

## 野外菌根から得られた菌根圏細菌が培養菌糸成長に及ぼす影響

田中恵・奈良一秀 (東大院新領域)

**要旨** : 外生菌根菌, 及びある種の根圏細菌は共に樹木の成長を促進させることが知られている。しかしながら, この促進効果は双方の微生物の組み合わせに依存する可能性がある。特に菌根ヘルパー細菌は樹木根への外生菌根菌糸の定着を促進することで, 結果的に菌根形成を促進するが, その効果は外生菌根菌種によっても異なる可能性がある。本研究では *in vitro* における同時培養を行い, 外生菌根菌の菌糸成長に菌根圏細菌が及ぼす影響について調べた。細菌株及び外生菌根菌の菌株は富士山火山荒原から得られたものを用いた。その結果, 接種する細菌の種類によって培養菌糸の成長は促進されるものがあり, 特定の菌根から分離された細菌にその菌種に対する成長促進効果があるものが見られた。また, 異なる菌根菌種から分離された細菌, 特に *Bosea* 属細菌にも培養菌糸の成長を促進させる効果が見られたことから, 外生菌根菌と根圏細菌の間の機能的な特異性は必ずしも強くない可能性が考えられる。

**キーワード** : 外生菌根 根圏細菌 培養菌糸 成長促進 *Bosea* 属

**Abstract**: Both ectomycorrhizal fungi and some rhizosphere bacteria promote tree growth, but this positive effect may depend on the combinations of both microbes. Mycorrhiza-helper bacteria, which promote the colonization of ectomycorrhizal fungi on tree roots, may also be different among ectomycorrhizal fungal species. In this study, we examined the effect of rhizosphere bacteria on the growth of ectomycorrhizal fungi in an *in vitro* co-culture experiment. Both bacteria and ectomycorrhizal fungal strains were obtained from the volcanic desert on Mount Fuji, Japan. Some bacteria were confirmed to promote the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi, mostly in the original combinations of bacteria and ectomycorrhizal fungal species in the field. We also found that some bacteria, especially *Bosea* spp., had positive effects on mycelial growth even in non-original combinations, indicating that the functional specificity between ectomycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria may not necessarily be strong.

**Keyword** : ectomycorrhiza rhizosphere bacteria culture mycelium growth Genus *Bosea*

## I はじめに

木本植物の殆どは外生菌根菌と共生関係を結び, そのことにより環境適応性を高めている。樹木の成長に必要な養分の大部分は外生菌根菌から供給されるため, 外生菌根菌が共生しない樹木は殆ど成長できない。この外生菌根とその周辺環境である外生菌根圏では主にプロテオバクテリアに属する *Pseudomonas* 属や *Burkholderia* 属細菌が存在することがわかっている (1)。また最新の研究では, 樹木の成長と外生菌根圏細菌の密度には強い相関があり, それが樹木の成長促進に寄与している可能性や (6), 共生する外生菌根菌によって細菌相が異なる可能性が示されている (7, 8)。また, 一般的にマメ科植物と共生し根粒を形成することが知られている *Rhizobium* 属細菌が外生菌根圏にも多様に存在していることが明らかになるなど (9), 外生菌根圏細菌の新しい知見が得られつつある。しかしながらその実態および作用機構については, 未知の部分が多い。

菌根圏細菌が菌根共生にもたらす作用の一つとして, 樹木と外生菌根菌の共生関係を促進する, ヘルパー機能が提唱されており (4), 具体的な働きとして

は「細菌が菌根菌の菌糸成長を促進することにより, 結果的に菌根形成を促進する」という機能が考えられている。本研究ではこの菌根圏細菌のヘルパー機能に着目し, 野外の外生菌根から分離した菌根圏細菌について外生菌根菌との同時培養を行い, 細菌が培養菌糸の成長に及ぼす影響を調べた。また, 菌糸成長の促進効果が見られた細菌については, 機能のひとつとして窒素固定機能遺伝子のスクリーニングを行うとともに, 分類学的位置の推定を試みた。

