

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15565

研究課題名（和文）地下に子実体を形成する根部内生菌の分散生態に関する研究

研究課題名（英文）An study on the dispersal ecology of the subterranean fruiting endophytic fungus

研究代表者

中村 慎崇（Nakamura, Noritaka）

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・研究員

研究者番号：10867534

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではHymenoscyphus sp.（以下、本菌）をモデルとして根部内生菌の分散生態に関する知見を深めることを目的とした。国内で本菌子実体を収集し、580分離菌株を確立した。培養性状の違い及び複数遺伝子座に基づく系統解析から、今回収集した菌株が種複合体を形成していることが示唆された。このうち最も広範囲に分布した一系統に着目し、SSRマーカーを用いた集団遺伝学的な解析に供した結果、有意な集団遺伝構造が検出されたほか、集団間の地理的な距離が大きいほど遺伝的な距離が大きく、本菌が地上生の近縁種と異なる孢子分散の様式や分散能力を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とした菌の宿主となるブナ科樹木は国内に広く分布するにもかかわらず、その根部内生菌については記載的な研究も未だ不十分である。本研究では国内で報告されていなかった植物根に発生するHymenoscyphus属菌を収集・整理することで根部内生菌の知られざる生物多様性の一端を明らかにした。さらに、本研究により得られたHymenoscyphus属菌の分散様式及び分散能力に関する知見は根部内生菌群集の形成メカニズムを考える上で役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to expand our understanding of the dispersal ecology of root endophytic fungi, utilizing Hymenoscyphus sp. as a representative example. Specimens of this fungus were collected in Japan and 580 isolates were obtained. Phylogenetic analyses, based on four distinct loci and variations in cultural traits, indicated the presence of a species complex. The most prevalent species among them was subjected to population genetic analysis using SSR markers, revealing a significant population genetic structure. Furthermore, the data suggested that as the geographic distance between populations increased, so did the genetic distance, indicating that this fungus possesses a distinct spore dispersal mode and dispersal ability compared to its aboveground-fruited relatives.

研究分野：微生物生態学

キーワード：内生菌 ビョウタケ目 分散

### 1. 研究開始当初の背景

分散能力は生物の分布を決定づける要因の一つである。自ら長距離を移動できない菌類は、風や水流、動物などに運搬を任せることによって分散している。根部内生菌と呼ばれる植物の根に無病徴で定着するグループの中には分散構造がこれまで一度も確認されていない系統が含まれる一方で、*Hymenoscyphus monotropae* のように宿主の根を基質として土壤中に小型の子実盤を形成する種も知られる。これらは地上生の近縁種と異なり、多くの場合土壤中に存在するために風による分散が生じにくいと考えられる。上記のような植物の根から子実体を発生させる種はこれまで報告自体が限られていたこともあり、記載的な研究または宿主との相互作用に着目した研究がなされているのみであり、分散に着目した研究はほとんど行われていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、*H. monotropae* 様菌 (図1) をモデルとして根部内生菌の分散生態を明らかにし、内生菌の群集構造を決定づける要因の一つとしての分散能力の差が生じるメカニズムを理解することを最終的な目的とした。そのために、直接的な孢子の検出及び集団遺伝構造を手掛かりに、国内に発生する *H. monotropae* 様菌の分散生態に関する知見を得ることとした。



