

氏 名(本籍) まえ 前 かわ 川 かず 和 まさ 正

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 660 号

学位授与年月日 平 成 15 年 3 月 6 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 ケイ酸施用によるイネ苗いもちの発病抑制に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 三 枝 正 彦
教 授 前 忠 彦
教 授 羽 柴 輝 良

論文内容要旨

第1章 緒論

ケイ素は植物の必須元素ではないが、植物の種類によっては生育に有益な効果が認められるため、有用元素として位置づけられている。イネは代表的なケイ酸集積植物であり、本田において 950kg ha^{-1} のケイ酸を吸収し、葉身のケイ酸含有量は 200g kg^{-1} を越える場合もある。ケイ酸をイネに施用すると、光合成を促進し、乾物生産・根の活性・耐倒伏性などが向上すると同時に、病害や虫害に対する抵抗性も強化されることが知られている。

イネ病害に対する軽減効果については、いもち病、紋枯病、ごま葉枯病、小粒菌核病、葉鞘褐変病などで報告されている。いもち病に対する発病抑制効果は、本田における葉および穂いもちに対して古くから知られていた。

近年、良食味ではあるがいもち病罹病性品種の作付け増加、箱育苗が発病に好適であること、さらに育苗管理の不備などのため、苗いもちが多発する傾向にある。苗いもちには本田でのいもち病の主要な感染源となる恐れがあるため、その防除を徹底する必要がある。しかし、苗いもちに対しては最近までケイ酸の抑制効果がそれほど認識されていなかった。

また、ケイ酸のいもち病抑制の作用機作については、吸収されたケイ酸が葉身、籾殻等の蒸散流の末端に移動し、濃縮され、機動細胞などの表皮細胞に蓄積し、いもち病菌の菌糸の侵入を物理的に阻止することが主要な要因とされている。しかし、ケイ酸を施用しても窒素を多施用すると発病が増加すること、イネを遮光処理するとケイ化細胞数は減少するが、葉いもちの発生が抑制されることなどから、ケイ化細胞による物理的な侵入阻止以外の機作も存在することが予想された。

以上の背景と知見に基づき、本研究では、1. 各種ケイ酸資材の中からイネ苗いもちの発病抑制に有効な資材を選抜した。2. ケイ酸カリウム溶液の育苗培土灌注による実用的な苗いもちの発病抑制方法を確立した。3. 葉身内および培地中の水溶性ケイ酸濃度を変化させ、いもち病斑形成および菌糸伸長抑制におよぼす影響について考察した。4. いもち病菌接種時のイネにおいて、ケイ酸による活性酸素の生成助長について検討を行った。5. いもち病菌侵入時のイネ表皮上でのケイ素の蓄積部位について、観察・分析した。

第2章 イネ苗いもちの発病抑制に対する有効なケイ酸資材の検索

第1節 有効なケイ酸資材の検索

ケイ酸資材はその種類が豊富で、剤型、副成分、含有するケイ酸化合物の分子構造、pH、植物体への吸収などに資材間で差異がある。そこで、各種ケイ酸資材を育苗箱に施用することにより、イネ苗いもちの発病抑制に対する有効ケイ酸資材をいもち病菌噴霧接種法で検索した。

5種類の資材を比較したところ、育苗箱(58 × 28 × 3cm)当たりシリカゲル250g(以下いずれも箱当たりケイ酸成分)の床土混和处理、試薬のケイ酸カリウム溶液(以下ケイ酸カリ試薬とする)3gの灌注処理は、苗いもちの病斑抑制効果が高かった(第1図)。地上部のケイ酸含有量は無施用イネの17g kg⁻¹に対して、シリカゲル250g施用で76g kg⁻¹(無施用に対し4.5倍)、ケイ酸カリ試薬3g施用で39g kg⁻¹(同2.3倍)で、ケイ酸カリ試薬の施用によりケイ酸含有量が比較的低くても、病斑抑制効果が高いことを明らかにした(第2図)。

第2節 有効資材の施用量試験

前節の実験において有効であった2剤の施用量と発病抑制程度との関係を高濃度のいもち病菌噴霧接種法で検討したところ、苗いもちの病斑面積率をシリカゲル200g、250g/育苗箱で無施用区の約10%に、ケイ酸カリ試薬12g(ケイ酸成分)で、無施用の12.7%に抑制した。これらの施用は強烈な発病条件下においても、殺菌剤にほぼ匹敵する高い抑制効果を有することを明らかにした(第3図)。

第3章 ケイ酸カリウム溶液の育苗培土灌注によるイネ苗いもちの発病抑制

第1節 ケイ酸カリ試薬とシリカゲルの効果特性比較

前章においてシリカゲル肥料の250g/育苗箱の施用が苗いもち抑制効果が高いことを明らかにしたが、シリカゲルの価格が現時点では高いことと、床土に均一に混和する労力が問題である。そこで、ケイ酸カリ試薬の抑制効果に着目し、シリカゲルと詳細に比較、検討した。この試験では、いもち病菌感染種子を用いて自然発生条件により近い条件で試験を行った。試薬の10g(ケイ酸成分)/育苗箱の培土灌注処理は、種子伝染によって生じる苗いもち立枯れ症状、および立枯れ症状から二次感染で生じるいもち病斑の両症状に対し、高い抑制効果が認められた。一方、シリカゲルの250g/育苗箱の床土混和处理は、病斑抑制効果は高かったが、立枯れ症状を抑制する効果は認められなかった(第4、5図)。以上の結果より、ケイ酸カリ試薬は苗いもちの2種類の病徴

