

内生菌相の地理的変異に関する研究 ～ブナ・アカガシを例に～

2006年3月修了 環境学専攻 自然環境コース 生物圏機能学分野 46724 橋詰洋介
指導教員 助教授 福田健二

キーワード：気温、標高、優占菌

1、はじめに

植物内生菌 (endophytic fungi:以下、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(Petrini 1991)。内生菌には病原性・腐生性を示す菌種が含まれる場合があり、またその群落組成は生育地の気候条件、酸性や大気汚染、宿主個体の生育的衰退、分布の分断などにより変化する可能性がある(Asai *et al.*1998;Taylor *et al.* 1999)。特に、葉内生菌群集では、葉が枝や幹に比べて宿主の生育環境の影響を受けやすいため、群集の変化は大きいと予想される (Ragazzi *et al.* 2003)。このことから、葉内生菌群集を広域にわたって比較することにより、内生菌の環境に対する選好性や群集構造と環境の関係を明らかにできると考えられる。本研究の目的は、内生菌群集の地域および標高による違いを明らかにし、気温が内生菌群集に与える影響を捉えることである。調査対象の宿主は、広く分布するブナ(*Fagus crenata* Blume)及びアカガシ(*Quercus acuta* Thunb.ex Murray)の2種とし、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。これら2種の植物は日本の植生を代表する植物であり、酸性雨、温暖化に代表されるような環境問題にさらされ、各地で林地の孤立や衰退が生じている。本研究により、ブナ、アカガシの葉内生菌群集と気温との関係が明らかにされ、温暖化に起因する森林環境の変化が内生菌のような植物共生菌に与える影響を検討することが可能となると考えられる。

2、材料と方法

ブナの葉は、秋田県田沢湖(39°46'N,140°14'E 860m a.s.l.)、新潟県赤安山(37°48'N, 139°19'E 350m a.s.l.)、神奈川県丹沢(35°26'N,139°9'E 1340m a.s.l.)、宮崎県尾鈴山 (32°17'N,131°25'E 1400m a.s.l.) のまとまったブナ林4箇所と、周辺をカラマツ林に囲まれた孤立林である長野県菅平高原の大洞ブナ林(36°30'N,138°20'E 1400m a.s.l. 約150本が残存)の合計5箇所から採取した。各調査地についてブナの健全木を5個体選定し、各供試木から見かけ上健全な葉を20枚ずつ採取した。アカガシの葉は、宮崎県尾鈴山の標高900m・1100m・1300mの3地点、東京都高尾山 (35°47'N,139°14'E 599m a.s.l.:約600m) の標高400m・600mの2地点から採取した。各標高で、アカガシ3個体を供試木とし、各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。試料採取は2004・2005年の7月・8月・9月に各調査地とも合計3回行った。採取試料は48時間以内に分離試験に供試した。葉を24時間流水洗浄後、80%エタノール、アンチホルミン (NaClO:有効塩素濃度1%) を用いて表面殺菌し、滅菌水で2回洗浄後、滅菌濾紙上で乾燥し、葉縁を含む部位 (以下、葉縁部) と葉脈を含む部位(以下、葉脈部)から、火炎滅菌した直径6mmの皮ポンチで葉片を切り出し試料片とした(図1)。各部位から切

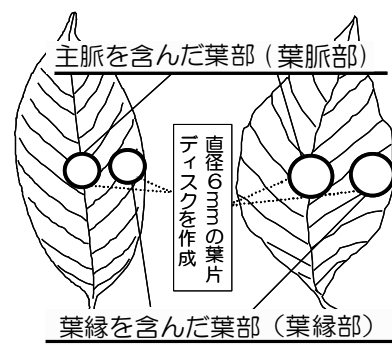


図1. 試料片の作成部位

り出した試料片を 1/2 濃度の PDA 平板培地上に静置して、20°C 暗黒条件下で 1~3 ヶ月間培養した。出現した菌は菌叢の形態から菌叢タイプに類別した。胞子形成の認められたものは、形態により同定した。各菌叢タイプの分離率(The isolation rate; Ri)を算出し、優占菌を決定した。優占菌については、1 葉片から多くの菌叢が分離されたため、葉片当たりの平均菌叢数(The mean number of isolate; Ni)を算出した。ノン・パラメトリック検定法により、地域(ブナ)・標高(アカガシ)・採取部位(ブナ+アカガシ)による Ni の差を検定した。また、優占菌について、5°C~35°Cの範囲で温度成長試験を行った。

