

## 海砂砂耕における遊走子放出量に基づいた *Olpidium brassicae* —単遊走子嚢分離株の寄生性評価

小金澤碩城・笹谷孝英\*・野見山孝司\*・守川俊幸\*\*

(近畿中国四国農業研究センター・近畿中国四国農業研究センター 四国研究センター\*・  
富山県農業技術センター野菜花き試験場\*\*)

Evaluation of host specificity of a single-sporangial isolate of *Olpidium  
brassicae* based on zoospore release in a sea-sand culture

By Hiroki KOGANEZAWA, Takahide SASAYA\*, Kouji NOMIYAMA\* and Toshiyuki MORIKAWA\*\*  
(National Agricultural Research Center for Western Region, Fukuyama, Hiroshima 721-  
8514, Japan, \*National Agricultural Research Center for Western Region, Zentsuji Campus,  
Zentsuji, Kagawa 765-8508, Japan, and \*\*Vegetable and Ornamental Crops Experiment  
Station, Toyama Agricultural Research Center, Tonami 939-1327, Toyama, Japan)

### 緒 言

*Olpidium brassicae*はツボカビ綱 (Chytridiomycetes) に属し、通常の糸状菌とは異なり菌糸体は形成せず、その生活環において遊走子嚢、遊走子、休眠孢子の形態をとる。本菌はレタスビッグベイン病とタバコネクロシスウイルス、タバコわい化ウイルス、チューリップ微斑モザイクウイルスを媒介することが知られている (日高・多川, 1976; Campbell, 1996; 守川ら, 1997; Lot *et al.*, 2002)。*O. brassicae*の遊走子嚢から放出される鞭毛を持った遊走子が、病原ウイルス媒介に重要な役割を演じる。一方、休眠孢子は耐久器官であり、乾燥土壤中で20年以上も生存することが報告されている (Campbell *et al.*, 1985)。タバコネクロシスウイルスを除く病原ウイルスは休眠孢子中で安定に存在するため、病原ウイルスを保毒した *O. brassicae* が一度圃場内に持ち込まれると、これを根絶することはほとんど不可能である。

レタスビッグベイン病の発生はわが国では1973年に和歌山県で初めて確認された (岩木ら, 1978)。数年後には、和歌山県の発生地域ではレタス栽培を断念せざるを得ない状況となった。その後国内

では長野県、静岡県、埼玉県、兵庫県、香川県、千葉県、沖縄県、岡山県、徳島県でもその発生が確認されており、現地レタス生産者はその発生面積の拡大を大変危惧している (神余ら, 2002; 相野, 2002)。ビッグベイン病罹病レタスからは2種のウイルス、レタスビッグベインウイルス (LBVV) とミラフィオリレタスウイルス (MiLV) が分離されている (Kuwataら, 1983; Roggero *et al.*, 2000; Lot *et al.*, 2002; 夏秋ら, 2002; Roggero *et al.*, 2002)。ビッグベイン病抵抗性育種検定、薬剤効果試験あるいは *O. brassicae* 感染阻害細菌の選抜では、被害植物であるレタスの根における *O. brassicae* の増殖程度を調査する必要がある。現在のところ、わが国では検定植物の根内の遊走子嚢と休眠孢子数を計測することで *O. brassicae* に対する薬剤や感染阻害細菌の効果を評価している (相野ら, 2002; 岩本ら, 2003; 神余ら, 2001)。この方法は大変な労力と時間がかかる。しかも、*O. brassicae* は検定植物の各株や根内に均一に感染するとは限らないし、また、根毛が多い部位は観察しにくく、正確に *O. brassicae* の感染率を測定することは大変困難である。また、ビッグベイン病抵抗性育種検定においては病徴の

発現あるいはウイルスの検定が行われているだけで、*O. brassicae*に対する抵抗性についての報告はされていない。

海外においては検定植物を珪砂で育て、*O. brassicae*を感染させ、一定期間後に放出される遊走子数を測定することにより本菌の増殖度を推定している（Campbell, 1988 : Campbell and Sim, 1994）。本研究はわが国に適した*O. brassicae*の寄生性評価方法を確立することを目的として行い、安価にかつ容易に入手できる海砂を珪砂の代わりに用いても、同様に放出される遊走子数を測定できることを明らかにし、*O. brassicae*の単遊走子囊分離株を10科36種の植物に接種して遊走子放出量を調査した。

