Mini Review

植物共生微生物・VA菌根菌の培養は可能か？

Can we culture VA mycorrhizal fungi asymbiotically?

斎藤 雅典*

MASANORI SAITO*

農林水産省草地試験場生態部土壌微生物研究室

〒329-2793 栃木県那須郡西那須野町千本松768

*Laboratory of Soil Microbiology, Department of Ecology, National Grassland Research Institute,
Nishi-nasuno, Tochigi, 329-2793 Japan*

(受付 1999年4月27日—受理 1999年6月1日)

Vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal fungi belonging to order Glomales, Zygomycetes, are obligately associated with plant roots. To culture the fungi, we have to establish the symbiosis by growing host plants inoculated with the fungi. Many trials have been done to culture the fungi asymbiotically, but none have succeeded to date. The fungi can grow asymbiotically from spores or intraradical hyphae for some periods, but do not complete their life cycle; spore are not reproduced under asymbiotic conditions. Possible reasons for the failure in asymbiotic proliferation were discussed. We are not able to exclude the possibility that we have not yet obtained all the compounds essential to the asymbiotic growth, but this possibility is low. During the symbiotic growth phase of the fungi, functional differentiation may occur in the intraradical and extraradical hyphae. This may be one of the keys to solving the problem.

Key words: VA mycorrhizal fungi, arbuscular mycorrhizal fungi, glomales, symbiosis, culture

1. VA菌根菌とは何か？

VA菌根菌 (vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, VAM fungi) は接合菌類 Glomales 目に属する糸状菌であり、植物の根に共生し、宿主である植物の養分吸収 (特にリン酸) の促進、宿主への乾燥ストレス耐性付与やある種の病害に対する抵抗性向上等の作用のあることが知られている。そのため、微生物資材として本菌類の農業利用が進められており、このことに関連しては、すでに多くの解説がある^{12,18,19,26)}。本菌類を扱う研究者集団の間では、

アーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM fungi) という呼称が主に使用されているが¹⁹⁾、一般的にはVA菌根菌という用語も広く使用されているので、本稿ではこれを用いることにする。この菌は、植物の根の内部に共生し、植物より炭素化合物をエネルギー源として受け取る。その一方で、根から土壤中へ伸ばした菌糸からリン酸を吸収し、それを宿主である植物へ供給する。この菌はこうした植物との共生によってのみ、子孫 (新たな孢子形成) を残すことができる。VA菌根菌の培養のためには、土壤から分離した孢子を植物の根へ接種し、共生関係を成立させる必要がある。菌を単独で培養しようという試みが、過去から数多くなされてきたが、いまだ成功していない。菌単独での培養

* e-mail: msaito@ngri.affrc.go.jp

という点では、VA 菌根菌は non-culturable かも知れないが、宿主との共生条件を維持すれば culturable ではある。本稿では、なぜこの菌類が共生条件でしか増殖できないのか、について論議する。

2. VA 菌根菌のライフサイクル

VA 菌根菌の培養可能性を論議する前に、本菌類のライフサイクルについて簡単に述べる^{15,22,24}。本菌類は、1 個の胞子に数百から数千の核が存在する直径 50~500 μm の大型の胞子を主に土壤中に形成する。接合菌類に分類されているが、接合胞子形成および有性世代ははまだ確認されていない。適当な環境条件になると胞子は発芽し、宿主となる植物根を求めて発芽菌糸を伸張する。その菌糸が根と遭遇すると根の表皮細胞表面に付着器が形成される。菌は、根内に内生菌糸 (intraradical hyphae) を伸ばし、樹枝状体 (arbuscule)・嚢状体 (vesicle) という共生特異的器官を形成する (この共生特異的器官が VA 菌根菌と呼ばれる理由である)。こうした根内での菌の増殖とともに、根から土壤中へ広く外生菌糸 (extraradical hyphae) が伸張し、外生菌糸の先