に対し有効で、殺菌剤と同等の効果を有することが判明した。そしてその灌注時期と回数は、播種時の1回施用が適切であることを明らかにした。

第2節 有効な市販ケイ酸カリ液肥の検索

これまでの実験では試薬のケイ酸カリウム溶液を用いていたが、市販のケイ酸カリ液肥（以下、液肥とする）の中で、発病抑制効果の高いものを検索するため、いもち病菌噴霧接種法で試験を行った。無施用の苗いもち立枯れ苗率2.5%に対し、供試した3種類の液肥の5g（ケイ酸成分）／育苗箱の播種時、培土灌注処理の立枯れ苗率は0.0～0.2%と、試薬灌注区とほぼ同等の高い抑制効果があった（第6図）。いもち病斑に対しては、試薬以上の高い抑制効果を示した液肥Aが1種類あり、無施用の100本当たり病斑数は192個であるのに対し、液肥A灌注区の100本当たり病斑数は11.3個で、高い抑制効果が認められた（第7図、写真1{11P}）。また、地上部のケイ酸含有量は無施用イネの 25.8g kg^{-1} に対して、液肥Aを施用したイネは 42.1g kg^{-1} （無施用に対し1.63倍）、と最も高い値を示した（第8図）。いもち病菌感染種子を用いた試験で、液肥Aの育苗箱当たりケイ酸成分灌注量は、0.5～1.0gで立枯れ苗率を無施用の40%程度に発病抑制した。5.0gでは無施用の7%に抑制し、最も高い発病抑制効果が認められた（第1表）。以上の結果より、液肥Aの5.0g（ケイ酸成分）／育苗箱の灌注が実用的であることを明らかにした。

第3節 ケイ酸カリ液肥のpHが抑制効果、生育、土壌条件におよぼす影響

ケイ酸カリウム溶液は強アルカリ性であるので、灌注処理により培土のpHを上昇させたり、生育にも影響をおよぼす可能性がある。また、液肥のpHによって抑制効果に差が生じるかどうかについて調査するため、pHを下げた液肥Aの灌注効果を調べた。pHを5.0～10.4（pH無調整）に変えた液肥の5.6g（ケイ酸成分）／育苗箱を灌注すると、全pH区とも立枯れ症状および病斑に対して高い抑制効果が認められた（第2表）。床土のpHはケイ酸無施用区で5.0に対し、pH無調整の液肥pH10.4区では5.5とやや上昇したが、ムレ苗の発生が助長されるpHではなく、十分、許容範囲であった。pH無調整の液肥の灌注区でも苗丈、葉齢などの生育には影響は認められなかった（第2表）。以上の結果より、この程度の施用量では液肥のpHを下げなくても、土壌pH、生育に影響を与えないことが判明した。

第4章 ケイ酸施用によるイネ苗いもちの抑制機作

第1節 イネ葉いもちの発病抑制におよぼす水溶性ケイ酸の影響

ケイ酸が病害抵抗性を増強するためには、植物体内でケイ酸が水溶性の状態であることが必要であるとキュウリで報告されている。そこでケイ酸のいもち病抵抗性機作を解明するために、蒸散抑制処理によって水溶性ケイ酸含有量を変化させて、葉いもちの発病抑制程度を検討した。

蒸散抑制処理したケイ酸施用イネにいもち病菌を噴霧接種し、発生した病斑数を葉位別に調査した。接種時最上位であった第5葉では蒸散抑制の有無にかかわらず、1葉当たり病斑数は同等であった。第4葉では無処理区の2.56個/葉に対し、蒸散抑制区で1.66個/葉と減少し、第3葉では、無処理区で1.03個/葉に対し、蒸散抑制区で0.31個/葉と約3分の1に減少した(第9図)。第3葉の水溶性ケイ酸含有量は無処理区で 240mg kg^{-1} に対し、蒸散抑制区で 318mg kg^{-1} と蒸散抑制処理によって増加した(第10図)。

次に水溶性ケイ酸が、いもち病菌の生育に直接影響をおよぼすか否かを検討した。ケイ酸カリ試薬を用い、ケイ酸濃度0, 18, 240, 318mg L^{-1} 溶液を作り、寒天を加えて平板培地を作製した。いもち病菌を移植したところ、蒸散抑制により上昇した第3葉のケイ酸濃度である 318mg L^{-1} 区では、蒸散抑制処理をしない第3葉のケイ酸濃度である 240mg L^{-1} 区より、菌糸の進展が約3分の2に抑制された(第11図)。以上の結果より、 318mg L^{-1} の水溶性ケイ酸はいもち病菌の菌糸生育に対して直接的な抑制作用を有すると考えられた。このことは、葉身の水溶性ケイ酸の増加が病斑数の抑制に関与している可能性を示唆した。

第2節 いもち病菌接種時のイネにおけるケイ酸による活性酸素の生成助長

いもち病に対して、ケイ酸がイネの生理的な抵抗性を促進する可能性を有するかを探るため、植物の生理的抵抗性発現の引き金としての役割を持つ活性酸素の生成に対するケイ酸の影響について検討した。

ケイ酸カリ試薬を灌注して栽培したイネの葉身にウミホタルルシフェリン誘導体を添加したいもち病菌孢子懸濁液を接種し、倒立顕微鏡に装着した極微弱発光測定用ビデオカメラで微弱な発光を測定し、二次元フォトカウンティングシステムでスーパーオキシドアニオン(以下 O_2^-)の生成量を求めた。ケイ酸カリウム施用区ではいもち病菌接種後0~0.25hに、無施用区より有意に高いレベルの O_2^- 生成が認められ、ケイ酸の施用により O_2^- 生成が促進された。接

