

ニガウリに発生したつる割病とその病原菌の特徴

宮崎県総合農業試験場 ^{いま}今 ^{むら}村 ^{ゆき}幸 ^{ひさ}久

はじめに

2000年に宮崎県宮崎市を中心とするニガウリ産地において、萎凋症状が発生し問題となった。本症状の原因を究明した結果、*Fusarium oxysporum* Schlechtendahl: Friesによるニガウリつる割病（新称）であることを明らかにした（今村ら, 2002; 2007）。本病は国内では鹿児島、宮崎および沖縄の3県で発生を認めている（並木ら, 1992; NAMIKI et al., 1994; 金城ら, 2002）が、本稿では宮崎県における本病の病徴や病原菌について詳細を報告する。さらに、rDNA IGS領域の塩基配列を解析し、本病菌とウリ科作物つる割病菌各分化型との比較を行ったので併せて報告したい。

I 発生状況

1 病徴

発生圃場では、発病株は一部の主枝がまず萎れ、その1週間～1か月後に株全体が萎凋枯死した（図-1①）。萎凋した主枝を除く枝が枯れずに残る場合や、萎凋したままで枯死に至らない株もあった。また、萎凋に先だってウイルス症状様の葉脈黄化や葉枯症状が見られる場合もあった（図-1②）。萎凋株の根部を掘り取って観察すると根腐れ症状は認められないが、地際部の茎を水平に切るとわずかに褐変が見られ、検鏡により導管部に糸状菌の菌糸および胞子が観察された。

2 発生状況

発生面積や発生程度について詳細な調査は行っていないが、宮崎市を含む県内のニガウリ産地で本病が広く確認され、発生は拡大の方向にある。

II 病原菌の特徴

1 形態

定法により罹病サンプルから菌の分離を行い、露地圃場からMR2-2、施設圃場からM1-Tの2菌株を得た。両菌株はSynthetic low Nutrient Agar (SNA)培地上で大型分生子と小型分生子を形成した。大型分生子は3隔

壁（平均 $32.6 \times 4.6 \mu\text{m}$ ）のものがほとんどで、鎌形、培地表面あるいは培地中の分枝ないし非分枝の分生子柄上のモノフィアライドから形成された。小型分生子は単胞（平均 $8.1 \times 3.6 \mu\text{m}$ ）で非分枝の短い分生子柄上のモノフィアライドから擬頭状に形成された。厚膜胞子（平均 $10.2 \times 9.6 \mu\text{m}$ ）は頂生または間生に形成された。分生子連鎖は認められず、PDA培地上で白色綿毛状から淡紫色の気生菌糸を発生し、裏面を紫色に着色する菌叢を形成した。また、菌叢の生育適温は 27.5°C 付近にあった。これらの形態的特徴および培養性状から、分離菌株を*Fusarium oxysporum* Schlechtendahl: Friesと同定した。

2 病原性

MR2-2とM1-T菌株の2菌株を供試し、‘百成レイシ’、‘宮崎こいみどり’のニガウリ2品種への接種による病原性確認、およびウリ科作物における宿主範囲を明らかにするための接種試験を行った。接種は、供試菌株をフスマ培地で約1か月間培養し、滅菌土8l当たり培養物1lを混和した土壤に供試作物の幼苗を移植する土壤混和接種法で行った。以下に示す基準により発病調査を行い、供試菌株の病原性の強弱を判定した。すなわち、1か月以内に70～100%の株が萎凋または枯死する場合を強（+++）、40～60%の株が萎凋または枯死する場合をやや強（++）、10～30%の株が萎凋または枯死する場合を中（+）、萎凋または枯死はしないが対照の無接種株に比較して生育が劣る場合を判然としない（±）、病徴が見られない場合を無（-）とした。さらに、病徴発現苗の地際部から菌の再分離を行い、同様の接種法によりニガウリへの病原性を確認した。また、分離菌株とウリ科作物つる割病菌の各分化型*F. oxysporum* f. sp. *lagenariae*, f. sp. *cucumerinum*, f. sp. *melonis*およびf. sp. *niveum*の菌株を供試し、同様の接種方法によりウリ科作物に対する病原性を比較した。供試菌株の由来を表-1に示した。分離菌株の接種土壤にニガウリ幼苗を移植すると、約2週間後に現地圃場で見られるような葉脈の黄化や葉枯れを伴う激しい萎凋症状が再現された（図-1③）。さらに、分離菌株はニガウリのほかにユウガオに強い病原性を示し、キュウリ、メロン、スイカ、カボチャ、トウガンにも病原性が認められた（表-2）。これらの接種作物幼苗の地際部からは、接種菌株と同様の糸状菌が再分離され、すべてニガウリに強い病原性を

