

長野県下の高冷地耕地土壌より分離された *Pythium* 属菌

埋橋志穂美・今津道夫

信州大学農学部 食料生産科学科 生産環境管理学講座

要 約 長野県下の標高900～1,400mに位置する真田町菅平, 軽井沢町, 南牧村野辺山, 富士見町の各地において耕地土壌を採取し, キュウリ種子及びジャガイモの組織片を用いた捕捉法により *Pythium* 属菌の分離を行い, 合わせて82菌株の *Pythium* 属菌を得た。これらの分離菌株について形態的特徴に基づいて種を同定し, 更に rDNA ITS 領域の PCR-RFLP 解析を行って種間および菌株間で RFLP パターンを比較した。その結果, *P. deliense* 7菌株, *P. hydnosporum* 1菌株, *P. sylvaticum* 13菌株, *P. torulosum* 1菌株, *P. ultimum* 43菌株, *P. nayloroense* 14菌株及び未同定 *Pythium* 属菌 2 種 3 菌株を認めた。このうち *P. ultimum* は全分離菌株の過半数を占め, 更に全ての調査地より分離されたことから, この種が長野県下の高冷地耕地土壌に優占的に分布していると考えられた。また PCR-RFLP 解析の結果, 分離同定した *Pythium* 属菌各種の菌株間で RFLP パターンは一致し, 種内多型は認められなかった。その一方で *P. nayloroense* は *P. ultimum* と同一の RFLP パターンを示し, これら 2 種は形態的にもよく類似していることから, 今後両菌の分類学的取り扱いについての詳細な検討が望まれた。

キーワード：高冷地耕地, PCR-RFLP, *Pythium* 属, *Pythium nayloroense*, *Pythium ultimum*

緒 言

Pythium 属菌は世界中の様々な土壌に普遍的に存在する土壌伝染性病原菌で, 播種したばかりの種子を腐らせて発芽不良や幼苗の立枯れを引き起こしたり, 生育した植物の根腐れや生育不良を生じることから植物病原菌として重要な位置をしめている。また, *Pythium* 属菌は一般に多犯性で宿主範囲が広く, 更に宿主植物の有無に関わらず土壌中で長期間生存することができるためその防除は困難であり, 様々な作物に経済上深刻な被害をもたらしている。わが国では50種以上の農作物に, 立枯れ病, 根腐れ病, 腐敗病などの *Pythium* 属菌による病害が報告されている¹⁾。

長野県下の高標高作物産地のうち, 標高800～1,000m未満の地域は準高冷地, 1,000m以上の地域は高冷地と区分されている。これらの冷涼地域は夏期でも気温が低く, 温暖地の作物産地と比較して農業生産に不利な環境条件だと思われがちである。しかし実際には他の産地と出荷時期をずらすなど高冷地特有の気象条件を活かした特徴的な農業生産活動を行っている。特にレタス, キャベツ, ハクサイは高原野菜として盛んに生産され, 各地へ出荷

されている。近年では, 過度の集約的生産による地力の低下や限定された作物種の連作による根腐れ病, 根こぶ病などの土壌病害の発生がしばしば問題となっている。しかしながら, これまでに長野県において土壌より分離される *Pythium* 属菌の種類相について検討した報告は見られない。

本研究では, 重要な土壌病原菌の一群である *Pythium* 属菌について, 耕地土壌中における分布や生態の一端を明らかにすることを目的として, 長野県下に位置する高冷地の耕地土壌より *Pythium* 属菌の分離同定を行い, その種類相について検討を行った。

材料及び方法

1. 調査地と供試土壌

長野県小県郡真田町菅平, 北佐久郡軽井沢町, 南佐久郡南牧村野辺山, 諏訪郡富士見町の各地を調査地とし, これらの地域より2003年の5月から10月にかけて栽培作物の異なる耕地土壌を2～3回採取して実験に供試した(表1)。真田町菅平は標高約1,300mに位置し, 冷涼少雨の夏期にレタス, ハクサイ等の栽培が盛んな地域である。ここでは6月21日にレタス栽培地の土壌及びベニバナインゲンの栽培土壌と更に10月11日にハクサイ栽培地の土壌を採取した。軽井沢町は, 標高900～1,000mに位置し,

