

光合成をやめた植物—菌従属栄養植物のたどった進化の道のり

オーガナイザー

辻田 有紀

東北大学植物園 〒980-0862 仙台市青葉区川内 12-2

(現所属: 佐賀大学農学部 応用生物科学科 〒840-8502 佐賀市本庄町 1 番地)

遊川 知久

国立科学博物館筑波実験植物園

〒305-0005 つくば市天久保 4-1-1

植物の植物たるゆえんは、光合成によって自らエネルギーを作り出す独立栄養性にあります。ところが光合成をやめてしまい、共生する菌類から栄養や水をもたらさず暮らす植物が、世界に 880 種ほどいるのです。こうした方法で生きる種類を菌従属栄養植物 (mycoheterotrophic plants) とよび、コケ植物から被子植物まで様々な陸上植物の系統で幾度も進化してきました。菌従属栄養植物は、もともとは光合成をする独立栄養植物であり、光合成をやめていく進化がおこったことがわかっています。また、この光合成をやめる進化の道のりで、実に多様な形質進化がおこることもわかってきました。光合形成質の変化に加え、葉がなくなる、種子サイズが非常に小さくなるなどの極端な形態的变化、さらには菌根菌や送粉昆虫など他の生物との共生関係までも変化するため、菌従属栄養植物は植物の様々な形質進化を研究する非常によいモデルとなります。しかしながら、これまで菌従属栄養植物は研究の対象として見過ごされてきました。

本総説集では、光合成をおこなう独立栄養から菌従属栄養への進化の道のりでなにが起こったかをさまざまな視点で紹介します。まず第 2 章では菌従属栄養植物に関する基礎情報を紹介し、第 3 章で受粉様式の変化、そして第 4 章では菌根菌との共生系のダイナミックな変化の話をご紹介します。また、独立栄養から菌従属栄養へ進化する際の間段階と考えられている部分的菌従属栄養植物にスポットをあて、第 5 章で部分的菌従属栄養植物の発芽生態に関する研究を紹介し、最後に第 6 章では進化の道のりで起こったキーイベントである菌根共生の変化と今後の展望の話で締めくくります。

植物が植物をやめるほどの大胆な変革を実現しているからには、菌従属栄養性を獲得するプロセスでおもしろい進化がおこっているはずですが、複雑な進化の道のりを紐解くには、実に様々な学問分野から多面的なアプローチが必要です。本総説は、植物学的に大変おもしろい本植物を広く皆様に知っていただきたいという目的で企画しました。このユニークな生物材料に光があたり、さまざまなアプローチで研究が進展することを願ってやみません。

本総説は、日本植物学会第 77 回大会 (2013 年 9 月) で開催されたシンポジウムの講演内容を再構成したものです。シンポジウムの開催にあたってお世話になりました大会実行委員の先生方、そしてこのレビューを出版する機会を与えてくださいました広報委員の先生方に厚くお礼申し上げます。

菌従属栄養植物の系統と進化

遊川 知久

国立科学博物館筑波実験植物園
〒305-0005 つくば市天久保 4-1-1

Tomohisa Yukawa

Phylogenetics and evolution of mycoheterotrophic plants

Key words: Evolution, mycoheterotrophy, mycorrhizal fungi, nutritional mode, symbiosis

Tsukuba Botanical Garden, National Museum of Nature and Science

4-1-1, Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

1. はじめに

菌従属栄養植物とは、生きるために必要な栄養を光合成に代わって共生する菌に依存する植物である。地球上の植物の約80%の種は地下の根や茎で菌類と共生しており、「菌根共生」と呼ぶ。ここで植物は光合成によって稼いだ炭素の一部を共生菌に与え、菌は植物の生存に欠かすことのできない窒素とリンを植物に与える相利共生が成り立っている。ところがまれに、植物が光合成の機能を失って菌から一方的に栄養を奪い取る進化が起こっている(図1)。これは植物が植物をやめるに等しい、栄養摂取の一大イノベーションといえよう。

自分で栄養を作らないなら根も葉もいらぬ。多くの菌従属栄養植物は生きるために不要な器官がなくなって奇妙な姿に変わり果てている。生き物として退化した存在のように感じるが、ほかの生物から栄養を横取りして生きるの、実は巧妙で洗練されたやり方に違いない。この菌従属栄養植物に着目すれば、生物の栄養摂取や共生系の進化の解明に新たな光をあてることができるはずだ。ここでは菌従属栄養植物の基本的な特性を紹介しよう。

2. 見過ごされたおどろきの多様性

2-1. 種類と系統

菌従属栄養植物は12科90属約530種が、世界の熱帯～亜寒帯の湿潤な地域に分布する(Merckx 2013)。日本には約70種が分布

し、世界でもっとも多様性の高い地域のひとつである。身近なところでも、ギンリョウソウ(図2; ツツジ科)、マヤラン(ラン科)など菌従属栄養植物はひっそりと暮らしてしている。

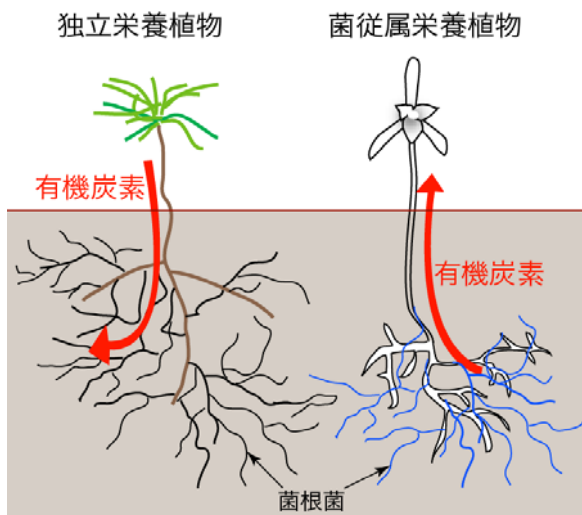


図1 菌従属栄養植物の栄養移動。ふつう植物は、光合成で作出した炭素の一部を共生する菌に与え、代わりに菌は窒素とリンを植物に与える。ところが菌従属栄養植物は光合成することをやめ、菌から一方的に栄養を奪い取っている

陸上植物の大系統のレベルでみると、菌従属栄養植物は、苔植物門、ヒカゲノカズラ綱（小葉類）、シダ（大葉シダ）綱、球果植物綱、被子植物綱に出現した。大部分の種は被子植物綱に含まれる（図3）。系統樹をよりどころに菌従属栄養性の出現したポイントを推定すると、約50回の進化があったと推定できる。菌従属栄養性がこれだけの回数くりかえし進化したということは、この性質を獲得することは途方もなく低い確率ではないことを示している。また研究材料としてみれば、独立栄養性から菌従属栄養性の進化を検証する系がたくさんあるわけで、比較するうえでたいへん都合がよい。



図2 ギンリョウソウ。里山でよく見かける菌従属栄養植物。全体に半透明の白色で光合成することができない。ベニタケ科の菌から栄養をもらっていることが分かっている（写真 木下晃彦）

2-2. まだまだみつかる新種

世界の菌従属栄養植物の種数は、この20年間で急増した。日本でも次々と新種、新記録が報告されている。たとえばラン科のタンザワサカネラン。神奈川県丹沢山系で発見され2008年に発表された（Yagame et al. 2008; 図4）。首都圏のハイキングコースでもあり、明治以来多くの植物研究者が調査した土地に、新種が見逃され眠っていたのである。海外に目を向けると属レベルで新奇なものもいろいろ発見されている。たとえば雄

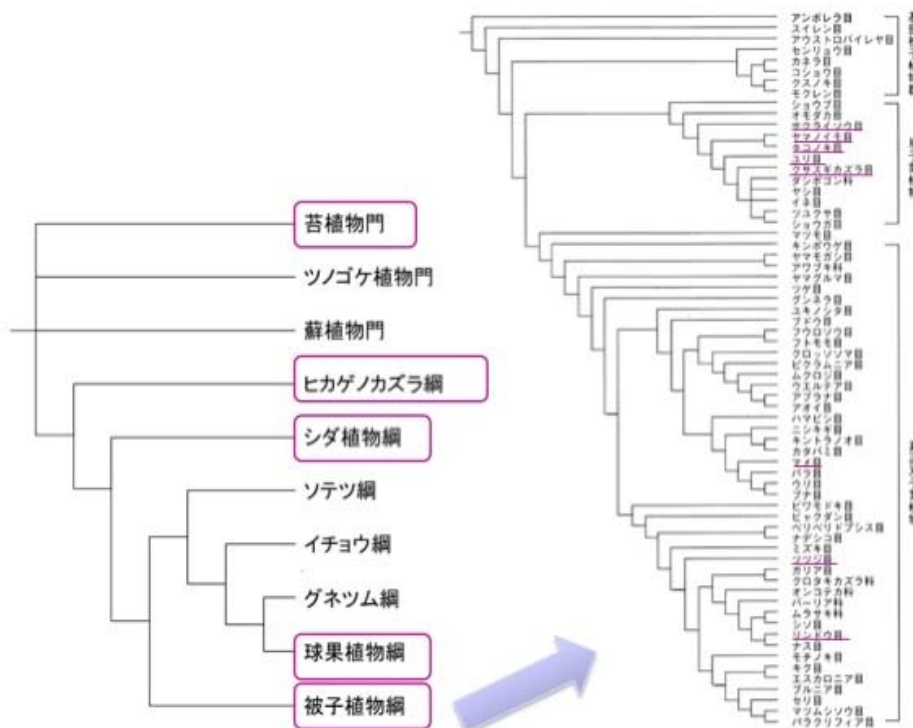


図3 菌従属栄養植物の出現する系統。ただし、球果植物綱に属するパラシタクス・ウスタ *Parasitaxus usta*（マキ科）の菌従属栄養性についてはさらに研究が必要とされる。陸上植物の分子系統樹（Soltis et al. 2011 にもとづく）をリファレンスとした（『新しい植物分類学Ⅰ（講談社）』p.8の図を改変）

蕊と雌蕊の配置が逆転した「掟破り」の植物、ホンゴウソウ科のレカンドニア (*Lecandonia*) は好例だ。

なぜ多くの種が見逃されてきたのか？ 菌従属栄養植物は開花・結実期しか地上部に出ていないことが最大の理由だろう。つまり発見のチャンスがきわめて限られているのだ。たとえばラン科のタシロランは1年のうち地上部にせいぜい3週間ほどしか姿を現さない。これからも奇妙な菌従属栄養植物がまだまだ発見されるだろう。

2-3. いまだ謎めく類縁関係

菌従属栄養植物の研究でまずぶつかる難問は、系統がはっきりしないことだった。菌従属栄養性へ進化するとさまざまな形質がドラスティックに変化するため、いったいどの植物と縁が近いのか分からなくなる。分類に困ったので、菌従属栄養植物の属や科がたくさん作られた。ところが21世紀に入って多くの植物のゲノムの塩基配列情報が蓄積するとともに、菌従属栄養植物の予想されなかった類縁が次々と明らかになってきた。

めざましい例として独立栄養性のオゼソウ属(図5)と菌従属栄養性のサクライソウ属(図6)の姉妹関係の発見をあげておこう(Fuse & Tamura 2000, Cameron et al. 2003; 図7)。オゼソウ属は日本固有のオゼソウ1種のみで、日本のユニークな生物地理を象徴する植物としてよく知られてきた。しかし、アジアにわずか3種が知られるサクライソウ属ともども、単子葉植物の中で類縁のよく分からない植物として取り残されていた。



図4 タンザワサカネラン。神奈川県丹沢山系で発見され2008年に発表された。梅雨時の短期間だけ地上に現れるので、これまで見逃されていたのだろう(写真 谷亀高広)



図5 オゼソウ。これまで類縁が謎だった日本固有の植物。菌従属栄養性のサクライソウ属ともっとも縁が近いことが最近の研究で明らかになった



図6 サクライソウ。国内では中部地方と奄美大島の限られた場所にしか分布しない珍しい菌従属栄養植物

いくつかの遺伝子領域を使って単子葉植物の進化を探る研究で両者のデータを加えると、驚くべきことにもっとも縁の近いものどうしになることが分かり、いまではサクライソウ科というひとつの科にまとめられている。こうして独立栄養植物と菌従属栄養植物のペアがはっきりすれば、独立栄養性から菌従属栄養性に変化するプロセスでどんな進化が起こったか検証することができるようになる (Yamato et al. in press)。

とはいえ、いくつかの菌従属栄養植物ではゲノムの塩基置換速度が大きく上昇するため、いまだに確からしい系統関係を描くことができない。菌従属栄養植物の系統の全貌はまだつかめていないのが現状だ。

3. 「根も葉もない」進化への道のり

3-1. ひとつとびでない複雑な進化

菌従属栄養の種にもっとも縁の近い独立栄養種がはっきりしはじめたことで、独立栄養から菌従属栄養への進化のプロセスで何が起こったかを高い精度で検証できるようになった。

独立栄養種と菌従属栄養種のペアーを使って比較してみよう。菌に栄養を依存する進化の過程で、普通葉の退化、根や地下茎の変化、種子の微細化といった形の変化にとどまらず、異時性の発現のような発生に関わる変化、菌根共生系 (第4章で詳述) や送粉共生系 (第3章で詳述) など生態の変化、気孔の退化、葉緑素の喪失、色素体ゲノムの退化など生理に関わる変化といったさまざまな形質が進化してはじめて、植物は光合成せずに生育できることが分かりはじめた。つまり「根も葉もない」進化は、少数の遺伝子の変化で起こるようなシンプルなものではない。

さらにいろいろな系統の菌従属栄養種を調べると、系統ごとに異なった形質状態の組み合わせで菌従属栄養性が進化していることが分かる (図8)。菌従属栄養性の進化はひとつのモデルで説明できないことも明らかだ。

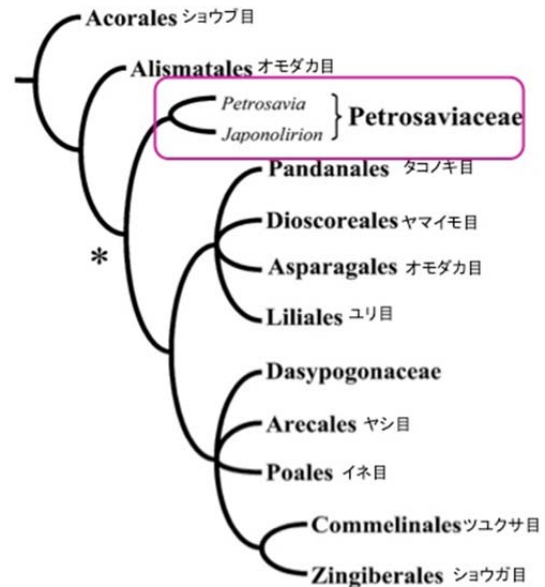


図7 単子葉植物の中でのオゼソウ属とサクライソウ属の位置 (Cameron et al. 2003 を改変)。遺伝子の情報を使って解析するまで、両者が姉妹関係にあることにだれも気づかなかった



図8 菌従属栄養植物の体のつくりは種によって大きく異なる。コンジキヤガラ (ラン科) の地下部 (左)。肥大した地下茎で菌と共生し根をつくらない。ホンゴウソウ (ホンゴウソウ科) の地下部 (右)。長く根をのばし根で菌と共生する (写真 木下晃彦)

3-2. 進化の中間段階・部分的菌従属栄養

これまで植物の独立栄養から菌従属栄養への進化は、ワンステップの単純な事象として扱われてきた。しかし「葉の退化」といったひとつの形質の進化ではなく、多数の独立した形質の進化が菌従属栄養性の成立に必須であることがはっきりしたことから、相当な時間をかけて進化的「実験」をしながら完全な菌従属栄養性を手に入れたに違いない。こう考えて独立栄養から菌従属栄養へ進化するプロセスをていねいに調べると、完全な菌従属栄養へ進化する準備段階と思われる状態が見え始めた。

たとえば菌従属栄養種と縁の近い独立栄養種の栄養摂取を調べると、みかけはふつうに光合成をしているように見えるものの、菌からかなりの栄養をもらっていることが分かりはじめた。この優柔不断な栄養のとり方を「部分的菌従属栄養」という(図9)。独立栄養と菌従属栄養に由来する炭素の体内での割合は種によって違い、生活史の段階、生育環境によっても変わることがラン科シュンラン属(図10)やサカネラン連を使った研究などで分かり始めた(Motomura et al. 2010 など; 第5章で詳述)。

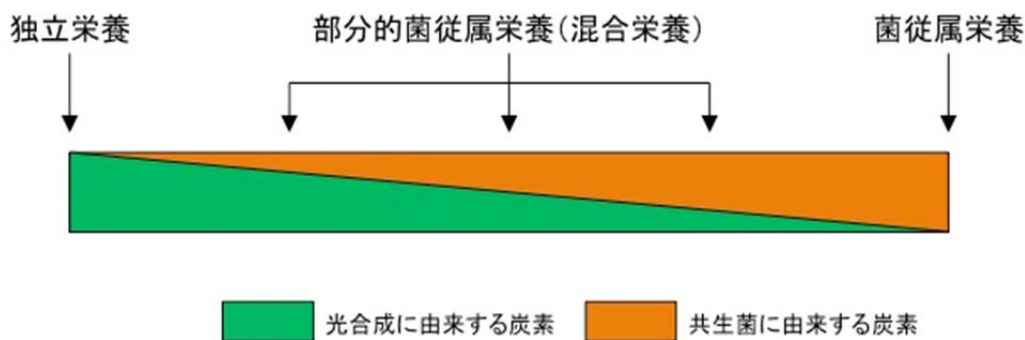


図9 部分的菌従属栄養のイメージ。植物体を構成する炭素の由来は光合成産物と菌に大別される。左端は完全な独立栄養。右端は完全な菌従属栄養。2つの間にさまざまなレベルの部分的菌従属栄養が存在する

植物にとって独立栄養を完全に捨てる「カベ」は高いだろう。部分的菌従属栄養の段階でさまざまな形質進化のゆらぎが許容されるプロセスが、菌従属栄養に適した形質状態の組み合わせの獲得に重要なのではないだろうか。とすれば、独立栄養から菌従属栄養へ一足飛びには進まず、独立栄養⇒部分的菌従属栄養⇒菌従属栄養という道のりがより普遍的である可能性が高い。

3-3. 共生菌の多様性

言うまでもなく菌従属栄養植物が生きていくためには、栄養を分けてくれる気前のよい菌のパートナーが必須だ。これまで、きわめて限られたグループの菌が菌従属栄養植物の共生者と見なされていたが、分子同定法を利用したデータの蓄積で、担子菌門、子囊菌門、グロムス門にまた



図10 シュンラン。青々とした葉をたくさん着け正常な光合成能を持つが、個体によっては体内の60%程度の炭素は共生する菌から奪っていることが分かった(写真 中山博史)

がる広範な分類群の菌が共生することが分かってきた（第4章で詳述）。

おもしろいことに、菌従属栄養植物は独立栄養植物よりずっと多様な菌類のグループと共生関係を取り結んでいる。菌従属栄養植物の菌根菌の中には独立栄養植物とはけっして共生しないグループがしばしば現れる。たとえば凶悪な植物病原菌となるナラタケ属（図11：キシメジ科）や落葉分解菌であるホウライタケ科など（Ogura-Tsujita et al. 2009 など）。つまり独立栄養植物は、4億年の歴史をかけて築き上げてきた菌との共生関係に安住する保守的な存在で、対する菌従属栄養植物はリスクを冒しつつ魅力的なパートナーを求めてさまようドンファンである。



図11 ナラタケの子実体。いくつかの菌従属栄養植物は、ナラタケのように強い寄生性、病原性を持つ菌すら飼いならして共生する（写真 細矢剛）

4. みえてきた共生系の実体

主役の植物と菌の顔が見えてきたところで、次に両者の作り出す共生系に注目してみよう。

いまお話したように菌従属栄養植物は全体としてさまざまなグループの菌と共生するが、それぞれの種に着目すると、限られた種の菌だけと共生することがふつうだ。たとえば隣り合って2種の菌従属栄養植物が生えていても、同じ菌と共生するわけではない（図12）。

もっとも縁の近い独立栄養植物と菌従属栄養植物のペアでそれぞれが共生する菌の多様性を比べると、菌従属栄養植物の共生菌の多様性は格段に低くなる（Ogura-Tsujita et al. 2012; Yamato et al, in press）。菌従属栄養植物はパートナーのえり好み激しいのだ。その理由として寄主と寄生者の双方で進化の「軍拡競争」が起こっていることが考えられるが、まだ証明されていない。

共生する菌の種類が限定されれば、植物は特定の菌の種類とうまくやっていくための適応が重要になるだろう。その苦勞を髣髴させるのが、生活史のステージによって菌根菌がシフトする現象である（第5章で詳述）。たとえばオニノヤガラ（図13）はナラタケと共生することで有名だが、これは生育が進んでからのことで、発芽から実生の初期ではクヌギタケ属の菌としか共生しないことが分かった（Xu & Guo 2000）。想像をたくましくすれば、最強の植物病原菌ナラタケは、ひ弱な実生のパートナーにはなりえず、落ち葉の分解者クヌギタケに生育初期の養育をゆだねているようにみ



