

氏 名(本籍)	もり 森 　　た 田 　　そう 聡 　　いち 一 　　ろう 郎
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 753 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)
学位論文題目	根内糸状菌 <i>Heteroconium chaetospira</i> によるハクサイ地上部の抵抗性誘導
論文審査委員	(主 査) 教 授 羽 柴 輝 良 (副 査) 教 授 菅 原 和 夫 教 授 南 澤 究

論文内容要旨

緒言

土壌病害の抑制は、輪作など耕種的防除が有効であるとされているが、経済・生産性の観点から、臭化メチルや PCNB 剤などによる土壌燻蒸（化学的防除）に依存している。だが、ハロゲンを含む薬剤は、オゾン層破壊など深刻な環境汚染を引き起こす恐れがあり、代替手段の開発が求められている。

近年注目されているのは、生物的な機能を用いて、作物-病原体-微生物間の相互作用により防除を行う生物防除法である。しかしながら、これまで行われて来た土壌病害に対する生物防除法は、用いている微生物が環境変化の影響を受け易い根圏・根面に生息しているために、安定した効果が得られないといった問題点が指摘されていた。

そこで我々は、効果の場を植物根内に求め、安定した効果を得ることができる生物防除資材を探索することを試みた。黄化病に汚染されたコムギ畑土壌で栽培したハクサイの根部から、糸状菌 *Heteroconium chaetospira* を単離した。本菌をハクサイに接種したところ、病徴を示すことなく根内に侵入し、定着することを観察した。また、*H.chaetospira* を接種したハクサイに対し、圃場レベルで根こぶ病・黄化病の試験を行ったところ、抑制効果を示した（図 1.）。このことから、本菌は有力な生物防除資材として期待されている。

このように、土壌病害に対する抑制効果から、有望な生物防除資材として選抜された *H.chaetospira* であるが、現在のところ、その効果の機構や、他の病原体に対する効果は明らかにされていない。本研究では、根部において病害抑制効果をもたらす *H.chaetospira* がハクサイ地上部（茎葉）においても効果を示すかについて解析するとともに、その抵抗性誘導機構の一端を明らかにすることを試みた。

1. *H.chaetospira* の接種法の構築

1) 接種・栽培方法の構築

H.chaetospira を根部に接種して、地上部に現れる抑制効果を解析するためには、根部に *H.chaetospira* を接種処理したハクサイを大量に育成する必要がある。その

ため、簡易な方法で *H.chaetospira* を感染させる実験系の構築を試みた。

H.chaetospira の接種方法は、土壌灌注・混和法を採用した。*H.chaetospira* は液体培養し、菌糸が十分に成長した時点で回収した。得られた新鮮な菌糸は破碎後、菌懸濁液を調製し、滅菌した園芸培土に混和（2.0 g/1.0 kg 土壌）した。菌懸濁液を混和した土壌は遮光・静置し、一定期間培養した。*H.chaetospira* を培養した土壌にハクサイを播種し、温室で栽培した。播種 15 日後のハクサイの根部を観察したところ、組織中に菌糸の存在が確認された。

2) 生育促進効果

H.chaetospira を接種したハクサイは成育促進効果が観察され、播種 20 日目に新鮮重の増加が見られ、20~32 日の間で平均 1.54 倍、最大で 1.78 倍に達した（図 2）。このことから、本方法によって、*H.chaetospira* は根部に感染し、定着が行われたものと判断し、以後の実験に供した。

2. ハクサイの地上部における抵抗性の誘導

H.chaetospira を接種したハクサイに、空気伝染性の病原菌、菌類病として黒斑病（*Alternaria brassicae*）、細菌病として黒斑細菌病（*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*）を接種し、現れた病斑・病徴を調査することにより、地上部の抵抗性を解析した。

黒斑病菌をハクサイ葉に噴霧接種（濃度 1.0×10^6 spores / ml）したところ、*H.chaetospira* 接種区では、コントロール区と比較して病斑数の減少を示した（図 3,4）。病斑を顕微鏡観察したところ、感染を受け水浸状となった部分では組織全体が褐変し、さらに侵入菌糸が多数分岐し、細胞間隙に蔓延していた。一方、*H.chaetospira* 区での病斑は、発芽した分生子の周囲で、細胞の褐変がみられたが、その範囲は分生子の周囲にとどまり、侵入した菌糸は成長が停止していた（図 5）。病斑を、症状の程度から 5 段階のランクに分類し、発病程度を算出したところ、*H.chaetospira* 区では、コントロール区と比べて低い発病程度であった（図 6）。

