

イチゴ萎黄病菌の *nit* 変異菌株の作出とその諸性質

後藤知昭・小山田浩一・中山喜一

(栃木県農業試験場)

Formation of Nitrate-nonutilizing Mutants from *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and Some of Their PropertiesTomoaki GOTO¹, Kouichi OYAMADA and Kiichi NAKAYAMA

摘 要

イチゴ萎黄病菌の硝酸塩利用能欠損変異菌株 (*nit* 変異菌株) を作出し, その諸性質を野生菌株と比較した。作出した *nit* 変異菌株は窒素源利用能により *nit* 1, *nit* 3, NitM の表現型に分類され, イチゴに対する病原性, PDA 培地上の菌糸生育温度を調査した結果, 野生菌株とはほぼ同等の性質であった。MMCPA 培地を用いて, *nit* 変異菌株接種土壌および接種植物からの分離を試みた結果, イチゴ萎黄病菌の野生菌株とイチゴ灰色かび病菌, イチゴ炭疽病菌は生育せず, 接種土壌および接種植物からイチゴ萎黄病菌 *nit* 変異株が選択的に分離された。以上より, 作出したイチゴ萎黄病菌 *nit* 変異株と MMCPA 培地を用いることで, イチゴ萎黄病菌の動態解析が可能と考えられた。

栃木県におけるイチゴ栽培は, 品種「とちおとめ」がその栽培面積の 9 割以上を占め, 主要品目の 1 つになっている。イチゴ萎黄病は, *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* によって引き起こされる病害で, 土壌伝染と苗伝染することから, 防除が困難な病害として知られている (手塚・牧野, 1984)。本県では, イチゴ萎黄病の発生が増加傾向にあり, 養液栽培においてもその発生が確認されている。そのため, 養液栽培培地内におけるイチゴ萎黄病菌の伝染経路の解明や養液栽培培地の太陽熱を利用した消毒法の開発が要望されている。

土壌伝染性の病原菌である *Fusarium oxysporum* は, 宿主範囲が広く, 分化型やレースに細分されている (松尾, 1980)。これまで, *F. oxysporum* の動態解析の手法として, *nit* 変異株 (nitrate-nonutilizing mutant) (Hardar et al., 1989), ペノミル耐性菌 (Postma and Luttkholt 1993), 色素変異体 (Larkin et al. 1993), GFP 遺伝子の導入 (Nonomura et al. 2001) が報告されている。

そこで, イチゴ養液栽培培地中のイチゴ萎黄病菌を選択的に分離するため, 本病菌の *nit* 変異菌株を作出し, その諸性質について検討した。

材料および方法

1. *nit* 変異菌株の作出

nit 変異菌株の作出は, イチゴ萎黄病菌 Kt-01 を用い, Puhalla (1985) の方法に準じて行った。*Fusarium oxysporum* の最小培地 (MM 培地) に L-asparagine (1.6g/l) と KClO₃ (15g/l) を加えた MMC 培地と, 市販のブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA 培地, Difco 製) に KClO₃ (15g/l) を加えた PDC 培地を用いて行った。PDA 平板培地で培養した萎黄病菌の菌叢片を各培地に 40 個ずつ置床し, 27 °C で 7 日間培養した。生育した菌叢を MM 培地に置床し, 気中菌糸がなく菌叢の薄いものを *nit* 変異菌株として PDA 斜面培地で保存した。

2. *nit* 変異菌株の表現型の類別

得られた *nit* 変異菌株は Correll et al. (1987) に従い硝酸塩, 亜硝酸塩, ヒポキサンチン, アンモニウム塩,

¹ Address: Tochigi Prefectural Agricultural Experimental Station, 1080 Kawarayacho, Utsunomiya, Tochigi 320-0002, Japan
2004年4月30日受領

尿酸の窒素源利用能により *nit 1*, *nit 3*, NitM の 3 種類の表現型に分類した。表現型の類別に用いた培地は、 NaNO_3 を含む MM 培地を基本とし、窒素源として NaNO_3 の代わりに NaNO_2 (0.5g/l), ヒポキサンチン (0.2g/l), 酒石酸アンモニウム (1g/l), または尿酸 (0.2g/l) をそれぞれ加えて作製した。各培地上に *nit* 変異菌株を置床し、硝酸塩のみ利用できないものを *nit 1*, 硝酸塩と亜硝酸塩を利用できないものを *nit 3*, 硝酸塩とヒポキサンチンを利用できないものを NitM として類別した。

3. *nit* 変異菌株の諸性質

1) *nit* 変異菌株のイチゴに対する病原性

得られた *nit* 変異菌株のうち FM7 (*nit 1*), FM15 (*nit 3*), FM11 (NitM) の 3 菌株, および野生菌株を供試し, ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地 (PDB 培地, Difco 製) 100ml にそれぞれの菌叢片を移植し, 27 で 7 日間振とう培養後の胞子様菌体 (bud cell) を 10^6 bud cell/ml に調整して, 株あたり 50ml を萎黄病罹病性のバージニアイチゴ (*Fragaria virginiana*) 4 株に土壤灌注接種した。接種は 2002 年 8 月に行い、接種後は、ガラス温室内で発病状況を調査した。

