

島根大学研究機構 戦略的研究推進センター 『萌芽研究部門』	平成26年度	年度報告書	提出日 平成27年2月16日
① プロジェクト名	島根県内に生息する微生物資源の保存と利用		
② プロジェクトリーダー	上野 誠	所属	生物資源科学部
		電子メール	makoto-u@life.shiamne-u.ac.jp
③ プロジェクトの概要 (プロジェクトの最終年度における到達目標を簡潔に記入してください。)			
<p> 本研究プロジェクトでは、島根県内の植物及び土壌から微生物を分離・保存し、それら微生物の農業上の利用方法を検討する。山陰地域にある島根県は東西に長く、地域によって気象が異なるが、他県と比較しても湿度が高く、微生物の生息には都合が良い。また、隠岐、匹見、三瓶など未探索の地が多く、有用な微生物が多く存在する可能性がある。しかし、島根大学として、そのような微生物の探索や保存とその公開は行われていない。微生物資源を分離・保存することは世界的に注目されている重要課題の1つである。これまでに、微生物資源は、農業、医療、食品開発などに利用されており、島根大学が地域の微生物資源を分離・保存することは、地域貢献・地域産業育成にも寄与できる有意義な研究である。そこで本プロジェクトでは、隠岐、匹見、三瓶など気候的・地理的に特色のある場所を含めた島根県の20市町村で植物・土壌を採取し、①それらに生息する微生物「細菌(特に放線菌)、糸状菌」の分離、同定、保存、②分離、同定、保存できた微生物のデータベース化して公開する。また、③これら微生物の利用の可能性を確認するために、島根県でも問題となっている農作物病害、農作物害虫を防除できる微生物のスクリーニングと微生物を利用した土壌改良材の作成を行う。 </p>			
④ プロジェクトのメンバー及び役割			
氏名	所属(職)	本年度の役割分担	
(プロジェクトリーダー) Ueno Makoto 上野 誠	生物資源科学部 (農林生産学科)・准教授	研究総括・植物からの微生物の分離と植物保護への利用方法の開発	
Hayashi Shohei 林 昌平	生物資源科学部 (農林生産学科)・助教	植物及び土壌からの微生物の分離・保存と同定	
Sato Kuniaki 佐藤 邦明	生物資源科学部 (地域環境科学科)・助教	土壌改良材の開発	
Izumi Yohei 泉 洋平	生物資源科学部 (農林生産学科)・助教	吸汁害虫に対する微生物の利用方法の開発	

⑤ (1) 本年度の研究計画目標の達成状況及び自己評価

(本年度当初の計画書に書かれた内容に沿って、計画と達成目標を箇条書きにしてください。また、その達成目標の項目ごとにその達成状況を記入し、以下の基準に従って自己評価して下さい。

- A : 目標以上に成果をあげた。
- B : ほぼ目標通りの達成度で予定した成果をあげている。
- C : 計画より遅れ気味であるが年度末には目標達成が可能である。
- D : 年度末までに目標達成は不可能である。

自己評価が B 以外の場合には、その原因についても記載して下さい。 2～3月に行う計画のため未執行の場合には評価を空欄にして下さい。)

計画と達成目標	達成状況と自己評価
<p>① 島根県内の土壌や生育している植物からの微生物の分離・保存(上野・林)</p> <p>・植物生育や病害虫防除に利用可能な微生物を探索するために、隠岐、匹見、三瓶など特徴ある場所から採取する土壌やソバ、イチジク、ポタン、ブドウ、ワサビなどの植物から細菌(主に放線菌)、糸状菌を分離し、保存する。</p>	<p>(自己評価)A</p> <p>島根県内のすべての市及び郡で植物及び土壌を採取し、微生物の分離・保存「土壌(細菌・放線菌:1000 菌株以上)、きのこ(17 菌株)、カキ(酵母:5 菌株)、植物(根粒菌:97 菌株)」を行った。土壌からの分離菌については、様々な活性を調査できるように分離したすべての菌株の培養液の保存も行った。さらに、県内で問題となっている植物病原菌(8 菌株)の分離・保存も行った。希望があった研究機関へは、試行的に分譲も行った。土壌からの分離菌については、県内で問題となっている植物病原菌を用いて利用可能な微生物のスクリーニングを開始しており、抑制効果を示す微生物をいくつか発見している。次年度に向けて、分離した微生物の同定と論文成果が課題となっている。しかし、企業や他大学との共同研究、学会及び展示会での発表、ポスター賞の受賞などにも繋がり、目標以上に成果を上げることが出来たので、自己評価を A とした。</p>
<p>② 島根県内で分離された微生物を利用した土壌改良材の作成(佐藤)</p> <p>・植物生育や病害防除に効果を示す土壌改良材を作成するために島根県内の土壌性質と微生物の関係を調査する。</p>	<p>(自己評価)B</p> <p>様々な土壌や有機成分と微生物活性の関係を調査するため、各種土壌(マサ土、赤土、黒ボク土)に牛糞堆肥、豚糞堆肥、鶏糞堆肥を混合し 4 週間培養試験を行い、デヒドロゲナーゼ活性、土壌呼吸量、無機態窒素量を計測した。その結果、微生物の有機物分解活性とデヒドロゲナーゼ活性に相関関係が見られた。今後、デヒドロゲナーゼ活性を測定するスクリーニング方法を用いることで、県内で分離した微生物の中から有機物を無機物に変換する活性の高い菌株を探索できることが明らかになった。計画した実験はすべて実施して結果が得られたので自己評価をBとした。</p>