同様に黒斑細菌病菌（濃度 1.5×10^8 cfu / ml）をハクサイ葉に噴霧接種したとこ

ろ (図7.) , 一株当りの病斑数は, *H.chaetospira* 区で約 1/3 に減少した (図8.) . コントロール区の着生葉位別では下位葉から上位葉になるにつれ病斑数が増加した. *H.chaetospira* 区でも, コントロール区と同様に上位葉になるにつれ病斑数は増加したが, どの葉位でもコントロール区と比較して病斑数は少なく, 全体的に抑制されていた (図9.) . また, 発病程度でも, 病斑数と同様の傾向を示し, 全体的に軽減していた (図10.) .

このように, *H.chaetospira* は根部に局在しているにもかかわらず, 病原菌に対する抑制効果が地上部に現れたことから, 効果はハクサイを介した間接的なものであることが示された. 更に, この効果は植物のどの部位でも見られたことから, 全身的なものであると考えられた. 菌類病のみならず, 細菌病に対しても効果が見られたことから, 抵抗性は幅広いスペクトルを持つと考えられる. この抵抗性は病斑の形成を完全に抑制するものではなく, 進展を遅らせるものであったことから, 質的な防御反応ではなく, 抵抗性が強められる量的なものであると考えられた.

3. 病害抵抗性誘導物質の解析

これまで, 植物の全身的な防御反応の誘導には, サリチル酸 (SA) やエチレンといった低分子の二次代謝物質がシグナル伝達物質として機能していると報告されている. 本章では, SA, 生合成が分岐しているフェノール性化合物群を測定し, 全身的防御反応機構の解析を行った.

H.chaetospira を根部に接種し, 栽培したハクサイ地上部を回収し, SA, 配糖体型 SA (SAG ; 貯蔵タイプ), フェノール性化合物群の測定を行った. しかし, *H.chaetospira* を接種・定着させたハクサイ内のこれら生理活性物質の含量は コントロール区と比較して, むしろ低い値を示した (図11,12.) .

次に *H.chaetospira* を接種処理したハクサイに対して病原菌 (黒斑病菌 ; 1.0×10^6 spores/ml) の接種を行い, 生理活性物質の消長を経時的に測定した. コントロール区の SA は, 初期含量 約 70 ng/g から, 緩やかに増加し, 最終的には約 140 ng/g と, 約 2 倍に増加した. 一方, *H.chaetospira* 接種区では, 病原菌接種前は 60 ng/g であったが, 接種 2 日後から増加し, 7日目には 330 ng/g と, 約 5.5 倍に増加し

た. この値は *H.chaetospira* 単独接種と比較して約 23.5 倍であった (図 13.) .

同様に, フェノール性化合物含量の変動を調査した. コントロール区では病原菌接種後のフェノール性化合物の変化は緩やかで, 最終的には, 初期含量の約 1.1 倍であった. 一方, *H.chaetospira* 区では, 接種 0.5 日後から増加が見られ, 最終的には, 初期値の約 2.6 倍 (4.36 mg/g) に増加した (図 14.) .

定量を行った物質が, 抵抗性を誘導した本体かどうか明確には出来ていないが *H.chaetospira* が根内に感染した植物は, 病原菌を接種した時に SA, フェノール性化合物群の合成速度が速いことが判明した. *H.chaetospira* 接種により宿主植物に何らかの準備ができており, 病原菌の感染に対し素早く反応し, 強度の抵抗性をもたらすものと推測された.

4. まとめ

H.chaetospira は, ハクサイの根部に定着し, 土壌病害に対する抑制効果を持つことを既に報告している.

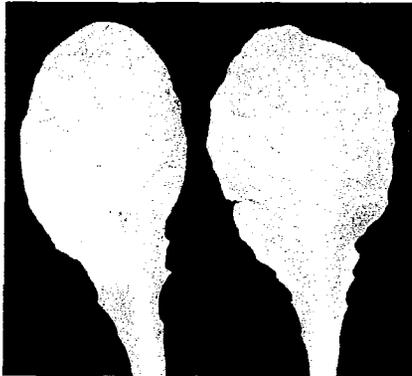
本研究では, *H.chaetospira* が根部に感染することによって, ハクサイ地上部にも抑制効果が現れるか否かに着目し, 空気伝染性病原菌を接種することで, *H.chaetospira* による抑制効果とその機構の一端を明らかにした.

