

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	尤 暁東
学位授与の日付	2020年3月31日	
論文名	Development of vermicompost from moso-bamboo, and analysis of its mechanisms of plant-disease suppressiveness (モウソウチク由来ミミズ堆肥の作出とその植物病害抑制機構の解明)	
論文審査委員	主査	東條 元昭
	副査	乾 隆
	副査	高野 順平

論文要旨

ミミズによる堆肥化は家畜し尿・敷きわらなど固体廃棄物リサイクルの有効な手段であり、様々な植物病害に抑制効果を示すことがこれまでに報告されている。日本のタケの主要種であるモウソウチクは、かつては食用や建材などに広く利用されていたが、生産者の高齢化によって現在その多くが放置され農地や森林崩壊の原因になっている。モウソウチクを植物病害に抑制効果をもつミミズ堆肥に変えて植物生産現場で利用すれば、植物病害の軽減と放置竹林の有効活用を同時に図ることができる。しかしタケ材をミミズ堆肥化したという報告はこれまでに見られず、その植物病害抑制効果については全く不明である。モウソウチク由来ミミズ堆肥を植物生産で利用するためには、その作出法を開発して植物病害に対する発病抑制効果を確かめるとともに、発病抑制効果に関わる要因を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、モウソウチクから植物病害に抑制効果をもつミミズ堆肥を作出して植物生産に利用することを目的として、堆肥の作出方法の確立、植物病原糸状菌および植物寄生性線虫に対する抑制効果の評価、植物病原糸状菌への抑制に関わる生物学的および化学的要因の特定、およびこの堆肥への生物防除微生物添加による病害抑制効果向上の検討を行った。

第1章 モウソウチク由来ミミズ堆肥の作出と植物病原糸状菌に対する抑制効果の評価

モウソウチクをパウダー状の細粉にした後に水道水に約 12 時間浸漬することにより、シマミミズがモウソウチクを食べて糞化することがわかった。シマミミズは水道水に浸漬しないモウソウチク細粉中では生存できなかった。モウソウチクからミミズに毒性を示す水溶性物質の存在が確認され、水道水への短時間の浸漬で除去可能であった。また、シマミミズがモウソウチク細粉中で長期間生存するためには、マメ科植物等による有機体窒素の供給も必要であることがわかった。これらの結果に基づき、水道水に一晩浸漬したモウソウチク粉末 10 kg (湿重) に窒素源としてのクズ乾燥茎葉 100 g を添加したものにシマミミズ 100 g を投入し、含水率約 80%、温度約 28°C に静置した。2 週間毎に堆肥の熟度をコマツナ発芽試験で調べた結果、シマミミズ投入の 8 週間目に完熟することがわかった。

この方法で作出したモウソウチク由来ミミズ堆肥 (vermicomposted bamboo、以下 VB) を育苗土として用いた場合のキュウリ苗立枯病に対する抑制効果を調べた。その結果、市販育苗培土 commercial nursery medium、以下 CNM) に比べて VB では苗立枯病を起こす糸状菌 3 種 (*Pythium aphanidermatum*、*Globisporangium ultimum* var. *ultimum* および *Rhizoctonia solani* AG1-IB) による発病が有意に抑制された。VB と CNM を、0、25、50、75 および 100% (v/v) になるように混合し、上記と同様に接種実験を行った結果、VB の発病抑制効果は濃度依存的に高くなることがわかった。