端部において新たな胞子の形成が行われる (Fig. 1)。

3. VA 菌根菌培養の試み

VA 菌根菌は農業上きわめて有用な微生物であるが、共生条件でしか増殖できないために、その培養には労力と時間がかかり、農業用接種資材としてはかなり高価なものになっている。そのため、この菌を単独で培養しようという試みが古くから数多くなされてきた^{1,10,24}。まず、胞子の発芽率をいかに高めるか、また、発芽後の菌糸の生長をどれだけ維持することが出来るか、という観点から、培地へ種々の有機物を添加して発芽や菌糸生長を調べる研究が進められてきた。その結果、亜硫酸化合物やフラボノイド化合物、 CO_2 等が、発芽を促進したり、菌糸の生長を促進することが明らかになってきた。しかし、いずれの場合も宿主植物との共生なしに、新たな胞子を形成することはなかった。また、根粒形成等のシグナル物質として注目されているフラボノイド化合物の一部には胞子発芽促進等の作用があるものの、菌根共生成立に必須な物質ではないことが

Fig. 1. Schematic representation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Phosphorus in soil (P) is absorbed by extraradical hyphae and transported through hyphae.

確認されている³⁾。

新たな孢子形成に係わる遺伝子群は非共生状態では眠っているが、植物との共生を成立によって、そ

れらの遺伝子群が発現することは容易に予想できる。そうであるならば、それらの遺伝子群がオンの状態、すなわち共生状態にある菌糸を再成長させる

Table 1. Effect of medium on hyphal re-growth of *Glomus mosseae* from colonized onion root pieces^{a, b)}.

Medium	Proportion of root pieces showing hyphal re-growth (%) ^{c)}
Deionized water	24
2% albumin	0
0.1% peptone+0.02% yeast extract	75
0.5% peptone+0.2% yeast extract+1% glucose	56

a) Onion root pieces (5 mm length) colonized with *G. mosseae* were surface sterilized with 2% Chloramine T and streptomycine¹⁰⁾ and were incubated at 25°C for 6 days.

b) unpublished results (SAITO).

c) About 50 pieces were examined.

Fig. 2. Hyphal re-growth of *Glomus mosseae* from colonized root pieces (SAITO, unpublished). (1) Hyphal re-growth from the end of root pieces. (2) Hyphal re-growth from the intraradical hyphae isolated from the roots by enzymatic digestion¹⁶⁾. Arrows: re-grown hyphae, V: vesicles, I: intraradical hyphae. (3) Small spore-like organs (external vesicle) produced after 46 days incubation of colonized root pieces. (4) Small spore-like organs (about 20 μ m in diameter) and branched hyphae. Close up observation of (3).

ことによって菌の単独培養が可能になるかも知れない。実際、菌の共生している根の断片あるいは根組織から単離した菌糸の再成長は可能であり、また、こうした菌糸の再成長にある種の養分が影響を及ぼすことを示唆する結果も得られている^{8,25)} (Table 1)。しかし、こうした菌糸の再生も一時的なもので、新たな胞子の形成には至らない (Fig. 2)。おそらく内生菌糸内の嚢状体などに貯蔵された養分に依存した生長と推定される。Fig. 2-4 に示したように、宿主非存在下で通常の胞子よりかなり小さい胞子状器官 (vegetative spore, external vesicle などと呼ばれる) が、しばしば形成される。こうした小胞子状器官の形成は、胞子のみでの発芽試験においても観察されるが、これらの小胞子状器官からの新たな菌糸の発芽は認められない。しかし、つい最近、*Glomus clarum* という種において、こうした小胞子器官も、もし、共生状態が維持されるのであれば、通常の発芽可能な胞子へと成熟することが報告された⁷⁾。VA 菌根菌と一言に言っても分類的にかなり多様な菌を含んでおり、この報告が *G. clarum* 以外の VA 菌根菌にもあてはまるのか、検討が必要である。

4. いくつかの可能性

1996年カリフォルニア大学バークレー校で開催された 1st International Conference on Mycorrhizae において “Culturing VAM fungi—why have we failed?” という小集会がもたれた。そこでの論議を基にいくつかの可能性を考えてみる。

1) 共生が成立しないと DNA 複製・核の分裂は起こらない：

VA 菌根菌 *Gigaspora margarita* の胞子の発芽や菌糸の初期生長が、DNA 複製阻害剤の影響を受けないことから、当初、この菌の DNA 複製開始に共生が必須であると考えられた。しかし、フローサイトメーター等を用いた試験によって、VA 菌根菌は宿主非存在下でも、菌糸の発芽に伴って DNA 複製・核の分裂を起こしていることが見出され、この可能性は否定された^{2,5)}。