図12 常緑広葉樹林の林床でとなりあって咲く2種の菌従属栄養植物、シャクジョウソウ（ツツジ科）とホンゴウソウ（ホンゴウソウ科）。両者の菌根菌はまったく別の種類である



図 13：オキノヤガラ。高さ 1.5m にもなり，菌従属栄養植物としてはずばぬけて大きい。生活史の初期はクヌギタケ属，後期はナラタケ属とパートナーを変える。ナラタケの巨大なバイオマスに支えられて，オキノヤガラはのびのびと生育しているように見える（写真 木下晃彦）

える。いずれにせよ，懇ろにしていたパートナーが変わるのは「ワケあり」なのは確かだ。

では植物の独立栄養から菌従属栄養への進化という大きなタイムスケールで，菌根共生系はどう変わったのだろう。さきほど独立栄養⇒部分的菌従属栄養⇒菌従属栄養という進化のシナリオを紹介したが，シュンラン属を使った研究でこれらのステージごとに共生する菌の種類の組み合わせが変わることが分かった（Ogura-Tsujita et al. 2012）。部分的菌従属栄養の段階で新しく共生を始めた菌の種類が，菌従属栄養の進化の引き金になっていることを示すデータだが，ここでも部分的菌従属栄養が菌従属栄養を醸成する舞台になることを裏付けている（第6章で詳述）。

5. これからの研究

ここまでお話しした内容は，菌従属栄養植物のほんの一部の系統から得られたものに過ぎない。植物の菌従属栄養性進化の予想をはるかに超えた複雑な実体を明らかにするには，多くの系統を使った網羅的な研究が不可欠だ。また菌従属栄養植物は菌根共生系にのちを託すはかない存在で，多くの種は絶滅のおそれがある。保全を進めるためにも，それぞれの種の生物学的な特性を明らかにしなければならない。

DNA や安定同位体を使った解析手法の進展は，菌従属栄養植物の研究にブレイクスルーをもたらした。ところがまだ大きな問題が残されている。地下の動態だ。菌従属栄養植物のおもな生活空間は，菌と共生する土の中にある。地上に出るのは開花・結実する数十日にすぎない。菌従属栄養植物をよりよく知るには，この地中の「ブラックボックス」の部分の解明がカギだろう。

「ブラックボックス」を可視化するには，自生地播種の技法が有効である（辻田・遊川 2008）。

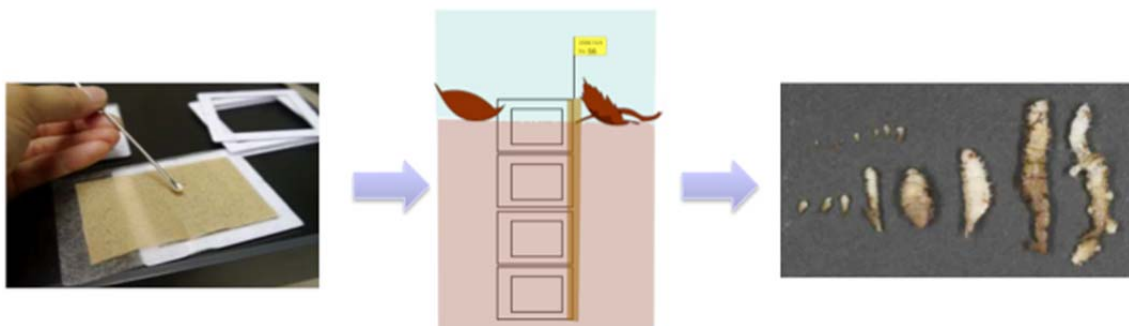


図 14 自生地播種の手順。種子をナイロンメッシュなどに入れスライドフィルムの枠で固定する。土をくずさないようにスリットを作り，地中にうめる。適当な時期に掘り上げ観察する（写真左 前田綾子，写真右 辻田有紀）

種子をナイロンメッシュなどに封入し地中にうめるシンプルなものだが、いつ、どこで、どのように発芽するか把握することができ、地下部の形態を破壊せずに観察できる（図 14；5 4 章も参照）。「ブラックボックス」解明の切り札ともいえる、自生地播種を利用した研究が進むことを期待したい。

これまで菌従属栄養植物の研究は、菌根共生系の解明に偏っていたきらいがある。今後はさまざまな研究分野の知見を結集し、多面的なアプローチで「植物をやめた植物」の正体に迫りたいものだ。

謝辞

ここで紹介した研究の一部は、日本学術振興会・科学研究費補助金（21370038, 24370040）の支援を得て行われた。

引用文献

- Cameron K.M., Chase, M.W., & Rudall, P.J. 2003. Recircumscription of the monocotyledonous family Petrosaviaceae to include *Japonolirion*. *Brittonia* 55: 214-225.
- Fuse, S., & Tamura, M.N. 2000. A Phylogenetic analysis of the plastid *matK* gene with emphasis on Melanthiaceae sensu lato. *Plant Biol.* 2: 415-427.
- Merckx, V.S.F.T. (ed.) 2013. Mycoheterotrophy: The biology of plants living fungi, Springer, New York.
- Motomura, H., Selosse, M. A., Martos, F., Kagawa, A., & Yukawa, T. 2010. Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: Evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Ann. Bot.* 106: 573-581.
- Ogura-Tsujita, Y., Gebauer, G., Hashimoto, T., Umata, H., & Yukawa, T. 2009. Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proc. R. Soc. B.* 276: 761-767.
- Ogura-Tsujita Y., Yokoyama J., Miyoshi K., & Yukawa T. 2012. Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 99: 1158-1176.
- Soltis, D.E. et al. 2011. Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa. *Am. J. Bot.* 98: 704-730.
- 戸部博, 田村実 2012. 新しい植物分類学 I. 講談社. 東京.
- 辻田有紀, 遊川知久 2008. ラン科植物の野外播種試験法. 保全生態学研究 13: 121-127.
- Yagame, T., Katsuyama, T., & Yukawa, T. 2008. A New Species of *Neottia* (Orchidaceae) from the Tanzawa Mountains, Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 59: 219-222.
- Yamato, M., Ogura-Tsujita, Y., Takahashi, H., & Yukawa, T., in press. Significant difference in mycorrhizal specificity between an autotrophic and its sister mycoheterotrophic plant species of Petrosaviaceae. *J. Plant Res.*
- Xu, J., & Guo, S. 2000. Retrospect on the research of the cultivation of *Gastrodia elata* Bl, a rare traditional Chinese medicine. *Chinese Med. J.* 113: 686-692.

菌従属栄養性の生活様式を可能にした様々な適応進化

—特に送粉様式の変化について

末次 健司・加藤 真

京都大学大学院人間・環境学研究科
〒606-8501 京都市左京区吉田二本松町

Kenji Suetsugu, Makoto Kato

Evolution of life history traits suited to mycoheterotrophic life style
with special reference to pollination biology

Key words: breeding system, complex adaptive trait, mixotrophy, mycoheterotrophy,
Orchidaceae, reproductive biology, self-pollination

Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University
Yoshida Nihonmatsu-cho, Sakyo, Kyoto 606-8501, Japan

1. はじめに

多くの陸上植物は根圏において菌根菌と共生関係を結んでおり、植物は光合成で得た同化産物を菌根菌に提供し、その見返りに菌根菌は水や窒素やリンなどの無機塩類の吸収や防衛の手助けをしている。

しかしながら、植物の中には、光合成能力を失い、他の生物からすべての養分を略奪するという特異な進化を遂げた従属栄養植物が存在する。これらの植物は、他の植物に取り付いて養分を奪う寄生植物と (Suetsugu et al. 2008, 2012a)、菌根菌から養分を奪う菌従属栄養植物に大別される (Leake 1994, Bidartondo 2005; 図 1)。

特に、菌従属栄養植物は、開花、結実期以外は地上に姿を現さず、植物体自体が見つかりにくいいため、植物相の研究が進ん



図 1 寄生植物と菌従属栄養植物 (両者とも光合成能を保持したものと完全に喪失したものがある。寄生植物は吸器で他の植物に取り付くことで、菌従属栄養植物は菌糸を細胞中に取り込むことで、寄生を成立させる)

だ日本でさえ、ほとんどの種類において正確な分布情報は謎のままである (Suetsugu & Ishida 2011, Suetsugu et al. 2012b, Suetsugu 2013, Suetsugu et al. 2013 など)。しかしながら菌従属栄養植物は、既知の種数こそそれほど多くないものの、幅広い分類群で見られ、被子植物だけでも、ツツジ科、ヒメハギ科、リンドウ科、ヒナノシヤクジョウ科、コルシア科、アヤメ科、ラン科、サクライソウ科、ホンゴウソウ科において、それぞれ独立に起源していることがわかっている (Leake 1994, Bidartondo 2005)。これまで、菌従属栄養植物は、奇異な形態から人々の関心を集めてきたが、学問的な探求は十分ではなかった。よって、菌従属栄養植物がどのように起源し、どのような適応を遂げたのかを明らかにすることは、植物学における重要な課題であると言えるだろう。

近年、分子生物学的手法や安定同位体分析といった手法の発達に伴い、菌従属栄養植物が、その進化の過程で、どのような適応を遂げたのか明らかになりつつある。例えば、緑葉を持つ種類と完全に葉緑素を持たない種を含む近縁種の系統樹を作成することで、完全に葉緑素を失った菌従属栄養性の種の出現に先行して、緑葉を持ちながら、自身の光合成産物の不足を補う部分的菌従属栄養性の種が先に現れる場合があることが指摘されている (Selosse and Roy 2009; 第2章, 第6章参照)。またその系統樹上に、菌への依存度や共生菌叢といった形質をマッピングすることで、菌従属栄養性の進化に伴い、より炭素源を奪いやすい菌類への宿主転換や特殊化が起こることも明らかになってきた (Selosse & Roy 2009)。

上記のように菌従属栄養植物が、その進化の過程で菌との関わりを変化させてきたことは、非常にわかりやすいストーリーであり、受け入れやすいものである。しかしながら、「菌従属栄養植物がその特異な生活史を全うするためにどのような適応を遂げたのか」を理解するためには、地下部と地上部の両方で、どのような適応が見られるのかを知る必要があるはずである。本稿では、菌従属栄養植物が、どのような適応を遂げ、生存を可能としているのかを、これまであまり注目されていなかった地上部での適応を含め紹介したい。

2. 菌従属栄養性の適応的意義

まず菌類から養分を略奪するという進化に、どのような適応的意義があるのか考えてみよう。一般的に広く受け入れられている説明は、菌に寄生することで、他の競争相手の少ない暗い林床でも生存可能になったというものである (Bidartondo et al. 2004)。しかし、暗い林床での生育を可能にすること以外にも、菌への依存性を高めることの適応的意義がある可能性は捨てきれない。

我々は、菌に寄生することの別の適応的意義として、一度、地上部を現した後でも、ストレスにさらされた際には、翌年、地下にとどまり、菌から十分な炭素源を得た後、再度、地上部を現すということができるという利点を考えた。通常の光合成だけを行っている植物においても、多年生植物の場合、地上に現れない状態で存在し続け、翌年以

降, 再度, 地上部が現われることがある。こうした現象は「地上器官の休眠 (vegetative dormancy の訳語 以下は, 単に休眠とする)」と呼ばれるが (Shefferson 2009), 種子の休眠とは異なり, 根の呼吸などの代謝活動は停止しない。そのためこれまでに調査されたほとんどの植物で, 蓄積した養分が枯渇してしまい, 休眠を経た個体の生存率が低下することが明らかになっている (Gregg & Kéry 2006, Hutchings 1987, Shefferson et al. 2003, Shefferson & Tali 2007 など)。しかしながら菌に寄生する植物の場合, 休眠中も, 菌類から炭素源を補うことができるため, 休眠のコストが軽減され (むしろ地上部を現さないことで食害などを受ける危険性が減るため), 生存率を保つことができる可能性がある。



図2 部分的菌従属栄養植物のキンラン

そこで我々は, Mark and recapture 法を用い, 部分的菌従属栄養性のキンランの休眠率や生存率がどの程度か, さらに食害や結実の有無などにより, 休眠率や生存率がどのように変化するかを検討した。キンランは栽培が難しく, 長期間維持することは難しいため, 緑葉を展開してから菌に依存している可能性が示唆されていたが, 近年行われた栽培実験や安定同位体分析から, 実際に菌に依存していることが証明されている植物である (図2; Yagame & Yamato 2013, 坂本ら 2013)。その結果, 我々の予想通り, 食害を受けたときや結実したときなど, 植物の資源が枯渇した際には, 休眠が起こりやすくなることが明らかになった。またこのように生存が難しくなった状態で休眠に入るにも関わらず, 休眠を経た個体の生存率が低下することはなかった (末次ら 投稿中)。

実は, 先行研究でも, 例外的に休眠後の生存率が下がらない種類が知られている。これらは, 菌従属栄養性の観点からは議論されていなかったが, 部分的菌従属栄養性の種類で複数回, 報告されている現象である (Shefferson et al. 2005, Jäkäläniemi et al. 2011)。上記のことを考え併せると, 「ストレスを受けた際に, 地上部を展開せずに地下にとどまることができる」ことも, 菌に寄生する意義の一つであると考えられる。

3. アルビノ突然変異体から見える無葉緑化の障壁

先に述べたように, ラン科やツツジ科などの一部の種類は, 発達した緑葉を展開し, 一見すると光合成だけで生存可能のように見えるにもかかわらず, 菌類にも炭素を一部依存している種類が存在する (Gebauer & Meyer 2003, Bidartondo et al. 2004, Tedersoo et al. 2007 など)。このような部分的菌従属栄養植物を含むグループから, 葉緑素を失った

完全に菌従属栄養性に特化した種類が出現することがあるが、部分的菌従属栄養の種数に比べて、完全に菌従属栄養性を獲得した種数はきわめて少ない。前項で述べたように菌に寄生するという生活史が植物にとって得策であるならば、菌からの養分略奪だけで生育する無葉緑植物は何故少ないのだろうか。このことを考えるために、無葉緑化の獲得にどのような障壁があるのかを考えてみよう。

興味深いことに、部分的菌従属栄養植物は、完全に葉緑素を失ったアルビノ突然変異体を生じることが多い (Selosse et al. 2004, Julou et al. 2005, Tranchida-Lombardo et al. 2010 など)。通常の植物であれば、葉緑素を失ったアルビノは、種子に貯蔵された養分を使い果たすと枯れてしまう。しかしながら部分的菌従属栄養植物のアルビノは、菌から炭素源を含む養分を略奪することができるため、葉緑素を持つ通常個体と同程度まで成長し、花を咲かせることができるのである。このことは部分的菌従属栄養植物が、菌から略奪した養分だけで生存することが可能なことを示唆している。にもかかわらず、部分的菌従属栄養植物のアルビノは稀な存在であり、集団内に広がることはめったにないのである。



図3 キンランのアルビノ突然変異体

菌から養分を略奪する能力を獲得したグループの中で、完全に無葉緑になった種類が少ないことや、部分的菌従属栄養植物のアルビノが、集団内に広がらないことは、菌に対する寄生能力の獲得以外の面でも、無葉緑化を達成するためにはさらなる適応が必要であることを示唆している。

キンランも他の部分的菌従属栄養植物の例にもれず、しばしばアルビノを生じる個体群が見受けられる (図3)。このようなアルビノが何故集団中に広がっていかないのか (つまり、無葉緑の進化にはどのような障壁があるのか) を、キンランのアルビノと通常個体の種子生産力を適応度の指標とすることで考えてみたい。キンランは、送粉者がいなければ果実をつけることが出来ない植物で、ヒメハナバチやコハナバチといった小型のハチに花粉の媒介を託している (末次ら 投稿中)。よって、アルビノのほうが送粉者の誘引力が乏しければ、果実をつける数、ひいては種子数に違いが出ると考えられる。送粉者の訪れた回数を正確に把握することは、通常の植物においては開花期間中継続して観察しない限り極めて難しい。しかしながら、ヤクシマラン亜科を除くラン科では、観察が容易である (Suetsugu & Fukushima 2013, Suetsugu & Tanaka 2013a, b)。何故ならば、数十万の花粉が互いに結合して塊になった花粉塊と呼ばれる構造となってお

り、そのため全ての花粉は、昆虫が1回（多くても数回）訪れただけで持ち去られるからである。そこで実際に花粉の持ち去り率や受粉率を調べたところ、アルビノ個体も通常個体と同程度、送粉者をおびき寄せることが明らかになった（末次・加藤 未発表データ）。つまり、キンランのアルビノ個体の適応度が下がる理由は、送粉者の誘引力の差ではないのである。この後の項目では、菌従属栄養植物が、受粉生態の面でも制約を受けていることを述べるが、これには暗所への進出が深く関わっている。しかしながらキンランのアルビノは、通常個体と同じような光環境に生育しているため、受粉の面で、著しい不利益を被ることはないのである。適応度が下がる理由が送粉者とは無関係であることは、自動自家受粉が可能なギンランやハマカキランでもアルビノ個体も集団内に広がっていないことから示唆される（末次・加藤 未発表データ）。

それでは何故アルビノは集団内に広がらないのであろうか。アルビノと通常個体の遺伝的な決定メカニズムは明らかではないものの、アルビノが劣勢ホモである可能性は十分考えられ、このことが一因となっているのかもしれない。しかしながら観察を続けていると、その他の理由の存在も示唆された。中でも大きな理由としてアルビノは通常個体よりも早いタイミング（多くの場合種子が成熟する前）に消失してしまうため、通常個体に比べ1%以下の種子しか残すことができないことが挙げられる。結実前に枯れてしまうのは、光合成を行わないにも関わらず大きな葉や気孔を保持しているため、蒸散がうまくいかず乾燥しやすく通常個体より早く枯れてしまうことが一因だと考えられる（Roy et al. 2013, 末次・加藤 未発表データ）。またアルビノは葉緑素を持つ通常個体と同程度まで成長するものの、光合成能を失っている分だけ炭素制限に陥りやすい可能性もある。その場合、同化器官の退化は、蒸散過多になるのを防ぐだけでなく、資源削減の意味でも大きな意味を持つと考えられる。他にも、(1) アルビノ個体は通常個体よりも、菌への依存度が高いため窒素含有率が高く、植食性昆虫にとって好適な餌になることや、(2) 反射率の高い白い葉を持つことで、植食性昆虫から見つけられやすくなることによる食害率の上昇などもアルビノの生育には不利に働いている（Stöckel et al. 2011, Roy et al. 2013, 末次・加藤 未発表データ）。つまり無葉緑植物になるためには、菌からの養分略奪を可能にする能力のみならず、気孔の退化、葉に代表される同化器官の退化、開花から結実までの期間の短縮、非開花時期の休眠、保護色、繁殖様式の変化（繁殖様式の変化については次項で詳しく説明する）などの様々な適応を遂げる必要があると考えられる。これらの適応を同時に遂げることが難しいため、部分的菌従属栄養植物に比べ、葉緑素を失った菌従属栄養植物は少ないのかもしれない。

4. 菌従属栄養植物で卓越する自家受粉

前項では、アルビノを用いて、当代の生育に関して、菌従属栄養性の進化にどのような障壁があるのかを考えた。次に「種」として従属栄養性を獲得しているものを用いて、繁殖に関して、菌従属栄養植物の獲得に、どのような制約があるのかを考えたい。菌従

菌従属栄養性の進化の利点としてよく挙げられるものは、光合成をする必要がないため、他の競争相手の少ない暗い林床で生存可能になるというものである。しかしながら暗い環境で生活することは、菌との関わり以外の面で制約を受けることはないのだろうか。例えば、暗い林床での生活を成し遂げるためには、繁殖も暗い環境で行う必要があるが、こうした環境はハナバチなどの訪花性昆虫のにぎわいとは無縁の世界である (Herrera 1995, Herrera 1997, Lee et al. 2001)。そのため、菌に寄生するという生活史は、薄暗い林床で受粉を達成するという困難を植物に強いている。そこでこのような暗い場所に生育する植物は、どのような方法で受粉を達成しているのか紹介していくことにしよう。

菌従属栄養性の進化と受粉様式の間に関係があるのではないかとする仮説は以前から存在しており、Bidartondo (2005) は、過去の菌従属栄養植物の送粉様式に関する報告をもとに、「地下部で菌根菌を騙している菌従属栄養植物は、地上部で蜜をださずに送粉者を騙すことはできず、自殖を採用している」という仮説を提唱した。しかしながら菌従属栄養植物の送粉様式に関する研究は、液浸標本を用いて、柱頭と葯の位置関係などから受粉様式を推定した研究がほとんどで (Warming 1901, Oehler 1927)、実際に野外観察、袋掛け処理などを通して詳細に受粉様式を検討した研究は僅かであった。そこで我々は、「菌従属栄養性と送粉様式の変化には密接な関わりがある」という仮説の下、日本に産する菌従属栄養植物の受粉様式を詳細に検討した。その結果、シュンラン属、ムヨウラン属、タネガシマムヨウラン属、イモラン属、ヒメノヤガラ属、ヒナノシャクジョウ属、オニノヤガラ属、ツチアケビ属、トラキチラン属などの菌従属栄養植物の多くが、自動自家受粉を進化させていたことが明らかになった。

