

塩生植物の耐塩性を高める耐塩性根圏微生物の分離と特性解明

助成研究者：小澤 隆司 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科)

共同研究者：藤井 修平 (帝塚山大学短期大学部)

植物の根圏土壌や根内部には、植物の光合成産物の供給を受けて多様な微生物群集が生息している。これらの微生物と植物の間では様々なシグナル物質を介した相互作用が展開し、その結果、窒素固定細菌や菌根菌などにみられる共生関係や、病原菌にみられる寄生関係が成立している。海浜など塩濃度の高い土壌で生息する塩生植物の生育も、その根圏微生物の群集構造や活性によって影響を受けていると考えられる。我々はこれまでに様々な植物の根圏より、植物の生育促進作用を示す窒素固定細菌を分離してきた。本研究では、塩生植物であるアッケシソウ (*Salicornia europaea*) の根より分離した好気性窒素固定細菌が植物の耐塩性を高めることを確認し、それら分離株の特性を明らかにする。

海浜に生息しているアッケシソウ、ウラギク (*Aster tripolum*)、ヨシ (*Phragmites australis*) の根圏から 5% NaCl を添加した LB 培地上で増殖する好気性窒素固定細菌をそれぞれ 7、4、1 株分離し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列と生理的諸性質から同定した。このうちアッケシソウ根圏より分離した *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Sal35 株について、アッケシソウの生育に対する接種効果を調べた。アッケシソウは Murashige-Skoog 培地上で無菌栽培すると、培地内 NaCl 濃度が 0.2~0.3 M で生育量が最大となり、0.4 M 以上では生育阻害を受け、葉の退色がみられた。しかし、播種後 3 日目に Sal35 株を接種すると、NaCl による植物体重量減少に影響はなかったが、地上部のクロロフィル含量の低下が図のように抑制された。アッケシソウ体内には 5 mmol/g d.w.以上の Na が蓄積していたが、同時に 120 μ mol/g d.w.以上のグリシンベタインの生成も認められた。また、Sal35 株を 0.5 M NaCl を含有する LB 培地で培養すると、70 nmol/10⁸cells のベタインが生成された。アッケシソウ細胞内で適合溶質として機能することが知られているグリシンベタインの生合成に Sal35 株がなんらかの影響を与えているのかもしれない。

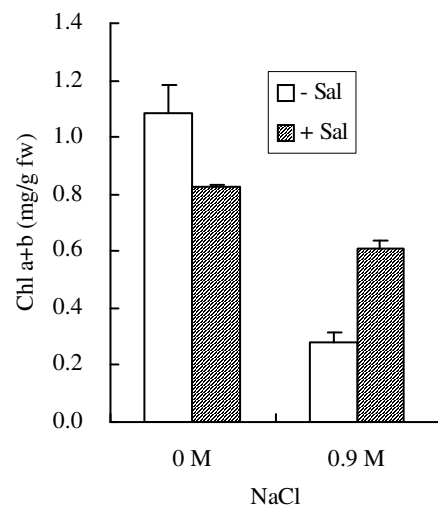


Fig. 2. Effect of NaCl in the MS medium and the inoculation with strain Sal35 on the chlorophyll content of *Salicornia europaea*

15

助成番号 0415

塩生植物の耐塩性を高める耐塩性根圏微生物の分離と特性解明

助成研究者：小澤 隆司（大阪府立大学大学院農学生命科学研究科）

共同研究者：藤井 修平（帝塚山大学短期大学部）

1. 研究目的

植物の根圏土壌や根内部には、植物の光合成産物の供給を受けて多様な微生物群集が生息している。これらの微生物と植物の間では様々なシグナル物質を介した相互作用が展開し、その結果、窒素固定細菌や菌根菌などにみられる共生関係や、病原菌にみられる寄生関係が成立している。自然界における植物の生育は、その根圏微生物の群集構造や活性によって影響を受けていると考えられる。

海浜など塩濃度の高い土壌で生息する塩生植物は、適合溶質の生産、 Na^+ の体外排出や液胞内蓄積などの様々な耐塩機構を持っていることが知られている¹⁾。これらの耐塩機構に関与する遺伝子の導入による組み換え体の作出の結果、塩感受性作物の改変も可能となってきた。しかし、これらの塩生植物を人工培地上で無菌栽培すると、本来の生育環境より低い塩濃度で生育阻害を受ける場合がある²⁾。このことは、その塩生植物自身が持っている耐塩機構の他に、その根圏に生息している微生物がなんらかのしくみで植物の耐塩性を高める働きをしていることを示唆している。

