

日本産ホウレンソウ萎凋病菌の VCG 類別と簡易な品種抵抗性検定法

財団法人岩手生物工学研究センター ^{かつ} ^べ ^{かず} ^{のり}
勝 部 和 則

はじめに

ホウレンソウの「雨よけ栽培」は岐阜県を発祥とし、岩手県においても 1980 年の水稲の大冷害を契機に、やませ地帯や中山間地を中心に夏季冷涼な気象を利用した集約的な換金作物として面積が拡大してきた。産地形成から 30 年弱が過ぎ、生産者の高齢化とともに、連作障害が各地で問題となっている。岩手県を例に見れば、連作障害の主たる要因は、*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* (以下、FOS) による萎凋病、*Aphanomyces cochlioides* Drechsler による根腐病で、このほか夏季の平均気温の上昇に伴い、高温障害も顕在化しつつある。

本稿では、筆者が 1997～99 年にかけて、全国の関係諸兄の協力を得て実施した日本産 FOS の菌糸和合性群 (Vegetative compatibility group, VCG) の分布と、岩手県内主産地あるいは特定圃場内の分布状況および季節消長を調べた結果を紹介する。

I 日本産 *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* の VCG の分布

FOS の VCG は FiELY et al. (1995) によって、3 種の VCG に類別されることが明らかにされ、VCG0330、0331 および 0332 と定義された (KISTLER et al., 1998)。世界中から集められたホウレンソウ由来の *F. oxysporum* は、FOS のみが三つの VCG のいずれかに和合性があり、これ以外の非病原性 *F. oxysporum* には和合性がない (FiELY et al., 1995)。なお、その後も新しい VCG は見つかっていない。

筆者は、日本産 FOS の VCG を調べるに当たって、後述する病原性検定法によって菌株ごとの病原力を評価するとともに、硝酸塩利用能欠損 (*nit*) 変異株を PUHALLA (1985) の方法によって作出し、窒素源の異なる培地を用いて表現型 (*nit1*, *nit3*, NitM) を決定した。表現型を決定した *nit* 変異株は 1.5% 塩素酸カリウム加用最少

液体培地を入れたバイアル管であらかじめ培養し、48 穴ウエルプレートを用いた菌糸和合性試験において、FOS VCG の標準菌株と対峙培養 (25℃下で 10 日以上) して、VCG を決定した (図-1)。

1 国内の VCG 分布

16 府県の産地から分離された FOS 100 菌株を用いて VCG の分布を調べたところ、VCG0330 および 0331 は全国的に広く分布することが明らかになった (図-2 (a))。一方、VCG0332 は供試菌株の多かった岩手県でのみ確認されたが、今後、他の府県でも供試菌株を増やすことによって VCG0332 が検出される可能性がある。我が国の VCG の構成比を見ると VCG0330 には 46.0% の菌株が類別され、VCG0331 には 39.0%、VCG0332 には 7.0% がそれぞれ類別され、アメリカ合衆国の場合と同様に VCG0330 が優先していることが明らかとなった。

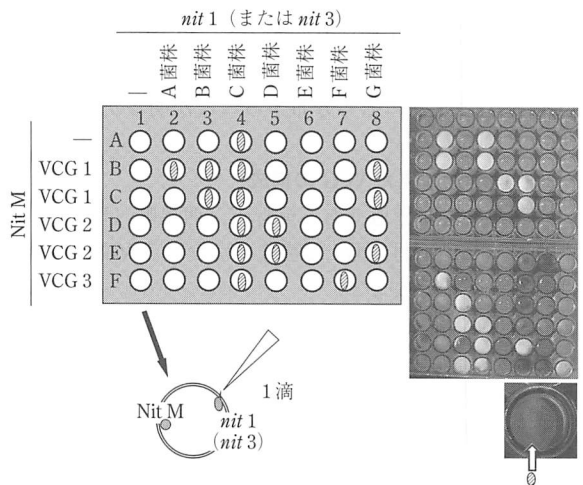


図-1 ウェル・プレートをを用いた VCG 決定法 (模式図)
●は対峙によって菌糸和合して、補完反応によって菌叢が旺盛に生育した例を示す。第 1 列には標準菌株 Nit M のみ、第 A 行には供試菌株の *nit 1* (*nit 3*) のみを滴下する。第 2 列の A 菌株および第 2 列 B 菌株は VCG 1、第 5 列 D 菌株は VCG 2 にそれぞれ所属。第 4 列は C 菌株の *nit* 変異株が野生に戻った例、第 6 列は 1 滴中に E 菌株の分生子が入っていないため第 8 列は VCG 1, 2 の標準菌株と和合したため、それぞれ再試験が必要と判定する。各ウェルには約 1.5 μl 最少培地が入っている。

