

福島県いわき市のスギ林内に生育するギンリョウソウの菌根菌

横山 潤¹・高橋睦美¹・吉田政敬²

(¹: 山形大学理学部生物学科, ²: 山形大学大学院理工学研究科)

緒言

陸上植物は、真菌類と広範囲にわたって共生関係を営んでおり、中でも植物が光合成産物を菌に与え、菌は根における無機養分等の吸収を補助する菌根共生系は、最も普遍的な共生関係としてよく知られている (Selosse and Tacon 1998; Smith and Read 2008)。しかし一部の植物では、菌根共生系に炭素源を依存して生育する種も知られている。菌寄生植物 (菌従属栄養植物) は、そのような種の中でも特に極端なもので、光合成能を失い、生育に必要な炭素源を完全に菌 (菌根菌) を介して得ている (Leake 1994; Brundrett 2002)。菌寄生植物は、世界中で 400 種程度しか知られていないが、特異な形態を示す種が多く、光合成能を失う過程で生じるさまざまな生理的適応、菌類との共生関係に関わる諸性質の進化など、陸上植物の進化を考える上で重要な研究系を提供してくれる植物群である。

菌寄生植物の中でも、ツツジ科シャクジョウソウ亜科に属する種については、特に菌根菌との対応関係に関する研究が盛んに行なわれている (Bidartondo and Burns 2001, 2002; Bidartondo 2005)。しかし、その多くは北米大陸に産するものについてであり、アジア産の種についてはまだ研究例が少ないのが現状である。ギンリョウソウ *Monotropastrum humile* (D. Don) H. Hara は、アジア固有のシャクジョウソウ亜科の菌寄生植物で、東アジアから東南アジアにかけて広く分布している。日本においても、北海道から沖縄にかけて広く分布し、針葉樹林や広葉樹林の林床で見ることができる。林内では主に湿った腐植上に生育し、通常は細かく分枝した根が塊状になっている状態で生育している。地上部は開花期 (4-8 月) にのみ出現し、全体が白色で、茎は直立して分枝せず高さ 5-20cm になり、鱗片葉がやや密につく。茎頂に 1 花のみをやや下向きにつけ、開花後は白色の液果を実らせる。これまでの研究で、本種の菌根菌の大部分が、樹木の外生菌根菌であるベニタケ科ベニタケ属であること、また同属内の広い範囲の種を菌根菌として利用していることが示されている (Bidartondo and Bruns 2001, 2002; Yamada et al. 2008; Matsuda et al. 2011)。しかし、本種の分布範囲は上述の通りきわめて広く、分布域全体に渡って菌根菌との対応関係が正確に明らかになっているわけではない。また、生育する森林タイプも多様であり、それらと菌根菌との関係についても、十分明らかになっているとはいえず、生育地・生育環境の両面からより広範な解析を行な

う必要がある。

本研究では、福島県いわき市においてスギ林内にギンリョウソウの生育を認めたので、その菌根菌の分子同定を試みた。ギンリョウソウが生育する森林は、針葉樹、広葉樹どちらが優占する林であっても、優占樹種は外生菌根を有する種である。しかしスギは外生菌根を形成しないため、スギ以外の植物のもつ外生菌根菌と関係を結んでいると考えられる。そこで、根から抽出した DNA を用いた解析を援用することで、スギ林内に生育するギンリョウソウがどのような菌根菌を持っているのかを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

野外調査は 2011 年 5 月 30 日に行った。調査地は福島県いわき市田人町旅人（北緯 36 度 56 分 3 秒，東経 140 度 43 分 26 秒）で、スギ植林地とコナラおよびクマシデの落葉広葉樹林がみられる丘陵地である。スギ植林地内で発見されたギンリョウソウは 7 個体で、このうち 2 個体を採集して解析に用いた。すべての個体はスギ林縁から 6–7m 林内に入ったところに生育しており、このスギ林は約 3.7m の幅員の道をはさんでコナラ林に隣接している。スギ林内の植被はまばらで、低木としてアオキ、クロモジなど、草本層にはテイカカズラやトウゲシバなどが生育していた。



