

氏 名 (本籍) ^{なが}長 ^お尾 ^{ひで}英 ^{ゆき}幸

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 博 第 3 2 5 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 5 9 年 9 月 1 3 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 農 学 研 究 科
(博 士 課 程) 農 芸 化 学 専 攻

学 位 論 文 題 目 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*
の 耐 久 体 に 関 す る 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

助 教 授 服 部 勉 教 授 高 橋 甫

助 教 授 江 原 淑 夫

論文内容要旨

1. 緒 論

Fusarium 菌は、多数の作物の地下部を侵害し、経済的に重大な被害をおよぼす土壌病原菌として知られている。*Fusarium* 菌の感染源は厚膜胞子と呼ばれる耐久体と考えられ、それは土中または植物残渣に存在している。厚膜胞子の存在が土壌という不均一な環境と相まって薬剤処理等の妨げとなり、この病害の防除を一層困難なものにしている。

従来の *Fusarium* 菌の研究は、圃場における *Fusarium* 菌数と発病の関係を中心に行なわれてきたが、両者の間には明らかな関連が見出されていない。筆者らは、*Fusarium* 病発生抑制土壌の研究において、土性の異なる土壌と *Fusarium* 病の発生の関係を調べたところ、*Fusarium* 病と *Fusarium* 菌数、他の微生物の菌数には明確な関係が見出されなかった。菌数調査は、発病と *Fusarium* 菌の量的な関係を調べる手掛りであるが、発病に影響を及ぼす土中での *Fusarium* 菌の活動状態を把握することはむずかしい。厚膜胞子の活動に関する研究では、厚膜胞子がどのように形成されるか、又その定量的な方法が欠けていた。*Fusarium* 菌の実際の活動をとらえるような方向に研究を進展させるには、*Fusarium* 菌の厚膜胞子形成および発芽についての解析的研究を行ない、実際の圃場での研究の基礎をつくるのが何よりも重要となってくる。

本研究では、厚膜胞子の菌糸上での形成および発芽の解析的研究を通じて、従来の厚膜胞子の認識を再検討し、厚膜胞子の微細構造についても組織学的研究を行なった。

2. 実験方法

供試菌 *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* SUF 384 を Czapeck-Dox 液体培地で一週間培養し、ホモブレンダーで磨砕、遠沈洗浄後、Qureshi - Page の塩類溶液 (KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g / liter) + 0.01% グルコースで培養した。厚膜胞子、CL 体の形成の観察は、経時的に光学顕微鏡 ($\times 40$) で行なった。視野直径を通る菌糸とそれに形成された厚膜胞子、CL 体をそれぞれ数え、単位菌糸長あたりの厚膜胞子、CL 体数を求めた。

厚膜胞子、CL 体の発芽は、ブレンダーで菌糸から引き離し、遠沈洗浄後、所定の濃度に調整しスライドグラス上で (0.02 ml) 培養し、観察を行なった。

透過型電子顕微鏡による微細構造の観察は、蒸留水で洗浄した試料をグルタルアルデヒド-オスミウム酸の二重固定法により固定し、脱水後低粘性エポキシ樹脂に包埋した。切片は酢酸ウラニル・鉛染色により染色後、80 KV で観察した。

3. 結 果

(1) 光学顕微鏡による厚膜胞子の観察

菌糸上に観察された二種類の球形細胞を、厚い細胞壁を有し、豊富な脂肪顆粒をもつ典型的な厚膜胞子と、厚い細胞壁がみられず、細胞内にもわずかに、あるいはまったく脂肪顆粒が存在せず、細胞質が一様に存在するように観察される形態的に類似した厚膜胞子類似構造体 (CL 体) とに区別した。菌糸上に形成された球形細胞を染色せずにそのまま観察した場合に、上述したような二種類の球形細胞を区別したが、コットンブルー、酸性フクシン、オーラミン O とサフラニンの二重染色をそれぞれ行ない観察した場合にはまったく異なる結果となった。すなわち染色により厚い細胞壁が染め残され、細胞質が一様に染まり内容物のちがいは不明となった。脂肪顆粒の存在については、

