

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82617

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14442

研究課題名(和文)植物-菌共生系を使った菌従属栄養植物の保全技術の確立

研究課題名(英文)Development of conservation techniques of mycoheterotrophic plants using plant-fungi symbiosis

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：菌従属栄養植物の生息域外保全の核心となる3つの課題、1) 共生する特定の菌のみの分離・精製、2) 分離した菌の培養・保存、3) 植物-菌共生系の構築、以上の解決をめざした技術開発を行った。1) に関しては、菌糸コイルを抗生物質水溶液で洗浄することにより、特定の菌を大量に分離することが可能となった。2) に関しては、自生地の腐植を菌糸に覆土することによって、効率よく子実体を形成させることが可能となった。3) に関して菌従属栄養植物と菌の2者共生系は確立したが、独立栄養植物-菌根菌-菌従属栄養植物の3者共生系では更なる技術開発が必要である。

研究成果の概要(英文)：We developed new methods to resolve three central issues concerning efficient ex situ conservation of mycoheterotrophic plants, i. e., 1) isolation of particular fungi in association with the host plant species, 2) culture and preservation of isolated fungi, and 3) establishment of plant-fungi symbiosis. Regarding the first issue, mass isolation of target fungal species was accomplished by repeated washes of hyphae in aqueous solution of antibiotics. In relation to the second issue, covering of hyphae with humus from the habitat of target species facilitated the growth and subsequent formation of fruit bodies. On the last issue, mycoheterotrophic plant-fungi symbiosis was established in this study, while further experiments are needed to establish tripartite symbiosis involving an autotrophic plant, a fungus, and a mycoheterotrophic plant.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：菌根 保全 植物 共生 菌類

### 1. 研究開始当初の背景

植物の基本的な特徴のひとつとして独立栄養性があるが、成長に必要な栄養を特定の菌に依存し続ける植物がまれに存在する。このような生理的特性を有する一群を「菌従属栄養植物」と呼ぶ。菌従属栄養植物の保全を実施する際、菌との共生系を構築するための技術が不可欠である。しかし、菌従属栄養植物は種ごとに特定の菌としか共生しない、共生する菌が絶対寄生性であることが多く単独に分離・培養することが困難、in vitro で植物と菌の共生系の確立が困難、といった課題があるため、本研究「植物 - 菌共生系を使った菌従属栄養植物の保全技術の確立」を着想した。

### 2. 研究の目的

菌従属栄養植物の生息域外保全の核心となる3つの課題、1) 共生する特定の菌のみの分離・精製、2) 分離した菌の培養・保存、3) 植物 - 菌共生系の構築、以上の解決をめざした技術開発を行った。さらに一連の技術開発のプロセスで、菌従属栄養植物と共生する菌の未知の生物学的特性を明らかにし、絶滅が危惧される菌従属栄養植物の保全に資する知見の集積を図ることをめざした。

### 3. 研究の方法

上述した3課題に対して、以下の研究を行った。

#### (1) 菌根菌の単離と培養の技術確立

本研究では、ラン科サイハイラン属モイワランを用いた。菌根菌の分離は、先行研究で用いた手法を大幅に改変した。モイワランの根茎を長さ約1 cm に切断し、それを滅菌した乳鉢ですりつぶした。次に、菌糸の伸長を阻害するバクテリアを除去するため、分離した菌糸塊を滅菌蒸留水により5回繰り返し洗浄し、さらにテトラサイクリン塩酸塩およびストレプトマイシン硫酸塩溶液によって分離菌糸塊を洗浄・滅菌した。分離した菌糸塊は、菌分離培地 (Czapek-dox 培地) による前培養を経て、ジャガイモ・ショ糖培地(PDA) 上で培養した。

また、菌の子実体形成の手法についても、既往の手法の改良を試みた。PDA 上で培養した菌糸塊を寒天ごとオガクズ (コナラ・ブナなどに由来) とフスマを混ぜ合わせた培地に移植し、子実体形成のための前培養を行った。まず、乾燥させたオガクズとフスマを混ぜ合わせた培地に蒸留水を加えて、培地の水分含量を70%前後に調節した。培地はキノコ用の培養瓶 (ポリプロピレン製) に入れ加圧滅菌した。1週間放置して培地にコンタミネーションが見られないことを確認し、培地上にPDA で培養したモイワランの菌根菌を滅菌したメスを使って寒天ごと移植し、菌糸を植え付けた。培養瓶は25 暗所に置き、菌糸を伸長させた。菌糸が十分に培養瓶の中のオガ

