

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：52301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06346

研究課題名(和文)生物指標の遺伝子解析を用いた林業・活性汚泥の循環利活用型土壌改良資材の開発

研究課題名(英文)Development of a soil improvement materials using cedar bark and sludge with free-living nematodes.

研究代表者

大和田 恭子(Owada, Kyoko)

群馬工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号：10203952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物寄生性線虫による連作障害抑制のために、地域の未利用バイオマスとして林業の余剰杉バーク、し尿処理場の乾燥汚泥、池底泥脱水土等を混合発酵させた化学農薬に代わる新たな土壌改良資材を開発した。指標生物として自活性線虫とBacillus属細菌を用い、ヤマトイモ実圃場試験から連作障害抑制に有効な資材中の指標生物数と資材構成材料の混合比を決定した。DNA解析により、作物被害抑制効果をもたらす自活性線虫種を調査した。オカラを添加した開発改良資材は、エダマメ圃場のダイスシストセンチュウ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

農作物の植物寄生性線虫被害による経済的損失は世界で年間数十兆円と見積もられ、連作障害抑止が第一の植物寄生性線虫被害の防除である。実圃場試験によりこの抑制効果が認められた土壌改良資材の開発は、国内外の農業への経済的効果のみならず、地域の未利用バイオマス、特に林業における杉バークの有効利用及びし尿処理場の乾燥汚泥の活用、化学農薬使用低減による安全かつ循環型農業の持続可能な社会への貢献に大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Soil improvement materials were developed to control crop damage caused by plant parasitic nematodes, using unused local biomass such as cedar bark, dried sludge, and dehydrated soil. Free-living nematodes and Bacillus subtilis were used as indicator organisms. The number of indicator organisms in the material and the mixing ratio of the material constituents that are effective in suppressing continuous cropping damage were determined based on field tests of Chinese Yam, and DNA analysis was conducted to identify the species of free-living nematodes that cause crop damage control. Developmental improvement material with the addition of bean curd refuse was found to be effective in suppressing soybean cyst nematodes in edamame fields.

研究分野：分子生理学

キーワード：土壌改良資材 線虫 活性汚泥 バイオマス

1. 研究開始当初の背景

植物寄生性線虫被害による経済的損失は世界で年間数十兆円と見積もられ、その抑止は緊急の課題である。現在、被害への対策は化学農薬による燻蒸や輪作が第一選択肢であるが、化学農薬の使用は近隣住民への健康被害も招く。そこで、化学農薬の代替えとなる連作障害抑制効果をもつ土壌改良資材として地域未利用バイオマス活用型の開発に着手した。Bacillus 属細菌は植物に対する病原性の報告がなく、Bacillus 属細菌の中でも代表的な Bacillus subtilis は、抗生物質によって植物病原菌を抑制することが知られている。本申請者は、し尿処理場からの Bacillus 属細菌優占化活性汚泥、底泥脱水土、米ヌカ等を家庭用生ごみ処理機(容量 20 リットル)で混合させ、試験的に土壌改良資材の作製を試みてきた。杉パークが他のバイオマス資源との混合により形が不明確な状態にまで分解され良好な改良資材の原料となると同時に、自活性線虫が大量に発生することがわかってきた。自活性線虫が多く生育すると、線虫間の生態学的競合で植物寄生性線虫が土壌中から淘汰され、連作障害が抑制されることが期待される。そこで、Bacillus 属細菌と自活性線虫を生物指標として、連作障害抑制に有効な土壌改良資材の開発を行った。

2. 研究の目的

連作障害抑制に有効な土壌改良資材の開発にあたり、資材の構成材料の構成比の決定と実圃場試験で連作障害による植物寄生性線虫被害を抑制できたかを調査する必要がある。実圃場試験のために、土壌改良資材作製を 1~3 トンが作製可能となるようスケールアップする。これまで土壌の有機物の分解等で土づくりに極めて重要だとされていながら、土壌改良資材における微生物との相関関係が DNA レベルで明らかにされていない自活性線虫から簡易的に DNA を抽出する方法を提案し、種の同定のための独自の PCR 用プライマーを設計する。実圃場試験として地域特産品の一つであるヤマトイモの圃場を対象とした。土壌改良資材投入による圃場中の線虫の動態を調べ、植物寄生性線虫の防除に有効な種類を検討することを目的とした。協力農家の状況変化から、最終年度においてエダマメ圃場への改良資材投入試験を行った。

