

博士論文要約 (Summary)

入学年 Entrance Year : 2017 年

連合農学研究科

専攻 Course : 農水圏資源環境科学

氏名 Name : 竹腰 恵

| | |
|------------|--|
| タイトル Title | ジャガイモそうか病の種イモ共存細菌群集制御による生態学的防除技術に関する研究 |
|------------|--|

キーワード Key word (ジャガイモそうか病) (植物共存細菌) (焼酎蒸留残液)

そうか病菌に罹病したジャガイモの種イモを焼酎蒸留残液に浸漬することにより、ジャガイモ種イモ上のそうか病菌密度が減少し、そこから伸長したストロン上に形成される新生塊茎への伝染が抑制されることが知られている(富濱ら, 2018)。本研究では、その抑制メカニズムを微生物生態学的に解明することを目的とした。

はじめに第2章において、片倉コープアグリ(株)筑波総合研究所(茨城県土浦市)内ハウスにて、そうか病汚染土壌を用いたポット栽培により採取した種イモを用いて、病斑以外の表皮に共存する細菌の群集構造を調査した。供試した5つの品種(「ニシユタカ」, 「アイユタカ」, 「デジマ」, 「アイノアカ」, 「さんじゅう丸」)の種イモに共存する細菌群集構造は類似しており、存在比が大きい上位3つの細菌属は共通していた。優占属のなかには、そうか病菌が属する *Streptomyces* 属も含まれ、その存在比はそうか病菌に対する抵抗性が弱い品種ほど大きい傾向がみられた。このことから、汚染土壌から採取した種イモには、病斑を形成していない表皮にもそうか病菌が共存している可能性があり、特に抵抗性が弱い品種では優占して共存している可能性が示唆された。一方、種イモ共存細菌の優占3属の一つである *Bacillus* 属の存在比は品種間差が小さく、種レベルにおける群集構造も品種間で類似していた。中でも *Bacillus aryabhatai* に近縁の OTU 配列は全品種で存在比が大きく、*B. aryabhatai* は品種を問わずジャガイモ塊茎と親和性が高く、貯蔵後の種イモ上にも耐久して共存している可能性が示唆された。以上より、種イモには固有の共存細菌群集構造が構築されていることが示された。種イモ上の細菌群集構造には、共存する細菌種間の相互作用も関与すると考えられ、そうか病菌の種イモ上での動態や新生塊茎への伝播にも影響を及ぼすと推察された。

そこで第3章では、焼酎蒸留残液浸漬処理が植付け後の種イモおよびそこから伸長したストロンに共存する細菌の群集構造に与える影響を、鹿児島県農業開発総合センター内試験圃場より採取した罹病種イモを用いて調査した。浸漬処理により種イモ表皮およびストロンで存在比が最も増加した細菌属は、いずれも *Bacillus* 属であった。*Bacillus* 属の中でも *B. aryabhatai* に近縁の OTU 配列は、種イモとストロンで共通して優占種であることに加え、焼酎蒸留残液浸漬処理によって存在比が増加した。さらに種イモ表皮からは、そうか病菌に対して拮抗作用を示す細菌が3菌株分離されたが、いずれも最近縁種は *B. aryabhatai* であることが明らかとなり、焼酎蒸留残液浸漬処理によって存在比が増加した細菌と 16S rRNA 遺伝子配列が一致した。以上から、焼酎蒸留残液浸漬処理によるそうか病の種イモ伝染抑制作用には、種イモ表皮に共存する拮抗細菌 *B. aryabhatai* の存在比の増加ならびにストロンへの伝播が関与することが示唆された。

