

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658013

研究課題名（和文）

イネばか苗病菌が生産するジベレリンは単なる病徴発現因子か？

研究課題名（英文）

Role of gibberellin in pathogenesis of the rice bakanae pathogen *Fusarium fujikuroi*

研究代表者

柘植 尚志 (TSUGE TAKASHI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30192644

研究成果の概要（和文）：イネばか苗病菌は、ジベレリン（GA）を生産し、イネに徒長症状を引き起こす。本研究では、ばか苗病菌の野生株と GA 欠損株を用いて、GA が病徴発現だけでなく、菌のイネ組織内での増殖にも関与することを明らかにした。また、ばか苗病菌胞子を混合した土壌に非宿主植物の種子を播種すると、イネだけでなく他の植物にも菌が感染し、徒長を引き起こすことを見出した。同様な土壌接種条件では、GA 欠損株も非宿主植物に感染することを確認した。以上の結果から、本菌は宿主範囲の広い内生菌であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The rice bakanae pathogen, *Fusarium fujikuroi*, produces gibberellin (GA) and causes overgrowth (bakanae) symptom in rice seedlings. We made GA-minus mutants from *F. fujikuroi* by the disruption of a GA biosynthetic gene *P450-1*. The GA-minus mutants did not cause bakanae symptom and showed reduced ability to colonize rice seedlings, suggesting that GA helps the pathogen to colonize host tissue. *F. fujikuroi* was found to infect nonhost plants and cause bakanae symptoms, when seeds of non-host plants were planted in soil infested with the pathogen conidia. The GA-minus mutants also infect nonhost plants without symptom under the same inoculation condition. This result suggests that *F. fujikuroi* is an endophytic fungus with a broad host range.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 0 | 1,600,000 |
| 2011年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 総計 | 3,100,000 | 450,000 | 3,550,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：イネばか苗病菌、ジベレリン、病原性、内生菌

1. 研究開始当初の背景

イネばか苗病菌 (*Fusarium fujikuroi*、完全世代 *Gibberella fujikuroi* MP-C) は、イネに特徴的な徒長症状（ばか苗症状）を引き起こす種子伝染性の病原菌である。本菌が感染した種子を育成すると、幼苗期に徒長、黄化症状を示し、重症株は枯死する。特徴的な徒長症状は、本菌が感染組織中で生産するジベレリン（GA、主に GA3）によって引き起こされる。

GA は、茎の伸長、花芽形成、種子発芽などに関わる植物ホルモンとして広く知られているが、その生産が最初に確認されたのはイネばか苗病菌である。ばか苗病菌の GA 生合成の遺伝子機構については、ドイツの Tudzynsky らのグループによって精力的な研究が展開され、GA 生合成に必要な 7 個の遺伝子 (*P450-1*、*P450-2*、*P450-3*、*P450-4*、*des*、*ggs2* および *cps/ks*) が約 18 kb の領域にクラスターとして存在することが明らかにされ

ている。

GA の植物ホルモンとしての確固たる機能から、ばか苗病菌の GA も典型的な病徴発現因子として位置づけられてきた。研究代表者は、本菌の GA 生合成遺伝子のひとつ *P450-1* の遺伝子破壊によって GA 欠損 (GA⁻) 株を作出した。野生株と GA⁻ 株をイネ種子に接種したところ、野生株が顕著な徒長・黄化症状を引き起こしたのに対して、GA⁻ 株は全く病徴を引き起こさず、GA が病徴発現に不可欠であることが確認された。なお、GA⁻ 株の培地上での成育、コロニー形態、孢子形成能力は正常であり、GA は本菌の成育や形態形成には関与しない。したがって、GA が単なる病徴発現因子であれば、GA⁻ 株はイネ組織中で共生菌のように定着・増殖するはずである。しかしながら、接種苗を切り分け菌を培養分離したところ、GA⁻ 株はイネの発芽種子に侵入するが、組織内増殖・蔓延能力が著しく低下していることが判明した。この結果は、本菌の GA が単なる病徴発現因子ではなく、菌の組織内増殖にも重要な役割を果たすことを示唆した。研究代表者は、ばか苗病菌が生産する過剰な GA がイネの生理機能を攪乱し、菌の定着、増殖、蔓延のための宿主環境づくりに貢献していると考えに至った。