3. 研究の方法

(1) 杉パークとし尿処理場活性汚泥を用いた土壌改良資材の各種バイオマス混合比決定

県内の未利用バイオマスの有効活用として、林業の新たなバイオマス資源としての県産杉パーク、し尿処理場からの Bacillus 属細菌が優占化した余剰活性汚泥を主とした各種混合比でバチルス優占化土壌資材の試作を行い、最適混合比率を決定した。1回/週のサンプリングを行い、連作障害抑制のための指標生物として自活性線虫数と Bacillus 属細菌を調べた。Bacillus 属細菌については土壌 1 g あたり 10 の 7 乗個のコロニー以上、線虫は 1000 頭以上を有効なものとして混合比の決定を行った。

(2) 土壌改良資材作製のスケールアップ

各種バイオマス混合比を決定後、県内の森林組合の協力のもとスケールアップを行った。森林組合の敷地の一部を借りて 1~3 トンのスケールで土壌改良資材の作製を行った。

(3) 自活性線虫の分離と個体別の線虫 DNA 抽出

土壌試料 10 g からベルマン法を用いて線虫を分離した。抽出時間は 72 時間とした。分離した線虫をスライドグラスにのせ、顕微鏡下で 1 個体毎に押し潰し法で DNA を抽出した。スライ

ドグラス上で線虫1個体に2 mm四方の滅菌ろ紙をかぶせて押し潰し、ろ紙片を0.2 mlの滅菌チューブに入れて0.1% SDS含むバッファー(10 mM Tris-HCl (pH8.0), 5mM EDTA (pH8.0), 500 µl/ml ProteinaseK)を10 µl加え、50 で1時間の後、90 で10分間の温度処理を行い、滅菌水60 µlを加えてDNA抽出溶液とした。DNA濃度はNanoDropLite (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。土壤中の自活性線虫は口針の形態により捕食性・腐食性等の分類ができる。光学顕微鏡観察で口針の形態による分類評価も実施し、個体毎の口針形態データとDNA塩基配列データの併用で種を同定した。

(4) 線虫解析のためのプライマー設計とPCRおよびDNAシーケンス解析

自活性線虫はChromadorea綱とEnoplea綱に分けられるため、それらに属する線虫種の塩基配列データベースからプライマーを設計した。基本PCR条件は、クルードDNAサンプルのPCRに適したGflex DNA polymerase(TakaraBio)を用いた。得られたPCR産物はClean-up Gel Extraction Kit (MACHEREY-NAGEL)で精製後、外部業者に委託して塩基配列決定を行った。得た配列データはNucleotide BLAST等により種の同定を行った。

(5) 実圃場試験

ヤマトイモ農家の協力を得て土壌改良資材を投入した実験区画と投入しない対照区から定期的に土壌サンプルを採取し、自活性線虫の数とDNA解析を実施した。対象とした圃場は、1.2 m x 50 mの広さであった。イモの連作障害への有効性を調べるために、収穫時にイモをサンプリングして被害状況の外観確認と収穫時の重量を測定した。資材の投入量は、3トン/10aとした。コロナ禍によりヤマトイモ農家の状況に変更が生じたため、エダマメに被害報告があった農家の協力を得てエダマメ圃場用のオカラを混合して新たに作製した土壌改良資材の投入試験を実施した。実験区・対照区からシストセンチウのシストを分離し、シスト数の調査とシスト毎にDNA抽出をして種を同定した。

4. 研究成果

(1) 土壌改良資材の各種バイオマス混合比決定

県内の未利用杉バーク、し尿処理場からのBacillus 優占化活性汚泥、底泥脱水土にぬかを発酵の促進剤として用いた。良好な効果が認められた混合比は「杉バーク、底泥脱水土、活性汚泥、ぬかの割合は乾燥重量比4:4:1:1」であり、その混合比で1~3トンの作製が可能となった。Bacillus 属細菌については土壌1gあたり10の7乗個のコロニー以上、線虫は1000頭以上となった資材を実圃場試験に用いた。

