

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658121

研究課題名（和文） 樹木の成長を支える共生菌の交配育種技術の開発

研究課題名（英文） Towards the breeding of effective ectomycorrhizal fungal strains to improve tree performance

研究代表者

奈良 一秀 (NARA KAZUHIDE)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：60270899

研究成果の概要（和文）：樹木の多くは養分吸収の大部分を外生菌根菌に依存しており、効果的な菌株を選抜・育種ができれば、樹木の成長や定着を促進できる。本研究では、厳しい土壌条件でも効果が期待される菌根菌の選抜や樹木に与える影響の評価を行い、有効な菌群を特定した。また、交配育種に役立つ情報を整備するため、主要な菌群の遺伝子流動や系統進化についても新規知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Most tree species depend on ectomycorrhizal fungi for soil nutrients. If we were able to select and breed effective ectomycorrhizal fungal strains, they could promote the growth and establishment of trees in various environments. In this study, we conducted screening experiments to know which fungi could effectively promote tree growth in problematic soils (e.g. poor nutrients and high salinity). We also made some new findings on gene flow and phylogenetic evolution of some ectomycorrhizal fungal groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林生産・育種

1. 研究開始当初の背景

(1) 森林の全ての樹木は菌根菌と共生していることが知られる。その中でも、マツ科やブナ科など、森林の主要構成樹木に共生しているのは、いわゆるキノコをつくる菌類である。菌根菌は樹木から光合成産物を受け取る代わりに、土壌中の菌糸で吸収した養水分を宿主樹木に供給する。樹木の成長に必要な窒素やリンの9割以上は菌根菌から供給されるため、菌根菌と共生しない樹木はほとんど成長することができない。

(2) 森林にはヘクタール当たり 100 種を超える菌根菌が生息している。さらにそれぞれの菌根菌種は、数多くの遺伝的に異なる個体か

ら構成されて集団として存在する。生理特性や樹木への成長促進作用には大きな種間差や種内差が認められる。もし、菌根菌の選抜・育種技術が開発され、ストレス耐性菌株などの有用株を作出できれば、荒廃地の厳しい環境下でも樹木の成長や定着を飛躍的に促進できる可能性がある。

(3) 菌根菌には人工培養が困難な種が多く、子実体を人工的に作ることができない種が大部分を占める。しかし、有用な菌株の選抜や交配育種に必要な特性を調べることは、幅広い学術上および応用上の発展性が望める。

2. 研究の目的

(1) 菌根菌が厳しい環境条件下でも繁殖するためには孢子発芽、菌糸成長、植物との共生による相互作用の各段階において、耐性を持つ必要がある。そこで各種環境条件がそれぞれの段階でどのように影響するかを明らかにする。

(2) 樹木の成長や定着にとって厳しい環境条件でこそ、菌根菌による効果が期待できることが望ましい。そこで、現実の問題となることが多いストレス土壌の条件として、塩類、アルカリ塩類、重金属、貧栄養を想定し、上記の検討を行う。

(3) 人為的な交配育種技術を実現するためには自然条件での遺伝子の拡散様式や種分化に関する知見が重要である。そこで、海外の研究機関と連携し、主要な菌群の遺伝子流動や系統進化について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 国内外で収集した多数の外生菌根菌の菌株を利用し、培地上での生育試験を行った。現実の問題土壌を反映させ、塩類や重金属、アルカリ性などの負荷を与え、菌糸成長にどのような影響が表れるのかを調べた。

(2) 外生菌根菌の多くは人工培養が難しい。単離された菌株以外にも広く有用な菌種をスクリーニングするため、自然土壌中に蓄積された埋土孢子に着目した。埋土孢子は宿主樹木の根が近くに来ると発芽し、根に感染して外生菌根を形成する。貧栄養な土壌として、一次遷移初期過程の土壌、熱帯の土壌、トガサワラ林土壌などを採取し、宿主樹木の実生を植栽するバイオアッセイ実験を行った。一定期間栽培した後、苗に感染した菌種をDNA解析によって同定した。また、苗の乾燥重量などを測定し、感染菌種との関係を解析した。

