

ラン科植物と共生する *Phizoctonia* 属菌の分類学的研究

学位論文内容の要旨

自然条件下で、ラン科植物は種子発芽時に菌根菌を必要とし、菌根菌の種子への感染により、実生段階（葉の分化）に到る。現在までにラン科植物の成体の根から菌根菌が多数分離されてきたが、自然界で実際にラン科植物の種子発芽がどのような菌類により誘導されているのかはほとんど明らかにされていない。また *Rhizoctonia* 属菌の系統進化を知る上でラン科植物共生菌としての *Rhizoctonia* 属菌を解析することは重要と考えられる。そこで本研究では、自生地におけるランの成個体の根およびその根圏土壤中のプロトコームから菌分離を行ない、ランの初期生育に関与する菌を明らかにすること、また日本およびカナダ産の温帯性地生ランから分離された共生菌 *Rhizoctonia* 属菌の系統解析を行ない、ラン科植物共生菌としての本属の分類学的位置付けを明らかにすることを研究目的とした。

ラン科植物 *Dactylorhiza aristata*（ハクサンチドリ）の自然状態のプロトコーム、実生および成個体の根から共生菌を分離した。分離された菌はすべて形態属 *Rhizoctonia* 属菌であった。菌糸融合を用いた類別結果より、本研究における分離菌株は、*Ceratobasidium cornigerum*（2 核 *Rhizoctonia* の菌糸融合群 AG-C）、*Ceratobasidium* sp.（AG-G および AG-H）、*Tulasnella deliquescens*（R.r.1）、および多核 *Rhizoctonia* の *Thanatephorus orchidicola*（T.o.1）と同定された。*T. orchidicola* の日本産のラン科植物からの分離は初報告であった。

ハクサンチドリのプロトコームからは4つの菌糸融合群に属する菌株（R.r.1、AG-C、AG-H および T.o.1）が分離され、成個体の根からは

この他に、AG-G に属する菌株が分離された。さらに、成個体1個体の根圏土壌中から分離された菌種を、分離源で比較したところ、R.r.1 および AG-C は、根とプロトコームの両者から分離されるか、あるいはプロトコームのみから分離されたのに対し、T.o.1 は、根とプロトコームの両者から分離された。また、T.o.1 は、常に R.r.1 と同じ個体に感染していたのに対し、R.r.1 および AG-C は、プロトコームおよび成個体の根にそれぞれ単独でも感染していた。これは、T.o.1 が二次感染によってランの根に定着したことを示すと考えられた。

In vitro の共生発芽試験において、表皮毛を形成したハクサンチドリ種子にのみ菌の感染が認められた。よってハクサンチドリ種子は菌侵入前に発芽(表皮毛形成)し、表皮毛が菌糸の唯一の感染経路であることが観察により明らかとなった。

In vitro の共生発芽試験における、種子発芽およびプロトコームの生育に対する菌の影響に、菌株の分離源(根あるいはプロトコーム)による違いはなく、接種区の全てで生育促進効果が見られた。供試した菌は種子への侵入前に、種子の表皮毛形成を促進する菌群と促進しない菌群の2群に分かれた。よってラン種子に侵入する以前から共生菌が種子の発芽に対して何らかの影響を及ぼしていると考えられた。さらに、発芽促進と生育促進の間には正の相関が見られ、プロトコーム由来の菌株の一つがプロトコームの生育を最もよく促進した。またそれとは別に、種子細胞内に入った後に生育を促進している菌も存在した。

ラン科植物の菌根菌として分離される *Rhizoctonia* 属と植物病原菌として報告されている *Rhizoctonia* 属との比較を行なうため、rDNA の塩基配列データを用いた系統解析を行なった。18S rDNA の塩基配列による解析では、Basidiomycotina 内における *Rhizoctonia* 属の類縁関係を解析した。その結果、*Rhizoctonia zeae* (*Waitea circinata*) を除く *Thanatephorus cucumeris*、2 核 *Rhizoctonia* および *Epulorhiza* は単一のクラスターを形成し、単系統性を示した。またこの3属においては、*Ceratobasidium* と *Thanatephorus* (Ceratobasidiaceae) が *Epulorhiza* (Tulasnellaceae) より近縁であることが示された。

rDNA の 5.8S rRNA コード領域は、2 核 *Rhizoctonia* および多核 *Rhizoctonia* では、155 bp で長さは一致していたが、このうち 1 塩基が置換していた。ただし、AG-G では完全に多核 *Rhizoctonia* の菌株と一致していた。

Rhizoctonia 属内および種内の類別は菌糸融合でなされている。これらの分類群の系統関係を明らかにするためさらに rDNA の ITS 領域を解析したところ、*Epulorhiza* 属では *Epulorhiza repens* と *E. anaticula* が明確に区別され、さらに *E. repens* 内の 2 菌糸融合群が区別された。一方、2 核 *Rhizoctonia* では菌糸融合群不明菌株が既知の菌糸融合群とクレードを作った。よって菌糸融合不明菌株を含めて、ランから分離される 2 核 *Rhizoctonia* が近縁であることが示唆された。さらに AG-E および AG-G の菌株が、多核の菌株と系統的に近いことが示された。今後はラン以外の分離源由来の菌株数を増やして比較を行ない、*Rhizoctonia* 全体の系統を調べる必要があると考えられた。

