

オオバトソウ (*Platanthera minor*) の生態とその菌根共生

¹谷亀 高広・¹折原 貴道・²Marc-André Selosse・¹大和 政秀・¹岩瀬 剛二
¹鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター 〒680-8553 鳥取県鳥取市湖山南 4-101
²Université Montpellier II Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive
Route de Mende, 34 293 Montpellier cedex 5, France

Ecological characteristics and mycorrhizal symbiosis in *Platanthera minor* (Orchidaceae)

¹Takahiro Yagame・¹Takamichi Orihara・²Marc-André Selosse・¹Masahide Yamato・¹Koji Iwase
¹Fungus/mushroom Resource and Research Center, Faculty of Agriculture, Tottori University
4-101 Koyama-Minami, Tottori, 680-8553, JAPAN
²Université Montpellier II Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive
Route de Mende, 34 293 Montpellier cedex 5, France

Summary

Diversity of myco-symbionts and relative abundance of ^{15}N and ^{13}C in *Platanthera minor* was investigated. This orchid is commonly distributed in various types of ectomycorrhizal tree forests in Japan and is found in the highly shaded forest stand. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of *P. minor* indicate that this orchid is mixotroph. This is the first report of tribe Orchideae species as a mixotrophic orchid. The majority of myco-symbionts in *P. minor* were mainly found in specific clades of Ceratobasidiaceae. The fungi in Ceratobasidiaceae have been regarded mainly as saprobic or plant pathogenic fungi, but sometimes detected from orchids as myco-symbionts. Furthermore, a few ectomycorrhizal fungi have been also reported. However, distribution and diversity of ectomycorrhiza-forming Ceratobasidiaceae has not been well studied. In phylogenetic analysis, majority of myco-symbionts in *P. minor* clustered with ectomycorrhizal Ceratobasidiaceae. The formation of ectomycorrhizas on the roots of *Pinus densiflora* seedlings was confirmed by inoculation of fungal coils isolated from the roots of *P. minor*. It is revealed that *P. minor* mainly associates with ectomycorrhiza forming Ceratobasidiaceae fungi and the fungi could be commonly distributed in Japan, China, Taiwan, and tropic Asia to Oceania considering the distribution of the host orchid plants.

緒言

ラン科は高等植物の中で最も種分化が進んでおり、その生育環境は樹上から薄暗い林内まで極めて多様である。近年、林内に生育するラン科植物の中に、生育に必要な炭素源の一部を菌根菌に依存し、同時に光合成も行う種が発見されている。このような生態は混合栄養性 (mixotrophy) と呼ばれ、サカネラン連 (Neottieae) のキンラン属 (*Cephalanthera* spp.)、カキラン属 (*Epipactis* spp.) およびシュンラン連 (Cymbidieae) のシュンラン属 (*Cymbidium* spp.) などで発見されている (Bidartondo et al. 2004, Motomura et al. 2010)。この生態的特性は炭素および窒素の安定同位体値の測定によって推定される。緑色植物の二酸化炭素固定酵素 (Rubisco) は $^{12}\text{CO}_2$ とよく反応する性質を持つため、独立栄養性種では $\delta^{13}\text{C}$ が低い値となる。一方、ランと菌根共生する菌類では

^{13}C の蓄積がみられるため、菌根菌からの炭素源供給に依存する菌従属栄養性種では $\delta^{13}\text{C}$ が高い値となる。また、菌類の中でも樹木と共生し生育する外生菌根菌は $\delta^{15}\text{N}$ 値が高く、植物遺体を分解し生育する腐生菌は $\delta^{15}\text{N}$ 値が低いことが知られている。すなわち、植物体の $\delta^{13}\text{C}$ 値と $\delta^{15}\text{N}$ 値を比較することで、その植物の菌根菌への依存度や、菌根菌の生態的特性を推定することができる。

オオバトソウ (*Platanthera minor*) は本州南部から四国、九州、中国大陸および台湾に分布し、里山の疎林などにごく普通に見られるラン科ツレサギソウ属の植物である。オオバトソウが含まれるツレサギソウ属は約 150 種が北半球の冷温帯に分布し、いくつかの種について Tulasnellaceae および Ceratobasidiaceae が菌根菌として同定されている。 (Zelmer and Currah 1995, Bidartondo et al. 2004)。これらは主に腐生

