

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05610

研究課題名（和文）リゾクトニア根腐れ病に対するオオムギの抵抗性機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of disease resistance mechanisms against Rhizoctonia root rot in barley

研究代表者

香西 雄介（Kouzai, Yusuke）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：50783502

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：土壌に生息する糸状菌*Rhizoctonia solani* AG-4は、世界規模で問題となっているオオムギ根腐れ病の原因菌である。本研究では、オオムギおよびモデル草本植物であるミナトカモジグサを用いて、AG-4菌株の感染阻止に有効な抵抗性機構の解明を目指した。菌感染を受けたオオムギのトランスクリプトーム解析により、罹病性と抵抗性系統で免疫応答が活性化されるタイミングが異なることを見出した。また、N-ヒドロキシピペコリン酸で誘導される免疫応答が、オオムギおよびミナトカモジグサの地上部へのAG-4菌株の感染阻止に有効であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Rhizoctonia solani* AG-4に対する抵抗性品種はこれまで確認されておらず、植物が抵抗性を発揮できるポテンシャルを持つかは不明であった。本研究により、N-ヒドロキシピペコリン酸の処理によって植物のAG-4に対する抵抗性を高められること、オオムギの抵抗性系統に特徴的な菌感染に対する応答、ミナトカモジグサの利用可能性などを見出した。これらの結果は、AG-4菌株の植物への感染戦略の解明や抵抗性誘導剤などの新たな防除策開発につながることで期待できる。

研究成果の概要（英文）：*Rhizoctonia solani* AG-4, a soil-borne plant-pathogenic fungus, causes *Rhizoctonia* root rot in barley and wheat. In this study, we used barley and the model grass *Brachypodium distachyon* to elucidate the disease resistance mechanisms effective against AG-4 infection. Transcriptome analysis of barley plants infected with the fungus revealed that the timing of immune response activation varies between susceptible and resistant cultivars. Furthermore, we demonstrated that immune responses induced by N-hydroxypipecolic acid effectively prevent AG-4 infection in the aerial parts of both barley and *Brachypodium distachyon*.

研究分野：植物病理学

キーワード：病害抵抗性 オオムギ *Rhizoctonia solani* トランスクリプトーム N-ヒドロキシピペコリン酸

## 1. 研究開始当初の背景

*Rhizoctonia solani* は土壌に生息する糸状菌で、78科386作物に病害を発生させる極めて多犯性の植物病原菌である。本菌は生理・生態・遺伝的性質が異なる菌株からなる種複合体であり、対峙培養時の菌系融合の有無で13の菌系融合群(AG)に分類される。コムギやオオムギでは、AG-2、AG-4、AG-8の菌株が地下部に感染し、重要病害である「根腐れ病」を引き起こす。本病害による被害は甚大であり、アメリカやオーストラリアでは最大で15%もの収量減をもたらす。農業現場では持続的かつ低コストな防除法である抵抗性品種の導入が望まれているが、病原菌に対する抵抗性機構やそれを制御する遺伝子群が明らかとなっておらず、実現には至っていない。

我々はこれまで、AG-1菌株が原因であるイネの紋枯病に対する植物の抵抗性機構を明らかにしてきた。本菌の地上部感染によって引き起こされる紋枯病に対し、抵抗性を示す栽培イネは存在しない。これは *R. solani* が殺生菌であることとも合致し、植物は *R. solani* に抵抗性を示し得るポテンシャルを持たないと考えられてきた。しかし我々は、モデル草本植物であるミナトカモジグサを利用した研究展開から、本植物には抵抗性系統が存在し、ミナトカモジグサに加えてイネも植物ホルモンであるサリチル酸(SA)の処理によって抵抗性が付与されることを明らかにしてきた。これを踏まえ、根腐れ病に対しても植物は抵抗性を発揮しているのではないかと考えた。そこで、実用作物であり、日本におけるリソース的優位性が期待されるオオムギに着目し、国内に生息するAG群のオオムギへの感染性の検証からAG-4菌株が利用できることが判明した。さらに、オオムギの主要な3系統についてAG-4菌株の感染性を比較し、抵抗性の系統間差を見出すことに成功した。

## 2. 研究の目的

本研究は、オオムギおよびミナトカモジグサを用いて、AG-4菌株に対する抵抗性の系統間差の背景にある免疫応答と遺伝子座を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

農研機構ジーンバンク所蔵のAG-4菌株(MAFF305225)を供試菌として、オオムギおよびミナトカモジグサ系統群との相互作用を、ゲノム科学手法やケミカルバイオロジー手法を用いて解析した。具体的には以下の項目を実施した。

