

クワ培養細胞を用いたクワ芽枯病菌の 病原性評価法の確立

野末雅之・蔡 偉・石井ちか子・塩入秀成
小島峯雄・*齋藤英毅

(信州大学繊維学部応用生物科学科繊維植物生産学講座, *信州大学繊維学部附属農場)

クワ芽枯病は、病斑部からフザリウム菌の分生胞子および子のう胞子が飛散し、9月から10月に枝の傷や皮目から侵入することにより引き起こされる。そして冬季の間に菌糸が緩やかな生育を続け、翌春になり病斑が急激に拡大し、やがて枝が枯死する桑病である(1, 2)。仮に春季から夏季に同様に病原菌の胞子がクワ枝に付着しても、桑樹が盛んに成長する夏季のクワの傷部では傷害反応によりコルク層などの治癒組織が速やかに形成されるため、菌の侵入は阻止される。したがって、クワ芽枯病菌のクワ組織への感染は、桑樹の成長期が過ぎた秋季以降に限られる。

クワ芽枯病菌として、*Fusarium* (*Gibberella*) *lateritium* f. sp. *mori*, *F. (Hypomyces) solani* f. sp. *mori*, *F. (Hypomyces) solani* f. sp. *psii*, *F. roseum* 'Graminearum' など数種のフザリウム菌が知られている(2)。従来、桑園より採集したフザリウム菌がクワに対して病原性があるか否かを判定するには、クワへ直接、有傷接種試験を行い、病斑形成の有無を確認する方法(有傷接種法)が一般的であった。しかし、この方法では、接種を行う時期が秋季に限られ、病原性の識別は翌春になり、判定に非常に長期間(8~9か月)を要する。この方法は、人為的にクワ枝に傷を付けて菌胞子を接種する以外は全て自然条件下での発病経過と同じであり、正確な病原性の評価が期待できるが、採集した多くの菌株の病原性の有無を季節に関係なく判定することは困難であった。そこで齋藤ら(3, 4)により、発芽前に伐採し冷蔵庫内に保存されたクワ枝を病原性判定材料に用いる検定法が考案された。フザリウム菌を接種した桑条をポリ袋あるいはプラスチック容器内でそれぞれ、2から4か月間あるいは1から2か月間インキュベートした後、病原性を判定する方法である。この方法では、従来の有傷接種法とほぼ同様の病原性評価結果が確認されている。齋藤らの伐

採クワ枝を用いた簡易接種法は、冷蔵保存桑条を用いて年間通じて芽枯病菌の識別が可能であり、判定に要する期間も従来法に比べ大幅に短縮される。

近年、植物の病害抵抗性に関与する遺伝子を単離し、その機能を明かにすることにより抵抗性機構を解明しようという試みがなされている。種々の遺伝子標識法により得られた多数の標識植物の中から、宿主植物の抵抗性反応に変異が生じた植物を選抜し、その変異が生じた植物体から標識された遺伝子を単離することにより病害抵抗性に関係した遺伝子を同定することが可能である。クワ植物の病害抵抗性遺伝子を同定し、芽枯病菌抵抗性機構を解明する過程で、本病における種々の病原性変異株を選抜しなければならない。そのためには、多数の変異株の抵抗性の程度、有無を短時間に検定することが可能な *in vitro* の病害抵抗性(病原性)検定法の確立が必須である。そこで、今回、我々は、判定材料にクワ培養細胞系を用いた新たなフザリウム菌の病原性検定法の確立を試みた。

材料および実験方法

1 供試菌株

本研究に供試したフザリウム菌株を Table 1. に示した。クワに対して病原性を有する芽枯病菌株として *F. lateritium* f. sp. *mori* 6株, *F. solani* f. sp. *mori* 2株を供試した。また、クワ以外の植物から単離されクワに対しては非病原性菌株である *F. lateritium* f. sp. *celosiae* 2株, *F. lateritium* f. sp. *crotalariae* 1株, *F. solani* f. sp. *radicicola* 2株, *F. solani* f. sp. *phaseoli* 1株, *F. oxysporum* f. sp. *bataas* 2株, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* 1株, *F. roseum* 'Graminearum' 2株の合計19株を供試した。これらのフザリウム菌株は、信州大学繊維学部で系統保存されており、すべて宿主植物が確認されてい

