

シラカシとヒサカキにおける葉内生菌の内部分布の比較

松村愛美・福田健二（東大院新領域）

Abstract: In order to know the within leaf variation of endophytic fungal assemblages in leaves, we isolated endophytic fungi from leaves that had expanded in different term, of two evergreen broadleaves, *Quercus myrsinaefolia* and *Eurya japonica* in secondary forest in Kashiwa city. Fungi were isolated from five different positions of the leaf (2mm×2mm segments) and the two disks of 6mm ϕ in each leaf. The isolation frequency tended to be higher in segments with midrib than without midrib. *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Phyllosticta* sp., *Phomopsis* sp.1 and 4 unidentified fungal taxa were frequently isolated. In leaf of *Quercus myrsinaefolia*, organ preference was observed in some fungal taxa.

Keyword: endophytic fungal assemblages, within-leaf distributions, organ preference, dominant

要旨: 柏市に位置する二次林において、感染様式や菌群間の競合等に関する知見を得るため、シラカシとヒサカキの展葉期間の異なる葉を用いて、内生菌群集の部位による差異を検討した。一枚の葉から2mm角の異なる5部位また直径6mmのディスクの2部位を切り出し、それらより内生菌を分離した。分離頻度は、主脈を含まない部位より含む部位で大きい傾向がみられた。高頻度で分離された主要な内生菌群は、*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Phyllosticta* sp., *Phomopsis* sp.1と4未同定菌群であった。シラカシの優占菌であった *Phomopsis* sp.1は葉柄や主脈を含む部位で、Dark sterile QMGは、それ以外の部位で高頻度に分離された。これら2菌群には部位選好性がみられた。

キーワード: 内生菌群集, 葉内分布, 部位選好性, 優占菌

I はじめに

植物内生菌 (endophytic fungi) は、生活環のある時期において、病徴を現すことなく、生きた宿主植物の組織内に生息する菌類 (9) で、多くの樹種から内生菌が見出されている。さらに、それらの生態的な役割は多様であり、潜伏性病原菌 (3,10)、潜伏性分解菌 (7)、また病原菌や害虫に拮抗する共生菌 (1) 等が報告され、森林生態系において重要な役割を担っていると考えられている。

筆者らの先行研究 (14) は、同じ林内の複数の宿主樹種に共通の内生菌が感染していることを示した。また多様な菌群集が同じ環境下で共存していることが観察された。ヒサカキでは様々な宿主に感染できる宿主範囲の広い菌群が優占していたのに対し、シラカシでは宿主選好的な菌群である未同定菌 Dark sterile QMGの優占度が高かった。多くの樹種から分離された *Phomopsis* 属菌は枝部をより好んで感染するという報告もなされている (4,10,13)。

これらの異なる性質がみられた菌群は、葉内部でも異なる分布をしていると予想される。本研究では、葉内部の分布を比較することにより、各菌群の感染様式や菌群間の競合等の知見を得ることを目的とした。

II 調査地の概況および調査方法

調査地は、千葉県柏市の東大柏キャンパス内の半自然林であり、コナラやシラカシが優占する二次林である。対象樹種はシラカシおよび低木層に多く生育するヒサカキである。2008年9月に1樹種あたり3個体を任意に選

び、各々1枝を樹冠下部より採集し、シラカシについては当年葉と1年葉、ヒサカキについては最も新しいモジュール (6) の葉10枚とその前に展開したモジュールの葉10枚の計20枚の健全葉を得た。以後それぞれ new と old と呼ぶ。new と old それぞれのサンプル数は30である。

サンプル処理は採集後48時間以内に行った。まずサンプルを流水洗浄し、無菌操作下にて以下の方法で表面殺菌を行った。70%エタノールに1分間、続いて次亜塩素酸溶液 (有効塩素濃度1%) に1分間、70%エタノールに1分間と浸漬し、滅菌水で2回洗浄した (14)。続いて滅菌紙上で余分な水分を乾かした後、1枚の葉から滅菌メスで2mm長または2mm角を5部位、直径6mmの滅菌皮ポンチにて2部位の試料片を切り出した。上記に示した5部位は葉柄 (P)、葉の基部の主脈を含む部位 (Bm)、含まない部位 (Bl)、また葉の先端部的主脈を含む部位 (Dm)、含まない部位 (DI) とし、2部位は主脈を含む部位 (Lm) と葉縁部を含む部位 (Le) とした (図-1)。それらの切片を滅菌シャーレ (直径9cm) で改変1/2PDA培地 (Potato dextrose agar 1.95%, Plate count agar 0.9%, Chloramphenicol 0.06%) 上にて20℃暗黒条件下で1ヶ月以上培養した。

出現した菌株は、胞子を形成した場合は胞子や胞子形成器官により同定した。また多くの場合は不稔であった

Emi MATSUMURA and Kenji FUKUDA (Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa-no-ha 5-1-5, Kashiwa, Chiba, 277-8563) Endophytic fungal assemblages of *Quercus myrsinaefolia* and *Eurya japonica* and their within-leaf distributions.

