

(様式第 1 3 号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: NGUYEN THI QUYET

題目: 野生きのこから分離した菌類による植物病害の抑制に関する研究
(Studies on the inhibition of plant diseases by fungal strains isolated from wild mushrooms)

植物病害の防除には、抵抗性品種や化学合成農薬の利用が一般的であるが、高度抵抗性品種の罹病化や過度な農薬使用による薬剤耐性菌の出現が問題になっている。近年、微生物を用いた植物病害の防除に関する研究が盛んに行われている。野生きのこに寄生・共生する菌類には、未だに未同定のものも多く、病害防除に利用可能な未知の有用な菌が存在すると考えられる。本研究は野生きのこから分離した菌類による植物病原菌の抑制について調査した。

1. 野生きのこからの菌分離とスクリーニング

日本国内で採取した46種類の野生きのこから、105菌株が分離された。90分離菌のうち20菌株の培養ろ液がイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制した。これらの分離菌の培養ろ液の熱処理を行った結果、イネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成と抑制しないグループ、イネいもち病菌の感染行動を抑制するグループ、孢子発芽を抑制しないが、付着器形成を抑制するグループの3つのグループに分類された。また、オオムギ葉上で、O1、O3、S5及び S9分離菌の培養ろ液の前処理することによりイネいもち病の病斑形成を抑制した。ITS領域の解析により、これらの菌は*Annulohyphoxylon* sp. (S9)、*Nigrospora* sp. (S5) 及び *Penicillium* sp. (O1 及びO3) と高い相同性を示した。これらの結果から、野生きのこから分離された菌類がイネいもち病の防除に利用できる可能性が示された。

2. O821 菌株の培養ろ液の植物病原菌に対する抑制効果について

最もイネいもち病菌の感染抑制効果の高い培養ろ液として、O821 菌株に注目して研究を進めた。ITS領域のシークエンス解析により、本菌株は*Biscogniauxia*属菌であることが推定された。熱処理(121°C、20分間)したO821 菌株の培養ろ液(O821-CF)は無処理のO821-CFと同様にイネいもち病菌の孢子発芽及び付着器形成を抑制した。O821-CFは濃度依存的にイネいもち病菌の菌糸生育を抑制し、イネいもち病以外の複数の地上病害及び土壌病害の植物病原菌の感染行動を濃度依存的に抑制した。これらのことから、O821-CF中には抑制物質が存在し、その物質が熱安定な物質であることが示唆された。

イネいもち病菌との混合接種では、O821-CFはいもち病の病斑形成を抑制し、前処理においても発病が抑制された。O821-CFはキュウリ体上でもキュウリの重要な病害である褐斑病及び炭疽病の病斑形成にも抑制効果を示した。これらの結果から、O821-CF中にイネいもち

病菌だけでなく、キュウリの重要な病原菌である褐斑病菌及び炭疽病菌を抑制する物質も生産されることが考えられた。

3. O821菌株の培養ろ液とイネへの抵抗性誘導

O821-CFを処理したイネ葉では、過酸化水素の生成を示す褐色の3,3'-diaminobenzidine反応が観察された。同様にイネの病害抵抗性誘導関連遺伝子として知られているPBZIについても、対照区と比較して、発現量が増加していた。カタラーゼの添加により培養ろ液の抑制活性が著しく抑制され、過酸化水素がO821-CFの抑制機構において、重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、サリチル酸が抵抗性誘導に重要であることが知られているが、サリチル酸の蓄積は増加しなかった。これらのことからO821-CF中にはサリチル酸を介さず、抵抗性を誘導する物質が存在することが示された。

4. O821の培養ろ液に生産される抑制物質の分離及び同定

カラム及びHPLCを用いて、O821-CF中に生産される抑制物質の分離及び、NMR、GC/MS/MS及びFT-IRによる同定を行った。その結果、本物質が分子量248の(3aS,4aR,8aS,9aR)-3a-hydroxy-8a-methyl-3,5-dimethylenedecahydronaphtho[2,3-b]furan-2(3H)-oneで、新規な物質であることが明らかになった。展開溶媒のトルエン：酢酸エチル=1：1 (v/v)を用いた場合に、TLCのRf値0.5-0.6付近にその物質が確認でき、5 ppmからイネいもち病菌の孢子発芽及び病斑形成を抑制することを明らかになった。また、本物質を前処理したイネにおいてもイネいもち病の病斑形成を抑制することが示された。本物質を処理したイネでは、過酸化水素の生成及びPBZI遺伝子の発現量の増加が確認され、病原菌に対する直接的な抑制効果だけでなく、本物質はイネに抵抗性も誘導できる可能性が示された。

5. H921菌株の培養ろ液がイネいもち病菌に及ぼす影響

H921菌株の培養ろ液(H921-CF)中にはイネいもち病菌の孢子の感染行動を抑制する物質が存在し、この抑制物質は酢酸エチルに可溶で熱安定であった。また、H921-CFはオオムギ及びイネ上でもイネいもち病の病斑形成を抑制した。ITS領域のシーケンス解析により、本菌株が*Trichoderma*属であることが示唆された。展開溶媒のトルエン：酢酸エチル=1：1 (v/v)を用いた場合に、TLC上では、Rf値0、0.13、0.19、0.25及び0.56の位置にイネいもち病菌及びイネごま葉枯病菌の生育阻止帯が認められた。これらのことからH921-CF中にイネいもち病菌に対して抑制活性を示す複数の物質が存在する可能性が示唆された。

本研究の結果から、野生きのこにおいては、「きのこに寄生・共生する菌類」が多く存在し、それらの菌類が生産する物質が植物病原菌の防除に利用できる可能性が示された。