(2) プロジェクト全体の自己評価 (プロジェクト全体としての達成目標から、今年度の研究成果がこれまでの経過・成果にもとづいてどの段階にあるのかを明示して下さい。また、各グループ間での連携状況についても記入してください。)

●プロジェクト全体評価(自己評価) プロジェクト全体としての達成目標に対する今年度の研究成果の達成状況について(自己評価)

本研究の目的は、島根県内の植物及び土壌から微生物を分離・保存し、それら微生物の農業上の利用方法を検討することにある。本年度の計画は順調に遂行できており、島根県内のすべての市及び郡で植物及び土壌を採取し、微生物の分離・保存「土壌(細菌・放線菌:1000 菌株以上)、きのこ(17 菌株)、カキ(酵母:5 菌株)、植物(根粒菌:97 菌株)」を行った。土壌からの分離菌については、様々な活性を調査できるように分離したすべての菌株の培養液の保存も行った。さらに、県内で問題となっている植物病原菌(8 菌株)の分離・保存も行い、試行的に研究利用のための分譲も行った。微生物の利用については、県内で問題となっている植物病原菌の抑制や土壌改良に利用可能な微生物のスクリーニング方法を確立した。害虫については、アブラムシの増殖を行い、殺虫及

び忌避効果を確認するための3種類の方法を確立させた。また、保存した微生物の中には雑草から分離した根粒菌が含まれており、これらの植物生育促進効果も確認している。以上の事から今後の応用研究に利用できる微生物ライブラリーの構築とスクリーニング技術が確立できたと確信している。企業との共同研究や受託研究などの外部資金の獲得も進みつつあることから、順調にプロジェクトが進んでいると考えている。次年度に向けては、今年度に構築された微生物ライブラリーに保存されている微生物の同定と分譲利用促進のためのデータベースの作成やそれぞれの分担者が確立したスクリーニング法を用いた利用可能な微生物の探索が必要となる。

●各グループ間またはメンバーとの連携状況

平成 26 年 4 月 1 日：今後の研究の進め方についての打ち合わせ（上野、泉、林）
 平成 26 年 6 月 25 日：研究進捗状況についての確認及び打ち合わせ（上野、泉、佐藤、林）
 平成 27 年 2 月 12 日：今年度の研究進捗状況についての確認及び打ち合わせ（上野、泉、林）

全体会議は 3 回のみであったが、同じ所属メンバーで構成されており、研究結果が出た時点で、常に代表者と分担者又は分担者と分担者において、ディスカッションを行える状況であった。また、上記のように各研究者が今年度の目標をほぼ達成していることからメンバーの連携は取られていたと考えられる。今後は、企業との連携も含めて、実用化に向けての研究を進めたい。

⑥ 公表論文、学会発表など（当該研究に関連した本年度の公表論文、学会発表、特許申請の件数を一覧表に記入して下さい。発明等に関しては、差し支えない範囲で記載して下さい。）

