

第3章 *Mycosphaerella buna* の生活環

新種として記載した主要な内生菌の1種である *M. buna* について、ブナとの関係を明らかにするため、そのブナ上での生活環を解明することを試みた。本種の精子器と偽子のう殻は、落葉した枯死葉に形成されることが知られている。そこで、1) これらの形成時期と子のう胞子の成熟時期を明らかにすること、2) 生葉への感染時期を明らかにすること、3) 生葉への侵入・感染部位を明らかにすることにより *M. buna* の生活環を解明することにした。

1. ブナ落葉における偽子のう殻の出現と開葉時期との関係

ブナ落葉（枯死葉）上における *M. buna* の精子器の形成時期および偽子のう殻内の子のう胞子の成熟時期とブナの開葉時期の関係を明らかにするため、以下の調査・実験を行った。

1-1. 材料と方法

供試試料

1997年11月17日と1998年11月11日に、それぞれ4本の供試木の枯死葉を枝から採取し、ポリネット(30 cm×40cm)に詰め、風で飛ばぬよう供試木の幹に紐で固定し、根元の地面に置いた(図版10)。1997年11月17日に静置した枯死葉からは越冬後の1998年4月12日、5月4日、6月13日、7月19日、9月6日、10月25日に1回の調査につき20葉(1ネット当たり5葉)ずつ採取した。さらに、1998年11月11日に静置した枯死葉からは、越冬後の1999年3月30日、4月25日、5月18日、6月13日、7月18日、8月29日、10月11日に同様に試料を採取した。

観察および発芽試験方法

枯死葉を流水で 10 分間程度丁寧に洗い、蒸留水で 2 回すすぎ、吸水紙に挟み水分を取り除いた。各枯死葉ごとに精子器または偽子のう殻の有無を実体顕微鏡で観察した。精子器または偽子のう殻が認められた場合は、これらの切片をフリーズマイクロトームを用いて作成した。ラクトフクシン、ラクトフェノールおよびラクトコットンブルーで切片を染色後、ラッカーまたはマニキュアで封入し、プレパラートを作成してノマルスキー型顕微鏡で観察した。

子のう胞子の成熟は、発芽試験によって確かめた。偽子のう殻内から取り出した子のう束を滅菌スライドガラスとカバーガラスの間に挟んで押し、子のう胞子をばらばらにして 1%MA 培地上に散布し、20℃暗黒下で培養し、24 時間後に発芽状態を観察した。

精子器または成熟偽子のう殻の出現頻度 (PF) は、以下の計算式で算出した。

$$PF (\%) = P_i / P_t \times 100$$

P_i : 精子器または成熟した子のう胞子をもつ偽子のう殻が観察された枯死葉数

P_t : 全枯死葉数(20 枚)

1-2. 結果と考察

精子器(図 5)は、落葉時期の 1997 年 11 月および 1998 年 11 月に観察したほぼ全ての枯死葉上で確認された。越冬後の枯死葉上では 1998 年 4 月 12 日に 20% の出現頻度であったが、5 月 4 日以降の枯死葉上に精子器は観察されなかった。また、1999 年 3 月 30 日に 80% の高い出現頻度で観察され、4 月 25 日にも 15% の出現頻度で観察されたが、5 月 18 日以降の枯死葉上には前年同様に精子器は観察されなかった。

偽子のう殻(図 5)は、1998 年 4 月 12 日に枯死葉上で未熟な子のうをもつもののみが観察された。しかし、5 月 4 日に成熟した子のう胞子をもつ偽子のう

