

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06737

研究課題名(和文) カシ類とそれに特異的な内生菌の親和性をSSRおよび菌特異的マーカーにより解明する

研究課題名(英文) Revealing the relationship between evergreen oak and host-specific endophyte by genetic marker.

研究代表者

松村 愛美 (Matsumura, Emi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：40747565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：既往研究より森林の孤立化による宿主特異的な内生菌の遺伝的多様性の低下が推測された。そこでカシ類とそれに特異的なTubakia科菌の関係を検討するため、本科菌の宿主特異性および遺伝構造を調査した。その結果、日本全国的なカシ類葉の内生菌群集では複数の未記載種を含むTubakia科の菌がカシ類で優占していた。シラカシに特異的なTubakiaceae sp.1のマイクロサテライト解析により森林間の遺伝的分化や有性生殖の可能性を示した。また孤立林調査では、Tubakiaceae sp.1は林床の落葉の有無が感染率に影響すること、またその感染源の飛散距離が100m程度であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主である樹木と共生菌類の相互作用について理解することは、生物多様性の評価だけでなく森林保護上でも大変重要と考えられる。本研究でカシ類とTubakia科菌の系を例に樹木と内生菌の密接な関係の一端が明らかになった。また本研究で得た未知の7菌種と近年問題になっている米国ナラ類を枯死させる菌種とは同科ながら遺伝的に遠いことが分かり、今後、病原性と系統進化について整理することが森林保護でも役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In our previous studies, it was speculated that genetic diversity of host-specific endophytes decrease by forest isolation. To reveal the relationship between evergreen oak and its specific tubakiaceous fungi, I investigated host-specificity of tubakiaceous fungi and fungal genetic structure. As a result, Tubakiaceous fungi with seven new species dominated endophytic fungal community of evergreen oak leaves in Japan. A microsatellite analysis of Tubakiaceae sp.1, which is a specialist of *Quercus myrsinifolia* leaves, showed genetic differentiation among forests and possibility of sexual reproduction. Isolated forest survey suggested that infection frequency of Tubakiaceae sp.1 was affected by presence of fallen-leaves and estimated dispersal distance of infection resource is about 100m.

研究分野：森林微生物生態学

キーワード：マイクロサテライト解析 森林の孤立化 宿主特異性 内生菌 カシ Tubakia

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代は第 6 の大量絶滅時代と言われ、生物間の関係が生物多様性や生態系全体にどの程度寄与しているのかを解明することが現在の課題であり、まず基礎データの収集が急務である。本研究で対象とする植物内生菌 (endophytic fungi) は、病気を示さず生きた宿主植物の組織内に感染しており、広義の共生者である。それら内生菌は様々な植物種に普遍的に生息する。また同じ種で多様な生態 (先駆的分解者、潜伏性病原菌、相利共生者) を有するものも珍しくなく、物質循環や生物間相互作用等で生態系において重要な役割を担っていると期待されるが、未解明な部分が多い。

樹木の内生菌では孢子により水平伝播する種が多く、宿主の系統と器官、環境により群集構造が決定すると考えられている。先行研究では、都市環境の劣化に着目し山地林と都市近郊林の内生菌群集を比較し、内生菌群集と樹種・気候環境・空間分布と対応関係を把握した上で、都市化による森林の孤立が温帯林の樹木内生菌群集に与える影響を明らかにした。都市近郊林ではスペシャリストの感染率は、その宿主密度の低下により感染源そのものの量が制限されることにより低下する。それに加えてジェネラリストの感染率が増えることに困っていたと示唆された。特にスペシャリストの遺伝的多様性の低下が推測された。

またカシ類葉ではスペシャリストである *Tubakia* 科に属する菌種が複数出現した。カシ類は日本で広く分布するが、複数種が混在する場合や一種が圧倒的に優占するなど多様であり、カシ類同士のすみ分けについてよく分かっていない。カシ類と内生菌の相互関係を解明することで、両者の基礎生態を理解する一助となる。さらに、近年、同科の *Tubakia* 属菌が海外でコナラ属の樹木に甚大な被害を及ぼしており、これら菌種との関係を明らかにすることが森林保護の観点でも急務である。

2. 研究の目的

これまでの研究結果より孤立林ではスペシャリストの遺伝的多様性が低下している可能性が考えられた。そこで本課題ではカシ類とそのスペシャリスト *Tubakia* 科菌の関係を検討するため、本科菌の宿主特異性および遺伝構造を調査した。

