

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25292083

研究課題名(和文) 樹木内生菌の伝播・繁殖機構および樹体内共生機構の解明

研究課題名(英文) Dispersal and reproductive modes of fungal endophytes of trees and intra- and interspecific interactions of the fungi

研究代表者

松下 範久 (Matsushita, Norihisa)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：00282567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：内生菌は、宿主植物に病気を引き起こすことなく、植物の健全な生きた組織内部に生息する菌類である。内生菌は、これまでに調査されたすべての陸上植物種で存在が確認されている普遍的な植物の共生者である。本研究では、樹木の葉内生菌の伝播・繁殖様式を明らかにするために、クマシデ、ハウチワカエデ、ヒサカキ、ブナ、モミ、ヤブツバキの葉内生菌の群集構造を調査した。また、ブナについては、葉内における内生菌種の詳細分布を調査した。さらに、ブナの葉内の優占種であった *Ascochyta fagi* については、マイクロサテライトマーカーを開発し、葉内における *A. fagi* のジェネットの詳細分布を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Endophytes are organisms including fungi that asymptotically infect healthy plant tissues, which have been reported in every plant species examined to date. Recently, fungal endophytes are getting attention as one of the important symbiont of terrestrial plants. To know the dispersal and reproductive mechanisms of endophytes of tree leaves, we surveyed the community structure of culturable fungal endophytes in leaves of *Abies firma*, *Acer japonicum*, *Camellia japonica*, *Carpinus japonica*, *Eurya japonica*, and *Fagus crenata*. In *F. crenata*, we investigated the fine-scale distribution of endophytic fungal species within the leaves. In addition, we developed polymorphic microsatellite markers for *Ascochyta fagi*, which is a dominant species in the fungal endophyte community of *F. crenata* leaves, and investigated the fine-scale distribution of the fungal genotypes in the leaves of *F. crenata*.

研究分野：森林植物学

キーワード：内生菌 共生 ジェネット 群集構造 *Ascochyta fagi* ブナ モミ

1. 研究開始当初の背景

陸上生態系に生育するほとんどの植物には菌類が共生しており、陸上で植物が生存するためには共生菌が不可欠であると考えられている。内生菌は、「宿主植物に病気を引き起こすことなく、植物の健全な生きた組織内部に生息している菌類」である。これまでに世界各地で調査されたすべての陸上植物種において内生菌の存在が確認されていることから、内生菌は極めて普遍的な植物の共生者であると考えられている。しかも内生菌の種多様性は非常に高く、一枚の葉に複数種の内生菌が生息しているのが普通である。さらに、イネ科草本では、植食性動物や植物病原菌に対する有毒物質を生産する菌種や、宿主の生長促進作用や耐乾性向上作用を持つ菌種が見つまっていることから、他の植物の内生菌にも宿主に対する大きな共生機能が存在すると推測されている。

樹木の内生菌については、主に葉内の内生菌について、樹種毎の内生菌類相の調査や、葉組織の加齢や個体内の部位などの時空間的要因が内生菌群集に与える影響に関する研究が国内外で行われ、既に多数の報告がなされている。しかし、樹木内生菌の生態特性や共生機能についてはほとんど明らかにされておらず、樹木と内生菌との間の共存機構の実態についても不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、クマシデ、ハウチワカエデ、ヒサカキ、ブナ、モミ、ヤブツバキの葉の内生菌を対象として、(1)伝播・繁殖様式、(2)葉内動態、(3)樹体内共生様式を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 伝播・繁殖様式の解明

モミ針葉内生菌の種構成の季節変化

東京大学附属千葉演習林に生育するモミ成木5個体を選び、2014年4月から2015年2月まで2か月毎に計6回、各個体から枝を3本採集して実験室に持ち帰った。各枝から当年葉と一年生葉を4本ずつ採取して表面殺菌をした後、葉の中央部から約1cm長の切片を作成した。各切片を1/2濃度のPDA平板培地へ置床して培養した後、葉片から出現した全菌叢を2%麦芽エキス寒天培地に移植して菌株を確立した。各菌株の菌種をrDNA-ITS領域のRFLP解析とシーケンシングにより同定し、各菌種の分離頻度[IF(%) = (各菌種が分離された供試片数 / 全供試片数) × 100]を計算した。また、内生菌群集の多様度を、Shannon-Wienerの多様度指数(H')を用いて評価した。

