

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15871

研究課題名(和文) 絶滅危惧種ナガボナツハゼ・菌根菌・マツにおける3者間共生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of tripartite symbiosis in the endangered species *Vaccinium sieboldii*, mycorrhizal fungi, and *Pinus densiflora*

研究代表者

富永 晃好 (Tominaga, Akiyoshi)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：50776490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ツツジ科ナガボナツハゼは絶滅危惧IA類に指定されており、生存数が減少した要因の解明が喫緊の課題となっている。本研究では、ナガボナツハゼの絶滅危機を回避するための基礎的知見を得ることを目的とし、自生地と人工栽培条件下におけるナガボナツハゼとアカマツの菌根菌共生メカニズムの解析を行った。この結果、ナガボナツハゼとアカマツは複数の共通菌根菌と共生し、外生様菌根を形成することが明らかになった。また、ナガボナツハゼの生育には外生様菌根形成の影響が大きく、菌根形成に適切な条件を明らかにすることが絶滅危機を回避するために重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ツツジ科ナガボナツハゼが絶滅の危機に瀕している原因の解明を試みた。この結果、ナガボナツハゼは自生地においてアカマツの近くに生息しており、アカマツと複数の共通菌根菌を有し、特殊な菌根を形成することが明らかになった。特に、Helotiales目の菌は環境が異なっても共通菌根菌として検出され、重要な機能を持っていると考えられた。また、ナガボナツハゼの菌根はアカマツと混植することで形成され、生育に大きな影響を与える可能性が示唆された。この共生メカニズムを解明できれば、ナガボナツハゼの絶滅回避につながることも、近縁のブルーベリー等の園芸作物の栽培技術開発への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：The azalea *Vaccinium sieboldii* is listed as a critically endangered species (IA), and there is an urgent need to understand the factors that have led to the decline in the number of surviving plants. In this study, we analyzed the mechanism of mycorrhizal symbiosis between *Vaccinium sieboldii* and *Pinus densiflora* under natural and artificial cultivation conditions. The results showed that *Vaccinium sieboldii* and *Pinus densiflora* symbiosis with several common mycorrhizal fungi and form ecto-like-mycorrhizas. The ecto-like-mycorrhizas symbiosis is important to avoid extinction risk because ectomycorrhizal symbiosis has a great influence on the growth of *Vaccinium sieboldii*. It is important to clarify the appropriate conditions for mycorrhizal formation of *Vaccinium sieboldii*.

研究分野：園芸生理

キーワード：ナガボナツハゼ アカマツ 菌根菌 共生 菌糸ネットワーク 絶滅危惧種 ツツジ科 マツ科

### 1. 研究開始当初の背景

ナガボナツハゼ (*Vaccinium sieboldii* Miq.) はツツジ科スノキ属の落葉低木であり、同属のシャシャンボやナツハゼなどと同様に我が国固有の貴重な遺伝資源である (第1図A)。しかしながら現在、ナガボナツハゼは静岡県西部から愛知県東部の一部にしか自生していないことから、絶滅危惧IA類 (ごく近い将来における野生での絶滅の危険が極めて高いもの) に指定されており (環境省, 2020), 絶滅回避のためには生存数が減少した要因の解明が必須である。要因について検討するにあたり、ナガボナツハゼは自生地において必ずアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) の樹周辺に生息しているという興味深い生態的特徴がある (第1図B)。我が国のアカマツの栽植本数は昔に比べ激減しており、これに伴いナガボナツハゼの生存数も減少している流れが考えられるが、この場合、ナガボナツハゼとアカマツは共存するための生理メカニズムを有していることが前提となり、先行研究は全くない。ナガボナツハゼとアカマツが共存するメカニズムについては、菌根菌共生に関する最近の報告について着目した。ツツジ科植物とマツ科植物は代表的な菌根菌共生植物として知られている (Trappe, 1987; Wang・Qiu, 2016)。

菌根菌共生メカニズムの中で、ツツジ科植物とマツ科植物においては菌根菌を介して植物間での養分の受け渡しを行っている報告がある。2007年には、ツツジ科の草本植物であるベニバナイチヤクソウが、マツを含む菌根共生樹木の養分を、菌根菌の菌糸を経由して受容している可能性が報告された (Hashimoto ら, 2012; Zimmer, 2007)。ベニバナイチヤクソウは、植物単独でも生育できるがその生育は悪く、菌根菌経由の養分に大半を依存している植物であり「部分的菌従属栄養性植物」と定義されている。さらに、ナガボナツハゼと同属であるブルーベリーとナツハゼがツツジ型菌根菌と共生し内生菌根 (ツツジ型菌根) を形成していることが報告されていた (Baba ら, 2016; Bizabani・Dames, 2015; Carrillo ら, 2015)。

### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、ナガボナツハゼは菌根菌と共生しており、土壤中においてアカマツと共通する菌根菌の菌糸でつながることで生育をアカマツに依存しているのではないかという仮説が考えられた。そこで本研究では、ナガボナツハゼの絶滅危機を回避するための基礎的知見を得ることを目的とし、ナガボナツハゼとアカマツにおける菌根菌共生メカニズムの解析を行った。初めに、自生地においてナガボナツハゼとアカマツの菌根形態解析を行い、共通菌根菌の同定と土壌の菌叢解析を行った。そして、人工栽培条件下でナガボナツハゼとアカマツの混植試験を行い、ナガボナツハゼの生育にアカマツと菌根菌が及ぼす影響の調査を行った。

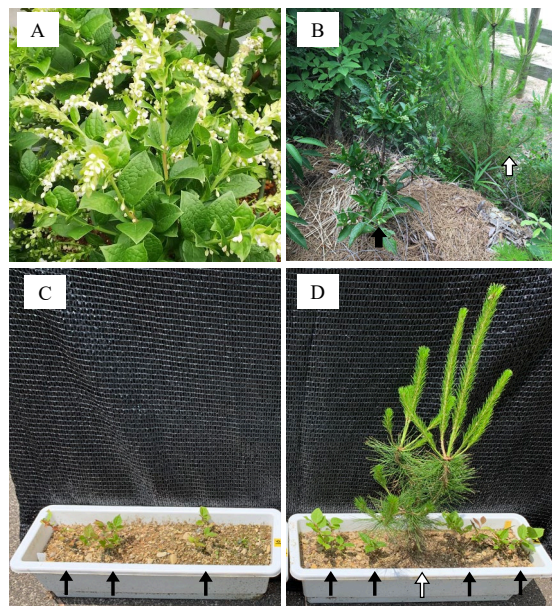
### 3. 研究の方法

#### (1) 植物材料および土壌材料

2018年6月, 9月, 2019年4月, 7月および10月に静岡県に自生するナガボナツハゼ2系統の根を各回に採取した。また、それぞれのナガボナツハゼに最も近い距離に位置するアカマツ6個体から根を採取した。さらに、計8ヶ所の土壌を約1gずつ採取した。そしてサンプリングした根と土壌を-20°Cで保存した。また、人工栽培条件下で自生地環境を再現することを目的とし、プランター内でナガボナツハゼとアカマツの混植試験を行った。植物材料として、ナガボナツハゼの1年生苗36個体を供試した。また、アカマツの苗については市販の1年生苗を5個体供試した。試験区として、ナガボナツハゼの単植区 (第1図C) とナガボナツハゼ・アカマツの混植区 (第1図D) を設定した。各プランターにナガボナツハゼ4個体を定植し、混植区にはアカマツを1個体ずつ定植した。そして、定植399日後にナガボナツハゼの展葉数を調査した後、プランターから植物体を掘り起こし以降の解析に用いた。

#### (2) ナガボナツハゼとアカマツの菌根の形態解析

ナガボナツハゼとアカマツの根の外部形態を実体顕微鏡で観察した。さらに、菌根をアテクノビットに包埋し、リトラトームを用い



第1図 ナガボナツハゼおよびアカマツ

A: 自生地および人工栽培条件下のナガボナツハゼの花序, B: 自生地においてナガボナツハゼとアカマツが混在する様子, C: 人工栽培条件下における単植区, D: 人工栽培条件下における混植区

図中の黒矢印はナガボナツハゼを示し, 白矢印はアカマツを示す

て6  $\mu\text{m}$ 切片を調製した。得られた切片は正立顕微鏡で観察した。

### (3) ナガボナツハゼとアカマツの根および菌根からの DNA 抽出

根および菌根に存在する菌の DNA 抽出については、改変 SDS 法を用いて行った。採取した根系を蒸留水と70%エタノールで洗浄後、1 cm 長の切片を作成し、各切片を1 サンプルとした。得られた DNA を滅菌水 50  $\mu\text{L}$  に溶解し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### (4) PCR による菌の ITS 領域の増幅

