

## コムギの雪腐黒色小粒菌核病抵抗性の解析

## 学位論文内容の要旨

秋播きコムギは9月に播種後、100日から150日に及ぶ積雪期間を経て、翌年の7月に収穫を迎える。積雪下でコムギは根雪前に蓄積したエネルギー源（主にフルクタン）を消費しながら生きながらえ、その過程で雪腐病菌がコムギを加害する。コムギの雪腐病抵抗性は秋から冬にかけての低温順化過程で発現し、様々な因子が関与する圃場抵抗性を示すが、その発現機構には不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、積雪期間にコムギに重大な被害を引き起こす雪腐病、特に雪腐黒色小粒菌核病（以下、雪腐病と称する）について、本病原菌のコムギに対する病原力及びコムギの雪腐病抵抗性の発現機構の両面から解析を行った。

## 1. コムギの雪腐病抵抗性室内検定法の開発と雪腐病菌の病原力の解析

効率的な抵抗性及び病原力の評価を行うため、室内検定法の開発を行った。人工気象室内で育成したコムギを用いて雪腐病菌を接種後8℃、暗黒、高湿度条件下に静置することで、催芽から3カ月で抵抗性評価を行うことができた。そして検定期間の短縮、供試コムギの均質化、通年にわたる検定の実施が可能となった。そして雪腐病菌の病原力の評価に上記の室内検定法が利用可能なことがわかった。

次に本菌の有性世代を利用して得られる遺伝的背景に近い後代菌株間で病原力を比較するため、本菌の子実体形成を試みた。10℃/5℃（昼/夜）、8時間日長、光強度 $46 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、多湿条件で3~4週間培養することにより雪腐病菌の菌核から子実体を形成させることに成功した。子実体から単分離した担子孢子由来のモノカリオン菌株同士を交配することにより、後代菌株（合成ダイカリオン）が得られた。モノカリオン菌株はすべて病原力が弱かった。一方、合成ダイカリオン菌株の病原力は、交配するモノカリオン菌株の組み合わせにより大きく変化することがわかった。

以上のように、雪腐病抵抗性及びコムギに対する雪腐病菌の病原力を室内で解析する実験系が開発された。本室内検定法及び同一子実体由来のモノカリオン間の交配により得られるダイカリオン菌株を利用することで、病原力を詳細に解析することが可能となった。

## 2. コムギの雪腐病抵抗性発現機構の解析

## 1) キチナーゼ遺伝子の発現と雪腐病抵抗性

コムギは播種から根雪前にかけて低下する気温を認識して雪腐病抵抗性を発現させる。病害抵抗性と関連することが明らかとされているキチナーゼ遺伝子をコムギから単離するとともに、低温順化過程及び積雪下での発現解析を行うことで、雪腐病抵抗性の発現とキチナーゼ遺伝子との関連について検討した。

野外で低温順化したコムギからキチナーゼ遺伝子を3種類（*chi1*、*chi7*、*chi10*）単

離した。低温順化過程（積雪前）では、*chi1* と *chi10* は葉で、*chi7* はクラウンで発現量が多かった。すべての単離遺伝子は葉で低温順化が進むに従い発現量が増加した。しかしコムギ品種間では、それらの遺伝子の発現量には顕著な差は検出されなかった。積雪下では、雪腐病抵抗性の強いコムギ「PI 173438」の葉において、*chi1* 及び *chi10* の発現量が雪腐病菌を接種後 10、20 日目で特異的に増加した。雪腐病抵抗性の弱い「Valuevskaya」では、それらの発現量が接種後 10 日目で増加したが、20 日目には急激に減少した。

## 2) フルクタン蓄積量と雪腐病抵抗性

コムギでは、フルクタンの蓄積量の増加と雪腐病抵抗性の増強との間に関連があることが報告されている。そこで雪腐病抵抗性発現に対するフルクタンの役割を明らかにする目的で、積雪下での雪腐病菌の感染によるフルクタン蓄積量の変動について解析した。

