)</sup>	<i>Rhexocercosporidium carotae</i>	<i>Daucus carota</i> , Høyland, Norway <sup>6)</sup>	AF487897	<b>AB469688</b>	AF487895

1) 太字は本研究で決定した塩基配列

2) ITS領域は5.8S rDNAを含む

3) ex-type

4) 本研究で分離した菌株

5) 小林ら(2009)の記載

6) Årsvoll (1965)の記載

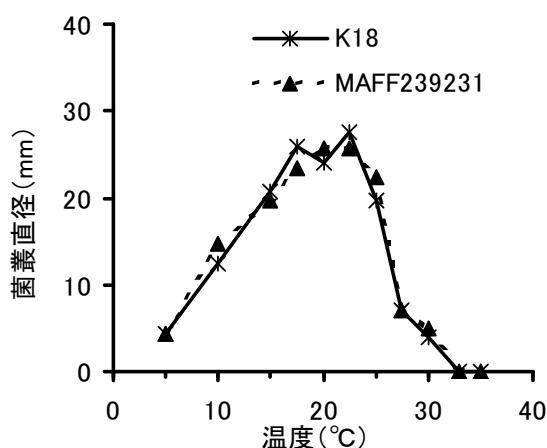


図 4 菌糸生育に及ぼす温度の影響.

PDA に移植し暗黒下 14 日間培養した.

### 第 3 節 病原学的性質

*G. triflora* 分離株 (K18 株) と *G. scabra* 分離株 (MAFF 239231 株) の病原性を明らかにするために、エゾリンドウ (*G. triflora*) およびササリンドウ (*G. scabra*) に接種した.

#### 材料および方法

供試菌株は K18 株と MAFF 239231 株を用いた. 供試植物は、リンドウ 2 種を用い、*G. triflora* は品種「安代の秋」、*G. scabra* は品種「安代のさわ風」を用いた. 草丈を 40 cm の長さに切り揃え、蒸留水で満たした 300 ml 容の三角フラスコに 2 本ずつ水差しした. 接種源の調製法および接種法はそれぞれ第 4 章第 3 節および第 5 章第 1 節に詳細に示した. 分生子懸濁液 ( $1 \times 10^5$  個/ml) を接種源として用い、ハンドスプレーで噴霧接種した後、ポリエチレン袋で被覆し 25°C の湿室で 3 日間維持した. ポリエチレン袋を除去した後、室内で 2 週間管理した.

#### 結果

*G. triflora* 分離株 (K18 株) と *G. scabra* 分離株 (*M. gentiana* MAFF 239231) の接種において *G. scabra* (品種「安代のさわ風」) は発病せず、病原性を示さなかった. 一方で、両菌株ともに *G. triflora* (品種「安代の秋」) は激しく発病した. 接種 7 日後には灰白色の微小な斑点を生じ、20 日後には約 1 mm 程度の典型的な病斑を形成した. (図版 II - A).

### 第 4 節 形態的特徴

*G. triflora* 分離株 (K18 株) の所属を明らかにするため、孢子体および分生子の形態について *G. scabra* から分離された *M. gentiana* のタイプ菌株 (MAFF 239231 株) と比較した. また、K18 株の分生子形成様式を詳細に観察した.

#### 材料および方法

供試標本は、第 3 節において K18 株および MAFF 239231 株の接種により生じた罹病葉を用いた. 罹病葉上における孢子体の観察は以下のとおりとした. 病斑上における孢子体の形成を促すために、罹病葉を 20°C の湿室 (滅菌水で湿らせたペーパータオルを底に敷いたプラスチック製の箱) に 2~7 日間保持した. 罹病葉上に形成された孢子体の形態は、実体顕微鏡 (SZX7, Olympus 製) で観察した. この罹病葉から病斑組織をカミソリを用いて 5 mm 角に切り出し、ラクトフェノール・コットンブルー溶液で 1 分間染色し、ラクトフェノール溶液で 2 回洗浄した後、プレパラートを作成した. 孢子体および分生子の形態は、罹病葉から滅菌針を用いて掻き取った孢子体を蒸留水に懸濁してプレパラートを作製し、生物顕微鏡 (BX51, Olympus 製) で観察した.

#### 結果

K18 株の接種により生じた罹病葉を湿室に静置したところ、孢子体が多数形成された (図版 II - B, C). K18 株と *M. gentiana* MAFF 239231 株の形態を表 4 に示す. K18 株の孢子体は、大きさ  $40 \sim 93 \times 20 \sim 113 \mu\text{m}$ 、箒状であった (図版 II - H). 分生子柄は、無色、大きさ  $7 \sim 20 \times 4 \sim 5 \mu\text{m}$ 、単細胞または多細胞、上部は分岐した. 分生子形成細胞は、分生子柄に統合されその先端部または中間部に位置し、分生子痕は厚くなく目立たなかった. 分生子の離脱様式は裁断型 (schizolytic) であった (図版 II - I). 分生子は、無色、大きさ  $20 \sim 60 \times 3 \sim 5 \mu\text{m}$ 、はじめは鞭状、成熟すると棍棒形~円筒形 (cylindric) もしくはやや円筒形、真っすぐに伸び、隔壁でくびれ  $6 \sim 7 \mu\text{m}$  間隔で 3~6 細胞に区切られ、先端部は丸く、基部は丸いか面取りされ、まれに基底にある細胞の残存組織を伴うことがあり、離脱痕は厚くなく無色 (図版 II - K), しばしば連鎖して分岐を伴った求頂的な鎖状であった (図版 II - J).

分生子の大きさは、K18 株 ( $20 \sim 60 \times 3 \sim 5 \mu\text{m}$ ) と MAFF 239231 株 ( $19 \sim 39 \times 3.5 \sim 5 \mu\text{m}$ ) はほぼ一致した. 分生子の先端部の形態に若干の違いが認められ、K18 株は先端部の細胞が丸みを帯びたが、MAFF 239231 株はやや尖った. 孢子体の形態的特徴に基づき、K18 株は *Mycochaetophora* 属菌と同定された.

K18 株の孢子体の発達様式は以下のとおりであった. 分生子柄は罹病葉の表皮下の菌糸から現れ (図版 II - D), 未熟な分生子が鞭状かつ単細胞に生じ、後に隔壁を生じ 1~2 分節となった (図版 II - E). その先端部の細胞は成熟すると膨れ上がり、裁断状に離脱して分生子となった. 残りの細胞は出芽状に分生子形成細胞または分生子を形成した (図版 II - F). 分生子形成細胞は、基部の 1~2

表4 リンドウ褐斑病菌の胞子体, 分生子柄および分生子の形態

	<i>G. triflora</i> 分離株 <sup>1)</sup>		<i>M. gentianae</i> ( <i>G. scabra</i> 分離株) <sup>2)</sup>	
	本研究		本研究	小林ら(2009)
胞子体				
大きさ(μm)	40~93×20~113		63~100×70~105	70~130
形	箒状		箒状	箒状
分生子柄				
大きさ(μm)	7~20×4~5		7~21×4~5	—
色	無色		無色	—
細胞数	1~多細胞		1~多細胞	—
分生子				
大きさ(μm)	20~60×3~5		19~39×3.5~5	15~43×2~2.5
色	無色		無色	無色
形	棍棒状~円筒状 先端は円い		円筒状 先端はやや尖る	円筒状 先端はやや尖る

1) K18株

2) MAFF 239231株

細胞を除いて分生子となった(図版II-G). 分生子柄の上部は分岐した(図版II-J). 分生子の多くは二次分生子を形成した. 一次分生子は, 基部から数えて1~2細胞目に二次分生子を生じた(図版II-I, J). 二次分生子が連続的に形成されることで, 本属に特有の箒状の胞子体を生じた.

## 第5節 分子系統解析

リンドウ褐斑病菌のビョウタケ目における系統学的な位置付けを明らかにするとともに, Braun<sup>7)</sup>が示した *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類との関連性を明らかにするため, 分子系統解析を実施した.

### 材料および方法

供試菌株は, 表3に示した *Mycochaetophora* 属の K18株, J4株, MAFF 239231株および *Rhoxocerosporidium carotae* U. Braun CBS 418.65株とした. これら菌株を PDA で 20°C, 暗黒下°Cで 14日間培養し, 菌叢から菌糸を掻き取った. DNAの抽出は, 約 0.1gの菌糸から ISOPLANT Kit(ニッポン・ジーン)を用い実施した.

シーケンスは, rDNAの3領域, すなわち small subunit (SSU) rDNA, large subunit (LSU) rDNA, 5.8S rDNAを含む ITS領域を対象とし, これら領域をPCRにより増幅した. PCRに供試したプライマーは, SSU rDNAを増幅する NS1とNS4<sup>79)</sup>, LSU rDNAを増幅する LR0RとLR7<sup>64)</sup>, および 5.8S rDNAを含む ITS領域を増幅する ITS1とITS4<sup>79)</sup>を用いた. これら領域の増幅は, 25 μlのPCR反応液(1 μM各プライマー, 0.125U TaKaRa Ex Taq (TaKaRa Bio), 2.5 mM dNTP mixture, 2 mM Mg<sup>2+</sup>を含む Ex Taq reaction buffer)で実施した. PCRは以下の条

件で行った. 初期変性:94°C, 4分; (変性:94°C, 1分; アンニリング:48.8°C (SSU rDNA) / 46.2°C (LSU rDNA) / 61.5°C (ITS), 1分; 伸長:72°C, 1分) 35回繰り返す; 最終伸長:72°C, 7分. PCR産物は QIAquick gel extraction kit (Qiagen)で抽出し, ABI PRISM BigDye-terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems)に供試した. シーケンスに用いたプライマーは, SSU rDNAでは NS1, NS4, SR3, SR7, SR7R および SR8Rを, LSU rDNAでは LR0R, LR7, LR3R, LR5 および LR16を, ITSでは ITS1とITS4をそれぞれ用いた. これらプライマーの配列は, Duke 大学微生物学研究室のホームページ (<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)で公開されている. シーケンス反応物は Montage SEQ96 sequencing reaction cleanup kit (Millipore)で精製し, ABI PRISM 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems)に供した. 得られた塩基配列は 4Peaks (Freeware; <http://4peaks.en.softonic.com/>), ATSQ および GENETYX (GENETYX corporation)で判読した. 塩基配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ)に寄託した(表3).

*Mycochaetophora* 属菌の系統学的な所属を明らかにするために, SSU rDNA, LSU rDNA および 5.8S rDNAを統合したデータセット(SSU+LSU+5.8S rDNA)による高次解析を実施した. ビョウタケ目のアライメントは TreeBASE (<http://www.treebase.org/treebase/>, アクセス No. M2780<sup>76)</sup>)からダウンロードした. このアライメントは, SSU rDNA (950bp), LSU rDNA (914bp) および 5.8S rDNA (156bp)から構成されている. 既報<sup>75)</sup>に従って, このアライメントから 55菌群を選び, *Mycochaetophora* 属 2菌株(K18株および MAFF 239231株) および *R. carotae* (CBS 418.65株)を加えた計 58菌群からなるデータセットを準備

した。この外群は *Candida albicans* (C.P. Robin), *Neolectia irregularis* (Peck) Korf & J.K. Rogers および *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen とした。

*Mycochaetophora* 属菌と *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類並びにビョウタケ目の *Cadophora* 属菌との関連性を明らかにするために, ITS 領域を用いた低次解析を実施した。既報の *M. gentianae* や *R. carotae* を含む系統樹<sup>24,33,40)</sup>を基に 26 菌群を選び, *Mycochaetophora* 属 4 菌株を加えた計 30 菌群からなるデータセットを準備した。ITS 塩基配列は DDBJ データベースから得た。この外群は, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary および *Sclerotium shiraiana* (Henn.) S. Imai とした。

塩基配列のアライメントは, 系統解析ソフト MEGA4<sup>71)</sup>に搭載されている ClustalW<sup>72)</sup>で実施した。イントロンはアライメントから除外するとともに, アライメントが不明瞭な位置は系統解析に供する前に除外した。また, アライメントギャップは欠損データとして取り扱った。得られたアライメントは TreeBASE (<http://www.treebase.org/tree-base/>, アクセス番号 No. S2485) に寄託した。系統樹は, MEGA4 を用いて最大節約法 (MP 法, ヒューリスティック探索, CN1 level = 1) により構築した。ブートストラップ値 (BP) は, 樹形の信頼性を確保するために 1,000 反復で計算した。

## 結果

### 1. 高次解析(SSU + LSU +5.8S rDNA)に基づく系統関係

K18 株の SSU rDNA を PCR により増幅したところ, *Mycochaetophora gentianae* MAFF 239231 (約 1,000 bp) に比べてサイズの大きい約 1,600 bp の増幅産物が認められた。この増幅産物は 1661 塩基からなり, イントロンが 491 番目から 825 番目 (335 bp) および 1263 番目から 1568 番目 (306 bp) に挿入されていることが明らかになった (データ省略)。そこで, 以降の解析にはこのイントロンを除去した塩基配列を用いた。

K18 株および *M. gentianae* のタイプ菌株 (MAFF 239231 株) の系統学的な所属について, 3 ヶ所の rDNA 塩基配列を統合したデータセット (SSU+LSU +5.8S) を用いて検討した (図 5)。このデータセットは 58 菌群の 2,020 塩基のアライメントから構成され, 745 ヶ所の variable position (36.9%), 503 ヶ所の parsimony-informative position (24.9%) を有した。このうち, Wang et al.<sup>75)</sup>が解析から除外した 14 ヶ所は, この分析でも除外した。最大節約法 (MP 法) では, 樹長 2,483, 一致指数 0.443, 保持指数 0.580 の最短樹 (MPTs) が 3 樹得られ, それらをもとに厳密合意樹を作成した。

系統解析から, K18 株と *M. gentianae* MAFF 239231 株はズキンタケ綱 (Leotiomycetes) ビョウタケ目 (Helotiales) ーリテスマ目 (Rhytismales) のクレードに含まれることが明らかとなった (BP = 86%)。そして, 両菌株は単系統であることが高いブートストラップ値 (97%) で強く支持された。さらに, これら *Mycochaetophora* 属 2 菌株は *Rhexocercosporidium carotae* と単一のクレードを形成した (BP = 100%)。このクレードとの姉妹群は, *Vibrissea* 属 (ビンタケ科; Vibrisseaceae), *Mollisia* 属 (ハイイロチャワンタケ科; Dermateaceae), *Loramycetes* 属 (Loramycetaceae) および不完全菌の *Phialocephala* 属から構成されるクレードであったが, ブートストラップ値は 50%未満であった。このクレードの近傍には, ビョウタケ目の各科 (ヒアロスキファ科; Hyaloscyphaceae, テングノメシガイ科; Geoglossaceae, ビョウタケ科; Helotiaceae, キンカクキン科; Sclerotiniaceae, ズキンタケ科; Leotiaceae) が位置した。しかし, 各科とも 2 つのクレードから構成され, 単系統ではなかった。

### 2. 低次解析 (ITS 領域) に基づく系統関係

*G. triflora* 分離株, *M. gentianae* およびビョウタケ目に所属する *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌との系統関係を ITS 領域を用いて評価した (図 6)。このデータセットは 30 菌群の 525 塩基のアライメントから構成され, 256 ヶ所の variable position (48.8%), 166 ヶ所の parsimony-informative position (31.6%) を有した。アライメントが不明瞭な 5 ヶ所はこの分析から除外した。MP 法では, 樹長 542, 一致指数 0.742, 保持指数 0.787 の 24 個の最短樹が得られ, それらをもとに厳密合意樹を作成した。

この系統解析から, *G. triflora* 分離株と *M. gentianae* は単一系統であることが強く支持された (BP = 99%)。 *M. gentianae* MAFF 239231 と MAFF 239284 の ITS 塩基配列は一致し, K18 株はこれらと比較して 2 塩基の違いが認められた。 *Mycochaetophora* 属のクレードは 2 つのサブクレードに分かれ, 一方は岩手県内の *G. triflora* から分離された K18 株と J4 株 (BP < 50%) のサブクレード, 他方は岡山県内の *G. scabra* から分離された MAFF 239231 株と MAFF 239284 株のサブクレードであった。

*Mycochaetophora* 属のクレードは, *Rhexocercosporidium* 属のクレードと姉妹群に位置し (BP 値 < 50%), さらに *Rhexocercosporidium* 属, *Helgardia* Crous & W. Gams (テレオモルフ: *Oculimacula* Crous & W. Gams), *Rhynchosporium* Heinsen ex A.B. Frank, *Cadophora* 属, *Leptodontidium orchidicola* Sigler & Currah, および *Pyrenopeziza brassicae* B. Sutton & Rawl から成る大型のクレードを形成した (BP 値 99%)。このクレードは 2 つのサ



ブクレードに分かれ、一方は *Helgardia* 属と *Rhynchosporium* 属 (BP 値 56%), 他方は *Cadophora* 属, *L. orchidicola*, *Mycochaetophora* 属, *P. brassicae* および *Rhexocerosporidium* 属 (BP 値 < 50%) であった. *Mycochaetophora* 属と最も近縁なテレオモルフは、ハイロチャワンタケ科 (Dermateaceae) の *Oculimacula* 属であった.

*O. yallundae* と *O. acuformis* の両種は ITS 領域の塩基配列が一致し, K18 株と 30 塩基の違いが認められた. 次に近縁なテレオモルフはハイロチャワンタケ科 (Dermateaceae) の *P. brassicae* であった. *P. brassicae* の 2 菌株は ITS 領域の塩基配列が一致し, K18 株と 33 塩基の違いが認められた.

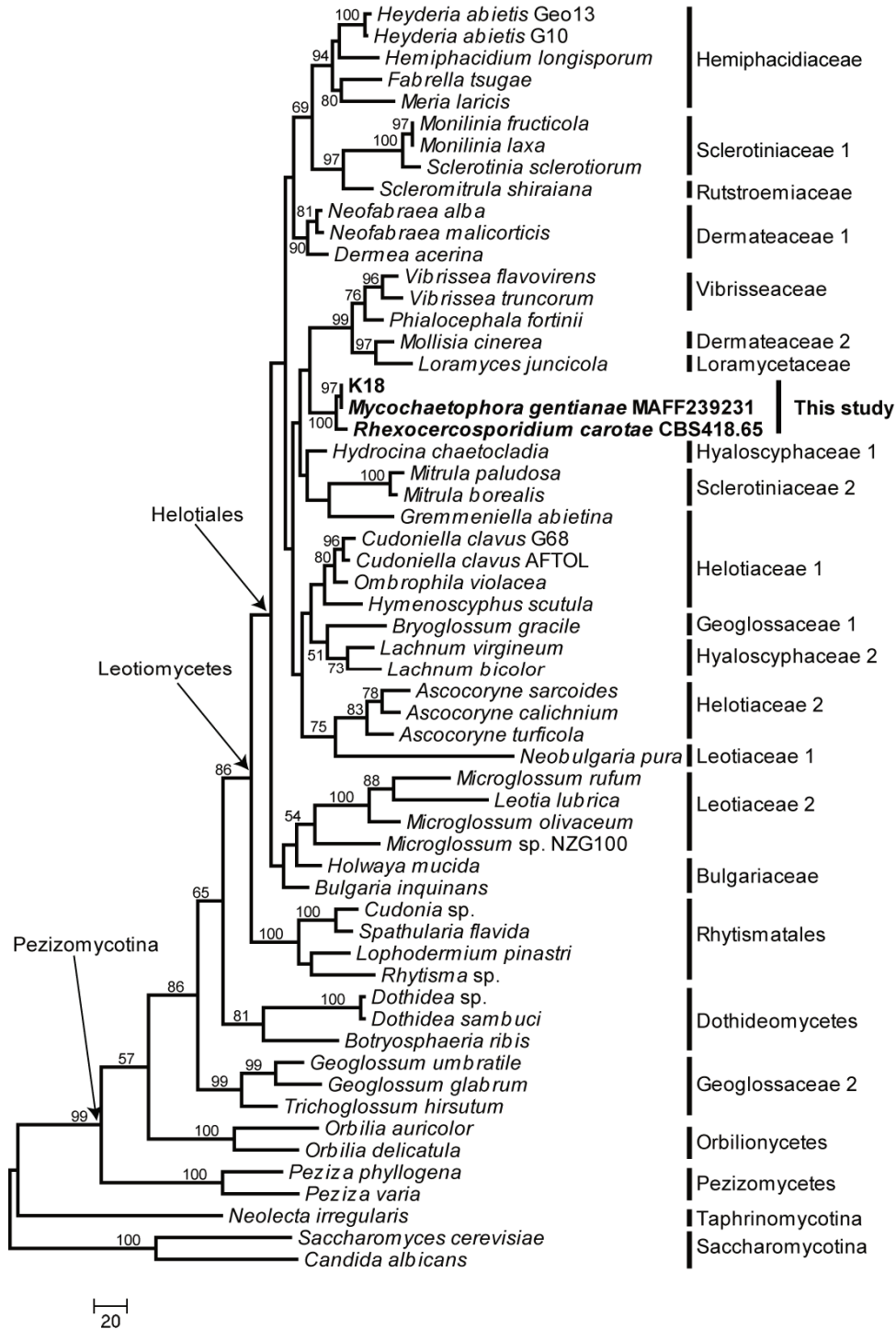


図 5 SSU+LSU+5.8S rDNA のデータセット (Wang et al. 2006a, b) に基づくリンドウ褐斑病菌の分子系統樹 (高次解析).

最大節約法により厳密合意樹 (樹長 2,483, 一致指数 0.443, 保持指数 0.580) を作成した. 太字は *Mycochaetophora* 属菌と *Rhexocerosporidium carotae* を含むクレードを示す. 科レベルのクレードの記載は Lumbsch and Huhndorf (2007a) に基づき記載した. ブートストラップ分析は 1,000 反復で実施し, 信頼値 50% 以上を分岐に示した. スケールはステップ数を示す.

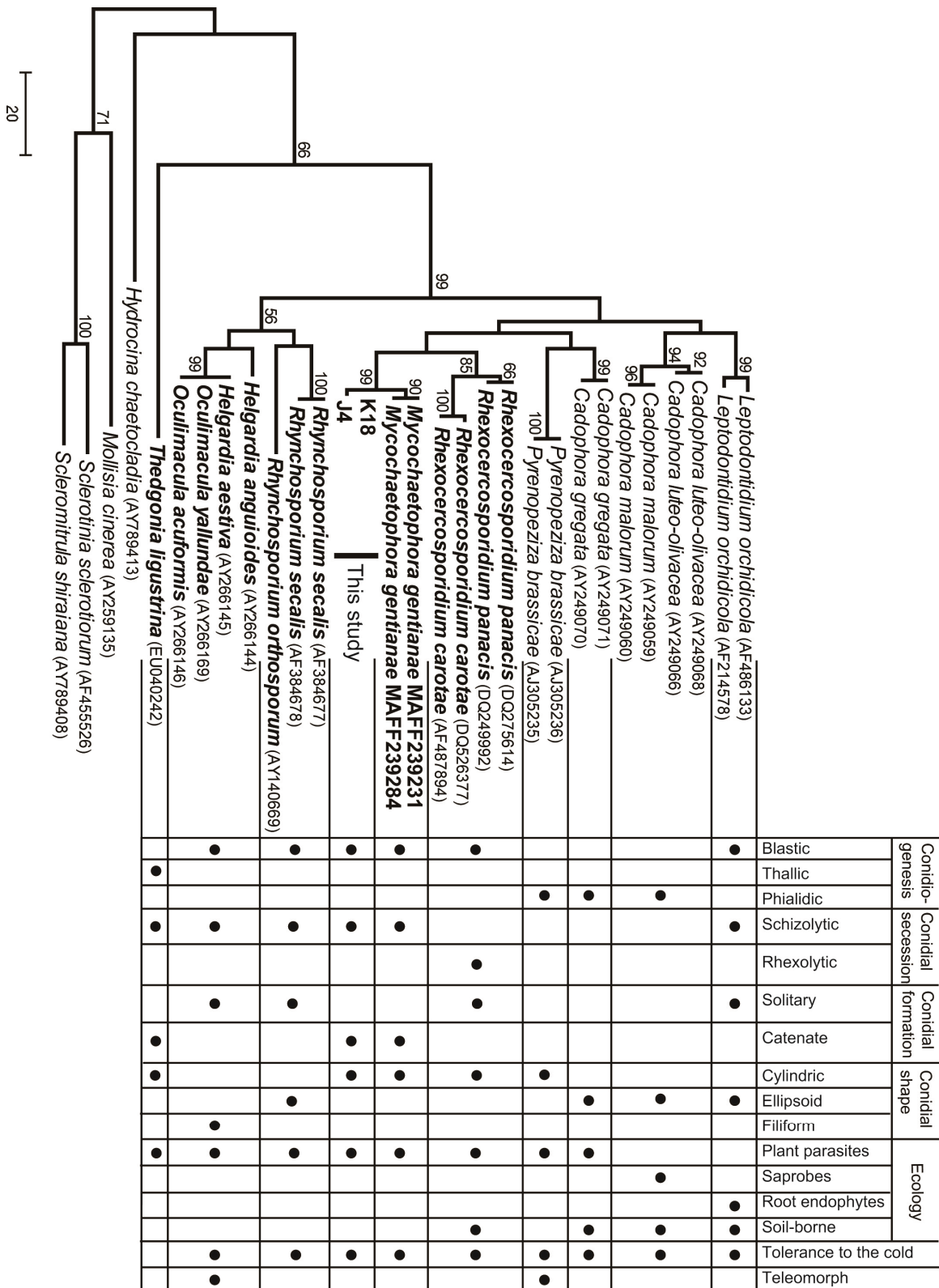


図 6 リンドウ褐斑病菌とビョウタケ目の *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌の分子系統樹(低次解析).

最大節約法により厳密合意樹(樹長542, 一致指数0.742, 保持指数0.787)を作成した. 太字は *Mycochaetophora* 属菌と *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌を示す. ブートストラップ分析は1,000 反復で実施し, 信頼値50%以上を分岐に示した. スケールはステップ数を示す.

## 第6節 考察

### 1. *G. triflora* 分離株の同定

*G. triflora* 分離株 (K18 株) の培養的, 病原学的, 形態的な特徴は, *M. gentiana*e MAFF 239231 株 (*G. scabra* から分離されたタイプ菌株) と比べて, 分生子の先端の形態を除いてほぼ一致した. MAFF 239231 株の分生子は, 未成熟な時はその先端が尖っているが, 成熟して胞子体から脱離する頃になるとその先端はやや尖っているか丸い. したがって, この分生子の形態からは, K18 株と MAFF 239231 株を形態的に区別することはできなかった. また, MAFF 239231 の分生子の幅は, 原記載<sup>40)</sup>とわずかに異なっていた (3.5~5  $\mu\text{m}$  と 2~3.5  $\mu\text{m}$ ). K18 株, MAFF 239231 株ともに, 分生子ははじめ鞭状であるため, この原記載<sup>40)</sup>は未成熟な分生子を基にしていると思われる. さらに, 両者の ITS 領域を比較すると 2 塩基の違いはあるものの, 上記の形態的な違いを支持する形質であるか, 本研究では明らかにすることはできなかった. 以上のことから, *G. triflora* 分離株は *M. gentiana*e と同定することが妥当であると考えられた.

本菌の原記載には *G. scabra* の病徴写真が示されている<sup>40)</sup>が, この罹病株の写真は *G. scabra* に特有の花葉の形態, すなわち萼裂片が線形~狭皮針状<sup>86)</sup>や花冠が反転する<sup>87)</sup>特徴を有しておらず, むしろ *G. triflora* に見える. そして, 接種試験では, *G. scabra* 分離株と *G. triflora* 分離株は, *G. triflora* に病原性を示したが, *G. scabra* には示さなかった. 以上のことから, 既報<sup>40)</sup>で用いたリンドウは *G. triflora* であった可能性がある. また, *G. scabra* は *M. gentiana*e の感染に対して抵抗性を有していることも示唆される. 各品種と発病の関係については, 第6章「品種と発病の関係」でさらに検討した.

### 2. *M. gentiana*e の分生子形成様式

顕微鏡観察の結果から, *M. gentiana*e の分生子は, 短い分生子柄から出芽状に形成されることが明らかになった. この短い分生子柄の存在は, 本病の初発生を報告した粕山・出射<sup>36)</sup>では言及されているが, *M. gentiana*e の原記載<sup>40)</sup>では触れられていない. *M. gentiana*e の分生子形成様式は, 本属のタイプ種である *M. japonica* と似ている. すなわち, 原<sup>23)</sup>は, *M. japonica* の担子梗の基部の細胞 1, 2 個を除く他の細胞より発芽状に胞子を発出するとしている. 一方で, 分生子において二次分生子が形成される細胞の位置は, *M. gentiana*e と *M. japonica* では異なっている. すなわち, 前者は分生子の基部から数えて 1 番目もしくは 2 番目の細胞に二次分生子が形成されるが, 後者はほとんどすべての細胞に形成される<sup>23)</sup>. また, 分生子の離脱様式は裁断型 (schizolytic) であり, その分生子痕は厚くなく目立たない. 以

上をまとめると, *M. gentiana*e の分生子形成様式の特徴 (分生子痕は厚くなく目立たない, 分生子は無色で連鎖する, 分生子柄は短い, 分生子の離脱様式は裁断型である) は *Pseudocercospora* 属不完全糸状菌類の特徴とよく一致しており, 両者の類縁性を示唆している.

### 3. *M. gentiana*e のビョウタケ目 (Helotiales) における系統学的な位置

*M. gentiana*e のテレオモルフは未だ見つかっていない. そこで, *M. gentiana*e の系統学的な所属を明らかにするために, 3ヶ所の rDNA (SSU + LSU + 5.8S) を統合した高次の系統解析を実施した (図 5). その結果, *M. gentiana*e はビョウタケ目に属する *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類の *Rhexocercosporidium carotae* と単系統であった (BP 値 100%). この 2 属は, ビョウタケ目-リテスマ目のクレードに含まれていることが強く支持され (BP 値 86%), さらにビョウタケ目に属する各科が近傍に位置した. この結果から, *M. gentiana*e はビョウタケ目に属すると考えられた.

この高次解析では, ビョウタケ目の各科は単系統ではなかったため, *M. gentiana*e の科レベルでの所属を明らかにすることはできなかった. ビョウタケ目の各科が異系統から構成されていることは, 他の系統解析からも知られている<sup>17,19)</sup>. また, *M. gentiana*e と *R. carotae* がビョウタケ目内でグループを形成していることは明らかとなったが, 他のビョウタケ目の菌群との系統関係を明らかにすることはできなかった. Wang et al.<sup>75)</sup>は, 今回用いた 3ヶ所の rDNA 領域のデータを用いた解析では, 幅広い分類群におけるビョウタケ目の系統関係を解明するには有効であるが, より深い関連性を明らかにするにはその有効性は限定されるとしている.

一方で, ITS 領域を用いた低次の系統解析では, *M. gentiana*e を含む類縁菌のクレードは 2 つのテレオモルフ, すなわちハイイロチャワンタケ科 (Dermateaceae) の *Pyrenopeziza* 属と *Oculimacula* 属も含まれた. Goodwin<sup>19)</sup>は, ITS 領域の系統解析に基づき, *Rhynchosporium secalis* のテレオモルフが存在するならば, *Tapesia* 属 (= *Oculimacula* 属) であろうと予測している. したがって, *M. gentiana*e のテレオモルフがもし存在するのであれば, *Oculimacula* 属もしくは *Pyrenopeziza* 属に近い菌群であると予測される.

### 4. *M. gentiana*e と *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類との関連性

ITS 領域を用いた解析から, *M. gentiana*e はビョウタケ目に所属する *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類のうち 3 属 (*Helgardia* 属, *Rhexocercosporidium* 属, *Rhynchosporium* 属) とクレードを形成し (BP = 99%), 両者には緊密な系統関

係が認められた(図6). これら3属は *M. gentianae* と同様に、分生子痕は厚くなく目立たず、分生子形成様式は出芽状であるという共通の特徴がある. 一方で、ビョウタケ目の *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類のうち *Thegonia ligustrina* (Boerema) B. Sutton はこのクレードからは分かれた. この系統関係の違いは、*Thegonia* 属の分生子形成様式の違い(葉状体型[thallic] vs 出芽型[blastic])が反映していると推察される. したがって、*M. gentianae* と *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類3属との系統関係は、形態的な類縁性を反映していると推察され、*Mycochaetophora* 属を創設した原<sup>23)</sup>の予測、すなわち「*Mycochaetophora* 属は広義の *Cercospora* 属 (= *Pseudocercospora* 属)の隣に位置する」ことを支持する結果である.

このクレードの中で、*M. gentianae* は単系統であり、*Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類3属 (*Helgardia* 属、*Rhexocercosporidium* 属、*Rhynchosporium* 属)から分かれることが強く支持された(BP 値 99%). これら3属は既報でもお互いに近傍に位置することが示唆されている<sup>12,19,24,33)</sup>が、これまでこれら菌群の系統関係と形態的特徴の関連性については十分に考察されていない.

