

地域資源を用いた堆肥の微生物群集解析と青枯病抑制への適用

長岡技術科学大学大学院 (学) ○宮原将志 (学) 蔵下はづき
長岡技術科学大学 (正) 幡本将史 (正) 渡利高大 (正) 山口隆司

1. はじめに

青枯病は、土壌中に生息する細菌 *Ralstonia solanacearum* により引き起こされる土壌病害の一種である。*R. solanacearum* は植物病原菌であり、科学的・生物学的に重要な植物細菌病原体 10 種の中で 2 位に位置している¹⁾。日本においては、ナス科作物をはじめとした 27 科 50 種の作物への被害が報告されている。*R. solanacearum* は土壌に一度定着すると土壌中から除去することは困難であり、その防除法として太陽熱殺菌や燻蒸剤による土壌消毒、抵抗性接ぎ木による病害回避、輪作等がある。しかし、これらの方法は栽培コストの増加や圃場環境の変化、一定以上の技術を要求される等の問題がある。近年、青枯病に対して有効な微生物 (*Bacillus amyloliquefaciens*) を用いた研究は報告されているが、実用化には至っていない。

本研究では、*Bacillus* 属細菌を含んだ地域資源を活用した堆肥が青枯病の抑止に対して有効であるかを目的とし、青枯病が発生したトウガラシ (*Capsicum annuum* L.) 栽培圃場の一部を使用し、圃場試験を行った。

2. 実験方法

2.1 圃場及び試料の採取

圃場実験には、12.5m×3m の圃場内の 2 畝を使用し、これを 3 区画に分け、それぞれ試験区 1, 2, 3 とした (図 1)。試験区 1 はコントロール系とし、従来と同様の栽培を行い、試験区 2 及び試験区 3 に本研究で作製した堆肥の施肥を行なった。堆肥の組成は表 1 に示す。施肥量は試験区 2 で 3 kg/m²、試験区 3 で 6 kg/m² とした。土壌試料の採取は、それぞれの試験区内の畝を対角線採土法により採取、混合し、測定および分析に供した。

表 1 試験区と堆肥の組成

試験区 1	通常堆肥 (牛糞堆肥)
試験区 2	作製堆肥 (牛糞堆肥+下水汚泥+米糠)
試験区 3	作製堆肥 (牛糞堆肥+下水汚泥+米糠)

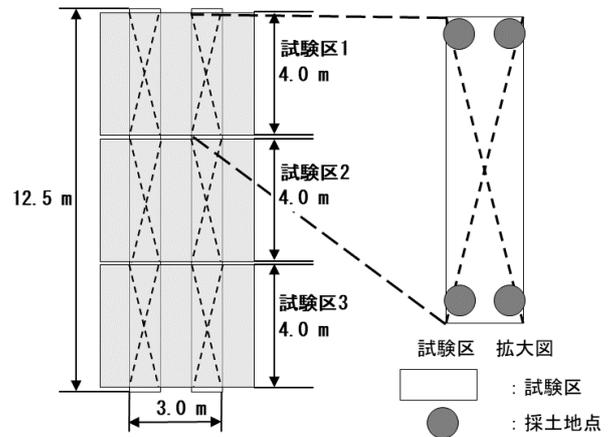


図 1 試験区概略

2.2 発病度調査

発病度は、日本植物防疫協会の調査法²⁾に従い行なった。0:発病を認めず、1:茎頂に萎れを観察、2:葉に萎れを観察、3:株全体が青枯状、4:枯死の 5 段階で株毎に指数別評価を行い、これらを用いて次式より算出し各試験区の発病度とした。

$$\text{発病度} = \left\{ \sum (\text{発病指数別株数} \times \text{発病度}) \times 100 \right\} \div (\text{総調査数} \times 4)$$

2.3 青枯病菌検出及び菌数測定

青枯病菌検出及び測定には、各試験区の土壌試料と青枯病が確認された株を採取し使用した。青枯病菌の抽出は土壌試料においては、土壌微生物実験法²⁾に則り、青枯病が確認された株については、2つの条件 (条件: ①根本付近で切断後、菌泥の流出が確認できるまで蒸留水に断面を浸す。②根本付近の茎を輪切りにし、維管束が露出するまで表皮を剥ぎ、蒸留水に浸漬させる) で実施した。青枯病菌の培養には原・小野培地²⁾を使用し、30°Cで 72 時間以上静置培養を行い、F 型コロニーを測定することで測定・検出を行なった。乾土 1 g 当りの青枯病菌 N は次式より算出した。青枯病確認株の青枯病菌 N の算出は、懸濁液及び希釈液を直接用いての測定であるため、試料重量に関する項を 1 として算出した。

$$N = \text{集落数平均値} \times \text{希釈倍率} \times 1 / \text{培地に滴下した量 (mL)} \times \text{原土重量 (g)} / \text{乾燥重量 (g)}$$