種後 0.25 h 以降には両区とも生成量は急減し、その後、ほぼ同等の O_2 生成量で推移した (第12図)。

病虫害などの環境ストレスを感知した植物組織が、急激に活性酸素を生成するという現象 (オキシダティブバースト) が知られている。オキシダティブバーストは、植物の感染生理的な防御反応において、病害抵抗性を誘導するシグナルとしての役割を持っている。

以上の結果より、接種直後のオキシダティブバーストが、ケイ酸の施用により促進されたことを明らかにし、ケイ酸の施用がイネにおいて物理的な抵抗性だけでなく、病原菌感染時の認識シグナルを増幅し、生理的な抵抗反応に関与している可能性を示した (第13図)。活性酸素は多様な病害抵抗機能を有するため、ケイ酸により生成助長された活性酸素が、防御反応経路のどの過程に特に関与しているのかを今後、究明する必要がある。

第3節 イネ葉身におけるいもち病菌侵入部位でのケイ素の蓄積

いもち病菌を接種したイネ葉身において、菌の感染部位でのケイ素の挙動を把握するため、前処理なしに生体試料を生のまま観察できる低真空走査電子顕微鏡 (以下 VP-SEM) とエネルギー分散型 X 線分析装置 (以下 EDX) を用いて観察・分析した。

まず、いもち病菌を接種していないイネの機動細胞を中心とした葉身の断面において、ケイ素は表皮に高密度で分布しており、葉肉細胞などは低密度であった (第14図)。接種 64 時間後の葉身表面を観察すると、いもち病菌の分生胞子が発芽して、先端に形成された付着器と呼ばれる侵入器官付近の表面にケイ素が高密度に集積していた。しかし、窒素、カリウム、マグネシウム、塩素、カルシウム等の元素は無接種の場合と同様に葉身表面にほぼ均一に分布していた (第15図)。

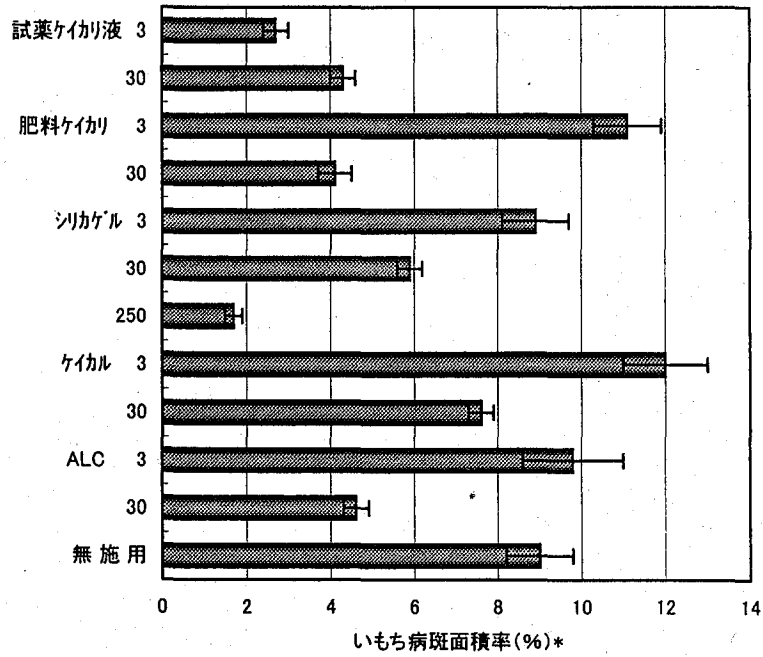
本実験で用いた VP-SEM は従来の SEM と異なり、前処理無しに水分を含んだ生体試料を分析できることが利点であり、前処理時に生じる元素の混入、移動、流失の等の障害を受けない。すなわち、イネ葉身上でいもち病菌の付着器付近にケイ素が集積することをより自然に近い条件で、初めて観察することができた。表皮細胞のアポプラスト領域に重合して蓄積したケイ素は再転流しないので、菌の感染を感知したイネの生理的抵抗反応の結果あるいは過程で、水溶性のケイ素が集積したと考えられる (第13図)。

総括

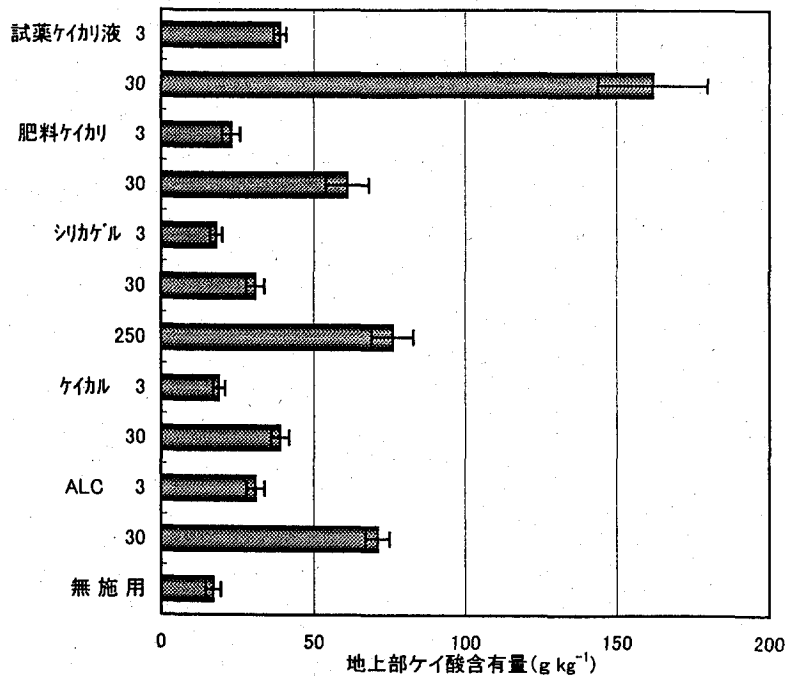
ケイ酸施用によるイネ苗いもちの発病抑制技術の開発と、発病抑制機作について検討を行い、以下の成果を得た。

