

市販種子から検出されたホウレンソウ萎ちょう病菌について

荒井 滋

Detection of the Spinach Wilt Pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*, from Commercial Seeds

Shigeru ARAI.

Summary

Fusarium wilt of spinach caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* is a daily occurrence and is a difficult problem in spinach fields. As one form of counter measure, the use of resistant cultivars and solar heating pasteurization is carrying out. Despite this, however, the fungus soon becomes re-established in the pasteurized field and rapid contamination of new production fields is observed.

For this reason, seed transmission of the fungus was considered and the present experiments were performed in order to investigate fungal seed transmission in 25 commercial cultivars.

1. *Fusarium oxysporum* was isolated from commercial seed lots tested at a high rate. Fifty percent of isolates were identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* by observation of cultures and an inoculation test.

2. The fungus was isolated from the surface of seeds and the mycelia, macroconidia and chlamydospores were observed using scanning electron microscopy. The results suggested that the fungus was adhering to the surface or the lower side of the pericarp.

Key Words: spinach, fusarium wilt of spinach, *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*, seed transmission, commercial seeds

緒 言

6～8月まきの夏穫りホウレンソウ栽培では、元来低温性植物³⁾であるホウレンソウの宿命的な耐暑性の欠如や、*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*による萎ちょう病の発生^{4,8,14)}により生産は不安定である。生産障害対策として抵抗性品種の検索¹⁵⁾や太陽熱利用による土壌消毒方法の検討^{6,7)}などが行なわれている。また、筆者は上記の技術に加えて移植栽培の導入など、耕種的な総合技術の組み立てにより生産の安定化を図り、一応の成果を得た¹⁾。

しかしながら、太陽熱を利用したハウス密閉処理や、ガス剤を利用して土壌消毒を実施した圃場でも、次作では発病株が相当数認められることや、栽培歴がまったく

ない新規造成畑においても、予想に反して早い速度で圃場汚染が進むことなど、ホウレンソウの種子そのものに起因すると考えられる事例が多い。

本研究は、市販ホウレンソウ25品種を供試して、フザリウム菌による種子汚染の実態を調査、検討したものである。なお、本研究の概要は61年度園芸学会春季大会において発表した。

材料および方法

種子からのフザリウム菌の検出

9 cmベトリ皿に分注された *Fusarium oxysporum* 選択分離培地¹⁰⁾上に1984年に購入した市販の種子25品種を各20粒置床して25℃、5日間培養の後、種子周囲か

らの菌そう出現の有無で汚染率を算出した。フザリウム菌は菌そうの形状等で他の糸状菌と区別した。25品種のうち6品種については、購入年次による汚染率の差を知るため、1984年以前に購入した種子も同時に検討した。

分離したフザリウム菌の病原性検定

汚染程度のひどい6品種から検出されたフザリウム菌で、その形状や色素産生能の異なる14菌株について、ホウレンソウ(キング・オブ・デンマーク)に対する病原性を検討した。接種源として、各分離菌株で胞子形成に差があるため、PDA培地で25℃、7日間培養した菌そうを用い、その菌そうを10mmのコルクボーラーで一定量打ち抜き、殺菌土で栽培された子葉展開期および本葉3枚期のホウレンソウ各10株に接種した。接種試験は25℃、12時間照明の恒温室内で行った。病原性調査は、接種30日後に病徴を観察し、根部導管が褐変して萎ちょう枯死を示した場合にのみ病原性有りとした。

また、本葉3枚期のホウレンソウに病原性を示した6菌株については、CMA、PDA、駒田の各培地上での培養所見の調査と、ホウレンソウ以外の16種の植物にも前記方法で子葉期の植物に接種し、寄生性の有無を調べた。

種子表面のフザリウム菌胞子の観察

果被表面に付着しているフザリウム菌胞子の調査は、ホウレンソウ種子10mlに蒸留水50mlを加え、スターラーで5分間攪拌後、2重のガーゼでろ過し、ろ液を3,000rpm、5分間遠沈してその沈澱物を顕微鏡観察した。また、種子をホルマリン蒸気で固定、風乾後、金蒸着して走査電子顕微鏡(ALPHA-9)で、果被表面のフザリウム菌を観察した。

つぎに、フザリウム菌の付着場所を推定するため、果被を取り除いた種子を5%次亜塩素酸ソーダ液で30分間表面殺菌し、9cmペトリ皿に分注したフザリウム菌選択分離培地上に20粒置床し、25℃、5日間培養の後、種子周囲のフザリウム菌そうの有無を調査した。

