

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580049

研究課題名(和文) 宿主特異的毒素生成病原菌に対するキュウリの光誘導抵抗性の発現機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies on light-induced resistance of cucumber against host specific toxin producing pathogen

研究代表者

荒瀬 榮 (ARASE SAKAE)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：40127478

研究成果の概要(和文)：

キュウリの重要病害である褐斑病は赤色光の照射により抑制できるか否かを調査した。その結果、病原菌を接種したキュウリを赤色蛍光灯照射下に保つと、自然光下に保ったキュウリに比べて病斑形成が著しく抑制された。しかし、キュウリの重要病害である炭疽病の場合は病斑形成の抑制は認められなかった。褐斑病菌に対するキュウリの光誘導抵抗性はサリチル酸経路に依存した抵抗性の誘導剤バイオンの前処理により抑制されたことより、光誘導抵抗性にはこの経路とは異なる経路の関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：

In this study, effect of red light irradiation on lesion development by *Corynespora cassiicola* in cucumber was investigated. When cucumber inoculated with *C. cassiicola* kept under natural light, large necrotic lesions were formed. Under red light, however, lesion formation was significantly inhibited. Such red light induced resistance was not observed in cucumber infected with *Colletotrichum orbiculare*. Red light-induced resistance of cucumber against *C. cassiicola* was significantly inhibited by the pre-treatment with plant activator Bion which activate salicylic acid-dependent resistance pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2012年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：植物感染生理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：光誘導抵抗性、キュウリ、褐斑病、炭疽病

1. 研究開始当初の背景

キュウリ褐斑病菌 *Corynespora cassiicola* はコットン(Jones, 1961)やカウピー、キュウリ、ナス、ゴマ、ダイズ、タバコ、およびトマト(Silvaら, 1998)などの70種類以上の植物で激しい被害を引き起こす。農作物の生

産のための最適環境状態である高温多湿条件がしばしば病気の発生を増やすので、この病気の防除は非常に難しいとされている(Menziesら, 1996)。この *C. cassiicola* はキュウリの栽培において最も重要な病原菌の

ひとつで、収穫が開始される頃に下位葉に発生し、収穫が進むにつれて上位葉に蔓延する。日本では病気の抑制に対してキュウリ褐斑病菌の主要防除薬剤であるチオファネートメチル、ジエトフェンカルブ及びアゾキシストロビンが非常に有効であったが、近年のこれらの主要薬剤に対する薬剤耐性菌の発生も報告されており(伊達ら、2004)、化学農薬に頼らない新たなキュウリ褐斑病菌の防除法が求められている。

一方、植物病害の発生には、大きく3つの要素がかかわっており、病原菌(主因)、病気になる可能性のある植物(素因)、その両者を取り巻く環境(誘因)の3つが関わっている(久能ら、2007)。このうちのひとつ、誘因に関わる環境のうち、光は病気の発生を左右する非常に重要な要素であり、特定の波長の光、特にウルトラバイオレット(岡ら、2011)、紫(Wangら、2010)、及び青(Wangら、2010)が植物の抵抗性に影響を及ぼすことが報告されている。今回実験に用いた赤色光でも植物の抵抗性を誘導する例があり、イネいもち病(荒瀬ら、2010)、ソラマメ灰色かび病(Rahmanら、2002)やシロイヌナズナの線虫病および細菌病(Islamら、2008)などの防除に有効であることが知られている。イネの場合、イネの内部ではフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(以下、PAL)活性が光依存的に増加し、感染葉では桂皮酸が蓄積する(荒瀬ら、2010)。ソラマメではタンパク質合成や光合成に依存した抵抗性が起こる(Rahmanら、2002)。シロイヌナズナでは、細菌病に対してはサリチル酸経路が活性化し、線虫病ではサリチル酸経路に依存しない異なる経路が動く(Islamら、2008)。

2. 研究の目的

キュウリのハウス栽培において、赤色蛍光灯点灯下ではキュウリ褐斑病の発病が抑制

され、それは宿主の抵抗性発現によるものであることが報告されているが(Rahmanら、2010)、この効果が上に挙げた他の植物で分かっているような、どのような現象によってもたらされているのか、という点については全く明らかではない。そこで本研究では、この現象を明らかにする目的で褐斑病菌を人工接種したキュウリの赤色光区での抵抗性を調査した。又、合わせてキュウリ炭疽病に及ぼす抵抗性を調査した。

3. 研究の方法

・供試植物の育成

キュウリ(*Cucumis sativus*)品種は、湧泉(タキイ種苗(株))を使用した。キュウリ種子はクレハ園芸培土(株式会社クレハ)に播種し、ガラス室で栽培し、第一本葉が十分展開した時に使用した。

