

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

2009年3月 自然環境学専攻 自然環境評価学分野 076718 坂田益朗

指導教員 教授 福田健二

キーワード:アーバスキュラー菌根菌(AM菌), 小笠原諸島,

固有種, 外来種, 絶滅危惧種, DGGE法

1、はじめに

アーバスキュラー菌根菌(Arbuscular Mycorrhizal Fungi, 以下 AM 菌)は植物体と共生関係を結ぶ土壤微生物の一種である。AM 菌は宿主植物の根内から土壤中に菌糸を伸ばすことによって、植物が養分を吸収できない範囲からも無機養分を吸収し、宿主植物に供給している。一方、宿主植物から光合成産物である有機物を受け取っている。このような養分の授受により、一般に AM 菌が感染すると植物の成長が促進される。この効果を利用し、海外では絶滅危惧植物の保護育成に AM 菌が導入されてきているが、日本国内ではまだ実用例はなく、土壤中の AM 菌群集構造や各菌種の地理的分布に関しても不明な点が多い。

本研究においては、多くの固有植物が絶滅の危機に瀕している小笠原諸島に着目し、小笠原諸島の植物に共生している AM 菌群集構造を把握することを目的とした。小笠原諸島では、島内にどのような AM 菌が分布しているかといった生態系保全の基礎となるインベントリー的知見は皆無である。島内での植物と AM 菌の共生関係を把握することは、絶滅危惧種保全への重要な基礎的知見になると考えられる。

2、材料と方法

2008年6月～7月に、小笠原諸島の兄島、父島、南島、母島から計40科73種の植物根を採取した。第3章ではまず小笠原諸島での AM 菌の存在有無を確認するために、採取したすべての植物種の根をトリパンブルー溶液で染色し、根内 AM 菌の光学顕微鏡観察を行った。第4章では、rDNA による共生 AM 菌種の推定を行った。PCR 産物中には複数の AM 菌のクローンが存在しているため、塩基長が同程度の DNA を塩基配列の違いによって分離できる DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法によって分離し、主要な DNA バンドの塩基配列に関して DNA シーケンサー(3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)により解読した。

3、結果と考察

(1) 染色観察による AM 菌の存在有無の確認

小笠原諸島で採取された植物40科73種のうち、65種の根内で AM 菌の存在が確認された。日本国内の海洋島における AM 菌の存在を示した研究は本研究が初めてである。北海道や本州、沖縄では AM 菌の存在が既に確認されているので、国内のほぼ全域に AM 菌が存在していると考えられる。

小笠原諸島の固有植物種には、30種中26種に AM 菌が見られた。小笠原諸島固有属であるミ

カン科シロテツ属のオオバシロテツ *Boninia grisea* Planch., キク科ワダンノキ属のワダンノキ *Dendrocacalia crepidifolia* (Nakai) Nakai の両種ともに AM 菌の感染が見られた。現在小笠原諸島の原生植生に甚大な悪影響を与えている外来種のアカギ *Bischofia javanica* Blume には高い感染率で AM 菌が感染していた。感染率は、一般に AM 菌と植物との親和性を示す指標であることから、アカギの異常繁茂の原因のひとつとして AM 菌を効果的に利用している可能性が示された。

小笠原諸島固有種は現在 107 種が環境省発行のレッドデータブックに掲載されている。今回の調査ではその内の 27 種を採取できた。その内、シマイガクサ *Rhynchospora boninensis* Nakai を除く全ての絶滅危惧種に AM 菌が感染していた。絶滅危惧種保護育成事業への AM 菌の導入により、育成施設内での植物の成長促進効果が期待できる。

(2) PCR-DGGE 法を用いた根内 AM 菌種の推定

18S rDNA を対象にした PCR-DGGE 法で得られた 51 のクローンから合計 19 系統が得られた。 *Glomus* 属, *Acaulospora* 属, *Diversispora* 属の存在が示唆された。中でも, *Glomus* 属が 14 系統ともっとも多かった。 *Gigaspora* 属, *Scutellospora* 属は検出されなかった。アカギには *Glomus* 属の 1 種 GloS4 が感染していた。GloS4 は 4 島全てのサンプルで見られ, 固有種にも感染していた。アカギに共生している AM 菌は小笠原諸島に広く分布している種であることが示唆された。

