

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19225

研究課題名（和文）微生物の匂い成分を用いた植物倍速栽培技術の開発

研究課題名（英文）Acceleration of plant cultivation by using microbial smelling compounds

研究代表者

上田 晃弘（Ueda, Akihiro）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・教授

研究者番号：10578248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物生育促進作用を持つ微生物由来揮発性物質を同定し、その揮発性物質を用いて植物の生長を促進させる技術開発を行った。これまでに研究が進んでいない、植物-微生物間接的相互作用に着目して、植物と微生物を閉鎖系容器内で隔離共培養することにより植物生育促進微生物の選抜と、これらの微生物から放出される揮発性物質の同定をガスクロマトグラフ-質量分析器を用いて行った。その結果、植物の生長を促進する複数の微生物由来揮発性物質の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、植物の生育を促進できる微生物由来の揮発性物質の同定を行った。これまでの植物生育促進細菌の単離方法は、微生物を植物に直接接種する方法が主流であったが、本研究では互いに接触しないように培養して間接的相互作用の中から、微生物由来の新規な植物生育促進物質の同定に成功した。植物の生育促進作用を持つ微生物由来揮発性物質は今後、新規な植物生長調節剤として植物栽培への応用できると期待される。一方で、微生物由来揮発性物質がどのようにして植物の生長を促進するのかのメカニズムについてはまだ未解明であるため、今後はその作用機序を明らかにする必要がある。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to isolate microbial volatile organic compounds having the ability to promote plant growth and develop novel techniques to accelerate plant growth by using microbial volatile organic compounds. By focusing on indirect interactions between plants and microbes which have not been studied well, plant growth promoting microbes were screened by using co-cultivation systems in a two section split petri-dish. Gas chromatography mass spectrometer analysis successfully identified microbial volatile organic compounds that can promote plant growth.

研究分野：環境微生物学、植物栄養学

キーワード：植物生育促進微生物 植物生長調節剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物はその一生を微生物との相互作用の下で過ごす。水溶性化合物(共生や病原性因子等)の授受を介した植物-微生物間の直接的相互作用については、共生・病原性微生物を用いた研究事例が多く報告されている。一方、植物-微生物間の間接的相互作用の研究事例は乏しく、その分子機構はほとんど不明である。近年、植物や微生物が放出する揮発性物質が植物-微生物間の間接的相互作用の鍵物質であることが明らかとなってきた。微生物が発する揮発性物質には、植物生理に影響を与える物質が存在すると考えられている(上田ら, 2019)。植物や微生物が発する揮発性物質の分子実体を同定することや揮発性物質が持つ自身や他生物種への影響を調べることは、植物-微生物間接的相互作用機構の理解やなぜ生物が揮発性物質を放出するのかの意義を理解することにつながる。

### 2. 研究の目的

本研究では、植物-微生物間接的相互作用系を基軸として、植物生育促進作用を持つ微生物由来の揮発性物質を同定し、その揮発性物質を用いた植物の倍速栽培技術開発の素地を作ることを目的とした。間接的相互作用の検出には、閉鎖系容器内で植物と微生物が接触しないように培養(隔離共培養)することで、互いが放出する揮発性物質のみが作用する栽培系を用いた。植物-微生物間接的相互作用検出系を用いて、植物の生育を促進する微生物の選抜やその微生物種の同定、微生物由来の揮発性物質の定性分析、揮発性物質を用いた植物栽培試験を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物生育促進微生物の選抜

日本国内の様々な土壌や水、植物サンプルから環境微生物の単離を行った。細菌類の単離には LB 培地、真菌類の単離にはクロラムフェニコール入り PDA 培地を使用した。培地上で形成されたシングルコロニーについては、液体培養が可能な場合には 15% (v/v) グリセロールストックを作成して -80°C 超低温冷凍庫内保存し、それ以外の微生物については 2 mL チューブ内に作成したスタブで常温保存した。

植物生育促進微生物の選抜には、2 分割シャーレを用いた閉鎖容器内での植物(シロイヌナズナ)と微生物を 23°C、連続光照射下(光強度 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )で 2 週間の隔離共培養を行った(図 1)。片側にシロイヌナズナ用の 1/2 濃度の MS 培地、反対側に細菌用の LB 培地や酵母用の YPD (一部の YPD 培地には malt extract を添加)を作成して、それぞれ培養した。微生物非接種時のシロイヌナズナの生育量(乾物重量)を基準として、シロイヌナズナの乾物重量を増加させる酵母の選抜を行った。MS 培地上にはシロイヌナズナを 10 個体生育させ、平均的は 5 個体をサンプリングし、70°C で 72 時間以上通風乾燥させてから乾物重量を測定した。微生物種の同定は 16s rDNA 配列あるいは ITS1 配列解析により行った。