*R. carotae* は、高次解析および低次解析において *M. gentianae* の最も近傍に位置する土壌伝染性の病原菌であり、ニンジン (*Daucus carota* L.) に black rot を引き起こす<sup>6,7)</sup>. *Rhexocercosporium* 属は、分生子の離脱様式が rhexolytic (基部の隔壁より下の側壁が裂開して破裂して切断)であり、分生子柄は大きく糸状であり (Braun 1995)、分生子の形態は *M. gentianae* と良く似ている. この *Rhexocercosporidium* 属の分生子の離脱様式 (rhexolytic) は、*M. gentianae* の裁断型 (schizolytic) と明らかに区別される (図6).

*Helgardia* 属は、*M. gentianae* とは別のサブクレードに位置し、オオムギやコムギ等の穀物に眼紋病 (eye spot) を生じ、短い分生子柄に分生子塊を生じる<sup>12,65)</sup>. *Helgardia* 属の分生子塊の形状は、*Mycochaetophora* 属の胞子体の形状 (箒状) と類似している. しかし、*Helgardia* 属と *M. gentianae* は、分生子の形成パターン (単生; solitary vs 連鎖; catenate) や分生子の形態 (糸状 [filiform] vs 円筒形 [cylindrical]) の点で異なる. さらに、*Helgardia* 属の分生子柄の形態は、円筒形～膝関節状または波状であり<sup>12,65)</sup>、*M. gentianae* の分生子柄の形態とは著しく異なる.

*Rhynchosporium* 属は、*Helgardia* 属と同様に *M. gentianae* とは異なるサブクレードに位置し、オオムギ、ライムギおよび牧草に雲形病 (scald) を引き起こす. 分生子は二細胞のうち一方には嘴状の beak を有する特徴がある<sup>10)</sup>. *Rhynchosporium* 属の分生子は、菌糸上に直接形成され分

生子柄を形成しない<sup>10)</sup>. すなわち、*Rhynchosporium* 属の分生子の形成様式や形態は、*Mycochaetophora* 属とは明らかに異なる (図6).

以上をまとめると、*M. gentianae* とこれら3属は、生態的 (植物病原菌) および表面的な形態の類似性はあるが、系統関係および形態的な特徴には明確な違いがあることから、*Mycochaetophora* 属は独立した属でありこれら3属のシノニム (同物異名) ではないことは明らかである.

## 5. *M. gentianae* と *Cadophora* 属、*Leptodontidium* 属および *Pyrenopeziza brassicae* との関連性 (1) 形態的な関連性

ITS 領域の系統関係から、*M. gentianae* は2つのアナモルフ、*Leptodontidium* 属および *Cadophora* 属、およびテレオモルフの *Pyrenopeziza brassicae* と同クレードを形成した (図6). これらはそれぞれエンドファイト、腐生菌および植物病原菌であり、これまでもビョウタケ目の *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類との系統関係が示唆されてきた<sup>12,19,24,33,81)</sup>. *Leptodontidium* 属の分生子形成様式は出芽状であり<sup>15)</sup>、*M. gentianae* や *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類の分生子形成様式と一致している. しかし、*Cadophora* 属や *P. brassicae* のアナモルフ (*Cylindrosporium concentricum* Greville) の分生子はフィアライドから形成され、*M. gentianae* の分生子形成様式とは異なる. したがって、*M. gentianae* とこれら菌群との系統関係は、形態的特徴からだけでは説明することができなかった.

## (2) 生態的な関連性

Wang et al.<sup>75)</sup> は、ビョウタケ目に属する菌群における進化の歴史には、ライフスタイルや生態的要因が大きいことを示唆している. *M. gentianae* の PDA における菌糸生育は低温域でも認められ (図4)、この低温域は宿主であるリンドウの生育に適している<sup>88)</sup>. *R. carotae* も低温条件下で生育することができる<sup>34,63,68)</sup>. Goodwin<sup>19)</sup> は、*Rhynchosporium* 属と *Helgardia* 属 (= *Ramulispora* 属) では生態的な特徴が似ていることを指摘している. すなわち、両病原菌は、それぞれの宿主に対して秋から冬にかけて感染し<sup>10,16)</sup>、低温条件下では分生子の形成や発芽することができる<sup>10,16)</sup>. *P. brassicae* も低温条件において宿主に感染し分生子を形成することができる<sup>18)</sup>. *L. orchidicola* はカナダ西部の高山性や亜高山性の地帯に自生する植物から分離されている<sup>15)</sup>. *C. gregata* は土壌伝染性の病原菌であり、ダイズ落葉病 (brown stem rot) を引き起こすが、その病徴発現は低温が好適である<sup>22)</sup>. また、*Cadophora* 属菌は南極の土壌に生息し、この地帯に自生している腐生菌である<sup>4,25)</sup>. 以上をまとめると、これら菌群の系統学的な類縁性は、共通した特性、すなわち低温環

境に対する耐性が関連している可能性を示唆しており、低温耐性クレード(cold-tolerant clade)を構成しているかもしれない。

また、ITS 領域の系統関係から、*M. gentianae* と土壌生息性の菌群(*Cadophora* 属、*Leptodontidium* 属および *Rhexocercosporidium* 属)は低いブートストラップ値であったがサブクレードを構成した。本病は前年に発生した圃場では翌年も発生する傾向がある<sup>50)</sup>ことから、この結果は *M. gentianae* が土壌で生息している可能性を示唆している。本病菌の土壌伝染性については、第5章第5節で検討した。

### (3) ビョウタケ目内における低温耐性クレードの系統学的な位置

Wang et al.<sup>75)</sup>は、3ヶ所の rDNA を統合した塩基配列をもとに、ビョウタケ目を新たに 9 つのクレードに分けている。Lumbsch and Huhndorf<sup>44,45)</sup>は、このクレードがビョウタケ目における将来的な科レベルの分類の基礎となるかもしれないと述べている。Wang et al.<sup>75)</sup>は、9 つのクレードの中で *Vibrissea-Loramyces* クレードは水生腐生菌、木材分解菌および根部エンドファイトから構成され、*Rhexocercosporidium* 属や植物病原性の *Tapesia* 属 (*Oculimacula* 属)が含まれるだろうと予測している。しかし、本研究の結果では、*R. carotae* と *M. gentianae* から成るクレードは、*Vibrissea-Loramyces* クレードには含まれず、その姉妹群として位置した(図5)。したがって、*Vibrissea-Loramyces* クレードは Wang et al.<sup>75)</sup>の予測よりも広いことが推測される。また、上述の ITS 領域の系統関係から見いだされた低温耐性クレードは、植物病原菌、腐生菌および根部エンドファイトが含まれており、ビョウタケ目内で植物病原菌を中心とした新しいクレードが構成される可能性がある。

## 6. まとめ

本章では、岩手県内のエゾリンドウ(*G. triflora*)から分離したリンドウ褐斑病菌を *Mycochaetophora gentianae* と同定した。本菌の分生子は、短い分生子柄から出芽型(blastic)に生じ、裁断状(schizolytic)に離脱し、分生子痕は厚くなく目立たないことを明らかにした。分子系統および形態的特徴から、*M. gentianae* はビョウタケ目に属する *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類 3 属と近縁であるが、*Mycochaetophora* 属は独立した属であり、これら 3 属のシノニムではないことを示した。加えて、ITS 領域の解析から、*M. gentianae* はビョウタケ目の *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類と同様に、*Cadophora* 属、*Leptodontidium* 属および *P. brassicae* とともに系統学的に関連していることが明らかになった。

## 第4章 病原菌の生理学的性質

第3章では、病原菌は不完全菌の *Mycochaetophora gentianae* であることを明らかにした。本章では、病原菌の感染、発病および孢子形成に関わる生理学的性質を明らかにするために、*in vitro* において分生子の発芽、菌糸生育、および分生子の形成に影響する諸条件を検討した。

### 第1節 分生子の発芽

#### 1. 培地を用いた発芽試験

培地上における分生子の発芽に及ぼす培地の栄養分、温度および pH の影響を調査した。

#### 材料および方法

培地を用いた発芽試験は、PDA または WA 平板を用い、5~35°Cの温度範囲で行った。分生子懸濁液は、K18 株の接種により罹病葉を作製し、第3章第4節で示した方法で孢子体を形成させこれを回収して滅菌水に懸濁し 5×10<sup>5</sup> 個/ml となるように調製した。培地 1 枚当たり 3 ヶ所に分生子懸濁液を 10 μl ずつ滴下し、クリーンベンチ内で約 15 分間風乾した後、所定温度に設定した恒温器で 24 時間培養した。発芽率の経時変化は、WA 平板を用いて、培養 12, 24, および 48 時間後に調査した。pH の影響は、HCl および NaOH で pH3~9 に調整した WA 平板を用い、20°C で 24 時間培養した。発芽率の調査は、接種した位置にラクトフェノール・コットンブルー溶液 10 μl を滴下して分生子を染色し、光学顕微鏡(BX51, Olympus 製)を用いて行った。発芽管長は、発芽した孢子を任意に 20 個選び計測した。

#### 結果

温度条件が分生子の発芽に及ぼす影響を図7に示す。発芽率が最も高くなった温度は 20~25°Cであった。発芽率 50%に要する時間は、20~25°Cが 12 時間であり、15°Cと 30°Cが 24 時間、10°Cが 48 時間であった。発芽率 90%に要する時間は、20~25°Cが 24 時間であり、15°Cと 30°Cは 48 時間であった。5°Cでは分生子の発芽がわずかに認められたが、35°Cでは認められなかった。

培地の種類が分生子の発芽に及ぼす影響を図8に示す。PDA と WA では、いずれの温度条件においても発芽率および発芽管長には差が認められなかった。

培地 pH が分生子の発芽に及ぼす影響を図9に示した。培養 24 時間後の比較において、pH4~9 では発芽率 90%以上であったが、pH3 では 74%とやや低かった。発芽管の伸長は、pH5~9 に比べて pH3~4 では短かった。

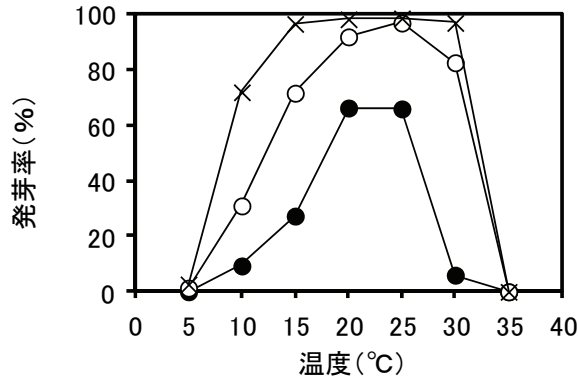


図 7 分生子の発芽に及ぼす温度の影響

WA に分生子懸濁液を滴下し、12~48 時間培養した。

●: 培養 12 時間, ○: 24 時間, ×: 48 時間

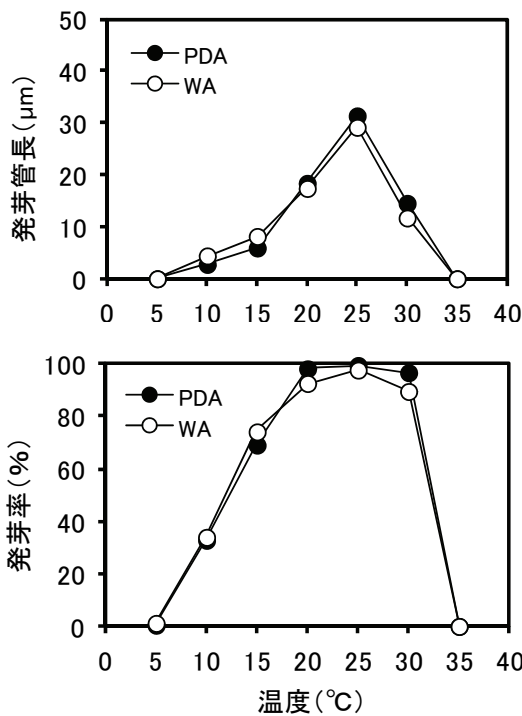


図 8 分生子の発芽に及ぼす培地の種類の影響。

PDA (●) と WA (○) に分生子懸濁液を滴下し、24 時間培養した。

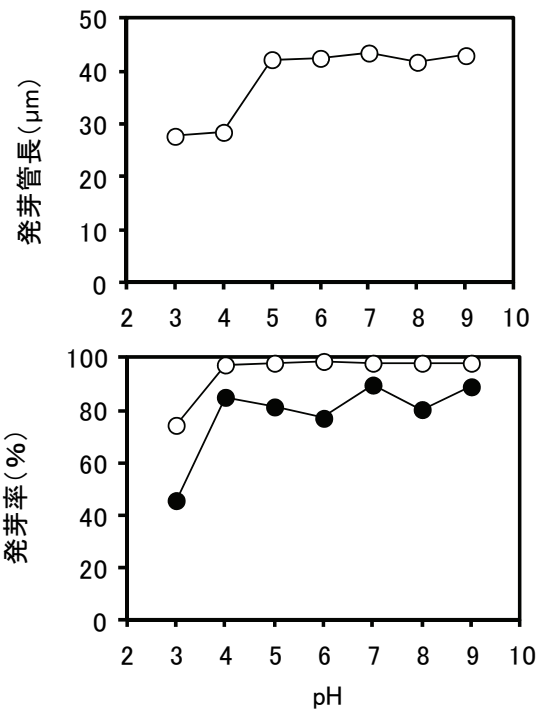


図 9 分生子の発芽に及ぼす培地 pH の影響。

所定の pH に調製した WA に分生子懸濁液を滴下し培養した。●: 12 時間, ○: 24 時間

## 2. スライドガラスを用いた発芽試験

スライドガラス上における分生子の発芽に及ぼす温度と相対湿度の影響を調査した。

### 材料および方法

湿室は 9 cm 径のプラスチック製のペトリ皿を用いた。このペトリ皿に NaCl を 0, 0.3, 0.9, および 1.5 M 加えた 2% 寒天を約 40 ml 流し込み、湿室内の相対湿度 (RH) をそれぞれ 100, 99, 97, 95% とした<sup>3)</sup>。前項 (1) で用いた K18 株の分生子懸濁液をスライドガラス上の 3 ヶ所に 10 μl ずつ滴下し、クリーンベンチ内で約 15 分間風乾した。自由水処理ではこの

風乾を行わなかった。このスライドガラスを各相対湿度に設定したペトリの上蓋に置き寒天が上面となるように重ねた後、パラフィルムを巻いて密封した。自由水処理では RH 100% の湿室に静置した。24 時間後と 48 時間後にスライドガラスを各 1 枚ずつ回収し、ラクトフェノール・コットンブルー溶液で染色した後、プレパラートを作製した。光学顕微鏡 (BX51, Olympus 製) で 1 箇所当たり 100 個の分生子を調査し、発芽率を算出した。試験は 2 回実施した。発芽率に対する温度と相対湿度の影響は、分散分析により検討した。発芽率は、arcsine 変換により角変換した後、統計ソフト JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて分散分析に供試した。



## 結果

分散分析の結果から、分生子の発芽に影響する要因として、温度、相対湿度、および両者の交互作用が認められたが、相対湿度の影響が特に大きかった(表5)。分生子の発芽に対する相対湿度と温度の影響を図10に示す。培養24時間、48時間いずれにおいても、RH 100%および99%では発芽したが、97%以下では発芽しなかった。培養48時間のRH 100%と99%の比較において、いずれの温度でもRH

99%の発芽率が顕著に低かった。また、温度が高くなると発芽率も高くなった。RH 100%の比較において、発芽率は25°C、20°C、15°C、10°Cの順にそれぞれ100%、91%、39%、16%であった。

分生子の発芽に及ぼす風乾処理の影響を表6に示した。培養48時間の比較において、風乾した場合(RH 100%)は風乾しなかった場合(自由水処理)に比べて、いずれの温度でも発芽率が高い傾向がみられた。

表5 分生子の発芽<sup>1)</sup>に及ぼす温度と相対湿度の影響に関する分散分析表

要因	自由度	平方和	平均平方	F値	p値
温度(T)	3	2,752	917	7.987	0.0018
相対湿度(RH)	3	17,119	5,706	49.675	<0.001
T×RH	9	3,741	416	3.619	0.0122
誤差	16	1,838	115		

1) 培養48時間の発芽率について分析

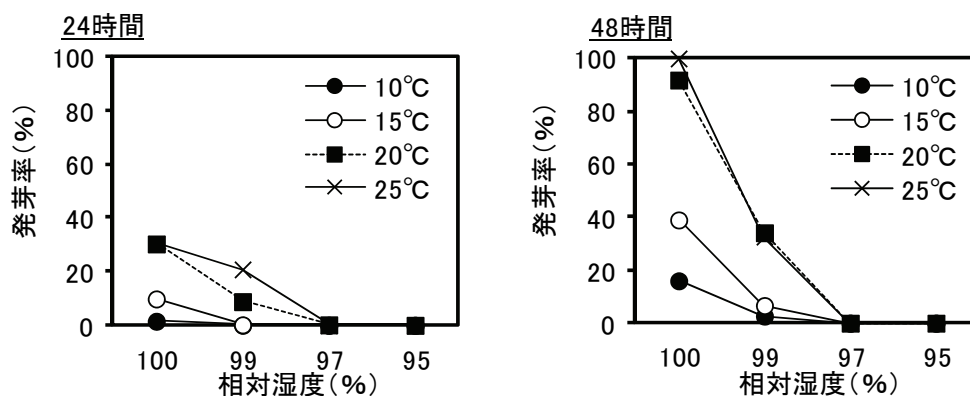


図10 分生子の発芽に及ぼす相対湿度と温度の影響。

分生子懸濁液を滴下したスライドガラスを各相対湿度に設定した湿室に置き各温度で培養した。左は24時間後、右は48時間後。●:10°C, ○:15°C, ■:20°C, ×:25°C。

表6 分生子の発芽<sup>1)</sup>に及ぼす風乾処理<sup>2)</sup>の影響

温度	分生子発芽率(%)					
	試験1		試験2		平均	
	FW	Dry	FW	Dry	FW	Dry
10	11	17	8	15	10	16
15	21	41	8	37	15	39
20	63	92	100	92	81	92
25	27	100	100	100	63	100

1) 培養48時間後に調査

2) FW:自由水(風乾なし), Dry:風乾あり



## 第2節 培地における菌糸生育

菌糸生育に及ぼす培地の種類とpHの影響を検討した。

## 材料および方法

供試菌株は K18 株, J4 株および MAFF 239231 株を用いた(表 3)。V8 ジュース平板培地で前培養した菌叢から 5 mm 径のコルクボーラーで一部を切り出し, 新しい平板培地に移植し, 20°C で 14 日間培養した。各種培地の菌糸生育に及ぼす影響を明らかにするために, 松山<sup>47)</sup>を参考に表 7 に示した天然培地 4 種, 半合成培地 2 種, 合成培地 5 種の合計 11 種を選び用いた。至適 pH を明らかにするために, 塩酸または水酸化ナトリウムで pH3~10 に調整した PDA を用いた。調査は, 培養 14 日後に菌叢の長径と短径を計測してその平均を求めた。実験は 3 反復とし, これを 2 回実施した。

## 結果

## (1) 培地の種類の影響

各種培地における菌叢生育を表 7 に示す。供試した 3 菌株はいずれも PDA, PCA, V8 ジュース, オートミール, 麦芽エキスおよび酵母エキスでの生育は良好であった。各培地における菌叢の特徴を表 8 に示すとともに, 主な培地における菌叢を図版 III に示す。PDA, PCA, V8 ジュースおよび V8 ジュースおよびオートミールでは, 菌叢の周囲が黄~オリーブ色を呈した(図版 III-C, D)。酵母エキス培地ではフェルト状の菌叢を生じた(図版 III-E)。供試菌株のうち J4 株は, 合成培地の Currie 氏, Pfeffer 氏および Czapek 氏培地における菌糸生育が悪く, K18 株および MAFF 239231 株に比べて薄い菌叢を生じた(図版 III-F)。いずれの培地においても分生子の形成は認められなかった。

表7 各培地における菌叢生育<sup>1)</sup>

培地の種類	菌叢直径 (mm)		
	K18	J4	MAFF 239231
PDA	35.0	37.5	37.5
PCA	35.0	37.5	37.5
V8	38.0	37.5	32.4
オートミール	33.0	34.0	31.5
麦芽エキス	35.5	35.4	36.3
酵母エキス	31.8	33.0	36.5
Currie氏	25.5	17.3	19.3
Rhichards氏	27.8	31.3	23.3
Pfeffer氏	25.5	14.7	17.0
Hopkins氏	22.5	28.2	20.5
Czapek氏	28.8	17.2	21.5

1) 暗黒下で20°C, 14日間培養

表8 各培地における菌叢の特徴<sup>1)</sup>

培地の種類	菌叢の特徴		培地への色素産生
	菌糸の色	形態	
PDA	暗緑色~暗褐色	円形, 中央部が盛り上がる, 気中菌糸あり	—
PCA	暗緑色~暗褐色	円形, 菌叢は薄い, 中央部がやや盛り上がる	—
V8	暗緑色~暗褐色	円形, 菌叢はやや厚い,	黄~オリーブ色
オートミール	灰白色~暗緑色	円形, 菌叢は薄い	黄~オリーブ色
麦芽エキス	褐色~オリーブ色	円形, 菌叢は薄い	—
酵母エキス	褐色~灰褐色	円形~不整円形, フェルト状	—
Currie氏	褐色~暗緑色	不整円形, 菌叢は薄い, J4株の菌叢は特に薄い	—
Rhichards氏	暗緑色~暗褐色	円形~不整円形, 菌叢は薄い, J4株の菌叢は特に薄い	—
Pfeffer氏	褐色~灰白色	不整円形, 菌叢は薄い, J4株の菌叢は特に薄い	—
Hopkins氏	褐色~灰褐色	円形~不整円形, 菌叢はやや薄い	—
Czapek氏	暗褐色	不整円形, 菌叢は薄い, J4株の生育は特に悪い	—

1) K18株を暗黒下で20°C, 14日間培養

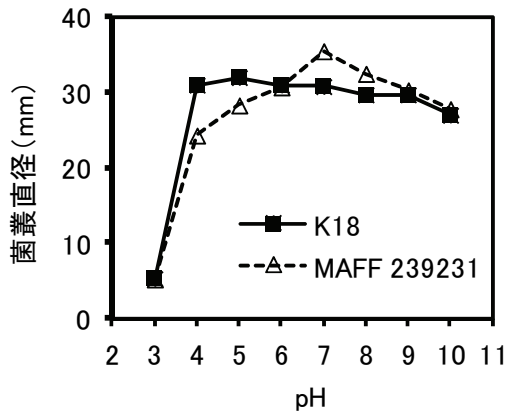


図 11 菌糸生育に及ぼす培地 pH の影響

各 pH に調整した PDA に移植し、20°C、14 日間、暗黒下で培養した。

## (2)pH の影響

培地 pH が菌糸生育に及ぼす影響を図 11 に示す。K18 株および MAFF 239231 株ともに pH3~10 のすべての区で生育した。pH4~10 では菌糸の生育は良好であったが、強酸性の pH3 では劣った。

## 第 3 節 分生子の形成誘導

本病の接種試験法を確立するため、接種源となる分生子の人工培養法を検討した。

### 1. 平板培養

#### (1)紫外線照射

##### 材料および方法

供試菌株は K18 株、J4 株および MAFF 239285 株を用いた。これら菌株を V8 ジュース平板で 14 日間前培養した後、PCA 平板に移植し 20°C、7 日間暗黒下で培養した。生育した菌糸表面の菌糸を白金耳で掻き取り、BLB 照射 12 時間明暗条件下でさらに 7 日間培養した。

##### 結果

いずれの菌株も孢子形成は認められなかった(データ省略)。

#### (2)重層培地

##### 材料および方法

(1)と同様に、PCA 平板で 7 日間培養した後、1.5%素寒天を 10 ml 重層し、さらに 7 日間暗黒下で培養した。

##### 結果

K18 株と J4 株では、重層した素寒天の表面に菌糸を若干生育したが、孢子形成は認められなかった(データ省略)。

#### (3)水没処理

##### 材料および方法

(1)と同様に、PCA 平板で 7 日間培養した後、培地表面に滅菌水 5 ml を流し込み、3 日間水没処理した。この表層水を除去した後、20°C で 7 日間暗黒下で培養した。

##### 結果

いずれの菌株も孢子形成は認められなかった(データ省略)。

#### (4)スライド培養

##### 材料および方法

供試菌株と接種源は(1)と同様とした。スライド培養は池上ら<sup>27)</sup>に従い、プラスチック製のペトリ皿にうすく流した PCA 培地の一部を取り除き、小部屋を作って菌を接種後、通気のため少しずらして 22 mm 角のカバーガラスをかけ、この培地を 20°C、7 日間暗黒下で培養した。

##### 結果

供試した 3 菌株ともに、培地が接していないカバーガラスの表面に菌糸を伸長し、この菌糸上に孢子体が形成された(図 12, 図版 IV-A)。また、培地とカバーガラスとの間を伸長した菌糸には孢子体は形成されなかったが、カバーガラス置床部を超えて伸長した菌糸には孢子体が形成された(図 12)。分生子柄は未熟な分生子とともに鞭状かつ単細胞に生じ、後に隔壁を生じて短い分生子柄を生じた。この分生子柄から分生子が出芽状に形成され孢子体を形成した(図版 IV-B, C)。K18 株の分生子の大きさは 12~32×2~3 μm であった。

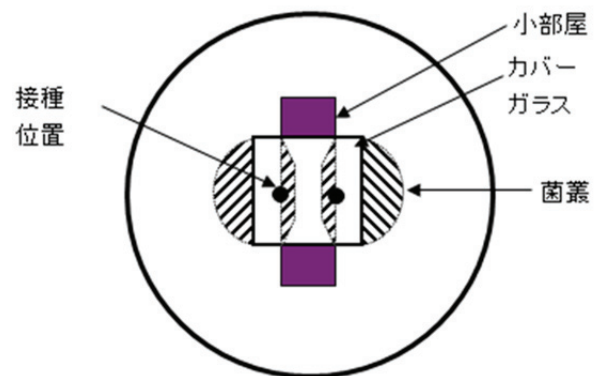


図 12 スライド培養による孢子体の形成。

PCA 平板に幅約 20×5 mm の小部屋を空け、その側部に接種した。図中の斜線部は菌叢上に孢子体が形成された位置を示す。

## (5)カバーガラス等の被覆と胞子体形成との関係

(4)ではスライド培養において，カバーガラスの置床部を超えて伸長した菌糸に胞子体が形成された。そこで，接種後のカバーガラスの被覆期間と胞子体の形成との関係を検討した。

## 材料および方法

供試菌株と接種源は(1)と同様とした。PCA 平板に菌糸片を接種し，乾熱滅菌した 22 mm 角の カバーガラスまたはオートクレーブ滅菌した 30 mm 角のセロファンで被覆し，20℃の恒温器で 8 日間培養した。所定の期間(0, 2, 4, 6, 8 日間)経過した後，この被覆を取り除いた。光学顕微鏡(BX-2, Olympus 製)を用いて被覆面を経目的に観察した。

## 結果

カバーガラスおよびセロファンを被覆処理した菌叢は，被覆を除去した直後は胞子体が認められなかった(表 9)。被覆除去 2 日後には，被覆面の菌叢には胞子体が形成され，被覆除去 4 日後には胞子体が多数認められた(図版IV-D~F)。被覆をしなかった菌叢(被覆期間 0 日)は，被覆処理した菌叢に比べて明瞭に盛り上がり，また試験期間を通じて胞子体は形成されなかった。被覆を 8 日間継続した菌叢(被覆期間 8 日)では，K18 株では胞子体は認められなかったが，MAFF 239285 株では被覆の外側に伸長した菌糸，およびセロファンを突き抜けて伸長した菌糸に胞子体を形成した。

## 2. 液体培養

液体培地を用いて分生子を大量に培養することを目的として，分生子濃度に及ぼす培地および培養温度の影響を検討した。

## 材料および方法

供試菌株は K18 株と J4 株を用いた(表 3)。培地はジャガイモニンジン液体培地(ジャガイモ 20g;ニンジン 20g; 蒸留水 1L, 以下 PC 液体培地)と，これを 10 倍希釈した培地を用いた。供試菌株を V8 ジュース平板で 20℃, 2 週間培養した後，その含菌寒天を所定濃度の PC 液体培地に接種した。この培地を，所定の温度(15, 20 および 25℃), 5 日間暗黒下で往復振とう培養した。得られた培養液は，ガーゼで菌糸をろ過し，分生子懸濁液を得た。培養液中の分生子濃度は，トーマ氏血球計算盤を用いて 3 回計数し，その平均値から算出した。反復は，1 処理当たり 2 本とし，試験は 2 回実施した。

## 結果

培地濃度が培養液中の分生子濃度に及ぼす影響を表 10 に示した。PC 液体培地は 1/10 希釈した培地に比べて，いずれの菌株でも分生子濃度が高かった。

培養温度が培養液中の分生子濃度に及ぼす影響を表 11 に示した。K18 株は J4 株に比べて，いずれの培養温度でも分生子濃度は低かった。両菌株ともに培養温度が高くなると分生子濃度は低くなる傾向があり，15℃が適温であった。25℃では，菌体増殖量は旺盛であったが，分生子はほとんど認められなかった。

表9 スライド培養におけるカバーガラスの被覆期間<sup>1)</sup>と以降の胞子体の形成程度<sup>2)</sup>

供試菌株	被覆期間 (日数)	カバーガラス/セロハン				
		被覆除去後の培養期間(日数)				
		0	2	4	6	8
K18	0	—	—	—	—	—
	2	—/—	+/+	+/+	+/++	nt
	4	—/—	+/-	+/+	nt	nt
	6	—/—	+/-	nt	nt	nt
	8	—/—	nt	nt	nt	nt
MAFF 239285	0	—	—	—	—	—
	2	—/—	+/+	+/+	+/++	nt
	4	—/—	+/+	+/++	nt	nt
	6	—/—	+/+	nt	nt	nt
	8	—/— ※ ※	nt	nt	nt	nt

1) PCAに菌糸片を接種し，カバーガラスまたはセロハンで被覆した。所定期間被覆を保持した後に除去した。

2) —:胞子体の形成が認められない，+:認められる，++:多数認められる

※カバーガラス:被覆外側の菌糸に胞子形成，セロファン:セロファンを突き抜けた菌糸に胞子体を形成

表10 培養液中の分生子濃度に及ぼす培地濃度の影響<sup>1)</sup>

供試菌株	培地濃度 <sup>2)</sup>	実験回数/分生子濃度( $\times 10^5$ 個/ml)			
		1回目	2回目	3回目	平均
K18	1	0.9	1.9	1.4	1.4
	1/10	1.7	0.2	—	0.9
J4	1	12.5	1.3	3.1	5.6
	1/10	2.3	0.6	—	1.5

1) 15°C, 5日間振とう培養した.

2) PC液体培地

表11 培養液中の分生子濃度に及ぼす培養温度の影響<sup>1)</sup>

供試菌株	培養温度(°C)	実験回数/分生子濃度( $\times 10^5$ 個/ml)			
		1回目	2回目	3回目	平均
K18	15	0.9	1.9	1.4	1.4
	20	0.0	0.8	0.2	0.3
	25	0.0	0.0	0.2	0.1
J4	15	12.5	1.3	3.1	5.6
	20	10.6	2.0	0.6	4.4
	25	0.0	0.3	1.9	0.7

1) PC液体培地で5日間振とう培養した.

