

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：81401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06119

研究課題名(和文) 絶滅危惧樹木ヤクタネゴヨウの保全に資する菌根菌の埋土胞子の生存期間の解明

研究課題名(英文) Survival period of soil spore banks of ectomycorrhizal fungi for the conservation of endangered tree *Pinus amamiana*

研究代表者

村田 政穂 (Murata, Masao)

秋田県農林水産部(農業試験場、果樹試験場、畜産試験場、水産振興センター及び林業研究研修センター)・林業研究研修センター・主任研究員

研究者番号：20582381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、樹木の保全・保護に菌根菌を活用した手法を開発することを念頭に、絶滅危惧種のヤクタネゴヨウの生存に関わりを持つヤクタネショウロの埋土胞子の生存期間を解明するため、宿主樹木の消失により胞子の新規供給が長期間途絶えている場所で埋土胞子の感染性を調べることでヤクタネショウロの埋土胞子の生存期間の推定を試みた。その結果、ヤクタネショウロの埋土胞子は少なくとも16年間、宿主と共生することなく生存していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年マツ材線虫病等により個体数が激減している種子島のヤクタネゴヨウ林に着目し、この枯死記録と枯死木周辺の埋土胞子を調べることで、ヤクタネゴヨウと特異的に共生するヤクタネショウロの埋土胞子の長期的な生存期間を明らかにできると考えた。その結果、これまでの先行研究で実験的に明らかにされているショウロ属菌の生存期間は6年だったが、本研究では少なくとも16年であることが示された。これは旧自生地を利用することで植栽されたヤクタネゴヨウの生存率を向上し個体数を増やすことができることを意味しており、本研究の結果はヤクタネショウロを利用したヤクタネゴヨウの保全に重要な成果であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：With a view to developing methods utilising ectomycorrhizal fungi for tree conservation and protection, this study sought to elucidate the survival period of soil spore banks of *Rhizopogon yakushimensis*, which are implicated in the survival of the endangered *Pinus amamiana*, by investigating the infectivity of soil spore banks in areas where new supplies of spores have been interrupted for long periods due to loss of host trees. The results showed that soil spore banks of *R. yakushimensis* survived for at least 16 years without symbiosis with the host.

研究分野：森林保護学

キーワード：絶滅危惧種 外生菌根菌 ヤクタネゴヨウ ヤクタネショウロ

### 1. 研究開始当初の背景

森林を構成する多くの樹木は外生菌根菌(以下菌根菌)という土壤中の菌類と共生し、菌根菌から養分を受け取ることで生きている。菌根菌は樹木が生育するのに必要不可欠であり、すでに成立した森林には多様な菌根菌が生息している。一方、菌根菌は特定の樹木にしか共生しない菌種も多く、菌種によって樹木に与える影響は大きく異なる。そのため、私は対象となる樹木にどのような菌根菌が共生しているのかを明らかにすることは、菌根菌を活用した樹木の保全や保護にむけた最初のステップとして重要であると考え、モデルケースとして、これまで絶滅危惧樹木のトガサワラ (*Pseudotsuga japonica*) やヤクタネゴヨウ (*Pinus amamiana*)、アポイカンバ (*Betula apoiensis*) の菌根菌の種構成を解明した(村田・奈良 2017; Murata et al. 2013; 2017a; 2017b)。そのうちヤクタネゴヨウの林分にはヤクタネゴヨウとだけ共生する新種の菌根菌ヤクタネショウロ (*Rhizopogon yakushimensis*) (Sugiyama et al. 2018) が土壤中に休眠した胞子(以下埋土胞子)の形態で普遍的に存在し、実生の生育を促進した(Murata et al. 2017b)。そのため、ヤクタネショウロの埋土胞子は実生の更新に重要な存在であることが示唆された。

ヤクタネショウロの埋土胞子はヤクタネゴヨウを保全・保護に活用できる可能性があるが、活用するためにはまだこの菌根菌の埋土胞子について明らかにすべき点がいくつかあった。特に、土壤中に休眠状態で存在するヤクタネショウロの胞子が、「どのくらいの期間土壤中で、感染源として生存することができるのか?」という問題は、菌根菌を絶滅危惧樹木の保全・保護に活用するための更新技術の一端になる「菌根菌の生物資材の作成」に必要な情報になるため、解明すべきであると考えた。

