

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370038

研究課題名（和文） 日本産ラン科植物を使った菌従属栄養性進化の総合的解析

研究課題名（英文） Multidisciplinary analysis of the evolution of mycoheterotrophy in Japanese orchids

研究代表者

遊川 知久（YUKAWA TOMOHISA）

国立科学博物館・植物研究部・グループ長

研究者番号：50280524

研究成果の概要（和文）：ラン科の複数のグループを材料に、植物の菌従属栄養性進化にともなう形質進化の実体を研究した。その結果、進化過程において独立栄養と菌従属栄養の中間段階が存在すること、菌従属栄養性は多数の形質のさまざまな形質状態が組み合わさった進化の結果として獲得されること、菌従属栄養植物の種類ごとに栄養摂取に関わる形質の組み合わせの異なること等を解明した。従来、植物の独立栄養性から菌従属栄養性への進化は、ワンステップの単純な事象として理解されてきたが、進化のパターンとプロセスが多様で複雑であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： We tested evolution of ecophysiological characters associated with the acquisition of mycoheterotrophy in several orchid groups. We demonstrated the following insights: 1) in several orchid groups, full mycoheterotrophy appeared gradually via partial mycoheterotrophy, not directly from autotrophy. 2) Mycoheterotrophy is results of evolution of various characters related to ecophysiological properties. 3) Each mycoheterotrophic species exhibits different combinations of characters relevant to nutrition. The processes involved in shifting from autotrophy to mycoheterotrophy are diverse and complex, whereas previous studies emphasized a simple evolutionary event.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2009 年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,110,000 |
| 2010 年度 | 5,000,000 | 1,500,000 | 6,500,000 |
| 2011 年度 | 4,500,000 | 1,350,000 | 5,850,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：植物系統分類学

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：植物 担子菌 進化 ラン科 分子系統 光合成 菌根 共生

1. 研究開始当初の背景

菌従属栄養植物（通称：腐生植物）とは、生活史を通じ炭素源を菌根菌に依存する特

殊化した栄養摂取様式を持つ植物である。植物の栄養摂取の基盤となる光合成機能を失ったことに起因する適応進化に関心が持たれてきたものの、寄生植物の中でもっとも研究が遅れている。ラン科は菌従属栄養植物種の約40%を占めるため、菌従属栄養性の進化と多様性を理解する上で不可欠な材料である。

申請者らのこれまでの研究から、菌従属栄養性を有するラン科について1) 菌従属栄養性のレベルが種ごとに異なる可能性のあること、2) 菌根菌パートナーの系統と栄養摂取様式が多様であること等を明らかにすることができた。しかしながら、これまでの研究は、菌従属栄養ランの一部の系統を使って得られたものである。菌従属栄養ランと菌根菌パートナーの関係に未知の多様性が予想される状況においては、複数の菌従属栄養種とその姉妹群となる独立栄養種のペアを用いた網羅的な解析を行い、形質進化の多様性の実体を明確にする必要がある。複数の分岐群を使った解析を行うことによって、ラン科の菌従属栄養性獲得に伴う植物と菌の形質進化のパターンを抽出し、また複数の形質間の相関を把握することが可能となるからである。

2. 研究の目的

本研究は日本産ラン科植物を材料として、植物と菌にまたがる多数の形質を使い、植物の菌従属栄養性の進化について総合的に解析する。申請者のこれまでの研究から、菌従属栄養植物の進化に伴う菌根菌パートナーの系統と栄養摂取様式のシフトには、複数のパターンが存在することが明らかになった。本研究では植物の菌従属栄養性の進化と菌根菌パートナーのシフトという2つの事象の多様性と相関をより明確に示すことを目的として、以下のことを明らかにする。1) 日本産菌従属栄養ラン科植物の系統関係 2) 菌根菌パートナーの多様性 3) 植物体の菌従属栄養レベル（獲得する有機炭素に占める光合成産物と菌からの転流物質の比） 4) 菌根菌の栄養摂取様式（腐生、外生菌根性） 5) 植物体と菌根菌の解剖形質。さらに得られた結果を分岐群ごとに比較し、植物の菌従属栄養性シフトに伴う植物と菌双方の形質進化のプロセスとパターンを解明する。

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。さらに開花期の人工交配と結実期の採種も実施した。

(2) 分子系統解析

主として色素体の *matK*, *rpL16* イントロン、*trnK* イントロン、*trnT-L-F* ならびに、核リボソーム RNA 遺伝子 ITS 領域を用いて、調査対象植物種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、本研究で解析する形質の進化を推定した。

