

学位論文題名

アズキ萎凋病抵抗性品種選抜に有用な
アズキ萎凋病菌の植物毒素の検出

学位論文内容の要旨

アズキ萎凋病は *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukiicola* によって引き起こされる土壌病害である。本病に罹病したアズキは、葉脈の褐変と葉の萎縮、維管束部の褐変を起こした後、急速に萎凋枯死する。症状の発現には植物毒素の関与が考えられた。アズキ萎凋病菌の宿主範囲はアズキとその近縁種に限定されており、病徴の発現に植物毒素が関与しているならば、アズキ萎凋病菌の宿主特異性への植物毒素の関与も考えられる。本研究では、アズキ萎凋病菌の病原性に関与する植物毒素の確認とその化学的特性、及び植物毒素を利用したアズキの萎凋病抵抗性品種選抜の可能性について検討した。

1. 植物体による植物毒素の生物検定

アズキ萎凋病菌の培養濾液を作出し、その希釈液を萎凋病感受性品種「ハヤテショウズ」の苗（地際部で切断した茎葉付きの苗：以下切離茎）に処理すると、自然発病の場合とはその症状は異なるが、葉や茎には褐変症状などの障害が認められた。培養濾液処理した各アズキ品種では、葉脈褐変で萎凋病感受性品種と抵抗性品種との間に差が認められたが、導管褐変では品種間差は認められず、茎の伸長は供試した全品種が抑制された。

アズキ萎凋病菌の出芽細胞 (bud-cell) を蒸留水中で培養して得た出芽細胞培養液を処理した「ハヤテショウズ」の切離茎において、罹病アズキと同様の葉脈と茎導管の褐変症状が見られ、茎の伸長抑制も認められた。褐変症状は萎凋病罹病アズキの症状に類似していたことから、病徴発現に関与する物質の存在が考えられた。20 倍に濃縮した出芽細胞培養液を処理した場合にはより明確な褐変症状と伸長抑制が認められた。出芽細胞培養液を処理した抵抗性品種「きたのおとめ」及び「しゅまり」の葉脈褐変は感受性品種「ハヤテショウズ」及び「寿小豆」よりも軽度で、萎凋病感受性と一致する品種間差が認められた。しかし、感受性品種「エリモショウズ」の褐変症状は抵抗性品種と同等に軽度であった。導管褐変と伸長抑制では萎凋病感受性品種と抵抗性品種との間に差は認められなかった。

出芽細胞培養液を処理したダイズでは葉の黄化症状を中心とする異常が認められ、インゲンマメでは出芽細胞培養液処理による異常は認められなかった。また、アズキに対して非病原性の *F. oxysporum* 13 菌株の出芽細胞培養液にも同様な毒性が認められた。特に、タマネギ乾腐病菌、クリムソクローバー病原性菌、アズキ根圏から分離した腐生性 *F. oxysporum* の出芽細胞培養液の毒性が強かった。一方、他の7つの分化型の出芽細胞培養液は毒性が低く、アズキにほとんど褐変症状を起こさなかった。アズキ萎凋病菌の出芽細胞培養液がアズキ以外の植物に対しても毒性を示し、アズキ萎凋病菌以外の *F. oxysporum* の出芽細胞

