

氏 名(本籍) 竹 中 重 仁

学位の種類 博士 (農 学)

学位記番号 農 第 469 号

学位授与年月日 平 成 5 年 3 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 麦類雪腐病の血清学的診断法の開発と植
物体中における本病原菌の動態に関する
研究

論文審査委員(主 査) 教 授 江 原 淑 夫
教 授 星 川 清 親
教 授 大 瀧 保
助教授 羽 柴 輝 良

論文内容要旨

積雪地帯での麦類栽培において最大の問題は、雪腐病による被害である。雪腐病は、積雪下で活動できる特殊な生態を持った数種の糸状菌によって引き起こされる病気の総称で、全国で現在6種類が知られている。それらの内、北陸地方に主に発生する雪腐病は、褐色雪腐病（病原菌：*Pythium paddicum*, *P. iwayamai*）、雪腐褐色小粒菌核病（*Typhula incarnata*）および紅色雪腐病（*Miconectriella nivalis*）の3種類である。これらの病原菌は単独よりむしろ混合感染することが多く、また有効薬剤は菌の種類によって異なるため、本病の防除が難しいのが現状である。今後有効な防除法を確立するためには、各菌を正確かつ迅速に検出する手法を開発する必要がある。また本病に対する薬剤防除は経済性、有効性の問題から、北陸地方に導入することが困難であるため、各種雪腐病菌の生態的特徴を利用した防除技術の確立が切望されている。

そこで本研究では、各種雪腐病を圃場と同様に再現できる人工接種法を開発し、それをを用いて各種雪腐病菌の麦類に対する病原力を検定した。また、血清学的手法を用いた本病の診断法を開発し、それをを用いて各種雪腐病菌の植物体中での動態を調査し、各菌の生態的特徴を明らかにした。

I. 麦類雪腐病の発生実態

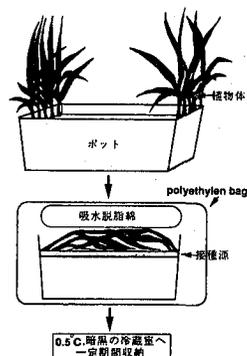
各種雪腐病の発生実態を把握するため、新潟県上越地方の来歴の異なる麦類圃場について、本病の発生状況を従来の病徴観察と感染組織からの病原菌の分離試験により調査した。その結果、従来の報告通り主要な雪腐病は褐色雪腐病と雪腐褐色小粒菌核病の2種類であり、場所により紅色雪腐病を含めた3種類が重要病害であることが明らかとなった。また来歴の異なる圃場から菌を分離・同定した結果、水田転換初年畑と2年畑からは、*P. paddicum*のみが分離されたが、10年以上ムギを連作していた畑では*P. iwayamai*と*T. incarnata*の2菌が主に検出され、*P. paddicum*はほとんど検出されなかった。このことから、水田転換畑では畑転換後の経過年数に伴い、分布する雪腐病菌が*P. paddicum*から*P. iwayamai*と*T. incarnata*へと移行するものと推察された。

II. 雪腐病菌の人工接種法の開発とそれをを用いた各種雪腐病菌の病原力の比較

自然環境下では各種雪腐病菌が混在するため、圃場で特定の病原菌の病原力検定や動態解明を実施するのは困難である。したがってこれらの試験を実施するためには、各種雪腐病を圃場と同様に再現できる人工接種法を開発する必要がある。そこで、第1図に示した隔離条件下で雪腐病を再現できる人工接種法を開発し、それをを用いて各種雪腐病菌の麦類に対する病原力を検定した。

1. コムギ品種を用いた人工接種法の開発

圃場試験で異なった抵抗性程度を示すコムギ3品種（強品種：ユキチャボ、中：東山16号、弱：農林16号）を供試し、植物体の育苗条件を変えて圃場試験結果と一致する人工接種法を開発を試みた。その結果、秋期から初冬にかけ



