

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660115

研究課題名(和文) 森林の断片化が菌根菌の群集構造と遺伝的多様性に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Effects of forest fragmentation on ectomycorrhizal fungal communities

## 研究代表者

奈良 一秀 (Nara, Kazuhide)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：60270899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：森林は多くの動植物の生息場所として重要であるが人間活動によって断片化が進行し、生物多様性への影響が懸念されている。森林の主要樹木は菌根菌という土壌微生物と共生することで生きているが、森林の断片化が菌根菌に及ぼす影響については明らかにされていない。本研究では、最終氷期以降、高山に取り残される形で隔離分布しているハイマツを対象にして、共生する菌根菌の種組成を複数の山系で調べた。ハイマツと共進化したと考えられる新菌種を発見する等の成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Forests harbor various plant and animal species. But, due to human activities, forests have been quickly decreasing and becoming isolated, causing serious concern about biodiversity loss. Major forest trees are in symbiosis with soil inhabiting ectomycorrhizal fungi and depend on them for soil nutrients. Although these symbiotic microbes could greatly affect the fate of fragmented forests, we know nothing about the effect of forest fragmentation on ectomycorrhizal fungal communities. Here we investigated ectomycorrhizal fungal communities in forests of alpine dwarf pine, *Pinus pumila*. This host plant has been isolated in alpine habitats of some high mountains since the last ice age, providing an ideal opportunity for studying the long time effect of forest fragmentation. We found some new ectomycorrhizal fungi, which are likely to have co-evolved with *P. pumila*, and obtained some more interesting results concerning potential factors determining ectomycorrhizal fungal communities.

研究分野：森林微生物学

キーワード：森林断片化 共生微生物 菌根菌 群集

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 森林には多くの動植物が生息している。しかし、人間活動によって世界的規模で森林の減少や孤立化が進んでおり、生物多様性に及ぼす影響が懸念されている。
- (2) 森林の断片化が動植物の遺伝的多様性の減少、種の絶滅に繋がることについては、多くの研究によって明らかにされている。一方、森林生態系において動物や植物と同様に重要な機能を果たしている微生物が森林の断片化によってどのような影響を受けるかについてはほとんど分かっていない。これは、微生物が動物や植物のように肉眼で観察できないことに起因している。しかし、近年は DNA 解析技術の進歩によって、生態系中の微生物の群集を正確にとらえられるようになってきており、技術的な障壁はなくなりつつある。
- (3) 温帯のマツ科やブナ科、カバノキ科、熱帯のフタバガキ科やフトモモ科など、自然林の主要な樹木の根には外生菌根菌（以下、菌根菌）という土壤微生物が普遍的に共生している。菌根菌は樹木から光合成産物を受け取るかわりに、樹木に土壤養分を供給している。宿主樹木の多くは、養分吸収の大半を菌根菌に依存しているため、適合する菌根菌が存在しない環境ではほとんど成長することができない。
- (4) このように重要な働きをする菌根菌という微生物が森林の断片化によって影響を受けているとすれば、共生する樹木の成長に直接影響し、森林生態系全体の機能が損なわれる重大なリスクとなる可能性がある。また、ある地域のある樹種にしか見られなかった菌根菌が絶滅してしまうと、いくら他の場所から樹木の種や苗を導入しても、適合する共生相手を見つけないことができないため、元のような森林には戻らない可能性も高い。このため、関連する知見の収集は急務である。

## 2. 研究の目的

- (1) 本研究では森林の断片化が菌根菌の群集や多様性にどのような影響を与えるのかについて基礎的な知見を得ることを目的とする。
- (2) 一般に生息地が断片化すると、集団のサイズが小さくなり、絶滅のリスクが高まる。また、他の生息地との断片距離が大きくなれば、新たな個体の流入機会も減少するとともに、隔離された個体群内の同系交配が進んで遺伝的多様性が減少し、絶滅のリスクがさらに高まる。このような影響は短期間では現れず、長期間の平衡によって決まることが動物や植物の研究例で明らかにされている。菌根菌についても同様な生態学的モデルが適用されるならば、より長期間にわたって断片されている生息地を研究することが望ましいであろう。
- (3) 本研究ではハイマツ林を研究対象地とした。ハイマツは最終氷期にシベリアから日本

列島を南下し、1万年ほど前の氷期の終わりとともに再び北上したが、一部は高山に取り残される形で生息している。高山という地理的に隔離された環境で1万年も生き残ってきたことから、森林断片化の長期的影響を調べるのに適している。そこで本研究ではハイマツにどのような菌根菌がどれくらい共生しているのかについて基礎的な知見を収集する

## 3. 研究の方法

- (1) 北海道の大雪山系旭岳、青森県の八甲田山、栃木県的那須岳系茶臼岳、富山県の立山、長野県の乗鞍岳のハイマツ林を対象地とした。いずれも国立公園に該当するため、環境省および林野庁の調査許可に基づいて調査を行った。