受理日 10月18日

採択日 12月8日

表1. 供試土壌採取地

調査地		標高(m)	採取日	栽培作物
菅平	小県郡真田町菅平	1,300	2003/ 6/21	レタス
			2003/ 6/21	ベニバナインゲン
			2003/10/11	ハクサイ
軽井沢	北佐久郡軽井沢町	900～	2003/ 8/ 3	エダマメ
		1,000	2003/10/ 4	ダイズ
野辺山	南佐久郡南牧村野辺山 AFC 野辺山ステーション	1,400	2003/ 5/ 8	ライムギ
			2003/ 9/ 3	レタス
富士見	諏訪郡富士見町	1,300	2003/ 8/ 3	キャベツ
			2003/10/ 4	ネギ

夏期の冷涼な気候のため日本でも有数の避暑地とされ観光地としても知られている。ここでは8月3日にエダマメの栽培土壌、10月4日にダイズの栽培土壌をそれぞれ採取した。南牧村野辺山は標高約1,400mに位置し、冷涼な気候を活かした様々な高原野菜の栽培が盛んな地域で、信州大学農学部附属アルプス圏フィールド科学教育研究センター(AFC)野辺山ステーション内の圃場において5月8日に緑肥としてライムギをすき込んだ直後の土壌と、更に同一圃場において9月3日にレタスの収穫後の土壌を採取した。富士見町は八ヶ岳山麓の裾野に広がる標高約1,300mに位置する高冷地で、ここでは8月3日にキャベツ栽培圃場におけるキャベツ収穫後の土壌及び10月4日にネギの栽培土壌をそれぞれ採取した。

2. *Pythium* 属菌の分離と形態学的観察

各供試土壌はいずれも採取後2週間以内に *Pythium* 属菌の分離に用いられた。*Pythium* 属菌の分離はキュウリ種子とジャガイモ塊茎の組織片を用いた捕捉法²⁾によって行った。キュウリ種子は高圧滅菌処理(120°C, 20分)を行った後、またジャガイモ塊茎は直径7mmのコルクボーラーで打ち抜き、蒸留水で濯いだ後それぞれ分離に用いた。各供試土壌30gと蒸留水20mlをシャーレ内でよく懸濁させた後、各捕捉基質を10粒埋没させて20～25°Cで24～48時間培養した。培養後取り出した基質を水道水でよく濯ぎ、2%素寒天培地上に静置して25°Cで24～48時間培養した。その後実体顕微鏡下で菌糸の伸長を確認し、単一の菌糸体を培地ごと取り出して素寒天培地上に静置した。そして25°Cで培養後、再度単菌糸体分離を繰り返して分離菌株とした。

各分離菌株は孢子のう、遊走子などの無性生殖器官の形態形成を促すため2%素寒天平板培地上に静

置し、更にペトリ液(KH₂PO₄ 150mg, MgSO₄ 150mg, KCl 60mg, Ca(NO₃)₂ 60mg, 蒸留水 1,000ml)²⁾を4ml添加して25°Cで培養した。そして培養後形態形成の有無を光学顕微鏡下で随時観察し、無性生殖器官の形成が確認された菌株については、有性生殖器官の形成を促すためペトリ液を除去して更に20°Cで培養した。一方、菌糸以外の無性生殖器官の形態が確認されなかった菌株については、25°Cで更に培養を続けた。形態形成の認められた菌株は、無性生殖器官及び有性生殖器官について光学顕微鏡で形態観察を行った。無性生殖器官では孢子のうの形態、孢子のうからの球のう形成や遊走子形成の有無について、有性生殖器官では造精器、造卵器、卵孢子の形態や形成位置および受精様式について詳細に観察した。これらの形態観察結果に基づき Van der Platts - Niterink³⁾、渡邊⁴⁾及び Watanabe⁵⁾に従って *Pythium* 属菌の種を同定した。