ため、菌叢の形態等で類別し任意に命名した。各出現菌群の分離頻度 (IF) は、次の式で算出された。

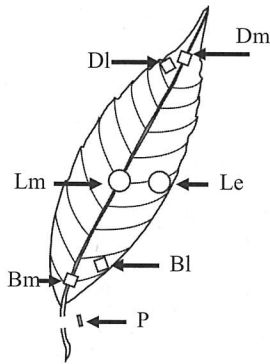


図-1. 切片の各部位
7切片, 葉柄(P)長さ2mm,
葉身基部の主脈を含む葉部(Bm)含まない葉部(Bl),
葉身先端部の主脈を含む葉部(Dm)含まない部位(Dl)を2mm×2mm, 中央部の主脈を含む葉部(Lm),
葉縁部(Le)を直径6mmのディスクとして作成した。

$IF (\%) = Ni / Nt \times 100$
Ni は各菌群の出現した葉片, Nt は供試片総数を示す。

相対優占度は、出現した菌群種の IF の合計値を 100 とした時の各菌群の IF の相対値である。相対優占度で 5% 以上を示したものを主要な内生菌群とし、他の菌群は Others にまとめた。

また 1 葉片に複数の菌株が出現した場合が多かったので、1 葉片あたりの菌株数を分離密度 (ID) と定義した。

全体の IF, ID および主要な菌群ごとの IF を、葉

齢・部位間で二元配置分散分析を行った。統計的に有意 ($p < 0.05$) であったら、続いて以下の検定を行った。葉片サイズの等しい 5 部位間の比較には α を $p < 0.05$ として Tukey-Kramer の多重比較検定を用いた。

III 結果

1. 出現菌群数と分離頻度 宿主・部位・葉齢別の出現菌群数と分離頻度 (IF) を図-2 に示した。ヒサカキについて、IF は Dl (new) で 66.7% と最も低かったが、ヒサカキ全体では 94.3% と高い値を示した。出現菌群数は全体で 22 菌群であり、P (old) で最も多く 14 菌群であり、最も少なかった Bl (old) は 4 菌群であった。ヒサカキ全体で 1 葉片あたりに平均 1.4 菌株が出現し、この ID は葉齢の高い方が、高い値を示す傾向がみられた ($p < 0.001$, 二元配置分散分析)。またそれぞれ主脈部を含む部位と含まない部位 (Bl と Bm, Dl と Dm, Le と Lm) とを比較すると、主脈を含む部位の方が高い値を示す傾向がみられ、特に先端部では有意な差がみられた ($p < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test)。

シラカシについて、IF は P (new) で 66.7% と最も低く、シラカシ全体では 88.6% とヒサカキよりやや低い値を示した。出現菌群数は全体で 33 菌群であり、最も多かった Dm (new) は 13 菌群、最も少なかった Bl (new) は 7 菌群であった。1 葉片あたりに平均 1.3 菌株が出現し、この ID はヒサカキと同様に、主脈を含む部位の方が高い値を示す傾向がみられ、特に中央部では有意な差がみられた ($p < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test)。しかし

