

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07200

研究課題名(和文) 原始的維管束植物「シダ植物」の配偶体の異時性進化と菌共生

研究課題名(英文) Fungal symbiosis and heterochrony involved in gametophyte evolutions of primitive vascular plants, monilophytes.

研究代表者

今市 涼子 (Imaichi, Ryoko)

日本女子大学・理学部・研究員

研究者番号：60112752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シダ植物の心臓形配偶体の多くはアーバスキュラー(AM)菌を感染させている。その菌感染率は配偶体のハビタットと関連し、地上生が高いのに対して、岩上、樹上着生は感染率0%を示す。実験的に、十分量のAM菌接種区と非接種区を作り、シダ胞子とAM菌の共培養を行った。配偶体種は3群に分けられた。(1)菌が必ず感染し、顕著なサイズ差(10倍)が生じる種、(2)菌が感染し、接種区の配偶体が有意に大きくなるが、サイズ差が小さい(1.5倍)種と、サイズに有意差が生じない種、(3)菌が全く感染しない種。(1)はAM菌への栄養依存度が高いが、(2)は栄養依存度が低く、(3)は菌感染を防ぐ機構をもつと考えられる。

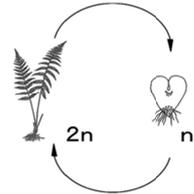
研究成果の概要(英文)：Fern gametophytes are colonized with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. AM fungal colonization levels appear to be correlated with habitats, where gametophytes are growing; terrestrial gametophytes show high level of AM colonization, while epiphytic ones show low level. To clarify habitual relationships between fern gametophytes and AM fungi, we performed experimental co-cultivations of fern gametophytes and AM fungi. Fern gametophytes examined were classified to three groups: (1) AM infection rates show 100%, and infected gametophytes are much larger in size than uninfected gametophytes, (2) AM infection rates were 50-100%, but infected gametophytes are not significantly larger in size than uninfected gametophytes, and (3) AM infection rates show 0%. Gametophytes in the group (1) and (2) probably have high and relatively low nutritional dependence on AM fungi, respectively. In contrast, gametophytes in the group (3) rather may have a certain system to avoid fungal infection.

研究分野：植物形態学

キーワード：シダ植物 配偶体 菌根菌 アーバスキュラー菌 共生 進化 ハビタット

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 4.5 億年前に海から上陸した植物は、アーバスキュラー (AM) 菌との共生関係を結び、乾燥した内陸への分布拡大に成功したと考えられている。現生の維管束植物の大半は根に AM 菌をもっており、シダ植物の孢子体の根も例外ではない。これに対して、シダ植物配偶体は、数 mm と小形であるため、AM 菌を感染させないと考えられてきた。我々は、数年前から、日本各地で採取した野生配偶体について、*rBCL* 遺伝子を用いて種同定を行い、切片法にて AM 菌感染の有無を調べ、シダ種ごとの感染率を調べてきた (Ogura-Tsujita et al. 2013)。さらに菌感染がみられた場合は、核 DNA を用いて AM 菌の種同定を行った。その結果、「大半のシダ種の配偶体が中肋 (中央の多層部、クッション層) に AM 菌を感染させていること」、そして「感染率はシダ種によって異なること」、「感染率は配偶体の生育地と関係が深く、地上生配偶体は、高い菌感染率を示すが、岩上や樹上着生の心臓形配偶体は AM 菌を欠くこと」を示した。しかし、これは配偶体の生育する土壤中の AM 菌量の差を反映したものである可能性を払拭できない。



(2) 維管束植物の進化においては、これまで孢子体における茎、葉、根の起源に注目が集まり、小形の配偶体についての進化研究は大きく遅れている。シダ配偶体は、心臓形を示しながらクッション層の厚さに違いがみられ、地上生心臓形は厚いクッションをもつが、着生ものではクッション層が薄くなる傾向がある。また、着生種にはヘラ形やリボン形などを示す配偶体もある。配偶体の形態進化は発生タイミング変更によってもたらされる異時性進化で起こり、地上生から着生へと生息地のシフトとともなって AM 菌との共生関係が変更した事が大きな役割を果たした可能性がある。しかし、異時性進化の観点からの、シダ配偶体の進化を明らかにしようとする研究は、これまで全くなされてない状況にある。

