

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658134

研究課題名(和文) 樹皮内生菌における宿主樹木の後天的防御機構への貢献に関する研究

研究課題名(英文) Bark endophytic fungi as the agent for acquired defense on their host trees.

研究代表者

升屋 勇人(Masuya, Hayato)

独立行政法人森林総合研究所・東北支所・チーム長

研究者番号：70391183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：アカマツ、コナラ、ミズナラ、ブナの枝を、各地より採取し、内生菌を分離した結果、樹種、採集場所によって優占的に出現する菌の種類や出現頻度は異なっていた。樹木枝に内生する菌は胴枯病菌が優占分類群であった。本グループは枝の病原菌として知られる種類が多く、弱病原性グループが、枝が健全な段階でいち早く枝に内生している可能性が考えられた。一部の地域、樹種で抗菌物質で他菌種の生育を抑制する種類が優占しており、後天的防御機構の付与に貢献すると思われた。本課題により得られた知見は、新規の病害防除法の開発に応用可能であり、特に枝から感染するような樹木の胴枯病の新たな防除手法の提案につながる。

研究成果の概要(英文)：Bark endophytic fungi were isolated from twigs of *Pinus densiflorae*, *Quercus serrata*, *Quercus crispula* and *Fagus crenata* in four different localities. Their species composition was quite different among wood species and localities. Dominant order of the endophyte was Diaporthales which is known as the agents of tree canker diseases. Diaportalean species with weak virulence appeared to infect without symptoms on the host trees. At a part of the localities, Rhytismatalean species with strong anti-fungal compound was dominant, and seems to inhibit other fungal infection. This species may be a useful candidate for giving acquired defense on the host trees. This knowledge can develop new method for biological control for tree disease, particularly infectious canker disease on twigs.

研究分野：森林科学

科研費の分科・細目：森林保護

キーワード：Diaporthe Colpoma Xylaria 抗菌物質 胴枯病 多様性

1. 研究開始当初の背景

植物内部に生息する菌類は、宿主に様々な正の影響を与えることで、負の影響を与える病原菌とは異なる形で生き残ってきたと考えられている。有名な例は根部および葉部の内生菌である。根内部に生息する内生菌は、リンその他の栄養分の吸収に貢献しており、宿主の成育に重要な役割を果たしている。また一部の根内生菌は弱病原菌であり、宿主の根にあらかじめ感染することで、強い病原菌の感染を防ぐ機能がある。葉内生菌の中でイネ科牧草の葉内生菌は、毒素を産生し、植食者を回避させることで、宿主の生存に貢献している。また樹木の葉内生菌では、その多様性と相互作用が、葉の病原菌の感染や植食者に影響すると考えられている。

根、葉の内生菌に比べて、枝や樹幹部の樹皮内生菌に関する研究は少ない。しかし、実際には次の3つの役割が予想されている。

1) 自然剪定：弱病原菌として機能している菌類が、被陰されている下枝を枯死させ、結果的に風や雪などによりその枝が落ちることで、自然に剪定がなされる (Kowalski and Kehr 1997)。

2) 病原菌への拮抗作用：他の寄生菌の枝や樹皮への感染・定着を阻害する (Sieber 2007)。

3) 分解菌との拮抗作用：落枝の分解者に対して拮抗することで、分解サイクルに影響する (Fukazawa et al. 2009)。

特に2)については、樹木のような永年性植物が病原菌に対抗する手段として新たに防御機構を発達させることが難しいという事実から想定されている。他微生物に対して拮抗能力を有する特定の樹皮内生菌が存在することが、宿主樹木と樹皮内生菌の特異的関係が進化してきた要因である可能性がある。実際にヨーロッパで行われた枝内生菌の調査では、樹木と枝内生菌の特異的関係が明らかになっている (Kowalski and Kehr, 1992) が、それらの意義については全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、樹皮内生菌の樹木に対する後天的防御機構への貢献を明らかにするために、様々な樹木の健全枝、樹幹樹皮から菌を分離し、その種類相、頻度、分布、他菌に対する拮抗能力を明らかにした。枝の内生菌の拮抗能力を種類、頻度と合わせて網羅的に検証した例は今までに無く、本研究により、菌類の森林生態系における機能の一つとして、樹木の樹形やその生存戦略に樹皮内生菌が影響することを明らかにする点は、菌根共生、葉内生菌に関する知見と同じぐらい生態学に新たな視点を与えるものである。本研究により、枝や幹の樹皮内生菌の生態的重要性が明らかになることで、正確な森林生態系の機能の解明が可能になる。また本研究で検出された拮抗菌は、病害防除や産業上の利用可能性もあることから、生態系研究のみならず

