

フザリウムワークショップに参加して(2)

千葉大学園芸学部生物生産基礎科学講座

長 尾 英 幸

I Fusarium 菌の分類と同定

Fusarium 菌の分類は、歴史的には Wollenweber-Reinking のシステムがパイオニアとして位置づけられる。初期には植物体上に形成されたスポロドキアの胞子を観察したため、同じ種内の変異が膨大な種へと認識された。後には培養に菌株の比較を行い 1,000 余種を 65 種までに整理した。BURGESS のグループでは変異に左右されず、種の特徴を表せるような培養条件を設定し、五つの観察項目を重視している。三つの培養条件とは、

- ① 基本培地はカーネーション葉片寒天培地 (CLA) とジャガイモブドウ糖寒天培地 (PDA)，
 - ② 環境制御が十分行われた条件下での培養，
 - ③ 单胞子分離による培養株のスタート，
- である。各項目について補足すると、①については、カーネーション葉片は γ 線照射による殺菌が推奨された。また PDA はコロニーの色素を観察するために用いられている。②については、培養環境は明暗 12 時間周期で、温度を 25°C と 30°C に設定する。③については、胞子を形成しなくなった株では、菌糸先端を培養のスタートとする方法でも代替できる。

Fusarium 菌の分類と同定には次の五つのポイントを必ず確認し、比較する，

- ① スポロドキアに形成された大型分生胞子の形態
- ② 小型分生胞子形成の有無
- ③ 小型分生胞子の形態と形成様式(擬頭状か鎖状か)
- ④ 分生胞子形成細胞の形態(モノフィアライドかポリフィアライドか)
- ⑤ 菌糸上に厚膜胞子を形成するかどうか

II Fusarium 菌の分類と同定の実際

講義は特徴をまとめたスライドを写し、それぞれのポイントを解説してくれた。大まかな同定については同定ガイド I を表-1 に示した。表内の同定ガイド II・III には以下の解説ポイントに紹介した種が含まれる。取り上げられた種はオーストラリアや南半球でのみ報告されているものもある。詳細はフザリウム実験マニュアル第 3 版に説明されているので、この項では強調された点について

て記する。

< 同定ガイド I >

F. decemcellulare カカオやライチの胴枯れ病を起こす熱帯性の菌。大型分生胞子は非常に長い。小型分生胞子はモノフィアライド上に鎖状に形成。生育は非常に遅い。スポロドキアは黄色で液滴が付着。厚膜胞子は形成しない。

F. dimerum 大型分生胞子は小さく、1-2 隔壁。PDA 上の生育は遅く酵母のような生育をする。気中菌糸はほとんどない。小型分生胞子を形成しない。厚膜胞子を形成。

F. lateritium コーヒーの木の病原菌。大型分生胞子は細胞壁が薄く、頂部の細胞は鉤状(図-1)。スポロドキアは淡いオレンジ色に着色。生育は遅い。厚膜胞子の形成はほとんどない。

F. merismoides 大型分生胞子は頂部がやや屈曲し、3-4 隔壁。PDA 上の生育は遅く酵母のような生育をする。コロニーは黄色から暗茶褐色に着色。厚膜胞子を形成。

< 同定ガイド II >

F. anthophilum 小型分生胞子は擬頭状にのみ形成されるが、モノフィアライド上とポリフィアライド上の両者が観察される。小型分生胞子は球形のものもある。

表-1 オーストラリア産 *Fusarium* 菌の検索表
(フザリウム実験マニュアル第 3 版より)

