

都市近郊林のナラ類葉内生菌群集の空間変動パターン

松村愛美・福田健二

東京大学大学院新領域創成科学研究科自然環境学専攻

摘 要：都市近郊林では樹木の葉内生菌群集が山地の森林に比べて単純化している原因を明らかにするために、都市近郊林の樹木葉内生菌群集の林内での空間変動を調べた。千葉県柏市・流山市の都市近郊林2か所において、優占樹種であるコナラ、クヌギの葉内生菌群集の空間変動と、林縁と林内、樹冠上部と下部という環境の違いとの対応関係の有無について検討した。その結果、内生菌全体の感染密度や、宿主範囲の広い優占菌である *Phomopsis* spp. の感染密度は、樹冠上部よりも下部、林縁よりも林内で高かった。すなわち、樹冠上部や林縁は、高温や強い日射により内生菌の感染にとって不適な環境であることが示唆された。一方、ナラ類に宿主特異的な優占菌である *Discula* sp. は、これらの環境の違いによる感染密度の差が見られなかった。

キーワード：林縁、樹冠、微気象、*Phomopsis*, *Discula*

はじめに

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生物」であり、真菌類を指す。草本性植物の内生菌として良く知られているイネ科に特異的なバツカクキン科 (Clavicipitaceae) に属する菌は、宿主にとって有利に働く、多くの生物的效果が知られており内生菌接種芝生苗の販売など農業分野では既に応用されている。一方、葉、枝、樹皮、根などの組織器官ごとに異なる種が優占する木本植物の内生菌は、単一菌種が全身に感染している草本植物の内生菌とは生活環や生態的役割が大きく異なると考えられ、草本植物の場合のように宿主と相利共生関係にあるかどうかは明らかではない。いくつかの樹種において、主要な内生菌が病害や虫害の発生に抑制的に働くという結果が報告されているが、内生菌の分布や生態などが詳しく調べられているのはマツ科、ブナ科などに限られており、ほとんどの樹種では内生

菌の種組成などの基礎データが不足しているのが現状である。一般に、温帯林の樹木の葉内生菌相は、1～数種の菌種が優占していることが多く、それらの優占菌の科と宿主樹種の科との間に系統的な対応関係がみられることから、相利共生的な共進化の結果であるとの仮説が提示されている (Sieber, 2007)。一方、樹木内生菌には、多様な宿主から広く検出される菌も知られており、それらの多くは潜伏感染している多犯性の病原菌や落葉分解菌のような片利共生ないし寄生的な菌であり、熱帯林ではそのような宿主範囲の広い菌が優占していることが知られている (Arnold et al., 2000; Suryanarayanan et al., 2003 など)。この気候帯による違いは、宿主樹種が温帯林では純林や優占林を作るのに対して、熱帯林では種多様性の高い森林を作っており、特定の宿主樹種の個体密度が低いわけではないかと考えられた。そこで、温帯林において都市化による森林の孤立が生じると、宿主選好菌 (スペシャリスト) は宿主となりう

る樹種の個体数が少なくなるため衰退し、孤立林の中でも宿主となる樹木の個体数が比較的多く存在する広宿主範囲菌(ジェネラリスト)が優占するようになるのではないかと予測される。

都市近郊における林地の孤立は、宿主特異的菌の分離頻度を減少させ、葉内生菌全体の感染頻度の低下と、樹種間の内生菌群集の多様性(β 多様性)の低下を引き起こしていることが関東地方の千葉県柏市、流山市、栃木県宇都宮市の計4林分で知られている(松村・福田, 2011; Matsumura and Fukuda, 2013)。

そこで、本研究では、こうした都市林の孤立化に伴う宿主選好菌の衰退のメカニズムを明らかにするために、宿主樹種の密度などの生物的要因に加えて、森林の孤立化、小面積化に伴う影響として広く知られている林縁的環境の増加についても検討することとした。

