

利尻島においてミズナラ落葉の漂白に関わる子囊菌類

大園享司¹⁾・広瀬 大²⁾

¹⁾ 〒 520-2113 大津市平野 2-509-3 京都大学生態学研究センター

²⁾ 〒 274-8555 船橋市習志野台 7-7-1 日本大学薬学部

Ascomycete Fungi Associated with the Bleaching of *Quercus crispula* Leaf Litter in Rishiri Island

Takashi OSONO¹⁾ and Dai HIROSE²⁾

¹⁾Center for Ecological Research, Kyoto University, 2-509-3, Hirano, Otsu, Shiga, 520-2113 Japan

²⁾College of Pharmacy, Nihon University, 7-7-1, Narashinodai, Funabashi, Chiba, 274-8555 Japan

Abstract. Fungi associated with the bleaching of *Quercus crispula* leaf litter were studied in Rishiri Island, northern Japan. Leaf mass per area and lignin content were lower in bleached than in nonbleached leaf area. A total of 47 fungal isolates were obtained from surface-sterilized leaf disks from bleached and non-bleached leaf area. Three of these isolates (denoted as RQ-BL-21, RQ-BL-151, and RQ-NB-31) exhibited the bleaching activity of sterilized leaf litter under the pure culture. Molecular analysis indicated that the three isolates were phylogenically related to ascomycete species in Leotiomyces, *Xylaria*, and Sarcosomataceae, respectively.

はじめに

菌類は難分解性の構造的有機物であるリグニンを効率的に分解する能力を有しており、森林土壌における落葉の分解において中心的な役割を担う (Osono, 2007)。リグニン分解性菌類の定着を受けた落葉組織は白色化することが知られており、落葉の漂白とよばれる。漂白を受けた部位の落葉組織 (以下、漂白部とする) の化学組成や漂白に関与する菌類種については、わが国では京都の冷温帯林のブナ (Osono & Takeda, 2001)、京都の暖温帯林のヤブツバキ (Koide *et al.*, 2005a, 2005b)、沖縄本島の亜熱帯林のスタジイ (Osono *et al.*, 2008b) で報告されている。またカナダでは太平洋岸のダグラスモミ林の主要な下層植生である *Gaultheria shallon* (ツツジ科) の葉に顕著な漂白が認められる (Osono *et al.*, 2008a)。タイ北部の

熱帯季節林では *Shorea obtusa* (フタバガキ科) の落葉に漂白が認められる (Osono *et al.*, 2009)。これらのデータをまとめた Osono (2006) によると、1) 落葉表面積全体に占める漂白部位の面積率は熱帯林よりも温帯林で低い、2) 熱帯林では主に担子菌類が、温帯林では主に子囊菌類が落葉の漂白に関与する、3) 熱帯林、温帯林によらず漂白部のリグニン濃度は漂白を受けていない褐色の非漂白部よりも低い、という傾向が認められている。

冷温帯と寒温帯の移行帯に位置する北海道の針葉樹林では、担子菌類が腐植層の漂白を引き起こすことが Miyamoto *et al.* (2000) および Miyamoto & Igarashi (2004) により明らかにされている。一方で、分解初期段階の落葉の漂白にどのような菌類が関与するのかについては報告例がない。本研究では、利尻島の姫沼周辺で観察されたミズナラの漂

白を受けた落葉（図1）を材料として、漂白部の化学組成と、漂白に関与する菌類を調べた結果を報告する。比較のため、北海道南部の黒松内で1999年5月に採取したブナ落葉の漂白部の化学性と、この漂白部から分離され、なおかつ培養系において漂白力を示した菌株に関する未発表データも合わせて示す。

本研究は財団法人発酵研究所の特定研究「日本における微生物多様性評価に関する調査研究」による資金援助を受けて実施された。研究の実施にあたり、環境省より利尻島での採取許可を受けた。NBRCの岡根泉博士、中桐昭博士には試料採取において多大なる援助をいただいた。利尻町立博物館の佐藤雅彦氏には利尻島に関する情報を提供いただいた。京都大学大学院農学研究科の小田貴志博士にはブナ落葉の漂白菌類の遺伝子解析において助力いただいた。これらの方々にお礼申し上げる。