同定ガイド I

A. コロニー直径が 2.0 cm 以下 (25°C, 3 日培養)

1. 小型分生胞子を形成しない

i. PDA 上のコロニーは平滑、酵母様あるいはサンゴ状(ほとんど粘質)で、クリーム色、黄色または暗赤褐色

F. dimerum

F. merismoides

ii. 大型分生胞子はすらりとして、しばしば頂部細胞が鉤状となる。PDA 上のコロニーは平滑(ほとんど粘質)あるいは綿毛状の菌糸をともなう

F. lateritium

2. 小型分生胞子は豊富、鎖状に形成する。CLA と PDA 上に黄色スポロドキアを多数形成。スポロドキアに浸出物の液滴を付着。

F. decemcellulare

B. コロニー直径が 2.0 cm 以上 (25°C, 3 日培養)

1. 小型分生胞子を形成し、通常は豊富に形成。フィアライド上に擬頭状あるいは鎖状に分生胞子を形成。

同定ガイド II

2. 小型分生胞子を形成しないかほとんどまれに形成

同定ガイド III

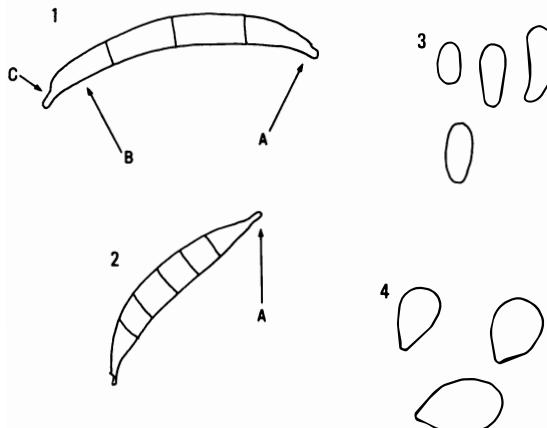


図-1 大型分生胞子と小型分生胞子

1:大型分生胞子の概略, A, 頂部, B, 基部, C, 脚胞, 2: *F. sambucinum* の大型分生胞子, A, 「イルカの鼻」, 3: 典型的な小型分生胞子, 4: 滴状(napiform)の小型分生胞子。

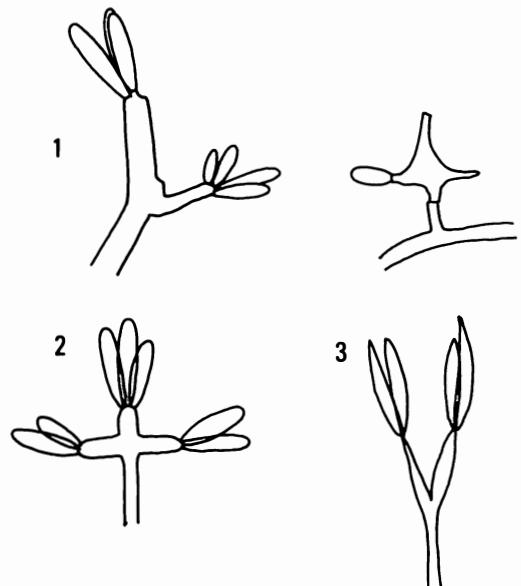


図-2 ポリフィアライドの例

1:ポリフィアライドの概略, 2:十字架状のポリフィアライド, 3:「ウサギの耳」。

厚膜胞子は形成しない。

F. babinda 種小名は湿潤森林地域で採集されることにちなむ。小型分生胞子はポリフィアライド上に単生もしくは擬頭状に形成される。

F. beomiforme 垂熱帯域から熱帯域で採集される。大型の滴状(napiform)から球形の小型分生胞子(図-1)をモノフィアライド上に単生もしくは擬頭状に形成。オレンジ色から赤みがかった茶色の色素を培地に分泌。スポロドキアはくすんだオレンジ色に着色。植物寄生性は知られていない。

F. chlamydosporum ポリフィアライド上にコンマ型の小型分生胞子を形成。大型分生胞子の形成の有無は菌株により異なる。くすんだバラ色から赤茶褐色の色素を培地に産生。厚膜胞子を豊富に形成。

F. moniliforme *F. babinda*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*に似ているが、厚膜胞子を形成しない。ただし菌糸中に膨大した細胞が観察されることがある。小型分生胞子はモノフィアライドから擬頭状及び鎖状に形成される。大型分生胞子は長く細い外観である。フモニシン、フザリン、フザリン酸、モニリフォルミンなどの毒素を産生する。

F. nygamai *F. oxysporum*に形態的特徴やコロニーの性状が似ている。小型分生胞子は擬頭状及び鎖状に形成されるが、培養齢の増加や水分ポテンシャルが低下したときには鎖状になりやすい。厚膜胞子を形成。大型分生胞子を豊富に形成。スポロドキアはくすんだオレンジ色に着色。弱病原性菌と考えられる。

F. oxysporum フィアライドの長さは *F. solani* な

どものものと比べると短い。小型分生胞子はモノフィアライド上に擬頭状に形成される。スポロドキアは淡いオレンジ色に着色。

F. poae 壺型のモノフィアライド上に球形の小型分生胞子を形成する。胞子形成の状態はブドウの房状となる。また大型分生胞子の形成も非常に少ない。厚膜胞子を形成しない。

F. polyphialidicum 小型分生胞子はポリフィアライド上に擬頭状に形成される。大型分生胞子は紡錘形で、ポリフィアライド上に形成される。PDA 培地にオレンジ色から茶色の色素を産生。

F. proliferatum 小型分生胞子は擬頭状及び鎖状に形成され、モノフィアライド上とポリフィアライド上の両者が観察される。鎖状に形成された場合 *F. moniliforme* などに比べて胞子の連鎖は短い。滴状(napiform)の小型分生胞子を形成する。

