

第2章 有機農業を特徴づける指標の策定

第1節 水稻の有機栽培育苗土に特徴的な微生物相と病害抑制効果

1. 課題の背景・目的

有機栽培では、化学農薬を用いなくとも病害の発生が経済的許容水準以下に抑制され、収穫が可能となっています。しかしながら、その仕組みの解析は十分に行われていないため、有機農業を推進する上でその科学的な理解は必要不可欠です。本課題では、イネの育苗土に生息する微生物に着目し、有機栽培と慣行栽培における微生物相の特徴や差異を、培養法、PCR-DGGE 法、マイクロバイオーム解析により比較しました。さらに、有機栽培に特徴的な微生物種あるいは微生物相と、イネ苗病害抑制の相互関係を解析することにより、有機栽培育苗土に特徴的な微生物が、有機農業の指標となり得るかを検証しました。また、新たな有機農業用資材の開発の可能性を検討する目的で、独自にイネ由来の有機物を利用した堆肥を作成し、これを混合することにより有機栽培育苗土で得られた知見が再現できるか確認しました。

2. 試験方法

(1) 有機栽培育苗土の病害抑制効果の解析

有機栽培育苗土としては、東日本を中心とした各地の有機栽培農家が自作したもの(12点)を入手し解析に用いました(表4-1)。対照区としては市販の慣行栽培育苗土を用いました。イネもみ枯細菌病、イネ苗立枯細菌病による苗腐敗症を対象病害とし、イネ(品種:コシヒカリ)の種子を温湯消毒後、2日間 28°Cで吸水し、はと胸期に達したところで、*Burkholderia glumae* (MAFF 302746)または *B. plantarii* (MAFF 302475)の菌液(OD₆₀₀, 0.01)に浸漬し、5分間減圧接種を行いました。接種後、各育苗土に播種し(7.5×7.5×5.5 cmのプラスチック容器を使用)、30°C一定条件(明期:14 h, 暗期 10 h)で9日間培養し、発病検定を行いました。発病検定は病徴を4段階(0:無病徴、1:生育抑制・黄白化、2:半枯死、3:完全枯死)に分けて数え、発病度(Disease index, DI)を以下の式で算出しました(Ando et al., 2014)。

$$\text{発病度(DI)} = \frac{(1 \text{ の個体数} \times 1 + 2 \text{ の個体数} \times 2 + 3 \text{ の個体数} \times 3)}{(\text{総個体数} \times 3)} \times 100$$

有意差検定には、Steel-Dwass test を用いました。

(2) 有機栽培育苗土の土壤理化学性の分析

収集した有機栽培育苗土の土壤理化学性について、26項目(pH、EC、仮比重、全窒素、全炭素、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、無機態窒素、有効態リン酸、交換性カリ、交換性石灰、交換性苦土、リン酸吸収係数、陽イオン交換容量、可給態鉄、腐植含量、カリ飽和度、苦土飽和度、石灰飽和度、塩基飽和度、苦土・カリ比、石灰・苦土比、水溶性ホウ素、交換性マンガン、可溶性亜鉛、可溶性銅)を測定しました。測定は(株)片倉コープアグリに委託しました。

(3) 有機栽培育苗土の微生物多様性と微生物相の堅牢性の解析

有機栽培育苗土の微生物多様性の検討を PCR-DGGE 法及び、次世代シーケンサーを用いたマイクロバイオーム解析によって行いました。育苗土からの DNA 抽出には、Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP-Biomedicals)を使用しました。PCR-DGGE 解析は抽出した DNA を鋳型として使い、968f-GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3')と 1378r (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3') をプライマーに用いて細菌の 16S rDNA を、xml (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT-3')と GCFung (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG

CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CAT TCC CCG TTA CCC GTT G-3') をプライマーに用いて糸状菌の 18S rDNA を増幅しました。DGGE 解析は、農研機構農業環境変動研究センターの“土壤微生物群集(細菌・糸状菌)の PCR-DGGE 解析 eDNA プロジェクト課題共通マニュアル Ver. 1.7”に従って行いました。また、マイクロバイオータ解析は 16S rDNA の V4 領域を増幅し次世代シーケンサー MiSeq (Illumina)を用いてデータを取得しました(Takahashi et al., 2018)。

(4)有機栽培育苗土からの病害抑制活性のある細菌の分離

宮城県涌谷町、福島県石川町、秋田県大潟村の有機農家から分譲された育苗土から、病害抑制活性を有する細菌の探索を行いました。NA 普通寒天培地に有機栽培育苗土の懸濁液を塗布し、25°C で 1 日培養後得られたシングルコロニーを分離し、16S rDNA 配列を基に簡易分類を行いました。分離した細菌を NA 培地で培養後、懸濁液の濁度(OD₆₀₀, 0.5)を調整後、1)に記載の通りに *B. glumae* を減圧接種した種子を播種した容器(オートクレーブした慣行栽培育苗土)に 10 ml 添加しました。30°C 一定条件(明期:14 h, 暗期 10 h)で 9 日間培養し、発病検定を行いました(Ando et al. 2014)。

