

三重県における園芸作物病害の発生生態の解明と  
対策に関する研究

Studies on epidemiology and control of plant diseases  
on horticultural crops in Mie Prefecture, Japan

三重大学生物資源学研究科

Graduate school of Bioresources

Mie University

中嶋 香織

Nakajima Kaori

## 目次

諸言	1
第1章 三重県における温州萎縮ウイルスの系統分布と感染率	7
1. 温州萎縮ウイルスの発生状況	
2. CiMV sub-strain 罹病樹のモザイク果実発生状況	
3. SDV strain, CiMV sub-strain および NIMV strain のカラタチ苗への感染率	
第2章 ウンシュウミカンにおける茎頂接ぎ木による3種ウイロイドの効率的無毒化法	33
1. ‘みえ紀南3号’原木のウイロイド検定	
2. 断続熱処理と茎頂接ぎ木法	
3. 茎頂接ぎ木樹のカンキツウイロイド検定	
第3章 三重県におけるトマト葉かび病菌のSDHI剤に対する感受性	54
1. トマト葉かび病の発生状況	
2. 各圃場におけるトマト葉かび病菌のSDHI剤耐性菌の発生動向	
3. トマト苗を用いた生物検定による薬剤感受性評価	
4. SDHI剤の使用履歴と耐性菌発生との関係	
第4章 <i>Pythium myriotylum</i> による黒ウコン立枯病 (新称)	77
第5章 三重県におけるムギ類赤かび病のチオファネートメチル耐性菌の発生推移	88
1. チオファネートメチル剤に対するムギ類赤かび病菌の薬剤感受性	
2. $\beta$ 2-チューブリン遺伝子のMBC耐性変異	
3. MBC感受性の年次変動	
総合考察	106
摘要	118
謝辞	123
引用文献	125
公表論文目録	158

## 諸言

三重県は日本列島のほぼ中央に位置し、海岸線に沿って南北に長い地勢であるため、海岸地域、平野部、山地と変化に富んだ気候を生かして、全国 3 位の生産量を誇る伊勢茶を始め、水稻、コムギ、トマト、イチゴ、三重なばな（葉茎）、カンキツ、三重サツキなど、地域の特色に応じた多様な農産物が生産されている（農林水産省，2020，2021a，2021b，2021c，2022a，2023）。

三重県における耕地面積は 57,000 ha であり、その内訳は田 43,600 ha、畑 13,400 ha（普通畑 8,040 ha，樹園地 5,320 ha，牧草地 26 ha）となっている（農林水産省，2022b）。また，農業産出額（畜産を除く）は 597 億円であり，主な農産物の占める割合は，米が約 38%，野菜が約 25%，果実が約 12%，茶が約 7%，花きが約 6%である（農林水産省，2021d）。

果樹品目の農業産出額の約半分を占めるカンキツは、極早生ウンシュウと中晩柑を中心とした東紀州地域、早生ウンシュウを中心とした伊勢志摩地域、普通ウンシュウの貯蔵出荷を中心とした中北勢地域に産地が分かれている（第 63 回全国カンキツ研究大会，2023）。

三重県が育成した極早生ウンシュウ‘みえ紀南 1 号’が平成 20 年に品種登録され、東紀州地域では平成 23 年より糖度 10 以上、酸度 1.1 %以下のものを「みえの一番星」として販売しており、老木化した極早生ウンシュウ‘崎久保早生’から品種転換を進めている。このような優良品種への更新時に、カンキツの重要病害の 1 つであるウイルス病の温州萎縮病は、汚染土壌への定植や罹病樹への接ぎ木により感染が拡大するため、汚染圃場や罹病樹を特定し、汚染圃場の土壌消毒や罹病樹の伐採・除去などの対策が必要である。温州萎縮病は、果実形質では着色不良、浮皮になりやすい、果皮が厚い、腰高果や奇形果が多い傾向があり、収量も劣る（清水ら，2004）。さらに、果実品質では糖度が低く、クエン酸含量が高い傾向

が認められ、ウンシュウミカン栽培における影響が大きいことが報告されている（清水ら，2004）．そこで，三重県で発生している温州萎縮ウイルスの系統把握と罹病樹周辺に定植したカラタチ苗への感染に及ぼす影響について調査を行った．

三重県が育成した極早生ウンシュウ‘みえ紀南 3 号’は，収穫期が 9 月下旬から 10 月中旬であり，‘みえ紀南 1 号’に続いて収穫できる極早生ウンシュウである．しかし，育成段階で 3 種類のウイロイド（HSVd, CDVd, CVd-VI）に感染したため農業者への普及にはウイロイドの無毒化が必要となった．そこで，今回断続熱処理を行った‘みえ紀南 3 号’から 0.2mm 程度の茎頂を切り出して茎頂接ぎ木を行い，ウイロイド除去が可能か検討を行った．

三重県のトマトは 169 ha で栽培され（農林水産省，2021a），野菜品目の農業産出額で 1 位である（農林水産省，2021d）．近年，高軒高ハウスや環境制御装置を整備した植物工場でのトマト生産が増加している．主

要トマト産地では、トマト葉かび病抵抗性遺伝子 *cf-9* を有する品種が栽培され、*Fulvia fulva* によるトマト葉かび病は大きな問題となっていなかったが、抵抗性品種への過度な依存から抵抗性を打破するトマト葉かび病菌レースが確認されているため（Enya ら, 2009; 山田, 2009）、発生状況の把握を行った。一方、他県では、ボスカリドおよびペンチオピラドに耐性を示すトマト葉かび病菌が確認されるなど（渡辺ら, 2013）、本病の防除に有効な殺菌剤に対する耐性菌の発生も懸念されている。三重県においても succinate dehydrogenase inhibitors（SDHI）剤の防除効果が劣る事例が発生したため、県内の主要産地において数種の SDHI 剤に対する感受性を調査した。

三重県では薬用作物などの栽培技術に関する研究を行っており、黒ウコン (*Kaempferia parviflora*) は、タイ原産のショウガ科バンウコン属の植物で、塊茎を生薬として利用する。黒ウコンの葉鞘が褐色の水浸状に侵さ

れ、その後軟化、倒伏に至る症状が確認されたため、罹病組織から菌を分離し、形態的・生理的特徴を調査し、病原菌を同定した。

三重県では水田転換畑でコムギが 7,250 ha 栽培され、収穫量で全国 5 位（2022 年産）の産地である（農林水産省，2022a）。三重県のコムギ赤かび病の防除薬剤は、チオファネートメチル剤が主に使用されている。一般的にチオファネートメチルのようなベンズイミダゾール系薬剤（MBC）は連続使用によって耐性菌率が高まり、使用中止後もその割合は下がりにくいことが知られている。チオファネートメチル剤に対する高度耐性菌は、三重県において 2008 年に初検出された。本剤に対する耐性菌が顕在化し、使用が制限された場合、生産に及ぼす影響が大きいため、コムギ赤かび病菌のチオファネートメチル剤に対する感受性検定を継続して実施してきた。2008 年から 2021 年まで継続して実施した感受性検定の調査結果から、MBC 耐性株の発生への影響を考察したので報告する。

以上のように、本論文では三重県の主要園芸作物で発生した病害を中心に、カンキツ類で発生した温州萎縮病の発生状況と感染に及ぼすウイルス系統の影響、ウンシュウミカンにおける3種ウイロイドの除去技術の確立、トマト葉かび病の発生状況とSDHI剤に対する薬剤感受性、黒ウコンに発生した立枯病の病原菌の同定及びムギ類赤かび病の発生状況とチオファネートメチル剤に対する薬剤感受性に関する研究を行った。本論文はその結果を取りまとめたものである。



## 第1章 三重県における温州萎縮ウイルスの系統分布と感染率

カンキツ類の温州萎縮病は、1952年に山田・沢村によって報告され、接ぎ木により伝染するほか、土壌伝染することが知られている。三重県においては、1940年代から尾張系ウンシュウ(*Citrus unshiu* Marcow.)や早生ウンシュウで、温州萎縮病様の症状を示す樹体がみられ、1965年に名古屋植物防疫所のウイルス検定で温州萎縮病が初確認された（前、1986）。1980年代には、カンキツ類新品種の普及に伴い、極早生ウンシュウや中晩柑類への品種更新が進むに従って、罹病した苗や穂木の導入により温州萎縮病の発生事例が増加した（前、1986）。近年はウイルスフリーの苗や穂木の導入により、感染拡大は抑えられているが、汚染土壌への定植や罹病樹への接ぎ木により感染が拡大するため、汚染圃場や罹病樹を特定し、汚染圃場の土壌消毒や罹病樹の伐採・除去などの対策が必要である。

温州萎縮ウイルス (Satsuma dwarf virus, SDV) は、カンキツ樹に感染すると舟型葉やさじ型葉と呼ばれる葉の萎縮や枝の叢生、樹全体の萎縮、果実品質や収量の低下を生ずる。SDV, カンキツモザイクウイルス (Citrus mosaic virus, CiMV) やナツカン萎縮ウイルス (Natsudaidai dwarf virus, NDV), ネーブル斑葉モザイクウイルス (Navel orange infections mottling virus, NIMV), ヒュウガナツウイルス (Hyuganatsu virus, HV) は、セコウウイルス科 *Sadwavirus citri* のウイルスである。温州萎縮ウイルス以外はウイルス種でないため、本論文で用いる *Sadwavirus citri* のウイルス系統とその略称を表 1-1 に整理した。これらのウイルス系統はカンキツ類に深刻な被害を与える (Ito et al., 2004; Iwanami et al., 1993, 2001)。狭義の SDV については、SDV strain と表記する。CiMV は SDV の一系統であり、さらに NDV についても CiMV の亜種 (Iwanami, 2023) と考えられるため、本論文では CiMV を CiMV sub-strain, NDV を NDV sub-strain と表記する。NIMV および HV は SDV の一系統であるため、NIMV を NIMV

strain, HV を HV strain とした. CiMV sub-strain の特徴的な症状は, 果皮に緑色と黄色のモザイクが発生することである (Miyakawa and Yamaguchi, 1981; Yamada and Tanaka, 1968). NIMV strain はネーブルオレンジの葉の一部に壊死を伴う斑点を発生させる (Miyakawa and Yamaguchi, 1981; Yamada and Tanaka, 1968). NDV sub-strain は, ナツダイダイ(*C. natsudaidai* Hayata)の春葉に斑点や萎縮の症状を引き起こす (Miyakawa and Yamaguchi, 1981; Yamada and Tanaka, 1968). HV strain は, ヒュウガナツ(*C. tamurana* Hort. ex Tanaka)に目に見える症状を引き起こすが, まだ解明されていない (Ito et al., 2004). しかし, 三重県における SDV に含まれる系統の詳細な分布は明らかにされていない.

本研究では, どのウイルス系統が分布しているかを把握するため, 三重県の主要なカンキツ栽培地域において, 温州萎縮症状を示したカンキツ樹より新梢または果皮を採集し, イムノクロマト法および RT-PCR 法を用いて温州萎縮ウイルスの系統調査を行った.

CiMV sub-strain はモザイク病の病原として報告されており、ウンシュウミカン果実に着色しない輪紋状の斑紋を生じる (Iwanami et al., 2001; Yamamoto and Yamaguchi, 1980). 果実の成熟に伴って全体が着色してモザイク症状は不明瞭となるが、果面の凹凸や果皮の硬化、腰高の果型が生じることが知られている。しかし、CiMV sub-strain の中には果実にモザイク症状を示さない系統の存在も知られている (井沼・富村, 2016; Ito et al., 2007; Iwanami et al., 2001). 三重県のカンキツ樹に感染している CiMV sub-strain が果実にモザイク症状を引き起こす系統かどうか罹病樹の調査を行った。

一方、SDV strain の伝染は、SDV strain 罹病樹に隣接する健全樹や汚染圃場への健全樹の植栽によって数年後に発病することがあり、土壌伝染性であると推察されている (伊沢, 1966; 牛山・大垣, 1970). CiMV sub-strain も土壌伝染性病原体であることが示唆されたが (Imada, 1981), SDV strain や CiMV sub-strain の媒介生物 (ベクター) は未だ不明であ

り、伝染機構が明らかになっていない。片木・牛山（1990）は、土壌を介して感染した SDV strain が肉眼で判定できる病徴を発現させるまでの期間は、SDV に感染したカンキツ樹を波形のビニール板で土壌遮断し、新しく植えたカンキツ樹で病徴が発現されるまでに少なくとも 4 年、メタムアンモニウム、クロルピクリン、D-D (1, 3-ジクロロプロペン/1, 2-ジクロロプロパン) で土壌くん蒸後、新しいカンキツ樹を植えてから病徴が発現するまでに 5 年を要したと報告している。磯田・行徳（1990）は、SDV strain 罹病樹に隣接した健全樹について、ELISA 法によるウイルス検定と病徴発現の調査を毎年実施した結果、5 年目に ELISA 法で陽性反応が見られ、6 年目に舟型葉やさじ型葉の病徴を確認した。さらに、SDV strain 発病跡地に 15 品種のウイルスフリー苗を定植した結果、2 年後に ELISA 法で陽性反応を確認している（磯田・行徳, 1990）。土壌を介して伝染した SDV strain の病徴は早いもので 4~5 年、伝染は 2 年程度と推察されるが、SDV strain の近縁ウイルスである CiMV sub-strain や NIMV strain が同じ速度で土

壤伝染するかは不明である。そこで、SDV strain, CiMV sub-strain および NIMV strain が発生する圃場にカラタチ (*Poncirus trifoliata*) 実生苗を植え付け、温州萎縮ウイルスの系統とカラタチ苗への感染率について調査を行った。

## 材料および方法

### 1. 温州萎縮ウイルスの発生状況

2010年5月から2012年5月にかけて、三重県内の主要なカンキツ栽培地9市町(桑名市, 亀山市, 津市, 多気町, 南伊勢町, 紀北町, 熊野市, 御浜町, 紀宝町)のカンキツ園69圃場において、温州萎縮ウイルスの発生状況を調査した。葉の萎縮や樹勢の低下等の温州萎縮症状を示したカンキツ樹の新梢を採取した。新梢が採取できない時期には、加藤ら(2014)の方法に従い、果皮のフラベド部位を用いて検定した。

温州萎縮ウイルスの感染の有無は、イムノクロマト診断キット「SDV クロマト®」((株)ミズホメディー, 佐賀) および SDV strain, CIMV strain, NIMV

strain の共通プライマーを用いた RT-PCR 法により検定した。「SDV クロマト®」は、検体 0.1 g に検体摩砕試液 0.5 ml を加えて摩砕し、試料液 3 滴をテストプレートに滴下し、判定部ラインの有無により陽性を判定した (加藤ら, 2014; Kusano et al., 2007). RT-PCR 法では、検体 0.2 g から ISOGEN ((株)ニッポンジーン, 東京) を用いて全 RNA を抽出した. PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) (タカラバイオ (株), 滋賀) を用いて、共通プライマーFW146 および RV488 (Iwanami, 2010) を用いた RT-PCR を行った. RT-PCR 検出には、SDV strain, CiMV sub-strain, NDV sub-strain および NIMV strain の RNA-2 塩基配列の共通配列に基づいて設計した特異的プライマー (FW146、5'-ACTAGGGATAGCGCCCTAG-3'、RV488、5'-GGACCGATTGGCCAT-3') を用いた.

RT-PCR の反応条件は、初期変性を 94 °C で 5 分の後、熱変性 94 °C で 30 秒、アニーリング 55 °C で 30 秒、伸長反応 72 °C で 30 秒で

40 サイクル行った。その後 RT-PCR 産物を 2 %アガロースゲルで電気泳動して分離し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下で可視化した。

イムノクロマト法と温州萎縮ウイルスの共通プライマーを用いた RT-PCR 法で陽性と判定した検体のうち、同一圃場で最も病徴の激しい樹を選定して検体とした。ただし、同一圃場の陽性検体であっても品種や植栽時期が異なる場合は感染由来が異なる可能性があるため、別検体として扱った。

陽性と判定した検体について、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) (タカラバイオ(株), 滋賀)を用いて、株特異的プライマー (井沼・冨村, 2016; Kato et al., 2020) 増幅条件は Kato et al. (2020) の記載に従った。陽性対照として, SDV strain (S-58), CiMV sub-strain +NIMV strain (NG2), NIMV strain (WK64-1) を用いた。

## 2. CiMV sub-strain 罹病樹のモザイク果実発生状況

果実の調査は、モザイク症状が確認しやすい着色初期に行った。2011 年 10 月から 11 月, 2012 年 9 月から 11 月にかけて, CiMV sub-strain の



感染が確認された 36 樹のうち、伐採済および調査時の着色状態による判定不能を除く 22 樹について、果実のモザイク症状の有無を全果調査した。残りの 14 本は伐採されているか、調査時の果実の色の状態から症状が観察できなかった。

### 3. SDV strain, CiMV sub-strain および NIMV strain のカラタチ苗への感染率

SDV strain, CiMV sub-strain, SDV strain と CIMV-substrain, SDV strain と NIMV strain の感染が確認された樹の周辺にイムノクロマト法で確認した温州萎縮ウイルスフリーのカラタチ実生苗を 2010 年 9 月から 2011 年 6 月に定植した。SDV strain 罹病樹は 1 樹（樹番号 K-1）、CiMV sub-strain 罹病樹は 4 樹（樹番号 Q-4, L-3, H-1, P-1）、SDV strain と CiMV sub-strain に複合感染した樹木は 1 本（樹番号 KN9-1）、CiMV sub-strain と NIMV strain に複合感染した樹木は 1 本（樹番号 A-4）

であった。CiMV sub-strain 罹病樹のうち 2 樹（樹番号 Q-4, H-1）で果実にモザイク症状が確認された。

カラタチ実生苗は第 5～6 葉展開期の 1 年生苗を SDV strain または CiMV sub-strain または NIMV strain に感染したカンキツ樹の根域に、10 cm 間隔で 10 株×8～12 列で定植した。土壌表層にもカンキツの根が伸長しており、定植時にカラタチ実生苗の根と接触する可能性を避けるため、鹿沼土で根を包みながら定植した。定植後は定期的に病虫害防除や施肥等の生育管理を行った。剪定は、各区別に別々の剪定バサミを用い、同一区内の各カラタチ間の樹液接種を防ぐため、剪定後は剪定バサミを加熱殺菌した。また、野生動物による被害を防ぐため、圃場の側面にネットを設置した。カラタチの生育状況は、2011 年 12 月から 2012 年 1 月に草丈（cm）、総節数（節）を調査した。温州萎縮ウイルスの感染はカラタチの新葉を 2012 年 4 月から 6 月および 2013 年 4 月に採取し、免疫クロマト法により検定した。SDV (SDV strain または CiMV sub-strain または

NIMV strain)の感染株率 (%)を、 $100 \times (\text{感染株数}) / (\text{全株数} - \text{枯死株数})$ として算出した。

## 結果

### 1. 温州萎縮ウイルスの発生状況

調査したカンキツ園 69 圃場のうち、43 圃場で温州萎縮ウイルスの感染が確認された(表 1-2)。RT-PCR 法による菌株判別 (図 1-1) の結果、表 1-2 に示すように三重県における各系統の発生状況は、CiMV sub-strain が最も多く (33 樹/44 樹, 75.0 %), 次に SDV strain (6 樹/44 樹, 13.6 %), SDV strain と CiMV sub-strain の複合感染 (2 樹/44 樹, 4.5 %), NIMV strain (1 樹/44 樹, 2.3 %), CiMV sub-strain と NIMV strain の複合感染 (1 樹/44 樹, 2.3 %)、不明 (1 樹/44 樹, 2.3 %)であった (表 1-2)。不明の検体は、イムノクロマト法で陽性を示したが、共通プライマーによる RT-PCR 法で系統識別できなかったものを示す。

### 2. CiMV sub-strain 罹病樹のモザイク果実発生状況

調査した 22 樹のうち、ウンシュウミカン 4 樹において果実にモザイク症状が確認された（表 1-3, 図 1-2）。モザイク症状が確認された品種は、極早生ウンシュウ‘崎久保早生’（H-1, KN4-2）、早生ウンシュウ‘興津早生’（D-2）、中生ウンシュウ‘石地早生’（Q-4）であった（図 1-2）。明瞭な斑紋は確認できないが、着色ムラができる果実がウンシュウミカン 8 樹で確認された。‘不知火’（‘清見’（*C. unshiu* × *C. sinensis*）× ‘中野ポンカ 3 号’（*C. reticulata* Blanco)), ‘せとか’（（‘清見’ × ‘アンコール No.2’（*C. nobilis* Lour. × *C. deliciosa* Ten.)) × ‘マーコット’（*C. reticulata* × *C. sinensis*)), ‘サマーフレッシュ’（ハッサク（*C. hassaku* Hort. ex Yu. Tanaka）× ナツダイダイ), ‘カラ’（*C. unshiu* × *C. nobilis*）ではモザイク症状は確認されなかった。

### 3. SDV strain, CiMV sub-strain および NIMV strain のカラたち苗への感染率

SDV strain, CiMV sub-strain および NIMV strain に感染した個体のう

ち、同時期に定植したカラタチ間で、草丈および総節数に一定の傾向は見られなかった（データ略）。SDV 系統のカラタチへの感染は、SDV strain の K-1 区が定植 309 日後に 1.0 %、定植 660 日後に 1.1 %、CiMV sub-strain の P-1 区が定植 370 日後に 17.7 %、定植 721 日後に 36.7 %となった（表 1-4, 図 1-3）。残りの 6 試験区は調査期間中にカラタチへの感染が認められなかった。

## 考察

三重県における温州萎縮ウイルスの集団は主に CiMV sub-strain に属する分離株で構成されていることが明らかになった。CiMV sub-strain に次いで多かったのは SDV strain で、NIMV strain に属する分離株も認められた。日本国内の温州萎縮ウイルスの構成は、静岡県は SDV strain が主要であったが、九州をはじめとした西日本地域においては CiMV sub-

strain が主要であるとされており（富村ら，2013），三重県は西日本地域の状況と一致した。

SDV strain と CiMV sub-strain の複合感染は，1966 年植栽の早生ウンシュウ‘宮川早生’で確認された。周辺も同品種であり，別品種の高接ぎもされていなかったため，どの時点で複合感染したのかは不明であった。

NIMV strain は，三重県において発生が初確認された。NIMV strain は，国内では和歌山県で発生が確認されており（今田，1977；井沼・富村，2016；岩波，2001），次いで愛媛県で 1 件報告されている（Shimizu et al., 2005）。海外でも中国四川省で 1 件報告があるのみである（Yan et al., 2021）。三重県で確認された NIMV strain は極早生ウンシュウ‘崎久保早生’に感染しており，春葉に舟型葉が生じていたが，感染拡大を防ぐため伐採したため，成葉の壊疽斑や果実の斑紋症状などの確認はできていない（図 1-4）。CiMV sub-strain と NIMV strain の複合感染は，極早生ウンシュウ‘山川早生’で確認され，春葉に舟形葉が発生し，樹全体

が萎縮した (図 1-4). しかし, 成葉の壞疽病斑や果実の斑点症状は認められなかった. カンキツ類における CiMV sub-strain と NIMV strain の複合感染の報告はこれが初めてである.

