

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780143

研究課題名(和文) 絶滅危惧種トガサワラを救う菌根菌を探る

研究課題名(英文) Survey of ectomycorrhizal fungi on endangered Japanese Douglas-fir forests

研究代表者

村田 政穂 (Murata, Masao)

東京大学・新領域創成科学研究科・客員共同研究員

研究者番号：20582381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：トガサワラは、紀伊半島と四国東部にのみ確認されている固有種である。トガサワラの現存する個体数は約1,000個体と推定されており、絶滅危惧II類(VU)に指定されている。申請者は、樹木の生育に必要な不可欠である外生菌根菌を4つのトガサワラ林で調べ、*Cenococcum geophilum*やベニタケ科やイグチ科フウセンタケ科などが高頻度で検出されたことを明らかにした。また、高知県と紀伊半島の4つのトガサワラ林分全体で344種の外生菌根菌が存在し、トガサワラだけでも218種以上の外生菌根菌が共生していると推定した。

研究成果の概要(英文)：Japanese Douglas-fir (*Pseudotsuga japonica*) is restricted to localities on the Kii peninsula and on eastern Shikoku island in Japan. Previous censuses of *P. japonica* estimated the remaining number of individuals at around 1,000. With increasing awareness of its extinction risk, *P. japonica* is now designated as an Endangered species II (VU). I studied Ectomycorrhizal (ECM) fungal communities on four *P. japonica* forests. Dominant ECM fungi found on the existing roots in *P. japonica* forests included *Cenococcum geophilum*, Russulaceae, Boletaceae, Cortinariaceae species, all of which are not specific to *Pseudotsuga*. The richness estimator for ECM fungi on these four forests and only *P. japonica* was at least 344 and 218, respectively.

研究分野：森林科学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：林学 森林保護 外生菌根菌

### 1. 研究開始当初の背景

トガサワラは日本固有の針葉樹で、紀伊半島と四国東部にのみで生育が確認されている日本に自生する分布域が極端に狭い種である(林 1952、矢頭 1957、山中 1975)。トガサワラの現存している個体数は約 1,000 個体となっており、種としての存続が危ぶまれ、本種は絶滅危惧 II 類(VU)に指定されている。森林伐採が減少の主要因であり、100 年後の絶滅確率が 90%であるとされている(環境庁 2000)。そのような状況にあるにもかかわらず、これまでのトガサワラに関する研究は、ほとんどがその分布や林分内の植生に関するものだけで、トガサワラを保全する上で必要な基礎的な情報はまだまだ不足していた。

本研究は、上記の基礎的な研究の一環として、トガサワラに共生する外生菌根菌(以下菌根菌)を調べることを目的とした。樹木と共生関係にある菌根菌は、土壤中から吸収した養分を樹木に供給する働きを持つことが知られ、樹木の成長にとって不可欠であることが知られている(Smith and Read 2008)。その依存度は極めて高く、樹木の成長に必要なリンや窒素の 9 割以上は菌根菌から供給されており、菌根菌に感染しなかった樹木が自然条件下で健全に生育することはない。実際に攪乱跡地における研究では、適合する菌根菌が土壤中に存在する場所でしか樹木の定着は見られていない(Nara 2006)。上記の理由により菌根菌は森林生態系を支える重要な微生物であることから、近年、熱帯から冷温帯林まで世界各地で菌根菌の群集(種組成や多様性)を調べる研究が行われている(Ishida et al. 2007 など)。しかし、衰退や絶滅が危惧されている樹種を対象にした研究はなかった。したがって、樹木の健全程度を明らかにする上で、菌根菌の定着状況を明らかにすることは非常に重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、樹木の保全と保護に菌根菌を活用した新たな手法を開発することを念頭に、固有種であり絶滅が危惧されているトガサワラを一つのモデルケースとして基礎的な研究を行った。具体的には、日本国内に残存するトガサワラ林分に現在どのような菌根菌が生息しているのかについて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

調査は紀伊半島で 2 箇所〔奈良県吉野郡川上村三之公川(以下三之公川)と三重県熊野市大又(以下大又)〕と高知県で 2 箇所〔安芸郡馬路村安田川山(以下安田川山)と安芸郡馬路村魚梁瀬千本山(以下千本山)〕の計 4 林分で行った。各林分のトガサワラ成木の周囲において土壌サンプル(5×5×10cm)を 25 ヶ所ずつ採取した。各サンプリング地点

