

学 位 論 文 題 名

イネかさ枯病に関する研究

学位論文内容の要旨

イネかさ枯病は、1983年世界ではじめて青森県で発見された新病害である。

イネかさ枯病の病徴は、イネの葉身に黄色で円形～長円形の大型病斑を形成するもので、病斑の中心部は直径1～2 mm程度の褐点または長さ数mm程度の褐条となり、その周囲は黄色～黄褐色のハローとなる。この病徴からイネ科牧草等の例に従い、病名を「かさ枯病、英名 bacterial halo blight」とした。多発条件下では葉鞘部分にも類似の病斑を形成することがあるが、穂の発病は確認されていない。病原細菌の人工接種は容易で、無傷・付傷接種とも自然発病に類似する病斑を形成した。

青森県における本病の発生分布は主に津軽半島一帯に集中し、常発地は一部地域に限られ、他はいずれも単年度だけの発生であった。本病はイネの幼穂形成期から減数分裂期にかけて一斉に発生し、その後は新たな病勢進展は見られず徐々に衰退し、出穂期までには病斑は消失した。本病発生には気温の影響は少なく、数日間の連続降雨の7～10日後に病勢が急激に進展する傾向が明らかであった。

病原細菌はグラム陰性桿菌で、大きさは $0.5\sim0.9\times1.2\sim2.6\mu\text{m}$ 、1～5本の単極べん毛を有し、ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の菌体内蓄積は認められなかった。普通寒天培地上でのコロニーは白色、円形、全縁、わずかに中高で、表面平滑であった。好気性でグルコースを酸化的に分解し、King's B培地上で黄緑色蛍光色素を産生した。また、40℃で発育できず、タバコ過敏反応は陽性であったが、オキシダーゼ、アルギニンジヒドロラーゼの活性及びジャガイモ塊茎の腐敗は陰性であった。これらの性質並びにその他の詳細な検査結果のほとんどは *Pseudomonas syringae* van Hall 1902 と一致した。また、本細菌はイネの他に、オオムギ、エンバク及びインゲンマメにのみ寄生性を示し、これは既知の *P. syringae* 群菌いずれとも異なるものであった。以上の結果から本細菌をイネに病原性を有する *P. syringae* の pathovar と認め、新学名 *P. syringae* pv. *oryzae* Kuwata 1985とした。

自然発病イネの病斑組織から分離される菌数と、病斑のハロー部分の大きさとの間には、有意な正の相関が認められた。自然発病及び人口接種病斑ともに、中心の褐変部分から高濃度の菌が分離されるが、周囲のハロー部分から分離される菌数は極めて少ないか、または全く分離されなかった。病斑形成と接種菌量との関係は、無傷噴霧接種では 10^7 CFU/ml、付傷噴霧接種では 10^3 CFU/ml が病斑を形成できる限界の菌量であった。菌はイネ葉組織内で対数増加的に増殖し、菌数が最高値に達した後に接種部の周囲にハローが発現しはじめた。菌の組織内での増殖量の推移は、しゃ光条件下でも日照条件下と同様に対数的な増加を示したが、しゃ光条件下ではハローの形成は接種10日後でも認められなかった。しかし、接種後しゃ光条件下に置いたイネを途中で日照条件下に移すと、その翌日には鮮明なハローが形成された。

本菌の液体培養で対数増加期の濾液にはイネ葉に対する毒性は認められず、最高値に達して以降、減数期にかけての濾液に毒性が認められた。この濾液処理によって自然発病及び人口接種によるものと同様のハローが形成され、毒素の産生が推定された。本菌の培養濾液を処理したイネをしゃ光条件下に置いた場合には、ハローは生じなかったが、これを日照条件下に移すと、その翌日には鮮明なハローが発現した。平板培養菌を蒸留水に懸濁しただけの濾液でも、イネ葉にハローを生じたが、この懸濁液中の生菌数が減少しても濾液の毒性に変化は見られなかった。培養濾液はイネ以外に、供試した植物すべての葉にイネに類似するハローを生じ、菌の宿主範囲とは無関係であり、本菌毒素は他の *P. syringae* 群菌の毒素同様に非特異的なものと認められた。培養濾液は $110^{\circ}\text{C} \cdot 10$ 分間の加熱処理によって、また $1/32$ 以上の希釈によってイネ葉にハローを生じなくなった。

