

トルコギキョウ斑点病の特異的プライマーを用いたPCR法による検出と 育苗期における伝染源の解明

成山秀樹*・菊原賢次

本試験では、育苗期におけるトルコギキョウ斑点病 (*Pseudocercospora nepheloides*) の伝染源を明らかにするため、種子伝染の可能性および育苗施設内の生産資材の汚染実態について検討した。種子から斑点病菌を検出するためにITS領域の70bpの配列を増幅する種特異的プライマーを用いたPCR法を開発した。本法による検定を実施した結果、発病株由来の種子から斑点病菌を検出した。さらに、同種子および斑点病菌の分生胞子を粉衣した種子について、播種後の幼苗の発病状況を調査した。その結果、いずれも幼苗に発病を認めた。また、生産資材表面の付着物をセロハンテープにより回収し、光学顕微鏡で観察し、分生胞子の付着状況とその発芽率について調査した。その結果、セルトレイ、エキスパンドメタル、エアコンに分生胞子の付着を認め、発芽能力を有する分生胞子も認められた。以上のことから、トルコギキョウ斑点病は種子およびセルトレイ等の育苗施設の資材を介して伝染することが示唆された。

[キーワード：分生胞子、伝染源、PCR、生産資材、種子、トルコギキョウ斑点病]

Investigation of *Pseudocercospora nepheloides* Contamination Sources in a Plant Nursery Facility using PCR. NARIYAMA Hideki and Kenji KIKUHARA (Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. For. Res. Cent.* 9: 8-13 (2023)

We investigated the theory that contaminated seeds and materials in a plant nursery facility during seedling rearing can act as infection sources of *Pseudocercospora nepheloides*. A PCR method using specific primers established to detect the pathogen. PCR tests allowed the detection of the pathogen in the seeds harvested from diseased plant cultivars. The aforementioned diseased seeds as well as seeds artificially infected with *P. nepheloides* spores were resulting in the emergence of seedlings bearing the typical disease symptoms. Adherence and potential germination of spores on the nursing materials in the facility was investigated. Results revealed that spores could germinate on some planting materials such as cell trays. Overall results obtained from the present study suggest that contaminated seeds and materials in plant nursery facilities can act as *P. nepheloides* infection sources.

[Key words: gardening materials, infection sources, PCR, *Pseudocercospora nepheloides*, seeds, spores]

緒言

トルコギキョウ斑点病（以下、斑点病）は *Pseudocercospora nepheloides* によって引き起こされる糸状菌性の病害であり (Braun *et al.* 2009)、トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) の葉に黒褐色や灰褐色のすす状の斑紋を形成し (石井ら 2011)、商品価値を大きく低下させる。

日本国内において、本病は2008年に福岡県の育苗中の苗で初めて確認された (石井ら 2011)。その後2015年頃から九州各県で一斉に発生し、2022年5月時点で東北から沖縄までの24県から特殊報が発出されている (例：福岡県 2017、岐阜県 2022)。現在、福岡県では育苗期から本圃に至るまで本病が発生している。しかし、本病は2015年頃まで国内での発生が限定的であったため、発生病態や防除技術に関する報告が少なく、防除対策が確立されていない。

