

## 論文の内容の要旨

森林科学専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏名 菊池 研介

指導教員名 鈴木 和夫

論文題目 外生菌根菌の生態生理的特性

森林において、樹木の多くは根の表面を覆う菌糸体である菌鞘と皮層の細胞間隙を縫うように広がる菌糸体であるハルティヒネットで特徴付けられる外生菌根を形成しており、植物の根では吸収不可能な場所にある無機養分や水を菌根から伸びる根外菌糸を介して吸収することが可能である一方、外生菌根菌は宿主植物の光合成産物を受け取って自らの炭素源とするという共生関係が成立している。

外生菌根を形成する菌類は地球上に 5000 種以上が存在するとされ、化石の存在から 5,000 万年以上維持されている関係であることも報告されており、生理的・生態的な多様性の存在が窺われるが、その詳細については不明である。

本研究は、外生菌根菌の動態を明らかにするための DNA 分析法の検討を行った上で実際の適用を試みることを第一の目的としたが、その動態の裏にある生理的性質についても併せて考察し、研究の過程で外生菌根菌を対象とした研究でも急速に広まっているものの、あまり省みられない DNA 分析の課題についても整理されることを目指した。

### 人工培地上での外生菌根菌の成長比較と siderophore 産生能力

DNA 抽出用の菌糸体の培養などに用いる培地を検討することを目的として、外生菌根菌 4 種を用いて菌根菌の培養に使用される浜田培地、太田培地、MMN 培地の 3 種類の寒天培地上での成長量を比較した。その結果、ヌ

メリイグチとアマタケは順調な成長を見せた一方で、MMN 培地上ではホンシメジ及びマツタケでは2週目までに菌叢直径の成長がほぼ停止した。培地の組成の比較などから、MMN 培地中の  $\text{Fe}^{3+}$  が  $\text{PO}_4^{3-}$  と不溶性の塩を形成することで鉄またはリンの欠乏が起こったことが原因であると考えられたが、両者の培地への添加量を比較すると鉄欠乏が原因である可能性が高いものと考えられた。

鉄欠乏下では菌類は siderophore と呼ばれる鉄と親和性の高い物質を産生することが知られており、種間でその産生能力に差があるために MMN 培地上で成長の停止が起こった可能性が考えられることから、CAS assay による siderophore 産生能力の評価を試みた。その結果、MMN 培地上での成長抑制が特に顕著であったホンシメジがほぼ 0% で推移したのに対し、緩やかながらも若干成長し続けたマツタケは 4~5% 程度、成長が順調であったアマタケはマツタケの倍の 10% 程度で推移しており、MMN 培地上での成長とほぼ一致した結果となった。

siderophore の機能として、*Pseudomonas* 属菌で主に研究された種間競争力の強化の他、植物への鉄の供給、風化の促進によるリンなどの可給化、鉄以外との錯体形成能力に基づく重金属耐性への影響などが他の菌類を用いた研究で報告されており、外生菌根菌でもその産生能力の差を通じて土壌条件による棲み分けや宿主植物の成長促進効果における種間差につながっていることが示唆される。

## DNA 分析法の検討

### ITS 領域の塩基配列に基づいた種の識別

核 rDNA の ITS 領域の塩基配列を比較した結果、*Tricholoma* 属、*Suillus* 属の各種ではいずれの属でも同種では 99% 以上の相同性を示したのに対して異種間では 95% を超えることは稀であったことから、ITS 領域の塩基配列に基づいた種の同定が有効であるものと考えられた。実際、*Tricholoma* 属の各種について ITS 領域の配列に基づいた種特異的プライマーの設計が可能であり、マツタケについては野外採取のサンプルへの適用も可能であったことから、接種試験の結果の評価などへの応用可能性が示された。

ITS 領域は菌株の識別を行うためには変異が不十分であり、接種試験等で定着した菌株が接種したものと同一であることを厳密に証明することはできないため、菌株の識別には他の領域もしくは手法を用いる必要があるものと考えられた。

### 菌株の識別法の検討

外生菌根菌の種内の遺伝的な変異を検出する方法として、DNA 分析および SI test (対峙培養) について、アマタケを対象にして検討を行った。

供試したアマタケの 18 菌株は、本研究で開発した 4 種類の SSR マーカーでは 12 タイプ、2 種類のプライマーを用いた ISSR 多型解析では 8 タイプに分かれ、両者を合わせると 15 タイプに分かれた。SI test では、経年によって帯線が不明瞭となる傾向が観察され、誤判定が生ずる可能性があるものと考えられた一方、比較的新しく分

離された菌株では SI test でも菌株間の遺伝的な関係を良好に示しており、潜在的には DNA 分析をしのぐ識別能力を有していることも示唆された。更なる検討のためには人工的に作出され、遺伝的な背景が明らかな複核菌糸による実験を行う必要があるものと考えられる。