CiMV sub-strain はウンシュウミカンの果実にモザイク状の斑紋を生じるカンキツモザイク病の病原として知られており, 早生ウンシュウ‘宮本早生’とともに広がったトラミカン (モザイク症状を呈するウンシュウミカン果実の呼称) 騒動は有名である (今田, 1977; Yamamoto and Yamaguchi, 1980). そのため, 現地では新葉の萎縮などの温州萎縮症状を示した罹病樹のうち, 果実にモザイク症状を示さないものは SDV strain に感染しており, CiMV sub-strain の発生は少ないと考えられていた. CiMV sub-strain に感染したウンシュウミカン 18 樹において, 果実にモザイク症状が発生した割合は 22.2 %と低く, 三重県では果実にモザイク症状を示さない CiMV sub-strain が広く分布している可能性が示唆された. 和歌山県で実施された温州萎縮病の調査でも CiMV sub-strain が 80 %以上を占めており,

それらの樹においてモザイク病の病徴が認められていない（井沼・富村，2016）．韓国においても CiMV sub-strain に感染しているにもかかわらず，典型的な症状を示さないカンキツ樹が多く確認されている（Hyun et al.，2020）．CiMV sub-strain は SDV strain と同様に舟型葉や枝の叢生を生ずるが，SDV strain より症状が軽いため（宇杉ら，1986），果実にモザイク症状を示さない CiMV sub-strain が日本国内のカンキツ産地に広がっていった可能性が考えられる．本研究では，葉の萎縮や樹勢の低下等の温州萎縮症状を示したカンキツ樹を調査対象としたが，極早生ウンシュウは，早生ウンシュウと比較して樹勢が矮化しているだけでなく，葉が小型化し，節間の短縮や葉が極端に丸みを帯びることがあり（岩政ら，1984），新葉が温州萎縮病で萎縮したように見え，葉の萎縮だけでは判別が難しい樹があった．このような樹勢の矮化や葉の小型化など極早生ウンシュウの特徴が軽微な病徴と似ており，感染初期の罹病樹の特定を困難にしていると考えられた．



土壌を介して伝染した SDV strain の病徴の発現は早いもので 4~5 年の期間を要するとされている（磯田・行徳，1990；片木・牛山，1990）。本研究では罹病樹周辺にカラタチ実生苗を定植した結果，SDV が 1 年以内に感染することを明らかにした。P-1 区の SDV の感染率は，定植 370 日後に 17.7 %，定植 721 日後に 36.7 %と高く，非常に伝染能力の高い分離株である可能性が示唆された。一方，K-1 区の SDV の感染率は，定植 309 日後に 1.0 %，定植 660 日後に 1.1 %と低かった。しかしながら，影山ら（2011）は SDV strain の罹病樹周囲に植栽したカラタチの土壌感染率が，定植 3 年後に 50 %，9 年後に 100 %と報告しており，SDV strain の土壌感染率が低いわけではないと考えられる。今回の調査では，残りの 6 試験区は調査期間中にカラタチへの感染が確認されなかった。カラタチ苗を定植した試験圃場は年間降水量が約 3,000 mm と多いが，土壌は礫質で水はけの良い果樹園が多い。しかし，感染が確認された P-1 区と K-1 区のカラタチ定植箇所は，他の 6 試験区と比較してカンキツ樹や隣接する

山林によって陰となることが多く、土壌が湿潤であったが、これらの要因が土壌伝染に及ぼす影響は明らかにできていない。SDV strain と CiMV sub-strain のベクターは未だ不明であり、今後はベクターの解明と土壌伝染を誘引する環境条件などのさらなる研究が必要である。感染が確認された P-1 区と K-1 区の感染率の差は、ウイルス系統の違いに起因するのか、圃場の環境要因に起因するのかは判然としなかった。カラタチはカンキツ類の台木として広く用いられており、温州萎縮ウイルスの汚染圃場へのカンキツ苗の定植後に同様の感染が台木部のカラタチに生じている可能性が示唆された。

**表 1-1** 本研究で使用した SDV の系統名

種	系統	亜系統
Sadwavirus citri	主な系統, 温州萎縮ウイルス, SDV strain	-
	カンキツモザイクウイルス, CiMV strain	主要な亜系統, CiMV sub-strain Az-1 sub-strain ナツカン萎縮ウイルス, NDV sub-strain
	ネーブル斑葉モザイクウイルス, NIMV strain	-
	ヒュウガナツウイルス, HV strain	-

\* Iwanami (2023)の報告に基づく.

表 1-2 三重県における SDV の発生状況

品種名 <sup>a</sup>	調査圃場数	SDV感染したカンキツ樹の樹数 <sup>b</sup>							
		圃場数	樹数	SDV	CiMV	NIMV	SDV/ CiMV	CiMV/ NIMV	不明
‘崎久保早生’, ‘みえ紀南1号’等 (極早生ウンシュウ)	21	13	14	0	12	1	0	1	0
‘興津早生’, ‘宮川早生’等 (早生ウンシュウ)	18	12	12	2	8	0	1	0	1
‘石地早生’, ‘大津4号’, ‘盛田温州’ (中生ウンシュウ)	4	4	4	1	3	0	0	0	0
‘青島温州’ (晩生ウンシュウ)	2	2	2	2	0	0	0	0	0
‘カラ’	4	2	2	0	2	0	0	0	0
‘清見’	1	1	1	1	0	0	0	0	0
‘不知火’	1	1	1	0	1	0	0	0	0
‘はるみ’	5	2	2	0	2	0	0	0	0
‘せとか’	5	4	4	0	4	0	0	0	0
‘サマーフレッシュ’	2	1	1	0	1	0	0	0	0
‘セミノール’	1	0	0	0	0	0	0	0	0
酢ミカン	1	1	1	0	0	0	1	0	0
不明	4	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	69	43	44	6	33	1	2	1	1

a: NIASジーンバンク([https://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant\\_search.php](https://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant_search.php))の記述に基づく。

b: SDV, SDV strain; CiMV, CiMV sub-strain, NIMV, NIMV strain; 不明, イムノクロマト法で陽性を示したが, 共通プライマーによるRT-PCR法で系統識別できなかったものを示す。

**表 1-3** CiMV sub-strain 感染樹の果皮におけるモザイク症状の発生

品種名 <sup>a</sup>	果皮に症状を呈した樹数		
	モザイク症状	着色ムラ	未症状
‘崎久保早生’等(極早生ウンシュウ)	2	3	6
‘興津早生’, ‘宮川早生’等(早生ウンシュウ)	1	4	0
‘石地早生’(中生ウンシュウ)	1	1	0
‘カラ’	0	0	1
‘不知火’	0	0	1
‘せとか’	0	0	1
‘サマーフレッシュ’	0	0	1
合計	4	8	10

a: NIASジーンバンク([https://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant\\_search.php](https://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant_search.php))の記述に基づく.

表 1-4 SDV 罹病樹周辺に定植したカラタチ苗への SDV 感染率

カンキツ 樹番号	系統または亜系統名	カンキツ種または品種 (台木および中間台木)
A-4	CiMV sub-strain + NIMV strain	‘山川早生’
Q-4	CiMV sub-strain (モザイク症状)	‘石地早生’ (甘夏, ‘扇早生’)
L-3	CiMV sub-strain	‘崎久保早生’
H-1	CiMV sub-strain (モザイク症状)	‘崎久保早生’ (甘夏)
P-1	CiMV sub-strain	‘不知火’
KN9-1	SDV strain + CiMV sub-strain	酢ミカン (セミノール)
K-1	SDV strain	‘興津早生’
H-1	CiMV sub-strain (モザイク症状)	‘崎久保早生’ (甘夏)

カンキツ 樹番号	カラタチ 定植日	採取1回目					採取2回目				
		採取日	定植後 日数	調査 樹数	感染 樹数	感染率 (%) <sup>a</sup>	採取日	定植後 日数	調査 樹数	感染 樹数	感染率 (%) <sup>a</sup>
A-4	2010/9/29	2012/4/18	567	109	0	0	- <sup>b</sup>	-	-	-	-
Q-4	2010/9/29	2012/4/17	566	116	0	0	-	-	-	-	-
L-3	2010/9/30	2012/4/19	567	113	0	0	-	-	-	-	-
H-1	2011/4/21	2012/4/24	369	67	0	0	-	-	-	-	-
P-1	2011/4/21	2012/4/25	370	79	14	17.7	2013/4/11	721	79	29	36.7
KN9-1	2011/6/21	2012/4/27	311	97	0	0	-	-	-	-	-
K-1	2011/6/21	2012/4/25	309	97	1	1	2013/4/11	660	94	1	1.1
H-1	2011/6/24	2012/4/24	305	82	0	0	-	-	-	-	-

a: SDV (SDV strain または CiMV sub-strain または NIMV strain) の感染株率 (%) を、 $100 \times (\text{感染株数}) / (\text{全株数} - \text{枯死株数})$  として算出した。

b: -, 未実施。

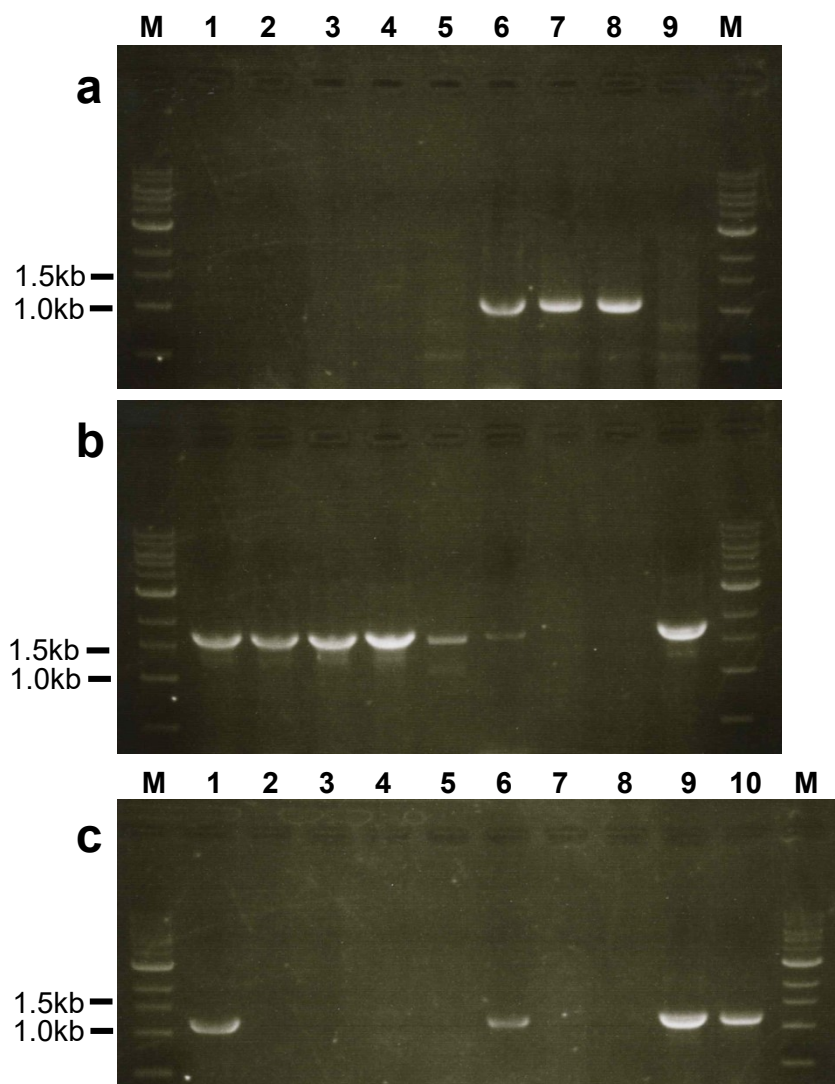
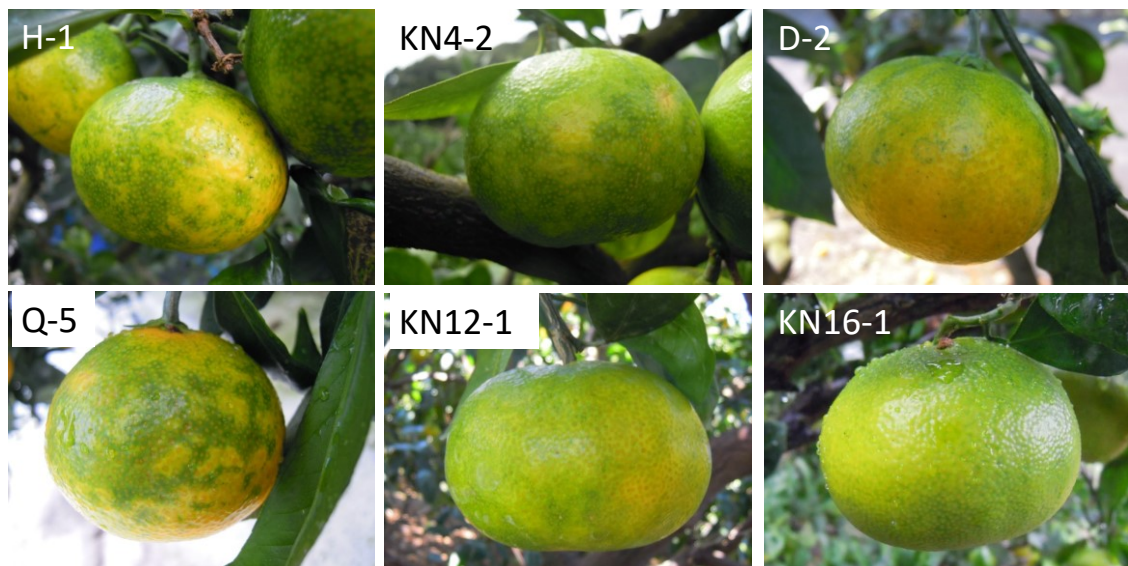


図 1-1 特異的プライマーを用いた(a)温州萎縮ウイルス(SDV strain), (b)カンキツモザイクウイルス(CiMV sub-strain), (c) ネーブル斑葉モザイクウイルス(NIMV strain)の RT-PCR 検出.

Lane 1: A-4; 2: Q-4; 3: L-3; 4: H-1; 5: P-1; 6: KN9-1; 7: K-1; 8: S-58 (SDV strain ポジティブコントロール); 9: NG2 (CiMV sub-strain + NIMV strain ポジティブコントロール); 10:WK64-1 (NIMV strain ポジティブコントロール); M: 1 kb DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)



**図 1-2** CiMV sub-strain 感染樹のカンキツ類の果実のモザイク症状

モザイク症状：H-1, KN4-2, 極早生ウンシュウ‘崎久保早生’；D-2, 早生ウンシュウ‘興津早生’；Q-5 (Q-4 隣接樹), 中生温州‘石地’；着色ムラ：KN12-1, 早生ウンシュウ；未症状：KN16-1, 極早生ウンシュウ



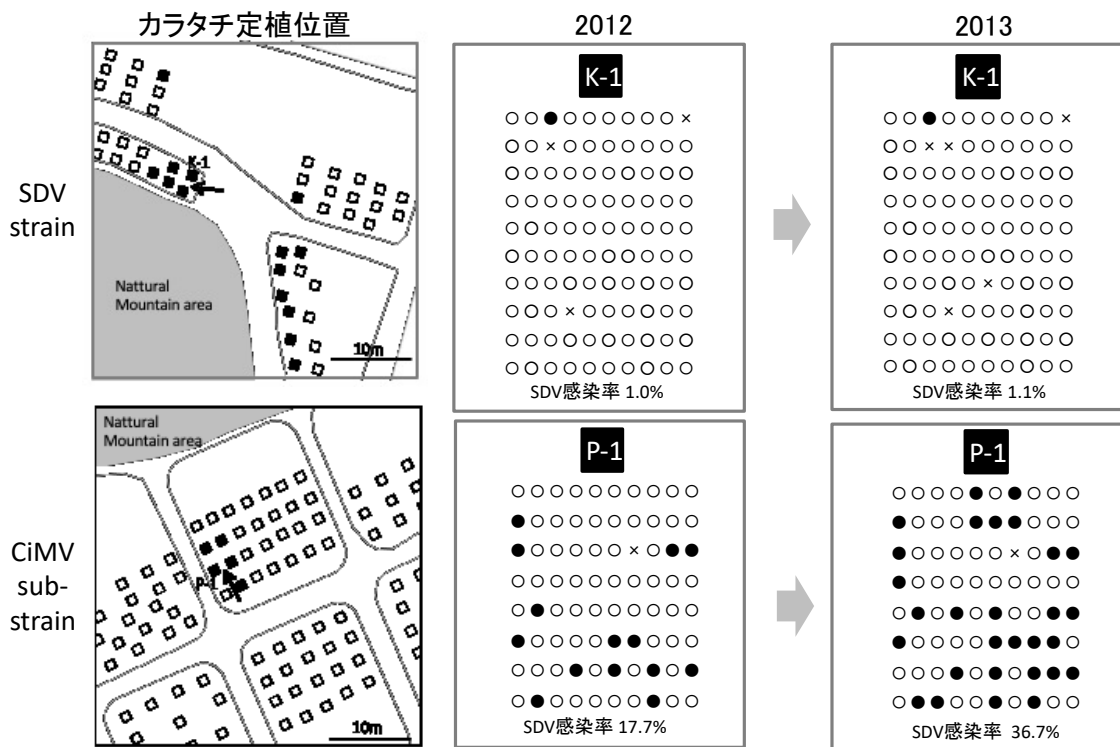


図 1-3 SDV strain または CiMV sub-strain のカラタチ苗 への感染率  
記号は木の位置を示す。□は健全なカンキツ類の樹，■は SDV strain または CiMV sub-strain に感染したカンキツ類の樹，○は健全なカラタチの苗，●は SDV strain または CiMV sub-strain に感染したカラタチの苗，矢印は植えたカラタチの位置を示す。



**図 1-4** NIMV strain, または CiMV sub-strain と NIMV strain に重複感染した極早生ウンシュウの症状

a, NIMV strain に感染した樹 (カンキツ樹番号 KN19-1) の春芽の舟形葉,  
b, CiMV sub-strain と NIMV strain (A-4) に重複感染した樹の春芽の舟形葉,  
c, CiMV sub-strain と NIMV strain (A-4) に重複感染した樹の成葉に壊疽病斑や果実の斑点症状なし.

## 第2章 ウンシュウミカンにおける茎頂接ぎ木による3種ウイロイドの効率的無毒化法

カンキツには世界中で多くのウイロイドが報告されている (Ito and Ohta, 2010). 日本で栽培されるカンキツでは, これまでにカンキツエクソコーテイスウイロイド (Citrus exocortis viroid, CEVd), カンキツベントリーフウイロイド (Citrus bent leaf viroid, CBLVd), ホップ矮化ウイロイド (Hop stunt viroid, HSVd), カンキツ矮化ウイロイド (Citrus dwarfing viroid, CDVd, 旧 CVd-III), カンキツバーククラッキングウイロイド (Citrus bark cracking viroid, CBCVd, 旧 CVd-IV), カンキツウイロイド V (Citrus viroid V, CVd-V), カンキツウイロイド VI (Citrus viroid VI, CVd-VI, 旧 CVd-OS) の7種類のウイロイドと CBLVd の変異株であるカンキツウイロイド-I-LSS (Citrus viroid I-low sequence similarity, CVd-I-LSS) が検出されている (Ito et al., 2003; Ito and Ohta, 2010). これらのウイロイドの中でも, HSVd と CDVd は比較的検出頻度が高く, CVd-I-LSS と CVd-

VI はウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marc.) や‘不知火’ (*C. reticulata* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*) など特定の品種，系統での検出頻度が高い。一方，CEVd, CBLVd, CBCVd が検出されることはあまり多くない。ウイロイドのカンキツへの影響は，台木や品種によって異なり，例えばカラタチ台木のカンキツに CEVd が感染するとカラタチ台木部に剥皮症状が起こり，樹勢が著しく低下する。その他のカンキツウイロイドが複合感染すると，CEVd が引き起こす症状と類似の症状が生じることがある (Ito et al., 2002b)。海外でも，クレメンタイン (*C. clementina* Hort.) では CEVd はしばしばカラタチ台木部に剥皮症状を引き起こすが，HSVd あるいは CVd-IV を含む重複感染でカラタチ台木部に亀裂を生じる例が報告されている (Vernière et al., 2004, 2006)。このため，少なくともカンキツの母樹や原母樹はこれらのウイロイドを無毒化しておくことが望ましい。

茎頂接ぎ木によるカンキツの無毒化技術は，1970 年代に Navarro et al. (1975) によって確立された。本法は，長さ 0.2 mm 以下の茎頂部を切

り出し、実生苗に茎頂接ぎ木する方法で、その後多くの国で標準的な手法として用いられ、CEVd, CBLVd, HSVd, CDVd などに感染していたカンキツが無毒化されている (Kapari-Isaia et al., 2009). しかしながら、日本で独自に発見された CVd-VI (Ito et al., 2001) の無毒化についての報告はなく、また CDVd, CVd-VI が感染したウンシュウミカンからの除去例は報告がない。さらに、HSVd, CDVd, CVd-VI の 3 種が混合感染した状態のウンシュウミカンからの除去例もない。

ウイルスやウイロイドの除去には新梢の熱処理と茎頂接ぎ木を併用した方法で除去率が高いとされている (Koizumi, 1984). ウイロイドは 30℃付近でよく増殖するため (Morris and Smith, 1977), 熱処理はそれより高い温度が必要となる。しかし、ウンシュウミカンなど熱耐性が弱いカンキツでは熱処理により樹体が衰弱して、茎頂を得るのが困難であった (家城・山田, 1984). 高温障害を減らすために、40℃と 25℃を 4 時間ごとに繰り返し処理し (断続熱処理), 樹勢を維持しながら組織中のウイルス濃度を低下さ

せる方法が、タバコモザイクウイルス (Tobacco mosaic virus, TMV) に感染させたタバコ (*Nicotiana tabacum* L. 'Xanthi') およびササゲクロロティックモットルウイルス (Cowpea chlorotic mottle virus, CCMV) に感染させたササゲ (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. 'California Blackeye') において報告されている (Lozoya-Saldana and Dawson, 1982).

