

前作物によるイチゴ萎黄病の軽減機構 (第3報)

無菌植物により継代培養したイチゴ萎黄病菌の諸性質

堀本圭一・岡山健夫・小畠博文・小玉孝司

Studies on the Control of Fusarium Wilt of Strawberry  
by Preceding Crops. III

Some characteristics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* cultivated  
with microorganism-free plants

Keiichi HORIMOTO, Ken-o OKAYAMA, Hirofumi KOBATAKE and Takashi KODAMA

Summary

In order to elucidate the mechanisms of control of soil-borne disease by crop rotation, we investigated some characteristics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* cultivated with plants free from microorganisms.

1. The density of chlamydospores was high on the roots of maize, Chinese cabbage, strawberry, pumpkin next to tomato, melon and most low peas.
2. The shape of the chlamydospores on the roots of strawberry was especially large and round with full contents. In contrast, chlamydospores of other plants were small and empty.
3. Variants which had a different colony type and low pathogenicity were obtained from the melon rhizosphere.
4. In comparison with strawberry, the pathogenicity of strains cultivated with tomato became weak. The susceptibility to PCNB of less aggressive strains was different from that of the parent and aggressive ones.

Key Words:

*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, crop rotation, chlamydospore, pathogenicity, cultural characteristics

緒 言

前報では、短期輪作によるイチゴ萎黄病軽減機構として、輪作圃場では強病原力菌株の比率が低下すること、また強病原力菌株と弱病原力菌株では菌叢形態が異なる

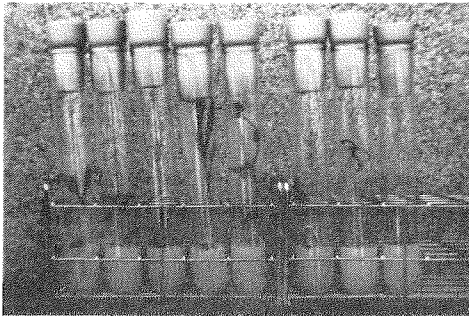
ことを報告した。一般に *Fusarium* 属菌は圃場において、雑草など非寄主植物根圏で生息していることが確認されている<sup>2)</sup>。したがって本報告では、試験管内で無菌的に育苗した各種植物でイチゴ萎黄病菌を培養し、病原力等を調査した。その結果前報と同様の結果を得たのでその概要を報告する。

実験材料および方法

本報告の一部は先の日本植物病理学会において発表した<sup>1)</sup>。

### 1. 無菌育苗植物によるイチゴ萎黄病菌の継代培養

試験管に培地(ハイポネックス 10 g, 寒天 15 g, 水 1 ℓ) 10 ml 入れ, オートクレーブ滅菌後, 修正ウイソソ液で 10 分間殺菌したイチゴ・メロン・トウモロコシ・カボチャ・ハクサイ・エンドウの種子を無菌条件下で播種した。イチゴは 3 か月間, メロン等は 1 か月間 25℃ 条件化で育成し, 細菌・糸状菌等が混入していない事を確認後, イチゴ萎黄病菌(奈良農試保存菌株)を培地表面に接種した(第1図)。その後各植物体から根を 3~5 mm 切り取り, あらかじめ同様の方法で育成した同種の植物培地上に接種し, 継代培養した。接種時期は 1984 年 4 月, 8 月, 11 月, 1985 年 3 月, 7 月の 5 回である。



第1図 無菌育苗植物によるイチゴ萎黄病菌培養状況

### 2. 無菌育苗植物根面におけるイチゴ萎黄病菌厚膜孢子

1984 年 12 月に継代培養 3 回目の各植物体の根を培地から取り出し水洗後, 根面の厚膜孢子密度・形態を調査した。形成密度は光学顕微鏡 200 倍で, 1 mm 当りの厚膜孢子数を各 100 視野調査した。形態は同様に, 光学顕微鏡 400 倍で各 70 個の厚膜孢子を写真撮影し, その長径・短径を計測した。