調査地および調査方法

2007年7月、北海道利尻富士町の姫沼周辺において、漂白を受けたミズナラ落葉を採取した。歩道に沿って4mのトランセクトを設定し、1m間隔で5地点を選定した。各地点で20×20cmのワクを林床に置いて、ワク内に含まれるミズナラ落葉を4枚ずつ採取し化学分析に用いた。また各地点のワクの周辺から漂白を受けたミズナラ落葉を4枚ずつ、5地点で計20枚を採取し、菌類の分離に用いた。採取した落葉は紙袋に入れて室温で保管し、実験室に持ち帰った。落葉試料の処理は採取5日後に行った。

化学分析用のミズナラ落葉について、漂白部と同じ落葉の非漂白部から直径6mmのパンチを用いて葉片をワクあたり15～22枚ずつ打ち抜いた。葉片は40℃の恒温乾燥機で1週間乾燥後、重量を測定した。葉片の葉面積と重量から葉重比（mg/

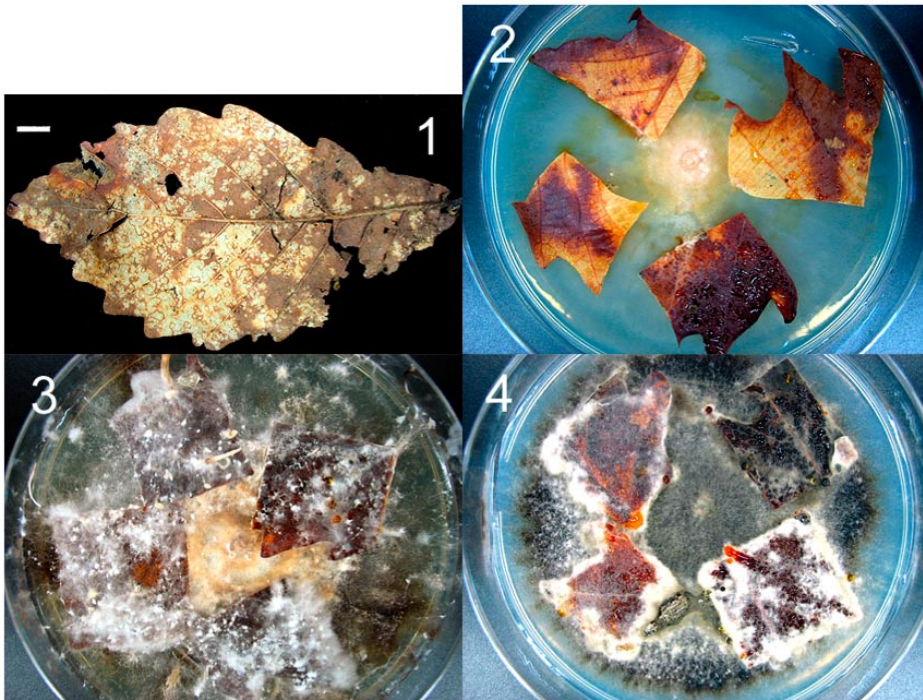


図1. (1) 漂白を受けたミズナラ落葉（利尻島）、培養系における菌類による減菌済みミズナラ落葉の漂白：(2) RQ-BL-21, (3) RQ-NB-31, (4) RQ-BL-151.

表 1. ミズナラ落葉の漂白力を有する菌株と、それら菌株の DNA 塩基配列による分類群の検討。北海道南部の黒松内で採取したブナ落葉の漂白部から分離された菌株のデータも合わせて示した（大園，未発表）

