

北海道で発生した*Fusarium*属菌の花き病害 (第2報) —アスター萎凋病—^{*1}

堀田 治邦^{*2} 児玉不二雄^{*3}

北海道で栽培されたアスター (*Callistephus chinensis* (L.) Nees.) で株が黄化・萎凋する病害が発生した。病株の地際部基部にも褐変が認められた。これら病株から*Fusarium*属菌が高頻度で分離された。病原性試験を実施し、分離菌を接種した土壌でアスター2品種を栽培したところ、2品種とも葉の黄化、維管束の褐変が見られ、やがて萎凋・枯死した。発病株から*Fusarium*属菌が再分離された。本病菌のPDA培地における菌叢は白色または淡桃色を示した。大型分生子は主に3隔壁、中短長、直状～先端部でやや曲がる。小型分生子は楕円形、短い分生子柄に擬頭状に形成された。本菌のDNAを*Fusarium oxysporum*の特異検出プライマーでPCRを行ったところ、想定される増幅バンドが検出された。以上から、本菌を*Fusarium oxysporum* Schlechtendalと同定した。さらに18科37植物に接種を行い、分化型を検討したところ、アスターに強い病原性とキクに弱い病原性を示し、その他植物に病原性は認められなかったことから、分化型はf.sp. *callistephi*に該当した。以上から、北海道において*Fusarium oxysporum* Schlechtendal f.sp. *callistephi* W.C. Snyder & H.N. Hansenによるアスター萎凋病の初発生を確認した。

緒 言

北海道における花き栽培は平成20年以降700ha程度の作付面積を維持している⁵⁾。このうち、アスター (*Callistephus chinensis* (L.) Nees.) は平成7～12年にかけて6ha程度の栽培面積を有していたが、平成20年に3ha程度まで減少し、それ以降は横ばいに推移している。

アスターでは平成4年頃から栽培中の株に萎凋症状が発生し、生産上大きな問題となっていたが、調査の結果、アスター萎凋病であることが明らかとなった。これらは北海道における初発生であったため、学会発表がなされたが、その詳細は講演要旨での記載に留まっている⁶⁾。また、本邦における萎凋病の初発生は松浦⁹⁾が報告しているが、病原菌の分離・同定に基づいた記載はない。

以上のことから、本報では北海道のアスターから分離した病原菌の同定や接種試験結果を詳細にまとめ、アスター萎凋病の発生記録として報告したい。

試験方法

1. 病原菌の分離

平成4年8月に長沼町で発生したアスターの萎凋症状から組織分離法¹¹⁾で糸状菌の分離を行った。罹病茎部を約5mm角に切断し、70%エタノールに30秒間、次亜塩素酸ナトリウム液 (有効塩素 0.5%) に1分間、滅菌水に1分間 (2回) それぞれ浸漬し、滅菌濾紙で吸水後、ストレプトマイシン加用ジャガイモ・デキストロース寒天 (PDA) 培地平板に置床した。生育した菌叢の先端部をとり、PDA培地平板で純粋培養した。分生子の形成を確認後、5mm角の菌叢を滅菌水で懸濁してPDA培地に画線し、単孢子由来の菌叢を釣菌して供試菌株とした。

2. 分離菌の培養性質および形態観察

分離株の培養性質および形態を調査した。培地裏面の菌叢色の観察はPDA培地平板を用い、23℃、4週間培養して観察した。また、合成低栄養寒天 (Synthetic Low Nutrient Agar; SNA) 培地を用いて、スポロドキアの形成、大型分生子および小型分生子の形態を光学顕微鏡下で観察した。加えて、PDA培地を1/4量にした平板 (1/4PDA) でも培養し、大型分生子の形成を観察した。

2016年11月24日受理

^{*1} 本報の一部は、1995年度日本植物病理学会北海道部会で発表した。

^{*2} (地独) 北海道立総合研究機構中央農業試験場, 069-1395 夕張郡長沼町
E-mail: horita-harukuni@hro.or.jp

^{*3} 元道立北見農業試験場 (現: 北海道植物防疫協会, 060-0001 札幌市)

