

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 21日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658057

研究課題名（和文） 菌類を用いたスギ花粉飛散防止技術の開発

研究課題名（英文） Development of the cedar pollen scattering prevention technique using fungi

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）：スギ雄花に寄生する菌類（スギ黒点病菌；*Leptosphaerulina japonica*）を用いて、人為的にスギ花粉の飛散を抑える散布処理液の開発を検討した。その結果、スギ雄花の生育ステージ（生育段階）に沿って、「スギ黒点病菌糸体懸濁液に市販の大豆油を10%添加した散布処理液」を接種したところ、約35～65%の頻度で雄花を枯死させることに成功し、小規模な試験ながら、人為的に花粉の飛散を抑止させる方法を完成させた。

研究成果の概要（英文）：We discovered the fungus (*Leptosphaerulina japonica*) which is parasitic on a cedar male flower in 2004. We examined the development of the cedar pollen scattering prevention technique using fungi by inoculation tests artificially. As a result, after inoculating by using the mycelium suspension which added 10% of commercial bean oil in cedar male flower along the growth stage (growth stage) of the cedar male flower, we succeeded in letting a male flower wither and die at approximately 35-65% of frequency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	0	1,900,000
2010年度	500,000	0	500,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	210,000	3,310,000

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：スギ、花粉症、雄花、菌類利用、花粉飛散防止

1. 研究開始当初の背景

スギは日本の主要な造林樹種であり、古くから造林されてきた。現在、人工林面積は約800万haに達している。この様な中、1963年にスギ花粉症患者が初めて発見され、その数は年々増加し、現在では人口の

約16%（約2,000万人）にも達し、日本国民は花粉症に苦しめられている。このように、スギ花粉症は、まさに日本の大きな社会問題の一つとなっており、早急に、スギ林からの花粉の飛散抑制が強く求められている。筆者らは2000年以降、スギ雄花

を特異的に枯死させる菌類を探して来た。その結果、2004年に菌によって雄花が黒変枯死し、花粉がまったく飛散しないものを発見した。これらの雄花の内部には正常な花粉が形成されていたが、表面が黒い菌糸体に覆われており、花粉はまったく飛散していなかった。また、この菌体は雄花のみを特異的に侵し、枝葉にはまったく影響を与えないことも判明した。筆者らは、この事実を「ある特定の菌類によって、スギの雄花が枯死したために引き起こされた現象である」と推察した。その後の研究で、筆者らは本菌類を *Leptosphaerlina cryptomeriae* と同定し、接種試験によって病原性を確認した。そこで、本研究では、この菌類を用いた即効性があり、かつ環境に易しいスギ花粉飛散抑制剤及び散布技術の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

スギ花粉症は我が国の国民的病気と言われて久しいが、依然として花粉症患者は増大しており、早急に、スギ林におけるスギ花粉飛散抑制対策の確立が求められている。2005年以来、筆者らは即効性があり、かつ化学薬剤を使用しない花粉飛散防止技術の対策として、スギ雄花に寄生する微生物を利用して雄花を枯死させ、花粉の飛散を抑制する手法を開発する研究を行って来た。薬剤散布のできない都市近郊林や人口密集地における花粉飛散源に対し、生物薬剤として微生物を使用することは、生態系保全や環境保全の観点からも安全で即効的な効果が期待できる。2004年、スギ雄花に寄生する糸状菌、スギ黒点病菌 *L. japonica* を約90年ぶりに再発見し、本菌を用いた散布方式による実用化を画策した。本課題では、本菌を用いた実用化に処することができる散布式処理法の開発を目的に研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) *L. japonica* の形成過程

本病の被害発生地において、一年を通じて、感染枯死雄花を採取し、枯死雄花上における本菌子実体（分生子、子のう胞子）の形成過程を追跡した。

(2) *L. japonica* の孢子飛散時期も特定

感染枯死雄花からの孢子飛散時期を特定する目的で、孢子の雄花への飛来・付着を人為的に制御する「袋掛け試験」を行った。未熟雄花が着生した主枝にビニール袋（90 X 70cm）を被覆（close）又は取り外し（open）する「暴露処理」を9月から翌年4月まで行った。処理区は5区とし、1区につき2～3本の主枝を用いた。暴露期間はI区では9/19～10/31、II区は11/1～11/28、III区は11/29～12/27とした。IV区は期間中 close、V区は期間中 open とした。調査期間後、感染枯死雄花を付けた小枝をカウントして、感染時期を推定した。

