

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20964

研究課題名(和文) まつたけ山施業の土壌微生物相への影響を次世代アンプリコンシーケンス解析で解明する

研究課題名(英文) Matsutake "Shiro" revealed through amplicon sequencing analysis

研究代表者

黒河内 寛之 (Kurokochi, Hiroyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：00609000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアンプリコンシーケンスを用いたシロの土壌細菌・真菌の微生物相の把握、核SSRマーカーを用いたシロ中のマツタケの追跡およびマツタケの集団遺伝構造の把握をした。アンプリコンシーケンス解析では、マツタケシロに特徴的な微生物相があることはわかったが、まつたけ山施業をしても微生物相の変化は1～2年程度では明瞭には表れず、マツタケの子実体が発生するような環境への移行の判断は難しかった。核SSRマーカー解析では、マツタケシロ中のマツタケの個体識別ができることが判明した。さらに、県レベル、全国レベルの遺伝構造解析の結果から地域間の国産マツタケの遺伝的分化の程度は低いことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マツタケの有無を土壌中の微量DNAから判断する方法はすでにあったが、本研究ではマツタケの個体識別を土壌DNAから可能にした。

国産マツタケの遺伝構造に関する知見は少なかったが、本研究では全国スケールと県スケールで明らかにした。遺伝的分化の程度は低く、明瞭な地域性も見られなかった。本種の遺伝資源保全を考えるうえで参照可能なデータを提供できた。

マツタケシロの土壌微生物相に着目した研究は数件の先行研究があるが、本研究の結果も同様にマツタケシロ周辺の微生物相は特徴的で同一クラスターに分類される傾向が示された。マツタケシロ周辺の微生物相と似たクラ

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated the microbiome of soil bacteria and fungi in Matsutake-Shiro using amplicon sequencing. Furthermore, we tracked the *Tricholoma matsutake* in Matsutake-Shiro using nuclear SSR markers and grasped the genetic structure of the *T. matsutake*. Amplicon sequencing analyses revealed that Matsutake-Shiro had a characteristic microbiome, but the change in microbiome could not be clearly detected in a few years even after thinning shrub and removing AO layer. It was difficult to judge the transition to an environment in which *T. matsutake* fruiting bodies occur.

Nuclear SSR marker analysis revealed that individual identification of *T. matsutake* from Matsutake-Shiro is possible. Furthermore, the results of genetic structure analysis at the prefectural and national levels showed that the degree of genetic differentiation of domestic *T. matsutake* fruiting bodies between regions was low.

研究分野：分子生態学、森林施業

キーワード：マツタケシロ 個体識別 メタゲノム解析 土壌細菌相 土壌真菌相

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「まつたけ山」維持のための管理は、植物群落や土壤微生物群集が遷移していくプロセスを人為的に抑制し、環境を貧栄養な状態に維持あるいは変化させ、まつたけが発生しやすい生態系を作るための作業であると考えられる。

これまで、貧栄養な環境を作るために、落葉掻きや雑木伐採などの林地施業を通じてマツタケの子実体発生を促進する方法、まつたけの発生が減少した老齢林の皆伐によるアカマツ林の再生を目指す方法などが考えられてきた。しかし、現在までのところ、施業により「まつたけ山」の状況が好転した例はあるものの、全てで成功しているとは言えない。施業効果の不確かさが残る背景には、各施業が「まつたけ山」の維持にどのように寄与するのかに関する科学的根拠が不足しており、施業の正確な評価が出来ないことが一因としてある。これらの評価を行うには、各種の施業による「まつたけ山」の環境変化や、それに伴う植物群落と土壤微生物群集の変遷を多面的かつ長期間追跡する必要がある。

(1)

土壤微生物群集の追跡研究は、発生した子実体の追跡や菌根の抽出 DNA のサンガーシーケンシング法による種同定などにより行われてきた。しかし、これらにより検出可能な種は生息する種のごく一部にすぎず、土壤微生物の群集構造の変化を理解するには不十分である。一方、次世代シーケンサー (NGS) を利用したアンプリコンシーケンシングは、多様な土壤微生物種が生息する土壌から直接抽出した混合 DNA を用い、リボソーム DNA の特定領域をシーケンシングすることで、土壤微生物群集の網羅的解析が可能であり、本研究の目的に合致したすぐれた手法と考えられる。