### 2. 研究の目的

シダ配偶体の AM 菌感染率は、配偶体の生育地の土壤中の菌密度を反映している可能性は無いのか。十分の AM 菌の存在下においても、着生配偶体は菌感染率が低いのか。これらの疑問に答えを出すため、本研究では、AM 菌とシダ孢子との共培養実験法の確立を目指す。また、配偶体の菌感染率と生育地との関係が熱帯でも同様に見られるか否か、を明らかにするため、インドネシアでの予備調査も行う。

さらに、「着生配偶体のサイズの小型化とクッション層の減少が、AM 菌感染率減少と関

連した異時性進化によって起こった」とする作業仮説を明らかにするため、AM 菌を含む寒天培地での共培養実験法の確立を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) シダと AM 菌との共培養実験

シダ種については、我々のこれまでの研究から、野生配偶体の感染率がすでにわかっている、地上種 (ゼンマイ、コシダ、ヤワラシダ等)、岩上着生 (マメツタ、コバノヒノキシダ等) を選んだ。また AM 菌は、すでにシダ配偶体において同定されている 3 種

(*Acaulospora longula*, *Glomus intraradices*, *Claroideoglomus claroideum*) を用いた。6 穴シャーレ (各穴は直径 35mm、深さ 18mm) に、黒ボク土 : 川砂 = 7 : 3 で混合した土壌を充填し、そこにシダ孢子懸濁液を穴全体に均一になるようかけた。種ごとに孢子の播種位置を変えた計 8 プレートを作成した。比較のため、シダ孢子のみで AM 菌を接種しない菌非接種区も同様に 8 プレート作った。培養は、人工気象器内で行った (25 14h 明期、20 10h 暗期)。

#### (2) 共培養実験のサンプリングとデータ解析

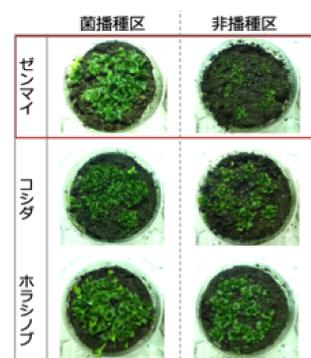
培養 2, 3 ヶ月後、菌接種区と非接種区のそれぞれから、造卵器をもつ成熟個体を採取し FAA 固定した。配偶体のサイズに穴ごとの大きな違いがみられたので、種ごとに、穴に関係なく大きい順に 50 個体を選んだ。光学顕微鏡観察によって、菌感染の有無と、菌感染領域を判断した。各種について、数個体を選んで、配偶体を中肋部で縦半分にし、一方はシダ種と菌種を分子同定に用いた。また残りの半分は切片作成に用い、光学顕微鏡にて菌感染を確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) AM 菌とシダ孢子の土壌共培養実験

##### 【生育状況の比較】

右図に、ゼンマイ、コシダ、ホラシノブを例に、3 ヶ月培養後の成長した配偶体の写真を示した。外見上、菌接種区と非接種区で、配偶体成長が大きく、異なったのは、ゼンマイ



(上図)とリュウビンのみで、その他はコシダ、ホラシノブ (上図)と同様、外見上は大きな違いはみられなかった。また着生種についても、菌接種区と非接種区で大きな違いはみられなかった。

【菌感染率の比較】

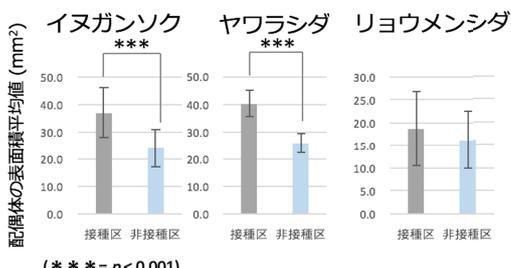
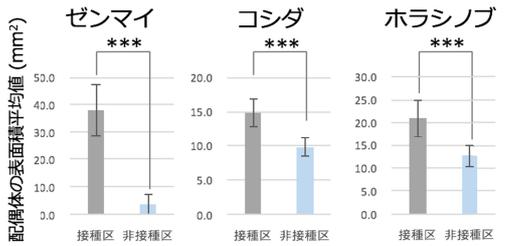
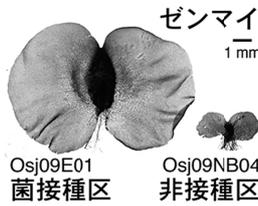
7種についての菌接種区における菌感染率を例に、それぞれ同種の野生配偶体の感染率と比較した(下表)。