結 果

種子からフザリウム菌の検出

フザリウム菌とその他の糸状菌は、図版I.7-8のようにフザリウム菌選択分離培地上の菌そう観察により容易に

区別できた。第1表に示したように、市販の種子25品種のうち23品種で糸状菌が検出された。その内、フザリウム菌は13品種、汚染のひどい品種では75%の種子から、平均でも24.6%の種子から検出された。

また、購入年次が古いほどフザリウム菌の検出種子率は低い傾向であった(第2表)。

第1表 市販ホウレンソウ種子からの糸状菌およびフザリウム菌の検出状況

Table 1. Detection of *Fusarium oxysporum* and another fungi from commercial seeds.

品 種	供試種子数	検 出 粒 数	
		糸状菌	フザリウム菌
1-1	20	11	5
1-2	20	15	4
1-3	20	5	0
1-4	20	16	2
1-5	20	19	7
1-6	20	16	15
1-7	20	9	2
2-1	20	18	13
2-2	20	2	0
3-1	20	2	2
3-2	20	4	2
3-3	20	8	0
4-1	20	1	0
4-2	20	6	0
4-3	20	0	0
5-1	20	3	0
5-2	20	1	0
5-3	20	18	3
5-4	20	2	0
6-1	20	12	2
6-2	20	13	6
7-1	20	3	0
7-2	20	9	1
8-1	20	8	0
9-1	20	0	0

フザリウム菌とその他の糸状菌は、図版I.7-8のようにフザリウム菌選択分離培地上の菌そう観察により容易に

第 2 表 購入年次別種子のフザリウム菌検出状況

Table 2. Detection of *Fusarium oxysporum* from different year's purchase of spinach seeds.

品 種	購 入 年 次	フザリウム菌 検出種子率(%)
1-3	'83	10
1-3	'84	0
1-4	'83	15
1-4	'84	10
1-5	'81	0
1-5	'84	35
1-6	'82	0
1-6	'84	75
1-7	'83	0
1-7	'84	10
2-2	'80	0
2-2	'82	0
2-2	'83	0
2-2	'84	0

分離したフザリウム菌の病原性検定

フザリウム菌検出種子率が高い6品種から検出したフザリウム菌そうから、明らかに菌そう密度や色素産生能が異なる14菌株を分離培養し、ホウレンソウに対する病原性の有無を検討した。その結果は第3表に示すように、3葉期のホウレンソウに対し、1-1-3,1-6-1,1-6-7,6-2-1,6-2-3の5菌株は発病株率50%以上の強い病原性を示し、1-5-5菌株はやや劣った。他の8菌株は病原性が認められなかった。また、生育ステージにより病原性に大きな差は認められず、発病株からは病原性を有した接種6菌株がそれぞれ再分離できた。しかし、ホウレンソウ以外の16植物に対しては寄生性は認めなかった(第4表)。

これら分離菌は、いずれも供試した3培地でよく伸長したが、各菌株の色素産生能や菌そう密度は微妙に異なった(第5表、図版I・1-6)。

分離菌株の胞子は、いずれもPDA培地でよく形成されたが、1-6-1菌株では厚膜胞子の形成は認められなかった。6菌株は、いずれも、隔膜のない短い担子梗上に数個から多数の大きさ5~10×2.0~4.0μmの小型分生胞子を擬頭上に形成した。大型分生胞子は菌株により形成量に差が認められ、厚膜胞子は頂生または間生で豊富に形成された(図版II・3-5)。

第 3 表 分離菌株のホウレンソウに対する病原性

Table 3. Pathogenicity of the isolated *Fusarium oxysporum* to spinach seedlings.

菌 株	病 原 性 ¹⁾	
	子 葉 期	本葉3枚期
1-1-2	+	±
1-1-3	+	±
1-2-1	+	±
1-2-3	+	±
1-5-2	±	-
1-5-5	±	+
1-6-1	±	±
1-6-7	+	±
1-6-7r	±	±
2-1-3	±	-
2-1-10	+	±
6-2-1	±	±
6-2-2	±	±
6-2-3	±	±

- 1) ± : 50% ≤ 発病株率
- + : 10% ≤ 発病株率 < 50%
- ± : 株の萎ちょうのみ
- : 寄生性なし

第 4 表 分離菌株の各種植物に対する寄生性

Table 4. Host range of 6 isolates of *Fusarium oxysporum*.

