

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21580185

研究課題名(和文) マツ葉ふるい病菌の生葉及び落葉における生息密度 樹木病原菌の個体群解析

研究課題名(英文) Population density of *Lophodermium pinastri* in living and fallen needles - Population analysis of a tree pathogen.

研究代表者

畑 邦彦 (HATA, Kunihiro)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：00325771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円、(間接経費) 420,000円

研究成果の概要(和文)：マツ葉ふるい病菌について生活史各時期における生息密度の指標を検討した結果、本菌はクローンレベルの体細胞不和合性を有しており、葉上では分離時のコロニー数をほぼクローン数とみなしうることが明らかになった。これに基づいて本菌の季節的、地域的変動を調査した結果、本菌の変動はかなり不規則であり、孢子飛散時期と感染時期が一致しないことや、同じ葉内に生息する他の菌との相互作用に強く影響されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：I examined what are proper indices of population density of *Lophodermium pinastri*. As a result, this fungus was proved to possess clone-level somatic incompatibility, which means that the numbers of colonies in isolation can nearly be regarded as the numbers of clones. Based on this, seasonal and stand-level changes in the population densities of this fungus were examined. Such changes of this fungus were found to be very unstable, even the season of spore dispersal and infection was different. One of the reasons of this instability was that this fungus was strongly affected by the interaction with other fungi inhabiting in the same needles.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：Lophodermium pinastri マツ葉ふるい病菌 生息密度 対峙培養 体細胞不和合性 季節変動 地域変動 種間相互作用

1. 研究開始当初の背景

真菌類の生態を研究する上で一つの大きな問題として、個体数の把握が難しいことが挙げられる。近年発達してきた分子生物学的な解析は有効ではあるものの手間が掛かり、扱える規模にも限界がある。それでは真菌類の個体数をより容易に把握する方法はないのであろうか？ 実は非分子的な方法によるクローン識別は菌によっては可能である。一つは体細胞不和合性と呼ばれる現象で、これを有する菌は対峙培養によってクローン識別が可能な場合がある。一方、帯線と呼ばれる黒～褐色の線を形成する菌があるが、これもしばしばコロニーの境界線とされている。

マツ葉ふるい病菌 *Lophodermium pinastri* はマツ属の針葉に異常な落葉を生じさせる重要病害「マツ葉ふるい病」の病原菌として広く知られた菌であるが、通常は内生菌として生葉内に無病徴で生息しており、落葉後には子実体を形成し、胞子を飛散して樹上の生葉に感染する。この菌は古くから知られた樹木病原菌であるが、その割に生活史の詳細がはっきりしていない。研究自体はそれなりにあるのだが、樹病としての研究と内生菌としての研究と落葉菌としての研究が乖離していたのである。しかし、この菌が落葉上に生じる帯線が個体間の境界線であることを示した研究例がある。この帯線か、あるいは体細胞不和合性によるクローン識別が出来れば、個体群密度の推定が可能となり、上述のような様々な視点で得られたデータ間の乖離が埋められるのではないだろうか？ 本研究はそういったことを背景に着想された。

2. 研究の目的

本研究においては、マツ葉ふるい病菌 *Lophodermium pinastri* について、非分子的なクローン識別法を中心に生息密度の変動をよく反映する指標を見出し、それに基づいて本菌の非発病状態の生活史各時期における生息密度を調査することにより、本菌の季節的、地域的な変動とそれに影響する要因を明らかにすることを目指した。そのため、まず(1)本菌の生息密度の指標の検討を行なった。具体的には、本菌の帯線はクローンの境界か？ 本菌はクローンレベルの体細胞不和合性を有している(=コロニー数をクローン数とみなして良い)か？ 分離頻度と比較してコロニー数、帯線数は生息密度の指標として有効か？ 空中孢子密度の変動の指標としては何が適切か？ について検討した。これらの知見を踏まえ、(2)本菌の生葉および落葉における生息密度の季節的・地域的な変動とその要因を明らかにするための調査を行なった。具体的には本菌の生息密度の季節的な変動と本菌の生息密度の地域的な変動を明らかにするための定期的調査を行い、本菌の生息密度の変動に影響する要因を検証するための実験を行なった。

