

アカマツ針葉および形成層から得られた endophytic bacteria の特徴

Characteristics of endophytic bacteria isolated from Japanese red pine needle leaves and cambium

田中恵*¹・奈良一秀*²Megumi TANAKA*¹ and Kazuhide NARA*²

* 1 東京農業大学地域環境科学部

Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502

* 2 東京大学大学院新領域創成科学研究科

The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8563

要旨 : Endophytic bacteria とは、健全な植物組織に存在し宿主に明らかな病徴や症状を引き起こさないバクテリアである。樹木根圏には多数のバクテリアが見られ、一部は endophytic bacteria として組織内に存在する可能性が示唆されている。しかしながら、地上部に存在するものについては殆どわかっていない。ヨーロッパアカマツ成木の針葉や枝の endophytic bacteria は地下部のものとは群集が異なるとされているが、このような違いは実生の時点においても見られるのか、また、群集組成に部位や年齢による違いが見られるか調べるために、苗畑で育苗された当年生及び3年生アカマツ実生の針葉及び茎・形成層から希釈平板法を用いてバクテリアを分離し種を推定した。その結果多くは *Bacillus* 属や *Burkholderia* 属あるいは放線菌などで、特に形成層には *Burkholderia* 属が多く見られた。一方、針葉は *Bacillus* 属が多く、比較的単純なバクテリア相であることが明らかになった。

キーワード : アカマツ実生, 内生バクテリア, 地上部, *Bacillus* 属, *Burkholderia* 属

Abstract : Endophytic bacteria are defined as bacteria that colonize healthy plant tissue without causing obvious disease or producing obvious injury to the host. Numerous bacterial species have been described in plant rhizosphere, and many of them colonize plant roots as endophytic bacteria. However, little is known about what bacteria exist in aboveground tissues of plants. A few studies have shown that endophytic bacteria in needle leaves and branches were different from those of roots in mature Scots pine trees. To investigate whether these differences are also observed in young seedlings, we studied endophytic bacteria in needle leaves and stem/cambium of 1st-year and 3rd-year Japanese red pine seedlings using dilution plate methods and compared them with rhizosphere bacteria in previous studies. As a result, many endophytic bacteria in above-ground tissues included *Bacillus*, *Burkholderia*, and actinobacteria species. Specifically *Burkholderia* or *Methylobacterium* were dominant in the cambium of 3rd-year seedlings, while *Bacillus* was dominant in needle leaves. These endophytic bacterial communities were relatively simple than that of rhizosphere bacteria.

Keyword : *Pinus densiflora* seedling, endophytic bacteria, aboveground tissue, Genus *Bacillus*, Genus *Burkholderia*

I はじめに

“endophytic bacteria” は内生バクテリアとも呼ばれ、健全な植物組織に存在し宿主に明らかな病徴や症状を引き起こさないバクテリアである (1)。樹木根圏には多数のバクテリアが見られることが知られている (3, 9) が、その一部は根圏や根面といった根の表面ではなく根内、すなわち組織内に endophytic bacteria として存在する可能性が示唆されている (7)。しかしながら、特に木本植物の地上部に存在する endophytic bacteria については殆どわかっていないのが現状である。地下部である外生菌根圏では樹種に関わらず、主にプロテオバクテリアに属する培養可能なバクテリアが優占することがわかっている (10) が、地上部におい

ても同様の群集組成を持っているのだろうか。また、地上部の中でも針葉、あるいは茎や形成層といった部位によりバクテリア群集は異なるのだろうか。

さらに、endophytic bacteria が植物体内にいつ、どうやって侵入するのかについてもあまりわかっていない。ヨーロッパドウの根面に蛍光標識した *Burkholderia phytofirmans* を直接接種した実験例では時間を追うごとに接種バクテリアが根内から花軸、さらに実の中に移動していく様子が観察されている (2) ことから、endophytic bacteria は植物体内を移動しコロニーを形成する可能性が考えられている。

本研究はアカマツ (*Pinus densiflora*) 実生を材料とし、苗畑に播種された当年生及び3年生実生の針葉及び茎・形成

層から希釈平板法を用いてバクテリアを分離し種を推定することで、endophytic bacteriaが実生のどの段階から存在するのか、年齢や部位による群集構造の違いについて調べた。また、10年生稚樹及び成木から導管流を採取し、同様の手法を用いてバクテリアの分離を試みることでendophytic bacteriaが樹木体内を移動する可能性についても検討した。

II 材料と方法

1. アカマツ当年生・3年生実生の endophytic bacteria の分離及び推定 アカマツ実生は、東京都西東京市の東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林田無演習林の第一苗畑で育苗されているものを使用した。供試体として当年生実生5個体、3年生実生5個体をそれぞれ選び、培養当日に当年生実生から針葉と茎、3年生実生から針葉と形成層を採取した。針葉は1個体から1cmに切ったものを5本、茎は1個体につき1cmずつ採取した。形成層は1個体につき幹に1ヶ所メスで5mm角の切れ目を入れ、表皮ごと剥ぎ取った。

