

アカマツ葉さび病菌 *Coleosporium* species の

生活史戦略の多様性

2018年7月

鈴木浩之

アカマツ葉さび病菌 *Coleosporium* species の

生活史戦略の多様性

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物圏資源科学専攻

博士（農学）学位論文

鈴木浩之

第1章	序論	1
第2章	アカマツ林におけるさび孢子世代の存在量	9
2-1.	緒言	
2-2.	実験材料および方法	
2-2-1.	調査地概要	
2-2-2.	さび孢子堆の採集および種同定	
2-2-3.	データ解析	
2-3.	結果	
2-3-1.	マツ葉さび病菌各種の存在量	
2-3-2.	マツ葉さび病菌各種の存在量に対する採取場所、葉齢、高さの影響	
2-3-3.	アカマツ実生の種組成	
2-4.	考察	
第3章	<i>Coleosporium phellodendri</i> および <i>C. lycopodis</i> の冬孢子世代の存在量	33
3-1.	緒言	
3-2.	実験材料および方法	
3-2-1.	<i>Coleosporium phellodendri</i> の冬孢子堆積算面積	
3-2-2.	ススキ草原における <i>C. lycopodis</i> の冬孢子堆積算面積	
3-3.	結果	
3-4.	考察	
第4章	冬孢子および担子孢子が発芽特性	40
4-1.	緒言	
4-2.	実験材料および方法	
4-2-1.	冬孢子が発芽温度特性	
4-2-2.	担子孢子が発芽温度特性および間接発芽率	
4-2-3.	担子孢子が乾燥耐性	

4-3.	結果	
4-3-1.	冬孢子および担子胞子の発芽温度特性	
4-3-2.	担子胞子の間接発芽率	
4-3-3.	担子胞子の乾燥耐性	
4-4.	考察	
第5章	担子胞子の感染可能なアカマツの成長段階	53
5-1.	緒言	
5-2.	実験材料および方法	
5-3.	結果	
5-4.	考察	
第6章	総合考察	63
	摘要	70
	謝辞	73
	引用文献	74

## 第1章

生態学は Haeckel により、動物に関して「非生物のおよび生物的環境との間の全ての関係、すなわち生物の家計に関する科学」と初めて定義された。Krebs (1972) は、さらに明確な生態学の定義として、「生物の分布と存在量を規定している相互作用を解明する科学」を提案した。この定義の相互作用という言葉には対象とする生物に外から影響を与える生物学的あるいは非生物的環境との相互作用も含まれると考えられている (Begon et al. 2002)。したがって、生態学は、対象とする生物がどこに、どれほど多く出現するかを評価し、それらを制限する環境要因について探求する科学である。

菌類の生態学は、動物や植物の生態学に比べ大きく立ち遅れている (徳増, 2006)。その要因の一つとして、菌類の個性性が不明瞭であり、多くの動物や植物のように個体数によって存在量を計ることが困難であることが挙げられる。この困難を克服するため、菌類の生態学では“個体”の代わりに“コロニー”を用いて存在量を評価してきた。木材腐朽菌やリテイズマ科菌類などの落葉分解菌は、異なる系統に由来するコロニーの境界に帯線が生じることが知られている (Rayner and Todd, 1979)。これらの菌類では、存在量を評価するため、基質を占めるコロニーの大きさや数を帯線を指標として計測してきた (Tateishi et al., 1989; Masuhara and Katsuya, 1992; Mabuhay, 2003; Hirose and Osono, 2006; Matsukura et al., 2017)。マツ属やモミ属植物の落葉に定着する腐生菌では、基質の明瞭な個性性に着目し、存在量を評価してきた。個性性の明瞭な落葉では単葉を1個の方形枠と考えて出現頻度 (= ある種のコロニーが得られた針葉数 / 調査した針葉数 × 100) を求めることができる。複数の調査地点において同数のマツの葉を用いて、出現頻度を算出することで、各地の菌の存在量を相対的に比較してきた (Iwamoto and Tokumasu, 2001; Tokumasu, 2001; Tokumasu and Aoki, 2002)。

サビキン目 (Pucciniales) は担子菌門 (Basidiomycota)、サビキン亜門 (Pucciniomycotina) に所属する植物病原菌であり、トウモロコシ、ダイズ、ムギ類といった主要作物をはじめ、

経済的に重要な多くの植物に感染し、被害を与えている重要病害の一群である (Cummins and Hiratsuka, 2003)。サビキノは生きた植物の細胞からのみ栄養を得ることができる絶対寄生菌であり、最大で5つの機能的・形態的に異なる孢子(精子・さび孢子・夏孢子・冬孢子・担子孢子)を形成する。多くのサビキノは分類学的に全く無関係な2つの植物を宿主として利用する複雑な生活環(異種寄生性生活環)を有しており5つの孢子を有するサビキノの異種寄生性生活環では、精子・さび孢子世代をある植物種で、夏孢子・冬孢子・担子孢子世代を別の植物種上で過ごす。

サビキノの分布に関しては野外において病徴を示す植物体を採取し、孢子堆や孢子の形態的特徴を基に種同定を行うことで調査が行われてきたが (Chung et al., 2009; Mauricio and Anibal, 2013)、存在量に関する研究は少ない。サビキノに対しては、一般的な植物病原菌と同様に、葉面積に対する病徴の割合、孢子形成度などを基にスケール化された値 (Disease Severity) を指標として存在量が評価されてきた (Inglis et al., 1988; Ishii et al., 2007; Talukder et al., 2013; Huang et al., 2015)。しかし、Disease index は菌の系統間の病原力や、宿主植物の品種間の抵抗性を比較するための指標であり、サビキノの存在量を計測するという目的で設定された指標ではない。また、この方法では同一植物上に形態的に類似した種が複数種存在している場合、各種を識別し、その存在量を評価することは現実的に難しい。そのため、異なる種間の存在量を比較した研究例はこれまでなかった。

*Coleosporium* 属菌は、サビキノ目(Pucciniales)のコレオスポリウム科(Coleosporiaceae)に属するマツ葉さび病を引き起こす植物寄生菌であり、日本では28種が報告されている (Kaneko, 1981; Zinno and Kaneko, 1984)。28種うち7種が五葉マツ類を精子・さび孢子世代宿主とし、12種が二葉マツ類を精子・さび孢子世代の宿主とする。マツ属植物針葉上のさび孢子堆は、高湿度条件下で護膜が裂開すると、さび孢子が風に乗って種ごとに特異的な中間宿主へと飛散すると感染し夏孢子堆を形成する。夏孢子は無性的に形成され、繰り返し感染をしながら分布域を拡大しつつ、やがて冬孢子堆を形成する。1細胞性の冬孢子は休眠能力を有せず、冬季に入る前に成熟し4細胞の内生担子器へ変化すると、好適条件下で担

子胞子を飛散させる。多くの場合、マツ属植物の当年葉に感染した担子胞子は翌年に精子器およびさび胞子堆を形成すると考えられている(佐保, 1969; Kaneko, 1975a; Kaneko, 1978) (図 1-1)。

本属菌が感染にすることによってマツ属植物は早期の落葉が起こり、深刻な場合は枯死に至ることもある。各地の造林地や自然林、苗畑等においてしばしば発生し、大きな被害を与えるため、経済的に重要な病原菌の一つとして認識されている (Baxter, 1931; 陣野&遠藤, 1964; Nicholls et al., 1968)。加えて、夏胞子・冬胞子世代の宿主(中間宿主)の中には、キハダ、サンショウ、シソなど、経済的に重要な植物が含まれており(佐保, 1963a; Kaneko, 1975b, 1987)、マツ葉さび病菌はこれらの一次感染源ともなる。効率的な防除法を確立するためにも、マツ属植物上の *Coleosporium* 属菌の生態的情報は重要である。

しかし、野外のアカマツ(*Pinus densiflora*)上における *Coleosporium* 属菌の種構成や存在量はこれまでほとんど研究されていなかった。二葉マツをさび胞子世代の宿主とする 12 種の *Coleosporium* 属菌の全てがアカマツを精子・さび胞子世代の宿主として用いることに加え(佐保, 1969; Hiratsuka and Kaneko, 1976; Kaneko, 1977, 1981; Hiratsuka and Saho, 1984)、*Coleosporium* 属菌のさび胞子世代は種間で形態的特徴が非常に類似している (Kaneko, 1981)。そのため、マツ属植物上のさび胞子世代を形態的に種同定することは非常に難しい。マツ葉さび病菌の生態に関する先行研究では、さび胞子世代の種同定のために調査地に分布している中間宿主種、あるいはその近縁種に対しさび胞子を用いた接種試験を行い、その結果生じた夏胞子・冬胞子世代の観察を必要とした(佐保, 1963a; 陳野ら, 1965; 陣野・千葉, 1967; 浜, 1972)。こうした従来の方法では種同定までに長い時間と労力を必要とする。多数のさび胞子堆を同定する必要がある *Coleosporium* 属菌のさび胞子世代の生態的研究を行うためには、より迅速かつ正確に種同定する手法の確立が求められた。

近年では、形態的に識別することが困難な種を分類あるいは同定するために、分子生物学的手法が用いられている。制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 法は菌の種同定に頻繁に用いられる手法の一つである (Moricca et al., 1998; Nakamura et al., 1998; Imazu et al., 2000;

Santos et al., 2010)。PCR-RFLP 法は、PCR 増幅した DNA 領域を、特定の配列を検知する制限酵素によって切断し、断片長の違いを電気泳動によって検出する方法である。制限酵素の数が豊富で多様な配列を切断できるため、様々な DNA 領域に適用することができる。また、シーケンスに比べ、簡便で迅速、かつ安価に種同定ができるため、野外において多量に採取される *Coleosporium* 属菌のさび孢子堆を種同定する手法として適していると考えられる。

筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所（以下菅平高原実験所）は長野県上田市菅平高原に位置する。菅平高原実験所の敷地内では、異なるタイプの植生が遷移の段階に沿って並び、半自然的に維持されている（図 1-2）。ススキ草原からアカマツ林を経て落葉広葉樹林を形成する過程は、中部山岳地帯における典型的な二次遷移のパターンであり（Kashiwagi, 1991）、自然に近い環境が人工的ではあるが整えられている。アカマツ林と隣接するススキ草原をはじめとして、菅平高原実験所の内外には *Coleosporium* 属菌の中間宿主が複数種分布しており、2006 年から 2008 年に行われた菅平高原実験所内の菌類インベントリー調査において、二葉マツに感染することが知られている 4 種の異種寄生性 *Coleosporium* 属菌 [*C. asterum* (Dietel) Syd. & P. Syd., *C. clematidis-apiifoliae* Dietel, *C. lycopodis* Syd. & P. Syd., *C. phellodendri* Kom.] が、これらの中間宿主上において発見されている（山岡 未発表データ）。また、アカマツ林の針葉上ではさび孢子堆の形成が見られることから、菅平高原実験所では複数種の *Coleosporium* 属菌がアカマツを共有しながら生活環を完了させていると推察される。

板井（2008）はこのような立地環境に注目し、菅平高原実験所を調査地として *Coleosporium* 属菌の発生生態を調査した。アカマツ林におけるさび孢子堆の発生状況を明らかにするため PCR-RFLP 法を開発し、針葉上のさび孢子堆を解析した。その結果、アカマツ林からは *C. phellodendri* および *C. lycopodis* のさび孢子堆が種同定され、これら 2 種が菅平高原実験所において生活環を完了させていることが示唆された。しかし、板井の開発した PCR-RFLP 法では、*C. clematidis-apiifoliae* および *C. asterum* を識別することはでき

なかったため、菅平高原実験所のアカマツ林における種構成を把握することはできていない。

鈴木（2014）はこれら 4 種の *Coleosporium* 属菌を種同定できるよう、板井（2008）の PCR-RFLP 法を改良し、2011 年と 2012 年に菅平高原実験所内のアカマツ林において採取したさび胞子堆を種同定した。各年とも 300 サンプルを超えるさび胞子堆を種同定した結果、針葉上から *C. phellodendri*, *C. lycopodis*, *C. asterum*, *C. clematidis-apiifoliae* の 4 種が認められた。各年のさび胞子堆の割合は種によって大きく異なり、*C. phellodendri* が 2 年を通じて全サンプル中の 85%以上を占め、アカマツ林で優占していた。しかし、存在量の種間差やその差を生じる要因については、明らかにすることはできなかった。

一般的に、感染源と被接種植物の距離が近いほど、また接種源が多いほど被接種植物への感染の機会が増し、存在量が多くなると推測される。しかし、これまでの調査で、アカマツ林内や隣接するススキ草原には、*C. phellodendri* の中間宿主であるキハダ (*Phellodendron amurense*) は認められず、鈴木（2014）が認めた本菌の感染状況を、この考え方で説明することはできない。一般的なサビキノの担子胞子の感染可能な飛散距離は十数 m と言われており（佐保，1968）、*C. lycopodis* は感染源となる中間宿主からおおよそ 10m 離れたアカマツにはほとんどさび胞子堆を形成しないことが報告されている（作山，1973）。一方、*C. phellodendri* は感染源からおおよそ 200m 離れたアカマツにも多量のさび胞子堆を形成していることから、本種の担子胞子の感染可能な飛散距離は 200m 以上飛散と考えられている（浜，1972）。菅平高原実験所には樹高 15m を超えるキハダが樹木園（アカマツ林縁から約 250m）に 3 本植樹されており、落葉広葉樹林に 1 本分布している。また、菅平高原実験所から南西方向におおよそ 250m 離れた場所に位置するキハダの植樹林には約 250 本のキハダが存在している（図 1-2）。これらのキハダが担子胞子の供給源になっている可能性が高いが、これまで中間宿主上の冬胞子堆やそこから供給される担子胞子の量について種間で比較した報告はない。また、*Coleosporium* 属菌の担子胞子による感染有効距離に差が生じる理由についても不明である。

感染源を供給する中間宿主と被接種植物（アカマツ）が、近くに存在していても必ずしも感染に成功するとは限らない。感染源となる担子胞子を形成する冬胞子の形成時期、冬胞子・担子胞子が発芽可能な環境や担子胞子が感染可能なアカマツの部位やそれが存在する期間などが、感染の成功率に大きく影響を与え、存在量の差にもその影響が反映されると考えられる。これらの生理的特性に関する情報はいくつかの種で報告はあるが(佐保, 1968; 作山, 1980)、それぞれの種の野外での生態にどのような影響があるか解析された例はほとんど無い。

そこで本研究では、筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所を調査地として、*Coleosporium* 属菌 4 種 (*C. asterum*, *C. clematidis-apiifoliae*, *C. lycopodis*, *C. phellodendri*) の生態、特にアカマツ林におけるさび胞子世代の存在量や分布に影響を与えている各種の生理的特性を調査し、これら菌類の生活史戦略の多様性とそれに関わる要因を明らかにすることを目的とした。第 2 章では、まず、サンプルあたりの感染数、調査木あたりの感染強度、アカマツ林の平均感染強度、流行度、ならびに葉齢ごとのサンプルあたりの感染数を求め、これらの指標を用いてアカマツ林における 4 種の存在量の実態を把握し、その存在量と林内での分布や葉齢の関係性を解析した。なお、この解析には鈴木 (2014) が用いたデータも合わせて利用した。第 3 章では、4 種のうち *C. phellodendri* と *C. lycopodis* を対象とし、それぞれの中間宿主のアカマツからの距離および中間宿主上の冬胞子堆の量とアカマツ上での存在量の間関係を考察した。第 3 章の結果から、*C. phellodendri* が他 3 種に比べ担子胞子を長距離飛散させる必要があることが示されたため、第 4 章では、4 種の冬胞子および担子胞子の発芽温度特性に加え、担子胞子の長距離飛散に関連すると考えられる担子胞子の間接発芽能力および乾燥耐性を明らかにした。また、第 5 章では、異なる生育段階のアカマツ苗に担子胞子による接種を行い、各種が感染可能なアカマツの葉齢と生育段階を明らかにした。第 6 章ではこれらの結果を総合的に捉え、*Coleosporium* 属菌の生活史戦略の多様性を考察した。

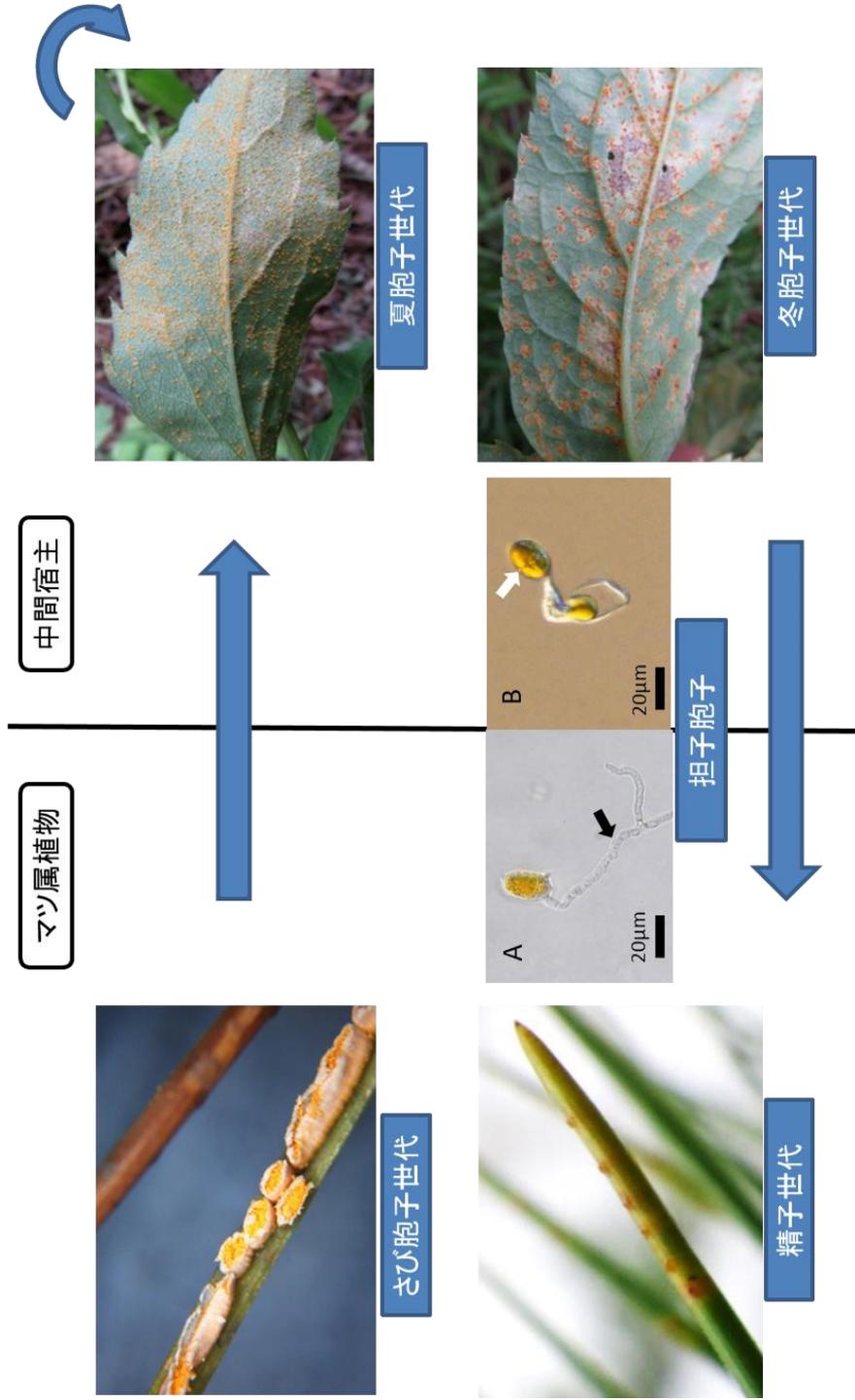


図 1-1. 異種寄生性を有する *CoLeosporium* 属菌の生活環

A: 直接発芽、黒矢印は発芽管を指す B: 間接発芽、白矢印は二次担子胞子を示す

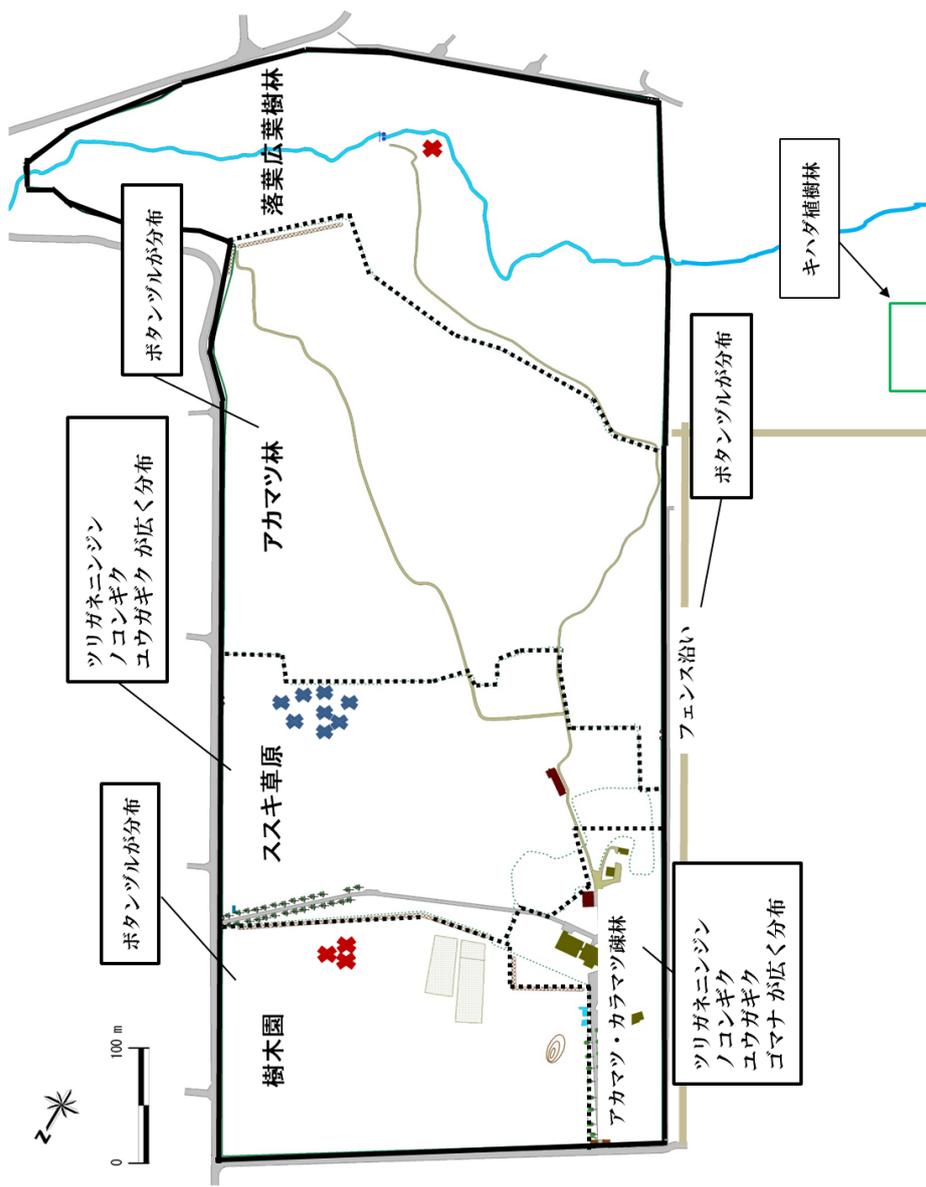


図 1-2 筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所の敷地図

黒実線で囲まれた領域が菅平高原実験所を示す

✖ はキハダを示す

✧ はアカマツ実生を示す

## 第2章 アカマツ林におけるさび孢子世代の感染状況

### 2-1. 緒言

筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所には二葉マツを精子・さび孢子世代宿主とする4種の *Coleosporium* 属菌 (*C. asterum*, *C. clematidis-apiifoliae*, *C. lycopodis*, *C. phellodendri*) がそれぞれの間宿主上で夏孢子・冬孢子世代を形成している(山岡 未発表データ)。鈴木(2014)は板井(2008)のPCR-RFLP法を改良して、4種全てを同定可能にし、2011年および2012年の2年にわたり菅平高原実験所のアカマツ林から採取したさび孢子堆を種同定し、このアカマツ林における *Coleosporium* 属菌の種構成と存在量を明らかにした。アカマツ林には *C. phellodendri*, *C. lycopodis*, *C. asterum*, *C. clematidis-apiifoliae* の4種がさび孢子堆を形成しており、両年とも採取した全さび孢子堆中の *C. phellodendri* のさび孢子堆が85%を超え優占していることが明らかになった。一方で *C. asterum* や *C. clematidis-apiifoliae* のさび孢子堆の割合は両年とも極めて低く、アカマツ林における各種のさび孢子堆の存在量には違いが見られた。しかし、4種の存在量を統計的に評価し比較することや、存在量に影響を与える要因までは検討しなかった。