脂質に強い染色性をもつスダンブラック B による染色から次のようなちがいが見られた。厚膜胞子では濃染され、脂肪顆粒の存在を示し、一方 CL 体では通常の菌糸の場合と同様に全体が薄く染まる場合や染色される部位が局在した。ノマルスキー顕微鏡観察からは、厚膜胞子は豊富な脂肪顆粒の存在がより明確になった。CL 体では脂肪顆粒の局在や細かい粒状構造を呈するように観察された。この観察から両者のちがいは一層明らかになった。これらのことは、従来の研究に次の欠陥があったことを示している。すなわち、①光学顕微鏡観察により認められる典型的な厚膜胞子にのみ注目し、形態的に類似しているがその特長を欠いた細胞は未熟な厚膜胞子として見過していた、②しばしば染色により明らかになる厚壁化した細胞壁を指標としていたために、このような観察からはすべてが厚膜胞子となり CL 体の存在は見落されやすい。

以下の研究では、このような特徴に基づき厚膜胞子、CL 体を区別して、菌糸上における形成およびその発芽の検討を行なった。

(2) 厚膜胞子、CL 体の形成の速度論(I)

塩類溶液中に移した菌糸に厚膜胞子、CL 体がどのように形成されるか経時的に観察し、厚膜胞子、CL 体の形成を単位菌糸長あたりに換算し、菌糸上での厚膜胞子、CL 体の形成の速度論を検討した。

厚膜胞子、CL 体が形成される時に、次のような 3 段階の区分けを試みた、①菌糸生育期、②耐久体形成期、③菌糸溶菌期

〔菌糸生育期〕 菌糸が生長を続ける期間。この期間中、厚膜胞子、CL 体の形成はほとんど観察されなかった。

〔耐久体形成期〕 厚膜胞子、CL 体が形成される期間。

〔菌糸溶菌期〕 厚膜胞子、CL 体に連続している菌糸や連続していない菌糸が部分的に自己溶菌する期間。

(3) 厚膜胞子、CL 体の形成の速度論II)

菌糸上での厚膜胞子、CL 体の形成を観察する時、単位菌糸長あたりの厚膜胞子、CL 体の形成頻度を検討した。厚膜胞子の頻度分布は時間の経過に従い逆 J 型から徐々にベル型へと移行した。CL 体の頻度分布は時間の経過に従い逆 J 型からすみやかにベル型へと移行した。厚膜胞子の形成がみられなかった pH 4.5 の培養を除いて、いずれの pH でも同様の分布パターンを示した。(Fig. 1) このような頻度分布のポアソン分布への近似を検討した結果、十分に近似できることが判明した。このことから顕微鏡による菌糸片の観察はランダムであると考えられる。近似されたポアソン分布のパラメーター (m) の値の時間変化を検討すると、次のような一次方程式で表わされる。

$$m = p + qt \dots\dots\dots (1)$$

m : 厚膜胞子、CL 体の形成が観察される確率。

t : 時間

p, q : 各 pH における厚膜胞子、CL 体の形成のパラメーター。ことに q は形成速度を表わす。

m の値と時間の関係は、m の値が時間とともにほぼ直線的に増加すると見なすことができると考えられる。パラメーター (m) は、ポアソン分布においてある事象が起きる確率であるから、この厚膜胞子、CL 体の頻度分布においては菌糸上に形成される厚膜胞子、CL 体の観察の確率が一定の

速度で増加することを意味し、この速度を厚膜胞子、CL体形成速度とみなすことができる。

(4) 厚膜胞子、CL体の速度論(Ⅲ)

菌糸上の厚膜胞子、CL体は徐々に形成されることが明らかになったが、更にその形成速度について検討を行なった。厚膜胞子、CL体形成を時間に対してプロットすると、両者の形成は溶菌が観察されるまで時間に対して直線関係があるとみなすことができる。(Fig.2) それは次のような一次方程式で表わすことができると考えられる。