(3) 外生菌根菌の子実体から孢子を採取し、宿主樹木の根と共培養することにより、孢子の発芽率を計測することができる。塩類濃度を段階的に変えた条件化で同様の孢子発芽実験を行い、外生菌根菌の孢子発芽に及ぼす塩類濃度の影響について調べた。

(4) ウラムラサキとセイヨウショウロ類、イッポンシメジ類について、世界各地の子実体標本などから得られたDNA情報と、国内で収集した子実体のDNA情報をあわせて、集団遺伝学的解析、分子系統学的解析を行い、遺伝子流動や進化様式について推定を行った。

4. 研究成果

(1) NaClを添加した(0mM, 25mM, 50mM, 100mM, 200mM, 400mM) MN培地上で、コツブタケ No. 1

と *Cenococcum geophilum* No.1 菌株を培養したところ、前者では 0mM から 50mM にかけて菌糸成長は阻害され、100mM 以上では菌糸成長が全く見られなかった。一方、*C. geophilum* No.1 では、400mM でも十分な菌糸成長が見られ、高い塩類耐性を示すことが明らかにされた。*Cenococcum geophilum* は海岸のクロマツ林の最優占種であることが知られているが、同菌の高い塩類耐性がそれを実現しているものと考えられる。

さらに多くの菌種で塩類負荷試験を実施し、*C. geophilum* の他の菌株や、ショウロ属菌、ヌメリイグチ属菌など、幅広い菌種の菌株で塩類耐性が認められた。

中国の乾燥地帯に広がる塩類土壌地域では高濃度の NaCl だけでなく、土壌のアルカリ性化が大きな影響を及ぼすことが知られている。そこで、NaCl (100mM) とアルカリ負荷 (pH9.0) を組み合わせた条件下で、10 菌株の菌糸培養試験を行った。その結果、NaCl 条件だけでは、ザラツキカタワタケ、ヌメリイグチ No.2、アカダマタケ、ハツダケ、コツブタケ No.1、*C. geophilum* No.1、Unidentified Tanashi fungus、ウラムラサキの7菌株において、対照区と変わらない菌糸成長が見られた。これらの菌株はアルカリ負荷だけの条件でも対照区の70%以上の成長量を示すものが多かった。しかし、NaCl とアルカリ負荷を組み合わせた条件では、試験を行った全ての菌株で対照区の10%以下の菌糸成長量しか得られなかった。これらのことから、複数のストレス条件が重なることで、ストレスが相乗的に作用し、菌糸成長に悪影響を及ぼすものと考えられる。今後はさらに幅広い菌株をスクリーニングし、複合ストレスにも耐えうる菌種をスクリーニングする必要がある。

重金属についてはCuとZnの負荷条件下で、およそ50の菌株を用いて培養試験を行った。Cuについては、ヌメリイグチ No.1、アマタケなどの菌株で高い耐性が確認された。また、Znについても10の菌株で耐性が確認された。CuとZnの耐性株は多くの場合一致しなかったことから、違う遺伝子が耐性機能に関与しているものと考えられる。さらに、これらの菌株は重金属汚染地ではない場所で採取したものが多くことから、耐性遺伝子は汚染地以外でも広く集団内に固定されていることが明らかにされた。

(2) 人工培養ができる菌種では、ストレス負荷による培養試験が有効なスクリーニング手法であるが、外生菌根菌には人工培地上での成長が見られない菌種も多い。そこで、自然土壌中に見られる外生菌根菌の孢子を対象にして、スクリーニングするためのバイオアッセイ実験を行った。このスクリーニン

