



コケ植物の仮死状態とアーバスキュラー菌根菌との共生関係

桑畑，裕太郎

(Citation)

課題研究優秀論文集, 2024:213-241

(Issue Date)

2025-01

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/0100492583>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492583>



2024 年度 卒業研究最終論文

コケ植物の仮死状態と アーバスキュラー菌根菌との共生関係

神戸大学附属中等教育学校 11 回生

6 年 3 組 11 番

桑畑 裕太郎

(指導教員 中垣 篤志)

2024 年度 卒業研究最終論文

コケ植物の仮死状態とアーバスキュラー菌根菌との共生関係

神戸大学附属中等教育学校 11 回生 6 年 3 組 11 番 桑畑 裕太朗

(指導教員 中垣 篤志)

要旨

アーバスキュラー菌根菌（以下 AMF）は、陸上植物の 8 割以上と共生関係を築き、根の内部に樹脂状態と呼ばれる栄養交換機関を形成し、栄養をやりとりすることで互いに利を得ている。近年では、リン鉱物の安定供給が危ぶまれることから農業利用を目的に注目され研究が進んでいる。その一方で、菌根共生の原点とも言われているコケ植物と AMF に関する研究は非常に遅れている。そこで本研究では、コケ植物と AMF の共生の中でも、関係に変化が見られると予想されるコケ植物が仮死状態になる前後に着目した。本研究では、この共生関係の一端を明らかにし共生の原点に迫ること、またこの共生が相利のものであるのかに対する議論に新しい視点を加えることを目的とした。

共生関係の変化を確認するため、メチレンブルー水溶液を用いた染色を行い、フタバネゼニゴケが仮死状態になる前、乾燥し仮死状態にある時、そして再給水し復活した後の AMF の感染状況を顕微鏡で観察した。この観察の結果、フタバネゼニゴケが仮死状態になると樹枝状態を含む感染ゾーンは減少するが、他の感染ゾーンでの感染は継続していること、フタバネゼニゴケが仮死状態から復活する前後では AMF の感染状況に大きな変化がないことがわかった。以上の結果からは、フタバネゼニゴケが仮死状態にあるとき、AMF は樹枝状態を形成するのに必要な栄養が不足すること、樹枝状態を含まない感染ゾーンには何か独立した役割があること、フタバネゼニゴケの復活に AMF が寄与していないことが考えられる。また、この二者間の共生関係について、コケ植物は他の維管束植物と AMF の共生関係に比べ、水資源に対して AMF への依存性が低い可能性が示唆された。

今後については、サンプル数を増やした実験と、実験室での接種試験を行うことによってより明確な結果を得ることができると期待している。また、本研究で樹枝状態を含まない感染ゾーンに役割がある可能性が見つかった為、樹枝状態を持たない感染形態を持つコケ植物について実験を行い、その役割を明らかにしたい。さらに、ストリゴラクトンなどのシグナル伝達分子を調べ、コケ植物の視点から、仮死状態の前後で AMF を要求しているのかを検討したい。

コケ植物の仮死状態とアーバスキュラー菌根菌との共生関係

Cryptobiosis of Moss Plants with Arbuscular Mycorrhizal Fungi

桑畑裕太朗
Yutaro Kuwahata

Abstract

This study investigates the influence of cryptobiosis, a dormancy state triggered by desiccation, on the symbiotic relationship between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and moss plants. The persistence of AMF and the dynamics of the infection zone were assessed during both cryptobiotic and revived states of the moss. The results revealed that AMF remains present within host tissue even during desiccation. However, the infection zone exhibited no expansion upon moss plant revival. Interestingly, distinct reactions were observed within the two infection zones, arbuscules and non-arbuscules. These observations suggest a potential disruption of nutrient exchange during dry periods. This finding necessitates further investigation into the specific role of AMF within the infection zone during cryptobiosis.

Keywords: Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Cryptobiosis, Moss Plants, Symbiosis

目次

第1章	序論	1
第1節	はじめに	1
第2節	コケ植物の基本	1
第3節	AMF 共生の基本	2
第4節	コケ植物と AMF	3
第5節	観察方法について	3
第6節	本研究の目的と意義	4
第2章	コケ植物の乾燥時における AMF 共生の調査	6
第1節	本調査の概要	6
第2節	調査目的	6
第3節	調査方法	6
第4節	調査結果	8
第5節	検定	13
第6節	考察	14
第7節	まとめ	15
第3章	コケ植物の再給水時における AMF との共生関係の調査	16
第1節	本調査の概要	16
第2節	調査目的	16
第3節	調査方法	16
第4節	調査結果	17
第5節	考察	19
第6節	まとめ	19
第4章	結論	21
第1節	まとめ	21
第2節	今後の展望	21
謝辞		22
参考文献・引用文献		23

第 1 章 序論

第 1 節 はじめに

近年、国際的に安定したリン肥料の供給に不安が高まるに従い、アーバスキュラー菌根菌 (*Arbuscular mycorrhizal fungi*、以下 AMF) への注目が高まっている[1-4]。これは、AMF が植物と互いに助け合う相利の共生関係を築いているためである。通常、AMF は植物の根の内部に菌糸を伸ばし、樹枝状態 (アーバスキュル) と呼ばれる栄養交換機関を形成する[1,2,4]。そこでは、AMF が土壌中からリンなどのミネラル栄養素や水を集めて植物に供給し、植物は光合成を通して生成した炭水化物和脂質を AMF に供給している[1,2]。この共生が植物に与える影響として、作物の生育を促進することが示されている[1,2]。これには、リンの供給の効率化のほかにも Delavaux らにより示されている窒素吸収や病気への抵抗性の効果など[2]が影響していると考えられる。

また、農業だけではなく他の利用方法も多く検討されている。例えば、谷口などは AMF が森林形成に与える影響を提唱し[5]、松田らは海岸林の再生に AMF を利用するための研究を行っている[1]。

このように、AMF は現在の農林業と切り離せないものとなっており、様々な研究が進められているが、それらに比べてコケ植物と菌根菌についての研究は非常に遅れをとっている[1]。これはコケ植物が農作物として利用されておらず、産業的な価値が低いと捉えられているからであると考えられる。しかし、後述の通りコケ植物と菌根菌についての研究は菌根菌共生の歴史、進化を紐解く上で非常に重要な、欠かすことのできないテーマである。これは、コケ植物が最初に陸上進出したこと[6-9]、現在見つかった最古のアーバスキュラー菌根菌の化石がコケ植物の仲間から観察されたこと[7,10]からも明らかである。

第 2 節 コケ植物の基本

コケ植物は、陸上植物のうちで、維管束を持たない分類群と定義されており[11]、原生のコケ植物は蘚類、苔類、ツノゴケ類の 3 つに分類される[6,11]。それぞれの特徴は表 1 にまとめる。コケ植物の本質的性質として、胞子で増えることがあげられる[6,11]。コケ植物は、種子からではなく、減数分裂によって作られる胞子から発生する。単相世代の配偶体はその本体であり、複相世代の胞子体は受精によって作られる胚から発生し、分枝することなく配偶体に寄生している[6,11]。

表 1 蘚類、苔類、ツノゴケ類の特徴（[6]より作成）

	蘚類	苔類	ツノゴケ類
原糸体	糸状	塊状や盤状	塊状や盤状
植物体	茎葉体	茎葉体、葉状体	葉状体
葉	多列につく	通常 2 列	ない
仮根	多細胞	単細胞	単細胞
葉緑体	多数	多数	1 細胞に 1 ～ 2 コ