ブナの葉に優占する *Ascochyta fagi* の葉内におけるジェネット分布

(2)- において、*A. fagi* と同定された菌株から、葉片1枚当たり1菌株を選んだ。各菌

株の培養菌糸体からDNAを抽出し、新たに開発した6遺伝子座のマイクロサテライト(SSR)マーカーを用いて、各菌株の遺伝子型を決定した。

都市化による森林の孤立がヒサカキとヤブツバキの葉内生菌群集に与える影響

調査地として、森林の孤立・分断のない山地林の千葉演習林(千葉)、約9haの孤立した都市近郊林である東京大学附属田無演習林(田無)、都市中心部にあり約2haの孤立林と植樹帯からなる東京大学本郷・弥生キャンパス(本郷)を選定した。各調査地においてヒサカキとヤブツバキを各5個体選び、2016年5月と10月に、各個体から12枚の一年葉を採取した。葉から直径5mmの葉片を1片採取して内生菌を分離し、(1)-と同じ方法で、全分離菌株の菌種を同定し、IFとH'を計算した。さらに、内生菌群集構造の類似関係を非計量的多次元尺度構成法(NMDS)で解析した。また、内生菌群集の類似度が樹種、調査地、季節によってどのように影響を受けているかを、PerMANOVAで解析した。

(2) 葉内動態の解明

モミ一年葉の部位別の内生菌の分離頻度と多様度

千葉演習林内に生育するモミ成木5個体を選び、2013年7月に枝を1本ずつ採集して実験室に持ち帰った。各枝から一年葉を10本ずつ採取して表面殺菌した後、各針葉を先端部、中央部(1cm)、基部に分割し、各葉片を1/2濃度のPDA平板培地に1片ずつ置床した。その後、(1)-と同じ方法で、菌種の同定、IFとH'の計算を行った。また、部位間の菌種組成の類似関係を、NMDSとPerMANOVAにより解析した。

ブナの葉内における内生菌の詳細分布

2014年7月に、東京大学附属秩父演習林内の天然林に生育するブナ6個体から枝を1本ずつ採集して実験室に持ち帰った。各枝から健全葉を1枚採取して表面殺菌した後、葉の中央付近の3列の葉脈間から直径5mmの葉片を打ち抜いた。打ち抜いた葉片を1/2濃度のPDA平板培地上に置床して培養した後、出現したすべての菌叢を別の培地に移植した。得られた全菌株について、(1)-と同じ方法で、各菌株の菌種を同定した。

葉内生菌の病原性

2015年10月に、秩父演習林内に生育するブナ1個体、クマシデ1個体、ハウチワカエデ2個体から、罹病葉と健全葉を含む枝を3~5本ずつ採集し、実験室に持ち帰った。各個体の病患部および健全部から、直径8mmの葉片をそれぞれ100枚採取して表面殺菌をした後、1/10濃度のPDA平板培地上に置床して培養した。出現した菌を菌叢の形態によ

り分類し、主要な菌については rDNA-ITS 領域の塩基配列により同定した。

(3) 樹体内共生様式の解明

モミ針葉内に優占していた内生菌の生育温度特性と菌糸間相互作用

(1)- の調査の結果、モミ針葉内に優占していた *Muscodor fengyangensis* (Mf)、*Leotiomyces* sp.1 (L1)、*Phoma* sp.1 (P1) の各 1 菌株を PDA 平板培地で培養した後、菌叢の周縁部を直径 6 mm のコルクボーラーで打ち抜いて接種源とした。各接種源を PDA 平板培地の中央に接種し、5~35 の 5 間隔に設定した恒温器内で 15 日間培養した後、菌糸伸長量を測定した。また、2 菌株の接種源を PDF 平板培地上に 2 cm 離して接種した後、25℃、暗黒下で 10 日間対峙培養した。対峙培養は 3 菌株の総当たりで行い、培養後の菌糸間の相互作用を既往の研究にしたがい、接触前阻害（両菌株の菌叢が接触する前に菌叢成長が停止する）、接触停止（両菌株の菌叢が接触することで菌叢成長が停止する）、置き換わり（一方の菌株の菌叢が他方の菌株の菌叢内に侵入する）に分類して評価した。どちらの培養実験も 5 反復行った。

