

小笠原諸島産シダ類配偶体における
AM 菌感染の実態および菌相の解明

山田 旭、村上哲明、加藤英寿*

Arbuscular mycorrhizal symbiosis of fern gametophytes
in the Ogasawara Islands

Asahi YAMADA, Noriaki MURAKAMI & Hidetoshi KATO*

首都大学東京理学研究科牧野標本館（〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1）
Makino Herbarium, Department of Biological Sciences, Graduate School of Science,
Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan

* katohide@tmu.ac.jp (Author for correspondence)

要旨

小笠原諸島における菌根共生系に関する研究は少なく、植物との相利的な共生関係が知られる AM 菌（アーバスキュラー菌根菌）共生系の研究対象は被子植物に限られていた。AM 菌感染はシダ植物においても確認されており、近年、配偶体にも生じることが報告された。配偶体は発達した根を持たないことから、定着時に孢子体よりも厳しい環境ストレスに晒されると考えられる。植物の環境ストレス耐性は、植物の根の代わりとなって土壤中の栄養分や水分を回収する AM 菌の働きによって高められるため、AM 菌感染が配偶体の定着に関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、小笠原諸島におけるシダ類と AM 菌の共生系に対する理解を深めるために、小笠原諸島産のシダ類配偶体の AM 菌感染の実態と、シダ類-AM 菌間の種特異性の有無を明らかにすることを目的とし、解剖学的手法による AM 菌感染の確認と、分子生物学的手法による感染 AM 菌種の推定を行った。

材料は、父島・母島の計 5 地点で採取したシダ類の配偶体を用いた。採取した配偶体は 2 つに切り分け、一方を樹脂切片作製とトリパンプルー染色による観察、他方をシダ植物種と AM 菌種の推定に使用した。

シダ類配偶体の分子種同定によって、小笠原諸島に分布する 10 科 15 種のシダ類

配偶体が得られていることがわかった。さらに樹脂切片の観察では、13種のシダ類配偶体内部にAM菌の樹枝状体様の菌糸構造が観察された。そのうち、3種のシダ類配偶体では、トリパンブルー染色によってAM菌のもう1つの特徴である無隔壁菌糸が観察された。そのため、これら3種の配偶体にAM菌感染が生じることがほぼ確実となった。また、4種のシダ類配偶体は菌感染率が100%であったことから、AM菌への依存性が強いことも示唆された。

AM菌の分子種同定では、シダ類11種25個体からAM菌のrDNA領域の25配列が得られた。塩基配列の類似度が97%以上のものを同一のMOTU（分子操作的分類群）としてクラスタリングしたところ、AM菌2科3属（グロムス科の*Glomus*属と*Septoglomus*属、アカウロスポラ科の*Acaulospora*属）の8MOTUs（Glo1~6, Sep1, Aca1）、未分類のAM菌が5MOTUs（Unc1~5）、相同性の高い既知配列が得られなかった5MOTUs（New1~5）の合計18MOTUsが検出された。また、シダ類6種（ヘゴ、ムニンエダウチホングウシダ、オガサワラハチジョウシダ、ケホシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ）から複数のAM菌MOTUが検出されたことと、逆に、AM菌5MOTUs（New1, Glo4, Glo5, Unc3, Sep1）が、科の異なる複数種のシダ類から検出されたことから、小笠原諸島に生息するシダ類とAM菌の間に種特異的な関係がないことが示唆された。

本研究によって検出された小笠原諸島産のAM菌のrDNA25配列には、海外（北米、中米、ヨーロッパ、アジア等）で登録されたAM菌既知配列と同一のクラスター（Glo1, Glo4, Glo5, Sep1, Aca1, Unc1, Unc2, Unc3, Unc5）を構成するものがあった。一方で、父島と母島の両島に全く同じ塩基配列をもったAM菌は見られなかった。この要因として、今回の調査におけるサンプル数の不足と、島の生物相の変化によるものという2つの可能性が考えられた。

キーワード

AM菌、小笠原諸島、共生、シダ類配偶体、分子操作的分類群

1. はじめに

1-1. 小笠原諸島とその植物相の特徴

小笠原諸島は、東京都心部から約1,000 km南に離れた太平洋上に位置し、大小30余りの島々から成る。全ての島は誕生して以来一度も大陸と繋がったことのない海洋島である。海洋島では生物の移入の機会が限られているため、生物相が貧弱であ

ったり、固有種が多かったり、生物が絶滅しやすいという特徴が共通して見られる。これらの特徴は一般に *island syndrome* と呼ばれており、小笠原諸島にも見られる。例えば、生育する維管束植物の 36.5% が固有種である（環境省ら、2018）ことは、小笠原諸島における *island syndrome* の一例であり、その生物相の独自性の高さを示している。

海洋島において、特定の植物と動物が共生することも独自の生態系を形成する一因と考えられ、これらの共生系を明らかにすることは重要である。小笠原諸島においても、数多くの送粉共生系の研究が行われ、自生する被子植物と送粉昆虫との関係が明らかにされてきた（Abe, 2006；Abe et al., 2008；辻村ら、2015）。一方で菌根共生系の研究例はきわめて少なく、データが不十分である。小笠原諸島に自生する植物と菌の共生関係の実態が明らかになれば、小笠原諸島の特異な生態系の科学的理解を深めることになるだけでなく、それらを適切に保全する上でも重要な知見となると考えられる。

1-2. AM 菌共生

AM 菌（アーバスキュラー菌根菌）は、ケカビ門グロムス亜門に属する菌類である。陸上植物の約 80% と共生すると考えられる、最も普遍的な菌根菌のひとつである。これまでに 200 種ほどが知られている（大園、2018）。菌根菌とは、植物の根に菌根と呼ばれる共生器官を形成する菌類のことをいう。AM 菌は植物との共生なしでは生存できない絶対共生菌でもある。土壤中に存在し、胞子から隔壁をもたない菌糸を伸ばして、植物の根の細胞内に侵入する。そして、細胞内に樹枝状体（Arbuscle）という構造を形成する。この菌糸構造を形成することは、AM 菌における大きな特徴であり、名前の由来でもある。樹枝状体は植物と菌の栄養交換の場であり、植物からは糖などの光合成産物が供給され、反対に菌からは土壤中の水分や無機栄養分が供給される（図 1）。

これまでに AM 菌共生が植物の成長や養分吸収、環境ストレス耐性を改善することが広く報告されてきた（Araim et al., 2009；石井、2014）。そのため、海外では絶滅危惧植物種の保全に AM 菌を利用する試みも成されている。Gemma ら（2002）は、絶滅危惧種である *Sesbania tomentosa* と *Colubrina oppositifolia*（どちらもハワイの固有植物種）に対して、ハワイの AM 菌 *Glomus aggregatum* 分離株の接種実験を行い、2 種の苗の成長が AM 菌接種条件下では非接種条件下に比べて 2.1~7.0 倍促進されることを報告した。環境省レッドリスト（2018）には、日本国内に自生する

2,000 種以上の維管束植物が掲載されているが、それらの AM 菌共生系に関する知見は不十分である。

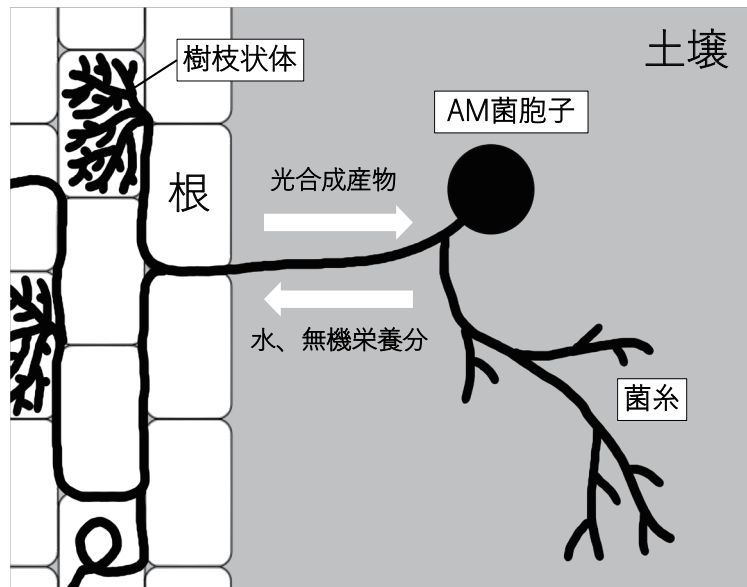


図 1. 植物の根に AM 菌が感染する様子.

AM 菌は胞子から植物の根の細胞内に菌糸を伸ばし、樹枝状体を形成する。樹枝状体を介して、植物との栄養交換を行う。

1-3. シダ植物の定着と AM 菌感染

これまでにシダ植物においても AM 菌感染が生じることが明らかとなっている。シダ植物は 2 つの独立した世代、孢子体世代 (2n) と配子体世代 (n) をもつ (図 2)。まず、シダ植物の孢子体から散布された胞子が発芽し、配偶体を形成する。配偶体が成熟すると、造卵器、造精器が形成され、受精が起こる。そして再び孢子体を形成する。通常、これらの 2 世代は同所的に生育している。孢子体は根、茎、葉の 3 器官から構成され、中にはヘゴのように 12~13m の高さに成長する大型種もある。一方、配偶体は、翼 (一細胞層領域)、クッション層 (多細胞層領域)、仮根のみから成る単純な構造をしており、どの分類群においても非常に小さい (1 cm 以下)。シダ植物における AM 菌感染は、孢子体では良く知られているが、発達した根をもたない配偶体には、生じないと考えられてきた (ハナヤスリ科などの完全菌従属栄養配偶体を除く)。しかし、Ogura-Tsujita ら (2013) によって、祖先的な分類群に属

