

## 論文内容の要旨

論文題目 **ブナ科樹種の葉内生菌群集の地理的变化に関する研究**

**Geographical variation of foliar endophytes of Fagaceous trees**

氏名 **橋詰洋介**

植物内生菌とは「生活環のある時期において、明らかな害を示すことなく、宿主植物の生きた組織内に生息する菌類」のことである。イネ科草本にバクカクキン科の菌類の一群が感染していることが発見されて以来、1970年代には、内生菌が樹木にも広く存在することが明らかとなり、日本では、主にマツ科、ブナ科、ツツジ科樹種で研究が行われ、内生菌・宿主植物・環境の相互関係が明らかにされつつある。内生菌が分離される際の頻度である分離率は季節によって変動することが認められている。また、内生菌には、宿主特異性・組織特異性・地理的な群集組成の相違といった性質がしばしば報告されているが、その原因である内生菌 - 宿主植物の相互関係は未解明の部分が多い。

ブナ (*Fagus crenata* Blume) については、東北地方広域でブナ葉に内生菌が広く存在することが明らかにされ、優占する菌種や、それらの組織選好性が明らかにされている。また、内生菌は宿主の生育する地域の気候帯や標高差から生じる気温の違い、酸性雨による影響、宿主個体の生育的衰退、分布の分断(孤立)などの環境因子により、その群集組成が変化を示

す可能性が考えられる。今後、温暖化や天然林の衰退、分断化などが生じることが予測されるが、生態系における菌類や微生物の機能や環境変化に対する反応はほとんど解明されていないのが実状であり、樹木の葉内生菌についても基礎的知見が欠落している。そこで、本研究では樹木の葉内生菌の群集構造を広域にわたって比較することにより、個々の内生菌種の環境に対する選好性や内生菌の群集構造と環境の関係を明らかにすることを目的とした。

本研究では、既往研究との菌類相の比較が可能で、日本に広く分布するブナ科樹種を対象とし、それぞれの樹種について、広域の材料から同一の分離法・培養法を用いて内生菌の分離を行った。調査対象の宿主は、広く分布するブナ及びアカガシ(*Quercus acuta* Thunb. ex Marry)とし、広域の材料から同一の分離法・培養法を用いて内生菌の分離を行った。本研究では、分離試験時の葉面積と出現種数との関係を明らかにした上で、標高変化を含む気温の変化のブナ、アカガシ葉内生菌相への影響、林地の孤立や混交林化が内生菌相に与える影響を解明することを目的として、葉内生菌の分離試験を行った。

ブナ葉内生菌相の季節変化を2008年4月~6月に検討し、また、分離条件の検討をおこなった上で、広域の調査地でのブナ葉の調査は2004~2007年7月~9月に、アカガシ葉の調査は、2004~2006年7月~9月に行った。

ブナ葉の採取地は、田沢湖(秋田県)、赤安山(新潟県)、小丸(神奈川県)、尾鈴山(神奈川県)の4箇所のブナ純林、高尾山(東京都)、吾国山(茨城県)、筑波山(茨城県)の3箇所の落葉樹混交林、大洞(長野県)のブナ孤立林、男女岳(秋田県)の標高800, 1000 および、1200mの3地点の各地点とし、それぞれ5個体の供試木から、見かけ上、健全な葉を20枚選び採取した。アカガシの葉は、尾鈴山の標高900m・1100m・1300mの3地点、高尾山の標高400m・600mの2地点から採取した。各標高で、3個体の供試木から見かけ上健全な当年生葉を15枚ずつ採取した。

採取試料は48時間以内に分離試験に供試した。流水洗浄後、アンチホルミン(有効塩素濃度1.0%)を用いたアンチホルミン・エタノール系で表面殺菌し、滅菌水で2回洗浄して、滅菌紙に表面の水分を吸水させ、葉縁を含む部位(以下、LE)・葉脈を含む部位(以下、CM)に分けた。LEとCMのそれぞれについて火炎滅菌を施した直径6mmのコルクボーラーで葉片を切り出し、試料片とした。試料片各5片を、ブナについては出現菌種の非選択性を考慮した1/2PDA+PCA平板培地上(PDA: 19.5g/L, PCA: 9.0g/L, クロラムフェニコール: 600mg/L)に、アカガシについては、通常の1/2PDA平板培地に静置して、20 暗黒条件下で1ヶ月間~3ヶ月間、培養した。分離した菌叢を孢子形態・サイズ・形成様式等により同定した。孢子未形成の種については、rDNA ITS領域のシーケンシングによりホモロジー検索を行った。未同定な菌については菌糸の可視形態によって類別、任意に命名した。

また、分離が認められたすべての菌群について、IF(分離率) = (内生菌の出現が認められた供試片数/ 供試片数) × 100 (%) を算出し、分離試験の結果とした。ブナ葉での調査については、1葉片当たりの感染密度(ID)を算出した。また、The Shannon Index of Diversity ( $H'$ )