3、結果

内生菌の分離結果は以下の通りである。[ブナ]①各調査地ともに、優占する菌叢タイプと他の菌叢タイプとの間で Ri、Ni の差が大きかった。②優占タイプはどの地域でも同種 *Acremonium* sp.であった。③優占タイプ *Acremonium* sp.は年平均気温が低い調査地ほど Ni が高かったが、孤立林である大洞では傾向に反して Ni が低かった(図 2.)。④*Acremonium* sp.は、葉縁部よりも葉脈部で Ni が高かった。[アカガシ]①高尾山では *Phomopsis* sp.1、QA-b が、尾鈴山では *Discula* sp.、QA-b がアカガシ葉で優占する内生菌であり、どちらの地域でも 2 種優占型であった。②高尾山・尾鈴山の両方で、標高の低い場所で優占する内生菌は QA-b であった。③QA-b は、標高が高くなるにつれ Ni が低くなる傾向にあり、葉脈部に比べ葉縁部で Ni が高かった。④*Phomopsis* sp.1、*Discula* sp.は、標高が高くなるにつれ Ni が高くなる傾向にあり、葉縁部に比べ葉脈部で Ni が高かった。その結果、採取地の標高が変化するにつれて優占第一位の内生菌の交替が見られた(図 3.4.)。

4、考察

本研究の結果、ブナ・アカガシ葉内生菌相は宿主の生育地の気温に大きな影響を受けていることが示された。さらに、ブナ葉内生菌については、葉内生菌相が林地の孤立の影響を受けている可能性が示唆された。したがって、地球温暖化に伴う気温の変化や林分の孤立は、植物のみならず、内生菌相にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

5、引用文献

Asai *et al.* (1998): Mycol. Res. **102**: 1316-1318.
 Petrini (1991): Microbial Ecology of the Tree. : 179-197.
 Ragazzi *et al.* (2003): For.Path.**33**: 31-38.
 Taylor *et al.* (1999): New Phytol. **142**: 335-346.

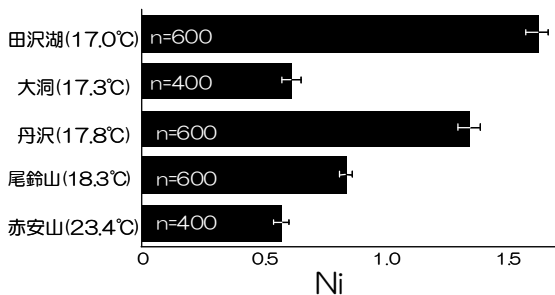


図 2. 各調査地でのブナ優占菌 (Bar は標準誤差)

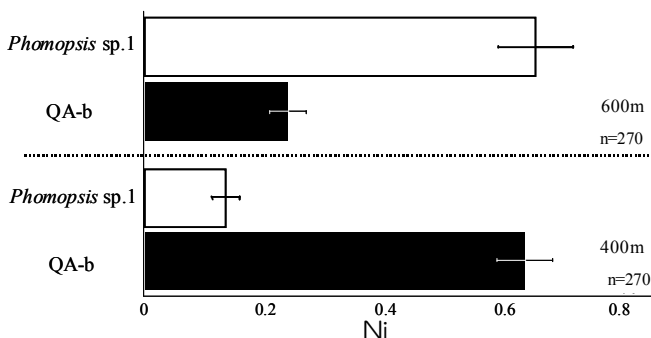


図 3. 高尾山でのアカガシ葉優占菌の出現傾向

(Bar は標準誤差)

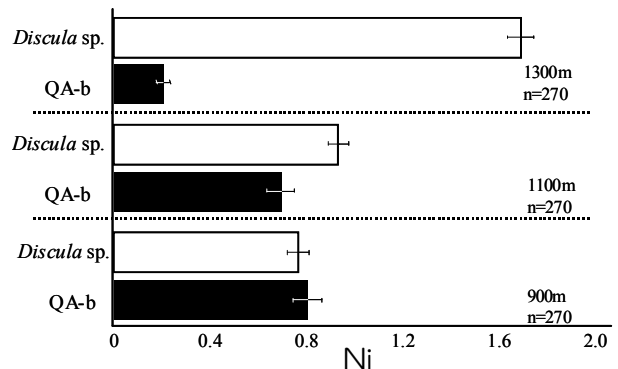


図 4. 尾鈴山でのアカガシ葉優占菌の出現傾向

(Bar は標準誤差)

