

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18725

研究課題名(和文) 菌根性きのこ発生に及ぼす共生細菌群の影響および機能評価

研究課題名(英文) Effects of ectomycorrhizosphere bacteria on sporocarps occurrence of ectomycorrhizal fungi

研究代表者

小長谷 啓介 (Obase, Keisuke)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：90612739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：菌根の周りに生息する細菌が菌根菌の菌糸成長、菌根の形成量、きのこの発生量など、菌根共生の成立と発達に及ぼす機能を明らかにした。野外から最も多く単離培養された土壌細菌 *Bradyrhizobium* の数株が、菌根菌 *Laccaria parva* の菌糸伸長を促進し、キノコの発生量や頻度を増加させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
制御環境下における安定的な外生菌根菌のきのこの発生技術を開発し、野外の菌根周辺に生息する細菌の一部がきのこの発生頻度や成熟度を向上させることを世界で初めて明らかにすることが出来た。本研究成果は、生物間相互作用に関する新知見であるのみならず、栽培が難しいとされる外生菌根菌のきのこの栽培技術開発など応用学問分野の発展にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Effects of ectomycorrhizosphere bacteria on hyphal growth, ectomycorrhizal formation and sporocarps production of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria parva* were examined. Members of *Bradyrhizobium* that were the most frequently isolated from ectomycorrhizosphere of *L. parva* in field promoted hyphal extension and sporocarps production of *L. parva*.

研究分野：土壌微生物

キーワード：バクテリア 外生菌根菌 子実体 相互作用 対峙培養 単離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸上植物の 80%の根には「菌根菌」と称する共生菌が定着している。菌根菌の働きにより、土壌からの養水分の吸収効率が改善され、宿主植物の成長は大きく促進する。一方、菌根菌の中でも主に樹木と共生する「外生菌根菌」は宿主植物から光合成産物を獲得し、この共生関係を経て子実体(きのこ)を発生させる。外生菌根菌の中にはマツタケ・トリュフを代表とする食用価値の高い子実体を作る菌類が含まれるが、これら子実体の発生には、宿主樹木との菌根共生の発達が重要と考えられている。そのため、外生菌根菌を根に定着させた感染苗の作出や、菌根共生を促進し子実体発生を促す技術開発が、国内外問わず必要とされている。

外生菌根菌の周りには多種多様な土壌微生物が生息し、その中には外生菌根菌の成長を向上させ、菌根共生の発達を促進する「菌根化促進細菌」など、外生菌根菌の成長に影響を与える細菌が存在する。こうした細菌群の生物資材としての有効活用を見据えて、1990年代以降、同細菌群の群集構造と単離株の機能解析について研究が進められてきた。しかし、研究対象とされた種は依然限定的であり、また機能解明に関しても、外生菌根菌の菌糸成長量と菌根形成量に及ぼす影響を対象としたものに限定されている。外生菌根菌の成長や菌根共生の促進を通じて、細菌が子実体発生にも重要な影響を与えている可能性が考えられるが、子実体の発生量や発生頻度など、子実体の形成と発達に及ぼす土壌細菌群の機能については、研究例が無く明らかにされていない。

外生菌根菌の生態については依然不明な点が多く、子実体の発生には、宿主植物の生理特性や環境条件など様々な未知の環境・生物的要因が関与していると思われる。そのため、一般的にインビトロな環境で子実体を人工的に発生させることは難しい。これに関して申請者は、これまでに関わってきた荒廃地における外生菌根菌の多様性・機能解析の研究成果から、先駆的な生態特性を持つ菌種に着目した。キツネタケ属菌などの先駆種は、恒温室など安定環境下でも接種から数ヵ月後に幼苗付近から子実体を発生することを確認している。これら菌種をモデル材料に用いることで、子実体発生を制限する環境・生物的要因を極力除外し、子実体発生に及ぼす細菌群の影響を評価できると考えた。