菌株コード	分離部位	コロニー形態の観察に基づく分類群	遺伝子	DDBJ 登録番号	GenBank で塩基配列の相同性がもっとも高かった菌類の分類群	相同性	塩基配列に基づく分類群
ミズナラ(利尻)							
RQ-BL-21	漂白部	White sterile mycelium	D1-D2	AB465204	<i>Phialea strobilina</i> (EF596821)	98%	Leotiomycete sp.
RQ-NB-31	非漂白部	<i>Xylaria</i> sp.	D1-D2	AB465203	<i>Xylaria acuta</i> (AY544676)	98%	<i>Xylaria</i> sp.
			ITS	AB465207	Beech leaf mycelium (AB041994)	99%	<i>Xylaria</i> sp.
RQ-BL-151	漂白部	Dark sterile mycelium	D1-D2	AB465202	<i>Pseudopezizomyces nigrella</i> (AY945852)	99%	Sarcosomataceae sp.
			ITS	AB465206	Foliar endophyte of <i>Picea glauca</i> (AY566889)	98%	Sarcosomataceae sp.
ブナ(黒松内)							
KW1	漂白部	White sterile mycelium	ITS	AB041994	<i>Xylaria</i> sp. (DQ780446)	100%	<i>Xylaria</i> sp.

cm²) を算出した。10 地点の漂白部と非漂白部の葉片はそれぞれ混合して 1 点ずつ、計 2 点としてからミルで粉碎した。粉末試料を用いて、硫酸法によりリグニン濃度を、硫酸フェノール法により全炭水化物濃度を、それぞれ測定した（大園・武田，2003）。

20 枚の漂白落葉の漂白部とそれに隣接する非漂白部から、火炎滅菌したコルクボーラー（直径 5.5mm）を用いて葉片を 1 片ずつ、合計 40 片を打ち抜き、菌類の分離に用いた。菌類の分離は表面殺菌法により行った（大園，2006）。表面殺菌後の葉片は LCA 培地（三浦・工藤，1970）の表面に置き、20°C の暗所で 1 ヶ月間培養した。葉片は培養期間中に適宜観察し、出現菌を順次、分離した。生殖器官を形成した分離菌株の同定は、微小形態の顕微鏡観察に基づいて行った。

分離菌株の落葉漂白力は培養試験により確認した。漂白力の確認に用いた落葉は長野県上田市において 2007 年 11 月に採取した。2% 麦芽エキス寒天培地（麦芽エキス 2%，寒天末 2%）上で 1 ヶ月間前培養した菌類コロニーに、オートクレーブ滅菌（120°C，20 分間）したミズナラ落葉の葉片（約

1cm 四方）を置き、20°C でさらに 1 ヶ月間培養した。培養後の葉片の表面を倍率 40 倍の実体顕微鏡で観察し、落葉の白色化の有無を記録した。

培養系において落葉の漂白を引き起こした 3 菌株（RQ-BL-21，RQ-NB-31，RQ-BL-151）については、DNA 塩基配列による分類群の検討を行った。DNA 抽出は、2% 麦芽液体培地で 1 週間程培養した菌体から改変 CTAB 法（Matsuda & Hijii, 1999）により行った。PCR 法による増幅は、rDNA ITS 領域及び 28SrDNA D1-D2 領域を対象とした。プライマーは、ITS 領域：ITS1-F（Gardes & Bruns, 1993）－ITS4（White *et al.*, 1990），D1-D2 領域：D1（Peterson, 2000）－NL4（O'Donnell, 1993）を用いた。PCR 産物を精製後、それらをテンプレートとしシークエンス反応を行い、塩基配列を決定した（Hirose & Osono, 2006）。決定された配列の DDBJ 登録番号は表 1 に示した。配列データを基に、NCBI の BLAST 検索（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）を行い、菌株の分類群を決定した。なお、RQ-BL-21 に関しては ITS 領域における PCR 増幅がみられなかったため D-D2 領域の結果のみを示した。

結果と考察

[落葉の漂白部と非漂白部の化学組成]

ミズナラ落葉の漂白部では、非漂白部に比べて、LMA およびリグニン濃度が低く、全炭水化物濃度が高かった (表 2)。この傾向は、利尻島の約 290km 南方に位置する北海道の黒松内において採取したブナ漂白落葉 (表 2) や、本州、南西諸島、東南アジアの各地で採取した漂白落葉での結果 (Osono, 2006) と一致した。

[落葉から出現した菌類]

