

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840144

研究課題名(和文)植物における菌根共生による環境適応の検証

研究課題名(英文)Test of adaptation through mycorrhizal symbiosis

研究代表者

山本 哲史 (Yamamoto, Satoshi)

神戸大学・人間発達環境学研究所・研究員

研究者番号：10643257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：種間交雑が認められているカシワとミズナラ合計45個体において根に共生する菌根菌群集を個体ごとに解析し、菌根菌群集に個体変異があることを明らかにした。またRAD法によって供試植物個体のSNPマーカーを網羅的に解析し、植物個体ごとの遺伝的組成を明らかにした。これらのデータから各植物個体の遺伝的組成と共生する菌根菌群集との関連を解析したところ、植物個体の遺伝的組成が似ているほど担子菌類の種組成が似ていたが、子囊菌類に関しては傾向は見られなかった。このことから、外生菌根を形成する担子菌類の共生は宿主植物の遺伝子との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mycorrhizal communities associated with roots of *Quercus dentata* and *Quercus crispula* were revealed by metabarcoding analysis. Genetic background of the host individuals were also revealed by RAD-seq. Based on those datasets, we found that a principal coordinate axis of genotypic distances among host individuals significantly correlated with community similarity of basidiomycetes and ectomycorrhizal fungi although any axes were not significant in ascomycetes. On the other hand, correlation between fungal community similarity and genotypic distances among hosts was not significant in both basidiomycetes and ascomycetes. Those results suggest that fungal community composition correlate with not merely genotypic similarity of hosts but an element involved in host's genotype.

研究分野：生態学

キーワード：菌根共生

1. 研究開始当初の背景

植物は菌根菌との共生によって、リンや窒素など成長に不可欠な栄養を効率良く獲得することができる。陸上植物種の90%以上が菌根菌と共生しており、菌根共生は植物の生存・成長にとって不可欠であると考えられている(Smith & Read 2008)。

先行研究では、菌根菌の宿主植物に対する選好性が知られているが(Sato et al. 2007)、特殊な菌根共生の例を除いて、宿主植物の菌根菌に対する選好性は知られていない。このため菌根共生の進化を考えると、宿主植物の菌根菌に対する選好性はあまり重視されてこなかった。しかしこれには一つの問題がある。それは、宿主植物が地域集団単位で菌根菌に対する選好性を進化させていることを見落としている可能性があることである。

菌根共生では、全ての菌根菌が一様な利益を植物に提供しているわけではない。例えば、ある菌根菌では宿主植物の乾燥耐性を高めることが示唆されているが(Herzog et al. 2012)、別の菌根菌では病気に対する抵抗性を高めることが示唆されている(Zeng 2006)。乾燥耐性を高める菌根菌との共生は、植物が乾燥しやすい環境に生息する場合には適応的であろう。このように、植物の適応度は共生する菌根菌の種類に左右されると考えられる。したがって、植物は生息環境に適合した利益をもたらす菌根菌と共生するように自然選択を受け、結果的に異なる環境にある植物集団の間で共生する菌根菌に相違が生じると考えられる(図1)。このように集団単位で植物を観察すると、菌根菌に対する選好性が明らか

になる可能性がある。

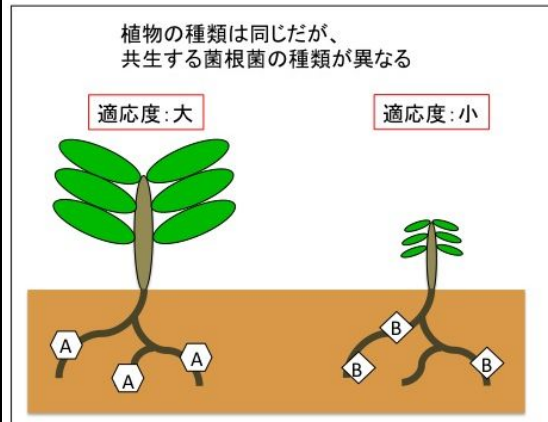


図1 菌根菌と適応度の概念図。図にある植物は、菌根菌Aと共生した場合、菌根菌Bと共生するよりも適応度は高い。したがって、自然選択によって菌根菌Aと共生可能な個体が集団内に増加するだろう。

