

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780022

研究課題名(和文) 菌根菌を活用したツツジ科果樹の低投入環境保全型栽培技術の開発

研究課題名(英文) Development of low input sustainable cultivation method of blueberries with mycorrhizal fungi.

研究代表者

伴 琢也 (Takuya, Ban)

東京農工大学・農学部・准教授

研究者番号：20325046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：エリコイド菌根菌は子囊菌門および担子菌門に属し、ツツジ科果樹の細根に菌根を形成する。本菌根は土壌中の栄養塩類の吸収と宿主植物への輸送などの機能を有し、ツツジ科植物の条件不利地域における自生を可能とするものである。本研究では我が国で自生または栽培されているツツジ科果樹(ブルーベリーおよびナツハゼ)を対象とし、根系における菌根菌の感染状況の把握と菌種を同定した。その結果、これらの根系には菌根菌が共生しており、特にブルーベリーについては、二次根と比較して一次根の菌根化率が高いことが明らかになった。また、菌相については栽培地域の環境要因が影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The hair roots of ericaceous plants are in symbiotic association with ericoid mycorrhizal fungi. Ericoid mycorrhizas play very important roles in acquisition of nutrient of their host's and the high tolerance to the stresses by factors within the acidic soils. In this study, the mycorrhizal colonization conditions and the microbial flora in the hair roots of blueberries and *Vaccinium oldhamii* Miq. in Japan were investigated. The mycorrhizal colonization levels of these plants were high and the microbial floras were different among the cultivated area. These results indicate that the growing conditions may affect the microbial floras in the hair root of blueberries.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：ブルーベリー ナツハゼ エリコイド菌根菌 根系 菌相

### 1. 研究開始当初の背景

強酸性の土壌では、土壌粒子中のアルミニウムを始めとする重金属イオンが溶出し、溶出した過剰な重金属イオンが植物の根に障害を与えることが知られている。また、酸性条件下では硝化細菌の活性が抑制されることから、窒素はアンモニア態で保持される。そのため、強酸性の土壌に自生する植物は、重金属イオン耐性を有し、窒素源としてアンモニア態窒素を要求するが多い。ツツジ科果樹はもともとヒースランドをはじめとする未分解の有機物が堆積して強酸性を示す湿潤な土壌に自生している場合が多い。強酸性土壌においてツツジ科果樹の自生を可能とするメカニズムには今だ不明な点が多いが、近年、根系に共生するエリコイド菌根菌(以下ERM菌)の存在が注目されている。

ERM菌は子囊菌門または担子菌門に分類され、ツツジ科植物の細根に感染する。(Hair root, R. L. Petersonら, 2004)ERM菌は宿主であるツツジ科植物から栄養素の供給を受けるが、菌根よりプロテアーゼやホスファターゼを分泌して土壌中の有機物の分解とリンの無機化を促進し、もともと土中に存在する無機栄養分とともに菌糸を通じて植物体に供給している。また,ERMは宿主の重金属吸収を抑制する作用を有することも報告されており、以上のような相互作用によりツツジ科植物は他の植物が成長困難な劣悪な環境下においても健全に成長できるものと考えられている(Cairney・Meharg, 2003)。

国外における調査では、ヒースランドを始めとする湿潤酸性土壌に自生するツツジ科植物の根系にERM菌が共生する場合が非常に多く、ツツジ科植物が生育している植生タイプがERM菌の多様性に非常に大きな影響を及ぼしていることが明らかにされている(Bougoureら, 2007)。また,ERM菌が共生した植物とそれ以外の植物との間でERM菌の菌糸を介した生態的ネットワークが存在する可能性があることが報告されている(Cairney・Meharg, 2003)。さらにERM菌の中でも優れた機能を有する種を単離・増殖し、生物肥料としての活用を提言する例もある(Noeら, 2000)。国内におけるERM菌および菌根に関する研究は、主に森林地帯に自生するツツジ科植物(イソツツジ:飯島ら,2005他)を対象としており、特に耕地における調査は前例がない。

### 2. 研究の目的

我が国で自生するツツジ科果樹およびツツジ科果樹の中でも最も栽培面積が大きいブルーベリーを調査対象とし,ERM菌の感染状況を解明する。特にブルーベリーに関しては、我が国における代表的な土性であるクロボク土、さらに赤色土、灰色低地土および水田転換畑に栽植されているブルーベリーの根系を調査する。さらに、これらERM菌の養分獲得能を評価し,ERM菌を活用したブルー