3. PCR-RFLP 解析

Pythium 属菌の rDNA ITS 領域は種間で明瞭な差異が認められ^{6,7)}、*Pythium* 属菌の種の同定において、同領域に基づく PCR-RFLP 解析の有効性が報告されている⁸⁾。そこで、分離した全ての *Pythium* 属菌株を用いて rDNA ITS 領域の PCR-RFLP 解析を行った。DNA の抽出は PDA 培地上で培養した各菌株の菌糸体より行った。これらの DNA 試料を鋳型として、PCR 法によりリボソーム DNA の 5.8S を含む ITS 領域を ITS5, ITS4 プライマー⁹⁾を用いて増幅した。得られた PCR 産物を精製した後、*Alu* I, *Hinf* I, *Rsa* I 及び *Taq* I の4種の制限酵素を用いてそれぞれ消化し、RFLP 解析を行った。制限酵素により切断した DNA 断片は8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、紫外線照射装置を用いて観察した。また DNA ジー

ンバンクより *Pythium* 属菌各種の ITS 領域の塩基配列データを入力し、それらから得られた RFLP パターンと比較するとともに、形態学的観察から種を同定するに至らなかった菌株については、*Pythium* 属菌各種の既知の RFLP パターンに基づいて種の同定を試みた。

結 果

各供試土壌から分離を行った結果、富士見のキュウリ種子で一部 *Pythium* 属菌を分離できなかったが、全ての調査地より合わせて82菌株の *Pythium* 属菌株を分離した（表2）。また分離基質の違いによる分離頻度及び種類相に、著しい差異は認められ

なかった。

これらの分離菌株について形態形成を促したところ、供試した82菌株のうち48菌株で有性生殖器官の形成が認められた。このうち34菌株 {UZ31, UZ32, UZ36, UZ38, UZ39, UZ42 (菅平); UZ54, UZ55, UZ56, UZ57, UZ58, UZ59, UZ60, UZ61, UZ63, UZ96, UZ98, UZ99, UZ101, UZ102, UZ103 (軽井沢); UZ25, UZ80, UZ81, UZ82, UZ83 (野辺山); UZ85, UZ86, UZ87, UZ89, UZ91, UZ93, UZ94, UZ95 (富士見)} は、胞子のうは球形で、頂生または間生していた（図1）。造精器は大部分が造精器柄を有さず、造卵器の直下に形成していた。造卵器は平滑、頂生または間生し、卵胞子は未充満型で造卵器内に1個形成さ

表2. 各調査地より分離された *Pythium* 属菌株

調査地	採取日	分 離 基 質		計
		キュウリ	ジャガイモ	
菅平	2003/ 6/21	6 (UZ31, UZ32, UZ34, UZ35, UZ36, UZ37)	— *	6
	2003/ 6/21	4 (UZ38, UZ39, UZ41, UZ42)	—	4
	2003/10/11	3 (UZ104, UZ105, UZ106)	3 (UZ107, UZ108, UZ109)	6
軽井沢	2003/ 8/ 3	10 (UZ54, UZ55, UZ56, UZ57, UZ58, UZ59, UZ60, UZ61, UZ62, UZ63)	—	10
	2003/10/ 4	4 (UZ96, UZ97, UZ98, UZ99)	4 (UZ100, UZ101, UZ102, UZ103)	8
野辺山	2003/ 5/ 8	10 (UZ21, UZ22, UZ23, UZ24, UZ25, UZ26, UZ27, UZ28, UZ29, UZ30)	—	10
	2003/ 9/ 3	7 (UZ77, UZ78, UZ79, UZ80, UZ81, UZ82, UZ83)	13 (UZ64, UZ65, UZ66, UZ67, UZ68, UZ69, UZ70, UZ71, UZ72, UZ73, UZ74, UZ75, UZ76)	20
富士見	2003/ 8/ 3	6 (UZ48, UZ49, UZ50, UZ51, UZ52, UZ53)	—	6
	2003/10/ 4	0	12 (UZ84, UZ85, UZ86, UZ87, UZ88, UZ89, UZ90, UZ91, UZ92, UZ93, UZ94, UZ95)	12
計		50	32	82

