

ラッキョウのウイルスフリー苗から分離した *Fusarium* 菌の病原性、 体細胞和合性およびベノミル剤耐性

本多 範行・川久保 幸雄

Noriyuki HONDA and Yukio KAWAKUBO :
Characterization of *Fusarium* spp. from virus-free Rakkyo (*Allium chinense*)
by pathogenicity, vegetative compatibility groups and Benomyl-resistance

福井県のラッキョウ (*Allium chinense* G. Don) は三里浜砂丘地帯で栽培され、そのほとんどが植え付け2年後に収穫される2年掘り栽培である。現在、栽培面積は200haで、生産量は2,500tとなっているが、生産量の年次変動が大きい。本県のラッキョウは、ほぼ100%ニンニク潜在ウイルスに感染しており⁹⁾、その対策として、ウイルスフリー球の利用による生産性の向上を進めている。

ラッキョウ乾腐病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *allii*)⁹⁾ は1975年に鳥取県で発見され、本県でもほとんど同時期に「ラクダ系福井在来」から系統選抜した品種「九頭竜」で多発した。その後は発病株率0.1%以下の少発生で推移してきたが、1993年頃からウイルスフリー苗に乾腐病が多発し、約10%が欠株となり問題となった。りん茎の腐敗部からは *Fusarium* 菌が分離された。しかし、腐敗の見られないラッキョウにおいても非病原性 *Fusarium* 菌が高頻度に分離される²⁾ ことから、病原菌と非病原菌を類別することは重要である。

F. oxysporum は病原性の違いによって分化型に分類されるが、病原性の発現は土壌、環境条件および植物の生育段階などによって変動しやすく¹⁰⁾、また、病原性検定に長期間を要する。近年、*F. oxysporum* の分化型を硝酸塩利用能欠損変異株 (Nitratonon-utilizing mutant: *nit* mutant) を利用した体細胞和合性群 (Vegetative compatibility group, VCG) によって分類する試みがなされている^{11), 12)}。

そこで、ウイルスフリー苗から分離した *Fusarium* 菌の病原性、体細胞和合性による分類およびベノミル剤に対する感受性について検討したので報告する。

材料および方法

1. ウイルスフリー苗からの *Fusarium* 菌の分離

1993年10月、福井県三国町のウイルスフリー苗増殖圃場の生育不良の苗と坂井農業改良普及センターで貯蔵してあったウイルスフリー球を採集した。腐敗の見られるりん茎基部と外見健全なりん茎のりん片、底盤部および根部から、常法により表面殺菌後、駒田培地³⁾ に置床し、*Fusarium* 菌を分離した。分離した *Fusarium* 菌はジャガイモ煎汁・しょ糖寒天 (PSA) 培地とKCl寒天培地⁶⁾ を用いて同定した。

2. 分離した *Fusarium* 菌のラッキョウに対する病原性

接種に用いたラッキョウは、場内の圃場で栽培した「ラクダ系福井在来」の種球を用いた。接種方法は底盤接種と土壌接種の2方法で行った。

底盤接種は遠山の方法¹⁰⁾ に準じた。根を切除したラッキョウりん茎を、次亜塩素酸ナトリウム400倍液で20分間表面殺菌し、流水で洗浄後、底盤の下面にメスで小さく傷を付けた。付傷部に、ジャガイモ煎汁・ブドウ糖寒天 (PDA) 培地で培養した供試菌株の菌叢ディスクを付着させ、接種した。直径9cmのシャーレにろ紙を敷き、1シャーレ当たり殺菌水を2ml加え、湿室状態にしたシャーレに5球ずつ入れ、25℃で34日間培養後、菌株当たりりん茎20球の腐敗程度を調査した。培養期間中、水の補充は行わなかった。

