インゲンマメ苗立枯病に関与する *Pythium* 属菌の 分類とその制御に関する研究

学位論文内容の要旨

北海道の主要インゲンマメ生産地では、しばしば種子の発芽障害や生育不良、根の褐変等の苗立枯症状が観察される。これらの症状を示すインゲンマメからは *Pythium* 属菌が多く分離された。本研究では、北海道におけるインゲンマメの出芽前・後苗立枯れと *Pythium* 属菌の関連を明らかにし、景山ら (1981) が報告した連作障害の原因である *Pythium* 属菌との異同を明らかにするため、連・輪作土壌と、一般圃場から *Pythium* 属菌を分離してその種構成と病原性を比較した。さらに、それら *Pythium* 属菌に対するインゲンマメ品種・系統の感受性、環境が病原力に与える影響、および、化学的、生物的防除法について検討した。

1. *Pythium* 属菌の分類と病原性

分離した *Pythium* 属菌 68 菌株を、生殖器官 (卵孢子, 造精子) の形態から暫定的に 6 グループに分類した。それぞれの代表菌株 (A1-2-4, B1-2-12, C1-1-20, C2-2-6-1, C2-2-6-2, P-0140) をインゲンマメ‘大正金時’へ接種したところ、A1-2-4 菌株以外は不発芽や主根の伸長停止などの苗立枯症状や、連作障害として報告された生育不良・根腐れなどの症状を引起こした。また、*Pythium* 属菌は一般的に広い宿主範囲を持つので、他作物への病原性も確認した。A1-2-4 菌株を除く菌株は、エンドウ・カボチャ・ダイズ・ダイコン・タマネギ・テンサイに不発芽や苗立枯症状を起し、その病原力の強弱は *Pythium* 属菌の種によって異なっていた。

2. 病原性 *Pythium* 属菌の同定

6 つにグループ分けした *Pythium* 属菌のうちインゲンマメに病原性を示した 5 グループを、形態的・生態的特徴および ITS 領域の RFLP 解析や塩基配列解析、種特異的プライマーによる PCR 検出を組合せて同定を試みた。その結果、これら 5 グループは *P. irregulare* Buisman, *P. mamillatum* Meurs, *P. myriotylum* Drechsler, *P. spinosum* Sawada, *P. ultimum* Trow var. *ultimum* であることが判明した。

3. *Pythium* 属菌の病原力に影響する要因

Pythium 属菌を様々なインゲンマメ品種の種子に接種したところ、全体的に白色種皮品種の方が *Pythium* 属菌による苗立枯症状が激しく出る傾向があった。それぞれの種で寄生性は異なり、*P. myriotylum*, *P. spinosum*, *P. ultimum* は赤種皮品種のインゲン

マメに対しても比較的強い病原力を発揮したが、*P. irregulare*, *P. mamillatum* はそれ程強くなかった。また、温度条件を変えて育成し病原力を比較したところ、*P. myriotylum* は高温で、反対に、*P. spinosum* は低温条件で多くのインゲンマメ品種に不発芽を起こした。この2種は温度によって病原力が変化することから、実際の圃場においても季節によって被害は異なると示唆された。なお、*P. ultimum* の病原力は温度に依存せず、常にインゲンマメに強い病原性を示した。

4. インゲンマメの病原菌としての *Pythium* 属菌

景山 (1982) は、*Pythium* 属菌はインゲンマメの「連作障害」の原因菌であると報告している。本研究は、連作障害に関与する *Pythium* 属菌も、接種試験時の条件によってはインゲンマメの出芽前・後の苗立枯症状に関与することを明らかにした。そこで、この *P. irregulare*, *P. mamillatum*, *P. myriotylum*, *P. spinosum*, *P. ultimum* var. *ultimum* を病原菌として報告し、その病名を「インゲンマメ苗立枯病」と提案した。

5. インゲンマメ苗立枯病の農薬資材による防除

今回の研究では、*Pythium* 属菌によって引起されるインゲンマメ苗立枯病に対して、化学的・生物的防除法の検討を行った。まず、*Pythium* 属菌が属する卵菌類に効果があるとされる化学農薬チウラム剤をインゲンマメ種子に塗抹処理すると、圃場試験において高い防除効果を示した。また、多くの病原菌への拮抗性が報告されている *P. oligandrum* の生物農薬を種子に塗布し、病原菌土壌混和接種によるポット試験を検討した結果、チウラム剤と同等の高い防除効果が得られた。

6. 非病原性 *Pythium* 属菌の分離と同定

接種試験でインゲンマメに病気を起こさない A1-2-4 菌株は、形態および生理的な特徴と ITS-RFLP 解析により *P. acanthophoron* と同定した。インゲンマメとコムギを用いた捕捉法により、連・輪作圃場から新たに4菌株を分離し、すでに同定済みの菌株と併せた計7菌株 (A1-2-4, mW-1, mW-2, rHim-1, rK-1, Rk-3, MAFF425319) を ITS 領域の塩基配列解析に供試した結果、7菌株全てがデータベースに登録された *P. acanthophoron* の ITS 領域塩基配列と高い相同性を示し、また、7菌株間での相同性は 99.0-100% と高かった。この *P. acanthophoron* をインゲンマメ白種皮3品種、赤種皮3品種の種子に接種したところ、全ての品種に病原性を示さず、接種区の草丈は対照区と比較して高くなる傾向にあった。