供試体内、形成層は表皮をむき、それ以外の部位は中性洗剤で軽く洗浄した後、クリーンベンチ内で3%過酸化水素水を用いて15秒表面殺菌し、滅菌水で3回洗浄した。その後、滅菌水100 μ Lを入れたマイクロチューブ内で3,000rpm、30秒で破碎し滅菌水900 μ Lを加えたけん濁液を1次希釈とし、10%ずつ希釈し得られるけん濁液を3次希釈まで作成した。けん濁液はYG培地(Yeast extract 1g, Glucose 1g, K₂HPO₄ 0.3g, KH₂PO₄ 0.2g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, Agar 15g, DW 1L, pH7.0)にシャーレ1枚あたり100 μ Lずつ塗布し暗黒下25°Cで培養した。

出現したバクテリアはサンプルごとにランダムに10コロニーを選び、ダイレクトPCRを行った。出現コロニーが10個に満たない場合は全てのコロニーをPCRした。その後16S rRNA領域(約800bp)をシークエンスし、NCBIのBLAST検索を用いて属レベルの推定を行った。

2. アカマツ10年生稚樹・成木の導管流からの endophytic bacteria 分離 10年生稚樹及び成木サンプルを田無演習林内のアカマツ林で採取した。各5個体を選び、培養当日に当年生枝を採取した。導管流の採取はプレッシャーチャンバーを用いて行った。枝は針葉と樹皮をすべて取り去りチャンバーにセットした。クリーンベンチ外での作業のため、70%エタノールで表面殺菌をした3Lビーカーをチャンバー全体を覆うようにかぶせ、空気からのコンタミネーションを防いだ。枝は導管流の採取直前に70%エタノールで拭いた剪定ばさみで切り戻し、切り口から出てくる導管流を滅菌ろ紙2枚(直径5mm)に十分吸わせ、

滅菌水1mlを入れたマイクロチューブに入れたものを1次希釈とした。2次希釈まで作成し、実生と同様にYG培地にシャーレ1枚あたり100 μ Lずつ塗布し暗黒下25°Cで培養した。作業途中でのコンタミネーションの有無を確認するため上記の作業を滅菌水のみでも行った。

III 結果と考察

1. アカマツ当年生・3年生実生の endophytic bacteria の分離及び推定 2次希釈液の培養によって得られたバクテリアの平均コロニー数を図-1に示す。針葉と茎・形成層ではコロニー数に大きな違いがみられた。針葉は年齢に関わらずコロニー数が少ない傾向がみられ、当年生実生で平均1.8個、3年生実生でも平均4.3個ときわめて少ないことがわかった。一方、茎・形成層ではそれぞれ平均31.5個、12.2個と針葉よりもバクテリアコロニーは多く出現する傾向がみられた。

当年生針葉から出現した全てのコロニー(18個)、3年生針葉から48コロニーをピックアップしたシークエンスした結果を図-2に示す。針葉ではシークエンスに成功した55コロニー中、*Bacillus*属が最も多くなり、全体の71%を占めた。次いで*Methylobacterium*属が13%、属レベルでの推定ができなかったものの、*Rhizobiales*目バクテリアが7%となった。次に当年生茎・3年生形成層から各50コロニーをピックアップしたシークエンスした結果を図-3に示す。シークエンスに成功した96コロニーの内では針葉と同様に*Bacillus*属が最も多く、全体の35%を占めた。次いで*Burkholderia*属が18%、いずれも放線菌門に属する*Curtobacterium*属、*Fronthabitans*属がそれぞれ14%と8%、*Methylobacterium*属が8%、属レベルでの推定ができなかったものの、*Rhizobiales*目バクテリアが5%となった。これらのことから、アカマツ実生地上部の培養可能なendophytic bacteriaは*Bacillus*属が中心であることが明らかになった。

表-1に部位・年齢ごとの推定バクテリア属とコロニー数を示す。全ての部位・年齢において*Bacillus*属がみられたが、シークエンスしたコロニーに占める*Bacillus*属の割合は当年生の針葉で26%、茎で22.4%だったのに対し、3年生の針葉では87.5%、形成層では48.9%と当年生よりも3年生の方が高い割合を示した。しかしながら、推定された属の数は当年生針葉が4属、3年生針葉が7属、当年生茎が6属、3年生形成層が10属となり、年数が上がるにつれていずれの部位でも推定属数が増える傾向が見られた。針葉はバクテリア数が比較的少なく、出現バクテリアも*Bacillus*属中心であるのに対し、茎・形成層は針葉よりもバクテリア密度が高く、複雑なバクテリア群集を持つことが推察された。

