

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07536

研究課題名(和文) 最古の菌根共生「ケカビ亜門共生系」はシダ植物にも存在するか？

研究課題名(英文) Fern gametophytes harbor diverse Mucoromycotina fungi

研究代表者

辻田 有紀 (Ogura-Tsujita, Yuki)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：80522523

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)：ケカビ亜門に属する菌類と植物との共生系は、植物と菌類との菌根共生において最古の共生系の1つと考えられている。本研究は、維管束植物における菌根共生の進化を明らかにする上で重要な系統的位置を占めるシダ植物に本共生系が存在するかどうかを探索した。野外で採取した2系統のシダ類配偶体について、DNA分析から10系統のケカビ亜門を検出した。また、形態観察からケカビ亜門に特有のFREの菌糸構造を確認し、DNAと形態の両面から、シダ類とケカビ亜門との共生関係を実証することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

菌根共生はコケ植物から被子植物まで陸上植物の9割に存在し、地球上で最も普遍的に存在する共生系の1つである。また、本共生は植物と菌類の双方にとって重要な栄養獲得経路であり、植物と菌類の多様性を創出してきた大きな原動力の1つである。菌根共生は植物の陸上化とともに始まったとされるが、その進化史は未だに謎が多い。本研究結果は、初期維管束植物の菌根共生が、AM菌に加えケカビ亜門とも営まれてきたことを示す重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：To explore whether Mucoromycotina colonize fern gametophytes, we subjected fungal associations with gametophytes of two distantly related ferns, *Angiopteris lygodiiifolia* (Marattiales) and *Osmunda japonica* (Osmundales), to molecular analysis. We detected Mucoromycotina sequences in the gametophytes of *A. lygodiiifolia* and *O. japonica* at rates of 41% (7/17) and 50% (49/98) of gametophytes, respectively, and assigned them to 10 OTUs of Endogonales lineages. In addition, we used AM fungal-specific primers and detected Glomeromycotina sequences in all individuals examined. The results suggest that Glomeromycotina and Mucoromycotina colonized fern gametophytes simultaneously. We found that Mucoromycotina were present in fern gametophytes of Marattiales and Osmundales, which implies that a variety of fern taxa have Mucoromycotina associations.

研究分野：系統分類

キーワード：菌根共生 シダ植物 ケカビ亜門 配偶体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は陸上化とともに菌根菌と共生関係を営んできたと考えられており、グロムス亜門の菌類と共生するアーバスキュラー菌根(AM) 共生系はコケ植物や化石植物から見つかったことから、現生の菌根共生系の中で最も祖先的であると考えられてきた。しかし近年、現生の陸上植物の中で最も基部に位置するコケ植物や化石植物から、ケカビ亜門に属する菌類との共生が発見され、本菌との共生も最古の菌根共生系の1つではないかと考えられるようになった。その後、これまで AM 菌と考えられていたファインルートエンドファイト (FRE) がケカビ亜門共生に含まれることが明らかとなり、本共生系が陸上植物に広く存在する可能性が示唆されている。しかし、維管束植物における菌根共生の進化を明らかにする上で重要な系統的位置を占めるシダ植物に関する情報は未だ断片的である。本研究では、形態・DNA 分析と共生培養系を駆使してシダ植物とケカビ亜門との共生系を解明し、陸上植物におけるケカビ亜門共生系の普遍性を探索する。

2. 研究の目的

本研究では、系統的に異なるシダ類のリュウビнтаイ (リュウビнтаイ目) とゼンマイ (ゼンマイ目) の2種に着目し、DNA・形態・共生培養の3つの手法を用いてシダ類とケカビ亜門との共生を検証することを目的とした。まず(1) 野外から採取した配偶体を用いて、DNA 分析と形態観察によりケカビ亜門の感染を確認し、次に(2) *in vitro* で植物と菌とを共生培養する実験系を確立し、両者が共生関係にあるかを確認した。

3. 研究の方法

(1) DNA 分析と形態観察

リュウビнтаイ2集団 (石垣・西表) 17 個体とゼンマイ4集団 (茨城、東京、三重) 98 個体を野外で採取した。得られた配偶体より DNA を抽出し、菌の 18S リボソーム RNA 遺伝子領域を用いてケカビ亜門の分子同定を行った。また、ケカビ亜門が植物の表皮に付着している介在菌ではなく植物組織内に感染している菌根菌であることを確認するため、一部の個体は実体顕微鏡下で細胞内より菌糸塊のみを取り出し、分析した。さらに、コケ植物ではケカビ亜門と AM 菌が同時共生していることが知られていることから、採取した一部の個体は、DNA 分析と形態観察の両面から AM 菌感染の有無を確認した。

形態観察は、組織片をトリパンブルー溶液で染色し、押しつぶし法によって細胞内に感染している菌糸の性状を確認した。

(2) 共生培養

野外より採取した配偶体組織より、実体顕微鏡下で細胞内の菌糸塊を取り出し、寒天培地上で培養を行った。ケカビ亜門の一部は子実体を形成するため、子実体由来の菌株を用いて、無菌的に育成したゼンマイ配偶体と菌株とを *in vitro* 条件下で培養した。一定期間培養した後、配偶体組織にケカビ亜門が感染しているかどうかを1)と同様の手法で観察した。

4. 研究成果

(1) DNA 分析と形態観察

野外で採取したリュウビнтаイ2集団17個体、ゼンマイ4集団98個体についてDNA分析を行った結果、それぞれ41%と50%の個体よりケカビ亜門を検出した(図1)。

