

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380092
 研究課題名 (和文) 虫えいを侵入門戸とする樹木病原菌の感染機構の解明
 研究課題名 (英文) Infection mechanisms of sclerotial dieback of *Cryptomeria japonica* - micro flora and chemical property in *Cryptomeria* needle gall -
 研究代表者
 窪野 高德 (KUBONO TAKANORI)
 独立行政法人森林総合研究所・森林微生物研究領域・領域長
 研究者番号：80353671

研究成果の概要 (和文) : スギ枝枯菌核病菌の感染機構の解明に関して虫えい組織に着目した結果、虫えい内には病原菌の侵入を阻止する拮抗菌類がないこと及び虫えい内壁が欠落していることなどから、本菌の感染を可能にしたものと推察された。また、虫えい内にはクロロゲン酸やアミノ酸などの二次代謝産物が多く存在したが、これらの化学物質が虫えい内における本菌の生育に影響する物質である証拠は掴めなかった。

研究成果の概要 (英文) : *Scolicosporium* sp., the causal fungus of Japanese cedar sclerotial dieback of *Cryptomeria japonica*, is frequently isolated from the insect galls of *Contarinia inouyei* Mani. formed on the needles. It was made clear that the pathogen took root in the needle tissue by taking advantage of the insect galls. To success the infection from the galls, the pathogen must overcome the inhabiting fungi in the galls. The results of studies were showed that no antagonistic fungi against the pathogen existed in the gall, and also epidermal cells were lacking in the inner walls of the gall. Therefore, the above facts enabled to success the infection from the galls of the pathogen. Secondary metabolite, chlorogenic acid and amino acid, existed in the gall in plenty, in comparison with the normal tissue. However, the evidence whether chlorogenic acid and amino acid will support the infection of the pathogen was not able to obtain in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・森林工学

キーワード：スギ、枝枯菌核病、タマバエ、虫えい、侵入門戸、伝染環、感染機構

1. 研究開始当初の背景

スギ枝枯菌核病は 1962 年に秋田県で発見されたが、本病を引き起こす病原菌及び伝染

経路は未解明のまま残され、適切な防除方法は確立されていなかった。しかし、2003 年に本病の病原菌が発見され、また、2004 年には

本病原菌がスギタマバエの虫えい (Gall) から侵入することが突き止められ、本病に対する防除技術の開発に道が開かれた。しかしながら、なぜ、本病原菌が虫えいを侵入部位と為し得たか? という感染戦略に関しては、科学的には立証されていなかった。

2. 研究の目的

スギ枝枯菌核病菌 (*Asteromassarina* sp., *Scoliosporium* sp.) が、スギタマバエの虫えいを侵入門戸として樹体内に感染するという興味深い現象が発見され、樹木病原菌の感染戦略において、虫えいの持つ何らかの機能が影響していることが推察された。そこで、本研究では虫えい内に生息する微生物群と虫えい内に存在する化学物質に着目し、病原菌の感染成否を作用する微生物及び化学物質を特定することによって、なぜ、スギ枝枯菌核病菌が虫えい組織を侵入門戸と為し得たか? を突き止め、これらの結果を基に、長年、難病と言われたスギ枝枯菌核病の感染戦略及び感染機構を解明することを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) スギタマバエ成虫、幼虫及び虫えいに由来する微生物群の探索及び分離

本菌の伝搬経路及び感染機構を明らかにする上で重要な実験である。本菌が虫えい内に侵入する過程で、スギタマバエ成虫や幼虫がベクターとなって本菌を運ぶ可能性があることから、成虫及び幼虫体表面から本菌の分離試験を行い、ベクターとしての可能性を検討する。また、本菌が虫えい内において感染を成立させるためには、すでに虫えい内に生息している先住微生物群との競争に打ち勝たなければならないことから、本菌の最適分離用培地である 2%Malt 培地を用いて、虫えい内に生息する微生物群の探索及び分離を行う。

