

アルファルファのバーティシリウム萎ちょう病抵抗性の発現機作に関する一考察

誌名	北海道農業試験場研究報告 = Research bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station
ISSN	03675955
著者名	佐藤, 倫造
発行元	北海道農業試験場
巻/号	143号
巻号補足	
掲載ページ	p. 65-74
発行年月	1985年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



アルファルファのバーティシリウム萎ちょう病 抵抗性の発現機作に関する一考察

佐藤 倫造*

はじめに

Verticillium albo-atrum に起因するアルファルファのバーティシリウム萎ちょう病は、1918年スウェーデンで発見されたのが最初で、その後、北ヨーロッパ各地⁶⁾、ニュージーランド¹²⁾、カナダ¹⁾から発生が報告され、近年アメリカ⁵⁾でも発生が確認されている。我が国においては1980年に本道の江別市及び三笠市の草地で発生しているのがみつき、その後の調査で道央地域一帯及び道北地域にも発生していることがわかった。現在のところ発生草地が局限されているものの本道の気象条件や本菌の生態的な面から考えて今後ますます発生の拡大が予想される。本病に罹病したアルファルファは壊滅的な被害を受け、発病のみられた草地では次第に裸地化がすすみ、またその草地から病原菌を除去することは極めて困難で、翌年にはほとんど収量が期待できなくなる⁷⁾。このため他作物への転作や草地の更新を余儀なくされる農家が増加している。

本研究は抵抗性品種の利用による本病の被害回避の可否を検討するため、アルファルファ品種間の *V. albo-atrum* に対する抵抗性の差異を明らかにするとともに、アルファルファでの病原菌の動態を観察したものである。

本稿をまとめるにあたり、御校閲を頂いた草地開発第二部、川端習太郎部長に感謝申し上げる。また、研究に御協力いただいた牧草第1研究室、植田精一室長、我有満技官、病理昆虫部 三井康室長に厚くお礼申し上げます。牧草第3研究室 但見明俊室長、松本直幸技官には常に有益な助言を頂き、また現地試験では棚橋輝雄氏に御協力いただいた。記して

深謝する。

Ⅱ 試験材料及び方法

1. アルファルファ品種の抵抗性検定

17品種、4育成系統を供試した。このうち「Vertus」、*Maris Kabul*、「Sabilt」及び「Lutèce」の各品種はそれぞれスウェーデン、イギリス及びフランスでバーティシリウム萎ちょう病抵抗性品種として選抜育成されたものである。接種源の調製には麦粒培地(500ml コルベンに水に浸漬した小麦粒30gとグルコース1g 添加してオートクレーブ)に、アルファルファから分離した *V. albo-atrum* を移植し、22℃で3～4週間培養した。ポリエチレン製の育苗箱(45×35×10cm)に蒸気消毒(100℃ 1時間)した土壌12kgと接種源 300g を入れて混和し、同時にアルファルファを品種ごとに条播した。接種後は温室内(20～25℃)に保持し、約60日後に全株を抜きとり、次により罹病指数を算定した(第1表)。この場合、罹病指数1及び2を抵抗性、3、4、5を罹病性とみなし、各品種の抵抗性個体率を算定した。

第1表 *V. albo-atrum* 抵抗性検定のための調査基準⁵⁾

罹病指数	地 上 部	根部(道管褐変)
1	健 全	な し
2	1～2葉が黄化	軽 い
3	複葉が黄化	中程度
4	全身が黄化、萎ちょう	激しい褐変
5	枯 死	腐 敗

2. 圃場試験

江別市角山の発病草地内に試験区を設定した。試験区は1区1.5×4.2mの3反復。供試したアルファルファは10品種で、あらかじめ温室内ペーパーポットで生育させたものを本葉4～5枚時に各品種とも

昭和59年11月20日受理

*草地開発第二部牧草第3研究室

1区当たり36本を移植した。1982年6月に試験を開始し、83、84年の2年間、発病を調査した。

3. 罹病性、抵抗性品種における病原菌の動態観察

罹病性品種として「Thor」、抵抗性品種として「Vertus」を供試した。両品種とも栄養繁殖により個体を増殖し、そのうちの一部に *V. albo-atrum* 菌を接種してその反応を確かめてから用いた。

