



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Isolation and Characterization of Novel Biocontrol Agents for Controlling Tomato Bacterial Wilt(内容と審査の要旨 (Summary))
Author(s)	Malek Khaled Mahmoud Marian
Report No.(Doctoral Degree)	博士(農学) 甲第701号
Issue Date	2018-09-30
Type	博士論文
Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/77267

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏 名 (本国籍)	Malek Khaled Mahmoud Marian (ヨルダン・ハシェミット王国)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	農博甲第701号
学位授与年月日	平成30年9月30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	Isolation and Characterization of Novel Biocontrol Agents for Controlling Tomato Bacterial Wilt (トマト青枯病に対する新規生物防除エージェントの分離と特性解析)
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

トマトは世界で年間に約1億8千万トン以上も生産され、最も生産量の多い野菜である。わが国においても合計1万2千ヘクタールの面積で年間約73万トンものトマトが生産されており、経済的に極めて重要な作物となっている。このトマトを生産する上で大きな障害となるのが土壌伝染性の青枯病である。青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* species complex) は主に根から感染し、根や茎の維管束内で増殖した後、粘質性多糖類や各種分解酵素などの病原性因子を分泌して宿主植物を枯死に至らしめる。トマトの生産現場では、青枯病対策として土壌くん蒸消毒や抵抗性台木を用いた接ぎ木栽培が広く行われているが、いずれも防除効果が不安定であり、被害を食い止められない場合が多い。また、土壌くん蒸剤は、人への毒性や環境負荷の面で大きな問題があり、欧州や米国などでは既に全廃あるいは使用制限が実施されている。以上のことから、接ぎ木栽培や土壌くん蒸消毒を補完・代替する青枯病防除技術の確立が求められている。そこで本研究では、トマト青枯病に対する実用的な生物防除技術の確立を目指し、新規生物防除細菌株の探索、選抜細菌株の特性解析、選抜細菌株の最適処理方法の検討および防除機構の解析を行った。

まず、圃場で栽培したトマト、ニラおよびネギから根圏細菌を合計442株分離した。これら分離細菌株の青枯病菌に対する抗菌活性を検定したところ、276菌株が活性を示した。次に、試験管内での青枯病発病試験 (シードリングバイオアッセイ法) により、抗菌性菌株の青枯病抑制効果を評価した。その結果、56菌株が発病を抑制し、中でも非病原性 *Ralstonia* 属の8菌株および *Mitsuaria* 属の11菌株に高い発病抑制効果が認められた。 *Mitsuaria* 属菌の青枯病防除効果は未報告であったことから、11株全てについて続くポット試験で防除効果を評価し、候補菌株

の絞り込みを行った。一方、非病原性 *Ralstonia* 属菌は既に青枯病防除効果が報告されていたため、シードリングバイオアッセイ法で一番効果が高かった TCR112 株を候補菌株として選抜し、ポット試験に供した。その結果、*Mitsuaria* 属菌株の中では TWR114 株が安定して高い防除効果を発揮したことから、本菌株を最終候補株として選抜した。また、*Ralstonia* sp. TCR112 株も高い防除効果を示した。そこで次に、両菌株の土壤灌注処理による防除効果を青枯病汚染圃場で検証した。2ヶ年の試験の結果、両菌株とも1週間間隔で灌注処理することで圃場条件下においても青枯病を顕著に抑制することが確認された。

以上の試験で選抜した TWR114 株および TCR112 株の防除効果は、土壤灌注後 10~14 日程度で消失するため頻繁な追加接種が必要であった。そこで、両菌株の混合処理で防除効果の持続性が向上するかを検討した。TWR114 株と TCR112 株を 1:1、1:2、2:1 の比率で混合した懸濁液を用い、ポット試験で防除効果を評価したところ、両菌株の単独処理に比べて混合処理で防除効果の持続性が大幅に向上した。特に、TWR114 株と TCR112 株を 2:1 の比率で混合した場合、1回の灌注処理で1ヶ月以上にわたり発病がほぼ完全に抑制されたことから、同比率で混合処理することが望ましいと考えられた。

TWR114 株と TCR112 株の種を同定するため、ハウスキーピング遺伝子を用いた Multilocus sequence analysis (MLSA) を行うとともに、MiSeq で解析した全ゲノムデータを基に Average nucleotide identity (ANI) および *in silico* DNA-DNA hybridization (*isDDH*) を行った。*Mitsuaria* 属の細菌は今のところ *M. chitosanitabida* の1種しか報告されていないが、上述のいずれの解析においても、TWR114 株は *M. chitosanitabida* とは別種である可能性が高いことが明らかとなった。同様に、TCR112 株も既知種の *R. pickettii* に近縁ではあるものの、別種である可能性が示唆された。