論文掲載（総件数）	0 件
学会発表（総件数）	4 件
特許出願（総件数）	0 件

【内訳】

●論文（年度末までに発行される学術雑誌等（紀要も含む）に掲載が確定しているものも含め、代表的なものを10件程度選んで記入してください。）

なし

●学会発表（代表的なものを数件記入して下さい。） 4 件

Quyet Nguyen Thi, Kana Ueda, Junichi Kihara, Sakae Arase, Kazuhito Itoh, Syohei Hayashi, and Makoto Ueno. Inhibitory effect of culture filtrates of fungi isolates from mushroom against *Magnaporthe oryzae*:The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on Plant Pathology, Busan, Korea

松原和司・西脇いつか・Nguyen Thi Quyet・木原淳一・荒瀬 榮・上野 誠: *Bacillus* 属菌の揮発性成分による植物病原菌の抑制について 平成 26 年度日本植物病理学会関西西部会（富山）

上野 誠・新里尚也: 沖縄微生物ライブラリーを利用したマンゴー炭疽病の抑制について 平成 26 年度日本植物病理学会関西西部会（富山）

上野 誠・Nguyen Thi Quyet・上田加奈・木原淳一・荒瀬榮・上野誠: *Biscogniauxia* 属菌を用いたイネいもち病の抑制について(3) 平成 26 年度日本植物病理学会大会（北海道）

●特許出願

なし

⑦ 外部資金獲得状況（当該プロジェクトに関連した外部資金について一覧の各項目に総件数、金額を記入して下さい。）

■外部資金獲得状況一覧		件数	金額(千円)
(1) 科研費 (配分額は間接経費を含む)		0	配分額
(2) 科研費以外の外部資金	受託研究	1	1700
	共同研究	1	200

	寄附金・助成金	1	1000
	合 計	3	2900

【一覧内訳】

(1) **科研費**(科目ごとに、テーマ、研究者、金額をそれぞれ列挙してください。)
なし

(2) **その他外部資金**(一覧の項目別に、テーマ、研究者、金額を列挙してください。)

1. **共同研究**「土壌における微生物の挙動と利用に関する研究」(株式会社アーサーアグリ)(上野誠・林昌平)
平成 26 年 7 月 11 日～平成 27 年 3 月 31 日、200 千円
2. **寄付金**「土着微生物を活用した沖縄産農作物の病害防除技術の開発」(一般財団法人沖縄美ら島財団)
(上野誠)、1000 千円
3. **受託研究**「菌床椎茸における植氷凍結を利用したナガマドキノコバエの防除技術の開発」(科学技術振興機構)(泉洋平)、平成 27 年 1 月 1 日～平成 27 年 12 月 31 日、1700 千円

⑧ **その他特筆すべき成果** (受賞、シンポジウムの開催、産学連携・地域連携に関する各種見本市、展示会への出展等も含む。)

【受賞】

●3rd Korea-Japan Joint Symposium on the Plant Pathology Poster Award.

「Quyet Nguyen Thi, Kana Ueda, Junichi Kihara, Sakae Arase, Kazuhito Itoh, Syohei Hayashi, and Makoto Ueno. Inhibitory effect of culture filtrates of fungi isolates from mushroom against *Magnaporthe oryzae*. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on Plant Pathology, Busan, Korea」

【招待講演】

- 上野 誠「植物の病気と光を用いた植物の病気の防除について」、教育学部 自然環境教育講座 研究懇話会、平成 26 年 4 月 26 日
- 上野 誠「光照射による植物病害の防除法の開発」、科学技術振興機構、山陰(鳥取・島根)発 新技術説明会、平成 26 年 7 月 4 日
- 上野 誠「土着微生物を活用した沖縄産農作物の病害防除技術の開発」、一般財団法人沖縄美ら島財団 平成 26 年度 亜熱帯性動植物に関する調査研究・技術開発研究会、平成 27 年 2 月 20 日(予定)

【展示会】

- GPEC(施設園芸・植物工場展)(平成 26 年 7 月 23 日-25 日、東京ビックサイト)
- アグロ・イノベーション 2014(平成 26 年 11 月 12 日-14 日、東京ビックサイト)

【産学連携・地域連携】

- 上野 誠・林昌平・泉洋平・佐藤邦明: 島根県内の微生物を利用した植物病害虫防除と植物生育促進について、生物資源科学部ミッション研究課題成果報告会
- 上野 誠・松原和司・西脇いつか・Nguyen Thi Quye・木原淳一・荒瀬榮: 島根県内の微生物を利用した植物病害虫防除と植物生育促進について 中山間地域研究センターフェア
- 林 昌平: 島根県の土壌から単離したマメ科根粒菌の同定と利用 島根県食品工業研究会との交流会ー生物資源科学部ミッション報告会・農林水産業の六次産業化プロジェクトセンター報告会ー(予定)
- 泉 洋平・宮永龍一: 菌床椎茸における植氷凍結を利用したナガマドキノコバエの防除技術の開発、第 2 回島根大学サテライトキャンパス in 飯南(予定)