するゼンマイとリュウビнтаイの独立栄養配偶体から AM 感染が報告された。さらに木生シダ群や、派生的な分類群である広義ウラボシ類の配偶体からも感染が報告されている (Ogura-Tsujita et al., 2016 ; 徳留, 2007 ; 迫田, 2010 ; 水澤, 2012 ; 石山, 2013 ; 鈴木, 2013) ことから、シダ類の心臓形配偶体の多くに AM 菌感染が生じることが明らかになった。また、AM 菌感染率が種ごとに一定であることも明らかとなった (鈴木, 2015)。山田 (2016) は、上記の先行研究において AM 菌感染率が 100% だったゼンマイ (*Osmunda japonica*) と 75% だったリュウメンシダ (*Arachniodes standisii*) の 2 種を対象に AM 菌の接種実験を行った。その結果、ゼンマイでは AM 菌接種条件下と比較して非接種条件下では成長が遅れたのに対し、リュウメンシダではどちらの条件下であっても成長の速度が変わらず、AM 菌感染と成長の関係性には 2 種間で大きな違いが見られた。このことは、シダ類の配偶体は AM 菌依存度が種間で異なることを示唆する。

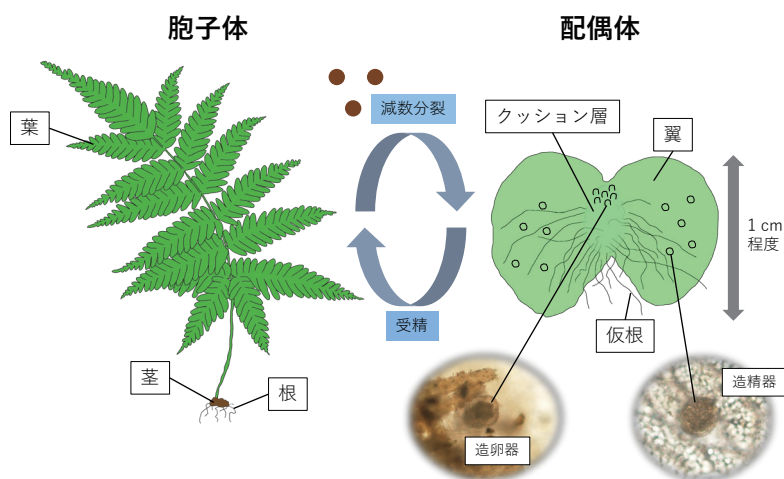


図 2. シダ植物の生活環と形態的特徴.

シダ植物の生活環は孢子体と配偶体の二世代から成る。孢子体で減数分裂が生じ、孢子が形成され、それが散布される。発芽した孢子は配偶体となり、やがて生殖器官 (造卵器、造精器) を形成して受精し、再び孢子体となる。孢子体は根、茎、葉の器官分化が見られるのに対して、配偶体は翼、クッション層、仮根から成るのみで、器官分化は見られない。

胞子で散布されるシダ植物にとって、配偶体の定着は胞子体の定着、個体群の定着へと繋がる重要なイベントである。しかし、未発達の仮根しかもたない配偶体は、胞子体に比べて、定着時により厳しい環境ストレスに晒されると考えられる。一方、AM 菌は土壤中に菌糸を張り巡らせて、植物の根では届かないところからも無機栄養分や水分を回収し、植物にそれらを供給している。このように、植物の環境ストレス耐性は、植物の根の代わりとなる AM 菌の働きによって高められるため、AM 菌感染が配偶体の定着に関与している可能性が考えられる。

1-4. 小笠原諸島における AM 菌共生系の先行研究と本研究の目的

小笠原諸島における維管束植物の AM 菌共生系の研究は一例（坂田、2008）しかない。坂田（2008）は、小笠原諸島に自生する 40 科 73 種の被子植物について AM 菌感染の有無を調査し、絶滅危惧種を含む 65 種の根に AM 菌感染が生じることを明らかにした。一方、小笠原諸島には 70 種のシダ植物が自生している（豊田、2014）。しかし、それらの AM 菌感染については全く調査されておらず、実態は不明なままである。シダ植物の配偶体世代の AM 菌共生系を明らかにすることは、島という特殊な環境にシダ植物が定着したプロセスを解明する糸口になり得る。さらに、シダ植物と AM 菌に種特異的な関係性があるならば、共生菌類も含めた保全を行うことが重要となる。

そこで本研究では、小笠原諸島に生育するシダ類配偶体の AM 菌感染の実態と、シダ類-AM 菌間の種特異性の有無を明らかにすることを目的とした。まず、シダ植物の配偶体は単純な構造をしていて、形態的特徴に基づく種同定ができないため、葉緑体 *rbcL* 領域の塩基配列情報による分子種同定を行なって、配偶体サンプルの種を明らかにした。次に、これらのサンプルに菌感染が生じているのかを明らかにするため、樹脂切片を作製し、光学顕微鏡下で細胞内部の菌糸の有無を確認した。さらに、サンプル数に余裕のあったシダ種についてはトリパンブルー染色を行なって菌糸を染め、同様に菌糸の有無を確認した。最後に、配偶体に観察された菌糸が AM 菌のものであることをより確実にするため、28S rDNA 領域による AM 菌の分子種同定を試みた。本研究では、これらを総合して、小笠原諸島におけるシダ類と AM 菌の共生系に対する理解を深めることを目指した。

2 材料と方法

2-1. 調査地

2017年の6月、9月及び2018年の7月に小笠原諸島の父島と母島にて、シダ類の配偶体の調査を行った。父島では旭山 (CA)、東平 (CH)、中央山付近 (CC、CL) の3地点、母島では乳房山 (HC) と石門 (HS) の2地点、合計5点を調査地とした (図3)。

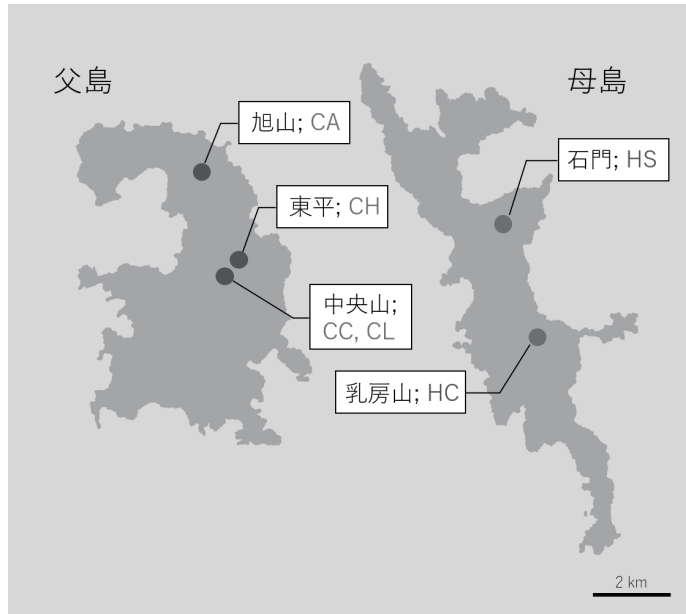


図3. 本研究の調査地.

2-2. 配偶体のサンプリング方法

シダ類の地上生心臓形配偶体を林内で採取した。シダ類の配偶体は露出した土壌や倒木上にコケと同所的に生育していることが多い (図4)。本研究では小笠原諸島産シダ類の配偶体を種網羅的に採取するため、様々なシダ植物種の孢子体の直下で配偶体を探索し、採取した。発見した配偶体は土壌ごと採取し、チャック付ポリ袋 (生産日本社 ユニパック B-4) に入れて、分析まで4°Cで保存した。

2-3. サンプリングした配偶体の処理

採取した配偶体は実験室に持ち帰り、実体顕微鏡 (LEICAEZ4 HD) の下で洗浄した。イオン交換水を張ったシャーレにサンプルを浮かべ、筆とピンセットを使用して仮根に付着した土を除いた。実体顕微鏡に付属するカメラを用いて配偶体の外部

形態を撮影した。次に洗浄と撮影を終えたサンプルを頂端-基部軸で2つに切り分け（図 5）、一方を分子種同定に使用し、もう一方は FAA 中で固定保存し、後に AM 菌感染の確認に使用した。

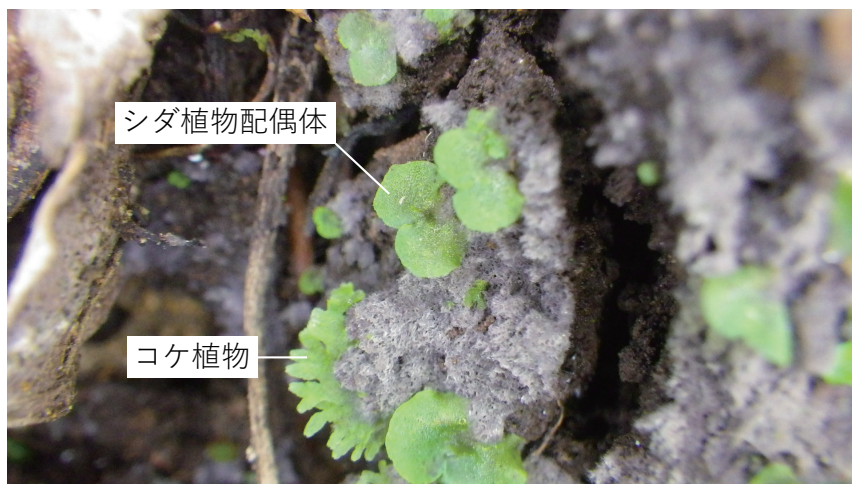


図 4. シダ植物の配偶体が生育する様子.

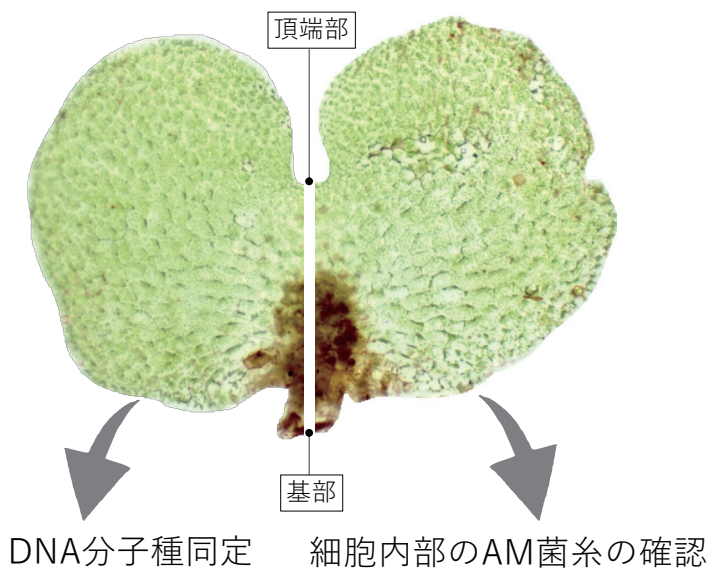


図 5. 配偶体サンプルの処理.