1. 各種のケイ酸資材の育苗箱施用により、発病抑制効果について検討した結果、シリカゲルと試薬のケイ酸カリウム溶液が高い苗いもち病斑抑制効果を有していることを明らかにした。
2. ケイ酸カリウム溶液の培土灌注処理は、苗いもちの立枯れと病斑の2種類の症状に対し、殺菌剤の効果に匹敵する抑制効果を持つことを明らかにした。また、市販ケイ酸カリ液肥から有効な銘柄を選抜し、適切な灌注量・時期・回数は5g(ケイ酸成分)/育苗箱・播種時・1回であることを明らかにし、実用的なケイ酸カリ液肥の施用方法を確立した。
3. イネを蒸散抑制処理することで増加した葉身内の水溶性ケイ酸含有量と同濃度のケイ酸 318mg L^{-1} は、培地上でいもち病菌の菌糸生育を抑制することを明らかにし、葉身の水溶性ケイ酸の増加が病斑抑制に密接に関係している可能性を示唆した。
4. いもち病菌の感染初期のイネにおいて、活性酸素の生成をケイ酸が助長することを明らかにした。
5. 生体試料を前処理無しに観察できるVP-SEMとEDXを用い菌の感染部位でのケイ素の挙動を観察した結果、菌の感染に反応してケイ素がいもち病菌の付着器付近に集積することを明らかにした。

以上の結果をとりまとめると、農業生産現場においては、苗いもちに対して育苗箱へのケイ酸カリウム溶液の灌注が、殺菌剤の代替として有効な防除技術であることを明らかにした。ケイ酸の発病抑制機作に関しては、表皮細胞に沈積したケイ酸の物理的な菌糸侵入阻止作用が、最も主要な抑制機作であると思われる。しかし、それ以外に水溶性ケイ酸の持つ菌糸伸長抑制作用や、いもち病菌感染時の活性酸素助長などの作用も関与している可能性を明らかにした(第13図)。

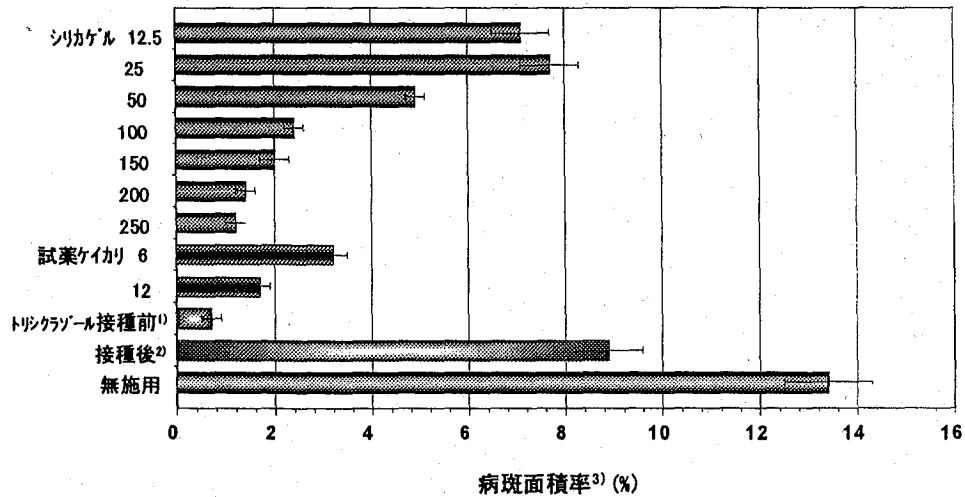


第1図 各種ケイ酸資材の育苗箱施用によるイネ苗いもちの病斑症状抑制効果
 資材名の後の数字はSiO₂としての育苗箱当たりの施用量(g)。いもち病菌噴霧接種法で発病させた。バーは標準偏差を示す。(以下同様)*接種時最上位葉におけるいもち病斑の占める面積率。