菌あるいは植物病原菌として知られている菌群である。ツレサギソウ属に限らず、緑色葉を持つラン科植物の多くは、種子発芽から緑色葉の形成に至るまでの生育過程において Tulasnellaceae、Ceratosporiaceae などの腐生性の異担子菌類に炭素源を依存し、緑色葉が形成されると菌類への依存度が低下するとされている。草原に生育する *P. chlorantha* は、生育に必要な炭素源のほとんどを光合成によって自ら生産する独立栄養性種であることが、安定同位体値の計測から推定されている (Bidartondo et al. 2004)。しかし、ツレサギソウ属植物は草原から湿地、林床など多様な環境に生育することから、種ごとに菌根菌への依存度に差異があることが想定される。オオバノトンボソウは日本各地の多様な林分環境に生育する。このような性質は、様々な林内にごく普通に生育する菌根菌と共生するか、それぞれの林分ごとに共生する菌類を変化させ多様な菌根共生系を構築するか、どちらかの生存戦略によるものと考えられる。本研究では、多様な林分環境においてオオバノトンボソウを採集して菌根菌を分子同定し、その多様性を調査するとともに、安定同位体値を測定することによって菌従属栄養度について評価を行った。また、オオバノトンボソウの菌根菌は樹木と共生する外生菌根菌であると推察されたため、樹木苗の細根に対する、外生菌根形成能を調査した。

実験方法

サンプル採集と安定同位体値の測定

安定同位体値測定のためのサンプルは 2010 年 8 月に長野県下伊那郡 (site A)、埼玉県狭山市 (site B)、宮崎県北諸県郡 (site C) にて実施した。各採集地の標高、自生地における外生菌根性樹種については表 1 に示した。Site A、B では、サルトリイバラ (*Smilax shina*) とリョウブ (*Clethra barbinervis*) を、Site C ではサルトリイバラとベニシダ (*Dryopteris erythrosora*) をそれぞれ比較対照の独立栄養植物とし、異なる個体から 6 枚ずつの葉を採集した。また比較対照の外生菌根菌として、

Site A ではベニタケ科ベニタケ属の一種 (*Russula* sp.) の子実体を 2 個、site B ではテングタケ科のフクロツルタケ (*Amanita volvata*) の子実体を 3 個と、イボタケ科イボタケ属の一種 (*Thelephora* sp.) の子実体を 2 個、site C ではイグチ科アワタケ属 (*Xerocomus* sp.) の子実体 4 個をそれぞれ採集した。オオバノトンボソウは各採集地において 5 個体から地上部を採集した。採集したサンプルは 60 °C で 4 日間乾燥させた後、乳鉢を用いて粉末にした。安定同位体値は安定同位体比質量分析装置によって計測し、安定同位体比 (‰) を以下の計算式によって算出した。

$$\delta^{13}\text{C} \text{ or } \delta^{15}\text{N} = \left(\frac{R_{\text{サンプル}}}{R_{\text{基準物質}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ [‰]} \quad (1)$$

$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} \text{ or } {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$$

それぞれの採集地ごとに緑色植物、オオバノトンボソウ、外生菌根菌の子実体について $\delta^{13}\text{C}$ 値と $\delta^{15}\text{N}$ を求め、² 適合度検定およびバートレット検定によって、正規分布と分散について検定を行った。平均値の比較については、一元配置分散分析によって 3 群間の統計的有意差を検定し、多重比較検定は Tukey-Kramer 法を用いた。炭素の菌従属栄養度については linear two-source isotopic mixing model (Gebauer and Meyer 2003) の理論ののっとり、以下の計算式によって算出した。

菌根菌の多様性の調査は、上記に示した 3 地点を含む全国 9 地点から、41 個体、104 本の根を採集し、実施した (表 1)。

表 1. オオバトンボソウ採集に関する情報、および菌根菌 (Ceratosidiaceae) の塩基

採集地	採集地標高 (m)	供試した根の本数 ^a	ITS ^b			nLSU ^b	採集日	自生地における外生菌根性樹種
			1	2	3			
宮崎県北諸県郡	600	12 (4)	AB605637			AB605651	2009年5月26日	スダジイ
岡山県真庭市	640	15 (5)	AB605643	AB605644*		AB605654	2009年6月11日	アカマツ・コナラ
石川県金沢市	170	9 (4)	AB605645	AB605646		AB605655	2009年6月14日	モミ
	650	12 (5)	AB605647			AB605656	2009年6月27日	コナラ
長野県下伊那郡	800	21 (7)	AB604952	AB605635	AB605636	AB605650	2009年6月27日	アカマツ
埼玉県狭山市	93	12 (5)	AB605641	AB605642		AB605653	2009年7月7日	コナラ
千葉県鴨川市	204	11 (5)	AB605638	AB605639	AB605640*	AB605652	2009年7月8日	モミ
徳島県那賀町	800	4 (3)	AB605648			AB605657	2009年8月24日	アカマツ
鳥取県八東町	810	8 (3)	AB605649*			AB605658*	2009年9月16日	ブナ