3. 種特異プライマーによる検出

F. oxysporum を特異的に検出するプライマーペア (FOF1/FOR1) を用いて⁹⁾, PCRによる検出を行った。アスター全分離株を用い, 対照として *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* Fsp1201株 (=MAFF244461) および *Fusarium avenaceum* TOF9202株 (=MAFF245306) を用いた。各菌株をPDA培地平板で23℃条件下, 7日間培養した菌叢の気中菌糸を採取し, DNeasy Plant Mini Kit ((株)キアゲン) でDNAを抽出した。これをテンプレートとしてPCRを行い, 増幅した遺伝子断片の有無を調査した。

4. 接種試験

各アスター分離株の汚染土壌を用いて, アスター (品種: 「有明アスター」, 「ボンボンミックス」) への接種試験を行った。汚染土壌はPDA培地平板 (直径9cm) で各菌株を2週間培養し, 3枚の平板を寒天ごと300mlの滅菌水とともにミキサーで破碎し, ミニプランター (28型; 28×14.5×11.8cm) に詰めた土壌 (タキイ培養土) に混和して作製した。これに約1ヶ月栽培した幼苗5株を1列ずつ並べて定植した。温室で1ヶ月栽培し, 地上部の症状を随時観察した。1ヶ月後に株を抜き取り, 茎部の維管束褐変調査と接種菌の再分離を行った。対照として, 滅菌水を混和した無接種を設けた。

また, AsF9201株を用いて, 18科37植物に対する病原性を調査した。1×10⁴個/mlに調整した分生子懸濁液を作製し, これに2時間浸根接種して, 培養土を詰めたミニプランターに定植した。温室で1ヶ月栽培し, 上記と同様に発病を調査した。

結 果

1. 病徴と病原菌の分離

発病株は定植後に生育が不良となって下葉が退緑する症状が認められた (図1a)。また, 花蕾が形成される頃

から株全体が急激に萎凋し, 葉は退緑して黄化を伴う症状となった (図1b)。発病株はやがて株全体の葉が褐色となって枯死した。株元の茎は表面が褐変し, 褐変は症状の進行とともに上部へ進展した。発病株の茎を切断すると維管束の褐変が見られた。罹病茎部から病原菌を分離した結果, ほぼ同一の菌叢で, 同じ生育程度を示す糸状菌が高頻度に分離された。単胞分離を実施し, AsF9201, AsF9203, AsF9204を得た。

2. 分離菌の培養性質および形態観察

分離菌株はSNA培地上でスポロドキアや大型分生子の形成は見られず, 小型分生子および厚膜胞子は豊富に形成された。大型分生子は1/4PDA培地平板で認められ, 細くて中短長, 直状〜やや屈曲し, 主に3隔壁で非分枝の分生子柄上のモノフィアライドから形成され, 大きさは25.1~52.8 × 2.8~7.1 μmであった (図1d)。小型分生子は楕円形, 単胞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, 大きさは7.5~17.8 × 1.9~5.7 μmであった (図1e)。両分生子とも連鎖は認められなかった。厚膜胞子は単生あるいは二連に形成され, 大きさは5.7~11.8 × 4.2~9.1 μmであった (図1f)。PDA培地における培養菌叢は白色でまれに淡桃色を呈した。以上の性質をLeslie and Summerell⁷⁾ の *Fusarium* 属菌の記載と照合した結果, *Fusarium oxysporum* Schlechtendalと同定した (表1)。

3. 種特異プライマーによる検出

F. oxysporum の種特異プライマーを用いたPCRを行った結果, アスターから分離した3菌株とも, 想定される増幅断片 (340bp) が得られた (図2)。対照菌株では *F. oxysporum* f. sp. *batatas* Fsp1201株で同様の増幅断片が認められ, *F. avenaceum* TOF9202株では認められなかった。

