

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19356

研究課題名（和文）アーバスキュラー菌根ネットワークから有機炭素を得る林床植物の網羅的探索

研究課題名（英文）Exhaustive survey of understory herbaceous plants obtaining organic carbon through arbuscula mycorrhizal networks.

研究代表者

横山 潤（Yokoyama, Jun）

山形大学・理学部・教授

研究者番号：80272011

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：陸上植物では、光合成能力を保持したまま、菌根菌からも有機炭素を得る部分的菌従属栄養植物が知られている。これらの植物は外生菌根菌に依存するラン科やツツジ科で多く見出され、独立栄養植物とは主に炭素の安定同位体比で識別できる。しかし、部分的菌従属栄養がどのくらい一般的な存在かは分かっていない。本研究は、北海道の夏緑樹林を対象とした安定同位体分析から、アーバスキュラー菌根菌（AM菌）に炭素源の一部を依存する林床植物を探索することを目的とした。その結果、部分的菌従属栄養の林床植物が存在すれば、その安定同位体比が大きいことは期待できるが、同位体比だけで栄養摂取様式を推測することは難しいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラン科とツツジ科では、外生菌根菌に依存する部分的菌従属栄養植物が多く見出されており、炭素の安定同位体比が主要な根拠となってきた。一方、大多数の植物種がアーバスキュラー菌根菌（AM菌）と共生しているにも関わらず、AM菌に依存する部分的菌従属栄養植物は積極的に探索されてこなかった。本研究では、部分的菌従属栄養植物の新たな特定には至らなかったが、安定同位体比の有効性と限界について、詳細な検討を行うことができた。

研究成果の概要（英文）：Many green orchids and pyroloids have been found to be partially mycoheterotrophic (i.e. mixotrophic) feeding on ectomycorrhizal fungi associated with surrounding trees. Whereas many fully mycoheterotrophic plants feed on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, the prevalence of mixotrophy in AM plants is still debated. We investigated ^{13}C and ^{15}N isotopic abundances of understory plants, canopy trees, and AM fungi in a Japanese temperate forest to explore potential mixotrophic understory plant species. Our results suggest that isotopic abundances are of limited help in finding potential mixotrophs that feed on AM fungi, even though mixotrophic species, if any, are likely to be enriched in ^{13}C .

研究分野：多様性生物学

キーワード：安定同位体 栄養摂取様式 菌根菌ネットワーク 菌従属栄養植物 森林群集

1. 研究開始当初の背景

多くの陸上植物は根圏で菌根菌と共生し、植物は有機炭素（光合成産物）を菌根菌に提供する代わりに、菌根菌から栄養分や水を得ている。一般に、菌根菌の宿主特異性は低いため、土壤中では多くの植物種が菌根菌を介して繋がるネットワークが存在し、植物個体間で炭素や窒素の交換が起こることも知られている。しかし、菌根ネットワークを介した物質動態については、未解明の部分が多い。

陸上植物では、光合成能力を失い、菌根菌から有機炭素を得る「完全菌従属栄養」が繰り返し進化してきた。例えば、樹木の外生菌根菌に炭素源を依存するラン科のムヨウランやツツジ科のギンリョウソウは、菌根ネットワークを介して間接的に近隣の樹木から有機炭素を得ている。さらに近年、これらの分類群では、光合成能力を保持したまま、菌根菌からも有機炭素を得る「部分的菌従属栄養」の植物が見出された。部分的菌従属栄養植物は、外見では独立栄養の植物と識別できないが、外生菌根菌（子実体）の炭素安定同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）が宿主植物よりも大きいことから、独立栄養の植物に比べて $\delta^{13}\text{C}$ が大きな植物は、炭素源の一部を菌に依存していることが分かる（図1；Hynson *et al.*, 2013; Selosse *et al.*, 2017）。しかし、部分的菌従属栄養がどのくらい一般的な存在なのかは分かっていない。