は独立性を確保するため約 10m 以上離し、それぞれの位置を GPS で記録した。また、サンプリングを行った一部の地点では、トガサワラを中心とした半径 5 m 以内の胸高直径 5 cm 以上の樹木について、毎木調査を行った。持ち帰ったサンプルは処理するまでの間冷蔵保管した。各サンプルから根を洗い出し、実体顕微鏡下で菌根の形態分類を行い、それぞれの形態タイプの根端数を計測した。各サンプル中の全ての菌根形態タイプから DNA 解析用のサンプルを複数選び、チューブに入れて乾燥・保存し、CTAB 法によって DNA を抽出した。菌特異的プライマー(ITS1F と ITS4 または ITS4B)によって、rDNA の ITS (internal transcribed spacer) 領域を増幅した後、制限酵素の Hinf と Alu を用いた RFLP を行った。各土壌サンプルの全ての RFLP タイプからダイレクトシーケンスを行ない、既存の塩基配列データベース(GenBank など)で同源性検索して菌根菌の種同定を行った。さらに、上記の試験の DNA 抽出サンプルより、葉緑体 DNA(trnL-F 領域)を増幅し、制限酵素で処理することで得られるバンドパターンと毎木調査の結果より宿主樹種を特定した(Tedersoo et al. 2008)。

データの解析は得られた菌根菌の種の出現頻度から、生息する全菌種数を Estimate S によって推定した。また、菌根菌群集を樹種ごとに分けて多変量解析(MNS)し、菌根菌の種構成におよぼす樹種の影響を評価するとともに、トガサワラに特異的な菌種の有無を明らかにした。

### 4. 研究成果

トガサワラ林から採取した土壌中で見つかった総計 17651 の菌根を実体顕微鏡下で観察し、このうち 760 を DNA 解析に用い、311 サンプルのシーケンスを行った。その結果 136 種の菌根菌がトガサワラ林で検出され、トガサワラだけでも 68 種の菌根菌が検出された。Estimate S による推定菌根菌種数は林分全体では 344 種以上、トガサワラだけでは 218 種以上であった(図 1)。

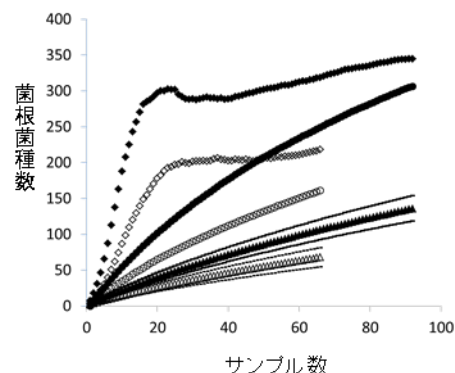


図1 トガサワラ林における菌根菌の種数累積曲線

黒: 林分全体 白: トガサワラのみ  
 三角: 種数累積曲線 丸: Jackknife2による推定値  
 四角: Chao2による推定値

検出された菌根菌群集は数種の複数頻度で出現した菌種と大多数の1つの土壤サンプルにしか出現しなかった菌種で構成されていた(図2)。これは菌根菌の典型的な群集構造であった(Horton and Bruns 2001, Ishida et al. 2007)。 *Cenococcum geophilum* (67.4%) が最も高頻度で出現し、ペニタケ科(59.8%)やイグチ科(27.2%)、フウセンタケ科(23.9%)、イボタケ科(15.2%)、テングタケ科(12.0%)、シロソウメンタケ科(12.0%)も高頻度で出現した。最も多くの種数が検出されたのはペニタケ科(46種)であり、次いでフウセンタケ科(18種)、イボタケ科(10種)、テングタケ科(9種)、イグチ科(9種)が多く出現した。先行研究では、ペニタケ科やイボタケ科は温帯林で優占することが報告されているが(Kennedy et al. 2003, Horton et al. 2005, Ishida et al. 2007, Morris et al. 2009)、トガサワラ林ではイボタケ科よりもイグチ科やフウセンタケ科の方が出現頻度が高かった。

