

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292090

研究課題名(和文) 開放系森林生態に導入した菌類微生物の動態解明と環境への影響評価

研究課題名(英文) Evaluation of the effects of *Sydowia japonica* introduced in natural ecosystem

研究代表者

升屋 勇人 (Masuya, Hayato)

国立研究開発法人 森林総合研究所・東北支所・チーム長

研究者番号：70391183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉飛散防止に対してスギ黒点病菌の利用が検討されているが、環境への影響評価は行われていない。本研究ではスギの雄花寄生菌類、*Sydowia japonica*の自然界での挙動と影響の評価を行った。調査の結果、日本海側に偏って分布していた。特に分布中心と思われる兵庫、京都、石川では高頻度に出現する傾向があり、冬の日照時間と夏の降水量が比較的影響があると考えられた。胞子懸濁液散布直後では菌は検出されたが、2週間後以降、葉、土壌からは急速に本菌のDNA量が減少した。メタゲノム解析で雄花、葉、土壌における群集構造は、散布区と対照区では土壌微生物相に若干の違いが確認されたが、その差は少なかった。

研究成果の概要(英文)：An Dotidealean fungus, *Sydowia japonica*, specific parasite on male strobilus of Japanese cedar, is expected as a useful candidate for control of Japanese cedar pollinosis. To develop the application of *S. japonica* as the bioherbicide, its potential distribution and environmental effects of its establishment should be clarified. We predicted the potential distribution of *S. japonica* in Japan by using field survey and maximum entropy model, and identified the environmental variables that influence its distribution. We could find *S. japonica* from total 81 localities in Japan. Based on the presence data and environmental variables, our study showed that *S. japonica* is widely distributed in Japan but mainly in Hokuriku and San'in areas, Sea of Japan side of central northern Japan. MAXENT predicted that environmental variables influenced for the fungal distribution were sunshine duration in winter and precipitation in summer.

研究分野：樹病学

キーワード：スギ花粉症 生物防除 *Sydowia* 分布予測

1. 研究開始当初の背景

Sydoia japonica は子嚢菌の1種で、自然界ではスギの雄花にのみ感染することが知られている部位特異的寄生菌である。1917年に発見されて以降、これまでほとんど注目されてこなかったこの菌が、近年、その寄生性から注目を浴びつつある。この菌の部位特異的な寄生性を利用して、人為的にスギの雄花を枯死させることによって、花粉の飛散を抑制しようとする試みが一定の成果を上げているためである。

実際に、スギ及びヒノキ花粉症は我が国で大きな社会問題となっており、現在、約2,500万人の日本国民が花粉症に苦しんでいる。そこで、スギ及びヒノキ花粉症防止対策として、花粉形成の少ない品種の選抜や花粉を形成しない品種(雄性不稔個体)の育成研究が行われ、多くの品種が開発されている。しかし、これらを植林して、花粉の少ないスギ林やヒノキ林を育成するには約30年を要することから、直ぐにでも効果が現れる即効性のある花粉飛散防止法が求められている。こうした背景から、スギ雄花特異的な本菌の利用に注目が集まった。

2009年より開始した科学研究費補助金による挑戦的萌芽研究「菌類を用いたスギ花粉飛散防止技術の開発」において、特許審査請求中の処理液を適期に散布処理することによって、人為的にスギ及びヒノキ雄花を枯死させ、花粉の飛散を人為的に防止する実験に成功している(Hirooka et al. 2013 PLoS ONE 8(5): e62875)。また、野外のスギ及びヒノキ実験林において、開発した分生子懸濁液を雄花に散布することによっても、80%以上の成熟雄花を枯死させ、花粉の飛散を抑えることに成功している。

しかし、一方で生物農薬における特徴といわれる環境低負荷に関する知見は本菌についてはない。本来本菌は自然界にも存在し、非常に高い発生頻度の場所もある。これが何に起因しているかを多面的に明らかにすることは、本菌を生物防除資材として利用する際に重要である。また、大量散布が生態系に及ぼす影響を多面的に明らかにすることで、環境低負荷な部位特異的な生物除草剤への利用可能性が飛躍的に向上する。こうした視点は、ほとんどの生物農薬では、単純な生態系である農地での利用が多いからかほとんど評価されていない。

2. 研究の目的

本研究では *S. japonica* の自然界での生息状況を解明するとともに、人為的散布が、森林に生息する生物群集にどのような影響を与えるかを、多面的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は大きく2つのアプローチをとった。一つは自然条件下における生息状況の把