Geographical variation of endophytic fungal community on Japanese Beech and Evergreen oak

Mar. 2006, Institute of Environmental Studies, Course of Natural Environmental Studies, Lab. of biosphere functions 46724 Yousuke Hasizume
Supervisor; assistant professor, Kenji Fukuda

Keyword: temperature, altitude, dominant fungi

1. Introduction

The term 'endophytic fungi' refers to all fungal species that live in plant tissue without producing any external symptoms at some time in their life cycle (Petrini 1991). Ecological rolls of endophytic fungi are not clearly known, but some of them show pathogenicity and saprophytism. Endophytic fungal communities could be affected by climatic changes, acid rain and decline of host individuals and populations (Asai *et al.* 1998; Taylor *et al.* 1999). Especially, foliar endophytic fungal community could be greatly affected by environmental changes, because leaf tissue is more sensitive to the environment than twig, branch, trunk or other plants portions (Ragazzi *et al.* 2003; Taylor *et al.* 1999). Purpose of this study is to make clear the reaction of endophytic fungal community to climate changes by comparing the foliar endophytic fungal communities from wide geographical ranges and from different altitudes. In this study, Japanese beech (*Fagus crenata* Blume.) and an evergreen oak (*Quercus acuta* Thunb.ex Murray), which are widely distributed in Japan, were chosen as the target host. These two species are representatives of cool- and warm-temperate forests in Japan, respectively, and are suffering from the environmental problems, such as global warming or heat island effect.

2. Materials and method

Samples of *F.crenata* were collected from 4 large populations over the geographical range of this species: Tazawako (Akita Pref.; 39°46'N, 140°14'E), Mt.Akayasu (Nigata Pref.; 37°48'N, 139°19'E), Tanzawa (Kanagawa Pref.; 35°26'N, 139°9'E), Mt.Osuzu (Miyazaki Pref.; 32°17'N, 131°25'E) and from an extremely isolated population, Oobora (Nagano Pref.; 36°30'N, 138°20'E, only 150 individuals remained). At each site, five healthy trees of *F.crenata* were chosen, and 20 healthy leaves were collected from each tree. Samples of *Q.acuta* were collected from Mt.Osuzu and Mt.Takao (Tokyo Pref.; 35°47'N, 139°14'E). From Mt.Osuzu, sample leaves of *Q.acuta* were collected from altitudes of 900m, 1100m and 1300m a.s.l., and from Mt.Takao, samples were collected from 400m and 600m. At each altitude, three healthy trees of *Q.acuta* were chosen, and 15 healthy leaves were collected from each tree. To avoid seasonal changes of endophytic community, samples were collected three times after the maturation of the current leaves in summer

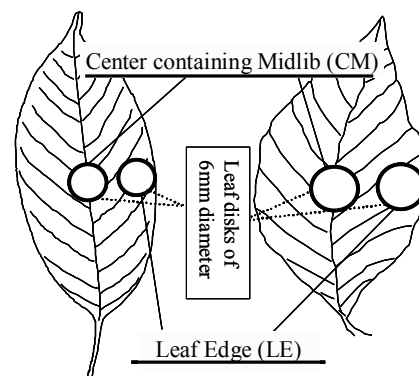


Fig.1 The portions on the leaf used for fungal isolation.

of 2004 and 2005. The leaves were used for fungal isolation within 48h after collection. Each leaf was surface sterilized with 80% ethanol solution and NaClO (1% available chlorine). Two leaf disks with a diameter of 6.0mm were punched out from the leaf by a sterile cork borer, one from center containing midrib (CM) and the other from the leaf edge (LE)(Fig.1). The leaf disks were incubated on a half solution PDA and incubated at 20°C for 3 weeks or more in the dark. Emerged fungi were identified to species or categorized to morphological types and named by a code. Isolation rate (Ri) was calculated to determine dominance. For dominant fungi, the mean number of isolates infected one leaf disk (Ni) was also calculated. Nonparametric statistical methods were used for data analysis.