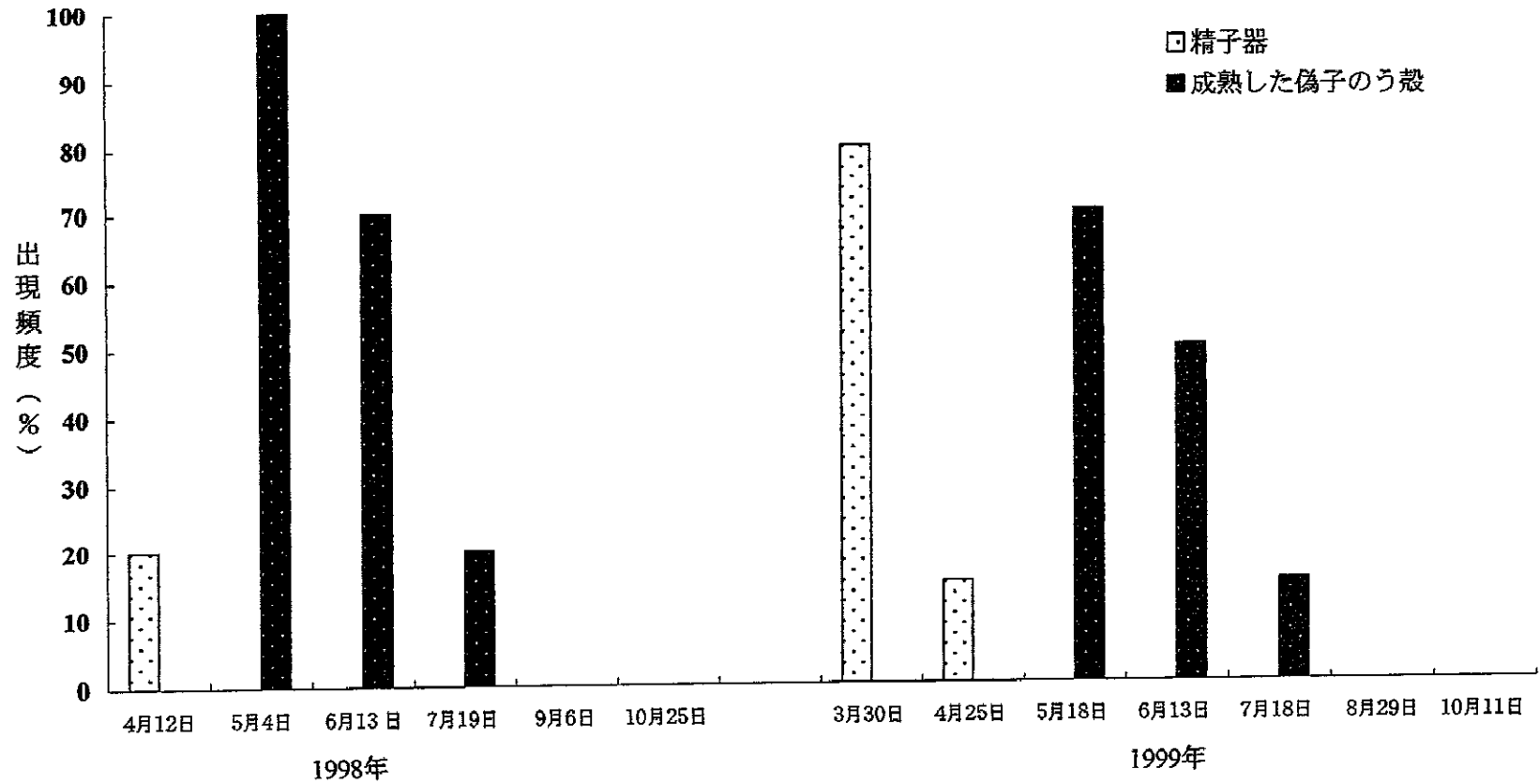


図5. プナ越冬枯死葉上における *Mycosphaerella buna* の精子器および成熟した偽子のう殻の出現頻度

殻が 100%の出現頻度で観察され、6月13日には、70%、7月19日においても20%の出現頻度で枯死葉上で成熟した偽子のう殻が観察された。9月6日以降の枯死葉には、子のうおよび子のう胞子は確認されず、空になった偽子のう殻のみ子座の中に残存しているのが観察された。また、1999年3月30日および4月25日に枯死葉上で未熟な子のうをもつもののみ観察された。しかし、5月18日に成熟した子のう胞子をもつ偽子のう殻が70%の出現頻度で確認された。その後6月13日に50%、7月18日に15%の出現頻度で観察された。しかし、8月29日以降は、子のうおよび子のう胞子は確認されず、空になった偽子のう殻のみ子座の中に残存しているのが観察された。

5月、6月および7月における発芽試験の結果、子のう胞子の発芽率は、毎回90%を越えていた。

小川学術参考保護林内のブナ葉は、1998年には5月4日に約50%が開葉していたことから、開葉時期は4月下旬から5月中旬であり、1999年には、4月25日の時点では冬芽からの新葉の展開が認められず、5月18日に50%以上開葉していたことから、開葉時期は5月初旬から下旬であったと推察できる。

以上の結果から、精子器は落葉直後から形成され、越冬後の4月まで観察されることが明らかになった。偽子のう殻内に成熟した子のう胞子が、5月から7月に観察され、特に5月に最も高頻度に見られたことから、子のう胞子の成熟時期とブナの開葉時期は、図6に示したようにほぼ一致することも明らかになった。このことから、子のう胞子による開葉したブナへの感染が示唆された。

1998年に比較して、1999年における枯死葉上の成熟した子のう胞子をもつ偽子のう殻の頻度の減少およびブナの開葉時期の遅れは、1998年11月から1999年2月にかけての実験地一帯の異常な降水量の減少、すなわち11月、1月、2月は平年の1%、23%、43%の降水量(小川学術参考保護林に最も近い花園測候