Vegetative Compatibility Groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* in Japan, and Assay Methods of Spinach Cultivar for Resistance to Fusarium Wilt. By Kazunori KATSUBE

(キーワード: ホウレンソウ, 萎凋病菌, VCG, 個体群, 病原性検定, 抵抗性検定, 簡易法)

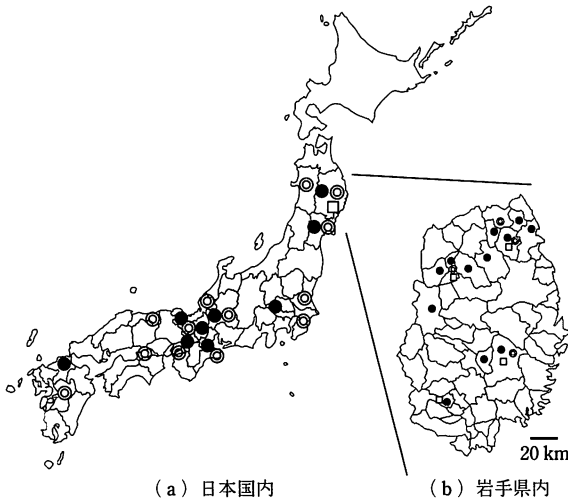


図-2 我が国における *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* VCG の国内分布

凡例は、●：VCG0330，◎：VCG0331，□：VCG0332。

2 岩手県における VCG の分布

岩手県の主要産地における VCG の構成比を見ると、供試 *F. oxysporum* 793 分離菌株のうち、625 菌株 (78.8%) が病原性を有し、FOS と同定された。三つの VCG の構成は、VCG0330 が 54.0%、VCG0331 に 6.4%、VCG0332 には 5.2% がそれぞれ分類され、いずれの VCG も岩手県内に広く分布することが明らかとなった (図-2 (b))。

3 産地別に見た VCG の構成

岩手県の主要産地である遠野市、西根町 (現 八幡平市) および山形村 (現 久慈市) における VCG の構成は、次の通りであった。

遠野市では分離分離された FOS のほとんどが VCG0330 に所属した (65.9%)。西根町では分離 FOS のうち、VCG0330 に所属した菌株の割合は他の二つの VCG に優占したものの、26.7% と遠野市よりも低かった。一方、山形村では FOS の 38.8% が VCG0330 に類別されたが、VCG0031 に類別される菌株の割合が 13.8% で遠野市、西根町に比較して高いという特徴があった。このほかの 10 市町村では 65.9% が VCG0330 に分類された。このように、他の市町村においても病原性菌に占める VCG0330 の割合が高いことがわかった。なお、軽米町では分離 3 菌株がすべて VCG0331 に類別されたが、供試菌株数を増やした検討が必要である。

以上を、萎凋病の発生実態に関連づけて考察すれば、遠野市では分離 *F. oxysporum* 菌株に占める病原菌の割

合が最も高く、ほとんどが VCG0330 に所属した。VCG0330、0332 に所属する菌株の病原力は VCG0331 の菌株のそれに優るとされ (FIELY et al., 1995)、本研究によっても確認できている。このことが本病の多発に関与している可能性がある。西根町では分離 *F. oxysporum* 菌株のうち、VCG0330 に所属した菌株の割合は他の二つの VCG に優占したものの、26.7% に過ぎず、分離菌株に占める病原菌株の割合も低い。西根町は夏期が高温多日照になりやすいが、萎凋病の発生は遠野市に比べ少ない。この理由として、上記強病原性の VCG が相対的に少ないことおよび紫外線カットフィルムの普及が考えられる (Narro et al., 1996)。山形村では分離 *F. oxysporum* 菌株のうち、病原菌の割合が 69.0% と高く、VCG0330 に類別された菌株の割合が比較的 low、VCG0331 に類別される菌株の割合は遠野市、西根町に比較して高いという特徴があった。山形村では本病の発生が比較的少ないが、この地域は比較的冷涼なやませ地帯に位置すること、また、病原力の劣る VCG0331 の割合が比較的高いことも関与している可能性が考えられる。