本研究は、ヤクタネショウロの埋土胞子の生存期間を解明するために、近年マツ材線虫病により個体数が激減している種子島のヤクタネゴヨウ林に着目した。種子島のヤクタネゴヨウの枯死木は位置や枯死年、樹齢などの記録がある。また先行研究で、ヤクタネショウロの埋土胞子の分布範囲は、天然林内とその周辺数百メートル以内に限定されることが明らかにされている(未発表)。これらのことから、枯死被害を逆にとり、種子島の周囲数百メートル以内に生存木の無いヤクタネゴヨウ枯死木周辺の埋土胞子を調べれば、他ではできない長期のヤクタネショウロの埋土胞子の生存期間の知見を得ることができると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、菌根菌の埋土胞子を利用した絶滅危惧樹木の更新技術の確立を大きな目的とし、ヤクタネゴヨウの維持、更新に関わる菌根菌の埋土胞子の生存期間を解明するため、以下の2つの課題(1. 現地のヤクタネショウロの埋土胞子の生存期間(長期)の推定、2. 実験室でのヤクタネショウロの埋土胞子の生存期間(短期)の検証)について調査・研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 現地のヤクタネショウロの埋土胞子の生存期間(長期)の推定

ヤクタネゴヨウ枯死地でのヤクタネショウロの埋土胞子の生存状況を調べ、埋土胞子の生存期間を推定するため、鹿児島県種子島内のマツ材線虫病などにより枯死したヤクタネゴヨウのうち、周囲数百メートル以内に生残ヤクタネゴヨウがない枯死時期の異なる(2~71年前)枯死木を10本選択した(表1)。1枯死木につき、その周辺で3地点の土壌採取地点を決め、1地点につき異なる2つの深さ(0-10cmと10-20cm)の土壌サンプルを採取した。

本研究では、土壌中の胞子をいったん実生に感染させて菌根を形成させ、できた菌根をDNA解析することによって菌種を同定するパイオアッセイと呼ばれる手法を用いた。パイオアッセイでは一般的に林分構成種と同種または近縁種を用いる。上記の採取した土壌を2本の50mlチューブにいれ、ヤクタネゴヨウの種子を播いた。さらにヤクタネゴヨウと近縁種のタカネゴヨウ (*Pinus armandii*) (一部の土壌サンプルのみ) とゴヨウマツ (*Pinus parviflora*) でも同様にパイオアッセイを行った。空気からの胞子感染を防ぐため、クリーンブース内で育苗を行ない、対照として滅菌した土壌で育てた苗を供試した。

播種から6ヶ月後にパイオアッセイ実生を採取し、実体顕微鏡下で実生の菌根を観察し、菌根の形態で類別した。各形態からDNA解析用サンプルを選別した。DNA解析用サンプルの菌根からDNAを抽出し、rDNAのITS領域をPCR増幅し、シーケンサーで塩基配列を決定し、既存の塩基配列データベースで相同性を検索することで菌種を同定した。

#### (2) 実験室での埋土胞子の生存期間(短期)の検証

表1 調査したヤクタネゴヨウ枯死木

調査地点 No.	枯死後の 年数	枯死形態	枯死要因	枯死木の 胸高直径 (cm)
1	12	立枯れ	マツ材線虫病	70
2	8	立枯れ	不明	56
3	15	立枯れ	不明	26
4	16	立枯れ	マツ材線虫病	50
5	13	立枯れ	マツ材線虫病	43
6	71	立枯れ	老衰	382
7	15	立枯れ	マツ材線虫病	29
8	2	立枯れ	不明	30
9	13	立枯れ	不明	34
10	37	伐採	伐採	150

屋久島の西部地域の鹿見橋尾根と種子島の中割のヤクタネゴヨウ自生林分でヤクタネショウ口を採取した。また、比較対照として乗鞍岳でハイマツショウ口 (*Rhizopogon alpinus*) を、東京大学大学院新領域創成科学研究科の大学内の圃場で育苗中のリュウキュウマツの苗木からホンショウ口 (*Rhizopogon luteolus*) を採取した。採取したキノコから孢子懸濁液を作成し、滅菌土壌に同じ濃度 ( $14.6 \times 10^6$ 個) に調整した孢子懸濁液を 50ml のチューブに入れた滅菌土壌に接種した。孢子懸濁液を接種した土壌を屋久島のヤクタネショウ口では 2 つの温度 (5 と 20 ) と 2 つの乾湿の 4 条件で保存し、種子島のヤクタネショウ口とハイマツショウ口、ホンショウ口は 20 で乾湿の 2 条件で保存した。保存期間は孢子接種後 0 日、1、1.5、2、5、10 年に設定した。各試験区における供試数は 5 (ハイマツショウ口のみ 3) とした。保存期間の終了後にヤクタネショウ口はヤクタネゴヨウで、ハイマツショウ口はゴヨウマツで、ホンショウ口はクロマツ (*Pinus thunbergii*) でバイオアッセイを行なった。その後、課題 ( 1 ) と同様の手法によって実生の菌根の菌種を同定した。

