

論文の内容の要旨

森林科学専攻
平成18年度博士課程 進学
氏名 高橋 由紀子
指導教員名 寶月 岱造

論文題目 ブナ科樹木萎凋病菌 *Raffaelea quercivora* の伝搬様式と樹体内動態

ブナ科樹木萎凋病は、カシノナガキクイムシ *Platypus quercivorus* の集中穿孔（マスアタック）によって樹体内に持ち込まれる病原菌 *Raffaelea quercivora* によって引き起こされる。1980年以降、本州日本海側を中心に、本病によるナラ類集団枯死被害が多発しており、本病の防除方法の確立が急務の課題となっている。本病の防除を行う上で、病原菌の伝搬機構や枯死機構を解明することが必要である。本研究では、*R. quercivora* の伝搬様式を解明することを目的として、マイクロサテライト（SSR）マーカーを用いたDNA多型解析により、ナラ類集団枯損林分における*R. quercivora* とカシノナガキクイムシの遺伝的構造を明らかにした。さらに、ブナ科樹木萎凋病の病徴進展過程において*R. quercivora* が担う役割を解明することを目的として、菌糸の特異的染色方法により*R. quercivora* の樹体内分布と宿主反応との関係を明らかにした。

ブナ科樹木萎凋病菌 *Raffaelea quercivora* の伝搬様式

Raffaelea quercivora はカシノナガキクイムシによって伝搬されるため、本菌の伝搬様式を明らかにするためには、両者の繁殖様式を同時に把握する必要がある。そこで、両者のSSRマーカーを作製して、同所的に存在する*R. quercivora* とカシノナガキクイムシの遺伝的構造を解析し、本菌の伝搬様式を考察した。

被害木から採集した*R. quercivora* とカシノナガキクイムシからDNAを抽出し、*R. quercivora* で88個、カシノナガキクイムシで31個のSSRマーカーを作製した。これらのうち、泳動像が明瞭でかつ多様であり、互いに連鎖していないものを*R. quercivora* 4遺伝子座、カシノナガキクイムシ7遺伝子座選び、以下の解析に用いた。

福島県喜多方市雷神山（喜多方）、新潟県十日町市大蔵寺高原（大蔵寺）、新潟県十日町市当間高原（当間）、愛知県犬山市東京大学愛知演習林犬山研究林（犬山）の被害林分に調査地を設定し、被害木から *R. quercivora* とカシノナガキクイムシを採集した。各試料から DNA を抽出し、作製した SSR マーカーを用いて遺伝子型を同定した。犬山において、同じカシノナガキクイムシ坑道内の異なる部位から *R. quercivora* を分離し、それぞれの遺伝子型を同定した。その結果、いずれの坑道においても遺伝子型の異なる菌が複数生息していることがわかった。カシノナガキクイムシの配偶様式は一夫一婦制であり、1 ペアが 1 本の坑道を造りその坑道は他のペアの坑道とつながることはない。また、菌嚢があるのは雌だけであるため、1 本の坑道内には 1 匹の雌が持ち込んだ菌が定着すると推測される。したがって、カシノナガキクイムシの雌は複数の遺伝的に異なる *R. quercivora* を運んでいると考えられる。

Raffaelea quercivora について、樹木個体間、林分間における固定指数 (F_{ST}) を算出した結果、いずれの集団間にも有意な遺伝的分化はなかった。また、同一林分の 2006 年と 2007 年の集団間にも有意な遺伝的分化はなかった。一方、調査地間では、当間-大蔵寺の間では有意な遺伝的分化はなかったが、当間-犬山間、大蔵寺-犬山間には有意な遺伝的分化が生じていた。カシノナガキクイムシでは、各集団スケールで近交係数 (F_{IS}) を算出した結果、いずれの調査地でも集団スケールに関わらず 0 からの有意な偏りはなかった。したがって、カシノナガキクイムシは各集団内で任意交配していると考えられる。また、各集団間の F_{ST} を算出した結果、樹木個体内、林分内、調査地内ではいずれのスケールでも有意な遺伝的分化はなく、同一林分の 2006 年と 2007 年の集団間にも有意な遺伝的分化はなかった。一方、調査地間では、喜多方-当間間、喜多方-大蔵寺間、当間-大蔵寺間では遺伝的分化はなかったが、喜多方-犬山間、当間-犬山間で遺伝的分化が生じていた。

以上のように、*R. quercivora* とカシノナガキクイムシの両者とも当間と大蔵寺の集団間では遺伝的に分化しておらず、両集団と犬山集団とは遺伝的に分化していた。したがって、当間と大蔵寺のカシノナガキクイムシ集団は起源を同じとする集団が互いに多様性を維持しながら分布を拡大したと推測される。また、当間・大蔵寺と喜多方間ではカシノナガキクイムシ集団の遺伝的分化が認められなかったことから、喜多方の被害は新潟県北東部から拡大したと推測される。

