

学 位 論 文 題 名

Studies on Biological Control of *Fusarium* Basal Rot
of Onion Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

(タマネギ乾腐病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*) の
生物防除に関する研究)

学位論文内容の要旨

植物病原糸状菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* によって引き起こされるタマネギ乾腐病は、北海道におけるタマネギの主要病害のひとつである。北海道では、1911 年石狩で初めて発生し、その病原菌は半沢により *Fusarium cepae* sp. n. と報告された。現在は、Snyder・Hansen の分類体系により *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* とされている。近年では、1973 年に北海道全域にわたって発生し、問題となった。

Fusarium oxysporum は、各種植物に対する病原性の差異によって、多数の分化型に分けられている。*F. oxysporum* の分化型やレースを判別するには、多くの作物や品種に接種を行って病原性を調べる必要があるため、多大の労力と時間を要する。さらに接種方法と条件によっては、異なる結果を示すことがある。このような問題から、より簡便でより正確に *F. oxysporum* の分化型を判別する方法が求められ、硝酸塩の利用能をマーカーにして、体細胞和合性(VCG)を調べ、簡便に分化型を識別する方法が開発された。しかし、タマネギ乾腐病の病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* の体細胞和合性群は未調査であった。一方、本病は、ベノミルあるいはトリフルミゾールによる種子消毒、健全苗の確保、ベノミルあるいはトリフルミゾールの苗浸漬処理、抵抗性品種等により防除が行われるが、それにもかかわらず発生する例がみられる。*Fusarium* 病に対して非病原性 *F. oxysporum* および拮抗性細菌が発病抑制効果をもつことについては多くの報告がある。

そこで本研究では、*F. oxysporum* f. sp. *cepae* 菌株について、体細胞和合性群および病原力を調べると同時に、非病原性 *F. oxysporum* および熱耐性細菌を利用した生物的防除法の検討を行い、発病抑制に有効な非病原性 *F. oxysporum* を選択し、その抑制の機構を検討することを目的として行った。

硝酸塩非利用突然変異株 (Nitrate non-utilizing (nit) mutant) の選抜を行なった。CMA (cornmeal agar) に KClO_3 を 1.5 - 3.0 % 添加した培地上に野生型の *F. oxysporum* f. sp. *cepae* 菌糸片を置いた。3 日から 14 日間で良好な生育を示したセクターの先端菌糸を取って最少培地上に移し、菌糸が素寒天培地上での生育と同じような薄い菌叢を形成する菌を nit mutant として選抜した。nit mutant の表現型の同定は Correll ら(1987)に従った。nit mutant を亜硝酸ナトリウムまたは hypoxanthine を加えた基本培地を利用して、3 種類 (nit1, NitM, および nit3) の nit mutant を同定した。野生型の親株から分離した 3 種類の nit mutant を最少培地上で相互に対峙培養した。相補性がある nit mutant 間で

は、菌糸接触部分でヘテロカリオンを形成し、野生株型の気中菌糸を形成する。いくつかの *nit1* および *NitM* に属する菌株間での相補性を調べ、和合性群を決定した。

F. oxysporum f. sp. *cepae* 48 菌株は4つの VCG および単独自己和合性の2菌株に分けられ、Puhalla's numbering system (1985) により、それぞれを VCG 0420、0421、0422、0423 および単独自己和合性の 042- と命名した。48 菌株の内 33 菌株は一つの最大 VCG(0420) に含まれた。その VCG に属する菌株は8地点のタマネギ圃場の内、7地点から分離された。タマネギおよびネギの茎盤部に接種実験した結果から、茎盤部全体が褐変することはなく、VCG および品種によって発病指数の差があった。

土壌なすりつけ法によると、本菌の厚膜胞子の発芽は、端野および訓子府土壌では低かった。その厚膜胞子発芽抑制土壌から耐熱性細菌を分離した。分離菌株の内 10 菌株を用いてタマネギ乾腐病菌に対する生育抑制効果を *in vitro* の系で検証した。分離菌株の内 10 菌株は *in vitro* で乾腐病菌の生育を抑制した。