Fusarium Wilt due to *Fusarium oxysporum* in Balsam Pears and the Character of the Pathogen. By Yukihisa IMAMURA

(キーワード: ニガウリ, つる割病, 分化型, *Fusarium wilt*, *Fusarium oxysporum*)

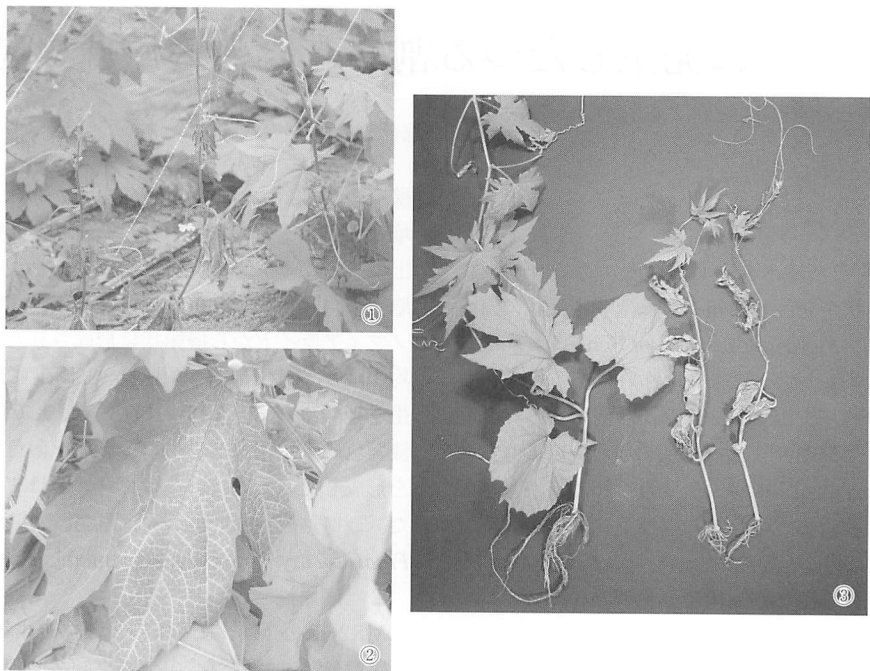


図-1 ニガウリつる割病発病株の病徴
①萎凋枯死，②葉脈黄化，③接種により再現された発病株（左側は対照無接種株）。

表-1 供試菌株一覧

菌株名	分化型	由来		提供元 ^{a)}
		分離場所	分離植物	
MR2-2		宮崎	ニガウリ	
M1-T		宮崎	ニガウリ	
MAFF103008	<i>lagenariae</i>	三重	ユウガオ	MAFF
MAFF305118	<i>lagenariae</i>	高知	ユウガオ	MAFF
MAFF103054	<i>cucumerinum</i>	三重	キュウリ	MAFF
Focu-1S	<i>cucumerinum</i>	大分	汚染土	KONARC
Focu-2S	<i>cucumerinum</i>	大分	汚染土	KONARC
MAFF305544	<i>melonis</i>	静岡	メロン	MAFF
Melo2005	<i>melonis</i>	不明	メロン	KONARC
Melo2010	<i>melonis</i>	不明	メロン	KONARC
MAFF305543	<i>niveum</i>	静岡	スイカ	MAFF
MAFF305608	<i>niveum</i>	不明	スイカ	MAFF

^{a)} MAFF：農林水産ジーンバンク。KONARC：九州沖縄農業研究センター。

示した。しかしながら、雑種カボチャ品種‘新土佐一号’では、対照と比較して生育は劣ったものの萎凋などの明瞭な病徴は見られなかった。また、*F. oxysporum* の各分化型の菌株は、それぞれの宿主に病原性を示したが、ニガウリには病原性を示さなかった（表-3）。

3 rDNA IGS 領域の塩基配列解析

供試菌株をシヨ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地で

表-2 ニガウリ分離菌株（MR2-2，M1-T）のウリ科野菜に対する病原性

作物名	品種名	病原性の強さ ^{a)}
ニガウリ	百成レイシ	+++
	宮崎こいみどり	+++
ユウガオ	FR ダントツ	++
	長かんぴょう	++
キュウリ	シャープ1	+
	夏秋節成	+
メロン	アムス	+
	サンライズ	+
スイカ	三喜スイカ	+
	紅大	+
カボチャ	エビス	+
	宮崎早生2号	+
雑種カボチャ	新土佐1号	±
	トウガン	
	青冬瓜	+
	ライオン冬瓜	+

