

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06391

研究課題名(和文) シダ植物配偶体におけるAM菌共生関係の多様性と進化

研究課題名(英文) Evolution of symbiotic relations between fern gametophytes and AM fungi

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シダ類の心臓形配偶体とAM菌との間の共生関係は、シダ種のハビタットと関連して多様であることが、野生配偶体のAM菌感染率(感染個体数/観察個体数)の計測、及び土壌培地(黒ボク土+川砂)を用いたシダ類配偶体とAM菌との共培養実験結果から推定されていた。

本研究では、シダ類配偶体とAM菌との共生関係の解明に向けて、土壌共培養系に比べて、より厳密な培養条件コントロールが可能となる寒天共培養実験系の構築を目的とした。リンが吸着する土壌粒子の代替としてシリカゲルあるいは活性炭の添加効果の検討、更にリン濃度、光条件、配偶体の密度効果の有無、等の検討を行なった結果、1つの実験系を立ち上げるに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

4.5億年前、上陸に成功した植物は、根、茎、葉を作り、様々な植物群を進化させてきた。そして、その進化に土壌中の菌類との共生関係が重要であったとされているが、その実態は不明である。現生シダ類の配偶体は、数mmと小型で、光合成を行うにもかかわらず、多くの種でAM菌を感染させている。培養条件を厳密に制御できる「シダ配偶体とAM菌の寒天共培養実験系」の構築は、「シダ類配偶体とAM菌との共生関係」という新たな基軸に基づいた植物進化研究を大いに進めるものとなる。

また植物と菌類との共生関係は近年、森林維持、特に林業の面からも注目を集めており、林業施作も含めて社会的問題を解決するための基礎研究となる。

研究成果の概要(英文)：The symbiotic relationship between the cordiform gametophytes of ferns and AM fungi is diverse, as shown by AM infection rates (number of infected individuals/number of observed ones) in wild gametophytes which were collected in many places in Japan. Our co-cultivation experiments of fern gametophytes and AM fungi in a soil medium (andosol+ river sand) suggested that there is a close relation between the AM infection rates and habitats of fern species, terrestrial or epiphytic. In order to elucidate the symbiotic relationship between fern gametophytes and AM fungi, we need to construct an agar co-cultivation experimental system that allows more strict control of culture conditions compared to soil cultivation system. As a result of examining substitutes for soil particles (silica gel or activated carbon), phosphorus concentration, light conditions, presence or absence of gametophyte density effects, etc., here we present an agar co-cultivation experimental system.

研究分野：植物形態学、植物進化形態学、植物分類学

キーワード：シダ 配偶体 AM菌 菌根菌 共生 ハビタット 進化 形態

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シダ植物を含めて維管束植物の根と土壤中のアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) との共生関係は広く知られているが、長さ数 mm の小型のシダ類配偶体については研究が大きく遅れている。我々は DNA バーコーディング技術を用いた野生配偶体のシダ種および AM 菌種の同定を行い、シダ類の多くの種で、配偶体の数層からなる中肋部に AM 菌を感染させている事を明らかにした (Ogura-Tsujita et al. 2013, 2016)。

さらに、野外で採取したシダ類 16 科 40 種 741 個体の配偶体データから、「地上生種の配偶体の多くが AM 菌を感染させているが、菌感染率 (感染個体数 / 観察個体数) は分類群によって多様であること」、そして、「着生種の配偶体には AM 菌が感染していないこと」から、AM 菌の感染とシダ種のハビタットとの間に相関関係がある可能性が示唆された。そこで土壌 (黒ボク土 + 川砂) を用いたシダ類配偶体と AM 菌との共培養実験を試みた。その結果、以下の 3 群が認識できた。(1) 菌有り区 (菌接種区) と菌無し区 (非接種区) の間に 10 倍以上の配偶体サイズ差があり、AM 菌に強い栄養依存関係をもつと予想される種 (ゼンマイ、リュウビнтаイ) (2) 菌感染は行いが、サイズ差が少なく、栄養依存度が低いか無いと考えられる種 (コシダ、リュウメンシダ等) (3) 菌接種区においても菌感染が全く見られない種 (マメツタ、ノキシノブ、コバノヒノキシダ等、全て着生種)。