^a()の数字は採集した個体数を示す。^b*は腐生菌と想定されたもの。

$$C = (\delta C_{MX} - \delta C_{EMF}) / (\delta C_R - \delta C_{EMF}) \times 100 [\%] \quad (2)$$

C_R=独立栄養植物

C_{EMF}=外生菌根菌

C_{MX}=オオバトンボソウ

菌糸コイルの分離

オオバトンボソウは、個体あたり 1-3 本の根を有している。根の菌根菌の定着部位 1 カ所から Warcup and Talbot (1967)を改変した手法によって菌糸コイルを分離し、さらに DNA を抽出した。また、長野県下伊那郡(site A)で採集された個体の一つは、大きな根を有し、多くの新鮮な菌糸コイルを分離することができたことから、この個体より分離された菌糸コイルは、菌根菌の分離培養、および外生菌根菌の定着試験に供試した。

菌根菌の分離培養と外生菌根菌定着試験

Site A において採集された個体から分離された菌糸コイルは、外生菌根菌の分離培養に用いられる改変 MMN 培地上に置床し、25.0±0.5 の暗黒条件下で培養した。また、Site A における外生菌根性樹種はアカマツ (*Pinus densiflora*)のみであったことから、本種を外生菌根菌の宿主とした。アカマツの種子 10 粒を、121 で 30 分間滅菌した赤玉土に播種して、1 ヶ月間温室で栽培した後、生育のよい 6 株を選抜し、外生菌根が形成されていないことを確認した後、外生菌根形成試験に供試した。赤玉土を丁寧に除去し、細根にピペットを用いて菌糸コイルを直接付着させた。その後、根を不織布(孔径約 50 μm)で挟み、赤玉土をその上に被せることで菌糸コイルを細根上に

安定させた。アカマツの苗は温室で菌接種後 4 ヶ月間栽培し、外生菌根形成を観察した。

菌根菌の分子同定

分離した菌糸コイル(約 20 粒)、およびアカマツの根に形成された外生菌根(4 チップ)から DNA を抽出し、rDNA の ITS 領域を対象とした PCR を行った。通常菌類の ITS 領域にはプライマー ITS1F /ITS4 を用いるが、これまでにツレサギソウ属植物の主要な菌根菌として報告されている Tulasnellaceae の DNA は上記のプライマーセットでは増幅しないことが知られている。このため、この菌の ITS 領域を増幅する ITS1-OF/ITS4-OF のプライマーセットも同時に用いた。また、rDNA の大サブユニット (nLSU)についても NL1/NL4 のプライマーセットを用いて増幅し、系統解析を行った。PCR 産物はクローニング(3 回反復)を行った後、シーケンス反応を行い、菌根菌の塩基配列を決定した。得られた DNA データは BLAST searches によって相同性検索を行った。ITS、nLSU の各領域の系統解析は、検出頻度が高かった Ceratosidiaceae に対してのみ行った。この解析では、同一の自生地から得られた同じ塩基配列は除外し、異なるすべてのタイプの配列を含めることとした。塩基配列のアライメントは CLUSTAL W を用い、近隣結合法および最節約法を用い、解析には MEGA version 4 を用いた。また、より信頼度の高い系統樹を得る目的で、系統解析の際の樹形構築にはベイズ法を用い、解析には MrBayes 3.1.2 program を用いた。



図1. オオバトンボソウの自生地の外観。A:埼玉県狭山市(コナラ林), B:長野県下伊那郡(アカマツ林), C:宮崎県北諸県郡(スダジイ林)