ジャガイモ煎汁寒天培地で7～14日間培養した菌そうから胞子を取り、3回水洗、 5×10^6 /mlの胞子濃度に調整した。「Thor」及び「Vertus」を鉢から掘り上げ、根部を中性洗剤液ですすいだのち水道水で水洗した。次いで胞子浮遊溶液に根を浸し、22℃、照明下に12時間おき、その後は蒸溜水に移した。試料の採取は接種後1、2、3、5、7、10日目に行い、走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。SEM用の試料は次のように作製した。根を約7～8mmの長さに切断し、蒸溜水で洗ってから1%グルタルアルデヒドで12時間固定、エタノール・シリーズで各15分間

脱水し、酢酸イソアミルに置換したのち臨界点乾燥(JCPD-3)、内部組織の観察用にはカミソリ刃で道管部を露出させAuを蒸着(JFC-1100)、走査型電子顕微鏡(JSM-T200)で観察した。

Ⅲ. 試験結果

1. 抵抗性検定

各品種について3～7回接種試験を行ったが、その都度、品種の反応は同じ傾向を示したので一括して第2表に、また一部の品種の罹病程度を第1図及び第2図に示した。

本病抵抗性品種として選抜育成された「Vertus」、「Maris Kabul」、「Lutèce」は、本試験においても発病指数により強度の抵抗性が示され、また品種内に含まれる抵抗性個体の割合も高かった。これに対し、「Saranac」、「Thor」、「Europe」、「Citation」、「Alfa」、「du Puits」、「キタワカバ」などの品種は罹病性で抵抗性個体率も低かった。育成系統の月系0301、0302、0303及び0304はいずれも罹病性であった。

第2表 *V. albo-atrum* に対するアルファルファ品種の反応

品種(系統)	個体数	発病指数		抵抗性個体率 %
		地上部	根(道管褐変)	
Maris Kabul	113	1.2	1.1	96.3
Vertus	114	1.2	1.3	96.3
Lutèce	131	1.3	1.4	86.8
Sabilt	78	1.5	1.8	89.0
Sitel	56	1.7	1.8	77.1
Phoenix	106	1.9	1.7	73.1
Everest	57	1.9	1.7	67.3
Citation	52	2.0	2.0	66.5
Kitawakaba	43	2.2	2.1	59.1
Gemini	73	2.3	2.1	50.1
Florida 77	60	2.3	2.1	52.1
Glacier	50	2.5	2.5	46.5
Saranac	61	2.7	2.4	40.3
Thor	122	2.7	2.3	44.7
Alfa	86	2.8	2.4	33.5
Europe	79	2.9	2.6	42.1
du Puits	96	3.0	2.3	35.5
月系 0301	65	2.0	2.0	70.2
月系 0302	50	2.2	1.9	56.7
月系 0303	61	2.5	1.9	43.7
月系 0304	55	1.8	1.9	61.4

第3表 圃場におけるアルファルファ品種の発病

品 種	1983			1984		
	調査株数	発病株数	発病株率	調査株数	発病株数	発病株率
			%			%
Vertus	107	3	2.8	62	2	3.2
Maris Kabul	103	3	2.9	53	2	3.8
Sabilt	108	7	6.5	29	2	6.9
Lutèce	101	8	7.9	23	0	0.0
Phoenix	107	13	12.1	58	9	15.5
Sitel	108	15	13.9	57	11	19.3
Everest	99	9	9.1	79	18	22.8
Gemini	107	22	20.6	51	7	13.7
Europe	108	26	24.1	74	12	16.2
Thor	108	12	11.1	86	19	22.1

2. 圃場試験

2年間に行った発病調査の結果を第3表に示した。「Vertus」及び「Maris Kabul」の発病率は2年間を通じて低く、「Thor」,「Europe」などの品種は高かった。これは抵抗性検定における抵抗性個体率と一致する結果であった。一方、抵抗性検定で強と判定された「Sabilt」及び「Lutèce」は発病率がやや高かった。なお1984年における調査株数の減少は冬期間の客土作業により試験区の一部が調査不能となったためである。

