

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

**Ecological management for tuber-borne potato common
scab by regulating the bacterial communities
on the seed tuber periderm**

鹿児島大学大学院連合農学研究科
農水圏資源環境科学専攻

竹腰 恵

2022 年

目 次

第 1 章 緒言.....	1
第 2 章 種イモに共存する細菌の群集構造	6
第 1 節 材料および方法.....	6
1-1. ジャガイモの種イモ表皮の採取と試料調整.....	6
1-2. 種イモに共存する細菌の群集構造解析	7
第 2 節 結果.....	8
第 3 節 考察.....	10
第 3 章 焼酎蒸留残液による浸漬処理が種イモ共存細菌群集構造およびそうか病菌に対する拮抗細菌に及ぼす影響.....	14
第 1 節 材料および方法.....	14
1-1. ジャガイモの種イモ表皮およびストロンの採取と試料調整	14
1-2. 種イモおよびストロンに共存する細菌の群集構造解析.....	15
1-3. そうか病菌に対して拮抗作用を示す細菌の分離	15
第 2 節 結果.....	16
2-1. 焼酎蒸留残液浸漬処理が種イモおよびストロンに共存する細菌群集に及ぼす影響	16
2-2. 種イモ表皮からのそうか病菌に対する拮抗細菌の探索.....	21
第 3 節 考察.....	23
第 4 章 鹿児島県における慣行殺菌剤および焼酎蒸留残液による浸漬処理が種イモ共存細菌群集構造に与える影響.....	27
第 1 節 材料および方法.....	27
1-1. 種イモの採取と試料調整.....	27
1-2. 種イモに共存する細菌の生菌数測定および群集構造解析.....	28
1-3. 統計学的評価	28
第 2 節 結果.....	29
第 3 節 考察.....	38
第 5 章 長崎県における慣行殺菌剤および焼酎蒸留残液による浸漬処理が種イモ共存細菌群集構造に与える影響	44
第 1 節 材料および方法.....	44
1-1. 種イモの採取と試料調整.....	44
1-2. 種イモに共存する細菌の生菌数測定および群集構造解析.....	44
1-3. 統計学的評価	45
第 2 節 結果.....	45

第3節 考察.....	54
第6章 焼酎蒸留残液含有有機酸がそうか病菌およびそうか病菌に対する拮抗細菌の培 地上での増殖に与える影響.....	57
第1節 材料および方法.....	57
1-1. 供試菌株.....	57
1-2. 供試焼酎蒸留残液.....	57
1-3. 寒天培地を用いた抗菌試験.....	57
1-4. 焼酎蒸留残液および有機酸溶液中における細菌の生残性.....	58
第2節 結果.....	59
2-1. 寒天培地を用いた抗菌試験.....	59
2-2. 焼酎蒸留残液および有機酸溶液中の細菌の生残性.....	69
第3節 考察.....	72
第7章 総合考察.....	76
引用文献.....	81
謝辞.....	92
要約.....	93
要約（英文）.....	95

第 1 章 緒言

ジャガイモそうか病は、病原性 *Streptomyces* spp.によって引き起こされる世界的な重要病害の一つである。本病原菌が生成するサクストミン毒素により、感染した表皮細胞の細胞壁ではセルロース合成が阻害され (Bischoff *et al.*, 2009), 最終的に感染細胞は壊死する。壊死細胞の周辺細胞ではコルク化が生じて塊茎表面に陥没やかさぶた状の病斑を形成するため (Braun *et al.*, 2017), 商業的価値が著しく低下する。さらに、萌芽遅延や新生塊茎の矮小化によって収量にも影響を及ぼすことが知られている (Hiltunen *et al.*, 2005)。これまでに世界中で複数種のそうか病菌が報告されているが、日本国内に分布しているのは *Streptomyces scabiei*, *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies* の 3 種であり (Miyajima *et al.*, 1998 ; 西ら, 2015 ; 田中, 2003), いずれもジャガイモの栽培土壌と種イモによって新生塊茎に伝染する (田代, 2003 ; Wang and Lazarovits, 2005)。

土壌伝染に対しては、殺菌剤や土壌燻蒸剤処理の他に土壌の酸性化処理や灌漑などの耕種的防除法が古くから開発されてきた (Lapwood *et al.*, 1973 ; Martin *et al.*, 1920 ; 田代ら, 1982)。しかし、現在国内に分布している 3 種のそうか病菌は pH や土壌水分等に対する耐性が異なる (Lambert and Loria, 1989b; Miyajima *et al.*, 1998 ; 西ら, 2015 ; 田中, 2003)。加えて圃場ごとに土壌の物理化学性は多様であるため、安定的な効果が得られる防除策が確立しておらず、環境負荷の大きい土壌燻蒸剤処理に頼らざるを得ないのが現状である (小山, 2009)。さらに、そうか病菌は土壌中では腐生生活によって生残するため (Loria *et al.*, 1997), 一度圃場に定着したそうか病菌を完全に除去するのは困難である (Wang and Lazarovits, 2005)。さらに、そうか病菌の病原性遺伝子は *Streptomyces* 属の種間で水平移動することから (Bukhalid *et al.*, 2002 ; Kers *et al.*, 2005), 腐生性 *Streptomyces* spp.の病原性獲得による新しいそうか病菌種の出現も危惧されて

いる（内藤，2004）。そのため，発生圃場における土壌対策に加え，未発生圃場においてはそうか病菌の新たな持ち込みを回避する対策が重要となる。

そうか病菌は土壌風食，透水，罹病種イモによって新しい圃場に拡散する。特に見かけ上健全な罹病塊茎は種イモとして各地に分配されるため，そうか病菌が拡散する主要因となっている（Wang and Lazarovits, 2005）。小山（2009）は，国内で使用されている種イモ表面からそうか病関連遺伝子 *necl*（necrosis-inducing protein 遺伝子）を $1.1 \sim 4.0 \times 10^4$ コピー/g で検出しており，流通している種イモの中に罹病塊茎が混入している可能性を指摘している。また Wang and Lazarovits（2005）は，見かけ上健全な罹病種イモから形成された新生塊茎のうち，60%がそうか病の病徴を示したと報告している。さらに，造成直後の圃場や土壌消毒実施圃場など微生物叢が希薄な土壌において，種イモ伝染による新生塊茎の発病程度が高いとの報告もあり（田代ら，1986），種イモ消毒の重要性が高まっている。

種イモ消毒には一般的に化学合成殺菌剤が用いられている（Errampalli and Johnston, 2001；西・尾松，2006；Pung and Cross, 2000）が，経費や使用後の廃液処理の問題，環境負荷や人畜危害に対する懸念の声が挙がっている。また，化学合成殺菌剤は選択性が高められてはいるものの，環境中には多種多様な微生物が複雑に相互作用しながら生息しているため，標的外の微生物に対する影響は避けられない（山本，2003）。田方ら（2014）は，殺菌剤の連用は対象とする病原菌だけでなく環境微生物群にも影響を与え，耐性菌や低感受性菌の割合が増加することを明らかにしている。種イモ消毒においても同様に，殺菌剤の使用は種イモに共存する細菌群に影響を及ぼすと推察される。

上記のような問題が生じにくい代替法の一つとして，焼酎蒸留残液を用いた種イモ浸漬がある。焼酎蒸留残液とは，焼酎の製造工程で生成される副産液で，アミノ酸やビタミン類，有機酸などの有機物を含有するスラリー状の液体であ

る（向井ら，2017）。富濱ら（2018）は，焼酎蒸留残液に浸漬した罹病種イモ上では、そうか病菌密度が低下することによって、そこから伸長したストロン上に形成する新生塊茎での発病が低減し，その低減効果は化学合成殺菌剤浸漬と同程度であることを明らかにしている。しかし，その抑制メカニズムの詳細は明らかとなっておらず，効果を安定的に高めるためにはメカニズムを解明する必要がある。

自然界において植物には様々な微生物が共存しており，その群集構造は宿主植物と微生物，微生物と微生物の間の相互作用によってコントロールされている（Hassani *et al.*, 2018）。ジャガイモ植物体にも様々な細菌が共存しており，塊茎に共存する細菌群集構造は葉や茎，根など他の部位のそれとは明らかに異なる（Kobayashi *et al.*, 2015 ; Someya *et al.*, 2013）。また，塊茎の共存細菌群集構造はそうか病に対する抵抗性レベルが異なるジャガイモ品種間において違いがみられる（Kobayashi *et al.*, 2015）。さらに，そうか病の病斑やその周辺には複数のそうか病菌種（Lehtonen *et al.*, 2004 ; Wanner, 2009）やそうか病菌に対して拮抗作用を示す非病原性 *Streptomyces* spp.（Hiltunen *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 1995）が存在している。またジャガイモ黒あし病（*Pectobacterium atrosepticum*）では，種イモ伝染による新生塊茎の発病程度に対して，種イモの共存細菌群が影響するとの報告がある（Kõiv *et al.*, 2015）。これらのことから，種イモ表皮には多様な細菌群が共存しており，種イモにおけるそうか病菌の増殖や新生塊茎における発病に影響を及ぼすと考えられる。

焼酎蒸留残液は，有機酸等の易分解性有機物を豊富に含有する。有機酸は抗菌作用を有することが古くから知られているが，その抗菌作用には pH の低下作用と特定条件下における非解離分子の量に加えて，各有機酸本体の持つ固有の性質も影響すると考えられており（松田ら，1994），有機酸の種類と微生物の種類の組み合わせによって抗菌作用は大きく異なる。焼酎蒸留残液浸漬処理に

より、有機酸を含む豊富な易分解性有機物が付加された種イモ上では、共存している細菌ごとの資化性や感受性に応じて群集構造が変化すると考えられる。さらには、この変化した共存細菌群集構造がそうか病の種イモ伝染の抑制に関与する可能性が推察される。

環境中の細菌群集を網羅的に解析する手法として、細菌が固有にもつ 16S rRNA 遺伝子の特異的に PCR 増幅させ、次世代シーケンサーで配列決定するメタ 16S 解析が盛んに活用されている。しかしながら、植物共存細菌を解析する場合、宿主植物に由来するオルガネラ（ミトコンドリアおよびプラスチド）の DNA も同時に抽出され、16S rRNA 遺伝子を標的とした細菌用プライマーで過剰に PCR 増幅される重大な問題が存在する（Garbeva *et al.*, 2001 ; Ikenaga *et al.*, 2002, 2003 ; Marilley and Aragno, 1999 ; Yang and Crowley, 2000）。この問題を解決するために様々な手法が提案されてきたが（Chelius and Triplett, 2001 ; Ikeda *et al.*, 2009 ; Sakai *et al.*, 2004 ; Sakai and Ikenaga, 2013），中でも Locked Nuclease Acid オリゴヌクレオチド（LNA オリゴ）を用いた PCR クランプ技術は細菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を選択的に増幅できることから（Ikenaga and Sakai, 2014 ; Ikenaga *et al.*, 2015 ; 池永ら, 2016），次世代シーケンスなどを用いた植物マイクロバイオーーム解析に有効とされている（Ikenaga *et al.*, 2018）。

そこで本研究では、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を生態学的に解明することを目的として、以下の試験を実施した。まず第 2 章において、LNA オリゴ-PCR クランプ技術を適用した次世代シーケンス解析により、複数品種の種イモに共存する細菌の群集構造を比較調査することで、種イモ共存細菌叢の特性を明らかにした。第 3 章では、これらの種イモ共存細菌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おいて、焼酎蒸留残液浸漬処理が与える影響を調査した。さらに、種イモ表皮からそうか病菌に対する拮抗細菌を分離し、浸漬処理が拮抗細菌の動態に及ぼす

影響を調査した。これらの試験から、焼酎蒸留残液浸漬処理による種イモおよびストロンに共存する細菌叢（特に拮抗細菌）の変化と、種イモ上のそうか病菌密度低減ならびに新生塊茎への伝染抑制作用との関係性を明らかにした。第4, 5章においては、慣行的に実施されている化学合成殺菌剤を用いた種イモ消毒と焼酎蒸留残液を用いた種イモ浸漬が、種イモに共存する細菌叢、特に拮抗細菌の動態に与える影響を比較することで、両資材の防除メカニズムの違いや焼酎蒸留残液の代替資材としての有用性を示した。最後に第6章において、焼酎蒸留残液がそうか病菌の増殖を特異的に抑制する要因を明らかにすることを目的として、含有有機酸がそうか病菌およびそうか病菌に対して拮抗作用を示す細菌の生育に与える影響を比較した。

第 2 章 種イモに共存する細菌の群集構造

第 1 節 材料および方法

1-1. ジャガイモの種イモ表皮の採取と試料調整

人工的に作製したそうか病汚染土壌 2.5kg を 3.2L 容量（直径 160mm，高さ 160mm）の不織布ポットに充填後，片倉コープアグリ(株)筑波総合研究所（茨城県土浦市）内のハウスに埋設した。そこに，長崎県農林技術開発センター内クロルピクリン消毒圃場より採取した健全種イモを，各ポットに 1 つずつ植付けた。そうか病汚染土壌は，*Streptomyces scabiei* S58 株（鹿児島県農業開発総合センターから分譲）を滅菌したバーミキュライト・オートミール培地（バーミキュライト，1L；粉碎したオートミール，5.1g；カザミノ酸，0.26g；蒸留水，350mL）で 25℃，3 週間培養したそうか病菌培養物を用いて， 10^4 CFU g⁻¹ 生土となるよう，5mm の篩を通したハウス内土壌（黒ボク土，表 2.1）と混和して作製した。またポット充填前に，硫安，過リン酸石灰および硫酸加里をそれぞれ N；5mg，P₂O₅；30mg，K₂O；20mg／100g 生土となるよう，そうか病汚染土壌に混和した。約 3 ヶ月間栽培後に採取した新生塊茎のうち，そうか病の病斑を 0～1 個有するものを選定し，休眠明けまで冷暗所で保管後に浴光処理したものを供試種イモとした。試験には，暖地ジャガイモ栽培地域で広く栽培され，そうか病に対する抵抗性強度に差がある「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 5 品種を用いた。種イモは滅菌水で洗浄後，メスを使って病斑以外の部分から表皮を剥ぎ，2～3 mm 四方に細断した。種イモ表皮は各品種 2 個の種イモから得られた表皮を合わせて 1 セットとし，3 セットを調製した。

1-2. 種イモ表皮に共存する細菌の群集構造解析

上記で調製した種イモ表皮試料の各セットから 0.5 g (新鮮重) を 15 mL 遠沈管にそれぞれ秤取し、液体窒素下でステンレス棒を用いて凍結・粉碎後、0.1 g を DNA 抽出に用いた。DNA 抽出には Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用い、抽出過程で PPS (protein precipitation solution) を添加する前にフェノール-クロロホルム処理を加えた以外は製品プロトコルに従った。PCR 反応は、植物共存細菌の 16S rRNA 遺伝子を選択的に増幅するために、LNA オリゴによる PCR クランプ技術 (Ikenaga *et al.*, 2015, 2018) を用いて行った。ジャガイモのミトコンドリア遺伝子およびプラスチド遺伝子に特異的にアニーリングする 4 種の LNA オリゴ (表 2.2) を適用し、植物共存細菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を PCR 増幅した。反応液は Premix ExTaq™ Hot Start Version (タカラバイオ) 12.5 μ l, 各プライマー (最終濃度 0.8 μ M), 各 LNA オリゴ (最終濃度 4.0 μ M), 抽出 DNA 1 μ l を含む計 25 μ l とした。増幅条件は 94°C で 3 分間, [94°C で 1 分間, 70°C で 1 分間, 54°C で 1 分間, 72°C で 2 分間] $\times$ 35 サイクル, 72°C で 10 分間とした。

細菌 16Sr RNA 遺伝子をテンプレートとしてアンプリコンシーケンス解析を行った。シーケンスライブラリーの調製は、第一ステップの PCR 反応をアダプター付加したプライマーセット 341F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') および 805R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') を用いてサイクル数を 8 とした。その他は Illumina 社の 16S メタゲノム用ライブラリー調製プロトコル (Part #15044223 Rev. B) に従って、ペアエンド法により V3V4 領域のシーケンスを行った。QIIME パイプライン (Caporaso *et al.*, 2010) を用いて、OTU (operational taxonomic units) としてのクラスタリングと系統分類の推定を行った。属レベルでの分類推定は、取得した代表配列と Greengenes (ver.13_8) の 97% OTU を比較することにより実施した。属内の種レベルでの分類では、

100%の類似度でクラスタリングを行い、BLAST 検索により種を推定した。

第 2 節 結果

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のうち、いずれかの品種で相対存在比が 1.0%以上を示す細菌属について、相対存在比を図 2.1 に示した。種イモ表皮からは合計 17 種類の細菌属が検出された。種イモに共存する細菌の群集構造は品種間で類似しており、存在比が大きい上位 3 種類の細菌属は共通して、*Pseudarthrobacter* 属、*Streptomyces* 属、*Bacillus* 属であった。*Pseudarthrobacter* 属の存在比が最も大きい品種は「さんじゅう丸」で 41.7%を示し、「アイユタカ」と「デジマ」ではそれぞれ 11.4%と 11.9%で他の品種と比べて存在比が小さかった。そうか病菌が属する *Streptomyces* 属の存在比は「ニシユタカ」(22.3%)、「アイユタカ」(29.2%)、「デジマ」(40.1%)で大きく、「アイノアカ」(15.9%)と「さんじゅう丸」(8.1%)で小さかった。一方、*Bacillus* 属の存在比は品種間で差が小さく、5 品種全ての種イモにおいて 15%以上の存在比を示した。

そこで種イモに共存する *Bacillus* 属細菌については、種レベルでの品種間差を比較するために OTU 配列を 100%の類似度でクラスタリングして解析を行った。種イモに共存する *Bacillus* 属細菌の OTU 配列のうち、存在比が大きい上位 3 種は品種間で共通していた（図 2.2）。OTU19841 は存在比 7.9~11.3%を示して 5 品種全ての種イモにおいて *Bacillus* 属の最優占種であり、その近縁種は *Bacillus aryabhattai*（類似度 100%）と推定された。次いで存在比が大きい OTU 配列は OTU1771（近縁種 *B. jeddahensis*, 類似度 99.5%）と OTU15358（近縁種 *B. wiedmannii*, 類似度 100%）で、存在比はそれぞれ 0.9~2.3%, 1.1~1.6%であった。

表 2.1 試験圃場の土壌化学性

pH (H ₂ O)	EC mS/cm	NH ₄ -N	NO ₃ -N	可給態リン酸	交換性K ₂ O	交換性CaO	交換性MgO
mg/100 g 乾土							
6.4	0.22	0.5	0.4	8.1	52.1	298.7	55.4

農林水産省が定める土壌分析法に準じて分析した。

表 2.2 LNA スクレオチドの配列

オルガネラ遺伝子	競合プライマー	名称	配列
ミトコンドリア	KU63f	LNA-Mit63a	5'- GTCGA <u>ACG</u> ITGTTTT C Gp-3'
	KU1494	LNA-Mit1494a	5'- CTTC <u>ACCCCAG</u> TCGA AAG Ap-3'
プラスチド	KU63f	LNA-Pla63c	5'- TCG <u>GACG</u> GGAA AC ACGp-3'
	KU1494	LNA-Pla1494b	5'- CTTC <u>AC</u> IC CA GTC ACT AGCp-3'

太字はプライマーの3'末端側の塩基と競合する塩基を、下線部はLNAに置換した塩基を示す。
いずれのLNAオリゴも3'末端をリン酸化している。

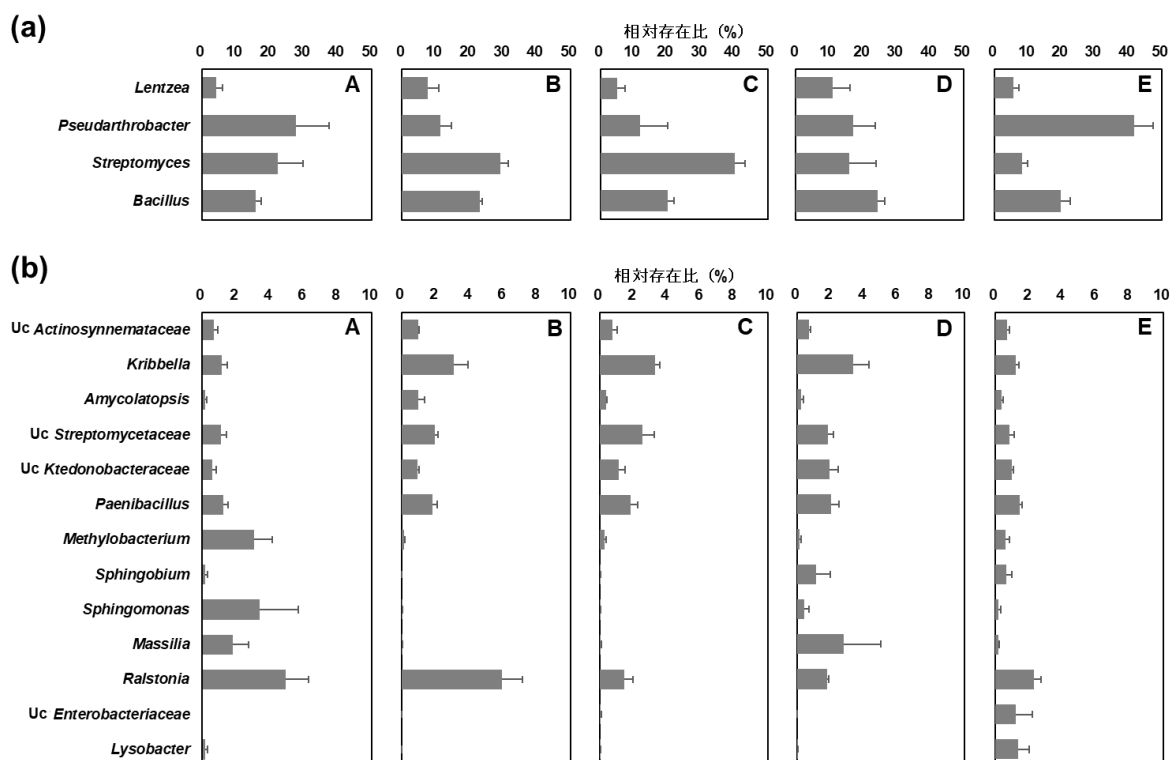


図 2.1 種イモに共存する細菌の群集構造

A ニシユタカ, B アイユタカ, C デジマ, D アイノアカ, E さんじゅう丸

(a)相対存在比が10%以上の細菌属, (b)10%未満の細菌属

エラーバーは標準誤差を示す。Uc=Unclassified (未分類)

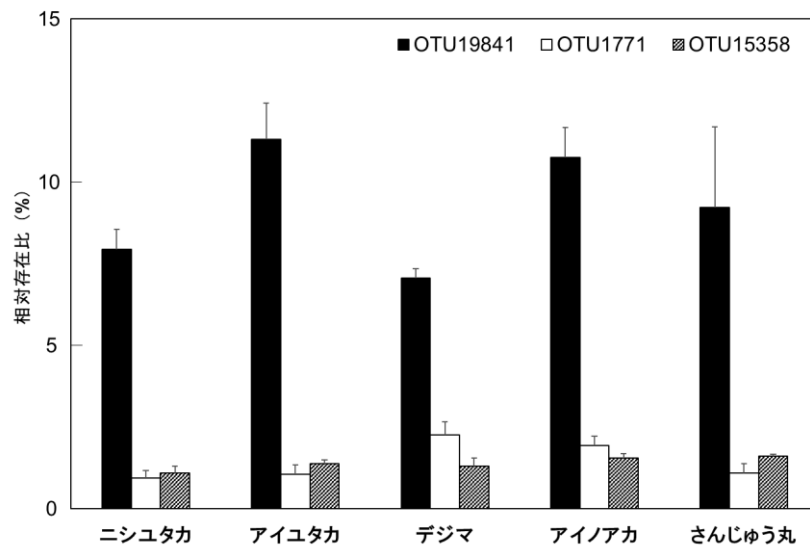


図 2.2 種イモに共存する *Bacillus* 属優占種

各 OTU の推定近縁種は、OTU19841, *Bacillus aryabhatai* ; OTU1771, *Bacillus jeddahensis* ; OTU15358, *Bacillus wiedmannii* である。エラーバーは標準誤差を示す。

第 3 節 考察

5 種類のジャガイモ品種（「ニシュタカ」、「アイユタカ」、「デジマ」、「アイノアカ」、「さんじゅう丸」）を用いて、種イモに共存する細菌群集構造を調査した。種イモに共存する細菌群のうち、存在比が大きい上位 3 属は品種間で共通して、*Pseudarthrobacter* 属、*Streptomyces* 属、*Bacillus* 属であった（図 2.1）。新生塊茎に共存する細菌群は、前世代である種イモに共存していた細菌群の一部が伝播した細菌群と、栽培土壌から新たに定着した細菌群で構成される（Buchholz *et al.*, 2021）。そのため、新生塊茎に共存する細菌叢は、品種によって異なるという報告（Buchholz *et al.*, 2019 ; Kobayashi *et al.*, 2015）や、栽培条件（土壌タイプや気象等）の影響を大きく受けるという報告（Weinert *et al.*, 2010a）があり、様々な生物的・非生物的要因によって変動すると考えられる。さらに塊茎の共存細菌群集構造は、収穫してから次作の種イモとして植え付けまでの貯蔵中にも大きく変動し、種数（richness）が低下して耐久性のある細

菌グループが優占する（Buchholz *et al.*, 2021）。本試験では、異なる品種のジャガイモを同一の条件で栽培して形成した塊茎を採取し、休眠が明けるまで貯蔵したものを供試種イモとして、共存細菌群集構造を調査した。そのため、種イモ上に優占して共存する細菌属（*Pseudarthrobacter* 属，*Streptomyces* 属，*Bacillus* 属）が 5 品種間で共通していた要因の一部としては、これらの細菌属が貯蔵中の塊茎上において耐久性が高いことや栽培条件が影響した可能性が考えられる。さらに 3 つの優占属はいずれも、種イモから新生塊茎へと垂直伝播することが知られていることから（Buchholz *et al.*, 2019），ジャガイモの塊茎上で安定的に共存する能力の高い細菌グループであると推測される。

