

氏名	はせがわ まさる 長谷川 優
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	甲第305号
学位授与年月日	平成15年 9月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	イネ内穎褐変病菌の発生生態に関する研究
学位論文審査委員	(主査) 尾谷 浩 (副査) 中島 廣光 田中 秀平 山口 武視 荒瀬 榮

## 学位論文の内容の要旨

日本では、主食用作物である水稲の安定栽培はきわめて重要であるが、食糧増産の時代が終わり、現在では品質、食味、安全性等が重要視されるようになってきている。イネの品質低下を引き起こす病害の一つに、イネ内穎褐変病が知られている。本病は *Erwinia ananas* によって引き起こされる細菌性病害の一つである。イネの内穎褐変症状は古くから知られていたが、この症状が細菌によって引き起こされることを吉田ら（1980）が初めて報告し、その後、畔上らが病原細菌の同定および命名を行った（1983）。しかし、本病は収量への影響が少ない病害であることから、これまでマイナー病害として扱われてきた。このため、本病に関する研究は少なく、また、病原菌検出技術も未確立であることなどから、発生生態は解明されていない。ところが、近年、本病が発生しやすいコシヒカリの栽培面積の増加、夏期の高温等により、本病の発生が各地で顕在化し始め、有効な防除対策を講じる上で、まず、本病の発生生態の解明が要望されている。このように、本病は主要な細菌性病害の一つとして認識されつつあり、本病の発生生態について研究することの意義は大きいと考えられる。

本病の発生生態を解明するためには、まず、病原菌の検出技術の確立が必要である。植物体における病原菌の増殖部位、動態等を明らかにする手法として、近年、発光遺伝子を導入した細菌を、二次元ルミノメーター等で検出する技術が各種細菌病で利用されている。そこで、本病についてもこの技術を利用して病原菌の動態把握を試みた。まず、海洋細菌 *Vibrio fischeri* 由来の生物発光 (*lux*) 遺伝子群を用いて、イネ内穎褐変病菌の形質転換を行い、形質転換体の中から、安定した強い発光能力を有する菌株を選抜した。選抜した形質転換菌の病原性および細菌学的性質は、親株とほぼ同様であった。また、本菌は対数増殖期終わりから定常期初めにかけて急激に発光し、その後の発光は認められなかったことから、本菌は急激に増殖する場合のみに発光すると考えられた。これらのことから、本菌を利用することにより、試料を破壊することなく植物体上における病原菌の動態把握が可能となり、本菌は病原菌の発生生態の解明に有効であると考えられた。

この形質転換菌の検出技術を用いて、病原菌の初感染前の増殖部位について検討を行った。菌液の接種により葉先、下位葉鞘、下位葉身等の枯死組織で強い発光が認められ、これらの組織が本菌の増殖の場となることが示唆された。一方、緑色健全組織および止葉葉鞘内部ではこのような発光は認め

られなかった。また、枯死組織ではわずか 20cfu の接種によっても強い発光が認められ、菌が急激に増殖することが示唆された。つづいて病原菌の籾感染から発病に至る過程について検討を行った。開花 12 時間後の葯で最初に発光が認められ、さらに 24~48 時間後の内穎内部器官の柱頭あるいは子房基部、鱗被で強い発光が認められた。このような発光が認められた籾の大半が、開花 48~72 時間後に発病に至った。開花後の柱頭には多量の花粉が付着しており、発病籾の柱頭は褐変していたが、健全籾ではこのような褐変は認められなかった。つぎに、葯における発光について詳細に検討を行った。開花直後の葯ではわずか 20cfu の菌接種によっても強い発光が認められ、枯死組織と同様に低密度の菌の感染でも急激に増殖することが示唆された。また、発光する葯内部の顕微鏡観察により、発光部位は葯内側の組織および花粉表面であることが明らかとなった。なお、開花前の葯への菌接種では発光が認められなかったことから、菌は開花前の葯に感染できないと考えられた。開花 20 日後の籾に付着している葯では、菌液の接種により強い発光が認められ、開花後長期間経過した葯においても、本菌の増殖が可能であった。これらのことから、イネの開花後の葯、内穎内部器官の柱頭、子房、鱗被等は病原菌の重要な増殖部位であるとともに、これらの内穎内部器官における病原菌の増殖には花粉の付着が関与している可能性が示唆された。