3. 抵抗性、罹病性品種における病原菌の動態

孢子浮遊液中に根を浸し、所定時間後に採取した試料を SEM で観察した。その結果を第3及び4図に示した。24～48時間目では罹病性品種「Thor」及び抵抗性品種「Vertus」の根表面における孢子の動態にはほとんど差異がなかった。すなわち両品種上の孢子は24時間以内に発芽を開始し、発芽管は太く短く（図3-1及び3）、分岐しているのもみられた。また菌糸の先端を表皮の細胞縫合部に挿入（図3-2及び4）しているのがみられた。72～96時間目の観察では、両品種の根表面には発芽した孢子の数がふえ、菌糸の伸長も盛んで、表皮の細胞縫合部に侵入しているのもみられたが、品種による動態のちがいはみられなかった。内部組織を観察した結果、両品種の道管内には菌糸の存在は認められないが、96時間目の「Thor」の道管内にくもの巣状の粘質物が形成されていた（図4-1）。120～240時間目の内部観察では、「Thor」の道管内に1～2本の菌糸の迷走（図4-2）がみられた。膜孔を通して道管内

に入った菌糸はやや太く、また分岐していた。分岐した菌糸の先端は組織にしっかりと付着しているようにみうけられた。ときどき粗面を呈する菌糸もみられ、これらから Cooper ら³⁾がいう outgrowth とみられるものが発生し、その一端は道管壁に接続していた（図4-4）。菌糸がみられない道管の一部にはくもの巣状の粘質物が形成されており、ガム状物質によって閉塞している道管もみられた（図4-3）。抵抗性品種「Vertus」の道管内にはこのような菌糸及びその他の異状は認められなかった。

IV 論 議

道内のアルファルファ草地ではパーティシリウム萎ちょう病による汚染が着実に増加しており、草地衰退の一原因になっていることは明かである。未発病地へのまん延を防止するとともに汚染草地での対策が必要である。牧草の病害防除にあたっては、長い期間かかって抵抗性品種の育成が最良の方策であろう。ヨーロッパ諸国では早くから本病に対する抵抗性品種が育成、栽培されており、現在ではほとんど発病がみられなくなったといわれている。北海道に栽培適性をもち、なおかつパーティシリウム萎ちょう病に抵抗性のあるアルファルファ品種の育成が強く望まれる。

ここに述べた *V. albo-atrum* の接種方法は抵抗性検定に用いるのに適当である。この方法によると現在北海道で栽培が奨められている「Thor」,「Saranac」,「Europe」,「Citation」などのアルファルファ品種は極めて罹病性¹⁾であることがわかった。こ

れに対しヨーロッパで育成された抵抗性品種の「Vertus」(スウェーデン)、「Maris Kabul」,「Sabilt」(イギリス)、「Lutèce」(フランス)などの品種は接種試験の結果ばかりでなく、本病が激発している土壌に植えた場合でも強度の抵抗性を示した。これら品種の北海道における栽培適性並びに収量性などについては「Lutèce」を除いては十分なデータはないが、圃場試験で観察したかぎり不適合とは考えられず、本病にひどく汚染された草地へ導入することで被害を回避し、草地を維持できるものと考ええる。抵抗性品種は無病徴のまま保菌しているので伝染源になりうる¹⁰⁾とする報告もあるが、本試験ではその確証が得られず、むしろ菌量の低下が顕著であった(未発表)。

ヨーロッパでは北緯46°までの重要病害⁶⁾といわれているように本病は冷涼を好適条件とし、温度が病原菌の活性や病原性に影響を及ぼす⁹⁾。このため、接種試験では温度条件に注意する必要がある。例えば20～25℃で保持した場合、罹病性品種では10日目ごろから病徴が現れるが、30℃以上の時間が多くなるにつれて病徴発現がおくれ、さらに抵抗性、罹病性の差が不明りようになる。

