

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07770

研究課題名(和文) 日本国内の林地にみられるアーバスキュラー菌根菌群集に関する研究

研究課題名(英文) Study on communities of arbuscular mycorrhizal fungi in Japanese forests

研究代表者

大和 政秀 (Yamato, Masahide)

千葉大学・教育学部・教授

研究者番号：00571788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本国内の8箇所の林地において、アーバスキュラー菌根(AM)菌群集の調査を実施した。採取した植物根から得られたAM菌のSSU rDNAの部分塩基配列を97%の相同性に基づく操作的分類群(OTU)に区分し、各OTUのリード数の構成によってAM菌群集を評価したところ、総リード数の1%以上を占めるOTUは19にとどまった。さらに上位30TUのリード数が全体の48%を占める結果となった。これは日本国内の温帯地域の森林生態系が限定されたAM菌群によって主に構成されている可能性を示唆するものである。また、上位30TUに相当する分類群のAM菌が世界の森林生態系に広く分布していることが併せて確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な植物によって構成される森林生態系が限定されたAM菌群によって主に構成されていることを示唆する本研究の成果は、多様な菌根菌がみられる外生菌根菌群集とは対照的であり、学術的に興味深い知見が得られた。今後、これらのAM菌を分離培養することができれば、広く林木育種や苗木の生産などに適用できるものと期待され、実用的意義も大きい成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We investigated arbuscular mycorrhizal (AM) fungal communities in secondary forests and/or *Chamaecyparis obtusa* plantations at eight study sites in Japan's temperate region. The AM fungal communities were evaluated based on compositions of the AM fungal operational taxonomic units (OTUs), which were clustered at a 97% similarity threshold of the sequences of a partial SSU rDNA obtained from the plant roots. Interestingly, only 19 OTUs remained after selecting for those that had more than 1.0% of the total reads, and these 19 OTUs accounted for 86.3% of the total reads. Furthermore, three dominant OTUs constituted 48.0% of the total reads. These results indicate that AM fungal communities are primarily constituted by limited AM fungal taxa in the forest ecosystems in Japan's temperate region. The searches against MaarjAM, a database of AM fungal sequences, also revealed that the AM fungi corresponding to the three dominant OTUs are distributed in forest ecosystems on a worldwide scale.

研究分野：菌類生態学

キーワード：アーバスキュラー菌根 グロムス菌亜門 グロムス科 森林生態系 ヒノキ林 リボソームRNA遺伝子
Bray-Curtis指数

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

アーバスキュラー菌根 (AM) は陸上植物とグロムス菌亜門に属する菌類との共生によって形成される最も普遍的な菌根である。AM 菌は土壌中の無機栄養 (特にリン酸) を植物に供給することが知られており、可給態リン酸含量の低い自然生態系では植物の成長にとって必須の菌根菌となっている。AM 菌は胞子の形態によって種の記載が行われ、これまでに 300 種以上が報告されてきた。一方、リボソーム RNA 遺伝子などを対象とした AM 菌特異的プライマーの開発によって、植物根内の AM 菌を分子同定することが可能となり、これまでに様々な生態系において AM 菌群集に関する研究が進められてきたが、その多くで多様な未記載種の存在が報告されている。

森林生態系の菌根については、これまでは林冠を優占する樹種にみられる外生菌根に関する研究が主に行われており、AM 菌群集に関する知見は不十分なままである。特に日本国内の林地は国土の約 7 割を占めるにもかかわらず、AM 菌についてはほとんど研究がなされてこなかった。



2. 研究の目的

森林生態系における AM 菌群集について、我々が行ってきた先行研究で、いくつかの優占種が存在する可能性が示唆された (Yamato et al. 2016)。そこで本研究では「日本国内の林地には地上部の生物多様性とは対照的に地域や樹種の影響をあまり受けない林地特有の AM 菌群集が見られるのではないか」との仮説を立て、これを検証することを目的として調査を実施した。

