

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370039

研究課題名(和文) 従属栄養植物における植物 菌根菌 エンドファイトの三者系のダイナミクスの進化

研究課題名(英文) Evolution of dynamics of plant-mycorrhizal fungi-endophyte triadic relationships in heterotrophic plants

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) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：菌寄生植物は従属栄養性の植物群で、菌根菌からの炭素源供給に頼って生育している。従属栄養性の進化の過程での、植物 菌根菌 エンドファイト菌の三者系ダイナミクスの変化は解析されてこなかった。本研究では、複数の系統を対象に、エンドファイト菌が三者系で果たす役割の変化に注目して研究を行った。4つの系統群を用いた菌類相解析では、構成種が従属栄養化に伴って少なくなった。エンドファイト菌の種間には、干渉的競合関係が示唆された。MYB72、NPR1遺伝子の発現量には明瞭な傾向は見られず、エンドファイト菌の役割の変化は小さいと考えられた。従属栄養性の進化の過程で、三者系が単純化していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Myco-heterotrophic plants depend on fungi for their carbon resources. Studies on evolutionary changes of dynamics of plant-mycorrhizal fungi-endophyte triadic relationships in heterotrophic plant evolution have not been conducted so far. In this study, we focused on the evolutionary changes of the role of endophytes in the triadic relationships. Analyses on fungal flora in four phylogenetic groups of angiosperms revealed the reduction of species diversity during the evolution of heterotrophy. Interference competition was observed among some endophytes. Expressions of genes for MYB72 and NPR1 were not obviously different among plant species and, thus, the role change of endophytes seems to be small. Simplification of the triadic relationships was occurred during the evolution of myco-heterotrophy in angiosperms.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：エンドファイト菌 菌根菌 菌寄生植物 共棲 相互作用 共生 寄生

1. 研究開始当初の背景

植物の中には、他の生物に炭素源を一部または完全に依存して生育する従属栄養性のグループが知られている。寄生植物や菌寄生植物(腐生植物・混合栄養植物を含む)がこれに対応し、前者は他の植物から直接、後者は菌根菌を介して他の植物や腐植などから炭素源を得ている。これら従属栄養性の植物は、光合成能の消失に伴う生理的な変化の他、特異な形態の進化(*Rafflesia* など: Davis et al., 2007, *Science* 315: 1812)、分子進化速度の極端な上昇(Barkman et al., 2004, *PNAS* 101: 787-792)、寄主からの遺伝子の水平伝搬(Davis & Wurdack, 2004, *Science* 305: 676-678)、寄主との共進化(Merckx et al., 2008, *Proc.R.Soc.B* 275: 1029-1035)など、きわめて興味深い現象を多数内包しており、植物の進化を研究する上で貴重な材料となっている。

特に菌寄生植物は、様々な栄養摂取段階の比較研究が可能であることから、植物の従属栄養性の進化を研究する好適な材料である。完全従属栄養性の菌寄生植物は全世界で400種程度であるが、光合成も行い部分的に炭素源を菌類に依存する混合栄養性の種の発見によって、菌寄生植物の種数は格段に増加し、より普遍的な栄養摂取様式である可能性が高くなった。従属栄養性の進化には、これまで菌根菌パートナーの変化や特定の菌根菌への特殊化が関連していることが示されてきた。しかし一方で、パートナーシップの目立った変化がない場合や、逆に特異性が低くなった例もあり、菌根菌とのパートナーシップの変化は、従属栄養性の進化に常に決定的な影響を与えているとはいえなくなっており、他の進化的要因の探索が求められる。

