

高抗菌性放線菌の分離と病害防除自然農薬評価実験の計画

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科バイオ研究部 2年

【背景と目的】

病害虫を防除する農薬の使用について**使用方法が厳しく**決められていることから**安全面で心配**する人が多い。土壌細菌の一種であり抗生物質を生産する放線菌を、家庭菜園などで使用する**効果的な自然農薬**として活用できる可能性について検討する。

【放線菌とは】

主に土壌中に生息する**原核微生物**で**病原性を示すもの**、**抗生物質を生産する有用なもの**もある



【研究の計画】

- ①土壌放線菌の分離：土壌懸濁液の塗抹をし、純粋分離、抗菌性試験の後、抗菌性を示した株をDNA分析で菌株を同定する。
- ②植物病害の誘導検査：農作物の苗を準備をし、土壌懸濁液の穿刺接種を行い、放線菌の効果を検証するための病害誘導の実証試験を実施する。

【材料】

- ①**土壌放線菌の分離**：園芸高校敷地内から採取した土壌
- ②**抗菌性の検定菌**：大腸菌、枯草菌、コクリア菌、パン酵母
- ③**植物病害の誘導試験**：実習農場から収集した土壌
- ④**接種作物**：アブラナ科のアリッサムとアブラナ

【土壌放線菌の分離】

①方法

- 1) 1gの土壌を蒸留水5mLに懸濁後、生理食塩水で希釈したのち、放線菌用平板培地に塗抹し28℃で培養した。
- 2) 得られた単独コロニーから菌株を釣菌し、純粋分離した。
- 3) 分離株は、放線菌用平板培地上で交叉培養法により抗菌性試験を実施した。

②結果

・純粋分離した土壌細菌40株のうち、13株について抗菌性が認められた(図2)。



図1. B100株の交叉培養結果

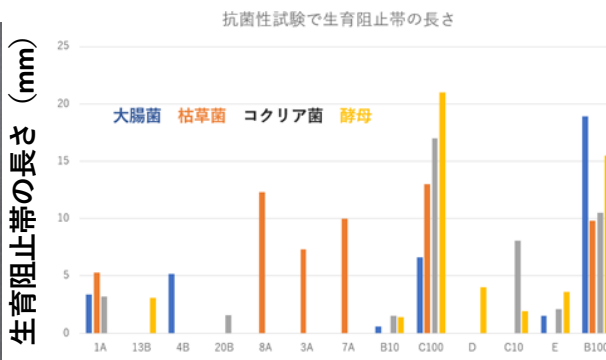


図2. 分離した土壌放線菌の抗菌性試験で生育阻止帯形成株とその長さ

【DNA分析】

①方法

抗菌性を示した4株についてDNA抽出し、ダイレクトシーケンス法により16SrRNA領域の配列を解析した。得られたシーケンスをwebサイト(NCBI)で相同検索した。

②結果

強い抗菌性を示した2株(C100, B100)について真正細菌放線菌ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属の登録データと97~100%で一致した(図3、4)。

弱い抗菌性を示した2株(1A, 8A)は、枯草菌バチルス(*Bacillus*)属の登録データと、いずれも98%一致した。

Streptomyces sp. strain HBUM206418 16S ribosomal RNA gene, partial s
Sequence ID: [MT549094.1](#) Length: 1173 Number of Matches: 1

Range 1: 66 to 709 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1190 bits(644)	0.0	644/644(100%)	0/644(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGAACGGGTGAGTAACACGTTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACG	60		
Sbjct 66	CGAACGGGTGAGTAACACGTTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACG	125		
Query 61	GGGTCTAATACCGGATACCACTCCTGCCCTGCATGGGCGGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTG	120		
Sbjct 126	GGGTCTAATACCGGATACCACTCCTGCCCTGCATGGGCGGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTG	185		

図3. C100株の相同検索結果の一部(一致率100%)

Streptomyces pseudovenezuelae strain pdL12 16S ribosomal RNA gene, p
Sequence ID: [MK519177.1](#) Length: 1373 Number of Matches: 1

Range 1: 45 to 704 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1164 bits(630)	0.0	646/660(98%)	1/660(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACACGTGGGCAATCTGCCCTTCRCCTCTGGGACAAGCCCTGGARACGGGGTCTAMTACCGG	60		
Sbjct 45	ACACGTGGGCAATCTGCCCTTCRCCTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGG	104		
Query 61	ATAACACTTCCAMTCTCCTGGGTGGAGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGC	120		
Sbjct 105	ATAACACTTCCACTCTCCTGGGTGGAGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGC	164		

図4. B100株の相同検索結果の一部(一致率97%)

【土壌懸濁液による病害誘導試験】

①方法

放線菌懸濁液を塗抹した葉に、塗抹直後と1日後に土壌懸濁液を滅菌した爪楊枝の先につけ、穿刺接種した。接種後、穿刺箇所をラップで覆い、1週間をかけて観察した。対照区には、放線菌を塗抹せずに土壌懸濁液穿刺接種または接種操作で付傷だけ行った。実験は、室内のポット栽培の苗で実施した。

②結果

アリッサムでは、放線菌塗抹1日後に土壌懸濁液を穿刺接種したものは、感染障害が抑制された。アブラナでは、放線菌塗抹で障害発生を抑制されず、反対に増長する様子が観察された。

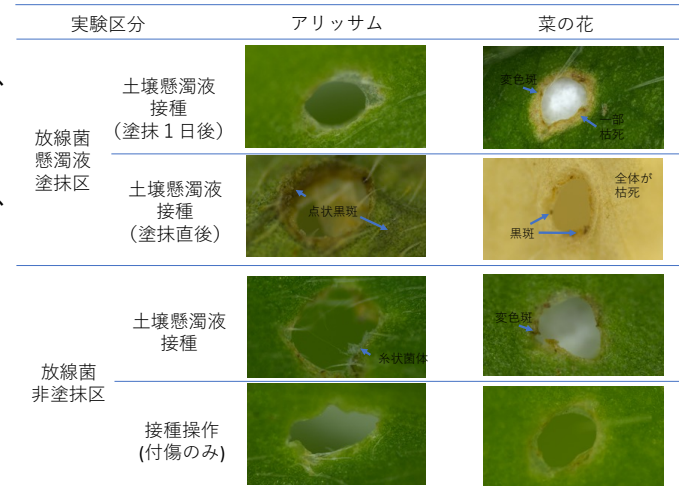


図5. 放線菌懸濁液塗抹と土壌懸濁液穿刺接種による病害の発生試験

【まとめ】

抗菌性を示した4株の内2株が放線菌であった。生育阻止帯は放線菌のほうがはるかに長い。放線菌と枯草菌の抗菌性にはやはり大きな差がある。

放線菌の抗菌性を植物の病害防除に使用できる可能性について検討した結果、アリッサムでは1日前の塗布で感染を防ぐことができたが、アブラナでは、枯草菌自体が植物体に病害をもたらす可能性が示された。

【今後の展望】

植物種を増やして病害防除実験を行いたい。また、圃場での栽培条件下での実施を試みたい。

【参考文献】

京都大学農学部, 応用微生物実験実験書 2004年度版, 応用微生物実験 京都大学