

北海道内で分離したアルファルファ萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*) の菌糸和合群による群別

宮川 栄一¹⁾・増田 年也¹⁾・佐藤 基¹⁾
松島 得雄²⁾・竹原 利明³⁾・岡本 英竜¹⁾

Vegetative Compatibility Groups Determined in *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* Isolated in Hokkaido

Eiichi MIYAGAWA, Toshiya MASUDA, Motoki SATO, Tokuo MATSUSHIMA,
Toshiaki TAKEHARA and Eiryu OKAMOTO
(June 1999)

I. 緒 言

アルファルファは、多年生のマメ科牧草で良質の蛋白質に富み、家畜の嗜好性も高く、北海道における作付け面積は、現在までに1万haを超えている²²⁾。しかし、混播草地では3~4年で立ち枯れ現象による草地衰退化が見られる。その主要な原因の一つとして、アルファルファ萎凋病がある^{12,13,20,26)}。

本病の原因菌であるアルファルファ萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*) の同定は、主として形態と作物に対する病原性の違い (分化型) に基づいている。しかし、形態で分化型や非病原菌株を区別することは困難である。また、分化型の決定には植物に対する感染試験を行わなければならないが、多くの手間と時間(数カ月)を要する¹⁴⁾。しかも、菌の接種方法、宿主作物の生育ステージ、及び温度などの環境条件により結果が左右されやすい³⁾。

Puhalla¹⁷⁾ は *nit* 変異株 (nitrate-nonutilizing mutant, 硝酸塩利用能欠損変異株) を用いた菌糸和合群 (Vegetative Compatibility Group: VCG) が *Fusarium oxysporum* の分化型を区別するのに有効な手法である事を報告した。それ以降、多くの研究者がこの方法を検討し、VCGが分化型の決定に有効であることを確認してきている。VCGは、ある病原菌の遺伝的多様性を明らかにできるばかりでなく、病原菌株と非病原菌株を区別するのにも役立つ事が

知られてきている^{10,15,24)}。

松島¹⁵⁾ は江別から分離したアルファルファ萎凋病菌を用いて、VCGの調査を行いA~Fの5群に群別した。今回は道内3地域に調査を広げ、アルファルファ萎凋病から本菌を分離し、*nit* 変異株を作出し、それらを用いたVCGについて検討した。

II. 材料および方法

1. *nit* 変異菌株の作出

罹病アルファルファの根部褐変部より分離・同定したアルファルファ萎凋病菌16菌株を使用した (Table 1)。これら菌株は、北海道内の八雲町、清水町、名寄市の道内3地域におけるアルファルファ栽培圃場から分離したものである²¹⁾。16菌株について、Puhalla¹⁷⁾ の方法に準じて、*nit* 変異菌株の作出を行った。MMC (minimal medium with chlorate) はPDC (potato dextrose medium with chlorate) に比べ、*nit* 変異菌株が得られやすかった¹⁵⁾ ので、本実験では *nit* 変異菌株作出用培地として、MMC培地^{3,15,17,24)} を使用した。

PSA (potato sucrose agar) 斜面培地で25℃、4日間培養した野生菌株の菌叢切片 (径2~3mm) 40個を、ペトリ皿に分注したMMC培地に置き、25℃で培養した。7~10日後に生育してきた菌叢をPSA斜面培地に移植した。得られた菌株から菌叢切片をMM (minimal medium) 平板培地^{17,18)} に置床 (25℃、4日間) し、塩素酸塩耐性の薄い菌叢を形成

¹⁾ 酪農学園大学酪農学科, 農業微生物

Department of Dairy Science, Agricultural Microbiology, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

²⁾ SSE スラリーシステムエンジニアリング株式会社

Slurry System Engineering Co, Ltd., Sapporo, 060-0909, Japan

³⁾ 農林水産省農業研究センター, 病害虫防除部畑病害研究室

Upland Crop Disease Laboratory, Department of Plant Protection, National Agriculture Research Center, Tsukuba, Ibaraki, 305-8666, Japan