表1 アスター分離株と *Fusarium oxysporum* の比較

	アスター分離株	Leslie and Summerell ^{a)}
大型分生子	細くて中短長, 細胞壁薄い, 直状〜やや曲がる, 隔壁数は通常3, 分生子柄はモノフィアライド	細くて中短長, 細胞壁薄い, 直状〜やや曲がる, 隔壁数は通常3, 分生子柄はモノフィアライド
小型分生子	楕円, 隔壁なし, 擬頭状に形成, 分生子柄は短く, モノフィアライド	楕円, 隔壁なし, 擬頭状に形成, 分生子柄は短く, モノフィアライド
厚膜胞子	豊富に形成, 単独, 二連	豊富に形成, 単独, 二連, 多連鎖
菌叢	白色, 培地着色なし, まれに淡桃色	白色または淡紫色の菌糸, 培地が紫色あるいはマゼンタに着色, 菌株によって着色なし

a) Leslie and Summerell⁷⁾

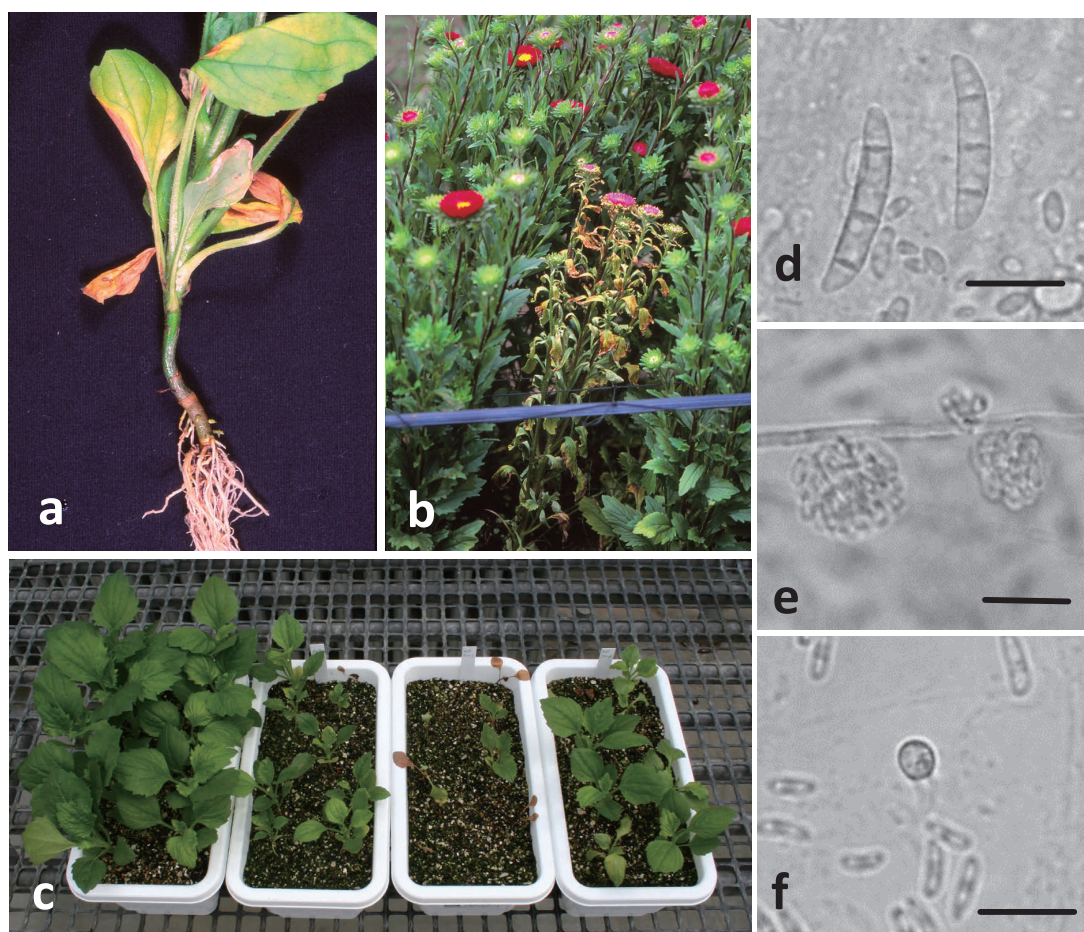
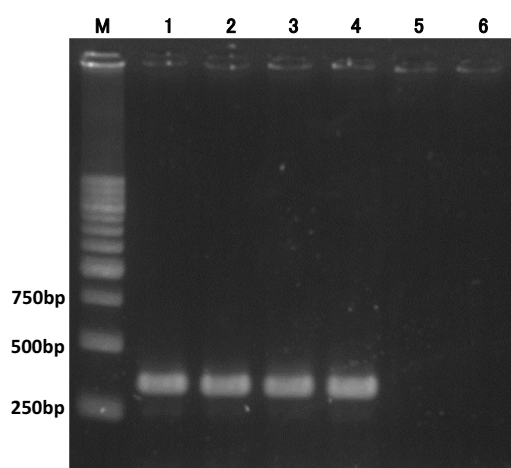


