

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19285

研究課題名(和文)送粉昆虫が媒介する微生物の種子感染経路の検証とその適応的意義の解明

研究課題名(英文)Evaluation of infection routes of microorganisms to seeds by pollinator insects and its adaptive significance.

研究代表者

横山 潤(Yokoyama, Jun)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：80272011

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):植物の種子に感染する微生物は、訪花昆虫による水平感染が予測されるが、この可能性は検証されていない。本研究では、開花と閉鎖花を持つ一年生植物を対象として種子内微生物相を調査し、種子に感染する仕組みとして、訪花動物を介した花からの感染経路を検証した。2種の植物について、種子からの微生物の単離・分子同定し、植物の生育に影響する可能性のある微生物が単離された。訪花昆虫から単離した微生物には対象植物の種子から得られた属のものが含まれ、訪花昆虫による伝搬の可能性を示唆した。植物体から種子への感染の過程で、内生微生物の選別がある可能性が示唆された。感染実験を行ったが、発芽が促進される効果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、種レベルまで同一の微生物を種子と訪花昆虫の両方から得ることができなかったが、属レベルで共通の微生物は複数得られ、一定の微生物が訪花昆虫を介して種子に感染する可能性が示されたのではないかと考えている。種子に訪花昆虫によってもたらされる微生物がいる可能性は、植物への微生物感染経路の新しい道筋を示しているとともに、植物にとって生育上利益のある微生物や、逆に不利益な病原性微生物の感染経路としても作用していると考えられるため、今後特に後者の感染経路としての訪花昆虫のコントロールが重要な意味を持つかもしれない。

研究成果の概要(英文):Microorganisms that infect plant seeds are expected to be transmitted horizontally by flower-visiting insects. However this possibility has not been confirmed. In this study, we investigated the microbiota in the seeds of annual plants with chasmogamous and cleistogamous flowers, and verified the infection route from flowers via flower visitors as a mechanism of seed infection.

Microorganisms were isolated from the seeds of two plant species and molecular identification was performed. Microorganisms that may affect plant growth were isolated. The microorganisms isolated from flower-visiting insects included genera obtained from the seeds of the target plants, suggesting the possibility of transmission by flower-visiting insects. It was suggested that endophytic microorganisms may be selected during the infection process from the plant body to the seeds. Infection experiments were performed, but no effect of promoting germination was observed.

研究分野：多様性生物学

キーワード：植物 種子 内生微生物 訪花昆虫 垂直感染 水平感染

1. 研究開始当初の背景

植物には病徴を示さずに内生する微生物が存在し、植物の成長促進やストレス耐性付与に関わる共生生物として、菌根菌や窒素固定バクテリアなどの古典的な植物共生者と比肩する無視できない存在となっている。これらの微生物のほとんどは、菌根菌や窒素固定バクテリアのように植物に水平感染すると考えられてきた (Bright and Bulgheresi (2010) Nature Review Microbiology 8: 218-230) が、近年は広範囲の微生物が種子を介して植物に垂直感染する可能性が指摘されている。種子感染性微生物は特に作物で注目され、成長促進、病害抵抗性などの観点から盛んに研究されている (Shahzad et al. (2018) Frontiers in Plant Science 9: art24)。一方、野生植物における微生物の垂直感染はあまり注目されてこなかったが、報告例も出てきており (Hodgson et al. (2014) Ecology and Evolution 4: 1199-1208 など) 申請者もエンドファイトに関する研究の過程で、一定の割合で存在することを確認している (後述)。最近では遺伝子型特異的病原体 (Eck et al. (2019), PNAS 116: 7371-7376) や土壌微生物の遺産効果 (Bakker et al. (2018) Cell 172: 1178-1180) の存在が明らかになり、これらとの関連性においても種子感染性微生物は重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、野生植物における種子感染性微生物の実態と、植物・微生物双方における適応的意義については、ほとんど分かっていないのが現状である。