3. 研究の方法

調査地は日本国内の 8 箇所に設定した (図 1: 蒜山: 岡山県、川内: 鹿児島県、足柄: 神奈川県、真鶴: 神奈川県、大津: 滋賀県、白井: 千葉県、船生: 栃木県、平倉: 三重県)。このうち蒜山、足柄、大津、船生、平倉では二次林とヒノキ植林を調査林とし、川内、真鶴は二次林のみを、白井はヒノキ植林のみをそれぞれ調査林とした。各調査林において 5 x 5 m の調査プロットを 3 箇所、互いが 10m 以上離れるように設定し、プロット内の植生調査を行うとともに、中心部において 50 cm 間隔で 3 箇所から直径 5 cm、深さ 10 cm の土壌コアサンプルを採取した。

この 3 つのコアサンプルを一つにまとめ、植物の細根を取り出し、DNA を抽出した。抽出 DNA に対して AM 菌の SSU rDNA の部分塩基配列をプライマー AMV4.5NF と AMDGR を用いた PCR によって増幅し、Ion PGM を用いた次世代シーケンシングを行い、AM 菌の塩基配列を得た。また、植物については葉緑体 DNA の trnL 領域をプライマー trnLc と trnLh を用いた PCR によって増幅し、Ion PGM を用いた次世代シーケンシングを行った。

得られた AM 菌の DNA 塩基配列は 97% の相同性で区分して、これを操作的分類群 (OTU) とし、各サンプルのリード数をレアファクション解析によって揃えた後、各 OTU のリード数をマトリクス表にまとめた。このマトリクスにおけるサンプル間の OTU 構成の非類似度を Bray-Curtis 指数によって算出した。この Bray-Curtis 指数について、調査地間における違いを

PERMANOVA
 によって検定
 し、森林タイプ
 間(二次林とヒ
 ノキ植林)の違
 いについては
 nested
 PERMANOVA
 によって検定
 した。また各
 OTU の代表配
 列について、

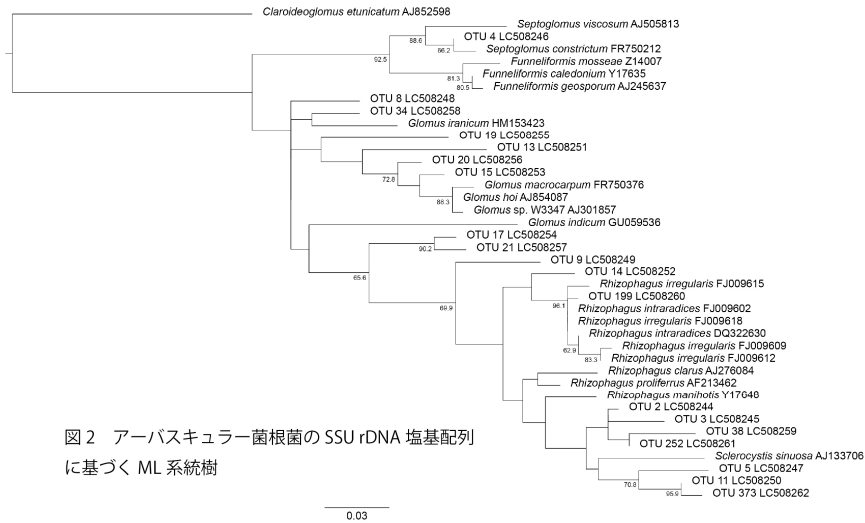


図2 アーバスキュラー菌根菌のSSU rDNA塩基配列に基づくML系統樹

GenBank のデータとともに最尤法による分子系統解析を行った。植物の DNA 塩基配列については科レベルで区分し、同様に Bray-Curtis 指数の算出と二次林の調査地間の違いに関する検定を行った。また、調査地間の距離と調査根の植物の科の構成が AM 菌群集に及ぼす影響をマンテルテストによって検定した。

優占的な分布が確認された AM 菌の OTU については AM 菌の DNA 塩基配列データベースである MaajAM (Öpik et al. 2010) に対する検索を行い、地理的分布と生態系に対する分布特性を世界レベルで調査した。