ベリーの栽培方法を考察する。

### 3. 研究の方法

本研究課題の計画・方法の概要に従い、以下の項目について調査を実施した。

#### (1)異なる地域で栽培されたブルーベリーの根系に共生する菌根菌相について

材料として東京都府中市(黒ボク土)、京都府京丹後市(灰色低地土)、島根県雲南市(灰色低地土)および松江市(赤色土)に栽植のラビットアイブルーベリー‘Woodard’を供試した。2011年7月~8月、各調査地において健全に成長する成木個体よりhair rootを採取した。表面に付着した微細土壌等を除去するため、hair rootを蒸留水およびエアロゾルOTを用いて洗浄し、分析まで75%エタノール中に保存した。各hair rootからSDS法によりDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型として、ERM菌のinternal transcribed spacer(ITS)領域をターゲットとしたPCRを行った(Villarreal-Ruizら, 2004)。プライマーとしてITS1f(Gardes・Bruns, 1993)およびITS4(Whiteら, 1990)を用いた。得られたPCR産物を精製し、塩基配列を決定した。以上の結果から、異なる地域で栽培されたブルーベリーの根系に共生する菌根菌相を比較考察した。

#### (2)ブルーベリーの樹齢と根系におけるhair rootの菌根化率の関係

材料としてラビットアイブルーベリー‘Tifblue’の挿し木1年生苗(2011年5月挿し木)、2年生苗(2010年5月挿し木)、44年生成木を5個体ずつ供試した。挿し木苗について、いずれの個体も健全に成長した成木から穂木(休眠枝)を採取し、ピートモスと鹿沼土の混合培養土(3:1,体積比)を用いて挿し木繁殖したものである。2012年5月から6月にかけて各個体から根部を採取し、水道水及び0.27%ピロリン酸ソーダ水溶液で洗浄した。染色のため、根部を10%水酸化カリウム水溶液に48時間、1%塩酸に24時間浸漬し、次いで0.05%ラクトフェノール-トリパンブルー溶液に5日間浸漬した。染色した根部は検鏡までラクトグリセロール溶液中に保存した。

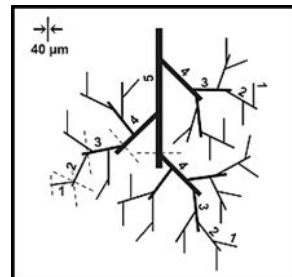


図1 Fitter(1982)が示したブルーベリーの根系モデルに基づき,Estradaら(2008)が作成したハイブッシュブルーベリーの根系モデル

Fitter ら (1982) の方法に従い染色した根部を分類し、各個体から 1 および 2 次根を採取した (図 1)。

光学顕微鏡下で長さ 500 $\mu$ m の 1 および 2 次根を観察し、表皮細胞におけるエリコイド菌根菌の菌糸コイルの有無を確認した。(菌糸コイルが確認できた断片数 / 50 断片)  $\times$  100 を算出し、菌根化率とした。

以上の結果から、異なる樹齢のブルーベリーから採取した hair root の菌根化率を根の次数別に比較考察した。

### (3) ツツジ科スノキ属野生種ナツハゼの自生地土壌の調査と根系発達特性の解明

材料として島根県松江市 (2012 年 7 月採取)、京都府京丹後市 (同年 8 月採取)、群馬県みどり市 (同年 10 月採取)、東京都八王子市 (同年 11 月採取)、新潟県新潟市 (同年 12 月採取) に自生するナツハゼを 3 個体ずつ掘り上げて採取し、根部と土壌を供試した。採取した hair root は 4 で冷蔵し、採取から 1 週間以内に保存処理を行った。まず、hair root を超音波洗浄して大まかな附着物を除去した。その後、微細な土壌や根の表面に附着した菌糸を除去するために、蒸留水とエアロゾル OT を用いて洗浄した。洗浄した hair root は分析まで 75% エタノール中に保存した。

菌根菌相の解明のため、hair root から SDS 法によりゲノム DNA を抽出し、これを鋳型とした PCR を行って内生菌の ITS 領域を増幅した。プライマーは、ITS1F\_KYO1 (Toju ら, 2012) および ITS4 (White ら, 1990) を用いた。得られた PCR 産物を精製・増幅し、シーケンス解析により塩基配列を決定した。相同性検索は、米国立生物工学情報センターが提供する BLAST により行った。

