

## Roles of Endophytic Fungi in Lignin Decomposition of Tree Leaves

Takashi OSONO\* and Dai HIROSE\*\*

(Received January 28, 2020)

Endophytic fungi derived from live leaves of trees are known to occur on dead leaves and take part in the decomposition. In this review, we summarize the taxonomy and ecology of endophytic fungi associated with the decomposition of tree leaf litter. Topics include their occurrence, colonization, succession, and persistence on leaf litter and their contributions to the decomposition processes. A preliminary study applying molecular biological techniques targeting environmental DNA recently suggested minor roles of endophytic fungi in lignin decomposition of subtropical and tropical tree leaves.

**Key words :** subtropical forest, fungal succession, tropic, bleach, Rhytismataceae

**キーワード :** 亜熱帯林, 菌類遷移, 熱帯, 漂白, リチズマ科

### 内生菌が樹木落葉のリグニン分解に果たす役割

大園 享司, 広瀬 大

#### 1. はじめに

内生菌はエンドファイトともよばれ, 一般的に「生活環のある時期に植物に何ら害を及ぼすことなく組織内部に生息する菌類」と定義される. 広義には, 表面殺菌した植物組織から出現する菌類が内生菌とみなされる場合が多い<sup>1)</sup>. 内生菌はこれまで調べられたあらゆる陸上植物から報告されており, 樹木でも葉身や葉柄, 茎, 枝, 樹皮といった地上部の組織のみならず, 地下部の根からも見出されている. 樹木の葉に見出される内生菌の研究が活発に進められており, その系統分類学的な特徴のみならず, 生態, 生理, 植物との相互作用, ならびに応用などについての知見が集積しつつある<sup>2)</sup>.

生態系における内生菌の役割の1つとして, 落葉の分解に果たす腐生菌としての重要性が知られてい

る. Hudson (1968)<sup>3)</sup>は植物残渣の分解にともなう菌類遷移についてレビューし, 生葉に由来する寄生菌(内生菌を含む生葉関連菌)が枯死葉の分解初期に出現することを報告した. その後, 内生菌が分解初期の落葉から出現することが様々な樹木において報告されている. Osono (2006)<sup>4)</sup>と Osono and Hirose (2009)<sup>5)</sup>はそれらの情報を総合化し, 内生菌が樹木落葉の分解者菌類群集の発達と分解プロセスに果たす役割について明らかにした. それ以降も, リグニン分解に関わる内生菌の生態と機能について一連の研究成果が報告されるとともに, 新たな分子生物学的手法の導入と, これまで調査例の少なかった亜熱帯林・熱帯林での研究が行われつつある.

本総説では, 落葉分解に関わる内生菌の分類学的な多様性と生態についてまとめるとともに, 内生菌

\*Department of Environmental Systems Science, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto 610-0394

Telephone: +81-774-65-6688, E-mail: tosono@mail.doshisha.ac.jp

\*\*College of Pharmacy, Nihon University, Funabashi, Chiba

が落葉のリグニン分解に果たす役割と、分子生物学的手法を用いた亜熱帯林・熱帯林での最新の研究事例を紹介する。

なお本総説では、硫酸に不溶の残渣（クラークソンリグニン）をリグニンとよぶ。この酸不溶性画分には、リグニンに加えて、タンニンやクチン、腐植物質などが含まれることが知られている<sup>6)</sup>。

## 2. 落葉からの出現

内生菌は、落葉からの出現の有無に基づいて、生葉だけでなく落葉からも出現する種と、生葉から出現するものの落葉からは出現しない種の2群に大別される。Table 1 には、さまざまな樹木の落葉からも出現する内生菌の種数をまとめた。これらのデータに基づいて集約すると、平均して樹種あたり 2.5 種 (n=17) の内生菌が落葉から出現しており、この種数は生葉から報告される内生菌の全種数の67%を占める。

これらの内生菌が落葉における分解者群集に占める割合（相対頻度）は平均で31% (n=22) だが、樹種や分解段階により3~92%と大きく異なる (Table 1)。この分解者菌類群集に占める内生菌の相対頻度は、分解にともなって減少する場合もあれば<sup>11,15)</sup>、ほとんど変化しないか<sup>8)</sup>、増加する場合もある<sup>14)</sup>。また、常緑樹の落葉では、この相対頻度が季節的に変化する場合も報告されている<sup>7,10)</sup>。

落葉から出現する内生菌としては、子嚢菌類とそのアナモルフの属である *Pestalotopsis* 属、*Alternaria* 属、*Phomopsis* 属、*Colletotrichum* 属、*Guignardia* 属、*Xylaria* 属、*Geniculosporium* 属、*Nodulisporium* 属がよく知られている (Table 1)。分離培養法を用いた場合、樹木生葉の内生菌としてこれらの子嚢菌類とそのアナモルフの属がくりかえし得られることは一般的な傾向といえる<sup>19)</sup>。

これまで、形態観察により種同定を行っていた従来の研究では、担子菌類が内生菌として検出されることはほとんどなかった。しかし近年になって、分類群の特定に分子生物学的手法が用いられるようになると、担子菌類が内生菌として頻繁に検出されることがわかってきた<sup>20)</sup>。分子生物学的手法は生葉

および落葉から得られた菌株の同一性や系統的な近縁度を評価するのもにも適した方法であり<sup>21)</sup>、それら担子菌類に属する内生菌が落葉分解に果たす役割についても今後明らかにされていくと考えられる。

