

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 若手研究（A）
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22688011
 研究課題名（和文） 日本の海岸クロマツ林における外生菌根菌群集の解明と優占種の機能的、
 遺伝的評価
 研究課題名（英文） Functional significance and population structure of dominant fungal
 species in ectomycorrhizal communities in Japanese coastal pine forests
 研究代表者
 松田 陽介（MATSUDA YOSUKE）
 三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
 研究者番号： 30324552

研究成果の概要（和文）：

マツ材線虫病や東日本震災により劣化、喪失した海岸クロマツ林を将来にわたり維持・保全するため、効果的な更新技術が求められている。クロマツの養水分吸収を担い、耐塩性も向上させる外生菌根菌を対象に全国の海岸クロマツ林において、①外生菌根群集構造の解明、②優占種の遺伝子解析、③優占菌種の耐塩性の評価、を行った。その結果、調査した 8 林分で *Cenococcum geophilum* が優占していた。本種の遺伝的な種内変異、さらに菌株間に塩化ナトリウムに対する反応も異なることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Coastal pine forests in Japan are declining by pine nematode disease and eradicated by a recent Tohoku earthquake needing effective planting techniques to rehabilitate the forests. Japanese black pine associate with ectomycorrhizal fungi that can facilitate nutrient water uptake and alleviate soil salinity. I conducted the present research to clarify ectomycorrhizal community structures, genetic characterization of a dominant fungal species, and the response of the species against salinity. Among 8 stands examined, *Cenococcum geophilum* was the most dominant species irrespective of the stands. Variations in the genetic diversities and the resistance to NaCl were observed among isolates of the species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究分野：森林微生物学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林生態・保護・保全・海岸・クロマツ・菌根共生・外生菌根・*Cenococcum geophilum*

1. 研究開始当初の背景

日本の海岸や里山におけるマツ枯れ被害（マツ材線虫病）は現在も深刻な状況にある。さらに 2011 年には東日本大震災を経験し、

沿岸部の海岸林が壊滅的な被害を受けた。古来より日本人の生活や精神文化に深く根ざしたマツを守り、健全なマツ林を次世代に受け継いでいくことは我々の責務である。中

も海岸のマツ林は、風害、塩害などから民家、農地を保護する防災機能や、白砂青松と謳われる沿岸地域の景観機能を担うことから、その林分の維持、再生は極めて緊急性の高い課題である。マツ枯れ被害地へは材線虫抵抗性実生の植栽が推奨されているが、海岸部の過酷な生育環境下で実生の生残を向上させ、生育を促進させる技術の開発は、海岸林の果たす機能をいち早く回復させ、安定的に維持させるためにはきわめて重要である。

外生菌根菌（以下、菌根菌）は、クロマツ細根全体を菌糸で覆う共生体、外生菌根（以下、菌根）を形成し、実生苗の生残を向上させる。海岸に生育するクロマツ細根の大部分は菌根であり、このことは土壌からの養水分の吸収は実質的に菌根を通して行なわれることを意味している。