3. 研究の方法

本研究は鹿児島県内の五ヶ所のクロマツ海岸林(佐多、阿久根、大崎、吹上、桜島)から採取した針葉を用いて行なった。いずれの調査地でもマツ葉ふるい病の発病は見られなかった。また、今回用いた培地は全て2%麦芽エキス寒天培地であった。

(1) *L. pinastri* の生息密度の指標の検討

L. pinastri の帯線はクローンの境界か？

培地上に生ずる帯線が針葉上に生ずる帯線と一致するのかを確認するため、菌株間に滅菌クロマツ針葉を置床して対峙培養を行った。また、通常の対峙培養を行って帯線が安定して形成されるか検証を行った。

前者では、150、1時間の乾熱滅菌処理を施した長さ3cmの針葉断片を中央に置床した6cmシャーレ上で2つの菌株を2cm間隔で針葉に沿って接種し、25の暗所で約2ヶ月間培養した。培地上と針葉断片上で帯線が形成されるかどうか、両者の位置が一致しているかどうかを観察した。

後者については、6cmシャーレに2つの接種源を2cm間隔で置床して25の暗所で約2ヶ月間培養した。各菌株について帯線形成の有無を確認し、帯線形成なし、対峙側のみ帯線形成、非対峙側のみ帯線形成、全周に帯線形成の4カテゴリーに区分した。

菌株は、桜島の調査地で2009年に採取したクロマツ一年葉より表面殺菌法を用いて分離したものをを用いた。すなわち、採取した針葉から0.5cmの長さの断片を切り出し、70%エタノール1分間、15% H_2O_2 1分間、70%エタノール1分間の連続処理による表面殺菌後、培地上に置床した。培地上に出現した菌の中からコロニー形態を元に本菌を同定、分離し、その中から菌株を選抜した。

L. pinastri はクローンレベルの体細胞不和合性を有しているか？

本菌がクローンレベルの体細胞不和合性を有しているか確認するため、まずはで行なった通常の対峙培養の際、同時にコロニー融合の有無を観察し、完全に融合、不完全に融合、接触して融合せずに成長を停止、接触前に成長を停止の4カテゴリーに区分した。

しかし、本菌はきわめて強い自己成長阻害能力を有しており、通常の対峙培養法だと同一菌株間ですらコロニーの融合が確認し難いことが明らかになった。そこで、次に最初から菌株を接触させて培養する方法(以下接触対峙培養)を用いて対峙培養を行った。すなわち、6cmシャーレの中央に2つの菌株を隣接して接種後、25の暗所で約1ヶ月間培養し、コロニー融合の有無を確認した。こちらではコロニーの融合の有無は明瞭に区別できたため、有無の2カテゴリーのみとした。

分離頻度と比較してコロニー数、帯線数は生息密度の指標として有効か？

コロニー数と帯線数が実際に生息密度の指標としてどの程度有効か確認するために、同一調査地・調査日で得られたこれらの指標に分離率を加えて比較を行った。

試料としてクロマツの生葉（当年葉、1年葉、2年葉）及び落葉を用いた。試料は桜島では2010年7月～11月まで毎月1回、他4ヶ所では8月と10月に各1回ずつ採取した。それぞれの調査林分で健全なクロマツ成木を5個体ずつ選び、生葉と落葉を採取した。生葉は地上50cm～2m程度の位置から葉齢別に、落葉は各個体下の地上に任意に設置した10cm×10cmの枠内に落ちていたものから、任意に各5対ずつ針葉対を採取した。

分離には、各クロマツ針葉対のうち一本の先端から2.5cm～3.0cmの位置の断片（長さ0.5cm）を用い、表面殺菌、培養後、断片ごとに本菌のコロニー数を記録した。落葉の場合は更に、分離に用いなかった方の針葉を実体顕微鏡で観察して帯線数を記録した。