森林の内生菌群集は、宿主樹種の林内での個体数密度や周囲の植生、宿主の遺伝的性質などの内生菌の感染源の量に影響する生物的要因のほか、気温や降水量などの気候要因、葉の樹冠内の位置や光環境、風当り、湿度などの微環境といった内生菌の感染・定着に関する環境要因の影響を受ける(Carroll, 1995; Saikkonen, 2007)。たとえば、樹幹に近いほど、樹冠下部ほど、内生菌の感染率が高まる傾向が観察されており(Helander et al., 1993 など)、多湿で鬱閉した樹冠下部の葉では上部の陽葉に比べて内生菌の胞子が感染しやすいためと考えられている(Bahnweg et al., 2005 など)。孤立した都市林では、林縁環境の増加が低木層の樹種構成や林床植生を変化させることが知られているが、林縁環境が内生菌に与える影響については報告がない。

そこで、本研究では、都市近郊林での内生菌群集と非生物要因の対応関係を見出すため、林縁から林内にいたるライン上での樹木個体間、また同一個体の樹冠上部・下部間の葉内生菌群集の変動パターンを明らかにするとともに、気温および日射量を計測し、葉のおかれた微環境との関係を検討した。

材料と方法

千葉県北西部に位置する都市近郊林として、柏市こんぶくろ池自然博物公園(以下「こんぶくろ」)、流山市市野谷の森(以下「市野谷」)の2調査地を選定した。2009年7月8日にこんぶくろで、同年7月28日に市野谷で、環境調査および葉の採集を行った。一般に展葉後の湿潤時に内生菌感染が高まると考えられるため、この時期に調査を行った。実際に行った内生菌群集のフェノロジー調査(松村・福田 2013)では、今回の採取月以前の6月後半にはその後一年間に分離されたほとんどの菌種が分離され始めた。

林縁から林内に向かって、2m × 40~50mのコドラートを1調査地あたり3ヶ所ずつ設置した。コドラートで優占したコナラとクヌギについて、位置を記録した。環境要因について、データロガー(おんどとり Jr, こんぶくろのみ)で2009年7月5日から15日までの気温を解析した。また2009年7月4~8日(こんぶくろ)および7月26~27日(市野谷)に、簡易積算日射量測定システム(オプトリーフ)による積算日射量測定を行った。実際に内生菌の採集に用いた枝から3葉を選びにオプトリーフ(感光フィルム)を貼り付け、3反復とした。林縁からの距離と積算日射量との関係は、Tukey-Kramerの多重比較法によって検定した。

内生菌分離のため、優占種コナラとクヌギより、樹冠が林縁に位置する個体と林内のものをこんぶくろでは3個体と17個体、市野谷では4個体と16個体を選定した。また樹冠位置による比較のため、こんぶくろのみで、林縁より3個体、林内より4個体について、樹冠上部（地上高6m以上）と下部（約3m）の葉群を採集した。各個体より外見上健全な成葉10枚を供試した。それらを流水洗浄後、エタノール・アンチホルミン系で表面殺菌し、1枚の葉より直径6mmのディスクを主脈を含む葉片（主脈部）と主脈を含まない葉片（葉縁部）と2部位切り出した。それらを1/2PDA+PCA培地、20℃暗黒条件下で培養した。分離菌株は孢子とその形成器官および菌叢の形態的特徴により同定した。

それぞれの内生菌種の出現頻度（常在度）および密度（優占度）は、

分離頻度 (IF, %)

$$= \text{菌が出現した供試片数} / \text{供試片数} \times 100$$

および

感染密度 (ID) = 分離菌株数 / 供試片数
により評価した。

林縁からの距離と感染密度の関係また菌種同士の拮抗関係をピアソンの相関係数で検定した。林縁・林内の感染密度の比較にt検定を用い、樹冠上部・下部では対応のあるt検定を用いた。なお、「林縁」とは林縁から0mの地点とし、林縁から2m以上離れた地点を「林内」とした。

結 果

平均気温は林縁（トランセクトの 0m 地点）で最も高く 26.1℃であり、林縁の最高気温は 33.8℃であった。林内の平均気温および最高気温は林縁から遠ざかるにつれて林縁から 4m まで急激に低下し、10～

12m よりも遠い場所では林冠やギャップとの位置関係に応じて変動した。つまり林縁効果は、気温に関しては林縁から 10m 程度の範囲に現れているとみなされた。一方、最低気温は林内のほうがやや高い傾向にあったが、有意差はなかった。林縁と林内各地点の温度差の最大値は、平均気温で 0.7℃、最高気温で 1.5℃であった（図 1）。