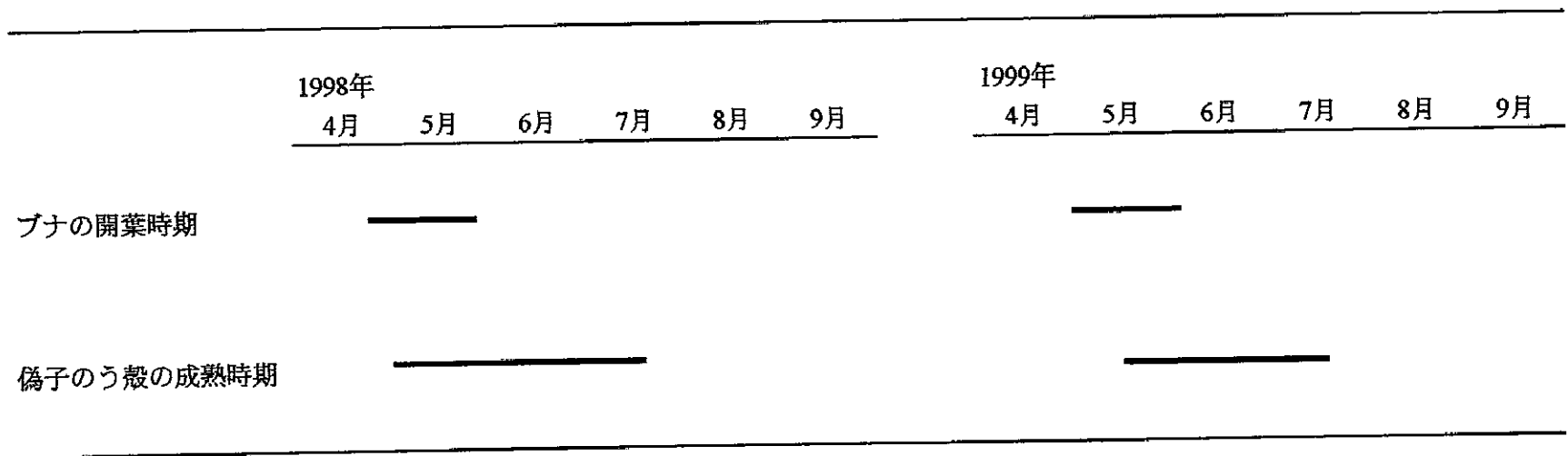


図6. ブナの開葉時期および*Mycosphaerella buna* の偽子のう殻の成熟時期

所データ、図 4)が一因であると考えられた。

2. ブナ生葉への感染時期

Mycosphaerella buna は葉のみから出現し、また、落葉上の子のう胞子の成熟時期が開葉時期と一致することから、ブナ生葉への感染は子のう胞子による可能性が極めて高いと推測された。そこで子のう胞子の生葉への感染を明らかにするため、開葉前の越冬冬芽を含む小枝を被覆して、感染源と考えられる胞子の汚染を除いた状態で展開した生葉における *M. buna* の出現の有無を調査した。また、無病徴のブナ生葉から高頻度に出現する *M. buna* は、季節がすすむにつれて出現頻度が増加する傾向がみられた。この出現頻度の増加の要因は、葉内での菌の伸展あるいは新たな散布体による葉への感染あるいはその両者によるものと考えられた。そこで、試験地において *M. buna* の葉への感染時期を明らかにするため、無感染ブナ実生苗を試験地に置き、その生葉からの *M. buna* の出現の有無を分離試験によって確認した。

2-1. 被覆実験

開葉前の数個の冬芽を持った枝を透明なポリエチレン製袋で被覆し、被覆した生葉・葉柄・当年生枝からの *M. buna* の出現の有無について開葉時期の5月から落葉時期の10月まで5回の調査を行った。

2-1-1. 材料と方法

1999年3月30日に前述の9本の供試木の高さ約2mの枝に各2カ所ずつ透明なポリエチレン製袋をかぶせた。袋のサイズは、500×600mm、厚さ0.025mmで、開口部に遠い部分に8cm間隔でコルクボーラーで直径12mmの通気用の穴を10カ所空けた。その穴には直径18mm、PTFE 0.45 μ mのミリシール(Nihon Millipore LTD)を貼り、外からの胞子等の侵入を防いだ。袋は、雨水が入らないように袋の口が下向きになるよう枝に結びつけた。また、Wilson and Carroll

(1994)は、降雨の中の多量の *Discula quercina* 分生子により *Quercus garryana* Dougl.の生葉へ感染が引き起こされると述べていることから、雨水が袋内に入らないように工夫した。雨水を防ぐため、袋の口より幹に近い枝に麻縄を巻き付け、両端を少し長めにたらし、紐を伝って雨水が流れ落ちるようにした(図版 11-A)。試料は、5月18日、6月13日(図版 11-B)、7月18日(図版 11-C)、8月29日、10月11日に、1供試木につき、生葉、葉柄、当年生枝のそれぞれから計 45 試料を採取した。また、同時期、同じ高さの無被覆の生葉、葉柄、当年生枝からそれぞれ 45 試料を採取した。