### 3. 無菌育苗メロンで継代培養したイチゴ萎黄病菌の諸性質

上記の植物体を取り除き残った培地をブレンダーで粉碎し, フザリウム選択培地を用いて希釈平板法によりイチゴ萎黄病菌を分離した。その結果メロンで継代培養した菌株に菌叢が変化するのが認められたので, 菌糸先端部を培地ごと切り取り, PSA 斜面培地に移植し下記の試験に供した。分生孢子形成量は各菌株をツアベック液体培地 100 ml で 10 日間培養し, 光学顕微鏡 200 倍で 1 視野当り培養液中の分生孢子数を計測した。菌体重は

同様に, ツアベック液体培地 100 ml で 12 日間培養し, 菌叢重量を計測した。菌糸伸長は, PSA 培地・ツアベック培地・フザリウム選択培地上での 1 日当りの菌糸伸長を測定した。供試した菌株はすべて, あらかじめ PSA 培地で 10 日間培養した菌叢を, 直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いたものを用い, 温度条件は 25℃ に設定した。病原力の検定は, PSA 斜面培地で伸長した菌叢を滅菌水 200 ml 加えてブレンダーで粉碎し, 8 月にイチゴ苗(宝交早生)に浸根接種後, 直径 12 cm の黒ポリポットに定植し, 経時的に発病程度を調査した。

### 4. 無菌育苗トマトで継代培養したイチゴ萎黄病菌の病原力および薬剤感受性

無菌育苗トマトで 5 回継代培養したイチゴ萎黄病菌を, 培地ごと滅菌水 200 ml 加えて粉碎し, 8 月にイチゴ苗(宝交早生)に浸根接種して, 経時的に発病程度を調査した。同時に上記の粉碎した培地から, PCNB 300 ppm・オクスゴール 150 ppm・ホウ酸ナトリウム 300 ppm・ストレプトマイシン 100 ppm を加えた素寒天培地を用い, 希釈平板法により菌の分離を行った。25℃ 条件下で培養 4 日後, 生育したコロニーから無作為に 30 菌株を選び, 素寒天培地で 10 日間培養した。その後同様に滅菌水 200 ml 加え素寒天培地ごとブレンダーで粉碎し, 8 月にイチゴ苗に浸根接種し経時的に発病程度を調査した。10 月発病調査後フザリウム選択培地を用い, イチゴ導管部から接種菌の再分離を行った。その結果発病程度の低いイチゴ株から分離される菌株は, フザリウム選択培地上でコロニー形態がやや不規則であったため, 分離菌のフザリウム選択培地に添加される抗菌性物質に対する感受性を調査した。あらかじめ各菌株を素寒天培地で 10 日間培養し, 伸長した菌糸を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜き, フザリウム選択培地の基本培地に, 抗菌性物質(PCNB 1000 ppm・オクスゴール 500 ppm・ホウ酸ナトリウム 1000 ppm・ストレプトマイシン 300 ppm)を別々に添加した培地に接種し, 菌糸伸長を観察した。

## 実験結果

### 1. 無菌育苗植物で継代培養したイチゴ萎黄病菌厚膜孢子的各種植物根面における密度ならびに形態

根面における厚膜孢子形成密度は, トウモロコシ・ハクサイ・イチゴ・カボチャで高く, 次いでトマト・メロンとなりエンドウでは最も低くなった。厚膜孢子的の大き

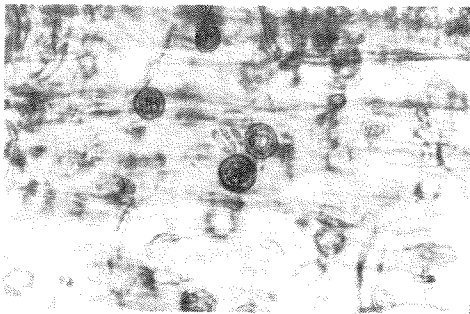
第1表 無菌育苗植物で培養したイチゴ萎黄病菌の各植物根面における厚膜胞子の形成密度並びに大きさ

植 物	形成密度 <sup>1)</sup>		大 き さ <sup>2)</sup>		
	(個/mm <sup>2</sup> )	長径 (um)	短径 (um)	長径/短径	体積比
メ ロ ン	3.2	7.6	6.4	1.19	40.8
トウモロコシ	6.5	8.5	6.9	1.23	53.7
エ ン ド ウ	2.6	7.9	6.8	1.16	47.2
ハ ク サ イ	5.6	8.8	7.6	1.17	65.4
ト マ ト	3.4	8.5	7.7	1.11	62.3
カ ボ チ ャ	4.8	9.0	7.1	1.26	61.7
イ チ ゴ	5.4	9.8	9.1	1.07	100.0
対 照	—	3.8	8.0	1.10	69.4