上記 3 群が存在するという事は、シダ類の進化、特に胞子体の多様なハビタットへの進出に、配偶体と AM 菌との共生関係の変化が関係している可能性があることを示唆している。この配偶体と AM 菌の関係の多様性を明らかにするためには、培地のリン濃度や光条件、シダ胞子生育密度等を厳密にコントロールできる共培養実験系が必要となり、その確立が急務となっている。

### 2. 研究の目的

シダ類配偶体と AM 菌との共生関係の多様性を明らかにするために、土壌培地に比べて精度の高い実験系、すなわち寒天培地を用いた配偶体と AM 菌の共培養実験系の確立を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 材料: ゼンマイ胞子 (京都府京都市伏見区大岩山で採集)

AM 菌 (農研機構 農業生物資源ジーンバンクより入手)

*Rhizophagus intraradices* (Glomeraceae)

*Acaulospora longula* (Acaulosporaceae)

*Claroideoglossum claroideum* (Claroideoglossaceae)

(2) 培養方法

ゼンマイ胞子を、リン等無機塩類を全く含まないアガロース寒天培地で発芽させた。

AM 菌 3 種 (上記) の胞子 10~35 個ずつを混ぜ、直径 5cm のプラスチックシャーレに充填した M 培地 (リン濃度を  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  で調整した Phytogel の寒天培地, Declerck et al. 2005) の中央部に置床し、暗黒下で培養した。その際、リンが吸着すると予想される土壌粒子の代替品としてシリカゲルあるいは活性炭を添加した (図 1)。シリカゲルは 1 シャーレ当たり 4g (シャーレの底一面を薄く覆う量) とし、活性炭は寒天培地の 0.5% (Fonseca et al. 2014) とした。

数日後、AM 菌が発芽したことを確認した後、それら菌の上に得られたゼンマイの胞子発芽直後の幼配偶体を置床した (菌有り区、図 1)。対照区として、AM 菌を含まない M 培地にも同様に、得られたゼンマイ幼配偶体を置床した (菌無し区)。

バイオトロン内で、配偶体に造卵器が形成される

まで、70~90 日間培養した。培養後、個々の配偶体の表面積を測定し、菌有り区と菌無し区の間で比較した。

菌有り区で成熟した配偶体中での AM 菌の存在は、樹脂切片法及び細胞解離法によるトリパンブルー染色によって確認した。

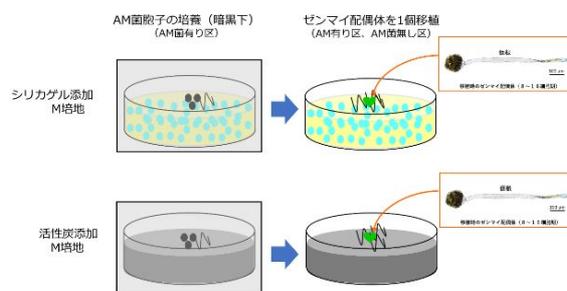


図1 シリカゲル添加 M 培地と活性炭添加 M 培地によるゼンマイ配偶体と AM 菌の共培養方法

(3) 培養条件の検討

寒天中のリン濃度

土壌中のリンは、(1) 自由水と土壌粒子の吸着水に溶けている可給態 P、(2) 土壌粒子の表面吸着無機態リン  $P_i$ 、(3) 土壌表面吸着有機体リン  $P_o$ 、そして (4) 難溶性の P、に分けられる。配偶体に使われると想定されるのは (4) 難溶性の P を除いた前 3 者の合計である。本研究

の予備実験では、寒天培地のリン濃度を、これら3者の合計として3.35ppmとなるように $\text{KH}_2\text{PO}_4$ の量で調整していた。この値3.35ppmは、土壌培地(黒ボク土+川砂)についての測定値である3.35ppmを再現するものであった。しかしながら、この値は乾燥土壌1kg dry soilについての値であり、実際には土壌、寒天培地共に多量の水が存在するため1kg waterについて計算しなければならないことが判明した。

本研究において、再度、逐次抽出法を用いて、これまでの予備実験で用いてきた寒天培地、及び土壌共培養実験で用いた土壌培地(黒ボク土+川砂)について、測定と計算を行なった。結果、上記の(1)可給態P、(2)土壌表面吸着 $P_i$ 、(3)土壌表面吸着 $P_o$ の合計は、M培地寒天培地では5.10 mg/kg water(5.10 ppm)であったのに対して、黒ボク土+川砂では73.38 mgP/kg water(73.38ppm)となり、本実験で当初用いていた寒天培地のリン濃度は、黒ボク土+川砂の約1/14と、低い値であることがわかった。従って、本研究では、寒天培地のリン量を、5.10 mgP/kg waterの1倍(土壌の1/14)、7倍(土壌の1/7)、14倍(土壌と同じ)とする3つの条件で培養を行ない、最適な寒天のリン濃度を検討した。