* 供試せず

れた(図2)。こうした形態的特徴から、これらの菌株を *P. ultimum* Trow var. *ultimum* と同定した。富士見から分離された2菌株(UZ84, UZ92)は、胞子のうは球形、造精器は無柄で造卵器を取り囲むように複数形成、一部有柄で造卵器に対し1個が側着していた。造卵器は平滑で、頂生または間生し、卵胞子は未充満型で造卵器内に1個形成された(図3)。こうした形態的特徴から、これらの菌株を *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix と同定した。また、軽井沢(UZ100)と富士見(UZ48, UZ49, UZ50, UZ51, UZ52, UZ53)から分離された7菌株は、胞子のうは膨状または数珠状で樹枝状に分岐し、頂

生していた(図4)。造精器は長い造精器柄を有し、造卵器に対して1個形成され側着性であった。造卵器は平滑で大部分が頂生し、造卵器柄は長く造精器に向かって緩やかに傾き、卵胞子は未充満型で造卵器内に1個形成された(図5)。こうした形態的特徴から、これらの7菌株を *P. deliense* Meurs と同定した。菅平から分離された1菌株(UZ104)は、胞子のうの形成が認められなかった。造卵器は鋭頭突起を有して頂生し、卵胞子は充満型で造卵器内に1個形成された(図6)。よってこの造卵器の特徴から、この1菌株を *P. hydnosporum* (Mont.) Schroter と同定した。更に軽井沢から分離された

