

学位論文題名

Mechanism of the suppression of clubroot disease in crucifers by calcium-rich organic matter

(高カルシウム有機物施用による
アブラナ科植物根こぶ病の抑止メカニズム)

学位論文内容の要旨

アブラナ科植物根こぶ病は、原生生物の Cercozoa 門に分類される根こぶ病菌 (*Plasmodiophora brassicae*) に起因する土壤伝染病害の一種であり、世界中でアブラナ科作物に甚大な被害をもたらしている。本病は、感染源である休眠胞子が土壤中で長期間生存することや、病原菌 *P. brassicae* が培養できない絶対寄生菌であるため、発病と発病程度に影響する環境要因、特に土壤要因に関する知見が乏しく、防除が困難な代表的土壤病害の一つである。本研究は、名古屋大学の有機物連用試験圃場で見つかった根こぶ病抑止および発病土壤をモデル土壤として用い、本病の第一次感染(根毛感染)過程に影響を及ぼす土壤要因を特定すると共に、その要因の作用メカニズムを明らかにすることを目的として行った。

1. 高カルシウム有機物の連用による根こぶ病抑止メカニズム

名古屋大学有機物連用試験圃場では、各種有機物や化成肥料を15年以上に渡って連用しており、農地への有機物還元が作物や土壤理化学性、および地下浸透水などに及ぼす影響を調査している。この試験圃場では、1997年度秋作のキャベツに初めて根こぶ病が発生して以来、慣行的な管理(化学肥料および少量の有機物を施用)を行っている試験区においては、極めて高率で根こぶ病が発生し続けているのに対し、カルシウムを多く含む有機物を多量に施用している試験区においては、本病の発生がほとんど認められていない。そこで、これら土壤の化学性の比較分析を行ったところ、根こぶ病抑止土壤は、発病土壤よりも高い土壤 pH および交換性カルシウム含量を示したことから、高カルシウム有機物の長期連用による土壤 pH の上昇が発病抑止の主因であるという仮説を立てた。水酸化カルシウム、炭酸カルシウムおよび水酸化カリウムにより土壤 pH を7以上に調整した発病土壤、硫酸カルシウムにより pH を変化させずにカルシウム濃度のみを上昇させた発病土壤、および硫酸を用いて pH

を6未満に調整した抑止土壤に根こぶ病菌休眠胞子を接種し、人工気象器内で *Brassica rapa* var. *peruviridis* cv. Komatsuna Rakuten を8日間栽培した後、根毛感染数を調査した。発病土壤を中和することにより、根毛感染は顕著に抑制されたが、このときの抑制効果はカルシウム資材の方が水酸化カリウムよりも有意に高かった。土壤 pH を変えずにカルシウム濃度のみを高くしても根毛感染は抑制されなかった。一方、抑止土壤を酸性化した土壤では根毛感染が有意に促進された。これらのことから、本試験圃場における根こぶ病抑止要因はカルシウム含量の高い有機物を連用したことによる土壤 pH の上昇であり、カルシウムそのものは土壤 pH が高いときにのみ付加的に感染抑止効果を示すことが明らかとなった。

2. 土壤 pH が根圏における根こぶ病菌休眠胞子の発芽に及ぼす影響

土壤の中和により根毛感染が抑制される事実から、pH の上昇は休眠胞子の発芽または発芽後の根毛への感染のどちらかの過程を阻害していることが予想された。しかし、本病原菌に関しては、信頼性の高い発芽試験系が未確立であったため、まず、細胞壁および核の二重染色による発芽検定法の検討を行った。休眠胞子を接種した根こぶ病発病土壤で *Brassica rapa* var. *peruviridis* を7日間栽培後、根圏および非根圏土壤から高密度遠心分離媒体 (Percoll) を用いて比重差により胞子を分離・回収した。UV 励起下で蛍光を発する Fluorescent brightener 28 (細胞壁特異的色素) および G 励起下で蛍光を発する SYTO82 Orange Fluorescent Nucleic Acid Stain (核特異的色素) により胞子を二重染色し、UV 励起下で胞子の全数を、G 励起下で核を有する胞子 (未発芽胞子) を計数し、核の無い胞子 (発芽胞子) の割合を算出した。非根圏土壤中では、栽培前後で核の無い胞子の割合は変わらなかったのに対し、根圏土壤中では栽培後に核の無い胞子の割合が有意に増加すると共に、このとき、寄主の根では根毛感染が観察されたことから、本方法により感染に寄与する発芽胞子の割合を定量的に評価できることが示された。本方法を用いて、カルシウム含量の高い有機物または炭酸カルシウムを混和した発病土壤における休眠胞子の発芽率を調べたところ、これらの資材の添加に伴う土壤 pH の上昇が根圏における休眠胞子の発芽を阻害し、その結果、根毛感染が抑制されることが示された。また、このことは感染に寄与する休眠胞子は、根の極近傍 (根圏土壤) に存在するごく一部のもののみであり、土壤全体で見ると極めて小さな割合であることを示しており、これが発病土壤において、その感染ポテンシャルが長期間維持される要因の一つであると考えられた。

本研究では、発病抑止および発病土壤の比較分析により、発病抑止に重要な土壤要因は pH であり、中性の土壤においては、休眠胞子の発芽が阻害されることにより感染が抑制されるメカニズムを世界で初めて明らかにした。本研究で得られたこれらの知見や用いられた研究

手法は、根こぶ病の新たな耕種的防除法の確立や、発芽促進物質の同定、おとり植物の育成などへの応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 江 澤 辰 広
副 査 教 授 大 崎 満
副 査 教 授 近 藤 則 夫

