

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370040

研究課題名(和文)植物の菌従属栄養性進化のパターンとプロセスの解明

研究課題名(英文) Investigation of patterns and processes in the evolution of mycoheterotrophy of 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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：菌従属栄養植物種とそれにもっとも近縁な独立栄養植物種のペアを複数用いて、各系統の菌従属栄養性進化に伴う形質を解析し、植物の菌従属栄養性進化のパターンとプロセスを推定した。その結果、植物が独立栄養から菌従属栄養に進化するポイントで菌根菌相が大きく変化することと、菌従属栄養植物の複数の系統間で菌パートナーの収斂が起こっていることが明らかになった。植物が栄養摂取を最適化する菌パートナーを選択したことが、菌従属栄養性進化のキー・イノベーションとなった可能性が高い。

研究成果の概要(英文)： We analyzed changes of characters in association with the evolution of mycoheterotrophy by using pairs of mycoheterotrophs and its autotrophic sister species from several plant groups and estimated patterns and processes in the evolution of mycoheterotrophy. The results showed that communities of fungal partners change in the course of the evolution from autotrophy to mycoheterotrophy in plants and that convergence of fungal partners occurs in distantly related mycoheterotrophs. These results suggest that selection of fungal partners optimizing nutrition process of a plant acts as key innovation in the evolution of mycoheterotrophy.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：菌根 進化 共生 植物 従属栄養 寄生 光合成 菌類

1. 研究開始当初の背景

菌従属栄養植物とは、生命維持に必要な栄養を菌根菌に依存する特殊な栄養摂取様式を持つ植物である。陸上植物に約 530 種が知られ、進化過程で少なくとも 45 回出現したと推定される。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、大部分の研究は形態の記述と菌根菌の同定のいずれかにとどまっており、どのような形質進化により菌従属栄養性が獲得されたかは解析されていない。

これまで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扱われてきた。しかし申請者らの研究で、1) 進化過程において独立栄養と菌従属栄養の中間段階、部分的菌従属栄養が存在すること、2) 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、獲得されること、3) 菌従属栄養植物の種類ごとに菌従属栄養性に関連する形質の組み合わせが異なること等を解明した。

このように、菌従属栄養性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されたものの、陸上植物で繰り返し進化した菌従属栄養性のごく一部の系統での断片的な知見に過ぎない。このような未知の多様性が予想される状況においては、帰納的なアプローチを用いて菌従属栄養性獲得に関わる形質進化の多様性をさらに追求することが必須である。

2. 研究の目的

植物の菌従属栄養性進化の実体を解明するためには、1) 菌従属栄養性に進化した複数の系統を調べること、2) 菌従属栄養種にもっとも近縁な独立栄養種を確定し解析すること、3) 菌従属栄養性獲得に関わる形質を網羅した解析をおこなうことが不可欠である。

この方針のもと、まず独立栄養種と菌従属栄養種を含む分岐群の精度の高い系統仮説を構築し、菌従属栄養種と独立栄養種の姉妹群を複数確定する。それぞれの種ごとに、生育環境に関わる生態形質、栄養器官の解剖形質、種子の形質、色素体の形質、光合成に関わる形質、菌根菌の形質、菌根の解剖学的形質と動態、菌従属栄養レベル(植物体を構成する炭素における光合成産物と菌根菌からの転流物質の割合)、以上をそれぞれに最適な手法で解析する。得られた結果を、独立に進化した分岐群間で比較することにより、菌従属栄養性獲得に伴う形質進化のパターンとプロセスを明らかにする。

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) 植物の分子系統解析

主として色素体ゲノムの *matK*、*rpl16* イントロン、*trnK* イントロン、*trnT-L-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リボソーム RNA 遺伝子 LSU と核リボソーム 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、クロロフィル蛍光の計測、気孔や葉の内部構造などを観察した。

(6) 栄養器官と菌根菌の解剖形質の解析

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) グロムス菌門と共生する植物(アーバスキュラー菌根植物)の菌従属栄養性進化にともなう菌パートナーの変化