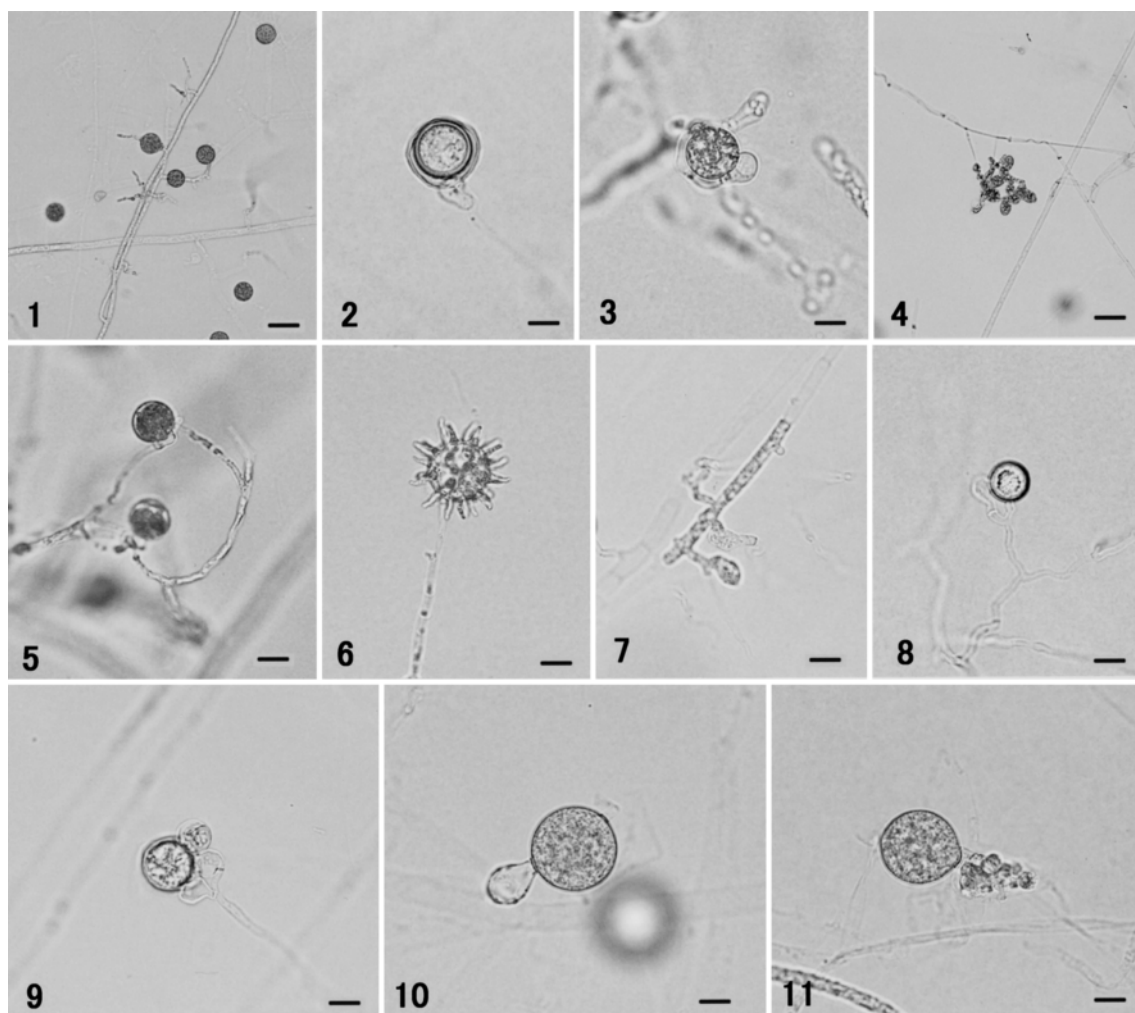


図1, 2: *Pythium ultimum*, 胞子のう(1)と造精器, 造卵器及び卵胞子(2)

図3: *Pythium sylvaticum*, 造精器, 造卵器及び卵胞子

図4, 5: *Pythium deliense*, 膨状胞子のう(4)と造精器, 造卵器及び卵胞子(5)