2. 研究の目的

本州以南から九州に至るまでの海岸クロマツ林における菌根菌群集を明らかにし、その優占種の遺伝的多様性とその耐塩性を明らかにすることを目的とした。

そのため以下の1から3を実施した。

(1) 海岸クロマツ林の天然分布の北限地と南限地における菌根菌群集を解明するため、菌根の遺伝子解析を行った。

(2) 優占種の遺伝的多様性を、地域レベル、全国レベルで明らかにするため、遺伝解析を行った。

(3) 優占種の耐塩性を明らかにするため、塩化ナトリウム (NaCl) 付与試験を行った。

3. 研究の方法

(1) 菌根群集

クロマツ自然分布の北限と南限における海岸クロマツ林の菌根菌群集を明らかにするため、青森県と鹿児島県の海岸クロマツ林分における菌根調査を行った。調査地は青森県つがる市の屏風山海岸林と鹿児島県日置市の吹上浜海岸林に設置した。2010年7月から8月に両調査地の約5haの範囲から土壌パイプを用いてクロマツ樹冠下の表層土壌（直径3cm、長さ30cm）を採取した。土壌は各クロマツから1サンプル、最低数m以上離れた個体から合計56サンプル採取した。全サンプルからクロマツ根系を取り出してから顕微鏡観察に用いた。クロマツ根端は外観から菌根かどうかを判別し、*Cenococcum geophilum* 菌根は光学顕微鏡観察にもとづき同定した。その後、*C. geophilum* 菌根を除く菌根を対象に菌由来の核 rDNA ITS 領域のダイレクトシーケンス解析を行ない、系統タイプに識別した。土壌サンプルにおける各系統タイプもしくは *C. geophilum* の有無にもとづき出現頻度を、土壌サンプルに占める検出菌根数を出現割合として算出するとともに、多様性指数

を評価した。

(2) 優占種の遺伝的多様性

海岸クロマツ林8林分（三重県紀宝町、愛知県田原市、静岡県静岡市三保松原、沼津市千本松原、石川県能美市、富山県高岡市、青森県つがる市、鹿児島県さつま市）に由来する *C. geophilum* 菌根もしくはそれらの分離菌株を用いた。各林分において *C. geophilum* 菌根を1-5haの範囲から採取し、実体顕微鏡下で形態的特徴にもとづき同定した。これらの菌根および分離菌株からゲノムDNAを抽出した後、*C. geophilum* の Internal transcribed spacer (ITS) 領域の部分領域を増幅するプライマー対 (CGITS1/CGITS2) でPCR反応を行い、単一バンドの増幅の有無によって本種を分子同定した。増幅が確認されたサンプルを対象に、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gpd) 遺伝子を増幅するプライマー対 (gpd1/gpd2) でダイレクトシーケンス解析を行ってから、Blastによる相同性検索と近隣結合法による系統樹作成を行った。さらに、既存の *C. geophilum* 用の5組のマイクロサテライトマーカを用いたマイクロサテライト解析を行った。

(3) 優占種の NaCl 耐性

(2) で用いた7県8か所の海岸クロマツ林分に由来する菌株について菌体を含む直径6mmのプラグを作成し、NaCl濃度を6段階（0, 25, 50, 100, 200, 400 mM）に調整したMMN培地上に静置した。暗条件下、25°Cで2か月間培養し、10日毎に直行する水平方向の菌糸伸長量をノギスで計測した。

4. 研究成果

(1) 菌根群集

青森県、鹿児島県の調査地から採取したクロマツ根端のそれぞれ100% (n=5209), 99.9% (n=10409) が菌根化していた。菌根の色は白系、茶系、黒系に大別され、黒系菌根は星状の Net Synenchyma 様の表面構造を有することから *C. geophilum* による定着と同定された (図1)。

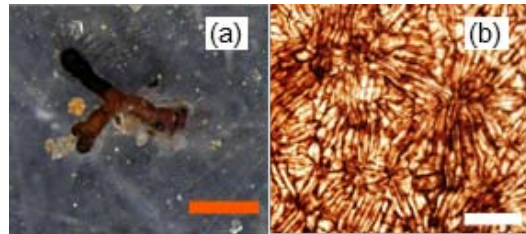


図1. クロマツ-*Cenococcum geophilum* 菌根 (a)とその菌鞘表面に認められる星状の net synenchyma 様の菌糸配列 (b) a, b のバーは各 2cm, 40 μ m

この菌根は両調査地から検出され、青森県と鹿児島県の土壌サンプルにおける出現頻度はそれぞれ42.6%と100%であった(図2)。*C. geophilum* 菌根の出現割合は、青森県で7.6%、鹿児島県で57.9%であった。このことから、*C. geophilum* は両調査地で優占する種であると考えられた。茶、白色系の菌根 517 サンプル中、402 サンプルで種の推定に成功し、20 分類群に分けられた。両調査地で各14 分類群が確認され、そのうち8 分類群は共通のものであったが、各分類群の割合は異なっていた。したがって、両クロマツ林それぞれに特有の菌根菌群集が構築されていると考えられた。以上より、地域間で菌根菌群集菌が異なるものの、*C. geophilum* が日本の海岸クロマツ林に優占して分布することが示唆された。