第1図 雪腐病菌の人工接種法の模式図

て低温短日の自然条件下で、3～4葉期まで育苗した植物体を用いた人工接種法により、各種雪腐病に対するコムギ品種の抵抗性の差が、圃場試験と同様に明瞭に現れた（第2図）。

2. 各種雪腐病菌の麦類に対する病原力の比較

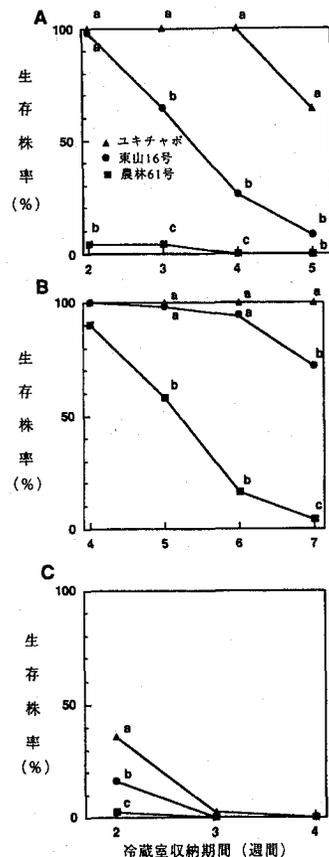
北陸地方の麦類栽培にとって最も重要な病原菌である *P.paddicum*、*P.iwayamai* および *T.incarnata* の麦類に対する病原力を、上記の人工接種法を用いて検定した（第1表）。その結果、① *P.iwayamai* は、3菌の内オオムギおよびコムギに対して最も病原力が強く、現在北陸地方で栽培されている耐雪性強のオオムギ品種ミノリムギおよびコムギ品種ユキチャボにも強い病原力を有していること、② *T.incarnata* はコムギに対する病原力は弱い、オオムギに対しては強く、根部を侵害することによって茎の再生力を低下させ、耐雪性強のミノリムギに対しても *P.iwayamai* 並の被害を与えること、③ *P.paddicum* のオオムギに対する病原力は弱く、またコムギに対する病原力も *T.incarnata* より強いが、耐雪性強のユキチャボに対しては枯死させる程の病原力を有していないことが明らかとなった。

Ⅲ. リボソーム抗体を用いた雪腐病の血清学的診断法の開発

前述したように、北陸地方の麦類圃場では各種雪腐病が混合発生するため、従来の病徴観察や分離・同定法では、罹病植物体から各菌を正確に判定・検出することが困難である。そのため、それに代わる新しい検出・定量法の開発を血清学的手法を用いて検討した。糸状菌の検出・定量に血清学的手法を利用する場合、その構成がウイルスや細菌に比べて複雑であるため、抗原として何を選択するかが重要である。そこで、すべての細胞に存在し、種々のレベルの分類群に対応する多様性と共通性を示し、生育条件やageによる組成の変動がないという特性を持っているリボソームタンパク質に着目した。

1. 各種雪腐病菌のリボソームタンパク質の比較

P.paddicum、*P.iwayamai*、*T.incarnata*、*M.nivalis* の4菌および宿主植物であるコムギからリボソームを抽出し、各々のタンパク質組成をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離パターンから比較検討した。その結果、*P.paddicum* と *P.iwayamai* の間に差はなかったが、*Pythium* 菌、*T.incarnata*、*M.nivalis* お



第2図 人工接種法を用いた *P.paddicum* (A)、*T.incarnata* (B) および *M.nivalis* (C) に対するコムギ3品種の抵抗性検定

注) 同一収納期間の同一英文字間にはタンカン多重検定による有意差(5%)がないことを示す。

よびコムギの泳動パターンの間には明瞭な差が認められた (第3図)。

2. 各種雪腐病菌の抗リボソーム血清の作製とその特異性の比較

上記4種の雪腐病菌の菌体から抽出したリボソームを家兎に注射して、各菌の抗リボソーム血清を作製した。それらの特異性を上記4菌の他に雪腐黒色小粒菌核病菌 (*T. ishikariensis*) とコムギのリボソームも比較試験のために加え、*Oucsterlony*法で検定した。同属の菌のリボソーム間には血清学的差異は認められなかったが、*Pythium*菌、*Typhula*菌、*M. nivalis*およびコムギのリボソーム間には明瞭な差が認められた。