遺伝資源の利用といった側面でも意義がある。

3. 研究の方法

対象樹種として、日本の森林生態系における主要構成樹種であるアカマツ、コナラ、ブナを中心に、それらの枝、樹皮を対象に分離を行う。検出されると考えられる菌類は Diaporthales、Xylariales、Peziziales 等の子囊菌類であるが、いくつかの種類についてはすでに知見が蓄積されている。

調査地

北茨城市の小川学術参考林、八幡平市の安比高原試験地、森林総合研究所千代田試験地において樹木の採集、接種試験を行う。また、その他の採集地として京都府、青森県、岩手県を設定した。

方法

1. 分離、同定方法

各種樹木の枝を直径 5mm 以下、5-30mm、30mm 以上に分けて採取し、長さ 1cm に切除したあと、70%EtOH で 1 分、次亜塩素酸で 1 分、滅菌水で 1 分の処理を行い、表面洗浄を行う。そのあと 1% 麦芽エキス寒天培地上に置いて培養し、そこから生育してきた菌類を 2% 麦芽エキス寒天培地に移植することで純粋培養菌株を確立する。確立した菌株は、培地上で形成された孢子等の構造物、および rDNA 領域の部分塩基配列のデータから同定を行った。

枝 1cm ごとに出現した菌類の種数を計測し、用いた枝の合計数における各菌が出現した枝の数の割合で出現頻度を算出する。樹種、部位ごとの優占菌の種類を明らかにした。

2. 接種方法

分離により明らかになった優占種を、あらかじめ被陰されていた枝に接種し、病斑のサイズを比較した。樹皮表面を 95%EtOH で滅菌し、直径 5mm のコルクボーラーで樹皮をくりぬき、そこにあらかじめ菌を生育させておいた同径の樹皮片を埋め込んだ。また、先にくりぬいた樹皮片から菌の分離を行い、そこに存在している菌類の種類を明らかにした。接種試験により形成された壊死班の長径と短径、辺材方向への乾燥部の深さを計測し、病原力として評価した。

3. 拮抗試験

2% 麦芽エキス寒天培地上で、主要優占種について対峙培養し、それぞれの拮抗能力を検定した。拮抗能力は、通常の生育速度との比較、阻止円の形成、孢子形成能の変化で評価した。

4. 研究成果

アカマツ、コナラ、ミズナラ、ブナの枝を、

青森県、岩手県、茨城県、京都府の各地より採取した。表面殺菌した各枝を長さ 1cm に切断して内生菌を分離した。その結果、樹種、採集場所によって優占的に出現する菌の種類や出現頻度は異なっていた。茨城県で採取したアカマツでは *Sphaeropsis sapinae* (*Botryosphaeriaceae*) が優占したが、他の地域では本菌は検出されなかった (図 1)。本種は樹木病原菌として知られるが、特に海外では重要なマツの侵入病害である。本種の分布が限定されていることは、本種が海外からの侵入種である可能性を示しているが、今後より詳細な分布調査が必要であろう。また茨城県で採取したコナラ枝の優占種は *Diaporthe* の *Amphiportha* 属菌であったが、他地域、ミズナラでは検出されなかった。岩手県のミズナラ枝では *Colpoma* 属菌が優占種であり (図 2)、この結果は他樹種、他域とは異なっていた。本種は枝に発生する *Rhytismatales* としては日本国内では唯一の種である。京都府では樹種を問わず *Xylariales* が比較的高頻度に検出される傾向があった (図 3)。*Xylaria* 属菌と *Biscogniauxia* 属菌が出現したが、後者のグループは樹皮内生菌であると同時に潜在的に樹木の条件的寄生菌としても知られ、樹勢が衰えると発症する場合がある。樹木枝に内生する菌は全体として *Diaporthe* が優占的に出現する分類群であった。本グループは枝の病原菌として知られる種類が多く、弱病原性グループが、枝が健全な段階でいち早く枝に内生している可能性が考えられる。

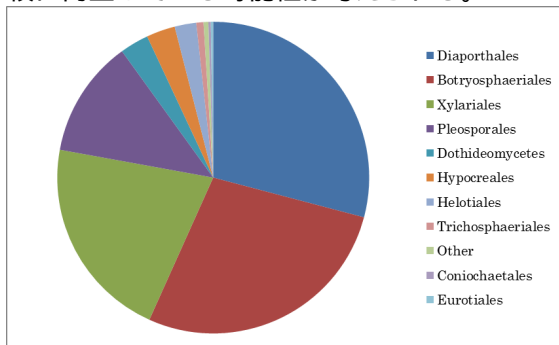


図 1 . 茨城県のアカマツ枝の内生菌相 (目)

