

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780138

研究課題名（和文）外生菌根圏バクテリアの多様性—森林形成が及ぼす影響—

研究課題名（英文）Microbial diversity in the ectomycorrhizosphere affected of forest formation

研究代表者

田中 恵（TANAKA MEGUMI）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：40401301

研究成果の概要（和文）：外生菌根圏に存在するバクテリアの群集構造および多様性解析を行い、植生遷移に伴う樹木-菌根菌-バクテリアの三者共生の相互作用機構について新たなモデルを提言することを目的とした。富士山火山荒原における一次遷移樹種であるミヤマヤナギについて、遷移の発達段階の違いが菌根圏バクテリアの群集構造に及ぼす影響を解析したところ、ミヤマヤナギの成長に伴う菌根菌種の遷移系列と菌根圏バクテリアの種構成が対応していることがわかり、植生遷移と共に菌根圏バクテリアの種構成は変化することが示された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the interaction mechanism of bacteria-ectomycorrhizal fungi-tree associated with the vegetation succession by examining the community structure and diversity of bacteria present in the ectomycorrhizosphere. In a primary successional volcanic desert, we analyzed the effect of successional phase on the community structure of ectomycorrhizosphere bacteria associated with *Salix reinii*, pioneer dwarf willow. Species composition of ectomycorrhizosphere bacteria are related with ECM fungus associated with the successional phase of *Salix reinii*. It was inferred species composition of ectomycorrhizosphere bacteria along with the transition of vegetational succession.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：外生菌根

1. 研究開始当初の背景

外生菌根とは、樹木を宿主とする共生系の一形態である。木本植物の殆どは外生菌根菌（以下、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菌根菌から供給されるため、菌根菌が共生しない樹木は殆ど成長できない（Smith & Read 2008）。

通常、樹木に対する菌根の作用は、菌根保有個体と非保有個体との比較によって調べられるが、菌根の作用は単に樹木と菌根菌との関係のみで説明されるわけではなく、他の生物的、非生物的要因と関係していると考えられる。このうち、生物的要因の一つとして考えられるものが、菌根圏、すなわち菌根とその周囲に存在するバクテリアである。これらは、非根圏環境とは異なる特殊なバクテリアであり、菌根菌・樹木の必要とする栄養物の吸収をめぐり競合したり、その代謝産物により菌根菌・樹木の生育を助長もしくは阻害するなど、複雑な相互作用系を形成していると考えられている (Frey-Klett *et al.* 2007)。

近年、菌根圏では *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* などに属するバクテリアが多く分離され (Beattie 2007)、主に菌根共生を促進する mycorrhiza helper bacteria について、その機能に関する研究が行われている (Aspray *et al.* 2006, Timonen & Hurek 2006, Uroz *et al.* 2007)。

一方、菌根圏バクテリアが森林生態系の中で果たす役割については殆ど分かっていない。申請者はこれまでの研究から、樹木の成長と菌根圏バクテリアの密度には強い相関があり、樹木の成長促進に寄与している可能性があること (田中・奈良 2006)、共生している菌根菌によってバクテリア相が異なる可能性を示し (田中・奈良 2007)、一方で、野外環境ではバクテリア相の違いは、菌根菌の種類よりもむしろ樹種の違いが関係する (田中・奈良 2008) ことなどを明らかにしてきた。また、一般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* 属バクテリアがマツ科外生菌根圏にも存在することをつきとめ、その分子系統学的多様性を明らかにした (Tanaka & Nara 2009)。このようにいくつかの新しい知見が得られ

つつある菌根圏バクテリアであるが、生態系における相互作用機構については未だ明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

これまでの研究から、樹木と菌根菌の相互作用の中には菌根圏バクテリアが関与していることが示されたが、その実態については未知の部分が多い。本研究課題では、以下の項目を設け、外生菌根圏バクテリアの基礎的知見をさらに集積することで、樹木-菌根菌-バクテリアの三者共生の相互作用機構について新たなモデルを提言する。

(1) 森林における外生菌根圏バクテリアの群集構造

富士山火山荒原から採取した菌根に付随する菌根圏バクテリアの群集構造を解析し、樹種、菌根菌種とバクテリア群集の対応関係を植生遷移段階ごとに明らかにする。

(2) 外生菌根圏バクテリアの多様性解析

菌根から希釈平板法により培養可能なバクテリアを単離する方法と直接 DNA を抽出し、培養を用いないバクテリア相全体を調べる方法の2種類を用いて、菌根圏バクテリア全体の分子系統学的多様性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 森林における外生菌根圏バクテリアの群集構造