本試験では、そうか病の病斑を除く種イモ表皮に共存する細菌群集構造を調査したにも関わらず、*Streptomyces* 属が高い存在比（8.1～40.1%）で検出された。本試験で実施した 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析では、OTU 配列から *Streptomyces* 属を種レベルまで類別して推定することは困難である。そのため、種イモ表皮から検出された *Streptomyces* 属がそうか病菌か否かは判別できない。しかし、種イモ上の *Streptomyces* 属の存在比における品種間の傾向は、そうか病に対する抵抗性の傾向と類似していた。長崎県総合農林試験場の報告によると、供試した 5 品種のそうか病に対する抵抗性の強さは、「ニシユタカ」「アイユタカ」「デジマ」が「弱」であるのに対し、「アイノアカ」と「さんじゅう丸」はそれよりも強い「中」である（向島ら，2012；中尾ら，2004；田淵ら，1995）。特に「さんじゅう丸」はそうか病に対する抵抗性を目的として育成された品種でもあることから、5 品種の中で最も抵抗性が強いとされている。種イモ上の *Streptomyces* 属の存在比は、「さんじゅう丸」で最も小さく、次いで「アイノアカ」であり、そうか病菌に対して抵抗性が弱い 3 品種（「ニシユタカ」，「アイユタカ」，「デジマ」）では、それよりも高い存在比を示した。小山（2009）は、国内で使用されている見かけ上健全な種イモ

表面からそうか病関連遺伝子を検出している。本試験結果からも、そうか病に汚染された土壌から採取した種イモには、病斑が形成されていない表皮にもそうか病菌が共存している可能性が示唆された。さらに、抵抗性が弱い品種ほど種イモ上でそうか病菌が優占する可能性も示唆された。

一方、種イモに共存する *Bacillus* 属の存在比は品種による差が小さく、供試した 5 品種すべてにおいて 15%以上の存在比を示した。*Bacillus* 属細菌の多くは、塊茎上の主たるポリマー（ペクチン、セルロース、デンプン）に対して分解能を持ち、ジャガイモの植物体の中でも特に塊茎で優占的に共存する（Someya *et al.*, 2013 ; Weinert *et al.*, 2010a）。さらに、塊茎上の *Bacillus* 属の存在比は貯蔵中に増加するとの報告もあることから（Buchholz *et al.*, 2021），*Bacillus* 属は品種に因らず、塊茎と親和性が高く、かつ、貯蔵中の種イモ上でも耐久して共存している可能性が示唆された。さらに、*Bacillus* 属については種レベルでの群集構造も品種間で類似しており、存在比が大きい上位 3 種の *Bacillus* 属は共通して *Bacillus aryabhattai*, *B. jeddahensis*, *B. wiedmannii* であった。なかでも *B. aryabhattai* は 5 品種すべての種イモで 7%以上の存在比を示したことから、特に塊茎との親和性が高い細菌種であると考えられた。

以上より、ジャガイモの種イモ表皮には、特定の細菌群が優占して共存しており、固有の細菌群集構造が構築されていることが示唆された。さらに、汚染土壌から採取した種イモでは、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ことも示された。植物に共存する微生物同士は、直接的あるいは間接的に、競合や拮抗、協力等、様々に相互作用しながら生息している。ジャガイモの塊茎表皮においても、そうか病菌に対する拮抗細菌が検出されていることから（Hiltunen *et al.*, 2009 ; Lin *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 1995），共存する細菌の群集構造は細菌種間の相互作用によって制御されていると推察される。すなわち、そうか病菌の種イモ上における動態や新生塊茎への伝播には、種イモに

共存する細菌群集が影響すると推測される。

第 3 章 焼酎蒸留残液によるジャガイモ種イモ浸漬処理が共存細菌群集およびそうか病菌に対する拮抗細菌に及ぼす影響

第 1 節 材料および方法

1-1. ジャガイモの種イモ表皮およびストロンの採取と試料調整

第 2 章において、種イモの共存細菌群集構造は品種間で類似していることが確認されたことから、以降の試験は九州において栽培面積が最も大きい「ニシユタカ」を対象として実施することとした。

焼酎蒸留残液には、片倉コープアグリ社製「ソイルサプリエキス」を供試した。本焼酎蒸留残液は麦焼酎の製造副産液を濃縮した特殊肥料で、肥料成分（窒素 3%，リン酸 1%，カリ 1%）のほか、アミノ酸（5～6%），有機酸（4～5%），腐植酸（4～5%），糖類（7～8%）などの有機物を含有しており，pH は 4.0 前後である。

鹿児島大学内圃場から採取した褐色低地土を 4 mm の篩に通し，N， P_2O_5 ， K_2O として各 0.08 g kg^{-1} を $(NH_4)_2SO_4$ ， $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ，KCl で施肥してコンテナ（W640 mm×D440 mm×H380 mm）に詰めた。鹿児島県農業開発総合センター内そうか病発生圃場から採取した 1～3 個のそうか病の病斑を有する種イモ（以下，罹病種イモ）を焼酎蒸留残液 5 倍希釈液に瞬間浸漬して風乾し，コンテナ内土壌に植付けた。対照として，罹病種イモを蒸留水に浸漬して植付ける区を設けた（無処理区）。また，植付け前の種イモとして浸漬処理前の種イモを供試した。各試験区 6 個の種イモを供試した。植付け前および植付け 15 日後に種イモ，30 日後に種イモおよびそこから形成したストロンの先端 5 mm を採取した。種イモは滅菌水で洗浄後，メスを使って病斑以外の部分から表皮を剥ぎ，2～3 mm 四方に細断した。ストロンは滅菌水で洗浄後 2～3 mm 四方に細断した。種イモ表皮は各試験区 2 個の種イモから得られた表皮を合わせて 1 セット

とし、3 セットを調製した。またストロンは種イモごとに形成された数が異な
ったため、各試験区 6 個の種イモから形成されたストロンを採取・混合し、こ
れを 4 セットに分割して調製した。

1-2. 種イモ表皮とストロンに共存する細菌の群集構造解析

種イモおよびストロンに共存する細菌の群集構造解析は、第 2 章 1-2 と同様
に実施した。すなわち、上記で調整した種イモ表皮およびストロンの細断試料
0.5 g (新鮮重) を凍結・粉碎した試料 0.1 g から DNA を抽出し、LNA オリゴに
よる PCR クランプ技術を適用した 16S rRNA (V3V4 領域) アンプリコンシーク
エンス解析を行った。

1-3. そうか病菌に対して拮抗作用を示す細菌の分離

上記で調製した植付け前の種イモ表皮の細断試料 0.2 g (新鮮重)、2.5 mm 径
ガラスビーズ 1.5 g、滅菌水 4.8 mL を 15 mL 遠沈管に入れてボルテックスで攪
拌し、表皮懸濁液を調製した。そうか病菌として *Streptomyces scabiei* S58 株 (鹿
児島県農業開発総合センターから分譲) を供試した。そうか病菌を ISP No.2 培
地 (酵母エキス, 4 g ; 麦芽エキス, 10 g ; グルコース, 4 g ; 寒天, 20 g L⁻¹ ; pH
7.3) (Shirling and Gottlieb, 1966) を用いて 30℃ で 7 日間スラント培養し、滅菌
水 6 mL を加えて白金耳で胞子を懸濁後、滅菌水で 10 倍希釈したものをそうか
病菌胞子懸濁液とした。表皮懸濁液を滅菌水で段階希釈した懸濁液 150 μL と
そうか病菌胞子懸濁液 150 μL を 1/2 ISP No.2 平板培地に滴下し、スプレッダー
で培地表面に均一に広げて 30℃ で培養した。そうか病菌に対して生育阻止円を
形成したコロニーを釣菌し、1/2 ISP No.2 平板培地を用いて菌株のアイソレー
ションを行った。

分離した菌株のそうか病菌に対する拮抗作用は次のように確認した。上記と

同様に調製したそうか病菌孢子懸濁液 150 μ L を ISP No.2 平板培地に滴下し、スプレッダーで培地表面に均一に広げてよく乾燥した。滅菌した爪楊枝を用いて、分離菌株の菌体を少量採取し、培地表面に 3 点植菌した。30℃で培養後、拮抗作用を調査した。

以下の通り、分離した菌株の系統解析を行った。分離菌株の 16S rRNA 遺伝子（約 1,400bp）をプライマー 5'-AGAGTTTGATCCTCAG-3' と 5'-AAGGAGGTGATCC-3'（大腸菌 *Escherichia coli* 遺伝子上においてそれぞれ 8-27 と 1525-1541 に位置する）を用いて PCR 増幅した（Winker and Woese, 1991）。PCR 産物を精製後、ダイレクトシーケンス解析によって塩基配列を決定し、BLAST 検索を行った。得られた分離菌株の配列は、近縁種の基準株の配列と共に CLUSTAL W ソフトを用いてマルチプルアラインメントを行い、系統解析ソフト MEGA 7 を用いて近隣接合法による系統樹を作成した（Kumar *et al.*, 2016）。また本研究で得られた分離菌株の 16S rRNA 遺伝子の配列は、DNA データバンクに Accession No. LC485466～LC485468 として登録した。

第 2 節 結果

2-1. 焼酎蒸留残液浸漬処理が種イモ表皮およびストロンに共存する細菌群集に及ぼす影響

無処理区の種イモ表皮およびストロンに共存する細菌群集のうち相対存在比が 1%以上の属について、その変動を図 3.1 に示した。植付け前、植付け 15 日後および 30 日後の種イモ表皮ならびに植付け 30 日後のストロンからは、合計 41 種類の属が検出された。そのうち 5%以上の存在比を示した主要な属は、*Arthrobacter* 属、*Rhodococcus* 属、*Streptomyces* 属、*Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属、*Ralstonia* 属、*Enterobacter* 属、*Erwinia* 属であった。*Arthrobacter* 属は植付け前の種イモでは 25%の存在比を示したが、植付け後の種イモとストロンでは 1%

以下に減少した。*Rhodococcus* 属は植付け前の種イモでは 6%の存在比を示したが、植付け後の種イモとストロンでは 1%以下に減少した。*Streptomyces* 属の存在比は植付け前の種イモでは 1%であり、植付け 15 日後には 5%に増加したが、植付け 30 日後の種イモおよびストロンでは 2%であった。*Bacillus* 属は試験期間を通して 15%以上の存在比を示し、植付け前の種イモでは 18%、植付け 15 日後には 24%に増加し、30 日後の種イモとストロンではそれぞれ 19%と 17%であった。*Paenibacillus* 属の種イモにおける存在比は、植付け前が 4%、植付け 15 日後が 9%、植付け 30 日後が 17%で徐々に増加する傾向を示したが、ストロンにおける存在比は 6%であった。*Ralstonia* 属は種イモにおける存在比は 1%以下であったのに対し、ストロンでは 10%であった。*Enterobacter* 属の種イモにおける存在比は、植付け前が 9%であり、植付け 15 日後、30 日後には 26%に増加したが、ストロンでは 1%以下であった。*Erwinia* 属は植付け前の種イモでは 7%の存在比を示したが、植付け後の種イモとストロンでは 1%以下に減少した。

焼酎蒸留残液浸漬処理による種イモ表皮およびストロンにおける細菌群集の変動を図 3.2 に示した。供試種イモ数が少なかったこともあり、t 検定により 5%水準で有意差を確認することができなかったため、無処理区と浸漬処理区における相対存在比の差が 5%以上の細菌属を、浸漬処理によって増加または減少したと判断した。植付け 15 日後の種イモ表皮（図 3.2.A）では、種イモおよびストロンに共存する主要属のうち無処理区と比較して焼酎蒸留残液浸漬処理によって存在比が増加したのは *Bacillus* 属と *Paenibacillus* 属で、*Bacillus* 属は 24%から 36%、*Paenibacillus* 属は 9%から 15%に増加した。一方、*Enterobacter* 属は 26%から 4%に減少した。その他の主要属および主要属以外の属の存在比については、焼酎蒸留残液浸漬処理による影響はみられなかった。焼酎蒸留残液浸漬処理による植付け 30 日後の種イモ表皮における細菌群集の変動を図 3.2 .B に示した。無処理区と比較して焼酎蒸留残液浸漬処理によって存在比が

増加した主要属は無く，減少したのは *Paenibacillus* 属で 17%から 7%に減少した。その他の主要属および主要属以外の属の存在比については，焼酎蒸留残液浸漬処理による影響はみられなかった。焼酎蒸留残液浸漬処理による植付け 30 日後のストロンにおける細菌群集の変動を図 3.2.C に示した。無処理区と比較して焼酎蒸留残液浸漬処理によって存在比が増加した主要属は *Bacillus* 属で，17%から 34%に増加した。その他の主要属および主要属以外の属の存在比については，焼酎蒸留残液浸漬処理による影響はみられなかった。

種イモ表皮およびストロンに共通して存在比が大きく，焼酎蒸留残液浸漬処理によって存在比が増加した *Bacillus* 属について，種レベルでの存在比を 100% の類似度で OTU 配列をクラスタリングすることにより解析した。その結果，種イモ表皮およびストロンに共存する *Bacillus* 属は，種レベルにおいて 9 種類で構成されていた。最も存在比の大きい OTU 配列は OTU31105 で，次いで OTU7136，OTU18575 であり，それぞれの近縁種は *Bacillus aryabhattai*（類似度 100%），*Bacillus vireti*（類似度 100%），*Bacillus funiculus*（類似度 99%）と推定された。これら上位 3 種類の *Bacillus* 属優占種について，焼酎蒸留残液浸漬処理による存在比の変動を比較した（図 3.3）。OTU31105 の種イモ表皮における存在比は植付け前が 12%で，植付け 15 日後の無処理区では 11%であったのに対し，焼酎蒸留残液浸漬処理区では 22%に増加した。植付け 30 日後には浸漬処理区における存在比も 10%に減少したものの，無処理区では 8%であった。植付け 30 日後におけるストロンの存在比は，無処理区では 4%であったのに対し浸漬処理区では 15%に増加した。OTU7136 の種イモ表皮における存在比は，植付け前が 3%であったのに対し，植付け 15 日後には無処理区で 7%，浸漬処理区で 6%に増加した。植付け 30 日後には無処理区では変動がみられなかったのに対し，浸漬処理区では 2%に減少した。植付け 30 日後のストロンにおける存在比は，試験区間に大きな差はみられず，無処理区で 5%，浸漬処理区で 4%

であった。OTU18575 の種イモ表皮における存在比は、植付け 15 日後、30 日後において試験区間に大きな差はみられなかった。植付け 30 日後のストロンにおける存在比は、無処理区で 2%であったのに対し、浸漬処理区では 10%に増加した。浸漬処理によって種イモ表皮およびストロンにおいて存在比が最も増加したのは OTU31105（近縁種；*Bacillus aryabhattai*）であった。

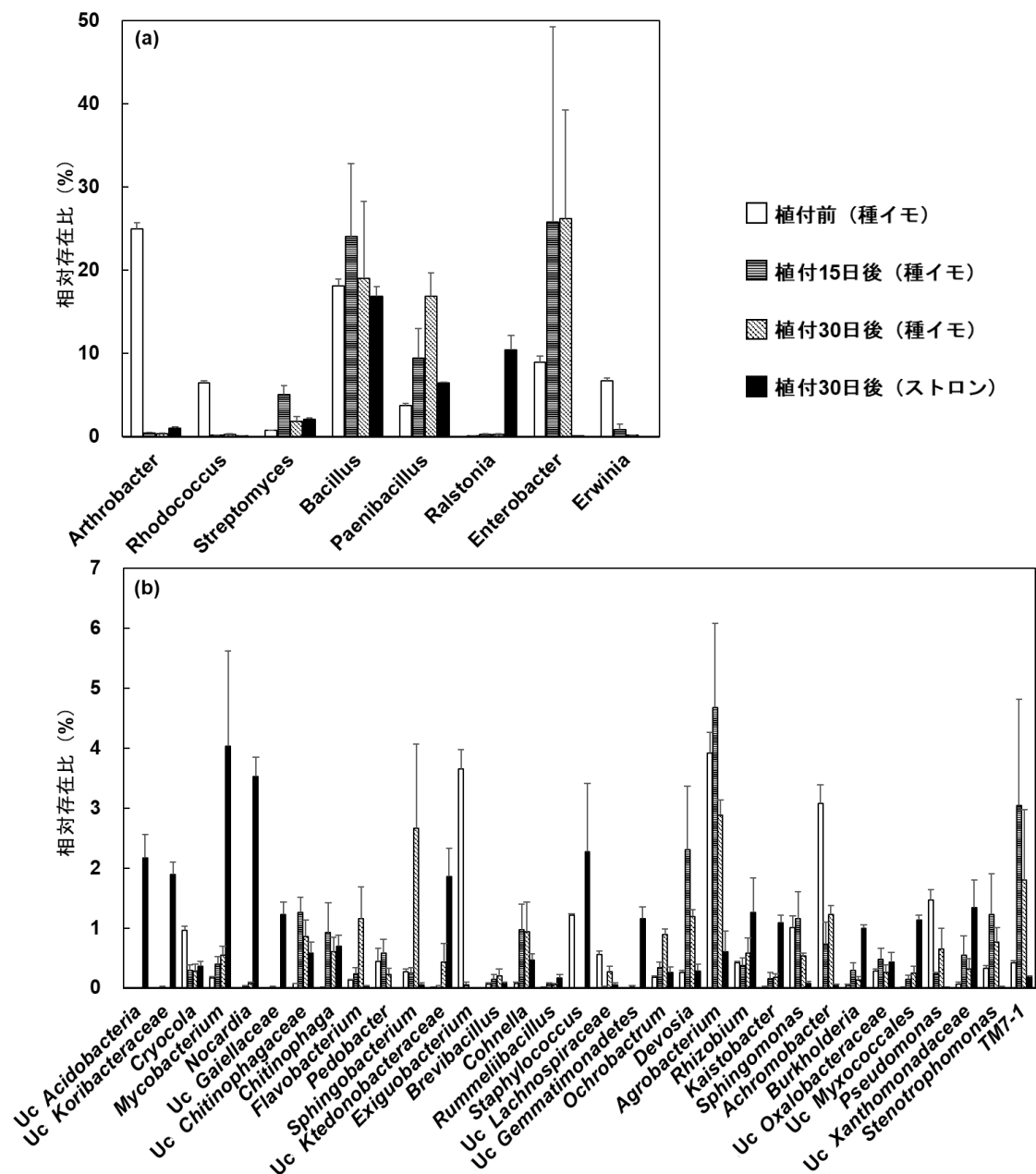


図 3.1 無処理区の種イモ表皮およびストロンにおける細菌群の存在比の変動
(a) 相対存在比が 5%以上の細菌属, (b) 5%未満の細菌属
エラーバーは標準誤差を示す。Uc=Unclassified (未分類)

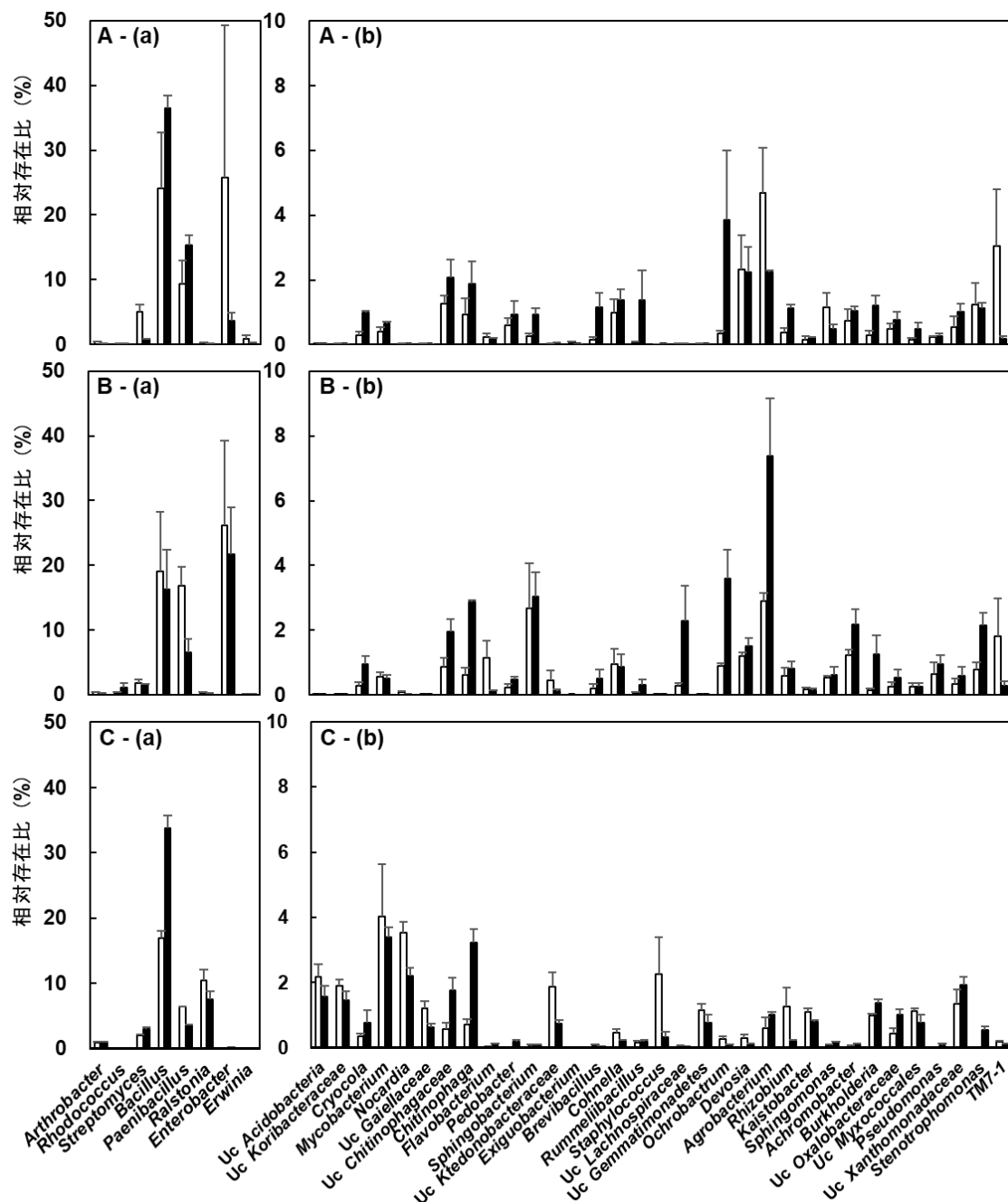


図 3.2 焼酎蒸留残液浸漬処理が種イモ表皮およびストロンにおける細菌群の存在比に及ぼす影響

A 植付 15 日後の種イモ表皮, B 植付 30 日後の種イモ表皮,

C 植付 30 日後のストロン

(a) 植付け前の種イモまたは無処理区で存在比 5%以上であった主要な細菌属

(b) 5%未満の細菌属

□無処理区, ■焼酎蒸留残液区, Uc=Unclassified (未分類)

エラーバーは標準誤差を示す。

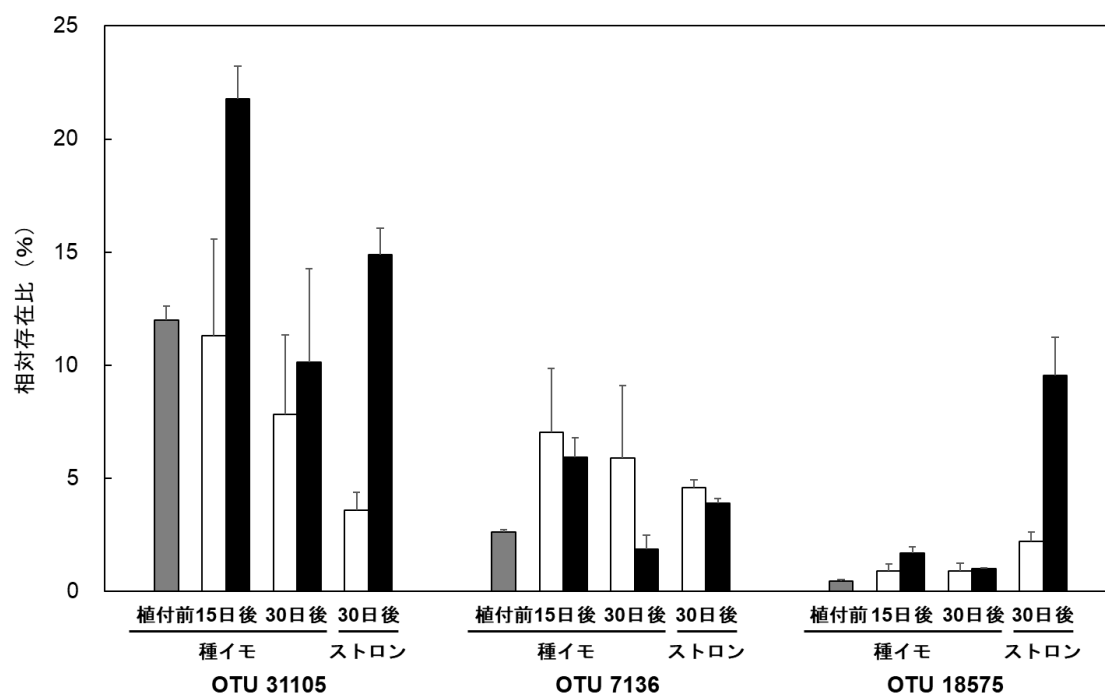


図 3.3 焼酎蒸留残液処理が種イモ表皮およびストロンにおける *Bacillus* 属優占種に及ぼす影響

各 OTU の推定近縁種は、OTU31105, *Bacillus aryabhattai* ; OTU7136, *Bacillus vireti* ; OTU18575, *Bacillus funiculus* である。

□ 無処理区, ■ 焼酎蒸留残液区
エラーバーは標準誤差を示す。

2-2. 種イモ表皮からのそうか病病原菌に対する拮抗細菌の探索

種イモ表皮懸濁液の 10^3 希釈液とそうか病菌 (*Streptomyces scabiei* S58 株) 胞子懸濁液を混合培養した培地上で、生育阻止円を形成する 3 つのコロニーを得た。これらのコロニーを釣菌してアイソレーションを行い、分離した 3 菌株 KST12, KST13, KST15 について、そうか病菌に対する拮抗性を確認した (図 3.4)。3 菌株のシーケンス解析により得られた 16S rRNA 遺伝子 (約 1400 bp) の配列を BLAST 検索した結果、いずれも *Bacillus* 属に分類された。そこで主要な数種の *Bacillus* 属細菌とともに近隣接合法による系統樹を作成した結果 (図 3.5), 分離した 3 菌株は全て *Bacillus aryabhattai* B8W22^T が最近縁種であることが判明した。

