

チューリップ球根腐敗病の品種抵抗性の簡易検定技術に関する研究 第1報 球根への針接種および浸漬接種と発病

向島 博行・名畑 清信・草葉 敏彦

Hiroyuki MUKOBATA, Kiyonobu NAHATA and Toshihiko KUSABA: Studies on a simple technique for evaluation of tulip cultivar resistance to bulb rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*. (1) The bulb inoculation methods using a needle-prick or dipping in a conidial suspension

Summary

The present study was undertaken to establish a more simple evaluation technique for resistance on the tulip bulb rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*. Bulb inoculation methods were examined for the disease to various commercial cultivars by artificial wound and dipping in a conidial suspension of the fungus. Some fundamental data obtained are summarized as follows.

The casual fungi were isolated from diseased tulip bulbs of several commercially cultivate regions in Japan. From them, about 50 isolates were obtained by a single spore isolation. Each isolate has its own virulence to tulip cultivars. Bulbs of some cultivars were inoculated with representative isolates, No. 32 and No. 105, to examine their pathogenicity. In regard to spore density levels, the disease development increased directly to as the inoculum increased in both isolates.

It was obviously recognized that pathogenicity differed much in different cultivars by the methods mentioned above. Results obtained by two methods were considerably agreed as evaluation of disease severity for each cultivar, namely, lesion development and percentage of rotted bulbs occurred by needle and dipping inoculation, respectively. It was showed that some of those isolates had clearly different pathogenicity to a cultivar 'Red Matador'. Infected bulbs have showed different symptoms in combinations of the isolate and the cultivar by wound inoculation, and they were classified into five types.

I 緒 言

チューリップ球根腐敗病は戦後オランダから導入された球根により全国的に広がり、昭和29年にわが国のチューリップに大発生して潰滅的な被害を与えた。その後、球根消毒などにより本病の防除技術は進歩したが、なお毎年1~5%の球根腐敗病による被害が発生しており、ウイルス病とならびチューリップの重要な病害となっている。

本病に対する抵抗性に品種間差異が存在することはこれまで経験的に知られているが、その評価は必ずしも一定していない。土壌の高温、高湿は本病の発病誘因となるが、また種々の栽培条件も発病を助長する変動要因の一つである。実際の生産現場では施肥量を抑え、球根の

肥大を犠牲にして本病の発生を防ぐ努力をしている現状である。

本研究は球根腐敗病に対するチューリップの品種抵抗性を検定するための簡易接種法を確立する目的で、まず球根への針接種および浸漬接種を行なったところ、2、3の基礎的な結果が得られたのでここに報告する。

本試験を行なうにあたり、新潟県園芸試験場中臣康徳氏、京都府丹後病虫害防除所森岡良策氏、兵庫県農試但馬分場川瀬譲氏、鳥取県野菜試験場遠山明博士、鳥根県農業試験場多久田達雄氏の方々には本病罹病球根を送付していただき、また信州大学松尾卓見博士には種々の有益な御助言を賜った。記して厚くお礼を申し上げる。

II 材料および方法

1 供試菌

わが国のおもな球根産地から本病罹病球を収集した。収集地は新潟、京都、兵庫、鳥取、島根、富山の6府県

である。罹病球は常法により表面殺菌後、寒天上に置き単胞子を分離した。上記の方法によって得られた約50の分離菌株はPSA培地で保存した。各分離菌株は病原力を検定したのち、以降の試験に用いる菌株を選定した。すなわち病原力の比較的強い菌株にNo. 32菌（以後No. 32と略記）、比較的弱いものにNo. 105菌（以後No. 105と略記）の2株を選んだ。

接種に際し分離菌株はまずPSA培地で25°C、約10日間培養した。培養菌体を二重のガーゼで濾別したのち、分生胞子浮遊液中の胞子数をトーマス血球計算盤で計測し、所定の胞子数に調整して接種に用いた。

2 接種方法

1) 針接種 外皮をつけたままの貯蔵球根にあらかじめ一定濃度の胞子浮遊液をつけた木綿針20本で突き刺し、有傷接種（直径約4mm、深さ約2mm）を行なった。接種部は球根の背部の中央とし、1球につき1か所宛とした。接種後球根は18日間25°Cの恒温器に保った。接種直後の3日間はビニール袋で覆って温室に保ち、その後は無被覆のままとした。所定期間後に球根外皮をはがし、第一鱗片表面上に伸展した病斑の長さを計測した。