採集した配偶体は、頂端部と基部を結んだ線に沿って2つに切り分けた。一方を DNA 分子種同定に、他方を細胞内部の AM 菌糸の確認に使用した。

2-4. 分子種同定の方法

2-4-1. DNA 抽出

全ての DNA 抽出は CTAB 法 (Doyle & Doyle, 1987) を用いて行った。シダ類の配偶体サンプルを 2 ml プラスチックチューブに入れ、1.5 ml 用ホモジナイザーペッセル (BIO-BIK 1005-39) を用いて破碎した。抽出用 CTAB バッファー (2% 臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB)、0.1M Tris HCl (pH8.0)、2.0mM EDTA (pH8.0)、1.4M NaCl、0.1% (v/v) β -メルカプトエタノール) 250 μ l を加え、ヒートブロック (IWAKI ALB-120) 上で 55°C、20 分間インキュベートした。そこに CIA 溶液 (クロロホルム・イソアミルアルコール、24:1 v/v) を 250 μ l 加え、攪拌機 (Scientific Industries VORTEX-GENE 2) を用いて攪拌した。そして、微量高速冷却遠心機 (HITACHI himac CF15R) を用いて遠心分離 (15,000 rpm \times 5 分、20°C) を行い、上清 150 μ l を 1.5 ml チューブに回収した。上清に -20°C に冷やしたイソプロパノール 150 μ l を加え、よく攪拌し、遠心分離 (15,000 rpm \times 10 分、4°C) を行った。チューブの底に沈殿した DNA を流さないように、ゆっくりと上清を捨てた。沈殿物に -20°C の 70% エタノール 250 μ l を加え、よく攪拌した。遠心分離 (15,000 rpm \times 5 分、4°C) をした後、上清を捨てた。チューブの蓋を開けたままデシケーター内で 10 分間減圧乾燥させ、エタノールを飛ばした。そして 25 μ l または 50 μ l の TE バッファー (0.01M Tris-HCl、0.001M EDTA (pH8.0)) を加えて沈殿物を溶解後、DNA の分析まで -20°C で保存した。

2-4-2. シダ類の葉緑体 *rbcL* 領域の PCR 増幅と DNA の精製

上述した方法でシダ類配偶体から抽出した全 DNA を鋳型にして、葉緑体 *rbcL* 遺伝子の約 1,200 bp の領域をターゲットに aF3 及び cR3 のプライマーのペアを用いて PCR 増幅を行った。これらのプライマーの情報を表 1 に示した。反応液は 1 サンプルあたり、Prime STAR Max DNA Polymerase (TaKaRa) 5 μ l、10 μ M の各プライマー 0.6 μ l、滅菌水 3.3 μ l、Template DNA 0.5 μ l となるように作製した。反応プログラムは 95°C 10 分のホットスタートで開始し、その後 98°C 10 秒、58°C 10 秒、72°C 5 秒を 35 サイクル、最後に 72°C 7 分となるようにサーマルサイクラー (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700) を設定した。PCR 反応産物は ExoStar (illustra) を用いて、37°C 30 分、80°C 15 分の処理を行うことにより精製した。

2-4-3. AM 菌 28S rDNA 領域の PCR 増幅と DNA の精製

シダ類の配偶体から得た全 DNA (2-4-1. DNA 抽出) を用いて、AM 菌 28S rDNA 領域の nested PCR による増幅を行った。最初に真核生物の 28S rDNA 領域を幅広く増幅できる LR1 と真菌 DNA を特異的に増幅できる FLR2 の 2 つのプライマーペアを用いて 1st PCR を行い、次に AM 菌特異的な FLR3 及び FLR4 のプライマーペアで 2nd PCR を行い、約 350 bp の DNA を増幅した。これらのプライマーの情報も表 1 に示した。反応液の組成はシダ類の PCR 増幅用と同じである。反応プログラムは各 PCR 共に 95°C 10 分で開始し、98°C 10 秒、55°C 10 秒、72°C 5 秒を 35 サイクル、最後に 72°C 7 分と設定した。PCR 反応産物の精製はシダ類と同様の方法で行った。

2-4-4. 塩基配列の決定と種同定、系統解析

Big Dye terminator v3.1 キット を用いてシーケンス反応を行った。シダ類の *rbcL* 遺伝子のシーケンスには aF3、cR3、bF、aR の 4 種類のプライマーを、AM 菌の rDNA のシーケンスには FLR3 と FLR4 の 2 種類のプライマーを使用した (表 1)。反応プログラムは 96°C 1 分で開始し、96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 1 分を 25 サイクル、4°C ∞ と設定した。塩基配列の解読は、キャピラリー DNA シーケンサー ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた配列を ChromasPro 1.5 (Technelysium) を用いて編集し、MEGA7 (Kumar et al., 2016) 上でアライメントを行った。シダ類については、BLAST 検索 (NCBI) により、DNA データベース上にある *rbcL* の配列と比較することによって種を同定した。この時、サンプルの配列が既知データと 2-3 塩基以内の違いであった時に、既知配列の種と同種であるとした。

表 1. シダ植物の葉緑体 *rbcL* 領域と AM 菌の 28S rDNA 領域の PCR 増幅に用いたプライマー。

プライマー	対象生物	塩基配列	方向	文献
aF3	シダ植物	5'-ATGTCACCACAAACGGAGACTAAAGC-3'	Forward	Hori <i>et al.</i> 2018
cR3	シダ植物	5'-GCGGCAGCCAATTCGGACTCCA-3'	Reverse	Hori <i>et al.</i> 2018
bF	シダ植物	5'-TATCCCCTGGATTTATTTGAGGAAGGTTC-3'	Forward	Hasebe <i>et al.</i> 1994
aR	シダ植物	5'-CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTCTCCA-3'	Reverse	Hasebe <i>et al.</i> 1994
LR1	AM 菌	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3'	Forward	van Tuinen <i>et al.</i> 1998
FLR2	AM 菌	5'-GTCGTTTAAAGCCATTACGT-3'	Reverse	van Tuinen <i>et al.</i> 1998
FLR3	AM 菌	5'-TTGAAAGGGAAACGATTGAAGT-3'	Forward	Golotte <i>et al.</i> 2004
FLR4	AM 菌	5'-TACGTCAACATCCTTAACGAA-3'	Reverse	Golotte <i>et al.</i> 2004

AM 菌についても、BLAST 検索 (NCBI) を行なって、DNA データベース上にある rDNA の配列と比較した。本研究では、サンプルの配列と既知配列の類似性が 97% 以上のものを同一の AM 菌 MOTU (分子操作的分類群) として扱うこととした。さらに AM 菌については、97%以上類似した既知配列等と共に、MEGA7 を使用して NJ 法 (Saitou & Nei, 1987)、Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980) による系統樹を構築した。

2-5. 解剖学的手法によるシダ類配偶体への AM 菌感染の確認

2-5-1. 樹脂切片の作製

FAA 中に固定したサンプルを各濃度のエタノールシリーズ (50%、60%、70%、80%、90%、99.5%) に 1 時間浸し、脱水した。その後 2% サフラニン in 50% エタノールを数滴滴下した 100% エタノールに 1 時間以上浸した。最後に 100% エタノールを入れ替えて再び 1 時間浸した。

次に以下の方法で、樹脂置換を行った。100% エタノールに浸ったサンプルに樹脂 (KULZER Technovit 7100) を加え、徐々に樹脂の比率を大きくした。比率と時間は、エタノールと樹脂が 2 : 1 の量で 1 時間、1 : 1 で 1 時間、1 : 2 で 2 時間、樹脂のみで 24 時間とした。樹脂と付属の硬化剤を 15 : 1 の比率で混合し、これを 300 μ l ずつ包埋板の穴へ流し込んだ。下部が固まったことを確認し、先に樹脂置換したサンプルを樹脂中に置いた。同様に 2 液を混合し、サンプルの上から再び 300 μ l ずつ流し込み、サンプルを完全に樹脂中に閉じ込めた。樹脂が完全に固まったことを確認し、樹脂ブロックを包埋板から外した。そして、よく熱したカミソリを用いて、樹脂ブロックの余分な箇所を切り落とした。瞬間接着剤 (東亜合成 アロンアルファ) で樹脂台にブロックを貼りつけた。カミソリでトリミングを行い、余分な接着剤を削った。

次に、マイクロトーム (Marshall SCIENTIFIC Leitz 1512) を使用して、配偶体の頂端-基部軸が断面となるように、3 μ m の厚さの切片を作成した。スライドガラスに水滴を作り、切り出した切片を水滴に浮かべて並べた。60°C に設定したパラフィン伸展器上で 10 分以上乾燥させ、切片をスライドガラスに完全に貼り付けた。

最後に、植物の細胞壁と菌糸を染めるため、サフラニンとトルイジンブルーを使用し、以下の手順で染色を行った。染色後は 60°C に設定した伸展器上でスライドガラスを乾かした。

プレパラート染色の手順

1) 2%塩化亜鉛 (ZnCl ₂)水溶液	1分
2) 流水	1分
3) サフラニン水溶液	5分
4) 蒸留水	5秒
5) トリジンブルー・0.2%ホウ酸ナトリウム水溶液	6分・60°C
6) 流水	5秒、2回
7) 蒸留水	5秒
8) 2%オレンジG・5%タンニン酸水溶液	30秒
9) 流水	5秒、2回
10) 蒸留水	5秒
11) 5%タンニン酸水溶液	45秒
12) 流水	2分
13) 0.2%硫酸アンモニウム鉄水溶液	1分
14) 流水	2分
15) 蒸留水	5秒

このように作製、染色した切片をのせたスライドガラスにパーマウント剤（メルク・ジャパン エンテランニュー）を数滴たらし、カバーガラスをのせて封入した。プレパラートを十分に乾かした後、光学顕微鏡（LEICA DM 2500）の下で切片を観察した。細胞内部の菌糸の有無を調査し、顕微鏡に付属のデジタルカメラ（LEICA MC170 HD）で写真を撮影した。