(5)有機栽培育苗土由来の細菌による植物免疫の活性化の解析

有機栽培育苗土から分離したイネもみ枯細菌病抑制活性を有する細菌 (*Pseudomonas* sp. W6 株、Y3 株)による植物免疫の活性化の有無を解析するため、細菌処理後 2 日のイネ芽生えから RNA を抽出し、qRT-PCR による防御関連遺伝子の発現解析を行いました。RNA の抽出には TRIzol (Thermo Fisher Scientific)を用い、逆転写には PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA)を用いました。さらに qPCR は SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II を用い、7300 Real-Time PCR System (Life Technologies)を使用して標準条件で行いました。イネの ACC 合成酵素遺伝子(*OsACS2*)の解析には ACS2-f (5'-GGA ATA AAG CTG CTG CCG AT-3')及び *OsACS2-r* (5'-TGA GCC TGA AGT CGT TGA AGC-3')をプライマーとして用いました。内在性コントロールとしてはユビキチン遺伝子を用いました (RUB-f; 5'-CCA CAA ATC GCA CGT CAA GC-3', RUB-r; 5'-GGA CAC AAT GAT TAG GGA TCA C-3')。

エチレン産生量の測定にはガスクロマトグラフ[GC-8A、島津製作所、水素炎イオン化検出器(FID)]を用いました。イネ芽生えからのエチレン産生量を測定するため、播種後 2 日目のイネ種子 20 粒を蒸留水 750 μl とともに 25 ml のバイアルビンに入れ、密封しました。28°Cの暗条件で 6 時間インキュベートし、気体を 1 ml 抜き取り、ガスクロマトグラフに供試しました。エチレン産生量は植物体の新鮮重・1 時間あたりの産生量(pl/mg*h)として求めました。

(6)もみ殻堆肥の作出と施用方法

2016 年 5 月に東北大学青葉山新キャンパス圃場においてもみ殻、稲わら、米ぬかを材料に堆肥(以下、自作もみ殻堆肥)の作成を開始し、2017 年 5 月に温度推移などから完熟したと見なし、病害抑制効果の解析に用いました。無肥料培土と自作もみ殻堆肥を 3:1 の割合で混合し、イネもみ枯細菌病抑制効果の解析を行いました。

3. 結果と考察

(1)有機栽培育苗土の病害抑制効果

東日本を中心に全国 12 地点から有機栽培育苗土を収集し、イネもみ枯細菌病とイネ苗立枯細菌病の抑制効果を検討しました(表4-1)。対照としては市販の慣行栽培育苗土 3 点を用いました。その結果、慣行栽培育苗土では病原菌接種により激しい病徴を示し、枯死したのに対し、有機栽培育苗土に播種した場合は発病が有意に抑制されました(図4-1)。有機栽培育苗土では慣行栽培育苗土に比べてイネの生育が遅延するなどの特徴も認められましたが、解析した全ての有機栽培育苗土でイネも

み枯細菌病抑制効果が確認されました。イネ苗立枯細菌病についても同様の結果が得られました。このことから、有機栽培育苗土には病害抑制効果があり、この効果にはある程度の普遍性があると考えられます。有機栽培育苗土の作成方法の聞き取り調査では、材料として米ぬかやもみ殻などイネ由来の有機物を投入するケースが多いものの、特に決まった方法は存在しませんでした。そこで、有機栽培育苗土に共通して認められた病害抑制効果を生み出す要因について検討を進めました。

表4-1 有機栽培育苗土の採集地と病害抑制効果

有機栽培育苗土の採集地等	イネもみ枯細菌病	イネ苗立枯細菌病
福島県・石川町	抑制効果あり	抑制効果あり
宮城県・涌谷町	抑制効果あり	抑制効果あり
宮城県・鳴子町	抑制効果あり	抑制効果あり
栃木県・野木町	抑制効果あり	未解析
栃木県・芳賀町	抑制効果あり	抑制効果あり
秋田県・大潟村	抑制効果あり	抑制効果あり
静岡県・下田市	抑制効果あり	未解析
岩手県・遠野市	抑制効果あり	未解析
栃木県・上三川町	抑制効果あり	未解析
埼玉県・さいたま市	抑制効果あり	未解析
新潟県・新潟市	抑制効果あり	未解析
宮城県・東松島市	抑制効果あり	未解析
合成培土 L(慣行培土)	効果なし	効果なし
クレハ(慣行培土)	効果なし	効果なし
いなほ N(慣行培土)	効果なし	効果なし

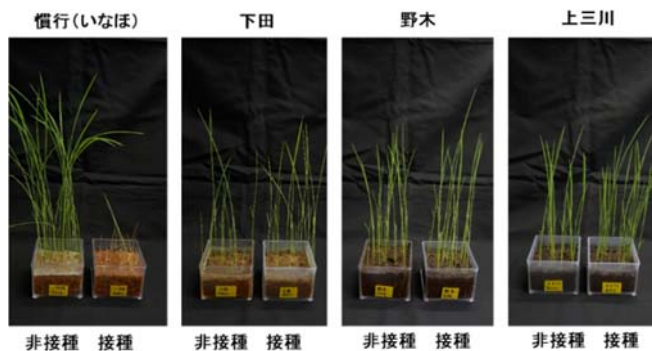


図4-1 有機栽培育苗土のイネもみ枯細菌病抑制効果。
イネもみ枯細菌病菌を接種した種子を育苗土に播種し、9日間培養後に発病を確認した。写真は静岡県下田市、栃木県野木町、栃木県上三川町の有機農家から入手した有機栽培育苗土について示した。対照区に慣行栽培育苗土(いなほN)を用いた。