本研究の目的は、アッケシソウ (*Salicornia europaea*) の根より分離した好気性窒素固定細菌が植物の耐塩性を高めることを確認し、それら分離株の特性を明らかにすることである。

2. 研究方法

2.1 窒素固定細菌の分離

岡山県瀬戸内市の塩田跡地に自生しているアッケシソウ (*Salicornia europaea*)、ウラギク (*Aster tripolium*)、ヨシ (*Phragmites australis*) の根を好気性窒素固定細菌の分離源とした。それぞれの植物1個体より根を約1g切り取り、表面に付着していた土壌を滅菌水で洗脱したのち、根断片を乳鉢中で破碎した。破碎液の100倍希釈液50 μL を10mLのJNFb-Y (3% NaCl含有) 軟寒天培地³⁾に接種した。窒素固定活性の認められた培養をJNFb-Y軟寒天培地で3回継代培養したのち、菌体を酵母エキス-マンニトール (YEM) 寒天平板培地⁴⁾に塗布し、形成したコロニーをさらに定法にしたがって純化した。

2.2 分離株の同定

分離菌株を Proteinase K, Tween 20, Nonidet P-40 で処理して得た溶菌液中のゲノム DNA を鋳型とし、PCR 法により 16S rRNA および nifH 遺伝子を増幅、分離した。使用したプライマーは、16S rRNA 遺伝子に対しては、27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' と、1525r: 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'、nifH 遺伝子に対しては、nifHf36: 5'-GGTATCGGCAAGTCCACCAC-3' と nifHr416: 5'-GGCATGGCGAAGCCGCCGCA-3' を使用した。両増幅断片の 5'-末端側の塩基配列を決定し、DDBJ データベースより相同性検索を行った。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列相同性から推定された属の菌株が示す生理的諸性質を定法により調べた⁵⁾。

2.3 アッケシソウの栽培

アッケシソウ種子は上記生息地より 2003 年 10 月に採取し、10°C、暗所にて保存しておいたものを使用した。種子をエタノールで 2 分間、続いて 10% さらし粉る液で 10 分間処理して表面殺菌し、Murashige-Skoog (MS) 寒天培地⁶⁾ に播種した。26°C の人工気象器 (15,000 lx、明 16 時間-暗 8 時間) において発芽させ、播種後 5 日目にプラスチックポット (100 ml 容) に入れた MS 寒天培地に移植し、引き続き同上人工気象器内で栽培した。この本栽培用 MS 培地には NaCl を 0~1.1 M となるようにあらかじめ添加した。

2.4 細菌の接種

LB 培地で対数後期まで生育した細菌を蒸留水で洗浄し、播種後 3 日目の幼植物 1 個体ずつにその菌懸濁液 (10^8 cells/ml) 30 μ l を接種した。

2.5 窒素固定活性の測定

菌体を YEM 液体培地で対数後期まで生育後、その培養液 50 μ l を試験管 (16 x 180 mm) に入れた 10 ml の JNFb-Y 軟寒天培地に接種し、30°C、暗所で培養した。培養 5 日目に試験管をゴム栓で密閉し、2.0 ml のアセチレンを注入後、30°C、暗所で培養を継続した。生成するエチレンをガスクロマトグラフィーで定量しアセチレン還元活性 (ARA) を求め、これを窒素固定活性の指標とした。

2.6 植物体および菌体内成分の分析

植物体および菌体を凍結乾燥後、硫酸-過酸化水素法によって有機物を分解し、分解液中の K, Na, Ca, Mg を原子吸光光度計 (日立 Z-6100 型) を用いて定量した。また、この分解により生成したアンモニアをインドフェノール法で比色定量することで生体中の全窒素量を求めた⁷⁾。植物体中のクロロフィル a と b はアセトンで抽出後、645 nm, 663 nm, 750 nm における吸光度から定量した⁸⁾。植物体および菌体のグリシンベタイン量は、試料を 80% メタノールで抽出後、イオン交換カラムで部分精製し、過ヨウ化物誘導体を比色定量することによって推定した⁹⁾。分離菌株を高 NaCl 含有培地で培養すると生成する未知物質は GC-MS により分析した。分離菌株の 80% メタノール抽出物のアセチル誘導体を調製し、こ