植物に非特異的に作用する病原糸状菌の代謝産物 (植物ホルモン、非特異的毒素など) は、どれも病徴発現因子として位置付けられ、それ以外の病理学的機能については、これまでほとんど注目されてこなかった。本研究では、ばか苗病菌 GA の病理学的機能について、新たな視点から研究を展開した。

2. 研究の目的

本研究では、これまで典型的な病徴発現因子と考えられてきた、イネばか苗病菌の GA について、ばか苗病菌野生株と GA⁻ 株のイネに対する病原性、イネ組織での定着・増殖能力などを比較解析することによって、本菌の植物感染における GA の役割を再検証した。また、野生株と GA⁻ 株の孢子を開花期の穎花に注入接種し、花卉感染 (種子感染) における GA の役割、花卉感染による種子成熟への影響などについて調査した。健全な植物から、*F. fujikuroi* が内生菌として分離されることが報告されており、本菌が宿主範囲の広い内生菌である可能性が考えられた。そこで、イネ以外の植物への各種接種試験によって、本菌の宿主範囲を再検証した。

3. 研究の方法

(1) 実験材料として、イネばか苗病菌の野生株、GA⁻ 株 (*ΔP450-1* 株) および GA⁻ 株に正常な *P450-1* を再導入した相補株を用いた。これら菌株の植物組織中での感染行動を観察するために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺

伝子導入株を作出した。具体的には、GFP 発現野生株を作出し、その *P450-1* 破壊株を、さらに *P450-1* 破壊株に正常な *P450-1* を再導入し、相補株をそれぞれ作出した。

(2) イネ短銀坊主種子を野生株と GA⁻ 株の孢子懸濁液に浸漬した後、寒天培地に植え付け育成し、接種イネからの菌の再分離、共焦点レーザー顕微鏡を用いたイネ組織中の菌の観察を行った。

(3) 野生株と GA⁻ 株をイネの各種 GA 関連変異体に接種した場合のイネの反応を観察した。イネの GA 関連変異体として、GA 生合成変異体 (*d18*)、GA 受容体変異体 (*gid1*)、GA 情報伝達因子変異体 (*gid2*, *slr1*) を用いた。各変異体の種子を両菌株の孢子懸濁液に浸漬し、育苗培土に播種、育成した。経時的に草丈を計測するとともに、他の外部病徴 (黄化、枯れ症状など) を観察した。

(4) 本菌の花卉感染における GA の役割を明らかにするために、開花期の穎花の上部を切り取り、1 穎花あたり野生株と GA⁻ 株の孢子を 10 個または 100 個ずつ注入し、50 日間育成後、接種穂を収穫した。穂の稔実率、籾重、発芽率を調査するとともに、蛍光顕微鏡による籾、玄米、発芽種子における菌の定着状況の観察、接種種子の発病程度の調査を行った。

(5) イネばか苗病菌の宿主範囲を再検証するために、イネ、オオムギ、トマト、メロン、ダイズおよびエンドウを用いて、以下の 3 通りの接種実験を行った。

① 土壌接種：野生株と GA⁻ 株の孢子を混合した汚染土壌に種子を播種し、経時的に草丈を計測、他の外部病徴を観察した。また、汚染土壌で発芽させた種子を非汚染土壌に移植し、経時的に草丈を計測、外部病徴を観察した。さらに、接種植物組織から菌を再分離し、菌の定着の有無を確認した。

② 浸根接種：非汚染土壌で育成したイネ、メロン、ダイズ苗の根を野生株の孢子懸濁液に浸漬接種し、培養土で育成後、経時的に草丈を計測、外部病徴を観察した。

③ 注入接種：非汚染土壌で育成したメロンとダイズの胚軸に野生株と GA⁻ 株の孢子懸濁液を注入接種し、経時的に草丈を計測、外部病徴を観察した。さらに、接種植物組織から菌を再分離し、菌の定着の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) 実験に用いる GFP 発現株の GA 生産性、病原性を検定した。GFP 遺伝子を導入した野生株、GA⁻ 株 (*ΔP450-1* 株)、相補株を既報の GA 生産用培地で培養したところ、野生株と相補株は GA を生産したが、GA⁻ 株は GA 生

産性を失っていた。イネ種子をこれら菌株の孢子懸濁液に浸漬接種したところ、野生株と相補株は徒長を引き起こしたが、GA⁻株は引き起こさなかった(図1)。また、GFP発現野生株はその親株と同様なGA生産性と病原性を保持していた。以上の結果から、P450-1がGA生合成に不可欠であること、GAが病徴発現に不可欠であること、GFP発現がGA生産性、病原性に影響しないことが明らかとなり、これら菌株が実験材料として有効であることが確認された。