2) 菌糸生育温度試験

得られた *nit* 変異菌株の FM7 (*nit 1*), FM15 (*nit 3*), FM11 (NitM) および野生菌株の菌糸生育温度を調査するため, 各菌株を PDA 平板培地に置床し, 各温度 (5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35) で 5 日間培養し, その生育した菌糸伸長量を調査した。調査は 3 反復で行った。

3. *nit* 変異菌株の選択培地を用いた分離

1) MMCPA 培地の *nit* 変異菌株に対する選択性

nit 変異菌株を選択的に分離するため, 竹原ら (1994b) の方法に準じ, MM 培地を基本とし KClO_3 (10g/l), PCNB (0.25g/l), L-asparagine (1.6g/l) を含

む MMCPA 培地を作製した。

得られた *nit* 変異菌株の FM-7 (*nit 1*), FM-15 (*nit 3*), FM-11 (NitM) と対照菌株として野生菌株 (Kt-01), イチゴ炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) およびイチゴ灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の菌叢片を MMCPA 培地に置床し, 27 で 5 日後の生育状況を調査した。

2) 土壌および接種植物からの *nit* 変異菌株の分離
殺菌土を詰めた 4 号ポリポットにバージニアイチゴを移植した。*nit* 変異菌株および野生菌株を病原性試験と同様の方法で接種し, ポット内の土壌および発病したイチゴから *nit* 変異菌株の分離を行った。接種 2 週間後, 発病株ポット内の土壌を滅菌水で $10^{-2} \sim 10^{-4}$ に希釈し MMCPA 培地で生育した菌叢を調査した。さらに, MMCPA 培地と PDA 培地を用いて, 発病したイチゴのクラウン部から常法により組織分離し, 接種菌の分離を行った。

生育した菌の *nit* 変異株かどうかの確認には MM 培地を用いた。

結果および考察

1. *nit* 変異菌株の作出と表現型の類別

イチゴ萎黄病菌の野生菌株 (Kt-01) から MMC 培地で 45%, PDC 培地で 32.5% の出現率で *nit* 変異菌株が作出された。各培地での表現型の出現率は MMC 培地, PDC 培地とも *nit 1* が最も高く, *nit 3* および NitM の出現率は両培地とも 10% 以下であった (第 1 表)。

2. *nit* 変異菌株の諸性質

1) イチゴに対する病原性

表現型の異なる *nit* 変異菌株および対照として用いた野生菌株を接種したバージニアイチゴは, 接種後 2 週間ですべての株が枯死した。各菌株間で病徴による差異は見られなかったことから, 作出した *nit* 変異菌株は, 野生菌株の有する病原性とほぼ同等であると考

第 1 表 イチゴ萎黄病菌^{a)} の *nit* 変異株の作出

培地名	置床菌叢片数	変異菌叢片数 (下段は出現率)			
		<i>nit 1</i>	<i>nit 3</i>	NitM	合計
MMC	40	11	4	3	18
		27.5%	10.0%	7.5%	45.0%
PDC	40	11	1	1	13
		27.5%	2.5%	2.5%	32.5%

a) 野生菌株はイチゴ萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) の菌株 Kt-01 を用いた。

えられた。

2) *nit* 変異菌株の生育温度

PDA培地で27℃, 5日間培養後の菌糸伸長量を調査した結果, *nit* 変異菌株と野生菌株は5℃~35℃で生育し, 生育適温は25℃~28℃であった。FM-15(*nit 3*), FM-11(NitM)は野生菌株と同様の生育を示したが, FM-7(*nit 1*)では, 30℃まで生育が旺盛であった(第1図)。

3. 選択培地を用いた *nit* 変異菌株の分離

1) MMCPA培地の *nit* 変異菌株に対する選択性

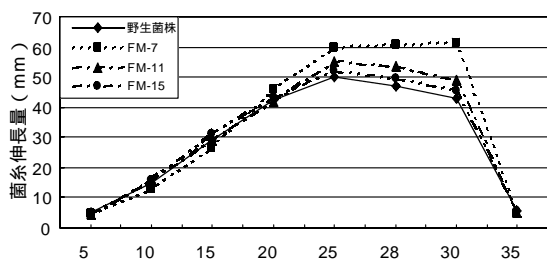
土壌中の *nit* 変異菌株の選択的分離には, MMCPA培地を用いることで, *Fusarium*属菌の野生菌株がほとんど生育せず, *nit* 変異菌株のみを選択的に分離することが可能であると報告されている(竹原ら1994b)。今回, MMCPA培地の *nit* 変異菌株の選択性を検討したところ, イチゴ萎黄病菌の野生菌株, イチゴ炭疽病菌およびイチゴ灰色かび病菌では生育が見られず, *nit* 変異菌株のみが生育した(第2表)。