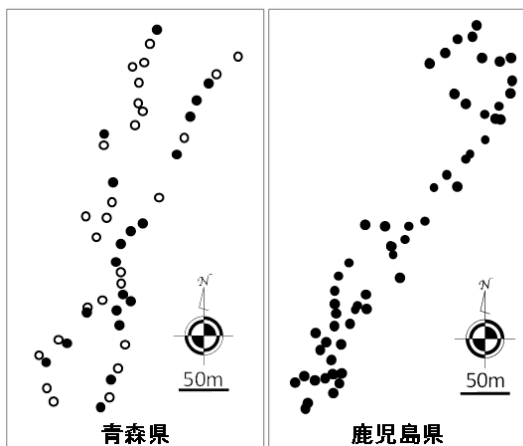


図 2. 調査地における土壌採取地点 (○) とそのうち *Cenococcum geophilum* 菌根が出現した地点 (●)

(2) 優占種の遺伝的多様性

解析に用いた 118 サンプルが 79 の遺伝子型に分かれ、さらに UPGMA 系統樹にもとづいて 60%以上の相同性を示す 28 グループに分けられた。これらを採取地点と照らし合わせた例として、富山県のもの (図 3) に示した。採取地点という cm 単位のスケールでは同一遺伝子型の寡占、採取地内という m 単位のスケールでは 6~16 の遺伝子型が確認され、多様な個体群の共存が推察された。採取地間のグループの構成比は異なるものの、特定のグループが太平洋側の採取地のみで共通して見られ、採取地間という km 単位のスケールでは遺伝子型のグループで距離に対応した多様性が見られた。以上より、海岸クロマツ林に優占する *C. geophilum* は遺伝的に多様であり、異なる距離 (cm, m, km のそれぞれ) のスケールで特有の分布様式を示すと考えられた。

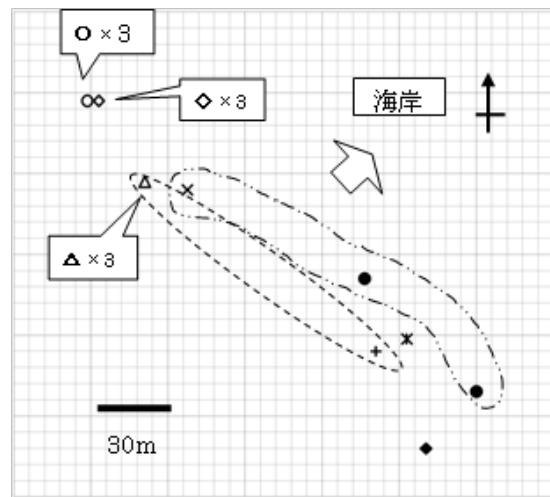


図 3. 富山県の *Cenococcum geophilum* 菌根の遺伝子型の空間分布

○・△などの記号は遺伝子型を示す。ふきだしは 1 地点から複数のサンプルを解析したことを示す。同じグループの遺伝子型を破線で囲った。

(3) 優占種の NaCl 耐性

供試した全菌株をまとめた場合、*C. geophilum* の 0mM から 200mM NaCl までに有意な伸長の減少は認められなかった (図 4)。菌株が由来する各地域別の菌糸伸長では、愛知、三保、千本の菌株の生育が良好であり、鹿児島、青森に由来する菌株の生育が悪い傾向にあった (図 5)。同様な傾向が地域内でも認められた。

以上より、調査地間の菌糸伸長は有意に異なるが、NaCl に対する反応は類似しており、林分内には NaCl 耐性の異なる多様な *C. geophilum* がクロマツの根に定着するものと考えられた。そして耐塩性に対する *C. geophilum* の種内変異は大きく、高い耐塩性を有する菌株も存在のかもしれない。