伝染源の解明は防除対策を確立する上で重要である。除去した発病株を圃場周辺に放置している圃場では発病しやすい (石井 未発表) ことから、発病残渣が伝染源となっ

ている可能性がある。一方、発病残渣の影響の小さい育苗施設内においても発病しており、汚染種子や斑点病菌が付着した生産資材 (以下資材) が伝染源になっている可能性が考えられる。斑点病菌と近縁のダイズ斑点病菌 (*Cercospora sojina* Hara) では、播種24~27日後の植物体の発病により、種子の汚染が確認できる (堀田ら 1993)。しかし、トルコギキョウは播種から発芽まで約2カ月を要し、播種試験での確認には時間を要する。また、稲こじ病では自然条件での種子伝染による発病はかなり低率であり、試験規模が小さい場合は発病株から採種した種子を播種しても発病しない場合がある (辻 2001)。一方、アブラナ科野菜に種子伝染する黒斑細菌病菌 (*Pseudomonas cinnabina* pv. *alisalensis*, *P. syringae* pv. *maculicola*) は、PCR法によりわずかな汚染程度の種子から迅速に検出可能であり (Inoue・Takikawa 2021)、斑点病菌においても同様の検定法の確立が望まれる。そこで本試験では、これまで報告されていない斑点病菌の種特異的プライマーの設計を試みた。次に、育苗期における種子伝染の可能性について、PCR検定及び播種試験により検討した。

また、成山・石井 (2020) は、本圃の資材から発芽可能な分生胞子を検出し、これらが次作での伝染源になっている可能性について報告しており、育苗施設においても資材が伝染源となっている可能性が考えられる。そこで、育苗施設の資材における分生胞子の付着状況と発芽の可否についても調査した。

材料および方法

1 種特異的プライマーの設計と PCR 法による斑点病菌の検出

(1) 斑点病菌の ITS 領域の塩基配列の決定

プライマーの設計は、杉村 (2001)、矢野 (2016) の方法を参考に行った。福岡県香春町、久留米市、福津市の生産者圃場の発病株から 1 菌株ずつ、宮若市の生産者圃場の 2 品種の発病株から 1 菌株ずつ、計 5 菌株を常法により分離した。PDA 培地上で 21 日間培養した 5 菌株の菌叢から MagExtractor®-Plant Genome- (TOYOBO CO., LTD.) により全 DNA を抽出した。

全 DNA 抽出後、White ら (1990) の方法に準じて ITS4 と ITS5 のプライマーセットで PCR を実施し、rDNA の ITS 領域を増幅した。PCR 反応には AmpliTaq Gold 360Master Mix (Thermo Fisher SCIENTIFIC K.K.) を使用し、全反応液を 20 μ l に調製した。DNA の増幅にはサーマルサイクラー T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いた。増幅条件は 95 $^{\circ}$ C 5 分、(95 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分) \times 35 回、72 $^{\circ}$ C 7 分で行った。この PCR 産物のダイレクトシーケンシング解析を eurofins Genomics 株式会社に委託し、斑点病菌の rDNA の ITS 領域の塩基配列を決定した (第 1 図)。

(2) プライマーの設計と検証

5 菌株の ITS 領域の塩基配列と、米国国立生物工学情報センター GenBank のデータベース上で公開されている斑点病菌および斑点病菌以外の 5 種類の *Pseudocercospora* 属菌 [① *P. cydoniae* (Accession: MH877505), ② *P. acericola* (Accession: GU269650), ③ *P. marginalis* (Accession: MH865905), ④ *P. flavomarginata* (Accession: MH863876), ⑤ *P. fuliginea* (Accession: GU060636)] の ITS 領域とを比較し、プライマー設計用ソフト「Primer3 Plus」(Slashdot Media, LLC) を用いて斑点病菌に特異的な ITS 領域の塩基配列を増幅する種特異的プライマーの候補を 15 種類設計した。なお、①~④は斑点病菌と類縁とされる菌 (Crous *et al.* 2012) であり、⑤は福岡県内で一般的に見られるトマトすすかび病菌である。

次に香春町、久留米市、福津市の圃場から分離された斑点病菌 3 菌株と、同病菌以外の 4 菌株を用いて、設計したプライマー候補の検証を行った。PCR 条件については「(1) 斑点病菌の ITS 領域の塩基配列の決定」に準じた。斑点病菌以外の 4 菌株は、*Pseudocercospora* 属の植物病原菌として *P. fuliginea* (トマトすすかび病菌)、*P. timorensis* (サツマイモ角斑病菌)、トルコギキョウ炭疽病菌および立枯病菌と同属・種の菌である

