

学 位 論 文 題 名

Studies on *Cephalosporium gramineum*, the causal fungus
of Cephalosporium stripe disease of wheat

(コムギ条斑病を引き起こす
病原糸状菌 *Cephalosporium gramineum* に関する研究)

学位論文内容の要旨

コムギ条斑病は、土壤伝染性糸状菌 *Cephalosporium gramineum* Nisikado & Ikata (*Hymenula cerealis* Ell. & Ev.)により引き起こされるコムギの重要病害である。1930年代から、主に日本、英国および米国などの秋播きコムギ地帯において本病の発生が認められている。コムギの葉鞘から葉身にかけて葉脈の褐変を伴う黄色の条斑が典型的な病徴であり、コムギ下葉から順次上葉に広がる。症状が激しい場合、収穫期にはコムギの草丈は低くなり、穂が出すくみ状となって稔実不良となることから、種実は「しいな」となり著しい減収となる。本菌はコムギのほかオオムギ、ライムギなどのムギ類、オーチャードグラスなどの各種イネ科牧草にも病原性を有し、これら宿主作物の頻繁な作付けにより圃場に定着し、恒常的にコムギに被害を与える。イネ科作物以外の作付けによる輪作、残渣の適切な処理および種子消毒が現在採られている防除対策であり、防除に最も効果があると考えられる有望な抵抗性のコムギ品種は未だ開発されていない。

本研究では、分離年代および分離地が異なるコムギ条斑病菌を収集し、それらの遺伝子型の比較から系統学的な検討を行った。また、各遺伝子型の塩基配列情報により、コムギ条斑病特異的 DNA マーカー検出用のプライマー組合せを開発した。さらに、各種コムギ品種・系統について本病に対する抵抗性を評価するとともに、近年、春播きコムギの新たな栽培法として注目される初冬播きが、本病の発生に及ぼす影響を検討した。本論文は、以下のように要約される。

1 コムギ条斑病菌の遺伝子型

リボソーム RNA をコードする遺伝子(rDNA)の internal transcribed spacer (ITS)領域および intergenic spacer (IGS)領域の制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析と ITS 領域の塩基配列解析に基づき、日本、米国および欧州各国において分離されたコムギ条斑病菌の遺伝的変異を検討した。ITS 領域 (~600 bps) の塩基配列は、菌株間で保存性は非常に高いものの 1 塩基置換が認められ、これにより制限酵素 *HinfI* の制限部位が生じ、制限酵素断片パターンから 2 つのグループに分けられることが明らかになった。一方、IGS 領域 (~5 Kbps) の *HinfI* と *EcoRI* による RFLP 解

析の結果、供試した菌株は4遺伝子型（A：9菌株、B：10菌株、C：18菌株およびD：3菌株）に分けられた。以上のITSおよびIGS領域のRFLPデータを統合すると、ITS領域に1塩基置換が認められた菌株はすべて遺伝子型Aに含まれ、2つのサブグループから構成されることが明らかになった。また、各遺伝子型と分離場所の関係について、結論を出すにはさらに調査菌株数を増やす必要があるが、北海道で分離された27菌株は4遺伝子型のいずれかに属し多様であったが、米国産の分離菌株は遺伝子型BとCに、欧州産の分離菌株は遺伝子型Aのみに分類された。

2 コムギ条斑病菌特異的 DNA マーカーの開発

4遺伝子型の塩基配列に多様な変異が認められる領域（～1 Kbps）がIGS領域に存在するが、この領域の配列長に基づき遺伝子型の区別を可能にする遺伝子型特異的マーカーの構築には至らなかった。しかしながら、4遺伝子型間で類似度が高い領域の塩基配列から開発したプライマー（CGIGS 1とCGIGS 2）を利用したPCRにより、供試したすべてのコムギ条斑病菌からは1.8KbpのDNA断片の増幅が確認され、分子マーカーの利用が可能と考えられた。本菌以外のコムギ立枯病菌などコムギに病原性を有する各種病原菌およびコムギ栽培土壌からの腐生性の糸状菌を含む11属20種の菌株、あるいはコムギ植物体のDNAからの増幅は全く認められなかったことから、このプライマー組合せはコムギ条斑病菌特異性を有することが確認された。さらに、コムギ条斑病菌DNAの高い増幅感度（700 fg/μl以下）あるいは罹病コムギ試料から抽出したDNAからの本菌の安定した検出性能が示されたことから、コムギ体内での本菌の動態把握が容易になると考えられ、コムギ系統・品種の本菌に対する侵入および伸展抵抗性の評価にこのプライマー組合せは利用可能である。

3 コムギ各種系統・品種の抵抗性の評価

春播きコムギ34系統および秋播きコムギ34系統について、温室内においてコムギ条斑病菌を接種し発病程度を指標に抵抗性を評価した。秋播きコムギでは北見農業試験場から分譲された1系統、“1395-22-1482”にのみ抵抗性が認められた。この系統は、1980年代に確認された抵抗性系統“CC1239-3.5”とホロシリコムギの交配後代である。また、一般的な圃場において、春播きコムギにはコムギ条斑病の発生は認められない。これは秋期から初冬期にかけての土壌中の本病菌密度が高い時期に栽培されず、春期以降は凍結による根の傷害も少なく本菌の侵入が抑制されるためと考えられている。しかし、本菌分生胞子の土壌接種により春播きコムギにも本病が起きることを示し、中東、南米、北アフリカ、北米および中国産の春播きコムギ系統・品種には抵抗性のものは認められなかった。

4 初冬播き栽培法による春播きコムギの発病

春播きコムギの初冬播き栽培法は、積雪直前に播種する方法であり、北海道のように積雪期間が長い地域において春播きコムギの生育期間を延長することで、収量さらには品質を向上させる目的で取り組まれている。この栽培体系が及ぼす春播きコムギの条斑病発生に対する影響を検討した。積雪下の温度条件に設定したクライオトロン内と初冬期の圃場において、秋播きコムギの