分離培養法は、第2章 1-1の方法に準じた。

葉の被覆による影響を調査するため、被覆した内部温度と外気温を、小川学術参考保護林内の1供試木にて BoxCar Pro. 4.0 気温測定装置(米国オンセツトコンピュータ社)を用いて、1999年8月13日から9月3日まで30分間隔で3週間測定した。小川学術参考保護林の気温は、1986年から1995年の10年間の月平均データ(Mizoguchi et al., 2002)によると最も暑い月は8月で平均 22.6°C(Max. 27.8°C、Min. 18.9°C)であった。したがって、最も暑い時期の8月13日から9月3日までの3週間の外気温および袋内部の温度を測定した。

Mycosphaerella buna の生育における温度の影響を確認するため、2菌株(MSP9901, CSSP9903)を用いて、5°Cから35°Cまで7段階の温度を設定し、第2章で用いた PDA 培地、2%MA 培地、LCA 培地の3種類の培地上での生育試験を行った。菌の生育は、10日間培養したコロニーの直交する直径を測定した。

2-1-2. 結果と考察

Mycosphaerella buna は、被覆した生葉からは、分離されなかった(図7)。一方、同時期に採取した無被覆の生葉からは、7~10月に高頻度に出現した。ま

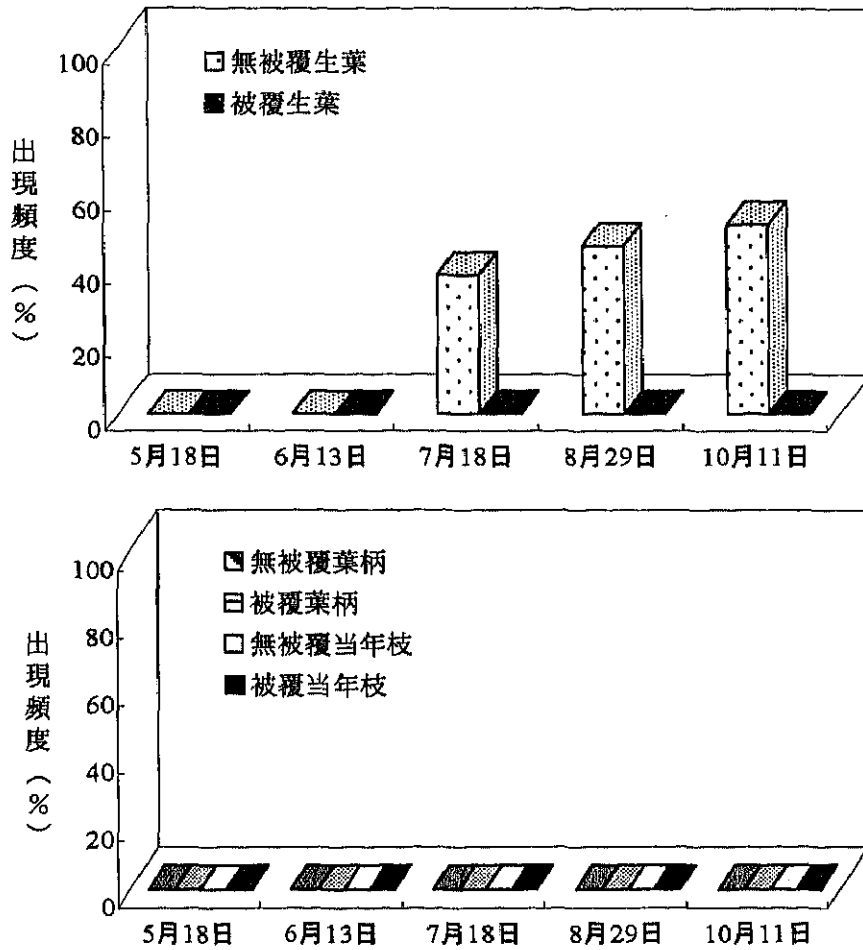


図7. 被覆および無被覆の生葉、葉柄、当年枝における *Mycosphaerella buna* の出現頻度

た、被覆および無被覆の葉柄および当年生枝からも *M. buna* は、分離されなかった。以上の結果から、ブナ生葉に内生的に生息する *M. buna* の感染源は子のう胞子など風等で散布されている可能性が大きいことが示唆された。