親個体からの垂直感染以外の種子への微生物感染経路として、花が重要なインターフェースとして機能している可能性がある。花に存在する微生物についても近年情報が集積してきており (牧野・横山 (2014) 日本生態学会誌 64: 101-115) 極めて高浸透圧の環境である花蜜中などに生活し、送粉動物によって移動する特殊な微生物群集を形成している。一方、種子内も形成過程では糖が集積し、成熟に向けて水分が失われることから、一時的ではあるが高浸透圧環境になる。この環境の類似は、花に感染する微生物の種子への感染を想起させる。実際にインゲンマメでは、芽生えのエンドファイトの約半数が花蜜に優占する真菌 (*Aureobasidium pullulans*) であった (Parsa et al. (2016) Fungal Biology 120: 783-790)。つまり、種子に感染する微生物には、送粉動物を媒介されるものも豊富に存在することになり、この解明なくして、その全体像は解明できない。

2. 研究の目的

本研究では、野生植物の種子に感染する新たな微生物をリクルートする仕組みとして、送粉動物を介した花からの感染経路を検証することを目的とした。自然界で微生物が種子に感染するルートとしての花の効果は、野生植物においては全く調べられていない。さらに、送粉昆虫の効果については、上述のようにそのことを想定させる事実があるにも関わらず、これもまた検討されていないのが現状である。本研究では、閉鎖花をつける一年生植物を研究対象として、花から種子への微生物感染を検証するシステムを提案する。閉鎖花をつける一年生植物を材料に選択したのは、同じ個体内で送粉昆虫の影響がある花(およびそれ由来のの種子)と影響のない花(およびそれ由来のの種子)を得ることができるからである。これらを用いたシステムの有効性を検証するとともに、野生植物における種子感染性微生物の生態的役割についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、野生植物の種子に感染している微生物相の解析、訪花昆虫に感染している微生物相の解析、感染実験による種子感染微生物相への訪花昆虫の効果の検証、感染実験による植物の成長に与える微生物の効果の検証、を行った。対象植物として、(i) 広域に分布し、(ii) 変動性の高い環境に生育し、(iii) 送粉昆虫の影響の差が出ると想定される開放花と閉鎖花の両方を咲かせる、(iv) 世代時間の短い植物、が好適である。これらの条件を満たす植物として、コナギ (*Monochoria vaginalis* (Burm.f.) C.Presl ex Kunth, 単子葉類ミズアオイ科) とヤハズソウ (*Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl., 真正双子葉類マメ科) を用いた。特に前者については、山形大学農学部の水田(自然共生水田: 中耕除草のみを行い、無施肥・無農薬で耕作を行っている)に長年に渡って本種集団が無農薬の状態維持されているため、これを用いて研究を行った。

まず、両種の種子・花粉(開放花・閉鎖花)から培養可能微生物(バクテリア・真菌類)を単離し、分子同定を行った。開放花に訪花する昆虫の調査も行い、採集した訪花昆虫の体表面に存在する微生物も単離・同定する。採集した植物を洗浄後、果実の表面殺菌を行った。表面殺菌した果実から種子を取り出し、破碎したものを滅菌水で懸濁し、それを培地に撒布して培養した。コロニーが生じたら、新しい培地に移して培養し、単離株を得た。訪花昆虫の体表面微生物の培養については、訪花昆虫の体表面を滅菌水で洗浄し、その液を培地に撒布した。あとは、種子内微生物の単離と同様にして単離株を得た。得られた単離株から DNA を抽出し、PCR 法でバクテリアについては 16S rRNA 遺伝子の部分配列を、真菌類については核 rDNA の ITS 領域を増幅した。その後、塩基配列を決定して BLAST 検索による分子同定を行った。

同時に、次世代シーケンサによるメタゲノム解析を合わせて行い、植物に感染している微生物

を網羅的に調査して、種子の微生物相への影響を評価した。

ついで、植物に対する感染実験を以下のように計画した。単離した微生物を開放花に感染させ、同時に自家受粉を行って種子を得る。得られた種子を培地上で一定期間培養し、供試菌類が感染しているか否かを解析する。感染が確認された場合、さらに培養を継続して、送粉昆虫由来の微生物が植物の成長に影響するか否かを、感染させた微生物によるバイオマスの違いを調査することによって検証することを計画した。