28S rDNA を対象にした PCR-DGGE 法では 49 クローンから合計 13 系統が得られた。 *Glomus* 属, *Acaulospora* 属は 18S の解析と同様に得られたが, *Diversispora* 属は得られなかった。一方, 18S では得られなかった *Gigaspora* 属が 28S では検出された。NosL1 は既知種との相同性検索で類似配列が得られなかったが, 系統解析では *Glomus* 属と思われるグループに入った。つまり, NosL1 は新種の AM 菌である可能性が示唆され, 小笠原諸島の固有種であるかどうか興味を持たれる。

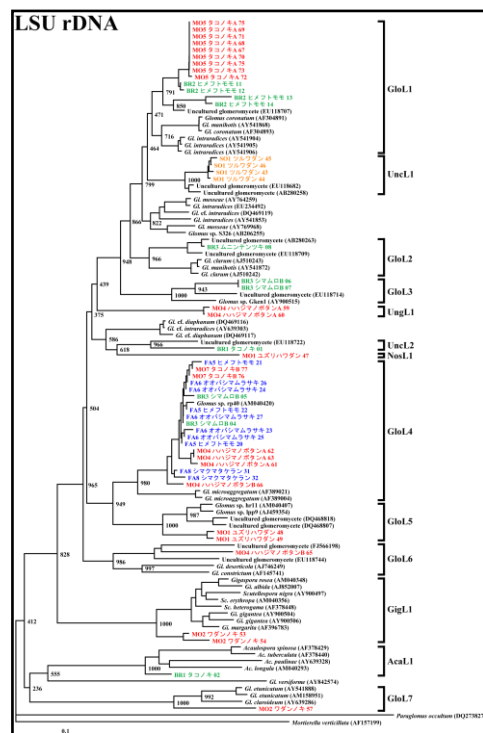


Fig. 1 28S LSU rDNA による AM 菌の系統解析

4. まとめ

本研究により, 小笠原諸島での AM 菌の存在が初めて示された。ほとんどの絶滅危惧種の根に AM 菌が存在しており, それらの保護育成に AM 菌が利用できることが示された。外来種であるアカギにも高い感染率で AM 菌が存在していた。アカギに感染していた菌種は小笠原諸島に広く分布していることが示唆され, 今後のアカギの動態にも更なる注意が必要である。AM 菌 rDNA による系統解析の結果, 小笠原諸島には新種の AM 菌が存在していることが示唆された。

Community structure of Arbuscular mycorrhizal fungi colonizing plant roots in the Bonin (Ogasawara) islands, Japan.

March, 2009 Department of Natural Environmental Studies

Laboratory of Evaluation of Natural Environment 076718 Masurou SAKATA

Supervisor: Professor Kenji FUKUDA

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), The Bonin (Ogasawara) islands, Endemic, Alien, Endangered, DGGE method

1, Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are symbiotic fungi in plant roots. In return for a food supply of plant photosynthate, AMF extend the reach of the plant root system, improving the uptake of water and nutrients. Recently, AMF are introduced for enhancing the plant growth including endangered species in abroad. There are no researches about conservations of endangered plant species by using AMF in Japan. For such purpose, to know AM fungal communities on endangered plants and geographical distributions of AM fungal species are the most important scientific bases, however, there is little knowledge on AMF communities on Japanese plants.

In this study we investigated the presence and community structure of AMF in the Bonin (Ogasawara) islands, where many endemic species are endangered and no research on AMF has been conducted. To reveal the symbioses between plants and AMF in these islands is needed for more effective conservations of endangered species.

2, Materials and Methods

Seventy three plant species including endemic plants were sampled during June to July of 2008 in 4 islands; Ani-jima (Elder brother island), Chichi-jima (Father island), Minami-jima (South island) and Haha-jima (Mother island). To check the presence/absence of AMF in the Bonin islands plants, roots were stained with trypan-blue and infection rate of AMF was evaluated to 3 levels under a microscope. Identifications of AM fungal species in the roots were done by below DNA methods.