・供試菌と接種

褐斑病菌は米ぬか培地に約2週間培養後、気中菌糸を取り除きBLB蛍光灯照射下で同調的に形成させた胞子を、 2×10^5 spores/mlの濃度に調整後、第一本葉に滴下接種した。炭疽病菌は米ぬか培地で約2週間培養し、形成された胞子を 1×10^5 spores/mlの濃度に調整後、第一本葉に滴下接種した。

・光処理

接種キュウリは湿室条件にした透明なプラスチックボックス内に入れ、サランラップで覆った。ボックスは蛍光管(FL20S・R、Panasonic)にカラーパイプ(NK92050R、Panasonic)を装着し、赤色光が照射されている25°Cのインキュベーター(KCLP-1000 II CT、日本医化器械)内に7日間保ち、赤色光区とした。蛍光管とキュウリ葉の距離は約15cmになるように調整した。赤色光区の光環境は光量子束密度 $60.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、放射照度 6.334W m^{-2} 、照度 635.2k lux であった。自然光区は、蛍光灯による照射は行わず、25°C

に保ったガラス室内に7日間保った。自然光区の光環境は光量子束密度 $2.26\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、放射照度 0.2 Wm^{-2} 、照度 22.7 k lux であった。

・発病調査

キュウリ褐斑病菌の接種7日後、キュウリの第一本葉に形成された病斑の大きさを計測した。1回の実験にキュウリは3個体を使い、実験は3回繰り返した。データは平均と標準誤差を計算し、t検定 ($P < 0.05$) により統計処理を行った。

・孢子発芽の観察

褐斑病菌及び炭疽病菌の孢子を 2×10^5 spores/ml の孢子濃度に調整後、懸濁液をスライドガラスに滴下した。スライドガラスは湿室にした滅菌シャーレに納めた後、赤色光区と自然光区に保った。48時間後、光学顕微鏡 (BX50-33FLA-3, OLYMPUS) で孢子発芽を調査した。

・褐斑病菌の侵入行動の確認

褐斑病菌孢子接種キュウリを赤色光区と自然光区に保った。5日間後に第一本葉に出現した病斑を約1cm四方に切り取り、無水エチルアルコールと氷酢酸の混合溶液 (3:1, v/v) に24時間浸漬し、脱色した。切片は、抱水クロラール水溶液に浸漬後、光学顕微鏡 (BX50-33FLA-3, OLYMPUS) で孢子の侵入を観察した。

・抵抗性誘導剤バイオオン (ASM) の処理とキュウリ褐斑病菌の接種

キュウリの第一本葉を 0.5 mM ASM 溶液、又は蒸留水に約30秒間浸し、3時間後に第一本葉に褐斑病菌孢子懸濁液を滴下した。接種キュウリは赤色光区と自然光区に保った。接種7日後に病斑形成を調査した。

4. 研究成果

1. 褐斑病菌及び炭疽病菌の病斑形成に及ぼす赤色光の影響

褐斑病菌の孢子懸濁液をキュウリの第一本葉に滴下接種し、7日後に病斑直径 (mm) を計測した結果、赤色光下では病斑が形成されないか、あるいは形成されても病斑は非常に小型で淡黄褐色を呈していた。これに対して、自然光区でのそれは大型で黄褐色を呈するか、あるいは水浸状を呈していた (図1)。また、自然光区で形成された病



自然光区 赤色光区
図1. キュウリ褐斑病菌のキュウリ葉での病斑形成に及ぼす赤色光の影響

斑直径は $6.4 \pm 1.5 \text{ mm}$ となったが、赤色光区では病斑拡大は著しく抑制され、直径は $2.6 \pm 0.5 \text{ mm}$ となった (図2)。このように、赤色光区ではキュウリ褐斑病菌の病斑形成とそ

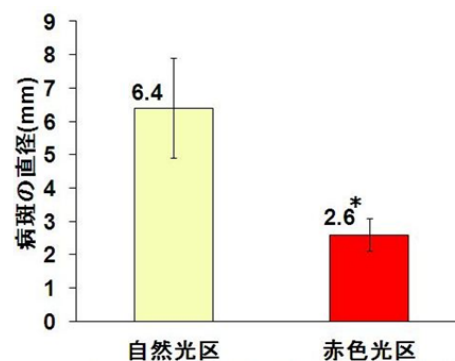


図2. キュウリ褐斑病菌のキュウリ葉での病斑形成に及ぼす赤色光の影響
カラム上の*はt検定において有意差があることを示す。

の拡大が抑制されることが明らかとなった。一方、炭疽病菌接種キュウリでの病斑形成は、褐斑病菌の場合と大きく異なり、赤色光区においても病斑形成及び拡大の抑制は観察されなかった (図3)。