一方、植物には菌根菌以外にエンドファイト菌という重要な共生パートナーが存在する。エンドファイト菌は植物に病原性を示すことなく体内で生育する菌をさし、様々な植物に普遍的に存在している。エンドファイト菌は植物の乾燥・重金属耐性や耐病性、被食防御機構の誘導に関わっており(Omacini et al., 2001, *Nature* 409: 78-81; Arnold et al., 2003, *PNAS* 100: 15649-15654) 根に存在するエンドファイト菌は根の発達を促進することも知られている(Harman et al., 2004, *Nature Review Microbiology* 2: 43-56)。菌寄生植物のエンドファイト菌の報告は極めて限られているが(Vincenot et al., 2008, *Mycorrhiza* 19: 15-25) 申請者らの予察的調査からは、少なくともいくつかの菌寄生植物には普遍的に存在することがわかってきている。

エンドファイト菌は、同じ植物に感染して炭素源を得ている点で、菌根菌の競争者となりうる(Keenan et al., 2008, *Oikos* 117: 310-320)。アーバスキュラー菌根菌との関係では菌根菌を死なせてしまうこともあり、菌根菌の寄生者となることもある(De Jaeger et al., 2010, *FEMS Microbiology Ecology* 73: 312-322)。一方で根の発達を促進し、植物体

の防御機構の誘導に寄与している点で、共生者にもなりうる(Victoria Novas et al., 2009, *Mycological Progress* 8: 75-81)。一般的な植物が光合成で得た炭素源を用いて、役割の異なる各種の菌類を共生させているのに対して、菌寄生植物の進化の過程では、炭素供給源が植物から菌根菌に変化しており、エンドファイト菌が菌根菌の競争者、寄生者となっている状況では、植物-菌根菌-エンドファイト菌の三者間の関係にも変化が生じると考えられる。また、菌寄生植物はその進化の過程で、地上部の存在期間の極端な短縮や、根の発達または極端な退化など、様々な形態・生活史特性の変化を遂げている。エンドファイト菌が植物体の防御機構の誘導や根の発達と関連があることを考えると、このような変化も三者系のダイナミクスに影響を与えている可能性がある。しかし、菌寄生植物における植物-菌根菌-エンドファイト菌の三者間の関係については、これまで全く研究されたことがなく、特に菌寄生植物の進化の過程で、エンドファイト菌の役割がどのように変化し、その結果植物の進化にどのような影響を与えたのかを明らかにする研究はこれまでに例がない。

2. 研究の目的

本研究では、従属栄養植物の一群である菌寄生植物と、類縁関係にある独立栄養植物を対象に、研究期間内に次の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) それぞれの植物の菌根菌およびエンドファイト菌フロラはどのような種で構成されているのか。
- (2) 独立栄養性から従属栄養性の進化の過程で、植物体内での菌根菌とエンドファイト菌の相対的な現存量はどのように変化しているのか。
- (3) 栄養摂取様式の進化に伴い、エンドファイト菌の果たす役割はどのように変化しているのか。

(1)については、対象植物の菌根菌およびエンドファイト菌の分子同定を行い、フロラ構成を明らかにするとともに、植物種間でフロラの比較を行なう。(2)については、それぞれの菌類の植物体内での現存量を定量PCR法によって解析し、対応する独立栄養性種と従属栄養性種とで量的な差異を比較する。(3)については、エンドファイト菌によって植物体の防御機構が誘導される際に発現する転写因子MYB72および転写制御因子NPR1に注目し、これらの遺伝子の発現量と(2)で得られた現存量を指標として、エンドファイト菌の三者系のダイナミクスに果たす役割を評価する。

3. 研究の方法

研究材料として、独立栄養性植物-従属栄養性植物の組み合わせを含むラン科(Orchidaceae) ツツジ科(Ericaceae) ギン

リョウソウ亜科 Monotropoideae)、リンドウ科 (Gentianaceae)、ビャクブ科 (Stemonaceae) - ホンゴウソウ科 (Triuridaceae) (ビャクブ科はホンゴウソウ科の姉妹群)を用いた。