供 試 植 物	菌 株					
	1-1-3	1-5-5	1-6-1	1-6-7	6-2-1	6-2-3
ネ ギ <i>Allium fistulosum</i>	— ¹⁾	—	—	—	—	—
アスパラガス <i>Asparagus officinalis</i>	—	—	—	—	—	—
レ タ ス <i>Lactuca sativa</i>	—	—	—	—	—	—
ゴ ボ ウ <i>Arctium lappa</i>	—	—	—	—	—	—
ミ ツ バ <i>Cryptotaenia japonica</i>	—	—	—	—	—	—
ハ ク サ イ <i>Brassica pekinensis</i>	—	—	—	—	—	—
キ ャ ベ ツ <i>Brassica oleracea</i>	—	—	—	—	—	—
ダ イ コ ン <i>Raphanus sativus</i>	—	—	—	—	—	—
メ ロ ン <i>Cucumis melo</i>	—	—	—	—	—	—
キ ュ ウ リ <i>Cucumis sativus</i>	—	—	—	—	—	—
ユ ウ ガ オ <i>Lagenaria siceraria</i>	—	—	—	—	—	—
ヘ チ マ <i>Luffa cylindrica</i>	—	—	—	—	—	—
ナ ス <i>Solanum melongena</i>	—	—	—	—	—	—
ト マ ト <i>Lycopersicum esculentum</i>	—	—	—	—	—	—
ソ ラ マ メ <i>Vicia fava</i>	—	—	—	—	—	—
ア ズ キ <i>Phaseolus radiatus</i>	—	—	—	—	—	—
ホウレンソウ <i>Spinacia oleracea</i>	+ ²⁾	+	+	+	+	+

1)寄生性なし 2)寄生性あり

第 5 表 分離菌株の培養特性

Table 5. Cultivation property of isolates of *Fusarium oxysporum*.

分離菌株 ¹⁾	C M A 培地		P D A 培地		駒田培地		孢子形成
	菌そう直径(mm)	菌そうの色	菌そう直径(mm)	菌そうの色	菌そうの直径(mm)	菌そうの色	
1-1-3	74	白	70	白	36	赤紫	小型、大型 厚膜
1-5-5	75	白	47	白	32	紫褐	小型、大型 厚膜
1-6-1	70	白	49	白	30	紫褐	小型、大型
1-6-7	62	赤	81	赤	45	赤紫	小型、大型 厚膜
6-2-1	76	白	70	赤紫	45	紫	小型、大型 厚膜
6-2-3	74	白	67	赤紫	28	白	小型、大型 厚膜

1) 25°C、7日間培養

種子表面のフザリウム菌の形態観察と付着場所

種子洗浄残渣から種子表面に付着していたと考えられるフザリウム菌の厚膜胞子と大型分生胞子が、図版Ⅱ・1-2のように、他の糸状菌胞子に混ざって検出された。その検出頻度はホウレンソウ種子1粒当りに換算して2~3個であった。また、種子表面を走査電子顕微鏡で観察したところ、吸水後2日目にはフザリウム菌と思われる小型分生胞子、大型分生胞子、厚膜胞子および菌糸が観察された(図版Ⅱ・6-8)。

次亜塩素酸ソーダ処理によるフザリウム菌の検出状況は、第6表に示したように、30分処理で検出率が20%に、処理後果被を除去した場合は15%に低下した。果被除去後に次亜塩素酸ソーダ処理をすれば5%に激減し、種子の表面殺菌効果が認められた。

第6表 次亜塩素酸ソーダ処理種子からのフザリウム菌の検出

Table 6. Detection of *Fusarium oxysporum* from spinach seeds treated with sodium hypochlorite.