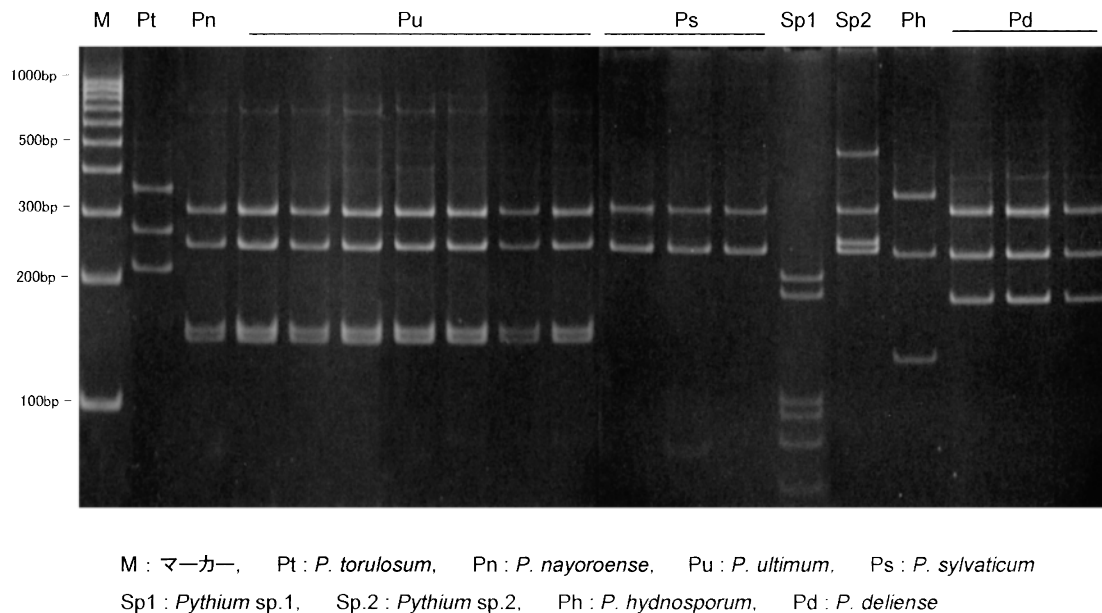
図6: *Pythium hydnosporum*, 造卵器

図7, 8: *Pythium torulosum*, 膨状胞子のう(7)と造精器, 造卵器及び卵胞子(8)

図9: *Pythium* sp. 2, 造精器, 造卵器及び卵胞子

図10, 11: *Pythium nayloriense*, 胞子のうおよび胞子のうの直下の原形質を欠く菌糸の膨らみ(10)と胞子のう及び球のう(11)

スケールは図1, 4 = 40 μ m, 図5 = 20 μ m, 図2, 3および図6—11 = 10 μ mを示す。

図12. rDNAITS 領域の *Taq* I における制限酵素断片パターン

1 菌株 (UZ97) は、胞子のうは数珠状で樹枝状に分岐し、頂生していた (図 7)。造精器は短い造精柄を有し、造卵器に対し 1～4 個形成し、造精器の先端が造卵器に結合していた。造卵器は平滑、頂生または間生し、卵胞子は充満型で造卵器内に 1 個形成された (図 8)。これらの形態的特徴より、この 1 菌株を *P. torulosum* Coker & Patterson と同定した。菅平 (UZ41) と野辺山 (UZ67, UA69) から分離された 3 菌株は有性生殖器官の形成が認められたが、それらの形態的特徴において一致する記載が認められなかったことから種を同定することはできなかった。そこで造精器が造卵器を取り囲むように形成し、卵胞子は未充満型で造卵器内に 1 個形成された菅平から分離された 1 菌株を *Pythium* sp. 1 とした。一方、造精器を 1～3 個形成し、造卵器の周囲に結合、卵胞子は未充満型で造卵器内に 1 個形成された野辺山から分離された 2 菌株を *Pythium* sp. 2 (図 9) とした。

有性生殖器官の形成が認められなかった 34 菌株のうち野辺山から分離された 14 菌株 (UZ21, UZ22, UZ23, UZ24, UZ26, UZ27, UZ28, UZ29, UZ64, UZ65, UZ66, UZ68, UZ70, UZ71) では、胞子のうの直下に原形質を欠く空白の菌糸の膨らみが形成された (図10)。この構造は渡邊⁵⁾が報告している *P. nayoroense* T. Watanabe とよく類似していた。更に同菌では球のうと考えられる形態の形成が認められたが (図11)、有性生殖器官の形成が全く認められていないことから、これらの 14 菌株

を *P. nayoroense* と同定した。他の 20 菌株については種を同定することはできなかったが、無性胞子の形態的特徴から 2 つのタイプが認められた。このうち菅平 (UZ34, UZ35, UZ37, UZ105, UZ106, UZ107, UZ108, UZ109)、野辺山 (UZ72)、富士見 (UZ88, UZ90) の 11 菌株は、円筒形または楕円形の胞子のうが間生する特徴を示し、これらの菌株を *Pythium* sp. 3 とした。一方、軽井沢 (UZ62)、野辺山 (UZ30, UZ73, UZ74, UZ75, UZ76, UZ77, UZ78, UZ79) の 9 菌株は、球形胞子のうを形成し、それらが頂生する特徴を示したことから、これらの 9 菌株を *Pythium* sp. 4 とした。

