

ミニ特集：新たな土壤診断技術

根こぶ病防除薬剤の施用が土壤微生物群集に与える影響の PCR-DGGE 法による評価

(独)農研機構 野菜茶業研究所* 村^{むら}上^{かみ}弘^{ひろ}治^{はる}

はじめに

キャベツやハクサイ、ブロッコリー等のアブラナ科野菜に広く発病が見られる根こぶ病は、難防除土壤病害の一つとして知られている。その病原菌 *Plasmodiophora brassicae* (根こぶ病菌) は絶対寄生菌で、土壤中では通常は耐久体である休眠胞子の状態で存在しており (口絵① a), 病原性を有したまま 10 年以上も生残できる。宿主植物の根がその近くに伸張してくると、休眠胞子は発芽して一次遊走子となり、根毛で一次感染がおこる。そして、根毛内で増殖して遊走子のうをつくり (口絵① b), やがて二次遊走子が放出される。この二次遊走子により根の皮層細胞で感染がおこり、根内での増殖に伴い、こぶ (根こぶ) が形成される (口絵① c)。このため植物体は維管束がその影響を受け、日中に地上部が萎れるなどの症状が見られるようになり、ひどい場合には生育の停滞や枯死に至る。この根こぶの中には次世代の休眠胞子が含まれていて、根こぶの腐敗に伴って、再び土壤中に拡散される。

根こぶ病の対策としては、さまざまな耕種的方法が開発されているが (村上, 2003), 一般に病原菌 (休眠胞子) 密度が 10^4 個休眠胞子/g 土壤程度の比較的低い場合には発病抑制効果が期待できるものの、病原菌密度が 10^6 個休眠胞子/g 土壤程度と高い場合には化学農薬以外では顕著な効果は得られにくい傾向にある。

根こぶ病の防除に広く用いられている薬剤の一つにフルスルファミド粉剤があるが、この薬剤の施用により、土壤微生物群集が受ける影響やその評価についてはこれまで十分に明らかになっていない。そこで、本稿では、土壤から直接抽出した DNA に PCR-DGGE 法を用いて、培養できない微生物も含めて評価した結果について紹介する。

I フルスルファミド粉剤の防除効果と残効性

フルスルファミド粉剤は施用時の土壤水分条件などを考慮して、十分に土壤と混和すれば、前述のように病原菌密度が比較的高い場合であっても、十分な発病抑制効果が期待できる。この発病抑制効果は根こぶ病菌の休眠胞子が発芽することを抑えることで得られている。そのため、薬剤を施用しても土壤中の休眠胞子数自体を積極的に減らす効果は見られない。

実際、(独)農研機構東北農業研究センター福島研究拠点 (福島県福島市) 内の普通黒ボク土の圃場において、キャベツ栽培前後 (定植前および収穫時) に土壤を採取して根こぶ病菌の休眠胞子を回収し、カルコフルオール・ホワイト M2R で蛍光染色して、直接検鏡法により計数したところ、本剤を 30 kg/10 a 施用した場合でも、施用していない対照区と同様に、栽培の前後において休眠胞子密度に有意な差は見られなかった (図-1)。

しかし、本剤は発病、すなわち、根こぶの形成を抑制するため、土壤中の病原菌密度を増大させないという点では非常に有効な手段といえる。

また、本剤を施用してアブラナ科野菜を栽培した場合、次作において薬剤を施用しない場合でも発病が抑制されることがあり、その効果には持続性 (残効性) が認められる。

前述と同じ東北農業研究センター福島研究拠点内の圃場において実施した試験では、1 年目の春作にフルスルファミド粉剤を 30 kg/10 a 施用してキャベツを栽培したところ、薬剤を施用しなかった対照区では発病が顕著であったが、薬剤を施用した区ではほとんど発病は見られなかった (図-2)。この圃場で、翌年 (2 年目) の春作にいずれも薬剤を施用せずにキャベツを栽培したところ、対照区では 1 年目と同様に発病が見られたが、1 年目に薬剤を施用した跡地では 1 年目よりは発病度は若干高くなったものの、対照区に比べると顕著に抑制された。このように、薬剤施用 1 年後にも発病が顕著に抑制される場合も見られ、薬剤の効果の持続性・残効性が認められた。