そこで本章では、アカマツ林における4種の存在量の実態を把握することを目的とした。そのため、サンプルあたりの感染数、調査木あたりの感染強度、アカマツ林の平均感染強度、流行度という4つの指標を用いた。感染数を用いてさび孢子堆の存在量に対する地上からの高さや葉齢の影響を解析し、感染強度を用いて調査木あたりの、平均感染強度を用いてアカマツ林全体の各種のさび孢子世代の存在量を相対的に比較した。そして流行度を用いて全調査木中の感染木の割合を種ごとに比較した。また、ススキ草原に分布するアカマツ実生とアカマツ林に形成されるさび孢子堆の種組成を比較した。本章では鈴木(2014)の修士研究において、本研究と同様の手法によって得られた2012年および2013年のデータを加え、2015年のデータとともに解析を行った。

## 2-2. 実験材料および方法

### 2-2-1. 調査地概要

筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所は、長野県上田市菅平高原の中央部（北緯 36° 31'50", 東経 138° 20'50", 標高 1320m）に位置する。1981 年から 2010 年の気象データによると菅平高原の年平均気温は 6.6°C であり、月平均気温は 8 月で最も高く 19.4°C, 2 月で最も低く - 5.5 °C となる。年平均降水量は 1,342mm である (<http://www.sugadaira.tsukuba.ac.jp/nature/weather.html>)。ケッペンの気候区分によれば亜寒帯湿潤気候区 (Dfb) にあたり、夏季冷涼・冬季厳寒な気候である。センターの敷地は樹木園、ススキ草原、アカマツ林、落葉広葉樹林に分けて管理されている。ススキ (*Miscanthus sinensis* Andersson) を優占種とする草原は本州中部の典型的な山地草原であり、遷移の進行によってアカマツ林へと移行する (Kashiwagi, 1991)。

菅平高原実験所におけるススキ草原は約 8.0 ha の面積を有し、優占種であるススキのほかにワラビ [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn]、ヤマハギ (*Lespedeza bicolor* Turcz.)、ヨモギ [*Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* (Nakai) H. Hara] など多くの草本から成る本州中部の典型的な山地草原 (林, 2003) であり、その構成種の中には *C. asterum* の中間宿主であるユウガギク (*Aster iinumae* Kitam.)、ノコンギク [*A. microcephalus* (Miq.) Franch. & Sav. var. *ovatus* (Franch. & Sav.) Sejima & Mot. Ito]、*C. clematidis-apiifoliae* の中間宿主であるボタンヅル (*Clematis apiifolia* DC.)、そして *C. lycopodis* の中間宿主であるツリガネニンジン [*Adenophora triphylla* (Thunb.) A. DC. var. *japonica* (Regel.) Hara] がある。特にツリガネニンジンはこれらの中間宿主の中で被度が最も高く、ススキ草原の全域に広く分布している (林, 2003)。

アカマツ林はススキ草原と隣接する北西端から南東側へと広がっており、約 8.5 ha の面積を有する。北西端の樹齢は約 50 年、落葉広葉樹林に向かって徐々に樹齢が高くなっていき南東側では樹齢約 80 年のアカマツが分布している。アカマツの当年葉は 6 月中旬から展葉しはじめ、8 月中旬に展葉を完了する (図 2-1; 鈴木, 2014)。林内は 400 m<sup>2</sup> あたり 137 本

のアカマツが分布しているが (Kashiwagi, 1991)、点在するギャップの他は十分な日光が林内に届かないために下枝の多くは枯れ落ちている。林床には *Coleosporium* 属菌の中間宿主としてはボタンヅルが多くみられるが、広い範囲でクマイザサ [*Sasa senanensis* (Franch. & Sav.) Rehder] が繁茂している。

アカマツ林に隣接している落葉広葉樹林には主にミズナラ (*Quercus crispula* Blume) が分布している。それに加え、シラカンバ [*Betula platyphylla* Sukaczew var. *japonica* (Miq.) H.Hara]、カエデ属植物 (*Acer* spp.)、そしてサクラ属 (*Prunus* spp.) が分布している。*Coleosporium* 属菌の中間宿主では、*C. phellodendri* の中間宿主であるキハダおよびボタンヅルも分布している。

菅平高原実験所内の樹木園には、菅平本来の自然の森を復元するため、ブナ (*Fagus crenata* Blume) が多く植樹されている。その他、現在菅平に多く植樹されたカラマツ [*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière] や、菅平の亜高山帯や高山帯に分布するシラベ (*Abies veitchii* Lindl.)、コメツガ [*Tsuga diversifolia* (Maxim.) Mast.]、トウヒ [*Picea jezoensis* (Siehold & Zucc.) Carrière var. *hondoensis* (Mayer) Rehder] などの針葉樹が植樹されている。また、オウシュウトウヒ [*Picea abies* (L.) H.Kart]、ヨーロッパアカマツ (*Pinus sylvestris* L.)、ストロブマツ (*Pinus strobus* L.) などの海外種が植樹されている。樹木園内には *Coleosporium* の中間宿主も分布しており、15m 以上の樹高を有するキハダが 3 本ある。また、林床にはボタンヅルが見られる。

その他、研究棟西南部には、アカマツおよびカラマツの疎林があり、*C. asterum* の中間宿主の 1 つであるゴマナ (*Aster glehnii* F.Schmidt) やツリガネニンジンが分布している。また、菅平高原実験所の南西側のフェンス沿いにボタンヅルが繁茂している。センターの南西 200m ほどに位置する菅平小中学校所有林にはキハダの植樹林があり、樹高 10m を越えるキハダが 200 本以上分布している。

菅平高原実験所における中間宿主上の *Coleosporium* 属菌の夏孢子堆および冬孢子堆の形成開始時期は種によって異なる。2011 年から 2013 年にかけて各中間宿主上の夏孢子堆お

よび冬胞子堆の発生時期を調査したところ、ツリガネニンジン上の *C. lycopodis* は 6 月中旬に夏胞子堆を形成し、7 月初旬には冬胞子堆を形成し始めた。キハダ上の *C. phellodendri* は 7 月初旬に夏胞子堆を形成し、7 月中旬に冬胞子堆を形成した。ボタンヅル上の *C. clematidis-apiifoliae* は 7 月中旬に夏胞子堆を形成し、8 月初旬に冬胞子堆を形成した。ゴマナ上の *C. asterum* は 8 月初旬に夏胞子堆を形成し、8 月中旬に冬胞子堆を形成した (図 2-1; 鈴木, 2014)。

#### 2-2-2. さび胞子堆の採集および種同定

2012 年、2013 年、および 2015 年 6 月に菅平高原実験センター内のアカマツ林においてさび胞子堆を採集した。2012 年には林縁 33 本、林内 13 本、2013 年には林縁 48 本、林内 17 本、2015 年には林縁 13 本、林内 9 本のアカマツを調査木とした。調査木の 4.5m, 5.5m, 6.5m の高さから高枝切バサミを用いて約 60 cm の長さの枝をそれぞれ 2 本ずつ切り落とした。枝内に存在する感染葉を全て採集し、各針葉の葉齢を記録した。多くのさび胞子堆の護膜はすでに裂開していたため、異なる針葉間でさび胞子が混ざらないように針葉をそれぞれ別の袋に入れて採取した。

また、アカマツ林に接したススキ草原の北東側には、樹高 1.5 m 以下のアカマツの実生が 8 本存在していた。これらの実生にも *Coleosporium* 属菌の感染が見られたため、実生に存在する感染葉をすべて採集し、葉齢を記録した。

実験室内において各針葉から無作為に一つのさび胞子堆を選び、針葉から切り取って 100 $\mu$ l の CTAB (臭化セチルトリメチルアンモニウム液) 液に入れ DNA 抽出を行うまで保存した。Gardes and Bruns (1993) を一部改変した方法によって以下のように DNA を抽出した。100 $\mu$ l の CTAB 液中でさび胞子堆を粉碎し、65 $^{\circ}$ C の恒温器で 30 分温めた。クロロホルム・イソアミールアルコール溶液 100  $\mu$ l を加え攪拌したのち、15 分間 13000 rpm で遠心した。上澄みに 10 $\mu$ l の酢酸ナトリウム (pH5.2) と 100  $\mu$ l のイソプロパノールを加えて攪拌し、20 分間 13000rpm で遠心して沈殿物を得た。100 $\mu$ l の滅菌した Tris ethylene diamine

tetra acetic acid を加え、Polymerase chain reaction (PCR) 反応に用いるまで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

プライマーセット 5.8s-coleo(5'-CACATCGATGAAGAACACAGTG-3')および itsr-coleo (5'-CGGACTCCTGTAAAAGAGCCA-3') を用い、rDNA ITS2 領域の PCR 反応を行った。PCR 反応の試薬は TaKaRa ExTaq DNA polymerase (TAKARA BIO INC.)を用い、PCR 反応には My Cyclor Thermal Cyclor (BIORAD) を使用した。反応条件は、 $95^{\circ}\text{C}$ ・3 分間のプレインキュベーション後、 $95^{\circ}\text{C}$ ・30 秒間の熱変性、 $55^{\circ}\text{C}$ ・1 分間のアニーリング、 $72^{\circ}\text{C}$ ・1 分間の伸長という増幅サイクルを 35 回繰り返した後、最後に  $72^{\circ}\text{C}$ ・10 分間のインキュベーションを行った (Virtudazo et al. 2001)。得られた PCR 産物の一部を 1.2%アガロースゲル上で電気泳動 ( $100\text{V}$ ・15 分) し、エチジウムブロマイド蛍光染色により DNA 増幅を確認した。

制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 法には *SspI*, *HindII*, *MboI* の 3 つの制限酵素を用いた。0.2ml エッペンドルフチューブ内で、制限酵素 0.5 $\mu\text{l}$ , Buffer 1.0 $\mu\text{l}$ , PCR 産物 8.5 $\mu\text{l}$  を混合し、 $32^{\circ}\text{C}$ で 12 時間インキュベートした。3%のアガロースゲル上で電気泳動 ( $100\text{V}$ ・30 分) し、エチジウムブロマイド蛍光染色により RFLP パターンを確認した。バンドパターンから種同定を行った (図 2-2)。

### 2-2-3. データ解析

アカマツ林における各種の存在量を明らかにするため、2015 年のデータに加え 2012 年および 2013 年の 6 月に同様の方法によって採取したさび胞子堆のデータも合わせて供試した。

各調査木において同じ高さから得た 2 本の枝を 1 サンプルとし、種 A のさび胞子堆を形成した針葉数をサンプル当たりの種 A の感染数とした。調査木の中には適切な高さに枝が存在しない場合があったため、全てのアカマツから同じ数のサンプルを得ることができなかった。そのため、各調査木から得られたサンプルの感染数の平均値を求め、その調査木の

感染強度とした。そして、全調査木の感染強度を平均した値をアカマツ林の平均感染強度とした。また、全調査木のうち、種 A のさび孢子堆が得られた調査木の割合を種 A の流行度とした。

種ごとにアカマツ林における流行度および平均感染強度を比較するため、一般化線形混合モデル (GLMM) を用いた。流行度を比較する場合は、誤差構造に二項分布を、リンク関数としてロジットを用い、平均感染強度を比較する場合は、誤差構造にポアソン分布を、リンク関数としてログをそれぞれ用いた。流行度を評価する GLMM の目的変数には感染した調査木の数および非感染の調査木を、平均感染強度を評価する GLMM の目的変数には各調査木の感染数の合計を設定した。両モデルにおいて種、調査年、および種と調査年の交互作用を説明変数の固定効果とし、調査木の各個体をランダム効果として扱った。それに加え、平均強度を評価するモデルにおいては、各調査木から得られたサンプル数をログ変換した値をオフセットとして設定した。目的変数に対する説明変数の影響を評価するため、尤度比検定 (Type I) を行い、 $P$  値を求めた。

*Coleosporium phellodendri* に関しては、流行度、あるいは平均感染強度に対するアカマツ林の採集場所 (林縁あるいは林内) および調査年の影響を評価するため、GLMM を用いた。説明変数として、採集場所、調査年、採集場所および調査年の交互作用を固定効果として設定し、調査木の各個体をランダム効果とした。加えて、平均強度を評価するモデルにおいては、各調査木から得られたサンプル数をログ変換した値をオフセットとして設定した。目的変数に対する説明変数の影響を評価するため、尤度比検定 (Type I) を行い、 $P$  値を求めた。

ある種の感染数に与える枝の高さおよび葉齢の影響を評価するため、各サンプルの感染数を葉齢ごとに分けて 1 つの目的変数のデータとし、ポアソン分布を誤差構造、リンク関数をログとした GLMM を用いた。林内では高さの低い枝は落枝しており、十分なサンプルが得られなかったため、林縁から得られたデータのみを用いて解析を行った。説明変数として、枝の高さ、葉齢、枝の高さおよび葉齢の交互作用を固定効果として扱い、調査木の各個

体をランダム効果として扱った。目的変数に対する説明変数の影響を評価するため、尤度比検定 (Type I) を行い、 $P$ 値を求めた。

各 GLMM においていずれかの説明変数および交互作用に有意な効果が見られた場合、Tukey の事後検定を行った。全ての統計解析は R 3.3.2 (Ihaka and Gentleman, 1996) を用いて行い、lme4 パッケージ (Douglas et al. 2015) および multcomp パッケージ (Bretz et al. 2011) を使用した。

アカマツ林から得られたさび孢子堆の種組成と、実生から得られたさび孢子堆の種組成を比較するため、2012 年、2013 年および 2015 年におけるアカマツ林 6.5 m, 5.5 m, 4.5 m の各高さにおける各種のさび孢子堆の割合と、実生における各種のさび孢子堆の割合を算出した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. マツ葉さび病菌各種の存在量

2012 年には 46 本、2013 年には 64 本、2015 年では 22 本のアカマツを調査した結果、各年でそれぞれ 387、1361、212 本の感染葉が得られた。なお、さび孢子堆が各年ともほとんど得られなかった *C. clematidis-apiifoliae* については、統計解析から除外した。*Coleosporium phellodendri* のアカマツ林における流行度は各調査年でそれぞれ 76.1, 94.7, 72.7% と一貫して高い値を示したのに対し (表 2-1, 図 2-3)、*C. lycopodis* は最大で 32.6%, *C. asterum* は最大で 15.2%, *C. clematidis-apiifoliae* の流行度は最大で 2.2% であった (表 2-1, 図 2-4, 2-5, 2-6)。GLMM では、種と、種および調査年の交互作用の 2 つの説明変数が有意に影響を及ぼしていたため ( $P < 0.001$ ,  $p = 0.032$ )、Tukey の事後検定を行った結果、全ての調査年において *C. phellodendri* の流行度は *C. lycopodis* および *C. asterum* の流行度に比べ有意に高かった (表 2-1)。*Coleosporium lycopodis* および *C. asterum* の流行度は 3 年間を通じて有意な差が見られなかった (表 2-1)。

各調査年の *C. phellodendri* のアカマツ林における平均感染強度も、それぞれ 3.42, 11.0,

および 3.73 と他種に比べ高い値を示した (表 2-1)。GLMM の結果では、種、調査年、種および調査年の交互作用の全ての説明変数が有意に影響を与えていることが示されたため (それぞれ  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ )、Tukey の事後検定を行った。その結果、全ての調査年において *C. phellodendri* の平均感染強度は *C. lycopodis* および *C. asterum* の平均感染強度に比べ有意に高かった (表 2-1)。 *C. lycopodis* および *C. asterum* の平均感染強度の間には 2012 年を除いて有意な差が見られなかった (表 2-1)。

### 2-3-2. マツ葉さび病菌各種の存在量に対する採取場所、葉齢、高さの影響

3 年の調査の間、林内で採取されたさび孢子堆 137 のうち、136 のさび孢子堆が *C. phellodendri* と同定された。そのため、流行度および平均感染強度に与える採集場所 (林縁、林内) の影響を評価する解析は *C. phellodendri* に関してのみ行った。GLMM の結果、説明変数のうち、採集場所と採集場所および調査年の交互作用は流行度に有意に影響を与えていた (各  $P < 0.001$ ,  $P = 0.05$ )。一方、平均感染強度に対しては全ての説明変数 (採集場所、調査年、採集場所および調査年の交互作用) が有意な影響力を有していた (各  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ )。Tukey の事後検定では、2013 年および 2015 年における *C. phellodendri* の流行度および平均感染強度は林内に比べ林縁の方が有意に高かった (表 2-2)。2012 年では採集場所によって有意差はなかったが、林縁の流行度が 81.8% に対し、林内の流行度は 69.2% であり、林縁の平均感染強度が 4.17 に対し、林内の平均感染強度が 1.79 といずれも林縁の方が高かった。

サンプル中の感染数に対する葉齢および高さの影響を評価する GLMM では、*C. phellodendri* の感染数は全ての調査年で葉齢に有意に影響を受けていることが示された (表 2-3)。本種のさび孢子堆は主に 2 年葉に形成されていた (図 2-7, 表 2-4, 2-5, 2-6)。それに対し、*C. lycopodis* および *C. asterum* の感染数は、葉齢に影響を受けていなかった (図 2-7)。また、GLMM の結果では 2012 年および 2013 年の *C. phellodendri* の感染数および、2013 年の *C. lycopodis* の感染数は枝の高さに対して有意に影響を受けていたが、いずれの

種においても一貫した傾向は見られなかった（図 2-7）。

### 2-3-3. アカマツ実生の種組成

アカマツ林における成木の 4.5m から 6.5 m の各高さから得られたさび孢子堆の種組成とススキ草原に存在するアカマツ実生から得られたさび孢子堆の種組成を図 2-8 に示した。各年とも 6.5 m から 4.5 m までのアカマツ成木では 80% 以上のさび孢子堆が *C. phellodendri* であり、高い割合を占めていた。一方で、実生では *C. phellodendri* のさび孢子堆はほとんど得られなかった。実生では、*C. lycopodis* が優占しており、各調査年とも *C. lycopodis* のさび孢子堆の割合は 78% 以上を占め、高い割合を示した。

### 2-4. 考察

本研究では、調査木のある高さから得た約 60 cm の 2 本の枝を 1 サンプルと考え、1 サンプル内の全ての感染葉からそれぞれ 1 つのさび孢子堆を種同定した。*Coleosporium* 属菌の菌糸はアカマツの枝を通して他の針葉に伸長することではなく、異なる針葉上に形成されたさび孢子堆は異なるコロニー由来のさび孢子堆と考えられる。そのため、各針葉から 1 つのさび孢子堆を採集して各種の存在量の指標とした。1 つの枝に存在する針葉数は枝ごとに異なるが、統一的なサンプリング法を用いることによって各種の存在量を相対的に比較することは可能であると考えた。しかし、1 つの針葉内に複数の種が存在していた場合、針葉における孢子堆形成数が少ない種の存在量を過小評価している可能性に留意する必要がある。

*Coleosporium phellodendri* の流行度は他種に比べ有意に高かった（表 2-1）。流行度は全調査木中の感染木の割合であるため、この結果は *C. phellodendri* が他種に比べ多くのアカマツに感染しており、アカマツ林の広範囲に分布していることを表していると考えられる（図 2-3）。また、本種のアカマツ林における平均感染強度も他種に比べ有意に高く（表 2-1）、アカマツ林において *C. phellodendri* が他種に比べ多くのさび孢子堆を形成しているこ

とを示している。このことは、多量の *C. phellodendri* の担子胞子がアカマツ林に広く分散し、感染が起こっていることを示している。加えて、林縁から得られたサンプル中の感染数は、高さによる影響を受けておらず (表 2-3, 図 2-7)、本種の担子胞子が林縁に偏りなく飛散し感染が起こっていることを示している。アカマツ周辺に存在するキハダ上の冬孢子堆がこれらの担子胞子の供給源となっている可能性が高く、これらの冬孢子堆の量がさび孢子堆の存在量に大きく影響を与えていると考えられる。しかし、これまで中間宿主上における冬孢子堆量を調査し種間で比較した報告はないため、これらの調査を行う必要がある。

*Coleosporium phellodendri* の流行度および平均感染強度は、アカマツ林内よりも林縁に有意に多かった (表 2-2)。林縁環境では、光強度、湿度あるいは宿主の分布パターンなど、局所的に環境条件が変化しやすいため、一般的に、植物病原菌の分布パターンが林内と大きく異なることが知られている (Laine and Hanski, 2006; Meentemeyer et al., 2008; Damschen et al., 2008)。加えて繁殖体が風媒される植物病原菌にとって林縁は、飛散する胞子が最初に到達する場所となるため、病原菌の動態に大きく影響する (Fagan et al., 1999; Plantegenest et al., 2007)。こうした効果は林縁効果と呼ばれる。Lauren et al. (2011) は林縁効果の結果、ビロードハギ (*Lespedeza stuevei*) に寄生するサビキンである *Uromyces* 属菌の感染率が林縁に分布する植物において極めて高くなることを報告している。本研究において *C. phellodendri* のさび孢子堆が林内に比べ林縁から多く得られた要因の 1 つとして林縁効果が考えられた。

4 種の中で *C. phellodendri* の感染数だけが葉齢に強く影響を受けており (表 2-3)、本種は 2 年葉に多くのさび孢子堆を形成する傾向がみられた (図 2-7)。佐保 (1963b) および浜 (1972) は *C. phellodendri* の担子胞子を用いた接種試験を行い、その後 2 年間精子器およびさび孢子堆の出現を観察した。その結果、本種は、感染の翌年にさび孢子堆を形成する生活環と同時に、感染の 2 年後にさび孢子堆を形成する生活環を有していることを報告した。日本に分布する *Coleosporium* 属菌の接種試験は多くの種について行われているが、さび孢子堆の形成に 2 年を要する生活環が報告されている種は本種と *C. plectranthi* Barclay だけ

である (Kaneko, 1981)。 *Coleosporium phellodendri* が 2 年型の生活環を有することは 2 年葉に多くのさび孢子堆を形成する要因の 1 つであると考えられた。

アカマツ実生における種組成はアカマツ林における種組成と大きく異なり、 *C. lycopodis* が優占していた (図 2-8)。 *Coleosporium lycopodis* は感染源から 5m 範囲内のアカマツに多くのさび孢子堆を形成し、 10m 離れたアカマツにはほとんどさび孢子堆を形成しないことが報告されている (作山, 1973)。 中間宿主であるツリガネニンジンの草丈はおよそ 1.2m あり、アカマツ実生と同程度である。 また、ツリガネニンジンはススキ草原に広く分布しており、同じくススキ草原に分布しているアカマツ実生との距離は極めて近い。 このことから *C. lycopodis* は中間宿主と近い距離に分布するアカマツを主に利用して生活環を完了していると考えられる。

