

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04417

研究課題名(和文) 菌根菌の変化が植物の寄生性進化をもたらしたか？

研究課題名(英文) Do shifts of mycorrhizal fungi provide the evolution of parasitism in plants?

研究代表者

遊川 知久 (Yukawa, Tomohisa)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・グループ長

研究者番号：50280524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,460,000円

研究成果の概要(和文)：植物の独立栄養性から菌従属栄養性への進化をもたらした原因を追求した。植物の独立栄養種と菌従属栄養種を含む複数の分岐群を用いて共生菌の変化を解析した結果、植物の菌従属栄養レベルの進化に伴って特定の共生菌に収斂することが判明した。さらに植物-菌の共生培養系を用いた実験の結果、特定の共生菌が高い栄養供給能を持つことが明らかになった。以上から、「植物がより多くの栄養を供給する菌パートナーを選び適応した結果、菌従属栄養性が進化した」とする仮説の妥当性が検証された。

研究成果の概要(英文)：We explored causes of the evolution of mycoheterotrophy in plants. First, changes of mycobionts were analyzed for several clades including both autotrophic and mycoheterotrophic plant species. The results showed that convergence towards particular mycobionts occurred in association with the evolution of mycoheterotrophy in plants. Further, the results of co-culture experiments between plants and their mycorrhizal fungi demonstrated that particular mycobionts can function as efficient nutrition suppliers. Consequently, validity of the hypothesis “mycoheterotrophy evolved in accordance with selection and adaptation of plants to fungi that can optimize nutrition process of host plants” was corroborated.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：菌根 進化 共生 寄生 従属栄養 光合成 植物 菌類

1. 研究開始当初の背景

本課題代表者らの一連の研究によって、独立栄養植物から菌従属栄養植物(菌類に寄生し栄養を依存し生活する植物)への進化をもたらしたキー・イノベーションは菌パートナーの変化で「植物がより多くの栄養を供給する菌パートナーを選び適応した結果、従属栄養性が進化した」とする仮説がもっとも確からしいことが浮き彫りにされた。この仮説を検証するためには2つの課題

1) 植物の菌従属栄養性進化に伴う菌パートナーの変化と収斂は普遍的な事象なのか?

2) 植物の菌従属栄養性進化に伴い選択した菌パートナーが植物により多くの炭素を供給するのか?

の追求が必要だが、1)に関しては、植物の精度の高い系統仮説に立脚した比較解析が必要であるものの、厳密に検証されていなかった。2)に関しては、菌従属栄養植物が共生するほとんどの菌の機能は明らかになっていない上、菌従属栄養植物と菌の共生培養が困難であるため、共生する菌種ごとの植物の適応度にもたらす効果を定量的に評価できていなかった。

2. 研究の目的

上掲の2課題の解明にあたって、1)については植物の確からしい系統樹を用いて菌根菌の変化パターンを帰納的アプローチで解明すること、2)には姉妹関係にある部分的菌従属栄養植物(独立栄養と菌従属栄養の両方をフレキシブルに利用する種)と菌従属栄養植物の菌根菌を交互接種して植物-菌の共生培養系を構築し、菌の種ごとの植物にもたらす栄養供給の違いを明確にすることが必要である。

以上のアプローチによる研究を実施し、「植物がより多くの栄養を供給する菌パートナーを選び適応した結果、従属栄養性が進化した」とする仮説を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 材料の収集と野外調査

調査対象種の生植物、乾燥標本、DNA抽出用サンプル、共生菌分子同定用サンプル、植物体周辺の土壌や菌の子実体等を採集した。また植物体周辺の光・水環境、植生等も記録した。さらに開花期には人工交配を行い、結実期には採種を実施した。

