

氏 名(本 籍)	成 沢 一 彦 (東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1065 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	<i>Puccinia coronata</i> var. <i>coronata</i> の交配系に関する研究
主 査	筑波大学教授 Ph. D. 勝 屋 敬 三
副 査	筑波大学教授 農学博士 正 野 俊 夫
副 査	筑波大学助教授 農学博士 柿 嵐 眞
副 査	筑波大学助教授 農学博士 星 野 貴 行
副 査	筑波大学客員教授 農学博士 金 子 繁
	(森林総合研究所)

## 論 文 の 要 旨

本研究はさび菌 *Puccinia coronata* Corda var. *coronata* を供試菌として、単相世代からの培養菌株を確立し、その培養菌株を供試し交配試験を行い、交配系を明らかにしたものである。その概要は次の通りである。

### (1) 単相世代からの人工培養菌株の確立および菌株の形質

*Puccinia coronata* var. *coronata* の精子器を有するクマヤナギの感染葉片を表面殺菌し、培地上に静置する方法で34菌株を確立した。一方、単一担子胞子からは菌株の確立が出来なかった。供試した7種類の培地のうち1/4濃度の Murashige & Skoog (1962) 培地の無機塩類、ビタミン類、glycine および sucrose を基本組成とし、これらに lab-lemco broth および peptic peptone を添加した培地が培養菌株確立および継代培養には最適であった。

培養菌株のコロニーを顕微鏡等で観察したところ、コロニーの表面がフェルト状で、気中菌糸がよく発達しており、白色から淡黄色を示すコロニーと、表面に凸凹がありち密で、気中菌糸が発達しておらず、橙黄色であるコロニーとの2タイプが認められた。しかし継代培養を繰り返行うと、フェルトタイプのコロニーがち密タイプのコロニーに変化することが頻繁に観察された。菌株確立3年後では、生存している15菌株全てが、ち密タイプを示した。培養コロニーは主に直線的に伸長している菌糸より構成され、フェルトタイプの菌糸は幅が広く1細胞の長さが短く、ち密タイプの菌糸は幅が狭く1細胞の長さが長かった。菌糸の表面構造は平滑であった。

培養菌株菌糸内の1細胞あたりの核数の観察および1核あたりのDNA含量の測定を行ったところ、調査した34菌株全て1細胞あたり1核であった。継代培養を繰り返し、分離4年後でも、1細胞あたり1核で、2核化はしていなかった。また、培養菌株の菌糸細胞の1核あたりのDNA含量は寄主植物上で形成された精子(単相1核)内の1核あたりのDNA含量と一致した。これより培養菌株菌糸内の核は単相であると結論した。

クマヤナギ新葉の表皮組織に培養菌株コロニーを接種した結果、分離後1年以内の25菌株中4菌株で感染が認められ、接種約2週間後にクマヤナギ葉表に橙黄色の精子器が形成された。また、分離3年以上を経過し、クマヤナギ葉片への感染が認められなくなった15菌株を供試して、クマヤナギのカルスへの接種試験を行った結果、15菌株中7菌株で、菌糸がカルス表面および細胞間隙に伸長し、また細胞内菌糸も形成しており、感染が認められた。

以上より、本菌の単相世代からの培養菌株は1担子孢子由来であり、本実験で用いた方法は、1担子孢子由来の培養菌株を得るために適していると考えられた。

## (2) 培養菌株による交配試験

本菌がヘテロタリックであることの確認のため担子孢子を鉢植えのクマヤナギ葉に接種し、自家交配試験を行った。その結果、クマヤナギ葉上にさび孢子堆の形成は観察されなかった。一方、未受精であることを確認した精子器を有する葉片を、培養菌株のコロニーに精子器とコロニー表面が接触するように静置し交配試験を行った。その結果、供試した15菌株中、5菌株で、葉片上にさび孢子堆の形成が確認された。以上より本菌はヘテロタリックであることが確認された。

15培養菌株(菌株番号 Pccs-4, Pccs-6, Pccs-8, Pccs-15, Pccs-23, Pccs-24, Pccs-27, Pccs-32, Pccs-36, Pccs-45, Pccs-46, Pccs-47, Pccs-50, Pccs-59, および Pccs-60)の間の総当たりによる組合せで2培養菌株間の対じ培養を行った。培養開始1ヶ月後に、2菌株のコロニーが接触している部分の菌糸を光学顕微鏡で観察し2核菌糸が認められた場合を和合性交配、2核菌糸が認められない場合を不和合性交配とした。コロニー接触部では、菌糸融合が観察され、特に異なる菌株間では菌糸橋の形態で菌糸融合が観察された。同一菌株間では、2核菌糸が全く認められなかった。一方、異なる菌株間では、全組合せの90.5%で2核菌糸を生じた。1株菌糸に比べて、2核菌糸は菌糸幅が広く、1細胞あたりの長さが短かった。

Pccs-8, Pccs-32, Pccs-45 および Pccs-59 の4菌株間の交配反応において、Pccs-8は他の3菌株との組合せですべて不和合を示した。これより、これら4菌株の交配系が二極性であれば、すべて同じ交配型を有する事になり、その他の交配組合せもすべて不和合を示し、和合の組合せは存在しないはずである。しかしながら本実験では、Pccs-32×Pccs-59 および Pccs-45×Pccs-59 で和合が確認された。したがって、本菌が二極性交配系を有することは考えられず、本菌の交配系が四極性であることを示している。これより15菌株の交配型を四極性で説明することができ、また、本菌の交配系は多数の交配型を有することから multiple-allelomorphic 四極性であると結論した。

本実験で培養菌株による交配系の解明がさび菌においても可能であることを示すことができた。この培養菌株による試験法は、今後他のさび菌の交配系を調査するためにも有効である。

## 審 査 の 要 旨

現在まで、さび菌の交配に関する研究はすべて寄生植物上で行われてきたが、特に交配系に関する厳密な実験は1例に過ぎない。これはさび菌が絶対寄生菌であるため交配系の解明に不可欠な単相世代で、かつ同一遺伝形質を有する多数の個体を寄生植物上に形成させることが極めて困難であるためである。

本研究では他の担子菌類で行われている培養菌株を用いての交配系解明を試みるため、第一の難関であるさび菌の単相世代からの人口培養菌株の確立およびその増殖に成功し、且つ培養菌株を用いて交配系の解明が出来たことは極めて高く評価される。

本研究の成果は著者の研究に対する発想、実行力、技術力等によるもので、この成果は今後のさび菌類の単相世代からの人工培養菌株の確立および交配系の解明に大きく貢献すると断言できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。