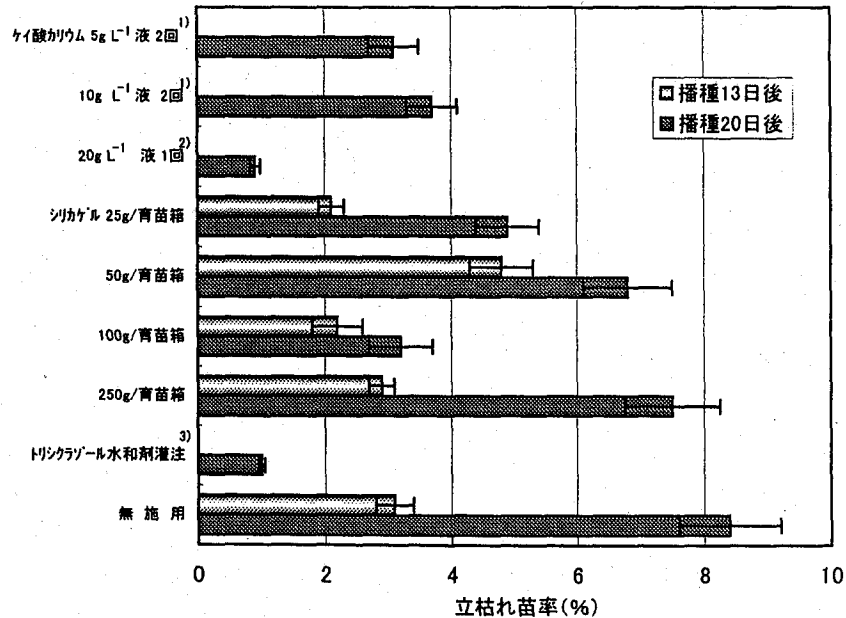
第2図 各種ケイ酸資材を育苗箱施用したイネの地上部ケイ酸含有量

資材名の後の数字はSiO₂としての育苗箱当たりの施用量(g)。播種15日後サンプリング。



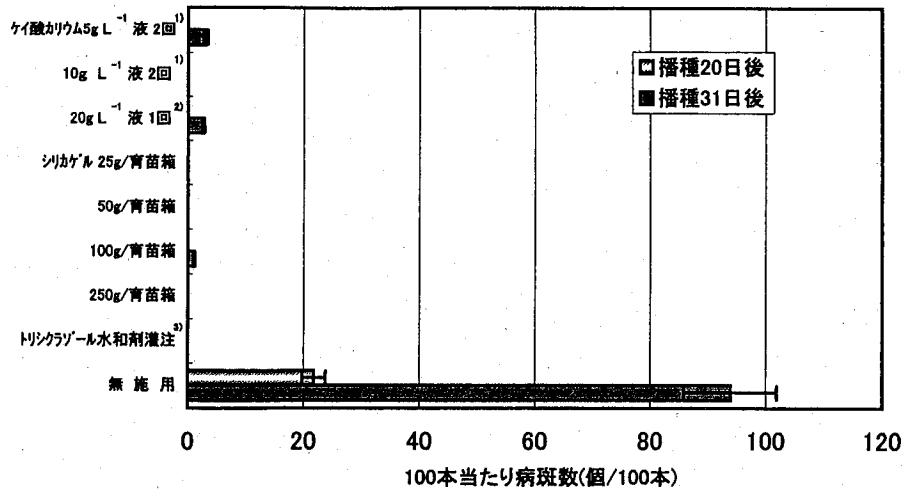
第3図 シリカゲル及びケイ酸カリウム溶液試薬施用によるイネ苗いもちの抑制効果

資材名の後の数字はSiO₂としての育苗箱当たりの施用量(g)。
いもち病菌噴霧接種法で発病させた。バーは標準偏差を示す。1) 接種当日灌注。2) 接種2日後灌注。3) 接種時最上葉におけるいもち病斑の占める面積率。



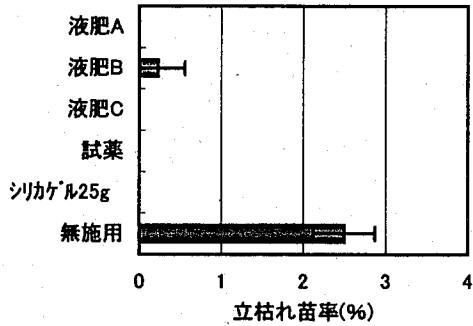
第4図 ケイ酸カリウム溶液試薬の育苗培土灌注による立枯れ症状苗いもちの抑制効果

いもち病菌保菌種子使用。ケイ酸カリウム溶液の濃度は1L当たりのSiO₂成分。灌注量は0.5L/育苗箱。1) 播種時と4日後灌注。2) 播種時灌注。3) 1000倍を播種7日後灌注。



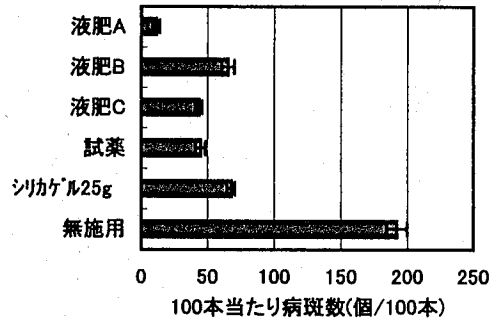
第5図 ケイ酸カリウム溶液試薬の育苗培土灌注によるいもち病斑の抑制効果

いもち病菌保菌種子使用. 1)播種時と4日後灌注. 2)播種時灌注.
3)1000倍を播種7日後灌注. 灌注量は0.5L/育苗箱.



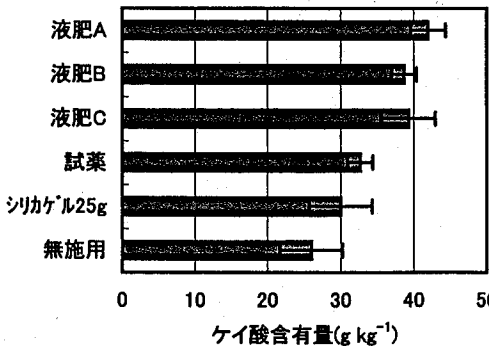
第6図 各種ケイ酸カリ液肥の育苗培土灌注による立枯れ症状苗いもちの抑制効果

いもち病菌噴霧接種法で検定. SiO₂成分として5g/育苗箱を播種時灌注. 播種7日後の2.0葉期に噴霧接種. 播種11日後発病調査.



第7図 各種ケイ酸カリ液肥の育苗培土灌注によるいもち病斑の抑制効果

いもち病菌噴霧接種法で検定. SiO₂成分として5g/育苗箱を播種時灌注. 播種20日後の3.0葉期に噴霧接種. 播種24日後発病調査.



第8図 各種ケイ酸カリ液肥を育苗培土灌注した苗の地上部ケイ酸含有量

SiO₂成分として5g/育苗箱播種時灌注. 播種30日後サンプリング.