2. 研究の目的

この仮説を検証するために、本研究では(1)適応的な菌根菌の識別に関わる植物側のアリル(対立遺伝子)を明らかにし、(2)土壤環境とアリル頻度との相関関係を明らかにする。土壤環境に応じて、集団間でアリルの頻度が大幅に変化する場合、そのアリルで識別される菌根菌は植物の環境適応に貢献していると言える。以上の研究によって、菌根菌の種類が植物集団間で適応的に分化することを検証できる。

この仮説を検証するために、次の点を明らかにすることを目的とした。

1. ホスト植物の遺伝子が菌根共生をコントロールするかどうかを明らかにする
ホスト植物の遺伝的組成を明らかにし、共生する菌類群集との相関を明らかにする。
2. 菌根共生マーカーの開発
植物ゲノムの中でそれぞれの菌根菌の識別に関わる遺伝的領域をアソシエーション

法によって探索し、遺伝的マーカーを開発する。

3. 集団間比較研究

開発したマーカーを利用して、特定の環境だけで宿主植物個体と共生する菌根菌を明らかにする。さらに、その菌根菌が、自然選択の効果によって植物集団中に広がったことを、集団遺伝学的解析によって検証する。

3. 研究の方法

北海道大学の苫小牧演習林において、7月ごろ、ミズナラとカシワが交雑している林分から当年生実生を採集し、次世代シーケンサーGS-junior を利用したメタゲノム解析によって、菌根菌を明らかにする。方法は、菌根菌を含む植物根からDNAを抽出し、菌根菌だけに適合するプライマーを使ってITS2遺伝子をPCR増幅する。PCR産物をGS-juniorでシーケンスし、得られた塩基配列を基に、NCBIなど公共のDNAデータベースから生物情報を取得し、菌根菌の種類と生態的特徴を明らかにする。この方法は申請者が所属する研究グループで開発した方法で、論文などで公表済みでもある(Toju et al. 2012)。また、すでに交雑集団から得たサンプルによって予備実験も済ませており、その結果から、申請研究によって目的に見合うデータが得られることを確認している。実験は、申請者の所属先で運用するGS-juniorを用いて、研究代表者自身で行う。

RAD法によるジェノタイピング 申請研究ではRAD法によるジェノタイピングによっ

て、多数のマーカー遺伝子座の個体変異を検出する(Baird et al. 2008)。

4. 研究成果

まず、カシワとミズナラが同所的に分布している範囲で、これらの実生42個体を採集し、RAD-seqによってSNPを探索した。結果として多型的な遺伝子座89座位を明らかにし、これらの座位をもとに、主座標分析により個体間の遺伝的関係を明らかにした。解析対象とした実生(図中の○)は遺伝的に互いに近縁で、カシワかミズナラかの2つのクラスターに区別することはできなかった。また、葉の形態から純粋なカシワ(□)もしくは純粋なミズナラ(△)と考えられる成木サンプルも同時に解析したところ、純粋なカシワとミズナラも非常に近縁であることが明らかとなった(図2)。