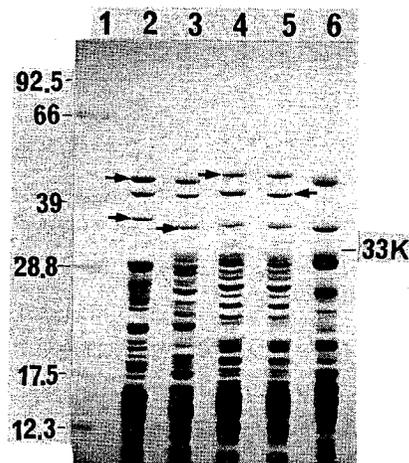
3. 抗リボソーム血清を用いた酵素抗体法による植物体からの各種雪腐病菌の検出・定量

上記4菌の抗リボソーム血清を用いたELISA法およびウェスタンブロット法により、植物体からの各菌の検出の可能性を検討した。その結果、抗リボソーム血清を用いた間接ELISA法は、植物体から各菌を属レベルで確実に検出・定量できた (第4図)。さらにウェスタンブロット法を用いれば、褐色雪腐病菌である *P. paddicum* と *P. iwayamai* を識別することは不可能だが、*T. incarnata* と *T. ishikariensis* を識別することができ、雪腐病を褐色雪腐病、雪腐褐色小粒菌核病、紅色雪腐病および雪腐黒色小粒菌核病の病名ごと

第1表 *P. paddicum*、*P. iwayamai*および*T. incarnata*の麦類に対する病原力の比較

病原菌	生存率 (%)			
	オオムギ品種		コムギ品種	
	カシマムギ	ミノリムギ	農林61号	ユキチャボ
<i>P. paddicum</i>	100 a	100 a	9.3a	100 a
<i>P. iwayamai</i>	10.2c	50.9c	0.0a	25.3b
<i>T. incarnata</i>	51.9b	71.3b	64.9b	98.6 a

注) オオムギ品種は冷蔵室に3週間、コムギ品種は冷蔵室に5週間それぞれ収納した。同一列の同一英文字間にはダンカン多重検定による有意差 (5%) がないことを示す。



第3図 各種雪腐病菌とコムギのリボソームタンパク質の電気泳動パターン
1: 分子量マーカー (×1,000ダルトン)、2: *M. nivalis*、3: *T. incarnata*、
4: *P. iwayamai*、5: *P. paddicum*、6: コムギ。

注) 矢印は分子量33,000ダルトン (33K) 以上の各菌固有のバンドを示す。

に診断することが可能であった (第5図)。

IV. 細胞壁タンパク質を用いた褐色雪腐病の診断法の開発

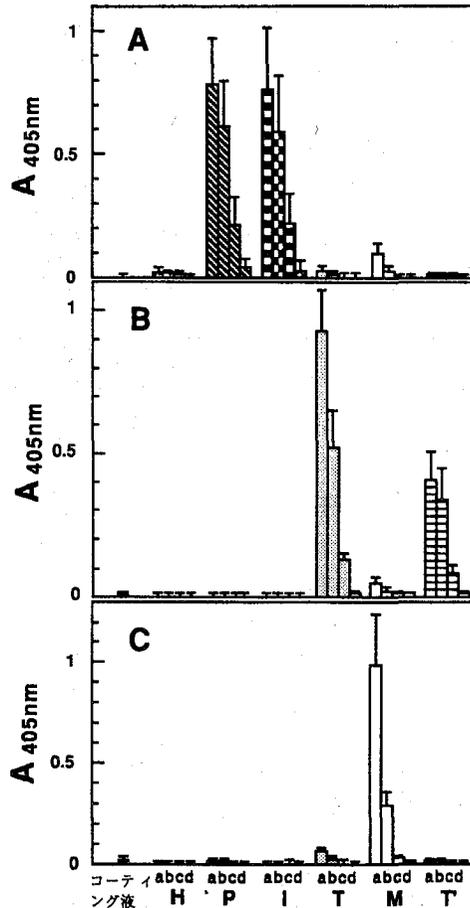
抗リボソーム血清を用いた酵素抗体法では識別できない2種の主要な褐色雪腐病菌 *P.padicum* と *P.iwayamai* の特異的検出法を開発するため、リボソーム以外の新たな抗原を検索し、血清学的手法を用いて両菌の特異的検出法の開発を検討した。

