

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Influence of the rhizosphere microbial community on root-borne disease suppression in the multiple parallel mineralization system (MPM 法における根部病害抑止効果に影響を及ぼす根圏微生物生態系に関する研究)

氏 名 藤原 和樹

論 文 内 容 の 要 旨

有機質肥料活用型養液栽培(the multiple parallel mineralization system)は、土壤微生物を水中で培養し、有機質肥料(有機態窒素)を無機化することができるため、有機質肥料の利用が可能な新規な水耕栽培法である。本栽培システムでは培養液中に棲息する微生物により根部病害の発生を長期間に渡って抑止するという興味深い現象が認められている。本論文では、微生物学的な視点から有機質肥料活用型養液栽培における根部病害を抑止する現象の解明を試みてきた。以下に、これまでの研究成果を概説する。

有機質肥料活用型養液栽培の根圏では、微生物がバイオフィームを形成し、一種の生態系が構築する。化成肥料を用いた慣行的な養液水耕では、水中に浸漬する根は根毛が未発達で、滑面となっている。そこで、トマト苗を有機質肥料活用型養液栽培で定植して 4 日後の根圏バイオフィームの構造を走査型電子顕微鏡(SEM)によって組織学的に解析した。その結果、多量の細菌が根面上に付着しているのが観察され(菌密度は約 1.8×10^{13} cfu/g)、いくつかの細菌種は粘着性の物質を分泌することで根の表面に強く付着していることが明らかとなった。また観察された細菌形態が球菌や桿菌など様々なものが認められたから、多様な細菌種が主要な構成員であることが示唆された。

次に、根圏バイオフィームを構成する微生物相を調べるためイネ、コマツナ、およびトマト苗の根圏に形成されたバイオフィームについて PCR-DGGE 法による微生物群集解析を行った。有機質肥料活用型養液栽培で 2 週間栽培後、根圏バイオフィームを経時的に採取し解析した結果、バンドパターンの変化をとらえることができた。バンドのうち明瞭なものの塩基配列を決定した結果、17 種類の細菌が同定され、そのうち *Bacillus* 属、*Comamonadaceae* 科、*Sphingobacteriaceae* 科、*Actinomycetales* 目、*Burkholderiales* 目、*Deltaproteobacteria* 綱については、病害抑止土壌と呼ばれる根部病害の発生が抑制される圃場で特異的に検出される細菌群として報告されている。以上の結果から、有機質肥料活用型養液栽培では様々な種の細菌がバイオフィームを根面上で形成していることが明らか

となった。さらに、有機質肥料活用型養液栽培の根圏微生物群には病害抑止土壌で認められる微生物群が存在していることも明らかとなった。

有機質肥料活用型養液栽培による根部病害抑止効果について、果菜代表としてトマト、葉菜の代表としてサラダナを対象に検討した。トマトに対しては細菌病を引き起こす青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)および糸状菌であるトマト根腐萎凋病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*)、サラダナに対してはレタス根腐病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*)で接種検定を行った。その結果、慣行の無機養液栽培では、ほぼすべての植物体が萎凋・枯死したのに対して、有機質肥料活用型養液栽培では全く病徴が認められず、高い防除効果を示した。実験終了時の培養液中の病原菌の消長を調べてみると、青枯病菌は有機質肥料活用型養液栽培の区からは検出されなかった。興味深いことに病原性 *F. oxysporum* においては罹病株が発生しなかった有機質肥料活用型養液栽培の培養液中から病原性 *F. oxysporum* が検出され、再分離して無機養液栽培に接種するとレタスは枯死し、病原性を保持することが明らかとなった。以上の結果から、有機質肥料活用型養液栽培では糸状菌、細菌を問わず根部病害に対し高い防除効果を示すことが明らかとなった。また、カビと細菌の病原菌に対して異なる病害抑止メカニズムが機能していることが示唆された。

上述のように、青枯病を引き起こす *R. solanacearum* は培養液中で減少するが、一方で、病原性 *F. oxysporum* は培養液中で生残しているにも関わらず病害が発生しないという非常に興味深い現象が起きている。そこで *R. solanacearum* と病原性 *F. oxysporum* が培養液内でどのような作用を受けているのか、抑止メカニズム解明を試みた。その結果、両病原菌において、耕水を滅菌(フィルター除菌、オートクレーブ滅菌)処理すると、培養2週間後には対象区と同等のレベルまで増殖が認められた。他方、無処理の耕水では *R. solanacearum* は減少し検出されず、病原性 *F. oxysporum* においては増殖が認められなかった。以上の結果から、耕水中には *R. solanacearum* および病原性 *F. oxysporum* に作用する低分子の増殖抑制因子が存在する可能性は低いということが明らかとなった。また、無処理の耕水のみで *R. solanacearum* および病原性 *F. oxysporum* の増殖抑制が認められたことから生きた微生物の直接的接触が増殖抑制に強く関与していることが示唆された。

