

# 有機栽培イネ細胞間隙に由来する 微生物の解析と病害防除

高橋 英樹・安藤 杉尋

東北大学 大学院農学研究科

## はじめに

有機農業では化学農薬に依存しない食料生産が実現しているが、なぜ有機栽培により病害虫の発生が抑制されるのかについて、十分な理解がなされているわけではない。有機栽培における病害抑制のしくみを詳しく調べることは、さらに安定した有機栽培システムを構築する上でも重要である。様々な要因が作用し合った結果として有機農業が成立しているのであれば、病害抑制効果についても、多面的な視点からの解析が必要であろう。病害抑制に関わる要因をひとつずつ明らかにすることにより、その全体像が明らかになってくるものと思われる。近年、様々な植物内生菌の病害抑制への関与が報告されている(Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006; Rodriguez *et al.*, 2009)。有機栽培においては、殺菌剤などを使用しないことにより、植物内生菌叢が多様化しているものと予想される。本研究では、有機農業の成立機構を科学的に解析する第一歩として、イネ細胞間隙に生息する微生物に着目し、有機栽培に特徴的な微生物の解析と病害抑制の可能性について検討を行った。

## 1. 細胞間隙に生息する微生物とは

植物体の葉表面や細胞組織には様々な微生物が存在し、植物に対して生育促進、病害抑制などの様々な役割を果たしていることが明らかになりつつある(Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006; Rodriguez *et al.*, 2009)。これまでは、それら微生物の中で、培養可能なものを中心に研究がなされてきた。しかし、植物の葉表面や細胞間隙で生きている内生菌の中には、培養が難しいものや、培養可能でも休眠により培養不可能な状態(viable but nonculturable, VNC)に移行しているものも多数含まれていることから、これまで、集団を構成する微生物種を総合的に把握するまでには至っていなかった(McDougald *et al.*, 1998; van Overbeek *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2009)。しかし近年、植物組織の細胞間隙中の存在する微生物集団から“まるごと”DNAを単離・解析することにより、培養性状にかかわらず、集団を構成する微生物を解析することが可能になってきた(メタゲノム解析)。したがって、有機栽培と慣行栽培イネの細胞間隙に由来する微生物を従来の培養法により解析することに加え、細胞間隙に由来する微生物DNAをメタゲノム的手法により比較解析することによって、有機栽培イネに特徴的な微生物を包括的に解析することが可能となると考えられる。

## 2. 有機栽培イネの細胞間隙の生息する内生菌の網羅的解析

イネの葉身および葉鞘組織の細胞間隙に 0.005%Silwet77 を含む滅菌蒸留水を減圧浸漬させた後、細胞間隙に含まれる液体を細胞間隙液として回収し、WaterMaster™DNA purification kit (EPICENTRE, Madison, WI, USA)を用いて ”まるごと” DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型とし、細菌 rDNA あるいは糸状菌 rDNA を増幅するプライマーを用いて PCR を行い、増幅断片の塩基配列を次世代シーケンサーにより決定したところ、細菌 rDNA に対しては  $\alpha$ -proteobacteria や  $\gamma$ -proteobacteria, *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp., *Microbacterium* sp., *Moraxella* sp., unculturable bacteria などの rDNA に相同性の高い DNA 断片が増幅されていることが確認された。また、糸状菌 rDNA については *Tilletiaria anomala*, *Tilletia iowensis*, *Tilletiopsis penniseti*, unculturable eukaryotes などの rDNA と高い相同性を示したことから、細胞間隙に生息する微生物集団に由来する DNA が抽出できているものと考えられた(Takahashi *et al.*, 2011)。

次に、品種や栽培時期と場所が異なるイネの細胞間隙より抽出した DNA を鋳型として PCR 増幅した微生物 rDNA 断片混合物を、泳動パターンの違いとして検出することができる Denatured gradient gel electrophoresis 法により解析したところ(PCR-DGGE 解析)、異なるイネ品種や栽培地域に比べ、栽培時期の違いにおいて泳動パターンがより顕著に変化していた。したがって、有機栽培イネに特徴的な微生物を見出すためには、異なる栽培時期の有機・慣行栽培イネの細胞間隙に生息する微生物集団の比較解析が必要であると考えられた。

さらに、細胞間隙に由来する微生物 DNA のメタゲノム解析は、難培養性微生物や VNC 状態にある微生物を含む集団を包括的に解析できる利点をもつが、一方で、従来の培養法のように、個々の微生物を生きた状態で単離できるわけではない。したがって、有機栽培のイネ細胞間隙に特徴的な微生物の機能を解析するためには、培養法により単離された微生物の解析と、メタゲノム的手法による解析の両面からのアプローチが必要であると考えられる。