一方で、アカマツ林縁に多くのさび孢子堆を形成していた *C. phellodendri* は、林縁近くに分布するアカマツ実生に対しても多くの担子孢子を飛散していると推測されるが、実生からは本種のさび孢子堆はほとんど得られなかった (図 2-8)。 本研究ではこの要因を明らかにすることはできなかったが、複数の可能性が考えられた。 まず、菅平高原実験所では、 *C. phellodendri* の冬孢子堆が形成され始める 7 月中旬にはススキがアカマツ実生の樹高より高く成長するため、ススキが物理的な障壁となって本種の担子孢子がアカマツ針葉に到達できない可能性が考えられた。 また、浜 (1972) は、 *C. phellodendri* によるアカマツの被害は 4, 5 年生造林木にはなはだしく、当年度植栽木および 2-3 年生造林木では軽微であることを報告しており、自然環境においては実生に対する感染の成功率が低い可能性が考えられる。 そして、 *C. lycopodis* の冬孢子堆の形成開始時期は 4 種の中で最も早いことから、他種に先んじてアカマツ実生に感染することができたと思われる。 先に感染した病原菌が宿主の防御応答反応を促進することはよく知られており、例えばシロイヌナズナ [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] に対し、 *Trichoderma* 属菌を感染させることで *Botrytis* 属菌に対する抵抗性が生じることが知られている (Korolev et al., 2008)。 *Coleosporium lycopodis* がアカマツ実生に先に感染することにより、アカマツの抵抗性が誘引された可能

性が考えられる。

*Coleosporium asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* の菅平高原実験所におけるさび孢子世代の存在量は3年を通じて少なかった。2種の冬孢子堆の形成時期は、さび孢子世代の存在量の多い *C. phellodendri* および *C. lycopodis* よりも遅く（図 2-1）、担子孢子（子実）の飛散期間が短いと考えられ、このことが *C. asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* のさび孢子世代の存在量が少ない要因の一つとなっていると考えられる。

本章の結果、アカマツ林における4種の *Coleosporium* 属菌のさび孢子世代の存在量、形成葉齢、分布範囲が種によって異なることが明らかになった。特に、流行度と感染強度という2つの指標を用いたことにより、*C. phellodendri* がアカマツ林の広範囲に多量のさび孢子堆を形成していることが示された。担子孢子（子実）の飛散可能な距離内に存在する冬孢子堆の量が多いほどさび孢子世代の存在量は大きくなると考えられるが、これまで中間宿主上における冬孢子堆の量を調査した例はない。そこで第3章では、アカマツ林周辺に存在する *C. phellodendri* の冬孢子堆の存在量を、また、比較対象としてススキ草原に *C. lycopodis* の冬孢子堆の量を調査した。

\* 本章の内容の大部分は、Suzuki et al. (2018)として学術ジャーナル *Mycoscience* において発表した。

月	7月	8月	9月	10月
菌種	展葉中		展葉完了	
<i>C. phellodendri</i>	III	III		
<i>C. lycopodis</i>		III		
<i>C. asterum</i>			III	
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>			III	

図 2-1. 菅平高原実験高原所におけるアカマツ当年葉の針葉の生育段階と *Coleosporium* 属菌 4 種の冬孢子世代 (III) の形成期間

鈴木 (2014) から引用

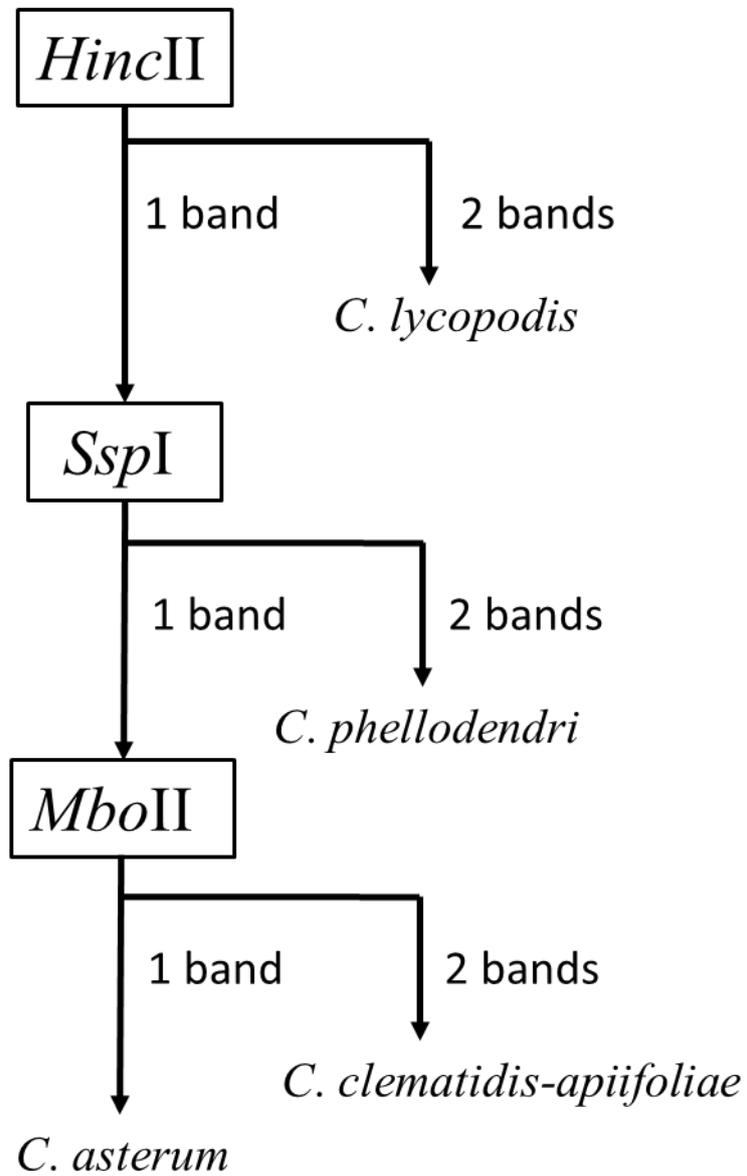
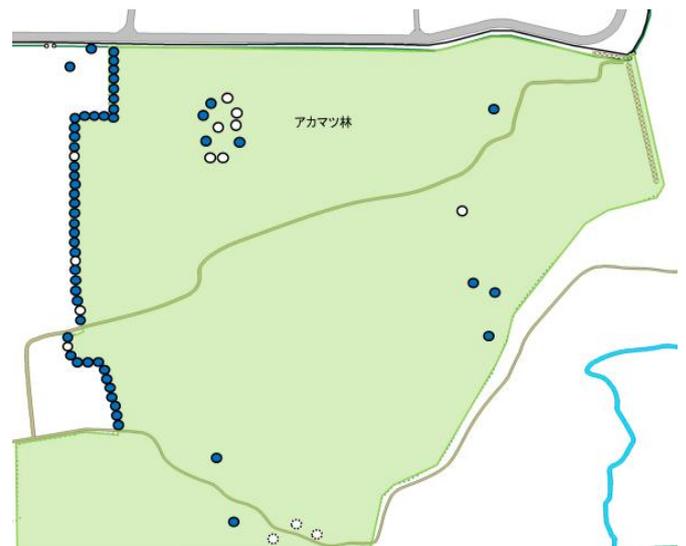


図 2-2. PCR-RFLP による種同定法



2012年



2013年



2015

図 2-3. アカマツ林における各調査年の *C. phellodendri* の分布

- *C. phellodendri* のさび胞子堆が得られた調査木
- *C. phellodendri* のさび胞子堆が得られなかった調査木
- 非調査木

緑の領域はアカマツ林を示す

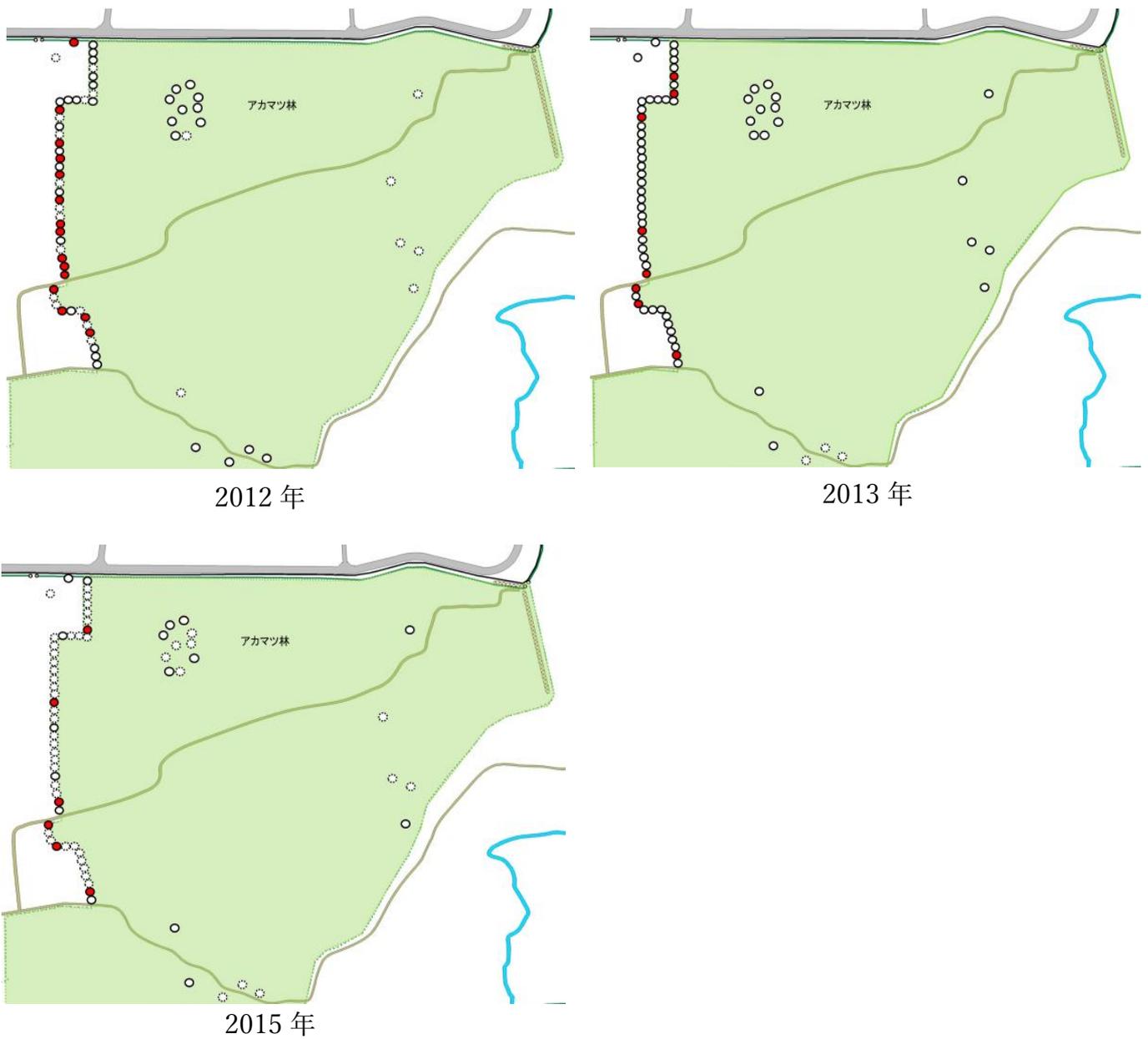


図 2-4. アカマツ林における各調査年の *C. lycopodis* の分布

- *C. lycopodis* のさび胞子堆が得られた調査木
- *C. lycopodis* のさび胞子堆が得られなかった調査木
- 非調査木

緑の領域はアカマツ林を示す

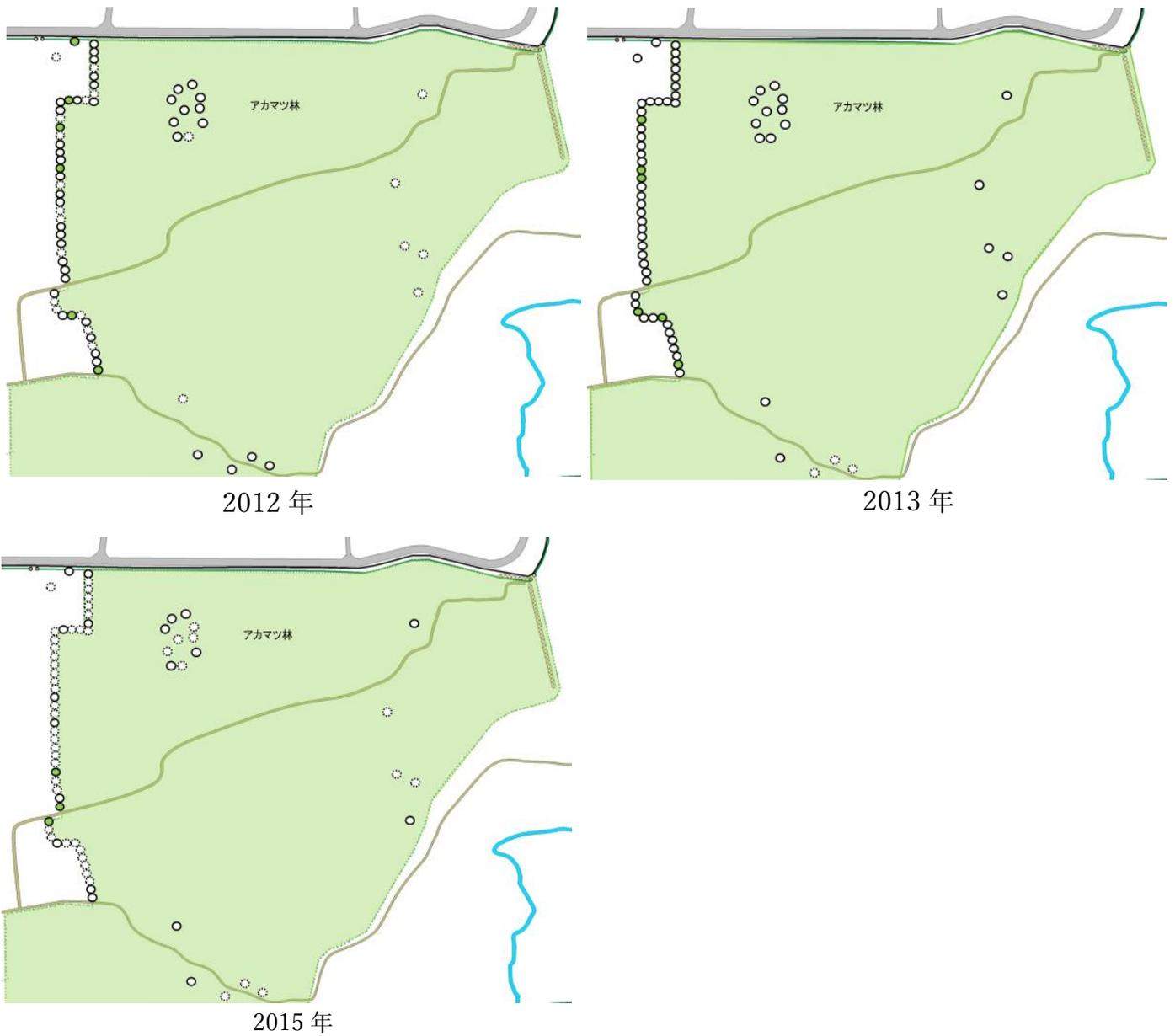


図2-5. アカマツ林における各調査年の *C. asterum* の分布

- *C. asterum* のさび胞子堆が得られた調査木
- *C. asterum* のさび胞子堆が得られなかった調査木
- 非調査木

緑の領域はアカマツ林を示す

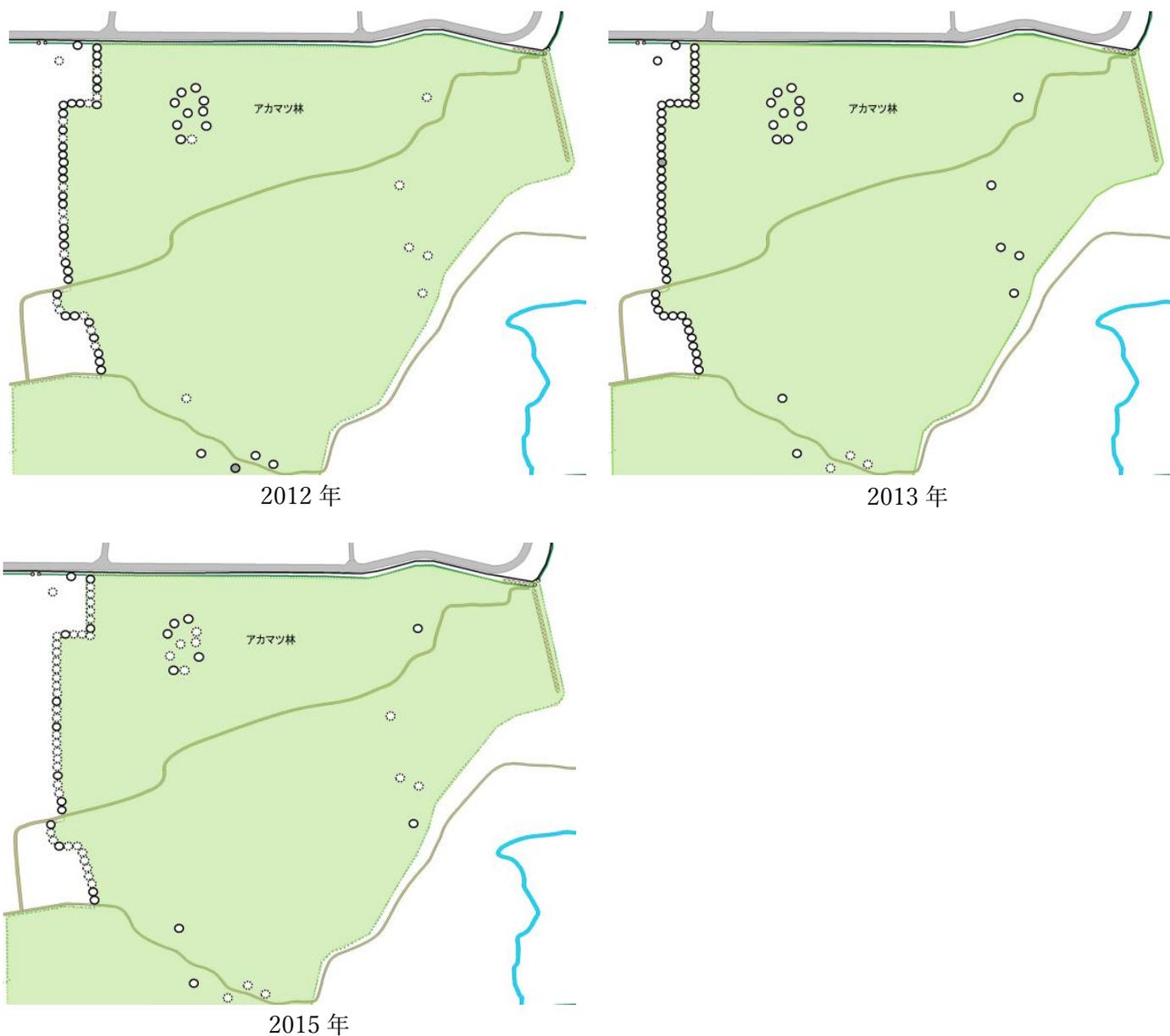


図 2-6. アカマツ林における各調査年の *C. clematidis-apiifoliae* の分布

- *C. clematidis-apiifoliae* のさび胞子堆が得られた調査木
- *C. clematidis-apiifoliae* のさび胞子堆が得られなかった調査木
- 非調査木

緑の領域はアカマツ林を示す

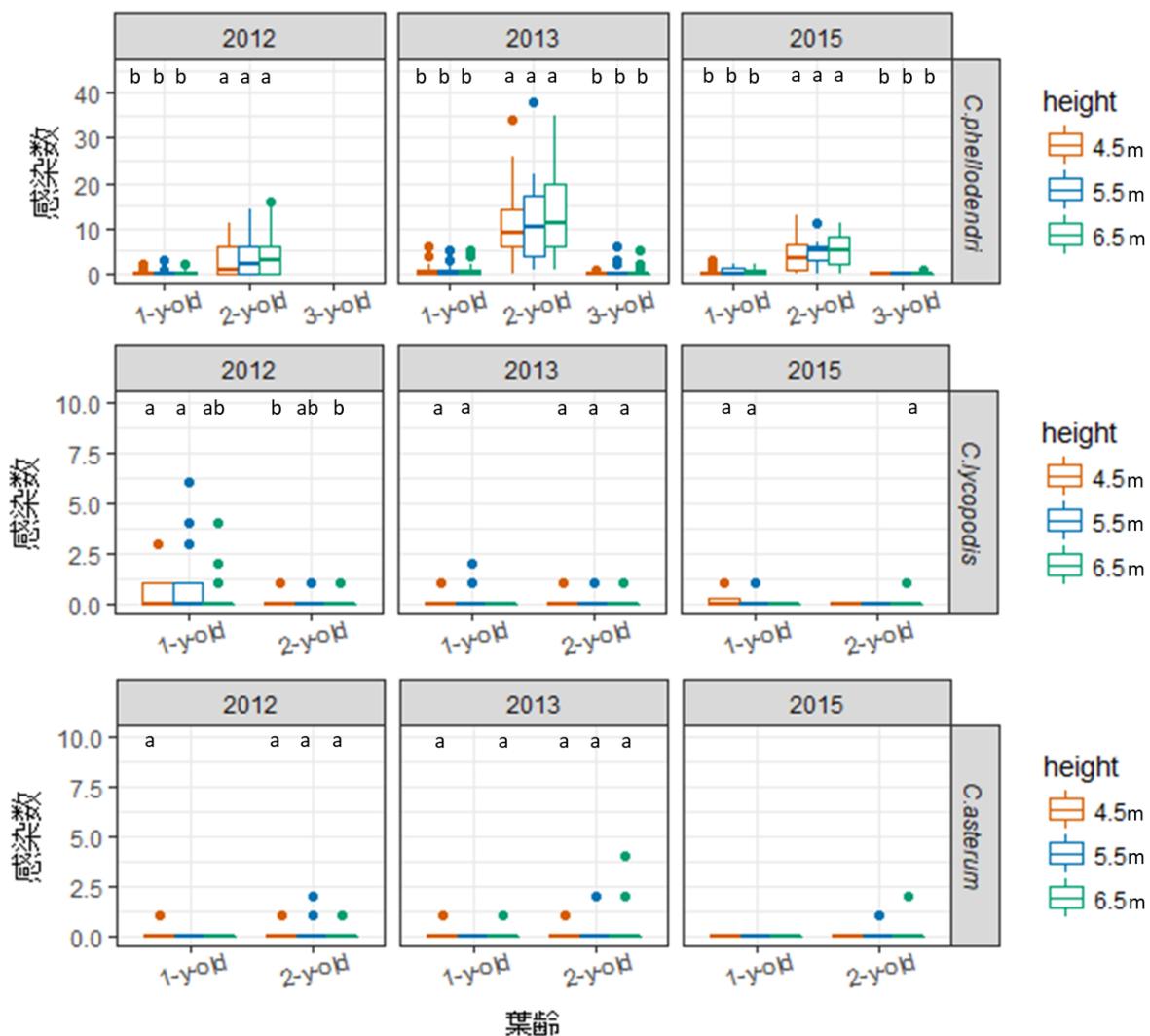
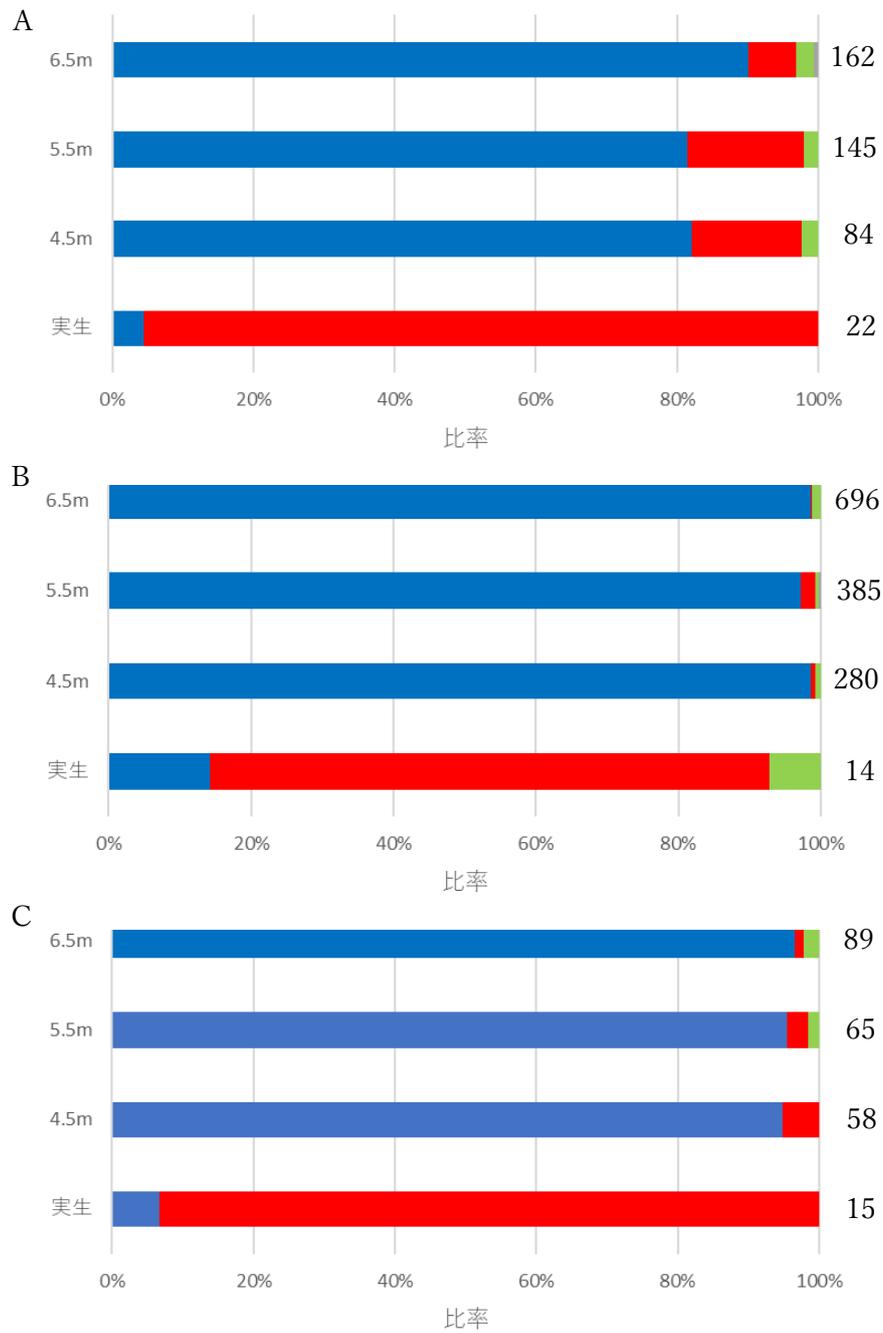


