

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05249

研究課題名(和文) 外来きのこ定着が進行するニュージーランド森林における菌根共生環境因子の解明

研究課題名(英文) Studies on root associated microbes in ectomycorrhizal tree forests in NZ and Japan.

研究代表者

田中 千尋 (TANAKA, Chihiro)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：60263133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではニュージーランドのナンキョクブナにおいて、外来菌の菌根形成を確認するとともに、我が国ブナ科樹木の根圏において優占するHelotiales目菌新属Glutinomycesの四新種について記載した。これらの菌は外生菌根内部に局在することをin situハイブリダイゼーションによって可視化し、本属菌と外生菌根菌との直接的な相互作用について議論した。また、テレオモルフが明らかでない*G. brunneus*において、薬剤耐性マーカーを用いて疑似有性生殖能を調査し、疑似有性生殖による遺伝的多様性創出の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブナ科あるいはナンキョクブナ科は典型的な外生菌根性樹種であるが、植物根内ならびに菌根を含む根圏の微生物についてあまり知見が得られていない。本研究では、ニュージーランドで問題となっているナンキョクブナ林に侵入した外来菌根菌種(ベニテングタケなど)の菌根を調査するとともに、わが国の我が国ブナ科樹木の根圏ならびにマツタケシロの微生物の調査を行った。従来、樹木根圏に優占している可能性が指摘されていたHelotiales目菌について菌学的研究を行いそれらの分類、生態に新知見を加えた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified ectomycorrhiza of black beech with exotic fungus *amanita muscaria* in New Zealand. We also investigated root-associated fungal communities in fagaceous roots in Japan. Hyaloscyphaceous fungi (Helotiales, Ascomycota) were dominantly detected at all four sites. This group of fungi was morphologically and phylogenetically investigated and a new genus *Glutinomyces* and four new species were proposed. We also elucidated their habitat in a mycorrhiza and parasexuality using molecular techniques.

研究分野：森林生物

キーワード：菌根菌 ナンキョクブナ ブナ科 *Glutinomyces* 外生菌根 寄生

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

## 1. 研究開始当初の背景

菌類は、森林生態系において、一般に分解者として有機物を無機物に変える重要な役割を果たしている。さらに、中でも外生菌根菌類(以下きのこ略記)は、森林樹木の共生者として、森林の養分循環や、宿主植物の生存・成長に必要不可欠である。このきのこの共生を積極的に利用し、有用樹木の育苗や、植林時の活着率向上など、森林育成を目指した研究が世界各地で行われている。しかし、菌根共生の林業的な利用には、まだ多くの解明すべき課題が残されている。特に、移植先の林地における共生関係の維持、言い換えればきのこの定着の問題である。例えば、特用林産物のマツタケはアカマツの共生者であり、その経済価値も高いことより、マツタケ感染アカマツ苗の活用が研究されている。しかし、林内に新たに持ち込まれたマツタケが定着することは極めてまれである。この理由として、移植地根圏土壌に生息する他生物の影響が考えられている。具体的には、土着の菌根菌との宿主根を巡る競合や、腐生菌の拮抗による菌根形成の阻害などである。一方、根圏の生物は、共生に負の作用ばかりを及ぼすものではない。例えば、根圏に生息するある種細菌は Mycorrhiza Helper Bacteria として菌根形成を促進することが明らかにされている。このように根圏の生物は、それぞれの個体群間の相互作用を通して、菌根共生に密接に関わると考えられているにも関わらず、それら群集の構造や動態が実際の林地で明らかにされた例は少ない。