被覆生葉から *M. buna* が出現しなかった要因として 7~8 月の袋内部の高温による感染源である胞子等の死滅も否定できなかったため、外気温と袋内部の温度の違いを調査した。その結果、袋内部温度と外気温の温度パターンは非常に類似していたが、袋内部温度は外気温に較べ約 1℃高かった。最高値は、9 月 2 日の内部温度 29.7℃(外気温 29.2℃)で、最低値は、8 月 14 日の内部温度 16.3℃(外気温 16.3℃)であった。内部温度と外気温の最も大きい差は、8 月 22 日の 1.6℃(内部温度 26.8℃、外気温 25.2℃)であった。袋内部の温度が約 1℃しか上昇しなかった理由として、フィルターからの空気の出入りがあったことと直射日光のほとんどが上層の樹冠により遮られたことが考えられた。

また、*M. buna* のコロニー (図 8)は、PDA、2%MA、LCA 培地のいずれにおいても 0℃および 35℃においては生育しなかったが、15℃から 30℃の間では良好であった。これらのことから被覆したことによる温度の影響は、ほとんどないことが推察された。

Wilson (1996)は、野外の *Q. garryana* および *Q. emoryi* Torr.の枝を透明なポリエチレン製の袋で覆い、*Discula quercina* (Westend.) Arx, *Asteromella* sp. および *Plectrophomella* sp.の胞子懸濁液を散布することにより生葉への感染について調査した。Wilson の実験は、本研究と異なり、袋の底をネット状にして通気性を保ったため、外からの散布体による影響もわずかに見られたが、胞子等による空気伝染を防ぐのに有効な方法であると述べている。

2-2. ブナ実生苗を用いた感染実験

小川学術参考保護林に自生しているブナでは、ブナ葉生育期以降の生葉に

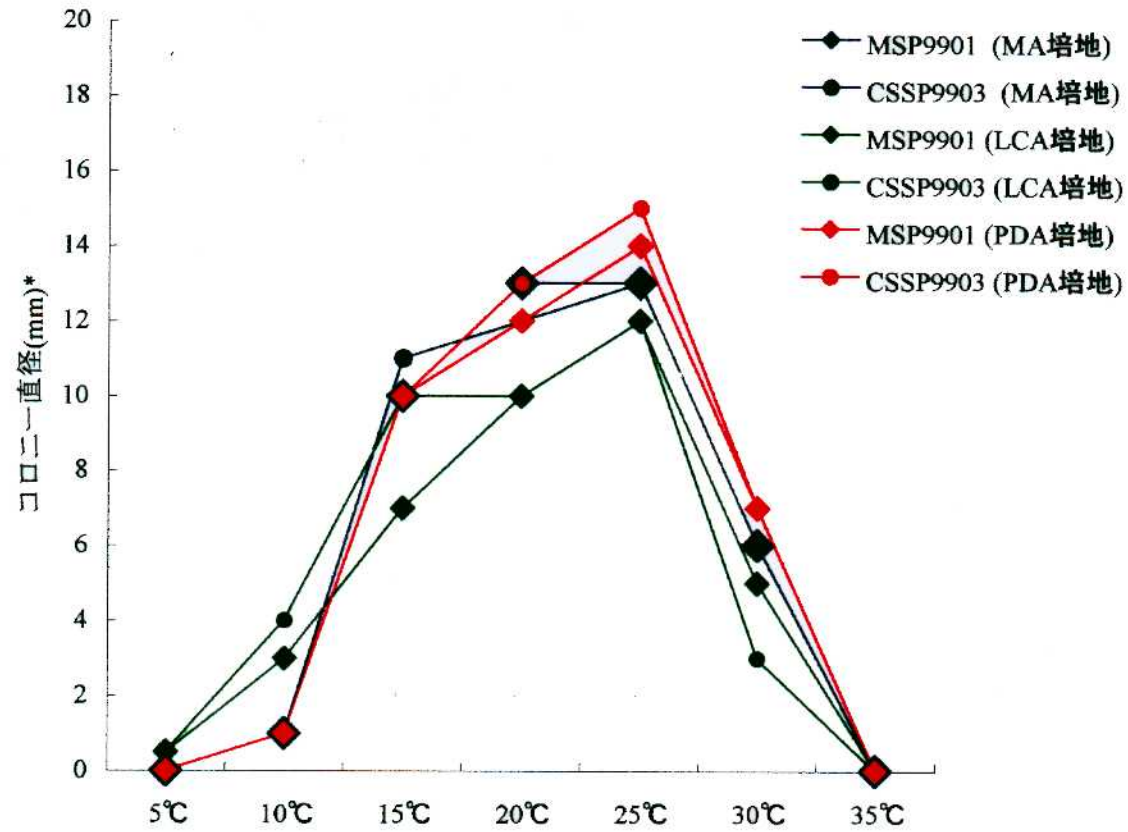


図8. *Mycosphaerella buna* の2菌株(MSP9901, CSSP9903)の3培地上における温度別生育試験
* 2%MA, LCA, PDA培地上での10日目のコロニー直径(mm)

