

学 位 論 文 要 旨 <和文>

氏 名 富 濱 毅

題 目 チャ赤焼病の病原細菌の諸性質，生態ならびに防除法に関する研究
(Studies on Characteristics and Ecology of a Causal Agent of Bacterial Shoot Blight of Tea and Their Control)

赤焼病細菌の銅剤に対する感受性とその感受性に対するチャ葉成分の影響について調査した結果，銅耐性菌の存在は確認されなかった。赤焼病細菌の硫酸銅に対する感受性は，供試した培地の種類で大きく異なった。

赤焼病細菌は，培地の寒天濃度によって Swim 型と Swarm 型の運動性を示し，マイクロタイタープレート上のウェルの壁面にバイオフィルムを形成した。また，赤焼病細菌を茎内に接種すると，発病適温域で病原細菌は導管内を移動することが示唆された。

赤焼病細菌の菌体外多糖質 (EPS) 産生はバイオフィルム形成に大きく影響した。また，バイオフィルムの形成により赤焼病細菌は抗生物質のカスガマイシンに対して著しく感受性が低くなったが，バイオフィルムの形成程度と感受性との間に相関は見られなかった。赤焼病細菌のバイオフィルム形成は，チャ葉内に含まれる主要カテキンであるエピガロカテキンガレート (EGCg) によって著しく増加した。

赤焼病発生茶園からは，氷核活性能を有する *Xanthomonas campestris* (INAX) および *Pseudomonas syringae* が分離されたが，INAX の分離頻度は極めて高く，*Pseudomonas syringae* のそれは低かった。-4℃の低温処理を繰り返し行うと INAX は赤焼病細菌の病斑形成を助長した。一方，低温に遭遇しない場面において INAX は，赤焼病細菌のバイオフィルム形成や茎内移動，病原力を抑制した。

赤焼病細菌の EPS 産生は葉圏における細菌集合体の形成，無傷部位での乾燥耐性に関与し，鞭毛着生は葉圏における細菌集合体の形成，有傷部位での生存，組織内での増殖に関与した。Swarm 型の運動性と病原力との間には高い相関が見られた。EGCg はスクロース存在下で，赤焼病細菌の葉圏での乾燥耐性を高めた。

10～11月の最低気温が平年よりも低く推移した年度は，赤焼病の発生が早く，かつ多くなった。秋冬期にトンネル被覆により防霜を実施したところ，赤焼病の発生は著しく抑制された。栽培管理の中で，最も赤焼病の発生に影響があったのは，11月のマシン油乳剤の散布であった。

チャ赤焼病に対する銅剤の残効性は，カスガマイシン・銅水和剤の残効性が最も高かった。銅剤の散布量は 400 g/10a が適切で，散布時期としては初発生確認後の防除が重要であった。初発生時の防除とその後定期的に防除する体系により，発生を十分抑制できた。

赤焼病の被害許容水準は 4月上旬の発病葉率で 6.6%と推定された。また，無防除もしくはカスガマイシン・銅水和剤防除 1ヵ月後の赤焼病の発生推移を予測する式が確立された。赤焼病の被害許容水準から，予測式により推定された要防除水準および防除有効水準は，3月上旬でそれぞれ 1.6%および 2.6%であった。

学 位 論 文 要 旨 <英文>

氏 名 TOMIHAMA TSUYOSHI

題 目 Studies on Characteristics and Ecology of a Causal Agent of Bacterial Shoot Blight of Tea and Their Control
(チャ赤焼病の病原細菌の諸性質, 生態ならびに防除法に関する研究)

Bacterial shoot blight (BSB) of tea, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *theae* (*P.s.theae*), is one of the major disease in tea plant (*Camellia sinensis*).

P.s.theae showed swimming and swarming motility on semisolid agar plate, and formed a biofilm on an abiotic surface. When cells of *P.s.theae* were injected into the stem, both lesion formation of leaf adjacent to injection points and long distance movements of *P.s.theae* in xylem were observed under the temperature that was optimum for disease development.