The rDNA of AMF in plant roots were amplified by nested PCR, and 2 primer pairs were used for identification AM fungal species. Each primer pairs targets on different regions, *i.e.* SSU (18S) and LSU (28S). Since PCR products usually contain several AM fungal clones, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analysis was used to separate each clone. After the DGGE, prominent DNA bands were cut out from the gel, and extracted DNA were analyzed by DNA sequencer (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

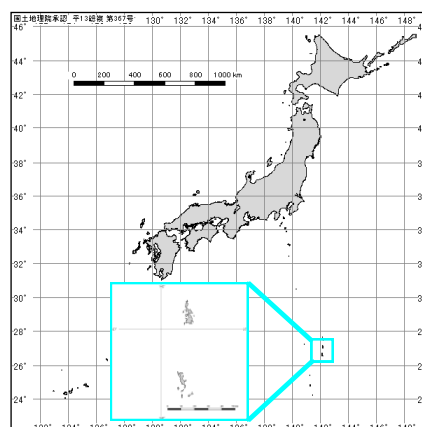


Fig.1 The location of the study

sites, the Bonin islands in Japan.

3, Results and Discussions

(1) AM colonization

AMF existences were confirmed for 65 plants of the Bonin islands. This is the first report that showed the existence of AMF in the oceanic island in Japan. As in other regions of Japan (Hokkaido, Honshu and Okinawa), AMF have been confirmed, so it is suggested that AMF are ubiquitous for all terrestrial ecosystems. For 26 endemic plant species, AMF were found in their roots. *Boninia grisea* Planch and *Dendrocacalia crepidifolia* (Nakai) Nakai (endemic genera in the Bonin islands) also had AMF. On the other hand, *Bischofia javanica* Blume, an infamous alien plant species in the Bonin islands, showed high infection rates. It is seemed that high infection rate of AMF inabled *B. javanica* to invade widely into the Bonin islands. Among 107 species facing extinction (RDB), we sampled 27 endangered species here. The roots of 26 endangered plants had AMF. This result suggested that AMF will work effectively in the conservation these species.

(2) AMF identification using the DGGE analysis

By the 18S rDNA analysis, 19 phylotypes were identified and *Glomus* spp. , *Acaulospora* spp. and *Diversispora* spp. were clustered. *Glomus* contained 14 phylotypes, while no *Gigaspora* sp. or *Scutellospora* sp. were found. A widespread *Glomus*, “GloS4”, which was found from all 4 islands including endangerd species, also colonized roots of alien *B. javanica*.

By the 28S rDNA analysis, 13 phylotypes were identified including *Glomus* spp. , *Acaulospora* spp. and Gigasporaceae sp. , while no *Diversispora* sp. was identified. From the result, a novel AM fungal species (NosL1) was found. Its taxonomical description and whether this species is an endemic AMF in the Bonin islands should be examined in further studies.

4, Conclusion

This study is the first report to show the existence of AMF in the Bonin islands. Most of the endangered species had AMF in their roots, and these results suggested that AMF can be applied for the conservation of these plant species.

The roots of the alien species *B. javanica* showed high AM fungal infection rates, and the same AMF were widely distributed throughout the islands. Therefore, further attention of the future dynamics of *B. javanica* should be necessary.

From the phylogenetic analysis of AM fungal rDNA, a novel AM fungal species was shown to exist in the Bonin islands.

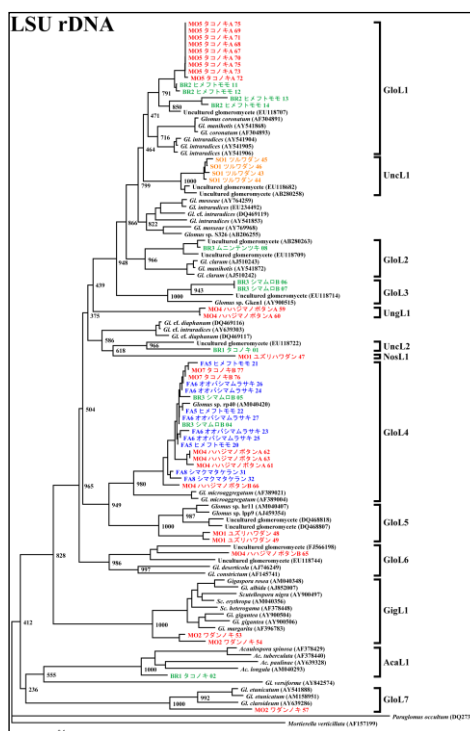


Fig. 2 The neighbor-joining tree analyzed by partial 28S LSU rDNA of AMF