H.chaetospira は根内に局在しているにもかかわらず, 地上部でも病害に対する抵抗性が誘導された. このことから, *H.chaetospira* は, 宿主植物を介し, 間接的に抵抗性を誘導し, その抵抗性は全身的なものであることが明らかとなった.

抵抗性の機構を明らかにするため, 全身的な抵抗性に関係していると思われる生理活性物質について定量を行った. *H.chaetospira* の単独接種では, SA, 配糖体 SA, フェノール性化合物群の含量は増加せず, むしろコントロール区と比較して低い数値であった. 一方, *H.chaetospira* 接種後, 病原菌を接種した時には, 生理活性物質の生成速度はより速くなることが観察され, *H.chaetospira* の感染による情報が, ハクサイに何らかの抵抗性の準備をもたらし, それにより, 病原菌の接触に対して素早い反応が引き起こされるのではないかと考えられた.



図1. *H. chaetospira* 接種による根こぶ病の抑制効果.
(上) コントロール区. (下) *H. chaetospira* 処理区



Control *H. chaetospira*

図3. *H. chaetospira* 接種による黒斑病菌の病斑形成抑制.

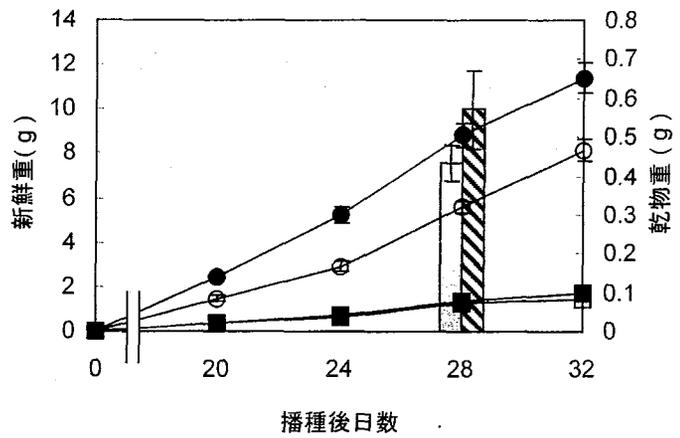


図2. *H. chaetospira* 処理と、ハクサイの成長.
上; 播種 24 日目のハクサイ
(左) Control, (右) *H. chaetospira* 処理区
下; ○, コントロール区の地上部新鮮重;
●, *H. chaetospira* 接種区の地上部新鮮重;
□, コントロール区の地下部新鮮重;
■, *H. chaetospira* 接種区の地下部新鮮重.
白棒, コントロール区乾燥重;
斜線棒, *H. chaetospira* 接種区の乾燥重.

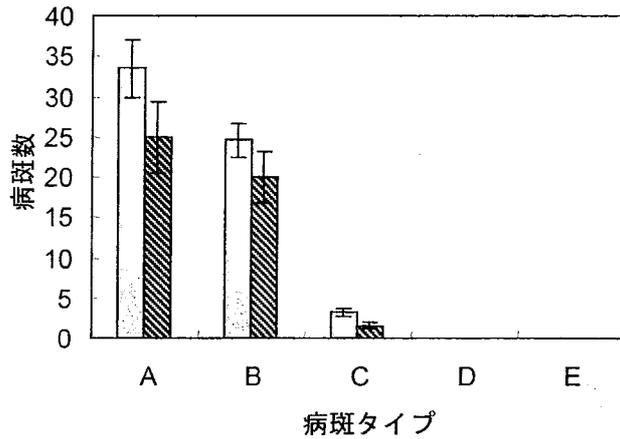


図4. *H. chaetospira* を接種したハクサイの地上部における、黒斑病菌の病斑形成。黒斑病菌の接種濃度： 1.0×10^6 spores/ml
 A. 黒斑周囲が黄緑に退色した病斑，
 B. 径0.5cm以下の水浸状病斑，
 C. 径1.0cm以下の水浸状病斑，
 D. 径1.0cm以上の水浸状病斑，
 E. 径2.0cm以上の結合型拡大病斑