学 位 論 文 題 名

Mechanism of the suppression of clubroot disease in crucifers by calcium-rich organic matter

(高カルシウム有機物施用による
アブラナ科植物根こぶ病の抑止メカニズム)

本論文は英文 70 頁、図 13、表 4、引用文献 53、緒言、2 章、英文総括からなり、ほかに参考論文 2 編が付されている。

アブラナ科植物根こぶ病は、原生生物の Cercozoa 門に分類される根こぶ病菌 (*Plasmodiophora brassicae*) に起因する土壤伝染病害の一種であり、世界中でアブラナ科作物に甚大な被害をもたらしている。本病は、感染源である休眠孢子が土壤中で長期間生存することや、病原菌 *P. brassicae* が培養できない絶対寄生菌であるため、発病と発病程度に影響する環境要因、特に土壤要因に関する知見が乏しく、防除が困難な代表的土壤病害の一つである。本研究では、名古屋大学の有機物連用試験圃場で見つかった根こぶ病抑止および発病土壤をモデル土壤として用い、本病の第一次感染 (根毛感染) 過程に影響を及ぼす土壤要因を特定すると共に、その要因の作用メカニズムを明らかにした。

1. 高カルシウム有機物の連用による根こぶ病抑止メカニズム

名古屋大学有機物連用試験圃場では、1997 年度秋作のキャベツに初めて根こぶ病が発生して以来、慣行的な管理 (化学肥料および少量の有機物を施用) を行っている試験区においては、極めて高率で根こぶ病が発生し続けているのに対し、カルシウムを多く含む有機物を多量に施用している試験区においては、本病の発生がほとんど認められなかった。そこで、これらの土壤の化学性の比較分析を行ったところ、根こぶ病抑止土壤は、発病土壤よりも高い土壤 pH および交換性カルシウム含量を示したことから、高カルシウム有機物の長期連用による土壤 pH の上昇が発病抑止の主因であるという仮説を立てた。水酸化カルシウム、炭酸カルシウムおよび水酸化カリウムにより土壤 pH

を7以上に調整した発病土壌、硫酸カルシウムにより pH を変化させずにカルシウム濃度のみを上昇させた発病土壌、および硫酸を用いて pH を6未満に調整した抑止土壌に根こぶ病菌休眠胞子を接種し、人工気象器内で *Brassica rapa* var. *peruviridis* cv. Komatsuna Rakuten を8日間栽培した後、根毛感染数を調査した。発病土壌を中和することにより、根毛感染は顕著に抑制されたが、このときの抑制効果はカルシウム資材の方が水酸化カリウムよりも有意に高かった。土壌 pH を変えずにカルシウム濃度のみを高くしても根毛感染は抑制されなかった。一方、抑止土壌を酸性化した土壌では根毛感染が有意に促進された。これらのことから、本試験圃場における根こぶ病抑止要因はカルシウム含量の高い有機物を連用したことによる土壌 pH の上昇であり、カルシウムそのものは土壌 pH が高いときにのみ付加的に感染抑止効果を示すことが明らかとなった。

2. 土壌 pH が根圏における根こぶ病菌休眠胞子の発芽に及ぼす影響

土壌の中和により根毛感染が抑制される事実から、pH の上昇は休眠胞子の発芽または発芽後の根毛への感染のどちらかの過程を阻害していることが予想された。しかし、本病原菌に関しては、信頼性の高い発芽試験系が未確立であったため、まず、細胞壁および核の二重染色による発芽検定法の検討を行った。休眠胞子を接種した根こぶ病発病土壌で *Brassica rapa* var. *peruviridis* を7日間栽培後、根圏および非根圏土壌から高密度遠心分離媒体 (Percoll) を用いて比重差により胞子を分離・回収した。UV 励起下で蛍光を発する Fluorescent brightener 28 (細胞壁特異的色素) および G 励起下で蛍光を発する SYTO82 Orange Fluorescent Nucleic Acid Stain (核特異的色素) により胞子を二重染色し、UV 励起下で胞子の全数を、G 励起下で核を有する胞子 (未発芽胞子) を計数し、核の無い胞子 (発芽胞子) の割合を算出した。非根圏土壌中では、栽培前後で核の無い胞子の割合は変わらなかったのに対し、根圏土壌中では栽培後に核の無い胞子の割合が有意に増加すると共に、このとき、寄主の根では根毛感染が観察されたことから、本方法により感染に寄与する発芽胞子の割合を定量的に評価できることが示された。本方法を用いて、カルシウム含量の高い有機物または炭酸カルシウムを混和した発病土壌における休眠胞子の発芽率を調べたところ、これらの資材の添加に伴う土壌 pH の上昇が根圏における休眠胞子の発芽を阻害し、その結果、根毛感染が抑制されることが示された。また、このことは感染に寄与する休眠胞子は、根の極近傍 (根圏土壌) に存在するごく一部のもののみであり、土壌全体で見ると極めて小さな割合であることを示しており、これが発病土壌において、その感染ポテンシャルが長期間維持される要因の一つであると考えられた。

本研究では、発病抑止および発病土壌の比較分析により、発病抑止に重要な土壌要因は pH であり、中性の土壌においては、休眠胞子の発芽が阻害されることにより感染が抑制されるメカニズムを世界で初めて明らかにした。本研究で得られたこれらの知見や用いられた研究手法は、根こぶ病の新たな耕種的防除法の確立や、発芽促進物質の同定、おとり植物の育成などへの応用が期待される。

よって、審査員一同は、丹羽理恵子が博士（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。