本菌はジャガイモ、サツマイモ、ニンジン等の各種植物の貯蔵組織に対して、組織の肥大やカルス誘導等の生理活性を示さなかった。また、*Geotrichum candidum* 及びその他26種の植物病原糸条菌に対して、生育阻害活性は認められなかった。本菌は *Escherichia coli* に対して生育阻害作用を示し、この作用はL-グルタミンによって部分的に、または完全に回復し、*P. syringae* pv. *tabaci* 及び *P. syringae* pv. *coronafaciens* についての結果と一致した。本菌の液体培養濾液は *E. coli* の生育を阻害し、イネ葉にハローを生じたが、これらの作用性は、 $120^{\circ}\text{C} \cdot 10$ 分間の加熱で部分的にまたは完全に失活した。またL-グルタミン添加によって *E. coli* 生育阻害は不完全ながら回復した。以上の結果は、本菌毒素は *P. syringae* pv. *tabaci* 及び *P. syringae* pv. *coronafaciens* の毒素（タブトキシン）と類似したものであることを示すものと認められた。

本菌毒素の構造決定を試みた結果、毒素はトレオニン及び非蛋白構成アミノ酸から成るジペプ

チドであった。1 Mピリジン溶出粗毒素及び0.2Mピリジン平衡化陽イオンカラム溶出の精製毒素を、D₂O 中で270MHz・¹H-NMR 分析した結果、粗毒素にはタブトキシンが、また精製毒素にはタブトキシンと iso-タブトキシンが含まれることが明らかとなり、本菌の病徴発現毒素はタブトキシンと同定された。タブトキシンの異性化はカラム中の存在時間が長いために起こるもので、流速を2 倍にすると異性化していないタブトキシンを得ることができた。

本菌の継代培養により病原性を喪失した菌株は、2、3 の細菌学的性質に変化が見られたものの、*P. syringae* の主要な性質は保持していると認められた。病原性喪失株は野性型株と同様にイネ葉組織内で増殖したが、ハローの発生は認められなかった。また、その液体培養濾液処理によっても、イネ葉のハロー発生及び *E. coli* の生育阻害は認められなかった。本菌をアクリジノオレンジ添加液体培地で培養することにより、*E. coli* 生育阻害能の喪失が認められ、本菌の毒素産生能はプラスミドにより支配されている可能性が示唆された。

本病の種子伝染の可能性が考えられ、また病原細菌は乾燥罹病葉内で長時間生存が可能であり、これらが、本病の第一次伝染源となる可能性が示された。

オキシテトラサイクリン・ストレプトマイシン水和剤に *in vitro* での菌の発育阻害効果が高く、またポット試験で本剤の高い病斑形勢阻止効果が認められた。本病の初発直前から初発時にかけて、本剤500倍液を1 回散布することにより、高い防除効果が認められた。

病原細菌の分類学上の地位、ハロー形成要因の解明、第一次伝染源、並びに薬剤防除等の諸問題について考察した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	生 越	明
副 査	教 授	木 村	郁 夫
副 査	教 授	喜久田	嘉 郎
副 査	助教授	小 林	喜 六

本論文は和文で記され、図28、表33、引用文献118を含み、総頁数166よりなる。内容は12章をもって構成され、参考文献25編が添えられている。

イネかさ枯病は、1983年世界ではじめて青森県において発見された病害である。本論文は、そ

の発見者が病気の発生状況、病徴、病原、病原性に関与する毒素、防除法等について行った研究を取りまとめたものであり、その概要は次の通りである。

イネかさ枯病の常発地は北津軽郡など一部地域に限られ、イネの幼穂形成期から減数分裂期にかけて、数日間の連続降雨の7～10日後に病勢が急激に進展する傾向が明らかであった。

