

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06815

研究課題名(和文)クモキリソウ節(ラン科)の進化における菌根菌の変化と菌根形成過程の解明

研究課題名(英文)Studies on shifts of mycorrhizal fungi and symbiotic germination process in sect. *Liparis* (Orchidaceae)

研究代表者

堤 千絵 (Tsutsumi, Chie)

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：30455422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本のクモキリソウ節植物を用いて、植物の進化に伴う菌根菌の変化と、菌パートナーのシフトに伴う菌根形成過程の変化を明らかにすることを目的に、菌根菌の分子系統解析、共生培養実験、形態学的調査等を行った。これらの植物は、菌根菌に対して高い特異性を持ち、植物の系統ごとに異なる *Tulasnella* のグループを菌パートナーとすることから、*Tulasnella* グループ内で菌根菌パートナーを変えながら多様化したと考えられる。さらにスズムシソウの共生培養下での胚発生の内部構造観察から、発芽時における菌根菌の成立過程には複数の段階があり、非スズムシソウ菌種とではいずれか特定の段階で共生が妨げられると推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ランと菌根菌に関する研究例は多々あるが、系統関係を考慮し共生培養実験により定量的に菌に対する特異性を調べた研究例は少ない。本研究では、植物と菌、両者の系統関係を考慮し、共生培養実験を重ねて、植物の進化と菌根菌の変化を推定した。さらにスズムシソウの共生胚の細胞内動態の調査から、種子発芽時における菌根共生の成立には、菌糸の侵入、胚の基部側細胞での菌糸の制御、その後の活発な胚細胞分裂が関与していること、スズムシソウでは非適合な菌とでは特定の段階で停止することが明らかとなった。今後スズムシソウは、菌根共生の成立過程における遺伝的なメカニズムの解明など、さまざまな研究への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To clarify shifts of mycorrhizal partners and changes in symbiotic germination processes in *Liparis* sect. *Liparis*, molecular analyses on mycorrhizal fungi, symbiotic germination experiments, and anatomical studies on symbiotic embryos were conducted using Japanese *Liparis* species. The results of molecular analyses and symbiotic experiments suggested that the *Liparis* species had high specificity for its mycorrhizal partners and the plants in different lineages were associated with different *Tulasnella* strains. Therefore the plants likely diversified with changes in mycorrhizal partners. The anatomical study on symbiotic embryo development in *L. suzumushi* inferred that the symbiotic process proceeded through hyphal invasion, hyphal control in the basal part, and then appearance of meristematic cells in the apical part of the embryo. The symbiotic process stopped at a specific stage when the seeds of *L. suzumushi* were cultivated with incompatible fungi.

研究分野：多様性生物学

キーワード：菌根菌 系統解析 ラン科クモキリソウ属

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2000年代以降、分子同定が容易になり、菌根菌の多様性に関する研究はめざましく進んでいる。ラン科植物の菌根菌についても同様に、国内外で研究が進んでいるが、植物や菌の系統関係を考慮し、共生培養によりランの菌根菌に対する特異性を明らかにした研究例は少ない。

ラン科植物の一部種では、初期発生における細胞内の菌の詳細な動態が研究されている (Burgeff 1959; Uetake et al. 1992; Smith & Read 2008 など)。しかし、菌根共生系が成立しない、あるいは途中で停止する条件下での詳細な内部構造の観察は不十分である。菌根菌の分子同定や系統解析が容易になった現在、菌種ごとにどの発生ステージで生育が停止するかを詳細に解析することで、菌根菌パートナーシフトに伴い、植物の個体発生時における菌根の形成過程がどのように変化したかを調査することが可能になっている。

2. 研究の目的

本研究では、生育特性(生活型、生育地、分布範囲など)が多様な日本のクモキリソウ節植物を用いて、分子系統解析、共生培養実験、形態学的調査等を行い、植物の進化に伴う菌根菌の変化と、菌パートナーのシフトに伴う菌根形成過程の変化を明らかにする。共生培養実験では、植物と菌の系統を考慮してさまざまな菌種と植物を用い、植物の菌根菌に対する種特異性を *in vitro* で検証するとともに、共生系が成立しない場合、どの発生ステージで生育が停止するか、成立する場合と比べて、植物細胞内における菌根菌の動態や発現遺伝子にどのような違いがあるか調査する。共生培養により得られた植物と菌の共生体は、超低温保存法による保全開発に應用する。