(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。DNA については、菌の分類群の判別に有効なミトコンドリア rRNA 遺伝子 LSU と核 rRNA 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、クロロフィル蛍光の計測、気孔や葉の内部構造などの形態形質の観察、透過型電子顕微鏡を用いた葉緑体の形態形質の観察を行なった。

(6) 栄養器官と菌根菌の解剖形質の解析

生活形と栄養摂取様式の多様化に伴う解剖形質の進化を明らかにするため、調査対象植物種を用いて、栄養器官の比較解剖学的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) 炭素および窒素安定同位体分別を用いたシュンラン属の菌従属栄養性進化の解明

ラン科シュンラン属 (*Cymbidium*) において無葉緑性が1回進化したこと、無葉緑性のマヤランとサガミランは単系統群となり、両種の姉妹群には普通葉を生じるナギランが、これらに対する外群としてシュンランが位置すること、無葉緑性の進化に伴い菌根菌パートナーがシフトすることを、これまでに明らかにした。本属における無葉緑性の進化とそれにリンクする共生菌相の進化は、菌従属栄養性への進化と関連すると考えられるものの検証されていない。そこで植物と菌の間で炭素および窒素安定同位体比の異なる特性を用いて、上記シュンラン属4種の菌従属栄養性の程度を評価した。

解析の結果、シュンラン属4種の栄養器官を構成する炭素と窒素の一部は、菌に由来し

ていることが明らかになった。なかでも無葉緑性のマヤランとサガミランの菌従属栄養性の程度が高かった。シュンランとナギランについては、菌従属栄養性の程度が典型的な独立栄養植物種と同等の値を示すものからマヤランやサガミランと同等の値を示すものまで、個体によりばらつきが大きかった。

この結果は、シュンランとナギランにおいて、生活史のステージや自生環境によって菌従属栄養性の程度が変化することを示唆する。以上の結果から、シュンラン属においては普通葉を生じる種において既に菌従属栄養性を有し、この形質が前適応となり、生活史を通じてより菌類に栄養を依存するマヤランとサガミランが進化したと推定される。

(2) シュンラン属の光合成特性の系統間および器官間での比較

菌従属栄養レベルと生育立地の光環境が多様化したラン科シュンラン属内の分岐群（ヘツカラン：強光・独立栄養；シュンランとナギラン：弱光・部分的菌従属栄養；マヤラン：弱光・無葉・菌従属栄養）を用いて、植物の菌従属栄養性の進化に伴う光合成機能の変化を検証した。

普通葉を欠くマヤラン以外の種について、葉の光合成量子収率と電子伝達速度を比較したところ、強光環境に生育するヘツカランは弱光環境に生育するシュンランより光合成活性が有意に高いが、同じく弱光に生育するナギランはシュンランより活性が有意に低かった。シュンラン属の葉は、弱光環境に進出し菌従属栄養レベルが高くなるとともに、光合成機能が低下することが示された。

次に、果実の量子収率と電子伝達速度を比較したところ、弱光環境に生育するシュンラン、ナギラン、マヤランの果実は、シュンランの葉の63%の光合成活性を示した。強光環境に生育するヘツカランの果実は、シュンラン、ナギラン、マヤランの果実に比べて活性が高かったが、ヘツカランの葉に対しては65%の活性を示した。4種の果実の解剖形質を比較したところ、気孔密度が低く、CO₂拡散経路となる細胞間隙が未発達な点において、種間で共通していた。既往の果実の光合成に関する知見と併せ考察すると、シュンラン属の果実の光合成は、大気CO₂を同化する栄養摂取にではなく、呼吸で生成したCO₂の再固定に機能していると考えられる。したがって、菌従属栄養性のマヤランにおいても、果実に光合成能力が維持されている事が示された。

以上の結果から、植物の菌従属栄養性進化において、従属栄養レベルの上昇に伴い、葉では光合成機能が低下する反面、果実においては機能が維持される進化パターンが見出された。これは、栄養摂取における葉と果実の役割の違いを反映していると考えられる。

(3) シュンラン属の生活形と栄養摂取の多様化と菌根菌パートナーのシフトの相関

分子同定法を使って、シュンラン属の菌根菌の系統的な帰属を解明した。まず祖先の段階であるヘツカランなど着生・独立栄養の種を調べると、大多数の菌根菌は担子菌のツラスネラ科 (Tulasnelaceae) に属する自由生活性の腐生菌だった。通常は樹上で樹皮やコケの遺体などを炭素源として利用しているグループである。