次に、耕水中の微生物の存在量が病原菌にどのような影響を与えるのかを検討するため、病原性 *F. oxysporum* をモデル病原菌として用いて解析を行った。耕水を熱処理(常温~80°C)、および希釈処理(2~50倍希釈)したものに病原性 *F. oxysporum* を添加し、振とう培養1週間後の菌密度を調べた。その結果、60°C以上で処理した耕水中、あるいは5倍希釈以上の耕水中では病原性 *F. oxysporum* の増殖抑制効果が低減することが明らかとなった。また、耕水に含まれるバイオフィルムを遠心分離して採取し、これを無機養液に懸濁したのものについても同様に様々な希釈度で検討した。この場合も耕水での実験と同様、5倍希釈までは病原性 *F. oxysporum* の増殖抑制効果が認められた。さらに、バイオフィルムを懸濁した無機養液でサラダナを栽培し病原性 *F. oxysporum* の接種試験を行った結果、5倍にバイオフィルムを希釈した場合(約 6.1×10^{12} cfu/ml)で低度の病徴が認められた。以

上の実験結果から、病原性 *F. oxysporum* の増殖抑制効果および根部病害抑止効果を保持するためには、生きた微生物の存在が一定量必要であることが明らかとなった。

有機質肥料活用型養液栽培に病原性 *F. oxysporum* を接種した場合、耕水中で病原性 *F. oxysporum* はどのような動態を示すのだろうか。そこで、耕水中における *F. oxysporum* の形態観察を行った。その結果、無機養液では、病原性 *F. oxysporum* の菌密度は上昇しており、形態別に分類してみると小型孢子、菌糸伸長した孢子、大型孢子的存在が確認できた。他方、耕水中では、病原性 *F. oxysporum* の菌密度は上昇せず、形態別の分類では、大型孢子は検出されず、興味深いことに、小型孢子以外の孢子はすべて厚膜孢子を形成していた。顕微鏡観察下では厚膜孢子周辺には微生物が付着、もしくは定着している様子が観察された。厚膜孢子は貧栄養や低温度等といった悪環境下で形成される耐久体として知られる。以上の結果から、耕水中の微生物生態系は病原性 *F. oxysporum* にとって好適環境ではなく、微生物による直接的な競合によって、有機質肥料活用型養液栽培における根部病害抑止効果が保持されているということを強く示唆する結果となった。

有機質肥料活用型養液栽培では根圏バイオフィームを構成する微生物群により *F. oxysporum* の増殖抑制効果が保持されていることが明らかになった。そこで、根圏微生物群のうち、培養可能な細菌群で *F. oxysporum* の増殖抑制効果を再現できるか検討した。その結果、1/10 Nutrient Broth 液体培地で培養可能な 13 菌株の混合培養液で病原性 *F. oxysporum* の増殖抑制効果が認められた。さらに、この増殖抑制効果を保持する菌株の特定を試みた結果、13 菌株中 6 菌株の混合培養液で *F. oxysporum* の増殖抑制効果が認められた。先ほどの 6 菌株において詳細に検討した結果、2 菌株の混合培養液で病原性 *F. oxysporum* の増殖抑制が認められた。興味深いことに、選抜された 6 菌株は単独では病原性 *F. oxysporum* の増殖抑制効果は保持していなかった。以上の結果から、耕水中で認められる病原性 *F. oxysporum* の増殖抑制効果は、複雑な微生物の相互作用の組み合わせにより保持されていることが強く示唆される結果になった。

本研究では、有機質肥料活用型養液栽培における根部病害抑止効果の解明について、植物—微生物間および多様な微生物間の相互作用により根部病原菌に対するバイオコントロール作用が生じていることが明らかになった。従来の防除思想では特定の拮抗微生物により解決を試みるのが主なアプローチだが、本研究では微生物コンソーシアムにより病害抑止効果を獲得していることが示唆されたため、本稿の根部病害抑止メカニズムが根部病害防除における根圏微生物生態系とその機能の関連を考える基礎の一つになれば幸いである。現在、有機質肥料活用型養液栽培における根部糸状菌病・細菌病に対する防除効果を新たなバイオコントロール技術として無機養液栽培や土耕栽培など他の農法に応用をすすめている。もしこの方法が適用できれば、低コスト、環境負荷低減など極めて有用な防除技術となると考えている。