

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06119

研究課題名(和文) 木本植物の葉の内生菌の定着を規定する要因の解明

研究課題名(英文) Factors that regulate colonization of endophytic fungi on leaves of woody plants

研究代表者

橋本 靖 (Hashimoto, Yasushi)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：40332481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物の葉や根には内生菌と呼ばれる菌類が病徴を示さずに一般的に定着している。これらの内生菌の存在が宿主植物にとってどのような意味があるのか、また、定着する菌類側はどのような生活をしておりどのように宿主植物を選んで定着しているのかなど、基礎的なことは分かっていない。この研究では、同じ環境下で近接して暮らしている樹木種4種の生きた葉の中にある内生菌の種構成を比較することから、植物の分類群や根系で特異的に選ばれている共生微生物との関連を明らかにすることを目的とした。その結果、分類群が近い樹種では似た分類群の内生菌が定着し、分類群が遠い樹種ではより異なる内生菌群集を持つことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の根系の共生菌類では、宿主特異性や機能性がかなり判ってきており、農作物管理への応用や希少植物の保全に役立つ情報が蓄積されている。しかし、地上部に定着している共生菌類が、どのような傾向を持って宿主植物に定着しているのか、特に樹木では、これまでほとんど明らかではなかった。その理由は、極めて多様な内生菌類が検出されるものの、樹木の大きさ故に定着の傾向を、環境要因などを絞り込んで比較することが出来にくいためであった。今回、同じ環境下で同所的に定着している複数の異なる性質の矮性樹種を比較することが出来たため、地上部の内生菌類の特異性の傾向が、宿主の分類群にある程度依存することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In general, it is known that various endophytic fungi colonize the leaves and roots of most plants without showing disease symptoms. However, it is not well understood what benefits the presence of these endophytic fungi have for the host plants. In addition, the basic ecology of how endophytic fungi choose host plants and colonize them remains unclear. The purpose of this study was to clarify the relationships between plant taxa, symbiotic microorganisms specifically selected in their root systems, and endophytic fungi colonizing leaves. In this study, we compared the species composition of endophytic fungi in the living leaves of four tree species living in close proximity under the same environment. The results showed that taxonomically related tree species had similar endophytic fungal communities, while tree species with distant taxonomic groups had different endophytic fungal communities.

研究分野：微生物生態学

キーワード：樹木 内生菌 共生 宿主特異性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の葉や根には、様々な菌類や細菌類が病徴等を示さずに広く定着し、植物と共生していることが知られている。これらの共生微生物は、定着部位や様式によって、菌根菌・根粒菌・内生菌などと呼ばれ、養分の吸収を補助したり、病害を防いだりする働きを示すものも多いことが、先行研究から示されている。特に、根系の共生菌である菌根菌や根粒細菌の働きは、植物の窒素やリンなどの土壌中の無機養分の獲得において、なくてはならない関係性を持つことが明らかになっており、植物の定着から成長を助けて相利的な共生関係を持っていると考えられる。また、それら根系の共生微生物は、マメ科植物と根粒細菌の関係や、アカマツと菌根菌であるマツタケの関係のように、宿主植物ごとに共生関係を持つことが出来る対象の微生物が、ある程度厳密に決まっている宿主特異性が見られることが判っている。このように、植物の根系の共生微生物に関しては、宿主特異性や生態的な機能が現在かなり判ってきており、農作物管理への応用や、希少植物の保全などに役立つ情報が蓄積されている。

植物の組織の内部に定着している内生菌に関しても、先行研究によって、様々な植物種において多様な菌類の定着が確認されているため、無視できない存在であると考えられる。これまでに、一部の植物の根系に定着する内生菌では、菌根菌と同様な機能を有する関係性も示されているが、特に葉や茎などの地上部に定着する内生菌類については、ほとんどの植物種において、その内生菌の存在が、どのような機能的な優位性があるのか、また、定着する菌類側はどのような生活をしており、どのように宿主植物を選んで定着しているのかなど、基礎的な知識は十分に蓄積されてはいない。木本植物においても、やはり地上部の葉や茎へ多様な内生菌類が定着していることが、先行研究によって知られている。しかし、樹木の個体の大きさや、森林内の環境要因の多様さとその変化の大きさのために、樹木個体内での定着内生菌の変化や、季節による変化などを、比較可能な統一された条件下で、調査をすることが難しいこともあり、内生菌類の宿主への特異性の程度などの基礎的な情報は明らかになっておらず、何らかのブレイクスルーが待たれている状況である。