れをガスクロマトグラフィー - 質量分析器(島津 GC-MS-QP 200A 型)を用いて分析した。

3. 研究結果と考察

アッケシソウ、ウラギク、およびヨシの根よりそれぞれ、10、18、および1株の好気性細菌を分離した(Table 1)。これらのうち窒素固定活性を示したものは合計 12 株であった。特にヨシからの分離株で窒素固定活性を示さないものは 78% を占めていた。しかし、窒素固定活性を示さなかった分離株のなかにも、*nifH* 遺伝子の増幅がみられた株が 7 株あった。また、すべての分離株は 5% (= 0.86 M) の NaCl を含む LB 培地で増殖することができた(Table 2)。本研究ではこれらの分離株のうち、アッケシソウから分離し、JNFb-Y 培地内で高い窒素固定活性を示し、かつ *nifH* 遺伝子が認められた 2 株(Sal35, Sal36)についてさらに特性の解析を行った。

Table 1. Number of bacterial isolates from the roots of halophytes.

Source plant	Number of			Relationship*
	Isolates	<i>nifH</i> -positive	ARA-positive	
<i>Aster tripolum</i>	18	8	4	<i>Agrobacterium</i> sp. (1), <i>Allorhizobium</i> sp. (1), <i>Chromohalobacter</i> sp. (1), <i>Halomonas</i> sp. (6), <i>Pseudomonas</i> sp. (2), <i>Rhizobium</i> sp. (1),
<i>Phragmites australis</i>	1	1	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (1)
<i>Salicornia europaea</i>	10	10	7	<i>Chromohalobacter</i> sp. (2), <i>Halomonas</i> sp. (3), <i>Pseudomonas</i> sp. (2), <i>Rhizobium</i> sp. (3),

*Figures in parentheses following each species indicate the number of the isolates from the species.

Table 2. Salt tolerance of the bacterial isolates from halophytes.

The isolates were grown in LB broth supplemented with NaCl for 2 days at 30C. The isolates were classified into five groups based on the concentration of NaCl in LB where the isolates were able to grow.

Source plant	Salt tolerance type				
	I	II	III	IV	V
	----- NaCl in LB -----				
	0 %	0 - 3 %	0 - 5 %	0 - 10 %	3 - 5 %
<i>Aster tripolum</i>	0	0	4	0	14
<i>Phragmites australis</i>	0	0	1	0	0
<i>Salicornia europaea</i>	0	0	5	0	5

分離株の生理的諸特性と 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列(5'-末端側約 600 bp)から、Sal35 株は *Pseudomonas pseudoalcaligenes* に属する細菌と同定された(Table 3)。Sal36 株は *P. pseudoalcaligenes* とは異なり 41°C での生育が認められなかったが、その他の特性はすべて *P. pseudoalcaligenes* と同一であり、*P. pseudoalcaligenes* に極めて近縁な分類学的位置に

ある細菌と考えられた。

MS培地上でのアッケシソウの生育量は培地中のNaCl濃度が0.2~0.3 Mで最大となったが、0.4 M以上のNaClが存在すると生育阻害を受けた (Fig. 1)。播種3日目にSal35株を接種した場合にも、植物の生育量に対するNaClのこのような促進および阻害効果に変わり認められなかった。

培地中のNaClが0.6 M以上に増加すると、アッケシソウの生重量あたりのクロロフィル量の減少も認められた。しかし、アッケシソウにSal35株を接種した場合にはその減少の程度は無菌栽培の場合ほど著しくなく、0.9 M NaClを添加した場合でも、非接種植物体に比べおよそ2倍量のクロロフィルを持っていた (Fig. 2)。