2) 浸漬接種 所定の胞子浮遊液に球根を3時間浸漬した後風乾しては場に植え付け慣行栽培した。1処理区につき24球を用いた。接種は昭和55年10月27日、植え付けは10月30日に行なった。球根は翌年6月中・下旬に株ごと掘り取り、乾燥後貯蔵して7月30日に収穫全球の本病による腐敗の有無について調査した。

3 供試品種

分離した約50菌株の病原力検定は品種 Rose Beauty (10cm球)で行なった。接種濃度と発病の試験において針接種では Paul Richter (11cm球)、浸漬接種では Spring Song (12cm球)を用いた。品種抵抗性の試験では本病に対し抵抗性が異なると思われる、Athleet, Queen of Night, Red Matador, Lucky Strike, Albino および Spring Song の計6品種を供試し、それぞれ針接種（各品種10cm球）および浸漬接種（各品種12cm球）を行なった。

III 試験結果

1 分離菌株の病原力

各地の罹病球から分離した菌株をチューリップ球根に針接種し、各菌株の病原力を検定した。接種部位における病斑面積は菌株ごとに異なり、18日目に約14cm²~18cm²の病斑を形成する菌株を中心に No. 13, 19, 27, 114 など病斑面積0に近い菌株が3、病斑面積4cm²の菌株が1つあるが、ほぼ8cm²~23cm²の病斑を形成す

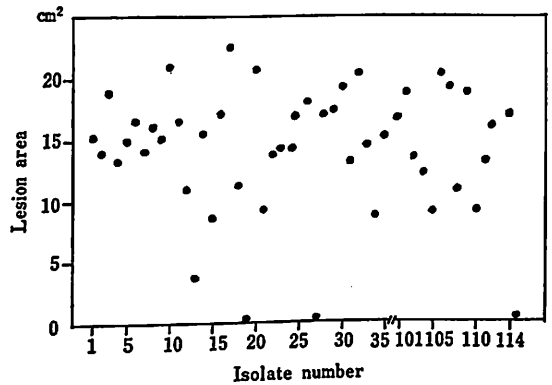


Fig. 1. Pathogenicity of isolates from the rotted tulip bulbs collected from several cultivate prefectures in Japan. The bulbs of tulip cultivar 'Rose Beauty' were firstly inoculated by artificial wound inoculation and measured 18 days after inoculation.

る菌株が連続的に見出された。このように、各菌株間には病原力の差異が明らかに認められるが、それらの明確な類別は困難であった。ただし、No. 13, 19, 27およびNo. 114の4菌株は病原力が著しく弱かった (Fig. 1)。

2 針接種法

1) 胞子濃度 病原力の比較的強い菌株としてNo. 32を、弱い菌株としてNo. 105を用い、胞子濃度と発病との関係を針接種法で検討した。Fig. 2のとおり、両菌株とも10³~10⁴個/mlの比較的低濃度では病斑の形成は認められなかった。No. 32は10⁵個/mlで、No. 105は10⁶個/mlの濃度で初めて病斑の拡大を示した。同一胞子濃度

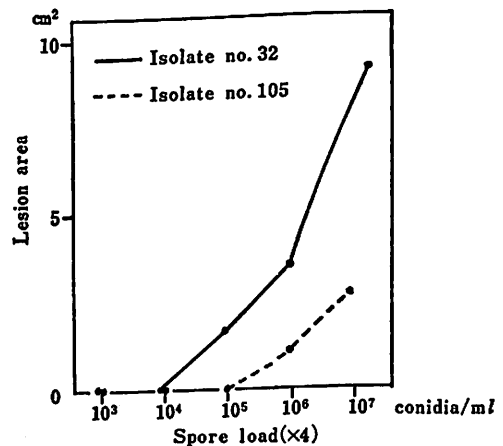


Fig. 2. The relationship between lesion development in bulb of tulip cultivar 'Paul Richter' inoculated by wound inoculation and some various concentrations of conidia of *F. oxysporum* f. sp. *tulipae*.