三重県では産地の活性化と農業者の経営安定化のために優秀な県オリジナル品種の育成を行っている。三重県が育成したウンシュウミカン 'みえ紀南 3 号' ('上野早生' の珠心胚実生から育成) は、収穫期が 9 月下旬から 10 月中旬であり、三重県育成極早生ウンシュウ 'みえ紀南 1 号' に続いて収穫できる極早生ウンシュウである。しかし、育成段階で 3 種類のウイルス (HSVd, CDVd, CVd-VI) に感染したため農業者への普及にはウイルスの無毒化が必要となった。そこで、今回断続熱処理を行った 'みえ紀南 3 号' から 0.2 mm 程度の茎頂を切り出して茎頂接ぎ木を行い、ウイルス除去が可能か検討を行ったので報告する。

## 材料および方法

### 1. ‘みえ紀南 3 号’原木のウイロイド検定

三重県農業研究所紀南果樹研究室（御浜町）（以下，三重農研紀南果樹）植栽の‘みえ紀南 3 号’の原木から 2010 年 8 月 30 日に樹皮 0.1 g を採取し，ISOGEN（(株)ニッポンジーン，東京）を用いて全 RNA の抽出を行った．RT-PCR は TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0（タカラバイオ(株)，滋賀）を用いて行った．6 種類のカンキツウイロイド（CVEd, CBLVd, HSVd, CDVd, CBCVd, CVd-VI）と CBLVd の変異株（CVd-I-LSS）の検出用プライマーは，Ito et al. (2002a, b) のマルチプレックス RT-PCR 用プライマーおよび単独 RT-PCR 用プライマーを用いて検定を行った．また，CVd-V については，Ito and Ohta (2010) の方法に従い，CVd-V 特異的 RT-PCR 用プライマーを用いて検定を行った．

サーマルサイクラーの温度・時間条件は，7 種類のカンキツウイロイドと CBLVd 変異株を対象に，逆転写反応が cDNA 合成 37 °C，60 分，逆転

写酵素の熱変性を 95 °C で 5 分，冷却を 5 °C で 5 分を行った．PCR 反応は，CVd-V を除く 6 種類のウイロイドと CBLVd 変異株に対しては，熱変性を 94 °C で 30 秒，アニーリングを 57 °C で 10 秒，伸長反応を 72 °C で 10 秒を 35 サイクル行った．CVd-V に対しては，熱変性を 94 °C で 30 秒，アニーリングを 60 °C で 30 秒，伸長反応を 72 °C で 30 秒を 35 サイクル行った．その後 PCR 産物を 2.0%アガロースゲルで電気泳動後，エチジウムブロマイド染色により検出した．

## 2. 断続熱処理と茎頂接ぎ木法

2008 年 3 月 11 日に播種したカラタチ (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) およびシークワシャー (*C. depressa* Hayata) 実生苗 (径 12.0 cm ポリポット) にウンシュウミカン‘みえ紀南 3 号’原木から採取した穂木を 2010 年 2 月 19 日に接ぎ木した (対照区，断続熱処理区ともにカラタチ台およびシークワシャー台を 2 : 8 の割合で供試)．接ぎ木後，2010 年 8 月まで三重農研紀南果樹のガラス温室で管理した．2010 年 8 月 30 日より断続熱処



理を開始し、2010年10月15日から2011年7月11日の期間に長さが約2~5 cmに達した伸長中の新梢を用いて茎頂接ぎ木を行った。断続熱処理はグローブチャンバ（MLR-351, 三洋電気（株）, 大阪）を用い、40 °Cと25 °Cを4時間ごとに繰り返す温度設定とした。照明は蛍光灯を用いて日長16時間、20,000 lux（光合成有効光量子束密度150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ）とした。慣行の定温区は人工気象器（LPH-220-RDCT, (株)日本医化器機製作所, 大阪）を用い、温度設定は28 °C、照明は自然光のみとした。断続熱処理により樹勢が弱った個体については、随時新しい個体と交換した。断続熱処理および慣行の熱処理樹の新梢伸長に合わせてカラタチの種子を滅菌処理した用土（鹿沼土：バーミキュライト = 1：1）を入れた径7.5 cmポリポットに播種し、約1週間28 °Cの人工気象器内で光が当たらないように生育させた。断続熱処理を行った‘みえ紀南3号’の新梢は実体顕微鏡（20~60倍）下でカミソリ（フェザーハイ・ステンレス両刃, フェザー安全剃刀(株), 大阪）の刃を用いて0.2 mm

をガラススケール上で切り取り、カラタチ実生苗の先端を階段状に切り取った位置に置床した（図 2-1）。置床後、接木テープ（メデール、(株)アグリス、福岡）で保湿し、28 °Cの人工気象器に入れて生育させた。茎頂接ぎ木の活着の有無を40～60日後にルーペを使って目視により調査した。活着した個体については、2010年6月に播種したシークワシャーのポリポット（径12.0 cm）に移植して寄せ接ぎを行った（図 2-1）。その後2011年9月8日にシークワシャーを樹高の約2分の1の位置で除去した。

### 3. 茎頂接ぎ木樹のカンキツウイロイド検定

茎頂接ぎ木後の活着を確認した個体の中で、ウイロイド検定用の葉柄が採取可能な展開葉3枚以上の個体について葉柄0.1 gが定量できるまで下位葉から順に1～2回採取し、使用するまで-60 °Cで冷凍保存した。採取した葉柄0.1 gは上記1の方法と同様にRNA抽出し、原木に感染が認められた3種類のウイロイド（HSVd, CDVd, CVd-VI）についてRT-PCR法で検定を行った。

## 結果

### 1. ‘みえ紀南 3 号’原木のウイロイド検定

7 種類のカンキツウイロイドと CBLVd 変異株について RT-PCR 法を用いて検定した結果, HSVd, CDVd, CVd-VI の 3 種類のウイロイドの感染が確認された (図 2-2). これらのウイロイドは単独感染では生育への影響は少ないといわれているが, 複合感染による樹勢低下などを引き起こす可能性が示唆されている (草野ら, 2005). 草野ら (2005) の報告によるとウンシュウミカン‘原口早生’では HSVd と CDVd がカラタチ台木部における病徴発現への関与率が高いとしており, さらに CVd-VI, CVd-I-LSS が単独もしくは複合感染することにより病徴がさらに激しくなると推察している. 現在のところ, 樹皮に亀裂が入りエクソコーティス病のように鱗片状に剥がれる激しい症状は‘みえ紀南 3 号’の原木には現れていない (図 2-3).

### 2. 断続熱処理と茎頂接ぎ木法

茎頂接ぎ木処理時と同様に摘出した 20 個体の茎頂の長さを別途測定したところ、28 °C で一定の 0.2 mm 茎頂接ぎ木処理（以下定温区）が  $0.20 \pm 0.01$  mm、断続熱処理の 0.2 mm 茎頂接ぎ木処理（以下断続熱処理区）が  $0.19 \pm 0.02$  mm であり、実際に茎頂接ぎ木に用いた茎頂もほぼ同様の大きさであったと考えられる。

2011 年 8 月 19 日に茎頂接ぎ木の活着率を調査したところ、定温区では 22.1 %、断続熱処理区では 34.4%であった（表 2-1）。

茎頂接ぎ木に利用する新梢が 1 cm に達してから茎頂を切り出した日までの日数は、定温区では 4～5 日程度であったが、断続熱処理区では断続熱処理による生育抑制が見られ、12～14 日程度と長くなる傾向が認められた（表 2-2）。しかし、茎頂接ぎ木に利用する新梢が 1 cm に達してから茎頂を切り出した日までの日数に関してウイロイド除去の有無による有意な差は見られなかった。

茎頂の切り出しに用いた新梢は、定温区では 5～6 cm の新梢が多く、断続熱処理区では 2～3 cm 程度で新梢の成長が止まったため、短めの新梢が多くなった（表 2-3）。茎頂の切り出しに用いた新梢の長さに関してウイロイド除去の有無による有意な差は見られなかった。

### 3. 茎頂接ぎ木樹のカンキツウイロイド検定

茎頂接ぎ木後に活着した個体について RT-PCR 法を用いてウイロイド検定した結果、ウイロイド除去個体割合はどの処理区においても CDVd, CVd-VI, HSVd の順に高かった（表 2-4）。また、RT-PCR 法を用いてウイロイド検定した個体におけるウイロイド除去個体割合はどのウイロイドにおいても断続熱処理区で高くなった（表 2-4）。さらに、2 種類のウイロイドのみが除去できた個体割合でも同様の結果となった。3 種類全部のウイロイドが除去できた個体割合は定温区で 38.9 %，断続熱処理区で 48.0 %であった（表 2-4）。全供試個体数(茎頂接ぎ木実施個体数)に対する 3 種類全

部のウイルスが除去できた個体割合は定温区で 8.1 %，断続熱処理区で 12.5 %であった（表 2-4）。

## 考察

茎頂接ぎ木後に活着した個体について RT-PCR 法を用いてウイルス検定した結果，断続熱処理による無毒化の効果が最も強く表れたウイルスは HSVd であり，活着後の無毒化率で比較すると，定温区に対して断続熱処理区の無毒化率は約 1.4 倍となった。どの処理区においても比較的無毒化されやすかったウイルスは CDVd であった。

HSVd, CDVd, CVd-VI が単独あるいは複合感染している場合，茎頂を 0.2 mm と小さく摘出することはウイルス無毒化に有効な方法であることがわかった。しかし，0.2 mm 茎頂接ぎ木は茎頂が小さいため，作業にかなりの熟練を要する。無毒化率を向上させるため，新梢伸長中に断続熱処理を併用した。活着した個体中の無毒化率は，断続熱処理区が定温区より

高いが、各処理区間においてカイ 2 乗独立性検定で有意な差は認められなかった。さらに、活着後の生育も両区に差は見られなかった。

そのため、茎頂を 0.2 mm で切り出すことができれば、断続熱処理は行う必要がないといえる。

本研究においては、3 種類のウイロイド (HSV, CDVd, CVd-VI) が複合感染したウンシュウミカンでは、断続熱処理を行わずに 0.2 mm 茎頂を利用した茎頂接ぎ木により、効率よく無毒化できることを明らかにした。より熱耐性の強いオレンジなどの中晩柑類でも同様の手法で無毒化が可能と推察される。また、発生の知られている 7 種類のウイロイドと 1 種類の変異株の中で、CEVd, CBLVd, CVd-I- LSS, CBCVd, CVd-V は本研究で無毒化できるかどうかは検討できなかった。しかしながら、標準的な茎頂接ぎ木で、CEVd, CBLVd, CBCVd は HSVd や CDVd と同様にベルガモット (*C. bergamia* (Risso) Wright and Arn.) などから除去できるので (Kapari-Isaia et al., 2009), 本研究で示した 0.2 mm 茎頂を利用した茎

頂接ぎ木で、比較的容易に除去できると推察される。一方、CVd-I-LSSとCVd-Vに関しては、無毒化に関する先行研究例が皆無であるので、今後十分な検討が必要である。



**表 2-1** 新梢伸長中の設定温度の違いが茎頂接ぎ木活着率に及ぼす影響

処理区	設定温度(°C)	茎頂接ぎ木活着個体数／全供試個体数(活着率(%))
定温区	28	19/86(22.1)
断続熱処理区	40/25	33/96(34.4)

表2-2 茎頂接ぎ木利用新梢が1 cmに達した日から茎頂接ぎ木実施までの日数

処理区	設定温度 (°C)	ウイロイド除去の成否	HSVd		CDVd		CVd-VI	
			調査個体数 <sup>z</sup>	茎頂接ぎ木利用新梢が1 cmに達した日から茎頂接ぎ木までの日数(日) <sup>y</sup>	調査個体数	茎頂接ぎ木利用新梢が1 cmに達した日から茎頂接ぎ木までの日数(日)	調査個体数	茎頂接ぎ木利用新梢が1 cmに達した日から茎頂接ぎ木までの日数(日)
定温区	28	成功	8	5.8 ± 0.6	15	4.7 ± 0.5	14	5.0 ± 0.5
		失敗	10	4.0 ± 0.6	3	5.0 ± 1.0	4	4.0 ± 0.8
断続熱処理区	40/25	成功	13	10.5 ± 1.4	20	12.1 ± 1.6	18	12.3 ± 1.8
		失敗	9	14.4 ± 3.0	2	12.0 ± 2.2	4	11.3 ± 2.2

<sup>z</sup> 断続熱処理区は、茎頂接ぎ木利用新梢が1 cmに達した日が不明の個体があり、第3および第4表中の調査個体数より少ない

<sup>y</sup> 平均 ± 標準誤差

表2-3 茎頂接ぎ木実施時の新梢長

処理区	設定温度 (°C)	ワイロイド 除去の成否	HSVd		CDVd		CVd-VI	
			調査 個体数	茎頂接ぎ木実施時の 新梢長(cm) <sup>z</sup>	調査 個体数	茎頂接ぎ木実施時 の新梢長(cm)	調査 個体数	茎頂接ぎ木実施時 の新梢長(cm)
定温区	28	成功	8	6.1 ± 1.0	15	5.9 ± 1.0	14	5.9 ± 1.0
		失敗	10	5.6 ± 1.3	3	5.4 ± 1.1	4	5.4 ± 1.3
断続熱処理区	40/25	成功	15	2.8 ± 0.4	23	2.8 ± 0.3	20	2.7 ± 0.3
		失敗	10	2.8 ± 0.4	2	2.6	5	3.3 ± 0.5

<sup>z</sup> 平均±標準誤差

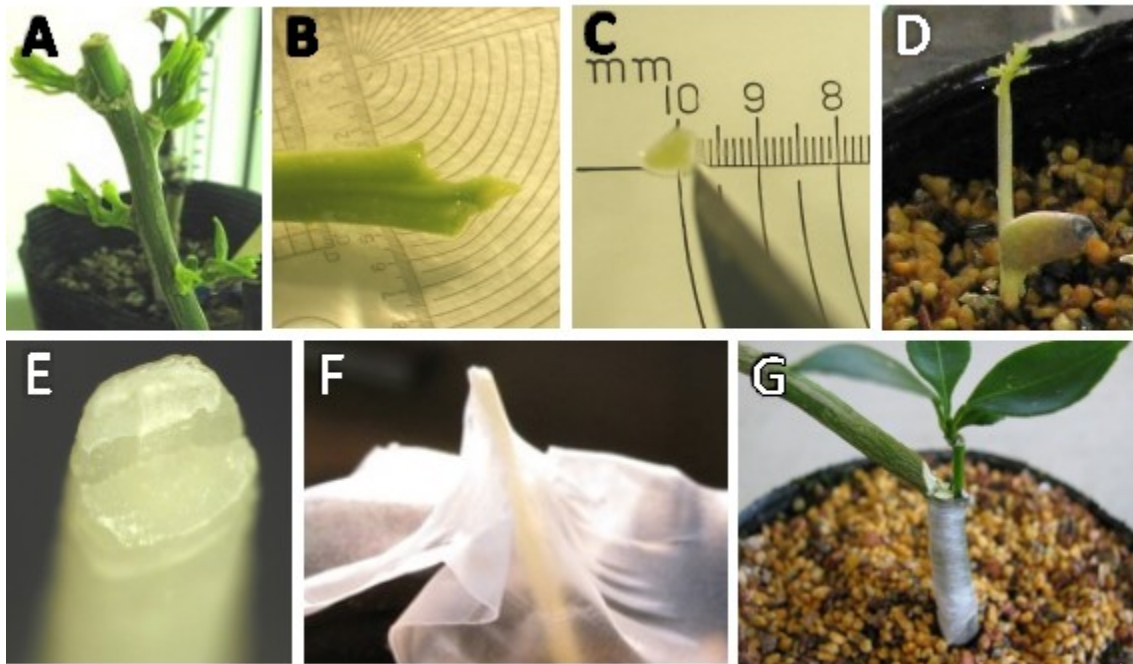
表2-4 新梢伸長中の設定温度の違いが3種類のウイロイド無毒化に及ぼす影響

処理区	設定温度 (°C)	茎頂 接ぎ木 活着率 (%)	ウイロイド除去個体数/ウイロイド検定可能個体数 <sup>z</sup>						3種類ウイロイド除去個体数 /全供試個体数 <sup>y</sup> (除去率(%))	
			HSVd	CDVd	CVd-VI	HSVd CDVd	CDVd CVd-VI	HSVd CDVd CVd-VI	HSVd CDVd CVd-VI	HSVd CDVd CVd-VI
定温区	28	22.1	8/18ns <sup>x</sup>	15/18ns	14/18ns	7/18ns	13/18ns	8/18ns	7/18ns	7/86(8.1)
断続熱処理区	40/25	34.4	15/25ns	23/25ns	20/25ns	13/25ns	19/25ns	13/25ns	12/25ns(48.0)	12/96(12.5)

<sup>z</sup> ウイロイド検定可能個体数は、茎頂接ぎ木後に活着が認められた個体のうち、枯死や生育不良により葉柄が採取できなかった個体を除く

<sup>y</sup> 全供試個体数は、茎頂接ぎ木実施個体数

<sup>x</sup> ns: 各処理区間にカイ2乗独立性検定による有意差なし(5%)



**図 2-1** 茎頂接ぎ木の手順

A: 断続熱処理後の芽, B: スケール上での茎頂切り取り, C: 0.5 mm の茎頂, D: カラタチ実生苗の発芽した状態. E: カラタチ実生苗の階段状に切り取った先端, F: 茎頂接ぎ木後のパラフィン被覆, G: シークワシャーへの寄せ接ぎ

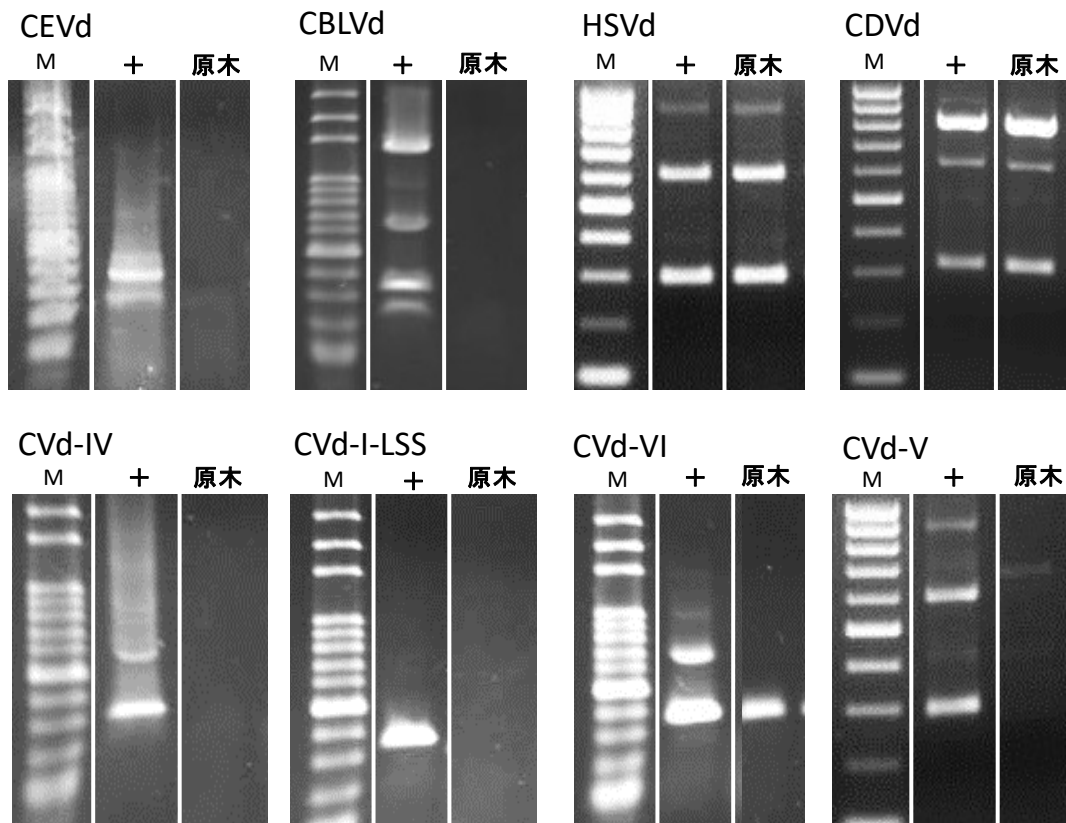


図 2-2 RT-PCR 法を用いたウンシュウミカン‘みえ紀南 3 号’原木のウイロイド保毒状況

M:DNA ラダーマーカー, +:ポジティブコントロール



**図 2-3** ウンシュウミカン‘みえ紀南 3 号’原木のカラタチ台木部の様子  
2014 年 2 月 11 日撮影，高接ぎ樹 14 年生‘みえ紀南 3 号’（中間台木：29 年生，‘清見’）

### 第3章 三重県におけるトマト葉かび病菌のSDHI剤に対する感受性

トマト葉かび病 (*Fulvia fulva*) は、トマトの重要病害の一つである。三重県の主要トマト産地では、トマト葉かび病抵抗性遺伝子 *cf-9* を有する品種が栽培されており、葉かび病の発生が問題となっていなかったが、近年葉かび病の発生が見られる圃場が散見されるようになってきた。抵抗性を打破する葉かび病菌レースの発生を遅延させるには、化学合成殺菌剤との併用で、葉かび病の発生を抑える必要がある (Enya et al., 2009)。

一方、近年各農薬メーカーで研究開発が集中しているミトコンドリア電子伝達系複合体 II のコハク酸脱水素酵素を阻害する succinate dehydrogenase inhibitors (以下、SDHI) 剤は、幅広いスペクトラムと優れた殺菌効果を有する殺菌剤で、トマト葉かび病に対しても高い防除効果を示す。しかし、耐性菌リスクが中程度から高に分類され、耐性菌管理が必要とされており (FRAC, 2020)、国内ではキュウリ褐斑病菌、キュウリうどん



んこ病菌，イチゴ灰色かび病菌，ナスすすかび病菌などで耐性菌の発生が確認されている（Miyamoto et al., 2009; Miyamoto et al., 2010; 鈴木ら, 2012; 岡田・下元, 2016). トマト葉かび病菌についても SDHI 剤のうちボスカリドおよびペンチオピラドに対する耐性菌が確認されており（渡辺ら, 2013), 耐性菌管理を行いながら効果を持続させる必要がある.