アカマツ実生の菌根圏バクテリアは菌根菌種に関わらず *Burkholderia* 属が優占することがわかっている(6)。また、ヨーロッパアカマツ成木の地上部(針葉・枝)と地下部(根圏)の *endophytic bacteria* を調べた例では、地上部と地下部の群集は異なるとされている(4)。このことから、当年生実生の地上部、特に *Bacillus* 属中心の針葉と *Burkholderia* 属中心の地下部では *endophytic bacteria* の群集組成が大きく異なっていることが考えられる。

本研究で *Bacillus* 属に次いで多く分離された *Burkholderia* 属バクテリアは、マツだけでなく、様々な植物の組織から検出されることから植物と何らかの関連があるとされている(5)。これらのことから *Burkholderia* 属バクテリアは選択的にアカマツ実生の組織内に存在することが示唆された。

2. アカマツ 10 年生稚樹・成木の導管流からの *endophytic bacteria* 分離 実験に用いた全ての導管流サンプルについて、最長で3ヶ月間培養し観察を続けたが、いずれもバクテリアコロニーは得られなかった。一方、作業途中のコンタミネーションを確認するために同条件下で滅菌水を塗布したシャーレにもバクテリアが出現しなかったことから、導管流の採取作業は無菌的に行われたと考えられる。これらのことからアカマツの導管流には少なくとも培養可能なバクテリアは流れていない可能性が示唆された。

実験環境下で発芽前のマツ種子表面に付着するバクテリア群集を調べた例では、林床に播かれて1週間たった時点で種子には分離可能なレベルの量のバクテリアが付着することがわかっている(8)。このことから、本研究で分離されたバクテリアの多くは種子の発根、発芽過程で空気や土壌を通じて侵入した可能性が考えられる。

IV まとめ

アカマツ実生の地上部に存在する *endophytic bacteria* について、培養法を用いて分離した結果、当年生実生の段階でもバクテリアは既に組織内部に存在していることが明らかになった。分離されたバクテリアの多くは *Bacillus* 属や *Burkholderia* 属あるいは放線菌などで、特に形成層には *Burkholderia* 属が多く見られた。一方、針葉は *Bacillus* 属が多く、比較的単純なバクテリア相であることが明らかになった。年齢による違いでは当年生よりも3年生の方がバクテリアの群集組成は複雑になる傾向がみられた。侵入経路については本研究では明らかにならなかったが、導管流に培養可能なバクテリアがほぼ見られないことから、アカマツの *endophytic bacteria* は播種された時点で空気や土壌を通じて種子表面に付着し、その後の発芽過程で侵入する可能性が考えられた。

引用文献

- (1) BACON, C.W. and HINTON, D.M. (2007) Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. Plant-Associated Bacteria (GNANAMANICKAM, S.S., ed.) pp. 155-194. Springer, Dordrecht, the Netherlands
- (2) COMPANT, S., KAPLAN, H., SESSITSCH, A., NOWAK, J., BARKA, E.A. and CLÉMENT, C. (2008) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. FEMS Microbiol. Ecol. **63**: 84-93
- (3) FREY-KLETT, P., GARBAYE, J. and TARKKA, M. (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytol. **176**: 22-36
- (4) IZUMI, H., ANDERSON, I.C., KILLHAM, K. and MOORE, E.R.B. (2008) Diversity of predominant endophytic bacteria in European deciduous and coniferous tree. Can. J. Microbiol. **54**: 173-179
- (5) NGUYEN, N.H. and BRUNS, T.D. (2015) The microbiome of *Pinus muricata* ectomycorrhizae: community assemblages, fungal species effects, and *Burkholderia* as important bacteria in multipartnered symbioses. Microb. Ecol. **69**: 914-921
- (6) 田中恵, 奈良一秀 (2007) 土壌と菌根菌の違いが根圏バクテリア群集に及ぼす影響. 第118回日本森林学会大会学術講演集 C29
- (7) TANAKA, M. and NARA, K. (2009) Phylogenetic diversity of non-nodulating *Rhizobium* associated with pine ectomycorrhizae. FEMS Microbiol. Ecol. **69**: 329-343
- (8) 田中恵, 濱口顕寛, 上原巖, 菅原泉, 佐藤明 (2013) 富士青木ヶ原樹海の林床に存在する微生物密度の季節変化. 関東森林研究 **64**(1): 45-48
- (9) 田中恵, 奈良一秀 (2014) 野外菌根から得られた菌根圏バクテリアが培養菌糸成長に及ぼす影響. 関東森林研究 **65**(1): 123-126
- (10) TANAKA, M. and NARA, K. (2015) Bacterial communities associated with ectomycorrhizal root of pioneer dwarf willow in a primary successional volcanic desert. 8th International Conference on Mycorrhiza. PS1-61