M. buna が出現したが、葉への感染時期は不明である。そこで、感染時期を推定するため、同保護林内に無感染ブナ実生苗を植えた鉢を静置し、*M. buna* の感染の有無を調査した。

2-2-1. 材料と方法

グロースチャンパー（昼 22℃夜 18℃15 時間照明最大 26,000 lux, 湿度 85%～90%）内で生育させた 2 年生のブナ実生苗 1 本を植えた 12 個の鉢を準備した。このうちの 4 鉢は、1998 年 6 月 13 日に小川学術参考保護林に移し、1 供試木近くの地面に軽く鉢を埋め、7 月 18 日まで静置した。また、4 鉢は、同年 9 月 6 日に小川学術参考林に移し、上記の 4 鉢に隣接して同様の方法で 10 月 25 日まで静置した。残りの 4 鉢は、コントロールとしてグロースチャンパー内に保ち育てた(図版 11-D)。それぞれ 7 月 18 日および 10 月 25 日に生葉を各実生苗につき 10 葉、計 40 葉ずつ採取した。コントロールの実生苗も野外からものと同時期に計 40 葉ずつ採取し、菌の存在の有無を確認するため分離試験に供試した。

分離培養法および出現頻度算出法は第 2 章 3-1 の方法に準じた。

2-2-2. 結果と考察

実験結果は図 9 に示した。調査林内に静置した鉢植えブナ実生苗の生葉からの *M. buna* の出現頻度は、7 月 18 日は 25%、10 月 25 日は 44%であった。一方、グロースチャンパーに保ったブナ実生苗生葉からは、全く菌類が分離されなかった。

小川学術参考林内に静置した無感染ブナ実生苗の生葉から *M. buna* が出現したことにより、林内に *M. buna* の感染源が存在することが明らかになった。

6～7 月は、実生苗の葉の生育期であり、かつ第 3 章 1-2 の結果から明ら

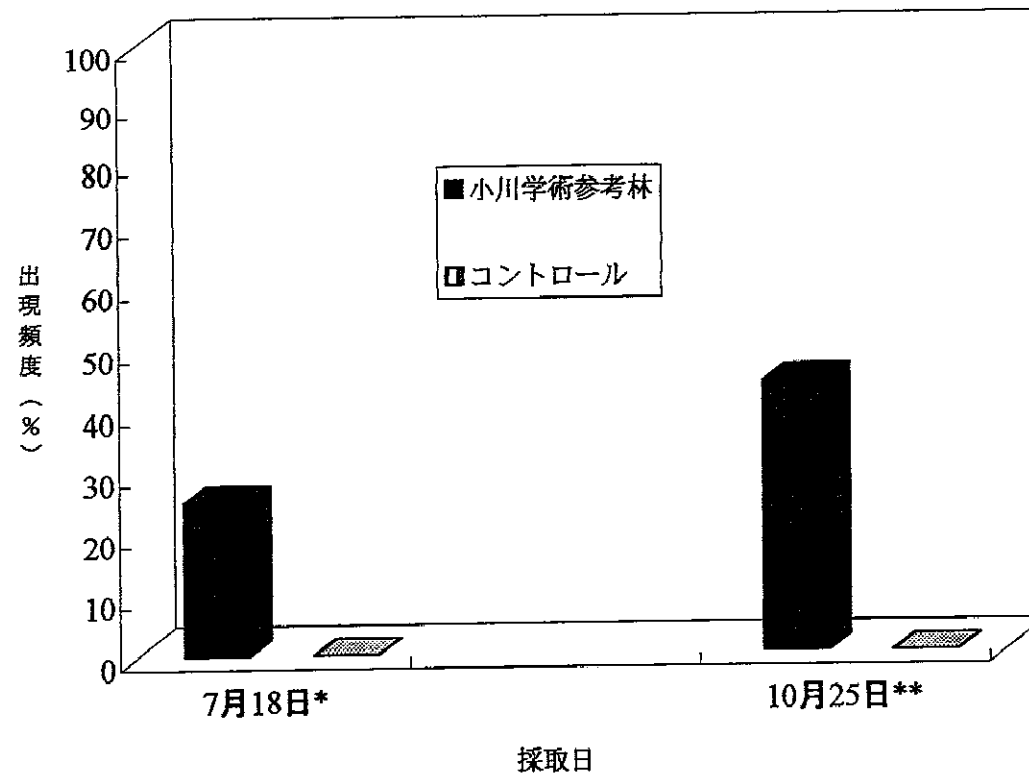


図9. 小川学術参考林内に設置した鉢植えブナ実生苗の生葉における *Mycosphaerella buma* の出現頻度

* 6月13日～7月18日（鉢の静置期間）

** 9月6日～10月25日（鉢の静置期間）

かなように落葉上の子のう胞子の飛散時期である。したがって、子のう胞子による生育期のブナ葉への感染が示唆された。また、9～10月は、実生苗葉の成熟期から黄葉期であり、落葉上に子のう胞子の形成が観察されなかった時期であるが、生葉から *M. buna* が出現したことは、成熟期のブナ葉への子のう胞子以外の分散体による感染が示唆された。野外で採取後湿室内に保った落葉上に分生子座や分生子の形成が認められることや培地上の葉片上には分生子が形成されることから分生子による感染も考えられるが今後の検討が必要である。また、感染源がブナ以外の樹種の落葉に形成される可能性も否定できない。他の樹種の落葉上での *M. buna* の偽子のう殻または分生子の存在も詳細に調査する必要がある。

