

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19570082

研究課題名 (和文) アンモニア菌の生物地理的分布と分散特性の解析

研究課題名 (英文) Analyses in biogeographical distribution of ammonia fungi and their characteristics for dispersion

研究代表者

鈴木 彰 (SUZUKI AKIRA)

千葉大学・教育学部・教授

研究者番号：50110797

研究成果の概要 (和文)：タイ及びベトナム高地のマツ林(*Pinus.kesiya*)で尿素施与を行なった結果、亜寒帯から亜熱帯のマツ林と共通する腐生性のアンモニア菌の存在が確認された。一方、菌根性のアンモニア菌は、形態学的特徴と分子系統学的解析から *Hebeloma vinosophyllum* あるいはその近縁種と思われる 1 分類群のみが確認された。マツ林の尿素処理土壌からは多数の微小菌が分離され、80%以上の菌株はセルロース及びリグニン分解酵素活性を示した。

研究成果の概要 (英文)：Several saprobic ammonia fungi and a mycorrhizal ammonia fungus were found from the urea-treated Pine (*Pinus kesiya*) forests in highlands of Thailand and Vietnam. Most saprobic species were ubiquitous and have been recorded from pine forests in subtropical to subarctic regions. The mycorrhizal species was identified as *Hebeloma vinosophyllum* or its allied species based on its morphological features and molecular analysis. Many micro fungi were isolated from the urea-treated soils. Above 80% of them showed cellulolytic and ligninolytic enzyme activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：アンモニア菌、菌相、マツ林、尿素施与、生物地理的分布、熱帯高地、腐生菌、菌根菌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高窒素物質による攪乱跡地に発生するアンモニア菌は、地球レベルでみた炭素や

窒素など物質の循環を把握する上で必要不可欠な生態菌群である。

(2) アンモニア菌相の調査は、亜寒帯から

亜熱帯まで行なわれているが、熱帯圏ではまったく行なわれていない。

(3) マツ林は、亜寒帯から熱帯高地まで分布しており、熱帯高地以外では調査が行われており、熱帯高地マツ林でのアンモニア菌相の調査は、アンモニア菌の生物地理的分布とその分散特性を解明する上でかつこの調査対象と考えられる。

(4) アンモニア菌は尿素処理により、高い頻度での発生の誘起が可能であるため、一般に生物地理的分布の調査が困難な菌類にあって例外的に高い精度で菌類の生物地理的分布の調査が可能と予想され、地球レベルでの菌類の生物地理的解析に最適な研究対象と考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 熱帯高地林(マツ林)で尿素施与を行ないアンモニア菌相の調査を形態種レベルで行い、優占種の特定及び菌株の収集を試みる。

(2) 得られた優占菌種の菌株と過去の研究で蓄積した同菌種及びその近縁種(いずれも形態種レベル)に限り分子系統解析を試み、優占アンモニア菌種の生物地理的分布を解明し、同菌種の分散特性の解明を目指す。

(3) 尿素施与区からの分離菌種の生理特性、特に植物質の分解に関する酵素活性を比較調査し、得られた結果に基づきアンモニア菌の生物地理的分布とその分散特性を推察すると共に、アンモニア菌の熱帯生態系における役割を推察する。

## 3. 研究の方法

(1) 調査地：2007年にタイ及びベトナム各地で実験に適するマツ林の調査を行い、タイではチェンマイ近郊のTumbon Su Thep, Amphoe Mueang(DS) の70年生の*Pinus kesiya* とブナ科樹木との混交林とTumbon Doi Ka e Amphoe Chom Thong(DI)の30年生の*P. kesiya*純林を、ベトナムではダラト市内(Tay Nguyen Institute)の80年生の*P. kesiya*の純林及びダラト近郊Xuan Thoの30年生の*P. kesiya* の純林を実験地として選定した。タイの尿素施与区(各1 m × 8 m; 0 g 尿素/m<sup>2</sup> (T1; 対照区), 200 g 尿素/m<sup>2</sup>(T2), 400 g 尿素/m<sup>2</sup>(T3), 800 g 尿素/m<sup>2</sup>(T4))を、ベトナムの実験地では、(各1 m × 2 m; 400 g 尿素/m<sup>2</sup>, 800 g 尿素/m<sup>2</sup>)を設けた。タイでは、2008年10月12日に、ベトナムでは 2008年 9月17日に尿素施与を行なった。