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)を対象に、菌従属栄養性進化にともなう菌パートナーの変化に着目して研究を行った。グロムス菌門と共生する植物で独立栄養種と菌従属栄養種の系統関係が解明されているサクライソウ科の独立栄養性のオゼソウ(*Japonolirion osense* Nakai)と姉妹群である菌従属栄養性のサクライソウ(*Petrosavia sakurii* (Makino) J.J. Sm. ex van Steenis)を用いて、両者の菌根菌相を比較した。

オゼソウ、サクライソウをそれぞれ3地点、6地点の自生地から採集し、核リボソーム RNA 遺伝子の 18S 領域の塩基配列情報を用いて菌根菌の分子同定をおこなった。その結果、オゼソウは *Glomus*-group A の多様なグループと菌根を形成する一方、サクライソウ

は *Glomus*-group A の一部の系統のみと特異性の高い共生系を確立していることが明らかになった。その中の 1 グループはサクライソウの菌根菌と同一の分岐群となり、99%の相同性があった。独立栄養から菌従属栄養への進化とともに菌パートナーの特異性が高くなることが明らかになった一方、オゼソウとサクライソウは同じ菌根菌を利用する場合があり、菌パートナーのシフトは必須ではないことが判明した。

またグロムス菌門と共生するヒナノシャクジョウ科の菌従属栄養種キリシマシャクジョウとルリシヤクジョウの菌根菌の多様性を解析し、*Glomus*-group A の一部の系統のみと特異性の高い共生系を確立していることが明らかになった。今後、ヒナノシャクジョウ科植物の系統関係を明らかにし、調査した種と近縁の独立栄養種の菌根菌と比較する予定である。

(2) 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

担子菌門と共生する植物で独立栄養から菌従属栄養への進化する系統を分子系統解析によって特定した。その結果、ラン科サカネラン属 (*Neottia*) とシュンラン属 (*Cymbidium*) において、独立栄養種と菌従属栄養種の確からしい系統仮説を提示できたので、これらの植物について菌根菌の多様性を調査した。

サカネラン属植物 11 種 (独立栄養種: 5 種、菌従属栄養種 6 種) の菌根菌について、核リボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域および LSU の分子系統解析を行った。その結果、菌従属栄養種のすべてのサンプルは担子菌門のロウタケ目 (Sebacinales) group A と、独立栄養種のすべてのサンプルはロウタケ目 group B と菌根共生することが分かった。また植物種ごとに菌根菌への特異性に差があり、菌従属栄養種のタンザワサカネランのようにロウタケ目以外のイボタケ科やベニタケ科などとも共生する種も存在した。さらにツツジ科植物と菌根共生するロウタケ目 group B の種が独立栄養種のミヤマフタバランやコフタバランより検出され、ラン科とツツジ科植物が菌根菌を共有する可能性が示唆された。ロウタケ目は group A と B の 2 分岐群からなり、前者は樹木の外生菌根を形成するのに対し、後者は腐生菌などの非外生菌根性の種から構成されることが知られている。別途構築したサカネラン属の分子系統樹を参照体系として菌根菌相のシフトを検証したところ、サカネラン属の独立栄養から菌従属栄養への進化に伴い、腐生性のロウタケ目 group B から外生菌根を形成するロウタケ目 group A に菌根菌がシフトした可能性が高いことが明らかとなった。