培養液がアズキに毒性を示したことから、アズキ萎凋病菌の出芽細胞培養液中の植物毒素は宿主特異的毒素ではないと考えられた。

2. 植物毒素とアズキのカルスを用いた抵抗性検定

本研究では、アズキ萎凋病菌の植物毒素とアズキのカルスを利用した抵抗性検定の可能性を検討した。透析処理後の出芽細胞培養液の内容物を 100mg/L, 50mg/L, 10mg/L の濃度で 2,4-D を添加したムラシゲ・スクーグ (MS) 培地に混入し、その培地上で萎凋病感受性品種及び抵抗性品種・系統のカルスを培養した。100mg/L 及び 50mg/L の濃度では、2 週間培養後の感受性品種のカルスと抵抗性品種・系統のカルスとの間には、褐変程度と生重で明確な差があり、各品種・系統の萎凋病感受性に一致した。抵抗性品種・系統のカルスは感受性品種のカルスに比べ褐変程度は低く、カルスの重量は増加した。一方、septoria medium 由来の培養濾液を 2,4-D 添加 MS 培地に 0.5%及び 0.1%の濃度で添加した培地に各品種・系統のカルスを移植して同様に培養したところ、各品種・系統の萎凋病感受性と褐変程度や生重との間に関連性は認められなかった。カルスによる生物検定から、アズキ萎凋病菌の出芽細胞培養液中の植物毒素はアズキ萎凋病菌の病原性に関与していることが確認された。この植物毒素とアズキのカルスを利用した萎凋病抵抗性検定は可能であり、抵抗性育種への利用も期待できると考えられた。また、出芽細胞培養液中の植物毒素と培養濾液中の植物毒性物質が互いに異なる物質であり、培養濾液中の植物毒性物質とアズキ萎凋病菌の病原性との関連性は低いことが示唆された。

3. 植物毒素の特性

出芽細胞培養液に含まれる植物毒素の特性を検討した。出芽細胞培養液を 60℃~121℃の各段階で加熱処理したところ、121℃20 分間の加熱処理で毒性の低下が認められたものの、他の条件では毒性低下はなく、この植物毒素が耐熱性を持つことがわかった。出芽細胞培養液を各種酵素, protease K, β -glucosidase, β -galactosidase, α -mannosidase で処理した結果、 β -galactosidase 処理による毒性の低下が認められたが、いずれの酵素によっても出芽細胞培養液の毒性は失活することはなかった。出芽細胞培養液の透析では、透析膜内液に活性が認められた。透析後の出芽細胞培養液の内容物をセルロファイブ GCL-2000 によりゲル濾過を行ない、その分画の毒性を生物検定試験により確認したところ、短時間で溶出された分画にアズキに対する最も強い毒性が認められ、分子量が非常に大きいことがわかった。最も強い毒性のある分画には 280nm の吸光が確認され、植物毒素にタンパク質が含まれることが推察された。培養濾液には、出芽細胞培養液の毒性の強い分画と同じ分画には吸光はほとんど認められないことから、出芽細胞培養液の植物毒素と培養濾液の植物毒性物質が異なることが示唆された。出芽細胞培養液の毒性分画について非変性ポリアクリルアミド電気泳動を行なったところ、銀染色とシッフ染色により染色されたことから、植物毒素は糖タンパクであることが推察されたが、分子量は不明であった。この分画を加水分解すると、mannose と galactose が検出され、先の酵素処理の結果と合わせ、出芽細胞培養液の植物毒素の活性への galactose の関与が考えられた。

本研究では、アズキ萎凋病菌がその病原性に関与する植物毒素を産生することが確認された。カルスを用いた生物検定では各品種の植物毒素に対する反応と萎凋病感受性が一致しており、アズキ萎凋病菌の植物毒素は、アズキ萎凋病菌の宿主特異性への関与は低いですが、アズキ萎凋病の病徴発現に重要な役割を果たしていると考えられた。この植物毒素とカルスを用いた萎凋病抵抗性アズキ品種選抜は有効であることが明らかとなった。

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 助 教 授 近 藤 則 夫

学 位 論 文 題 名

アズキ萎凋病抵抗性品種選抜に有用な アズキ萎凋病菌の植物毒素の検出

本論文は図48、表8を含む総頁数159の和文であり、別に参考論文2編が付されている。

アズキ萎凋病は *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola* を病原とし、その症状は葉脈の褐変と葉の萎縮、維管束部の褐変、最終的な萎凋、枯死である。これら病徴の発現には植物毒素の関与が考えられた。本研究は、アズキ萎凋病菌の病原性に關与する植物毒素の単離とその化学的特性、及び植物毒素を利用したアズキの萎凋病抵抗性品種選抜の可能性について検討したものであり、得られた結果の概要は以下のとおりである。

1. 植物体による植物毒素の生物検定

アズキ萎凋病菌の培養濾液（以下 CF）の希釈液を萎凋病感受性品種「ハヤテシヨウズ」の苗（地際部で切断した茎葉付きの苗：以下切離茎）に処理すると、葉の褐変などの障害が認められた。ただし、その症状は本病罹病アズキとは異なっていた。本病感受性品種と抵抗性品種との間に CF 処理による葉脈の褐変程度では差が認められたが、維管束はいずれの品種でも同様に褐変してその差は認められず、茎の伸長も全品種が抑制されるなどその差はなかった。