図1. イネばか苗病菌野生株とGA⁻株の病原性。

(2) 野生株とGA⁻株のイネ組織中での増殖能力を比較するために、両菌株の孢子懸濁液に浸漬接種したイネ短銀坊主種子を寒天培地で15日間育成した後、イネ組織から菌を再分離した。接種イネを表面殺菌した後、種子、約5mmに切り分けた主根と茎を糸状菌分離用培地で培養した。その結果、野生株接種苗では、種子、地際部の10~20mm上部の茎葉からGFP発現株が分離された。一方、GA⁻株接種苗では、種子からはGFP発現株が再分離されたが、他の部位からはほとんど分離されなかった。以上の結果から、GA⁻株はイネ組織中での増殖能力が低下していること、すなわちGAが単なる病徴発現因子ではなく、本菌のイネ組織中での増殖に関与することが確認された。

野生株とGA⁻株のイネへの感染行動を蛍光顕微鏡下で観察した。孢子懸濁液中で発芽させた種子を観察したところ、GA⁻株は野生株と同様に、籾表面に付着し、特に種子発芽時に露出した胚乳部で旺盛に増殖していた。一方、出芽した芽の表面には両菌株ともほとんど進展しておらず、ばか苗病菌の初期感染部位は発芽種子の露出した胚乳部であることが明らかとなった。また、接種イネの中胚軸切片を蛍光顕微鏡で観察したところ、野生株接種苗でも組織中で定着している菌糸が

ほとんど観察されず、本菌は組織中での増殖が低いことが明らかとなった。

(3) ばか苗病菌の植物感染におけるGAの機能をさらに解析するために、野生株とGA⁻株をイネのGA関連変異体に接種し、イネの反応を観察した。イネのGA関連変異体として、GA生合成変異体(*d18*)、GA受容体変異体(*gid1*)、GA情報伝達因子変異体(*gid2*、*slr1*)を用いた。なお、GA受容体またはGA情報伝達因子変異体はGA非感受性であり、*gid1*変異体と*gid2*変異体は極度な矮性、*slr1*変異体はGA非依存的に徒長する。野生株とGA⁻株をこれら変異体に接種したところ、予想通り、*d18*変異体では野生株接種によって成育が回復し、後期には徒長が引き起こされたが、他の変異体では顕著な病徴は観察されなかった。しかしながら、*d18*変異体にGA⁻株を接種した場合、*gid1*変異体と*gid2*変異体に野生株またはGA⁻株を接種した場合に、これら変異体がより矮化する傾向が認められた。この結果は、ばか苗病菌のGA以外の病原力因子の存在を示唆した。

(4) ばか苗病菌は花卉感染(種子感染)する。開花期の穎花に野生株とGA⁻株の孢子を注入接種することによって花卉感染を再現し、GAの花弁感染における機能を検証した。

1 穎花あたり各菌株の孢子を10個または100個ずつ注入接種し、50日間育成した。種子の成熟時に菌が存在する場合には、胚乳に菌が蔓延して正常に登熟しないと予想していた。しかしながら、野生株、GA⁻株どちらの孢子を接種した場合にも、外見上正常な種子が形成され、稔実率、籾重、種子発芽率も無接種籾と同様であった。接種籾と接種玄米における菌の局在を蛍光顕微鏡で観察したところ、菌が検出できたのは野生株接種区、GA⁻株接種区ともに30%程度であった。しかしながら、発芽種子を蛍光顕微鏡で観察したところ、両接種区ともほとんどの発芽種子から菌が観察され、特に種子発芽時に露出した胚乳部に菌が蔓延していた。接種種子を培養土に播種し、育成したところ、野生株接種区では徒長または極度な成育不良、GA⁻株接種区では極度な成育不良が引き起こされ、ほとんどの接種種子に菌が定着していたことが確認された。以上の結果は、ばか苗病菌が穎花に感染した場合にも、野生株、GA⁻株ともに穎花中で蔓延せず、種子成熟にほとんど影響しないこと、さらに本菌の穎花感染(種子感染)にはGAが関与しないことを示した。