2-5-2. トリパンブルー染色

サンプル数に余裕のあったシダ類9種（シロヤマゼンマイ、ヘゴ、ムニンエダウチホングウシダ、イシカグマ、オガサワラハチジョウシダ、オオバノヒノキシダ、ケホシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ）の配偶体については、AM菌の形態的特徴を持つ菌糸が侵入しているかどうかを調べるために、細胞内の菌糸をトリパンブルー染色液で染色した。FAA中に固定した配偶体サンプルを水道水で洗浄し、10% KOHの入ったチューブに入れて60°Cに温めた。30分浸漬した後10% KOHを捨て、再び水道水で洗浄した。次に2% HClを加え、20分浸漬した。2% HClを捨て、トリパンブルー染色液を加え、60°Cで20分浸漬した。染色液をよく切った後、ラクトグ

リセロール中に保存した。観察には光学顕微鏡 (LEICA DM 2500) を使用し、菌糸の有無やその特徴 (隔壁があるかないか等) を確認して、顕微鏡に付属のデジタルカメラ (LEICA MC170 HD) で写真を撮影した。

3 結果

3-1. シダ類配偶体の分子種同定

小笠原諸島での 3 度のサンプリングによって、合計 283 個体のシダ類心臓形配偶体を得ることができた。そのうち、181 個体について *rbcL* の PCR 増幅に成功した。種同定の結果、ゼンマイ科のシロヤマゼンマイ *Osmunda banksiifolia* (C.Presl) Kuhn、ヘゴ科のヘゴ *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook.、メヘゴ *Cyathea ogurae* (Hayata) Domin、マルハチ *Cyathea mertensiana* (Kunze) Copel.、ホングウシダ科のムニンエダウチホングウシダ *Lindsaea repanda* Kunze、コバノイシカグマ科のユノミネシダ *Histiopteris incisa* (Thunb.) J. Sm. とイシカグマ *Microlepia strigosa* (Thunb.) C.Presl、イノモトソウ科のオガサワラハチジョウシダ *Pteris boninensis* H.Ohba、チャセンシダ科のオオバノヒノキシダ *Asplenium trigonopterum* Kunze、ヒメシダ科のケホシダ *Thelypteris parasitica* (L.) Tardieu、メシダ科のノコギリシダ *Diplazium wichuriae* (Mett.) Diels とオオシケシダ *Deparia bonincola* (Nakai) M.Kato、オシダ科のキンモウイノデ *Ctenitis lepiger* (Baker) Tagawa とムニンオニヤブソテツ *Cyrtomium falcatum* (L.f.) C.Presl subsp. *australe* S.Matsumoto、ツルシダ科のタマシダ *Nephrolepis cordifolia* (L.) C.Presl の 10 科 15 種のシダ類配偶体を得ていたことがわかった。これら 15 種のうち、7 種が小笠原諸島固有種、8 種が広域分布種だった。各種の分布特性 (豊田、2014 ; 海老原、2016 ; 海老原、2017) と調査地ごとのサンプル数を表 2 に示す。

また、父島からはこのうちの 11 種 (シロヤマゼンマイ、ヘゴ、メヘゴ、マルハチ、ムニンエダウチホングウシダ、イシカグマ、オガサワラハチジョウシダ、ケホシダ、ノコギリシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ)、母島からも 11 種 (シロヤマゼンマイ、ヘゴ、ユノミネシダ、イシカグマ、オガサワラハチジョウシダ、オオバノヒノキシダ、ケホシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ、ムニンオニヤブソテツ、タマシダ) の配偶体を得られ、8 種 (シロヤマゼンマイ、ヘゴ、マルハチ、イシカグマ、オガサワラハチジョウシダ、ケホシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ) については両島から得られた。

3-2. 配偶体に感染する AM 菌の分子種同定

得られた AM 菌の分子系統樹を図 6 に示す。ダイレクト・シーケンシングによって、シダ類配偶体 11 種（シロヤマゼンマイ、ヘゴ、メヘゴ、ムニンエダウチホングウシダ、イシカグマ、オガサワラハチジョウシダ、ケホシダ、ノコギリシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ）25 個体から AM 菌の rDNA の 25 配列が得られた。これらの配列は、グロムス科 *Glomus* 属に含まれる 6MOTUs (Glo1~Glo6)、同じくグロムス科の *Septoglomus* 属に含まれる 1MOTU (Sep1)、アカウロスポラ科 *Acaulospora* 属に含まれる 1MOTU (Aca1)、未分類の AM 菌 5MOTUs (Unc1~5)、相同性の高い既知配列が DNA データバンクから得られなかった AM 菌 5MOTUs (New1~5) の、合計 18MOTUs にクラスタリングされた。この 18MOTUs はいずれも父島と母島のどちらか片方の島からのみ検出され、父島からは Glo1、Glo2、Glo3、Glo4、Glo5、Glo6、Unc1、Unc3、Unc4、Unc5、New2、New4、New5 の 13MOTUs、母島からは Unc2、New1、New3、Sep1、Aca1 の 5MOTUs が得られた。

3-3. 樹脂切片による菌感染の確認

樹脂切片観察では、13 種のシダ類配偶体（シロヤマゼンマイ、ヘゴ、メヘゴ、マルハチ、ムニンエダウチホングウシダ、ユノミネシダ、イシカグマ、オガサワラハチジョウシダ、ケホシダ、ノコギリシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ、ムニンオニヤブソテツ）の細胞内部に菌糸が観察された（図 7、8）。シダ類各種の配偶体サンプル数と菌感染率（菌感染が観察されたサンプル数／観察した総サンプル数）を図 9 に示した。13 種のうち 9 種（シロヤマゼンマイ、ヘゴ、メヘゴ、マルハチ、ムニンエダウチホングウシダ、ユノミネシダ、ノコギリシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ）については、全ての配偶体サンプルで菌感染が観察された。4 種（イシカグマ、オガサワラハチジョウシダ、ケホシダ、ムニンオニヤブソテツ）では、菌感染が観察されなかったサンプルもあった。

3-4. トリパンプルー染色による菌感染の確認

トリパンプルー染色では、無隔壁の菌糸と有隔壁の菌糸の両方が観察された（図 10）。染色に用いた 9 種（シロヤマゼンマイ、ヘゴ、ムニンエダウチホングウシダ、イシカグマ、オガサワラハチジョウシダ、オオバノヒノキシダ、ケホシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ）のうち、ヘゴ、オオシケシダ、キンモウイノデの 3 種では無隔壁の菌糸が観察できた。他の 6 種のサンプルは細胞が分厚くて菌糸が確認で

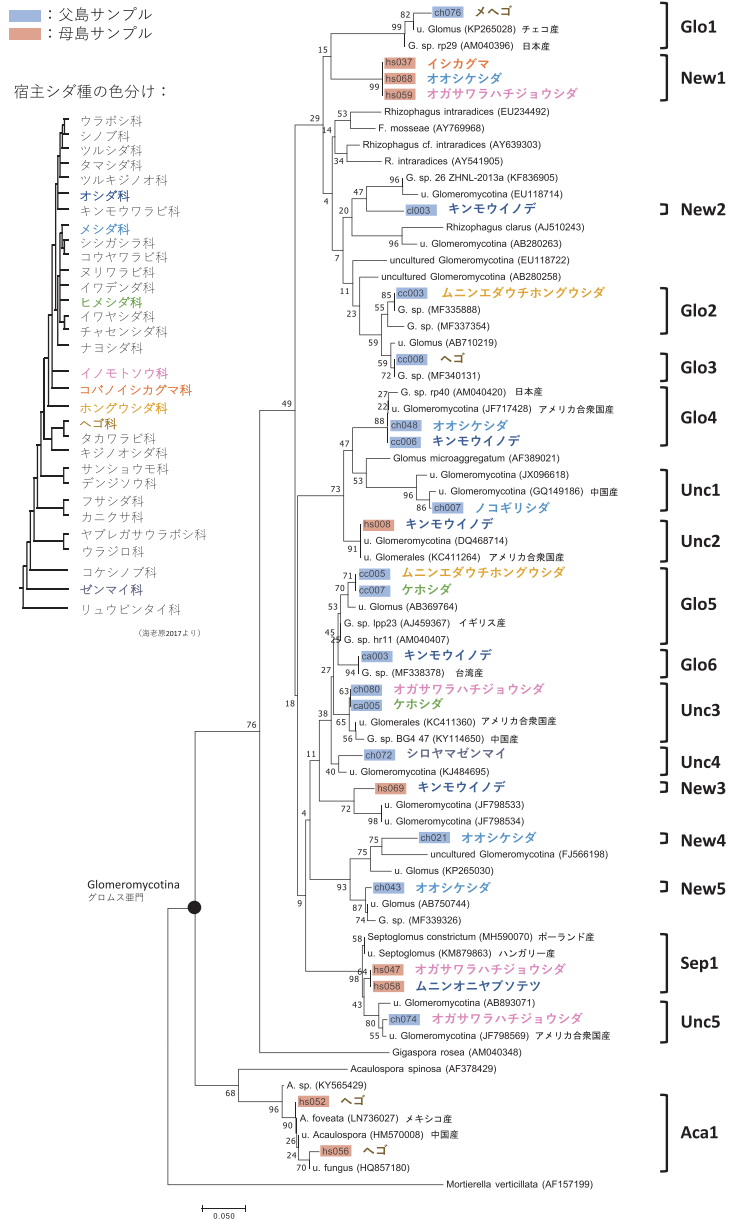


図 6. 28S rDNA 領域の塩基配列情報に基づく、小笠原諸島産シダ類の配偶体に感染していた AM 菌の分子系統樹 (NJ 法で構築)。

青色・赤色で示したのが本研究で得られた AM 菌の配列であり、それぞれ父島・母島のどの種のシダ類配偶体から得られたかを示す。宿主のシダ類は、左に示すシダ類の系統樹にならって、科ごとに色分けして示した。アクセッション番号が示してあるものは DNA データバンクから得た AM 菌の配列であり、様々な植物から検出された配列や菌の孢子から得られた配列である。

