

植物病害抑制に寄与する *Bacillus* 属細菌の機能解析

長岡技術科学大学院 非会員 ○ 吉村凌弥, 学生会員 永井孔明, 非会員 牧慎也, 正会員 山口隆司

1. はじめに

ジャガイモそうか病は、ジャガイモ栽培における最も深刻な伝染性植物病害である。ジャガイモそうか病は、病原性 *Streptomyces* 属放線菌によって引き起こされる植物病害であり、感染したジャガイモの塊茎表面にかさぶた状の病斑が発生する。これにより、外観が損なわれたジャガイモの品質価値は著しく低下する¹⁾。そのため、そうか病の効果的かつ持続的な抑制は、ジャガイモ栽培の高い収益性を維持するために必要不可欠である。

我々は、鹿児島県内にあるジャガイモそうか病の発生が軽微である圃場（以下、病害抑制圃場）に着目し、抑制効果が土壌細菌叢に由来すると考えた。そこで本研究では、圃場の植物病害に対する抑制メカニズムを詳細に解明することを目的に、土壌内に生息する細菌の同定および機能解析を行った。

2. 実験方法

2.1 微生物群集構造解析による各圃場の比較

鹿児島県内の圃場 A - F から土壌サンプルを採取した。A - D が病害抑制圃場、E, F が病害多発圃場である。土壌サンプルから FastDNA SPIN kit for Soil を用いて、付属のプロトコルに従って DNA を抽出した。その後、Univ515F - Univ806R の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 QIIME2 を使用した。

2.2 有用微生物のスクリーニング

病害抑制圃場から *Bacillus* 属細菌の単離を行った。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 で培養し、8 - 15 時間後に寒天培地上に形成された *Bacillus* 属細菌に特徴的なコロニーを得た。コロニー形状、顕微鏡観察に基づく形態的特徴から分類を行い、16S rRNA 遺伝子シーケンスおよび対峙培養 (2.3) に供した。16S rRNA 遺伝子シーケンスは、抽出した DNA に対して 8F - 1492R プライマーペアを用いた PCR 増幅を行った。精製した PCR 産物を FASMATCH に外注し、塩基配列を決定した。遺伝子配列の解析には NCBI ソフトウェアを使用した。

2.3 対峙培養による拮抗性調査

そうか病原菌の単離は Dees らの方法²⁾に従って感染ジャガイモの病変部から行った。培養 5 日後に寒天培地上に形成された放線菌に特徴的なコロニーを釣菌し、St10 株、St13 株の 2 種を単離した。各 *Streptomyces* 属放線菌に対する *Bacillus* 分離株の拮抗性はディスク拡散法で試験した³⁾。St10 株、St13 株を YME 培地に植菌し、28°C で 2 日間振盪培養した。培養液を OD₆₀₀ = 0.35 (St10 で 1.3 - 3.8 × 10⁵ 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。*Bacillus* 分離株は NB 培地で培養後、OD₆₀₀ = 0.30 (Ba02 で 1.8 - 3.4 × 10⁸ 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。

2.4 *Bacillus* 分離株の系統樹解析

各 *Streptomyces* 属放線菌に対する *Bacillus* 分離株 (2.3) および他の *Bacillus* 属細菌の系統樹解析を行った。系統樹を構築するために、MEGA11 の Neighbor joining ベースの進化解析を用いた。また、再現樹の割合を示すため、Bootstrap 検定 (1000 回) を行った。

3. 実験結果

3.1 微生物群集構造解析による各圃場の比較

図 1 に 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を示す。病害抑制圃場 (A - D) のプロットはグラフ中央から右側である (図 1 I) のに対して、病害多発圃場 E, F は左上にプロットが集中した (図 1 II)。病害被害の大きさは土壌細菌叢と関連していると推察される。

3.2 対峙培養による有用微生物の拮抗性調査

St10 に対しては 6 株、St13 に対しては 8 株で阻害円の形成が確認された。BLAST による同源性検索ではシーケンスに供した 8 株全ての塩基配列が既報の *Bacillus* 属細菌と 99 % 以上一致し、計 5 つの *Bacillus* グループに分類された。圃場 A における病害抑制が複数の細菌種によって達成されていると推察される。

3.3 *Bacillus* 分離株の系統樹解析

16S rRNA 遺伝子配列に基づいて構築された系統樹は、*Bacillus* 分離株の間で遺伝的均一性を示した(図2)。分離株はグループ (I–IV) に分けることができ、それぞれ病原菌への効果の適用性が関与していると推察された。

4. まとめ・今後の予定

圃場の土壌微生物群集が病害被害程度と関連していることが示唆された。病害抑制圃場から単離された *Bacillus* 属細菌の多くがそうか病原菌に対する拮抗性を示した。今回対象とした圃場では、*Bacillus* 属細菌が生物的防除の役割を發揮していると推察された。今後は、病害抑制圃場から単離した病原菌に対して拮抗性のある *Bacillus* 属細菌の特性評価・植物成長促進活性について試験する予定である。

参考文献

- 1) Sarah Braun. *et al.* Potato Common Scab: a Review of the Causal Pathogens, Management Practices, Varietal Resistance Screening Methods, and Host Resistance. *American Journal of Potato Research*. **94**, 283–296, 2017.
- 2) Dees, M. W. *et al.* Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathol* **62**, 217–225, 2013.
- 3) Lin, C. *et al.* Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *PLoS One* **13**, 1–10, 2018.
- 4) Jay Shankar Singh. *et al.* *Agriculture, Ecosystems and Environment* **140**, 339–353, 2011.

