

1. 課程・論文博士の別

課程博士

2. 申請者氏名（ふりがな）

Jittra KANCHANAPRAYUDH（じつとら がんざなぶらよ）

3. 学位の種類

博士（農学）

4. 学位記番号

博農 第2650号

5. 学位授与年月日

平成15年9月30日

6. 論文題目（和訳）

Molecular phylogeny and molecular ecology of ectomycorrhizal *Pisolithus* fungi in Thailand.

（タイ国における *Pisolithus* 属外生菌根菌の分子系統的及び分子生態的研究）

7. リンク先 URL

無し

8. 論文の内容の要旨

樹木は担子菌類、子囊菌類および接合菌類と共生し、樹木の根に外生菌根を形成する。樹木は菌に光合成産物を供給し、外生菌根菌は植物に養水分を供給する。また、外生菌根菌には、樹木を病原菌から守る働きがあることも知られている。宿主樹木はマツ科、カバノキ科、ブナ科、フトモモ科等、森林の主要構成樹種が多いこともあり、外生菌根菌は、森林生態系の機能に重要な役割を果たしているものと予想されている。

外生菌根菌の共生機能を理解する上で、菌の繁殖機構の解明は必要不可欠なものと言って良い。外生菌根菌群集では、多数の菌種が比較的狭い範囲で共存しており、互いに影響を及ぼしあっている。最近

では、この様な外生菌根菌群集の構造解析も、分子生物学的技術を用いて少しずつ解明されつつある。外生菌根菌群集の全貌を明らかにするには、群集内種構成や各構成種の空間分布の解析等の積み重ねが重要であろう。一方、外生菌根菌の多数を占める担子菌類は、菌糸伸長による無性繁殖と担子胞子散布による有性繁殖の両方の様式で繁殖する。両者のバランスはジェネット（遺伝的に同一な細胞集団）の大きさと密度に反映されるため、ジェネットの大きさや密度の解析が、既にいくつかの菌種で行われている。

上に述べた外生菌根菌繁殖機構の研究の多くは、地上に発生した子実体を対象に行われている。しかし、最近、発生する子実体が、地下部の種構成とは直接対応しない例が、多数報告されるようになった。また、地下部のジェネットもほとんど解析されていない。従って、外生菌根菌の繁殖実態を正しく把握するには、子実体だけではなく、地下部の解析も合わせて行う必要がある。

こうした背景のもとで、本研究では、タイ国内ユーカリ植栽地に大量の子実体を発生させる *Pisolithus* 属菌に着目し、その繁殖特性を、分子生態学的解析により明らかにすることを目的とした。従来、*Pisolithus* 属菌の大半は *P. tinctorius* に属すと見なされてきたが、最近になって、宿主や分布域の異なる多数の種が識別されてきている。そこで、分子生態学的解析に先立って、タイ国内の *Pisolithus* 菌の系統的位置付けを分子系統学的手法を用いて行った (Chapter I, II)。次いで、*P. albus* のマイクロサテライト (SSR) マーカーを作製し (Chapter III)、ユーカリ植栽地の *P. albus* の子実体および菌根について、ジェネット解析 (Chapter IV) と、地下外生菌根菌群集内の種構成解析 (Chapter V) を行った。加えて、ケシアマツ林に発生した *Pisolithus* 子実体近傍で、地下菌根の種構成を解析し、子実体発生菌種の地下分布を明らかにした (Chapter VI)。

第1章 タイ国ユーカリ、マツ、フタバガキ樹木に共生する *Pisolithus* 属菌の分子系統発生学的解析

タイ国内のマツ林3カ所、マツ-フタバガキ林1カ所、フタバガキ林2カ所、およびユーカリ造林地29カ所から採取した、*Pisolithus* 属菌子実体135個に対して、分子系統学的解析を行った。rDNA内にあるITS領域の多型により、これらの子実体は26グループに分けられた。それぞれのグループから選んだサンプルのITS領域塩基配列を決定し、系統樹解析を行った結果、タイ国には、少なくとも3種の *Pisolithus* 属菌が存在することが解った。塩基配列の相同性解析から、ユーカリ造林地に発生した子実体は、いずれも *P. albus* であり、マツ林およびマツ-フタバガキ林から採取したものは、Martinら(2002)が species 5 と名付けた菌種であることが解った。また、フタバガキ林から採取された第三の種は、これまで報告されているいかなる種にも合致しなかった。

第2章 タイ国フタバガキに共生する新しい *Pisolithus* 菌の分類学的検討

第1章の分子系統学的解析により、既知のいずれの種にも合致しなかった第3の *Pisolithus* 種の子実体について、分類学的検討を行った。子実体の色は、茶色から薄黒で、形状は、球形から類球形の棍棒状の腹菌性子実体であった。柄は、頭部の付け根の表皮が黒く光り、上部は最初平滑で後にひび割れるが鱗片状にはならず、やや曲がっていた。胞子の形状は、球形から類球形であった。以上のような特徴をもとに、新種 *Pisolithus abditus* Kanchanaprayudh, Sihanonth, Hogetsu & Watling を提唱した。