4. 研究成果

(1) コナギ、ヤハズソウの開放花・閉鎖花の識別

本研究の材料は開放花の閉鎖花の両方を咲かせることを基準にして選択している。それぞれの種について、野外試料における開放花の閉鎖花の区別の可否について検討した。コナギは研究開始当初は野外試料の果実からでは開放花の閉鎖花の区別はできなかった。そのため、以下の(2)では両方を区別せずに単離を開始した。その後実験温室等で栽培を行い、開放花と閉鎖花を区別することにしたが、栽培環境下では閉鎖花が著しく多く、開放花はそのままでは結実しないことも多かった。開花後の果実の発育過程は、開放花と閉鎖花で差が認められなかった。ヤハズソウは、各節に通常1個の開放花と複数の閉鎖花をつける。開放花の花柄は一般に閉鎖花より長いいため、開花後も識別可能であることがわかった。しかし、一部の閉鎖花も長い花柄を持つことがあるため、区別して種子を採取する際にはラベルを付して区別した。

(2) コナギの種子に感染する微生物相の解析

コナギについては、山形県内の2箇所(上市市と鶴岡市)に生育するコナギの訪花昆虫体表面と種子内に存在する微生物を同定した。コナギ種子のサンプリングは、山形県の上市市と鶴岡市の山形大学農学部高坂農場で行った。上市市では慣行栽培水田の水路から採集し、鶴岡市では上述のように農場内の無農薬栽培を継続している水田のものを採集した。その結果、上山集団の種子からは24属のバクテリアが、鶴岡集団の種子からは9属のバクテリアが、それぞれ得られた。鶴岡の種子では、同定されたバクテリアの約半数が *Pseudomonas* で占められていた。上山の種子からは *Paenibacillus* と *Sanguibacter* が相対的に多く得られた一方、鶴岡の種子からは、*Mycolicibacterium*、*Priestia* が相対的に多く得られた。両集団のコナギ種子から共通して得られたのは、*Pseudomonas*、*Yersinia*、*Rahnella*、*Pedobacter*、*Burkholderia* の5属のバクテリアであった。

これらのバクテリアを含めて、単離されたバクテリアの生態的特性を比較すると、2地点で共通して得られた *Pedobacter* や *Yersinia* は、水中に広く存在することが知られており、水生植物であるコナギの生育環境と関連していると考えられる。一方、これらのバクテリアは植物と関連しているという報告はあまり見られないので、今回の単離結果の解釈は慎重に行うべきである。残りの3属 (*Pseudomonas*、*Rahnella*、*Burkholderia*) を含め、植物と関連する種を含むことが知られているバクテリアの属は6属 (*Burkholderia*、*Sanguibacter*、*Paenibacillus*、*Priestia*、*Pseudomonas*、*Rahnella*) 同定されたので、これらについては系統解析を行ってさらに詳しい同定を行った。上山の種子から得られたのは *Sanguibacter inulinus*、*Paenibacillus macquariensis* と同定された。*S. inulinus* は難溶性リンの可溶化によって植物に無機養分を供給するという観点で、植物に有益な作用を持っている (Amy et al. 2022)。*P. macquariensis* は、好冷性植物病原菌の菌糸成長および菌糸生産を阻害し、植物病原菌の抵抗性に繋がっているという知見がある (Hoshino et al. 2009)。一方、鶴岡市の種子から得られたのは *Pseudomonas koreensis*、*Priestia megaterium*、*Priestia aryabhatai* に近縁な種であると同定された。*P. koreensis* はインドール酢酸やシデロフォアなどを生産する能力があり、植物の成長を促進することが報告されている (Guo et al. 2020)。*P. megaterium* は単独では植物に直接影響を与えないが、植物の成長に有益な真菌と共感染することで植物の成長に影響することが知られている (Hohmann et al. 2020)。*P. aryabhatai* は(塩ストレス下ではあるが) *P. koreensis* と同様にインドール酢酸を生産する能力を持つバクテリアである (Maria et al. 2022)。さらに、両地点の種子から共通して得られたものとして *Rahnella aquatilis*、*Burkholderia contaminans*、*Pseudomonas tolaasii* が同定された。*R. aquatilis* は *Rahnella* とされたバクテリアのほとんどが本種と同定されたもので、難溶性リンの可溶化やインドール酢酸生産など、植物の成長に影響する可能性がある性質を持っている (Guo et al. 2012; He et al. 2013)。*B. contaminans* は植物に対する抗菌作用や成長促進作用がある可能性がある (Tagele et al. 2018)。*P. tolaasii* は植物の成長を促進する作用が存在することが報告されている (Adhikari et al. 2001)。このように、コナギ種子からは植物の成長に影響を与えるさまざまなバクテリアが同定された。