## 3. 落葉への定着と遷移

落葉への内生菌の定着経路としては、生葉からの存続と落葉への直接定着の2つの経路が考えられる。

菌類遷移の研究では、枯死葉の分解初期に出現する寄生菌は、生葉に感染して落葉に存続すると考えられてきた<sup>3)</sup>。事実、落葉直後の枯死葉を滅菌して菌類を排除してから林床に設置した実験では、滅菌した落葉での内生菌の出現頻度が非滅菌の対照落葉と比べて低下する例が報告されており (Table 2)、生葉からの存続が落葉への定着に重要であることが示唆される。そのような内生菌として、ブナの *Phoma* 属の種や *Ascochyta fagi*、ヤブツバキやクロマツのリチズマ科菌類が挙げられる。生葉に潜在感染する内生菌が、葉の老衰が始まるとともに菌糸の伸長を開始し、落葉に存続してから子実体形成を行う生活環を有することが、ダグラスモミの内生菌 *Rhizoglyphus parkeri* や<sup>23)</sup>、ドイツトウヒの内生菌 *Lophodermium piceae* で報告されている<sup>24)</sup>。

その一方で、滅菌落葉から非滅菌の対照落葉と同程度の頻度で出現する内生菌も報告されている。その例として、ブナの内生菌である *Nemania diffusa* (および、その *Geniculosporium* 属アナモルフ<sup>14)</sup>) が挙げられるが、このような内生菌は周辺の落葉や大気中の感染源から落葉へと直接定着していると考えられる。

落葉上に見出される内生菌は、落葉の分解にともなう遷移パターンに基づいて、分解の開始後まもなく姿を消す種と、分解にともなって落葉に存続する種の2群に大別される。生葉に由来する寄生菌は葉の老衰時には優占的だが、枯死葉の分解初期に消失する傾向が一般に認められている<sup>3)</sup>。内生菌が落葉から消失する理由の1つとして、先述のような落葉後に速やかに子実体形成して落葉から姿を消す生活環を持つことが挙げられる (先述)。この他にも、利用可能な基質の枯渇、温度や水分などの微環境の変

Table 1. Number of species, relative proportion in decomposer fungal assemblages, and genera of endophytic fungi on leaf litter of tree species. Modified from Osono and Hirose (2009) <sup>9)</sup>.

Tree species	Study site	Number of species <sup>a</sup> (%)	Leaf type	Relative frequency <sup>b</sup>	Fungal genera <sup>c</sup>
<i>Nothofagus truncata</i> <sup>7)</sup>	New Zealand	2/2 (100)	Dead leaves attached on tree	29	St, Sp
<i>Pinus taeda</i> <sup>8)</sup>	USA	4/4 (100)	Needle from L layer	11	Al, Ni, Pe
			Needle from F1 layer	13	
			Needle from F2 layer	15	
<i>Populus tremuloides</i> <sup>9)</sup>	Canada	1/8 (13)	Newly shed leaves	92	Ds
<i>Eucalyptus viminalis</i> <sup>10)</sup>	Argentina	3/6 (50)	Dead leaves attached on tree	18	Al, Ma, Co
<i>Quercus germana</i> <sup>11)</sup>	Mexico	1/4 (25)	Newly shed leaves (day 0)	39	Pe
			Partly decomposed leaves (day 45-157)	6	
<i>Liquidambar styraciflua</i> <sup>11)</sup>	Mexico	2/2 (100)	Newly shed leaves (day 0)	55	Cl, Pe
			Partly decomposed leaves (day 45-157)	3	
<i>Abies alba</i> <sup>12)</sup>	Switzerland	3/4 (75)	Partly decomposed leaves	17	Cr, Gl, Le
<i>Rhododendron reticulatum</i> <sup>13)</sup>	Japan	4/4 (100)	Yellow fallen leaves	63	Ph, Cm, Al, Pe
<i>R. pulchrum</i> var. <i>speciosum</i> <sup>13)</sup>	Japan	4/4 (100)	Yellow fallen leaves	60	Gu, Ph, Cm, Pe
<i>R. obtusum</i> <sup>13)</sup>	Japan	5/6 (83)	Yellow fallen leaves	51	Ph, Cm, Al, Pe, Di
<i>R. macrosepalum</i> <sup>13)</sup>	Japan	5/5 (100)	Yellow fallen leaves	33	Gu, Ph, Cm, Al, Pe
<i>Pieris japonica</i> <sup>13)</sup>	Japan	1/2 (50)	Yellow fallen leaves	36	Gu
<i>Fagus crenata</i> <sup>4)</sup>	Japan	3/5 (60)	Newly shed leaves	33	Ge, Xy, As
			Partly decomposed leaves	66	
<i>Swida controversa</i> <sup>15)</sup>	Japan	1/5 (20)	Partly decomposed leaves	7	Xy
<i>Camellia japonica</i> <sup>16)</sup>	Japan	2/3 (67)	Partly decomposed leaves	21	Rh, Ge
<i>Castanopsis sieboldii</i> <sup>17)</sup>	Japan	1/2 (50)	Partly decomposed leaves	8	Ge
<i>Shorea obtusa</i> <sup>18)</sup>	Thailand	1/2 (50)	Partly decomposed leaves	17	Ni
Mean		2.5/4 (67)		31	

<sup>a</sup> Number of species of endophytic fungi that occurred frequently on leaf litter as compared with the total number of species of endophytic fungi on live leaves. Percentage in parenthesis.

<sup>b</sup> Relative frequency (%) = the sum of isolation frequency of endophytic fungi on leaf litter / the sum of isolation frequency of all fungi on leaf litter × 100.

<sup>c</sup> Genera of endophytic fungi that occur on leaf litter. St, *Stachyliidium*; Sp, *Sphaeriaceae*; Al, *Alternaria*; Ni, *Nigrospora*; Pe, *Pestalotiopsis*; Ds, dark sterile mycelium; Ma, *Macrophoma*; Co, *Coniothyrium*; Cl, *Cladosporium*; Cr, *Cryptocline*; Gl, *Gloeosporidiella*; Le, *Leptostroma*; Ph, *Phomopsis*; Cm, *Colletotrichum*; Gu, *Guignardia*; Di, *Discostroma*; Ge, *Geniculosporium*; Xy, *Xylaria*; As, *Ascochyta*; Rh, *Rhizmataceae*.

