

筑波大学構内と筑波実験植物園に生育する常緑樹数種の植物内生性担子菌類の調査

秋成 怜美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岡根 泉 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

植物内生菌は、生活環のある時期に害を及ぼすことなく植物組織内に生息する菌類と定義され、2,770 種以上が知られる。そのうち約 87%が子囊菌門に属し、担子菌門は約 9%であるが、その調査は分離培養が主体である。担子菌門の菌類は一般に成長が遅く、人工培地による分離が難しい分類群を含む。したがって、培養依存的な方法では担子菌門の内生菌の多様性が見落とされている可能性がある。さらに、葉内の担子菌の DNA を担子菌特異的プライマーセットで検出する菌類相の調査研究は、土壌や根圏を扱ったものに比べ非常に少ない。

タケ類の内生菌のほとんどは子囊菌門のフンタマカビ綱とクロイボタケ綱が占めるとされる。一方、ギンバイカの葉の菌類相のメタバーコーディング研究で、菌相の半分程度が担子菌であることが報告され、樹種により内生性担子菌類の多様性に違いがあることが予想される。

本研究では、筑波大学構内及び筑波実験植物園に生育するホテイチク及びギンバイカをはじめとする常緑樹数種の葉の内生性担子菌の菌類相を明らかにすることを目的として、特異的プライマーセットを用いた培養非依存的な方法と、一部の樹種については培養依存的な方法での内生菌調査を行った。

【材料と方法】

(1) 供試植物

2022 年 5 月と 8 月に筑波実験植物園で採取したギンバイカ (MC) 1 個体とその亜種 (MCT) 1 個体、斑入り品種 (MCV) 2 個体、ギンバイカ属の一種 (MCS) 1 個体、及び同年 2 月と 8 月に筑波大学構内で採取したホテイチク (Pa) 3 株、クスノキ (Cc) 3 個体、ヒラドツツジ (R×p) 2 個体とツツジ属の一種 (RS) 1 個体、サザンカ (Cas) 2 個体とヤブツバキ (Caj) 1 個体、シラカシ (Qm) 3 個体、モミ (Af) 3 個体の生葉 5 から 10 枚を以下の実験に供試した。

(2) 特異的プライマーセットによる葉圏の担子菌の検出

上記の供試植物の生葉をエーロゾル OT 0.005%による洗浄法 (徳増、1980) で処理し、CTAB 法で DNA 抽出を行った。菌類特異的プライマー ITS1F と担子菌特異的プライマー ITS4B または担子菌・接合菌・植物特異的プライマー LB-W による ITS 領域の PCR 増幅と PCR 産物の TA クローニングを行った。得られた配列を用いて BLAST 検索による簡易同定を行った。また、担子菌が検出された樹種については葉面菌の分離培養も試みた。

(3) 分離培養によるギンバイカ属、ホテイチクの内生菌の調査

供試植物のうち、ギンバイカ属とホテイチクの生葉に対し 70% エタノールと 1% 次亜塩素酸ナトリウムによる表面殺菌処理の後に葉片を PDA 培地に置き内生菌の分離培養を行った。分離株から DNA の抽出、rDNA の ITS 領域の PCR 増幅を行い、得られた塩基配列で BLAST 検索による簡易同定を行った。

【結果および考察】

(1) 特異的プライマーセットで検出された担子菌

リード総数 118 配列を得て、各個体で重複する分類群の配列を除き 87 配列を得た。2 月に調査したツツジ属の一種 1 個体、クスノキ 1 個体、5 月に調査したギンバイカ属の 5 個体、8 月に調査した全ての樹種で担子菌が検出された。最も多くの宿主から検出されたのは順にシロキクラゲ目、エリスロバシジウム目、モチビョウキン目だった。目が不明な菌の半数以上はモチビョウキン綱だった。モチビョウキン属 (*Exobasidium*) が検出されたツツジ属を含むほとんどの樹種からモチビョウキン綱が検出されたが、クロボキン亜門の分類群による病害が未報告のモミでも *Exobasidium* 属が検出され、潜在的な病原菌の内生や宿主範囲の広さが示唆された。また、検出された分類群の多くが酵母に類別される種だった。その中には、シロキクラゲ目の *Carlosrosaea foliicola*、*Derxomyces melastomatis*、レウコスפורジウム目の *Leucosporidium intermedium*、フクロタンシキン目の *Robertozyma ningxiaensis* のように、内生菌として未報告の種も検出された。葉面菌の分離培養では、葉面菌として知られる *Cladosporium* 属や *Aureobasidium* 属などと共に、クローニングで検出された *C. foliicola*、*Erythrobasidium hasegawianum*、*Derxomyces* 属、*Dioszegia* 属などの菌が分離された。一方、クローニングで検出された *Exobasidium* 属や *Leucosporidium* 属、*Robertozyma* 属などは葉面菌の分離培養では検出されなかった。

(2) 分離培養で検出された菌類

ギンバイカ属 5 個体から 29 株、ホテイチク 3 株から 12 株が得られたが、全て子囊菌門のクロイボタケ綱またはフンタマカビ綱に属し、担子菌門の分類群は検出されなかった。

【まとめ】

内生菌の分離培養では担子菌が検出されない一方で、特異的プライマーを用いた検出ではいずれかの採取時期で全樹種の生葉で担子菌が検出された。担子菌の検出頻度が低いと推測したホテイチクでも複数の担子菌が検出された。また、潜在的な病原菌の内生や宿主範囲の広さが示唆される分類群も検出された。葉面菌の分離培養により、内生菌として未報告である一部の種は葉面菌としての定着が示唆された。一方、葉面菌として分離されずクローニングのみで検出された *L. intermedium*、*R. ningxiaensis*、*Exobasidium* 属などは葉の組織内部での生息が示唆された。

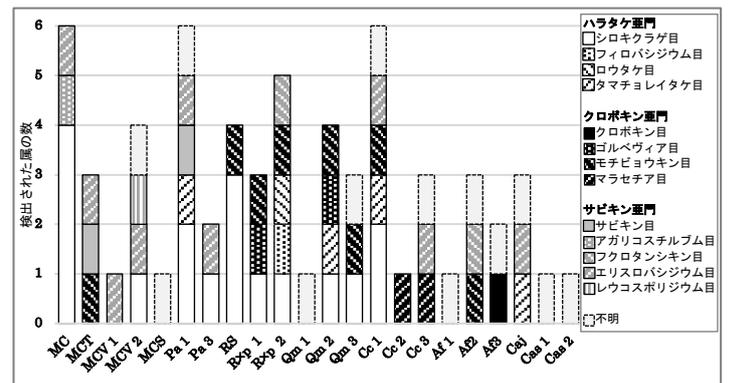


図 1 特異的プライマーセットで検出した宿主個体葉内の担子菌分類群の内訳。横軸は宿主、縦軸は 2 回の採取分で検出された属数を合算した値。