Exopolysaccharide (EPS) production of *P.s.theae* was correlated with the formation of biofilm. The presence of a flagellum was correlated with swimming motility, biofilm formation on an abiotic surface. Biofilm-grown cells of *P.s.theae* showed severe resistance to kasugamycin but showed same resistance to copper sulfate than planktonic-grown cells. No correlation was observed between the degree of biofilm formation and biofilm resistance to bactericides. Epigallocatechin gallate (EGCg), which was a major tea catechin that had antimicrobial activities against varieties of bacteria, induced biofilm formation.

From BSB diseased tea fields, ice nucleation active *Xanthomonas campestris* (INAX) and *Pseudomonas syringae* were isolated. INAX was the most frequently isolated ice nucleation active bacteria from lesion of BSB disease. A high density of INAX promoted the lesion formation by *P.s.theae* in both cold chamber and field inoculation tests under low temperature; however, under non low temperature condition, INAX reduced biofilm formation, virulence and long survival in lesion of *P.s.theae*.

EPS production of *P.s.theae* was correlated with formation of a bacterial aggregate and survival on nonwounded leaf surface, but was not required for virulence. The presence of a flagellum was correlated with aggregate formation on the leaf surface, survival on a wounded leaf site and propagation within the leaf tissue. EGCg increased survival of *P.s.theae* under dry conditions on nonwounded leaf surfaces in the presence of sucrose.

When minimum temperature during October to November was lower than an average minimum temperature, the occurrence of BSB was earlier and severe. Frost protection of tea plants by cheesecloth covering during late autumn, which prevented leaves from frost damage, reduced the occurrence of BSB disease.

Application of machine oil in November remarkably enhanced the occurrence of BSB disease because application of machine oil encouraged the frost and cold damage of tea leaves in winter.

Copper bactericide with kasugamycin had the longest residual efficacy. Optimum application dose of copper bactericide for BSB was 400 liters per 10a. The application of copper bactericide at initial incidence of BSB was important for efficient control. A disease control system, which was based on the application of bactericide at initial incidence of BSB and regular application of bactericide after initial incident, could control an outbreak of BSB.

Economical injury level of BSB disease was estimated as 6.6 % diseased leaves at beginning of April. Control threshold and control effective levels were estimated as 1.6 % and 2.6% diseased leaves at the beginning of March respectively.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	富 瀨 毅
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 岩井 久
	副査 佐賀大学 教授 大島 一里
	副査 鹿児島大学 教授 津田 勝男
	副査 琉球大学 教授 諸見里 善一
	副査 佐賀大学 准教授 草場 基章
審査協力者	鹿児島大学 名誉教授 荒井 啓
題目	チャ赤焼病の病原細菌の諸性質，生態ならびに防除法に関する研究 (Studies on Characteristics and Ecology of a Causal Agent of Bacterial Shoot Blight of Tea and Their Control)
<p>チャ(<i>Camellia sinensis</i>)は，全国で栽培面積が約 50,000ha にも上る重要な特用作物であり，鹿児島県は静岡県に次ぐ主要産地となっている。チャは年に 3~4 回の摘採を行うことから新芽が繰り返し生育し，病害虫が発生しやすい条件下にある。よって，茶業生産・経営の安定を図るためには病害虫防除は欠くことができない。なかでも細菌病であるチャ赤焼病は，主要病害として全国のチャ産地で発生が認められている。赤焼病は晩秋から初春の低温期に発生するため，最も収益性の高い一番茶への被害が大きい。本研究は，チャ赤焼病の病原細菌 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>theae</i> の諸性質，発生生態に関しての新知見を得，病害発生に及ぼす気象や栽培管理の影響を解析し，より有効な防除対策を提案しようとしたものである。得られた知見は以下のとおりである。</p> <p>赤焼病細菌の銅剤に対する感受性とその感受性に対するチャ葉成分の影響について調査した結果，銅耐性菌の存在は確認されなかった。赤焼病細菌の硫酸銅に対する感受性は，供試した培地の種類で大きく異なった。</p> <p>赤焼病細菌は，培地の寒天濃度によって Swim 型と Swarm 型の運動性を示し，マイクロタイタープレートのウェルの壁面にバイオフィルムを形成した。また，赤焼病細菌を茎内に接種すると，発病適温域で病原細菌は導管内を移動することが示唆された。</p>	