三重県内のトマト産地では，トマト葉かび病抵抗性品種が栽培されていても本病の発生が確認されていることから，本病に対する防除対策の見直しが必要となっている．しかし，抵抗性品種の導入以来，本病の発生や防除の実態について十分に把握してこなかった．産地の実態に合わせた有効な防除対策を検討するために，本研究ではトマト葉かび病抵抗性品種を導入しているトマト産地において本病の発生状況および防除状況を調査した．そして現地ほ場から採取した葉かび病菌株を用いて SDHI 剤を対象に薬剤感受性検定を行い，トマト葉かび病の SDHI 剤に対する薬剤感受性の実態を明らかにした．

## 材料および方法

### 1. トマト葉かび病の発生状況

三重県桑名市の主に促成栽培・長期抑制栽培のトマト 15 圃場（施設）を対象に、2016 年 10 月から 2019 年 3 月にかけて継時的にトマト葉かび病の発病調査を行った。発病調査は病虫害発生予察事業のトマト葉かび病の調査実施基準（農林水産省，2016）に準じて行った。なお，評価するうえで，発病が認められるものの圃場全体で数株程度の発病株が確認された圃場を「微」とし，葉かび病の発病程度を，0（無），1（微），2（少），3（中），4（多），5（甚）の 6 段階で評価した。

調査圃場で栽培されていたトマト品種は，‘桃太郎プレミアム’，‘桃太郎ネクスト’，‘りんか 409’，‘感激 73’であり，すべてトマト葉かび病抵抗性遺伝子 *cf-9* を有する品種であった。

### 2. SDHI 剤に対するトマト葉かび病菌の薬剤感受性検定

発生状況調査時に発病が確認された 7 圃場から、葉かび病罹病葉を採集した。罹病葉の菌叢から、常法により単孢子分離を行い、1 調査時・1 圃場当たり最大 6 菌株、計 83 菌株を供試した。供試菌株は検定の 2 週間以上前に Potato Dextrose Agar (以下 PDA, 日水製薬(株), 東京) 平板に移植し、25 °C, 暗黒下で前培養を行った。

供試薬剤には既存の SDHI 剤のボスカリド水和剤 (2005 年上市, 商品名:カンタスドライフロアブル, 以下, ボスカリド), ペンチオピラド水和剤 (2010 年上市, 商品名:アフエットフロアブル, 以下, ペンチオピラド) に加え, 新規 SDHI 剤のイソピラザム水和剤 (2017 年上市, 商品名:ネクスターフロアブル, 以下, イソピラザム), ピラジフルミド水和剤(2018 年上市, 商品名:パレード 20 フロアブル, 以下, ピラジフルミド), トマト葉かび病に登録がない (2020 年 12 月時点) がユニークな活性を示すフルオピラム水和剤 (2013 年上市, 商品名:オルフィンフロアブル, 以下, フルオピラム) を用いた。培地上での薬剤感受性の評価は, 菌糸摩砕液を用いた。YB 培地法

(櫻井ら, 2011; 渡辺ら, 2013) により実施した. 検定培地中の各薬剤の有効成分濃度が 0.5, 1, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  となるように滅菌水で希釈した薬液をオートクレーブ後の YB 培地 (Yeast extract 10 g, Bacto peptone 10 g, Agar 15 g/l) に添加した. 前培養した供試菌株の菌叢摩砕液 10  $\mu\text{l}$  を検定培地に滴下し, 25 $^{\circ}\text{C}$ , 暗黒下で 10 日間培養後, 菌叢生育の有無により MIC (最小生育阻止濃度) 値を求めた. 渡辺ら(2013)の報告を基に, ボスカリドは 1  $\mu\text{g/ml}$ , ペンチオピラドは 0.5  $\mu\text{g/ml}$  で生育する菌株を耐性菌と判定した. イソピラザム, ピラジフルミド, フルオピラムについては薬剤感受性のベースラインが定められていないため, MIC 値で感受性の評価を行った.

### 3. トマト苗を用いた生物検定による薬剤感受性評価

各 SDHI 剤のトマト葉かび病の農薬登録濃度での防除効果を, トマト苗を用いた生物検定により検討した. なお, フルオピラムは, トマトに登録がな

いためイチゴ灰色かび病での農薬登録濃度に準じて 2,000 倍希釈相当の 208.5 µg/ml とした。

供試菌株は、培地検定においてボスカリドおよびペンチオピラドの両剤に耐性を示した 1 菌株（以下、No. 51 菌株）と両剤に感受性を示した 1 菌株（以下、No. 33 菌株）を用いた（表 3-1）。他の SDHI 剤に対する No. 51 菌株の MIC 値は、イソピラザム >100 µg/ml, ピラジフルミド 100 µg/ml, フルオピラム 10 µg/ml を示し、No. 33 菌株の MIC 値はイソピラザム, ピラジフルミドおよびフルオピラムに対して 0.5 µg/ml を示した。供試菌株は PDA 平板培地で前培養した菌叢に BLB ランプを 10 日間照射し、胞子を人工的に形成させた。この培地表面に 0.01 % Tween 20 を含む滅菌水を滴下し、2 重ガーゼで濾過し、胞子懸濁液を作製した。生物検定には、葉かび病感受性品種‘ハウス桃太郎’を用いた。ポット育苗を行い、本葉 7 葉展開時に供試薬剤をそれぞれの登録濃度で散布処理した。薬液を風乾後、供試菌株の分生子懸濁液（ $1.0 \times 10^4$  個/ml）を葉裏に向けて 1

株当たり 25 ml 噴霧接種した。感染を助長するために接種苗をビニール袋で覆い, 20 °C, 12 時間日長の人工気象器 (LPH-411SP, (株)日本医  
器械製作所, 大阪)で 2 日間保持した。供試菌株と供試薬剤の組み  
合わせごとに接種苗 3 株をプランター (640×200×H170 mm) に定植して  
1 試験区とし, 反復は設けなかった。ガラス温室内 (平均気温 19.7 °C,  
平均湿度 71.9 %) で, プランター全体をビニール被覆し, 内部を加湿条件  
にして発病を促した。発病調査は接種 36 日後に行い, 各株の本葉第 1  
~7 葉について, 下記の発病指数別に葉数を調査し, 発病葉率, 発病度  
を求めた。防除価は発病度から算出した。

発病程度指数 0: 複葉中のいずれの小葉にも病斑を認めない; 1: 複  
葉中の 1/3 未満の小葉に病斑が認められる; 2: 複葉中の 1/3~2/3 未  
満の小葉に病斑が認められる; 3: 複葉中の 2/3 以上の小葉に病斑が認  
められる; 4: 複葉中の全小葉に病斑が認められる; 発病度 =  $\Sigma$ (発病程度  
別指数 × 複葉数) / (4 × 調査複葉数) × 100.

#### 4. SDHI 剤の使用履歴と耐性菌発生との関係

トマト葉かび病の発病を確認した 7 圃場における 2016～2018 年作で使用した殺菌剤の使用履歴を収集し、使用回数が耐性菌の発生に及ぼす影響を検討した。7 圃場におけるトマト葉かび病菌採取時までには当年の栽培期間中に使用された SDHI 剤の総使用回数（以下、SDHI 剤の総使用回数）と使用されていた殺菌剤の種類（2 つの説明変数）を用い、耐性菌の割合を目的変数として、一般化線形モデルにより解析した。モデルには交互作用を含めた。目的変数が従う誤差構造には二項分布、リンク関数にはロジットを設定した。その後、モデルに関して逸脱度分析を行い説明変数として用いた各要因内の有意性を検定した。統計解析には、R version 3.6.3 (R Core Team, 2020) を用いた。

### 結果

#### 1. トマト葉かび病の発生状況

2016年10月～2019年3月にトマト葉かび病の発生状況を調査した結果、15圃場のうち7圃場で発病が確認された（表3-2）。2017年および2018年は3月から、2019年は12月から発生が確認された（表3-2）。発病程度は見取り調査により散見される程度（微～少発生）の圃場が多かったが、5月以降に多発生となった圃場も確認された（表3-2）。

## 2. 各圃場におけるトマト葉かび病菌のSDHI剤耐性菌の発生動向

ボスカリド耐性菌は5圃場から採取した31菌株、ペンチオピラド耐性菌は3圃場から採取した21菌株が確認され（表3-3、表3-4）、ペンチオピラド耐性菌はすべてボスカリドに交差耐性を示した（表3-4）。イソピラザムのMIC値は、0.5 µg/ml, 5～50 µg/ml, >100 µg/mlの3つに分かれた（表3-3）。ピラジフルミドのMIC値は、0.5～5 µg/ml, 100～>100 µg/mlの2つに分かれた（表3-3）。フルオピラムのMIC値は、0.5～10 µg/ml, >100 µg/mlの2つに分かれた（表3-3）。



ボスカリド、ペンチオピラドに対して MIC 値 $>100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  を示した 12 菌株は、イソピラザムに対してすべて MIC 値 $>100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  を示した (表 3-4).

ピラジフルミドに対しては、MIC 値  $100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  が 10 菌株、 $>100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  が 2 菌株と上記の 3 剤と同様の傾向を示した (表 3-4). フルオピラムに対しては、MIC 値  $10$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  が 9 菌株と $>100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  が 3 菌株の二峰性を示した (表 3-4). フルオピラムに対して MIC 値 $>100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  を示した 3 菌株は、イソピラザムに対して MIC 値 $>100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ピラジフルミドに対して MIC 値 $>100$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  を示した (表 3-4).

### 3. トマト苗を用いた生物検定による薬剤感受性評価

生物検定で用いた No.33 菌株は、無処理の発病葉率 95.0 %, 発病度 90.0 の多発生条件で、いずれの薬剤を処理した場合でも発病葉率は 0.0 ~15.0 %であり高い防除効果が認められた (表 3-5). 一方、No.51 菌株は、無処理の発病葉率 100 %, 発病度 90.0 の多発生条件で、供試薬剤に対する発病葉率が、ボスカリド  $500$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  およびペンチオピラド  $100$

μg/ml で 94.7 %, イソピラザム 187 μg/ml で 95.0 %, ピラジフルミド 100

μg/ml で 85.0 %と高かった (表 3-5). フルオピラム 208.5 μg/ml の発病葉

率は 65.0 %と他の SDHI 剤に比べてやや抑えられた (表 3-5).

#### 4. SDHI 剤の使用履歴と耐性菌発生との関係

トマト葉かび病菌を分離した 7 圃場において使用されていた SDHI 剤は、ボスカリドとペンチオピラドであった。ペンチオピラドを 2 回以上散布した圃場は、ボスカリドおよびペンチオピラドの耐性菌が確認され、イソピラザム、ピラジフルミドおよびフルオピラムに対して耐性を示す MIC 値 >100 μg/m の菌株が検出された (表 3-6)。ボスカリドおよびペンチオピラドについては、SDHI 剤の総使用回数が増加するほど、耐性菌率が増加する傾向にあった ( $p < 0.001$ ) (図 3-1)。また、ボスカリドとペンチオピラド間で有意な差が認められた ( $p < 0.001$ )。SDHI 剤の総使用回数と殺菌剤の種類の変異作用も認められた ( $p = 0.007$ )。

## 考察

三重県の主要トマト産地では、トマト葉かび病抵抗性遺伝子 *cf-9* を有する品種を栽培しているため、トマト葉かび病は大きな問題とはなっていない。しかし、今回の調査において、調査圃場 15 圃場のうち 7 圃場でトマト葉かび病の発生が確認され、そのうち 1 圃場では 2018 年度の栽培終了前に多発生となっていた（表 3-2）。このことから、抵抗性品種を栽培している圃場であっても本病の防除が必要になりつつあると考えられた。

培地検定の結果から、ボスカリド、ペンチオピラドに対する耐性菌が確認され、ペンチオピラド耐性菌 21 菌株はすべてボスカリドに交差耐性を示した（表 3-4）。両剤に対して耐性を示す 21 菌株のうち、12 菌株は MIC 値  $>100 \mu\text{g/ml}$  を示し、佐竹ら（2019）による *SdhC* の N85K 変異を持つボスカリドに高度耐性を示す菌株の感受性程度と同様の傾向を示したため、高度耐性菌である可能性が示唆された（表 3-4）。

イソピラザム、ピラジフルミドおよびフルオピラムの薬剤感受性のベースラインは、生物検定によって感受性が確認された 0.5 µg/ml あたりと推定された (表 3-3).

ボスカリドとペンチオピラドに対して耐性の No.51 菌株は、イソピラザムでも同様に発病したため、イソピラザムに対しても耐性菌であると考えられた (表 3-5). No.51 菌株のピラジフルミドの MIC 値は 100 µg/ml であったため、発病葉率 85.0 %とやや抑制されたが、防除効果としては低くピラジフルミドに対しても耐性菌であると考えられた (表 3-5). No.51 菌株のフルオピラムの MIC 値は 10 µg/ml であり、発病葉率 65.0 %と発病は抑制されていたが、感受性である No.33 菌株の結果と比較すると発病しており、フルオピラムに対しては感受性低下菌であると考えられた (表 3-5).

生物検定の結果も併せて考えると、ボスカリド、ペンチオピラドに加え、イソピラザム、ピラジフルミドに対する耐性菌も発生していることが確認された (表 3-4, 表 3-5). イソピラザム、ピラジフルミドに対する耐性菌が発生した

圃場 No. 8, 10, 13 は、ボスカリド、ペンチオピラドの使用履歴はあったが、  
イソピラザムおよびピラジフルミドの使用履歴はなく、ボスカリド、ペンチオピラ  
ドの散布による交差耐性が生じている可能性が示唆された。

「野菜・果樹・茶におけるストロビルリン系薬剤 (quinone outside  
inhibitors 剤, QoI 剤) 及び SDHI 剤使用ガイドライン」(日本植物病理学  
会殺菌剤耐性菌研究会, 2012) では, SDHI 剤の使用は 1 作 1 回までと  
推奨されている。ボスカリド, ペンチオピラド, イソピラザムおよびピラジフルミ  
ドの 4 剤すべてに耐性菌が発生した圃場 No. 8, 10, 13 はペンチオピラド  
を 1 作 2 回以上散布しており, SDHI 剤の散布によって耐性菌の出現頻  
度が増加することが示された (表 3-6)。圃場 No.3, 6, 7, 9 は SDHI 剤を  
未使用もしくは 1 作 1 回までの使用であり, ボスカリドの耐性菌は発生して  
いたが, ペンチオピラドの耐性菌は未発生であった。上記圃場以外も, ボス  
カリドやペンチオピラドをガイドラインよりも多い 1 作 2 回以上散布していた  
圃場が見受けられたが, トマト葉かび病の発生が認められなかったため, 問

題となつてはいなかった（データ略）。本産地では、品種によるトマト葉かび病抵抗性が無力化されつつあり、トマト葉かび病菌が空気伝染性であることも踏まえると、現在トマト葉かび病が未発生の圃場でも SDHI 剤の使用回数制限が重要と考えられた。

渡辺（2017）は、他の病害防除の傍らで目的外の病害の耐性菌を出現させる可能性について指摘している。本調査の供試薬剤のボスカリドやペンチオピラドは、トマト灰色かび病防除のために使用されることが多いことから、必ずしもトマト葉かび病防除で使用したことで耐性が顕在化したのではなく、灰色かび病等の防除により結果として耐性菌が発生している可能性がある。圃場 No.10, 13 で採取した灰色かび病菌からは、ボスカリドおよびペンチオピラドに対する耐性菌が確認されており（川上ら, 2019）、SDHI 剤の耐性リスクが高いことが示されている。

ペンチオピラドは、キュウリ褐斑病菌やうどんこ病菌に対する基礎活性がボスカリドより高いため、より低濃度で感受性菌の生育や発病を抑制するこ

とが報告されている（石井，2012）．現地では，ボスカリドよりペンチオピラドの使用率が高かったが，トマト葉かび病菌に対してボスカリドの耐性菌率の方がペンチオピラドの耐性菌率より高くなった（表 3-6）．逸脱度分析の結果からも，耐性を示す薬剤の種類（ボスカリド，ペンチオピラド）に差があることが明らかとなった（図 3-1）．ペンチオピラドの散布により，基礎活性が低いボスカリドの方が先に耐性菌が顕在化したと考えられた．この結果は，トマト灰色かび病菌での報告と一致した（川上ら，2019）．

以上のことから，トマト葉かび病の SDHI 剤に対する耐性菌管理には FRAC コードに基づく殺菌剤系統を考慮した防除計画の必要性が示された．また，灰色かび病菌を対象に散布した殺菌剤に対してトマト葉かび病菌の耐性菌が確認された可能性が高く，個々の病原菌に対する殺菌剤系統の選択だけでなく，病害防除全体での殺菌剤系統を考慮した防除計画が重要である．

**表 3-1** 生物検定に供試したトマト葉かび病菌の各 SDHI 剤に対する MIC

菌株名	MIC値 ( $\mu$ g/ml)				
	ボスカリド	ペンチオピラド	イソピラザム	ピラジフルミド	フルオピラム
No.51	>100	>100	>100	100	10
No.33	1	0.5	0.5	0.5	0.5

MIC: 最小生育阻止濃度



**表 3-2** 調査圃場におけるトマト葉かび病の発生程度<sup>1)</sup>の推移

調査作期 <sup>2)</sup>	採取年月	圃場No.															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	
2016年作	2016年	10月	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0
		12月	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2017年	1月	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3月	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		4月	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		5月	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0
		7月	-	-	0	0	0	0	0	1	0	1	-	0	-	-	0
2017年作	2017年	10月	-	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		12月	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2018年	1月	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3月	-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4月	-	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
		5月	-	0	0	0	0	1	1	4	1	2	0	0	1	0	0
		7月	-	-	0	0	-	2	2	4	1	1	0	-	-	-	0
2018年作	2018年	10月	-	0	0	-	-	0	0	-	0	-	0	-	0	0	0
		12月	-	0	0	-	0	2	0	-	0	0	-	0	-	0	0
	2019年	2月	-	0	1	-	0	1	1	-	0	0	-	0	-	0	0
		3月	-	0	0	0	0	2	1	-	0	0	-	0	0	0	0

1) 葉かび病の発生程度は、各圃場全体の達観調査により、0(無)、1(微)、2(少)、3(中)、4(多)、5(甚)の6段階で評価した。-: 調査未実施の圃場を示す。

2) 調査産地の主力作型である促成栽培の定植月である9月を起点として、全圃場で栽培が終了する7月までを調査作期とし、調査作期の起点となる年を示した。

**表 3-3** トマト葉かび病菌に対する各 SDHI 剤の MIC 値別菌株数

薬剤名	供試 菌株数	MIC値 (μg/ml) 別菌株数						
		0.5	1	5	10	50	100	>100
ボスカリド	83	3	49	9	10	0	0	12
ペンチオピラド	83	62	0	9	0	0	0	12
イソピラザム	83	61	0	6	2	2	0	12
ピラジフルミド	83	62	5	4	0	0	2	10
フルオピラム	83	54	7	10	9	0	0	3

MIC: 最小生育阻止濃度

表 3-4 トマト葉かび病菌に対する各 SDHI 剤の MIC 値別菌株数と耐性程度

MIC値 (μg/ml)					菌株数
ボスカリド	ペンチオピラド	イソピラザム	ピラジフルミド	フルオピラム	
0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3
1	0.5	0.5	0.5	0.5	46
1	0.5	0.5	0.5	1	3
5	0.5	0.5	0.5	0.5	4
5	0.5	0.5	1	0.5	1
5	0.5	0.5	0.5	1	4
10	0.5	5	0.5	5	1
10	5	5	1	5	4
10	5	5	5	5	1
10	5	10	5	5	2
10	5	50	1	5	1
10	5	50	5	5	1
>100	>100	>100	100	10	2
>100	>100	>100	>100	10	7
>100	>100	>100	>100	>100	3