図 2-7. アカマツ林縁から得られた *Coleosporium* 属菌 3 種のサンプルあたりの感染数 (1 サンプルから得られたさび孢子堆の感染葉数)  
異なるアルファベットは統計的に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )



A : 2012年 B : 2013年 C : 2015年

■ *C. phellodendri* ■ *C. lycopodis* ■ *C. asterum* ■ *C. clematidis-apiifoliae*

図 2-8. アカマツ成木 (4.5-6.5m) およびアカマツ実生から得られたさび孢子堆の種組成  
各区から得られたさび孢子堆中の各種の比率を示す。棒グラフ右側の数字はその区から  
得られたさび孢子堆数を示す。

表 2-1. *Coleosporium* 属菌 4 種のアカマツ林における流行度および平均感染強度

Species	流行度 (%)				平均感染強度		
	2012*	2013	2015	2012	2013	2015	
<i>C. phellodendri</i>	76.1 <sup>a</sup>	94.7 <sup>a</sup>	72.7 <sup>ab</sup>	3.42 ± 3.62 <sup>b</sup>	11.01 ± 10.47 <sup>a</sup>	3.73 ± 3.49 <sup>b</sup>	
<i>C. lycopodis</i>	32.6 <sup>bc</sup>	14.0 <sup>cd</sup>	22.7 <sup>cd</sup>	0.42 ± 0.83 <sup>c</sup>	0.08 ± 0.23 <sup>d</sup>	0.11 ± 0.24 <sup>d</sup>	
<i>C. asterum</i>	15.2 <sup>cd</sup>	10.5 <sup>d</sup>	9.1 <sup>cd</sup>	0.10 ± 0.25 <sup>d</sup>	0.09 ± 0.36 <sup>d</sup>	0.05 ± 0.16 <sup>d</sup>	
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	2.2	1.8	0.0	0.02 ± 0.15	0.01 ± 0.06	0 ± 0	

異なるアルファベットは統計的に有意差があることを示す (p < 0.05)

流行度：全調査木中の感染木の割合

平均感染強度 ± SD：各アカマツ調査木の感染強度の平均値

\* 調査年

表 2-2. *Coleosporium phellodendri* の採取場所ごとの流行度および平均感染強度

採集場所	流行度			平均感染強度		
	2012*	2013	2015	2012	2013	2015
林縁	81.8 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	84.6 <sup>a</sup>	4.17 ± 3.88 <sup>b</sup>	12.87 ± 8.63 <sup>a</sup>	5.59 ± 3.76 <sup>b</sup>
林内	69.2 <sup>a</sup>	62.5 <sup>b</sup>	55.6 <sup>b</sup>	1.79 ± 2.14 <sup>b</sup>	2.43 ± 3.77 <sup>b</sup>	1.56 ± 2.55 <sup>c</sup>

異なるアルファベットは統計的に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )

流行度：全調査木中の感染木の割合

平均感染強度 ± SD：各アカマツ調査木の感染強度の平均値 ± SD

\* 調査年

表 2-3. 感染数に対する高さ，葉齢および交互作用との関係

菌種	調査年	目的変数	説明変数	残差	p値			
<i>C. phellodendri</i>	2012	Number of infection	Null	624.1				
			Height(H)	615.8	0.02 *			
			leaf age(L)	329	<0.001 ***			
				H × L	328.5	0.79		
				2013	Number of infection	Null	2616	
						Height(H)	2607.8	0.02 *
	leaf age(L)	576.6	<0.001 ***					
				H × L	563	0.01 *		
				2015	Number of infection	Null	380.6	
						Height(H)	379.9	0.75
	leaf age(L)	118.8	<0.001 ***					
				H × L	116.7	0.72		
<i>C. lycopodis</i>				2012	Number of infection	Null	157.9	
						Height(H)	154.77	0.21
	leaf age(L)	117	<0.001 ***					
			H × L	117	0.99			
			2013	Number of infection	Null	63.7		
					Height(H)	55.1	0.01 *	
leaf age(L)	55	0.76						
			H × L	53.7	0.52			
			2015	Number of infection	Null	301		
					Height(H)	28.9	0.54	
leaf age(L)	26	0.09						
			H × L	20.6	0.07			
			<i>C. asterum</i>	2012	Number of infection	Null	49.3	
						Height(H)	49.2	0.99
leaf age(L)	44.2	0.02 *						
			H × L	40.9	0.2			
			2013	Number of infection	Null	64.2		
					Height(H)	59.4	0.09	
leaf age(L)	57.4	0.16						
			H × L	55.6	0.4			

表 2-4. 2012 年に各高さの葉齢から得られたサンプル当たりの感染数（感染数の平均値 ± SD)

Species	高さ					
	4.5*		5.5*		6.5*	
	葉齢		葉齢		葉齢	
	1	2	1	2	1	2
<i>C. phellodendri</i>	0.18 ± 0.50	2.95 ± 3.72	0.2 ± 0.61	3.73 ± 4.42	0.23 ± 0.53	3.43 ± 4.26
<i>C. lycopodis</i>	0.55 ± 1.06	0.05 ± 0.21	0.7 ± 1.51	0.07 ± 0.25	0.25 ± 0.74	0.03 ± 0.16
<i>C. asterum</i>	0.05 ± 0.21	0.05 ± 0.21	0	0.1 ± 0.40	0	0.10 ± 0.30
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	0	0	0	0	0	0.03 ± 0.16

\* 4.5, 5.5, 6.5 m から得られたサンプル数はそれぞれ 22、30 および 40

表 2-5. 2013 年に各高さの葉齢から得られたサンプル当たりの感染数（感染数の平均値 ± SD)

Species	高さ								
	4.5*			5.5*			6.5*		
	葉齢			葉齢			葉齢		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>C. phellodendri</i>	0.91 ± 1.54	11.59 ± 9.06	0.05 ± 0.21	0.59 ± 1.10	10.75 ± 8.79	0.34 ± 1.21	0.39 ± 0.93	11.7 ± 11.36	0.16 ± 0.73
<i>C. lycopodis</i>	0.05 ± 0.21	0.05 ± 0.21	0	0.13 ± 0.42	0.13 ± 0.34	0	0	0.02 ± 0.13	0
<i>C. asterum</i>	0.05 ± 0.21	0.05 ± 0.21	0	0	0.06 ± 0.35	0	0.05 ± 0.23	0.11 ± 0.59	0
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	0	0	0	0	0.03 ± 0.18	0	0	0	0

\* 4.5, 5.5, 6.5 m から得られたサンプル数はそれぞれ 22、32 および 46

表 2-6. 2015 年に各高さの葉齢から得られたサンプル当たりの感染数（感染数の平均値 ± SD)

Species	高さ								
	4.5*			5.5*			6.5*		
	葉齢			葉齢			葉齢		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>C. phellodendri</i>	0.5 ± 1.00	4.08 ± 3.87	0	0.57 ± 0.85	3.86 ± 3.42	0	0.41 ± 0.73	3.45 ± 3.51	0.05 ± 0.21
<i>C. lycopodis</i>	0.25 ± 0.45	0	0	0.14 ± 0.36	0	0	0	0.05 ± 0.21	0
<i>C. asterum</i>	0	0	0	0	0.07 ± 0.27	0	0	0.09 ± 0.43	0
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* 4.5, 5.5, 6.5 m から得られたサンプル数はそれぞれ 12、14 および 22

### 第3章 *Coleosporium phellodendri* および *C. lycopodis* の冬孢子世代の存在量

#### 3-1. 緒言

第2章の結果、*C. phellodendri* がアカマツ林の広範囲に多量のさび孢子堆を形成し、優占していることが明らかになった。このことは *C. phellodendri* の担子孢子が他種に比べ多くアカマツ林の広範囲に飛散し感染していることを示している。しかし、飛散する担子孢子の量や、その供給源となっている中間宿主上の冬孢子堆の量を調査し、種間で比較した報告はこれまでにない。

アカマツへ侵入し感染する孢子は担子孢子であり、感染源の量を比較するにはアカマツ林縁や林内の空気中から担子孢子を採集し、その種構成や存在量を計測することが望ましい。しかし、担子孢子は形態的特徴に乏しく、採集することができたとしても形態観察に基づいて種同定し、種構成や存在量を明らかにすることは難しい。そこで本章では、冬孢子堆の存在量から担子孢子の飛散量を推定した。Kaneko (1981) の分類体系に従えば、*Coleosporium* 属菌4種の冬孢子の大きさはほぼ等しいため、孢子堆内の冬孢子の密度はほぼ等しいと考えられる。また、1つの冬孢子が形成する担子孢子はいずれの種も4つであるため、中間宿主上の冬孢子堆の積算面積を概算することができれば、飛散する担子孢子の量を推察する1つの指標となると考えられた。

本章では、菅平高原実験所においてさび孢子世代の存在量が多かった *C. phellodendri* および *C. lycopodis* を対象とし、2種の冬孢子世代の存在量を明らかにすることを目的とした。アカマツ林を中心として半径500mの範囲以内に存在する2種の中間宿主の分布を調査したところ、*C. phellodendri* の中間宿主であるキハダの成木は樹木園、落葉広葉樹林、植樹林において確認されたが、それ以外には発見されなかった(図3-1)。菅平高原における *C. phellodendri* の冬孢子世代の存在量を推定するため、キハダの分布密度が最も高い植樹林において調査を行った。*Coleosporium lycopodis* の中間宿主であるツリガネニンジンハスキ草原、カラマツ疎林に分布している他、アカマツ林の林道や、実験所外部に散見された

が、最も分布密度が高くアカマツ林に近かったのはススキ草原であった。そのため、ススキ草原に分布するツリガネニンジン上の冬孢子堆が主な感染源であると考え、ススキ草原における *C. lycopodis* の冬孢子世代の存在量を調査した (図 3-1)。

### 3-2. 材料および方法

#### 3-2-1. *Coleosporium phellodendri* の冬孢子堆積算面積

2015 年 6 月に植樹林に分布する全キハダ 248 本の胸高直径を計測し、菅平高原におけるキハダ個体の平均胸高直径を算出した。この平均胸高直径を以下の相対成長関係式 (岡野, 1994) に代入し、キハダ個体の平均葉面積を導いた。

$$\ln(LA) = -6.7865 + 1.9441 \times \ln(DBH^2), \quad (r = 0.9827)$$

LA : Leaf area (m<sup>2</sup>), DBH : (cm<sup>2</sup>)

6 月から 10 月まで月に 1 度、10 本のキハダを調査し、各個体から 12 枚の複葉をランダムに採集し、12 枚の複葉中に含まれる小葉数と感染小葉数を数え、感染小葉率を算出した。10 本のキハダの感染小葉率の平均値をその月の平均感染小葉率とした。相対成長関係式から導いた平均葉面積に各月の平均感染小葉率を掛け、6 月から 10 月まで総計することでキハダ個体あたりが形成する冬孢子堆の積算面積を概算した。この値をもとに、樹木園、広葉樹林、植樹林における *C. phellodendri* の冬孢子世代の存在量を求めた。

#### 3-2-2. ススキ草原における *C. lycopodis* の冬孢子堆積算面積

2015 年の 5 月に 1×55 m のプロットを 3 つ設置し (図 3-1)、プロットあたりの *C. lycopodis* の冬孢子堆の積算面積を以下のように概算した。3 プロット内に分布するツリガネニンジンの各個体からランダムに 3 枚の葉を選び面積を計測し、これらの葉面積からツリガネニンジンの葉 1 枚の平均葉面積を算出した。6 月から 10 月まで月に 1 度調査を行い、各プロットのツリガネニンジンの葉数と感染葉数を記録し、感染葉率を算出した。葉 1 枚あたりの平均葉面積と葉数からプロット内の葉面積を求め、感染葉率を掛けてプロット内

の冬胞子堆面積を概算した。3プロットの冬胞子堆面積の平均値をプロットあたり (55 m<sup>2</sup>) の平均冬胞子堆面積とし、6月から10月までの平均冬胞子堆面積を総計してプロットあたりの *C. lycopodis* の冬胞子堆の積算面積を算出した。この値をもとに、アカマツ林縁から 10, 50, 100, 200 m に存在する *C. lycopodis* の冬胞子堆積算面積を求めた。

### 5-3. 結果

キハダ 248 個体から算出した平均胸高直径は  $45.3 \pm 23.1$  (平均±標準偏差) cm であった。岡田 (1994) の相対成長関係式によってキハダ個体あたりの葉面積は約 3104 m<sup>2</sup> と導かれた。6月から10月までの各月の平均感染小葉率はそれぞれ、0 %, 0.2 %, 38.4 %, 90.0 %, 92.0% であった。これらの値から6月から10月までに形成されるキハダ個体あたりの *C. phellodendri* の冬胞子堆の積算面積は約 6844 m<sup>2</sup> と概算された。樹木園に植樹された3本のキハダ上の冬胞子堆積算面積は約  $2.0 \times 10^4$  m<sup>2</sup>、広葉樹樹林に分布する1本のキハダ上では 6844 m<sup>2</sup>、植樹林の248本のキハダ上では冬胞子堆積算面積は約  $1.7 \times 10^6$  m<sup>2</sup> であった。

6月から10月までの各月のススキ草原プロット (55 m<sup>2</sup>) のツリガネニンジンの平均葉面積はそれぞれ 3.5 m<sup>2</sup>, 2.7 m<sup>2</sup>, 1.1 m<sup>2</sup>, 0.4 m<sup>2</sup>, 0.1 m<sup>2</sup> であり、平均感染葉率はそれぞれ 0%, 1.3%, 23.2%, 34.7%, 26.3% であった。これらの値から *C. lycopodis* のプロットあたりの冬胞子堆積算面積は約 0.52 m<sup>2</sup> と概算された。アカマツ林から 10, 50, 100, 200 m に存在する冬胞子堆積算面積はそれぞれ、26, 142, 283, 266 m<sup>2</sup> であった。

### 5-4. 考察

アカマツ林周辺に存在するキハダ上に形成される *C. phellodendri* の冬胞子堆積算面積は、ススキ草原に分布するツリガネニンジン上の *C. lycopodis* の冬胞子堆積算面積の約 3000 倍多かった。作山 (1973) の報告から、仮に *C. lycopodis* の担子胞子の有効感染距離が 10 m であるとした場合、感染源は林縁から 10 m 以内に分布するツリガネニンジン上の冬胞子堆

に限られるため、その差はより拡大する。このことから、*C. phellodendri*の冬孢子世代の存在量は*C. lycopodis*に比べ極めて多いと考えられ、この差がさび孢子世代の存在量の差に強く影響を与えていると考えられた。

*Coleosporium phellodendri*の感染小葉率は7月の0.2%から9月の90%にかけて急激に増加し、10月には飽和状態に至った。本種の間宿主であるキハダは4種の間宿主の中で唯一木本植物であり、草本植物に比べ葉の量が多く密生しているため、個体内においても夏孢子によって感染が拡大しやすいと考えられる。それに加え、植林地においてはキハダが人工的に密集して植えられているため、個体間の感染拡大も容易に起こり、結果として極めて多量の冬孢子堆が形成されてきたと考えられる。一方、*C. lycopodis*の平均感染葉率は最大で34.7%に止まった。ススキ草原は多様な植物種で構成されており（第2章）、間宿主であるツリガネニンジンが一定の場所に集中分布しているわけではない。そのため、宿主植物と非宿主植物とを混植栽培した時に生じる病害抑制効果と同様の効果が*C. lycopodis*に対しても働いていることが予想される（Mundt, 2002; Guo et al., 2010）。Nakajima (1996)はイネいもち病菌である*Pyricularia oryzae* Cavaraの混植栽培における感染個体率が単植栽培における感染個体率に比べ低下することを報告しており、非宿主植物が分生子の拡散を抑えるバリアー効果が関与していることを示した。ススキ草原内で*C. phellodendri*ほど効率的に感染拡大することが出来なかったことも、2種の冬孢子世代の存在量の差が生じた要因の1つと考えられた。

しかし、*C. phellodendri*がこれらのキハダから飛散し、アカマツ林の広範囲に多くのさび孢子堆を形成するためには、担子孢子は少なくとも300 m飛散する必要がある（図3-2）。*Coleosporium phellodendri*の担子孢子は200 m以上飛散することが報告されており（浜, 1972）、一般的なサビキノの担子孢子の飛散距離である十数 m と比べて長い。佐保(1963b)や作山(1973)は*C. phellodendri*の担子孢子が長い有効感染距離を有する理由としてキハダの樹高の高さを挙げているが、筆者はそれに加え、担子孢子の発芽特性が影響している可能性を考えた。*Coleosporium phellodendri*のほか、担子孢子の長距離飛散が報告されてい

る種には、ゴヨウマツ発疹さび病の病原菌である *Cronartium ribicola* J.C. Fisch., ナシ赤星病の病害菌である *Gymnosporangium asiaticum* Miyabe ex G. Yamada のなどの種が知られているが、(梅本, 1989; Zambino, 2010)、これらのサビキノの担子胞子は間接発芽能力を有することが報告されている (Bega, 1960; Spine, 1993; Mims and Richardson, 1990)。間接発芽は 2 次胞子を形成し、再び飛散するための発芽様式と考えられており、担子胞子の飛散距離を伸長させる要因の 1 つと考えられる。*Coleosporium* 属菌の中ではこれまでフキ [*Petasites japonicus* (Siebold & Zucc.) Maxim.] に冬胞子堆を形成する *C. yamabense* (Saho) Hirats. f. の担子胞子が間接発芽能力を有していることが知られており、*C. phellodendri* の担子胞子も間接発芽能力を有している可能性が考えられる。

本章の結果から、*C. phellodendri* の冬胞子世代の存在量は *C. lycopodis* に比べ極めて大きく、冬胞子堆の存在量がさび胞子堆の存在量に影響していることが示された。しかし、*C. phellodendri* の担子胞子がアカマツ林に広く感染するためには少なくとも 300 m は飛散する必要がある。本種は担子胞子を長距離飛散させるため、間接発芽能力を有している可能性が示唆された。そこで第 4 章では、4 種の担子胞子の発芽特性を明らかにした。

