

## 論文の内容の要旨

論文題目 硝酸塩利用能欠損変異菌株を用いた  
フザリウム病の発生生態の解明に関する研究

氏 名 竹 原 利 明

フザリウム病の発生生態を解明するためには、特定の病原性フザリウム菌を他の分化型・レースや非病原性フザリウム菌と区別して追跡する必要があるが、従来のフザリウム菌選択分離培地ではこれらの識別は困難であった。本研究では、各種 *Fusarium oxysporum* から塩素酸塩に耐性の硝酸塩利用能欠損変異株 (*nit* 変異株) を作出し、これをマーカー菌として自然土壌に投入し、塩素酸塩耐性をマーカーとして選択培地で分離することによって、特定のフザリウム菌の動態を簡易かつ確実に追跡する手法を確立した。さらに、本手法により、トマト萎凋病 (*F. o. f. sp. lycopersici*) およびハウレンソウ萎凋病 (*F. o. f. sp. spinaciae*) の発生生態を明らかにした。本研究の概要は以下の通りである。

### I. *nit* 変異菌株を用いたフザリウム菌の動態解析法の開発

#### 1. *nit* 変異株の作出

塩素酸カリウムを含む培地を用いて、10 分化型の日本産病原性 *F. oxysporum*、および非病原性の *F. oxysporum* から、塩素酸塩耐性を有する *nit* 変異株を作出した。得られた *nit* 変異株は、硝酸塩とその他 4 種類の窒素源利用能により、亜硝酸塩・

ヒポキサンチン・アンモニウム塩・尿酸のいずれをも窒素源として利用できる *nit1*, 亜硝酸塩を利用できない *nit3*, ヒポキサンチンを利用できない *NitM* の 3 つの表現型に分類された。*nit* 変異株の出現頻度や各表現型の出現比率は、菌株により異なった。

## 2. 選択分離培地による *nit* 変異株および野生株の分離

*nit* 変異株の選択分離培地を用い、*nit* 変異株を土壌中や罹病植物体から選択的に分離する手法を検討した。塩素酸カリウムを含む選択分離培地 (MMCPA 培地) 上では、フザリウム菌の野生株はほとんど生育せず、胞子 (bud cell) 懸濁液、汚染土壌および罹病植物体から *nit* 変異株が選択的に分離された。窒素源として硝酸塩のみを含む分離培地 (MMPA 培地) 上では、*nit* 変異株はごく小さなあるいは薄いコロニーを作るため、野生株との識別が可能であった。MMCPA 培地と MMPA 培地を併用して、マーカー菌とした *nit* 変異株と自然に存在する野生株を別々に分離することにより、特定の *F. oxysporum* の動態を解析することが可能となった。MMCPA 培地と MMPA 培地では、目的とするフザリウム菌の土壌中菌密度が低い場合には、他の糸状菌の生育に阻まれて正確な定量は困難であったが、両培地のショ糖をガラクトース (30g/l) に置換し、硝酸ミコナゾール 50mg/l, ホウ酸 0.5g/l, クロラムフェニコール 0.25g/l を添加することにより、フザリウム菌以外の糸状菌の生育を抑制して選択性を高めることができた。こうして得られた *nit* 変異株用の CGMBP 培地と野生株用の GMBP 培地を用いることにより、*F. oxysporum* の野生株を含む畑土壌中に  $10^2 \sim 10^3$  CFU/g 乾土の *nit* 変異株を混入した場合にも、希釈平板法により *nit* 変異株と野生株とを別々に定量することが可能となった。

## 3. *nit* 変異株と野生株の諸性質の比較および *nit* 変異株の安定性

*nit* 変異株をフザリウム菌の生態的研究に用いるためには、*nit* 変異株が野生株と同等の性質をもち、さらに、マーカーとした *nit* 形質が安定している必要がある。そこで、ダイコン萎黄病菌 (*F. o. f. sp. raphani*), ホウレンソウ萎凋病菌, および非病原性 *F. oxysporum* を用い、*nit* 変異株と元の野生株とについて、固体培地上の生育、液体培地中および滅菌土壌中の増殖、病原性などの諸性質を比較した。また、保存中および土壌中や植物体中での *nit* 形質の変化を調査した。ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天 (PSA) 培地上における生育は、供試した変異株計 22 菌株の多くは野生株と同様であったが、明らかに生育の遅いホウレンソウ萎凋病菌変異株が 2 菌株見出された。PS 液体培地および滅菌土壌中の増殖は *nit* 変異株と野生株で差が認められなかった。ベノミルに感受性のダイコン萎黄病菌から作出した変異株 24 菌株はいずれもベノミル感受性であった。病原性については、供試した 43 の変異株のうち、ホウレンソウ萎凋病菌の 2 変異株は明らかに弱かったが、多くは野生株とほぼ同等