なお、シリカゲル添加寒天培地では、「4.研究成果」で後述するように、菌有り区と菌無し区の間で配偶体サイズ差が全くみられず、添加物として不適当と考えられたため、上記のリン量の検討は活性炭添加寒天培地を用いた。

#### 培養中のバイオトロン内の明期の光と温度条件

シリカゲル添加培地を充填したシャーレ付近では $35\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ と測定されたため、活性炭添加培地の場合も、(1)シリカゲル添加培地と同光量下、(2)暗い光量の $11\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、(3)さらに暗い $5\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ を試した。なお、バイオトロン内の温度は、明期25 14h;暗期20 10hとなるように調整した。

#### 密度効果の有無

1つのシャーレに5mm間隔で3個体3列の9個体を並べた培養と、単独で中央に1個体で培養した場合を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 培養条件の検討

添加物と光条件: シリカゲル添加培地では菌有り区と菌無し区の両方でほぼ同じ大きさに成長し、配偶体サイズに有意差は全く見られなかった。活性炭添加でも、シリカゲル添加と同光量下( $35\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )で培養した場合、配偶体サイズ差は見られなかったが、低光量の $11\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の場合に最も大きなサイズ差が得られた。なお、さらに低い $5\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ では光量が少なすぎたため配偶体は成熟個体まで成長できなかった。

リン濃度: 低光量 $11\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 下で、リン量を、1倍(5.10 mgP/kg water)、7倍(35.7 mgP/kg water)、14倍(71.4 mgP/kg water)で9個体/1シャーレで培養したところ、いずれも菌有り区の方が、成長が早くに進む個体があり、最も大きい個体を含んでいたが、両者に有意な差は見られなかった。従って、リン量は黒ボク土+川砂の場合より、かなり低いが、1倍(5.10 mgP/kg water)で問題無いと考えた。

密度効果: 9個体同時培養より、1個体での培養の方が絶対値としてのサイズは小さいが、菌有り区と菌無し区との間で有意なサイズ差が生じた。

### (2) 最終結果

以上の結果を含め、以下の条件の時に最も良い結果を得ることができた。

#### [ 培養条件 ]

単独培養(1個体/シャーレ)

AM菌胞子: 3種混合(各々10~35個)

M培地のリン濃度: 5.10 ppm

光量:  $11\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

培養期間: 75日間(Jan.19,2023~Apr.4,2023)

#### [ 結果: 配偶体サイズの比較 ]

培養75日目の菌有り区と菌無し区での配偶体の表面積の比較から、菌有り区の配偶体は、菌無し区の配偶体より、有意に大きかった(表、図2、Welch's t-test  $p=0.01$ )。

表 AM 菌有り と AM 菌無し で共培養した  
ゼンマイ配偶体の平均表面積

| 平均表面積 ± SD (mm <sup>2</sup> ) |             |
|-------------------------------|-------------|
| AM菌有り (n=6)                   | 7.04 ± 3.80 |
| AM菌無し (n=5)                   | 1.27 ± 1.24 |

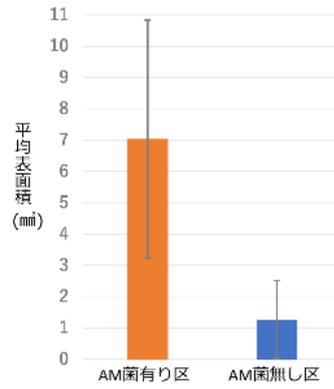


図2 AM 菌有り区と AM 菌無し区の  
ゼンマイ配偶体表面積の比較

培養 40 日目と 75 日目で、同一個体の配偶体を並べた写真 (図 3) を比較すると、培養期間を通じて、菌有り区と菌無し区の成長度合いが大きく異なっていることが分かる。