(3) *L. japonica* の雄花への侵入機構

L. japonica の孢子体がどの様に雄花に侵入し、雄花を枯死に導くか？を明らかにする実験を行った。分生子懸濁液を雄花に散布後、経時的に雄花を採取し、固定した。その後、光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用いて、本菌の侵入過程を観察した。

(4) *L. japonica* を用いた最適接種時期の検討

8年生のスギ26個体に、100ppm ジベレリン水溶液を散布して人工的に雄花を形成させ、以下の人工接種試験に供試した。接種時期は2010年9月上旬～10月下旬までは週1回、2010年11月～2011年2月までは各月中旬に1回とし、接種源として *L. japonica* を2週間米ぬか+ふすま培地に培養した菌糸粒（有菌米ぬか・ふすま固形培地）を用いた。また、対照として米ぬか+ふすま培地のみ（無菌米ぬか・ふすま固形培地）の接種を行った。接種方法は、付着法（雄花穂をビニールテープで覆い、その中に接種源を入れる方法）とし、毎回、各処理に2枝ずつ割付け、各枝25雄花穂ずつ接種した。さらに、各接種時期における花粉の生育状態を把握する

ため、各接種個体から毎回3雄花穂ずつ採取し、雄花縦断面のプレパラートを作成して、光学顕微鏡による観察を行った。感染調査は2011年5月下旬に、枯死した雄花穂を計数して雄花枯死率を算出すると共に、枯死雄花からの接種菌の再分離を行った。

4. 研究成果

(1) *L. japonica* の形成過程

図1. にスギ黒点病菌の伝染環を示す。一年を通して枯死雄花上の菌体を調べた結果、春季5月頃から鱗片上に柄子殻様態が見られ、その後、これらは柄子殻様態上に分生子を形成した。一方、子のう殻は秋季9月の試料で初めて観察され、本菌は9月から子のう胞子の飛散を開始させたものと推察された。また、秋季10月頃から初期感染が確認されたことから、本病は子のう胞子によって感染するものと考えられた。



図1 スギ黒点病菌の伝染環

(2) *L. japonica* の胞子飛散時期

暴露試験の結果、I区3本(3/376=感染枝数/総調査枝数)、II区1本(1/163)、III区4本(4/323)、V区2本(2/144)の枯死雄花着生枝が確認された。暴露させなかったIV区では発病は認められなかった。各区とも自然感染枝が少ない結果に終わったが、枯死雄花の発生を基に判断すると、秋季10月から冬季12月末まで胞子飛散が続き、この期間に雄花へ感染したものと推察された。以上から、人為的に雄花枯死率を高めるためには、未熟~若齢雄花の多い秋季に人工接種を

行うことが最良である可能性が示唆された。本研究成果は、接種時期の決定に寄与するものである。

(3) *L. japonica* の雄花への侵入機構

接種3日後、雄花表面に菌糸が伸長しているのが観察されたが、雄花鱗片間隙には菌糸は認められなかった。雄花表面では、菌糸が鱗片表面を這っており、*L. japonica* の分生子形成が認められた。接種7日後には、菌糸は鱗片間隙に伸長し、雄花内部の花粉囊表面に到達していた。接種18日後には、菌糸が花粉囊中に侵入しているのが観察され(図2)、菌糸は花粉粒からみつき、一部では菌糸が花粉粒に陥入している様子が観察された。また、接種7日目までは菌糸は雄花鱗片組織中には観察されなかったが、接種18日後では、一部の鱗片組織内に菌糸が侵入していた。この時期になると、花粉粒は鱗片によって封じ込められ、飛散が抑制される(図3)。これらの観察から、スギ黒点病菌は雄花表面で菌糸を伸長させ、鱗片間隙を伝って花粉囊に到達して内部に侵入し、花粉粒に陥入して養分を得ていると考えられた。