例えば、無葉緑のツチアケビは、バニラ亜科、バニラ連に属し、光合成をするバニラと近縁である (Cameron & Carmen Molina 2006)。バニラ属の植物は、小型のハナバチによって送粉が行われるものがほとんどで、昆虫の助けなしで受粉が起こる種類はごくわずかである (Soto Arenas 2003)。ツチアケビも花形態は、バニラのそれと非常によく似ており、コハナバチなどの小型のハナバチによって送粉されることが予想される。しかしながら派手な花をしているにもかかわらず、ツチアケビについては、かなり早いタイミングで (場合によっては開花する前に)、葯帽に格納された花粉塊がすぐ下の柱頭



図 4 結実期のツチアケビ 蕾の時期に袋掛けを行った個体と自然状態の個体 (同程度の結実が見られる)

に滑り落ち、自動自家受粉が起こることが明らかになった (Suetsugu 2013)。早いタイミングで自動自家受粉が起こることを考えると、ツチアケビは主に自殖で種子を残していると考えられる (図 4)。バニラ属では自家受粉の種類が極めて少ないことを考えると、この事は、菌従属栄養性と自殖の進化に関連がある可能性を示唆している。

しかしながら菌従属栄養性と自殖の進化に関連性があるかを明らかにするためには、詳細な系統関係が明らかとなっている種群を用いるほうが適切である。これまでの研究から、シュンラン属では、無葉緑性が1回進化したこと、無葉緑性のマヤランとサガミランは単系統群となること、両種の姉妹群には普通葉を生じるナギランが位置すること、またこれらの外群がシュンランであることが明らかになっている (Yukawa et al. 2002)。また安定同位体分析によって、普通葉を展開するシュンラン、ナギランも部分的菌従属栄養性であることが明らかになっている (Motomura et al. 2010)。よってシュンラン属は、菌従属栄養性の進化と植物の形質進化を検討するのにすぐれた系であるといえる。このシュンラン属においても、菌従属栄養性の進化と受粉様式の間には、相関が見られることが明らかになった。ナギランの外群となるシュンランとカンランでは、ミツバチのワーカーとケブカハナバチの雄にそれぞれ送粉され、自動自家受粉も行わない (Tsuji & Kato 2010)。しかしながら、より菌従属栄養性を強めていると考えられるナギランや葉を生じないマヤランやサガミランでは、主に自動自家受粉を行っている。興味深いことに、中国のナギランの個体群では、自動自家受粉を行わない個体群の存在も確認されている (Cheng et al. 2007)。シュンラン属では、無葉緑の進化に伴って腐生菌から外生菌根菌へとパートナーのシフトが起こっており、その過程で両者を保持する中間段階を経ることが分かっているが (Ogura-Tsujita et al. 2012)、送粉様式の面でも、葉を生じない種群の進化に先行して、不完全な形で自動自家受粉が進化しているのは興味深い。

こうした自殖の進化は暗い林床で確実に繁殖するのに役立ったと考えられる。菌従属栄養植物が自動自家受粉を採用しやすいという予測はこれまでにも存在したが (Bidartondo 2005)、系統関係が明らかとなっている種群で、野外観察と袋掛け実験を通して実証した例として本研究は価値がある。また部分的菌従属栄養植物のなかでも、自殖をまったく行わないカンランとシュンランは、比較的明るい環境を好み、開花時期も林冠が閉鎖してしまう前の冬や早春である点もきわめて興味深い。一般的には、昆虫があまり活動していない冬や早春に開花することは不利とされ、このような時期に開花する植物は鳥など昆虫以外の送粉者に依存する場合が多い (Kunitake et al. 2004, Fang et al. 2012 など)。しかしながら、カンランとシュンランは、ほかの近縁種と同様にハナバチを送粉者としているにも関わらず、冬や早春に開花する。これらの開花時期も、より明るい環境で受粉を達成するための適応である可能性がある。

5. 菌従属栄養植物における送粉者の重要性

前項で述べた通り、暗い林床に生育する菌従属栄養植物にとって、コハナバチやミツ

バチなどの明るい環境を好む昆虫に送粉を頼ることは非常に難しいと考えられる。しかしながら、暗い環境に進出可能な昆虫に送粉を託すことができれば、暗い林床でも他殖を行うことが可能ではないだろうか。例えばマルハナバチは、体温調節が可能のため、暗い環境でも採餌を行う傾向がある。したがって、マルハナバチを呼び寄せることができれば、他殖で生活史を回すことも可能であると考えられる。事実、ギンリョウソウやモイワランを含むいくつかの菌従属栄養植物は、大量の蜜を報酬とすることで、トラマルハナバチを初めとするマルハナバチを送粉者として利用し、自動自家受粉も行わない (Ushimaru & Imamura 2002, 末次 未発表データ)。またショウキランは、蜜をだすことなく、鮮やかな花をつけ、採餌経験の浅いマルハナバチに餌があると思わせることで、送粉を達成している (末次 未発表データ)。

さらに菌従属栄養植物の中には、これまで訪花性と考えられていなかった昆虫を送粉者として利用するものまで存在することが明らかになりつつある。このような例として、我々は、オニノヤガラ属ヤツシロラン節の特殊な受粉様式を発見した (末次ら 未発表データ)。ショウジョウバエは、腐敗が始まった果実やキノコを探して暗い林床を飛び回るが、ヤツシロラン節の多くの種は、キノコ臭や発酵臭に擬態することで、ショウジョウバエに送粉を託している。また興味深いことにこのヤツシロラン節の種群には、近くにキノコが存在することで、受粉率が上がる種類があることも明らかになった。ヤツシロランは腐生菌に寄生する特徴から、暗く湿った環境に生育することが多く、事実、ヤツシロランの生える周辺には腐生菌の子実体が出現することも多い。つまりヤツシロランは、自身のそばに多く生える「キノコ」に送粉者を誘引してもらうことが可能なのである (Suetsugu & Kato 2013, 末次・加藤 未発表データ)。ヤツシロランは、周辺にキノコがない環境でも、受粉を達成することができるため、キノコによる送粉者の誘引に完全に頼っているわけではないものの、ヤツシロランは、栄養のみならず送粉サービスも、キノコに依存しているといえる。

Bidartondo (2005) は、「すでに地下部で菌根菌を騙している菌従属栄養植物は、地上部で蜜をださずに送粉者を騙すことはできない」という仮説を提唱したが、ショウキランもヤツシロランも蜜を出さないため、この仮説には該当しない例外もあると言える。しかしながら、蜜などの報酬を送粉者に提供しない (以下無報酬花と述べる) 菌従属栄養植物では、特に自殖が卓越しているのは事実である。このことには、無報酬花は送粉者に報酬を提供しないため、独立栄養性植物の場合でも送粉者が訪れる頻度が極めて低いことがおそらく関係している (Neiland & Wilcock 1998, Tremblay et al. 2005)。つまり元々外交配の機会が少なかった無報酬花の菌従属栄養植物の祖先種は、従属栄養性を獲得し暗い環境に進出する過程で、より強い送粉者制限をこうむることになったと考えられる。そのような条件下では、繁殖の保障として自動自家受粉できる性質が、より有利に働くため、蜜を出さない菌従属栄養植物では、自殖が卓越していると考えられる。

これまで菌従属栄養植物で自殖が卓越する要因としては、寄生生活に伴う資源制限が原因といわれてきた (Takahashi et al. 1993, Zhang & Saunders 2000)。しかしながら、(1) 自殖を行う菌従属栄養植物でも鮮やかな花を持つものが多いこと (Zhou et al. 2012, Suetsugu 2013; 図5) や、(2) 暗い環境に生息する昆虫を送粉者に採用している菌従属栄養植物では、自殖を行わないことも多いことを考え合わせると (Hentrich et al. 2010, Klooster & Culley 2009), 資源制限だけではなく、光環境も菌従属栄養植物の繁殖様式に影響を与えているといえる。このことを裏付ける証拠としては、オキノヤガラ属のオキノヤガラは、暗い環境では専らアポミクシスにより種子を生産するが、明るいギャップなどに生育する個体では、かなりの割合でコハナバチによる他殖を行っていることが挙げられ (末次・加藤 未発表データ)。また宿主となる菌のハビタット選好性も影響するため一概には言えないが、ハナバチ媒の菌従属栄養植物は明るい環境に生育する場合が多い (Suetsugu & Kato 2012, 末次 未発表データ)。つまり菌従属栄養性の獲得により、他の競争相手の少ない暗い林床で生存可能になるとされてきたが、実際のところは、送粉様式の点でも特別な適応を遂げなければ、暗所への進出は不可能なのである。



図5. 自動自家受粉可能な菌従属栄養植物 (鮮やかな花をつけるものも多く、中には大量の花蜜を分泌するものも存在し、他殖の可能性を完全に放棄している訳ではないことを想起させる) 上段左から順に、ホクリクムヨウラン、ヒナノシヤクジョウ、シロシヤクジョウ、マヤラン、ツチアケビ、タシロラン

またオニノヤガラのように、自殖と他殖を併せ持つ繁殖様式は、多くの菌従属栄養植物にとって重要な役割を果たしているのかもしれない (図 6)。菌従属栄養植物とその菌根菌の関係は、寄生者と宿主の関係ととらえることができる。これまでの研究の多くが、菌根共生における共生から寄生への変化には特定の菌への特殊化が必要であることを示唆している (Leake 2004, Bidartondo 2005)。この共生菌のシフトや特殊化の起こる理由に関する有力な仮説が、ほかの寄生者—宿主系と同様に、菌従属栄養植物と宿主との間で軍拡競争が働いているからというものである (Leake 2004, Selosse & Roy 2009)。このような敵対的な相互作用の場では、同じ適応度を維持するために、相手に対して絶えず適応し続けなければならない。このことは、ルイス・キャロルの童話「鏡の国のアリス」に登場する赤の女王の「同じ場所にとどまるためには、全速力で走り続けなければならない」というセリフになぞらえて赤の女王仮説と呼ばれている (Ladle 1992)。そして適応進化の速度を早めるような性質が有性生殖であり、敵対的な相互作用の存在こそが、有性生殖の存在意義を担保する重要な要因と見なされている (Ladle 1992)。



図 6 オニノヤガラとその送粉者のコハナバチ

本来、菌根共生系では、お互いが良いパートナーかどうかを見分ける仕組みがあり、より多く窒素やリンを提供できる菌、同じく、より多く炭素を供給できる植物が、相手に選ばれりとされる (Kiers et al. 2011)。つまり植物も菌もパートナーの善し悪しをしっかりと識別しており、受け取る資源に応じて送り込む養分の量を調節しているのである。ラン科植物とその菌根菌の間では、このような「審問」の仕組みは明らかになっていない。しかしながら、ラン科植物でも多くの場合は、発芽当初は炭素を含む養分を菌に依存するものの、緑葉を展開してから炭素を菌に返還することで、相利共生を営んでいると考えられている (Cameron et al. 2006, 2008, Hynson et al. 2009)。にもかかわらず菌従属栄養植物は、本来、植物側の本来の提供物である炭素を与えないだけでなく、逆に奪い取って生育を可能にしている。よってその背景には、共生シグナルの擬態などの巧妙なシステムが存在することが予想される。赤の女王仮説に倣って考えてみると、宿主となる菌類を騙し続けるためには、絶えず適応し続けなければならない、専ら自殖のみを行う生活史は極めて不利と考えられる。また、このような寄生者—宿主系に関わる問題点を考えずとも、自家受粉のみに頼る生活史には、近交弱勢を初めとする様々な不利益が存在する (Lloyd 1992)。このような不利益を解消するのに、稀に起こる他殖が

重要な働きを果たしており、自殖と他殖を併せ持つ繁殖様式が、菌従属栄養植物の生活スタイルにとっては適している可能性がある。しかしながら極端に暗所に進出した菌従属栄養植物は、開花するものでも他殖の機会をほぼ完全に失っており、中にはつぼみの状態で自家受粉する完全自殖



図 7 完全自殖型の花である閉鎖花のみをつける ツボミヤツシロラン (左) とタケシマヤツシロラン (右)

型の閉鎖花のみをつける種類も存在する (Hsu et al. 2012, Suetsugu 2013, Suetsugu et al. 2013; 図 7)。そのような種類は、遅かれ早かれ、菌を騙すことができなくなり、絶滅する運命にあるのかもしれない。もしそうであるならば、菌から養分をかすめ取るという彼らの生き方は、一見非常に賢いように見えるものの、その他の面で数々の不利益を伴うものであり、進化の過程で袋小路に迷い込み、長い進化の過程では消えゆく運命にあるととらえることができるかもしれない。

6. まとめと今後の展望

我々の研究を含む近年の研究の進展により、菌従属栄養植物が、その特異な性質を獲得・維持するために、宿主菌に対してだけでなく、他の生物との相互作用においても数々の数奇な適応を遂げていることが明らかになりつつある。主に自殖を行っていると考えられてきたためか、菌従属栄養性の種群においては、「希少性」、「分布」、「多様化」などは主に宿主菌との相互作用の文脈でのみ議論され、その他の要因が考慮されることは少なかった (Taylor et al. 2003a,b, Merckx & Bidartondo 2008, Bougoure et al. 2009, 2010, Hazard et al. 2012)。しかしながら、多くの菌従属栄養性の種を含むラン科は、送粉共生という面でも非常に特殊化しており、特定の送粉者を呼び寄せるために、独特な花形態を進化させているものがほとんどである (Cozzolino & Widmer 2005, Waterman & Bidartondo 2008, Waterman et al. 2011)。また送粉者と密接な相互作用を築いているため、緑葉を持つ種類では、その希少性は、送粉者の特殊化の程度や、送粉者の希少性と大きく関係していることが明らかになっている (Neiland & Wilcock 1998, Dixon 2009, Phillips et al. 2011)。またラン科の爆発的な多様化の背景には、受粉様式や送粉者のシフトが大きく関わっていると考えられている (Cozzolino & Widmer 2005)。菌から全ての養分を略奪している菌従属栄養植物の「希少性」、「分布」、「多様化」が菌との関わりにより規

定されているという考えは非常に魅力的なものであるが、送粉様式、種子散布様式、その他非生物学的な要因を考慮に入れ、菌従属栄養植物の実態に迫ることが重要であろう。

謝辞

本研究は、日本学術振興会の特別研究員奨励費（12J00602）の支援を受けている。また研究全般、原稿執筆にあたって貴重なアドバイスを頂いた川北篤博士に御礼申し上げたい。またアルビノのキンランの写真は、写真家の故新井和也氏にご提供いただいた。さらに絶滅危惧植物が多い、菌従属栄養植物を研究するにあたり多くの植物愛好家の方々に、自生地場所の案内や情報提供などの形でお世話になっている。ここにすべての人を挙げることはできないが、多数の方々の支援を受け、研究が可能となっていることを記して感謝したい。

引用文献

- Bidartondo, M. I. 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytol.* 167: 335-352.
- Bidartondo, M.I., Burghardt, B., Gebauer, G., Bruns, T.D., & Read, D.J. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc. R. Soc. B.* 271: 1799-1806.
- Bougoure, J., Ludwig, M., Brundrett, M., & Grierson, P. 2009. Identity and specificity of the fungi forming mycorrhizas with the rare mycoheterotrophic orchid *Rhizanthella gardneri*. *Mycol. Res.* 113: 1097-1106.
- Bougoure, J.J., Brundrett, M.C., & Grierson, P.F. 2010. Carbon and nitrogen supply to the underground orchid, *Rhizanthella gardneri*. *New Phytol.* 186: 947-956.
- Cameron, D.D., Johnson, I., Read, D.J., & Leake, J.R. 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytol.* 180: 176-184.
- Cameron, D.D., Leake, J.R., & Read, D.J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol.* 171: 405-416.
- Cameron, K., & Carmen Molina, M. 2006. Photosystem II gene sequences of psbB and psbC clarify the phylogenetic position of *Vanilla* (Vanilloideae, Orchidaceae). *Cladistics* 22: 239-248.
- Cheng, J., Liu, S.Y., He, R., Wei, X.L., & Luo, Y.B. 2007. Food-deceptive pollination in *Cymbidium lancifolium* (Orchidaceae) in Guangxi, China. *Biodiver. Sci.* 15: 608-617.
- Cozzolino, S., & Widmer, A. 2005. Orchid diversity: An evolutionary consequence of deception? *Trends Ecol. Evol.* 20: 487-494.
- Dixon, K. W. 2009. Pollination and restoration. *Science* 325: 571-573.
- Fang, Q., Chen, Y.Z., & Huang, S.Q. 2012. Generalist passerine pollination of a winter-flowering fruit tree in central China. *Ann. Bot.* 109: 379-384.

- Gebauer, G., & Meyer, M. 2003. ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytol.* 160: 209-223.
- Gregg, K.B., & Kéry, M. 2006. Comparison of size vs. life-state classification in demographic models for the terrestrial orchid *Cleistes bifaria*. *Biol. Conserv.* 129: 50-58.
- Hazard, C., Lilleskov, E.A., & Horton, T.R. 2012. Is rarity of pinedrops (*Pterospora andromedea*) in eastern North America linked to rarity of its unique fungal symbiont? *Mycorrhiza* 22: 393-402.
- Hentrich, H., Kaiser, R., & Gottsberger, G. 2010. The reproductive biology of *Voyria* (Gentianaceae) species in French Guiana. *Taxon* 59: 867-880.
- Herrera, C.M. 1997. Thermal biology and foraging responses of insect pollinators to the forest floor irradiance mosaic. *Oikos* 78: 601-611.
- Herrera, C.M. 1995. Floral biology, microclimate, and pollination by ectothermic bees in an early-blooming herb. *Ecology* 76: 218-228.
- Hsu, T.C., Chung, S.W., & Kuo, C.M. 2012. Supplements to the orchid flora of Taiwan (vi). *Taiwania* 57: 271-277.
- Hutchings, M.J. 1987. The population biology of the early spider orchid, *Ophrys sphegodes* Mill. I. A demographic study from 1975 to 1984. *J. Ecol.* 75: 711-727.
- Hynson, N.A., Preiss, K., & Gebauer, G. 2009. Is it better to give than to receive? A stable isotope perspective on orchid-fungal carbon transport in the green orchid species *Goodyera repens* and *Goodyera oblongifolia*. *New Phytol.* 182: 8-11.
- Jäkäläniemi, A., Crone, E.E., Närhi, P., & Tuomi, J. 2011. Orchids do not pay costs at emergence for prolonged dormancy. *Ecology* 92: 1538-1543.
- Julou, T., Burghardt, B., Gebauer, G., Berveiller, D., Damesin, C., & Selosse, M. A. 2005. Mixotrophy in orchids: Insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol.* 166: 639-653.
- Kiers, E.T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J.A., Franken, O., Verbruggen, E., Fellbaum, C.R., Kowalchuk, G.A., Hart, M.M., Bago, A., Palmer, T.M., West, S.A., Vandenkoornhuyse, P., Jansa, J., & Bücking, H. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880-882.
- Klooster, M.R., & Culley, T.M. 2009. Comparative analysis of the reproductive ecology of *Monotropa* and *Monotropis*: Two mycoheterotrophic genera in the Monotropoideae (Ericaceae). *Am. J. Bot.* 96: 1337-1347.
- Kunitake, Y.K., Hasegawa, M., Miyashita, T., & Higuchi, H. 2004. Role of a seasonally specialist bird *Zosterops japonica* on pollen transfer and reproductive success of *Camellia japonica* in a temperate area. *Plant Spec. Biol.* 19: 197-201.
- Ladle, R.J. 1992. Parasites and sex: Catching the red queen. *Trends Ecol. Evol.* 7: 405-408.

- Leake, J.R. 2004. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 422-428.
- Leake, J.R. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol.* 127: 171-216.
- Lee, H.L., Sodhi, N.S., & Elmqvist, T. 2001. Bee diversity along a disturbance gradient in tropical lowland forests of south-east Asia. *J. Appl. Ecol.* 38: 180-192.
- Lloyd, D.G. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *Int. J. Plant Sci.* 153: 370-380.
- Merckx, V., & Bidartondo, M.I. 2008. Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proc. R. Soc. B.* 275: 1029-1035.
- Motomura, H., Selosse, M.A., Martos, F., Kagawa, A., & Yukawa, T. 2010. Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: Evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Ann. Bot.* 106: 573-581.
- Neiland, M.R. M., & Wilcock, C.C. 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *Am. J. Bot.* 85: 1657-1671.
- Oehler, E. 1927. Entwicklungsgeschichtlich-zytologische Untersuchungen an einigen saprophytischen Gentianaceen. *Planta* 3: 641-733.
- Ogura-Tsujita, Y., Yokoyama, J., Miyoshi, K., & Yukawa, T. 2012. Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 99: 1158-1176.
- Phillips, R.D., Brown, A.P., Dixon, K.W., & Hopper, S.D. 2011. Orchid biogeography and factors associated with rarity in a biodiversity hotspot, the Southwest Australian Floristic Region. *J. Biogeogr.* 38: 487-501.
- Roy, M., Gonneau, C., Rocheteau, A., Berveiller, D., Thomas, J., Damesin, C., & Selosse, M.A. 2013. Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ. *Ecol. Monogr.* 83: 95-117.
- 坂本 裕紀, 横山 潤, 遊川 知久, 辻田 有紀, 牧 雅之 2013. 日本産キンラン属における共生菌の多様性および共生菌への栄養依存性の解明. 第 11 回アジア太平洋蘭会議 沖縄大会講演要旨集 pp. 264-268.
- Selosse, M.A., & Roy, M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends Plant Sci.* 14: 64-70.
- Selosse, M.A., Faccio, A., Scappaticci, G., & Bonfante, P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microb. Ecol.* 47: 416-426.
- Shefferson, R.P. 2009. The evolutionary ecology of vegetative dormancy in mature herbaceous perennial plants. *J. Ecol.* 97: 1000-1009.