2. 研究の目的

樹木の地上部の内生菌類の生態学的な研究が難しくなる要因として、樹木の個体の大きさや、森林内の環境要因の多様さとその変化の大きさがある。葉の付いている位置の違いによって日当たりや温度や水分など条件が変わり、樹木個体内での定着内生菌の変異や、季節による変化などを調査することが難しい。また、複数樹種間の比較も、樹種の違い以外の要因を比較可能なレベルまで統一することが難しく、得られたデータの解釈が難しい状況になってしまう。そこでこの研究では、木本植物の葉に定着している内生菌類の、宿主植物の分類群の違いや、その根系で各々の宿主植物種によって特異的に選ばれて定着している菌根菌や根粒細菌の違いとの関連を、上記の要因を統一出来る条件下で行う野外調査の結果から、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の調査地は、北海道別海町の西別湿原とした。この湿原では過去の植物遺体などが堆積した直径 1m・高さ 50cm 程度の円形のマウンドが存在する。そのマウンドの上部の狭い範囲は湿原内では比較的乾燥した状態にあり、木本植物を含めて様々な植物が定着している。今回の調査対象とした樹木種は、これらのマウンド上に同所的に定着している矮性の樹木で、ヤチカンバ(カバノキ科)、ハンノキ(カバノキ科)、ヤチヤナギ(ヤマモモ科)、イソツツジ(ツツジ科)の4種とした。これらの樹種は、その根系において各々異なる共生微生物を主に定着させることが知られており、ヤチカンバは外生菌根菌、ハンノキは外生菌根菌と根粒細菌、ヤチヤナギはアーバスキュラー菌根菌と根粒細菌、イソツツジはツツジ型菌根菌と、根系においては各々異なる生理的なメカニズムでパートナーとなる共生微生物を選択していると考えられる。このような性質を持つこれらの樹種全てが、同じマウンドから密接して生育している場所を選び、マウンドごとに葉サンプルを採取した。分離培養による内生菌の検出用に7月末から8月始めに10カ所のマウンドから樹種ごとに15枚ずつ、アンプリコンシーケンス解析用に樹種ごとに1枚ずつ健全な葉を採取した。実験室に持ち帰った後、表面を滅菌した葉サンプルから、麦芽エキス寒天培地上への分離培養を行うことによって内生菌の検出を行い、それらの菌系体からDNAを抽出し、rDNAのITS領域をPCR増幅して、その配列をシーケンス解析しBLAST検索によって種の推定を行った。さらに、同様に表面の滅菌を行った葉サンプルを対象に、16S rRNA遺伝子を対象とした次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンス解析を行い、網羅的に菌類叢を検出して、これらの樹種の葉に定着している内生菌類の定着の傾向を明らかにした。

4. 研究成果

分離培養による内生菌の検出の結果、4樹種合計600枚の葉から420枚で菌の分離ができ、全部で438菌株となった。これらの菌株を種同定した結果、検出されたのは合計で81種だった。そのうち、4種の菌のみが4樹種の葉から共通して出現していた。多変量分散分析

(PERMANOVA)の結果、各樹種から検出された内生菌の種構成は、4樹種の間ですべての組み合わせで有意に異なっていた ($p=0.01$)。一方、アンプリコンシーケンス解析の結果、4樹種合計で288の多様な Amplicon Sequencing Variant (ASV)が検出された。4樹種から得られた葉の内生菌叢について、Bray-Curtis 非類似度の距離行列を使ってNMDSの二次元プロットを作成した結果、同じカバノキ科に含まれるヤチカンバとハンノキの内生菌叢が近く、ヤチヤナギとイソツツジから検出されたものは、カバノキ科の2種から各々離れている結果が示された(図1)。

分離培養によって検出された内生菌と、アンプリコンシーケンス解析で検出された内生菌の結果の間で、出現種が異なっていた。特に、培養法によって検出された菌類叢では、子嚢菌類のみしか検出出来なかったが、アンプリコンシーケンス解析で検出された菌叢では、担子菌類が約11%~21%含まれていた。これは、内生菌を培地上に分離する際に事前に行った葉の表面への滅菌作業によって、本来存在した内生菌のうち活性を失ってしまった種が存在すること、また、培養の際に用いた培地(麦芽エキス寒天培地)が、その生育に適さない菌類も存在した可能性がある、などが原因として考えられ、表面滅菌した培養法によって検出された菌類叢には、ある程度のバイアスが存在することが示された。

以上の結果、樹木の葉に定着する内生菌は、多様な種が存在しており、環境が均一な条件下で近接して生育する樹木の葉同士であっても、宿主樹種ごとにある程度異なる菌が定着していると考えられ、樹木の葉の内生菌類にも、ある程度の選択性が存在するものと考えられた。特に、アンプリコンシーケンスの結果からは、宿主植物の分類群が近い樹種では似た内生菌類叢が定着しており、分類群が遠い樹種ではより異なる内生菌類叢を持つことが示されたこと

から、内生菌類は宿主の分類群ごとで定着する菌が選択されている可能性が示された。

今回の調査では、1m程度のごく狭い範囲で同所的に生育している1m程度の背の低い樹木を対象にしているため、これら4樹種の葉は、概ね等しい環境条件下にあり、また、同じような孢子等の菌類の感染源にさらされていると考えられる。また、今回対象にした樹木種4種は、その地下部の根系に定着する菌根菌類が、外生菌根菌、ツツジ型菌根菌、アーバスキュラー菌根菌、根粒細菌と、各々異なった組み合わせで、植物側がその定着を何らかの生理的なメカニズムで選択的に受け入れていると考えられる。今回の研究の結果、地上部の共生菌である内生菌類においても、たとえ周辺から受ける菌類の感染源がほぼ同じ条件にあると考えられる環境下であっても、宿主樹木の分類群レベルごとで異なる内生菌叢が見られたことは、樹木の葉の内生菌類の、植物と菌類の両方の生態学的・生理学的な理解を進める上で示唆を与える情報である。

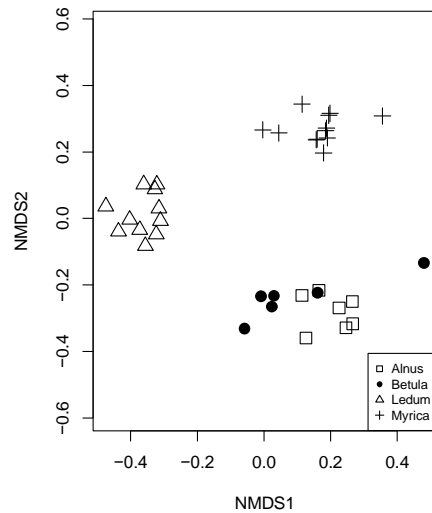


図1. NMDSによる4樹種の葉内生菌叢

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	コイデ ロジャー (Koide Roger)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関