表1 各調査プロットから得られたアーバスキュラー菌根菌OTUのリード数

Forest type	Plot	AM fungal OTUs																			
		3	2	8	5	252	4	11	13	21	373	14	19	9	34	15	20	17	199	38	
		MaajAM VTXs																			
		80	84	166	224	80	64	291	122	219	291	312	178	88	159	191	194	219	113	80	
Hiruzen	Secondary	HuS-1	122	35	14	173	42	0	96	0	8	26	0	27	0	0	88	0	15	0	0
		HuS-2	186	150	0	91	40	0	47	0	5	56	0	114	0	0	0	0	0	0	0
		HuS-3	231	179	0	31	42	0	27	0	14	52	0	26	37	0	28	0	0	0	0
Plantation	HuP-1	257	311	0	11	31	0	40	0	0	0	0	15	0	0	38	0	0	0	0	
	HuP-2	274	369	0	0	12	0	0	0	0	0	0	22	10	0	9	0	0	0	0	
	HuP-3	194	256	0	91	4	0	95	0	0	10	0	34	8	0	12	0	0	0	0	
Sendai	Secondary	SeS-1	16	0	230	0	2	0	0	115	1	0	126	0	0	15	0	3	0	0	9
		SeS-2	29	0	84	0	32	0	0	113	0	0	124	0	0	0	21	7	0	0	80
		SeS-3	44	0	247	0	62	0	0	19	30	0	0	0	0	6	0	0	17	0	2
Ashigara	Secondary	AsS-1	6	0	492	0	11	1	0	0	0	0	0	0	0	161	0	0	0	0	0
		AsS-2	0	0	37	0	0	580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0
		AsS-3	4	0	133	0	0	473	0	0	0	0	0	0	0	1	0	47	0	0	0
Plantation	AsP-1	58	0	20	0	27	0	1	138	63	8	0	0	0	0	123	32	36	0	0	
	AsP-2	183	0	255	0	125	1	0	50	2	0	0	0	0	6	15	8	23	0	0	
	AsP-3	37	7	43	0	14	53	0	299	83	0	0	0	0	0	0	74	48	0	0	
Manazuru	Secondary	MaS-1	0	0	51	0	0	0	82	0	0	0	0	0	129	0	0	0	0	0	0
		MaS-2	0	0	125	0	0	59	0	0	0	0	0	0	83	0	0	0	0	0	0
		MaS-3	0	0	416	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0
Otsu	Secondary	OiS-1	127	133	0	95	0	0	45	0	0	91	0	0	180	0	0	0	0	0	0
		OiS-2	246	436	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36	0	0	0	0	0	0	2
		OiS-3	309	286	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	22	0	0	0	88
Plantation	OiP-1	332	393	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	OiP-2	287	291	0	0	0	5	0	0	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	OiP-3	70	93	0	290	0	0	66	0	0	146	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Shiroy	Plantation	ShP-1	109	16	269	0	66	0	0	92	0	15	0	0	21	19	0	69	0	0	
		ShP-2	194	4	122	89	83	0	199	0	0	17	0	0	0	2	0	1	0	0	0
		ShP-3	111	13	83	61	52	0	94	0	0	219	0	0	9	8	0	0	0	0	0
Funyu	Secondary	FuS-1	29	0	0	108	0	0	113	0	0	68	0	0	0	3	0	224	142	0	0
		FuS-2	337	152	36	6	92	0	31	0	1	16	0	0	38	0	2	4	0	0	0
		FuS-3	341	173	0	58	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plantation	FuP-1	139	247	99	3	34	0	0	73	12	0	0	0	0	39	1	11	0	0	0	
	FuP-2	253	229	66	0	20	0	0	4	0	15	29	0	60	11	2	0	0	0	0	
	FuP-3	261	354	14	0	0	0	0	6	1	0	2	0	54	5	1	0	0	0	0	
Hirakura	Secondary	HiS-2	331	1	9	0	204	0	0	105	18	0	0	0	0	0	4	14	11	0	0
		HiS-3	271	40	0	0	147	0	0	25	73	0	0	0	0	0	61	13	0	0	0
		HiP-1	217	191	15	46	3	0	44	15	53	4	0	54	25	1	0	0	30	0	0
Plantation	HiP-2	115	135	0	85	0	0	69	0	104	0	0	137	0	0	0	65	0	0	0	
	HiP-3	102	94	9	37	1	0	92	0	28	0	0	169	0	2	0	73	19	0	0	
Total		5822	4588	2869	1275	1266	1167	1064	1034	598	560	501	499	483	458	400	388	375	342	323	

