

## 地域研究

# 道北地域の土壌からのエンドファイトの単離

丸山洋介<sup>1)</sup>\* 安藤清一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 名寄市立大学保健福祉学部栄養学科 <sup>2)</sup> 神戸女子大

キーワード：道北地域 エンドファイト

## はじめに

微生物は 40 億年前から存在し、動物や植物も微生物の世界の中で生きていと考えられる<sup>(10)</sup>。なかでも植物や植物の根圏に生息する微生物は、農業の発展にとって重要であり、植物の生育や環境の応答に根圏の微生物が重要であることが示唆されている<sup>(4,7)</sup>。Endophyte とは、植物の組織内部(局所的や全身的に)に存在する細菌や真菌のことで、植物の生育に悪影響を及ぼさないものを指す<sup>(12)</sup>。現在、植物微生物相の分離配列に基づく研究により、植物に多様なエンドファイトが存在することが確認されている。エンドファイトは、栄養を植物が利用しやすい形に変換する、全身抵抗性を誘導する、抗菌化合物や植物ホルモンを生産する、植物の成長を促進するなど、植物にとって有用な効果をもたらす。北海道は日本の耕地面積の 25%以上を占める。その中でも道北地域は北海道内でも冷涼な気候であり、名寄市周辺では冬季の気温は-20℃程度まで下がるにもかかわらず、夏季には 35℃以上の気温になる事もあり、夏季、冬季の気温差が 60℃程度もある特徴的な地域である。

本研究では名寄市周辺の地域から土壌を採取し、その土壌を用いてエンドファイト候補の単離と同定を行う。道北地域(名寄市周辺)からエンドファイトの単離を行ったという報告はなく、北海道の中でも特徴的な気候条件の名寄市周辺では、有用なエンドファイトの候補を単離できる可能性がある。

## 1. 実験方法

### 1) 土壌のサンプリング

大学内の敷地内から土壌をサンプリングする。サンプリングした土壌は播種を行うまで冷暗所に保管した。

### 2) エンドファイトの単離

サンプリングした土壌に市販されているナスの種子を播種した。ナスはトーホク交配の紫彩を用いた。播種後 1 ヶ月間、室温 24 度、16 時間明期、8 時間暗期の条件でインキュベーター内で生育した。その後、成長したナスの根端部分をサンプリングした。サンプリングした根は表面を界面活性剤とエタノールにより滅菌を行なった。滅菌後に根端部分をコーンミール培地に静置した。その後、室温で暗所にて 1 ヶ月程度静置した<sup>(18)</sup>。

### 3) 単離したエンドファイトの同定

単離した菌から DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型にして、16s rRNA の遺伝子領域に設計したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物をシーケンス解析のためにカラムを用いて精製した。その後シーケンス解析を行った。

\*責任著者 E-mail:yamaruyama@nayoro.ac.jp

## 2. 結果と考察

シーケンス解析の結果、*Bacillus* 属、*Mycobacterium* 属、*Brevibacillus* 属、*Paenibacillus* 属、*Gordonia* 属を同定する事ができた。

### *Bacillus* 属

*Bacillus* 属は環境に広く存在するグラム陽性の内生菌として知られている。*Bacillus* 属にはモデル生物として枯草菌などが含まれている。*Bacillus* 属の一部の菌種は窒素固定能を有する事が報告されている<sup>(3)</sup>。これまでに *Bacillus* 属が *Pseudomonas* 属と同様に植物病原菌の増殖を抑制する事や、植物へ抵抗性を付与する事が報告されている<sup>(3)</sup>。

### *Mycobacterium* 属

*Mycobacterium* 属では *Mycobacterium tuberculosis* が結核菌として知られている。*Mycobacterium* 属はこれまでにススキの種子やイネの根から同定されている<sup>(1,9)</sup>。*Mycobacterium phlei* は栄養条件の低い土壌においてトウモロコシの窒素、リン、カリウム吸収を促進する事が報告されている<sup>(5)</sup>。

### *Brevibacillus* 属

*Brevibacillus* 属は、好気性の芽胞形成性細菌として知られている。昆虫、軟体動物や線虫に対する毒性が報告されていて、生物防除剤として用いられている<sup>(2,11)</sup>。

これまでにトマト、コメ、コーヒー、などから単離されている<sup>(9,15,17)</sup>。これまでに *Brevibacillus* 属が生物防除剤としての作用について報告がある。

### *Paenibacillus* 属

根圏の *Paenibacillus* 属や *bacillus* 属は窒素固定、リン酸可溶化、植物ホルモンであるインドール-3-酢酸 (IAA) の生産、鉄獲得を可能にする鉄運搬体の放出を通じて、作物の成長を直接促進する。これまでにトウモロコシ、ポプラ、カボチャ、イネ、植物の成長を促進することが報告されている<sup>(6,8,14)</sup>。また *Paenibacillus* 属の産生する外来多糖類やアミラーゼ、セルラーゼ、その他の酵素が、洗剤、食品・飼料、繊維、紙、バイオ燃料、ヘルスケアなどへの応用が期待されている。