Colletotrichum acutatum (イチゴ炭疽病菌) および *Fusarium oxysporum* (イチゴ萎黄病菌) を用いた。*P. fuliginea* (MAFF:306727) と *P. timorensis* (MAFF:237873) は農業生物資源ジーンバンクから購入し、*C. acutatum* と *F. oxysporum* は、福岡県八女市現地圃場のイチゴの発病株から分離した。

2 汚染種子からの種特異的プライマーを用いた PCR 法による検出

(1) 種子の由来

試験には条件の異なる 4 種類の種子 (発病株種子、市販種子、健全株種子、健全株種子に斑点病菌分生胞子を接種した種子) を用いた。

発病株種子は、発病葉率 40~70%、発病度 15~35 の多発生の「ハピネスホワイト」を用い、2019 年 8 月 2~16 日に交配して得られた自家採種種子である。交配時には同株の病斑から採取した分生胞子を筆で雌しべに粉衣した。2019 年 11 月 8 日~2020 年 2 月 21 日に採種し、風乾させた後パラフィン紙に包み、プラスチックシャーレに入れパラフィルムで密封し、5 $^{\circ}$ C 冷蔵庫内に保存した。市販種子は 2018 年に購入した「ハピネスホワイト」を供試した。健全株種子への斑点病菌の接種は、福岡県農林業総合試験場内圃場の本病発病株の病斑から採取した分生胞子を筆で種子表面に粉衣した。健全株種子は、発病株種子と同時期に無病徴の株を交配して得られた自家採種種子である。発病株種子と同時期に採種し、同様に保管した。

(2) PCR 法による検定

検定は 2020 年に実施した。発病株種子、市販種子、健全株種子、健全株種子に分生胞子を粉衣した種子の粉砕物や発病株種子の洗浄液から、PCR による斑点病菌の検出を試みた。発病株種子、健全株種子、健全株種子に分生胞子を粉衣した種子は 300 粒を、市販種子は 50 粒を 2mL マイクロチューブに 3mm 径ビーズとともに入れ、自動粉砕機 MM 300 (Verder Scientific GmbH&Co. KG) を用いて粉砕した。また、発病株種子の洗浄液は、別途 300 粒を 1.5mL マイクロチューブに入れ、0.05% ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート 50 μ l を添加し、オートマティックミキサー S-100 (タイテック株式会社) で 10 秒間振とう後種子を取り除いて調製した。各種子粉砕物と洗浄液については、ITS 領域の塩基配列の決定に用いた方法により DNA を抽出し、PCR 法により検定した。

3 汚染種子による幼苗への伝染

(1) 種子の由来

試験には、条件の異なる 4 種類の種子 (発病株種子、市販種子、市販種子に斑点病菌分生胞子を粉衣した種子、健全株種子) を用いた。発病株種子と健全株種子は、「2 汚染種子からの種特異的プライマーを用いた PCR 法による検出」に用いた 2019 年交配種子に加え、2018 年 8 月 24~28 日に交配して採種した種子を用いた。試験は 2019 年および 2020 年に実施し、2018 年に交配した種子を 2019 年に、2019 年に交配した種子を 2020 年に用いた。市販種子への本菌の接種方法は、PCR 法による検出と同様に分生

胞子を筆で種子表面に粉衣した。

(2) 育苗条件

試験は2019年および2020年に実施した。発病株種子と健全株種子は、2019年試験には2018年に交配した種子を、2020年試験には2019年に交配した種子を用いた。

2019年試験は、2018年12月27日および2019年2月6日に200穴セルトレイ(2cm×2cm穴)に播種した。本葉2葉期に発病株種子および健全株種子は96株、市販種子は60株を、72穴セルトレイ(3.5cm×3.5cm穴)に植え替えた。2020年試験は、2020年4月8日および30日に72穴セルトレイに1粒/穴ずつ、発病株種子および健全株種子は約150粒、市販種子は60粒播種した。育苗は、いずれも福岡県農林業総合試験場の幅5.8m×長さ12.7m×高さ3.3mの加温ガラス室内で行い、コンタミネーションを避けるため、室内の四隅に配置した。施肥は、本葉展葉から約10日間隔で、液肥(N:P₂O₅:K₂O=6:10:5)500倍をハンドスプレーで散布した。