無接種条件では、コムギ品種によらず葉とクラウンでフルクタンが徐々に分解された。菌接種後 10 日目では無接種の場合と比べ、フルクタン蓄積量に差が検出されなかったが、接種後 20 日目では無接種の場合に比べフルクタンの分解が急速に進んだ。特に雪腐病抵抗性の弱い Valuevskaya の葉で、フルクタン蓄積量の減少が顕著だった。

## 3) コムギのフルクタン代謝に関する分子生物学的解析

植物種及びその生育ステージによって蓄積されるフルクタンの構造が異なる。そのためコムギが低温順化過程で発現するフルクタンの合成・分解に関与する酵素遺伝子の解析を行った。

コムギでは、光合成により合成されるスクロースを基質として、sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) が 1-ケストースを合成し、スクロースと 1-ケストースを初期の基質として sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) によってフルクタンが合成される。しかし低温順化過程で蓄積するフルクタンの合成には、それらの酵素以外に fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) が必要であることがわかった。さらにフルクタン分解に関与する 4 種類の fructan exohydrolase (FEH) 遺伝子をイネ科植物から初めて単離し、それらがコードするタンパクの一次構造や基質特異性を明らかとした。それらの単離遺伝子は、低温順化過程及び積雪下では主にクラウンで発現していた。

以上のことから、積雪下におけるフルクタン蓄積量とキチナーゼ遺伝子の発現量の変化を比較し、コムギの雪腐病抵抗性について以下のように考察した。

雪腐病抵抗性の弱いコムギは、低温順化過程（積雪前）でのフルクタン蓄積量が少なく、積雪下では感染による消耗も多いため、フルクタン蓄積量が急激に減少する。フルクタンは積雪下で主なエネルギー源であることから、その蓄積量の減少はコムギ組織の生理活性の低下につながる。そしてキチナーゼ遺伝子の発現量が減少し雪腐病菌抵抗性が著しく低下することで、感染が早く進行し被害が大きくなる。そのため、低温順化過程でフルクタンを多量に蓄積し、積雪下では効率的に病害抵抗性を誘導する機構を持つコムギほど、雪腐病抵抗性が強いことが明らかとなった。

本研究で得られた知見によって、キチナーゼ遺伝子の発現やフルクタンの蓄積及び分解がコムギの雪腐病抵抗性の増加と関連することを明らかとするとともに、コムギの雪腐病抵抗性及び雪腐病菌の病原力を効率的に評価する手法を確立した。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	内藤繁男
副査	教授	幸田泰則
副査	教授	大澤勝次
副査	助教授	近藤則夫
副査	教授	松本直幸 (筑波大学連携大学院)

## 学位論文題名

### コムギの雪腐黒色小粒菌核病抵抗性の解析

本論文は、図 74、表 11、203 頁からなる和文であり、別に参考論文 9 編が付されている。

秋播きコムギは 9 月に播種後、100 日以上に及ぶ積雪期間を経て、翌年の 7 月に収穫を迎える。積雪下でコムギは根雪前に蓄積したエネルギー源（主にフルクタン）を消費しながら生きながらえ、その過程で雪腐病菌がコムギを加害する。コムギの雪腐病抵抗性は秋から冬にかけての低温順化過程で発現するが、その発現機構には不明な点が多い。そこで本研究では、積雪期間にコムギに重大な被害を引き起こす雪腐黒色小粒菌核病（以下、雪腐病と称する）について、本病原菌のコムギに対する病原力及びコムギの雪腐病抵抗性の発現機構の両面から解析を行った。

#### 1. コムギの雪腐病抵抗性室内検定法の開発と雪腐病菌の病原力の解析

効率的な抵抗性及び病原力の評価のため、室内検定法の開発を行った。人工気象室内で育成したコムギを用いて雪腐病菌を接種後 8℃、暗黒、高湿度条件下に静置することで、催芽から 3 カ月で抵抗性評価を行うことができた。また供試コムギの均質化、通年にわたる検定の実施が可能となった。