3. 研究の方法

(1) 日本全国的なカシ類の *Tubakia* 科菌の宿主特異性

調査地として東京大学付属の千葉演習林および樹芸研究所 (静岡) 高尾山 (東京) 鳥取、福知山 (京都) 綾 (宮崎) に位置する自然性の高い 7 つの森林を選定した。2016 年から 2017 年に、カシ類を対象に各樹種 3 個体以上から各個体 10 から 15 枚葉の健全な当年葉を採集した。

また、千葉演、樹芸研、高尾山では夏・冬の 2 度調査し、季節差異を検討した。葉をアンチホルミン・エタノール系で表面殺菌し、1 葉から直径 6 ミリのディスク 1 片を作成し、1/2 濃度の PDA 平板培地に静置し、20°C 暗黒下で培養した。分離株は形態分類 (菌叢や孢子) および分子生物学的分類 (rDNA の ITS 領域) で種を確立した。各種の分離頻度 (%) を各菌種が分離された供試片数 / 全供試片数 × 100 で算出し、菌群集組成の類似構造を PerMANOVA、NMDS で解析した。また宿主特異性を宿主種数と分離頻度を加味した指数である宿主特異性指数 S_i (Rohde 1980) で算出した。また *Tubakia* 科菌においては、孢子発芽率、菌糸伸長速度、病原性を調査した。

(2) SSR マーカーの開発と遺伝構造の推定

シラカシに特異的な種 *Tubakiaceae* sp.1 の培養菌系体から全ゲノム解析データ (de novo, Hiseq) よりマイクロサテライト (SSR) (3.4 繰り返し配列、リピート数 10~15) を検索し、マーカーを作成後に、増幅・多型チェックを行った。今回新たに作成した 8 マーカー対を用いて、これまで自身で得た、茨城、千葉、東京、静岡、愛知、京都、鳥取、宮崎の計 12 森林由来の 195 菌株について多型解析を行った。

(3) 千葉県柏市南部における森林の分断化とシラカシ内生菌群集

森林の孤立度とシラカシ葉内生菌群集との関係を検討した。森林の孤立度と周辺環境を明らかにするため、柏市の南半分を対象とし現存植生図 (環境省) を基に土地利用情報を GIS にて解析した。孤立度の異なる森林または公園 18 か所を調査地として、各調査地でシラカシ 5 個体から健全葉 3 枚ずつを採集し、1 枚当たり 2 片ずつから内生菌の組織分離を行った。種同定は (1) と同法とした。分離菌株の種数や株数、主要な種の菌株数を応答変数として、調査地の面積、落

葉の有無、最も近い森林までの距離、50 m、100m、200m、300 mそれぞれのバッファー内に含まれる森林面積とその占める割合、土地利用別の面積等を説明変数として、GLMによるモデリングを行った。

4. 研究成果

(1) 日本全国的なカシ類の *Tubakia* 科菌の宿主特異性

7 調査地において 1980 葉片から 2467 菌株を分離した。計 45 属 180 種のうち *Tubakia* 科が最も高頻度に分離され、*Xlaria*、*Diaporthe* 属菌が多く分離される傾向が見られた。イチイガシでは調査した 4 調査地全てで全く *Tubakia* 属菌が分離されなかった。また宮崎ではブナ科のカシ以外（マテバシイ属、シイ属）からも分離したが同様に *Tubakia* 属菌は全く分離されなかった。PerMANOVA の結果、カシ類の内生菌群集組成は宿主樹種、調査地、季節で有意に異なっており（ $p < 0.001$ ）、宿主樹種で最も高い寄与率を示した。NMDS の結果とも整合的であった。

Tubakia 科に絞って検討すると、*Tubakia* 科菌は宿主特異指数（ S_i ）が 1 から 0.94 の選好性の強い 5 種（*Paratubakia subglobosa*、*Tubakiaceae* sp.QA-b、T. sp.1、T. sp.4、T. sp.5）、 S_i が 0.88 ~ 0.61 の選好性の弱い 3 種（*Tubakia dryina*、T. sp.2、T. sp.3）に大別された。ウバメガシ、アカガシ、シラカシ、アラカシではスペシャリストが第 1 位優占菌であった。またアラカシにはスペシャリスト種が多い傾向があった。*Tubakia* 属菌の優占度には季節間の差異や地域差が見られた。