Table 2. Occurrence of endophytic fungi and decomposition on sterilized leaf litter in the field.

Tree species	Frequency of occurrence of endophytic fungi on sterilized leaves	Mass loss of sterilized leaves
<i>Fagus crenata</i> <sup>14)</sup>	Decreased <sup>a</sup>	(no data)
<i>Swida controversa</i> <sup>22)</sup>	No change <sup>a</sup>	No change <sup>a</sup>
<i>Camellia japonica</i> <sup>16)</sup>	Decreased <sup>b</sup>	No change <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Newly shed leaves previously sterilized to exclude fungi and other microbes were placed on the forest floor, and measurements were made on the frequency of occurrence of endophytic fungi on and/or mass loss of the sterilized leaves after a given period of incubation.

<sup>b</sup> A decrease was observed in the bleached leaf area caused by endophytic fungi.

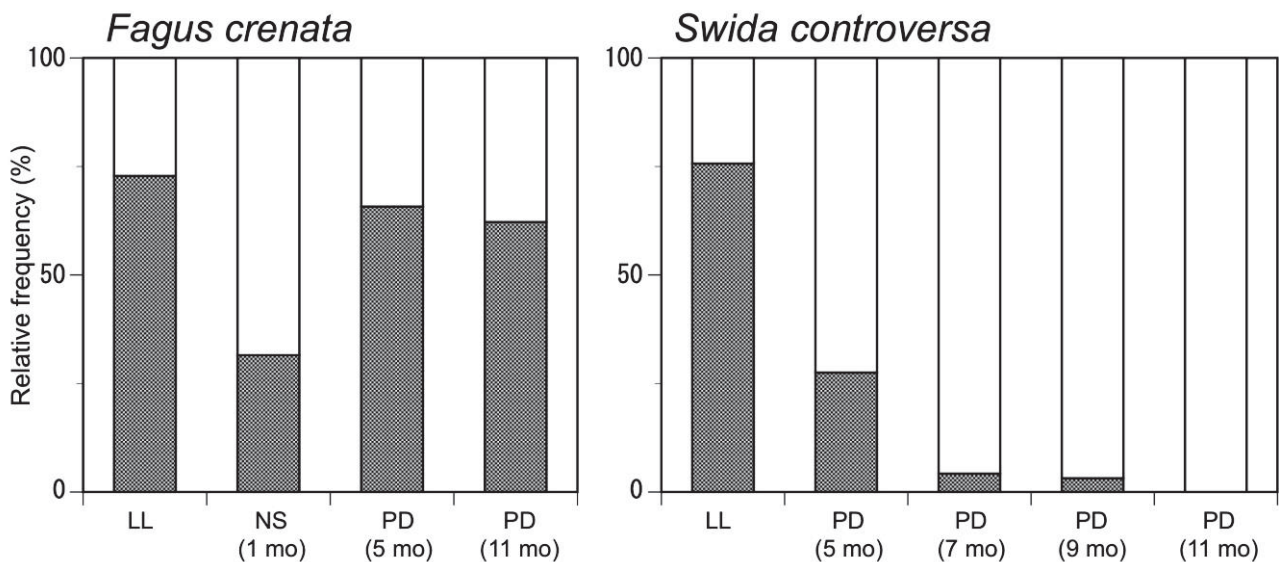


Fig. 1. Succession of endophytic fungi on leaves of *Fagus crenata*<sup>14, 25)</sup> and *Swida controversa*<sup>15)</sup> in a cool temperate forest. Fungi were isolated from leaf litter with a surface disinfection method. LL, live leaves; NS, newly shed leaves; PD, partly decomposed leaves. Relative frequency (%) = the isolation frequency of endophytic fungi / the isolation frequency of all fungi  $\times$  100. Black area indicates the relative frequencies of endophytic fungi on leaves, and blank area indicates those of other fungi than endophytic fungi. Newly shed leaves are defined as those that had been fallen for less than one month, and partly decomposed leaves are defined as those that had been fallen for more than five months.

化、および他の分解菌との干渉競争（拮抗的な菌糸間相互作用、抗菌作用を持つ代謝物の分泌など）などを、内生菌の消失の理由に挙げることができる。

ただし、落葉上の菌類群集における内生菌の相対頻度の変化を見ると（Table 1）、分解にもなって減少するパターンがいくつかの樹種の葉で認められるものの、逆に分解にもなって増加するパターンも認められている。例えば、ブナ（*Fagus crenata*）では、落葉直後（1ヶ月目）には一時的に内生菌の相対頻度が低下するが、5ヶ月目には再び増加し（Fig. 1）、その後も11ヶ月にわたって落葉に存続することが報告されている<sup>25</sup>。難分解性の成分であるリグニンの濃度が比較的高いブナ落葉では、リグニン分解活性を有するクロサイワイタケ科内生菌が長期にわたって落葉に存続すると考えられる<sup>26</sup>。その一方で、リグニン濃度が比較的低いミズキ（*Swida controversa*）の落葉では、利用可能性の高い資源であるリグニン化していない炭水化物が比較的豊富であることから、そのような資源をめぐる他の分解者との獲得競争により、内生菌は落葉から次第に姿を消すと考えられる（Fig. 1）。