2) 土壌および接種植物からの *nit* 変異菌株の分離

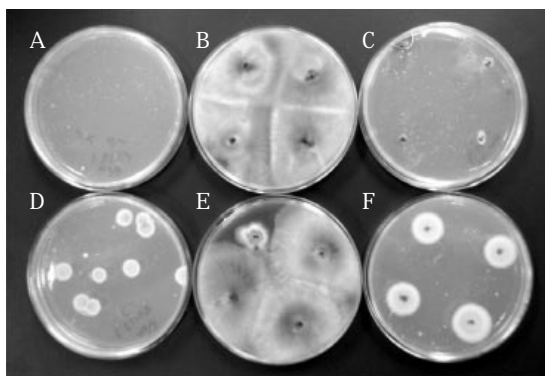
MMCPA培地により土壌から *nit* 変異菌株を検出したところ, イチゴ萎黄病菌の野生菌株は全く検出されず, *nit* 変異菌株のみが検出された。さらに, 接種植物からの分離では, MMCPA培地上で *nit* 変異菌株を

接種したイチゴのみから *Fusarium*属菌が分離され, 野生菌株を接種したイチゴからは分離されなかった。PDA培地上では, *nit* 変異菌株および野生菌株を接種したイチゴからそれぞれ *Fusarium*属菌が分離された(第2図)。MMCPA培地で分離された *Fusarium*属菌をMM培地に置床し *nit* 変異菌株かどうかを確認したところ, すべて弱い生育を示したことから *nit* 変異菌株であると考えられた。

nit 変異菌株を生態的研究に用いる場合, その病原性や菌学的性質が野生菌株と同等である必要がある(竹原ら1994a)。今回作出した *nit* 変異菌株は, イチゴに対する病原性が野生菌株とほぼ同等であり, 生育温



第1図 野生菌株と各 *nit* 変異株の生育温度



第2図 土壌および接種植物からの *nit* 変異菌株の選択的分離

上段: イチゴ萎黄病菌野生株を接種し 10^{-4} に希釈した土壌(A)および接種イチゴ(BおよびC)
 下段: イチゴ萎黄病菌*nit*変異株(*nit 1*)を接種し 10^{-4} に希釈した土壌(D)および接種イチゴ(EおよびF)

A, D: MMCPA 培地
 B, E: PDA 培地
 C, F: MMCPA 培地

第2表 MMCPA培地の各菌株に対する選択性

菌名	菌株名	生育 ^{a)}
イチゴ萎黄病菌 (<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>)	Kt-01 (野生菌株)	-
	FM7 (<i>nit 1</i>)	+
	FM15 (<i>nit 3</i>)	+
	FM11 (Nit M)	+
イチゴ炭疽病菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	MKU	-
イチゴ灰色かび病菌 (<i>Botrytis cinerea</i>)	S-9	-

a) MMCPA培地に置床して, 27℃, 5日後の生育の有無

度もほぼ同様であった。さらに、選択分離培地を用いた *nit* 変異菌株の選択的分離法を検討したところ、MMCPA培地上では、イチゴ萎黄病菌野生株とイチゴ灰色かび病菌、イチゴ炭疽病菌は生育せず、*nit* 変異菌株接種土壌および接種植物から *nit* 変異菌株のみが選択的に分離された。これまで数種の *Fusarium* 属菌の *nit* 変異菌株が作出され (竹原ら 1994a)、他の菌株と区別して追跡するマーカーとして用いることができるとされている (竹原ら 1994b、Takehara and Kuniyasu 1995)。今後、本県におけるイチゴ養液栽培の普及に伴い、その効率的な培地消毒法を検討するため、イチゴ萎黄病菌の養液栽培培地内での動態解析に *nit* 変異菌株は有用であると考えられる。

引用文献

- Correll, J. C. et al. (1987) *Phytopathology* 77 : 1640 - 1646.
- Hardar, E. et al. (1989) *Plant Dis.* 73 : 800 - 803.
- Larkin, R. P. et al. (1993) *Phytopathology* 83 : 1105 - 1116.
- 松尾卓見 (1980) 作物のフザリウム病 (松尾卓見ほか編). 全国農村教育協会, 東京, pp. 31 - 36.
- Nonomura, T. et al. (2001) *J. Gen. Plant. Pathol.* 67 : 273 - 280.
- Postma, J. and Luttkholt, A. J. G. (1993) *Neth. J. Plant Pathol.* 99 : 175 - 188.
- Puhalla, J. E. (1985) *Can. J. Bot.* 63 : 179 - 183.
- 竹原利明・國安克人 (1994a) 日植病報 60 : 699 - 704.
- 竹原利明・國安克人 (1994b) 日植病報 60 : 705 - 710.
- Takehara, T. and Kuniyasu, K. (1995) *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61 : 541 - 548.
- 手塚信夫・牧野孝宏 (1984) 植物防疫 38 : 544 - 548.