2. 研究の目的

外生菌根菌の周りに生息する細菌が、外生菌根菌の成長や菌根共生の発達に影響を与えることが分かってきた。これら細菌群は菌根共生の促進を介して、子実体の発生にも影響を与えている可能性がある。本研究では、根圏の土壌細菌を活用した外生菌根菌感染苗の安定的作出技術と子実体発生の促進技術開発に貢献することを最終的な目標に見据え、細菌を菌根圏から単離培養し、これら細菌群が外生菌根菌の菌糸伸長量、菌根の形成量、子実体の発生量など、菌根共生の成立と発達に及ぼす機能を明らかにする。

3. 研究の方法

根内部、周辺に生息する細菌が、外生菌根菌の菌糸伸長、菌根の形成量、子実体の発生量・頻度に与える影響を明らかにする。これらの知見を基にして、菌根共生系の成立、特に子実体の発生における細菌群の重要性を提示し、その機能的役割を明らかにする。このため以下に焦点を絞り研究を行った。当初は研究対象としていた菌種をキツネタケ *Laccaria laccata* としていたが、2019年に出版された系統分類学的研究により、アジアの種はヨーロッパの *L. laccata* とは異なる別種であることが明らかにされた。過去の研究代表者の発表・業績では「*L. laccata*」を用いていたが、これらは全て *L. parva* に該当する。

(1) *L. parva* の菌根圏に生息する細菌の多様性解析と分離株の採取

L. parva が形成する菌根の内部および周辺に生息する細菌の群集構造を調査した。山梨県のクリ園において、*L. parva* の子実体が発生していた5地点から土壌コア(7×7×7 cm)を採取した。形態的特徴から *L. parva* の菌根を60根端採取した。10根端については、個別に1 mLの滅菌蒸留水で7回表面を洗浄した後に、1 mL中の滅菌蒸留水中で菌根をペッスルによりすり潰し、0.1 mLずつシャーレ上のYG培地に塗布し、暗黒下25度で培養した。単離したコロニーからプライマー8fと1400rを用いてPCR反応を行い、16SrDNA領域の塩基配列を解読し、分類属性を明らかにした。

残りの50根端については、5根端ずつ同様に洗浄した後に、50根端を一つにまとめて、PowerSoil DNA isolation Kit (MO Bio Laboratories) によりDNAを抽出した。プライマー8fおよび1223rで得られた16SrDNA領域のPCR反応物を用いて、Topo TA Cloning kit (Invitrogen) によりクローニングを行った。プライマーM13fおよびM13rを用いて大腸菌コロニーからダイレクトPCRを行った。プライマー515fを用いてシーケンス解析を行い、V3、V4領域の塩基配列から分類属性を推定した。*L. parva* 以外で多く見られた菌根 (*Cenococcum geophilum*) についても同様の解析を行った。

(2) *L. parva* の菌根圏に生息する細菌が同菌の菌糸伸長に及ぼす影響

L. parva と細菌の対峙培養試験により、細菌が外生菌根菌の菌糸伸長に与える影響を明らかにした。(1)で単離した34系統を含む計80の細菌株を供試した。*L. parva* はクリ園および森林総合研究所(茨城)から得られた計5菌株を供試した。グルコース含量を10分の1に調整

した Modified Melin Norkrans (MMN) 培地のプレート (径 9 cm) の中心に、径 7 mm の *L. parva* 菌糸片をおいた。菌糸片の中心部から 90 度の間隔で 2 cm 離れた四方に、細菌を線状 (長さ 1 cm) に塗布した。室温 (23-25 度) で 30 日間培養した後に菌糸の伸長面積を計測し、対照区 (細菌株を塗布していない処理区) に対する比率を求めた。反復は各処理区につき 5 とした。