(2) 植木鉢での培養：タイでは、Tumbon Doi Kaew, Amphoe Chom Thongの*P. kesiya*

林内のL-A層上層の土壌を、ベトナムではダラト市内(Tay Nguyen Institute)から、タイではチェンマイ近郊のTumbon Doi Kaew, Amphoe Chom Thongからそれぞれ土壌を持ちかえり、ベトナム、タイ共に0 mg 尿素/g 乾土区(対照区), 10 mg-N 尿素/g 乾土, 20 mg-N 尿素/g 乾土, 40 mg-N 尿素/g 乾土を設け、野外調査地の選定と腐生性アンモニア菌の野外調査の補助とした。

(3) DNA抽出, PCR, 塩基配列の解析

供試菌の風乾子実体の一部を切り取り、破碎後、TES緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1% SDS)に懸濁し、DNAを溶出した。DNAはTE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA) 飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 処理により純化したのち、イソプロピルアルコールによって沈殿させて精製した。得られたDNAのペレットを乾燥させたのち、30 µLのTE緩衝液に溶解した。ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')とITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGTATGC-3')プライマーとしてITS1-5.8S-ITS4 rDNAをEx Taq (TakaraBio)を用いてPCRによって増幅した。PCR増幅したDNAはNucleoSpin Extract II (MACHEREY-NAGEL) を用いて精製した。DNA断片は、Big Dye Terminator ver. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem)を用いてラベル化した。ラベル化したDNAは Centri Sep (Princeton Separations)によって精製後、3130x DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を読み取った。塩基配列はATSQ Softwareを用いて、編集・解析した。

(4) 系統解析

得られたITS1-5.8S-ITS4 rDNAの塩基配列は Clustal X ver. 1.81によってアライメント化した。系統解析は外群に*Anamika indica* を用い、NJ法によって系統樹を作成した。各単系統群のブートストラップ値は1000回試行により算出した。

(5) 酵素活性の測定

① セルロース分解酵素：供試菌を1.8%(W/V) CMCを含むセルロース分解基本寒天培地で5-10日間培養後、培地表面を2%コンゴレッド水溶液に15分間浸した。次いで純水で洗浄し、菌糸体を含む同寒天培地表面全体の染色(赤色)を終えた。その後1 M NaClで15分間処理したのち、紫色に呈色した部分を、セルロース分解酵素活性の存在する部分と判定した

② リグニン分解酵素：供試菌をCMS培地で培養し、培地表面の50-60%程度に栄養菌糸体が

達した時に、菌糸体の周縁部の少し内側の十字の頂点に該当する4方向に5 mm直径のコルクボーラーを用いて孔をあけ、1%ピロガロール水溶液と0.4%過酸化水素水を滴下したにち、黄色一茶色に呈色した部分を、リグニン分解酵素の一つであるペルオキシダーゼ活性の存在する部分と判定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マツ林のアンモニア菌相

Tumbon Su Thep, Amphoe Mueang(DS)の70年生の*P. kesiya* とブナ科樹木の混交林からは、腐生性菌では*Ascobolus denudatus*, *Pseudombrophila deerata*, *Peziza moravecii*, *Lyophyllum tylicolor*, *Coprinopsis* sp.の発生を確認したが菌根性菌の*Hebeloma* sp.の発生は確認されなかった。Tumbon D oiKaew, Amphoe Chom Thong(DI)の30年生の*P. kesiya* 純林では、腐生性菌の*As. denudatus*, *Ps.deerata*, *P. moravecii*, *L. tylicolor*, *Coprinopsis* sp.と菌根性菌の*Hebeloma* sp.の発生が確認された。

タイのマツ林の尿素区から持ちかえった土壌(L-A層上部)から多種の微小菌を得た(表1に一部を示す)。*Chaetomium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Trochoderma* spp. など尿素区に特異的に増殖する菌種の存在を示唆する結果が得られた。しかしながら、多数回の繰り返し実験を行い、対照区からの土壌(L-A層上部)からの場合との分離頻度の比較検討を行うに至らなかったため、尿素区から分離された菌種を新規アンモニア菌と断定するに至らなかった。