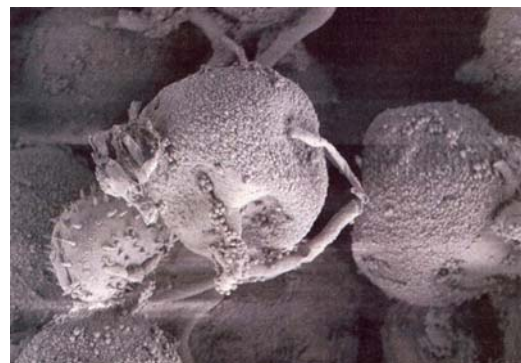


図2 菌糸体が花粉粒に貫入

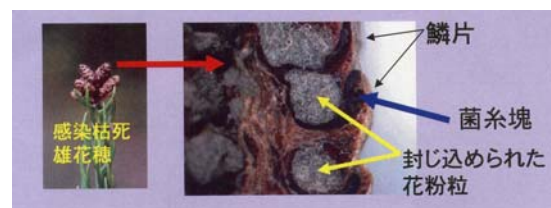


図3 花粉粒が封じ込められる

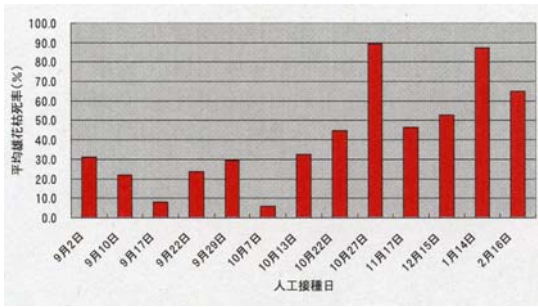


図4 秋季から初冬が最適接種時期



図5 接種試験によって枯死した雄花序

(4) *L. japonica* の懸濁液を用いた接種試験の確立

図4に人工接種時期別の平均雄花枯死率を示した。雄花の枯死は、いずれの接種時期でも認められたものの、花粉母細胞期にある9月22日以前や、成熟花粉となる1月14日以降の接種では、枯死雄花から *L. japonica* は再分離されなかった。*L. japonica* の感染が認められ、概ね3割~9割の雄花枯死率(図5)を示した9月29日~12月15日の期間は、花粉が四分子期から小孢子期の時期であった。特に、平均雄花枯死率が89.3%と最も高い値を示した10月27日接種では、雄花枯死率の変動係数も他の接種時期に比べ明らかに小さく、この時期が人工接種の最適期であることが示唆された。

以上の研究結果により、本菌の懸濁液に10%大豆油を混入させた処理液を、秋季から初冬のスギ雄花に散布処理することによって、人為的に雄花を枯死に導き、花粉の飛散を抑止する技術の開発に道が開けた。本技術はスギ花粉症対策に大いに寄与するものである。

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0件)

[学会発表] (計6件)

- ① 窪野高德、秋庭満輝、升屋勇人、高畑義啓、市原 優、廣岡裕吏、阪上宏樹、壽田智久、山本茂弘、矢田 豊、接種枯死した雄花上におけるスギ黒点病菌の子実体形成、日本森林学会第123回大会、2012年3月27日、宇都宮大学(宇都宮市)
- ② 窪野高德、秋庭満輝、升屋勇人、高畑義啓、市原 優、阪上宏樹、壽田智久、山本茂弘、矢田 豊、菌類を利用したヒノキ花粉飛散防止法の検討、東北森林科学会第16回大会、2011年8月25日、青森県総合社会教育センター(青森市)
- ③ 市原 優、壽田智久、秋庭満輝、升屋勇人、窪野高德、スギ黒点病菌の雄花組織内への侵入経過、東北森林科学会第16回大会、2011年8月25日、青森県総合社会教育センター(青森市)
- ④ 壽田智久、窪野高德、秋庭満輝、升屋勇人、阪上宏樹、高畑義啓、市原 優、山本茂弘、矢田 豊、スギ黒点病菌の人工接種適期の検討、東北森林科学会第16回大会、2011年8月25日、森県総合社会教育センター(青森市)
- ⑤ 窪野高德、壽田智久、山本茂弘、市原 優、菌類を用いた散布法によるスギ花粉飛散防止技術の検討、東北森林科学会第15回大会、2010年8月23日、岩手大学農学部(盛岡市)
- ⑥ 壽田智久、窪野高德、スギ精英樹3クローンへのスギ黒点病菌の人工接種、東北森林科学会第15回大会、2010年8月23日、岩手大学農学部(盛岡市)

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

秋庭 満輝 (AKIBA MITSUTERU)

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：50353553

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