コケ植物は最も原始的な陸上植物といわれており[6]、他の陸上植物と異なる特徴をいくつも持っている。まず、水を吸い上げるための根、水や栄養を運ぶための維管束、そして体内から水分の蒸散を防ぐためのクチクラ層が発達していないことがあげられる[6,11]。これらの機能は維管束植物が乾燥耐性を高めるのに役立っているものであるが、これらが無いからといってコケ植物は乾燥に弱い訳ではない。コケ植物は、変水性（poikilohydry；水分が十分に得られないときは積極的に水分を手放して休眠状態でやり過ごし、湿気があるときには少量の水でも急速に回復する性質）を高度に発達させることで乾燥に適応している[6,11]。本論文ではこのような再給水により復活する、乾燥による休眠状態のことを仮死状態とした。この性質のため、コケ植物は水が全く得られなくても生存することができる。例えば、民家の石垣などによく見られるヒジギゴケという蘚類では、7ヶ月間乾燥状態においても全く変化がないことが報告されている[6]。この性質はコケ植物が維管束植物の生育できない河原、岩上、木の幹などの環境に進出するのを助けている[6]。

コケ植物は、今から約4億年前に陸上に進出し、地球環境が過酷であった時代から現在まで生き延びてきた[12]。コケ植物の大発生は、地球の酸素量に影響を与えたとされている[12]。また、すべての生態系の基礎としての重要な役割も果たしている[12]。

第3節 AMF 共生の基本

菌根菌は通常、植物の根に生息し、菌根という根とそこに生息する菌の統合体を形成する[1,2,4]。AMF はケカビ門（*Mucoromycota*）のグロムス菌亜門（*Glomeromycotina*）に属する真菌であり、菌根菌の中でも最も普遍的なものである[1]。また、上記の通り、植物の根の内部に樹枝状態を形成し、土壌からミネラル栄養素、特にリンを植物に供給し、引き換えに植物が光合成で生成した炭水化物と脂質を得るという相利共生を結んでいる[1,2]。リンは基本的に土壌粒子に吸着しやすいため、土壌中を移動しにくく、作物の成長を阻害する原因になりやすい[4]。例えば、トウモロコシが自身の根からリンを吸収することができる範囲は 0.2 mm といわれている[4]。つまり、0.2 mm よりも離れたところにあるリンは吸収できない。ところが、AMF と共生すると長いもので 10cm にもなる外生菌糸の届く範囲のリンを吸収

することができる[4]。これにより、植物の生育や収量が向上することが数多くの研究によって示されている[1-4,8]。また、その効果はリンが蓄積した土壌に生育しているものよりも、リンが枯渇している土壌に生育しているもののほうが大きいと示されている[4]。植物は生育ステージごとに必要な養分バランスが異なり、置かれている養水分および光の環境に応じて根の分布や菌根形成を最適化していると予想される[2]。

この共生関係を生かし、AMF を微生物資材として作物に接種することで農作物の生育を改善しようという取り組みが行われており、国際的に期待が高まっている[1,2]。

そのほかの特徴として、AMF は宿主特異性をほとんど欠いており、共生する相手をほとんど選ばないことがあげられる[1]。30 万種を超えている現存する陸上植物の 80% 以上と共生しているともいわれており、表 2 にもある通り、他の菌根菌と比べても、コケ植物を含む幅広い相手と共生していることから、宿主特異性の低さを見て取ることができる。

表 2 いろいろな菌根菌と植物の組み合わせ ([1]より作成)

菌根	植物	菌	宿主特異性
アーバスキュラー菌根	コケ植物 シダ植物 裸子植物 被子植物	グロムス菌亜門	無～低
外生菌根	被子植物（マツ科、 ブナ科などの木本）	担子菌類 子囊菌類	有
ラン菌根	ラン科	担子菌類	有
エリコイド菌根	ツツジ科	子囊菌類	有
アーブトイド菌根	ツツジ科などの一部	担子菌類	有
モノトロホイド菌根	ツツジ科無葉緑植物	担子菌類	有

AMF の特性としてもう一つあげておかなければいけないことは、絶対共生であることである。絶対共生微生物は、共生していない状態では増殖できない[1]。つまり、AMF は植物と共生していないと増殖できない。

4 億 5,000 万年以上前の植物の陸上進出は、地球の進化史上で最も重要な出来事の一つである。AMF 類は 4 億年以上前にはじめて陸地に進出したと考えられている、アグラオフィトンという植物の仮根からも観察され、当時栄養に乏しかった土壌で陸上植物が生育するのに役立っていたのではないかと考えられている[1,7,9-10,13]。また、1993 に Simon らは 18SrDNA に基づく分子系統解析の結果、AMF 共生系の起源は 4 億年前の陸上植物の出現と同時期だと推察し[2]、2021 年には Melanie.K.Rich らによりアーバスキュラー菌根の相利共生が最初の陸上植物で進化し、陸生化を可能にした形質の一つであることが証明された[9]。

第4節 コケ植物と AMF

前述の蘚類、苔類、ツノゴケ類の中で、AMF が共生するのは、主に苔類とツノゴケ類の一部である[8]。特に、苔類ではモデル植物として使用されているゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) には存在せず、そのほかフタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea*) などには広く共生が確認されている[8]。

ゼニゴケの仲間では、AMF の菌糸が根粒を通して侵入し、葉状体の中肋（苔類においては葉状体中央部の分厚くなっている部分のこと）領域の実質細胞に樹枝状態を形成することが知られている[8]。また Julia Russell らにより、その中に2つの感染ゾーンがあることが確認された。1つ目の感染ゾーンは薄く染色され、下部の葉状体を縦方向に移動する菌糸が含まれている。2つ目の感染ゾーンは濃く染色され、上部の細胞の菌糸が広範囲にコイル状になっており、生きているものと老化したものを含む樹脂状態が含まれている[10]。

第5節 観察方法

AMF は無色透明で、植物の内部に樹枝状態を形成するため、肉眼で確認することはできない。そのため、AMF を染色し、顕微鏡を使って観察するのが一般的である。方法は主に2つあり、一つはトリパンブルーなどの染色液を使って染色する方法であり、古くからよく用いられている。一方で、コントラストは必ずしも高いわけではなく、高倍率での観察がもとめられる[14]。もう一つは、蛍光標識した小麦胚芽凝集素(WGA)を用いた蛍光染色であり、近年使われ始めている方法である。この方法は、コントラストが高いが、観察には蛍光顕微鏡や暗室などの設備が必要である[14]。

本研究では設備の観点から容易であった染色液を使用する観察方法をもとに、予備実験を通してコントラストが比較的高くなるように調節して実験を行った。

第6節 本研究の目的と意義

本研究ではコケ植物が特有に持つ仮死状態と AMF との共生関係に着目した。コケ植物は乾燥し仮死状態になると、生命活動を停止し休眠する。その間、光合成による炭水化物や脂肪の生成は停止され、これらの光合成産物がコケ植物から AMF に供給されてなくなると予想される。また、コケ植物が再給水した際、コケ植物は即座に光合成を開始し、それに伴い光合成産物が生成されるため、停止していた AMF への炭水化物や脂肪などの供給が再開すると考えられる。この際、AMF により供給される水分や栄養が、コケ植物が生命活動を再開するのに役立つ可能性も考えられる。このように双方の利益について考えると、コケ植物が仮死状態になる前、仮死状態にある時、再給水時において AMF との共生に変化があるのではないかという仮説が立てられた。本研究では、この仮説を確かめ、どのような変化が起きるのかを明らかにすることを目的とした。

この研究にコケ植物を用いることで、菌根共生の原点に近づくとともに、すべての維管束植物の基盤であるコケ植物における AMF の働きを解明することができれば、共生について菌根菌の視点でも進歩を促し、農業や森林生産システムの向上に貢献できる可能性があると確信している。

第2章 コケ植物の乾燥時における AMF 共生の調査

第1節 本調査の概要

コケ植物が乾燥して仮死状態になる時のコケ植物と AMF との菌根菌共生関係の変化を調べるために、フタバネゼニゴケを、水を与えるグループと与えないグループに分けてそれぞれの菌根菌の様子を数日おき観察しつつ、水を与えないグループに変化が見られなくなった時を仮死状態とし、そのときの AMF の感染の様子を観察した。