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により、シュンラン属には、一般の植物のように光合成によ

て栄養を獲得する独立栄養種と、光合成をほとんど行わず生活史を通じて共生菌に栄養を依存する菌従属栄養種、および光合成と共生菌の両方から栄養を獲得する部分的菌従属栄養種が存在することが分かった。またシュンラン属の多くは独立栄養であるが、その中から部分的菌従属栄養種を含むグループが進化し、さらにその中から菌従属栄養種が進化したことを、分子系統解析によって明らかにした。栄養摂取が多様化した単系統群を形成する独立栄養のヘツカラン (*C. dayanum*)、部分的菌従属栄養のナギラン (*C. nagifolium*) とシュンラン (*C. goeringii*)、菌従属栄養のマヤラン (*C. macrorhizon*) とサガミラン (*C. nipponicum*) に着目し、これらの菌根菌相を調査した。核リボソーム RNA 遺伝子 ITS 領域の塩基配列を用いて菌を分子同定したところ、1) 独立栄養のヘツカランは植物遺体を分解し炭素を獲得する腐生菌で、ラン科から普遍的に検出される担子菌門のツラスネラ科 (Tulasnellaceae) と共生し、2) 部分的菌従属栄養のナギランとシュンランはツラスネラ科に加えて、生きた樹木から炭素を獲得する外生菌根菌である担子菌門のロウタケ目 (Sebacinales)、ベニタケ科 (Russulaceae)、イボタケ科 (Therepholaceae)、カレエダタケ科 (Clavulinaceae) と共生し、3) 菌従属栄養のマヤランとサガミランは、主に外生菌根菌のロウタケ目と共生していることが明らかになった。以上の結果から、シュンラン属では独立栄養から部分的菌従属栄養を経て菌従属栄養が進化する過程に伴って、菌パートナーが腐生菌から腐生菌 + 外生菌根菌を経て、外生菌根菌へ段階的にシフトしたことが示された。

(3) 生活史ステージによる菌根菌相変化の種間比較

これまでおもに成熟個体の菌従属栄養植物を用いて菌根菌相を調査・評価していたが、研究を進めるとともに種子発芽時は成熟時とは異なる菌パートナーが共生する事例があることが明らかになり始めた。そこで、これまで成熟個体の菌根菌相を網羅的に調べたラン科シュンラン属の 4 種 (シュンラン、ナギラン、マヤラン、サガミラン) を用いて、生活史ステージによる菌根菌相の変化を詳細に解析した。各種 2-4 ヶ所の自生地で播種し回収した実生から DNA を抽出し、核リボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域を解読して菌根菌を同定した。ついで植物種ごとに菌種の相対出現頻度を求めて、生活史段階と種間で比較した。すべての種で幼若期の個体は、担子菌門ロウタケ目を主体とする外生菌根菌とのみ共生することが分かった。すなわち部分的菌従属栄養のシュンランとナギランは、幼若期には外生菌根菌とのみ共生し、成熟とともに菌パートナーが多様化し、腐生菌とも共生した。一方、菌従属栄養のマヤランとサ

ガミランは、生活史のいずれの段階も外生菌根菌とのみ共生した。以上から、生活史の段階によって菌パートナーが変化する種としない種が存在することが明らかになった。また本研究で解析した4種と近縁の独立栄養種は腐生菌とのみ共生することから、幼若期の菌パートナーが腐生菌から外生菌根菌にスイッチしたことが、菌従属栄養性進化の前適応となっていることが示唆された。

(4) 独立栄養植物と菌従属栄養植物の雑種作出

植物は独立栄養から菌従属栄養への進化の過程でさまざまな形質が変化するものの、関与する遺伝子群については未だ明らかにされていない。雑種を用いた遺伝解析は重要な手法であるが、菌従属栄養種に近縁な独立栄養種がほとんど特定されておらず、人工交配の機会も稀であるため、雑種作出は実現していなかった。しかしながら分子系統解析の結果、シュンラン属の菌従属栄養種には近縁な独立栄養種が存在することが明らかになったため、独立栄養種 *Cymbidium ensifolium* subsp. *haematodes* と菌従属栄養種マヤラン (*C. macrorhizon*) に着目して交配した。得られた種子を無菌培養して、60の雑種個体を得た。播種から5年後よりプラスチック内で開花を始め、播種後6年7ヶ月後には50個体が開花した。独立栄養植物と菌従属栄養植物の雑種開花の世界で初めての事例である。種子親の *C. ensifolium* subsp. *haematodes* は、シュートの伸長とともに頂芽から普通葉を形成し、発根した後、腋芽が生殖シュートになるが、花粉親のマヤランは、シュートの頂芽、腋芽ともに生殖シュートに発達し、根を形成しない。雑種個体はすべて種子親と同様に根を形成したが、シュートについては両親のタイプが観察された。また花茎に生じる鱗片葉の発達程度には差異が見られた。未熟な個体もあるため、これらの形質の評価には、さらなる観察が必要である。