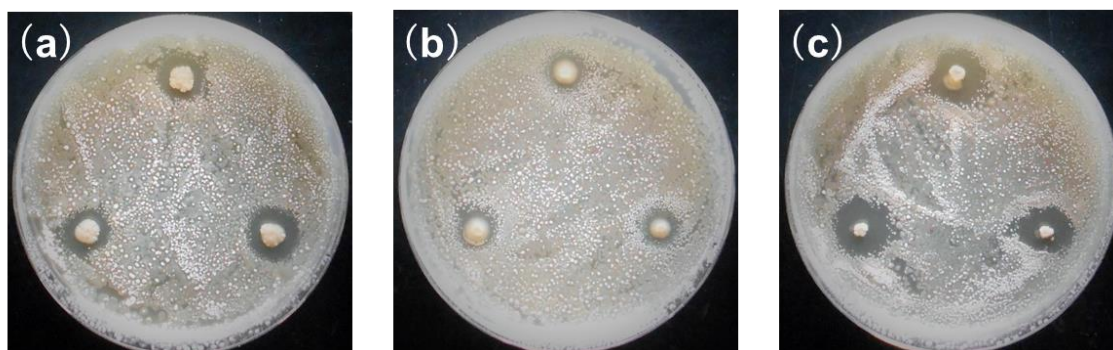


図 3.4 種イモ表皮から分離した細菌のそうか病菌に対する拮抗性
(a) KST12, (b) KST13, (c) KST15

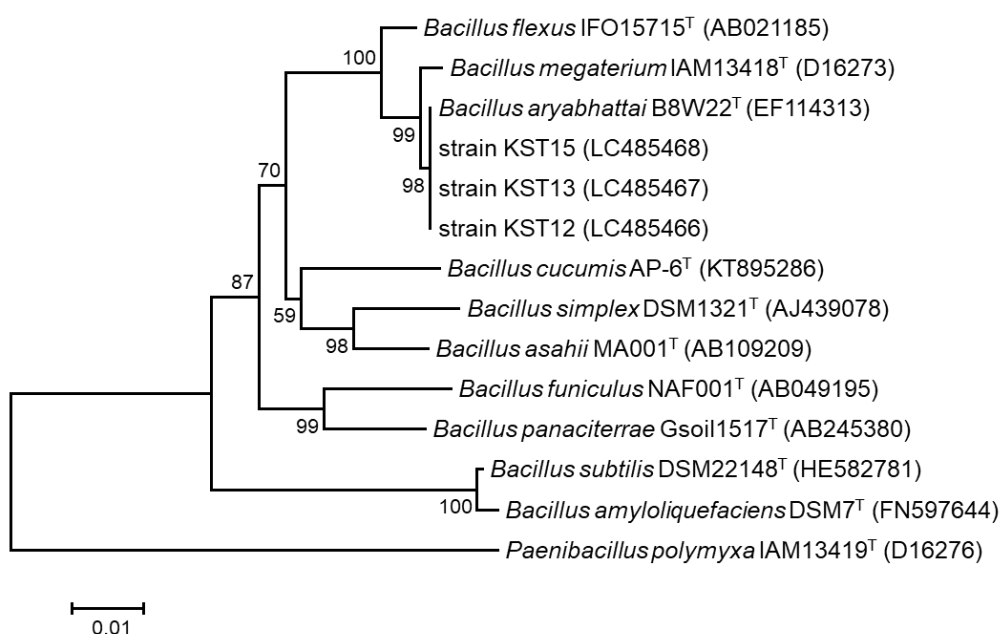


図 3.5 種イモ表皮から分離した細菌 KST12, KST13, KST15 の
16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹

対照は全て基準株の配列を, アウトグループは *Paenibacillus polymyxa* IAM13419^T を用いた。括弧内に Accession No.を, 分岐にブートストラップ値を示した。

第3節 考察

焼酎蒸留残液を用いたジャガイモの種イモ浸漬処理は、罹病種イモ上のそうか病菌密度を減少させることで、そうか病の種イモ伝染を抑制することが報告されている(富濱ら, 2018)。本研究では、焼酎蒸留残液浸漬処理が種イモ表皮, そこから形成したストロンに共存する細菌群集構造に与える影響を解析し、そうか病菌密度減少との関係性を調査した。

種イモ表皮およびストロンにおける共存細菌群集構造は、無処理区においてもジャガイモの生育段階や部位によって大きく変動した(図 3.1)。植付け前の種イモ表皮に共存する細菌の優占属は *Arthrobacter* 属, *Bacillus* 属, *Enterobacter* 属, *Erwinia* 属, *Rhodococcus* 属であった。*Arthrobacter* 属, *Bacillus* 属, *Rhodococcus* 属は開花期の新生塊茎 (Kobayashi *et al.*, 2015) や貯蔵後の塊茎表皮 (Sturz *et al.*, 1999) から検出されており, *Erwinia* 属にはジャガイモの塊茎に黒あし病を引き起こす病原細菌種も含まれる。また *Enterobacter* 属は、土壌や水、動物の腸内、植物の根圏や根面、組織内など自然界に普遍的に存在しており、なかには窒素固定を行う種も含まれる。このことから、これらの細菌はジャガイモ塊茎と親和性が高く、さらに植付けまでの貯蔵中にも安定して塊茎表皮に共存していると推察された。植付け後の種イモにおける優占属は *Bacillus* 属, *Paenibacillus* 属, *Enterobacter* 属であり、ストロンにおける優占属は *Bacillus* 属と *Ralstonia* 属であった。種イモとストロンで共通して優占した *Bacillus* 属は、世界各地の様々な植物の根圏土壌や植物組織内から検出されているが (Misaghi and Donndelinger, 1990), ジャガイモでは根圏土壌と比較して塊茎周辺土壌において検出割合が高いとの報告がある (Weinert *et al.*, 2010b)。根圏土壌と塊茎周辺土壌における細菌群集構造の違いは栄養源の違いによるものと考えられ、根圏における主な栄養源は根滲出物であるのに対し、塊茎周辺で利用可能な栄養は主に塊茎表皮の傷口や亀裂に由来した物質である (Weinert *et al.*, 2010a)。ジ

ジャガイモの生育中にはその周辺土壌で細菌が増殖し、根、ストロン、新生塊茎などの地下組織や根圏土壌に定着することが知られており、幼苗期における根表面に共存する細菌の密度は 10^8 CFU g⁻¹（新鮮重）であるのに対し、塊茎形成期の根表面および塊茎表面では 10^{10} CFU g⁻¹（新鮮重）に増加する（Weinert *et al.*, 2010a）。また種イモに共存している細菌の一部は収穫時まで種イモに残存し、一部は周辺土壌や他の地下組織に定着する（Bahme and Schroth, 1987）。このことから、ジャガイモの塊茎表面では生育に応じて特定の細菌が増殖、定着すると考えられ、その中には種イモに共存している *Bacillus* 属も含まれると考えられる。他にもジャガイモ塊茎から *Bacillus* 属を検出した報告は多く、Kobayashi *et al.*（2015）は様々な品種の開花期における塊茎内から、Boer and Copeman（1974）は、貯蔵後の塊茎内から、Weinert *et al.*（2010a）は収穫期の塊茎表皮および塊茎周辺土壌から、Sturz *et al.*（1999）は貯蔵中の塊茎表皮から *Bacillus* 属細菌を検出している。また第 2 章では、茨城県でポット栽培により採取した複数品種の種イモ表皮において、*Bacillus* 属細菌が高い存在比で共存していることが明らかとなった。さらに、種イモに共存する *Bacillus* 属細菌の一部は新生塊茎へと伝播するとの報告もある（Buchholz *et al.*, 2019）。鹿児島県の土壌を用いて実施した本試験においても、植付け前後の種イモ表皮およびそこから形成されたストロンにおいて、*Bacillus* 属が高い存在比で検出されたことから、*Bacillus* 属はジャガイモの品種や栽培環境に関わらず、栽培期間を通して安定的に塊茎に共存していることが示唆された。

焼酎蒸留残液を用いた種イモ浸漬処理により、種イモ表皮およびそこから形成したストロンに共存する細菌群集構造は変化した（図 3.2）。浸漬処理により、植付け 15 日後の種イモ表皮では *Bacillus* 属と *Paenibacillus* 属の存在比が増加し、*Enterobacter* 属の存在比が減少した（図 3.2.A）。植付け 30 日後の種イモ表皮では対照の種イモに比べ *Paenibacillus* 属の存在比が減少し（図 3.2.B）、スト

ロンでは *Bacillus* 属の存在比が増加した（図 3.2.C）。*Bacillus* 属は、種イモ表皮およびストロンの両方に共通して、優占属の一つであるとともに焼酎蒸留残液浸漬処理によって最も存在比が増加した。

そこで *Bacillus* 属について詳細に調査するため、OTU 配列を 100%の類似度でクラスタリングした種レベルでの存在比の変動を解析した（図 3.3）。植付け前の種イモ表皮に共存する *Bacillus* 属の中で最も存在比の大きい OTU 配列は OTU31105 で、次いで OTU7136, OTU18575 であり、それぞれの近縁種は *Bacillus aryabhatai*（類似度 100%）、*B. vireti*（類似度 100%）、*B. funiculus*（類似度 99%）であった。焼酎蒸留残液浸漬処理により種イモ表皮およびストロンで最も存在比が増加したのは、いずれも OTU31105 であった。植物の共存細菌群の一部は植物体内で異なる器官に伝播する（Bai *et al.*, 2015）。種イモに共存する細菌群についても、その一部が新生塊茎へと伝播することが知られている（Buchholz *et al.*, 2019）。焼酎蒸留残液浸漬処理による種イモ表皮上における *Bacillus* 属の増加、その中でも特に存在比が大きい OTU31105 の増加は、種イモから形成されたストロンにまで伝播する可能性が示された。

これまでジャガイモ塊茎においてそうか病菌に対する拮抗細菌の存在が報告されている（Hiltunen *et al.*, 2009 ; Lin *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 1995）ことから、本研究においても種イモ表皮における拮抗細菌の分離を試みたところ、そうか病菌（*Streptomyces scabiei* S58 株）に対し拮抗作用を示す細菌が 3 菌株分離された（図 3.4）。分離菌株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いて系統解析を行った結果、最も近縁な種はいずれも *B. aryabhatai* であった（図 3.5）。また、焼酎蒸留残液浸漬処理によって種イモおよびストロンで存在比が増加した OTU31105 の配列と 3 菌株の 16S rRNA 遺伝子配列は完全に一致した。さらに第 2 章においては、ジャガイモの品種に因らず、*B. aryabhatai* が種イモ表皮上に優占的に共存している可能性が示されている。以上のことから、種イモ表皮

にはそうか病菌に対して拮抗性を示す *B. aryabhatai* に近縁の種が高頻度で共存しており，焼酎蒸留残液浸漬処理によってその存在比はさらに増加し，これがストロンにも伝播することにより，種イモ表皮上のそうか病菌密度の減少および新生塊茎へのそうか病の伝染抑制に関与しているものと推察された。

塊茎周辺土壌の *Bacillus* 属の存在比とそうか病の発病度の間には負の相関関係があることが知られており (Shi *et al.*, 2019)，そうか病菌に対して拮抗作用を示す *Bacillus* 属細菌の報告は多い (Han *et al.*, 2005 ; Lin *et al.*, 2018 ; Meng *et al.*, 2012)。しかし，*B. aryabhatai* によるそうか病菌に対する拮抗作用に関する報告は本研究が初めてである。さらに 16S rRNA 遺伝子による系統解析の結果 (図 3.5) から，拮抗菌としての報告が多い *B. amyloliquefaciens* (Lin *et al.*, 2018 ; Meng *et al.*, 2012) と *B. aryabhatai* は系統的に大きく離れた種であることが判明した。よって，これら既知の拮抗性 *Bacillus* 属細菌と本研究で分離した *B. aryabhatai* の特性は異なる可能性も示唆される。*B. aryabhatai* は世界各地の土壌で検出されており，各種分解酵素やフォスファターゼを生成し，様々な炭素化合物やアミノ酸を資化することが報告されている (Shivaji *et al.*, 2009)。さらに活性酸素や塩類ストレスに対する耐性，各種植物ホルモン生成能，共存作物に対する生育促進効果や病害抑制効果などが知られている (Bhattacharyya *et al.*, 2017 ; Lee *et al.*, 2012 ; Park *et al.*, 2017 ; Ramesh *et al.*, 2013 ; Shivaji *et al.*, 2009 ; Yan *et al.*, 2016)。*B. aryabhatai* は強いストレス耐性により，焼酎蒸留残液浸漬処理によって pH 等の環境が大きく変化した種イモ表皮上でも生存し，かつ付加された有機栄養分を資化することでその存在比を増加させ，さらに増加した *B. aryabhatai* による拮抗作用が種イモ表皮上のそうか病菌密度の減少に関与したと推察される。

第4章 鹿児島県における慣行殺菌剤および焼酎蒸留残液による 浸漬処理が種イモ共存細菌群集構造に与える影響

第1節 材料および方法

1-1. 種イモの採取と試料調整

焼酎蒸留残液として片倉コープアグリ社製「ソイルサプリエキス」を供試した。種イモ消毒用の化学合成殺菌剤としては、そうか病防除を目的として一般的に使用されているフルアジナム SC（商品名；フロンサイド SC，石原バイオサイエンス社製）（以下，フルアジナム）を用いた。

鹿児島県農業開発総合センター内において，クロルピクリン（商品名；クロピクテープ，三井化学アグロ社製）を用いて土壌消毒した試験圃場より採取した塊茎（品種；ニシユタカ）を種イモとして供試した。種イモを流水で洗浄後，製品取り扱い説明書の希釈倍率に従い，焼酎蒸留残液 5 倍希釈液または殺菌剤 100 倍希釈液に瞬間浸漬後，風乾した。対照として蒸留水に浸漬する区（無処理区）を設けた。同センター内のそうか病発生圃場（黒ボク土）に，各処理を施した種イモを株間約 30cm 間隔で植付けた。試験は 3 反復で行い，種イモ浸漬処理を 2016 年 9 月 8 日に実施し，2016 年 9 月 13 日に植付けた。植付け直前に，化学肥料（商品名；バレイショ配合 14 号，JA 物流かごしま社製，窒素：リン酸：カリ=14%，14%，14%）を 100 kg/10a 全面全層施用した。植付け 7 日後，14 日後，28 日後に，それぞれ各試験区から 6 個の種イモを採取した。処理前の種イモについても同様に，6 個の種イモを供試した。採取した種イモは滅菌水で洗浄後，メスを使って表皮を剥ぎ，2～3 mm 四方に細断した。各試験区 2 個の種イモから得られた表皮を合わせて 1 セットとし，3 セットを調製した。

1-2. 種イモ表皮に共存する細菌の生菌数測定および群集構造解析

種イモに共存する細菌数の測定には、1/10 Trypticase Soy Agar (TSA) 培地（ペプトン，1.7g；Soytone (Difco)，0.3g；グルコース，0.25g；K₂HPO₄，0.25g；NaCl，0.5g；寒天，20g L⁻¹；pH7.3）を用いた希釈平板法を実施した。上記で調製した種イモ表皮の細断試料 0.5g（新鮮重），2.5mm 径ガラスビーズ 1.5g，滅菌水 4.5ml を 15ml 遠沈管に入れてボルテックスで攪拌したものを，生菌数測定用の 10⁻¹ 希釈液とした。滅菌水で段階希釈して 10⁻⁶ 希釈液まで作製し，各試料希釈液を 1/10 TSA 培地に塗抹接種した。30℃で 7 日間培養後，出現したコロニーを計数した。

種イモに共存する細菌の群集構造解析は，第 2 章 1-2 と同様に実施した。すなわち，上記で調整した種イモ表皮の細断試料 0.5 g（新鮮重）を液体窒素下で凍結・粉碎した試料 0.1 g から DNA を抽出し，LNA オリゴによる PCR クランプ技術を適用した 16S rRNA（V3V4 領域）アンプリコンシーケンス解析を行った。また，QIIME にて UniFrac distance 法（Lozupone and Knight, 2005）によるサンプル間の細菌叢の距離を算出し，主座標分析(PCoA)を行った。

1-3. 統計学的評価

各サンプリング時期における種イモの共存細菌群集構造を試験区間で比較するために，アンプリコンシーケンス解析より得られた各細菌グループの相対存在比について Tukey-Kramer 法を用いた多重比較検定を行った。また，植付け後の種イモにおける一定期間の共存細菌群集構造を試験区間で比較するため，植付け 7 日後，14 日後，28 日後の全データを対象に Steel-Dwass 法を用いた多重比較検定を行った。解析は，統計解析アドインソフト（エクセル統計 BellCurve for Excel Ver.3.21，社会情報サービス）を用いて行った。

第 2 節 結果

種イモ表皮に共存する細菌のコロニー数の推移を図 4.1 に示した。処理前の種イモには 1.1×10^5 CFU gFW⁻¹ の細菌が共存していた。植付け後のコロニー数を試験区間で比較すると、無処理区では植付け 7 日後には 3.0×10^7 CFU gFW⁻¹ まで増加し、その後は 28 日までオーダーが変わらなかった。焼酎蒸留残液区におけるコロニー数は、いずれの採取時期においても無処理区と同等であった。一方、フルアジナム区では植付け 7, 14 日後のコロニー数はそれぞれ 2.7×10^6 , 6.5×10^6 CFU gFW⁻¹ で無処理区および焼酎蒸留残液区と比較して 1 オーダー少なく、28 日後に 1.2×10^7 CFU gFW⁻¹ まで増加して他 2 試験区と同等となった。

次に、アンプリコンシーケンス解析より得られたデータを用いて、種イモ共存細菌群集の主座標分析を行った（図 4.2）。無処理区の細菌群集構造は、植付け後に大きく変化し、経時的にも変化した。焼酎蒸留残液区の細菌群集構造の変動パターンは無処理区と類似しており、経時的に無処理区の群集構造に近接した。一方、殺菌剤区の細菌群集構造は、植付け後の変化および経時的変化が相対的に小さく、植付け 28 日後においても他 2 試験区の群集構造とは大きく異なることが確認された。

そこでフルアジナムおよび焼酎蒸留残液が種イモ共存細菌に与える影響を評価するために、植付け後の共存細菌群集構造の推移を目レベルで比較した。処理前および植付け後の種イモからは、合計 18 種類の目が検出された（図 4.3）。そのうち 15%以上の存在比を示した主要な目は、植付け前の種イモでは *Bacillales* 目と *Spirobacillales* 目の 2 目であり、植付け後の種イモでは *Actinomycetales* 目、*Bacillales* 目、*Burkholderiales* 目、*Enterobacteriales* 目の 4 目であった。植付け後の主要目について存在比の推移を試験区間で比較すると、*Actinomycetales* 目は、処理前の種イモでは 13%の存在比を示し、無処理区では植付け後も 12%以上の存在比を示した。焼酎蒸留残液区においても植付け 7 日

から 28 日後まで 15%以上の存在比を示し、*Actinomycetales* 目の存在比に与える影響は認められなかった。一方、フルアジナム区では植付け 7 日後に 1%に減少し、その後経時的に増加したものの 28 日後においても 6%であり、植付け 7 日から 28 日後までの間、他 2 試験区と比較して有意に存在比が減少した。

Bacillales 目は、処理前の種イモにおける存在比は 31%で、共存細菌の中で存在比が最大であった。無処理区における *Bacillales* 目の存在比は、植付け 7 日後に 9%に減少したが、14 日後は 28%、28 日後は 33%であり、経時的に増加する傾向がみられた。焼酎蒸留残液区における *Bacillales* 目の存在比の変動は無処理区と類似しており、植付け 7 日後には 17%に減少したが、14 日後に 22%、28 日後に 25%に増加した。*Bacillales* 目は、無処理区および焼酎蒸留残液区の植付け 14、28 日後の種イモにおいて、最大の存在比を示す共存細菌であった。一方、フルアジナム区では植付け 7、14 日後の存在比は 5%であり、28 日後に 18%まで増加したものの他 2 試験区と比較して低く推移し、植付け 7 日後には焼酎蒸留残液区と、14 日後および 28 日後には無処理区と比較して有意に減少した。

Burkholderiales 目は、処理前の種イモにおける存在比は 5%であったが、無処理区では植付け後に増加し、植付け 7、14、28 日後の存在比は 11%、18%、9%であった。焼酎蒸留残液区およびフルアジナム区においても *Burkholderiales* 目の存在比は増加し、植付け 7、14、28 日後の存在比はそれぞれ 15%、16%、13%および 23%、47%、21%であり、特にフルアジナム区において存在比が大きかった。フルアジナム区の植付け 14、28 日後の種イモにおいては、共存細菌の中で *Burkholderiales* 目の存在比が最大であり、無処理区に対して有意に存在比が増加した。

Enterobacteriales 目は、処理前の種イモにおける存在比は 1%であり、無処理区では植付け 7 日後には 52%に大きく増加したものの、14 日後には 5%、28 日後には 1%に減少した。フルアジナム区および焼酎蒸留残液区においても *Enterobacteriales* 目の存在比は植付け 7 日後に大きく増加した後、14、28 日後

に減少し、それぞれ 56%, 7%, 9%および 28%, 9%, 6%で推移し、試験区間に有意差は認められなかった。全ての試験区において、植付け 7 日後の最優占目は *Enterobacteriales* 目であった。

フルアジナムおよび焼酎蒸留残液が植付け後の種イモ共存細菌群集構造に与える影響は、主要な細菌目に対しても長期的に大きく異なることが認められた。そこで、各処理が一定期間に渡って細菌叢に与える影響を比較するために、植付け 7, 14, 28 日後の全サンプルを用いて多重比較検定を行った（表 4.1）。無処理区と焼酎蒸留残液区間に有意差が認められた細菌目は無かった。フルアジナム区においては、無処理区に対して有意に存在比が増加した主要目は *Burkholderiales* 目であり、有意に減少した主要目は *Actinomycetales* 目と *Bacillales* 目であった。

各資材が種イモ共存細菌に与える影響をさらに詳細に比較するため、存在比が 15%以上の目グループに属する主要な細菌属について、植付け後の存在比を用いて多重比較検定を行った（表 4.2）。*Actinomycetales* 目に属する細菌属は 6 種類検出されたが、そのうち無処理区に対して焼酎蒸留残液区で有意差がある細菌属は無かった。一方、フルアジナム区においては *Terracoccus* 属、*Cryocolla* 属、*Microbacterium* 属、*Arthrobacter* 属、*Mycobacterium* 属の存在比が無処理区に対して有意に小さかった。*Bacillales* 目に属する細菌属は 4 種類検出されたが、そのうち無処理区に対して焼酎蒸留残液区で有意差がある細菌属は無かった。一方、フルアジナム区においては *Bacillus* 属、*Cohnella* 属、*Paenibacillus* 属の存在比が無処理区に対して有意に小さかった。*Burkholderiales* 目に属する細菌属は 8 種類検出されたが、そのうち *Achromobacter* 属と *Pandoraea* 属の存在比は焼酎蒸留残液区で無処理区に対して有意に大きかった。一方、フルアジナム区では *Paraburkholderia* 属と *Ralstonia* 属の存在比が無処理区に対して有意に

大きかった。*Enterobacteriaceae* 目に属する細菌属は 5 種類検出されたが、試験区間で有意差が認められた細菌属は無かった。

試験区間で有意差が認められた細菌属の中で最も変化の大きい *Bacillus* 属については、OTU 配列を 100%の類似度でクラスタリングした種レベルにおける存在比の変動を比較した。種イモ表皮に共存する *Bacillus* 属の細菌種は、7 種類で構成されていた。そのうち存在比が大きい上位 3 種類の *Bacillus* 属優占種について、存在比の変動を図 4.4 に示した。*Bacillus* 属の中で存在比が最も大きい OTU 配列は OTU33302 で、次いで OTU27418, OTU4090 であり、それぞれの近縁種は *B. aryabhatai* (類似度 100%), *B. jeddahensis* (類似度 99%), *B. shackletonii* (類似度 99%) と推定された。無処理区における OTU33302 の存在比は、植付け 7 日後に 1%であったのに対し、14 日後に 8%に増加し、28 日後は 3%であった。焼酎蒸留残液区では、植付け 28 日後まで 2%から 3%で一定の存在比で共存しており、無処理区に対して有意差は認められなかった。一方、フルアジナム区における存在比は植付け 28 日後まで 1%未満で他 2 試験区と比較して低く推移し、植付け 14 日後には無処理区に対して有意に減少した。OTU27418 の存在比は、無処理区では植付け 7 日後に 1%であったのに対し、14 日後に 4%、28 日後に 6%であり、経時的に増加する傾向がみられた。焼酎蒸留残液区においても無処理区と同様の傾向がみられ、植付け 7, 14, 28 日後の存在比はそれぞれ 2%, 3%, 4%であった。一方、フルアジナム区における存在比は植付け 28 日後まで 1%前後で他 2 試験区と比較して低く推移し、植付け 14 日後および 28 日後には無処理区に対して有意に減少した。OTU4090 の存在比は、無処理区では植付け 7 日後に 1%であり、14 日後に 5%に増加したものの 28 日後は 1%であった。焼酎蒸留残液区における存在比は植付け 7, 14, 28 日後にそれぞれ 2%, 5%, 3%であり、植付け 7 日後および 28 日後において無処理区に対して有意に増加した。一方、フルアジナム区における存在比は植付け 28 日

後まで 1%未満であり，他 2 試験区と比較して低く推移した。各処理が種イモ共存細菌叢に与える影響は *Bacillus* 属優占種に対しても長期的に異なることが認められた。そこで一定期間の影響を比較するために，植付け後の存在比を用いて多重比較検定を行った（表 4.3）。その結果，種イモに共存する *Bacillus* 属優占 3 種全てにおいて，焼酎蒸留残液は大きな影響を与えないのに対し，フルアジナムは有意に存在比を減少させることが示された。