第2節 調査目的

第一に、フタバネゼニゴケがいつ仮死状態になっているのかを見極めること、次に、その時の菌根菌の共生の様子にどのような違いがあるのかを明らかにすることを目的として、乾燥させた宿主植物であるフタバネゼニゴケの観察と、湿潤状態と仮死状態それぞれにあるフタバネゼニゴケに共生している AMF の根内菌糸の染色観察を行った。

第3節 調査方法

第1項 フタバネゼニゴケの乾燥

まず、スコップを用いてフタバネゼミゴケを採集し、採集したフタバネゼニゴケを2つのグループに分け、生育地の土壌と共にタッパーに入れた。次にフタバネゼニゴケをタッパーに入れた状態で霧吹きで1週間水道水を与え、生育させた。その後、2つのタッパーのうち片方のみ水やりをやめ、蓋はどちらも開けた状態で静置し、水を与えていないグループのフタバネゼニゴケに変化がなくなるまで毎朝フタバネゼニゴケの様子を観察した。

フタバネゼニゴケが仮死状態になっているかどうかは、先行研究[15]に基づき、乾燥を始めてからの時間を元に定義した。

この実験では自然環境下ですでに AMF に感染しているサンプルを用いて実験を行った。通常の状態での感染率の差を減らすためにサンプルはすべて1つのコロニーから採取した。コロニーは、事前に数カ所のコロニーから採取したフタバネゼニゴケの AMF の感染状況を確認し、感染率の最も高かったコロニーを使用した。

第2項 根内菌糸の染色、観察

A) サンプルの採集

第1項を経た湿潤状態と仮死状態それぞれにあるフタバネゼニゴケを根掘り法[16]により5個体ずつ採集し水洗いをした後、10分間の超音波洗浄機を用いた洗浄により仮根などに付いていた土などを落とした。つぎに、はさみを使い図1において赤い線

が引かれている部分で切断し、左をL、中央をM、右をRとした。3分割されたフタバネゼニゴケをマイクロチューブに入れた。

B) 染色準備

マイクロチューブに10%水酸化カリウム水溶液をサンプルが浸る程度加え、ウォーターバスの中で温度を約90℃に保ち1時間加熱した。常温下で冷却した後、10%酢酸を適量加え中和した。

C) インキュベート

サンプルをマイクロチューブから取り出してサンプルとマイクロチューブを水洗し、サンプルとPBS（リン酸緩衝液）をマイクロチューブに入れ、1時間以上インキュベートした。

D) AMF 染色と観察

マイクロチューブからサンプルを取り出してシャーレにのせ、5%メチレンブルー水溶液で1時間染色した。表面に付いたメチレンブルー水溶液を洗い流すために、染色したフタバネゼニゴケをPBSで洗い、キムワイプで水分を吸い取った。実体顕微鏡を使い、メスとピンセットでサンプル1つにつき2カ所を縦に薄く切り、断面を観察できるようにサンプルを横向きに倒してプレパラートを作成した。最後に、顕微鏡を使って、40倍、100倍、400倍で根内菌糸を観察した。

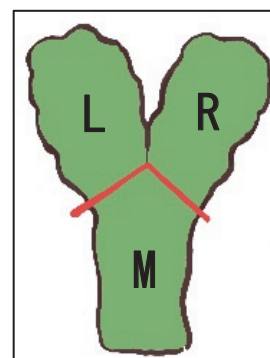


図1 フタバネゼニゴケのイメージ図

二股に分かれている左側をL、右側をR、分かれる前の部分をMとした。

第4節 調査結果

第1項 フタバネゼニゴケの乾燥

フタバネゼニゴケに水を与えるのをやめたグループと、水を与え続けたグループの経過を観察した結果を図2-7に示す。以下、水を与え続けたグループを湿潤コロニー、途中から水を与えなかったグループを乾燥コロニーとする。

湿潤コロニーは、図2-4に示すような結果となり、15日の観察期間中に大きな変化は見られなかった。一方、乾燥コロニーは図5-7のように変化し、水分不足による影響が確認された。図5と図6に大きな違いが見られないように、給水停止後5日間は、表面の乾燥が見受けられた程度で、大きな変化は見られなかった。その後、乾燥コロニーは変化をはじめ、給水停止後9日目には図7の示す状態となり、その後15日目まで変化が見られなかった。このことから、9日目には仮死状態に入っていたと判断し、第2項では15日目の結果を使用することとした。

第2項 根内菌糸の染色、観察

第1項の実験より、この実験では乾燥状態にあるコケ植物が十分に仮死状態であると考えられる5日目のサンプルを染色し、観察した。表3に湿潤コロニー、表4に乾燥コロニーのAMF感染状況の結果を示す。各サンプルにおいて、第2章第2節にて示した図1のL、M、Rそれぞれにつき2カ所ずつ観察を行ったので、部位のあとに数字をつけて区別した。例えば、L-2はサンプルの分岐の左側の2カ所目の観察結果に対応する。

観察結果と Julia Russell らによって示された2種類の感染ゾーン（第1章 第4節参照）に基づき、本研究ではAMFとコケの共生の状態は図8に示される3種類に分類した。具体的には、薄い染色の部分と濃い染色の部分がそれぞれ確認できるかどうかをそれぞれ確認し、2種類の感染ゾーンがともに染色されている状態のサンプルに○、縦方向の菌糸の感染ゾーンのみが染色されている状態のサンプルに△、感染ゾーンのどちらにも染色がない状態のサンプルに×をつけて記録した。興味深いことに、樹枝状態を含む濃く染色された感染ゾーンのみが確認された個体はなかった。



図2 湿潤1日目の様子



図3 湿潤5日目の様子



図4 湿潤15日目の様子



図5 乾燥1日目の様子



図6 乾燥5日目の様子



図7 乾燥15日目の様子

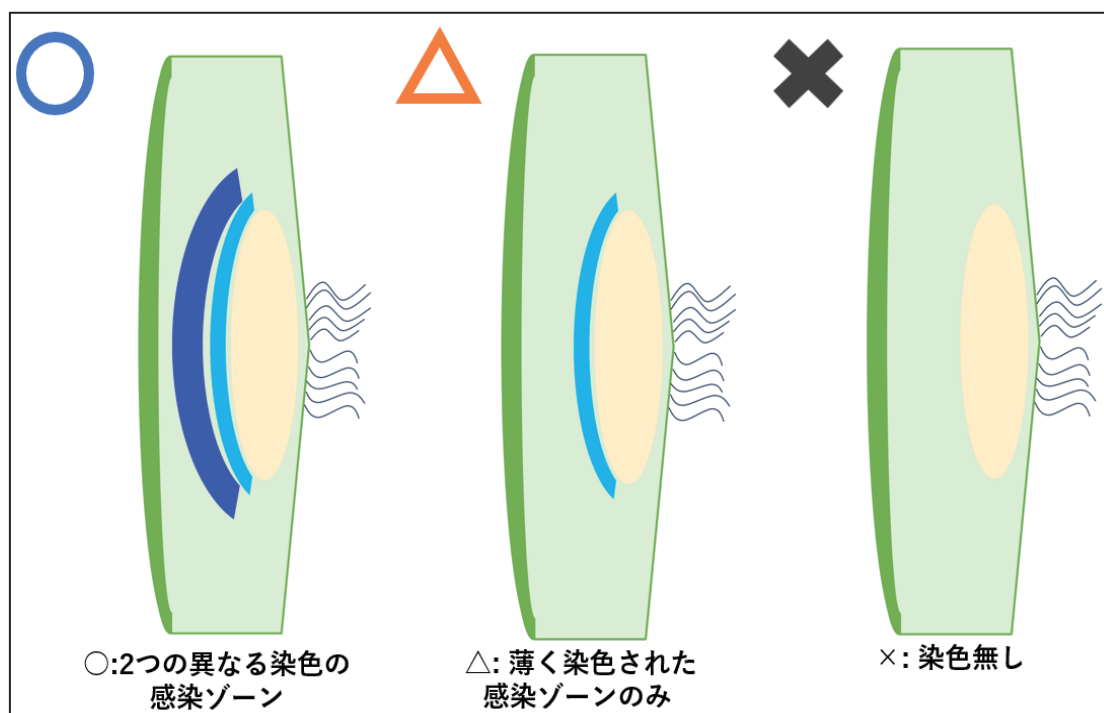


図8 図式化した3つの感染形態

この実験で確認された AMF の感染形態はすべて以上の3つに分類された。この図は染色の濃さも再現しており、それぞれ右側にある仮根を地面に向けて生育している。中肋領域（中央の分厚い部分）の上側に見られる青い部分は AMF が感染しているとされている部位。