抵抗性の異なるアルファルファ品種上での病原菌胞子の動態を比較観察したところ、発芽、伸長、寄主体への侵入などいわゆる初期段階の様相は両品種とも同じであったが、接種96時間以降の道管内では品種間に差異がみられた。すなわち、抵抗性品種「Vertus」では全く異状が認められなかったが、罹病性品種「Thor」では道管内に菌糸が迷走したりガム状物質による道管閉塞⁹⁾もみられた。別の試験で、アルファルファの茎の切枝を孢子浮遊液に浸漬し、孢子が直接道管内に入ったとき、抵抗性品種の道管内でも正常な発芽、伸長を観察しており(未発表)、また両品種の茎葉磨砕汁液を用いた孢子発芽の比較でもほとんど差がなかった(未発表)。これらのことから「Vertus」及び「Thor」における反応のちがいは、病原菌が表皮細胞を貫穿したのち道管にいたる組織でおこっていると考えられる。GARBER⁴⁾は *V. albo-atrum* に対し抵抗性の異なるワタの2品種で菌の侵入過程を比較し、その結果、菌糸が道管に到達するまでの様相は同様であったが、道管内の菌糸量や新たに道管内で形成される孢子量は罹病性品種で多いことを認めている。ハッカの抵抗性品種の茎内では病原菌の増殖が抑えられ²⁾、またトマトの萎ちょう

病で、抵抗性品種の道管内に入った病原菌胞子(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)は4日目に崩壊¹³⁾したことをみている。

接種240時間までの道管内を観察したかぎり、菌糸量は道管当たり1～3本存在するだけで、これが直接地上部の黄化、萎ちょうの主因であるとは考えにくい。むしろ菌糸の存在しない道管内でみられるくもの巣状の粘質物あるいはガム状物質の生成による道管閉塞の結果であろう。

V. 摘 要

アルファルファのパーティシリウム萎ちょう病(*Verticillium albo-atrum* REINKE et BERTHOLD)に対する抵抗性検定法を確立した。人工汚染土壌(蒸気殺菌土12kg:麦粒培地で培養した接種源300g)にアルファルファを播種し、20～25℃で2ヵ月間保持した結果、品種間に反応の差が明りように現れた。すなわち、「Thor」、「Saranac」、「Europe」、「Citation」など北海道で栽培が奨められている品種及び供試した4育成系統はすべて罹病性であり、「Vertus」、「Maris Kabul」、「Sabilt」及び「Lutèce」は抵抗性であった。地上部の発病指数は根の道管褐変指数と一致した。また圃場試験におけるアルファルファ品種の反応は接種試験の結果とほぼ一致した。罹病性品種(「Thor」)及び抵抗性品種(「Vertus」)の栄養系に病原菌胞子を接種し、その動態を走査型電子顕微鏡により比較観察した。その結果、根面における胞子の行動は72時間までは両品種の間に差異がなく、発芽した胞子は24時間以内に表皮の細胞縫合部から侵入を開始した。しかしながら接種120時間以降の内部組織では明らかに差がみられた。すなわち「Vertus」の道管内には異状が認められなかったのに対し、「Thor」においては膜孔を通して道管に侵入した菌糸がやや太さを増し、分岐し、ときには粗面を呈する菌糸が迷走した。また、くもの巣状の粘質物やガム状物質が道管内に形成され、これら物質による道管閉塞が地上部の黄化・萎ちょうの主な原因と考えられた。

引用文献

1. AUBÉ, C. and SACKSTON, W. E. (1964): Verticillium wilt of forage legumes in Canada. *Can. J. Plant Sci.*, **44**, 427-432.
2. BRANDT, W. H., LACY, M. L. and HONER, C. E. (1984):