## 3. 有機栽培イネに特徴的な内生菌と病害抑制

### 1) 有機栽培イネの葉身・葉鞘組織に特徴的な微生物集団の解析と病害抑制

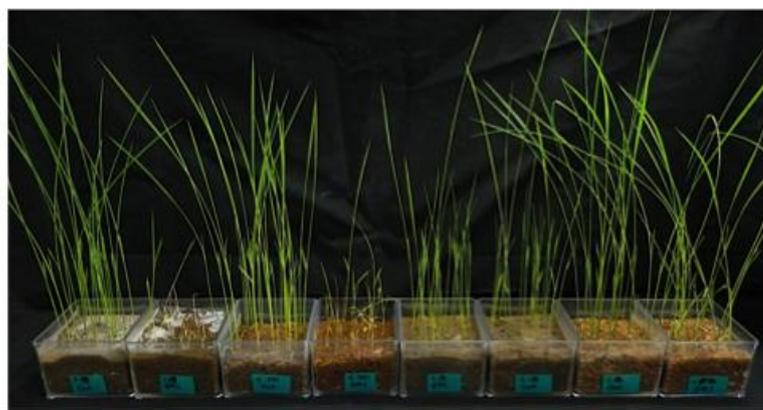
生育時期の異なる有機栽培と慣行栽培のイネの葉身と葉鞘組織から細胞間隙液を採取し、DNA を単離するとともに、一部を NA 培地に塗布して培養した。培養および rDNA 断片の PCR-DGGE 解析を行ったところ、有機栽培イネの細胞間隙液に特徴的な内生細菌がイネの生育初期に比較的多く認められることが確認された。また、培養により単離された細菌の 16S rDNA 断片の塩基配列に基づく分類を行ったところ、有機栽培において特徴的な微生物として *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Acinetobacter* sp.などを見出すことができた。

これまで、イネから単離した *Pseudomonas* 属菌に、いもち病菌の分生子発芽を抑制する抗いもち病菌性抗菌物質の産生や、サリチル酸の蓄積を伴った全身抵抗性を誘導する活性があること

が報告されている (Gnanamanickam and Mew, 1992; Krishnamurthy and Gnanamanickam, 1998)。また、*Bacillus* 属菌も多く多くの植物において全身誘導抵抗性を介して様々な病害に対する抵抗性を高めていることが知られている (Choudhary and Johri, 2009)。本研究においても、単離された *Pseudomonas* sp. について、イネ幼苗の葉鞘組織を用いたいもち病菌の抵抗性を評価した。*Pseudomonas* sp. を処理したイネの葉鞘では、いもち病菌の侵入菌糸が付着器直下の細胞から近傍の細胞に伸展する率が低下し、接種葉鞘内のいもち病菌のバイオマスも減少する傾向が認められた(安藤杉尋・高橋英樹, 2011)。さらに、いもち病菌侵入時の活性酸素生成を DAB 染色によって観察したところ、*Pseudomonas* sp. 処理イネではいもち病菌の付着器直下の染色率が増加していた。すなわち、*Pseudomonas* sp. 処理イネの葉鞘では、いもち病菌の感染を認識後、速やかに活性酸素を生成し、これによっていもち病菌の侵入を遅延させている可能性が考えられた。しかしながら、葉身への噴霧接種では病斑形成に差は認められず、*Pseudomonas* sp. のみでは完全な抵抗性を付与することはできないと考えられた。

## 2) 有機栽培育苗培土で生育したイネ苗に特徴的な微生物の解析と苗病害の抑制

イネの生育初期において有機栽培に特徴的な内生細菌が単離されていることから、有機栽培育苗培土で育成した苗を用いて、細菌による苗病害に対する抑制効果を検討した。もみ枯細菌と苗立枯病細菌をそれぞれ接種したイネ籾を、3種類の有機栽培育苗培土に播種し、苗腐敗症状の発生を調べたところ、あらかじめ熱処理を施した培土以外は、



イネもみ枯細菌  
細菌接種

-	+	-	+	-	+	-	+
慣行育苗土		いなほN 無肥料培土		宮城県涌谷町 有機育苗土		福島県石川町 有機育苗土	

図1 有機育苗培土のイネもみ枯細菌病抑制効果  
イネ籾にもみ枯細菌を接種後、培土に播種した。「いなほN無肥料培土」は製造過程で熱処理がなされている。

症状の抑制効果が認められた。さらに、この効果は培土のオートクレーブ処理により失われたことから、育苗培土中に存在する何らかの生物的要因により、病気の発生が抑制されたものと推察された (図 1)。