^{a)} +++強，++やや強，+中，±病原性の有無が判然としない。

表-3 ニガウリ分離菌株 (MR2-2, M1-T) とウリ科野菜つる割病菌の病原性の比較

菌株名	分化型	ウリ科野菜に対する病原性 ^{a)}				
		ニガウリ	ユウガオ	キュウリ	メロン	スイカ
MR2-2		+++	++	+	+	+
M1-T		+++	++	+	+	+
MAFF103008	<i>lagenariae</i>	—	+++	NT	NT	NT
MAFF305118	<i>lagenariae</i>	—	+++	NT	NT	NT
MAFF103054	<i>cucumerinum</i>	—	NT	+++	NT	NT
Focu-1S	<i>cucumerinum</i>	—	NT	+++	NT	NT
Focu-2S	<i>cucumerinum</i>	—	NT	+++	NT	NT
MAFF305544	<i>melonis</i>	—	NT	NT	+++	NT
Melo2005	<i>melonis</i>	—	NT	NT	+++	NT
Melo2010	<i>melonis</i>	—	NT	NT	+++	NT
MAFF305543	<i>niveum</i>	—	NT	NT	NT	+++
MAFF305608	<i>niveum</i>	—	NT	NT	NT	+++

^{a)} +++強, ++やや強, +中, —無, NTは未調査を示す。

25℃ 7日間振とう培養し、得られた菌体を液体窒素で凍結粉碎後、Nucleon Phytopure (Amersham) を用いてDNAを抽出した。rDNAIGS領域の増幅は、FIGS11 (GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG) と FIGS12 (GCAAAATTCAATAGTATGGC) (KAWABE et al., 2005) をプライマーとして rTaq (Takara Biomedicals, Otsu) を用いて行った。PCR反応条件は 95℃・1分間を1サイクル行った後、94℃・20秒間、50℃・30秒間、72℃・1分間を35サイクル繰り返し、72℃・5分間を1サイクル行った。2%アガロースゲルを用いてPCR産物の電気泳動を行い、目的とするバンドを切り出して suprec-01 (Takara Biomedicals, Otsu) による精製を行い、ABI3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City) を用いて塩基配列を解読した。ClustalW でアラインメントを行った後、MEGAを用いて系統解析を行った。

ニガウリ分離菌株を含む各分化型計12菌株のrDNAIGS領域の塩基配列について、National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されている *Gibberella fujikuroi* (FGSC7610) を out group として解析し、近隣結合法 (NJ法) および平均距離法 (UPGMA法) で系統樹を作成した。NJ法による系統樹を図-2に示した。これによるとウリ科作物を宿主とする *F. oxysporum* 各分化型の菌株は系統樹の中にランダムに分布し、分化型と系統の間に明確な相関は認められなかった。UPGMA法でもほぼ同じような結果であった (データ省略)。

おわりに

SUN and HUANG (1983) は、台湾で発生したニガウリの萎凋性病害から分離した *F. oxysporum* がニガウリにのみ病原性を示すことから、新分化型 *f. sp. momordicae* を提案している。ところが、宮崎県で発生したニガウリつる割病菌は、ニガウリに加えユウガオをはじめとする多くのウリ科作物に病原性があつた。このため本分離菌株については、分化型を当てはめることは行わず、*Fusarium oxysporum* Schlechtendahl : Fries を病原として記載した (今村ら, 2007)。

F. oxysporum における分化型の概念は、明瞭な宿主特異的病原性に基いており、限られた宿主植物のグループにのみ病原性を示すことが特徴となっている。しかし、分化型には多くの例外が報告されており、ある単一の分化型の菌株が複数の属や種のウリ科作物を宿主とする場合がある (McMILLAN, 1986; NOMURA, 1992; KIM et al., 1993)。宮崎県で分離したニガウリつる割病菌も、これらの報告のように分化型の概念の例外と言えるような病原性を示した。一方、供試した4分化型の各菌株はそれぞれの宿主作物には強い病原性を示したが、ニガウリには病原性はなく、明らかに本分離菌株とそれら4分化型の各菌株の病原性は異なつた。

ニガウリつる割病菌および他のウリ科作物を宿主とする分化型がどのような系統関係にあるのかを解析することは、ニガウリつる割病菌の発生・進化の考察や、抵抗性台木利用において有益な知見を与えることと思われる。近年、*F. oxysporum* の分化型の関係を分子系統に基