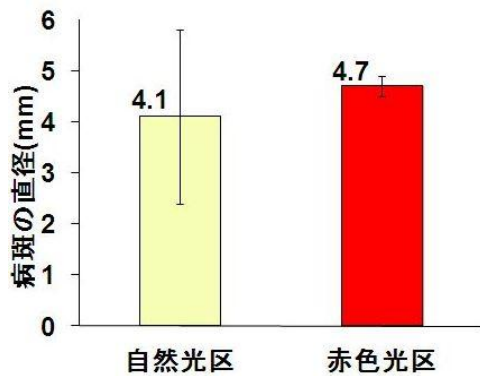


図3. キュウリ炭疽病菌のキュウリ葉での病斑形成に及ぼす赤色光の影響

赤色光照射が褐斑病菌及び炭疽病菌の孢子発芽に及ぼす影響を調べたが、両菌の孢子発芽は阻害されなかった。

2. 褐斑病菌の菌糸伸展に及ぼす赤色光の影響

接種5日後のキュウリ葉に現れた病斑部を光学顕微鏡で撮影した。その結果、赤色光区、自然光区共に孢子発芽や付着器形成において違いは認められなかった。しかし、赤色光区では付着器下の細胞が褐色に染まり、細胞外への菌糸の拡大が止まっていた。これに対し、自然光区では色の変化は起こらず、菌糸

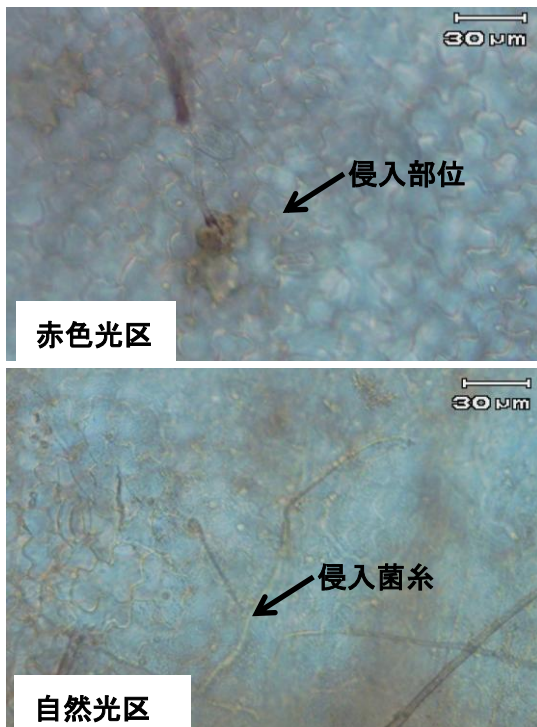


図4. 褐斑病菌の侵入に及ぼす赤色光の影響

が広がっていた。

3. 褐斑病菌に対するキュウリの赤色光誘導抵抗性に及ぼすASM処理の影響

DW及びASMを処理したキュウリに褐斑病菌を接種後自然光区と赤色光区に保ち、病斑形成を比較した。その結果、蒸留水処理キュウリにおける病斑直径は自然光区では

16 ± 0.5mmであったのに対し、赤色光区では6.1 ± 0.2mmとなり、これまでの赤色光誘導抵抗性が観察された。これに対して、ASM処理キュウリにおける病斑形成は大きく異なった。即ち、自然光区での病斑直径は18.3 ± 0.4mmであった。また、赤色光区におけるそれは18.9 ± 0.4mmとなり、蒸留水/自然光区あるいはASM/自然光区におけるそれとほぼ同じ値を示した。このように、ASM処理キュウリでは褐斑病菌に対する光誘導抵抗性が抑制さ

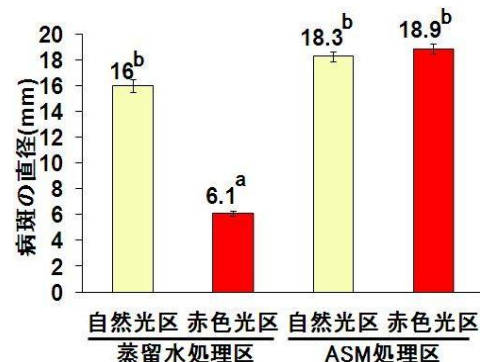


図5. キュウリの褐斑病菌に対する赤色光誘導抵抗性に及ぼすバイオン(ASM)の影響

れることが判明した(図5)。

本研究より、赤色光照射はキュウリの褐斑病菌による病斑形成を強く阻害することが明らかとなった。しかし、同じキュウリの病原菌である炭疽病菌による病斑形成は阻害しなかった。赤色光下における褐斑病菌と炭疽病菌の孢子発芽は阻害されておらず両菌で見られた病斑形成の違いは赤色光の病原菌に対する直接的効果によるものではなく、キュウリの抵抗性によるものであると共に、病原菌によりその抑制効果に違いにあるこ