Table 1 Location of wild type strains, and frequency and phenotype of their *nit*-mutant recovered from MMC medium.

| Wild type strains | Location | <i>Nit</i> recovery(%) | Phenotypes of <i>nit</i> -mutant | | |
|-------------------|----------|---------------------------|----------------------------------|--------------|------|
| | | | <i>nit</i> 1 | <i>nit</i> 3 | NitM |
| YKA23 | Yakumo | 12.5 | 3 | 1 | 1 |
| YKA24 | | 22.5 | 5 | 1 | 3 |
| YKB22 | | 20 | 1 | 4 | 3 |
| YTC11 | | 15 | 4 | 1 | 1 |
| YTC21 | | 30 | 6 | 2 | 4 |
| SMC21 | Shimizu | 30 | 8 | 3 | 1 |
| SME31 | | 35 | 10 | 2 | 2 |
| SNA12 | | 45 | 14 | 2 | 1 |
| SNB21 | | 40 | 11 | 1 | 4 |
| SOC11 | | 32.5 | 8 | 3 | 2 |
| STA22 | | 45 | 9 | 3 | 6 |
| NAE21 | | Nayoro | 17.5 | 3 | 2 |
| NHD21 | 35 | | 12 | 1 | 1 |
| NHE22a | 30 | | 6 | 3 | 3 |
| NHYC11 | 2.5 | | — | — | 1 |
| NKB11 | 2.5 | | 1 | — | — |

したものを *nit* 変異菌株とした。*nit* 変異菌株の保存には PSA 斜面培地を用いた。

2. *nit* 変異菌株の表現型の類別

nit 変異菌株は硝酸塩、亜硝酸塩、ヒポキサンチン、アンモニウム塩、尿酸の5種類の窒素源利用能により3種の表現型 (*nit* 1, *nit* 3, NitM) に分類した³⁾。これら5種類の培地(ペトリ皿中)に *nit* 変異菌株の菌叢切片を置いて3~4日後にそれぞれの培地上での生育を調査し、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 とした。

3. 菌糸和合試験

同一の親株(野生菌株)から得られた *nit* 変異菌株同士を MM 平板培地上で 2~3 cm 離して対峙培

Table 2 Complementary pairing strains of *nit* mutants used in this study.