結果

オオバトンボソウの安定同位体値

オオバトンボソウは 3 カ所の採集地 (図 1) すべてで、 $\delta^{15}\text{N}$ 値および $\delta^{13}\text{C}$ 値が周辺に生育する緑色植物よりも有意に高く、外生菌根菌の $\delta^{13}\text{C}$ 値よりも有意に低かった。(F ;43.0-61.3, $p < 0.05$)。また、site C において、オオバトンボソウの $\delta^{15}\text{N}$ 値は周辺の外生菌根菌のよりも有意に高く(F= 38.1, $p < 0.05$)、site A, B においては有意差が見られなかった。また、炭素化合物の菌根菌への依存度は計算式(2)より 50.7 ~ 65.5 %と推定された。以上の結果からオオバトンボソウは典型的な混合栄養性種であることが明らかとなった。

菌根菌の生理的特徴

MMN 培地に置床5日後、菌糸コイルから僅かに菌糸の伸長がみられたが、14 日後には菌糸伸長が停止した。一方、菌糸コイルを付着させた6 株のアカマツ苗のうち、1 株の根において外生菌根の形成が確認された(図2)。また、外生菌根から抽出した菌根菌の DNA 塩基配列は、接種した菌糸コイルから抽出された塩基配列と一致し、Ceratobasidiaceae と同定された。

オオバトンボソウの菌根菌の多様性

ITS1F/ITS4 および ITS1-OF/ITS4-OF 両のプライマーセットによって ITS 領域の塩基配列を増幅しシーケンスを行った結果、得られた 312 の塩基配列のうち、306 は Ceratobasidiaceae であった。宮崎、埼玉、長野(2 カ所)、岡山および鳥取の各県で採集されたオオバトンボソウからは

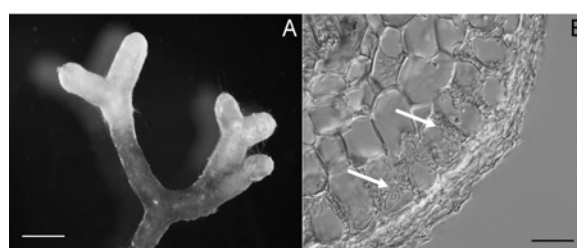


図 2. 菌糸コイルの接種によりアカマツの根に形成された外生菌根。

A:外生菌根の外観。Bar=500 μm , B:外生菌根の横断切片。矢印:ハイヒネット Bar=20 μm

菌種に近縁なものと、オーストラリアの地下生ランとして知られる *Rhizantella* spp.の菌根菌や、日本に自生する菌従属栄養性ランであるヒメノヤガラ (*Chamaegastrodia sikokiana*) の菌根菌に近縁なものに区別された。全体としては後者のタイプがはるかに多く、これらの菌群は樹木に外生菌根を形成すると考えられる。site A で採集された個体からは後者のタイプのみの配列が検出された。一方で、石川・千葉の各県で採集された個体からは、イボタケ科 (Thelephoraceae)、ロウタケ科 (Sebaciaceae)、ベニタケ科 (Russulaceae) カレエダタケ科 (Clavariaceae) などの菌も検出された。これらの個体はいずれもモミ林に自生していた個体であった。オオバトンボソウの主要な菌根菌である Ceratobasidiaceae に対し、ITS 領域について系統解析を行ったところ、その多くは *Rhizantella* spp. や、ヒメノヤガラ、さらにヤクシマラン属植物の菌根菌と近縁で、これらの菌は支持率の高いクレードを形成した(図 3)。また、このクレードに含まれるオオバトンボソウの菌根菌の塩基配列は、地理

的に離れた地域から採集されたにもかかわらず極めて高い相同性を示した。

考察

安定同位体値から、オオバトンボソウは外生菌根菌と菌根共生し、生育する混合栄養性種であることが明らかとなった。これはチドリソウ連としては初めての報告である。本種は様々な林分に普遍的に分布する特定の外生菌根性の *Ceratobasidiaceae* を主要な菌根菌とし、さらにそれぞれの林分ごとに異なった菌根菌とも共生することで、全国の様々な林分環境に分布すること示唆された。また、本研究においてオオバトンボソウが、ヤクシマラン (*Apostasia nipponica*) と *Apostasia wallichii* の 2 種の菌根菌に極めて近縁

