

## 学位論文題名

## 紫紋羽病菌の諸性質と分類に関する研究

## 学位論文内容の要旨

紫紋羽病菌 (*Helicobasidium mompa* Tanaka) は、アスパラガス、リンゴ等多数の作物を侵す土壌伝染性病原菌として知られている。しかし、本病原菌は生育が遅く、取扱いが難しいため、種の諸性質等不明な点が多い。また、欧米で報告されている類似菌 *Helicobasidium purpureum* (TUL.) PAT. との異同についても決定的な判断は下されていない。

本論文は、この紫紋羽病菌および *H. purpureum* について諸性質を調べるとともに、両種の異同について検討することを目的とし、紫紋羽病菌および *H. purpureum* の形態・生理・生態的諸性質、菌糸融合、両種の化学分類学的研究を行なった。

本菌の54菌株は、菌叢の形態より3つのグループに分けられた。すなわち、グループ1：菌叢が密で堅く、生育が遅く、濃い褐色に色づき、培地にも色素を強く産生する菌株、グループ2：菌叢が粗であり、生育が速く、培地を着色しない菌株、グループ3：菌叢が密で、生育が速く、褐色に色づく菌株である。グループ1に属する菌株は12菌株、2に属するもの24菌株、3に属するもの18菌株であった。グループ1と3に属するものは菌糸由来の菌株であり、グループ2に属する菌株は担子孢子由来のものが多かった。分生胞子を形成する1菌株は、これらグループとは異なり、菌叢が密で、生育が速く、菌叢が桃色に着色し、培地を褐色に着色した。

紫紋羽病菌の1菌株はPDA上で "*Tuberculina*" 型の分生子柄上に、球形または卵形で大きき5.5 ~10.9×4.1 ~8.2 $\mu$ mの分生胞子を形成した。生育適温は、紫紋羽病菌は23℃~27℃であり、*H. purpureum* は23℃であった。

土壌中での生育は、グループ3に属するものが良好であった。グループ1および2に属する菌株および分生胞子形成菌株の生育は不良であった。腐生性は土壌中での生育の良否とほぼ一致し、グループ3に属する菌株が強かった。分生胞子形成菌株は弱かった。

ポット試験による病原性は、グループ3の菌株が強く、分生胞子形成菌株は弱かった。アルファルファを用いたin vitroでの病原性は、ポット試験による接種試験の結果にほぼ一致した。本方法は病原性の簡易検定に使用できると考えられた。*H. purpureum* は、アルファルファにin vitroで病原性を示した。紫紋羽病菌と同様生育を抑制し、細胞間隙への菌の侵入が認められた。

ポリガラクツロナーゼ (PG) 活性は、紫紋羽病菌は酸性側で高い活性を示した。pH3における各菌株のPG活性は菌株により差があり、強い病原性があった8菌株は高い活性を示したものの、病原性の弱い菌株のなかにも高い活性を示す菌株があった。pH3におけるPG活性は、*H. purpureum* においても粘度低下率70%以上の比較的高い活性を示す菌株があった。

イタコン酸産生量は、病原性の強い菌株が多かった。それらの菌株は、菌体1g 当たり1,000mg 以上の産生量を示し、濾液のpHも約3まで低下した。*H. purpureum* のイタコン酸産生量は、紫紋羽病菌と比較し少なかったものの、菌体1g 当たり約200~600mg 産生された。

7種類の培地（ジャガイモ寒天培地、荒木・笠井の培地、ワックスマン寒天培地、酵母エキス・麦芽エキス寒天培地、麦芽エキス寒天培地、V8ジュース寒天培地、ツアパック寒天培地）で紫紋羽病菌と *H. purpureum* の菌叢形態を比較した結果、*H. purpureum* は一般に培地表面、裏面ともに濃く着色した。PDA 上での *H. purpureum* の4菌株の菌叢はいずれも堅く、密で暗褐色であり、培地を濃く着色し、生育は遅く紫紋羽病菌のグループ1の菌株に類似していた。