(1) 対象植物の菌根菌およびエンドファイト菌フロアの解明

各対象植物を地上部が十分成長した適期に採集する。採集した植物は実験室に持ち帰り、根と地上部にわけて、それぞれから DNA を抽出して、核リボソーム RNA 遺伝子間の ITS 領域を増幅するプライマーを用いて PCR 法で増幅を行なった。得られた増幅産物をクローニングし、各クローンの塩基配列を決定して、国際データベースに登録されている配列と比較して菌の分子同定を行なった。これと平行して、エタノールと次亜塩素酸で表面殺菌を行なった植物試料を培地に展開して、エンドファイト菌及び菌根菌(培養可能なもののみ)の単離を行なった。また、独立栄養性の植物については、種子を適期に採集し、表面殺菌の後に無菌培地上で発芽させ、培養株の作成を試みた。

(2) 対象植物生体内の各種菌類の現存量の推定

(1)で明らかになった菌類フロアから、各種菌根菌およびエンドファイト菌に特異的なプライマーを作成し、定量 PCR による各種菌類の現存量推定を行なった。得られたデータをそれぞれの独立栄養-従属栄養植物の組み合わせで比較し、独立栄養性から従属栄養性への進化の過程で、菌根菌およびエンドファイト菌の現存量がどのように変化したか、また、その変化と形態的・生活史特性の違いとの間に関連性があるかどうかを検討した

(3) 対象植物における防御機構に関わる遺伝子の塩基配列の比較

(1)で抽出した DNA を用いて、対象植物の MYB72 および NPR1 遺伝子の塩基配列を決定した。プライマーは既知の配列から設計し、得られた PCR 産物をクローニングして、MYB72 のオルソログである事を確認した。

(4) 対象植物におけるエンドファイト菌の防御機構誘導能の評価

対象植物について、新たに自生地から採集し、根および地上部から mRNA を抽出した。作成したプライマーを用いて、RT-定量 PCR によって MYB72 および NPR1 遺伝子の発現量解析を行った。これと平行して、無菌培養株を作成した 4 種の独立栄養性植物については、菌根菌とエンドファイト菌を共感染させて、感染成立後に野外サンプルと同様に DNA および mRNA を抽出し、定量 PCR によって各種菌類の現存量および MYB72 および NPR1 遺伝子の発現量解析を行う。これを野外サンプルの結果と比較して、野外と同様の植物-

エンドファイト相もグループによって大きく異なり、ラン科、ビャクブ科-ホンゴウソウ科では単純な種構成であったのに対し、リンドウ科、ツツジ科では単離される菌群の多様性が高い傾向が見られた。菌根菌-エンドファイト菌の三者系が実験室でも再構築後できるのかを検討した。

4. 研究成果

(1) 対象植物の菌根菌およびエンドファイト菌フロアの解明

本研究では前述の通り独立栄養植物と従属栄養植物を含む 4 群(ラン科、リンドウ科、ツツジ科、ビャクブ科-ホンゴウソウ科)の系統群を用いて、まず菌根菌およびエンドファイト菌フロアの解析を行った。

菌根菌はラン科では担子菌 (Sakamoto et al., in press)、ツツジ科では担子菌と子の菌であったのに対し、リンドウ科とビャクブ科-ホンゴウソウ科ではグロムス菌類であった(図 1)。