1. 各種雪腐病菌の細胞壁タンパク質の比較

上記2菌の他に、褐色雪腐病菌として報告されている4種の *Pythium* 菌 (*P.okanoganense*、*P.graminicola*、*P.vanterpooli*、*P.volutum*) も供試して、各菌の特異的タンパク質を検索した。その結果、各菌は細胞壁に分子量の異なる数種の特異的糖タンパク質を有していることが明らかとなった (第6図)。またレクチンとの反応性から、*P.padicum*、*P.iwayamai*、*P.okanoganense* の細胞壁タンパク質はN-グルコシド結合型糖鎖を、*P.graminicola*、*P.vanterpooli*、*P.volutum* の細胞壁タンパク質はO-グルコシド結合型糖鎖を有していることが推察された。

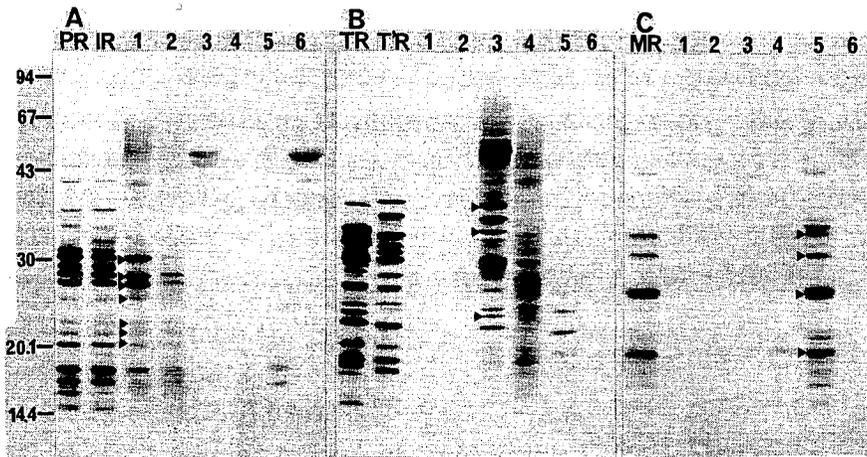
2. 細胞壁タンパク質に対する抗血清の作製と特異性の比較

P.padicum の細胞壁タンパク質である37Kタンパクに対する抗血清 (Pp37K抗血清)、除糖処理した37Kタンパクに対する抗血清 (Pp37K'抗血清)、*P.iwayamai* の細胞壁タンパク質である32Kタンパクに対する抗血清 (Pi32K抗血清) および除糖処理した32Kタンパクに対する抗血清 (Pi32K'抗血清) を家兎より



第4図 間接ELISA法による抗リボソーム血清の各菌感染コムギ粗汁液との反応
A: *P.padicum* の抗リボソーム血清、B: *T. incarnata* の抗リボソーム血清、C: *M. nivalis* の抗リボソーム血清、H: 健全コムギ、P: *P.padicum* 感染コムギ、I: *P.iwayamai* 感染コムギ、T: *T. incarnata* 感染コムギ、M: *M. nivalis* 感染コムギ、T': *T. ishiharimensis* 感染コムギ。