背景の濃灰色は耐性菌, 灰色は感受性低下菌, 淡灰色は耐性程度未確定の菌, 白色は感受性菌を示す。

MIC: 最小生育阻止濃度

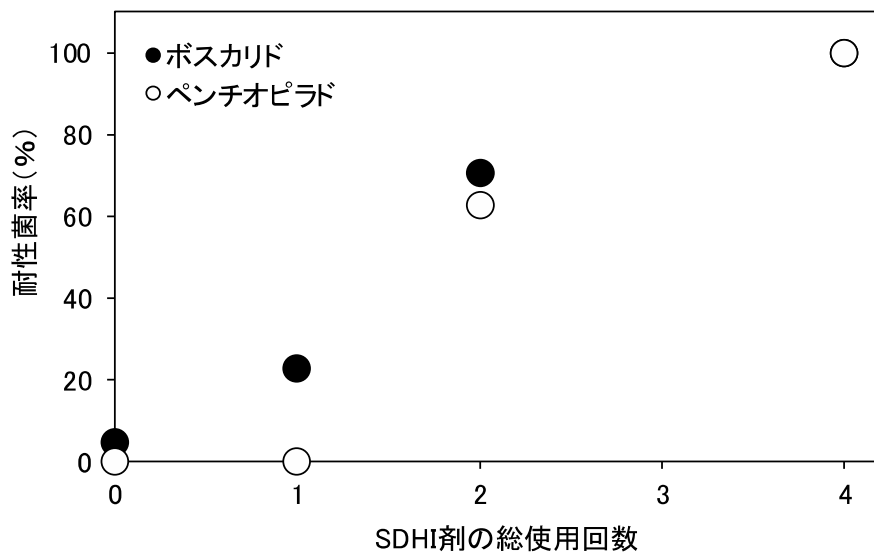
**表 3-5** トマト苗を用いた生物検定によるトマト葉かび病菌に対する各 SDHI 剤の防除効果

薬剤名	散布濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	菌株名	調査 葉数	発病葉率 (%)	発病度	防除価
ボスカリド	500	No.51	19	94.7	72.4	19.6
		No.33	20	15.0	5.0	94.4
ペンチオピラド	100	No.51	19	94.7	72.4	19.6
		No.33	21	0.0	0.0	100
イソピラザム	187	No.51	20	95.0	81.3	9.7
		No.33	21	0.0	0.0	100
ピラジフルミド	100	No.51	20	85.0	51.3	43.1
		No.33	21	0.0	0.0	100
フルオピラム	208.5	No.51	20	65.0	23.8	73.6
		No.33	21	0.0	0.0	100
無処理		No.51	20	100	90.0	-
		No.33	20	95.0	90.0	-

No. 51 菌株: 培地検定でボスカリドおよびペンチオピラドの両剤に耐性を示した菌株

No. 33 菌株: 培地検定でボスカリドおよびペンチオピラドの両剤に感受性を示した菌株





**第 3-1 図** SDHI 剤の使用履歴とボスカリドおよびペンチオピラドに対するト  
マト葉かび病菌の耐性菌率との関係

## 第4章 *Pythium myriotylum* による黒ウコン立枯病(新称)

黒ウコン (*Kaempferia parviflora* Wall.) は、タイ原産のショウガ科バンウコン属の植物で、塊茎を生薬として利用する。黒ウコンは低温に弱い植物であるため、露地での栽培適地が限定されること、土耕栽培では連作障害が生ずることなどから、施設水耕での栽培技術の確立が進められてきた(小林, 2014)。2018年5月、京都府亀岡市において、土耕栽培および水耕栽培の黒ウコンの葉鞘が褐色の水浸状に侵され、その後軟化、倒伏に至る症状が発生し、7月まで継続して確認された(図4-1)。発病株の塊茎も褐色の水浸状に軟化していた。黒ウコンの罹病組織から病原菌の分離を試みるとともに、接種試験等により病原菌の同定を行った。

### 材料および方法

#### 1. 病原菌の分離

2018年7月に京都府亀岡市で発病した塊茎の罹病組織片を70%エタノールおよび次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度1%)で表面殺菌した

後、滅菌水で2回洗浄し、NARM 培地（組成：Corn meal agar 17 g, 寒天 23 g, 水 1,000 ml, ナイスタチン 10 ppm, アンピシリン 250 ppm, リファンピシリン 10 ppm, ミコナゾール 1 ppm, Morita and Tojo, 2007）上に置床し、38℃で培養した。培養1日後に、伸長した菌糸を分離した。

## 2. 分離株の形態観察

分離菌についてトウモロコシ煎汁培地（CMA）と芝草葉培養（Waterhouse, 1967）を用いて形態的特徴を観察した。

生育温度と適温については、前培養した分離菌を直径 5 mm のコルクボーターで打ち抜き、CMA 培地上で 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 および 45 °C の各温度下における 24 時間後の菌糸伸長量を測定した。

## 3. 黒ウコンに対する病原性

供試菌の接種にはベントグラス種子培地（東條ら, 2004）を用いた。ベントグラス種子 2 g と蒸留水 10 ml を 200 ml フラスコに入れ、オートクレーブ滅菌したものに供試菌を接種し、25 °C 暗所培養した。気中菌糸がベント



ガラス全体を覆う程度生育した段階でフラスコを振って混ぜ、これを繰り返しながら 5 日間培養した。滅菌水 100 ml と十分混合し、10 ml を株元に灌注接種した。各菌株にそれぞれ 3 株ずつの 3~4 葉展開期の黒ウコン植物を供試し、接種後は 25 °C・12 時間日長の人工気象器で管理し、2 週間後に発病調査を行った。

#### 4. 分離株の rDNA-ITS 領域解析

rDNA ITS 領域と *coxI* 遺伝子の塩基配列を以下のようにして調べた。

菌株を V8 ジュース寒天培地上で 25 °C, 暗黒下で 7 日間培養し、伸長した気中菌糸より PrepMan Ultra Reagent (アプライドバイオシステムズジャパン(株), 東京)を用いてゲノム DNA を抽出した。rDNA ITS 領域は、White et al. (1990)の方法に準じプライマー ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') および ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), *coxI* 遺伝子は、Robideau et al. (2011) の方法に準じプライマー OomCoxILevup (TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC) および

FM85mod (RRHWACKTGACTDATRATACCAAA) を用いてサーマルサイ  
クラー (Gene Amp PCR system 2700, アプライドバイオシステムズジャパ  
ン, 東京) で PCR を行っ た. PCR 産物を ExoSAP-IT Express PCR  
Product Cleanup Reagent (アプライドバイオシステムズジャパン, 東京) で  
精製後, BigDye Terminator v. 3.0 (アプライドバイオシステムズジャパン,  
東京) でシーケンシング PCR を行い, 常法に従い ABI3700 DNA  
sequencer (アプライドバイオシステムズジャパン, 東京) を用いて塩基配列  
を決定した. 得られた塩基配列について DNA Data Bank of Japan (DDBJ)  
の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) による相同性検索を行  
った.

## 結果

### 1. 病原菌の分離

土耕栽培および水耕栽培の発病株から分離した 3 菌株

MIE2018072001 (土耕), MIE2018072401 (土耕),

MIE2018072403 (水耕)を供試菌株とした.

## 2. 分離株の形態観察

胞子のうは膨潤した糸状, 造卵器は球形, 平滑, 頂生し, 直径 21~28  $\mu\text{m}$  (平均 24.7  $\mu\text{m}$ ), 造精器は主に異菌糸性で造卵器に 3~6 個付着した (図 5-2, 表 5-1). 卵胞子は球形, 平滑, 非充満で, 直径 18~23  $\mu\text{m}$  (平均 19.6  $\mu\text{m}$ ) であった.

菌糸生育は 10~40  $^{\circ}\text{C}$  で認められ, 生育適温は 35  $^{\circ}\text{C}$  であった (図 5-

3). これらの形態的特徴および培養特性は, van der Plaats-Niterink

(1981) の *P. myriotylum* の記載とよく一致した.

## 3. 黒ウコンに対する病原性

接種株は, 葉柄や根に褐色水浸状の病斑が形成され, 軟化した病斑部から上部が折れ, 病徴が再現された. 無接種では発病が見られなかった.

いずれも罹病組織から接種菌と同一の菌が再分離されたことから, 本菌による病害であると考えられた.

#### 4. 分離株の rDNA-ITS 領域解析

黒ウコンから分離した 3 菌株の塩基配列について DDBJ の BLAST による相同性検索を行った。その結果、供試 3 菌株の rDNA ITS 領域 (DDBJ/EMBL/GenBank DNA データベース Accession No. LS518891, No.LS518892, No.LS518893) と *coxI* 遺伝子 (DDBJ/EMBL/GenBank DNA データベース Accession No. LS518894, No. LS518895, No.LS518896) は、*Pythium myriotylum* と 99%以上の高い相同性が認められた。

#### 考察

黒ウコンの罹病組織から菌の分離を試みたところ、*Pythium* 属菌が分離され、形態的・生理的特徴から、*Pythium myriotylum* Drechsler であった。ショウガ属のショウガ (*Zingiber officinale* Rosc.) やミョウガ (*Z. mioga* Rosc.) の根茎腐敗病 (高橋, 1954; 桂・谷岡, 1967), クルクマ属に分類

されるクルクマ (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) やキョウオウ (*C. aromatica* Salisb.) の立枯病 (鈴木ら, 2008; 小野ら, 2011) として, *P. myriotylum* による報告はあるが, ショウガ科バンウコン属の黒ウコンでの発生は未記載である. 本菌による黒ウコンの立枯症状については国内未報告であり, 病名を黒ウコン立枯病 (英名:Damping-off) とすることを提案する.

供試菌株 MIE2018072001 を MAFF247170 として, MIE2018072401 を MAFF247171, MIE2018072403 を MAFF247172 として, 農業・食品産業技術総合研究機構農業生物資源ジーンバンクに寄託した.

**表 4-1** 黒ウコン分離菌株と *Pythium myriotylum* Drechsle の形態的特徴

形態	MIE2018072001 (黒ウコン分離株)	CaPym09-1 (キョウオウ分離株) <sup>a)</sup>	<i>Pythium myriotylum</i> Drechsler <sup>b)</sup>
胞子のう	膨潤した糸状	膨潤した糸状	膨潤した糸状
造卵器	球形, 平滑, 頂生ときに間生	球形, 平滑, 頂生ときに間生	球形, 平滑, 頂生ときに間生
直径	21.2~28.1 $\mu\text{m}$ (平均24.7 $\mu\text{m}$ )	28.3~35.0 $\mu\text{m}$ (平均31.2 $\mu\text{m}$ )	(20)26~32(-35) $\mu\text{m}$ (平均29 $\mu\text{m}$ )
造精器	嚢状, 側着性, 異菌糸性	嚢状, 側着性, 異菌糸性	嚢状, 側着性, 異菌糸性ときに同菌糸性
卵胞子	球状, 平滑, 非充満性	球状, 平滑, 非充満性	球状, 平滑, 非充満性
直径	18~23 $\mu\text{m}$ (平均19.6 $\mu\text{m}$ )	20~29 $\mu\text{m}$ (平均25.8 $\mu\text{m}$ )	(18-) 20~27(-29) $\mu\text{m}$ (平均24.5 $\mu\text{m}$ )
生育温度	10~40°C (適温35°C)	5~40°C (適温37°C)	5~40°C (適温37°C)

a)小野ら(2001)

b)van der Plaats-Niterink(1981)

図 4-1 黒ウコンの立枯症状  
A, C: 土耕栽培での症状; B, D: 水耕栽培での症状





図 4-2 分離菌の形態

A: 胞子のう, B: 造精器, 造卵器, C; 卵孢子

Bar=20  $\mu$  m



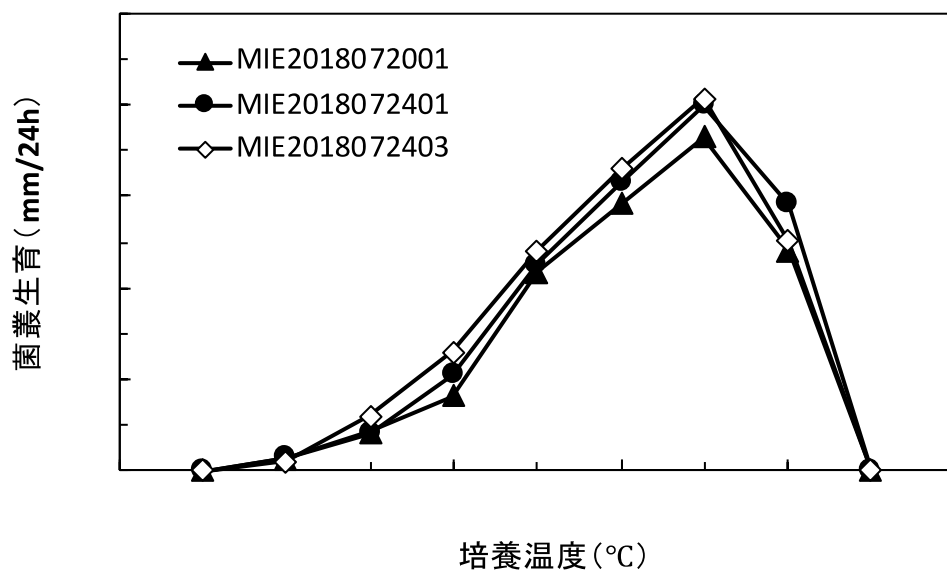


図 4-3 分離菌株の温度別菌糸伸長

## 第 5 章 三重県におけるムギ類赤かび病のチオファネートメチル耐性菌の発生推移

ムギ類赤かび病 (*Fusarium head blight*) は、コムギ (*Triticum aestivum* L.) 及びオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の収量や品質の低下につながる重要な病害である。原因菌はデオキシニバレノールやニバレノールなどのマイコトキシンを産生する可能性があり、これらを摂取するとヒトや家畜にマイコトキシン症を引き起こす可能性がある (McMullen et al., 2012; Suga et al., 2022)。ムギ類赤かび病は、日本において *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* sensu stricto, *Microdochium nivale* および他のいくつかの *Fusarium* 種によって引き起こされる病害である (Koizumi et al., 1993; O'Donnell et al., 2000, 2004; Suga et al., 2008, 2022)。三重県では、*F. asiaticum* がムギ類赤かび病菌の優占種であることが報告されている (Kuroda and Suzuki, 2009; Suga et al., 2008; Ueda et al., 2007)。

ベノミルやチオファネートメチルなどのメチルベンズイミダゾールカーバメート (MBC) 系殺菌剤は、ムギ類赤かび病菌も含む広い殺菌スペクトルを持ち、多くの植物病原性菌類の防除に世界中で使用されている。MBC 殺菌剤は、 $\beta$ -チューブリンと結合することで、微小管の形成を阻害し、細胞周期を阻害することができる (Davidse, 1973)。一方、MBC 殺菌剤の耐性機構は、 $\beta$ 2-チューブリン遺伝子内の様々な位置で起こる点変異によって容易に誘発される (Albertini et al., 1999; Koenraad et al., 1992; Ma et al., 2003, 2005; Maymon et al., 2006; Yarden and Katan, 1993; Zhou and Jia, 2015)。ムギ類赤かび病菌のうち、*F. graminearum sensu stricto* および *F. asiaticum* の  $\beta$ 2-チューブリン遺伝子のコドン 6 (H6N), 73 (Q73R), 167 (F167Y), 198 (E198Q, E198L, E198K), 200 (F200Y) の各コドンにおいて起こる点変異が MBC 殺菌剤の耐性機構として確認されている (Chen et al., 2009, 2015; Duan et al., 2014; Komura et al., 2018; Sevastos et al., 2016)。

日本では、ムギ類赤かび病菌の MBC 耐性菌は、2004 年に大分県で最初に報告された(Chung et al., 2008; Iwama et al., 2007; Yoshimatsu et al., 2006). 三重県では 2003 年から県内に分布するムギ類赤かび病菌の MBC 殺菌剤に対する感受性程度を調査し、2008 年に同地域のコムギ 2 圃場から MBC 耐性菌を初確認した (Kuroda and Suzuki, 2009). 本研究では、本剤に対する感受性程度の調査を 2021 年まで継続して実施した結果を報告する.

本研究では、2021 年までのムギ類赤かび病菌の MBC 耐性菌の発生状況と感受性程度について現地調査の結果を報告する.

## 材料および方法

### 1. ムギ類赤かび病菌の採集と菌分離

2008 年から 2021 年にかけて、三重県においてムギ類赤かび病に罹病したコムギとオオムギの穂を採取した. 分離菌株は、同一罹病穂のスπόロドキアからは 1~2 菌株、同一圃場からは 1~5 菌株となるよう分離した.

単コロニー分離は、2008年に予備スクリーニング用の方法として確立した。まず、スポロドキアをピンセットで摘み、試験管中の滅菌水に懸濁し、希釈した分生子懸濁液を *Fusarium* 属菌用の選択培地の駒田培地 (Komada, 1975) に塗布し、培地表面を風乾した後、25 °Cで3~7日間、暗黒下で培養した。培養後、単コロニーを有柄針で掻き取り、1/2ポテトデキストロース寒天 (以下、PDA, 日水製薬(株), 東京) 培地に移植し、20~25 °Cで培養した。DNAシーケンス用の単孢子分離では、Nakashima et al. (2016) に記載された方法を用いた。三重県においてムギ類赤かび病に罹病したコムギとオオムギから合計 1,280 菌株の *Fusarium* 属菌を分離した (表 5-1, 図 5-1)。

## 2. チオファネートメチル剤に対するムギ類赤かび病菌の薬剤感受性検定

ムギ類赤かび病に対する防除剤として日本で良く使用されている MBC 殺菌剤の1つであるチオファネートメチル剤に対する各分離株の感受性を評価した。PDAに懸濁したチオファネートメチル [有効成分 70% (w/w)];

トップジン M 水和剤,日本曹達,東京] の最終濃度が 0, 1, 10, 30, 60 および 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう添加した. チオファネートメチルはオートクレーブする前に培地に添加した. 供試菌株は PDA 平板に移植し, 20  $^{\circ}\text{C}$ , 暗黒下で 4 日間前培養を行った. 各濃度のチオファネートメチルを添加した PDA 平板培地に菌糸体プラグ (直径 4 mm) を置床し, 20  $^{\circ}\text{C}$ , 暗黒下で 3 日間培養した. チオファネートメチルの各濃度での菌糸コロニーの生育に基づいて, 分離株を 3 つの表現型に分類した. 感受性 (S): 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では生育しない; 中度耐性 (MR): 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  から 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  未満で生育する; 高度耐性 (HR): 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で生育する. ムギ類赤かび病菌の殺菌剤感受性に関する先行研究と同様にチオファネートメチル耐性を決定するために 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  および 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で識別した (Chen et al., 2015; Duan et al., 2014) (図 5-2).

### 3. DNA 抽出、PCR 増幅、塩基配列解析

DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、麦芽寒天培地 (Difco, Becton Dickinson, Franklin, NJ) 上で生育する菌糸体から、製造元のプロトコールに従ってゲノム DNA を抽出した。

フザリウム属を同定するためのバーコード領域であるヒストン H3 遺伝子コード領域は、プライマー H3-1a/H3-1b (Steenkamp et al., 1999) を用いて増幅し、塩基配列を決定した。増幅反応混合物 (総量 12.5  $\mu$ l) には、ゲノム DNA 1~20 ng, 10 $\times$ PCR Buffer (Bioline, London, UK) 1.25  $\mu$ l, 80  $\mu$ M dNTPs (Bioline), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0.2  $\mu$ M 各プライマー, 0.5 U Taq DNA ポリメラーゼ (Bioline) が含まれていた。プライマー Fgbeta637F/Fgbeta637R (Duan et al., 2014) は、MBC 殺菌剤耐性に関連するコドン 167, 198 および 200 の点変異を含む  $\beta$ 2-チューブリン遺伝子のコード領域の部分断片を増幅するために使用した。増幅はサーマルサイクラー (Bio-Rad T100, 東京) で行い、次のようにプログラムした: 94  $^{\circ}$ C で 2 分間の初期変性; 94  $^{\circ}$ C で 1 分間の熱変性; 56  $^{\circ}$ C で 1 分間の

アニーリン; 72 °Cで1分間の伸長を35サイクル行い, 72 °Cで5分間の最終伸長とした. 得られたヒストン H3 遺伝子コード領域の増幅産物は, PCRプライマーを用いて両方向の塩基配列を決定した.  $\beta$ 2-チューブリン遺伝子は, プライマーHS273/HS266 (Suga et al., 2011) を用いて塩基配列を決定した. 三重大学先端科学研究支援センター (津, 三重) において, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster, CA) とDNAシーケンサー (Applied Biosystems DNA analyzer 3730x1) を用いて, 増幅産物のDNA配列を決定した.

## 結果

### 1. チオファネートメチル剤に対するムギ類赤かび病菌の薬剤感受性検定

本研究では, チオファネートメチルを添加したPDA平板培地上での最小発育阻止濃度 (MIC) に基づいて1,280菌株の菌糸成長を評価した. その結果, 1,259菌株 (98.4%) がチオファネートメチルに感受性 (S),



13 菌株 (1.0 %)が中度耐性 (MR), 8 菌株 (0.6 %)が高度耐性 (HR)であった (表 5-1).

## 2. $\beta$ 2-チューブリン遺伝子の MBC 耐性変異

2008 年から 2021 年の間に, 採取場所, 宿主, 宿主の品種に基づいて 192 分離株が選択された. これらの分離株の  $\beta$ 2-チューブリン遺伝子の部分配列を解析し, MBC 耐性に関連するコドン 167, 198, 200 の点変異を検出した (表 5-2, 図 5-1).

コドン 167 の点変異は, HR 株の 3 菌株で観察され, フェニルアラニンからチロシンに置換していた (TTT-TAT, Phe-Tyr, F167Y). コドン 198 の点変異は, S 株の 1 菌株と MR 株の 12 菌株で観察され, グルタミン酸からグルタミンに置換していた (GAG-CAG, Glu-Gln, E198Q). 本研究で E198Q 変異を持つ S 株が観察された理由は不明である. コドン 200 の点変異は, HR の 3 菌株で観察され, フェニルアラニンからチロシンへの置換

が見られた (TTC-TAC, Phe-Tyr, F200Y). また, MR 株の 1 菌株については, コドン 167, 198, 200 に変異は認められなかった.