	野生感染率		共培養感染率	
ゼンマイ	100%	(9/9)	=	100% (120/120)
コシダ	100%	(5/5)	=	100% (120/120)
ホラシノブ	100%	(5/5)	=	100% (120/120)
イヌガンソク	100%	(7/7)	=	100% (50/50)
ヤワラシダ	88%	(28/32)	<	100% (120/120)
リョウメンシダ	75%	(15/19)	<	98% (49/50)
マメツタ	0%	(0/5)	=	0% (0/20)

野生で感染率100%の種(ゼンマイ、コシダ)は、共培養下でも菌感染率100%を示した。また、野生配偶体で88%、75%の菌感染率を示す種(ヤワラシダ、リョウメンシダ)は、それぞれ共培養下で100%、98%と菌感染率の上昇がみられた。興味深い事に、岩上や樹上着生で野生感染率0%の種(マメツタ)は、十分な菌量が存在するにもかかわらず、菌感染はどの個体にもみられなかった。

【サイズの比較】

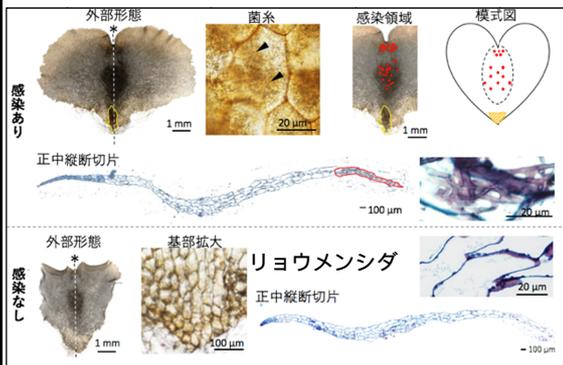
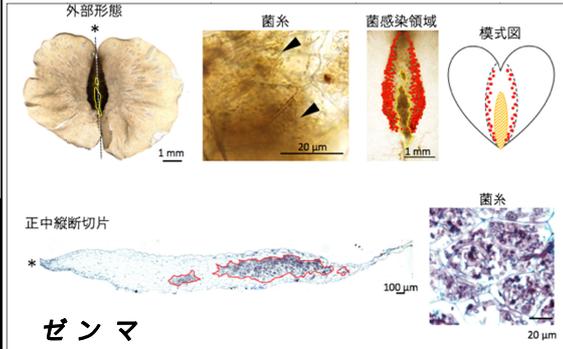
前述のように、外見上で、菌接種区の個体と非接種区の個体サイズの比較から、両者で大きな差がみられる種(例、ゼンマイ、右図)と、差がほとんどみられない種があった。そこで、数種を選んで、サイズ(面積)を比較した(下図)。



ゼンマイ、コシダ、ホラシノブ、イヌガンソク、ヤワラシダでは、菌接種区の配偶体が、非接種区のものより大きく、有意差がみられた。これに対して、リョウメンシダには有意差がみられなかった。前者についてサイズを比較すると、ゼンマイではサイズ差は10倍以上にのぼるが、コシダ、ホラシノブ、イヌガンソク、ヤワラシダのサイズ差は小さく、1.5倍程度であった。

【菌感染率と感染部位の比較】

菌感染率と感染領域との関連を確認するため、顕微鏡観察と切片観察を行った。ゼンマイとリョウメンシダの例を下図に示す。中肋クッション部の赤点は造卵器を示す。



す。ゼンマイでは、クッションの半分より上部まで、クッションの約2/3に菌感染がみられる事が、全体写真と切片から示されている。コシダ(図無し)では、菌感染領域は、配偶体の基部の約1/3までであり、切片からもゼンマイに比べて、感染領域が小さかった。また、リョウメンシダでは、菌感染領域はコシダよりさらに縮小し、配偶体の尾部のみにとどまっている。なお、リョウメンシダでは菌感染のみられない個体も存在するため、非感染の配偶体の観察結果も一緒に示している(上図)。非感染個体の中肋部のクッションの厚さは、菌感染した個体のもとはほとんど変わらず、菌感染の有無による配偶体の形態の変化はみられないことが示されている。

本結果は、野生配偶体の菌感染率と感染領域が、共培養実験下でも同様であることを示し、遺伝的に制御されている形質であることが予想され、興味深い。ゼンマイは野生配偶体においても100%の感染率を示し、感染領域も広い。コシダの野生配偶体の菌感染率は切片観察では100%、菌感染領域は、ゼンマイに比べて小さい。またリョウメンシダの野生配偶体の感染率は75%と他2種と比べて低く、感染領域も配偶体の尾部のみで大変狭い。