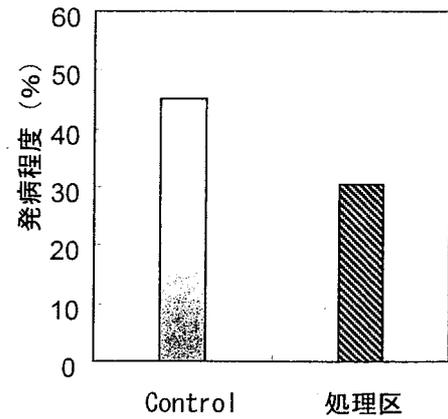


図6. *H. chaetospira* 接種ハクサイにおける黒斑病の抑制。

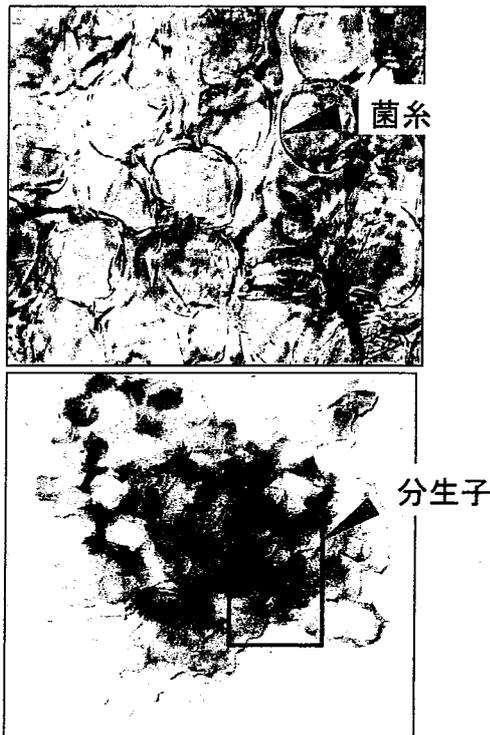


図5. *H. chaetospira* 接種により見られた、黒斑病菌 (*A. brassicae*) の菌糸伸展の抑制効果 (病斑拡大図)。 (上) 水浸状病斑の拡大図， (下) *H. chaetospira* 接種区。

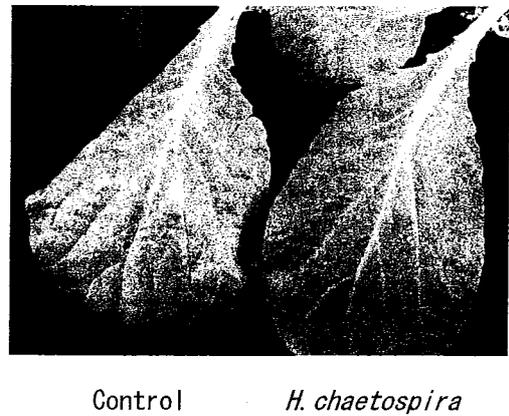


図7. *H. chaetospira* 接種ハクサイ葉における黒斑病の抑制。

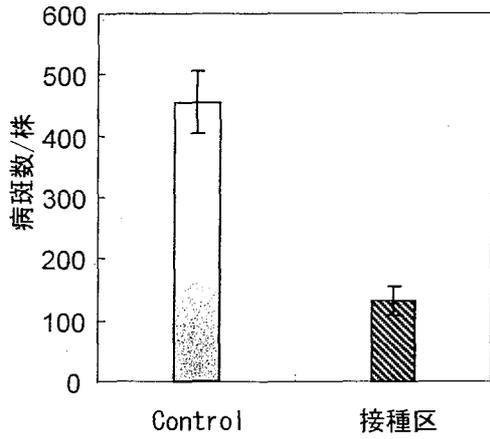


図8. *H. chaetospira* 接種ハクサイにおける黒斑細菌病の抑制. 一株当たりの平均病斑.