アズキ萎凋病菌の出芽細胞（bud-cell）を蒸留水中で培養して得た出芽細胞培養液（以下 BF）を処理した「ハヤテシヨウズ」の切離茎において、葉脈と茎維管束に褐変症状が見られ、茎の伸長抑制も認められた。褐変症状は本病罹病アズキの症状に類似しており、病徴発現に毒性物質の関与が示唆された。抵抗性品種の葉脈褐変は感受性品種よりも軽微で、本病感受性と一致する品種間差が認められた。ただ、感受性品種の中で唯一「エリモシヨウズ」の褐変の程度は抵抗性品種と同等であり、維管束褐変と伸長抑制では品種間に差はなかった。

BF 処理したインゲンマメには異常は認められなかったが、ダイズでは葉の黄化を特徴とする障害が認められた。また、アズキに対し非病原性の *F. oxysporum* 13 菌

株のBFに、アズキに対する毒性が認められた。その中でタマネギ乾腐病菌、クリムソクローバー病原性菌、アズキ根圏由来の腐生性 *F. oxysporum* のBFの毒性が強く、一方、他の7つの分化型のBFはアズキに褐変症状を起こさなかった。アズキ萎凋病菌のBFがアズキ以外の植物に対しても毒性を示し、アズキ萎凋病菌以外の *F. oxysporum* のBFがアズキに毒性を示したことから、BF中の植物毒素は宿主特異的毒素ではないと考えられた。

2. 植物毒素とアズキのカルスを用いた抵抗性検定

アズキ萎凋病菌の植物毒素とアズキのカルスを利用した抵抗性検定法を検討した。透析後のBFの内容物を10mg/L、50mg/L、100mg/Lの濃度で2,4-D添加ムラシゲ・スクーグ (MS) 培地に混入し、本病感受性品種及び抵抗性品種・系統のカルスを培養した。50mg/L及び100mg/Lの濃度では、抵抗性品種のカルスは感受性品種のカルスに比べ褐変程度は軽微で、カルス重量が植物毒素無添加の対照と同等なことからカルスの成長抑制はほとんどないなど、これらの反応は各品種・系統の本病感受性に一致した。カルスによる生物検定から、BF中の植物毒素がアズキ萎凋病菌の病原性あるいは発病力に関与していることが確認された。この植物毒素とアズキのカルスによる本病抵抗性検定は有効で、抵抗性育種への利用も期待できる。一方、CFを添加した培地では、カルスの褐変程度や重量に対する影響の間に本病感受性との関連性は認められず、BF中の植物毒素はCF内の毒性物質と異なることがあらためて示唆された。

3. 植物毒素の特性

BFを60℃～121℃の各段階で加熱処理したところ、121℃20分間の処理で毒性の低下が認められたが、植物毒素が耐熱性を持つことがわかった。BFの β -galactosidase処理による毒性の低下が認められたが、他の酵素による毒性の失活はなかった。BFの透析膜内液に活性が認められたので、セルロファイブ GCL-2000によるゲル濾過で透析BF内容物を分画し、各分画の毒性を確認したところ、分子量が非常に大きい分画に毒性が認められた。毒性分画には280nmの吸光が確認され、タンパク質の存在が推察された。非変性ポリアクリルアミド電気泳動では、銀染色とシッフ染色により植物毒素は糖タンパクであることが推察されたが、分子量は不明であった。この分画を加水分解するとgalactoseが検出され、植物毒素の活性へのgalactoseの関与が考えられた。

本研究では、アズキ萎凋病菌がその病原性に関与する植物毒素を生産することを確認し、これがアズキ萎凋病の病徴発現に関与していることを明らかにした。また、アズキ各品種の本病に対する感受性が植物毒素に対するアズキ各品種のカルスの反応と一致したことから、植物毒素とカルスを用いた抵抗性アズキ品種の選抜は本病抵抗性育種に有効であると推察される。従ってこれらの成果は、実用的に利用可能性が高く、学術的にも高く評価される。

よって、審査員一同は、藤根 統が博士 (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。