握、もう一つは人為的な散布による *S. japonica* の消長および、他生物への影響評価である。

自然条件下における生息状況の把握では、全国における分布調査と、その結果と環境変数に基づく分布予測を行った。分布調査は全国各地のスギ林100か所以上の雄花について、罹病の有無を目視にて確認した。場所によっては落枝上の罹病雄花を採取し、分離・培養・同定を行った。*Sydoia japonica* がこれまでに確認された全国85か所の緯度経度のデータと、気象庁のメッシュ気候図2010(5kmメッシュ)を用いた。MAXENT3.3を用いて分布予測を行った。緯度経度のデータはMicrosoft Excel2010で編集した。また、気候図はQGISでシェープファイルをascファイルに変更した。分布予測には、環境因子として毎月、およびその年の平均気温、最高気温、最低気温、日射量、日照時間、降水量の合計78因子を用いた。モデルはブートストラップ100反復で作成した。反復サンプルセットはランダムシードでサンプルを置き換えて選んだ。最終的に構築されたモデルは、receiver operating characteristic (ROC) curveのarea under the curve (AUC)を計算することで、正確性を検証した。AUCが1に近づくにつれて、より正確と考えられ、0.5以下ではよりランダムと解釈される。

散布による消長、他生物への影響については、*S. japonica* 特異的プライマーとプローブを作成した。そして、岩手県盛岡市の樹齢約50年のスギ人工林に形成されていた雄花に孢子懸濁液を噴霧し、2週間ごとに雄花、葉、土壌を採取して、それらにおける消長についてリアルタイムPCRを用いて確認した。

同時に、他生物への影響評価についてはメタゲノム解析を行った。同スギ人工林の林縁1m²に、*S. japonica* 孢子懸濁液1Lを散布した。また、対照区として約100年生アカマツ天然林、およびスギ人工林付近で、それぞれ1m²の非散布区を設定した。各区でA0層を除去し、ランダムに20mlの土壌を10地点から、約2週間ごとに1年間、28回採取した。採取土はサンプルごとに混和、攪拌後、500mgずつ、3本のチューブに移し、FastDNA spin kit for soilで抽出を行った。得られたDNAを鋳型に、ITS1領域をターゲットにしたバーコード付きのIllumina用アダプタープライマーでPCR増幅を行った。PCRは3反復行ったあと混合、電気泳動により分離、精製し、Illumina Miseqを用いて解析した。得られたデータはQIIMEで解析した。

4. 研究成果

MAXENTにより分布を予測した結果、本菌の分布は特に日本海側に偏ると予想された。特に近畿地方の日本海側、南東北の日本海側に分布が集中している可能性が示唆された(図1)。分布していないと予想されている岩手県北上山系について、複数回調査を行って

るがこれまでのところ、本菌は確認できていない。MAXENTにより予想された分布に寄与する環境因子について、その貢献度から上位6つについて検証したところ、2月の日照時間、7月の雨量、2月の雨量などが分布に影響している可能性が示唆された。実際にこれらの時期は子嚢胞子の飛散時期、菌糸、分生子による増殖時期、越冬時期であり、菌糸成長が比較的高温により抑制される本菌にとって、影響のある時期であると考えられた。本研究で用いた環境因子では微地形要素は考慮されていない。よって分布予測で生息しないと予想されている場所であっても、かろうじて本菌の分布が確認できる場所はあるかもしれない。新たな分布データが追加されることで、予測精度は向上すると思われるが、分布中心についてはほぼ予測している地域で間違いはないと思われる。

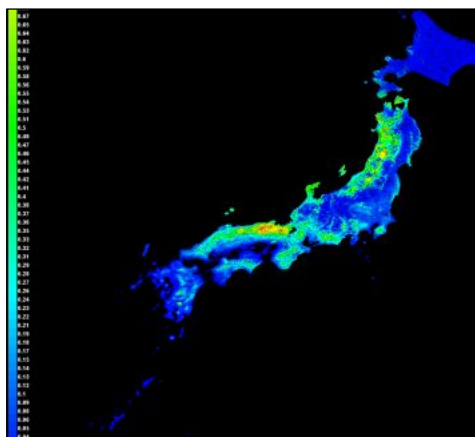


図1. スギ黒点病菌の MAXENT による分布予測図

種特異的プライマーで人為的に散布した *S. japonica* の検出を行ったところ、散布直後の10月後半では全てのサンプルから検出されたが、時間を追うごとに雄花 (MS) 以外 (葉 (L)、土壌 (S)) からは検出されなくなった (図2)。12月末では葉上からはほとんど検出されなくなった。一方、雄花では1年後でも検出された。よって人為的散布では雄花のみで生残すると考えられた。