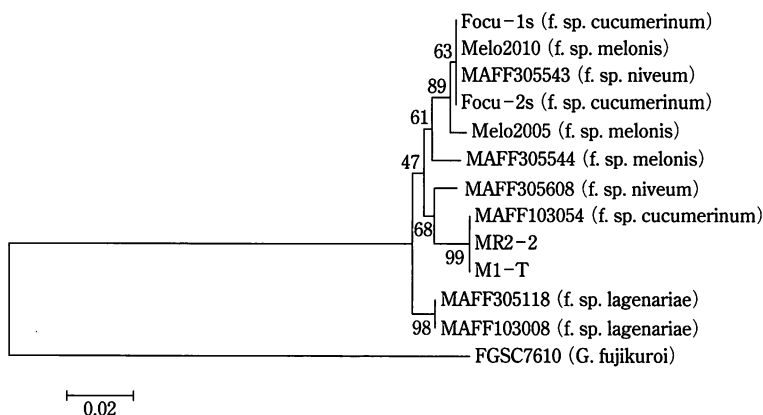


図-2 ニガウリ分離菌株を含む、ウリ科作物つる割病菌の分子系統樹 (NJ 法)
Bootstrap trial : 1000

づいて解析する研究が多く報告されており, rDNA IGS 領域の塩基配列の比較により病原性と系統との関係を明らかにする試みが行われている (FUJINAGA et al., 2005; KAWABE et al., 2005)。そこで, 本分離菌株と各分化型に属する菌株の rDNA IGS 領域に基づく系統解析を行った結果, これらの供試菌株は多系統由来 (polyphylogenetic) であることが示唆された。KIM et al. (1993) は, ウリ科作物を宿主とする *F. oxysporum* 各分化型の mitochondrial DNA RFLPs のクラスター分析および最節約法分析によって, すべての供試菌株は系統的に非常に近い関係にあり, 宿主特異性と系統関係が結びつかないことを報告した。本研究で得られた系統樹でも分化型は系統を反映しておらず, 本分離菌株とキュウリつる割病菌 *f. sp. cucumerinum* (MAFF103054) の rDNA IGS 領域 (590 bp) の塩基配列が 100% 相同であったように, 異なる分化型の菌株が同じ分化型の菌株よりも近縁である場合も認められた。これらは, ウリ科植物に感染する病原菌菌株の宿主特異性の変異によって新たなウリ科植物を宿主とする病原菌が生じ, 病害が顕在化する可能性を示唆している。このため, ウリ科作物を宿主とする *F. oxysporum* の分化型などの宿主特異性を, rDNA IGS 領域の解析によって識別することは困難であると考えられた。

本病発生地域では, 農家の経験的な技術として雑種カボチャ ‘新土佐一号’ を用いた接木栽培が行われている

(杉下ら, 2002) が, 接種試験においても ‘新土佐一号’ には明瞭な病徴が認められず (表-2), 本品種を利用した接木が防除対策上有効であることが裏付けられた。2007 年現在, 宮崎県のニガウリの栽培面積 166 ha (市町村集計) のうちの約 5 ~ 10% で接木栽培が行われていると思われるが, ほとんどが宮崎市内の半促成の作型に集中している。今後, 本病の発生拡大に伴い接木栽培は増加すると思われる。

一方, 本病原菌は種子伝染 (金城・上原, 2003) および土壌伝染することが推定されていることから, 病原菌の生態と防除法についてはさらに詳細な検討が必要である。

引用文献

- 1) FUJINAGA, M. et al. (2005): J. Gen. Plant Pathol. 71: 402 ~ 407.
- 2) 今村幸久ら (2002): 日植病報 68: 185 (講要).
- 3) ————ら (2007): 九病虫研報 53: 1 ~ 8.
- 4) KAWABE, M. et al. (2005): J. Gen. Plant Pathol. 71: 263 ~ 272.
- 5) KIM, D. H. et al. (1993): Phytopathology 83: 91 ~ 97.
- 6) 金城衣恵・上原勝江 (2003): 日植病報 69: 273 ~ 274 (講要).
- 7) ————ら (2002): 九病虫研報 48: 97 (講要).
- 8) McMILLAN, R. T. (1986): Ann. Appl. Biol. 109: 101 ~ 105.
- 9) 並木史郎ら (1992): 日植病報 58: 540 ~ 541 (講要).
- 10) ————ら (1992): 同上 58: 541 (講要).
- 11) NAMIKI, F. et al. (1994): Applied and Environmental Microbiology 60: 2684 ~ 2691.
- 12) NOMURA, Y. (1992): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 58: 373 ~ 379.
- 13) 杉下弘之ら (2002): 九農研報 64: 164.
- 14) SUN, S. K. and J. W. HUANG (1983): Plant Disease 67: 226 ~ 227.