

# NaCl 処理がクロマツ実生に形成された *Cenococcum geophilum* 菌根の細胞外酵素活性に及ぼす影響

山口郷彬 (三重大院生資)・谷川東子 (森林総研関西)・小長谷啓介 (森林総研)・松田陽介 (三重大院生資)

塩ストレスの負荷が、樹木の栄養吸収を担う菌根の栄養獲得機能に及ぼす影響を明らかにするため、NaCl 添加後のクロマツ実生に形成された *Cenococcum geophilum* 菌根の細胞外酵素活性を調べた。クロマツ無菌実生に本菌を接種して 20 ヶ月育苗した後に、0 mM か 200 mM NaCl 水溶液を 3 週間添加した後、葉のクロロフィル蛍光と、*C. geophilum* 菌根から滲出する 8 種類の細胞外酵素活性を測定した。その結果、200 mM NaCl 区のクロロフィル蛍光は 0 mM NaCl 区より有意に低く、細胞外酵素活性はリン獲得に関わる酵素で減少傾向、炭素獲得に関わる酵素では増加傾向にあった。以上より、*C. geophilum* はクロマツの光合成機能の低下に対して、栄養獲得機能を変化させると推察された。

キーワード：海岸林、耐塩性、外生菌根、接種試験、マイクロプレート法

## I はじめに

クロマツ (*Pinus thunbergii*) は耐塩性に優れており (2)、塩ストレスの厳しい海岸の防災林として管理されてきた (12)。養水分吸収を担うクロマツの細根は土壌表層に集中して分布するため、台風や津波など一時的に生じる高塩環境の影響を受けやすい。クロマツの細根には外生菌根菌といわれる土壌菌類が共生し、菌根を形成する (2)。そして、土壌中に微細な菌糸を伸長し、酵素を滲出して窒素やリンを獲得する (4)。海岸に生育するクロマツの細根には特に *Cenococcum geophilum* が優占し、海岸林の生態系の中で重要な役割を果たしていると考えられる (5)。

*C. geophilum* の宿主範囲は広く、世界中の森林に遍在し、乾燥ストレスへの耐性が高い (8)。さらに本菌は、養分獲得のための多様な細胞外酵素を分泌する (11)。耐塩性に関しては、塩化ナトリウム (NaCl) を用いた培養試験によると、海岸に由来する *C. geophilum* 菌株は 200 mM の濃度まで耐性があるとされている (6)。

外生菌根菌の生理的機能を評価する手法として、最適化された細胞外酵素活性の計測方法が提案された (9)。本手法を用いて、*C. geophilum* が干ばつや温暖化から受ける影響について調べられている (1)。しかし、クロマツに形成された本菌の菌根が、塩ストレスを受けた場合の生理的機能に関する研究例はない。そこで本研究では、塩ストレス条件下における *C. geophilum* 菌根の生理的機能を明らかにするため、NaCl を添加した際の *C. geophilum* 菌根の細胞外酵素活性を調べた。

## II 材料と方法

本研究の *C. geophilum* の菌株は、青森県つがる市、静岡県沼津市、愛知県田原市、三重県津市の海岸クロマツ林で採取された *C. geophilum* 菌根に由来する。50 mL コニカルチューブにパーライトとココピート (7:3) を入れて、121 °C、15 分間、オートクレーブで滅菌後、*C. geophilum* 菌株を接種した。その後、チューブ内に MMN 液体培地

を 10 mL 注入し (3)、室温暗条件下で菌糸を蔓延させた。クロマツ種子は三重県津市の海岸林で採取した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 5 分間表面殺菌し、滅菌水で 2 回洗浄した後、寒天培地に静置し、発芽した個体をチューブに移植した (n=10 個体/菌株)。25 °C、16 時間明期/8 時間暗期で 20 ヶ月育苗した後、0 mM または 200 mM NaCl 水溶液を 3 週間、3 日おきに計 7 回添加した。200 mM NaCl 区では急激な塩傷害を避けるため、NaCl 水溶液の濃度を 25, 50, 75, 100, 200 mM と徐々に上げた。両処理区とも液肥として隔週でグルコースを除いた MMN 液体培地を与えた。*C. geophilum* を接種しない処理区も設定し、同様の NaCl 添加処理を行った。