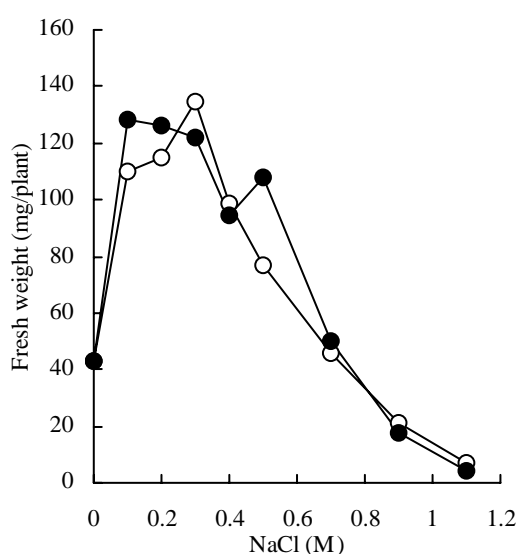


Fig.1. Effect of NaCl in the MS medium on the growth of *Salicornia europaea*.

The plants were grown for 42 days on the MS agar supplemented with NaCl, and fresh weights of the upper part of the plants were measured. Values are means of four replicates. ○: Plants not inoculated, ●: inoculated with strain Sal35.

Table 3. Physiological characteristics of the isolates, Sal35 and Sal36, and the similarity of 16S rDNA products to a closest relative.

	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	Sal35	Sal36
PHB accumulation	d	-	-
Fluorescent pigments	-	-	-
Diffusible pigments			
Arginine dihydrolase	d	-	-
Oxidase reaction	+	+	+
Growth at 41 °C	+	+	-
Starch hydrolysis	-	-	-
Reduction of NO ₃ to NO ₂		-	-
Tween 80 hydrolysis	-	-	-
Denitrification	d	-	-
Carbon sources used for growth:			
Glucose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
Fructose	+	+	+
D-Ribose	-	-	-
Malonate	-	-	-
Betaine	+	+	+
Mannitol	-	-	-
L-Malate	+	+	+
β-Hydroxybutyrate	+	+	+
Similarity to 16S rDNA of <i>Pseudomonas</i> sp. R-9		99%	99%

Symbols: +, positive; -, negative; d, differs among strains.

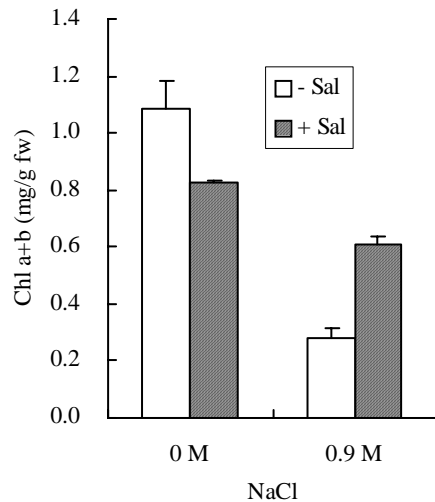


Fig. 2. Effect of NaCl in the MS medium and the inoculation with strain Sal35 on the chlorophyll content of *Salicornia europaea*

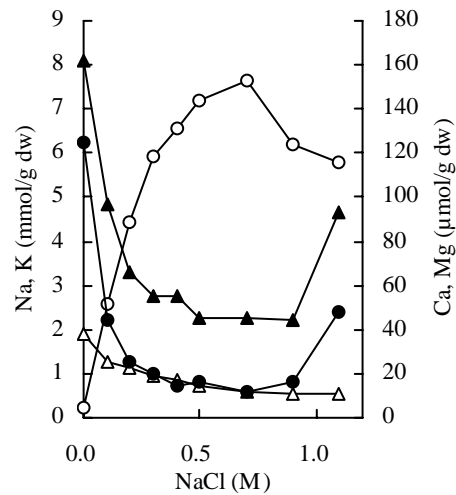


Fig. 3. Effect of NaCl in the culture medium on the concentration of Na, K, Ca, and Mg in *Salicornia europaea* plants.