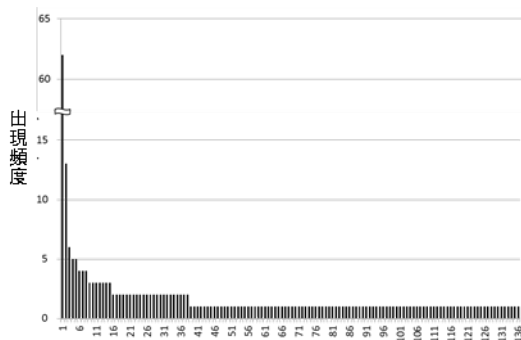


図2 トガサワラ林における菌根菌の出現頻度

*Cenococcum geophilum* やペニタケ科、イグチ科、フウセンタケ科、シロソウメンタケ科はすべての外生菌根性宿主樹木で検出された。対照的に、有意な差はなかったが、テングタケ科やチャワタケ科、ロウタケ科はモミやツガでは検出されなかった。MNSによる多変量解析によって、菌根菌群集は宿主樹木、特にナラ類と針葉樹で分布が異なっていた(図3)。MRPP解析でも菌根菌群集は宿主樹木間で有意に異なっていた( $A=0.209$ ,  $P=0.013$ )。さらに各樹種間の菌根菌群集で比較をすると、トガサワラに対するソレンセンの類似度指数が最も高かったのはツガで(0.224)、次いでモミ(0.213)とナラ類(0.18)となった。最も低い関係にあったのはモミとナラ類だった(0.062)。MRPP解析では、トガサワラとナラ類( $A=0.214$ ,  $P=0.014$ )やツガ( $A=0.167$ ,  $P=0.041$ )の間には有意な差があったが、モミ( $A=0.106$ ,  $P=0.110$ )との間にはなかった。菌根菌群集に対する宿主の影響は先行研究でも報告されている(Ishida et al. 2007, Tedersoo et al. 2008, Morris et al. 2009, Smith et al. 2009)。Ishida et al. (2007) は日本の温帯混交林の3科5属8種の宿主で検証して、宿主の分

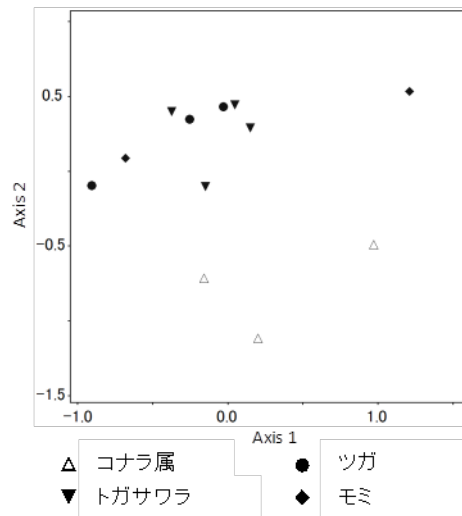


図3 MNSによるトガサワラ林における4宿主の菌根菌群集

類群の距離が離れるほど菌根菌群集が異なっていることを明らかにした。本研究のトガサワラ林でも同様の傾向が示された。

トガサワラで検出された68種の菌根菌のうち、トガサワラでのみ検出された菌は41種であり、そのほとんどが1つの土壤サンプルでのみ検出された菌であった。トガサワラで検出された菌根菌とその菌に関連したデータベースから獲得した各菌種あたり20のDNAシーケンスデータで系統解析をしたところ、トガサワラ属に特異的な菌根菌は発見されなかった。トガサワラ属に特異的な菌根菌は、北米のダグラスファーでショウロ属やヌメリイグチ属が確認されており(Horton et al. 2005, Twieg et al. 2007)。これらの多くは山火事やがけ崩れといった大規模なかく乱後の遷移初期段階で、ダグラスファーに優占的に感染している。また、これらの菌の土壤中での存在様式は、宿主樹木の根端に感染しているより、胞子の状態でかく乱時まで長期に保管されていることが多い。本研究のトガサワラ林は遷移のかなり進んだ林分であり(多くのトガサワラが老齢木)、トガサワラに特異的な菌根菌が検出されにくかったのかもしれない。また、トガサワラ林でもトガサワラに特異的な菌根菌が埋土胞子の状態で存在している可能性は非常に高く、今後その存在の有無やその菌根菌のトガサワラ実生に対し成長を促進するかどうかを検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計1件)

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. ( 査読あり )  
doi:10.1007/s00572-013-0504-0

[学会発表](計2件)

村田政穂・奈良一秀 トガサワラ林にお  
ける土壌深度間の外生菌根菌群集の比較  
第 125 回日本森林学会大会(大宮, 2014  
年 3 月 29 日)

村田政穂・木下晃彦・奈良一秀 トガサ  
ワラ林分における外生菌根菌の埋土孢子  
群集 第 57 回日本菌学会大会(東京, 2013  
年 6 月 8 日)

[その他]

ホームページ等

[http://lbf.nenv.k.u-tokyo.ac.jp/contents/Nara\\_lab/Top.html](http://lbf.nenv.k.u-tokyo.ac.jp/contents/Nara_lab/Top.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 政穂 (MURATA, Masao)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・客  
員共同研究員

研究者番号: 20582381