4 特定圃場内における VCG の構成

岩手県遠野市の特定圃場においては、VCG0330 が優先し、圃場全体に広く分布した (図-3)。これに対して VCG0331 に所属する菌株はハウス入り口付近にのみ分布した。VCG0332 に所属する個体群はハウス中央部に比較的広く分布した。なお、圃場内においても、同じ区画に複数の個体群が混在し、多様性を形成していた。

このように、圃場内において、ある特定の個体群が優先的に存在したうえで別の個体群が圃場内に混在している例はリンゴ紫紋羽病菌 *Helicobasidium mompa* (KATSUMATA et al., 1996) や、メロンつる割病菌 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* race2 (ZUNIGA et al., 1997)、トマト萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race3 (MARLATT et al., 1996) で見られる。このような個体群構造が宿主作物の連作によって、圃場内まん延の過程で見られるものか、あるいはまん延の結果であるのかについては興味深い課題である。

5 VCG 構成比の季節変動

FOS の VCG 構成を作物別に調査したところ、構成比には季節変動が見られた (図-4)。すなわち、6 月穫り以降、作型が進むに連れて VCG0330 の占める割合が高くなること、7、8 月穫り作型では、VCG0331、0332 の構成比が高まるが、9 月には分離されなくなることが明らかとなった。このことから、VCG によって生育適温が異なることが予想されたが、培養試験の結果、いずれの VCG も生育適温は既知の所見 (NAIKI and MORITA,

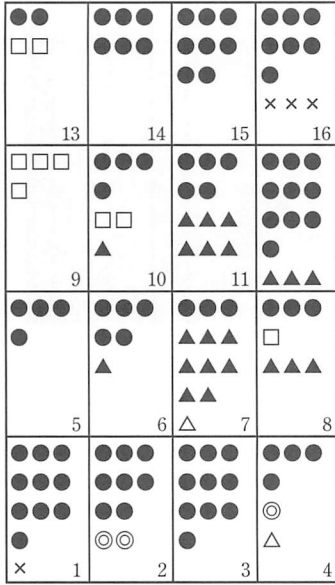


図-3 特定圃場における *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* VCG の分布

● : VCG0330, ◎ : VCG0331, □ : VCG0332, ▲ : 既知 VCG に和合性の低い強病原性の菌株群, △ : 既知 VCG に和合性の低い弱病原性の菌株群, × : 非病原性の菌株群. 図中の数値 1 ~ 16 は圃場内の区分番号.

3 ~ 5 回連作され, 作型ごとに異なる品種が作付けされるのが一般的である. 病原菌は短期間に作付けされる多様な品種に適応することが求められることになる. 一方, 品種の抵抗性検定法で後述するように, FOS 菌株とホウレンソウ品種の組み合わせでは, 分散は小さいが統計的に有意な交互作用が認められる. このことが圃場内での個体群の多様性形成にどのように寄与するかは非常に興味深い.

II *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* の病原性検定法

Fusarium 属菌の接種源には菌糸, 分生胞子, 厚壁胞子を用い, 主に土壌フスマ培養や寒天培地を用いた平板培養, 液体培地による振とう培養により調製する (荒木, 1984). 接種方法としては土壌混和, 溝灌注, 浸根接種などがある (小林, 1992). この場合の接種源濃度は $10^4 \sim 10^6$ cfu/乾土 g が適当とされている (荒木, 1984). ホウレンソウ萎凋病菌の接種法は, 土壌接種法 (内記・森田, 1983), 浸根接種法 (O'BRIEN and WINTERS, 1977) および株元注入法 (REYES, 1977) が報告されており, また, 出芽期に接種すると播種時よりも重症となる (REYES, 1977). 接種菌量は土壌接種で $10^3 \sim 10^5$ cfu, 浸根接種および株元注入法では 10^6 胞子/ml 菌液を用いている.