ミズナラ落葉の漂白部・非漂白部からあわせて 47 菌株が分離された。このうち白色の胞子未形成菌株が 18 菌株、暗色の胞子未形成菌株が 9 菌株であった。培養条件下で胞子を形成したのはこれら以外の 20 菌株であり、内訳は *Penicillium soppi* が 4 菌株、*Umbelopsis nana* が 3 菌株、*Cladosporium cladosporioides* が 2 菌株であった。*Alternaria* sp., *Chaetomium* sp., *Mucor gevenensis*, *Nigrospora sphaerica*, *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Pyrenochaeta* sp., *Sclerotinia* sp., *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma* sp. が各 1 菌株ずつ得られた。このうち *Penicillium soppi*, *C. cladosporioides*, *M. gevenensis*, および *T. polysporum* は利尻山のダケカンバ落葉上からも分離されている (Osono & Hirose, 2009)。

[菌類の落葉漂白活性]

白色および暗色の胞子未形成菌株 27 菌株を培養コロニーの巨視的形態の特徴に基づいて 20 タイプに類別した。この 20 タイプの計 20 菌株を対象と

して、滅菌したミズナラ落葉の漂白力を評価した。その結果、漂白部から分離された白色の胞子未形成菌株 RQ-BL-21 および暗色の胞子未形成菌株 RQ-BL-151, および非漂白部から分離され滅菌落葉上でシンネマを形成して *Xylaria* sp. と同定された RQ-NB-31, の 3 菌株で落葉の漂白力が認められた (図 1)。

[落葉漂白菌の分類群の検討]

落葉の漂白活性が認められた 3 菌株について DNA 塩基配列を決定し、BLAST 検索を行ったところ、いずれも子囊菌門に属することが確かめられた。RQ-BL-21 はズキンタケ綱 (Leotiomycetes) に属する菌類と、RQ-NB-31 はクロサイワイタケ科の *Xylaria* sp. と、そして RQ-BL-151 はクロチャワンタケ科 (Sarcosomataceae) に属する菌類と、それぞれもともと相同性が高かった (表 1)。

利尻島のミズナラ落葉上で漂白に関与する *Xylaria* sp. (RQ-NB-31) は、黒松内のブナ落葉の漂白に関与する *Xylaria* sp. と系統的に近縁であった (表 2)。京都府においても *Xylaria* sp. がブナ落葉の漂白に関与することが確かめられている (Osono & Takeda, 2001)。以上からわが国の冷温帯以北では、*Xylaria* 属の種が共通してブナ科樹木の落葉の漂白に関与する可能性がある。ズキンタケ綱の菌類ではリチズマ科の *Coccomyces* 属および *Lophodermium* 属の菌類においてリグニン分解活性が確認されている (Koide *et al.*, 2005a, 2005b; Osono *et al.*, 2008a; 大園, 未発表)。クロチャワンタケ科菌類は子実体が落葉上に発生することが知られているが、同科菌類が落葉分解においてどのような役割を果たすのかについては検討されて

表 2. 利尻島で採取したミズナラ落葉の漂白部と非漂白部の葉重比とリグニン・全炭水化物の含有量。値は平均±標準誤差 (n=5)。北海道南部の黒松内で採取したブナ漂白落葉のデータも合わせて示した (大園, 未発表)。対応のある t 検定、* P<0.001, nd 未測定

	ミズナラ (利尻)		ブナ (黒松内)	
	漂白部	非漂白部	漂白部	非漂白部
葉重比 (mg/cm ²)	4.3 ± 0.2	6.5 ± 0.3*	nd	nd
リグニン (mg/g)	253	432	290	330
全炭水化物 (mg/g)	355	266	297	254

いなかった。本研究から、同科菌類には活発な落葉分解活性を示す種が存在する可能性が考えられた。

北海道の針葉樹林では、*Mycena* 属、*Collybia* 属の担子菌類がリグニン分解力を有し、腐植層の漂白に関与していることが確かめられている (Miyamoto *et al.*, 2000; Miyamoto & Igarashi, 2004)。今回の結果から、北海道では担子菌類に加えて子囊菌類も広葉樹の落葉の漂白を引き起こすことが実証的に示された。今後はこれら落葉漂白菌類のリグニン分解活性や、同属菌による落葉漂白が北海道以外の地域においても同様に認められるかについて、さらに調査を進める必要がある。