きない、隔壁の有無が判断できない等の理由で隔壁の有無を確認できなかった。一方、有隔壁の菌糸は9種のシダ類全てに見られた。

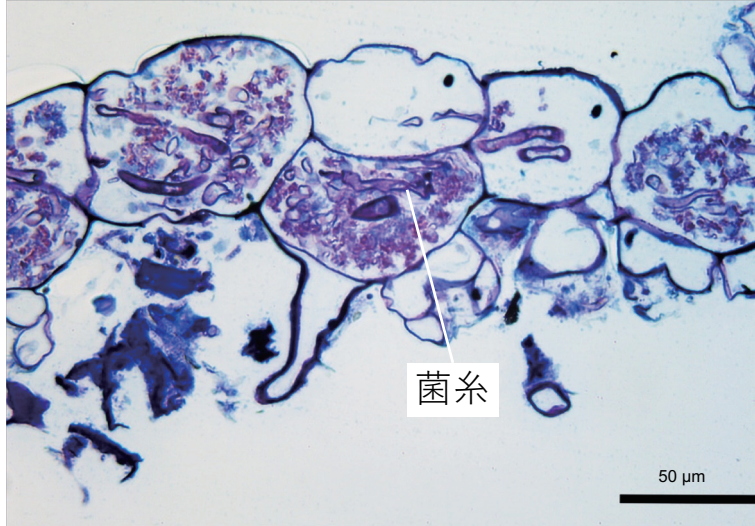


図7. キンモウイノデの配偶体の細胞内部で観察された菌糸。菌糸が樹の枝のように細かく分枝し、細胞内に広がっている。

4. 考察

4-1. 父島・母島間のシダ類の胞子の移動

得られたシダ類15種の心臓形配偶体(表2)は、いずれも小笠原諸島に胞子体の分布が確認されているシダ類の種だった。本研究で配偶体を得られた地点と文献による胞子体の分布(豊田, 2014; 海老原, 2016; 海老原, 2017)を比較したところ、13種は、胞子体の生育する島から配偶体も得られていた。しかし、シロヤマゼンマイについては、胞子体の分布の報告が父島からのみであるにも関わらず、本研究において母島からも1個体の配偶体が見つかった。また、ノコギリシダについては、胞子体の分布が母島と火山列島からしか報告されていないにも関わらず、父島から1個体の配偶体が見つかった。つまり、これら2種については、胞子体の分布が確認されていない島で配偶体が見つかったことになる。このことは、父島・母島間にシダ類の胞子の移動があることを示唆している。シダ類の心臓形の配偶体は通常、栄養繁殖をしないため、一個体の配偶体が生存し続けられる期間は限定されている。

表 2. 本研究で配偶体が得られたシダ種とその分布特性（小笠原固有または広域分布）ならびにサンプル数（数字は得られた配偶体の数）.

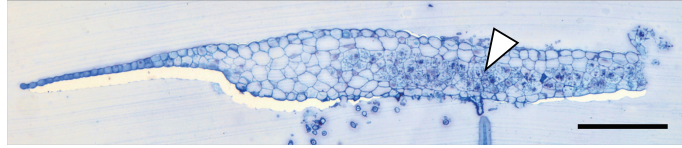
科	種 名	学 名	分布特性	父 島			母 島	
				旭山 (CA)	東平 (CH)	中央山 (CC, CL)	乳房山 (HC)	石門 (HS)
ゼンマイ科		<i>Osmunda banksii</i> (C. Presl) Kuhn	-	7	3	-	1	
ヘゴ科		<i>Cyathea spinulosa</i> Wall. ex Hook.	-	1	1	-	8	
		<i>Cyathea ogurae</i> (Hayata) Domin	-	2	-	-	-	
ホンダウシダ科		<i>Cyathea mertensiana</i> (Kunze) Copel.	1	1	-	1	-	
		<i>Lindsaea repanda</i> Kunze	-	2	5	-	-	
コバノイシカグマ科		<i>Histiopteris incisa</i> (Thunb.) J. Sm.	-	-	-	1	-	
		<i>Microlepia strigosa</i> (Thunb.) C. Presl	-	2	2	3	9	
イノモトウシダ科		<i>Pteris boniniensis</i> H. Ohba	-	3	-	4	10	
チャセンシダ科		<i>Asplenium trigonopterum</i> Kunze	-	-	-	3	-	
ヒメシダ科		<i>Thelypteris parasitica</i> (L.) Tardieu	1	20	5	27	17	
		<i>Diplazium wichuranae</i> (Mett.) Diels	-	1	-	-	-	
オシダ科		<i>Deparia bonincola</i> (Nakai) M. Kato	-	8	-	-	3	
		<i>Ctenitis lepigera</i> (Baker) Tagawa	3	11	2	5	4	
ツルシダ科		<i>Cyrtanthium falcatum</i> (L.f.) C. Presl subsp. <i>australe</i> S. Matsumoto	-	-	-	2	1	
		<i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.) C. Presl	-	-	-	1	-	

←頂端側

基部側→

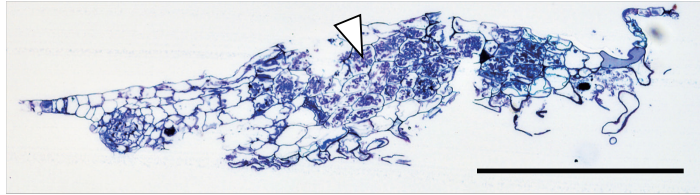
a

シロヤマゼンマイ
CC015



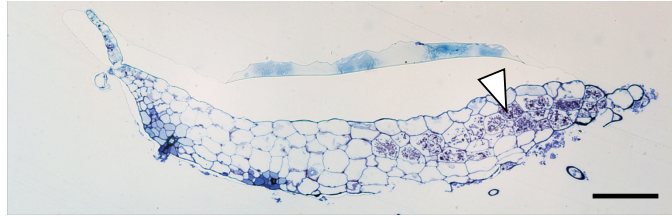
b

ヘゴ
CC008



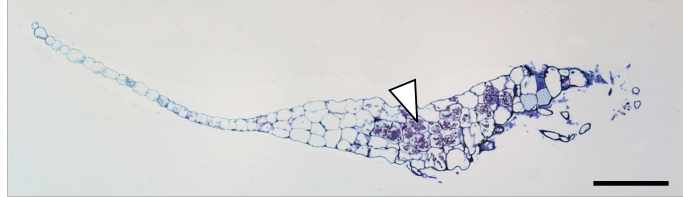
c

メヘゴ
CH075



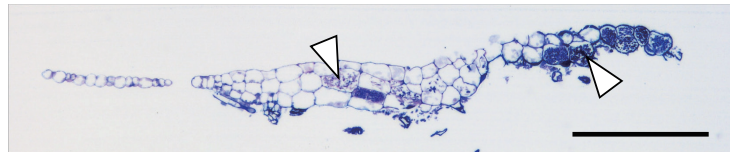
d

マルハチ
CH068



e

ムニンエダウチ
ホングウシダ
CH065



f

ユノミネシダ
HC045

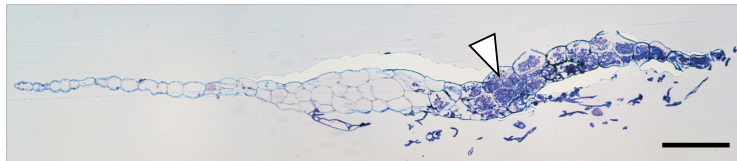


図8. シダ類13種の配偶体の樹脂切片と菌感染.

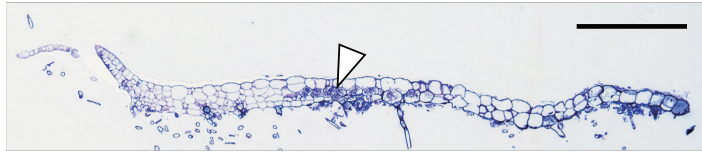
配偶体に観察された菌感染の部位を白矢印(▽)で示した(スケールバー:50 μm).

←頂端側

基部側→

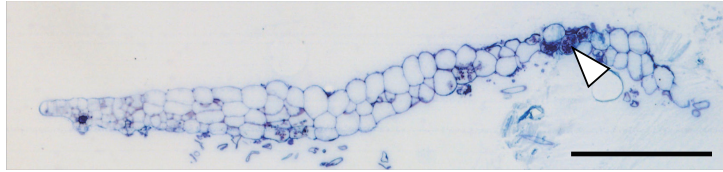
g

イシカグマ
CH055



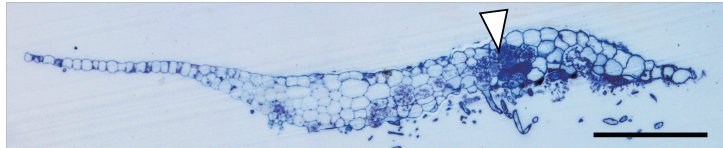
h

オガサワラ
ハチジョウシダ
CH074



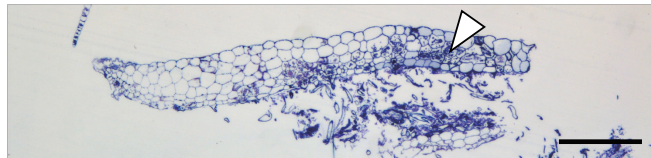
i

ケホシダ
HS004



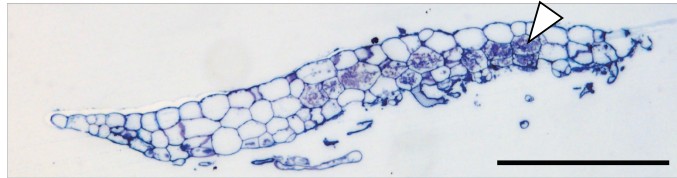
j

ノコギリシダ
CH007



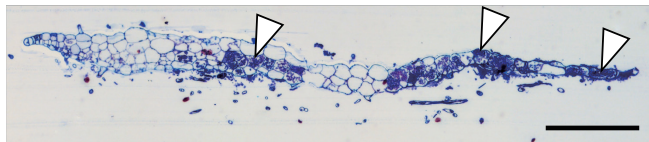
k

オオシケシダ
HS067



l

キンモウイノデ
CH064



m

ムニン
オニヤブソテツ
HS058

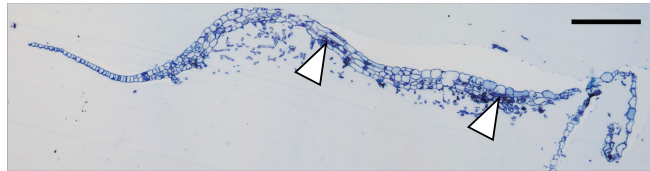


図 8. (続き) シダ類 13 種の配偶体の樹脂切片と菌感染.