グは、培養できない菌種も対象にして行える利点がある。

富士山の一次遷移初期過程の貧栄養土壌から採取した土壌を用いて、ミヤマヤナギとカラマツの実生を栽培し、菌根を形成する菌種や苗の成長への影響を調べた。その結果、ミヤマヤナギの場合、採取直後の試験ではキツネタケ属やアセタケ属など、多様な菌種が菌根を形成したのに対し、採取1年後の試験では、ハマニセシウロが優占していた。この結果は、大部分の菌種の埋土胞子は1年程度で大きく活性が低下するのに対し、ハマニセシウロは長く感染力を維持できることを示しており、有望な菌種であると考えられる。一方、カラマツではミヤマヤナギに比べて感染頻度は低く、菌種もハナイグチやシロヌメリイグチが優占するなどミヤマヤナギで得られた菌種群とは大きく異なる結果となった。同じ土壌に含まれる埋土胞子を用いても、菌根を形成する菌種が両樹種で大きく異なっていたことから、対象とする樹種に適した菌種を選ぶことが重要であるといえる。また、実験した土壌が極貧栄養で容器も小さかったことから、菌根形成による苗の成長促進はいずれの場合も確認できなかった。貧栄養土壌に適した菌株育種において、埋土胞子をスクリーニングに利用するためには更なる条件検討が必要であろう。

埋土胞子を利用したスクリーニング実験は、スマトラ島で採取したマツ林土壌や、トガサワラ林でも実施した。詳細は検討中であるが、いずれもシウロ属菌が出現する頻度が高く、実生の成長促進効果も顕著であった。育種に有望な菌種であることが示唆される。

(3) 海岸林で採取した外生菌根菌の子実体を利用し、塩類負荷条件下での胞子の発芽試験を実施した。200mM程度の塩類負荷でも胞子発芽は確認できたが、苗の状態によって結果のばらつきが大きく、今後、実験条件を検討することが必要である。

(4) ヨーロッパと日本のウラムラサキの集団遺伝解析では、それぞれの地域内で遺伝子の流動は大きいものの、両地域間の遺伝子流動はほとんどなく、遺伝的に分化しているものと考えられる。菌類の胞子は小さく、大量に生産されるため、地球規模の分散が可能であるとする仮説もあるが、得られた結果はその仮説を否定するものである。遺伝的に隔離された集団間で交配が可能かどうかは更なる検討が必要である。

同様に、セイヨウシウロやイッポンシメジ類の地下生菌でも、アジアとヨーロッパ、北米で独立した系統群を示すものが多いことから、それぞれの地域で独自の進化と種分化を繰り返しているものと考えられる。これ

らの菌群は地下に子実体を形成し、胞子の散布も動物に依存していることから、地上性の子実体を形成する菌種よりも地域分化が進んでいる可能性もある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

(1) 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*, online early DOI: [10.1007/s00572-013-0504-0](https://doi.org/10.1007/s00572-013-0504-0) [査読有]

(2) Bonito, G., Smith, M.E., Nowak, M., Healy, R. E., Guevara, G., Cázares, E., Kinoshita, A., Nohra, E. R., Domínguez, L. S., Tedersoo, L., Murat, C., Wang, Y., Moreno, B.A., Pfister, D. H., Nara, K., Zambonelli, A., Trappe, J. M., Vilgalys, R. (2013) Historical biogeography and diversification of truffles in the Tuberales and their newly identified Southern hemisphere sister lineage. *Plos One* 8: e52765 DOI: [10.1371/journal.pone.0052765](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052765) [査読有]

(3) Kinoshita, A., Sasaki, H., Nara, K. (2012) Multiple origins of sequestrate basidiomes within *Entoloma* inferred from molecular phylogenetic analyses. *Fungal biology* 116: 1250-1262. DOI: [10.1016/j.funbio.2012.09.006](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.09.006) [査読有]

(4) Tedersoo, L., Bahram, M., Toots, M., Diedhiou, A., Henkel, T., Kjöller, R., Morris, M., Nara, K., Nohra, E., Peay, K., Pölme, S., Ryberg, M., Smith, M., Kõljalg, U. (2012) Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular ecology* 21: 4160-4170. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2012.05602.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05602.x) [査読有]