## 第4節 考察

### 1. 分生子の発芽

分生子の発芽には、温度と相対湿度(RH)が影響することが明らかになった。培地およびスライドグラスを用いた発芽試験の結果はよく一致し、温度範囲は10~30°C、適温は20~25°Cであった。この結果は、菌糸生育温度の結果(図4)とよく一致している。一方、分生子の発芽には、相対湿度99%以上を必要とし、100%が好適であった。一般に、孢子が発芽するためにはRH90%以上を必要とする<sup>21)</sup>が、水媒伝染するリンゴ黒星病菌 *Venturia inaequalis* の分生子はRH99%未満では発芽しない<sup>21)</sup>。相対湿度100%になると結露を伴うことから、本病菌のリンドウ葉上での発芽やその後の感染には葉面の濡れ時間が制限要因となり得ることを示唆している。

スライドグラスを用いた発芽試験において、分生子懸濁液を風乾した場合は、風乾しなかった場合(自由水処理)に比べて発芽率が高かった(表6)。他の植物病原菌における発芽試験では自由水処理は最も発芽率が高くなる傾向があり<sup>3,32,43,83)</sup>、本結果とは異なる。Struck<sup>69)</sup>は、数種の病原糸状菌では、分生子が発芽するためには基底(substratum)に接触し付着することが不可欠であるとしている。したがって、本病菌の分生子は水滴中では容易には発芽せず、風乾処理によってスライドグラスに付着し物理的な刺激を受けることで発芽が促進されたと推察される。

### 2. 菌糸生育に対する培地の影響

V8 ジュースおよびオートミール平板培地の培養菌叢では、黄~オリーブ色の着色を呈した。本病は病斑の周囲が黄色のハローを呈する(第2章第1節, 図版I)ことから、このハローは本病菌が生産する色素であると推察される。

### 3. 分生子の形成誘導

本病菌は各種培地の菌叢上には分生子を形成しなかった。他の糸状菌で報告されている孢子形成法<sup>59)</sup>では分生子は形成されなかったが、スライド培養によって孢子体が形成された。すなわち、カバーガラス表面に伸長した菌糸やカバーガラス置床部を超えて伸長した菌糸に孢子体が形成された。この培養条件下で形成された分生子の大きさは、病葉上に形成された孢子体(表4)に比べてやや小さい傾向があったものの、分生子の形成様式は出芽状であり罹病葉のそれと合致した(第3章第4節)。また、カバーガラスやセロファンで被覆培養し、被覆を除去することでも後に孢子体を形成した。この孢子形成法は、酵母 *Cryptococcus neoformans* では報告がある<sup>14)</sup>が、糸状菌での報告は見あたらない。リンドウの罹病葉における孢子体の形成様式は、表皮下の菌糸から分生子柄が現れる(第3章第4節)ことや、セロファンで被覆した場合にはこれを

突き破って胞子体が形成されたことから、この被覆培養は本病菌がリンドウの表皮下に存在しているかのような擬似環境を作り出している可能性がある。また、この被覆を除去もしくは菌糸が被覆外に伸長すると胞子体が形成されたことから、リンドウ葉上における胞子体の形成には、宿主側の変化による物理的的刺激、例えば病患部の罹病程度の伸展に伴う組織の崩壊や腐敗が影響する可能性が示唆される。病患部の罹病程度が胞子体の形成に及ぼす影響は、第5章第4節で検討した。

PC液体培地を用い、15°Cで培養することで $10^5$ 個/mlを超える濃度の分生子懸濁液を大量に得ることができた。この分生子の形成適温15°Cは、本病菌の菌糸生育適温の20~25°Cに比べると低温である。本病菌のような菌糸生育適温に比べて胞子形成適温が低い傾向は、本病菌と系統関係にある *Helgardia herpotrichoides* や *Rhynchosporium secalis* (第3章第6節)でも認められている<sup>10,16)</sup>。

## 第5章 発生生態

第3章では、本病菌がエゾリンドウに病徴を示すが、ササリンドウには病徴を示さないことを述べた。そこで、本章ではエゾリンドウ(以下、「リンドウ」)を用い、本病の伝染様式を明らかにするために、分生子によるリンドウへの感染(第1節、第2節)、潜伏期間(第3節)、病斑上における胞子体の形成(第4節)に関わる諸条件を検討した。また、本病菌の生活環を明らかにするため、前年罹病残さの第一次伝染源としての役割を検討した(第5節)。また、第6節では圃場における感染実態を調査し、感染条件や生活環をもとに気象条件と時期別の感染頻度との関係を考察した。

### 第1節 感染条件

本病菌のリンドウに対する感染条件を明らかにするため、発病に及ぼす接種濃度、温度、葉面濡れ時間、および葉位の影響を検討した。

#### 1. 接種濃度の影響

##### 材料および方法

供試植物は、岩手県農業研究センター(岩手県北上市)で栽培されている4年生のリンドウ品種「ジョバンニ」を用い、2009年8~9月に切り枝を採取した。草丈を約40cmに切り揃え、葉が9対(18葉)となるように調製した。この切り枝を蒸留水で満たした300ml容三角フラスコに2本ずつ水差し、1処理当たり6本を供試した。

供試菌株はK18株(表3)を用いた。接種源は、第4章第3節2.に準じて、V8平板で前培養した菌叢片をPC液体培地に接種し、15°Cで5日間往復振とう培養した。この培養液は、ガーゼで菌糸を取り除いた後、冷却遠心機を用いて4°C、8,000 rpmで15分間遠心分離して上清を除去した。得られたペレットを滅菌水に再懸濁し、 $10^1 \sim 10^5$ 個/mlの5段階希釈した分生子懸濁液を調製した。

接種は、1処理当たり約30 mlの分生子懸濁液を供試植物全体に噴霧した。接種後の葉面の濡れを維持するために、接種した植物は温室(ポリエチレン製袋内)で被覆し、25°C、暗黒下に設定した恒温器(Tabai-ESPEC社製)内で72時間の葉面の濡れを維持した。温室内の飽和湿度を保持するために、蒸留水で濡らしたペーパータオル2枚を底に敷くとともに、期間中は袋の内側に滅菌水をハンドスプレーで24時間おきに噴霧した。温室から供試植物を取り出し、扇風機で30分間乾かした後、25°Cに保持した実験室内で管理した。実験は3回繰り返した。

発病調査は、接種14日後に肉眼によって発病の有無を観察し、発病葉率を算出した。

統計処理は、統計解析ソフトJMP(SAS Institute)を用い、回帰分析によって発病葉率と分生子濃度との関連を検討した。発病葉率は対数変換した数値を用いた。

## 結果

発病葉率は、接種濃度(分生子濃度)が高まるにつれて増加し、 $10^5$ 個/mlが最も高かった(図13)。分生子濃度が $10^2$ 個/mlでも発病した。分生子濃度と発病葉率との間には直線的な相関が認められ、 $R^2 = 0.840$ であった。

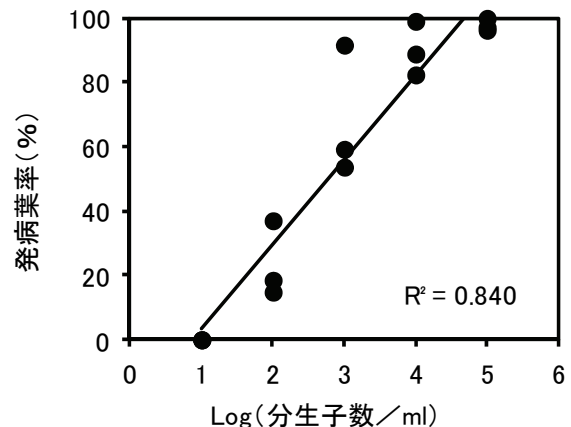


図13 リンドウ褐斑病の発病葉率に及ぼす接種源濃度の影響。

供試植物は2009年8~9月に圃場から採取した切り枝を用いた。接種後、25°C、72時間の葉面の濡れを保持した。発病調査は接種14日後に実施した。

## 2. 温度、葉面濡れ時間および葉齢の影響

### 材料および方法

供試品種、接種源、接種方法および発病調査は前項1)に準じた。供試植物は2009年6~7月に切り枝を採取した。接種後の温度と葉面濡れ時間の影響は、4段階の温度(10, 15, 20, 25°C)と5段階の葉面濡れ時間(24, 36, 48, 60, 72時間)の組合せで検討した。所定の葉面濡れ時間毎に、各温室から6個体ずつランダムに取り出し、25°Cに保持した実験室内で管理した。感染に対する葉齢の影響を検討するために、供試植物の上位葉、中位葉、下位葉には印を付けた。実験は3回繰り返した。実験計画は3分割区法(split-split-plot)で行い、このうち主試験区を温度( $T$ )、副試験区を濡れ時間( $W$ )、副・副試験区を葉位( $LP$ )とした。

発病調査は、葉齢による感受性を評価するために、葉位毎に上(第1~3葉位)、中(第4~6葉位)、下(第7~9位)の3グループに分け、個々の葉における発病の有無を観察し、発病葉率を算出した。

統計処理は、統計解析ソフトJMP(SAS Institute)を用い、分散分析(ANOVA)により、発病葉率に及ぼす温度、葉面濡れ時間および葉齢の影響を検討した。発病葉率はarcsine変換により角変換した数値をANOVAに供試した。

## 結果

### (1) 温度と葉面濡れ時間の影響

分散分析の結果から、温度、葉面濡れ時間、および両者の交互作用は、発病葉率に対して有意に影響が認められた(表12)。

温度(15~25°C)と葉面濡れ時間(36~72時間)が増加すると、発病葉率は高くなった(図14, 図15)。一方で、温度10°Cや24時間の葉面の濡れでは、いずれの温度と葉面濡れ時間の組み合わせでも発病しなかった。各葉面濡れ時間において、各温度(10~25°C)の間には有意な違いが認められた。

### (2) 葉位の影響

分散分析の結果から、発病葉率に対して葉位の影響が認められたが、温度や葉面濡れ時間に比べて $F$ 値は小さかった(表12)。葉位別では、上位葉に比べて中位葉および下位葉の発病葉率が高かったが、有意差は15°C、葉面濡れ時間72時間のみ認められた(図15)。

## 3. 考察

分生子懸濁液を用いた接種試験により本病菌の感染に及ぼす各種要因の影響を検討したところ、接種源濃度、温度、葉面濡れ時間、および葉齢が感染に影響することが明らかになった。

感染に好適な条件下(温度25°C、葉面の濡れ72時間)では、 $10^2$ 個/mlの低い分生子濃度でもリンドウに病斑を生じた。この結果は、本病の流行には分生子による分散が大きな意味を持っていることを示している。すなわち、圃場における発生消長は、はじめ散在的に病斑が発生し漸増した後に急激に増加する(第2章第1節)ことや、病斑上には多数の分生子を抱えた胞子体が形成されることから、発生初期に形成された病斑は第二次伝染源として以降の流行に影響を与えると推察される。

本病菌の感染は15~25°Cの範囲で起こり、適温は25°Cであった。この温度範囲15~25°Cは岩手県におけるリンドウの栽培期間のうち6~9月の平均気温にあたり、感染適温25°Cは本病が急激に発病増加する8月の平均気温とほぼ一致している。発病に要した葉面濡れ時間は、少なくとも36時間であった。Magarey et al.<sup>46)</sup>は、葉に斑点を生じる植物病原菌53種類について、感染に及ぼす温度と葉面濡れ時間の影響の既報を基に、発病に要する最少の葉面濡れ時間( $W_{min}$ )を比較している。これによれば、約90%の事例は、 $W_{min}$ が20時間未満(平均9時間)であり、本病菌のように $W_{min}$ が24時間を超える植物病原菌は*Cercospora carotae*(宿主:ニンジン、 $W_{min}$ :28時間)と*Sclerotinia sclerotiorum*(宿主:ダイズ、 $W_{min}$ :48時間)の2

表12 発病葉率<sup>1)</sup>に及ぼす温度、葉面濡れ期間、葉位の影響に関する分散分析

要因 <sup>2)</sup>	df	平方和	平均平方	$F$ 値	$p$ 値
T	3	93,503.63	31,167.88	216.14	<0.001
W	4	86,543.52	21,635.88	150.04	<0.001
LP	2	3,972.23	1,986.12	13.77	<0.001
$T \times W$	12	38,855.73	3,237.98	22.45	<0.001
誤差	158	22,784.40			

1) arcsine変換した数値を用いた。

2) T:温度, W:葉面濡れ期間, LP:葉位

種のみである。したがって、本病菌は他の植物病原菌に比べて、宿主に感染するために長時間の葉面の濡れを必要とする特異な性質を有していると考えられる。

葉齢の影響は、温度や葉面濡れ時間に比べると小さかったものの、上位葉は中位葉や下位葉に比べて発病が少なく、より抵抗性であった。この結果は、圃場内では中位

葉や下位葉に発病が多いこと(第2章第2節;仲谷・高橋<sup>51)</sup>)と一致している。したがって、展開間もない若い葉は本病菌の感染に対して抵抗性であるが、成葉になり老化すると他の糸状菌病害の事例<sup>9,49)</sup>と同様に感受性に変化することを示唆している。

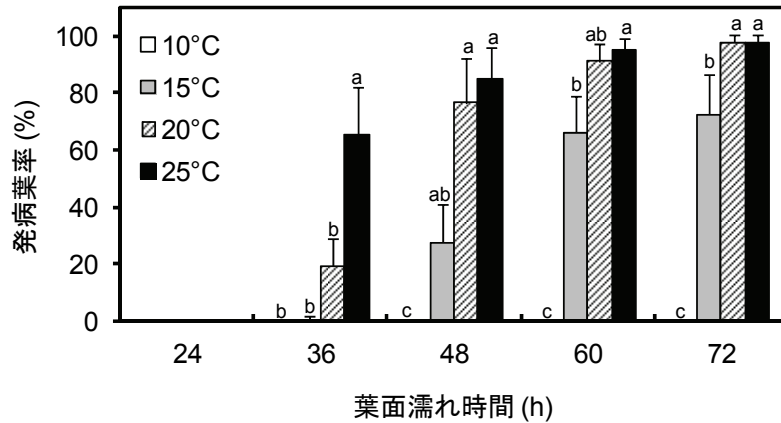


図 14 リンドウ褐斑病の発病葉率に及ぼす温度と葉面濡れ時間の影響。

供試験植物は 2009 年 6~7 月に圃場から採取した切り枝を用いた。接種源は、 $10^5$  個/ml に調整した分生子懸濁液を用いた。調査は接種 14 日後に実施した。エラーバーは標準誤差。葉面濡れ時間毎の同一英小文字間には Turkey の多重比較において違いがないことを示す。

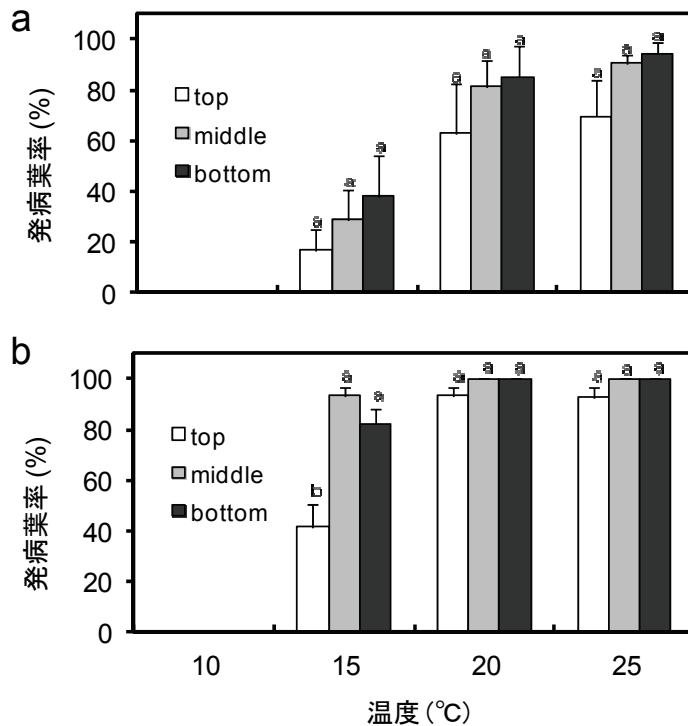


図 15 リンドウ褐斑病の発病葉率に及ぼす葉齢の影響。

供試植物と接種源濃度は図 14 と同一。葉面濡れ時間は 48 時間(a)と 72 時間(b)。エラーバーは標準誤差。温度毎の同一英小文字間には Turkey の多重比較において違いがないことを示す。



## 第2節 分生子の感染動態

第1節において、本病菌の分生子による感染は、温度と葉面濡れ時間の影響を受けることを明らかにした。本節では、接種後の分生子の動態とこれら要因との関係を検討した。

### 1. 病斑上における分生子の発芽と付着器の形成

#### 材料および方法

供試品種、菌株、接種法は第1節に準じた。リンドウ葉組織内への病原菌の侵入は、接種7日後に生じた直径1mm未満の微小な病斑を用いて観察した。病斑を中心に約5mm角に葉片を切り出した。葉片の固定、脱色および染色は、Kanto *et al.* (2007)の方法を改変して行った。葉片はエタノール-酢酸(95:5)に浸漬して、2日間、組織を固定した。この葉片は、抱水クロラルを染み込ませたティッシュペーパーに、接種面が上側になるように1日間静置し、脱色した。滅菌水を染みこませたティッシュペーパー上で30分間、水に置換した後、ラクトフェノール・コットンブルー溶液で10分間染色し、プレパラートを作製した。光学顕微鏡(BX-51, Olympus製)下で病斑の表面を観察した。

#### 結果

接種7日後の病斑上では1~数個の分生子が認められ、いずれも発芽管と付着器が観察された(図版V-A)。この分生子は、その片側または両端の細胞から発芽し、いくつかは中間の細胞からも発芽した。付着器は、発芽管の先端に形成され、形態、色および大きさには変異があるが、多くは棍棒形~卵形、無色~やや褐色で、大きさ8~10×5~8 μmであった。この病斑上には、発芽管や付着器を有する分生子が存在するだけでなく、直下の表皮内には感染菌糸がマット状に広がっていた(図版V-B)。

### 2. 分生子の発芽と付着器の形成に及ぼす温度と葉面濡れ時間の影響

#### 材料および方法

供試品種と菌株は第1節に準じた。接種後に分生子が発芽し付着器を形成する過程は、健全葉に分生子懸濁液を接種したものを観察した。リンドウ葉は、圃場から中位葉を採取し用いた。接種は、分生子懸濁液(5×10<sup>5</sup>個/ml)10 μlを1葉当たり3ヶ所に滴下した。接種葉は、濡れたペーパータオルを敷いたプラスチック製の湿室に静置し、5段階の温度(5, 10, 15, 20, 25℃)に設定した恒温器で暗黒下で保持した。所定の葉面濡れ時間(24, 48, 72時間)を保持した後、この湿室から接種葉2枚を取り出し、接種した位置を中心として5mm角に切り出した。各処理ともに6葉片を準備した。

葉片の固定、脱色および染色は、前項1.に準じて行い、

1葉片当たり分生子50個(分生子300個/処理)について、光学顕微鏡下で観察した。試験は3回実施した。

#### 結果

分生子の発芽と付着器の形成に及ぼす温度と葉面濡れ時間の影響を図16に示した。分生子の発芽率は、温度と葉面濡れ時間に応じて著しく異なった(図16a)。24時間の葉面の濡れにおいては、発芽率は15℃では61%、20~25℃では90%以上であった。一方で、5℃と10℃ではそれぞれ0%、13%と低かった。48時間の葉面の濡れにおいては、15~25℃では発芽率100%であったが、5℃では0%、10℃では31%と低かった。すなわち、15~25℃では分生子の発芽は48時間の葉面の濡れで完了した。

付着器は、発芽管の先端に形成され、形態、色および大きさには変異があり、しばしば膨潤した付着器も認められた(図版V-F, G)。葉面では表皮細胞の間隙の付近に高い頻度で観察された(図版V-C~F)。付着器の形成割合は、温度だけでなく葉面濡れ時間も著しく影響し、温度が高く葉面濡れ時間が長いほど高くなった(図16b)。25℃では最も付着器の形成が活発であり、24時間の葉面の濡れで付着器の形成がわずかに認められ、48時間では50%以上となった。葉面の濡れ48時間の比較において、付着器の形成割合は、5~10℃で0%、15℃で8%、20℃で26%、25℃では73%であった。葉面の濡れ72時間の比較において、5℃で0%、10℃で7%、15℃で48%、20℃で70%、25℃では79%であった。

### 3. 考察

リンドウ葉面において、10℃以下では、分生子の発芽と付着器の形成は著しく抑制された。このことは、接種試験において10℃では72時間の葉面の濡れでも発病しなかった結果を支持している。分生子の発芽適温は20~25℃であり、15℃でも48時間の葉面の濡れで発芽が完了した。この結果は、*in vitro*における発芽試験の結果(図8, 図10)とよく一致している。付着器の形成割合は、温度が高く葉面濡れ時間が長くなるほど増加した。この結果は、第1節で示した、感染に及ぼす温度と葉面濡れ時間の影響(図14)の結果とよく一致している。付着器の形成は、植物病原菌では一般的な感染様式であり、各種環境条件により影響を受ける(Struck 2006)。したがって、温度の上昇と葉面濡れ時間の持続に伴い発病増加することには、付着器の形成がより重要な要因として関係していることを示している。

第3章第6節において、本病菌 *M. gentianae* は、植物病原性の不完全菌である *Helgardia* 属, *Rhexocercosporidium* 属および *Rhynchosporium* 属と形態的、系統学的並びに生

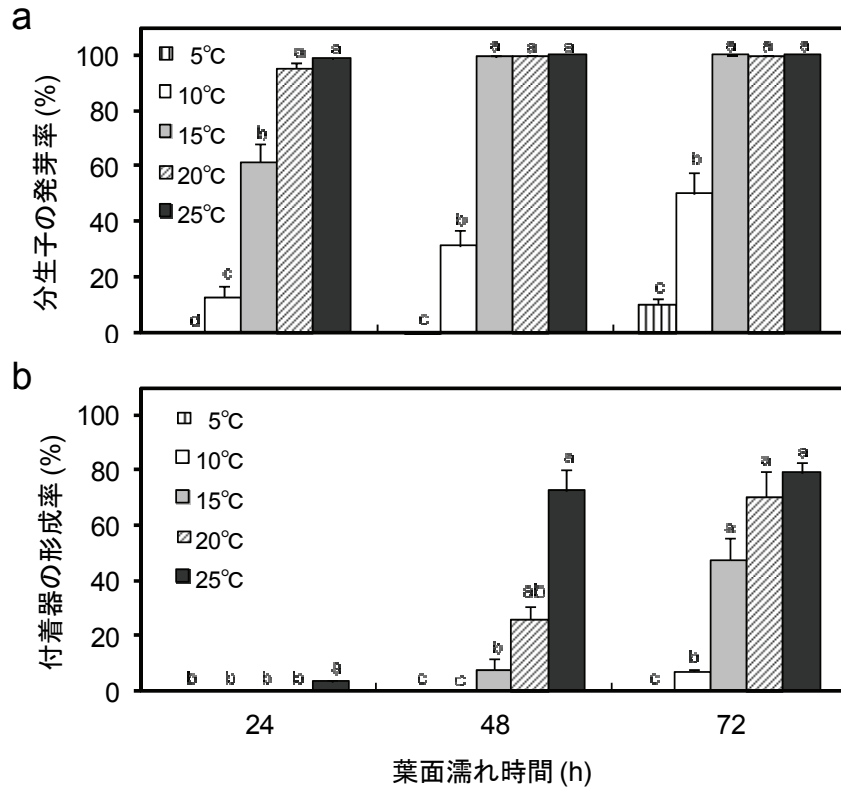


図 16 リンドウ葉上における分生子の発芽(a)と付着器形成(b)に及ぼす温度と葉面濡れ時間の影響

リンドウ葉に分生子懸濁液(5×10<sup>5</sup> 個/ml)を 10 μl 滴下し、湿室に静置した。エラーバーは標準誤差。葉面濡れ時間毎の同一英小文字間には Turkey の多重比較において違いがないことを示す。

態学的に関連性があることを考察した。これら植物病原菌の分生子は、宿主の葉上で付着器を形成し、その後表皮内に菌糸を侵入して感染する<sup>5,49,82)</sup>ことから、本病菌も同様の様式によることが示唆される。例えば、*Rhynchosporium secalis* は付着器を表皮細胞間隙の垂直な細胞壁上に形成し細胞間隙から表皮下に侵入する<sup>82)</sup>が、本病菌の付着器も表皮細胞の間隙近くに多く認められている。本研究では、リンドウ葉面における分生子の動態のみ観察したことから、今後は本病菌が表皮内に侵入する動態について観察する必要がある。

### 第 3 節 潜伏期間

感染から発病までの潜伏期間に及ぼす温度の影響を明らかにする。

#### 1. 接種後の温度管理が潜伏期間に及ぼす影響 材料および方法

供試品種、菌株、接種方法および発病調査は第 1 節に準じた。接種後、湿室で 25°C、60 時間の葉面の濡れを維持した切り枝を用いた。供試植物を所定の温度(15, 20, 25°C)に設定した恒温器内で管理した。調査は、接種 9, 11, 14 日後に実施した。発病程度は、病斑面積率に応じて以下の 0~4 の発病指数を与えた。0:病斑なし、1:1~

5%, 2:5~20%, 3:20~50%, 4:50%以上の病斑面積率。

### 結果

各温度条件で管理したリンドウにおける発病の推移を図 17 に示す。25°Cでは、接種 7 日後には灰白色、直径 0.1 mm 以下で肉眼では判別しにくい微細な斑点がわずかに認められた。この斑点は次第に拡大し、接種 14 日には直径約 0.5 mm の明瞭な斑点となった。接種 9 日後には発病程度 1.3 であったが、接種 11 日後には発病程度 2.2 と急激に増加し、接種 14 日後では発病程度 2.6 と漸増した。20°Cでは、接種 9 日後には発病は認められず、接種 11 日後では発病程度 0.6、接種 14 日後では 0.8 と漸増した。15°Cでは、接種 14 日後までの観察においていずれも発病が認められなかった。

#### 2. 接種後の変温管理が潜伏期間に及ぼす影響 材料および方法

供試植物、菌株、接種方法および発病調査は第 1 節に準じた。接種後、湿室で 20°C、60 時間の葉面の濡れを維持した切り枝を用いた。供試植物を 15°Cと 25°Cの恒温処理、または接種 11 日後までは 15°C、その後 25°Cとする変温処理条件下で管理した。調査は、接種 11 日後と 16 日後の 2 回実施した。

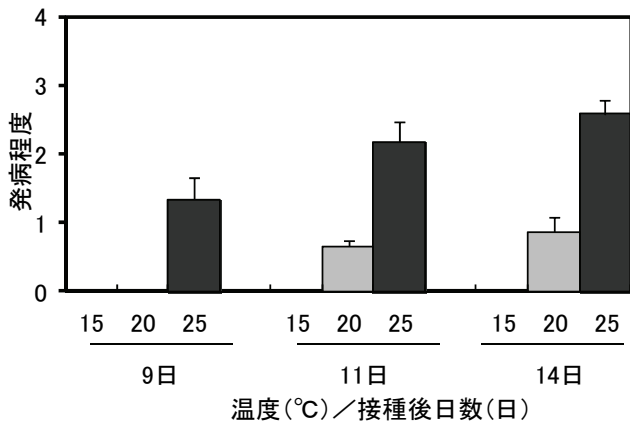


図 17 接種後の温度条件が潜伏期間に及ぼす影響.

温室で 20°C, 60 時間保持した後, 各温度条件で管理した. エラーバーは供試個体の標準誤差.

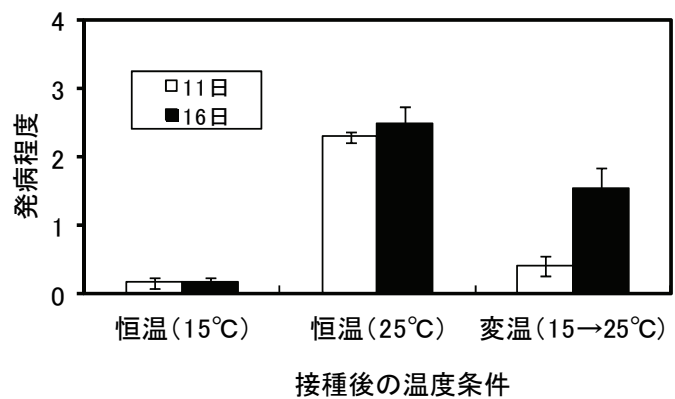


図 18 接種後の変温条件が潜伏期間に及ぼす影響.

温室で 20°C, 60 時間保持した後, 各温度条件で管理した. エラーバーは供試個体の標準誤差.

## 結果

恒温または変温処理したリンドウの発病推移を図 18 に示す. 接種 11 日後から 16 日後にかけて, 25°C の恒温条件ではそれぞれ発病程度 2.3 から 2.5 に漸増した. 15°C の恒温条件では, いずれも発病程度 0.2 と発病増加は認められなかった. 変温条件では, 接種 11 日後では発病程度 0.4 であり, さらに 25°C で 5 日間管理したところ接種後 16 日後では発病程度 1.5 となり, 15°C の恒温条件に比べて顕著な発病増加が認められた.

## 3. 考察

25°C で管理したリンドウは, 接種 7 日後から微細な病斑が現れ, 接種 14 日後には明瞭な病斑に伸展した. 小林ら (2009) は, 8 月接種では 5 日後, 10 月接種では 7 日後から形成されるとしており, 本結果とほぼ一致した. ただし, 接種 7 日後に生じた微細な病斑は肉眼では識別しにくく, 以降も発病増加することから, 接種から発病までの潜伏期間は 14 日程度であると判断される. 一方で, 15°C や 20°C の低温条件下で管理したリンドウは 25°C に比べて, 初発生時期が遅く発生量も少なかった. しかし, 15°C の低温処理したリンドウをその後 25°C で管理する変温処理では顕著な発病増加が認められた. したがって, 発病までの潜伏期間には感染成立後の温度が影響し, 低温ではこの期間が遅延することが明らかになった.

本研究では, 接種試験に切り枝を用いたためにリンドウを長期間管理することができず, 各温度別の潜伏期間を特定するには至らなかった. 今後, 寒冷地特有の低温の影響を検討することで, 実際の圃場における本病の潜伏期間を明らかにすることができると思われる.

## 第 4 節 病斑上における胞子体形成と分生子の分散

本節では, 本病の第二次伝染に関わる要因として, 病斑上における胞子体の形成に影響する諸条件を明らかにするとともに, 分生子の分散様式を検討した.

### 1. 胞子体の形成に関わる諸条件

#### (1) 病患部の罹病程度の影響

##### 材料および方法

供試菌株, 品種, 接種方法は第 1 節に準じた. 供試リンドウは, 2009 年 8 月にそれぞれ切り枝を圃場から採取し, 本病菌を接種して罹病葉を作製した. 罹病葉上の胞子体の形成を促すために, プラスチック製の箱 (30×22×5 cm) に濡れたペーパータオルを敷いた温室に罹病葉を置床し, 所定温度 (5, 10, 15, 20, 25°C) で 3 日間保持した. 各処理ともに罹病葉 6 枚を供試した. 病患部の罹病程度の影響を調べるために, 褐変腐敗を伴う病斑と褐変腐敗を伴わない (灰白色の斑点のみ有する) 病斑を各 9 個ずつ選び用いた. この病斑を中心として約 5 mm 角となるように葉片を切り出し, ラクトフェノール・コットンブルーで 10 分間染色し, さらにラクトフェノールで 2 回洗浄した後, プレパラートを作製した. 光学顕微鏡を用いて組織表面における胞子体の形成状況を調査し, 胞子体の形成割合を算出した.

## 結果

病患部の罹病程度が胞子体の形成に及ぼす影響を表 13 に示す. 褐変腐敗を伴った病斑では, 病斑上における胞子体の発達が顕著に認められた. 胞子体の形成割合は 20°C が最も高く, 次いで 15°C と 25°C であった. これに対して対照の褐変腐敗を伴わない病斑では, 胞子体の形成が認められなかった.

