

三重大学大学院生物資源学研究科の
博士学位と修士学位の提出論文,
2004 年 3 月 - 2004 年 12 月

**Titles of Doctor and Master Theses from the
Faculty of Bioresources of Mie University,
March 2004 to December 2004**

博士 (学術) 学位論文 20 名

課程修了博士学位

生物資源開発科学専攻

氏名	清水 将文
学位記番号	生博 甲第 145 号
学位記授与の日付け	平成 16 年 3 月 25 日
学位論文題目	内生放線菌を用いた病害耐性組織培養菌の作出に関する研究
論文審査委員	主査 教授・久能 均 教授・森田 脩 教授・神山 康夫 助教授・伊藤進一郎 富山県立大学工学部 教授・古米 保

要 旨

本研究では、植物内生放線菌を利用して耐病性のシャクナゲ組織培養苗を作出し、馴化過程における疾病被害を軽減することを目的とした。

1. シャクナゲ内生放線菌の分離・選抜および候補株の同定

圃場生育の健全シャクナゲの根・茎・葉を次亜塩素酸ナトリウムとエタノールで表面殺菌した後、IMA-2 寒天培地上で約 1 ヶ月培養した。試料表面に出現してきた内生放線菌を分離し、17 菌株を得た。ペスタロチア病菌と根腐病菌に対する拮抗性および組織培養培地上での生育性から、R-5 株を候補株として選抜した。R-5 株の形態および培養性状、生理生化学的性状、16S rDNA の塩基配列を解析し、*Streptomyces galbus* Frommer であると同定した。R-5 株の培養液から抗生物質をアセトン抽出

し、抗菌活性スペクトラムを検定した結果、グラム陽性菌および酵母、各種の病原糸状菌に抗菌活性を示すことが明らかとなった。HPLC および LC/MS, NMR 分析から、アセトン抽出物にはアクチノマイシン X₂ およびフンギクロミンが検出された。このことから、R-5 株の抗菌活性は、これら抗生物質に依存すると考えられた。

2. R-5 株処理による耐病性シャクナゲ組織培養苗の作出

シャクナゲ組織培養苗が生育中のフラスコ内の増殖培養培地表面に R-5 株菌液を処理して培養したが、苗の生育には何ら影響は認められなかった。

R-5 株処理 10 日目の苗の葉にペスタロチア病菌を接種し、14 日間培養したところ、無処理区では 54% の苗が枯死したのに対して、R-5 株処理区の苗は枯死しなかった。つぎに、根腐病菌を混和した培養土へ R-5 株処理

苗を移植して1ヶ月間育成した結果、R-5株処理区の根腐病罹病率は無処理区よりも約72%減少した。以上の結果から、フラスコ内でR-5株処理したシャクナゲ組織培養苗はペスタロチア病および根腐病に耐病性化することが明らかとなった。

そこで、R-5株処理苗の耐病性効果が実際の馴化過程でも有効か否かを検討した。実用面を考慮して、①フラスコ処理区（上述と同様にして組織培養フラスコ内へR-5株菌液を処理し、セルトレーへ移植）、②浸漬処理区（セルトレーへ移植前にR-5株菌液に苗を3時間浸漬）、③土壌処理区（R-5株菌液を混和したセルトレー培養土へ無処理苗を移植）の3処理区を設け、馴化用ビニルトンネル内で無農薬栽培した。移植2ヵ月後の自然枯死苗率は、無処理区で約53%であったが、①～③ではそれぞれ約7, 11, 4%であった。このことから、実際の馴化過程においてもR-5株処理の病害抑制効果が有効であることが実証された。しかし、最も有効な処理方法を決定するには、さらに詳細な検討が必要である。

3. R-5株処理苗の耐病性機構

R-5株処理した増殖用培地およびシャクナゲ組織培養苗から抽出した抗生物質をHPLC分析した結果、培地と苗には、PDA培地上でのペスタロチア病菌と根腐病菌の菌糸生長を抑制するに十分な量のアクチノマイシンが蓄積していた。そこで、市販のアクチノマイシンD（アクチノマイシン₂の類縁体）とアンホテリシンB（フングクロミンの類縁体）でシャクナゲ組織培養苗を処理し、ペスタロチア病と根腐病に対する耐病性試験を行っ

たが、R-5株処理ほどの耐病性効果は得られなかった。

R-5株処理シャクナゲ苗を電子顕微鏡観察した結果、R-5株は葉表面のクチクラ層およびワックス層中で菌糸伸長し、気孔から葉内部へ侵入して細胞間隙で生育していた。R-5株菌糸が接着している葉肉細胞にはwall appositionが形成されていたことから、シャクナゲ細胞はR-5株菌糸の存在を認識していると考えられた。

R-5株菌液を混和した培養土で育成したシロイヌナズナに炭疽病菌を接種したところ、無処理シロイヌナズナよりも病斑進展が抑制された。R-5株処理シロイヌナズナの防御応答遺伝子の発現をノーザン解析した結果、ジャスモン酸・エチレン情報伝達経路の下流に存在する*PDF1.2*の発現量が顕著に増加していた。この結果は、R-5株処理シロイヌナズナでは、ジャスモン酸・エチレン情報伝達経路を介した病害抵抗性が誘導されていることを示唆している。

これらの結果から、R-5株処理シャクナゲ苗の耐病性化には、①R-5株処理シャクナゲ苗への抗生物質の蓄積と②R-5株菌糸を認識することで誘導されたジャスモン酸・エチレン経路を介した病害抵抗性が複合的に関与していると推定された。

4. 以上述べたように、馴化過程でシャクナゲ組織培養苗に発生する病害を内生放線菌R-5株処理で抑制できることが明らかとなった。したがって、本研究の当初の目的は十分に達成できた。今後は、本法を実用化するために、R-5株処理法や耐病性機構の詳細な解析が必要であると考えられる。