#### 4. 研究成果

( 1 ) 現地のヤクタネショウ口の埋土孢子の生存期間 ( 長期 ) の推定

検出された外生菌根菌の出現頻度を図 1 に示した。タカネゴヨウやゴヨウマツで検出された菌根菌はすべてヤクタネゴヨウでも検出された。一方で、ヤクタネゴヨウのみで検出された菌根菌もあった。また、菌根菌の出現頻度はヤクタネゴヨウとタカネゴヨウはヤクタネショウ口が最も高かったのに対し、ゴヨウマツは *Cenococcum geophilum* が最も高かった。近縁種より本来の宿主であるヤクタネゴヨウの方で感染率が高く、ヤクタネショウ口には宿主選好性があることが示唆された。タカネゴヨウはゴヨウマツよりヤクタネゴヨウに近縁であり、宿主の近縁の程度がヤクタネショウ口の感染率に影響していた可能性も考えられた。本研究の結果は、バイオアッセイの宿主を本来の宿主の近縁種で行った場合、過小評価になってしまう可能性を示しており、今後同様のバイオアッセイを行う上で宿主の影響はさらに検討をする必要がある。

ヤクタネゴヨウ枯死後の年数とヤクタネショウ口の出現頻度を図 2 に示した。調査地 No.1、5、6、10 ではすべての宿主でヤクタネショウ口は検出されなかった。一方、調査地 No.2、3、7 ではヤクタネゴヨウとタカネゴヨウまたはゴヨウマツで検出され、調査地 No.4、8、9 ではヤクタネゴヨウのみで検出された。これらの結果は、本研究で検出されたヤクタネショウ口はヤクタネゴヨウが枯死した年に土壌中に保存されたと仮定すると、16 年間埋土孢子の状態で生存していたことを示している。一方で、本研究で検出したヤクタネショウ口の埋土孢子は枯死年以前に蓄積されていたものである可能性もあり、ヤクタネショウ口の埋土孢子が 16 年以上生きている可能性も十分あると考えら