- (1) AG-4接種に対するオオムギの応答性の系統間比較解析
- (2) AG-4に対する抵抗性を誘導する化合物の解析

## 4. 研究成果

### (1) AG-4接種に対するオオムギ応答性の系統間比較解析

予備試験における汚染土壌を用いた接種試験の結果から、AG-4菌株の地下部感染に対し、オオムギ系統 Morex が抵抗性を示し、Haruna-nijo が罹病性を示すことが判明していた。まず、抵抗性レベルを精密に測定するため、汚染土壌を用いた接種方法を改良し、健全植物に対する接種植物の草丈と根長の比から求めた Growth performance ratio によって定量化した。この結果、AG-4菌株の接種により、Haruna-nijo および Golden Promise は健全植物の50%程度まで生育が阻害されたが、Morex では15%に留まった。従って、Morex の抵抗性が高レベルであることが定量的に確認された。

次に、ミナトカモジグサを用いて同様の試験を行った。紋枯病の原因である AG-1 菌株に対し、ミナトカモジグサ系統 Bd21 は感受性を示し、Bd3-1 および Gaz-4 は抵抗性を示す。AG-4 菌株の地下部感染に対し、Bd21 の生育は健全植物の 65%まで阻害されたが、Bd3-1 および Gaz-4 は 30%程度の生育阻害に留まった。この結果から、Bd3-1 および Gaz-4 が AG-4 菌株に対しても一定の抵抗性を示すことが明らかになった。

また、菌糸プラグと植物の切葉を用いた接種試験により、AG-4 菌株の地上部感染に対する抵抗性も調査した。その結果、オオムギの Morex、ミナトカモジグサの Bd3-1 および Gaz-4 は地上部感染に対しても抵抗性を示した。

以上の結果から、AG-4 菌株は植物の地下部だけでなく地上部組織にも感染することができ、両部位において抵抗性形質が維持されていることが示された。また、ミナトカモジグサにも AG-4 菌株に対する抵抗性の系統間差が存在することから、本植物も免疫応答の解明や抵抗性遺伝子の同定に利用できる可能性が示唆された。

AG-4 菌株の地下部感染に対するオオムギの応答が、抵抗性強度の違いでどのように異なるかを明らかにするため、Morex および Haruna-nijo を用いて比較トランスクリプトーム解析を行った。汚染土壌に両系統の芽生えを移植することで AG-4 菌株を接種し、7 日間育成した植物の地上部と地下部を回収した。対照区として、通常の培土で育成した健全植物からも同様に組織を回収した。その後、回収した組織から RNA を抽出し、ライブラリを作製、3'-mRNA をターゲットとした RNA-seq 解析を行った (2 系統×2 試験区×2 組織×3 反復の合計 24 サンプル)。

得られたデータセットの主成分分析と健全 / 接種植物間の発現変動遺伝子群 (DEGs) の解析から、AG-4 菌株に対する応答は、両系統とも地上部と地下部で顕著に異なることが判明した。そこで、地上部と地下部に区別し、DEGs のクラスタリング解析と遺伝子オントロジー解析によって両系統の応答を比較した。この結果、Haruna-nijo の地上部では防御応答関連の遺伝子群が、Morex の地上部では栄養成長に関する遺伝子群が顕著に発現誘導されていた。一方、地下部では両系統の遺伝子発現パターンは類似していたが、Morex では防御応答関連遺伝子群の発現が抑制されていた。すなわち、免疫応答の活性化は Haruna-nijo の地上部のみで観察された。

以上の結果から、感受性の Haruna-nijo では菌接種に反応した免疫応答が接種 7 日後まで持続するものの、抵抗性の Morex は既に菌の感染を抑止して通常の栄養成長にシフトしている、もしくは菌の感染がそもそも成立しない非宿主抵抗性が発揮されている可能性が示唆された。一方、この仮説は接種 7 日後におけるトランスクリプトームのスナップショットに基づいている。今後、防御応答マーカー遺伝子を利用した時系列の応答解析等で検証する必要がある。

また、岡山大学が保有する大規模なオオムギ遺伝資源 (SV274) について、AG-4 菌株に対する抵抗性形質を高速にフェノタイピングし、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって遺伝子座の解析を行った。具体的には、汚染土壌にオオムギ幼苗を移植し、葉の長さを経時的に計測するとともに、10 日後に地上部の生重量を測定した。これらについて、各系統の非接種区に対する割合から Disease severity index を算出し、この数値と SV274 の多型情報をもとに GWAS を行った。結果として、4 番と 5 番染色体上にそれぞれ強い相関を示す多型が検出された。今後これらの詳細を解析する予定である。

## (2) AG-4 抵抗性を誘導する化合物の解析

我々はこれまで、噴霧等による SA の投与により、イネとミナトカモジグサで AG-1 菌株の地上部感染に対する抵抗性を付与できることを明らかにしてきた。また、イネやジャガイモにおいて、*R. solani* 感染により植物内部のピペコリン酸量が増加すること

が報告されている。さらに、SA とピペコリン酸の誘導體である *N*-ヒドロキシピペコリン酸 (NHP) は、植物の全身獲得抵抗性におけるシグナル伝達に重要な役割を果たすことが知られている。そこで、本項目では SA や NHP によって誘導される免疫応答が AG-4 菌株の感染抑止に有効であるか調べた。

