学習奨励金6-22G「放線菌の自然農薬としての可能性」成果報告

高抗菌性放線菌の分離と病害防除自然農薬としての評価実験

大阪府立園芸高等学校　３年　バイオサイエンス科バイオ研究部　森　小桜

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。

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**植物病害の防除検査**：農作物の苗を準備し、放線菌塗抹区、無し区に分け4つの区分で観察

材料

①**土壌放線菌の分離**：園芸高校敷地内の土壌

②**抗菌性の検定菌**：大腸菌,枯草菌,コクリア菌,酵母

③**接種作物**：アリッサム,アブラナ（菜の花）,スイカ
キュウリ,ピーマン,向日葵

方法

１gの土壌を蒸留水５mLに懸濁後生理食塩水で希釈,放線菌用平板培地に塗抹し２８℃で培養。得られた単独コロニーから菌株を釣菌し、純粋分離した。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。

実験①結果[1]

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

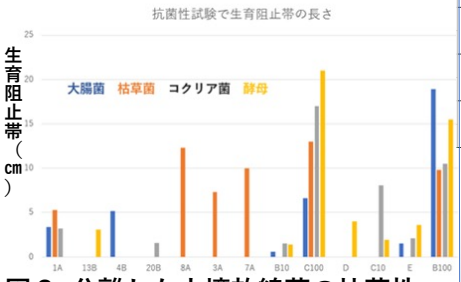


図２. 分離した土壌放線菌の抗菌性試験で生育阻止帯形成株とその長さ

DNA 分析

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NCBIのBLASTで相同検索した。

実験①結果[2]

C100, B100について真正細菌,放線菌*Streptomyces*属の登録データと97~100％一致。残り２株(1A, 8A)は、枯草菌*Bacillus*属の登録データと、いずれも98％一致。

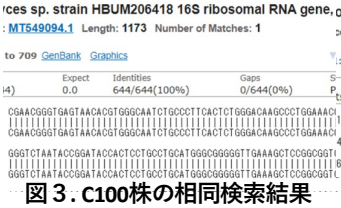


図３. C100株の相同検索結果の一部（一致率100%）

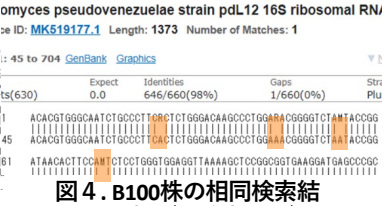
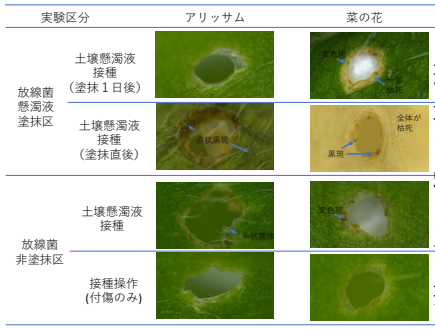


図４. B100株の相同検索結果の一部（一致率97%）

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、土壌懸濁液を放線菌懸濁液塗抹直後と１日後に滅菌した爪楊枝を用いて穿刺接種した。対照区では土壌懸濁液穿刺接種のみ・接種操作のみで付傷だけ行ったもの。４区分室内のポット栽培。圃場栽培では放線菌培養液散布区,培養液散布区,無し区の三区分で実施した。

実験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。**

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**助長する様子**が観察された。

放線菌塗沫区で明らかに病害が**抑制された。**

複雑な微生物層を作ることで**病害の抑制ができた**

作物	実験区分	散布対象	観察葉数	病害発生	健全葉
キュウリ	放線菌散布区	健全株	20	3	17
（うどん粉病）		発病株	20	4	16
	無菌培地散布区	健全株	20	0	20
		発病株	20	5	15
	無散布区	発病株	20	20	0
ピーマン	放線菌散布区	健全株	60	0	60
（カビ病）	無菌培地散布区	健全株	60	1	59
スイカ	放線菌散布区	健全株	10	5	5
（白絹病）	無菌培地散布区	健全株	10	5	5
ヒマワリ	放線菌散布区	健全株	8	1	7
	無菌培地散布区	健全株	8	0	8

まとめ

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、室内栽培のアリッサムでは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、放線菌自体が植物体に病害をもたらす可能性が示された。圃場栽培では、**放線菌の塗沫だけでなく**、複雑な微生物環境を作ることで**特定の病害菌**が**優勢的**に生育することを**防ぐことができた。**

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