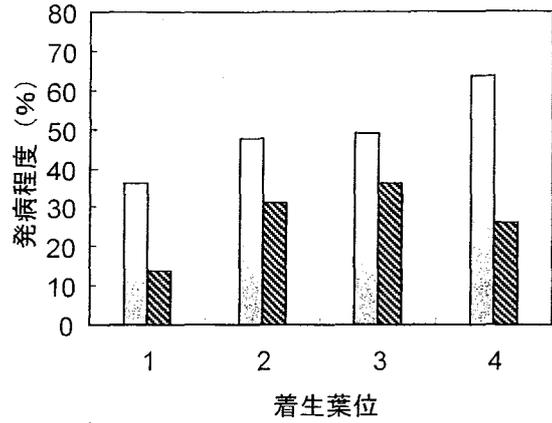


図10. *H. chaetospira* 接種ハクサイにおける黒斑細菌病の抑制. 各着生葉当たりの発病程度. 白棒, コントロール区; 斜線棒, *H. chaetospira* 処理区

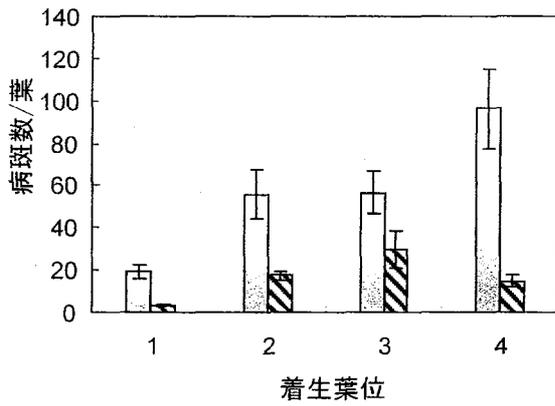


図9. *H. chaetospira* 接種ハクサイの地上部における黒斑細菌病菌の病斑形成. 数字は下位葉よりの葉位. 白棒, コントロール区; 斜線棒, *H. chaetospira* 接種区.

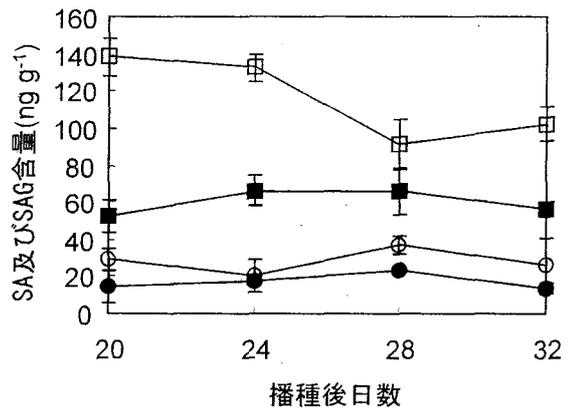


図11. *H. chaetospira* 接種とサリチル酸 (SA), 配糖体型サリチル酸 (SAG) 含量. ○, コントロール区 SA; ●, *H. chaetospira* 接種区 SA; □, コントロール区 SAG; ■, *H. chaetospira* 接種区 SAG.

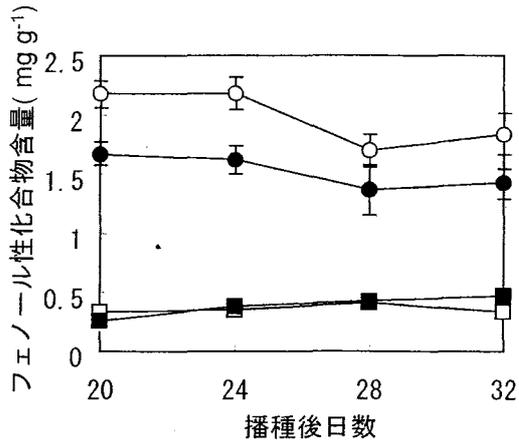


図12. *H. chaetospira* 接種とフェノール性化合物類の含量。
○, コントロール区, 葉 ;
●, *H. chaetospira* 接種区, 葉 ;
□, コントロール区, 根 ;
■, *H. chaetospira* 接種区, 根.

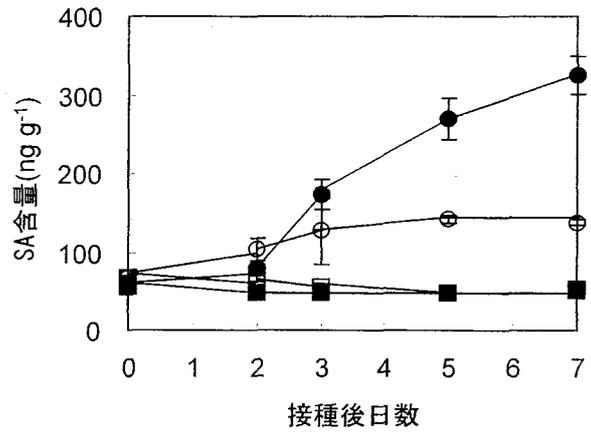


図13. *H. chaetospira* 接種ハクサイに対する黒斑病菌接種後の遊離型SAの含量。接種病原菌濃度; 1.0×10^6 spores/ml。
□, コントロール区, 病原菌無接種 ;
■, *H. chaetospira* 接種区, 病原菌無接種 ;
○, コントロール区, *A. brassicae*接種 ;
●, *H. chaetospira* 接種区, *A. brassicae*接種.