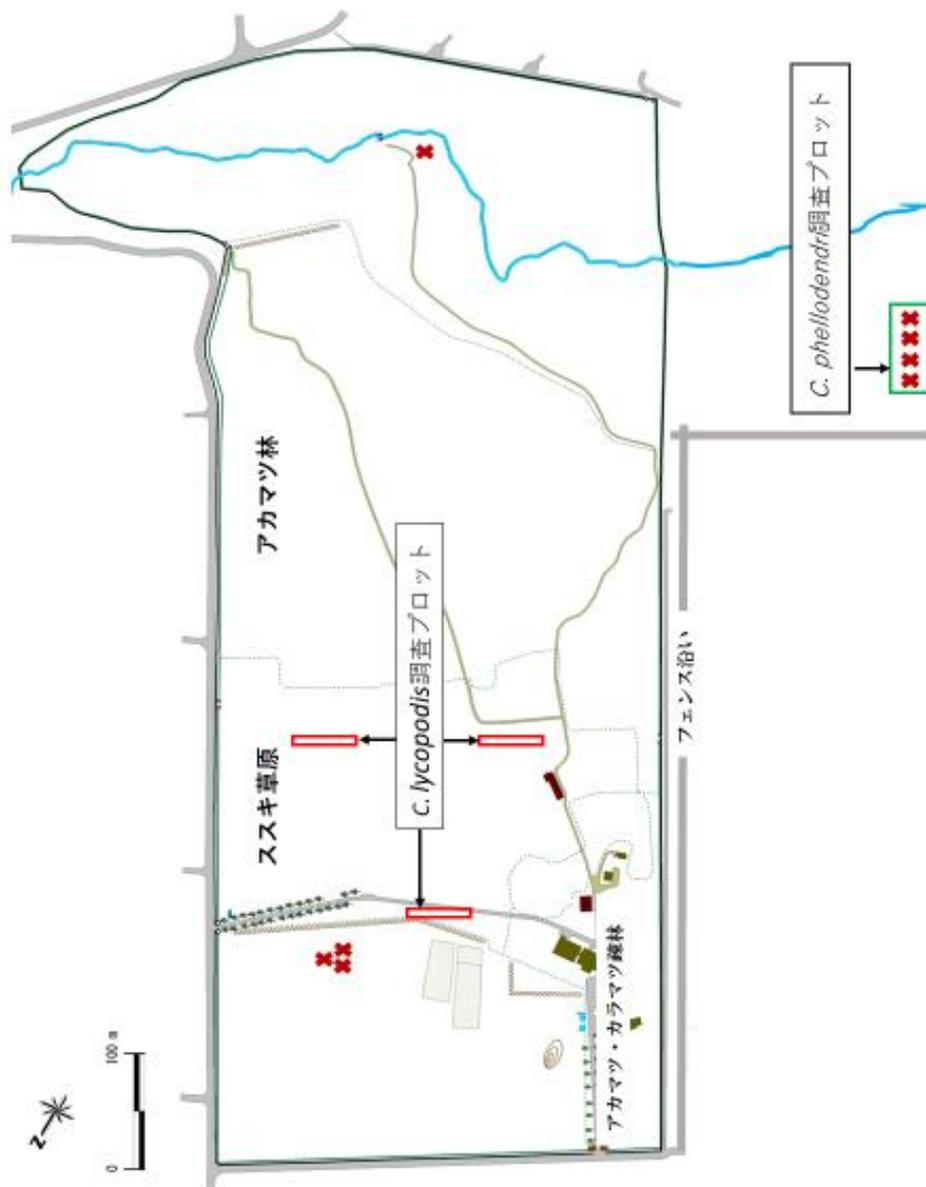


図 3-1. *Coleosporium phellodendri* および *C. lycopodis* の冬孢子堆面積の調査プロット

✕ はきハダ成木を示す

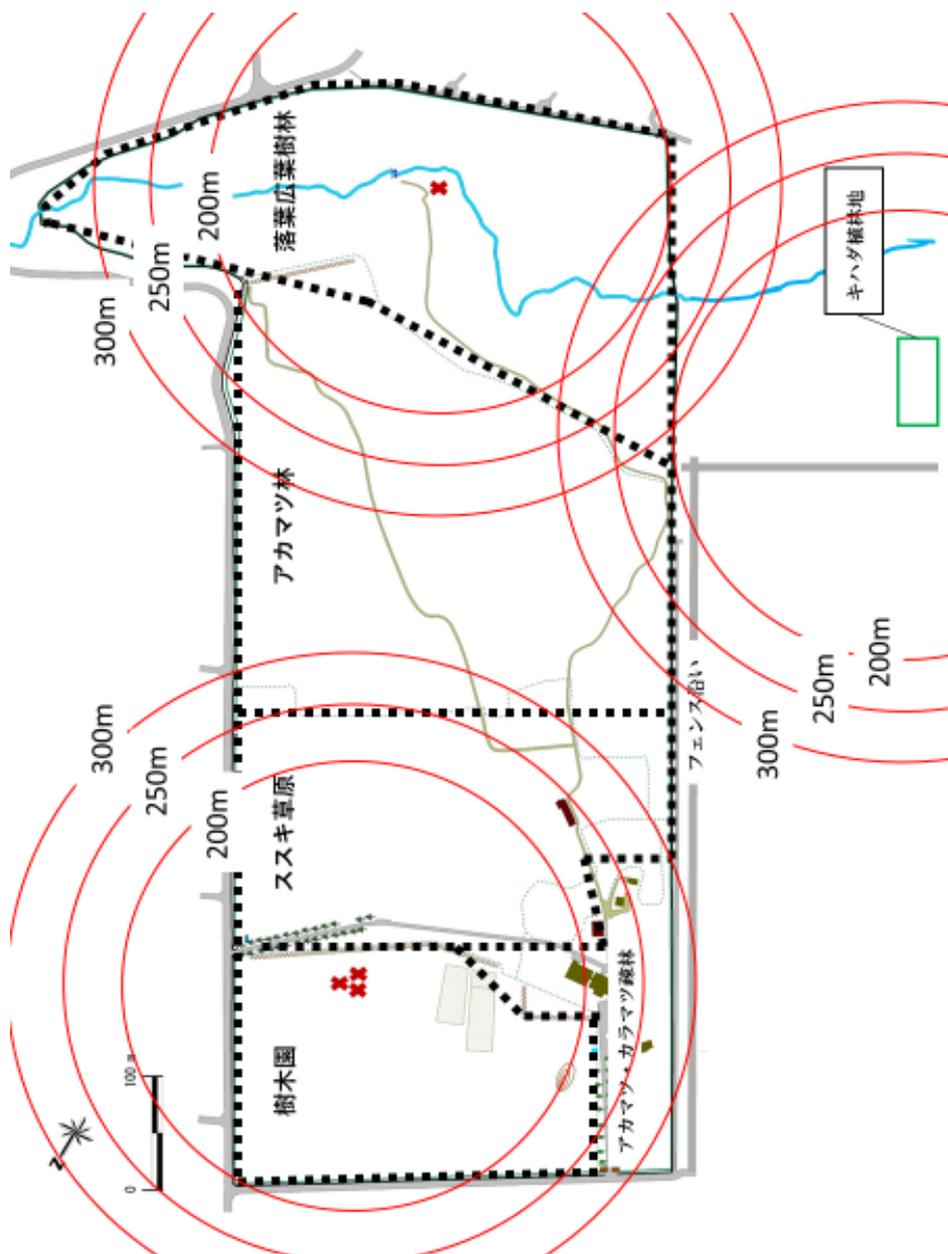


図 3-2. 各場所から分布するキハダからアカマツまでの距離

## 第4章 冬孢子および担子胞子の発芽特性

### 4-1. 緒言

第2章において、*C. asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* は、*C. phellodendri* や *C. lycopodis* に比べアカマツ林におけるさび孢子世代の存在量が少ないことが示された。*Coleosporium asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* の冬孢子堆は菅平高原実験所において形成時期が遅く、8月以降に初めて冬孢子堆を形成する（鈴木，2014）。菅平の気候条件下では8月以降に担子胞子が飛散・感染する機会が限られていると考えられるが、*Coleosporium* 属菌の冬孢子および担子胞子の発芽温度特性はこれまでほとんど調べられていない。

担子胞子の発芽様式には、発芽管を伸長させる直接発芽および、発芽管の代わりに2次担子胞子を形成する間接発芽の2タイプが知られている（Bega, 1960）。これまで、担子胞子の間接発芽能力は、マツの発疹さび病菌である *Cronartium ribicola* (Bega, 1960)、マツこぶ病菌である *Cronartium quercuum* (Berk.) Miyabe ex Shirai (Spine, 1993)、リンゴ赤星病菌である *Gymnosporangium juniperi-virginianae* Schiwein. (Mims and Richardson, 1990) において報告されている。*Coleosporium* 属菌では、フキを中間宿主とする *C. yamabense* の担子胞子に間接発芽能力があることが報告されており、本種は発芽実験において6次担子胞子まで確認されている（Kaneko, 1975b）。担子胞子は間接発芽を繰り返すたびに胞子の大きさが小さくなるものの、1次担子胞子と同様の病原力を示す（Roncadori, 1968; Petersen, 1974; Bauer, 1986）。一般的なサビキノの担子胞子の有効感染距離が十数mであるのに対し（佐保, 1968）、これらの種の有効感染距離は1kmを超えている（梅本, 1989; Zambino, 2010）。*Coleosporium phellodendri* の担子胞子は菅平高原実験所において300m以上飛散していることから、本種の担子胞子も間接発芽能力を有する可能性があるが、これまで調査されたことはない。

菌類の胞子の発芽には自由水や高湿度条件を必要とする。*Gymnosporangium juniperi-*

*virginiana* の冬胞子は相対湿度 85%以上の適温条件で担子胞子を発芽させる (Pearson et al. 1980)。また、*Cronartium quercuum* の担子胞子は相対湿度 90%以上で発芽することが実験的に確かめられている (Baker et al., 2006)。加えて、水分は担子胞子の生存にも強く影響を与えている。一般的に担子胞子は脆弱であり、特に乾燥すると急激に発芽能力を失うと考えられてきた (Snow, 1968; Gould and Shaw, 1969)。しかし、ナシ赤星病の病原菌である *G. asaticum* は、相対湿度 45%において 6 日間保存されていた担子胞子が発芽能力を保持しているなど、乾燥に耐性のある担子胞子の存在も報告されている (Dong et al. 2006)。担子胞子の乾燥耐性は感染の成功率に強く影響すると考えられるが、*Coleosporium* 属菌の担子胞子の乾燥耐性についてはこれまで調査されたことはない。

本章では菅平高原実験所から採取した *C. phellodendri*, *C. lycopodis*, *C. asterum*, *C. clematidis-apiifoliae* の冬胞子を用いて発芽試験を行い、(1) 冬胞子および担子胞子の発芽温度特性、(2) 担子胞子の間接発芽率および乾燥耐性を明らかにすることを目的とした。

## 4-2. 実験材料および方法

### 4-2-1. 冬胞子の発芽温度特性

2014 年および 2015 年の 7 月から 10 月にかけて、菅平高原実験所において 4 種 *Coleosporium* 属菌の冬胞子堆を採集した。罹病葉は中間宿主ごとにビニール袋に入れ、常温のまま研究室に持ち帰り、その日のうちに発芽試験に供試した。

*Coleosporium* 属菌の冬胞子は冬胞子堆内で互いに密着しているため、個々の冬胞子を観察して発芽率を算出することが難しい。そこで、冬胞子の発芽率の算出は Laure et al. (1992) の方法を改変し行った。冬胞子堆を形成している葉からおよそ 1×1cm の葉片を作成し、画像解析ソフトを用いて葉片上の冬胞子堆の表面積を計測した。その後、NaCl を含む素寒天培地を満たしたシャーレの蓋に葉片を貼りつけて蓋をし、パラフィルムを用いて密封した。シャーレを恒温器に入れ、冬胞子堆を 4, 10, 15, 20, 25, 30 °C の温度条件でそれぞれ 24 時間培養し、担子胞子を落下させた。培養後、光学顕微鏡を用いて落下した担子胞子数を計測

した。画像解析によって得られた葉片の冬胞子堆の表面積と、Kaneko (1981) に記載されている各種の冬胞子の直径の値から、供試した冬胞子堆内に存在する冬胞子の数を計算し、その値を 4 倍することによって冬胞子堆が 100%の発芽率を示したときに理論上得られる担子胞子数を概算した。これらの値を用いて、以下の式により冬胞子の発芽率を求めた。

$$\text{冬胞子の発芽率} = (\text{観測した担子胞子数} / \text{発芽される担子胞子の理論値}) \times 100$$

冬胞子の発芽試験はそれぞれ 5 反復行った。

#### 4-2-2. 担子胞子の発芽温度特性および間接発芽率

2014 年および 2015 年の 7 月から 10 月にかけて、菅平高原実験所において 4 種 *Coleosporium* 属菌の冬胞子堆を採集した。罹病葉は中間宿主ごとにビニール袋に入れ、常温のまま研究室に持ち帰り、その日のうちに発芽試験に供試した。

冬胞子堆を形成している葉からおよそ 1×1 cm の葉片を切り取り、1%素寒天培地で満たしたシャーレの蓋に葉片を貼りつけて蓋をし、パラフィルムを用いて密封した。シャーレを恒温器内に静置し、冬胞子堆を 4, 10, 15, 20, 25, 30 °C の各温度条件で培養して担子胞子を培地上に落下させた。24 時間後、光学顕微鏡を用いて 100 個以上の担子胞子を観察した。その際、直接発芽と間接発芽を分けて記録し、間接発芽率 (= 間接発芽した担子胞子数 / 観察した担子胞子数)、全発芽率 (= 直接発芽した担子胞子数 + 間接発芽した担子胞子数 / 観察した担子胞子数) をそれぞれ計算した。担子胞子の試験はそれぞれ 5 反復行った。4 種の各処理区における平均間接発芽率を Tukey の事後検定によって統計的に比較した。

#### 4-2-3. 担子胞子の乾燥耐性

2016 年の 7 月から 10 月にかけて、菅平高原実験所において 4 種 *Coleosporium* 属菌の冬胞子堆を採集した。罹病葉は中間宿主ごとにビニール袋に入れ、常温のまま研究室に持ち帰り、その日のうちに発芽試験に共試した。冬胞子堆を形成している葉からおよそ 1×1 cm の葉片を切り取り、スライドガラスの入ったシャーレの蓋に葉片を貼りつけて蓋をし、パラフ

フィルムを用いて密封した。*Coleosporium phellodendri* および *C. lycopodis* の冬胞子は 20 °C で、*C. asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* の冬胞子は 15 °C でそれぞれ 6 時間培養し、スライドガラス上に担子胞子を落下させた。その後、スライドガラスについた水滴を可能な限り取り除き、それぞれ 5, 10, 15, 20, 25, 30 °C の各温度で 12 時間乾燥させた。乾燥後、光学顕微鏡下で担子胞子の写真を撮影した。各種の担子胞子を同じ条件で 12 時間再培養したのち、光学顕微鏡下で撮影した。

乾燥後に撮影した写真と再培養後に撮影した写真を用いて 100 個以上の担子胞子を比較し、新たな発芽や発芽管の伸長がみられた場合に担子胞子の乾燥耐性を認め、生存していると判断した。以下の式で生存率を算出した。

$$\text{生存率 (\%)} = \text{乾燥耐性が認められた担子胞子数} / \text{観察した担子胞子数} \times 100$$

試験はそれぞれ 5 反復行った。4 種の各処理区における平均生存率を Tukey の事後検定によって統計的に比較した。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. 冬胞子および担子胞子の発芽温度特性

*Coleosporium phellodendri* および、*C. lycopodis* の冬胞子は 15~25 °C の温度条件で発芽し、担子胞子を落下させた。2 種の冬胞子が最も高い発芽率を示したのはともに 20 °C であった (図 4-1A, B)。一方、*C. asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* の冬胞子は 10~25 °C の温度条件で発芽し、最も高い発芽率を示したのは 15 °C であった (図 4-1C, D)。

*Coleosporium phellodendri* および *C. lycopodis* の担子胞子は 15 °C~25 °C の範囲で発芽し、*C. asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子は 10 °C~25 °C の範囲で発芽した。全発芽率は 4 種ともに担子胞子の発芽温度範囲内であればいずれも 70% 以上の高い発芽率を示した (図 4-2)。

#### 4-3-2. 担子胞子の間接発芽率

間接発芽率は種によって異なった（図 4-3）。*Coleosporium phellodendri* の担子胞子はいずれの区画でも他種に比べ有意に平均間接発芽率が高く、15 °C で 33%、20 °C で 62%、25 °C ではおよそ 90% を示した。一方、*C. lycopodis* および *C. asterum* の平均間接発芽率は 2 種間で統計的に有意な差はなかった。*Coleosporium lycopodis* の担子胞子の間接発芽率は 15 °C、20 °C および 25 °C でそれぞれ 1.5%、7.6%、13.2% であり、*C. asterum* の担子胞子の間接発芽率は 10 °C、15 °C、20 °C、25 °C でそれぞれ 2.1%、3.4%、10.5%、19.3% であった。それに対し、*C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子はほとんど間接発芽しなかった。

#### 4-3-3. 担子胞子の乾燥耐性

*Coleosporium lycopodis*, *C. asterum*, *C. clematidis-apiifoliae* の 3 種の担子胞子について乾燥耐性が見られた。生存率は種によって異なり、間接発芽率とは反対の傾向が見られた（図 4-4）。*Coleosporium clematidis-apiifoliae* の担子胞子は 15 °C で乾燥耐性を示し、平均生存率は 19.3% を示した。15 °C の生存率は他種に比べ有意に高かった ( $P < 0.001$ )。 *Coleosporium lycopodis* の担子胞子は 15 °C から 25 °C の範囲で乾燥耐性を示した。20 °C の乾燥条件下で最も生存率が高く、この温度での平均生存率は 6.1% であった。*Coleosporium asterum* の担子胞子は 20 °C の乾燥条件下で乾燥耐性がみられ、平均生存率は 4.7% であった。一方、*C. phellodendri* の担子胞子には乾燥耐性が見られず、全ての温度区画の乾燥条件下で生存している担子胞子を観察することはできなかった。

#### 4-4. 考察

鈴木（2014）が 2013 年に葉濡れセンサーを林縁に設置し、葉上に結露が生じている時間を調査した結果、6 月から 10 月までの夜間（18:00-6:00）には担子胞子の発芽に十分な時間結露が生じていることが示された。そのため、夜間の最低気温が各種の胞子の発芽最低温度以上であれば、担子胞子が飛散し発芽する十分な時間が確保できると考えられる。冬胞子および担子胞子の発芽試験の結果、*C. phellodendri* および *C. lycopodis* の冬胞子および

担子胞子の発芽温度範囲が 15°C から 25°C であった。菅平高原実験センターが観測している気象データから、2006 年から 2013 年の 6 月 1 日から 10 月 15 日までの夜間最低気温の平均値を算出した結果、7 月初旬から 9 月初旬までの 2 か月間は *C. phellodendri* および *C. lycopodis* の担子胞子が飛散、発芽する条件が満たされていると考えられる。菅平高原実験所で *C. phellodendri* が冬胞子堆を形成する期間は 7 月中旬から 10 月中旬であり、*C. lycopodis* が冬胞子堆を形成する期間は 6 月下旬から 10 月中旬であった（鈴木, 2014）。これらのことから、*C. phellodendri* の担子胞子の主な飛散期間は、7 月中旬から 9 月初旬までのおよそ 1 か月半であり、*C. lycopodis* のアカマツへの主な飛散期間は 7 月初旬から 9 月初旬までのおよそ 2 か月であると考えられる（図 4-5A, B）。

一方、*C. asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* の冬胞子および担子胞子の発芽温度範囲は *C. phellodendri* および *C. lycopodis* に比べて広く、10 °C から 25 °C であった（図 4-1, 4-2）。この結果から、菅平高原実験所では 6 月初旬から 9 月中旬までの 3 か月半の期間 *C. asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子が飛散し発芽する気候条件が満たされていると考えられる。しかし、菅平高原実験所における 2 種の冬胞子堆の形成時期は遅く、*C. asterum* は 8 月中旬に中間宿主の 1 つであるゴマナ上で初めて冬胞子堆が形成され、*C. clematidis-apiifoliae* は 8 月初旬に初めて冬胞子堆が形成される（鈴木, 2014）。これらのことから、*C. asterum* の担子胞子の主な飛散期間は 8 月中旬から 9 月中旬までのおよそ 1 か月間、また、*C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子の主な飛散期間は 8 月初旬から 9 月中旬までのおよそ 1 か月半であると考えられる（図 4-5C, D）。このように、*C. asterum* および *C. clematidis-apiifoliae* の冬胞子および担子胞子の発芽温度範囲は *C. phellodendri* および *C. lycopodis* に対し広く、菅平の気候では夏以降も担子胞子を飛散・発芽させることができることが示された。しかし、菅平ではこれら 2 種の冬胞子が形成され始める時期が遅いため、感染可能期間が大きく制限されていた。冬胞子の形成時期がさび胞子世代の存在量に影響を与えている可能性がある。

*Coleosporium clematidis-apiifoliae* は他種に比べ高い乾燥耐性を示した（図 4-4）。サビ

キノの担子胞子は一般的に乾燥に対し極めて脆弱であり、低湿度に晒されると急速に生存率が低下することが知られている (Spaulding and Rathbun-Gravatt, 1926; MacLachlan, 1935; Blank and Leathers, 1963; Gould and Shaw, 1969; Snow, 1968)。そのため、担子胞子は高湿度が保たれる夜間のうちに感染を完了させるか、雨天時に感染する必要がある (作山, 1973; Laure et al., 1992; Flint and Thomson, 2000)。しかし、*C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子は乾燥耐性を示した。このことは、感染の途中で湿度が低下した場合においても死亡することなく、再び湿度が上昇した時に感染を再開することができることを示しており、担子胞子が針葉に到達した際の感染の成功率を増加させると考えられる。

*Coleosporium phellodendri* の担子胞子は他種に比べ有意に間接発芽率が高かった。担子胞子は粘着質の細胞外基質に覆われており、それによって宿主に固着する (Gold and Mendgen, 1991)。間接発芽能力を有さない担子胞子の場合、感染に不適な場所に一度落下してしまうと、多くの場合はそのまま死亡してしまう。しかし、間接発芽能力を有する担子胞子は、感染に不適な場所に担子胞子が落下した場合でも 2 次担子胞子を形成して再び飛散し、有効感染距離を拡大させることができる (Bega, 1960)。*Coleosporium phellodendri* は菅平高原実験所において多くの担子胞子を間接発芽によって長距離飛散させることができると考えられる。高い間接発芽率によってさび胞子世代宿主と中間宿主が離れて分布しているデメリットを補い、担子胞子をアカマツ林に到達させていると推定された。このことから、間接発芽率の高さが *C. phellodendri* のさび胞子世代の存在量を増加させる要因となっている可能性が高いと考えられた。

*Coleosporium phellodendri* の担子胞子は間接発芽率他種よりも有意に高い一方で、乾燥耐性は示さなかった。一方、*C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子の間接発芽率は極めて低かったが、乾燥耐性は他種に比べ有意に高かった。このように、担子胞子の間接発芽能力と乾燥耐性にはトレードオフの関係が示唆された (図 4-3, 図 4-4)。*Coleosporium phellodendri* は発芽に適した夜間に多くの担子胞子を間接発芽させ、アカマツ針葉と担子胞子との接触率を上昇させ、感染を増加させる戦略を獲得したと考えられる。*Coleosporium clematidis-*

*apiifoliae* は針葉と担子胞子が接触した場合の感染の成功率を上昇させることでさび胞子世代の存在量を増加させる感染戦略を獲得したと考えられる。

本章の結果、*C. phellodendri* の担子胞子は高い間接発芽率を示した。担子胞子の間接発芽能力は本種が担子胞子をアカマツ林まで飛散させられた要因の 1 つと考えられた。一方で、*C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子は乾燥耐性を有していることが明らかになり、これら 2 種はアカマツに対し、異なる感染戦略を有していることが示唆された。

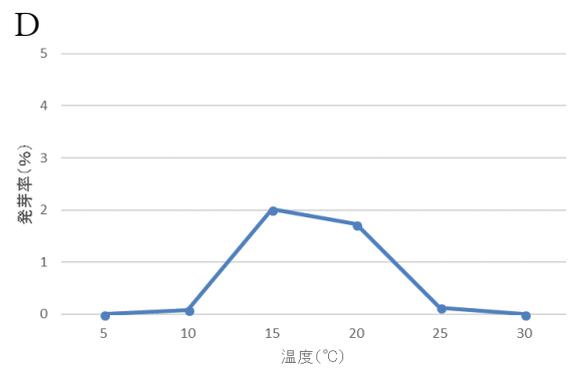
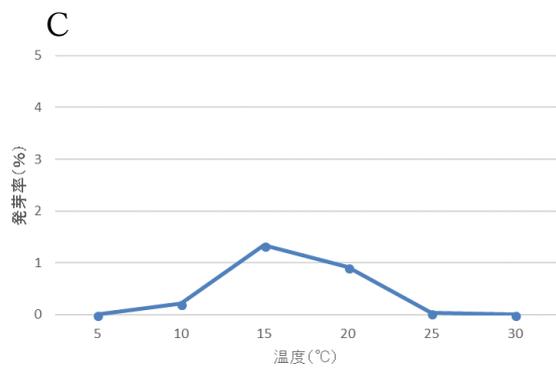
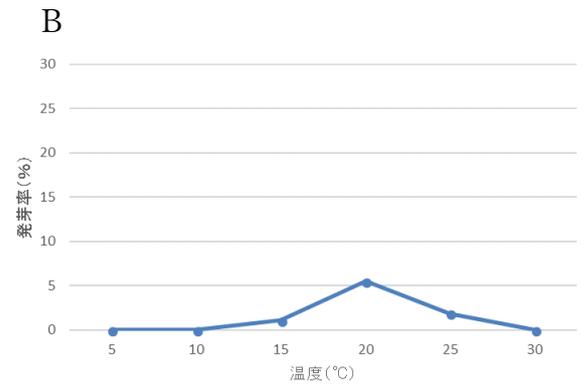
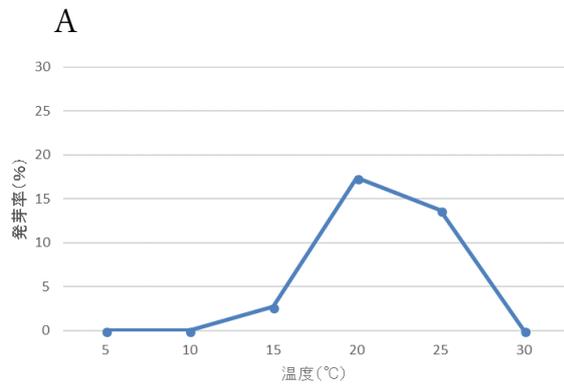