(5) Huang, J., Nara, K., Lian, C., Zong, K., Peng, K., Xue, S., Shen, Z. (2012) Ectomycorrhizal fungal communities associated with Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) in Pb-Zn mine sites of central south China. *Mycorrhiza* 22: 589-602. DOI: [10.1007/s00572-012-0436-0](https://doi.org/10.1007/s00572-012-0436-0) [査読有]

(6) Vincenot, L., Nara, K., Sthultz, C., Labbé, J., Dubois, M.P., Tedersoo, L., Martin, F., Selosse, M.A. (2012) Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* complex. *Molecular Ecology* 21: 281-299. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x) [査読有]

(7) Vincenot, L., Nara, K., Sthultz, C., Labbé, J., Dubois, M.P., Tedersoo, L., Martin, F., Selosse, M.A. (2012) Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* complex. *Molecular Ecology* 21: 281-299. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x) [査読有]

(8) Vincenot, L., Nara, K., Sthultz, C., Labbé, J., Dubois, M.P., Tedersoo, L., Martin, F., Selosse, M.A. (2012) Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* complex. *Molecular Ecology* 21: 281-299. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x) [査読有]

(9) Vincenot, L., Nara, K., Sthultz, C., Labbé, J., Dubois, M.P., Tedersoo, L., Martin, F., Selosse, M.A. (2012) Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* complex. *Molecular Ecology* 21: 281-299. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x) [査読有]

(10) Vincenot, L., Nara, K., Sthultz, C., Labbé, J., Dubois, M.P., Tedersoo, L., Martin, F., Selosse, M.A. (2012) Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* complex. *Molecular Ecology* 21: 281-299. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x) [査読有]

[学会発表] (計6件)

- ① 奈良一秀, 南賢士郎, 村田政穂, 木下晃彦, Maman Turjaman, I Made Sudiana (2013) 熱帯性スマトラマツ自然林における外生菌根菌群集. 日本森林学会 第124回大会 (岩手大学, 2013.3.27)
- ② Nara, K. (2013) Ectomycorrhizal fungal communities in Japanese Douglas-fir forests. The 7th International Conference on Mycorrhiza (Delhi, India), invited talk. 2013.1.10
- ③ 木下晃彦, 佐々木廣海, 村田政穂, 奈良一秀 (2012) リボソーム DNA 塩基配列のメタ解析によるショウロ属のグローバルな多様性と進化. 日本森林学会 第123回大会 (宇都宮大学, 2012.3.27)
- ④ 宗昆, 奈良一秀, 練春蘭 (2012) カドミウムストレス下における外生菌根菌 45 株の菌糸成長とカドミウム吸収について. 日本森林学会 第123回大会 (宇都宮大学, 2012.3.27)
- ⑤ 奈良一秀, 田中元気, 村田政穂 (2012) 一次遷移過程における外生菌根菌の埋土胞子. 日本森林学会 第123回大会 (宇都宮大学, 2012.3.27)
- ⑥ 村田政穂, 木下晃彦, 奈良一秀 (2012) トガサワラ林における外生菌根菌の埋土胞子群集. 日本森林学会 第123回大会 (宇都宮大学, 2012.3.27)

[図書] (計3件)

- (1) 奈良一秀 (2013) 地下から森林を見つめ直す. In 「アジアの生物資源環境学」. 則定・小島 編. 東京大学出版会. (印刷中掲載確定)
- (2) 奈良一秀 (2012) 図説日本の樹木 (分担執筆). 鈴木和夫・福田健二 編. 朝倉書店, 200pp.
- (3) 奈良一秀 (2012) 見えないところで樹木をつなぐ 「森を生み出すキノコのチカラ」 自然保護 525: 40-42

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奈良一秀 (NARA KAZUHIDE)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授
 研究者番号: 60270899

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

木下晃彦 (KINOSHITA AKIHIKO)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号: 70533983

田中 恵 (TANAKA MEGUMI)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員
 研究者番号: 40401301

村田 政穂 (MURATA MASAO)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員
 研究者番号: 20582381