サリチル酸処理がモミ針葉内生菌の種構成に与える影響

植物に全身獲得抵抗性を誘導することが知られているサリチル酸処理が、モミの内生菌群集に及ぼす影響を明らかにするために、以下の調査を行った。

千葉演習林内に生育するモミの稚樹 5 個体を選び、各個体 3 本のシュートの当年枝と一年枝の境界部に、1 mM サリチル酸水溶液と脱水ラノリンを混合したものを塗布した（処理区）。対照として、各処理個体の近くに生育していた稚樹 1 個体を選び、蒸留水と脱水ラノリンを混合したものを同様に塗布した。処理は 2014 年 4 月に行い、処理の 3 ヶ月後に各枝の当年葉を 4 本ずつ採取して、(1)- と同じ方法で、内生菌の分離、菌種の同定、IF と H' の計算を行った。また、菌種構成に対する処理の影響を、NMDS と PerMANOVA により解析した。

ブナ葉内優占種の種間および種内における菌糸間の相互作用

(1)- の調査の結果、ブナの葉内に優占していた *A. fagi*、*M. buna*、*C. acutatum* の各 1 菌株を 2% 麦芽エキス平板培地で培養した後、菌叢周縁部を直径 5 mm コルクボーラーで打ち抜いて接種源とした。PDA 平板培地上に、2 菌株の接種源を 45 mm 離して 1 つずつ接種し、25℃、暗黒下で、3 週間対峙培養した。対峙培養は、3 菌株の総当たりで、各組合せ 5 反復行った。また、*A. fagi* については、遺伝子型の異なる 2 菌株間の対峙培養を同様の方法で行った。培養後の菌糸間の相互作用を、(3)- と同じ分類で評価した。

4. 研究成果

(1) 伝播・繁殖様式の解明

モミ針葉内生菌の種構成の季節変化

当年葉から 28 種、一年葉から 54 種、合計 64 種の内生菌が確認された。全菌種の IF の合計は、4 月と 12 月は一年葉の方が当年葉より有意に高く (t 検定, $p < 0.05$)、他の月も同様の傾向が見られた。種数も、すべての月で一年葉の方が当年葉よりも多かった。H' は、当年葉の 4 月が 0.69 と低かった以外は 2.12 ~ 2.55 であり、採集月や葉齢の間で大きな差はなかった。したがって、本調査地域のモミの内生菌は葉齢に伴い種数が増加するものの、菌群集の多様度に対する季節や葉齢による影響は少ないと推測された。

分離された内生菌のうち、*Muscodor fengyangensis* (Mf)、*Leotiomyces* sp.1 (L1)、*Phoma* sp.1 (P1) の IF は他種よりも高く、これら 3 種の IF の合計は 4 月の当年葉を除いていずれも 40% 以上であった。このことから、これらの 3 種が、この地域のモミ針葉における優占種であると考えられた。IF が最も高かった月は、Mf では当年葉の 6 月と一年葉の 4 月、L1 では当年葉と一年葉の 8 月、P1 では当年葉の 10 月と一年葉の 8 月であった。一方、当年葉の 4 月以外で IF が最も低かった月は、Mf では当年葉の 10 月と一年葉の 8 月、L1 では当年葉の 6 月と一年葉の 4 月、P1 では当年葉の 6 月と一年葉の 4 月であった。すなわち、内生菌群集に 3 種が占める割合は季節により変化し、Mf が春から初夏に、L1 が夏に、P1 が夏から秋に優占し、冬には 3 種がほぼ同じ割合を占めていた。

ブナの葉に優占する *A. fagi* の葉内におけるジェネット分布

調査した 88 菌株は、63 の遺伝子型に区別された。そのうちの 49 の遺伝子型は、それぞれ 1 菌株からのみ検出された。他の遺伝子型は、2~5 菌株から検出された。また、葉内の離れた葉片由来の菌株が同じ遺伝子型である例はあったが、異なる葉由来の菌株が同じ遺伝子型である例はなかった。これらのことから、*A. fagi* は孢子により葉に感染した後、葉内の数センチメートル以下の狭い範囲に広がって生息するものと考えられた。