4. 研究成果

採取した植物根を trnL 領域の DNA 塩基配列に基づいて同定したところ、AM 菌の宿主は 28 科に区分された。このうち、全体の 1%以上の配列を有する科はヒノキ科、クスノキ科、ムクロジ科、ミカン科、ウコギ科、バラ科、モクレン科、ミズキ科、コショウ科、ウルシ科となった。

二次林の植物の科の構成について 多様性を Bray-Curtis 指数によって算出し、調査地間における違いを検定したところ、有意な差が認められた ($F = 2.36, p = 0.002$)。

AM 菌は 121 OTU に区分された。この OTU の構成について Bray-Curtis 指数を算出し、調査地間の違いを PERMANOVA で、森林タイプ間の違いを nested PERMANOVA でそれぞれ検定したところ、それぞれ調査地間 ($F = 4.26, p = 0.001$)、森林タイプ間 ($F = 2.486, p = 0.003$) となり、いずれも有意差が認められた。また、調査地間の距離と調査根の植物の科の構成が AM 菌群集に及ぼす影響をそれぞれマンテルテストによって検定したところ、調査地間の距離は有意な影響を与えず ($R = -0.052, p = 0.60$)、調査根の植物の科の構成の影響は有意だった ($R = 0.305, p = 0.003$)。

一方、全体の 1% 以上の配列を有する OTU は 19 OTU のみとなり、これらはいずれもグロムス科 (Glomeraceae) に属した。また、この 19 OTU のうち既知種と同一クレイドを形成するものは 2 OTU のみだった (図 2)。この 19 OTU で全体の 86.3% を占め、さらに上位 3 OTU のみで全体の 48% となり (表 1)、日本の温帯林の AM 菌群集は限られた種によって主に構成されていることが示唆された。この結果は高い多様性を有する外生菌根菌群集とは対照的である。

上位 3 OTU についてデータベース MaarjAM に対する検索を行ったところ、いずれも森林での優占とアジア、ヨーロッパ、アフリカ、オセアニア、北アメリカ、南アメリカでの分布が確認された (表 2)。以上の結果から、日本国内の温帯林で優占する AM 菌が世界的に広く森林生態系に分布することが明らかとなった。

MaarjAM に掲載されている AM 菌の OTU の多くは広く世界中に分布することが確認されている (Davison et al. 2015)。OTU の分岐年代は大陸移動の終了後であることが推定されていることから、世界的な AM 菌群の普遍性をもたらす海洋を超えた AM 菌の分散が示唆されている。最近、鳥の糞の中から AM 菌のイノキウムが検出されることが報告されており (Correia et al. 2019)、渡り鳥などによって AM は広く運ばれているのかもしれない。本研究の成果は、このような AM 菌の広範な分散によって、日本国内の森林に優占する AM 菌群が世界的にも広く森林生態系に分布している可能性を示唆するものである。

AM 菌群集では、優占種の優占度が他の生物群よりも比較的高いことが知られている (Dumbrell et al. 2010)。植物と AM 菌の共生系では、植物はリン酸供給能力の高い AM 菌に、より多くの炭素化合物を報酬として与えることが実験で確認されており (Kiers et al. 2011)。このような関係性が安定した生態系のもとで優占種の存在をもたらしているのかもしれない。本研究で日本の温帯林で普遍的に高い優占度をもつことが示された AM 菌は森林環境の中で特に有益な菌である可能性も考えられる。今後、これらの AM 菌の単離が成功すれば、その接種効果について検証するとともに、林木育種や苗木の生産などの場面で活用できるものと期待される。