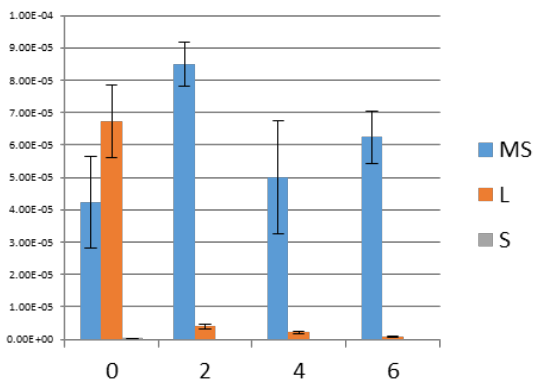


図2. *Sydowia japonica* 散布後の消長

メタゲノム解析の結果、約 885 万リードが得られた。すべてのリードをランダムに 10000 リードまでサンプリングし直して多様性を計算して作成した希薄化曲線では、対照区間で種数に大きな違いは見られなかったが、散布区でやや種数の減少が見られた (図3)。主座標分析では各区は異なるクラスターを形成し、各区で種構成が異なると考えられた (図4)。散布区では 12 月末まで *Sydowia japonica* が検出されたが、以降頻度は減少し、未検出となった。全体的に比較的高い頻度で出現したのは *Mortierella* と未同定子嚢菌、および *Archaeorhizomyces* であった。*Archaeorhizomyces* はマツ林で 6 月に最大 33% の頻度で検出された。菌類の多様性の季節性については十分な解像度は得られなかったが、冬期では両区で *Archaeorhizomyces* の頻度はやや低下する傾向にあった。また、夏期に対照区で未同定子嚢菌の頻度がやや上昇したのに対し、*Mortierella* では逆の傾向にあった。ただし、散布区とマツ林内ではこうした傾向は認められなかった。結論として散布の影響は少ないと考えられた。

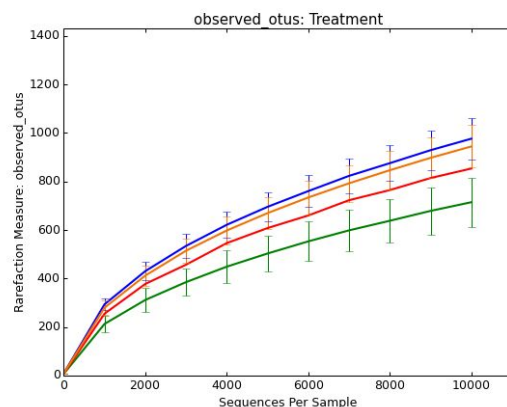


図3. 希薄化曲線 (緑: 散布区、赤: マツ林、青: 対照区、オレンジ: 散布前)

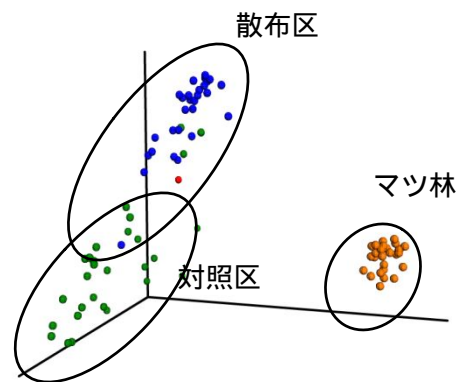


図4. *Sydowia japonica* 散布の影響評価 (リボゾーム DNA-ITS 領域の解析による土壌菌類相の PCA)

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)

高橋由紀子、升屋勇人、窪野高德、自然環境下におけるスギ黒点病菌 *Sydowia japonica* の感染状況、樹木医学研究、査読あり、2017、vol.21、pp.1-7

高畑義啓・秋庭満輝・升屋勇人・市原優・廣岡裕吏・壽田智久・山本茂弘・矢田 豊・阪上宏樹・窪野高德、熊本県におけるスギ黒点病菌によるヒノキ花粉飛散抑制の可能性、九州森林研究、査読あり、vol.69、2016、pp.121-124

[学会発表](計5件)

高橋由紀子、升屋勇人、窪野高德、スギ人工林における *Sydowia japonica* の自然感染率、樹木医学会第21回大会、2016年11月12日～11月14日、神戸大学(兵庫県神戸市)

升屋勇人、市原優、相川拓也、高橋由紀子、窪野高德、スギ黒点病菌 *Sydowia japonica* の潜在分布予測、日本菌学会第60回大会、2016年9月17日～9月18日、京都大学(京都府京都市)

高橋由紀子、升屋勇人、窪野高德、スギ黒点病感染雄花花序枝における *Sydowia japonica* のジェネット組成、日本菌学会第60回大会、2016年9月17日～9月18日、京都大学(京都府京都市)

市原優、升屋勇人、スギ黒点病菌の近畿地方における分布調査、第66回 応用森林学会大会、2015年10月10日～10月11日、岡山大学(岡山県岡山市)

窪野高德、升屋勇人、秋庭満輝、佐橋憲生、スギ雄花病菌のスギ林散布後の消長とスギ成長への影響評価、樹木医学会第19回大会、2014年11月1日～11月3日、盛岡市観光文化交流センター(岩手県盛岡市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

升屋 勇人(Masuya, Hayato)

国立研究開発法人森林総合研究所・東北支所・チーム長

研究者番号：70391183

(2)研究分担者

市原 優(Ichihara, Yu)

国立研究開発法人森林総合研究所・関西支所・グループ長

研究者番号：10353583

相川 拓也(Aikawa, Takuya)

国立研究開発法人森林総合研究所・東北支所・主任研究員

研究者番号：90343805