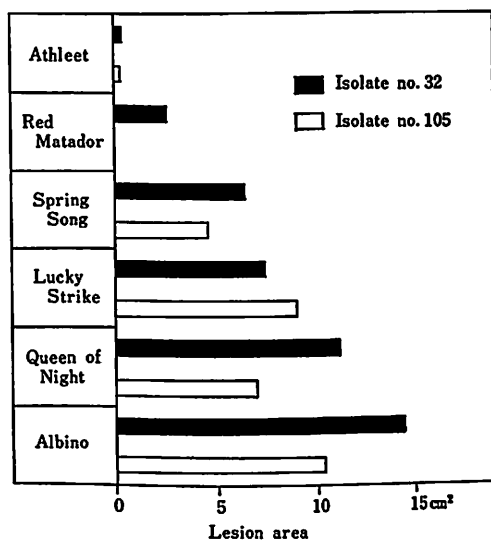


Fig. 3. Lesion enlargement was compared among six cultivars by artificial wound inoculation with 5×10^7 /ml conidial suspension of *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* 18 days after inoculation. Inoculation was carried out on July 15 in 1981.

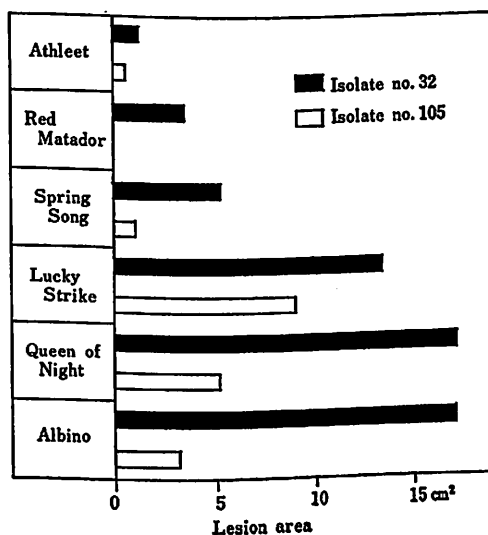


Fig. 4. Lesion enlargement was compared among six cultivars by artificial wound inoculation with 5×10^7 /ml conidial suspension of *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* 18 days after inoculation. Inoculation was carried out on August 19 in 1981.

では両菌株間で病原力の差異が見出されたが、いずれも接種濃度が高くなるにしたがって病斑面積も増した。

2) 品種抵抗性 菌株 No.32 と No.105 を用いて供試 6 品種のチューリップ球根に対する発病程度を比較した。接種は昭和55年7月15日と8月19日の2回行なった。その結果、病斑面積は接種時期によりわずかに異なったが、各品種間における病斑面積の差異がより一層明らかであった (Fig. 3, Fig. 4)。病斑面積は Albino, Queen of Night および Lucky Strike で最も大きく現われ、Spring Song と Red Matador とがこれらに次ぎ、Athleet で最も小さかった。供試した 2 菌株では病原力の差異が認められたが、供試 6 品種における病斑の拡大はほぼ同様の傾向を示した。しかし、品種 Red Matador では両菌株間に病原力の明らかな差異が認められた。すなわち、他の品種で比較的強い病原力を示す菌株 No.32 が平均 3.5cm^2 の病斑を形成するのに対し、弱い病原力を示す No.105 では病斑の形成は全く認められなかった。この現象は 2 回の繰返し実験で同様に認められた (Fig.3, Fig.4)。

3) 病斑部における病徴の差異 針接種によって著しく侵される感受性の品種では、18日後には球根表面は白色の菌糸体で覆われた (Plate I-1)。一方、感受性程度の低い品種すなわち Athleet (Plate I-2) では孢子浮遊液のかわりに殺菌水を用いた対照区 (Plate I-3) よりも病斑はやや大きいけれども、病斑の周囲がリング状を呈し伸展が止まっているのが特徴であった。その特徴は次に示す 5 つのタイプに分けられた。1: 球根の表面が白色の菌体で覆われる (Plate I-4)。2: 病斑部の菌体は白色の菌糸層の中に赤紫色の色素を産生する (Plate I-5)。3: 病斑は淡褐色~黒色で球根は乾固状を呈する (Plate I-6)。4: 病斑は黒色で水浸状を呈する (Plate I-7)。5: 球根は病斑部から樹脂を分泌する (Plate I-8)。