### 3. MBC 感受性の年次変動

三重県では, 2008 年にチオファネートメチルに対する MBC 高度耐性菌株が初めて検出された (Kuroda and Suzuki 2009) (表 5-1). 48 菌株のうち, 同一地域のコムギ 2 圃場から分離された 4 菌株 (8.3 %) が HR 株と判定された. その後, 2009 年から 2017 年までの現地調査では, ムギ類赤かび病が多発したにもかかわらず, 最初に検出された圃場を含め, 耐性菌は検出されていない (表 5-1). 2015 年は 102 菌株のうち 2 菌株 (2.0 %), 2016 年は 154 菌株のうち 2 菌株 (1.3 %) が薬剤感受性検定および  $\beta 2$ -チューブリンコード遺伝子領域の塩基配列解析の結果から MR 株と判定された. 2018 年は, 142 菌株のうち, 2008 年とは異なる圃場から採取された 1 菌株 (0.7 %) が HR 株と判定され, さらに 142 菌株のうち 2 菌株 (1.4 %) が MR 株と判定された. 2020 年, 2021 年には, 158 菌株のう

ち 2 菌株 (1.3 %), 175 菌株のうち 1 菌株 (0.6 %) が HR 株と判定された。また, MR 株は 158 菌株のうち 3 菌株 (1.9 %), 175 菌株のうち 4 菌株 (2.3 %) であった。これらの MBC 耐性菌は, 2015 年に 1 圃場から 2 菌株 (MR 株) , 2021 年に 1 圃場から 2 菌株 (MR 株) が分離された以外は, 異なる圃場から採取し, 分離された。

## 考察

三重県では, 特にムギ類赤かび病が多発する中山間地では, イネ・コムギ/オオムギ・ダイズの 2 年 3 作の輪作体系の導入が進んでいる。さらに, MBC 殺菌剤の一つであるチオファネートメチルは, コムギとオオムギの開花期に年 1 回, ムギ類赤かび病の主要防除剤として使用されている。2020 年以降, 大規模水田農業経営体を中心に脱メチル化阻害剤 (DMI) 殺菌剤の使用が増加しているが, 主流はチオファネートメチル水和剤であり, 耐性菌の発生が拡大した場合, 生産に及ぼす影響が大きい。

2008年と2018年に三重県で採取されたHR株は、 $\beta$ 2-チューブリンコード遺伝子にF200Y変異を有していた。日本ではF200Y変異を持つ菌株は稀で、熊本県からのみ報告されている (Suga et al., 2011)。中国でも同様に、F200Y変異を持つ耐性菌株は、耐性集団の0.0~7.3%と少数である (Chen et al., 2015; Liu et al., 2010, 2019)。

*Fusarium asiaticum* のチオファネートメチルに対するHR株は、2008年に同じ地域の2つの圃場から収集され、その出現率は同じ圃場での再調査で50.0% (12菌株中6菌株) を示した (表5-1, 表5-2)。同一圃場からHR株が高頻度に検出されたことから、同一圃場内で変異が生じたか、あるいは他圃場から移動して圃場内で拡散したものと考えられた。2008年にMBC耐性株が初めて検出されて以来、同一圃場または近隣圃場から採取されたスポロドキアが形成された穂およびそこから分離された分離菌株を用いて、その発生状況をモニタリングしてきた。その結果、2021年現在、特定の抵抗性系統が同一圃場や近隣圃場で連続して発生していな

い (図 5-1, 図 5-2, 表 5-1, 表 5-2). このことから, この地域で越冬する抵抗性菌株の発生頻度は十分ではなく, MBC 耐性に関連する変異の発生・選択は, 毎年最初に発生した各圃場において限定的であることが示唆された. FGSC によるムギ類赤かび病の一次伝染の主な伝染源は, 有性期の子のう胞子, 無性期の分生子および厚膜胞子である (Nishikado, 1958; Shaner, 2003; Sutton, 1982). 前作の作期から発生した伝染源は, コムギ, イネ, その他のイネ科植物の藁などの植物残渣上で, 宿主の未作付け期間に生存する. 翌年の春, 残渣に定着した胞子のうに形成された分生子などの伝染源が風によって飛散し, 穂状花序に初感染する (Koizumi et al., 1993; Nishikado, 1958; Shaner, 2003; Sutton, 1982).

一方, 子のう胞子や分生子による二次伝染は主要な伝染経路ではないことが示唆されている (Fernando et al., 1997; Sutton, 1982). その代わりに, 圃場の残渣に形成された伝染源がコムギの開花期以降長期間にわたって一次伝染源として寄与すること, すなわち, ムギ類赤かび病が主に単

発性の病害であることが確認された (Fernando et al., 1997; Ohsaki et al., 2009). さらに, Dill-Macky and Jones (2000) は, 小区画圃場における作物残渣の種類と量の違いが発病に影響し, 生産者の圃場内のような局所的な接種源が接種量と発病ポテンシャルに直接寄与することを示した.

先行研究および本調査の結果から, 三重県では2年3作体系により, 分生子による二次感染の頻度が低く, 変異株の選抜機会が少ないこと, 一次伝染源の残渣量が少ないことなどから, 前作の圃場で発生した抵抗性菌株の集団密度が依然として低いことに矛盾はない.

また, 中国では F167Y 変異を持つ *F. asiaticum* 株が MBC 耐性株として優占しており, その割合は 68.3~89.2%に達する (Chen et al., 2015, Liu et al., 2010, 2019). しかし, 三重で検出された F167Y 変異株は, 異なる圃場, 異なる品種から採取されたもので, まだ稀であり, 断続的な発生として各圃場に出現したことが示唆される (表 5-2).

中国では、中等度耐性を引き起こす E198Q 変異が耐性株の 4 分の 1 を占め、Liu et al. (2010) では全体の 24.4 %, Chen et al. (2015) では 1.4 %, Liu et al. (2019) では 25.8 %であった。三重県では、E198Q 変異を有する MR 株が 2015 年に初めて検出され、2016 年、2018 年、2020 年、2021 年と継続して検出されている (表 5-2)。日本では三重県でのみ発生が確認されている (Suga et al., 2011)。10 µg/ml のチオフアネートメチル含有培地では生育しない E198Q 変異を持つ MR 株は、実用的な濃度の MBC で制御可能である。しかし、同一作付圃場ではない近隣地域から継続的に検出されており、わずかではあるが、圃場伝播が生じている可能性がある。麦類赤かび病発生地での越冬・伝播メカニズムを解明するためには、さらなる圃場調査が必要である。

**表 5-1** 三重県のコムギおよびオオムギ栽培圃場で採取した *Fusarium graminearum* 種複合体分離菌株のチオファネートメチル剤に対する薬剤感受性の年次変動

採取年	採取圃場数	分離菌株数	耐性菌株数 <sup>a</sup>		
			MR	HR	
2008*	5月	24	48	0	4
		(2)	(12)	0	(6)
2009	5月	37	152	0	0
2010	5月	14	70	0	0
2011	— <sup>b</sup>	—	—	—	—
2012	5月～6月	26	44	0	0
2013	5月	10	40	0	0
2014	5月	18	66	0	0
2015	5月	26	102	2	0
2016	5月	49	154	2	0
2017	5月	24	42	0	0
2018	5月～6月	40	142	2	1
2019	5月～6月	27	87	0	0
2020	5月～6月	47	158	3	2
2021	5月～6月	95	175	4	1
合計		437	1,280	13	8

\*: データはKuroda and Suzuki (2009)による。下段は耐性株が検出された2地点の再分離を示す。

a: HR: 高度耐性, チオファネートメチル濃度100 µg/mlで生育; MR: 中程度耐性, チオファネートメチル濃度10 µg/mlから100 µg/ml未満で生育。

b: サンプル未採取。



表 5-2 *Fusarium graminearum* 種複合体分離菌株のチオファネートメチル剤に対する薬剤感受性とβ2-チューブリン遺伝子のMBC耐性変異

採取年	分離菌株名	採取市町名	コムギ品種名	MIC (μg/ml) <sup>a</sup>	耐性程度 <sup>b</sup>	β2 tub変異 <sup>c</sup>
2021	MUCC3326	菰野町	あやひかり	10	S	E198Q
2015	MUCC2132	多気町	ニシノカオリ	100	MR	E198Q
2015	MUCC2133	多気町	ニシノカオリ	100	MR	E198Q
2016	MUCC2180	津市	あやひかり	100	MR	E198Q
2016	MUCC2181	多気町	ニシノカオリ	100	MR	E198Q
2018	MUCC2566	津市	あやひかり	100	MR	E198Q <sup>d</sup>
2018	MUCC2567	松阪市	あやひかり	100	MR	E198Q <sup>d</sup>
2020	MUCC3105	津市	あやひかり	100	MR	E198Q
2020	MUCC3132	多気町	ニシノカオリ	100	MR	E198Q
2020	MUCC3153	松阪市	あやひかり	100	MR	E198Q
2021	MUCC3343	玉城町	ニシノカオリ	100	MR	変異なし
2021	MUCC3367	多気町	ニシノカオリ	100	MR	E198Q
2021	MUCC3368	多気町	ニシノカオリ	100	MR	E198Q
2021	MUCC3371	多気町	ニシノカオリ	100	MR	E198Q
2008	8093001	松阪市	あやひかり	> 100	HR	-
2008	8093002	松阪市	あやひかり	> 100	HR	-
2008	8093003	松阪市	あやひかり	> 100	HR	-
2008	8093004	松阪市	あやひかり	> 100	HR	-
2008	0824005TMR	松阪市	あやひかり	> 100	HR	F200Y <sup>e</sup>
2008	0824006TMR	松阪市	あやひかり	> 100	HR	F200Y <sup>e</sup>
2008	0824007TMR	松阪市	あやひかり	> 100	HR	F200Y <sup>e</sup>
2008	0824008TMR	松阪市	あやひかり	> 100	HR	F200Y <sup>e</sup>
2008	0824009TMR	松阪市	あやひかり	> 100	HR	F200Y <sup>e</sup>
2008	0824010TMR	松阪市	あやひかり	> 100	HR	F200Y <sup>e</sup>
2018	MUCC2568	津市	あやひかり	> 100	HR	F200Y <sup>d</sup>
2020	MUCC3053	伊勢市	ニシノカオリ	> 100	HR	F167Y
2020	MUCC3137	多気町	ニシノカオリ	> 100	HR	F167Y
2021	MUCC3332	伊賀市	タマイズミR	> 100	HR	F167Y

a: チオファネートメチルを添加したPDA平板培地上での最小発育阻止濃度 (MIC) に基づく。

b: HR: 高度耐性, チオファネートメチル濃度100 μg/mlで生育; MR: 中程度耐性, チオファネートメチル濃度10 μg/mlから100 μg/ml未満で生育; S: 感受性, チオファネートメチル濃度10 μg/mlで生育せず。

c: β2-チューブリン遺伝子のコドン167, 198または200における変異の種類とメチルベンズイミダゾールカーバメートに対する耐性。

d: LAMP-FLP法 (Komura et al. 2018) を用いて変異型を解析。

e: 診断用PCR-RFLP法 (Suga et al. 2011) を用いて変異型を解析。

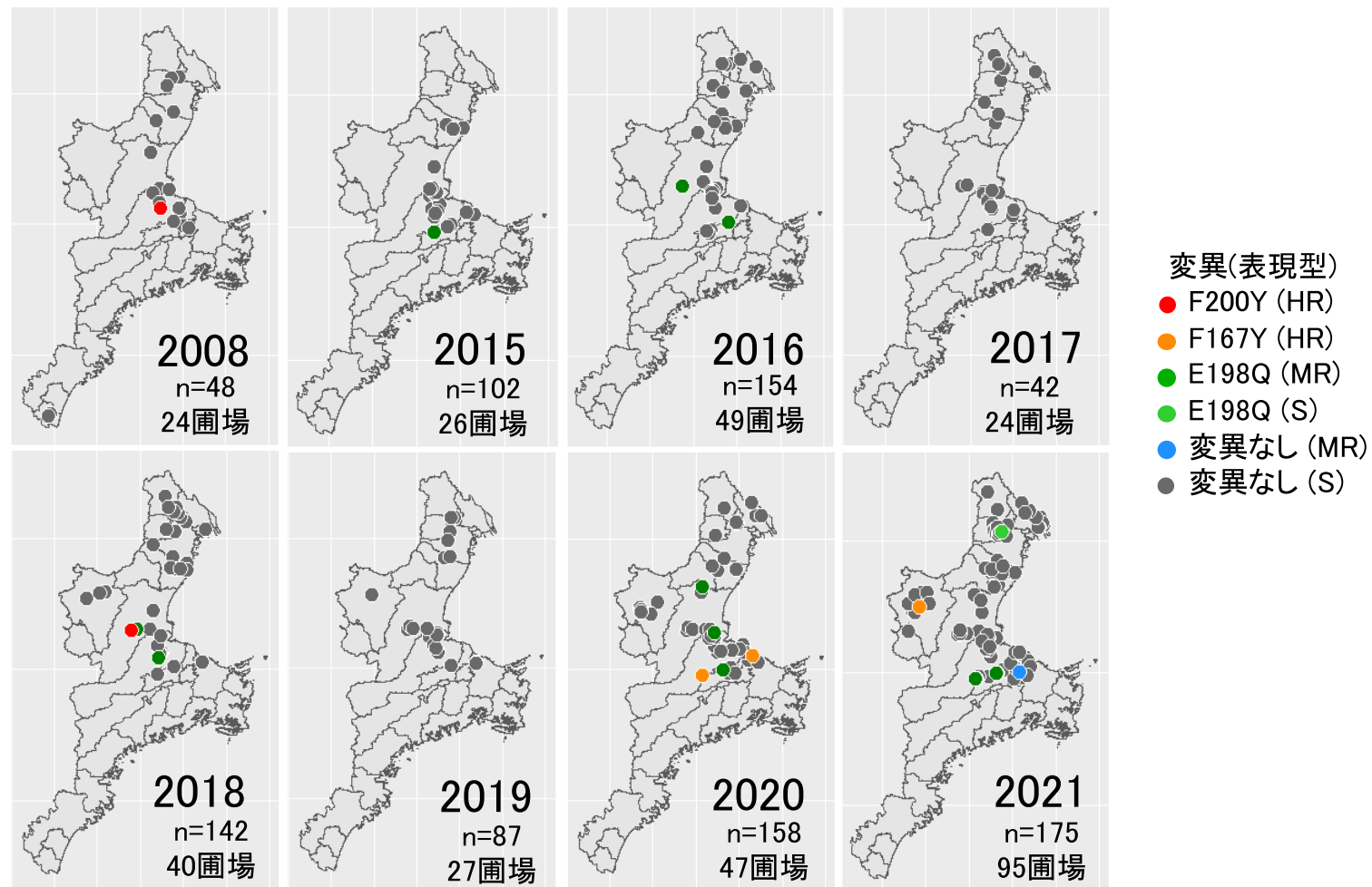
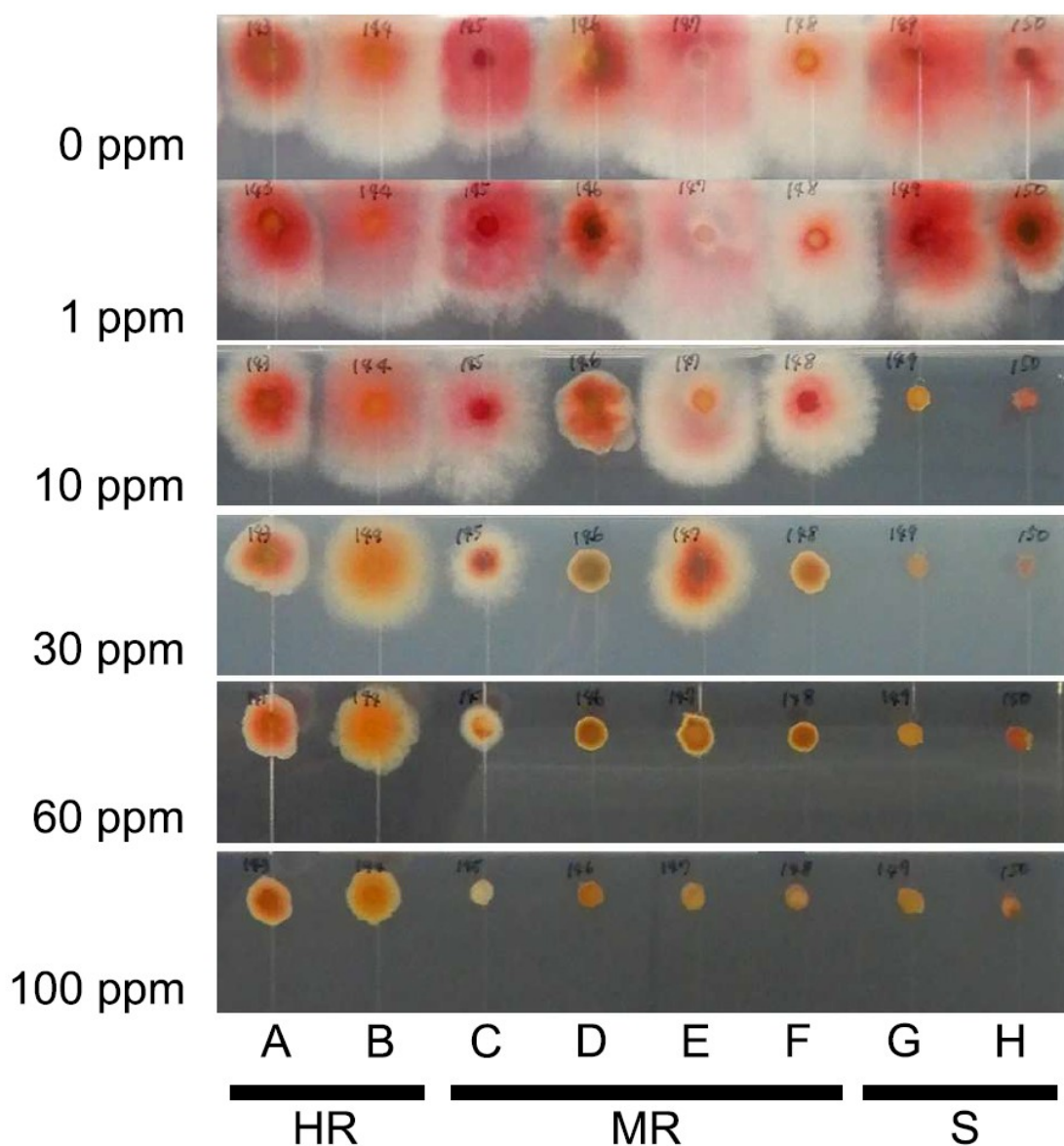


図5-1 三重県におけるムギ類赤かび病菌の採取箇所及びチオファネートメチル剤に対する薬剤感受性  
 HR：高度耐性, チオファネートメチル濃度100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育；MR：中程度耐性, チオファネートメチル濃度10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ から100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満で生育；S：感受性, チオファネートメチル濃度10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育せず。



**図 5-2** チオファネートメチル剤に対するムギ類赤かび病菌の薬剤感受性。  
 HR:高度耐性, チオファネートメチル濃度 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で生育;MR:中程度耐性, チオファネートメチル濃度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  から 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  未満で生育;S:感受性, チオファネートメチル濃度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で生育せず。

A:08093001(変異は未解析), B:08093002(変異は未解析),

C:15070184(変異は未解析), D:15071085(変異は未解析),

E:MUCC2180 (E198Q), F:MUCC2181 (E198Q), G:MUCC2086(変異は未確認), H:MUCC2091(変異は未確認)。

## 総合考察

本研究では，三重県の園芸作物で発生している病害の発生状況を明らかにするとともに，その対策技術の確立を試みた．

三重県における温州萎縮ウイルスの集団は主に CiMV sub-strain に属する分離株で構成されていることが明らかになった．CiMV sub-strain に次いで多かったのは SDV strain で， NIMV strain に属する分離株も認められた．NIMV strain は，三重県において発生が初確認された．NIMV strain は，国内では和歌山県で発生が確認されており（今田，1977；井沼・富村，2016；岩波，2001），次いで愛媛県で1件報告されている（Shimizu et al., 2005）．海外でも中国四川省で報告があるのみである（Yan et al., 2021）．さらに，CiMV sub-strain と NIMV strain の複合感染が極早生ウンシュウ‘山川早生’で確認された．カンキツ類における CiMV sub-strain と NIMV strain の複合感染の報告はこれが初めてである．

CiMV sub-strain はウンシュウミカンの果実にモザイク状の斑紋を生じるカンキツモザイク病の病原として知られている（今田, 1977; Yamamoto and Yamaguchi, 1980). そのため, 現地では新葉の萎縮などの温州萎縮症状を示した罹病樹のうち, 果実にモザイク症状を示さないものは SDV strain に感染しており, CiMV sub-strain の発生は少ないと考えられていたが, 三重県の主要系統は CiMV sub-strain で構成されていた. CiMV sub-strain に感染したウンシュウミカン 18 樹において, 果実にモザイク症状が発生した割合は 22.2%と低く, 三重県では果実にモザイク症状を示さない CiMV sub-strain が広く分布している可能性が示唆された. 和歌山県で実施された SDV strain 調査でも CiMV sub-strain が 8 割以上を占めており, それらの樹においてモザイク病の病徴が認められていない（井沼・富村, 2016). 韓国においても CiMV sub-strain に感染しているにもかかわらず, 典型的な症状を示さないカンキツ樹が多く確認されている (Hyun et al., 2020). CiMV sub-strain は SDV strain と同様に舟型葉や

枝の叢生を生ずるが、SDV strain より症状が軽いため（宇杉ら，1986），  
果実にモザイク症状を示さない CiMV sub-strain が日本国内のカンキツ産  
地に広がっていった可能性が考えられる。

土壌を介して伝染した SDV strain の病徴は早いもので 4～5 年の期間  
を要するとされている（磯田・行徳，1990；片木・牛山，1990）。罹病樹周  
辺にカラタチ実生苗を定植した結果，SDV が 1 年以内に感染することが明  
らかになった。しかし，8 試験区のうち残りの 6 試験区は調査期間中にカラ  
タチへの感染が確認されなかったため，感染が確認された試験区の感染  
率の差は，ウイルス系統の違いに起因するのか，圃場の環境要因に起因  
するのかは判然としなかった。SDV strain や CiMV sub-strain のベクター  
は未だ不明であり，今後はベクターの解明と土壌伝染を誘引する環境条  
件などの調査が望まれる。