表13 胞子体の形成に及ぼす病患部の罹病程度の影響<sup>1)</sup>

病斑の褐変腐敗 <sup>2)</sup>	温度(°C)／胞子体の形成割合(%)				
	5	10	15	20	25
あり	0	0	11	78	22
なし	0	0	0	0	0

1) K18株の接種14日後の罹病葉を各温度に設定した湿室に3日間保持。

2) 病患部が褐変腐敗を伴う病斑と褐変腐敗を伴わない(灰白色の斑点のみ有する)病斑を各9個ずつ選び用いた。

## (2) リンドウの生育ステージの影響

### 材料および方法

供試菌株、品種および罹病葉の調製方法は前項1. に準じた。リンドウの生育ステージの影響を明らかにするために、生育ステージ別に生育初期(5～6月:2008年)、着蕾期(7～8月:2009年)、収穫後(9～10月:2007年、2008年)にそれぞれ切り枝を採取し、接種により罹病葉を調製した。自然発病葉を用いた試験では、2007年10月に岩手県農業研究センター内圃場、および岩手県奥州市農家圃場から罹病葉を採取した。湿室内に罹病葉を置床し、所定温度(5, 10, 15, 20, 25°C)で3日間保持した。各処理ともに罹病葉6枚を供試した。前項1. に準じて、褐変腐敗を伴う病斑をランダムに9～18個ずつ選び、胞子体の形成割合を調査した。

### 結果

リンドウの生育ステージおよび温度条件が胞子体の形成に及ぼす影響を表14に示す。生育初期(5～6月)では、10～20°Cの範囲で胞子体の形成割合が高かった。着蕾期(7～8月)では20°Cで胞子体の形成割合が高く、次いで15°Cと25°Cの順であり、5°Cと10°Cでは低かった。収穫後(9～10月)では、15°Cで胞子体の形成割合が最も高く、次いで20°Cと10°Cであった。各試験時期を通じて、20°Cは胞子体の形成割合が38～57%と最も高く、次いで15°Cの3～85%であり、5°Cと25°Cでは全般に低かった。また、着蕾期では、生育初期や収穫後に比べて、胞子体の形成割合はいずれの温度でも低かった。

表15には、収穫後(10月)の残茎に発生した自然発病葉における胞子体の形成状況を示した。胞子体の形成は温度10～23°Cすべてにおいて認められた。胞子体の形成割合は15°Cが最も高く、次いで13°Cであった。

## (3) 相対湿度の影響

### 材料および方法

供試菌株、品種および罹病葉の調製方法は前項1. に準じた。供試リンドウは、2008年5月と2009年6月に圃場から

表14 リンドウの生育ステージ別の胞子体の形成状況

生育ステージ <sup>1)</sup>	温度	胞子体の形成割合 <sup>2)</sup> (%)		
		1回目	2回目	平均
生育初期(5～6月)	5	0	7	3
	10	73	93	83
	15	53	40	47
	20	27	87	57
	25	7	0	3
着蕾期(7～8月)	5	0	0	0
	10	0	0	0
	15	0	6	3
	20	44	39	42
	25	0	11	6
収穫後(9～10月)	5	0	0	0
	10	60	0	30
	15	100	70	85
	20	30	50	38
	25	30	0	18

1) 各生育ステージ毎にリンドウを採取および接種し得られた罹病葉を用いた。試験年次は以下のとおり。生育初期:2008年、着蕾期:2009年、収穫後:2007年;2008年

2) 各試験において供試した病斑数は9～18個。

表15 収穫後に自然発病した罹病葉上における胞子体の形成に及ぼす温度の影響

温度	胞子体の形成割合 <sup>1)</sup> (%)		
	1回目	2回目	平均
10	0	40	20
13	75	70	73
15	100	100	100
18	30	30	30
20	40	20	30
23	nt	40	40

1) 品種「ジョバンニ」の自然発病葉を採取し用いた。1回目が2007年10月5日に岩手県農業研究センター内圃場、2回目が10月10日に岩手県奥州市農家圃場から採取した。供試した病斑数は、1回目が8～10個、2回目が10個。

り枝を採取し、本病菌を接種して罹病葉を作製した。相対湿度 (RH) の影響を調べるために、湿室内に濡れたペーパータオルを敷く代わりに、蒸留水、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、酒石酸ナトリウム、および  $\text{KCl}$  の各飽和水溶液をそれぞれ 100 ml ずつ流し込み、それぞれ相対湿度 100%、99%、94%および 86.6%とした<sup>80)</sup>。この時、罹病葉が溶液に直接触れないように湿室内に径 9 cm のペトリ皿を入れ、この上に罹病葉を置床した。各処理ともに罹病葉 6 枚を供試した。これら湿室で 15°C、3 日間維持した後、褐変腐敗を伴う病斑をランダムに 9~15 個ずつ選別用いた。組織表面における胞子体の発達程度を以下の基準で調査した。胞子体の発達程度別指数 0: 病斑上に分生子柄および分生子が認められない、1: 分生子柄の形成が認められる (図版 II - D)、2: 糸状の分生子を伴った分生子柄が認められる (図版 II - E)、3: 短い分生子柄から糸状の分生子の分岐が認められる (図版 II - F)、4: 小型の胞子体の形成が認められる (図版 II - G)、5: 大型の胞子体の形成が認められる (図版 II - C)。胞子体の形成割合は、上記の指数 4 および 5 に該当する病斑数から算出した。なお、同一病斑上に発達程度が異なる胞子体が混在する場合は、その発達程度が最も伸展したグレードが 5 個以上存在したものを計数した。

## 結果

胞子体の形成に及ぼす相対湿度の影響を表 16 に示した。相対湿度は、胞子体の形成に強く影響し、RH 100%では胞子体の形成割合が 37%であったが、RH 99%では 7%のうち 1 回目の試験では胞子体の形成は認められなかった。胞子体の発達程度は、相対湿度 100%では供試した 24 病斑のう

ち 17 病斑で確認されたが、相対湿度が低くなるにつれて発達が認められない (発達程度別指数が 0 に該当する) 病斑数が増加し、RH 86.5%では発達が全く確認されなかった。

## 2. 分生子の分散

病斑から分生子が水中に分散するか検討する。

### 材料および方法

供試植物は、2008 年 7~8 月に採取した品種「ジョバンニ」を用い、前項 1. に準じて罹病葉を作製した。罹病葉上における胞子体の形成を促すために相対湿度 100%の湿室に罹病葉を静置し、この湿室を 7 段階の温度 (5, 10, 15, 18, 20, 23, 25°C) に設定した恒温器に配置した。3 日後と 4 日後にそれぞれ罹病葉片を取り出し、任意に選んだ病斑上に蒸留水 12  $\mu\text{l}$  をマイクロピペットを用いて滴下し、2~3 回ピペット内で攪拌した後、10  $\mu\text{l}$  を回収した。この液とラクトフェノール・コットンブルー溶液を等量混和し、プレパラートを作成した。プレパラート内の分生子数を光学顕微鏡を用いて計数した。なお、胞子体として回収された場合は、これを 1 個の分生子とみなした。試験は 2 回実施し、1 回目は 9 病斑、2 回目は 5 病斑を供試した。

## 結果

各温度・濡れ期間で保持した病斑上から回収された分生子数を表 17 に示した。湿室で 3 日間維持した場合は、20°C で分生子が多く回収された。4 日間維持した場合は、3 日間に比べて各温度ともに回収された分生子数が著しく増加し、25°C が最も多かった。

表 16 罹病葉上における胞子体の形成<sup>1)</sup>に及ぼす相対湿度の影響

相対湿度	胞子体の形成割合 <sup>2)</sup> (%)			胞子体の発達程度別病斑数 <sup>3)</sup>						
	1回目	2回目	平均	0	1	2	3	4	5	計
100	40	33	37	7	1	3	4	2	7	24
99	13	0	7	15	5	0	2	2	0	24
96	0	0	0	23	1	0	0	0	0	24
94	0	0	0	19	4	1	0	0	0	24
87	0	0	0	24	0	0	0	0	0	24

1) 各相対湿度に設定した湿室を 15°C、3 日間維持した。

2) 各実験で供試した病斑数は 9~15 個。

3) 2回の実験結果を統合した。程度別指数 0: なし、1: 分生子柄が認められる、2: 分生子柄が糸状に伸長、3: 分生子柄が分岐、4: 小型の胞子体の形成が認められる、5: 大型の胞子体の形成が認められる。

表17 各温度で保持した罹病葉<sup>1)</sup>から蒸留水への分生子の分散数

湿室の保持期間	温度(°C)	分生子数 <sup>2)</sup>		
		1回目	2回目	平均
3日	5	nt <sup>3)</sup>	0.0	0.0
	10	nt	1.9	1.9
	15	0.0	0.8	0.4
	18	nt	9.1	9.1
	20	32.0	11.7	21.9
	23	nt	6.2	6.2
	25	0.0	0.4	0.2
4日	5	nt	0.2	0.2
	10	nt	8.0	8.0
	15	11.6	40.0	25.8
	18	nt	52.8	52.8
	20	102.6	157.0	129.8
	23	nt	312.0	312.0
	25	528.7	372.8	450.8

1) 7~8月に採取したリンドウの接種により生じた罹病葉を用いた。

2) 3日目は9病斑, 4日目は5病斑を供試し, 1病斑あたり蒸留水12 µlを滴下し10 µlを回収した。数値は10 µl当たりの分生子数の平均値。

3) nt: 試験を実施しなかった。

### 3. 考察

孢子体の形成に関わる諸条件について検討したところ、温度や相対湿度だけでなく、病患部の罹病程度やリンドウの生育ステージも影響することが明らかになった。

生育初期(5~6月)や収穫後(9~10月)のリンドウを用い接種により生じた病斑では、温度15°C付近で孢子体を旺盛に形成した(表14)。また、収穫後に発生した自然発病葉を用いた試験結果(表15)も同様であった。この孢子体の形成適温15°Cは、本病菌の液体培養による分生子の形成適温(第4章第3節)と一致した。しかし、7~8月のリンドウに接種して生じた病斑では、孢子体の形成割合は全般に低く20°Cが適温であった。すなわち、リンドウの生育ステージにより孢子体の形成適温が異なった。生育初期や収穫後に採取したリンドウは病斑の伸展に対する抵抗力が低く、接種葉に灰白色の病斑が出現した後、速やかに褐変腐敗を伴う傾向がある。それに対して、7~8月のリンドウでは、灰白色の斑点を生じた後しばらくは褐変腐敗を伴わず、湿室に静置すると葉組織は病斑を中心に褐変腐敗するが、15°C以下ではその褐変腐敗は少ない傾向がある。孢子体の形成は、褐変腐敗を伴う病斑で起こり(表13)、本病菌を培地で被覆培養した場合は被覆を除去した後に孢子体が旺盛に形成される(第4章第3節)ことから、孢子体の形成には表皮組織の

腐敗が関連していると考えられる。

相対湿度は、孢子体の形成に大きく影響し、相対湿度99%以下では孢子体はほとんど形成されず、また病斑上に分生子柄を形成する割合(孢子体の発達程度別指数1以上)も少なかった。このことから、圃場において相対湿度100%が長期間保たれる条件、すなわち降雨日の連続や日当たりや風通しの悪い栽培環境は、感染だけでなく孢子体の形成をも助長する要因であると考えられる。

病斑から水中への分生子の分散は、湿室保持期間が3日間では20°Cが最も多く(表17)、孢子体の形成割合の結果(表14)と一致した。したがって、分生子は雨滴中で孢子体から離脱・分散し雨滴を介して飛沫伝染することが強く示唆された。また、湿室の保持期間が4日間まで長くなると、各温度ともに水中への分生子の分散数は著しく増加し、25°Cが最も多かった。25°C条件下では、はじめ病斑上における分生子柄および孢子体の形成の発達は抑制されるが、長期間の湿室条件により葉の褐変腐敗が進むことで孢子体の形成が助長されたと推察される。このように、本病菌は病患部が腐敗するほど孢子体を旺盛に形成するような腐生的な生態が認められる。この腐生的な生態は、本病菌と系統学的に近縁な腐生菌の *Cadophora* 属菌だけでなく、植物病原菌の *Rhynchosporium secalis* でも認められている<sup>10)</sup>

## 第5節 第一次伝染源

本病の発生特徴のひとつとして、圃場によって発生量が著しく異なり、多発生した圃場では翌年も発生が多い傾向がある<sup>50)</sup>。このことから、本病の第一次伝染源が圃場内に存在する可能性がある。多くの病害では罹病残さが第一次伝染源となる<sup>74)</sup>ので、本節では前年の罹病残さが翌年の第一次伝染源になる可能性を検討した。

### 1. 罹病葉における越冬性

越冬した罹病葉上に胞子体が形成されるか検討した。

#### 材料および方法

供試菌株は K18 株を用いた。9 月下旬に、本菌株を第 1 節で述べた方法に準じて品種「ジョバンニ」(3~4 年生)の切り枝に接種し、罹病茎葉を得た。接種 21 日後の 10 月上旬に、この罹病茎葉を節間で切断して網袋に入れた後、30 cm 径の素焼き鉢の中に入れ上蓋をして屋外で越冬した。翌年に罹病茎葉の一部を定期的に回収し、温室で 15°C、4 日間維持した。第 4 節に準じて、この罹病葉から病斑を中心として組織片を 20~30 個ずつ切り出し、ラクトフェノール・コトンプルー溶液で染色した後、プレパラートを作製した。光学顕微鏡を用いて胞子体の形成有無を調査し、胞子体の形成割合を算出した。なお、罹病茎葉を温室に供する前に 10 個の組織片を採取し、胞子体が形成されていないことを確認した。試験は 2 ヶ年実施し、2008 年は 1 月と 4 月の 2 回、2009 年は 4 月、5 月、7 月および 8 月の計 4 回実施した。

#### 結果

予備試験では、越冬した罹病葉を 5°C、10°C および 15°C に設定した温室に静置したところ、15°C で胞子体を旺盛に形成した(データ省略)。2007 年および 2008 年に越冬処理した病斑上には、いずれも翌年に胞子体を形成した(図版 VI)。この越冬処理した病斑は、1 月~5 月の調査では葉表面の崩壊は少なく、本病菌の胞子体が優占して形成された。7~8 月になると葉表面が崩壊し、*Alternaria* 属、*Botrytis* 属および *Cladosporium* 属菌をはじめとする他の糸状菌が葉表面を優占した。越冬処理後の病斑上における胞子体の形成割合の推移を表 18 に示す。2008 年は、1 月が 90%、4 月が 75%であった。2009 年では、4 月が 90%であったが以降は減少し、8 月では認められなかった。

### 2. 前年発病株の株元土壌の伝染性

本病菌が土壌伝染する仮説のもと、前年発病株の株元土壌にリンドウを定植することで発病するか検討した。

## 材料および方法

供試土壌は、前年に本病が発生したプランタ(50×20×20 cm)植えリンドウの株元の土壌(以下、株元土壌)を用いた。2007 年 4 月に、この土壌約 8L を 2 等分し、一方はオートクレーブで 121°C、40 分間高圧滅菌(株元土壌滅菌処理区)し、他方は無処理(株元土壌区)とした。それぞれの土壌を等量の無病培土(三研ソイル製)と混和し、この土壌を上述と同じ大きさのプランタに敷き詰めた。対照として無病培土を用いた。これら土壌に「イーハトーヴォ」(2 年生)をそれぞれ 4 株/プランタとなるように定植し、網室内で管理した。試験は 2 反復とした。調査は、同年 8 月 4 日に実施し、全葉を対象に発病の有無を調査した。

## 結果

株元土壌区では 8 株中 5 株で発病が認められ、発病率 7.2%であった。株元土壌滅菌処理区と無病培土区では全く発病が認められなかった(表 19)。

### 3. 前年罹病残さの伝染性

前年罹病残さが伝染性を有するか検討した。

表 18 越冬処理した病葉上における胞子体の形成状況<sup>1)</sup>

試験年次	調査時期	胞子体を形成した病斑の割合 <sup>2)</sup>	
		回収直後	温室処理後
2008年	1月	0/10	27/30
	4月	0/10	22/30
2009年	4月	0/10	27/30
	5月	0/10	10/20
	7月	0/10	5/20
	8月	0/10	0/20

1) 前年10月に接種茎葉を素焼き鉢に入れ、屋外で越冬処理した。

2) 温室内で15°C、4日間保持、胞子体を形成した病斑数/供試数

表 19 前年発病株元土壌に定植したリンドウの発病状況<sup>1)</sup>

試験区 <sup>2)</sup>	発病株数/供試株数(発病率)		
	1区	2区	合計(平均)
株元土壌滅菌処理	0/4 (0%)	0/2 (0%)	0/6 (0%)
株元土壌	3/4 (6.8%)	2/4 (7.6%)	5/8 (7.2%)
無病培土	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/8 (0%)

1) 2007年4月に「イーハトーヴォ」(2年株)を各区4株ずつ定植した。

2) 株元土壌滅菌処理区は前年発病株の株元土壌をオートクレーブ滅菌した。

3) 調査は2007年8月4日に実施した。



材料および方法

罹病茎葉は, 前項1. と同様に K18 株を接種して作製した. 前年 10 月に, 無病培土を入れたプランタ (50×20×20 cm) 上に長さ 40 cm の罹病茎葉 10 本を培土と接するように置床した. 網室内で越冬した後, 5 月にリンドウ (2 年株) を 5 株ずつ定植した. 試験区は, 罹病残さを残した区 (罹病残さ区), これを除去した区 (残さ除去区) を設け, 対照を無病培土とした. 試験は 2008 年と 2009 年の 2 回実施し, いずれも 2 反復とした. 供試リンドウは, 2008 年は「イーハトーヴォ」と「マシリエイ」, 2009 年は「吾妻系」と「矢巾系」を用いた. 調査は, 2008 年が 8 月 6 日, 2009 年が 8 月 7 日に実施した.

結果

2008 年, 2009 年ともに, 罹病残さ区と残さ除去区で発病が認められ, 発生量は前者が多かった. 無病培土では発病が認められなかった (表 20, 表 21). 2008 年の試験では, 罹病残さ区における発生は, 発病株数が 9 株 (「マシリエイ」5 株, 「イーハトーヴォ」4 株), 発病葉率 16.1~26.5% であった. 2009 年の試験では, 供試した「矢巾系」で欠株が生じ, 調査株数は罹病残さ区で 4 株, 残さ除去区で 3 株となった. 罹病残さ区における発生は, 発病株数が 9 株, 発病葉率が 42.9~58.2% であった.

表20 屋外で越冬した前年罹病残さの伝染性<sup>1)</sup>

試験区 <sup>2)</sup>	供試品種/発病個体割合 (発病葉率) <sup>3)</sup>	
	マシリエイ	イーハトーヴォ
罹病残さ	5/5 (26.5%)	4/5 (16.1%)
罹病残さ除去	3/5 ( 2.4%)	2/5 ( 0.7%)
無病培土	0/5 ( 0%)	0/5 ( 0%)

1) 伝染源は2007年10月に配置した. 供試リンドウ (2年株) は2008年5月に各区5株ずつ定植した.

2) 罹病残さ除去区は, 定植直前に伝染源を除去した.

3) 発病個体割合は発病数/調査数. 調査日は2008年8月6日

表21 屋外で越冬した前年罹病茎葉の伝染性<sup>1)</sup>

試験区 <sup>2)</sup>	供試品種/発病個体割合 (発病葉率) <sup>3)</sup>	
	吾妻系	矢巾系
罹病残さ	5/5 (58.2%)	4/4 (42.9%)
罹病残さ除去	2/5 ( 1.7%)	1/3 ( 1.7%)
無病培土	0/5 ( 0%)	0/5 ( 0%)

1) 伝染源は2008年10月に配置した. 供試リンドウ (2年株) は2009年5月に各区5株ずつ定植した.

2) 罹病残さ除去区は, 定植直前に伝染源を除去した.

3) 発病個体割合は発病数/調査数. 調査日は2009年8月7日

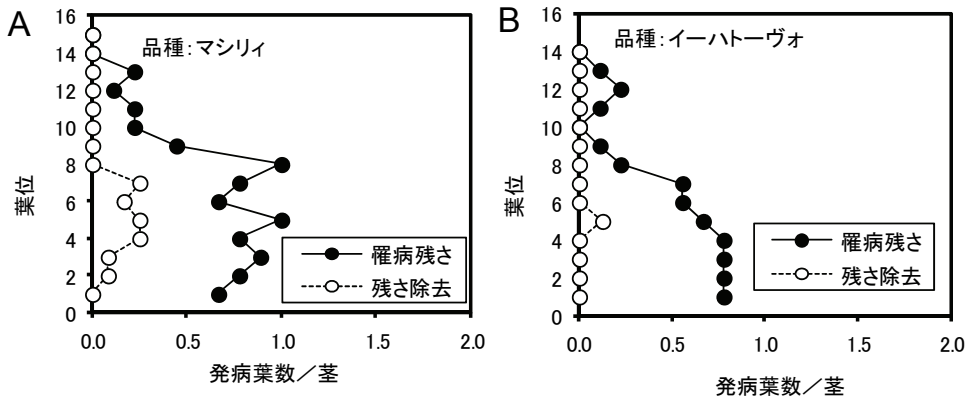


図 19 前年罹病残さを配置 (●) 又は除去 (○) した試験区における葉位別発生状況 (2008 年) 試験は表 20 に同じ. 供試品種はマシリエイ (A) およびイーハトーヴォ (B).

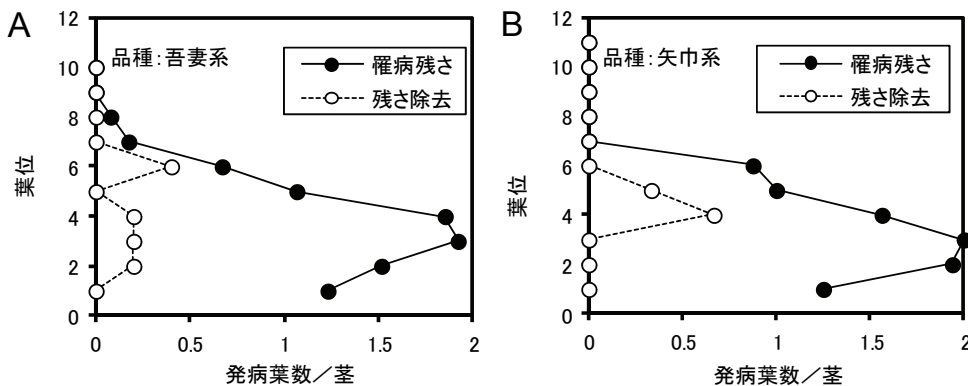


図 20 前年罹病残さを配置 (●) 又は除去 (○) した試験区における葉位別発生状況 (2008 年) 試験は表 20 に同じ. 供試品種は吾妻系 (A) および矢巾系 (B).

2008 年および 2009 年における葉位別の発病分布を図 19 と図 20 にそれぞれ示した。2008 年に供試した「イーハトーヴォ」と「マシリィ」を比較すると、いずれも下位葉を中心に発病し「マシリィ」では上位葉でも認められた(図 19)。「マシリィ」の罹病残さ区と残さ除去区を比較すると、発病葉数に差はあるものの、葉位別の発生分布の傾向はほぼ一致した。

2009 年に供試した「吾妻系」と「矢巾系」を比較すると、いずれも下位葉(第 1~5 位葉)を中心に発病し、「吾妻系」では中位葉(第 7~8 位葉)でも発病が認められた(図 20)。「吾妻系」の罹病残さ区と残さ除去区を比較すると、発病葉数に差はあるものの、葉位別の発生分布の傾向はほぼ一致した。

試験期間を通じて、罹病残さの葉および茎には、本病菌と思われる完全世代の形成は認められなかった。

#### 4. 分生子による土壌伝染の可能性

罹病葉上に形成された胞子体から分生子が水中で分散することを第 4 節では明らかにした。この分生子が土壌中で越冬し翌年の伝染源となり得るか検討した。

##### 材料および方法

供試菌株は、K18 株、J4 株および MAFF 239231 株とした。前年 10 月に、無病培土を入れたプランタ(50×20×20 cm)に 10<sup>5</sup> 個/ml に調整した分生子懸濁液 500ml を灌注した。対照は無病培土とした。網室内で越冬した後、5 月にリンドウ(2 年株)を 4 株ずつ定植した。試験は 2008 年と 2009 年の 2 回実施し、いずれも 2 反復とした。供試リンドウは、2008 年は「イーハトーヴォ」と「マシリィ」、2009 年は「吾妻系」と「矢巾系」を用いた。調査は、2008 年が 8 月 6 日、2009 年が 8 月 7 日に実施した。

##### 結果

前年秋に分生子懸濁液を灌注した土壌における本病の発生状況を表 22 に示した。2008 年は、いずれの試験区も

表 22 灌注接種土壌で栽培したリンドウにおける発生状況<sup>1)</sup>

供試菌株	発病葉割合 <sup>3)</sup>	
	2008年	2009年
K18	0/1054	1/402
J4	0/1062	0/480
MAFF 239231	0/1096	0/476

- 1) 前年10月に分生子懸濁液を各区に灌注した。両年ともに5月にリンドウ(2年株)を5株ずつ定植した。供試験品種は、2008年は「イーハトーヴォ」と「マシリィ」、2009年は「吾妻系」と「矢巾系」。  
2) 発病葉割合は発病葉数/調査葉数。調査は2008年が8月6日、2009年が8月7日に実施。

発病が認められなかった。2009 年は、K18 株の接種区の「吾妻系」において 1 病斑が認められ、他の試験区では認められなかった。

#### 5. 罹病葉から分離された褐斑病菌の遺伝的背景

罹病残さ区等の発病の由来を明らかにするために、これら罹病葉から分離された菌株の遺伝的背景を検討した。K18 株は、第 3 章第 5 節で述べたとおり small subunit(SSU) rDNA に約 300 bp のイントロンを 2 箇所含むため、SSU 領域を増幅するプライマー NS1 と NS4(White et al. 1994)を用いることで約 1,600bp の遺伝子増幅産物が得られ、他の菌株(約 1,000bp)と識別することができる。そこで、K18 株をマーカー菌株として用い、罹病残さ区から分離された菌株の SSU rDNA を検出した。

##### 材料および方法

前項3. の罹病残さ区および残さ除去区で発病した罹病葉を各 3 枚ずつ供試し、流水で 1 時間表面除菌した後、湿室に静置し、15℃、暗黒下で 7 日間保持した。病斑上に形成された胞子体から常法により単胞子分離し、各 1 菌株ずつ得た。対照として、同一の網室内で J4 株の罹病残さを配置したプランタに発生した病斑から分離した 3 菌株を用いた。第 3 章第 5 節で述べた方法に準じて、これら菌株から全核酸を抽出し PCR 法により SSU 領域を増幅した。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動によって検出した。

##### 結果

図 21 には、各菌株における SSU rDNA の増幅産物を示す。K18 株の罹病残さ区、残さ除去区から分離された菌株は、対照の K18 株と同様に、いずれも約 1,600bp の位置にバンドが検出された。対照の J4 株の残さ配置区から分離した 3 菌株も J4 株と同様に、約 1,000bp の位置にバンドが検出された。

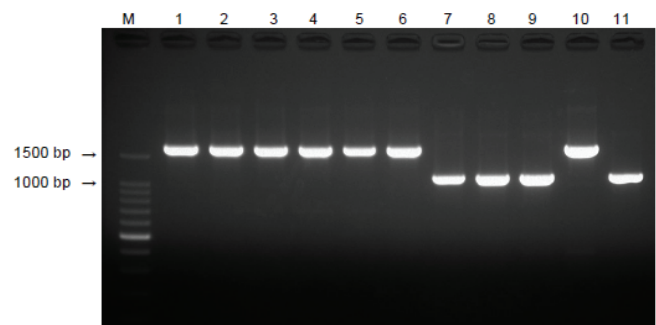


図 21 前年罹病残さを配置したリンドウの罹病葉から分離された菌株の SSU 領域の増幅産物

レーン 1~3:K18 株接種罹病残さ設置;4~6:K18 株接種罹病残さ除去;7~9:J4 株接種罹病残さ設置;10:K18 株;11:J4 株;M:100 bp ladder.

## 6. 考察

### (1) 罹病葉における越冬性

素焼き鉢内の擬似環境下で越冬させた病葉では、回収直後の病斑上には胞子体は認められなかったが、温室に静置することで表皮下の菌糸から分生子柄を生じ、次いで胞子体を旺盛に形成した。また、この擬似越冬環境下の病葉上、および地表面に置き風雪にさらした茎葉には完全世代の形成は認められなかった。以上から、本病菌は罹病葉で越冬することが明らかになった。

本病菌は、広義の *Cercospora* 属 (*Pseudocercospora* 属) の関連菌群と形態的に類縁性がある(第3章)。小林<sup>39)</sup>によれば、広義の *Cercospora* 属菌の越冬および翌春の第一次伝染源については3つのタイプがある。第一に、落葉した病葉上で精子器(Spermatogonium)と若い子のう殻を形成して越冬し、翌春子のう殻が完熟して子のう胞子を形成するタイプ、第二に、秋いったん分生胞子と分生子柄が脱落し、子座の表面に薄い膜を作って、または表皮をまだ破っていない若い子座が越冬し、翌春これらの子座の上に分生子柄および分生子をつくるタイプ、第三に病葉上で分生子が脱落消失せずにかんりの量が高い発芽率をもって着生したまま越冬するタイプである。本病菌の越冬の形態は、前述の第二のタイプにあたり、第3章第6節で示した本病菌と系統学的に近縁な植物病原菌 *Rhynchosporium secalis* の越冬形態<sup>62)</sup>とも共通している。

### (2) 罹病残さにおける胞子体の形成能力

擬似環境下で越冬した病斑は、5~10℃に設定した温室に静置すると胞子体をほとんど形成しなかったが、15℃では胞子体を旺盛に形成した。この結果は、第4章第3節で示した液体培養による胞子形成の適温と一致している。したがって、圃場においても気温が15℃に達し十分な湿度が確保されれば、本病菌は前年罹病残さ上で胞子体を旺盛に形成できる可能性が高い。擬似環境下で越冬した病斑における胞子体の形成割合は、4月が最も高かったが、気温の上昇とともに減少し、8月には認められなくなった。越冬した病斑の表面は、4月や5月は表皮組織が比較的保持され他の糸状菌の繁殖も少なかったが、7月や8月になると崩壊し各種糸状菌が優占した。したがって、罹病残さの表皮組織は、気温の上昇に伴って崩壊し、胞子体の形成能力が徐々に減衰して8月になるとほとんどなくなると推察される。

### (3) 前年罹病残さの伝染性

前年の罹病残さは、翌年において重要な伝染源となり得ることが明らかになった。すなわち、罹病残さを翌年まで残した場合、これを除去した場合に比べて、発病率が著しく高かった。また、前年発病株の株元土壌や、罹病残さを春に

除去した土壌でも発病が認められたことから、地表面に残存した罹病残さが伝染源になり得ることが強く示唆された。また、この結論は、罹病残さ区および残さ除去区から分離した菌株の SSU rDNA が接種菌株のものと一致したことから、遺伝学的にも裏付けられた。さらに、この伝染性試験では、リンドウに発生した病斑は下位葉を中心に発生し、上位葉では発生が非常に少なかった。このことは、株元に配置した伝染源から近距離にある下位葉では感染頻度が高かったためであると推察される。加えて、病斑が出現した葉位は、早生種(マシイ、吾妻系)では中・晩生種(イーハトーヴォ、矢巾系)に比べて高い位置にも発生した。早生種は中・晩生種に比べて発芽・展葉が早いことから、この発病位置の違いには感染時期におけるリンドウの生育状況(葉段数)の違いが反映していると考えられる。

### (4) 分生子による土壌伝染の可能性

分生子の土壌伝染性を検討するために、前年秋に灌漑接種を実施し、この汚染土壌にリンドウを定植した。2008年は8月の調査では全く発病は認められなかったが、2009年には1病斑だけ発病が認められた。したがって、本病菌が土壌伝染する可能性も示唆されるが、罹病残さ区や残さ除去区に比べて発生頻度が著しく低いことから、再現性について今後さらに検討する必要がある。また、仮に本病菌が分生子によって土壌伝染するとしても、罹病残さに比べて第一次伝染源としての役割は極めて低いと考えられる。

## 第6節 圃場における感染実態

第2章第2節では、岩手県における本病の発生消長について、8月上旬に初発生し、発病が漸増した後、8月下旬~9月上旬に急激に発病増加することを示した。本節では、圃場における時期別の感染実態を明らかにするとともに、この感染頻度と気象条件との関係を検討した。さらに、第1節~第5節で示した本病菌の感染条件、潜伏期間、胞子体の形成、および第一次伝染源の知見に基づき、圃場における伝染経路について推論した。

### 1. 時期別の感染量の把握

#### 材料および方法

曝露試験は、2001年、2002年、2003年および2008年の4ヶ年実施した。2001年~2003年は、岩手県花巻市の農家圃場において品種「ジョバンニ」(5~7年生)の無防除区画1.8m<sup>2</sup>に、鉢植えリンドウ「ジョバンニ」(3~5年生、15cm径ポリポット植え)を5株ずつ株元に配置し、およそ10日間ごとに回収した。試験は6~8月にかけて実施した。各年次とも圃場内で初発生を確認後は、罹病株元に設置した。2008

年は、岩手県農業研究センター内において、エゾリンドウの育成系統の自然発病株の株元に、鉢植えリンドウ「ジョバンニ」(7年生, 15 cm 径ポリポット植え)を5株ずつ配置し、およそ7日間ごとに定期的に配置した。試験は8~9月にかけて実施した。回収した鉢植えリンドウは、いずれも18~28℃の温室内で1カ月間管理した。調査は、回収直後および7日間ごとに1ヶ月後まで実施した。全葉について発病の有無を調査し発病葉率を算出した。

## 結果

### (1)各年次における時期別の感染量と気象の特徴

2001年の曝露試験の結果を表23に示す。本年は7月上旬(7月4日~16日)の曝露から発病が認められた。8月下旬(8月20日~9月3日)の曝露は発病葉率63.4%と試

験期間を通じて最も発病が多く、この期間中の降雨日数は7日間あり、うち2日間連続する降雨の延べ回数は4回であった。

2002年の曝露試験の結果を表24に示す。本年は、6月下旬(6月27日~7月5日)の曝露から発病が認められた。6~7月の曝露試験のうち、7月上旬(7月5日~17日)の曝露が発病葉率32.6%と最も発病が多く、この期間中の降雨日数は8日間あり、うち2日間連続する降雨の延べ回数は5回、3日間では2回であった。8月の曝露試験では、8月中旬(8月8日~15日, 8月15日~22日)の曝露で最も発病が多く、それぞれ発病葉率65.5%と37.7%であった。この時期の降雨日数はそれぞれ6日と4日であり、2日間連続する降雨の延べ回数はそれぞれ5回と3回であり、3日間連続する降雨の延べ日数もそれぞれ4回と1回であった。

表23 圃場内に曝露したリンドウ株<sup>1)</sup>における発病状況と曝露期間中の気象(2001年)

曝露期間	調査 葉数	発病 葉数	発病葉率 (%)	曝露期間中の気温と降雨の状況			
				平均気温 (°C)	降雨 日数	連続降雨の延べ回数	
						2日間	3日間
6/4~6/14	656	0	0	17.3	4	1	0
6/14~6/25	636	0	0	18.0	5	2	1
6/25~7/4	640	0	0	22.2	5	2	1
7/4~7/16	700	4	0.6	24.5	5	1	0
7/16~7/26	712	1	0.1	25.4	4	3	2
7/26~8/6	618	3	0.5	21.6	4	1	0
8/6~8/14	836	19	2.3	21.9	1	0	0
8/14~8/20	766	6	0.8	23.1	0	0	0
8/20~9/3	640	406	63.4	22.7	7	4	1