第3章 タイ国ユーカリ植栽地に発生する *Pisolithus albus* の多型性マイクロサテライトマーカー
ユーカリ林の *P. albus* 集団の遺伝的構造を詳しく調べるためには、共優性DNAマーカーが必要である。そこで、タイのユーカリ林から採取した *P. albus* から、dual-suppression-PCR法によって7個の多型SSRマーカーを開発した。各遺伝子座あたりのアレル数は2から5で、ヘテロ接合度の推定値は0.123から0.721であった。

第4章 タイ国ユーカリ造林地における *Pisolithus albus* 集団の遺伝的構造解析

開発したSSRマーカーおよびISSRマーカーを用いて、3カ所のユーカリ林に発生した *P. albus* 子実体の多型解析を行い、ジェネット構造を解析した。その結果、ユーカリ林で採集した238の子実体は、180のジェネットで構成されており、大部分のジェネットが一つの子実体のみから構成されていることが解った。4mを超えるサイズのジェネットも幾つか見られたが、隣接する子実体でも異なるジェネットに属していることが多く、サイズの小さい多数のジェネットが存在することが示唆された。また、いくつかの子実体周辺に2×2mの方形区を5カ所設定し、それぞれから土壌ブロック（およそ150cm³）を等間隔に16個採取した。土壌ブロックから外生菌根を集め、その中から4チューブにそれぞれ4〜5個の菌根を入れ、そのブロックのサンプルとした。それぞれのチューブからDNAを抽出してSSR多型解析を行った。その際、ある子実体のSSR遺伝子型を構成する全てのバンドが現れた場合、そのチューブ中には子実体と同一ジェネットの菌根が存在するものと見なした。解析の結果、子実体直下または周辺の地下には、殆どの場合、子実体と同一ジェネットの菌が外生菌根を形成していた。また、一つの土壌ブロック中でも、複数ジェネットの菌が共存して菌根を形成していることが解った。

第5章 タイ国ユーカリ林における地下部外生菌根菌群集構造

ユーカリ植栽地において、地下部外生菌根の群集構造を解析した。80の土壌ブロックから、外生菌根をサンプリングし、DNAを抽出した。およそ2000の菌根をITS多型解析したところ、17のITSタイ

プが見いだされた。それぞれの ITS タイプから一サンプルずつ選び、ITS 領域の塩基配列を決定した。得られた塩基配列について、相同性検索を行ったところ、外生菌根菌種と相同性を示す 5 タイプが見いだされた。その内、2 タイプは、*P. albus* と species 5 に極めて高い相同性を示した。また、この 2 タイプの地下部における分布を調べたところ、両種とも植栽地全域にわたって広く繁殖していることが解った。一方、一つの菌根を取り分け、ITS 多型解析を行ったところ、複数の菌種が一つの菌根に感染しているケースがかなり多いことが示唆された。

第 6 章 タイ国ケシアマツ林における外生菌根菌の地下部分布様式

ケシアマツ林では species 5 が発生する。ケシアマツ林に設けた species 5 を含む 16 m² 方形区および二つの 4 m² 方形区において、*Russula* sp.1、*Russula* sp.2、*Scleroderma citrinum* の子実体分布とそれぞれの菌種による外生菌根菌の地下部における分布を、外生菌根の ITS 領域多型解析によって調べた。各方形区から土壌ブロックをそれぞれ 50cm 置きに等間隔に採取し、それぞれのブロックから菌根を分離した。分離した菌根から第 4 章と同様に、サンプルチューブを作った。それぞれのチューブから DNA を抽出し、PCR 増幅して得られた ITS バンド中に、それぞれの菌種の ITS バンドと同一サイズのものが存在すれば、そのチューブにはその菌種が存在すると見なして、各菌種の地下分布を解析した。その結果、子実体の発生した場所の近傍からはその菌の菌根が検出されたが、少し離れると検出されなかった。このことは、species 5 を含む 4 種とも、子実体の分布と地下部の菌根の分布は概ね対応しており、また、地下部菌糸体の広がりが比較的限定されていることを示している。さらに、幾つかのサンプルで ITS 領域の塩基配列を決定し、相同性検索を行った結果、*Thelephoraceae*, *Russulaceae*, *Tricholomaceae*, *Sclerodermataceae* に属す外生菌根菌と相同性を示す菌が地下群集を構成していることが解った。

以上の研究により、タイ国 *Pisolithus* 属外生菌根菌の系統学的状況が明らかになるとともに、地下部の分子生態学的解析によって、ユーカリ植栽地、ケシアマツ林における同属菌種の繁殖様式の一端が明らかになった。本研究では、SSR マーカーを開発して DNA 多型解析を行ったが、これまでに外生菌根菌の分子生態学的研究に SSR マーカーを適用した例は二例しか報告されておらず、本研究の先駆的意義は大きい。また、*Pisolithus* 菌の地下におけるジェネット解析の例は皆無であり、本研究によって、貴重な情報を得ることが出来た。