処 理 方 法	フザリウム菌 検出種子率(%)
処理 ¹⁾	20
処理後果被除去	15
果被除去後処理	5
無処理	75

1) 次亜塩素酸ソーダ5%、30分

考 察

市販のホウレンソウ種子から高頻度にフザリウム菌が検出され、検出された菌株の約50%がホウレンソウに病原性を有することが確認された。これらの菌株は、だ円形の小型分生胞子を隔膜のない短い担子梗上に形成すること¹²⁾や寄生性などの所見から *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* と考えられる^{2,13)}。

種子の汚染は、同一の種苗会社の同じ品種であっても、購入の新しい種子ほど汚染率が高い傾向にあったが、古い種子も高率に汚染されている場合もあり、採種圃場での汚染程度差が影響しているものと考えられる。また、

これらホウレンソウ種子での本病原菌は、種子洗浄残渣および種子表面の検鏡結果からもわかるように、耐久器官である厚膜胞子の形で表面に付着していることが多く、長期間の生存が可能であり、古い種子でも高率に検出されたものと考えられる。

そこで、本病原菌の種子での侵入部位について検討した。次亜塩素酸ソーダ処理による表面殺菌種子からのフザリウム菌の検出は、無処理に比べおよそ4分の1に減少し、処理後に果被を取り除いてもその数字はほとんどかわらなかった。また、果被除去後に表面殺菌処理をした場合は、検出率は25分の1に激減した。これらの結果から、フザリウム菌の付着場所は、果被または種皮上と考えられる。このような種子の汚染部位については、Macdonald¹¹⁾によってビート種子での *F. oxysporum* f. sp. *betae* でも報告されている。表面殺菌種子のフザリウム菌検出頻度ならびに検鏡による種子表面の胞子や菌糸の確認などからも、ホウレンソウ種子の場合は、ユウガオ種子で報告されているように、フザリウム菌が導管を経由または腐敗果肉中で増殖して種子内部に侵入した⁹⁾とは考えられず、果被や果肉の乾いた組織(外被)に潜伏する果実内潜伏型感染、果実貫通型感染または付着型感染⁵⁾のいずれかと考えられる。このような汚染された外被をつけたままの種子を圃場に播種することによって、ホウレンソウ栽培歴のない圃場でも本病による汚染が急速に進むものと考えられる。