1) 岩手県花巻市農家圃場の無防除圃場内で実施した。鉢植えリンドウ5株を株元に配置した。8月以降は発病株元に配置した。

表24 圃場内に曝露したリンドウ株<sup>1)</sup>における発病状況と曝露期間中の気象(2002年)

曝露期間	調査 葉数	発病 葉数	発病葉率 (%)	曝露期間中の降雨と気温			
				平均気温 (°C)	降雨 日数	連続降雨の延べ回数	
						2日間	3日間
6/13~27	578	0	0	16.8	5	4	1
6/27~7/5	696	3	0.4	19.3	4	3	2
7/5~17	614	200	32.6	22.1	8	5	2
7/17~24	845	31	3.7	25.4	3	1	0
7/24~8/2	534	6	1.1	25.5	2	1	0
8/2~8/8	822	34	4.1	24.9	2	2	1
8/8~15	571	374	65.5	23.7	6	5	4
8/15~22	616	232	37.7	21.0	4	3	1
8/22~26	549	39	7.1	20.6	1	0	0
8/26~9/5	334	29	8.7	24.9	1	0	0

1) 表23に同じ

2003年および2008年においても同様の調査を行った。2003年の曝露試験の結果を表25に示す。6～7月の曝露試験では、6月下旬(6月24日～7月1日)の曝露から発病が認められ、7月上旬(7月1日～12日)の曝露が発病率率37.9%と最も発病が多かった。また、2003年と2008年のそれぞれ8月の曝露試験の結果を表25と表26に示す。両年ともに発病が多い時期はいずれも、降雨日数、2日間連続する降雨の延べ回数、および3日間連続する降雨の延べ回数も多かった。

## (2)発病までの潜伏期間

2002年の曝露試験において、回収日から初発生するまでの日数はいずれも10日以内であった(表27)。曝露期間中に最初に遭遇した降雨日を起算とした場合、降雨日から発病までの日数は概ね14日間であった。一方で、2003年の曝露試験において、回収日から初発生するまでの日数は12～37日であった(表28)。曝露期間中に最初に遭遇した降雨日を起算とした場合、降雨日から発病までの日数は、20～38日間であった。

表25 圃場内に曝露したリンドウ株<sup>1)</sup>における発病状況と曝露期間中の気象(2003年)

曝露期間	調査 葉数	発病 葉数	発病率 (%)	曝露期間中の降雨と気温			
				平均気温 (°C)	降雨日数	連続降雨の延べ回数	
						2日間	3日間
6/13～24	284	0	0	21.6	4	0	0
6/24～7/1	318	32	10.1	17.8	6	5	4
7/1～12	248	94	37.9	19.0	6	4	1
7/12～18	318	0	0	20.2	1	0	0
7/18～25	364	8	2.2	18.0	4	3	1
7/25～8/1	248	2	0.8	19.9	4	2	0
8/1～8	160	2	1.3	24.4	1	0	0
8/8～15	254	20	7.9	22.3	5	2	0
8/21～29	282	187	66.3	23.0	6	5	4

1) 表23に同じ

表26 圃場内に曝露したリンドウ株<sup>1)</sup>における発病状況と曝露期間中の気象(2008年)

曝露期間	調査 葉数	発病 葉数	発病率 (%)	曝露期間中の降雨と気温			
				平均気温 (°C)	降雨日数	連続降雨の延べ回数	
						2日間	3日間
8/8～15	216	0	0	24.4	2	1	0
8/15～22	350	92	26.3	21.1	6	4	2
8/22～29	278	176	63.3	20.1	4	3	2
8/29～9/6	212	170	80.2	23.4	5	3	2
9/6～13	198	72	36.4	22.1	5	2	1
9/13～9/19	254	0	0	21.6	0	0	0
9/19～26	108	24	22.2	19.2	3	1	0
9/26～10/3	160	8	5.0	13.6	2	1	0

1) 岩手県農業研究センター内の無防除圃場内で実施した。発病株元に鉢植えリンドウ5株を配置した。

2. 感染量に及ぼす各種気象要因の影響

材料および方法

前項1. で実施した曝露試験における各曝露期間中の発病葉率(Y)を目的変数とし、各種気象要因の4要素を説明変数とする重回帰分析を行った。すなわち、平均気温(X1)、1 mm以上の降雨日数(X2)、2日間連続する降雨日の延べ回数(X3)、3日間連続する降雨日の延べ回数(X4)を用いた。4ヶ年の曝露試験の結果は、本病発生前の6~7月と発生後の8~9月の2つにそれぞれ統合した。発病葉率(Y)はパーセントデータであるため、arcsine変換により角変換した数値を回帰分析に供した。統計解析ソフト JMP(SAS Institute Inc.)を用い、ステップワイズ法により

候補モデルを作成した後、回帰分析を行った。

結果

各種気象要因を説明変数、発病葉率を目的変数とする重回帰分析では、表23~表26に示したデータを用いた。

この解析の結果、6~7月の曝露試験における発病葉率(Y1)および8~9月の曝露試験における発病葉率(Y2)は、いずれも2日間の連続する降雨の延べ回数(X3)によって説明することができた。すなわち、6~7月の曝露試験における発病葉率(Y1)は  $R^2 = 0.366$ ,  $F$  値 9.65, 5%水準で有意であり、単回帰式により  $\text{arcsine}(Y1) = -2.350 + 4.686(X3)$  で表された。

表27 圃場内に曝露した lindou 株<sup>2)</sup>における発病推移(2002年)

曝露期間	曝露終了後の発病推移(調査日/発病葉数)										回収日から 発病までの 日数 <sup>2)</sup>	降雨日から 発病までの 日数 <sup>3)</sup>
	7/24	8/2	8/8	8/15	8/23	8/28	9/5	9/13	9/19	9/25		
6/13~27	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	—	—
6/27~7/5	3	3	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—
7/5~17	5	67	170	208	200	—	—	—	—	—	7~29	18~30
7/17~24	0	16	25	31	31	—	—	—	—	—	9~22	14~24
7/24~8/2		0	2	4	4	6	—	—	—	—	6~26	7~26
8/2~8/8			0	15	25	33	34	—	—	—	7~28	13~32
8/8~15				0	69	267	374	—	—	—	8~21	13~21
8/15~22					0	12	161	232	—	—	6~22	13~24
8/22~26						0	21	33	39	—	10~24	12~24
8/26~9/5							0	16	29	50	8~20	8~20

1) 表24に同じ

2) 回収日を起算とし、最初に発病を認めた日~最後の発病増加を認めた日

3) 曝露期間中に最初に遭遇した降雨日~最後の降雨日を起算とした場合

表28 圃場内に曝露した lindou 株<sup>1)</sup>における発病推移(2003年)

曝露期間	調査日												回収日から 発病までの 日数 <sup>2)</sup>	降雨日から 発病までの 日数 <sup>3)</sup>
	6/24	7/1	7/12	7/18	7/25	8/1	8/11	8/18	8/26	9/3	9/10	9/18		
6/13~24	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—
6/24~7/1		0	0	0	0	12	32	—	—	—	—	—	37~48	37~43
7/1~12			0	0	0	51	94	—	—	—	—	—	19~30	28~30
7/12~18				0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
7/18~25					0	0	0	0	7	7	8	—	32~47	38~47
7/25~8/1						0	0	0	1	2	2	—	25~33	32~35
8/1~8							0	0	0	0	0	2	40	44
8/8~15								0	0	3	11	20	18~34	25~34
8/21~29										0	87	187	12~20	20

1) 表25に同じ

2) 回収日を起算とし、最初に発病を認めた日~最後の発病増加を認めた日

3) 曝露期間中に最初に遭遇した降雨日~最後の降雨日を起算とした場合



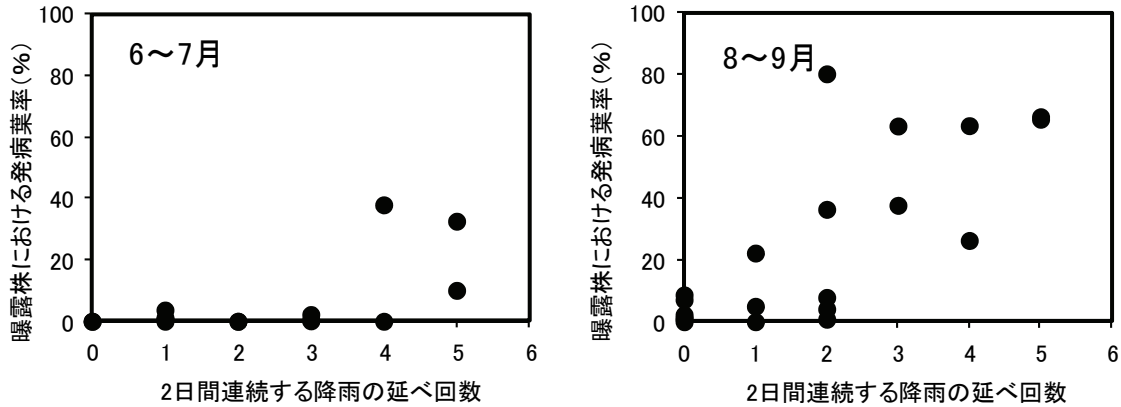


図 22 曝露期間中の 2 日間連続する降雨の延べ回数と曝露したリンドウの発病葉率との関係

表 23～表 26 に示したデータをプロットした。

発病株元に設置した 8～9 月の曝露試験における発病葉率(Y2)は、 $R^2 = 0.640$ 、 $F$  値 34.45、5%水準で有意であり、単回帰式により  $\arcsin(Y2) = 6.747 + 9.881(X3)$  で表された。図 22 には、各曝露試験における発病葉率と 2 日間連続する降雨の延べ回数との関係を示した。

### 3. 考察

#### (1) 圃場における感染実態

4 ヶ年実施した曝露試験の結果から、圃場では少なくとも 6 月下旬～7 月上旬から感染がはじまり、9 月にかけて感染が続くことが明らかになった。時期別の感染量は、8 月の曝露で発病が多いが、2002 年(表 24)や 2003 年(表 25)のように初発生前の 7 月上旬でも多く、これら感染量が多い曝露期間は降雨日数も多かった。

本病の感染量に及ぼす気象条件の影響について、回帰分析により検討したところ、6～7 月の感染および 8～9 月の感染のいずれにおいても「2 日間連続する降雨の延べ回数」との関連性が認められた。このことは、第 1 節の感染条件で示した、本病菌の感染には少なくとも 36 時間以上の葉面の濡れを必要とする結果とよく一致している。また、重相関係数( $R^2$ )は、6～7 月( $R^2 = 0.366$ )に比べて 8～9 月( $R^2 = 0.640$ )では高かった。これは、前者の曝露試験は発病を認めていない時期に実施したため、設置した場所や年次毎の第一次伝染源量の影響を強く受けたためであると考えられる。一方で、後者の曝露試験は発病株元に設置し伝染源の直下に配置したため、伝染源量の影響が比較的小さい条件下で実施されたと推察する。

曝露試験において本病菌の感染を認めた 6 月下旬～9 月は、岩手県では平均気温が 15～25℃で推移し、本病の感染温度範囲(第 1 節)と一致している。この期間のうち、8

月の平均気温は例年 25℃付近となり、短時間(少なくとも 36 時間)の葉面の濡れで感染することができると推察される。一方で、6～7 月や 9 月は、平均気温が 15～20℃で推移し短時間の葉面の濡れによる感染には適していないが、例年 6 月下旬～7 月下旬は梅雨、9 月は秋雨の時期である<sup>48)</sup>ため、葉面濡れ期間が保持されやすい。したがって、この期間は、長時間の葉面の濡れによって感染することができると推察される。

本病菌が感染する 6 月下旬～9 月は、時期によって伝染源が異なると考えられる。すなわち、罹病残さ上では孢子体が旺盛に形成され少なくとも 7 月まで認められたこと(第 5 節)、本病の初発生は例年 8 月上旬であること(第 2 章第 2 節)、葉上に出現した病斑上には孢子体が形成され水滴中に分生子が分散すること(第 4 節)から、7 月までは罹病残さ上に形成された分生子による第一次伝染であり、8 月以降は葉上に出現した病斑からの第二次伝染であると推定される。この推論について、第 7 章では薬剤防除試験によって検証した。

#### (2) 潜伏期間

感染から発病までの潜伏期間は、曝露期間中に最初に遭遇した降雨日を起算とした場合、2002 年は概ね 14 日間であり、堀越ら<sup>26)</sup>が福島県で実施した曝露試験の結果、および第 4 節の室内接種試験の結果とよく一致した。しかし、2003 年は 20～38 日間と 2002 年に比べて長く、両年の試験結果は大きく異なった。本病の潜伏期間は感染後の温度が低いと長くなる傾向である(第 3 節)ことから、2003 年のような低温年(7 月と 8 月の平均気温はそれぞれ 19.1℃と 22.4℃)では、2002 年のような高温年(7 月と 8 月の平均気温はそれぞれ 23.4℃と 23.2℃)に比べて潜伏期間は長くなると考えられる。



## 第6章 品種と発病との関係

第3章第3節では、エゾリンドウ(*G. triflora*)から分離されたリンドウ褐斑病菌 K18 株は、既報のササリンドウ(*G. scabra*)から分離された MAFF 239231 株<sup>40)</sup>と同様に、*G. triflora* の品種「安代の秋」に病徴を示すが、*G. scabra* の品種「安代のさわ風」には病徴を示さないことを述べた。本章では、この2つのリンドウ種に対する本病菌の病原性を明らかにすることを目的とした。

### 第1節 品種と発病の関係

病原菌の感染に対する *G. triflora* と *G. scabra* 品種の感受性を検討した。

#### 1. 実生苗を用いた接種試験

##### 材料および方法

試験は2007年に実施した。供試菌株は K18 株および MAFF 239231 株を用いた。供試品種は表29に示した8品種を用いた。128穴セルトレイで3ヶ月間育苗後、ジベレリン 100 ppm を茎葉散布して抽台を促した。本葉が5対程度となった7月18日に各区8苗を選び、第5章第1節で述べた方法に準じて、本菌株の分生子懸濁液( $1 \times 10^5$  conidia/ml)を噴霧接種した後、セルトレイをポリエチレン袋で被覆し、25°C、48時間の葉面の濡れを保持した。被覆を除去した後、15~25°Cに保たれた温室内で管理した。調査は8月22日に実施し、苗毎に発病の有無を調査した。

##### 結果

実生苗に対する K18 株および MAFF 239231 株の病原性試験の結果を表29に示す。両菌株ともに、供試した7品種のうち *G. triflora* の6品種に対しては病原性が認められたが、*G. scabra* の品種「アルタ」に対しては病原性が認められなかった。

表29 リンドウ褐斑病菌の各品種に対する病原性<sup>1)</sup>

リンドウ種	品種	発病個体数 <sup>2)</sup> /供試数	
		K18	MAFF239231
<i>G. triflora</i>	キュースト	8/8	8/8
	マシリイ	8/8	8/8
	マジェル	8/8	8/8
	イーハトーヴォ	8/8	8/8
	いわて	8/8	8/8
	ジョバンニ	8/8	8/8
<i>G. scabra</i>	アルタ	0/8	0/8

1) セルトレイで育苗した実生苗に対する接種試験

2) 調査は接種35日後の8月22日に実施

#### 2. 切り枝を用いた接種試験

##### 材料および方法

2008~2009年に、表30に示した品種を圃場から採取し、第5章第1節で述べた方法により調製し、1品種当たり6茎を用いた。接種は、第5章第1節で述べた方法に準じて、K18株の分生子懸濁液( $1 \times 10^5$  個/ml)を噴霧接種し、25°C、72時間の葉面の濡れを保持した。被覆を除去した後、25°Cに保たれた室内で21日間管理した。調査は、第5章第1節で述べた方法に準じて実施した。実験は2回実施した。

##### 結果

各品種の切り枝に対する K18 株の病原性試験の結果を表30に示した。*G. triflora* の10品種および由来不詳のラブリーアシロおよびニューハイブリッドアシロは発病したが、*G. scabra* の「アルタ」と「安代のさわ風」、および種間交雑品種の「アルビレオ」は発病しなかった。

#### 3. 自然感染による接種試験

##### 材料および方法

2002年に岩手県花巻市農家圃場(品種:「ジョバンニ」)で実施した。鉢植えリンドウは、15cm径のポリ鉢に定植した品種「ジョバンニ」および「アルビレオ」(2年株)を用いた。発病株の株元に鉢植えリンドウを各1鉢ずつ4ヶ所に配置し、8月8日~15日の7日間曝露した。回収した鉢植えリンドウは、15~25°Cに保たれた温室内で管理した。調査は9月5

表30 リンドウ褐斑病菌K18株の各品種に対する病原性<sup>1)</sup>

リンドウ種	品種	発病葉率 <sup>3)</sup> (%)
<i>G. triflora</i> (GT)	イーハトーヴォ	89.2
	いわて	58.7
	キュースト	100.0
	ジョバンニ	100.0
	マジェル	67.1
	マシリイ	46.1
	安代の夏	95.0
	安代の秋	60.9
	安代の初秋	91.7
	安代の晩秋	67.7
<i>G. scabra</i> (GS)	アルタ	0
	安代のさわ風	0
GS×GT	アルビレオ	0
不詳	ニューハイブリッドアシロ	52.3
不詳	ラブリーアシロ	14.0

1) 切り枝を用いた接種試験

3) 2回の実験の平均

日に実施した。

## 結果

本病の自然感染に対する「アルビレオ」の耐病性を表 31 に示した。対照の「ジョバンニ」では供試したすべての株で発病が認められ，発病葉率 65.5%であった。一方で，「アルビレオ」では全く発病が認められなかった。

## 第2節 種間交雑種における抵抗性の遺伝様式

第1節では，種間交雑品種「アルビレオ」が本病に対して抵抗性を示すことを明らかにした。そこで，本品種の抵抗性の遺伝様式について検討した。

### 材料および方法

供試した系統は，表 32 に示した。品種「アルビレオ」の親系統である *G. scabra* (九州系;OK) と *G. triflora* (磐梯系;Ba)，および両者の交配により得られた実生由来の集団 05-573, 05-576 および「アルビレオ」を用いた。圃場に定植されている外観健全な 6 株から各 1 茎ずつ採取し，前項1. で示した切り枝を用いた接種試験に供試した。

## 結果

「アルビレオ」の親系統およびその後代に対する K18 株の病原性試験の結果を表 32 に示す。親系統の Ba(*G. triflora*) は発病葉率 98.2%と激しい病徴を示した。一方，親系統の OK(*G. scabra*)，Ba×OK (05-573 および 05-576)，および OK×Ba(アルビレオ)では発病が認められなかった。

## 第3節 考察

*G. triflora* から分離された K18 株は，*G. triflora* の 10 品種および由来不詳の 2 品種に対して病原性を示したが，*G. scabra* の 2 品種および *G. scabra*×*G. triflora* の「アルビレオ」に対して病原性を示さなかった。K18 株と MAFF 239231 株は *G. scabra* の「アルタ」の実生苗に対しても病原性を示さなかった。この結果は，岩手県において *G. scabra* 品種では未だ発病を確認していない事実と一致する。*G. scabra* の供試数は *G. triflora* に比べて少なかったが，これは *G. scabra* の開花時期が 10 月でありその品種数は少ないためである。今後，*G. scabra* における本病の発生報告<sup>40)</sup>で用いたリンドウを慎重に同定する必要があるが，今回得られた結果は，*G. scabra* は *M. gentianae* の感染に対して抵抗性を有していることを強く支持している。なお，今回用いた *G. scabra* は 10 月咲きの青花であるが，育成系統の中には白花やピンク花もあることから，この抵抗性が *G. scabra* に一般的な形質であるか，今後明らかにする必要がある。

*G. scabra* と *G. triflora* の種間交雑品種「アルビレオ」も本病菌に対して強い抵抗性を示した。「アルビレオ」の交配親である磐梯系 (Ba;*G. triflora*) は罹病性であったが，九州系 (OK;*G. scabra*) は抵抗性であった。また，「アルビレオ」(OK×Ba) と交配組み合わせを異にする Ba×OK 系統でも供試したすべての個体が抵抗性を示した。これら結果から，OK (*G. scabra*) の抵抗性が優性遺伝しその後代の「アルビレオ」が抵抗性を示すことが明らかになった。今後，*G. scabra* を本病に対する抵抗性の遺伝資源として育種に導入することで，本病に抵抗性を有した品種の開発が期待される。

表31 自然感染<sup>1)</sup>に対する「アルビレオ」の耐病性

供試品種	調査株数	発病株数	調査葉数	発病葉率 (%)
アルビレオ	5	0	572	0
ジョバンニ	5	5	571	65.5

1) 岩手県花巻市農家圃場の「ジョバンニ」の罹病株元に鉢植えリンドウを5株ずつ配置

表32 リンドウ褐斑病に対する各交配組合せの耐病性

品種名又は系統名 <sup>1)</sup>	交配組合せ (♀×♂)	供試茎葉数	発病茎率 (%)	発病葉率 (%)
Ba	—	6	100	98.2
OK	—	6	0	0
05-573	Ba×OK	6	0	0
05-576	Ba×OK	6	0	0
アルビレオ	OK×Ba	6	0	0

1) 系統は岩手県農業研究センターの保存系統。Ba:*G. triflora*，OK:*G. scabra*

## 第7章 防除法

これまでに明らかになった感染実態に基づき、防除法を確立するための試験を行った。初発生は8月上旬であるが実際の感染は6月下旬から始まるため、発病前の予防散布が重要であると考えた。また、本病に有効な薬剤として、TPN水和剤、マンネブ水和剤、塩基性硫酸銅およびアンバム液剤が報告されている<sup>51)</sup>が、アンバム液剤を除いて散布後には薬斑による汚れを生じるため、栽培面積が多い早生種の開花時期である7月には使用することができない。そこで、本病に対する防除効果が高かつ汚れの少ない薬剤を選抜した。次いで、第5章第6節で述べた感染実態と合わせて、薬剤散布時期と防除効果の関係について検討した。

### 第1節 有効薬剤の検索

#### 1. 室内接種による防除効果

##### 材料および方法

供試薬剤は、チウラム水和剤(500倍)、TPN水和剤(1,000倍)を用いた。供試品種は所内圃場で栽培されている「ジョバンニ」(2年生)とした。試験区は1区2.1m<sup>2</sup>、4連制とした。薬剤散布は、2007年9月23日に動力噴霧器を用いて0.4L/m<sup>2</sup>となるように株全体に散布した。散布3日後の9月26日に、各区から外観健全な切り枝を3本ずつ採取した。第5章第1節で述べた方法に準じて切り枝の水挿しを調製した。接種源は、K18株の分生子懸濁液(1×10<sup>5</sup>個/ml)を用い、ハンドスプレーで切り枝全体に噴霧し、25℃、60時間の葉面の濡れを維持した後、25℃に保たれた室内で管理した。調査は、接種14日後に実施し、全葉について以下の発病程度別に調査し、発病葉率と発病度を算出した。発病度=Σ(指数×該当数)/3N×100。発病程度別指数 0:発病なし、1:1~5%、2:5~20%、3:20%以上の病斑面積率。

##### 結果

室内接種による防除効果の評価を表33に示す。無処理

区は発病葉率83.6%、発病度74.2の多発生となった。供試したチウラム水和剤とTPN水和剤は、それぞれ発病葉率3.2%と1.7%、発病度1.4と0.9であった。散布10日後の葉の汚れは、チウラム水和剤は実用上問題のない程度であり、TPN水和剤は薬斑が目立った。

#### 2. 圃場における防除薬剤の検索

供試薬剤は、TPN水和剤(1,000倍)、アンバム液剤(2,000倍)、塩基性硫酸銅水和剤(500倍)、クレソキシムメチル水和剤(2,000倍)、メパニピリム水和剤(2,000倍)およびチウラム水和剤(500倍)を用いた。試験は4ヶ年実施し、2000年、2002年および2003年は岩手県花巻市農家圃場、2007年は岩手県奥州市農家圃場で実施した。実験計画は、試験区全体の6畦(花巻市、奥州市それぞれ1畦当たり約30m、40m)を隣り合う2畦ずつ3つのブロックとし、このブロック内に各処理区を配置する分割実験とした。供試品種はいずれも「ジョバンニ」とし、1区9~12m<sup>2</sup>、3反復とした。各年次の薬剤散布日は以下のとおりであった。2000年:6月26日、7月7日、19日、22日(計4回)、2002年:6月27日、7月5日、17日、24日(計4回)、2003年:6月24日、7月3日、14日、28日(計4回)、2007年:6月4日、14日、23日、7月4日、12日、23日(計6回)。無防除区には、葉枯病防除剤として本病に防除効果のないチオファネートメチル水和剤(1,500倍)を散布した。試験散布前後は農家慣行防除とした。

各試験年次の調査方法は以下のとおりとした。2000年は、8月31日に20茎を任意に選び発病葉率と100葉当り病斑数を調べた。2002年は、8月19日に30株を任意に選び発病茎率を、また10月8日には80茎を任意に選び発病茎率と発病葉率を調べた。2003年は、8月18日に30株を任意に選び発病茎率を、また10月24日に20株を任意に選び発病茎率を調査した。2007年は8月24日に発病株率を、また10月11日に発病茎率を調査した。葉害および薬斑の程度は調査時に肉眼で観察した。

表33 リンドウ褐斑病に対する各種薬剤の防除効果<sup>1)</sup>

供試薬剤	希釈倍数	成分量 (ppm)	発病葉率 (%)	発病度 <sup>2)</sup>	薬斑の程度 <sup>2)</sup>
チウラム水和剤	500	800	3.2	1.4	±
TPN水和剤	1,000	400	1.7	0.9	+
無処理			83.6	74.2	-

1) 2007年9月23日に岩手県農業研究センター内の「ジョバンニ」(2年生)に供試薬剤を散布。試験は4反復で実施。散布3日後に各区から採取した切り枝にK18株を室内で接種。調査は接種14日後に実施。

2) 発病程度別指数を与えて算出。指数0:0%、1:1~5%、2:5~20%、3:20%以上の発病面積率

3) -:汚れない、±:汚れが少ない、+汚れがあり販売に難がある、++汚れが著しく販売が困難

## 結果

2000年に実施した防除試験の結果を表34に示す。無防除区では発病葉率18.7%、100葉当たり病斑数が67.4であった。TPN水和剤、塩基性硫酸銅水和剤およびアンバム液剤では高い防除効果が認められた。TPN水和剤では散布による汚れがあり販売に難があると判断された。塩基性硫酸銅は汚れが著しく販売が困難と判断された。

2002年に実施した防除試験の結果を表35に示す。無防除区では、8月19日の調査では発病率66.4%、10月8日では発病率100%、発病葉率76.1%と多発生となった。クレソキシムメチル水和剤では、両調査日において発病が少なく、高い防除効果が認められた。アンバム液剤は、無防除区と比べて防除効果が認められなかった。クレソキシムメチル水和剤の散布による汚れは少なかった。

2003年に実施した防除試験の結果を表36に示す。無防

除区では、8月18日の調査では発病率42.6%、10月24日では発病株率と発病率とともに100%の多発生となった。8月18日と10月24日の発病率の比較において、TPN水和剤は0%、2.7%と高い防除効果が認められた。メパニピリム水和剤は、発病率3.6%、25.4%と防除効果は不十分であった。TPN水和剤は、展着剤ミックスパワー(3,000倍)を加用して散布したところ、葉斑による汚れが少なかった。

2007年に実施した防除試験の結果を表37に示す。無防除区では、8月24日の調査では発病率2.9%であり1反復では発病が認められなかったが、10月11日では、いずれの区でも発病が認められ、発病率51.0%であった。チウラム水和剤とTPN水和剤は、両調査日において発病が少なく、高い防除効果が認められた。チウラム水和剤の散布による汚れは少なかった。

表34 リンドウ褐斑病に対する各種薬剤の防除効果<sup>1)</sup>

供試薬剤 <sup>2)</sup>	希釈倍数	成分量 (ppm)	発病葉率 (%)	100葉当たり病斑数	葉斑の程度 <sup>3)</sup>
TPN水和剤	1,000	400	0	0	+
塩基性硫酸銅水和剤	500	1,160	0.1	0.1	++
アンバム液剤	2,000	268	0.1	0.1	-
無防除			18.7	67.4	±

1) 2000年に花巻市農家圃場で実施。薬剤散布日:6月26日,7月7日,19日,22日(計4回),調査日:8月31日

2) 無防除ではチオファネートメチル水和剤(1,500倍)を散布

3) 表33に同じ

表35 リンドウ褐斑病に対する各種薬剤の防除効果<sup>1)</sup>

供試薬剤 <sup>2)</sup>	希釈倍数	成分量 (ppm)	8月19日調査		10月8日調査		葉斑の程度 <sup>3)</sup>
			発病率 (%)	発病率 (%)	発病率 (%)	発病率 (%)	
クレソキシムメチル水和剤	2,000	208	1.1	17.9	3.5	±	
アンバム液剤	2,000	268	44.8	100.0	61.0	-	
無防除			66.4	100.0	76.1	±	

1) 2002年に岩手県花巻市農家圃場で実施。薬剤散布日:6月27日,7月5日,17日,24日(計4回)

2) 表34に同じ

3) 表33に同じ

表36 リンドウ褐斑病に対する各種薬剤の防除効果<sup>1)</sup>

供試薬剤 <sup>2)</sup>	希釈倍数	成分量 (ppm)	8月18日調査		10月24日調査		葉斑の程度 <sup>3)</sup>
			発病率 (%)	発病率 (%)	発病率 (%)	発病率 (%)	
メパニピリム水和剤	2,000	200	3.6	53.9	25.4	±	
TPN水和剤 <sup>3)</sup>	1,000	400	0	7.2	2.7	±	
無防除			42.6	100	100	±	

1) 2003年に岩手県花巻市農家圃場で実施。薬剤散布日:6月24日,7月3日,14日,28日(計4回)

2) TPN水和剤は葉斑の軽減を目的に展着剤ミックスパワー(3,000倍)を加用。無防除は表34に同じ

3) 表33に同じ

表37 リンドウ褐斑病に対する各種薬剤の防除効果<sup>1)</sup>

供試薬剤 <sup>2)</sup>	希釈倍数	成分量 (ppm)	8月24日調査	10月11日調査	薬斑の 程度 <sup>3)</sup>
			発病株率 (%)	発病茎率 (%)	
チウラム水和剤	500	800	0	0.1	±
TPN水和剤	1,000	400	0	0.2	±
無防除			2.9	51.0	±

1) 2007年に岩手県奥州市農家圃場で実施. 薬剤散布日: 6月4日, 14日, 23日, 7月4日, 12日, 23日 (計6回)

2) 表36に同じ

3) 表33に同じ

## 第2節 薬剤散布時期と防除効果の関係

### 材料および方法

試験は2001年～2003年の3ヶ年, 岩手県花巻市農家圃場で実施した. 供試薬剤はTPN水和剤, クレソキシムメチル水和剤およびアンバム液剤を用いた. 実験計画は第1節2.と同様の分割実験とし, 各処理区は1区9m<sup>2</sup>, 3反復とした. 各試験年次の薬剤散布日は表38～表40に示した. 各年次の調査は, 第1節2.と同様とした. 薬剤散布期間中における時期別の感染実態を明らかにするために, 第5章第6節と同様に, 無防除区において鉢植えリンドウを用いた曝露試験を実施した. 各年次の曝露期間は, 表38～表40に示した.

### 結果

2001年におけるTPN水和剤の散布時期と防除効果の関係を表38に示した. 無処理区では反復間で発生量に大きな違いが認められたので, 少発生区(2反復)と多発生区(1反復)に分けて集計した. 無防除区では, 発病株率44.0%～94.7%であった. TPN水和剤の散布時期毎の発生量は, 7月中旬・下旬(3区)が最も少なく, 次いで7月中旬(4区), 6月下旬・7月上旬(2区)の順に少なかった. 6月中旬(1区)では発生量が多く防除効果が認められなかった. 曝露試験では, 7月上旬(7月4日～16日)の曝露から発病が認められた.

2002年におけるTPN水和剤の散布時期と防除効果の関係を表39に示す. 無防除区では8月19日調査で発病茎率66.4%の多発生であった. TPN水和剤の散布時期毎の発生量は, 6月下旬・7月上旬(2区)と7月上旬・7月中旬(3区)がそれぞれ0.2%, 0.9%と発生が極めて少なかった. 7月中旬(4区)は72.2%であり防除効果が認められなかった. 10月8日になるといずれの試験区も発病茎率100%, 発病葉率45.3～61.6%と多発生した. このような中において, クレソキシムメチル水和剤の6月下旬～7月下旬の4回散布(1

区)は, 10月8日でも発病茎率17.9%, 発病葉率3.5%と発病が顕著に少なかった. 曝露試験では, 6月下旬以降の曝露で発病が認められ, 7月上旬の曝露が発病葉率32.6%と最も高く, 次いで7月中旬と7月下旬がそれぞれ3.7%, 1.1%であった. 2003年は, 汚れないアンバム液剤を早生種の収穫時期に使用することを想定し, 本剤を7月中旬と下旬に組み入れた薬剤散布体系を検討した. 薬剤散布体系と防除効果の関係を表40に示した. 無防除区では8月18日調査で発病茎率42.6%, 10月8日では100%となった. TPN水和剤を6月下旬・7月上旬, 続いてアンバム液剤を7月中・下旬に散布した2区では, 8月の調査では発病が認められなかったが, 10月24日では発病株率17.5%, 発病茎率5.6%であった. 2区の防除効果は, TPN水和剤を6月下旬～7月下旬まで4回連続散布した1区(発病株率7.2%, 発病茎率2.7%)と比較すると, やや劣った. 曝露試験では, 6月下旬と7月上旬の曝露では発病葉率10.1%, 37.9%と高く, 7月中旬と下旬もそれぞれ1.1%, 0.8%と感染が認められた.