植物種名	集団名	個体数	アツギケカビ科					Densospora科				
			OTU1	OTU2	OTU3	OTU4	OTU5	OTU6	OTU7	OTU8	OTU9	OTU10
リュウビнтаイ	AL1	3	1		1					1		
	AL2	4				3					2	
ゼンマイ	OJ1	6	2				4		2			1
	OJ2	11						6	1		3	2
	OJ3	5		1	1							3
	OJ4	27		1	7			9		8		8

図 1. リュウビнтаイとゼンマイより検出されたケカビ亜門の種類と内訳。個体数は、供試個体数のうち、ケカビ亜門の配列が検出された個体数を示す。検出した菌の配列は、塩基配列の相同性が97%以上あったものを同一グループ(操作的分類群; OTU)とした。数値は各 OTU の出現頻度を示す。

これらのケカビ亜門は、塩基配列の情報から 10 グループに分けられた。系統解析の結果、4 グループはアツギケカビ科、5 グループは Densospora 科、1 グループは新規系統群に含まれることが明らかになった（図 1）。また、細胞内より分離した菌糸塊からもケカビ亜門が検出されたことから、検出されたケカビ亜門は植物の細胞内に共生している菌根菌である可能性が高い。また、多くのグループにはコケ植物に由来するケカビ亜門が含まれており、コケ植物とシダ類に共生するケカビ亜門は同系統であることが示された。

形態観察では、細胞内にケカビ亜門の FRE の特徴をもつ菌糸を確認した（図 2）。以上の結果は、2 種の配偶体がケカビ亜門と共生していることが強く支持するものである。一部の個体で AM 菌との共生を確認したところ、調査した全ての個体で、DNA と形態の両面から AM 菌の感染を確認した。このことから、2 種の配偶体は常時 AM 菌と共生し、半数近くの個体は同時にケカビ亜門とも共生していることが明らかになった。

（2）共生培養

細胞内より分離した菌糸塊は、いずれも寒天培地上で菌糸の伸長が見られなかった。また、子実体由来の菌株と無菌的に育成したゼンマイ配偶体を滅菌土壌上で培養したが、組織内にケカビ亜門の感染は確認できなかった。今後培養条件をさらに検討する必要がある。

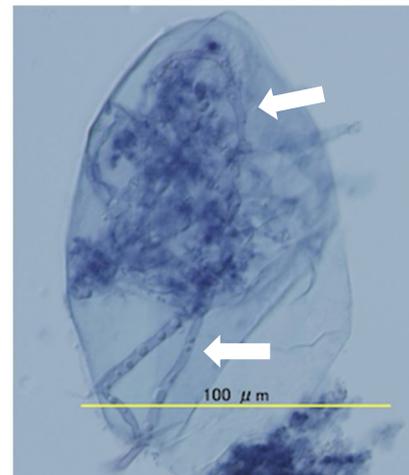


図 2 . 細胞内にみられた菌糸。
矢印は菌糸を示す。

<まとめ>

本研究はシダ類とケカビ亜門との共生を DNA と形態の両面から特定した初めての研究である。本共生系はこれまでコケ植物およびヒカゲノカズラ類から報告があったが、本研究でシダ類にも存在することが確実となった。目の異なる 2 系統のシダ類でケカビ亜門が確認されたことは、本共生系が他のシダ類にも広く存在する可能性を示唆している。コケ植物や化石植物では、細胞間隙にみられる壁の厚い菌糸構造でケカビ亜門の感染が区別されているが、今回の調査ではこれらの構造は確認されず、FRE の形態のみが観察された。初期陸上植物と維管束植物では、ケカビ亜門の感染形態が異なり、シダ類では FRE の菌糸構造を持つことが示唆された。本研究成果は、維管束植物とケカビ亜門との共生を解明する上で非常に重要な知見となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogura-Tsujita, Y., Yamamoto, K., Hirayama, Y., Ebihara, A., Morita, N., & Imaichi, R.	4. 巻 132
2. 論文標題 Fern gametophytes of <i>Angiopteris lygodiifolia</i> and <i>Osmunda japonica</i> harbor diverse <i>Mucoromycotina</i> fungi.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 581-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s10265-019-01121-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto, K., Shimamura, M., Degawa, Y., & Yamada, A.	4. 巻 132
2. 論文標題 Dual colonization of <i>Mucoromycotina</i> and <i>Glomeromycotina</i> fungi in the basal liverwort, <i>Haplomitrium mnioides</i> (Haplomitriopsida).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 777-788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s10265-019-01145-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 辻田有紀・平山裕美子・山本航平・海老原淳・今市涼子
2. 発表標題 新規菌根共生系ケカビ亜門共生はシダ植物にも存在するか？
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ogura-Tsujita, Y., Yamamoto, K., Hirayama, Y., Ebihara, A., Morita, N., & Imaichi, R.
2. 発表標題 Fern gametophytes of <i>Angiopteris lygodiifolia</i> and <i>Osmunda japonica</i> harbor diverse <i>Mucoromycotina</i> fungi.
3. 学会等名 The 10th International Conference on Mycorrhiza. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤浪理恵子・安達利紗子・植松真理子・高橋ひとみ・西田美緒・宮崎あかね・今市涼子
2. 発表標題 シダ植物配偶体とAM菌の寒天共培養法の検討.
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	海老原 淳 (Ebihara Atsushi) (20435738)	独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹 (82617)	
研究分担者	藤浪 理恵子 (Fujinami Rieko) (40580725)	京都教育大学・教育学部・講師 (14302)	
研究分担者	今市 涼子 (Imaichi Ryoko) (60112752)	日本女子大学・理学部・研究員 (32670)	
研究分担者	山本 航平 (Yamamoto Kohei) (60806248)	栃木県立博物館・学芸部自然課・学芸嘱託員 (82207)	