7. 非病原性 *Pythium* 属菌を利用した防除

P. acanthophoron の菌糸磨砕液を混合した土壌にインゲンマメを播種し、*P. myriotylum* を寒天片接種した結果、病原菌単独接種区と比較して苗立枯症状が抑制された。これより *P. acanthophoron* のインゲンマメ苗立枯病に対する抑制効果が示唆された。また、*P. acanthophoron* の細胞壁タンパク質 (CWP) を抽出し、インゲンマメ種子に吸水させてから病原菌を接種すると、発芽率が病原菌単独接種区と比較して高くなり、インゲンマメに病害抵抗性および生育促進を誘導する作用が示唆された。SDS-PAGE で確認した結果、*P. acanthophoron* の CWP は 30kDa であった。

以上より、チウラム剤や生物農薬、そして今回防除効果が証明された *P.*

acanthoporon の利用, インゲンマメ品種の選択, 適切な水管理, また, 輪作体系の適切な設計を組み合わせることで, *Pythium* 属菌が引起すインゲンマメ苗立枯病に対する効果的な防除を行うことが可能になると考える.

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 近 藤 則 夫
副 査 教 授 内 藤 繁 男
副 査 教 授 幸 田 泰 則

学 位 論 文 題 名

インゲンマメ苗立枯病に關与する *Pythium* 属菌の 分類とその制御に関する研究

本論文は図58、表31を含み、10章からなる総頁数175の論文であり、別に参考論文1編が添えられている。

北海道の主要なインゲンマメ生産地ではしばしば苗立枯症状が見られ、これら被害苗および不発芽種子から *Pythium* 属菌が多く分離されることから、苗立枯症状と *Pythium* 属菌との関連が推定されてきた。本研究は、これらのインゲンマメの出芽前後の苗立枯症状と *Pythium* 属菌の関連を明らかにし、連作障害の原因である *Pythium* 属菌との異同を明らかにすることを主な目的として行われたものである。この中で、試験的に設けられたインゲンマメ連作土壌も含め、本症状発生圃場土壌から分離した *Pythium* 属菌の同定と病原性の検討がなされた。さらに、苗立枯症状の防除法について、新たな生物的防除資材の探索が試みられた。

分離した *Pythium* 属菌 68 菌株は形態的に6種に分けられ、このうち5種がインゲンマメに不発芽や主根の伸長抑制などの苗立枯症状を引起すことが明らかにされた。これら5種について、形態的、生理的比較および ITS 領域の RFLP 解析や塩基配列の比較、種特異的プライマーによる PCR 検出を組合せて同定がなされた。その結果、これらは *P. irregulare*, *P. mamillatum*, *P. myriotylum*, *P. spinosum*, *P. ultimum* var. *ultimum* であることが判明した。いずれも各種作物に病原性を有することが知られている種である。

これら病原 *Pythium* 属菌は概して赤色種皮品種インゲンマメに対してよりも白色種皮品種に対して激しい症状を起す傾向にあったが、*P. myriotylum*, *P. spinosum*, *P. ultimum* は赤色種皮品種に対しても比較的強い病原力を発揮した。また、*P. myriotylum* は比較的高温で、反対に *P. spinosum* は低温条件で多くのインゲンマメ品種に不発芽を起こした。一方、*P. ultimum* は温度に拘らずインゲンマメに強い病原性を示した。以上のことより、*P. irregulare*, *P. mamillatum*, *P. myriotylum*, *P. spinosum*, *P. ultimum* var. *ultimum* をインゲンマメの新たな病原として報告し、その病名「インゲンマメ苗立枯病」が提案された。また、インゲンマメの根の褐変あるいは生育抑制を伴う連作障害の原因である *P. myriotylum* がインゲンマメ苗立枯病の病原菌のひとつであり、本菌はインゲンマメのほとんどの生育期に亘って影響を及ぼすことが明らかになった。

次に、インゲンマメ苗立枯病に対して、*Pythium* 属菌が属する卵菌類に効果が認められているチウラム剤をインゲンマメ種子に塗抹処理することで、高い防除効果を示すことが圃場試験において確認された。また、多くの病原菌への拮抗性が報告されている *P. oligandrum* の生物農薬資材を種子に塗布することにより、チウラム剤と同等の高い防除効果がポット試験で認められ、生物防除の可能性が示唆された。

上記5種の病原性 *Pythium* 属菌以外の1種は、インゲンマメのほか主な作物に対しても病原性は認められなかった。その形態的および生理的特徴と ITS 領域塩基配列の高い相同性により本菌は *P. acanthophoron* と同定された。本菌接種による作物の生育促進効果および病害抑制効果の報告があることから、インゲンマメ苗立枯病に対する生物的防除資材としての効果が検討された。*P. acanthophoron* の菌糸磨砕液を混合した土壤にインゲンマメを播種し次いで病原菌の *P. myriotylum* を接種すると、病原菌単独接種区と比較して苗立枯症状が抑制され、さらに *P. acanthophoron* のみ接種したインゲンマメの草丈が対照の無接種インゲンマメと比較して高くなるなど、病害抑制効果および生育促進効果が期待できた。*P. acanthophoron* から抽出した分子量約 30kDa の細胞壁タンパク質をインゲンマメ種子に処理し、次いで病原菌を接種すると、病原菌単独接種区と比較して発芽率が高くなり発病抑制効果が見られたことから、細胞壁タンパク質によるインゲンマメの病害抵抗性および生育促進誘導作用が示唆された。

以上の成果は、インゲンマメ栽培に多大な影響を与える病害の病原を明らかにすることによって防除対策の基盤を築き、新たな生物的防除資材の可能性を見出したことにより、応用上、学術上高く評価できる。よって 審査員一同は、的場百合香が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。