(3) *L. parva* の菌根圏に生息する細菌が同菌の菌根形成および子実体発生に及ぼす影響

クリ園の *L. parva* 菌根の周辺に優占していた土壌細菌 *Bradyrhizobium* と宿主樹木アカマツ、*L. parva* の 3 者共生系をインビトロ環境下で成立させることにより、子実体の発生に及ぼす細菌の影響評価を行った。*L. parva* はクリ園から分離培養した LL02 株を用いた。土壌細菌は *Bradyrhizobium* 株のうち、*L. parva* LL02 株の菌糸伸長を抑制する 2_2_2_2 株、影響を与えない 6_9_1_1 株、伸長を促進する 5_8_1_1 株の計 3 株を用いた。500 mL 容のマヨネーズ瓶に 250 mL の芝の目土と、90 mL の蒸留水を添加し、オートクレーブ滅菌を行った。その後、無菌的に発芽させたアカマツ実生を瓶内に植栽し、MMN 液体培地で 1 ヶ月間前培養した *L. parva* の菌糸体と、イースト・グルコース液体培地で 1 週間前培養した *Bradyrhizobium* 各株の懸濁液 10 mL を同時に根部に接種した。対照区では細菌の懸濁液の代わりに、イースト・グルコース液体培地を 10 mL 添加した。日長 16 時間 (23 度)、暗期 8 時間 (20 度) にプログラムした照明付きインキュベーター内で 3 ヶ月育苗した後に、アカマツ稚樹の乾燥体重量や菌根の形成量、子実体の発生頻度および乾燥重量を測定した。反復数は各処理区につき 26 とした。

4. 研究成果

(1) *L. parva* の菌根圏に生息する細菌の多様性

分離培養法から 223 の細菌株を得た。クローニング法では 177 のクローンを得た。これらは塩基配列の類似性 (99% 閾値) から 106 の Molecular Operational Taxonomic Unit (MOTU) に分けられた。MOTU 数で多く占めていたのが Proteobacteria 門 (57 MOTU) で、Bacteroidetes 門 (19 MOTU)、Acidobacteria 門 (11 MOTU)、Actinobacteria 門 (10 MOTU)、Firmicutes (7 MOTU)、Verrucomicrobia (1 MOTU) と続いた。目レベルで見ると、最も多かったのが Rhizobiales (Alphaproteobacteria) (15 MOTU) で、Burkholderiales (Betaproteobacteria) (12 MOTU)、Chitinophagales (Chitinophagia) (9 MOTU) と続いた。

分離培養法では、*Bradyrhizobium* と *Rhizobium* 属に属すると推定された 1 系統の株が複数の採取地点から得られ、株数も多かった (それぞれ 60 株、36 株)。その他の MOTU は得られた株数が少なく、限られた採取地点からしか株を得られなかった。

クローニング法では、MOTU *Bradyrhizobium* と Gammaproteobacteria の 1 系統が複数の採取地点から検出され、クローン数も多かった (それぞれ 16 と 10) が、その他の MOTU は限られた採取地点からしか検出されず、クローン数も少なかった。MOTU *Bradyrhizobium* と Gammaproteobacteria の 1 系統は *C. geophilum* の菌根からも高頻度で検出された (それぞれ 25 と 6)。

以上の結果から、*L. parva* の菌根の周辺には Proteobacteria 門を代表とする多様な細菌が生息し、なかでも *Bradyrhizobium* 属が普遍的に存在していると考えられた。また同細菌は、*C. geophilum* の菌根からも優占的に検出されたことから、*L. parva* 以外の菌根の周りにも普遍的に生息していることが示唆された。

(2) *L. parva* の菌根圏に生息する細菌が同菌の菌糸伸長に及ぼす影響

L. parva と細菌株の対峙培養試験の結果、多くの細菌株は *L. parva* の菌糸伸長に影響を与えないか抑制することが分かった。また、ほとんどの細菌株において、*L. parva* の菌糸の種類と細菌との対峙培養による菌糸伸長への影響の間には、有意な相互作用があることが分かった。以上から、細菌株の対峙培養による影響の受け方が *L. parva* の菌糸間で異なることが示唆された。