三笠のタマネギ栽培土壌および健全母球から分離した非病原性 *F. oxysporum* 16 菌株、福井県農試分譲のラッキョウ乾腐病抑制効果を示す非病原性 *F. oxysporum* (AR4312) および *F. moniliforme* (AR1073) を用いて、浸根接種法により有効菌株を選抜した。発病率が低い菌株として SM007、AR4312、NK049、1-1007、3-1026 菌を選抜し、他の接種法の実験に供試した。さらにタマネギ以外の数種作物に対する病原性を検討した。それぞれの菌株について浸根接種法、苗床前接種法、自然土壌への混和法、および灌注法を行った。非病原性 *F. oxysporum* をタマネギ苗、自然土壌、苗床に接種したところ、タマネギ乾腐病の発病が抑制された。接種方法と胞子の濃度の違いで発病抑制効果に差がみられた。根に *F. oxysporum* を前接種した区では発病抑制効果が認められたが、それぞれの実験で差がみられた。非病原性 *F. oxysporum* の多くの菌株は、菌の厚膜胞子混和土壌を自然土壌へ混和する条件で、発病を抑制した。また、非病原性菌の接種濃度が高いほど本病の抑制効果は高かった。苗床に前接種し、移植した苗では乾腐病の発病抑制が認められた。殺菌した土壌での実験では、AR4312、1-1007、および 3-1026 菌株では厚膜胞子接種濃度が高いほど本病の抑制効果は高かった。非病原菌の菌体懸濁液を母球に接種すると、無処理区より 30 日後における発病指数は低かった。非病原菌の菌体懸濁液を培養土に灌注すると、乾腐病の発病が抑制された。以上の結果から、発病を抑制するために非病原性 *F. oxysporum* により十分な感染が必要である。病原菌と非病原菌を同時接種する場合は、病原菌の濃度よりも非病原菌の濃度を高くすることが必要であった。非病原性 *F. oxysporum* は、PSA 培地において乾腐病菌と対峙培養しても拮抗しなかった。その結果から、非病原性 *F. oxysporum* は抗生作用以外のメカニズムにより、乾腐病を抑制したと考えられた。

分根法により非病原性 *F. oxysporum* SM007 菌株は乾腐病の発病を抑制した。その結果から、非病原性 *F. oxysporum* SM007 菌株によりタマネギは全身誘導抵抗性を獲得し、乾腐病を抑制したことが考えられた。非病原性 *F. oxysporum* SM007 菌株および AR4312 菌株は病原菌の感染部位における競合によりタマネギ乾腐病を抑制した。*F. oxysporum* f. sp. *cepae* の厚膜胞子混和土壌中に非病原菌の分性胞子懸濁液を灌注すると病原菌の厚膜胞子の発芽が減少した。しかし、この非病原性 SM007 菌株あるいは AR4312 菌株を灌注した土壌の中にグルコースを加えると、病原菌の厚膜胞子の発芽率が増加した。このことから、非病原性 *F. oxysporum* SM007 菌株および AR4312 菌株は病原菌と栄養素の競合で、乾腐病を抑制したことが考えられた。

本研究で用いた非病原性 *F. oxysporum* 菌は、タマネギのみならずダイコン、アズキ、ホウレンソウ、トマト、スイカ、メロン、レタス、インゲンに病原性を示さなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 越 明

副 査 教 授 小 林 喜 六

副 査 助 教 授 近 藤 則 夫

学 位 論 文 題 名

Studies on Biological Control of Fusarium Basal Rot of Onion Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

(タマネギ乾腐病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*) の
生物防除に関する研究)

本論文は図 26、表 14、引用文献 126 を含み、7 章からなる総頁数 131 の英文論文である。別に参考論文 4 編が添えられている。

本論文は、北海道におけるタマネギの主要病害のひとつである乾腐病について、その病原菌の体細胞和合性群を調べ、同時に乾腐病に対して非病原性 *Fusarium oxysporum* および耐熱性細菌を利用した生物的防除法の検討を行い、発病抑制に有効な非病原性 *F. oxysporum* を選抜し、その抑制の機構を解析した研究をまとめたものである。

