

菌根圏から分離された放線菌がクロマツ実生、 菌根菌 *Cenococcum geophilum* の生育に及ぼす影響

裕田翔耀・松田陽介（三重大院生資）

海岸のクロマツ細根で優占する *Cenococcum geophilum*（以下、Cg）菌根の周辺には様々な細菌が生息する。本研究では、クロマツや Cg の成長を促進する細菌類を探索するため、Cg 菌根の内部に由来する放線菌の接種が両者の成長に及ぼす影響を調べた。放線菌と Cg や病原菌との対峙培養では、それぞれ 55.4%、29.1% で菌糸伸長を抑制した。クロマツへの接種試験では、根の伸長と細根形成を促進した放線菌が 1 菌株ずつ認められた。窒素固定能とインドール酢酸生産能は、全 5 菌株で確認された。以上より、Cg 菌根圏には、クロマツ根系の成長を促進し、土壌病原菌の成長を抑制する放線菌が生息することが示唆された。

キーワード：植物成長促進、対峙培養、接種試験

I はじめに

マツ科樹木の大部分の細根には、外生菌根菌が定着し、外生菌根という共生体を形成する（松田・伊藤 2005）。海岸に生育するクロマツの細根には *Cenococcum geophilum*（以下、Cg）が優占して定着する（Matsuda et al. 2009）。細根と菌根菌が周辺土壌に影響を与える領域を菌根圏とよび（Johansson et al. 2004）、この範囲には土壌 1 g あたり 10^6 cfu の細菌が生息する（Kataoka and Futai 2009）。菌根圏に生息する細菌のなかには、菌根菌による菌根形成や菌糸伸長の促進、植物の成長促進、病原菌への拮抗性などの効果を有する場合がある（Garbaye 1994 ; Frey-Klett et al. 2007）。さらに、菌根菌と細菌の共接種によりクロマツ実生の成長を促進させるという報告もある（Wu et al. 2012）。

多様な分類群を含む細菌のうち、放線菌はグラム陽性細菌の一群であり、有用な二次代謝物を産出することで注目を集めている。しかし、菌根菌の成長を促進する放線菌の報告は 1 例のみであり（Schrey et al. 2005）、菌根圏に生息する放線菌の分類や機能は不明である。

そこで本研究では、菌根圏における放線菌-クロマツ-菌根菌の関係を明らかにすることを目的とした。その端緒として、Cg 菌根から分離された放線菌が Cg とクロマツの生育に及ぼす影響を調べた。

II 材料と方法

放線菌の分離は、三重県津市、愛知県田原市、静岡県静岡市、富士市に位置する海岸のクロマツ林 4 ヶ所から行った。各林分からクロマツ根系を採取し、Cg 菌根の表層と内部から放線菌を分離した。菌根を超音波と滅菌水で洗浄し分離されたものを表層由来、この処理に加えて表面殺菌を行ったものを内部由来と定義した。

分離した放線菌と Cg またはクロマツ実生を枯死させ

た病原菌 (*Pestalotiopsis* 属) の対峙培養は以下の方法で行った。1/2PDA 培地で培養した Cg または病原菌を $\phi 10$ mm のコルクボーラーで打ち抜き、1/2PDA 培地の中心に接種した。滅菌したろ紙を中心から 30 mm 離して静置し、1/2PDB 培地で培養した放線菌培養液を接種した (Cg : 計 74 菌株、表層由来 68、内部由来 6 ; 病原菌 : 計 79 菌株、表層由来 71、内部由来 8)。接種後、Cg は 2 ヶ月間、病原菌は 1 週間培養して菌糸の成長を観察した。

放線菌のクロマツへの接種は、100 mL あたり海岸土壌 10 g、寒天 1.5 g を加えて 121°C、15 分でオートクレーブした培地に、無菌的に発芽させたクロマツ種子を移植し、培地上に放線菌培養液を塗布することで行った。接種には表層由来の *Streptomyces* 属菌株 5 菌株を使用した。接種 2 ヶ月後に根長と細根数を計測した。

放線菌の植物成長促進効果の評価は、窒素固定能とリン酸塩可溶性の有無、インドール酢酸 (IAA) の生産量で評価した。これらの試験には同一の放線菌 5 菌株 (表層由来 4、内部由来 1) を使用した。窒素固定能は、Baldani et al. (1984) にしたがって、LGI 培地に放線菌を接種し、7 日後に培地表面に白い菌膜が形成されれば窒素固定能があると判定した。リン酸塩可溶性は放線菌を Pikovskaya 寒天培地 (Pikovskaya 1948) で培養し、コロニー周辺のクリアーゾーンの有無で判定した。IAA 生産量は、Kumar et al. (2012) にしたがって、トリプトファン添加 TSB 培地で放線菌を 1 週間振盪培養し、Salkovski 試薬を用いて濃度推定を行った。

III 結果と考察

供試した放線菌菌株の 55.4% (41/74 菌株) は、Cg の菌糸伸長を抑制し、それ以外では影響は認められなかった。Cg の成長を抑制したもののうち、DNA 解析による分類群

SAKODA Shoyo*, MATSUDA Yosuke

Effect of actinomycetes isolated from a mycorrhizosphere on the growth of Japanese black pine seedlings and ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*.