二次元ルミノメーターによる発光観察では、菌が急激に増殖している場合は検出可能であるが、菌が低密度あるいは増殖していない場合の検出は困難である。発生病態の解明のためには、低密度の菌の存在部位も明らかにする必要がある。そこで、形質転換菌の選択培地の作製を行うため、Goto ら (1990) の *E.ananas* 選択培地 (NSVC) にテトラサイクリンを加えて選択性の向上を図るとともに若干の改良を行った。この改良培地を用いることにより、イネ枯死組織等における低密度の形質転換菌を選択的に検出することに成功した。一方、病原菌の伝染経路の解明を行うために、自然界に存在する病原菌の検出技術の確立が必要であることから、野性株を検出するための選択培地の作製を行った。NSVC 培地では非病原性 *E.ananas* および *Erwinia herbicola* も生育することから、病原性 *E.ananas* のみを検出することは困難である。そこで、病原性 *E.ananas* の選択性を向上するために、各菌のイノシトール利用能の相違に着目して NSVC 培地の改良を行った。改良培地の組成は、イノシトール 10g、ペプトン 10g、NaCl 50g、シクロヘキシミド 100mg、バンコマイシン 100mg、蒸留水 10 および寒天 15g とし、NSVC-In 培地と命名した。本培地上では、病原性 *E.ananas* は良好な生育を示し、培養 6 日後には大型で乳白色の粘稠集落を形成した。一方、非病原性 *E.ananas* おおよび *E.herbicola* の生育は劣り、病原性 *E.ananas* おとの識別は容易であった。また、本培地の平板効率は、栄養源を豊富に含む培地と同等であった。そこで、本培地を用いてイネ枯死組織から病原菌の検出を試みた結果、選択的に病原菌を検出することに成功した。

本研究で作製した形質転換菌および野性株の各選択培地を用いて、病原菌の伝染経路、イネ体上における伝染等について検討を行った。まず、本病の第一次伝染源を解明するために、種子、水田のイネ残渣、畦畔雑草について検討を行った。形質転換菌の保菌種子では、浸種液および苗から本菌が再分離され、また、一般種子の場合も同様の結果が得られたことから、病原菌が種子から苗に伝染することが示唆された。なお、一般のみかけ上健全種子からも病原菌が検出され、病原菌は種子に普遍的に存在することが示唆された。つづいて移植前の水田のイネ残渣等から病原菌の検出を試みた結果、イネ刈り株、稲わらおよび移植直前の田面水から病原菌が検出された。とくにイネ刈り株基部からは、病原菌が高率に検出され、病原菌の越冬場所として重要であることが示唆された。一方、7 種類の畦畔雑草の保菌について検討を行ったが、いずれの雑草からも病原菌は検出されなかった。また、これらの雑草における形質転換菌の増殖は緩慢であり、病原菌はイネへの寄生性が高いことが示唆された。以上のことから、本病の主要な第一次伝染源は、イネ種子およびイネ残渣であることが示唆された。つぎに、イネ体における形質転換菌の伝播について検討を行った。本菌は保菌組織の接触、温室条件

下における下位葉鞘表面の水、ツマグロヨコバイ等の昆虫によって、イネ上位あるいは他の健全イネに伝播されることが明らかとなった。なお、野外のイネにおける病原菌の増殖部位は、枯死組織、柱頭、葯等であることが確認され、発光観察の結果と一致した。

発病籾の柱頭の褐変と葯内部の発光観察の結果から、発病における花粉の役割について検討を行った。発病には柱頭あるいは内穎基部への花粉の付着が必要であり、また、病原菌は花粉表面に存在する粘着物質を利用して増殖した。したがって、花粉は病原菌の重要な増殖部位であり、発病に大きく関与することが示唆された。

以上のことから、本研究では病原菌の第一次伝染源、水田におけるイネ上位への病原菌の伝播様式、開花期前後のイネ体における病原菌の動態について多くの知見を得ることができた。これらの知見は今後の防除対策およびさらなる研究に役立つものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

*Erwinia ananas* によって引き起こされるイネ内穎褐変病は収量への影響が少ないことから、これまでマイナー病害として扱われてきたが、近年、本病の発生が各地で顕在化し始め、大きな問題となっている。しかし、有効な防除対策を講じる上で極めて重要な病原菌の発生生態については明らかとなっていない。本研究は、内穎褐変病菌の発生生態を明らかにする目的で、病原菌のイネ体における動態、第一次伝染源、水田における伝播様式等について詳細に検討したものであり、その概要は以下の通りである。