得られた菌の DNA を同定するため、Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ (株)) によって、ITS 領域の PCR を行った。得られた DNA を鋳型にして、2 $\times$ PCR buffer, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 2 mM フォワードプライマー, 2 mM リバースプライマー, KOD 0.1units FX Neo ポリメラーゼ (東洋紡) を含む 10  $\mu\text{l}$  の PCR 反応液を調整した。プライマーには、担子菌特異的な gITS7 フォワードプライマー (5'-GTGAATCATCGARTCTTTG-3'), ITS4B リバースプライマー (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3') と、子囊菌特異的な ITS1F フォワードプライマー (5'-GTAACAAGGT (T/C) TCCGT-3'), ITS4A リバースプライマー (5'-CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG-3') を用いた。

### (5) 菌の ITS 領域のシーケンス解析と菌種の同定

PCR 産物を電気泳動後、1 本のバンドが明瞭に確認できたサンプルをシーケンス解析に用いた。得られたシーケンス配列について NCBI の BLAST 検索によって相同性を検索し、検出された菌の分類を調べた。ナガボナツハゼとアカマツで菌名が一致した菌を「共通菌根菌」と定義した。共通菌根菌については、塩基配列解析ソフトである MEGAX を用いてアライメント解析を行った後、Neighbor-Joining 法によって分子系統樹を作成し、系統レベルで菌が同一であるかを確認した。

### (6) 土壌中の菌叢解析

採取した土壌サンプルを粉碎チューブに約 1 mg 入れ、DNA 抽出後、菌の ITS 領域の塩基配列を次世代シーケンサー (illumina 社, Miseq) で決定した。次世代ゲノムシーケンサーの解析は (株) 生物技研に委託した。得られたリード数をもとに各菌の種類を分類し、土壌中の菌叢解析を行った。

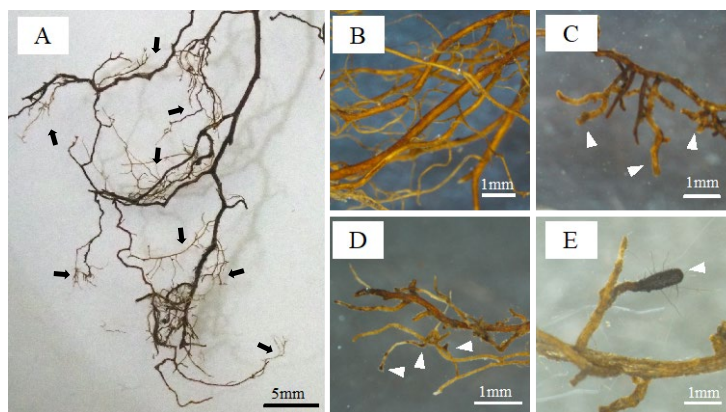
## 4. 研究成果

### (1) アカマツとナガボナツハゼの根に形成された菌根の形態解析

アカマツの根は、主根と側根で形成されており、主根には菌根が観察されなかったが、側根の大部分には外生様菌根 (外生菌根に外観が似ているが、内部構造は未知の菌根の総称) が形成されていた。これらの菌根形態にはさまざまな種類が見られ、色で分類すると褐色の菌根と黒色の菌根に分けられた。また、褐色の菌根のほとんどは、先端が二又以上に分枝しており、黒色の菌根は分枝せず黒色の菌糸を有していた。また、ナガボナツハゼの根は一般的なツツジ科植物と同様に、樹体を支持する太めの褐色根から hair root と呼ばれる細い毛状根が出る形態をしており

(第2図 A)、太めの褐色根には外観において菌根様の形態は見られ

なかった (第2図 B)。これに対し、hair root においては、頻度は低いものの外生様菌根が確認された (第2図 C~E)。一般的にツツジ科植物は内生菌根 (ツツジ型菌根) を形成するため、予想外の現象であった。これらの菌根形態は複数種見られ、色で分類すると褐色の菌根 (第2図 C) と黒色の菌根 (第2図 D, E) に分けられた。また、褐色の菌根は、菌根先端が分枝しているのに対し (第2図 C)、黒色の菌根は分枝せず黒色の菌糸を有していた (第2図 D, E)。ツツジ科で外生様菌根を形成する事例としては、部分的菌従属栄養性植物であるイチヤクソウ属のベニバナイチヤクソウとイチヤクソウ (Hashimoto ら, 2012; Matsuda ら, 2017) および絶対的菌従属栄養性植物であるギンリョウソウ属のギンリョウソウ (谷亀, 2014; Yamada ら, 2008) が知られている。ツツジ科スノキ属における外生様菌根の確認は初めての事例であり、ナガボナツハゼは菌従属栄養性植物に似た菌根菌共生メカニズムを有している可能性が考えられた。