第1表 ケイ酸カリ液肥Aの育苗培土灌注による苗いもち抑制効果

ケイ酸灌注量 ¹⁾	立枯れ苗率 ²⁾ (%)
0.5g	4.1±2.1ab
0.5g×2 ³⁾	3.4±0.8ab
1.0g	3.6±0.9ab
2.5g	2.1±2.0bc
5.0g	0.7±1.0c
無施用	9.6±5.2a

- 1) SiO₂成分としての育苗箱当たりの量. 播種時灌注. 2) 播種13日後調査.
- 3) 播種時と7日後の2回灌注. 土の後の値は標準偏差を示す. 同一英文字を付した数値間には最小有意差法により5%水準で有意差がないことを示す.

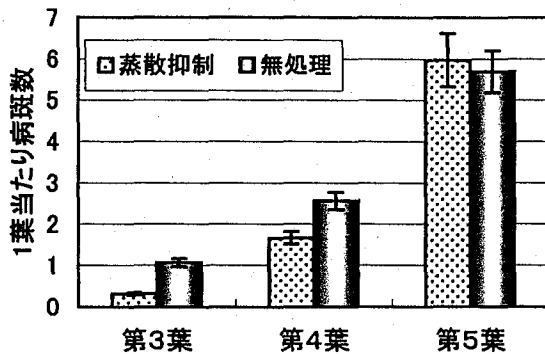
第2表 pHを変えた液肥Aの灌注が苗いもちの発病、
土壌pH、イネ苗の初期生育におよぼす影響

液肥 pH	立枯れ 苗率 ¹⁾ (%)	病斑数 ²⁾	培土 pH ³⁾	苗丈 ⁴⁾ (cm)	葉齢 ⁴⁾
5.0	0.0	0.0	4.8	10.9	3.0
6.5	0.0	0.0	4.8	10.5	3.0
8.0	0.0	0.0	4.8	10.3	3.0
9.5	0.0	0.0	5.3	10.5	3.0
10.4	0.0	0.0	5.5	10.1	3.0
無施用	0.6	2.7	5.0	10.5	3.0

