氏 名 LE THI PHUONG

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6067号

学位授与の日付 2019年 9月25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

Study on the mode of action of saccharin as a plant activator of disease resistance

(植物抵抗性賦活剤サッカリンの作用機構に関する研究)

論文審查委員 教授 加藤鎌司 教授 豊田和弘 准教授 能年義輝 教授 一瀬勇規

## 学位論文内容の概要

#### CHAPTER I

In this chapter, I introduce the basic knowledge on plant immune system, types of induced resistance, and chemically induced resistance by plant activators. It also provides a brief overview of the historical trait of saccharin from a common artificial sugar to an active metabolite of probenazole (PBZ) and the known mode of saccharin action as a plant activator. Generally, plant activators are compounds that lead to the improved plant protection to pathogen attacks by inducing the plant's own defense mechanisms, thereby not resulting in drug resistance development of pathogens, side effects on non-target organisms, and polluted environment. In the current study, we attempt to elucidate the molecular mechanism and efficacy saccharin and PBZ acting as the plant activators of effective defenses against bacterial and fungal pathogens in both dicot and monocot plants.

### CHAPTER II

This chapter describes attempts to further elucidate the mechanism underlying saccharin- and PBZ-induced resistance using the pathosystem of dicot model plant *Arabidopsis thaliana* and different bacterial and fungal pathogens. We show that exogenous application of saccharin and PBZ to the wild-type Arabidopsis plant triggered resistance to the hemibiotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000), but not to a necrotrophic bacterium *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, and a hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum*, and in the case of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*, they enhanced susceptibility. Analysis of gene expression profile revealed that activation of SA-regulated genes (*PR1*, *PR2*) and the concomitant suppression of JA-regulated genes (*LOX2*, *VSP2*, *PDF1.2*) by saccharin and PBZ might be the contributing event which accounted for induced resistance to *Pto* DC3000 and increased susceptibility to *B. cinerea*. By using Arabidopsis mutants, we reconfirm and complement the current knowledge in that resistance induced by saccharin and PBZ against *Pto* DC3000 is mainly via activation of SA-signaling, possibly resulting in suppression of JA/ET-signaling and vice versa. Moreover, both saccharin and PBZ upregulated expression of other defense-related genes and accelerated the deposition of callose in Arabidopsis plants, suggesting the additive roles of multiple defense outcomes in resistance to *Pto* DC3000.

### CHAPTER III

The chapter presents our next efforts to gain more inside into the molecular mechanism of resistance induced by saccharin and PBZ in a monocot plant. Pretreatment of wheat seedlings with saccharin or PBZ results in a significant reduction in powdery mildew disease caused by a strictly biotrophic fungus *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, a causal agent of powdery mildew disease. Transcriptional analysis revealed expression profile of 15 defense-related genes in wheat seedlings exposed to either saccharin or PBZ. Indeed, saccharin and PBZ induced expression of multiple defense-related genes such as PR genes (*PR1.1, PR2, PR4, CHI3, CHI4*), genes associated with SA signaling and biosynthesis (*NPR1, PAL*), genes involved in JA biosynthesis (*LOX, AOS*), wheat chemically induced genes (*WCI2, WCI3*), and a transcription factor encoding gene (*WRKY72a/b*). The enhanced expression of those defense genes in wheat treated with saccharin or PBZ is closely correlated to the conferred resistance to *B. graminis*.

# CHAPTER IV

This final chapter of the thesis summarizes the results and discussions obtained from chapters II and III.

## 論文審査結果の要旨

毎年,世界全体の食糧生産額の約 14% が病害で失われている状況において,農作物の安定した生産と品質 の保持に化学農薬の使用は欠くことができない。したがって,新規薬剤の開発はもとより,既存の優良な薬剤 や誘導体の対象作物の拡大、あるいはそれを検証する研究は、今世紀、持続可能な食料生産には避けて通れな い課題である。Le Thi Phuong 氏は、植物抵抗性賦活作用をもつイネいもち病防除剤プロベナゾールが植物体 内で代謝されて生成するサッカリンに着目して、モデル植物シロイヌナズナを使ってその作用機構について詳 細に解析している。その結果、サッカリンの茎葉処理あるいは根圏への土壌処理によって、(半)活物寄生性 病原体に対する全身的な抵抗性が誘導されるが、殺生寄生性病原体には効果はないか、逆に罹病性を増加させ ることを明らかにした。続いて、(半)活物寄生性病原体および殺生寄生性病原体に有効な防御関連遺伝子の 挙動について調べ、サッカリンがサリチル酸によって調節される一群の防御関連遺伝子を活性化するが、ジャ スモン酸を介して調節される遺伝子群には抑制的に働くことを示した。以上から、サッカリンの主たる作用は サリチル酸を介した防御応答の促進作用にあり, (半)活物寄生性病原体による病害の防除に有効であると結 論している。一方で、サッカリンによる防除効果について、コムギうどんこ病を使って調べ、コムギへの茎葉 処理や土壌からの処理によって複数の防御関連遺伝子の急速に活性化され、うどんこ病の発病を抑制できるこ と示した。同氏が調べた限り、サッカリンには抗菌作用は認められない。サッカリンは人工甘味料として広く 使用され、その製造はプロベナゾールより安価である。さらに、環境や農作業者への負荷や耐性菌発生のリス クもほとんどないことなどから、今後、減農薬を実現する代替資材としての利用も期待される。以上のように 本論文では、サッカリンの植物病害の防除効果とその作用機作を明確にしたものであり、基礎的研究に留まら ず、実際の生産現場での利用の礎となる重要な知見を多数含んでおり、博士(農学)の授与に値するものと判 断される。