

環境にやさしくカビを撃退できるのか
～有用微生物によるアスパラガス病原菌の増殖抑制効果の検証～

生物資源科学部 生物環境科学科

B20G032 長谷部 菜々

支援スタッフ 生物資源科学専攻

M20G022 鶴見 拓哉

指導教員 生物資源科学部 生物環境科学科

准教授 佐藤 孝

1. 背景・目的

カビ（糸状菌）は菌類の一種であり、我々の身の回りに多種多様に存在している。その中には植物に病原性を示すものもあり、農業においては化学農薬により防除されるケースが多いが、農薬でも防除が難しい病原性のカビも多く存在する。また、農薬は人体に有害なだけでなく、残留農薬や系外流出農薬による環境への影響が懸念されている。

近年、秋田県では主力野菜の一つであるアスパラガス生産において、茎疫病などの病原性糸状菌による病害発生が問題視されている。これらを防除するためには、殺菌剤を使用する必要があるが、効果が十分ではなく減収しているのが現状である。

一方、先行研究により土壌から分離された植物生長促進作用を有するクスダマカビ *Cunninghamella elegans* (以下R株)とコウジカビ *Aspergillus aureolus* (以下Wf株)は、培地上での増殖が速いため、拮抗作用により病原菌の増殖抑制効果が期待できる。そこで、今回の研究ではアスパラガスより病原菌(糸状菌)を分離し、拮抗微生物によりアスパラガスの病原菌の増殖を抑制できるか検討した。

2. 試験方法

1) 拮抗微生物の特徴

① クスダマカビ(R株)

Cunninghamella elegans



図 1 R株の形態

② コウジカビ(Wf株)

Aspergillus aureolus



図 1 Wf株の形態

*R株・Wf株ともに新潟県の畑の土壌試料から単離したものである。

2) アスパラガスからの病原菌の単離

アスパラガス植物体は生産者圃場(埼玉県)より採取した。病徴がみられるアスパラガスの罹病部を切り取り、70%エタノール及び0.25%次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌した。その後、滅菌水で2回ほどすすぎ、素寒天培地で培養した(培養は25℃、1週間程度)。培養した糸状菌をストマイシン入りのPDA培地でそれぞれ単離し、合計30株を単離した(H1~H30)。

3) アスパラガスの病原菌への増殖抑制効果の検討

PDA培地で上記の拮抗微生物RとWfとアスパラガスから単離した病原菌を対峙培養させ、菌叢面積評価にて抑制効果を判断した。菌叢面積評価方法は、デジタルカメラ(OLYMPUS STYLUS TG-4 Tough)で撮影後、画像計測アプリ(leafareacounter_plus_ja)を用い、菌叢面積を割り出した。各試験を3連で行い、阻害率を算出した。

4) 単離した菌の同定

PEX法により1cm²各の菌叢からDNAを抽出し、PCR法にて18S-rRNA遺伝子を増幅し、本学のバイオテクノロジーセンターにて塩基配列を解読し同定した。

3. 結果

1) 単離した病原菌の同定結果

表1にアスパラガスから単離した主な病原菌株の同定結果を示す。アスパラガスの罹病部位から30株の糸状菌(病原菌)を分離することに成功した。H1は文献1)より、イネ馬鹿苗病を引き起こす菌株であると分かった。H7は文献2)より、ヨコバイから伝染する植物病原菌であることが分かった。また、H17・H24は文献4)より、アスパラガス炭疽病を引き起こす病原性子囊菌であることが分かった。H9・H20は*Alternaria*で、ハマタマボウキのStem spot病(文献5))を引き起こす。また、H8・H12・H14・H16・H19・H29は*Fusarium oxysporum*でアスパラガス立枯病の原因になりうる(文献5))。今回の試験では、アスパラガスに関係する病原菌以外の菌種もアスパラガスの罹病部から分離された。

