

## 塩生植物の葉圏に生息する微生物群の植物生育促進・抑制作用

広島大学大学院統合生命科学研究科

上田 晃弘

### 【背景】

高塩環境は植物の生育には好ましくないが、塩生植物であるアッケシソウやシバナ、ヨシは塩分に対する耐性を高めることで、高塩環境で自生している。条件不利な環境下で植物が自生するためには、その環境での耐性を高めること以外に、有用微生物との共生関係が重要である。植物の生育に影響を与える微生物については、植物根圏微生物の研究が盛んであるが、葉圏微生物についての研究事例は乏しい。葉圏微生物は茎葉から植物体に侵入するか、あるいは葉面にとどまって宿主植物の生育に影響を与える。

申請者らは最近、葉圏に生息する微生物が揮発性物質の放出を介して植物の生育に影響を調べる手法として、植物と微生物を閉鎖系容器内で非接触共培養系を構築してきた（上田ら、2019）。本研究では、塩生植物の葉圏由来の微生物のうち、特に葉細菌が植物の生育にどのような影響を与えているのかについて明らかにする。

### 【材料および方法】

#### 1. 材料

令和2年8月20～24日まで厚岸町に滞在し、厚岸湖岸の湿地帯に自生する塩生植物をサンプリングした。サンプリングした塩生植物の葉を滅菌した生理食塩水を用いて数回洗浄し、付着している土壌を取り除いた。その後、塩生植物の葉を乳棒と乳鉢を使ってすりつぶした。葉1gにつき、10 mLの滅菌した生理食塩水を添加して抽出作業を行い、抽出液は適宜希釈しながらLB寒天培地（10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar）に塗布した。恒温インキュベーター（SIB-35, SANSHO）内で28℃で48時間静置培養を行った後、コロニーを形成した200種類の細菌を単離した。単離した細菌は2 mL LB液体培地（10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast extract, 10 g/L NaCl）中で125 rpm、28℃で恒温振盪培養機（BR-40LF, TAITEC）内で48時間培養した。得られた培養液は長期保存のために、終濃度が15%（v/v）となるようにグリセロールを添加してよく攪拌し、-80℃の超低温冷凍庫（MDF-C8V1-PJ, PHC）内で保存した。

#### 2. シロイヌナズナと葉圏細菌の非接触共培養

非接触培養系には2分割シャーレを用い、片側には植物培養用のMurashige-Skoog寒天培地を、もう一方には細菌培養用のLB寒天培地を作成した。シロイヌナズナ（cv.

Col-0) の種子を 1.5 mL マイクロチューブ中で 2% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて滅菌し、5 日間 4°C の冷蔵庫内で春化处理を行った。春化处理後、シロイヌナズナ種子 12 粒を MS 寒天培地上で栽培した。LB 寒天培地上には超低温冷凍庫内で保存していた細菌凍結サンプルの一部を塗布した。2 分割シャーレはサージカルテープを用いてシールした後、さらにパラフィルムを用いて 2 重にシールすることで、内部の気密性を維持した。シャーレ内のシロイヌナズナと細菌は気温 23°C、16 時間日長、光強度 150  $\mu\text{mol PPFD m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の条件下で人工気象器 (LPH-410SP, 日本医化器械製作所) で共培養を行い、3 週間後にシロイヌナズナの地上部を切り取って、新鮮重を測定した。細菌を LB 寒天培地上に塗布しなかったときの細菌非接種区のシロイヌナズナの新鮮重を対照区として、シロイヌナズナの新鮮重を増加あるいは減少させた細菌の同定を行った。

### 3. 細菌種の同定

LB 寒天培地上で生育させた細菌コロニーの一部を滅菌したつまようじでかきとり、100  $\mu\text{L}$  の滅菌水中に懸濁した。細菌懸濁液を 100°C で 5 分間加熱して溶菌させ、遠心分離機 (CT15E, HITACHI) により 12,000 g で 2 分間遠心分離した。この上澄み 2  $\mu\text{L}$  をテンプレート DNA として、2×Quick Taq (TOYOBO) を 25  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{M}$  27f プライマーを 2.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{M}$  803r プライマーを 2.5  $\mu\text{L}$ 、滅菌蒸留水を 18  $\mu\text{L}$  加えて PCR による 16S rDNA 領域の増幅を行った。PCR サイクルは 95°C で 2 分間を 1 サイクル、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、68°C で 1 分間を 30 サイクルの条件で行った。各プライマーの塩基配列は表 1 の通りである。