図 9-14 にて実際に観察された個体の中で各分類（○, △, ×）を代表するものの顕微鏡写真を例示する。また、表 3-4、図 15-16 にて本実験でのそれぞれのコロニーの根内菌糸の観察の結果を示す。

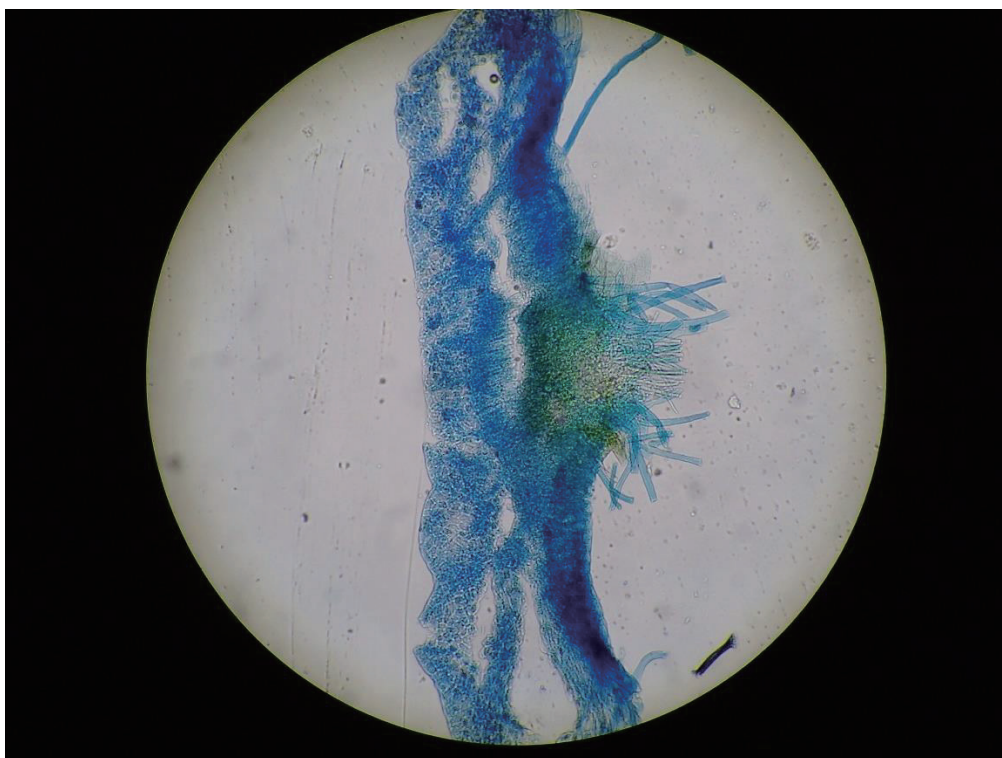


図9 O, 湿潤条件 15 日目における中央部分（個体 4-L）の顕微鏡写真（100 倍）

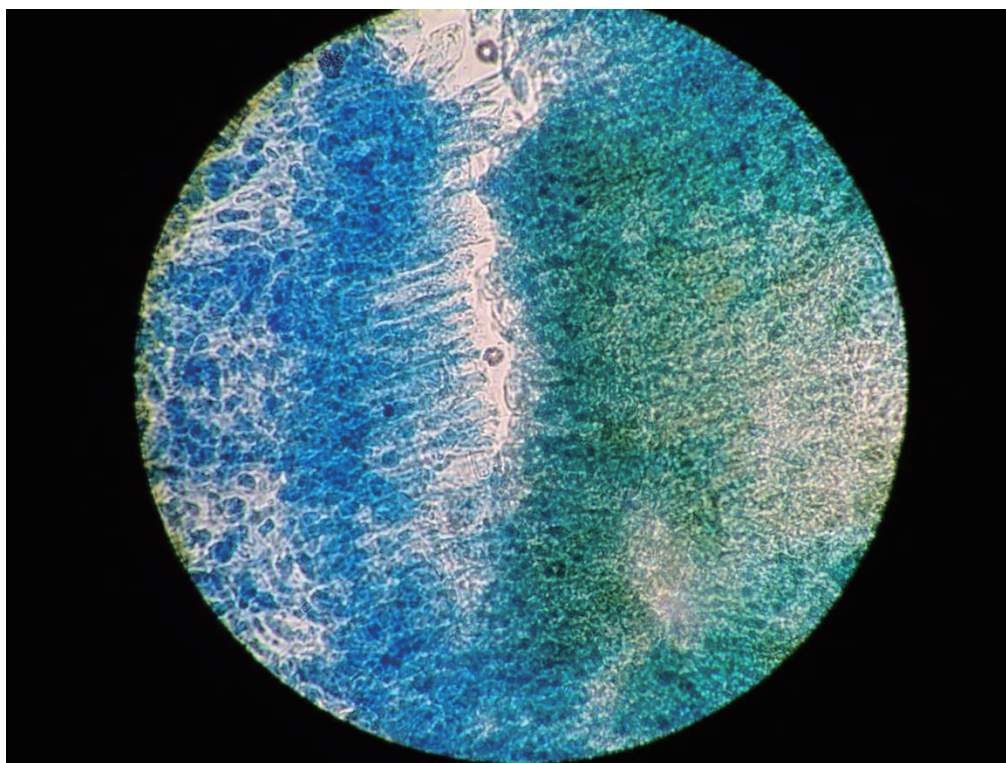


図10 O, 湿潤条件 15 日目における中央部分（個体 4-L）の顕微鏡写真（400 倍）



図 11 △, 乾燥条件 15 日目における右側部分（個体 1-R）の顕微鏡写真（100 倍）

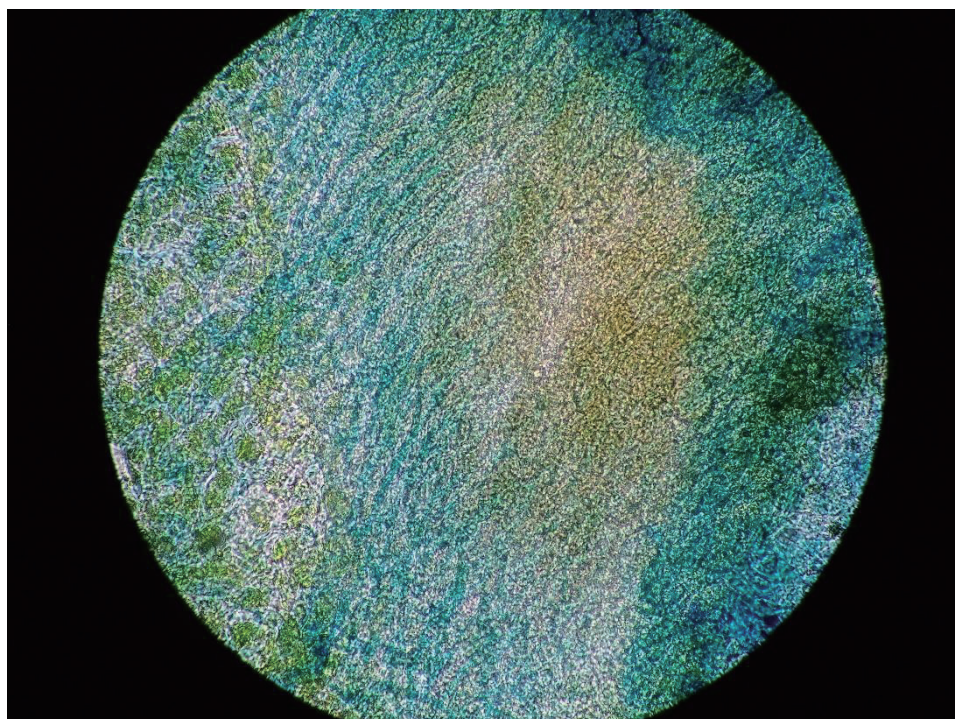


図 12 △, 乾燥条件 15 日目における右側部分（個体 1-R）の顕微鏡写真（400 倍）

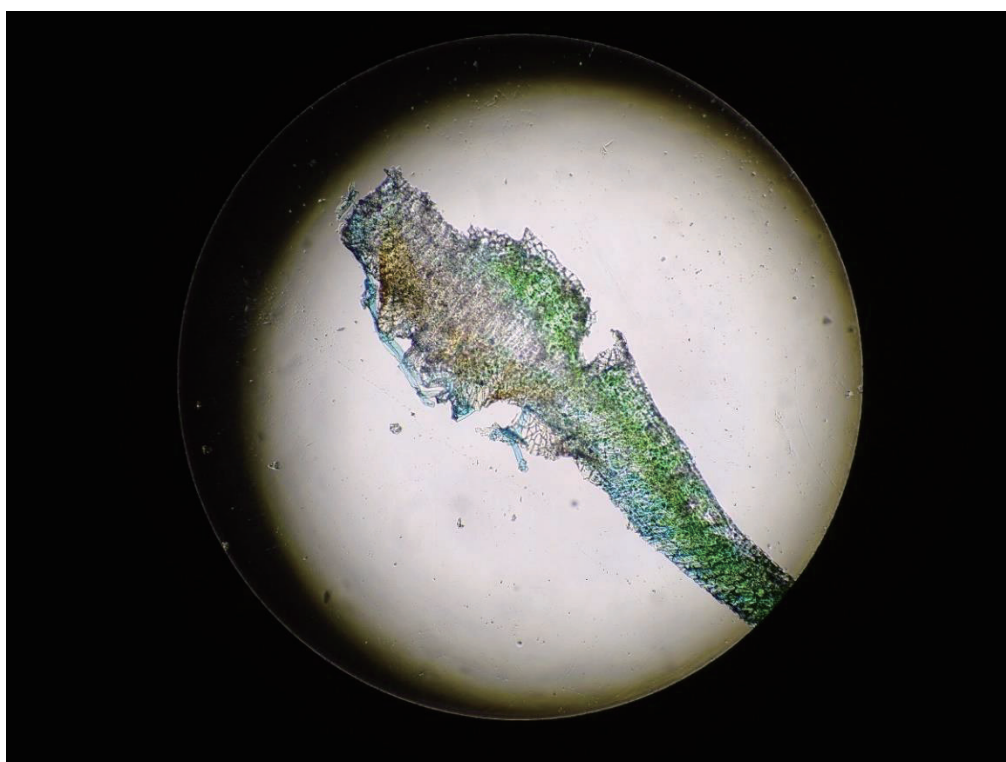


図 13 ×, 乾燥条件 15 日目における右側部分（個体 4-R）の顕微鏡写真（100 倍）

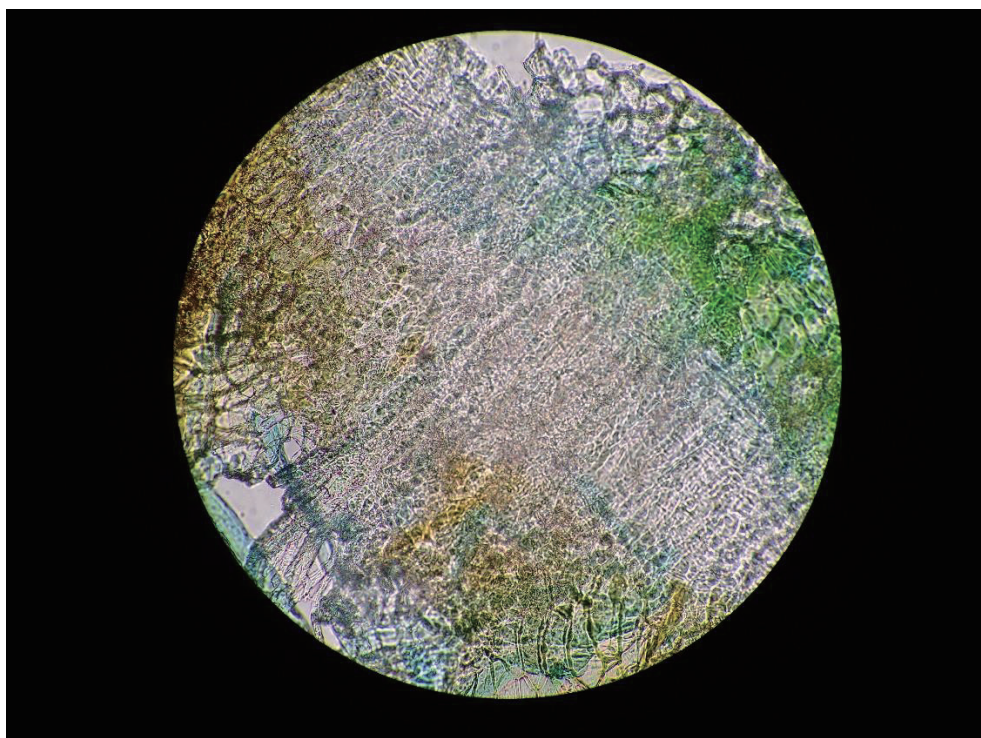


図 14 ×, 乾燥条件 15 日目における右側部分（個体 4-R）の顕微鏡写真（400 倍）