## 材料および方法

### 供試菌

富山県氷見市のネギより単遊走子囊分離した株 W0ms-3 を用いた。本分離株はLBVVとMiLVを伝搬できる（夏秋ら, 2002）。マクワウリ（品種：銀泉）あるいはササゲ（品種：黒種三尺）に感染させ、接種2～4週間後のものを接種源として用いた。

### 供試植物の栽培

10科36種の植物（表）を供試し、接種源植物を含め全てイチゴパックに海砂を用いて砂耕した。海砂は3ミリ目の篩いをとおした後、濃い濁り水が出なくなるまで水洗し、滅菌した。タバコとセルリーを除いて供試植物の種子を20℃あるいは25℃でペトリ皿内の湿らせたろ紙上で発芽させ、発芽した種を海砂に移植した。タバコとセルリーの種子は直接海砂に播種した。液肥として週に2回程度1,000倍希釈のハイポネックス®を施用した。20℃に保ったガラス温室内で、5～14日間生育させたものを実験に供試した。接種時の苗齢は移植時から計算し、タバコとセルリーでは発芽が認められた日から計算した。遊走子採取前4日間は灌水あるいは液肥の施用を行わなかった。

### 接種法

接種用の遊走子は下記に述べる方法により水道水（広島県福山市水道）中に10～15分間根を浸漬して放出させ採取した。遊走子濃度は試験ごとに異なるが1ml当たり $1 \times 10^8$ 以上とし、苗1株当たり3～6mlを株元に散布して接種した。接種後、

砂が水に飽和していない場合には、水道水を追加して飽和させた。その後はイチゴパックをトレーに入れ、20℃に設定したガラス温室で栽培した。

### 遊走子数の算出方法

遊走子接種6、14および21日後、検定植物の根をできるだけ傷つけないように砂ごと掘り出し、200mlコップ内の水道水で素早く数回洗い、附着している砂を落とした後、根を水道水中で約15分間静置して放出された遊走子数を計測した。用いる水道水の量と検定植物数は、接種2日後に供試植物1株を抜き取って根量と*O. brassicae*の栄養菌体（thallus）の数およびその生育程度を観察して調整した。感染量に応じて4～10株をまとめて、根量が少ない場合は10ml、根量が多い場合は20～30mlの水道水に根を浸漬した。遊走子の観察は微分干渉顕微鏡（ニコン）を用い200倍で行った。遊走子数の算出は血球計算盤（64区画）を用い、遊走子量が多い場合は適宜希釈して観察した。放出遊走子数は検定植物1株から放出された遊走子数に換算して示した。遊走子の放出に用いた接種6日後の植物の根については遊走子囊と休眠胞子を微分干渉顕微鏡で直接観察し、根における感染量を無感染－、少感染＋、中感染＋＋、甚感染＋＋＋として判定した。根が太いなどの理由により透明性が低い場合は2枚のスライドグラスに挟んで押しつぶすか、カミソリの刃で表皮を薄くはぎ取り観察した。

## 結果および考察

10科36種の植物に*O. brassicae*のW0ms-3分離株を遊走子接種して、6日、14日および21日後に放出される遊走子の数を測定した（表）。検定植物によって放出される遊走子数には大きな差があり、本分離株はネギから分離されたにもかかわらず、ウリ科植物のマクワウリとキュウリ、マメ科植物のササゲとダイズ並びにアオイ科のオクラで多くの遊走子が放出された。特に、マメ科のササゲからは接種21日後でネギの100倍以上の遊走子の放出が観察された。しかし、マメ科植物でもエンドウやリョクトウ、クロタラリアでは感染量は比較的多いにもかかわらず、エンドウやリョクトウでは遊走子量は少なく、クロタラリアでは放出は認められなかった。これらの植物ではほとんどの遊走子囊が小さく、生育していなかった。