## II 材料と方法

1. 菌根圏細菌の分離および推定 菌根圏細菌の分離源となる菌根の採取は2007年10月3日に静岡県御殿場市の富士山南東斜面(N35°29', E138°40', asl.1500-1600m)で行った。調査地は宝永の噴火によりスコリアが厚く堆積し, 植生が完全に破壊された後, 約300年が経過した現在も一次遷移の初期段階にある。この調査地における主要な外生菌根性樹木ミヤマヤナギ (*Salix reini*) 根端を, 既往の研究で示された菌根菌の遷移系列ごとに採取した (5)。

採取した菌根は実体顕微鏡下で土壌粒子を取り除き,

同所に存在する根端を7根端採取し、滅菌水1 mLを入れたマイクロチューブ内でボルテックスし洗浄した。洗浄を5回繰り返した後、内2根端はDNA抽出に用いたITS領域のシーケンスにより菌根菌種を決定し、残り5根端は以下のバクテリア分離に用いた。滅菌水1 mL中で磨砕したものを一次希釈とし、10%ずつ希釈し得られる分散液を4次希釈まで作成し、YG培地（Yeast extract 1g, Glucose 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, Agar 15g, DW 1L, pH7.0）にシャーレ1枚あたり100μLずつ塗布し暗黒下25°Cで培養した。作業途中でのコンタミネーションの有無を確認するため上記の作業を滅菌水のみでも行った。

出現したバクテリアは希釈段階ごとにランダムにコロニーを選び分離後、DNAを抽出し16S rRNAの全領域をシーケンスし、NCBIのBLAST検索を用いて属レベルの推定を行った。

2. 菌根圏バクテリアの培養菌糸との同時培養 分離して得られたバクテリアのうち、同根端から得られ、シーケンス結果により同じと推定された株を除外し、研究室で分離継代されてきたアカマツ菌根圏バクテリア保存株3株をあわせ、最終的に10株（表-1）を同時培養実験に供試した。培養菌糸には同じ調査地に発生した子実体から分離培養され、遷移系列が明らかになっているウラムラサキ（*Laccaria amethystina*）、キツネタケ（*Laccaria laccata*）、クロトマヤタケ（*Inocybe lacera*）、ハマニセシオウロ（*Scleroderma bovista*）、ニセクサハツ（*Russula pectinatoides*）、キチャハツ（*Russula sororia*）、ワカフサタケ（*Hebeloma mesophaeum*）、及び *Hebeloma pusillum* の8菌株を用いた。1/2MMN培地を入れたシャーレの中心にコルクボーラーで直径6 mmに切り取った菌根菌の接種源を置き、その1 cm外周にバクテリア10μLを円を描くように接種した。バクテリアは滅菌水1 mLにシャーレ1枚分の菌体をなじませた後、12,000rpm、2分で集菌し、滅菌水300μLに再分散させたものを用いた。対照区には滅菌水を同様に接種した。暗黒下25°Cで培養し、培養2、4、8週間後の菌糸直径を測定した。供試数はそれぞれ12とした。

3. 窒素固定遺伝子のスクリーニングと系統解析 属レベルの推定を行ったバクテリアからDNAを抽出し、窒素固定遺伝子 *nifH* 領域のPCR増幅を行なった。*nifH* 領域の増幅が見られた属はMEGA

(<http://www.megasoftware.net/>)を用いて16S rRNA領域に基づく既知種との系統解析を行った。

### III 結果と考察

1. 菌根圏バクテリアの分離および推定 分離が成功した106株の内、異なる根端・異なる菌根菌種別に選別した24株について、16SrRNA領域のシーケンス、BLASTを用いた属レベルの推定を行ったところ、*Rhizobium* 属が7株、*Bosea* 属が4株、*Burkholderia* 属が10株、*Mesorhizobium* 属が1株、*Paenibacillus* 属が2株であることがわかった。作業途中のコンタミは確認されなかった。