図 1. 福島県いわき市田人町のスギ林下におけるギンリョウソウの生育状況（左）と採集したギンリョウソウの全体像（右）

採集したギンリョウソウの根から DNA を抽出した。根は水でよく洗浄し土壌や腐植を可能な限り取り除いたうえで、乳鉢で液体窒素を加えながらすりつぶし、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社)を用いた DNA 抽出に用いた。抽出した DNA は実験に用いるまで -20°C で保存した。

菌根菌の分子同定を行なうため、以下の方法で核 rDNA の ITS 領域の塩基配列を決定

した。担子菌特異的なプライマーである ITS1F と ITS4B (Gardes and Bruns 1993) を用いて、PCR 法で菌根菌の DNA のみを増幅した。ギンリョウソウの根から抽出した DNA 5 μ l (約 50-100ng の DNA に相当)、10×*Ex Taq* Buffer 5 μ l、dNTP 4 μ l、前述のプライマー (5nmol/ml) を各 5 μ l ずつ、*Ex Taq* 0.25 μ l、滅菌水 25.75 μ l を混合して計 50 μ l の反応液を作成し、PCR 反応を行った。PCR サイクルは 95°C(3min)の後、95°C(30sec)-51°C (30sec)-72°C (1.5min) を 35 サイクル行った。増幅した DNA 断片は、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche 社) を用いて精製した。精製した増幅産物を用いて、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (QIAGEN 社) によるサイクルシーケンス反応を行った。プレミックス反応液を 4 μ l、プライマー (1 nmol/ml) を 1.6 μ l、精製した DNA 4.4 μ l を混合して 10 μ l の反応液を作成し、PCR を行った。反応液は、ITS1F を用いたものと ITS4B を用いたものの 2 種類を作成し、塩基配列を両側から決定した。PCR サイクルは、96°C (1min) の後、96°C (10sec) - 50°C (5sec) - 60°C (4min) を 25 サイクル行った。その後 AutoSeq G - 50 Dye Terminator Removal Kit (GF ヘルスケア社) を用いて精製し、ABI PRIZM 310 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems 社) で塩基配列を決定した。得られた塩基配列について、NCBI/GenBank/DDBJ 国際 DNA データバンクに登録されているデータとの相同性を、BLAST 検索 (Altschul et al. 1997) によって比較した。

結果と考察

各サンプルからそれぞれ 795bp (Tabito-1)、826bp (Tabito-2) の ITS 領域の配列が決定された。BLAST 検索による相同性検索の結果、Tabito-1 はベニタケ属の *Russula laccata* Huijsman (score: 1332, 相同性 96.9%) ないしはドクベニタケ *R. emetica* Pers. (score: 1324, 相同性 97.1%) であると判断された (表 1)。一方 Tabito-2 は、チチタケ属のキカラハツモドキ *Lactarius zonarius* (Bull.) Fr. (score: 971, 相同性 93.3%) であると判断された (表 1)。ベニタケ属、チチタケ属はいずれもベニタケ科に属し、一般に樹木の外生菌根として生育している担子菌類である。このことは、今回スギ林で発見されたギンリョウソウが、スギ林外に生育している (おそらく隣接している林を形成している) コナラなどの落葉広葉樹に依存して生育していることを示している。隣接するコナラ林からの距離は 10m ほどであるので、スギ林下までコナラの根が伸びてきていると考えても、それほど無理のある距離ではないと考えられる。

今回いわき市のサンプルから得られた菌根菌のうち、ベニタケ属はギンリョウソウの菌根菌として最も普遍的に検出されるグループである (Bidartondo and Bruns 2001, 2002; Yamada et al. 2008; 高井 2008; Matsuda et al. 2011; 中村 2012)。本属は非常に種類が多く、