- Shefferson, R.P., & Tali, K. 2007. Dormancy is associated with decreased adult survival in the burnt orchid, *Neotinea ustulata*. *J. Ecol.* 95: 217-225.
- Shefferson, R.P., Kull, T., & Tali, K. 2005. Adult whole-plant dormancy induced by stress in long-lived orchids. *Ecology* 86: 3099-3104.
- Shefferson, R.P., Proper, J., Beissinger, S.R., & Simms, E.L. 2003. Life history trade-offs in a rare orchid: The costs of flowering, dormancy, and sprouting. *Ecology* 84: 1199-1206.
- Soto Arenas, M.A. 2003. *Vanilla*. *Genera Orchidacearum* 3: 402.
- Stöckel, M., Meyer, C., & Gebauer, G. 2011. The degree of mycoheterotrophic carbon gain in green, variegated and vegetative albino individuals of *Cephalanthera damasonium* is related to leaf chlorophyll concentrations. *New Phytol.* 189: 790-796.
- Suetsugu, K. 2013a. Autogamous fruit set in a mycoheterotrophic orchid *Cyrtosia septentrionalis*. *Plant Syst. Evol.* 299: 481-486.
- Suetsugu, K. 2013b. *Gastrodia takeshimensis* (Orchidaceae), a new mycoheterotrophic species from Japan. *Ann. Bot. Fenn.* 50: 375-378.
- Suetsugu, K., & Kato, M. 2012. Pollination biology of mycoheterotrophic orchid *Gastrodia elata*: Apomixis as insurance when insect-mediated pollination fails *The 5th EAFES International Congress / the 59th Annual Meeting of Ecological Society of Japan*.
- Suetsugu, K., & Kato, M. 2013. Plant that eats fungi imitates mushroom *The wild mushroom chase*.
- Suetsugu, K., & Fukushima S. 2013. Pollination biology of the endangered orchid *Cypripedium japonicum* in a fragmented forest of Japan. *Plant Spec. Biol.* doi: 10.1111/1442-1984.12016.
- Suetsugu, K., Nakama, M., Watanabe, T., Watanabe, H., Yamamoto, T., & Yokota, M. 2013. First record of the mycoheterotrophic plant *Gastrodia clausa* (Orchidaceae) from Okinawa Island, Ryukyu Islands, Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 64: 123-126.
- Suetsugu, K., & Tanaka, K. 2013a. Moths visiting the flowers of orchid *Platanthera japonica*. *Entomol. News* 123: 78-80.
- Suetsugu, K., & Tanaka, K. 2013b. Pollination of *Sedirea japonica* (Orchidaceae) by *Bombus diversus diversus* (Hymenoptera: Apidae). *Eur. J. Entomol.* 110: 545-548.
- Suetsugu, K., Takeuchi, Y., Futai, K., & Kato, M. 2012a. Host selectivity, haustorial anatomy and impact of the invasive parasite *Parentucellia viscosa* on floodplain vegetative communities in Japan. *Bot. J. Linn. Soc.* 170: 69-78.
- Suetsugu, K., Nakama, M., Watanabe, T., Watanabe, H., & Yokota, M. 2012b. The northernmost locality of *Gastrodia shimizuana* (Orchidaceae). *J. Jpn. Bot.* 87: 67-69.
- Suetsugu, K., & Ishida, K. 2011. New locality and fungal association of *Thismia abei* (Thismiaceae). *J. Phytogeogr. Taxon.* 59: 43-45.
- Suetsugu, K., Kawakita, A., & Kato, M. 2008. Host range and selectivity of the hemiparasitic plant *Thisium chinense* (Santalaceae). *Ann. Bot.* 102: 49-55.

- Takahashi, H., Nishio, E., & Hayashi, H. 1993. Pollination biology of the saprophytic species *Petrosavia sakurarii* (Makino) van Steenis in Central Japan. *J. Plant Res.* 106: 213-217.
- Taylor, D.L., Bruns, T.D., & Hodges, S.A. 2003a. Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. *Proc. R. Soc. B.* 271: 35-43.
- Taylor, D.L., Bruns, T.D., Szaro, T.M., & Hodges, S.A. 2003b. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *Am. J. Bot.* 90: 1168-1179.
- Tedersoo, L., Pellet, P., Kõljalg, U., & Selosse, M.A. 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: Ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* 151: 206-217.
- Tranchida-Lombardo, V., Roy, M., Bugot, E., Santoro, G., Püttsepp, Ü., Selosse, M.A., & Cozzolino, S. 2010. Spatial repartition and genetic relationship of green and albino individuals in mixed populations of *Cephalanthera* orchids. *Plant Biol.* 12: 659-667.
- Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K., & Calvo, R.N. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: A spasmodic journey to diversification. *Biol. J. Linn. Soc.* 84: 1-54.
- Tsuji, K., & Kato, M. 2010. Odor-guided bee pollinators of two endangered winter/early spring blooming orchids, *Cymbidium kanran* and *Cymbidium goeringii*, in Japan. *Plant Spec. Biol.* 25: 249-253.
- Ushimaru, A., & Imamura, A. 2002. Large variation in flower size of the myco-heterotrophic plant, *Monotropastrum globosum*: Effect of floral display on female reproductive success. *Plant Spec. Biol.* 17: 147-153.
- Warming, E. 1901. Sur quelques Burmanniacées recueillies au Brésil ar le Dr. A. Glaziou. *Overs. Konegl. Danske Vidensk. Selsk. Forh. Meddlemers Arbeider* 6: 173-188.
- Waterman, R.J., Bidartondo, M.I., Stofberg, J., Combs, J.K., Gebauer, G., Savolainen, V., Barraclough, T.G., & Pauw, A. 2011. The effects of above- and belowground mutualisms on orchid speciation and coexistence. *Am. Nat.* 177: 54-68.
- Waterman, R.J., & Bidartondo, M.I. 2008. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *J. Exp. Bot.* 59: 1085-1096.
- Yagame, T., & Yamato, M. 2013. Mycoheterotrophic growth of *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae) in tripartite symbioses with Thelephoraceae fungi and *Quercus serrata* (Fagaceae) in pot culture condition. *J. Plant Res.* 126: 215-222.
- Yukawa, T., Miyoshi, K., & Yokohama, J. 2002. Molecular phylogeny and character evolution of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo* 28: 129-139.
- Zhang, D., & Saunders, R.M.K. 2000. Reproductive biology of a mycoheterotrophic species, *Burmannia wallichii* (Burmanniaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 132: 359-367.

Zhou, X., Lin, H., Fan, X.L., & Gao, J.Y. 2012. Autonomous self-pollination and insect visitation in a saprophytic orchid, *Epipogium roseum* (D.Don) Lindl. *Aust. J. Bot.* 60: 154-159.

菌従属栄養植物の菌根共生系の多様性

谷亀 高広

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター植物園

〒060-0003 北海道札幌市中央区北3条西8丁目

(現所属：国立科学博物館筑波実験植物園

〒305-0005 つくば市天久保4-1-1)

Takahiro Yagame

Diversity of mycorrhizal symbioses in mycoheterotrophic plants

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi, ectomycorrhizal fungi, saprophytic fungi,
symbiotic culture, tripartite symbiosis

Field Science Center for Northern Biosphere Hokkaido University Botanic Garden Kita3

Nishi8, Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0003

Current address: Tsukuba Botanical Garden, National Museum of Nature and Science

4-1-1, Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

1. はじめに

陸上植物の多くは光合成を行うことで独立栄養生活を送り、生産者として生態系を支えている。ところが8割以上の植物種の根に真菌類の菌糸が定着し (Trappe 1987, Wang & Qiu 2006), 特異的な構造 (菌根) が形成される。身近な例としてマツタケとマツ科植物の関係が挙げられるだろう。マツタケはマツ科植物の根において菌根共生する菌類 (菌根菌) で、マツ科植物には土壤中の窒素やリン等を供給し、一方でマツ科植物からは光合成産物が菌体に供給されている (鈴木 2005)。このような共生系を植物と菌類が構築することで、植物は地中からの養分吸収効率を飛躍的に高めることができ、菌根菌は炭素化合物を安定して獲得できる。グロムス門、担子菌門、子囊菌門の菌類がこの共生系を構築する (Peterson et al. 2004)。光合成を行う植物と菌類の共生系は、双方にとって有益である。しかし、菌従属栄養植物は、菌根菌に光合成産物を渡すことはできず、一方的に菌から養分を収奪し生育するとされる。菌従属栄養植物の菌根共生系に関する研究は、菌根菌の分子同定や、炭素と窒素の安定同位体分別値の計測による菌従属栄養性の評価が確立したことで、近年、様々な植物種を対象に研究がなされるようになってきた (Merckx et al. 2013)。

2. 菌従属栄養植物の菌根共生

菌従属栄養植物の菌根共生は、大きく3つのタイプに分類される。1つ目は樹木に‘外生菌根’と呼ばれる構造を形成し共生する‘外生菌根菌’から養分を得て生育するタイプである。ツツジ科のギンリョウソウやシャクジョウソウ、ラン科のサカネランなどの植物がこれにあたる (図 1A, B, C)。これらの菌従属栄養植物は、樹木が産生する光合成産物を、菌根菌

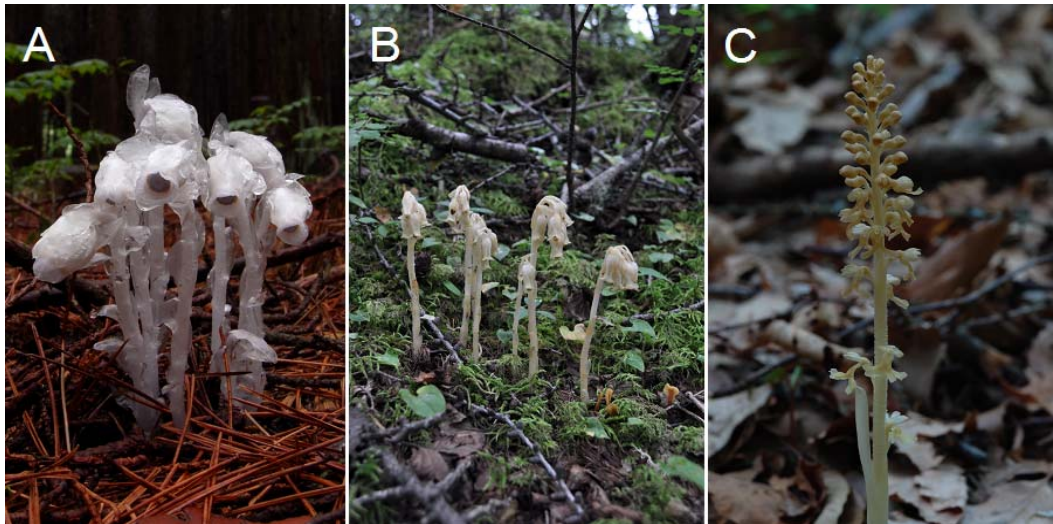


図1 外生菌根菌と菌根共生する菌従属栄養植物。A, ギンリョウソウ; B, シャクジョウソウ; C, サカナラン

を經由し獲得することによって生育している (Bidartondo & Bruns 2002, Selosse et al. 2002, McKendrick et al. 2002)。

菌従属栄養植物より検出される外生菌根菌の主な分類群には、担子菌門のベニタケ科、ロウタケ科、イボタケ科等がある (Smith & Read 2008)。さらにセイヨウショウロ科セイヨウショウロ属 (*Tuber*) のような子囊菌門が菌根菌となる例も知られている (Selosse et al. 2004)。樹木は短期間で枯れることはないため、菌従属栄養植物は外生菌根菌を介して樹木の光合成産物を安定して受け取ることができる。

2つ目に、木材や落葉落枝を炭素源として生育する腐生菌類から養分を得て生育するラン科のオニノヤガラ、ツチアケビ、タシロランなどが挙げられる (Kusano 1911, Terashita & Chuman 1987, Yamato et al. 2005; 図2)。オニノヤガラやツチアケビが担子菌門のキシメジ科ナラタケ属 (*Armillaria*) の菌種と菌根共生することは、古くより知られている (Kusano 1911, Hamada 1939)。事実、自生地で地中から掘り出すと、植物体表面にナラタケ属菌類が形成する黒色の菌糸束 (根状菌糸束) の付着が観察される時がある。しかし Umata et al. (2013) は、発芽直後のツチアケビの実生苗にはナラタケ属は共生しておらず、その代り担子菌門タマチョレイタケ目 (Polyporales) に含まれる未記載の菌種が共生し、生育を促したことを報告している。この研究によって、ツチアケビはナラタケ属菌との共生系が確立される以前に、ある程度の大きさの苗まで生長するまで別の菌種と菌根共生する事実が示された。このような生長過程における菌根菌のシフトはオニノヤガラでも確認されており (Xu & Mu 1990)、何故そのような現象が起こるのか、大変興味深い。他にもいくつかの菌従属栄養性のラン科はクヌギタケ科やナヨタケ科など様々な腐生性の菌種と共生するが (大和・谷亀 2009)、腐生菌との菌根共生は他の科の菌従属栄養植物には見られない。そもそも、ラン科植物は緑色葉を有する種でも、ケラトバシディウム科、ツラスネラ科、ロウタケ科などのいわゆるリゾクトニアと呼ばれる腐生性の異担子菌類と菌根共生することが特徴である (Smith & Read 2008)。

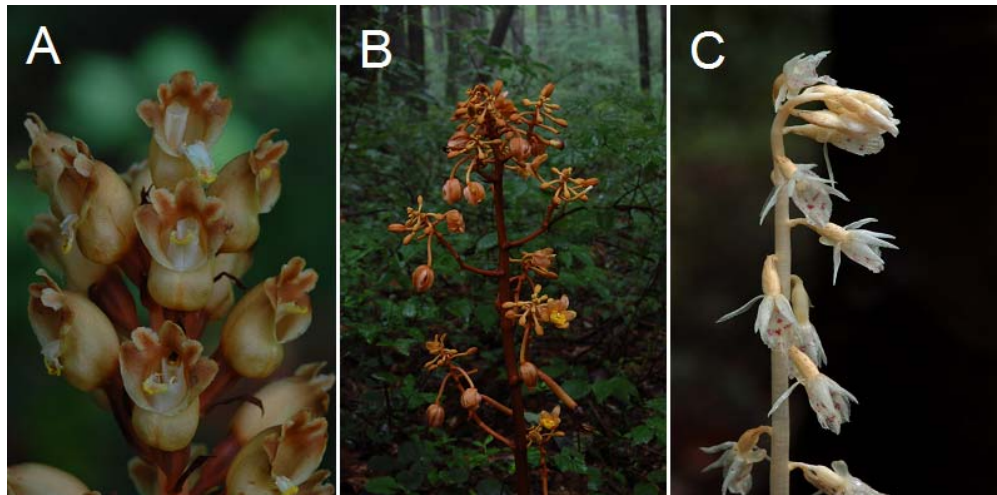


図2 腐生菌と菌根共生する菌従属栄養植物。A, オミノヤガラ; B, ツチアケビ; C, タシロラン

3つ目は‘アーバスキュラー菌根菌’（AM菌）と共生する菌従属栄養植物である。グロムス門に属するAM菌による共生系は、陸上植物の様々な分類群の独立栄養植物が営む最も普遍的な菌根共生系である（Peterson et al. 2004）。緑色植物とAM菌との共生系は特異性が低く、1種類の植物に多数の菌種が定着する。一方、菌従属栄養植物からも複数種のAM菌が検出されるが、植物の種ごとに特定の種のAM菌が高頻度で検出される傾向が強く、その多くは Schwarzott et al. (2001)により定義されたグロムス門の中のグループAとよばれる系統に含まれる（Bidartondo et al. 2002; Yamato et al. 2011; Ogura-Tsujita et al. 2013）。

AM菌と菌根共生する菌従属栄養植物は、ホンゴウソウ科、ヒナノシヤクジョウ科、コロシア科、リンドウ科、ヒメハギ科、サクライソウ科など様々な科にわたり（Merckx et al. 2013）、日本にはホンゴウソウ、シロシヤクジョウやタヌキノシヨクダイなどが分布する（図3A, B, C）。また、シダ植物のハナヤスリ科やヒカゲノカズラ科などの地下で生育する配偶体は、光合成色素を持たないことから菌従属栄養と推定され、これらもグロムス門グループAの菌種と菌根共生することが知られている（Winther & Friedman 2007a; Winther & Friedman 2007b）。AM菌と共生する菌従属栄養植物は、外生菌根菌に依存する種と同様に、緑色植物からAM菌を通じて光合成産物を収奪し、生育していると考えられる。

3. 菌従属栄養植物と菌根菌の共生系の検証

3-1. 先行研究に対する疑問

菌従属栄養植物がどのような分類群の菌類から養分を得て生育するのかという疑問は、菌根菌の分子同定が可能になったことで、種ごとに解明されつつある。しかし、地中に存在する菌従属栄養植物の根は様々な菌類が存在する土壌に曝されているため、分子生物学的手法によって菌根菌を同定する際、根表面に付着している菌根菌以外の菌種のDNAがPCR法によって増幅される可能性がある。また、根からは複数の菌種が検出されることが多く、実際にどの菌種が菌従属栄養植物の生育に影響を及ぼしているかについては把握されていない場



図3 AM菌根菌と菌根共生する菌従属栄養植物。A, ホンゴウソウ; B, シロシャクジョウ; C, タヌキノシヨクダイ

合が多い。先行研究では、定量的な解析を行うことで、より多くの塩基配列データが得られた菌種を主要な菌根菌であろうと推定している。さらに安定同位体値を評価することで、菌根菌の生理的特性を推定する場合もある (Yagame et al. 2012)。しかし、この実験手法をもってしても分子同定された菌種が菌従属栄養植物の生育に及ぼす影響を評価できない。そこで著者は菌従属栄養植物と菌根菌の共生系を構築し、植物体の生育を観察する研究を行ってきた。その結果、分子同定では解明できない、菌従属栄養植物の生育段階ごとの菌共生の実体を解明することに成功した。

3-2. 腐生菌との共生系構築

ラン科タシロラン属タシロランは、関東地方を北限とし、熱帯アジアからアフリカ西部まで自生する菌従属栄養植物である。日本では6月下旬から7月上旬に花を咲かせ、都心部の神社の境内などでも観察することができる。タシロランより菌根菌を分離し分子同定した結果、ナヨタケ科の菌種と菌根共生することが明らかになった (Yamato et al. 2005)。しかし、この共生系の存在は当初懐疑的に見られていた。当時ラン科植物の菌根菌といえばリゾクトニアである、という先入観が強かったためだ。

そこで、著者はタシロランから分離された菌株のひとつである ME1-1 株をタシロランの種子に接種し、種子が発芽・生育するかを調査した。ME1-1 株は Yamato et al. (2005) の分子系統解析の結果、イヌセンボンタケ (*Coprinellus disseminatus*) に近縁であることが明らかにされていた。そこで著者はまず ME1-1 の種レベルでの同定を目的とし、子実体形成実験を行った。その結果、大量の子実体が形成され、その形態的特徴からイヌセンボンタケと同定した (Yagame et al. 2008)。この菌株をタシロランの種子に接種したところ、6週間後、発芽が確認された (図 4A)。その後ストロンおよび塊茎の発達などが確認され (図 4B, C)、播種後 26 週で塊茎の頂部に花芽が形成され (図 4D, E)、播種後 27 週で開花に至った (図 4F)。

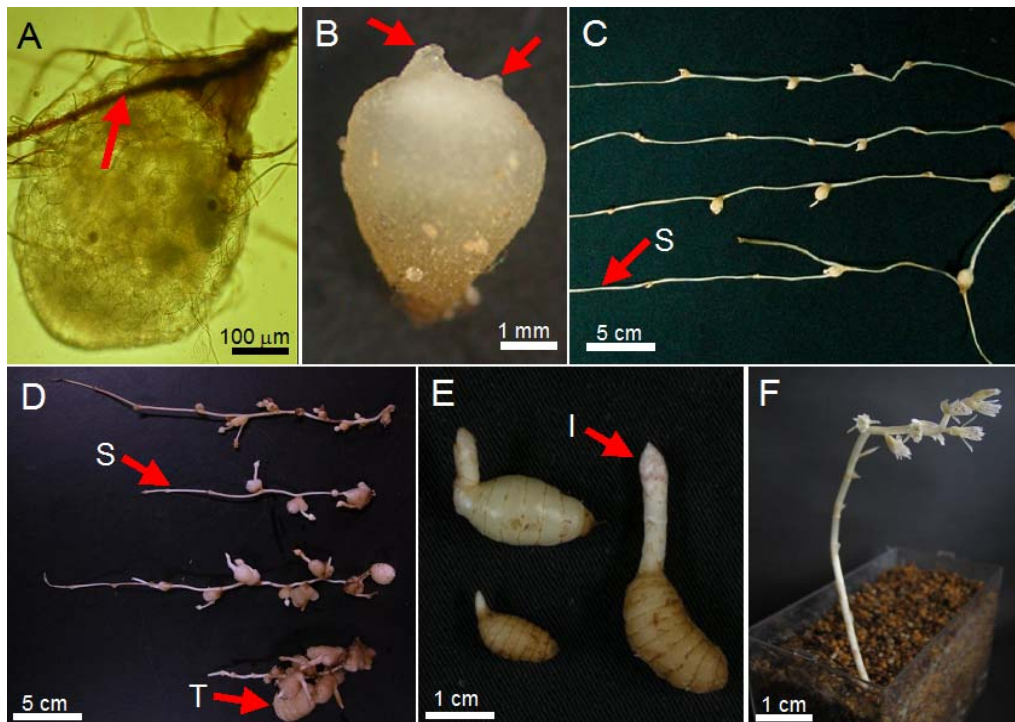


図4 タシロランの生長過程。A, 播種6週目 矢印はプロトコームに付着する菌根菌 ME1-1 の菌糸束; B, 播種8週目 矢印はストロンの原基; C, 播種12週目 S:ストロン; D, 播種16週目 S:ストロン T:塊茎; E, 播種18週目成熟した塊茎 I:花序; F, 播種27週目 開花