上記の 1~3 のタイプは同一なチューリップ品種でも併合して見られ、すなわち個体により異なって発現される場合があった。4 のタイプは菌株 No.105 や No.110, 111 などの接種により観察され、5 は品種 Spring Song で特徴的であった。しかし、これら 5 つのタイプは必ずしも特定の菌株、あるいは品種に特有の反応ではなく、菌株と品種との両者の組合せで発現されるようであった。

3 浸漬接種法

1) 接種濃度 浸漬接種法においても発病率は分生孢子濃度に比例して増加した (Fig. 5)。病原力は供試 2 菌株で明らかに異なり、菌株 No.32 はつねに No.105 に優っていた。すなわち収穫したすべての新球の発病球率では、No.32 が 4×10^7 の接種濃度で 26.0%、 $\times 10^6$ で 15.9%、 $\times 10^5$ で 9.1%、 $\times 10^4$ で 4.9% であった。一方、

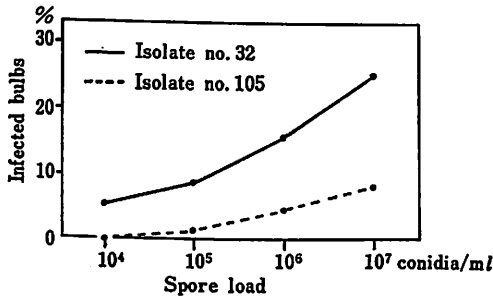


Fig. 5. Percentage of rotted offspring bulbs of the tulip cultivar 'Spring Song' by dipping in a conidial suspension of *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* at different concentrations.

No. 105では 4×10^7 で7.2%, $\times 10^6$ で4.9%, $\times 10^5$ で0.7%の値を示し, $\times 10^4$ では発病がまったく認められなかった。

2) 品種抵抗性 供試6品種について発病検定を行なった結果, Table 1のように品種間に明らかな差異が認められた。Fig. 6に示したように最も発病の著しい品種は Albino であり, 収穫全球の発病球率で示すと No. 32接種では66.4%, No. 105接種では52.0%であった。これに対し Athleet は最も発病率が低く, No. 32接種では3.0%, No. 105では4.2%であった。供試6品種に

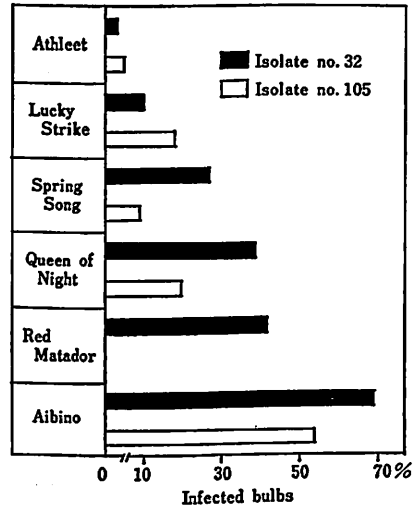


Fig. 6. Percentage of rotted offspring bulbs of six tulip cultivars by dipping in a conidial suspension of *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* (4×10^7 conidia/ml) for three hours. Bulbs were planted on October 30 and harvested in June the following year. They were dried quickly, stored ordinary condition and examined on July 30 in 1981.

Table 1. Percentage of infected offspring bulbs of six tulip cultivars by dipping in a conidial suspension of *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* (4×10^7 conidia/ml) for three hours. Bulbs were planted on October 30 and harvested in June

Cultivar	Isolate no.	Percentage of infected plants	Percentage of infected offspring bulbs*	
			Main bulbs	Lateral bulbs
Athleet	T-32	13.0	4.3	2.6
	K-105	16.7	12.5	2.1
	Cont.	4.2	0	1.0
Queen of Night	T-32	60.9	47.8	27.4
	K-105	52.4	19.0	20.0
	Cont.	20.8	0	5.6
Red Matador	T-32	79.2	45.8	38.6
	K-105	0	0	0
	Cont.	0	0	0
Lucky Strike	T-32	25.0	16.7	7.2
	K-105	54.2	26.1	15.7
	Cont.	0	0	0
Albino	T-32	100	95.8	57.8
	K-105	95.8	91.7	39.7
	Cont.	8.3	4.2	1.1
Spring Song	T-32	78.3	43.5	22.0
	K-105	34.8	17.4	5.2
	Cont.	4.2	0	0.8

* Number of harvested main bulbs and lateral bulbs varied per treatment per cultivar from 23 to 24 and from 78 to 121, respectively. Examination was carried out on July 30 in 1981.