研究の調査地である千葉県柏市北部に位置するこんぶくろ池は、日射積算量は、こんぶくろでは林縁（0m）のみで高い値を示し 2.05（標準誤差 ± 0.22）であったが、林縁から 2m 以上離れた林内ではほぼ一定で、0.75（± 0.03）と林縁よりも明らかに暗かった。市野谷では、それぞれ 6.74（± 0.79）、1.79（± 0.06）で、ほぼ同様の傾向であった（図 2）。すなわち、林縁部の積算日射量は、林縁から 2m 以上入った林内の各地点の日射量よりも 3 倍程度高く、有意な差がみられた（t 検定、こんぶくろ t=11, 市野谷 t=14, $P < 0.0001$ ）。

コナラおよびクヌギの内生菌群集は、調査地が異なっても主要な菌群は共通していた（表 1）。すなわち、*Phomopsis* spp. と *Discula* sp. の 2 つの分類群が圧倒的に多く分離され、次いで *Colletotrichum* spp. (*Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* sp.3, *Colletotrichum* sp.4) が多かった（表 1）。またそれらは既往報告でも同様にコナラの主要な菌種であった（Matsumura and Fukuda, 2013；松村・福田, 2011, 2013）。

林縁木では、樹冠上部の葉と下部の葉で感染密度や分離菌群数の差異は認められなかった。一方で林内の樹木個体では、全体の感染密度および *Phomopsis* spp. の感染密度が樹冠上部の葉より下部の葉で高かった（表 2）。また林縁木の内生菌

全体の感染密度および*Phomopsis* spp. の感染密度は、他の林内個体のものよりも有意に低かった（表3）。一方、宿主選好菌である優占菌*Discula* sp.および広宿主範囲の*Colletotrichum* spp.の2分類群については、林縁個体と林内個体の感染密度にも有意差はなかった。