### アマタケの単孢子分離法の検討と単核菌糸の生理的性質

人工条件下での外生菌根菌の孢子の発芽率は一般に非常に低く、外生菌根菌を対象とした遺伝学的研究を進める上での障害となっていることから、単核菌糸を得る方法についてアマタケを対象に検討を行った。

外生菌根菌の孢子発芽に有効とされる既往の報告を組合せた処理による発芽率を比較した結果、活性炭処理とアカマツ無菌苗との二員培養を組合せた処理でのみアマタケ孢子の発芽がみられた。この方法では他にもマツタケなどでも孢子の発芽が観察され、宿主植物の根の滲出物中の物質によって孢子発芽が起こる現象が多く、種で共通である可能性が考えられた。

また、アマタケ孢子懸濁液をアカマツ実生へ接種した結果、4 週目には菌根の形成が確認されたことから、土中でも根の滲出物によって孢子が発芽し、菌根形成に至っているものと考えられた。

上記の方法で得た同一子実体由来のアマタケ単核菌糸をアカマツ実生に接種した結果、供試した単核菌糸全てで複核菌糸である親子実体からの分離菌株と外観的に同様の菌根を形成し、菌根の形成が確認されるまでの期間も同等であった。この結果、これまでに報告のある 4 属 (*Laccaria*, *Hebeloma*, *Suillus*, *Pisolithus*) では、いずれも単核菌糸が菌根形成能力を持つ結果を得ることとなり、外生菌根菌の多くが単核菌糸であっても菌根形成能力を持っている可能性が高く、仮に孢子の発芽後すぐに複核化に至らない場合でも単核菌糸のまま菌根を形成して長期の生存が可能であることが示唆された。

複核化は、単核菌糸同士の交配による他、担子菌類では複核菌糸との核の受け渡しによる複核化 (di-mon 交配) も知られており、外生菌根菌は炭素源を宿主植物に依存するという制約の元でも他の腐生菌などに劣らない複雑な繁殖メカニズムを持つ可能性が示唆されるが、この点については本研究でも開発した SSR マーカーを用いた解析などにより今後明らかにされることが期待される。

### 地掻き及び除伐がアマタケの発生動態に及ぼす効果

広島県加計町内のアカマツ天然林内で行った地掻きや除伐などの施業が試験地において主に発生したアマタケの発生動態に及ぼす効果とその根拠について遺伝構造の解析から検討を行った。

施業を行った処理区では施業後数年経過してからアマタケ子実体の発生本数は増加する傾向が見られ、施業はアマタケの発生本数に正の効果と及ぼすものと考えられた。

L 関数による発生位置の空間構造の解析から、毎年の子実体は半径 1m 以内のパッチを構成して集中分布を示

した一方で、各プロットにおける調査年間の発生位置に明確な関係は認められなかったことから、胞子による繁殖を毎年行っている可能性と土壌中を広く分布した同一ジェネットの菌糸から毎年不規則に子実体を発生している可能性が考えられた。さらに、SSR マーカーなどによる遺伝構造の解析を行った結果、調査を行った4年間にわたって同一の複数のジェネットが各プロットで優占していたことから、後者の可能性が高いものと考えられた。

その一方で、新たなジェネットもごく稀ながら出現しており、その頻度は施業区の方が多かったことから、施業によって胞子の定着が促進されていることも示唆された。新たに出現したジェネットは、その近傍に優占して存在するジェネットの対立遺伝子をホモ接合で持っており、同一ジェネットに属する子実体由来の胞子同士の交配によって出現した可能性が高いものと考えられた。

今までに報告されたアミタケなどの *Suillus* 属各種の交配様式は2極性であるため、同一子実体由来の胞子でも50%の確率で和合性であることや、子実体直下に落下する胞子がかなりの数にのぼる報告例から、同一子実体由来の胞子同士の交配が実現されている可能性は非常に高いものと考えられる。仮にそのような繁殖が行われた場合、本研究で遺伝構造の解析に用いた方法でそれを識別できるか否かは未知数であり、今後、解析に用いるマーカーを増やすことに加え、人工的に交配した菌株による実験を行うことでこの点について明らかにされることが期待される。

*Suillus* 属は、本研究から高い産生能力が示された siderophore の産生や成長速度の速さが種間競争力の高さにつながっており、さらには胞子からの菌根の形成も容易なこともあって攪乱ともいえる施業後の発生本数の増加に至っており、菌根菌相の遷移では early-stage、late-stage のいずれにも当てはまらない multi-stage fungi に分類されるようなしたたかな生活を送ることが可能であるものと考えられる。