地表に立地を変えて部分的菌従属栄養を獲得したシュンランとナギランでも、着生の独立栄養種と同じくツラスネラ科の腐生菌が共生していた。ところが同じサンプルから同時に、通常は樹木の菌根菌として生活しているベニタケ科 (Russulaceae) やロウタケ目 (Sebacinales) などが見つかった。本来これらの菌は、まわりに生える特定の樹木の種と共生関係を持ち、樹木から炭水化物をもらったり代わりにリン等を樹木に与えるという栄養のやり取りを行っている。樹木の菌根菌が同時にシュンラン属の菌根菌になるということは、樹木が光合成によって作った炭水化物の一部を菌が利用し、さらにその一部を菌からシュンラン属が奪うネットワークのあることを示している。

地生の菌従属栄養種、マヤランとサガミランの菌根菌を検討すると、腐生菌はほとんど共生しておらず、樹木の菌根菌のみと共生することが分かった。光合成をほとんど行わないこれらの菌従属栄養種は、生存を支える有機炭素をもっぱらベニタケ科やロウタケ科などの菌に、言い換えれば、菌を介して樹木の作った炭水化物に依存していることになる。

以上の結果から、菌根菌が、植物の生活形や栄養摂取の進化に影響を及ぼした可能性の高いことが明らかとなった。

(4) 菌従属栄養ラン科植物の果実における光合成関連形質の多様性

シュンラン属の結果から、これまで「菌従属栄養性」と一括りで扱われてきた形質は、実際には複数の形質のさまざまな形質状態が組み合わさった進化の結果として獲得されることが示唆された。そこで系統の異なるラン科葉緑植物の3種（エビネ、シラン、シュンラン）、無葉緑植物の4種（オニノヤガラ、タシロラン、ツチアケビ、マヤラン）の光合成特性、気孔の形質、色素体の形質について比較をおこなった。

葉緑植物の3種では、果実の果皮片に光合成活性が確認され、気孔や葉緑体も正常な機能を有すると推定された。無葉緑植物の内、マヤランでは葉緑植物と遜色ない光合成活性と気孔・葉緑体の形成が見られたが、オニ

ノヤガラでは光合成活性、気孔、葉緑体のすべてが欠失していた。タシロランやツチアケビでは、光合成活性は測定限界以下の値で葉緑体も確認されなかったが、気孔は形成されていた。

以上のことから、ラン科の無葉緑植物の種類ごとに栄養摂取に関わる形質の組み合わせの異なることが明らかになった。さらに無葉緑植物の種間で菌への従属栄養レベルの違いがあること、植物の独立栄養性から菌従属栄養性への進化のパターンとプロセスが多様で複雑であることが示唆された。

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 16 件)

1) Ogura-Tsujita, Y., J. Yokoyama, K. Miyoshi & T. Yukawa, 2012. Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium*. *American Journal of Botany*, in press. 査読有

2) Nomura, N., Y. Ogura-Tsujita, S. W. Gale, A. Maeda, H. Umata, K. Hosaka & T. Yukawa, 2012. Dependency upon novel mycobiont offers insights into the rarity of *Nervilia nipponica* (Orchidaceae). *Journal of Plant Research*, in press. 査読有

3) Eum, S. M., S. W. Gale, T. Yukawa & N. S. Lee, 2011. Phylogenetic and conservation status of the endangered terrestrial orchid *Nervilia nipponica* (Orchidaceae) in Korea. *Biochemical Systematics and Ecology*, **39**, 635-642. 査読有

4) Li, J.-h., Z.-j. Liu, G. A. Salazar, P. Bernhardt, H. Perner, T. Yukawa, X.-h., Jin, S.-w. Chung, & Y.-b. Luo, 2011. Molecular phylogeny of *Cypripedium* (Orchidaceae: Cypripedioideae) inferred from multiple nuclear and chloroplast regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **61**, 308-320. 査読有

5) Yamato, M., T. Yagame, N. Shimomura, K. Iwase, H. Takahashi, Y. Ogura-Tsujita & T. Yukawa, 2011. Specific arbuscular mycorrhizal fungi associated with non-photosynthetic *Petrosavia sakurii* (Petrosaviaceae). *Mycorrhiza*, **21**, 631-639.