都市化による森林の孤立がヒサカキとヤブツバキの葉内生菌群集に与える影響

両調査月とも、ヒサカキでは本郷・田無に比べて千葉の種数が多く、ヤブツバキでは本郷、田無、千葉の順に種数が増加する傾向が見られた。また、両樹種ともに、本郷、田無、千葉の順に分離頻度の合計が高くなる傾向が見られた。H' は、各調査地内では、採集月間や樹種間で大きな差がなかったが、調査地間では本郷、田無、千葉の順に大きくなる傾向が見られた。5 月と 10 月を比較すると、千

葉では 10 月の菌種数が 5 月よりも顕著に大きかった一方、本郷や田無では採集月間での大きな差はなかった。NMDS による解析では、調査地の異なる同一樹種の菌群集よりも同一調査地内の異樹種の菌群集の方が互いに近くに布置される傾向が見られた。PerMANOVA の結果、内生菌群集構造は、宿主樹種間、採集月間、調査地間のすべてで有意に異なっていた ($p < 0.001$)。

以上のように、内生菌群集構造は 5 月と 10 月で大きく変化したにもかかわらず、内生菌の分離頻度、種数、多様性指数は、いずれも本郷、田無、千葉の順に大きくなる傾向が見られたことから、内生菌群集の種多様性が森林の孤立・小面積化によって低下していると推測された。また、NMDS の結果から、宿主の違いを超えて調査地が菌群集構造に強く影響していることが推測された。本郷、田無と比較して千葉で 5 月より 10 月に種数が顕著に多かったのは、森林が分断されていない千葉では孢子分散が制限されないため、生育期を通じて多様な菌が感染しているためであると推測された。

いずれかの調査地、供試樹種、調査月で、IF が 20% 以上の高頻度で分離された内生菌は、*Colletotrichum* sp. 1 と sp. 2、*Guignardia mangiferae*、*Sordariomycetes* sp.、*Xylariales* sp. の 5 種であった。これらの菌種のうち、*C. sp. 2*、*S. sp.*、*X. sp.* の IF は、樹種や調査地による偏りがみられた。*X. sp.* は、ヒサカキでのみ高頻度に分離され、特に千葉での分離頻度が高かった。*C. sp. 2* は、ヤブツバキよりもヒサカキの方が分離頻度が高く、本郷と田無では高頻度に分離されたが、千葉では全く分離されなかった。*S. sp.* は、田無で 10 月に高頻度に分離されたが、他の分離頻度は低かった。以上の結果から、宿主特異性が高い *X. sp.* は、林分内に感染可能な宿主が減るため森林の孤立の影響を受けやすく、宿主特異性の低い *C. sp. 1* と *C. sp. 2* は、分断された森林でも林分内に感染可能な宿主が存在する確率が高いため森林の孤立の影響を受けにくいと推測された。また、*C. sp. 2* は本郷と田無でのみ高頻度で分離されたことから、都市の孤立林に適応した菌種である可能性も考えられた。

(2) 葉内動態の解明

モミ一年葉の部位別の内生菌の分離頻度と多様度

針葉の先端部、中央部、基部から分離された菌種数は、3 部位とも 19 種であった。種数累積曲線により推定された種数は、先端部と中央部で 27 種、基部で 28 種であった。全種をあわせた IF には、部位間で有意な差はなかった (一元配置分析、 $p = 0.34$)。H' は、先端部と中央部で 2.48、基部で 2.65 であり、部位間で大きな差はなかった。NMDS による解析の結果、針葉の部位ごとに偏って布置される傾向は見られず、針葉の部位ごと

の内生菌群集間には有意な類似性もなかった (PerMANOVA、 $p = 0.53$)。以上の結果から、本調査地域のモミ針葉内生菌の種数や種組成には、針葉の部位間で大きな違いはないと推測された。