3. 研究の方法

(1) 菌根菌の分子系統解析

日本に生育するクモキリソウ節植物における菌根菌パートナーの系統関係を明らかにするため、植物を採集し、菌根菌の単離と分子同定、分子系統解析を行う。すでに明らかになっている植物の系統と、今回明らかにする菌の系統関係の比較や、植物における菌根菌パートナーに対する種特異性のレベルなどを調査し、植物の進化に伴い、菌パートナーはどのように変化してきたかを明らかにする。

(2) 共生培養実験と形態学的調査等

植物と菌の系統を考慮した上で、さまざまな菌種と植物との共生培養試験を行い、発芽率等の比較から、菌根菌に対する適合度や種特異性がどのくらい高いかを定量的に調査する。(1)の結果と合わせ、植物の菌根菌に対する種特異性の変化を明らかにする。また、共生系が成立しない場合、どのステージで植物の発生が停止するかを確かめる。発生が停止するステージを中心に準超薄切片を作成し、植物細胞内における菌根菌の動態を調査し、成立する場合と比較して、どのような違いがあるのかを明らかにする。ステージや部位が特定できたのち、発生が停止する段階ではどのような遺伝学的機構が働いているか、RNA-Seq法などトランスクリプトーム解析によるゲノムの発現パターンの違いを明らかにする研究に着手する。

(3) 「植物と菌の共生体」での保全手法開発

共生培養実験により得られる、植物と菌根菌が共生した「共生体」を使用して、アルミニウムクライオプレート法(山本ら、2012)を用いた超低温保存法により、植物と菌の共生体を長期保存する技術を開発する。

4. 研究成果

(1) 菌根菌の分子系統解析

スズムシソウ、アキタスズムシソウ、フガクスズムシソウ、クロクモキリソウ、クモキリソウ、ジガバチソウ、ギボウシラン等の成体から菌根菌を単離し分子同定を行った。結果、いずれからも *Tulasnella* (担子菌門) Group II sensu Cruz et al. (2014) が検出された。植物と菌それぞれの系統を比較すると、植物の系統が異なると、検出される *Tulasnella* の系統も異なっていたことから、クモキリソウ節では、植物の系統ごとに菌根菌の系統も異なると推定された。

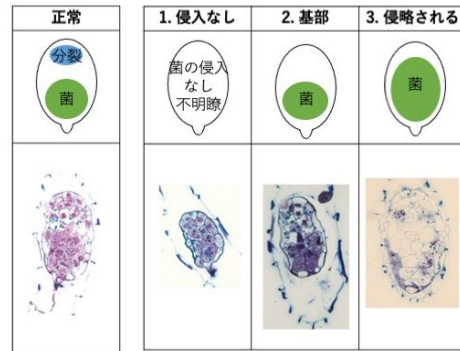
(2) 共生培養実験と形態学的調査等

クモキリソウ節植物の主要な系統を代表する種で、かつ種子が多く入手できたスズムシソウ、クモキリソウ、ジガバチソウを用いて、得られた複数の *Tulasnella* の菌と共生培養を行い発芽率を比較した。その結果、同種の成体から単離された菌や、それと極めて類縁な系統関係にある菌と共生させた場合でのみ高い発芽率を得た。このことから解析したクモキリソウ節植物では、種子から成体にいたるまで菌パートナーは *Tulasnella* であり、菌根菌に対して高い特異性を持

つと推定された。分子系統解析の結果と合わせるとクモキリソウ節植物は、*Tulasnella* の類縁なグループの中で菌根菌パートナーが変化しつつ多様化してきたと考えられる。