(2)

マツタケの個体群動態については、子実体の発生を追跡した報告はあるものの、その定着初期から解明した例は無い。土壌中のマツタケを追跡するためには、マツタケと他の菌を識別すること、マツタケの個体を識別することが必要であるが、前者に対してはマツタケ特異的な DNA マーカーが知られているものの、その識別能は本研究の目的には不十分である。後者については、申請者のこれまでの研究からマイクロサテライト (SSR) マーカーなどの個体間でサイズ変異を伴う DNA マーカーが簡便かつ経済的で有効と考える。

2. 研究の目的

(1)

「まつたけ山」の施業後に比較的早い変化が予想される環境条件や土壤微生物 (真核菌と細菌類) の群集構造に着目し、異なる施業により季節や年ごとにどのように変遷するのか解明する。

(2)

従来の解析ツールに改良を加え、施業後の林内でのマツタケ個体群の動態を土壌 DNA から追跡するための手法を開発する。

3. 研究の方法

(1)

長野県伊那市と諏訪市のアカマツ林に調査区を設置し、灌木の処理と地掻きの処理を行う処理区を作った。各処理区の一部に土壌温度計と含水率計を埋設した。定期的に土壌の採取を行い、16S 領域と ITS 領域のアンプリコンシーケンシング解析を行った。

(2)

国産マツタケのゲノムデータからマイクロサテライト領域を抽出し、SSR マーカーを開発した。開発した SSR マーカーを用いて、土壤中のマツタケの個体識別を行うとともに、異なる地域から採取したサンプルの集団遺伝解析を行った。

4 . 研究成果

(1)

A0 層を除去することで、マツタケシロ付近の地温変化は多少大きくなる傾向が確認されたが、処理区間に有意な差は季節を通じてほとんど確認されなかった。一方、含水率には顕著な差が確認され、A0 層を除去した処理区では有意に含水率が高くなった(図 1、Kurokochi et al. 2018)。

土壌微生物相(細菌類及び真菌類)の季節変化や年変化に明瞭な変化は見られなかったが、マツタケシロ近傍の土壌微生物相は樹木の種組成と密接にかかわっていて、アカマツ林以外にはコナラ林といった二次林的要素のある土壌微生物相に類似していた(黒河内ら 2018)

(2)

多型解析、親子解析を行うのに十分な多型性を持つ SSR マーカーを開発した(Kurokochi et al. 2017)。これらのマーカーを用いて、土壤中のマツタケの菌糸密度が高い場所(マツタケシロ)では、土壌 DNA から個体識別が可能であることを確認した(黒河内ら 2017)。さらに、これらのマーカーを使い、長野県産のマツタケの集団遺伝解析を行ったところ、遺伝的分化が低いことも示唆された(図 2、Kurokochi et al. 2017)。

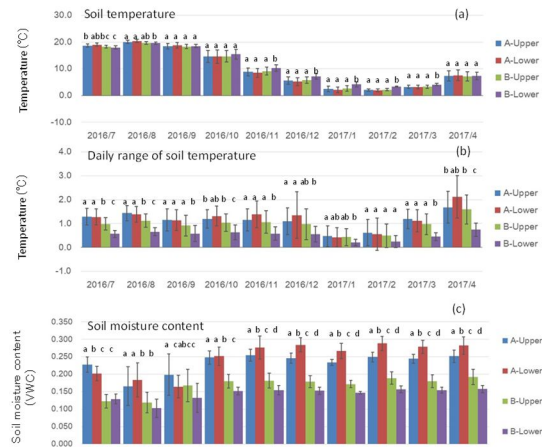


図 1 . A0 層除去による地温と土壌含水率の変化(A : 対照区、B : 処理区)