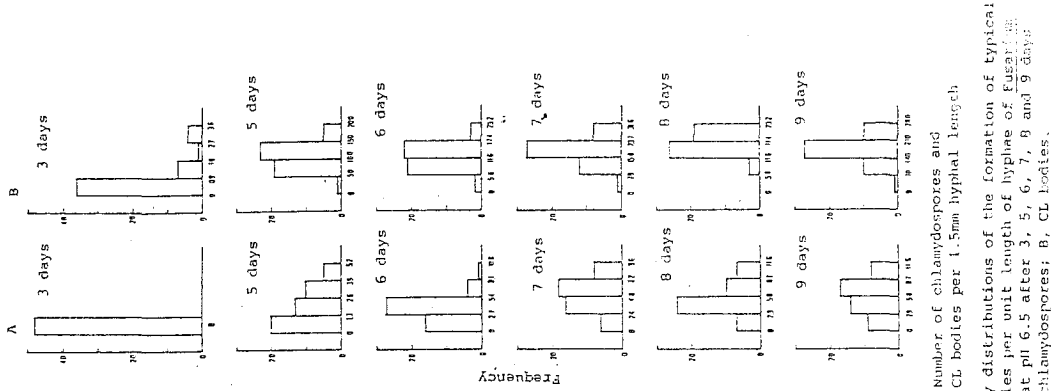


Fig. 2. Frequency distributions of typical chlamydospores and CL bodies per unit length of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* at pH 6.5 after 3, 5, 6, 7, 8 and 9 days incubations. A, typical chlamydospores; B, CL bodies.

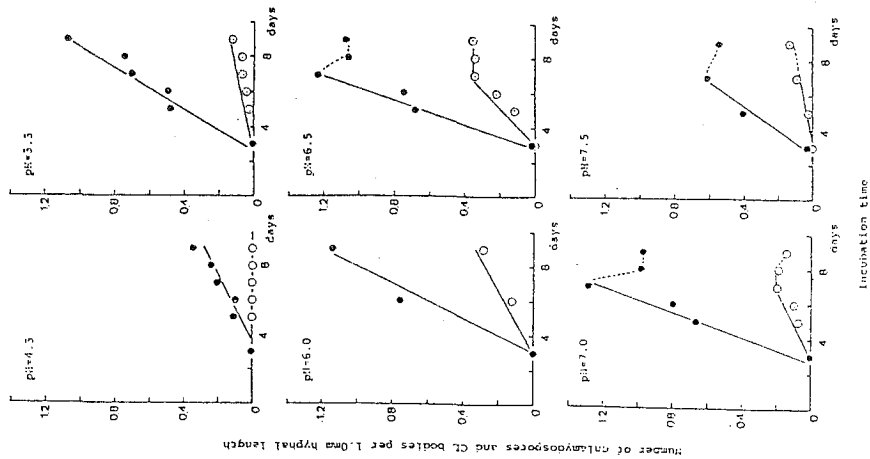


Fig. 3. Formation of typical chlamydospores and CL bodies by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* in the Puresh-Page's salt solution plus 0.01% glucose at various pH values. Each point represents the mean of two counts. O, typical chlamydospores; ●, CL bodies.

$$f = a + bt \dots\dots\dots (2)$$

f : 単位菌糸長あたりに形成される厚膜胞子, CL体数。

t : 時間

a, b : 各pHにおける厚膜胞子, CL体の形成のパラメーター。ことにbは, 形成速度を表わす。

この結果, 厚膜胞子, CL体は一定の速度で形成されると考えられる。菌糸に溶菌が観察された場合, 溶菌していない部分について形成される厚膜胞子, CL体の形成を観察した。その時, 単位菌糸長あたりの厚膜胞子, CL体の形成数は減少した。このことは菌糸に溶菌が生じると, 同時に単位菌糸長あたりの厚膜胞子, CL体の形成は停止するか, 形成速度が小さくなるためと考えられる。