クズに広がった後、培養物をプラスチック製のコンテナに広げ、その上からモイワランの自生地のリター層より採集した腐植を加圧滅菌した後に覆土し、菌根菌の子実体形成を促した。

#### (2) 菌従属栄養植物と菌の2者共生系の技術確立

複数のグループの腐生性の菌と共生する、ラン科サイハイラン属サイハイランを材料に実験を行った。サイハイランは研究1) で用いたモイワランにもっとも近縁な種で、植物の菌従属栄養性進化に伴う共生菌の生物学的特性の変化を検証するのに最適な材料である。報告者らの先行研究によって、サイハイランの自生個体は、大部分のラン科植物が共生する担子菌門のツラスネラ科などの通称リゾクトニアとともに、モイワランなど限られた菌従属栄養植物のみと共生する担子菌門のナヨタケ科が検出された。これら2グループの菌とサイハイランとの共生系を構築し、形態形成、さらには機能の差異を検証することを試みた。

サイハイランから高頻度で検出されるツラスネラ科、およびナヨタケ科の菌をそれぞれ1系統用い、サイハイランとの共生系構築を行った。一般的に共生培養にはオートミール培地 (OMA) を用いることが多いが、本実験では長期間安定した共生系を維持する必要性が高いため、栄養が豊富なオガクズを培地に用いた長期共生培養の手法を考案した。オガクズの排水や通気を良くするため、鹿沼土と赤玉土を混合・滅菌した培地にサイハイランの偽球茎と菌株を植え付けた。サイハイランの偽球茎は、国立科学博物館筑波実験植物園において維持されている無菌培養系の繁殖個体 (神奈川県産) を供試した。12時間照明の条件下で192日間共生培養した後、植物体における根茎形成の有無、根長、シュート数などを計測した。

#### (3) 独立栄養植物 - 菌根菌 - 菌従属栄養植物の3者共生系の構築

ラン科植物と菌根共生する外生菌根性の菌種の多くは分離培養が困難であり、このような菌種を取り扱うための技術革新が求められている。本実験では、ラン科シュンラン属マヤランを材料として用いた。

マヤランの主な菌根菌は、通常はマツ科、ブナ科、カバノキ科などの外生菌根菌として共生する、担子菌門ロウタケ目の菌種である。外生菌根菌となるロウタケ目の種は、人工培地上での培養が困難なことが先行研究から明らかにされている。

本実験では、まず分離した菌糸塊を本来の菌のパートナーである木本植物の苗の細根に固定し、外生菌根を形成させる技術開発を試みた。この手法を確立することにより、分離培養が困難である外生菌根性の菌種を in vitro での実験に利用することが可能となる。

本実験ではマツ科アカマツを菌の宿主に用いた。アカマツは、ロウタケ目と菌根共生することが確認されており、種子の保存が容易であるとともに、実生苗が小型で *in vitro* での実験に扱いやすいためである。

マヤランの自生個体から 1) の手法により分離した菌糸塊を寒天片に付着させ、種子発芽直後のアカマツの苗から伸長する根とともに不織布で挟み、菌糸塊から植物体に菌糸が伸長しやすくなるようにした。宿主は滅菌した鹿沼土と赤玉土の混合土を用い、滅菌したポリプロピレン製の鉢に植え付けた。

菌糸塊の根への異なった固定方法も試みた。アカマツ実生の根に 1% アルギン酸ナトリウム溶液で懸濁し粘度を高めた菌糸塊を付着させ、そこに 10mM の塩化カリウム溶液を塗布してゲル状に固め、菌糸塊を根に固定する手法を試みた。この手法では、マヤランの根茎表面に付着した土壌も接種源として利用できる可能性があると考え、菌糸塊と同様の方法でアカマツの根に付着させた。一連の実験では菌根形成のプロセスを観察しやすいように、使い捨て滅菌シャーレを培養容器として用いた。具体的には、使い捨て滅菌シャーレの側面に溝を切り、そこに発芽直後のアカマツ苗を固定した。次に、菌糸塊を付着させた根をシャーレ側面に広げ、それを滅菌したろ紙で覆った。その上に滅菌した赤玉土を敷き、シャーレの蓋を閉め、ピニールテープで蓋を固定した。