空中孢子密度の変動の指標としては何が適切か？

まずは空中における子嚢胞子の密度を直接調べる方法を三種類検討したが、いずれも本菌の子嚢胞子を補足出来なかった。そこで、間接的に子嚢胞子密度の変動を把握する指標として、落葉上における成熟子嚢盤数の変動が有効か検討した。桜島において2011年5月～12月初旬まで二週間に1回調査を行った。調査の際には、各調査林分から選んだ10本の落葉を用い、実体顕微鏡下で各針葉における成熟子嚢盤数と未成熟子嚢盤数を計数した。本菌の子嚢盤は黒色楕円形であるが、成熟すると縦の亀裂を生じ、広く開口する。開口部が見られた子嚢盤では予備的に観察した20試料の子嚢盤全てで子嚢胞子の存在が確認された為、子嚢盤の開口の有無を成熟、未成熟の判断の基準とした。

(2) *L. pinastri* の生葉および落葉における生息密度の季節的・地域的変動とその要因

L. pinastri の生息密度の季節的変動

クロマツ生葉及び落葉における本菌の生息密度の季節的変動及び空中孢子密度の変動との関係を明らかにするため、桜島において生葉及び落葉における本菌のコロニー数と落葉における本菌の子嚢盤数を調査した。

コロニー数については、2011年の5月～11月と2012年4月～2013年11月の期間にわたり、毎月1回調査を行った。試料採取及び本菌の分離は(1)と同じ方法で行なった。ただし、こちらでは生葉を採取する際に各葉齢に加えて樹上枯死葉も採取した。また、本菌以外の菌が出現した場合、それも記録した。

子嚢盤数については、2011年の5月～12月まで二週間に1回、2012年4月～2013年11月まで毎月1回調査を行った。試料採取及び成熟及び未成熟子嚢盤数の計数も(1)と同じ方法で行なった。なお、2011年につい

ては(1)と同じデータを使用している。

L. pinastri の生息密度の地域的変動

クロマツ生葉及び落葉における本菌の生息密度の地域的変動及び空中孢子密度の変動との関係を明らかにするため、桜島、佐多、阿久根、大崎、吹上において生葉及び落葉における本菌のコロニー数と落葉における本菌の子嚢盤数を調査した。

コロニー数、子嚢盤数とも2011年～2013年の8月と10月に各1回調査を行なった。試料採取、調査方法は(2)と同じ方法を用いた。なお、桜島については(2)の調査における該当月のデータを使用している。

L. pinastri の生息密度の変動に影響する要因

の結果、本菌の生息密度の変動に本菌以外の菌が影響していることが明らかになったため、対峙培養試験により両者の関係を確認した。対峙培養は、の調査で2013年に分離された菌から *L. pinastri* を5株、その他の菌8種（研究成果表2を参照）16菌株（対峙菌）を選び、両者の間で行なった。培地を入れた9cmシャーレに *L. pinastri* と対峙菌の接種源を約3cmの間隔を空けて1つずつ接種し、25℃、暗黒下で30日間培養した。4～5日ごとに各コロニーの対峙側と非対峙側について接種源から先端までの長さを計測した。非対峙側より対峙側の成長が有意に悪い場合、成長抑制とした。成長停止後、コロニー同士の関係を観察して接触前障害、接触障害、超過の3タイプに類別した。

4. 研究成果

(1) *L. pinastri* の生息密度の指標の検討

L. pinastri の帯線はクローンの境界か？

菌株間に滅菌針葉を置床して行なった対峙培養では、帯線が針葉上を横切った18回のうち針葉上に帯線が生じたのは10回であった。10回全てについて両者は同じ位置に生じていたため、針葉上に生じる帯線は培地上に生じる帯線と同じものである可能性が高いことが改めて確認されたが、反面、針葉で帯線が生じたのは半分程度であり、培地上で帯線が出来るような条件下でも針葉上で帯線が出来るとは限らないことが示唆された。一方、通常対峙培養の結果（表1）同一菌

表1. 通常対峙培養での帯線形成

	帯線形成*				結果の一致**
	無	対	非	全	
同一菌株	41	9	25	31	7/16
異なる菌株	40	10	3	101	15/28

*各カテゴリーの試行数 **結果が全て一致した組み合わせ数/全組み合わせ数 無：帯線形成なし 対：対面側のみ帯線形成 非：非対面側のみ帯線形成 全：全周に帯線形成