第2章 植物病原糸状菌に対する抑制効果の要因の解析

VB をオートクレーブしたもの (aVB) では発病抑制力が完全に消失したことから、VB の発病抑制効果には微生物やその代謝産物が関わっていることが示唆された。そこで VB 中の微生物の活性と密度を FDA 加水分解活性法と希釈平板法により aVB や CNM と比較した。その結果、VB の微生物活性と微生物密度は aVB や CNM に比べて有意に高かった。次に Miseq を用いたアンプリコンシーケンス解析により細菌叢を網羅的に調べた結果、VB にのみ *Flavobacterium* 属菌が存在し、また *Bacillus* 属菌が aVB や CNM に比べて高い割合で存在することがわかった。そこで *F. akiainvivens*、*B. amyloliquefaciens*、*B. pumilus* および *B. thuringiensis* の計 4 種について、植物病原糸状菌の活性と発病に及ぼす影響を検定した。植物病原糸状菌としてキュウリ苗立枯病菌 *Rhizoctonia solani* AG1-IB と *Globisporangium ultimum* var. *ultimum* を用いた。その結果、いずれの細菌株も *R. solani* AG1-IB に対して顕著な抗菌活性と発病抑制力を示した。一方で、*G. ultimum* var. *ultimum* に対してはいずれの細菌株も発病抑制力を示さなかった。*F. akiainvivens* と *Bacillus* 属菌 3 種の由来を明らかにするためにミミズ腸内および VB の原料であるモウソウチクとクズに含まれる細菌叢を網羅的に調べたところ、*F. akiainvivens* はミミズ腸内に、*Bacillus* 属菌 3 種はモウソウチクとク

ズに由来することがわかった。またこれらの *Bacillus* 属菌はミミズの腸内を通ることで約 100 倍に密度を増加させることがわかった。

次に VB 中に含まれる抗糸状菌物質について調べた。糸状菌として植物病原菌の *R. solani* AG1-IB を供試した。酢酸エチル等による抽出やペーパーディスク検定を経て VB 中の主要な抗糸状菌物質の成分を単離し構造解析を行った結果、VB の酢酸エチルエキスの 5 つの画分で抗糸状菌活性が確認された。これらの内の 1 つから主成分を単離して構造解析を行った結果、ergosterol peroxide とそのアナログと同定された。原料であるモウソウチク粉末の酢酸エチルエキスにはこのような活性が見られなかったことから、この物質はモウソウチクが堆肥される過程で産生されたと考えられた。

第 3 章 植物寄生性線虫に対する抑制効果の評価

植物寄生性線虫のネコブセンチュウとニセフクロセンチュウに対する VB の防除効果を、ササゲを用いた温室および圃場レベルで調べた。この実験では、圃場で施用しやすい水抽出液にして VB を供試した。比較として、野菜残渣ミミズ堆肥 (vermicomposted vegetable waste、以下 VV) の水抽出液と水道水を用いた。評価項目は、1) 二期幼虫への殺効果と卵の孵化抑制、2) 線虫の根への侵入の抑制、および 3) ササゲの生長・収量の影響およびネコブ形成の抑制とした。その結果、VB と VV で殺線虫効果や卵の孵化抑制および線虫の根への侵入の抑制が見られた。VB と VV との比較では、ニセフクロセンチュウの卵の孵化で VB の方が高い抑制効果が見られたが、ネコブセンチュウの孵化では有意な差が見られなかった。また VB は両線虫の根侵入に対して VV より高い抑制効果を示したが、ネコブセンチュウの二期幼虫に対する殺効果は VV よりも低かった。さらに VB と VV のいずれも、ササゲの生長・収量への影響が見られなかったが、VB ではササゲの線虫によるネコブ形成において、時期が異なる 2 つの試験で有意な抑制が見られた。このように VB と VV の両方で線虫に対する抑制効果が見られたが、VB の方が、試験の時期に関わらず安定した抑制を示した。これはモウソウチク由来ミミズ堆肥では材料が時期によらず均質であるのに対し、野菜残渣由来ミミズ堆肥では時期によって材料の種類や質が異なることが原因と考えられた。

第 4 章 生物防除微生物 *Pythium oligandrum* の添加による VB の発病抑制効果の向上

上述のように VB は植物病原糸状菌や植物寄生性線虫に対する抑制効果を示すことが明らかになったが、その効果は殺菌剤と比較すると低い。そこで VB の発病抑制効果の向上を目的として、苗立枯病を抑制する生物防除微生物として既に良く知られている *P. oligandrum* の添加の影響を調べた。VB を 25 および 50% (v/v) の比率になるように CNM に混合し、*P. oligandrum* の培養物を 1% (v/v) になるように添加した。これらを用いてキュウ