表 各種検定植物における *Olpidium brassicae* WOmS - 3 の遊走子の放出量の比較

植物名科・種名	品種名	接種時苗齢 (日)	感染量*	1株当たり放出遊走子数** ( $\times 10^6$ )			
				6日後	14日後	21日後	
ウリ科	マクワウリ	銀泉	7	+++	1	6	7
	キュウリ	よしなり	7	+++	5	6	NT
		夏さんご	5	+++	2	4	NT
		夏しぐれ	7	+++	1	8	NT
マメ科	ササゲ	黒種三尺	7	+++	10	10	40
	セスバニア	カンナビナ	7	++	0.4	1	NT
	ダイズ	タマホマレ	7	+++	3	6	3
	アズキ	大納言	10	+++	7	0.1	NT
	スイートピー		7	+	0.1	2	NT
	エンドウ	絹さや	5	+++	Tr	Tr	NT
	リョクトウ	グリーンマップ	7	++	Tr	Tr	0
	クロタリリア	コブトリソウ	7	++	0	0	0
アカザ科	フダンソウ	日本白茎	7	++	0.2	2	NT
	ハウレンソウ	次郎丸	7	++	0.09	0.2	3
	ビート	シュガーマンゴールド	7	++	0.2	0.05	NT
	キノア		7	+++	0.08	0.06	NT
キク科	シュンギク	中葉春菊	7	++	Tr	6	6
	ゴボウ	秋蒔	7	++	0.08	0.3	2
	キンセンカ		7	+	0.04	0.04	0.09
	ヒャクニチソウ		7	+++	0.7	0.4	NT
	レタス	ウエアヘッド	7	+	0	Tr	NT
		シスコ	7	+++	0.02	0.3	1
セリ科	ニンジン	本紅金時	7	++	Tr	1	NT
	セルリー	トップセラー	10	+	0	Tr	0
ユリ科	ネギ	九条太	10	+++	0.2	0.6	0.3
	タマネギ	泉州中甲高	10	+	Tr	0.1	NT
		あまがし	10	+++	0.7	1	NT
ナス科	トマト	Ponterosa	7	+++	Tr	3	1
		桃太郎	7	+++	Tr	0.4	1
	ピーマン	エース	7	+++	0.3	0.5	1
	ナス	千両二号	7	+++	0.08	0.7	1
	タバコ	Xanthi nc	14	(+)	0	0	NT
アブラナ科	コカブ	金町こかぶ	7	++	0.06	0.07	NT
	ハクサイ	空海70	7	++	0.1	0.2	NT
	キャベツ	富士早生	7	(+)	0	0	NT
	ダイコン	おしん	5	+	0.3	0	NT
アオイ科	オクラ	グリーンエチュード	10	+++	2	4	NT
イネ科	イネ	ヒノヒカリ	7	+	0.06	0.05	NT
	コムギ	ふくさやか	7	+	Tr	0.06	2
	トールフェスク	ジャガーIII	7	+	Tr	0.4	2
	エンパク	オーツワン	7	+	Tr	Tr	NT

\*感染量は接種6日後の調査。-：無感染，+：少感染，++：中感染，+++：甚感染，(+): 侵入は認められるが全く生育していない。

\*\*Trは遊走子は放出されているが，0.1mm<sup>3</sup>内に2個以下（1株当たり2～4x10<sup>4</sup>以下）である。NTは未観察を示す。

アカザ科のキノア (*Chenopodium quinoa*)でも、生育していない遊走子嚢が多かった。さらにクロタラリアでは遊走子が根の外に出られず細胞内を泳ぎ回っているのが観察された。クロタラリアで遊走子の放出が認められなかったのは遊走子嚢に成熟できるものが少ないのと、成熟しても遊走子が根外に出られなかった二つの要因のためと思われる。遊走子が細胞内を動き回っているのはハクサイやコカブでも観察された。これらの植物細胞内ではWOms-3の遊走子嚢は時に放出管を正しく根外に伸張させることができないと推察された。