3. ブナ生葉への侵入・感染

無病徴のブナ葉に *M. buna* が潜在すること、子のう胞子や分生子により生葉への感染が起こることが示唆されることは、すでに第3章2-2で述べたが、本菌がブナ葉へどこから侵入し、葉内のどこに存在しているのかは不明のままである。そこで、*M. buna* のブナ葉への侵入経路と組織内での存在部位を明らかにすることを目的として、子のう胞子および分生子を鉢植えブナ実生苗の生葉へ接種し、経時的観察を行った。また、観察した菌が *M. buna* であるかどうかを検証するため、同時期に接種葉からの分離試験を行った。

3-1. 材料と方法

被接種植物

グロースチャンパー（昼 22℃夜 18℃15 時間照明最大 26,000lux, 湿度 85%~90%）内で種子から生育させた3年生ブナを1鉢に1本ずつ植えたもの6鉢を使用した。

接種源

Mycosphaerella buna の1菌株 MSP9901 をオートクレーブ滅菌葉へ接種し、分生子(*Pseudocercospora* 属)を形成させた。その分生子を滅菌蒸留水に懸濁し、分生子懸濁液（約 10^5 /ml）を作成し、ブナ生葉への接種に用いた。また、子のう胞子は、2000年5月13日小川学術参考林にて採取の落葉上の偽子のう殻内から子のうを滅菌スライドグラス上に取りだし、滅菌カバーグラスの上から押しつぶし、子のう胞子を得た。顕微鏡で *M. buna* の子のう胞子であることを確認後、滅菌水を入れた滅菌ホールスライドに既述の子のう胞子を集め、子のう胞子懸濁液(約 10^5 /ml)として接種に用いた。

接種方法(図 10、図版 12)

