

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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*) およびホウレンソウ萎凋病 (*F. o. f. sp. spinaciae*) の発生生態を明らかにした。

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

塩素酸カリウムを含む培地を用いて、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。次いで、*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、孢子 (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) 上でも野生株との識別が可能であった。さらに、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。続いて、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や保存中および土壌中や植物体中での形質の変化を調査した。その結果、ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天 (PSA) 培地上における生育、PS 液体培地および滅菌土壌中の増殖、病原性については供試した変異株の多くが野生株と同様であった。また、室温で約 3 年間継代培養により保存した場合や、罹病植物体から再分離した場合でも、多くの菌株がもとの表現型を保持していた。さらに、*nit* 変異株が土壌中で既存の *F. oxysporum* と菌糸融合を起こす可能性も低いことが示された。

II. *nit* 変異菌株を用いたフザリウム病の発生生態の解明

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。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經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。次に、ハ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ところ、病原菌は無処理畑土壌中よりも速く増殖し、ハウレンソウの発病も病原菌密度の増加に伴って増加することが示された。一方、*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。このように、*nit* 変異株を圃場に接種した場合、長期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ハウレンソウ萎凋病の発生生態を解明したものである。

本研究で得られた成果は学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。