大多数の植物種はアーバスキュラー菌根菌（以下、AM 菌）と共生しているにも関わらず、AM 菌に依存する部分的菌従属栄養植物は、近年まで積極的に探索されてこなかった。その理由として、（1）AM 菌は子実体をつくらないため、その安定同位体比を測定するためには微細な孢子（50~300 μm ）を土壤中から大量に単離する必要がある、（2）実験系では AM 菌と宿主植物の $\delta^{13}\text{C}$ に顕著な違いが見られない、という問題が挙げられる。しかし（2）に関して、森林生態系においては分解者が土壌から放出する CO_2 の影響により、林床から林冠に向かって $\delta^{13}\text{C}\text{CO}_2$ が大きくなる垂直勾配が存在する（Hanba *et al.*, 1997）。AM 菌は ^{13}C を多く含む CO_2 を吸収する樹木が主な炭素源だと考えられるため、宿主植物とは $\delta^{13}\text{C}$ に違いが無くても、独立栄養の林床植物と $\delta^{13}\text{C}$ で識別できる（すなわち、林床植物の炭素源を $\delta^{13}\text{C}$ で識別できる）可能性がある。また、林床植物は夏季に光が著しく制限される環境で生育しており、年によって地上部をつくらない特殊な休眠様式が報告されていることから AM 菌からの炭素供給が疑われる。

2. 研究の目的

本研究は、北海道の夏緑樹林を対象として、AM 菌に炭素源を依存する部分的菌従属栄養植物を、大規模な安定同位体分析により探索することを目的として行った。

3. 研究の方法

ヤチダモやハルニレ、イタヤカエデが優占する北海道の夏緑樹林に 12ヶ所の調査区を設置し、これらの樹種および 30 種の林床植物から葉を採集した。また、土壌を採取し、密度勾配遠心法を用いて AM 菌の孢子大量に単離した。得られた試料に対して、炭素および窒素の安定同位体比を元素分析 / 同位体比質量分析計（EA-IRMS）により分析した。AM 菌孢子については、約 700 個の孢子から DNA を抽出し、rRNA 遺伝子の部分塩基配列（約 215 bp；Sato *et al.*, 2005）を PCR 増幅し、次世代シーケンシングを用いた DNA メタバーコーディング分析により属を同定した。

各試料の安定同位体比は、標準物質における安定同位体比との差として $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N} = (\text{R}_{\text{試料}}/\text{R}_{\text{標準物質}} - 1) \times 1000$ (‰) のように表される（R は $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ または $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ）。調査区による安定同位体比の違いを補正するため、各試料を採取した調査区における林床植物の平均値を基準とした偏差（enrichment factors, $\epsilon^{13}\text{C}$ および $\epsilon^{15}\text{N}$; Preiss & Gebauer, 2008）を算出し、この値をデータ解析に用いた。また林床植物は、試料が十分に得られた 24 種を解析の対象とした。

林床植物 24 種からは細根をあわせて採取し、トリパンブルーで染色した後、生物顕微鏡下で AM 菌感染率（共生の程度）を測定した。また、菌根の観察に基づき、各植物種の菌根を形態型（Paris 型もしくは Arum 型; Dickson *et al.*, 2007）に分類した。

4. 研究成果

本研究の成果の概要は以下のとおりである。

（1）土壌から単離した孢子には *Glomus* 属や *Claroideoglomus* 属、*Scutellospora* 属、*Acaulospora* 属などの AM 菌が含まれていた。同じ調査地を対象として、50 種を超える植物と共生する AM 菌群集を比較した研究でも、これらの属を含む多様な菌種（Operational Taxonomic Units）が見出されている（未発表）。

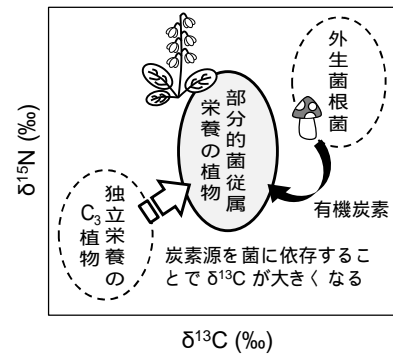


図1. 外生菌根菌と共生するラン科やツツジ科では、2種類の炭素源が安定同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）で識別できることを利用して、部分的菌従属栄養の植物が見出されている。

(2) AM 菌の炭素安定同位体比 ($\epsilon^{13}\text{C}$) は、林床植物の平均値よりも有意に大きく ($2.99 \pm 0.26 \text{ ‰}$; mean $\pm 1 \text{ SD}$)、林冠木 ($3.55 \pm 1.10 \text{ ‰}$) とは有意差が無かった(図2)。この結果は、林床から林冠に向かって $^{13}\text{CO}_2$ が大きくなる垂直勾配が存在すること、林冠木が AM 菌の主な炭素源であることを反映していると考えられる。また、AM 菌と密接に共生していた幾つかの林床植物種では $\epsilon^{13}\text{C}$ が顕著に大きかったが、その中でもギョウジャニンニクの $\epsilon^{13}\text{C}$ ($2.92 \pm 0.33 \text{ ‰}$) は AM 菌とほぼ同じ値を示した。その他にも、フッキソウ ($2.34 \pm 0.96 \text{ ‰}$) やバイケイソウ ($2.32 \pm 0.62 \text{ ‰}$)、オオバナノエンレイソウ ($2.15 \pm 0.57 \text{ ‰}$) などで $\epsilon^{13}\text{C}$ が大きかった。

