

カラマツ-ハナイグチ共生系における根圏バクテリア接種の影響

Effects of inoculation with rhizosphere bacteria in the *Larix kaempferi* -*Suillus grevillei* symbiont白川誠^{*1}・上原巖^{*2}・田中恵^{*2}Makoto SHIRAKAWA^{*1}, Iwao UEHARA^{*2} and Megumi TANAKA^{*2}

*1 東京農業大学大学院農学研究科

Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture

*2 東京農業大学地域環境科学部

Faculty of Regional Environment Sci., Tokyo Univ. of Agriculture

要旨：植物の根圏に特異的に生息するバクテリアを根圏バクテリアと呼ぶ。これらは、根圏土壌と根端で優占種が異なり、宿主植物や共生する菌根菌に対して様々な影響を及ぼすことが考えられる。本研究ではカラマツとハナイグチによる共生系に対して根圏バクテリアが及ぼす影響について明らかにするために、野外カラマツ根圏土壌由来バクテリアを用いた接種試験を行った。加えて、ハナイグチの菌糸成長を促進、または抑制するバクテリア株を特定するために根圏土壌と根端からバクテリアを選出し、*in vitro* でハナイグチとの二員培養を行った。接種試験では地下部乾重量において処理区間の有意差が認められ、ハナイグチと根圏バクテリアがそれぞれカラマツ実生の成長を促進する傾向が見られた。二員培養ではバクテリア株ごとに異なる菌叢の発達が見られ、特にカラマツ根端由来の *Burkholderia* 2 株、*Ralstonia*, *Rhizobium* がハナイグチの菌糸成長を有意に抑制した。二つの試験から、バクテリアは根圏における極めて小さな生息箇所の違いにより、カラマツ-ハナイグチ共生系に対して異なる影響を及ぼすことが示唆された。

キーワード：外生菌根菌・根圏バクテリア・接種試験・二員培養・ハナイグチ

Abstract: “Rhizobacteria” is the bacteria that inhabiting specifically in plant rhizosphere. They have different dominant species in bulk soil and rhizosphere, it seems that a variety of effects on the host plant and mycorrhizal fungi. In this study, to clarify the effects of rhizosphere bacterial inoculation in *Larix kaempferi* -*Suillus grevillei* symbiont, inoculation test was conducted using rhizosphere soil isolated from planted *L. kaempferi*. In addition, coculture experiment was carried out *in vitro* to identify the bacterial strain that promote or inhibit the mycelial growth of *S.grevillei*. In the inoculation test, rhizosphere soil-derived bacteria and *S. grevillei* significantly affect root dry weight of seedlings of *L. kaempferi* respectively. Moreover, a root tip-derived bacteria, significantly suppressed the mycelial growth of *S.grevillei* in coculture experiment. Results suggested that bacteria have different effects depending on each habitat in the rhizosphere.

Key-word: ectomycorrhizal fungi, rhizobacteria, inoculation test, coculture experiment, *Suillus grevillei*

I はじめに

植物の根に感染し、菌根と呼ばれる共生体を形成する真菌類の中で、マツ科やブナ科などの樹木と共生関係を結ぶものを特に外生菌根菌と呼ぶ。菌根の形成により、宿主樹木は窒素、リン、カリウムといった無機養分の吸収能の向上や、乾燥や寒さへの耐性を得ることが知られている(2, 5, 6)。また、植物根圏には多様なバクテリアが生息している。こうしたバクテリアは根面や、根面に付着する土壌(根圏土壌)に存在しており、窒素固定細菌に見られる根粒のような緊密な共生関係を持たない(12)ことから、宿主とはいわば「緩い」共生関係にあるといえる。

根圏バクテリアの中には菌根菌の菌糸成長を促進することで宿主の成長に寄与するものも存在し、それらは菌根ヘルパーバクテリア(MHB)と呼ばれる(4)。したがって、外生菌根菌を用いた接種試験において、菌根菌の接種効果を検討する際には根圏バクテリアの影響を考慮に入れる必要がある。

日本においてスギ・ヒノキに次ぐ造林樹種であるカラマツ(*Larix kaempferi*)は外生菌根菌の接種により成長が向上することが示されている(7, 9)。カラマツ根圏のバクテリア相は根圏土壌と根端で優占種が異なることが示されている(11)が、それらが宿主植物及び菌根菌に及ぼ