#### 4. 落葉分解に及ぼす影響

内生菌には先述のように、落葉後おおよそ1年以内の分解初期段階に出現する種が多い。それら内生菌を含む、初期分解者の分解への寄与を定量的に評価するため、落葉直後の枯死葉を滅菌して菌類を排除してから林床に設置し、その分解速度を非滅菌の対照落葉と比較する実験が行われている。ミズキとヤブツバキを用いた例では、滅菌落葉と対照落葉の分解速度に差が認められなかった（Table 2）。分解初期段階にみられる落葉の重量減少には、可溶性糖類の分解が大きく寄与することが知られている<sup>27</sup>。可溶性糖類の分解は、溶脱と微生物による代謝の2つのプロセスにより進行する。初期段階において分解速度への滅菌処理の効果が認められなかった理由として、内生菌をはじめとする微生物の除去により代謝が低下しても溶脱による重量減少が進む可能性が挙げられる。

リグニン分解活性を有する内生菌が、より長期的

な落葉分解プロセスに影響する可能性が示唆されている。ブナやミズキではクロサイワイタケ科内生菌が、ヤブツバキとクロマツではリチズマ科内生菌が、それぞれリグニンの分解に関与し落葉の漂白を引き起こすことが示唆されている。リグニンは難分解性の構造成分であり、落葉分解の後期段階における重量減少の律速要因になるとともに、分解産物となる腐植物質の量や質に影響し、さらには分解にもなう窒素の動態にも深く関わっている<sup>27,28,29</sup>。リグニン分解活性を有する内生菌は、これらのプロセスに深く関与しているものと考えられる。

内生菌の落葉定着が、落葉の化学的な改変を通じて、後から定着してくる菌類の分解活性に間接的に影響を及ぼすことが、培養系での接種試験により確かめられている。内生菌2種があらかじめ分解したブナ落葉を準備し、その落葉に落葉生の微小菌類を接種すると、微小菌類の落葉分解力は低下した<sup>30</sup>。逆に、内生菌の先行的な分解を受けた落葉では、クヌギタケ属の大型菌類2種によるリグニン分解が促進された。別の研究例で、リグニン分解性の内生菌である *Coccomyces* 属菌があらかじめ分解したヤブツバキ落葉では、落葉生の子囊菌類2種による落葉分解が促進された<sup>31</sup>。実際に野外で観察すると、この *Coccomyces* 属内生菌が先行定着した漂白部位では、本菌は落葉後2ヶ月以内に姿を消すにも関わらず、未定着の非漂白部位に比べて落葉の分解が15ヶ月にわたって促進された<sup>32</sup>。内生菌による脱リグニンが、炭水化物の利用可能性を増加させたことが理由の1つと考えられる。

#### 5. 落葉のリグニン分解と漂白

落葉の漂白は、リグニン分解菌によりリグニンが選択的に除去されることで引き起こされる<sup>6,33</sup>。漂白を引き起こす菌類は落葉分解において中心的な役割を担うことが確かめられつつあるが<sup>6</sup>、落葉漂白に関与する内生菌の生態についてはいまだ研究例が少ない。

これまで、ブナ林構成樹木、ヤブツバキ、スタジイ、サラノキ属樹木で、生葉の内生菌と落葉の漂白菌との比較調査が行われた（Table 3）。ここで漂白

Table 3. Comparison between endophytic fungi on live leaves and bleaching fungi on leaf litter. Asterisks indicate that the fungal taxa were common to both.

Tree species	Endophytic fungi on live leaves	Bleaching fungi on leaf litter <sup>a</sup>
Twelve tree species in beech forest <sup>34)</sup>	<i>Xylaria cubensis</i> *	<i>Xylaria cubensis</i> *
	<i>Nemania diffusa</i> ( <i>Geniculosporium</i> sp.)	
	<i>Biscogniauxia atropunctata</i>	
<i>Camellia japonica</i> <sup>16,32)</sup>	Rhytismataceae spp. *	Rhytismataceae spp. *
	<i>Geniculosporium</i> sp.	
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
<i>Pinus thunbergii</i> <sup>35)</sup>	<i>Lophodermium pinastri</i> *	<i>Lophodermium pinastri</i> *
<i>Castanopsis sieboldii</i> <sup>17)</sup>	<i>Geniculosporium</i> sp.	Lachnocladiaceae sp.
<i>Shorea obtusa</i> <sup>18)</sup>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Lachnocladiaceae sp.
	<i>Nigrospora</i> sp.	
	<i>Geniculosporium</i> sp.	

<sup>a</sup> Bleaching fungi are defined as those that were isolated from bleached portions of leaf litter and caused bleaching of sterilized leaf litter under pure culture conditions.