(2) 植物の分子系統解析

独立栄養種と菌従属栄養種を含む分岐群の精度の高い分子系統樹を構築し、独立栄養種と従属栄養種の姉妹群を複数確定することをめざし、色素体ゲノムの *matK*、*rpL16* イントロン、*trnK* イントロン、*trnL-F*、*accD*、*clpP* ならびに、核ゲノムの *xdh*、リボソーム RNA 遺伝子 ITS 領域を用いて、調査対象植物の分子系統解析を行った。得られた系統樹を

参照体系として、菌根共生に関わる形質進化を推定した。

(3) 菌根菌の単離と分子同定

調査対象植物種から菌根菌を単離し培養するとともに、DNA を抽出した。これらの DNA をテンプレートとし、菌の分類群の同定に有効な核リボソーム RNA 遺伝子 LSU ならびに ITS 領域の塩基配列を決定した。BLAST 検索により既知の菌の塩基配列データと比較するとともに菌の系統解析を行ない、系統分類学的な帰属を決定した。

(4) 炭素と窒素安定同位体比を用いた植物体の菌従属栄養レベルの推定

栄養摂取の段階が異なる生物の間で炭素および窒素安定同位体分別値の異なる特性を用いて、調査対象植物種の栄養器官の菌従属栄養レベルを推定した。

(5) 光合成関連形質を用いた植物体の独立栄養レベルの解析

植物体の相対的な独立栄養レベルを把握するためクロロフィル蛍光を計測し、気孔や葉の内部構造などを観察した。

(6) 植物-菌の共生培養系を用いた複数の菌の機能の評価

部分的菌従属栄養種と菌従属栄養種の姉妹群の双方あるいはいずれかに共生する菌の種を双方の植物に接種し、植物-菌の共生培養系を構築した。上述した菌をあらかじめ繁殖させたオガクズ培地に植物の無菌培養苗を置床し、明区と暗区を設けて培養した。対照区として無菌のオガクズ培地に植物を置床した。一定期間、生育させた植物体を用いて、菌の種ごとに植物への栄養供給の違いを定量的に評価するとともに形態形質を観察した。

4. 研究成果

(1) 植物の菌従属栄養性進化に伴う菌パートナーの変化と収斂

陸上植物においてもっとも普遍的なグロムス菌門と植物の菌根共生系(アーバスキュラー菌根)を形成するリンドウ科、ホンゴウソウ科、ヒナノシャクジョウ科、サクライソウ科植物においては、いずれも菌従属栄養性進化に伴ってグロムス科の特定の分岐群と共生する菌パートナーの収斂が生じていることが明らかになった。いずれの植物においても菌従属栄養性進化のプロセスで菌パートナーの特異性が高くなったが、サクライソウ科においては独立栄養種と菌従属栄養種が同一の菌種と共生することが確認され、菌パートナーのシフトは必須ではないことを発見した。一方、ホンゴウソウ科の菌従属栄養種において担子菌門のツノタンシキン科と共生する種を発見し、菌従属栄養植物の種分化の過程で跳躍的な菌パートナーのシフトが起こりうるようになった。

担子菌門と共生する植物の菌従属栄養性進化にともなう菌パートナーの変化については、ラン科サカネラン連を用いて詳細な研

究を行った。まず連内の全 6 属について詳細な分子系統解析を行った結果、普通葉の退化を伴った菌従属栄養性は 5 回独立に進化した可能性が高いことを解明した。

サカネラン属においては菌従属栄養性の進化に伴い、担子菌門ロウタケ目の腐生菌分岐群から外生菌根菌分岐群に菌根菌がシフトした可能性が高い。一方、キンラン属、カキラン属、タネガシマムヨウラン属、*Palmeria* 属、*Limodorum* 属の共通祖先において、大部分のラン科の種が共生する担子菌門アンズタケ目の腐生菌グループから担子菌門イボタケ科、ベニタケ科、ロウタケ科の外生菌根菌グループに菌根菌がシフトした可能性が高いことが明らかになった。共通祖先の段階では緑色の普通葉を有することから、完全な菌従属栄養性への進化に先立って菌パートナーの変化が生じたことが判明した。さらに炭素と窒素安定同位体比を用いた植物体の菌従属栄養レベルの推定の結果、上述の 5 属の葉緑種は部分的な菌従属栄養性を有することが明らかになった。したがってこの分岐群においては、独立栄養から部分的菌従属栄養を経て完全な菌従属栄養が進化し、部分的菌従属栄養に進化する時点で菌パートナーの変化が起こった可能性が高い。またカキラン属の特定の分岐群において、菌パートナーが担子菌門外生菌根菌グループから腐生菌グループへ逆転し、同時に部分的菌従属栄養から独立栄養に変化することが判明した。