見されていることから、この生態的特性は林床環境にランが進出する中での収斂進化の結果、獲得されたと考えられる。外生菌根性 *Ceratobasidiaceae* はオーストラリアの地下生ラン *Rhizantella gardneri* から最初に発見され (Warcup 1991)、その後菌従属栄養ラン科植物のヒメノヤガラからも検出されている (Yagame et al. 2008)。しかし、これらのランは分布が限られた希少種であり、外生菌根性 *Ceratobasidiaceae* の分布については十分な情報が得られていなかった。さらに、*Ceratobasidiaceae* はこれまで腐生菌や、植物病原菌として認識されてきたことから、仮に外生菌根菌から *Ceratobasidiaceae* の DNA が

検出されても、これまでは外生菌根性の菌種として認識されなかった可能性がある。本研究によって、外生菌根性 *Ceratobasidiaceae* はオオバトンボソウが自生する日本各地の様々な林分をはじめ、ヤクシマラン属植物の分布する熱帯アジアの常緑樹林林床、*Rhizantella* spp. の分布するオセアニアまで、広く分布することが明らかとなった。今後、世界各地における外生菌根菌相の調査の際、外生菌根性 *Ceratobasidiaceae* の菌種の存在を十分に勘案する必要があるだろう。本研究では、人工培地上で培養が困難な菌根菌を、直接樹木の細根に付着させることで、菌根形成の誘導に成功した。外生菌根菌と菌根共生するラン科植物から菌根菌を分離培養することは困難な場合が多く、樹木・菌根菌・ランの 3 者共生系を構築する上で大きな障害となってきた。この菌根形成手法は、今後希少野生植物の保全・増殖のための基礎技術として様々な応用が期待される。

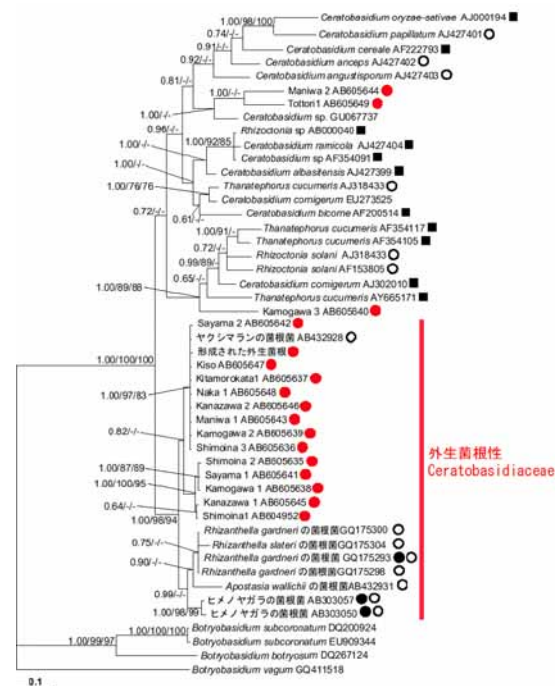


図 3. ベイズ法による rDNA, ITS 領域の系統樹。

ベイズ法による事後確率、近隣結合法および最節約法におけるブートストラップ値は枝の基部に示し、外群には *Botryobasidium* spp. を用いた。

はオオバトンボソウの菌根菌、 はランの菌根菌、 は外生菌根性、 は植物病原菌として分離されたものをそれぞれ示す。

な菌と菌根共生することが明らかとなった。これらのヤクシマラン属植物も暗い林床に自生することから、混合栄養性種であることが新たに示唆された。混合栄養性種はラン科の複数の系統から発

謝辞

本研究はグローバル COE プログラム 持続性社会構築に向けた菌類きのこ資源活用 の一課題として行われた。

引用文献

- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read D (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 271:1799-1806.
- Gebauer G, Meyer M (2003) ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* 160: 209-223
- Motomura H, Selosse MA, Martos F, Kagawa A, Yukawa T (2010) Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae) (In press)
- Warcup JH, Talbot PHB (1967) Perfect status of *Rhizoctonias* associated with orchid. *New Phytol* 66:631 - 641.
- Warcup JH (1991) The *Rhizoctonia* endophytes of *Rhizantella* (Orchiaceae). *Mycol Res* 95:656-659.
- Yagame T, Yamato M, Suzuki A, Iwase K (2008) *Ceratobasidiaceae* mycorrhizal fungi isolated from nonphotosynthetic orchid *Chamaegastrodia sikokiana*. *Mycorrhiza* 18:97-101.
- Zelmer CD, Currah RS (1997) Symbiotic germination *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with naturally occurring endophyte. *Lindleyana* 12:142 - 148.