富士山火山荒原 (先駆樹木のミヤマヤナギが定着した植生パッチ) において、植生遷移段階別に3段階の調査地を設ける。各々10サイト、計30サイトから菌根圏を含んだ土壌サンプルを採取する。菌根は樹木の根を直接辿って行くことにより出来るだけ樹種のみを採取する。

実体顕微鏡下で菌根を拾い出し、1サイトごとに同所的に存在する菌根を7根端採取す

る。その内5根端については項目2で使用する。残り2根端からDNAを抽出する。ここには樹木、菌根菌、バクテリアの各菌根圏のDNAが含まれている。バクテリアについては、新規に開発したバクテリア特異的プライマーを用いた16S rDNA領域を、菌根菌については菌特異的プライマーを用いたrDNAのITS領域をそれぞれPCR増幅する。増幅産物をクローニング処理し、各サンプルにつきコロニーPCRを行い、シーケンス。得られた塩基配列はBLASTプログラムを用いて菌根菌、バクテリアの種を推定する。

樹種間、菌根菌種間のバクテリア群集の類似度を群集解析の手法を用いて明らかにする。植生調査データから得られる環境変数を解析に組み込むことで、遷移の発達段階の違いが菌根圏バクテリアの群集構造に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 外生菌根圏バクテリアの多様性解析

採取した菌根から、希釈平板法を用い、培養可能なバクテリアコロニーを得る。分離培養後、コロニーPCRを行い、RFLPを用いたタイプ分けを行う。各タイプごとにシーケンスを行い、同様の解析を用いて種を推定する。得られた培養可能な菌根圏・非根圏土壌バクテリアと項目1で得られた培養を用いないバクテリア相全体（菌根圏・非根圏土壌）の両データを全てまとめて近縁種間の分子系統学的解析を行う。菌根圏バクテリア全体の多様性を明らかにすると共に、培養可能なバクテリアと培養を用いないバクテリア相全体で違いがあるのか、手法の違いが及ぼす影響についても解析する。

以上2つの項目から得られた外生菌根圏バクテリアの基礎的知見を総合的に解析し、植生の遷移に伴う樹木-菌根菌-バクテリアの三者共生の相互作用機構について新たなモデルを提言する。

4. 研究成果

ITS領域のシーケンスにより推定された菌根菌種を表1に示す。パッチサイズの

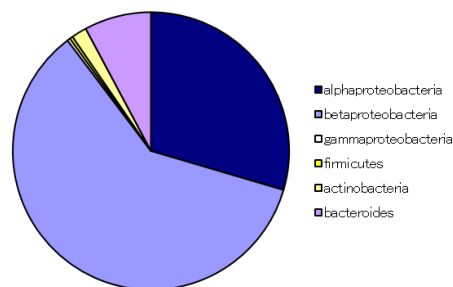
表1 ITS領域のシーケンスにより推定された菌根菌種

site	sp.	bp	E-value
1	<i>Laccaria amethystina</i>	402	0
2	<i>Laccaria laccata</i>	341	E-175
3	<i>Inocybe lacera</i>	401	0
4	<i>Laccaria laccata</i>	382	E-118
S 5	<i>Laccaria amethystina</i>	127	3E-48
6	<i>Laccaria laccata</i>	353	0
7	<i>Scleroderma bovista</i>	382	0
8	<i>Laccaria laccata</i>	360	E-153
9	<i>Laccaria amethystina</i>	388	0
10	<i>Laccaria amethystina</i>	385	0
11	<i>Laccaria amethystina</i>	426	0
12	<i>Laccaria amethystina</i>	427	0
13	<i>Laccaria amethystina</i>	395	0
14	<i>Scleroderma bovista</i>	425	0
LO 15	<i>Inocybe sp.</i>	315	E-104
16	<i>Inocybe sp.</i>	353	E-159
17	<i>Laccaria amethystina</i>	150	1E-72
18	<i>Laccaria amethystina</i>	380	0
19	<i>Laccaria murina</i>	342	E-133
20	<i>Boletus cf. rubellus</i> Nara redl	142	6E-26
21	<i>Cortinarius helobius</i>	461	0
22	<i>Laccaria laccata</i>	469	0
23	<i>Thelephoraceae sp.</i>	541	0
24	<i>Tomentella ellisii</i>	442	0
LI 25	<i>Laccaria amethystina</i>	424	0
26	uncultured ectomycorrhiza (Thelephoraceae)	409	0
27	<i>Laccaria murina</i>	393	E-134
28	<i>Thelephoraceae sp.</i>	466	0
29	<i>Russula sororia</i>	461	0
30	<i>Russula pectinatoides</i>	480	0