また独立栄養から菌従属栄養への進化に伴い腐生菌から外生菌根菌に菌根菌がシフトするパターンは、サカネラン連のみならず、バニラ亜科、ホテイラン連、シュンラン属からも検出された。一連の研究の結果から、植物の菌従属栄養レベルの変化に伴って特定の菌パートナーに収斂することを明確に示すことができた。

(2) 植物 - 菌の共生培養系を用いた複数の共生菌の機能の評価

ラン科サイハイランの全国 17 箇所の自生地集団の個体を用いて、菌根菌の分子同定を行った。さらに、植物体の炭素と窒素の安定同位体比 (^{13}C および ^{15}N) を測定し、個体ごとの菌従属栄養レベルを評価した。その結果、担子菌門のロウタケ科、ツノタンシキン科、ナヨタケ科、ツラスネラ科が主要な菌根菌として検出され、検出サンプルのそれぞれ 24%、16%、13%、6% を占めた。また各個体の ^{13}C は -34.7 ~ -27.4‰ となり、独立栄養から強い菌従属栄養性を有するものまで、個体による菌従属栄養レベルの分散が 1 種の植物としては例外的に大きかった。一方、ナヨタケ科と共生する個体ではすべて根茎の形成がみられ、菌従属栄養レベルが有意に高かった。したがってサイハイランの根茎はナヨタケ科と共生する際に誘導され、根茎において大量の菌と共生することで高い菌従

属栄養性が発現することが示唆された。

以上の結果をふまえて、サイハイランの根および根茎から分離したツラスネラ科ならびにナヨタケ科とサイハイランの共生培養系を構築し、植物の栄養摂取と形態形成に及ぼす 2 種の菌の影響を評価した。上述した菌をあらかじめ繁殖させたオガクズ培地にサイハイランの無菌培養苗を置床し、明区 (12 時間照明) と暗区を設け、25 恒温で 192 日培養した。対照区として無菌のオガクズ培地にサイハイラン苗を置床した。培養後、植物体の形態と生重量を記録するとともに、菌根組織を観察した。

ナヨタケ科との共生体は、明区・暗区ともにすべて腋芽からサンゴ状に分枝する根茎を形成した。一方、ツラスネラ科共生体は根茎を形成せず、腋芽から普通葉を展開した。生重量に関して明区では、ナヨタケ科共生体とツラスネラ科共生体の間で有意差は見られなかったが、菌従属栄養性のみが発現する暗区では、ナヨタケ科共生体が発現した。また、それぞれの区画の共生体の菌根を観察した結果、ツラスネラ区では消化された菌糸コイルを持つ細胞は平均 13% であったが、ナヨタケ区では同様の細胞が 40% に達することが確認された。以上の結果、菌根菌の種類が植物の器官の形態形成に違いをもたらすことを、培養系を用いてはじめて明確に示すことができた。さらに 2 種の菌は同一種の植物で菌根形成するにもかかわらず、栄養供給に関わる機能が異なることが明らかになり、菌根共生する菌と植物の栄養移動の違いに起因することが、菌根の菌糸コイルの状態から示唆された。

