

アズキ茎疫病に対するアズキの抵抗性機構に関する研究

学位論文内容の要旨

アズキ茎疫病は、*Phytophthora vignae* f. sp. *adzukiicola* によって引き起こされる土壌伝染性病害である。本病害の抑制には、圃場の排水対策を基本とする栽培管理法や、薬剤利用の有効性が示されてはいるが、本病は、アズキの幼苗期から成熟期近くまで長期にわたって発生する病害であることから、薬剤散布等による完全な防除は難しく、抵抗性品種の利用が重要とされている。しかしながら、近年、従来のレースに対して抵抗性を有する品種が育成されると、すぐにその品種を侵す新レースの出現が起きており、新たな防除戦略の構築が必要とされている。本病に対するアズキの抵抗性メカニズムについては、これまで詳細な研究は進められていないが、宿主-病原の相互作用や抵抗性メカニズムの理解は、効果的な防除戦略を確立する上でも不可欠のものである。以上のような状況から、本研究は、本病に対するアズキの抵抗性機構を解明することを目的としておこなった。

1. アズキ切離葉および胚軸を用いた接種法の確立

P. vignae f. sp. *adzukiicola* に対するアズキの抵抗性機構を検討するためには、土を介さず、アズキの罹病性／抵抗性の反応が明確に起こる接種方法・条件を確立する必要があった。そこで、アズキ切離葉および胚軸を用いた接種法の検討をおこなった。その結果、両組織における典型的な罹病性の反応は、接種部とその周囲に拡大した褐色・水浸状の病斑の形成、抵抗性の反応は、暗褐色・点状の変化または無病徴と特徴づけられた。従来用いられている 3 つの判別品種（「エリモショウズ」、「寿小豆」、「しゅまり」）の齢の異なる組織に、3 レース（レース 1、3、4）をそれぞれ接種したところ、接種に対する反応は齢の影響を受けることが明らかになった。若齢の組織では、抵抗性の品種においても罹病性型の反応を示すものがあり、齢が増すに伴って、罹病性品種でも抵抗性型の反応を示す組織の割合が増加した。最も明確に罹病性／抵抗性の反応が区別されたのは、展開後 10 日の初生葉の切離葉、および発芽後 6 日の胚軸を用いたときであった。そこで、以降の抵抗性機構に関する試験には発芽後 6 日の胚軸への接種法を用いることとした。

2. 切離葉または胚軸接種に対する圃場抵抗性選抜系統の反応

圃場抵抗性を有するとされる選抜系統「Acc282」、「Acc558」、「Acc1142」、「Acc1398」を用いて、切離葉への遊走子接種、胚軸への有傷接種をおこない、

その反応をレース特異的抵抗性および罹病性品種と比較した。切離葉への接種に対し、「Acc1398」は全ての切離葉が抵抗性型の反応を示し、レース特異的抵抗性品種「しゅまり」と同様の反応であった。「Acc558」、「Acc1142」は、罹病性品種「エリモショウズ」より、抵抗性型の反応を示す葉の割合が高かった。

胚軸への接種に対して、「Acc1398」、「Acc558」は、罹病性品種「エリモショウズ」より有意に低い病斑形成程度を示したが、「Acc282」、「Acc1142」の病斑形成は「エリモショウズ」と同程度であった。これらの結果から、切離葉、胚軸を用いた接種法により、完全ではないものの圃場抵抗性の評価ができる可能性が示唆された。また、同一の系統でも、遊走子接種に対する切離葉の反応と、有傷接種に対する胚軸の反応に違いがあるものがあつたことから、供試した系統の圃場抵抗性には、異なる機構のものが存在すると考えられた。