この汚染防止対策としてビート種子で行なわれている汚染外被を取り除く処理法¹¹⁾さらには簡易で効果的な種子消毒法について今後検討を加えたい。

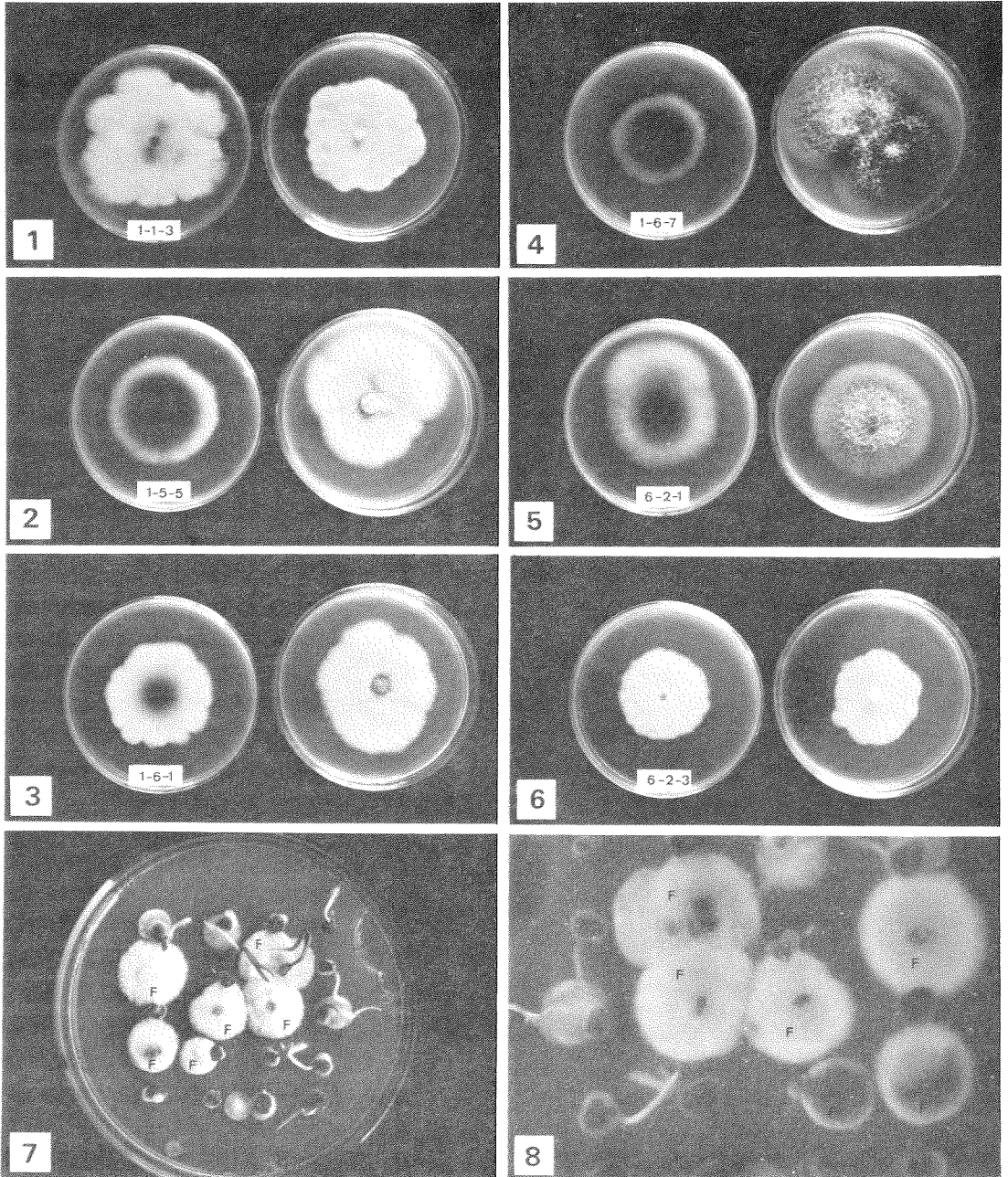
摘 要

ホウレンソウ栽培圃場でフザリウム菌による土壌病害が深刻な問題となっている。その対策として抵抗性品種の利用や太陽熱利用による土壌消毒が行なわれているが、病原菌の早期復活や新規造成畑での急速な汚染により、種子汚染の可能性が考えられる。本報では、市販の25品種を供試してその実態を調査した。

1. 供試種子からはフザリウム菌が高率に検出され、検出された菌株の50%はホウレンソウに病原性を有する *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* であった。
2. ホウレンソウ種子表面からの本菌の検出や走査電子顕微鏡による胞子ならびに菌糸の観察結果などから、本菌の付着場所は種子外部の果被上および果被下と考えられた。

引用文献

1. 荒井滋・岡山健夫・小島博文 1984. ホウレンソウの移植栽培法に関する研究(第3報). ホウレンソウ萎ちょう病の耕種的防除法について. 奈良農試研報**15**:10-20.
2. HUNGERFORD, C. W. 1923. A *Fusarium* wilt of spinach. *Phytopath.* **13**:205-209.
3. 香川彰 1974. ホウレンソウ. 農業技術大系、野菜編7. 農文協. 11.
4. 加納正和・内記隆 1979. ホウレンソウ萎ちょう病の発生生態に関する研究. 関西病虫研報**21**:45.
5. 岸国平 1976. 保菌種子をめぐる諸問題. 植物防疫**30**:27-30.
6. 小坂能尚・植村則大 1983. 夏どりホウレンソウの生産安定化技術について. 京都農総研報**11**:35-45.
7. 小玉孝司・福井俊男・中西喜徳 1979. 太陽熱とハウス密閉処理による土壌消毒法について. II. イチゴ萎黄病のほか土壌伝染性病害に対する土壌消毒効果と効果判定基準の設定. 奈良農試研報**10**:82-92.
8. 小島博文・荒井滋・岡山健夫 1979. 奈良県における夏ホウレンソウの生産障害について. 関西病虫研報**21**:46.
9. 国安克人・岸国平 1977. ユウガオつる割病の種子伝染に関する研究. II. ユウガオ種子の保菌経路について. 日植病報**43**:192-198.
10. 駒田旦 1972. 合成処方による *Fusarium oxysporum* の選択分離培地. 日植病報**38**:191.
11. MAC DONALD, J. D. and L. D. LEACH 1976. The association of *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae* with nonprocessed and processed sugarbeet seed. *Phytopath.* **66**:868-872.
12. 松尾卓見 1969. フザリウム菌の見分け方. 植物防疫**23**:473-480.
13. NAIKI, T. and M. KANO 1977. On *Fusarium* wilt of spinach and its causal fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **43**:297-300.
14. 内記隆・加納正和 1978. ハウス栽培ホウレンソウの土壌病害の発生とその病原菌. 日植病報**44**:543-558.
15. ———・森田恭充 1983. ホウレンソウ萎ちょう病に対する品種抵抗性の比較. 関西病虫研報**25**:10-13.