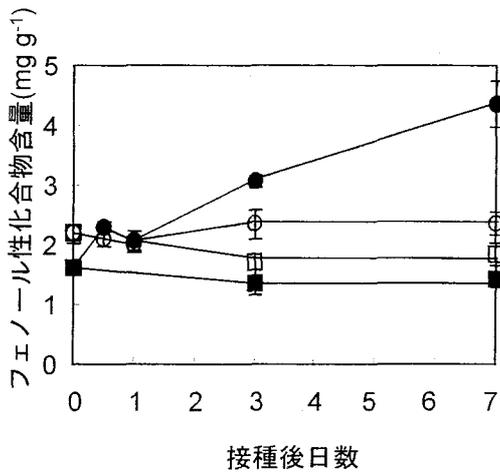


図14. *H. chaetospira* 接種ハクサイに対する黒斑病菌接種後のフェノール性化合物の含量。接種病原菌濃度; 1.0×10^6 spores/ml。
□, コントロール区, 病原菌無接種 ;
■, *H. chaetospira* 接種区, 病原菌無接種 ;
○, コントロール区, *A. brassicae*接種 ;
●, *H. chaetospira* 接種区, *A. brassicae*接種.

論文審査結果要旨

近年の作物栽培において、特産地の形成に伴い連作傷害としての土壌病害が増加している。ハクサイでは難防除土壌病害であるアブラナ科根こぶ病が報告されており、現在のところ薬剤による土壌薫蒸で防除が行われている。しかしながら、環境・健康に対する懸念が広まりつつあり、代替手段の開発が望まれ、生物防除用の糸状菌として *Heteroconium chaetospora* が探索・単離された。

本研究では、ハクサイの根内に定着し、アブラナ科根こぶ病に対して抑制効果をもたらす *H. chaetospora* の付加価値的な機能・効果を調査するために、宿主であるハクサイの地上部における病害抵抗性、及びその機構についての解析を目指した。

H. chaetospora を土壌混和法によりハクサイに処理したところ、播種から2週間後に根の皮層細胞への侵入・定着が見られた。また、播種20日目から地上部の生育促進効果が観察され、新鮮重で約60%、乾物重では約30%の促進が見られた。この効果は根では見られず、地上部に特異的であると考えられた。

土壌混和法により、*H. chaetospora* 処理を行ったハクサイの地上部に、アブラナ科黒斑病菌の *Alternaria brassicae* を噴霧接種したところ、病斑数、及び発病程度の低下が見られた。また、アブラナ科黒斑細菌病の *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* を噴霧接種したところ、どの部位の葉でも、病斑数、及び発病程度の大幅な低下が見られた。この結果から、*H. chaetospora* により、ハクサイの地上部に抵抗性が誘導されており、その機構は、植物を介した間接的なものであり、かつ全身的であると考えられた。また、菌類病だけではなく、細菌病にも効果があるなど、幅広い効果であると考えられた。

この誘導された抵抗性が、どのような機構によるものであるかを調べるために、サリチル酸、フェノール性化合物類、エチレン前駆体 ACC について含量の経時的変化を測定した。その結果、*H. chaetospora* の単独処理を行った区では、対照区と比較して違いは見られ無いか、もしくは含量の低下を示した。それに対して、*H. chaetospora* 処理を行ったハクサイに対して病原菌（黒斑病菌）を接種し、測定を行ったところ、フェニルプロパノイド経路のサリチル酸とフェノール性化合物類において、対照区と比較して急速な生成・蓄積が観察された。

以上のように本研究は、根内に定着する糸状菌 *H. chaetospora* をハクサイに処理することにより、離れた部位である地上部において空気伝染性病害に対する抵抗性が現れること、また、生理活性物質などの生合成スピードに違いが現れることを明らかにしたことから、生物防除のメカニズム解明に寄与したと認められる。よって、審査員一同は、本論文は博士（農学）の学位を授与するに値する内容であると判定した。