そこで、有機栽培育苗培土で培養したイネの内生菌に着目し、地上部組織の細胞間隙抽出液から培養法により内生菌を分離し、16S rDNA 配列解析により慣行栽培区と内生細菌叢の比較を行ったところ、*Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Microbacterium* sp. と推定される細菌類に有機栽培に特徴的なものが存在した。さらに、これらの細菌を、滅菌処理した慣行栽培培養土に処理することで、有機栽培育苗培土で観られた病害抑制効果と同様の効果が認められた (図 2)。したがって、有機

栽培育苗土に含まれる微生物が、イネもみ枯細菌病などを抑制するはたらきを持つ可能性が考えられた。

## おわりに

本研究により、有機栽培イネの葉身・葉鞘組織には、特徴的な微生物が存在し、イネもみ枯細菌病などの抑制に関わっている可能性が明らかになった。有機栽培は、様々な要因が複合的に関わりあって、化学農薬に依存しないイネ栽培が可能となっているものと推察できる。したがって、有機栽培イネ体内に特徴的な微生物は、有機栽培の成立要因のひとつとして役割を担っているのかもしれない。

それらの微生物が、有機栽培イネにおいてどの程度の普遍性をもって存在するのかを明らかにすることは、今後の課題であろう。また、今回は解析対象としなかった、有機栽培に特徴的な内生糸状菌や難培養性微生物が、病害抑制効果を持つ可能性についても検討が必要である。

有機栽培における病害抑制は、複合的な要因によるものと考えられることから、内生微生物による病害抑制が、環境などの要因により変動されることも十分予想される。有機栽培の科学的な研究は未だ十分ではないことから、さらに多面的なアプローチにより、有機栽培を成立させている機構が明らかになることを期待したい。

## 引用文献

安藤杉尋・高橋英樹 (2011) 「有機栽培イネ細胞間隙に由来する微生物の解析と病害防除」 (Analysis of endophytes from intercellular fluid of organically-grown rice plants and its effect on disease tolerance) 土と微生物 (Soil Microorganisms) Vol. 65 No. 2, pp. 100~103.

Choudhary, D.K. and Johri, B.N. (2009) Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.* 164: 493-513.

Gnanamanickam, S.S. and Mew, T.W. (1992) Biological control of blast disease of rice (*Oryza sativa* L.) with antagonistic bacteria and its mediation by a *Pseudomonas* antibiotic. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 380-385.

Krishnamurthy, K. and Gnanamanickam, S.S. (1998) Induction of systemic resistance and salicylic acid accumulation in *Oryza sativa* L. in the biological suppression of rice blast caused by treatments with *Pseudomonas* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 935-937.

McDougald, D., Rice, S.A., Weichert, D. and Kjelleberg, S. (1998) Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol.Ecol.* 25: 1-9.

Rodriguez, R.J., White, J.F. Jr., Arnold, A.E. and Redman, R.S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182: 314-330.

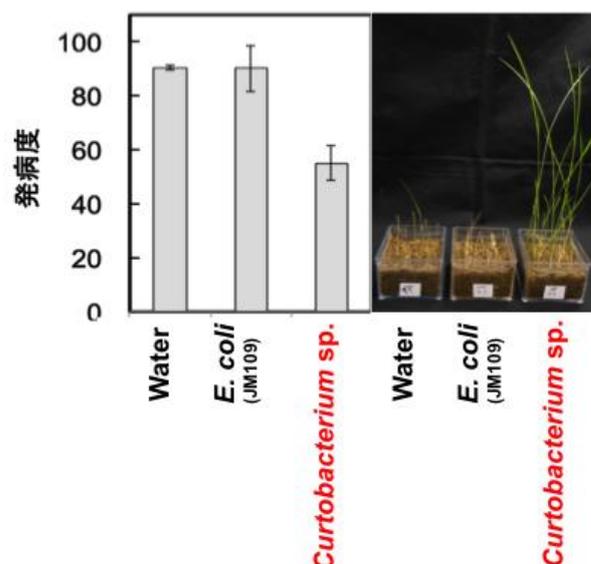


図2 有機栽培育苗土で栽培したイネより単離した細菌によるもみ枯細菌病の抑制

- Rosenblueth, M. and Martínez-Romero, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 827-837.
- Takahashi, H., Sekiguchi, H., Ito, T., Sasahara, M., Hatanaka, N. Ohba, A., Hase, S., Ando, S. and Takenaka, S. (2011) Microbial community profiles in intercellular fluid of rice and their variation during stages of growth. *J. Gen. Plant Pathol.* 77: 121-131.
- van Overbeek, L.S., Bergervoet, J.H.W., Jacobs, F.H.H. and van Elsas, J.D. (2004) The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Phytopathology* 94: 463-469.