シュンギクやレタスの品種シスコでは接種6日後の遊走子の放出量は少なかったが、14日目、21日目と徐々に増加した。ナス科のトマト、ピーマン、ナス、アカザ科のハウレンソウでも同様な傾向であった。これは接種時にはまだ根量が少なく、次第に根量が増したためと考えられる。これらの植物もWOms-3分離株の好適な宿主と考えられた。逆にアズキやビート、ダイコンでは接種6日後より14日後の方が遊走子の放出量は少なかった。この理由として、これらの植物では成体抵抗性がある、あるいは*O. brassicae*感染により抵抗性が誘導されたなどが考えられる。一方、アブラナ科植物とイネ科植物では感染量が比較的少なく、放出される遊走子量も少ない傾向が認められた。また、本分離株はタバコとキャベツからは全く遊走子の放出が観察されなかった。しかも、顕微鏡観察でこれらの植物の根には成熟した遊走子嚢や休眠胞子が全く観察されなかった。しかし、接種2日後と6日後の観察では遊走子とほぼ同じかやや大きい始原体 (primordium)と思われる粒子が数は少ないがこれらの植物の根に認められたことより、本分離株はこれらの植物の根に侵入できるが、生育することができず、タバコとキャベツは宿主とならないと考えられた。以上述べたように、*O. brassicae*が植物根内で増殖する場合でもその程度は様々であり、侵入感染の多少ばかりでなく、侵入後の遊走子嚢への分化や放出管の形成も増殖に関与していることが明らかになった。また、本研究では観察しなかったが、休眠胞子の形成割合や遊走子の運動性なども遊走子放出量や2次感染に影響することが考えられる。

*O. brassicae*は寄主範囲が広いことで知られている。例えばBarr(1980)は寄主植物として14

科50種を記載している。しかし、ほとんどの報告では単遊走子嚢分離株を用いておらず、寄生性の異なる系統の混合物の結果であることを否定できない。本研究で用いたWOms-3は単遊走子嚢分離株であり、試験した10科36種中タバコ、キャベツ、クロタラリアを除く植物で遊走子の放出が確認され、大変広い寄主範囲を持っていることが明らかとなった。一方では*O. brassicae*の各分離株の寄生範囲が異なっていることが報告されている (Garrett and Tomlinson, 1967; Temmink et al., 1970; Campbell and Sim, 1994; Nott et al., 2002)。例えば、Temminkら(1970)はレタスとトマトのからの分離株は寄生範囲が広く、クロガラシとエンバクからの分離株は寄主範囲が狭いとしている。しかし、これまで体系的な寄生性分化に関する報告はない。今後本報告で用いた方法を用いて*O. brassicae*の寄生性の分化を調べる必要があると考えられる。

WOms-3分離株の寄主範囲が広いが、今回実験に用いたレタスやタマネギでは品種間に遊走子放出量や感染量に顕著な差が認められた。レタスのバターヘッド型品種ウエアヘッドでは遊走子の放出は認められないかあるいは少なかった。Fry and Campbell (1966)もコス型レタスの品種では遊走子放出量は少なかったことを報告している。これらの品種はビッグベイン病に対して抵抗性といわれている。今後ビッグベイン病の抵抗性を検定する場合、*O. brassicae*に対する抵抗性を考慮する必要があると思われる。

*O. brassicae*に対する薬剤選抜あるいは感染阻害細菌の選抜には汚染土壌にレタスを植え、レタス根中の遊走子嚢や休眠胞子数を計測しているが (相野ら, 2002; 岩本ら, 2003; 神余ら, 2001)、放出される遊走子数を調べる方法はこれらの計測法より簡便でしかも時間がかからない。先に述べたように*O. brassicae*が感染後途中で生育を停止した場合には、根での増殖の指標である放出遊走子数と遊走子嚢や休眠胞子数に基づいた感染量は必ずしも一致していない。遊走子嚢や休眠胞子数を数えるよりも遊走子数を調べる方法の方がより正しく寄生性を評価できると考えられる。また、汚染土壌に植える場合は苗への*O. brassicae*の感染時期を特定することができないが、遊走子接種法では感染を同調させることができる。従って、

薬剤効果検定や *O. brassicae* により伝搬されるウイルス病の様々な研究の場面で本報告で用いた方法は有効であると考えられる。

## 摘 要

海砂で栽培した供試植物に *Olpidium brassicae* を接種し、一定期間後に放出される *O. brassicae* の遊走子数を計測することで、*O. brassicae* の寄生性を評価することができる。本法を用いてネギより単遊走子囊分離して得られた WOfms - 3 の寄主範囲を調べたところ、供試植物により放出される遊走子数は大きく異なるが、10科36種中10科33種の植物に寄生し遊走子を放出することが確認された。マクワウリ、キュウリ、ササゲ、ダイズ、オクラなどでは多量の遊走子が放出された。タバコ、キャベツとクロタラリアでは遊走子の放出は認められなかった。タバコとキャベツでは本分離株は根の細胞に侵入できるが全く増殖しなかった。