(3) 発病調査

2018年12月27日播種および2019年2月6日播種の苗は、ともに2019年5月17日に発病状況を調査した。2020年4月8日播種の苗は6月15日に、2020年4月30日播種の苗は6月17日に発病状況を調査した。調査時の苗はいずれも本葉4~8葉で、葉に病斑が確認された株を発病株とし、発病株率を算出した。

4 育苗施設内資材の汚染

福岡県福津市および久留米市のトルコギキョウ生産者の育苗施設を対象とし、資材上の分生孢子付着状況およびその発芽能力を調査した。2017年から発生が確認されている福津市の施設および2016年から発生が確認されている久留米市の施設において、それぞれ2019年8月29日と9月9日に調査した。なお、調査時の苗は両施設とも本葉2~4葉期、斑点病の発生状況は、福津市の施設が多発生、久留米市の施設が少発生であった。施設内の冷房用エアコン内プラスチック製フィルター(以下エアコンフィルター)、冷房用エアコン吹き出し口下の金属パネル表面(以下エアコン表面)、育苗架台のエキスパンドメタル(以下エキスパンドメタル)、育苗用セルトレイ側面(以下セルトレイ)の4種類の資材を調査対象とした。

エアコンフィルターは40箇所、その他の資材は1資材につき20箇所について、1.5cm×2.5cmのセロハンテープの粘着面を付着させ、分生孢子を採取した。次に、セロハンテープの粘着面をスライドグラス上に垂らした水滴の上に乗せ、25℃で2~3日間静置した後、光学顕微鏡で分生孢子的の有無とその発芽状況を調査した。

結果

1 種特異的プライマーの設計とPCR法による斑点病菌の検出

斑点病菌を特異的に検出するプライマーとして、上流プライマー-PNF(AATTCGCTTCGGAGTGCTGA)、下流プライマー-PNR(CTACCTGATCCGAGGTCAACC)を選定した。本プライマーに

よるPCR反応は、斑点病菌のrDNA-ITS領域のうち、5'末端から430~499番目の70bpの塩基配列を増幅する(第1図)。

斑点病菌および同病菌以外の菌に対し、設計したプライマーを用いてPCR法による検出を試みた結果、斑点病菌が特異的に検出されることを確認した(第2図、一部データ略)。



第1図 *Pseudocercospora nepheloides* の核 rDNA-ITS 領域の塩基配列

1) 矢印はプライマーの設定部位



第2図 設計したプライマーによる斑点病菌に特異的なDNAバンドの検出

1) M1, M2: Ladder Marker

1~3: 斑点病菌株(順に香春町、久留米市、福津市の圃場から採取)

4: トマトすすかび病菌

5: サツマイモ角斑病菌

6: イチゴ炭疽病菌

7: イチゴ萎黄病菌

8: DNA未添加

2 汚染種子からの種特異的プライマーを用いたPCR法による検出

トルコギキョウ種子に対する、種特異的プライマーを用いたPCR法による検定の結果を、第1表および第3図に示した。発病株種子の粉砕物および洗浄液、種子粉砕処理前に分生孢子を粉衣した健全株種子から、PCRで増幅され

