

## 論文要旨

論文題目 *Ralstonia solanacearum* の表現型変異株を利用した青枯病の生物的防除

氏 名 中原 浩貴

青枯病は細菌 *Ralstonia solanacearum* によって引き起こされる土壌伝染性病害であり、経済的に重要なトマトやナスなど 200 種以上の作物を萎凋・枯死させるため、作物生産において甚大な被害をもたらす。本病害は温暖な気候で発生しやすく、地球温暖化の進行によりさらなる被害の拡大が危惧されている。青枯病の防除法として、抵抗性台木植物を利用した接木栽培と化学農薬や太陽熱を利用した土壌消毒が一般的に行われている。しかし、抵抗性植物を犯す病原菌の出現による台木の罹病化や、土壌深部の病原菌には土壌消毒の効果が届きにくいことから、青枯病の防除は困難である。また、土壌消毒では病原菌だけでなく他の有用微生物も死滅させるため、環境負荷が大きい。現在、環境負荷の低減や食の安全・安心の観点から環境保全型の新たな防除法の確立が求められている。

青枯病菌は培地、土壌、植物内で自発的に突然変異し、菌体外多糖類などの病原性因子の産生能を失った表現型変異株 (Phenotype conversion : 以下, PC 株) に変異する。トマト、ナス、ジャガイモ、タバコなどのナス科植物に PC 株を事前に接種することで、病原菌感染後の青枯病の発病が抑制されることが報告されている。PC 株による防除効果は、植物種、PC 株の系統、接種方法によって異なり、効果が不安定である。また、PC 株を利用した効果的な防除法の開発には、PC 株による病害防除機構の解明が不可欠である。そこで本論文では *R. solanacearum* の PC 株を利用した青枯病の生物的防除法の確立に向けて、PC 株による青枯病の防除機構と青枯病防

除に効果的な PC 株接種技術を明らかにすることを目的とした。第 2 章では液体培地中における PC 株と野生株の増殖特性と PC 株の培養ろ液による野生株の増殖抑制について、第 3 章ではトマト・ナス青枯病防除に有効な PC 株接種技術について、第 4 章では土壌・植物内における PC 株と野生株の定着特性と PC 株定着による野生株の定着抑制機構について、第 5 章では PC 株接種による植物への抵抗性誘導および植物の生育・果実品質に及ぼす影響について調査した。そして、第 6 章では、本研究の結果から PC 株による青枯病の防除機構と効果的な PC 株接種技術を考察し、PC 株を利用した防除技術の展望について総括した。

第 2 章では、液体培地中における野生株と PC 株との増殖競合を調査した。異なる組成の液体培地中で野生株と PC 株を同濃度 ( $10^2$ - $10^3$  cfu ml<sup>-1</sup>) で混合し、静置培養したところ、BG 液体培地中では両菌株とも  $10^6$  cfu ml<sup>-1</sup> 以上まで増殖したが、培養後期には野生株のみ菌濃度が  $10^2$  cfu ml<sup>-1</sup> まで低下する現象がみられた。しかし、その現象は BG 液体培地の 100 倍希釈液と超純水中では確認されなかった。また、PC 株の培養ろ液中では PC 株は増殖したが、野生株の増殖は特異的に抑制された。以上のことから、液体培地における野生株と PC 株との競合には、栄養をめぐる競合だけでなく、PC 株が生産する物質の関与が示唆された。さらに、系統・特性の異なる PC 株 27 菌株の培養ろ液を供試して、野生株に対する抗菌活性と増殖抑制効果を調査した。PC 株培養ろ液中の野生株の増殖抑制効果は、培養ろ液の種類によって異なり、抗菌活性のない培養ろ液でも野生株の増殖が抑制された。このことから、PC 株培養ろ液における野生株の増殖抑制には、PC 株が生産する抗菌物質以外にも、PC 株による培地内の成分変化が関与することが推察された。

第 3 章では、系統・特性の異なる PC 株と PC 株培養ろ液を用いて、トマト・ナスの青枯病防除効果を調査した。まず、野生株の増殖抑制効果が異なる PC 株培養ろ液を 6 種類供試して、土壌中の野生株の増殖抑制を調査したところ、いずれも野生株の増殖は抑制されなかった。一方で、PC 株培養ろ液をトマト 'Micro-tom' とナス '千両二号' の根部に浸漬接種し、青枯病の防除効果を調査したところ、PC 株培養ろ液接種により青枯病の発病が抑制される場合があった。つぎに、系統・特性の異なる PC 株 27 菌株の菌液を、トマト 'Micro-tom' の根部に浸漬接種し、青枯病防除効果を調査した。さらに、トマト青枯病の防除効果が異なる PC 株 10 菌株を供試して、罹病性ナス 5 品種 ('Black Beauty', '筑陽', '千両二号', '佐土原', および '久留米長') の青枯病防除効果を調査したところ、8224PC または 8103PC の接種はトマトと複数のナス品種に共通して高い防除効果を示し、青枯病防除に効果的な PC 株が選抜された。また、青枯病の防除効果は、抗菌活性を持たない PC 株や PC 株培養ろ液の接種においても確認されたことから、PC 株の抗菌活性は、青枯病防除機構の主要因ではないことが示唆された。