三重県では産地の活性化と農業者の経営安定化のために優秀な県オ  
リジナル品種の育成を行っている。三重県が育成したウンシュウミカン‘みえ

紀南 3 号' ('上野早生'の珠心胚実生から育成)は、収穫期が 9 月下旬から 10 月中旬であり、三重県育成極早生ウンシュウ'みえ紀南 1 号'に続いて収穫できる極早生ウンシュウである。しかし、育成段階で 3 種類のウイロイド (HSVd, CDVd, CVd-VI) に感染したため農業者への普及にはウイロイドの無毒化が必要となった。ウイルスやウイロイドの除去には新梢の熱処理と茎頂接ぎ木を併用した方法で除去率が高いとされている (Koizumi, 1984)。40 °C と 25 °C を 4 時間ごとに繰り返し処理し (断続熱処理)、樹勢を維持しながら組織中のウイルス濃度を低下させた'みえ紀南 3 号'から 0.2 mm 程度の茎頂を切り出して茎頂接ぎ木を行い、ウイロイドの除去を行った。断続熱処理による無毒化の効果が最も強く表れたウイロイドは HSVd であり、活着後の無毒化率で比較すると、定温区に対して断続熱処理区は無毒化率は約 1.4 倍となった。どの処理区においても比較的無毒化されやすかったウイロイドは CDVd であった。HSVd, CDVd, CVd-VI が単独あるいは複合感染している場合、茎頂を 0.2 mm と小さく摘出することはウ

イロイド無毒化に有効な方法であることがわかった。しかし、0.2 mm 茎頂接ぎ木は茎頂が小さいため、作業にかなりの熟練を要する。無毒化率を向上させるため、新梢伸長中に断続熱処理を併用した。活着した個体中の無毒化率は、断続熱処理区が定温区より高いが、各処理区間においてカイ2乗独立性検定で有意な差は認められなかった。さらに、活着後の生育も両区に差は見られなかった。本研究においては、3種類のウイロイド(HSV, CDVd, CVd-VI)が複合感染したウンシュウミカンでは、断続熱処理を行わずに0.2 mm 茎頂を利用した茎頂接ぎ木により、効率よく無毒化できることを明らかにした。

三重県の主要トマト産地では、葉かび病抵抗性遺伝子 *cf-9* を有する品種を栽培しているため、トマト葉かび病は大きな問題とはなっていないが、抵抗性品種の導入以来、本病の発生や防除の実態について十分に把握してこなかった。今回の調査において、調査圃場 15 圃場のうち 7 圃場でトマト葉かび病の発生が確認され、トマト葉かび病抵抗性品種が栽培



されていても本病の発生が確認されていることから、本病に対する防除対策の見直しが必要と考えられた。

一方、近年各農薬メーカーで研究開発が集中しているミトコンドリア電子伝達系複合体 II のコハク酸脱水素酵素を阻害する succinate dehydrogenase inhibitors (以下、SDHI) 剤は、幅広いスペクトラムと優れた殺菌効果を有する殺菌剤で、トマト葉かび病に対しても高い防除効果を示す。しかし、耐性菌リスクが中程度から高に分類され、耐性菌管理が必要とされており (FRAC, 2020)、トマト葉かび病菌においても SDHI 剤のうちボスカリドおよびペンチオピラドに対する耐性菌が確認されており (渡辺ら, 2013)、耐性菌管理を行いながら効果を持続させる必要がある。薬剤感受性検定の結果から、SDHI 剤のうちボスカリド、ペンチオピラドに加え、イソピラザム、ピラジフルミドに対する耐性菌も発生していることが確認された。イソピラザム、ピラジフルミドに対する耐性菌が発生した圃場は、ボスカリド、ペンチオピラドの使用履歴はあったが、イソピラザムおよびピラジフルミドの使用

履歴はなく、ボスカリド、ペンチオピラドの散布による交差耐性が生じている可能性が示唆された。上記 4 剤すべてに耐性菌が発生した圃場はペンチオピラドを 1 作 2 回以上散布しており、SDHI 剤の散布によって耐性菌の出現頻度が増加することが示された。逸脱度分析の結果から、耐性を示す薬剤の種類（ボスカリド、ペンチオピラド）に差があることが明らかとなった。

現地では、ボスカリドよりペンチオピラドの使用率が高かったが、ペンチオピラドの散布により、基礎活性が低いボスカリドの方が先に耐性菌が顕在化したと考えられた。本調査の供試薬剤のボスカリドやペンチオピラドは、トマト灰色かび病防除のために使用されることが多いことから、必ずしもトマト葉かび病防除で使用したことで耐性が顕在化したのではなく、灰色かび病等の防除により結果として耐性菌が発生している可能性が高く、個々の病原菌に対する殺菌剤系統の選択だけでなく、病害防除全体での殺菌剤系統を考慮した防除計画が重要であることが示唆された。

黒ウコン (*Kaempferia parviflora* Wall.) は、タイ原産のショウガ科バンウコン属の植物で、塊茎を生薬として利用する。黒ウコンの葉鞘が褐色の水浸状に侵され、その後軟化、倒伏に至る症状が発生した。発病株の塊茎も褐色の水浸状に軟化しており、罹病組織から菌の分離を試みたところ、*Pythium* 属菌が分離され、形態的・生理的特徴から、*Pythium myriotylum* Drechsler と同定された。本菌による黒ウコンの立枯症状については国内未報告であり、病名を黒ウコン立枯病(英名:Damping-off)とすることを提案した。

ムギ類赤かび病 (Fusarium head blight; FHB) は、コムギ (*Triticum aestivum* L.) 及びオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の収量や品質の低下につながる重要な病害である。三重県では、FHB の主要防除剤としてチオファネートメチル水和剤が、コムギとオオムギの開花期に年 1 回使用されている。ベノミルやチオファネートメチルなどのメチルベンズイミダゾールカーバメート (MBC) 系殺菌剤は、広い殺菌スペクトルを持ち、多くの植物病原

性菌類の防除に世界中で使用されている。しかし、MBCs 殺菌剤の耐性機構は、 $\beta$ 2-チューブリン遺伝子内の様々な位置で起こる点変異によって容易に誘発される (Albertini et al., 1999; Koenraad et al., 1992; Ma et al., 2003, 2005; Maymon et al., 2006; Yarden and Katan, 1993; Zhou and Jia, 2015)。大分県で 2004 年に *F. graminearum* 種複合体によるチオファネートメチル耐性菌が国内ではじめて確認され、2005 年には福岡県および熊本県でも確認された (Chung et al., 2008; Iwama et al., 2007; Yoshimatsu et al., 2006)。三重県では 2003 年から県内に分布するコムギ赤かび病菌を対象に、本剤に対する感受性程度を調査し、2008 年に本剤の耐性菌を初確認した (Kuroda and Suzuki, 2009)。本剤に対する感受性程度の調査を 2021 年まで継続して実施した。

2008 年と 2018 年に三重県で採取された高度耐性株は、 $\beta$ 2-チューブリンコード遺伝子に F200Y 変異を有していた。日本では F200Y 変異を持つ菌株はまれで、熊本県からのみ報告されている (Suga et al., 2011)。中

国でも同様に、F200Y 変異を持つ耐性菌株は、耐性集団の 0.0～7.3 %と少数である (Chen et al., 2015; Liu et al., 2010, 2019). 2008 年に MBC 耐性株が初めて検出されて以来、同一圃場または近隣圃場から採取されたスポロドキアが形成された穂およびそこから分離された分離菌株を用いて、その発生状況をモニタリングしてきた。その結果、2021 年現在、特定の抵抗性系統が同一圃場や近隣圃場で連続して発生していないことから、この地域で越冬する抵抗性菌株の発生頻度は十分ではなく、MBC 耐性に関連する変異の発生・選択は、毎年最初に発生した各圃場において限定的であることが示唆された。

また、中国では F167Y 変異を持つ *F. asiaticum* 株が MBC 耐性株として優占しており、その割合は 68.3～89.2 %に達する (Chen et al., 2015, Liu et al., 2010, 2019). しかし、2020 年と 2021 年に三重で検出された高度耐性を引き起こす F167Y 変異株は、異なる圃場、異なる品種から採

取されたもので、まだ稀であり、断続的な発生として各圃場に出現したことが示唆される。

中国では、中度耐性を引き起こす E198Q 変異が耐性株の 4 分の 1 を占め、Liu et al. (2010)では全体の 24.4 %、Chen et al. (2015) では 1.4 %、Liu et al. (2019) では 25.8 %であった。三重県では、E198Q 変異を有する中度耐性株が 2015 年に初めて検出され、2016 年、2018 年、2020 年、2021 年と継続して検出されている。日本では三重県でのみ発生が確認されている (Suga et al., 2011)。E198Q 変異を持つ中度耐性株は、実用的な濃度の MBC で制御可能である。しかし、同一作付圃場ではない近隣地域から継続的に検出される。わずかではあるが、圃場伝播が生じている可能性がある。ムギ類赤かび病発生地での越冬・伝播メカニズムを解明するためには、さらなる圃場調査が必要である。

本研究は、三重県の主要園芸作物で発生した病害を中心に、カンキツ類に発生した温州萎縮病ウイルスの系統分布と罹病樹周辺に定植したカ

ラタチ苗への感染率，ウンシュウミカンにおける3種ウイロイドの除去技術の確立，トマト葉かび病の発生状況と薬剤感受性，黒ウコン立枯病の病原菌の同定及びムギ類赤かび病の発生状況と薬剤感受性に関する研究結果を取りまとめたものである。

生産現場における農作物の病害発生は，品質や収量の低下を招き，農業生産の減少に直結する。生産者の農業所得の安定化を図るためには，農作物の病害の発生原因の究明や，その病原の発生生態の解明，防除方法の確立など，現場に即した農業研究による課題解決が必要である。本研究では課題解決まで至らなかった部分もあるが，更なる研究や実証を重ね，現場で活用できる技術を構築していきたいと考える。ここで得られた知見が，現場段階での効果的な防除対策の構築や園芸作物の高品質・安定生産に繋がれば幸いである。

## 摘要

本研究では、三重県の園芸作物等で発生している病害の発生状況を明らかにするとともに、その対策技術の確立を試みた。

カンキツの温州萎縮病は、温州萎縮ウイルス (Satsuma dwarf virus, SDV) によって引き起こされる土壌伝染性病害であり、カンキツ樹に感染すると舟型葉やさじ型葉と呼ばれる葉の萎縮や枝の叢生、樹全体の萎縮、果実品質や収量の低下を生ずる。2010年から2012年にかけて、調査した69圃場のうち43圃場でSDVの発生が確認された。SDVは主にカンキツモザイクウイルス (CiMV sub-strain) がもつとも多く、次いでSDV (SDV strain) であり、ネーブル斑葉モザイクウイルス (NIMV strain) に属する分離株も認められた。NIMV strainは三重県において発生が初確認され、CiMV sub-strainとNIMV strainの複合感染の報告はこれが初めてである。本研究の結果、CiMV sub-strainは和歌山県外に広く分布していることが明らかになった。さらに、三重県では果実にモザイク症状を示さない



CiMV sub-strain が広く分布している可能性が示唆された。極早生ウンシュウの特徴である樹勢の矮化や葉の小型化などが、CiMV sub-strain の軽微な病徴と似ており、感染初期の罹病樹の特定を困難にしていると考えられた。SDV 系統および CiMV sub-strain に感染した罹病樹周辺にカラタチ実生苗を定植した結果、定植 1 年以内に感染することが明らかになった。カラタチはカンキツの台木として広く使用されており、SDV 汚染圃場へのカンキツ苗の定植後に同様の感染が生じる可能性が示唆された。

極早生ウンシュウ‘みえ紀南 3 号’は、育成段階で 3 種類のウイロイド（ホップ矮化ウイロイド (HSVd)、カンキツ矮化ウイロイド (CDVd)、カンキツウイロイド VI (CVd-VI)) に感染したため、普及にはウイロイドの無毒化が必要となった。断続熱処理を行った‘みえ紀南 3 号’から 0.2 mm 程度の茎頂を切り出し、茎頂接ぎ木を行い、ウイロイド除去が可能か検討を行った結果、断続熱処理を行わずに 0.2 mm 茎頂を利用した茎頂接ぎ木により、効率よく無毒化できることが明らかになった。

三重県の主要トマト産地では、トマト葉かび病抵抗性遺伝 *cf-9* を有する品種が栽培され、*Fulvia fulva* によるトマト葉かび病は大きな問題ではなかったが、調査した施設トマト 15 圃場のうち 7 圃場でトマト葉かび病の発生が確認された。2016 年 10 月～2019 年 3 月にかけて、7 圃場から 83 菌株を採集し、SDHI 剤に対する薬剤感受性検定を行った。ボスカリド耐性菌、ペンチオピラド耐性菌の発生が確認され、ペンチオピラド耐性菌はすべてボスカリドと交さ耐性を示した。また、イソピラザムおよびピラジフルミドに対する耐性菌が発生していることを確認した。菌採取した圃場は、イソピラザムおよびピラジフルミドの使用履歴はないため、ボスカリドおよびペンチオピラドの散布による交さ耐性が生じている可能性が示唆された。SDHI 剤の総使用回数が増加するほど、ボスカリドおよびペンチオピラドの耐性菌率が有意に増加した。耐性菌率に関して殺菌剤間にも有意な差が認められ、ボスカリドに対する耐性菌はペンチオピラドに対する耐性菌よりも多く出現した。

また、岐阜大学流域圏科学研究センターと連携し、*Pythium myriotylum* が黒ウコンの立枯症状を引き起こすこと病因学的に明らかにし、黒ウコン立枯病として報告した。

ムギ類赤かび病はコムギおよびオオムギの主要な病害である。ベンズイミダゾール系殺菌剤（MBC）の一つチオファネートメチルは、三重県ではムギ類赤かび病の主要防除剤の1つだが、薬剤耐性系統の蔓延が懸念されている。そこで2008年から2021年にかけて、460圃場において穂にスポロドキアを形成したコムギおよびオオムギから *Fusarium graminearum* 種複合体（FGSC）1,280菌株を分離し、FGSC分離株の薬剤抵抗性は最小発育阻止濃度（MIC）法およびMBC耐性発現に関連するβ2-チューブリン遺伝子コード領域の一塩基多型により抵抗性の有無を判定した。分離株はβ2-チューブリン遺伝子コード領域に複数のアミノ酸変異を有しており、高度耐性株ではF200YおよびF167Y変異が、中度耐性株ではE198Q変異が検出された。E198Q変異の検出は中国で1件の報告があるが、日本

では初めてである。チオファネートメチルに対して高度耐性示す F200Y 変異株は、2008 年と 2018 年にのみ検出された。三重県では、分生子による二次感染の頻度が低く、変異株の淘汰の機会が少ないこと、2 年 3 作体系による一次宿主植物の残渣量が少ないことなどから、MBC 耐性株の個体数がまだ少ないと考えられた。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、現地試験等にご協力頂きました各生産農家の皆様、各地域農業協同組合、中央農業改良普及センター及び各地域農業改良普及センター等の関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

また、本論文の取りまとめにあたり、貴重なご指導、ご助言を頂きました三重大学大学院生物資源学研究科教授 中島千晴博士、同名誉教授 平塚 伸博士、同教授 名田和義博士、同教授 奥田 均博士には、謹んで深甚なる感謝の意を表す。

さらに、本研究を行うにあたり、著者の共同研究者であるだけでなく、貴重なご助言や激励を賜りました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所 岩波 徹博士（現 東京農業大学）、同研究所 長岡（中藪）栄子博士（現 筑波大学）、同研究所 富村健太博士（現 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門）、岐阜大学流域圏科学研究センター教授 景山幸二博士、岐阜県

農業技術センター 渡辺秀樹博士(現 岐阜県農政部)をはじめ，各都道府県の植物病理関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

本研究は，著者が三重県農業研究所において主に行った研究内容を取りまとめたものであり，同研究所の市ノ木山浩道博士（現 退職），須崎徳高氏（現 退職），黒田克利氏，磯崎真英博士（現 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門），鈴木啓史博士（現 三重県農林水産部），西野 実氏，川上 拓氏，同研究所特別顧問 故 保科次雄博士には，ご指導並びに有益なアドバイスをいただいた。さらに，同研究所の方々には実験の円滑な遂行に多大なご協力をいただき，ここに深甚なる感謝の意を表する。

なお，本研究の一部は，新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「効率的茎頂接ぎ木と地域版簡易診断キットを活用した無毒カンキツ苗供給システムの開発」の一環として行った。

## 引用文献

### 諸言

第 63 回全国カンキツ研究大会 (2023) 産地紹介

Enya J, Ikeda K, Takeuchi T, Horikoshi N, Higashi T, Sakai T, Iida Y,

Nishi K, Kubota M (2009) The first occurrence of leaf mold of  
tomato caused by races 4.9 and 4.9.11 of *Passalora fulva* (syn.

*Fulvia fulva*) in Japan. J Gen Plant Pathol 75:76-79

<https://doi.org/10.1007/s10327-008-0134-0>

農林水産省 (2020) 令和 2 年産地域特産野菜生産状況調査

農林水産省 (2021a) 令和 3 年産野菜生産出荷統計

農林水産省 (2021b) 令和 3 年産果樹生産出荷統計

農林水産省 (2021c) 令和 3 年産花き生産出荷統計

農林水産省 (2021d) 令和 3 年産農業所得統計

農林水産省 (2022a) 令和 4 年産作物統計

農林水産省 (2022b) 令和 4 年耕地及び作付面積統計

農林水産省 (2023) 都道府県の農林水産業の概要 (令和 5 年度版)

清水伸一・藤原文孝・三堂博昭・井上久雄・西山富久・三好孝典・橘 泰

宣 (2004) 温州萎縮ウイルスを保毒した温州ミカンにおける果実形

質および品質の変化. 四国植防 39:27-33

<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.71.52>

渡辺秀樹・足立昌俊・堀之内勇人・清水 薫・桑原圭司 (2013) トマト葉

かび病菌における SDHI 剤耐性菌の発生. 日植病報 79:199 (講

要) <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.79.159>

山田憲吾 (2009) 微生物遺伝資源利用マニュアル 28:1 - 9

## 第 1 章 三重県における温州萎縮ウイルスの系統分布と土壌伝染

Hyun J W, Hwang R Y, Choi C W, Jung K E, Han S G (2020)

Symptomatology of *Citrus mosaic sadwavirus* (CiMV) in some

citrus cultivars and effect of CiMV infection on citrus fruit



quality. *Plant Pathol J* 36:106-110

<https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.07.2019.0192>

今田 準 (1977) 温州萎縮病及び類似病害の種類と研究の現状. 植物

防疫 31(10):399-402

Imada J (1981) Citrus mosaic. In: Miyakawa T, Yamaguchi A (eds)

Citrus diseases in Japan. *Jpn Plant Prot Assoc*, Tokyo, pp41-42

井沼 崇・富村健太 (2016) 和歌山県のカンキツ樹から検出された温州

萎縮ウイルスの系統. 関西病虫研報 58: 107-108

<https://doi.org/10.4165/kapps.58.107>

磯田隆晴・行徳 裕 (1990) カンキツウイルス病に関する研究 第7報 カ

ンキツ園における温州萎縮病の隣接樹への伝搬. 九病虫研会報

36:64-67

Ito T, Iwanami T, Ieki H, Shimomura K, Shimizu S, Ito T (2004) A new

virus related to Satsuma dwarf virus: the nucleotide sequence of

the 3'-terminal regions of Hyuganatsu virus RNAs 1 and 2. Arch  
Virol 149:1459-1465 [https://doi.org/10.1007/s00705-003-  
0284-5](https://doi.org/10.1007/s00705-003-<br/>0284-5)

Ito T, Ito T, Shiotani H, Iwanami T, Ozaki K, Muramoto K (2007)  
Genetic diversity and a heterogeneous population of Citrus  
mosaic virus within a single citrus tree. J Gen Plant Pathol  
73:147-151 <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0329-1>

岩政正男・山口清二・栗山隆明・中牟田拓史・江原忠彰・仁藤伸昌・片  
山幸良 (1984)

極早生温州の発生とその形質. 佐賀大農彙報 56: 99-107

Iwanami T (2010) Properties and control of Satsuma dwarf virus. Jpn  
Agric Res Q 44: 1-6 <https://doi.org/10.6090/jarq.44.1>

Iwanami T (2023) Major Citrus Viruses in Japan. Jpn Agric Res

Quarterly: JARQ, 57: 99-110

<https://doi.org/10.6090/jarq.57.99>

Iwanami T, Koizumi M, Ieki H (1993) Diversity of properties among

Satsuma dwarf virus and related viruses. Ann Phytopathol Soc

Jpn 59:642-650 <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.59.642>

Iwanami T, Kondo Y, Kobayashi M, Han SS, Karasev AV (2001)

Sequence diversity and interrelationships among isolates of

satsuma dwarf-related viruses. Arch Virol 146:807-813

<https://doi.org/10.1007/s007050170149>

伊沢房雄 (1966) 温州萎縮病に関する調査. 愛知園試研報 5:1-9

影山智津子・市川 健・太田光輝・増井弘子・芹沢拙夫・伏見典晃・神尾

章子・岩波 徹 (2011) 温州萎縮ウイルス (SDV) 汚染圃場におけ

る土壌消毒の効果と台木の耐病性. 静岡農林技研報 4:61-66

片木新作・牛山欽司 (1990) 温州萎縮病に関する研究 (第3報) 土壤

伝染の実態と土壤遮断及び土壤消毒による感染防止効果. 神奈

川園試研報 40:11-18

加藤光弘・影山智津子・石井香奈子・上西啓資・藤田絢香・草野成夫・

野口真弓・岩波徹 (2014) イムノクロマト診断キットによる温州萎縮ウ

イルスの周年検定. 日植病報 80(2):222-228

<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.80.222>

Kato M, Tomimura K, Ishii K (2020) Comparison of an

Immunochromatographic Assay Kit with DAS-ELISA for Large-

Scale Diagnosis and Molecular Discrimination of Satsuma Dwarf

Virus Collected from Citrus Orchards. Plant Pathol J 36:509-

514 <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.06.2020.0096>

Kusano N, Hirashima K, Kuwahara M, Narahara K, Imamura T, Mimori

T, Nakahira K, Torii K (2007) Immunochromatographic assay for

simple and rapid detection of Satsuma dwarf virus and related viruses using monoclonal antibodies. J Gen Plant Pathol 73:66-71 <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0316-6>

