

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06046

研究課題名（和文）土壌病害に対する省力型バイオコントロール技術の開発

研究課題名（英文）Development of labor-saving biocontrol method for management of soil-borne diseases

研究代表者

中島 雅己（Nakajima, Masami）

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：70301075

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではまず、青枯病菌に対して抗菌活性を示す内生細菌を分離する目的で茨城県内の有機栽培圃場などから採取した土壌で緑肥作物のソルガムを栽培し、2週間後のソルガム根内から細菌を分離した。得られた細菌株について青枯病菌に対する抗菌活性とソルガム根における増殖を評価した。次に、選抜した菌株について、トマト青枯病の抑制効果を調査した。分離細菌を含むソルガムの根を細断して青枯病菌の汚染土壌に混和し、その1ヶ月後にトマト幼苗を移植して発病度を調査した。その結果、最も抗菌活性の高かった菌株処理区において有意に高い発病抑制効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、農業の現場で病害防除に不可欠な化学合成農薬の使用回数を削減する目的で様々な資材が微生物農薬として販売・使用されることが多くなってきている。しかしながら、土壌病害に対する微生物農薬の開発は現場のニーズに対応し切れていない状況にある。本研究では緑肥作物の栽培と同時に土壌病害防除が可能であることを明らかにした。得られた成果は、防除困難な土壌病害に対する省力・低コスト型で有効かつ環境負荷の少ない防除技術として農業現場での活用に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：For the isolation of antagonistic bacteria, sorghum was cultivated in soil collected from organically managed fields. The bacterial strains isolated from sorghum roots were evaluated for their antagonistic activity against *Ralstonia solanacearum* and their ability to proliferate in sorghum roots. In addition, the inhibitory effects on tomato bacterial wilt were investigated for the selected strains. Sorghum seeds sown in sterile soil were inoculated with the suspension of bacterial strains. After one month of cultivation, the sorghum roots were harvested and mixed with soil containing *R. solanacearum*. Tomato seedlings were transplanted to the soil one month later, and the severity of disease was investigated two weeks later. The results showed that the strain with the highest antagonistic activity significantly suppressed the development of bacterial wilt.

研究分野：植物病理学

キーワード：土壌病害 拮抗細菌 緑肥作物 エンドファイト 防除法

1. 研究開始当初の背景

(1)微生物農薬として機能する微生物は、植物病原菌に対する抗菌性、防除対象植物における定着性および安全性といった性質を兼ね備えていることが理想である。しかし、実験室で選抜した拮抗微生物を環境中で使用した場合、栄養条件や他の微生物等の影響を受けて葉面など病原菌に作用する部位で長期間に亘って定着できない、あるいは定着したとしても病原菌を抑制するだけの活性を発揮できない等の問題点が指摘されており、このことが防除効果における不安定さの原因とされている。(吉田・對馬, 2013)。また、対象が土壤病害の場合、拮抗微生物が作用する場所は土壤中となるため、土壤条件やそこに生息する膨大な数の微生物の影響を受けることになり、地上部病害の防除に比べて上記の問題点はさらに深刻なものとなる。そのような状況の下、土壤病害防除において重要な拮抗微生物の定着性の問題を打破するために、植物の根圏あるいは根面における定着性に優れた菌の探索や、植物体内に生息している内生菌を活用するといった研究が行なわれている。すなわち、拮抗微生物を利用した土壤病害防除研究の対象はその定着性に着目し、圃場全体から植物の根圏土壤、さらに根面や根内へと移行してきている。しかしながら、このような研究によって得られた防除資材を露地栽培の作物に利用する場合、微生物を広大な圃場全体に処理することになり、生産者にとっては多大な労力とコストが必要になる。

(2)申請者らはこれまでに、マッシュルームコンポストから分離された *Bacillus amyloliquefaciens* がトマト青枯病菌を含む数種の土壤病原菌に拮抗活性を示すことを明らかにしている(外山ら, 2013)。トマトを対象植物として、本菌の青枯病および萎凋病に対する抑制効果を調査した結果、本菌をマッシュルームコンポストと共に病原菌汚染土に施用した場合、汚染土における本菌の増殖が確認され、両病害に対して顕著な抑制効果を示すことが明らかとなった。一方、本菌のみを汚染土に施用した場合、その増殖は確認されず、抑制効果も持続しなかった(Sotoyama et al., 2016, 2017)。これらの結果から、本菌の病害抑制効果の発揮には土壤中における本菌の増殖および定着が重要であり、それにはコンポストの添加が必要であることが明らかとなった。つまり、本菌を農業現場で使用する場合、大量のコンポストを同時に使用することになり、多大な労力と莫大なコストが必要になる。