ギンリョウソウも分布域全体でみると、広範囲なベニタケ属の種を菌根菌として利用する傾向にあるようである (Matsuda et al. 2011)。一方、地域ごとにみると特定の系統群を中心に利用する傾向があるようにもみえ (Matsuda et al. 2011)、しかもその傾向は発生年によっても異なる可能性がある (中村 2012)。ドクベニタケおよび近縁種が、いわき市のギンリョウソウ個体群で普遍的に利用されている菌根菌なのか否かについては、さらに個体数を増やして解析する必要がある。

表 1. いわき市のギンリョウソウから得られた菌根菌配列の相同性検索結果

サンプル名	検索の結果得られた種	アクセッション番号	スコア	相同性 (%)
Tabito-1	<i>Russula laccata</i>	HQ604844	1332	96.9%
	<i>Russula cf. Emetica</i>	AY228350,AY228360	1328	97.1%
Tabito-2	<i>Lactarius zonarius</i>	AF096979	971	93.3%

一方、Tabito-2 から検出されたチチタケ属は、ギンリョウソウの菌根菌として各地で検出されるものの、一般的にその頻度はベニタケ属よりは低い。しかし、地域によってはチチタケ属が主な菌根菌として検出されることもある (岐阜県や北陸地方の集団など : Yamada et al. 2008)。このような違いがなぜ、どのようにして生じるのかについては、今の所明らかになっていない。地域が異なることによる菌根菌の種構成の差異については、近縁種のギンリョウソウモドキ (アキノギンリョウソウ, *Monotropa uniflora* L.) の北米集団でも知られており (Bidartondo and Burns 2001; Bidartondo 2005)、優占する菌根菌の違いや、栄養供給能に優れた菌根菌の選択など、何かしらの要因が存在している可能性がある。本研究では 2 個体しか解析しておらず、どちらの属がこの集団での一般的な菌根菌パートナーなのかについては判断できない。しかし解析した 2 個体が異なる菌根菌と関係を結んでいたことから、いわき市の集団では特に優占する菌根菌の種が存在していない可能性も考えられる。本集団は、東北地方南部の一般的な生育地に比べると南方で低標高であり、そのような生育環境の特異性と、菌根菌との関係の間にも、関連性があるかもしれない。今後解析個体数を増やすことで、これらの点について検討する必要がある。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金 (課題番号 : 23370039) を用いて行なわれたものであることを記して謝意を表します。

引用文献

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 17:3389-402.
- Bidartondo MI, Bruns TD (2001) Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread phylogenetic and geographical structure. *Molecular Ecology* 10: 2285-2295.
- Bidartondo MI, Bruns TD (2002) Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Molecular Ecology* 11: 557-569.
- Bidartondo MI (2005) The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist* 167: 335-352.
- Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304.
- Gardes M, Bruns TD (1993) Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi: taxon-specific oligonucleotide probes for the suilloid fungi. *Molecular Ecology* 2: 233-242.
- Leake JR (1994) The biology of myco-heterotrophic (saprophytic) plants. *New Phytologist* 127: 171-216.
- 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.
- 中村 茜 (2012) 菌寄生植物ギンリョウソウの遺伝型と菌根菌の対応関係. 山形大学大学院理工学研究科 (理学系) 修士論文.
- Selosse MA, Le Tacon F (1998) The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* 13: 15-20.
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis* 3rd edn. Academic Press, San Diego.
- 高井真理 (2008) ギンリョウソウと菌根菌との対応関係の地理的変異. 山形大学理学部生物学科卒業論文.
- Yamada A, Kitamura D, Setoguchi M, Matsuda Y, Hashimoto Y, Matsushita N, Fukuda M (2008) *Monotropastrum humile* var. *humile* is associated with diverse ectomycorrhizal Russulaceae fungi in Japanese forests. *Ecological Research* 23: 983-993.