こうした林縁と林内、樹冠上部と下部の違いの有無をもたらす要因として、サ

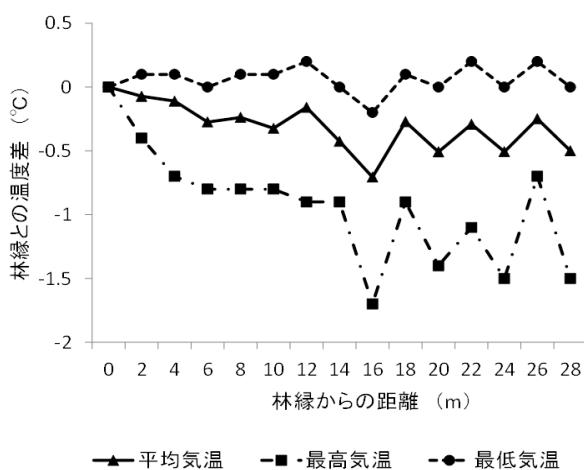


図1 こんぶくろの林縁からの距離と林縁との温度差（2009年7月5日から15日までの日平均、日最高、日最低気温の11日間の平均）。

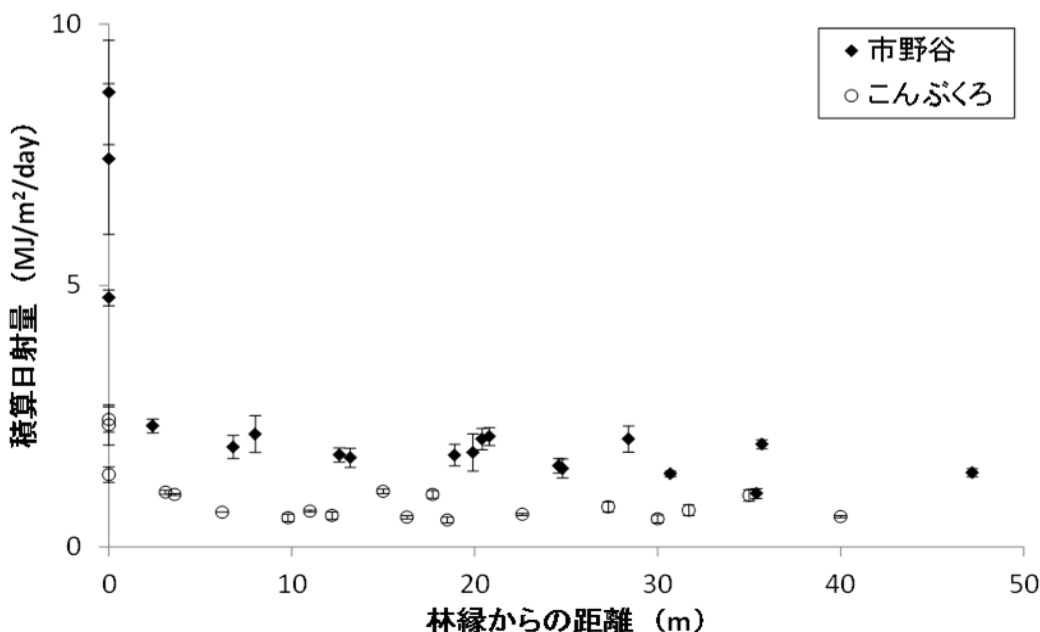


図2 こんぶくろと市野谷における林縁からの距離と日積算日射量との関係（2009年7月4～8日（こんぶくろ）および7月26～27日（市野谷）の平均値）。

ンプリングを行った枝の気温および日射量との関係を解析した（図3）。林縁と林内、樹冠上部と下部で感染密度に差がなかった*Discula* sp. は、平均気温、積算日射量のいずれとも相関がなかったが、林縁や樹冠上部で感染密度が低下していた*Phomopsis* spp.は、平均気温と有意な負の相関が認められた。積算日射量については、日射量の多い葉では感染率が低かったが、有意な相関は得られなかった。内生菌の感染は、湿度が低下すると低くなると言われており（Helander et al., 1993; Bahnweg et al., 2005 など）、林縁での高い気温は湿度を低下させるため、*Phomopsis* spp.の感染を抑制していることが推測された。一方、ナラ類の宿主選好的な優占菌である*Discula* sp.は気温や湿度の影響を受けにくいことが示唆された。

なお、林内個体において、優占菌2種、*Phomopsis* spp.と*Discula* sp.の感染密度には弱い負の相関がみられた（ $r = -0.29$, $P < 0.0044$, 図は省略）。

表1 葉内生菌の分離頻度 (IF) の調査地間比較.

分離菌群	市野谷	こんぶくろ	総計
<i>Phomopsis</i> spp.	47.9	35.0	40.2
<i>Discula</i> sp.	31.8	45.4	39.9
<i>Colletotrichum</i> spp.	8.7	4.8	6.4
<i>Astrocystis</i> sp.	3.7	1.4	2.3
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	2.6	2.0	2.2
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2.1	2.0	2.0
<i>Alternaria</i> sp.	3.2	1.1	1.9
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	2.1	0.9	1.4
<i>Rosellinia</i> sp. 2	2.1	0.2	1.0
総計	100.0	95.2	97.1

IFが2%を超える菌群のみ表示

表2 感染密度 (ID) の樹冠位置間の比較.

環境	分離菌群	樹冠		t値	P値
		上部	下部		
林縁	全菌種合計	0.90	0.93	-0.2	NS
	<i>Phomopsis</i> spp.	0.20	0.18	0.3	NS
	<i>Discula</i> sp.	0.40	0.57	-1.1	NS
	<i>Colletotrichum</i> spp.	0.02	0.03	-0.5	NS
林内	Others	0.30	0.15	1.8	NS
	全菌種合計	1.18	1.74	-3.8	0.007
	<i>Phomopsis</i> spp.	0.53	0.93	-3.2	0.015
	<i>Discula</i> sp.	0.46	0.56	-0.6	NS
	<i>Colletotrichum</i> spp.	0.05	0.05	0.0	NS
Others	0.14	0.20	-1.0	NS	

表3 葉内生菌の分分離頻度 (IF) と感染密度 (ID) の林縁・林内間比較.

分離菌群	IF (%)		ID			
	林縁	林内	林縁	林内	t値	P値
<i>Phomopsis</i> spp.	18.0	46.1	0.20	0.68	-3.9	0.0002
<i>Discula</i> sp.	41.0	39.6	0.48	0.46	0.3	NS
<i>Colletotrichum</i> spp.	4.0	7.2	0.05	0.08	-1.0	NS
Others	27.5	21.6	0.28	0.22	1.2	NS
全体	64.0	96.9	1.00	1.43	-3.4	0.0009