スケールバー : 50 μ m.

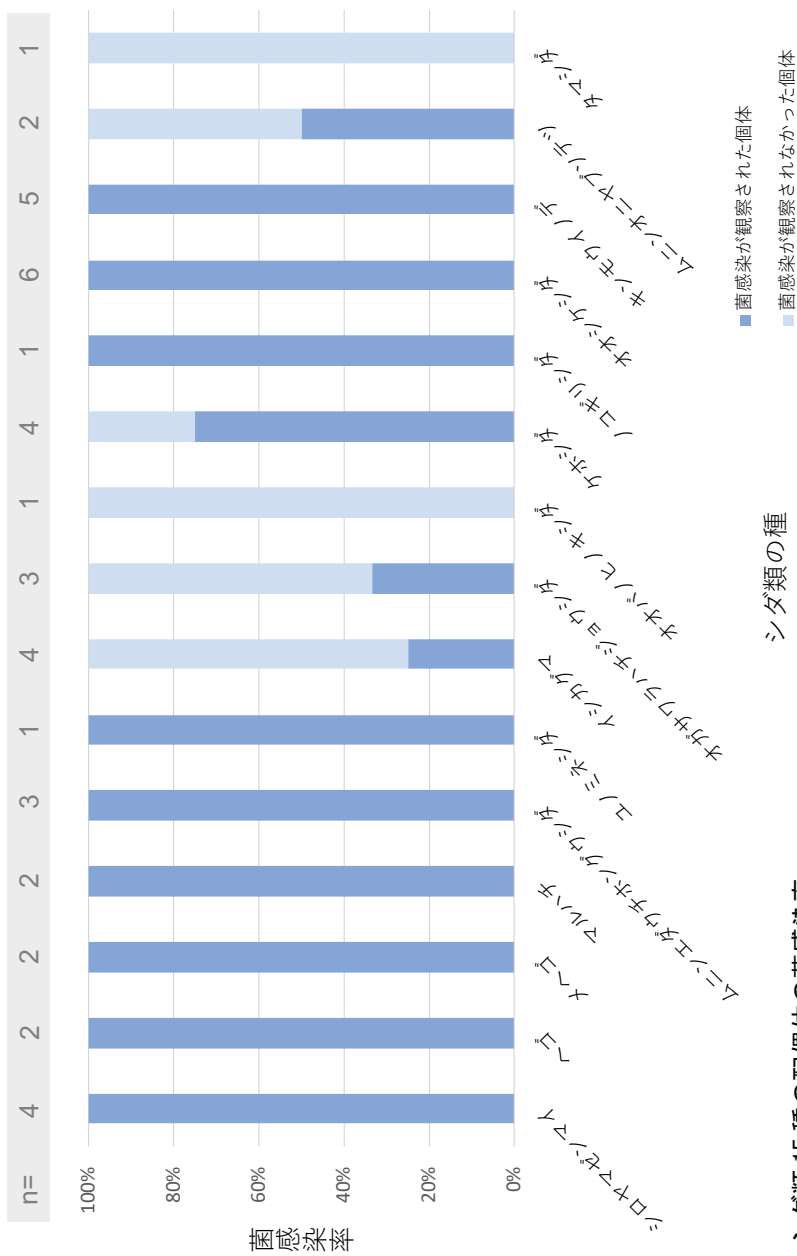


図9. シダ類 15 種の配偶体の菌感染率.
 菌感染率は、樹脂切片を観察した配偶体の総サンプル数に対する、菌感染が観察されたサンプル数の割合として示した.

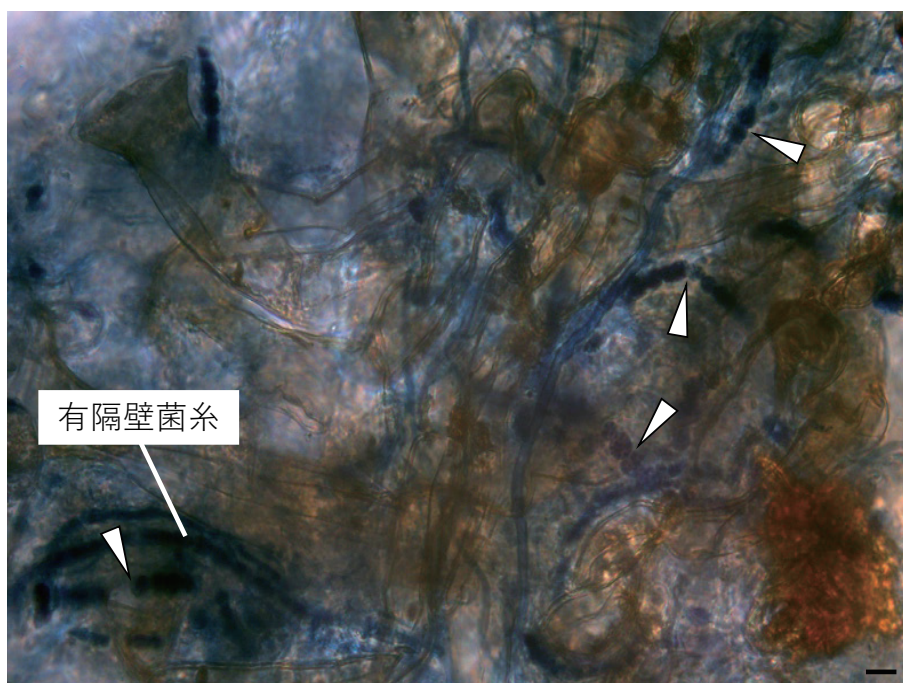
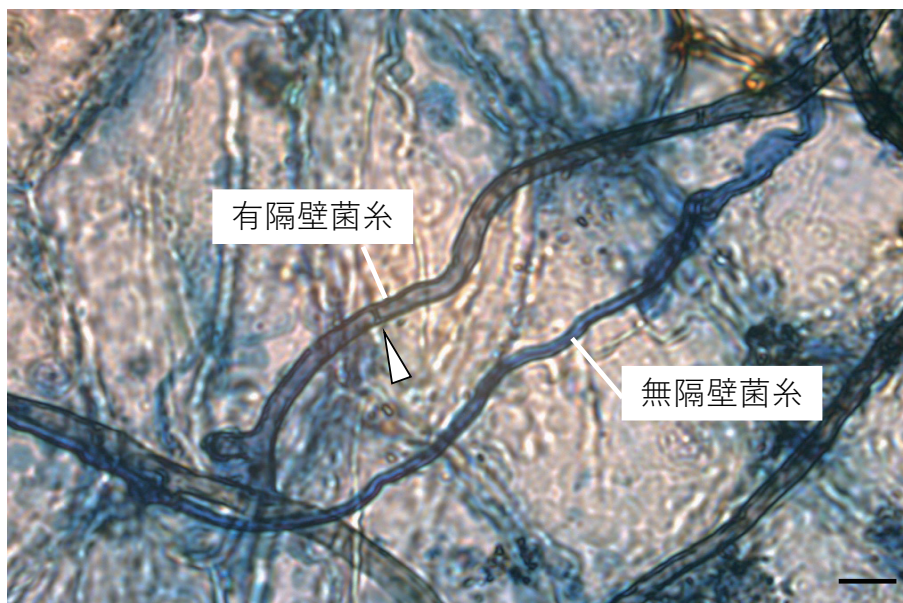


図 10. トリパンプルー染色によって観察された配偶体内部の菌糸.
無隔壁菌糸 (AM 菌) と有隔壁菌糸 (AM 菌ではない菌) の両方が観察された.
隔壁を白矢印 (▽) で示した (スケールバー: 10 μ m) .

したがって、最近、孢子から生じたものと考えられる。一方でシダ植物の孢子体については、少なくともシロヤマゼンマイやノコギリシダのように孢子体が湿った環境で大きく育つ種は、比較的容易に発見されるだろう。そう考えられるにも関わらず、小笠原諸島の地元有識者でも2種の孢子体を見たことがないということは、これらの種の配偶体が新たに見つかった島において、孢子体が生育している可能性は高くないと考えられる。一般的にシダ類の孢子の大部分は孢子体の近くに散布される (Murakami et al., 1997)。しかし、火山島の噴火したところに、それまで生育が確認されなかったシダ植物が出現し、分布を拡大した例も報告されている (上條ら、2005)。シダ類、特に小笠原諸島などの海洋島に生育するシダ類の孢子の散布能力は高いと考えられる。本研究でも、シダ類の孢子が父島・母島間の海洋上を約 50 km も移動していることが明らかとなった。さらに、小笠原諸島内にそれぞれの島固有のシダ類が多く存在していることから、それらの孢子が島間を移動していても、孢子体の定着には至りにくいことも考えられる。

光合成を行う配偶体をもつシダ類のほとんどは、心臓形の配偶体を形成するが、ごく少数の科 (コケシノブ科、イノモトソウ科、ウラボシ科など) にはリボン状の配偶体を形成する種もある。そして、それらの中には、無性的な増殖によって配偶体世代のみを繰り返す生活環をもったシダ類がいることが知られている (Farrar, 1967)。このような配偶体は独立配偶体と呼ばれており、孢子体を形成しないか、あるいは孢子体とは離れて生育している。独立配偶体を形成するシダ類は、配偶体よりも孢子体の方が、より生育環境が限定されていると考えられている。本研究で対象とした、心臓形配偶体を形成する多くのシダ類は、これらとは大きく異なった特徴をもつが、同様に孢子体の生息していない場所で配偶体のみが見られた例があったことは、シダ類の定着の過程を知る上で興味深い。

4-2. シダ類配偶体の菌感染

樹脂切片において観察された配偶体内部の樹の枝のように細かく分枝している構造は、AM 菌に特徴的な樹枝状体であると考えられた (図 7, 8)。つまり、樹枝状体が観察できた 13 種に AM 菌感染が生じていることが強く示唆された。菌感染率の結果 (図 9) からは、シダ類配偶体の菌感染には2つのタイプがあることが考えられた。1 つ目は菌感染率が 100%のシダ類 (全てのサンプルに菌感染が見られた種)、2 つ目は 100%未満のシダ類 (菌感染の生じないサンプルも存在する種) である。サンプル数が少ない ($n \leq 2$) 等の理由で 2 タイプのどちらかがはっきりしな