図 4-1. 各温度における *Coleosporium* 属菌 4 種の冬胞子の発芽率

A: *C. phellodendri* B: *C. lycopodis* C: *C. asterum* D: *C. clematidis-apiifoliae*

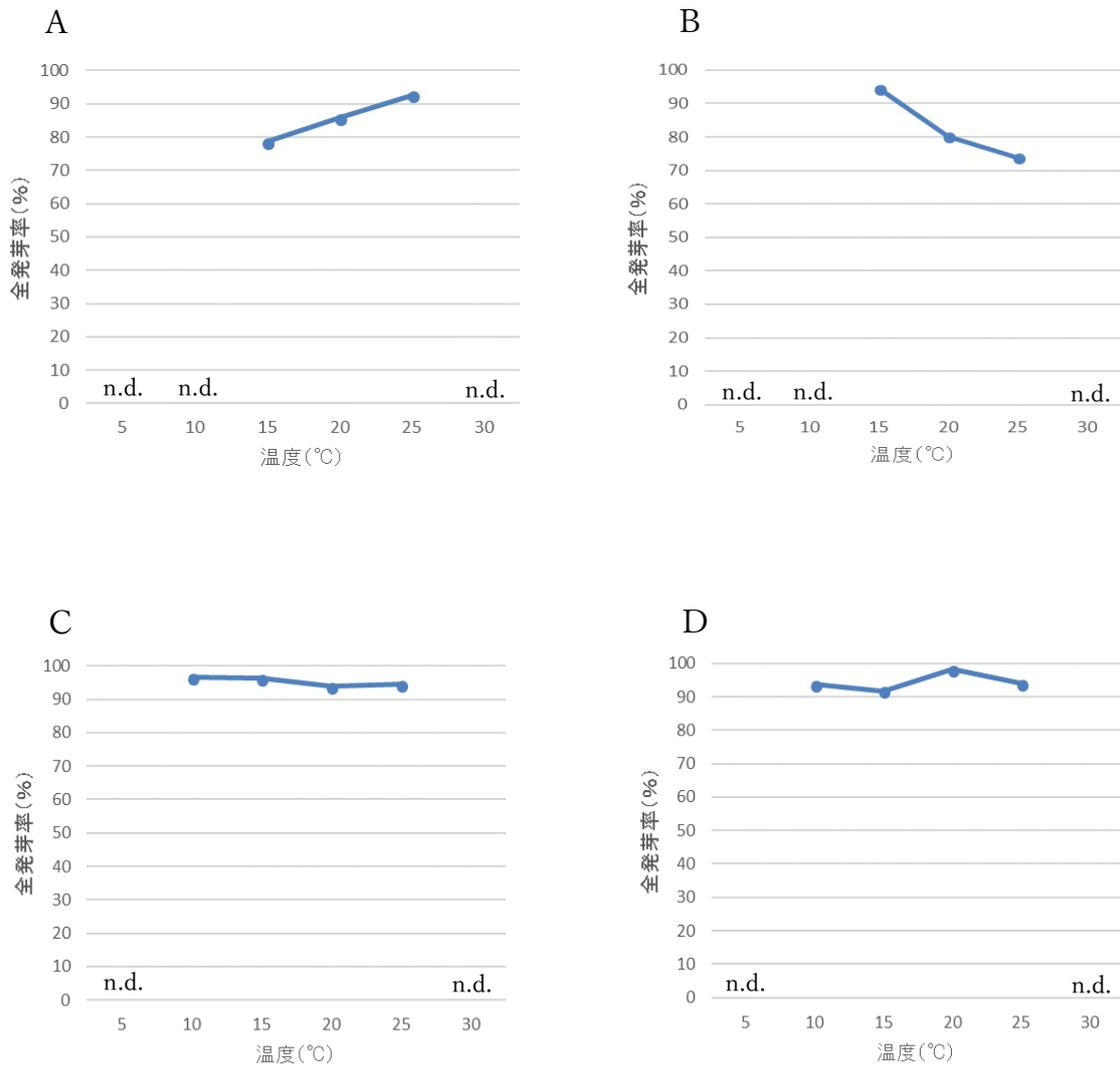


図 4-2. 各温度における *Coleosporium* 属菌 4 種の担子胞子の全発芽率

A: *C. phellodendri* B: *C. lycopodis* C: *C. asterum* D: *C. clematidis-apiifoliae*

n.d.は冬胞子が発芽しなかったためデータが得られなかった

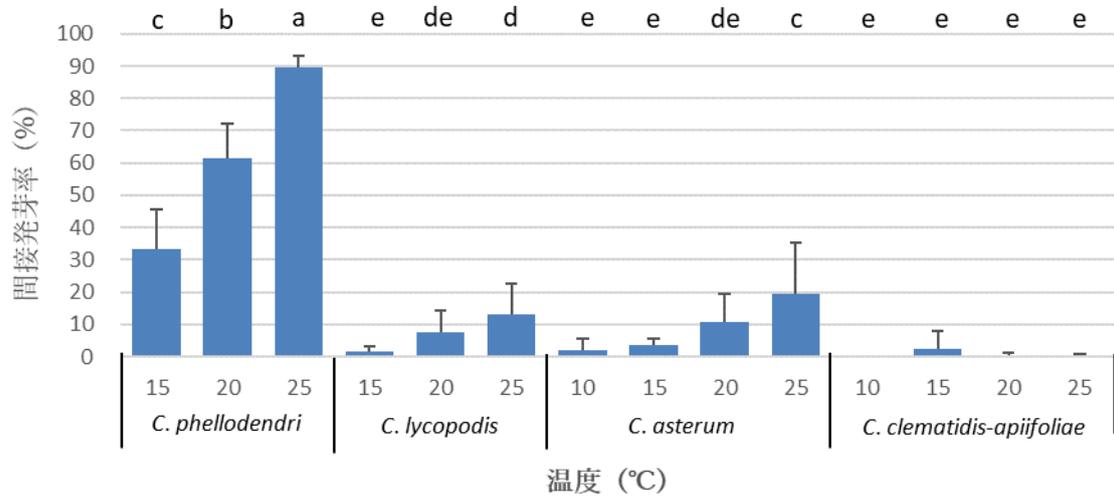


図 4-3. 各温度における *Coleosporium* 属菌 4 種の担子胞子の間接発芽率

異なるアルファベットは統計的に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )

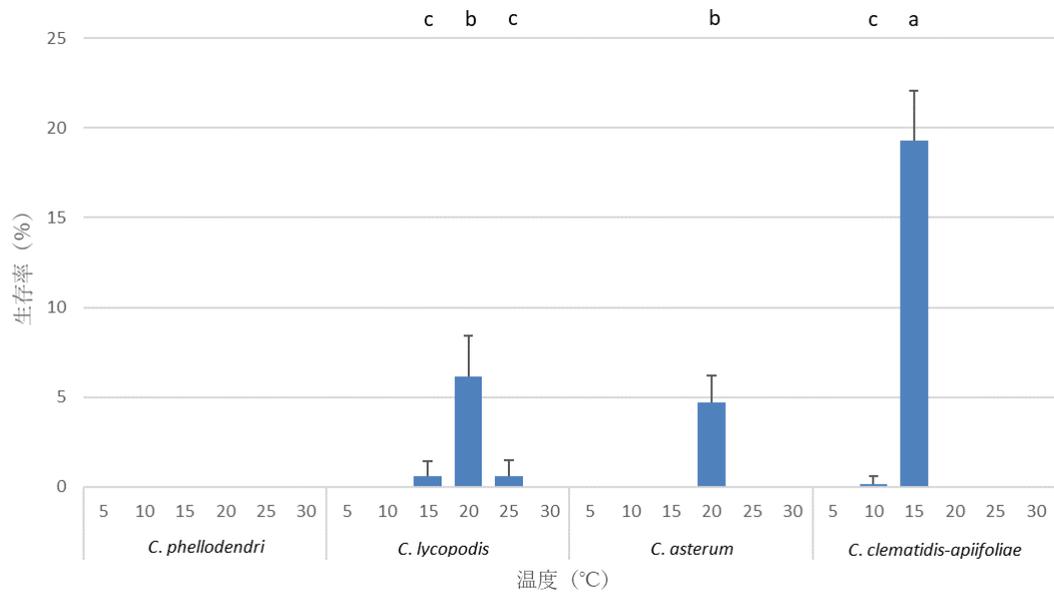


図 4-4. 各温度における *Coleosporium* 属菌 4 種の担子胞子の乾燥耐性

異なるアルファベットは統計的に有意であることを示す ( $P < 0.05$ )

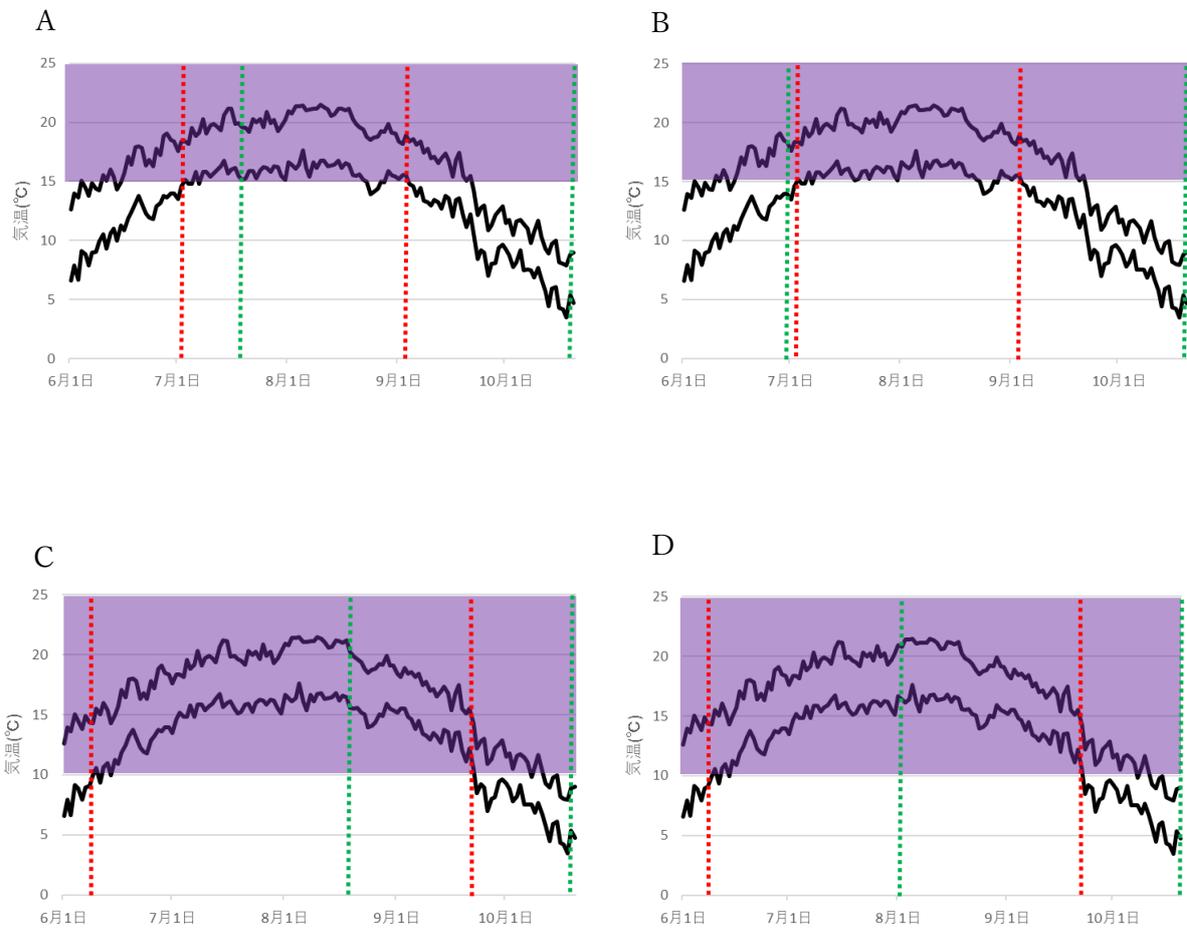


図 4-5. 菅平高原実験所における *Coleosporium* 属菌 4 種の冬孢子堆形成期間

A: *C. phellodendri* B: *C. lycopodis* C: *C. asterum* D: *C. cleamtidis-apiifoliae*

実線は夜間の最高気温および最低気温の 2006 年から 2013 年における平均値

背景色がついている温度域は冬孢子および担子胞子の発芽温度範囲を示す

赤破線で挟まれた領域は最低気温の平均値から推測される担子胞子の飛散可能期間

緑破線で挟まれた領域は菅平高原実験センターにおける冬孢子世代の形成期間

赤破線で挟まれた領域と緑破線で挟まれた領域の重なる部分が主な担子胞子の飛散期間を示す

## 第5章 担子胞子の感染可能なアカマツ針葉の成長段階

### 5-1. 緒言

サビキンの担子胞子は一般に角皮感染すると考えられている (Miller et al., 1980; Gray et al., 1983; Hopkin et al., 1988)。そのため、クチクラ層の発達した展葉後の葉には担子胞子は感染しないと認識されてきた (Melander and Craigie, 1927)。オウシュウトウヒに精子・さび胞子世代を形成する *Chrysomyxa rhododendri* (DC.) De Bary の担子胞子は、展葉中の当年葉にのみ貫入できることが報告されている (Bauer et al., 2000)。しかし、第2章の結果で、*C. phellodendri* のさび胞子堆は主に2年葉に形成されていた。そのため本種は1年葉にも感染できる可能性が考えられたが、これまで *Coleosporium* 属菌の担子胞子が感染することのできる針葉の成長段階を研究した例はない。

そこで本章では、*C. phellodendri*, *C. lycopodis*, *C. asterum*, *C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子が感染することのできるアカマツ針葉の生育段階の違いを明らかにすることを目的とした。当年葉が展葉している期間のアカマツ苗を前期、展葉が完了した後のアカマツ苗を後期とし、針葉の成長段階を前期当年葉、後期当年葉、前期1年葉、後期1年葉の4段階に分けた。各成長段階の針葉に対し、担子胞子の接種試験を行った。

### 5-2. 実験材料および方法

2015年5月に3年生のポット植えアカマツを100本用意し、試験直前まで実験室で生育させた。アカマツ苗の成長段階を前期当年葉、後期当年葉、前期1年葉、後期1年葉の4段階に分け (図5-1)、一度の接種試験に前期のアカマツ苗10本、または後期アカマツ苗10本をランダムに選び供試した。

接種に用いる4種の冬胞子堆は2015年7月から10月にかけて野外から採集した (表5-1)。*Coleosporium phellodendri* の冬胞子堆は7月16日および9月29日に、筑波大学植物見本園に存在するキハダの罹病葉とともに採取した。*Coleosporium lycopodis* の冬胞子堆は

8月20日および9月18日に、菅平高原実験所に分布するツリガネニンジンの罹病葉とともに採取した。*Coleosporium clematidis-apiifoliae*の冬孢子堆は8月22日および10月1日に筑波山に分布するボタンヅルの罹病葉とともに採集した。*Coleosporium asterum*の冬孢子堆は9月26日に菅平高原実験所に分布するゴマナ上で初めて確認されたため、その日に罹病葉とともに採取した。接種はいずれも採取日に行った。

1回の接種試験に用いる担子胞子を等量にするため、罹病葉片上の冬孢子堆の面積を、画像解析ソフト (ImageJ) を用いて計測し、合計で約 1500 mm<sup>2</sup> に統一した。ただし、*C. clematidis-apiifoliae*は十分な量の冬孢子堆を採集することができなかったため、約 500 mm<sup>2</sup> になるよう統一した。直径 75 cm、高さ 80 cm のプラスチック容器の蓋の裏面に冬孢子堆を形成した葉片を均等に張り付け、前期または後期のアカマツ苗 10 本が入った容器に蓋をした。容器内を高湿度条件に保ち 15 °C で 48 時間培養し、担子胞子を落下させ接種を行った。ただし、*C. asterum*の冬孢子堆は冬孢子堆の発生時期が遅かったため、前期のアカマツ苗に対して接種することができなかった。接種後、アカマツ葉表面に付着している担子胞子の感染能力を失くすため、室内で 24 時間乾燥させた。乾燥後、接種したアカマツは再び野外で生育させた。2015 年 10 月から 2017 年 6 月まで月に 1 度、接種した全てのアカマツを観察し、精子器およびさび孢子堆の出現日および感染葉数をそれぞれの成長段階ごとに記録した。

感染数に対する種および当年葉の成長段階の影響を評価するため、ポアソン分布を誤差構造、リンク関数をログとした GLMM を用いた。説明変数として、種、成長段階およびそれらの交互作用を固定効果として扱い、各接種試験をランダム効果として扱った。目的変数に対する説明変数の影響を評価するため、尤度比検定 (Type I) を行い、*P* 値を求めた。GLMM においていずれかの説明変数および交互作用に有意な効果が見られた場合、Tukey の事後検定を行った。ただし、接種試験に用いた *C. clematidis-apiifoliae* の冬孢子堆面積は他種と異なるため、本解析に含めなかった。統計解析は R3.3.2 (Ihaka and Gentleman, 1996) を用いて行い、lme4 パッケージ (Douglas et al. 2015) および multcomp パッケージ (Bretz

et al. 2011) を使用した。

### 5-3. 結果

接種試験の結果を接種した葉齢別に表 5-2, 5-3 に示した。4 種の担子胞子は、前期当年葉だけでなく、後期当年葉にもさび孢子堆を形成した (表 5-2)。それに対し、1 年葉に病徴が見られたのは *C. phellodendri* だけであった (表 5-3)。

前期のアカマツに担子胞子を接種した場合、*C. phellodendri*, *C. lycopodis*, *C. clematidis-apiifoliae* の 3 種は接種年の 2015 年秋に精子器を形成し、2016 年の春にさび孢子堆を形成した。後期のアカマツ苗に接種した場合、*C. lycopodis*, *C. clematidis-apiifoliae*, *C. asterum* の 3 種は 2016 年の春に精子器とさび孢子堆を形成した。一方で、*C. phellodendri* は他種と同様に 2016 年春に精子器を形成したものの、その年にさび孢子堆を形成せず、2017 年の春に初めてさび孢子堆を形成した (表 5-2)。また、前期 1 年葉に感染した *C. phellodendri* は 2015 年の秋に精子器を形成したものの、翌年には落葉した。

*Coleosporium phellodendri* の前期当年葉、後期当年葉、前期 1 年葉に対するアカマツ苗あたりの平均感染葉数はそれぞれ 4.3, 0.3, 0.1 であった。*Coleosporium lycopodis* の前期当年葉および後期当年葉に対する平均感染葉数はそれぞれ 1.3 および 0.2、*C. clematidis-apiifoliae* の前期当年葉および後期当年葉に対する平均感染葉数はそれぞれ 0.9 および 1.4 であった。*Coleosporium asterum* の後期当年葉に対する平均感染数は 0.1 であった。当年葉の感染葉数を評価するための GLMM において説明変数間の交互作用に有意差がみられたため ( $P < 0.001$ )、Tukey の事後検定を行った。その結果、*C. phellodendri* は他種に比べ前期当年葉に対する平均感染葉数が有意に大きかった (図 5-2)。また、*C. phellodendri* および *C. lycopodis* は後期当年葉に対する感染葉数が前期当年葉に対する感染葉数に比べ減少したのに対し、*C. clematidis-apiifoliae* は後期当年葉に対しても高い感染数を維持した (図 5-2)。

#### 5-4. 考察

接種試験の結果、*Coleosporium* 属菌 4 種の全ての種がクチクラ層の発達している後期当年葉に感染することができた。このことから、葉の展開直後あるいは展葉中の柔らかい葉にしか感染できない一般的なサビキンに対し、本属菌の担子胞子は感染可能な針葉の生育段階が広いことが示された。*Coleosporium* 属菌と同様に、冬胞子が越冬せずに発芽し、担子胞子によって針葉樹へと感染するサビキンの中には、担子胞子の感染様式が角皮感染ではなく気孔感染する種が報告されている。Patton and Johnson (1970) や Bergdahl and French (1985) はストロブマツの針葉に感染する *Cronartium ribicola* やバンクスマツ (*Pinus banksiana* Lamb.) に感染する *C. comandrae* Peck の担子胞子が夏胞子と同じように発芽管を気孔から侵入させていることを報告している。これらの先行研究では、クチクラ層の発達している常緑針葉樹に感染するため、担子胞子の気孔感染能力が進化してきたと推測している。*Coleosporium* 属菌も同様に、担子胞子が気孔感染する能力を獲得しており、そのために後期当年葉に感染することができる可能性が示唆された。

当年葉に加え、1 年葉に感染が見られたのは *C. phellodendri* だけであった。本試験では、*C. phellodendri* は前期 1 年葉に感染したものの、後期 1 年葉への感染は見られなかった。しかし、鈴木 (2014) において、*C. phellodendri* に感染された野外のキハダ直下に 3 年生のアカマツ苗 10 本を 1 週間静置して担子胞子の接種試験を行った結果では、前期 1 年葉に加え後期 1 年葉にも精子器およびさび胞子堆の形成が見られた (表 5-4)。本試験の結果と鈴木 (2014) の結果から、*C. phellodendri* は当年葉に加え、1 年葉にも感染することができ、他 3 種に比べて広い範囲の針葉に感染することができると考えられる。

*Coleosporium phellodendri* および *C. lycopodis* は前期当年葉に対し高い感染数を示したが、後期当年葉に対しては感染数が低下した (図 5-2)。それに対し、*C. clematidis-apiifoliae* は後期当年葉にも高い感染数を維持した (図 5-2)。*Coleosporium phellodendri* は他種の利用できない 1 年葉に感染範囲を拡大することで感染数を増加させており、*C. clematidis-apiifoliae* は他種の感染しにくい後期当年葉にも高い感染数を維持することで感染数を増加

させていると考えられる。このように、*C. phellodendri*と *C. clematidis-apiifoliae* はアカマツへの感染数を増加させるため、異なる生理的特性を進化させていると考えられた。

*Coleosporium lycopodis*, *C. clematidis-apiifoliae*, *C. asterum* の3種は担子胞子が感染したアカマツの成長段階に拘わらず、感染の翌年にさび胞子堆を形成した。それに対し、*C. phellodendri*は後期当年葉に感染した場合、感染の2年後にさび胞子堆を形成することが示された(表 5-2)。本試験では、前期当年葉に感染した場合は、感染の翌年にさび胞子堆を形成することが示されたが、前期1年葉に感染した場合はさび胞子堆を形成する前に落葉してしまった(表 5-3)。しかし、鈴木(2014)の野外接種試験の結果では、前期当年葉および前期1年葉に感染した場合は翌年にさび胞子堆を形成し、後期当年葉および後期1年葉に感染した場合は、感染の2年後にさび胞子堆を形成していた(表 5-4)。これまで、佐保(1963a)や浜(1972)によって *C. phellodendri*が1年型の生活環に加え2年型の生活環を有していることが報告されていたが、その要因は明らかになっていなかった。本試験および鈴木(2014)の結果から、感染時の葉の成長段階がその要因の一つとして考えられた。

これらの結果から、*C. phellodendri*は後期当年葉に感染し、2年後にさび胞子堆を形成するものと、1年葉に感染し翌年にさび胞子堆を形成するものの総計が2年葉にさび胞子堆を形成すると考えられる(図 5-3)。このように2年型の生活環および1年葉への感染能力の2つの要因によって、本種が2年葉に多くのさび胞子堆を形成していることが示された。

本研究の結果、*Coleosporium*属菌4種の担子胞子はいずれも成長段階に拘わらず当年葉に感染することができた。しかし、1年葉に感染することができたのは *C. phellodendri*だけであった。また、*C. phellodendri*と *C. clematidis-apiifoliae*は、感染数を増加させるために異なる生理的特性を有していることが示された。そして、2年型の生活環と1年葉への感染能力を持つことにより、*C. phellodendri*は2年葉に多くのさび胞子堆を形成することが示された。