赤焼病細菌の菌体外多糖質 (EPS) 産生はバイオフィーム形成に大きく影響した。また、バイオフィームの形成により赤焼病細菌は抗生物質のカスガマイシンに対して著しく感受性が低くなったが、バイオフィームの形成程度と感受性との間に相関は見られなかった。赤焼病細菌のバイオフィーム形成は、チャ葉内に含まれる主要カテキンであるエピガロカテキンガレート (EGCg) によって著しく増加した。

赤焼病発生茶園からは、氷核活性能を有する *Xanthomonas campestris* (ice nucleation-active *X. campestris*; INAX) および *Pseudomonas syringae* が分離されたが、INAX の分離頻度は極めて高く、*Pseudomonas syringae* のそれは低かった。-4℃ の低温処理を繰り返し行くと INAX は赤焼病細菌の病斑形成を助長した。一方、低温に遭遇しない場面において INAX は、赤焼病細菌のバイオフィーム形成や茎内移動、病原力を抑制した。

赤焼病細菌の EPS 産生は葉圏における細菌集合体の形成、無傷部位での乾燥耐性に関与し、鞭毛着生は葉圏における細菌集合体の形成、有傷部位での生存、組織内での増殖に関与した。Swarm 型の運動性と病原力との間には高い相関が見られた。EGCg はスクロース存在下で、赤焼病細菌の葉圏での乾燥耐性を高めた。

10~11 月の最低気温が平年よりも低く推移した年度は、赤焼病の発生が早く、かつ多くなった。秋冬期にトンネル被覆により防霜を実施したところ、赤焼病の発生は著しく抑制された。栽培管理の中で、最も赤焼病の発生に影響があったのは、11 月のマシン油乳剤の散布であった。

赤焼病に対する銅剤の残効性は、カスガマイシン・銅水和剤の残効性が最も高かった。銅剤の散布量は 400 g/10a が適切で、散布時期としては初発生確認後の防除が重要であった。初発生時の防除とその後定期的に防除する体系により、発生を十分抑制できた。

赤焼病の被害許容水準は4月上旬の発病葉率で6.6%と推定された。また、無防除もしくはカスガマイシン・銅水和剤防除1ヵ月後の赤焼病の発生推移を予測する式が確立された。赤焼病の被害許容水準から、予測式により推定された要防除水準および防除有効水準は、3月上旬でそれぞれ1.6%および2.6%であった。

以上のように、本研究は、チャ赤焼病の発生には、栽培管理法に加え、病原細菌の産生する菌体外多糖質に由来するバイオフィームや運動性、葉上に共生する氷核活性細菌に助長される霜寒害発生など、多種多様な要因が相互に関係することを体系的に明らかにし、適期の防霜と要防除水準と防除有効水準を活用した薬剤防除を含む『チャ赤焼病の総合防除体系』を確立した。すでに鹿児島県下のチャ栽培地帯では、本体系に基づいた防除法が普及に移されつつある。本研究は、細菌学的基礎研究が植物細菌病の防除体系に直結できた稀有の例であり、得られた成果は、本病の防除に留まらず、他の植物細菌病へも応用し得るものである。

よって、本論文は、博士（農学）の授与に十分な価値があると判断した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏 名	富 瀨 毅
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 岩 井 久
	副査 佐賀大学 教授 大 島 一 里
	副査 鹿児島大学 教授 津 田 勝 男
	副査 琉球大学 教授 諸 見 里 善 一
	副査 佐賀大学 准教授 草 場 基 章
審査協力者	鹿児島大学 名誉教授 荒 井 啓
実施年月日	平成 1 9 年 1 2 月 2 5 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input type="radio"/> 口答・ <input checked="" type="radio"/> 筆答	
<p>主査、副査及び審査協力者は、平成19年12月25日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>また、筆答により外国語（英語）の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

富 濱 毅

[質問 1]

本細菌の場合に集落変異株が高い頻度で現れる原因をどう考えるか？

[回答 1]

研究の当初は変異株の出現頻度はもっと低いものと想定していたので、意外であった。変異株は振とう培養ではまれにしか出現しないのに、静置培養では頻繁に出現する。その原因として、試験管に静置した液体培地では、大きく、上層（空気に接する）、中層（酸素が不足する）、および下層（且つ圧力がかかる）のように、異なった生息環境ができ、細菌がそれぞれに適応して変異するものと考えられる。また、出現のメカニズムとしては、本細菌に存在が確認されている様々なサイズのプラスミド（核外遺伝子）や未確認のトランスポゾンの関与が考えられ、今後それらの解析を行う必要がある。