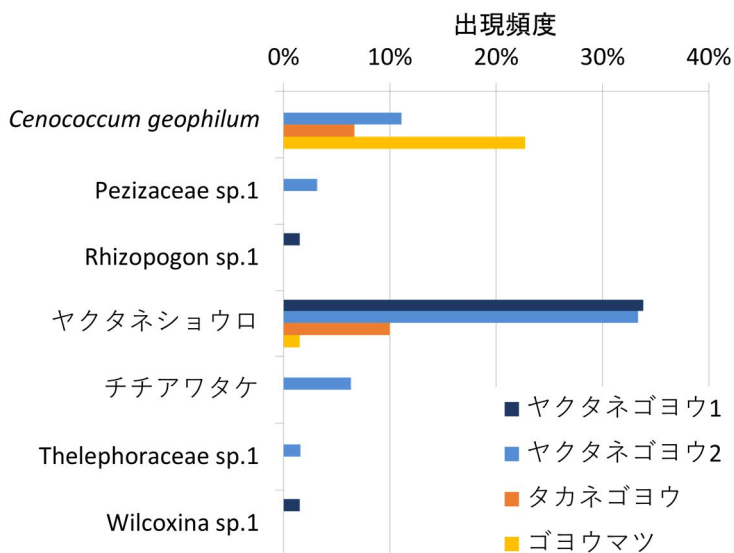


図 1 検出された外生菌根菌の出現頻度

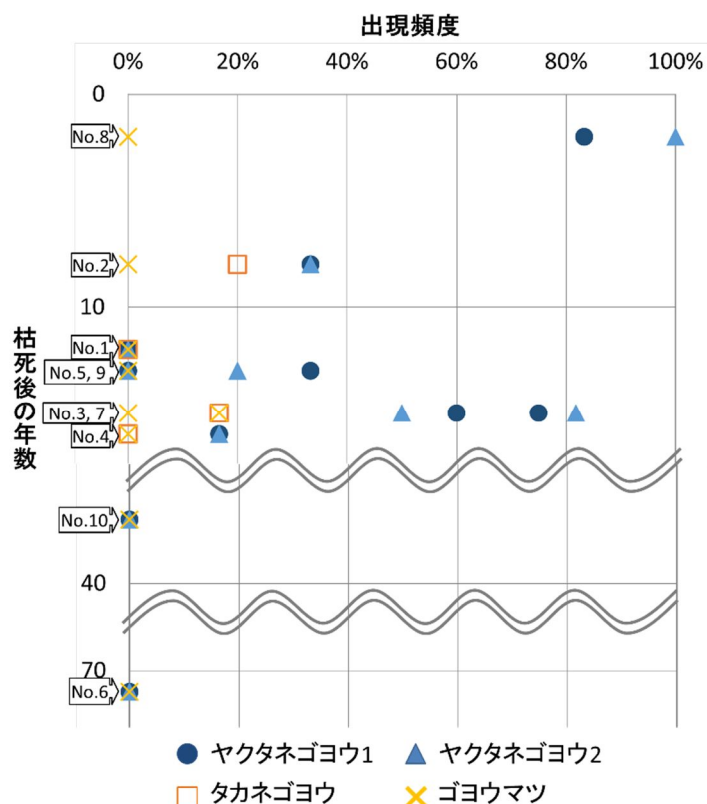


図 2 ヤクタネゴヨウ枯死後の年数とヤクタネショウ口の出現頻度

れた。一般的にショウ口属の胞子は乾燥に強く、長寿命であることが知られているが、直接的に胞子の寿命を検証した研究は数例のみで最長で6年までの生存検証であり (Bruns et al. 2009; Nguyen et al. 2012) 本研究で初めてショウ口属菌の埋土胞子が15年以上生存可能であることが示された。さらに本研究ではヤクタネゴヨウが枯死後37年と71年の調査地がそれぞれ一つずつのみであり、実際にこれらの年数まで生存しているかどうかについてはさらなる検証が必要である。

(2) 実験室での埋土胞子の生存期間 (短期) の検証

本研究は新型コロナの感染拡大の影響を受けて、予定していた子実体探索調査が遅れまたは十分に行うことができなかった。そのため本研究では2年間の埋土胞子の生存状況を検証する予定であったが、1年までの結果しか得ることができなかった (表2)。

表2 保存した土壌における各ショウ口属菌の埋土胞子の生存状況

保存条件		0日	1年	1.5年	2年	5年	10年
ヤクタネショウ口・屋久島	5 ・湿潤	100%	100%	-	-	-	-
	5 ・乾燥	100%	100%	-	-	-	-
	20 ・湿潤	100%	100%	-	-	-	-
	20 ・乾燥	100%	100%	-	-	-	-
ヤクタネショウ口・種子島	20 ・湿潤	100%	100%	-	-	-	-
	20 ・乾燥	100%	100%	-	-	-	-
ハイマツショウ口	20 ・湿潤	100%	0%	-	-	-	-
	20 ・乾燥	100%	0%	-	-	-	-
ホンショウ口	20 ・湿潤	100%	100%	-	-	-	-
	20 ・乾燥	100%	100%	-	-	-	-

屋久島と種子島のヤクタネショウ口とホンショウ口はいずれの保存条件においても保存期間0日と1年ではすべてのバイオアッセイ苗で菌根菌の菌根形成を確認し、種同定の結果、接種をした菌であることを確認した (表2)。一方でハイマツショウ口は0日ではすべての苗で菌根形成を確認したものの、1年ではすべての苗で菌根の形成が確認できなかった。他のショウ口属菌でも1年土壌を保存したことにより出現頻度が大幅に減少する事象もあり (Murata et al. 2017b) すべてのショウ口属菌が長寿命性を持っているわけではないことが示唆された。しかしながら、本研究のハイマツショウ口のバイオアッセイで用いた宿主は本来の宿主であるハイマツではなくゴヨウマツであり、このことが結果に影響した可能性も考えられるため、今後さらに検証する必要がある。

< 引用文献 >

- Bruns, T.D., Peay, K.G., Boynton, P.J., Grubisha, L.C., Hynson, N.A., Nguyen, N.H., Rosenstock, N.P. (2009) Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first 4 year of a 99-year spore burial experiment. *New Phytol* 181:463-470
- 村田政穂・奈良一秀 (2017) 絶滅危惧種トガサワラの優占林分における土壌深度別の外生菌根菌群集. *日林誌* 99: 195-201.
- Murata, M., Kinoshita, A., Nara, K. (2013) Revisiting the host effect on ectomycorrhizal fungal communities: implications from host-fungal associations in relict *Pseudotsuga japonica* forests. *Mycorrhiza* 23: 641-653.
- Murata, M., Kanetani, S., Nara, K. (2017a) Ectomycorrhizal fungal communities in endangered *Pinus amamiana* forests. *PlosOne* 12(12): e0189957.
- Murata, M., Nagata, Y., Nara, K. (2017b) Soil spore banks of ectomycorrhizal fungi in endangered Japanese Douglas-fir forests. *Ecological Research* 32: 469-479.
- Nguyen, N.H., Hynson, N.A., Bruns, T.D. (2012) Stayin' alive: survival of mycorrhizal fungal propagules from 6-year-old forest soil. *Fungal Ecol* 5:741-746
- Sugiyama, Y., Murata, M., Nara, K. (2018) A new *Rhizopogon* species associated with *Pinus amamiana* in Japan. *Mycoscience* 59: 176-180.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田政穂・金谷整一・奈良一秀
2. 発表標題 ヤクタネシヨウ口埋土胞子の宿主選好性
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田政穂、金谷整一、奈良一秀
2. 発表標題 ヤクタネシヨウ口の埋土胞子は何年生きるのか：過去の松枯れ被害地から推定
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
研究協力者	奈良 一秀  (Nara Kazuhide)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------