

# Bacillus 属細菌によるジャガイモそうか病の抑制

長岡技術科学大学大学院 ○佐藤剛 笹原僚希 牧慎也 幡本将司 山口隆司

## 1. はじめに

ジャガイモそうか病は *Streptomyces* 属放線菌が引き起こす難防除病害であり、世界中で発生が確認されている。感染したジャガイモの表面には、かさぶた状の病斑が発生し、商品価値が著しく損なわれてしまうため、効率的な対策法の確立が望まれる。近年は新たなそうか病抑制法として *Pseudomonas* 属、非病原性 *Streptomyces* 属、*Bacillus* 属細菌などを用いた生物防除の研究が行われている<sup>1)2)</sup>。

本研究では、バイオマス利用による病害抑制に着目し、そうか病が多発するジャガイモ圃場および病害による被害を抑制している圃場（以下そうか病抑制圃場とする）を対象とした土壌微生物群集構造解析を行った。そうか病抑制圃場から複数の有用微生物を単離し、罹病ジャガイモから単離した *Streptomyces* 属放線菌に対する拮抗性を調査した。

## 2. 実験方法

### 2.1 圃場を対象とした微生物群集構造解析

鹿児島県内の6圃場(圃場A-F)から無作為に土壌サンプルを採取した。サンプリングの時期はジャガイモの収穫に合わせ、春作収穫(4月末)、秋収穫(12月末)とした。圃場A, B, Cはいずれもそうか病抑制圃場であるのに対して、圃場D, E, Fではそうか病が多発している。

土壌からFastDNA SPIN kitを用いてDNA抽出した後、Univ515F-Univ806Rプライマーペアを使用してPCR増幅を行った。精製したPCR産物はシーケンサーMiSeqによって塩基配列を決定した。16S rRNA遺伝子配列の解析にはQIIMEソフトウェアを使用し、Greengenes ver. 13\_8を参照して系統分類を行った。

### 2.2 有用微生物のスクリーニング

微生物群集構造解析結果(2.1)から、そうか病抑制圃場では*Bacillus*属細菌が病害抑制に寄与していると推察された。*Streptomyces*属放線菌に拮抗性を示す菌株の存在を確認するため、バイオマスの施肥が行われている圃場Aから*Bacillus*属細菌の単離を行った。

採取した土壌サンプルを無菌水に懸濁させ、NB寒天培地に塗抹した。38°Cで培養を行い、8-15時間後に寒天培地上に形成された*Bacillus*属細菌に特徴的な100個以上のコロニーに対して形状、顕微鏡観察に基づく形態分類を行い、菌株を単離した。代表菌株8種を16S rRNAシーケンスおよび対峙培養(2.3)に供した。

### 2.3 対峙培養(ディスク拡散試験)

罹病ジャガイモの病変部から単離した2種の*Streptomyces* sp. に対する各分離株の拮抗性を試験した<sup>3)</sup>。*Streptomyces*属放線菌をYME培地に植菌し、28°Cで2日間振盪培養した。培養液をOD<sub>600</sub>=0.35(St10で1.3~3.8×10<sup>5</sup>CFU/mL)となるように無菌水で希釈した後、100 μLをYME寒天培地上に塗抹した。拮抗性をテストする*Bacillus*属細菌はNB培地で培養後、OD<sub>600</sub>=0.30(Ba02で1.8~3.4×10<sup>8</sup>CFU/mL)となるよう無菌水で希釈し、細菌懸濁液5 μLを寒天培地上に配置した直径6 mmのペーパーディスク上に滴下した。各シャーレを28°Cで4日間培養した後、ペーパーディスク周囲に形成された生育阻害円の直径を計測した。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 圃場を対象とした微生物群集構造解析

図1に各圃場における16S rRNA遺伝子に基づくPCoAによる土壌微生物群集構造の比較結果を示す。

そうか病抑制圃場(A-C)のプロットは主にグラフ右側であるのに対して(図1.I)、そうか病が特に多発している圃場E, Fは左上にプロットが集中していることから(図1.II)、そうか病被害の大きさが土壌細菌叢の差異に由来していることが示唆された。圃場A, Bでは完全発酵したバイオマス施肥が行われており、共通した菌叢(図1.I)はバイオマス肥料導入によるものと考えられる。

各土壌細菌の検出割合を用いた冗長性分析(RDA)の結果を示す(図2)。図中の矢印は各要素の関係性を示し、同じ向きでは正の相関、逆向き

では負の相関を持つ傾向が認められる。

冗長性分析では数種類の細菌の検出割合がそうか病の病原菌として報告されている *S.puniciscabiei* の検出割合と負の相関関係にあることが示された。この中で OUT No. d23547 の菌種は BLAST 検索の結果、既報の *Bacillus* 属細菌と近縁であることが判明した。*Bacillus* 属細菌は既にジャガイモそうか病の生物防除研究に活用されており<sup>3)4)</sup>、圃場 A-C での病害抑制に関与している可能性が考えられる。

### 3.2 対峙培養（ディスク拡散試験）

圃場 A から単離した 8 株の *Bacillus* 代表菌株の 16S rRNA 遺伝子に基づく相同性検索結果および 2 株の *Streptomyces* 分離株とのディスク拡散試験の結果を示す（表 1）。