## 第3節 考察

本病の防除薬剤について, 粕山ら<sup>37)</sup>はマンゼブ, スルフェン酸系, ダイホルタン, TPN, グアザチン剤を, 仲谷・高橋<sup>51)</sup>は塩基性硫酸銅, マンネブ, TPN, アンバムを, 堀越ら<sup>26)</sup>はクレソキシムメチルをそれぞれ報告しているが, 現在農薬として流通しているのは, マンゼブ, TPN, 塩基性硫酸銅, マンネブ, アンバムおよびクレソキシムメチルである. 圃場における防除試験の結果から, 塩基性硫酸銅, TPN, クレソキシムメチルに加えて, 新たにチウラムが優れることを明らかにした. チウラムは有機硫黄系の殺菌剤であり, 本病に効果があるマンゼブ, マンネブおよびアンバムと同系統であることから, 有機硫黄系は全般に本病に対して防除効果を示すと考えられる. このうち, アンバム液剤は2ヶ年の試験のうち2002年は防除効果が劣った(表35). 仲谷・高橋<sup>51)</sup>もアンバムはTPN

表38 TPN水和剤の散布時期と防除効果<sup>1)</sup>および時期別の感染量

試験区	薬剤散布日 <sup>2)</sup> (月/日)と曝露時期 <sup>3)</sup>					少発生区 <sup>4)</sup>	多発生区 <sup>4)</sup>
	6月中旬 (6/14)	6月下旬 (6/25)	7月上旬 (7/4)	7月中旬 (7/16)	7月下旬 (7/26)	発病株率 (%)	発病株率 (%)
1	●	—	—	—	—	32.3	40.8
2	—	●	●	—	—	15.6	13.0
3	—	—	—	●	●	0	7.8
4	—	—	—	●	—	0	12.3
無防除	—	—	—	—	—	44.0	94.7
曝露したリンドウの 発病葉率(%)	0	0	0.6	0.3	0.6		

1) 2001年に岩手県花巻市農家圃場で実施

2) 表中の●はTPN水和剤, —はチオファネートメチル水和剤の散布時期を示す

3) 無防除区で実施した鉢植えリンドウの曝露期間は以下のとおり. 6月中旬:6/14~25, 6月下旬:6/25~7/4, 7月上旬:7/4~16, 7月中旬:7/16~26, 7月下旬:7/26~8/6

4) 少発生区は2区の平均, 多発生区は反復なし

表39 各種薬剤の散布時期と防除効果<sup>1)</sup>および時期別の感染量

試験区	薬剤散布日 <sup>2)</sup> (月/日)と曝露時期 <sup>3)</sup>					8月19日調査		10月8日調査	
	6月中旬 (6/13)	6月下旬 (6/27)	7月上旬 (7/5)	7月中旬 (7/17)	7月下旬 (7/24)	発病茎率 (%)	発病率	発病率	発病率
1	—	○	○	○	○	1.1	17.9	3.5	
2	—	●	●	—	—	0.2	100.0	45.3	
3	—	—	●	●	—	0.9	100.0	55.0	
4	—	—	—	●	—	72.2	100.0	61.6	
無防除	—	—	—	—	—	66.4	100.0	76.1	
曝露したリンドウの 発病葉率(%)	0	0.4	32.6	3.7	1.1				

1) 2002年に岩手県花巻市農家圃場で実施

2) 表中の●はTPN水和剤, ○はクレソキシムメチル水和剤, —はチオファネートメチル水和剤の散布時期を示す.

3) 無防除区で実施した鉢植えリンドウの曝露期間は以下のとおり. 6月中旬:6/13~27, 6月下旬:6/27~7/5, 7月上旬:7/5~17, 7月中旬:7/17~24, 7月下旬:7/24~8/2

表40 各種薬剤の散布時期と防除効果<sup>1)</sup>および時期別の感染量

試験区	薬剤散布日 <sup>2)</sup> (月/日)と曝露時期 <sup>3)</sup>					8月18日調査		10月24日調査	
	6月中旬 (6/16)	6月下旬 (6/24)	7月上旬 (7/3)	7月中旬 (7/14)	7月下旬 (7/28)	発病茎率 (%)	発病株率 (%)	発病率 (%)	発病率 (%)
1	—	●	●	●	●	0	7.2	2.7	
2	—	●	●	△	△	0	17.5	5.6	
無防除	—	—	—	—	—	42.6	100.0	100.0	
曝露したリンドウの発 病葉率(%)	0	10.1	37.9	1.1	0.8				

1) 2003年に岩手県花巻市農家圃場で実施

2) 表中の●はTPN水和剤, △はアンバム液剤の散布時期を示す

3) 無防除区で実施した鉢植えリンドウの曝露期間は以下のとおり. 6月中旬:6/13~24, 6月下旬:6/24~7/1, 7月上旬:7/1~12, 7月中旬:7/12~25, 7月下旬:7/25~8/1

に比べて効果がやや劣ることを示している。当年の曝露試験では、7月上旬が発病率 32.6%と感染量が多く、かつ降雨も8日間連続した(表 24)ことから、このような感染強度が高い条件下では対照の TPN に比べて効果が劣ると思われる。また、本病に対する防除効果が高くかつ葉斑による汚れの少ない薬剤として、クレソキシムメチルとチウラムを選抜した。また、TPN は汚れがあり販売に難があったが、これに展着剤ミックスパワーを加用して散布することで葉斑による汚れが少なくなることを見出した。したがって、上記 3 剤を組み合わせることで、早生種に対しても防除することが可能となる。

2001 年～2003 年に TPN 水和剤の散布時期と防除効果の関係を検討した。6月中旬の散布では防除効果は認められず(表 38)、6月下旬～7月下旬のいずれかで防除効果が認められた。このうち、2002 年と 2003 年は、7月上旬とその前後に散布した場合には 8月の調査では高い防除効果が認められた(表 39, 表 40)。この散布時期と曝露試験で感染量が多い時期は一致しており、感染量が多い 7月上旬の前後に散布することで高い防除効果が認められたと推察される。しかし、この前後の防除を無防除とした場合(表 39)や防除効果の劣るアンバム液剤を組み入れた場合(表 40)は、クレソキシムメチル水和剤または TPN 水和剤を 6月下旬～7月下旬まで連続散布した場合に比べて、10月の調査では防除効果が劣った。両年の曝露試験では 6月下旬～7月下旬にかけて感染が認められていることから、防除しなかった時期の感染が 8月以降にわずかに病斑として出現し、これが第二次伝染源となった可能性がある。このわずかな病斑が 9月以降の流行にどの影響するかについては、感染に好適な条件下では  $10^2$  個/ml の分生子濃度でも発病することや 15～20℃の低温であっても長時間の葉面の濡れがあれば感染できること(第 5 章第 1 節)、さらに病患部組織が褐変腐敗するほど孢子体の形成と分生子の分散が盛んになること(第 5 章第 4 節)から、第二次伝染源として十分に機能し得ると推察される。したがって、8月以降に本病が発生した場合、以降の発病増加を食い止めることは困難であると考えられる。

以上のことから、岩手県における本病の防除適期は 6月下旬～7月下旬であることが明らかになった。そして、この時期に本病に効果の高い薬剤を散布することで、8月以降の本病の発生を抑えることができると考えられた。さらに、本防除試験によって、第 5 章第 6 節で推論した、7月までは前年の罹病残さからの第一次伝染、8月以降は罹病葉からの二次伝染とした本病の伝染経路を検証することができた。すなわち、6月下旬～7月下旬に防除効果の高い薬剤を散布することにより第一次伝染が遮断され、以降の第二次伝染が抑えられたと考えられる。

## 第 8 章 総合考察

### 第 1 節 病原菌

リンドウ褐斑病菌の分類学的所属、生理学的性質および発生生態について知見がほとんどなかったので調査研究を行った結果、その生活環や発生生態に関わるいくつかの菌学のおよび病理学的特徴が見いだされた。

#### 1. 分類学的所属

岩手県内のエゾリンドウ(*G. triflora*)から分離したリンドウ褐斑病菌を *Mycochaetophora gentianae* と同定した。本病菌は、盤菌綱ビョウタケ目に所属し、本目の *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類 3 属(*Helgardia* 属, *Rhoxocerosporidium* 属, *Rhynchosporium* 属)と形態的並びに系統学的に近縁であった。また、本病菌と系統学のおよび生態的に近縁な菌群として、上記の 3 属に加えて *Cadophora* 属, *Leptodontidium* 属および *Pyrenopeziza brasicae* を明らかにした。これら菌群は、いずれも低温環境に対する耐性を有することから、本病菌も高い越冬能力を有する可能性を示唆している。

#### 2. 病理学的特徴

第一に、本病菌の感染活動には高湿度条件や長時間の葉面の濡れを必要とした。すなわち、病斑上における分生子柄の出現には相対湿度 94%以上、孢子体の形成には 99%以上を必要とした。分生子は相対湿度 98%以下では発芽せず 99%以上を必要とした。付着器の形成割合が 50%以上となるのは、適温の 25℃では 48 時間、20℃では 72 時間の葉面の濡れを要した。分生子による接種試験では、24 時間の葉面の濡れでは全く感染が認められなかった。発病率 50%以上となるには、感染適温の 25℃では少なくとも 36 時間の葉面の濡れを要した。このことは、圃場内に曝露したリンドウの発病率と曝露期間中に遭遇した 2 日間連続する降雨の延べ回数との間に相関が認められた結果を支持している。一般に、植物病原菌が葉に感染するために必要とする葉面濡れ時間は 20 時間以内(平均 9 時間)であり<sup>46)</sup>、本病菌は特に長時間の葉面の濡れを必要とする特異な感染生態を有していると考えられる。

第二に、本病菌の孢子体形成の適温は 15℃付近であり、これは本病菌の感染温度範囲 15～25℃の下限であった。一方で、病原菌の感染活動の適温は、分生子の発芽は 20～25℃、付着器の形成と感染は 25℃、感染から発病までの潜伏期間は 25℃、菌糸生育は 20～23℃であり、概ね 25℃付近であった。一般に、分生子の形成は菌糸生育に比べてやや低いとされている<sup>59)</sup>が、本病菌の孢子体の形成適温は著



しく低いといえる。

第三に，感染から発病までの潜伏期間には感染成立後の温度が大きく影響した(第5章第3節)．すなわち，接種後の温度条件が25℃では潜伏期間が約14日間であった．低温条件(20℃以下)では25℃に比べて潜伏期間が長くなった．また，低温条件で管理したリンドウを25℃条件下でさらに管理すると速やかに発病した．露地栽培では気温の変化が大きいため，これら結果は感染時期によって潜伏期間が異なることを示唆している．

第四に，本病菌は腐生的な生態が認められた．すなわち，孢子体の形成は，葉上に出現して間もない新しい病斑では認められず，病斑が褐変腐敗を伴うことで孢子体を旺盛に形成した．この罹病葉を湿室内で長期間保持すると葉全体が褐変腐敗するとともに，病斑以外の周辺組織でも孢子体が形成された(データ未提出)．以上の結果は，病斑の罹病程度が高まるほど孢子体の形成能力が高くなるとともに，その伝染能力の保持期間が長いことを示唆している．

第五に，罹病葉における越冬性は高く，擬似環境下で越冬した罹病葉は病斑上に孢子体を多数形成した．また，罹病残さをリンドウの地際部に放置すると，梅雨明け後には多数の病斑を生じた．さらに，圃場で実施した曝露試験でも，発病が見られない7月上旬に多数の感染を認めた．これら結果は，罹病残さと発病との因果関係を示すとともに，罹病残さの伝染性が強く重要な伝染源となることを示している．

## 第2節 生活環と岩手県における発生生態

リンドウ褐斑病菌の生活環について知見がなかったため調査研究を行った結果，ほぼ全ぼうが明らかになり，図23のようにリンドウ圃場内で分生子による生活環を形成していると考えられた．第一次伝染源は前年の罹病残さである．この罹病残さ上に孢子体が形成され，雨滴中に分生子が分散し飛沫することで第一次伝染が起こる．分生子は，リンドウの葉上で発芽後，付着器を形成して表皮下に侵入し，感染菌糸をマット状に広げて灰白色の微細な斑点として病徴を示す．この葉上に出現した病斑(葉上病斑)上の孢子体が第二次伝染源となる．すなわち，葉上病斑に形成された孢子体から雨滴中に分生子が分散し飛沫することで第二次伝染が起こる．病原菌の越冬は，葉上病斑の表皮下で感染菌糸によって行われる．

上記の生活環を基に，岩手県内で実施した曝露試験による感染実態の把握(第5章第6節)や防除試験(第7章)の結果から，本県では第一次伝染が6月下旬～7月下旬に起こり，8月上旬に葉上病斑が出現した後，第二次伝染が8～9月に起こっていることが明らかになった(図24)．本病菌の感染には温度と葉面濡れ時間が大きく影響するので，リンゴ斑点落葉病<sup>54)</sup>のように病原菌の感染生態と本県の気候特性が密接に関係していることが考えられる．そこで，岩手県における発生生態と気候特性との関係について以下に論じることとする．

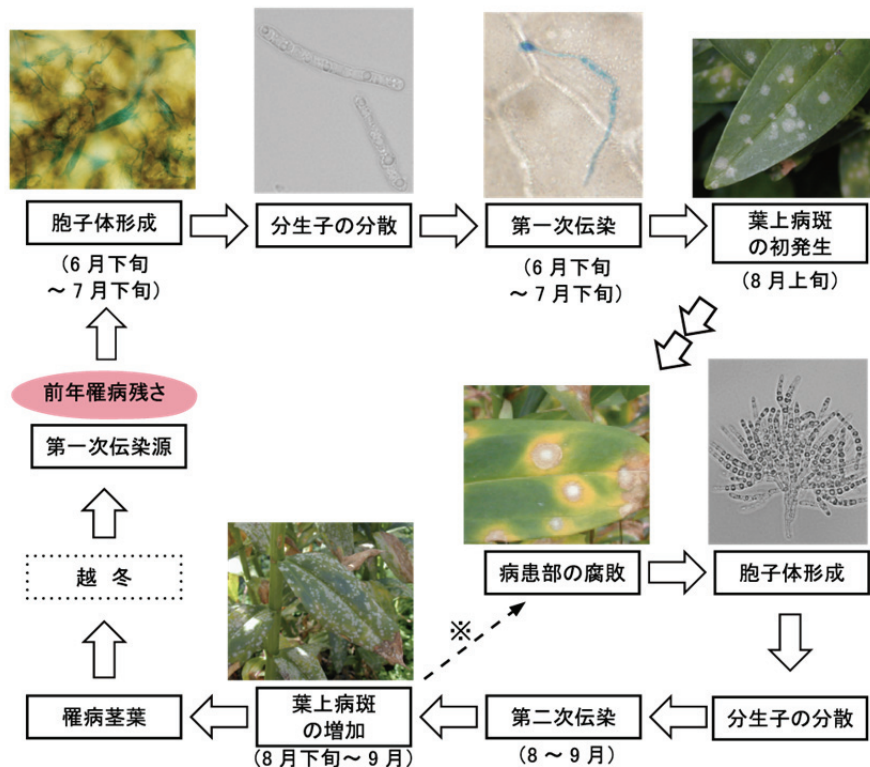


図23 リンドウ褐斑病の生活環

※岩手県では，8月下旬～9月に出現した病斑からの伝染環はほとんど無いと推察される。

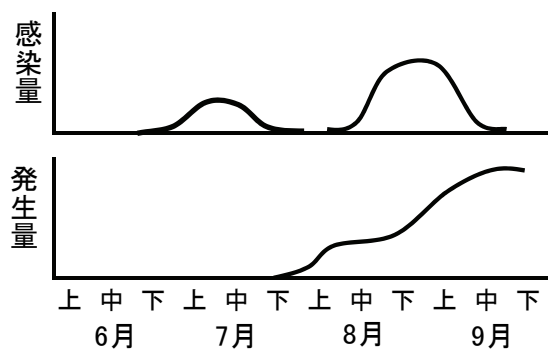


図 24 岩手県におけるリンドウ褐斑病の発生生態の模式図

6 月下旬～7 月下旬に第一次伝染が起こり、8 月上旬に初発生する。  
8～9 月に第二次伝染が起こり 8 月下旬～9 月上旬にかけて急激に発生量が増加する。

### 1. 第一次伝染

胞子体の形成適温(15℃)が感染温度(15～25℃)の下限であることは、第一次伝染を効率良く行う上で重要な意味があると考えられる。すなわち、岩手県中部では 6 月上旬には平均気温が 15℃に達し、6 月末まで 20℃以下で推移する。この温度帯は胞子体の形成適温とほぼ一致している。リンドウ圃場は水田転換畑であり畑地に比べて圃場の地下水位が高く地表面は湿潤を保ちやすい。また、この時期の栽培管理として地表面が乾燥する際には畝間灌水が行われる<sup>84)</sup>。したがって、この時期の地表面は湿潤になりやすく、罹病残さ上で分生子柄(もしくは胞子体)を形成するのに適している。すなわち、胞子体の形成適温が 15℃であることは、梅雨入りとともに罹病残さ上で胞子体の形成を効率良く行うための環境適応であると考えられる。

第一次伝染が起こる 6 月下旬～7 月下旬は岩手県では梅雨期にあたる。岩手県気候誌<sup>48)</sup>によれば、長雨が続くようになるのは 6 月下旬半ば以降のことが多く、梅雨の初期には雨の降り方が地雨式にしとしと降ることが多い。2001～2003 年の 7 月の降雨の状況(表 23～表 25)を見ると、6 月下旬～7 月上旬にかけて 2 日間連続する降雨の延べ回数がいずれも多く、この記載と一致している。また、擬似環境下で越冬させた病葉では胞子体の形成能力が徐々に減衰し 8 月には認められなかった。感染量が多かった 2002 年と 2003 年を見ると、7 月上旬の感染量が多く、次いで 6 月下旬と 7 月中旬であり、7 月下旬は少なかった。以上のことから、罹病残さにおける胞子体の形成と分生子の分散、およびリンドウへの感染は、梅雨の初期の 7 月上旬を中心として一時的に活発になるが、7 月下旬になると少なくなり、8 月にはなくなると考えられる。

本病菌がリンドウに感染するためには長時間の葉面の濡れが必要である。第一次伝染が起こる梅雨期は平均気温 20℃付近で推移するため、第二次伝染が起こる 8 月(平均気温 25℃付近)に比べてより長時間の葉面の濡れを必要とする。梅雨の初期(7 月上旬とその前後)は上述したとおり 2 日間連続する

降雨の延べ回数が多い。また、リンドウは畦間 70cm、株間 30cm、2 条植えの密植栽培であり、収穫期には草丈が 1.5m まで生育するため、日当たりや風通しが悪く、畦の条間は葉面の濡れが保持されやすい。仲谷・高橋<sup>51)</sup>は、本病の発生が畦の外側よりも内側で発病が多いことを観察している。以上から、第一次伝染が起こる梅雨期は、平均気温が本病の感染適温より低いものの、葉面濡れ時間を長く保持しやすい気候であるため、長期間の葉面の濡れを必要とする本病菌にとってリンドウに感染しやすい時期であると推論される。

### 2. 潜伏期間

感染から発病までの潜伏期間は温度が影響することから、岩手県の初発生は例年 8 月上旬であることには 7 月の気温の推移が影響していると思われる。すなわち、第一次伝染が最も多い 7 月上旬は平均気温 20℃付近であるが、例年 7 月下旬の半ばに梅雨明けを迎え、その後は蒸し暑い天気となり 8 月上旬には最高気温が 30℃、最低気温が 20℃前後となる<sup>48)</sup>。したがって、梅雨明け後の気温の上昇に伴い発病が助長され、例年 8 月上旬に初発生が認められると推察される。一方で、2003 年においては 6 月下旬～7 月上旬の感染量が多かったにもかかわらず、8 月上旬の発生量は少なく以降に漸増するような発生消長であった(図 2)。当年は冷害年であり 7 月下旬の気温は 18～20℃で推移した(表 25)。したがって、冷害年や梅雨明けが遅い年は 7 月下旬における気温の上昇がなく、例年よりも遅れた発生経過になったと考えられる。また、第二次伝染における潜伏期間は、8 月は平均気温が 25℃付近で推移することから約 14 日間、9 月は平均気温 20℃付近で推移することから 8 月の潜伏期間よりも長くなると考えられる。

### 3. 第二次伝染

圃場における発生消長は、8 月上旬に散在的に病斑が発生し 8 月下旬～9 月上旬にかけて急激に増加する。この期間の感染量は 8 月中下旬に多く、潜伏期間を約 14 日間とすると、

発病増加する時期と一致している。第二次伝染源は葉上病斑であるが、8月上旬の発生間もない病斑には孢子体は形成されず、病斑組織が褐変腐敗を伴う期間を経た後に伝染能力を有すると考えられる。また、8月の平均気温25℃付近は本病菌の感染適温であり、2日間連続する降雨があれば容易に感染することができる。さらに、本病菌の分生子は感染好適条件(25℃、72時間の葉面の濡れ)では $10^2$ 個/mlの分生子濃度でも病徴を示すことができる。以上のことから、8月は散在的に発生した病斑が第二次伝染源となり、感染・発病に適した温度条件のもと、急激な発病増加を招いていると推察される。

2009年の曝露試験では収穫後の9月にも感染を認めた。また、いくつかの防除試験では、収穫期の8月下旬までほとんど発病が認められなかったにも関わらず、10月に発病増加を認めた。これらのことは、収穫後にも感染が起こり得ることを示している。この伝染源としては、第一次伝染を由来として8月上旬に出現した病斑と、この病斑からの再感染により8月下旬～9月上旬に出現した病斑の2つが考えられる。病斑の罹病程度が高まるほど孢子体形成能が高くなることを考慮すれば、8月下旬～9月上旬に新たに出現した病斑は、9月が20℃以下で推移するために褐変腐敗が進みにくく孢子体を形成しにくいと考えられる。一方で、8月上旬に出現した病斑は、罹病程度が高く伝染能力の保持期間が長いと考えられるため、9月であっても伝染源になり得る。以上のことから、収穫後の9月の感染も第一次伝染に由来する病斑が伝染源である可能性が高い。10月以降は、平均気温が15℃を下回りまた晴天が多くなる<sup>48)</sup>ことから、新たな感染はないと考えられる。

以上をまとめると、8月上旬に発生した葉上病斑は罹病程度が高まった後に孢子体を形成するようになり8月中旬頃から第二次伝染が本格化し9月まで続く。第一次伝染に由来する葉上病斑は伝染能力の保持期間が長いと推察される。第二次伝染による伝染サイクルは1回(もしくは1～2回)であると推定される。

#### 4. 葉上病斑における越冬

本病菌の越冬は、第二次伝染により生じた葉上病斑の表皮下で感染菌糸によって行われる。エゾリンドウの開花は9月末に終わるが、その後の栽培管理は翌年の株養成のために株当たり数本を残し、11月に茎が地際部まで十分に枯れてから刈払いが行われる。刈払った茎葉は他の病害虫の越冬源を絶つ目的で焼却処分されているが、刈払った後の株元には短い茎葉が残ることから、この葉上病斑で越冬すると考えられる。罹病葉における越冬性は高く、罹病残さとして翌年の第一次伝染源になる。したがって、8～9月に起こる第二次伝染は、本病菌がリンドウ圃場内で生活環を繋ぐための重要なプロセスと位置づけられる。

### 5. リンドウ以外の宿主の可能性

リンドウの主要病害である葉枯病や花腐菌核病は、野山に自生しているリンドウでも見られる<sup>30,73)</sup>ことから、リンドウの栽培当初から圃場で発生するようになったと考えられる。一方で、褐斑病は自生しているリンドウでは未だ発生が確認されていないため、その起源については不明である。本研究では、本病菌のテレオモルフを明らかにすることはできなかったが、分子系統解析の結果から盤菌綱ビョウタケ目に所属することを明らかにした。ビョウタケ目の大部分は腐生菌であり<sup>78)</sup>、本病菌も腐生的な生態が認められる。また、本病の初発生は、林地に隣接する圃場で認めることが多いようである(仲谷、私信)。これらから、リンドウ以外の宿主が存在し、例えば林地の樹木等で腐生的に子のう盤を形成し、子のう孢子を介した生活環を有している可能性も考えられる。今後、本病菌の宿主範囲について検討する必要がある。

### 第3節 防除対策

#### 1. 各種防除法の実効性

第2節では、本病の生活環と岩手県における発生生態を考察し、第二次伝染源である葉上病斑の伝染性は高くかつ伝染能力の保持期間は非常に長いこと、罹病残さは伝染性が強く第一次伝染源として重要な役割を果たすことを述べた。このことから、第二次伝染を対象とした防除では、本病菌の生活環を断つことは困難であると考えられる。一方で、葉上病斑からの第二次伝染の伝染サイクルは岩手県では1回程度と推定されることから、第一次伝染を遮断することで本病を効果的に防除できると思われる。第一次伝染を防除する方法として、耕種的防除と薬剤防除が考えられるので、以下にその実効性について考察する。

前年の罹病残さは、伝染性が強く梅雨入り間もなく多数の感染をもたらすことから、これを除去することは防除対策上、非常に重要である。通常の栽培管理では初冬に残茎の刈払いとその焼却処分が実施されており、これらは防除効果を上げていると考えられる。しかし、刈払った後の株元には短い茎葉が残存し、この葉上病斑で越冬して翌年の第一次伝染源となる。この残茎は、害虫等の越冬源になるために雪解け間もなく除去する生産者もいるが、雪解け後は残さとして地表面に脱落し、第一次伝染源となり得る。したがって、耕種的防除だけでは第一次伝染を防止することは困難であると考えられる。また、他病害では罹病茎葉の除去が指導されているが、本病の葉上病斑は畦の条間に発生し見つけにくいことや、わずかな葉上病斑でも以降の大流行に直結することから、その実効性は低いと考えられる。

病害名	5月	6月	7月	8月	9月	10月
葉枯病		■	■			
花腐菌核病				■	■	■
褐斑病		■	■			
黒斑病				■	■	
炭疽病		■				
防除薬剤	キャブタン チラム 銅		TPN クレソキシメチル	ホリオキシ ン クレソキシメチル メハコピリム	ミノクタジン酢酸塩 フェブコナゾール チオファネートメチル ペニミル	

図 25 岩手県におけるリンドウ病害の感染時期と重点防除時期

図中の横棒は感染時期，網掛けは重点防除時期を示す．防除薬剤は，当該時期に主に使用する殺菌剤を示す．

薬剤防除は，6月下旬～7月下旬に本病に有効な薬剤を連続散布することで，本病の感染がなくなる10月まで発生を抑えることができた(第7章)．図25に示すように，この防除時期は葉枯病の重点防除時期でもある．褐斑病に有効なTPNやクレソキシメチルは，葉枯病にも卓効を示し(猫塚，未発表)同時防除することができるため，この時期の防除薬剤として適している．一方で，褐斑病の第二次伝染が起こる8月は，県北部では花腐菌核病，県南部では黒斑病<sup>55)</sup>の重点防除時期になる．両病害を対象とする防除薬剤の多くは褐斑病に対する防除効果が劣るため，本病との同時防除は期待できない．このように，リンドウには複数の病害が発生するため，これらを総合的に防除するためには，それぞれの防除適期に効果の高い薬剤を選択する必要がある．したがって，褐斑病については第一次伝染が起こる6月下旬～7月下旬に絞って防除を実施することが妥当であろう．なお，本県より南に位置する地域では，葉上病斑の発生が早く(26,70)，以降も気温が高く推移するため，伝染サイクルが複数回起こっている可能性がある．この場合，第一次伝染を対象とした薬剤防除の徹底だけでは防除効果が不十分であることが予想されるため，第二次伝染の発生を想定した追加防除についても検討する必要があると思われる．

## 2. 発生予察

本病は，いったん発生するとその後の病勢進展を抑えることは困難であり，定期的な発生予察によって葉上病斑の発生を確認してもその後の防除手段がない．これまで述べてきたように本病の防除対象時期は第一次伝染であることから，第一次伝染の時期と量を把握し防除対策に反映させる必要

がある．

感染開始時期の予測は，梅雨の初期に感染量が多くなるので，梅雨入り時期を指標にすることができる．岩手県では，例年梅雨入りが6月下旬の半ば頃，梅雨明けが7月下旬の半ば頃であり，その年次変動も小さいことから，重点防除時期を6月下旬～7月下旬に設定することができる．また，梅雨入りが早まった場合には，防除開始時期を早めることで対応することができる．なお，イネいもち病ではアメダスデータを利用した感染好適条件の推定に基づく薬剤防除の判断基準が示されている<sup>41)</sup>が，本病菌の場合は感染後や初発生後の散布では防除効果が期待できないので，これを利用して防除対策に反映させることは困難であろう．

第一次伝染源量の予測は，罹病葉が翌年の第一次伝染源となることから，秋期の発生量を指標にすることができる．すなわち，収穫期まで発生が見られなくてもその後に発病増加することがあるので，収穫後の9～10月にかけて圃場を見回りし，本病の発生を認めた場合には翌年の発生を予測することができる．そして，生産者は，防除適期である6月下旬～7月下旬に本病に有効な薬剤を選択する意志決定が可能となる．仲谷<sup>50)</sup>も，本病の防除対策として前年発生圃場では当年の発生を見込んで予防散布することを提案している．

## 3. 防除薬剤の変遷とリンドウ褐斑病の再発生

岩手県では，1983年に本病が初めて発生しその後大きな被害をもたらした．1987年に本病の防除薬剤が明らかにされ<sup>51)</sup>，翌年には薬剤防除が徹底されたことにより終息した(仲谷，私信)．その後しばらくは本病の発生が認められなかったが，1999年になって再び発生した．仲谷・高橋<sup>51)</sup>は1980年代



に発生した原因について、本病が初発生する以前までは葉枯病や花腐菌核病を対象としたチオファネートメチル水和剤やイミノクタジン酢酸塩液剤が広く使用されてきたが、褐斑病に対してこれら薬剤の効果が低いことから、この薬剤の偏重が一因となっていたと考察している。本病の発生が終息した後の 1990 年代になると、7 月下旬咲きの「マシリィ」が 1992 年に品種登録される等、早生種の作付面積が増加してきた。早生種の開花期である 7 月中下旬は、中生種や晩生種も含めて薬斑の少ない殺菌剤を使用する傾向である。したがって、1999 年の再発生は、本病の防除適期である 7 月の防除薬剤の変遷が一因となった可能性が高い。

本研究では、薬斑による汚れの少ないクレスキシムメチル水和剤やチウラム水和剤を選抜するとともに、TPN 水和剤に展着剤ミックスパワーを加用することで薬斑を軽減できることも明らかにした。そこで、本病の防除適期にこれら薬剤を組み合わせて使用することで、本病菌の第一次伝染が遮断され生活環が断ち切られることで、本病の発生が再び終息に向かうと考えられる。岩手県農業研究センターでは 2003 年に上述した本病の防除適期と有効薬剤を示し<sup>56)</sup>、以降は本病の発生が大きく減少している(図 1)。

#### 4. 総合防除

露地切り花リンドウは、多年生の宿根草であり定植後は同一圃場内で数年にわたり栽培される。このような栽培様式は、リンゴをはじめとする果樹に相通じるものがある。そこで、第一次伝染を効果的に防除するにあたっては、果樹栽培で実施されているような耕種の対策と薬剤防除を組合せた総合防除<sup>42,61,77)</sup>が有効であると考えられる。

リンドウ圃場では畦の条間は葉が乾きにくく、長時間続く葉面の濡れは本病の感染を助長する。そこで、株仕立て本数を調整し、日当たりの良い栽培環境を作ることによって感染頻度が減少するとともに防除薬剤の薬液の到達性が改善されると考えられる。また、従来の栽培管理で実施されている収穫後の刈払いおよび刈払った茎葉の焼却処分は、翌年の第一次伝染源量を減少させるうえで有効であると考えられる。

この他に、抵抗性品種の導入が挙げられる。本研究では、ササリンドウ (*G. scabra*) は抵抗性であり、エゾリンドウ (*G. triflora*) は罹病性であることを明らかにした。このことから、ササリンドウは本病に対する防除を省略できる可能性はあるが、本病菌はササリンドウでも付着器を形成できる(データ未提出)ため、潜在感染の可能性について今後検証する必要がある。また、リンドウはひとつの圃場の中に複数の品種を定植することが一般的であるので、品種にかかわらず同一の薬剤防除が実施されている現状にある。したがって、梅雨期の連続降雨等によりやむを得ず防除できない場合は少なくとも罹