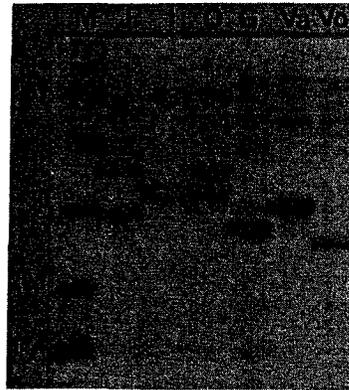
注) これら粗汁液をコーティング液で a: 1/100, b: 1/1,000, c: 1/10,000, d: 1/100,000 に希釈して用いた。実線は標準偏差を示す。



第5図 ウェスタンブロット法による感染コムギ葉粗汁液からの各菌の検出
 A: *P. paddicum*の抗リボソーム血清、B: *T. incarnata*の抗リボソーム血清、C: *M. nivalis*の抗リボソーム血清、PR: *P. paddicum*のリボソーム、IR: *P. iwayamai*のリボソーム、TR: *T. incarnata*のリボソーム、T'R: *T. ishikariensis*のリボソーム、MR: *M. nivalis*のリボソーム、1: *P. paddicum*感染コムギ葉、2: *P. iwayama*感染コムギ葉、3: *T. incarnata*感染コムギ葉、4: *T. ishikariensis*感染コムギ葉、5: *M. nivalis*感染コムギ葉、6: 健全コムギ葉。

注) 左の数字は分子量 ($\times 1,000$ ダルトン) を、矢印は各菌のリボソームの特徴的なバンドを示す。

作製し、各菌の細胞壁タンパク質との特異性をウェスタンブロット法で検定した。Pp37K抗血清とPi32K抗血清は、*P. graminicola*、*P. vanterpooli*、*P. volutum*の細胞壁タンパク質とは反応しなかったが、同一の糖鎖を有していると推察された3菌 (*P. paddicum*、*P. iwayamai*、*P. okanoganense*) の細胞壁タンパク質とはhomologousな抗原と同程度に反応した (第7図 A、B)。免疫原の糖鎖部位を除去して作製したPp37K' とPi32K' 抗血清も*P. paddicum*と*P. iwayamai*に特異的な抗体ではなく、Pi32K' 抗血清はすべての褐色雪腐病菌の細胞壁タンパク質と反応した (第7図C、D)。以上のように上記4種の抗血清の特異性は低いが、細胞壁タンパク質以外のタンパク質とは反応しないことから、ウェスタンブロット法を用いることにより、各菌の菌体粗汁液から検出されるバンドパターンから各菌を容易に同定することができた。



第6図 各種褐色雪腐病菌の細胞壁タンパク質の電気泳動パターン
 M: 分子量マーカー ($\times 1,000$ ダルトン)、P: *P. paddicum*、I: *P. iwayamai*、O: *P. okanoganense*、G: *P. graminicola*、Va: *P. vanterpooli*、Vo: *P. volutum*

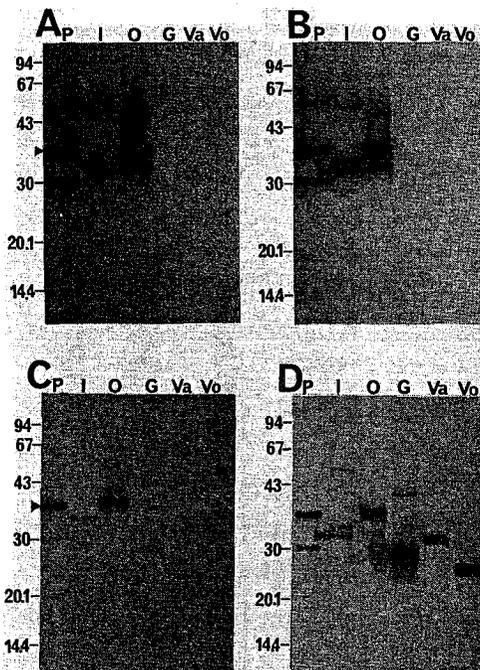
注) 矢印は各菌の特徴的なタンパク質を示す。

3. 細胞壁タンパク質に対する抗血清を用いた植物体からの褐色雪腐病菌の検出

上記抗血清を用いることにより、実際に感染している植物体から*P.paddicum*と*P.iwayamai*を識別して検出できるかを検討した。その結果、Pp37K抗血清あるいはPi32K抗血清を用いたウェスタンブロット法により、*P.paddicum*は30Kの細胞壁タンパク質を、*P.iwayamai*は32K細胞壁タンパク質をそれぞれマーカーにすることにより、両菌の感染の有無を判定することができた(第8図)。