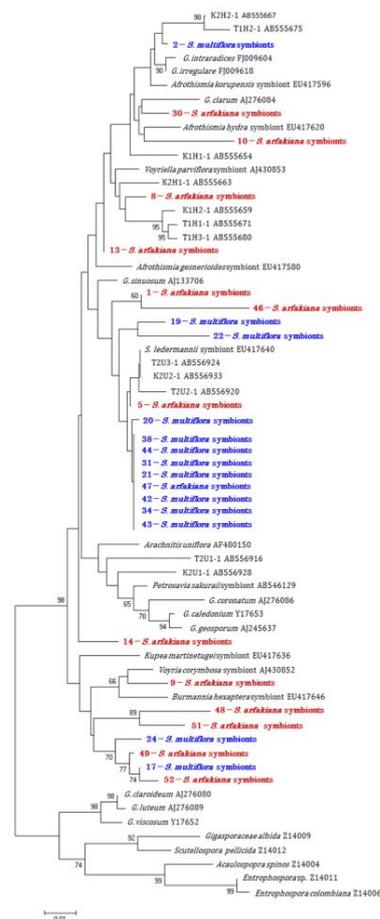


図 1 . パラオ産 2 種のホンゴウソウ科植物の菌根菌。赤字は *Sciaphila arfakiana*, 青字は *S. multiflora* から得られた配列を示す。

菌根菌の種相は、従属栄養化に伴って、全体的に単純化する傾向があった。しかし、リンドウ科とビャクブ科-ホンゴウソウ科のグ

ロムス菌類に依存している2グループについては、その他の2グループに比べて単純化の傾向が弱く、菌寄生（および菌依存度の高い種）群でも比較的多様な菌群に依存していることが示された。

一方、エンドファイト相もグループによって大きく異なり、ラン科、ビャクブ科—ホンゴウソウ科では単純な種構成であったのに対し、リンドウ科、ツツジ科では単離される菌群の多様性が高い傾向が見られた(図2,3)。

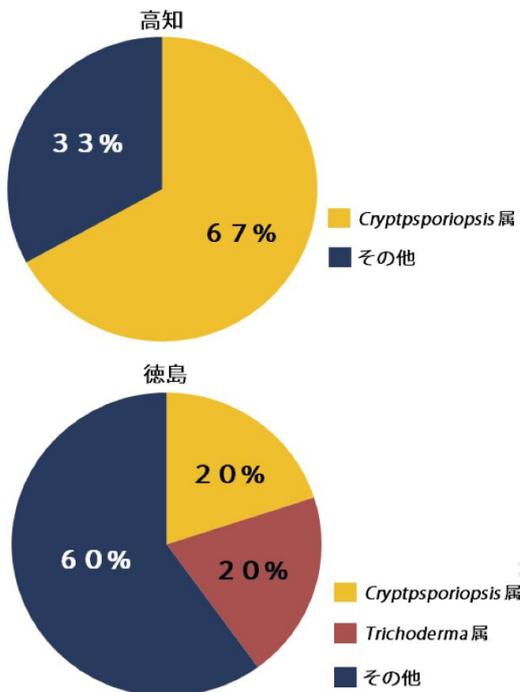


図2 . ナベワリ (ビャクブ科) から得られた根部エンドファイト相。

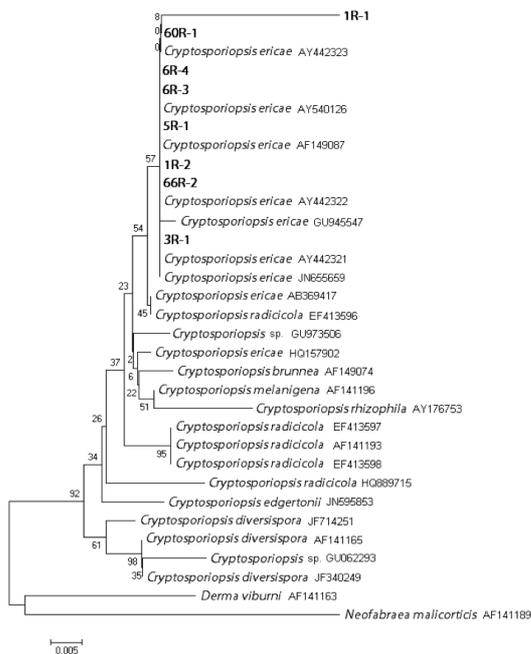


図3 . ナベワリ (ビャクブ科) から得られた *Cryptosporiopsis* 属菌類の系統関係。

また、エンドファイト菌の出現傾向から、菌の種間に干渉的競合関係があることが推測された。これは抗菌物質を放出することが示されている *Muscodor* 属が出現した場合に観察され、*Muscodor* 属が得られたサンプルからは *Colletotrichum* 属の菌類が得られなかった(図4)。