(5) 厚膜胞子, CL体の関係

形態的に類似した厚膜胞子とCL体の関係は, 次のような2つの可能性が考えられる。

- ① CL体は厚膜胞子の前駆体であり, 最終的には厚膜胞子となる。
- ② CL体は前駆体ではなく, 典型的な厚膜胞子へとは変化しない。

第1の可能性については, CL体が厚膜胞子の前駆体であるためにはその成熟の期間が必要なので, CL体の形成が厚膜胞子の形成に先立って生じると考えられる。厚膜胞子とCL体の形成は時間に対して直線関係がみられるので, CL体が前駆体であるならば, その形成開始時間は厚膜胞子の形成開始時間よりも短くなると考えられる。しかしながらCL体の形成開始時間は, 厚膜胞子の形成開始時間よりも短くならなかった。厚膜胞子, CL体の形成が停止した培養10, 15, 20日後に両者の比率と細胞密度を調査した。その結果, 両者の比率は一定でありその時の細胞密度には変化が認められなかった。

以上の結果から, CL体が厚膜胞子の未熟な状態である可能性よりも, 厚膜胞子とは独立して形成され, 存在している可能性が示唆される。

(6) 厚膜胞子, CL体の形成に及ぼすpHの影響

厚膜胞子の形成に対するpHの影響は様々に報告されている。その原因は先に述べたように厚膜胞子の正確な認識と定量的な厚膜胞子の形成が行なわれていなかったことに基づいている。この点を考慮した結果, 厚膜胞子とCL体の形成速度とpHの関係はFig.3に示されたとおりである。ことにpH 4.5では厚膜胞子の形成は観察されず, CL体の形成速度も小さかった。

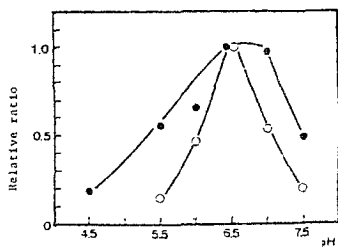


Fig. 3 The effect of pH in salt solution on the formation of both bodies by *F. oxysporum* f. sp. *raphani*. In each case the rate at pH 6.5 was taken arbitrarily as 1.0. ○, typical chlamydospores; ●, chlamydospore-like bodies.

(7) 厚膜胞子, CL体の形成に及ぼすアンモニウム塩の影響

Fusarium 菌による病害の発生と窒素肥料の関係が多数報告されている。本実験では菌糸上の厚

膜胞子，CL体の形成に対するアンモニウム塩の効果について検討した。上述の塩類溶液に0.1，0.01%のアンモニウム塩濃度となるように加えて培養した時，これらの濃度では厚膜胞子の形成はほとんど観察されなかった。CL体の形成を時間に対してプロットすると，両者の関係は前述の式(2)により表わされる。この結果，CL体は一定の速度で形成されると考えられる。菌糸に溶菌が生じると，同時に単位菌糸長あたりのCL体の形成は停止するか，形成速度が小さくなることが考えられた。又，CL体の形成速度は0.1，0.01%のアンモニウム塩濃度の時，他の濃度に比べて大きかった。CL体の形成に関しては，細胞が2～3個連らなって形成される場合が観察された。アンモニウム塩の存在は，菌糸上の厚膜胞子，CL体の形成に影響を与えるが，頻度分布の解析からこのような観察は無作為に行なわれた結果であると考えられる。その時の頻度分布はポアソン分布により近似されることが判明し，そのパラメーター(m)と培養時間の関係は前述の式(1)により表わされる。これはアンモニウム塩を加えた条件下での菌糸上に観察されるCL体の形成確率が一定の速度で増加することを意味する。

アンモニウム塩が加わることにより，①厚膜胞子の形成が抑えられ，②CL体の形成速度が大きくなり，③CL体が形成され，溶菌が生じるまでの時間が短縮された。このような厚膜胞子，CL体の形成におよぼすアンモニウム塩の短期間での影響を検討した。アンモニウム塩を培養24時間，48時間後にそれぞれ遠沈洗浄で除去した。その結果，CL体の形成がまだ観察されない培養24時間後に除去した場合，CL体の形成速度はゆるやかになり，除去の影響を受けたが，CL体の形成が始まる培養48時間後に除去した場合，CL体の形成速度はコントロールと変わりがなかった。