菌糸成長速度は 20°C または 25°C で最大となり最速の *T. dryina* と最遅の T. sp.4 では 5 倍の差異があった。*T. dryina*、T. sp.2、T. sp.3、*P. subglobosa*、T. sp.QA-b、T. sp.1、T. sp.4 の順に速く、孢子発芽率、宿主選好性の差異とよく対応していた。病原性試験では、無傷区では、どの菌種も病斑を形成しなかった。一方、有傷区ではカシ類の多種に内生する *T. dryina*、T. sp.2、3 で病斑形成が高率かつ病斑サイズも大きかった。続いて *P. subglobosa* であり、T. sp.1、QA-b は形成率も低く、病斑も小さかった。宿主選好性の高い種は病原性が弱い傾向にあった。今回、未記載 7 菌種については、新種として記載予定である。

(2) SSR マーカーの開発と遺伝構造の推定

調査した 198 菌株は、174 の遺伝子型に区別され、うち 139 はそれぞれ 1 菌株からのみ検出された。ほとんどの調査地間で Fst が有意な値を示し、調査地間で遺伝的分化があることを示した。またベイズクラスタリングによる遺伝子型をグルーピングしたところ、5 系統に分かれた。近い森林同士では系統の組成が類似する傾向が見られた。このことから、地域分化の可能性が考えられたが、さらに地点数およびサンプル数を追加すれば、より頑健な結果を得られると考えられる。また連鎖不平衡の指標の算出により、4 調査地中 3 調査地で、またいずれの系統でも有性生殖の可能性を示した。*Tubakia* 科では本菌種同様、有性世代が見つからない種が多く、今後の発見に期待が高まる。

(3) 千葉県柏市南部における森林の分断化とシラカシ内生菌群集

18 調査地から 36 種 431 菌株が分離された。各調査地で分離された菌株数は 10 ~ 38、種数は 5 ~ 14 であった。*Tubakiaceae* sp.1、*Tubakiaceae* sp.2、*Colletotrichum* spp.、*Phyllosticta* spp.、*Phomopsis* spp.などが主に分離された。GLM によるモデリングでは、T. sp.1 の菌株数に対し、落葉の有無が有意な正の影響を、最も近い森林までの距離が有意な負の影響を示した。出現種数、出現属数、全出現菌株数、T. sp.2 の菌株数に対しては有意な要因はみつからなかった。シラカシのスペシャリストとして知られる T. sp.1 の菌株数に対して落葉の有無が正の影響を示したことから、T. sp.1 は落葉上に形成される孢子が感染源となっていることが示唆された。また、最も近い森林までの距離が T. sp.1 の菌株数に対して負の影響を示し、最も近い森林までの距離が 100 m を超える調査地では T. sp.1 はほとんど分離されなかった。このことから、T. sp.1 の孢子が感染可能な距離は 100 m 程度であろうと推測された。一方で、カシ類の多くに共通する菌である T. sp.2 の菌株数はどの要因からも有意な影響を受けておらず、300 m までの範囲では分散制限が起きていないと考えられた。種数、属数、全菌株数は、どの要因からも有意な影響を受けていなかったことから、森林の孤立はスペシャリストである T. sp.1 のみに影響を及ぼし、ジェネラリストである T. sp.2 の感染には影響を及ぼさないことが分かった。今後はさらにマイクロサテライト解析を行い、遺伝的多様性の差異を調査予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松村愛美・森永健太・福田健二
2. 発表標題 カシ類の葉内生菌群集の宿主選好性と培養特性
3. 学会等名 日本生態学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松村愛美・森永健太・福田健二
2. 発表標題 カシ類の葉に優占する内生菌Tubakia spp.の病原性
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森永健太・松村愛美・福田健二
2. 発表標題 カシ類樹木の葉内生Tubakia属菌群集の生態
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森永健太・松村愛美・福田健二
2. 発表標題 異なる3地点におけるカシ類葉内生Tubakia属菌群集の比較
3. 学会等名 樹木医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松村愛美・松下範久・福田健二
2. 発表標題 カシ類の葉に内生するTubakiaceae sppの多様性
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村愛美・福田健二
2. 発表標題 Tubakia科の未記載7種の形態的、遺伝的および生態的特徴
3. 学会等名 樹木医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村愛美・土井隆宏・松下範久・福田健二
2. 発表標題 都市近郊の孤立林におけるシラカシ葉の内生菌群集
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----