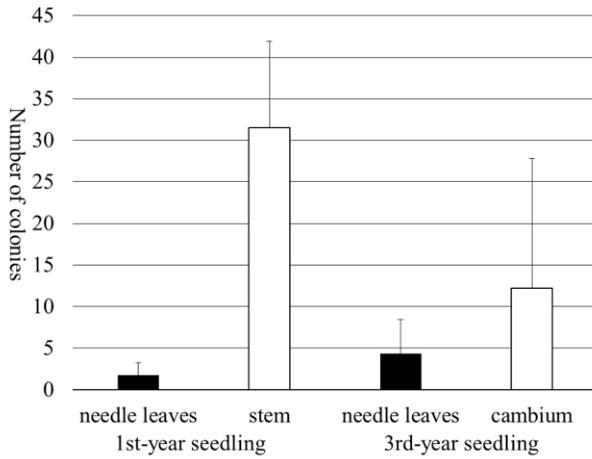


図-1. 培養によって得られたバクテリアの平均コロニー数（2次希釈）左：当年生実生 右：3年生実生 n=3-5
 Fig. 1 Number of bacterial colonies from seedlings (2nd dilution)

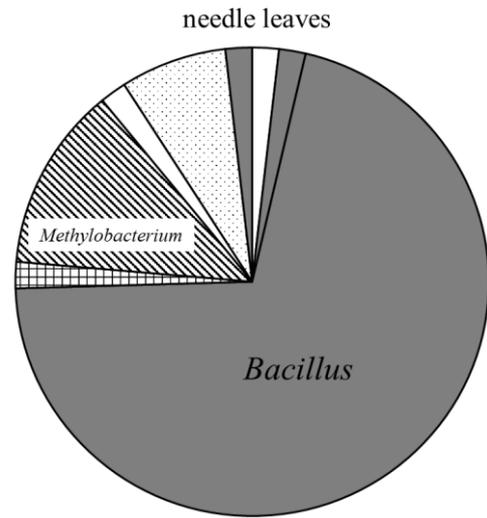


図-2. 針葉由来バクテリアの出現頻度（属レベル）
 灰：Firmicutes 門 斜線：*Methylobacterium* 白：放線菌門 ドット：Rhizobiales 目 網かけ：その他

Fig. 2 Bacterial frequency isolated from needle leaves (Genus level)

grey: Phylum Firmicutes stripe: *Methylobacterium* white: Phylum Actinobacteria dot: Order Rhizobiales check: others

表-1. 部位・年齢別の推定バクテリア属及びコロニー数
 Table 1 Bacterial genus and number of occurrence

Genus name	needle leaves		stem		total
	1st-year	3rd-year	1st-year	3rd-year	
<i>Actinobispora</i>		1			1
<i>Anoxybacillus</i>		1			1
<i>Bacillus</i>	4	35	11	23	73
<i>Burkholderia</i>			16	1	17
<i>Chryseobacterium</i>		1			1
<i>Cohnella</i>				1	1
<i>Curtobacterium</i>			13		13
<i>Fronidihabitans</i>			8		8
<i>Halospirulina</i>				2	2
<i>Methylobacterium</i>	7			8	15
<i>Paenibacillus</i>			1	3	4
<i>Propionibacterium</i>		1			1
Rhizobiales (Order)	4			5	9
<i>Roseococcus</i>				1	1
<i>Sphingomonas</i>				3	3
<i>Streptococcus</i>		1			1
total	15	40	49	47	151
number of Genera	4	7	6	10	16

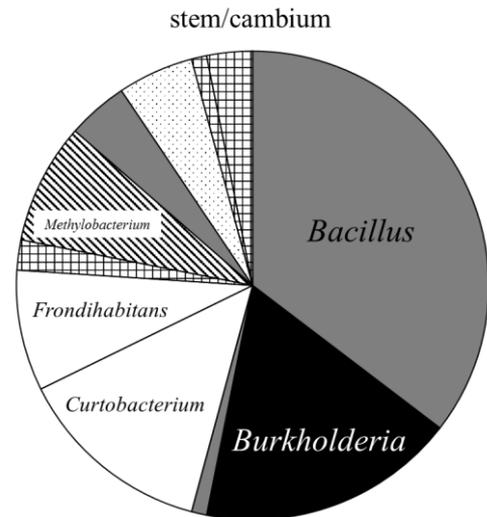


図-3. 茎・形成層由来バクテリアの出現頻度（属レベル）
 灰：Firmicutes 門 黒：*Burkholderia* 白：放線菌門 斜線：*Methylobacterium* ドット：Rhizobiales 目 網かけ：その他

Fig. 3 Bacterial frequency isolated from stem/cambium (Genus level)

grey: Phylum Firmicutes black: *Burkholderia* white: Phylum Actinobacteria stripe: *Methylobacterium* dot: Order Rhizobiales check: others