す影響や、バクテリア相が採取部位により異なる理由、根端への定着の過程については明らかになっていない。

本研究では、カラマツに対する接種効果が示されている(7)が、根圏バクテリアによる影響と合わせて行われた研究例がないハナイグチ (*Suillus grevillei*) との共生系を用いて二種類の実験を行った。まず、上記の共生系に野外カラマツ成木から採取した根圏土壌を用いた接種試験を行い、カラマツの実生成長に根圏土壌由来のバクテリアが与える影響について調べた。加えて、接種した根圏土壌と供試実生根端のバクテリア相を調べることで接種試験後の根端における優占種と、根圏土壌由来のバクテリアが根端へ定着する可能性について検討した。また、菌根菌の菌糸成長に対して影響を及ぼすバクテリアを特定するために、*in vitro* においてハナイグチと根圏バクテリアによる二員培養を行い、ハナイグチの菌叢の変化を直接的に観察した。

II 材料と方法

1. 接種試験

1. 1. 培土 芝の目土、黒土、川砂を2:1:1で混ぜ合わせ、121°C20分で滅菌したものを使用した。

1. 2. カラマツ実生 吸水処理及び有効塩素濃度1%のNaClOによる表面殺菌処理を10分間行ったカラマツ種子を播種し、滅菌培土で75日間培養したものを使用した。

1. 3. ハナイグチ 1/2MMN 培地で20°C39日間前培養し、接種試験に用いた。

1. 4. 根圏土壌 東京農業大学奥多摩演習林内の40年生カラマツ成木10本から岡島・松中(8)の手法を用いて計5gの根圏土壌を採取した。採取した土壌に純水50mlを加えて30分間振とうした後、雑菌によるコンタミネーションを防ぐために上澄み液を5 μ mのシリンジフィルターで濾して、バクテリアのみを含む根圏土壌ろ液とした。

また、採取した各成木の根圏土壌に含まれているバクテリアについて16SrRNAシーケンスを用いて属レベルでの推定を行った。

1. 5. 処理区及び育成 control, 根圏土壌ろ液接種区, ハナイグチ+根圏土壌ろ液接種区の3処理区を設定した。滅菌培土を詰めた角シャーレ(23.3×8.2×1.5cm)1枚につき3本ずつカラマツ実生を移植した。ハナイグチ接種区には前培養したシャーレからハナイグチの菌糸体を培地ごと切り取り、実生地下部に接種した。根圏土壌ろ液は育成45日目に角シャーレ1枚につき4mlを実生地下部に滴下した。育成は太陽光及び赤色灯(12時間点灯)を光源とする培養棚にて室温で半年間行った。繰り返し数は4とした。

1. 6. 調査項目 育成期間終了後、掘り取って地上部成長量、地下部成長量、地下部乾重量について測定した。ハナイグチ+根圏土壌ろ液接種区は菌根の形成状況についても調べた。また、各処理区シャーレから最も成長量の良い個体を選出し、その根端から得たバクテリアについて16SrRNAシーケンスを行い、属レベルでの推定をした後、根圏土壌ろ液と接種実生のバクテリア相の非類似度をNonmetric multidimensional scaling (NMDS)を用いて序列化した。また、NMDSによりグループが形成された場合さらにMultiple-response Permutation Procedures (MRPP)を用いてグループを分割することの妥当性を調べた。これらの結果を元に接種したバクテリアの根端への定着について検討した。

2. 二員培養 接種試験及び白川ら(11)の結果を元に、接種した根圏土壌に加えて、野外カラマツ成木根端及び接種試験実生根端からそれぞれの優占種を中心に計7株のバクテリアを選出した(表-1)。各バクテリア株はYG培地、25°C暗黒下で72時間前培養した後、濁度を調整(OD₆₀₀=0.05)した懸濁液として濃度1/2MMN培地に50 μ l塗布し、中央にコルクボーラーを用いて直径6mmに打ち抜いたハナイグチの菌糸体ディスクを配置した。20°C暗黒下で8週間培養し、菌糸成長とコロニーの観察を適宜行うと共に、培養8週目の菌叢直径を測定した。繰り返し数は4とした。