| Strains | Location | Complementary Pairing Strains (phenotype) | Maker of <i>nit</i> mutants |
|--|---|---|---|
| <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>medicagenes</i> | Yakumo | | |
| YKA23 | | YKA23-11 (NitM), YKA23-23 (<i>nit</i> 1), YKA23-33 (<i>nit</i> 3) | Masuda |
| YKA24 | | YKA24-38 (<i>nit</i> 3), YKA24-8 (NitM), YKA24-9 (<i>nit</i> 1) | |
| YKB22 | | YKB22-3 (NitM), YKB22-5 (NitM), YKB22-21 (<i>nit</i> 1), YKB22-14 (<i>nit</i> 3) | |
| YTC11 | | YTC11-6 (NitM), YTC11-20 (<i>nit</i> 3), YTC11-21 (<i>nit</i> 1) | |
| YTC21 | | YTC21-8 (<i>nit</i> 3), YTC21-22 (<i>nit</i> 1), YTC21-33 (NitM), YTC21-34 (NitM) | |
| SMC21 | Shimizu | SMC21-13 (NitM), SMC21-35 (<i>nit</i> 3), SMC21-36 (<i>nit</i> 3), SMC21-38 (<i>nit</i> 3) | |
| SME31 | | SME31-1 (NitM), SME31-15 (NitM), SME31-23 (<i>nit</i> 3), SME31-40 (<i>nit</i> 1) | |
| SNB21 | | SNB21-16 (NitM), SNB21-25 (NitM), SNB21-34 (<i>nit</i> 1) | |
| STA22 | | STA22-10 (NitM), STA22-11 (NitM), STA22-17 (NitM) | |
| NAE21 | | Nayoro | NAE21-6 (NitM), NAE21-20 (<i>nit</i> 1), NAE21-31 (NitM) |
| NHD21 | NHD21-14 (<i>nit</i> 3), NHD21-21 (<i>nit</i> 1), NHD21-36 (NitM) | | |
| NHE22 | NHE22a-34 (NitM), NHE22a-35 (NitM) | | |
| NHYC11 | NHYC11-20 (NitM) | | |
| NKB11 | NKB11-40 (<i>nit</i> 1) | | |
| C-2-1 | Ebetsu | | C-2-1-3 (<i>nit</i> 3), C-2-1-4 (NitM), C-2-1-13 (NitM), C-2-1-A (<i>nit</i> 1) |
| D-1-2 | | D-1-2-6 (<i>nit</i> 1), D-1-2-7 (<i>nit</i> 3) | |
| D-6-2 | | D-6-2-1 (<i>nit</i> 3), D-6-2-2 (<i>nit</i> 1), D-6-2-15 (NitM) | |
| E-4-2 | | E-4-2-4 (<i>nit</i> 1), E-4-2-15 (<i>nit</i> 3), E-4-2-16 (NitM), E-4-2-C1 (NitM) | |
| F-4-2 | | F-4-2-1 (<i>nit</i> 3), F-4-2-6 (<i>nit</i> 1), F-4-2-12 (NitM), F-4-2-15 (<i>nit</i> 1) | |
| P-1-1 | | P-1-1-7 (<i>nit</i> 3), P-1-1-11 (NitM), P-1-1-14 (<i>nit</i> 1) | |
| 18 | | Chitose | 18-2 (NitM), 18-3 (<i>nit</i> 1), 18-12 (<i>nit</i> 3), 18-19 (<i>nit</i> 1) |
| ATCC 46587 | USA (North Carolina) | 24 (NitM), 25 (NitM), 26 (<i>nit</i> 1) | |
| ATCC 52168 | USA (Minnesota) | 28 (NitM), 13 (<i>nit</i> 1), 32 (<i>nit</i> 3) | |
| ATCC 52169 | USA (Pennsylvania) | 7 (NitM), 6 (NitM), 19 (NitM), 23 (<i>nit</i> 3) | |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i> | | Ba-N1 (<i>nit</i> 1), Ba-N13 (NitM) | Takehara |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> | | Cu-N9 (<i>nit</i> 3), Cu-N11 (NitM), CU-N14 (NitM) | |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lagenariae</i> | | La-N11 (NitM), La-N13 (NitM) | |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (race 1) | | L1-N29 (<i>nit</i> 1), L1-N30 (NitM) | |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (race 2) | | L2-N10 (<i>nit</i> 1), L2-N11 (NitM) | |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> | | Ni-N5 (<i>nit</i> 1), Ni-N9 (<i>nit</i> 1), Ni-N4 (NitM) | |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> | | Ra-N14 (NitM), Ra-N24 (NitM) | |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> | | RL-N9 (NitM), RL-N11 (<i>nit</i> 1), RL-N14 (NitM), RL-N16 (<i>nit</i> 1) | |
| <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i> | | Sp-N2 (<i>nit</i> 1), Sp-N3 (NitM), Sp-N5 (<i>nit</i> 3) | |
| <i>F. oxysporum</i> S-52 (non-pathogenic strain) | | <i>nit</i> 1, <i>nit</i> 3 | |

養することにより相補性を調べた。相補性の指標となるヘテロカリオン（異核接合体）の形成は25℃で通常7～10日間培養する事により形成される^{3,17,25)}。しかし、菌株によっては3週間を要する場合がある¹⁵⁾ため、本実験では培養期間を4週間とし、2つの菌叢の接触した部位で旺盛な菌糸生育（補完反応）が現れる *nit* 変異菌株の組み合わせを選択した。