[質問 2]

本細菌の培地上での増殖最適温度が中温域（25～28℃）にあるのに対し、発病最適温度が低温域（15℃前後）にある理由をどう考えるか？

[回答 2]

培地上と植物体内という環境の違いに起因するといえるが、低温域で植物の生理活性が低下した結果、抵抗性が打破されるとも考えられる。この際に打破されるのが、侵入抵抗性と拡大抵抗性のどちらなのかは推定できない。また低温期に根の活性が低下するのは明らかで、晩秋期の過剰な施肥は冬期の発病を助長すると考える。また過剰施肥で葉の窒素含量が高まると感受性が強まる。

[質問 3]

増殖適温と発病適温が異なる原因として、発病すなわち病徴の発現は、本細菌の病原性によるもので無く、抵抗性による宿主の反応と考えられないか？さらに、チャ赤焼病に特徴的な赤褐色病斑は過敏反応を想起させ、このような仮説を示唆しているようにも思える。

[回答 3]

確かに、赤褐色病斑は、宿主側の抵抗性反応の結果、形成される可能性も考えられる。また、植物病原糸状菌の *Alternaria* 属菌が生産する宿主特異的毒素では、毒素により誘起される宿主の細胞壊死は、本来ならば抵抗性反応であるはずの過敏細胞死が過度に生じた結果であることが指摘されている。この例からも、宿主の抵抗性反応の一環として赤褐色病斑の形成が生じる可能性がある。検討する価値があると思われ、今後の課題とさせていただきたい。なお、もし、抵抗性反応によって壊死（赤褐色病斑）が生じるのならば、これはアポトーシスによるものであり、壊死組織から抽出したDNAにラダー化（電気泳動で示される異なったサイズの多数のDNA断片）が生じているかどうかを指標にすれば、検討することができると考えられる。

[質問 4]

培地上でSwarm型運動性を示す場合、電子顕微鏡で細菌同士が塊を形成し周辺に多数の鞭毛が観察されるとあるが、この記述は、分類学上*Pseudomonas*の鞭毛の着生様式が極毛であることに矛盾しないか？

[回答 4]

表現上誤解を招いたようだが、周毛菌を意味していない。細菌の集合体（群体）の外側に多数の鞭毛が認められると解釈してほしい。ただしこの場合に、内側に位置する細菌が鞭毛を失っているのかどうかは確認できていない。

[質問 5]

Swarm型は、細菌が増殖しつつもお互いに分離することなく最初から塊を形成して行動するのか？ それとも、最初は遊離して各々鞭毛で遊泳していた細菌細胞が後に集合したものなのか？

[回答 5]

培地上での集落の移動速度が速く、粘菌に類似した群体行動をしている。よって、増殖の際には分離せず、あたかも多細胞のように協同し、組織的に情報を分配しつつ運動すると考えられる。鞭毛によらない運動であり、正にSwarm（ミツバチの群れ）と呼ぶ所以である。

[質問 6]

赤焼病細菌の定着にINAXが寄与している点と、両細菌を対峙培養した際に集落の形態が変化することから、両細菌が、共存するために、シグナル物質を出して相互に形態変化を促し合っているとは考えられないか？

[回答 6]

罹病性品種では、赤焼病細菌を単独接種した場合よりも、INAXと混合接種した方が、病斑サイズが明らかに大きい。よって、低温下では、拡大する病斑内で赤焼病細菌とINAXは協同しており、物質による情報交換により共生に適した形態変化が起こっていることも考えられる。一方、抵抗性品種に接種し、病斑が認められない場合にも、後に両細菌が分離されてくることが多く、その場合にも、相互にサプレッサーを補完しあうことで、宿主の抵抗反応に対抗していると想像される。

[質問 7]

赤焼病の要防除水準として1.6%という値が提示されているが、圃場での初期病徴の出現は偏在するのが常であり、割合を算出するのが困難である。実用上どのような適用法を考えるのか？

[回答 7]

ご指摘のように初期病徴はスポット状に出るのが常なので、圃場全体を単位方面に区分し、罹病葉を少しでも含む区画数率が1.6%に達した場合を要防除と考えることにより、実用に移すことが可能である。