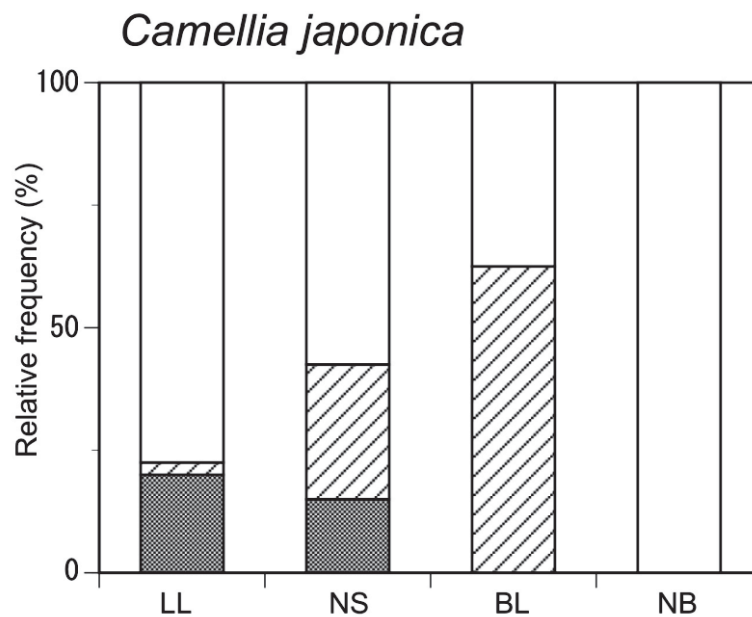


Fig. 2. Succession of endophytic fungi on leaves of *Camellia japonica* in a subtropical forest<sup>37)</sup>. The clone library method was used to investigate fungal assemblages. LL, live leaves; NS, newly shed leaves; BL, bleached portions of partly decomposed leaves; NB, nonbleached portions of partly decomposed leaves. Relative frequency (%) = the number of clones of fungal species / the total number of clones  $\times$  100. Black area indicates the relative frequencies of endophytic fungi on leaves; shaded area indicates the relative frequencies of ligninolytic fungi; and blank area indicates those of other fungi than endophytic or ligninolytic fungi.

菌とは、落葉の漂白部から分離され、かつその菌株が培養条件下において滅菌落葉の漂白を実際に引き起こした菌類を指す。

冷温帯林のブナ林構成樹木では *Xylaria cubensis* が、暖温帯林のヤブツバキとクロマツではリチズマ科菌類 (*Coccomyces* 属, *Lophodermium* 属) が、それぞれ生葉の内生菌でありかつ落葉の漂白菌であった。その一方で、亜熱帯林のスタジイと熱帯林のサラノキ属樹木では、内生菌と漂白菌で共通して出現する菌類はみられなかった。この結果に関連して、Osono (2016)<sup>36)</sup>では、亜熱帯林と熱帯林ののべ78樹種の落葉で漂白を認めており、それらの漂白部においてリチズマ科菌類の子実体が頻繁に記録されている。これら樹種の生葉を対象とした菌類の調査は行われていないが、この漂白部から出現しているリチズマ科菌類が内生菌である可能性は高い。ただし、リチズマ科菌類には菌糸成長の遅い種が含まれるため、菌糸成長速度の高い種が選択的に検出される従来からの分離培養法では検出が困難であるという問題点が考えられる。

その問題点を克服するため、亜熱帯林のヤブツバキ (*Camellia japonica*) を材料として、分子生物学的手法の1つであるクローンライブラリー法を用いた研究が行われた<sup>37)</sup>。生葉、新規落葉、および腐朽落葉の漂白部と非漂白部の4タイプの葉組織からそれぞれDNAを抽出し、菌界に特異的なユニバーサルプライマーを用いてPCR増幅したのち塩基配列を決定した。生葉から高頻度で出現した分類群を内生菌とし、塩基配列をもとに検索した分類学的な情報に基づいて、リグニン分解菌（ここではリチズマ科、クロサイワイタケ科）を決定した。

その結果、内生菌は新規落葉から出現するものの、さらに分解の進んだ腐朽落葉からは出現がみられなかった (Fig. 2)。また、リチズマ科のリグニン分解菌は生葉で検出されたものの相対頻度が低かったが、新規落葉で増加し、漂白部でさらに増加した。以上をまとめると、ヤブツバキでは分子生物学的手法を適用した場合でも分離培養法で得られたのと類似した傾向が認められ、生葉由来のリチズマ科菌類が落葉の漂白に関与していることが実証された。

## 6. 亜熱帯林・熱帯林の落葉漂白に果たす役割

落葉のリグニンの分解は、温帯林や北方林に比べて、亜熱帯林や熱帯林で活発に進行することが知られている<sup>38)</sup>。落葉の漂白が分解プロセスに占める割合をみても、温帯林に比べて亜熱帯林や熱帯林で高い傾向が認められている<sup>36, 39)</sup>。リグニン分解に関わる内生菌の地理的な分布パターンには気温や降水量が影響していることから<sup>40)</sup>、落葉漂白にみられるこのような緯度パターンにも、内生菌が関与している可能性がある。しかし、亜熱帯林・熱帯林の樹種を対象に、内生菌と落葉漂白との関連を調べた研究例は少ない (Table 1)<sup>17, 18)</sup>。

そこでアジア・オセアニアの3地域にみられる6樹種の落葉を材料に、亜熱帯林のヤブツバキについての研究<sup>37)</sup>と同じクローンライブラリー法を用いて予備的な調査を行なった。これらの樹種は各地域の亜熱帯林・熱帯林における優占種であり、落葉上に明瞭な漂白が出現する。6樹種の生葉からあわせて13種、樹種あたり1~3種の内生菌が検出された。このうち3樹種では、それぞれ1種の内生菌が新規落葉から高頻度で出現した (Table 4)。しかし6樹種のすべてにおいて、内生菌は腐朽落葉から出現しなかった。また、3樹種の腐朽落葉の漂白部でリグニン分解菌の出現が認められたが、いずれも内生菌とは別の種であった (Fig. 3)。以上の結果から、これらの樹種で内生菌は落葉にも定着しうるがすぐに姿を消すことと、内生菌が落葉漂白に関与している可能性は低いことが示唆される。

## 7. まとめ

本総説では、樹木葉の内生菌が落葉から頻繁に出現し、落葉の長期的な分解プロセスに関与しうることを明らかにした。特に近年になって、分子生物学的手法の導入により、選択的リグニン分解により落葉の漂白に関与する内生菌の生態・機能について新たな洞察が得られていることを紹介した。亜熱帯林・熱帯林では落葉の漂白が顕著に認められるが、予備調査からは内生菌の漂白への貢献はそれほど大きくない可能性が示唆されている。ただし、熱帯林

Table 4. Relative frequency of 13 species of endophytic fungi detected on leaves of subtropical and tropical trees examined with the clone library method. LL, live leaves; NS, newly shed leaves; BL, bleached portions of partly decomposed leaves; NB, nonbleached portions of partly decomposed leaves. Unpublished data of Osono and Hirose.