2) 未知の増殖因子の可能性：

すでに述べたように、これまでの数多くの研究から、未知の増殖因子によって、この菌が非共生状態においても増殖できるという可能性は低いように思われる。しかし、全く可能性が無くなったわけでは

ない。

3) 共存する他の微生物の影響：

VA 菌根菌の胞子・菌糸の中に細菌様構造物 (BLO; bacteria like organelle) の存在することは、古くから電子顕微鏡観察で知られていたが、BLO はやはりある種の細菌 (*Burkholderia* 類縁菌) であることがイタリアのグループによって確かめられた⁹⁾。こうした細菌が菌根菌の増殖に何らかの役割を果たしていると考えられているが¹³⁾、これまでのところ、この細菌の単離増殖には成功していない。非共生状態でも、この共生細菌は胞子内に存在しているので、共生細菌の有無が VA 菌根菌の増殖を直接支配しているとは考えにくい。また最近、胞子内に細菌を共存させていない種類の VA 菌根菌のいることも明らかになり、少なくともこれらの体内共生細菌が菌の増殖に必須というわけではないであろう¹¹⁾。

4) 共生状態にある VA 菌根菌は外生菌糸—内生菌糸で機能分化している：

Agrobacterium rhizogenes によって作製した毛状根を宿主植物として用いた研究によると、外生菌糸の生長は根内に樹枝状体が形成されてはじめて活発に進行し、樹枝状体が形成されないと生長は停止するという⁴⁾。樹枝状体は宿主と菌との養分交換の場と考えられているが、樹枝状体を通した宿主からの養分供給が開始されないと、VA 菌根菌は増殖できないのであろう。胞子から発芽したばかりの菌糸と、植物との共生状態にある菌糸とでは、酵素活性の発現が異なっており、かなり代謝様式が異なっているものと推定される¹⁶⁾。

たとえば、Harrison らによって単離されたリン酸トランスポーターは外生菌糸でしか発現していない⁹⁾。炭素代謝の面でも、内生菌糸と外生菌糸では機能分化が起きており、内生菌糸はグルコースなどの糖を吸収利用できるが、外生菌糸は利用できないことなどが明らかになっている^{14,20,23)}。これらのことから、VA 菌根菌が増殖するためには、宿主からの炭素化合物を吸収する樹枝状体等の内生菌糸と土壌からリン酸などを吸収する外生菌糸が一体となっはじめて個体として増殖できる可能性は高い。しかし、*in vitro* で内生、外生の菌糸を一体として培養する系を開発することが困難なためであろうか、これまでにこうした観点から行われた研究はない。

5. 共生菌の進化

VA 菌根菌のみならず、サビ病菌、ウドン粉病菌などの植物寄生病菌、アブラムシ等の昆虫体内に共生する微生物等、宿主となる他の生物に絶対的に依存している微生物は数知れない。それらの中には培養できる微生物も少なからずある。たまたま我々がそれらの微生物を宿主と切り離れた条件で培養出来ないときに、人間の都合で「絶対共生」「絶対寄生」と呼んでいるに過ぎない。少なくとも自然環境下ではその増殖を絶対的に宿主に依存している。これらの微生物は宿主との共進化の過程において単生で増殖する能力を失ってきた、つまり、増殖に必要な環境を宿主に絶対的に依存するようになってきたと思われる。

地球の歴史の中で、VA 菌根菌は、約 4 億年前すなわち陸上植物出現の頃に登場したと推定されている^{17,21)}。植物が陸上へ進出するためには、菌根菌による養分吸収の助けが必要であったのであろう。そのような長い進化の歴史を反映して、VA 菌根菌は、他の寄生あるいは共生生物と異なり、ほとんど宿主特異性を欠いている。アブラナ科など一部の植物を除き、大半の植物と共生することが可能である。このことは、種特異性の高い寄生あるいは共生微生物が宿主に対して複雑な養分要求を有していると予想されるのに対して、VA 菌根菌の増殖には種特異的な要因は少なく、この菌の共生環境を何らかの形でシミュレートすることが出来れば、本菌単独の培養も可能かも知れない。