とが示唆された。病原菌には、キュウリ褐斑病菌のように宿主の細胞を殺し、その死細胞から栄養を取る生活様式の殺生性病原菌と、宿主細胞を破壊せず、生細胞から栄養をとる活物性病原菌、炭疽病菌のように殺生性病原菌と活物性病原菌の特性を併せ持つ半活物性病原菌の3種類が存在する。この様な栄養摂取法の異なる病原菌に対する抵抗性発現に関与する代謝経路として、殺生性病原菌に対してはジャスモン酸経路が、活物性病原菌や半活物性病原菌に対してはサリチル酸経路が機能することが知られている。抵抗性誘導剤バイオン(ASM)を接種前処理したキュウリでは褐斑病菌に対する光誘導抵抗性の発現が強く抑制された。ASMはサリチル酸経路依存型の抵抗性誘導剤として知られており、炭疽病に対して抵抗性を誘導することが知られている(石井,2000)。サリチル酸経路とジャスモン酸経路は拮抗し、サリチル酸処理はジャスモン酸の生合成及びジャスモン酸に反応して発現する遺伝子の発現を抑制し、これによりジャスモン酸経路を抑制することが知られている(Reyesら,2010)。これらのことから、キュウリの褐斑病菌に対する赤色光抵抗誘導性はジャスモン酸経路か、あるいはASMによって抑制される未知の防御応答シグナル伝達経路が動いた可能性がある。しかし、ジャスモン酸処理が褐斑病菌に対する抵抗性を誘導したという報告はない。このことから、褐斑病菌に対する赤色光誘導抵抗性は未知の防御応答シグナル伝達経路である可能性がある。

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)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Arase, S., Kondo, Y., Parada Jaco, R., Otani, H., Ueno, M. and Kihara, J., Suppression of rice blast disease by

autoclaved water extract from the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes*, Mushroom Science and Biotechnology, 査読有, Vol. 21, 2013, 印刷中.

- ② Inagaki, Y., Noutoshi, Y., Fujita, K., Imaoka, A., Arase, S., Toyoda, K., Shiraiishi, T. and Ichinose, Y., Infection-inhibition activity avenacin saponins against the cereal pathogens *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Bipolaris oryzae*, and *Magnaporthe oryzae*, Journal of General Plant Pathology, 査読有, Vol. 79, 2013, pp. 69-73.
- ③ Shirasawa, H., Ueno, M., Kihara, J. and Arase, S., Protective effect of red light against blast disease caused by *Magnaporthe oryzae* in rice, Crop Protection, 査読有, Vol. 39, 2012, pp. 41-44.
- ④ Ueno, M., Suzuki, Y., Kumura, Y., Ueda, K., Nguyen T. Q., Kihara, J., Arase, S. and Oshima, A., Isolation of *Streptomyces* strain STS1 that inhibits the growth of *Colletotrichum orbiculare* Journal of JSATM, 査読有, Vol.18, 2012, pp.191-195.
- ⑤ Ueno, M., Kumura, Y., Ueda, K., Kihara, J. and Arase, S., Indole-derivatives enhance resistance against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, Journal of General Plant Pathology, 査読有, Vol. 77, 2011, pp. 209-213.
- ⑥ Islam, S. Z., Rahman, M. Z., Khanam, N. N., Ueno, M., Kihara, J., Honda, Y., and Arase, S., Disease suppression by light-enhanced antioxidant system in broad bean, Current Topics in Plant Biology, 査読有, Vol. 12, 2011. pp. 55-61
- ⑦ 荒瀬 栄, 上野 誠, 木原享一, 赤色光照射による病害抵抗性誘導と病害防除への応用, 植物防疫 査読有, 2010, Vol. 64, pp. 511-514.
- ⑧ Rahman, M. Z., Khanam, H., Ueno, M., Kihara, J., Honda, Y. and Arase, S., Suppression by red light irradiation of

Corynespora leaf spot of cucumber caused by *Corynespora cassiicola*, J. Phytopathology, 査読有, Vol. 158, 2010, pp. 378-381.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Arase S., Kondo Y., Parada R. Y., Otani H., Ueno M. and Kihara J., Effect of autoclaved water extract from spent substrate of hatakesimeji mushroom on protection of rice against blast. The 2nd Korea-Japan Joint Symposium in Plant Pathology, 2012 年 3 月 27 日, 福岡国際会議場 (福岡) .

[図書] (計 2 件)

- ① 尾谷 浩・荒瀬 榮, 丸善プラネット株式会社, 菌類きこの遺伝資源-発掘と活用-, 2013, 172.
② 上野誠、荒瀬 榮、木原淳一, 丸善プラネット株式会社, 菌類きこの遺伝資源-発掘と活用-, 2013, 172.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kankyuu.shimane-u.ac.jp/oryzae/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒瀬 榮 (ARASE SAKAE)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：40127478

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：