いシダ類 5 種（ヘゴ、メヘゴ、マルハチ、ユノミネシダ、ノコギリシダ）を除くと、前者にはシロヤマゼンマイ、ムニンエダウチホングウシダ、オオシケシダ、キンモウイノデの 4 種が該当し、後者にはイシカグマ、オガサワラハチジョウシダ、ケホシダ、ムニンオニヤブソテツの 4 種が該当する。トリパンブルー染色によって無隔壁の菌糸が観察された 3 種のうち 2 種（オオシケシダ、キンモウイノデ）は菌感染率 100%のグループに含まれ、残りの 1 種（ヘゴ）については、サンプル数が少ないものの、観察した 2 個体のどちらにも菌感染が確認された。AM 菌の菌糸には隔壁がないという特徴があるため、樹枝状体と無隔壁の菌糸が見られたこれらの 3 種の配偶体に、AM 菌感染が生じていることは、ほぼ確実である。先行研究では、シダ類の種間で配偶体における成長への AM 菌依存度は異なることが示唆されていた（山田、2016）。本研究によって示された菌感染率 100%の 4 種（シロヤマゼンマイ、ムニンエダウチホングウシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ）は、100%でない種に比べて AM 菌への依存性が強いかもしれない。

また、AM 菌には隔壁のない菌糸をもつという大きな特徴があるが、トリパンブルー染色の結果、調査したシダ類 9 種全ての配偶体で隔壁をもつ菌糸が観察された。これらは、植物に感染が確認されている DSE（Dark Septate Endophyte）かもしれない。DSE は子嚢菌の仲間であり、これまでにシダ類の孢子体の根への感染が確認されている（Zubek et al., 2010）が、配偶体への感染の報告はない。しかし、配偶体における AM 菌感染の研究が長年行われてこなかったように、DSE 感染の研究もほとんど行われていない可能性も大いに考えられる。今後、シダ類配偶体への DSE 感染についても研究していく必要があるだろう。

4-3. 小笠原諸島に生育するシダ類の配偶体と感染する AM 菌の種特異性

AM 菌が検出されたシダ類 11 種のうち 6 種（ヘゴ、ムニンエダウチホングウシダ、オガサワラハチジョウシダ、ケホシダ、オオシケシダ、キンモウイノデ）からは、複数の AM 菌 MOTU が検出された。少なくともこれらのシダ類配偶体においては、特定の AM 菌と種特異的に共生しているのではないと考えられる。また、科の異なる複数のシダ類から検出された AM 菌 MOTU が 5 つ（Glo4、Glo5、Sep1、Unc3、New1）もあったことは、AM 菌についても同様に、特定のシダ類に対して種特異的に感染するのではないことを示している。これらの結果は、小笠原諸島産のシダ類配偶体のごく限られた AM 菌種とのみ共生しているのではなく、シダ類配偶体と AM 菌の間に種特異的な関係がないことを示唆する。AM 菌は、デボン紀の化

石前維管束植物（コケ植物段階とシダ植物段階の中間の段階）*Aglaophyton major* の根から樹枝状体様の菌糸構造が見つかった（Remy et al., 1994）ことと、AM 菌 rDNA を用いた Simon et al. (1993) の分子系統解析の結果から、約 4 億年前に起源したと考えられている。この起源が植物の陸上進出と同時期であることから、一般的に AM 菌との共生によって植物の陸上進出が可能になったと考えられている。AM 菌と共生することが、植物の新たな土地への分布拡大に有利に働くならば、植物が特定の AM 菌とだけでなく、多様な AM 菌と共生できた方がより植物の生存に有利であると考えられる。本研究で調査したシダ類 13 種の配偶体に AM 菌感染が生じていたことから、小笠原諸島におけるシダ類配偶体の定着に対して、AM 菌共生が有利に働いていた可能性が考えられる。さらに、AM 菌に対する種特異性を持たないことは、シダ類 13 種の配偶体の生存を有利にしたのかもしれない。

本研究では、ダイレクト・シーケンシングを行い、1 個体のシダ類配偶体から 1 種の AM 菌のみが検出されたが、逆に複数の配列が PCR 増幅されたことによって塩基配列自体を決定できなかったこともあったと考えられる。すなわち、シダ類配偶体には複数種の AM 菌が同時感染することが十分考えられるのに、それは本研究では調べ切れていない。PCR 増幅した DNA 断片をクローニングする、あるいは次世代シーケンサーなどを用いて網羅的に配列を決定するなどして、この問題を解決する必要がある。

一方で、先行研究（坂田、2008）では、小笠原諸島において繁茂が問題視されている外来種のアカギ (*Bischofia javanica* Blume) に、単一種の AM 菌のみが感染していることが示唆されている。アカギは強いアレロパシーをもつことによって、他の在来植物を排除し、純林を形成することが知られる。そのためアカギの純林の地下部では、アカギのパートナー以外の AM 菌が排除され、AM 菌相が単純化していることも考えられている。このように、小笠原諸島には、生存の戦略として AM 菌パートナーを狭めることを選んだ植物も存在していることは興味深い。

4-4. シダ類と被子植物の AM 菌感染の比較

坂田 (2008) は、小笠原諸島産の被子植物 (40 科 73 種) から、グロムス科の *Glomus* 属と *Septoglomus* 属、ギガスポラ科の *Gigaspora* 属、ディバーシスポラ科の *Diversispora* 属、アカウロスポラ科の *Acaulospora* 属の AM 菌を検出している。このことは、これらの 4 科 5 属の AM 菌が小笠原諸島に分布していることを示している。しかし、本研究で扱った小笠原諸島産シダ類配偶体からは、*Glomus* 属、

Septoglomus 属、*Acaulospora* 属の3属しか検出されなかった。さらに *Acaulospora* 属が検出されたシダ類はヘゴの1種のみであり、残りのシダ類10種からはグロムス科のAM菌しか検出されなかった。そのため、シダ類よりも被子植物の方が多様なAM菌と共生関係を築いている可能性が考えられる。多様なAM菌と共生できることは植物にとって水分・栄養分の獲得に有利となる。このことが、被子植物がシダ植物よりも乾燥した土地へ進出できたきっかけとなったのかもしれない。一方で、本研究ではシダ類の孢子体よりも生育環境が限定されている配偶体でしか調査を行っていない。配偶体は成長しても1cm程度にしかならず、仮根もかなり短い。孢子体は大きいものでは十数mに成長し、その分根も長くなる。孢子体がより地中の遠いところまで根を伸長させることで、配偶体世代では接触できなかった新たなAM菌と共生する可能性も考えられる。

4-5. AM菌の分散

本研究によって検出された小笠原諸島産のAM菌のrDNA25配列には、海外（アメリカ合衆国、メキシコ、イギリス、ポーランド、ハンガリー、チェコ、中国、台湾等）で登録されたAM菌既知配列と同一のクラスター（Glo1、Glo4、Glo5、Sep1、Aca1、Unc1、Unc2、Unc3、Unc5）を構成するものがあつた（図6）。一方で、父島と母島の両島に全く同じ塩基配列をもつたAM菌は見られなかった。この要因として以下の可能性が考えられる。

ひとつ目は、今回の調査におけるサンプル数の不足である。実際は、小笠原諸島には多様なAM菌が存在しており、本研究ではそれらのごく一部しか検出できなかったために、父島と母島のどちらか一方の島から得られたAM菌ばかりだったという可能性である。ふたつ目は、島の生物相の変化によるものである。もしかすると、AM菌は比較的古い時代に他の地域から小笠原諸島に到達したが、最近は何らかの原因によって島間を移動していないのかもしれない。一般に、生物が海洋島へ分布を拡大する際には、風、海流、鳥の翼、もしくは人為のいずれかの手段を利用すると考えられている。AM菌は、孢子が大きいことや土壤中に存在していることから、比較的分散能力に乏しい菌であると考えられ、その散布様式は明らかとなっていない。もし風や海流によって散布されるのなら、現在でも父島・母島の間にはAM菌の移動が生じるはずである。一方で、小笠原諸島の無人島には多くの地中営巣性の海鳥が生育しており、かつての父島と母島にも繁殖していたことが考えられる。しかし現在の2島では、海鳥がほぼ絶滅している。海鳥がAM菌にとっての重要な散

布者であったならば、かつては両島間で AM 菌の移動が生じていたものの、現在は AM 菌の島間移動が制限されている可能性が考えられる。今後、サンプル数を増やして、島間の AM 菌相の差が見られるのかを明確にする必要がある。

5. 結論

本研究によって、初めて、小笠原諸島に生育するシダ類配偶体にも AM 菌感染が生じていることが明らかとなった。また、これらのシダ類と AM 菌との間に種特異的な関係は見られなかった。今後、シダ類配偶体の定着に AM 菌共生がどれだけ有利に働いているのかを明らかにするためには、配偶体と AM 菌の共同培養実験を試みる必要がある。さらに配偶体だけでなく孢子体の定着も、島における個体群の繁栄にとって不可欠なイベントである。本研究では配偶体のみを扱ったが、今後は孢子体でも同様の調査を行う必要がある。その際には、ダイレクト・シーケンシングでなく、クローニングや、次世代シーケンサーを用いた AM 菌 DNA 解析を行い、植物 1 個体から複数の菌種を得るなどして、より多くのデータを集めるべきである。

小笠原諸島には、本研究で扱ったシダ類（固有種 8 種、広域分布種 7 種）以外にも多くのシダ類が生育しており、その中には東京都のレッドデータブック東京 (<http://tokyo-rdb.jp/rdbtoha.html>) において、絶滅危惧 I A 類とされるヒメタニワタリや絶滅危惧 II 類とされるオガサワラリュウビンタイ、準絶滅危惧とされるリュウビンタイモドキ等も含まれる。また、本研究と先行研究（坂田、2008）で調査された種（50 科 85 種）以外にも、小笠原諸島には多くの維管束植物が自生している。小笠原諸島の森林生態系を維持するためにも、これらの菌根共生系の実態を明らかにし、共生菌類も含めた保全を行なっていく必要がある。

6. 謝辞

現地調査の実施にあたっては、環境省小笠原自然保護官事務所、小笠原総合事務所国有林課、東京都小笠原支庁土木課自然公園係より、許認可などのご配慮を頂きました。母島でのサンプル採取では、星善男氏にご協力頂きました。また、本稿作成に関して、可知直毅博士には多大なご教示とご鞭撻をいただきました。

7. 引用文献

Abe T (2006) Threatened pollination systems in native flora of the Ogasawara (Bonin) Islands. *Annals of Botany*, 98: 317–334.