このうち、*Rhizobium* 属4株（*Rhizobium*1~4）、*Bosea* 属3株（*Bosea*1~3）を同時培養試験に供試した。

2. 菌根圏バクテリアの培養菌糸との同時培養 同時培養試験に用いた菌株のうち、キツネタケ、ニセクサハツ、キチャハツの3種では接種したいずれのバクテリアよりも対照区の成長が上回り、促進効果は見られなかった。その他の5種の菌糸成長経過を図-1に示す。ウラムラサキでは *Rhizobium*3、*Burkholderia*、*Mesorhizobium* がそれぞれ対照区よりも菌糸成長が有意に大きくなり、促進効果が認められた（図-1A）。このうち *Rhizobium*3 はミヤマヤナギに形成されたウラムラサキ菌根から分離された株である（表-1）。それ以外では *Rhizobium*1 が有意に菌糸成長を阻害している他は、いずれの株も対照区との有意な差はなかった。クロトマヤタケでは培養8週目に *Paenibacillus* の菌糸成長が有意に大きくなり、その他の株はいずれも対照区よりも成長が小さくなった（図-1B）。また、ハマニセシオウロもクロトマヤタケと同様に *Paenibacillus* との同時培養で菌糸成長が有意に大きくなり、次いで *Bosea*3 が有意に大きくなった（図-1C）。ワカフサタケは *Bosea*1、*Bosea*2、*Bosea*3 の3株が対照区よりも有意に菌糸成長が大きくなった（図-1D）。また同じ *Hebeloma* に属する *H. pusillum* も有意差は認められなかったが、培養8週目で *Bosea*1、*Bosea*2、*Bosea*3 が対照区に近い成長を見せた。特に *H. pusillum* の菌糸は培養4週目までは殆ど動きが止まっていたが、菌叢の先端部分がバクテリア接種部位に到達した時期から急速に成長した可能性が考えられる（図-1E）。

培養菌糸成長に促進効果の見られたバクテリアを表-2に示す。菌根菌種によってバクテリアによる促進効果は見られるものと見られないものがあり、*Hebeloma* 属のワカフサタケと *H. pusillum* はいずれも同じ *Bosea* 属バクテリアによる促進効果が見られた。逆に *Russula* 属のニセクサハツ、キチャハツでは接種したいずれのバクテリアも促進効果が見られなかった。菌根菌の遷移系列から見ると、遷移初期段階の菌根菌であるウラムラサキやクロトマヤタケ、ハマニセシオウロはアカマツ菌根

から分離された *Burkholderia* や *Paenibacillus* のような、分離源が異なる細菌によって菌糸成長が促進された。*Burkholderia* 属は土壌鉱物の風化を促進させる他、マツの成長を促進させる働きのあるものがあることが知られている (2)。一方、遷移中期のワカフサタケと *H. pusillum* はミヤマヤナギ菌根から分離された *Bosea* 属で菌糸成長が促進されたが、これらの菌根菌-菌根圏細菌の対応関係に一定の傾向は見られなかった。

細菌から見ると、ウラムラサキの菌糸成長を促進する *Rhizobium*3 は同じウラムラサキ菌根から分離されたものであるため、「菌糸成長を促進させることで菌根形成率を高める」ヘルパー機能を持つ可能性が考えられる。しかし、他の細菌はいずれも異なる種の菌根、あるいは非菌根から分離されているため、同じ菌種の菌根から分離される特定の細菌が直接菌糸成長を促進するとは限らないと思われる。

3. 窒素固定遺伝子のスクリーニングと系統解析 属レベルの推定を行った 24 株について *nifH* 領域を PCR 増幅した結果、同時培養試験に用いた *Bosea* 属の 2 株 (*Bosea*1, *Bosea*3) に *nifH* が存在する可能性があることがわかった。他の株については認められなかった。*Bosea* 属について、16S rRNA のシーケンスに基づく系統解析を行なった結果、同時培養試験に供試した 3 株のいずれも既知の種からは遠くに分岐していた (図-2)。最も近い *B. lathyri* はマメ科のヒロハノレンリソウ根粒から分離されたものであり、*Bosea* 属全体がマメ科根粒由来のものであることから (3)、本研究の *Bosea* 属 3 株は新種である可能性が高いと考えられた。

IV まとめ

接種する細菌の種類によって培養菌糸の成長は促進あるいは阻害されるものがあることが明らかになった。ウラムラサキに対する *Rhizobium*3 の成長促進効果は、菌根圏から分離された細菌にその菌糸成長の促進効果があるという、ヘルパー機能の仮説を支持する結果が得られた。しかしながら、異なる菌根菌種から分離された細菌、特に *Bosea* 属細菌にも *Hebeloma* 属菌の菌糸成長を促進させる効果が見られた。

引用文献

(1) BEATTIE GA (2007) Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: Plant-Associated Bacteria. GNANAMANICKAM SS (eds) Springer, Dordrecht, the Netherlands, pp. 1-56.