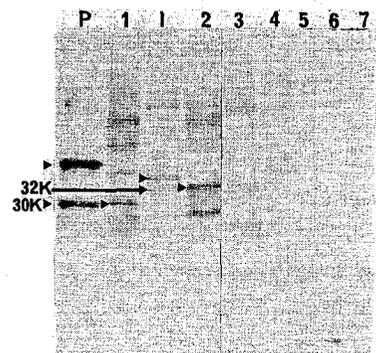
V. 植物体中における各種雪腐病菌の動態

北陸地方の水田転換畑に主に分布する*P.paddicum*、*P.iwayamai*および*T.incarnata*の植物体中での動態と混合感染下での各菌の相互関係を明らかにするため、①各菌の植物体への侵入方法の光顕観察、②抗リボソーム血清を用いた間接ELISA法による各菌の植物組織中での増殖量の測定、③抗リボソーム血清を用いた間接ELISA法および抗細胞壁タンパク質血清を用いたウェスタンブロット法による混合感染下での各菌の競争力の比較を行った。



第7図 ウェスタンブロット法によるPp37K抗血清(A)、Pi32K抗血清(B)、Pp37K'抗血清(C)とPi32K'抗血清(D)の各種褐色雪腐病菌の細胞壁タンパク質との反応
P: *P.paddicum*、I: *P.iwayamai*、
O: *P.okanoganense*、G: *P.graminicola*、
Va: *P.vanterpooli*、Vo: *P.volutum*

注) 左の数字は分子量(×1,000ダルトン)を、矢印はPp37KとPi32Kタンパクを示す。



第8図 Pp37K抗血清を用いたウェスタンブロット法による感染オオムギ葉粗汁液からの*P.paddicum*と*P.iwayamai*の細胞壁タンパク質の検出

P: *P.paddicum*の細胞壁タンパク質、I: *P.iwayamai*の細胞壁タンパク質、1: *P.paddicum*感染葉、2: *P.iwayamai*感染葉、3: *P.okanoganense*感染葉、4: *P.graminicola*感染葉、5: *P.vanterpooli*感染葉、6: *P.volutum*感染葉、7: 健全葉

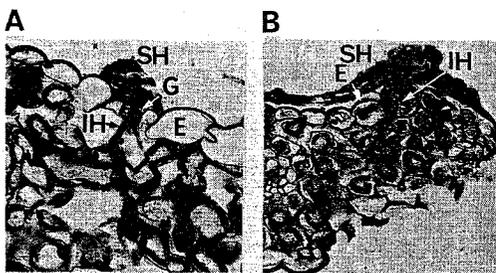
注) レーン1の矢印は37K、30Kタンパクを、レーン3の矢印は34K、32Kタンパクを示す。

1. 各種雪腐病菌の植物体への侵入機構

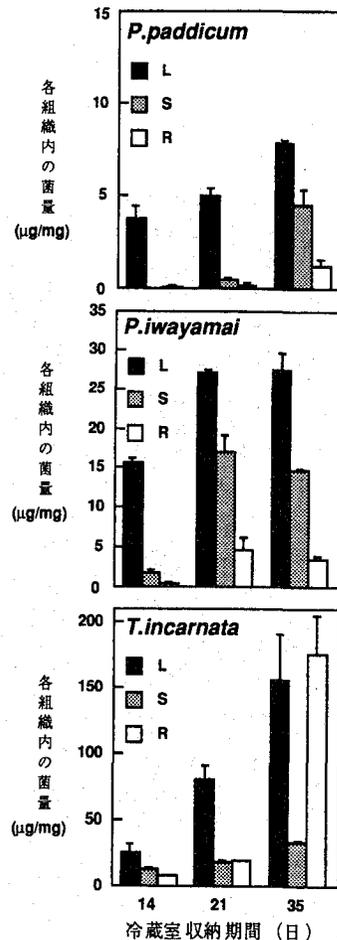
*T. incarnata*のムギ葉への侵入方法として、集合菌糸による気孔侵入と角皮侵入が観察され（第9図）、観察頻度から後者が本菌の最も一般的な侵入方法であることが明らかになった。*P. paddicum*と*P. iwayamai*も*T. incarnata*と同様、角皮侵入が高頻度に観察されたことから、上記3菌は同じ方法で葉身部に侵入することが明らかになった。