表 1. 土壌(DI)からの分離培養による出現頻度

菌	分離日	出現頻度(%)											
		Site I				Site II							
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4				
接合菌													
<i>Mucor</i>	1	20	0	14	10	13	0	8	13				
	2	0	0	33	0	0	25	33	0				
子のう菌													
<i>Chaetomium</i>	1	0	13	14	0	0	0	0	13				
	2	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>Eupenicillium</i>	1	0	0	8	10	0	0	0	13				
	2	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>Eurotium</i>	1	0	0	0	20	0	13	0	0				
	2	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>Sordaria</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0				
	2	0	0	0	0	0	0	0	20				
担子菌													
<i>Coprinopsis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0				
	2	0	0	33	0	0	0	0	0				
不完全菌													
<i>Aspergillus</i>	1	20	25	0	20	50	25	17	0				
	2	0	0	0	20	0	0	0	20				
<i>Fusarium</i>	1	0	13	29	0	0	0	0	63				
	2	0	0	0	0	0	25	0	20				
<i>Penicillium</i>	1	20	25	0	20	50	25	17	0				
	2	0	0	0	20	0	0	0	20				
<i>Trichoderma</i>	1	60	50	43	40	50	63	67	0				
	2	100	100	33	20	100	0	67	60				

1: 2008年10月27日, 2: 2008年11月 8日

##### (2) ベトナムのマツ林のアンモニア菌相 ダラト近郊Xuan Thoの30年生の*P. kesiya*の

純林では腐生性菌の*Amblyosporium botrytis*, *As. denudatus*, *Pe. moravecii*, *L. tylicolor*, *Coprinopsis* sp.の発生と菌根性の*Hebeloma* sp.の発生が確認された。一方、ダラト市内(Tay Nguyen Institute)の80年生の*P. kesiya* の純林では、腐生性菌はXuan Thoのマツ林と同様の菌種の発生がみられたが、*Hebeloma* sp.の発生はみられなかった。

以上のことから、タイとベトナムのマツ林はほぼ同様のアンモニア菌相を有していること、熱帯高地のマツ林のアンモニア菌相は亜熱帯～亜寒帯のマツ林とほぼ共通しており、とりわけ、腐生性のアンモニア菌は極めて広範囲に分布している汎布種が多いことが確認された。

##### (3) 分子系統解析

ベトナム産の*Hebeloma* sp.をITS rDNAに基づき分子系統解析した結果、*H. vinosophyllum*あるいは*Theobromina*節の菌種のいずれかあるいはその近縁種と判定した(図1)。ベトナム産の*Hebeloma* sp.の形態学的特徴は明らかに*Theobromina*節の菌種とは異なっており、さらに担子胞子が赤褐色をしていることから、*Porphyrospora*属する*Hebeloma*属の菌であり、*H. vinosophyllum*あるいはその