第 4 章では、土壌中と植物内での野生株と PC 株の増殖特性を調査し、植物内における野生株と PC 株の定着と青枯病の防除効果との関係を調査した。土壌中では両菌株とも同様に増殖した

が、植物内では PC 株より野生株の方が高密度に増殖した。PC 株の接種濃度と接種日数が異なるナス‘千両二号’を用いて、植物内の PC 株定着量と青枯病防除効果との関係を調査したところ、高濃度の PC 株接種区では、PC 株接種から野生株感染までの期間が比較的短い場合でのみ組織内に PC 株が高密度で定着し、青枯病の発病が抑制された。さらに、青枯病防除効果と根、茎および葉における両菌株の定着量の関係を比較した結果、PC 株による防除効果が発揮された高濃度の PC 株接種では、根における野生株の定着量が顕著に低下したことから、発病抑制には根における野生株の定着抑制が重要であると示唆された。根における野生株と PC 株の定着・挙動を調査するため、蛍光タンパク質 (*gfp* または *DsRed2*) 遺伝子で標識した青枯病菌の *gfp* 遺伝子組換え株 (Wild-type 株) と *DsRed2* 遺伝子組換え株 (PC-type 株) を作出し、蛍光顕微鏡を用いてトマト‘Micro-Tom’の根における青枯病菌の定着を調査した。PC-type 株を接種したトマトでは、対照区と比べて根内における Wild-type 株の定着が抑制された。また、PC-type 株が高密度で定着した根内では、皮層および皮層細胞間隙における Wild-type 株の定着は抑制され、導管内での定着もみられなかった。以上のことから、PC 株による青枯病の防除機構には、根における PC 株の高密度な定着による野生株の根組織内への侵入抑制が関与すると示唆された。

第 5 章では、PC 株による植物への抵抗性誘導を明らかにするため、PC 株を接種したトマト‘Micro-Tom’の根における 6 種の感染特異的 (PR) タンパク質遺伝子の発現を半定量解析した。PC 株を接種したトマトでは、無接種の植物には発現がみられなかった *PR-2b* ( $\beta$ -1, 3 グルカナラーゼ), *PR-3b* (キチナーゼ) *PR-5b* (ソーマチン様タンパク質), *PR-6* (プロテインアーゼインヒビター II) の塩基性 PR 遺伝子の発現が誘導された。このことから、PC 株による青枯病防除には植物への抵抗性誘導が関与することが示唆された。また、PC 株を接種したトマトの生育、果実収量および果実品質を調査した結果、無接種の植物と比べて有意な差はなく、PC 株接種による植物生育への影響はないことが明らかになった。

第 6 章では、PC 株による青枯病の防除機構と効果的な PC 株接種技術を考察し、PC 株を利用した防除技術の展望について総括した。これまでに、PC 株による青枯病防除機構には、PC 株と野生株間の栄養をめぐる競合、PC 株による抗菌作用、植物組織内への PC 株定着による野生株の物理的な定着阻害、植物への抵抗性誘導が考えられている。本研究の結果から、①貧栄養液体培地中では野生株と PC 株の増殖に違いはみられず、菌株間で栄養の競合が生じる可能性は低いこと、②野生株に対して抗菌作用を示さない PC 株接種でも青枯病の発病が抑制されること、③PC 株が高密度で定着した植物根では、野生株の侵入が抑制されること、④PC 株接種により植物根に PR タンパク質遺伝子の発現誘導が起こることから、PC 株による青枯病防除機構は、PC 株定着による野生株の物理的な定着阻害と植物への抵抗性誘導が主要な要因であると示唆された。また、これまでに青枯病の防除効果は PC 株の接種条件によって異なることが報告されており、本研究では、植物種・品種、PC 株の種類、PC 株の接種濃度および接種方法によって防除効

果が異なった。本研究において、青枯病防除には高濃度の PC 株菌液を植物根に浸漬接種する方法が有効であり、系統・特性の異なる PC 株の中から、複数の植物種・品種の青枯病防除に効果的な PC 株が選抜された。

本論文では、青枯病菌の野生株と PC 株の増殖特性は、液体培地、土壌、および植物内で異なること、PC 株による青枯病の発病抑制は、植物根内に PC 株が高密度で定着し、野生株の侵入・定着が抑制されることで発揮されること、PC 株を接種した植物根部では、感染特異的タンパク質遺伝子の発現誘導が起こることを明らかにした。本研究より、これまで考えられてきた PC 株による青枯病防除機構の中でも、植物根内への PC 株定着による野生株との定着阻害と、植物への抵抗性誘導が主に関与することが示唆された。さらに、本研究では青枯病防除に効果的な PC 株の接種方法を明らかにし、複数の植物種・品種に共通して高い防除効果を発揮する有用な PC 株が得られた。本研究成果は、PC 株による青枯病防除機構の解明および PC 株を利用した実用的な生物的防除技術の確立に寄与すると考えられる。