## 2. 研究の目的

本研究では、外来外生菌根菌種の定着が進みつつあるニュージーランドの森林と我が国の森林の菌根形成樹種の根圏あるいは菌根の微生物相を、攪乱処理を通して比較・解明することを当初の目的としていた。申請者ならびに海外研究協力者は2014年10月発効の生物多様性条約(CBD)名古屋議定書に対応するため当初協力研究者の所属する組織が調査研究サイトを利用し、標本あるいは試料借り出しの形で研究を進める予定であったが、生物遺伝資源に対するマオリ族の権利の問題(Waitangi Tribunal claim, WAI262)がより複雑化したこと(特に未同定微生物試料の取り扱い)、CBDに対応してニュージーランド政府 Department of Conservation が保護区森林の管理を強化し、彼国研究協力者を通じて申請・許可されていた調査地において、当初予定していたような新たな攪乱を伴う調査が2016年以降行えない可能性が高いことが知らされた。2016年3月に現地を訪れ、共同研究者ならびに研究協力者と討議した結果、ニュージーランドのサンプルについては以前の共同研究の際採取貸与された仮同定菌根標本を用いて、菌根種の同定を行うこと、微生物相調査について、我国ブナ科樹木林あるいはアカマツ林において研究を行うこととし、その結果をニュージーランド側にフィードバックして、ニュージーランドにおける菌根微生物相の解明に役立てることとした。

## 3. 研究の方法

### (1) ナンキョクブナ (*Fuscospora solandri*) 菌根菌の同定

2006年からの共同研究において採取・貸与されたナンキョクブナ(black beech; *Fuscospora solandri*) 菌根標本を用いて、DNA抽出後 ITS 領域を PCR で増幅、塩基配

列を決定し Blast を用いたデータベース検索を行い菌根形成菌の同定を試みた。

( 2 ) アカマツ林のマツタケシロにおける微生物相調査は京都府坂井研究林から得られたサンプルを用いて行った。活性菌根帯とそこから直線上内側に 30cm 離れたシロ内側、外側へ 30 cm 離れたシロ外側の 3 サンプルを採取し分析した。真菌・細菌微生物密度は土壤希釈平板培養法をもちいて、また真菌種については土壤サンプルから調製した DNA から ITS 領域を PCR 法で増幅し、HiSEQ を用い single end 100bp の配列を決定した。

( 3 ) ブナ科樹木優占林における根部内生菌群集の解析と優占種の種同定

京都府を中心に複数の地点でブナ科樹木の根圏土壤をサンプリングし、実態顕微鏡下で植物根を選別した。次亜塩素酸カルシウムを用いて表面殺菌を行ったブナ科樹木の根からピョウタケ目内生菌を分離し、リボソーム DNA の LSU 領域および ITS 領域の塩基配列に基づいて分類群の特定、OTU の識別を行った。また、これらの中から優占種と思われる 4 種については菌叢形態の解析や Helotiales (ピョウタケ目) 子実体のデータベース検索を含めた分子系統解析により、既知近縁種との比較も行い、新属、新種提案を行った。

( 4 ) ブナ科樹木優占林における根部菌存在様式の検討

ブナ科植物菌根から頻繁に分離された Helotiales、Hyaloscyphaceae 所属菌の外生菌根組織における局在様式を *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて明らかにしようとした。近縁菌の 26S rRNA 配列を比較し、候補となる分類群特異的なプローブを合成、digoxigenin-UTP を用いてオリゴ DNA3' 端を用いてラベルし、DIG Nucleic Acid Detection kit を用いて菌根組織中の菌糸を検出した。

( 5 ) *Glutinomyces brunneus* における疑似有性生殖能の確認

*Glutinomyces* 属菌は有性世代が確認されておらず、遺伝的多様性を生じ維持するは未だ明らかでない。そこで *G. brunneus* における疑似有性生殖の可能性を、薬剤耐性遺伝子を用いて、調査した。ベノミル耐性株は供試菌株をベノミル含有培地上で馴化することで得、beta-tubulin 遺伝子のシーケンスをおこない突然変異型を決定した。ハイグロマイシン耐性株は、pPZPHYG2 プラスミドを用いた *Agrobacterium*-mediated transformation 法で作出した。これらの株で対峙培養を行った後、対峙部分を二種類の薬剤を含む選択培地に移植し、二重耐性株の選択培養を行った。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) ナンキョクブナ ( *Fuscospora solandri* ) 菌根菌の同定