菌根化率について、根の次数を Fitter (1982) の根系モデルに従って先端から分岐ごとに設定し、研究の方法 (2) と同じ方法で測定した。菌根化率を測定したサンプルを用いて光学顕微鏡下で 1 および 2 次根の先端から 50 $\mu$ m の部分の直径を測定した。土壌試料については pH を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 異なる地域で栽培されたブルーベリーの根系に共生する菌根菌相について

PCR 産物のシーケンス解析および相同性検索の結果から、子囊菌門および担子菌門に属する内生菌の存在が確認できた。本研究により、我が国で経済栽培されているブルーベリーの根系にもエリコイド菌根菌が共生していることが明らかになった。

次に単離された菌類の ITS 領域の塩基配列に基づく分子系統樹を作成した (図 2)。その結果、子囊菌門の菌相は地域ごとに大別でき、特に担子菌門に属する菌類は京丹後市のサンプルでのみ存在が確認できた。本調査は樹の管理作業 (剪定、施肥条件他) がほぼ同じ園で実施しており、特に京丹後市、松江市、

雲南市には同一母樹から穂木を採取し、挿し木繁殖した苗を定植している。以上の結果はブルーベリーの栽培環境が根系に共生するエリコイド菌根菌相に影響することを示唆するものである。

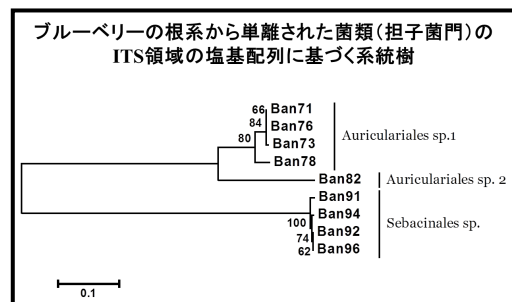
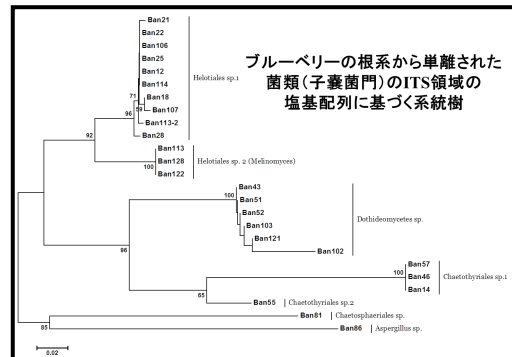


図 2 ブルーベリーの根系から単離された菌類の ITS 領域の塩基配列に基づく系統樹 (上: 子囊菌門, 下: 担子菌門)

### (2) ブルーベリーの樹齢と根系における hair root の菌根化率の関係

光学顕微鏡でブルーベリーの hair root を観察したところ、表皮細胞中にエリコイド菌根菌の菌糸コイルおよびエンドファイトの存在が確認できた (図 3)。

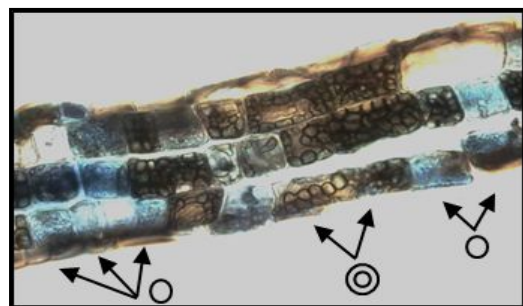


図 3 ブルーベリーの hair root に共生する内生菌  
図中の 印はエリコイド菌根菌が共生している表皮細胞を示し、印は表皮細胞中のエンドファイトの存在を示す。

菌根化率は同一樹齢では 2 次根と比較して 1 次根で高かった (図 4)。樹齢と菌根化率の間には相関がなかった。ブルーベリーの挿し木繁殖において休眠枝を穂木とした場合、挿し木約 2~3 か月後に発根する (Gough, 1991)。しかし、根の成長は夏季の高温で抑制される

ため、1年生苗の根の伸長は前年の秋季および翌年の春季に限定される。本研究により、1年生苗の hair root における高い菌根化率が明らかになった。以上の結果は、ブルーベリーの根に対するエリコイド菌根菌の感染は比較的短時間で完了することを示唆するものである。

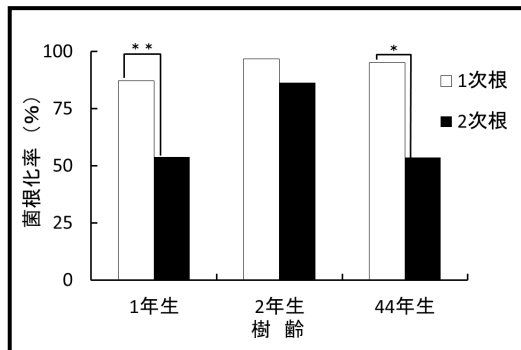


図4 各樹齢のブルーベリーの hair root における表皮細胞の菌根化率(ERM菌 + エンドフアイト)