ディスク拡散試験の結果、St10 に対しては 6 株、St13 に対しては 7 株で阻害円の形成が確認されたが、分離株によって阻害円の直径は大きく異なり、最小で 5 mm から最大で 31 mm であった。*Bacillus* 属細菌の病害抑制メカニズムとして Iturin A, macrolactin A, surfactin, fengycin といった抗生物質の関与が報告されており<sup>3)4)</sup>、本実験で確認された阻害円の大きさにも抗生物質の種類と濃度が関与していたと推察される。

*Bacillus* 属細菌の *Streptomyces* 属放線菌に対する拮抗性が示唆された。圃場 A におけるそうか病抑制には *Bacillus* 属細菌が少なくとも寄与していると考えられる。BLAST による相同性検索ではシーケンスに供した 7 株全ての塩基配列が既報の *Bacillus* 属細菌と 99% 以上一致し、計 4 つの *Bacillus* グループに分類され、病害の抑制が複数の細菌種によって達成されている可能性が示唆された。

## 4. 結論

そうか病多発圃場とそうか病抑制圃場では土壌微生物群集構造が異なることから、バイオマス肥料導入による菌叢の変化が病害を抑制に寄与したと考えられる。また、そうか病抑制圃場から単離された *Bacillus* 属細菌の多くが *Streptomyces* 属放線菌に対する拮抗性を示し、対象圃場において *Bacillus* 属細菌が病害の抑制に関与していることが示唆された。

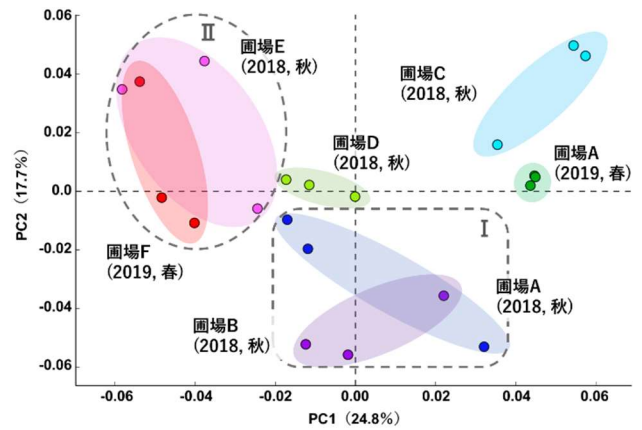


図 1 PCoA による各圃場の微生物群集の比較

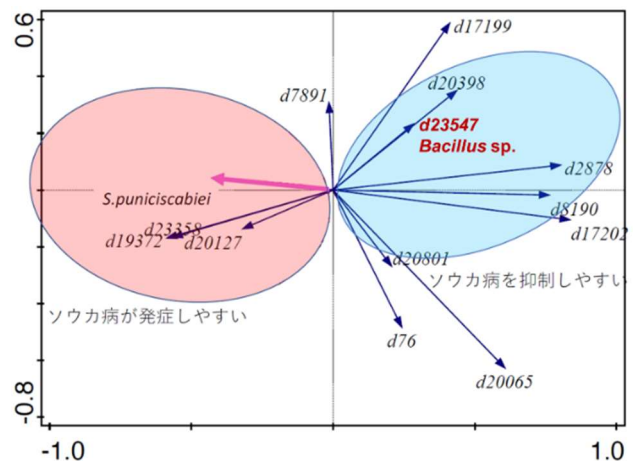


図 2 OTU 検出割合の冗長性分析 (RDA) 結果

表 1 ディスク拡散法による生育阻害円測定結果および代表菌株の 16S rRNA 解析結果

供試菌株	Taxonomy	相同性 (%)	阻害円の直径 (mm ± SD)	
			St10	St13
Ba01	(Not performed)	—	22 ± 4.0	27 ± 2.1
Ba02	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. strain HZMJW 1-10	99.87	25 ± 1.7	31 ± 0.9
Ba06	<i>Bacillus safensis</i> strain KMF402	99.87	9 ± 2.4	8 ± 1.7
Ba07	<i>Bacillus safensis</i> strain KMF402	100	10 ± 0.9	6 ± 0.9
Ba08	<i>Bacillus safensis</i> strain KMF402	100	7 ± 2.4	6 ± 2.2
Ba11	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain ZJH-2	100	—	5 ± 0.5
Ba17	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. strain HZMJW 1-10	99.87	—	—
Ba18	<i>Bacillus pumilus</i> strain DF39	99.87	10 ± 0.9	15 ± 1.2

阻害円の直径 = (阻害域の直径) - (ペーパーディスクの直径 6 mm) で算出  
—: 阻害円の形成無し

## 参考文献

1. Kobayashi, Y. et al. *J. Gen. Plant Pathol.* **78**, 62–72 (2012).
2. Dees, M. W. & Wanner, L. *Potato Res.* **55**, 249–268 (2012).
3. Lin, C. et al. *PLoS One* **13**, 1–10 (2018).
4. Han, J. S. et al. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 213–221 (2005).