図1 アスターの萎凋症状と分離菌の形態

a：定植後1ヶ月頃に発生した株の萎凋症状，b：収穫期頃に発生した萎凋症状，c：接種試験による発病（左から滅菌水，AsF9201，AsF9203，AsF9204接種区），d：分離菌の大型分生子（Bar=20μm），e：分離菌の小型分生子（Bar=20μm），f：分離菌の厚膜胞子（Bar=20μm）

図2 特異プライマーを用いたPCRによる *Fusarium oxysporum* の検出

M：サイズマーカー（250bp ladder），1-3：アスター分離株（1：AsF9201，2：AsF9203，3：AsF9204），4：*Fusarium oxysporum* f.sp. *batatas* Fsp1201株，5：*Fusarium avenaceum* TOF9202株，6：Distilled water

表2 アスター分離株の接種試験結果

菌株名	各品種に対する病原性	
	「有明アスター」	「ボンボンミックス」
AsF9201	5/5 (+) ^{a)}	5/5 (+)
AsF9203	5/5 (+)	5/5 (+)
AsF9204	5/5 (+)	5/5 (+)
無接種	0/5 (-)	0/5 (-)

a) 発病株/接種株, ()内は+; 再分離, -; 再分離されず

4. 接種試験

各アスター分離菌株はアスターの各品種に病原性を示した (表2)。定植1週間後から葉の萎凋が認められ, 1ヶ月後の調査では生育不良が著しく, 枯死する株も認められた (図1c)。地際部の茎は褐変し, 上部へ進展した。茎部から接種菌が再分離された。無接種株では発病が認められなかった。

AsF9201株の18科37植物に対する病原性を調査した結果, アスターでは激しい萎凋症状を示し, 維管束褐変と地際部表面の褐変が認められた。キクでは萎凋症状に至らなかったものの, 生育遅延と維管束の褐変, 地際部茎表面の褐変が認められた (表3)。ダイズでは萎凋症状や維管束褐変が認められなかったものの, 一部個体で地際部茎表面の褐変が認められた。その他接种植物では発病が認められなかった。これらの病原性は分化型 *callistephi* に相当した。

考 察

アスターに発生した黄化・萎凋症状から分離した糸状菌は各器官の形態, 培養性質, 特異検出プライマーを用いたPCR, アスターへの強い病原性から *Fusarium oxysporum* Schlechtendal f.sp. *callistephi* W.C. Snyder & H.N. Hansen¹²⁾ と同定された。各分離株の2品種に対する接種試験でも症状の再現と接種菌の再分離でアスター萎凋病であることが明らかとなった。本試験の一部は既に報告 (講演要旨)⁶⁾ したが, 本報にその詳細を記載した。本邦における発生は松浦⁹⁾ が初めて報告しているが, 病原菌の同定および接種試験の記載はなく, 米国で発生したBeachの報告³⁾ を引用して, これに類する病害であろうとしている。それ以降, アスター萎凋病菌の同定に関する報告はなく, 本報がわが国における分化型まで同定された初の記載であると考えられる。

本病菌の病原性はアスターに激しい萎凋症状を示したが, キクにも弱い病原性が認められたことから f.sp. *callistephi* の分化型について考察してみる。f. sp. *callistephi* はアスターのみに病原性を持つ分化型である