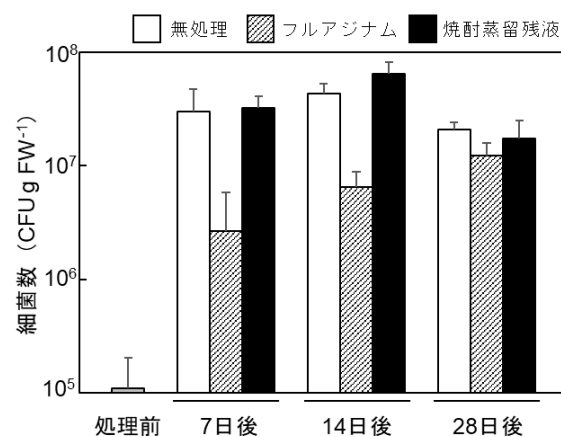


図 4.1 種イモ表皮に共存する細菌数の推移
エラーバーは標準誤差を示す。

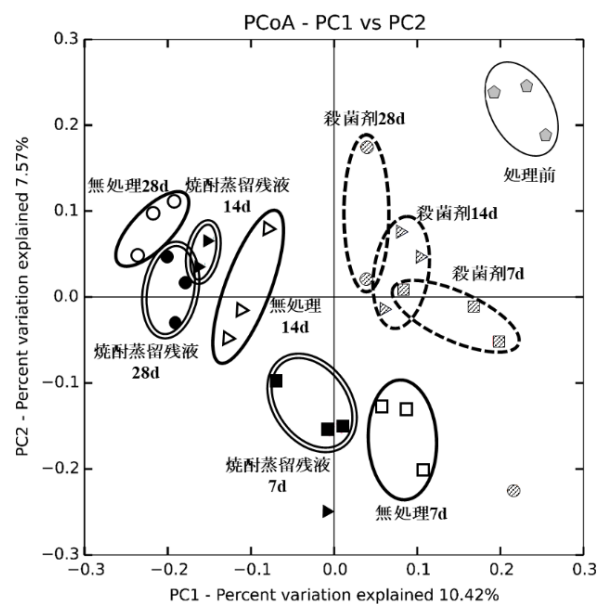


図 4.2 アンプリコンシーケンス解析に基づく，
種イモ表皮に共存する細菌群集の主座標分析

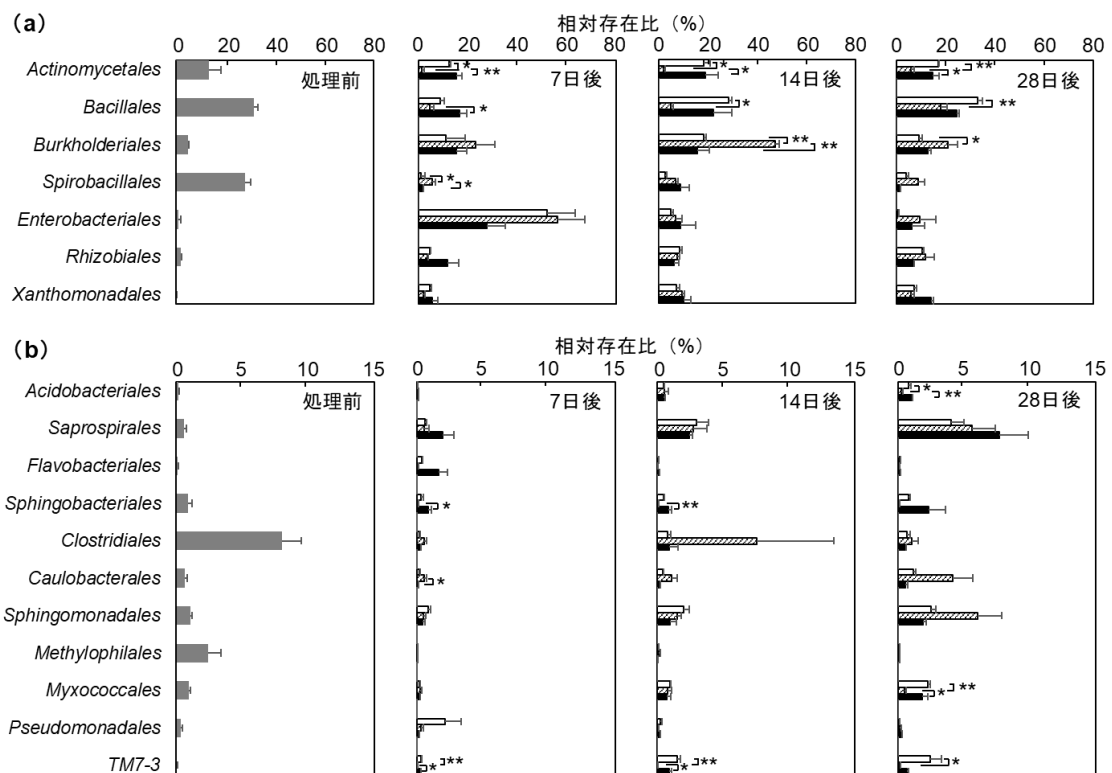


図 4.3 目レベルにおける種イモ表皮共存細菌の群集構造変化

(a) 相対存在比が 10%以上の細菌目, (b) 10%未満の細菌目

□, 無処理区; ▨, フルアジナム区; ■, 焼酎蒸留残液区

エラーバーは標準誤差を示す。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ で有意差があることを示す (Tukey-Kramer Test)。

表 4.1 目レベルにおける，
各処理が種イモ表皮共存細菌群に及ぼす影響比較

	相対存在比 (%) [*]		
	無処理	殺菌剤	焼酎蒸留残液
<i>Acidobacteriales</i>	0.44 (0.12)	0.29 (0.12)	0.54 (0.15)
<i>Actinomycetales</i>	15.76 (1.39) a [†]	2.98 (0.82) b	16.13 (1.95) a
<i>Saprospirales</i>	2.53 (0.64)	2.97 (0.94)	4.02 (1.14)
<i>Flavobacteriales</i>	0.16 (0.06) a	0.02 (0.01) b	0.63 (0.32) a
<i>Sphingobacteriales</i>	0.53 (0.09) a	0.05 (0.02) b	1.34 (0.45) a
<i>Bacillales</i>	23.39 (3.86) a	9.06 (2.40) b	21.09 (2.61) a
<i>Clostridiales</i>	0.54 (0.13)	3.04 (2.03)	0.56 (0.21)
<i>Caulobacteriales</i>	0.58 (0.15) ab	1.94 (0.72) a	0.28 (0.09) b
<i>Rhizobiales</i>	7.81 (0.95)	7.56 (1.57)	8.15 (1.67)
<i>Sphingomonadales</i>	1.78 (0.31)	2.69 (1.01)	1.08 (0.27)
<i>Burkholderiales</i>	12.78 (1.54) b	30.38 (4.96) a	14.53 (1.91) ab
<i>Methylophilales</i>	0.04 (0.02)	0.05 (0.04)	0.01 (0.00)
<i>Myxococcales</i>	1.14 (0.30)	0.50 (0.13)	0.91 (0.28)
<i>Spirobacillales</i>	2.49 (0.52) b	6.99 (1.00) a	3.89 (1.58) ab
<i>Enterobacteriales</i>	19.11 (8.51)	24.07 (8.86)	14.13 (4.66)
<i>Pseudomonadales</i>	0.81 (0.48)	0.16 (0.07)	0.16 (0.03)
<i>Xanthomonadales</i>	6.26 (0.87)	5.75 (1.18)	9.88 (1.61)
TM7-3	1.42 (0.40) a	0.04 (0.02) b	0.59 (0.12) a

^{*} 各試験区植付け後の 9 サンプルの平均値（標準誤差）を示す。

[†] 異文字間に有意差があることを示す（Steel-Dwass 多重検定， $P<0.05$ ）。

表 4.2 属レベルにおける，
各処理が種イモ表皮共存細菌群に及ぼす影響比較

	相対存在比 (%) [*]		
	無処理	フルアジナム	焼酎蒸留残液
Actinomycetales 目[†]			
<i>Terracoccus</i>	0.55 (0.17) a [‡]	0.02 (0.01) b	0.24 (0.08) a
<i>Cryocolla</i>	4.46 (0.52) a	0.22 (0.08) b	8.33 (1.38) a
<i>Microbacterium</i>	0.74 (0.12) a	0.03 (0.01) b	1.19 (0.15) a
<i>Arthrobacter</i>	4.62 (0.94) a	0.62 (0.21) b	3.35 (1.15) a
<i>Mycobacterium</i>	0.76 (0.25) a	0.03 (0.01) b	0.73 (0.16) a
<i>Streptomyces</i>	1.85 (0.61)	0.67 (0.30)	0.57 (0.22)
Bacillales 目			
Uc <i>Bacillaceae</i>	0.36 (0.09)	2.62 (1.80)	0.56 (0.17)
<i>Bacillus</i>	12.67 (2.44) a	3.87 (1.38) b	11.22 (1.52) a
<i>Cohnella</i>	1.18 (0.31) a	0.06 (0.01) b	1.50 (0.33) a
<i>Paenibacillus</i>	7.57 (1.62) a	1.61 (0.29) b	7.09 (1.13) a
Burkholderiales 目			
Uc <i>Alcaligenaceae</i>	0.46 (0.19)	0.27 (0.11)	0.72 (0.27)
<i>Achromobacter</i>	1.36 (0.42) b	1.50 (0.54) b	3.06 (0.58) a
<i>Paraburkholderia</i>	1.49 (0.26) b	8.29 (1.94) a	1.19 (0.23) b
<i>Burkholderia</i>	5.56 (1.03)	10.11 (1.88)	4.45 (0.66)
<i>Pandoraea</i>	0.39 (0.12) b	0.36 (0.09) b	1.19 (0.11) a
Uc <i>Oxalobacteraceae</i>	1.40 (0.31)	2.08 (0.49)	1.18 (0.22)
<i>Cupriavidus</i>	0.14 (0.02)	0.49 (0.25)	0.25 (0.08)
<i>Ralstonia</i>	1.60 (0.32) b	6.98 (1.44) a	2.06 (0.59) ab
Enterobacteriales 目			
<i>Pectobacterium</i>	0.11 (0.05)	2.44 (2.23)	0.13 (0.04)
<i>Citrobacter</i>	0.19 (0.10)	0.03 (0.01)	0.51 (0.31)
<i>Enterobacter</i>	9.44 (4.62)	17.94 (8.75)	12.43 (4.03)
<i>Erwinia</i>	8.88 (5.12)	2.95 (2.57)	0.48 (0.23)
<i>Serratia</i>	0.32 (0.15)	0.56 (0.29)	0.49 (0.28)

* 各試験区植付け後の 9 サンプルの平均値（標準誤差）を示す。

† 存在比 15%以上の優占目に属する細菌属のみを抜粋した。

Uc = Unclassified（未分類）

‡ 異文字間に有意差があることを示す（Steel-Dwass 多重検定， $P < 0.05$ ）。

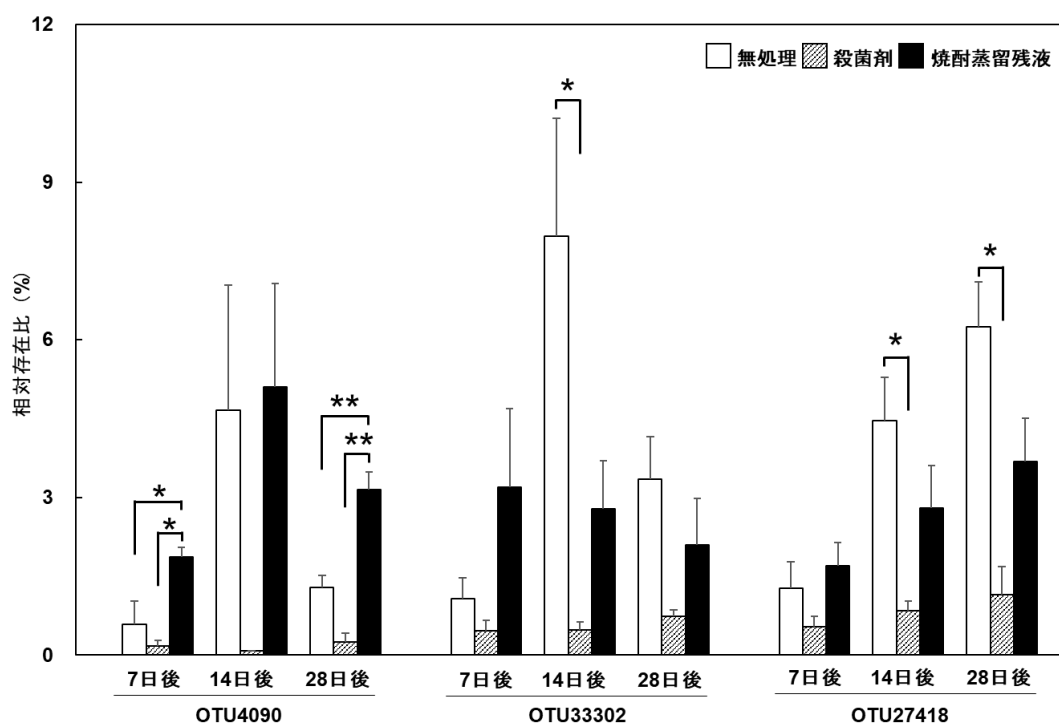


図 4.4 *Bacillus* 属優占種の存在比の変動

各 OTU の推定近縁種は、OTU4090, *Bacillus shackletonii* ; OTU33302, *Bacillus aryabhattai* ; OTU27418, *Bacillus jeddahensis* である。

エラーバーは標準誤差を示す。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ で有意差があることを示す (Tukey-Kramer Test)。

表 4.3 各処理が種イモ表皮に共存する *Bacillus* 属優占種の存在比に及ぼす影響比較

	相対存在比 (%)*		
	無処理	フルアジナム	焼酎蒸留残液
OTU4090	2.18 (0.94) a†	0.17 (0.06) b	3.37 (0.74) a
OTU33302	4.13 (1.23) a	0.56 (0.09) b	2.68 (0.59) a
OTU27418	3.99 (0.82) a	0.85 (0.19) b	2.72 (0.46) a

* 各試験区植付け後の 9 サンプルの平均値 (標準誤差) を示す。

† 異文字間に有意差があることを示す (Steel-Dwass 多重検定, $P < 0.05$)。

第 3 節 考察

現在国内におけるジャガイモそうか病の種イモ伝染に対する主な防除法は、化学合成殺菌剤を用いた種イモ消毒である。一方で、代替技術として焼酎蒸留残液を用いた種イモ浸漬が提案されており、汚染土壌からの本病原菌の伝染を防ぐ効果は無いが、罹病種イモ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を防ぐ効果は殺菌剤と同等であるとの報告がある（富濱ら，2018）。殺菌剤と焼酎蒸留残液のいずれを用いた場合にも、罹病種イモ上のそうか病菌密度は減少する（富濱ら，2018）。しかし種イモにはそうか病菌だけでなく多様な細菌種が共存しているため、両資材はこれらの共存細菌群にも影響を及ぼすと推測される。そこで本研究では、鹿児島県において種イモ消毒用殺菌剤として慣行的に使用されているフルアジナムと焼酎蒸留残液が種イモ共存細菌叢に与える影響を明らかにした。

はじめに、種イモに共存する細菌のコロニー数と細菌群集構造の推移を試験区間で比較した（図 4.1，図 4.2）。種イモ共存細菌のコロニー数は、処理前が 1.1×10^5 CFU gFW⁻¹ であったのに対し、無処理区および焼酎蒸留残液区では植付け後に 2 オーダー増加し、植付け 28 日後まで 10^7 CFU gFW⁻¹ を維持した。また両試験区は細菌群集構造の変動も類似しており、植付け後に大きく変化した後、経時的に変化しながら近接する傾向がみられた。このことから、焼酎蒸留残液は種イモに共存する細菌のコロニー数には影響を与えず、細菌群集構造に与える影響も小さいことが示唆された。一方、フルアジナム区における種イモ共存細菌のコロニー数は、植付け 14 日後まで他 2 試験区と比較して 1 オーダー少なかった。さらに、フルアジナム区における細菌群集構造の経時的な変化は他 2 試験区と比較して小さく、植付け 28 日後においても他の試験区とは大きく異なっていた。種イモに共存する細菌の群集構造は、収穫から植付けまでの貯蔵期間中に環境耐性が高い特定の細菌グループが優占するとの報告がある

(Buchholz *et al.*, 2021)。植付け後は種イモ表皮が土壌と接触することで細菌増殖に適した水分状態へと変化し、これらの種イモ上で耐久している細菌グループ、あるいは土壌微生物群から新たに種イモに定着した細菌グループが増殖すると考えられる。その結果、無処理区の種イモでは共存する細菌数が増加し、群集構造も大きく変化したと推察される。フルアジナムを処理して植え付けた種イモでは、このような共存細菌の増殖が阻害される可能性が示唆された。対して、焼酎蒸留残液による種イモ共存細菌群の変動の一因としては、低 pH や有機栄養分の付加が考えられる。これらの要因が微生物に与えるインパクトはフルアジナムと比較して小さいと想定される。さらに、焼酎蒸留残液は易分解性の有機成分を多く含有するため分解や代謝が速く、共存細菌群に与える影響も短期的であったと考えられる。

次に、フルアジナムおよび焼酎蒸留残液が種イモ共存細菌群に与える影響をより詳細に比較するために、細菌の系統分類グループごとに存在比の変動を調査した。本試験は3反復で実施したが、様々な要因が影響する圃場試験では反復間の振れ幅が大きく、定点的な結果のみを用いて、経時的に変動する共存細菌群集構造を考察することは難しいと考えられた。そこで、各処理の一定期間における影響を比較するために、植付け後の全サンプルを用いて多重比較検定を行った（表 4.1）。フルアジナム処理による種イモ共存細菌の動態は細菌グループによって異なっており、フルアジナムは特定のグループの存在比を減少させることが明らかとなった。共存細菌群のうち存在比 15%以上の主要な目グループに着目すると、フルアジナム処理によって増殖が有意に抑制された主要細菌目は、*Actinomycetales* 目と *Bacillales* 目であり、抑制されずに存在比が増加した主要目は *Burkholderiales* 目であった。試験区間に有意差が認められたこれら主要目の存在比は、サンプリング時期（植付け 7, 14, 28 日）によっては試験区間に有意差が認められない場合もあったが、いずれの時期においてもフル

アジナム区で他 2 試験区と比較して小さい傾向にあった（図 4.3）。さらに、主座標分析結果（図 4.2）からも、フルアジナム区と他 2 試験区の共存細菌群集構造はいずれのサンプリング時期においても大きく異なることが確認できる。これらのことから、植付け後の全サンプルを用いた統計解析が示す結果は、各処理が一定期間に渡って種イモ共存細菌叢に与えた影響を評価するのに妥当であると判断された。

そこで次に、主要目に属する細菌のうち存在比が 5%以上の主要属についても同様に、処理による一定期間の影響を比較した（表 4.2）。その結果、フルアジナム処理によって *Actinomycetales* 目に属する *Cryocola* 属と *Arthrobacter* 属および *Bacillales* 目に属する *Bacillus* 属と *Paenibacillus* 属は有意に増殖が抑制され、*Burkholderiales* 目に属する *Paraburkholderia* 属と *Ralstonia* 属は抑制されずに存在比が増加した。フルアジナムの抗菌スペクトルについては、菌類に関する報告はある（Komyoji *et al.*, 1995）が、細菌に対する詳細な報告はない。しかし、フルアジナムが植物に共存する細菌群に及ぼす影響を報告した例はある。Liao *et al.*（2021）は、アブラナ科根こぶ病防除を目的にフルアジナムを処理した圃場で根圏細菌群の多様性は低下し、根こぶ病の発病指数と負の相関関係にある細菌属が特異的に生残したと報告している。また Doherty *et al.*（2017）は、フルアジナムの連用散布によって、芝の葉圏に共存する細菌の生菌数は、糸状菌と比較して長期間抑制されたと報告している。これまで、ジャガイモの共存細菌群についてはフルアジナムによる影響を評価した報告例は無く、細菌グループごとに比較した本研究は新しい知見といえる。また、フルアジナムが植物に共存する特定の細菌グループの増殖を抑制する点や共存細菌数を長期的に抑制する点は、Liao *et al.*（2021）や Doherty *et al.*（2017）の報告と本研究結果で一致していた。

一方、焼酎蒸留残液区においては、無処理区に対して有意に存在比が減少した種イモ共存細菌属は無く、焼酎蒸留残液によって大きな影響を受ける細菌グループは無いことが示された。また有意差は無いものの、そうか病菌が属する *Streptomyces* 属の存在比は、無処理区に対してフルアジナム区と焼酎蒸留残液区で同等に減少した。*Streptomyces* 属が属する *Actinomycetales* 目の他の細菌属を比較しても同様の傾向を示すグループは無く、焼酎蒸留残液が *Streptomyces* 属の増殖みを特異的に抑制するメカニズムについては今後詳細な研究が必要といえる。

フルアジナム区でのみ存在比が減少した種イモ共存細菌のうち、*Bacillales* 目は無処理区と焼酎蒸留残液区において最優占目であることに加え、フルアジナム処理による存在比の減少幅が大きく、試験区間の細菌群集構造の違いに対する寄与が大きいと想定される。さらに *Bacillales* 目の中でも *Bacillus* 属は、そうか病菌に対して拮抗作用を示す種の報告が多い (Han *et al.*, 2005 ; Lin *et al.*, 2018 ; Meng *et al.*, 2012)。本研究の第 3 章においても、種イモから拮抗細菌 *Bacillus aryabhattai* を分離しており、焼酎蒸留残液に浸漬した種イモでは植付け後に存在比が増加する可能性を示した。ま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垂直伝播するとの報告もあり (Buchholz *et al.*, 2019)、そうか病の種イモ伝染防除の観点から、*Bacillus* 属は重要な細菌属であると考えられる。そこで、*Bacillus* 属については種レベルでの存在比の変動を解析し、試験区間で比較した (図 4.4, 表 4.3)。植付け後の種イモに共存する *Bacillus* 属の中で存在比が最も大きい OTU 配列は OTU33302 で、次いで OTU27418, OTU4090 であり、それぞれの近縁種は *Bacillus aryabhattai*, *B. jeddahensis*, *B. shackletonii* と推定された。これら *Bacillus* 属優占種の植付け後の存在比を比較すると、いずれの種も無処理区と焼酎蒸留残液区においては同等であり、フルアジナム区でのみ有意に減少した。このことから、フルアジナ

ムと焼酎蒸留残液が種イモ表皮上の *Bacillus* 属に与える影響に種間差はなく、フルアジナム処理によって広範囲の *Bacillus* 属細菌が減少する可能性が示唆された。また OTU33302 の近縁種である *B. aryabhattai* は、本研究の第 2 章および第 3 章でも種イモ表皮から高い存在比で検出しており、さらには、そうか病菌に対する拮抗作用も確認している。本章でも、無処理区および焼酎蒸留残液区の種イモでは試験期間を通して高い存在比で検出されたことから、拮抗細菌 *B. aryabhattai* はジャガイモ塊茎に安定的に共存しており、焼酎蒸留残液処理では大きな影響を受けないものの、フルアジナム処理では有意に増殖が抑制される可能性が示された。

焼酎蒸留残液は、*Streptomyces* 属の存在比を減少させる傾向がみられたものの、*Bacillus* 属に対しては影響を与えなかった。両細菌の変動の違いには、焼酎蒸留残液の含有成分に対する資化性や含有有機酸に対する感受性が関与すると推察される。

殺菌剤および焼酎蒸留残液による浸漬処理は、種イモ表皮のそうか病菌密度を減少させることにより、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を抑制するが、その抑制効果は同等である（富濱ら，2018）。しかし、各処理が種イモ共存細菌群に与える影響は大きく異なった。フルアジナムは広範囲の細菌グループの増殖を抑制することが明らかとなり、その中にはそうか病菌に対する拮抗細菌 *Bacillus aryabhattai* も含まれていた。種イモに共存する *Bacillus* 属細菌の一部は新生塊茎へと垂直伝播するとの報告があり（Buchholz et al., 2019）、*B. aryabhattai* もまた種イモから高頻度で検出される細菌の一種である（第 2 章，第 3 章）。フルアジナム処理は、このような拮抗細菌を減少させることにより、元々構築されている健全な種イモ共存細菌叢の静菌作用を低下させる危険性が示された。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、フルアジナムの連用による防除が必要となり、耐性菌の出現や環境負荷

に繋がる危険性がある。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、連用によっても種イモ表皮の共存細菌叢本来の静菌作用を維持しながら、そうか病の種イモ伝染を抑制できると推察される。

第 5 章 長崎県における慣行殺菌剤および焼酎蒸留残液による浸漬処理が種イモ共存細菌群集構造に与える影響

第 1 節 材料および方法

1-1. 種イモの採取と試料調整

焼酎蒸留残液として片倉コープアグリ社製「ソイルサプリエキス」を供試した。種イモ消毒用の化学合成殺菌剤としては、そうか病防除を目的として長崎県で一般的に使用されているアグリマイシン-100（日本曹達社製，有効成分；オキシテトラサイクリン 1.5%，ストレプトマイシン硫酸塩 18.8%）（以下，アグリマイシン）を用いた。

長崎県農林技術開発センター内において，クロルピクリンを用いて土壤消毒した試験圃場より採取した塊茎（品種；ニシユタカ）を種イモとして供試した。種イモを流水で洗浄後，製品取り扱い説明書の希釈倍率に従い，焼酎蒸留残液 5 倍希釈液またはアグリマイシン 40 倍希釈液に瞬間浸漬後，風乾した。対照として蒸留水に浸漬する区（無処理区）を設けた。各処理を施した種イモを同センター内のそうか病発生圃場（黒ボク土）に植付けた。植付け前に，化学肥料（商品名；馬鈴薯特号，窒素：リン酸：カリ=10%，8%，6%）を 140 kg/10a 全面全層施用した。植付け 7 日後と 28 日後に，それぞれ各試験区から 6 個の種イモを採取した。処理前の種イモについても同様に，6 個の種イモを供試した。採取した種イモは滅菌水で洗浄後，メスを使って表皮を剥ぎ，2～3 mm 四方に細断した。各試験区 2 個の種イモから得られた表皮を合わせて 1 セットとし，3 セットを調製した。

1-2. 種イモ表皮に共存する細菌の生菌数測定および群集構造解析

種イモに共存する細菌数の測定は，第 4 章 1-2 と同様に実施した。すなわち，

1/10 TSA 培地を用いた希釈平板法により細菌コロニー数を計数した。

種イモに共存する細菌の群集構造解析は、第 2 章 1-2 と同様に実施した。すなわち、上記で調整した種イモ表皮の細断試料 0.5 g（新鮮重）を凍結・粉碎した試料 0.1 g から DNA を抽出し、LNA オリゴによる PCR クランプ技術を適用した 16S rRNA（V3V4 領域）アンプリコンシーケンス解析を行った。