ばか苗病重症株は、イネが開花期を迎える頃に枯死し、枯死した植物体に菌が蔓延、植物表面に大量の孢子が形成される。形成された孢子が飛散し、イネの穎花に感染、あるいは籾表面に付着し、次年度の発生源になる。

本研究では、胞子を穎花に直接接種した場合にも、種子の稔実にはほとんど影響しないことを観察した。あたかも内生菌のように種子に潜伏感染することによって、感染種子は健全種子に混入する。ばか苗病菌の病原力が弱いという性質が、イネにおける感染環の成立に貢献しているようである。

(5) 外見上健全な植物から、*F. fujikuroi* が内生菌として比較的高頻度で分離されることが報告されている。そこで本研究では、イネばか苗病菌の非宿主植物に対する感染能力の有無について、オオムギ、トマト、メロン、ダイズおよびエンドウを用いて調査した。

① イネと非宿主植物の種子を、ばか苗病菌野生株の胞子を混合した汚染土壌に播種し、育成したところ、イネだけでなく他の植物にも徒長症状、黄化症状が高頻度で引き起こされた(図2)。さらに、徒長したトマト苗、メロン苗、ダイズ苗の胚軸と子葉から菌を再分離したところ、低頻度ではあるが、GFP発現接種菌が分離された。また、GA⁻株汚染土壌で育成した植物では徒長は引き起こされなかったが、トマト苗、メロン苗、ダイズ苗から、野生株汚染土壌で育成した苗とほぼ同様な頻度で接種菌が分離された。



図2. イネばか苗病菌野生株とGA⁻株のダイズに対する病原性。胞子汚染土にダイズ種子を播種、育成。

野生株汚染土壌に非宿主植物を播種した場合に引き起こされた徒長症状が、ばか苗病菌胞子が土壌中で発芽して生産、分泌したGAに起因する可能性も考えられた。そこで、汚染土壌で出芽したメロン、ダイズ、エンドウの苗を非汚染土壌に移植し、育成したところ、汚染土壌で育成した苗とほぼ同様に徒長した。一方、非汚染土壌で育成したイネ、メロン、ダイズ、エンドウの根に野生株胞子を浸根接種したところ、徒長症状は引き起こされず、ばか苗病菌は根からは感染できないことが明らかとなった。

以上の結果は、ばか苗病菌がイネ以外の非宿主植物にも、それらの種子発芽時には感染できること、その感染にはGAが不可欠でないことを示した。

② イネばか苗病菌の非宿主植物組織内での

定着能力をさらに検定するために、メロン苗とダイズ苗の胚軸に野生株とGA⁻株の胞子を注入接種した。その結果、野生株を接種したメロン、ダイズのどちらでも徒長症状が引き起こされた。注入部を蛍光顕微鏡で観察したところ、野生株だけでなく、GA⁻株を接種した胚軸でもその注入部周辺から局所的に定着した菌糸が観察された。さらに、注入部の上位組織から菌を再分離したところ、野生株、GA⁻株ともに高頻度で分離された。以上の結果は、イネばか苗病菌がイネ以外の植物にも定着する能力を保持していること、その能力にはGAが関与しないことを示した。

上記の研究から、イネばか苗病菌は本来宿主範囲の広い、感染能力、植物組織中での増殖能力の低い内生菌であるが、GA生産能を獲得することによって、徒長、黄化、枯死といったいわゆる病徴を引き起こす病原菌になったと推定された。イネばか苗病菌の植物感染におけるGA機能をさらに明らかにするとともに、本菌の病原性進化の解明を目的として、現在、内生菌として分離された*F. fujikuroi*にGA生合成遺伝子クラスターを導入し、GA生産株の作出に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

- ① イネばか苗病菌の野生株とジベレリン欠損株のイネ苗における感染行動. 西堀由記, 播本佳明, 藤晋一, 北野英己, 柘植尚志. 日本植物病理学会関西部会, 高松, 2011年10月2日
- ② イネばか苗病菌 AFM06-041A 株はイネ以外の植物にもばか苗症状を引き起こす. 西堀由記, 今崎伊織, 藤晋一, 北野英己, 柘植尚志. 日本植物病理学会大会, 東京, 2011年3月27-29日(東北地方太平洋沖地震のため中止。座長による査読後、学会発表とみなすこととなった。)

6. 研究組織

(1)研究代表者

柘植 尚志 (TSUGE TAKASHI)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号：30192644

(2)研究分担者

北野 英己 (KITANO HIDEMI)
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授
研究者番号：50144184