このことから、タシロランは種子発芽から開花に至るまで単一のナヨタケ科の菌種と菌根共生し生育することが可能なことが明らかとなり、加えて良好な生育環境下では種子発芽から僅か半年で開花することが明らかとなった (Yagame et al. 2007)。さらに、1粒の種子から半年で大小約80個もの塊茎が形成されたことから、高い栄養繁殖能力を有することが確認された。タシロランの生長過程は、Burgeff (1932) や Van Leeuwen (1937) らにより実生苗の特徴が報告されていたが、本研究によって発芽から開花に至る生長過程が明らかになった。また、ラン科植物とナヨタケ科が菌根共生する事実が初めて確認された。さらにラン科イモネヤガラ属の菌従属栄養種イモネヤガラが、ナヨタケ科の菌種と特異的に菌根共生する事実が分子同定により明らかにされたことから (Ogura-Tsujita & Yukawa 2008)、ナヨタケ科との共生が植物の菌従属栄養性進化と関連することが示唆された。

それでは、ナヨタケ科と共生する緑色葉を有するランは存在するのだろうか。サイハイランは緑色葉を有する種だが、薄暗い林床に生育するため独立栄養だけで生育することが難しいと考えられた。サイハイランが薄暗い環境に適応できる理由を菌根共生から解明してみようと考え、まず菌根菌を分子同定した。地中でサンゴ状に分枝する根茎より菌を分離培養したところ、複数の菌株がナヨタケ科と同定された。分離菌株のうち1株は、子実体を形成させることに成功し、ナヨタケ科の *Coprinellus domesticus* と同定された (Yagame et al. 2013)。また分子系統解析の結果、この菌はタシロランより分離された菌根菌に極めて近縁であることも明らかになった (図5)。さらに、分離した2系統の *Coprinellus* 属菌をサイハイランの種子に共生させた結果、種子が発芽し根茎が発達したことから、緑色葉を有するラン科植物の中にもナヨタケ科の菌種と菌根共生する種があることが証明された。サイハイランが、ナヨタケ

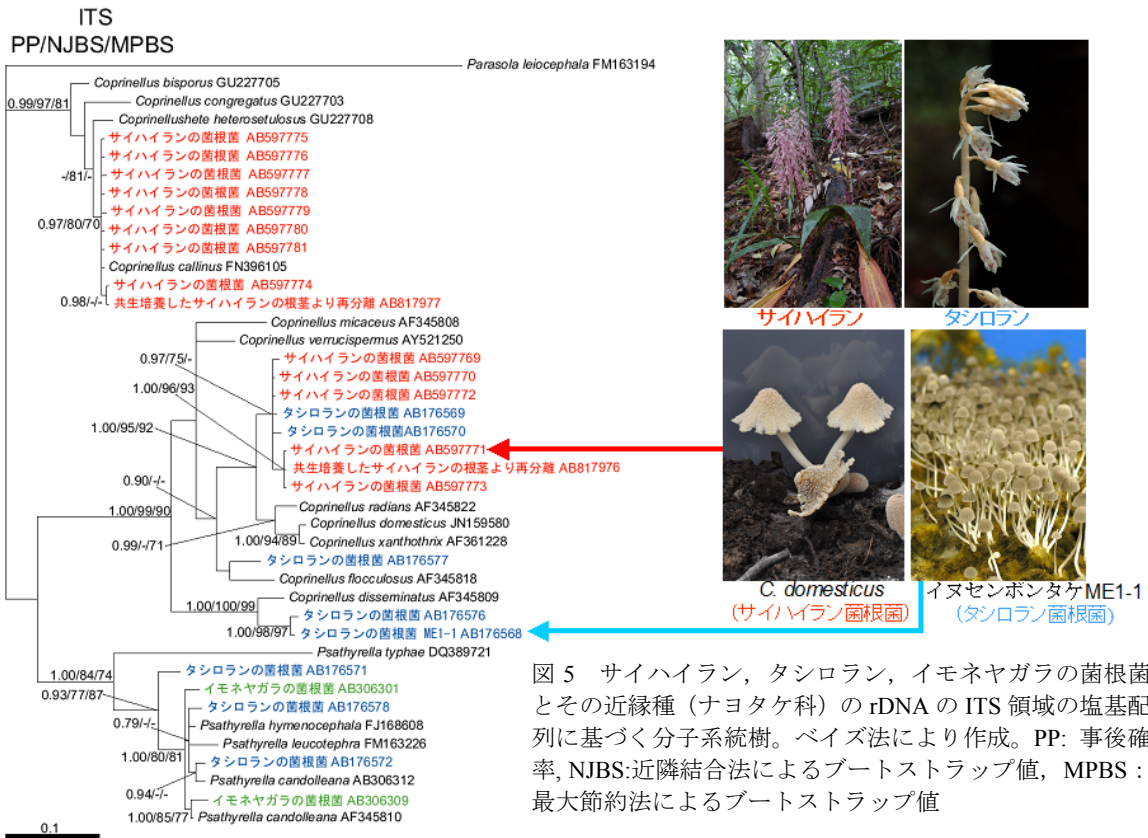


図5 サイハイラン, タシロラン, イモネヤガラの菌根菌とその近縁種(ナヨタケ科)のrDNAのITS領域の塩基配列に基づく分子系統樹。ベイズ法により作成。PP: 事後確率, NJBS:近隣結合法によるブートストラップ値, MPBS: 最大節約法によるブートストラップ値

科のような菌従属栄養植物の生育を支える菌類と共生することから、緑葉を持ちながらも菌根菌へ炭素を依存する部分的菌従属栄養植物(詳しくは第2章参照)である可能性が考えられる。サイハイランのこのような性質が、薄暗い林床環境における生育を可能にしているのかもしれない。

3-3. 外生菌根菌との共生系構築

樹木, 外生菌根菌, 菌従属栄養植物の3者共生系を人工的に構築した事例は, 過去に数例あるに過ぎない。Warcup (1985) は, オーストラリアに自生するラン科植物 *Rhizanthella gardneri* の苗を3者共生下で15週間栽培し, 開花に成功している。また, McKendrick et al. (2000) はユーラシア大陸から北米大陸にかけて広く分布するラン科植物である *Corallorhiza trifida* の実生苗を3者共生下で28週間生育させ, ¹⁴Cの計測により樹木から外生菌根菌を経由した炭素の移動と生産量の増加を確認している。さらに, Bougoure et al. (2010) は *Rhizanthella gardneri* を3者共生下で約1週間育成し, ¹³Cおよび¹⁵Nを用いて宿主植物からの炭素供給, および土壌中からの窒素供給にかかる時間を計測している。しかし, これらの研究では, 菌従属栄養植物の生育を長期的に観察できていない。また, 菌従属栄養の程度の高い種のみが用いられており, 緑色葉を持つ部分的菌従属栄養種については3者共生条件下で生育させた事例がない。

そこで著者は部分的菌従属栄養種であることが坂本ら(2013)により確認されているラン科キンランについて人工的に3者共生系を構築することを試みた。まず, キンランの根よ

り菌根菌を複数系統分離した。分子同定の結果、分離された菌株はすべてイボタケ科に含まれる菌種と同定された (Yagame and Yamato 2013)。次に、分離菌株を用いてコナラ (ブナ科) と外生菌根を形成させた。分離菌株と外生菌根を形成したコナラの苗と、無菌培養で生育させたキンランの苗を同じ鉢の中で 120 週栽培した。対照区では菌根菌を接種していないコナラの苗とキンランの無菌培養苗を一緒に栽培した。3

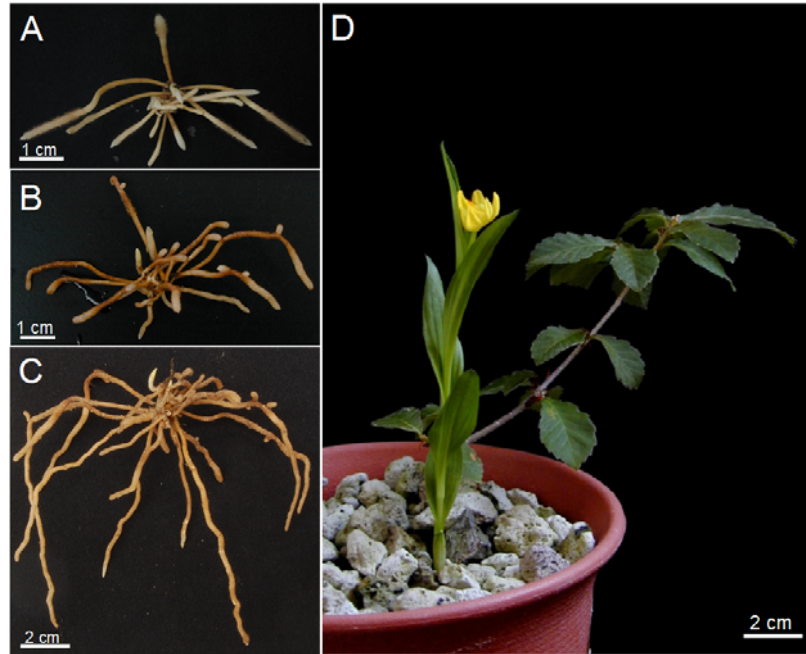


図 6 キンランの根の生育(A-C), およびシュートの伸長。A, 無菌培養苗; B, 3 者共生培養 6 ヶ月後; C, 3 者共生培養 18 ヶ月後; D, 3 者共生下の開花

者共生培養したキンランを図 6 に示す。3 者共生系を構築して 6 ヶ月後、菌根菌接種区と対照区で苗の生存率に差はみられなかった。しかし、30 ヶ月が経過すると接種区では 7 割以上の苗が生存していたが、対照区ではすべての苗が枯死していたことから、キンランの生育には、3 者共生系を介した菌根菌からの栄養供給が不可欠であることが確認された。コナラの光合成産物が菌根菌を介してキンランへと運ばれていたのである。また、キンラン属は野外において毎年必ずしもシュートを形成するわけではなく、状況に応じて地下部のみで生存していると考えられている (Abadie et al. 2006)。本研究によって、キンランが菌根菌からの養分を使って根の生長を続けていることを、培養下で初めて確認することができた。

3-4. AM 菌との共生系構築

ここまで外生菌根菌や腐生菌と菌従属栄養植物との共生系を人工的に作り出した実験系を紹介したが、AM 菌と共生する菌従属栄養植物を人工環境下で育成させた事例は知られていない。AM 菌は単独で培養することが困難で、さらに植物との共生系が構築されないと胞子を形成できない (Peterson et al. 2004)。宿主植物、AM 菌、菌従属栄養植物の 3 者共生系を構築するためには、AM 菌を生育の早い草本植物で共生させ、そこに菌従属栄養植物を植え付ける必要がある。

4. おわりに

菌従属栄養植物の菌根共生系解明に関する研究は、単に菌根菌の同定を行う段階から、検出された菌根菌のそれぞれが菌従属栄養植物の生育にどのような影響を与えているかを検証する段階になってきた。共生培養が様々な菌従属栄養性種で成功すれば、菌従属栄養植物の

生態・生理について理解が深まることが期待される。また、菌従属栄養植物の中には絶滅が危惧される種も多く、これらの保全・増殖に資する知見が集積されることが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、帝京科学大学生命環境学部 岩瀬 剛二教授、千葉大学教育学部 大和 政秀 助教、東京都市大学知識工学部 鈴木 彰 特任教授、千葉中央博物館 吹春 俊光 上席研究員、Montpellier 大学 Marc-André Selosse 教授、国立科学博物館遊川知久研究員など多くの方々より研究の際のご指導やサンプリングの際のご助力を賜った。また、タシロランのサンプリングについては明治神宮、櫃原神宮、下鴨神社にご協力をいただいた。以上の皆様に心より感謝の意を表したい。

引用文献

- Abadie, J.C., Püttsepp, Ü., Gebauer, G., Faccio, A., Bonfante, P., & Selosse, M.A. 2006. *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and non-photosynthetic individuals. *Can. J. Bot.* 84: 1462-1477.
- Bidartondo, M.I., & Bruns, T.D. 2002. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Mol. Ecol.* 11: 557-569.
- Bidartondo, M.I., Redecker, D., Hijri, I., Wiemken, A., Bruns, T.D., Dominguez, L., Sersic A., Leake, J.R., & Read, D.J. 2002. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 419: 389-392.
- Bougoure, J.J., Brundrett, M.C., & Grierson, P.F. 2010. Carbon and nitrogen supply to the underground orchid, *Rhizanthella gardneri*. *New Phytol.* 186: 947-956.
- Burgeff, H. 1932. Saprophytismus und Symbiose Studien an tropischen orchideen. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Hamada, M. 1939 Studien über die Mykorrhiza von *Galeola septentrionalis* Reichb. F.-Ein neuer Fall der Mykorrhiza-Bildung durch intraradicale Rhizomorpha. *Jpn. J. Bot.* 10: 151-212.
- Julou, T., Burghardt, B., Gebauer, G., Berveiller, D., Damesin, C., & Selosse, M.A. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol.* 166:639-653.
- Kusano, S. 1911. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. *J. Coll. Agric. Univ. Tokyo* 4: 1-66.
- McKendrick, S.L., Leake, J.R., & Read, D.J. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytol.* 145: 539-548.
- McKendrick, S.L., Leake, J.R., Taylor, D.L., & Read, D.L. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytol.* 154: 233-247.
- Merckx, V.S.F.T. (ed.) 2013. Mycoheterotrophy: The biology of plants living fungi, Springer, New

York.

- Ogura-Tsujita, Y., & Yukawa, T. 2008. High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 95: 93-97.
- Ogura-Tsujita, Y., Umata, H., & Yukawa, T. 2013. High mycorrhizal specificity in the mycoheterotrophic *Burmannia nepalensis* and *B. itoana* (Burmanniaceae) *Mycoscience* 54: 444-448.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., & Melville, L.H. 2004. Mycorrhizas: anatomy and cell biology NRC research press, Ottawa.
- 坂本 裕紀, 横山 潤, 遊川 知久, 辻田 有紀, 牧 雅之 2013. 日本産キンラン属における共生菌の多様性および共生菌への栄養依存性の解明. 第11回アジア太平洋蘭会議沖縄大会講演要旨集 pp. 264-268.
- Schwarzott, D., Walker, C., & Schüssler, A. 2001. *Glomus* the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21: 190-197.
- Selosse, M.A., Weiß M., Jany, J.L., & Tillier, A. 2002. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Mol. Eco.* 11: 1831-1844.
- Selosse, M.A., Faccio, A., Scappaticci, G., & Bonfante, P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecol.* 47: 416-426.
- Smith, S.E., & Read. D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, third edition, Academic press, San Diego.
- 鈴木 和夫 2005. 外生菌根共生系の生理生態とマツタケのパズル. 日本森林学会誌 87: 90-102.
- Terashita, T., & Chuman, S. 1987. Fungi inhabiting wild orchids in Japan IV: *Armillariella tabescens*, a new symbiont of *Galeora septentrionalis*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 28: 145-154.
- Trappe, J.M. 1987. "Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint". *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*, G.R. Safir (EDS), Florida: CRC Press.
- Umata, H., Ota, Y., Yamada, M., Watanabe, Y., & Gale, S.W. 2013. Germination of the fully myco-heterotrophic orchid *Cyrtosia septentrionalis* is characterized by low fungal specificity and does not require direct seed-mycobiont contact. *Mycoscience* 54: 343-352.
- Van Leeuwen, W.M.D. 1937. The biology of *Epipogium roseum* (D. Don) Lindl. *Blumea supplements* 1: 57-65.
- Wang, B., & Qiu, Y.L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.
- Warcup, J.H. 1985. *Rhizanthella gardneri* (Orchidaceae), its *Rhizoctonia* endophyte and close association with *Melaleuca uncinata* (Myrtaceae) in Western Australia. *New Phytol.* 99: 273-280.
- Winther, J.L., & Friedman, W.E. 2007a. Arbuscular mycorrhizal symbionts in *Botrychium* (Ophioglossaceae). *Am. J. Bot.* 94: 1248-1255.
- Winther, J.L., & Friedman, W.E. 2007b. Arbuscular mycorrhizal associations in Lycopodiaceae. *New*

Phytol. 177: 790-801.

- Xu, J., & Mu, C. 1990. The relation between growth of *Gastrodia elata* protocorms and fungi. *Acta Botanica Sinica* 32: 26-33.
- Yagame, T., Funabiki, E., Nagasawa, E., Fukiharu, T., & Iwase, K. 2013. Identification and symbiotic ability of Psathyrellaceae fungi isolated from a photosynthetic orchid, *Cremastora appendiculata* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 100: 1823-1830.
- Yagame, T., & Yamato, M. 2013. Mycoheterotrophic growth of *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae) in tripartite symbioses with Thelephoraceae fungi and *Quercus serrata* (Fagaceae) in pot culture condition. *J. Plant Res.* 126: 215-222.
- Yagame, T., Orihara, T., Selosse, M.A., Yamato, M., & Iwase, K. 2012. Mixotrophy of *Platanthera minor*, an orchid associated with ectomycorrhiza-forming Ceratobasidiaceae fungi. *New Phytol.* 193: 178-187.
- Yagame, T., Fukiharu, T., Yamato, M., Suzuki, A., & Iwase, K. 2008. Identification of a mycorrhizal fungus in *Epipogium roseum* (Orchidaceae) from morphological characteristics of basidioma. *Mycoscience* 49: 147-151.
- Yagame, T., Yamato, M., Mii, M., Suzuki, A., & Iwase, K. 2007. Developmental process of an achlorophyllous orchid, *Epipogium roseum* (D. Don) Lindl. from seed germination to flowering under symbiotic cultivation with a mycorrhizal fungus. *J. Plant Res.* 120: 229-236.
- Yamato, M., Yagame, T., Suzuki, A., & Iwase, K. 2005. Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae). *Mycoscience* 46: 73-77.
- 大和 政秀, 谷亀 高広 2009. ラン科植物と菌類の共生. 日本菌学会会報 50: 21-42.
- Yamato, M., Yagame, T., Shimomura, N., Iwase, K., Takahashi, H., Ogura-Tsujita, Y., & Yukawa, T. 2011. Specific arbuscular mycorrhizal fungi associated with non-photosynthetic *Petrosavia sakurarii* (Petrosaviaceae). *Mycorrhiza* 21: 631-639.