NaCl 処理後、各実生の葉の光合成光化学系 II の最大量子収率 (Fv/Fm) を小型クロロフィル蛍光測定器 (フルオロペン, FP100) で測定した。その後、実生を回収して、流水で洗浄後、実体顕微鏡下で *C. geophilum* 菌根の形成を確認した。健全な *C. geophilum* 菌根と非菌根を 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 1 つずつ入れた。細根の酵素活性はマイクロプレートリーダー (テカンジャンパン, i-control) を用いて行った。定法に従い (9)、ロイシンアミノペプチダーゼ (Leu)、キシロシダーゼ (Xyl)、β-グルクロニダーゼ (Glr)、セロビオヒドロラーゼ (Cel)、β-グルコシダーゼ (Gls)、N-アセチルグルコサミニダーゼ (Nag)、酸性ホスファターゼ (Pho) の活性は蛍光測定、ラッカーゼ (Lac) 活性は吸光測定にもとづき評価した。*C. geophilum* の酵素活性各種は、菌根から非菌根の値を差し引いた値で示した。

## III 結果と考察

菌株由来毎に菌根苗を十分得ることが出来なかったため、全ての菌根苗をまとめて NaCl 処理の影響を評価した。200 mM NaCl 区の Fv/Fm は 0.63 であり、0 mM NaCl 区の 0.73 より有意に低かった (図-1, t 検定, p<0.05)。このことから海水の約半分程度の濃度となる 200 mM NaCl の

YAMAGUCHI Satoaki \*, TANIKAWA Toko \*\*, OBASE Keisuke, MATSUDA Yosuke \*

Effects of sodium chloride addition on the extracellular enzyme activity of *Cenococcum geophilum* mycorrhizal roots on *Pinus thunbergii* seedlings

\*authors for correspondence; 518M111@m.mie-u.ac.jp, m-yosuke@bio.mie-u.ac.jp

\*\*現所属 名古屋大院生命農学研究科

高塩ストレスでクロマツ実生の光合成機能が低下したと推察された。NaCl 処理の有無によらず, Nag, Pho, Gls の活性が検出され, 特に Pho は明瞭であった (図-2)。処理区間で酵素種ごとの活性に有意差は認められず ( $p>0.05$ , t 検定), 200 mM NaCl 区の Nag, Gls, Pho の活性はそれぞれ 0 mM NaCl 区の 95.3 %, 134.9 %, 60.7 %であった。

Nag は菌糸の主要な構成成分であるキチン質を分解する酵素であり, 窒素を得るために有効である (10)。Gls はセロビオースを分解してグルコースに変換し, 炭素を得るための, Pho はリン化合物を分解してリンを得るための酵素である。NaCl 処理によりクロマツの光合成活性が有意に低下し, *C. geophilum* 菌根の Nag はほぼ同程度, Pho は低下傾向, Gls は増加傾向を示した。このことは, 高塩条件下でクロマツからの炭素供給量が下がったため, *C. geophilum* は窒素獲得を維持しつつ, リン獲得より炭素獲得を優先した可能性を示唆している。実際, コナラ属の一種 (*Quercus robur*) の間伐によって光合成機能が低下すると, Pho が低下し Gls が増加することが, 外生菌根菌のハイロカレエダタケ (*Clavulina cinerea*) やベニタケ属菌の一種 (*Russula* sp.), ラシヤタケ属菌の一種 (*Tomentella subulilacina*) においても確認されている (7)。

以上より, *C. geophilum* は 200 mM NaCl による高塩ストレス条件下でクロマツの光合成に障害が生じる状態であっても, 各酵素種の活性を変化させて宿主の機能低下に適応しながら, 生理的機能を維持していると考えられた。このことが, 塩ストレスの高くなる海岸林で *C. geophilum* が優占する要因の一つであるかもしれない。本手法は, 宿主樹木に関わる外生菌根菌の生理的機能を直接的に明らかにすることができるため, 今後, 海岸林の健全性を評価する手段として応用可能なものと思われる。

