

Pilar, P., E. Schilirò., M. M. Maldonado-González., R. Valderrama.,
J. B. Barroso-Albarracín., J. Mercado-Blanco (2011)

Roots hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots
by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity

Microb Ecol. **62**: 435-445

オリーブの根毛は *Pseudomonas* spp. による根の内部への定着において
重要な役割を果たす

土壌伝播性の植物病原体に対し、根に内在している細菌 (内生細菌) の利用は植物の疾病防除において、環境に配慮した生態学的効率の良い手法とされる。自生するオリーブの根毛に付着するグラム陰性桿菌 *Pseudomonas fluorescens* PICF7 株および *P. putida* PICP2 株は、糸状菌 *Verticillium dahliae* による半身萎凋病に対して、効率的な生物学的防除効果があると考えられている。これまで宿主である植物を対象とした研究が進んでいるが、細菌を対象とした研究は少ない。そこで本研究は、上記2種の細菌を用いてオリーブの根に最も早く定着する種を明らかにし、内部共生を始めるのに適した部位を解明することと、オリーブの根に定着する時に2種間で起きる種間競争を見出すこと、これらの細菌とオリーブの相互作用を調べるための実験方法の適合性を検証することを目的とした。

実験には、高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP) マーカーおよび、赤色蛍光タンパク質 (RFP) マーカーの2種類の蛍光タンパク質で標識した *P. fluorescens* PICF7 株と *P. putida* PICP2 株、および研究室にて無菌条件で育てたオリーブを用いた。オリーブは無菌の種を MS 培地で室温 13°C の暗条件で 15 日間かけて発芽させ、室温 25°C で 16L : 8D 明暗周期で 8 週間育てた後、DKW-2 培地に移し、その後同じ条件でさらに 6 週間育てた。EGFP 標識した *P. fluorescens* PICF7 株溶液および EGFP 標識した *P. putida* PICP2 株溶液をそれぞれ 25 本のオリーブに 15 分間浸し、その後寒天培地で室温 25°C、湿度 60-80%、光条件 16L : 8D 明暗周期で生育した。また、10 mM MgSO₄·7H₂O に 15 分間浸したオリーブを 15 本それぞれ用意し、自家蛍光をチェックした。オリーブの根に細菌が定着する過程は共焦点レーザー顕微鏡を用いて、オリーブの根に付着する *Pseudomonas* spp. を観察した。次に、RFP 標識した *P. fluorescens* PICF7 株と EGFP 標識した *P. fluorescens* PICF7 株の混合溶液、および RFP 標識した *P. fluorescens* PICF7 株と EGFP 標識した *P. putida* PICP2 株の混合溶液を用意し、それぞれ 15 本のオリーブに 15 分間浸しその後寒天培地で室温 25°C、湿度 60-80%、16L : 8D 明暗周期で生育させた。EGFP 標識した *P. fluorescens* PICF7 株を 10 本、10 mM MgSO₄·7H₂O に 15 分間浸したオリーブを 5 本それぞれ用意し、定着過程における細菌相互作用を検証するため、同様に共焦点レーザー顕微鏡を用いて、オリーブの根に付着する *Pseudomonas* spp. を観察した。

細菌 *P. fluorescens* PICF7 株および *P. putida* PICP2 株について、根の組織表面および内部への侵入の可視化により、2種の細菌は種間競争を避けている可能性があること、生物防除効果を持つ2種の細菌が同時にオリーブの根組織の内部に定着することが出来ることが判った。また、*Pseudomonas* spp. が根毛内部への付着の中心的役割を担っているということが示唆された。しかし細菌の根毛への付着は特異性の高い事であり、効率的に根毛に *P. fluorescens* PICF7 株および *P. putida* PICP2 株が付着することは稀であった。また、PICF7 株および PICP2 株は同時に同じ根に定着することができ、先に付着した細菌は後の細菌の付着および根内部への侵入を妨げることはなかった。多くの環境要因が根毛の数、組織構造、植物の発達に影響を与えるため、生物学的防除に有効な細菌の対象植物への定着能力と疾病防除効果の効率に対し、根毛の適合性は大きな影響を与えることが解った。今後はオリーブだけでなく他の植物において、内部に細菌が同様に定着するかについて検証する必要がある。

宮下 洋平