Tree species	Study site	Climate	Number of species <sup>a</sup>	Taxon of endophytic fungi <sup>b</sup>	Relative frequency <sup>c</sup>			
					LL	NS	BL	NB
<i>Castanopsis sieboldii</i>	Okinawa, Japan	Subtropical	0/3 (0)	Chaetosphaeriaceae <i>Fellomyces</i>	17	0	0	0
<i>Schima wallichii</i>	Okinawa, Japan	Subtropical	1/1 (100)	Sordariomycetes	13	0	0	0
<i>Dryobalanopsis aromatica</i>	Sarawak, Malaysia	Tropical	1/2 (50)	Gnomoniaceae Sordariomycetes	30	70	0	0
<i>Shorea beccariana</i>	Sarawak, Malaysia	Tropical	0/2 (0)	Sordariomycetes Fungi	17	38	0	0
<i>Cleistanthus myrianthus</i>	Queensland, Australia	Tropical	0/3 (0)	Capnodiales Botryosphaeriales <sup>d</sup>	24	8	0	0
<i>Endiandra microneura</i>	Queensland, Australia	Tropical	1/3 (33)	Mycosphaerellaceae Fungi <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	25	0	0	0
				Mycosphaerellaceae Botryosphaeriales <sup>d</sup>	13	0	0	0
					13	0	0	0

<sup>a</sup> Number of species of endophytic fungi that occurred frequently on leaf litter as compared with the total number of species of endophytic fungi on live leaves. Percentage in parenthesis.

<sup>b</sup> Cladent<sup>41)</sup> was used to assign consensus sequences to fungal taxa. The 'species' in this table denotes the operational taxonomic unit defined at 97% sequence similarity (i.e. OTU<sub>97</sub>).

<sup>c</sup> Relative frequency (%) = the number of clones of fungal species / the total number of clones (12-24) × 100. Frequent species was defined as those that with relative frequency more than or equal to 10%.

<sup>d</sup> The same species.



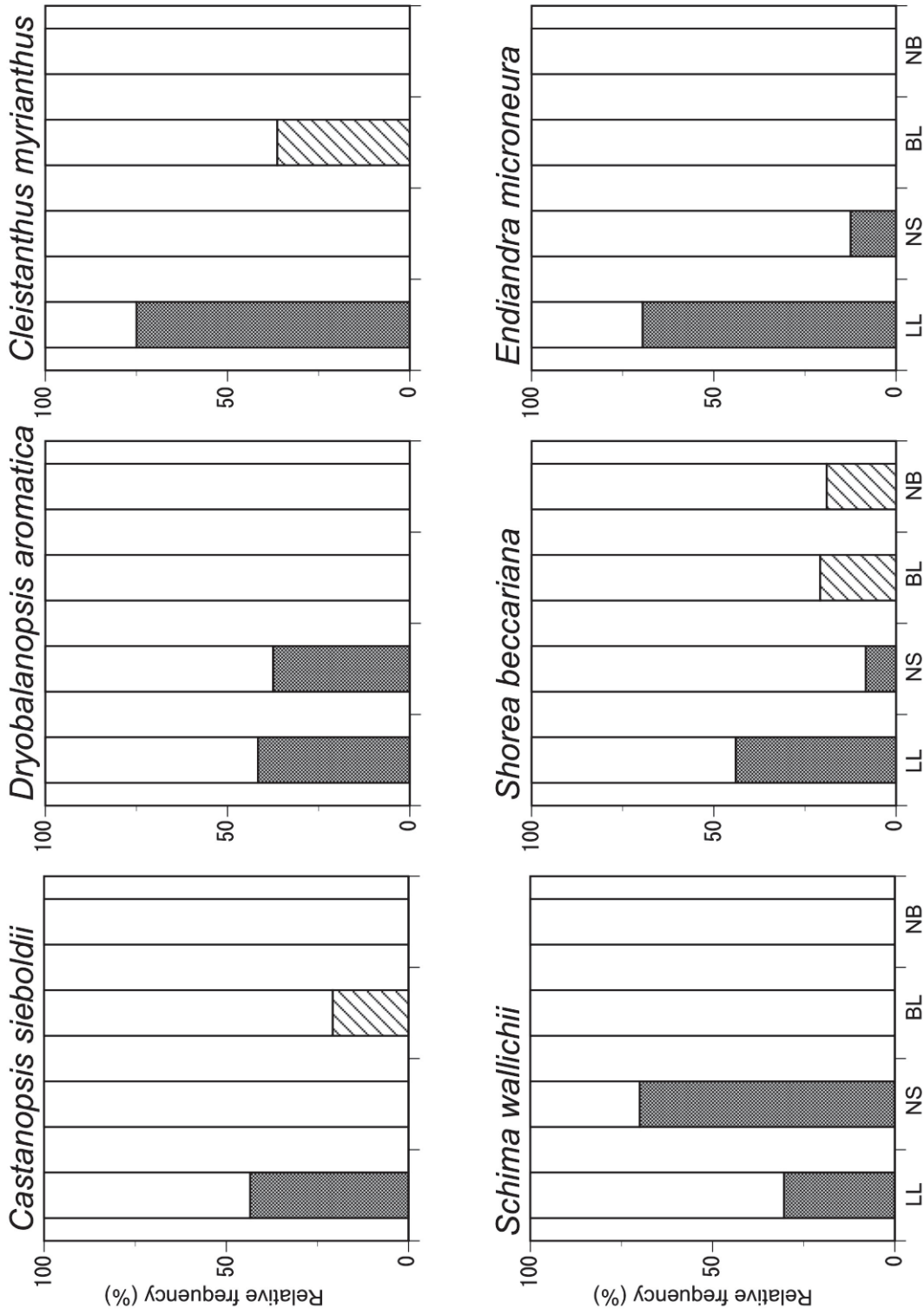


Fig. 3. Succession of endophytic fungi on leaves of six tree species in subtropical and tropical forests (unpublished data of Osono and Hirose). The clone library method was used to investigate fungal assemblages. Relative frequency (%) = the number of clones of fungal species / the total number of clones  $\times$  100. See the legend of Fig. 2 for abbreviations, the calculation of the relative frequencies, and black, shaded, and blank areas.