(2) 有機栽培育苗土の土壤理化学性の解析

収集した有機栽培育苗土の共通の特徴を知る目的で、土壤理化学性の解析を行いました。その結果、有機栽培育苗土に特徴的な傾向は認められず、それぞれ土壤理化学性は異なっていることが示されました(表4-2)。従って、土壤理化学性は有機栽培育苗土の病害抑制効果に関連した指標となる可能性は低いと考えられました。また、育苗に最適化された慣行栽培育苗土と比較して、土壤理化学性が大きく異なる値を示す有機栽培育苗土も多くあり、このことが苗の生育遅延等に反映されたものと推察されます。

表 4-2 有機栽培育苗土の土壌理化学特性

No.	試料名	圃土当たり				粒土当たり									
		pH	EC mS/cm	仮比重	窒素 全量 %	炭素 全量 %	7-7-7 窒素	硝酸態 窒素	無機態 窒素	有効態 リン酸 mg/100g	交換性 加里	交換性 石灰	交換性 苦土	リン酸 吸収 係数	
1	福島県石川町	5.97	0.49	1.02	0.10	0.45	48.0	0.1	48.1	5	66	145	63	1939	
2	宮城県楢谷町	5.36	0.21	0.78	0.23	2.94	1.7	5.8	7.5	22	58	391	93	1468	
3	宮城県鳴子町	5.63	0.12	1.0	0.08	1.16	16.9	0.6	17.6	3	38	111	36	1777	
4	栃木県野木町	6.48	0.21	0.40	0.97	22.98	3.0	5.4	8.5	2	41	1430	82	-	
5	栃木県芳賀町	5.55	0.64	0.67	0.75	12.20	1.5	36.8	38.2	10	224	143	173	2941	
6	秋田県大潟村	4.76	1.10	0.86	0.36	3.79	10.5	11.4	21.9	12	160	533	259	1608	
7	静岡県下田市	5.89	0.04	0.74	0.36	3.70	0.7	0.6	1.2	6	43	590	76	1721	
8	岩手県遠野市	6.39	0.78	0.59	0.69	8.39	8.0	21.5	29.5	93	427	366	173	1019	
9	栃木県上三川町	6.07	1.89	0.68	0.84	8.01	47	98	145	28	263	610	141	2646	
10	埼玉県さいたま市	6.35	0.65	0.81	0.3	3.9	1.1	35.9	37.0	30	108	297	96	1988	
11	新潟県新潟市	6.55	0.44	0.75	0.3	4.5	37	1	38	91	154	70	61	2032	
12	宮城県東松島市	6.42	1.35	0.50	0.5	11.5	71	55	127	467	507	320	298	983	
13	合成培土L	4.96	1.38	0.91	0.14	0.26	97.0	1.2	98.4	1.4	114	348	145	2351	
14	クレハ	5.63	1.91	1.00	0.2	1.8	104.4	0.1	104.5	28	168	380	154	1536	
15	し刈田N	5.48	1.40	1.04	0.2	0.2	115.4	0.1	115.5	35	124	172	73	1773	

No.	試料名	CEC meq/100g	陽換 mg/kg	加里 陽和度	石灰 陽和度 %	苦土 陽和度	窒素 陽和度	炭素 陽和度	7-7-7 窒素 陽和度	硝酸態 窒素 陽和度	無機態 窒素 陽和度	有効態 リン酸 陽和度	交換性 加里 陽和度	交換性 石灰 陽和度	交換性 苦土 陽和度	リン酸 吸収 係数
1	福島県石川町	23.3	0.8	6.0	22.2	13.4	41.6	1.7	2.2	0.2	11.1	11.8	8.1	2.6	2.6	2.6
2	宮城県楢谷町	29.1	5.1	4.2	47.9	15.8	67.9	3.0	3.7	0.5	331.9	13.4	25.9	4.4	4.4	4.4
3	宮城県鳴子町	18.9	2.0	4.3	21.0	9.2	34.5	2.3	2.1	0.2	34.1	1.9	41.3	0.8	0.8	0.8
4	栃木県野木町	75.0	39.5	1.2	67.9	5.4	74.5	12.6	4.6	1.5	0.7	83.8	4.7	0.1	0.1	0.1
5	栃木県芳賀町	46.9	21.0	10.2	10.9	18.3	39.3	0.6	1.8	0.4	56.8	44.3	7.6	0.1	0.1	0.1
6	秋田県大潟村	37.9	6.5	9.0	50.2	33.9	93.1	1.5	3.8	0.7	141.4	118.3	10.7	3.4	3.4	3.4
7	静岡県下田市	28.7	6.4	3	73	13	90	5.6	41	0.2	-	1.4	11.1	8.5	8.5	8.5
8	岩手県遠野市	28.7	14.4	32	46	30	107	1.5	0.9	1.0	-	5.1	19.5	0.7	0.7	0.7
9	栃木県上三川町	36.0	13.8	15	60	19	95	3.1	1.3	0.5	90.4	3.3	36.4	0.6	0.6	0.6
10	埼玉県さいたま市	23.7	6.7	10	46	20	74	2.2	2.1	0.2	95.4	16.6	19.1	8.7	8.7	8.7
11	新潟県新潟市	13.2	1.1	26	19	23	67	0.8	0.9	0.4	16.9	19.6	19.6	1.8	1.8	1.8
12	宮城県東松島市	26.7	3.8	40	43	55	138	0.8	1.4	1.1	3.3	7.9	15.1	0.2	0.2	0.2
13	合成培土L	22.6	0.5	11	55	32	98	1.7	3.0	0.7	2.5	92.8	7.4	3.9	3.9	3.9
14	クレハ	19.7	3.2	18	51	39	108	1.3	2.1	0.1	8.5	138.0	3.9	0.9	0.9	0.9
15	し刈田N	16.8	0.4	16	37	22	74	1.7	1.4	0.3	4.6	18.7	9.7	3.2	3.2	3.2