保存状態の問題もあり、外生菌根菌の塩基配列が得られたサンプルは比較的少なかった。しかしながら、外来種によって攪乱された林分の *Fuscospora solandri* 菌根サンプルからは侵入種である *Amanita muscaria* の配列が得られた。

( 2 ) アカマツ林マツタケシロにおける微生物相調査

マツタケの生物活性が高いシロ内部では、マツタケ以外の微生物密度は低く、微生物密度に関しては再現性が確認できた。糸状菌相については、*Mortierella* ならびに *Trichoderma* が優占しており、特に *Trichoderma* 属菌はシロ内側で存在頻度が高かった。また、今回の調査地においては白色の *Trichoderma* 属菌が多数分離されており、また、これらの菌株間においては遺伝的多型が見られた。このことから、これら *Trichoderma* 菌はマツタケ菌体に対して寄生・分解に関与している特定の種の可能性が考えられた。

また、細菌相については特定の種の優占は認められなかった。

### (3) ブナ科樹木優占林における根部菌群集の解析と優占種の種同定

四か所のブナ科樹木優占林における根部菌群集を分離培養に基づいて調査した。合計 1029 分離株を収集し、菌叢形態と分子生物学的情報を用いて分類した。Helotiales に属する種が四か所すべてで頻りに検出され、その中でも Hyaloscyphaceae に属し世界的に分布すると推定されるグループが優占していた。これらの分離株と国内の 8 か所から収集した分離株を合わせてこのグループを形態的、系統的に解析した。その結果、頻出した系統から構成されるクレードに合致する Hyaloscyphaceae テレオモルフ種ならびにアナモルフ種は全く知られておらず、新属 *Glutinomyces* を提案した。頻出した系統は、4 新種に分類可能であり、*G. brunneus*, *G. inflatus*, *G. vulgaris*, *G. takaragaikensis* として菌叢形態ならびに分子生物学的情報に基づき新種記載した。

### (4) ブナ科樹木優占林における根部菌存在様式の検討

*Glutinomyces* 属菌は、ブナ科植物菌根から頻りに分離された。また、分離時に菌根チップを表面殺菌しているためこれらは、根部(外生菌根部)に内生している可能性が高い。そこで、外生菌根組織における局在を *in situ* ハイブリダイゼーションにより観察するため、分類群特異的なプローブを開発した。ハイブリダイゼーションシグナルは外生菌根の菌鞘表面と菌鞘内部の外生菌根菌糸間に観察された。さらに、菌鞘における外生菌根菌糸内部への菌糸の侵入も観察された。一方、ハルティヒネットならびに植物組織においてシグナルは検出されなかった。以上の結果は、*G. inflatus*, *G. brunneus* と外生菌根菌との間に菌寄生等の直接的相互作用が存在することが示された。

### (5) *Glutinomyces brunneus* における疑似有性生殖能の確認

ベノミル耐性株とハイグロマイシン B 耐性株を用いた対峙培養で、他の菌株組み合わせより有意に多い二重耐性株を生じ、栄養菌糸間での遺伝子交流が示された。目視と顕微鏡観察により選択培養時における二つの現象が確認された。すなわち、菌糸同士が接触もしくは十分接近した箇所から生じ、二週間以内に伸長が停止する一時的な菌糸伸長と、それに続く永続的に伸長可能な二重耐性株の出現である。なお、これらの現象が観察される菌株の組み合わせは限られており、本種において栄養菌糸不和合性が高度に発達していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計5件)

Nishino K, Matsubara, K, Tanaka C, Yamaguchi M, Fujita T, Yamada A, Hirai N. Seasonal change in the content of the (oxalato)aluminato complex, an antimicrobial substance of the "shiro" of *Tricholoma matsutake*, and the bacterial community structure in the shiro area. *Mushroom Science and Biotechnology* 25: 9–16 (2017). 査読有.