: Na, : K, : Ca, : Mg

培養液中の Na^+ 濃度の増加に伴って、アッケシソウ体内には Na^+ が多量に蓄積していた (Fig. 3)。このほとんどは液胞内に局在していると考えられるので、細胞質の浸透圧を調節する適合溶質の生産が耐塩性の発現に重要な役割を果たしているであろう¹⁾。0.2 M NaCl を添加して30日間栽培したアッケシソウの地上部には $120 \mu\text{mol/g d.w.}$ のグリシンベタインが検出された。

クロロフィル含量の低下を抑制する効果を示した Sal35 株も、0.5 M の NaCl 含む LB 培地で培養中に洗浄菌体 10^8 細胞あたり 66 nmol のグリシンベタインを生産した。また、菌体抽出液内に未同定の配糖体の存在が確認された。

4. 今後の課題

塩生植物といえども高 Na^+ 処理によって生育障害を受ける。高 Na^+ ストレスによる代謝異常のひとつにクロロフィル合成の阻害がある。本研究の結果、アッケシソウ根圏から分離した好気性窒素固定細菌 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Sal35 株が、高 Na^+ ストレスを受けたアッケシソウのクロロフィル含量の低下を抑制することが明らかとなった。これは植物の耐塩性が異種生物の作用によって促進される可能性を示すものであり、その作用機構の解明が期待される。今後は、Sal35 株によって植物のベタイン合成の発現が促進されることを確認するとともに、その発現促進に関与するシグナル物質の同定を行っていきたい。また、非塩生植物に対しても同様の耐塩性促進効果を示すか検討を加えたい。

謝辞

本研究は、財団法人ソルトサイエンス研究財団による平成16年度研究助成 (No. 0415) により行われたものである。ここに感謝の意を表する。

引用文献

1. McNeil SD, Nuccio ML, Hanson AD 1999: Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.*, **120**, 945-949
2. Shimizu K 2000: Effects of salt treatments on the production and chemical composition of salt wort (*Salicornia herbacea* L.), rhodesgrass and alfalfa. *Jpn. J. Trop. Agr.* **44**:61-67
3. Döbereiner J 1995: Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biotechnology* (ed. Alef K and Nannipieri P), pp. 134-141, Academic Press, London
4. MacGregor AN, Alexander M 1971: Formation of tumor-like structures on legume roots by *Rhizobium*. *J. Bacteriol.*, **105**, 728-732
5. 長谷川武治 編 1985: 微生物の分類と同定, 学会出版センター
6. 竹内正幸、石原愛也、古谷力 編 1972: 植物組織培養, 朝倉書店
7. 植物栄養実験法編集委員会 編 1990: 植物栄養実験法, 博友社
8. Mackinney G 1941: Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **140**, 315
9. Wall JS, Christianson DD, Dimler RJ, Senti FR 1960: Spectrophotometric determination of betaines and other quaternary nitrogen compounds as their periodides. *Analytical Chemistry*, **32**, 870-874

Isolation and Characterization of Rhizobacteria Involved in Enhancement of Salt Tolerance of Halophytes

Takashi Ozawa¹ and Shuhei Fujii²

¹Graduate School of Agriculture and Biological Sciences, Osaka Prefecture University

²Tezukayama College

Summary

A diverse population of microbes lives in a rhizosphere of plant where a various signal substances are transferred between the organisms. Consequential results of the mutual interaction, such as symbiosis and parasitism, significantly affect the plant growth. Halophytes growing in salt marshes also offer good residence in the rhizosphere for microbes to proliferate, and may be influenced by these microbes. We examined in this study the possibility of enhancing salt tolerance of saltwort (*Salicornia europaea*) by nitrogen-fixing rhizobacteria.

Seven, 4, and 1 strains of nitrogen-fixing rhizobacteria were isolated from the roots of saltwort, aster (*Aster tripolum*), and reed (*Phragmites australis*), respectively. These plants grew wild in a previous salt field at Okayama Prefecture, Japan. The homogenate of the excised root was inoculated to a soft agar medium containing 0.5 % malic acid, 0.002 % yeast extract, and 5 % NaCl. From among the bacteria grown in the medium, aerobic nitrogen-fixing bacteria were isolated on LB agar plates. The isolates were classified by physiological characteristics and 16S rRNA gene sequences. One of the isolates from saltwort, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain Sal35, was inoculated to saltwort seedlings on a nutrient agar medium. The inoculation suppressed the decrease of chlorophyll content of the plants grown on the medium supplemented with 0.9 M NaCl. The inoculated plants had a larger amount of glycine betaine than un-inoculated plants. The results in this study suggest that strain Sal35 isolated from the rhizosphere of saltwort may enhance the salt tolerance of the plant by affecting the biosynthetic process of glycine betaine as a compatible solute.