を算出し、多様度の指標とした。IF の相対値(RF)を算出し、群平均法によるクラスター解析でグループ分けを行った。CCA 解析を行い、各内生菌群集の序列化を行った。また、各調査地の採取日前 30 日間のデータを用いた最高・最低・平均気温、日照時間、降水量、優占菌の ID 値、*H'*の各パラメーターについて、各クラスターグループと環境因子との相関を分析した。ブナ、アカガシ両者の優占菌について、温度成長試験を行った。

森林タイプ別のブナ葉内生菌相の調査では、*Ascochyta fagi* が単独で優占した。他にも、*Alternaria alternata*, *Pestalotiopsis* sp.がブナ葉遍在菌として観察された。*H'*は混交林・孤立林で高く、ブナ純林では菌類相は単純であった。クラスター解析の結果、ブナ葉内生菌相は、(i) ミズナラ+ブナ混交林タイプ、(ii) イヌブナ+ブナ混交林タイプ、(iii) ブナ純林タイプ a、(iv) ブナ純林タイプ b、(v) ブナ純林タイプ c、(vi) ブナ孤立林タイプ LE、(vii) ブナ孤立林タイプ CM の 7 タイプに分類された。CCA 解析の結果、それぞれのクラスターグループを特徴付けるパラメーターは以下の通りであった。純林(iii)~(v)では *A.fagi* の ID 値が高く、*H'*が低かった。混交林(i)、(ii)では気温が高く・日照時間が少なかった。孤立林(vi)、(vii)では他のグループと比較し、*Ascochyta fagi* の ID 値が極端に低く *H'*が高かった。CCA 解析の結果、気温(平均・最高・最低)、日照時間、*Ascochyta fagi* の ID 値、*H'*が、内生菌群集に有意な相関があった。各調査地での *H'*は混交林・孤立林で高かった。純林でも赤安山で高く、ブナの分布の中心である田沢湖では *H'*が低いことから、気温が高い場所や混交・孤立林で菌類相が多様であると考えられた。クラスター解析・CCA 解析の結果、ブナ葉内生菌相は気温条件、日照時間、*Ascochyta fagi* の ID 値、*H'*と相関があることが示された。相関分析の結果では、最高気温が低い調査地ほど *A.fagi* の ID が高くなる傾向が見られ、各パラメーターは、それぞれが林地の気温と関係しているものと考えられた。すなわち、ブナ内生菌相と群集構造は気温により影響を受けていることが示された。

ブナ分布の低温限界に近い標高別の調査では 1800 葉片を調査し、合計 17 種の内生菌の出現が確認された。優占菌・準優占菌は次の分離傾向を示した。優占菌 *Ascochyta fagi* は標高が高くなるにつれ IF が有意に低下した。準優占菌 *Phomopsis* sp.1 は標高が高くなるにつれ IF が有意に上昇した。準優占菌 *Pseudocercospora* sp.は標高 1000m 地点で最も IF が高かった。いずれの菌についても、葉片部位により IF に差が見られた。クラスター解析の結果では、群集組成は大きく葉片部位で異なり、さらに、高標高部と低～中標高部とに分かれた。すなわち、山地帯上部の垂直分布上限付近においても *Ascochyta fagi* がブナ葉で優占する内生菌であることが示された。優占菌・準優占菌とも、標高の変化に伴って、IF が有意に変化し、高標高部では *Ascochyta fagi* の優占度が低下した。ブナ分布の上限付近では、器官特異性と標高変化の両方が、群集組成に影響を与えているものと考えられた。

アカガシでは、高尾山、尾鈴山の両調査地で合計 1350 葉片を調査し 12 種の内生菌を確認した。*Tubakia rubra* および *Discula* sp., *Phomopsis* sp.1 がアカガシ葉に優占する内生菌として観察された。*Tubakia rubra* は尾鈴山と高尾山の両方の採集地において共通した。一方、*Phomopsis* sp.1 は高尾山でしか観察されなかった。また、*Discula* sp.は尾鈴山で優占したが、

高尾山では IF が低かった。 *Tubakia rubra* は 1000km 離れた両調査地に優占したことから、アカガシ葉における遍在菌であると考えられた。

本研究の結果、葉内生菌相は宿主の生育地の森林タイプや気温、混交樹種に大きな影響を受けていることが示された。また、ブナ、アカガシの両種においてみられた標高変化による優占菌種の増減は本研究で初めて明らかにされたものである。ブナ葉内生菌については、優占菌が他の菌の感染を妨げている可能性が考えられた。したがって、地球温暖化に伴う気温の変化や林分の孤立、混交林化は、植物のみならず、共生する内生菌相にも影響を及ぼす可能性が示唆された。