土壌接種はシードリングケース (8×15×5.5cm) に殺菌砂500mlを詰め、ジャガイモ煎汁・しょ糖液体 (PSB) 培地で、25℃、5日間培養した菌体懸濁液100mlを二重ガーゼで菌糸片を除き、遠心洗浄し灌注接種した。7日後に表面殺菌した種球をケース当たり10球植え付け、28℃のガラス室で栽培し、植付け34日後に萎ちょう株数を調査した。また、49日後に株を掘り上げ、りん茎の腐敗程度を調査した。

3. 分離した *Fusarium* 菌の相補性試験

nit mutant の作出は Puhalla¹¹⁾ の方法に従った。塩

素酸塩 (1.5% KClO₃ 添加, MMC) 培地¹⁾ に野生型の親菌株を置き, 4~7日間で生育してきたセクターを *Fusarium* 菌の最少 (MM) 培地¹⁾ に移植し, 培地上で薄い菌叢を形成する菌株を *nit mutant* として選抜した。

乾腐病菌とラッキョウからの分離菌株 (第1表) の親株から作出した *nit mutant* を MM 培地上で対峙培養した。相補性がある *nit mutant* 間では, 菌糸接触部分でヘテロカリオンを形成し, 野生型様の気中菌糸を形成する。対峙培養は2回以上行った。

4. ベノミル剤に対する感受性

ベノミル剤 (ベノミル水和剤, 50%) 濃度が 0.19, 0.39, 0.79, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 および 100ppm (成分比, 以下同じ) になるように PDA 培地に添加し, オートクレイブ (121°C, 20 分間) で滅菌後, 9 cm シャーレ当たり 10ml ずつ分注し, 検定用培地とした。PDA 培地で前培養した *Fusarium* 菌の菌叢ディスクを検定用培地に移植し, 25°C で 72 時間培養後, 最小生育阻止濃度 (MIC) を調査した。また, 併せて菌叢直径を測定し, 次式から菌糸生育阻止率を算出した。

$$\text{菌糸生育阻止率 (\%)} = (A - B) \div A \times 100$$

A : 薬剤無添加培地の菌叢直径

B : 薬剤添加培地の菌叢直径

結 果

1. 分離した *Fusarium* 菌の同定

Fusarium 菌の同定は Nelson⁵⁾ の分類体系によった。ウイルスフリーのラッキョウの腐敗した, または健全な組織からは, 3種類の *Fusarium* 菌 34 菌株が分離された。一つは分生子柄の先端に連鎖状と擬頭状の分生子を形成したことから *F.moniliforme* と同定した。他の二つは擬頭状の小型分生子と厚膜胞子を形成した。一方は無隔膜の短い分生子柄であるのに対して, 他方は隔膜を有する長い分生子柄の先端に擬頭状の小型分生子を形成したことから, 前者は *F.oxysporum*, 後者は *F.solani* と同定した。

ウイルスフリー苗の腐敗した組織からは, *F.oxysporum* が 17 菌株, *F.moniliforme* が 1 菌株, *F.solani* が 1 菌株分離された。外見健全なラッキョウの組織からは *F.oxysporum* が 12 菌株, *F.moniliforme* が 3 菌株分離された (第1表)。

2. 分離菌の病原性

底盤接種, 土壌接種で病原性を検定した結果, 底盤接種に比べ, 土壌接種による方が多く発病し, 芯腐れ症状を示す割合も高くなる傾向にあった。

供試した *Fusarium* 菌のうち, 底盤接種または土壌接種で底盤が腐敗し, 芯腐れ症状まで至ったのは 27 菌株であった。*F.oxysporum* 29 菌株のうち, 底盤接種,