- Abe T, Makino S, Okochi I (2008) Why have endemic pollinators declined on the Ogasawara Islands? *Biodiversity and Conservation*, 17: 1465–1473.
- Araim G, Saleem A, Arnason JT & Charest C (2009) Root colonization by an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of purple coneflower, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 2255–2258.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemistry Bulletin*, 19: 11–15.
- 海老原 淳 (2016) 日本産シダ植物標準図鑑 I, 学研プラス, 450p.
- 海老原 淳 (2017) 日本産シダ植物標準図鑑 II, 学研プラス, 507p.
- Farrar DR (1967) Gametophytes of four tropical fern genera reproducing independently of their sporophytes in the Southern Appalachians. *Science*, 155: 1266–1267.
- Gemma JN, Koske RE, Habte M (2002) Mycorrhizal dependency of some endemic and endangered Hawaiian plant species. *American Journal of Botany*, 89: 337–345.
- Gollotte A, van Tuinen D & Atkinson D (2004) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*, 14: 111–117.
- Hasebe M, Omori T, Nakazawa M, Sano T, Kato M & Iwatsuki K (1994) rbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 5730–5734.
- Hori K, Okuyama Y, Watano Y & Murakami N (2018) Recurrent hybridization without homoeologous chromosome pairing in the *Dryopteris varia* complex (Dryopteridaceae). *Chromosome Botany*, 13: 9–24.
- 石井 孝昭 (2014) 菌根菌の働きと使い方 —パートナー細菌と共に減肥・病害虫抑制. 農山漁村文化協会, 107p.
- 石山 恵理 (2013) シダ植物広義ウラボシ類の心臓形配偶体における AM 菌感染. 日本女子大学理学部 平成 25 年度卒業論文.
- 上條 隆志、清原 諭高、松田 深雪、加藤 拓、星野 義延、樋口 広芳 (2005) 三宅島 2000 年噴火後のユノミネシダの分布拡大. 植物地理・分類研究, 53: 83–89.
- 環境省 (2018) 環境省レッドリスト 2018. 掲載種数表. <https://www.env.go.jp/press/105504.html> (2019.1.10 確認)
- 環境省・林野庁・文化庁・東京都・小笠原村 (2018) 世界自然遺産 小笠原諸島 管

理計画 . <http://www.metro.tokyo.jp/tosei/hodohappyo/press/2018/03/29/37.html>
(2019.1.10 確認)

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111–120.

Kumar S, Stecher G & Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.

水澤 莉奈 (2012) ウラボシ目シダ類の野生配偶体に菌根菌は存在するか. 日本女子大学理学部 平成 24 年度卒業論文.

Murakami N, Nishiyama T, Satoh H & Suzuki T (1997) Marked spatial genetic structure in three populations of a weedy Fern, *Pteris multifida* Poir., and reestimation of its selfing rate. *Plant Species Biology*, 12: 97-106.

Ogura-Tsujita Y, Sakoda A, Ebihara A, Yukawa T & Imaichi R (2013) Arbuscular mycorrhiza formation in cordate gametophytes of two ferns, *Angiopteris lygodiiifolia* and *Osumunda japonica*. *Journal of Plant Research*, 126: 41-50.

Ogura-Tsujita Y, Hirayama Y, Sakota A, Suzuki A, Ebihara A, Morita N & Imaichi R (2016) Arbuscular mycorrhizal colonization in field-collected terrestrial cordate gametophytes of pre-polypod leptosporangiate ferns (Osmundaceae, Gleicheniaceae, Plagiogyriaceae, Cyatheaceae). *Mycorrhiza*, 26: 87-97.

大園 亨司 (2018) 基礎から学べる菌根生態学. 共立出版, 272p.

Remy W, Taylor TN, Hass H & Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 11841-11843.

Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

坂田 益朗 (2008) 小笠原諸島の植物に共生しているアーバスキュラー菌根菌の群集構造の解明. 東京大学新領域創成科学研究科 平成 20 年度修士論文.

迫田 曜 (2010) シダ植物野生配偶体の形態進化と菌共生. 日本女子大学理学部 平成 22 年度修士論文.

Simon L, Bousquet J, Lévesque RC & Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, 363: 67–69.

鈴木 絢子 (2013) シダ植物広義ウラボシ類の心臓形配偶体における AM 菌感染と

- 形態進化. 日本女子大学理学部 平成 25 年度卒業論文.
- 鈴木 絢子 (2015) シダ類の心臓形配偶体のハビタット変化に伴う形態進化と AM 菌感染率. 日本女子大学理学部 平成 27 年度修士論文.
- 徳留 加奈子 (2007) シダ野生配偶体の内生菌観察, 日本女子大学理学部 平成 19 年度卒業論文.
- 東京都. レッドデータブック東京. <http://tokyo-rdb.jp/index.php> (2019.1.10 確認)
- 豊田 武司 (2014) 小笠原諸島 固有植物ガイド. ウッズプレス.
- 辻村 美鶴・清水 晃・苅部 治紀・大林 隆司・村上 勇樹・村上 哲明・加藤 英寿 (2015) 外来種による小笠原在来植物の送粉系攪乱. 小笠原研究, 42: 23-64.
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A & Gianizzi-Pearson V (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology*, 7: 879–887.
- 山田 旭 (2016) シダ類心臓形配偶体、ゼンマイとリョウメンシダの AM 菌感染と成長の比較, 日本女子大学理学部 平成 28 年度卒業論文.
- Zubek S, Piątek K, Naks P, Heise W, Wayda M, Mleczko P (2010) Fungal root endophyte colonization of fern and lycophyte species from the Celaque National Park in Honduras. *American Fern Journal*, 100: 126-137.

SUMMARY

Arbuscular mycorrhizal symbiosis of fern gametophytes
in the Ogasawara Islands

Asahi YAMADA, Noriaki MURAKAMI & Hidetoshi KATO*

Makino Herbarium, Department of Biological Sciences, Graduate School of Science,
Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan

* katohide@tmu.ac.jp (Author for correspondence)

The Ogasawara Islands are oceanic islands that locate 1,000 km south of the metropolitan Tokyo, and have unique and fragile ecosystems. It is very important to clarify ecosystem or connections among different kind of organisms living there for their relevant conservation. In the Ogasawara islands, plant-pollinator systems have been well studied. In contrast, there are very few studies on mycorrhizal symbiosis. Especially, study on arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis, which is known as one of the important mutual relationship for land plants is few.

The AM symbiosis was reported to promotes plant growth and increases tolerance against environmental stress. AM colonization is known in ferns, even in their gametophytes. Gametophyte seems to suffer more than sporophytes by environmental stress during their establishment to new habitats. Therefore, AM symbiosis may play more important roles in fern gametophytes growing in oceanic islands. However, no study has been conducted on AM symbiosis of ferns in the Ogasawara Islands. That is the reason why I studied AM colonization in fern gametophytes there.

In the present study, fern gametophytes were collected at 5 localities in the Ogasawara Islands (Chichijima and Hahajima). The samples were divided into two pieces, one was used for resin section preparation or trypan blue staining for detecting AM fungi. The remaining half was used for species identification of ferns and AM fungi colonizing in fern

gametophytes. Nucleotide sequences of chloroplast *rbcL* gene of ferns and the 28S rDNA region of AM fungi were directly sequenced for their DNA barcoding.

As a result of molecular identification of the sampled gametophytes, 15 species (10 families) of ferns were identified. Most fern gametophytes were obtained from the islands where their sporophytes are also distributed. However, the gametophytes of the following two species: *Diplazium wichurae* (Mett.) Diels and *Osmunda banksiifolia* (C.Presl) Kuhn) were collected also from the island (Chichijima or Hahajima) where the distribution of their sporophytes was not recorded. These results suggested that fern spore moves between the islands which are about 50 km apart.

By the observation of resin sections of the sampled gametophytes, arbuscule-like hyphal structure was detected in the 13 gametophyte samples. Aseptate hyphae (another character of AM fungi) were also observed in the gametophytes of three fern species by trypan blue staining. The AM colonization was revealed in these fern species growing in the Ogasawara Islands.

In total, 25 rDNA sequences of AM fungi were obtained from the gametophytes of 11 fern species. The AM colonization of ferns in the Ogasawara Islands was confirmed by this molecular analysis of AM fungi. In the molecular phylogenetic tree based on the rDNA sequences, 18 MOTUs, each with more than 97% of sequence similarities were recognized. Among them, 8 MOTUs (Glo1~6, Sep1, Aca1) belonged to three genera of AM fungi (*Glomus*, *Septoglomus*, and *Acaulospora*), 5 MOTUs (Unc1~5) belonged to unclassified AM fungi, and the remaining 5 MOTUs (New1~5) belonged to AM fungi whose similar sequences were not found in the DNA data bank. There was no AM rDNA sequences, which were detected both from Chichijima and Hahajima. Multiple AM MOTUs were detected from the gametophytes of 6 fern species. Moreover, 5 AM MOTUs were detected from multiple species of ferns. These results suggested that there is no species-specific relationships between ferns and AM fungi in the Ogasawara Islands.

Some AM MOTUs included the sequences of AM fungi from North America, Central America, Europe, Asia, etc. On the other hand, no AM rDNA detected in this study having exactly the same nucleotide sequence between Chichijima and Hahajima as mentioned above. Two possibilities were considered to explain these results. (1) Number of samples analyzed in this study was too limited comparing with very large AM flora in the Ogasawara

Islands. (2) The AM flora were differentiated even between Chichijima and Hahajima by the human impacts to change the biota of the islands.

Key words

Arbuscular mycorrhizal fungi, Fern gametophytes, Molecular operational taxonomic units, Ogasawara islands, Symbiosis