3. アズキ茎疫病菌の接種に対し胚軸中に産生されるフラボノイド

本病菌を有傷接種したアズキ胚軸中より 9 種のフラボノイド、coumestrol、daidzein、dalbergioidin、genistein、2'-hydroxygenistein、kievitone、lupinalbin A、naringenin、phaseol が同定された。中でも、kievitone と dalbergioidin は、発芽後 6、11 日の胚軸において、罹病性の品種より、抵抗性の品種で高濃度に蓄積していた (kievitone: 1.8-3.6 mg/g dry weight, dalbergioidin: 0.6-1.6 mg/g dry weight)。更に、本病菌被のう胞子の発芽に対して、kievitone は強い抑制効果を、また dalbergioidin もわずかな抑制効果を有することが示された。以上のことから、kievitone と dalbergioidin は本病菌に対するアズキのファイトアレキシンであると結論づけられた。それ以外の 7 種のフラボノイドは、ファイトアレキシンの前駆体と考えられているものであるが、その蓄積量は胚軸の罹病性、抵抗性に関わらず僅かであった (<0.5 mg/g dry weight)。

4. 圃場抵抗性系統の胚軸におけるファイトアレキシン産生

圃場抵抗性選抜系統 4 系統を用いて、接種に対するファイトアレキシン産生について調査した。「Acc282」、「Acc558」、「Acc1142」では、接種に対する kievitone の有意な蓄積は認められず、これらの系統の圃場抵抗性へはファイトアレキシンは関与しないと考えられた。一方で、「Acc1398」は、胚軸有傷接種に対し、高濃度の kievitone を蓄積した (1.6 mg/g dry weight)。更に「Acc1398」と「エリモショウズ」を交配して得られた後代の F₄ 系統の、胚軸接種に対する kievitone 産生量は、圃場試験における茎疫病発病度と負の相関を示したことから、「Acc1398」の圃場抵抗性には、供試した他の系統とは異なって、ファイトアレキシンが何らかの形で関与しているものと示唆された。

5. 罹病性／抵抗性反応時の胚軸における遺伝子発現の比較

本病菌を有傷接種した「しゅまり」の胚軸における、接種 24 時間後の遺伝子発現を、long-SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法により比較した。その結果、計 5480 の SAGE タグ (21bp) の塩基配列情報が得られた。そのうちで、罹病性／抵抗性間で差のあるタグが 43 見つかり、データベース検索の結果、それらのタグの多くは、マメ科植物の断片的発現遺伝子配列 (EST) と相同性を示すものであった。抵抗性反応を示した胚軸からは、Phenylalanine ammonia lyase、

Protein kinase、Hypersensitive reaction-like lesion inducer などの抵抗性反応に関連すると推定されるタグが、罹病性反応を示した胚軸からは、Adenine diphosphate-ribosyltransferase などの感染時特異的と推定されるタグが高頻度で見いだされ、罹病性／抵抗性反応に特異的な遺伝子発現が確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 近 藤 則 夫

副 査 教 授 幸 田 泰 則

副 査 講 師 藤 野 介 延

副 査 助 教 秋 野 聖 之

学 位 論 文 題 名

アズキ茎疫病に対するアズキの抵抗性機構に関する研究

本論文は図 15, 表 12, 図版 2 を含み, 8 章からなる総頁数 126 の論文であり, 別に参考論文 1 編が添えられている。

アズキ茎疫病は, *Phytophthora vignae* f. sp. *adzukicola* によって引き起こされる土壌伝染性病害である。本病害の抑制には, 圃場の排水対策を基本とする栽培管理法や, 薬剤利用の有効性が示されてはいるが完全な防除は難しく, 抵抗性品種の利用が重要とされる。しかしながら, 近年, 従来のレースに対して抵抗性を有する品種が育成されても, その品種を侵す新レースの出現が起きており, レース特異的抵抗性に依存しない圃場抵抗性品種の育成が求められている。本研究は, このような品種の育成, 選抜に利用が期待できる, 宿主のアズキ病原のアズキ茎疫病菌の相互作用および抵抗性機構の解明を目的として行われたものである。