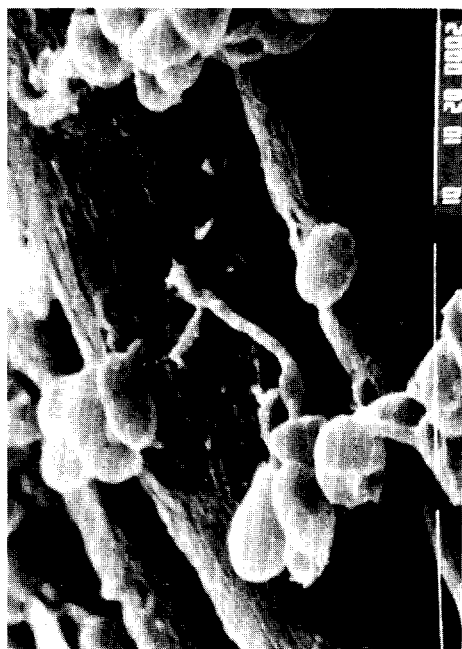
- Distribution of *Verticillium* in stems of resistant and susceptible species of mint. *Phytopathology*, **74**, 587-591.
3. COOPER, R. M. and WOOD, R. K. M. (1974): Scanning electron microscopy of *Verticillium albo-atrum* in xylem vessels of tomato plants. *Physiological Plant Pathology*, **4**, 443-446.
 4. GARBER, R. H. and HOUSTON, B. R. (1966): Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in the cotton plant. *Phytopathology*, **56**, 1121-1126.
 5. GRAHAM, J. H., PEADEN, R. N. and EVANS, D. W. (1977): *Verticillium* wilt of alfalfa found in the United States. *Plant Dis. Repr.*, **61**, 337-340.
 6. HEALE, J. B., ISAAC, I. and MILTON, J. M. (1979): The administrative control of *Verticillium* wilt of lucerne. In 'EBBELS, D. L. and KING, J. E. (Ed.) Plant Health, Blackwell Scient. Pub., pp. 71-78.
 7. ISAAC, I. (1957): Wilt of lucerne caused by species of *Verticillium*. *Ann. Appl. Biol.*, **45**, 550-558.
 8. 北沢健治, 佐藤倫造 (1981): *Verticillium albo-atrum* REINKE and BERTHOLD によるアルファルファのバーティシリウム萎ちょう病 (新称). 日植病報, **47**, 272-274.
 9. PANTON, C. A. (1964): A review of some aspects of the wilt pathogen *Verticillium albo-atrum* RKE. et BERTH. *Acta Agriculturae Scandinavica*, **14**, 97-112.
 10. PENNYPACKER, B. W., LEATH, K. T. and HILL, R. R., Jr. (1984): Resistant alfalfa plants as symptomless carrier of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*, **74**, 855.
 11. 佐藤倫造 (1982): *Verticillium albo-atrum* に対するアルファルファ品種の反応. 日植病報, **48**, 127.
 12. SMITH, H. C. (1965): The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *New Zealand J. Agric. Res.*, **8**, 450-478.
 13. STRONBERG, E. L. and CORDEN, M. E. (1980): Scanning electron microscopy of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in xylem vessels of resistant and susceptible tomato plants. *Can. J. Bot.*, **58**, 2360-2366.



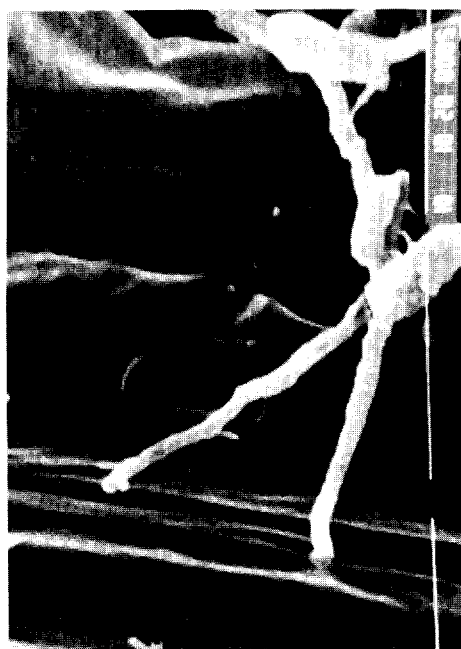
第1図 *V. albo-atrum* の接種による
アルファルファ品種の反応



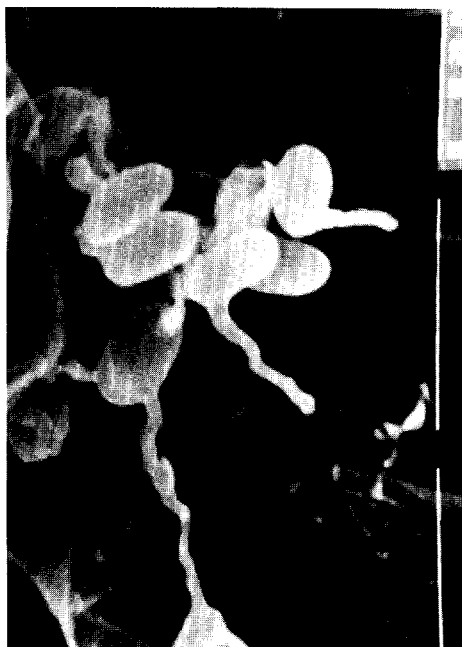
第2図 *V. albo-atrum* の接種による
アルファルファ品種の反応



1. 根表面の胞子発芽 (Thor, 24 h)