⑨ 本年度の主要な研究成果 (図、表、ポンチ絵などを多用して、2ページ以内にわかりやすくまとめてください。)

本プロジェクトでは、島根県内の植物及び土壌から微生物を分離・保存し、県内の微生物の農業への利用の可能性を探るために研究を行った。県内で問題となっている植物の病害虫防除や土壌改良に利用可能な微生物の探索に繋がる下記の成果が得られた。

1. 島根県内の土壌や生育している植物からの微生物の分離・保存

植物生育や病害虫防除に利用可能な微生物を探索するために、島根県内のすべての市及び郡で植物及び土壌を採取し、微生物の分離・保存「土壌(細菌・放線菌:1000菌株以上)、きのこ(17菌株)、カキ(酵母:5菌株)、植物(根粒菌:97菌株)」を行った。採取した土壌は冷蔵保存し、採取場所や位置情報をデータとしてEXCELファイルで保存した。土壌からの分離菌については、生きた菌体のグリセロールストックだけでなく、様々な活性を調査できるように培養液の保存と培養した菌体のアセトン抽出液も保存した(図1)。さらに、県内で問題となっている植物病原菌(8菌株)の分離・保存も行い、研究利用のための試行的な分譲も行った。江津市の土壌から分離した微生物についてはスクリーニングを開始し、県内で採取したイネいもち病菌、イチジク株枯病菌、ボタンの根黒斑病菌及びアブラナ科菌核病菌を抑制できる菌株を複数発見することができている(図2)。また、島根大学内で分離した菌株の揮発性物質が多くの植物病原菌を抑制し、イチゴを用いた実験により、イチゴ灰色病菌を抑制することを明らかにした(図3)。保存した微生物の中には一般的なマメ科の根粒菌だけでなく、雑草から分離した根粒菌と考えられる菌株が含まれており、現在、これらの菌株の植物体への定着と植物生育促進効果を確認中である(図4)。