培養苗は、他の菌のコンタミネーションや乾燥を防ぐため、チャック付ピニール袋の中で 12 時間照明条件下において 3 か月間培養した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 菌根菌の単離と培養の技術確立

これまでさまざまな菌根菌の単離と保存手法が考案されてきたものの、汎用性の高い技術は確立していない。ラン科の菌根菌においては、根の皮層細胞の一部を切り取り、ガラス棒等で粉碎した後、固化直前の液体寒天培地で菌糸コイルを封入する手法が一般的に用いられている。しかしこの手法では得られる菌糸コイルの量が少なく、質の良い生きた菌糸コイルを保存できる確率が低い。

そこで、本実験では根を乳鉢に入れ、乳棒を使って粉碎し菌糸コイルを取り出す手法を採用した。この手法により、以前より用いられてきた手法より格段に大量の菌糸コイルを得られるようになった。しかし、この新規手法には、菌糸コイルと一緒に大量のバクテリアがコンタミネーションしてしまう欠点がある。そこで、取り出した菌糸コイルを滅菌蒸留水で複数回数洗浄し、その上で抗生物質水溶液による洗浄処理を行うことで、バクテリアによるコンタミネーションの頻度を飛躍的に下げることができた。この手法は、従来の手法と比べてはるかに大量の菌糸塊を効率よく分離できるため、プロトコームな

どの小さな植物体から容易に菌根菌を分離できる。菌従属栄養植物の様々な生育ステージから菌根菌が分離できる、画期的な手法を開発することができた。

菌の子実体形成に関して、従来は培養菌糸体を物理的に傷つける「菌掻き」により子実体を形成させる手法が用いられてきた。この手法は木材腐朽菌には有用な場面が多かったが、腐生性の菌種の子実体形成を促す手法としては成功率が低かった。本実験の結果、自生地で採集した腐植を覆土する技術によって、効率よく子実体を形成させることが可能となった。今後、腐生菌の子実体形成を必要とする実験系において、汎用性の高い技術を開発することができた。

##### (2) 菌従属栄養植物と菌の 2 者共生系の技術確立

第 1 回目の実験では、菌が植物に寄生的にふるまい、植物が枯死する結果となった。これは共生培養に使用したサイハイラン培養物が、無菌培養下で長期間移植を行っていないためだと推定された。また、実験に供試したナヨタケ科の菌株に培養変異が発生し、植物体との共生能が低下していた。

これらの問題を解決するため、サイハイランについては、新しい培地へ無菌培養苗を移植し 3 か月培養し、新たに成長した部分を実験に用いた。また菌株については、製品評価技術基盤機構 (NITE) から冷凍保存されていた菌株の提供を受け、2 者培養に用いた。その結果、サイハイランと、*Tulasnellaceae* およびナヨタケ科の菌株との 2 者共生系を構築することに成功した。

菌根共生した植物の形態形成に着目すると、ナヨタケ科と菌根共生したサイハイランはすべて根茎を形成した。一方、*Tulasnellaceae* と菌根共生した植物体は、根茎を形成しなかった。さらにナヨタケ科と菌根共生した植物体は、*Tulasnellaceae* と菌根共生した植物体と比べ、特に明区において根がより短くなる傾向が見られた。また、ナヨタケ科の菌種と菌根共生した個体は、*Tulasnellaceae* と菌根共生させた個体よりも、シュート数が有意に多くなった。

以上の結果、共生する菌種が異なると、サイハイランの栄養器官の形態形成に違いが生じることが明らかとなった。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。今後は、2 種の菌と共生培養した植物の個体ごとに、炭素と窒素の安定同位体分別比を計測し、菌の種類が植物体の菌従属栄養性にどのような変化を及ぼすか明らかにする。さらには、菌の種類による植物体の菌根の構造の違いも併せて観察する予定である。

