

セイヨウスモモの連作障害に関与する微生物の培養

長岡技術科学大学院・工 学生会員 ○加田真依、非会員 牧慎也、正会員 幡本将史、正会員 山口隆司
島根大学・農 非会員 松本敏一、非会員 城惣吉

1. はじめに

セイヨウスモモはミネラルや食物繊維が豊富に含まれることから健康食品として注目され、日本での栽培が増加している。しかし、セイヨウスモモが属するバラ科植物では連作障害が報告されており、栽培農家を悩ませている。連作障害とは、同一箇所での連作によって植物の生育が著しく低下、あるいは枯死する現象である。この原因の一つとして、青酸配糖体からの派生物による成長阻害が挙げられる。バラ科植物は樹皮に青酸配糖体であるアミグダリンを含んでおり、果実の仁に含まれるエムルシンという酵素や微生物によって加水分解を受け、マンデロニトリルになる。さらに分解されベンズアルデヒド、青酸に変化し、ベンズアルデヒドは安息香酸となる¹⁾。ここで発生する青酸や安息香酸が連作障害の原因だと考えられているが、各物質の分解に関与する微生物については未解明のままである。本研究では、セイヨウスモモの連作障害に関与する微生物を確認することを目的とし、培地に青酸配糖体を加えて青酸配糖体を餌にする微生物の培養を行った。その後、培養した微生物の特定を行った。

2. 実験方法

(1) 土壌

島根大学圃場内にあるセイヨウスモモ区画に存在する、健康な樹木(健康土壌)、枯死しそうな樹木(進行土壌)、枯死した樹木(枯死土壌)の3本を選定した。各樹木の根元から半径30cm程度の円周上に3点を決め、3点の地表面から深さ10cm、20cm、30cmの箇所まで土壌を採取した。採取した土壌は分析まで4°Cで保存した。

キーワード: 連作障害、土壌微生物、16SrRNA

連絡先: 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学大学院 環境社会基盤工学専攻
水圏土壌環境研究室 TEL:0258-47-1611

(2) 微生物群集構造解析

土壌からのDNAの抽出には、Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedical社)を使用した。この時、土壌からのDNAの回収を増やすため、300mMリン酸緩衝液にカゼインを溶解したCasein Solutionを添加した。抽出したDNAを鋳型として原核生物の16S rRNA遺伝子を標的としたUniv515F-Univ806Rのプライマーセットを用い、PCRを行った。得られたPCR産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社)で精製した。超並列16S rRNAシーケンシングには、Miseq reagent Kit v2 (illumina社)を用いた。Greengenes データベース ver. 13_8を用いて門レベルに分類した。

(3) 培養方法

連作障害の原因微生物の分離を目的として、進行土壌と枯死土壌を植種源として微生物培養を行った。0.8%のゲランガムを含むVL55培地に5種類の基質(①アミグダリン②マンデロニトリル③キシラン④アミグダリン+キシラン⑤マンデロニトリル+キシラン)を加え、pHは5.5に調整した。培養は25°Cの暗所で好氣的に行った。

(4) 分離株の微生物群集構造解析

①アミグダリンのみの基質、または②マンデロニトリルのみを基質として得られた分離株の16S rRNA遺伝子配列の解析は上述(2)と同様に行った。得られた塩基配列はBLASTプログラムによる相同性検索を行った。