株同士の組み合わせで帯線が形成されることや、異なる菌株の組み合わせで帯線が形成されないこと、同じ組み合わせでも試行ごとに結果が違うことが少なくなかった。すなわち、帯線形成は極めて不安定であり、かつ必ずしも異なるクローンの境界線として生じるとは限らないことが明らかとなった。帯線が生じた場所は概ねコロニーの成長が止まった場所であったため、帯線はコロニーの境界線ではなく、成長停止線と思われた。

L. pinastri はクローンレベルの体細胞不和合性を有しているか？

まず通常の対峙培養の結果、同一菌株間でも（71/106 試行）異なる菌株間でも（149/154 試行）大半の試行で対峙菌株は接触前に成長が停止した。これは、本菌が強い抗菌作用を持っており、その作用が同一菌株間でも働くことを示すものである。これでは対峙培養でコロニー融合を確認するのは困難である。そこで、抗菌作用が働きにくいように工夫したのが接触対峙培養である。

その接触対峙培養においては、同一菌株の組み合わせ 60 組 180 試行全てで両菌株が融合した一方、異なる菌株間の組み合わせ 201 組 603 試行中融合が見られたのは 4 組 12 試行のみであった。ここで融合した 4 組は全て同一針葉断片から得られた菌株の組み合わせであった。また、どの組み合わせでも全反復同じ結果となった。すなわち、本菌はほぼクローンレベルで体細胞不和合性を有していると看做しうることが明らかとなった。

マツの針葉断片から本菌を分離する際に針葉断片から出現する本菌のコロニーは、比較的明瞭にコロニー境界を認識することが可能だが、今回の結果から、これはクローン間の境界であり、分離時のコロニー数はほぼクローン数と一致すると考えられた。

分離頻度と比較してコロニー数、帯線数は生息密度の指標として有効か？

生葉において、平均コロニー数と分離率の関係は、分離率が 80% を超えるあたりまでは比例に近かったが、それ以上になると分離率の伸びは鈍くなり、90~100% で横這いとなった（図 1）。落葉においては分離率が 80% を超えておらず、分離率とコロニー数は全体に比例に近かった（図 2）。これらのことから、コロニー数は分離率と一定の関係が認め

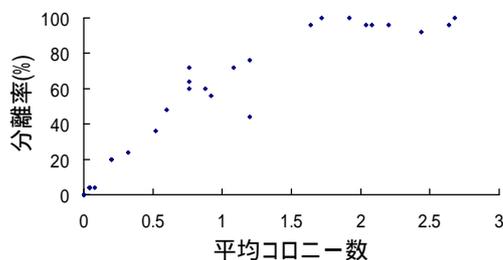


図 1 生葉における *L. pinastri* の断片あたり平均コロニー数と分離率の関係

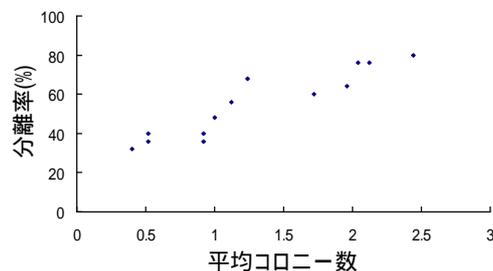


図 2 落葉における *L. pinastri* の断片あたり平均コロニー数と分離率の関係

られ、生息密度の指標として有効であることが示唆された。分離率とコロニー数を比較すると、低~中密度帯では生息密度の指標として同程度だが、高密度帯になると分離率は精度が落ちると考えられた。従って、全体としては生息密度の指標としてはコロニー数の方が分離率より適していると考えられた。

