

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380081

研究課題名(和文) 白砂青松の再生を目指して - 複合微生物系を用いた迅速かつ機能的なマツ育苗技術の開発

研究課題名(英文) Toward restoration of white sand and green pines: development of pine seedling propagation system using functional rhizosphere microorganisms

研究代表者

竹内 祐子 (Takeuchi, Yuko)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80452283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、津波被害に起因した土壌汚染が想定される海岸林での迅速な植生回復を目指した基礎研究を行った。

被災地における土壌及び菌根相調査を行ったところ、pHは表層でやや高い傾向があったが、重金属汚染は認められなかった。また、Wilcoxina属菌を優占種とした攪乱跡地に特徴的な外生菌根群集が検出された。

初期定着能の高いクロマツを作出するシステム開発を目的として、モデル植物シロイヌナズナ及びクロマツを用いた有用根圏細菌の選抜を行った。いずれの宿主植物に対しても、全152細菌株のなかでBurkholderia属細菌及びLeifsonia属細菌が実生苗の根端数を増加させる効果を示した。

研究成果の概要(英文)：We took rhizosphere soil samples of Japanese black pine at Tsunami-damaged coastal forests in Tohoku region. The soil pH was rather high especially in the surface layer, but no severe heavy-metal contamination was detected. The ectomycorrhizal flora reflected the effect of disturbance due to Tsunami, represented by Wilcoxina spp.

For development of pine seedling propagation by means of functional microbes, screening of rhizobacteria was performed with the model plant Arabidopsis thaliana and Japanese black pine. Out of 152 rhizobacteria derived from coastal pine forests, Burkholderia spp. and Leifsonia sp. showed a significant effect to increase root branching in both plants.

研究分野：森林病理学

キーワード：海岸林 クロマツ 外生菌根 根圏細菌 ファイトレメディエーション

1. 研究開始当初の背景

2011年3月11日に発生した東日本大震災に伴う大津波により、青森県から千葉県に至る広範囲の海岸クロマツ林が壊滅的被害を受けた。海岸クロマツ林は、防砂・防風・防潮といった保安機能を有しており、農地や居住地を守るなど地域住民の生活環境保全の観点からも復旧が急務である。しかし、津波浸水により土壌中の塩分濃度が上昇していることに加え、被災した工場・事業場や下水処理施設などから流出した有害物質や、津波で陸域に運ばれたヘドロなどの内湾性堆積物に起因する土壌汚染により、植生の回復を妨げられることが懸念されていた。

クロマツは菌根性樹種であり、菌根菌パートナーの共生なしには生育できない。菌根菌は5,000種を超えるが機能は千差万別で、なかには、耐塩性に優れた種や土壌汚染地のバイオレメディエーション [環境修復] に有効な種も存在する (Saleh-Rastin, 1976; Galli et al., 1994)。特に重金属に関しては、積極的に菌体中へ吸収するが植物へは移行させないことから、宿主植物体内の重金属蓄積を軽減し、厳しい環境下での生育を可能にする (Wilkins, 1991)。また近年、植物根内及び根圏に存在する一部の土壌細菌が宿主の生長やストレス耐性、そして菌根形成に及ぶまで大きな影響を持つことが明らかになってきた (Kataoka et al., 2009)。

2. 研究の目的

上記のような背景から、津波被災地のニーズに合わせた機能を備えたクロマツを作出・選抜し導入することで、津波による土壌被害 (特に塩害と重金属汚染) を修復するとともに、植物の生育困難な状況にある被災沿岸部において迅速に白砂青松を再生することが可能になると考えた。クロマツの育苗では、移植土壌への初期定着が最も重要かつ難しい部分である。上記細菌類の利用によって、実生根の初期生育を早めるとともに菌根化の促進が可能となり、クロマツ実生の初期定着の著しい向上が期待できる。特に、クロマツの生育を促進する細菌 (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) に焦点を合わせた。

本研究では、植物 (クロマツ) - 共生微生物 (外生菌根菌) - 機能性微生物 (根圏細菌) の3者共生系を利用した土壌浄化技術の開発ならびに海岸林の早期再生を目標として、微生物の制御に基づく機能付与型クロマツ苗の作出技術を開発するための基礎的知見を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 津波被害を受けた海岸クロマツ林における被害状況調査

根圏土壌の化学性調査

2012年1月に土壌汚染状況を把握するための予備調査を行った。青森県八戸市、岩手県陸前高田市、同山田町、宮城県山元町 (山下

浜) 同巨理町 (吉田浜)、同東松島市 (野蒜、浜市)、同仙台市 (荒浜) の海岸林において、クロマツ根圏土壌 (表層及び下層) を採取した。土壌は実験室に持ち帰り、土壌汚染対策法に基づく ICP-AES 分析 (ICP 発光分光分析法) に供した。