1. アズキ切離葉および胚軸を用いた接種法の確立

P. vignae f. sp. *adzukicola* に対するアズキの抵抗性機構を検討するため, アズキの罹病性/抵抗性の反応が明確に起こるよう切離葉および胚軸を用いた接種方法・条件を確立した。従来より用いられているアズキ判別品種の本病原菌の接種に対する反応は, アズキの齢の影響を受けることが明らかになった。若齢の組織では, 抵抗性の品種においても罹病性型の反応を示すものがある反面, 齢が増すに伴って, 罹病性品種でも抵抗性型の反応を示す組織の割合が増加した。最も明確に罹病性/抵抗性の反応が区別されたのは, 展開後 10 日の初生葉の切離葉, および発芽後 6 日の胚軸を用いたときであった。

2. 切離葉または胚軸接種による圃場抵抗性選抜系統の選抜

圃場抵抗性を有するとされる各種選抜系統の切離葉への遊走子接種, 同じく胚軸への有傷接種を行い, その反応をレース特異的抵抗性品種および罹病性品種と比較した。切離葉への接種に対しレース特異的抵抗性品種と同等の高い抵抗性, あるいは胚軸への接種に対して罹病性品種より有意に低い病斑形成程度を示す系統が見出された。すなわち, 切離葉, 胚軸を用いた接種法により, 圃場抵抗性の評価ができる可能性が示唆された。また, 同一の系統でも, 遊走子接種に対する切離葉の反応と, 有傷接種に対する胚軸の

反応が異なるものがあったことから、供試した系統の圃場抵抗性には、さらに異なる機構が関わっているものと考えられた。

3. アズキ茎疫病菌の接種に対し胚軸中に産生されるフラボノイド

本病菌を有傷接種したアズキ胚軸中より9種のフラボノイドが同定され、その中の Kievitone と Dalbergioidin は、発芽後6および11日の胚軸において、罹病性の品種より抵抗性の品種で高濃度に蓄積していた。さらに、本病菌被のう胞子の発芽に対して、Kievitone は強い抑制効果を、また Dalbergioidin も抑制効果を有することが示されたことから、Kievitone と Dalbergioidin は本病菌に対するアズキのファイトアレキシンであると結論づけられた。それ以外の7種のフラボノイドは、ファイトアレキシンの前駆体と考えられているものであるが、その蓄積量は胚軸の罹病性、抵抗性に関わらず僅かであった。

4. 圃場抵抗性系統の胚軸におけるファイトアレキシン産生

圃場抵抗性選抜系統の中に、本菌の胚軸有傷接種に対し高濃度の Kievitone を蓄積するものが認められた。この系統と罹病性品種の交配後代系統の、胚軸接種に対する Kievitone 産生量は、これら後代の圃場試験における茎疫病発病度と負の相関を示したことから、この系統の圃場抵抗性には、ファイトアレキシン産生能が関与していることが示唆された。

5. 罹病性／抵抗性反応時の胚軸における遺伝子発現の比較

接種24時間後の罹病性および抵抗性反応時の胚軸における遺伝子発現を比較し、計5480の塩基配列情報が得られた。そのうち、罹病性および抵抗性間で差のあるのは43であり、データベース検索の結果、それらの多くは、マメ科植物の断片的発現遺伝子配列と相同性を示すものであった。抵抗性反応を示した胚軸からは、ファイトアレキシン合成に関与する Phenylalanine ammonia lyase など抵抗性反応関連遺伝子の塩基配列が見いだされるなど、罹病性および抵抗性反応に特異的な遺伝子発現が確認された。

以上の成果は、アズキのアズキ茎疫病菌に対する抵抗性にファイトアレキシンが関与することを明らかにし、この抵抗性機構を指標とすることでアズキの病害抵抗性育種への利用可能性を示すものであり、学術上、応用上高く評価できる。よって審査員一同は、原田玄輝が博士（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。