[https://doi.org/10.24465/msb.25.1\\_9](https://doi.org/10.24465/msb.25.1_9)

Nakamura N, Tanaka E, Tanaka C, Tekeuchi-Kaneko Y. Localization of helotialean fungi on ectomycorrhizae of *Castanopsis cuspidata* visualized by *in situ* hybridization. *Mycorrhizha* 28: 17–28 (2017). 査読有.

<https://doi.org/10.1007/s00572-017-0803-y>

Crous PW, Wingfield MJ, Burgess TI, Carnegie AJ, Hardy GESJ, Smith D, Summerell BA, Cano-Lira JF, Guarro J, Houbraken J, Lombard L, Martín MP, Sandoval-Denis M, Alexandrova AV, Barnes CW, Baseia IG, Bezerra JDP, Guarnaccia V, May TW, Hernández-Restrepo M, Stchigel AM,

Miller AN, Ordoñez ME, Abreu VP, Accioly T, Agnello C, Agustin Colmán A, Albuquerque CC, Alfredo DS, Alvarado P, Araújo-Magalhães GR, Arauzo S, Atkinson T, Barili A, Barreto RW, Bezerra JL, Cabral TS, Camello RF, Cruz RHSF, Daniëls PP, da Silva BDB, de Almeida DAC, de Carvalho Júnior AA, Decock CA, Delgat L, Denman S, Dimitrov RA, Edwards J, Fedosova AG, Ferreira RJ, Firmino AL, Flores JA, García D, Gené J, Giraldo A, Góis JS, Gomes AAM, Gonçalves CM, Gouliamova DE, Groenewald M, Guéorguiev BV, Guevara-Suarez M, Gusmão LFP, Hosaka K, Hubka V, Huhndorf SM, Jadan M, Jurjević Ž, Kraak B, Kučera V, Kumar TKA, Kušan I, Lacerda SR, Lamlertthon S, Lisboa WS, Loizides M, Luangsa-ard JJ, Lysková P, Mac Cormack WP, Macedo DM, Machado AR, Malysheva EF, Marinho P, Matočec N, Meijer M, Mešić A, Mongkolsamrit S, Moreira KA, Morozova OV, Nair KU, Nakamura N, Noisripoom W, Olariaga I, Oliveira RJV, Paiva LM, Pawar P, Pereira OL, Peterson SW, Prieto M, Rodríguez-Andrade E, Rojo De Blas C, Roy M, Santos ES, Sharma R, Silva GA, Souza-Motta CM, Takeuchi-Kaneko Y, Tanaka C, Thakur A, Smith MT, Tkalčec Z, Valenzuela-Lopez N, van der Kleij P, Verbeken A, Viana MG, Wang XW, Groenewald JZ. Fungal Planet description sheets: 625–715. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **39**: 270–467 (2017). 査読有.

<https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.11>

Nakamura N, Hosoya T, Tanaka C, Tekeuchi-Kaneko Y. Detection of a root-associated group of Hyaloscyphaceae (Helotiales) species that commonly colonizes Fagaceae roots and description of three new species in genus *Glutinomyces*. *Mycoscience* **59**:397–408 (2018). 査読有.

<https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.02.010>

Nakamura N, Tanaka C, Tekeuchi-Kaneko Y. Transmission of antibiotic-resistance markers by hyphal fusion suggests partial presence of parasexuality in the root endophytic fungus *Glutinomyces brunneus*. *Mycological Progress* **18**:453–462 (2019). 査読有.

<https://doi.org/10.1007/s11557-018-1455-9>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：大澤 直哉

ローマ字氏名：OSAWA, Naoya

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：准教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 10221821

研究分担者氏名：門脇 浩明

ローマ字氏名：KADOWAKI, Komei

所属研究機関名：京都大学

部局名：森里海連環学教育研究ユニット

職名：研究員

研究者番号 ( 8 桁 ): 30643548

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：Peter K Buchanan

ローマ字氏名：

研究協力者氏名：Peter R Johnston

ローマ字氏名：

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。