スズムシソウを用いて、本来の菌以外ではどのステージで発生が停止しているのかを詳細に調べるため、準超薄切片を作成し胚の内部構造を経過観察した。スズムシソウの種子とスズムシソウの菌を共生培養すると、培養開始後 12 週で発芽率は 6 割を超え、生育した胚の内部では、他のラン科植物の先行研究と同様に、基部細胞から胚に菌糸が進入し、基部側の胚細胞内で菌糸が塊状となる様子が観察された。胚の先端側では、菌糸は観察されず、植物細胞分裂が活性化し、胚が成長していく様子が観察された。未発芽のままの胚では図のように、1. 胚に菌糸が見られない(侵入なし)、2. 胚の基部側の柔組織内で多数の菌糸が見られるが胚の細胞分裂活性は見られない(基部)、3. 胚の先端部にまで菌糸が侵入するパターンが観察された(侵略される)。スズムシソウ本来の菌と類縁な、シマクモキリソウから単離された菌と共生培養すると、発芽はほぼ見られず、培養 6 週ではパターン 2、培養 12 週ではパターン 3 の胚が多く観察され、胚が徐々に菌に侵略されていくと考えられた。スズムシソウ本来の菌と系統がやや離れたクモキリソウから単離された菌と共生培養すると、発芽は見られず、培養開始後 12 週目でもパターン 1 の胚が多く観察された。このことからスズムシソウの菌共生による発芽・生育には、菌糸の侵入、胚の基部側細胞での菌糸の制御、活発な胚細胞分裂が深くかかわっており、非スズムシソウ菌種ではいずれか特定の段階で共生が妨げられると推定された。

胚内部への菌の侵入度合い



共生過程が進む各段階において、どのような遺伝的機構が働いているのかをトランスクリプトーム解析により明らかにするため、微小な種子や共生体からの RNA 抽出法を確立した。本来の菌と正常に発生する段階と、不適合な菌と発芽前に停止する段階など、複数の種子や共生体ステージから RNA を抽出し、一部において RNA-Seq 法による解析を行った。

(3) 「植物と菌の共生体」での保全手法開発

多くの種子が得られたクモキリソウとジガバチソウについて、種子を本来の菌と共生させて発芽させた共生体を用いて、アルミニウムクライオプレート法による超低温保存試験を行った。結果、菌は超低温保存後も生育するものの、植物が生育する様子は観察できなかった。使用する薬剤耐性を検証するため、超低温保存の工程のみ除いて試験を行ったところ、ジガバチソウではおよそ 5 割で共生体の生育が観察されたことから、使用する薬剤の影響は少ないと考えられた。共生体の超低温下での保全手法開発には、とくに植物における超低温過程後の生育を可能にするためのさらなる条件検討が必要である。

引用文献

- Burgeff, H. 1959. Mycorrhiza of Orchids. In: The Orchids. A Scientific Survey (Ed. by C. L. Withner). pp. 361–395. Roland Press Company, New York.
- Smith, S. E., Read, D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd Edition, Academic Press, London.
- Cruz, D., Suárez, P. K., Kottke, I., Piepenbring, M. 2014. Cryptic species revealed by molecular phylogenetic analysis of sequences obtained from basidiomata of *Tulasnella*. *Mycologia*, 106: 708–722.
- Uetake, U., Kobayashi, K., Ogoshi, A. 1992. Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) protocorms associated with binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group C. *Mycological Research*. 96: 199–209.
- 山本 伸一, Tariq Rafique, 福井 邦明, 関沢健太郎, 小山 朗夫, 市橋 隆壽, 新野 孝男 2012. アルミニウムクライオプレートを用いた熱帯・亜熱帯原産クワ培養茎頂の超低温保存法の開発. *蚕糸・昆虫バイオテック*. 81: 57–62.

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 Chie Tsutsumi Tsuyoshi Hosoya, Yumi Yamashita and Tomohisa Yukawa	4. 巻 48
2. 論文標題 Mycorrhizal Fungi Isolated from Liparis krameri (Orchidaceae) in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堤千絵・平山裕美子・加藤雅啓・遊川知久
2. 発表標題 スズムシソウ（ラン科）種子発芽時の菌種による共生プロセスの形態比較
3. 学会等名 日本植物分類学会第20回大会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤千絵*・平山裕美子・細矢剛・加藤雅啓・遊川知久
2. 発表標題 クモキリソウ属クモキリソウ節の進化に伴う菌根菌の変化
3. 学会等名 日本植物分類学会第19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
研究協力者	遊川 知久 (Yukawa Tomohisa)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	細矢 剛 (Hosoya Tsuyoshi)		
研究協力者	山本 伸一 (Yamamoto Shinichi)		

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