5. 主な発表論文等

{ 雑誌論文 } (計 15 件)

1) Ogura-Tsujita, Y., K. Miyoshi, C. Tsutsumi and T. Yukawa, 2014. First flowering hybrid between autotrophic and mycoheterotrophic plant species: breakthrough in molecular biology of mycoheterotrophy. *Journal of Plant Research*, 127: 299–305. 査読有

2) Takamiya T., P. Wongsawad, A. Sathapattayanon, N. Tajima, S. Suzuki, S. Kitamura, N. Shioda, T. Handa, S. Kitanaka, H. Iijima and T. Yukawa, 2014. Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse group,

Dendrobium section *Dendrobium* and allies. *AoB PLANTS*, 6: plu045. 査読有
DOI 10.1093/aobpla/plu045

3) Yamato, M., Y. Ogura-Tsujita, H. Takahashi and T. Yukawa, 2014. Significant difference in mycorrhizal specificity between an autotrophic and its sister mycoheterotrophic plant species of Petrosaviaceae. *Journal of Plant Research*, 127: 685–693. 査読有

4) Chung, M. Y., J. López-Pujol, M. -O. Moon, M. Maki, T. Yukawa, N. Sugiura and M. G. Chung, 2013. Population history of the terrestrial orchid *Cremastra appendiculata* var. *variabilis* from Korea, inferred from levels and distribution of genetic diversity. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 173: 721–732. 査読有

5) Ogura-Tsujita, Y., A. Sakoda, A. Ebihara, T. Yukawa and R. Imaichi, 2013. Arbuscular mycorrhiza formation in cordate gametophytes of two ferns, *Angiopteris lygodiifolia* and *Osmunda japonica*. *Journal of Plant Research*, 126: 41–50. 査読有

6) Nomura, N., Y. Ogura-Tsujita, S. W. Gale, A. Maeda, H. Umata, K. Hosaka and T. Yukawa, 2013. The rare terrestrial orchid *Nervilia nipponica* consistently associates with a novel mycobiont. *Journal of Plant Research*, 126: 613–623. 査読有

7) Ogura-Tsujita, Y., H. Umata and T. Yukawa, 2013. High mycorrhizal specificity in the mycoheterotrophic *Burmannia nepalensis* and *B. itoana* (Burmanniaceae). *Mycoscience*, 54: 444–448. 査読有

8) Ogura-Tsujita, Y., J. Yokoyama, K. Miyoshi and T. Yukawa, 2012. Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium*. *American Journal of Botany*, 99: 1158–1176. 査読有

{ 学会発表 } (計 31 件)

1) Yukawa, T., 2014. Mycorrhizal fungi played key roles in the evolution of orchids. Second International Orchid Symposium, Tainan (Taiwan). 2014年3月5日

2) 木下晃彦・辻田有紀・遊川知久, 2014. ラン科シュンラン属の生活形・栄養・摂取様式の進化 - 12: 生活史ステージによる菌根菌

シフトの種間比較. 日本植物学会第 78 回大会, 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市), 2014 年 9 月 12-14 日.

3) 辻田有紀・三吉一光・堤千絵・遊川知久, 2014. ラン科シュンラン属の生活形・栄養摂取様式の進化 - 13: 独立栄養植物と菌従属栄養植物の雑種の世界初開花. 日本植物学会第 78 回大会, 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市), 2014 年 9 月 12-14 日.