表-1. 二員培養に供試したバクテリア株

Table 1 Bacterial strains used in coculture experiment

Genus	Species	Isolation source	Abbr.
<i>Arthrobacter</i>	<i>aureescens</i>	Mature trees rhizosphere soil(field)	Ar.
<i>Bacillus</i>	<i>drentensis</i>	Mature trees rhizosphere soil(field)	Ba.1
<i>Bacillus</i>	sp.	Mature trees rhizosphere soil(field)	Ba.2
<i>Burkholderia</i>	sp.	Mature trees root tip(field)	Bu.1
<i>Burkholderia</i>	sp.	Mature trees root tip(field)	Bu.2
<i>Ralstonia</i>	<i>mannitolilytica</i>	Seedlings root tip(inoculation tests)	Ral.
<i>Rhizobium</i>	<i>tropicum</i>	Seedlings root tip(inoculation tests)	Rhi.

3. 統計解析 接種試験の各測定項目にはKruskal-Wallis検定、菌叢直径ではone-way ANOVA及びTukey-Kramer検定を行った。また、NMDSの類似度指数はJaccard指数を尺度とした。統計解析にはSPSS statistics 21及びPC-ORD(version 6)を使用した。

III 結果と考察

1. 接種試験

1. 1. 成長量 地下部乾重量において処理区間の有意差が認められた(表-2)。controlに対して他の2処理区が成長量が大い傾向を示したことから、ハナイグチと根圏バクテリアがそれぞれ実生の成長促進に関与している

表-2. 接種試験の結果：実生の成長量 (n=3~4)

Treatment	Shoot height (cm)	Root length (cm)	Root dry weight(mg)
control	7.34±1.00	13.87±5.30	18.68±7.42
Rhizosphere soil	7.80±2.10	19.15±1.63	35.80±7.98
<i>S.grevillei</i> +Rhizosphere soil	9.33±2.28	18.98±2.50	42.52±13.29
Kruskal-Wallis <i>p</i> value	>0.05	>0.05	<0.05

ことが示唆された。また、ハナイグチを接種した区では菌根形成が確認された。形態分類からハナイグチだと考えられるが、ITS領域を用いたシーケンスで種を特定することはできなかった。

1. 2. 接種バクテリアの定着 根圏土壌及び各処理区のカラマツ実生根端から検出されたバクテリアについて、NMDSによる序列化を行ったところ、両者のバクテリア相が異なった(図-1)。さらにMRPPの結果から両者のグループ分けが有意に認められた($p < 0.001$)。根圏土壌では *Bacillus* 属が優占して出現した他、*Paenibacillus* 属や *Streptomyces* 属、*Arthrobacter* 属などが見られた。一方、実生根端では *Streptomyces* 属が広く見られたが、controlと根圏土壌ろ液接種区では *Ralstonia* 属が、ハナイグチ+根圏土壌ろ液接種区では *Rhizobium* 属が優占して出現し、*Bacillus* 属は極一部に留まった。*Ralstonia* 属と *Rhizobium* 属については接種土壌には見られなかった属であり、半開放下環境でのコンタミや、種子内部に生息していた可能性などが考えられるが由来は不明である。以上のことから、本試験では接種した根圏土壌に含まれるバクテリアは根端に定着せず、プロテオバクテリアに含まれる3属が根端を優占する結果となった。しかし、類似したバクテリア相を示した control(図中B)とろ液接種区(図中C)間で成長量に差が見られたこと、接種した根圏土壌中に出現した *Bacillus* 属、*Arthrobacter* 属、*Paenibacillus* 属にはMHBとして報告されている株が存在する(5, 10, 1)ことから、接種したバクテリアが実生に対して成長促進効果を示したことが考えられる。また、根圏土壌ろ液接種区とハナイグチ+根圏土壌ろ液接種区において優占種が異なったことから、ハナイグチの存在が根圏バクテリア相を変化させることが示唆された。