図版 I.1-6 分離菌株別 PDA 培地での菌そう
左：裏面 右：表面

7-8 市販種子からのフザリウム菌の検出
F：フザリウム菌 7：表面 8：裏面

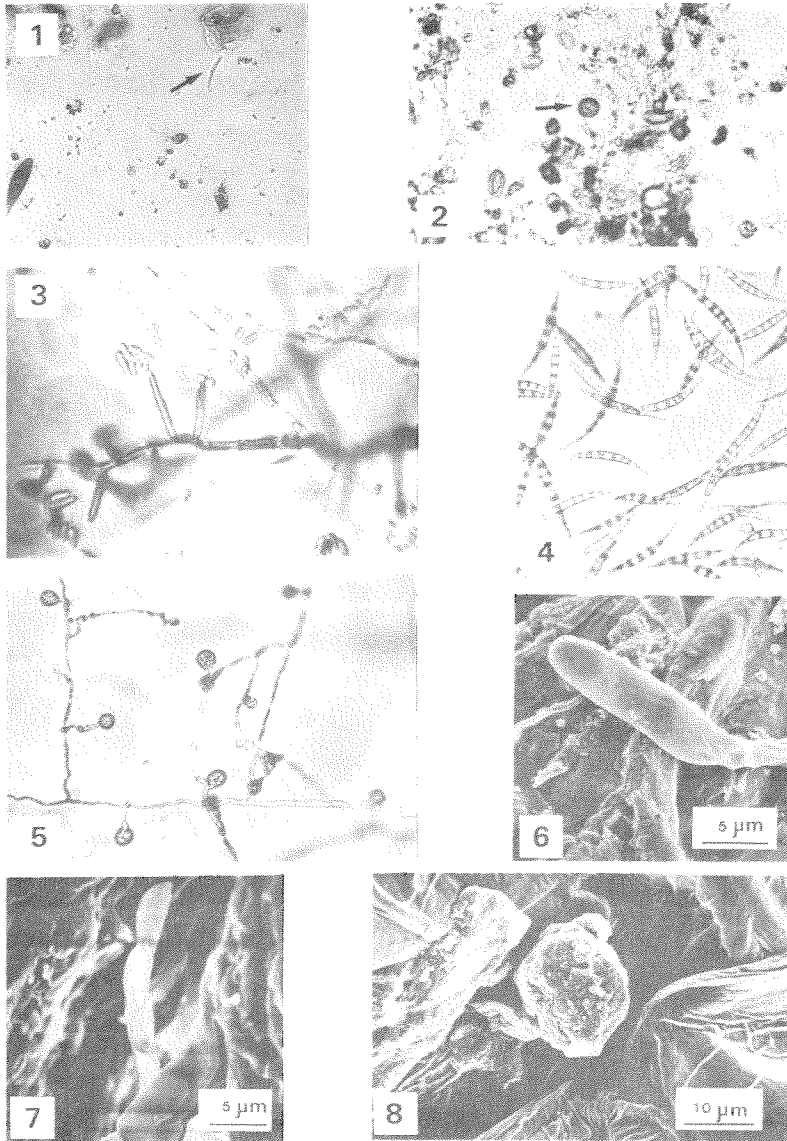
plate I

1-6 Colony of isolates from commercial seeds on PDA medium.

Left:back, Right:surface

7-8 Detection of *Fusarium oxysporum* from commercial seeds.

7:surface, 8:back, F: *Fusarium oxysporum*



図版 II.1-2 種子洗浄残渣からフザリウム菌胞子の検出 1:大型分生胞子(矢印) 2:厚膜胞子(矢印) 3 小型分生胞子の着生状況(6-2-1 菌株) 4 大型分生胞子(1-5-5 菌株) 5 厚膜胞子の着生状況(6-2-3 菌株) 6-8 ホウレンソウ種子表面のフザリウム菌胞子 6:小型分生胞子 7:大型分生胞子 8:厚膜胞子

Plate II 1-2 Detection of spores from seed washing pellet. 1:Macroconidia(arrow), 2:Chlamydospore(arrow) 3 Formation of microconidia(isolate 6-2-1). 4 Macroconidia(isolate 1-1-5). 5 Formation of chlamydospore(isolate 6-2-3). 6-8 Spores of *Fusarium* as observed on the surface of pericarp by scanning electron microscope. 6:Microconidia, 7:Macroconidia, 8:Chlamidospore