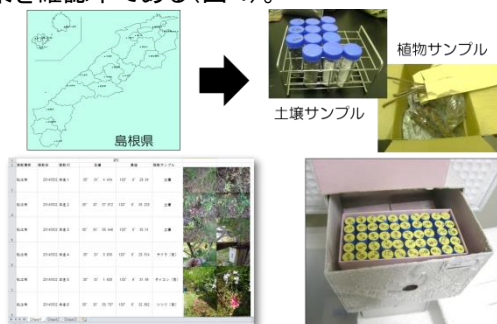


図1 島根県内で採取した微生物の保存

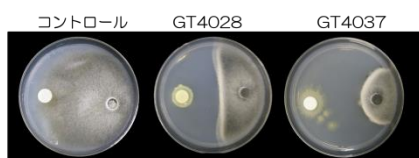


図2 江津市の土壌から分離した微生物による抑制効果



図3 揮発性物質による灰色カビ病の抑制

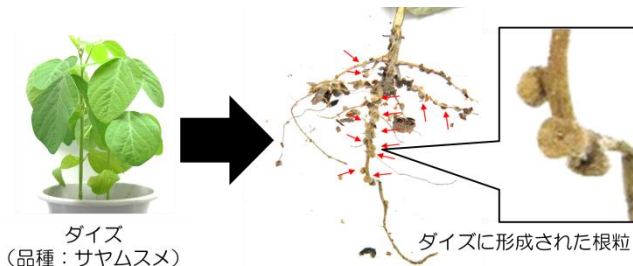


図4 島根大学圃場のダイズから採取した根粒

2. 島根県内で分離された微生物を利用した土壌改良材の作成

土壌改良材を作成するためには、導入した微生物が土壌中で定着する必要がある。定着した微生物の土壌中の役割として、有機物の分解がある。そこで定着した微生物の有機物分解活性を測定するために使用できるスクリーニング法を検討した。各種土壌(マサ土、赤土、黒ボク土)に牛糞堆肥、豚糞堆肥又は鶏糞堆肥を混合し、4週間培養試験を行った(図5)。その後、デヒドロゲナーゼ活性、土壌呼吸量及び無機態窒素量を計測した。今回用いた赤土は付属農場内の森林土壌を使用した。有機態窒素があるような森林の表層土であれば、窒素の無機化試験に使用できる可能性が確認された。また、有機物分解の活性評価については、鶏糞や豚糞のように簡単に分解できるものが良く、分解活性が高い微生物の探索の場合には比較的分解されにくい物質を含む牛糞を用いることが有効である可能性が考えられた。有機物の分解活性の指標にはデヒドロゲナーゼ活性が使用できる可能性が得られた(図6)。

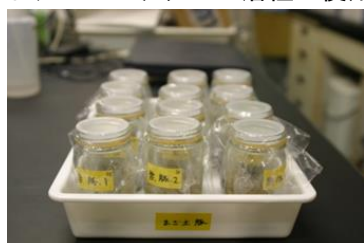


図5 各種土壌・有機物による培養試験

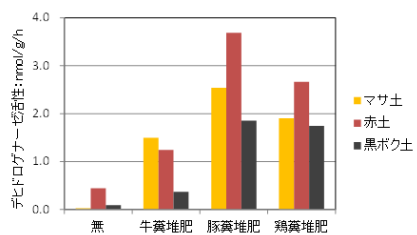


図6 4週間培養後のデヒドロゲナーゼ活性

3. 島根県内で分離された微生物を利用した害虫抑制微生物の探索

植物の害虫防除に効果を示す島根県内の微生物を探索するために、薬剤抵抗性の発達が問題となっているワタアブラムシ及びモモアカアブラムシを指標にスクリーニング系の確立を行った。実験に使用する2種のアブラムシを大学構内及び本庄農場にて採集し、ソラマメ催芽種子による累代飼育法を確立した。これにより、実験に必要な量のアブラムシの確保を完了した。次に殺虫および忌避効果を確認する3種類のスクリーニング系を試みた。殺虫効果の検証では、アブラムシに直接培養液を接触させる虫体浸漬法と、ソラマメのリーフディスクを培養液で処理した後にアブラムシを接種する葉片浸漬法の2種を用いた。忌避効果の検証では、シャーレ内に培養液で処理したリーフディスクと無処理のリーフディスクを設置し、その中間にアブラムシを放飼する選択実験を用いた。3種類のスクリーニング系において、菌の培養に用いるLBA、NGA、TSA培地のいずれも殺虫率および忌避率に影響が無いことを確認した。現在の所は、有望な菌株を見つけるには至っていないが、島根県内で分離した微生物の培養液を用いて、殺虫又は忌避効果のある培養液のスクリーニングを開始している(図7)。

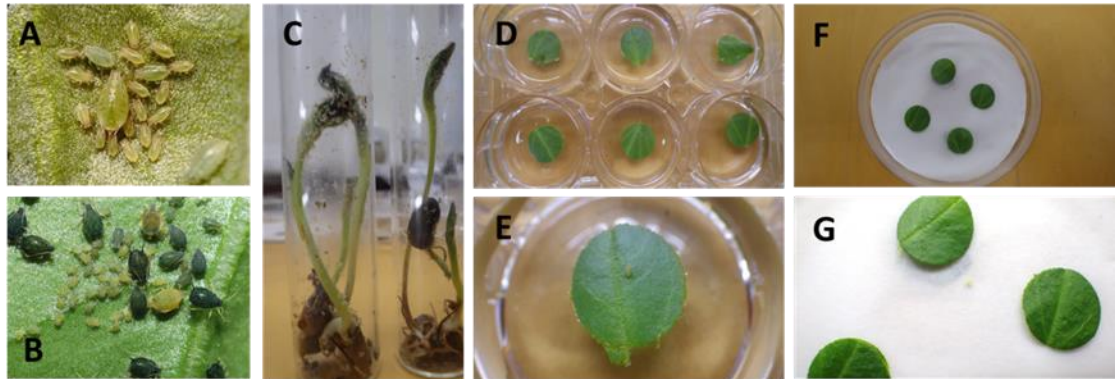


図7 A:モモアカアブラムシ B:ワタアブラムシ C:ソラマメ催芽種子によるアブラムシの飼育 D, E: 葉片浸漬法 F, G: 選択実験

まとめ