ITS領域の解析は種間あるいは種内などの近縁な分類群の比較に用いられる。近年、本領域の energy minimization method による二次構造予測で共通の保存領域を予想できるようになった。この手法をラン科植物の菌根菌として分離された *Rhizoctonia* 属菌に適用したところ、ITS 2 領域で共通の二次構造が見出された。これをアラインメントに応用することにより、スパーサー領域のアラインメントの信頼性を高められることが示された。

以上のことから、ランと共生する *Rhizoctonia* 属菌は、完全世代 3 属を含み、それらが近縁関係にあることが明らかとなった。*Dactylorhiza* 属のランは *Rhizoctonia* 属菌の 3 種類の完全世代に属する種と共生し、それらは少なくとも根の細胞内に「菌糸を形成して定着していた」という共生である。本研究から、ラン種子の発芽時(発芽の前)に細胞外から影響を及ぼす菌の存在(一次共生菌とする)が確認され、これと細胞内に入った後の「共生」とは区別すべきであると考えられた。よって今後はこのような観点から、一次共生菌をさらに多くのランから分離し、それらの類縁関係を調べる必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 越 明
副 査 教 授 小 林 喜 六
副 査 助 教 授 近 藤 則 夫

学 位 論 文 題 名

ラン科植物と共生する *Phizoctonia* 属菌の分類学的研究

本論文は和文で記され、図 18、表 10 を含む総頁数 123 頁からなり、8 章で構成されている。

自然条件下で、ラン科植物は種子発芽時に菌根菌を必要とし、菌根菌の種子への感染により、葉の分化に到る。現在までにラン科植物の成体の根から菌根菌が多数分離されてきたが、自然界で実際にラン科植物の種子発芽を誘導している菌についてはほとんど明らかにされていない。そこで、ランの初期生育に関与する菌を明らかにする目的で菌の分離を行なった。さらに分離した菌株が、*in vitro* の共生発芽試験においてラン種子に与える影響を調査した。また、ラン科植物共生菌としての本属の分類学的位置付けを明らかにすることを目的として、*Rhizoctonia* 属菌の系統解析を行なった。

ラン科植物 *Dactylorhiza aristata* (ハクサンチドリ) の自然状態のプロトコーム、実生および成個体の根から共生菌を分離した。それらはすべて形態属 *Rhizoctonia* 属菌であった。菌糸融合による同定で、分離菌株は *Ceratobasidium cornigerum* (2核 *Rhizoctonia* の菌糸融合群 AG-C)、*Ceratobasidium* sp. (AG-G および AG-H)、*Tulasnella deliquescens* (R.r.1)、および多核 *Rhizoctonia* である *Thanatephorus orchidicola* (T.o.1) と同定された。

成個体 1 個体の根圏土壌中から分離された菌種を分離源で比較したところ、R.r.1 および AG-C は、根とプロトコームの両者から分離されるか、あるいはプロトコームのみから分離されたのに対し、T.o.1 は、根とプロトコームの両者から分離された。また、T.o.1 は、常に R.r.1 と同じ個体に感染していたのに対し、R.r.1 および AG-C は、プロトコームおよび成個体の根にそれぞれ単

独でも感染していた。

In vitro の共生発芽試験において、ハクサンチドリ種子は菌侵入前に発芽（表皮毛形成）し、表皮毛が菌糸の唯一の感染経路であることが明らかとなった。また同試験において、種子発芽およびプロトコームの生育に対する菌の影響に、菌株の分離源（根あるいはプロトコーム）による違いはなく、接種区の全てで生育促進効果が見られた。しかし、供試した菌は種子の表皮毛形成を促進する菌群と促進しない菌群の2群に分かれた。共生菌が種子発芽に対して種子への侵入以前から何らかの影響を及ぼしていると考えられた。

ラン科植物の菌根菌として分離される *Rhizoctonia* 属と植物病原性 *Rhizoctonia* 属との比較のため、rDNA の塩基配列データを用いた系統解析を行なった。18S rDNA の塩基配列による解析では、*Rhizoctonia zeae* (*Waitea circinata*) を除く *Rhizoctonia* 属菌は単系統性を示した。

Rhizoctonia の属内および種内の類別は菌糸融合でなされている。これらの分類群の系統関係を明らかにするため、rDNA の ITS 領域を解析した。*Epulorhiza* 属では *Epulorhiza repens* と *E. anaticula* が明確に区別され、さらに *E. repens* 内の2菌糸融合群が区別された。一方、2核 *Rhizoctonia* では菌糸融合群不明菌株が既知の菌糸融合群とクレードを作った。そのため菌糸融合不明菌株を含めてランから分離される2核 *Rhizoctonia* が近縁であることが示唆された。さらに、AG-E および AG-G の菌株が、多核の菌株と系統的に近いことが示された。

以上のことから、ランと共生する *Rhizoctonia* 属菌は、いずれも近縁関係にあることが明らかとなった。*Dactylorhiza* 属のランは *Rhizoctonia* 属菌の3種類の完全世代に属する種と共生し、それらは少なくとも根の細胞内に「菌毯を形成して定着する」共生である。本研究から、ラン種子の発芽時（発芽の前）に細胞外から影響を及ぼす菌の存在（一次共生菌とする）が確認され、これと細胞内に入った後の「共生」とは区別するべきであると考えられた。よって今後はこのような観点から、一次共生菌をさらに多くのランから分離し、それらの類縁関係を調べる必要があることを示した。

以上の研究成果は学術上貢献するところ大きく、高く評価される。よって審査員一同は、早川志帆が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。