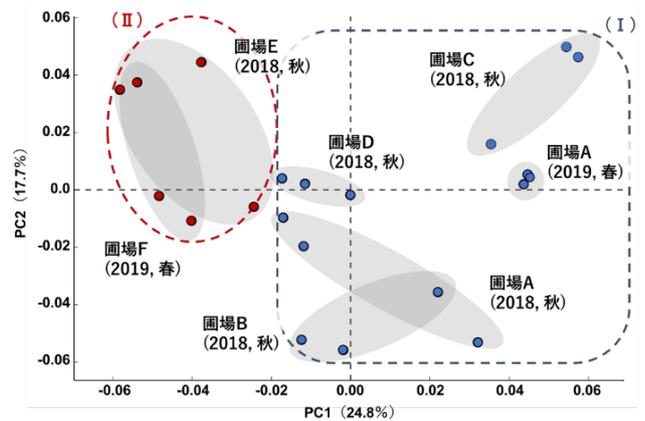


図1 PCoAによる各圃場の微生物群集の比較

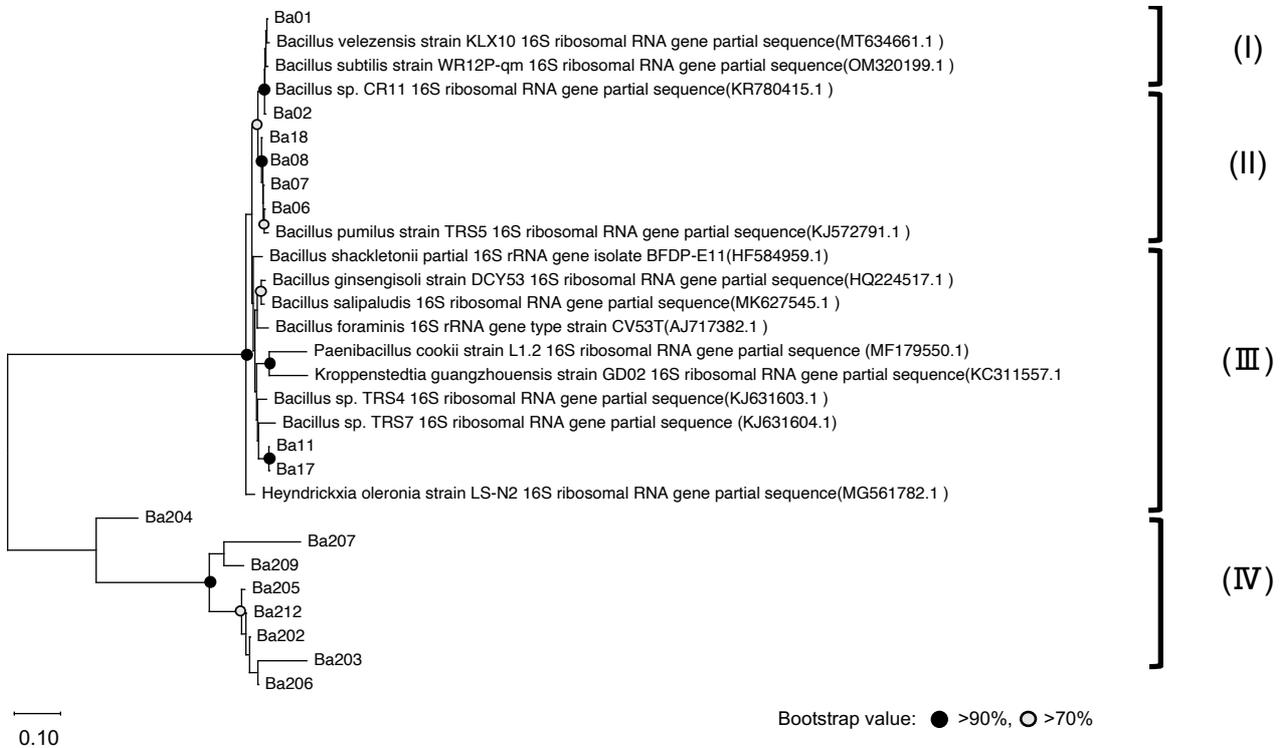


図2 16S rRNA遺伝子配列に基づく分離株の系統樹

Bootstrap値1000のNeighbor-Joining treeベースの進化解析を用いた。スケールバーは各塩基位置ごとの0.01置換を表す。