クロマツ根圏における菌根相調査

2012年および2013年の7月に津波被害を受けた海岸林2か所 (野蒜、山下浜) において、クロマツ成木を10本ずつ選抜し、選抜木の周囲で少なくとも2地点から根を採取した。根は実験室に持ち帰ったのち、外生菌根と非菌根に分別して根端数を計数し、菌根化率を計算した。また、菌根については、ランダムに40根端を選抜し、CTAB液中に浸漬した上で分析まで -20°C で保存した。続いて、それぞれの根端を96ウェルプレートに入れたDNA抽出液 (ExtractNampExtraction solution) に浸漬した後、 60°C で10分、続いて 95°C で10分のインキュベーションを行い、DNAを抽出した。この抽出液をテンプレートDNAとして、PCR用キット (AmpliAq Gold 360, Life Technologies) と菌類特異的プライマー (ITS1F/ITS4) を用いてPCR反応を行い、それぞれの菌根菌のITS領域を増幅した。PCR反応の成否を確認するため、アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、ここでDNA増幅が認められなかったサンプル、及び複数のDNAバンドが見られたサンプルについてはこの先のシーケンス解析から除外した。PCR反応が成功していたサンプルについてはExoSAPを用いた精製を行い、その後シーケンス解析に供試した。得られたDNA配列は、不要な配列を除いた後BLAST検索を行い、目あるいは科レベルでの分別を行った。その後、それぞれの目あるいは科ごとにClustalWを用いてアライメントを行った後、DNAdistを用いて距離計算を行い、続いてDoturを用いて97%レベルでのシーケンスの分別を行った。ここで分別されたそれぞれのシーケンスについて、UNITEを用いたブラスト検索を行い、種推定を行った。また、種の多様性指数を計算するとともに、サンプル間の種組成の類似性を主成分分析によって解析した。

(2) 有用微生物のスクリーニング

クロマツ根圏細菌株の取得

鳥取県海岸部のクロマツ優占林において、2011年7月及び2012年6月に実生苗根圏土壌を採取し、水中分画法 (犬伏, 1992) によりR2A培地にて細菌株を得た。色、コロニーの大きさ、コロニーの形状等の形態的特徴から重複株を除外し、152菌株を以降の実験に供した。

152菌株のうち任意に選択した90菌株について、細菌ユニバーサルプライマー10f及び907rを用いて16SrRNA領域を増幅し、シーケンス解析を行った。得られた配列情報から、

BLAST 検索を経て科レベルの種推定を行った。

モデル植物を用いた植物生長促進細菌 (PGPR) 候補の選抜 一次スクリーニング

López-Bucio et al. (2012) の手法に従って、モデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 株) を用いて PGPR 候補細菌株を選抜した。表面殺菌したシロイヌナズナの種子 24 粒を 0.2 × MS 培地 (9 cm シャーレ、寒天 1%) に播種し、発芽 4 日目に、R2A 液体培地にて 24 時間前培養した細菌 152 株各々の培養液 100 μl を根から 5 cm の部分に塗布した。対照区では、100 μl の R2A 液体培地を塗布した。Plant-growth chamber 中で 6 日間培養後、植物体をシャーレごとデジタルカメラで撮影し、その画像を ImageJ のアドオン SmartRoot を用いて解析した (Lobet et al., 2011)。解析項目は、根端数、主根長 (cm)、全根長 (cm) である。細菌接種の効果は、Steel test ($p < 0.05$) により評価した。根端数を増加させる効果の認められた候補株については、16S rRNA 領域を細菌ユニバーサルプライマー 10f 及び 907r で増幅し、シーケンス解析を経て種推定を行った。

クロマツを用いた PGPR 候補の選抜 二次スクリーニング

クロマツとの共培養ならびにクロマツ-菌根菌系との共培養後にそれぞれ根端数、重量、主根長、全根長を測定した。

クロマツ (*Pinus thunbergii*) の種子を表面殺菌後に 1.5% 寒天培地に播種し、発芽後に排水穴を有する 15 ml 容のスピッツ管 (鳥取大学乾燥地研究センター内で採取した砂土をオートクレーブ滅菌し、充填したもの) に移植した。クロマツ-PGPR 候補株の 2 者共培養試験については、R2A 培地で前培養した PGPR 候補株を接種した。クロマツ-菌根菌系との 3 者共培養試験については、同時に菌根菌 *Suillus granulatus* を接種した。90 日間培養後、植物体を採取、洗浄したのちに実体顕微鏡下で根端数を測定し評価した。