- (2) 各調査地において 50 の土壤サンプルを採取し、そこに含まれるハイマツの細根を実体顕微鏡下で観察した。菌根の形態情報をもとにタイプ分けし、土壤サンプルごとに各形態タイプから DNA 解析用の菌根試料を採取した。

- (3) 採取した菌根から CTAB 法によって DNA を抽出した。その後、菌特異的プライマーによって菌種識別に適した領域（rDNA の Internal Transcribed Spacer 領域）を PCR 増幅し、増幅産物を精製した後、ダイレクトシーケンスによって同領域の塩基配列を調べた。

- (4) 得られた配列情報をもとに、97%の相同性を持ったサンプルをグルーピングし、同一菌種と見なした。その後、BLAST 検索によって、国際塩基配列データベースに登録された情報をもとに、分類学的種の同定を行った。菌根菌以外の菌種と同定された場合はその後の解析から除外した。

- (5) 乗鞍岳においては、異なるサイズ段階のハイマツから土壤サンプルを採取して、ハイマツの成長段階が菌根菌群集に及ぼす影響について検討した。

- (6) 土壌中には、既に宿主樹木の根に共生した状態の菌根菌とは別に、埋土胞子として休眠状態の菌種が存在することが知られている。こうした埋土胞子は、生きた菌根にみられる菌種とは大きく異なること、攪乱後の樹木実生の更新に重要な役割を果たすことが知られている。直接埋土胞子を観察したり検出したりすることは難しいことから、無菌状態で発芽させた宿主樹木実生を採取土壤に植栽し、埋土胞子から実生に菌根を形成させるバイオアッセイ法が一般的に用いられる。本研究でも、ハイマツ林の埋土胞子群集を明らかにするため、バイオアッセイ法を試みた。実生に形成された菌根は上記と同様な手法によって同定した。

- (7) 出現した菌種の頻度をもとに統計解析を行った。多様性解析には Chao2 などの推定種数とサンプル数-種数曲線を用いた。群集に比較には rank-abundance 図や多変量解析

(nonmetric multidimensional scaling や permutational multivariate analysis of variance) を用いた。

(8) 一部の菌種については近縁菌種との進化的関係を探るため、分子系統解析を行った。関連するシーケンス配列を国際塩基配列データベースより入手し、マルチプルアライメントを行い、最尤法や近隣結合法、ベイズ法を用いて系統樹を作成した。

#### 4. 研究成果

(1) 調査対象地の中で最も大きなハイマツ分布を持つ大雪山においては、フウセンタケ科、カレエダダケ科、ペニタケ科、イボタケ科など、多様な分類群に属する菌根菌がハイマツの菌根から検出された。もっとも出現頻度の高かった *Clavulina cristata* が8つの土壤サンプルで確認されたものの、大半の菌種は1つの土壤サンプルのみから検出された。このように優占種の優占度が低く、多数の菌種が低い頻度で出現するパターンは成熟した群集と考えることができる。

(2) 調査地の中で最も小さなハイマツ分布である茶臼岳においては、ペニハナイグチが圧倒的に優占しており、半分以上の土壤サンプルから検出された。旭岳と茶臼岳のハイマツ菌根から検出された菌根菌のサンプル数-種数曲線を図1に示した。大雪山では全体で30種の菌根菌が同定され、1土壤サンプルには  $1.6 \pm 0.9$  種の菌根菌が含まれていた。そこから推定される最低実在種数は、全体で65種を超えており、多くの未検出菌の存在が示唆される。

茶臼岳においては全体で15種が確認され、1土壤サンプルあたりの種数も低く ( $1.3 \pm 0.5$ )、多様性指数 (Shannon, Simpson) も大雪山より有意に低い値を示した ( $p < 0.01$ )。推定種数も30種前後であり、実在する種数も大雪山より少ないものと考えられる。