部分的菌従属栄養植物ベニバナイチヤクソウの 発芽生態から見た菌従属栄養性の進化

橋本 靖

帯広畜産大学畜産生命科学研究部門

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地

Yasushi Hashimoto

Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds

Key words: dust seed, forest floor, host specificity, partial mycoheterotrophy, Pyroleae

Department of Life Science and Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

1. はじめに

菌従属栄養植物は、植物としての栄養摂取の基盤である光合成能力を、すべて・もしくは部分的に捨てて、他の生物、ここではカビやきのこと呼ばれる菌類に依存して生きるという、ずいぶん思い切った性質を獲得した植物達である。彼らはその進化の過程で、複数の植物の系統で複数回出現していることが知られている。この菌従属栄養植物は、植物の栄養の摂取機能や共生系の進化過程を解明する上で、また、森林生態系での生物間相互作用の重要性を考える上で、非常に興味深い存在として注目されている (Whitfield 2007, Selosse & Roy 2009)。この菌従属栄養植物のうち、光合成能力をある程度保持したまま、菌への従属栄養性を示す植物も知られ、部分的菌従属栄養植物 (混合栄養植物) と呼ばれている。このような中間的な性質を持つ植物の存在は、暗い森林林床環境下で植物が菌への依存性を獲得していく進化の過程の、前適応段階に当たると考えられる (Roy et al. 2013)。

また一般に、菌もしくは他の植物への寄生性を示す植物は、共通した特徴的な形質を有していることが知られる。その最も特徴的なのが「Dust seed」(埃種子) と呼ばれる微細種子の形成である (Eriksson & Kainulainen 2011)。ツツジ科に属するギンリョウソウやシャクジョウソウの仲間が作る種子も、本稿で主に紹介するベニバナイチヤクソウが含まれるイチヤクソウの仲間も、さらに、ツツジ科とは分類学的類縁性が遠いラン科植物も、外見上驚くほど類似した種子を作る (図1)。これは、従属栄養性を持った植物における収斂進化と考えられている。

光合成能力を残したまま菌への依存性もあわせ持つ部分的菌従属栄養植物の、微細種子発芽時の共生菌との関わり合いを明らかにすることは、菌従属栄養性の進化がどのような過程をへて起こってきたのかを推測する一助になると考えられる (Bidartondo

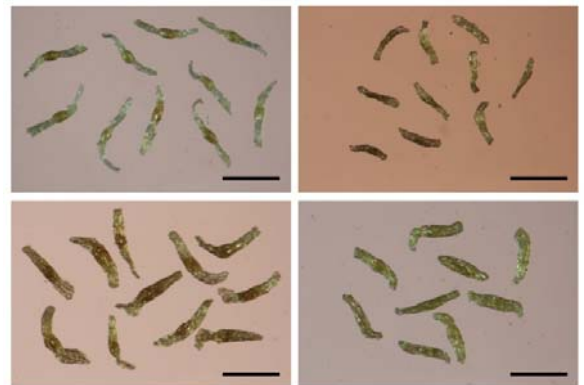


図1 同一の森林から採取した微細種子の例。左上・シャクジョウソウ、右上・クモキリソウ (ラン科)、左下・ベニバナイチヤクソウ、右下・コイチヤクソウ。スケールは1mm

& Read 2008, Selosse & Roy 2009)。そこで本稿では、この部分的菌従属栄養植物と考えられるツツジ科のベニバナイチヤクソウを取り上げ、その種子発芽の際に見られる共生菌との興味深い関係性を紹介する。

2. ベニバナイチヤクソウ

菌従属栄養植物の代表的な存在として、ラン科植物に属する多くの種が知られているが、ツツジ科シャクジョウソウ亜科

(Monotropoideae) に属するシャクジョウソウやギンリョウソウも、よく知られた菌従属栄養植物である (図2)。森林の林床に生育し、「腐葉土の上に生える腐生植物」などと図鑑等に記載されてきたため、落葉落枝などの分解物から炭水化物を得て生活しているイメージを持たれていたが、近年のDNA解析を用いた研究によって、彼らの根に定着している菌 (菌根菌) の種同定がなされた。その結果、これらの植物が周囲の優占樹木種の根に相利共生している「外生菌根菌」と菌根を形成しており、この菌根菌を経由して樹木の光合成産物を得ていること、また、その寄生対象となっている菌の種が、特異的であることが明らかになっている

(Smith & Read 2008)。有り体に言えば、葉緑素を持たない絶対的菌従属栄養性のシャクジョウソウ類は、自らの生長と種子生産に必要な物質のすべてを、根に定着している好みのきのこの菌糸を食べてまかなっており、間接的に周囲の樹木に寄生して生きていることになる。

これら絶対的菌従属栄養性のシャクジョウソウ類に近縁な植物として、同じツツジ科のシャクジョウソウ亜科に属するイチヤクソウの仲間が知られている (図3, 4左)。彼らは多年生の常緑草本植物で、世界的に30種程度が知られており、北半球の温帯から極地にかけて分布し、基本的に森林内や林縁に生育する。そのうち、本稿で主に紹介するベニバナイチヤクソウは、林床で比較的大きなコロニーを作って群生する植物である (図3)。最初に筆者がこのベニバナイチヤクソウに興味を持ったのは、まだ修士課程の学生の頃、調査の合間に (時に調査そっちのけで)、趣味のきのこ狩りをしていた際である。経験的に彼らのコロニーの中では、きのこがあまり生えていないように感じて疑問に思っていたのだが、当時は菌根の研究は初めておらず、この疑問に関わる研究を出来るとは思っていなかった。また、その当時はこれらイチヤクソウの仲間の菌根や栄養性についての研究は、ほとんどなされていなかった。しかし近年、にわかになら注目が集まり始め、イチヤクソウの仲間の親個体が作る菌根が、シャクジョウソウ類と同様に、周囲の樹木と共生している外生菌根菌によるものであること、また、シ



図2 シャクジョウソウ



図3 左: ベニバナイチヤクソウ, 右上: コバナイチヤクソウ, 右下: コイチヤクソウ

ヤクジョウソウ類とは異なり、その外生菌根菌の種があまり特異的ではないことが明らかになってきた (Tedersoo et al. 2007, Zimmer et al. 2007, Hynson & Bruns 2009, Hashimoto et al. 2012)。さらに、彼らの葉の安定同位体¹³C値から考えると、イチヤクソウの仲間は条件によって、ある程度の炭水化物を菌根から得ている部分的菌従属栄養植物である可能性が高いと考えられている (Tedersoo et al. 2007, Zimmer et



図4 ベニバナイチヤクソウのコロニー (左) と、菌根 (右上) と、菌根の横断面 (右下/ 表皮細胞内に菌糸が進入している)

al. 2007, Hynson & Bruns 2009)。すなわち、彼らは必要とする栄養分の一部を、根の共生菌を食べてまかなっており、間接的に樹木に寄生していることになる。ただし、これがどの程度なのかは明らかではない。

著者が現在主な調査地としている北海道の帯広市周辺では、イチヤクソウの仲間のうち、このベニバナイチヤクソウが最も目立つ存在である。ほかにもコバノイチヤクソウ、ジンヨウイチヤクソウ、コイチヤクソウなどが普通に見られる (図3, 4, 7)。これらの種は、山間部の樹齢の高い森林で見かけることもあるが、カラマツやトドマツなどの人工林や、シラカンバなどの二次林の林床で、そこがササに完全に覆われていない際の優占種として見かけることが多い。彼らは、暗い林床の環境に適応しており、地下茎を使って生育場所を広げ、条件が合うと驚くほど大きなコロニーを形成して、初夏には見事な花を咲かせている (図7右)。ちなみに、これらイチヤクソウの仲間が共生菌と形成する菌根は、他の多くの草本植物が作るタイプの菌根 (アーバスキュラー菌根) とは異なった形状の菌根である (Massicotte et al. 2008)。その中でも、ベニバナイチヤクソウは比較的しっかりした菌鞘を持つ菌根を形成することが多い (図4右上下)。

3. 微細種子

菌従属栄養植物のつくる微細種子は、数十個の細胞からなる小さな胚と種皮のみで構成され、発芽の際の栄養源となる子葉あるいは胚乳を持っていないことが特徴となる (図1)。そのため、少なくとも発芽の初期は、外部から栄養源を確保しなければ、その発芽生長の過程をうまく進めることが叶わない。そして、親個体が緑の葉を持ち自ら光合成を行っている植物種であったとしても、微細種子を作る植物は、発芽から葉を完成するまでの幼個体の間は、絶対的な菌従属栄養植物として生活していることになる。

この微細種子は、栄養源を外部に頼っていることから、個々の種子の発芽成功率が低いと予想される。しかし見方を変えると、将来にわたって栄養を依存する寄生対象を、初期の生長開始時点で、確実に確保しているとも考えられる。さらに、微細種子の生産は、1粒あたりのコストが最小限に抑えられることから、同じコストで大量の種子の生産が可能となり、数千から万単位の種子が親植物1個

体から生産される。これらの微細種子が親から放出された後は、その軽さを生かして、風や水の流れに乗って広く分散することが可能である。また、これらの種子は、土壌中でシードバンクとして比較的長期に発芽の機会を待つことが可能であると考えられる。そのため、植物種としての十分な発芽成功と、分布拡大の可能性が担保されていると見られる (Bruns & Read 2000)。この発芽の成功はその栄養源の確保の成否にかかっていると考えられ、菌従属栄養植物であれば適切な共生菌の確保を意味する。

4. 微細種子の発芽時の共生菌

微細種子が親から放たれて最終的に落ちる森林やその周辺の土壌中には、数多くの多様な菌類が生息していると考えられる。これら菌従属栄養植物の種子の発芽では、その植物種ごとにこの多様な菌の中から、ある特定の菌を種・属・科などのレベルで選んで共生菌としていると考えられている (Smith & Read 2008)。すなわち、その種子が落ちる場所に相性の良い菌が存在することが、発芽から定着成功の必須条件になる。

微細種子発芽の際の共生菌を明らかにするための発芽実験は、主にラン科植物やシャクジョウソウの仲間の種子を対象に行われており、特にラン科植物に関しては、植物病原菌として知られる不完全菌類のリゾクトニア属菌が、発芽の際の共生菌として比較的早くから知られている。しかし近年では、そのリゾクトニア属菌が複数の系統にまたがった集合体であることや、リゾクトニア属菌には含まれない菌もランの共生菌であることが明らかとなり、さらに、発芽時の共生菌も多様であることが判明してきている (Smith & Read 2008, Yukawa et al. 2009)。またランの場合、発芽の際の共生菌は、親個体から検出される菌と一致していることが多いようである (大和・谷亀 2009)。シャクジョウソウの仲間でも、発芽から親個体の菌根まで、同じ種類の菌がついていると考えられる (Bruns & Read 2000, Leake et al. 2004, Yamada et al. 2008)。

イチヤクソウの仲間の種子発芽に関する研究は、半世紀前の古典的な研究の例があるだけで、ごく最近までほとんど報告がなされていなかった。これは、研究が行われていなかった訳ではなく、その発芽を見いだすことが、なかなか出来なかったことが原因であると考えられる (Smith & Read 2008, Hynson et al. 2009)。そしてこの発芽の希少性が、イチヤクソウの仲間の生態に、どのように関わっているのか興味を持たれてきた。特に、これらイチヤクソウの仲間は、絶対的な菌従属栄養性のシャクジョウソウの仲間と非常に近縁であるため、これらの植物がその進化の過程でどのように菌従属栄養性を獲得してきたのかを考える上で、必要な情報であると考えられる。さらに、前述のようにイチヤクソウの仲間の親個体が作る菌根は、外生菌根菌によるもので、その菌に特異性がないとの報告がなされている。そのため、これらイチヤクソウの仲間の発芽は、ラン科やシャクジョウソウ類などと同じように、ある程度特異的な菌が共生菌となっているのか、もしくは親個体の菌根と同じく、多様な菌と共生関係を結んで発芽することが可能なのか、一層興味もたれるようになった。このような背景から、ベニバナイチヤクソウを対象に、彼らの種子がどのような条件で発芽し、どのような菌が発芽の際の共生菌となっているのかを解明するべく調査を行った (Hashimoto et al. 2012)。

5. ベニバナイチヤクソウの発芽調査

微細種子を作る植物の発芽を対象とした調査は、非常に目の細かなナイロンネットなどに種子を入れて目星を付けた場所の土壌中に埋めて、一定期間後に掘り出す方法が用いられている (Rasmussen & Whigham 1998, 辻田・遊川 2008)。最も一般的なのは、フィルム写真のスライド用マウントに種子入りネットを挿んで作った種子パックを土壌に埋める方法である (図 5)。これらの方法は、ランやシャクジョウソウの仲間の種子を対象に成果をあげ、発芽にかかる時間や、必要な条件、特に共生菌の種を知るのに有効である。

この手法を用いて、ベニバナイチヤクソウの種子の発芽調査を開始した。はじめは最もたくさんの種子が存在すると考えられる親植物が多く見られる森林のコロニー内や、その周辺に種子パックを埋めて様子を見ることにした。しかし、掘り出したパックからは全く発芽は見られなかった。それ以降、埋める場所、深さ、期間、元々の種子の質など、考えられるいろいろな要因を潰すように、あちこちに種子パックを埋めて掘り出すという行為を繰り返した。埋めた場所は、樹種の違う各森林内のベニバナイチヤクソウのコロニー内部やその周辺、林縁、森林に面した攪乱地、牧草地など、周辺にベニバナイチヤクソウが生育しており、彼らの小さな種子が飛ぶ可能性が考えられる場所を様々試してみた (表 1, 図 7)。

最初に発芽を観察出来たのは、ベニバナイチヤクソウの群落内でも、森林内でもなく、大学の校舎の屋上に放置した、ベニバナイチヤクソウとシラカンバの苗木を植えた他の実験用に作ったプランターの土の中に予備的に埋めたパックから

であった。これが2年目の出来事で、以降、パックの埋設場所を、発芽が観察されたプランターと条件が似ていると思われる、シラカンバ実生の生えた伐採跡地、道路脇の法面や、かく乱を受けた林縁部など、思いつく場所あちこちに埋めて回った。それでも、その後2年間全く発芽は見られず、最後と決めて望んだ5年目に、やっと3カ所の若齢のカバノキ二次林で、まとまった発芽を観察することが出来た。結局、発芽が観察されたのは、はじめに発芽を観察したシラカンバ苗木とベニバナイチヤクソウをともに植えたプランターの1つと、樹齢が約15年程度と推測されるシラカンバも

しくはダケカンバの若齢林の3カ所だけである。それ以外の埋設場所からは、明確に発芽していると思わせる種皮を突き抜けて生長している実生は観察されなかった (図 6)。埋設した種子パックは、予



図5 微細種子の埋設実験に用いた種子パックと(右)、ベニバナイチヤクソウ種子(左)

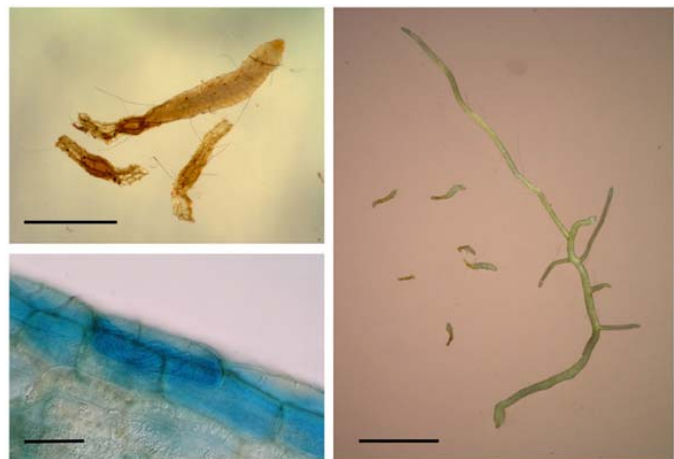


図6 ベニバナイチヤクソウの発芽種子。左上: 発芽の始まった種子と未発芽種子 (bar: 1mm/表面に見える黒色菌糸は発芽共生菌のものではなく土壌中の腐生性の菌の菌糸)。右: 未発芽種子と発芽段階の異なる発芽種子 (bar: 5mm)。左下: 染色した発芽種子細胞内の菌糸 (bar: 10µm)

備的に埋めたものを除いて合計 990 パックで、そのうち発芽が見られたのは 74 パックであった (表 1)。

表1 ベニバナイチヤクソウ種子を入れたパックの埋設場所と掘り出した種子パックの発芽率

埋設場所	優占樹種と林階等	ベニバナイチヤクソウの有無と生育状況	埋設種子パック数	発芽パック数と発芽率 (%)
カラマツ人工林	約 50 年生カラマツ	旺盛に生育 (コロニー形成)	90	0
カラマツ人工林	約 50 年生カラマツ	旺盛に生育 (コロニー形成)	100	0
カラマツ人工林	約 50 年生カラマツ	旺盛に生育 (コロニー形成)	60	0
シラカンバ二次林	約 50 年生シラカンバ	旺盛に生育 (大きなコロニー形成)	50	0
トドマツ人工林	約 40 年生トドマツ	旺盛に生育 (コロニー形成)	50	0
シラカンバ人工林	約 15 年生シラカンバ	まばらに生育	150	45 (2.4)
牧草地	なし	なし	20	0
林縁の斜面	なし	なし	20	0
伐採跡地	なし	なし	20	0
林縁の斜面	約 3 年生ダケカンバ	なし	60	0
伐採跡地	約 5 年生ダケカンバ	なし	60	0
林縁の斜面	約 5 年生トドマツとアカエゾマツ	旺盛に生育 (小さなコロニー形成)	20	0
林縁の斜面	約 5 年生トドマツとアカエゾマツ	旺盛に生育 (小さなコロニー形成)	10	0
林道脇の空き地	約 3 年生シラカンバ	なし	60	0
林道脇の空き地	約 3 年生ダケカンバ	なし	60	0
シラカンバ二次林	約 15 年生シラカンバ	まばらに生育	75	16 (1.0)
ダケカンバ二次林	約 15 年生ダケカンバとミヤマハシノキ	まばらに生育	75	10 (2.1)
実験用プランター	3 年生カラマツ苗木	カラマツ林から採取 3~5 口ゼット	5	0
実験用プランター	3 年生シラカンバ苗木	カラマツ林から採取 3~5 口ゼット	5	3 (11.9)

* 埋設した種子パックのうち発芽が見られたパックの割合。詳細は Hashimoto et al. 2012 参照

この結果から考えられるのは、ベニバナイチヤクソウの発芽は、土壌中で少なくとも 5 ヶ月程度あれば起こる可能性があること、土壌中で冬期を越す必要はないこと、また、土壌中での発芽の際に、カンバの仲間の特に若齢の個体の存在と、成熟林ほどではないがある程度有機物の堆積した土壌の存在が必要もしくは何らかの引き金になることであった。特に興味深いのは、親個体が旺盛に生育して大きなコロニーを作り、多くの種子が形成されている場所でも、全く発芽を観察出来なかったことである (図 7)。パックに入れた種子はこれらの場所から採取しているにも関わらず、である。



図7 ベニバナイチヤクソウ種子パック埋設地。左: 種子発芽が見られた若齢シラカンバ二次林。右: 種子発芽が見られなかったトドマツ人工林のベニバナイチヤクソウのコロニー (花期)

また、カラマツ林、トドマツ林だけでなく、シラカンバ成熟林のベニバナイチヤクソウのコロニー内でも、種子パックを 50 個埋めたが、発芽はまったく観察されなかった。さらに、発芽が見られたシラカンバ若齢林内でのベニバナイチヤクソウ親個体の生育場所と、発芽が見られた種子パックの埋設場所の間に意味のある関係性はなく、林内レベルでも発芽の起こる要因としての親個体の存在は必要な条件とは言えないようだった。つまり、ベニバナイチヤクソウの微細種子の発芽は、親の存在、もしくは親の根についている菌の存在とは関係がなく起きているということになる。これは、彼らに近縁な絶対的菌従属栄養植物のシヤクジョウソウの仲間では知られている発芽実験の結果とは異なるものであった (Leake et al. 2004)。

6. ベニバナイチヤクソウ種子の発芽共生菌

それでは、今回見られた発芽種子の共生菌はいかなる種類であろうか (図 6 左下)。発芽が観察されたプランターと、3カ所の若齢カバノキ林から得られた発芽種子から DNA を抽出して、発芽に関わっていると考えられる菌の rDNA の ITS 領域と 28S の一部を増幅して、その菌の種同定を試みた。その結果、ランダムに選んだ 34 の発芽実生のすべてから、担子菌類のロウタケ科 (*Sebacinaceae*) ロウタケ属 (*Sebacina*) の *Sebacina vermifera* にごく近縁の菌だけが検出され、ベニバナイチヤクソウの発芽の共生菌が特異的である可能性が示された (Hashimoto et al. 2012)。特に、3カ所の若齢カバノキ林の内の1カ所は、他の2カ所と約 90km 離れたところに位置しており、また、後日追加で種子パックを埋め、新たに採取した発芽実生の確認を行っても、供試したすべての実生から同じ菌の DNA が検出されたため、この菌がベニバナイチヤクソウの発芽に強く関わっている菌であることは間違いないと考えられる。さて、このロウタケ属の菌 (これらの菌は分類学的見直しが行われており、将来的に種名や属名の変更が行われる可能性が高い) が含まれるのは、ロウタケの仲間の中でも、主に樹木の根と共生する外生菌根菌として見つかるグループではなく、腐生菌 (分解菌) や植物の内生菌として見つかるグループ (*Sebacinales* の clade B) の菌であった。すなわち、ベニバナイチヤクソウは、生長した後に共生している外生菌根菌とは異なる生活様式の菌を、発芽の際の共生菌としていることになる。また、さらに興味深いのは、今回特異的に発芽実生から検出されたロウタケ属の菌は、主にオーストラリアで自生する1グループのラン (*Diuris* 連) の種子発芽の共生菌として知られている菌だったことである (Warcup 1971, Yagame & Yamato 2008)。イチヤクソウの仲間は北半球のみに生育する植物であり、地理的に非常に離れた場所で異なる菌従属栄養植物が、同じ腐生性のロウタケ属の菌を発芽共生菌に選ぶ、収斂進化が起こった可能性も考えられる。なぜ特定の腐生性ロウタケ属菌が、菌従属栄養性の種子発芽の共生菌として、異なるグループの植物に採用されたのかは、菌従属栄養植物の進化や生理機構を考える上で、鍵となる要因かもしれない。

7. 共生菌の乗り換え

上記のように、ベニバナイチヤクソウの発芽の共生菌は、外生菌根性ではない (樹木根と共生していない) タイプのロウタケの仲間の菌であることがわかった。それでは、発芽後、ベニバナイチヤクソウの生長が進んだ際に、発芽の共生菌であるこの菌は、いつまでベニバナイチヤクソウと関わり続けるのであろうか。そこで今回種子パックを埋めて発芽が見られたシラカンバとダケカンバの若齢林2カ所の林床土壌中から、ベニバナイチヤクソウのまだコロニーを形成していない若い個体の菌根を採取し、あわせて周囲の優占樹木の菌根を採取して、同様に DNA の解析を使って菌根菌の種同定を行った (表 2)。