ついで、これら *nit* 変異菌株、及び江別市分離株：6株、ATCC由来参照株：3株、strain 18（農林水産省草地試験場 島貫忠幸氏より分与）、*F. oxysporum* f. sp. *batatus*（サツマイモつる割病菌）、*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*（キュウリつる割病菌）、*F. oxysporum* f. sp. *lagenariae*（ユウガオつる割病菌）、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*（トマト萎凋病菌）レース1、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* レース2、*F. oxysporum* f. sp. *niveum*（スイカつる割病菌）、*F. oxysporum* f. sp. *raphani*（ダイコン萎黄病菌）、*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*（トマト根腐萎凋病菌）、*F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*（ハウレンソウ萎凋病菌）、非病原性 *F. oxysporum* S-52 からそれぞれ作出された *nit* 変異菌株との間で菌糸和合試験を行った（Table 2）。アルファルファ萎凋病菌において補完反応が見られた場合、これらの親株を同じVCGとした。補完反応が見られない場合は、異なるVCGとした。

III. 結果および考察

1. *nit* 変異菌株の作出

今回供試した全ての菌株で *nit* 変異菌株が作出された（Table 1）。しかし、*nit* 変異菌株の出現率は菌株により異なった。MMC培地を用いた *nit* 変異菌株への変異率は供試16菌株中、14菌株においては12.5～45.0%であり、容易に作出することができた。しかし、名寄市から分離したNHYC11、NKB11においては2.5%であった。

2. *nit* 変異菌株の表現型の類別

作出されたすべての *nit* 変異菌株（165菌株）のうち *nit 1*、*nit 3*、NitMのそれぞれの出現率は61.2%、17.6%、21.2%であった（Table 1）。NHYC11、NKB11を除くすべての菌株で3種類の表現型が見られた。先にCorrellら³⁾は、*F. oxysporum*の種々の分化型の菌株から作出された *nit* 変異菌株の多くは *nit 1* であったと報告しているが、本研究においても同じ結果が得られた。

SNA 12株より、*nit 1*、*nit 3*、NitMのいずれの表現型にも該当しない *nit* 変異菌株 SNA 12-18（室

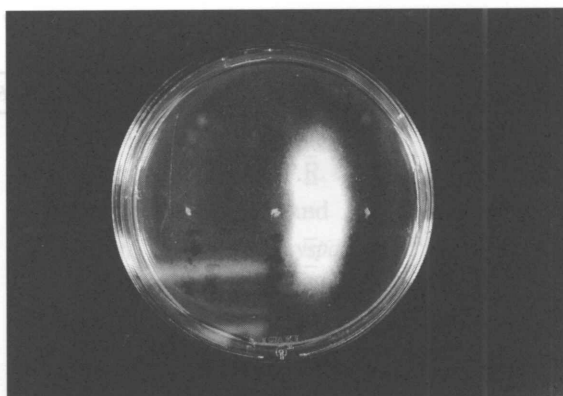


Fig. 1 Strong heterokaryon formed by vegetative compatibility between two strains (right). Heterokaryon was not formed by vegetative compatibility (left).

素源としてアンモニウム塩の添加された培地でのみ菌叢の生育の見られた)が作出された。

3. 菌糸和合性試験

同一親株から得られた3種類の表現型間で菌糸和合試験を行ったところ、清水町より分離したSNA 12とSOC 11以外は、両菌叢の接した部分で濃い菌叢を生じる強い補完反応を示した（Fig 1）。なお、SNA 12、SOC 11においては、同一菌株から得られた *nit* 変異菌株同士でも補完反応が現れない自己不和合性⁷⁾の菌株であった。

今回作出したアルファルファ萎凋病菌の *nit* 変異菌株が他の分化型の *F. oxysporum* と菌糸融合するかを調べたが、異なる分化型の *nit* 変異菌株とは補完反応を示さなかった（Table 3）。

アルファルファ萎凋病菌において、異なる親株由来の *nit* 変異菌株間での菌糸和合試験を行った。NAE 21-6 (NitM)、NAE 21-31 (NitM)、YKA 23-23 (*nit 1*)、YKA 23-33 (*nit 3*) が P-1-1-11 (NitM) と補完反応を示した。YKA 23-11 (NitM) が P-1-1-7 (*nit 3*)、P-1-1-14 (*nit 1*) と補完反応を示した。NAE 21-6 (NitM) と YKA 23-11 (NitM)、YKA-23-23 (*nit 1*)、YKA 23-33 (*nit 3*) との間に、及び NAE 21-20 (*nit 1*) と YKA 23-11 (NitM) との間で補完反応が見られた。以上の結果から、名寄市由来の NAE 21 と八雲町由来の YKA 23 は、松島¹⁵⁾の仮称するVCG-Fに属した。