表3 アスター分離株の寄主範囲

植物科・種名 (品種名)	根部表面の褐変	維管束の褐変
アブラナ科		
ダイコン (おしん)	0/5 ^{a)}	0/5
ハクサイ (耐病60日)	0/5	0/5
キャベツ (金系201号)	0/5	0/5
ブロッコリー (早生緑)	0/5	0/5
ナス科		
トマト (ボンテローザ)	0/5	0/5
ナス (千両二号)	0/5	0/5
ピーマン (エース)	0/5	0/5
ウリ科		
キュウリ (四葉胡瓜)	0/5	0/5
ユリ科		
ネギ (小春)	0/5	0/5
バラ科		
イチゴ (宝交早生)	0/5	0/5
セリ科		
パセリ	0/5	0/5
ホワイトレースフラワー	0/5	0/5
ブルーレースフラワー	0/4	0/4
イソマツ科		
スターチス (ゴールデンイエロー)	0/5	0/5
アヤメ科		
グラジオラス (ベガ)	0/5	0/5
ヒユ科		
ケイトウ (金峰)	0/5	0/5
ナデシコ科		
カーネーション (ウエディングスター)	0/5	0/5
ナデシコ (白梅)	0/5	0/5
ナデシコ (あすか)	0/5	0/5
アレナリア (モンタナ)	0/5	0/5
シュコンカスミソウ (プリストルフェアリー)	0/5	0/5
キンポウゲ科		
ラークスパー (ピンクパーフェクション)	0/5	0/5
ケシ科		
アイランドポピー	0/5	0/5
イソマツ科		
スターチス (ゴールデンイエロー)	0/5	0/5
リンドウ科		
トルコギキョウ (あすかの波)	0/5	0/5
ゴマノハグサ科		
キンギョソウ (桃園)	0/5	0/5
キク科		
ベニバナ (丸葉種)	0/5	0/5
アスター (ブルーマーガレット)	5/5	5/5
エローサルタン	0/5	0/5
キク (清姫)	3/5	5/5
ヒマワリ (ルナ)	0/5	0/5
ヒャクニチソウ (スカーレットフレーム)	0/5	0/5
マメ科		
アズキ (エリモショウズ)	0/5	0/5
インゲンマメ (大正金時)	0/5	0/5
ダイズ (トヨスズ)	2/5	0/5
アカクロバ (メジウム)	0/5	0/5
イネ科		
コムギ (ホクシン)	0/5	0/5

a) 発病株/接種株

が¹²⁾、さらにレースが4種に分けられ¹⁾、アスターとアフリカンマリーゴールド、ウルシ、マリーゴールドとの病原性の組み合わせで分類されている。一方、キクでは Toop¹³⁾ が *Fusarium oxysporum* f. sp. *callistephi* による萎凋病を報告したのが最初であるが、その後、Armstrongら²⁾ がキクの分化型 f. sp. *chrysanthemi* を提唱した。f. sp. *chrysanthemi* はキク以外にもアスター、マリーゴールドおよびルーピンに弱い病原性を持つとされ、これらは品種間でも発病の程度は異なるという。同時に、ササゲ分化型の f. sp. *tracheiphilum*、センナ分化型の f. sp. *cassiae* もキク「Encore」に病原性を持つことが示された。各分化型菌は激しい病原性を持つ植物に加え、他の植物にも弱いながら病原性を示す場合があると考えられる。今回分離されたアスター株についてもキクに弱い病原性を持つ菌で、新レースに該当すると考えられ、興味深い。この検討は各レースの菌株と各植物・品種を組合せた包括的な接種の検討が必要であろう。

本病の防除対策については、Elmerら⁴⁾ がメチルブROMAID・クロルピクリンくん蒸剤、ジクロロプロペン・クロルピクリンくん蒸剤、カーバムナトリウム塩液剤の薬剤防除で1%以下の発病株率に低下させることを報告し、本邦においてもクロルピクリンくん蒸剤、ダゾメット微粒剤の効果が認められている¹⁴⁾。薬剤によらない対策としては抵抗性品種の利用が考えられるが、現在、高度な抵抗性を持つ品種はなく中程度の抵抗性であるため、抵抗性品種とその他対策を組合せた防除対策が必要である。種子や育苗トレイの次亜塩素酸ナトリウム液による消毒³⁾ や作期、土壤消毒（蒸気消毒および土壤還元消毒）の組合せによる防除効果が明らかになっており¹⁰⁾、北海道における実証も今後必要である。

最後に本試験で供試した代表菌株は農業生物資源ジェンバンクに寄託された。AsF9201株、AsF9203株はそれぞれMAFF245746、MAFF245747として登録された。