一方、次世代シーケンサーを用いたバクテリアのメタバーコーディングを鶴岡集団について実施し、その結果16,506リードが得られた。これらから583のアンプリコンシーケンズバリアント (ASVs) が同定され、数多く検出された属は *Janthinobacterium* (28.9%)、*Pseudomonas* (17.3%)、*Rhodoferrax* (11.8%)、*Oxalobacteraceae* gen. (7.0%)、*Rubrivivax* (5.0%)、*Flavobacterium* (4.7%) などであった。単離法と同定精度が異なるため一概に比較できない部分があるが、2つの手法で共通して得られた属は *Pseudomonas*、*Flavobacterium*、*Agrobacterium* (1.2%)、*Paenibacillus* (0.1%) のみで、いずれの属も今回単離法で同定された種そのものは得られなかった。植物体から種子への感染の過程で、特定のバクテリアへの選抜が起きているか、種子特有の感染経路が存在していることを示唆している。また、優占して得られ

た属のうち、*Rubrivivax* 以外は土壌中からも極めて低頻度でしか得られておらず、植物体中存在しているバクテリアにも、環境からの感染の過程で強い選抜が生じていると考えられる。

(3) コナギの訪花昆虫に感染している微生物相の解析

コナギの訪花昆虫については、種子内微生物相の解析と同様に、山形県内の2箇所(上山市と鶴岡市)で観察と採集を行った。いずれの集団でも、ヒメヒラタアブ属(*Sphaerophoria*)の昆虫が訪花昆虫として採集された。これらの体表面の微生物相を解析すると、上山集団からは *Curtobacterium*, *Staphylococcus*, *Microbacterium* など7属のバクテリアと *Aureobasidium*, *Verticillium* など6属の真菌類が、鶴岡集団からは *Agrobacterium*, *Pseudomonas* など5属のバクテリアと2属の真菌類(*Aureobasidium*と *Penicillium*) が得られた。2集団の訪花昆虫間で共通の微生物はバクテリアでは *Agrobacterium*, 真菌類では *Aureobasidium* と *Penicillium* であった。訪花昆虫と種子で共通して得られたバクテリアは *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Microbacterium* であった。これらのバクテリアについて系統解析を行い、より詳細な同定を行ったところ、上山市の訪花昆虫から得られた *Microbacterium* は *M. testaceum*、鶴岡市の訪花昆虫から得られた *Pseudomonas* 属は *P. scedrina*、*Agrobacterium* 属は *A. larrymoorei* と同定された。*M. testaceum* は植物の内生微生物として同定されている一方(Midha et al. 2016)、*A. larrymoorei* と *P. cedrina* は植物病原性バクテリアとして知られている(Bouzar and Jones 2001)。訪花昆虫から得られた *Curtobacterium*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, 真菌類の *Verticillium* も植物病原性の種が報告されており、訪花昆虫の体表面には、植物にとっては病原性を示す可能性のある微生物が多く認められることがわかった。また、両集団で *Aureobasidium pullulans* が同定されたが、本種は花や蜜内に存在する主要な真菌類であることが知られており(牧野・横山 2014)。これらが訪花昆虫を介して感染する可能性が考えられる。