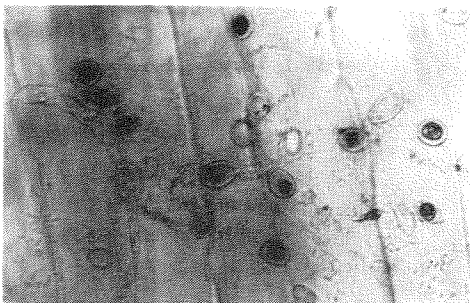
1) 根面 1 mm<sup>2</sup> 100 視野平均

2) 厚膜胞子 70 個平均

さはイチゴ根面で最も大きく、体積は他植物根面ではイチゴと比較して40～65%と小さくなった。また厚膜胞子はイチゴ根面で最も円形に近く、他植物では楕円形となった（第1表）。厚膜胞子の内容物は、イチゴ根面のものが最も充実しており、他植物ではすべて充実度が悪く、内容物が消失しているものも認められた（第2、3図）。



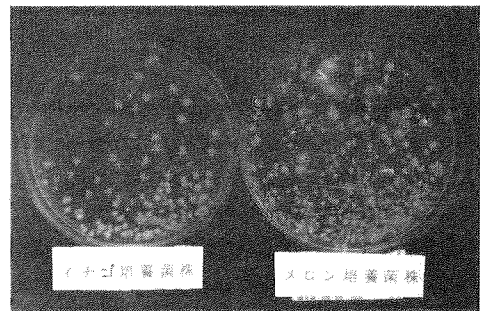
第2図 無菌育苗イチゴ根面におけるイチゴ萎黄病菌厚膜胞子の形態



第3図 無菌育苗メロン根面におけるイチゴ萎黄病菌厚膜胞子の形態

## 2. 無菌育苗メロンで継代培養したイチゴ萎黄病菌の菌叢形態の変化

メロン培養菌株はフザリウム選択培地上で、コロニー形態が2種類に分かれた（第4図）。これらの菌叢から

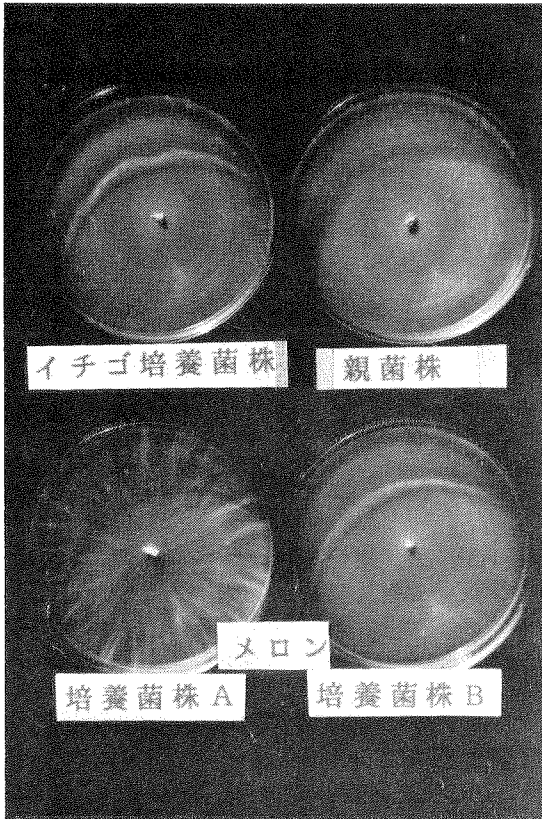


第4図 無菌育苗イチゴ及びメロンから分離されるイチゴ萎黄病菌のコロニー形態

菌糸先端部を切り取りP S A培地で培養したところ、菌糸束状の星形の形態を示すもの（メロン培養菌株A）と、親菌株・イチゴ培養菌株と同様の形態を示すもの（メロン培養菌株B）とになった（第5図）。この菌叢の変化はメロン培養菌株のみに認められ、他の供試した6植物および対照区では認められなかった。