現在、そうか病の種イモ伝染に対する防除法は、化学合成殺菌剤を用いた種イモ消毒が一般的である。しかし、使用後の廃液処理や人畜危害、環境微生物群に対する影響、耐性菌の出現等に対する懸念の声が挙がっている。このような問題が生じにくい代替資材の一つが焼酎蒸留残液である。そこで第4章と第5章では、鹿児島県および長崎県において種イモ消毒剤として慣行的に使用されているフルアジナムとアグリマイシンを用いた浸漬処理が種イモ共存細菌叢に与える影響を、焼酎蒸留残液による影響と比較した。まず両試験で供試した植付け前の種イモからは、いずれも拮抗細菌 *B. aryabhattai* の近縁種と推定される OTU 配列が高い存在比で検出された。これは第2~3章の結果と一致しており、種イモ表皮には *Bacillus* 属拮抗細菌が安定的に共存しており、そうか病菌に対して静菌作用を有する可能性が再確認された。無処理区の種イモでは、植付け後に共存細菌のコロニー数が2オーダー増加すると共に、群集構造が大きく変化することが示された。対して、供試した2種類の殺菌剤は種イモに共存する多様な細菌グループの増殖を長期的に抑制し、特に拮抗細菌を含む *Bacillus* 属の存在比を減少させることが示された。殺菌剤は種イモ共存細菌叢全体の増殖を制御することで、そうか病菌の種イモ伝染を抑制すると推察された。一方、焼酎蒸留残液は、殺菌剤と比較して種イモに共存する細菌数および細菌群集構造に与える影響が小さく、拮抗細菌を含む *Bacillus* 属の増殖を抑制しないことが再確認されると共に、そうか病菌が属する *Streptomyces* 属の増殖を特異的に抑制することが明らかとなった。種イモに共存する *Bacillus* 属の一部は次世代となる新生塊茎へと伝播するとの報告がある (Buchholz et al., 2019)。 *B. aryabhattai* もまた種イモから高頻度で検出されることから、垂直伝播する共存細菌の一種と推察される。殺菌剤を用いた種イモ浸漬処理は *Bacillus* 属拮抗細菌を減少させるため、元々構築されている種イモ共存細菌叢の静菌作用を低下させる危険性がある。静菌作用が低下した共存細菌叢は次世代へと伝播するため、殺菌剤の連用による防除が必要となり、環境負荷に繋がる危険性が考えられる。対して、焼酎蒸留残液は種イモ共存細菌群集構造に及ぼす影響は小さく、拮抗細菌 *B. aryabhattai* も減少させないため、種イモが本来有する静菌作用を利用した連用可能な技術であることが示された。

最後に第6章において、焼酎蒸留残液による浸漬処理が種イモ上の *Bacillus* 属拮抗細菌の増殖は抑制せず、そうか病菌の増殖のみを特異的に抑制する要因を調査した。焼酎蒸留残液による選択的抑制作用には、焼酎蒸留残液に対する共存細菌種ごとの資化性に加えて、含有有機酸(クエン酸、コハク酸、乳酸、リンゴ酸)に対する感受性の違いが関与すると推測された。そこで、各種有機酸の濃度と pH をそれぞれ数段階に調整した寒天培地を用いて、種イモ表皮から分離した拮抗細菌 *B. aryabhattai* とそうか病菌3種の増殖程度を観察することで感受性を比較した。また、種イモ浸漬時と同一の濃度である焼酎蒸留残液5倍希釈液およびそこに含まれる濃度および pH に調整した有機酸溶液中における、 *B. aryabhattai* およびそうか病菌の生残性を調査した。その結果、焼酎蒸留残液に含有する有機酸のうち *S. scabiei* は特にクエン酸、 *S. turgidiscabies* と *S. acidiscabies* はコハク酸と乳酸に対する感受性が *B. aryabhattai* と比べて高く、寒天培地上での増殖阻害(静菌作用)に加えて、溶液中での細菌数の減少(殺菌作用)も確認された。そうか病菌の菌種によって抗菌作用を示す主要な有機酸の種類は異なるものの、焼酎蒸留残液によるそうか病菌の増殖抑制作用には含有する有機酸が関与していることが示された。

以上の結果より、焼酎蒸留残液浸漬処理によるそうか病の種イモ伝染抑制メカニズムは、殺菌剤処理とは大きく異なることが明らかとなった。そうか病菌が属する放線菌 *Streptomyces* 属

や芽胞を形成する *Bacillus* 属などは、植付け前の種イモ表皮に耐久体で共存すると推測される。そうか病菌に対して拮抗作用を示す *B. aryabhatai* も、品種や栽培土壌に因らず高頻度で種イモから検出されることから、種イモはそうか病菌に対する拮抗作用を安定的に有することが示唆された。種イモに共存する細菌は植付け後に増殖するが、焼酎蒸留残液を浸漬した種イモでは *Streptomyces* 属の増殖が特異的に抑制された。この抑制作用の要因の一つとして、焼酎蒸留残液に含まれる有機酸による抗菌作用の関与が示された。一方、焼酎蒸留残液に対して感受性が低く、資化能力が高い共存細菌群は植付け後に種イモ上で増殖し、優占して定着すると推測されるが、その中には拮抗細菌 *B. aryabhatai* も含まれることが示唆された。焼酎蒸留残液中の成分は、有機酸を含めて易分解性の成分が多いため、分解・代謝が速く、種イモ共存細菌叢に与える影響は短期的であると推測される。そのため、有機酸によるそうか病菌の増殖抑制作用は一時的であり、その後は定着した種イモ共存細菌叢の働き、特に *B. aryabhatai* の拮抗作用によってそうか病菌の増殖が抑制されると考えられる。これら一連の結果として、焼酎蒸留残液に浸漬した種イモ上ではそうか病菌の密度が低減し、新生塊茎への伝播が抑制されると推察される。