本病の病徴はイネの葉身に黄色で円形～長円形の大型病斑を形成するもので、病斑の中心部は直径1～2 mm程度の褐点または長さ数mm程度の褐条となり、その周囲は黄色～黄褐色のハローとなる。この病徴からイネ科牧草等の例に従い、病名を「かさ枯病、英名 bacterial halo blight」とした。

病原は細菌であり、グラム陰性、極毛性桿菌で白色コロニーを形成した。好気性でグルコースを酸化的に分解し、King's B培地上で黄緑色蛍光色素を産生した。40℃で発育できず、タバコ過敏反応は陽性であったが、オキシターゼ、アルギニンジヒドローゼ及びジャガイモ塊茎腐敗は陰性であったことから、*Pseudomonas syringae* van Hall 1902と一致した。また、本細菌はイネの他にオオムギ、エンバク及びインゲンマメにのみ寄生性を示し、これは既知の *P. syringae* 群菌のいずれとも異なるものであった。以上の結果から、本細菌をイネに病原性を有する *P. syringae* の新 pathovar と認め、*P. syringae* pv. *oryzae* Kuwata 1985 とした。

病斑組織から分離される菌数と、病斑のハロー部分の大きさとの間には、有意な正の相関が認められ、病斑中心の褐変部分から高濃度の菌が分離された。菌はイネ葉組織内で対数増加的に増殖し、菌数が最高値に達した後に接種部の周囲にハローが発現しはじめた。菌の組織内での増殖量の推移は、遮光条件下でも日照条件下と同様に対数的な増加を示したが、遮光条件下ではハローの形成は接種10日後でも認められなかった。しかし、接種後遮光条件下に置いたイネを途中で日照条件下に移すと、その翌日には鮮明なハローが形成された。

本菌の液体培養で対数増加期の濾液には、イネ葉に対する毒性は認められず、最高値に達して以降、減数期にかけての濾液に毒性が認められた。この濾液処理によって、自然発病及び人工接種によるものと同様のハローが形成され、毒素の産生が推定された。培養濾液はイネ以外にも、供試した植物すべての葉にイネに類似するハローを生じ、菌の宿主範囲とは無関係であった。培養濾液は110℃・10分間の加熱処理によってイネ葉にハローを生じなくなった。

本菌はジャガイモ等の植物貯蔵組織に対して肥大等の生理活性を示さなかった。また、*Geotrichum candidum* 及びその他26種の植物病原糸状菌に対して生育阻害活性を示さなかった。*Escherichia coli* に対して生育阻害作用を示し、この作用はL-グルタミンによって部分的にまたは完全に回復し、*P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *coronafaciens* につい

ての結果と一致した。

本菌の液体培養濾液を用いた実験でも、微生物に対する作用性、熱による失活など菌体と同様の結果を得た。

培養濾液から抽出した本菌毒素は、トレオニン及び非蛋白構成アミノ酸から成るジペプチドであった。粗毒素及び精製毒素を NMR 分析した結果、粗毒素にはタブトキシンが、また精製毒素にはタブトキシンと iso-タブトキシンが含まれることが明らかとなり、本菌の病徴発現毒素はタブトキシンと同定された。本菌の継代培養により病原性を喪失した菌株は、野性型株と同様にイネ葉組織内で増殖したが、ハローの発生は認められなかった。また、その液体濾液処理によっても、イネ葉にハロー発生はなく、*E. coli* の生育阻害は認められなかった。更に、本菌の毒素産生能はプラスミドにより支配される可能性が示唆された。

種子及び乾燥罹病葉が本病の第一次伝染源となる可能性が示された。また、本病の初発直前から初発時にかけて、オキシテトラサイクリン・ストレプトマイシン剤500倍液を1回散布することにより、高い防除効果が認められた。

以上の研究成果は、新病害の記載とともに、病原細菌の同定、病徴発現機構の解明を行い、さらに防除対策まで示したものであり、高く評価される。よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 桑田博隆は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。