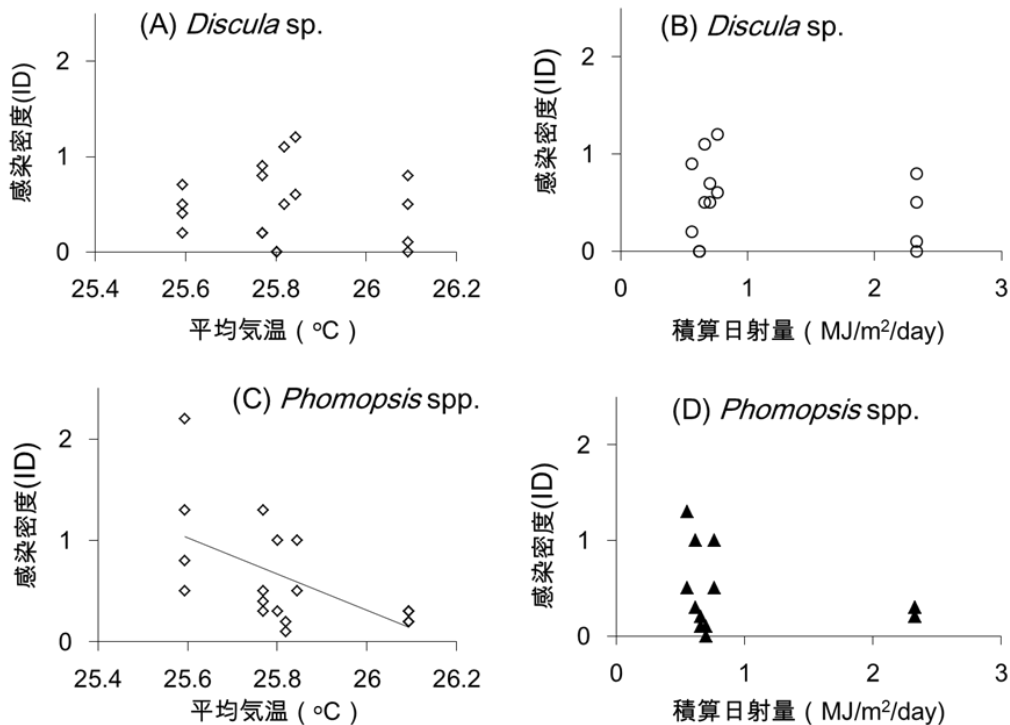


図3 優占菌2種の感染密度 (ID) と平均気温・積算日射量との関係.

- (A) こんぶくろ : n=18 (n.s.)
- (B) 市野谷 : n=38 ; こんぶくろ : n=36 (n.s.)
- (C) こんぶくろ : n=18 ($r = -0.63$, $P < 0.05$)
- (D) 市野谷 : n=38 ; こんぶくろ : n=36 (n.s.)

考 察

先行研究と同様に、ナラ類の葉内生菌群集においては、宿主選好的な*Discula* sp. と広宿主範囲の*Phomopsis* spp. が優占していることが示された。全体の感染密度や*Phomopsis* spp. の感染密度は、樹冠上部より下部で、また林縁より林内で高かった。一般に、内生菌の感染には湿度が高いほうが好適である (Helander et al., 1993; Bahnweg et al., 2005 など) ことから、直射日光が当たらず、最高気温の低い樹冠下部や林内のほうが菌にとっては好適な環境である。林縁でこれらの内生菌の感染密度や分離頻度が低下したのは、気温、日射量の直接の影響よりも、林縁では気温・葉温が高く、風が当たるために湿度が低いことが影響しているものと推測される。

Osono and Mori (2004) はミズキの樹冠内の異なる位置より葉を採集し、その葉圏菌群集、光環境、葉の成分の比較を行った。種によって出現傾向が異なり、被陰下でより高頻度に出現する種と、反対に被陰ありの環境ではほとんど出現しない種が観察されている。本研究では被陰なしの環境を好む種は観察されなかったが、宿主選好的な優占菌である*Discula* sp. は、林縁環境下でも分離頻度および感染密度の低下がみられなかった。*Discula* sp. の感染密度は、宿主範囲の広い優占菌*Phomopsis* spp. の感染密度と弱い負の相関を示したが、シラカシにおいても、宿主選好菌*Tubakia* sp.1 は、広宿主範囲菌である*Phomopsis* spp. の感染率と負の相関があることが報告されており (松村・福田, 2009)、さらに両者の培地上での拮抗関係が示されている (松村・福田, 投稿中)。同様の現象がコナラの葉においても生じ

