

バイオマス導入による土壌菌叢の変化とそうか病抑制効果

長岡技大・院 学生会員 ○佐藤 剛 非会員 笹原僚希, 牧 慎也
正会員 渡利高大, 幡本将史, 山口隆司

1. はじめに

ジャガイモそうか病は病原性 *Streptomyces* 属放線菌が引き起こす難防除病害である。我々は鹿児島県内には被害が軽微である病害抑制圃場が存在することに着目し、抑制効果が土壌細菌叢に由来すると考えた。また、幾つかの病害抑制圃場の中でも、ある圃場(以下圃場 A とする)では被害がほぼ完全に抑制されている。当該圃場でのみ完熟バイオマスの施肥が行われていることから、バイオマスの利用によって病害抑制が達成されていると推測した。本研究では圃場 A における病害防除メカニズムの解明を目的に、圃場を対象とした土壌微生物群集構造解析および単離した微生物のそうか病原菌に対する拮抗性の調査を行った。加えて、単離した拮抗菌を用いて実圃場で病害抑制効果を試験し、その効果を検討した。

2. 実験方法

2.1 6 圃場を対象とした微生物群集構造解析

鹿児島県内の圃場(A-F)から土壌サンプルを採取した。圃場 A-D は病害抑制圃場であるのに対して、圃場 E, F では被害が多発している。土壌から FastDNA SPIN kit を用いて DNA 抽出し、Univ515F-Univ806R プライマーペアを使用して PCR 増幅を行った。精製した PCR 産物はシーケンサー MiSeq によって塩基配列を決定した。16S rRNA 遺伝子配列の解析には QIIME を使用した。

2.2 有用微生物のスクリーニング

微生物群集構造解析(2.1)から、圃場では *Bacillus* 属細菌が病害抑制に寄与していると推察された。病害被害が顕著に小さい圃場 A から *Bacillus* 属細菌の単離を行った。採取した土壌サンプルを無菌水に懸濁させ、NB 寒天培地に塗抹した。38℃で培養し、8-15 時間後に寒天培地上に形成された *Bacillus* 属細菌に特徴的な 1000 個以上のコロニーを得た。コロニー形状、顕微鏡観察に基づく形態から 8 種に分類を行い、16S rRNA 遺伝子シーケンスおよび対峙培養(2.3)に供した。

2.3 対峙培養による拮抗性の調査

罹病ジャガイモの病変部から Dees らの方法¹⁾に従ってそうか病原菌の単離を行った。培養 5 日後に寒天培地上に形成された放線菌に特徴的なコロニーを釣菌し、St10 株、St13 株の 2 種を単離した。各 *Streptomyces* 属放線菌に対する *Bacillus* 分離株の拮抗性はディスク拡散法で試験した²⁾。St10 株、St13 株を YME 培地に植菌し、28℃で 2 日間振盪培養した。培養液を OD₆₀₀=0.35(St10 で $1.3 \sim 3.8 \times 10^5$ CFU/mL)となるように無菌水で希釈した後、100 μ L を YME 寒天培地上に塗抹した。*Bacillus* 分離株は NB 培地で培養後、OD₆₀₀=0.30(Ba02 で $1.8 \sim 3.4 \times 10^8$ CFU/mL)となるよう無菌水で希釈し、細菌懸濁液 5 μ L を寒天培地上に配置した直径 6 mm のペーパーディスク上に滴下した。各シャーレを 28℃で 4 日培養した後、ペーパーディスク周囲に形成された生育阻害円の直径を計測した。

2.4 圃場を対象とした生長および病害抑制試験

対峙培養(2.3)で St10, St13 に対して最も大きい拮抗性を示した Ba02 を用いて病害抑制効果を試験した。Ba02 を液体培養し、 9×10^8 CFU/mL の細菌懸濁液を用意した。Ba02 懸濁液を 10 倍、100 倍に希釈し、各懸濁液に種芋を 15 分間浸漬させることで表面に細菌を付着させた(等倍、10 倍、100 倍懸濁液浸漬系)。併せて、根圏土壌に直接的に Ba02 を導入する方法として稲わらを基材とした微生物製剤を作製した。1-2 cm 幅に切断した稲わらをオートクレーブ滅菌したのち Ba02 懸濁液を混和した。8 日間、37℃下で細菌を定着させ、8 日後の菌体密度は 2×10^8 CFU/g-biomass であった。種芋植え付け時、畝に微生物製剤を散布し、稲わら導入系とした。塊茎形成期～塊茎肥大初期の塊茎を各系 13-20 個ずつ収穫し、1 サンプルとした。各処理群で 3 サンプルずつ用意し、平均重量およびそうか病発病率を計測した。

キーワード バイオマス肥料, 植物病害抑制, ジャガイモそうか病, 土壌細菌叢

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 E-mail : s205036@stn.nagaokaut.ac.jp

3. 実験結果および考察

3.1 微生物群集構造解析による各圃場の比較

図 1 に 16S rRNA 遺伝子に基づく PCoA による 土壌微生物群集構造の比較を示す。病害抑制圃場 (A-D)のプロットはグラフ中央から右側である(図 1. I)のに対して、病害多発圃場 E,F は左上にプロットが集中した(図 1. II)。病害被害の大きさは土壌細菌叢と関連していると推察される。

3.2 Bacillus 分離株の拮抗性の調査

圃場 A から単離した 8 株の Bacillus 分離株の 16S rRNA 遺伝子に基づく相同性検索結果および Streptomyces 分離株とのディスク拡散試験の結果を示す(表 1)。St10 に対しては 6 株, St13 に対しては 7 株で阻害円の形成が確認された。