ブナの葉内における内生菌の詳細分布

6 枚の葉 (No. 1~6) から採取した 168 枚の葉片のうち、165 枚から内生菌が分離された。各葉から分離された内生菌は 3~8 種であり、合計で 13 種であった。これらの種のうち、*Ascochyta fagi* は 6 枚の葉から、*Mycosphaerella buna* は 5 枚の葉から分離され、両種とも IF が高かった。このことから、両種がこの地域のブナ内生菌の優占種であることが示唆された。また、両種が同じ葉片から分離されたのは 1 例だけであったことから、両種は、葉内で互いに避けあって分布していると推測された。一方、1 枚の葉では、*Colletotrichum acutatum* の分離頻度が最も高かった。この葉では、*A. fagi* が 16 葉片から分離され、そのうちの 15 葉片からは *C. acutatum* も分離された。また、別の 1 枚の葉においても、*C. acutatum* が分離されたすべての葉片から *A. fagi* が分離された。これらのことから、*A. fagi* と *C. acutatum* の葉内の分布は、互いに重なり合っていると推測された。

葉内生菌の病原性

クマシデの罹病葉は、シデ類黒斑病によるものであると診断できたが、ブナとハウチワカエデの罹病原因は特定できなかった。各個体からの分離率の高かった菌種は、ブナでは *Ascochyta fagi* と *Colletotrichum acutatum* であった。*A. fagi* はブナ黄斑病の病原であり、*C. acutatum* は炭疽病の病原である。これらは内生菌としても感染しており、落葉期前の葉枯れ症状の原因となった可能性が考えられた。クマシデの黒斑病の病原は *Gnomonia fimbriate* であり、本調査でも低率ながら *Gnomonia* sp. が分離された。この菌は健全部からも検出されたことから、内生菌として存在していたと考えられた。ハウチワカエデでは、*C. acutatum* の分離率が高く、病徴も炭疽病の症状に類似していた。

本調査の結果、病患部から分離された菌は、一部の腐生性の高い菌以外は、ほとんどが健全部からも分離された。このことから、葉の生理活性が低下した条件においては、病原力は弱いが感染力が強い内生菌が病原性を示すように転じる可能性が示唆された。

(3) 樹体内共生様式の解明

モミ針葉内に優占していた内生菌の生育温度特性と菌糸間相互作用

菌糸伸長が最も良かった培養温度は、Mf では 20、他の 2 種では 25 であった。また、L1 と P1 は 30 でも菌糸が伸長したが、Mf は伸長しなかった。これらのことから、

Mfの方が他の2種よりも生育適温が低いことが示唆された。一方、Mfと他の2種との対峙培養では、Mfは菌糸が伸長したがL1とP1は菌糸が伸長しなかった。また、L1とP1の対峙培養では、接触前阻害の菌糸間相互作用が見られた。これらの結果と(1)-の結果から、温度条件がMfの生育に適している春から初夏にはL1とP1の生育が阻害されて葉内にはMfが優占するが、温度条件がMfの生育に不適な夏になると、MfがL1とP1の生育を阻害する能力が低下し、これらの菌種の優占度が増加すると推測された。

サリチル酸処理がモミ針葉内生菌の種構成に与える影響

処理区のIF合計は115.0%、対照区のIF合計は113.3%であった。また、処理区からは22種、対照区からは21種、合計32種の内生菌が確認されたが、どちらかの区からのみ高頻度(IF>10%)で分離された菌種はなく、処理区と対照区の間でIFに有意差があった菌種もなかった。Hも処理区が2.63、対照区が2.38であり、大きな差はなかった。一方、NMDSによる解析の結果、処理区と対照区の個体が、それぞれまとまって布置される傾向が見られた。また、PerMANOVAによる解析の結果、内生菌群集の類似度に対する処理の有意な影響が見られた($p<0.001$)。したがって、サリチル酸処理により誘導される宿主の病害抵抗性により、モミの内生菌の群集構造は変化するものの、葉への感染や葉内での生育に大きな影響を受ける菌種は少ないと推測された。