第2図 自生地におけるナガボナツハゼの根に形成された外生様菌根の形態

A: 根の全体図 B: 菌根のない hair root, C~E: 観察された複数種の外生様菌根

Aの図中の矢印はhair root, C~Eの図中の矢じりは外生様菌根を示す

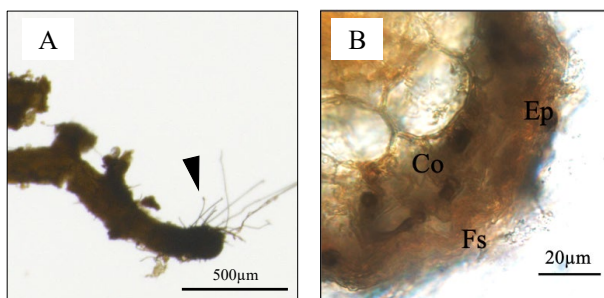
## (2) ナガボナツハゼとアカマツにおける根系の菌叢解析

ナガボナツハゼとアカマツの根系（根と菌根を含む）に存在する菌叢（菌の種類）を解析するために、PCR 解析とシーケンス解析を行った。検出された菌はすべて子囊菌門と担子菌門に分類された（第1表）。これらの菌のうち、自生地条件下および人工栽培条件下においてナガボナツハゼとアカマツの根系で共通して検出された菌は、代表的なツツジ型菌根菌として知られる子囊菌門：Helotiales 目の菌であり（第1表）、「共通菌根菌」と定義した。共通菌根菌の塩基配列をもとに分子系統樹を作成した結果、ナガボナツハゼとアカマツの根系から検出された Helotiales 目の菌が同じクラスターに分類された。

共通菌根菌が形成する菌根形態を明らかにするために、ナガボナツハゼとアカマツの外生様菌根から菌種を同定し、切片観察を行った。Helotiales 目の共通菌根菌が検出されたナガボナツハゼの菌根は、黒色で分枝していない外生様菌根であり、菌糸を伴っていた（第3図 A）。この菌根の横断面には厚い菌鞘が表皮細胞だけでなく皮層細胞内にも侵入している様子が見られ、ハルティヒネットが確認できない異常な外生様菌根であった（第3図 B）。Helotiales 目の共通菌根菌が検出されたアカマツの菌根は、褐色で分枝した外生様菌根であった。この菌根の横断面においては、ハルティヒネットは確認されたが、菌鞘が見られない異常な構造であった。以上の結果から、Helotiales 目の菌が検出されたナガボナツハゼとアカマツの外生様菌根は、典型的な外生菌根ではなく、植物種と生育環境によって形態が異なることがわかった。また、ナガボナツハゼとアカマツから検出された Helotiales 目の菌は、分子系統樹内で同じクラスターに位置しており、ナガボナツハゼとアカマツは Helotiales 目の同系統の菌の菌糸でつながっている可能性が示唆された。

第1表 ナガボナツハゼの根系から検出された菌

門	目	人工栽培条件下	
		自生地	単植区 混植区
子囊菌	Chaetosphaeriales	0	0 1
	Chaetothyriales	1	0
	Helotiales	7	19 2
	Mytilinidales	15	1 0
	Pezizales	1	0 0
	Pleosporales	0	0 1
担子菌	Agaricales	0	1 0
	Boletales	1	0 7
	Cantharellales	0	2 1
	Russulales	6	0 0
	Thelephorales	16	0 0
	Trechisporales	2	0 0