※窒素陽和度はNを総窒素の陽和度を示す。

(3)有機栽培育苗土の微生物多様性と環境変化に対する堅牢性の解析

有機栽培育苗土の土壤理化学性が病害抑制効果の指標になる可能性は低かったことから、生物的要因に着目し、微生物多様性の検討を行いました。9地点の有機栽培育苗土と対照として慣行栽培育苗土2点からDNAを抽出し、細菌の16S rDNA及び糸状菌の18S rDNAをPCRで増幅後、PCR-DGGE解析に用いました。バンドパターンに基づく多様性指数を算出した結果、特にバクテリアにおいて微生物相の多様性の高さを示すRichnessと均等性を示すEvennessが慣行栽培育苗土に比べて高いことが明らかになりました。また、糸状菌においても同様の傾向が観察されました(表4-3)。さらに、傾向が強く認められた細菌について、次世代シーケンサーを用いてマイクロバイオータ解析を行いました。その結果、解析した全ての有機栽培育苗土において、明らかに慣行栽培育苗土よりも多くの種類の細菌が存在し、かつ特定の細菌が優先せず、バランスが取れていることが示されました(図4-2a)。個々の有機栽培育苗土を比較すると、含まれる微生物の種類や量は異なりますが、共通した特徴として微生物多様性が高いことが確認されました。

さらに、この微生物相が環境変化に対してどのように変動するかについても検討しました。微生物相に影響を与える環境要因として、「灌水処理」と「イネの栽培」を行い、1週間後に育苗土からDNAを抽出し、16S rDNAを用いたマイクロバイオータ解析を行いました。その結果、解析した2点の慣行栽培育苗土では灌水処理やイネの栽培によって細菌相が大きく変動したのに対し、有機栽培育苗土(野木町、大潟村)では細菌相の変動が少なく、安定していました(図4-2b)。同様の結果は、糸状菌についてもPCR-DGGE法を用いて確認しました。従って、有機栽培育苗土の微生物相は環境変化に対して堅牢性(ロバストネス)を持つことが示唆されました。また、有機栽培育苗土にイネのみ枯細菌病菌を接種した種子を播種し、その後のみ枯細菌病菌の増殖を解析した結果、有機栽培育苗土では病原菌の増殖が抑制されることも確認しました。このことは、有機栽培育苗土の微生物相の堅牢性が病害菌の増殖を抑制する可能性を支持するものと考えられます(Takahashi et al., 2018)。

表4-3 PCR-DGGE 解析のバンドパターンに基づく多様性指数

No	Bacteria					Fungi				
	sample name	Richness	Shannon	Simpson	Evenness	sample name	Richness	Shannon	Simpson	Evenness
1	宮城県涌谷町 有機培土	28	3.181	0.952	8.803	宮城県涌谷町 有機培土	6	1.327	0.628	4.521
2	宮城県鳴子町 有機培土	24	3.096	0.951	7.751	宮城県鳴子町 有機培土	5	1.123	0.560	4.453
3	栃木県野木町 有機培土	33	3.362	0.962	9.814	栃木県野木町 有機培土	5	1.138	0.556	4.394
4	栃木県芳賀町 有機培土	21	2.916	0.942	7.201	栃木県芳賀町 有機培土	9	1.931	0.808	4.661
5	秋田県大潟村 有機培土	15	2.618	0.921	5.730	秋田県大潟村 有機培土	6	1.284	0.600	4.674
6	静岡県下田市 有機培土	23	2.943	0.938	7.816	静岡県下田市 有機培土	15	2.451	0.888	6.120
7	岩手県遠野市 有機培土	15	2.487	0.896	6.032	岩手県遠野市 有機培土	7	1.363	0.603	5.134
8	栃木県上三川 町有機培土	16	2.600	0.914	6.153	栃木県上三川 町有機培土	6	1.372	0.639	4.373
9	埼玉県さいたま市有機培土	19	2.806	0.933	6.772	埼玉県さいたま市有機培土	3	0.694	0.378	4.321
10	クレハ慣行 培土	12	2.239	0.871	5.358	クレハ慣行 培土	9	2.031	0.842	4.432
11	いなほ慣行 培土	8	1.278	0.567	6.262	いなほ慣行 培土	6	1.528	0.731	3.927