ITS 領域の PCR-RFLP 解析の結果、形態的特徴から *P. deliense*, *P. hydnosporum*, *P. sylvaticum*, *P. torulosum* 及び *P. ultimum* と同定した菌株は、*Alu* I, *Hinf* I, *Rsa* I 及び *Taq* I の各制限酵素による断片パターンにておい各種の分離菌株間で同一の結果を示した (図12)。更に DNA ジーンバンクに公開されている *Pythium* 属菌各種の ITS 領域の塩基配列から得られた RFLP パターンともそれぞれ一致した。一方、*P. nayoroense* と同定した 14 菌株は 4 種の制限酵素全てにおいて *P. ultimum* と同一の RFLP パターンを示した。また有性生殖器官の形成が認められず形態的特徴から種の同定に至らなかった 20 菌株のうち、*Pythium* sp. 3 の 11 菌株は *P. sylvaticum* と同一の RFLP パターンを示し、*Pythium* sp. 4 の 9 菌株は *P. ultimum* と同一の RFLP パターンを示した。これらの菌株は無性胞子

の形態においても *P. sylvaticum*, *P. ultimum* とそれぞれよく類似していることが確認されたため *Pythium* sp. 3は *P. sylvaticum* に, *Pythium* sp. 4は *P. ultimum* に同定した。しかしながら, *Pythium* sp. 1と *Pythium* sp. 2の菌株は, データベースから得られた *Pythium* 属菌種の RFLP パターンの中に一致するものが認められなかったため, 種を同定することはできなかった。

考 察

各種土壌に広く生息することが知られる *Pythium* 属菌は, 日本においても各地の様々な土壌から多数分離されている。中でも *P. aphanidermatum*, *P. spinosum*, *P. splendense*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* などは日本に広く分布し, 一般に分離頻度の高い種として知られている¹⁰⁾。また, 東北地方と南西諸島における *Pythium* 属菌の分布と菌量を調べた渡邊¹¹⁾によると, 地域により分離される *Pythium* 属菌の種類相に違いが認められ, *P. spinosum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* は東北地方において, *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. vexans* は南西諸島において分離頻度の高い種とされる。更に東北地方で多数分離される3種は生育適温が25℃であり, 一方南西諸島で分離頻度の高かった3種の生育適温は30℃であることが報告されている³⁾。本研究において分離された *Pythium* 属菌の種類相(表3)をみると, 最も分離頻度の高かった種は *P. ultimum* で, 42菌株と全分離菌株の過半数を占めるとともに全ての調査地から分離された。よって長野県下の高冷地耕地土壌において *P. ultimum* が広く優占的に分布していると考えられた。また, 菅平, 野辺山, 富士見から分離され, 比較的分離菌株数の多かった *P. sylvaticum* は, *P. ultimum* と

もに最低生育温度が5℃もしくはそれ以下と低温条件下でも生育可能な種であることが報告されている³⁾。したがって, 長野県下の高冷地に位置する耕地土壌からこれらの種が多数分離されたことは, 冷涼な高冷地の気候的特徴を反映した結果と考えられた。

また, 野辺山から分離された *P. nayloroense* は有性生殖器官を形成せず, 胞子のうの形態が *P. ultimum* と酷似し, 胞子のうの直下にはこの種に特異的とされる原形質を欠く空白の菌糸の膨らみが認められた。しかしながら PCR-RFLP 解析において *P. nayloroense* はいずれも *P. ultimum* と同一の RFLP パターンを示した。一方, *P. ultimum* については, 分離頻度の違いによる2つの季節型の存在や¹²⁾ 有性生殖器官の大きさにおける種内変異の存在¹³⁾ が報告されている。以上のことから, 今後 *P. nayloroense* と *P. ultimum* の分類学的取り扱いについての再検討が必要となった。