図1 樹木の根から発生する *Hymenoscyphus* 属菌

### 3. 研究の方法

日本国内8道県18地点から *H. monotropae* 様菌の子実体を収集するとともに、落下法により1/4PDA培地上に多孢子由来の分離菌株を確立した。取得した菌株はMEA培地、SNA培地を用いて培養性状を調査するとともに、電子レンジ法によりDNA抽出を行い、菌類特異的PCRプライマーを用いてPCRを行ったのち、ITS-5.8S領域の塩基配列を決定した。さらに、3遺伝子座 (*act*, *tub2*, *tef1*) の部分領域をPCRにより増幅するとともに塩基配列を決定し、ITS-5.8S領域と合わせて系統解析に供した。菌の接種実験を行うため、室内で発芽させたクヌギのシュートを切り取り過酸化水素水を用いて表面殺菌を施した。0.5 μMのインドール-3-酪酸を添加したハイポネックス培地で発根させ、無菌苗を作出した。無菌苗を滅菌土壌と取得した菌株の培養物を混合した土壌に植栽し二者培養系を確立した。野外における発生時期を明らかにするために、本菌の発生地においてクヌギの根を収集し、0.5 gずつプラスチックネットに入れ発生地に埋設し、四週間ごとに掘り出して実体顕微鏡下で発生子実体数を計数した。また、非発生時期にクヌギ根の表面殺菌を行い、分離培養を行って内生菌相を明らかにした。

取得した菌株からCTAB法を用いてゲノムDNAを抽出し、ゲノムシーケンスを行った。アセンブルしたゲノム情報をもとにMISAを用いてSimple Sequence Repeat (SSR) 領域を特定し、Primer3Plusを用いてプライマーを設計した。国内で収集した菌株を用いて各種集団遺伝学的な解析に供した。

### 4. 研究成果

#### (1) 国内に発生する *H. monotropae* 様菌の多様性

2021年1月から2022年3月にかけて国内各地から収集した *H. monotropae* 様菌から580菌株を取得した。研究開始当初、これらは単一の種であることを想定していたが、培養性状等の違い

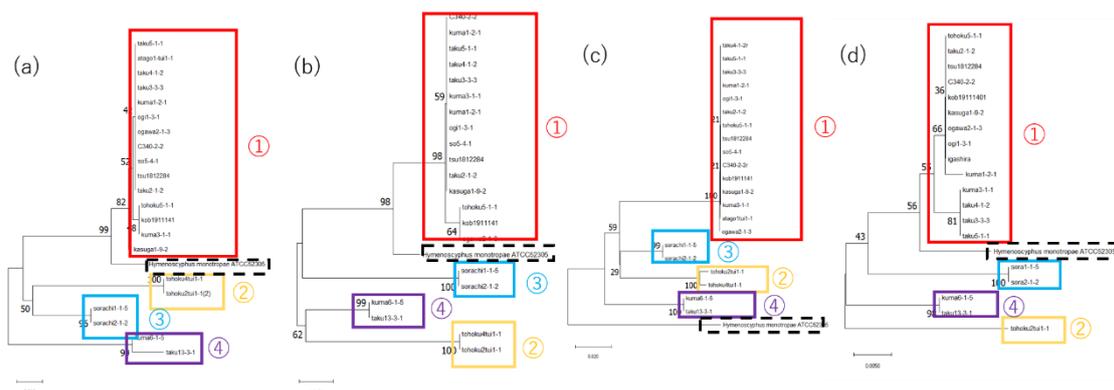


図2. *act* (a), *tub2* (b), *tef1* (c)各遺伝子座及びITS-5.8S領域 (d)の塩基配列に基づいた近隣結合系統樹

から複数種で構成される可能性があり、分類学的な検討を加える必要性が生じた。複数遺伝子座 (*act*, *tub2*, *tef1*, ITS) のDNA塩基配列を解析した結果、取得した分離菌株は一貫して4系統からなり、種複合体を形成していることが示唆された (図2)。このうち3系統は本州及び九州のブナ科樹木の樹下から採集され、残り1系統は北海道のカバノキ属樹下から採集された。これらのうち少なくとも3系統について、子実体形態、ならびにSNA培地上での子実体形成及び分生子形成の有無、ならびに分生子の形態で区別することができ、それぞれ別種とすることが適当であると考えられた。いずれも子実層が露出し、子囊盤は子嚢胞子を射出する機能を保持していたことから、土壤中に発生するにも拘らず風による分散が可能であることが示唆された。