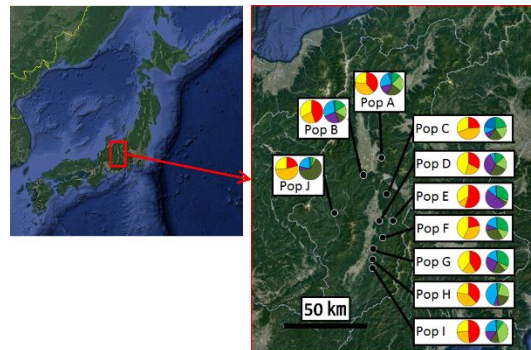


図 2 . structure 解析による長野県内 9 カ所から採取したマツタケの遺伝構造

< 引用文献 >

Kurokochi et al. 2018. Change in soil temperature and moisture content after removal of the A0 Layer in *Pinus densiflora* forest: a case study of a mountain where matsutake mushrooms (*Tricholoma matsutake*) grow. *Current trends in Forest Research*. 2, 1-8.

黒河内ら . 2018. 長野県伊那市上牧里山シュンラン自生地における樹木と土壌微生物の種多様性. 日本森林学会大会発表データベース 第 129 回日本森林学会大会. 124.

Kurokochi et al. 2017. Local-Level Genetic Diversity and Structure of Matsutake Mushroom (*Tricholoma matsutake*) Populations in Nagano Prefecture, Japan, Revealed by 15 Microsatellite Markers. *Journal of Fungi*. 3(2), 23.

黒河内ら . 2017. Genotyping of *Tricholoma matsutake* from soil in Japanese red pine forest. 日本森林学会大会発表データベース 第 128 回日本森林学会大会. 331.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kurokochi Hiroyuki, Zhang Shijie, Takeuchi Yoshie, Tan Engkong, Asakawa Shuichi, Lian Chunlan	4. 巻 3
2. 論文標題 Local-Level Genetic Diversity and Structure of Matsutake Mushroom (<i>Tricholoma matsutake</i>) Populations in Nagano Prefecture, Japan, Revealed by 15 Microsatellite Markers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 23~23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof3020023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiroyuki Kurokochi1, Chunlan Lian	4. 巻 2
2. 論文標題 Change in Soil Temperature and Moisture Content After Removal of the A0 Layer in <i>Pinus densiflora</i> Forest: A Case Study of a Mountain Where Matsutake Mushrooms (<i>Tricholoma matsutake</i>) Grow	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current trends in Forest Research	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.29011/CTFR-111.100011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Vaario Lu-Min, Asamizu Shumpei, Sarjala Tytti, Matsushita Norihisa, Onaka Hiroyasu, Xia Yan, Kurokochi Hiroyuki, Morinaga Shin-ichi, Huang Jian, Zhang Shijie, Lian Chunlan	4. 巻 23
2. 論文標題 Bioactive properties of streptomycetes may affect the dominance of <i>Tricholoma matsutake</i> in shiro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Symbiosis	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13199-020-00678-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黒河内寛之ら
2. 発表標題 長野県伊那市上牧里山シュンラン自生地における樹木と土壤微生物の種多様性
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lu Min Vaario, Shumpei Asamizu, Norihisa Matsushita, Hiroyuki Kurokochi, Tytti Sarjala, Hiroyasu Onaka, Chunlan Lian
2. 発表標題 May Matsutake mycorrhiza-associated Streptomyces distinguish friend and foe in shiro, the evidences from in vitro studies
3. 学会等名 3rd Conference on Ecology of Soil Microorganisms (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒河内寛之1、伊那北小学校6年1組(2017年度)、伊那北小学校6年2組(2017年度)、大野田文吉、唐木隆夫、唐木敬吉、張仕傑、練春蘭
2. 発表標題 長野県伊那市上牧里山シュンラン自生地における樹木と土壤微生物の種多様性
3. 学会等名 第129回日本森林学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Kurokochi, Shijie Zhang, Pawara Pachit, Ruiyang Xu, Chunlan Lian
2. 発表標題 Genotyping of Tricholoma matsutake from soil in Japanese red pine forest
3. 学会等名 第128回日本森林学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒河内寛之
2. 発表標題 国産マツタケの遺伝構造
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----