Table 1. *Fusarium* sp. used in the present experiments

<i>Fusarium</i> sp. Strain No.	Host plant
<i>F. lateritium</i> f. sp. <i>mori</i>	
SUF1156	mulberry
SUF1166	mulberry
SUF1181	mulberry
XVII-1	mulberry
XVII-3 (m12)	mulberry
XvII-5 (m14)	mulberry
<i>F. lateritium</i> f. sp. <i>celosiae</i>	
ce3	coakscomb
ce4	coakscomb
<i>F. lateritium</i> f. sp. <i>crotalariae</i>	
cr1	bean
<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i> (Wr.) Sakurai. et Matuo	
SUF235 (S1)	mulberry
SUF217-11 (S2)	mulberry
<i>F. solani</i> f. sp. <i>radicicola</i> (Wr.) Snyder. et Hans.	
SUF1305	radish
SUF1309	radish
<i>F. solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (Wr.) Snyder. et Hans.	
SUF386	bean
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>bataas</i> (Wr.) Snyder. et Hans.	
SUF1298	sweet potato
RUF1301	sweet potato
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> Kend. et Snyder.	
SUF672	bean
<i>F. roseum</i> 'Graminearum'	
G1	grain
G2	grain

る。

実験には、PDA培地で1週間から2週間培養した菌株から、殺菌水で各種濃度の分生孢子懸濁液を調製し、接種源とした。

2 クワ培養細胞の維持

クワ品種フィカス (*Morus alba* L. cv. Ficus) の実生胚軸切片を各種濃度のNAAと2, 4-Dおよびカイネチンとベンジルアデニンをそれぞれ組み合わせた3%シロ糖、0.3%ゲルライトを含むMS培地(5)上に置床し、27°C、暗所下で2週間培養し、カルスを誘導した。植物ホルモンの種々組み合わせのうちで、カルス化およびその後のカルスの成長が最も良好であった5 mg/L NAA、1 mg/L ベンジルアデニンおよび3%シロ糖を含むMS培地を用いて、以後3週間おきに継代培養しクワ培養細胞を維持した。

3 接種および病原性評価の方法

継代培養に用いたMS培地10mlを含む直径5.5cm

のペトリ皿で27°C暗所で7日間培養したクワカルス(新鮮重600mg)を病原性判定材料とした。クワカルス表面に各種濃度に調製した供試フザリウム菌株の分生孢子懸濁液を20μL滴下し、25°C、暗所下で3日間培養(コカルチャー)した。分生孢子懸濁液の濃度は、カルス当たり 10^2 から 10^6 に調製した。

クワカルスとフザリウム菌分生孢子をコカルチャーし、3日後にカルス表面に菌糸の生育が観察されるか否かを調べた。病原性の程度は、カルス表面での菌糸の発育が肉眼で観察される最少の分生孢子懸濁液濃度を求め、より少ない接種孢子数でも菌糸が生育すればより病原性が強いと判断した。逆に、より高濃度の分生孢子を接種しても菌糸が生育しなければその菌のクワカルスに対する病原性は無いかより低いと判断した。

また、同時に接種した分生孢子的発芽の有無、菌糸伸長の様子を光学顕微鏡で観察した。

結果および考察

1 クワ芽枯病菌(病原性菌)