## 3. メロン培養菌株の諸性質

メロン培養菌株Aは他の菌株と比較して、菌体重・菌糸伸長には差が認められなかったが、分生胞子形成量は明らかに劣っていた（第2表）。病原力の強さは親菌株・イチゴ培養菌株・メロン培養菌株B・メロン培養菌株A



第5図 PSA培地上での無菌イチゴ・メロン培養菌株の菌叢形態

の順となった。前者3菌株の病原力は強く、10月25日の調査でほとんどの株が奇形黄化となり枯死株も認められたが、メロン培養菌株Aでは病徴は軽く、奇形葉等の病徴を示さないものも認められた(第3表)。

#### 4. トマト培養菌株の病原力

トマト培養菌株はイチゴ培養菌株と比較して病原力はやや低下しており、枯死株率も少なくなった(第4表)。その菌株別の病原力は、トマト培養菌株で発病程度2までの弱病原菌が37%、3以上の強病原菌が46%であるのに対し、イチゴ培養菌株ではそれぞれ10%、70%となった。奇形葉等のイチゴ萎黄病の病徴を示さない菌株(発病程度1)は、イチゴ培養菌株には認められなかったが、トマト培養菌株では7%に認められた。全般に、トマト培養菌株では弱病原菌の比率が、また反対にイチゴ培養菌株では強病原菌の比率が高まる傾向が認められた(第5表)。

#### 5. トマト培養弱病原菌の薬剤感受性

トマト培養弱病原菌のコロニー形態は、フザリウム選択培地の基本培地に、オクスゴール500ppm・ホウ酸ナトリウム1000ppm・ストレプトマイシン300ppmを各々別個に添加した培地では正常であったが、PCNB 1000ppmを添加した培地上では不規則な形態を示した。この現象は培養初期(培養5日以内)に顕著に認められた。またトマト培養強病原菌はイチゴ培養菌株と同様に、PCNB 1000ppm存在下でもほぼ円形の正常なコロニー形態を示した(第6図)。

第2表 無菌育苗メロン及びイチゴで培養したイチゴ萎黄病菌の特性

供試菌株	分生孢子形成数 <sup>1)</sup> (個)	菌体重 <sup>2)</sup> (mg)	菌糸伸長(mm/day)		
			PSA 培地	Czapek 培地	Fusarium 選択培地
メロン培養菌株A	2.9	1.93	3.2	3.2	1.9
"      B	24.1	1.95	3.2	3.2	2.0
イチゴ培養菌株	25.7	2.15	3.2	3.2	2.0
親菌株	29.5	1.90	3.1	3.0	1.9

1) Czapek 液体培地 100 ml 25℃ 10日間培養

2) " " 12 "

第3表 無菌育苗メロン及びイチゴで培養したイチゴ萎黄病菌の病原力

供試菌株	発病度 <sup>1)</sup>		
	9月17日	10月1日	10月25日
メロン培養菌株A	9.0	19.8	21.5
"      B	50.0	47.0	62.5
イチゴ培養菌株	54.8	48.5	76.5
親菌株	55.0	56.3	84.5