ここでは, 後述する FOS の VCG を調査するうえで必要な分離菌の病原性を知るための方法として確立した簡易検定法の手順を紹介する (図-5).

- ①検定菌株の接種源調製: 分離菌株をショ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地 (PS) で振とう培養する (25°C, 5 ~ 7 日間). 培養後, 2 重ガーゼでろ過後, 菌体濃度がおよそ $10^7 \sim 10^8$ 個/ml の範囲になるようにする.
- ②検定植物: セル成型苗用培土を詰めた 128 穴プラグトレイに, FOS に感受性の高いホウレンソウ品種 'おかめ' (催芽済み種子) を 1 穴当たり 2 粒ずつ播種する.
- ③接種: FOS に対して感受性が最も高い '出芽~子葉期' (播種 7 日程度) の幼苗に対して, 1 菌株当たり接種源 30 ml をプラグトレイ 1/4 の試験区全体に均一に灌注接種する. この場合, 50 ml 程度の蒸留水を加えると均一に灌注しやすい.
- ④発病調査: 試験区全体の発病に対して次の指数を与えて調査する. 発病指数 2: 全株が萎ちょう枯死した状況, 指数 1.5: ほとんどの株が萎ちょうしているが健全株が散見される状況, 指数 1: 半数以上の

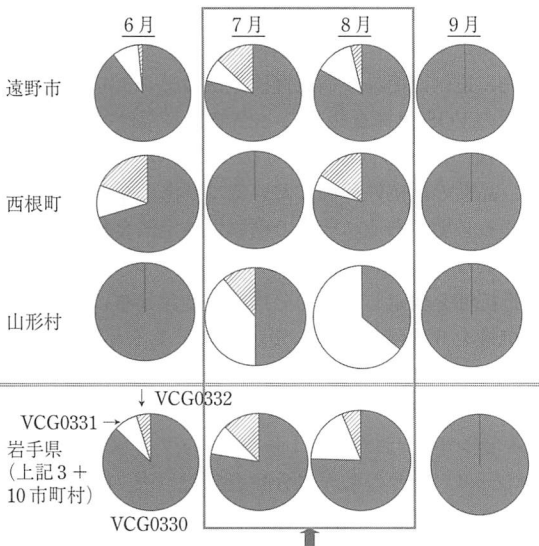


図-4 岩手県のホウレンソウ主要産地における *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* の VCG 構成の季節変動

1983) と一致し, 20 ~ 30°C の範囲にあり, 生育温度で季節変動を説明することはできなかった.