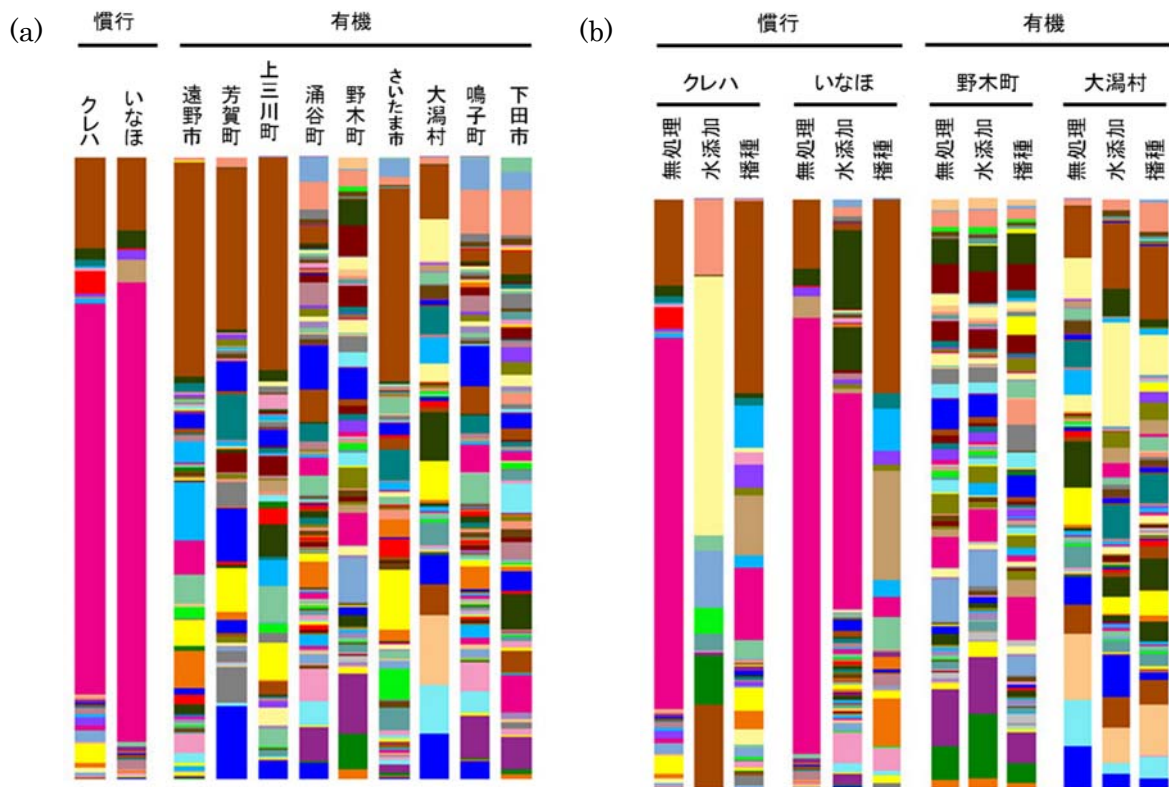


図4-2 有機栽培育苗土の微生物多様性とその環境変化に対する堅牢性。

(a)慣行栽培育苗土2点と有機栽培育苗土9点からDNAを抽出し、16S rDNAを用いたマイクロバイオータ解析を行った。(b)有機栽培育苗土、慣行栽培育苗土各2点を用い、灌水処理(水添加)およびイネの栽培(播種)を行い、1週間後の微生物相の変動を解析した。異なる色は異なる属に分類される細菌の割合を表している。

以上の結果から、微生物多様性の高さとその堅牢性が有機栽培育苗土の病害抑制機能の指標となり得ると考えられます。

(4) 有機栽培育苗土からの病害抑制活性を有する細菌の分離

これまでの結果から、有機栽培育苗土の微生物相が病害抑制効果に関与する可能性が示唆されましたが、一方で有機栽培育苗土には強い病害抑制活性を有する微生物が存在する可能性も考えられます。そこで、培養法によって有機栽培育苗土から細菌を分離し、16S rDNAによる簡易分類後、イネのみ枯細菌病抑制効果を解析しました。

3点の有機栽培育苗土について解析した結果、*Pseudomonas*属菌、*Arthrobacter*属菌、*Bacillus*属菌などが主に分離され、同じ属と推定される菌においても16S rDNA配列の違いがあったため、さらに便宜的にグループ分けを行いました(表4-4)。分離した細菌の懸濁液を添加した育苗土にイネのみ枯細菌病菌を接種した種子を播種したところ、宮城県涌谷町の有機栽培育苗土から分離した*Pseudomonas*属菌と推定される菌株[W6株: *Pseudomonas* sp. (2), Y3株: *Pseudomonas* sp. (6)]にイネのみ枯細菌病抑制活性があることが明らかになりました(Ando et al., 2014)。