2. 二員培養 供試した7株の内 Bu. 1, Bu. 2, Ral., Rhi.が control に対して有意に菌糸成長を抑制した(図-2a)。加えて、Ba. 2も菌叢直径は最も大きく成長したが、菌糸体ディスク付近を除いて菌叢が非常に薄くなっているため、抑制傾向にあると考えられる。また、抑制を示さなかった Ba. 1 及び Ar.においては control に比べて気中菌糸が厚くなっており、特に菌糸体ディスク中央はディスクを覆うように菌糸の発達が見られた(図-2b)。この2株に対しては培養72時間後にハナイグチにより阻止円が形

成されており(未発表)、一概に促進したとは言えないが、結果的にハナイグチの菌糸成長に寄与する形になった。このことから、根圏土壌由来と根端由来のバクテリアはハナイグチの菌叢に対して異なる影響を及ぼすことが示唆された。より宿主に近い根端由来バクテリアがハナイグチの菌糸成長を抑制したことについては、MHBとして働くことが示されているものの、培養菌糸と菌根に対する反応が異なる株や(5)、菌根菌種の違いにより菌根形成を抑制した例(3)が報告されており、ヘルパー効果の機構の違いや組み合わせの相性と考えることができる。また、抑制を示した3属には根粒の形成により宿主と緊密な共生関係を結ぶ種が含まれるが、菌根圏に生息するバクテリアから根粒を形成する種は出現していない(12)ことから供試した根端由来の4株は根粒形成能を持たないことが考えられる。しかし、こうしたバクテリアがハナイグチの菌糸成長を有意に抑制したことから、宿主-菌根菌と緩い共生関係にあるはずのバクテリアが宿主とのより緊密な共生を求めて菌根菌に対して競合的に作用する可能性についても今後検討していく必要がある。

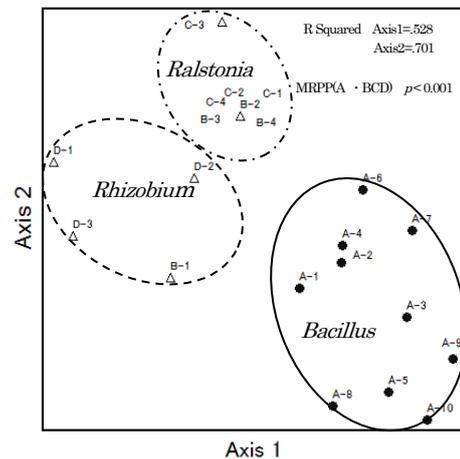


図-1. NMDSによる序列化

Fig.1 Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) analysis of bacterial communities

A : Rhizosphere soil B : Root tip (control) C : Root tip (rhizosphere soil)

D : Root tip (*S.grevillei*+ rhizosphere soil inoculated)

Circle indicates that have the same dominant species

IV まとめ

根圏土壌由来のバクテリアをカラマツ-ハナイグチ共生系に接種した結果、カラマツ実生根端への定着は見られなかったが、地下部乾重量の増加に寄与することが示唆された。二員培養では根圏土壌由来のバクテリアがハナイグチの菌糸成長を有意に促進した一方で根端由来のバクテリアは有意に抑制を示したことから、菌根においても同様の結果が予想される。したがって、根圏バクテリアは根圏土壌と根端というわずかな生息箇所の差によってカラマツ-ハナイグチ共生系に及ぼす影響が異なることが示唆された。

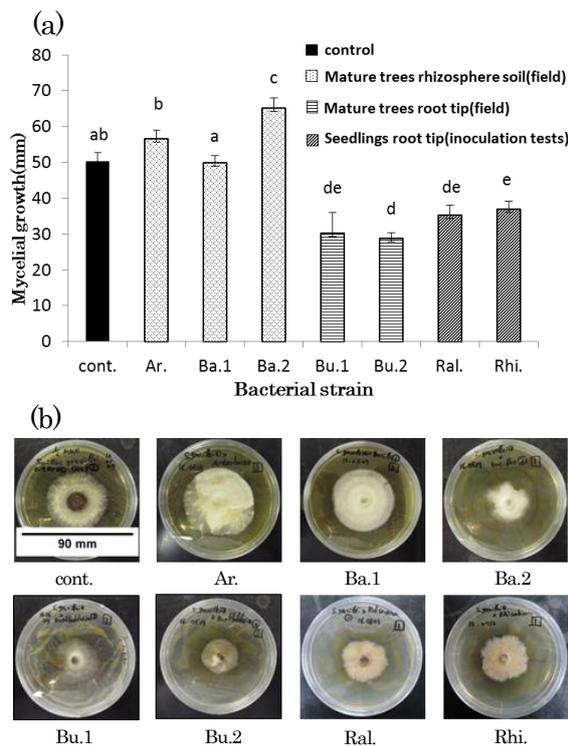


図-2. (a) 培養8週目ハナイグチの菌叢直径 (n=3~4)