また、細菌と菌根菌との直接の相互作用を調査するために対峙培養を行った。MNC 培地を含む 90 mm シャーレの中央に 6 mm コルクで打ちぬいた *S. granulatus* を接種した。2 cm 離れた場所に 2 ml の R2A 液体培地で 24 時間前培養した細菌 50 μl を塗布し (107~109 cfu/100 μl) 2 週間後に菌糸成長直径を測定した。対照区では R2A 液体培地 50 μl を塗布した。

PGPR 特性評価のための生化学試験

で選抜された PGPR 候補 16 株について、窒素固定能の有無を制御するニトロゲナーゼ還元酵素遺伝子 *nifH* の有無を調査した。PolF 及び PolR プライマーにより PCR 増幅し (Poly et al., 2001) 2% アガロースゲル上での電気泳動により分離した後、エチジウムプロ

マイド染色して UV 照射下で増幅を確認した。

その他、植物生長促進能に関与すると考えられるりん溶解能、IAA (インドール-3-酢酸) 産出量、ACCd (1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸デアミナーゼ) 活性を定法に従って評価した。

4. 研究成果

(1) 被災海岸クロマツ林における被害状況

土壤汚染状況

土壤 pH はいずれの調査地でも概ね下層より表層で高い傾向にあり、八戸市、山下浜、吉田浜、荒浜では pH 9.0 を超える強アルカリ性 (八戸で最高 pH 9.56) であった。有害金属に関して、八戸市と陸前高田の一部の試料で水抽出画分のヒ素含量がやや高い値となった (0.013 mg/L)。カドミウム、マンガンその他の重金属については、いずれの調査地でも環境基準値を超過する試料はなかった。

クロマツ根圏における菌根相

東日本大震災による津波被害を受けた宮城県の海岸林 2 カ所において 2012 年及び 2013 年に採取したクロマツ成木根圏試料について、DNA ベースで菌根菌群集解析を行った。多様度指数 (Simpson's D 及び Shannon's H) はいずれも野蒜で高く、同地の菌根菌種多様性が両年ともに山下浜よりも高かったことが示唆された。また、野蒜では多様度指数が 2012 年から 2013 年にかけて減少していたのに対し、山下浜では増加傾向が認められた。

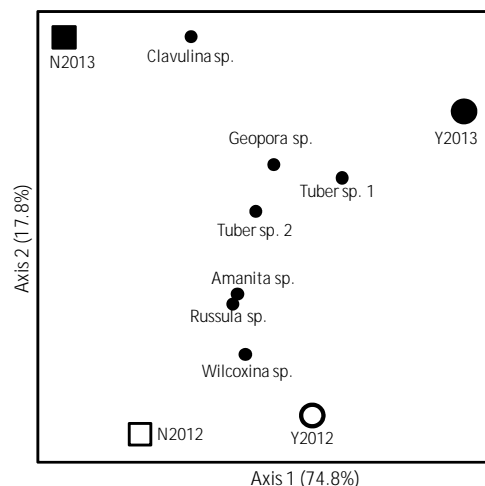


図 1. 各年の各調査サイトにおける菌根群集の主成分分析

野蒜を四角、山下浜を丸で、2012 年を白抜き、2013 年を黒塗りで示す。また、菌根群集に強い影響が認められた菌根菌の属を小さい黒塗りの丸で示す。

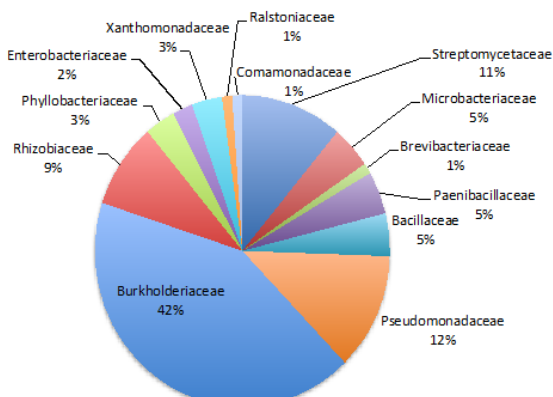
主成分分析では、第 1 軸が 74.8%、第 2 軸が 17.8% を説明しており、おおむね良好な結果が得られた (図 2)。2012 年の菌根群集には *Wilcoxina* 属菌、2013 年には *Clavulina* 属菌、*Geopora* 属菌および *Tuber* 属菌の影響が強く