BLAST による相同性検索ではシーケンスに供した 8 株全ての塩基配列が既報の Bacillus 属細菌と 99%以上一致し、計 5 つの Bacillus グループに分類された。圃場 A における病害抑制が複数の細菌種によって達成されている可能性が示唆された。

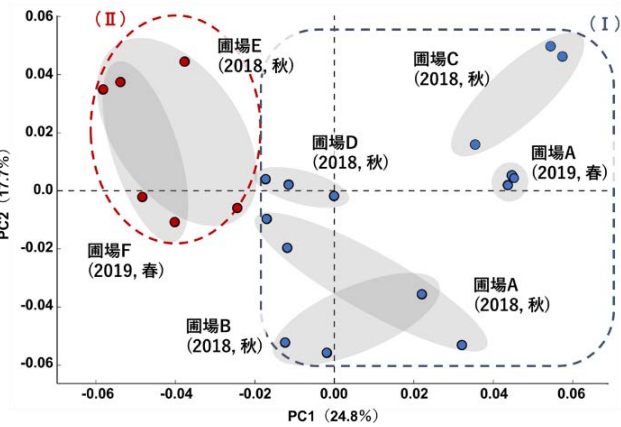


図 1 PCoA による各圃場の微生物群集の比較

表 1 分離株の 16S rRNA 遺伝子解析結果および ディスク拡散法による生育阻害円測定結果

供試菌株	Taxonomy	相同性 (%)	阻害円の直径 (mm ± SD, n=3)	
			St10	St13
A	Ba01 <i>Bacillus subtilis</i> strain LTNo.1	100	22 ± 4.0	27 ± 2.1
B	Ba02 <i>Bacillus subtilis</i> subsp. strain HZMJW 1-10	99.87	25 ± 1.7	31 ± 0.9
	Ba17 <i>Bacillus subtilis</i> subsp. strain HZMJW 1-10	99.87	—	—
C	Ba06 <i>Bacillus safensis</i> strain KMF402	99.87	9 ± 2.4	8 ± 1.7
	Ba07 <i>Bacillus safensis</i> strain KMF402	100	10 ± 0.9	6 ± 0.9
	Ba08 <i>Bacillus safensis</i> strain KMF402	100	7 ± 2.4	6 ± 2.2
D	Ba11 <i>Bacillus aryabhattai</i> strain ZJJH-2	100	—	5 ± 0.5
E	Ba18 <i>Bacillus pumilus</i> strain DF39	99.87	10 ± 0.9	9 ± 1.2

阻害円の直径 = (阻害域の直径) - (ペーパーディスクの直径 6 mm) で算出

3.3 圃場を対象とした生長および病害抑制試験

図 2 に各処理群の試験結果を示す。対照系と比較して Ba02 懸濁液浸漬系はいずれも生長度合い、病害抑制効果で改善は得られなかった。植え付けから塊茎形成期にかけて、Ba02 が種芋周囲、根圏土壌に優占しなかったことが原因と推測される。

Ba02 を定着させた稲わらを導入した系では顕著な生育促進が見られ、肥料効果が確認された一方で病害抑制効果は認められなかった。微生物製剤においても効果的に病害抑制効果を発揮するには長期的に拮抗菌を活性の高い状態で土壌中に優占させることが必要と考えられる。

4. まとめ・今後の予定

圃場の土壌微生物群集が病害被害程度と関連していることが示唆された。病害抑制圃場から単離された Bacillus 属細菌の多くが病原性 Streptomyces 属放線菌に対する拮抗性を示した。今後は、未利用バイオマスを用いた拮抗菌の効果的な利用法を開発し、病害抑制と廃棄物問題解決を試みる。

参考文献

1. Dees, M. W., Sletten, A. & Hermansen, A. Isolation and characterization of Streptomyces species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathol.* **62**, 217–225 (2013).
2. Lin, C. *et al.* Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *PLoS One* **13**, 1–10 (2018).

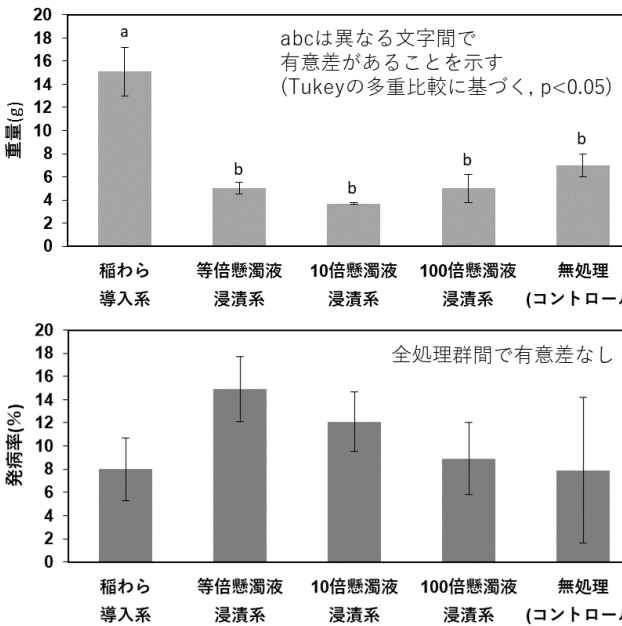


図 2 各処理群の塊茎重量(上)および発病率(下) エラーバーは標準偏差を示す(n=3)