### *Gordonia* 属

*Gordonia* 属菌は環境中に広く存在する好気性の放線菌で土壌や水中から頻りに分離される。エンドファイトとしてタマネギやマングローブから植物生長促進菌の候補としてスクリーニングにより得られている<sup>(13,16)</sup>。マングローブから単離された *Gordonia terrae* KMP456-M40 はオオムギやイネへの接種で収量や成長を促進する事が報告されている<sup>(16)</sup>。

本研究では大学の敷地内の土壌を用いてこれまで報告のあるエンドファイトの候補となる菌を単離し、同定する事が出来た。同定した *Bacillus* 属、*Mycobacterium* 属、*Brevibacillus* 属、*Paenibacillus* 属、*Gordonia* 属の多くは共生する植物に対して有用な相互作用が報告されていた。本研究で得られた因子について実験室環境で接種試験を行う事で有用な効果を明らかにする事ができる。しかしながら、植物-微生物の相互作用については、植物微生物の組み合わせ以外に土壌中の細菌叢や気温、湿度などの周辺環境も関与する事が報告されている事から圃場で有効なエンドファイトを選抜するためにはさらに多くの検証が必要である。

## 付記

本稿は名寄市立大学コミュニティケア教育センター2020年の課題研究の採択を受けたものである。

## 参考文献

- (1) CopeSelby, N., Cookson, A., Squance, M., Donnison, I., Flavell, R., & Farrar, K. (2017). Endophytic bacteria in *Miscanthus* seed: implications for germination, vertical inheritance of endophytes, plant evolution and breeding. *Gcb Bioenergy*, *9*(1), 57-77.
- (2) De Oliveira, E. J., Rabinovitch, L., Monnerat, R. G., Passos, L. K. J., & Zahner, V. (2004). Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. *Applied and environmental microbiology*, *70*(11), 6657-6664.
- (3) Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., & Fira, D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *117*, 101754.
- (4) Durán, P., Thiergart, T., Garrido-Oter, R., Agler, M., Kemen, E., Schulze-Lefert, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interkingdom interactions in roots promote *Arabidopsis* survival. *Cell*, *175*(4), 973-983.
- (5) Egamberdiyeva, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *applied soil ecology*, *36*(2-3), 184-189.
- (6) Fürnkranz M, Adam E, Müller H, Grube M, Huss H, Winkler J, et al. Promotion of growth, health and stress tolerance of Styrian oil pumpkins by bacterial endophytes. *Eur J Plant Pathol*. 2012;134:509–19.
- (7) Hacquard, S. et al. Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host Microbe* **17**, 603–616 (2015).
- (8) Han Z, Zhang Z, Dong Y, Yang M. Effects of endophytic bacteria P22 and S16 in *Populus* on the rooting and growth of the relative species plants. *J Northeast For Univ*. 2014;42:117–21.
- (9) Mano, H., Tanaka, F., Nakamura, C., Kaga, H., & Morisaki, H. (2007). Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environments*, *22*(2), 175-185.
- (10) McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., ... & Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(9), 3229-3236.
- (11) Ruiu, L. (2013). *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. *Insects*, *4*(3), 476-492.
- (12) Ruschel, A. P. (1975). Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugarcane seedlings. *Soil Biol. Biochem.*, *7*, 181-182.
- (13) Samayoa, B. E., Shen, F. T., Lai, W. A., & Chen, W. C. (2020). Screening and Assessment of Potential Plant Growth-promoting Bacteria Associated with *Allium cepa* Linn. *Microbes and environments*, *35*(2), ME19147.
- (14) Sheela T, Usharani P. Influence of plant growth promoting rhizobac- teria (PGPR) on the growth of maize (*Zea mays* L.). *Gold Res Thoughts*. 2013;3:629–40.
- (15) Silva, H. S., Tozzi, J. P., Terrasan, C. R., & Bettioli, W. (2012). Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control*, *63*(1), 62-67.
- (16) Soldan, R., Mapelli, F., Crotti, E., Schnell, S., Daffonchio, D., Marasco, R., ... & Cardinale, M. (2019). Bacterial endophytes of mangrove propagules elicit early establishment of the natural host and promote growth of cereal crops under salt stress. *Microbiological research*, *223*, 33-43.
- (17) Yang, C. J., Zhang, X. G., Shi, G. Y., Zhao, H. Y., Chen, L., Tao, K., & Hou, T. P. (2011). Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. *African journal of Microbiology research*, *5*(2), 131-136.
- (18) エンドファイトの働き方と使い方, 成澤才彦, 農山漁村文化協, 2011 ISBN: 9784540111433