## 引 用 文 献

- 相野公孝・前川和正・岩本豊・神頭武嗣(2002) : *Olpidium brassicae* 感染阻害細菌の選抜とレタスビッグベイン病に対する発病抑制効果. 日植病報, 68 : 240.
- 相野公孝 (2002) : レタスビッグベイン病の発生と防除. 植物防疫, 56 : 509~511.
- Barr, D. J. S. (1980) : *Olpidium brassicae*. Fungi Canadenses, No. 176, National Mycological Herbarium, Ottawa.
- Campbell, R. N. (1985) : Longevity of *Olpidium brassicae* in air-dry soil and the persistence of the lettuce big-vein agent. Can. J. Bot., 63 : 2288~2289.
- Campbell, R. N. (1988) : Cultural characteristics and manipulative methods. in : Viruses with Fungal Vectors. (J. I. Cooper and M. J. C. Asher, eds.), The Association of Applied Biologists, Wellsbourne, UK : 153-165.
- Campbell, R. N. (1996) : Fungal transmission of plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol., 34 : 87~108.
- Campbell, R. N. and S. T. Sim (1994) : Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radiale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. Can. J. Bot., 72 : 1136~1143.
- Fry, P. R. and N. Campbell (1966) : Transmission of a tobacco necrosis virus by *Olpidium brassicae*. Virology, 30 : 517~527.
- Garrett, R. G. and J. A. Tomlinson (1967) : Isolate differences in *Olpidium brassicae*. Trans. Br. Mycol. Soc., 50 : 429~435.
- 日高 醇・多川 閃 (1976). タバコ矮化病の *Olpidium* による伝染. 植物防疫, 30 : 185~189.
- 岩木満朗・中野昭信・家村浩海・栃原比呂志 (1978) : わが国におけるレタスビッグベイン病の発生とその土壌伝染. 日植病報, 44 : 578~584.
- 岩本豊・相野公孝・神頭武嗣・前川和正 (2003) : レタスビッグベイン病に対する有効薬剤と処理条件. 日植病報, 69 : 366~372.
- 神余暢一・十河和博・森 充隆・鐘江保忠(2001) : レタスビッグベイン病に対する有効薬剤の検索. 四国植防, 36 : 75.
- 神余暢一・十河和博・森 充隆・鐘江保忠(2002) : レタスビッグベイン病の防除. 四国植防, 37 : 15~21.
- Kuwata, S., S. Kubo, S. Yamashita and Y. Doi (1983) : Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. Ann. Phytopath. Soc. Jpn., 49 : 246~251.
- Lot, H., R. N. Campbell, S. Souche, R. G. Milne and P. Roggero (2002) : Transmission by *Olpidium brassicae* of *Mirafiori lettuce virus* and *Lettuce big-vein virus*, and their roles in lettuce big-vein etiology. Phytopathology, 92 : 288~293.
- 守川俊幸・築尾嘉章・夏秋知英 (1997) : チューリップ微斑モザイク病 (新称) の媒介者. 日植病報, 63 : 504.
- 夏秋啓子・守川俊幸・夏秋知英・奥田誠一(2002) : わが国のビッグベイン症状を示すレタスから検出された *Mirafiori lettuce virus*. 日植病報, 68 : 309~312.
- Nott, L., J. Bambridge and J. A. Walsh.

- (2002) : Development of diagnostics for the detection and quantification of *Olpidium brassicae*. Proc. 5<sup>th</sup> Int. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, : 29~30.
- Roggero, P., M. Ciuffo, A. M. Vaira, G. P. Accotto, V. Masenga and R. G. Milne. (2000) : An *Ophiovirus* isolated from lettuce with big-vein symptoms. Arch. Virol., 145 : 2629~2642.
- Roggero, P., H. Lot, S. Souche, R. Lenzi and R. G. Milne (2003) : Occurrence of Mirafiori lettuce virus and Lettuce big-vein virus in relation to development of big-vein symptoms in lettuce crops. Eur. J. Plant Pathol., 109 : 261~267.
- Temmink, J. H. M., R. N. Campbell and P. R. Smith (1970) : Specificity and site of in vitro acquisition of tobacco necrosis virus by zoospores of *Olpidium brassicae*. J. Gen. Virol., 9 : 210~213.