(2) CALVARUSO C, TURPAULT MP, FREY-KLETT P (2006) Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* :**72**(2), pp.1258-1266

(3) DE MEYER SE, WILLEMS A (2012) Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp nov., *Bosea lathyri* sp nov and *Bosea robiniae* sp nov., isolated from legumes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*: **62**, pp.2505-2510

(4) FREY-KLETT P, GARBAYE J, TARKKA M (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* :**176**, pp.22-36

(5) NARA K (2006) Pioneer dwarf willow may facilitate tree succession by providing late colonizers with compatible ectomycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert. *New Phytol.*: **171**, pp.187-197

(6) 田中恵, 奈良一秀 (2006) アカマツ外生菌根圏細菌の群集構造. 第 117 回日本森林学会大会学術講演集, F19

(7) 田中恵, 奈良一秀 (2008) 野外における菌根圏細菌の群集構造: 樹種および菌種の影響. 第 119 回日本森林学会大会学術講演集, J21

(8) 田中恵, 奈良一秀 (2010) 菌根圏細菌の群集構造: 非培養法と培養法の比較. 第 121 回日本森林学会大会学術講演集, E09

(9) TANAKA M, NARA K (2009) Phylogenetic diversity of non-nodulating *Rhizobium* associated with pine ectomycorrhizae. *FEMS Microbiol. Ecol.*: **69**, pp.329-343

表-1. 同時培養試験に供試した細菌株  
Table 1 Bacterial strains used in a co-culture experiment

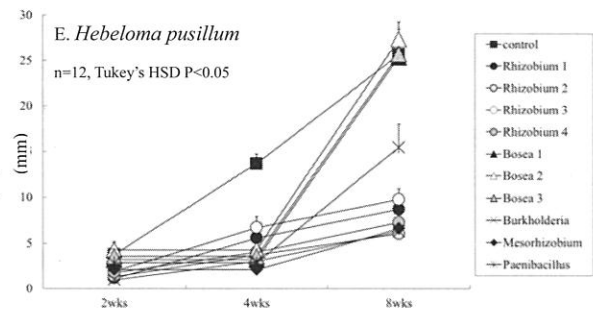
Bacterial strain	Host	Ectomycorrhizal fungi
<i>Rhizobium</i> 1	<i>Salix reinii</i>	<i>Scleroderma bovista</i>
<i>Rhizobium</i> 2	<i>Salix reinii</i>	<i>Laccaria laccata</i>
<i>Rhizobium</i> 3	<i>Salix reinii</i>	<i>Laccaria amethystina</i>
<i>Rhizobium</i> 4	<i>Salix reinii</i>	<i>Tomentella</i> sp.
<i>Bosea</i> 1	<i>Salix reinii</i>	<i>Inocybe</i> sp.
<i>Bosea</i> 2	<i>Salix reinii</i>	<i>Inocybe</i> sp.
<i>Bosea</i> 3	<i>Salix reinii</i>	<i>Thelephoraceae</i> sp.
<i>Burkholderia</i>	<i>Pinus densiflora</i>	<i>Suillus granulatus</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Pinus densiflora</i>	-
<i>Paenibacillus</i>	<i>Pinus densiflora</i>	-