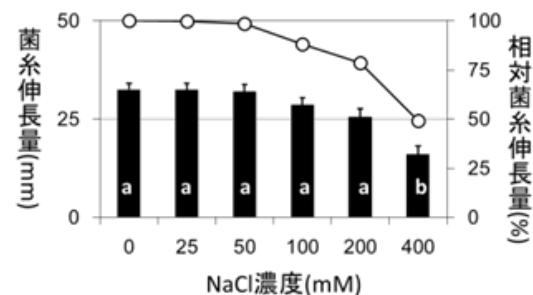


図 4. *Cenococcum geophilum* 菌株の異なる NaCl 濃度における菌糸伸長量 (■) と相対菌糸伸長量 (○)

菌糸伸長量は平均値 (n=57) ±SE で、異なる英字を付した濃度間に有意差があることを示す (One-way ANOVA, Tukey 検定, p<0.05)。相対菌糸伸長量は次式で算出した。

各 NaCl 濃度 / 0mM の菌糸伸長量 × 100 (%)

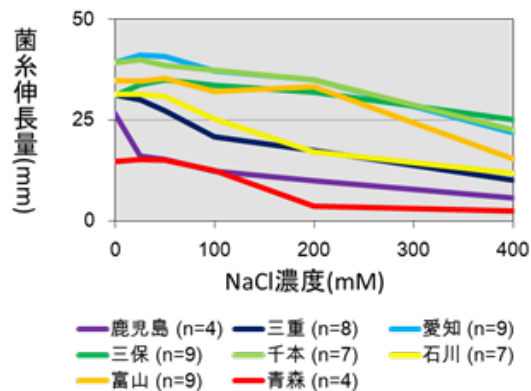


図 5.8 調査地ごとの *Cenococcum geophilum* 菌株の異なる NaCl 濃度における菌糸伸長量
データは各調査地の供試菌株数の平均値 (n) で、調査地と NaCl 濃度を固定因子とした線形混合モデルにより、有意な交互作用はなく、両因子にそれぞれ有意差が認められた (Two-way ANOVA, $p < 0.05$)

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 10 件)

- ① Matsuda Y, Takano Y, Shimada M, Yamanaka T, Ito S (2013) Distribution of ectomycorrhizal fungi in a *Chamaecyparis obtusa* stand at different distances from a mature *Quercus serrata* tree. *Mycoscience* 54(4): 260-264, 10.1007/s00572-012-0462-y, 査読有
- ② Pölme S, Bahram M, Yamanaka T, Nara K, Dai Y, Grebenc T, Kraigher H, Toivonen M, Wang P, Matsuda Y, Naadel T, Kennedy P, Kõljalg U, Tedersoo L (2013) Species richness and community composition of ectomycorrhizal fungi associated with alders (*Alnus* spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global scale. *New Phytologist* 198(4): 1239-1249, 10.1111/nph.12170, 査読有
- ③ Obase K, Matsuda Y, Ito S (2013) *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae) is commonly associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 23(3): 199-208, 10.1007/s00572-012-0462-y, 査読有
- ④ Matsuda Y, Shimizu S, Mori M, Ito S, Selosse M-A (2012) Seasonal and environmental changes of mycorrhizal associations and heterotrophy levels in mixotrophic *Pyrola japonica* growing under different light environments. accepted for *American Journal of Botany* 99: 1177-1188, 10.3732/ajb.1100546, 査読有