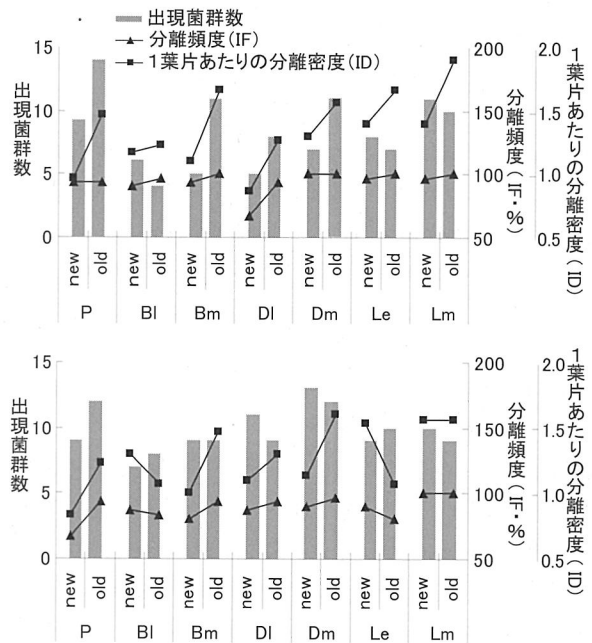


図-2. ヒサカキ (上) とシラカシ (下) の各葉齢、部位における出現した菌群数, 分離頻度 (IF), 1 葉片あたりの分離密度 (ID) の比較

葉齢についてヒサカキでみられた傾向は、シラカシで当てはまる場合は少なかった。

2. 主要な内生菌群の部位・葉齢別の分布 出現した主要菌群は、両樹種共通で *C. gloeosporioides*, *Phyllosticta* sp., White sterile I, WM34 の 4 分類群, ヒサカキのみで *C. acutatum* の 1 分類群, シラカシのみで *Phomopsis* sp.1, Dark sterile QMG, Q1 の 3 分類群であった (表-1)。

最も優占した菌群はヒサカキでは *C. gloeosporioides* であり、葉齢や部位の違いによって分離頻度に違いがなかった。一方シラカシでは、葉齢や部位ごとに最も優占した菌群が異なった。Bl, Dl と Dm (old) では Dark sterile QMG, P と Bm では *Phomopsis* sp.1, Dm (new) では White sterile I と WM34 であった。

Phyllosticta sp. はシラカシで葉齢が高いほど出現頻度が高く ($p < 0.001$, 二元配置分散分析), ヒサカキでも同様の傾向がみられた。

シラカシでは、*Phomopsis* sp.1 は Bm と P で他の部位より高頻度 ($p < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test), Dark sterile QMG は Bl と Dl で高頻度 ($p < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test) P で全く出現しなかった。また WM34 は Dm で他の部位より高頻度であり Bm, P ではほとんど出現しなかった ($p < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test)。White sterile I は Dm で Dl, Bl と P より高頻度で出現した ($p < 0.05$, Tukey-Kramer HSD test)。

表-1. ヒサカキとシラカシにおける主要な内生菌群と感染頻度 (%)

		ヒサカキ						計*1	シラカシ						計		
		P	Bm	Dm	Bl	DI	Lm		Le	P	Bm	Dm	Bl	DI		Lm	Le
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	new	43	57	50	40	40	40	37	45*2	7	0	7	0	10	7	40	11
	old	30	57	40	53	33	50	53		17	13	7	20	7	10	17	
<i>Phyllosticta</i> sp.	new	0	7	7	23	7	7	13	27	10	3	3	0	7	0	3	10
	old	23	47	40	37	33	67	63		17	17	23	17	20	17	7	
<i>Colletotrichum acutatum</i>	new	7	40	37	37	27	10	27	23	7	7	7	7	7	10	3	5
	old	7	20	23	27	27	10	20		13	3	3	0	3	3	3	
<i>Phomopsis</i> sp.1	new	7	0	0	0	3	3	0	2	23	37	0	3	3	30	3	18
	old	7	3	0	0	3	3	0		30	47	0	3	7	50	10	
White sterile I	new	3	0	7	3	0	27	23	7	0	10	20	3	7	37	27	12
	old	7	3	3	3	3	13	3		3	13	23	7	7	13	3	
WM34	new	3	0	17	0	7	17	3	6	0	3	20	13	3	30	37	15
	old	0	0	3	0	13	13	3		0	3	23	3	10	37	20	
Dark sterile QMG	new	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	17	60	47	10	17	25
	old	0	0	0	0	0	0	0		0	17	40	37	57	3	20	
Q1	new	0	0	0	0	0	0	0	0	17	7	7	0	0	0	0	3
	old	0	0	0	0	0	0	0		7	3	7	0	0	0	0	
Others	new	30	7	7	10	0	37	20	19	13	7	27	7	17	27	13	15
	old	57	23	33	0	7	27	13		20	3	23	10	7	13	17	

* 1 計は、葉齢と部位をまとめた場合の値

* 2 太字は、第一位優占菌

ヒサカキの優占菌は部位ごとにも分布は偏らなかった。

IV 考察

葉の老化につれて、または着葉期間が長いほど感染の機会が多いため、内生菌の分離頻度が上昇することは、一般的に知られている (12,13) が、ヒサカキではその傾向がみられたものの、シラカシでは *Phyllosticta* sp.を除いてほとんどみられなかった。また菌の組成にもあまり変化がなかった。