海洋細菌 *Vibrio fischeri* 由来の生物発光 (*lux*) 遺伝子群を用いて、内穎褐変病菌の形質転換を行い、安定した強い発光能力を有する形質転換菌を選抜した。本菌の病原性および細菌学的性質は親株と同様であり、急激に増殖する場合に強く発光することから、本菌を用いて植物体上における病原菌の動態把握が可能であると思われた。そこで、本形質転換菌を用いて、病原菌の籾感染前の増殖部位について検討した。菌接種により葉先、下位葉鞘、下位葉身等の枯死組織で強い発光がみられ、枯死組織ではわずかの菌接種によっても強く発光することから、枯死組織が本菌の増殖の場となることが示唆された。次に、病原菌の籾感染から発病に至る過程について検討した。菌接種により開花後の葯で最初に、さらに内穎内部器官の柱頭あるいは子房基部、鱗被で強い発光がみられ、発光した籾の大半が開花後に発病した。開花直後の葯ではわずかの菌接種によっても強い発光がみられ、枯死組織と同様に低密度の菌の感染でも急激に増殖した。また、顕微鏡観察により、発光部位は葯内側の組織および花粉表面であった。以上の結果から、イネの開花後の葯、内穎内部器官の柱頭、子房、鱗被等は本菌の重要な増殖部位であるとともに、これらの内穎内部器官における病原菌の増殖には花粉の付着が関与していることが示唆された。

形質転換菌による発光観察では、菌が低密度あるいは増殖していない場合は検出が困難である。発生生態の解明のためには、低密度の菌の存在部位も明らかにする必要があるので、形質転換菌の選択培地の作製を試みた。既報の *E.ananas* 選択培地 (NSVC) にテトラサイクリンを加えた結果、低密度の形質転換菌を選択的に検出することが可能となった。一方、病原菌の伝染経路を解明するためには、自然界に存在する病原菌の検出技術の確立が必要である。NSVC 培地では非病原性 *E.ananas* および *E.herbicola* も生育し、病原性 *E.ananas* のみを検出することは困難であるので、各菌のイノシトール利用能の相違に着目した NSVC 改良培地を作製した。その結果、本培地上では、病原性

*E.ananas*のみ良好な生育を示し、選択的に病原性 *E.ananas*を検出することが可能となった。

本研究で作製した各選択培地を用いて、病原菌の伝染経路、イネ体上における伝染等について検討した。形質転換菌の保菌種子では、浸種液および苗から本菌が再分離され、一般種子の場合も同様の結果が得られたことから、病原菌が種子から苗に伝染することが示唆された。なお、みかけ上健全な種子からも病原菌が検出され、病原菌は種子に普遍的に存在するものと思われた。次に、移植前の水田のイネ残渣等から病原菌の検出を試みた結果、イネ刈り株、稲わらおよび移植直前の田面水から病原菌が検出され、特にイネ刈り株基部からは、病原菌が高率に検出された。一方、畦畔雑草からは病原菌は検出されず、雑草における形質転換菌の増殖も緩慢であることから、本病の主要な第一次伝染源は、イネ種子およびイネ残渣であると思われた。次に、イネ体における病原菌の伝播について検討した結果、本菌は保菌組織の接触、温室条件下における下位葉鞘表面の水、ツマグロヨコバイ等の昆虫によって、イネ上位あるいは他の健全イネに伝播されることが明らかとなった。なお、野外イネにおける病原菌の増殖部位は、枯死組織、柱頭、葯等であることが確認され、発光観察の結果と一致した。発病初めの柱頭の褐変と葯内部の発光観察の結果から、発病における花粉の役割について検討した。発病には柱頭あるいは内穎基部への花粉の付着が必要であり、また、病原菌は花粉表面に存在する粘着物質を利用して増殖した。したがって、花粉は病原菌の重要な増殖部位であり、発病に大きく関与することが示唆された。

以上のように、本論文は、これまで不明であったイネ内穎褐変病菌の発生生態に関して多くの重要な知見を提示しており、今後の本病防除対策に直結する成果として高く評価され、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。