2. 表皮細胞の縫合部から侵入 (Thor, 48 h)

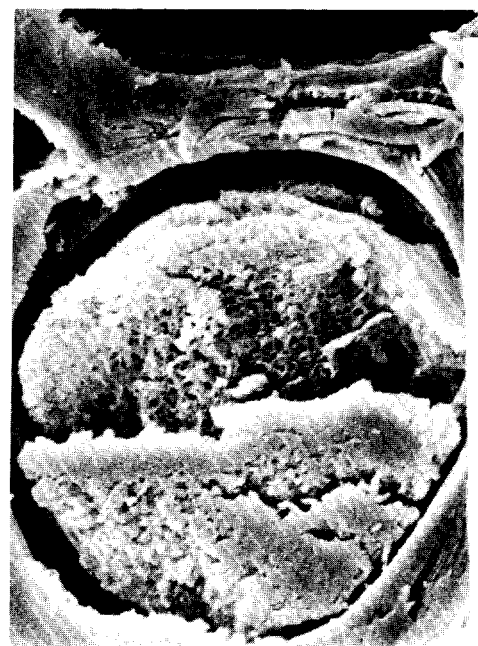


3. 根表面の胞子発芽 (Vertus, 24 h)



4. 表皮細胞の縫合部から侵入 (Vertus, 48 h)

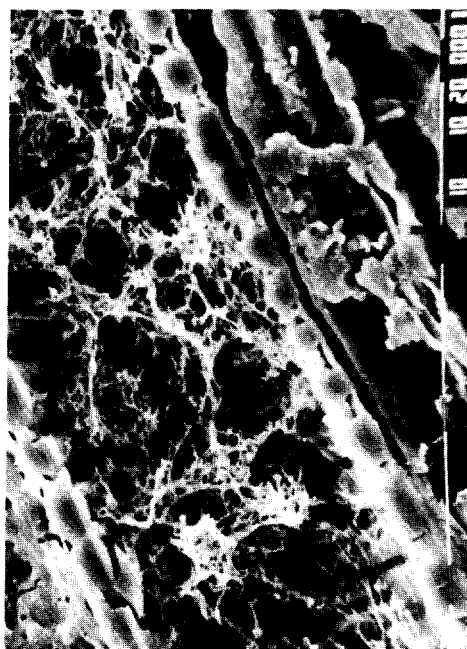
第3図 SEMによる病原菌の動態観察



3. ガム状物質で閉塞した道管 (240 h)



4. 粗面を呈した菌糸 (Thor, 120 h)



1. 道管内で見られるくもの巣状粘質物 (Thor, 96 h)



2. 道管内を迷走する菌糸 (Thor, 120 h)

第4図 SEMによる病原菌の動態観察

The Resistance Mechanism of Alfalfa Cultivars to Verticillium Wilt

Rinzo SATO*

Summary

An inoculation method for estimating the level of resistance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars to Verticillium wilt (*V. albo-atrum* REINKE et BERTHOLD) was devised and applied to a varietal assessment. Differences in resistance level was evident two months (at 20°-25°C) after seeding in infested soil (steam-sterilized soil 12kg + grain inoculum 300g); recommended cultivars for Hokkaido such as Thor, Saranac, Europe, and Citation and four synthetic lines all remained susceptible, and Vertus, Maris Kabul, Sabilt, and Lutèce were resistant. A disease rating of the tops coincided with the degree of browning of vessels. The disease rating of cultivars grown in a naturally infested field agreed with those of inoculated plants.

Pathogen behavior was observed with ramets of resistant (Vertus) and susceptible (Thor) cultivars under scanning electron microscope. Spores on the root surface germinated, and germings penetrated the intercellular epidermis within 24 hrs. There was no difference in the behavior of hyphae on the surface of both ramets till 72 hrs. At 120 hrs, hyphae penetrated the vessels of susceptible ramets through the pits, ramified swelled some what, and their surface often became rough. There were arachnoid or gum-like structures plugging the vessels. Vessels of resistant ramets, however, remained unchanged with no hyphae inside.

*Laboratory of Diseases and Insects,
Department of Forage Crop Breeding.