文 献

- 1) Azcón-Aguilar, C., B. Bago and M. Barea. Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi., in "Mycorrhiza, 2nd Ed". ed. by A. Varma and B. Hock, Springer-Verlag, Berlin. 1999. pp.391-408.
- 2) Bécard, G. and P.E. Pfeffer. 1993. Status of nuclear division in arbuscular-mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma*. **174**: 62-68.
- 3) Bécard, G., L.P. Taylor, D.D. Douds, P.E. Pfeffer and L. Doner. 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 252-258.
- 4) Bécard, G. and Y. Piché. 1989. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*.

- New Phytol. **112**: 77-83.
- 5) Bianciotto, V. and P. Bonfante. 1993. Evidence of DNA replication in an arbuscular mycorrhizal fungus in the absence of the host plant. *Protoplasma*. **176**: 100-105.
- 6) Bianciotto, V., C. Bandi, D. Minerdi, M. Sironi, H.V. Tchy and P. Bonfante. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3005-3010.
- 7) de Souza, F.A. and R.L.L. Berbara. 1998. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. *Mycologia*. **91**: 343-350.
- 8) Gryndler, M., H. Hrselova, I. Chvatalova and M. Vosatka. 1998. In vitro proliferation of *Glomus fistulosum* intraradical hyphae from mycorrhizal root segments of maize. *Micol. Res.* **102**: 1067-1073.
- 9) Harrison, M.J. and M.L. Van Buuren. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*. **378**: 626-629.
- 10) Hepper, C.M. Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. in "VA Mycorrhiza", ed. by L.C. Powell and D.J. Bagyaraj, CRC Press, Boca Raton, Florida. 1984. pp.95-112.
- 11) Hosny, M., D. van Tuinen, F. Jacquin, P. Füller, B. Zhao, V. Gianinazzi-Pearson and P. Franken. 1999. Arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria: how to construct prokaryotic DNA-free genomic libraries from the Glomales. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 425-430.
- 12) 小川 眞. 作物と土とつなぐ共生微生物, 農文協. 1987, 241p.
- 13) Perotto, S. and P. Bonfante. 1997. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends Microbiol.* **5**: 496-501.
- 14) Pfeffer, P.E., D.D. Douds, G. Bécard and Y. Shachar-Hill. 1999. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* **120**: 587-598.
- 15) 斎藤雅典, 上田哲也, 俵谷圭太郎. 1992. VA 菌根菌の分類と生理. *土肥誌*, **63**: 103-113.
- 16) Saito, M. 1995. Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall. *New Phytol.* **129**: 425-431.
- 17) 斎藤雅典. 1997. アーバスキュラー (VA) 菌根菌の進化と環境適応. *土と微生物*, **50**: 25-30.
- 18) 斎藤雅典. 作物栽培における VA 菌根菌の利用, 農業環境を守る微生物利用技術. 家の光協会, 1998. p.164-174.
- 19) 斎藤雅典. 1998. 土壌と植物をつなぐ VA 菌根菌. *化学と生物*, **36**: 682-687
- 20) Shachar-Hill, Y., P.E. Pfeffer, D. Douds, S.F. Osman, L.W. Doner and R.G. Ratcliffe. 1995. Par-

- titioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiol.* **108**: 7–15.
- 21) Simon, L.S., J. Bousquet, R.C. Levesque and M. Lalonde. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. **363**: 67–69.
- 22) Smith, S.E. and D.J. Read. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd ed. Academic Press, 1996. London.
- 23) Solaiman, M.Z. and M. Saito. 1997. Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytol.* **136**: 533–538.
- 24) 俵谷圭太郎. 1998. アーバスキュラー菌根の形成機構と宿主リン栄養の影響. *土と微生物*, **51**: 59–69.
- 25) Williams, P.G. 1990. Disinfecting vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Mycol. Res.* **94**: 995–997.
- 26) 依藤敏明, 鈴木源士. 菌根菌の活かし方. 農文協, 1995.