

	セイ カクレイ
氏 名	齊 佳鶴玲
本籍（国籍）	中国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第連研 683 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学位論文題目	Potential of biological control for tomato complex disease by root-knot nematode and <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> using entomopathogenic <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bacillus thuringiensis</i> を用いたサツマイモネコブセンチュウとトマト萎凋病による複合病の生物防除)
学位審査委員	主査 帯広畜産大学教授 小池 正徳 副査 相内 大吾(帯広 助教),長谷 修(山形 准教授),安 嬰(岩手 講師)

論文の内容の要旨

トマトの栽培において、トマト萎凋病（植物病害）とネコブセンチュウ（植物寄生性線虫）による複合病は世界的に非常に問題になっており、大きな経済損失をもたらしている。現在、この複合病に対する防除方法は土壌消毒を中心とした化学的防除法や抵抗性品種を用いた方法等が実施されている。しかし、抵抗性を侵す新レースの発生や化学薬剤に依存しない環境保全型農業が求められており、代替防除技術の提案が必要とされている。そこで、本研究では *Bacillus thuringiensis* (以下 BT) を微生物防除資材をとして利用し、複合病の原因となるトマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* 以下 FOL) とサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita* 以下 RKN) をターゲットとし実験を計画した。

BT は自然環境から分離されており、人体や環境に安全かつ効果的な微生物殺虫剤で、世界で一番利用されている。最近、BT が害虫だけでなく線虫や土壌病害の被害を抑制する報告もなされている。このため、本研究では、BT のこれらの特性を生かし、植物の病害と植物寄生性線虫を同時に抑制する生物防除資材としての可能性を探ることを目的とし、以下の実験を計画した。すなわち、実験 1 では BT によるトマト萎凋病菌の拮抗作用、ポット試験による発病抑制効果と植物成長促進効果 (PGPR) について検討した。次に、実験 2 では実験 1 による萎凋病抑制効果のメカニズムの一端を解明するため、BT の植物根面へのバイオフィーム形成能力を調査した。さらに、実験 3 では BT のネコブセンチュウに対する殺線

虫効果について検討した。最後に実験4では以上3つの実験結果を踏まえ、BTをもちいて、トマト萎凋病とサツマイモネコブセンチュウの複合病に対する防除効果をポット試験によりその防除効果の可能性を探った。

実験1. BTによるトマト萎凋病菌の拮抗作用、ポット試験による発病抑制効果と植物成長促進効果(PGPR): FOLに対するBTの対峙培養では、*B. thuringiensis japonensis* (BT17)と*B. thuringiensis kurstaki* (BT18)の2系統がFOLに対して強い拮抗作用を示した。また、BTを育苗ポットに混和し生育させたトマト苗をFOL汚染土に移植し、4週間後にトマト萎凋病の外部病徴を調査したところ、BT処理区すべてに発病抑制効果が認められ、特にBT17と*B. thuringiensis* CR371-H (BT20)処理区の効果が顕著であった。これらの結果から、BTにはいくつかの系統でトマト萎凋病原菌に対する拮抗作用が認められ、ポット試験においてもBTを根部に処理することにより萎凋病の発病を抑制することが明らかになったが、BT20はFOLに対する拮抗性が認められなかったのでその効果は誘導抵抗性によるもの推察された。また、トマトの種子や苗に対するBTのPGPR (Plant Growth Promote Rhizobacteria)としての効果を栄養細胞および培養ろ液を用いてロールタオル法により検討したところ、すべての系統において発芽促進(対照区に比べ35.7~107.1%)、および幼苗伸長効果(87.7~381.1%)が認められ、これらの効果も発病を抑制する役割の一部を担っていると考えられた

実験2. BTによるバイオフィーム形成能: BT6系統*B. thuringiensis sotto* (BT15), *B. thuringiensis israelensis* (BT16), *B. thuringiensis japonensis* (BT17), *B. thuringiensis kurstaki* (BT18), *B. thuringiensis roskildensis* (BT19), *B. thuringiensis* CR371-H (BT20)と比較のためエスマルクDF (*Bacillus thuringiensis*), ジャックポット顆粒水和剤 (*Bacillus thuringiensis*), ボトキラー水和剤 (*B. subtilis*), モミホープ水和剤 (*B. simplex*)を供試した。それぞれの培養液をマイクロプレートに分注し静置培養の後、CV染色によりバイオフィーム形成量の定量化を行った(Sandrine et al., 2005)。また、土壌および液体培地中において、トマト苗と供試菌株を共存培養し根面のバイオフィーム形成を光学顕微鏡観察で評価した。その結果、静置培養の1日目から2日目にかけて、全ての菌株でマイクロプレート中のCV染色量の増加が認められた。染色量の増加はマイクロプレート内のバイオフィーム形成量の増加と考えられた。それ以降は菌株によりバイオフィーム形成量の違いが認められた。次に土壌および液体培地条件下での共存培養し、トマト根面にはBTのコロニー塊が付着しているのが確認された。以上の結果より、トマト根面に対しBTによりバイオフィームが形成され、そのことがトマト萎凋病を抑制する可能性が示唆された。

実験3. BTのサツマイモネコブセンチュウに対する毒性: サツマイモネコブセンチュウに対するBTの毒性を調査するため、0.1ml 2期線虫懸濁液(50J2/well)と0.9ml BTの培養ろ液、菌体(栄養胞子)を24wellマイクロプレート内で共存培養した。24時間後、BTの培養ろ液、菌体処理区とも線虫の2期幼虫の致死率は高く、BTに殺線虫効果があることを確認した。さらに、BTと48時間共存培養したネコブセンチュウの卵のうを滅菌水に移し、

7日後孵化した2期幼虫をカウントした。また、この卵のうを押しつぶし、中の正常卵と異常卵を数えただうえで、BTの栄養細胞、栄養細胞の代謝産物が線虫の孵化率を抑制し、異常卵の形成率を増加させるが明らかになった。

実験4. BTによるトマト萎凋病とサツマイモネコブセンチュウの複合病抑制効果：以上の1～3の結果を踏まえ、BT17、BT18とBT20を選択し実験に供した。表面殺菌したトマト種子を催芽させた後に滅菌土に播種し、25℃温室条件で4週間生育させた。このトマト苗にBT3菌株の懸濁液(3×10^8 cfu/ml)を10mlずつ根圏に接種した。1週間後、5mlサツマイモネコブセンチュウ2期幼虫懸濁液(500 J2s/pot)を植物の根圏に接種した。さらに1週間後、BTとサツマイモネコブセンチュウを接種したトマト苗を萎凋病原菌汚染土に移植し、4週間後に外部病徴を含めた府複合病の被害調査(地上部生重、内部病徴、ネコブ指数)を実施した。実験には11処理区を設置した。すなわち、3系統(BT17、BT18、BT20) BT+萎凋病処理区；3系統(BT17、BT18、BT20) BT+ネコブセンチュウ処理区；3系統(BT17、BT18、BT20) BT+複合病実験区；萎凋病対照区；ネコブセンチュウ対照区；複合病対照区と無接種対照区を設けた。発病調査の結果、BT処理区はすべて複合病の病徴を抑えた。

以上の結果から、BT17～20の3系統は難防除病害であるトマトの萎凋病とサツマイモネコブセンチュウの複合病の発病を抑制できる微生物防除資材として有望であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本論文では、トマト萎凋病(植物病害)とネコブセンチュウ(植物寄生性線虫)による複合病は世界的に非常に問題になっており、大きな経済損失をもたらしている。そこで、本研究では *Bacillus thuringiensis* (以下BT)を微生物防除資材として利用し、複合病の原因となるトマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* 以下FOL)とサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita* 以下RKN)をターゲットとし、その複合病の防除をBTを用いて抑制することを試みた。

まず第1章において、トマト萎凋病菌に対する拮抗性と発病抑制試験を実施した。その結果FOLに対するBTの *in vitro*における対峙培養では、*B. thuringiensis japonensis* (BT17)と *B. thuringiensis kurstaki* (BT18)の2系統がFOLに対して強い拮抗作用を示した。発病抑制試験ではBT処理区すべてに発病抑制効果が認められ、特にBT17と *B. thuringiensis* CR371-H (BT20)処理区の効果が顕著であった。しかし、BT20はFOLに対する拮抗性が認められなかったためその効果は誘導抵抗性によるもの推察された。また、これらのBTの系統はトマトの種子や苗に対するBTのPGPR (Plant Growth Promote Rhizobacteria)としての効果も確認された。

第2章では、マイクロプレートとトマトの根との共存培養によりBT各系統におけるバイオフィーム形成能を調査した結果、BT各系統ともマイクロプレート内とトマト根面において、バイオフィームが形成され、そのことがトマト萎凋病を抑制する一つの役割を担っていることが示唆された。

第3章では、RKNに対するBTの毒性を調査するため、0.1ml 2期線虫懸濁液(50J2/well)と0.9ml BTの培養ろ液、菌体(栄養胞子)を24wellマイクロプレート内で共存培養し、その毒性効果を調査した。その結果、24時間後、BTの培養ろ液、菌体処理区とも線虫の2期幼虫の致死率は高く、BTに殺線虫効果があることを確認した。さらに処理後のRKNの卵のうを押しつぶし、中の正常卵と異常卵を数えたところいずれの処理区も異常卵の形成率を増加させることが明らかになった。

第4章においては、以上の1~3の結果を踏まえ、BT17、BT18とBT20を選択し複合病の発病抑制効果のポット試験に供試した。その結果、4週間後に外部病徴含めた複合病の被害調査(外部病徴、地上部生重、内部病徴、ネコブ指数)とも対照区にくらべ発病抑制効果が認められた。

以上の結果から、BTは、その栄養細胞の代謝産物の中にFOLに対する抗菌性物質、植物に抵抗性を誘導する因子、RKNに対する毒性因子また、そのPGPR効果やバイオフィーム形成能など複合的な作用により複合病を抑えていると推察し、これらのことは世界中で問題になっている土壌病原菌を植物寄生性センチュウの複合病の防除方法の今後の方向性を示した非常に価値のある。よって、本審査委員会は、同人を大学院連語農学研究科博士課程修了者としての学力と識見を有するものと認め、博士(農学)の学位を与えるのに十分な資格を有するものと判定した。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. **Jiaheling Qi**, Daigo Aiuchi, Masayuki Tani, Shin-ichiro Asano, Masanori Koike (2016) Potential of Entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Biological Control Agents for Tomato Fusarium Wilt ***International Journal of Environmental & Agriculture Research* 2(6):55-63**
2. **Jiaheling Qi**, Naoki Takahashi, Daigo Aiuchi, Masayuki Tani, Shin-ichiro Asano, Masanori Koike (2016) A Potential of Biofilm Formation by Entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* on Tomato Root Surface ***International Journal of Tropical Agriculture* 34(2):369-375**

参考論文

1. 小池正徳, **齊佳鶴玲**, 相内大吾, 石井嶺広, 浅野眞一郎 (2016)

Insect pathogen によるデュアルコントロール. *昆虫と自然* 51(7):45-48

2. 小池正徳, 高橋尚樹, 笹原勇太, 齊佳鶴玲, 石井嶺広, 相内大吾, 浅野眞一郎 (2016)
昆虫病原性 *Bacillus thuringiensis* の生態学(1) ファイトバイオームにおける *Bacillus thuringiensis*. *昆虫と自然* 51(13):39-41