1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* の体細胞和合性群 (VCG) と病原力
Puhalla's numbering system (1985) により *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* 48 菌株の内 46 菌株は 4 つの VCG (0420、0421、0422、0423) に、2 菌株は単独自己和合性群 (042-) に分けられた。48 菌株の内 33 菌株は一つの最大 VCG (0420) に属した。その VCG に属する菌株は 8 地点のタマネギ圃場のうち、7 地点から分離されたものであった。タマネギおよびネギ茎盤部への接種により、VCG および品種によって発病に差があることが判明した。

2. 耐熱性細菌によるタマネギ乾腐病の生物防除

北海道の端野および美幌の土壌では、病原菌の厚膜胞子の発芽率は低かった。これの土壌から分離した耐熱性細菌株の内 10 菌株は *in vitro* で乾腐病菌の生育を抑制した。しかし、*in vivo* の実験では乾腐病抑制効果は明らかでなかった。

3. 非病原性 *F. oxysporum* によるタマネギ乾腐病の生物防除

非病原性 *F. oxysporum* として SM007、AR4312、NK049、1-1007、3-1026 菌株を選抜し、生物的防除効果を調べた。これらの菌をそれぞれタマネギ苗、自然土壌、苗床に接種したところ、タマネギ乾腐病の発病が抑制された。菌株、接種方法、病原菌の濃度によってその効果に差がみられた。根に非病原性 *F. oxysporum* を前接種した区では発病抑制効果が認められたが、実験条件で差がみられた。非病原性 *F. oxysporum* の菌株を病原菌の厚膜胞子とともに自然土壌へ混和すると、発病を抑制した。また、非病原性 *F. oxysporum* の接種濃度が高いほど本病の抑制効果は高かった。非病原性 *F. oxysporum* を苗床に前接種し、苗を育て、病土に移植すると乾腐病の発病抑制が認められた。殺菌した土壌での実験では、AR4312、1-1007 および 3-1026 菌株ではそれらの厚膜胞子接種濃度が高いほど本病の抑制効果は高かった。非病原菌の菌体懸濁液を母球に接種した区では、無処理より 30 日後における発病指数は低かった。非病原菌の菌体懸濁液を土壌に灌注すると、乾腐病の発病が抑制された。以上の結果から、発病を抑制するためには非病原性 *F. oxysporum* による十分な感染が必要と考えられた。病原菌と非病原菌を同時接種した場合、病原菌の濃度よりも非病原菌の濃度を高くすることが必要であった。

非病原性 *F. oxysporum* を本研究で用いた非病原性 *F. oxysporum* 菌株は、タマネギのみならずアズキ、ダイコン、ハウレンソウ、トマト、スイカ、メロン、インゲンマメおよびレタスに病原性を示さなかった。

4. 非病原性 *F. oxysporum* によるタマネギ乾腐病の抑制の機構

非病原性 *F. oxysporum* は PSA 培地において乾腐病菌と対峙培養しても拮抗しなかった。その結果から、非病原性 *F. oxysporum* は抗生作用以外のメカニズムにより、タマネギ乾腐病を抑制したと考えられた。分根法で調べた結果、非病原性 *F. oxysporum* SM007 菌株が乾腐病の発病を抑制したことから、本菌株によりタマネギが全身誘導抵抗性を獲得し、乾腐病を抑制したと考えられた。SM007 菌株および AR4312 菌株は病原菌の感染部位における競合によりタマネギ乾腐病を抑制することも同時接種の結果から示唆された。*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* の厚膜胞子混和土壌中に非病原菌の分生胞子懸濁液を間注すると厚膜胞子の発芽率が減少した。しかし、この SM007 菌株あるいは AR4312 菌株を接種した土壌にグルコースを加えると、病原菌の厚膜胞子の発芽率が増加した。このことから、SM007 菌株および AR4312 菌株は病原菌との栄養素の競合により、乾腐病を抑制したと考えられた。

以上の研究結果は、*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* の体細胞和合性群を決定し、非病原性 *F. oxysporum* の乾腐病抑制の機構を示したもので、学術上、応用上、高く評価される。よって審査員一同は、ウィド博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。