引用文献

- 1) 渡邊恒雄: 植物土壌病害の事典, pp.110-112. 朝倉書店, 東京, 1998.
- 2) 渡邊恒雄: 新版土壌病害の手引, pp.79-82. 日本植物防疫協会, 東京, 1984.
- 3) Van der Platts-Niterink, A. J.: Monograph of the genus *Pythium*. Stud. Mycol. **21**, 1-142, 1981.
- 4) 渡邊恒雄: 土壌糸状菌, pp.48-81. ソフトサイエンス社, 東京, 1993.
- 5) Watanabe, T.: Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologic of Cultured Fungi and Key to Species. pp.53-91. CRC Press, Boca Raton London New York Washington, D.C., 2001.
- 6) Chen, W.: Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal

表3. 各調査地において分離された *Pythium* 属菌種

種名	調査地				計
	菅平	軽井沢	野辺山	富士見	
<i>P. deliense</i>		1		6	7
<i>P. hydnosporum</i>	1				1
<i>P. sylvaticum</i>	8		1	4	13
<i>P. torulosum</i>		1			1
<i>P. ultimum</i>	6	16	13	8	43
<i>P. nayloroense</i>			14		14
<i>Pythium</i> sp. 1	1				1
<i>Pythium</i> sp. 2			2		2
計	16	18	30	18	82

- DNAs of three heterothallic *Pythium* species. Phytopathology. **82**, 1467-1472, 1992.
- 7) Chen, W., Hoy, J. W., Schneider, R. W.: Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. Experimental Mycology. **16**, 22-34, 1992.
 - 8) Wang, P. H., and White, J. G.: Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. Physiol. Molec. Plant Path. **51**, 129-143, 1997.
 - 9) White, T. J., Bruns, S. Lee, and I. Taylor.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp.315-322. PCR protocols, a guide to methods and applications. Eds., M.A. Innes, D.H. Gelfand, J.S. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, San Diego, California, 1990.
 - 10) Watanabe, T.: Plant Prot. Bull. (Taiwan, R.O.C.) **27**, 211-224, 1985.
 - 11) 渡邊恒雄：東北地方と南西諸島における *Pythium* 属菌の分布と菌量. 日植病報 **47**, 449-456, 1981.
 - 12) 中菌栄子・東條元昭・一谷多喜郎：蔬菜畑土壌から分離された *Pythium ultimum* における 2 つの季節型の性状. 日植病報 **59**, 749, 1993.
 - 13) Tojo, M., Nakazono, E., Tsushima, S., Morikawa, T., and Matsumoto, N.: Characterization of two morphological groups of isolates of *Pythium ultimum* var. *ultimum* in a vegetable field. Mycoscience **39**, 135-144, 1998.
-

***Pythium* Species Isolated from Cultivated Soil at Highland in Nagano Prefecture**

Shihomi UZUHASHI and Michio IMAZU

Department of Food Production Science,

Faculty of Agriculture, Shinshu University

Summary

Pythium species were isolated from soils sampled from arable lands located at four highland areas (Sugadaira, Karuizawa, Nobeyama and Fujimi) by a trapping method with cucumber seeds and potato discs. A total of 82 *Pythium* isolates were obtained from the soil samples. These isolates were identified based on morphological characteristics and examined for PCR-RFLP analysis based on rDNA ITS region. In results, seven isolates of *P. deliense*, one isolate of *P. hydnosporum*, 13 isolates of *P. sylvaticum*, one isolate of *P. torulosum*, 43 isolates of *P. ultimum* and 14 isolates of *P. nayoroense* were identified. Three isolates were not identified in this study although PCR-RFLP suggested that they belonged to two different taxa. Among that, *P. ultimum* was most frequently isolated and detected from all samples, which suggested this species was dominant in cultivated soil at highland in Nagano Prefecture. The RFLPs of the ITS region was identical among isolates of each *Pythium* species, and were different at species level. On the other hand, *P. nayoroense* was identical with *P. ultimum* in the RFLPs and in the morphology, thus further study about taxonomical treatment of these two species will be required.

Key word : Cultivated soil at highland, PCR-RFLP, *Pythium* spp., *Pythium nayoroense*, *Pythium ultimum*