参考文献

- Gardes M. & T. D., Bruns, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118.
- Hirose D. & T. Osono, 2006. Development and seasonal variations of *Lophodermium populations* on *Pinus thunbergii* needle litter. *Mycoscience*, 47: 242-247.
- Koide K., Osono T. & H. Takeda, 2005a. Colonization and lignin decomposition of *Camellia japonica* leaf litter by endophytic fungi. *Mycoscience*, 46: 280-286.
- Koide K., Osono T. & H. Takeda, 2005b. Fungal succession and decomposition of *Camellia japonica* leaf litter. *Ecological Research*, 20: 599-609.
- Matsuda Y. & N. Hijii, 1999. Characterization and identification of *Strobilomyces confusus* ectomycorrhizas on momi fir by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS region of the rDNA. *Journal of Forest Research*, 4: 145-150.
- 三浦宏一郎・工藤光代, 1970. 水生不完全菌類のための一寒天培地. 日本菌学会報, 11: 116-118.
- Miyamoto T. & T. Igarashi, 2004. Spatial distribution of *Collybia pinastris* sporophores in a *Picea abies* forest floor over a 5-year period. *Mycoscience*, 45: 24-29.
- Miyamoto T., Igarashi, T. & K. Takahashi, 2000. Lignin-degrading ability of litter-decomposing basidiomycetes from *Picea* forests of Hokkaido. *Mycoscience*, 41: 105-110.
- O'Donnell K., 1993. Fusarium and its near relatives. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Edited by D.R. Reynolds, and J.W. Taylor. CAB International, Wallingford. pp. 225-233.
- Osono T., 2006. Fungal decomposition of lignin in leaf litter: comparison between tropical and temperate forests. In: *Proceedings for the 8th International Mycological Congress*, August 20-25, 2006. Cairns, Australia (eds by Meyer W. and Pearce C.), pp. 111-117, Medimond, Italy.
- 大園享司, 2006. 輪紋葉枯病に罹病したミズキ葉上の菌類と病原菌に対する拮抗作用. 森林応用研究, 15: 7-12.
- Osono T., 2007. Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research*, 22: 955-974.
- Osono T. & H. Takeda, 2001. Effects of organic chemical quality and mineral nitrogen addition on lignin and holocellulose decomposition of beech leaf litter by *Xylaria* sp. *European Journal of Soil Biology*, 37: 17-23.
- 大園享司・武田博清, 2003. 菌類によるコナラ材の分解：麦芽エキス添加の効果. 森林応用研究, 12: 177-180.
- Osono T. & D. Hirose, 2009. Altitudinal distribution of microfungi associated with *Betula ermanii* leaf litter on Mt. Rishiri, northern Japan. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: in press.
- Osono T., Iwamoto S. & J. A. Trofymow, 2008a. Colonization and decomposition of salal

- (*Gaultheria shallon*) leaf litter by fungi in successional forests on coastal British Columbia. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 427-434.
- Osono T., Ishii Y. & D. Hirose, 2008b. Fungal colonization and decomposition of *Castanopsis sieboldii* leaf litter in a subtropical forest. *Ecological Research*, 23: 909-917.
- Osono T., Ishii Y., Takeda H., Seramethakun T., Khamyong S., To-Anun C., Hirose D., Tokumasu S. & M. Kakishima, 2009. Decomposition and fungal succession on *Shorea obtusa* leaf litter in a tropical seasonal forest in northern Thailand. *Fungal Diversity*, 36: in press.
- Peterson S. W., 2000. Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and *lsu-rDNA* nucleotide sequences. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (eds. R. A. Samson, and J. I. Pitt), pp 163-178, Harwood, Amsterdam.
- White T. J., Bruns T., Lee S. & J. W. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White), pp. 315-322, Academic Press, Inc., New York.