た 70bp の斑点病菌の特異的バンドが検出された。分生胞子を粉衣しなかった市販種子および健全株種子からは特異的バンドは検出されなかった。

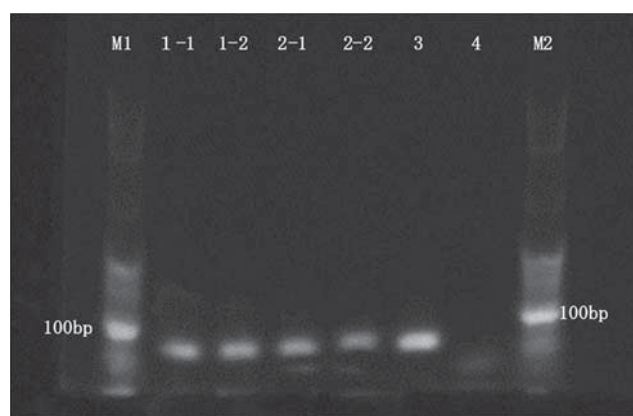
3 汚染種子による幼苗への伝染

播種した種子ごとの幼苗の発病状況を第 2 表に示した。発病株種子は、播種日により発病の有無があったが、採種年次が異なる種子で発病が認められた（発病株率 0～7.1%）。分生胞子を粉衣した市販種子は、高い確率で発病が認められた（発病株率 53.3, 80.0%）。粉衣しなかった市販種子および健全株種子では発病が認められなかった。

第 1 表 菌接種種子等の PCR 検定結果

| 検定種子の由来 及び処理条件 | PCR検定による 菌検出の有無 ⁵⁾ |
|--------------------------|----------------------------------|
| 発病株種子 ¹⁾ | + (粉砕物), + (洗浄液) ⁶⁾ |
| 市販種子 ²⁾ | - (粉砕物) |
| 健全株種子 ³⁾ | - (粉砕物) |
| 健全株種子+分生胞子 ⁴⁾ | + (粉砕物) |

- 1) 発病株を自家交配し、交配時に雌しべに分生胞子を粉衣して得られた種子
- 2) 市販の購入種子
- 3) 健全株を自家交配して得られた種子
- 4) 健全株種子表面に分生胞子を粉衣
- 5) PCR 検定は 2020 年に実施。複数回検定を行い、1 回でも特異的バンドが検出されれば+と判定
- 6) 「粉砕物」は種子粉砕物、「洗浄液」はマイクロチューブ中で種子とともに振とうした 0.05%ポリオキシエチレン (20)モノウラレート水溶液



第 3 図 PCR 検定による種子等からの特異的バンドの検出

- 1) M1, M2 : Ladder Marker
- 1-1, 2 : 発病株種子 (粉砕物)
- 2-1, 2 : 発病株種子 (洗浄液)
- 3 : 健全株種子+分生胞子 (粉砕物)
- 4 : 健全株種子 (粉砕物)

第 2 表 発病株から採種した種子、市販種子等の発病状況

| 種子の由来及び 処理条件 | 試験年次 | 播種日 | 発病調査 株数 | 発病株数 (率 (%)) |
|-------------------------|------|------------|------------|-----------------|
| 発病株種子 ¹⁾ | 2019 | 2018/12/27 | 96 | 2(2.0) |
| | " | 2019/2/6 | 96 | 0(0) |
| | 2020 | 2020/4/8 | 28 | 2(7.1) |
| | " | 2020/4/30 | 75 | 0(0) |
| 市販種子 ¹⁾ | 2019 | 2019/2/6 | 60 | 0(0) |
| | 2020 | 2020/4/8 | 60 | 0(0) |
| 市販種子+分生胞子 ¹⁾ | 2019 | 2019/2/6 | 60 | 32(53.3) |
| | 2020 | 2020/4/8 | 60 | 48(80.0) |
| 健全株種子 ¹⁾ | 2019 | 2019/2/6 | 96 | 0(0) |
| | 2020 | 2020/4/8 | 70 | 0(0) |
| | " | 2020/4/30 | 88 | 0(0) |