表 3 湿潤条件 15 日目の AMF 感染状況

No. \ 個体	1	2	3	4	5
L-1	△	×	○	○	○
L-2	×	○	○	△	×
M-1	○	△	×	△	○
M-2	△	×	○	△	○
R-1	×	○	×	×	○
R-2	○	○	×	×	○

表 4 乾燥条件 15 日目の AMF 感染状況

No. \ 個体	1	2	3	4	5
L-1	○	×	×	○	○
L-2	○	△	×	○	△
M-1	×	×	×	△	△
M-2	×	×	△	○	△
R-1	△	○	△	△	△
R-2	△	△	×	×	△

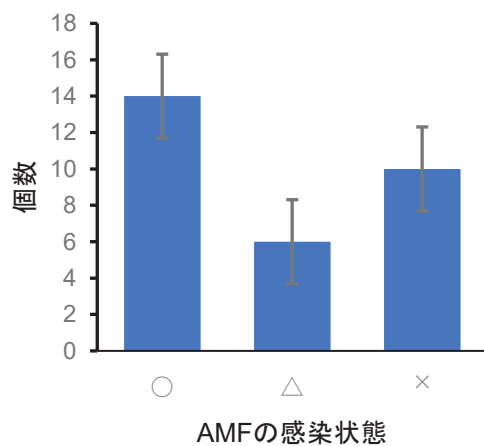


図 15 湿潤コロニーの感染状況

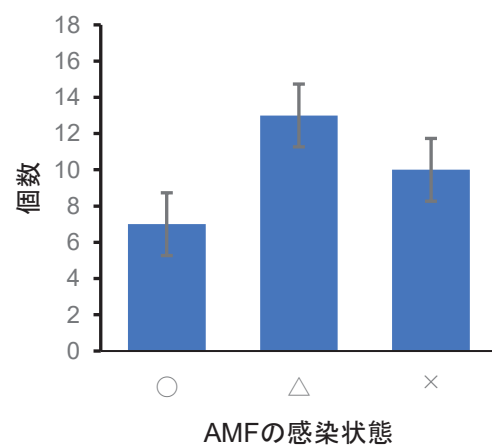


図 16 乾燥コロニーの感染状況

観察の結果、湿潤コロニーでは、2つの感染領域がどちらも確認できるサンプルが最も多く、薄い染色の感染グループのみが確認できるサンプルが最も少なかった。それに対して、乾燥コロニーでは、薄い染色の感染ゾーンのみが確認できるサンプルが最も多く、反対に2つの感染領域がどちらも確認できるサンプルの数が最も少なかった。また、×と判定された個体の数と△もしくは○と判定された個体の数の和には変化が見られなかった。