表4-4 有希栽培育苗土からの細菌の分離と16S rDNA配列による簡易分類

16S rDNAによる推定	涌谷町	石川町	大湊村
<i>Pseudomonas</i> sp. (1)	38		
<i>Pseudomonas</i> sp. (2)	4		
<i>Pseudomonas</i> sp. (3)	1		
<i>Pseudomonas</i> sp. (4)	1		
<i>Pseudomonas</i> sp. (5)	1		
<i>Pseudomonas</i> sp. (6)	1		
<i>Arthrobacter</i> sp. (1)		3	
<i>Arthrobacter</i> sp. (2)	1	2	
<i>Arthrobacter</i> sp. (3)	2	1	
<i>Arthrobacter</i> sp. (4)		1	
<i>Arthrobacter</i> sp. (5)		1	
<i>Arthrobacter</i> sp. (6)	1		
<i>Arthrobacter</i> sp. (7)	1		
<i>Bacillus</i> sp. (1)	4	2	5
<i>Bacillus</i> sp. (2)	1		
<i>Bacillus</i> sp. (3)		1	
<i>Bacillus</i> sp. (4)			15
<i>Bacillus</i> sp. (5)			15
<i>Bacillus</i> sp. (6)	1		
<i>Bacillus</i> sp. (7)	1		
<i>Bacillus</i> sp. (8)			1
<i>Bacillus</i> sp. (9)			1
<i>Bacillus</i> sp. (10)			1
<i>Janthinobacterium</i> sp.	1		
Total	59	11	38

(5) 有機栽培育苗土から分離した細菌施用による植物免疫の活性化の解析

有機栽培育苗土から病害抑制活性を有する細菌 (*Pseudomonas* 属菌、W6 株) が分離されたことから、その病害抑制効果のメカニズムの解析を行いました。W6 株には *B. glumae* に対する抗菌活性は認められなかったことから、植物免疫の活性化について検討しました。まず、W6 株施用後のイネ幼植物における防御関連遺伝子の発現解析を行ったところ、細菌施用後 2 日目のイネ芽生えでは、**PBZI**[サリチル酸(SA)、ジャスモン酸(JA)誘導性]、**PR5**(SA 誘導性)、**OsAOS2**(JA 生合成)などの遺伝子発現に大きな変動は認められなかったことから、SA や JA による誘導抵抗性は関与しないことが推察されました。一方、エチレン(ET)生合成遺伝子 **OsACS2** の発現は W6 株処理区において施用後早い段階で誘導されました(図4-3)。また、芽生えからのエチレン産生を測定したところ、細菌施用によって産生量が増加することが確認されました。さらに、ET 生合成前駆体である ACC を育苗土に添加することで、イネもみ枯細菌病による苗腐敗症が抑制されました。以上のことから、ET による初期の防御応答の活性化が W6 株の病害抑制活性に関与する可能性が推察されました。同様の結果は Y3 株についても確認されました。

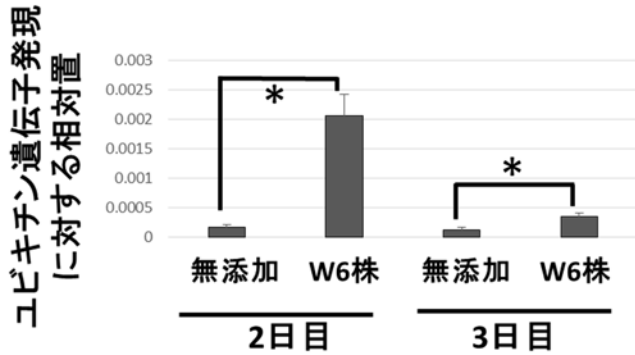


図4-3 W6株施用による *OsACS2* 遺伝子の発現誘導。
イネもみ枯細菌病接種実験と同条件で、病原菌を接種せず、W6のみ施用後(播種後)2日目と3日目の芽生えからRNAを抽出し、qRT-PCRを行った。*OsACS2*の発現量はユビキチン遺伝子との相対量で示した。*はt検定による有意差を示す(n=3, P<0.05)。

(6)有機栽培育苗土由来の培養可能な細菌の混合施用による病害抑制効果の解析

病害抑制活性が認められた *Pseudomonas* sp. (2) (W6株)の効果に対する、他の微生物の混合施用の影響を調べることで、育苗土において確認された微生物多様性が病害抑制活性に影響を与える可能性を簡易的に検証しました。まずは、*Pseudomonas* 属菌のみに着目し、分離した *Pseudomonas* sp. (表4-4)のうち、単独では病害抑制活性を持たない4種類を病害抑制活性の有効菌濃度以下(OD₆₀₀, 0.02)の *Pseudomonas* sp. (2)と混合して施用しました[Total菌濃度:OD₆₀₀, 0.5に調製した菌液を10 ml/pot(容量250 ml)で添加]。その際、最も多く分離された菌群である *Pseudomonas* sp. (1)でtotal菌濃度を調整しました。その結果、*Pseudomonas* sp. (2)に他の4菌株を添加すると、病害抑制活性が促進されました(図4-4)。また、この病害抑制活性には *Pseudomonas* sp. (2)が必要であることから、他の菌群が *Pseudomonas* sp. (2)の効果を促進している可能性が考えられました。このことは、微生物多様性が病害抑制活性に影響を及ぼす可能性を支持するものと考えられます。

続いて、有機栽培育苗土から得られた培養可能な細菌全てを混合し、施用することで、病害抑制効果が認められるか検証しました。まず、NA普通寒天培地で培養した細菌を全て混合し、OD₆₀₀値を0.1に調製後、育苗土に添加しました。その結果、元になる有機栽培育苗土によって、病害抑制効果が認められる場合があることが明らかになりました。また、細菌の培養に用いる培地の検討を行ったところ、1/1000に希釈したNA培地(貧栄養培地として使用)や、ゲル化剤としてゲランガムを用いることで、より病害抑制効果の強い細菌集団が得られる傾向が認められました。また、それぞれの培地から得た細菌集団のPCR-DGGE解析の結果、同一の育苗土から異なる培地で培養された細菌集団は異なる構造を持つことが確認されました。これらの結果から、特に病害抑制活性を有する微生物を分離しなくても、培養法を検討することで有機栽培育苗土から病害抑制効果を有する細菌集団を得ることが可能であることが示唆されました。