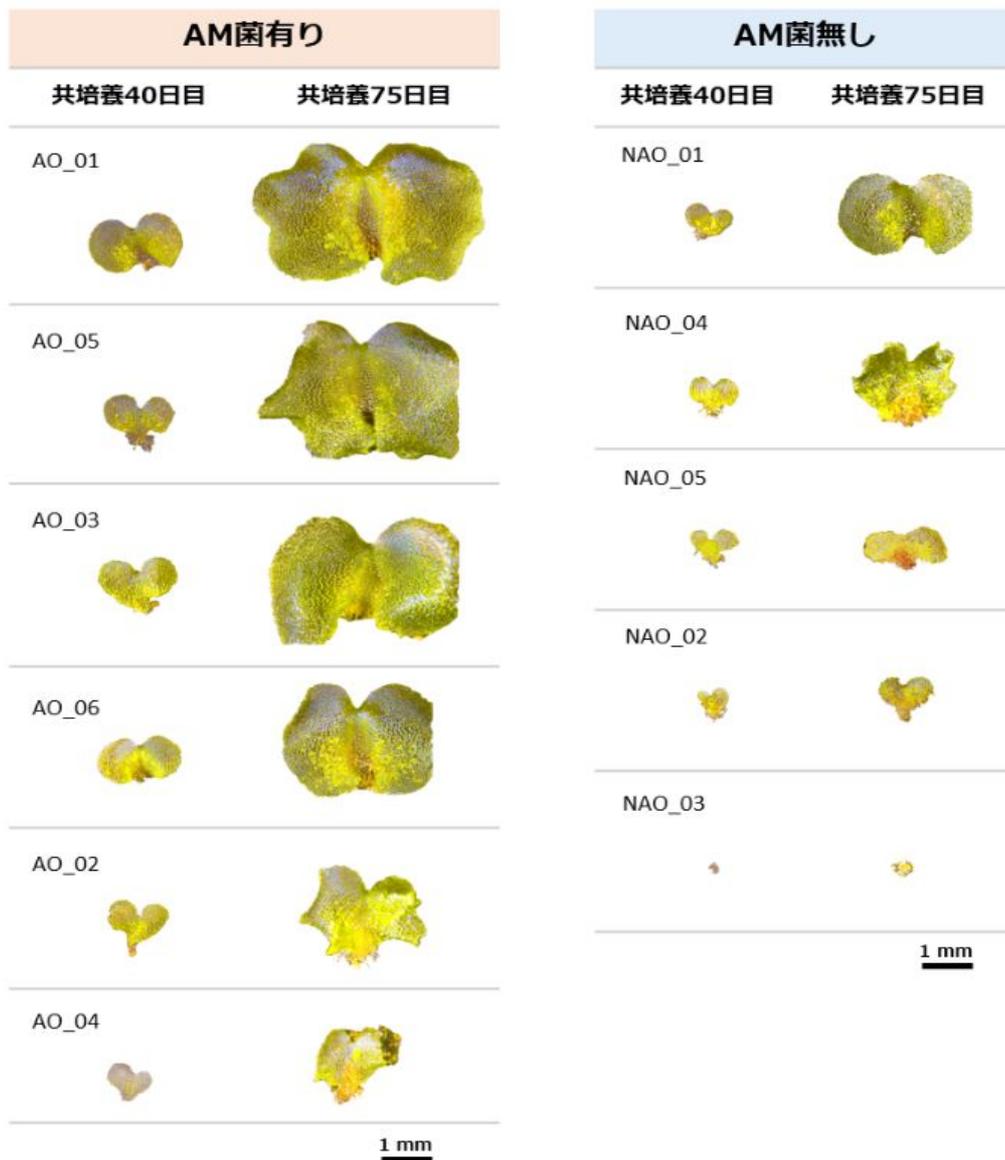


図3 AM 菌有り と AM 菌無し で共培養した共培養 40 日目と 75 日目のゼンマイ配偶体

### (3) 考察

着生種の配偶体を用いた共培養実験の必要性

黒ボク土+川砂の土壤共培養実験では、ゼンマイでは菌有り区と菌無し区の間で 10 倍の面積差が得られているが、本研究での寒天培養系では 6 倍の面積差しか得られなかった。この差を埋めるべく、寒天培養系でのさらなる培養条件検討を行うことは難しいと考える。しかし、土壤共培養系で得られた「着生種の配偶体には菌感染が見られない」という結果を、本実験系でも確認できれば、シダ配偶体の AM 菌との多様な関係を明らかにする上で必要な共培養系が確立できたものと考えられる。

