

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570116

研究課題名(和文)シダ植物配偶体の形態進化と菌共生関係の変遷

研究課題名(英文) Morphological evolution of fern gametophytes in relation to arbuscular mycorrhizal status.

研究代表者

今市 涼子 (Imaichi, Ryoko)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：60112752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：シダ類の地上生の心臓形配偶体はAM菌を共生させ、「心臓形配偶体の中肋(クッション層)の厚さとAM菌感染率の間には関係がある」とする仮説を検証することを目的とした。本研究では第一段階として、シダ類の基部分類群5科(リュウビンタイ科、ゼンマイ科、ウラボシ科、キジノオシダ科、ヘゴ科)6属8種の計274個体の野生配偶体を解析した。野生配偶体はrbcL遺伝子によって種同定で種を確認した後、切片観察からクッション層の厚さと菌感染の有無を確認した。菌感染率は58%-95%と高く、クッション層は207-470ミクロンと厚かった。SSU領域解析から、配偶体に共通するAM菌はGlomeraceaeであった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to verify hypotheses that the heart shaped, terrestrial gametophytes of ferns contain AM mycorrhizal fungi in its midrib called the cushion, and that there is a significant relation between the cushion thickness and the AM infection rate. As the first step of this research, we analyzed here basal taxa of ferns (Angiopteridaceae, Osmundaceae, Gleicheniaceae, Plagiogyriaceae, and Cyatheaceae). We collected wild gametophytes in many regions of Japan. Gametophytes collected were identified at species rank using rbcL genes, and cut longitudinally by the resin-sectioning method to check presence or absence of AM fungi, and cushion thickness. In total, 274 individuals of six genera and five families, were analyzed. The AM fungi infection rate was relatively high (58 -95%), and cushion thickness was relatively thick (207-470 micrometers). Molecular identification using SSU sequences showed that the most commonly found AM fungi were Glomeraceae.

研究分野：植物形態学

キーワード：配偶体 シダ植物 進化 共生 菌根菌 アーバスキュラー菌 ハビタット 形態

1. 研究開始当初の背景

(1) 現生の維管束植物の 90%以上が根にアーバスキュラー菌根菌を共生させていることは広く知られていた。そしてシダ植物も例外ではなく、孢子体の根に AM 菌が感染していると多くの報告があった。これに対して、シダ植物配偶体は光合成を行いサイズも数 mm と小型であることから、地中生の菌従属栄養性の少数をのぞき、AM 菌類をもたないと考えられてきた。しかし我々のリュウビンタイやゼンマイなどの野生配偶体の予備的研究から、心臓形配偶体の中肋部(クッション層)にかなり高い確率で AM 菌を感染させていることが示された。

(2) さらに我々の予備的研究によるデータ蓄積から、シダ植物薄囊シダ類の配偶体と AM 菌感染との関係に関して、「心臓形配偶体のクッション層の厚さと AM 菌感染率との間には有意な関係がある」とする考えを得るに至っていた。

2. 研究の目的

シダ植物の野生配偶体において「心臓形配偶体のクッション層の厚さと AM 菌感染率との間には有意な関係がある」とする上記の考えを仮説として提出し、その仮説を検証することが研究全体のゴールである。本科研費研究では、第一段階として、シダ植物の系統関係で基部に位置する分類群である、薄囊シダ類の姉妹群リュウビンタイ類と、薄囊シダ類のゼンマイ類、ウラボシ類、木生シダ類を対象として解析することとした。すなわち、シダ類基部分類群の心臓形配偶体において、AM 菌感染率と配偶体のクッション層の厚さとの関係を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