(b) 培養8週目ハナイグチの菌叢の様子

Fig.2 (a)Mycelial growth of *S. grevillei* after 8 weeks culture(n=3~4) (b)State of mycelium after 8 weeks culture
Common letters indicate non-significant differences

(one-way ANOVA, Tukey-Kramer tests, $p < 0.05$)

cont. : control Ar. : *Arthrobacter aurescens* Ba.1 : *Bacillus drementensis*

Ba.2 : *Bacillus* sp. Bu.1 : *Burkholderia* sp. Bu.2 : *Burkholderia* sp.

Ral. : *Ralstonia mannitolilytica* Rhi. : *Rhizobium tropici*

謝辞 ハナイグチ菌株を分譲して頂いた東京大学大学院新領域創成科学研究科、奈良一秀教授に感謝を申し上げます。また、本研究は科研費 15K07486 の助成を受けて行いました。記して感謝いたします。

引用文献

- (1) ASPRAY, T.J., JONES, E.E., DAVIES, M.W., SHIPMAN, M. and BENDING, G.D. (2013) Increased hyphal branching and growth of ectomycorrhizal fungus *Lactarius rufus* by the helper bacterium *Paenibacillus* sp. *Mycorrhiza* **23** : 403-410
- (2) DAVIES, JR.F.T., SVENSON, S.E., COLE, J.C., PHAVAPHUTANON, L., DURAY, S.A., OLALDE-PORTUGAL, V., MEIER, C.E. and BO, S.H. (1996) Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiology* **16** : 985-993
- (3) DUNSTAN, W.A., MALAJCZUK, N. and DELL B. (1998) Effects of bacteria on mycorrhizal development and growth of container grown *Eucalyptus diversicolor* F.Muell.seedlings. *Plant and soil* **201** : 241-249
- (4) GARBAYE, J. (1994) Helper bacteria : a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* **128** : 197-210
- (5) KATAOKA, R. and FUTAI, K. (2009) A new mycorrhizal helper bacterium, *Ralstonia* species, in the ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus thunbergii* and *Suillus granulatus*. *Biol Fertil Soils* **45** : 315-320
- (6) LEHTO, T., BROSINSKY, A., HEINONEN-TANSKI, H. and REPO, T. (2008) Freezing tolerance of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Mycorrhiza* **18** : 385-392
- (7) 村田義一 (1991) カラマツ芽ばえの菌根形成と成長. 北海道林業試験場試験報告 **29** : 1-13
- (8) 岡島秀夫・松中照夫 (1973) 根圏土壌に関する研究 (第1報) トウモロコシ, アルファルファ根圏土壌溶液の無機成分について. *日本土壤肥科学雑誌* **44** (11) : 413-420
- (9) QU, L.Y., SHINANO, T., QUORESHI, A.M, TAMAI, Y., OSAKI, M. and KOIKE, T. (2004) Allocation of ^{14}C -carbon in two species of larch seedlings infected with ectomycorrhizal fungi. *Tree Physiology* **24** : 1369-1376
- (10) RÓZYCKI, H., KAMPERT, M., STRZELCZYK, E., LI, C. and PERRY, D.A. (1994) Effect of different soil bacteria on mycorrhizae formation in scots pine (*Pinus sylvestris* L.)—*in vitro* studies. *Folia Forestalia Polonica* **36** : 92-102
- (11) 白川誠・上原巖・田中恵 (2016) カラマツ根圏におけるバクテリア群集の把握. 第 127 回日本森林学会大会学術講演集 : P1-062
- (12) TANAKA, M. and NARA, K. (2009) Phylogenetic diversity of non-nodulating *Rhizobium* associated with pine ectomycorrhizae. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69** : 329-343