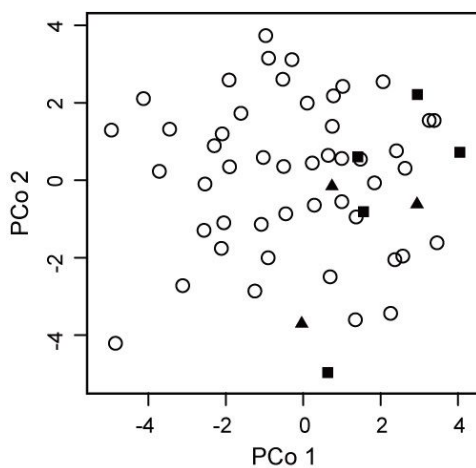
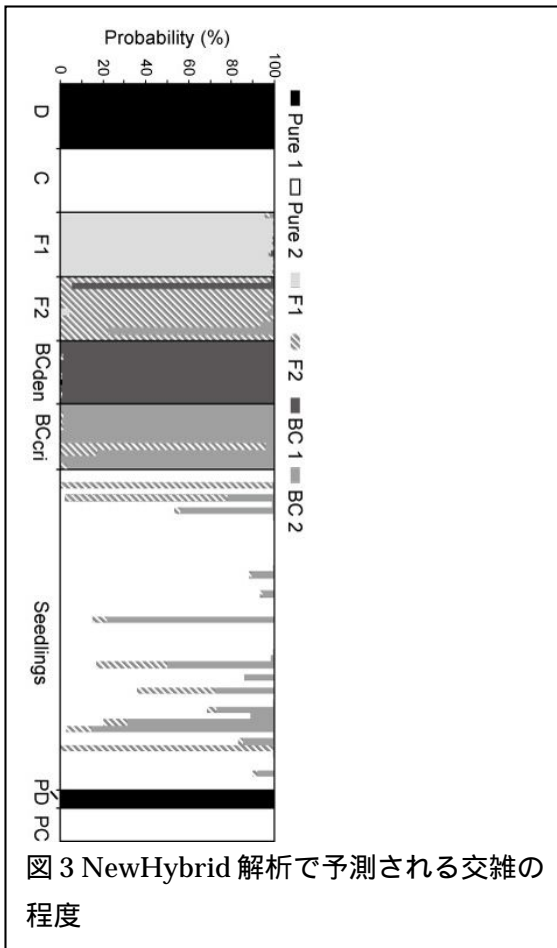


図2 SNPマーカーに基づく主座標分析

また、交雑の程度を解析するプログラムNewHybridを用いて、解析対象とした実生がカシワとミズナラの交雑個体であるかどうかを調べた。その際、カシワ成木、ミズナラ成木のサンプルを含め、さらに、それらの成

木の遺伝データからシミュレーションによって発生させた純カシワ個体、純ミズナラ個体、F1 個体、F2 個体、F1 とカシワの戻し交雑個体 (BCden)、F1 とミズナラの戻し交雑個体 (BCri) も同時に解析した。その結果、解析した実生は多くが純粋なミズナラと判断され、一部の实生が F2 もしくは F1 とミズナラの戻し交雑個体であることが示唆された (図 3)。



これらの実生の根に共生する真菌類をメタバーコーディング法によって解析したところ、共生菌類群集は個体ごとに異なることが明らかとなった。

複数の実生で共生関係が見られた真菌がいくつかあり、その上位には Helotiales 目の真菌であった。Helotiales 目の菌類は樹木の成長や生存に重要な共生関係を結んでい

ると言われているが、その働きは必ずしも明らかではない。それに続いて Russula 属や Lactarius 属などの担子菌で外生菌根菌を形成するタイプの菌類が多くの実生から検出された (表 1)。外生菌根菌は実生の生存など適応度に深く関わっていると考えられている。

ID	Frequency	Taxonomic assignment using the QCAuto Method
OTU 269	22	order: Helotiales, family: Hyaloscyphaceae
OTU 629	20	order: Helotiales, family: Helotiaceae
OTU 694	17	order: Helotiales, family: Hyaloscyphaceae
OTU 691	13	order: Helotiales, family: Helotiaceae
OTU 679	13	genus: <i>Russula</i> , species: <i>Russula vesca</i>
OTU 689	12	phylum: Ascomycota, class: Leotiomycetes
OTU 313	11	genus: <i>Lactarius</i> , species: <i>Lactarius quietus</i>
OTU 535	11	family: Nectriaceae, genus: <i>Neonectria</i>
OTU 708	10	subkingdom: Dikarya, phylum: Ascomycota