もし林床植物の $\epsilon^{13}\text{C}$ が主に栄養摂取様式を反映しているとするれば、ギョウジャニンニクでは AM 菌に炭素源のほとんどを依存していることになる。これは現実的ではないことから、林床植物の $\epsilon^{13}\text{C}$ は炭素源以外にも他の要因をあわせて反映している可能性が高い。つまり、もし炭素源の一部を AM 菌に依存する林床植物が存在すれば、その $\epsilon^{13}\text{C}$ が大きくなることは期待できるが、 $\epsilon^{13}\text{C}$ だけで栄養摂取様式を推測することは難しいと考えられた。

(3) 本研究で対象とした林床植物 24 種は Paris 型と Arum 型、菌根をつくらない 3 つのタイプに分類できた(図3)。本研究の開始後、大きな安定同位体比を示す Paris 型の林床植物が部分的菌従属栄養である可能性が学術誌上で議論されている (Giesemann *et al.*, 2020, 2021)。本研究でも、Paris 型の AM 菌根をつくる林床植物で、炭素および窒素の安定同位体比 ($\epsilon^{13}\text{C}$ および $\epsilon^{15}\text{N}$) が大きくなる傾向が見られたが、安定同位体比が顕著に大きかった植物種には両方の形態型が含まれていた。また、AM 菌感染率と安定同位体比との間には正の相関関係が見られ、この傾向は対象種間の系統関係を考慮した場合も統計学的に有意だった。したがって、炭素および窒素の安定同位体比は、菌根共生による炭素および窒素の獲得を含む何らかの利益を反映している可能性はあるが、AM 菌に炭素源を依存する部分的菌従属栄養植物であるかについては、さらに慎重な検討が必要だと考えられた。

本研究では、AM 菌に炭素源を依存する部分的菌従属栄養植物を特定するには至らなかったが、安定同位体比の有効性と限界について詳細に検討を行ったことで、当初の目的をある程度は達成できたものとする。

引用文献

Dickson S, Smith FA, Smith SE. 2007. Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more

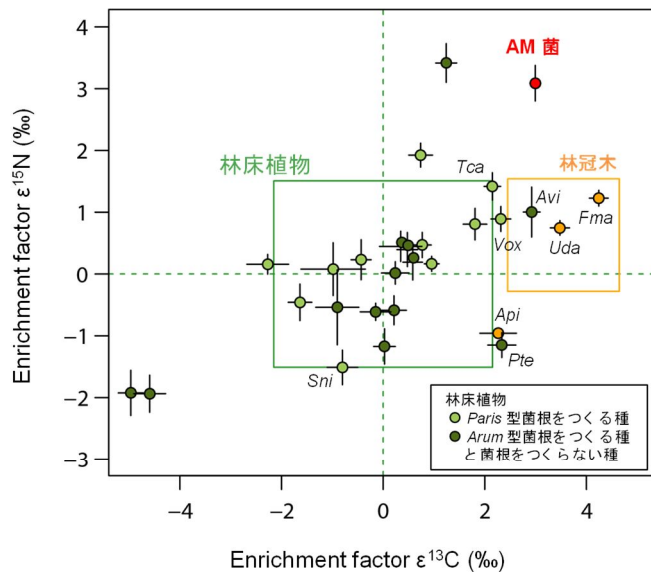


図2. AM菌(赤)と林冠木(オレンジ)、林床植物(薄い緑と濃い緑)における炭素と窒素の安定同位体比。安定同位体比は、林床植物の平均値に対する偏差(enrichment factor, 平均 $\pm 1 \text{ SE}$)として示す。オレンジ色と緑色の四角は、それぞれ林冠木と林床植物全体の平均 $\pm 1 \text{ SD}$ の範囲を表す。本文中で取り上げた植物種にはラベルを示した。

Api: イタヤカエデ, Avi: ギョウジャニンニク, Fma: ヤチダモ, Pte: フッキソウ, Tca: オオバナノエンレイソウ, Sni: ミヤコザサ, Uda: ハルニレ, Vox: バイケイソウ