### (2) *Hymenoscyphus* sp. 1の子実体発消長

このうち最も広範囲から収集された系統である *Hymenoscyphus* sp. 1について、子実体採集に役立てるとともに生活史を明らかにするため、子実体発消長及びクヌギ組織内への内生能力を調査した。*Hymenoscyphus* sp. 1は、茨城県つくば市のクヌギ植栽地において子実体が発生しない夏季に表面殺菌を施した細根から高頻度で分離された (表1)。更に、クヌギとの二者培養系では根の組織内への定着が観察されたことから、生活環の一部で内生菌的な生活様式を持つと考えられた。茨城県つくば市の発生地において、*Hymenoscyphus* sp. 1の子実体は10月から12月にかけて増加し、その後減少に転じたのち3月中旬まで発生を確認できた (図3)。寒天培地上での子実体発生試験では低温条件下で本菌の子実体形成が有意に増加した (ペアワイズt検定,  $p < 0.05$ ; 表2) ことから、低温条件が子実体形成を誘導することが示された。上記の結果から、*Hymenoscyphus* sp. 1は根部内生菌として樹木の根に定着し、枯死・脱落した根を基質として冬季に低温条件下で子実体を発生させると考えられた。

表1. *Hymenoscyphus* sp. 1 (赤字) 発生地のクヌギ細根から複数回分離された菌株の分類群

菌株	分離回数	最も相同性の高いGenBank配列	相同性(%)	カバー率(%)
Hyaloscyphaceae sp.	25	KF359568 Hyaloscyphaceae sp. CC 14-35	100	86
<b><i>Hymenoscyphus</i> sp.</b>	<b>17</b>	<b>LC596931 <i>Hymenoscyphus monotropae</i> TNS:F-89214</b>	<b>100</b>	<b>93</b>
Sordariomycetes sp.	14	MW208108 Sordariomycetes sp. NJ-2020a isolate SM17	93.3	54
<i>Aphanoascus fulvescens</i>	12	MW617027 <i>Aphanoascus fulvescens</i> isolate 145	100	81
<i>Dactyloctenidia pauciseptata</i>	10	MK602783 <i>Dactyloctenidia pauciseptata</i> isolate BV-1354	100	94
<i>Fusiconidium lycopodiellae</i>	6	MH107892 <i>Fusiconidium lycopodiellae</i> culture CBS:143437	100	92
Pleosporales sp.	6	KT269193 Pleosporales sp.	98.3	83
<i>Annulohyphoxylon</i> sp.	2	LC586233 <i>Annulohyphoxylon</i> sp. FC-7102	99.8	81
Ascomycota sp.	2	LR804234 uncultured fungus	100	32
<i>Fusarium</i> sp.	2	MK407590 Uncultured <i>Fusarium</i> clone D1818ITS	100	100
<i>Cadophora</i> sp.	2	MG076773 <i>Cadophora</i> sp. voucher M Loden	100	97
Helotiales sp.	2	EU888616 Fungal endophyte sp. Shylsm30	100	68

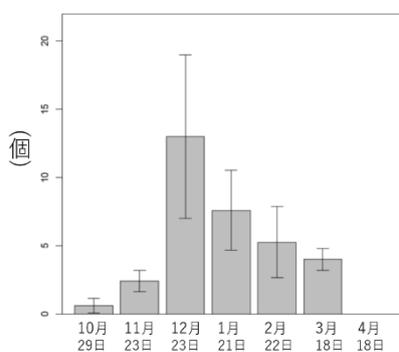


図3. クヌギ根 0.5 g あたり子実体発生数の推移

表2. 各菌株の培養温度ごとの子実体形成数

菌株	各温度における子実体形成数 (標準偏差)		
	4° C	10° C	25° C
chi1812113	4.80 (6.14)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
tsu1812282	1.25 (1.75)	0.43 (0.78)	0.00 (0.00)
tak1812312	4.20 (6.02)	0.20 (0.45)	0.00 (0.00)
全菌株	3.06 (4.63)*	0.24 (0.56)	0.00 (0.00)

### (3) *Hymenoscyphus* sp. 1の日本国内における集団遺伝構造

岩手県、茨城県、栃木県、滋賀県、佐賀県、熊本県の16地点に由来する580菌株の解析を行った。開発したSSRマーカーは各菌株は多胞子分離により得られたにも関わらず、574菌株は単一の遺伝型を示し、高頻度で近親交配または自殖が行われていることが示唆された。階層的AMOVAの結果、集団間 ( $p < 0.001$ )、地域間 ( $p < 0.05$ ) で有意な集団構造