SMC 21-35 (*nit 3*)、SMC 21-36 (*nit 3*)、SMC 21-38 (*nit 3*) と NHE 22 a-34 (NitM) との間に、また、SMC 21-13 (NitM) と NHE 22 a-35 (NitM) との間に補完反応が見られた。これらの結果から、清水町由来の SMC 21 と名寄市由来の NHE 22 a

Table 3 Vegetative compatibility tests between *nit* mutants of each forma specialis of *F. oxysporum* based on complementation reaction.

| | <i>F. o. m.</i> | <i>F. o. b.</i> | <i>F. o. c.</i> | <i>F. o. la.</i> | <i>F. o. ly.</i> (race 1) | <i>F. o. ly.</i> (race 2) | <i>F. o. n.</i> | <i>F. o. r.</i> | <i>F. o. r.-l.</i> | <i>F. o. s.</i> | <i>F. o. S-52</i> |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| <i>F. o. medicaginis</i> | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>F. o. batatas</i> | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>F. o. cucumerinum</i> | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>F. o. lagenariae</i> | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>F. o. lycopersici</i> (race 1) | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>F. o. lycopersici</i> (race 2) | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| <i>F. o. niveum</i> | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| <i>F. o. raphani</i> | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| <i>F. o. radialis-lycopersici</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>F. o. spinaciae</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| <i>F. oxysporum</i> S-52 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

+ : Strong complementation - : No complementation

をVCG-Hとした。また、NKB 11-40(*nit 1*)とYKB 22-3(NitM), YKB 22-5(NitM), YKB 22-14(*nit 3*)との間に補完反応が見られた。これらの結果から、八雲町由来のYKB 22と名寄市由来のNKB 11をVCG-Gとした。しかし、その他のYKA 24, YTC 11, YTC 21, SME 31, SNB 21, STA 22, NHD 21, NHYC 11から作出された*nit*変異菌株はいずれの*nit*変異菌株とも補完反応を示さなかった。そこで、これらの菌株をそれぞれ異なるVCGとした。以上の結果から菌系和合群を整理したのがTable 4である。

菌系和合性は*het*または*vic*という複数の遺伝子座によって支配されており、二つの菌株の遺伝子がすべての*vic*遺伝子座で同一の場合のみ菌系和合性を持つ²³⁾。*F. moniliform*では10個の*vic*遺伝子座が知られており、理論上は少なくとも2¹⁰個のVCGが存在することになる¹⁹⁾。菌株間の相補性はこの様

Table 4 Vegetative compatibility groups of *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*.

| VCGs ¹⁾ | Strains |
|--------------------|---------------------------------|
| A | ATCC46587, ATCC52168, ATCC52169 |
| B | 18, E-4-2 |
| C | C-2-1 |
| D | D-1-2 |
| E | D-6-2, F-4-2 |
| F | P-1-1, NAE21, YKA23 |
| G | YKB22, NKB11 |
| H | SMC21, NHE22a |
| I | YKA24 |
| J | YTC11 |
| K | YTC21 |
| L | SME31 |
| M | SNB21 |
| N | STA22 |
| O | NHD21 |
| P | NHYC11 |

1) Vegetative compatibility groups; Alphabetical letters denote a VCG designated in this study.

