

メロンがんしゅ病菌の分離および接種法の検討

上運天 博・森 宣雄 (宮崎大学農学部)

Studies on the isolation and inoculation of *Actinomycetales* causing root tumor of melon. Hiroshi KAMIUNTEN and Nobuo MORI (Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki 889-21)

メロンがんしゅ病は1987年、小林ら^{3,4)}によって病原体が放線菌の一種であることが明らかにされている。しかし、本菌は分離が極めて困難で、現在までに僅か2~3菌株しか報告されていない。病原菌の諸性質を比較検討するためには多数の菌株が必要であり、より多くの菌株を得る目的で、2~3の分離法について検討した。また、分離菌の病原性をできるだけ早く、且つ、確実に判定するために接種法についても若干の検討を行ったので、その概要を報告する。

本実験を行うにあたり、罹病メロンおよび汚染土壌を分譲していただいた宮崎県総農試三浦猛夫氏ならびに、いろいろと御援助をいただいた宮崎大学河野明綱教授に対し感謝の意を表する。

材料および方法

1) 供試植物

メロンがんしゅ病に対し感受性の高いコサックメロンを用いた。なお、メロンの栽培に用いた鉢および土壌はすべてオートクレーブで120℃、15分間消毒した。

2) 培地

菌の分離にはGAA培地²⁾ (L-アスパラギン0.5g, K₂HPO₄0.5g, ブドウ糖10g, 寒天15g, 蒸留水1ℓ, pH7.0) を用い、分離菌の継代、保存にはYPA培地 (酵母エキス5g, ペプトン10g, 塩化ナトリウム5g, 寒天15g, 蒸留水1ℓ, pH7.0) を用いた。また、接種源にはYEME培地¹⁾ (酵母エキス3g, ペプトン5g, 麦芽エキス3g, ブドウ糖10g, ショ糖340g, MgCl₂·7H₂O1.15g, 蒸留水1ℓ, pH6.8) で振盪培養した菌を供試した。

3) 菌の分離

3種類の分離法による菌の分離を試みた。なお、菌の分離は汚染病土を混ぜて栽培した罹病メロンの根の比較的新しい瘤より行った。

I) 70%アルコール、2%次亜塩素酸ナトリウム液で表面殺菌した瘤に少量の滅菌蒸留水を加え、磨碎した後

GAA培地上に画線した。生じたコロニーについて、2~3回の単コロニー分離を行った。

II) 表面殺菌した瘤をメスで2分割し、切断面が下になるようにGAA培地上に静置した。数日後、組織片の周りに発育したコロニーから釣菌し、2~3回の単コロニー分離を行った。

III) 水洗しただけの瘤を用いて、II) と同様に分離を行った。ただし、糸状菌の生育を抑えるために培地に0.02%のシクロヘキシドを加えた。

3種の方法で分離した菌株はYEME培地で培養し、菌数が約10⁸~10⁹cells/mlに達した時、メロンの株元に灌注し、約1カ月間ガラス室で生育させた後、瘤形成の有無を調べた。

4) 菌の接種

分離菌株の中で瘤形成が最も顕著であったM2080株を供試し、4種類の接種法について検討した。

I) 土壤灌注接種: YEME培養菌液(約10⁸~10⁹cells/ml)を株元に灌注した。

II) 浸漬接種: YEME培養菌液を遠心し、集菌した後、約10⁸~10⁹cells/mlになるように、滅菌水を加えて懸濁し、接種源とした。バーミキュライトで生育させた発芽5日目のメロンの根を水洗し、上記菌液に30分間浸漬した後、土に移植した。

III) 断根浸漬接種: メロンの根を茎基部から約5cm下の所で切断する以外はII) と同様な方法で行った。

IV) 針接種: YEME培養菌液を白金耳で1滴取り、発芽5日目のメロンの茎および茎基部に置き、針で数回刺して接種した。

接種した植物はすべて、昼25℃、夜20℃のファイトトロン室に置き、接種後7日毎に根を掘り取り、瘤形成の有無を調べた。

結果

1) 分離菌の病原性

各分離法で分離した菌株の病原性を調べた結果、表面殺菌した瘤組織から直接分離したⅡ)の方法が最も分離頻度が高く、184分離菌株中、28菌株に病原性が認められた(第1表)。それらの中には、比較的大きな瘤を形成するもの、また逆に極めて小さな瘤しか形成しない場合もあり、菌株により病原力に差があるようであった。病原性を有していた計29菌株はGAA培地上で白色のコロニーを形成し、顕微鏡観察の結果、すべてに菌糸が認められた。