サイハイランの姉妹群である完全な菌従属栄養性のモイワランはナヨタケ科と特異的に共生し、いずれの個体においても発達した根茎に菌根が形成される。本研究の結果は、サイハイラン属において担子菌門のさまざまなグループの中からナヨタケ科をパートナーに選んだことが、菌従属栄養性への進化を導いたことを裏付ける。今後、モイワランにおいてもツラスネラ科ならびにナヨタケ科との共生培養系を構築し、より高い精度で「植物がより多くの栄養を供給する菌パートナーを選び適応した結果、菌従属栄養性が進化した」とする仮説を検証することをめざす。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1) Ogura-Tsujita, Y., G. Gebauer, H. Xu, Y. Fukasawa, H. Umata, K. Tetsuka, M. Kubota, J. M.-I. Schweiger, S. Yamashita, N. Maekawa, M. Maki, S. Isshiki and T. Yukawa, 2018. The giant mycoheterotrophic orchid *Erythrorchis altissima* is associated mainly with a divergent set of wood-decaying fungi. *Molecular Ecology*, 27: 1324-1337. 査読

あり

2) Yagame, T., E. Funabiki, T. Yukawa, E. Nagasawa, 2018. Identification of mycobionts in an achlorophyllous orchid, *Cremastra aphylla* (Orchidaceae), based on molecular analysis and basidioma morphology. *Mycoscience*, 59, 18-23. 査読あり

3) Freudenstein, J. V., T. Yukawa and Y. B. Luo, 2017. A reanalysis of relationships among Calypsoinae (Orchidaceae: Epidendroideae): floral and vegetative evolution and the placement of *Yoania*. *Systematic Botany*, 42: 17-25. 査読あり

4) Yamato, M., H. Takahashi, A. Shimono, R. Kusakabe and T. Yukawa, 2016. Distribution of *Petrosavia sakurii* (Petrosaviaceae), a rare mycoheterotrophic plant, may be determined by the abundance of its mycobionts. *Mycorrhiza*, 26: 417-427. 査読あり

5) Sakamoto, Y., Y. Ogura-Tsujita, K. Ito, K. Suetsugu, J. Yokoyama, J. Yamazaki, T. Yukawa and M. Maki, 2016. The tiny-leaved orchid *Cephalanthera subaphylla* obtains most of its carbon via mycoheterotrophy. *Journal of Plant Research*, 129: 1013-1020. 査読あり

6) Yagame, T., Y. Ogura-Tsujita, A. Kinoshita, K. Iwase and T. Yukawa, 2016. Fungal partner shifts during the evolution of mycoheterotrophy in *Neottia*. *American Journal of Botany*, 103: 1630-1641. 査読あり

7) Kinoshita, A., Y. Ogura-Tsujita, H. Umata, H. Sato, T. Hashimoto and T. Yukawa, 2016. How do fungal partners affect the evolution and habitat preferences of mycoheterotrophic plants? A case study in *Gastrodia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 103: 207-220. 査読あり

〔学会発表〕(計 24 件)

1) Ogura-Tsujita, Y., G. Gebauer, H. Xu, Y. Fukazawa, H. Umata, K. Tetsuka, M. Maki and T. Yukawa, 2017. A giant mycoheterotrophic orchid, *Erythrorchis altissima*, is associated with a wide range of wood-decaying fungi. 9th International Conference on Mycorrhiza. Prague, Czech Republic.

2) 辻田有紀・榎本葉月・木下晃彦・山下由美・遊川知久, 2017. ラン科オニノヤガラにお

ける種子発芽時の菌根菌相. 日本菌学会第 61 回大会, 仙台.

3) 遊川知久・木下晃彦・山下由美・辻田有紀, 2017. 植物の成長とともに菌根菌は変わる-植物の生活史段階を指標とした菌共生パターンの多様性. 日本植物学会第 81 回大会, 野田.

4) 谷亀高広・遊川知久, 2017. 植物の形態形成におよぼす菌根菌の影響-ラン科サイハイランと菌の共生培養系を用いた検証. 日本植物学会第 81 回大会, 野田.