コロニー数と帯線数については、明確な関係は全く見られなかった（図 3）。

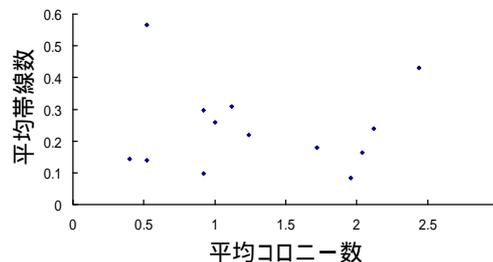


図 3 落葉における *L. pinastri* の断片あたり平均コロニー数と針葉 0.5 cm あたり帯線数の関係

以上のように、本菌の針葉上における生息密度の指標としては、コロニー数が最も有用であると考えられたため、(2) の調査ではコロニー数を指標として用いた。

空中孢子密度の変動の指標としては何が適切か？

成熟子嚢盤数は（次節図 9 参照）6 月末をピークに 5 月末から 7 月中旬まで出現するという滑らかな一山型の変動パターンを示した。この時期はこれまで知られている本菌の孢子飛散時期と一致しており、成熟子嚢盤数の変動は空中孢子密度の変動の指標として十分妥当であると考えられた。そこで、以降の調査では成熟子嚢盤数の変動を空中孢子密度の変動の指標とした。

(2) *L. pinastri* の生葉および落葉における生息密度の季節的・地域的変動とその要因 *L. pinastri* の生息密度の季節的変動

図 4~8 に生葉の各葉齢と樹上枯死葉・落葉における本菌の平均コロニー数の季節変動を示す。樹上枯死葉及び落葉における本菌の変動はどの調査年でも概ね類似していたのに対して、生葉はいずれの調査年も変動パターンがあまり類似していなかった。また、

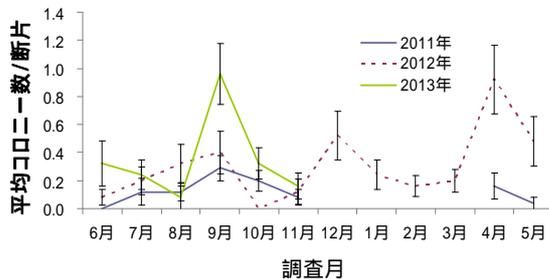


図4. *L. pinastri*の平均コロニー数の季節変動(当年葉) バー: 標準誤差

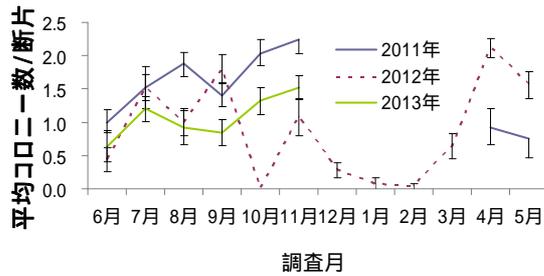


図5. *L. pinastri*の平均コロニー数の季節変動(1年葉) バー: 標準誤差

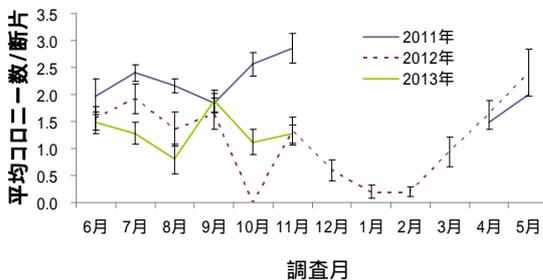


図6. *L. pinastri*の平均コロニー数の季節変動(2年葉) バー: 標準誤差

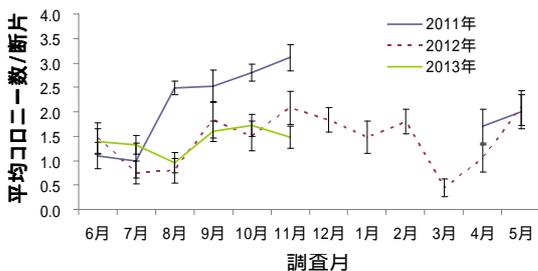


図7. *L. pinastri*の平均コロニー数の季節変動(樹上枯死葉) バー: 標準誤差

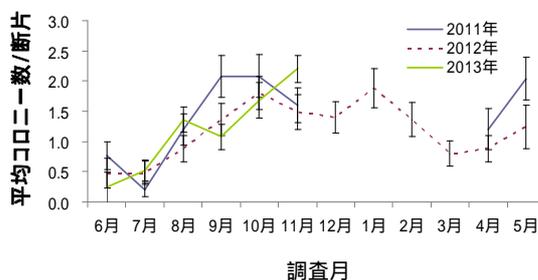


図8. *L. pinastri*の平均コロニー数の季節変動(落葉) バー: 標準誤差

樹上枯死葉・落葉においては変動が緩やかであったのに対し、生葉では調査月間の変動が激しかった。このように樹上枯死葉・落葉では、コロニー数の季節変動及び年次変動は安定していたが、生葉では不安定であった。