1) 発病程度 0:健全, 1:生育不良, 2:奇形葉, 3:奇形・黄化葉, 4:枯死

$$\text{発病度} = \frac{\Sigma(\text{発病程度})}{\text{調査株数} \times 4} \times 100$$

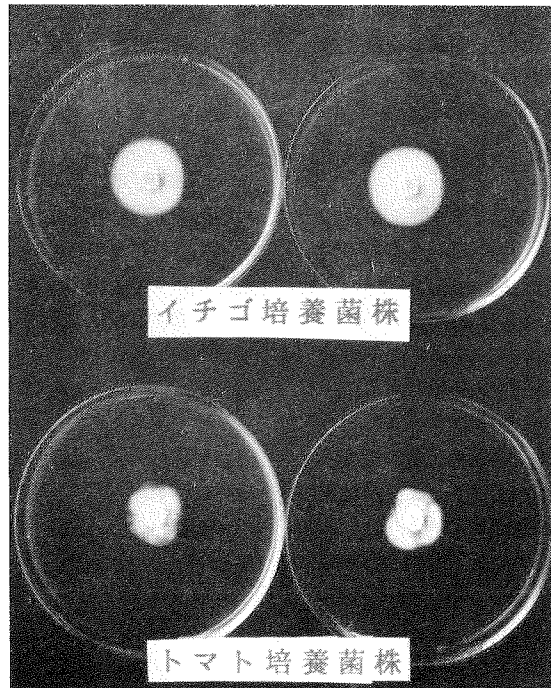
第4表 無菌育苗トマト及びイチゴで培養したイチゴ萎黄病菌の病原力

培養植物	発病度			枯死株率
	8月24日	9月14日	10月25日	10月25日
トマト	3.0	42.5	65.5	30.0
イチゴ	8.8	56.3	75.8	37.5

第5表 無菌育苗トマト及びイチゴで培養したイチゴ萎黄病菌株の病原力

培養植物	発病程度別菌株率 <sup>1)</sup> (%)							
	0	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
トマト	0	7	10	20	17	23	10	13
イチゴ	0	0	5	5	20	35	20	15

1) 30菌株, 2連制



第6図 無菌育苗イチゴ・トマトで継代培養したイチゴ萎黄病菌のPCNB(1000ppm)添加培地上での菌糸伸長

## 考 察

一般に *Fusarium* 属菌は土壤中で厚膜胞子の形態で生存しているが、植物根などによりたえず発芽し再厚膜化をくり返している。その発芽は病原菌の寄生性とは関係なく、非寄主植物においても行われる。M. N. Schroth らは *F. solani* f. sp. *phaseoli* が、トマト・レタス等の非寄主植物根圏で増殖することを報告している<sup>9)</sup>。筆者らも、イチゴ萎黄病発病圃場に栽培したメロン・トウモロコシ根面から萎黄病菌を分離し、イチゴ萎黄病菌が非寄主植物根面で生息していることを確認している(未発表)。また病原菌の病原力は培養時の栄養条件と高い相関があることから、非寄主植物による病原菌の腐生生活は、後の寄生生活における病害の発生程度に大きな影響を与えるものと思われた。これらの結果から、輪作による土壤病害軽減機構として、本試験により非寄主植物がイチゴ萎黄病菌の病原力等に与える影響を調査した。

無菌育苗植物根面における厚膜胞子密度は、植物間には認められたものの、イチゴが特異的に高い傾向は認められなかった。厚膜胞子の形態は、イチゴ根面でのみ大きく内容物も充実しており、他植物ではすべて一様に小さく充実度も悪くなった。したがって非寄主植物を輪作することにより、土壤中のイチゴ萎黄病菌の密度はあまり変化しないが、小さく充実度の悪い厚膜胞子の比率が高まるものと思われた。輪作作物の選定にあたっては、これら厚膜胞子の土壤中での生存期間等をさらに検討する必要がある。

次に無菌育苗メロンで継代培養したイチゴ萎黄病菌に、菌叢形態の異なる菌株が出現し病原力も弱いことが判明した。菌叢形態と病原力との関係は、*F. oxysporum*<sup>1,10)</sup>、*Ceratocystis ulmi*<sup>3,5)</sup>、*Colletotrichum gramini-cola*<sup>7)</sup>等、多くの病原菌で報告されている。これらの試験はすべてPDA培地等の合成培地上の結果であるが、筆者らの生きたメロン根圏で培養したものと、病原力の低下という点で一致している。菌糸束状の菌叢形態を示す弱病原力菌株は、輪作圃場においてイチゴ萎黄病発病程度の低いイチゴ導管部からも分離されている。これらのことから圃場の輪作植物根圏においても同様の現象が起こっているものと推察され、輪作のイチゴ萎黄病軽減機構の一因となっているものと思われた。