前 博視 (1986) 温州萎縮病のまん延に及ぼす防風垣用サンゴジュの影響. 三重県農技セ研報 14: 45-50

Miyakawa T, Yamaguchi A (1981) Citrus diseases in Japan. Jpn Plant Protection Association Tokyo, Japan

清水伸一・伊藤隆男・三好孝典・橘 泰宣・池上正人 (2005) 愛媛県内のカンキツから検出されたネーブル斑葉モザイクウイルス(NIMV)の新分離株. 日植病報 71:76-77 (講要)

<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.71.52>

富村健太・中嶋香織・市ノ木山浩道・野口真弓・加藤光弘・岩波 徹 (2013) 本邦における温州萎縮ウイルスの系統分布. 日植病報 79:210 (講要) <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.79.159>

牛山 欽司・大垣 智昭 (1970) 温州萎縮病に関する研究 (第 1 報) 神奈

川県における発生状況と被害の実態. 神奈川園試研報 18:57-65

宇杉 富雄・山本省 二・土崎 常男 (1986) 温州ミカンにモザイク病を起こす

Citrus Mosaic Virus の形態, 宿主範囲, 血清関係について. 日

植病報 52:349-354 <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.52.349>

山田 峻一・沢村 健三 (1952) 温州蜜柑の萎縮病に関する研究予報. 東

近農試研報・園芸 1:61-71

Yamada S, Tanaka H (1968) Virus diseases of the Citrus and

researches conducted on them in Japan. Jpn Agri Res Quarterly

3:10-14

Yamamoto S, Yamaguchi A (1980) Spread of citrus mosaic through

distribution of a new clone of satsuma mandarin. Int Organ

Citrus Virol Conf Proc 8:230-231

<https://doi.org/10.5070/C59731f1vx>

Yan J, Zhang S, Wu J, Yang F, Zhou Y, Zhou C, Cao M (2021)

Complete genome sequences and recombination analysis of three  
divergent Satsuma dwarf virus isolates. *Tropical Plant Pathology*  
46:26-30 <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00366-5>

## 第2章 ウンシュウミカンにおける茎頂接ぎ木による3種ウイロイドの効率的無毒化法

家城洋之・山田駿一 (1984) 熱処理によるカンキツトリステザウイルス、温州

委縮ウイルス及びタターリーフウイルスの無毒化. 果樹試報

B.11:71-87

Ito T, Ieki H, Ozaki K, Ito T (2001) Characterization of a new citrus

viroid species tentatively termed Citrus viroid OS. *Arch Virol*

146:975-982 <https://doi.org/10.1007/s007050170129>

Ito T, Ieki H, Ozaki K (2002a) Simultaneous detection of six citrus

viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by

multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. J

Virolog Methods 106:235-239 [https://doi.org/10.1016/S0166-](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00147-7)

[0934\(02\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00147-7)

Ito T, Ieki H, Ozaki K, Iwanami T, Nakahara K, Hataya T, Ito T,

Isaka M, Kano T (2002b) Multiple citrus viroids in citrus from

Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in

citron. Phytopathology 92:542-547

Ito T, Namba N, Ito T (2003) Distribution of citrus viroids and Apple

stem grooving virus on citrus trees in Japan using multiplex

reverse transcription polymerase chain reaction. J Gen Plant

Pathol 69:205-207 <https://doi.org/10.1007/s10327-002-0036-5>

Ito T, Ohta S (2010) First report of Citrus viroid V in Japan. J Gen

Plant Pathol 76:348-350 [https://doi.org/10.1007/s10327-010-](https://doi.org/10.1007/s10327-010-0254-1)

[0254-1](https://doi.org/10.1007/s10327-010-0254-1)



Kapari-Isaia, T, Voloudakis A E, Kyriakou A, Ioannides I, Papayiannis

L, Samouel S, Koutsoumari E M, Georgiou A, Minas G (2009)

Sanitation of citrus varieties and/or clones by in vitro

micrografting in Cyprus and Greece. *Acta Horti* 892:279-285

<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.892.33>

Koizumi M (1984) Elimination of tater leaf-citrange stunt virus from

Satsuma mandarin by shoot-tip grafting following pre-heat-

treatment. *Proc 9th IOCV* 229-233

草野成夫・井樋昭宏・栗原 実 (2005) カラタチ台温州ミカン「原口早

生」で確認されたカンキツエクソコー ティスウイロイド以外のウイロイド

による複合感染と樹体への影響. *九州病虫研報* 51:25-29

Lozoya-Saldana H, Dawson W O (1982) Effect of alter-

temperature regimes on reduction or elimination of viruses in

plant tissue. *Phytopathology* 72:1059-1064

Morris T J, Smith E M (1977) Potato spindle tuber disease:

procedures for the detection of viroid RNA and certification of  
disease-free potato tubers. *Phytopathology* 67:145-150

Navarro L, Roistacher C N, Murashige T (1975) Improvement of

shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *J Amer Soc Hort  
Sci* 100:471-479 <https://doi.org/10.21273/JASHS.100.5.471>

Vernière C, Perrier X, Dubois C, Dubois A, Botella L, Chabrier C,

Bové J M, Duran Vila N (2004) Citrus viroids: Symptom

expression and effect on vegetative growth and yield of

clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Plant Dis* 88:1189-

1197 <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.11.1189>

Vernière C, Perrier X, Dubois C, Dubois A, Botella L, Chabrier C,

Bové J M, Duran Vila N (2006) Interactions between citrus

viroids affect symptom expression and field performance of

Clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Phytopathology*

96:356-368 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0356>

### 第3章 三重県におけるトマト葉かび病菌の SDHI 剤に対する感受性

Enya J, Ikeda K, Takeuchi T, Horikoshi N, Higashi T, Sakai T, Iida Y,

Nishi K, Kubota M (2009) The first occurrence of leaf mold of tomato caused by races 4.9 and 4.9.11 of *Passalora fulva* (syn.

*Fulvia fulva*) in Japan. *J Gen Plant Pathol* 75:76-79

<https://doi.org/10.1007/s10327-008-0134-0>

FRAC (2020) 殺菌剤の作用機構分類一覧表 (2020.07.07)

URL:[https://www.jcpa.or.jp/labo/pdf/2020/mechanism\\_frac.pdf](https://www.jcpa.or.jp/labo/pdf/2020/mechanism_frac.pdf)

(2020年12月アクセス)

石井英夫 (2012) QoI 剤および SDHI 剤耐性菌の現状と薬剤使用ガイド

ライン. *植物防疫* 66:481-487

川上 拓・鈴木啓史・中嶋香織・磯崎真英・黒田克利 (2019) トマト栽培

圃場における灰色かび病菌の主要殺菌剤に対する耐性菌の発生動

向. 関西病虫研報 61:15-22

<https://doi.org/10.4165/kapps.61.15>

Miyamoto T, Ishii H, Seko T, Kobori M, Tomita Y (2009) Occurrence

of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on

cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. Plant Pathol. 58: 1144-

1151 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x>

Miyamoto T, Ishii H, Tomita Y (2010) Occurrence of boscalid

resistance in cucumber powdery mildew in Japan and molecular

characterization of the iron-sulfur protein of succinate

dehydrogenase of the causal fungus. J Gen Plant Pathol 76:261-

267 <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0248-z>

日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会（2012）野菜・果樹・茶におけ

る QoI 剤及び SDHI 剤使用ガイドライン URL:

[http://www.taiseikin.jp/mwbhphp/wp-content/uploads/03\\_野](http://www.taiseikin.jp/mwbhphp/wp-content/uploads/03_野)

菜・果樹・茶における QoI 剤及び SDHI 剤使用ガイドライン 2018 タ

マネギ追加).pdf (2020 年 12 月アクセス)

農林水産省（2016）発生予察事業の調査実施基準

URL:[http://www.jppn.ne.jp/jpp/bouteq/yosatu\\_data/6\\_tomato\\_et](http://www.jppn.ne.jp/jpp/bouteq/yosatu_data/6_tomato_et)

c.pdf (2020 年 12 月アクセス)

岡田知之・下元祥史（2016）ボスカリド耐性ナスすすかび病菌の発生と

PCR-RFLP による検出. 日植病報 82:87-92

<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.82.87>

R Core Team (2020) URL: <http://www.R-project.org/> (2020 年 12 月

アクセス)

櫻井誠也・萩原寛之・柳瀬勇次 (2011) ペンチオピラドの作用性と各種病

原菌に対する感受性検定の検討. 農薬誌 36:520-523

<https://doi.org/10.1584/jpestics.W11-36>

佐竹諒子・平井献士・渡辺秀樹・藤村 真 (2019) トマト葉かび病菌の 2

種類の Sdh C 変異 (T781, N85K) と各種 SDHI 殺菌剤感受性. 糸

状菌分子生物学コンファレンス 19:89 (講要)

鈴木啓史・田口裕美・黒田克利 (2012) ボスカリド感受性の低下した灰色

かび病菌の YBA 寒天培地ペーパーディスク法による検出. 日植病

報 78:56 (講要) <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.78.33>

渡辺秀樹 (2017) 植物防疫基礎講座 植物病原菌の薬剤感受性検定マ

ニュアル 2016 (13) トマト葉かび病-QoI 剤・ベンゾイミダゾール剤・ジ

エトフェンカルブ剤・SDHI 剤・DMI 剤-. 植物防疫 71:35-44

渡辺秀樹・足立昌俊・堀之内勇人・清水 薫・桑原圭司 (2013) トマト葉

かび病菌における SDHI 剤耐性菌の発生. 日植病報 79:199 (講

要) <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.79.159>

#### 第4章 *Pythium myriotylum* による黒ウコン立枯病(新称)

桂 琦一・谷岡義春 (1967) *Pythium* によっておこるショウガおよびミョウガ

の根茎腐敗病. 関西病虫研報 9:49-55

[https://doi.org/10.4165/kapps1958.9.0\\_49](https://doi.org/10.4165/kapps1958.9.0_49)

小林 証樹 (2014) 黒ショウガの栽培方法. 特許第 5501335 号

Morita Y, Tojo M (2007) Modifications of PARP medium using

fluazinam, miconazole, and nystatin for detection of *Pythium*

spp. in soil. Plant Dis 91:1591-1599

<https://doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1591>

小野 剛・鍵和田聡・星 秀男・堀江博道 (2011) *Pythium myriotylum* に  
よるキョウオウ立枯病(新称)の発生. 関東病虫研報 58:61-62  
<https://doi.org/10.11337/ktpps.2011.61>

Robideau G P, De Cock A W, Coffey M D, Voglmayr H, Brouwer H,  
Bala K, Chitty D W, Désaulniers N, Eggertson Q A, Gachon C  
M, Hu C H, Küpper F C, Rintoul T L, Sarhan E, Verstappen E  
C, Zhang Y, Bonants P J, Ristaino J B, Lévesque C A (2011)  
DNA barcoding of oomycetes with cytochrome *c* oxidase subunit  
I and internal transcribed spacer. Mol Ecol Resour 11:1002-  
1011 <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>

鈴木幹彦・景山幸二・外側正之・内山 徹 (2008) *Pythium myriotylum* に  
よるクルクマ立枯病(新称). 日植病報 74:178(講要)



高橋 實 (1954) 農作物の疾病を基因する数種 *Pythium* 属菌の形態並

に分類に就いて農作物の疾病を基因する数種 *Pythium* 属菌の形態

並びに分類に就いて. 日植病報 18:113-116

東條元昭 (2004) 植物防疫基礎講座土壌病害の見分け方(11) ピシウム

菌による病害. 植物防疫 58(3):120-126

Van der Plaats-Niterink A J (1981) Monograph of the genus *Pythium*.

Stud Mycol 21:1-241

Waterhouse G M (1967) Key to *Pythium* Pringsheim. Mycol Pap 109:1-

15

White T J, Bruns T D, Lee S B, Taylor J W (1990) Amplification and

direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for

phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and

applications (Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J,

eds.). pp.315-322 Academic Press San Diego California

## 第 5 章 三重県におけるムギ類赤かび病のチオファネートメチル耐性菌の発生推移

Albertini C, Gredt M, Leroux P (1999) Mutations of the  $\beta$ -tubulin

gene associated with different phenotypes of benzimidazole

resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and

*Tapesia acuformis*. Pestic Biochem Physiol 64:17-31

<https://doi.org/10.1006/pest.1999.2406>

Chen C J, Yu J J, Bi C W, Zhang Y N, Xu J Q, Wang J X, Zhou M G

(2009) Mutations in a  $\beta$ -tubulin confer resistance of *Gibberella*

*zeae* to benzimidazole fungicides. Phytopathology 99:1403-1411.

<https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1403>

Chen Y, Yang X, Gu C Y, Zhang A F, Gao T C, Zhou M G (2015)

Genotypes and phenotypic characterization of field *Fusarium*

*asiaticum* isolates resistant to carbendazim in Anhui Province of

China. *Plant Dis* 99:342-346. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0381-RE>

Chung W H, Ishii H, Nishimura K, Ohshima M, Iwama T, Yoshimatsu H (2008) Genetic analysis and PCR-based identification of major *Fusarium* species causing head blight on wheat in Japan. *J Gen Plant Pathol* 74:364-374 <https://doi.org/10.1007/s10327-008-0110-8>

Darriba D, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B, Flouri T (2020) ModelTest-NG: A new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol Biol Evol* 37:291-294 <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>

Davidse L C (1973) Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. *Pestic Biochem*

Physiol 3:317-25 [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(73\)90030-](https://doi.org/10.1016/0048-3575(73)90030-)

8

Dill-Macky R, Jones R K (2000) The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. Plant Dis 84:71-76  
<https://doi.org/10.1094/pdis.2000.84.1.71>

Duan Y, Zhang X, Ge C, Wang Y, Cao J, Jia X, Wang J (2014) Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. Sci Rep 4:7094 <https://doi.org/10.1038/srep07094>

Fernando W G, Paulitz T C, Seaman W L, Dutilleul P, Miller J D (1997) Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots. Phytopathology 87:414-421 <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.4.414>

Iwama T, Katsube K, Ishii H (2007) Detection of thiophanate-methyl-resistant isolates of *Fusarium culmorum*, a causal agent of *Fusarium* head blight on wheat, in Aomori prefecture, northern Japan. J Jour Phytopathol 73:162-165  
<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.73.162>

Koenraad H, Somerville S C, Jones A L (1992) Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. Phytopathology 82:1348-1354 <https://doi.org/10.1094/Phytopathology.82-1348>

Koizumi S, Kato H, Yoshino R, Komada H, Ichinoe M, Umehara Y, Hayashi N (1993) Studies on the pathogens and epidemiology of wheat and barley scab (in Japanese). Bull Natl Agric Res Cent 23:1-104

Komada H (1975) Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev Plant Prot Res (Tokyo) 8: 114-124

Komura R, Kawakami T, Nakajima K, Suzuki H, Nakashima C (2018) Simultaneous detection of benzimidazole-resistant strains of *Fusarium* head blight using the loop-mediated isothermal amplification-fluorescent loop primer method. J Gen Plant Pathol 84:247-253 <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0788-1>

Kozlov A M, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A (2019) RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. Bioinformatics 35:4453-4455 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing

platforms. Mol Biol Evol 35:1547-1549

<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Kuroda K, Suzuki H (2009) Occurrence of *Fusarium graminearum*

isolates resistant to thiophanate-methyl on wheat in Mie

Prefecture (in Japanese). Ann Rept Kansai Pl Prot 51:37-38

<http://doi.org/10.4165/kapps.51.37>

Liu S, Fu L, Wang S, Chen J, Jiang J, Che Z, Tian Y, Chen G (2019)

Carbedazim resistance of *Fusarium graminearum* from Henan

wheat. Plant Dis 103:2536-2540 <https://doi.org/10.1094/PDIS->

[02-19-0391-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0391-RE)

Liu X, Yin Y, Wu J, Jiang J, Ma Z (2010) Identification and

characterization of carbendazim-resistant isolates of *Gibberella*

*zeae*. Plant Dis 94:1137-1142 <https://doi.org/10.1094/PDIS->

[94-9-1137](https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1137)

Ma Z, Michailides T J (2005) Advances in understanding molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot* 24:853-863  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>

Ma Z, Yoshimura MA, Michailides TJ (2003) Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Appl Environ Microbiol* 69:7145-7152  
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7145-7152.2003>

Maymon M, Zveibil A, Pivonia S, Minz D, Freeman S (2006) Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statics (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96:542-548  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0542>



McMullen M, Bergstrom G, De Wolf E, Dill-Macky R, Hershman D,

Shaner G, van Sanford D (2012) A unified effort to fight an

enemy of wheat and barley: *Fusarium* Head Blight. Plant Dis

96:1712-1728 <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE>

Nakashima C, Motohashi K, Chen C Y, Groenewald J Z, Crous P W

(2016) Species diversity of *Pseudocercospora* from far east Asia.

Mycol Progr 15:1093-1117 <https://doi.org/10.1007/s11557->

[016-1231-7](https://doi.org/10.1007/s11557-016-1231-7)

Nishikado Y (1958) Studies on the control of wheat scab (in Japanese

with English summary). Nougyo Kairyo Gijutsu Siryo 97: 1-162

O'Donnell K, Kistler H C, Tacke B K, Casper H H (2000) Gene

genealogies reveal global phylogeographic structure and

reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*,

the fungus causing wheat scab. Proc Natl Acad Sci 97:7905-7910

<https://doi.org/10.1073/pnas.130193297>

O'Donnell K, Ward T J, Geiser D M, Kistler H C and Aoki T (2004)

Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal Genet Biol 41:600-623

<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.03.003>

Ohsaki M, Tomimura K, Urano S, Yoshida M, Nakajima T (2009)

Spatiotemporal distribution of diseased heads with *Fusarium* head blight in naturally infested wheat fields (in Japanese with English summary). Jpn J Phytopathol 75:307-313

<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.75.307>

Sevastos A, Markoglou A, Labrou N E, Flouri F, Malandrakis A (2016)

Molecular characterization, fitness and mycotoxin production of

*Fusarium graminearum* laboratory strains resistant to

benzimidazoles. Pestic Biochem Physiol 128:1-9

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.10.004>

Shaner G E (2003) Epidemiology of Fusarium head blight of small grain

cereals in North America. In: Leonard K J, Bushnell W R(eds)

Fusarium head blight of wheat and barley. APS, St. Paul, MN.

pp84-119 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032>

Steenkamp E T, Wingfield B D, Coutinho T A, Wingfield M J, Marasas

E F (1999) Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by

histone gene sequence data. Appl Environ Microbiol 65: 3401-

3406 <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3401-3406.1999>

Suga H, Hayashi M, Kushiro M, Miyano N, Inoue H, Nakajima K,  
Kawakami T, Tonooka T, Nakajima T, Shimizu M, Kageyama K  
(2022) A novel medium for isolating two Japanese species in the  
*Fusarium graminearum* species complex and a dipstick DNA  
chromatography assay for species identification and  
Trichothecene typing. J Fungi (Basel) 8  
<https://doi.org/10.3390/jof8101048>

Suga H, Karugia GW, Ward T, Gale L R, Tomimura K, Nakajima T,  
Miyasaka A, Koizumi S, Kageyama K, Hyakumachi M (2008)  
Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species  
complex in Japan. Phytopathology 98:159–166  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-2-0159>

Suga H, Nakajima T, Kageyama K, Hyakumachi M (2011) The genetic  
profile and molecular diagnosis of thiophanate-methyl resistant

strains of *Fusarium asiaticum* in Japan. *Fungal Biol* 115:1244-1250 <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.08.009>

Sutton J C (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can J of Plant Pathol* 4:195-209 <https://doi.org/10.1080/07060668209501326>

Takasaki T, Yoshimura D, Otofujii M (1982) Forecasting of wheat scab disease by climatic condition (in Japanese). *Proc Assoc Pl Prot Kyushu* 28:22-24

Ueda A, Nishimoto H, Kato N, Hirano T, Fukaya M (2007) Lineages and trichothecene mycotoxin types of *Fusarium* head blight pathogens of wheat and barley in Tokai district. *Res Bull Aichi Agric Res Ctr* 39:17-23

Ueda S (1995) Studies on prediction of the occurrence and control of wheat and barley scab, and on the protection of the

contamination by mycotoxin (in Japanese with English summary).

Bull Ehime Agric Exp Stn 33:1-54

Yarden O, Katan T (1993) Mutations leading to substitutions at amino

acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*.

Phytopathology 83:1478-1483 [https://doi.org/10.1094/Phyto-](https://doi.org/10.1094/Phyto-83-1478)

[83-1478](https://doi.org/10.1094/Phyto-83-1478)

Yoshimatsu H, Tomimura K, Ishii H, Ookubo H, Nakajima T, Hasama

W (2006) Occurrence of resistant strains of *Fusarium*

*graminearum* and baseline sensitivity of *F. avenaceum* to

thiophanate-methyl (in Japanese with English summary). J Jour

Phytopathol 72:32

Zhou M G, Jia X J (2015) Wheat pathogens in China. In: Ishii H,

Hollomon DW (eds) Fungicide resistance in plant pathogens:

Principles and a guide to practical management. Springer,

Tokyo, pp 313-328 [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_19)

8\_19

## 公表論文目録

中嶋香織・市ノ木山浩道・長岡(中菌)栄子・岩波 徹 (2017) ウンシュウミ

カンにおける茎頂接ぎ木による 3 種ウイロイドの効率的無毒化法. 園

学研 16:339-344 <https://doi.org/10.2503/hrj.16.339> (第 2 章に

記載)

中嶋香織・川上 拓・黒田克利・大坪佳代子・景山幸二 (2020) *Pythium*

*myriotylum* による黒ウコン立枯病(新称). 日植病報 86:154-156

<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.86.154>

中嶋香織・川上 拓・鈴木啓史・黒田克利 (2021) 三重県におけるトマト

葉かび病菌の SDHI 剤に対する感受性. 関西病虫研報 63:67-73

<https://doi.org/10.4165/kapps.63.67> (第 3 章に記載)