(8) 厚膜胞子，CL体の発芽の速度論

厚膜胞子，CL体の発芽の定量化を試みるために，一次反応式

$$N = N_0 e^{\frac{g(t-TR)}{e}} \quad (3) \quad N = N_0 (1 - e^{-g(t-TR)}) \quad \dots (3)$$

N : 培養 t 時間後の発芽率

N_0 : 予想される最大発芽率

e : 自然対数の底

g : 発芽定数

TR : 発芽開始時間

を用いて，パラメーターを検討した。

厚膜胞子の発芽には次の特徴が認められる。

- (1) 発芽定数(g)は，0.1 から 0.3 の間の値を示した。
- (2) 発芽開始時間 (TR) は，7.0 時間以上となる。
- (3) 厚膜胞子が形成されてから発芽実験に供試されるまでの時間 (加齢時間) が 30 日以上である時，g，TR はこのような値を示した。

CL体の発芽には次の特徴が認められる。

- (1) 発芽定数(g)は，0.2 から 1.6 の間の値を示した。
- (2) 発芽開始時間 (TR) は，2.0 時間以上であった。
- (3) CL体の加齢時間が 24 日以上である時，g，TR は上記の値の範囲にあり，最終発芽率も 80 % を越える値を示した。加齢時間が 15 日間の場合は，g 値は小さくなり，TR 値がやや大きくなる。また予想される最終発芽率もおよそ 50 % となる。

5分間の熱水処理を行ない耐熱性を検討したところ、50°C 処理では、厚膜胞子の最終発芽率は20%以上を越えないと予想され、一方CL体の発芽率は1.8%以下であった。55°C 処理では両者の発芽は観察されなかった。(Fig. 4)

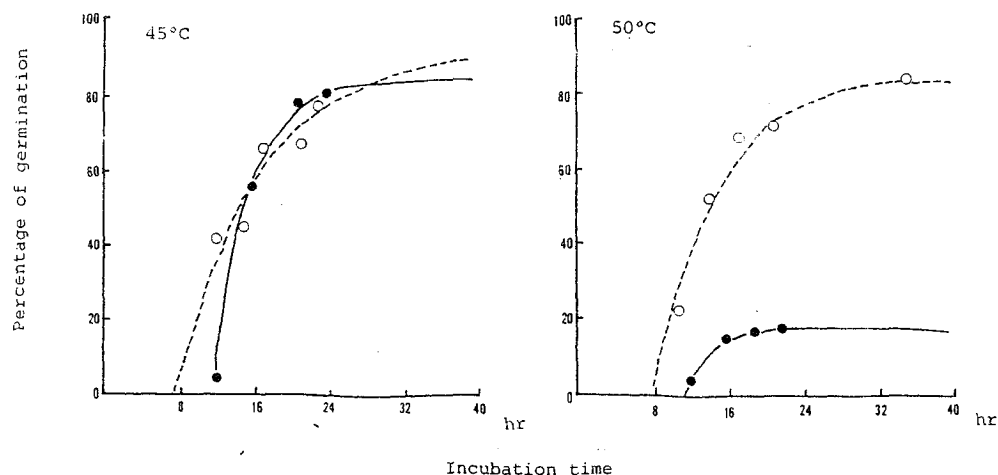


Fig. 4. Effects of heat treatment on the germination of chlamydozooids. The suspension of chlamydozooids was heat-treated for 5 minutes at 45°C or 50°C. After the treatment the germination of chlamydozooids was tested at 26-27°C. O, the germination of chlamydozooids without heat treatment; ●, the germination of chlamydozooids treated with heat at 45°C or 50°C.