1-3. 統計学的評価

各サンプリング時期における種イモの共存細菌群集構造を試験区間で比較するために、アンプリコンシーケンス解析より得られた各細菌グループの相対存在比について Tukey-Kramer 法を用いた多重比較検定を行った。また、植付け後の種イモにおける一定期間の共存細菌群集構造を試験区間で比較するため、植付け 7 日後、28 日後の全データを対象に Steel-Dwass 法を用いた多重比較検定を行った。解析は、統計解析アドインソフト（エクセル統計 BellCurve for Excel Ver.3.21, 社会情報サービス）を用いて行った。

第 2 節 結果

種イモ表皮に共存する細菌のコロニー数の推移を図 5.1 に示した。処理前の種イモには 2.2×10^5 CFU gFW⁻¹ の細菌が共存していた。植付け後のコロニー数を試験区間で比較すると、無処理区では植付け 7 日後に 2.7×10^7 CFU gFW⁻¹ まで増加した後は大きな変動は無く、28 日後に 4.1×10^7 CFU gFW⁻¹ であった。焼酎蒸留残液区におけるコロニー数は、いずれの採取時期においても無処理区と同等であり、植付け 7 日後に 2.1×10^7 CFU gFW⁻¹、28 日後に 1.7×10^7 CFU gFW⁻¹ であった。一方、アグリマイシン区では植付け 7、28 日後のコロニー数はそれぞれ 4.5×10^6 、 6.5×10^6 CFU gFW⁻¹ で無処理区および焼酎蒸留残液区と比較して 1 オーダー少なかった。

次に、アグリマイシンおよび焼酎蒸留残液が影響を与える種イモ共存細菌グループを比較するために、植付け後の共存細菌群集構造の推移を目レベルで比較した。処理前および植付け後の種イモからは、合計 20 種類の細菌目が検出された（図 5.2）。そのうち 15%以上の存在比を示した主要な目は、植付け前の種イモでは *Bacillales* 目と *Clostridiales* 目の 2 目であり、植付け後の種イモでは *Actinomycetales* 目、*Bacillales* 目、*Clostridiales* 目、*Burkholderiales* 目の 4 目であった。植付け後の主要目について存在比の推移を試験区間で比較すると、*Actinomycetales* 目は処理前の種イモには 6%の存在比で共存していたのに対し、無処理区では植付け 7 日後に 12%、28 日後に 15%に増加した。アグリマイシン区においても同様に漸増し、植付け 7 日後に 12%、28 日後に 22%であった。焼酎蒸留残液区においては植付け 7 日後に 4%に減少した後、28 日後に 11%に増加した。試験区間に有意差は認められなかった。*Bacillales* 目は、処理前の種イモにおける存在比は 33%で、共存細菌の中で存在比が最大であった。無処理区における *Bacillales* 目の存在比は、植付け 7 日後は 33%であったが、28 日後には 19%に減少した。焼酎蒸留残液区では植付け 7 日後に 19%に減少したものの、28 日後においても 20%を維持しており、無処理区と同等となった。一方、アグリマイシン区における存在比は他の 2 試験区と比較して低く推移し、植付け 7 日後に 13%、28 日後に 12%まで減少して、植付け 7 日後には無処理区に対して有意に低い値であった。*Clostridiales* 目は処理前の種イモにおける存在比は 19%であったが、無処理区では植付け 7 日後に 2%まで減少し、28 日後は 4%であった。焼酎蒸留残液区では植付け後に 1%未満まで減少した。アグリマイシン区では植付け 7 日後には 16%を維持していたが、28 日後には 1%に減少した。*Burkholderiales* 目は処理前の種イモでは 11%の存在比を示し、無処理区では植付け 7 日後に 27%まで増加して 28 日後には 17%となった。焼酎蒸留残液区においても同様に、植付け 7 日後に存在比が増加して 40%を示し、28 日後におい

でも 28%と高い存在比を維持しており，無処理区およびアグリマイシン区に対して有意に高い値であった。アグリマイシン区では植付け 7 日後に 17%，28 日後に 15%であり，他 2 試験区と比較して変動が小さかった。第 4 章における殺菌剤としてフルアジナムを用いた試験と同様に，アグリマイシンおよび焼酎蒸留残液で浸漬処理した種イモ上における主要目の存在比の変動は異なっていた。そこで，植付け 7，28 日後の全サンプルデータを用いて多重比較検定を行い，各資材が一定の期間中に植付け後の種イモ共存細菌群集構造に与える影響を比較した（表 5.1）。その結果，種イモに共存する主要な細菌目のうち，資材処理によって有意に存在比が変動した細菌目は *Bacillales* 目のみであり，アグリマイシン処理によって有意に存在比が減少した。

各資材が種イモ共存細菌に与える影響をさらに詳細に比較するため，主要目に属する細菌属について，植付け後の存在比を用いて多重比較検定を行った（表 5.2）。*Actinomycetales* 目に属する細菌属は 7 種類検出されたが，そのうち *Unclassified Intrasporengiaceae* 科はアグリマイシン区において無処理区に対し有意に存在比が増加した。一方，そうか病菌が属する *Streptomyces* 属の存在比は，焼酎蒸留残液区において無処理区に対し有意に減少した。*Bacillales* 目に属する細菌属は 4 種類検出されたが，そのうち *Bacillus* 属の存在比はアグリマイシン区で無処理区に対し有意に減少した。*Clostridiales* 目に属する細菌属は全部で 6 種類検出されたが，そのうち無処理区に対して各資材処理区で有意差が認められた細菌属は無かった。*Burkholderiales* 目に属する細菌属は 7 種類検出されたが，そのうち *Unclassified Alcalogenaceae* 科の存在比は，両資材処理区において無処理区に対し有意に増加した。一方で，*Unclassified Burkholderiaceae* 科と *Burkholderia* 属の存在比は，アグリマイシン区において無処理区に対し有意に減少した。

各資材処理区において無処理区に対して有意差が認められた細菌属のうち，

最も変化が大きかったのは *Bacillus* 属であり、第 4 章の鹿児島県において殺菌剤としてフルアジナムを用いた試験と一致していた。そこで、*Bacillus* 属については OTU 配列を 100% の類似度でクラスタリングした種レベルにおける存在比の変動を比較した。種イモ表皮に共存する *Bacillus* 属の細菌種は、7 種類で構成されていた。そのうち存在比が大きい上位 3 種類の *Bacillus* 属優占種について、存在比の変動を図 5.3 に示した。*Bacillus* 属の中で存在比が最も大きい OTU 配列は OTU4090 で、次いで OTU27418, OTU33302 であり、それぞれの近縁種は *B. shackletonii* (類似度 99%), *B. jeddahensis* (類似度 99%), *B. aryabhatai* (類似度 100%) と推定された。OTU4090 の無処理区における存在比は、植付け 7 日後に 13%, 28 日後に 7% であった。焼酎蒸留残液区における存在比は植付け 7, 28 日後とも 4% であり、一定の割合で共存していたが、植付け 7 日後の存在比は無処理区に対して有意に低かった。一方、アグリマイシン区では植付け 7, 28 日後とも 1% 未満であり、他の 2 試験区と比較して低く推移し、植付け 7 日後の存在比は無処理区と比較して有意に低かった。OTU27418 の無処理区における存在比は、植付け 7 日後に 5%, 28 日後に 3% であった。焼酎蒸留残液区においても無処理区と同等で、植付け 7 日後に 4%, 28 日後に 6% であった。一方、アグリマイシン区では植付け 7, 28 日後とも 1% 前後で、他の 2 試験区と比較して低く推移したが、無処理区に対して有意差は認められなかった。OTU33302 の無処理区における存在比は、植付け 7 日後に 3% であったが 28 日後には 1% に減少した。焼酎蒸留残液区においては植付け 7, 28 日後とも 2% であり、一定の割合で共存しており、植付け 28 日後の存在比は無処理区に対して有意に増加した。一方、アグリマイシン区では植付け 7 日後に 1% 未満、28 日後に 1% であり、特に植付け 7 日後において、有意差はないものの他の 2 試験区と比較して減少する傾向がみられた。各資材の種イモ共存細菌群集構造に与える影響は、*Bacillus* 属優占種に対しても長期的に異なる傾向がみられたため、

一定期間の影響を比較するために植付け後の全サンプルデータを用いて多重比較検定を行った（表 5.3）。その結果，アグリマイシンは無処理区と比較して OTU4090 と OTU27418 の存在比を有意に低下させ，OTU33302 に対しても，有意差は無いものの存在比を低下させる傾向が認められた。対して焼酎蒸留残液は，鹿児島県で実施した第 4 章の試験と同様に，種イモに共存する *Bacillus* 属優占種に対して影響を与えないことが示された。

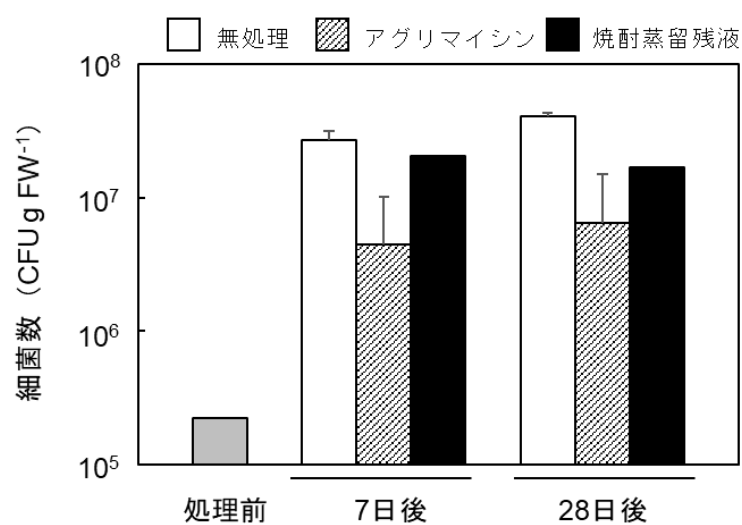


図 5.1 種イモ表皮に共存する細菌数の推移
エラーバーは標準誤差を示す。

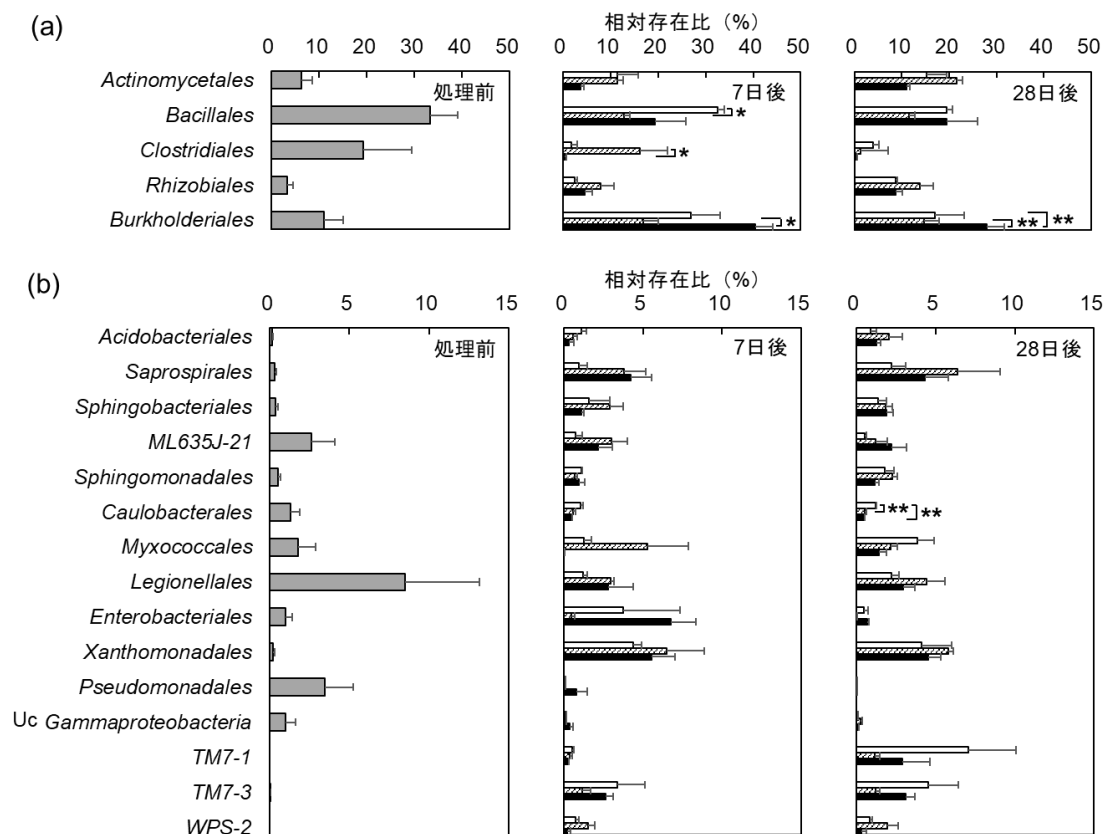


図 5.2 目レベルにおける種イモ表皮共存細菌の群集構造変化

(a) 相対存在比が 10%以上の細菌目, (b) 10%未満の細菌目

□, 無処理区; ▨, アグリマイシン区; ■, 焼酎蒸留残液区
エラーバーは標準誤差を示す。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ で有意差があることを示す (Tukey-Kramer Test)。

表 5.1 目レベルにおける，各処理が種イモ共存細菌群に及ぼす影響比較

	相対存在比 (%) [*]					
	無処理		アグリマイシン		焼酎蒸留残液	
<i>Acidobacteriales</i>	1.00	(0.22)	1.32	(0.52)	0.78	(0.29)
<i>Actinomycetales</i>	13.39	(2.22)	16.58	(2.83)	7.35	(1.81)
<i>Saprospirales</i>	1.60	(0.53)	5.10	(1.47)	4.28	(0.90)
<i>Sphingobacteriales</i>	1.50	(0.63)	2.39	(0.49)	1.52	(0.26)
<i>ML635J-21</i>	0.64	(0.19)	2.12	(0.70)	2.19	(0.60)
<i>Bacillales</i>	25.99	(3.66) a [†]	12.21	(0.67) b	19.46	(2.98) ab
<i>Clostridiales</i>	2.86	(1.76) ab	8.78	(4.23) a	0.48	(0.13) b
<i>Rhizobiales</i>	5.58	(1.56)	10.96	(2.31)	6.70	(1.70)
<i>Sphingomonadales</i>	1.46	(0.31)	1.48	(0.39)	1.07	(0.20)
<i>Caulobacteriales</i>	1.13	(0.10) a	0.57	(0.09) b	0.50	(0.03) b
<i>Burkholderiales</i>	21.95	(3.56) ab	15.81	(1.59) b	34.14	(3.37) a
<i>Myxococcales</i>	2.57	(0.78)	3.75	(1.36)	0.74	(0.38)
<i>Legionellales</i>	1.71	(0.33) b	3.70	(0.63) a	2.89	(0.79) ab
<i>Enterobacteriales</i>	2.14	(1.75) ab	0.26	(0.13) b	3.73	(1.53) a
<i>Xanthomonadales</i>	4.26	(0.87)	6.17	(1.08)	5.03	(0.80)
<i>Pseudomonadales</i>	0.03	(0.01)	0.04	(0.02)	0.42	(0.35)
<i>Uc Gammaproteobacteria</i>	0.07	(0.02)	0.19	(0.07)	0.25	(0.11)
<i>TM7-1</i>	3.80	(1.98)	0.76	(0.24)	1.59	(0.98)
<i>TM7-3</i>	3.97	(1.18) ab	1.18	(0.28) b	2.90	(0.34) a
<i>WPS-2</i>	0.80	(0.12) b	1.74	(0.37) a	0.27	(0.17) b

^{*} 各試験区植付け後の 9 サンプルの平均値（標準誤差）を示す。

[†] 異文字間に有意差があることを示す（Steel-Dwass 多重検定，P<0.05）。

表 5.2 属レベルにおける，各処理が種イモ共存細菌群に及ぼす影響比較

	相対存在比 (%) [*]							
	無処理			アグリマイシン			焼酎蒸留残液	
Actinomycetales目[†]								
Uc <i>Intrasporangiaceae</i>	0.24	(0.04)	b [‡]	1.18	(0.19)	a	0.13	(0.03) b
Uc <i>Microbacteriaceae</i>	0.50	(0.15)		0.29	(0.12)		0.38	(0.19)
<i>Cryocolla</i>	6.20	(1.04)		7.09	(1.69)		3.08	(0.84)
<i>Microbacterium</i>	0.70	(0.14)		1.40	(0.31)		0.54	(0.07)
<i>Arthrobacter</i>	1.95	(0.52)		2.47	(0.66)		1.06	(0.33)
<i>Mycobacterium</i>	0.52	(0.14)		1.17	(0.45)		0.22	(0.07)
<i>Streptomyces</i>	1.57	(0.42)	a	0.47	(0.10)	ab	0.37	(0.08) b
Bacillales目								
Uc <i>Bacillaceae</i>	0.64	(0.36)		1.96	(0.57)		1.23	(0.97)
<i>Bacillus</i>	18.37	(3.27)	a	3.67	(0.34)	b	13.17	(2.64) ab
<i>Paenibacillus</i>	4.68	(0.63)		4.04	(0.74)		3.21	(0.53)
<i>Staphylococcus</i>	0.09	(0.05)		0.21	(0.09)		0.36	(0.25)
Clostridiales目								
<i>Clostridium</i>	0.85	(0.49)		3.59	(2.89)		0.10	(0.06)
Uc <i>Lachnospiraceae</i>	0.43	(0.26)		2.73	(1.70)		0.18	(0.10)
<i>Coprococcus</i>	0.12	(0.08)	ab	0.63	(0.32)	a	0.01	(0.01) b
Uc <i>Ruminococcaceae</i>	0.03	(0.03)		0.19	(0.19)		0.02	(0.02)
Uc <i>Veillonellaceae</i>	0.61	(0.60)	ab	0.32	(0.16)	a	0.00	(0.00) b
<i>Pelosinus</i>	0.76	(0.47)	ab	0.95	(0.56)	a	0.02	(0.01) b
Burkholderiales目								
Uc <i>Alcaligenaceae</i>	0.39	(0.11)	b	2.85	(0.81)	a	2.34	(0.28) a
Uc <i>Burkholderiaceae</i>	7.26	(1.19)	a	2.99	(0.45)	b	6.52	(1.18) a
<i>Burkholderia</i>	5.06	(0.64)	a	2.34	(0.31)	b	8.45	(1.11) a
Uc <i>Comamonadaceae</i>	0.54	(0.08)		1.08	(0.49)		0.48	(0.08)
<i>Comamonadaceae_Other</i>	0.18	(0.04)	ab	0.76	(0.21)	a	0.13	(0.05) b
Uc <i>Oxalobacteraceae</i>	6.48	(1.99)	ab	2.96	(0.67)	b	11.53	(2.00) a
<i>Ralstonia</i>	1.49	(0.34)		2.10	(0.40)		3.59	(0.83)

* 各試験区植付け後の 9 サンプルの平均値（標準誤差）を示す。

† 存在比 15%以上の優占目に属する細菌属のみを抜粋した。

Uc = Unclassified（未分類）

‡ 異文字間に有意差があることを示す（Steel-Dwass 多重検定，P<0.05）。

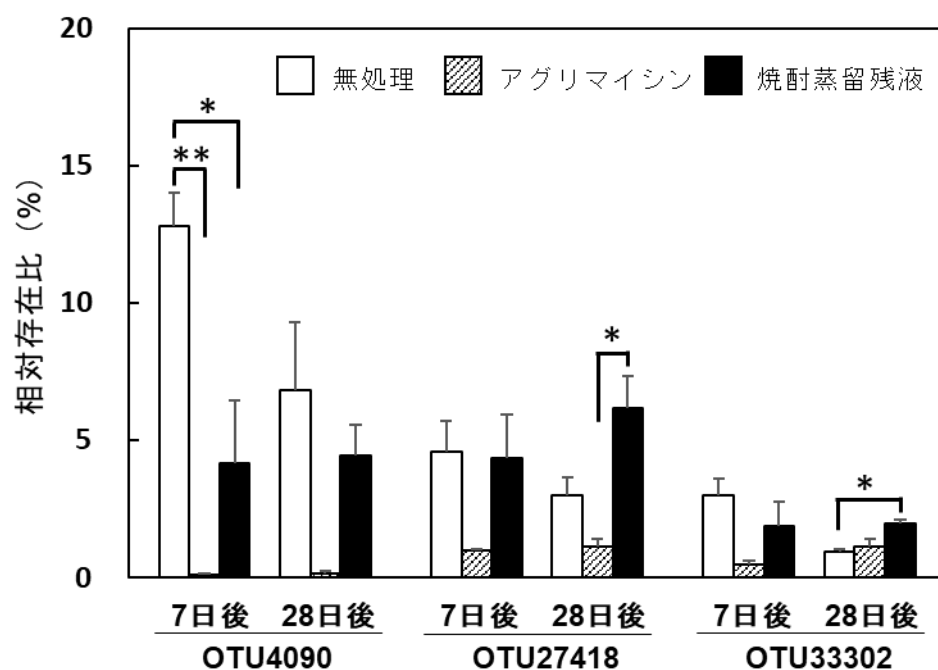


図 5.3 *Bacillus* 属優占種の存在比の変動
 エラーバーは標準誤差を示す。
 各 OTU の推定近縁種は、OTU4090, *Bacillus shackletonii* ;
 OTU27418, *Bacillus jeddahensis* ; OTU33302, *Bacillus aryabhattai* である。

表 5.3 各処理が種イモ表皮に共存する *Bacillus* 属優占種の存在比
 に及ぼす影響比較

	相対存在比 (%) [*]		
	無処理	アグリマイシン	焼酎蒸留残液
OTU4090	9.81(1.81)a [†]	0.13(0.05)b	4.29(1.15)a
OTU27418	3.80(0.67)a	1.05(0.14)b	5.24(0.99)a
OTU33302	1.95(0.53)	0.80(0.20)	1.91(0.41)

* 各試験区植付け後の 9 サンプルの平均値（標準誤差）を示す。

† 異文字間に有意差があることを示す（Steel-Dwass 多重検定, $P < 0.05$ ）。

第 3 節 考察

第 4 章では、焼酎蒸留残液および鹿児島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が、種イモに共存する細菌群に与える影響を比較した。その結果、フルアジナムは種イモに共存する特定の細菌群の増殖を抑制することが明らかとなり、その中にはそうか病菌に対して拮抗作用を示し、かつ、種イモに優占的に共存する *Bacillus* 属細菌も含まれていた。そこで本章では、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アグリマイシンを用いて同様の試験を実施し、アグリマイシンと焼酎蒸留残液が種イモに共存する細菌群に与える影響を比較した。

はじめに、種イモに共存する細菌のコロニー数を試験区間で比較した(図 5.1)。処理前の種イモには 2.2×10^5 CFU gFW⁻¹ の細菌が共存しており、無処理区および焼酎蒸留残液区では植付け 7 日後に 2 オーダー増加し、28 日後まで 10^7 CFU gFW⁻¹ を維持した。一方、アグリマイシン区の植付け 7, 28 日後のコロニー数はそれぞれ 4.5×10^6 , 6.5×10^6 CFU gFW⁻¹ であり、他の 2 試験区と比較して 1 オーダー少なく、アグリマイシンは植付け 28 日後まで種イモ共存細菌の増殖を抑制することが明らかとなった。

次に、アグリマイシンおよび焼酎蒸留残液が種イモ共存細菌群に与える影響を比較するために、細菌の系統分類グループごとに存在比の変動を調査した(図 5.2, 表 5.1, 表 5.2)。種イモ上で存在比 15%以上を示した主要目のうち、*Actinomycetales* 目、*Bacillales* 目、*Burkholderiales* 目は、第 3 章の鹿児島県で実施した試験においても種イモ共存細菌の主要目であった。このことから、これら 3 つの細菌目は普遍的かつ優占的に種イモに共存する細菌グループである可能性が示された。これら主要目のうち、無処理と比較してアグリマイシン処理によって有意に存在比が減少したのは *Bacillales* 目のみであり、有意に存在比が増加した主要目は無かった。さらに主要目に属する細菌のうち存在比が 5%

以上の主要属に着目すると、*Bacillus* 属の存在比がアグリマイシン処理によって有意に減少した。アグリマイシン処理によって存在比が有意に変動した細菌グループの種類は、第4章で実施したフルアジナム処理と比較して少なかったが、*Bacillus* 属は両殺菌剤で共通して有意に存在比が減少した。アグリマイシンは、有効成分としてオキシテトラサイクリンとストレプトマイシンを含み、主に細菌性病害に適用した殺菌剤である。オキシテトラサイクリンとストレプトマイシンはいずれも細菌のタンパク質合成を阻害することで殺菌作用を示す抗生物質であり、抗菌スペクトルは細菌のグラム染色性に関係なく広域に渡る。そのためアグリマイシンは特定の細菌グループではなく、ジャガイモに共存する細菌群の増殖を網羅的に抑制したと推測される。その結果、アグリマイシン処理は種イモに共存する細菌の増殖を長期的に抑制したにも関わらず、細菌群集構造に対する影響はフルアジナムと比較して小さかったと考えられる。しかしオキシテトラサイクリンを土壌に処理した場合に、グラム陰性菌と比較してグラム陽性菌のバイオマス量が大きく減少したとの報告もある（Chen *et al.*, 2013）。*Bacillus* 属もまたグラム陽性桿菌であるため、アグリマイシンに対する感受性が特に高い可能性があり、有意に存在比が減少したと推測される。

一方、焼酎蒸留残液処理によって有意に存在比が変動した主要な細菌目は無かった。主要目に属する細菌のうち存在比が5%以上の主要属に着目すると、焼酎蒸留残液処理によってそうか病菌が属する *Streptomyces* 属の存在比が有意に減少した。焼酎蒸留残液処理による *Streptomyces* 属の特異的な増殖抑制作用は、第4章の結果と一致した。

アグリマイシン処理によって有意に存在比が減少した *Bacillus* 属については、第4章と同様に、種レベルでの存在比の変動を解析し、試験区間で比較した（図5.3、表5.3）。植付け後の種イモに共存する *Bacillus* 属の中で存在比が大きい上位3つの OTU 配列は OTU4090, OTU27418, OTU33302 であり、それぞれの近