22 の細菌株は、対峙培養により全ての *L. parva* 株の菌糸伸長を有意に抑制した。34 の細菌株は、*L. parva* の菌糸伸長に有意な影響を与えない、あるいは有意に抑制した。20 の細菌株は、*L. parva* の菌糸伸長に有意な影響を与えない、あるいは有意に促進した。そのうち、7 の細菌株はいずれの *L. parva* 株に対しても、有意な菌糸伸長の抑制を示さなかった。

細菌の分類群別から見ると、Actinobacteria 門の全ての細菌株 (MOTU *Dactylosporangium*, *Diaminobutyricibacter*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, Streptomycetaceae)、Bacteroidetes 門の全ての細菌株 (MOTU Sphingobacteriaceae)、そして *Bacillus* の 1 系統を除く Firmicutes 門の全ての細菌株 (MOTU *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*) は、*L. parva* の菌糸伸長に影響を与えないか有意に抑制することが分かった。Proteobacteria 門 Burkholderiales 目の細菌株のうち、MOTU *Cupriavidus* は菌糸伸長に有意な影響を与えない、あるいは有意に促進した。MOTU *Herbaspirillum* は *L. parva* LL11 株のみ菌糸伸長を促進したが、その他の菌糸については有意に抑制した。他の全ての細菌株 (MOTU *Burkholderia*, *Duganella*, *Pelomonas*, *Rhodiferax*, *Variovorax*) は一部の株の菌糸伸長を有意に抑制したが、他の株については有意な影響を与えなかった。

MOTU *Bradyrhizobium* の 10 の細菌株のうち、6 はいずれの *L. parva* に対しても菌糸伸長を抑制せず、一部の株に対しては有意に促進した。3 は一部の株の菌糸伸長に影響を与えなかつ

たが、他の株については有意に抑制した。1 は一部の株の菌糸伸長を有意に促進したが、他の株については有意に抑制した。全ての *Bradyrhizobium* の細菌株は一部の *L. parva* 株(LL01、LL05 株)の菌糸伸長を有意に抑制しなかった。

MOTU *Rhizobium* 2 の 7 の細菌株のうち、2 は *L. parva* の菌糸伸長に有意な影響を与えない、あるいは有意に抑制した。その他の 5 は、*L. parva* の株によって、抑制から促進まで影響が異なった。

MOTUs *Labrys*、*Mesorhizobium*、*Rhizobium* 1 は *L. parva* の菌糸伸長に有意な影響を与えない、あるいは有意に抑制した。MOTU Rhizobiales 1 は *L. parva* の株によって、抑制から促進まで影響が大きく異なった。

以上の結果から、菌根の周囲に生息する細菌のほとんどは *L. parva* の菌糸伸長を抑制するのに対し、クリ園の *L. parva* の菌根の周辺から最も多く検出・分離された MOTU *Bradyrhizobium* は、概ねキツネタケの菌糸伸長に影響を与えないか伸長を促進させることが分かった。細菌と外生菌根菌間の相互作用は、細菌株と外生菌根菌の株の組合せによって大きく異なることが示唆された。

(3) *L. parva* の菌根圏に生息する細菌が同菌の菌根形成および子実体発生に及ぼす影響

L. parva に異なる影響を及ぼす MOTU *Bradyrhizobium* の 3 株 (菌糸伸長を抑制する 2_2_2_2 株、影響を与えない 6_9_1_1 株、伸長を促進する 5_8_1_1 株) を、アカマツと *L. parva* の共生系に導入して、植物の成長や菌根の形成量、子実体の発生量などに及ぼす影響を調べた。その結果、処理区間で植物体重量や根端の数に違いは見られなかったが、菌根の形成率は対照区と、6_9_1_1 株接種区、5_8_1_1 株接種区で平均 90% 程度と高かったのに対し、2_2_2_2 株接種区では 50% 程度と有意に低かった。