(9) 厚膜胞子, CL体の微細構造(I)

成熟した厚膜胞子の微細構造は、①高電子密度の外層と低電子密度の幅の広い内層の二層構造からなる厚い細胞壁をもち、②細胞質には豊富な脂肪顆粒が存在する、③壁の最外部には繊維層がみられることもある、④液胞内に高電子密度の物質が存在するなどの特徴がある。

CL体と思われる細胞の微細構造は、厚膜胞子の特徴である①厚壁構造、③繊維層、④高電子密度物質を含む液胞などが観察されたが、②脂肪顆粒が、細胞内に局在し、ポリサッカライド様物質が存在するという点が異なっていた。CL体の微細構造は明らかに菌糸や分生胞子の微細構造と異なるものである。

(10) 厚膜胞子, CL体の微細構造(II)

光学顕微鏡での観察から、厚膜胞子は発芽管が十分に伸長しても発芽前の厚膜胞子の特徴である厚い壁構造や脂肪顆粒の存在などの構造に変化が観察されなかった。一方、CL体の発芽管の伸長とともに内部の細胞質が空洞化するように観察された。

このような形態的变化について、電子顕微鏡によりその微細構造の変化を検討した。発芽30時間後の厚膜胞子の微細構造はほとんど変化せず、発芽管が十分伸長しても脂肪顆粒は大部分が残っていた。一方、発芽6時間後のCL体には、その細胞質に高電子密度物質を有した多数の液胞が出現し、それは細胞質の半分を占めていた。細胞膜の周辺に多数のポリサッカライド様物質が観察された。CL体の細胞内には多数のミトコンドリアやER、核などの細胞器も観察された。

以上のように、光学顕微鏡の結果に十分対応する微細構造の変化が観察された。

審査結果の要旨

Fusarium菌は、多くの土壤に生息し、しばしば農作物に大きな被害をおよぼしている。この菌の土壤中での長期にわたる生存を支える因子として、耐久体の形成が考えられ、この菌による病害を避けるためには耐久体の形成とその発芽のコントロールがきわめて有効だと思われる。しかしながら、Fusarium菌の耐久体の形態、形成や発芽の速度論についての知見は、充分確かなものとして蓄積されてこなかった。

本研究では、Fusarium oxysporium f. sp. raphani SUF 384を供試菌として、Qureshi-Pageの塩類液 (KH_2PO_4 , 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; H_2O , 1 ℓ) + 0.01% グルコース中での耐久体の形成を検討した。まず顕微鏡観察を通じて、この系で形成される耐久体には厚い細胞壁にかこまれた細胞内に豊富に脂肪顆粒をもつ従来厚膜胞子と呼ばれてきたものの外に、厚い細胞壁をもたず脂肪顆粒が局在するCL体と著者が名づけた球形細胞の存在することを認めた。

ついで、厚膜胞子、CL体の形成を経時的に追跡し、単位菌糸長当りに出現する両耐久体の頻度は、ポアソン分布で近似でき、その確率は時間とともに直線的に増大することを示した。単位菌糸長当りの平均両耐久体数もそれぞれ直線的に増大し、一次反応として扱えることを示した。又、その反応速度によって、形成と培地のpHの関係を定量的に示すことができた。実際の圃場では、窒素肥料がFusarium病の発生に影響を及ぼすことが知られているが、ここで確立された実験方法によっても、アンモニウム塩が厚膜胞子の形成を強く阻害することが明確に示された。一方CL体の形成は、アンモニウム塩で促進されることが認められた。

厚膜胞子、CL体の発芽現象は一次反応によって近似出来、環境条件との関係を定量的に検討できることが示された。又50℃、5分間の熱処理でCL体の発芽は98%阻害されたが厚膜胞子では80%以下であった。最後に電子顕微鏡によって厚膜胞子とCL体の発芽過程における微細構造の変化を検討した。前者の構造は発芽後も容易に変化しないが、後者は発芽直後から液胞が多数出現するなど対照的な変化を示した。

本研究は従来漠然と厚膜胞子とされていた耐久体に、厚膜胞子とCL体の2種類があることを示し、その形成過程と発芽過程を定量的に研究する方法を確立し、いずれも一次反応として定式化できることを明らかにした点で、土壤微生物学的に貴重な貢献をしており、農学博士の学位を授与するに値すると判断される。