#### 謝辞

本研究は, 研究費の一部を市村清新技術財団植物研究助成事業と岡三加藤文化振興財団にご支援頂きました。

#### 引用文献

(1) Herzog C, Peter M, Pritsch K, Günthardt-Goerg MS, Egli

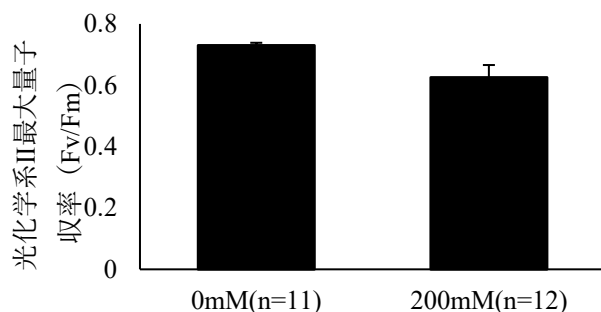


図-1. NaCl 添加処理後のクロマツ実生の葉のクロロフィル蛍光  
n は実生数, バーは平均±標準誤差を示す (t 検定,  $p<0.05$ )

S (2013) Drought and air warming affects abundance and exoenzyme profiles of *Cenococcum geophilum* associated with *Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*. Plant Biol 15: 230–237

- (2) 荏住昇 (2010) クロマツ. (最新樹木根図説各論. 誠文堂新光社). 75–80
- (3) Marx DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59: 153–163
- (4) 松田陽介 (2018) 森林利用と菌根菌. (森林と菌類. 升屋勇人, 共立出版). 114–117
- (5) Matsuda Y, Noguchi Y, Ito S (2009) Ectomycorrhizal fungal community of naturally regenerated *Pinus thunbergii* seedlings in a coastal pine forest. J For Res 14: 335–341
- (6) Matsuda Y, Yamakawa M, Inaba T, Obase K, Ito S (2017) Intraspecific variation in mycelial growth of *Cenococcum geophilum* isolates in response to salinity gradients. Mycoscience 58: 369–377
- (7) Mosca E, Montecchio L, Scattolin L, Garbaye J (2007) Enzymatic activity of three ectomycorrhizal types of *Quercus robur* L. in relation to tree decline and thinning. Soil Biol Biochem 39: 2897–2904
- (8) 小長谷啓介 (2016) 外生菌根菌 *Cenococcum geophilum* の系統的多様性と隠蔽種について. 日菌報 57: 23–30
- (9) Pritsch K, Courty PE, Churin JL, et al. (2011) Optimized assay and storage conditions for enzyme activity profiling of ectomycorrhizae. Mycorrhiza 21: 589–600
- (10) Pritsch K, Garbaye J (2011) Enzyme secretion by ECM fungi and exploitation of mineral nutrient from soil organic matter. Ann For Sci 68: 25–32
- (11) Rineau F, Garbaye J (2009) Does forest liming impact the enzymatic profiles of ectomycorrhizal communities through specialized fungal symbionts?. Mycorrhiza 19: 493–500
- (12) 林野庁 (2017) 海岸防災林の整備. (森林・林業白書. 林野庁). 63–64

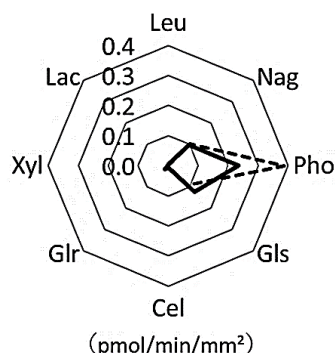


図-2. NaCl 添加処理後の *Cenococcum geophilum* の 8 種類の細胞外酵素活性  
値は 1 mm² あたりの単位時間における各種酵素活性濃度を平均値で示し, 菌根から非菌根の値を引いた. 実線が 200 mM NaCl 区 (n=12), 点線は 0 mM NaCl 区 (n=11) を示す.