表 1 メタバーコーディング解析で検出された菌類。10 以上の実生で検出されたもののみを示している。

これらの菌類群集をそれぞれの実生個体の形質として捉えるために主成分分析を行い、第 1~6 軸の主成分スコアを各個体の形質値とした。また、各軸の主成分スコアと実生の遺伝的組成との相関を解析した。その結果、実生間の遺伝的組成と菌類群集の主成分第 5 軸との間に有意な相関が見られた (図 4)。菌類群集を担子菌類と子囊菌類に分けて同

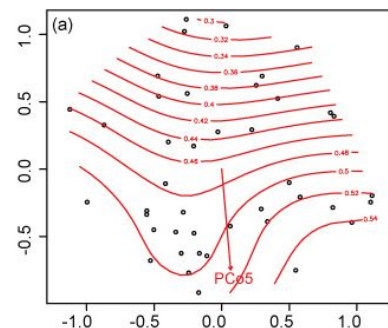


図 4 実生の遺伝的組成と主成分スコア第 5 軸との相関 (全データ)

様の解析を行ったところ、子囊菌ではこの傾向が見られず、担子菌のみで同様の傾向が見られた。カシワやミズナラの根に共生する担子菌類の多くは外生菌根菌を形成する菌類であるため、外生菌根菌との共生には植物個体の遺伝的背景が関与していると考えられる。実際に、外生菌根菌のみを取り出して菌群集と実生の遺伝的組成との相関を解析した結果、やはり主成分第5軸に有意な相関が見られた(図5)。このことから、外生菌根を形成する担子菌類の共生は宿主植物の遺伝子との関連が示唆された。

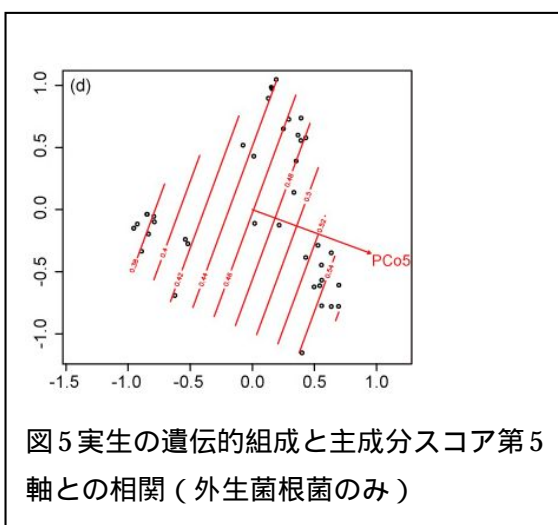


図5 実生の遺伝的組成と主成分スコア第5軸との相関(外生菌根菌のみ)

当初計画では、菌根共生を支配する遺伝子もしくはその遺伝子の近傍領域を特定し、自然集団を対象に菌根共生の進化遺伝学的解析を行う予定だったが、そこまでにはいたらなかった。しかし、本研究は菌根共生において宿主となる植物個体の遺伝子が共生するパートナーを選択することを示唆しており、菌根共生の進化を考える上で重要な結果を得ることができた。遺伝子もしくは近傍領域の特定にはより多くのマーカー遺伝子座を開発する必要があると考えられ、今後はより精度の高い実験が求められる。

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 1件)

1. Yamamoto S., Beljaev A.E., Sota T. (2016) Phylogenetic analysis of the winter geometrid genus *Inurois* reveals repeated reproductive season shifts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* vol.94 47-54.

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

特に無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 哲史 (YAMAMOTO, Satoshi)

神戸大学・大学院人間発達環境学研究所・
研究員

研究者番号: 10643257

(2)研究分担者

(3)連携研究者