

氏 名	NIARSI MERRY HEMELDA		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	農 学		
学位授与番号	博甲第	7 1 5 4	号
学位授与の日付	2 0 2 4 年 9 月 2 5 日		
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Crop protection activity and colonization behavior of <i>Allorhizobium vitis</i> VAR03-1, a biocontrol bacterium for grapevine crown gall disease (ブドウ根頭がんしゅ病の拮抗細菌 <i>Allorhizobium vitis</i> VAR03-1 の植物保護作用と宿主定着性の解析)		
論文審査委員	教授 平井儀彦	教授 能年義輝	教授 一瀬勇規 教授 豊田和弘
学位論文内容の要旨			
Grapevine crown gall disease, caused by the tumorigenic (Ti) strain of <i>Allorhizobium vitis</i>, is a major agricultural challenge. The nonpathogenic strain of <i>A. vitis</i> VAR03-1 acts as a biocontrol agent against this disease. VAR03-1 produces a tailocin named rhizoviticin, which has been shown to be responsible for its antagonistic activity against Ti in vitro. In this study, the contribution of rhizoviticin to the antitumorigenic activity of VAR03-1 in planta was evaluated using tomato and its original host, grapevine. The rhizoviticin-deficient mutants largely lost their tumor-suppressive activity, indicating that rhizoviticin plays a critical role the biocontrol activity of VAR03-1 in planta. Interestingly, the mutants still retained some antagonistic activity in both plant species, despite losing almost all of their growth suppression activity against Ti in vitro. Since VAR03-1 and Ti belong to the same bacterial genus and species, competition for nutrients and host colonization space could contribute to the residual biocontrol activity of VAR03-1 in planta. To understand the colonization behavior of VAR03-1 in the plant rhizosphere, <i>Arabidopsis thaliana</i> was used. In the MS (Murashige and Skoog) agar medium, VAR03-1 showed visible colonization even at a distance from the roots, predominantly in the upper part of the primary root, while another biocontrol agent, <i>Pseudomonas protegens</i> Cab57, colonized only the root surface without forming colonies. When sucrose was added to the medium, the density of VAR03-1 in the rhizosphere increased, with a pattern similar to that observed in the absence of sucrose. In contrast, Cab57 formed colonies only near the root. For both bacterial strains, sucrose supplementation caused growth inhibition of <i>Arabidopsis</i> seedlings in a concentration-dependent manner. This adverse effect appeared to be related to the bacterial overgrowth and may not be associated with the plant immune response. This inhibitory activity was reduced in the VAR03-1 <i>ΔrecA</i> mutant. Since the <i>ΔrecA</i> mutant showed an increased rate of biofilm formation, some activities associated with the free-living rather than the sessile lifestyle may be detrimental to host growth. VAR03-1 was able to grow in MS liquid medium supplemented with sucrose alone, whereas Cab57 required both sucrose and organic acids for growth. Supplementation of sugars and organic acids allowed both bacterial strains to grow near and away from <i>Arabidopsis</i> roots in MS agar. Taken together, our results suggest that the nutrient requirements for bacterial growth may be a determinant of their growth habitat in the rhizosphere. In other words, nutrients released in root exudates, may serve as limiting factors in harnessing microbiota. In conclusion, this study has characterized two modes of action for VAR03-1 as a biocontrol agent. This finding provides evidence that non-pathogenic microorganisms of the same genus and species as the pathogens often exhibit antagonistic activity in the field, and paves the way for future research to optimize the practical use of biocontrol in crop production.			

論文審査結果の要旨

本研究は、ブドウ根頭がんしゅ病の防除活性を有する拮抗細菌*Allorhizobium vitis* VAR03-1株の作用機序解明を目的として実施された。VAR03-1は本病の原因となる病原性*A. vitis*株と同属同種の非病原性系統であり、圃場レベルで強力な防除活性を示す。VAR03-1のin vitroでの病原菌株に対する拮抗活性は、rhizoviticinと名付けられたファージ尾部様バクテリオシンで規定されるが、本研究ではそのがんしゅ抑制活性への関与が調査された。トマトおよびブドウの茎への共接種実験が行われ、rhizoviticinを欠損したVAR03-1のがんしゅ抑制活性が大幅に低下することが示された。rhizoviticinは α プロテオバクテリア綱に見出された初のテイロシンであり、植物病に対する拮抗細菌の活性物質としても初めての例となった。

Rhizoviticinを欠損したVAR03-1にはがんしゅ抑制活性が残存しており、それは細菌同士の生息域や養分の競合が原因と予想された。VAR03-1、*A. vitis*の病原性菌株と非病原性・非拮抗性菌株、別の生物防除資材である*Pseudomonas protegens* Cab57について、Murashige-Skoog (MS) 寒天培地で生育させたシロイヌナズナ根圏での定着特性が比較解析された。*A. vitis*菌株は根周辺でコロニーを形成して主根伸長を促進したが、Cab57はコロニーが観察されず主根伸長を阻害した。次にMS液体培地で4細菌株の栄養要求性が調べられ、*A. vitis*はショ糖のみで増殖し、有機酸混合物のさらなる添加で促進された。一方、Cab57はショ糖のみではほとんど増殖せず、ショ糖と有機酸の添加で増殖した。各菌株のシロイヌナズナ根圏でのコロニー形成パターンは液体培地での増殖のショ糖依存性と一致しており、根圏では植物の根から放出された糖が濃度勾配を形成し、細菌増殖の糖要求性がその生息域を規定すると結論付けた。糖を混合した寒天培地では細菌は植物の生長を阻害したが、その理由が細菌の異常増殖によると仮定し、それを細菌の大量添加実験で証明した。また、細菌のバイオフィーム形成に関わる*recA*遺伝子に着目し、VAR03-1の*recA*欠損株はショ糖含有MS液体培地では野生株とほぼ同様の増殖を示すものの、ショ糖含有MS寒天培地では植物の生長を阻害しないことを見出した。*recA*欠損株はin vitro試験でバイオフィーム形成が向上することを示し、固着ではなく自由生活する細菌に由来する何らかの活動が植物の生長阻害に関わることを示唆した。

本研究は、植物根圏における土壌細菌の生息域がその栄養要求性で規定されることを明らかにした。これは病原菌と同属同種の微生物株がしばしば防除活性を示す事例の科学的裏付けといえる。植物は養分を根から放出し、根圏微生物はそれを利用して生息するが、本相互作用の成立には宿主の養分供給量の制御が重要であることも示し、植物病理学や生態学における一定の科学的価値が認められる。また、論文発表と質疑応答において、その内容の十分な理解度が確認された。以上をもって本論文は博士（農学）の学位の授与に値すると判断した。