病性のエゾリンドウだけでは防除することが現実的な対応であると思われる。

また、ササリンドウとエゾリンドウの種間交雑種「アルビレオ」も本病に対して抵抗性であり、ササリンドウの抵抗性が優性遺伝することが明らかになった。両種の種間交雑種は今のところ少ないが、今後、本病に抵抗性を有するササリンドウ系統を明らかにし、これらを親系統として育種に利用することで、本病に抵抗性を有する品種が開発され、栽培に導入することで防除労力の軽減につながるものと期待される。

### 摘要

2000 年から 2003 年および 2007 年から 2009 年までの 7 年間にわたり、リンドウ褐斑病の病原菌、発生生態および防除法に関する一連の研究を行った。成果は次のとおりである。

#### 1. 病徴および発生消長

- (1) 品種「ジョパンニ」と「イーハトーヴォ」の葉では、はじめ葉の表側表面に灰白色の微細な斑点が形成された。この斑点はしだいに大きくなり、直径 5mm を超える円形病斑となった。病斑の周囲は黄色になり、やがて褐変腐敗した。「イーハトーヴォ」では、葉の裏側にも病斑を生じ、その初期病徴は葉表と同様で、後に淡桃色～淡褐色を呈した。また、病斑の葉表には退緑斑を生じた。「蒼い風」と「衣川プリンセス」の葉では、褐色の円形病斑を明瞭に生じ、灰白色の病斑は目立たないかほとんど認められなかった。
- (2) 圃場における初発生は、8 月上旬であった。8 月中旬までは漸増し、8 月下旬～9 月上旬にかけて急激に増加した。発病の垂直分布は、はじめは下位葉に発病が多く、後に中位葉に伸展し、上位葉での発病は少なかった。圃場内における発生分布は、はじめ散在して発生し、後に罹病株に隣接する株で新たに発生した。発病位置は、畦の条間で多かった。

#### 2. 病原菌の分類学的所属

- (1) エゾリンドウ (*G. triflora*) から分離した褐斑病菌 (K18 株) を、小林ら (2009) がササリンドウ (*G. scabra*) から分離した *Mycochaetophora gentianae* のタイプ菌株 (MAFF 239231) と以下の点について比較検討し、*M. gentianae* と同定した。
  - ① 培養的性質: 両菌株ともに PDA では 5～30℃で生育し、33℃以上では生育しなかった。生育適温は 20～23℃であった。
  - ② 病原学的性質: 両菌株ともに *G. triflora* (品種「安代の秋」) に激しい病徴を示したが、*G. scabra* (品種「安代のさわ風」) には病徴を示さなかった。
  - ③ 形態的特徴: 両菌株ともに *Mycochaetophora* 属菌特

有の箒状の胞子体を形成した。分生子は、先端の形態を除いてほぼ一致した。

④ 遺伝子解析:両者の ITS 領域は 99.6%一致した。

(2) *M. gentianae* の分生子柄は短く、分生子が出芽状 (blastic) に形成された。その離脱様式は裁断型 (schizolytic) であり、分生子痕は厚くなく目立たなかった。

(3) 分子系統解析を実施し、*M. gentianae* の系統学的な位置付けを明らかにするとともに、本菌と分生子形成様式や形態が類似した *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類との系統学的な関係を以下のとおり明らかにした。

① 3ヶ所の rDNA (SSU+LSU+5.8S) を用いた高次の系統解析から、*M. gentianae* はビョウタケ目に属することが明らかになった。しかし、科レベルでの系統学的な位置を明らかにすることはできなかった。

② ITS 領域を用いた低次の系統解析から、*M. gentianae* はビョウタケ目の *Pseudocercospora* 様不完全糸状菌類 3 属 (*Helgardia*, *Rhexocerosporidium*, *Rhynchosporium*) と近縁であるが、形態的および系統学的に独立した属であることを示した。

③ *M. gentianae* は、*Cadophora* 属、*Leptodontidium* 属および *Pyrenopeziza brassicae* と系統学的に近縁であった。

### 3. 病原菌の生理学的性質

#### (1) 分生子の発芽

① 素寒天平板上では、温度 10~30°C の範囲で発芽し、適温は 20~25°C であった。pH は 3~9 で発芽し、至適 pH は 4~9 であった。素寒天と PDA では、発芽率に差が認められなかった。

② スライドガラス上では、空中の相対湿度 99% 以上を必要とし、100% が好適であった。分生子懸濁液をいったん風乾した場合は、風乾しなかった場合に比べて発芽率が高かった。

#### (2) 培養性質

① PDA, PCA, V8 ジュース, オートミール, 麦芽エキスおよび酵母エキス寒天では生育は良好であった。V8 ジュースおよびオートミール寒天の培養菌叢は、黄~オリブ色の着色を呈した。酵母エキス培地ではフェルト状の菌叢を生じた。いずれの寒天培地においても分生子の形成は認められなかった。

② pH3~10 で生育し、pH3 では生育が劣った。

#### (3) 分生子の形成誘導

① PCA 平板を用いたスライド培養によって胞子体の形成が誘導された。この胞子体は、カバーガラス表面に伸長した菌糸やカバーガラス置床部を超えて伸長した菌糸上に形成された。また、カバーガラスやセロファンで被覆

培養し、被覆を除去することで胞子体を形成した。

② PC 液体培地を用いた振とう培養によって分生子の形成が誘導された。胞子形成適温 (15°C) では  $10^5$  個/ml を超える分生子懸濁液を得ることができた。

### 4. 発生生態

#### (1) 感染条件

分生子懸濁液を用いた接種試験により、発病の影響する要因として分生子濃度、温度、葉面濡れ時間、および葉齢が明らかになった。

① 分生子濃度:  $10^2 \sim 10^5$  個/ml で発病した。分生子濃度と発病率との間には線形的な関係が認められ、 $R^2 = 0.840$  であった。

② 温度: 15~25°C の範囲で発病し、適温は 25°C であった。

③ 葉面濡れ時間: 24 時間の葉面の濡れでは全く発病が認められず、より長時間を要した。発病率 50% に要する葉面濡れ時間は、25°C では 36 時間、20°C では 48 時間、15°C では 60 時間であった。

④ 葉齢: 上位葉は、中位葉や下位葉に比べて抵抗性であったが、その影響は温度や葉面濡れ時間の要因に比べて小さかった。

#### (2) 分生子の感染動態

① リンドウ葉面上における分生子の発芽適温は 20~25°C であった。また、48 時間の葉面の濡れにおいて温度 15~25°C の範囲ではすべて発芽した。

② 接種 7 日後に出現した病斑上では 1~数個の分生子が認められ、いずれも発芽管と付着器の形成が観察された。付着器は、発芽管の先端に形成され、多くは棍棒形~卵形、無色~やや褐色で、大きさ 8~10×5~8  $\mu\text{m}$  であった。この分生子の直下の表皮内には、感染菌糸がマット状に広がっていた。

③ 付着器の形成は、表皮細胞の間隙の近くに高い頻度で観察された。付着器の形成割合は、温度が高く葉面濡れ時間が長くなるほど高くなった。48 時間の葉面の濡れでは、付着器の形成割合は 5°C と 10°C で 0%、15°C で 8%、20°C で 26%、25°C では 73% であった。温度と葉面濡れ時間の増加に伴い付着器の形成割合が増加する傾向は、発病増加する傾向とよく一致した。

#### (3) 潜伏期間

① 接種後、25°C で管理した場合、接種 7 日後から微細な病斑が現れ、接種 14 日後に明瞭な病斑として認められた。

② 接種後、低温条件下 (15~20°C) で管理した場合、25°C に比べて初発生時期が遅く、発病も少なかった。

#### (4) 病斑上における孢子体形成および分生子の分散

罹病葉を湿室に静置することで病斑上に孢子体が形成された。この孢子体の形成に対して、病患部の罹病程度、リンドウの生育ステージ、温度、および相対湿度の影響が認められた。分生子は、孢子体から水中に分散した。

- ① 病患部の罹病程度: 褐変腐敗を伴う病斑で孢子体を形成したが、これを伴わない病斑では認められなかった。
- ② リンドウの生育ステージ: 生育初期(5~6月)や収穫後(9~10月)のリンドウに接種して生じた病斑では、孢子体の形成適温は15°Cであった。着蕾期(7~8月)のリンドウでは、孢子体の形成適温は20°Cであったが、形成量は少なかった。
- ③ 相対湿度(RH): RH 99%以上を必要とし、RH 100%が好適であった。RH 86.5%では分生子柄の形成も認められなかった。
- ④ 分生子の分散: 病斑上に滴下した水滴に分生子が分散した。罹病葉をRH 100%の湿室で3日間維持した場合は20°Cで分散数が最も多く、 $6.2 \times 10^2$  個/mlであった。4日間維持した場合は、3日間に比べて各温度ともに分生子の分散数が著しく増加し、25°Cが最も多く  $4.2 \times 10^4$  個/mlであった。

#### (5) 第一次伝染源

- ① 素焼き鉢内の擬似環境下で越冬させた病葉では、回収直後の病斑上には孢子体は認められなかったが、湿室に静置することで表皮下の菌糸から分生子柄を生じ、次いで孢子体を旺盛に形成した。この孢子体の形成は、4月が最も高かったが、気温の上昇とともに減少し、8月には認められなくなった。
- ② 前年の発病株元土壌にリンドウを定植することで、本病が発生した。また、罹病茎葉を前年秋期に地表面に配置し翌春にリンドウを定植することでも発生した。さらに、定植前に前年罹病残さを除去しても発病した。発生量は、罹病残さを残した場合に多かった。病斑の発生は下位葉~中位葉で多かった。
- ③ 前年罹病残さの伝染性試験において発生した病斑から本病菌を分離し、SSU rDNA をPCR法により増幅した。分離菌のSSU rDNAの増幅産物(約1,600 bp)は、接種菌株(K18株)と同一の位置にバンドが検出され、対照のJ4株のSSU rDNA(約1,000 bp)とは異なった。
- ④ 分生子の土壌灌注による伝染性試験では、2008年は発病が認められず、2009年は1病斑だけ発病が認められた。発生頻度が著しく低いことから、再現性について今後検討する必要がある。

#### (6) 圃場における感染実態

- ① 4ヶ年(2001年~2003年, 2008年)実施した曝露試

験から、本病菌の感染は少なくとも6月下旬~7月上旬にはじまり、9月まで続いた。感染量が多い時期は、初発生前では7月上旬とその前後、初発後は8月中下旬であった。これら感染量が多い時期は、降雨日数も多かった。

- ② 上記の曝露試験から得られた時期別の発病葉率を目的変数、各種気象要因を説明変数とする重回帰分析の結果、6~7月の曝露試験における発病葉率(Y1)および8~9月の曝露試験における発病葉率(Y2)は、いずれも「2日間の連続する降雨の延べ回数」によって説明することができ、前者は  $R^2 = 0.366$ 、後者は  $R^2 = 0.640$  であった。
- ③ 上記曝露試験から得られた潜伏期間は、曝露期間中に最初に遭遇した降雨日に感染したと仮定した場合、2002年は約14日間、2003年は20~38日間であった。

#### 5. 品種と発病の関係

- (1) 実生苗を用いた接種試験において、K18株(*G. triflora*由来)とMAFF 239231株(*G. scabra*由来)は、*G. triflora*の6品種に対していずれも病原性を示したが、*G. scabra*の「アルタ」には病原性を示さなかった。
- (2) 切り枝を用いた接種試験において、*G. triflora*の10品種、および由来不詳の「ラプリーアシロ」と「ニューハイブリッドアシロ」は発病したが、*G. scabra*の「アルタ」と「安代のさわ風」、および*G. triflora*と*G. scabra*の種間交雑種「アルビレオ」は発病しなかった。
- (3) 種間交雑種「アルビレオ」の交配親である磐梯系(*G. triflora*)は罹病性、九州系(*G. scabra*)は抵抗性であった。さらに、「アルビレオ」と交配組合せを逆にした系統も抵抗性であった。これら結果から、*G. scabra*の抵抗性が優性遺伝することが明らかになった。

#### 6. 防除法

- (1) 圃場における薬剤防除試験の結果から、既報の塩基性硫酸銅、TPN、クレソキシムメチルの防除効果を確認するとともに、新たにチウラムが優れることを明らかにした。
- (2) TPN水和剤の散布時期と防除効果の関係を2001年~2003年の3ヶ年検討した。その結果、6月下旬~7月下旬のいずれかに散布することで防除効果が認められた。このうち、2002年と2003年は、7月上旬とその前後に散布した場合に高い防除効果が認められ、この時期は曝露試験で感染量が多い時期と一致した。しかし、この前後を無防除とした場合や防除効果の劣る薬剤を組み入れた場合は、クレソキシムメチル水和剤またはTPN水和剤を6月下旬~7月下旬まで連続散布した場合に比べて、10月の



発生量が多くなった。以上から、岩手県における防除適期を6月下旬～7月下旬とした。

## 7. 病原菌の生活環と岩手県における発生生態

リンドウ褐斑病に関する一連の研究結果から、本病菌は圃場内において分生子を介した生活環を形成していることを明らかにした。病原菌の生活環と岩手県における本病の発生生態は以下のとおり要約される。

### (1) 生活環

梅雨期の6月下旬～7月下旬に、罹病残さ上に形成された分生子によって第一次伝染が起こる。8月上旬になると葉上に病斑が出現し、この病斑上に形成された胞子体から分生子が雨滴とともに分散し第二次伝染が起こる。病原菌は罹病葉内で越冬し、翌年の第一次伝染源となる。

### (2) 第一次伝染源

罹病残さは、温度 15℃付近で数日間の濡れを経ることで、胞子体を旺盛に形成する。岩手県では梅雨期の6月下旬～7月下旬にかけて第一次伝染が起こる。この感染は、岩手県では梅雨入り間もない7月上旬とその前後に多く、梅雨期間を通じて続く。

### (3) 感染と発病

分生子による感染は、葉面濡れ時間が制限要因となる。24時間の葉面の濡れでは感染できず、他の植物病原菌と比較しても著しく長時間の葉面の濡れを必要とする。温度は15～25℃の範囲で感染可能であり、温度が高くなると感染に必要な葉面濡れ時間は短くなる。分生子は葉面で発芽後、付着器を形成する。付着器の形成は、温度が高く葉面濡れ時間が長いほど多くなる。すなわち、感染と付着器の形成には密接な関係が認められる。付着器から表皮下に侵入して感染が成立すると推定されるが、未検証である。

感染から発病までの潜伏期間は、感染成立後の温度条件により異なる。25℃条件下では潜伏期間は約14日間であり、温度が低くなると長くなる傾向がある。岩手県では本病の初発生は例年8月上旬であるが、このことには梅雨明け後の気温の上昇が関係していると推察される。

### (4) 第二次伝染源

葉上病斑における胞子体の形成は、病患部が褐変腐敗を伴うことではじめて行われる。相対湿度(RH)99%以上を必要とし、RH 100%が好適である。葉面の濡れ時間(RH 100%)が長いほど、胞子体の形成量は増加する。胞子体から分生子が雨滴に分散し、これが飛沫して伝染する。8月に発生した病斑は、ごくわずかであっても第二次伝染源として以降の流行に大きく影響する。

## 引用文献

- 1) 赤坂安盛 (2001). リンドウ褐斑病. 花と緑の病害図鑑 (堀江博道ほか編). pp. 176, 全国農村教育協会, 東京.
- 2) 安藤勝彦 (2005). 不完全菌門(アナモルフ菌類). 菌類・細菌・ウイルスの多様性と系統 (杉山 純編). pp. 295-307, 裳華房, 東京.
- 3) Arauz L.F., Sutton T.B. (1989). Influence of temperature and moisture on germination of ascospores and conidia of *Botryosphaeria obtusa*. *Phytopathology* 79:667-674.
- 4) Arenz B.E., Held B.W., Jurgens J.A., Farrell R.L., Blanchette R.A. (2006). Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry* 38:3057-3064.
- 5) Årsvoll K. (1971). *Acrothecium carotae*. sporulation, spore germination, and pathogenesis. *Acta Agric Scand* 21:3-10.
- 6) Braun U. (1994). Miscellaneous notes on phytopathogenic hyphomycetes (II). *Mycotaxon* 54:223-241.
- 7) Braun U. (1995). A monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes), vol. 1. IHW Verlag, Eching.
- 8) Braun U. (1998). A monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes), vol. 2. IHW Verlag, Eching.
- 9) Byrne J.M., Hausbeck M.K., Meloche C., Jarosz A.M. (1998). Influence of dew period and temperature on foliar infection of greenhouse-grown tomato by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Dis* 82:639-641.
- 10) Caldwell R.M. (1937). *Rhynchosporium* scald of barley, rye, and other grasses. *J Agric Res* 55:175-198.
- 11) Crous P.W., Braun U., Schubert K., Groenewald J.Z. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Stud Mycol* 58:33-56.
- 12) Crous P.W., Groenewald J.Z., Gams W. (2003). Eyespot of cereals revisited: ITS phylogeny reveals new species relationships. *Eur J Plant Pathol* 109:841-850.
- 13) Deighton F.C. (1973). Studies on *Cercospora* and allied genera. IV. *Cercospora* Sacc., *Pseudocercospora* gen. nov. and *Pseudocercosporidium* gen. nov. *Mycol Pap* 133:1-62.
- 14) Erke K.H. (1976). Light microscopy of basidia, basidiospores, and nuclei in spores and hyphae of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). *J Bacteriol* 128:445-455.
- 15) Fernando A.A., Currah R.S. (1995). *Leptodontidium*

- orchidicola* (Mycelium radicis atrovirens complex): aspects of its conidiogenesis and ecology. Mycotaxon 54:287–294.
- 16) Fitt B.D.L., Goulds A., Polley R.W. (1988). Eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) epidemiology in relation to prediction of disease severity and yield loss in winter wheat—a review. Plant Pathol 37:311–328.
- 17) Germandt D.S., Platt J.L., Stone J.K., Spatafora J.W., Holst-Jensen A., Hamelin R.C., Kohn L.M. (2001). Phylogenetics of Helotiales and Rhytismatales based on partial small subunit nuclear ribosomal DNA sequences. Mycologia 93:915–933.
- 18) Gilles T., Fitt B.D.L., Kennedy R., Welham S.J., Jeger M.J. (2000). Effects of temperature and wetness duration on conidial infection, latent period and asexual sporulation of *Pyrenopeziza brassicae* on leaves of oilseed rape. Plant Pathol 49:498–508.
- 19) Goodwin S.B. (2002). The barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis* is closely related to the discomycetes *Tapesia* and *Pyrenopeziza*. Mycol Res 106:645–654.
- 20) Goodwin S.B., Dunkle L.D., Zismann V.L. (2001). Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. Phytopathology 91:648–658.
- 21) Gottlieb D. (1950). The physiology of spore germination in fungi. The Botanical Review 16:229–257.
- 22) Gray L.E. and Grau C.R. (1999). Brown stem rot. In: Compendium of Soybean Diseases. 4th ed (Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC, eds). pp. 28–29, The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- 23) 原 撰祐 (1931). 日本菌類志料 三. 菌類 1: 103–113.
- 24) Harrington T.C., McNew D.L. (2003). Phylogenetic analysis places the *Phialophora*-like anamorph genus *Cadophora* in the Helotiales. Mycotaxon 87:141–152.
- 25) Held B.W., Jurgens J.A., Duncan S.M., Farrell R.L., Blanchette R.A. (2006). Assessment of fungal diversity and deterioration in a wooden structure at New Harbor, Antarctica. Polar Biol 29:526–531.
- 26) 堀越紀夫・小野光代・平子喜一 (2003). リンドウ褐斑病の防除薬剤の検索と防除適期について. 日植病報 69: 292–293 (講要).
- 27) 池上八郎・勝本 謙・原田幸雄・百町満朗 (1996). 新編植物病原菌類解説. pp. 25, 養賢堂, 東京.
- 28) 今村昭二・田端信一郎・田部 真 (1974). リンドウ菌核病について. 日植病報 40: 187 (講要).
- 29) 今村昭二・田端信一郎・田部 真 (1975). リンドウ花腐菌核病の病原菌について. 日植病報 41: 255 (講要).
- 30) 石山哲爾 (1934). On some species of *Septoria* collected in southern Saghalien. 札幌博物会報 13:218–222.
- 31) 岩手県農林水産部農産園芸課 (2009). 花きに関する資料, pp. 3, 岩手県, 盛岡.
- 32) Jacome L.H., Schuh W., Stevenson R.E. (1991). Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Phytopathology 81:1480–1485.
- 33) Kageyama S.A., Mandyam K.G. and Jumpponen A. (2008). Diversity, function and potential applications of the root-associated endophytes. In: Mycorrhiza: state of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics, 3rd edn. (Varma A, ed.). pp. 29–57, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- 34) Kastelein P., Stilma E.S.C., Elderson J., Köhl J. (2007). Occurrence of *Rhexocercosporidium carotae* on cold stored carrot roots in the Netherlands. Eur J Plant Pathol 117:293–305.
- 35) 粕山新二 (1998). リンドウ褐斑病. 日本植物病害大辞典 (岸 國平編). pp. 729, 全国農村教育協会, 東京.
- 36) 粕山新二・出射立 (1987). 岡山県で発生したアジサイ褐斑病 (新称) と切花用リンドウ (オヤマリンドウ) 褐斑病 (新称) について (予報). 日植病報 53: 377–378 (講要).
- 37) 粕山新二・出射立・横山竜夫 (1988). リンドウ褐斑病とオモト褐色円斑病の病原菌と防除薬剤について. 日植病報 54: 354 (講要).
- 38) Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. (2008). Dictionary of the fungi, 10th edn. CAB International, Wallingford.
- 39) 小林享夫 (1975). 緑化樹木の *Cercospora* 属菌による斑点性病害. 植物防疫 29:318–322.
- 40) 小林享夫・粕山新二・那須英夫・小野泰典・渡辺京子 (2009). リンドウ褐斑病とその病原菌. 日植病報 75:1–8.
- 41) 越水幸男 (1995). アメダスデータ利用による発生予察法. 植物病理学事典 (日本植物病理学会編). pp. 679–683, 養賢堂, 東京.
- 42) 工藤 晟 (1995). リンゴ斑点落葉病. 植物病理学事典 (日本植物病理学会編). pp. 774–775, 養賢堂, 東京.
- 43) Li B., Zhao H., Xu X.M. (2003). Effects of temperature, relative humidity and duration of wetness period on germination and infection by conidia of the pear scab pathogen (*Venturia nashicola*). Plant Pathol 52:546–552.

- 44) Lumbsch H.T. and Huhndorf S.M. (eds) (2007a). Outline of Ascomycota 2007. Myconet 13: 1-58.
- 45) Lumbsch H.T., Huhndorf S.M. (eds) (2007b) Notes on ascomycete systematics Nos. 4408-4750. Myconet 13: 59-99.
- 46) Magarey R.D., Sutton T.B., Thayer C.L. (2005). A simple generic infection model for foliar fungal plant pathogens. *Phytopathology* 95:92-100.
- 47) 松山宣明 (1993). 一般培地の種類と作製法. 植物病原性微生物研究法 (脇本 哲編). pp. 3-5, ソフトサイエンス社, 東京.
- 48) 盛岡気象台 (1966). 岩手県気候誌. pp.268, 岩手県, 盛岡.
- 49) Murray T.D., Ye H. (1986). Papilla formation and hypersensitivity at penetration sites and resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides* in winter wheat. *Phytopathology* 76:737-744.
- 50) 仲谷房治 (1992). リンドウ 育種と栽培 (吉池貞蔵編). pp. 75-81, 誠文堂新光社, 東京.
- 51) 仲谷房治・高橋哲 (1991). リンドウ褐斑病の発生と防除. 北日本病虫研報 42:66-68.
- 52) Nekoduka S., Tanaka K., Harada Y., Sano T. (2010). Phylogenetic affinity of *Mycochaetophora gentianae*, the causal fungus of brown leaf spot on gentian (*Gentiana triflora*), to *Pseudocercospora*-like hyphomycetes in Helotiales. *Mycoscience* 51:123-133.
- 53) Nekoduka S., Tanaka K., Sano T. (2010). Pathogenicity of *Mycochaetophora gentianae*, causal fungus of gentian brown leaf spot, as affected by host species, inoculum density, temperature, leaf wetness duration, and leaf position. *J Gen Plant Pathol* 76:370-376.
- 54) 猫塚修一・羽田厚・岩館康哉・石黒 潔 (2009). 流行盛期のリング斑点落葉病の発病程度に関するコホート内症例対照研究. 日植病報 75:314-322.
- 55) 猫塚修一・漆原昌二・勝部和則・月星隆雄 (2003). *Alternaria alternata*(Fries)Keissler によるリンドウ黒斑病の発生(新称). 日植病報 69:27 (講要).
- 56) 猫塚修一・勝部和則 (2003). リンドウ褐斑病の感染時期と防除適期. 北日本病虫研報 54:208 (講要).
- 57) Nekoduka S., Tanaka K., Sano T. (2013). Overwintering of brown leaf spot fungus, *Mycochaetophora gentianae*, in infected gentian leaves as the primary inoculum source. *J Gen Plant Pathol* DOI 10.1007/s10327-013-0438-6.
- 58) Nekoduka S., Horaguchi H., Akasaka S., Chiba K., Hikage T., Kawamura H., Nakatsuka T., Nishihara M. (2013). Inheritance of resistance to brown leaf spot disease in gentians *J Gen Plant Pathol* DOI 10.1007/s10327-013-0441-y.
- 59) 大畑貫一・荒木隆男・木曾皓・工藤晟・高橋廣治 (1995). 作物病原研究技法の基礎. pp. 342, 日本植物防疫協会, 東京.
- 60) 大野義文・常見讓史・石川成寿・山崎周一郎 (1996). リンドウ葉枯病の発生生態およびその病原菌. 関東東山病虫研報 43:117-120.
- 61) 大沼幸男 (1995) ブドウ晩腐病. 植物病理学事典(日本植物病理学会編). pp. 775-776, 養賢堂, 東京.
- 62) Parry D.W. (1990). *Plant pathology in agriculture*. pp. 166-171, Cambridge Univ Pr.
- 63) Reeleder R.D. (2007). *Rhexocercosporidium panacis* sp. nov., a new anamorphic species causing rusted root of ginseng (*Panax quinquefolius*). *Mycologia* 99:91-98.
- 64) Rehner S.A., Samuels G.J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol res* 98:625-634.
- 65) Robbertse B., Campbell G.F., Crous P.W. (1995). Revision of *Pseudocercospora*-like species causing eyespot disease of wheat. *S Afr J Bot* 61:43-48.
- 66) Saito I., Kaji K. (2006). *Ciborinia gentianae* sp. nov., the causal organism of sclerotial flower blight of cut-flower gentians. *Mycoscience* 47:41-47.
- 67) 佐竹義輔 (1981) リンドウ科 GENTIANACEAE. 日本の野生植物 草本Ⅲ 合弁花類 (佐竹義輔, 大井次郎, 北村四郎, 亘理俊次, 富成忠夫編). pp. 28-35, 平凡社, 東京.
- 68) Shoemaker R.A., Hambleton S., Lacroix M., Tesolin M., Coulombe J. (2002). *Fungi Canadenses* No. 344. *Can J Plant Pathol* 24:359-362
- 69) Struck C. (2006). Infection strategies of plant parasitic fungi. *In: The Epidemiology of Plant Diseases*. 2nd edn. (Cooke B.M., Gareth Johns. D., Kaye B., eds). pp. 117-138, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- 70) 平子喜一 (2003). リンドウ褐斑病. 原色 花卉病虫害百科3 (農文協編). pp. 655-656, 農山漁村文化協会, 東京.
- 71) Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- 72) Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids. Res. 22: 4673–4680.
- 73) 富樫浩吾・大沼総次 (1934). A list of parasitic fungi collected on Mt. Hayachine, Iwate prefecture. 盛岡高農学報 17:42.
- 74) 柘植尚志 (2004). 空気伝染病の発生生態. 最新植物病理学 (奥田誠一ほか編). pp. 94–104, 朝倉書店, 東京.
- 75) Wang Z., Binder M., Schoch C.L., Johnston P.R., Spatafora J.W. and Hibbett D.S. (2006a). Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. Mol. Phylogenet. Evol. 41: 295–312.
- 76) Wang Z., Johnston P.R., Takamatsu S., Spatafora J.W. and Hibbett D.S. (2006b). Toward a phylogenetic classification of the Leotiomycetes based on rDNA data. Mycologia 98: 1065–1075.
- 77) 渡辺博幸 (1995). ナシ黒斑病. 植物病理学事典 (日本植物病理学会編). pp. 776–778, 養賢堂, 東京.
- 78) Webster J. (1985). ウェブスター菌類概論 (椿 啓介ほか訳). pp. 347–353, 講談社, 東京.
- 79) White T.J., Bruns T. and Lee S. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (Taylor J, ed.). pp. 315–322, Academic Press, San Diego.
- 80) Winston P.W. and Bates D.H. (1960). Saturated solutions for the control of humidity in biological research. Ecology 41: 232–237.
- 81) Wu L., Guo S. (2008). Interaction between an isolate of dark-septate fungi and its host plant *Saussurea involucreata*. Mycorrhiza 18:79–85.
- 82) Xi K., Burnett P.A., Tewari J.P., Chen M.H., Turkington T.K., Helm J.H. (2000). Histopathological study of barley cultivars resistant and susceptible to *Rhynchosporium secalis*. Phytopathology 90:94–102.
- 83) Xu X.M., Guerin L., Robinson J.D. (2001). Effects of temperature and relative humidity on conidial germination and viability, colonization and sporulation of *Monilinia fructigena*. Plant Pathol 50:561–568.
- 84) 横山 温 (1992). 切り花栽培. リンドウ 育種と栽培 (吉池貞蔵編.). pp. 95–114, 誠文堂新光社, 東京.
- 85) 横山竜夫 (1987). 日本産不完全菌類の 3 新種について. 31 回日菌講: 32 (講要).
- 86) 米澤信道・河野昭一 (1989). 日本産リンドウ属リンドウ節植物の変異性と分類学的地位. Acta Phytotax Geobot 40:13–30.
- 87) 吉池貞蔵 (1992a). 品種改良の歴史と現状. リンドウ 育種と栽培 (吉池貞蔵編). pp. 22–26, 誠文堂新光社, 東京.
- 88) 吉池貞蔵 (1992b). 栽培の基礎. リンドウ 育種と栽培 (吉池貞蔵編). pp. 68–72, 誠文堂新光社, 東京.

# Studies on the Pathogen, Epidemiology and Control of Gentian Brown Leaf Spot Caused by *Mycochaetophora gentianae*.

Syuuichi Nekoduka

## Summary

Brown leaf spot disease causes significant economic losses on gentian. This report summarizes results from studies conducted in a total of seven years (2000–2003 and 2007–2009) at Iwate Agricultural Research Center in Kitakami, Iwate Prefecture, with special reference to the pathogen, epidemiology and control of the disease.

## I Symptoms and epidemics of the disease

1. Early leaf symptoms on gentian cv. Jobanni and cv. Ihatovo include minute, grayish white lesions on the upper surface. The lesions progressively enlarge to ca. 5 mm in diameter with yellowish marginal area, and subsequently become brown and rotten. Cv. Ihatovo develops the lesions on both sides of the leaf. Symptoms on cv. Aoi-kaze and cv. Koromokawa-princess, which are brown, circular and conspicuous, are different from the typical symptoms (grayish white, powdery lesions) on cv. Jobanni.
2. Field observations revealed epidemiologic characteristics of the disease as follows. Lesions first appeared in early August, gradually increased toward mid-August, and rapidly between late-August to early-September. The disease was more serious on plant leaves facing between two rows, and on the lower leaves. In the field, lesions were at first found sporadically, and then increased to neighboring healthy plants.