次に、2011年の成熟及び未成熟子嚢盤数の季節変動を図9に示す。成熟子嚢盤数は6~7

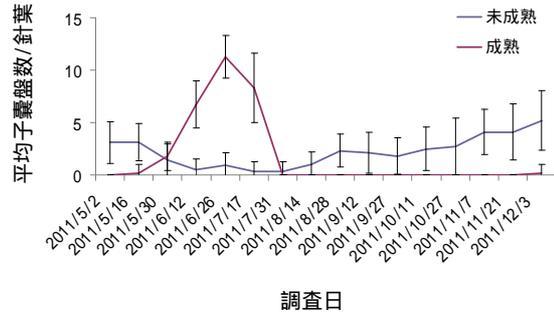


図9. *L. pinastri*の成熟及び未成熟子嚢盤数の季節変動(2011年) バー: 標準誤差

月の梅雨の時期に急激に増加し、以降夏まで出現したものの他の時期にはほとんど観察されなかった。未成熟子嚢盤数は梅雨の時期に減少し、夏以降は緩やかに増加した。なお、データは示さないが、2012年、2013年も同様であった。以上より、子嚢胞子の飛散時期は梅雨の時期であると推測された。それに対して、前述の生葉のコロニー数の変動は不規則であり、胞子の飛散時期との関係は確認できなかった。すなわち、本菌の感染時期は胞子飛散時期と一致していなかった。この理由は簡単に説明できず、将来的に興味深い課題である。一方、コロニー数の増減は本菌の新規な感染の成立と感染していたコロニーの死滅が生じていることを意味するが、これは分離率では推測できず、コロニー数という指標の精度の高さを示している。

*L. pinastri*の生息密度の地域的変動

図10に生葉の各葉齢と樹上枯死葉・落葉における本菌の平均コロニー数の、図11に成熟及び未成熟子嚢盤数の地域変動を示す。なお、地域変動についてはデータが膨大なので2013年のもののみを示している。本菌の平均コロニー数はそれぞれの調査試料、調査年月では調査地間に顕著な差が見られたが、全体としては明確な傾向は確認できなかった。成熟及び未成熟子嚢盤数についても同様

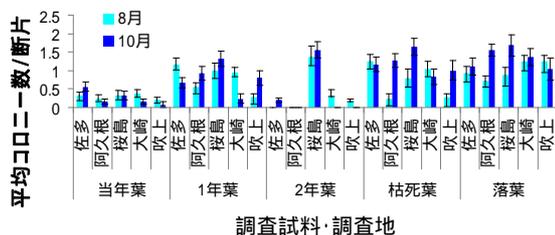


図10. 生葉の各葉齢と樹上枯死葉・落葉における*L. pinastri*の平均コロニー数の地域変動(2013年) バー: 標準誤差

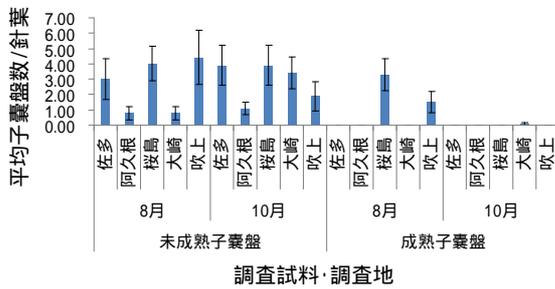


図 11. *L. pinastri* の成熟及び未成熟子囊盤数の地域変動 (2013 年) バー：標準誤差

であった。このような不安定な変動の原因としては、競争者の存在が考えられる。そこで、本菌以外に分離された菌と本菌の関係を確認するため、各針葉断片において本菌とその他の菌が片方だけ出現したか、両方出現したか、いずれも出現しなかったかという基準で四つに区分し、相対比率を調べた。