ているとすれば、林縁で*Phomopsis* spp. の感染密度が低下したことが、宿主選好菌*Discula* sp. の感染密度を高くする方向に働いている可能性も考えられる。

以上のことから、都市林における森林の孤立化・小面積化に伴う林縁的環境の増大は、広宿主範囲菌である*Phomopsis* spp. を含む内生菌感染率全体の低下を引き起こしている可能性はあるものの、ナラ類の宿主選好菌である優占種*Discula* sp. の衰退をもたらした要因とは考えられなかった。したがって、今後は、森林の孤立化に伴う宿主樹種の個体数の減少、すなわち宿主選好菌の感染源の減少が、宿主選好菌の衰退と広宿主範囲菌の増加をもたらしているというもう一つの仮説を、検証することが必要である。

引用文献

- Carroll, G. C. 1995. Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany* 73: S1316–S1324.
- Bahnweg G., W. Heller, S. Stich, C. Knappe, G. Betz, C. Heerdt, R. D. Kehr, D. Ernst, C. Langebartels, A. J. Nunn, J. Rothenburger, R. Schubert, P. Wallis, G. Muller-Starck, H. Werner, R. Matyssek, and H. Sandermann. 2005. Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonium errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biology* 7: 659–669.
- Helander, M. L., S. Neuvonen, T. Sieber, and O. Petrini. 1993. Simulated acid rain affects birch leaf endophyte populations. *Microbial Ecology* 26: 227–234.
- Osono T. and Mori A. 2004. Distribution of phyllosphere fungi within the canopy of giant dogwood. *Mycoscience* 45: 161–168.
- Saikkonen, K. 2007. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews* 21: 67–74.

松村愛美・福田健二. 2009. 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. 関東森林研究 60: 121-124.

松村愛美・福田健二. 2011. 関東地方二次林における樹木葉内生菌の分布特性. 日林学術講122: D38.

Matsumura, E. and K. Fukuda. 2013. A comparison of fungal endophytic community diversity in tree leaves of rural and urban temperate forests of Kanto District, eastern

Japan. Fungal Biology 117: 191-201.

松村愛美・福田健二. 2013. 落葉性, 常緑性広葉樹における内生菌群集の季節変化と葉齢効果. 樹木医学研究 17: 47-48.

松村愛美・福田健二. シラカシとヒサカキにおける葉内生菌の葉内分布と拮抗関係. 樹木医学研究 (投稿中).

著者: 松村愛美 〒277-8653 千葉県柏市柏の葉5-1-5 東京大学柏キャンパス 東京大学大学院新領域創成科学研究科自然環境学専攻 E-mail: emi-matu@nenv.k.u-tokyo.ac.jp, 福田健二 〒277-8653 千葉県柏市柏の葉5-1-5 東京大学柏キャンパス 東京大学大学院新領域創成科学研究科自然環境学専攻 E-mail:

“Spatial variation patterns of fungal endophyte community in oak leaves of suburban forests” Report of Chiba Biodiversity Center 7:28-34. Emi Matsumura・Kenji Fukuda. Department of Natural Environmental Studies Graduate School of Frontier Sciences The University of Tokyo Kashiwanoha 5-1-5, Kashiwa-shi, Chiba 277-8653, Japan. E-mail: emi-matu@nenv.k.u-tokyo.ac.jp

Abstract: In order to clarify the mechanism of decline in host-specific fungal endophytes in tree leaves in urban forests, spatial variations in tree endophytic assemblages were examined in urban forests in Nagareyama city and Kashiwa city, Chiba prefecture. Endophyte assemblages in oak (*Quercus serrata* and *Q. acutissima*) leaves were compared among different microhabitats such as forest edge or top of the forest canopy and inside. Infection frequency (IF) and infection density (ID) of *Phomopsis* spp. which are dominant endophytes with broad host range decreased at forest edge and canopy top. High temperature and strong sunshine at forest edge and canopy top seemed to negatively influence endophyte infection. On the other hand, IF and ID of another dominant endophyte *Discula* sp. which are host specific to *Quercus* spp. showed no difference among these microhabitats.

Keywords: Forest edge, canopy, microclimate, *Discula*, *Phomopsis*

(受理 2014年1月23日)