りおよびダイズを育成し、各植物の苗立枯病菌を接種して発病抑制効果を評価した。比較として標準的な殺菌剤を供試した。その結果、VBに *P. oligandrum* を添加した試験区では、VBや *P. oligandrum* の単独で処理した場合よりもキュウリ苗立枯病に対する発病抑制効果が高く見られ、さらに殺菌剤と同等のレベルに抑制効果が向上することがわかった。またダイズ苗立枯病に対しても *P. oligandrum* の添加による発病抑制効果の向上が確認された。育苗土中での *P. oligandrum* の菌密度を調べたところ、VBが一定割合で培土に存在する場合に有意な菌密度の増加が見られた。これらの結果から、VBは植物病原糸状菌や植物寄生性線虫を抑制するが、生物防除微生物の *P. oligandrum* に対してはその活性を促進することがわかった。

結論

本研究では、まずモウソウチク由来ミミズ堆肥の作出法を確立し、その植物病原糸状菌に対する抑制効果を確認した。そして、この抑制効果をもたらす主要な要因が、VB中に多様かつ高密度の微生物が存在することによる栄養や生育場所をめぐる競合、*F. akiainvivens* や *B. amyloliquefaciens* 等の拮抗作用、および ergosterol peroxide などの抗菌活性物質の存在であることを明らかにした。また温室および圃場レベルでVBが2種の植物寄生性線虫に対して抑制効果を示すことも確認した。さらに生物防除微生物 *Pythium oligandrum* をVBに添加することによってキュウリ等の苗立枯病に対して、標準的な殺菌剤と同等のレベルにまで発病抑制効果が向上することを明らかにした。今後、VBの植物病害抑制力をさらなる圃場試験で評価することにより、有機栽培や減農薬栽培などを行う作物生産現場でVBを活用することが期待される。

審査結果の要旨

ミミズによる堆肥化は食品廃棄物や家畜糞などの固体廃棄物リサイクルの有効な手段であり、様々な植物病害に抑制効果を示すことがこれまでに報告されている。日本のタケの主要種であるモウソウチクはかつては食用や建材等に利用されていたが、生産者の高齢化によって現在その多くが放置され農地や森林崩壊の原因になっている。モウソウチクを植物病害に抑制効果をもつミミズ堆肥に変えて植物生産現場で活用すれば植物病害の軽減と放置竹林の有効利用を同時に図ることができる。食品廃棄物や家畜糞は季節によって質が変わるため、ミミズ堆肥化した場合に発病抑制効果が安定しないという欠点があった。一方、モウソウチクは食品廃棄物等に比べて季節によらず質が安定しているため、これを材料にしたミミズ堆肥の発病抑制効果も一定になる可能性がある。食品廃棄物等に比べて難分解性のため腐植増加による土壌改良効果も期待できる。

しかしタケ材をミミズ堆肥化したという報告はこれまでに見られず、その植物病害抑制効果については全く不明であった。モウソウチク由来ミミズ堆肥を植物生産で利用するた

めには、その作出法を開発して植物病害に対する発病抑制効果を確認するとともに、発病抑制効果の安定性や要因を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、モウソウチクから植物病害に抑制効果をもつミミズ堆肥を作出して植物生産に利用することを目的として、堆肥の作出方法の確立、植物病原糸状菌および植物寄生性線虫に対する安定的な抑制効果の評価、植物病原糸状菌への抑制に関わる生物学的および化学的要因の特定、およびこの堆肥への生物防除微生物添加による病害抑制効果向上の検討を行った。

第1章ではモウソウチク由来ミミズ堆肥の作出と植物病原糸状菌に対する抑制効果の評価を行った。まず、モウソウチクからの成熟堆肥を8週間という短期間でミミズ堆肥を作出する方法を確立した。この方法で作出したミミズ堆肥のキュウリ苗立枯病に対する抑制効果を調べたところ、市販育苗土に対するこのミミズ堆肥の添加濃度が高くなるほど、苗立枯病の発生率が低くなることがわかった。