5) 辻田有紀・G. Gebauer・手塚賢至・遊川知久, 2017. 菌従属栄養植物タカツルランに栄養供給する菌を安定同位体比から探る. 日本植物学会第 81 回大会, 野田.

6) 山下由美・木下晃彦・辻田有紀・黒沢高秀・遊川知久, 2017. ラン科サカネラン連の核と色素体の複数遺伝子座を用いた系統解析. 日本植物学会第 81 回大会, 野田.

7) 蘭光健人・山下由美・遊川知久・辻田有紀, 2017. 無葉着生植物クモランの共生菌相解明と共生培養下での種子発芽. 日本植物学会第 81 回大会, 野田.

8) 鈴木貴子・丸山敦・遊川知久・大和政秀, 2017. リンドウ科光合成植物の菌従属栄養性に関する研究. 日本生態学会第 64 回全国大会, 東京.

9) Yukawa, T., Y. Ogura-Tsujita, A. Kinoshita, C. Tsutsumi, Y. Yamashita, K. Akai, A. Abe, S. W. Chung, T. C. Hsu, and Y. I Lee, 2017. Evolution of *Gastrodia*, a potentially important medicinal resource. 2017 Taiwan International Orchid Symposium, Tainan (Taiwan). 2017 年.

10) 辻田有紀・徐慧・深澤遊・手塚賢至・馬田英隆・牧雅之・遊川知久, 2016. 世界最大の菌従属栄養植物タカツルラン(ラン科)の菌根共生パターンの解明. 菌根研究会 2016 年度大会, 千葉.

11) 谷亀高広・船曳恵理子・Marc-André Selosse・大和政秀・遊川知久, 2016. 共生菌種の違いによるサイハイランの菌従属栄養レベルの変化. 日本菌学会第 60 回大会, 京都.

12) 大和政秀・高橋弘・下野綾子・日下部亮太・遊川知久, 2016. 菌従属栄養植物サクラソウの分布は共生菌の優占度の影響を受ける. 日本生態学会第 63 回全国大会, 仙台.

13) Freudenstein, J. V. and T. Yukawa, 2016. Analysis of relationships among Calypsoinae

(Orchidaceae), a small group with diverse floral and trophic strategies. Botany 2016. The Botanical Society of America, Savannah, USA.

14) 谷亀高広・船曳恵理子・Marc-André Selosse・大和政秀・遊川知久, 2015. サイハイランの菌従属栄養レベルは共生菌種の影響を受け決定する. 日本植物学会第 79 回大会, 新潟.

15) 木下晃彦・阿部篤志・佐藤裕之・Yung-I Lee・辻田有紀・遊川知久, 2015. ラン科ムカゴサイシン属の生活史段階による菌根菌シフトの種間比較. 日本植物学会第 79 回大会, 新潟市.

16) 宮下彩菜・杉浦大輔・前田綾子・辻田有紀・遊川知久, 2015. ラン科ムカゴサイシンの菌従属栄養度の評価. 日本植物学会第 79 回大会, 新潟.

17) 辻田有紀・前田綾子・遊川知久, 2015. ラン科ムカゴサイシンにおける菌根菌の感染状況とそのフェノロジー. 日本植物学会第 79 回大会, 新潟.

〔図書〕(計 1 件)

1) 遊川知久, 2016. 菌なしでは生きられない植物・ラン. 高橋英樹(編), ランの王国. 北海道大学出版会, pp. 85-98.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kahaku.go.jp/research/researcher/researcher.php?d=yukawa>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遊川 知久 (YUKAWA, Tomohisa)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・グループ長

研究者番号: 50280524

(2) 研究分担者

大和 政秀 (YAMATO, Masahide)

千葉大学・教育学部・准教授

研究者番号: 00571788

辻田 有紀 (TSUJITA, Yuki)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号: 80522523

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

谷亀 高広 (YAGAME, Takahiro)