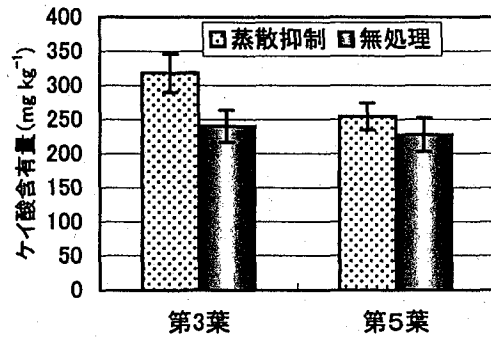
1) 播種18日後調査。 2) 葉身100本当たりの数。 播種22日後調査。

3) 播種8日後調査。 4) 播種32日後調査。 SiO₂成分5.6g/育苗

箱を播種時灌注。 いもち病菌保菌種子供試。



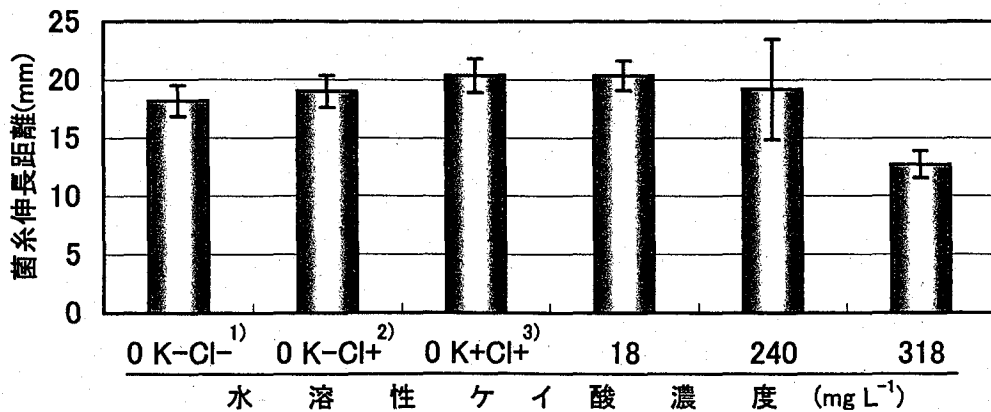
第9図 蒸散抑制処理がイネ葉位別のいもち病斑の発生におよぼす影響



第10図 蒸散抑制処理が葉位別の水溶性ケイ酸含有量におよぼす影響

水耕培養液にSiO₂100mg L⁻¹施用。蒸散抑制処理12日後の5.0葉期にいもち病菌噴霧接種。接種9日後調査。

水耕培養液にSiO₂100mg L⁻¹施用。蒸散抑制処理14日後採取。



第11図 ケイ酸を添加した素寒天培地でのいもち病菌の菌糸伸長距離

1) ケイ酸: 0mg L⁻¹, カリウム: 0mg L⁻¹, 塩素: 0mg L⁻¹

2) ケイ酸: 0mg L⁻¹, カリウム: 0mg L⁻¹, 塩素: 116mg L⁻¹

3) ケイ酸: 0mg L⁻¹, カリウム: 106mg L⁻¹, 塩素: 97mg L⁻¹

菌糸の距離は25℃で15日培養後の値。供試した2菌株の値を平均して示した。培地のpHは7.0。

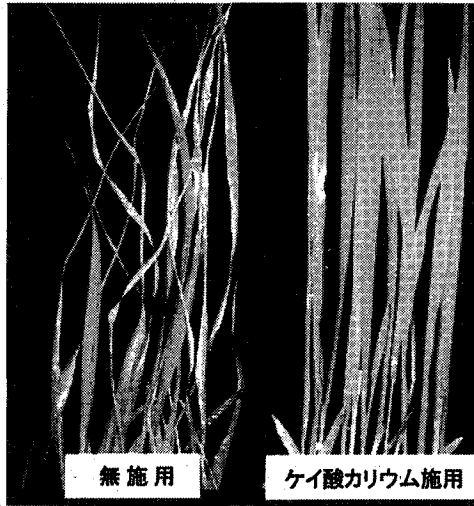
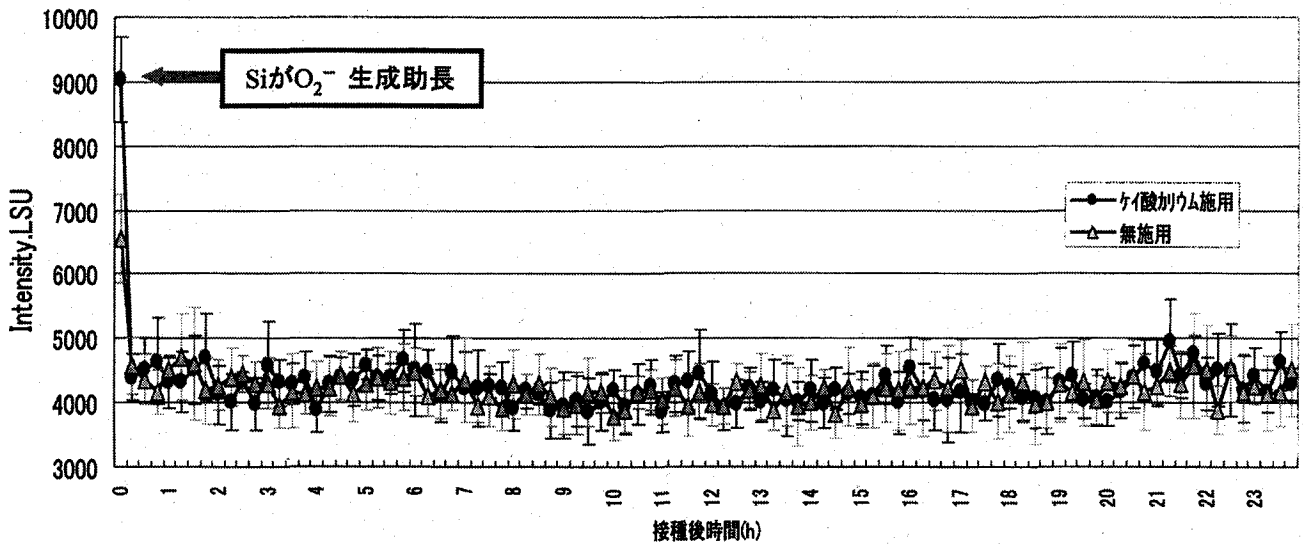
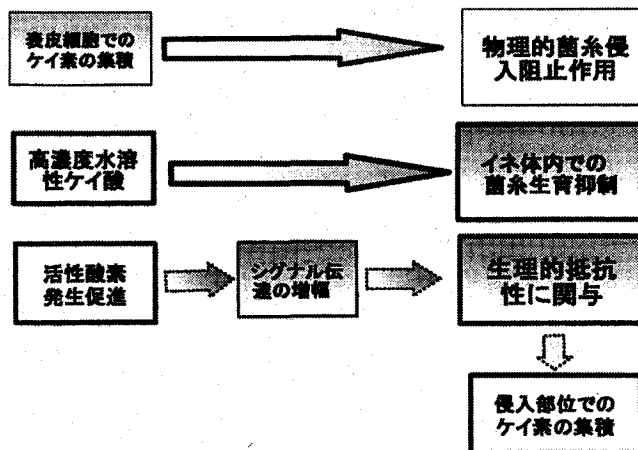


写真1 ケイ酸カリウム溶液灌注のいもち病抑制効果
SiO₂として5g/育苗箱灌注.

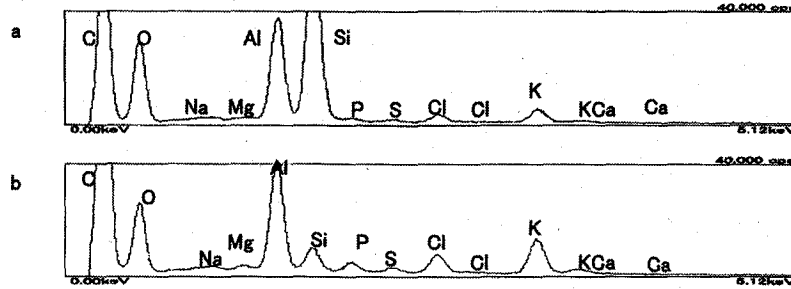
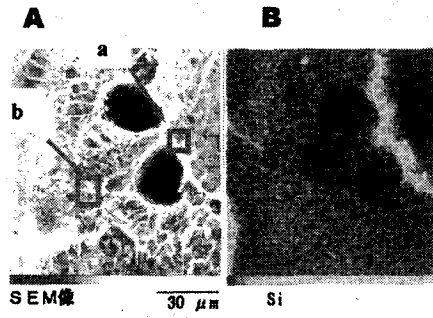


第12図 ケイ酸カリウム施用イネ葉身におけるいもち病菌接種後の活性酸素(O₂⁻)生成量の推移

土耕栽培イネの葉身表面を下に向けて置き、ルシフェリン誘導体を添加したいもち病菌胞子懸濁液を下から接種し、極微弱発光測定用ビデオカメラと光子カウンティングシステムで測定した。