縁種は *Bacillus shackletonii*, *B. jeddahensis*, *B. aryabhattai* と推定された。種イモに共存する *Bacillus* 属優占 3 種の構成は、第 4 章の鹿児島県における試験と一致しており、これらの *Bacillus* 属細菌はジャガイモ塊茎に高頻度で共存している可能性が示唆された。さらに OTU33302 の近縁種である *B. aryabhattai* は、品種や栽培土壌等の試験条件が異なる第 2 章および第 3 章の試験においても、種イモ表皮から高い存在比で検出されている。また第 3 章ではそうか病菌に対する拮抗作用も確認していることから、ジャガイモの種イモ表皮にはそうか病菌に対する静菌作用が普遍的に備わっている可能性が示された。しかし、アグリマイシンを処理した種イモでは拮抗細菌 *B. aryabhattai* を含む *Bacillus* 属優占種の存在比が減少することが明らかとなり、種イモ本来の静菌作用もまた低下する可能性が示唆された。種イモに共存する *Bacillus* 属細菌の一部は新生塊茎へと垂直伝播する (Buchholz *et al.*, 2019) ことから、アグリマイシン処理による種イモ共存細菌叢の静菌作用の低下は、次世代へと継代される可能性がある。そのため、フルアジナムと同様、アグリマイシンによる種イモ消毒は次作以降も連用が必要となる危険性がある。アグリマイシンの有効成分であるオキシテトラサイクリンとストレプトマイシンは、農薬だけでなく人畜に対する抗菌薬としても利用されているが、近年農薬の暴露による土壌や河川での耐性菌の出現が問題となっている。アグリマイシンの連用は環境負荷や人畜被害、耐性菌の出現に繋がる危険性が高いといえる。対して、焼酎蒸留残液は *Bacillus* 属拮抗細菌を含む種イモ共存細菌叢に対する影響は小さく、*Streptomyces* 属の増殖を特異的に抑制した。これは鹿児島県で実施した第 4 章の結果と一致しており、焼酎蒸留残液は圃場を問わず連用が可能であり、種イモ表皮の共存細菌叢本来の静菌作用を維持しながらそうか病の種イモ伝染を抑制できると推察される。

第 6 章 焼酎蒸留残液含有有機酸がそうか病菌およびそうか病菌に対する拮抗細菌の培地上での増殖に与える影響

第 1 節 材料および方法

1-1. 供試菌株

試験にはそうか病菌とそうか病菌に対して拮抗作用を示す *Bacillus aryabhattai* を供試した。前者には、日本国内に分布している *Streptomyces scabiei*, *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies* の 3 種を供試し、それぞれ鹿児島県農業開発センター分譲の S58 株, T45 株, a10 株を用いた。後者には、第 3 章で種イモ表皮から分離した KST12 株, KST13 株, KST15 株を用いた。

1-2. 供試焼酎蒸留残液

焼酎蒸留残液として片倉コープアグリ社製「ソイルサプリエキス」を供試した。一般に焼酎粕には麹菌に由来する有機酸が含まれ、当資材も有機酸としてクエン酸 1.52%, コハク酸 0.61%, 乳酸 1.01%, リンゴ酸 0.71% を含有し（三和酒類㈱における分析値），pH は 4.0 前後である。

1-3. 寒天培地を用いた抗菌試験

クエン酸一水和物，コハク酸二ナトリウム・六水和物，乳酸および DL-リンゴ酸を用いて，それぞれクエン酸，コハク酸，乳酸，リンゴ酸の 10% 溶液を作製した。各有機酸溶液をそれぞれ 5 段階の pH（4.0，4.5，5.0，5.5，6.0）に調整後，濾過滅菌した。ISP No.2 培地（Shirling and Gottlieb, 1966）を 6 倍希釈し，寒天濃度を 3.0% とした 1/6 ISP 培地（酵母エキス，0.67g；麦芽エキス，1.67 g；グルコース，0.67 g；寒天，30 g L⁻¹）を有機酸溶液と同様に 5 段階の pH に調製後，オートクレーブ滅菌（121℃，20 分）した。70℃ 前後に冷却した各培地

に,それぞれ対応する pH の 10%有機酸溶液を有機酸の終濃度が 0.03, 0.3, 0.5, 1.0% (w/v) となるように添加し,よく混合後,シャーレに分注して平板培地を作製した。pH の調整は HCl と NaOH を用いて行った。作製した平板培地に供試菌株 6 株を画線接種し, 30℃で 7 日間静置培養後に増殖の違いを目視で観察した。また同一 pH で有機酸無添加の区を対照として, 対照に対する増殖の程度を 3 段階で評価し, 有機酸の抗菌作用の指標とした (表 6.1)。培養は 2 反復で行い, 増殖が旺盛なプレートの評価に用いた。

表 6.1 抗菌作用の評価基準

指数	抗菌作用	供試菌株の増殖の様子
1	なし	増殖に大きな影響なし
2	弱	増殖抑制：対照と比較して増殖が明らかに劣る
3	強	増殖阻害：全く増殖しない

1-4. 焼酎蒸留残液および有機酸溶液中における細菌の生残性

種イモ浸漬時と同様の濃度となるよう焼酎蒸留残液を滅菌蒸留水で 5 倍希釈後,オートクレーブ滅菌 (105℃, 15 分) した。各有機酸溶液は,クエン酸一水和物,コハク酸二ナトリウム・六水和物,乳酸および DL-リンゴ酸を用いて作製し,それぞれ焼酎蒸留残液 5 倍希釈液中の濃度と等しくなるよう調製した。すなわち, 0.304% (w/v) クエン酸溶液, 0.122 % (w/v) コハク酸溶液, 0.202% (w/v) 乳酸溶液, 0.142% (w/v) リンゴ酸溶液を作製した。pH は供試した焼酎蒸留残液 5 倍希釈液と等しくなるよう HCl を用いて 4.0 に調整し, pH 調整後にろ過滅菌した。各有機酸の単独溶液の他に, 有機酸 4 種をそれぞれ焼酎蒸留残

液中の濃度となるように混合した溶液（有機酸混合区）も設けた。また対照として、滅菌蒸留水に HCl を添加して pH のみを 4.0 に調整した溶液、および滅菌蒸留水を供試する区も設けた。

供試菌株として、そうか病菌 3 種と拮抗細菌 *B. aryabhattai* KST15 株の計 4 菌株を用い、以下の通り菌懸濁液を調製した。そうか病菌はデンプン寒天培地（デンプン, 10g; スクロース, 1g; 酵母エキス, 1g; KCl, 0.1g; KH₂PO₄, 0.1g; MgSO₄·7H₂O, 0.1g; NaNO₃, 0.1g; 寒天, 15g L⁻¹; pH8.0）（松本, 1979）で 30℃, 10 日間、拮抗細菌 *B. aryabhattai* は R2A 寒天培地（BD Difco™）で 30℃, 4 日間画線培養した菌体を白金耳で回収し、滅菌蒸留水とセラミックボールを入れた 50ml 遠沈管に懸濁後、ボルテックスでよく攪拌した。R2A 寒天培地を用いた希釈平板法により菌懸濁液中の細菌数を計数し、10⁵~10⁶ CFU mL⁻¹ となるよう滅菌蒸留水で希釈したものを試験に供した。

滅菌した 20mL ガラス試験管に各溶液 9mL と各菌懸濁液 1mL を添加、混合後、シリコ栓で蓋をした。25℃で静置培養し、1, 6, 24, 48 時間後に R2A 寒天培地を用いた希釈平板法により細菌数を調査した。

第 2 節 結果

2-1. 寒天培地を用いた抗菌試験

焼酎蒸留残液に含まれる各有機酸が、そうか病菌および拮抗細菌 *Bacillus aryabhattai* の寒天培地上での増殖に与える影響を調査した。供試菌株の培養 7 日後における増殖程度を基に、各有機酸の抗菌作用を 3 段階で評価した結果を表 6.2~6.5 に、培養 7 日後における供試菌株の増殖の様子を図 6.1~6.4 に示した。

そうか病菌 *Streptomyces scabiei* および *S. turgidiscabies* は、pH4.0 の培地上では有機酸の添加の有無に関わらず増殖しなかったため、pH4.0 においては増殖

阻害要因が低 pH と各有機酸の抗菌作用のいずれに起因するのか判然としなかった。

クエン酸添加培地上において, *B. aryabhattai* 3 菌株は pH4.0 では 0.03%以上, pH4.5 では 0.3%以上で増殖が阻害された (表 6.2, 図 6.1)。pH5.0~6.0 においては, 高濃度 (1.0%) のクエン酸添加によっても増殖に大きな影響は認められなかった。そうか病菌に対するクエン酸の抗菌作用は, 菌種によって大きく異なっていた。*S. scabiei* は, pH4.5 においては低濃度 (0.03%) のクエン酸でも増殖阻害が生じ, pH5.0 では 0.3%以上, pH5.5~6.0 では 1.0%以上で明らかに増殖が抑制された。*S. turgidiscabies* は pH4.5 において, 0.3%以上のクエン酸濃度で明らかに増殖が抑制された。*S. acidiscabies* は, pH4.0 における高濃度のクエン酸 (1.0%) 添加によっても完全に増殖を阻害されることは無かった。以上から, クエン酸に対する感受性は *S. scabiei*, *B. aryabhattai*, *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies* の順で高かった。

コハク酸添加培地上での *B. aryabhattai* 3 菌株の増殖は, pH4.0 ではコハク酸濃度 0.3%以上で阻害された (表 6.3, 図 6.2)。pH4.5 での増殖は菌株によって異なり, コハク酸 0.5%培地で KST12 株は増殖が阻害されたのに対し, KST13 株と KST15 株は増殖が抑制されはしたものの増殖可能であった。そうか病菌に対するコハク酸の抗菌作用は菌種によって異なった。*S. scabiei* の増殖は, pH4.5 ではコハク酸添加濃度 0.3%で明らかに抑制され, 0.5%以上では阻害された。pH5.0 ではコハク酸濃度 1.0%で増殖が阻害され, pH5.5 以上では増殖に対する大きな影響はみられなかった。*S. turgidiscabies* は, pH4.5 ではコハク酸濃度 0.3%以上, pH5.0 では 1.0%で増殖が阻害された。*S. acidiscabies* は, pH4.0 ではコハク酸濃度 0.3%以上, pH4.5 では 0.5%以上で増殖が阻害された。以上より, コハク酸に対する感受性は, *S. turgidiscabies*, *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, *B. aryabhattai* (KST12 株>KST13 株=KST15 株) の順で高かった。

乳酸添加培地における *B. aryabhattai* の増殖は、pH4.0 では低濃度（0.03%）でも阻害され、pH4.5 では 0.3%以上、pH5.0 では 1.0%で阻害された（表 6.4, 図 6.3）。そうか病菌に対する乳酸の抗菌作用は、菌種によって異なった。*S. scabiei* の増殖は、pH4.5～5.0 では乳酸濃度 0.3%以上、pH5.5 では 1.0%で阻害された。また pH5.5～6.0 では乳酸濃度 0.3%以上で明らかに増殖が抑制された。*S. turgidiscabies* は pH4.5～5.0 では乳酸濃度 0.3%以上、pH5.5 では 1.0%で増殖が阻害され、明らかな増殖抑制がみられたのは pH5.5 の 0.5%と pH6.0 の 1.0%であった。*S. acidiscabies* は、pH4.0～4.5 では乳酸濃度 0.3%以上、pH5.0 では 0.5%以上、pH5.5 では 1.0%で増殖が阻害された。また、pH5.0 の 0.3%、pH6.0 の 1.0%では明らかに増殖が抑制された。以上より、乳酸に対する感受性は pH4.0 では *B. aryabhattai*, *S. acidiscabies* の順で高かったが（*S. scabiei* と *S. turgidiscabies* は不明）、pH4.5 以上では *S. scabiei*, *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies*, *B. aryabhattai* の順で高く、pH によって乳酸に対する感受性の順位は異なった。

リンゴ酸添加培地上での *B. aryabhattai* の増殖は、菌株によって異なった（表 6.5, 図 6.4）。pH4.0 において KST12 株はリンゴ酸濃度 0.3%以上で増殖が阻害され、0.03%では対照と同等の増殖を示した。KST13 株は pH4.0 では 0.03%以上、pH4.5 では 1.0%のリンゴ酸で増殖が阻害され、pH4.5 の 0.3%以上で明らかな増殖抑制がみられた。KST15 株は pH4.0 においてリンゴ酸濃度 0.3%以上で増殖阻害、0.03%以上で明らかな増殖抑制がみられた。そうか病菌に対するリンゴ酸の抗菌作用は菌種によって異なった。*S. scabiei* は pH4.5 においてリンゴ酸濃度 0.5%以上で増殖が阻害され、0.3%で明らかな増殖抑制がみられた。また pH5.0 においてもリンゴ酸濃度 1.0%では明らかに増殖が抑制された。*S. turgidiscabies* は、pH4.5 以上においては、高濃度（1.0%）のリンゴ酸濃度においても増殖に大きな影響はみられなかった。*S. acidiscabies* は、pH4.0～6.0 における 1.0%以下のリンゴ酸濃度では、増殖に大きな影響はみられなかった。以上

より，リンゴ酸に対する感受性は *S. scabiei*, *B. aryabhattai* (KST13 株 > KST12 株 = KST15 株), *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies* の順で高かった。

表 6.2 クエン酸添加培地上における細菌の増殖比較

<i>B. aryabhattai</i>					そうか病菌						
菌株	pH	添加量(%)				菌株	pH	添加量(%)			
		0.03	0.3	0.5	1.0			0.03	0.3	0.5	1.0
KST12株	4.0	3	3	3	3	<i>S. scabiei</i> S58株	4.0	-	-	-	-
	4.5	1	3	3	3		4.5	3	3	3	3
	5.0	1	1	1	1		5.0	1	2	2	2
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	2
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	2
KST13株	4.0	3	3	3	3	<i>S. turgidiscabies</i> T45株	4.0	-	-	-	-
	4.5	1	3	3	3		4.5	1	2	2	2
	5.0	1	1	1	1		5.0	1	1	1	1
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	1
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	1
KST15株	4.0	3	3	3	3	<i>S. acidiscabies</i> a10株	4.0	1	2	2	2
	4.5	1	3	3	3		4.5	1	1	1	1
	5.0	1	1	1	1		5.0	1	1	1	1
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	1
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	1

1：増殖に大きな影響なし

2：対照と比較して増殖が明らかに劣る（増殖抑制）

3：全く増殖しない（増殖阻害）

-：対照（クエン酸無添加）においても増殖しない

表 6.3 コハク酸添加培地上における細菌の増殖比較

<i>B. aryabhattai</i>					そうか病菌						
菌株	pH	添加量(%)				菌株	pH	添加量(%)			
		0.03	0.3	0.5	1.0			0.03	0.3	0.5	1.0
KST12株	4.0	1	3	3	3	<i>S. scabiei</i> S58株	4.0	-	-	-	-
	4.5	1	1	3	3		4.5	1	2	3	3
	5.0	1	1	1	1		5.0	1	1	1	3
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	1
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	1
KST13株	4.0	1	3	3	3	<i>S. turgidiscabies</i> T45株	4.0	-	-	-	-
	4.5	1	1	2	3		4.5	1	3	3	3
	5.0	1	1	1	1		5.0	1	1	2	3
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	1
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	1
KST15株	4.0	1	3	3	3	<i>S. acidiscabies</i> a10株	4.0	1	3	3	3
	4.5	1	1	2	3		4.5	1	1	3	3
	5.0	1	1	1	1		5.0	1	1	1	2
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	1
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	1

1：増殖に大きな影響なし

2：対照と比較して増殖が明らかに劣る（増殖抑制）

3：全く増殖しない（増殖阻害）

-：対照（コハク酸無添加）においても増殖しない

表 6.4 乳酸添加培地上における細菌の増殖比較

<i>B. aryabhattai</i>					そうか病菌						
菌株	pH	添加量(%)				菌株	pH	添加量(%)			
		0.03	0.3	0.5	1.0			0.03	0.3	0.5	1.0
KST12株	4.0	3	3	3	3	<i>S. scabiei</i> S58株	4.0	-	-	-	-
	4.5	1	3	3	3		4.5	1	3	3	3
	5.0	1	1	1	3		5.0	1	3	3	3
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	2	2	3
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	2	2	2
KST13株	4.0	3	3	3	3	<i>S. turgidiscabies</i> T45株	4.0	-	-	-	-
	4.5	1	3	3	3		4.5	1	3	3	3
	5.0	1	1	1	3		5.0	1	3	3	3
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	2	3
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	2
KST15株	4.0	3	3	3	3	<i>S. acidiscabies</i> a10株	4.0	1	3	3	3
	4.5	1	3	3	3		4.5	1	3	3	3
	5.0	1	1	1	3		5.0	1	2	3	3
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	3
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	2

1：増殖に大きな影響なし

2：対照と比較して増殖が明らかに劣る（増殖抑制）

3：全く増殖しない（増殖阻害）

-：対照（乳酸無添加）においても増殖しない

表 6.5 リンゴ酸添加培地上における細菌の増殖比較

<i>B. aryabhattai</i>					そうか病菌						
菌株	pH	添加量(%)				菌株	pH	添加量(%)			
		0.03	0.3	0.5	1.0			0.03	0.3	0.5	1.0
KST12株	4.0	1	3	3	3	<i>S. scabiei</i> S58株	4.0	-	-	-	-
	4.5	1	1	1	1		4.5	1	2	3	3
	5.0	1	1	1	1		5.0	1	1	1	2
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	1
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	1
KST13株	4.0	3	3	3	3	<i>S. turgidiscabies</i> T45株	4.0	-	-	-	-
	4.5	1	2	2	3		4.5	1	1	1	1
	5.0	1	1	1	1		5.0	1	1	1	1
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	1
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	1
KST15株	4.0	2	3	3	3	<i>S. acidiscabies</i> a10株	4.0	1	1	1	1
	4.5	1	1	1	1		4.5	1	1	1	1
	5.0	1	1	1	1		5.0	1	1	1	1
	5.5	1	1	1	1		5.5	1	1	1	1
	6.0	1	1	1	1		6.0	1	1	1	1

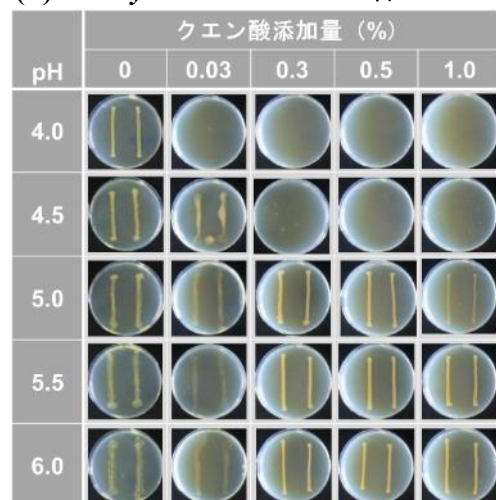
1：増殖に大きな影響なし

2：対照と比較して増殖が明らかに劣る（増殖抑制）

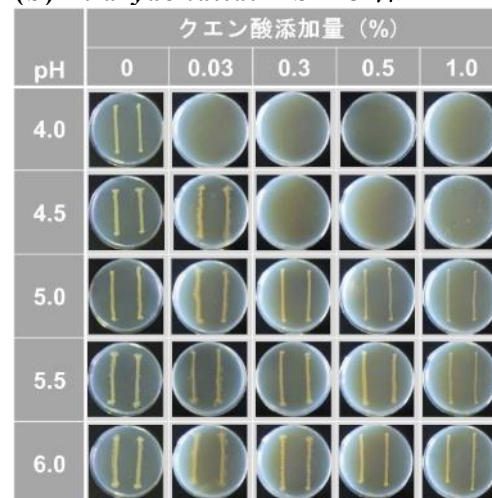
3：全く増殖しない（増殖阻害）

-：対照（リンゴ酸無添加）においても増殖しない

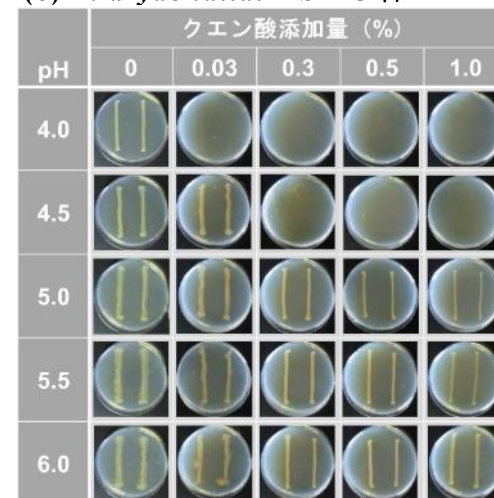
(a) *B. aryabhattai* KST12 株



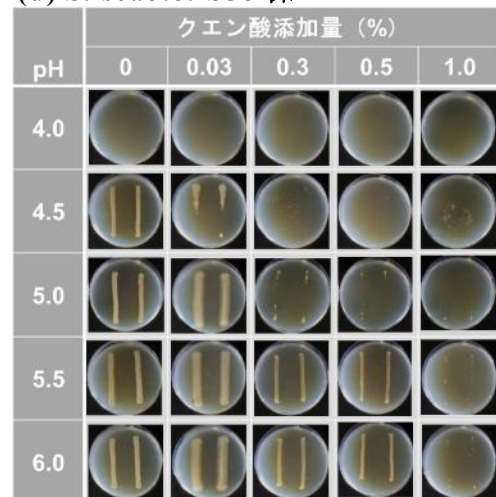
(b) *B. aryabhattai* KST13 株



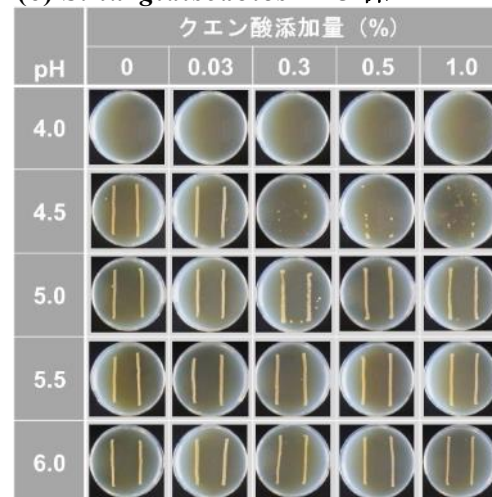
(c) *B. aryabhattai* KST15 株



(d) *S. scabiei* S58 株



(e) *S. turgidiscabies* T45 株



(f) *S. acidiscabies* a10 株

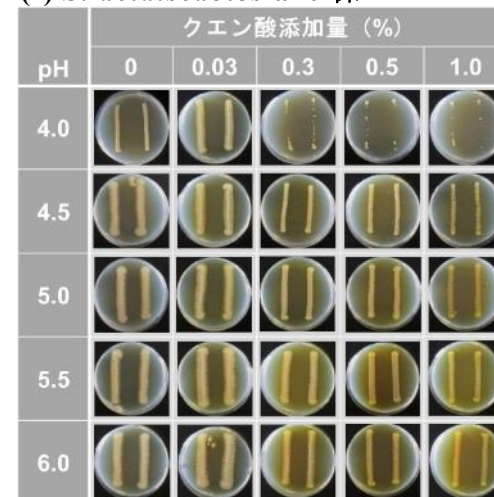
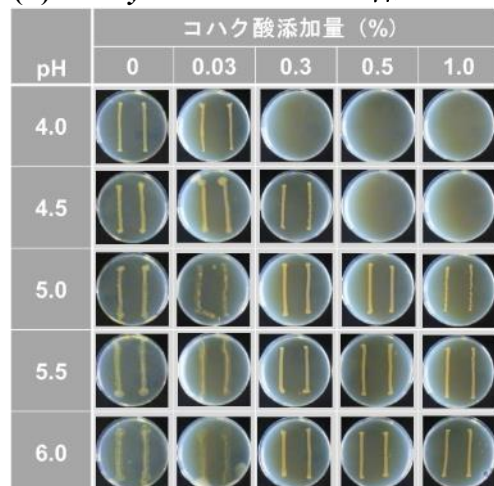