近年、露地栽培では土壤微生物の多様性を維持することにより土壤病害を防除する方法が注目されている。多様な微生物相を作り出すために土壤に有機物を施用する、作付け体系に輪作作物として緑肥を組み入れ、それらを鋤き込むといった方法に取り組む生産者も増えてきている。このような状況の中、緑肥に定着する根圏細菌あるいは内生細菌で病原菌に対して抗菌活性を持つものが見出され、それらが鋤き込み後の腐熟期間に土壤中で優先的に増殖可能であれば、省力・低コストの土壤病害防除が可能となると考えた。

2. 研究の目的

これまでに土壤病害の生物的防除技術の開発に関する研究は数多く行われており、それらは主に拮抗微生物の作物根圏での定着性や根面、根内での定着性に着目するものである。また、これまでの研究は、当然のことであるが防除効果を中心に進められてきているため、実際に生産者が技術を利用しようとした場合、多くのコストと労力が必要となる。現在わが国の農業従事者は高齢化が進んでいることから、防除効果は言うまでもないが、省力・低コスト化にも配慮した防除技術の開発が必要であると考えられる。そこで、本研究では緑肥を利用した旧来の生物的防除技術と緑肥に定着能を有する拮抗細菌を組み合わせることで、利用する生産者も取り組みやすく、効果的かつ広大な農地でも使用可能な防除技術の開発に取り組む。

3. 研究の方法

(1)ソルガムに定着能を有する拮抗細菌の分離

微生物相が多様であると考えられる有機栽培圃場の土壤 10 種、有機栽培に利用されている 14 種のコンポスト、森林公園内の土壤 15 種、大学構内の雑木林の土壤 10 種を採取し、それらの土壤で短稈型ソルガムを栽培した。ソルガム種子は次亜塩素酸ナトリウムを用いて表面殺菌後、6 × 6 × 5 cm のサイズのセルトレイに充填した各種土壤に播種し、人工気象器内で 25 °C、明期 16 時間、暗期 8 時間の条件下で栽培した。栽培 2 週間後にソルガムの根を水道水で洗浄し、70%エタノールおよび次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後、根を摩砕して 10 倍量の滅菌水を加え、細菌懸濁液とした。これらをトマト青枯病菌含有 Potato Peptone glucose (PPG) 平板培地に塗抹し、28 °C で 24 時間培養することで青枯病菌の生育を抑制して阻止円を形成する拮抗細菌の分離を行った。分離菌のトマト青枯病菌に対する抗菌活性を調査するために培地上での共培養試験を行った。分離菌を Tryptic Soy 液体 (TSB) 培地に懸濁し 28 °C、120rpm で 16 時間振とう培養した後、10,000rpm で 5 分間遠心分離し菌体を回収した。得られた菌体を滅菌水で懸濁・遠心を 3 度繰り返して洗浄した後に滅菌水に懸濁し、分光光度計で OD600 の値を 1.0 に調整した。青枯病菌を TSA 培地で 28 °C、16 時間前培養して得られた菌体を滅菌水に懸濁して OD600 の値を 1.0 に調整した懸濁液 100μl を TSA 平板培地に滴下し、コンラージ棒で塗布した。これに分離菌株の懸濁液 5μl を浸みこませた直径 5mm のペーパーディスクを置床し、28 °C で 24 時間培養し

た後、ペーパーディスクの周囲に形成された阻止帯の直径を計測して青枯病菌に対する抗菌活性を調査・比較した。培養上清の青枯病菌に対する抗菌活性試験を行った。分離菌株を TSB 培地に添加して 28、120rpm で 24 時間振とう培養した後、10000rpm で 5 分間遠心分離して得られた上清を滅菌フィルターで濾過した。共培養試験と同様の方法で青枯病菌の懸濁液を塗布した TSA 平板培地に分離菌株の培養上清 5 μ l を浸みこませたペーパーディスク置床して 28 で 24 時間培養後、形成された阻止帯の直径を計測することで培養上清の抗菌活性を調査・比較した。

(2) ソルガムにおける拮抗細菌の定着性評価

滅菌土壌にソルガム種子を播種すると同時に上記と同様の方法で調整した分離菌株の懸濁液 500 μ l を滴下接種した。その 2 週間後にソルガムの根を採取して表面殺菌した後に滅菌水中で摩砕して得られた細菌懸濁液を TSA 平板培地に塗抹し、ソルガム根における各菌株の菌密度を計測した。