紫紋羽病菌および *H. purpureum* の菌糸は、樹枝状に分枝し、隔壁形成後、そのすぐ下より分枝する傾向にあった。紫紋羽病菌の菌糸幅は3.4~4.8  $\mu\text{m}$  であり、分生孢子形成菌株も差はなかった。*H. purpureum* は3.7~4.4  $\mu\text{m}$  であり、両種に差はないと考えられた。

紫紋羽病菌の同一菌株間では容易に菌糸融合が観察された。紫紋羽病菌の異菌株間では、致死反応 (killing reaction) を伴う菌糸融合が観察された。紫紋羽病菌と *H. purpureum* の菌株間でもkilling reactionを伴う菌糸融合が観察された。

菌体内可溶性タンパク質の電気泳動パターンについては、紫紋羽病菌のグループ3に属する菌株および分生孢子形成菌株は、共通のメジャーバンドが観察され、パターンが類似していた。しかし、グループ2に属する菌株はそれぞれ異なる位置にメジャーバンドが認められ、紫紋羽病菌同一種内で変異が認められた。*H. purpureum* は紫紋羽病菌のグループ3と共通のメジャーバンドが認められたものの、グループ2に属する菌株とはパターンが異なっていた。アイソザイム分析に使用した11酵素のうち2酵素 ( $\alpha$ -エステラーゼ、グルタミン酸脱水素酵素) が両種から検出された。 $\alpha$ -エステラーゼについては、紫紋羽病菌と *H. purpureum* の1菌株はパターンが類似していたが、*H. purpureum* でも全く異なるパターンの菌株もあった。グルタミン酸脱水素酵素は紫紋羽病菌で1菌株、*H. purpureum* で3菌株、バンドが検出され、それぞれパターンが異なった。

GC含量は、紫紋羽病菌は48.4~50.4mole%、*H. purpureum* は49.2~51.1mole%で差異はなかった。核DNA の相同性は、紫紋羽病菌のグループ3に属する菌株および分生孢子形成菌株は100%、由来の異なる分生孢子的単孢子分離株とは88%、グループ2の菌株とは60%台であった。また、グループ2の菌株間では20%台の低い相同性であった。一方、紫紋羽病菌と *H. purpureum* は70%の相同性であった。

紫紋羽病菌菌株間の *Hind*IIIによるmtDNA の同一バンド率 (F 値) は90.0%で高いバンド類似性を示したが、紫紋羽病菌と *H. purpureum* 間のF 値は *Hind*III で8.3%、*Bgl* II で23.0%と低かった。

紫紋羽病菌は、菌叢の形態から3つのグループに分けられ、病原性の強いグループは他の菌株と菌叢の形態、生育速度から区別可能であった。病原性の強い菌株はPG活性が強く、イタコン酸産生能が高く、PGおよびイタコン酸と病原性との関わりが確認された。また、アルファルファによる病原性の簡易検定が可能であった。紫紋羽病菌は、菌体内可溶性タンパク質の電気泳動パターン、アイソザイムパターンおよび核DNA の相同性から遺伝的に多様な種であることが明きらかとなった。また、紫紋羽病菌と *H. purpureum* の相同性

は70%であり、さらに菌糸融合も確認された。両菌は同種であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 越 明  
副 査 教 授 木 村 郁 夫  
副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

学 位 論 文 題 名

## 紫紋羽病菌の諸性質と分類に関する研究

本論文は、和文で記され、図52、表21を含む総頁数184 からなり、10章をもって構成されている。

紫紋羽病菌 (*Helicobasidium mompa* Tanaka ) は、多犯性の土壌伝染性病原菌であるが、種の諸性質等不明な点が多い。また、欧米の類似菌 *Helicobasidium purpureum* (TUL.) PAT. との異同についても決定的な判断は下されていない。