得られた PCR 産物は精製した後、サンガー法による DNA 塩基配列の受託解析 (株式会社ファスマック) を依頼した。得られた塩基配列を用いてデータベース (BLASTn) 検索を行い、細菌種の同定を行った。

表 1. プライマーの塩基配列

| プライマー | 塩基配列 (5'-3')         |
|-------|----------------------|
| 27f   | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| 803r  | CATCGTTTACGGCGTGGAC  |

### 【結果および考察】

トキタイ川およびイクラウシ川の河口域に自生する塩生植物のうち、アッケシソウやホソバノハマアカザ、ヨシ、シバナを各 3 個体ずつサンプリングした。対照サンプルとして、湖岸から離れたところに自生していた中生植物であるススキをサンプリングした。トキタイ川の河口では比較的大きなアッケシソウ群落を確認できた (図 1)。イクラウシ川の河口では西岸湿地帯に 5x10m 程度大きさの群落がみられたが (図 2)、東岸では

数個体のみが確認できたが、これはアッケシソウの群落形成に有利な湿地帯が見られなかったことによると思われる。



図 1



図 2

本研究では、塩生植物から単離された細菌がシロイヌナズナの生育に及ぼす影響の調査を行った。閉鎖系容器内でシロイヌナズナと細菌と隔離共培養することで、お互いに接触することなく、植物—細菌間の相互作用を検出することができる（図 3）。この検出系では、植物と細菌がそれぞれ放出するガス状物質（揮発性物質を含む）がお互いの生育に影響を与えることが観察できる。

塩生植物の葉圏から単離された細菌 200 種について 2 回の選抜試験を行ったところ、2 株がシロイヌナズナの生育促進作用を持つことが明らかとなった（図 4）。一方、183 株の細菌種がシロイヌナズナを枯死させたことから、これらの細菌群は植物の生育抑制作用を持つことが示唆された。残りの細菌株はシロイヌナズナの生育に顕著な影響を与えなかった。



図 3

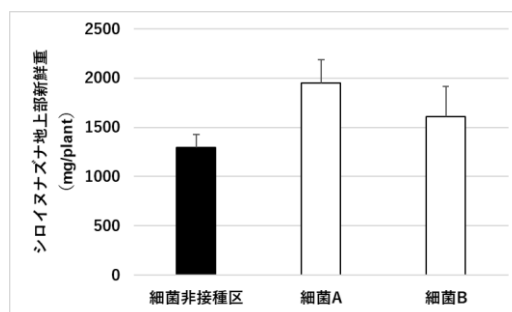


図 4

シロイヌナズナの生育を促進した細菌 2 種について、16S rDNA 塩基配列情報に基づいた菌種同定を行った。その結果、細菌 A は *Paenibacillus taichungensis*、細菌 B は *Pseudomonas oceani* であることが明らかとなった。細菌 A はススキ葉圏から、細菌 B はアッケシソウ葉圏から単離されたことから、植物生育促進効果を持つ揮発性物質を放出する細菌種は塩生植物葉圏にも中生植物葉圏にも存在することが明らかとなった。*P. taichungensis* と *P. oceani* はそれぞれ土壌および深海水サンプルから単離事例がある細菌種である (Pandya et al., 2015; Wang and Sun, 2016)。アッケシソウの葉圏から *P. oceani* が単離されたことは、アッケシソウが満潮時には水没することを考えると海水由来の *P. oceani* がアッケシソウに定着していた可能性が考えられる。塩生植物と中生植物の葉

圏から、植物生育促進作用を持つ異なる細菌種が単離されたことは非常に興味深いものの、これらの細菌種が宿主植物の生育にどの程度寄与しているのか、またこれらの細菌種が葉圏微生物群集でどの程度のポピュレーションを維持しているのか、については今後検証する必要がある。

#### 【引用文献】

Pandya M, Rajput M, Rajkumar S (2015) Exploring plant growth promoting potential of non-rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiate*. ***Microbiology* 84**: 80-89.

上田晃弘, 大戸貴裕, 近藤もも, 大村尚 (2019) 植物生育促進細菌の実用化に向けた試み. *土と微生物* 73: 5-9.

Wang MQ, Sun L (2016) *Pseudomonas oceani* sp. nov., isolated from deep seawater. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66**: 4250-4255.