認められた。*Wilcoxina* 属菌は攪乱跡地によく観察される種であり、震災 1 年後の 2012 年には多く認められたが、2013 年には他の菌の定着に伴い占有率が低くなったと考えられる。日本の海岸林における優占菌根菌種として知られる *Cenococcum geophilum* は、本調査地ではほとんど検出されなかった。東北の海岸林で同種がもともと少ないことに加え（松田ら、第 122 回日本森林学会大会）、津波による攪乱が生じたことが要因として考えられる。

(2) 有用微生物のスクリーニング

クロマツ根圏における細菌相

クロマツ実生根圏土壌（根に近い 2 次根圏土壌）には $10^7 \sim 10^8$ cfu/g-drysoil の細菌が存在しており、塩基配列から Bacillaceae、Brevibacteriaceae、Burkholderiaceae、Comamonadaceae、Enterobacteriaceae、Microbacteriaceae、Paenibacillaceae、Phyllobacteriaceae、Pseudomonadaceae、Ralstoniaceae、Rhizobiaceae、Streptomycetaceae、Xanthomonadaceae の 13 科に分類された（図 2）。このうち Bacillaceae、Burkholderiaceae、Enterobacteriaceae、Paenibacillaceae、Pseudomonadaceae、Rhizobiaceae の 6 科については、過去に PGPR としての報告がある。



90 bacteria classified at Family level

図 2. 海岸林クロマツ根圏土壌における細菌相（科レベル）

一次スクリーニング

シロイヌナズナを用いたスクリーニングにおいて、9 菌株が対照区（R2A 培地）と比較して有意に根端数を増加させた（Steel test, $p < 0.05$ ）。さらに高い平均根端数を示した 7 菌株を加えて、計 16 菌株を PGPR 候補株とした。形態及び 16S rRNA 領域のシーケンス結果から、*Ralstonia pickettii*、*Pantoea* sp.、*Streptomyces* sp. 1、*Raoultella ornithinolytica*、*Bacillus megaterium*、*Burkholderia sediminicola*、*Rhizobium* sp.、*Leifsonia* sp. 1、*Streptomyces* sp. 2、*Burkholderia sediminicola*、*Burkholderia* sp. 1、*Burkholderia* sp. 2、*Burkholderia* sp. 3、*Burkholderia caledonica*、*Burkholderia phenazinium*、*Leifsonia* sp. 2 と推定された。なかには、対照区と比較して主根長もしくはは

全根長において有意に伸長効果が認められたものも含まれる（各 7 菌株、Steel test, $p < 0.05$ ）。

二次スクリーニング

無菌クロマツへの接種試験の結果、供試した細菌株中 11 株（*Burkholderia* spp. 4 株、*Leifsonia* spp. 2 株、*Lysinibacillus* sp. 1 株、*Paenibacillus* sp. 1 株、*Brevibacterium* sp. 1 株、*Rhizobium* sp. 1 株、*Dyella* sp. 1 株）で対照区と比較して有意に根端数が増加した（対照区平均 89 に対し 140 以上）。

クロマツ-菌根菌系との 3 者共培養試験では、2 者培養系の結果を補強するデータは得られなかった。菌根菌-候補細菌の対峙培養で、*Streptomyces* 属 2 株と *Raoultella ornithinolytica* において菌糸伸長の阻害が認められた。

PGPR 特性評価

PGPR 候補の 16 株を対象に行った生化学試験において、*nifH* 遺伝子は *Ralstonia pickettii* のみ、りん溶解能は *Pantoea* sp. のみで確認された。また、IAA 酢酸の生産量は *Pantoea* sp. と *Raoultella* sp. で他菌と比べて多く、ACCd 活性は *Burkholderia* spp. で他菌よりも高い傾向が確認された。単独で生長促進能を規定する項目はなく、従来試験項目のみでの PGPR 活性評価は十分でないことが確認された。

以上の結果から、*Burkholderia* 属菌と *Leifsonia* 属菌がシロイヌナズナとクロマツの両方に PGPR 効果を有することが示唆された。さらに、草本であるシロイヌナズナと木本であるクロマツで PGPR 効果を示す細菌種が *Burkholderia* 属菌と *Leifsonia* 属菌以外は全て異なっていたことが興味深い。根の促進メカニズムが草本と木本で異なる可能性を示しており、今後の解明に期待が持てる。一方で課題も見られ、クロマツの栽培条件を均一化し安定した結果を得ること（例えば 3 反復中 2 反復で同じような結果が得られても、残りの 1 反復で値が大幅に異なるなど）PGPR 効果が菌根菌の菌根共生に与える影響についてどのような実験系が適当であるかの検討が必要である。