第5節 検定

上記結果の湿潤コロニーと乾燥コロニーの感染状況の差に関する評価の妥当性を確かめるため、カイ2乗検定を行った。また、効果量V（クラメールの連関係数）も求めた。

クラメールの連関係数 (Cramer's measure of association) [17]

分割表 (contingency table) のタテ側、ヨコ側の2つの属性間の連関の度合いを表す係数である。

$$V = \sqrt{\frac{x^2}{N\{\min(k, l) - 1\}}}$$

ここで、 x^2 は $k \times l$ の分割表から求めたカイ2乗統計計量値であり、Nは観測数の総数である。以下に結果を示す。

表5 コケ植物の乾燥状態における AMF 共生の調査結果 実測値

	乾燥	湿潤	合計
○	7	14	21
△	13	6	19
×	10	10	20
合計	30	30	60

表6 コケ植物の乾燥状態における AMF 共生の調査結果 期待値

	乾燥	湿潤	合計
○	10.5	10.5	21
△	9.5	9.5	19
×	10	10	20
合計	30	30	60

P 値 = 0.085765 > 0.05 効果量 V = 0.122807

有意水準 0.05 のカイ二乗検定の結果から、P 値が 0.05 を上回ったため、今回の結果が有意ではないといえる。しかし、○、△、×における効果量 V (クラメールの連関係数) は約 $0.123 > 0.1$ であり、今後、サンプルサイズを増やすこと、AMF を無菌状態のフタバネゼニゴケに接種して実験を行うことなどの検討を加えることで、より明確な結果が得られると期待される。

第 6 節 考察

まず、前節第 2 項の結果を議論するに当たって、Julia Russell ら[10]によって示されたものと同様の 2 つの感染ゾーンがこの実験においても存在したのかを考える。先の研究では、走査型電子顕微鏡を用いて 2 つの感染ゾーンの間の構造上の違いを確認している。本研究では、そのような実験は実施できていないため、確実に同じものが存在したということとはできない。しかしながら、中央中肋領域の周りに薄く染色された感染ゾーンがあり、その上側に濃く染色された感染ゾーンがあるという感染場所と染色の特徴が同じであることは、先の研究の記述と一致している。このことから、本研究で確認された濃さの異なる染色がされた 2 つの感染ゾーンは Julia Russell らによって示されたものと同様である可能性が高い。これにより、この 2 つの感染ゾーンの感染状況を Julia Russell らによる走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いた観察に当てはめて考えることができる。つまり、この実験に用いたフタバネゼニゴケは 2 つの感染ゾーンを有し、薄い染色の感染ゾーンには菌糸のみが含まれていて樹枝状態は含まれず、濃い染色の感染ゾーンには菌糸が広範囲にコイル状になっており、生きている樹枝と老化した樹枝を含んでいるといえる。

次に、この章の主題であるコケ植物が仮死状態になる前後における共生関係変化について考える。まず注目すべきは、図 16 から見て取れる通り、コケ植物が仮死状態になった後でも AMF は完全に消失しなかったということである。この実験では○と判定された個体が 7 個、△と判定された個体が 13 個あり、すべての個体の内 3 分の 2 の個体において何らかの形で AMF の感染が確認された。また、感染率 (○と△の和の割合) を見ると仮死状態に入る前後で変化がない。一方で、○と△の比率には大きな違いが見られ、宿主植物であるコケ植物が仮死状態になると、樹枝状態がある感染ゾーンを含む 2 つの感染ゾーンを持ち合わせている感染個体 (○) が減り、樹枝状態を含まない感染ゾーンのみを持つ感染個体 (△) が増える結果となった。これは、コケ植物が仮死状態になった時に AMF の樹枝状態を含む感染ゾーンのみが消失したという傾向を示している。

この現象の原因について、次の 2 つの仮説が立てられる。1 つ目に考えられるのは、AMF が樹枝状態を作るのに十分な光合成産物をコケ植物から受け取れなくなり、樹枝状態を作ることができなかった可能性である。前提として、樹枝状態は通常 2.5 日から 11 日ほど機能し、常に崩壊と発達を繰り返している[2]。このことから、乾燥を始めて 15 日目の時点で存在した AMF はすべてコケ植物が乾燥し始めた後に発生したものであるといえる。これより、AMF が意図しているかはさておき、コケ植物の状態にかかわらず共生関係

を維持しようとしていたが部分的に栄養が不足し、樹枝状態を形成できない部分があるというこの仮説は有力である。この仮説に基づくと、コケ植物を乾燥させたときに2つの感染ゾーンのうち樹枝状態の見られる感染ゾーンのみが消失するという傾向を説明することができる。また、樹枝状態のある感染ゾーンのみが消失する理由は、樹枝状態の形成には菌糸の形成よりも多くの栄養を必要とするからであると説明できる。しかし、樹枝状態は栄養交換機関であるため、従来考えられている共生関係を持っているのであれば、樹枝状態のある感染ゾーンを失った状態でAMFが生き続けることは困難であるといえる。

2つ目は、樹枝状態のない感染ゾーンに何か独立した役割があるという仮説である。そもそも樹枝状態がある感染ゾーンと樹枝状態のない感染ゾーンに分離して存在するという共生関係はコケ植物に特有のものである。そのため、AMFの樹枝状態以外の部分の役割は議論になっておらず、ほとんど明らかになっていない。Julia Russellらは、葉体を縦方向に成長する細胞内菌糸をここに確認するにとどまっている[10]。そんな中、今回の結果からコケ植物が仮死状態になるときに樹枝状態の見られる感染ゾーンとは異なる動きをしていることが確認された。独立して変化する器官なのであれば独立の役割を持っていたとしても不思議ではない。

最後にこれらの実験結果には変数が含まれていることを考慮しなければならない。この実験は野外からサンプルを採取して行ったため、実験前の感染率や生育状況に個体間で差があった可能性がある。よって、今回の実験では野外での状況に近い中での現象は判明した一方で、フタバネゼニゴケとAMFの間に実際に存在する共生関係やその利害関係について断言するには不十分であると言わざるを得ない。今後の研究で、今回の野外環境に寄せて行った実験によって示された傾向を制御環境で示す必要がある。

第7節 まとめ

本章の実験の結果、コケ植物が仮死状態になった際、AMFの持つ2つの感染ゾーンのうち樹枝状態を含む感染ゾーンのみが失われる傾向が見られた。このことから、コケ植物が仮死状態になると、AMFは光合成産物を得られなくなり樹枝状態を形成できなくなる、AMFの樹枝状態を含まない感染ゾーンには何か独立の役割があるという2つの仮説が立てられた。

第3章 コケ植物の再給水時における AMF との共生関係の調査

第1節 本調査の概要

本調査では、第2章の調査を行った際に仮死状態になったフタバネゼニゴケに再び水を与え、仮死状態から復活させ、その際のフタバネゼニゴケと AMF の共生の状況を調べた。