日本各地で野生の心臓形配偶体を採集した。先の研究から、シダ植物では、ある種の孢子体が多数生育しているとき、その近くに同種の配偶体が生育している傾向があることが知られている。したがって本研究では基部分類群各種(上記)の生育地で調査を行い、配偶体を採取した。採集した配偶体は水で洗って土を落とした後、中肋部の中央で縦に切って 2 つの配偶体片を作った。1 片から DNA を抽出し、葉緑体 *rbcL* 遺伝子を用いて配偶体の種同定を行った。もう 1 片はそのままトリパンブルー染色して永久プレパラートにするか、樹脂切片法によって縦断切片を作り、光学顕微鏡観察に供した。顕微鏡観察から、AM 菌感染の有無、AM 菌の存在場所を明らかにした。プレパラート観察によって菌感染があると判断された配偶体については、核 rDNA の SSU 領域を用いてクローニングにより AM 菌の種同定を行い、ベイズ法で系統樹を作成した。

4. 研究成果

本研究では第一にリュウビンタイ *Angiopteris lygodiifolia* とゼンマイ *Osmunda japonica* の野生配偶体について菌感染率とクッション層の厚さを解析した (Ogura-Tsujita et al. 2013)。

リュウビンタイ野生配偶体 (図 1 a, b, c) では 52 個体中 50 個体で菌根菌が観察され、菌感染率は 96%(50/52)であった。またゼンマイ (図 2 a, b, c) でも同様に 43 個体中 41 個体に菌感染がみられ、感染率は 95%(41/43)であった。両種とも菌根菌は配偶体の中肋部(クッション部)に局在していた。リュウビンタイでは菌根菌をもつ細胞が、クッション層内でパッチ状に存在していたが (図 1 d)、ゼンマイではクッション層全体に広がって存在していた (図 2 d)。これら菌根菌は、樹枝状体をもつことから (図 1 e, 図 2 f) 形態学的に AM 菌であると推測できた。

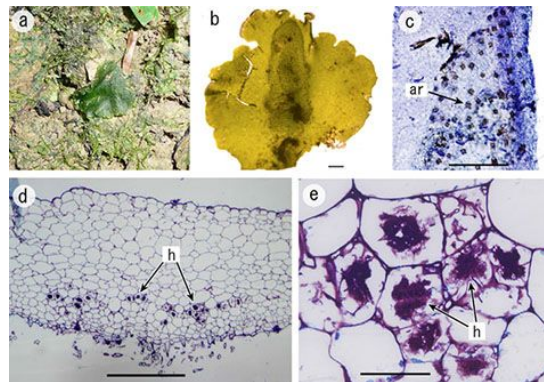


図 1. リュウビンタイ配偶体 . a: 採集地の野生配偶体 . b: 実体顕微鏡下で撮影した配偶体全体像 . c: クッション部分 (先端側) のトリパンブルー染色像 . d: 配偶体クッション部の横断切片 . e: AM 菌感染部分 . 図 1 d 右矢印部分の拡大像 . ar: 造卵器, h: 菌糸 . スケールは b = 1mm, c, d = 500 μ m, e = 50 μ m .

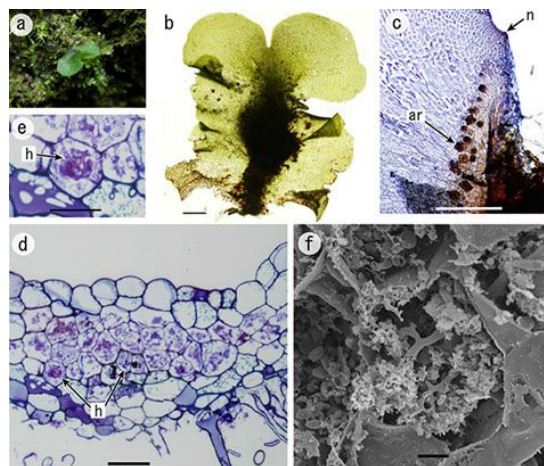


図 2. ゼンマイ配偶体 . a: 採集地の野生配偶体 . b: 実体顕微鏡下で撮影した配偶体の全体像 . c: ノッチ側先端のトリパンブルー染色像 . d: 配偶体クッション部の横断切片 . e: AM 菌感染部分 . 図 2 d 左矢印部分の拡大像 . f: AM 菌感染部分の走査電子顕微鏡像 .