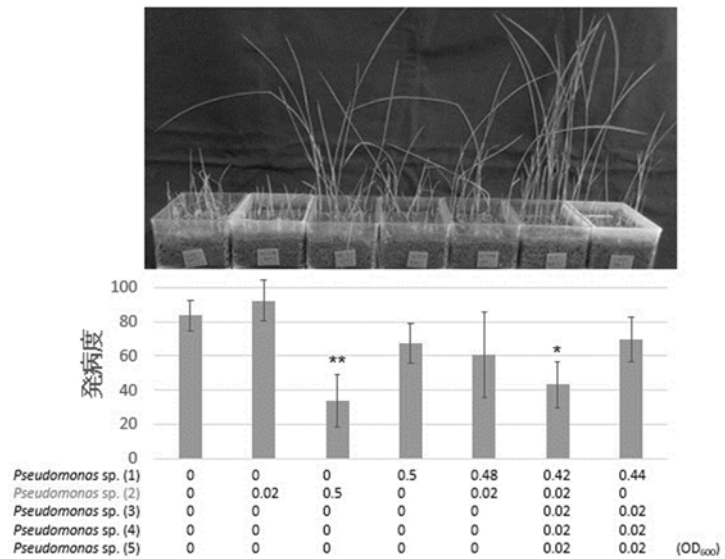


図4-4 土壌細菌の混合施用によるイネもみ枯細菌病抑制効果の促進。
病害抑制活性が認められた *Pseudomonas* sp. (2)に病害抑制効果が認められない *Pseudomonas* 属菌を混合施用した際の病害抑制効果の変化を解析した。施用する菌液はトータルOD₆₀₀値が0.5になるように調製した。*、**は無添加区に対する有意差を示すDunnnett test, n=3, *P<0.05, **P<0.01)

さらに、この細菌集団による病害抑制効果と育苗土添加後の細菌相形成との関係を解析しました。細菌集団を添加後9日の発病検定時の育苗土からDNAを抽出し、16S rDNAを用いたPCR-DGGEを行いました。その結果、病害抑制効果のある細菌集団添加後の育苗土の細菌相は病原菌の接種による影響が少ないことが明らかになりました。このことは、有機栽培育苗土の微生物相の堅牢性と類似しており、同様のメカニズムが関与している可能性が考えられます。

(7) 自作のもみ殻堆肥のイネもみ枯細菌病抑制効果

本研究において、有機栽培育苗土の多くは病害抑制機能をもつことが示唆されましたが、その作成方法は農家によって様々であり、有機農業を普及させるための技術としては問題があります。そこで、有機栽培育苗土の作成方法の聞き取り調査では、イネ由来の有機物が投入されていることが多いことに注目し、米ぬか(20 kg)、稲わら(15 kg)、もみ殻(19 kg)を材料としたもみ殻堆肥を作成し、これを用いて有機栽培育苗土で得られた結果が再現できるか検討しました。一年間かけて完熟させた堆肥を市販の無肥料培土に混合し、これを用いて有機栽培育苗土と同様の方法でイネもみ枯細菌病抑制効果の解析を行いました。対照としては堆肥無添加区と宮城県石巻市の有機農家から分譲されたもみ殻堆肥を使用した区を設けました。その結果、堆肥施用区では有機栽培育苗土と同様にイネもみ枯細菌病の発病が抑制されることが明らかになりました(図4-5)。

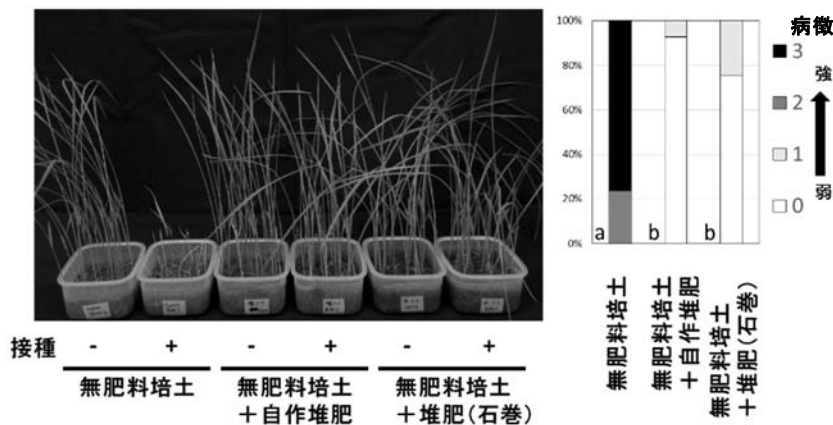


図4-5 堆肥施用によるイネもみ枯細菌病抑制効果。無肥料培土と堆肥を3:1で混合した育苗土にもみ枯細菌病菌を接種した種子を播種した。30℃で9日間培養後、発病度を4段階に分けてカウントした。異なるアルファベットは Steel-Dwass test による有意差を示す ($P<0.05$)。