### (3) ツツジ科スノキ属野生種ナツハゼの自生地土壌の調査と根系発達特性の解明

ナツハゼの根の表皮細胞においてブルーベリーと同様にエリコイド菌根菌および Dark-Septate Endophytic Fungi (DSE) と呼ばれる内生菌が確認できた(図5)。

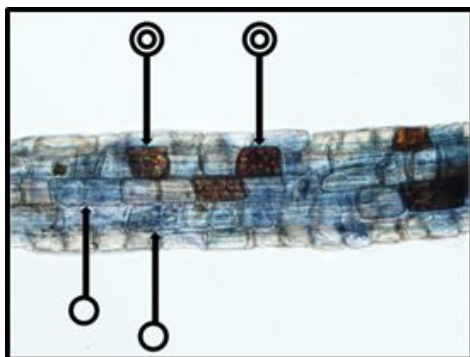


図5 ナツハゼの hair root に共生する内生菌 図中の 印はエリコイド菌根菌が共生している表皮細胞を示し、 印は表皮細胞中の DSE の存在を示す。

また、わずかではあったがアーバスキュラー菌根菌の菌糸や嚢状体に類似した共生器官も存在した。菌根化率は全てのナツハゼでほぼ 100%と非常に高く、1次根と2次根で差はなかった。研究(2)において、挿し木繁殖した1および2年生のポット植えのブルーベリーの菌根化率は、1次根と比較して2次根で低いことを報告している。ナツハゼの高い菌根化率は、互いの根圏が接触しないポット栽培とは異なり、その自生地には様々なツツジ科植物が混生し、共生菌が普遍的に存在するためであるかもしれない。ナツハゼの1および2次根の直径はそれぞれ 40~55μm、

60~75μm であり、典型的な hair root 様の形態を示した。また、供試した自生地土壌の pH は平均 4.4 であった。ブルーベリーの若い根の直径は 50~75μm と報告されていることから (Eck・Childers, 1966), ナツハゼの根はブルーベリーと類似しており、ブルーベリー同様に酸性土壌を好むことが示唆された。

PCR 産物のシーケンス解析および相同性検索の結果から、子囊菌門および担子菌門、グロムス門に属する内生菌の存在が確認できた(表1)。最も検出数の多かった子囊菌では、ERM 菌を含む *Oidiodendron* 属やビョウタケ目の菌が多く検出された。前報において、hair root の表皮細胞中に観察された菌糸コイルは、主にこれらの子囊菌によって形成されていたと考えられる。担子菌門では、その多くが外生菌根菌として知られるイグチ目やベニタケ目に属する菌が検出された。また、主にアーバスキュラー菌根菌(以下、AM 菌)によって構成されるグロムス門では、グロムス属の菌が検出された。スノキ属植物と AM 菌の共生関係に関する報告は非常に少ないが、Koske ら(1990)はハワイに自生するスノキ属植物が AM 菌と共生していたことを報告している。前報では、ナツハゼの根内に AM 菌の嚢状体様の器官が観察されたが、本研究の結果と併せると、ナツハゼが AM 菌と共生することが強く示唆された。以上から、ナツハゼの hair root における菌根菌相は、子囊菌門、担子菌門、そしてグロムス門にわたる多様な菌類によって構成されることが明らかになった。