クワに対して病原性(virulent strain)があるクワ芽枯病菌とクワカルスとのコカルチャーの結果をFig. 1.に示した。これらの観察結果は、すべて接種3日後に行ったものである。*F. lateritium* f. sp. *mori* SUF1156菌は、供試したクワ芽枯病菌の中で菌糸の発育に必要な孢子数が 10^4 個と最も高い値を示し、病原性の程度はさほど強くないと考えられる。他の7菌株については、いずれも 10^3 以下の孢子濃度で極めて良好な菌糸の発育が観察された。供試した全ての芽枯病菌でクワカルス表面上での菌糸の発育がみられたことから、すべてクワカルスに対して病原性があると判断される。その程度に関しては、*F. solani* f. sp. *mori* SUF217-11, *F. solani* f. sp. *mori* SUF235, *F. lateritium* f. sp. *mori* XVII-1, *F. lateritium* f. sp. *mori* XVII-3, *F. lateritium* f. sp. *mori* SUF1181の5菌株が極めて病原性が強く、続いて*F. lateritium* f. sp. *mori* XVII-5, *F. lateritium* f. sp. *mori* SUF1166の2菌株が強く、*F. lateritium* f. sp. *mori* SUF1156菌は、最も病原性が低いと判断される。*F. lateritium* f. sp. *mori* XVII-3菌の病原性については、斉藤らの伐採桑条を用いた簡易接種法による病原性評価の結果でも強い病原性が示されており(4)、今回のクワカルスを用いた場合の結果と良く一致した。

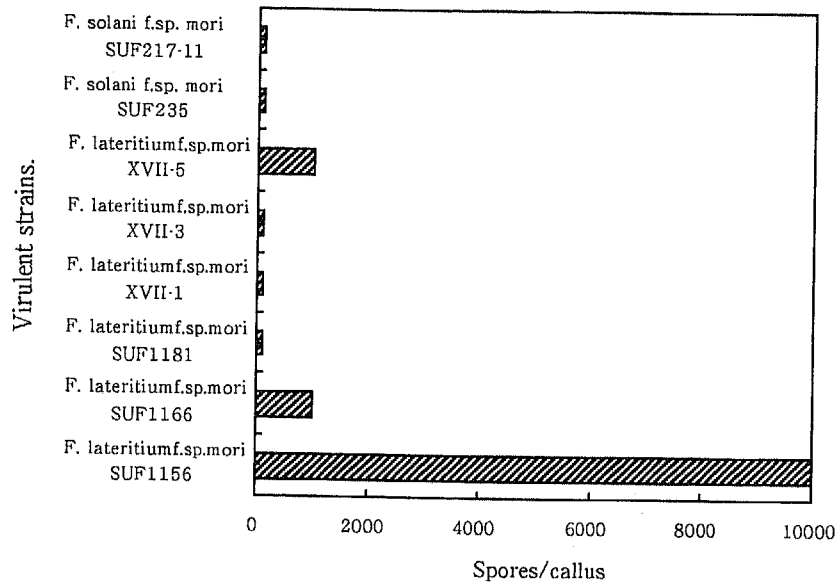


Fig. 1. Minimal inoculum size required for mycelial development on mulberry callus inoculated with virulent strains.