雨よけのホウレンソウ栽培では, 同じ圃場で 1 年間に

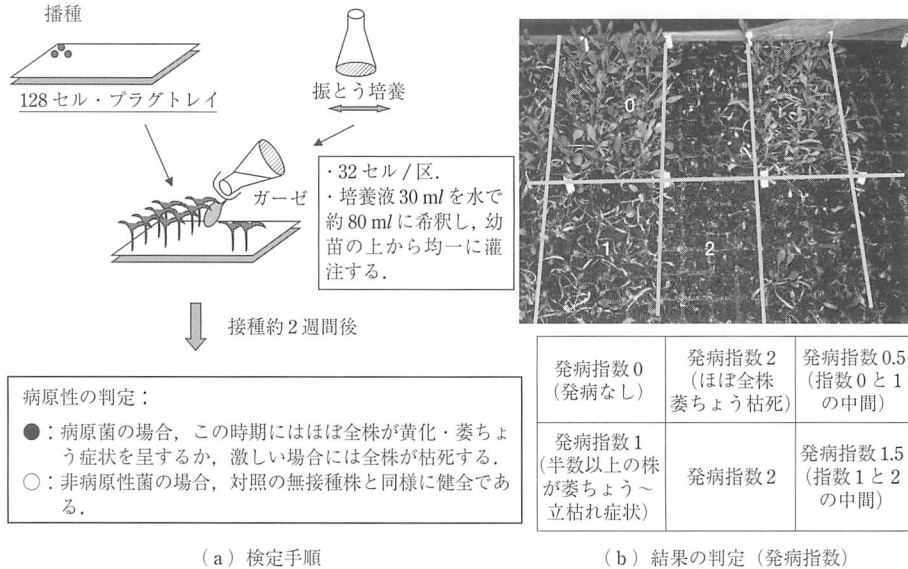


図-5 *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* の病原性検定法の手順と結果の判定

株が萎ちようしている状況、指数 0.5：一部の株が萎ちようしている状況、同指数 0：発病株なし。病原性は指数 1 以上を強、0.5 を弱、0 を病原性なしと判定する。

以上の簡易検定法の特徴は、①市販のセル成型育苗培土を使用できるので、培土によるフレが少ないこと、②接種は本病に対する感受性の高い出芽～子葉期(播種 7～10 日ごろ)に行うことにより、確実に発病させることができること、③接種作業および発病調査法が簡便であること、④冬期間でも温室の温度を 10℃ 以上に保つことで、結果の再現性が確保されていることなどがあげられ、ホウレンソウ萎凋病のみならず、他の土壌病害への応用も期待される。

この簡易検定法を、新たにホウレンソウから分離した病原性未知の *F. oxysporum* 820 菌株に適用し、病原性を検定したところ、産地によって、病原菌あるいは非病原性菌分離率、病原菌に占める強病原性菌と弱病原性菌の割合が異なることが明らかとなった。すなわち、萎凋病の発生が多い岩手県遠野市では病原性の強い FOS 菌株の分離頻度が高いことが明らかになり、一方、萎凋病の発生が少ない西根町(現 八幡平市)では弱病原性菌の分離頻度が比較的高く、非病原性菌の分離頻度も高いことが明らかとなった。

III 品種の抵抗性検定法

ホウレンソウ萎凋病抵抗性と判断された品種は日本国内の多様な土壌・気象条件のもとで栽培されることにな

る。すなわち、多様な産地の病原菌に対して安定して抵抗性を示す必要がある。これまでの抵抗性検定に関する報告では 5 葉期ごろ(播種 21 日後)の個体に浸根接種する方法(O'BRIEN and WINTERS, 1977)や病原菌接種土壌に播種する方法(内記・森田, 1983)が採用されたが、今回目的とした多数の品種・系統と菌株の組み合わせを検定するには操作が煩雑となる。

先に述べた簡易な病原性検定法はセルトレイを用いて多数の FOS 菌株を扱うことができるだけでなく、多くの品種・系統も同時に取り扱うことが可能である。一方、品種の抵抗性評価においては基準となる比較品種を定める必要がある。そこで病原性検定法を利用して、由来の異なる病原菌 5 菌株に対するホウレンソウ 25 品種の抵抗性を検定し、平均発病度の度数分布により品種の抵抗性を 5 段階に類別した。これによると抵抗性別に、「強」：「禹城」；「やや強」：「アトラス」，「ソロモン」；「中」：「バルチック」，「アクティブ」；「やや弱」：「ミンスターランド」，「おかめ」；「弱」：「キングオブデンマーク」，「マジック」などのように分類された(表-1)。これらの品種抵抗性区分は内記・森田(1984)によるものとおおむね一致した。また、1997 年当時、岩手県内では「アクティブ」が夏作で耐病性品種として広く作付けされていたが、産地では汚染程度の高い圃場などでしばしば株が枯死する事例が見られた。本試験の結果はその実態を反映していると考えられる。

なお、この実験の結果、品種と病原菌株との組合せによって抵抗性の順位に変動が見られたため、新たに

表-1 ホウレンソウ萎ちょう病に対する品種の抵抗性区分

品種抵抗性区分 ^{a)}				
強	やや強	中	やや弱	弱
馬城	アトラス ソロモン	バルチック 豊葉 オーライ 新日本 リード 若草 丸粒強力ミンスター アクティブ 札幌大葉 パレード ニューアジア ノーベル	オラクル 次郎丸 ミンスターランド シンフォニー おかめ 朝霧	マジック 日本 ビロフレイ キングオブデンマーク