S: 小パッチ LO: 大パッチ外側 LI: 大パッチ内側

違いにより、菌根菌種は異なっていた。植生が未発達の小パッチ、大パッチ外側では *Laccaria* 属や *Inocybe* 属など、更新初期種が見られた。これに対して植生遷移が進んだ大パッチ内側においては *Russula* 属や *Thelephoraceae* などが見られ、ミヤマヤナギパッチの発達に伴って菌根菌種も変化していくことが示された。

図2上に培養によって得られたバクテリア（培養法）の組成、図2下にクローニング（非培養法）によって得られたバクテリアの組成を示す。



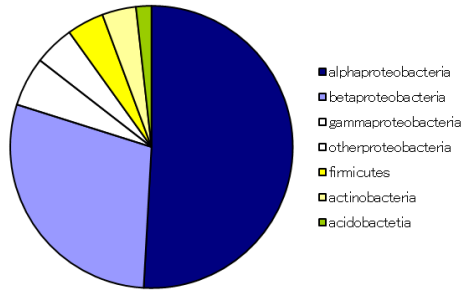


図2 手法別の菌根圏バクテリア組成
上:培養法によるもの 下:非培養法によるもの

培養法、非培養法ともに α -proteobacteria 綱、 β -proteobacteria 綱など、proteobacteria に属するバクテリアが大勢を占めた。Prteobacteria は培養が可能なため、手法によるバクテリア相の検出には大きな差がないことがわかった。一方で、培養法で見られた Bacteroides が非培養法では見られない、非培養法でわずかに見られた培養不可能な Acidbacteria が培養法では見られないなど、手法によって菌根圏バクテリアの検出にはバイアスがかかる可能性も示された。

次に、各パッチごとの培養法によって得られたバクテリア 281 コロニーを表 2、非培養法によって得られたバクテリア 442 シークエンスのうちフルシークエンスした 283 サンプルを表 3 にそれぞれ示す。442 シークエンスのうち植物プラスチドは全体の 21.7%にあたる 96、コンタミは 19 であった。培養法で出現したものは非培養法を用いてもほぼカバーすることができた。これは元々培養可能なものが多くスクリーニングされたためであり、培養法による制限はそれほどないと考えられる。一方手法間で比較的差異が認められたのは、バクテリアの種構成が複雑と考えられる大パッチ内側であることがわかった。

表2 培養法によって得られたバクテリア

Class	小パッチ(S)										大パッチ外側 (LO)										大パッチ内側 (LI)										計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Alphaproteobacteria	9	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	83
Betaproteobacteria	9	10	8	10	7	9	1	5	10	7	4	5	10	6	7	10	10	2	7	2	4	1	5	6	8	6	16	169			
Gammaaproteobacteria	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Otherproteobacteria	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Firmicutes	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Actinobacteria	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Bacteroidetes	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Acidobacteria	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Others	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
計	10	10	9	10	10	9	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	10	10	9	10	9	10	10	10	8	10	10	9	281	

※非培養法ではバクテリアコロニーが検出されなかった。

得られた全てのサンプルについて、既知種との分子系統解析を行った。相同性 99%以下は別種として解析した結果、培養法・非培養法をあわせた 564 サンプルは 240 種に分類されることがわかった。非根圏土壌から分離されたバクテリアはパッチサイズごとによる明確な違いは見られなかった。