また無菌育苗トマトで継代培養した菌株は、イチゴのものと比較して弱病原力菌株の比率が増加していた。圃場においても、トマト・メロン等の輪作区では弱病原力

菌株の比率が増加しており、同様の傾向となっている。病原菌の病原力は、窒素等の栄養条件と相関が高いと言われているが<sup>6,8,11)</sup>、さらに病原力の低下は各植物根から出る栄養源との調査が必要である。またこの弱病原力菌株は、PCNBに対する感受性が強病原力菌株に比べ異っていた。一般に薬剤耐性・病原力等を支配する遺伝子はプラスミド上に存在していると言われており、糸状菌において薬剤に対する耐性を獲得した菌株は、病原力・生存能力が感性菌より劣るとする報告例が多い<sup>10)</sup>。本試験では逆に病原力の低下した菌株の薬剤感受性変化が認められたが、今後薬剤感受性が病原力の指標となりうるかさらに検討が必要である。

以上の結果から、試験管内で無菌育苗植物により培養したイチゴ萎黄病菌は、輪作圃場のイチゴから分離された萎黄病菌と比較し、病原力の低下・菌叢形態の変化という点で同一の傾向となった。今後さらに輪作によるイチゴ萎黄病軽減機構として、病原力の低下を中心に検討してゆきたい。

## 摘 要

無菌的に育苗した各種植物でイチゴ萎黄病菌を継代培養し、厚膜胞子の形態、病原力、菌叢形態等を調査した。

1. 無菌育苗植物根面でのイチゴ萎黄病菌厚膜胞子密度は、トウモロコシ・ハクサイ・イチゴ・カボチャで高く、次いでトマト・メロンとなり、エンドウでは最も低かった。
2. 厚膜胞子の形態は、イチゴ根面で特異的に大きくまた円形で、内容物も充実していた。一方他植物では小さく、内容物の充実度も悪くなった。
3. メロン培養菌には、コロニー形態の異なる病原力の弱い変異株が認められた。
4. トマト培養菌ではイチゴ培養菌と比較し、弱病原力菌株の比率が高まる傾向であった。その弱病原力菌株は強病原力菌株と比較して、PCNBに対する感受性が異っていた。

## 引用文献

1. ARMSTRONG, G. M., J. D. MACLACHLAN, and R. WELNDING, Variasion in pathogenicity and cultural characteristics of the cotton-wilt organism, *Fusarium vasinfectum*. 1940. *Phytopathology* 30: 515—520.

2. HELBIG, J. B. and R. B. CARROLL. Dicotyledonous weeds as a source of *Fusarium oxysporum* pathogenic on soybean. 1984. *Plant Disease* 68:694—696.
3. HINDAL, D. F., E. J. HARNER and W. L. MACDONALD. Further studies on the relationship between cultural characteristics and pathogenicity in *Ceratocystis ulmi*. 1979. *ibid* 69:108—111.
4. 堀本圭一・岡山健夫・小島博文・小玉孝司 198. 異種作物導入によるイチゴ萎黄病軽減効果の機構解明(講要). *日植病報* 52:541.
5. LAWRENCE, R. S. and A. M. TOWNSEND, Variability in aggressiveness, recovery and cultural characteristics of isolates of *Ceratocystis ulmi*. 1976. *Phytopathology* 66:239—244.
6. MAIER, C. R. Influence of nitrogen nutrition on *Fusarium* root rot of pinto bean and on its suppression by barley straw. 1968. *ibid* 58:620—625.
7. 西原夏樹 人工培地上に形成されるトウモロコシ炭そ病菌分生胞子の二つの型とそれらの病原力について. 1975. *日植病報* 41:171—175.
8. PHILLIPS, D. J. Ecology of plant pathogens in soil. IV Pathogenicity of macroconidia of *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* produced on media of high or low nutrient content. 1965. *Phytopathology* 55:328—329.
9. SCHROTH, M. N. and F. F. HENDRIX JR. Influence of nonsusceptible plants on survival of *Fusarium solani* f. *phaseoli* in soil. 1962. *ibid* 52:906—909.
10. 上山昭則・多賀正節・津田盛也 薬剤抵抗性. 1983. 編集 深見順一ら ソフトサイエンス社 251—253.
11. WEINHOLD, A. R., T. BOWMAN, and R. L. DODMAN. Virulence of *Rhizoctonia solani* as affected by nutrition of the pathogen. 1969. *ibid* 59:1601—1605.
12. WELLMAN, F. L. and D. J. BLAISDELL, Pathogenic and cultural variation among single-spore isolates from strains of the tomato-wilt *Fusarium*. 1941. *ibid* 31:103—120.