- ⑤ 松田陽介 (2012) IV-3. ヒノキ林における外生菌根菌の分布. 広葉樹林化ハンドブック2012. . 独立行政法人 森林総合研究所四国支所編, 18-19pp. , 査読無
- ⑥ 山田明義・松田陽介 (2012) 外生菌根菌の放射能汚染に関する諸問題. 日本きのこ学会誌20:154-157, 査読無
- ⑦ 齋藤雅典・山田明義・松田陽介・大和政秀 (2012) 菌類による放射性セシウムの吸収・蓄積. セミナー室「放射性降下物の農畜産水産物等への影響-4」. 化学と生物50:748-751, 査読無
- ⑧ Matsuda Y, Okochi S, Katayama T, Yamada A, Ito S (2011) Mycorrhizal fungi associated with *Monotropastrum humile* (Ericaceae) in central Japan. *Mycorrhiza* 21: 569-576, 10.1007/s00572-011-0365-3, 査読有
- ⑨ 松田陽介・木村ゆきな・中村克典・伊藤進一郎 (2011) 青森県と鹿児島県の海岸クロマツ林における *Cenococcum geophilum* の出現状況. 中部森林研究 59:239-242, 査読有
- ⑩ 竹内裕也・松田陽介・伊藤進一郎 (2010) 東海地方の海岸クロマツ林における *Cenococcum geophilum* の出現割合. 中部森林研究58:19-20, 査読有

[学会発表] (計 27 件)

- ① Matsuda Y, Takeuchi K, Obase K, Ito S (2013) Genetic diversity and population structure of *Cenococcum geophilum* at coastal pine forests in Japan. Seventh International Conference on Mycorrhiza (ICOM7), New Delih, インド, Jan 6 - 11, 2013
- ② 稲葉智美・松田陽介・小長谷啓介・伊藤進一郎 (2013) 海岸のクロマツ菌根に由来する *Cenococcum geophilum* の異なる温度条件下における菌糸伸長. 第125回日本森林学会大会. 岩手大学(盛岡市), 2013年3月26-28日
- ③ 松田陽介・山川 舞・稲葉智美・小長谷啓介・伊藤進一郎 (2013) 異なる塩化ナトリウム濃度が外生菌根菌 *Cenococcum geophilum* の菌糸成長に及ぼす影響. 第125回日本森林学会大会. 岩手大学(盛岡市), 2013年3月26-28日
- ④ Matsuda Y, Torii M, Yamada T, Ito S (2012) Lessons from fungal inoculation experiments. How oak trees wilt and dead caused by the pathogen of the Japanese oak wilt? P3-19. International Symposium on Oak Forest Preservation, 韓国, August 27-29, 2012
- ⑤ 松田陽介・竹内康介・小長谷啓介・伊藤進一郎 (2012) 日本の海岸クロマツ林における *Cenococcum geophilum* の遺伝的多

- 様性. 第123回日本森林学会大会. 宇都宮大学 (宇都宮市), 2012年3月28日
- ⑥ 稲葉智美・松田陽介・小長谷啓介・伊藤進一郎 (2012) 西ノ浜海岸のクロマツ菌根に由来する *Cenococcum geophilum* の異なる温度条件下における菌糸伸長. 第123回日本森林学会大会. 宇都宮大学 (宇都宮市), 2012年3月28日
- ⑦ Matsuda Y, Ito S (2012) How mycorrhizal networks contribute to keep biodiversity in forests ? 2012 status and prospect of researches on forest biodiversity. Feb 3-4, 2012, Kangwon National University, 韓国
- ⑧ Matsuda Y, Obase K, Kimura Y, Takeuchi Y, Ito S (2011) Dominance of an ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* in coastal Japanese black pine forests in Japan. p380. Asian mycological congress 2011, Incheon University, 韓国, Aug7-11, 2011
- ⑨ 松田陽介・木村ゆきな・伊藤進一郎 (2011) 青森県と鹿児島県における海岸クロマツ林の外生菌根群集. 第122回日本

森林学会大会. 静岡大学 (静岡市), 2011年3月26日

- ⑩ Matsuda Y, Kubota N Ito S (2010) Changes in ectomycorrhizal communities with stand ages at Japanese coastal pine forests. Organic matter stabilization and ecosystem functions, Hyeres, フランス, September 19-23, 2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/junkan/busshitsu/lab2/matsuda.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 陽介 (MATSUDA YOSUKE)

三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授

研究者番号： 30324552