その結果、ベニバナイチヤクソウの若い親個体の菌根では、そのほとんどを外生菌根性の菌が占めており、発芽の際の共生菌であるロウタケの仲間は、シラカンバ林で 108 菌根片を調べて 5 菌根のみから検出され、ダケカンバ林では 53 菌根を調べて全く検出されなかった。また、調査林の優占樹種のカバノキの外生菌根からは、発芽の際に見られたロウタケの仲間の菌は全く検出されなかった。ベニバナイチヤクソウの種子は非常に小さく、発芽の後にどの程度の時間を経て葉を形成するのか明らかになっていないが、小さいながらも葉を形成した時点で、ベニバナイチヤクソウの共生菌の乗り換え

が始まっているようであった。

表2 2カ所の若齢カバノキ二次林から採取したベニバナイチヤクソウの菌根菌とシラカンバもしくはダケカンバの外生菌根菌のRFLPタイプ

	若齢シラカンバ二次林		若齢ダケカンバ・ミヤマノキ二次林	
	ベニバナイチヤクソウ	シラカンバ	ベニバナイチヤクソウ	ダケカンバ
供試した菌根数	108	122	53	66
出現RFLPタイプ数	34	42	14	26
発芽時出現菌と同じRFLPタイプ	5	0	0	0
共通して出現RFLPタイプ数	4(5.5%)		3(8.1%)	

詳細は Hashimoto et al. 2012 参照

このような共生菌との関係性が、その他のイチヤクソウの仲間にも当てはまるのかは明らかではないが、ベニバナイチヤクソウの共生菌において、発芽の際の腐生性の菌から、光合成能力を持った親個体では多様な外生菌根菌に乗り換えがおきていることは興味深い。ランの仲間やシヤクジョウソウの仲間では、多くの場合共生菌は生長の過程で変化しないことが多く、また変化が見られる際は、腐生菌から腐生菌、もしくは外生菌根菌から外生菌根菌への変化であり、腐生菌から外生菌根菌への変化ではない(大和・谷亀 2009)。では、彼らが生育の過程で腐生性の菌から外生菌根性の菌へ乗り換える理由は何であろうか。ベニバナイチヤクソウは発芽から葉を形成するまでは、完全な菌従属栄養性の生き方である。一方、葉を形成した後のベニバナイチヤクソウは、前述の通り部分的菌従属栄養性であるとの報告があり、また、今回種子パックを埋設したベニバナイチヤクソウ群落のいくつかで葉の安定同位体 ^{13}C の値を測定したところ、やはり、部分的菌従属栄養性であると見られる値を得ている(橋本, 未発表データ)。一般的に考えて、自ら土壤中の落葉など植物遺体を分解している腐生菌よりも、樹木を宿主としてその光合成産物をもらっている外生菌根菌の方が、多くの糖を安定して得られると考えられる。なぜベニバナイチヤクソウでは、絶対的な菌従属栄養性の種子発芽段階で外生菌根性の菌が共生菌でないのかわからないが、発芽直後の小さな実生の段階では、腐生性の菌を選ぶメリットがあるのかもしれない。特にベニバナイチヤクソウの発芽が、成熟した森林よりも、まだ土壌の発達があまり進んでいない条件の林で見られていることから(表1)、共生菌の生育適地が限定されている可能性が考えられる。このような要因によって発芽場所が限定されることが、この植物が新たな定着場所を広げるのに一役買っているのかもしれない。また一方で、すくなくとも親個体で糖を安定して得られると考えられる外生菌根性の菌との共生関係を持つことが出来るようになったことは、彼らが大きなコロニーを作って暗い林床で優占的に生育出来る要因であるのかもしれない。さらに、外生菌根菌と共生するようになったことは、菌従属栄養性の獲得の進化過程の前適応として働いているのかもしれない。同じイチヤクソウの仲間のイチヤクソウ (*Pyrola japonica*) では、種内でヒトツバイイチヤクソウと呼ばれる葉のサイズが小さく退化したものが知られており(図8)、菌従属栄養性の程度が高まっている様子が見受けられる。



図8 ヒトツバイイチヤクソウ (種子形成時期)

8. まとめ

部分的菌従属栄養植物と考えられるベニバナイチヤクソウを対象に、微細種子の発芽とその際の共生菌についての研究例を紹介した。ベニバナイチヤクソウは、完全な菌従属栄養性の発芽時には特異的な腐生菌と関係を経るが、葉の生長に伴って菌を乗り換えて、成熟個体では周囲の樹木が利用する多様な外生菌根菌と関係を経んでおり、その生活環の中で共生菌を変化させているようであった。このような共生菌の乗り換えが、菌従属栄養性の進化への前適応としての機能している可能性があると考えられる。また、暗い森林林床で生きるベニバナイチヤクソウが大きなコロニーを形成して優占的に生きられる背景には、このような菌を利用した巧みな生存戦略が関わっていると考えられる。林床という暗い環境で小さな植物が生きる中で、菌に頼って生きるという生き方が始まったと考えられるが、森林土壌中で異種の植物間が菌根菌の菌糸によって繋がっており、養分のやりとりが存在する事実は、森林生態系を見る上で新たな視点を与えてくれるだろう。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、科学研究費補助金 14780437 によります。また、これら研究は、帯広畜産大学での國司綾子氏・福川悟氏の修士論文研究の一部と島本繭氏・荒木陽子氏の卒業論文研究の一部の成果をまとめたもので、彼らの労を惜しまぬ研究への取り組みに感謝と敬意を表します。

引用文献

- Bidartondo, M.I. & Read, D.J. 2008. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Mol. Ecol.* 17: 3707-3716.
- Bruns, T.D. & Read, D.J. 2000. In vitro germination of non-photosynthetic, myco-heterotrophic plants stimulated by fungi isolated from the adult plants. *New Phytol.* 148: 335-342.
- Eriksson, O. & Kainulainen, K. 2011. The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 13: 73-87.
- Hashimoto, Y., Fukukawa S., Kunishi, A., Suga, H., Richard, F., Sauva, M., & Selosse, M.-A. 2012. Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds reveals convergences with germination in orchids. *New Phytol.* 195: 620-630.
- Hynson, N.A. & Bruns T.D. 2009. Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. *Proc. R. Soc. B* 276: 4053-4059.
- Leake, J.R., McKendrick, S.L., Bidartondo, M., & Read, D.J. 2004. Symbiotic germination and development of the myco-heterotroph *Monotropa hypopitys* in nature and its requirement for locally distributed *Tricholoma* spp. *New Phytol.* 163: 405-423.
- Massicotte, H.B., Melville, L.H., Tackaberry, L. & Peterson, R.L. 2008. A comparative study of mycorrhizas in several genera of Pyroleae (Ericaceae) from western Canada. *Botany* 86: 610-622.
- Rasmussen, H.N. & Whigham, D.F. 1998. Importance of woody debris in seed germination of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 85: 829-834.
- Roy, M., Gonneau, C., Rocheteau, A., Berveiller, D., Thomas, J.-C., Damesin, C., & Selosse M.-A. 2013. Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals *in situ*.

Ecol. Monogr. 83: 95-117.

- Selosse, M.-A. & Roy, M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends Plant Sci.* 14: 64-70.
- Smith, S. E. & Read, D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd Edition. San Diego, CA, Academic Press.
- Tedersoo, L., Pellet, P., Kõljalg, U. & Selosse, M.-A. 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understory Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* 151: 206-217.
- Warcup J.H. 1971. Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids. *New Phytol.* 70: 41-46.
- Whitfield, J. 2007. Underground networking. *Nature* 449: 136-138.
- Yagame, T., & Yamato, M. 2008. Isolation and identification of mycorrhizal fungi associated with *Stigmatodactylus sikokianus* (Maxim. ex Makino) Rauschert (Orchidaceae) *Mycoscience* 49: 388-391
- Yamada A., Kitamura, D., Setoguchi, M., Matsuda, Y., Hashimoto, Y., Matsushita, N., & Fukuda, M. 2008 *Monotropastrum humile* var. *humile* is associated with diverse ectomycorrhizal Russulaceae fungi in Japanese forests. *Ecol. Res.* 23: 983-993.
- 大和政秀, 谷亀高広 2009. ラン科植物と菌類の共生. 日菌報 50: 21-42.
- Yukawa, T., Ogura-Tsujita, Y., Shefferson, R.P., & Yokoyama, J. 2009. Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *Am. J. Bot.* 96: 1997-2009.
- Zimmer, K., Hynson, N.A., Gebauer, G., Allen, E.B., Allen, M.F. & Read, D.J. 2007. Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytol.* 175: 166-175.

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-

辻田 有紀^{1*}・横山 潤²・三吉 一光³・遊川 知久⁴

¹東北大学植物園 〒980-0862 仙台市青葉区川内 12-2

(現所属: 佐賀大学農学部 応用生物科学科 〒840-8502 佐賀市本庄町 1 番地)

²山形大学理学部 生物学科 〒990-8560 山形市小白川町 1-4-12

³千葉大学大学院 園芸学研究科 〒271-8510 千葉県松戸市松戸 648

⁴国立科学博物館筑波実験植物園 〒305-0005 つくば市天久保 4-1-1

Yuki Ogura-Tsujita¹, Jun Yokoyama², Kazumitsu Miyoshi³, Tomohisa Yukawa⁴

Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy

Key words: autotrophy, *Cymbidium*, mixotrophy, mycoheterotrophy, mycorrhizal fungi

¹Botanical Gardens, Tohoku University

12-2 Kawauchi, Aobaku, Sendai, Miyagi 980-0862, Japan

Current address: Department of Applied Biological Sciences, Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjo-machi, Saga 840-8502, Japan

²Department of Biology, Faculty of Science, Yamagata University

1-4-12 Kojirakawa-machi, Yamagata 990-8560, Japan

³Graduate School of Horticulture Laboratory of Ornamental Plant Science, Chiba University
Matsudo, 271-8510, Japan

⁴Tsukuba Botanical Garden, National Museum of Nature and Science
4-1-1, Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

1. はじめに

光合成をやめてしまった植物である菌従属栄養植物は一体どのように進化してきたのか? そのカギは菌根菌との共生関係が狂ってしまったことにある。通常、植物は光合成によってせっせと自分で二酸化炭素と水から有機炭素である糖を合成しながら暮らしている。一方、菌従属栄養植物は光合成ではなく、共生する菌根菌から有機炭素をもらって暮らしている。多くの光合成植物では、光合成で得た炭素を菌根菌に受け渡すかわりに、菌からリンや窒素などの栄養分をもらおうという持ちつ持たれつ関係を保っているが、菌従属栄養植物では、炭素までも菌から搾取してしまうのだ。働かずして炭素をもらえるのだから、彼らの菌根共生は植物にとってまさに「究極」といえる。本総説では、菌従属栄養植物にみられる「究極」の菌根共生パターンを紹介し、ラン科植物をモデルに菌根菌の共生関係がどのように変化していったのか、その謎に迫った私達の研究例を紹介して、最後に本研究分野における今後の展望を考える。

2. 菌従属栄養植物の菌根共生パターン

1990年代から、DNAの情報を利用して菌の種類を特定するいわゆる分子同定法が普及し、世界中の研究者が競ってこの物珍しい植物の菌根菌を調べ上げていった (Cullings et al. 1996, Taylor & Bruns 1997, Selosse et al. 2002 ほか)。情報の集積にともなう見えてきたのは、菌従属栄養植物は近縁な光合成植物とは全く異なる特殊な菌根菌との共生関係を築き上げていたのである。さらに、独立栄養から菌従属栄養への進化は、コケ植物から被子植物まで陸上植物の様々な系統で独立に40回以上おこっているが (Merckx et al. 2013)、菌根共生の特殊化にはいくつかのパターンがあることがわかってきた。

まずは、コケ植物のタイ類スジゴケ科でおこった菌根共生のダイナミックな変化を紹介しよう (図1)。多くのタイ類はグロムス門の菌類とアーバスキュラー菌根共生とよばれる共生系を形成しているが、その中から、菌根菌と共生しない非菌根性の系統が出現し、さらにその中から、担子菌のツラスネラという他と全く異なる種類の菌と共生するスジゴケ科が出現

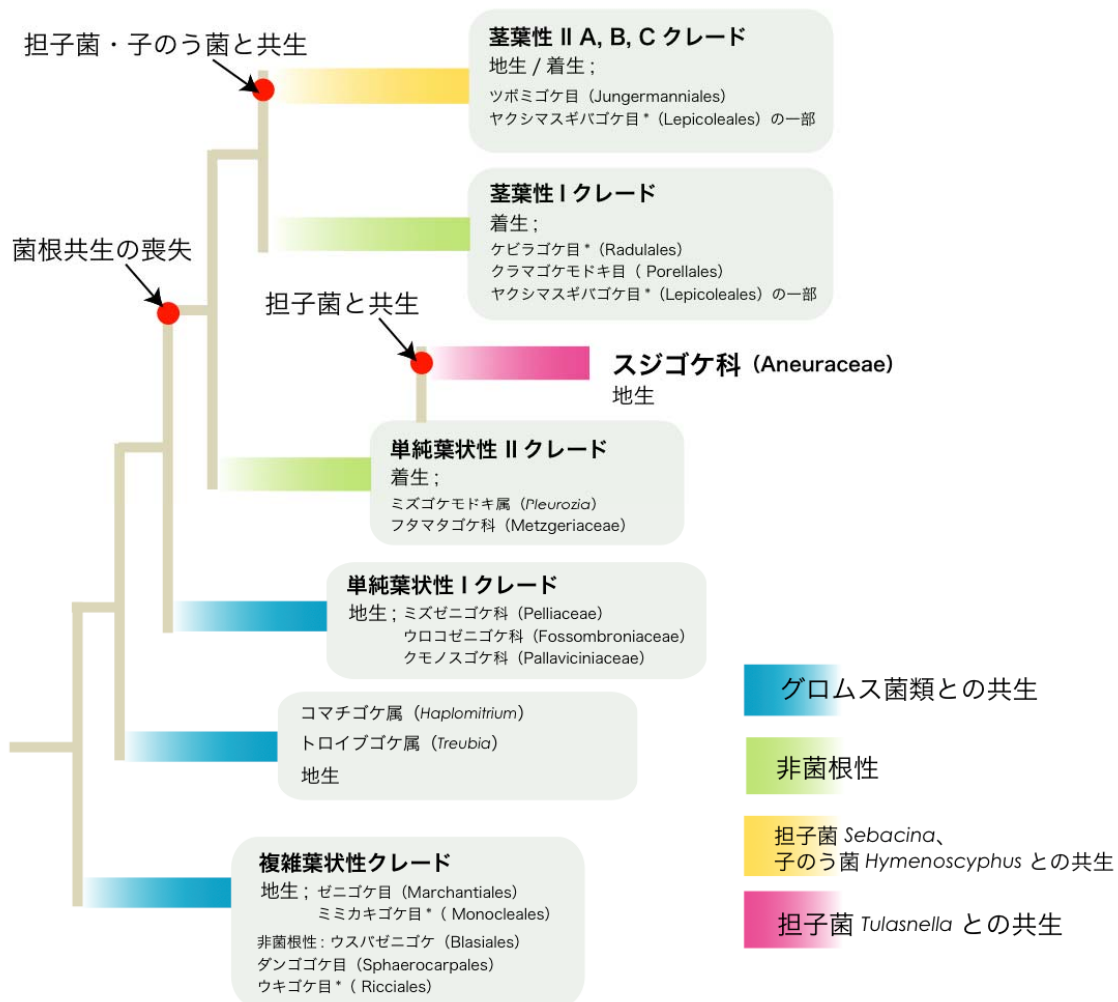


図1 コケ植物タイ類での菌根共生の変化 (Kottke & Nebel 2005 を改変。植物の分類体系は Davis (2004)による)。矢印は共生関係が変化したポイントを示す。*は現在使われていない分類群名で、現在 Lepicoleales は Lepicoleaceae としてツボミゴケ目に、Radulales は Radulaceae としてクラマゴケモドキ目 (Porellales) に、Monocleales は Monocleaceae としてゼニゴケ目に、Ricciales は Ricciareae としてゼニゴケ目に含まれている (嶋村 2012)

する (Bidartondo et al. 2003, Kottke & Nebel 2005)。そしてその後、担子菌と共生する系統の中から、*Aneura mirabilis* (*Cryptothallus mirabilis*)という菌従属栄養植物が誕生した。植物の進化の道のりで、菌根菌との共生関係は大きく変化している。同様に他の系統においても、このような菌従属栄養化に伴う共生関係のダイナミックなシフトが見つかっており、そのシフトパターンは収束する菌の種類によっておおざっぱに2-1から2-3の3つに分けられる。それぞれの共生パターンをもつ植物名や菌の種類は第4章に詳述されているため、ここでは、共生関係のシフトパターンについて焦点をしばって紹介する（さらに詳しい内容は Bidartondo (2005), Smith & Read (2008), Selosse & Roy 2009, Waterman et al. (2013)参照）。

2-1. 外生菌根菌へのシフト

主にツツジ科とラン科の菌従属栄養種に見られ、共生相手は本来樹木と菌根共生を行っている外生菌根菌である。そもそも外生菌根菌は樹木から炭素をもらって暮らしているの、その外生菌根菌から炭素をもらって暮らしている菌従属栄養植物は、結局は周辺の樹木が光合成で得た炭素を菌根菌の菌糸を介して利用していることになる（図2）。このように樹木・菌根菌・菌従属栄養植物という3つの生き物がつながっている状態は、3者共生系とよばれている。

ツツジ科の中で最も古い系統であるドウダンツツジの仲間は、アーバスキュラー菌根性であると報告されていることから (Abe 2005, Obase & Matsuda 2013), ツツジ科はもともとアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) と菌根共生していた可能性が高い。菌従属栄養植物であるギンリョウソウやシャクジョウソウの仲間は、この次に古い系統で、外生菌根性の担子菌類と共生している。おそらくツツジ科では光合成をやめる進化の過程で、菌根菌が AM 菌から外生菌根菌へすりかわってしまったのではないかと予想される。

ラン科では、最も古い系統であるヤクシマランの仲間を含むほとんどの種が、ラン型菌根菌とよばれる担子菌のグループ (ツラスネラ科, ケラトバシディウム科, ロウタケ科の一部を含む) と共生していることから (Yukawa et al. 2009), 菌従属栄養化に伴って、共生する菌がラン型菌根菌から外生菌根菌へシフトしたと考えられる。ラン科は約 25,000 種を含む大きな科であるが、ラン科の中だけでも光合成をやめる進化が 20 回あまりおこっているとされており (Molvray et al. 2000), 外生菌根菌への乗り換えはラン科の中だけでも幾度も繰り返されている。

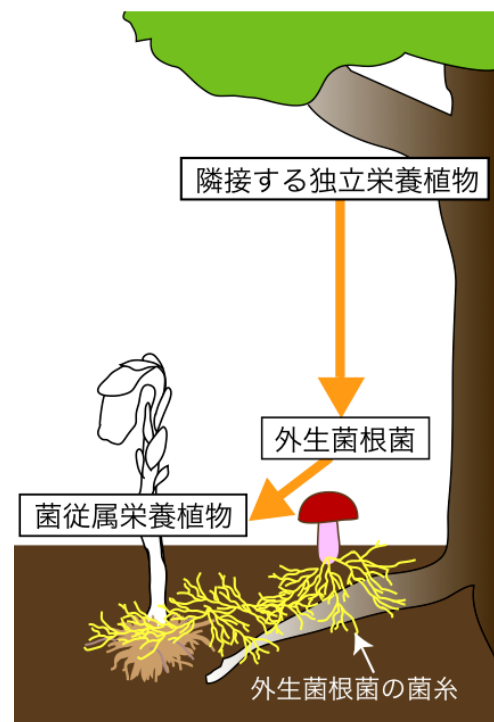


図2 外生菌根菌との3者共生系。矢印は炭素の移動方向を示す

2-2. アーバスキュラー菌根菌との3者共生

ヒナノシャクジョウ科やホンゴウソウ科などにみられ、主にグロムス門のグロムス科（旧 *Glomus* group A）に属する菌根菌と共生するパターンである。一般に、AM菌と共生する独立栄養植物では植物1個体に複数の科にまたがる多数のAM菌が共生しているが、菌従属栄養植物ではグロムス科に属する特定のグループの菌と非常に特異的に共生している場合が多い（Bidartondo et al. 2002, Franke et al. 2006 ほか、ただし、最近では複数の科のAM菌と共生する例外も見つかっており（Merckx et al. 2012）、今後見解が変わる可能性がある）。外生菌根菌と同様に3者共生系を構築し、隣接する独立栄養植物から菌根菌を介して炭素をもらって暮らしている。他のパターンでは、光合成をやめる過程で、共生する菌が全く違う種類にすりかわってしまうことが多いが、本パターンでは、複数の異なる系統の共生パートナーの中からある特定の系統の菌のみと共生するように関係を絞り込んでいったと考えられている（Merckx & Bidartondo 2008）。