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 3 件）

井上美那・中川憲一・谷口武士・山本福壽・山中原和. 海水による土壌冠水がホウライチク（*Bambusa multiplex*）の生育に及ぼす影響. 日本緑化学会誌, 査読有, Vol.40, No.1, 2014, 43-48

立石麻紀子・Ailijian Maimaiti・辻将大・井上美那・谷口武士・山本福壽・山中原和. 海

水浸漬がタブノキ、アカマツ、クロマツの整理に与える影響の経時変化. 日本緑化工学会誌, 査読有, Vol.40, No.1, 2014, 54-59

Taniguchi T., Usuki H., Kikuchi J., Hirobe M., Miki N., Fukuda K., Zhang G, Wang L., Yoshikawa K., Yamanaka N. Colonization and community structure of root-associated microorganisms of *Sabina vulgaris* with soil depth in a semiarid desert ecosystem with shallow groundwater. *Mycorrhiza*, 査読有, Vol.22, No.6, 2012, 419-328
DOI: 10.1007/s00572-011-0417-8

[学会発表](計8件)

中村慎崇・田中千尋・竹内祐子. プナ科樹木の根にみられるピョウタケ目菌の多様性. 第126回日本森林学会大会, 2015年3月28日, 北海道大学(北海道札幌市)

井上美那・山中典和・山本福壽・谷口武士. 海水冠水から2ヶ月後の樹体内塩分蓄積. 第125回日本森林学会大会, 2014年3月28日, さいたま市大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

中村慎崇・田中千尋・竹内祐子. ツブラジイ外生菌根におけるピョウタケ目内生菌群集に関する研究. 第125回日本森林学会大会, 2014年3月28日, さいたま市大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

井上美那・香口成美・立石麻紀子・谷口武士・山本福壽・山中典和. 海水による冠水が東日本太平洋沿岸域に分布する樹種の生理・生存におよぼす影響I 枯死過程. 第124回日本森林学会大会, 2013年3月26日, 岩手大学(岩手県盛岡市)

香口成美・井上美那・立石麻紀子・谷口武士・山本福壽・山中典和. 海水による冠水が東日本太平洋沿岸域に分布する樹種の生理・生存におよぼす影響II 樹体内の塩集積. 第124回日本森林学会大会, 2013年3月26日, 岩手大学(岩手県盛岡市)

立石麻紀子・Ailijian Maimaiti・辻将太・香口成美・井上美那・谷口武士・山本福壽・山中典和. 海水による冠水が東日本太平洋沿岸域に分布する樹種の生理・生存におよぼす影響III 樹液流動態. 第124回日本森林学会大会, 2013年3月26日, 岩手大学(岩手県盛岡市)

Hiramoto, M., Kataoka, R., Tanaka, C., Futai, K., Takeuchi, Y. Screening of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their relation to the ectomycorrhizal development in Japanese black pine rhizosphere. 7th International Conference on Mycorrhiza, 2013

年1月11日、デリー(インド)

Nakamura, N., Tanaka, C., Takeuchi, Y. Hidden fungal community inside ectomycorrhizas at *Castanopsis*-dominated forest. 7th International Conference on Mycorrhiza, 2013年1月7日、デリー(インド)

[図書](計3件)

谷口武士, 丸善出版, 「菌根共生」を利用した耐乾・耐塩性苗木の精算(pp66-67)『乾燥地を救う知恵と技術 砂漠化・土地劣化・干ばつ問題への対処法』鳥取大学乾燥地研究センター監修), 2014, 153頁

谷口武士, 京都大学学術出版会, 第3章植物の定着に関わる菌類—海岸クロマツ・ニセアカシア林における菌根共生(pp41-58)『微生物生態学への招待～森をめぐるミクロな世界～』二井一禎・竹内祐子・山崎理正編), 2012, 372頁

片岡良太, 京都大学学術出版会, 第4章クロマツの根圏で起こる微生物間相互作用—細菌がカビを助ける!(pp59-73)『微生物生態学への招待～森をめぐるミクロな世界～』二井一禎・竹内祐子・山崎理正編), 2012, 372頁

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 祐子 (TAKEUCHI, Yuko)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 80452283

(2)研究分担者

谷口 武士 (TANIGUCHI, Takeushi)
鳥取大学・乾燥地研究センター・助教
研究者番号: 10524275

片岡 良太 (KATAOKA, Ryota)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 00635104

(3)連携研究者

中村 克典 (NAKAMURA, Katsunori)
独立行政法人森林総合研究所・東北支所・チーム長
研究者番号: 40343785

前原 紀敏 (MAEHARA, Noritoshi)
独立行政法人森林総合研究所・東北支所・主任研究員
研究者番号: 20343808