対する発病検定の結果から, No. 32はNo. 105よりも病原力が強い傾向が認められた (Fig. 6)。No. 32の品種 Red Matador に対する接種試験の結果, 発病株率は79.2%であり, 収穫全球の発病球率は40.2%であったが, 菌株 No. 105の接種ではまったく発病球は認められなかった。したがってNo. 105は Red Matador に病原性がないと考えられた。なお, 浸漬接種法により接種した供試6品種ではほ場に植え付け後観察を行なったが, 立毛中における発病はほとんど認められなかった。

IV 考 察

チューリップの球根腐敗病に対して品種間差異が存在することを記載した報告^{7,10,12)}はこれまでいくつかある。筒井ら¹⁰⁾は貯蔵球根に対しメス等で有傷接種を行ないほ場に植え付けた結果, 品種により明らかな抵抗性の差異が見られ, 従来経験的に知られているそれぞれの抵抗性の強弱とかなり一致したことを報告している。今回の試験では供試6品種の抵抗性の評価, すなわち針接種による病斑の伸展面積と浸漬接種による球根の発病率はかなりよく一致する結果が得られた。

球根への針による有傷接種と浸漬して植え付ける無傷接種の2つの異なる接種方法による発病程度がかなり一

致した点は興味深い。本菌の感染経路に関して、山田ら¹³⁾は従来傷によって起るとされているのを、無傷部分でも表皮細胞の縫合部や気孔から侵入し、とくに前者に多いことを指摘した。一方、Bergman ら¹⁴⁾は本菌の球根内側のりん片に到達する方法は2つあり、1つは外側のりん片を通して進展する方法で他の1つは球根基部へ侵入して内側へ進展する方法であると述べている。これらの報告からも本試験での針接種と浸漬接種の方法による結果がかなり一致した点は支持されると考えられる。

接種した孢子濃度と発病に関して供試2菌株の病原力はそれぞれ異なっていた。病原力弱のNo.105は針接種では $10^3 \sim 10^5$ 個/mlの孢子数では病斑は進展せず、 10^6 個/mlで初めて認められ、浸漬接種では 10^4 個/mlでは発病は見られず、 10^5 個/mlより発病が認められた。病原力強のNo.32についても同様に同一孢子濃度では浸漬接種による病原力の方が針接種のそれよりも優っていた。これは浸漬接種では接種面が大きく、球根全面に対して安定した発病が起こるためと考えられる。また針接種、浸漬接種ともにある程度の孢子数が浮遊液に含まれていないと発病に至らなかった結果は、球根を発病に至らしめる病原力の差異が存在し、また浸漬接種法では接種後球根表面で菌体の増殖がそれほど旺盛ではないことに起因するのではないかと考えられる。

本試験の結果、わが国の各球根産地から分離した菌株間には病原力にかなり差異が認められた。現在まで本病菌の病原力あるいは病原性に関する報告^{1,5,9,13)}はいくつかある。しかし、本病菌のチューリップ品種に対する寄生性の差異について記載している報告^{1,13)}は少ない。本試験の結果、針接種、浸漬接種ともに品種Red Matadorに対してNo.32は明らかに発病を示したが、No.105の接種では病斑の伸展は見られず、また発病球もまったく認められなかった。No.32とNo.105のRed Matadorに対する発病の有無は本病菌の寄生性分化の存在を示唆するものと考えられる。

本病に対する品種間差異について、Bergmanら¹⁴⁾は植物組織内における化学的な物質の存在と品種間差異と関連させて考えることは時期尚早だと記述している。山田ら¹³⁾は強、弱の2品種を用い組織解剖的に検討した結果、抵抗性品種は罹病性品種に比較し表皮細胞での菌糸のまん延が緩慢であり、組織の崩壊や変形がほとんど認められなかったことをパラフィン切片の光顕観察により明らかにしている。本病に対する品種抵抗性の簡易検定法を確立するため、本実験で行った針接種による病斑面積の比較はその抵抗性を有効に判定できると考えられたが、このことは上述の山田らの報告によっても支持されると考えられる。

針接種による病斑部の病徴は5つのタイプに分けられたが、このように有傷接種で菌株あるいは品種の違いによりそれぞれ異なるタイプが認められたことは興味深い。今後さらに針接種による病斑部の病徴について詳しく検討する必要がある。