2-3. 腐生菌へのシフト

現在のところラン科でのみ発見されているシフトパターンで、木材や落葉落枝を分解する腐生菌類と共生している。先に紹介した2つのパターンでは、菌従属栄養植物は3者共生系によって生きた植物から炭素を搾取していたが、この場合は木材や落ち葉など植物の死骸を分解する菌から炭素をもらって暮らしている（図3）。つまり、菌従属栄養植物の周辺に転がっている倒木や落ち葉、枯れ枝が炭素源になっているのだ。外生菌根菌やAM菌との共生パターンは、どちらの菌も植物から取り出して菌を単独で培養することが難しいため、DNA情報を用いた分子同定法によってごく最近明らかになってきた共生系である。一方、腐生菌は比較的容易に培養できるため（第4章参照）、本共生パターンはかなり古い時代から認識されていた（Kusano 1911, Hamada 1939）。前述したようにラン科の多くはラン型菌根菌と共生していることから、光合成をやめる進化に伴って、共生する菌根菌はラン型菌根菌から木材腐朽菌や落葉分解菌へとシフトしたと考えられる。また、このようなシフトはラン科の中で独立に複数回起こったことがわかっている（Molvray et al. 2000）。

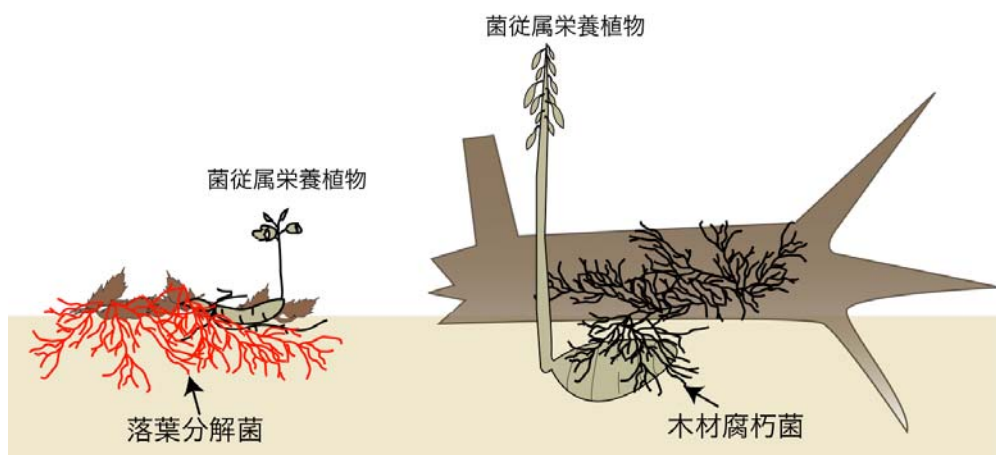


図3 木材腐朽菌や落葉分解菌と共生する菌従属栄養植物のモデル図

3. 菌従属栄養化へのステップ

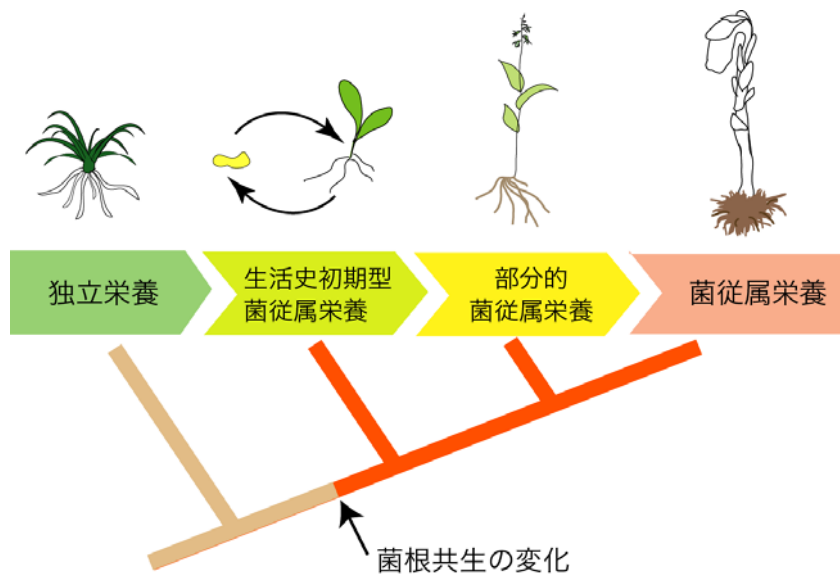


図4 菌従属栄養へのステップ (Merckx et al. 2013 を改変)

光合成をやめる進化の道のりは、1ステップの現象ではなく段階的で、いくつかの中間的なステージがあると考えられている。Merckx et al. (2013) では、次の中間的な2ステップをあげている(図4)。まずはじめに、種子や胞子の発芽時や実生・配偶体世代といった生活史の初期にのみ菌従属栄養というスタイルをとり、

成熟後は独立栄養である

「生活史初期型菌従属栄養」(initial mycoheterotrophy)へ移行する。次に、成熟した個体も菌根菌へ栄養を依存するようになるが、まだ光合成も行っている「部分的菌従属栄養」(partial myco-heterotrophy)のステップへ移り、ついには光合成をやめてしまう完全菌従属栄養(full mycoheterotrophy)となる。これらはラン科をモデルに考えられたパターンであるが、おそらく他の系統でも同様のステップをへていると考えられる。では、前述したような菌根共生の特殊化は、どのステップでおこっているのだろうか。多くの場合、生活史初期型菌従属栄養や部分的菌従属栄養といった中間的なステップに突入した段階ですでにその特殊化がおこっている。つまり、すべての引き金は菌根共生の変化にあるのだ。

4. 菌根共生の変化過程を種分化のレベルで

光合成をやめる進化の道で菌根菌との共生関係がどのように変化したのかを推定するためには、菌従属栄養植物とそれらに近縁な独立栄養植物の菌根菌を比較すればよい。このような比較研究は、ツツジ科を中心に数多く存在した(Bidartondo & Bruns 2002 ほか)。しかし、多くの菌従属栄養植物は、近縁な独立栄養植物といえども非常に縁が遠く(例えば、私達の身近に存在するギンリョウソウに最も近縁な独立栄養植物はドウダンツツジの仲間である)、両者を比較しても正確な変化過程を追うことは難しい。

私達は、ここ日本に奇跡的にごく近縁なグループ間で独立栄養種と菌従属栄養種が分化している植物群をモデルとして発見した。それは、ラン科シュンラン属(*Cymbidium*)植物である。これらは、花屋で見かけるシンビジウムの仲間、独立栄養種、部分的菌従属栄養種、菌従属栄養種のすべてを同一属内に含んでおり、近縁種間で栄養性が爆発的に多様化した植物群である。幸運なことに、この3つの栄養種はすべて日本に自生している。そこで、私達はこのシュンラン属をモデルに、植物の系統解析と菌根菌の調査を行った。

4-1. 植物の系統解析が物語る菌従属栄養化の道のり

植物の分子系統解析により、図5に示すようにシュンラン属はもともと樹上で暮らす着生の独立栄養種であり、その中から地面に降りて暮らすようになった地生の部分的菌従属栄養種が出現し、さらにその中から菌従属栄養であるマヤランとサ

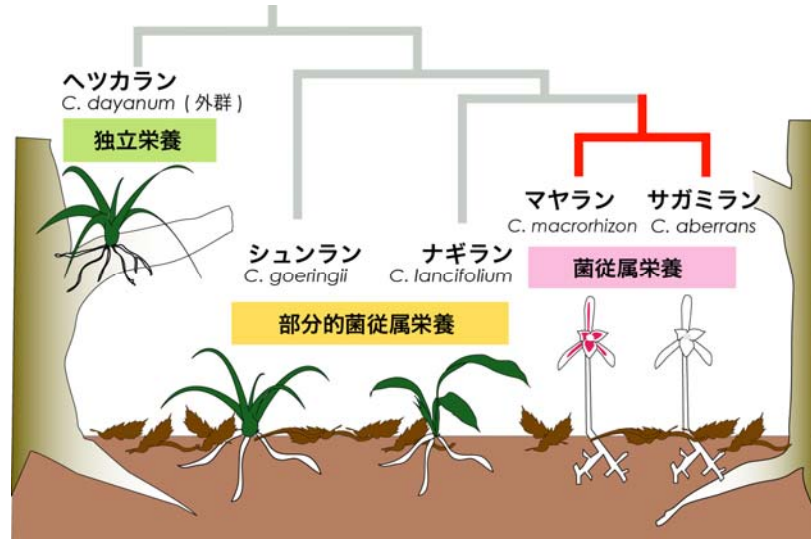


図5 調査したシュンラン属5種とそれらの類縁関係

ガミランの2種が出現したことが明らかになっている (Yukawa et al. 2002, Motomura et al. 2010; 図5)。つまり、シュンラン属では、独立栄養から部分的菌従属栄養という中間段階をへて菌従属栄養へと進化していたのである。またこの研究から、マヤランとサガミランはお互いに姉妹関係にあり、これら2種に最も近縁な光合成をする植物はナギランであることも明らかになった。

そこで私達は、図5にある5種の菌根菌を比較し、植物が独立栄養から部分的菌従属栄養をへて菌従属栄養へと進化していく過程で、菌根菌との共生関係がどのように変化していくのかを追うことにした。

4-2. シュンラン属でおこった菌根菌の変化

それぞれの種について複数の野生集団から、菌根菌が感染している根や地下茎を採集し、菌のDNA情報を利用した分子同定法によって菌の種類を特定した (図6; 詳しくは Ogura-Tsujita et al. 2012)。すると、見つかった菌は大きく2グループに分かれることがわかった。1つ目のグループは、多くのラン科植物が共生相手としているラン型菌根菌であり (以降 A グループと呼ぶ)、もう一つは、外生菌根菌のグループで、ベニタケ科やロウタケ科など主に樹木の主要な外生菌根菌として知られる菌類であった (以降 B グループと呼ぶ)。対象とした5種において、見つかった菌の内訳を調べたところ、独立栄養のヘツカランは A グループの菌のみと共生するが、部分的菌従属栄養の2種は A と B 両方のグループと共生しており、菌従属栄養の2種は B グループのみと共生していることが明らかになった。すなわち、独立栄養→部分的菌従属栄養→菌従属栄養という栄養性の変化に伴い、菌根菌の種類が A→A+B→B と変化しており、菌根菌の変化は A から B へ1ステップで変化するのではなく A+B という中間段階をへて変化していたことがわかったのである。特に、部分的菌従属栄養種ナギランでの結果は興味深く、今回調査した2種の部分的菌従属栄養種のうち、菌従属栄養種に最も近縁な光合成種であるナギランは、もう一種の部分的菌従属栄養種であるシュンランよりも B グループへの依存度がずいぶん高かったのである (図6)。

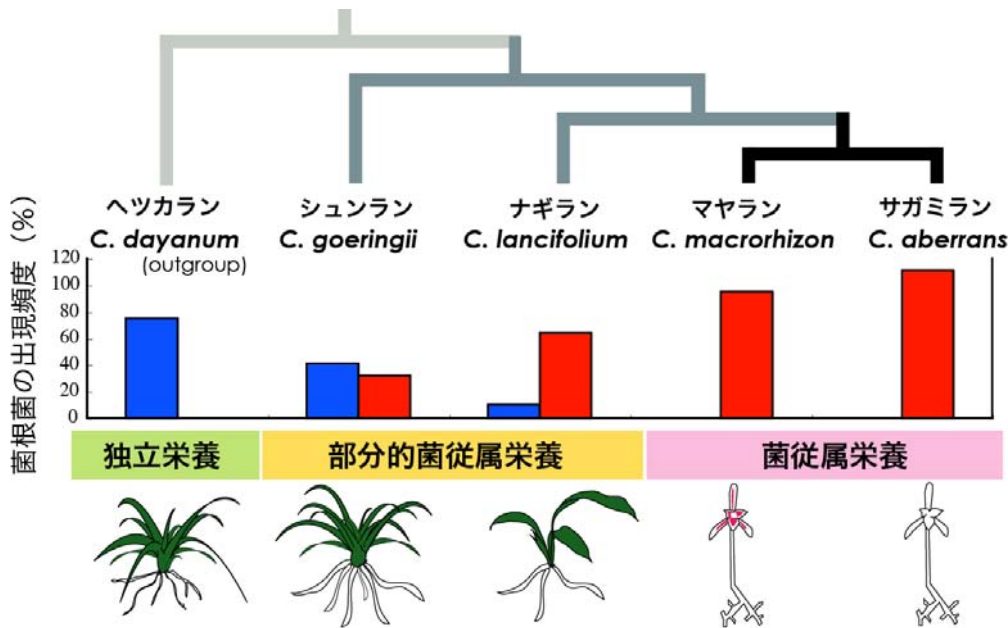


図6 調査したシュンラン属5種で見られた菌根菌の内訳。詳しくは Ogura-Tsujita et al. (2012)参照
つまり、A+B という中間段階においてもいろいろな段階があつて、進化の道のりの中で徐々に B への依存度を高めていったと考えられる。菌根菌が大きく変化する過程にこのような中間段階があつたことは本研究の大きな発見であり、このような中間型が菌根共生の特殊化に非常に大きな役割を果たしているに違いない。

その後、私達はシュンラン属の中で、光合成を行う独立栄養種のスルガランと、光合成をしない菌従属栄養種のマヤランの2種を交配し、雑種をつくることに成功した (Ogura-Tsujita et al. 2014)。両親の形質をあわせもつ雑種集団をうまく使うことによって、菌根菌の変化をはじめ、光合成をやめる進化の道のりにどのような遺伝子の変化があつたのかを調べることができる。現在、この雑種はフラスコの中で綺麗な花をさかせており (図7)、今後の展開が期待される。

5. 今後の展望

菌従属栄養植物にはまだまだ謎が多い。今も世界中で研究が進行しているが、大量の DNA 情報を短時間で解析できるシステムである次世代シーケンサーと、植物と菌根菌を一緒に試験管の中で培養する共生培養系を活用することによって、今後さらにももしろいことがわかりそうだ。菌従属栄養植物の共生相手である菌根菌は、どこでどのように暮



図7 試験管の中で花を咲かせる独立栄養種スルガランと菌従属栄養種マヤランの雑種 (写真提供; 鈴木和弘)

らしているのだろうか？菌根菌は主に地中で生育しているため、その分布や暮らしぶりはほとんど情報がないのが現状である。現在、次世代シーケンサーを使って、採取した土壌中にいるすべての菌類を調べ上げることが可能になってきた (Buée et al. 2009)。メタゲノムと呼ばれるこのような技術を使って、謎めいた菌根菌の生態の一端が明らかになってくるに違いない。また、次世代シーケンサーの技術を使えば、菌従属栄養植物と独立栄養植物のもつ長い長い DNA 情報を直接比較することも可能になる。このような比較研究によって、進化の道のりに伴って起こった様々な形質変化にどのような遺伝子が関わったのかが見えてくるはずだ。

次世代シーケンサーのような最新技術もさることながら、第4章で紹介されているような共生培養系も多くの謎を解決してくれるに違いない。通常、炭素は植物から菌根菌へ受け渡されるが、菌従属栄養植物では炭素の移動方向が逆転し、菌から植物へ移動する。この物質輸送の詳しいメカニズムの解明は、野外で行うのは非常に困難であり、共生培養系を用いた研究で明らかになってくるに違いない。また、このような培養系を使って、植物と菌との認識機構がどのように変化したのかなど生理的な現象を詳しく解明することができる。

光合成をやめる進化の道のりは、実に多様な形質の変化を伴う複雑な道のりである。植物が、なぜ？どうやって？光合成をやめたのか、その疑問に答えるためには、植物生理学、形態学、菌類学、生態学に系統分類学など、実に多様な学問をまたいで研究を行う必要がある。菌従属栄養植物の知名度はまだまだ低く、今後様々な分野の研究者が本植物に興味を持ち、多面的なアプローチで進化の道のりが解明されて行くことを期待したい。また、菌に頼る生き方ゆえ、菌従属栄養植物は環境の変化に非常に弱く、多くの種が絶滅の危機に瀕している。現在は彼らを守るべきがほとんどないため、世界の各所でひっそりと姿を消しているのが現状だ。今後の研究成果によって、本植物を保全する道が開かれることを願ってやまない。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は日本学術振興会・科学研究費補助金 (21370038, 24370040, 2440185) の助成を受けて行われた。本研究を遂行するにあたりご指導いただいた先生方、サンプル採集にご協力いただいた皆様に厚く御礼申し上げます。また、本稿執筆にあたりコケ植物の系統についてご助言いただいた榊原恵子氏に深謝する。

引用文献

- Abe, J.P. 2005. An arbuscular mycorrhizal genus in the Ericaceae. Abstracts of the Mycological Society of America/ the Mycological Society of Japan Joint Meeting 2005, Hilo, Hawaii.
- Bidartondo, M.I., Redecker, D., Hijri, I., Wiemken, A., Bruns, T.D., Dominguez, L., Sersic, A., Leake, J.R., & Read, D.J. 2002. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 419: 389-392.
- Bidartondo, M.I., & Bruns, T.D. 2002. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Mol. Eco.* 11: 557-569.
- Bidartondo, M.I. 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytol.* 167: 335-352.

- Bidartondo, M.I., Bruns, T.D., Weiss, M., Se'rgio, C., & Read, D.J. 2003. Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 835-842.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., & Martin, F. 2009. 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184: 449-456.
- Cullings, K.W., Szaro, T.M., & Bruns, T.D. 1996. Evolution of extreme specialization within a lineage of ectomycorrhizal epiparasites. *Nature* 379: 63-66.
- Davis, E.C. 2004. A molecular phylogeny of leafy liverworts (Jungermanniidae: Marchantiophyta). In: Goffinet, B., Hollowell, V., & Magill, M.R. (eds.) *Molecular Systematics of Bryophytes (MSB 98)*. pp. 61-86. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO, USA.
- Franke, T., Beenken, L., Döring, M., Kocyan, A., & Agerer, R. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi of the *Glomus*-group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in mycoheterotrophic plants from tropical Africa. *Mycol. Prog.* 5: 24-31.
- Hamada, M. 1939. Studien über die Mykorrhiza von *Galeola septentrionalis* Reichb. f. Ein neuer Fall der Mykorrhiza-Bildung durch intraradicale Rhizomorpha. *Jpn. J. Bot.* 10: 151-211.
- Kottke, I., & Nebel, M. 2005. The evolution of mycorrhiza-like associations in liverworts: an update. *New Phytol.* 167: 330-334.
- Kusano, S. 1911. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. *J. Coll. Agric. Univ. Tokyo* 4: 1-66.
- Merckx, V., & Bidartondo, M.I. 2008. Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proc. R. Soc. B.* 275: 1029-1035.
- Merckx, V., Janssens, S.B., Hynson, N.A., Specht, C.D., Bruns, T.D., & Smets, E.F. 2012. Mycoheterotrophic interactions are not limited to a narrow phylogenetic range of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Ecol.* 21: 1524-1532.
- Merckx, V.S.F.T., Mennes, C.B., Peay, K.G., & Geml, J. 2013. Evolution and diversification. In: Merckx, V.S.F.T. (ed) *Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi*. pp. 215-244. Springer, New York.
- Molvray, M., Kores, P.J., & Chase, M.W. 2000. Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters. In: Wilson, K.L. & Morrison, D.A. (eds.) *Monocots: systematics and evolution*. pp. 441-448. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation Publishing, Melbourne, Australia.
- Motomura, H., Selosse, M.A., Martos, F., Kagawa, A., & Yukawa, T. 2010. Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: Evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Ann. Bot.* 106: 573-581.
- Obase, K., Matsuda, Y., & Ito, S. 2013. *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae) is commonly associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23: 199-208.
- Ogura-Tsujita, Y., Yokoyama, J., Miyoshi, K., & Yukawa, T. 2012. Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 99: 1158-1176.
- Ogura-Tsujita, Y., Miyoshi, K., Tsutsumi, C., & Yukawa, T. 2014. First flowering hybrid between autotrophic and mycoheterotrophic plant species: breakthrough in molecular biology of mycoheterotrophy. *J. Plant Res.* 127: 299-305.

- Selosse, M.A., Weiß, M., Jany, J.L., & Tillier, A. 2002. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Mol. Ecol.* 11: 1831-1844.
- Selosse, M.A., & Roy, M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends Plant Sci.* 14: 64-70.
- 嶋村正樹 2012. コケ植物. 戸部 博・田村 実 (編) 新しい植物分類学II. pp. 1-12. 講談社. 東京.
- Smith, S.E., & Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, third edition, Academic press, San Diego.
- Taylor, D.L., & Bruns, T.D. 1997. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4510-4515.
- Waterman, R.J., Klooster, M.R., Hentrich, H., & Bidartondo, M.I. 2013. In: Merckx, V.S.F.T. (ed) Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi. pp. 267-296. Springer, New York.
- Yukawa, T., Miyoshi, K., & Yokohama, J. 2002. Molecular phylogeny and character evolution of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo* 28: 129-139.
- Yukawa, T., Ogura-Tsujita, Y., Shefferson, R.P., & Yokoyama, J. 2009. Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *Am. J. Bot.* 96: 1997-2009.