(2) スギ枝枯菌核病菌の虫えい内侵入機構の解明

本菌が虫えいから分離されることから、虫えいを侵入門戸としていることが判明した。しかし、本菌が虫えい内にどのように侵入・定着するかといった侵入様式は未解明である。そこで、本菌の胞子体がどのような手法で虫えい内に侵入するのかを組織解剖学的に明らかにする実験を行った。すなわち、虫えいの形成段階別に、本菌の菌糸体及び胞子体を人工接種し、接種した虫えいを 5%グルタルアルデヒドで固定した。その後、マイクロームで切片を作成して、微分干渉顕微鏡で観察し、本菌の虫えい内への侵入過程を検討した。

(3) スギタマバエ虫えい及び幼虫に由来する化学物質の探索

本菌の感染に影響を与える虫えい内因子と

して、虫えい内に存在する化学物質が深く関与していると推察されることから、虫えい組織より化学物質の分離を試みた。すなわち、生育ステージに合わせて虫えいを採取し、これから物質の分離を目的として抽出物を得る。抽出物に含まれる主要な活性及び抗菌性物質は、カラムクロマトグラフで単離し、同定に供した。

(4) スギ枝枯菌核病菌の伝染環の解明

3年間の研究で得られた実験結果及び、被害地における病害発生実態調査から、スギ枝枯菌核病菌の感染機構を解明するとともに、微生物間相互作用及び化学物質の両面から判断して、本病原菌が虫えいという特異な組織を侵入門戸とした意義を明らかにする。また、長年難病と言われてきた本病の被害を食い止めるため、本研究で明らかにされた感染機構を基に伝染環を作成し、伝染鎖を遮断することで防除を行う最適防除法を提示する。

4. 研究成果

(1) スギタマバエ成虫、幼虫及び虫えいに由来する微生物群

虫えいの生育段階に沿って菌類の分離試験を行った結果、*Pestalotia* sp.、*Rhinochlorella* sp. 及び *Cladosporium* sp. の 3 菌が、虫えいに優占的に生息する菌類であることが判明した。これら 3 種菌と本菌との対峙培養を行った結果、すべての菌に対して、拮抗反応は見られなかった。以上のことから、本菌が虫えい内に侵入・定着する際に、本菌の侵入を阻止する菌類は生息していないと推察された。また、スギタマバエ成虫が本病原菌の伝播に関与するか否かを検討した。スギタマバエの虫体から随伴菌を分離した結果、26 種類の菌が分離されたが、大部分は *Cladosporium cladosporioides* であり、本菌は検出されなかった。以上のことから、スギタマバエは本菌のベクターには成り得ず、本菌による虫えい内への感染は偶発的なものと推察された。

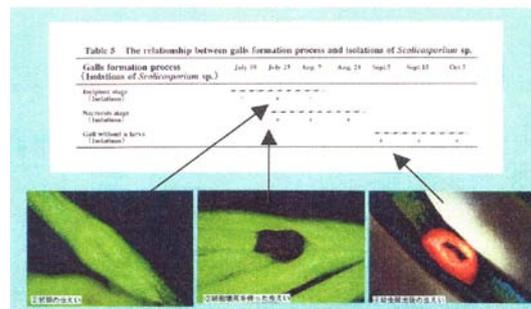


図 1 虫えいの生育段階毎における病原菌の分離結果

(2) スギ枝枯菌核病菌の虫えい内侵入機構の解明

本菌の菌糸体及び孢子体を虫えいに人工接種し、その後、接種部位を顕微鏡で観察したが、菌糸体及び孢子体の虫えい内への侵入及び定着は確認できなかった。一方、虫えいの形成段階別に組織を固定・解剖して構造の変化を検鏡した結果、成熟した虫えいの内壁において、表皮細胞やクチクラ層の欠損が見られた。病原菌の侵入を阻止する役割を持つ表皮細胞やクチクラ層の欠落は、病原菌の侵入を容易にすることが予想された。また、虫えいにはスリット状の空隙があり、この部位より孢子体が雨滴と一緒に虫えい内へ侵入する可能性が考えられた。以上のことから、スギタマバエの虫えい組織は本菌の侵入にとって、有益な組織構造を保持していることが推察された。

