

氏 名 (本 国 籍)	FU HUIZHEN (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 7 4 5 号
学 位 授 与 年 月 日	令和 2 年 9 月 1 8 日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Development of Eco-friendly Biological and Chemical Methods to Control Tomato Bacterial Wilt (トマト青枯病に対する低環境負荷型の生物学的および化 学的防除法の開発)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 須 賀 晴 久 副査 岐阜大学 准教授 清 水 将 文 副査 静岡大学 教 授 森 田 明 雄

論 文 の 内 容 の 要 旨

Ralstonia solanacearum 種複合体による青枯病は、トマトの最重要病害のひとつである。生産現場では、青枯病対策として土壌くん蒸消毒や接ぎ木栽培が普及しているが、いずれも防除効果が不十分である。また、土壌くん蒸剤は毒性が高く環境負荷が大きいことから、代替防除法の開発が強く望まれている。そこで本研究では、低環境負荷で安全性が高い新奇の実用的トマト青枯病防除技術の開発に取り組んだ。

第一の研究では、拮抗微生物を用いた新奇の生物的防除法の開発に挑んだ。先行研究では、拮抗微生物の土壌処理による青枯病防除効果ばかりが検討されてきたが、土壌処理は作業負担が大きく、多量の薬剤を要するため実用的ではなかった。そこで本研究では、土壌処理よりも省労力・低コストの茎葉散布で防除効果を示す拮抗微生物を探索することにした。茎葉散布の場合、拮抗微生物には高い乾燥耐性と茎葉定着性が求められることから、これらの特性を兼ね備えたトマト内生 *Bacillus* 属細菌を拮抗菌株の探索源とした。まず初めに、以下の方法で青枯病抑制効果をもつ *Bacillus* をトマト苗に集積させ、目的とする細菌を効率的に分離した。圃場土壌の懸濁液に 80℃の熱処理を施し、耐熱性の低い微生物を除去した。この土壌懸濁液にトマト苗の地上部を 1 時間浸漬し、3 日後に青枯病菌を接種した。接種 1 週間後に無病徴個体から茎葉をサンプリングし、そこから耐熱性の内生細菌を 50 株分離した。分離した細菌の中から、茎葉処理で青枯病を抑制し得る菌株を選抜するため、分離菌株の懸濁液に 1 週齢トマト苗の茎葉を 1 時間浸漬し、翌日に青枯病菌を断根接種して発病を比較した。その結果、G1S3 株と G4L1 株が発病を有意に抑制した。そこで次に、温室内でポット試験を行い、これら 2 菌株

の発病抑制効果を比較した。ポット試験では、トマト苗に2菌株を茎葉散布し、3日後に青枯病菌を灌注接種して2週間置いた。その結果、G4L1株のみが安定的に高い発病抑制効果を示したことから、同菌株を最終候補株とした。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析の結果、本菌株は *B. pseudomycoides* に近縁な種であると判明した。

青枯病菌密度を調査したところ、G4L1 処理苗の茎内では青枯病菌の増殖が顕著に抑制されていた。さらに、青枯病菌を接種した G4L1 処理苗における防御関連遺伝子群の発現量を定量 PCR 法で測定した結果、茎ではサリチル酸とジャスモン酸応答性の遺伝子、根ではエチレン応答性の遺伝子の発現量が顕著に増加していた。以上のことから、G4L1 株は、複数の情報伝達経路を介した病害抵抗性をトマト苗に誘導し、根からの青枯病菌の感染と茎内での青枯病菌の増殖を阻害することで発病抑制しているものと推測された。

第二の研究では、糖類を用いた青枯病防除法の開発に挑んだ。糖類は天然に最も広く存在する有機化合物であり、比較的安価で、食品添加物としても利用されるため、環境負荷が低く、安全で経済的な防除資材になり得ると考えた。本研究では、トマトへの葉害が少ないと予想されるトマト根浸出物に含まれる糖類 10 種（L-アラビノース、D-フルクトース、D-ガラクトース、マルトース、D-マンノース、D-ラフィノース、D-リボース、スクロース、D-木キシロース）に着目した。まず、これらの糖に対する青枯病菌の利用性を *in vitro* で検定したところ、青枯病菌は L-アラビノース、マルトース、D-ラフィノースおよび D-リボースを利用しないことが明らかとなった。次に、試験管内で育苗したトマト実生への接種試験でこれら 4 種の青枯病抑制効果を評価した。その結果、L-アラビノース添加区でのみ発病が有意に抑制された。そこで、0.1%~0.5%の L-アラビノースをトマトポット苗に灌注処理し、温室条件下で発病抑制効果を比較したところ、いずれの濃度でも発病が顕著に抑制されることと、その発病抑制効果が濃度依存的に高まることが明らかとなった。最も高濃度の 0.5%区では、対照区に比べて平均 86.5%も発病度が低下し、極めて高い発病抑制効果が得られた。

青枯病菌密度を調べた結果、0.5%L-アラビノース区のトマト苗では、根圏および茎内の青枯病菌密度が有意に低下していた。L-アラビノースには抗菌作用がなく、青枯病菌の走化性誘引物質でもなかったことから、抗菌作用や走化性攪乱が感染抑制の原因ではないと考えられた。そこで、青枯病菌接種した L-アラビノース処理苗における防御関連遺伝子群の発現を定量 PCR 法で解析した結果、サリチル酸およびエチレン応答性遺伝子群の発現が有意に誘導されていた。このことから、これらの植物ホルモンを介した病害抵抗性の誘導が L-アラビノースの青枯病抑制効果の原因であると推測された。

以上のように、本研究では、内生 *Bacillus* 菌の茎葉散布と L-アラビノースの土壌灌注という異なる 2 つの新奇なトマト青枯病防除法の開発に成功するとともに、それらの防除機構に関する基礎的な知見が得られた。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者 FU HUIZHEN 氏の研究は、トマトの最重要病害のひとつである土壌伝染性の青枯病に対する低環境負荷型の生物学的および化学的防除法の開発を目指したものである。同氏の研究成果は、以下の 2 つに大別される。

1. 茎葉散布でトマト青枯病を顕著に抑制できる内生 *Bacillus* 属細菌 G4L1 株を発見するとともに、その作用機序が全身抵抗性誘導であることを明らかにし、これまでにない新しい生物学的防除法を開発することに成功した。
2. 植物細胞壁の主成分のひとつである L-アラビノースに青枯病抑制効果があることを発見するとともに、その作用機序が全身抵抗性誘導であることを明らかにし、極めて安全性の高い化学的防除法を開発することに成功した。

以上の知見はいずれも学術的に新規性が高く、かつトマト生産に応用可能な実用的防除法の確立に大きく寄与するものであることを認める。

基礎となる学術論文

- 1) Fu, H-Z., M. Marian, T. Enomoto, A. Hieno, H. Ina, H. Suga and M. Shimizu: Biocontrol of tomato bacterial wilt by foliar spray application of a novel strain of endophytic *Bacillus* sp. , Microbes and Environments, in press
- 2) Fu, H-Z., M. Marian, T. Enomoto, H. Suga and M. Shimizu: Potential use of L-arabinose for the control of tomato bacterial wilt, Microbes and Environments, in press