ブナ科樹木萎凋病菌 *Raffaelea quercivora* の樹体内動態

本病の萎凋症状発現機構については、これまで宿主の通水阻害域の発生過程と宿主の防御反応に主眼が置かれてきたが、本病の主因である *R. quercivora* の樹体内動態は、菌糸の検出が困難であったためほとんどわかっていない。そこで、苗木に接種した *R. quercivora* の樹体内分布を詳細に観察し、本菌の動態と萎凋症の発現過程との関係について考察した。

ミズナラ、スダジイ、マテバシイ、ケヤキのポット苗に *R. quercivora* を接種し、ミズナラとケヤキについては、接種 4, 7, 14, 21, 28 日後、スダジイとマテバシイについては接種 14 日後に採取し、通水域と変色域の測定、菌の再分離および FITC 標識コムギ胚芽レクチン (F-WGA) を用いた菌糸分布と宿主組織の観察を行った。

ミズナラでは、*R. quercivora* は樹体内に侵入後、道管内を通過して垂直方向に伸長するとともに、道管に接する放射組織を通過して水平方向に分布を拡大すると考えられた。通道阻害は、菌糸の分布域よりも外側に、菌糸分布域とほぼ相似形の範囲で起こった。チロースの形成は、接種苗の方が対照苗よりも早くから認められたことから、接種苗の方が早くから道管内でキャビテーションやエンボリズムが発生していると考えられた。リグニン・スベリン様物質や蛍光物質等の防御物質は、菌

糸の分布域から放射方向に離れた位置に蓄積していた。試験期間を通して、菌糸は防御物質の分布域よりも常に接種点側に存在し、これらの分布域を越えることはなかった。これらの宿主の反応は、対照と接種のいずれにおいても認められたことから、傷に対する宿主の動的防御反応であると考えられた。しかし、*R. quercivora* 接種からの反応応答は接種が対照よりも遅かったことから、*R. quercivora* が宿主の防御物質形成を抑制していると推測され、そのために病原性のない他の菌類よりも樹体内を広範囲に侵入できると考えられた。

スダジイでは、個体による菌糸伸長や宿主反応にばらつきが大きかったが、*R. quercivora* は、ミズナラと同様に、道管と放射組織を通して分布を拡大していると考えられた。*R. quercivora* 接種苗と対照苗のいずれにおいても防御物質の蓄積はほとんど見られなかったが、ミズナラよりも通道阻害域が広くなかったことから、構造的な要因によりミズナラよりも通道阻害が起こりにくいのではないかと考えられた。

マテバシイでは、ミズナラやスダジイで見られたような放射組織を通った *R. quercivora* の菌糸伸長が見られず、水平方向への菌糸の伸長距離は短かった。防御反応の形成位置もミズナラよりも接種部に近く、物質の蓄積も明瞭であったことから、ミズナラよりも *R. quercivora* の侵入に対する防御反応が早く、ミズナラよりも *R. quercivora* に対して抵抗性であると考えられた。一方、ケヤキでは、接種 28 日後においても *R. quercivora* の樹体内への侵入が認められなかったことから、*R. quercivora* に対して抵抗性の樹種であると考えられた。ケヤキでは、リグニン・スベリン様物質の蓄積は認められなかったが、ゴム様物質と見られる物質の蓄積が道管中に認められた。

ケヤキへの *R. quercivora* の接種において、菌糸が樹体内で伸長できなかった原因を明らかにするために、木部抽出成分が *R. quercivora* の菌糸伸長におよぼす影響を調査した。ミズナラ、スダジイ、マテバシイ、ケヤキの木部の熱水抽出物を添加した培地を用いて、*R. quercivora* の菌糸成長速度を比較した。その結果、ケヤキの熱水抽出物添加培地での菌糸成長速度は他の樹種の抽出物添加培地と差がないか、やや早かった。さらにメタノール抽出物を用いて *R. quercivora* の菌糸伸長に対する抗菌性試験を行った結果、いずれの樹種の抽出物でも菌糸成長阻害効果は認められなかった。したがって、ケヤキの *R. quercivora* に対する抵抗性は木部抽出成分によるものではないと考えられた。

ケヤキの抵抗性が木部の物理的な抵抗性や動的抵抗性によるものかを検証するために、ガンマ線照射により組織を非破壊的に死滅させたミズナラとケヤキの切り枝と非処理の切り枝に対して *R. quercivora* の接種試験を行った。その結果、非処理の枝では、ミズナラ、ケヤキともに苗木への接種の結果と違いは認められなかったが、ケヤキガンマ線照射処理枝では *R. quercivora* の菌糸が蔓延した。したがって、*R. quercivora* へケヤキの抵抗性は動的抵抗性であると考えられた。また、水平方向への菌糸伸長がミズナラよりも短かったことから、放射組織の構造の違いが水平方向の移動を制限していると考えられた。一方、細胞の生死によるミズナラ樹体内の菌糸伸長量の違いから、ミズナラは動的抵抗性によって本菌の侵入を防御していると考えられた。