引用文献

- 1) Armstrong, G. M., Armstrong, J. K.. Races of the Aster-Wilt *Fusarium*. *Phytopathology* 61, 820-824 (1971)
- 2) Armstrong, G. M., Armstrong, J. K., Littrell, R. H. Wilt of chrysanthemum caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, forma specialis nov. *Phytopathology* 60, 496-498 (1970)
- 3) Beach, W. S. The *Fusarium* wilt of China aster. *Mich. Acad. Sci. Rep.* 20, 281-308 (1918)
- 4) Elmer, W. H., McGovern, R. J. Epidemiology and management of *Fusarium* wilt of China asters. *Plant dis.* 97, 530-536 (2013)
- 5) 北海道農業協同組合中央会・ホクレン農業協同組合連合会編. 北海道フラワーガイド その21. 北海道農業協同組合中央会・ホクレン農業協同組合連合会, 札幌, 2013. pp. 1-4.
- 6) 児玉不二雄, 堀田治邦. 北海道におけるアスター萎凋病の発生とその寄主範囲. *日植病報*. 61, 646 (1995)
- 7) Leslie, J. F. and Summerell, B. A. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell, Iowa, 2006. pp. 1-388
- 8) 松浦 勇. 恐るべき翠菊の萎凋病と其の防除に就いて. *實際園藝*. 6, 617-621 (1929)
- 9) Mishra, P. K., Fox, R. T. V., Culham, A. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiol. Letters*. 218, 329-332 (2003)
- 10) 小野佳枝, 藤永真史, 由井秀紀, 宮本賢二, 山本宗輝. 作期・品種・土壤消毒法がアスター萎凋病の発病抑制に及ぼす影響. *園芸学研究*. 6別1, 246 (2007)
- 11) 佐藤昭二, 後藤正夫, 土居養二. 植物病理学実験法. 講談社サイエンティフィク, 東京, 1983. p.230.
- 12) Snyder, W. C. and Hansen, H. N. The species concept in *Fusarium*. *Amer. J. Bot.* 27, 64-67 (1940)
- 13) Toop, E. W. The effect of pre-inoculation treatment of rooted chrysanthemum cuttings on subsequent vascular wall development. *Plant Dis. Repr.* 47, 284-287 (1963)
- 14) 渡邊 功, 横山 威, 金子英一. 隔離栽培と土壤消毒併用によるアスター萎凋病の防除効果. *九州農業研究*. 66, 227 (2004)

Fusarium Diseases on Ornamental Plants Occurred in Hokkaido (2) - Wilt of China Aster -

Harukuni HORITA^{*1}, Fujio KODAMA^{*2}

Summary

Yellowing on older leaves or wilt, together with occasional necrotic lesions at the stem base, were observed in China aster (*Callistephus chinensis*) in Hokkaido. A *Fusarium* sp. was frequently isolated from the diseased plants. For pathogenicity testing, two cultivars of China aster were grown on soil inoculated with *Fusarium* isolates. Yellowing of leaves and vascular blackening were observed in all plants that later wilted and died. *Fusarium* colonies were re-isolated from all inoculated plants. The colonies were observed as white or pale pink on PDA plates. The macroconidia were mostly 3-septate and short to medium in length, with curved apical cells. Oval, 0-septate microconidia were formed on typical single short monophialides or abundantly on false heads. *F. oxysporum*-specific segments were amplified from DNA extracted from all isolates. Based on growth characteristics, morphological observation, and banding pattern obtained using species-specific primers, the isolates were identified as *F. oxysporum*. Host range studies were conducted by inoculating seedlings of a differential set of 37 plant species with *F. oxysporum* AsF9201. The fungus was found to be highly pathogenic to China aster, and moderately pathogenic to chrysanthemum. The *formae speciales* of the isolates was assigned as *callistephi* on the basis of the host range study. This is the first report of wilt in China aster in Hokkaido caused by *F. oxysporum* f. sp. *callistephi*.

^{*1} Hokkaido Research Organization, Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan

E-mail: horita-harukuni@hro.or.jp

^{*2} Hokkaido Kitami Agricultural Experiment Station (present: Hokkaido Plant Protection Association, Sapporo, 060-0001 Japan)