子実体の発生頻度は、対照区で未熟な子実体 (高さ 0.5 cm 以上で傘が発達していない子実体と定義) の発生瓶数が 23 と多く、成熟した子実体 (大型で傘が発達し、胞子形成が確認された子実体と定義) の発生瓶数は 6 と少なかった。2_2_2_2 株接種区では未熟な子実体の発生瓶数は 8 と比較的少なく、成熟した子実体の発生瓶数も 4 と少なかった。6_9_1_1 株接種区、5_8_1_1 株接種区では、未熟な子実体の発生瓶数はそれぞれ 11、10 と対照区に比べて少なかったのに対して、成熟した子実体の発生瓶数は 20、22 と多く、その発生頻度は対照区よりも有意に高かった。

子実体の発生本数および重量別頻度分布を見ると、対照区では計 80 本のうち 58 本が 2 mg 以下の未熟な子実体であり、多くの割合を占めていた。2_2_2_2 株接種区では計 21 本中 9 本が 2 mg 以下の未熟な子実体であり、2-4 mg の子実体の本数が 2 番目に多かった。6_9_1_1 株接種区、5_8_1_1 株接種区では、それぞれ 38 本中 18 本 (47%)、35 本中 13 本 (43%) が 2 mg 以下の未熟な子実体であり、続いて多かったのは 6_9_1_1 株接種区では 6-8 mg、5_8_1_1 株接種区では 4-6 mg の大型の子実体であった。

子実体の総乾燥重量を見ると、2_2_2_2 株接種区では 77.3 mg であり、対照区の 150.1 mg よりも低かったのに対し、6_9_1_1 株接種区、5_8_1_1 株接種区ではそれぞれ 194.5 mg、178.6 mg であり、対照区よりも高かった。さらに子実体の成熟度別の総乾燥重量を見ると、対照区では 73% が未熟な子実体で占められていたのに対し、6_9_1_1 株接種区、5_8_1_1 株接種区ではそれぞれ約 20%、18% と低く、成熟した子実体の占める割合が高かった。

以上の結果から、*L. parva* の菌糸の伸長を抑制する *Bradyrhizobium* 株は菌根の形成も抑制し、その結果、子実体の発生量も抑制すると考えられた。それに対し、菌糸伸長に悪影響を及ぼさない株は、菌根の形成を抑制しないという、何らかの相互作用を通じて、成熟した子実体の発生を補助している可能性が考えられた。

(4) おわりに

L. parva の安定的な子実体発生技術を開発し、野外の菌根周辺に生息する一部の細菌が子実体の発生頻度や成熟度を向上させることを世界で初めて明らかにすることが出来た。本研究成果は、生物間相互作用に関する新知見であるのみならず、栽培が難しいとされる外生菌根菌の子実体の栽培技術開発など応用学問分野の発展にも貢献できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Obase K, Extending the hyphal area of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria parva* co-cultured with ectomycorrhizosphere bacteria on nutrient agar plate, *Mycoscience*, 査読有, 60, 2019, 95-101

<https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.12.002>

Obase K, Bacterial community on ectomycorrhizal roots of *Laccaria laccata* in a chestnut plantation, *Mycoscience*, 査読有, 60, 2019, 40-44

<https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.08.002>

〔学会発表〕(計6件)

Obase K, Effect of ectomycorrhizosphere bacteria on growth, ectomycorrhizal formation and sporocarps occurrence of *Laccaria laccata*. International Mycological Congress, 2018

小長谷啓介、菌根から分離された細菌がキツネタケの子実体発生に及ぼす影響、日本菌学会大会、2018

小長谷啓介、キツネタケ菌根から分離培養された細菌がキツネタケの菌糸成長に及ぼす影響、日本森林学会、2018

Obase K, Bacterial community on ectomycorrhizal roots of *Laccaria laccata*, Asian Mycological Congress, 2017

小長谷啓介、外生菌根菌キツネタケの菌根に生息する細菌フロラ、日本微生物生態学会、2017

小長谷啓介、キツネタケの菌根から分離培養されたバクテリア、日本森林学会、2017

〔その他〕

小長谷啓介、仲の良い細菌はキノコの発育を助ける？ - 外生菌根菌と細菌の関係を探る -、第3回茨城大学重点研究ジョイントシンポジウム、2019

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。