Host は宿主名, Ectomycorrhizal fungi は菌根菌種名を示す  
菌根菌種名のないものは非菌根を示す

表一 2. 菌根菌の培養菌糸成長に促進効果の見たれた  
バクテリア株

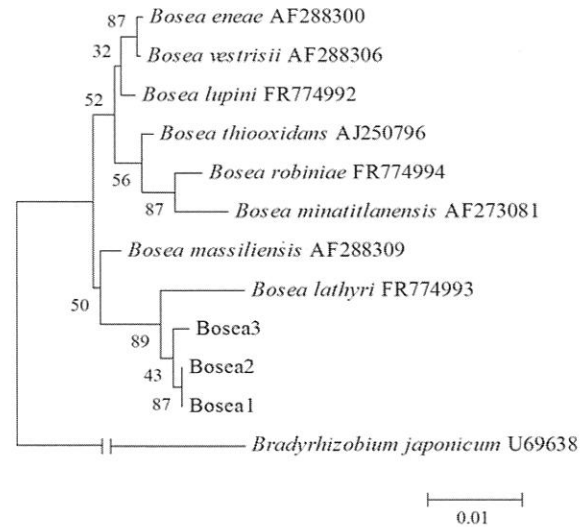
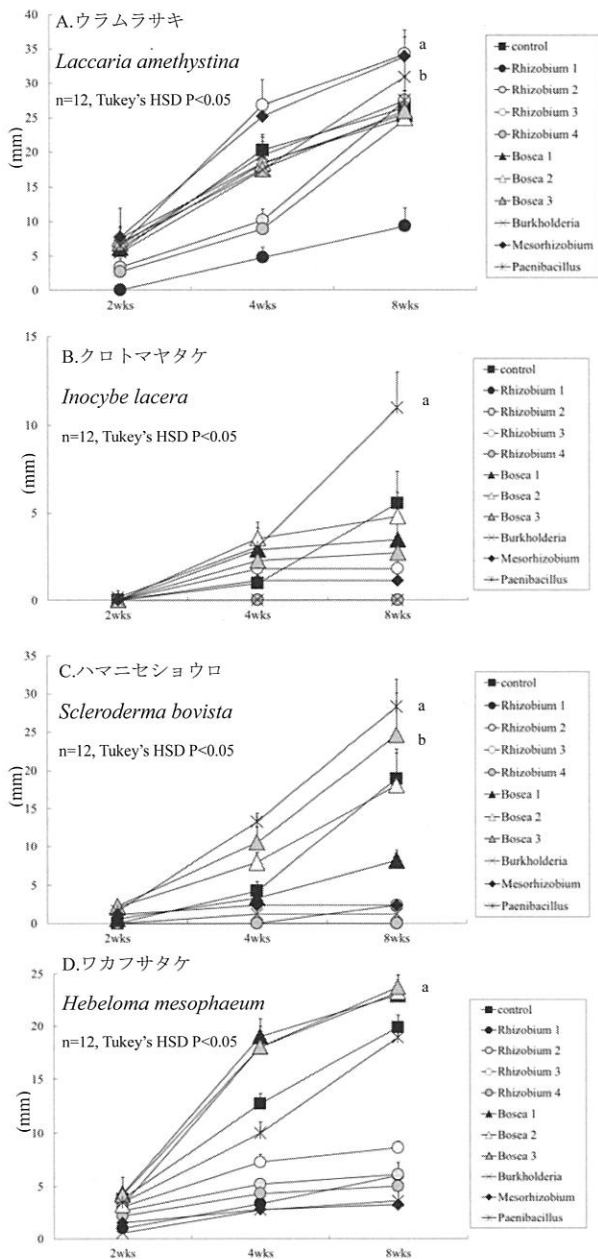
Table 2 Positive effects of bacterial strains on the mycelial  
growth of Ectomycorrhizal fungi

Ectomycorrhizal fungal strain	Successional stage	Bacterial strain
<i>Laccaria amethystina</i>	First-stage	Rhizobium3, Burkholderia, Mesorhizobium
<i>Laccaria laccata</i>	First-stage	-
<i>Inocybe lacera</i>	First-stage	Paenibacillus
<i>Scleroderma bovista</i>	Second-stage	Paenibacillus, Bosea3
<i>Russula pectinatoides</i>	Third-stage	-
<i>Russula sororia</i>	Third-stage	-
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	Third-stage	Bosea1, Bosea2, Bosea3
<i>Hebeloma pusillum</i>	Third-stage	Bosea1, Bosea2, Bosea3



図一 1 A~E. 異なるバクテリアを接種した各菌叢直径の推移 (平均値+標準偏差 (mm), 統計解析は全ての株で行いコントロールより有意に大きな成長を示した株のみ記号を示す)

Fig. 1A~E Diameters of mycelia co-cultured with different bacterial strains (Mean value+SD (mm))



図一 2. ミヤマナギ菌根から分離された Bosea 属バクテリア株の系統樹 (最尤法, 1259bp, 図中の数字はブートストラップ値, スケールバーはサイトあたりの塩基置換数を示す)

Fig. 2 Phylogenetic tree of Bosea strains isolated from Salix ectomycorrhizae with known Bosea species using 16S rRNA gene sequences (ML method, 1259bp. The numbers on the nodes indicate bootstrap values. Scale bar represents the number of substitutions per site.)