チホクコムギ（対照）および春播きコムギのハルユタカを病原菌接種土壌に植付け、開花期に発病度を調査した。積雪下温度条件に移行する際に2-3葉期であったクライオトロン内のハルユタカは、高い発病率を示した。一方、圃場試験において積雪下に移す際の生育ステージが発芽直後で、僅かに種子根が出現していた両コムギ品種の発病率は低かった。一般圃場の初冬播き栽培において春播きコムギの発病の可能性は否定できないものの、積雪前の発芽を最小限に抑えることで相当程度本病の発生を抑えられると考えた。

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 柏 木 純 一
副 査 講 師 秋 野 聖 之

学 位 論 文 題 名

Studies on *Cephalosporium gramineum*, the causal fungus of Cephalosporium stripe disease of wheat

(コムギ条斑病を引き起こす

病原糸状菌 *Cephalosporium gramineum* に関する研究)

本論文は図 28, 表 7 を含む 6 章、総頁数 106 からなり、別に参考論文 1 編が添えられている。

コムギ条斑病は、土壌伝染性糸状菌 *Cephalosporium gramineum* Nisikado & Ikata (*Hymenula cerealis* Ell. & Ev.) により引き起こされる世界的に重要な病害であり、コムギ生産に多大な影響を与える。コムギの葉鞘から葉身にかけて葉脈の褐変を伴う黄色の条斑が典型的な病徴であり、症状が激しい場合、収穫期にはコムギの草丈は低くなり、穂が出すくみ状となって稔実不良となることから、種実は「しいな」となり著しい減収となる。

本研究では、コムギ条斑病菌は大きく 4 つの遺伝子型集団に分類できることを明らかにし、各遺伝子型の塩基配列情報により、コムギ条斑病菌特異的 DNA マーカー検出用のプライマー組合せを開発した。さらに、各種コムギ品種・系統について本病に対する抵抗性を評価するとともに、近年、春播きコムギの新たな栽培法として注目される「初冬播き」においても、適切な播種時期であれば本病の発生を抑えられることを明らかにした。その詳細は、次のようにまとめられる。

1 コムギ条斑病菌の遺伝子型

リボソーム RNA をコードする遺伝子(rDNA) の internal transcribed spacer (ITS) 領域および intergenic spacer (IGS) 領域の制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析と ITS 領域の塩基配列解析に基づき、日本、米国および欧州各国において分離されたコムギ条斑病菌の遺伝的変異を検討した。ITS 領域の塩基配列は、菌株間で保存性は非常に高いものの 1 塩基置換が認められ、制限酵素断片パターンから 2 つのグループに分けられることが明らかになった。一方、IGS 領域の RFLP 解析の結果、供試した菌株は 4 遺伝子型に分けられた。

2 コムギ条斑病菌特異的 DNA マーカーの開発

4 遺伝子型間で類似度が高い領域の塩基配列から開発したプライマー組合せを利用した PCR により、すべてのコムギ条斑病菌から同じ塩基配列長の DNA 断片の増幅が確認され、分子マーカーの利用が可能と考えられた。本菌以外の 11 属 20 種の糸状菌、あるいはコムギ植物体の DNA から

の増幅は全く認められなかったことから、このプライマー組合せはコムギ条斑病菌特異性を有することが確認された。さらに、コムギ条斑病菌 DNA の高い増幅感度あるいは罹病コムギ試料から抽出した DNA からの本菌の安定した検出性能が示されたことから、コムギ体内での本菌の動態把握によるコムギ系統・品種の本菌に対する侵入および伸展抵抗性の評価にこのプライマー組合せは利用可能と考えられる。

3 コムギ各種系統・品種の抵抗性の評価

春播きコムギ 34 系統および秋播きコムギ 34 系統について、抵抗性を評価した。秋播きコムギでは北見農業試験場から分譲された 1 系統、"1395-22-1482"にのみ抵抗性が認められた。また、一般的に圃場においては春播きコムギにはコムギ条斑病の発生は認められないが、本菌分生胞子の土壤接種により春播きコムギにも本病が起きることを示した。接種試験により、中東、南米、北アフリカ、北米および中国産の春播きコムギ系統・品種には抵抗性のものは認められなかった。

4 初冬播き栽培法による春播きコムギの発病

春播きコムギの初冬播き栽培法は、積雪直前に播種する方法であり、北海道のように積雪期間が長い地域において春播きコムギの生育期間を延長することで、収量さらには品質を向上させる目的で取り組まれている。この栽培体系が及ぼす春播きコムギの条斑病発生に対する影響を検討した。積雪下の温度条件に設定したクライオトロン内と初冬期の圃場において、秋播きコムギのチホクコムギ（対照）および春播きコムギのハルユタカを病原菌接種土壤に植付け、開花期に発病度を調査した。積雪下温度条件に移行する際に 2-3 葉期であったクライオトロン内のハルユタカは、高い発病率を示した。一方、圃場試験において積雪下に移す際の生育ステージが発芽直後で、僅かに種子根が出現していた両コムギ品種の発病率は低かった。一般圃場の初冬播き栽培において春播きコムギの発病の可能性は否定できないものの、積雪前の発芽を最小限に抑えることで相当程度本病の発生を抑えられると考えた。

以上のように、コムギ条斑病菌の特異的マーカー開発は、コムギ条斑病菌の生態の解明、コムギの抵抗性育種および栽培環境改善に関わる本菌の動態解明に有用な基礎的な研究成果であり、学術上および応用上高く評価できる。よって 審査員一同は、ワファイ バアジ ドゥニアが博士（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。