オランダではEijkら^{5,6)}が菌体を土壌へ接種しそこに球根を植えつける土壌接種法により、交配1年目のチューリップ実生球を発病検定し、選抜育種を行なう方法を検討している。彼らはその報告⁹⁾の中で球根を浸漬接種する方法は土壌接種に比べ省力化できるが、前者は後者に比較して孢子の接種濃度と発病との関係が明確でなかったと述べている。

本試験の結果、接種孢子濃度を変更することによって発病程度を変えることができたが、このことは本病抵抗性の検定技術として重要な点である。実際の育種段階、あるいは育成系統や導入品種の検定などのためには、簡易的検定法により少数の球根を用いて短期間に精度の高い結果が得られることが望まれる。その点では針接種法はかなり有望な方法であると考えられたが、同時にその欠点についても今後明らかにする必要があるだろう。

V 摘 要

チューリップ球根腐敗病に対する品種抵抗性の簡易的検定技術を確立することを目的として本試験を行なった。本報ではまず球根への接種方法について検討したところ、2, 3の基礎的な結果が得られた。

1 富山県内および全国の球根産地から本病罹病球を収集し、病原菌を単孢子分離して約50菌株を得た。

2 50株の供試菌株の間には病原力の差異が明らかに認められた。

3 代表的な菌株を用いて数品種のチューリップ球根に接種した結果、品種により明らかな発病の差異が認められた。

4 針接種と浸漬接種の2つの方法は供試6品種の本病抵抗性に関して、かなりよく一致する結果を示した。また両方法では孢子の接種濃度を変更することによって発病程度を変えることができた。