第1表 供試菌株の分離源と所属

菌 株	分離源および来歴	所 属
FA 1, FA 2, FA 3, FA 4, FA 5, FA 6, FA 7, FA 8, FA 9, FA 11, FA 13	増殖圃場の腐敗球	<i>F.oxysporum</i>
FA 10, FA 15, FA 16, FA 17, FA 18, FA 19	室内貯蔵中の腐敗球	
FA 27, FA 28, FA 29, FA 30, FA 31	増殖圃場の健全球の根部	
FA 22, FA 23, FA 34	増殖圃場の健全球の底盤部	
FA 20, FA 25, FA 26, FA 32	増殖圃場の健全球のりん片	
FA 12	増殖圃場の腐敗球	<i>F.solani</i>
FA 14	増殖圃場の腐敗球	<i>F.moniliforme</i>
FA 21	増殖圃場の健全球の底盤部	
FA 24, FA 33	増殖圃場の健全球のりん片	
夏腐病菌 M95649	福井農試保存菌, 1970年代分離菌株	<i>F.oxysporum</i>
	福井農試保存菌, 1995年分離菌株	f.sp. <i>allii</i>
F 1 - 5 - 1	福井県立短大保存菌, 1970年代分離菌株	

菌株	<i>F.moniliforme</i>				<i>F.oxysporum</i>				
	F A 33	F A 24	F A 21	F A 14	F A 19	F A 15	F A 10	F A 7	F A 2
FA 2	○	○	○	○	●	●	○	●	●
FA 7	○	○	○	○	●	●	●	●	
FA 10	○	○	○	○	●	●	●		
FA 15	○	○	○	○	●	●			
FA 19	○	○	○	○	●				
FA 14	●	●	○	●					
FA 21	○	○	●						
FA 24	●	○							
FA 33	●								

第2図 ラッキョウから分離した非病原性 *F.moniliforme*, *F.oxysporum* の体細胞和合性

菌株, *F.moniliforme* の4菌株, *F.solani* は1菌株であった。これらの菌株は病原性がないか、または弱い菌株で、乾腐病菌と相補性を示さなかった菌株であった。MIC値が3.12ppm~6.25ppmであったのは、*F.oxysporum* 26菌株で、EC50はほとんどが0.79ppmと1.56ppmの間にあり、乾腐病菌3菌株と差がなかった(第3表)。

考 察

ウイルスフリー苗が、*Fusarium* 病に弱いという観察事例はイチゴ萎黄病などで知られている⁹⁾。ラッキョウにおいても1993年にウイルスフリー苗増殖圃場で乾腐病による欠株が散見された。

ラッキョウ乾腐病を引き起こす病原菌として*F.oxysporum* f. sp. *allii* と *F.solani* f. sp. *radicicola*¹⁰⁾ の2種類があるが、外見健全なラッキョウからは、*F.moniliforme* が頻りに分離され、次いで *F.oxysporum*, *F.solani* が分離される⁹⁾。これら非病原性の *F.moniliforme* や *F.oxysporum* を前接種することによって、*F.oxysporum* f. sp. *allii* による乾腐病の発生を抑制することができる⁹⁾。ウイルスフリー化によって、ウイルスだけでなく、これらの非病原性 *Fusarium* 菌が存在しないために、乾腐病に対する抵抗性が低下したとも考えられる。

圃場や貯蔵中のウイルスフリー苗の腐敗球からは、*F.oxysporum*, *F.moniliforme* および *F.solani* が分離され、*F.oxysporum* の分離率が高かった。これらの *Fusarium* 菌は接種試験の結果、*F.oxysporum* は強い病原性を示す菌株から病原性を示さない菌株を含んでいた。*F.solani* は病原力が弱く、*F.moniliforme* はラッ