- 1) 発病株種子、市販種子、健全株種子の由来及び処理条件は第 1 表の通り
- 2) 市販種子+分生胞子は、市販の購入種子表面に、播種直前に分生胞子を粉衣

4 育苗施設内資材の汚染

育苗施設内資材の分生胞子付着状況と発芽状況を第 3 表に示した。育苗中の苗で斑点病が多発した福津市の育苗施設では、エアコン表面とエキスパンドメタルからは分生胞子を検出できなかったが、エアコンフィルターとセルトレイで発芽可能なものを含む分生胞子が認められた。特にセルトレイでは 18 箇所中 10 箇所に分生胞子の付着が認められ、発芽可能な分生胞子の付着も 4 箇所でも認められた。育苗中の苗で少発であった久留米市では、全ての資材で 1～2 箇所に分生胞子の付着が認められたが、発芽可能な分生胞子はセルトレイの 1 箇所であった。各資材から採取された分生胞子数は、セロハンテープの付着面 1 箇所当たり数個～200 個以上で、同一資材においても調査箇所によってばらつきが大きかった。

考 察

PCR 法に用いられる種特異的プライマーは、増幅効率や電気泳動後の DNA バンドの見やすさから数百 bp の塩基配列を増幅するものが多い。本試験で選定した種特異的プライマーは、増幅する塩基配列の長さが 70bp と短かったものの、3%アガロースゲルを用いた電気泳動により明瞭に DNA バンドが識別可能で、種特異的プライマーとして利用可能であった。

発病株由来の種子は、PCR 法による検定で粉砕物及び表面から斑点病菌が検出され、播種後発病した。また、市販種子に分生胞子を粉衣して播種すると、高率で発病した。堀田ら (1993) は、トルコギキョウ斑点病と類縁のダイズ斑点病 (*Cercospora sojina*) において、発病圃場から採種した、目視で種子の一部に病斑が認められる汚粒種子を播種した場合に、それぞれ 6.9, 10.3%の発病株率であったことを報告している。本試験における発病株種子の発病率も 0～7.1%と低かったが、種子に分生胞子が付着することで、種子伝染が起こると推察された。本試験で、発

第3表 各資材における分生胞子の付着状況および発芽状況

| 圃場場所 | 調査対象資材 | | | | 圃場の発病状況 (達観) | |
|------|------------------------|------------|------------|-----------|--------------|---------|
| | エアコンフィルター | エアコン表面 | エキスパンドメタル | セルトレイ | | |
| 福津市 | 分生胞子検出箇所数/調査箇所数(割合(%)) | 5/40(12.5) | 0/18(0) | 0/20(0) | 10/18(55.6) | |
| | 発芽分生胞子が検出された箇所の割合(%) | (2.5) | (0) | (0) | (22.2) | 多 |
| | 1箇所当たり採取された分生胞子数 | 0~50個 | 0 | 0 | 0~200個以上 | |
| 久留米市 | 分生胞子検出箇所数/調査箇所数(割合(%)) | 2/40(5.0) | 2/13(15.4) | 1/20(5.0) | 1/19(5.3) | |
| | 発芽分生胞子が検出された箇所の割合(%) | (0) | (0) | (0) | (5.3) | 少(局所発生) |
| | 1箇所当たり採取された分生胞子数 | 0~10個 | 0~100個 | 0~50個 | 0~100個 | |

1) 斑点病菌以外の糸状菌が多く、斑点病菌の分生胞子の判別が困難な箇所は調査箇所から除外

病株から採種した種子は斑点病菌が種子表面に付着していることは明らかとなったが、組織内への感染は明らかにできなかった。これらについては今後検討する必要がある。

福津市の育苗施設ではエアコンフィルターとセルトレイから、久留米市では調査した生産資材全てから分生胞子が採取された。特にセルトレイからは2箇所の施設ともに1.5cm×2.5cm当たり100個以上の分生胞子が採取された箇所があり、発芽可能な分生胞子が認められた。宮本ら(2007)は、キュウリ褐斑病についてハウス内資材が次作の伝染源になっていることを報告しており、発病施設内において、カーテンビニルやハウス鉄骨に付着させたセロハンテープからは1cm²当たり約5個の分生胞子を、植物体が接触する誘引用のワイヤーからは100~1,000個の分生胞子を検出している。本病についても、本圃のハウスビニルやパイプ、植物体が接触するフラワーネットにセロハンテープの付着面1箇所当たり3~数十個の分生胞子の付着が認められている(成山・石井2020)ことから、本圃だけでなく育苗施設においても、汚染された生産資材が次作の伝染源になっている可能性が高い。