##### (3) 独立栄養植物-菌根菌-菌従属栄養植物の 3 者共生系の構築

寒天片に菌糸コイルを付着させ、不織布を使って実生苗の根に固定する手法では、外生菌根を形成させることができなかった。その原因は不織布に根が潜り込み、植物体の根の生育が阻害されたためと推定された。

ゲル化剤を用いた外生菌根形成実験については、マヤランの根茎から抽出した菌糸塊をアカマツに付着させた実験区で、実験開始から2か月後、外生菌根様の形態形成が確認された。しかしその後、菌根様の形態を形成した苗のすべてが枯死した。その原因として、マヤランと菌根共生するロウタケ科が、アカマツから多くの栄養を収奪する寄生的な外生菌根菌であることが考えられる。今後、マヤラン菌根の菌糸塊を接種源とした外生菌根形成実験を実施する際は、播種してからあるていど成長したアカマツの実生苗を供試することを予定している。またアカマツの実生苗の培養方法についても、さらなる検討が必要である。培養には滅菌シャーレを使わず、ポリプロピレン製の鉢にアカマツの実生苗を植え付け、健全に生育させることで、Sebacinaceae との安定した共生系を構築することを試みる。

#### 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 5 件)

1) Yagame, T., E. Funabiki, T. Yukawa, E. Nagasawa, 2017. Identification of mycobionts in an achlorophyllous orchid, *Cremastra aphylla* (Orchidaceae), based on molecular analysis and basidioma morphology. *Mycoscience*, in press. 査読あり

2) 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

3) 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

4) 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

5) 伊藤彩乃・庄司顕則・松本竹吾・赤崎洋哉・海道智文・松澤宏・山崎旬・遊川知久, 2015. 埋立地の植栽林におけるキンラン (*Cephalanthera falcata* (Thunb.) Blume) の野外播種試験法による繁殖の試み. *日本緑化工学会誌*, 41: 279-282. 査読あり

[学会発表](計 12 件)

1) 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3月3日

2) 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, 千葉大学(千葉県千葉市). 2016年12月10日

3) 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, 京都大学(京都府京都市). 2016年9月16-18日

4) 長谷川啓一・上野裕介・大城温・光谷友樹・瀧本真理・井上隆司・遊川知久, 2016. キンラン属3種の保全手法確立にむけた好適生育環境と生存戦略の推定. 日本生態学会第63回全国大会, 東北大学(宮城県仙台市). 2016年3月20-24日

5) Yukawa, T., K. Suzuki and Y. Ogura-Tsujita, 2015. Diversity and conservation status of Japanese indigenous orchids. 11th International Symposium on Diversity and Conservation of Asian Orchids, Janghang (Korea). 2015年12月16-17日

6) Suzuki, K., Y. Ogura-Tsujita and T. Yukawa, 2015. Ex situ conservation programs at Tsukuba Botanical Garden. 11th International Symposium on Diversity and Conservation of Asian Orchids, Janghang (Korea). 2015年12月16-17日

7) Ogura-Tsujita, Y., K. Suzuki and T. Yukawa, 2015. Conservation by in situ

seed germination techniques: a case for wild orchids of Japan. 11th International Symposium on Diversity and Conservation of Asian Orchids, Janghang (Korea). 2015年12月16-17日

8) 伊藤彩乃・庄司顕則・松本竹吾・赤崎洋哉・海道智文・松澤宏・山崎旬・遊川知久, 2015. 埋立地の植栽林におけるキンラン (*Cephalanthera falcata* (Thunb.) Blume.) の野外播種試験法による繁殖の試み. 第46回日本緑化工学会大会, 日本大学(神奈川県藤沢市). 2015年9月26-28日

9) 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, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市). 2015年9月6-8日

10) 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, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市). 2015年9月6-8日

11) 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, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市). 2015年9月6-8日

12) 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, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市). 2015年9月6-8日

〔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

山田 明義 (YAMADA, Akiyoshi)

信州大学・農学部・准教授

研究者番号：10324237

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)