であった。*F. oxysporum* の 10 分化型から作出した *nit* 変異株計 195 菌株を PSA 斜面培地で室温で約 3 年間継代培養により保存した結果、多くの菌株はもとの表現型を保持していたが、21 菌株 (10.8%) では硝酸塩利用能の回復が見られた。ポット内の育苗培土に接種したダイコン萎黄病菌の変異株を、約 3 年 4 カ月後に再分離して表現型を接種前と比較した結果、表現型の変化は認められず、また、土壌中の生存菌密度も野生株とほぼ同等であった。*nit* 変異株を接種した罹病植物体から再分離した場合にも、表現型の変化は見られなかった。分化型の異なる 9 菌株の菌糸和合性を最少培地上での *nit* 変異株の対峙培養により調べた結果、全て互いに異なる菌糸和合性群 (Vegetative Compatibility Group, VCG) に属することが示された。また、ハウレンソウ萎凋病菌と圃場から分離された非病原性 *F. oxysporum* との間でも菌糸和合性は認められなかった。したがって、追跡に用いる *nit* 変異株が土壌中で既存の *F. oxysporum* と菌糸融合を起こして標識を失ったり、標識が転移したりする可能性は低いと考えられた。

以上のように、*nit* 変異株の中には病原性の弱くなったものや形質の不安定なものが存在するが、多くの *nit* 変異株は野生株と同様の性質を有し、長期間安定であるため、追跡用マーカー菌として利用できると考えられた。

## II. *nit* 変異菌株を用いたフザリウム病の発生生態の解明

### 1. トマト萎凋病の発生生態の解明

トマト萎凋病菌レース 2 の種子伝染過程を、本菌の野生株および *nit* 変異株を用いて調査した。本菌を果実に接種して作成した保菌種子を播種したところ、播種 200 日後までに高率に発病した。保菌種子を播種して 81 日後には、主根や側根から病原菌が分離され、また、病原菌は第 1 花房の小果柄まで移行していたが、果実には到達していなかった。播種 113 日後以降に収穫した果実で、果実内の褐変した主維管束から病原菌が分離されたが、収穫直後の果実の種子からは病原菌は検出されなかった。しかし、収穫後に後熟腐敗処理を行なった果実では、果肉が菌で充満しているものが認められ、このような果実中の種子は、高率に病原菌を保菌していた。発病株から得られた保菌種子を播種すると、発芽した苗は高率に発病した。保菌種子をエタノールで表面殺菌すると保菌率は顕著に低下し、播種しても発病は起こらなかった。*nit* 変異株保菌種子を播種して 161 日後の発病株の周辺土壌から、約  $10^4$  CFU/g 乾土の *nit* 変異株が検出された。以上により、トマト萎凋病菌レース 2 が茎の維管束から小果柄を経由して果実内の主維管束に侵入し、果実内で増殖することによって種子伝染が起こることが明らかになった。また、汚染種子から発芽した植

物体により、周辺土壌も汚染されることがわかった。これら試験において *nit* 変異株は野生株とほぼ同様の種子汚染過程を示し、また、選択分離培地により確実に追跡ができたことから、*nit* 変異株は種子伝染過程における病原菌の追跡にも利用できると考えられた。

## 2. ホウレンソウ萎凋病の発生生態の解明

ホウレンソウ萎凋病菌の *nit* 変異株をオートクレーブ、熱水あるいはクロルピクリンで消毒した土壌へ接種した場合、病原菌は無処理畑土壌中よりも速く増殖し、ホウレンソウの発病も病原菌密度の増加に伴って増加した。すなわち、消毒土壌における病原菌の再汚染の危険性が示された。*Penicillium* 菌や非病原性フザリウム菌を病原菌よりも先に高密度で土壌に接種すると、病原菌の増殖と発病が一定期間抑制された。非病原性フザリウム菌の効果は、病原菌との密度差が大きいほど顕著であった。非病原性フザリウム菌による本病の生物的防除の試験において、CGMBP 培地と GMBP 培地を併用することは、病原性および非病原性フザリウム菌の動態解析に極めて有用であった。

ホウレンソウ萎凋病菌の *nit* 変異株を用いて、圃場での同菌の密度推移を調査した。パイプハウス内の土壌に本菌を接種して作成した汚染圃場で、クロルピクリン消毒または熱水消毒を行ない、次作以降、作付前にキチン類縁物質含有資材または微生物含有資材を土壌混和した。熱水消毒をした区では処理後第 6 作まで全般に発病が少なく、病原菌密度も著しく低かった。また、熱水消毒後のキチン類縁物質含有資材施用区では病原菌密度の復活が抑制される傾向が見られた。熱水消毒をしなかった区では、発病抑制効果はクロルピクリン処理区が最も高く、次いでキチン類縁物質含有資材処理区、微生物資材処理区の順であった。キチン類縁物質含有資材の連用により、病原菌密度が無処理区の 1/10 程度まで減少した。以上のように、*nit* 変異株を圃場に接種した場合、1 年以上にわたり菌密度の推移を調査することが可能であり、その菌密度と発病程度に相関が見られた。

以上を要するに、本研究は各種 *F. oxysporum* の硝酸塩利用能欠損変異株 (*nit* 変異株) を作出し、変異株の硝酸塩利用能以外の性質が野生株とほぼ等しいことを明らかにし、*nit* 変異株の選択培地を用いて特定のフザリウム菌の動態を解明する手法を確立した後、この手法を用いてトマト萎凋病およびホウレンソウ萎凋病の発生生態を解明したものである。