F. scirpi 小型分生胞子は十字架状あるいは十字架状のポリフィアライド上に形成される(図-2)。薄茶色の色素を培地に産生。

F. semitectum 小型分生胞子はほとんど形成されない。大型分生胞子は紡錘形で、ポリフィアライド上に形成される。胞子形成の様子は「ウサギの耳」というニックネームで呼ばれるような形態を示す(図-2)。スポロドキアはオレンジ色に着色。PDA 培地に茶色の色素を産生。バナナ果実の病気をおこす。

F. solani 小型分生胞子はフィアライド上に擬頭状に形成される。フィアライドの長さは *F. oxysporum* のものに比べて非常に長い。スポロドキアはクリーム色あるいは青みがかった緑色に着色。大型分生胞子の頂部と基部はしばしば円みを帯びる。PDA 上の培養では気中菌糸が少ない。最近 Queensland でトマトの根腐病の病原菌として分離されたが、分化型については未決定。

F. sporotrichioides ポリフィアライド上に紡錘形及び洋梨形の小型分生胞子を形成。マイコトキシンを生産。PDA 上のコロニーは *F. graminearum* に似る。

F. subglutinans 温帯域で採集される。小型分生胞子は擬頭状にのみ形成されるが、モノフィアライド上とポリフィアライド上の両方が観察される。厚膜胞子は形成しない。マツ pitch canker やパイナップルの果実腐敗や株腐れ病（プラジル）を起こす。

F. tricinctum 小型分生胞子はレモン形及び紡錘形の 2 種類を形成。大型分生胞子は三日月型。

<同定ガイド III>

F. acuminatum 大型分生胞子の形態とコロニーの性状がやや異なる二つの亜種が区別される。ssp. *acuminatum* 大型分生胞子の基部は脚胞が明瞭。スポロドキアは肌色またはくすんだオレンジ色に着色。30°Cでの生育速度は遅い。ssp. *armeniacum* 大型分生胞子の基部は脚胞が明瞭で、やや長い。スポロドキアはアンズ色から濃いオレンジ色に着色。30°Cでの生育速度は早い。

F. avenaceum 大型分生胞子の形態がやや異なる三つの亜種が区別される。ssp. *avenaceum* 大型分生胞子は縫い針のように細長く、細胞壁は薄い。ssp. *aywerte* 大型分生胞子は非常に長く、ssp. *avenaceum* に比べて頂部が尖銳である。30°Cでの生育速度は早い。ssp. *nurragi* 大型分生胞子の長さは ssp. *aywerte* よりもさらに長く、ことに頂部が細くなる。30°Cでの生育速度は遅い。大型分生胞子の観察では CLA の寒天上に形成された大型分生胞子は必ずしも極端に長くならず、カーネーション葉片上に形成された大型分生胞子はマニュアル記載のように長径が著しく長かった。

F. compactum 大型分生胞子は 5 隔壁で、頂部の細胞はたいへん鋭利。くすんだバラ色または紫がかった茶色の色素を培地に分泌。30°Cでの生育は早い。厚膜胞子を豊富に形成。

F. crookwellense 大型分生胞子の中央部は幅広く、基部は明瞭な脚胞 (foot shaped) を持つ。大型分生胞子の形態は *F. culmorum* に比べて頂部が尖銳。スポロドキアは暗褐色に着色。ジャガイモのイモ表面に「くぼみ」症を起こす。

F. culmorum *F. crookwellense* に極めて似ている。大型分生胞子は短径に対する長径の比率が小さい。*F. graminearum* による穀類立枯れ病と類似の症状を示す。

F. equiseti 草地で普遍的に採集される。大型分生胞子は三日月型で、基部は明瞭な脚胞を持つ。薄茶色の色素を培地に產生。カボチャ果実に zonate ringspot を起こす。

F. graminearum 大型分生胞子の形態は比較的幅が狭い。PDA 上の培養では、コロニーの中心は黄色で、周辺は赤色になる。豊富な気中菌糸を形成する。有性世代をほとんど形成しない Group 1 は植物残さ中に菌糸で生存。一方有性世代 (*Gibberella zeae*) を形成する Group 2 は、カーネーションやコムギの病原菌である。強力なマイコトキシンであるデオキシニヴァレノル (DON) やゼアラレノンを產生する。