#### (2) GC-MS による揮発性物質の定性分析

植物生育促進作用を持つ微生物由来の揮発性物質はガスクロマトグラフ-質量分析器(GC-MS、Gas Chromatography-Mass Spectrometry)による定性分析を行った。100 mL 容三角フラスコに 20 mL LB あるいは YPD 液体培地を作成して、30°C、150 rpm で微生物の培養を 24 時間行った。24 時間後、三角フラスコ内上部の気相を固相マイクロ抽出法(SPME、Solid Phase Micro Extraction)により捕集濃縮して、GC-MS による定性分析を行った。

#### (3) 揮発性物質を用いた植物の栽培

2 分割シャーレを用いた閉鎖容器内での片側でシロイヌナズナ、反対側に各種の揮発性物質をしみこませた 1  $\text{cm}^2$  のろ紙を設置し、上記(1)と同様にシロイヌナズナの生育量を評価した。

### 4. 研究成果

環境中から単離した 1,000 株の微生物を用いて、2 分割シャーレを用いた閉鎖容器内でシロイヌナズナとの隔離共培養を行い、各微生物が持つシロイヌナズナへの間接的作用の影響を調査した。微生物を接種しなかった場合のシロイヌナズナ地上部の生育量(乾燥重量)を 1 とした際の各微生物接種時のシロイヌナズナの乾物重量の比を図 2 に示した。一次選抜の結果、135 種類の微生物がシロイヌナズナの生育量を 1.5 倍以上に増加させた一方で、253 種類の細菌がシロイ

ヌナズナの生育量を 0.5 倍以下に減少させた。このことは植物と微生物は離れていても作用することが明らかとなった。今回の研究では微生物の生育がシロイヌナズナよりも早かったため、微生物からの間接的な影響がシロイヌナズナの生育に影響を与えるが顕著であった。

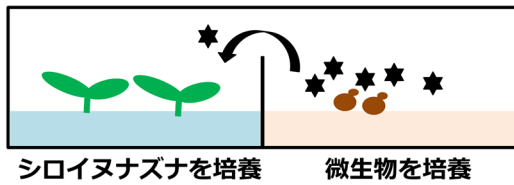


図 1 . 植物 - 微生物間接的相互作用の検出系。2 分割シャーレ内の片側で 1/2 濃度の MS (Murashige Skoog) 培地上にシロイヌナズナ、反対側で LB 培地あるいは YPD 培地上に微生物を生育させる (上田ら, 2019)。

一次選抜でシロイヌナズナの生育促進能を持つ微生物について、二次選抜を行うことでその再現性の検証を行った。その結果、46 種類の微生物がシロイヌナズナの生育を促進することが確認された。PCR による微生物種の同定の結果、これらは *Acinetobacter calcoaceticus* や *Batillus subtilis*、*Pseudomonas synxantha* などの細菌のほか、*Saccharomyces turicensis* のような酵母が含まれており、これまでに植物生育促進能を持つことが明らかになっていない微生物群を単離することができた。