第3表 ラッキョウから分離した *Fusarium* spp. のベノミル剤に対する感受性¹⁾

菌 数	MIC値 (ppm)	菌糸生育阻止率 (%) ²⁾	
		0.79ppm	1.56ppm
FA30	3.12	9	85
FA18	3.12	9	80
FA26	3.12	8	68
FA8	3.12	6	96
FA3	3.12	7	76
FA13	3.12	17	44
FA6	3.12	4	80
FA17	3.12	6	67
FA31	3.12	5	85
FA4	3.12	21	85
FA5	3.12	6	87
FA1	3.12	8	86
FA9	3.12	16	85
FA22	3.12	12	81
FA34	3.12	6	89
FA32	3.12	3	76
FA23	3.12	8	58
FA25	3.12	19	59
FA29	3.12	2	71
FA20	6.25	5	83
FA27	3.12	5	51
FA16	3.12	3	76
FA28	3.12	3	53
FA11	6.25	9	51
FA7	3.12	15	17
FA2	100<	0	17
FA10	3.12	20	99
FA15	100<	13	17
FA19	100<	0	6
FA12	100<	30	47
FA21	100<	0	0
FA14	100<	0	42
FA24	100<	13	42
FA33	100<	2	3
M95649	3.12	12	86
F1-5-1	3.12	16	97
夏腐病菌	3.12	7	84

注) 1) 25℃, 3日間培養 2) ベノミル剤濃度0.78ppm, 1.56ppm含有PDA培地における無添加培地に対する菌糸生育阻止率

キョウに対してりん茎腐敗より根腐れ症状を引き起こすことが多く、遠山¹⁰⁾, 伊阪ら⁹⁾の報告と一致した。また、外見健全なラッキョウからも病原力の強い *F.oxysporum*

が分離されたことから、病徴が見られなくとも既に感染していたものと考えられた。

F. oxysporum は各種植物に対する病原性の差異によって、多数の分化型に分けられている。分化型を判別するには多くの作物に接種し、病原性を調べる必要があるが、Puhalla¹¹⁾, Correll ら¹²⁾ は *nit mutant* の相補性を利用して、体細胞和合性を調べ、簡便に分化型を識別できることを示した。また、俞ら¹³⁾ はユリ科植物に病原性を示す *F. oxysporum* の 6 分化型 (*f. sp. garlic, lili, asparagi, cepae, allii, tulipae*) の VCG を調べ、これらの 6 分化型間では体細胞和合性は認められず、*F. oxysporum f. sp. allii* では 1 つの VCG であったとした。本試験では分離した *F. oxysporum* の 29 菌株は病原性が強いものからあまり強くないものが存在した。しかし、乾腐病菌 3 菌株と同一 VCG に属した 23 菌株に、非病原性の菌株が含まれなかったことから、これらは乾腐病菌と同定できる。また、俞ら¹³⁾ の試験では、福井分離株と鳥取分離株においても和合性を示したことから、体細胞和合性を調べることによって、簡便に乾腐病菌を同定できると考えられる。

病原性の弱いまたは病原性のない *F. oxysporum* 5 菌株と *F. moniliforme* 3 菌株は、それぞれ同一の VCG であったことから、これらの *nit mutant* のテスター菌株を用いることによって、ラッキョウに生息する *Fusarium* 菌の生態的研究が可能と考えられる。

ラッキョウ乾腐病対策として、本県では 1980 年頃からベノミル剤が使用されており、高い防除効果を上げている。しかし、鳥取県では 1978 年に本剤耐性菌の出現が報告され¹⁰⁾ て、現在でも問題となっている⁷⁾。供試した *F. oxysporum* のうち MIC 値が 100ppm 以上を示した 3 菌株は、病原性が弱いか、または病原性のない菌株で、乾腐病菌と和合性が認められなかった菌株であった。また、供試した全ての *F. solani*, *F. moniliforme* はベノミル剤に対して耐性を示した。これらのことからウイルスフリー苗における乾腐病の多発は、ベノミル剤耐性乾腐病菌の出現による薬効の低下によるものではないと考えられる。対照に使用した夏腐病菌、F1-5-1 菌は 1970 年代に分離された菌株であるが、乾腐病菌と同一の VCG に属した菌株は、対照菌株と MIC 値、EC50 に大きな差はなく、薬剤耐性は発達していないと考えられた。健全なラッキョウからは *F. moniliforme* が、*F. oxysporum* や *F. solani* に比べ頻りに分離されてくることから、*F. moniliforme* が種球消毒でベノミル剤の淘汰をうける機会が多く、耐性菌の割合が高くなったと考えられる。