F. heterosporum 大型分生胞子は三日月型よりもソーセージ型。スポロドキアはオレンジ色に着色。PDA 培地に明瞭な色素を產生しない。

F. longipes 大型分生胞子は細長く、頂部は鞭状になり、基部は長い脚胞を持つ。

F. sambucinum 冷涼な気候帶で採集される。大型分生胞子は「イルカの鼻」というニックネームで呼ばれる乳頭状の頂部をもつ (図-1)。コロニーの生育は遅い。

観察の実技では次のような 3 段階の手順で指導された。

① 実体顕微鏡による観察、低倍率 (対物 × 10) で CLA 上に形成されたスポロドキアや厚膜胞子を観察、

② 観察チェック表 (図-3) に従って観察と記入、

③ フザリウム実験マニュアルを参照して同定

また、個々の種の特徴を観察するには、次のようなポイントにも気をつける。

a. PDA 上での色素生産には菌株間の変異が大きいので注意する。

b. ポリフィアライドの特徴は分岐したフィアライドであるが、それぞれのフィアライドに隔壁がない点を確認することが観察のポイントである (図-2)。この観察は必ずしも搔き取った試料に限らず、CLA 上に直接カバーグラスを押しつけても可能である。

c. スポロドキアあるいは大型分生胞子の形成は菌株や種によっては CLA 上でもまんべんなく行われるわけではないようで、寒天上の菌糸にスポロドキアや大型分生胞子が見いだせない場合はカーネーション葉上または葉片の端を観察すると見つかりやすい。

d. 厚膜胞子の観察が CLA や PDA でできないときは、さらに Mud Agar (土壌添加寒天培地) に菌を移植して培養、観察を行う。

Check list for identification of *Fusarium* species

図-3 ワークショップで用いられた作業表

表-2 アナモルフとテレオモルフの関係

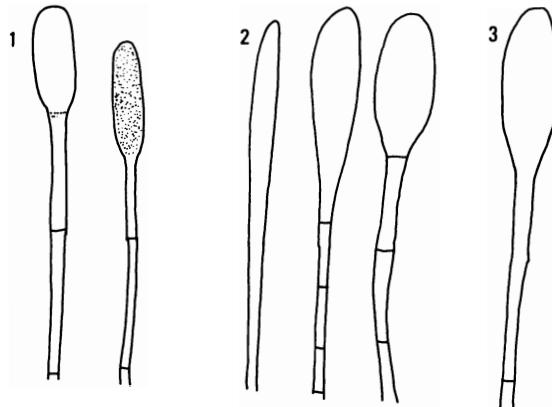


図-4 *Cylindrocarpon* 関連菌の分生子柄分枝
1: *Cylindrocarpon*, 2: *Cylindrocladum*, 3:
Cylindrocladiella.

III *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladium*, *Cylindrocladiella*, 及び *Verticillium* の分類と同定

*Cylindrocarpon*などの菌は*Fusarium*の大型分生胞子と非常に似た胞子を形成する。*Cylindrocarpon*などの同定は槍状の菌糸(vesicle, 分生子柄分枝, 図-4)の特徴とオレンジ色に着色するコロニーが同定のポイントである。*Verticillium*菌については省略する。

Cylindrocarpon 大型分生胞子は両端が鈍頭となる。分生胞子はモノフィアライド上に形成される。PDA 培養では茶色またはクリーム色の色素を培地に産生。厚膜胞子はオレンジ色がかった褐色。

Cylindrocladium 大型分生孢子は長く棒状、槍状の

アナモルフ	テレオモルフ
<i>Fusarium</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i>
	交配群
A = <i>F. moniliforme</i>	
B = <i>F. subglutinans</i>	
C = <i>F. moniliforme</i> / <i>F. proliferatum</i>	
D = <i>F. proliferatum</i>	
E = <i>F. subglutinans</i>	
F = <i>F. moniliforme</i>	
G = <i>F. nygamai</i>	
	<i>Gibberella zeae</i>
	<i>Nectria</i>
<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Nectria</i>
<i>Cylindrocladiella</i>	<i>Nectria</i>
<i>Cylindrocladium</i>	<i>Calonectria</i>

菌糸を形成する。PDA 培養では茶色の色素を培地に產生。厚膜胞子は明るい茶褐色。

Cylindrocladiella 大型分生胞子は短い棒状で、2, 3回分枝を繰り返す分生子柄状に形成される。鈍頭の槍状の菌糸を形成

IV テレオモルフの観察

今回実習した *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladum*, *Cylindrocladiella* とテレオモルフとの関係についても簡単に触れ、実習では *Nectria* と *Calonectria* の子囊殻の観察が行われた。一つのテレオモルフが複数のアナモルフを含む問題は交配群の研究について簡単に触れただけであった。