菌感染がみられた個体から得られた菌の DNA クローニングを行い、分子系統解析を行った。えられた系統樹 (図 3) から、これらはすべて *Glomus* A group (現在の *Glomeraceae*) に属する菌であることがわかった。

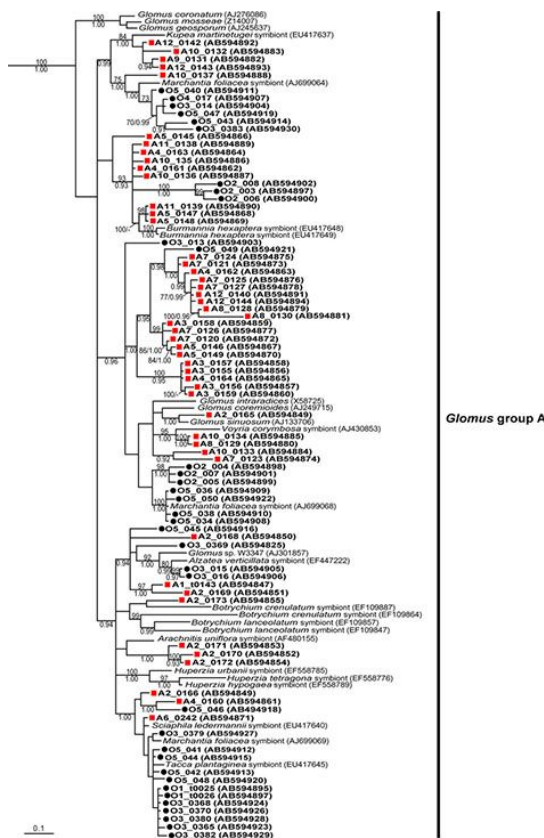


図 3. リュウビнтаイ () とゼンマイ () 配偶体から単離した感染 AM 菌 rDNA の SSU 領域の系統樹。Bayse 法を用い、Schwarzott et al. (2001) の既知データと比較した。数字は事後確率 (上側; 0.9 以上) と近隣結合法にて系統樹を作成した際のブートストラップ確率 (下側; 70% 以上) を示す。

第二段階として、研究材料を薄囊シダ類の基部分類群へと広げ、リュウビнтаイとゼンマイで行ったのと同様の方法で菌感染率と菌根菌の解析を行った。用いた材料は、ゼンマイ科のシロヤマゼンマイ (*Osmunda banksiiifolia*) 32 個体、ウラジロ科のコシダ (*Dicranopteris linearis*) 12 個体とウラジロ (*Diplopterygium glaucum*) 9 個体、キジノオシダ科のオオキジノ (*Plagiogyria euphlebia*) 55 個体とキジノオシダ (*G. japonica*) 31 個体、ヘゴ科ノクロヘゴ (*Cyathea podophylla*) 32 個体、ヒカゲヘゴ (*C. lepifera*) 8 個体である。解析の結果、これら 7 種の配偶体の菌感染率は 58.3%~96.5% と比較的高く、クッション層の厚さも 207~305 μ m とかなり厚かった。