(2) プライマー設計

自活性線虫種は未同定の種が数多く存在する。複数種類のプライマーの設計を試みた結果、自活性線虫が属するChromadorea綱とEnoplea綱に属する自活性線虫を選び出し、それらの18SrDNAと28SrDNAの相同性の高い部分をターゲットとしてFiプライマーとRiプライマーを設計した(表1)。このプライマーセットは、個体毎に押し潰し法で抽出したDNAを鋳型としてPCR産物を高い確率でシングルバンドとして得ることができた。

表1 PCRプライマーの塩基配列

primer	sequence
Fi	5'-GTCTGTGATGCCCTTAGATG-3'
Ri	5'-GTA CTTGTT CGCTATCGGTC-3'

(3) 実圃場試験

実験区と対照区における自活性線虫数の推移

ヤマトイモの圃場において3トン/10aの土壤改良資材を圃場にすき込み、土壤改良資材投入後、経時的にサンプリングして自活性線虫の数を調査した。その結果、1回の土壤改良資材投入で約6カ月の間圃場の自活性線虫数は非投入区よりも高い値を示した。投入後30日間は自活性線虫数が1000頭/10g土壤と非常に高い値を示したが、その後、非投入区と比べて安定的に高い自活性線虫数が維持されることが明らかになった。植え付けから収穫までの期間毎月の測定により、実験区では平均330頭/10g土壤であり、対照区では平均166頭/10g土壤であった。

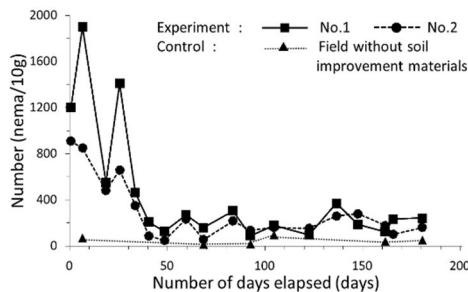


図1 改良資材投入後の自活性線虫数の推移

ヤマトイモ圃場中の線虫種の同定

線虫の種類については、実験区では捕食性線虫4種(*Ecumenicus* sp., *Paractinolaimus* sp., *Prionchulus oldeksandri*, *Rhysocolpus*)と、植物寄生性線虫4種(*Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Paratrichodorus allius*, *Aphelenchoides fragariae*)、その他にも菌食性5種、動物寄生性3種、藻食性1種とバラエティに富んだ種の分布を形成していることがDNA解析により明らかになった。この結果に対して、対照区では植物寄生性線虫1種(*Pratylenchus penetrans*)と、実験区には存在していなかった菌食性、藻食性のそれぞれ1種、動物寄生性3種が検出された。これらを比較すると、実験区では捕食性線虫が4種存在しているが、対照区では検出されていないことが分かる。したがって、土壤改良資材は捕食性線虫を増加させる効果を有することが示されたといえる。さらに、実験区での存在が明らかになった捕食性線虫4種は、いずれもDorylaimia亜綱であることがわかった。捕食性には、他にMononchida亜綱などの亜綱に属する線虫種が存在するにも関わらず、この亜綱のみが検出された。このことから、実験に用いたヤマトイモ圃場においてDorylaimia亜綱の捕食性線虫が連作障害の抑制に関与する有効種の可能性が示唆された。

ヤマトイモから単離した植物寄生性線虫種の同定

植物寄生性線虫の被害を受けたヤマトイモ自体の中に存在する線虫の卵と成体を分離したところ、罹患部1cm³あたり平均25個の卵と平均60頭の成体が寄生していることが明らかになった。さらに、これらをDNA解析したところ、すべて*Meloidogyne incognita* (和名：サツマイモネコブセンチュウ)であった。圃場からの土壤試料中には、他の種類の寄生性線虫も存在したが、*Meloidogyne incognita*のみ罹患部から検出されたことから、群馬県のヤマトイモ圃場における、直接的な連作障害の原因となっている主な植物寄生性線虫種は、*Meloidogyne incognita*だと推察された。