図 5-1. アカマツ針葉の成長段階

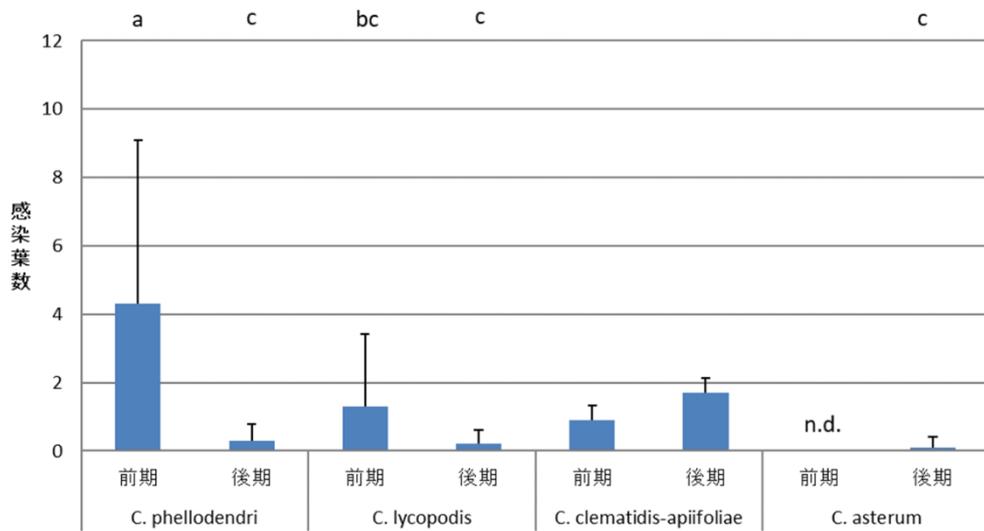


図 5-2. *Coleosporium* 属菌 4 種の当年葉の成長段階に対する平均感染葉数

異なるアルファベットは統計的に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )

n.d.はデータの欠落を示す

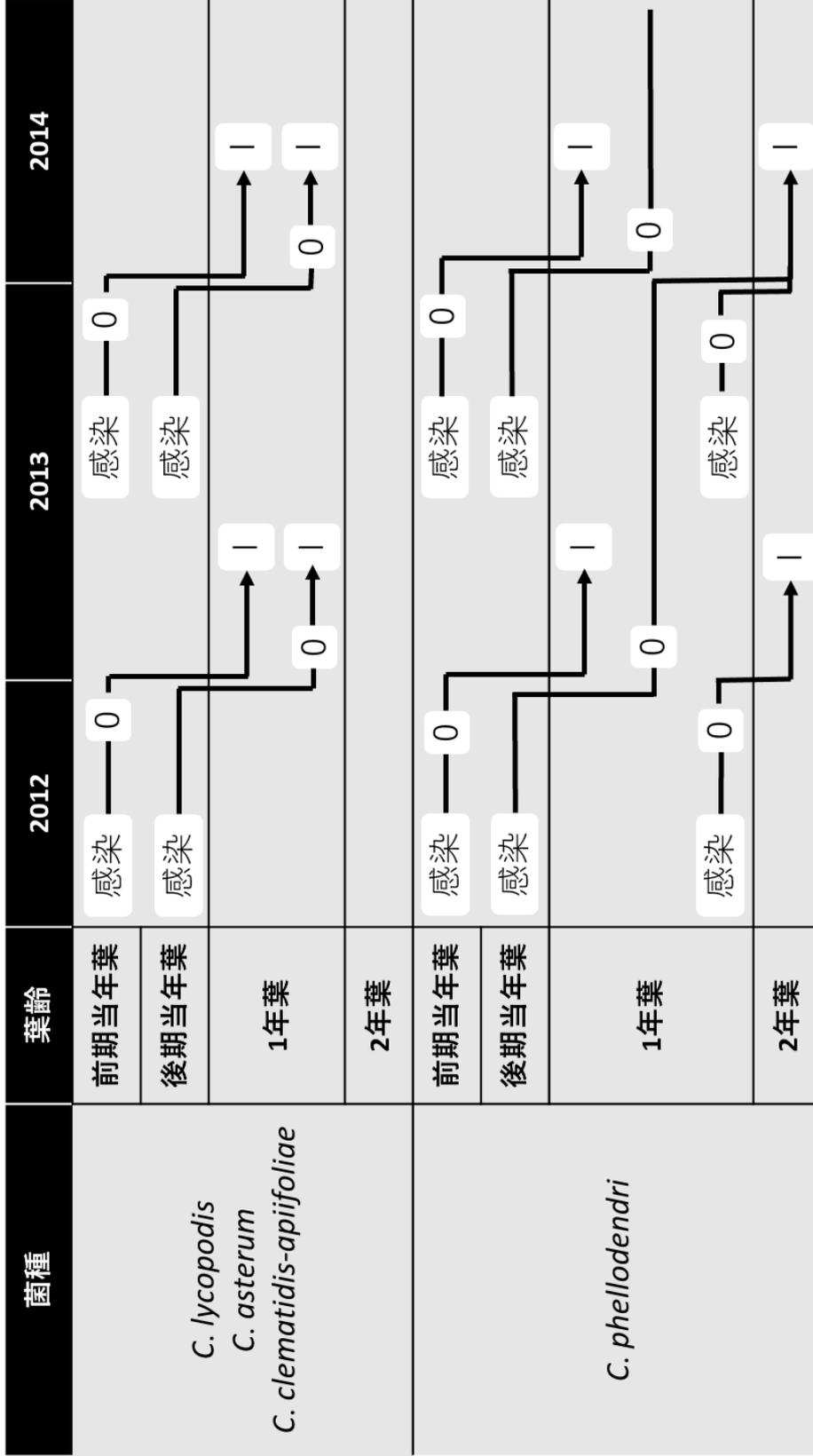


図 5-3. 本研究から推定されたアカマツ針葉上の *Coleosporium* 属菌 4 種のフェノロジー

表 5-1. 接種試験に用いた *Coleosporium* 属菌と接種したアカマツ苗の成長段階

菌種	採取場所	中間宿主	接種日 (2015)	接種に用いた冬胞子堆面積	アカマツ苗の成長段階*
<i>C. phellodendri</i>	筑波大学	キハダ	7月16日	1500mm <sup>2</sup>	前期
<i>C. phellodendri</i>	筑波大学	キハダ	9月29日	1500mm <sup>2</sup>	後期
<i>C. lycopodis</i>	菅平高原実験所	ツリガネニンジン	8月20日	1500mm <sup>2</sup>	前期
<i>C. lycopodis</i>	菅平高原実験所	ツリガネニンジン	9月18日	1500mm <sup>2</sup>	後期
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	筑波山	ボタンヅル	8月22日	500mm <sup>2</sup>	前期
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	筑波山	ボタンヅル	10月1日	500mm <sup>2</sup>	後期
<i>C. asterum</i>	菅平高原実験所	ゴマナ	9月26日	1500mm <sup>2</sup>	後期

表 5-2. *Coleosporium* 属菌 4 種の担子胞子の接種結果 (当年葉)

菌種	接種日 (2015)	成長段階	精子器出現日	さび胞子堆出現日
<i>C. phellodendri</i>	7月16日	前期	2015年9月30日	2016年4月11日
<i>C. phellodendri</i>	9月29日	後期	2016年6月19日	2017年5月16日
<i>C. lycopodis</i>	8月20日	前期	2015年10月27日	2016年4月11日
<i>C. lycopodis</i>	9月18日	後期	2016年4月11日	2016年5月19日
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	8月22日	前期	2015年10月27日	2016年4月11日
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	10月1日	後期	2016年4月11日	2016年4月11日
<i>C. asterum</i>	9月26日	後期	2016年4月11日	2016年5月19日

表 5-3. *Coleosporium* 属菌 4 種の担子胞子の接種結果 (1 年葉)

菌種	接種日 (2015)	成長段階	精子器出現日	さび胞子堆出現日
<i>C. phellodendri</i>	7月16日	前期	2015年10月27日	落葉
<i>C. phellodendri</i>	9月29日	後期	-	-
<i>C. lycopodis</i>	8月20日	前期	-	-
<i>C. lycopodis</i>	9月18日	後期	-	-
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	8月22日	前期	-	-
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	10月1日	後期	-	-
<i>C. asterum</i>	9月26日	後期	-	-

表 5-4. 野外における *C. phellodendri* の担子胞子接種試験 [鈴木 (2014) より引用]

菌種	接種日 (2012)	成長段階	葉齡	精子器出現日	さび胞子堆出現日
<i>C. phellodendri</i>	7月6~13日	前期	1年葉	n.d.	2013年5月31日
<i>C. phellodendri</i>	7月24~31日	前期	1年葉	n.d.	2013年5月31日
<i>C. phellodendri</i>	9月20~27日	後期	1年葉	2013年5月31日	2014年4月13日

## 第6章 総合考察

これまで菌類の生態学では、基質内の遺伝的に異なるコロニー間に帯線を形成する木材腐朽菌やリテイズマ科菌類、あるいは基質内から分離培養することが可能な腐朽菌についての存在量が調査されてきたが (Iwamoto and Tokumasu, 2001; Masuhara and Katsuya, 1992; Hirose and Osono, 2006; Matsukura et al., 2017)、帯線も形成せず、また多くの種で培養することのできないサビキノ存在量を種間で比較した報告はなかった。本研究では、1 サンプルあたりの感染数、調査木あたりの感染強度、アカマツ林の平均感染強度、流行度などの指標を用いることで、アカマツ林における各種のさび孢子世代の存在量を比較することができた。また、サンプル当たりの感染数を葉齢ごとに分けた値を求め、存在量に影響を及ぼす林内の分布や葉の高さ、葉齢など要因を評価することができた。同様の手法を応用することで、異なる調査地間の存在量を相対的に比較することが可能になり、*Coleosporium* 属菌の生物地理的研究が進展すると考えられる。

本研究で対象とした、4 種 (*C. asterum*, *C. clematidis-apiifoliae*, *C. lycopodis*, *C. phellodendri*) のさび孢子世代宿主への感染戦略は、*Puccinia* 属菌や *Uromyces* 属菌など、冬孢子によって越冬することができる一般的なサビキノとは大きく異なっていた。多くの *Puccinia* 属菌や *Uromyces* 属菌では、夏孢子によって十分感染を拡大した後に冬孢子を形成して越冬をし、さび孢子世代宿主が成長する春の好適環境下で一斉に担子孢子を飛散し、近接する宿主へと感染する (Waterhouse, 1921; Mendgen, 1983; Anikster, 1986; Webster and Weber, 2007)。それに対し *Coleosporium* 属菌は、初夏から晩秋までの長期間、担子孢子を飛散させ、常緑樹の針葉へと感染する。冬孢子によって越冬することのできない *Coleosporium* 属菌は、担子孢子による宿主交代が失敗すると冬孢子世代宿主が枯死するとともに死滅してしまう。そのため、宿主交代に有利な担子孢子的特性を獲得してきたと考えられる。

4種の *Coleosporium* 属菌の生活史戦略は表 6-1 に示す要因によって3つに分けることができた。間接発芽能力を有する種は、一度担子胞子が落下した場所がアカマツ針葉でなかった場合に、2次担子胞子を形成して再び飛散することができるため、間接発芽能力を持たない種に比べて長距離に胞子を分散させることができる。一方で、乾燥耐性を有する担子胞子は、乾燥耐性を有さない種に比べてアカマツ針葉に到達した場合に高い確率で侵入を成功させることができると考えられる。4種の担子胞子は当年葉に感染可能であることが示されたが、特に前期当年葉に対する感染数が多い傾向にあった。しかし、他種が感染することができない1年葉に感染部位を拡大する、他種が感染することが難しい後期当年葉にも感染数を維持するなど、感染範囲を拡大する種が見られた。生活環に関しては、1年型の生活環しか有さない種と1年型に加え、2年型の生活環を有する種が見られた。1年型と2年型の2タイプの生活環を有する種はアカマツへの宿主交代が成功すると、1度の飛散させられるさび胞子の量は減少するものの、中間宿主への宿主交代の機会が2年度分得られる。このことによって本種は、攪乱によって中間宿主が消失する、あるいは異常気象や、単に確率の問題で中間宿主への宿主交代が1年度成功しなかった場合でも、死滅しないというメリットを得ている。一方で、1年型の生活環のみを有する種は、宿主交代の機会は1年度分しか得られない代わりに、感染した全ての担子胞子由来のさび胞子を飛散させることができるというメリットを有する。

*Coleosporium phellodendri* の担子胞子は高い間接発芽率を示した一方で、乾燥耐性は全く示さなかった。アカマツへの感染部位に関しては、他種が感染することの出来ない1年葉に対しても感染能力を有しており、1年型および2年型の生活環を有していた。これらのことから本種は分散に特化した戦略を有していると考えられる。それに対し、*C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子は高い乾燥耐性を示したが、間接発芽能力をほとんど持たなかった。また、*C. clematidis-apiifoliae* は後期当年葉にも高い感染数を維持することができた。そのため、本種は侵入に特化した戦略を有していると考えられた。*Coleosporium asterum* および *C. lycopodis* の担子胞子は、間接発芽率においても乾燥に対する生存率に

においても4種の中で中間的な値を示した。これら2種は分散能力と侵入能力をバランスよく獲得した中間型の戦略を有していると考えられた。

こうした種による戦略の違いには、中間宿主の一般的な生育環境が影響を与えている可能性がある。共通のさび胞子世代宿主であるアカマツの生育環境は多様で、中部山岳地帯で一般的にみられるように遷移の移行段階にある草原内や、遷移が移行したあとのアカマツ林に分布する他、山地の尾根や岩山などの乾燥地や、湿地環境にも生育することができる（茂木ら, 2001）。それに対し、4種の中間宿主の生育環境は種によって異なる。自然界において、各種はそれぞれの中間宿主の近くに分布するアカマツを主に利用して生活環を完了してきたと考えられるため、担子胞子は中間宿主の生育環境に適応的な特性を獲得してきた可能性が高い。

*Coleosporium phellodendri* の中間宿主であるキハダは、木本植物のため草本植物に比べて分布密度も低く、アカマツとの距離も遠くなる可能性が高い。そうした環境下では、間接発芽によって担子胞子の飛散距離を伸ばすことが、宿主交代の成功に重要であると思われる。実際に、五葉マツ類とスグリ属を宿主として異種寄生する *C. ribicola* や、二葉マツ類とコラナ属植物を宿主として異種寄生する *C. quercuum*、ビャクシン属とナシやリンゴなどバラ科植物を宿主として異種寄生する *G. asiaticum* など、*C. phellodendri* と同様に2つの宿主を木本植物とするサビキンの担子胞子は間接発芽能力を有していることが知られている（Bega, 1960; Spine, 1993; Zhong-dong et al., 2017）。またキハダは、山地、特に湿度の高い沢沿いを好んで自生するため（茂木・勝山, 2000）、乾燥耐性の重要性は低い。こうした環境に適応するため、*C. phellodendri* は分散に特化した戦略を獲得してきたと考えられる。

一方、*C. clematidis-apiifoliae* の中間宿主であるポタンヅルは山地の日当たりの良い林縁に生育する（佐竹ら, 1999）。このような場所で生活環を完了する場合、担子胞子が乾燥耐性を獲得することは生活環を完了するために極めて重要であると考えられる。茨城県の桜川市と石岡市の境に位置する加波山の日当たりの良い山道沿いでは、多くのアカマツがポ

タンヅルと近接して分布しており、加波山のアカマツ針葉上からは多くの *C. clematidis-apiifoliae* のさび胞子堆が得られている（鈴木 未発表データ）。*Coleosporium clematidis-apiifoliae* は、こうした環境に適応して侵入に特化した戦略を獲得したと考えられる。

*Coleosporium lycopodis* および *C. asterum* の中間宿主であるユウガギク・ノコンギク・ゴマナは山地に普通に見られる草原性の植物である（永田ら, 1996）。そのため、これら 2 種は、草原からアカマツ林への遷移途上に現れるアカマツ実生を主に利用して生活環を完了していると考えられる。このような環境下では、乾燥耐性に加え、広範囲の実生へと到達するための間接発芽能力を獲得することが生存にもっとも有利であったと思われる。

*Coleosporium phellodendri* および *C. clematidis-apiifoliae* の属菌の担子胞子の感染部位は、他の種にとって感染に適さない、あるいは感染することができない部位に感染範囲を拡大していた。落葉分解菌では植物に対して提唱された C-S-R モデルを菌類に適応して生活史戦略を分類してきた（Jennings & Lysek, 1999; 徳増, 2006）。競争戦略（Competition strategy）を有する種はすでに獲得した資源を他種から防衛したり、競争者が占有している資源を攻撃する能力を持つ。ストレス耐性戦略（Stress tolerance strategy）を有する種は低温や高温、酸素が欠乏した条件、乾燥条件のなど、厳しい環境に適応している。そして、攪乱依存戦略（Rederal strategy）を有する種は、未占有の基質を他種に先んじて獲得する能力に優れており、他種が普通利用しない資源を利用するという特性を有する。アカマツへの感染可能部位が広い *C. clematidis-apiifoliae* および *C. phellodendri* は、C-S-R モデルにおける攪乱依存戦略と同様の特性を有していた。本研究においては、*C. lycopodis* および *C. asterum* が感染部位の拡大に代わるどのような生理的特質を有するか明らかにすることが出来なかったため、*Coleosporium* 属菌の戦略が C-S-R モデルに適合しているか判断することはできない。しかし、*C. lycopodis* および *C. asterum* の中間宿主は同じ草原性植物であり、類似したニッチを有していることから、競争戦略を獲得している可能性が高く、今後の研究で検証する必要がある。

本研究の結果はマツ葉さび病菌の防除のため、多くの知見を提供する。マツ葉さび病菌に対し、種によって異なる防除法を取る必要性が示された。これまで *C. phellodendri* の担子胞子は 200m 以上飛散することが浜 (1972) によって報告されてきたが、本研究の結果から本種の担子胞子は 300m 以上飛散することが明らかになった。担子胞子の飛散距離はキハダの樹高、地形、周囲の植生などに影響を受けると考えられるが、本研究の結果からは、*C. phellodendri* によるアカマツ葉さび病を予防するためには、少なくともアカマツの 300m 以内にキハダを植樹しないことが求められる。本種の葉さび病が既に発症している場合は、キハダを伐採することで効率的に防除を行うことができる (浜, 1972)。キハダ 1 個体でも感染していた場合は、そのキハダ上に多量の冬孢子堆が生じることから、キハダの分布調査は丹念に行い、全ての個体を伐採することが重要である。また、感染したアカマツは、感染後 2 年間さび胞子堆を形成するため、本種の葉さび病を根絶するためには 2 年間の防除作業を施行する必要がある。また、薬剤によって防除を行う場合、本種はアカマツ針葉が展葉している間、特に多量の感染が起こると考えられるため、秋までの薬剤散布が特に重要である。一方で、*C. clematidis-apiifoliae* は展葉後の担子胞子にも高い感染数を維持するため担子胞子が飛散する全期間を通じて重点的に薬剤散布する必要がある。今後、他の *Coleosporium* 属菌について生理的特性を調査することは、病害防除の対策を講じる上で重要である。

本研究では、菅平高原実験所のアカマツ林における *Coleosporium* 属菌 4 種のさび胞子世代の感染の実態を調査し、種によって存在量や林内における分布、形成葉齢の傾向が異なることを明らかにした。特に菅平高原実験所において *C. phellodendri* のさび胞子世代の存在量が多いことは、中間宿主上で感染源の供給源である冬孢子世代の存在量が多いこと、および担子胞子の飛散距離を伸ばす間接発芽能力を有することに起因すると考えられた。また、4 種の担子胞子の間接発芽能力、乾燥耐性、感染部位、生活環などの生理的特性が種によって異なっており、それらの組み合わせにより各種の生活史戦略を 3 つパターンに分けることができた。本研究は、同じさび胞子世代宿主を宿主とする系統的に近縁な

サビキンの種が、種によって多様な生活史戦略を進化させてきたことを示した。これらの知見はサビキンの生態学的・進化学的研究への基礎情報として利用できると考えられる。

表 6-1 *Coleosporium* 属菌 4 種の生活史戦略

菌種	間接発芽率	乾燥耐性	感染部位	生活環
<i>C. phellodendri</i>	+++	—	当年葉	1年型
			1年葉	2年型
<i>C. clematidis-apiifoliae</i>	+	++	当年葉	1年型
			後期当年葉にも高い感染数	
<i>C. asterum</i>	++	+	当年葉	1年型
<i>C. lycopodis</i>	++	+	当年葉	1年型

+ の数の違いは統計的に有意な差があることを示しており、—はその能力を有さないことを示す

## 摘要

*Coleosporium* 属菌は、サビキン目 (Pucciniales) のコレオスポリウム科 (Coleosporiaceae) に属するマツ葉さび病を引き起こす植物寄生菌であり、日本では 28 種が報告されているが、そのうち 12 種が二葉マツ類を精子・さび孢子世代の宿主とする (Kaneko, 1981; Zinno and Kaneko, 1984)。筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所 (以下菅平高原実験所) では、*Coleosporium asterum*, *C. clematidis-apiifoliae*, *C. lycopodis*, *C. phellodendri* の 4 種がアカマツ林を利用して生活環を完了させており、このうち *C. phellodendri* がアカマツ林で優占していることが明らかになっている。しかし、存在量の種間差や林内での分布に影響を与える要因については明らかになっていない。そこで本研究では、菅平高原実験所を調査地として、*Coleosporium* 属菌 4 種の生態、特にアカマツ林におけるさび孢子世代の存在量や分布に影響を与えている各種の生理的特性を明らかにすることを目的とした。

菅平高原実験所内のアカマツ林における *Coleosporium* 属菌の存在量の実態を把握し、その存在量と林内での分布、葉齢の関係を明らかにするため、アカマツ林から *Coleosporium* 属菌のさび孢子堆を採取し、制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 法により同定した。2015 年 6 月にアカマツ林、林縁 13 本、林内 9 本のアカマツを調査木とし、各調査木の高さ 4.5m, 5.5m, 6.5m の枝先約 60cm を 2 本ずつ切り落とし、さび孢子堆の形成されている針葉を全て採集し、各針葉からランダムに選んだ 1 孢子堆を同定に供試した。アカマツのある高さから得られた約 60 cm の 2 本の枝を 1 サンプルとし、サンプル当たりの感染数、調査木の感染強度 (その調査木の”サンプル当たりの感染数”の平均値)、アカマツ林の平均感染強度、流行度、ならびに葉齢ごとのサンプル当たりの感染数を求め、データの解析を行った。その結果、*C. phellodendri* のさび孢子堆がアカマツ林の広範囲に多量に存在し、特に 2 年葉に多く形成されていることが明らかになった。本種は林内に比べ林縁に多くのさび孢子堆を形成したが、枝の高さによる存在量の差は認められなかった。一方で、アカマツ林に隣接するススキ草原に分布するアカマツ実生では、*C. lycopodis* が優占

していた。

*Coleosporium lycopodis* の中間宿主であるツリガネニンジンとはアカマツ林に隣接するススキ草原内に広く分布するが *C. phellodendri* の中間宿主であるキハダは、アカマツ林の近くには存在せず、200m 以上離れた樹木園、落葉広葉樹林、菅平高原実験所の南西方向に位置する植樹林に存在している。これらのキハダ上で形成される冬孢子堆が担子胞子の供給源になっている可能性は高いが、この2種間で冬孢子的存在量にどの程度の差があるかは不明であった。そこで、*C. phellodendri* と *C. lycopodis* の中間宿主上で形成される冬孢子世代の量を、サンプル上の冬孢子堆面積をもとに、個体上、ならびに群ら以内での冬孢子堆面積を概算し、比較した。その結果、これらのキハダ上における *C. phellodendri* の冬孢子堆積算面積は、ススキ草原全体の中間宿主上で形成される *C. lycopodis* の冬孢子堆積算面積の 3000 倍多く、冬孢子世代の存在量の多さが本種のさび胞子世代の存在量に強く影響を与えていることが示された。同時に、担子胞子が 300m 以上飛散している可能性が示唆された。