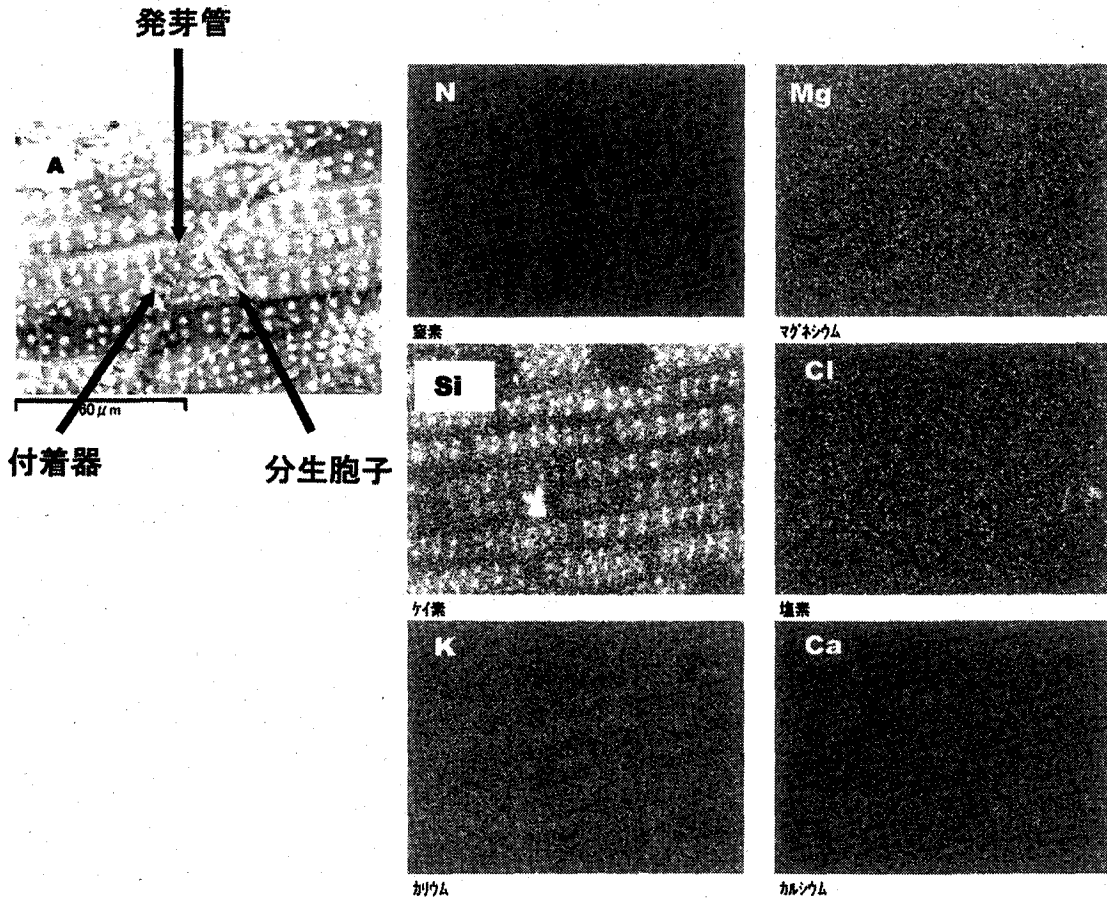
第13図 ケイ酸のいもち病抑制メカニズムの模式図



第14図 イネ葉身の機動細胞断面のSEM像とケイ素のマッピング

A : SEM像 B : Siのマッピング (緑色の点がケイ素の分布を示す)

a : Aのa部位でのX線スペクトル b : Aのb部位でのX線スペクトル



第15図 ケイ素施用イネ葉身表皮上におけるいもち病菌侵入部位周辺での主要元素マッピング (接種64時間後)

A : イネ表皮上のいもち病菌

論文審査結果要旨

ケイ酸は高等植物にとって必須元素ではないが、イネにとっては光合成を促し、乾物生産・根の活性・耐倒伏性、耐病虫害性などを向上させるため、農業的必須元素と言われる。本論文ではケイ酸施用によるイネ苗いもち病の発病抑制技術の開発と発病抑制機作について検討し、以下の成果を得た。

各種ケイ酸資材の育苗箱施用により苗いもち病の発病抑制効果を検討したところ、シリカゲルと試葉ケイ酸カリウム溶液が高い病斑抑制効果を示す事を明らかにした。またケイ酸カリウム溶液はシリカゲルより著しく少ないケイ酸量で有効であった。

ケイ酸カリウム溶液の培土灌注処理は、苗いもち立ち枯れ症といもち病斑の抑制の両方において殺菌剤と同等の効果を示す事を明らかにした。またケイ酸成分として5g/育苗箱・播種時1回施用が実用的施用方法であることを明らかにした。

イネの蒸散抑制処理で増加する葉身内水溶性ケイ酸含量と同濃度のケイ酸(318mg/L)は、培地上でもいもち病菌の菌糸生育を抑制することと、葉身水溶性ケイ酸含量が病斑発生と密接に関係している可能性を明らかにした。

いもち病菌感染初期のイネにおいて、ケイ酸処理が活性酸素の発生を助長することを明らかにし、ケイ酸がイネの生理的抵抗性を促進する可能性を示した。

生体試料を前処理なしに、VP-SEM,EDXで観察し、いもち病菌の感染に反応して、ケイ酸がいもち病菌の付着器付近に集積することを明らかにした。

以上の結果は、これまでイネにおけるケイ酸のいもち病発病抑制機作が、表皮細胞に沈積したケイ酸の物理的菌糸侵入抑制であるとするのに対して、それ以外にも水溶性ケイ酸によるイネ苗いもち病菌の菌糸伸長抑制作用やイネの生理的抵抗性の促進などが、関係する事を始めて明らかにした。このように本研究はイネ苗いもち病に対するケイ酸の発病抑制操作と発病抑制技術を明らかにしたもので、審査員一同は本論文が博士(農学)の学位を授与するに値すると判断した。