第3図 Helotiales 目の共通菌根菌が検出されたナガボナツハゼ外生様菌根の形態 A：外観，B：切片の横断面図

A の矢じりは外生菌根様の形態を示す

Fs：菌鞘，Ep：表皮細胞，Co：皮層細胞

## (3) 自生地土壌の菌叢解析

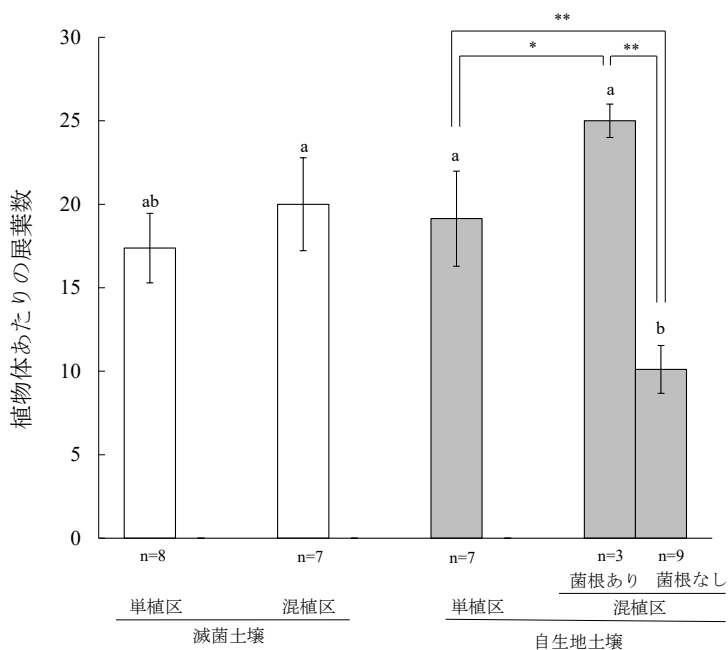
次世代ゲノムシーケンサーを用いて自生地土壌の菌叢解析を行った結果、子囊菌門 43 目と担子菌門 27 目の菌が大半を占め、計 84 目の菌が検出された。これらの中で検出数上位の菌は、多かった順に Agariaceales, Thelephorales, Helotiales 目の菌であり、ナガボナツハゼとアカマツの共通菌根菌である Helotiales 目の菌根菌が上位に含まれていた。

## (4) 人工栽培条件下におけるナガボナツハゼの生育

ナガボナツハゼの生育にアカマツと菌根菌が及ぼす影響を調査するため、ナガボナツハゼの培養苗を用いてプランター内でアカマツとの混植試験を行った。具体的には、滅菌土壌条件下と自生地土壌条件下において、それぞれナガボナツハゼの単植区とナガボナツハゼ・アカマツの混植区を設け、屋外で栽培した（第1図 C, D）。定植 399 日後に根系を観察した結果、自生地単植区、滅菌単植区および滅菌混植区のナガボナツハゼには外生様菌根は見られなかった。一方で、自生地混植区のナガボナツハゼ 12 個体のうち、3 個体の根において外生様菌根が観察された。この外生様菌根が見られた個体（菌根あり個体）は、菌根が見られなかった個体（菌根なし個体）に比べ生育が明らかに良く、展葉数が多かった（第4図）。さらに、菌根あり個体は、自生地単植区のナガボナツハゼよりも展葉数が多かった（第4図）。また、自生地混植区の菌根なし個体

は、菌根あり個体だけでなく、自生地単植区と滅菌混植区に比べても展葉数が少なかった（第4図）。以上の結果から、ナガボナツハゼはアカマツと混植することで外生様菌根を形成することが実証され、ナガボナツハゼにとって外生様菌根の形成は生育促進につながる重要な現象であると考えられた。

本研究では、ナガボナツハゼとアカマツは複数の共通菌根菌と共生しており、外生様菌根を形成することが明らかになった。特に、*Helotiales* 目の菌は環境が異なっても共通菌根菌として検出され、重要な機能を持っていると考えられた。また、ナガボナツハゼの外生様菌根はアカマツと混植することで形成され、生育に大きな影響を与える可能性が示唆された。この共生メカニズムを解明できれば、ナガボナツハゼの絶滅回避の対策技術につながるるとともに、近縁のブルーベリー等の栽培技術への応用も期待される。



第4図 人工栽培条件下で栽培した定植399日後におけるナガボナツハゼの展葉数

異なるアルファベット間には多群間において Tukey-Kramer の多重比較検定を行い5%水準で有意差あり

\*\*、\*は2群間において t 検定を行いそれぞれ 1%と 5%水準で有意差あり

縦棒は標準誤差を示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 富永晃好・内山優奈・細口知椰・八幡昌紀・小林裕樹
2. 発表標題 伊豆諸島の固有種オシマトツジにおける菌根菌共生メカニズムの解析
3. 学会等名 菌根研究会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akiyoshi Tominaga, Sota Yamazaki, Yuna Uchiyama, Masaki Yahata, Yuuki Kobayashi and Masayoshi Kawaguchi
2. 発表標題 Identification of mycorrhizal fungi common to the endangered species <i>Vaccinium sieboldii</i> and <i>Pinus densiflora</i>
3. 学会等名 5st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内山優奈・山崎創太・八幡昌紀・小林裕樹・川口正代司・富永晃好
2. 発表標題 絶滅危惧種ナガボナツハゼとアカマツにおける菌根形態の解析
3. 学会等名 第29回植物微生物研究会研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴尾佳歩・内山優奈・八幡昌紀・小林裕樹・川口正代司・富永晃好
2. 発表標題 伊豆諸島固有種オシマトツジとオオシマハイネズの菌根菌共生メカニズムの解析
3. 学会等名 第30回植物微生物研究会研究交流会
4. 発表年 2021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
---------	---------