SA または NHP (各 1 mM) を噴霧処理したオオムギから切葉を調製し、AG-4 菌株の菌系プラグを接種した。AG-4 菌株に対する抵抗性として、接種葉における菌の DNA 量を定量 PCR により測定し、感染した菌のバイオマスとして評価した。この結果、抵抗性の Morex と罹病性の Haruna-nijo のどちらにおいても、NHP の処理により接種葉における病斑形成や菌バイオマスの増加が抑制された。一方、SA 処理では NHP でみられた感染抑制効果は認められず、Morex においてはむしろ罹病性が誘導された。そこで、AG-4 菌株に対して罹病性を示すミナトカモジグサ Bd21 を用いて試験を行った。この結果、Bd21 においても、AG-4 菌株に対し NHP は抵抗性を、SA は罹病性を誘導する傾向が観察された。従って、NHP で活性化される植物免疫応答が AG-4 菌株の感染抑制に有効であることが強く示唆された。

次に、AG-1 菌株抵抗性に対する NHP の効果を調べたところ、Morex と Haruna-nijo のどちらにおいても NHP は抵抗性を誘導した。また、SA も AG-1 菌株に対する抵抗性を誘導し、既報のイネおよびミナトカモジグサの結果と一致した。

以上の結果から、NHP は AG-1 と AG-4 菌株の両方に対する植物の抵抗性を誘導できるが、SA は AG-1 菌株に対する抵抗性のみを誘導できた。従って、SA と NHP で活性化する植物の免疫応答は異なると考えられる。これまでの研究から、SA 依存的な免疫応答は AG-1 菌株の活物寄生ステージをターゲットとする可能性が示唆されている。SA で抵抗性が付与できない AG-4 菌株は、AG-1 菌株とは異なる感染戦略をとるかもしれない。従って、NHP 依存的な免疫応答は両菌株に共通の感染ステージを阻止していると考えられる。同じ *R. solani* であり、どちらも同じ宿主上で感染が成立しているようにみえても、その感染機構は異なりうることを示された。同じ AG であっても病原性や宿主特異性は異なることから、この感染機構の違いも AG に依存したものではないと考えている。

今後、本研究成果を基盤として、植物の AG-4 菌株に対する抵抗性形質と NHP との関連、地下部感染に対する抵抗性誘導作用、SA による罹病性誘導について検証し、抵抗性誘導剤等による AG-4 菌株に対する防除策開発に展開する予定である。

#### < 引用文献 >

- Misawa., 2019, MAFF Micro. Gen. Res. Manu.
- Okubara et al., 2014, Plant Sci.
- Okubara et al., 2016, Plant Dis.
- Hashiba., 1984, Bulletin of the Hokuriku Nat. Agri. Exp. Stat.
- Kouzai et al., 2018, New Phytol.
- Kouzai et al., 2020, Plant J.
- Aliferis and Jabaji., 2012, PLoS One.
- Suharti et al., 2016, Plant Prod. Sci.
- Park et al., 2007, Science.
- Guerra and Romeis. 2020, J. Exp. Bot.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mahadevan N, Kohno N, Nagao R, Nyein KT, Matsui H, Yamamoto M, Ichinose Y, Toyoda K, Hisano H, Kouzai Y, Noutoshi Y
2. 発表標題 The pathogenicity of <i>Rhizoctonia solani</i> Japanese isolates on <i>Brachypodium distachyon</i> and barley ( <i>Hordeum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i> )
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mahadevan N, Kohno N, Nagao R, Nyein KT, Matsui H, Yamamoto M, Ichinose Y, Toyoda K, Kouzai Y, Hisano H, Okamoto M, Noutoshi Y
2. 発表標題 N-hydroxypipicolinic acid confers resistance to <i>Rhizoctonia solani</i> in barley and <i>Brachypodium distachyon</i>
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mahadevan N, Kohno N, Nagao R, Nyein KT, Matsui H, Ichinose Y, Toyoda K, Kouzai Y, Hisano H, Okamoto M, Noutoshi Y
2. 発表標題 Virulence of Japanese isolates of <i>Rhizoctonia solani</i> on <i>Brachypodium distachyon</i> and barley in leaf and soil inoculation, and resistance induced by N-hydroxypipicolinic acid in leaves
3. 学会等名 2023 IS-MPMI Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 香西雄介
2. 発表標題 イネ科植物の免疫機構に関する研究
3. 学会等名 令和5年度(第57回)植物感染生理談話会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mahadevan N, Fernanda R, Matsui H, Ichinose Y, Toyoda K, Hisano H, Kouzai Y, Okamoto M, Noutoshi Y
2. 発表標題 Infectivity of Rhizoctonia solani isolates on Brachypodium distachyon and barley, and chemical-induced resistance
3. 学会等名 令和 6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	能年 義輝  (Noutoshi Yoshiteru)  (70332278)	岡山大学・環境生命科学学域・研究教授   (15301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	持田 恵一  (Mochida Keiichi)  (90387960)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー   (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------