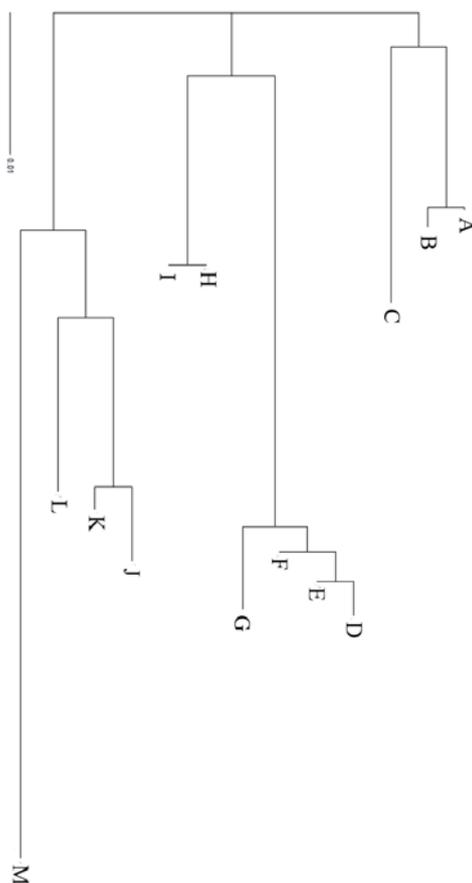


図1. *Hebeloma* sp.の分子系統樹

略号	菌種	菌株
A	<i>Hebeloma</i> sp.	ベトナム産
B	<i>Hebeloma vinosophyllum</i>	NBRC 32945
C	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	NBCI EF564167.1
D	<i>Alnicola subconspersa</i>	NBCI AY900069.1
E	<i>Alnicola umbrina</i>	NBCI AY900059.1
F	<i>Naucoria scolecina</i>	NBCI AF325629.1
G	<i>Naucoria escharoides</i>	NBCI AY900086.1
H	<i>Hebeloma vesterholtii</i> syn. <i>theobrominum</i>	NBCI FJ816621.1
I	<i>Hebeloma theobrominum</i>	NBCI EU570182.1
J	<i>Hebeloma aminophyllum</i>	CHU5001
K	<i>Hebeloma aminophyllum</i>	CHU5002
L	<i>Anamika lactariolens</i>	NBCI AY818352.1
M	<i>Anamika indica</i>	NBCI AF407163.1

近縁種と判断した。以上の結果は、*H. vinosophyllum* あるいはその近縁種は、本州中・南部から北半球のアジア熱帯高地まで分布している菌種である可能性が示唆された。一方、オーストラリア及びニュージーランドには*H. vinosophyllum*と近縁の*Hebeloma aminophilum* が冷温帯から熱帯低地林まで分布しており、両種は南半球と北半球で住み分けているものと推察される。今後、*Hebeloma*属菌の分散を解明するには宿主植物の生物地理的分布との関連から熱帯低地林での調査が必要である。

(4) 尿素区におけるセルロース及びリグニン分解

尿素区より分離した38菌株の内24菌株でセルロース分解活性が確認された。なかでも、*Coprinopsis* sp(p)と*Eurotium* spp.が強いセルロース分解活性を示した(表2-1参照; 一部データの表示)。一方、尿素区より分離した29菌株の内25菌株でリグニン分解活性が確認された(表2-2参照; 一部データの表示)。なかでも *Coprinopsis* sp(p), *Chaetomium* sp.で強いリグニン分解活性が確認された。以上のことから、熱帯高地のマツ林においても亜熱帯から亜寒帯の各種の林と同様に高濃度の尿素による攪乱跡地で

表 2-1. 微小菌のセルロース分解酵素活性

菌種	実験区	分解活性		
<b>子の菌</b>				
<i>Chaetomium</i> sp.1	DIT2	1	1	1
<i>Chaetomium</i> sp.2	DIT2	1	1	1
<i>Chaetomium</i> sp.3	DIT3	1	1	1
<i>Chaetomium</i> sp.4	DST2	1	1	1
<i>Chaetomium</i> sp.5	DST2	1	1	1
<i>Chaetomium</i> sp.6	DST2	1	1	1
<i>Chaetomium</i> sp.7	DST2	1	1	1
<i>Chaetomium</i> sp.8	DST2	2	2	1
<i>Chaetomium</i> sp.9	DST3	1	1	1
<i>Eupenicillium</i> sp..1	DIT3	2	2	2
<i>Eupenicillium</i> sp..2	DST2	2	2	2
<i>Eupenicillium</i> sp..3	DST2	2	2	2
<i>Eupenicillium</i> sp..4	DST3	1	2	2
<i>Eupenicillium</i> sp..5	DST3	1	1	1
<i>Eupenicillium</i> sp..6	DST3	2	2	1
<i>Eupenicillium</i> sp..7	DST3	1	1	2
<i>Eurotium</i> sp..1	DIT2	3	3	2
<i>Eurotium</i> sp..2	DST1	4	3	3
<i>Eurotium</i> sp..3	DST2	1	1	1
<i>Eurotium</i> sp..4	DST3	4	4	4
<i>Eurotium</i> sp..5	DST3	1	1	1
<i>Eurotium</i> sp..6	DST3	4	4	4
<i>Eurotium</i> sp..7	DST3	4	4	4
<i>Eurotium</i> sp..8	DST3	2	2	2
<i>Eurotium</i> sp..9	DST3	2	2	2
<b>不完全菌</b>				
<i>Beauveria</i> sp..1	DIT1	2	2	2
<i>Beauveria</i> sp..2	DIT1	2	2	2
<i>Beauveria</i> sp..3	DST2	1	1	1
<i>Penicillium</i> sp.1	DST2	2	2	2
<i>Penicillium</i> sp.2	DIT2	1	1	1
<i>Penicillium</i> sp.3	DIT3	1	1	1
<i>Penicillium</i> sp.4	DST2	1	1	1
<i>Penicillium</i> sp.5	DST2	2	2	2
<i>Penicillium</i> sp.6	DST2	2	2	1