Effects of Fulsulfamide on Soil Microbial Community. By Hiroharu MURAKAMI

(キーワード: 根こぶ病, フルスルファミド粉剤, PCR-DGGE, 糸状菌群集)

* 現 近畿中国四国農業研究センター

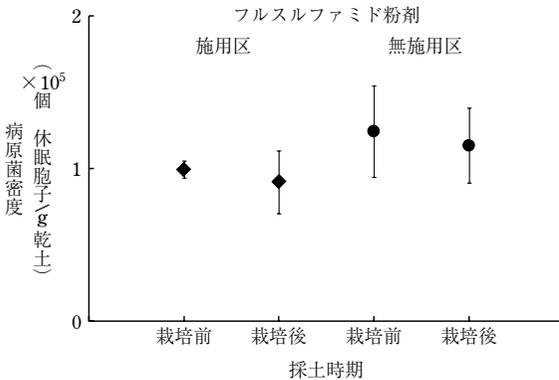


図-1 土壤中の病原菌密度に対するフルスルファミド粉剤施用の影響

普通黒ボク土 (福島), キャベツ (YR 青春2号) による圃場試験。

栽培前: 定植前, 栽培後: 収穫時。

縦棒は標準誤差を示す。

II フルスルファミド粉剤の施用が土壤微生物群集に及ぼす影響

フルスルファミド粉剤は根こぶ病菌に対しては休眠胞子の発芽を抑制しているが, ほかの土壤微生物に対する影響は明らかではない。そこで, フルスルファミド粉剤を 30 kg/10 a 施用したキャベツ圃場 (群馬県嬬恋村) において, 土壤から直接抽出した DNA を用いて PCR-DGGE 法を行い (森本・星野 (高田), 2008), 薬剤の施用による土壤微生物群集への影響を検討した。

供試前 (栽培前), 定植時 (薬剤や肥料等の資材施用前), 定植後 (資材施用約 2 週間後) および収穫時 (資材施用約 11 週間後) の 4 回, 作土層 (深さ 15 cm) の土壤試料を 5 箇所より採取し, 混合して 1 試料とした。これを各試験区 2 試料ずつ得た。2 mm にふるった後, 0.4 g ずつ破砕チューブに量りとり, FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いて, プロトコールに従い, 土壤から DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として, 細菌の 16 S rDNA の V6-8 可変領域または糸状菌の 18 S rDNA の V1-2 可変領域を対象に PCR を行った。得られた PCR 産物をキット (QIAquick PCR Purification Kit: QIAGEN) で精製後, DCode システム (BioRad) を用いて変成剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を行った。得られた電気泳動画像を FPQuest (Biorad) を用いて画像解析し, バンドの位置情報と濃淡を基に Ward 法によるクラスター解析を行った。

細菌 (16 S rDNA) および糸状菌 (18 S rDNA) の

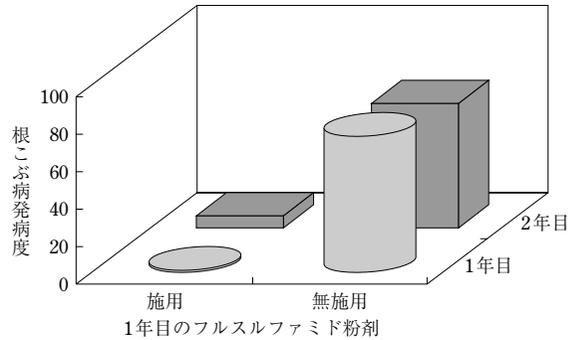


図-2 フルスルファミド粉剤の根こぶ病発病抑制効果
普通黒ボク土 (福島), キャベツ (YR 青春2号) による圃場試験。

PCR-DGGE の電気泳動結果を図-3 に示した。クラスター解析の結果, 細菌群集では, 対照区と薬剤施用区とは混在し, 薬剤施用の有無による差は見られなかった (図-4 a)。一方, 糸状菌群集では, 薬剤施用の有無によりクラスターが分かれる傾向が認められ, さらに, 薬剤施用区内では, 当年の薬剤の施用前後でも差が認められた (図-4 b)。

この際に薬剤の施用により, 根こぶ病の発病度は 100 から 57 へと低減し, 収量は 4.6 t/10 a から 8.8 t/10 a へとほぼ倍増した。このときの土壤中の休眠胞子密度は 10⁵ 個休眠胞子/g 土壤レベルとやや高く, 薬剤施用時に降水が続き, 土壤水分が高い傾向にあったため, 発病抑制効果はやや劣ったものの, 収量は十分に確保できた。