青枯病を含む細菌性病害に対する生物防除機構に関与すると言われている各種の分解酵素や抗生物質などの生合成遺伝子がゲノム上に保持されているかを解析したところ、TWR114 株にはプロテアーゼ、ポリガラクトナーゼおよびバクテリオシン、TCR112 株にはプロテアーゼ、ポリガラクトナーゼ、シデロフォア、バクテリオシン、フェナジンの生合成遺伝子が存在することが明らかとなった。また、寒天培地を用いた検定により、両菌株がプロテアーゼおよびポリガラクトナーゼを、TCR112 株がシデロフォアを生産することが確認された。さらに、両菌株を接種したトマトにおける防御関連遺伝子の発現変動を定量 PCR 法で解析した結果、病原菌接種後の遺伝子発現量が対照区よりも顕著に増加していた。発現する遺伝子のパターンは菌株により異なり、TWR114 株ではアブシジン酸およびエチレン応答性の遺伝子、TCR112 株ではエチレン応答性の遺伝子が誘導された。一方、両菌株の混合処理では、それらの遺伝子に加えてサリチル酸応答性遺伝子の発現量も増加していた。トマトの根圏および茎内での青枯病菌の増殖量を経日的に調査したところ、TWR114 株または TCR112 株の単独処理区では、接種後 1~2 週間はいずれの部位においても青枯病菌の増殖が有意に抑制されていた。それに対して両菌株の混合処理区では、単独処理区よりもさらに青枯病菌の増殖が抑制され、接種 28 日後には茎内の青枯病菌数が検出限界以下にまで減少していた。これらの結果から、TWR114 株と TCR112 株の防除機構には、抗菌作用や養分競合などによる根圏での病原菌増殖抑制および抵抗性誘導が複合的に関与していると考えられた。さらに、両菌株を混合処理した場合、複数の抵抗性経路が単独処理時よりも強力に活性化されるとともに、根圏での病原菌増殖抑制効果が高まるため、防除効果の持続性が向上するものと推測された。

本研究では、根圏細菌 *Mitsuaria* sp. TWR114 株および *Ralstonia* sp. TCR112 株を用いたトマト青枯病の効果的な生物防除法を確立するとともに、両菌株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 Malek Khaled Mahmoud Marian 氏の研究は、難防除のトマト青枯病に対する生物的防除法の確立を目指したものである。同氏は、トマト、ニラおよびネギの根圏より分離した 400 株を超える細菌の中から、圃場条件下でも安定した青枯病防除効果を発揮する *Mitsuaria* sp. TWR114 株および *Ralstonia* sp. TCR112 株を見出すことに成功した。さらに、これらの菌株を 2 : 1 の比率で混用することで防除効果が飛躍的に高まり、1 回の土壌灌注処理で 1 ヶ月以上にわたり青枯病を抑制できることを突き止めた。また、トマトにおける防御関連遺伝子群の発現解析や上記 2 菌株のゲノムシーケンス解析、その他の各種培養解析など様々な手法を駆使し、青枯病防除機構の解明にも取り組み、TWR114 株および TCR112 株の抗菌作用や根圏での養分競合、トマト植物体への抵抗性誘導など複数の機構が複合的に関与することを明らかにした。

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生物防除法を確立した点は高く評価できる。

基礎となる学術論文

- 1) Marian, M., T. Nishioka, H. Koyama, H. Suga, and M. Shimizu: Biocontrol potential of *Ralstonia* sp. TCR112 and *Mitsuaria* sp. TWR114 against tomato bacterial wilt. *Applied Soil Ecology*, 128, 71-80, 2018.
- 2) Marian, M., H. Koyama, H. Suga, and M. Shimizu: Enhanced biocontrol effect using the combined application of *Mitsuaria* sp. TWR114 and non-pathogenic *Ralstonia* sp. TCR112 for controlling tomato bacterial wilt. *Journal of General Plant Pathology*, (印刷中)

既発表学術論文

- 1) Marian, M., Ogawa, K., Yoshikawa, Y., Takasaki, S., Usami, A., Shimizu, M., Miyazawa, M and Hyakumachi, M. : Agroecosystem development of industrial fermentation waste - suppressive effects of beer yeast cell wall extract on plant diseases. *Current Environmental Engineering* 1, 207-211, 2014.