査読有

6) Tsutsumi, C., Miyoshi, K., Yukawa, T. & Kato, M. Responses of seed germination to light intensity and temperature in epiphytic and terrestrial *Liparis* (Orchidaceae). *Botany*, **89**, 841-848. 査読有

7) Motomura, H., M.-A. Selosse, F. Martos, A. Kagawa & T. Yukawa, 2010. Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, **53**, 573-581. 査読有

8) Gale, S. W., A. Maeda, C.-I. Chen & T. Yukawa, 2010. Inter-specific relationships and hierarchical spatial genetic structuring in *Nervilia nipponica*, an endangered orchid in Japan. *Journal of Plant Research*, **123**, 625-637. 査読有

9) Shefferson, R. P., C. C. Cowden, M. K. McCormick, T. Yukawa, Y. Ogura-Tsujita & T. Hashimoto, 2010. Evolution of host breadth in broad interactions: mycorrhizal specificity in East Asian and North American rattlesnake plantains (*Goodyera* spp.) and their fungal hosts. *Molecular Ecology*, **19**, 3008-3017. 査読有

10) Gale, S. W., J. Yamazaki, M. J. Hutchings, T. Yukawa & K. Miyoshi, 2010. Constraints on establishment in an endangered terrestrial orchid: a comparative study of *in vitro* and *in situ* seed germinability and seedling development in *Nervilia nipponica*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **163**, 166-180. 査読有

11) Nishimura, G. & T. Yukawa, 2010. Dark material accumulation and sclerotization during seed coat formation in *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science Series B (Botany)*, **36**, 33-37. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1) 野村尚史・上野修・遊川知久, 2012. シュンラン属の生活形・栄養摂取様式の進化—11: 光合成能力の系統比較. 日本植物分類学会第11回大会(2012年3月24日 吹田).
2) Yukawa, T., 2011. Novel fungal symbiosis lead to diversification in orchids. 7th International

Symposium on Diversity and Conservation of Asian Orchids (2011年12月8日 Seoul).

3) 丸川祐佳・野村尚史・遊川知久・伊藤元己, 2011. ラン科植物における菌根菌共生関連受容体型キナーゼ SYMRK 相同遺伝子の単離とその解析. 日本植物学会第75回大会 (2011年9月19日 東京).

4) 野村尚史・辻田有紀・Stephan Gale・前田綾子・馬田英隆・保坂健太郎・遊川知久, 2011. 共生菌相の特異性がもたらしたムカゴサイシン (ラン科) の希少性. 日本植物学会第75回大会 (2011年9月19日 東京).

5) Yukawa, T. & Y. Ogura-Tsujita. 2011. Mycorrhizal fungi played key roles in the evolution of orchids. 18th International Botanical Congress (2011年7月26日 Melbourne).

6) 遊川知久, 2011. ラン科の生活形と栄養摂取様式の進化. ワークショップ 雲霧林と林冠部を探る: 林冠部研究の包括化を目指して (2011年2月5日 京都).

7) Yukawa, T., 2010. Mycorrhizal fungi played key roles in the evolution of orchids: evidence in *Cymbidium*. 6th International Symposium on Diversity and Conservation of Asian Orchids (2010年11月3日 Nanning).

8) 谷亀高広・辻田有紀・岩瀬剛二・遊川知久, 2010. ラン型菌共生の起源と進化-4: サカネラン属およびフタバラン属の菌根共生. 日本植物学会第74回大会 (2010年9月9日 愛知).

9) 野村尚史・上野修・遊川知久, 2010. シュンラン属の生活形・栄養摂取様式の進化-10: 菌従属栄養植物の果実における光合成. 日本植物学会第74回大会 (2010年9月11日 愛知).

10) Ogura-Tsujita, Y., J. Yokoyama & T. Yukawa. Gradual shift of mycorrhizal partners; from green to myco-heterotrophic orchids. Annual Scientific Meeting of British Mycological Society (2009年9月2日 Dundee).

11) 遊川知久・辻田有紀・堤千絵・横山潤, 2009. なぜラン科は多様なのか-菌根菌パートナーのシフトがもたらしたランの生活形と栄養摂取様式の進化. 日本植物学会第73回大会 (2009年9月20日山形).

12) Freudenstein, J., C. F. Barrett, F. Craig & T. Yukawa, 2009. *Corallorhiza* (Orchidaceae) has

two copies of *matK*, one of which is a pseudogene. Botany & Mycology 2009, Annual Meeting of the Botanical Society of America (2009年7月27日 Snowbird).

[図書] (計1件)

1) 遊川知久, 2011. 植物の固有性に菌根菌は影響を与えているか? 加藤雅啓・海老原淳 (編), 国立科学博物館叢書 11 日本の固有植物, 東海大学出版会, pp. 10-11.

[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)
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

上野 修 (UENO OSAMU)
九州大学大学院・農学研究院・教授
研究者番号: 70414886

三吉 一光 (MIYOSHI KAZUMITSU)
秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 60312237