2) 接種法の検討

各接種法による発病結果を第2表に示した。いずれの接種法を用いても接種7日後には瘤の形成は認められなかった。浸漬接種では14日後に3株中2株に比較的大きな瘤が認められた(第1図)。なお、21日以降はすべての接種植物に多数の瘤が形成された。断根浸漬接種では14日後に3株中3株のメロンに発病した。発病の程度は浸漬接種と同程度であったが、断根部および、それより上部に瘤が形成されるのが特徴的であった。針接種でも14日後には茎基部に比較的大きな瘤が形成されたが、その上部の接種部位には瘤は形成されなかった(第2図)。

考 察

メロンがんしゅ病罹病根の磨碎液を健全なメロン幼苗に土壤灌注接種すると容易に発病し、瘤を形成する。しかし、形成された瘤の磨碎液からの病原菌の分離頻度は極めて低くかった。表面殺菌していない瘤磨碎液からの分

離も試みたが雑菌の生育が激しく、病原菌の分離は困難であった。そこで、瘤組織から直接、菌の分離を試みた所、28菌株の病原菌を分離することができた。しかし、分離頻度はまだ低く、更に高率に病原菌を分離する目的で表面殺菌していない瘤組織からの分離を試みた。何故なら、小林ら^{3,4)}は被害根を表面殺菌した後、殺菌土壌に加えてメロンを栽培したところ、無殺菌区に比べて瘤の



第1図 浸漬接種により形成された瘤



第2図 針接種により形成された瘤
T : 分離株 (M2080)
C : 対照 (滅菌蒸留水)
△ : 接種部位

第1表 各分離法により分離した菌株の病原性

分離法 ^{a)}	分離菌株数	発病菌株数	発病率(%)
I ^{b)}	26	1	3.8
II ^{c)}	184	28	15.2
III ^{d)}	27	0	0

a) 本文“材料および方法”参照

b) 瘤磨碎液から分離

c) 表面殺菌した瘤組織から直接分離

d) 表面殺菌していない瘤組織から直接分離

第2表 各接種法によるメロンがんしゅ病の発病

接種法	接種植物株数	発病株数 / 調査株数		
		接種後7日	14日	21日
土壤灌注接種	4	0/1	0/1	0/1
浸漬接種	12	0/3	2/3	3/3
断根浸漬接種	12	0/3	3/3	3/3
針接種	8	0/2	2/2	2/2

形成が極めて少なくなったことから病原菌が被害組織の表面に多く存在している可能性を示唆しているからである。しかし、病原性を有する菌株は分離できなかった。

20℃～30℃のガラス室で分離菌株を土壤灌注接種すると、約2週間で小さな瘤の形成が認められる場合もあったが、病原性の有無を確定するためには約30日を要した。そこで、より短期間に確実な病原性の判定が可能か否かを調べる目的で、他の接種法について検討を行った。何れの接種法でも7日後に病原性の有無の判定を行うことは困難であった。しかし、浸漬接種、断根浸漬接種、針接種では14日で判定可能であった。これら3種の接種法では明らかに瘤を形成したM2080株は同時に行った土壤灌注接種では28日後でも瘤の形成は認められなかった。根を抜き取って調査したため、28日以降の発病については検討できなかったが、その後の発病の可能性は十分考

えられる。しかし、供試植物が少なかったことを考慮に入れても、土壤灌注接種法が最も良い接種法とは言えないようである。今回検討した中では針接種法が簡単で確実な病原性の判定法であった。従って、病原性がなかったと思われる分離菌株についても針接種による再検討が必要と思われる。

引　用　文　献

- 1) HUNTER, I. (1985). DNA cloning II (D. M. Glover ed.) IRL press, Oxford. pp. 19 - 44.
- 2) 木村貞夫(1984). 新版土壤病害の手引(新版土壤病害の手引編集委員会編). 日本植物防疫協会, 東京. pp71 - 74. 3) 小林研三, 吉田政博, 中山武則, 古賀成司(1987). (講要). 日植病報53: 87 - 88.
- 4) 小林研三, 吉田政博, 中山武則, 古賀成司(1987). 日植病報53: 562 - 565.

(1988年5月7日 受領)