では樹種の多様性が高い上に、内生菌の超多様性が予測されていることから<sup>42)</sup>、より広範な地域・樹種を対象として、リグニン分解性の内生菌を探索する必要がある。超多様な内生菌の網羅的な探索には、超並列的で高速に塩基配列を決定できる DNA シーケンサーを用いたメタバーコーディングが有効といえる<sup>43)</sup>。また、今後は、ユニバーサルプライマーにより増幅する DNA のバーコーディング領域に加えて、リグニン分解に関わる酵素をコードする機能遺伝子を解析対象とすることで、菌類群集の機能的な側面をより直接的に解析できるものと期待される。

本研究は、JSPS 科研費 18K05731 の助成を受けて行った。

#### 参考文献

- 1) D. Wilson, Ecology of Woody Plant Endophytes, in C.W. Bacon, J. F. White Jr (eds.) *Microbial Endophytes*, (Marcel Dekker, New York, 2000), pp. 389-420.
- 2) 大園享司, "わが国における樹木の葉圏菌類 (エンドファイト・エピファイト) の生態学的研究", 日本菌学会報, **50**, 1-20 (2009).
- 3) H. J. Hudson, "The Ecology of Fungi on Plant Remains above the Soil", *New Phytol.*, **67**, 837-874 (1968).
- 4) T. Osono, "Role of Phyllosphere Fungi of Forest Trees in the Development of Decomposer Fungal Communities and Decomposition Processes of Leaf Litter", *Can. J. Microbiol.*, **52**, 701-716 (2006).
- 5) T. Osono and D. Hirose, Ecology of Endophytic Fungi Associated with Leaf Litter Decomposition, in M. Rai, P. Bridge (eds.), *Applied Mycology*, (CAB International, Wallingford, 2009), pp. 92-109.
- 6) T. Osono, "Functional Diversity of Ligninolytic Fungi Associated with Leaf Litter Decomposition", *Ecol. Res.*, **35**, 30-43 (2020).
- 7) Q. W. Ruscoe, "Mycoflora of Living and Dead Leaves of *Nothofagus Truncata*", *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **56**, 463-474 (1971).
- 8) E. S. Watson, D. C. McClurkin, M. B. Huneycutt, "Fungal Succession on Loblolly Pine and Upland Hardwood Foliage and Litter in North Mississippi", *Ecology*, **55**, 1128-1134 (1974).
- 9) H.G. Wildman and D. Parkinson, "Microfungal Succession on Living Leaves of *Populus Tremuloides*", *Can. J. Bot.*, **57**, 2800-2811 (1979).
- 10) D. Cabral, "Phyllosphere of *Eucalyptus Viminalis*: Dynamics of Fungal Populations", *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **85**, 501-511 (1985).
- 11) G. Heredia, "Mycoflora Associated with Green Leaves and Leaf Litter of *Quercus Germana*, *Quercus Sartorii* and *Liquidambar Styraciflua* in a Mexican Cloud Forest", *Cryptogamie Mycol.*, **14**, 171-183 (1993).
- 12) F. Sieber-Canavesi and T. N. Sieber, "Successional Patterns of Fungal Communities in Needles of European Silver Fir (*Abies Alba* Mill.)", *New Phytol.*, **125**, 149-161 (1993).
- 13) I. Okane, A. Nakagiri, T. Ito, "Endophytic Fungi in Leaves of Ericaceous Plants", *Can. J. Bot.*, **76**, 657-663 (1998).
- 14) T. Osono, "Phyllosphere Fungi on Leaf Litter of *Fagus Crenata*: Occurrence, Colonization, and Succession", *Can. J. Bot.*, **80**, 460-469 (2002).
- 15) T. Osono, B. K. Bhatta, H. Takeda, "Phyllosphere Fungi on Living and Decomposing Leaves of Giant Dogwood", *Mycoscience*, **45**, 35-41 (2004).
- 16) K. Koide, T. Osono, H. Takeda, "Colonization and Lignin Decomposition of *Camellia Japonica* Leaf Litter by Endophytic Fungi", *Mycoscience* **46**, 280-286 (2005).
- 17) T. Osono, Y. Ishii, D. Hirose, "Fungal Colonization and Decomposition of *Castanopsis Sieboldii* Leaf Litter in a Subtropical Forest", *Ecol. Res.*, **23**, 909-917 (2008).
- 18) T. Osono, Y. Ishii, H. Takeda, T. Seramethakun, S. Khamyong, C. To-Anun, D. Hirose, S. Tokumasu, M. Kakishima, "Fungal Succession and Lignin Decomposition on *Shorea Obtusa* Leaves in a Tropical Seasonal Forest in Northern Thailand", *Fungal Divers.*, **36**, 101-119 (2009).
- 19) L. Boddy and G. S. Griffith, "Role of Endophytes and Latent Invasion in the Development of Decay Communities in Sapwood of Angiospermous Trees", *Sydowia*, **41**, 41-73 (1989).
- 20) R. Martin, R. Gazis, D. Skaltsas, P. Chaverri, D. Hibbett, "Unexpected Diversity of Basidiomycetous Endophytes in Sapwood and Leaves of *Hevea*", *Mycologia*, **107**, 284-297 (2015).
- 21) P. Chaverri and R. O. Gazis, "Linking ex Planta Fungi with Their Endophytic Stages: *Perisporiopsis*, a Common Leaf Litter and Soil Fungus, is a Frequent Endophyte of *Hevea* Spp. and other plants", *Fungal Ecol.*, **4**, 94-102 (2011).
- 22) T. Osono, "Colonization and Succession of Fungi during Decomposition of *Swida Controversa* Leaf Litter", *Mycologia*, **97**, 589-597 (2005).
- 23) J. K. Stone, "Initiation and Development of Latent