さび胞子世代の存在量や分布に影響を与えている生理的特性を明らかにする目的で、菅平高原実験所において採取した4種の冬孢子および担子胞子の発芽試験を行った。その結果、冬孢子および担子胞子の発芽温度範囲は *C. phellodendri* と *C. lycopodis* では 15-25°C、*C. asterum* と *C. clematidis-apiifoliae* では 10-25°C と、種によって異なった。また、担子胞子の発芽では、発芽管が伸長する直接発芽と二次担子胞子が形成される間接発芽の2種類の発芽様式が認められた。より高温の条件で、間接発芽の率が高くなる傾向があった。また、発芽様式の比率は種によって異なり、*C. phellodendri* は間接発芽の率が他種に比べ有意に高かった。間接発芽により形成された2次担子胞子が再び飛散することで飛散距離を伸ばすと考えられており、この特性によって本種は 200 m 以上離れたアカマツ林まで担子胞子を飛散させることができたと考えられた。一方で、*C. clematidis-apiifoliae* の担子胞子は乾燥耐性を有していた。この性質は、担子胞子の飛散中や発芽中に乾燥状態にさらされても、アカマツへの感染を可能とする重要な性質と考えられるが、間接発芽能

力と乾燥耐性にはトレードオフの関係が見られた。

担子胞子が感染可能なアカマツの部位と成長段階を明らかにするため、アカマツ苗に対する担子胞子接種試験を行った。当年葉に対しては成長段階に拘わらず4種とも感染することができた。*Coleosporium clematidis-apiifoliae*以外の3種では、接種時点で展開中であつた当年葉上で、より多くの孢子堆形成が認められたが、*C. clematidis-apiifoliae*は展葉後の当年葉でより多くの孢子堆が形成された。また、*C. phellodendri*は展開翌年の初夏頃までの1年葉に感染することができた。加えて、*C. phellodendri*は展葉中の針葉に感染した場合は他種と同様に感染の翌年にさび孢子堆を形成するが、展葉後の針葉に感染した場合は感染の2年後にさび孢子堆を形成した。以上のように、種によって、感染可能なアカマツ針葉の葉齢や生長段階や感染後の挙動が異なり、*C. phellodendri*は2年型の生活環と1年葉への感染によって2年葉に多くのさび孢子堆を形成すると考えられた。

本研究の結果、菅平高原実験所において*C. phellodendri*のさび孢子世代の存在量が多いことは、中間宿主上で感染源の供給源である冬孢子世代の存在量が多いこと、および担子胞子の飛散距離を伸ばす間接発芽能力を有することに起因すると考えられた。また、*Coleosporium*属菌4種は、冬孢子・担子胞子の発芽温度範囲、担子胞子の発芽様式、乾燥耐性、感染可能なアカマツ針葉の葉齢、針葉に感染後の挙動等の生理的性質において、それぞれに他の種と比べて生存に有利と考えられる特性を有しており、それぞれに異なる生活史戦略を有していると考えられた。*Coleosporium phellodendri*は分散に特化した戦略を獲得し、*C. clematidis-apiifoliae*は侵入に特化した戦略を獲得していた。*Coleosporium lycopodis*および*C. asterum*は分散あるいは侵入のどちらかに特化しておらず中間型の戦略を有していた。本研究は、同じさび孢子世代宿主を宿主とする系統的に近縁なサビキノの種が、種によって多様な生活史戦略を進化させてきたことを示した。これらの知見はサビキノの生態学的・進化的研究への基礎情報として利用できると考えられる。

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、長くに渡って懇切丁寧な研究のご指導並びに励ましを頂きました。筑波大学生命環境系教授・山岡裕一博士に心より感謝申し上げます。

アドバイザーコミッティ及び博士論文の審査において、筑波大学生命環境系教授・上條隆志博士には生態学的な視点からのご助言や解析についてご助力を頂きました。筑波大学生命環境系准教授・岡根泉博士には、サビキンに関する豊富な知見を背景にご助力やご協力を頂きました。筑波大学生命環境系准教授・廣田充博士には生態学的な視点や調査法についてご助力頂きました。皆様に深く感謝申し上げます。

日本大学薬学部准教授・廣瀬大博士には分子生物学的手法に関するご指導の他、菌類の生態学について様々なご助言を頂きました。首都大学東京都市環境科学研究科助教・高木悦郎博士には生態学的な調査法についてご助言ご助力いただきました。皆様に心より感謝申し上げます。

筑波大学生命環境系助教・阿部淳一ピーター博士には、*Coleosporium* 属菌の分類・生態に関する知見からのご助言の他、研究生活において多くの面でご支援を頂きました。筑波大学生命環境系助教・石賀康博博士には、英語表現においてご指導頂きました。御両名に深く感謝申し上げます。

研究生活を共にし、多くの励ましを頂いた植物寄生菌学研究室の学生の皆様に厚く御礼申し上げます。最後に、私が本研究をまとめることができましたのは、皆様の温かいご指導、ご助言、励ましによる結果であります。皆様に重ねて深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- Anikster, Y. (1986). Teliospore germination in some rust fungi. *Phytopathology*, *76*, 1026-1030.
- Baker, L. G., Spaine, P., & Covert, S. F. (2006). Effect of surface wettability on germination and gene expression in *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* basidiospores. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *68*, 168-175.
- Bauer, H., Plattner, K., & Volgger, W. (2000). Photosynthesis in norway spruce seedlings infected by the needle rust *Chrysomyxa rhododendri*. *Tree physiology*, *20*, 211-216.
- Bauer, R. (1986). Basidiosporenentwicklung und -keimung bei Heterobasidiomyceten. Teil A: Experimentell-ontogenetische und karyologische Untersuchungen an keimenden Rostpilzbasidiosporen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, *99*, 67-81.
- Baxter, D. V. (1931). A preliminary study of *Coleosporium solidaginis* (Schw.) Thum. in forest plantations in the region of the Lake States. *Papers of the Michigan Academy of Science, Arts, and Letters*, *14*, 245-257.
- Bega, R. G. (1960). The effect of environment on germination of sporidia in *Cronartium ribicola*. *Phytopathology*, *50*, 61-69.
- Begon, M., Bennett, M., Bowers, R. G., French, N. P., Hazel, S. M., & Turner, J. (2002). A clarification of transmission terms in host-microparasite models: numbers, densities and areas. *Epidemiology and infection*, *129*, 147-153.
- Bergdahl, D. R., & French, D. W. (1985). *Penetration fo the primary tissues of Pinus banksiana by Cronartium comandrae*. Georgia: Athens University.
- Blank, L. M., & Leathers, C. R. (1963). Environmental and other factors influencing development of southwestern cotton rust (*Puccinia stakmanii*). *Phytopathology*, *53*, 921–928.
- Bretz, F., Hothorn, T., & Westfall, P. (2011). *Multiple Comparisons Using R*. New York: CRC Press.
- Chung, W., Ono, Y., Kakishima, M., & Haung, J. (2009). The new geographical distribution of

- rust fungi from Taiwan. *Taiwania*, *54*, 279-282.
- Cummins, G. B., & Hiratsuka, Y. (2003). *Illustrated genera of rust fungi* (S. Paul Ed.): APS Press.
- Damschen, E. I., Brudvig, L. A., Haddad, N. M., Levey, D. J., Orrock, J. L., & Tewksbury, J. J. (2008). The movement ecology and dynamics of plant communities in fragmented landscapes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, *105*, 19078-19083. doi:10.1073/pnas.0802037105
- Dong, X. L., H., L. B., Zhang, Z. F., Li, B. D., & Xu, X. M. (2006). Effect of environmental conditions on germination and survival of teliospores and basidiospores of the pear rust fungus (*Gymnosporangium asiaticum*). *European Journal of Forest Pathology*, *115*, 341-350.
- Douglas, B., Martin, M., Ben, B., & Steve, W. (2015). Fitting models using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67*(1), 1-48.
- Fagan, W. F., Cantrell, R. S., & Cosner, C. (1999). How habitat edges change species interactions. *American Naturalist*, *153*, 165-182. doi:10.1086/303162
- Flint, K. M., & Thomson, S. V. (2000). Seasonal infection of the weed dyer's woad by a *Puccinia* sp. rust used for biocontrol, and effects of temperature on basidiospore production. *Plant Disease*, *84*, 753-759.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, *2*, 113-118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.
- Gold, R. E., & Mendgen, K. (1991). *Rust basidiospore germlings and disease initiation* (G. T. Cole & H. C. Hoch Eds.). New York.
- Gould, C. J., & Shaw, C. G. (1969). Spore germination in *Chyrsomyxa* spp. *Mycologia*, *61*, 694-717.
- Gray, D. J., Amerson, H. V., & Van Dyke, C. G. (1983). Ultrastructure of the infection and early

- colonization of *Pinus taeda* by *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*. *Mycologia*, 75, 117-130.
- Guo, S., Huang, L., Kang, Z., Cherng, I., & Yang, Z. (2010). Occurrence and expansion of wheat stripe rust under mixed-cultivar planting. *Chinese journal of Eco-Agriculture*, 18, 106-110.
- 浜 武人. (1972). 中部山岳地帯針葉樹の主要さび病に関する研究. *林業試験場研究報告*, 343, 50-61.
- 林 一六. (2003). *植物生態学－基礎と応用－*. 東京: 古今書院.
- Hiratsuka, N., & Kaneko, S. (1976). Aecial states of *Coleosporium horianum* Hennings and *Pucciniastrum corni* Dietel. *Reports of the Tottori Mycological Institute*, 14, 79-84.
- Hiratsuka, N., & Saho, H. (1984). Inoculation experiments with heteroecious species of Japanese rust fungi VI. *Reports of the Tottori Mycological Institute*, 22, 42-44.
- Hirose, D., & Osono, T. (2006). Development and seasonal variations of *Lophodermium* populations on *Pinus thunbergii* needle litter. *Mycoscience*, 47, 242-247.  
doi:10.1007/s10267-006-0299-3
- Hopkin, A. A., Reid, J., Hiratsuka, Y., & Allen, E. (1988). Initial infection and early colonization of *Pinus contorta* by *Endocronartium harknessii* (western gall rust). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 10, 221-227.
- Huang, L., Ju, S., Zhao, J., Zhang, D., Qi-Hong, Teng, L., Yang, F., & Yan-Zuo. (2015). Hyperspectral measurements for estimating vertical infection of yellow rust on winter wheat plant pp. *International Journal of Agriculture & Biology*, 17, 1237-1242.
- Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5, 299-314.
- Imazu, M., Azbukina, Z. M., Kakishima, M., Fukushima, K., Nishimura, K., & Miyaji, M. (2000). Identification of a rust fungus on *Pinus pumila* collected in the North Kurils, Russia.

- Mycoscience*, 41(2), 139-144. doi:10.1007/bf02464322
- Inglis, D. A., Haedorn, D. J., & Rand, R. E. (1988). Use of dry inoculum to evaluate beans for resistance to anthracnose and angular leaf spot. *Plant Disease*, 72, 771-774.
- Ishii, H., Yano, K., Date, H., Furuta, A., Sagehashi, Y., Yamaguchi, T. Sugiyama, T. Nishimura, & Hasayama, W. (2007). Molecular Characterization and Diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. *Phytopathology*, 97, 1458-1466. doi:10.1094/PHYTO-97-11-1458
- 板井美緒. (2008). ツリガネニンジン及びアキノキリンソウに寄生する *Coleosporium* 属さび菌の発生分布. 日本菌学会第 52 回大会講演要旨集.
- Iwamoto, S., & Tokumasu, S. (2001). Dematiaceous hyphomycetes inhabiting decaying blackish needle of *Abies firma* and their distribution in the Kanto district, Japan. *Mycoscience*, 42, 273-279.
- Jennings, D. H., & Lysek, G. (1999). *Fungal Biology: Understanding the Fungal Lifestyle* (2nd Edition ed.). Oxford: Bios Scientific Publishers, Ltd.
- Kaneko, S. (1975a). Two species of *Coleosporium* needle rusts on *Pinus pumila* (PALL.) REGEL. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 16, 128-131.
- Kaneko, S. (1975b). Karyological observations on germination of teliospores and sporidia in *Coleosporium petasitis* (DC.) LEV. *Reports of the Tottori Mycological Institute*, 12, 15-24.
- Kaneko, S. (1977). *Coleosporium pedunculatum*, a new species of pine needle rust. *Reports of the Tottori Mycological Institute*, 15, 13-20.
- Kaneko, S. (1978). Notes on the life cycle and host range of *Coleosporium bletiae* Dietel. *Reports of the Tottori Mycological Institute*, 16, 37-42.
- Kaneko, S. (1981). Species of *Coleosporium* in the Japanese Archipelago. *Reports of the Tottori Mycological Institute*, 19, 159.

- Kaneko, S. (1987). A note on the *Coleosporium* rust species on *Solidago* plants in Japan. *Acta Mycologica Sinica, Supplement, 1*, 153-158.
- Kashiwagi, Y. (1991). Successional development from stands of *Miscanthus sinensis* to stands of *Pinus densiflora* and elements of microclimates: The seed germination and seedling establishment conditions of *P. densiflora*. *Theoretical and applied climatology, 43*, 149-158.
- Korolev, N., David, D. R., & Elad, Y. (2008). The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Biological Control, 53*, 667–683.
- Krebs, C. J. (1972). *The experimental analysis of distribution and abundance*. New York.
- Laine, A.-L., & Hanski, I. (2006). Large-scale spatial dynamics of a specialist plant pathogen in a fragmented landscape. *Journal of Ecology, 94*, 217-226. doi:10.1111/j.1365-2745.2005.01075.x
- Laure, M., Loustau, D., & Dupuis, F. (1992). A time-course study of teliospore germination and basidiospore release in *Melampsora pinitorqua*. *Mycological Research, 96*, 442-446.
- Lauren, L. S., Brenda, L. J., Lars, A. B., & Nick, M. H. (2011). Can dispersal mode predict corridor effects on plant parasites? *Ecology, 92*(8), 1559-1564. doi:10.1890/10-1116.1
- Mabuhay, J. A., Nakagoshi, N., & Horikoshi, T. (2003). Microbial biomass and abundance after forest fire in pine forests in Japan. *Ecological Research, 18*, 431-441.
- MacLachlan, J. D. (1935). The dispersal of viable basidiospores of the *Gymnosporangium* rusts. *Journal of the Arnold Arboretum, 16*, 411–422.
- Masuhara, G., & Katsuya, K. (1992). Mycorrhizal differences between genuine roots and tuberous roots of adult plants of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* (Orchidaceae). *The Botanical Magazine Tokyo, 105*, 453-460.
- Matsukura, K., Hirose, D., Kagami, M., Osono, T., & Yamaoka, Y. (2017). Geographical

- distributions of rhytismataceous fungi on *Camellia japonica* leaf litter in Japan. *Fungal Ecology*, *26*, 37-44. doi:10.1016/j.funeco.2016.11.006
- Mauricio, S. Y., & Anibal, A. (2013). Uredinales (rust fungi) biota of the parque nacional do itatiaia, Brazil: An analysis of composition, species diversity and altitudinal distribution. *Caldasia*, *35*, 165-176.
- Meentemeyer, R. K., Rank, N. E., Anacker, B. L., Rizzo, D. M., & Cushman, H. J. (2008). Influence of land-cover change on the spread of an invasive forest pathogen. *Ecology*, *84*, 159-171. doi:10.1890/07-0232.1
- Melander, L. W., & Craigie, J. H. (1927). Nature of resistance of *Berberis* spp. to *Puccinia graminis*. *Phytopathology*, *17*, 85-114.
- Mendgen, K. (1983). *Development and physiology of teliospores*. London: Academic press.
- Miller, T., Patton, R. F., & Powers, H. N. J. (1980). Mode of infection and early colonization of slash pine seedlings by *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*. *Phytopathology*, *70*, 1206-1208.
- Mims, C. W., & Richardson E, A. (1990). Ultrastructure of secondary spore formation in the rust *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. *Mycologia*, *82*, 236-242.
- 茂木 透, & 勝山輝男. (2000). 木に咲く花—離弁花<2> (山溪ハンディ図鑑). 東京: 山と溪谷社.
- 茂木 透, 城川四郎, & 高橋秀男. (2001). 木に咲く花—合弁花・単子葉・裸子植物 (山溪ハンディ図鑑). 東京: 山と溪谷社.
- Moricca, S., & Ragazzi, A. (1998). Use of RFLP and SSCP analysis to differentiate the pine rusts *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini*. *Mycological Research*, *102*(6), 666-670. doi:10.1017/s0953756297005467
- Mundt, C. C. (2002). Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review fo Phytopathology*, *40*, 381-410.

- 永田芳男, 西田尚道, 菱山忠三郎, & 畔上能力 (1996). *山に咲く花 (山溪谷ハンディ図鑑)*. 東京: 山と溪谷社.
- Nakajima, T., Sonoda, R., & Yaegashi, H. (1996). Effect of a multiline of rice cultivar Sasanishiki and its isogenic lines on suppressing rice blast disease. *Annals of the Phytopathological Society Japan*, *62*, 227-233.
- Nakamura, H., Kaneko, S., Yamaoka, Y., & Kakishima, M. (1998). Differentiation of *Melampsora* rust species on willows in Japan using PCR-RFLP analysis of ITS regions of ribosomal DNA. *Mycoscience*, *39*, 105-113.
- Nicholls, T. H., Patton, R. F., & Van Arsdell, E. P. (1968). Life cycle and seasonal development of *Coleosporium* pine needle rust in Wisconsin. *Phytopathology*, *58*, 822-829.
- 岡野哲郎, 汰木達郎, 小林 元, & 福山宜高. (1994). プラント・キャノピー・アナライザーによる LAI の測定について. *日林九支研論集*, *47*, 69-70.
- Patton, R. F., & Johnson, D. W. (1970). Mode of penetration of needles of eastern white pine by *Cronartium ribicola*. *Phytopathology*, *60*, 977-982.
- Pearson, R. C., Seem, R. C., & Meyer, F. W. (1980). Environmental factors influencing the discharge of basidiospores of *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. *Phytopathology*, *70*, 262-266.
- Petersen, R. H. (1974). The rust fungus life cycle. *Botanical Review*, *40*, 453-513.
- Plantegenest, M., Le May, C., & Fabre, F. (2007). Landscape epidemiology of plant diseases. *Journal of the Royal Society Interface*, *4*, 963-972. doi:10.1098/rsif.2007.1114
- Rayner, A. D. M., & Todd, N. K. (1979). Population and community structure and dynamics of fungi in decaying wood. *Advances in Botanical Research*, *7*, 333-420.
- Roncadori, R. W. (1968). The pathogenicity of secondary and tertiary basidiospores of *Cronartium fusiforme*. *Phytopathology*, *58*, 712-713.
- 佐保春芳. (1963a). ストローブマツ葉さび病に関する研究 VII *Coleosporium eupatorii* A. の小生

- 子感染の有効感染距離について. *日本林学会誌*, 45, 20-24.
- 佐保春芳. (1963b). *Coleosporium phellodendri* Kom. 小生子接種試験. *日本植物病理学会報*, 28, 182-184.
- 佐保春芳. (1968). 五葉松葉さび病に関する研究. *東京大学農学部演習林報告*, 64, 59-148.
- 佐保春芳. (1969). 日本産さび菌ノート3種の *Coleosporium* 属菌の小生子およびさび胞子接種試験. *日本菌学会会報*, 9, 137-139.
- 作山 健. (1973). アカマツの葉さび病菌の種類と生態. *岩手県林業試験場成果報告*, 5, 17-22.
- 作山 健. (1980). アカマツ葉さび病の生態と防除. *岩手県林業試験場成果報告*, 13, 19-28.
- Santos, M. S., Souza, E. S., Junior, R. M. S., Thalhari, S., & Souza, J. V. B. (2010). Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Brazilian Journal*, 43(8), 712-716. doi:10.1590/S0100-879X2010007500065
- 佐竹義輔, 亘理俊次, 原 寛, & 富成忠夫. (1999). *日本の野生植物 木本 <2>*. 東京: 平凡社.
- Snow, G. A. (1968). Basidiospore production by *Cronartium fusiforme* as affected by suboptimal temperatures and preconditioning of teliospores. *Phytopathology*, 58, 1541-1546.
- Spaine, P. C. (1993). Spore exudates and other factors affecting germination type of *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* basidiospores. *Mycologia*, 85, 51-61.
- Spaulding, P., & Rathbun-Gravatt, A. J. (1926). The influence of physical factors on the viability of sporidia of *Cronartium ribicola* Fischer. *Journal of Agricultural Research*, 33, 397-433.
- 鈴木浩之. (2014). *Coleosporium* 属菌のアカマツ上での分布制限要因の解明. *筑波大学生命環境科学研究科修士論文*, 57.
- Talukder, M. M. R., Riazuddin, M., Rahman, M. M., Uddin, M. S., & Khan, M. S. I. (2013). Efficacy of fungicides to control white rust (*Albugo occidentalis*) of red amaranth (*Amaranthus* sp.). *Bangladesh Journal of Plant Pathology*, 28, 15-17.
- Tateishi, T., Horikoshi, T., Tsubota, H., & Takahashi, F. (1989). Application of the chloroform

- fumigation-incubation method to the estimation of soil microbial biomass in burned and unburned Japanese red pine forests. *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 163-172.
- Tokumasu, S. (2001). Geographical distribution of *Sporidesmium goidanichii* in pine forests of Japan. *Mycoscience*, 42, 575-589.
- 徳増征二. (2006). マツ落葉生息微小菌類の生態に関する研究. *日本菌学会会報*, 47, 41-50.
- Tokumasu, S., & Aoiki, T. (2002). A new approach to studying microfungus succession on decaying pine needles in an oceanic subtropical region in Japan. *Fungal Diversity*, 10, 167-183.
- 梅本清作, 村田明夫, & 長井雄治. (1989). ナシ赤星病菌小生子の飛散距離. *日本植物病理学会報*, 55, 250-253.
- Virtudazo, E. V., Nakamura, H., & Kakishima, M. (2001). Phylogenetic analysis of sugarcane rusts based on sequences of ITS, 5.8S rDNA and D1/D2 regions of LSU rDNA. *Journal of General Plant Pathology*, 67(28-36).
- Waterhouse, W. L. (1921). Studies in the physiology of parasitism. VII. Infection of *Berberis vulgaris* by sporidia of *P. gr.* *Annals of Botany*, 35, 557-564.
- Webster, J., & Weber, R. W. S. (2007). *Introduction to fungi* (3rd ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Zambino. (2010). Biology and pathology of ribes and their implications for management of white pine blister rust. *Forest Pathology*, 40, 264-291.
- Zhong-dong, Y., Zheng, W., Yu, D., Peng, S., & Cao, Z. (2017). Half-reserve mitosis of sibling nuclei in *Gymnosporangium asiaticum*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 19, 1025-1030.
- 陣野好之, & 千葉 修. (1967). *Coleosporium paederiae* Dietel ex Hiratsuka によるストローブマツの葉さび病: 病原菌の生活史および形態. *日本林学会誌*, 49, 321-327.
- 陣野好之, & 遠藤 昭. (1964). *Coleosporium eupatorii* Arthur によるキタゴヨウマツの葉さび病について. *日本林学会誌*, 46, 178-181.

- 陣野好之, 遠藤 昭, & 渡瀬 彰. (1965). *Coleosporium eupatorii* Arthur によるストロブマツ  
葉さび病—さび孢子, 夏孢子の感染距離および本病の発生源—. *日本森林学会誌*, 47,  
263-274.
- Zinno, Y., & Kaneko, S. (1984). A needle rust of Japanese red pine caused by a new microcyclic  
*Coleosporium*. *Journal of Japanese forest society*, 66, 462-464.