表 2-2. 微小菌のリグニン分解酵素活性

菌種	実験区	分解活性		
子のう菌				
<i>Chaetomium</i> sp.1	DIT2	4	3	4
<i>Chaetomium</i> sp.2	DIT2	4	4	4
<i>Chaetomium</i> sp.3	DST2	2	2	1
<i>Eupenicillium</i> sp..1	DIT3	2	2	2
<i>Eupenicillium</i> sp..2	DST3	3	3	3
<i>Eupenicillium</i> sp..3	DST3	2	3	2
<i>Eurotium</i> sp..1	DST3	1	1	1
<i>Eurotium</i> sp..2	DST3	3	2	3
不完全菌				
<i>Beauveria</i> sp..1	DIT1	3	4	4
<i>Beauveria</i> sp..2	DIT1	4	4	4
<i>Beauveria</i> sp..3	DST3	4	4	3

1: 反応なし, 2: 弱い反応, 3 中程度の反応, 4: 強い反応

は非攪乱地と同様に植物質分解が、尿素施与によって増殖した菌群集によって代替されていることが確認された。なかでも、*Coprinopsis* spp.は、高濃度の窒素による攪乱跡地における植物質分解に重要な役割を演じていることが示唆された。

#### (5) 結論

以上のことから、タイ、ベトナムのマツ林の腐生性アンモニア菌の菌相はほぼ同一であり、北半球の亜寒帯～亜熱帯のマツ林、ブナ科の林や南半球の冷温帯～温帯のユーカリ林や南極ブナ林との共通種が多数存在していることが明らかになった。一方、タイ、ベトナムのマツ林の菌根性アンモニア菌は現在のところ、形態観察及び分子系統解析から *H. vinosophillum* あるいはその近縁種と思われる1菌種しか発見されておらず、北半球の亜熱帯～暖帯の菌根性アンモニア菌相に較べて単純なものである可能性が示唆された。さらに、高齢林では同 *Hebeloma* sp. が増殖しづらいう可能性が示唆された。また、熱帯高地のマツ林では、亜寒帯～亜熱帯の様々な樹林と同様、高窒素による攪乱後の植物質分解は、これらのアンモニア菌や高窒素濃度に耐性を有する微小菌（未知のアンモニア菌を含む）によって行なわれていることが確認された。これらアンモニア菌の分散の動態は今回の調査だけでは特定できなかつたが、

今後、アンモニア菌の生物地理的分布とそ

の分散特性を解明するには、熱帯低地のブナ科の樹木や各種菌根菌の宿主として知られている樹種を考慮にいて、まずは東南アジアの熱帯多雨林や熱帯雨緑林で尿素施与を行い発生菌の追跡調査を行えば高い確率でアンモニア菌、とりわけ、*Hebeloma* sp(p)等の菌根性アンモニア菌の分散経路の特定が可能と思われる。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① Jirapon Chalowrak, Kasem Soyong, Chiawat To-anun, Akira Suzuki: Diversity of ammonia fungi in pine forest, The 4th Annual Meeting of Thai Mycological Association (TMA) and Mycological Conference in Thailand, (2009.11.24) Maejo University, Chiang Mai, Thailand
- ② Jirapon Chalowrak, Kasem Soyong, Chiawat To-anun, Akira Suzuki: Collection and screening for enzyme production of ammonia fungi, The 4th Annual Meeting of Thai Mycological Association (TMA) and Mycological Conference in Thailand, (2009.11.24) Maejo University, Chiang Mai, Thailand

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 彰 (SUZUKI AKIRA)  
千葉大学・教育学部・教授  
研究者番号：50110797

##### (2) 研究協力者

Soytong Kasem  
King Mongkut's Institute of Technology  
Ladkrabang・Faculty of Agricultural  
Technology・准教授

To-anun Chiawat  
Chiang Mai University・Faculty of  
Agriculture・准教授

Truong Nguyen Binh  
Tay Nguyen Institute・Department of  
Micro-Biotechnology・主任研究員