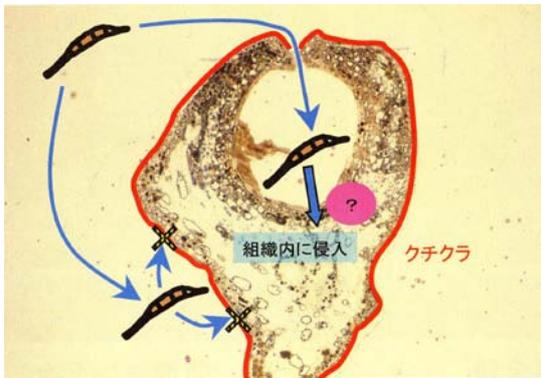


図2 病原菌孢子の虫えい内侵入経路

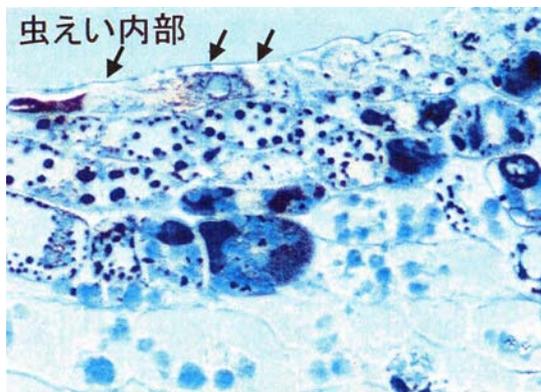


図3 虫えい内壁における表皮細胞とクチクラ層の欠損 (矢印)

(3) スギタマバエ虫えい及び幼虫に由来する化学物質の探索

虫えいに含まれる化学成分が本菌の生育に影響を与えると予想されることから、本菌の感染によって変動があると思われるフェノール性物質について分析を行った。その結果、「虫えい」、「虫えい周囲部」及び「虫えい形成のない部位」におけるフェノール性物質に定性的な差はなく、chlorogenic acidとその誘導体(1種類)が確認された。chlorogenic

acid は植物由来のフェノール性物質であり、健全植物に低濃度存在する一般的な抗菌物質として知られている。対照区よりも、虫えいや虫えい周囲で chlorogenic acid が多く含まれていたことから、虫えいで本化合物が誘導されていることが示唆された。また、虫えい内における無機栄養成分及びアミノ酸類を明らかにし、これらの化学物質が本菌の虫えい内への侵入に与える影響を検討した。その結果、虫えいでPとN濃度が高いことが判明したことから、虫えいに含まれる幼虫由来のPとNが影響していると考えられた。また、虫えいにおいて、高濃度で含まれていたアミノ酸はプロリンとシトルリンであった。プロリンはタンパク質の構成物質になる他、葉の乾燥障害に対する保護物質としても特別な意義がある。虫えいの孔口は常に開口していることや虫えいの内壁にはクチクラ層がないことから、虫えい内部が乾燥しているため、プロリンが機能している可能性が示唆された。以上のことから、虫えいには二次代謝産物のクロロゲン酸 (chlorogenic acid) 及びアミノ酸であるプロリンとシトルリンが他部位に比べて高濃度で含まれていることが明らかになった。しかし、これらの化学物質が直接的に虫えい内における本菌の生育に影響する物質である証拠は掴めなかった。

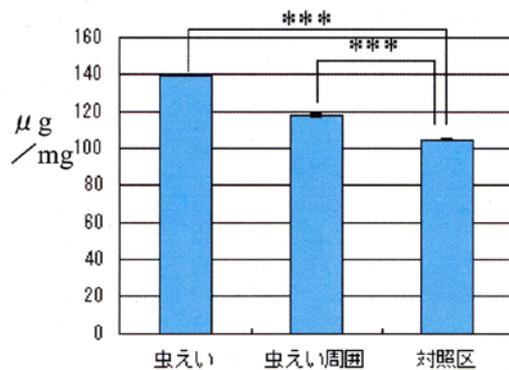


図4 各組織の抽出物に含まれる chlorogenic acid 類の総計

(4) スギ枝枯菌核病菌の伝染環の解明

3年間に及ぶ本菌の侵入機構に関する研究及び被害地における本菌の発生生態に関する生態学的研究の結果、本菌の伝播に關与する孢子体 (*Asteromassarina* sp., *Scolicosporium* sp.) の形成時期、本菌の感染部位、本菌糸束による病斑形成時期および枝枯発生時期が判明し、本菌の伝染経路及び伝染環を明らかにした。その結果、伝染に關与する孢子体は、前年に感染・枯死した枝葉上に形成されることが明らか