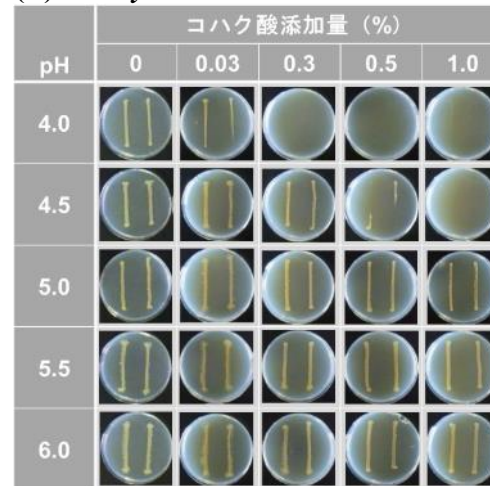
図 6.1 クエン酸添加培地上における細菌の増殖の様子

30℃で7日間培養後の様子を示す。(a)～(c)*Bacillus aryabhattai*, (d)～(f)そうか病菌

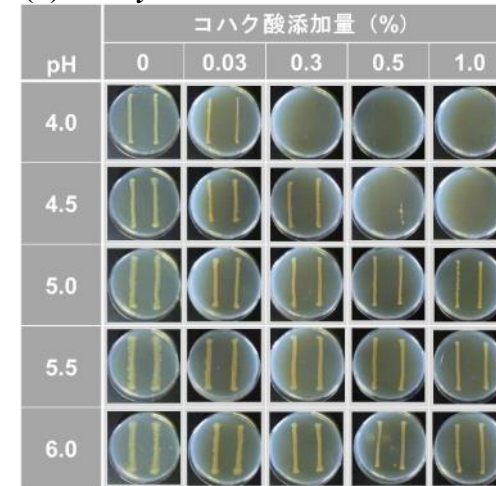
(a) *B. aryabhattai* KST12 株



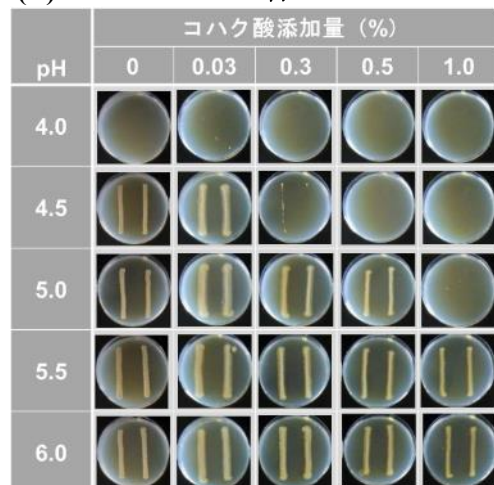
(b) *B. aryabhattai* KST13 株



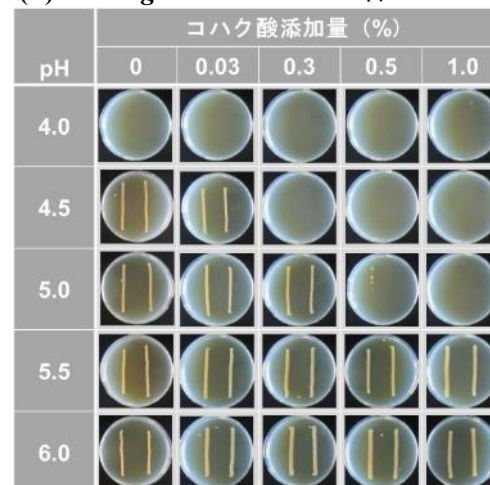
(c) *B. aryabhattai* KST15 株



(d) *S. scabiei* S58 株



(e) *S. turgidiscabies* T45 株



(f) *S. acidiscabies* a10 株

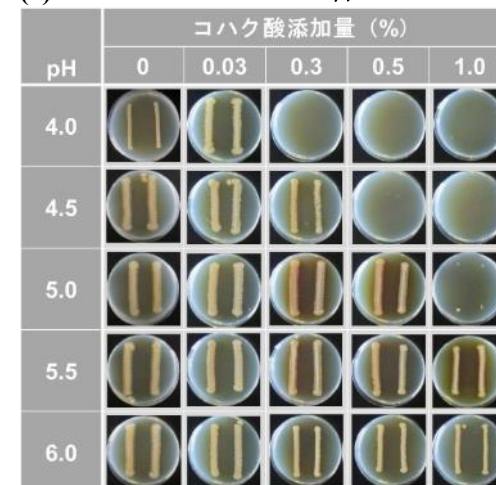
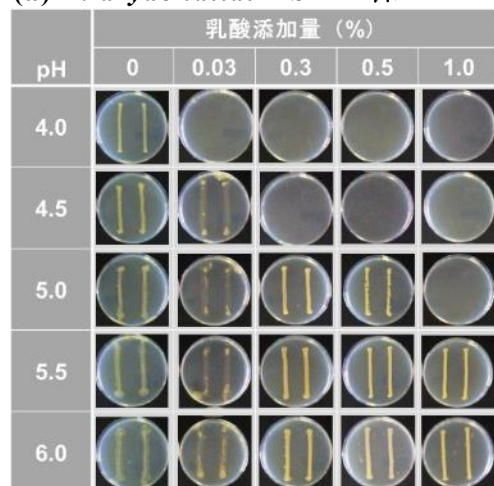


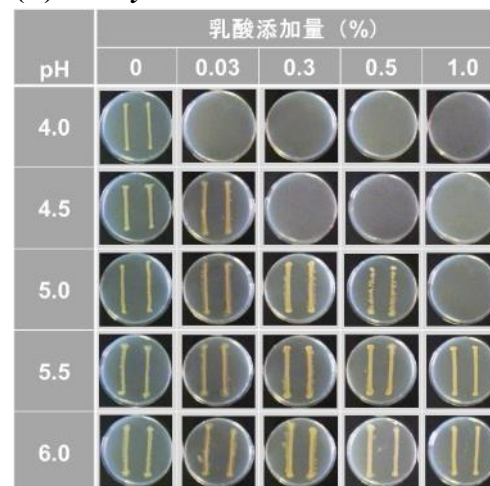
図 6.2 コハク酸添加培地上における細菌の増殖の様子

30℃で7日間培養後の様子を示す。(a)～(c)*Bacillus aryabhattai*, (d)～(f)そうか病菌

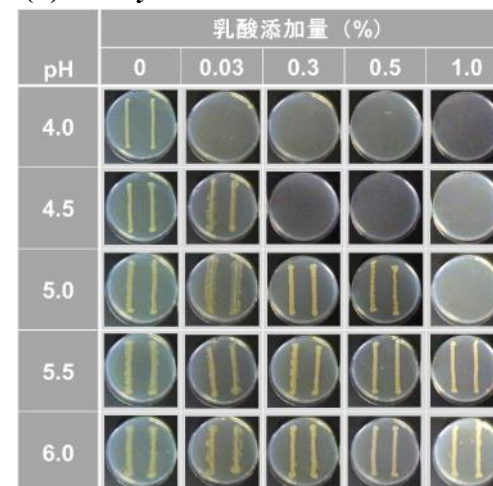
(a) *B. aryabhattai* KST12 株



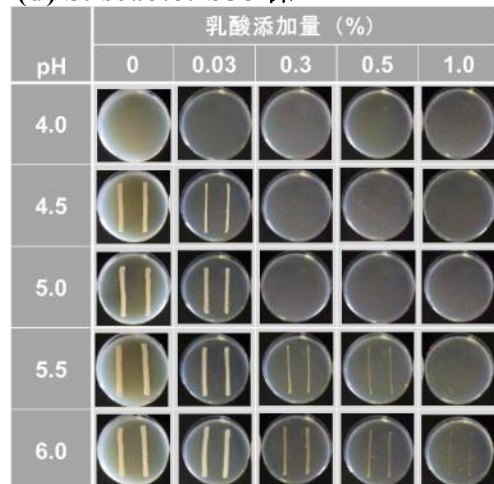
(b) *B. aryabhattai* KST13 株



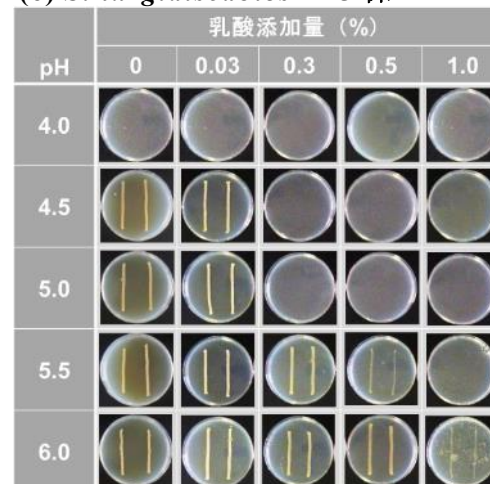
(c) *B. aryabhattai* KST15 株



(d) *S. scabiei* S58 株



(e) *S. turgidiscabies* T45 株



(f) *S. acidiscabies* a10 株

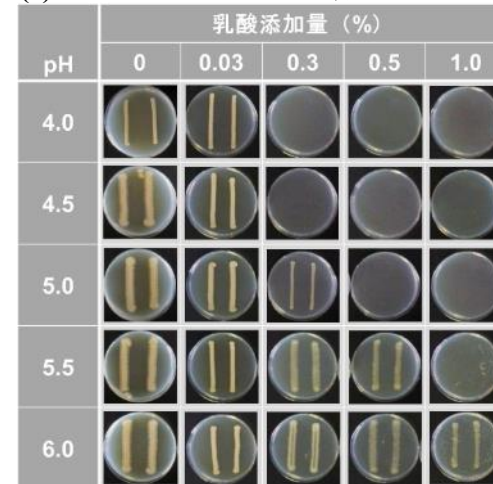
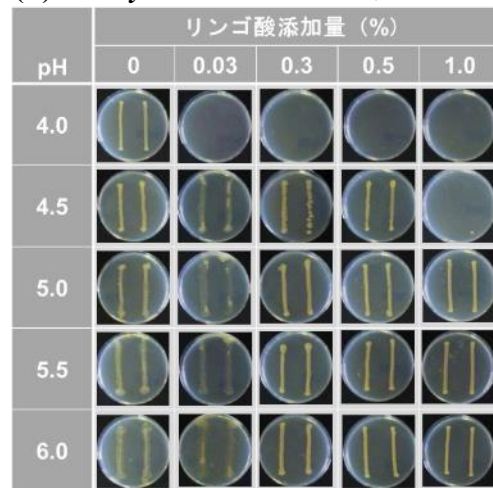
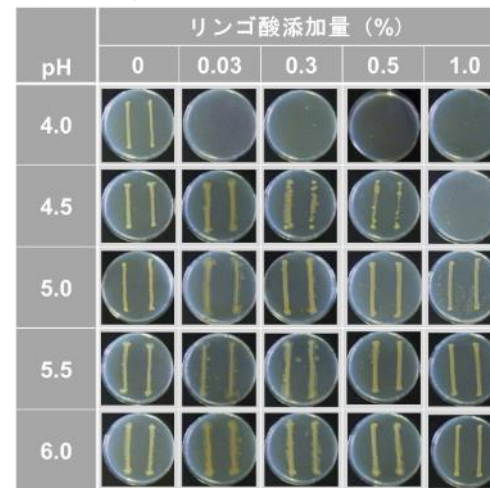


図 6.3 乳酸添加培地上における細菌の増殖の様子
30℃で7日間培養後の様子を示す。(a)～(c)*Bacillus aryabhattai*, (d)～(f)そうか病菌

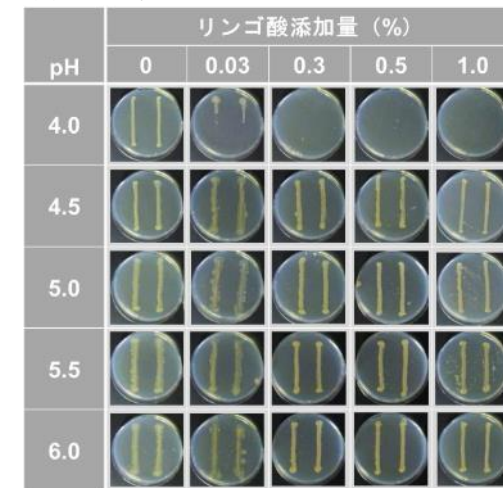
(a) *B. aryabhattai* KST12 株



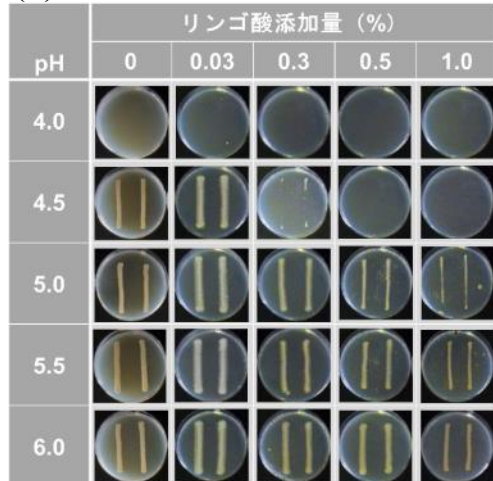
(b) *B. aryabhattai* KST13 株



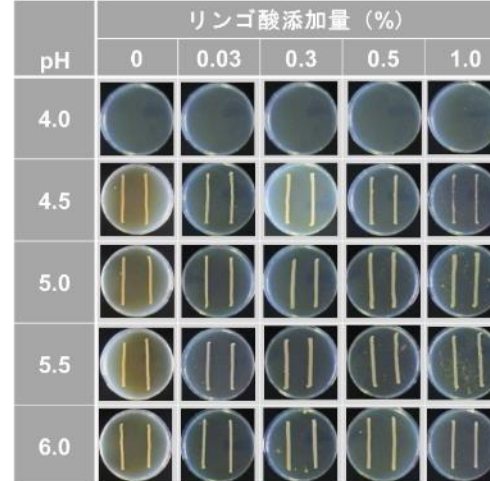
(c) *B. aryabhattai* KST15 株



(d) *S. scabiei* S58 株



(e) *S. turgidiscabies* T45 株



(f) *S. acidiscabies* a10 株

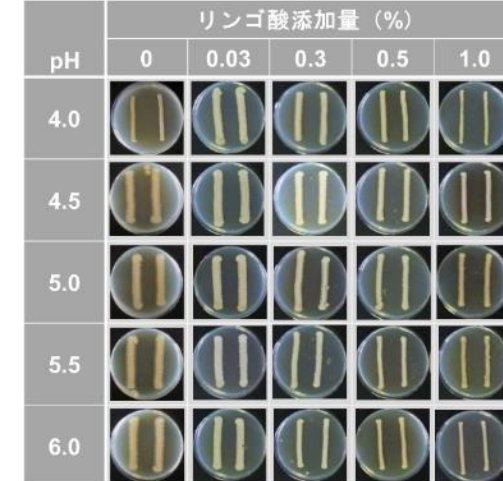


図 6.4 リンゴ酸添加培地上における細菌の増殖の様子
30℃で7日間培養後の様子を示す。(a)～(c)*Bacillus aryabhattai*, (d)～(f)そうか病菌

2-2. 焼酎蒸留残液及び有機酸溶液中における細菌の生残性

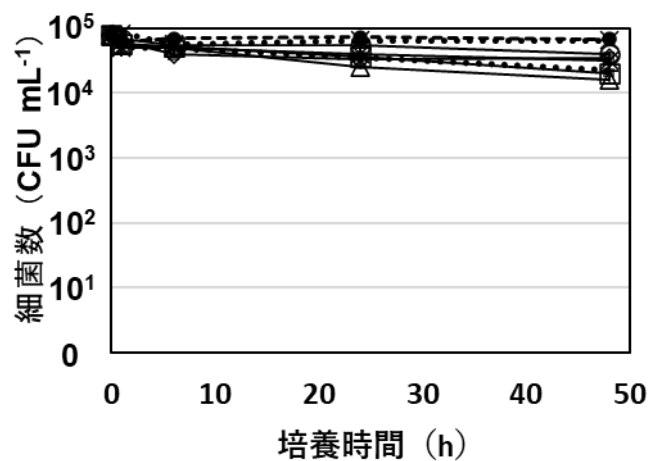
焼酎蒸留残液 5 倍希釈液および含有有機酸溶液中におけるそうか病菌およびそうか病菌に対する拮抗細菌 *Bacillus aryabhattai* の生残性を調査した (図 6.5)。

供試した拮抗細菌 *B. aryabhattai* KST15 株の細菌数は、焼酎蒸留残液 5 倍希釈液およびいずれの含有有機酸溶液中においても大きな変動はみられず、培養開始時から 48 時間後まで 10^4 CFU mL⁻¹ オーダーであった (図 6.5 (a))。一方、そうか病菌の細菌数は焼酎蒸留残液 5 倍希釈液や含有有機酸溶液の影響を受け、その変動パターンは菌種によって異なった。*Streptomyces scabiei* の培養開始時における細菌数は 6.5×10^4 CFU mL⁻¹ であったが、HCl 溶液 (HCl を用いて、焼酎蒸留残液 5 倍希釈液と同様の pH4.0 に調製した滅菌蒸留水) 中でも培養 48 時間後には 1 オーダー減少して 5.5×10^3 CFU mL⁻¹ となり、*S. scabiei* の細菌数は pH4.0 環境下では漸減することが示された (図 6.5 (b))。しかし *S. scabiei* の細菌数は、HCl 溶液中と比較して焼酎蒸留残液 5 倍希釈液や有機酸溶液中において大きく減少した。培養 48 時間後における細菌数を比較すると、含有有機酸のうちコハク酸溶液と乳酸溶液中の細菌数は対照と同等であったのに対し、クエン酸溶液中では 1.4×10^2 、リンゴ酸溶液中では 5.1×10^1 CFU mL⁻¹ に減少した。さらに、焼酎蒸留残液 5 倍希釈液および有機酸 4 種を混合した溶液中においては培養 48 時間後に *S. scabiei* は検出限界 (1.0 CFU mL⁻¹) 以下となった。*S. turgidiscabies* の培養開始時における細菌数は 7.5×10^4 CFU mL⁻¹ であったが、HCl 溶液中でも漸減し、培養 48 時間後には 9.4×10^2 CFU mL⁻¹ となった (図 6.5 (c))。培養 48 時間後の細菌数を比較すると、含有有機酸のうちクエン酸溶液とリンゴ酸溶液中の細菌数は対照と同等であったのに対し、コハク酸溶液中では 8.0 CFU mL⁻¹ に減少し、乳酸溶液中では検出限界以下となった。また、焼酎蒸留残液 5 倍希釈液および有機酸 4 種を混合した溶液中においても培養 48 時間後には *S. turgidiscabies* は検出されなかった。特に焼酎蒸留残液 5 倍希釈液中に

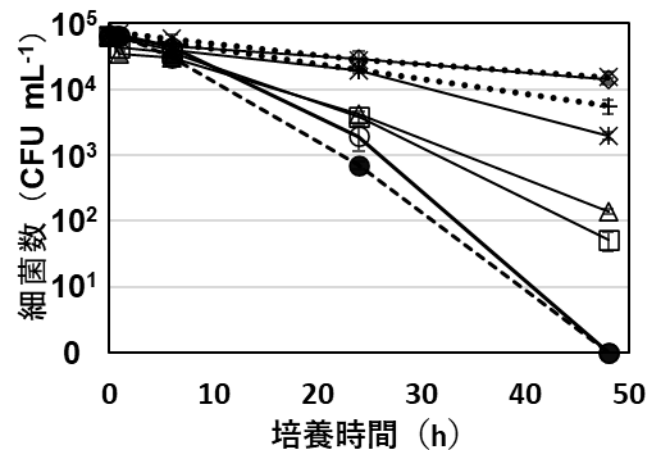
において細菌数の減少が速く，培養 6 時間後には検出限界以下となった。*S. acidiscabies* の培養開始時の細菌数は 5.1×10^4 CFU mL⁻¹ であり，HCl 溶液中では培養 48 時間後も 1.3×10^4 CFU mL⁻¹ で大きな変動は無く，他のそうか病菌 2 種と比較して pH による細菌数への影響は小さかった（図 6.5 (d)）。培養 48 時間後における細菌数を比較すると，クエン酸溶液とリンゴ酸溶液中の細菌数は対照と同等であったのに対し，コハク酸溶液中では 2.2×10^3 ，乳酸溶液中では 1.0×10^2 CFU mL⁻¹ に減少した。さらに，焼酎蒸留残液 5 倍希釈溶液および有機酸 4 種を混合した溶液中では，培養 24 時間後には検出限界以下となった。

以上のことから，焼酎蒸留残液 5 倍希釈液およびそこに含まれる有機酸は *B. aryabhattai* の細菌数に大きな影響を与えないのに対し，そうか病菌 3 種の細菌数を減少させることが明らかとなった。各有機酸の単独溶液中での細菌数の変動パターンはそうか病菌の菌種によって異なったが，いずれのそうか病菌種も焼酎蒸留残液 5 倍希釈液および有機酸 4 種を混合した溶液中においては培養 48 時間以内に検出限界以下に減少した。さらに，そうか病菌 3 種はすべて，有機酸溶液と比較して焼酎蒸留残液 5 倍希釈液中において速やかに細菌数が減少した。

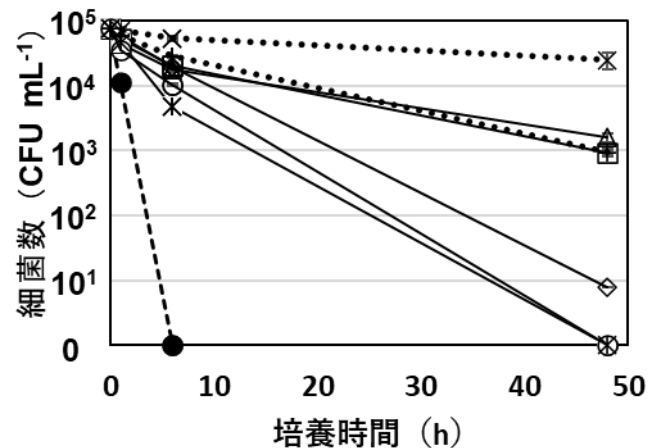
(a) *B. aryabhattai* KST15 株



(b) *S. scabiei* S58 株



(c) *S. turgidiscabies* T45 株



(d) *S. acidiscabies* a10 株

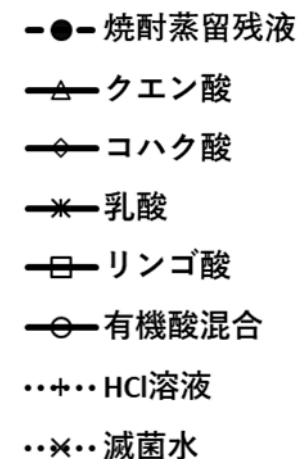
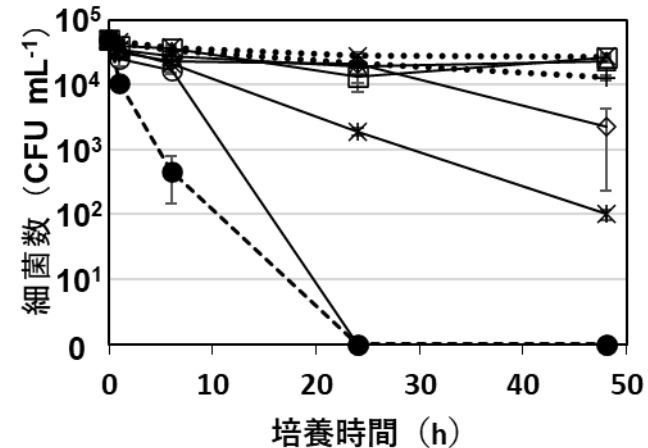


図 6.5 焼酎蒸留残液および含有有機酸溶液中における細菌数の推移

(a) *B. aryabhattai* KST15 株, (b) *S. scabiei* S58 株, (c) *S. turgidiscabies* T45 株, (d) *S. acidiscabies* a10 株
エラーバーは標準誤差を示す。

第 3 節 考察

焼酎蒸留残液を用いた種イモ浸漬処理では，種イモ上のそうか病菌密度が減少することによりそうか病の種イモ伝染が抑制される（富濱ら，2018）。第 3 章から第 5 章では，焼酎蒸留残液浸漬処理が種イモの共存細菌叢に与える影響を調査した。その結果，焼酎蒸留残液はそうか病菌が属する *Streptomyces* 属の増殖を特異的に抑制するのに対し，元々種イモに共存している *Bacillus* 属拮抗細菌の増殖は抑制しないことが明らかとなった。このことから，焼酎蒸留残液処理によるそうか病の種イモ伝染抑制には種イモに共存する *Bacillus* 属拮抗細菌が関与することが示唆された。また焼酎蒸留残液処理による種イモ共存細菌叢の変化には，共存細菌種ごとの焼酎蒸留残液に対する資化性や感受性の違いが関与すると推測された。

先行研究（未発表）では，焼酎蒸留残液を添加した寒天培地上での増殖を比較した結果，*Bacillus* 属拮抗細菌と比較してそうか病菌は焼酎蒸留残液に対する感受性が高いことが示された。さらに，焼酎蒸留残液に対する各細菌の感受性には pH も影響し，pH が低いほどそうか病菌および *Bacillus* 属拮抗細菌の最小阻止濃度は低下した。

焼酎蒸留残液に含有する成分のうち，細菌種ごとに感受性が異なり，感受性に pH が影響する成分として有機酸が挙げられる。有機酸による抗菌作用は古くから知られており，食品添加物としても利用されている。また，農業分野でもいくつかの病原菌に対しては防除効果が確認されており，例えば，マレイン酸はジャガイモの黒あし病菌（*Dickeya dianthicola*）や青枯病菌（*Ralstonia solanacearum*），輪腐病菌（*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*）に対して殺菌作用を示し（田中ら，2010），酢酸とコハク酸は銅水和剤と混合することでウリ科野菜の果実汚斑細菌病（*Acidovorax citrulli*）に対して高い防除効果を示す（原ら，2006）。また Abbasi ら（2009）は，トウモロコシを原料としたエ

タノール生産における副産濃縮液が、病原糸状菌 *Verticillium dahliae* および *Pythium ultimum* に対して防除効果を有することを示し、その要因は含有する有機酸（酢酸、ギ酸、グリコール酸など）にあると報告している。有機酸の抗菌作用には pH の低下作用と特定条件下における非解離分子の量に加えて、各有機酸本体の持つ固有の性質も影響すると考えられており（松田ら、1994）、有機酸の種類と微生物の種類の組み合わせによって抗菌作用は大きく異なる。そこで本章では、焼酎蒸留残液に含有する有機酸（クエン酸、コハク酸、乳酸、リンゴ酸）がどうか病菌および拮抗細菌 *Bacillus aryabhattai* の生育に与える影響を調査した。

はじめに、各有機酸を添加した寒天培地上における細菌の増殖程度を比較することにより、各有機酸に対するどうか病菌および *B. aryabhattai* の感受性を比較した（表 6.2～6.5, 図 6.1～6.4）。細菌の有機酸に対する感受性は菌株(strain)によっても大きく異なることが知られており（Adamczak *et al.*, 2020）、本試験で供試した *B. aryabhattai* の感受性も有機酸の種類によつては菌株(KST12, 13, 15) ごとに増殖程度に差がみられた。しかし、感受性の序列傾向がどうか病菌と入れ替わるほどの大きな差は無かった。どうか病菌の各有機酸に対する感受性は菌種によって大きく異なった。*Streptomyces scabiei* は、pH4.0 に調整した培地上では有機酸添加の有無に関わらず増殖しなかった。これは Lambert ら（1989a）の報告と一致する。pH4.5 以上における結果をみると、焼酎蒸留残液に含有する有機酸すべてに対して *B.aryabhattai* よりも感受性が高いことが示された。中でもクエン酸、コハク酸、リンゴ酸では、焼酎蒸留残液の pH に近い 4.5 における生育阻止濃度が *B. aryabhattai* 3 菌株と比較して低く、特にクエン酸では低濃度（0.03%）でも *S. scabiei* の増殖は阻害された。*S. turgidiscabies* も pH4.0 に調整した培地上では増殖しなかった。これは Miyajima ら（1998）の報告と一致する。pH4.5 以上の結果をみると、コハク酸と乳酸に対する感受性が

B. aryabhattai よりも高く、pH4.5 ではコハク酸の生育阻止濃度が *B. aryabhattai* 3 菌株と比較して低かった。*S. acidiscabies* はコハク酸と乳酸に対する感受性が *B. aryabhattai* よりも高いことが示され、pH4.0～4.5 領域ではコハク酸の生育阻止濃度が *B. aryabhattai* と比較して低い傾向がみられた。以上より、そうか病菌の種類によって感受性の高い有機酸の種類は異なるものの、*B. aryabhattai* と比較してそうか病菌 3 種に対して抗菌作用が高い有機酸種が焼酎蒸留残液には含まれることが示された。