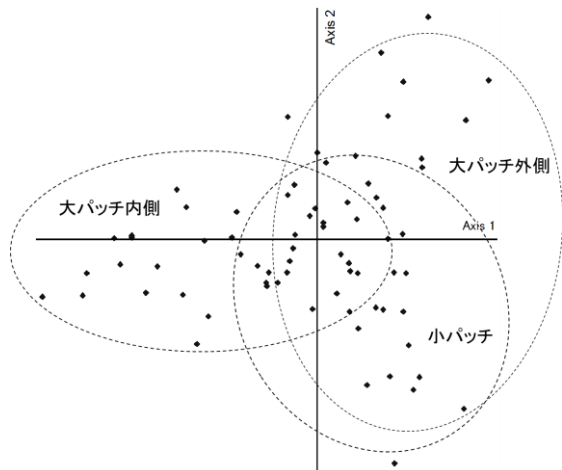


図3 CCA による菌根圏バクテリアと菌根菌の対応関係

固有値:1 軸 0.444/2 軸 0.227 分散説明率:
軸 35.1%/2 軸 18.0%

モンテカルロテスト p=0.010

これらのサンプルについて、正準対応分析 (CCA) を用いて菌根圏バクテリアと菌根菌種との対応関係を見ることにより植生遷移との関連を評価した (図 3)。パッチサイズの違いにより、バクテリア種は異なる群集構造を持つことが明らかになった。植生が未発達の小パッチ、大パッチ外側では共通する種が多く、比較的似たような構造を示すのに対し、遷移が進んだ大パッチ内側においてはそれ

らから遠く離れたバクテリア群集構造を持つことがわかった。これらのことから、植生遷移との関連は菌根菌種と同様にバクテリア種においても見られること、すなわちヤマヤナギの植生パッチの発達に伴い、地下部では菌根菌種だけでなく、菌根圏バクテリアの種構成も変化していくことが示された。

植生遷移の発達とともに菌根圏バクテリアの種構成が変化していく要因の一つとして、パッチが発達することで生産されるリター量が増加し、土壌がスコリアだけの極貧栄養状態からやや有機質が増えたことが影響を与える可能性が考えられる。しかしながら、非根圏土壌に存在するバクテリア相は菌根圏バクテリアとは異なり、パッチサイズによる明確な遷移系列は見られなかった。そのため、土壌の栄養条件だけでなく、それぞれの菌根菌に特徴のある菌根圏バクテリアが選択的に生息している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Uehara, I., and Tanaka, M. : Basic study on the bacteria resistance effects of *Cinnamomum camphora* and *Eucalyptus*. 関東森林研究 63 2012. (accepted) 査読有 (掲載確定)
- ② 栗原文裕, 田中恵, 佐藤明, 菅原泉, 上原巖 : 針葉樹林を伐開し広葉樹植栽した林地での中型土壌動物相の変化. 関東森林研究 63 2012. (accepted) 査読有 (掲載確定)

[学会発表] (計6件)

- ① 田中恵, Denise Brooks, 奈良一秀 : トガサワラ実生に存在する外生菌根圏バク

テリアの群集構造. 第123回日本森林学会大会学術講演集 K09, 2012.3.28 宇都宮大学.

- ② 栗原文裕, 田中恵, 佐藤明, 菅原泉, 上原巖 : 針葉樹林を伐開し広葉樹植栽した林地での中型土壌動物相の変化. 第1回関東森林学会大会講演要旨集 35, 2011.10.21 群馬県社会福祉総合センター.
- ③ 上原巖, 田中恵 : クスノキの葉の抗菌作用について. 第1回関東森林学会大会講演要旨集 117, 2011.10.21 群馬県社会福祉総合センター.
- ④ 田中恵, Denise Brooks, 奈良一秀 : トガサワラ林における樹木実生の菌根圏バクテリア. 第122回日本森林学会大会学術講演集 L02, 2011.3.27 静岡大学.
- ⑤ 栗原文裕, 佐藤明, 菅原泉, 上原巖, 田中恵 : スギ林伐採区に落葉広葉樹を植栽したことによる中型土壌動物相の個体数密度の変化. 第122回日本森林学会大会要旨集 B04, 2011.3.26 静岡大学.
- ⑥ 上原巖, 田中恵, 西野浩行 : ユーカリの抗菌作用について. 第122回日本森林学会大会学術講演集 J05, 2011.3.26 静岡大学.

[その他]

ホームページ等

http://lbf.nenv.k.u-tokyo.ac.jp/contents/Nara_lab/Top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 恵 (TANAKA MEGUMI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号 : 40401301