2. 各種雪腐病菌の植物体中での蔓延機構

本研究で開発した抗リボソーム血清を用いた間接ELISA法により、上記3菌を接種したオオムギの葉身部、葉鞘部および根部から各菌の菌量を測定し、各菌の増殖程度を調査した。その結果、オオムギにおける3菌の主な感染部位は、*Pythium*菌と*T. incarnata*で異なることが明らかとなった。すなわち、*P. paddicum*と*P. iwayamai*は植物体の地上部（葉身部、葉鞘部）を蔓延し、最終的に生長点を侵害する感染様式をとることが明らかとなった（第10図）。一方、*T. incarnata*は*Pythium*菌と異なり、主に植物体の地下部に蔓延して植物体の再生に影響を与えることが明らかになった（第10図）。



第9図 *T. incarnata*のコムギ葉身部への侵入方法の光顕観察
 A: 集合菌糸による気孔侵入のパラフィン切片法による観察
 B: 集合菌糸による角皮侵入のパラフィン切片法による観察
 SH: 表面菌糸、IH: 侵入菌糸、E: 表皮細胞、G: 孔辺細胞



第10図 抗リボソーム血清を用いたELISA法による各種雪腐病菌接種オオムギ（品種カシムムギ）からの各菌の定量
 L: 葉身部、S: 茎部、R: 根部、実線は標準誤差を示す。

3. 植物体中での各種雪腐病菌の相互関係

水田転換初年畑には *P.paddicum* のみが生息し、その後ムギを連作することにより、生息菌が *P.paddicum* から *P.iwayamai* と *T.incarnata* へと移行する原因を解明するために、3菌を2菌ずつオオムギに混合接種して、本研究で開発した抗リボソーム血清を用いた間接ELISA法と、抗細胞壁タンパク質血清を用いたウェスタンブロット法により、各菌の菌量を測定し3菌の競争力を比較した。その結果、病原菌としての3菌の競争力は、*T.incarnata*、*P.iwayamai*、*P.paddicum* の順で強いことが明らかになった。

既往の成果と本研究の結果から、水田転換初年畑には *P.paddicum* のみが生息し、その後ムギを連作することにより、生息菌が *P.paddicum* から *P.iwayamai* と *T.incarnata* へと移行する原因を解明することができた。すなわち、水田には他の2菌と異なり水田の高濃度CO₂条件に対する耐性が高い *P.paddicum* (高松 1989) のみが分布しているため、転換初年畑にムギを栽培すると、ほぼ *P.paddicum* による褐色雪腐病のみが発生する。その後ムギを連作することによる土壌の畑地化に伴い、外部から侵入してき *P.iwayamai* と *T.incarnata* がそこに定着可能となり、宿主植物をめぐる3菌間の相互関係が生じる。その結果、*P.paddicum* は病原力が弱く、さらに3菌の中で最も競争力が低いいため、徐々にそのポテンシャルを下げていく。一方、*P.iwayamai* は病原力の強さを利用して、また *T.incarnata* は競争力の強さを利用して、菌密度を上げていき、その結果、圃場には *P.iwayamai* と *T.incarnata* が共存するようになり、ムギの被害が増大する。