に同じ遺伝子の対立遺伝子により決定されるため、*nit*変異株を用いたVCGによる病原性糸状菌の群別は、研究者の主観が入る余地のない群別法である。本法は分化型やレースの遺伝的多様性及び病原性分化の解明に有効であり、未知の分離株の分化型レベルまでの同定への応用、病原菌の生態的研究への応用などが試みられている^{15,25)}。

*F. oxysporum*の各分化型のレースとVCGとの関係はセルリー萎黄病菌(*f. sp. api*)²⁾、ワタ萎凋病菌(*f. sp. vasinfectum*)⁹⁾、ダイコン萎黄病菌(*f. sp. raphani*)^{1,2)}、スイカつる割病菌(*f. sp. niveum*)^{2,11)}、カーネーション萎凋病菌(*f. sp. dianthi*)⁸⁾のように一つのレースにただ一つ、あるいはせいぜい数種の単純なVCG構成を持つものと、エンドウ萎凋病菌(*f. sp. pisi*)⁴⁾、メロンつる割病菌(*f. sp. melonis*)⁷⁾、バナナ萎凋病菌(*f. sp. cubense*)¹⁶⁾、トマト萎凋病菌(*f. sp. lycopersici*)^{2,5)}、アスパラガス立枯病菌(*f. sp. asparagi*)²⁾のように一つのレースに多数のVCGを持つ複雑なVCG構成を持つものがあることが報告されている。

今回の成績において、ATCC株は供試した日本由来の菌株とは異なるVCGに属した。また、分離地域の違いにも関わらず同じVCGを形成するものが存在した事や、同じ地域より分離したものがそれぞれ異なるVCGを形成したことから、VCGと地域との関連は認められなかった。アスパラガス立枯病菌⁶⁾、アズキ萎凋病菌(*f. sp. adzukiicola*)¹⁰⁾においてもVCGと地域との関連は認められない事が報告されている。本菌のVCGは、松島¹⁵⁾提案のA~Fに加え、新たにG~Pが加わり16群に群別された(Table 4)。現在のところレースの存在は報告されていないが、これらの結果から本菌は複数のVCGが存在する多様な遺伝子構造を持つ菌であることが明らかになった。

IV. 要 約

北海道内三地域（八雲町，清水町，名寄市）の罹病アルファルファから分離・同定したアルファルファ萎凋病菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*）16菌株から塩素酸塩を含む培地上で硝酸塩利用能欠損変異菌株（*nit* 変異菌株）の作出を試みた。その結果，供試した全ての菌株から *nit* 変異菌株が作出された。得られた *nit* 変異菌株は硝酸塩，亜硝酸塩，ヒポキサンチン，アンモニウム塩，および尿酸の5種の窒素源利用能により *nit 1*，*nit 3*，*NitM*の表現型に分類された。*nit* 変異菌株の出現頻度や各表現型の出現比率は菌株により異なった。これら *nit* 変異菌株について各種分化型および非病原株の *nit* 変異菌株と最少培地（MM 平板培地）上での対峙培養により菌糸和合性を調べた結果，補完反応が認められなかった。他の地域から分離された *nit* 変異菌株を併せて菌糸和合試験を行ったところ，アルファルファ萎凋病菌は16の菌糸和合群に群別され，本菌が多様な遺伝構造を持つことがあきらかになった。