になったことから、胞子体が飛散する時期である6月以前に、前年に感染枯死した枝葉を中心に枝打ちを行い、伝染源を排除することによって本病の発生を防ぐことが最も効果的な最適防除法であることを提示した。

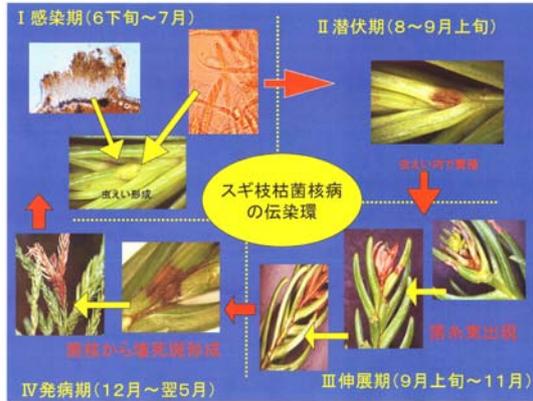


図5 スギ枝枯菌核病の伝染環

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 窪野高德、市原 優、スギ黒点枝枯病、*Stormatinia cryptomeriae*、の寄主範囲、鹿児島大学農学部演習林研究報告、査読有、37巻、2010、65-71
- ② K. Yamaji, S. Mori, M. Akiyama, A. Kato, T. Nakashima, The antifungal compound totarol of *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* seeds selects fungi on seedling root surfaces. *Journal of Chemical Ecology*, 査読有, Vol. 33, 2007, 2254-2265

[学会発表] (計6件)

- ① 小舟 瞬、梶村 恒、窪野高德、升屋勇人、昆虫共生菌の生態—シキミタマバエのゴールから分離された菌類—、日本菌学会第51回大会講演要旨集、39、2008年5月31日、三重大学
- ② 市原 優、窪野高德、升屋勇人、スギタマバエ虫えい形成過程における組織構造の変化、東北森林科学会講演要旨集13巻、20、2008年8月25日、コラッセ福島(福島市)
- ③ Y. Ichihara, K. Yamaji, Damping-off of current-year *Fagus crenata* seedlings under different illuminations—Temporal change of antifungal production and periderm formation in hypocotyls—. 4th Asia-Pacific Conference on Chemical E

cology, 2007 (Invited lecture in workshop)、2007年9月12日、つくば国際会議場(つくば市)

- ④ 小舟 瞬、梶村 恒、窪野高德、升屋勇人、シキミタマバエのゴールにおける共生菌相の動態、日本森林学会大会学術講演集、118、B24、2007年4月2日、九州大学
- ⑤ Kobune, S., Kajimura, H., Kubono, T. and Masuya, H., Succession of fungal flora in leaf galls induced by cecidomyiid fly. 2007 Asian Mycological Congress, Abstracts. 2007年12月25日、マレーシア

[図書] (計1件)

- ① 窪野高德、他、朝倉書店、森林大百科事典、2009、164-166

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪野 高德 (KUBONO TAKANORI)
独立行政法人森林総合研究所・森林微生物研究領域・領域長
研究者番号：80353671

(2) 研究分担者

市原 優 (ICHIHARA YU)
独立行政法人森林総合研究所・東北支所・主任研究員
研究者番号：10353583
升屋 勇人 (MASUYA HAYATO)
独立行政法人森林総合研究所・森林微生物研究領域・主任研究員
研究者番号：70391183
山路 恵子 (YAMAJI KEIKO)
筑波大学・生命環境科学研究科・講師
研究者番号：00420076