表1 分離した糸状菌の同定結果

番号	学名	番号	学名
H1	<i>Fusarium fujikuroi</i>	H17	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
H2	<i>Fusarium equiseti</i>	H18	<i>Fusarium solani</i>
H5	(unidentified)	H19	<i>Fusarium oxysporum</i>
H6	<i>Fusarium subglutinans</i>	H20	<i>Alternaria alternata</i>
H7	<i>Bionectria ochroleuca</i>	H21	<i>Fusarium incarnatum</i>
H8	<i>Fusarium oxysporum</i>	H22	<i>Fusarium proliferatum</i>
H9	<i>Alternaria alternata</i>	H23	<i>Fusarium incarnatum</i>
H10	(unidentified)	H24	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
H11	<i>Fusarium subglutinans</i>	H25	<i>Fusarium subglutinans</i>
H12	<i>Fusarium oxysporum</i>	H26	<i>Fusarium subglutinans</i>
H13	(unidentified)	H28	<i>Fusarium solani</i>

H14 <i>Fusarium oxysporum</i>	H29 <i>Fusarium oxysporum</i>
H15 <i>Fusarium solani</i>	H30 <i>Fusarium incarnatum</i>
H16 <i>Fusarium oxysporum</i>	

2) 面積評価による抑制効果

対峙培養期間は R 株が 3~4 日程度に対し Wf 株が 7 日程度で、両者で増殖速度に違いがみられた。R 株は増殖速度が速く、病原菌を覆いつくすように増殖していた (図 3)。一方、Wf 株は培地上での増殖速度は R 株ほど速くないが、病原菌と対峙面を形成していた (図 3)。

拮抗微生物との対峙培養による病原菌増殖阻害率を表 2 に示す。全体的に R 株は Wf 株よりも病原菌の増殖阻害率が高い結果となったが、H24 の子囊菌に対しては抑制効果が弱くなる傾向が見られた。

阻害率の度数分布を図 5 に示す。R 株は 40~60%が多く、60%以上の高い阻害率を示す頻度も高かった。Wf 株は 20~30%が多く、60%以上の阻害率は見られなかった。

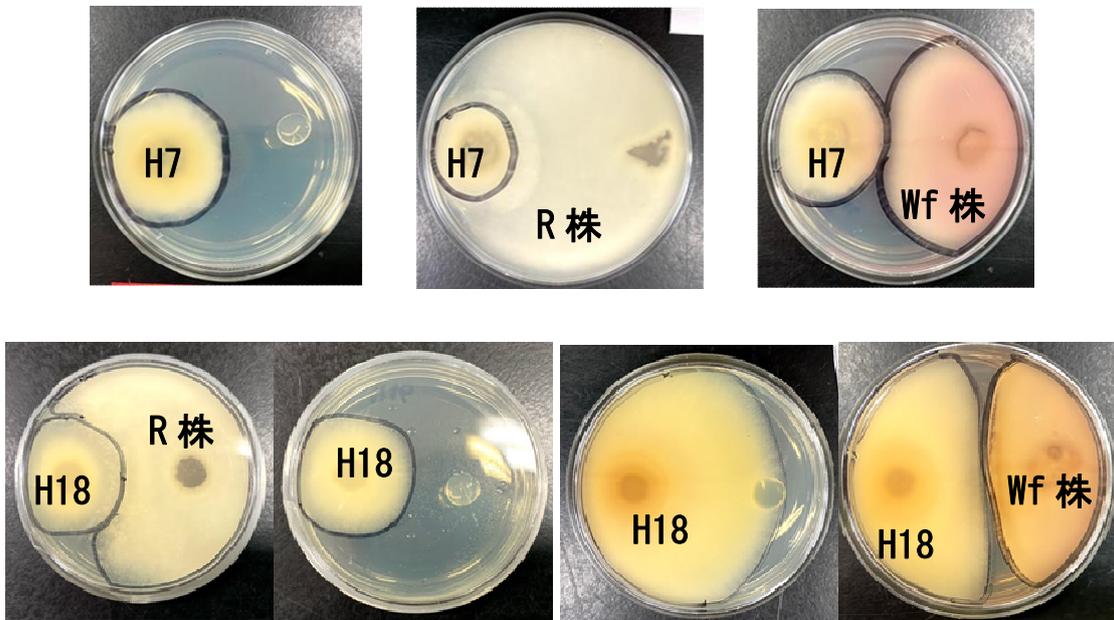


図 3 H7 株および H18 株と拮抗微生物との対峙培養結果

表 2 対峙培養結果の一覧

微生物 株名	アスパラガス分離菌の菌叢面積の阻害率(%)											
	H1	H2	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14
R	28.1	44.3	56.8	57.4	49.2	55.2	36.7	27.3	55.2	43.6	83.6	59.9
Wf	26.1	28.2	47.7	27.6	7.7	48.4	29.8	14.4	45.0	18.7	38.8	36.2
微生物 株名	アスパラガス分離菌の菌叢面積の阻害率(%)											
	H16	H18	H19	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H28	H30	
R	33.3	5.4	44.4	42.2	29.7	78.8	31.2	41.1	72.9	24.3	56.8	
Wf	21.4	26.4	31.7	21.3	18.6	57.4	45.8	35.7	40.3	39.0	52.6	