【共培養実験のまとめ】

上記以外の種についても同様の共培養実

験を行った結果、シダ配偶体は、AM菌感染の有無、個体サイズ差の2点から、次の3グループに分けることができた。

- I. 菌が必ず感染し、顕著なサイズ差(10倍以上)が生じる種(ゼンマイ、リュウビソク等)
- II. 菌が感染するが、配偶体のサイズ差が小さい(1.5倍、コシダ、イヌガソク、ホラシノブ、ヤワラシダ等)サイズに有意差がみられない(リュウウメンシダ、イヌシダ、ミゾシダ等)、逆に非接種区で有意に大きくなる(オシダ、ジュウモンジシダ等)種である。
- III. 菌が全く感染しない種(マメツタ、ノキシノブ、コバノヒノキシダ等)。

Iの配偶体はAM菌に栄養依存をしているが、IIの配偶体は栄養依存をしていないと考えられる。一方、IIIの配偶体は、AM菌が感染できないか、むしろ菌を排除する性質を持っている可能性が高い。グループIIについては、さらに小グループに分けられるか否か、今後、シダ種を増やして実験を続ける必要がある。

#### (2) 熱帯生配偶体の菌感染

インドネシアのチボダス植物園における「熱帯産シダ配偶体のAM菌感染について」の予備調査を行った。その結果、日本であれば本来、地上生であるリュウビソク属やクジャクシダ属等の心臓形配偶体が、岩上や樹上にも生育することがあり、これらにも菌感染がみられることがわかった。熱帯では岩上や樹上でもAM菌が十分量存在しているため、本来地上生である種の配偶体が着生環境にまで分布を広げている可能性がある。ただ、インドネシアでは、まだシダ分類群のDNAバーコーディングのデータが揃っておらず、野生配偶体の種同定が困難であるため、野生配偶体と菌共生との研究の今後の進め方には工夫が必要であることがわかった。

#### (3) 配偶体の異時性進化

AM菌存在下と非存在下での配偶体の成長を比較するには、配偶体の密度を均一にした上での、培養実験が必要となる。このため、寒天を用いた共培養系の確立を目指したが、残念ながら、未だうまくいっていない。今後も検討を進める。

#### <引用文献>

Ogura-Tsujita Y, Sajida A, Ebihara A, Yukawa T, Imaichi R. Arbuscular mycorrhizal formation in cordate gametophytes of two ferns, *Angiopteris lygodiiifolia* and *Osmunda japonica*. J. Plant Res. 126: 41-50.

2013.

#### 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)

Yuki Ogura-Tsujita, Yumiko

Hirayama, Aki Sakoda, Ayako Suzuki, Atsushi Ebihara, Nana Morita, Ryoko Imaichi. 2016. Arbuscular mycorrhizal colonization in field-collected terrestrial cordate gametophytes of prepolypod leptosporangiate ferns (Osmundaceae, Gleicheniaceae, Plagiogyriaceae, Cyatheaceae) *Mycorrhiza* 26:87-97. 2016. DOI 10.1007/s00572-015-0648-1 (査読有)

[学会発表](計4件)

今市涼子、鈴木絢子、橋本季巳江、辻田有紀、海老原淳、共培養実験を用いたシダ類配偶体とアーバスキュラー菌根菌の共生関係の解析菌根研究会 2017年12月、筑波大学

辻田有紀、山本航平、平山裕美子、海老原淳、山田明義、今市涼子、シダ植物リュウビソクとゼンマイの配偶体におけるケカビ垂門感染の探索 日本菌学会 2016年09月16日~18日、京都大学

橋本季巳江、今市涼子、鈴木絢子、AM菌共培養実験による、シダ植物配偶体の形態とAM菌感染率の関係解析 日本植物学会 2016年09月16日~19日、沖縄コンベンションセンター

鈴木絢子、橋本季巳江、大山ともこ、方やあなる、平山裕美子、辻田有紀、海老原淳、今市涼子、シダ類の心臓形配偶体におけるAM菌感染率とクッション層の厚さ、日本植物学会 2015年09月08日 新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ

[その他]

ホームページ等

<http://mcm-www.jwu.ac.jp/~ryoko/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

今市涼子 (IMAI CHI, Ryoko)  
日本女子大学・理学部・研究員  
研究者番号: 60112752

##### (2) 研究分担者

海老原淳 (EBIHARA, Atsushi)  
独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号：20435738

辻田有紀 (TSUJITA, Yuki)  
佐賀大学・農学部・准教授  
研究者番号：80522523

藤浪理恵子 (FUJINAMI, Rieko)  
京都教育大学・教育学部・講師  
研究者番号：40580725