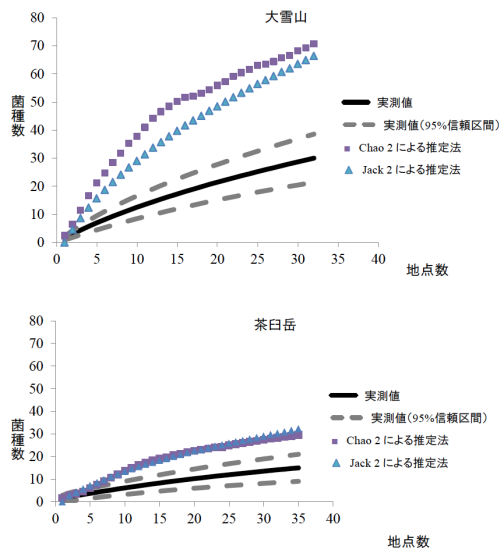


図-1 大雪山旭岳(上)および那須岳茶臼岳(下)で見つかった菌根菌の種数比較

(3) 菌根菌の埋土胞子を調べるバイオアッセイ実験では、ハイマツの休眠打破が困難であったため、アカマツ実生で代用した。5つの山系の全てに共通して出現した菌根菌は無かったことから、山系ごとの群集分化が進んでいる可能性がある。現地で採取したハイマツ菌根と埋土胞子の群集を比較すると4種が共通して出現したにとどまり、両者の種組成は大きく異なった。しかし、同じマツ属でもアカマツ等のマツ亜属(二葉松)とハイマツ等のストロブ亜属(五葉松)では、感染する菌種が大きく異なることが知られており、ハイマツを用いたバイオアッセイによってさらに詳しく調べる必要がある。また、全体として苗への感染率が低く、育苗環境が適していなかった可能性も考えられる。

(4) 乗鞍岳でハイマツ実生と成木の菌根菌群集を比較したところ、実生ではヌメリイグチ属やショウロ属、ロウタケ属の一部菌種が優占して出現したのに対し、フウセンタケ属やペニタケ属の一部の菌種は成木下の有機物層に有意に偏って出現した ( $p < 0.05$ )。群集全体を比較しても、実生と成木では有意な違いが認められた ( $p < 0.001$ , perMANOVA)。こうした事実は、同じ山系でもハイマツの発育段階によって菌根菌群集が異なることを示唆している。このため、山系間の菌根菌群集の違いを正確に把握するためには、サンプル採取するハイマツサイズを統一するなどの配慮が必要だと考えられる。

(5) ハイマツに共生していたショウロ属菌の分子系統解析の略図を図2に示す。ハイマツからは合計で3種のショウロ属菌が検出されたが、いずれもアカマツやハイマツといったマツ亜属に見られるショウロやホンショウロとは異なる系統群に属していることが明らかにされた。既知種とは大きく異なることから新種である可能性が高い。低地のマツ亜属とは隔離された環境で、ハイマツと共進化した菌種であるものと考えられる。その詳細な分布や機能については今後の調査によって明らかにしていく必要がある。

#### 【ショウロ属の系統解析】

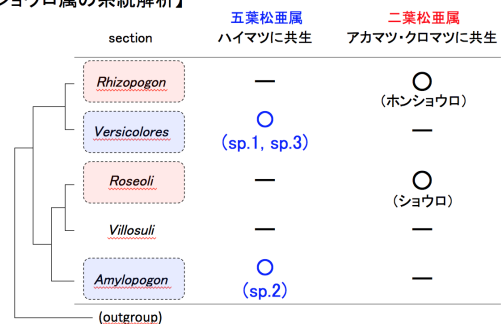


図2 ハイマツに共生するショウロ属菌の分子系統略図

## 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 2 件)

1. Miyamoto Y, Sakai A, Hattori M, Nara K (2015) Strong effect of climate on ectomycorrhizal fungal composition: evidence from range overlap between two mountains. *The ISME Journal* (online early). doi: 10.1038/ismej.2015.8. (査読有り)
2. Miyamoto Y, Nakano T, Hattori M, Nara K (2014) The mid-domain effect in ectomycorrhizal fungi: range overlap along an elevation gradient on Mount Fuji, Japan. *The ISME Journal* **8**: 1739-1746. DOI: 10.1038/ismej.2014.34 (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 小泉敬彦, 奈良一秀 (2015) ハイマツに共生する *Rhizopogon* の形態分類と分子系統解析. 日本菌学会第 59 回大会 (沖縄県那覇市・ぶんかテンプス館, 5.15-16)
2. 宮本裕美子, 奈良一秀 (2015) 標高に沿った外生菌根菌埋土孢子構成種の分布と群集構造. 第 126 回日本森林学会大会 (北海道札幌市・北海道大学, 3.26-29)
3. 小泉敬彦, 奈良一秀 (2015) 風衝地におけるハイマツ群落の発達と外生菌根群集. 第 62 回日本生態学会大会 (鹿児島県鹿児島市・鹿児島大学, 3/18-22)
4. 小泉敬彦, 奈良一秀 (2014) 乗鞍岳におけるハイマツ実生の定着様式と外生菌根菌群集. 菌根研究会 2014 年度大会 (千葉県柏市・東京大学, 11.29)
5. 小泉敬彦, 奈良一秀 (2014) ハイマツ外生菌根内に見られるピョウタケ目菌の群集構造. 日本菌学会第 58 回大会 (石川県小松市サイエンスヒルズこまつ, 6.14~15)

〔図書〕(計 2 件)

1. Nara K (2015) The role of ectomycorrhizal networks in seedling establishment and primary succession. In: *Mycorrhizal Network, Ecological studies series*, Tom Horton ed., Springer, New York (in press)
2. 奈良一秀 (2014) 菌根：地面の下の隠れた主役. In 教養としての森林学. 井出他編. 文英堂出版. pp. 227-228.

## 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