さらに、堆肥施用による病害抑制時の育苗土の微生物相を PCR-DGGE 法によって解析した結果、堆肥施用によって微生物相の多様性が高くなりました。また、無施用区では病原菌接種による細菌相の変動が大きかったのに対し、堆肥施用区では、自作、石巻ともに病原菌接種による変動が少なくなりました。このことは有機栽培育苗土で観察された結果と類似しており、堆肥施用により微生物相の堅牢性が高くなったと考えられます。

また、堆肥由来の細菌集団の病害抑制効果についても解析を行いました。堆肥を水に懸濁し、NA 普通寒天培地および 1/1000 希釈 NA 寒天培地に塗布し1日または2日培養(25℃)しました。続いて得られたコロニーを全て混合し、OD₆₀₀ 値を 0.1 に調製後、10 ml/pot で添加しました。その結果、NA 普通培地を用いた場合は抑制効果が非常に弱かったのですが、1/1000 希釈培地を用いた場合は堆肥を施用した場合と同等のイネもみ枯細菌病抑制効果を示しました。その際の育苗土の細菌相を PCR-DGGE 法を用いて解析したところ、有機栽培育苗土から培養した細菌集団を用いて解析した結果と同様に、病害抑制効果と微生物相の安定性(堅牢性)が相関していました。

以上の結果から、有機栽培育苗土で示された病害抑制効果と微生物相の多様性及び堅牢性の関連や、培養で得た細菌集団を用いた病害抑制効果に関する知見が、自作のもみ殻堆肥を用いて再現できることが示されました。このことは、有機農業を普及させる上で利用可能な知見と考えられます。

4. おわりに

本研究の結果から、有機栽培の病害抑制機能の指標の一つとして、育苗土の微生物多様性と微生物相の環境変化に対する堅牢性が提起されました。さらに、知見を蓄積し基準値を設定することで、この指標を用いて土壌の健全性などを客観的に評価できるようになることが期待されます。また、自作のもみ殻堆肥や有機栽培育苗土から培養した細菌集団を用いることで、有機栽培育苗土における病害抑制と類似した効果を創出できることを示しました。さらに詳細な検討が必要ですが、有機農業発の病害防除技術として確立されれば、我国の有機農業の推進に大いに役立つことが期待されます。また、本研究の成果が微生物集団を用いたバイオコントロールの手法としても展開されることが期待されます。

5. 要約

有機農業の病害抑制機能を明らかにする目的で、私たちは水稻の有機栽培育苗土の病害抑制効果について解析を行いました。有機農家が独自の方法で作成した有機栽培育苗土は土壌理化学性に共通性の高い特徴はないものの、イネもみ枯細菌病やイネ苗立枯細菌病による苗腐敗症の抑制効果が、ある程度の普遍性をもってあることが分かりました。そこで、育苗土に含まれる微生物が病害抑制効果に係わっている可能性について解析を行いました。その結果、有機栽培育苗土の微生物多様性は市販の慣行栽培育苗土に比べて高いという特徴が示されました。またこの微生物相は、環境変化によって大きな影響を受けず安定であること(堅牢性)が明らかになりました。このことから、有機栽培育苗土の微生物相の堅牢性が病原菌の侵入と増殖を抑制している可能性があると考えています。さらに、有機栽培育苗土から病害抑制活性をもつ細菌の分離を行ったところ、*Pseudomonas* 属菌と推定される細菌が単離されました。本菌の病害抑制効果にはエチレンを介した植物の免疫機構の活性化が関与している可能性が示唆されています。従って、有機栽培育苗土の病害抑制効果は土壌微生物相の堅牢性や植物免疫の活性化など複合的な要因によって為されていると考えられます。これらの知見を踏まえ、私たちは有機栽培育苗土から培養した細菌の混合施用によって、有機栽培育苗土に類似した微生物相の堅牢性を介した病害抑制技術の開発を試みました。その結果、土壌から貧栄養培地を用いて培養した細菌集団に細菌相の安定化を伴った強い病害抑制効果があることが分かりました。今後、これらの知見を利用した新たなバイオコントロール手法の開発が期待されます。

6. 引用文献

Ando S, Ito T, Kanno T, Kobayashi T, Morikawa T, Honda K, Tsushima S, Takahashi H. (2014) Impact of organic crop management on suppression of bacterial seedling diseases in rice. *Organic Agriculture*, **4**,187-196

Takahashi, H, Matsuhita Y, Ito T, Nakai Y, Nanzyo M, Kobayashi T, Iwaishi S, Hashimoto T, Miyashita S, Morikawa T, Yoshida S, Tsushima S, Ando S. (2018) Comparative analysis of microbial diversity and bacterial seedling disease-suppressive activity in organic-farmed and standardized commercial conventional soils for rice nursery cultivation. *J. Phytopathol.* DOI: 10.1111/jph.12682

農業環境技術研究所編 土壌微生物群集(細菌・糸状菌)のPCR-DGGE解析 eDNAプロジェクト課題共通マニュアル Ver. 1.7

7. 執筆者一覧

安藤杉尋、高橋英樹

8. 問い合わせ先

東北大学大学院農学研究科植物病理学分野 Tel: 022-757-4297