本試験では、PCR法により斑点病菌を特異的に検出する手法を確立し、PCR法及び播種試験により、種子伝染の可能性を明らかにした。また、育苗施設内の資材の分生胞子の付着状況と発芽の可否により、汚染資材が伝染源となる可能性があることを明らかにした。PCR法は、汚染種子の検出以外に、潜在感染や疑似症状の判別など、様々な活用場面が期待できる。

斑点病は育苗時から発病リスクがあり、本圃における防除対策だけでは伝染環を断ち切ることはできない。本圃の防除対策に加え、育苗施設や採種圃においても、資材の汚染を防止するため育苗架台の薬剤消毒、セルトレイやエアコンフィルターの更新等の対策を行い、さらに種子への分生胞子付着を防ぐため、播種作業前の着替え、手洗い等の衛生管理を行い、総合的に防除対策を実施することが必要である。

謝辞

本研究を行うにあたり、試験圃場の選定および調査、供試菌株の収集等にご助力いただいた現地の生産者、北筑前、久留米および田川普及指導センター花き係の方々、および専門技術指導員の方々、プライマーの選定にご助力いた

いた前福岡県農林業総合試験場生産環境部和田卓也専門研究員にこの場を借りて御礼申し上げます。

引用文献

- Braun U, Farr DF, Minnis AM(2009) Nomenclatural notes on some cercosporoid hyphomycetes. *Schlechtendalia* 19: 81-84.
- Crous P W, Braun U, Hunter G C, Wingfield M J, Verkley G J M, Shin H D, Nakashima C, and Groenewald J Z(2012) Phylogenetic Lineages in *Pseudocercospora* Studies in Mycology. 75: 37-114.
- 福岡県(2017) 平成28年度病害虫発生予察特殊報第2号について。
<http://jppn.ne.jp/fukuoka/jyouhou/28/toku2.pdf> (2022年5月27日閲覧)。
- 岐阜県(2022) 令和3年度病害虫発生予察特殊報第3号。
http://web1.jppn.ne.jp/download/bbs/attach/22TOKU_2254_1.pdf (2022年5月27日閲覧)。
- Yasuhiro Inoue and Yuichi Takikawa(2021) Primers for specific detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *alisalensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105: 1575-1584.
- 堀田治邦・白井佳代・田中文夫(1993) ダイズ斑点病(病原菌 *Cercospora sojina* Hara) の種子伝染. 北日本病虫研報 44: 41-42.
- 石井貴明・浦広幸・宇都俊介(2011) *Pseudocercospora eustomatis* によるトルコギキョウ斑点病の発生. 日植病報 77(3): 205.
- 宮本拓也・富田恭範・神原幸雄・皆藤昌彦(2007) キュウリ褐斑病の発病と農業用資材および罹病残渣に存在する分生子との関係. 関東東山病虫研報 54: 9-12.
- 成山秀樹・石井貴明(2020) トルコギキョウ斑点病におけるハウス内資材の汚染状況と発病好適温度の検討. 福岡農林試研報 6: 5-9.
- 杉村輝彦(2001) イチゴ、キク病原菌の核 rDNA-ITS 領域のシークエンスと属特異的プライマーの設計. 奈良農技研報 32: 9-17.
- 辻英明(2001) 稲こうじ病の種子伝染について. 北日本病虫研報 52: 24-26.
- White T J, Bruns T, Lee S and Talor J(1990) Amplification and direct sequencing of fungal

ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. (Eds. Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J and White T J), Academic Press, US, p. 315-322.

矢野顕子・本橋慶一(2016) ハナノキに褐色円斑病を引き起こす *Phyllosticta minima* の種特異的プライマーを用いた PCR 法による検出. 東農大農学集報 61(3): 100-105.