葉の部位によって内生菌の組成、分離頻度が異なる原因として、部位による化学性 (特にタンニン量) の違い、展葉過程によるずれ、胞子の付着しやすさの違いなどが挙げられている (12)。特に、主脈上には降水が溜まりやすく、水分蒸発時には脈上に胞子が残ると考えられるため、分離頻度が高くなると考えられる。本研究では、*Phomopsis* sp.1 は主脈部、特に葉の基部に、Dark sterile QMG は、主脈部以外に部位選好性が認められた。また1葉片あたりの分離密度は主脈部でより高く、既往研究と一致した (12)。*Phomopsis* 属菌は、様々な宿主樹種で主脈部をより好み (4)、葉部より枝部で分離頻度が高い (10,13) と言われている。シラカシの優占菌 Dark sterile QMG が *Phomopsis* sp.1 と逆の分布傾向を示したことは、この菌群間になんらかの競合関係がある可能性が推測された。

シラカシは一斉開葉型で落葉も年一回である。一方、ヒサカキは春から秋にかけて何度か開葉と落葉を行い複数の葉群 (モジュール) を形成する。よって今回のサン

プリング方法ではヒサカキとシラカシとでサンプルの着葉期間が異なった。シラカシでは約1年間、ヒサカキではおそらく2ヶ月間と考えられる。つまりシラカシでは年変化を、ヒサカキでは季節変化を示しているとも捉えられる。ヤブツバキの内生菌の季節変化と年変化について調査した研究では、季節に伴う内生菌相の変化がみられたが、年変化はみられなかった (8)。マテバシイにおいても、同様の傾向が観察された (4)。しかし今回の結果では、年変化とみられるシラカシでも季節変化とみられるヒサカキでも葉齢の違いがあまりみられなかった。樹種や生育環境によって、これらの変化の程度に違いがあることも考えられるが、ヒサカキについて、より葉齢の高い1年葉等を含めた調査が必要であると考えられる。シラカシについて、脈部に多く、枝からの感染が考えられる *Phomopsis* sp.1 は、山地より本調査地で多かった (14)。優占菌の葉内分布と地理的分布の関連について検討するための補足調査が今後の課題である。

引用文献

- (1) ARNOLD, AE. MEJIA, LC. KYLLO, D. ROJAS, EI. Maynard, Z. ROBBINS, N. and HERRE, EA.(2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. PNAS. **100**: 15649-15654.
- (2) GAMBOA, MA., LAUREANOL, S. and BAYMAN, P. (2002) Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? Mycopathologia. **156**: 41-45.
- (3) GENNARO, M. GONTHIER, P. and NICOLOTTI, G. (2003) Fungal endophytic communities in healthy and declining *Quercus robur* L. and *Q.cerris* L. trees in northern

Italy. J. Phytopathology. **151**: 529-534.

(4) HATA, K. ATARI, R. and SONE, K. (2002) Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. Mycoscience. **43**: 369-373.

(5) HELANDER, ML. NEUVONEN, S. SIEBER, T. and PETRINI, O. (1993) Simulated acid rain affects birch leaf endophyte populations. Microbial Ecology. **26**: 227-234.

(6) NITTA, I. and OHSAWA, M. (1997) Leaf dynamics and shoot phenology of eleven warm-temperate evergreen broadleaved trees near their northern limit in central Japan. Plant Ecology. **130**: 71-88.

(7) OSONO, T. (2006) Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. Can. J. Bot. **52**: 701-716.

(8) OSONO, T. (2008) Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age-dependent variations. Mycologia, **100**: 387-391.

(9) PETRINI, O. (1991) Fungal endophytes of tree leaves. 179-197, (Microbial Ecology of the Tree leaves. Andrews, J.H. and Hirano, S.S., 499pp., Springer Verlag, New York).

(10) SAHASHI, N. KUBOTA, T. MIYASAWA, Y. and ITO, S. (1999) Temporal variations in isolation frequency of endophytic fungi of Japanese beech. Can. J. Bot. **77**: 197-202.

(11) SUSAN, DC. (2004) Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Q. rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelial compatibility. European Journal of Pathology. **110**: 713-721.

(12) WILSON, D. and CARROLL, GC. (1994) Infection studies of *Discula quercina*, and endophyte of *Quercus garryana*. Mycologia. **86**: 635-47.

(13) 金子令子 (2008) ブナの葉の内生菌と枝葉被覆処理により示唆される感染ルート. 森林防疫 **57**: 16~24.

(14) 松村愛美・橋詰洋介・福田健二 (2008) 山地の森林と都市近郊林における樹木内生菌相の比較. 樹木医学研究 **12**: 133~134.