図 12 に示したのは 2013 年 10 月の例だが、*L. pinastri* の相対比率が高い場合はその他の菌の相対比率が低く、その他の菌の相対比

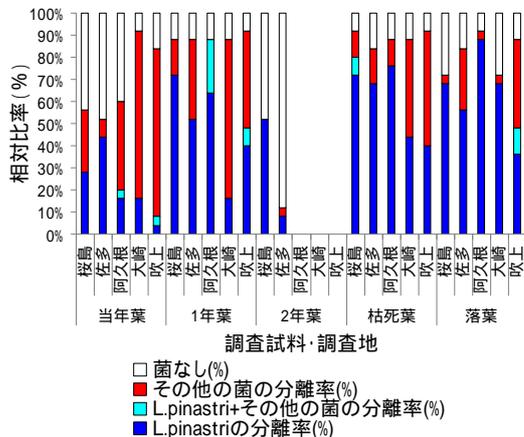


図 12. 2013 年 10 月における *L. pinastri* とそれ以外の菌の相対比率

率が高い場合は *L. pinastri* の相対比率が低い傾向が見られた。また、同じ針葉断片に両者が出現した例は、両者の分離率を考えると顕著に低かった。すなわち、*L. pinastri* とその他の菌の間には明確な排他性が見られた。これらの結果は他の調査年月でも同様であった。その他の菌としては次節で用いたような菌が見られたが、特定の菌が集中して出現するような特段の傾向はなかった。

L. pinastri の生息密度の変動に影響する要因

対峙培養の結果 (表 2) *L. pinastri* についてはどの菌と対峙した場合でも対峙菌による成長抑制が見られた。対峙菌側についても多くの場合で *L. pinastri* による成長抑制が見られた。対峙菌と本菌の相互作用の大半が接触前阻害であったが、接触阻害や超過も見られた。このように、*L. pinastri* は全て、対峙菌側も大半が成長を阻害された。

表 2. 対峙培養における各菌の対峙相手による成長抑制とコロニー間相互作用

	成長抑制*		相互作用**		
	Lp	対峙菌	前阻害	後阻害	超過
Pe	30/30	30/21	17	4	9
No	30/30	29/30	27	2	1
Fu	30/30	30/30	29	1	0
Ap	30/30	18/30	14	4	12
X1	30/30	0/30	0	0	30
Ph	27/27	27/27	26	1	0
X2	29/29	18/29	8	8	11
Cg	30/30	22/30	2	20	8

*成長が抑制された回数/全試行回数

**各カテゴリーの回数

前阻害：接触前阻害 後阻害：接触阻害

Lp: *Lophodermium pinastri*, Pe: *Pestalotiopsis* sp., No: *Nigrospora oryzae*, Fu: *Fusarium* sp., Ap: *Aureobasidium pullulans*, X1: *Xylaria* sp., Ph: *Phomopsis* sp., X2: *Xylariaceae* sp. 2, Cg: *Colletotrichum gloeosporioides*

大半の試行において対峙菌株間で接触前阻害が見られたということは、クロマツの組織内に生息する菌は本菌を含め多くが水溶性の抗菌物質を分泌していることを示唆する。すなわち、針葉組織内では生息する菌間に強い化学的競争が働いており、本菌を含む様々な菌の動態に影響していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

濱田 正信、曾根 晃一、畑 邦彦 鹿児島県の海岸クロマツ林の落葉におけるマツ葉ふるい病菌 *Lophodermium pinastri* の子囊盤数の季節変動、査読有、41 巻、2014 年、印刷中

〔学会発表〕(計 2 件)

濱田 正信、安田 将太、曾根 晃一、畑 邦彦 マツ葉ふるい病菌 *Lophodermium pinastri* のクロマツ落葉における子囊盤数と生葉におけるコロニー数の季節変動 第 68 回九州森林学会大会 2012 年 10 月 27 日 熊本県立大学

畑 邦彦、中島 彩夏、田中 拓也、曾根 晃一 マツ針葉の主要な菌 *Lophodermium pinastri* の生息密度はどのように把握すべきか? 日本菌学会第 56 回大会 2012 年 5 月 27 日 岐阜大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑 邦彦 (HATA, Kunihiko)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：00325771