III フルスルファミド粉剤施用歴が土壤微生物群集に及ぼす影響

フルスルファミド粉剤には前述のように残効性が見られることから, 土壤微生物群集に及ぼす影響にも持続性が見られるかどうかを検証した。フルスルファミド粉剤を施用してきたキャベツ圃場 (三重県松阪市) において, 表-1 のように, 薬剤施用を中止した区を設けて, 薬剤施用区および薬剤無施用区 (対照区) の土壤微生物群集を前章と同様に PCR-DGGE 法により比較検討した。

細菌群集のクラスター解析の結果では, それぞれの処理区ごとにクラスターが分かれる傾向が見られたものの, 薬剤無施用区と薬剤施用中止区とは相対的に類似し, 薬剤施用区がやや分かれる傾向にあった (図-5 a)。

糸状菌群集では, 薬剤施用区と薬剤施用中止区とは混在していたが, 薬剤無施用区が大きく分かれる傾向を示し, 薬剤の施用歴の有無によりクラスターが分かれた (図-5 b)。

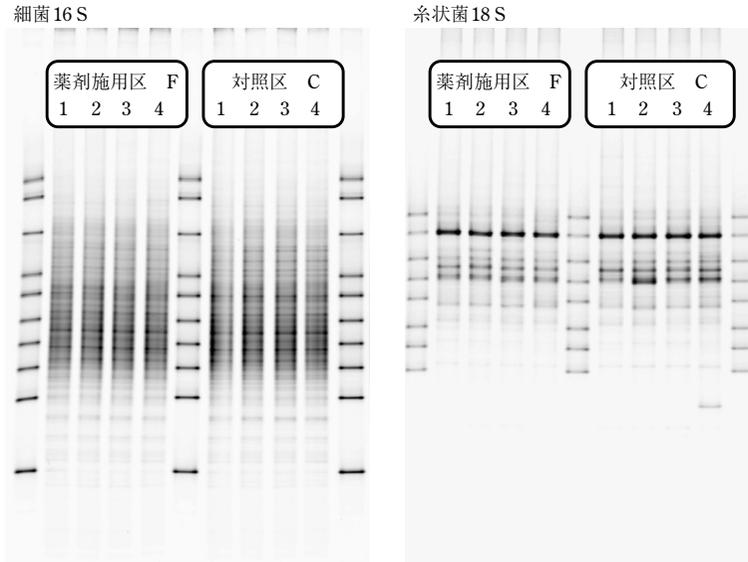


図-3 DGGE プロファイル
数字は採土時期を示す。
1: 供試前, 2: 定植時 (肥料・薬剤施用前), 3: 定植後, 4: 収穫時。

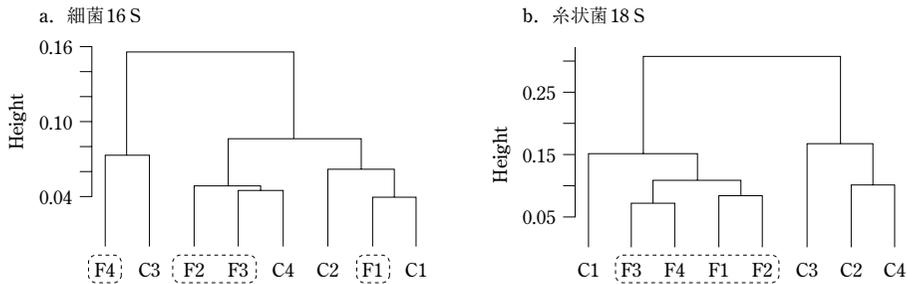


図-4 薬剤施用が土壤微生物群集に及ぼす影響
F: 薬剤施用区, C: 薬剤無施用区 (対照区).
試験区略号末尾の数字は採土時期を示す。
1: 供試前, 2: 定植時 (肥料・薬剤施用前), 3: 定植後, 4: 収穫時。

このとき薬剤施用中止区における発病は薬剤施用区ほど抑えてはいなかったが、対照区に比べるとほぼ半減し、その結果、収量の低下も軽減されており、薬剤の残効性が認められていた (図-6)。

このように、本剤の細菌群集に対する影響はあまり認められず、たとえ影響があっても持続しないと推測された。一方、糸状菌群集では当作出に薬剤を施用していない場合でも、前作までに施用した薬剤の影響が残存していると考えられた。

表-1 試験区の概要

試験区	薬剤施用		略号
	前作まで	当作出	
薬剤施用区	有	有	++
薬剤施用中止区	有	無	+ -
薬剤無施用区	無	無	- -

薬剤はフルスルファミド粉剤 30 kg/10 a.

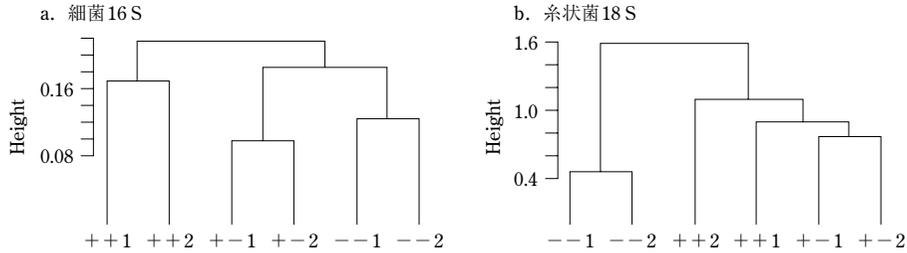


図-5 薬剤施用歴が土壤微生物群集に及ぼす影響
略号あとの数字は採土時期を示す。
1: 薬剤施用前, 2: 薬剤施用後。

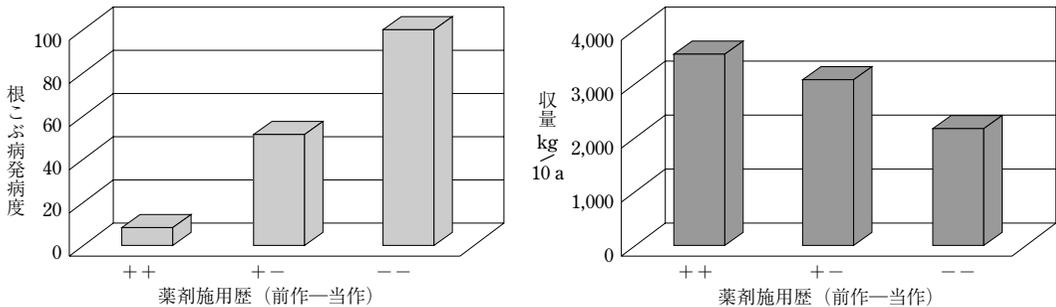


図-6 薬剤施用歴が根こぶ病発病度および収量に及ぼす影響
黒ボク土 (松阪), キャベツ (松波) による圃場試験。

おわりに

フルスルファミド粉剤の残効性については、薬剤の分解に関する土壤環境条件や土壤中の病原菌密度によって異なると推測される。この関連性をさらに検討することで、不必要な薬剤施用の防止につながる事が期待される。

また、病原菌密度を低減させる方法として有効なおとり植物の利用においても、フルスルファミド粉剤の施用歴のある圃場では、その効果が相殺されてしまい、十分な効果が得られないことが知られているが(村上ら, 2003), 薬剤施用後どのくらいの期間、薬剤の影響が続くのかは明らかになっていない。この点でも薬剤の残効性を評価する必要がある。

前述とは別の圃場(秋田県秋田市および群馬県嬬恋村)

で、薬剤施用を中止した区を設けて、同様に土壤微生物群集を調査したところ、糸状菌群集は薬剤施用歴の有無によりクラスターが分かれる傾向が認められ、根こぶ病の発病軽減効果も認められた。このように、薬剤の残効性が糸状菌群集に影響を及ぼすことはある程度普遍的と考えられる。

このことから、残効性と糸状菌群集との関連について、さらにデータを積み重ねていく必要はあるものの、薬剤の残効性を評価する方法の一つとして、PCR-DGGE法による糸状菌群集の解析が利用できる可能性があると考えられる。

引用文献

- 1) 森本 晶・星野(高田)裕子(2008): 土と微生物 62: 63 ~ 68.
- 2) 村上弘治(2003): 東北農研総合研究(A) 7: 10 ~ 16.
- 3) ———ら(2003): 土肥誌 74: 65 ~ 68.