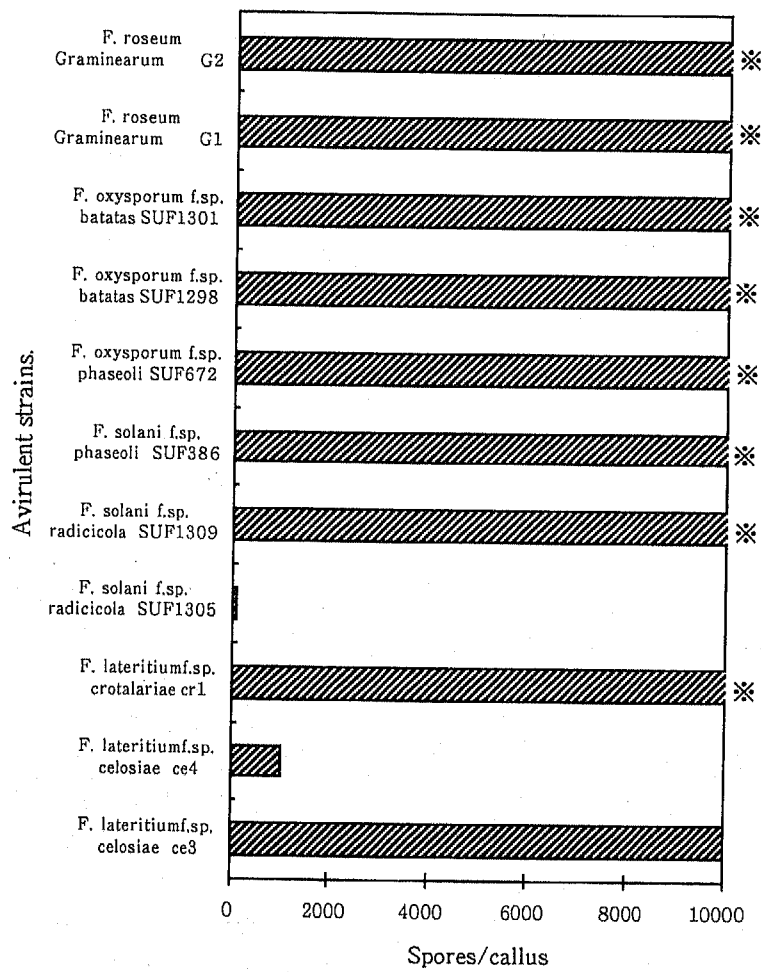


Fig. 2. Minimal inoculum size required for mycelial development on mulberry callus inoculated with avirulent strains. * ; Strains required more than 10,000 spores/callus to develop mycelia.

Table 2. Germination of inoculated spores on mulberry callus and their pathogenicity

Strains	Pathogenicity on mulberry callus in the present study	Germination of spores
<i>F. lateritium</i> f. sp. <i>mori</i> XVII-3	virulent	+
<i>F. lateritium</i> f. sp. <i>mori</i> XVII-5	virulent	+
<i>F. lateritium</i> f. sp. <i>celosiae</i> ce4	virulent	+
<i>F. solani</i> f. sp. <i>radicicola</i> SUF1305	virulent	+
<i>F. solani</i> f. sp. <i>radicicola</i> SUF1309	avirulent	+
<i>F. solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i> SUF386	avirulent	-
<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i> SUF235	virulent	+
<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i> SUF217-11	virulent	+
<i>F. roseum</i> 'Graminearum' G2	avirulent	-
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i> SUF1298	avirulent	-
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i> SUF1301	avirulent	+

+ : germinated ;

- : ungerminated

2 非病原性菌

クワに対して非病原性(avirulent strain)とされているフザリウム菌をクワカルスに接種し、3日間コカルチャーした場合の結果を Fig. 2. に示した。供試した11の非病原性菌株のうち8菌株で、 10^6 の分生孢子数をカルス表面に接種しても菌糸の発育は全くみられず、また *F. lateritium* f. sp. *celosiae* ce3 菌でも、菌糸の発育に必要な孢子数が 10^4 個と高い値を示した。逆に、クワに対して非病原性菌であるにも関わらず、*F. solani* f. sp. *radicicola* SUF1309, *F. lateritium* f. sp. *celosiae* ce 4 の両菌株では、低い孢子数でも菌糸の発育が観察された。特に、*F. solani* f. sp. *radicicola* SUF1309 菌では、 10^2 個の少ない孢子数でも良好な菌糸の発育が観察された。*F. solani* f. sp. *radicicola* のクワに対する病原性に関しては過去に報告されていないが、サツマイモ、グラジオラス、ジャガイモ、コンニャク、レンコン、チューリップ、ヤマゴボウ、ウド、ナガイモ、ニンジン、アルファルファ、ラッキョウなど多くの他の植物に対する病原性が報告されている(6)。今回確認されたクワカルスに対する *F. solani* f. sp. *radicicola* の病原性も、広い宿主範囲に病原性を発揮する本菌の特徴の一つと考えられる。

一方、供試した非病原性菌株の大半は、クワカルス上で菌糸の生育が阻害された。これらの菌株でコカルチャー6日目以降になると、MS培地にこぼれ落ちた孢子懸濁液からの菌糸の生育がみられたが、カルス表面での菌糸の生育はみられなかった。この菌の生育阻害は、非病原性菌に対する宿主細胞の抵抗性反応の結果であると考えられる。病原性菌がクワカルス上で菌糸が発育するためには、次の様な