第2節 調査目的

本調査では、第2章の実験で乾燥させたフタバネゼニゴケを復活させることでフタバネゼニゴケが枯死ではなく仮死状態であったことを確かめるとともに、フタバネゼニゴケが仮死状態から再給水し、復活するときに AMF との共生関係に変化があるのではないかという仮説を明らかにすることを目的として行った。

第3節 調査方法

第1項 フタバネゼニゴケの再給水

まず、第2章の実験で使用した仮死状態のフタバネゼニゴケに霧吹きで水道水を与え、タッパーの中で生育した。再給水後、フタバネゼニゴケの変化が見られなくなるまで毎朝観察した。

第2項 根内菌糸の染色、観察

第1項でのフタバネゼニゴケに再給水を行い、復活させたものの根内菌糸を観察した。根内菌糸の観察方法は第2章の第3節第2項の根内菌糸の染色、観察のときのものと同様に行った。

第4節 調査結果

第1項 フタバネゼニゴケの再給水

仮死状態のフタバネゼニゴケに水を与え、復活させたコロニーの観察の結果を図 15-17 に示す。以下、再給水を行い復活させたコロニーを復活コロニーとする。

復活コロニーは、再給水後約1時間で中肋に向かって巻かれていた葉状体が開き、約12時間後から変化が見られなくなった。このことから、12時間後には復活していたと判断し、第2項では再給水3日目のサンプルの観察を行った。



図 15 再給水直後の様子



図 16 再給水 1 日目の様子



図 17 再給水 3 日目の様子

第 2 項 根内菌糸の染色、観察

第 1 項の実験より、この実験では仮死状態にあるコケ植物が十分に復活したと考えられる 3 日目のサンプルを染色し、観察した。表 7 に復活コロニーの AMF 感染状況の結果を示す。また、第 2 章と同様に、図 1 の L、M、R それぞれにつき 2 カ所ずつ観察を行ったので、部位のあとに数字をつけて区別した。

観察の結果は、再吸水後の AMF の感染状況は、△と×が多く、○が少ないという傾向を示した。

表 7 再給水 3 日目の AMF の感染状況

No. \ 個体	1	2	3	4	5
L-1	△	×	△	△	○
L-2	△	△	△	×	△
M-1	○	×	×	△	×
M-2	×	×	×	×	△
R-1	△	○	○	×	△
R-2	×	○	△	×	○

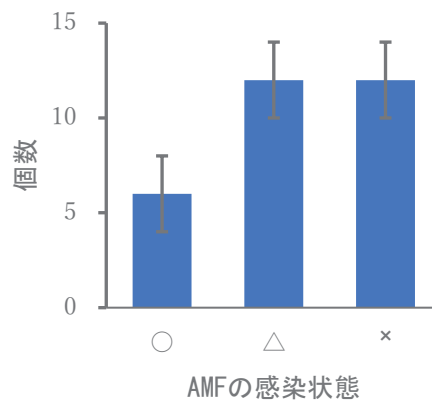


図 18 再給水 3 日目の AMF の感染状況

第 5 節 考察

まず、フタバネゼニゴケの再給水についてであるが、乾燥させたフタバネゼニゴケは再給水後すぐに復活をはじめ、翌日には乾燥前に近い状態に戻った。このことから、第 2 章の実験で乾燥させていたフタバネゼニゴケが枯死ではなく仮死であったことが確認された。

観察時期について、再給水 3 日目で行ったものであるため観察の段階では AMF の再感染及び樹枝状態の形成が未だ起こっておらず、樹枝状態の増加が確認されなかった可能性もある。しかし、本研究ではコケ植物が復活する時の変化に焦点を当てたため、再給水後可能な限り早い段階での観察を行う必要があった。なぜならば、自然界でのコケ植物が、仮死状態から復活してもまた乾燥すれば仮死状態に戻るためである。コケ植物の変水性により、再吸水後の対応に時間がかかってしまうと、その準備をしている間に次の乾燥を経験し、仮死状態に戻ると考えられる。また、3 日が AMF 樹枝状態の形成に十分な長さである理由については、AMF が内生菌糸を伸ばす速度から考えることができる。神山らにより、内生菌糸は 0.13-1.22mm/日[2]で成長すると示されている。これを元に考えると、3 日で土壌からフタバネゼニゴケの実質細胞に到達することが可能である。これより 3 日は、AMF が再感染及び樹枝状態を形成し、元の共生関係に戻るのに十分な時間であるといえる。

コケ植物が仮死状態から復活した際の AMF の感染状況の結果を、第 2 章の乾燥コロニーの実験結果と比較すると、○・△・×の感染形態を持つ個体数がほとんど同じであるとわかる。これより、コケ植物が仮死状態から再給水し復活する際、AMF との共生関係に大きな変化がないことが明らかとなった。AMF が復活に寄与しているのであれば、コケ植物は、復活時に必要とする水分を効率よく得ることができ、AMF は、光合成産物を得ることができるため相互の利益が期待できる。しかしながら、コケ植物が仮死状態になる際に減少した樹枝状態の増加が見られないことは、多くの個体において栄養の交換ができない形態の感染をしているといえる。これより、コケ植物の復活は、AMF に頼ることなく、独力で行われていると考えられる。

一般に、維管束植物は AMF と共生することでリンなどの栄養と、水分を得やすくなるという利益を得ているとされている。これについて、今回の実験の結果からコケ植物に当ては

めて考える。コケ植物は、その変水性の高さにより維管束植物とは異なる形で乾燥耐性を高めている。つまり、水分が得られなくなったとしてもコケ植物は休眠するだけであるため、AMF に頼って水を得る必要性は維管束植物に比べて低いのではないかと考えられる。これは、今回の実験でコケ植物が乾燥した際に樹枝状態が減少し、仮死状態から復活する際に樹枝状態が活発に生成されなかったことに一致する。このことから、コケ植物の受ける AMF 共生の恩恵は主に栄養面のみ、もしくは恩恵を受けていない可能性が考えられる。コケ植物の視点で AMF 共生を考えると、AMF の樹枝状態が発達するのは、コケ植物が無性生殖や有性生殖で繁殖するときなど栄養が必要になるときの可能性がある。また、AMF 側の視点では、光合成産物を安定して得ることができないコケ植物との共生を継続して行うことの意味はないように考えられる。今回の実験においても、フタバネゼニゴケが仮死状態になった時に樹枝状態を形成しなくなっている様子が見受けられたことから、仮死状態のコケ植物との共生を続けることに否定的な捉え方をすることができる。

次に、第 2 章の実験結果と合わせてコケ植物における AMF の樹枝状態の形成タイミングを考える。第 2 章より、フタバネゼニゴケが乾燥して仮死状態になるとき、AMF は部分的に樹枝状態の生成を停止し、樹枝状態の見られない感染ゾーンのみを有する個体が増加することが分かった。仮死状態になるときに樹枝状態が減少し、その後増加しないのであれば、AMF の樹枝状態はコケ植物が仮死状態になるたびに減少し続けていくはずである。そうだとすると、コケ植物と共生する AMF は減り続けてしまう。しかし、自生しているフタバネゼニゴケにも AMF が確認されたことから、どこかのタイミングで AMF が増加していると予測することができる。そのタイミングがいつであるのかという問に対しては異なる研究が求められるが、それを決定している要因がコケ植物にあるのか AMF にあるのかは興味深い。

最後に、今回の結果からコケ植物と AMF が本当に相利共生の形をとっているのか、どちらかがより多くの利益を得ているのかについて考える。この問題は既に議論の的となっている問題である[10]。実際に自然界には AMF と相利ではない関係を持っている種や、生育環境に応じて関係を変化させるものも多数存在し[1,18]、コケ植物については、AMF との共生関係がゼニゴケに悪影響を及ぼしている可能性が報告されている[19]。これまでの議論と合わせて考えると、今回の結果はコケ植物と AMF が相利共生を結んでいないとする説を支持するものであり、この議論に対し新たな視点をもたらすだろう。