(3) ポット試験による病害抑制効果の検証

土壌への病原菌接種は以下のようにおこなった。青枯病菌を PPG 液体培地に懸濁し、28、120rpm で 24 時間振とう培養を行った後、3000g で 10 分間遠心分離して菌体を回収した。得られた菌体を滅菌水に懸濁・遠心を 3 度繰り返して洗浄した後、滅菌水に懸濁して OD600 の値を 1.0 に調整して接種源とした。接種源と滅菌培養土を重量比 4:1 で混合することで汚染土を作製した。滅菌土壌に播種したソルガム種子に分離菌株の懸濁液をそれぞれ滴下接種して栽培 1 ヶ月後のソルガムの根を採取して約 1mm に細断した。これらを作製した汚染土に重量比 0.2% の割合で混和し、28 の暗所で腐熟期間とした 1 ヶ月間維持した。なお、対照区としてソルガム根を混合していない区と拮抗細菌を含まないソルガム根を混合した区を設けた。これらに播種後 1 週間生育させたトマト苗を移植し、人工気象器内で 2 週間生育させた後に発病度を算出した。

4. 研究成果

(1) ソルガムに定着能を有する拮抗細菌の分離

微生物相が多様であると考えられる有機栽培圃場や森林、雑木林の土壌を茨城県内の 49 箇所から採集し、それらの土壌でソルガムを栽培して 2 週間後のソルガム根から青枯病菌の増殖を抑制する細菌を分離した。その結果、3 種の有機栽培圃場の土壌、2 種のコンポスト、5 種の雑木林の土壌でそれぞれ培養したソルガム根から計 18 株の拮抗細菌が分離された。これらについてグラム染色を行ったところ、16 菌株がグラム陽性桿菌、2 菌株がグラム陰性桿菌であった。グラム陽性細菌について同定を行ったところ、4 菌株が *Bacillus megaterium*、7 菌株が *B. amyloliquefaciens*、5 菌株が *B. cereus* に分類されることが示された。分離された 18 菌株について、青枯病菌に対する抗菌活性を TSA 培地での共培養試験によって調査した結果、供試した全ての菌株で明瞭な生育阻止帯が形成され、中でも 1 菌株の *B. amyloliquefaciens* で最も大きな阻止帯が確認された。また、分離菌株を液体培地で 24 時間振とう培養して得られた培養上清について濾紙円板法にて抗菌活性試験を実施したところ、前述の菌株から得られた培養上清で最も高い抗菌活性が認められた。

(2) ソルガムにおける拮抗細菌の定着性評価

滅菌土壌にソルガム種子を播種し、1 週間後の植物体根圏に拮抗細菌の懸濁液を滴下接種した。その 2 週間後にソルガム根における各菌株の菌密度を計測した。その結果、拮抗細菌のソルガム根への定着能は確認されたが、それらの菌密度は供試した植物体によって異なる結果となった。そこで、拮抗細菌の接種時期を播種 1 週間後から播種時に変更して同様の試験を行った。その結果、全ての分離菌株が比較的安定してソルガム根に定着することが示された。

(3) ポット試験による病害抑制効果の検証

得られた分離菌株からトマト青枯病菌に対して強い抗菌活性を示す菌株 1 株ならびに、ソルガム根に高い定着能を有する 3 菌株を選抜し、各菌株が定着・増殖したソルガム根を用いて、ポット試験による青枯病抑制効果を調査した。その結果、4 菌株のうち *B. amyloliquefaciens* 1 菌株を定着させたソルガム根で青枯病に対する抑制効果が確認された。さらに、汚染土における青枯病菌の菌密度の低下との *B. amyloliquefaciens* の増殖が明らかとなった。これらのことから、本菌をソルガムを介して土壌に導入することで青枯病の発病を抑制する効率的な防除が可能であることが示された。

これまで国内外において緑肥作物と拮抗細菌の組み合わせによる土壌病害防除の報告例は無い。本研究では緑肥としてソルガムを用い、トマト青枯病を対象として実施してきたが、ここで得られた研究成果をさらに発展させ、他の緑肥作物に定着する拮抗微生物を分離することで、他の土壌病害への応用が期待できる。本研究成果は、これまで防除困難とされている様々な土壌病害に対する省力・低コストで有効かつ環境負荷の少ない防除技術として農業現場での活用に繋がるものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田夏菜・市川純・古谷綾子・中島雅己
2. 発表標題 ソルガム根に内生する拮抗細菌のトマト青枯病抑制効果
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------