ステップをへて、最終的に肉眼で認めらる菌叢が蔓延すると考えられる。つまり、(1)接種した分生孢子の発芽、(2)発芽管、菌糸の伸長、(3)クワカルス細胞への感染、(4)感染細胞内での菌糸の伸長の各段階である。非病原性菌に対する抵抗性反応がこれらのいずれかの段階を阻害するために、最終的に菌の蔓延が阻害されているものと考えられる。そこで、どのステップで菌の伸長が阻害されているのかを明らかにするため、接種したカルスおよび分生孢子を光学顕微鏡で観察した。その結果を Table.2. に示す。観察した14菌株のうち菌叢の発育がみられなかった非病原性の5菌株のうちで、3菌株は接種した孢子は全く発芽していなかった。残りの2菌株では、孢子は発芽しているがその後の菌糸の伸長が阻害されていた。これらの観察結果は、種々のステップについて、宿主植物の菌の侵入に対する複数の防御機構が存在することを示している。孢子発芽後の菌糸の生育阻害が、宿主細胞への感染前に起こる場合と感染後に起こる場合とがあるが、感染細胞の判別が必ずしも容易ではなく今回は区別しなかった。今回供試した非病原性菌株の多くは、①接種後クワカルス細胞上での孢子の発芽が阻害されることにより、あるいは②孢子発芽後の菌糸の生育が阻害されるために最終的に菌糸が発育しないと考えられる。少なくともそれら2通りの防御機構がクワカルス細胞あることが明らかになった。

宿主細胞が何らかの抵抗性反応を示す場合に、しばしばカルス表面細胞の褐変が観察された。感染細胞の褐変あるいは急激な細胞死は、植物細胞の典型的な病害抵抗性反応の一つであり(7)、菌糸の生育阻害機構に重要な関与していると考えられる。

3 培養細胞を用いた病原性評価について

既に病原性の有無が明かになっている系統保存菌株を用いて行った今回のクワカルスに対するフザリウム菌の反応は、従来の接種試験で得られた結果と非常によく一致するものであった。また、斉藤らの伐採桑枝を用いた簡易接種法（3, 4）でも最低1か月を要した検定期間が、本研究で検討した方法では、わずか3日で判別可能であることが分かった。広い宿主範囲を持つ菌でクワに対して非病原性菌と考えられていた菌でも、今回クワカルスに強い病原性を示すものがあったが、本来病原性を有していても自然界でこの菌とクワ植物が遭遇する機会が非常に少なく分離された報告が無いものと思われる。

今後、非病原性菌に対する宿主細胞の抵抗性反応機構を明かにすることにより、さらに短時間に病原性を評価することが可能となろう。

引用文献

1) MATUO, T. (1952) : Pathological studies of the

bud blight of mulberry trees. I. On the occurrence and development of the disease. J. Fac. Text. Seric. Shinshu Univ. 2 Ser. A, 1-43.

- 2) 松尾卓見 (1971) : 桑芽枯病の病斑, 蚕糸科学と技術, 10, 9, 24-28.
- 3) 斉藤英毅, 柳沢勝人, 茅野誠司 (1994) : 簡易接種法によるクワ芽枯病菌の病原力の判定, 信州大学繊維学部農場研究報告, 15, 39-44.
- 4) 斉藤英毅, 何玲, 柳沢勝人, 茅野誠司 (1995) : 伐採桑条を用いたクワ芽枯病菌の簡易接種法の検討, 日蚕雑, 64, 61-64.
- 5) MURASHIGE, T and SKOOG, F. (1962) : A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- 6) 松尾卓見, 駒田 旦, 松田 明編 (1980) : 作物のフザリウム病, 全国農村教育協会, P. 502.
- 7) NATON, B., HAHNBROCK, K. and SCHMELZER, E. (1996) : Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiol.*, 112, 433-444.