*E-mail: 516M120@m.mie-u.ac.jp

推定ができた 89.5% (34/38 菌株, Cg 表層由来 33 菌株, 内部由来 1 菌株) が *Streptomyces* 属であった。病原菌との対峙培養では 29.1% (23/79 菌株) で菌糸の伸長が抑制され、それ以外に影響がなかった。病原菌の成長を抑制したもののうち、DNA 解析による分類群推定ができた 19 菌株はすべて Cg 表層由来の *Streptomyces* 属であった。これらの結果より、Cg 菌根の表層に生息する *Streptomyces* 属菌には、菌類の成長を抑制するものが多いことが示唆された。

クロマツへの接種では、FuA63 と TsuA2 の菌株がそれぞれ根の伸長と細根形成を有意に促進した ($P < 0.05$, 図-1)。このことから、Cg 菌根の表層に生息する *Streptomyces* 属菌はクロマツ根の成長を促進することが示唆された。

窒素固定能の検定では、使用した菌株全てにおいてコロニー形成が確認され、窒素固定能を有すると判断された。リン酸塩可溶性能の試験では、いずれの放線菌でもクリアゾーンは確認されず、その能力はないと判断された。IAA は、全ての菌株で生産され、その量は 0.27-2.61 mg/mL であった ($P < 0.05$, 図-2)。しかし、最も IAA 生産量が多い傾向にあった菌株 MiA99 には、根の成長促進効果は認められなかった (図-1)。放線菌は、単一菌株であっても複数の二次代謝物を生産することから (Riedlinger et al. 2006)、根の成長促進には IAA だけではなく、他の物質も関与していたのかもしれない。

本研究では Cg 菌根内に生息する放線菌が菌類とクロマツに与える影響について調べた。その結果、Cg 表層由来の *Streptomyces* 属は菌類の成長を抑制したが、クロマツの根系成長を促進する菌株が認められた。さらに、窒素固定能、IAA 生産能を有する菌株も確認された。菌根菌による養水分の獲得は、菌根の近傍より根外菌糸として土壤中に広く分布する範囲から行われる (松田・伊藤 2005)。そのため菌根内の放線菌は、菌根圏の病原菌の成長を抑制しながら、クロマツ根の成長を促進し、圏外に伸長する Cg 菌糸が養分獲得をしているのかもしれない。

謝辞

試料採取は三重県、愛知県、静岡県の許可のもと行った。

引用文献

Baldani JI, Baldani JVD, Sampaio MJAM, Döbereiner J (1984)

A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. An Acad Bras Ci 56: 365

Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytol 176: 22-36

Garbaye J (1994) Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytol 128: 197-210

Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. FEMS Microbiol Ecol 48:1-13

Kataoka R, Futai K (2009) A new mycorrhizal helper bacterium, *Ralstonia* species, in the ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus thunbergii* and *Suillus granulatus*. Biol Fertl Soils 45: 315-320

Kumar PG, Kishore N, Amalraj ELD, Ahmed SKMH, Rasul A Desai S (2012) Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* spp. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi. Plant Growth Regul 67: 133-140

松田陽介・伊藤進一郎 (2005) 森林における外生菌根のはたらき. 森林科学 45: 32-39

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

Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17: 362-370

Riedlinger J, Schrey SD, Tarkka MT, Hampp R, Kapur M, Fiedler HP (2006) Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain AcH 505. Appl Environ Microbiol 72: 3550-3557

Schrey SD, Schellhammer M, Ecke M, Hampp R, Tarkka MT (2005) Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induce differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytol 168: 205-216

Wu XQ, Hou LL, Sheng JM, Ren JH, Zheng L, Chen D, Ye JR (2012) Effects of ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* and mycorrhiza helper *Bacillus cereus* on the growth and nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. Biol Fertl Soils 48: 385-391

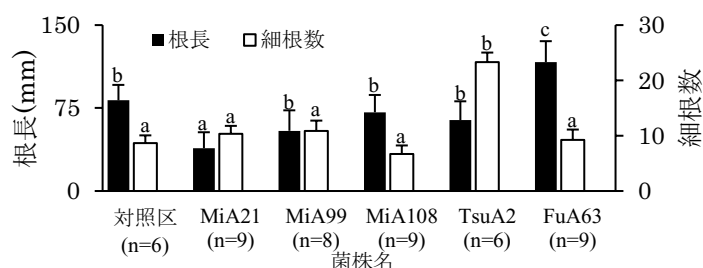


図-1. 放線菌接種によるクロマツの根長、細根数の応答 nはサンプル数、バーは平均+標準偏差、同一測定項目の異なるアルファベットには有意差があることを示す。(Bonferroni法、 $P < 0.05$)

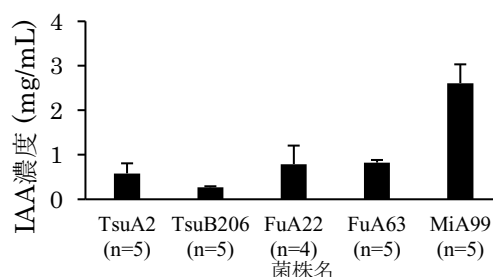


図-2. 放線菌のインドール酢酸(IAA)生産量 nはサンプル数、バーは平均+標準偏差を示す。(Kruskal-Wallis検定、 $P < 0.05$)