ヤマトイモ収穫量への土壤改良資材の影響

対照区を除く実験圃場全域から収穫したヤマトイモの総重量は138kgであった。収穫された約95%は被害のない商品として出荷できるものであった。約5%は、ネコブ病の罹患形態を示したものと*Pratylenchus* sp.によって商品価値を失ったものであった。通常は土壤燻蒸処理によって得られる収穫量とほぼ同量の収穫であった。従って、化学農薬使用時と土壤改良資材投入によるヤマトイモ収穫量はほぼ同様であることが期待され、収穫量が増加しないが、化学農薬を使用

せずに植物寄生性線虫被害を抑制することが可能であると期待された。

(4) 土壤改良資材構成材料からの線虫種の同定

土壤改良資材の構成材料のうち、し尿処理場の活性汚泥とおからは、土壤資材作製前に高温加熱処理が加えられているため、これらに生息する線虫は死滅する。よって、杉バークと底泥脱水土から線虫の供給があると考え、これら2つの材料から分離した線虫種の同定をすると同時に、投入後の圃場中の線虫種との比較を行った。圃場中に存在する線虫種が由来する構成材料は明確にはならなかった。改良資材熟成中に原料由来の線虫数は増減し、圃場投入後も圃場の土壤からの影響で自活性線虫、Bacillus 属細菌数ともに増減すると考えられ、群種解析の実施とあわせた検討が必要である。

(5) エダマメ圃場への土壤改良資材投入実験

前年度エダマメに被害があった圃場(1.4a)に、開発した改良資材にオカラを加えた資材を3トン/10aをすき込んだ実験区とすき込まない対照区との比較を行った。作付けから収穫までの期間、実験区は9か所2回、非投入区は1か所2回の試料採取を行ってシストをふるい分け法で分離した。シスト数は、投入区で平均50個/100g乾燥土、非投入区で平均194個/100g乾燥土であった。改良資材によりダイズシストセンチウの孵化が誘発されて被害抑制が得られた可能性があった。実験したエダマメ圃場から得たシストのDNA解析により、ダイズシストセンチウに加えてマメシストセンチウの存在も明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rikuto Kondo, Kyoko Owada, Toru Aoi	4. 巻 51
2. 論文標題 Soybean cyst nematode control with a novel functional soil amendment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematological Research	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3725/jjn.51.41	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kyoko Owada, Karen Kurihara, Toru Aoi	4. 巻 7
2. 論文標題 Analysis of the Free-living Nematodes in a Chinese Yam Farm for Developing a Soil Improvement Material	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transactions on GIGAKU	6. 最初と最後の頁 07001-1-07001-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34468/gigaku.7.1_07001-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Karen Kurihara, Kyoko Owada, Toru Aoi	4. 巻 49
2. 論文標題 Analysis of the genetic variability of nematodes in Chinese yam farm with the soil improvement material utilizing biomass resources	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nematological Research	6. 最初と最後の頁 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3725/jjn.49.49	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Rikuto Kondo, Kyoko Owada, Toru Aoi
2. 発表標題 Effects of biomass-based soil improvement materials on plant parasitid nematodes for sustainable agriculture
3. 学会等名 7th International Conference on Science of Technology Innovation（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kyoko Owada, Karen Kurihara, Toru Aoi
2. 発表標題 Free-living nematodes and microorganisms in soil improvement materials for plant parasitic nematode control
3. 学会等名 7th International Congress on Nematology (ICN2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤陸斗, 大和田恭子, 青井透
2. 発表標題 エダマメ圃場へのバイオマス活用型機能性改良資材によるダイズシストセンチュウ防除効果
3. 学会等名 日本線虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Karen Kurihara, Toru Aoi, Kyoko Owada
2. 発表標題 Analysis of free-living nematodes in Chinese yam farm with the soil improvement material
3. 学会等名 4th STI-Gigaku 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原 花怜、大和田 恭子、青井 透
2. 発表標題 バイオマス活用型土壌改良資材投入によるヤマトイモ圃場の線虫の解析
3. 学会等名 日本線虫学会第27回大会
4. 発表年 2019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
---------	---------