^{a)} 供試 25 品種の 5 菌株に対する発病指数の度数分布に基づく階級区分。抵抗性「強」は 0.87 未満，同「やや強」は 0.87 以上 1.63 未満，同「中」は 1.63 以上 2.4 未満，同「やや弱」は 2.4 以上 3.16 未満，同「弱」は 3.16 以上。^{b)} 各抵抗性ごとの品種の記載は，発病指数の低い順に行ったが，試験により順位は変動する。このため，今後の検定に当たっては二重下線を付した品種または一重下線を付した品種を各抵抗性の比較品種に使用し，絶対評価で行う必要がある。

FOS 7 菌株と，ホウレンソウ 6 品種の各組み合わせにおける発病度を調査した結果を分散分析によって菌株と品種の組み合わせによる交互作用およびそれぞれの要因効果を比較したところ，統計的には有意であったが，誤差分散は病原力の菌株間差あるいは品種間差という個々の要因効果よりも小さく，また，一部の菌株と品種に限られる。しかし，産地では病原菌の個体群が多様で，その構成も変動すること，さらに，今後，多様な系統の品種が育成されるであろうことを考慮すると，このような現象がより顕著になる可能性があり，品種の抵抗性検定においては複数の病原菌株を用いることが望ましいと考えられた。

おわりに

以上のように，我が国における FOS の VCG の分布が明らかになったが，最近，KAWABE et al. (2007) によって，この VCG 調査で用いた FOS 菌株を材料に，交配型遺伝子領域および rDNA IGS 領域の配列情報に基づいた分子系統解析を行った結果が報告されている。これによると，日本産 FOS の交配型はすべて MAT1-2 に分類され，少なくともこの個体群における有性生殖による交配の可能性はないこと，rDNA IGS 領域の比較では少なくとも四つ (S1 ~ S4) 以上に分類され，多くの菌株は S1 系統に所属すること，さらに S1 および S3 系統には VCG0330 と 0331 が含まれたが，他の分化型で報告され

ているような VCG と分子系統の関連性は見られなかったことが明らかにされている。

宿主ホウレンソウにおいて，本病に対する抵抗性遺伝子が特定されておらず，また，育種過程では複雑に交配が進められてきたことが，本分化型の個体群・系統の多様化を促してきたと推察するが，今後，遺伝的にも純粋な交配母本を用いた FOS 菌株との交互作用解析が進められることによって，FOS の系統分化の要因が明らかにされるとともに，宿主においては真性の抵抗性遺伝子発見のきっかけになるものと期待している。

引用文献

- 1) 荒木隆男 (1984) : 新版土壌病害の手引き，廣済堂，東京，p. 213 ~ 279.
- 2) FIELY, M. B. et al. (1995) : Plant Dis. **79** : 990 ~ 993.
- 3) KATSUMATA, H. et al. (1996) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **62** : 490 ~ 491.
- 4) KAWABE, M. et al. (2007) : J. Gen. Plant Pathol. **73** : (in press).
- 5) KISTLER, H. C. et al. (1998) : Phytopathology **88** : 30 ~ 32.
- 6) 小林紀彦 (1992) : 新編土壌微生物実験法，養賢堂，東京，p. 72 ~ 124.
- 7) MARLATT, M. L. et al. (1996) : Plant. Dis. **80** : 1336 ~ 1342.
- 8) NAKI, T. and Y. MORITA (1983) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **49** : 539 ~ 544.
- 9) 内記 隆・森田恭充 (1983) : 関西病虫研報 **25** : 10 ~ 13.
- 10) NAITO, Y. et al. (1996) : Mycoscience **37** : 15 ~ 19.
- 11) O'BRIEN, M. J. and H. F. WINTERS (1977) : J. Am. Soc. Hortic. Sci. **102** : 424 ~ 426.
- 12) PUHALLA, J. E. (1985) : Can. J. Bot. **63** : 179 ~ 183.
- 13) REYES, A. A. (1977) : Plant Dis. Rptr. **61** : 1067 ~ 1070.
- 14) ZUNIGA, T. L. et al. (1997) : Plant Dis. **81** : 592 ~ 596.