表2 日本国内の森林で優占することが確認された3 OTU (OTU 2, 3, 8)に相当するVTXのMaarjAMにおける登録シーケンス数

Ecosystems / Continents	AM fungal taxa		
	VTX084 (OTU 2)	VTX080 (OTU 3)	VTX166 (OTU 8)
Ecosystems*			
Forest	19	18	36
Grassland	6	8	28
Shrubland	1	3	13
Anthropogenic	1	0	14
Successional	1	2	6
Culture	0	0	0
Montane shrubland	0	0	0
Total	28	31	97
Continents*			
Asia	8 (6)**	9 (6)	15 (5)
Europe	5 (2)	7 (2)	42 (10)
Africa	2 (1)	4 (3)	13 (6)
Oceania	2 (1)	3 (2)	7 (3)
North America	6 (5)	2 (1)	9 (6)
South America	5 (4)	6 (4)	11 (6)
Total	28 (19)	31 (18)	97 (36)

*The ecosystems and continents are classified according to MaarjAM. **The numbers in parentheses are registration numbers in the forest ecosystem.

< 引用文献 >

- Correia M, Heleno R, da Silva LP, Costa JM, Rodríguez-Echeverría S (2019) First evidence for the joint dispersal of mycorrhizal fungi and plant diaspores by birds. *New Phytol* 222:1054-1060.
- Davison J, Moora M, Öpik M, Adholeya A, Ainsaar L, Bâ A, Burla S, Diedhiou AG, Hiiesalu I, Jairus T, Johnson NC, Kane A, Koorem K, Kochar M, Ndiaye C, Pärtel M, Reier Ü, Saks Ü, Singh R, Vasar M, Zobel M (2015) Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349:970-973.
- Dumbrell AJ, Nelson M, Helgason T, Dytham C, Fitter AH (2010) Idiosyncrasy and overdominance in the structure of natural communities of arbuscular mycorrhizal fungi: is there a role for stochastic process? *J Ecol* 98: 419-428.
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuysse P, Jansa J, Bücking H (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880-882.
- Yamato M, Takahashi H, Shimono A, Kusakabe R, Yukawa T (2016) Distribution of *Petrosavia sakurii* (Petrosaviaceae), a rare mycoheterotrophic plant, may be determined by the abundance of its mycobionts. *Mycorrhiza* 26: 417-427.
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Rejer Ü, Zobel M (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188:223-241.

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 Hiroki Miyake, Sakiko Ishitsuka, Takeshi Taniguchi, Masahide Yamato	4. 巻 30
2. 論文標題 Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in forest ecosystems in Japan's temperate region may be primarily constituted by limited fungal taxa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mycorrhiza	6. 最初と最後の頁 257-268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s00572-020-00945-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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大和政秀、折原貴道、大前宗之
2. 発表標題 胞子果形成アーバスキュラー菌根菌Glomus microcarpumの分子系統学的位置
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大和政秀、大金悦里、大前宗之、日暮卓志、折原貴道
2. 発表標題 胞子果形成アーバスキュラー菌根菌の分類と生態的特性
3. 学会等名 2016年度菌根研究会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大和政秀、大前宗之、折原貴道
2. 発表標題 Glomus microcarpumの分子系統学的位置
3. 学会等名 日本地下生菌研究会2017年度講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三宅大輝、大和政秀、石塚早紀子、谷口武士
2. 発表標題 本国内の温帯地域における二次林および人工林のアーバスキュラー菌根菌群集
3. 学会等名 2019年度菌根研究会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大和政秀、三宅大輝、石塚早紀子、谷口武士
2. 発表標題 日本国内の温帯林には類似したアーバスキュラー菌根菌群集がみられる
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 分担者	谷口 武士 (Taniguchi Takeshi) (10524275)	鳥取大学・乾燥地研究センター・准教授 (15101)	
研究 分担者	折原 貴道 (Orihara Takamichi) (30614945)	神奈川県立生命の星・地球博物館・学芸部・学芸員 (82709)	