本論文は、この紫紋羽病菌と *H. purpureum* について諸性質を調べるとともに、両種の異同について行なった研究をまとめたものである。

紫紋羽病菌は、菌叢の形態より3つのグループに分けられた。すなわち、グループ1：菌叢が密で堅く、生育が遅く、濃い褐色に色づき、培地にも色素を強く産生する菌株、グループ2：菌叢が粗であり、生育が速く、培地を着色しない菌株、グループ3：菌叢が密で、生育が速く、褐色に色づく菌株である。分生孢子形成菌株は、これらグループとは異なり、菌叢が密で、生育が比較的速く、菌叢が桃色に着色し、培地を褐色に着色した。分生子柄は "Tuberculina" 型であり、球形または卵形の分生孢子を形成した。*H. purpureum* の菌叢は紫紋羽病菌のグループ1の菌叢に類似していた。紫紋羽病菌と *H. purpureum* の菌糸の形態、菌糸幅、生育適温に差はなかった。

土壌中での生育は、グループ3に属するものが良好であった。グループ2に属する菌株および分生孢子形成菌株の生育は不良であった。腐生性、病原性は土壌中での生育の良否とほぼ一致した。

紫紋羽病菌のポリガラクトナーゼ (PG) 活性は、酸性側で高く、pH3における各菌株のPG活性は、病原性の強い菌株は高いが、病原性の弱い菌株でも高いものがあつた。*H. purpureum* でも比較的高い活性を示す菌株があつた。イタコン酸は、紫紋羽病菌では病原性の強い菌株の産生量が多く、*H. purpureum* でも産生された。

紫紋羽病菌の同一菌株間では容易に菌糸融合が観察され、紫紋羽病菌の異菌株間、紫紋羽病菌と *H. purpureum* の菌株間では、致死反応 (killing reaction) を伴う菌糸融合が観察された。

菌体内可溶性タンパク質の電気泳動パターンは紫紋羽病菌のグループ3に属する菌株および分生孢子形成菌株は類似していた。しかし、グループ2の菌株はパターンが異なり、紫紋羽病菌同一種内で変異が認められた。*H. purpureum* と紫紋羽病菌グループ3の菌株

のパターンは比較的類似していたが、グループ2の菌株のパターンとは異なった。

アイソザイム分析に使用した11酵素のうち検出されたのは2酵素 ( $\alpha$ -エステラーゼ、グルタミン酸脱水素酵素)のみであった。これら2酵素は種間よりも菌株間の差異が大きかった。

GC含量は、紫紋羽病菌は48.4~50.4mole%、*H. purpureum*は49.2~51.1mole%で、差異はなかった。紫紋羽病菌のグループ3の菌株および分生孢子形成菌株は100%の核DNAの相同性を示し、これらのグループと88%、60%の相同性の菌株もあり、グループ2の菌株間では20%台の低い相同性であった。一方、紫紋羽病菌と*H. purpureum*は70%の相同性であった。紫紋羽病菌菌株間のmtDNAのRFLPパターンは類似していたが、紫紋羽病菌と*H. purpureum*菌株間では異なっていた。

紫紋羽病菌は、菌叢の形態から3つのグループに分けられ、病原性の強いグループは他の菌株と菌叢の形態、生育速度から区別可能であった。病原性の強い菌株はPG活性およびイタコン酸産生能が高く、PGおよびイタコン酸と病原性との関わりが確認された。また、アルファルファによる病原性の簡易検定が可能であった。紫紋羽病菌は、菌体内可溶性タンパク質の電気泳動パターン、アイソザイムパターンおよび核DNAの相同性から遺伝的に多様な種であることが明らかとなった。また、紫紋羽病菌と*H. purpureum*の相同性は70%であり、さらに菌糸融合も確認され、両菌は同種であると考えられた。

以上の研究成果は、学術上高く評価される。よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者佐山 玲は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。