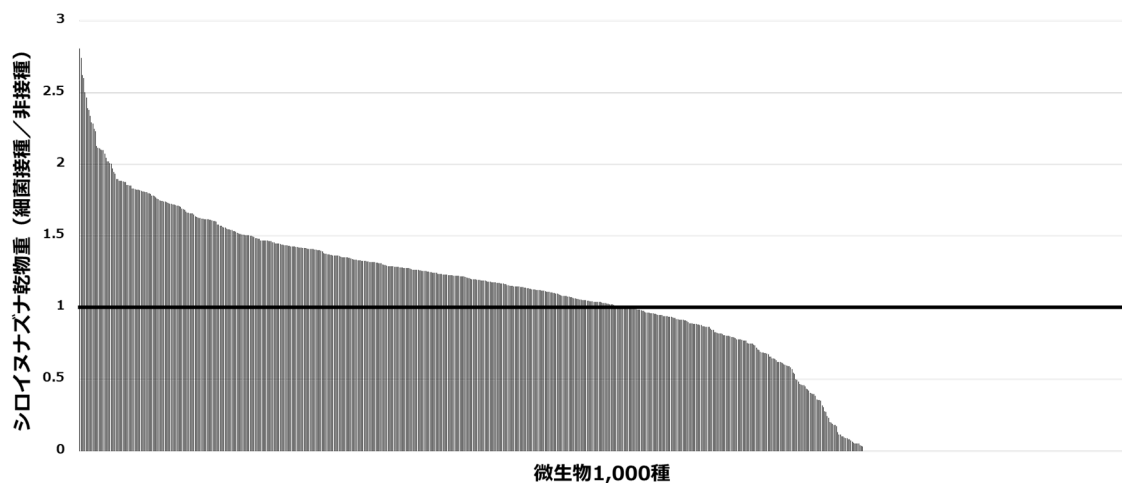
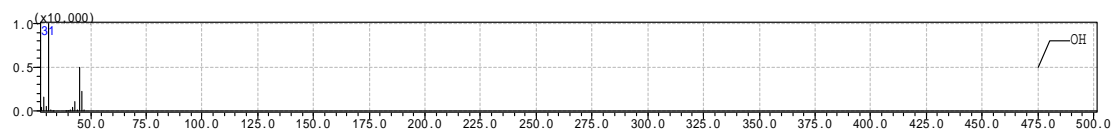
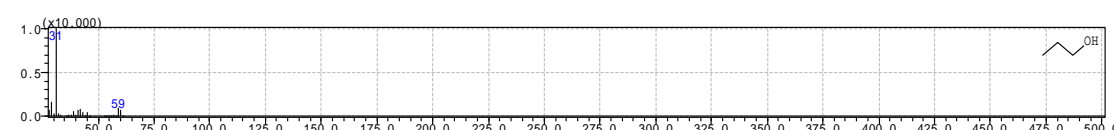


図 2 . 微生物 1,000 種が持つシロイヌナズナの生育への間接的な影響。微生物非接種時のシロイヌナズナの生育量を 1 とした際の、それぞれの微生物種の影響を相対値で示した。

(A) エタノール (分子量 46 分子式  $C_2H_6O$ )



(B) 1-プロパノール (分子量 60 分子式  $C_3H_8O$ )



(C) ジメチルジスルフィド (分子量 94 分子式  $C_2H_6S_2$ )

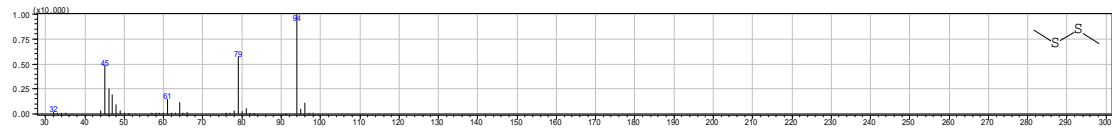


図3 . 植物生育促進酵母から放出されたガス状物質の GC-MS による定性分析。( A ) エタノール、( B ) 1-プロパノール、( C ) ジメチルジスルフィドのマススペクトル、分子量、分子式を示す。

シロイヌナズナの生育を間接的に促進させた微生物種のうち、数種類を用いて微生物由来の揮発性物質の分析を行った。三角フラスコ内で液体培養を行い、フラスコ内の気相部分に蓄積した揮発性物質を SPME により捕集濃縮して GC-MS による定性分析に供試した。その結果、エタノールや 1-プロパノール、ジメチルジスルフィドなどの物質が同定された。検出された微生物由来揮発性物質を用いてシロイヌナズナの栽培試験を行ったところ、いくつかの物質については生育促進効果が認められたことから、将来的に植物の生長を促進させる新規な植物生長調節剤として利用できる可能性が本研究により示された。

< 引用文献 >

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.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三輪佳蓮、棚林榛奈、柳井麻希、那須久瑠光、近藤もも、上田晃弘
2. 発表標題 間接的相互作用により植物の生育を促進させる微生物の単離
3. 学会等名 第118回日本土壌肥料学会関西支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 那須久瑠光, 三輪佳蓮, 上田晃弘
2. 発表標題 植物の生長を制御する微生物由来揮発性物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第64 回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akihiro Ueda, Karen Miwa, Kristine Mae Yu Bentoy, Theint Thida, Yuichiro Kubo, Momo Kondo, Hisashi Omura
2. 発表標題 Plant growth promotion through indirect interaction between plants and microbes
3. 学会等名 Taiwan Japan Plant Biology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三輪佳蓮、那須久瑠光、久保裕一朗、上田晃弘
2. 発表標題 植物の塩アルカリ害を軽減する微生物の探索
3. 学会等名 第119回日本土壌肥料学会関西支部講演会
4. 発表年 2023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
---------	---------