5 分離菌株の中にはチューリップの特定の品種に対して明らかに病原性の異なる菌株のあることが認められた。

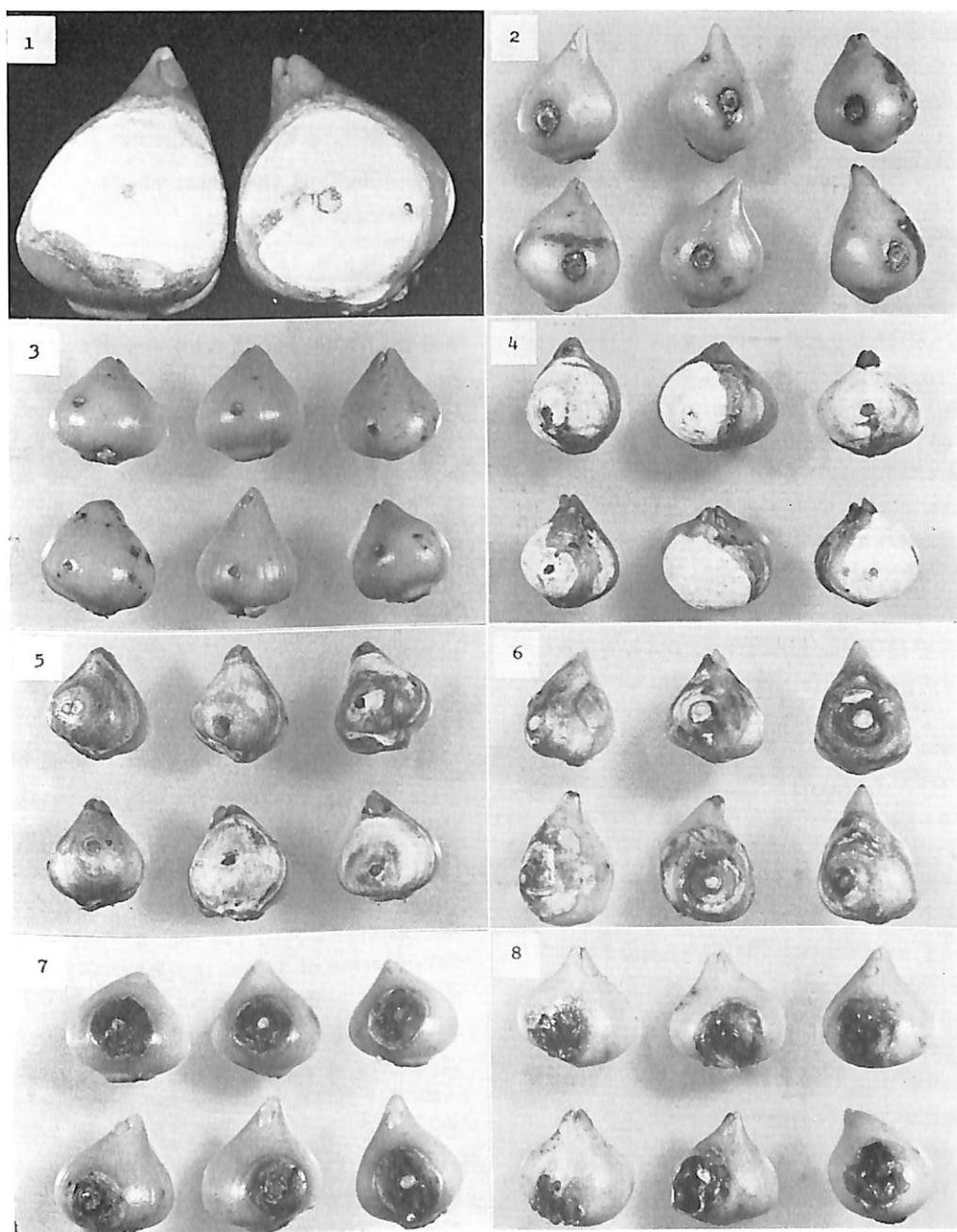
6 針接種法による球根病斑部の特徴は5つのタイプに分けられた。

引用文献

- 1) 安部卓爾・野添早苗(1960) *Fusarium* によるチューリップの球根腐敗に関する研究. 京都府立大学学術

- 報告 12: 47~56. 2) Bergman, B.H.H. and Beijersbergen, J.C.M. (1968) A fungitoxic substance extracted from tulips and its possible role as a protectant against disease. *Neth. J. Pl. Path.* 74 (Suppl. 1): 157~162. 3) Bergman, B. H. H. and Bakker-van der Voort (1979) Latent infection in tulip bulbs by *Fusarium oxysporum*. *Neth. J. Pl. Path.* 85: 188~195. 4) Eijk, J.P. van., Bergman, B.H.H. and Eikelboom, W. (1978) Breeding for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* in tulip (*Tulipa* L.). 1. Development of a screening test for selection. *Euphytica* 27: 441~446. 5) Eijk, J. P. van., Garretsen, Frida and Eikelboom, W. 1979 Breeding for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* in tulip (*Tulipa* L.). 2. Phenotypic and genotypic evaluation of cultivars. *Euphytica* 28: 67~71. 6) 桜井博(1962) チューリップの球根腐敗病. *新花卉* 36: 44~46. 7) 柴田喜久雄(1962) チューリップ腐敗病 (*Fusarium oxysporum* の一系統) 防除上の生態的知見. *新潟農林研究* 14: 17~23. 8) 筒井澄・西井謙治・豊田篤治(1963) チューリップ球根腐敗病の栽培上の問題に関する二, 三の実験. *富山県農試礪波園芸分場研報* 3: 20~27. 9) 山田員人・梶原敏宏・尾添茂(1971) チューリップ球根無傷部からの球根腐敗病菌の侵入について. *日植病報* 37: 386 (講要). 10) 山田員人・門脇義行(1979) チューリップ球根腐敗病の防除法確立に関する試験 2. 抵抗性の異なるチューリップ品種への球根腐敗病菌侵入経過と各菌株の各品種に対する病原性. 近畿中国地域春季試験研究打合せ会議資料 No.189. 11) 山本昌木・遠山和紀・吉野藩入・三沢健一(1959) 島根県下に発生したチューリップの立枯性病害について. *島根農科大学研報* 7: 79~84.

(1982年7月30日受領)



An aspect of lesion development and the symptoms of bulbous surface inoculated by a needle-prick inoculation, 18 days after inoculation.

1. Enlarged lesions covered with a white mycelial mats in susceptible cultivar.
2. Little developed lesion in resistance cultivar 'Athleet' showed a brown ring spot.
3. Control : inoculated with a sterilized water.
4. Bulbs covered fully with a white mycelia of the fungus, 18 days after inoculation.
5. Purple pigment of the fungus showed within an above white mycelia mats.
6. Lesion colored up light brown to black by the fungus and bulbs were dried.
7. Lesion of black color showing with just like a bruise.
8. Appearance of bulbs of gummosis like exudation.