表1 各調査地から検出された菌種とその分類

| 調査地 | 分類  | 菌種                                 | 調査地            | 分類                            | 菌種                         |   |                      |
|-----|-----|------------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------------------|---|----------------------|
| 高知県 | A   | <i>Ceratopogon zoophilum</i>       | 群馬県            | A                             | Chaetothyriales sp.2       |   |                      |
|     | A   | Chaetothyriales sp.4               |                | A                             | Helotiales sp.2            |   |                      |
|     | A   | Helotiales sp.1                    |                | A                             | Helotiales sp.4            |   |                      |
|     | A   | Helotiales sp.3                    |                | A                             | Helotiales sp.7            |   |                      |
|     | A   | Helotiales sp.8                    |                | A                             | Sordariomycetes sp.        |   |                      |
|     | A   | Helotiales sp.9                    |                | A                             | <i>Rhizoscyphus ericae</i> |   |                      |
|     | G   | Glomerales sp.                     |                | B                             | Agaricales sp.1            |   |                      |
|     | 京都府 | A                                  |                | Chaetothyriales sp.3          | 新潟県                        | A | Chaetothyriales sp.1 |
|     |     | A                                  |                | <i>Cryptosporopsis ericae</i> |                            | A | Chaetothyriales sp.5 |
|     |     | A                                  |                | Helotiales sp.1               |                            | A | Dothideomycetes sp.  |
| A   |     | Helotiales sp.5                    | A              | Helotiales sp.1               |                            |   |                      |
| A   |     | Helotiales sp.6                    | A              | Helotiales sp.2               |                            |   |                      |
| A   |     | <i>Oidiodendron chlamyosporium</i> | A              | <i>Oidiodendron maius</i>     |                            |   |                      |
| A   |     | <i>Oidiodendron maius</i>          |                |                               |                            |   |                      |
| 東京都 | A   | <i>Oidiodendron sp.</i>            |                |                               |                            |   |                      |
|     | A   | Pezizomycotina sp.1                |                |                               |                            |   |                      |
|     | A   | Chaetothyriales sp.2               |                |                               |                            |   |                      |
|     | A   | Helotiales sp.1                    |                |                               |                            |   |                      |
|     | A   | <i>Oidiodendron maius</i>          |                |                               |                            |   |                      |
|     | B   | Boletales sp.1                     |                |                               |                            |   |                      |
|     | B   | Boletales sp.2                     |                |                               |                            |   |                      |
|     |     | E                                  | Russulales sp. |                               |                            |   |                      |

A: 子囊菌門, B: 担子菌門, G: グロムス門を示す

現在、本研究で明らかになった我が国で栽培・自生するツツジ果樹の根系に共生するERM菌のリン獲得能を解析している。その結果、一部のERM菌が難溶性無機態リンの分解能を有することが明らかになった。今後はこれらエリコイド菌根菌のバイオ肥料としての活用方法を検討する。

### 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1件)

Takashi Baba, Dai Hirose, Nobumitsu Sasaki, Naoaki Watanabe, Nobuo Kobayashi, Yuji Kurashige, Fraidoon Karimi and Takuya Ban. 2016. Mycorrhizal Formation and Diversity of Endophytic Fungi in Hair Roots of *Vaccinium oldhamii* Miq. in Japan. *Microbes Environ.* In press. 査読有.

〔学会発表〕(計4件)

馬場隆士・広瀬 大・佐々木信光・渡辺直明・小林伸雄・倉重祐二・伴 琢也．わが国においてツツジ科果樹に内生する菌根菌相の解明(第4報)スノキ属野生種ナツハゼの hair root における菌根菌相について．園芸学会平成26年度秋季大会．平成26年9月28日．佐賀大学農学部(佐賀県佐賀市)

馬場隆士・小川明日香・廣瀬 大・渡辺直明・小林伸雄・倉重祐二・伴 琢也．我が国においてツツジ科果樹に内生する菌根菌相の解明(第3報)スノキ属ナツハゼの hair root における菌根化率について．園芸学会平成25年度春季大会．平成25年3月24日．東京農工大学工学部(東京都小金井市)．

小川明日香・長谷川莉代・馬場隆士・広瀬大・佐々木信光・乃万 了・伴 琢也．我が国においてツツジ科果樹に内生する菌根菌相の解明(第2報)ブルーベリーの樹齢と hair root の菌根化率の関係．園芸学会平成24年度秋季大会．平成24年9月23日．福井大学文京キャンパス(福井県福井市)

伴 琢也・山室美恵・広瀬 大・佐々木信光・小林省蔵・松田陽介・小林伸雄・倉重祐二・横山 正．我が国においてツツジ科果樹に内生する菌根菌相の解明(第1報)ブルーベリー圃場の土壌の種類が菌相に及ぼす影響．園芸学会平成24年度春季大会．平成24年3月29日．大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府堺市)

〔図書〕(計1件)

伴 琢也．ブルーベリー最新栽培テクニック．NHK テレビテキスト「趣味の園芸」7月号．pp.60~67．2015年6月21日．NHK出版．東京．

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ：

<http://web.tuat.ac.jp/~fscenter/ban.html>

[http://www.rd.tuat.ac.jp/activities/factors/search/20150626\\_2.html](http://www.rd.tuat.ac.jp/activities/factors/search/20150626_2.html)

(1)研究代表者

伴 琢也 (BAN, Takuya)

東京農工大学・農学部・准教授

研究者番号：20325046

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし