

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380187

研究課題名（和文） 分子生物学的手法を用いた植物葉圏細菌相の解析

研究課題名（英文） Bacterial community of crops by molecular biological methods

研究代表者

對馬 誠也 (TSUSHIMA SEIYA)

独立行政法人農業環境技術研究所・農業環境インベントリーセンター・センター長

研究者番号：50354080

研究成果の概要（和文）：

自然界には培養できない細菌が多く、土壌では約 99%は培養できない細菌と考えられているが、植物体では不明であった。本研究では、染色法を用いることで、代表的な作物である、イネ、ムギ葉面の「培養できる細菌」(A)と「培養できない細菌を含む全細菌数」(B)を国内2カ所で調べ、両者の割合を世界で初めて明らかにした。この結果、ムギの比率 A/B は 1/1000 程度に対して、イネでは 1/10 程度と顕著に異なることを明らかにした。この結果、培養できない細菌（未利用資源とも言える）の全細菌に対する比率はムギがイネに比べ顕著に高いことと、培養法による細菌の評価（数、役割等）における留意点を提出することができた。

研究成果の概要（英文）：

There are many unculturable bacteria in environment, for example, ca. 99% of bacteria in soil have been reported to be unculturable. However, little is known about bacteria on plant surface. In this study, the rapid and simple counting method of total bacteria on plant surface was developed and the populations of culturable (A) and unculturable (B) bacteria on the leaf surface of crops (rice and wheat) were assessed by the developed counting method and agar medium. The proportions (A/B) of their bacteria of rice and wheat before heading time were about 1/10 and 1/1000, respectively, indicating the significant difference in the proportion(A/B) among the two crops. The results suggest the dynamic change in the proportion of culturable bacteria on leaf surface among crops.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：生物環境、葉圏細菌

1. 研究開始当初の背景

土壌では、全細菌の 1%程度しか培養することができないと言われている。このことは、どの環境においても、微生物の利活用、微生物の役割を解明するには「培養できない細菌」の数や構成を明らかにすることが必須である。しかし、特に作物においては「培養できない細菌」と「培養できる細菌」の割合など全く不明であった。

2. 研究の目的

日本で代表的な作物であるイネ・ムギの葉面全細菌数を把握するため、染色法や分子生物学手法を用いて、国内2カ所で「培養できない細菌」と「培養できる細菌」の割合や構成を明らかにする。

3. 研究の方法

つくば市と福岡市において、イネとムギ圃場で、定期的に葉面細菌を洗浄法により回収し、それを染色法を用いて全細菌数を、寒天培地を用いて培養できる細菌数を調べる。必要に応じて、リボゾーム DNA を解析して、細菌相を解析する。

4. 研究成果

(1) 全葉面細菌の測定技術の開発

1年目には葉面細菌を回収して、全細菌数を調べる方法を開発した。土壌細菌で開発された方法を改良して、フィルターを使わずに、遠心操作と固定のみを行うことにより、回収率の低下を避け、かつ簡便な測定法を開発した(図1)。

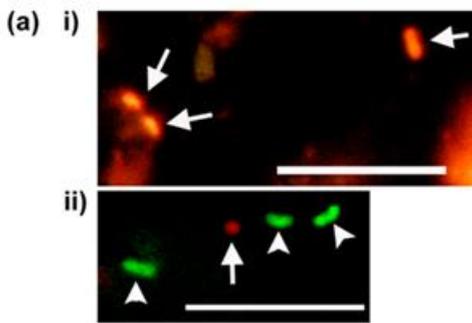


図1. 染色法により染まった細菌 (赤：死菌、緑：生菌)

(2) 全細菌測定法による種子の細菌数

この手法により、イネの種籾(種子)の洗浄液中の「培養できる細菌」(A)、「全細菌数」(B)を調べた結果、A/Bは1/10となり、種籾中の両者の比率は、土壌で報告

されている比率(約1/100)より高いことが示唆された(図2)。

さらに、全細菌数(黒棒)と生菌数(白棒)は有意に異なることから、全細菌数でカウントされた細菌の一部は死菌または死にかかっている細菌が存在することがされた。

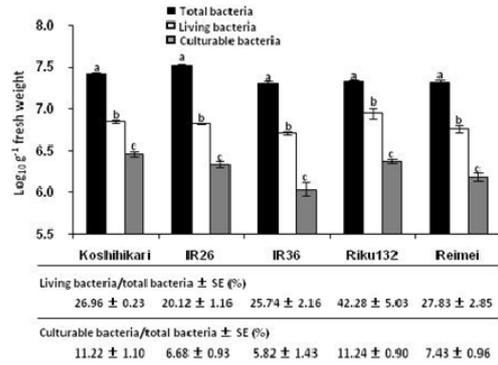


図2. 各種イネ品種の種籾洗浄液からの細菌の検出
黒棒：全細菌数、白棒：生菌数
灰色棒：培養分離菌数

(3) イネの葉圏細菌数

同様に、本田で栽培したイネの葉鞘の細菌数を調べたところ、「培養できる細菌数」(A)と「全細菌数」(B)の比率は、種籾と同様に1/10以下であり、従来土壌細菌で言われている1/100より顕著に高いことが示唆された(図3)。

一方で、葉鞘では、全細菌数と生菌数に大きな差がなく、葉鞘と種籾では生菌と全細菌の比率が異なることも明らかになった。

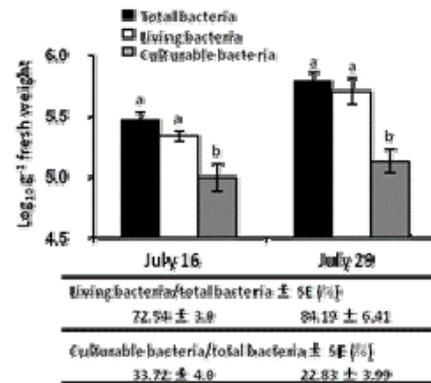


図3. 本田で栽培したイネ(品種コシヒカリ)の葉鞘洗浄液からの細菌数
黒棒：全細菌数、白棒：生菌数
灰色棒：培養分離菌数

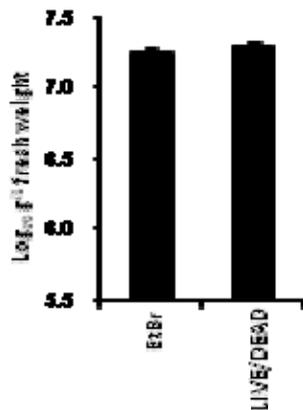


図4. エチジウムブロマイド染色法とライブ・デッド染色法による細菌数の比較

以上の結果から、まず、本研究により植物葉圏の洗浄液から全細菌を評価する簡便な手法を開発することに成功した。

この手法により、イネ種籾、本田で栽培したイネの葉鞘における「培養できる細菌数」と「全細菌数」を比較した結果、「培養できる細菌数」の「全細菌数」に占める割合は1割程度（あるいはそれ以下）であることが世界で初めて明らかになった。この値は、土壌で従来言われている比率（1/100）より著しく高いものである。

こうした違いが何に起因するのかは今後の検討が必要である。

なお、図1, 2, 3では、ライブ・デッド染色法を用いて全細菌数を測定したが、この手法は、従来土壌細菌の計測等で用いているエチジウムブロマイド染色法とも有意差がないことも明らかにしている（図4）。本試験でも用いた解析技術は、簡便さにおいても、精度においても葉圏細菌数の測定に適していると考えた。

(4) イネ、ムギの葉圏細菌数

開発した手法を用いて、2年間、イネ、ムギの葉鞘からの洗浄液中の「培養できる細菌数」(A)と「培養できない細菌を含む全細菌数」(B)を調べた。その結果、ムギでは、出穂前にA/Bが1/1000であったが、イネでは1/10程度と両者で著しく異なった。また、ムギは、出穂後にはA/Bが1/10程度まで上がった。また、出穂前にA/Bが極端に低下する原因の一つとして春先の気象要因（降雨、湿度など）が影響していることが示唆された。

以上の結果から、イネ、ムギにおける「全細菌数」や「培養できる細菌数と全細菌数の比率」は、つくば、福岡で作物毎に同様

の傾向が見られた。このことは、こうした細菌数および比率は、イネ、ムギにそれぞれ特有の現象であることが示唆される。

また、ムギは一定期間（主に出穂前）中に「培養できない細菌数」の割合が極端に少なくなること、逆にイネではこの割合がムギに比べ安定して高かった。

この結果は、従来、人類は培養法により微生物数を測定して研究を進めることが多かったが、植物葉圏における全細菌の役割や、意義を解明するには、培養に依存しない手法を用いることも重要であることを強く示唆している。

また、言い方を変えると、出穂期前の葉鞘には培養法で検出できる細菌に比べ遙かに多くの細菌が棲息していることが本研究で初めて明らかになった。この研究の成果は、培養できなくなる細菌の機構（VBNC機構）の解明や、あるいは培養法によらなり有用細菌の分離法の開発が重要であることも示唆している。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

- ① 對馬誠也、小坂橋基夫、微生物インベントリー、植物防疫、査読無、63巻、2009、42-46
- ② Rieko Niwa, Shigenobu Yoshida, Naruto Furuya, Kenichi Tsuchiya and Seiya Tsushima, Method for simply and rapidly enumerating total epiphytic bacteria in the washing solution of rice plants, Canadian Journal of Microbiology, 査読有、(投稿中)

〔学会発表〕（計4件）

- ① 丹羽理恵子、吉田重信、古屋成人、土屋健二、對馬誠也、イネ表面に存在する全細菌数計測法、日本農芸化学会大会講演要旨集、2009、127
- ② 丹羽理恵子、吉田重信、古屋成人、土屋健二、對馬誠也、イネおよび生育期間における葉面細菌数の推移、第25回日本微生物生態学会講演要旨集、2009、P-177
- ③ 植屋由希、吉田満朗、古屋成人、吉田重信、對馬誠也、土屋健二、コムギ葉鞘における棲息細菌密度とアシル化ホモセリンラクトン類生産・分解能の解析、日植病報、2009、278
- ④ 丹羽理恵子、吉田重信、古屋成人、土屋健二、對馬誠也、ムギの葉面細菌数の動態と気象要因の関係、日本土壤微生物学会2010年度大会講演要旨集、2010、P-47

〔図書〕(計 11 件)

- ① 對馬誠也、朝倉書店、葉面微生物「微生物の辞典(渡邊 信、西村和子、内山裕夫、奥田 徹、加来久敏、広木幹也編)、2008、180
- ② 對馬誠也、朝倉書店、総合的防除「微生物の辞典(渡邊 信、西村和子、内山裕夫、奥田 徹、加来久敏、広木幹也編)、2008、208
- ③ 百町満朗、馬誠也、ソフトサイエンス社、1. 競合「微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－」(百町満朗・對馬誠也編)、2009、10-17
- ④ 對馬誠也、ソフトサイエンス社、適応度「微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－」(百町満朗・對馬誠也編)、2009、20
- ⑤ 對馬誠也、ソフトサイエンス社、競争的排除「微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－」(百町満朗・對馬誠也編)2009、67
- ⑥ 對馬誠也、ソフトサイエンス社、エピファイト「微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－」(百町満朗・對馬誠也編)、2009、67
- ⑦ 對馬誠也、篠原弘亮、ソフトサイエンス社、微生物コミュニティ「微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－」(百町満朗・對馬誠也編)、2009、74-79
- ⑧ 對馬誠也、ソフトサイエンス社、植物成分による誘導抵抗「微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－」(百町満朗・對馬誠也編)、2009、184-186
- ⑨ 吉田重信、對馬誠也、ソフトサイエンス社、異種生物間の相互作用「微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－」(百町満朗・對馬誠也編)、2009、341-346
- ⑩ 對馬誠也、ソフトサイエンス社、環境保全型農業と生物防除「微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－」(百町満朗・對馬誠也編)、2009、376-379
- ⑪ 對馬誠也、ソフトサイエンス社、IPM「微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－」(百町満朗・對馬誠也編)、2009、360-361

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

- ① 微生物インベントリー Web サイト「*microForce* (マイクロフォース)」, [URL:http://www.niaes.affrc.go.jp/inventory/microorg/index.html](http://www.niaes.affrc.go.jp/inventory/microorg/index.html)

② 對馬誠也、未知の世界の生き物たち、常用新聞(2008. 11. 5 号)、2008

③ 對馬誠也、微生物で食の安全・安心をまもる! 微生物インベントリーの構築と微生物農薬開発、アグロ・イノベーション 2009 要旨集、2009、S2-2-1~S2-2-6

④ 對馬誠也、植物棲息微生物の新機能－生物防除、アルカロイド分解、かび毒分解能など、第 15 回弘前大学遺伝子実験施設シンポジウム講演要旨集、2009

⑤ 對馬誠也、土壤微生物相の解明による土壌生物性の解析技術の開発、有機農業研究者会議 2009 資料集、2009、37-41

6. 研究組織

(1) 研究代表者

對馬 誠也 (TSUSHIMA SEIYA)

独立行政法人農業環境技術研究所・農業環境インベントリーセンター・センター長
研究者番号: 50354080

(2) 研究分担者

土屋 健一 (TSUCHIYA KENICHI)

九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 40150510