#### 活性炭の役割

活性炭は土壤表面吸着  $P_i$ 、 $P_o$  の存在場所として土壤粒子の代替として寒天培地に添加した。活性炭を含む寒天培地と、含まない寒天培地の両者で、自由水中の可給態 P、土壤表面吸着  $P_i$ 、土壤表面吸着  $P_o$  の量を測定した。その結果、当初の予想と異なり、両培地共に、上記 3 態のリンがほぼ同じ割合で含まれていることがわかった。この結果は、活性炭を含まない寒天培地においても、土壤表面吸着  $P_i$  と土壤表面吸着  $P_o$  が含まれていることを示している。従って、活性炭はリンの吸着場所として役立つのではなく、黒色の活性炭が作る暗い条件が、AM 菌の成長をより促し、その結果、配偶体成長に良い影響を与えた可能性が高い。

#### 引用文献

Declerck S, Fortin JA, Strullu DG. 2005. Invitro Culture of Mycorrhizas. Soil Biology, Vol.4, Springer.

Fonseca HM, Berbara RL, Pereira ML. 2014. Monoxenic cultures of light sensitive arbuscular mycorrhizal fungi with *Lunularia cruciata* (Marchantiopsida). Nova Hedwigia, 98(1-2), 79-87.

Ogura-Tsujita Y, Sakoda A, Ebihara A, Yukawa T, Imaichi R. 2013. Arbuscular mycorrhiza formation in cordate gametophytes of two ferns, *Angiopteris lygodiiifolia* and *Osmunda japonica*. Journal of Plant Research 126: 41-50.

Ogura-Tsujita Y, Yirayama Y, Sakoda A, Suzuki A, Ebihara A, Morita N, Imaichi R,. 2016. Arbuscular mycorrhizal colonization in field-collected terrestrial cordate gametophytes of pre-polypod leptosporangiate ferns (Osmundaceae, Gleicheniaceae, Plagiogyriaceae, Cyatheaceae). Mycorrhiza 26: 87-97.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Ogura-Tsujita Y, Yamamoto K, Hirayama Y, Ebihara A, Morita N, Imaichi R.   | 4. 巻<br>132           |
| 2. 論文標題<br>Fern gametophytes of <i>Angiopteris lygodiifolia</i> and <i>Osmunda japonica</i> harbor diverse <i>Mucoromycotina</i> fungi | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Plant Research  | 6. 最初と最後の頁<br>581-588 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s10265-019-01121-x  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤浪理恵子、岸谷萌加、佐藤洸太、宮崎あかね、櫻井理沙子、今市涼子 |
| 2. 発表標題<br>シダ類配偶体とAM菌の寒天培養法                 |
| 3. 学会等名<br>日本植物学会第86回大会                     |
| 4. 発表年<br>2022年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤浪理恵子、植松真理子、岸谷萌加、今市涼子              |
| 2. 発表標題<br>シダ植物配偶体とアーバスキュラー菌根菌の寒天共培養実験系の確立の試み |
| 3. 学会等名<br>菌根研究会                              |
| 4. 発表年<br>2021年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤浪理恵子、安達理紗子、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<br>シダ類配偶体とAM菌の寒天共培養法の検討                    |
| 3. 学会等名<br>日本植物学会第83回大会                            |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>辻田有紀、平山裕子、山本航平、海老原淳、今市涼子    |
| 2. 発表標題<br>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<br>日本植物学会第82回大会                |
| 4. 発表年<br>2018年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤浪理恵子、植松真理子、安達利紗子、今市涼子         |
| 2. 発表標題<br>シダ植物配偶体とアーバスキュラー菌根菌の寒天共培養実験の試み |
| 3. 学会等名<br>2018年度菌根研究会大会                  |
| 4. 発表年<br>2018年                           |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                       | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 海老原 淳<br><br>(EBIHARA Atsushi)<br><br>(20435738) | 独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹<br><br><br>(82617) |    |
| 研究分担者 | 藤浪 理恵子<br><br>(FUJINAMI Rieko)<br><br>(40580725) | 京都教育大学・教育学部・准教授<br><br><br>(14302)          |    |
| 研究分担者 | 宮崎 あかね<br><br>(MIYAZAKI Akane)<br><br>(80293067) | 日本女子大学・理学部・教授<br><br><br>(32670)            |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|