次に、焼酎蒸留残液 5 倍希釈液および含有有機酸溶液中におけるそうか病菌および *B. aryabhattai* の細菌数の推移を調査した（図 6.5）。培養 48 時間後まで調査した結果、*B. aryabhattai* の細菌数はいずれの供試溶液中でもオーダーが変動しなかった。一方、そうか病菌 3 種の細菌数はそれぞれ異なる推移を示した。各種有機酸の単独溶液中での動態を比較すると、*S. scabiei* はクエン酸とリンゴ酸、*S. turgidiscabies* および *S. acidiscabies* はコハク酸と乳酸溶液中で細菌数が減少し、これらの有機酸は焼酎蒸留残液中の pH および濃度において、そうか病菌に対して抗菌作用を有することが示された。また各有機酸の単独溶液と比較して、有機酸 4 種を混合した溶液および焼酎蒸留残液 5 倍希釈液中において、いずれのそうか病菌も細菌数が速やかに減少した。*S. scabiei* と *S. acidiscabies* の細菌数は、有機酸 4 種を混合した溶液と焼酎蒸留残液 5 倍希釈液中において類似した挙動を示し、それぞれ 48 時間後と 24 時間後に検出限界以下にまで減少した。このことから、焼酎蒸留残液による *S. scabiei* と *S. acidiscabies* に対する抗菌作用の大半は、含有する有機酸に起因すると推察された。一方 *S. turgidiscabies* の細菌数は、有機酸混合液中では 48 時間後、焼酎蒸留残液 5 倍希釈液中ではそれよりも速い 6 時間後に検出限界以下にまで減少しており、対象微生物の種類によっては、焼酎蒸留残液が持つ有機酸以外の要因も抗菌作用に関与する可能性が示唆された。考えられる要因としては、焼酎蒸留残液の性

状や他の成分などが影響して、含有する有機酸のそうか病菌菌体への付着性や細胞膜透過性が変化した可能性が挙げられる。あるいは、焼酎蒸留残液中に含まれるアミノ酸の一種であるグリシンが作用した可能性も考えられる。グリシンには抗菌作用があり、その作用は有機酸との併用によって増大することが知られているが、クエン酸との併用効果に関する報告もある（宮尾ら，1974）。焼酎蒸留残液の抗菌作用に関する有機酸以外の要因については、さらなる詳細な試験が必要である。

寒天培地を用いた感受性試験と各溶液中での生残性試験から、焼酎蒸留残液に含有する有機酸がそうか病菌および拮抗細菌 *B. aryabhattai* の生育に与える影響を比較した。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* と比較して高く、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）もみられた。このことから、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、焼酎蒸留残液に浸漬した種イモ上におけるそうか病菌の選択的な増殖抑制作用には、含有する有機酸が関与していることが示された。

第 7 章 総合考察

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㈱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 aryabhattai* に近縁の OTU 配列は全品種で存在比が大きく，*B. aryabhattai* 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. aryabhattai* 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. aryabhattai* 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. aryabhattai* 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

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. aryabhattai* 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静菌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. aryabhattai* 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. aryabhattai* の拮抗作用によってそうか病菌の増殖が抑制されることが考えられる。これら一連の結果として、焼酎蒸留残液に浸漬し

た種イモ上ではど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。

引用文献

- 1) Abbasi PA, Lazarovits G, Weselowski B, Lalin I (2009) Organic acids in condensed distiller's solubles: Toxicity to soilborne plant pathogens and role in disease suppression, *Can. J. Plant Pathol.*, **31**, 88-95
- 2) Adamczak A, Ożarowski M, Karpiński TM (2019) Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants, *J. Clin. Med.*, **9**, 109
- 3) Bahme JB, Schroth MN (1987) Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology*, **77**, 1093-1100
- 4) Bai Y, Müller DB, Srinivas G, Oter RG, Potthoff E, Rott M, Dombrowski N, Münch PC, Spaepen S, Emsermann MR, Hütte B, McHardy AC, Vorholt J, Lefert PS (2015) Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota, *Nature*, **528**, 364-369
- 5) Bhattacharyya C, Bakshi U, Mallick I, Mukherji S, Bera B, Ghosh A (2017) Genome-guided insights into the plant growth promotion capabilities of the physiologically versatile *Bacillus aryabhatai* strain AB211. *Front. Microbiol.*, **8**, 411
- 6) Bischoff V, Cookson SJ, Wu S, Scheible WR (2009) Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J. Exp. Bot.*, **60**, 955–965
- 7) Boer SD, Copeman RJ (1974) Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Can. J. Plant. Sci.*, **54**, 115-

- 8) Braun S, Gevens A, Charkowski A, Allen C, Jansky S (2017) Potato common scab: A review of the causal pathogens, management practices, varietal resistance screening methods, and host resistance. *Am. J. Potato Res.*, **94**, 283-296
- 9) Buchholz F, Antonielli L, Kostić T, Sessitsch A, Mitter B (2019) The bacterial community in potato is recruited from soil and partly inherited across generations. *PloS ONE*, **14**, e0223691
- 10) Buchholz F, Junker R, Samad A, Antonielli L, Sarić N, Kostić T, Sessitsch A, Mitter B (2021) 16S rRNA gene-based microbiome analysis identifies candidate bacterial strains that increase the storage time of potato tubers. *Sci. Rep.*, **11**, 3146
- 11) Bukhalid RA, Takeuchi T, Labeda D, Loria R (2002) Horizontal transfer of the plant virulence gene, *necl*, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the diastatochromogenes cluster. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 738–744
- 12) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, **7**, 335-336
- 13) Chelius MK and Triplett EW (2001) The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.*, **41**, 252-263
- 14) Chen W, Liu W, Pan N, Jiao W, Wang M (2013) Oxytetracycline on functions and structure of soil microbial community. *J. Soil Sci. Plant Nut.*, **13**, 967-975
- 15) Doherty JR, Botti-Marino M, Kerns JP, Ritchie DF, Roberts JA (2017)

Response of microbial populations on the creeping bentgrass phyllosphere to periodic fungicide applications. *Plant Health Prog.*, **18**, 44-49

- 16) Errampalli D, Johnston HW (2001) Control of tuber-borne black scurf [*Rhizoctonia solani*] and common scab [*Streptomyces scabies*] of potatoes with a combination of sodium hypochlorite and thiophanate-methyl preplanting seed tuber treatment. *Can. J. Plant Pathol.*, **23**, 68–77
- 17) Garbeva P, Overbeek LS, Vuurde JW, Elsas JD (2001) Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis. *Microb. Ecol.*, **41**, 369-383
- 18) Han JS, Cheng JH, Yoon TM, Song J, Rajkarnikar A, Kim WG, Yoo ID, Yang YY, Suh JW (2005) Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. *J. appl. Microbiol.*, **99**, 213-221
- 19) 原 一晃・水上涼子・島津樹一・白川 隆 (2006) ウリ科野菜の果実汚斑細菌病に対する銅水和剤と有機酸の混合処理ならびに過酢酸処理の種子消毒防除効果, 関西病虫害研究会報, **48**, 57-60
- 20) Hassani MA, Durán P, Hacquard S (2018) Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, **6**, 58
- 21) Hill J, Lazarovits G (2004) A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Can. J. Plant. Pathol.*, **27**, 46–52
- 22) Hiltunen LH, Weckman A, Ylhäinen A, Rita H, Richter E, Valkonen JPT (2005) Responses of potato cultivars to the common scab pathogens, *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies*. *Ann. Appl. Biol.*, **146**, 395-403
- 23) Ikeda S, Kaneko T, Okubo T, Rallos LE, Eda S, Mitsui H, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Minamisawa K (2009) Development of a bacterial cell enrichment

- method and its application to the community analysis in soybean stems. *Microb. ecol.*, **58**, 703-714
- 24) Ikenaga M, Asakawa S, Muraoka Y, Kimura M (2003) Bacterial communities associated with nodal roots of rice plants along with the growth stages: estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **49**, 591-602
 - 25) Ikenaga M, Katsuragi S, Handa Y, Katsumata H, Chishaki N, Kawauchi T, Sakai M (2018) Improvements in bacterial primers to enhance selective SSU rRNA gene amplification of plant-associated bacteria by applying the LNA oligonucleotide-PCR clamping technique. *Microbes Environ.*, **33**, 340-344
 - 26) 池永 誠・川内智裕・境 雅夫 (2016) 分子生態学的手法を用いた植物共存細菌の多様性解析法の確立と新たな研究展開, *土と微生物*, **70**, 23-34
 - 27) Ikenaga M, Muraoka Y, Toyota K, Kimura M (2002) Community structure of the microbiota associated with nodal roots of rice plants along with the growth stages: estimation by PCR-RFLP analysis. *Biol. Fert. Soils*, **36**, 397-404
 - 28) Ikenaga M, Sakai M (2014) Application of locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide-PCR clamping technique to selectively PCR amplify the SSU rRNA genes of bacteria in investigating the plant-associated community structures. *Microbes Environ.*, ME14061
 - 29) Ikenaga M, Tabuchi M, Oyama T, Akagi I, Sakai M (2015) Development of LNA oligonucleotide-PCR clamping technique in investigating the community structures of plant-associated bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1556-1566
 - 30) Kers JA, Cameron KD, Joshi MV, Bukhalid RA, Morello JE, Wach MJ, Gibson DM, Loria R (2005) A large, mobile pathogenicity island confers plant

- pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.*, **55**, 1025–1033
- 31) Kobayashi A, Kobayashi YO, Someya N, Ikeda S (2015) Community analysis of root-and tuber-associated bacteria in field-grown potato plants harboring different resistance levels against common scab. *Microbes Environ.*, **30**, 301-309
 - 32) Kõiv V, Roosaare M, Vedler E, Kivistik PA, Toppi K, Schryer DW, Remm M, Mäe A (2015) Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers. *Sci. Rep.*, **5**, 116061-18
 - 33) Komyoji T, Sugimoto K, Mitani S, Matsuo N, Suzuki K (1995) Biological properties of a new fungicide, fluazinam. *J. Pestic. Sci.*, **20**, 129-135
 - 34) 小山修 (2009) 土壌診断と拮抗微生物によるジャガイモそうか病防除技術, 土と微生物, **63**, 84-88
 - 35) Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1870-1874
 - 36) Lambert DH, Loria R (1989a) *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, **39**, 387-392
 - 37) Lambert DH, Loria R (1989b) *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **39**, 393-396
 - 38) Lapwood DH, Wellings LW, Hawkins JH (1973) Irrigation as a practical means to control potato common scab (*Streptomyces scabies*): Final experiment and conclusions. *Plant Pathol.*, **22**, 157-163
 - 39) Lee S, Ka JO, Song HG (2012) Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhatai* in microcosm soil. *J. Microbiol.*, **50**, 45-49

- 40) Lehtonen MJ, Rantala H, Kreuze JF, Bång H, Kuisma L, Koski P, Virtanen E, Vihlman K, Valkonen JPT (2004) Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant Pathology*, **53**, 280-287
- 41) Liao J, Luo L, Zhang L, Wang L, Shi X, Yang H, Tan H, Tan L, Liu X, Wang D, Mao Z (2021). Comparison of the effects of three fungicides on clubroot disease of tumorous stem mustard and soil bacterial community. *J. Soils Sediments*, **22**, 256-271
- 42) Lin C, Tsai CH, Chen PY, Wu CY, Chang YL, Yang YL, Chen YL (2018) Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *PloS ONE*, **13**, e0196520
- 43) Liu D, Anderson NA, Kinkel LL(1995) Biological control of potato common scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Aps.*, **85**, 827-831
- 44) Loria R, Bukhalid RA, Fry BA (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.*, **81**, 836-846
- 45) Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8228-8235
- 46) Marilley L, Aragno M (1999) Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil Ecol.*, **13**, 127-136
- 47) Martin WH (1920) The relation of sulfur to soil acidity and to the control of potato scab. *Soil Sci.*, **9**, 393-408
- 48) 松田敏生・矢野俊博・丸山晶弘・熊谷英彦（1994）有機酸類の抗菌作用 各種 pH における最小発育阻止濃度の検討, 日本食品工業学会誌, **41**, 687-701

- 49) 松本和夫 (1979) ジャガイモそうか病菌の孢子形成培地と菌の長期保存法, 植物防疫, **33**, 461-463
- 50) Meng QX, Jiang HH, Hanson LE, Hao JJ (2012) Characterizing a novel strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 for potential biological control application. *J. Appl. Microbiol.*, **113**, 1165-1175
- 51) Misaghi IJ, Donndelinger CR (1990) Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, **80**, 808-811
- 52) Miyajima K, Tanaka F, Takeuchi T, Kuninaga S (1998) *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 495-502
- 53) 宮尾茂雄・鈴木 晋 (1974) グリシンおよび二, 三の有機酸塩のウイナーソーセージ由来微生物に対する制菌効果, 食品衛生学雑誌, **15**, 491-494
- 54) 向井伸彦・森本朋子・福家成美・吉田聡子・熊崎 努・寺本拓生ら (2017) 焼酎粕の栄養成分及び機能性成分の含量調査, 日本醸造協会誌, **112**, 695-706
- 55) 向島信洋・森 一幸・坂本 悠・田宮誠司・草原典夫・石橋祐二・中尾敬 (2012) バレイショ新品種 「さんじゅう丸」, 長崎県農林技術開発センター研究報告, **3**, 27-51
- 56) 内藤繁男 (2005) 総説:「馬鈴しょそうか病に関する国際シンポジウム (IPSS2004)」から, 植物防疫, **59**, 201-204
- 57) 中尾 敬・向島信洋・森 一幸・石橋祐二・茶谷正孝・森元 幸 (2004) 暖地二期作向けバレイショ新品種 「アイユタカ」 の育成, 九農県, **66**, 41
- 58) 西 八束・尾松直志 (2006) 銀担持ゼオライト剤の種イモ消毒によるジャガイモそうか病の防除効果, 九州病害虫研究会報, **52**, 24-27
- 59) 西 八束・竹内 徹・鈴木文彦・菅 康弘・田代暢哉・中村正幸・岩井

- 久 (2015) 鹿児島県および長崎県におけるジャガイモそうか病を引き起こす *Streptomyces* 属菌の分布, 日植病報, **81**, 22-31
- 60) Park YG, Mun BG, Kang SM, Hussain A, Shahzad R, Seo CW, Kim AY, Lee SU, Oh KY, Lee DY, Lee IJ, Yun BW (2017) *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PloS one*, **12**, e173203
- 61) Pung H, Cross S (2000) Common scab incidence on seed potatoes, and seed-borne disease control. Conference Proceedings of potatoes. 31th July-3th August, Adelaide, South Australia
- 62) Ramesh A, Sushil KS, Yadav N (2013) Phosphorus mobilization from native soil P-pool upon inoculation with phytate-mineralizing and phosphate-solubilizing *Bacillus aryabhattai* isolates for improved P-acquisition and growth of soybean and wheat crops in microcosm conditions. *Agr. Res.*, **3**, 118-127
- 63) Sakai M and Ikenaga M (2013) Application of peptide nucleic acid (PNA)-PCR clamping technique to investigate the community structures of rhizobacteria associated with plant roots. *J. Microbiol. Meth.*, **92**, 281-288
- 64) Sakai M, Matsuka A, Komura T, Kanazawa S (2004) Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant roots. *J. Microbiol. Meth.*, **59**, 81-89
- 65) Shi W, Li M, Wei G, Tian R, Li C, Wang B, Lin R, Shi C, Chi X, Zhou B, Gao Z (2019) The occurrence of potato common scab correlates with the community composition and function of the geocaulosphere soil microbiome. *Microbiome*, **7**, 14
- 66) Shirling ET, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces*

- species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**, 313-340
- 67) Shivaji S, Chaturvedi P, Begum Z, Pindi PK, Manorama R, Padmanaban DA, Shouche SY, Pawar S, Vaishampayan P, Dutt CBS, Datta GN, Manchanda RK, Rao UR, Bhargava PM, Narlikar JV (2009) *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, **59**, 2977-2986
- 68) Someya N, Kobayashi YO, Tsuda S, Ikeda S (2013) Molecular characterization of the bacterial community in a potato phytosphere. *Microbes Environ.*, **28**, 295-305
- 69) Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Arsenault WJ, Buchanan NA (1999) Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology*, **48**, 360-369
- 70) 田渕尚一・小村国則・石橋祐二・茶屋正孝・森元 幸 (1995) バレイショ新品種 「アイノアカ」 の特性, 九農県, **57**, 46
- 71) 田方康平・奥田誠一・根岸寛光・篠原弘亮 (2014) ウメ葉に生息している細菌群とそれらのストレプトマイシン感受性, 日植病報, **80**, 25 (講要)
- 72) 田中文夫 (2003) ジャガイモそうか病菌の同定・識別と発病機構, 土と微生物, **58**, 69-77
- 73) 田中文夫, 清水基滋, 角 一雄, 大上大輔, 小笠原美奈子, 不破秀明, 児玉不二雄 (2010) ジャガイモの種いも伝染性細菌病の切断刀伝染に対するマレイン酸の防除効果, 北日本病害虫研究会報, **61**, 57-60
- 74) 田代暢哉 (2003) ジャガイモそうか病の種イモ伝染と強酸性土壌での発生の実態, 土と微生物, **58**, 79-86

- 75) 田代暢哉・松尾良満 (1986) ジャガイモそうか病の種いも伝染による発生と種いも伝染に及ぼす土壌消毒および種いも消毒の影響, 九州病害虫研究会報, **32**, 24-27
- 76) 田代暢哉・山本平三・松尾良満 (1982) ジャガイモそうか病の発病経過と灌水による防除, 九州病害虫研究会報, **28**, 36-40
- 77) 富濱 毅・白尾 吏・森 清文・菅 康弘・三星暢公・紀岡雄三・野口勝憲 (2018) 大麦発酵濃縮液の種イモコーティング処理によるジャガイモそうか病の種イモ伝染の抑制, 土肥誌, **89**, 31-36
- 78) Wang A, Lazarovits G (2005) Role of seed tubers in the spread of plant pathogenic *Streptomyces* and initiating potato common scab disease. *Am. J. Potato Res.*, **82**, 221-230
- 79) Wanner LA (2009) A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. *Am. J. Potato. Res.*, **86**, 247-264
- 80) Weinert N, Meincke R, Gottwald C, Heuer H, Schlöter M, Berg G, Smalla K (2010a) Bacterial diversity on the surface of potato tubers in soil and the influence of the plant genotype. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **74**, 114-123
- 81) Weinert N, Meincke R, Gottwald C, Radl V, Dong X, Schlöter M, Berg G, Smalla K (2010b) Effects of genetically modified potatoes with increased zeaxanthin content on the abundance and diversity of rhizobacteria with in vitro antagonistic activity do not exceed natural variability among cultivars. *Plant Soil*, **326**, 437-452
- 82) Winker S, Woese CR (1991) A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Syst. Appl. Microbiol.*, **14**, 305-310
- 83) Yan Y, Zhang L, Yu MY, Wang J, Tang H, Yang ZW, Wan P (2016) The genome

of *Bacillus aryabhattai* T61 reveals its adaptation to Tibetan Plateau environment. *Genes Genom*, **38**, 293-301

- 84) 山本広基 (2003) 土壤環境中における農薬の微生物生態影響評価に関する研究, 日本農薬学会誌, **28**, 223-229
- 85) Yang CH, and Crowley DE (2000) Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 345-351

謝 辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり，終始温かいご支援とご指導を賜りました，指導教官である鹿児島大学農学部教授 境 雅夫 博士に謹んで深謝の意を表します。また本研究に対してご指導とご助言を賜りました，副指導教官である佐賀大学農学部准教授・上野大介博士，佐賀大学農学部名誉教授・染谷孝博士，鹿児島大学農学部准教授・池永誠博士に厚く感謝の意を表します。また博士論文の審査にあたり，副査としてご助言を賜りました，鹿児島大学農学部准教授・中村正幸博士と鹿児島大学農学部准教授・樗木直也博士に心より感謝申し上げます。

本研究において，長崎県農林技術開発センター・菅康弘博士と鹿児島県農業開発総合センター・富濱毅博士には，貴重な試料をご提供頂くとともに，ご助言，ご協力を賜り，ここに厚く御礼申し上げます。

また本研究を遂行するにあたり，農研機構北海道農業研究センター・池田成志 博士ならびに秋田県立大学名誉教授・古屋廣光博士には，実験手法をはじめとして様々のご助言を賜り，感謝申し上げます。

本研究の機会をいただき，終始激励を賜りました，片倉コープアグリ(株)小林武雄代表取締役社長，橘田安正代表取締役常務執行役員，野村豊前代表取締役社長，佐久間藏前取締役常務執行役員には衷心より感謝申し上げます。また，本研究の遂行と取りまとめに絶えずご支援，ご鞭撻を賜りました，片倉コープアグリ(株)野口勝憲技術顧問，筑波総合研究所藤澤英司所長，紀岡雄三前所長に厚く感謝の意を表します。最後に，本研究の遂行をご支援頂きました，片倉コープアグリ(株)筑波総合研究所の皆様にも心より感謝申し上げます。

要 約

ジャガイモそうか病は、病原性 *Streptomyces* spp.によって引き起こされる世界的な重要病害の一つである。そうか病は土壌と種イモによって伝染するが、病原菌の新たな侵入を防ぐ対策として種イモ消毒の重要性が高まっている。現在国内では、化学合成殺菌剤を用いた種イモ消毒が一般的であるが、使用後の廃液処理や人畜危害、環境負荷、耐性菌の出現等の問題が指摘されている。このような問題が生じにくい代替資材として、焼酎蒸留残液が提案されている。焼酎蒸留残液に浸漬した罹病種イモ上では、殺菌剤と同等に病原菌密度が低下し、そこから伸長したストロン上に形成する新生塊茎の発病が低減する（富濱ら，2018）。本研究では、焼酎蒸留残液浸漬処理による種イモ伝染抑制効果を安定的に高めるために、そのメカニズムを生態学的に解明することを目的とした。

種イモ表皮には多様な細菌が共存しているが、同一条件下で栽培した場合の群集構造は品種間で類似しており、特定の細菌が優占して共存していることが示された。汚染土壌で栽培した種イモでは、病斑を除く表皮に優占して共存する細菌属の中にそうか病菌が属する *Streptomyces* 属が含まれ、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、見かけ上健全な種イモ表皮にもそうか病菌が共存しており、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、*Bacillus* 属は品種や栽培土壌に因らず、安定的かつ優占的に種イモに共存していることが示された。さらに、種イモに共存する *Bacillus* 属の優占種である *Bacillus aryabhattai* は、そうか病菌に対して拮抗作用を示すことが明らかとなり、種イモ共存細菌叢は元来、そうか病菌に対して静菌作用を有していることが示された。これらのことから、種イモに共存する細菌群集構造の制御には細菌種間の相互作用も関与しており、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す

ると推察された。

種イモに共存する細菌群は植付け後に増殖し、その群集構造は大きく変動する。殺菌剤処理した種イモでは、広範囲の細菌群の増殖が抑制され、その中には拮抗細菌 *B. aryabhattai* も含まれることが明らかとなった。一方、焼酎蒸留残液は種イモ共存細菌叢全体に対する攪乱は小さく、*Streptomyces* 属の増殖を特異的に抑制することが示された。加えて、焼酎蒸留残液に浸漬した種イモおよびそこから伸長したストロンでは、拮抗細菌 *B. aryabhattai* の存在比が高まる可能性も示唆された。さらに、そうか病菌は *B. aryabhattai* と比較して、焼酎蒸留残液に含まれる抗菌成分の一つである有機酸（クエン酸、コハク酸、乳酸、リンゴ酸）に対して感受性が高いことが示された。*B. aryabhattai* はまた、各種炭素化合物やアミノ酸等に対する資化能力の高さや環境ストレス耐性の高さが知られている（Park *et al.*, 2017 ; Shivaji *et al.*, 2009）。これらのことから、*B. aryabhattai* は、焼酎蒸留残液浸漬処理によって有機酸の付加等で環境が大きく変化した種イモ上でも生存し、かつ付加された有機栄養分を資化することでその存在比を増加させて定着し、ストロンを介して新生塊茎にまで伝播すると推察された。一方、種イモ上のそうか病菌は、焼酎蒸留残液に含まれる有機酸によって増殖が抑制されるとともに、定着した *B. aryabhattai* の拮抗作用によって密度が低下し、新生塊茎への伝播も低減すると考えられた。

以上より、焼酎蒸留残液を用いた種イモ消毒法は、種イモに共存する細菌叢の機能を利用した持続可能な技術といえる。

要 約 (英文)

Potato common scab is a serious disease caused by soil- and tuber-borne pathogenic *Streptomyces* species. The surface coating treatment of seed tubers is one of effective methods in controlling tuber-borne common scab. Microbicide chemicals are generally used for the seed treatment, while the post-distillation slurry of barley-shochu can also have the similar effect to reduce the population density of the plant pathogen infected seed tubers, resulting in the decrease of disease incidence in the daughter tubers as well as the microbicide treatment (Tomihama et al., Jpn J Soil Sci Plant Nutr, 89:31-36, 2018). The objective of this study was to ecologically elucidate the detailed mechanism of the post-distillation slurry treatment.

The results showed that the bacterial community associated with periderm of seed tubers was composed of a taxonomically diversified bacteria, with the genus *Bacillus* spp. being the universal and predominant genus on the seed tubers throughout all examined potato genotype and cultivation fields. One of the predominant species belonging to *Bacillus* genus was *B. aryabhattai*, which showed antagonistic ability against pathogenic *Streptomyces scabiei* isolated from the periderm of seed tubers. The microbicide treatment drastically reduced the bacterial population and affected the community structures of phylogenetically broad bacteria. In particular, the abundant ratio of *Bacillus* spp. was decreased including *B. aryabhattai*. In contrast, the post-distillation slurry treatment mostly maintained the original bacterial community of seed tubers, and suppressed the growth of *Streptomyces* spp. selectively, while increased the ratio of *Bacillus* spp. In addition, the pathogenic *Streptomyces* spp. tended to be more sensitive to the organic acids; citric acid, succinic acid, lactic acid and malic acid, which were contained in the post-distillation slurry.

Thus, obtained results suggested that the antagonistic *B. aryabhattai* and the organic acids assumed to contribute the suppressing tuber-borne common scab by the post-distillation slurry.