第2章では植物病原糸状菌に対する抑制効果の要因の解析を行った。モウソウチク由来ミミズ堆肥を高圧滅菌処理すると発病抑制力が完全に失われたことから、この堆肥中の微生物やその代謝産物が発病抑制に関わっていることが示唆された。そこで堆肥中の微生物量や種類を培養法や次世代シーケンサーで調べたところ、市販育苗土よりも多くの種類と密度の微生物を含むこと、とくに*Flavobacterium*属菌と*Bacillus*属菌が高い割合で存在することがわかった。これらの内*Flavobacterium*属菌は市販育苗土には見られず、今回の堆肥中のみ認められた。そこでモウソウチク由来ミミズ堆肥由来の*F. akiainvivens*、*B. amyloliquefaciens*、*B. pumilus*および*B. thuringiensis*の計4種について植物病原糸状菌に対する抗菌活性と発病抑制力を調べた。その結果、いずれの細菌種も顕著な抗菌活性と発病抑制力を示した。またこれらの内、*Bacillus*属菌3種はミミズの腸内を通ることで約100倍に密度を増加させていることがわかった。さらにこの堆肥に含まれる抗糸状菌物質を単離し、それらをergosterol peroxide およびそのアナログと同定した。これらの物質はこの堆肥の原料からは検出されなかったことから、堆肥が作られる過程で産生されたと考えられた。

第3章では植物寄生性線虫に対する抑制効果を温室と圃場でササゲを用いて評価した。野菜残渣由来ミミズ堆肥を比較対照とした。その結果、モウソウチク由来と野菜残渣由来の両方のミミズ堆肥で、殺線虫効果や卵の孵化抑制および線虫の根への侵入の抑制が見られたが、モウソウチク由来ミミズ堆肥の方が、試験の時期に関わらず安定した抑制効果を示した。

第4章では生物防除微生物*Pythium oligandrum* (PO) の添加によるモウソウチク由来ミミズ堆肥の発病抑制効果の向上について検討した。モウソウチク由来ミミズ堆肥が様々な植物病原体に抑制効果を示すことが本研究で明らかになったが、その効果は市販農薬に比較して低かった。そこで生物防除微生物として既に知られているPOを添加することで発病抑制効果が向上するかどうかを調べた。モウソウチク由来ミミズ堆肥を施用した市販育苗土にキュウリやダイズの苗立枯病菌を接種し、POの培養物を処理した。そしてその後のキュウリやダイズの病害進展の程度を測定した。比較として市販農薬処理区を設けた。その結果、モウソウチク由来ミミズ堆肥にPOを処理すると市販農薬を処理した場合と同等のレベルにまで発病抑制効果が向上することがわかった。さらにモウソウチク由来ミミズ堆肥を施用した育苗土中ではPOの密度の増加が見られた。これらの結果から、モウソウチク由来ミミズ堆肥は様々な植物病原体を抑制する一方で、生物防除微生物のPOの活性を促進する作用があることが明らかになった。また、モウソウチク由来ミミズ堆肥とPOを同時施用す

ると、市販農薬と同等の植物病害抑制効果を示すことがわかった。

以上のように本研究では、まずモウソウチク由来ミミズ堆肥の作出法を確立した。次に植物病原糸状菌や植物寄生性線虫に対する抑制効果を温室および圃場レベルで確認した。そして、これらの抑制効果にいくつかの拮抗細菌や抗菌物質が関与していることを明らかにした。さらにこの堆肥を生物防除微生物の1つと同時施用することでこの生物防除微生物の活性を高め、市販農薬と同等のレベルにまで発病抑制効果を向上させるという結果も得た。

これらの新知見は応用生命科学分野とくに植物保護学と植物病理学の発展に大きく寄与する。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。