2.4 *Bacillus* 属細菌数の測定

Bacillus 属細菌の測定には、NB 平板培地を使用し、37°Cで 48 時間静置培養し、乾土 1 g 当りの生菌数を算出した。

3. 結果と考察

青枯病の発病度を図 2、青枯病菌数測定の結果を図 3 に示す。枯死株からは、 $10^3 \sim 10^4$ cfu/g の青枯病菌が検出された。一方、土壌試料からの青枯病菌の検出数は、試験区 1 では約 10^3 cfu/g、試験区 3 で約 10^2 cfu/g、試験区 2 では非検出となった。枯死株中からは、条件②において多くの青枯病菌が検出された。これより、青枯病菌が植物導管内に生息していることが確認できた。青枯病菌の検出数は、作製堆肥を最も多く施肥した試験区 3 の方が試験区 1 よりも低いものとなった。

青枯病の発病度は、苗の植付から 12 週目と 15 週目の結果を示す。通常堆肥のみを施肥したコントロール系の試験区 1 では、発病度は 12 週目で 41%、15 週目で 62.5%となり、20%以上上昇した。一方で、作製堆肥を施肥した試験区では、発病度は 40%以下に抑制されており、施肥量が増加するごとに発病度が低下していることが確認できた。

土壌中の *Bacillus* 属細菌は、試験区 2,3 は試験区 1 の 1.3, 1.7 倍の菌数であったが、全ての試験区で 10^7 cfu/g 程度であった。このことから、青枯病の抑制効果は、今回作製した堆肥内の *Bacillus* 属細菌数だけではなく、*Bacillus* 属細菌の種類も重要である可能性が考えられる。特に、本研究で作製した堆肥は下水汚泥を使用しているため、これに生息する *Bacillus* 属細菌に拮抗作用が存在する可能性が示唆された。

これらの結果より、*Bacillus* 属細菌を含んだ堆肥の施肥により青枯病の抑制が可能であることが示唆された。

4. まとめ

本研究では、以下の知見を得た。

- ・本研究で作製した堆肥を 3 kg/m^2 以上の施肥により、無施肥のものと比較し 20%以上の発病度抑制する事ができた。また、施肥区においては、発病度の上昇を 10%以下に留めることができた。
- ・堆肥を施肥することより青枯病菌数の減少が可能であることが確認できた。

今後は、堆肥内に存在する *Bacillus* 属細菌の単離

や特定、単離された各 *Bacillus* 属細菌の拮抗作用を確認するために今回採取された青枯病菌との対峙培養を実施する。また、今回採取された青枯病菌についても類型を決定する。

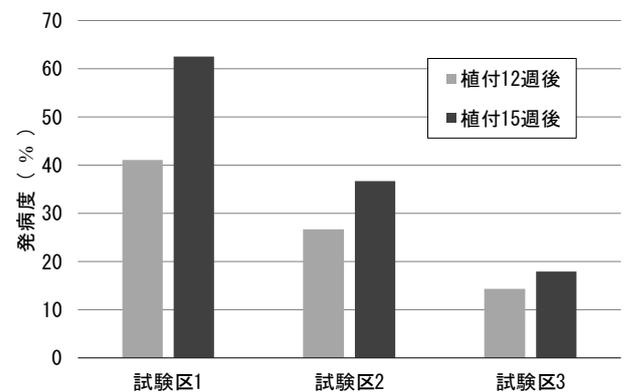


図 2 各試験区の発病度

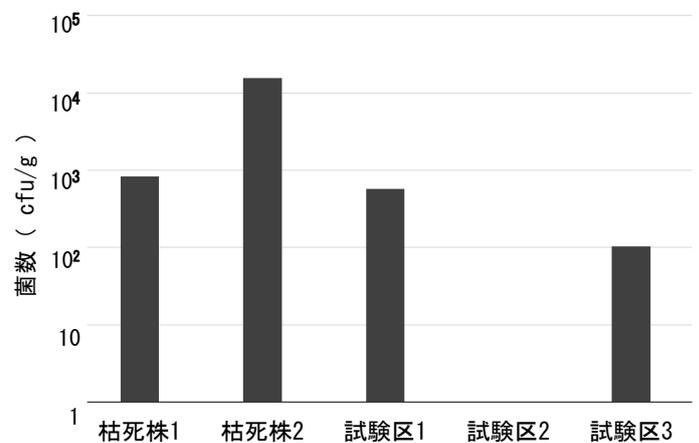


図 3 青枯病菌検出数

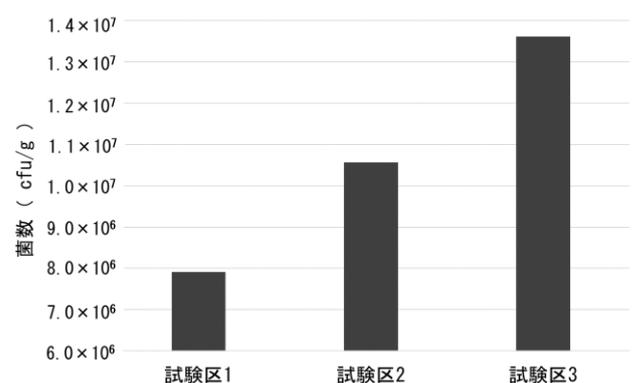


図 4 *Bacillus* 属菌数検出数

文献

- 1). Mansfield et al., Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, Volume 13, Issue 6, p. 614-629, 2012
- 2). 日本植物防疫協会, 調査法 -野菜関係-, p22-23
- 3). 日本土壌微生物学会, 土壌微生物実験法, 養賢堂 p200-203, 2013,