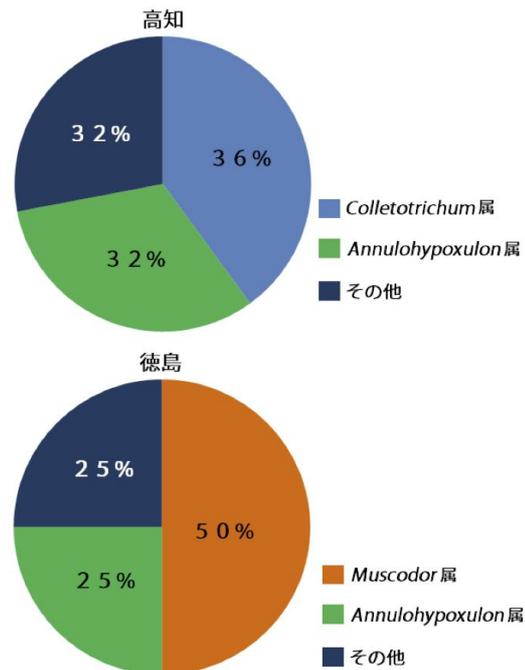


図4 . ナベワリ (ビャクブ科) から得られた葉部エンドファイト相。Muscodor 属の得られたサンプルからは *Colletotrichum* 属の菌類が得られていない。

(2) 対象植物生体内の各種菌類の現存量の推定

各種菌根菌およびエンドファイト菌に特異的なプライマーを作成し、定量 PCR による各種菌類の現存量推定を行なった。独立栄養-従属栄養植物の組み合わせで比較した結果、いずれの組み合わせでも従属栄養性（ないしは菌類への依存度の高い）種の方でエンドファイト菌類の現存量が少ない傾向にあることが示された。特に地上部の出現期間が短い種でその傾向が顕著であった。

(3) 対象植物におけるエンドファイト菌の防御機構誘導能の評価

対象植物から決定された MYB72 および NPR1 遺伝子の部分塩基配列に基づいて、各遺伝子の発現量解析を行った。野外から採集した植物、育成した植物ともに、エンドファイト菌の現存量と各遺伝子の発現量との間に明瞭な関係は見られなかった。このことは、菌類の種相や現存量による植物への防御機構誘導の差異は小さいことを示していると考えられる。

これらの結果を総合すると、菌寄生植物は近縁の独立栄養植物に比べて単純なエンドファイト菌フロラを持っていること、従属栄養性に至る進化の過程で、菌の種相が単純化し、相対的な現存量が減少する傾向があることが示された。単純化は、菌類各種の機能に大きな違いがないことに起因すると考えられる一方、炭素源を菌根菌からの供給に依存している以上、限られた炭素源で維持可能な相互作用に制限しているという側面があるとも考えられる。従属栄養性植物の単純化した植物-菌根菌-エンドファイト菌の三者系は、逆に一般の光合成能をもつ植物の著しく複雑な三者系がどのように維持されているのかを考えるシステムとして重要な意味を持つかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

1. Hayakawa, H., Tunala, Minamiya, Y., Ito, K., Gale, S., Yokoyama, J., Arakawa, R. and Fukuda, T. 2012. Comparative study of leaf morphology in *Aster hispidus* Thumb. var. *leptocladus* (Makino) Okuyama (Asteraceae). *American Journal of Plant Science* 3: 110-113. 査読あり.

2. Yoshida, M., Hayakawa, H., Fukuda, T. and Yokoyama, J. 2013. Incongruence between morphological and molecular traits in *Viola violacea* (Violaceae) populations in Yamagata Prefecture, northern Honshu, Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 63: 121-134. 査読あり.