V. 引用文献

- 1) Bosland, P.W. and P.H. Williams, 1987. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Can. J. Bot.* 65: 2067-2073.
- 2) Correll, J.C. 1991. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 1061-1064.
- 3) Correll, J.C., C.J.R. Klittich and J.F. Leslie, 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77: 1640-1646.
- 4) Correll, J.C., J.E. Puhalla, R.W. Schneider and J.M. Kraft, 1985. Differentiating races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* based on vegetative compatibility. *Phytopathology* 75: 1347 (abstract).
- 5) Elias, K.S. and R.W. Schneider, 1991. Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 81: 159-162.
- 6) Elmer, W.H. and C.T. Stephens, 1989. Classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* into vegetatively compatible groups. *Phytopathology* 79: 88-93.
- 7) Jacobson, D.J. and T.R. Gordon 1988. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 78: 668-672.
- 8) Katan, T., E. Hadar and J. Katan, 1989. Vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation in Israel. *Plant Pathol.* 38: 376-381.
- 9) Katan, T. and J. Katan, 1988. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. *Phytopathology* 78: 852-855.
- 10) Kondo N., F. Kodama and A. Ogoshi, 1997. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukiicola* and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* on adzuki bean isolated from adzuki bean fields in Hokkaido. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 8-12.
- 11) Larkin, R.P., D.L. Hopkins and F.N. Martin, 1990. Vegetative compatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and its relationship to virulence, aggressiveness, and race. *Can. J. Microbiol.*, 36: 352-358.
- 12) Leath, K.T. and A.A. Hower, 1993. Interaction of *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* with feeding activity of clover root curculio larvae in alfalfa. *Plant Dis.* 77: 799-802.
- 13) 松井幸夫, 1993. '90年代の酪農技術, pp. 23-29, 酪農学園エクステンションセンター, 江別.
- 14) 松尾卓見, 駒田 旦, 松田 明, 1980. 作物のフザリウム病, pp. 1-502, 全国農村教育協会, 東京.
- 15) 松島得雄, 1996. アルファルファ萎凋病菌の群別, 酪農学園大学博士論文, 江別.
- 16) Ploetz, R.C. and J.C. Correll, 1988. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubens*. *Plant Dis.* 72: 325-328.
- 17) Puhalla, J.E., 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63: 179-183.
- 18) Puhalla, J.E. and M. Hummel, 1983. Vegeta-

- tive compatibility groups within *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 73: 1305-1308.
- 19) Puhalla, J.E. and P.T. Spieth, 1983. Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*. *Exp. Mycol.*, 7: 328-335.
- 20) Salter, R., J.E. Miller-Garvin, and D.R. Viands. 1994. Breeding for resistance to alfalfa root rot caused by *Fusarium* species. *Crop Sci.* 34: 1213-1217.
- 21) 佐藤 基, 1997. 北海道で分離したアルファルファ萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*) の DNA 多型解析, 酪農学園大学修士論文, 江別.
- 22) 鈴木信治, 1992. マメ科牧草 アルファルファ (ルーサン) —その品種・栽培・利用, pp. 30-32, 雪印種苗株式会社, 札幌.
- 23) 竹原利明, 1992. 糸状菌における *nit* 変異株の作出と利用, *植物防疫*; 46: 395-399.
- 24) 竹原利明, 國安克人, 1994. *nit* 変異菌株を用いたフザリウム病の発生生態の解明 I. *Fusarium oxysporum* の各分化型の *nit* 変異菌株の作成, *日植病報*; 60: 699-704.
- 25) Takehara, T. and K. Kuniyasu, 1995. Use of nitrate nonutilizing mutants in ecological studies of *Fusarium* disease. III. Growth, benomyl sensitivity, pathogenicity, and stability of *nit* mutants of *Fusarium oxysporum* compared to wild-type strains. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, 61: 541-548.
- 26) Uddin, W. and T.R. Knous, 1991. *Fusarium* species associated with crown rot of alfalfa in Nevada. *Plant Dis.*, 75: 51-56.

Summary

Nitrate-nonutilizing mutants (*nit* mutants) of 16 strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* (*F. o. medicaginis*) were isolated from wilt-infested alfalfa in three geographical regions of Hokkaido: Yakumo, Shimizu, and Nayoro. The *nit* mutants were formed on media containing chlorate and assigned to one of three phenotypic classes, i. e., *nit 1*, *nit 3* and NitM, on the basis of their growth on media containing one of five nitrogen sources: nitrate, nitrite, hypoxanthine, ammonium and uric acid. Frequency of the *nit* mutations and their distribution by phenotype depended on the strain of *F. o. medicaginis* from which they had been isolated. Vegetative compatibility was tested by complementation reaction between the *nit* mutants on minimal medium. Results showed that each strain of *F. o. medicaginis* belongs to a vegetative compatibility group (VCG) different from that of eight formae speciales and a non-pathogenic strain. In addition, the isolates of *F. o. medicaginis* were found to belong to 16 different VCGs. These results show that a wide range of VCGs are represented by the *F. o. medicaginis* in Hokkaido, thus leading us to suspect that *F. o. medicaginis* throughout Japan would be dispersed among numerous vegetative compatibility groups.