第 6 節 まとめ

本章の結果により、コケ植物が仮死状態から復活する際の AMF との共生関係には目立った変化がないことがわかり、コケ植物の AMF の依存性に対して疑問を呈す結果となった。また、この結果は相利共生に関する議論に新たな視点をもたらすことが期待される。

第4章 結論

第1節 まとめ

フタバネゼニゴケが仮死状態になるとき、AMF は樹枝状態を含む感染ゾーンが消失し、菌糸のみの感染ゾーンは仮死状態となった後も残っているという傾向が見られた。また、仮死状態のフタバネゼニゴケが再び水を得ても AMF との共生関係はコケ植物が仮死状態にある時から大きな変化は見られなかった。これらの実験結果から、1) コケ植物が仮死状態の時に AMF は栄養不足によって樹枝状態を形成できていない可能性があること、2) AMF の菌糸のみがみられる感染ゾーンには何か独立した役割があること、3) コケ植物は栄養が必要になったときに AMF の樹枝状態を発達させていること、これら3つの可能性が示された。また、今回の実験はコケ植物と AMF が相利共生をしていることに懐疑的な論を支持する結果であるといえる。

第2節 今後の展望

まず、今回の実験ではややサンプル数が少なく、統計的な妥当性を確認することができなかったため、さらにサンプル数を増やした実験を行うことで、より確固たる結果を得たいと考えている。また、今回の実験では野外からサンプルを採取し、実際の環境で何が起きているのかを確かめることに重点を置いたが、今後、実験室での接種試験を行うことによってより明確な結果を得ることができると期待している。

次に、樹枝状態を含まない菌糸のみの感染ゾーンが、ただ残っているものなのか、何か独立した役割を持っているのかについて調べるため、樹枝状態を持たない感染形態をしているコケ植物について実験したいと考えている。また、コケ植物の視点から、仮死状態の前後で AMF を要求しているのかを知るために、ストリゴラクトンなどのシグナル伝達分子[8]を調べて明らかにしたい。

コケ植物と、AMF の相互の視点からこの共生関係について深めることでこの研究の意義が深まると信じている。

謝辞

本研究を進めるに当たり、研究についてご指導をいただいた本校教員中垣篤志先生、池田達哉先生、山本拓弥先生、樋口真之輔先生に深く感謝いたします。結果について統計的な議論をしてくださった林兵馬先生に深く感謝いたします。論文執筆にあたり協力してくださった三輪先生に深く感謝いたします。研究についての助言をくださった東京大学大学院総合文化研究科広域科学生命環境科学系環境応答論講座晝間敬先生に深く感謝いたします。バックテストのサンプルを提供してくださり、助言をくださった共立理化学研究所に深く感謝いたします。

付録 A 実験に使用したフタバネゼニゴケの 生育地土壌のリン酸濃度測定

本付録には、実験に使用したフタバネゼニゴケの生育地土壌のリン酸濃度測定の方法と結果を記載する。なお、本章での実験を終えて月日経った後にご指摘をいただいてから計測を行ったため、あくまでも参考である。

第1節 調査方法

本調査方法は、パックテストを提供していただいた共立理化学研究所に送付していただいた方法に基づき行った。

第1項 抽出

まず、保管していた乾燥した土壌を茶こしでふるいにかけ、植物片や小石などを取り除いた。次に、土壌を 20g はかり、蓋、メモリ付きの 250ml ポリ容器に入れた。そこに、抽出溶媒として 0.1mol/L の塩化カリウム水溶液を 100g 加え、1 分間上下に激しく振り混ぜた。その後、1 日間静置し、上澄み液を取水として得た。

第2項 測定

抽出液を共立理化学研究所のパックテスト;リン酸（低濃度）を使用法に基づき使用し、デジタルパックテスト・マルチ SP を用いて測定を行った。

第2節 調査結果

抽出液のリン酸計測結果

(回目)	1	2	3
PO ₄ -D(mg/kg ⁻¹)	0.10	0.15	0.20

第3節 まとめ

本測定結果から、参考ではあるものの、研究で使用したフタバネゼニゴケの生育していた土壌のリン酸濃度は低かったことがわかった。[20]

参考文献・引用文献

- [1] 齋藤雅典. 菌根の世界 菌と植物のきってもきれない関係. 築地書館(2020).
- [2] 神山拓也, & 佐藤匠. アーバスキュラー菌根菌の接種効果を決定する環境要因. 根の研究, 28(2), 23-37 (2019) .
- [3] 磯部勝孝, & 坪木良雄. イネ科・マメ科作物のアーバスキュラー菌根菌感染による生育促進効果と根の形態. 日本作物學會記事, 67(3), 347-352(1998).
- [4] 磯部勝孝.植物のリン吸収と生育を促進する共生微生物；菌根菌. モダンメディア 67(9),352-358 (2021).
- [5] 谷口武士. 菌根菌との相互作用が作り出す森林の種多様性. (<特集> 菌根・捕食者との相互作用が作り出す森林の種多様性). 日本生態学会誌 61(3), 311 - 318 (2011) .
- [6] 秋山弘之. 苔の話 小さな植物の知られざる生態.中公新書.2004.
- [7] Jennifer L Morris, et al., The timescale of early land plant evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(10), E2274-E2283 (2018).
- [8] Kodama, K., et al., An ancestral function of strigolactones as symbiotic rhizosphere signals. Nature Communications, 13(1), 3974 (2022).
- [9] Rich, M. K., et al., (2021). Lipid exchanges drove the evolution of mutualism during plant terrestrialization. Science, 372(6544), 864-868.
- [10] Russell, J., & Bulman, S. The liverwort *Marchantia foliacea* forms a specialized symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus*. New Phytologist, 165(2), 567-579 (2005).
- [11] 有川智己, 他, 神奈川県レッドデータ生物調査報告書 2006, 131-145, 神奈川県立生命の星・地球博物館 (2006).
- [12] 山本正幸. コケボード緑化工法の施工方法と断熱保温効果. 建設機械施工= Journal of JCMA: 一般社団法人日本建設機械施工協会誌, 73(10), 63-67 (2021).
- [13] 齋藤雅典. 「陸上植物と菌根菌の共進化」.土壌生態圏の進化と微生物－4.2004.
- [14] 農研機構.明視野条件下、高コントラストで菌根菌を染色する方法.
https://www.naro.go.jp/project/results/laboratory/harc/2015/15_041.html (2024 年 8 月 19 日閲覧)
- [15] Lloyd R. Stark., et al., The desert moss *Pterygoneurum lamellatum* (Pottiaceae) exhibits an inducible ecological strategy of desiccation tolerance: Effects of rate of drying on shoot damage and regeneration. American Journal of Botany, 100(8), 1522-1531(2013).
- [16] 大場広輔, 他. アーバスキュラー菌根実験法 (2): アーバスキュラー菌根の観察 (実験法). 土と微生物, 60(1), 57-61 (2006).

- [17]連関係数 Coefficient of association .
https://www.ouj.ac.jp/mijika/tokei/xml/kw2_04070.xml(2024 年 8 月 19 日閲覧)
- [18] 辻田有紀, 他. 菌従属栄養植物の進化に伴う菌根菌相のシフト—進化の道のりでおこった菌根共生のダイナミックな変化—. 植物科学の最前線, 5(C), 130-139 (2014).
- [19] Poveda, J. *Marchantia polymorpha* subsp. *ruderalis* (Bischl. & Boissel.-Dub.)-arbuscular mycorrhizal fungi interaction: beneficial or harmful?. *Symbiosis*, 82(3), 165-174 (2020).
- [20] Mark Thorne, Landon Rhodes, John Cardina. Effectivity of arbuscular mycorrhizal fungi collected from reclaimed mine soil and tallgrass prairie. *Open Journal of Ecology*. 3(3), 224-233 (2013).