本試験で、ベノミル剤に耐性を示す非病原性 *Fusarium* 菌が分離されたことから、ベノミル剤耐性非病原性

Fusarium 菌による生物的防除とベノミル剤による種球消毒の組合せによってより効果の高い防除が期待される。

摘 要

ラッキョウのウイルスフリー苗から分離した *Fusarium* 菌の病原性、体細胞和合性による分類、ベノミル剤に対する感受性を検討した。

1. ウイルスフリー苗から *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani* を分離した。

2. *F. oxysporum* 29 菌株のうち、病原性を示す 23 菌株がラッキョウ乾腐病菌と同一体細胞和合性群に属した。

3. 非病原性 *F. oxysporum* 3 菌株と弱病原性 *F. oxysporum* 2 菌株は同一体細胞和合性群に属した。

4. *F. moniliforme* 4 菌株は病原性を示さず、その内 3 菌株は同一体細胞和合性群に属した。

5. ラッキョウ乾腐病菌と同一の群はベノミル剤に感受性であった。

6. ベノミル剤に耐性を示したのは、*F. oxysporum* 3 菌株、*F. moniliforme* 3 菌株、*F. solani* 1 菌株でラッキョウに対して弱病原性、または非病原性の *Fusarium* 菌であった。

引用文献

- 1) Correll, J. C., Klittich, C. J. R. and Leslie, J. F. (1987) Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. *Phytopathology* 77: 1640~1646.
- 2) 本多範行・川久保幸雄 (1994) ラッキョウから分離される非病原性フザリウム菌の根部への定着、日植病報 60: 775.
- 3) 伊阪実人・岡本 博 (1977) *Fusarium* 菌の寄生によっておこるラッキョウの腐敗について。福井県立短大研究紀要 2: 19~52.
- 4) 駒田 旦 (1976) 野菜のフザリウム病菌, *Fusarium oxysporum* の土壤中における活性評価技術に関する研究。東海近畿農試研報 29: 132~269.
- 5) Matuo, T., Tooyama, A. and Isaka, M. (1979) *Fusarium* basal rot of *Allium bakeri* Regel and its causal fungus, *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *allii* n. f.. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 45: 305~312.
- 6) Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. (1983) *Fusarium* species, *Ann. Illustrated Manual for Identification* pp.193, Pennsylvania.

- 7) 佐古 勇・吉田浩之・遠山 明 (1995) ラッキョウ乾腐病菌のベノミル剤に対する耐性菌の発達経過と代替剤による防除効果. 関西病害虫研報 37: 67.
- 8) 高松 進 (1990) 弱毒ウイルスによるラッキョウウイルスの防除. 平成元年度病害虫に関する試験成績. 福井県農業試験場病理昆虫課資料No99: 40~63.
- 9) 手塚信夫・牧野孝宏 (1991) 非病原性 *Fusarium oxysporum* によるイチゴ萎黄病の生物的防除. 日植病報 57: 506~511.
- 10) 遠山 明 (1980) ラッキョウ乾腐病に関する研究. 鳥取野菜試特別報告 1: 1~56.
- 11) Puhalla, J. E. (1985) Classification of strain of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility, Can. J. Bot. 63: 179~183.
- 12) Windels, C. E. (1993) Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. 115~125, APS Press. Minnesota.
- 13) 兪晟溶・渡辺英樹・小林喜六・生越 明・児玉不雄 (1993) ユリ科植物に病原性を示す *Fusarium oxysporum* 分化型の体細胞和合性群 (Vegetative compatibility group, VCG). 日植病報 59: 3~9.

(1997年11月10日受領)