ブナ葉内優占種の種間および種内における菌糸間の相互作用

*A. fagi*と*M. buna*では接触前阻害、*A. fagi*と*C. acutatum*では接触停止、*M. buna*と*C. acutatum*では*C. acutatum*が*M. buna*に覆いかぶさる置き換わりの菌糸間相互作用が見られた。このことから、3種の間では、菌種の組合せにより、異なる菌糸間相互作用が起こることが示唆された。これらの結果と(2)-の結果から、ブナ葉内における3種間の相互作用は以下であると推測された。

*A. fagi*と*M. buna*の相互作用：互いに重なり合わずに葉内に分布しており、培地上でも両種は強い拮抗作用を示した。このことから両種は、互いに菌糸伸長を阻害しながら葉内に生育していると推測された。

*A. fagi*と*C. acutatum*の相互作用：*C. acutatum*は、*A. fagi*の分離された葉片から分離されることが多かったが、培地上では両種は互いに混じり合わなかった。このことから、両種が同所的に分布する理由は不明であるが、両種は葉内の狭い範囲で拮抗しながら生息していると推測された。

*M. buna*と*C. acutatum*の相互作用：*M. buna*は、*C. acutatum*が優占していた葉では1葉片からしか分離されず、培地上では、

*M. buna*から*C. acutatum*への菌叢の置き換わりが見られた。このことから*M. buna*は、*C. acutatum*が生息する葉内では生育を阻害されている可能性があると考えられた。

一方、*A. fagi*の菌株間では接触停止の相互作用が見られた。このことから、*A. fagi*は、同種内においても、遺伝子型の異なる系統同士は互いに混じり合わないと推測される。この結果と、(1)-の結果(*A. fagi*は、隣り合った葉片から遺伝子型の異なる系統が分離されることが多かった)から、*A. fagi*は孢子で感染した後、互いに拮抗しながら葉内に生息していると推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

渡邊悠介・松下範久(2016) 房総半島の暖温帯林におけるモミ針葉内生菌の季節変動. 樹木医学研究 20: 36-37 (査読無).

渡邊悠介・松下範久(2015) 房総半島の暖温帯林におけるモミ針葉内生菌の群集構造. 樹木医学研究 19: 169-170 (査読無).

高橋由紀子・松下範久・原田幸雄・宝月岱造(2014) ブナ科樹木葉に対する白粒葉枯病菌 *Redheadia quercus* の病原性と感染経路. 樹木医学研究 18: 105-110 (査読有).

[学会発表](計9件)

松下範久(2018) 水平伝播する樹木内生菌の多様性. 第129回日本森林学会大会(樹木病害研究会), 高知大学.

松下範久・佐々木夏未・福田健二(2017) ブナの葉内における内生菌の種間および種内の相互作用. 第128回日本森林学会大会, 鹿児島大学.

デニスサヤ・松下範久・福田健二(2017) 都市化による森林の孤立がヤブツバキとヒサカキの葉内生菌群集に与える影響. 第128回日本森林学会大会, 鹿児島大学.

松下範久・佐々木夏未・福田健二(2016) ブナの葉内における内生菌の詳細分布. 樹木医学会第21回大会, 神戸大学.

Endo N, Watanabe Y, Fukuda K, Matsushita N (2015) Leaf-endophyte community of *Abies firma* on Boso Peninsula, Japan. Asian Mycological Congress 2015, Goa, India.

6. 研究組織

(1)研究代表者

松下 範久 (MATSUSHITA, Norihisa)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号：00282567

(2)研究分担者

楠本 大 (KUSUMOTO, Dai)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
講師
研究者番号：80540608

呉 炳雲 (WU, Bingyun)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
助教
研究者番号：10396814
(2013年度)

(3)連携研究者

佐橋 憲生 (SAHASHI, Norio)
独立行政法人森林総合研究所・森林微生物
研究領域・領域長
研究者番号：10202102
(2013年度)

(4)研究協力者

渡邊 悠介 (WATANABE, Yusuke)
東京大学・大学院農学生命科学研究科
(2013年度～2015年度)

佐々木 夏未 (SASAKI, Natsumi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科
(2013年度～2015年度)

遠藤 直樹 (ENDO, Naoki)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任研究員 (2015年度)

デニス サヤ (DENNIS, Saya)
東京大学・農学部 (2016年度)