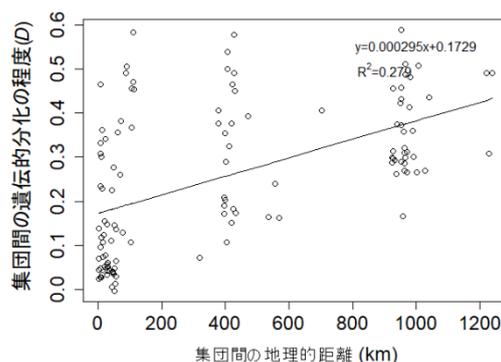


図4. *Hymenoscyphus* sp. 1 集団間の地理的距離及び遺伝的距離

を示した。変異のうち 72.1%が集団内、17.3%が集団間、10.5%が地域間で見られた。地域ごとの集団が見出され、かつ集団間の地理的な距離と遺伝的な距離には正の相関が見出された（図 4；Mantel の検定,  $p < 0.01$ ）。これらの結果から、国内のスケールにおいて地理的な要因による分散制限が存在すると考えられた。

ビョウタケ目菌類ではブナの殻斗を基質とするブナノシロヒナノチャワシタケにおいて日本国内での集団遺伝構造が調査された先行研究が存在する。ブナでは西日本において離散的な分布を示すにも拘らず、先行研究においては明確な地理的集団遺伝構造は見いだされていなかった。本菌の分散様式は明らかではないが、両者は類似した子実体の構造、子嚢胞子のサイズを持っており、本菌が土壤中に子実体を発生させることに関係する分散様式の違いが本菌の集団遺伝構造を形成していることが示唆された。

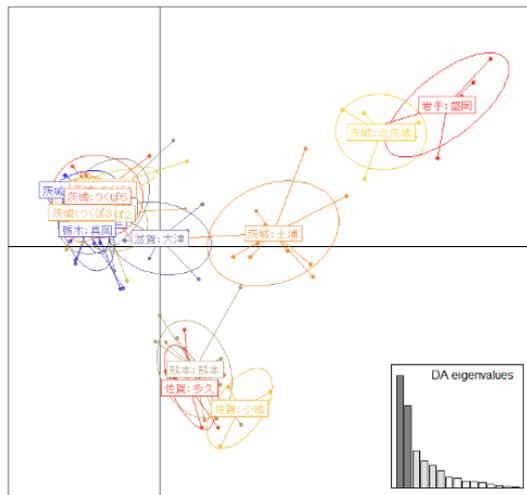


図 5. DAPC により可視化した *Hymenoscyphus* sp. 1 の集団遺伝構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura Noritaka, Abe Junichi Peter, Shibata Hisashi, Kinoshita Akihiko, Obase Keisuke, Worth James Raymond Peter, Ota Yuko, Nakano Shota, Yamanaka Takashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Genotypic diversity of the Asiatic black truffle, <i>Tuber himalayense</i> , collected in spontaneous and highly productive truffle grounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mycological Progress	6. 最初と最後の頁 1511 ~ 1523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11557-020-01642-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村 慎崇
2. 発表標題 根部内生菌 <i>Hymenoscyphus</i> sp. の子実体形態および子実体発生パターン
3. 学会等名 第133 回日本森林学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noritaka Nakamura, Junichi P. Abe
2. 発表標題 Observation of a spontaneous fruiting of Asiatic truffle <i>Tuber himalayense</i> in a Japanese chestnut orchard for seven years.
3. 学会等名 2020 中華民國真菌學會與台灣微生物生態學學會聯合年會（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 慎崇
2. 発表標題 樹木の根から子実体を発生させる根部内生菌 <i>Hymenoscyphus</i> spp.（ピョウタケ目）の日本国内における多様性と子実体発生消長
3. 学会等名 日本菌学会第67回大会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------