4) 大和政秀・高橋弘・下野綾子・遊川知久, 2014. 菌従属栄養植物サクライソウの分布は共生菌の優占度に影響を受けるか? 菌根研究会 2014 年度大会, 東京大学柏キャンパス(千葉県柏市), 2014 年 11 月 29 日.

5) 木下晃彦・辻田有紀・馬田英隆・佐藤大樹・橋本季正・遊川知久, 2014. オニノヤガラ属近縁 3 種間の菌根菌相と菌特異性の比較. 菌根研究会 2014 年度大会, 東京大学柏キャンパス(千葉県柏市), 2014 年 11 月 29 日.

6) 辻田有紀・馬田英隆・遊川知久, 2013. 菌従属栄養植物キリシマシャクジョウとルリシャクジョウの菌根菌に対する高い特異性. 日本菌学会第 57 回大会, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区), 2013 年 6 月 7-9 日.

7) 谷亀高広・辻田有紀・岩瀬剛二・遊川知久, 2013. ラン科サカネラン属における菌従属栄養性の進化に伴う菌根菌の変遷. 日本菌学会第 57 回大会, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区), 2013 年 6 月 7-9 日.

8) Ogura-Tsujita, Y., J. Yokoyama, K. Miyoshi and T. Yukawa, 2013. Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium*. 31th New Phytologist Symposium, Calabria (Italy), 2013 年 5 月 14-16 日.

9) 遊川知久・堤千絵・辻田有紀・T.-C. Hsu・S.-W. Chung・馬田英隆, 2013. 菌従属栄養植物オニノヤガラ属の菌根菌の多様性-1: オニノヤガラ属の核、色素体、ミトコンドリアゲノムの塩基配列情報に基づく系統関係. 日本植物学会第 77 回大会, 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市), 2013 年 9 月 13-15 日.

10) 木下晃彦・辻田有紀・馬田英隆・佐藤大樹・橋本季正・遊川知久, 2013. 菌従属栄養植物オニノヤガラ属の菌根菌の多様性-2: *Codonanthus* 節における菌根菌の特異性レベルの比較. 日本植物学会第 77 回大会, 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市), 2013 年 9 月 13-15 日.

11) 辻田有紀・Yung-I Lee・木下晃彦・馬田英隆・橋本季正・遊川知久, 2013. 菌従属栄養植物オニノヤガラ属の菌根菌の多様性-3: 共生パターンの多様性と進化に関する予報. 日本植物学会第 77 回大会, 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市), 2013 年 9 月 13-15 日.

12) 遊川知久, 2013. 菌従属栄養植物の系統と進化. 日本植物学会第 77 回大会, 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市), 2013 年 9 月 13-15 日.

13) 坂本裕紀・横山潤・遊川知久・辻田有紀・牧雅之, 2013. 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, 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市), 2013 年 9 月 13-15 日.

14) 辻田有紀・横山潤・三吉一光・遊川知久, 2013. 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, 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市), 2013 年 9 月 13-15 日.

15) 遊川知久・辻田有紀・高橋弘・大和政秀, 2012. アーバスキュラー菌根植物の菌従属栄養性進化にともなう菌パートナーのシフト. 日本植物学会第 76 回大会, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス(兵庫県姫路市), 2012 年 9 月 15-17 日.

〔図書〕(計 4 件)

1) 遊川知久, 2014. 菌従属栄養植物の系統と進化. 植物科学最前線, 5: 85-62. 日本植物学会.

2) 遊川知久, 2012. ラン科・共生菌がもたらした多様化. 戸部博・田村実(編), 新しい植物分類学 I: 210-223. 講談社.

〔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

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

今市 涼子 (IMAICHI, Ryoko)

日本女子大学・理学部・教授
研究者番号：60112752

(3)連携研究者

奥山 雄大 (OKUYAMA, Yudai)
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：40522529

堤 千絵 (TSUTSUMI, Chie)
独立行政法人国立科学博物館・植物研究
部・研究員
研究者番号：30455422

保坂 健太郎 (HOSAKA, Kentaro)
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：10509417