- Infections by *Rhabdocline Parkeri* on Douglas-fir", *Can. J. Bot.*, **65**, 2614-2621 (1987).
- 24) M. Osorio and B. R. Stephan, "Life Cycle of *Lophodermium Piceae* in Norway Spruce Needles", *Eur. J. For. Pathol.*, **21**, 152-163 (1991).
- 25) T. Osono and H. Takeda, "Organic Chemical and Nutrient Dynamics in Decomposing Beech Leaf Litter in Relation to Fungal Ingrowth and Succession during Three Year Decomposition Processes in a Cool Temperate Deciduous Forest in Japan", *Ecol. Res.*, **16**, 649-670 (2001).
- 26) 大園享司, "冷温帯林における落葉の分解過程と菌類群集", 日本生態学会誌, **57**, 304-318 (2007) .
- 27) T. Osono and H. Takeda, "Decomposition of Organic Chemical Components in Relation to Nitrogen Dynamics in Leaf Litter of 14 Tree Species in a Cool Temperate Forest", *Ecol. Res.*, **20**, 41-49 (2005).
- 28) T. Osono and H. Takeda, "Accumulation and Release of Nitrogen and Phosphorus in Relation to Lignin Decomposition in Leaf Litter of 14 Tree Species in a Cool Temperate Forest", *Ecol. Res.*, **19**, 593-602 (2004).
- 29) T. Osono and H. Takeda, "Limit Values for Decomposition and Convergence Process of Lignocellulose Fraction in Decomposing Leaf Litter of 14 Tree Species in a Cool Temperate Forest", *Ecol. Res.*, **20**, 51-58 (2005).
- 30) T. Osono, "Effects of Prior Decomposition of Beech Leaf Litter by Phyllosphere Fungi on Substrate Utilization by Fungal Decomposers", *Mycoscience*, **44**, 41-45 (2003).
- 31) T. Osono and D. Hirose, "Effects of Prior Decomposition of *Camellia Japonica* Leaf Litter by an Endophytic Fungus on the Subsequent Decomposition by Fungal Colonizers", *Mycoscience*, **50**, 52-55 (2009).
- 32) K. Koide, T. Osono, H. Takeda, "Fungal Succession and Decomposition of *Camellia Japonica* Leaf Litter", *Ecol. Res.*, **20**, 599-609 (2005).
- 33) T. Osono, "Ecology of Ligninolytic Fungi Associated with Leaf Litter Decomposition", *Ecol. Res.*, **22**, 955-974 (2007).
- 34) T. Osono, O. Tateno, H. Masuya, "Diversity and Ubiquity of Xylariaceous Endophytes in Live and Dead Leaves of Temperate Forest Trees", *Mycoscience*, **54**, 54-61 (2013).
- 35) T. Osono and D. Hirose, "Colonization and Lignin Decomposition of Pine Needle Litter by *Lophodermium Pinastris*", *For. Pathol.*, **41**, 156-162 (2011).
- 36) T. Osono, "Bleached Leaf Litter of Forest Trees and Associated Fruiting Bodies of Fungi in Tropical Asia and Australia", *The Harris Science Review of Doshisha University*, **57**, 204-212 (2016).
- 37) D. Hirose, S. Matsuoka, T. Osono, "Assessment of the Fungal Diversity and Succession of Ligninolytic Endophytes in *Camellia Japonica* Leaves Using Clone Library Analysis", *Mycologia*, **105**, 837-843 (2013).
- 38) T. Osono, "Leaf Litter Decomposition of 12 Tree Species in a Subtropical Forest in Japan", *Ecol. Res.*, **32**, 413-422 (2017).
- 39) 大園享司, "環境変化と菌類群集：熱帯から極域まで", 日本生態学会誌, **68**, 149-168 (2018) .
- 40) K. Matsukura, D. Hirose, M. Kagami, T. Osono, Y. Yamaoka, "Geographical Distribution of Rhytismataceous Fungi on *Camellia Japonica* Leaf Litter in Japan", *Fungal Ecol.*, **26**, 37-44 (2017).
- 41) S. Matsuoka, T. Iwasaki, Y. Sugiyama, E. Kawaguchi, H. Doi, T. Osono, "Biogeographic Patterns of Ectomycorrhizal Fungal Communities Associated with *Castanopsis Sieboldii* Across the Japanese Archipelago", *Front. Microbiol.*, **10**, 2656 (2019).
- 42) A. E. Arnold, Z. Maynard, G. S. Gilbert, P. D. Coley, T. A. Kursar, "Are Tropical Fungal Endophytes Hyperdiverse?", *Ecol. Lett.*, **3**, 267-274 (2000).
- 43) T. Osono, Metagenomic Approach Yields Insights into Fungal Diversity and Functioning, in T. Sota, H. Kagata, Y. Ando, S. Utsumi, T. Osono (eds.), *Species Diversity and Community Structure: Novel Patterns and Processes in Plants, Insects, and Fungi*, (Springer, Berlin, 2014), pp. 1-23.