次に本菌の有性世代を利用して得られる後代菌株間で病原力を比較するため、本菌の子実体形成を試みた。10℃/5℃（昼/夜）、8 時間日長、光強度  $46 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、多湿条件で 3~4 週間培養することにより子実体の形成に成功した。子実体から単分離した担子孢子由来のモノカリオン菌株を交配して作出した後代菌株の病原力は、モノカリオン菌株の組み合わせにより大きく変化した。

以上のように、雪腐病抵抗性及び雪腐病菌の病原力を室内で解析する実験系が開発された。本室内検定法及び同一子実体由来のモノカリオン菌株間の交配により得られる後代菌株を利用し、病原力を詳細に解析することが可能となった。

#### 2. コムギの雪腐病抵抗性発現機構の解析

### 1) キチナーゼ遺伝子の発現と雪腐病抵抗性

コムギからキチナーゼ遺伝子を単離し、低温順化過程及び積雪下での発現解析を行うことで、雪腐病抵抗性の発現とキチナーゼ遺伝子との関連を解析した。

コムギからキチナーゼ遺伝子3種類 (*chi1*, *chi7*, *chi10*) を単離した。低温順化過程では、*chi1* と *chi10* は葉で低温順化が進むに従い発現量が増加した。積雪下では、雪腐病抵抗性の強いコムギの葉では、*chi10* の発現量が雪腐病菌を接種後 10、20 日目で特異的に増加した。雪腐病抵抗性の弱いコムギでは、その発現量が接種後 10 日目で増加したが、20 日目には急激に減少した。

### 2) フルクタン蓄積量と雪腐病抵抗性

コムギでは、低温順化中にフルクタンが多量に蓄積する。雪腐病抵抗性の発現に対するフルクタンの役割を明らかにするため、積雪下での雪腐病菌の感染によるフルクタン蓄積量の変動を解析した。

無接種条件では、コムギ品種によらずフルクタンが徐々に分解された。雪腐病菌接種後 20 日目では、雪腐病抵抗性の弱いコムギで特に、フルクタンが急激に分解された。

### 3) コムギのフルクタン代謝に関する分子生物学的解析

低温順化過程で発現するフルクタンの合成・分解に関与する酵素遺伝子を解析した。

スクロースを基質として、sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase が 1-ケストースを合成し、スクロースと 1-ケストースを初期の基質として sucrose:fructan 6-fructosyltransferase によってフルクタンが合成される。しかし低温順化過程で蓄積するフルクタンの合成には、さらに fructan:fructan 1-fructosyltransferase が必要であった。またフルクタン分解に関与し、基質特異性の異なる4種類の fructan exohydrolase 遺伝子をイネ科植物から初めて単離した。それらの単離遺伝子は、低温順化過程及び積雪下では主にクラウンで発現していた。

以上のことから、積雪下でのフルクタン蓄積量とキチナーゼ遺伝子の発現量の変化を比較し、コムギの雪腐病抵抗性について以下のように考察した。

雪腐病抵抗性の弱いコムギは、低温順化過程でのフルクタン蓄積量が少なく、積雪下では感染による分解が多いため、フルクタン蓄積量が急激に減少する。フルクタンは積雪下で主なエネルギー源であり、その蓄積量の減少はコムギ組織の生理活性の低下につながる。そしてキチナーゼ遺伝子の発現量が減少し雪腐病菌抵抗性が著しく低下することで、感染が早く進行し被害が拡大する。そのため、低温順化過程でフルクタンを多量に蓄積し、積雪下では効率的に病害抵抗性を誘導する機構を持つコムギほど、雪腐病抵抗性が強いことが明らかとなった。

以上のように本論文では、キチナーゼ遺伝子の発現やフルクタンの蓄積及び分解がコムギの雪腐病抵抗性の増加と関連することを明らかとするとともに、コムギの雪腐病抵抗性及び雪腐病菌の病原力を効率的に評価する手法を確立した。この成果は、学術的、実用的に高く評価される。

よって、審査員一同は、川上 頤が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。