## II Taxonomic position of the causal fungus

1. The causal fungus (K18) isolated from *Gentiana triflora* was identified as *Mycochaetophora gentianae* because of its identity to the the ex-type strain (MAFF 239231) in terms of cultural characteristics, pathogenicity, conidial morphology, and genetic similarity as follows.
  - (1) Cultural characteristics: the isolate grew at temperatures from 5 to 30°C, but did not grow above 32.5°C with an optimum at ca. 20°C.
  - (2) Pathogenicity: inoculation tests showed that the isolate produced lesions on *G. triflora* cv. Ashiro-no-aki, but not *G. scabra* cv. Ashiro-no-sawakaze.
  - (3) Morphological characteristics: the isolate produced besom-like sporophores on diseased leaves. Conidial morphologies were almost identical between the two isolates except for their shape of the apex.
  - (4) Genetic similarity: ITS sequence was identified between the two isolates with 99.6% similarity (two nucleotides difference).
2. Microscopic observations revealed that conidia of *M. gentianae* were produced blastically from short conidiophores and detached in a schizolytic manner, leaving unthickened and inconspicuous scars on the conidiogenous cells.
3. Phylogenetic analyses revealed the phylogenetic position of *M. gentianae* and its allied fungi, *Pseudocercospora*-like hyphomycetes in conidiogenesis and conidial morphology.
  - (1) Phylogenetic analyses using 3 rDNA sequences combined (SSU + LSU + 5.8S rDNA) indicated that *M. gentianae* was a member of the Helotiales-Rhytismatales clade with strong support (BP = 88%) and placed in proximity to the helotialean families, but failed to characterize the position of *M. gentianae* at the family level.
  - (2) Molecular and morphological data clearly showed that *M. gentianae* had affinity with three helotialean, *Pseudocercospora*-like hyphomycetes (*Helgardia*, *Rhexocercosporidium*, *Rhynchosporium*) but that the fungus was distinct from these fungi.
  - (3) ITS phylogeny indicated that *M. gentianae* was also related to *Cadophora*, *Leptodontidium*, and *Pyrenopeziza brassicae*, as well as helotialean *Pseudocercospora*-like hyphomycetes.

### III Physiological characteristics of the causal fungus

#### 1. Conidium germination

- (1) Conidia germinated at temperatures between 10–30°C with an optimal range between 20–25°C and at pH 3–9 with an optimal range between pH4–9. There was no difference in the percentage of conidium germination between on WA and potato dextrose agar (PDA).
- (2) Relative humidity (RH) over 99% was required for conidium germination (the optimum was 100% RH). The rate of conidium germination was higher in dry-water than in free-water treatment at 100% RH.

#### 2. Mycelial growth

- (1) Colony growth of the fungus was vigorous on PDA, potato carrot agar (PCA), V8-juice agar, oat meal agar, malt extract agar, and yeast extract agar. Colonies grown on both V8-juice agar and oat meal agar were yellow to olive. Felty colonies developed on yeast extract agar. The fungus failed to produce conidia on these tested media.
- (2) Colony grew on PDA adjusted at pH 3–10 with an optimal range between pH4–10.

#### 3. Induction of conidium formation

- (1) PCA slide culture induced conidium (sporophore) formation. Sporophores were formed on the mycelia grown over the surface of cover-glass and on extended growth beyond cover-glass. Additionally, sporophore formation was induced by removing cover-glass or cellophane overlaid on PCA-slide culture.
- (2) Conidial suspension  $> 10^5$  conidia/ml was obtained when potato-carrot broth inoculated with mycelial blocks was shaken at 120 rpm at 15°C for 5 d.

### IV Epidemiology

#### 1. Effect of inoculum density, temperature, leaf wetness duration, and leaf age on infection of the causal fungus with conidia

Inoculation tests with conidial suspension revealed that disease incidence was affected by inoculum density, temperature, and leaf wetness duration.

- (1) Inoculum density: disease incidence increased with increasing inoculum density. Even an inoculum density as low as  $10^2$  conidia/ml could produce lesions. Logarithm of inoculum density was closely correlated to disease incidence ( $R^2 = 0.840$ ).
- (2) Temperature: temperatures between 15–25°C were conducive to the disease, but those below 10°C did not cause any lesions.
- (3) Leaf wetness duration: disease incidence increased with the increasing duration of leaf wetness (36–72 h), but no lesions occur when leaf wetness lasted less than 24 h. Leaf wetness duration required for developing more than 50% of disease incidence was 60, 48, and 36 h at 15, 20, and 25°C, respectively.
- (4) Leaf age: disease incidence on the top (youngest) leaves was lower than on the middle and bottom leaves (oldest), although analysis of variance indicated that the *F* value of leaf age was lower than that of temperature and leaf wetness duration.

#### 2. Invasion of gentian leaves

- (1) On gentian leaves, conidia germinated well in the range from 20° to 25°C. After 48 h of incubation, all conidia germinated at 15°–25°C.
- (2) Lesions that developed 7 d after inoculation had one to several germinated conidia. The conidia generally had germ tubes from one or both ends of the cells, but some germinated from the middle of conidial cells. Appressoria were usually formed at the tip of germ tubes and varied in shape, color and size, i.e., they were often clavate to ellipsoid, hyaline to pale brown and  $8\text{--}10 \times 5\text{--}8 \mu\text{m}$ . It is notable that appressoria were formed near the grooves on the boundary of epidermal cells. Hyphal mat developed under epidermal cells of the lesions.
- (3) Appressorium formation was markedly influenced by temperature and leaf wetness duration. More appressoria were formed at higher temperatures (15–25°C) with extended duration of leaf wetness (24–72 h). At 48-h leaf wetness, the rate of appressorium formation was 0, 8, 26, and 73% at 10, 15, 20, and 25°C, respectively.

#### 3. Latent period for disease development

- (1) When inoculated plants were maintained in a moist chamber at 25°C, minute lesions appeared 7 d after inoculation, and then developed conspicuously 14 d after inoculation.

(2) The latent period for disease development was longer at lower temperature (15–20°C) as compared with 25°C.

#### 4. Conidium formation and dispersion on diseased leaves

Sporophores were produced on diseased leaves when they were incubated in a moist chamber for several days. The sporophore formation was affected by (1) disease severity of the leaf tissue, (2) growth stage of host plants, (3) temperature, and (4) relative humidity (RH). Conidia produced on diseased leaves were easily dispersed into water drop.

- (1) Disease severity of the leaf tissue: sporophores were formed exclusively on brown and rotten lesions.
- (2) Growth stage of host plants: the rate of sporophore formation on diseased leaves was higher in the early stage (May–June) and in the blooming stage (September–October) than in the budding stage (July–August).
- (3) Relative humidity (RH): over 99% RH (the optimum 100% RH) was required for sporophore formation; RH below 86.5%, however, prevented even conidiophore formation.
- (4) Conidial dispersion: conidia were dispersed from the sporophores into water drop. The number of conidia in the droplet was the highest at 20°C ( $6.2 \times 10^2$  conidia/ml) when diseased leaves were incubated in the humidity for 3 days; it was  $4.2 \times 10^4$  conidia/ml when incubated at 25°C for 4 days.

#### 5. Primary inoculum source

- (1) Neither conidiophore nor sporophore was found on overwintered, infected leaves in an unglazed pot. Conidiophores emerged from the overwintered, infected leaves when they were incubated into a moist chamber at 15°C, and subsequently sporophores developed with numerous conidia. Sporophores were formed on the overwintered leaves sampled by July; the frequency of the sporophore formation was the highest on the leaves sampled in April, then became lower thereafter with increasing air temperature. Sporophores were not found in August.
- (2) Plants were diseased when planted in spring in the soil infested the previous year or when debris of diseased plants had been laid on the soil surface the previous fall. Even though the diseased debris was removed before planting gentians, lesions developed on the plants. The removal of the debris decreased the number of lesions. The lesions were more abundant on the lower leaves than upper leaves.
- (3) Cultures were obtained from lesions on inoculated plants using the debris of the overwintered diseased leaves and used for PCR detecting with SSU rDNA. The size of PCR products agreed with that of the original culture (isolate K18) with a length of ca. 1600 bp but differed from that of the reference culture (isolate J4) with ca. 1000 bp.
- (4) When healthy gentians were planted in soil contaminated with conidial suspension, the disease never occurred in 2008, but only a slight number of lesions were found in 2009. Further studies are required for elucidating the soil-born nature of the pathogen.

#### 6. Infection process in commercial fields

- (1) Four-year exposure tests (2001–2003 in Hanamaki and 2008 in Kitakami) revealed that the infection of the causal fungus started in late June to early July and continued until September in the commercial fields. Inoculum potential was highest in early July before disease occurrence, and after disease occurrence, it culminated in mid to late August. Disease incidence of plants exposed in both periods tended to be enhanced by many rainy days.
- (2) Multiple regression analysis was conducted using dataset of disease incidence as dependent variable and climatic factors as explanatory variables obtained from the four-year exposure tests. The results showed that disease incidence was strongly correlated with a total number of two consecutive rainy days. Correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.366 in June–July (Y1) and 0.640 in August–September (Y2).
- (3) Latent period inferred from the dataset was ca. 14 days in 2002 and 20–38 days in 2003 on assumption that infection occurred on the first rainy day.

### V Susceptibility of *G. triflora* and *G. scabra* to *M. gentianae*

1. Inoculation tests for seedlings showed that *M. gentianae* strain K18 (isolated from *G. triflora*) and MAFF 239231 (isolated from *G. scabra*) caused lesions on all six *G. triflora* cultivars but failed to infect *G. scabra* cv. Aruta.
2. Inoculation tests for cut plants showed that *M. gentianae* strain K18 caused lesions on all ten *G. triflora* cultivars, as well as cv. Lovely-ashiro and cv. New-hybrid-ashiro (both origins unknown), but failed to infect two *G. scabra* cultivars (cv. Ashiro-no-



sawakaze and cv. Aruta) and an interspecific hybrid between *G. triflora* and *G. scabra*, cv. Arubireo.

3. Parents of the interspecific hybrid cv. Arubireo, *G. triflora* cv. Ba was susceptible but *G. scabra* cv. OK was resistant for the causal fungus. These results indicate that the resistance of *G. scabra* is inherited dominantly.

## VI Disease control

1. Fungicide application tests in gentian field showed that basic copper sulfate, TPN, and kresoxym-methyl were highly effective as reported in the previous study, and the present study revealed the effectiveness of thiuram.
2. The relationship between TPN-application timing and the control efficacy was evaluated for three year times to examine infection periods in the field. The results showed that any of the application between late June and late July could control the disease with two consecutive applications. In 2002 and 2003, the application around early July was effective, which agreed with the fact that inoculum potential culminates in early July. Four consecutive application from late June to late July with 10 day intervals was superior to two consecutive applications around early July, in that the latter method failed to control disease development until October, despite of controlling perfectly until August. In conclusion, fungicide application for the disease control should be made consecutively in late June–late July (the rainy season) in Iwate.

## VII The life cycle of the causal fungus and disease ecology in Iwate

Results revealed that the brown leaf spot fungus on gentian was anamorphic in the field. Life cycle of the fungus and disease epidemiology in Iwate are summarized as follows.

### 1. Life cycles

A primary inoculum source is conidia formed on overwintered, infected leaves in the rainy season (late June to late July). Minute lesions appear sporadically on leaves in early August. The diseased leaves become secondary inoculum source and form conidia (sporophores) on the lesions. The conidia are dispersed into rain drops, which splash the conidia widely. The causal fungus overwinters as the hyphal mat under leaf epidermal cells. Overwintered, infected leaves serve as the primary inoculum source the following year.

### 2. The primary inoculum source

Overwintered, infected leaves as the primary infection source, form sporophores under the weather conditions in which temperature reaches about 15°C and leaf wetness duration continues for several days. In Iwate, primary infection continues between late June and late July, and infection frequency is higher around early July, i.e., just before the rainy season.

### 3. Infection and disease development

Leaf wetness duration is a limiting factor for conidial infection. Long period of leaf wetness (more than 36 h) are required as compared to other general plant pathogens. Temperature for conidial infection ranges from 15 to 25°C, and higher temperature allows rapid infection within short duration of leaf wetness.

Germinated conidia form appressoria on the surface of gentian leaves. Appressorium formation is promoted by high temperature and long leaf wetness duration. Appressorium may form infection hypha for invasion under epidermis of the leaves. Further studies still remain to clarify an invasion mode.

Latent period for disease development is affected by temperatures. At 25°C, lesions obviously develop ca. 14 d after inoculation, although the period tends to extend at lower temperatures. High temperatures tend to stimulate disease development rapidly, which agrees with field observations that lesions usually appear in early August. The appearance may be promoted by rapidly increase in temperature after the end of the rainy season.

### 4. Secondary inoculum source

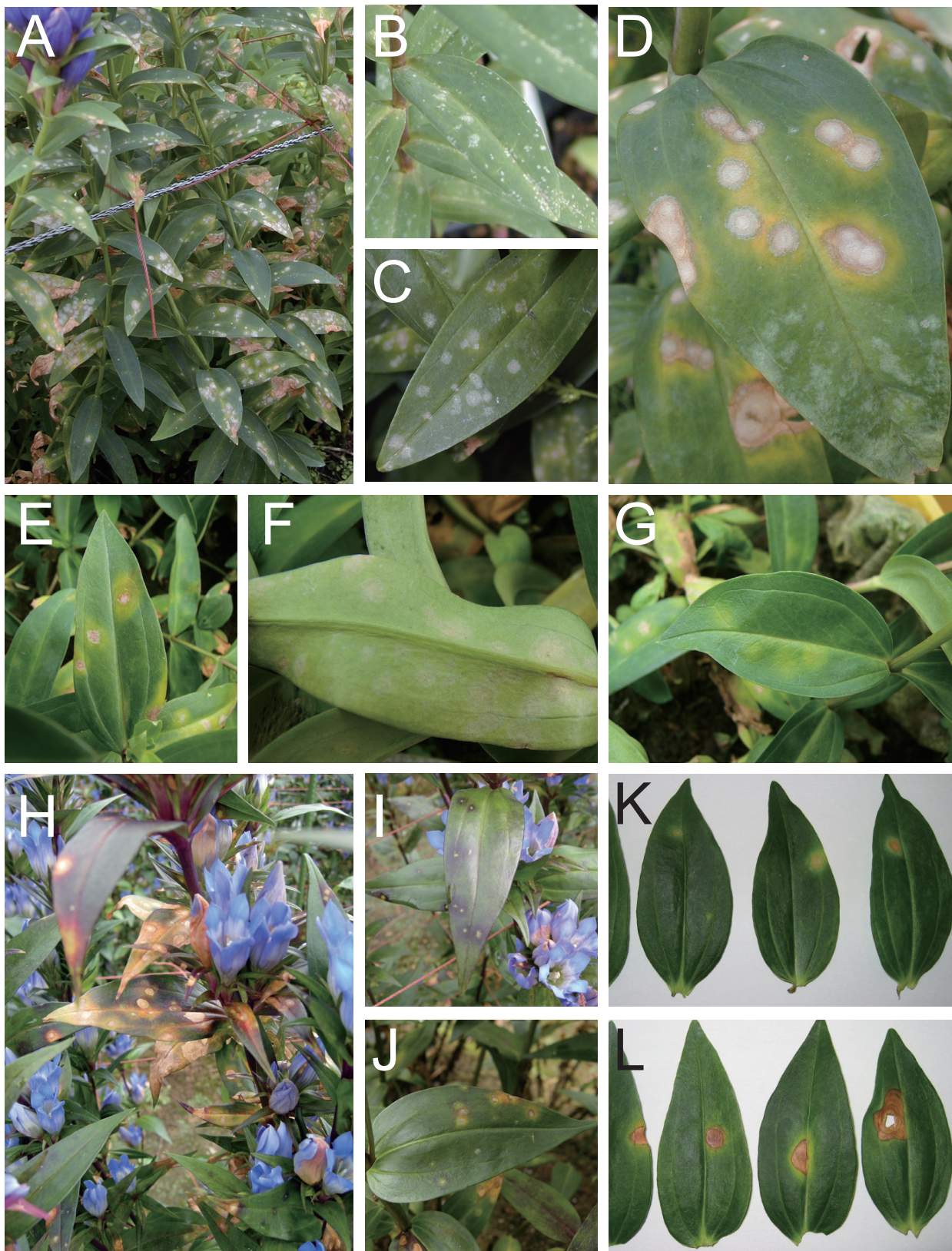
Sporophores are formed on diseased leaves when the lesion tissues turn brown and rotten and when humidity reaches > 99% RH (the optimum 100% RH). Long duration of leaf wetness leads to an increase in sporophore formation. Conidia produced on diseased leaves are dispersed into rain drops, and the droplet splashes and helps the pathogen infect leaves. Primary lesions appearing in the fields in early August, even though still sporadic, could provide sufficient inoculum in the late phase of epidemics.

**Keywords :** Brown leaf spot • Control • Epidemiology • Fungal disease • *Mycochaetophora gentianae*

## 図版説明

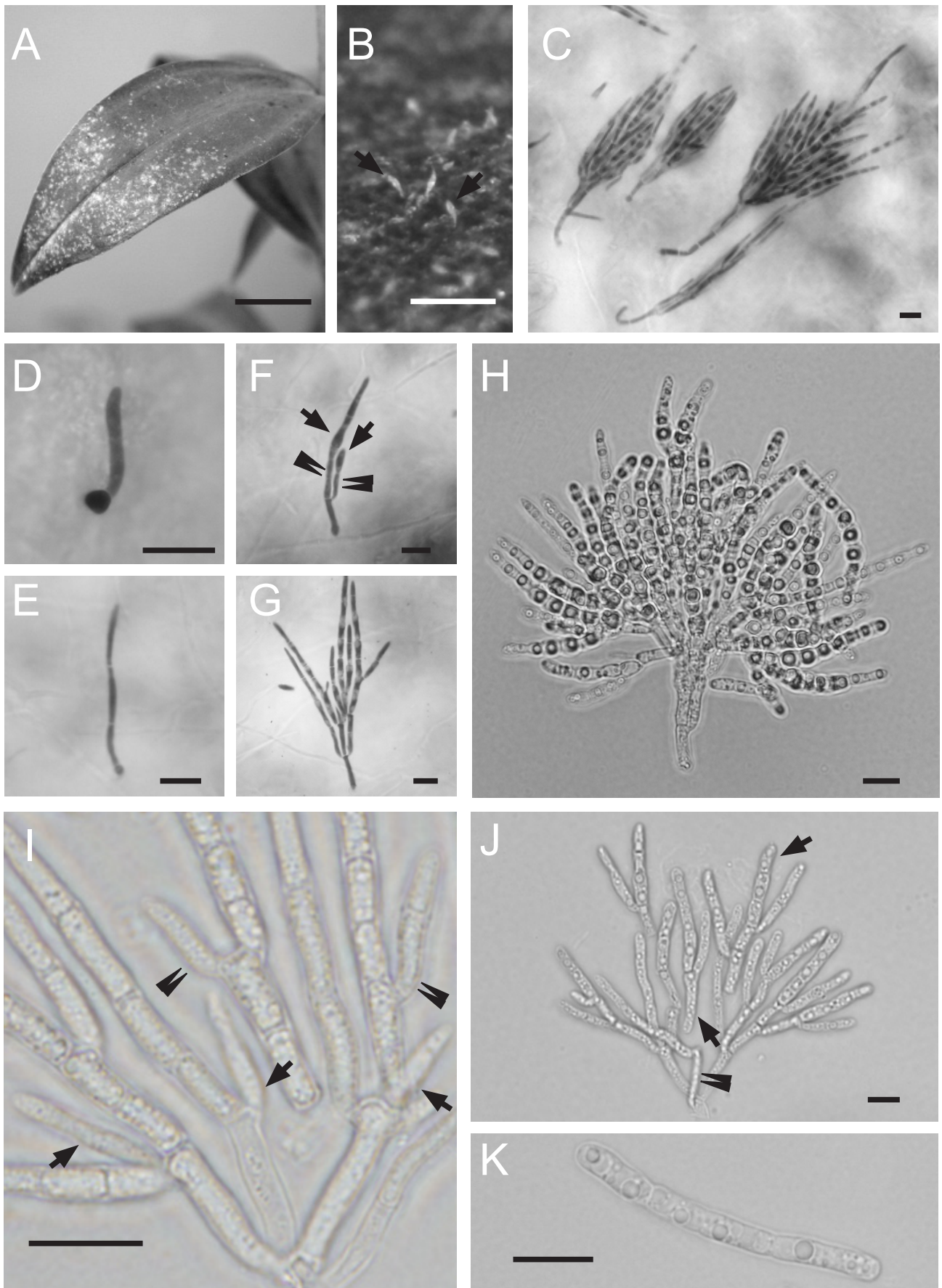
- 図版 I** リンドウ褐斑病の病徴. A-D. 品種「ジョバンニ」の病徴. A: 圃場における発病. B: 灰白色の微細な斑点. C: 円形病斑. D: 病斑が褐変し周囲が黄色を呈する. E-G. 品種「イーハトーヴォ」の病徴. E: 葉表の病斑. F: 葉裏に発生した灰白色～淡桃色の病斑. G: 葉裏に発生した病斑の葉表に見られる退緑斑. H-J. 品種「蒼い風」の病徴. H: 圃場における発病. 褐色の円形病斑が輪紋状に拡大し病斑の周囲が黄色～オリーブ色を呈する. I: 発病初期の病徴. 病斑の周囲が濃紫色を呈する. J: 灰白色の斑点. 病斑の周囲がオリーブ色を呈する. K-L. 品種「衣川プリンセス」の病徴. K: 灰白色～淡褐色の斑点を生じ周囲が退緑となる. L: 輪郭の明瞭な褐色の輪紋, 病斑の周囲がわずかに黄色を帯びる.
- 図版 II** *Gentiana triflora* から分離された *Mycochaetophora gentianae* K18 株. A: 接種による初期病徴. B: 罹病葉上の胞子体 (矢印). C: 罹病葉における箒状の胞子体. D-G: 胞子体の発達過程. D: 表皮上に分生子柄が出現. E: 隔壁を有する多細胞の分生子柄. F: 分岐した分生子柄 (二重矢印) に形成された分生子 (矢印). G: 二次分生子を伴った未熟な胞子体. H: 成熟した胞子体. I: 一次分生子 (矢印) と二次分生子 (二重矢印). J: 分岐しながら求頂的かつ鎖状形成された分生子が分生子柄 (二重矢印) から離脱. K: 分生子. 図中のバーは A: 10 mm, B: 1 mm, C-K: 10  $\mu$ m.
- 図版 III** *Gentiana triflora* から分離された K18 株 (中央上), J4 株 (右下), および *G. scabra* から分離された *Mycochaetophora gentianae* MAFF 239231 株 (小林ら, 2009) の各種培地における菌叢. 20°C, 暗黒下で 14 日間培養.
- 図版 IV** A-C: スライド培養により形成された胞子体. A: 培地 (右) からカバーガラス上に伸長した菌糸上に胞子体が形成. B: 短い分生子柄 (矢印) から出芽型に分生子が形成. 一次分生子 (二重矢印) から二次分生子が求頂的に形成. C: 分岐した分生子柄 (矢印) の先端に分生子が形成. D-F: カバーガラスによる被覆培養で形成された胞子体. D: 薄く伸びた菌糸上に形成された胞子体 (矢印). E, F: 分生子柄 (矢印) と分生子. 図中のバーは 20  $\mu$ m.
- 図版 V** リンドウ葉上における分生子の発芽と付着器形成. A, B: 接種 7 日後に生じた病斑における分生子と表皮下に広がるマット状の菌糸. C-G: 接種後 25°C, 48 時間の葉面の濡れを維持した葉上における分生子の発芽と付着器形成. C-E: 分生子からの発芽管の伸長と付着器形成. F: 表皮細胞の間隙に沿って形成された付着器, G: 膨潤した付着器. Ap: 付着器 (appressorium), Gt: 発芽管 (germ tube), Co: 分生子 (conidium).  
図中のバーは A-E: 20  $\mu$ m, F, G: 10  $\mu$ m
- 図版 VI** 越冬処理した罹病葉上に形成された胞子体. 前年 10 月に K18 株の接種茎葉を素焼き鉢に入れ, 屋外で越冬処理した. 湿室内で 15°C, 4 日間保持した病斑をコットンブルー染色した. 写真は 2009 年 4 月に撮影.

# 図版 I

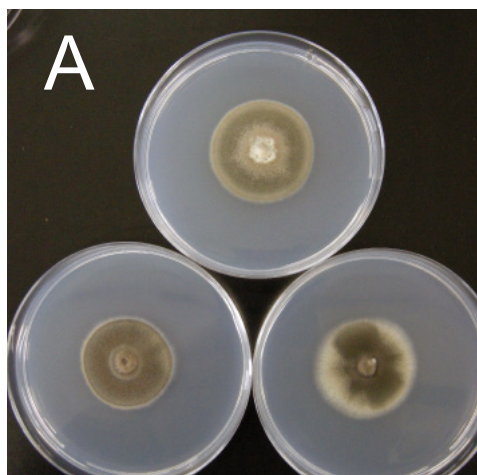




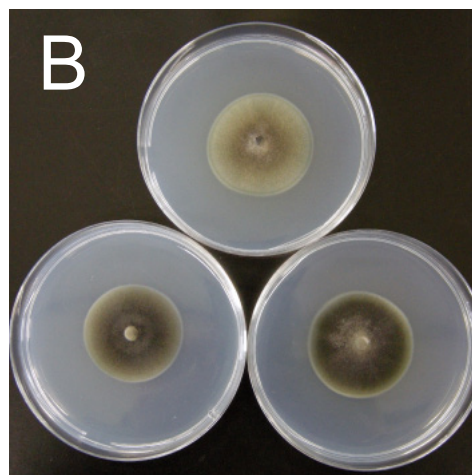
# 図版 II



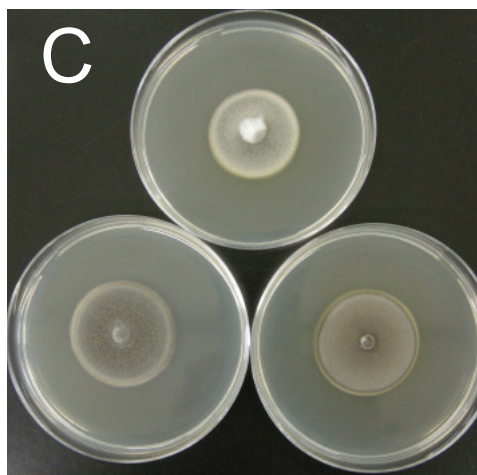
# 図版Ⅲ



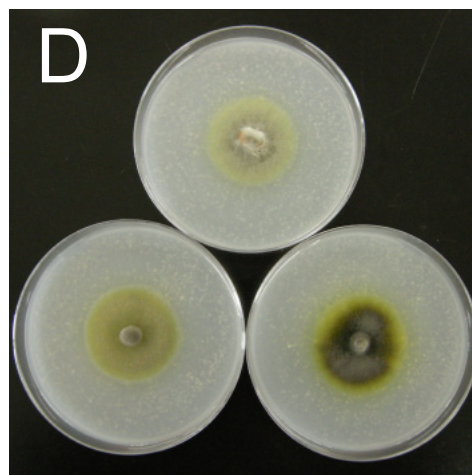
PDA



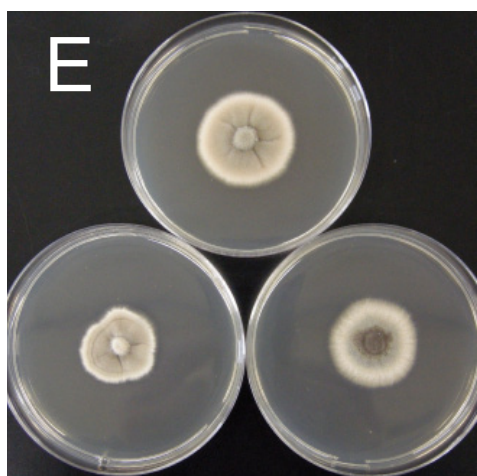
PCA



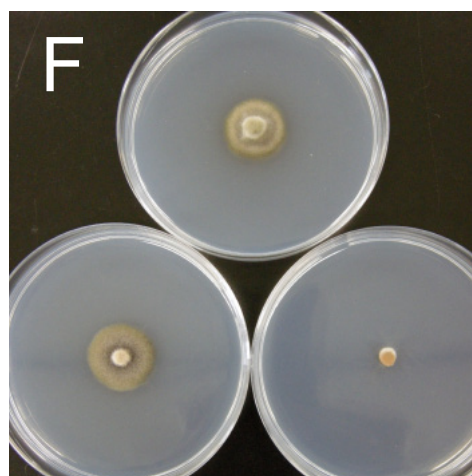
V8



オートミール



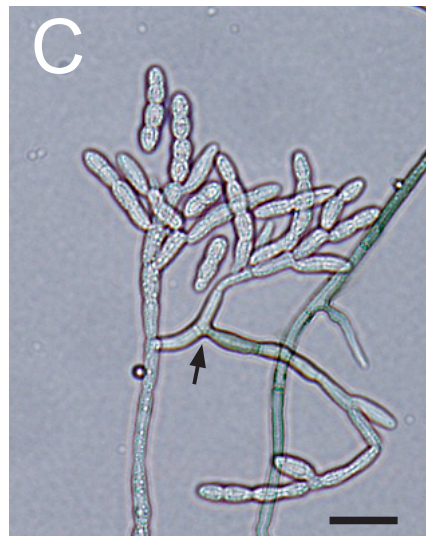
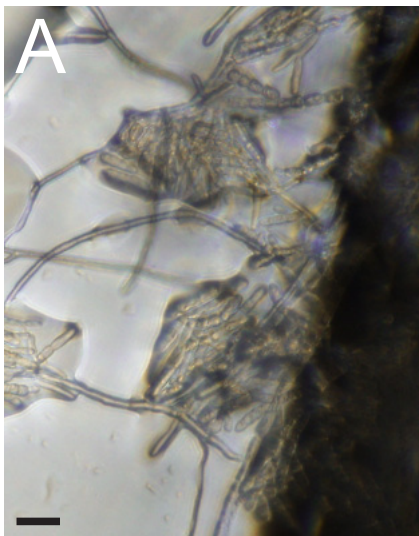
酵母エキス



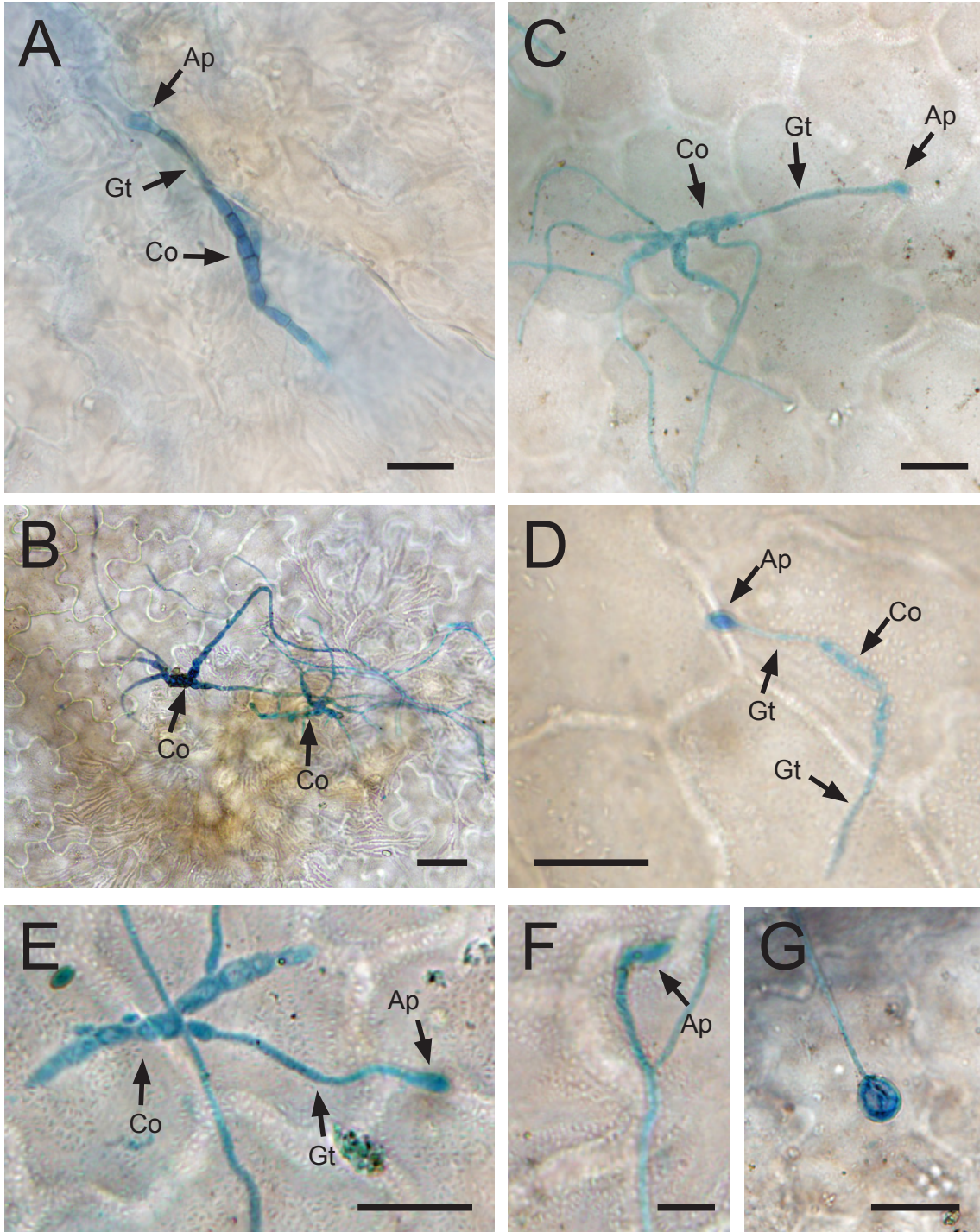
Hopkins 氏



# 図版IV



# 図版 V





## 図版VI