V. まとめ

本研究では、北陸地方の麦類栽培圃場に発生する主要な雪腐病菌の生態的特徴を解明するために、人工接種法の開発を検討するとともに、植物病原糸状菌ではまだまだあまり利用されていない血清学的手法を用いて各菌の検出法を開発し、それらを用いて植物体中における各菌の動態を解明した。すなわち、①本研究で開発した人工接種法は、圃場試験結果と一致する信頼度の高い手法で、これを用いて主要な雪腐病菌 (*P.paddicum*、*P.iwayamai*、*T.incarnata*) の麦類に対する病原力の強弱が明らかとなった。②本研究で開発した各菌のリボソームあるいは細胞壁タンパクに対する抗血清を用いた酵素抗体法により、混合感染した植物から各種雪腐病菌を種名ごとに正確に検出できるようになった。③上記3菌の植物体への侵入方法、感染様式および相互関係が明らかになり、水田転換後の年数経過に伴う生息菌の変遷機構を解明することができた。

審査結果の要旨

本研究は、北陸地方の麦類の重要病害である褐色雪腐病（病原菌：Pythium paddicum (P), P. iwayamai (I)), 雪腐褐色小粒菌核病 (Typhula incarnata (T)) 及び紅色雪腐病 (Fusarium nivale (F)) の人工接種法と血清学的診断法を開発し、これら手法を用いて各種雪腐病菌の植物体中での動態を解明した。

圃場と同様に本病を再現できる人工接種法の開発を検討した結果、秋期から初冬の低温短日条件下で育苗した植物体を用いた人工接種法が、本病に対するコムギ品種の抵抗性の差が、圃場試験と同様に現れる信頼性の高い接種法であることが明らかとなった。そこで本接種法を用いて、特に発生量の多いP, I, T3菌の麦類に対する病原力を検定した結果、I, T, Pの順で病原力が強いことが明らかとなった。

各種雪腐病菌の血清学的診断法を開発するため、抗原としての各菌のリボソームに着目した。P, I, T, Fの4菌からリボソームを抽出し、各菌のリボソームに対する抗体を作製し、それらの特異性を4菌の他に雪腐黒色小粒菌核病菌 (T. ishikariensis (T')) とコムギのリボソームを加えて検定した。その結果、同属の菌のリボソーム間には血清学的差異は認められなかったが、Pythium 菌、Typhula 菌、F及びコムギのリボソーム間には明瞭な差が認められた。そこで、各菌のリボソーム抗体を用いたELISA法及びウェスタンブロット法により、植物体からの各菌の検出を試みた。その結果、本法により感染植物体を病名ごとに診断することが可能となった。

抗リボソーム血清を用いた酵素抗体法では識別できない2種の褐色雪腐病菌PとIの診断法を開発するため、両菌の特異的タンパク質を検索した結果、両菌は細胞壁に分子量の異なる数種の特異的糖タンパク質を有していることが明らかとなった。そこで細胞壁糖タンパク質に対する抗体を作製し、本抗体を用いたウェスタンブロット法により、PとI感染植物体から両菌の検出を試みた結果、PとIの特異的糖タンパク質が検出され、これらをマーカーにすることにより、両菌の感染の有無を容易に判定できることが明らかとなった。

上記血清学的検出法を用いて、P, I及びTの植物体中での動態と混合感染下での各菌の相互関係を調査した。その結果、オオムギにおける上記3菌の主な感染部位はPythium 菌とTで異なり、PとIは植物体の地上部（葉身部、葉鞘部）を蔓延し、最終的に生長点を侵害する感染様式をとるのに対し、Tは主に植物体の地下部で蔓延して植物体の再生に影響を与えることが明らかになった。混合感染植物体から検出される各菌の菌量から、競争力は、T, I, Pの順で強いことが明らかになった。またこれら各菌の生態的特徴から、圃場における各種雪腐病菌の変遷機構を解明することができた。

以上のように、本研究により雪腐病の人工接種法及び診断法が開発され、また本研究で明らかになった各菌の生態的特徴は、今後本病の生態的病除技術を確立する上で重要な基礎的知見を与えるものである。よって審査員一同は本論文提出者は博士（農学）の学位を受けるに値すると判定した。