種子と訪花昆虫の両方から共通して単離されたバクテリアの属のうち、種レベルまで共通のものは認められなかった。したがって訪花昆虫が種子微生物の供給源の一つとなっていることを直接示す証拠は得られなかった。一方、上述のように共通属は複数検出され、訪花昆虫が種子微生物を伝播する可能性はまだ残されているのではないかと考えられる。本研究ではコナギの送粉昆虫として小型のハナバチ類を想定していたが、それらのサンプルは一連の調査で得られなかった。想定された送粉昆虫が得られれば、種レベルで共通の微生物も検出できたかもしれないので、今後さらに送粉昆虫の解析例を増やしていく必要がある。

(4) ヤハズソウの種子に感染する微生物相の解析

ヤハズソウについては、山形県上山市に自生する集団を用いて解析した。(1)に述べたように、採集の際には開花した開放花にラベルを付して、その節のその他の果実を閉鎖花と判断し、果実を採取した。種子内部に存在する培養可能なバクテリアが少ないのか、滅菌種子から単離できない場合が多かった。結果として、*Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Kosakonia*, *Pantoea* の4属が単離された。開放花と閉鎖花で単離されたバクテリアの相が異なっていたが、単離例数が多くないため明確な傾向かどうかは不明である。

(5) コナギ種子の発芽と生育に与える種子内微生物の影響

栽培条件下で開放花を十分得ることができなかったため、まずはコナギの滅菌済み種子に、(2)で得られた微生物を感染させ、その後の成長を見て種子内微生物の効果を検証しようとした。実験には、単離された種子内微生物のうち、*Sphingomonas echinoides*, *Pseudomonas fragi*, *Rahnella aquatilis*, および *Yersinia enterocolitica* の4種のバクテリアを感染させて、種子発芽やその後の成長にどのように影響するかを検討しようとした。しかし、感染実験によって種子の発芽が促進されるなどの効果は認められなかった。今後は感染実験系の見直しを行うとともに、本来実施予定であった花を介した感染実験系の確立を、引き続き目指していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田マリン・星山美樹・横山 潤
2. 発表標題 メドハギおよびネコハギ（マメ科ハギ属）の根粒内バクテリア相：Bradyrhizobium属に対する特異性の種間比較
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会（京都）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 館林 融・藤田マリン・横山 潤
2. 発表標題 コナギ（ミズアオイ科）種子内の微生物相の解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会（京都）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本祐司・横山 潤
2. 発表標題 イヌガヤとハイイヌガヤ（イチイ科）の培養可能な真菌エンドファイト組成の比較
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会（京都）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田マリン・星山美樹・横山 潤
2. 発表標題 マメ科ハギ属2種（メドハギ・ネコハギ）のBradyrhizobium属根粒菌に対する特異性の種間比較
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会（宮城）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 館林 融・藤田マリン・横山 潤
2. 発表標題 コナギ（ミズアオイ科）の種子内に存在する微生物相の地点間比較
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会（宮城）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fujita, Marin, Hoshiyama, Miki, Yokoyama, Jun
2. 発表標題 Analyses of rhizobial communities in root nodules of Japanese species of section Junceae (genus Lespedeza, Fabaceae).
3. 学会等名 BOTANY 2021 (virtual), Botanical Society of America (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田マリン・星山美樹・横山 潤
2. 発表標題 ハギ属メドハギ類の根粒内バクテリア相：Bradyrhizobium属のグループ構成の宿主間比較
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田マリン・星山美樹・横山 潤
2. 発表標題 ハギ属メドハギ類から得られた根粒内バクテリア：Bradyrhizobium属2グループ存在比の種間比較
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会（福島 + オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 館林 融・藤田マリン・横山 潤
2. 発表標題 コナギ（ミズアオイ科）の訪花昆虫の体表面に付着する微生物相の解析
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会（福島 + オンライン）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関