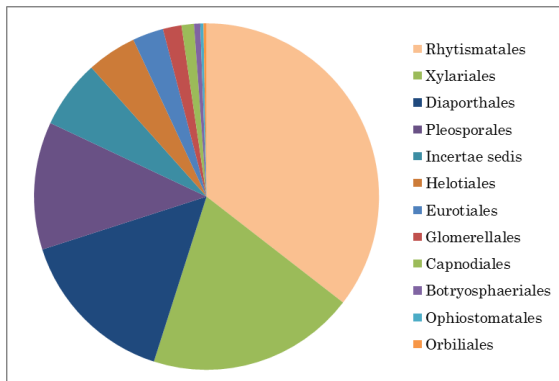


図 2 . 岩手県のミズナラ枝の内生菌相 (目)

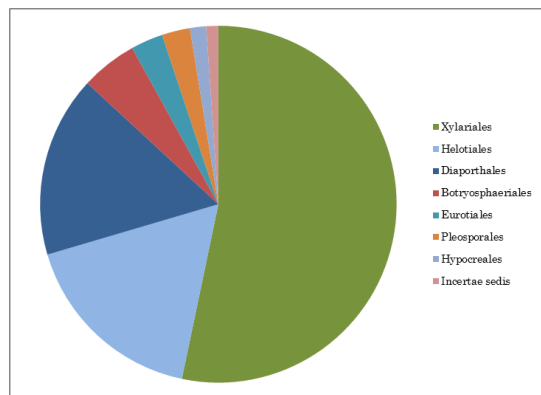


図 3 . 京都のアカマツ枝の内生菌相 (目)

接種試験ではいずれの種においても対照区と比べて顕著な病斑の形成は認められなかった。よって検出された種は健全な樹木にはほとんど病原力を有していないと考えられた。

アカマツ、コナラ、ミズナラ、ブナの枝を、青森県、岩手県、茨城県、京都府の各地より採取し、表面殺菌により得られた枝樹皮内生菌のうち、それぞれの優占種各 5 種について総当たりで対峙培養したところ、大きく 4 つのパターンが見られた (図 4)。Diaportheales は他菌と培地上では競合したが、生育が早いため多くの場合優占した。一方、Xylariales では他菌を覆うように生育し、基質上に優占した。ミズナラから分離された *Colpoma* は抗菌物質で他菌の生育を抑制した。結果的に分類群によって他菌に対する拮抗能力に違いが認められた。これらの能力と樹木への寄生性から、*Colpoma* などの抗菌活性を有する一部のグループに後天的防御能力を宿主に対して付与する可能性がある。ただし、検出される内生菌の種類が場所や樹種により異なることから、普遍的な防御機構は認められないと思われる。

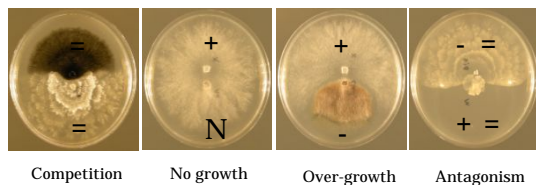


図 4 . 各菌の競合関係のパターン

本研究はこれまで十分には明らかではなかった樹木の枝内生菌の多様性を明らかにするとともに、その中から樹木病害の防除につながる内生菌の種類を明らかにした。この成果は研究項目の被害軽減、抑制技術の開発につながる知見として活用できる。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

升屋勇人、市原優、佐橋憲生 2014 樹木枝内生菌の多様性と宿主に対する生態的

役割 第 125 回日本森林学会大会要旨 p.145
2014 年 3 月 29 日 大宮

升屋勇人、市原優、佐橋憲生 2013 樹
木枝内生菌の多様性と主要種間の拮抗関係
東北森林科学会第 18 回大会要旨 p.43 2013
年 8 月 29 日 山形

升屋勇人、市原優、佐橋憲生、廣岡裕吏
2012 樹皮枝内生菌の多様性 日本菌学会第
56 回大会要旨集 p.66 2012 年 5 月 27 日 岐
阜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

升屋 勇人 (HAHATO MASUYA)
森林総合研究所・東北支所・チーム長
研究者番号 : 70391183

(2)研究分担者

市原 優 (YU ICHIHARA)
森林総合研究所・関西支所・グループ長
研究者番号 : 10353583

佐橋 憲生 (NORIO SAHASHI)
森林総合研究所・森林微生物研究領域・領域
長
研究者番号 : 10202102