シロヤマゼンマイの菌感染率 91% は、先のゼンマイの 95% に比べると低い値であった。

クッション層の厚さも同様にゼンマイが 470 μ m であったのに対して、シロヤマゼンマイは 250 μ m と低い値を示したため、ゼンマイ科ではクッション層の厚さと菌感染率との間に関係があるように見える。ウラジロ科では、ウラジロが 58%, コシダが 80% の菌感染率で、両種に違いがみられたが、クッション層の厚さはそれぞれ 259, 305 μ m であり、菌感染率の高い方がクッション層も厚くなる傾向がみられた。しかし、コシダの 305 μ m というクッション層の厚さはシロヤマゼンマイよりも高い値であるが、コシダの菌感染率は 58% で、シロヤマゼンマイより低いものとなっている。キジノオシダ科については、キジノオシダとオオキジノオシダは両種とも菌感染率、クッション層の厚さに差はみられなかった。ヘゴ科の解析結果も加えた結果、以下の通りに結論づけられた。ウラジロ科、キジノオシダ科、ヘゴ科の配偶体は、リュウビнтаイ、ゼンマイに比べて、菌感染率もクッション層の厚さも低い傾向が見られたが、解析された 3 科 4 属 7 種の間においては、菌感染率とクッション層の厚さとの間に強い関係を見ることはできなかった。

感染していた AM 菌の中で最も多くみられたのは *Glomeraceae* であった。AM 菌の種とされる VTX では、VT80, 166, 191, 219 が多くの配偶体種にみられた。VT166 はアフリカ、北アメリカ、南アフリカ、オセアニア、ヨーロッパ、アジア大陸に広く見られる AM 菌の種として知られていることから、VT166 が日本のシダ植物配偶体にもみられることは納得できることである。またリュウビнтаイとゼンマイでは *Glomeraceae* のみがみられたが (Ogura-Tsujita et al., 2013)、これとは異なり、ゼンマイ科、ウラジロ科、キジノオシダ科、ヘゴ科では *Glomeraceae* だけでなく、他に *Acaulosporaceae*, *Claroideoglomeraceae* などの AM 菌がみられるという特徴があった。これらの解析結果については、すでに論文としてまとめ、菌根菌の専門誌である *Mycorrhiza* に受理されている (Ogura-Tsujita et al. in press)。

今後は、薄囊シダ類の中で、最も多数の種を擁する広義ウラボシ類の配偶体の解析を行う必要がある。最終的には、シダ類全体をカバーする分類群の配偶体の解析を行い、全データを用いて、心臓形配偶体の菌感染率とクッション層の厚さと AM 菌感染率との関係が有るか否かをしるため、回帰分析 GLM 解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)
1、Ogura-Tsujita Y, Hirayama Y, Sakoda A, Suzuki A, Ebihara A, Morita N, Imaichi R

(2015) Arbuscular mycorrhizal colonization in field-collected terrestrial cordate gametophytes of pre-polypod leptosporangiate fern, Osmundaceae, Gleicheniaceae, Plagiogyriaceae, and Cyatheaceae. Mycorrhiza (in press). (査読有り)

2、Ogura-Tsujita Y, Sakoda A, Ebihara A, Yukawa T, Imaichi R (2013) Arbuscular mycorrhiza formation in cordate gametophytes of two ferns, *Angiopteris lygodiifolia* and *Osmunda japonica*. J Plant Res 126:41-50. (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

1、鈴木絢子・石山恵理・水澤莉奈・平山裕美子・辻田有紀・海老原淳・今市涼子, シダ植物広義ウラボシ類配偶体の AM 菌感染, 日本植物学会, 2014 年 9 月 13 日, 明治大学 (神奈川県川崎市)

2、辻田有紀・平山裕美子・迫田曜・海老原淳・今市涼子, 薄のうシダ類基部分類群ゼンマイ科・ウラジロ科・ヘゴ目野生配偶体の菌根性解明, 日本植物分類学会, 2014 年 3 月 21 日, 熊本大学

3、迫田曜・辻田有紀・海老原淳・平山裕美子・今市涼子, シダ類の地上生心臓形配偶体と菌根菌, 日本植物学会, 2013 年 9 月 14 日, 北海道大学.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今市 涼子 (Ryoko Imaichi)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：60112752

(2) 研究分担者

海老原 淳 (Atsushi Ebihara)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究

部・研究員

研究者番号：20435738

(3) 連携研究者

辻田 有紀 (Yuki Tsujita)

佐賀大学・農学部・准教授