3. 実験結果および考察

セイヨウスモモ区画の土壌の16S rRNA遺伝子に基づく門レベルの微生物群集構造解析の結果を図1

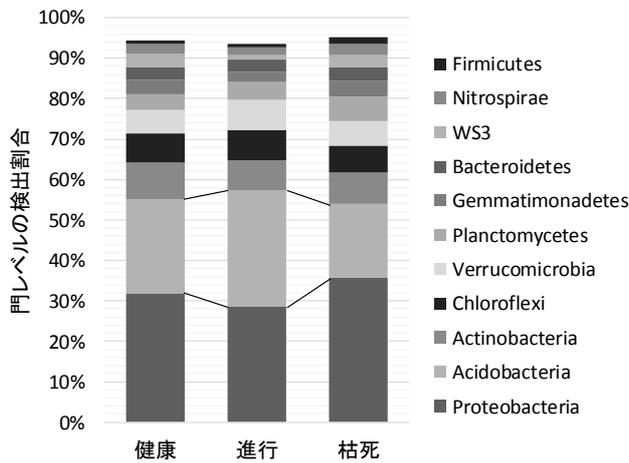


図1 門レベルの微生物群集構造解析結果

に示す。全ての樹木において *Proteobacteria* 門と *Acidobacteria* 門が半数以上の検出割合を占めた。健康土壌と枯死土壌では *Proteobacteria* 門が最も優占したのに対し、進行土壌では *Acidobacteria* 門が最も優占した。特に進行土壌では *Acidobacteria* 門に属する *Ellin6513* の検出割合が高かった。*Ellin6513* はオーストラリアの *Ellinbank* (酪農研究所) で培養された²⁾ が、機能については未解明である。よって連作障害に何らかの影響を与えている可能性が考えられるため、*Ellin6513* の培養を試みた。

進行土壌と枯死土壌を用いた培養では、全ての基質でコロニーの形成を確認した。①アミグダリンのみの基質、または②マンデロニトリルのみを基質として9株を分離することができた。得られた分離株の16S rRNA 遺伝子配列の解析結果を表1に示す。目的とした *Ellin6513* に相同性の高い分離株は分離できなかった。分離株 No.1 は *Flavobacterium* 属、No.2 は *Arthrobacter* 属、No.8 は *Cupriavidus* 属の細菌に高い

相同性を示した。*Flavobacterium* 属、*Arthrobacter* 属、*Cupriavidus* 属は全て芳香族化合物を分解する微生物種を含む属である。No.4/No.7/No.9 は同一の微生物であり、*Pseudomonas* 属に高い相同性を示した。また、No.6 は *Paenibacillus* 属に高い相同性を示したが、この *Paenibacillus* 属は元々 *Bacillus* 属に分類されていた。モモの木の土壌では *Bacillus* 属、*Pseudomonas* 属は青酸を生成すると報告されている³⁾。従って、青酸を生成する微生物が連作障害に関与している可能性がある。

4. まとめ

微生物群集構造解析の結果、進行土壌では *Acidobacteria* 門が最も優先した。特に *Acidobacteria* 門に属する *Ellin6513* は高い検出割合を占めた。

進行土壌と枯死土壌を用いた培養試験では、9株を分離した。分離株の中には、芳香族化合物を分解する微生物種を含む属が含まれていた。

今後は分離した分離株を用いて、連作障害の原因となる安息香酸や青酸を生産しているか確認を行う。また、今回分離できなかった *Ellin6513* の分離を引き続き試みる予定である。

参考文献

- 1) 谷田貝光克, 植物の香りと生物活性, フレグランスジャーナル社, pp.85, 2010.
- 2) Davis, K. E. et al., *Environmental microbiology*, 13.3, pp.798-805, 2011.
- 3) E.Benizri et al., *Soil Biology and Biochemistry*, 37.9, pp.1738-1746, 2005.

表1 分離株の BLAST 検索結果

分離株No.	基質	植種土壌	属名	相同性	Accession NO.
1	アミグダリン	枯死	<i>Flavobacterium</i>	99%	MG685758.1
2			<i>Arthrobacter</i>	100%	MG905906.1
3		進行	<i>Pimelobacter</i>	100%	LN830941.1
4			<i>Pseudomonas</i>	100%	MG897151
5			<i>Pseudarthrobacter</i>	100%	MG952592
6	マンデロニトリル	枯死	<i>Paenibacillus</i>	100%	KU983820
7			<i>Pseudomonas</i>	100%	MG897151
8		進行	<i>Cupriavidus</i>	100%	MG561851
9			<i>Pseudomonas</i>	100%	MG897151