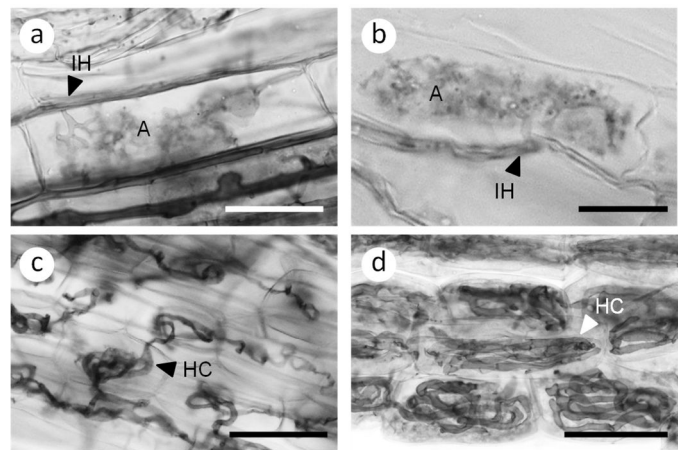


図3. 本研究で対象とした林床植物で観察されたアーバスキュラー菌根。(a)ギョウジャニンニク、(b)フッキソウ、(c)オオバナノエンレイソウ、(d)ミヤコザサ。(a)や(b)はArum型で、皮層細胞間を走る菌糸(IH)から枝分かれした樹枝状体(A)が見られる。それに対して(c)や(d)はParis型で、菌糸が渦を巻きながら細胞から細胞へ伸びるコイル(HC)が見られる

- than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza* 17: 375–393.
- Giesemann P, Rasmussen HN, Liebel HT, Gebauer G. 2020. Discreet heterotrophs: green plants that receive fungal carbon through *Paris*-type arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 226: 960–966.
- Giesemann P, Rasmussen HN, Gebauer G. 2021. Partial mycoheterotrophy is common among chlorophyllous plants with *Paris*-type arbuscular mycorrhiza. *Annals of Botany*, in press.
- Hanba YT, Mori S, Lei TT, Koike T, Wada E. 1997. Variations in leaf ¹³C along a vertical profile of irradiance in a temperate Japanese forest. *Oecologia* 110: 253–261.
- Hynson NA, Madsen TP, Selosse M-A, Adam IKU, Ogura-Tsujita Y, Roy M, Gebauer G. 2013. The Physiological Ecology of Mycoheterotrophy. In: Merckx V, ed. *Mycoheterotrophy*. New York, NY: Springer New York, 297–342.
- Preiss K, Gebauer G. 2008. A methodological approach to improve estimates of nutrient gains by partially myco-heterotrophic plants. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 44: 393–401.
- Sato K, Suyama Y, Saito M, Sugawara K. 2005. A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis. *Grassland Science* 51: 179–181.
- Selosse M-A, Bocayuva MF, Kasuya MCM, Courty P-E. 2017. Mixotrophy in mycorrhizal plants: extracting carbon from mycorrhizal networks. In: Martin F, ed. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 451–471.

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 Suetsugu, K., Matsubayashi, J., Ogawa, N.O., Murata, S., Sato, R. and Tomimatsu, H.	4. 巻 193
2. 論文標題 Isotopic evidence of arbuscular mycorrhizal cheating in a grassland gentian species.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oecologia	6. 最初と最後の頁 929-937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00442-020-04631-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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村田 怜, 橋本 靖, 山岸 洋貴, 横山 潤, 富松 裕
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌に炭素源を部分的に依存する林床植物の安定同位体分析による探索.
3. 学会等名 日本生態学会東北地区会第64回大会（盛岡）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 怜, 橋本 靖, 山岸 洋貴, 横山 潤, 富松 裕
2. 発表標題 夏緑樹林における植物群集とアーバスキュラー菌根菌の安定同位体分析
3. 学会等名 第50回種生物学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murata, S., Hashimoto, Y., Yamagishi, H., Yokoyama, J., Tomimatsu, H.
2. 発表標題 Isotopic analysis of plants in a temperate forest community: Do any understory plants extract carbon from arbuscular mycorrhizal fungi?
3. 学会等名 International Symposium on Rapid Evolutionary Change of Invertebrates, Plants, and their Interactions under Ecological Disturbance（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 怜, 橋本 靖, 山岸 洋貴, 横山 潤, 富松 裕
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌から有機炭素を得る林床植物の安定同位体分析による探索
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
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	富松 裕 (Tomimatsu Hiroshi) (40555398)	山形大学・理学部・教授 (11501)	

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
---------	---------