3. Kumekawa, Y., Miyata, H., Ohga, K., Hayakawa, H., Yokoyama, J., Ito, K., Tebayashi, S., Arakawa, R. and Fukuda, T. 2013. Comparative analysis of stomatal size and density among ecotypes of *Aster hispidus* (Asteraceae). *American Journal of Plant Science*. 4: 524-527. 査読あり.

4. Matsui, R., Takei, S., Ohga, K., Hayakawa, H., Yoshida, M., Yokoyama, J., Ito, K., Arakawa, R., Matsumoto, T. and Fukuda, T. 2013. Morphological and anatomical variations in rheophytic ecotype of violet, *Viola mandshurica* var. *ikedaeana* (Violaceae). *American Journal of Plant Sciences* 4: 859-865. 査読あり.

5. Hayakawa, H., Hayakawa, C., Kusumoto, Y., Nishida, T., Ikeda, H., Fukuda, T. and Yokoyama, J. in press. *Cephalanthera falcata* f. *conformis* (Orchidaceae) forma nov.: a new peloric orchid from Ibaraki Prefecture, Japan.

Acta Phytotaxonomica et Geobotanica, 査読あり.

6. Sakamoto, Y., Yokoyama, J. and Maki, M. in press. Mycorrhizal diversity of the orchid *Cephalanthera longibracteata* in Japan. *Mycoscience*, 査読あり.

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 野島大志・坂本裕紀・横山 潤・牧雅之. 分子同定に基づくオオウメガサソウの菌根菌解析と依存度の検証. 日本植物学会第 75 回大会(東京大学)2011 年 9 月 19 日.

2. 中野志保乃・高橋睦美・今市涼子・横山 潤・ハナヤスリ属(ハナヤスリ科)に共生する菌根菌の分子同定. 日本植物学会第 75 回大会(東京大学)2011 年 9 月 19 日.

3. 大庭ゆりか・中野志保乃・横山 潤・パラオ諸島に分布するホンゴウソウ属植物の菌根菌の分子同定. 東北植物学会第 1 回大会(岩手大学)2011 年 12 月 17 日.

4. 船田通弘・横山 潤・ナベワリ(ビャクブ科)におけるエンドファイト菌類の種構成. 東北植物学会第 1 回大会(岩手大学)2011 年 12 月 17 日.

5. 中村 茜・横山 潤・菌寄生植物ギンリョウソウの発生年による菌根菌相の変化. 東北植物学会第 1 回大会(岩手大学)2011 年 12 月 17 日.

6. 中野志保乃・横山 潤・生育環境が異なるカンザシワラビ 2 変種に共生する菌根菌の分子同定. 東北植物学会第 1 回大会(岩手大学)2011 年 12 月 17 日.

7. 野島大志・坂本裕紀・横山 潤・牧 雅之. オオウメガサソウ(*Chimaphila umbellata*)の菌根菌相の解明と菌依存性の検証. 日本植物分類学会第 11 回大会(大阪学院大学). 2012 年 3 月 23 日.

8. 坂本裕紀・横山 潤・遊川知久・辻田有紀・牧 雅之. 混合栄養植物における菌従属栄養性の多様性と進化. 日本植物学会第 77 回大会(北海道大学)2013 年 9 月 15 日.

9. 辻田有紀・横山 潤・三吉一光・遊川知久. 菌従属栄養植物の進化に伴う菌根菌相のシフト. 日本植物学会第 77 回大会(北海道大学)2013 年 9 月 15 日.

10. 小谷文乃・武浪秀子・高橋睦美・横山 潤・エゾリンドウ(*Gentiana triflora*)における標高によるエンドファイト真菌類の種組成の差異. 東北植物学会第 3 回大会(秋田)2013 年 12 月 14 日.

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

福田 達哉 (FUKUDA TATSUYA)

高知大学・教育研究部自然科学系・准教授

研究者番号：00432815