3. Results

Each endophytic fungus showed trends as below. [***F.crenata***] **1.** In each site, the difference in Ri and Ni between a dominant fungus and the others was prominent. **2.** The dominant fungus was a same species, *Acremonium* sp., for all sites. **3.** Ni of the *Acremonium* sp. increased as climate of the site become cooler, except for Oobora, isolated population (Fig.2). **4.** The Ni of *Acremonium* sp. was higher in CM than in LE. [***Q.acuta***] **1.** In Mt.Takao, *Phomopsis* sp.1, and QA-b were dominant. In Mt.Osuzu, *Discula* sp. and QA-b were dominant. Namely, two fungal species were dominant in the both sites. **2.** In the both sites, QA-b was more dominant in lower altitudes. **3.** Ni of QA-b was higher at lower altitudes, and higher in LE than CM. **4.** The Ni of *Phomopsis* sp.1 and *Discula* sp. were higher at higher altitudes, higher in CM than LE (Fig.3.4.).

4. Discussion

The results of this study showed that endophytic fungal communities of *F.crenata* was characterized by one dominant species, *Acremonium* sp. and for *Q.acuta* two dominant fungal species. Ni of these fungi was affected by temperature, and probability by segmentation of host population.

5. References

Asai *et al.* (1998): Mycol. Res. **102**: 1316-1318.
 Petrini (1991): Microbial Ecology of the Tree. : 179-197.
 Ragazzi *et al.* (2003): For.Path.**33**: 31-38.
 Taylor *et al.* (1999): New Phytol. **142**: 335-346.

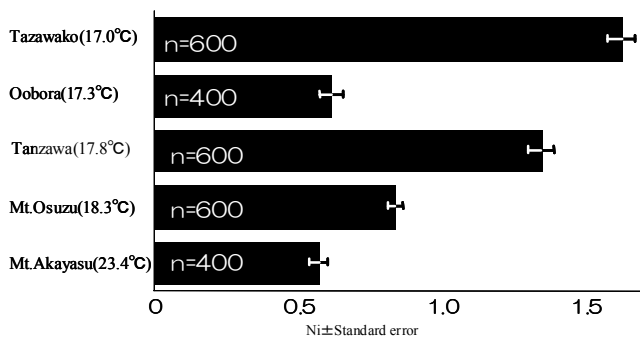


Fig.2 The occurrence of dominant fungi in *F.crenata* leaves.

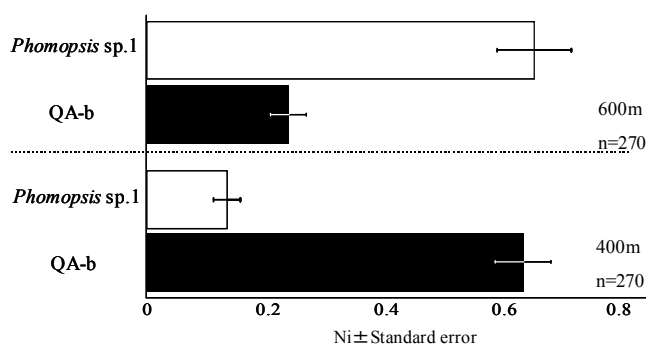


Fig.3 The occurrence of dominant fungi in *Q.acuta* leaves from Mt.Takao.

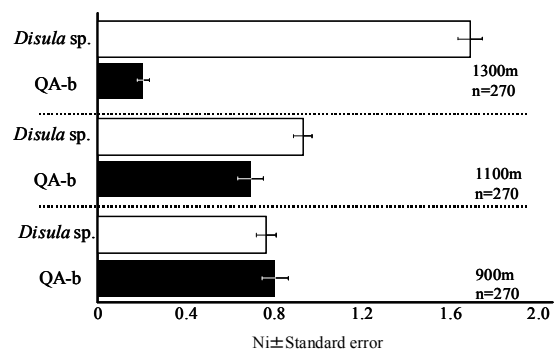


Fig.4 The occurrence of dominant fungi in *Q.acuta* leaves from Mt.Osuzu.