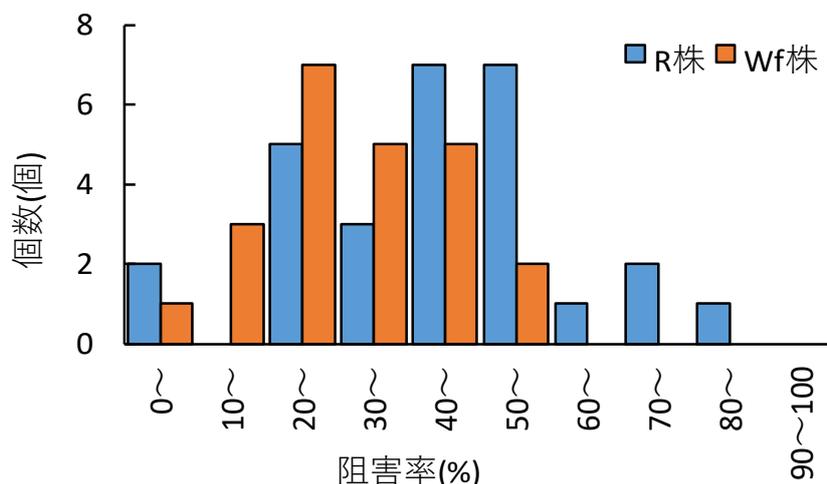


図5 各微生物の阻害率分布

4. 考察

R株では増殖速度が速いことによる物理的な抑制効果が確認され、Wf株は培地上での増殖速度はそれほど速くないが対峙面を形成していた(図3)。Wf株は対峙面が黒くなり病原菌の菌糸が分解されているように観察できたので、病原菌の増殖を抑制する物質を生産している可能性が示唆された。R株は*Fusarium oxysporum*に抑制効果が高い結果となったが、H24株(*Colletotrichum gloeosporioides*)にはWf株がより抑制効果が高いと考えられた(表2)。R株はH24株のような子嚢菌に対して効果が弱く、Wf株は抑制効果が高い可能性がある。H9株(*Alternaria alternata*)はR株・Wf株共に阻害率が低くなっているが(表2)、これはH9株の増殖速度が遅いため阻害率が低く見積もられている結果である。また、R株は増殖速度が速く病原菌と拮抗して阻害するため、阻害率の高い病原菌は増殖速度が速い傾向にあると考えられた。

本試験では既知のアスパラガス病原菌以外の菌種がいくつか分離された。これらの菌種がアスパラガスの罹病部に存在することで、アスパラガスに何らかの病状を引き起こしている可能性もある。これらの菌種も含め、今回分離された病原菌の多くが拮抗微生物により増殖が抑制されることが明らかになったことから、拮抗微生物を用いた環境にやさしいアスパラガスの病害防除の可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 青木孝之・Kerry O'Donnell・David M. Geiser(2014)「植物病原 *Fusarium* 属菌の系統学：その現状と将来への展望」、日植病報 80 特集号、p73-80
- 2) 藤永小百合・堀下美穂・飯山和弘・青木智佐・清水 進(2011)「トウモロコシからの昆虫病原性糸状菌の分離」、entomotech、35、p5-7
- 3) 小舟瞬・升屋 勇人・梶村 恒(2011)「シキミタマバエの共生菌 *Botryosphaeria dothidea* はゴールから伝播されているのか？—分生子の形態と菌糸の成長速度の比較—」、日本菌学会第55回大会
- 4) 吉田重信(2002)「日本産糸状菌類図鑑」
<www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/inventory/microorg/mokuroku/z49-Coll-gloeo.html>
- 5) 「農業生物資源ジーンバンク」
<www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php>