ラベル用シールに直径 4mm および 12mm のコルクボーラーで二重の同心円

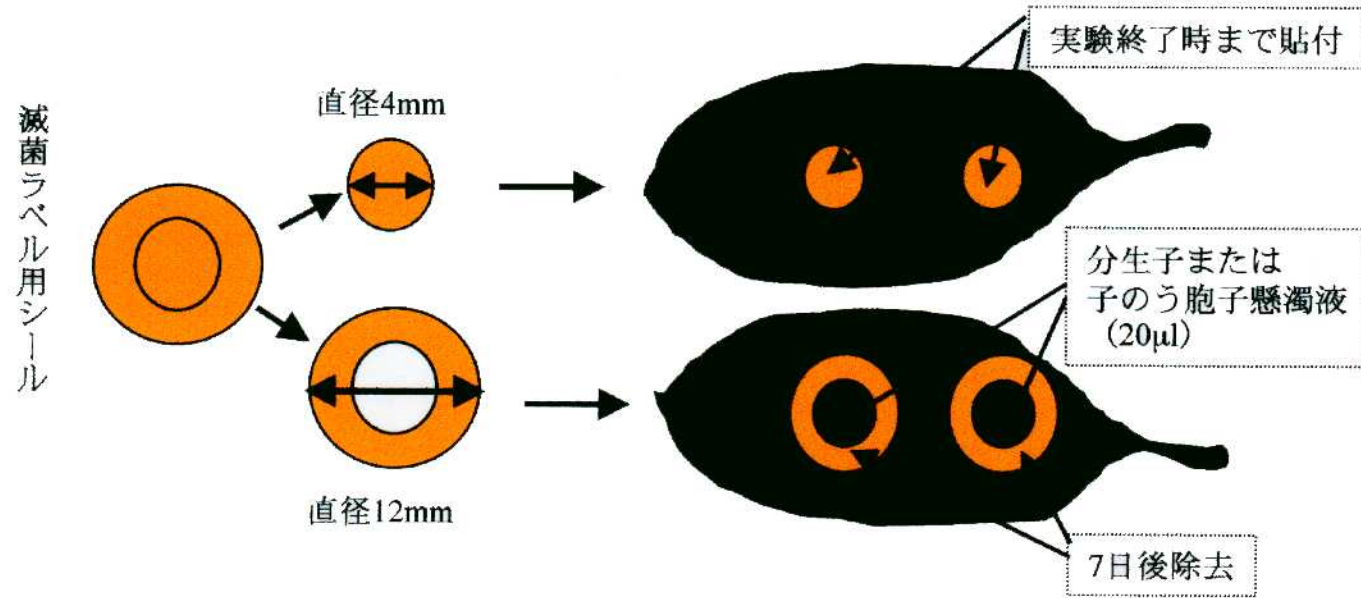


図10. *Mycosphaerella bura*の子嚢胞子および分生子懸濁液のブナ葉への接種方法

状に切り込みを入れ、オートクレーブ滅菌した。実生苗の開葉約 40 日後の生葉の両面を、70%エタノールを含む綿で拭いた後、ピンセットで葉の表側に直径4mmの小さい方のシール、裏面に中心部に直径4mmの穴の空いた直径12mmのシールを1葉に1~3カ所貼り付けた。分生子および子のう胞子懸濁液は、滅菌済みマイクロピペットで20 μ lずつブナ葉裏面のラベル用シールの空洞になっている中心部へ接種した。分生子懸濁液を接種した苗2鉢、子のう胞子懸濁液を接種した苗2鉢、さらにその対照として、ラベル用シールを貼り、滅菌蒸留水を滴下した2鉢を準備した。接種後3日間17℃湿度100%の暗黒下に保ち、その後元のグロースチャンバー内に戻し生育させた。7日後に裏面のシールを葉面より取り去ったが、接種位置の目印として表側の小円のシールは、実験終了時までそのままにした。

顕微鏡観察用試料

接種2日、7日、18日、30日、90日後に採取した接種部ディスク葉片(直径7mm)を用いた。

光学顕微鏡用試料は、染色・脱色のためエタノール・アニリンブルー溶液約10mlを入れた18mm試験管中に入れ、ガスバーナーで試料の入った溶液を1分間沸騰させ、火から放し、再度1分間沸騰させた。処理した試料を2日間室温に放置後、抱水クロラール(トリクロロアセトアルデヒド水和物、和光純薬工業)溶液に30~50分浸漬後、スライドグラスに載せ、50%グリセリン溶液でマウントし、光学顕微鏡で観察した。

走査型電子顕微鏡試料は、断面観察のため、両刃カミソリで切り込みを入れ、5ml用サンプル管ピンに1%カコジル酸バッファで2.5%に調整したグルタルアルデヒド溶液約2mlを注ぎ、その中に試料を入れた。試料の気泡除去のため、エバポレーターで約10分間吸引後、4℃で24時間浸漬した。試料は、1%カコジル酸バッファで30分ずつ2回洗浄後、エタノールシリーズ(50%, 70%, 90%,

95%エタノール溶液に順次各 30 分浸漬後 100%エタノール溶液 2 回各 30 分) 脱水後、酢酸イソアミルに置換(酢酸イソアミル:100%エタノール溶液;1:3, 1:3, 3:1 溶液各 30 分ずつ浸漬後、100%酢酸イソアミル 2 回 30 分ずつ浸漬) した。次ぎに、臨界点乾燥 (HCP-2 形日立臨界点乾燥装置、日立工機) を行った。試料から葉の表裏の目印にした糸をはずし、実体下で試料台 (15cm×7cm、日新 EM) に両面テープで固定した。イオンスパッター装置 (E-1030 形日立イオンスパッター、日立サイエンスシステムズ) で白金パラジウムコーティングを行い、走査型電子顕微鏡(S-4200 電界放出形走査電子顕微鏡、日立製作所)で観察を行った。

分離試験用試料

接種 2 日, 7 日, 18 日, 30 日後に採取した顕微鏡観察用試料と同一の接種部のディスク葉片 (直径7mm)を分離用の試料とした。また、90 日後に電子顕微鏡観察用試料と同じ枝の葉を10葉採取し、接種部、非接種部、葉柄を含む全葉 (約 7mm幅に分割) を試料とした。

培養方法

表面殺菌は、第 2 章 1 - 1 の方法で行った後、1%MA培地に静置し、20℃ 暗黒下で培養し、10 日目に観察した。90 日後の葉は、1シャーレ内に1葉全体を置き、同様に培養し、10 日目に観察した。

3 - 2 . 結果と考察

子のう胞子接種試料および分生子接種試料の観察結果に違いは認められなかった。接種 2 日後の試料(図版 13-A, C)では、葉表面上で子のう胞子および分生子共に良好に胞子先端および側面から発芽しているのが観察された。接種 7 日後の試料では、発芽管が良好に生育し、その先端が孔辺細胞に密着しているものや気孔へ到達しているもの(図版 13-B, D)が多く見られた。接種 18 日後

の試料では、孔辺細胞に密着しているものが多く観察され(図版 14-A, B)、切断面の観察では、孔辺細胞下の細胞間隙に菌糸が認められた(図版 14-C)。接種 30 日後の試料では、表皮下の細胞間隙に菌糸が存在し、分枝しているものも見られた(図版 14-D, E)。接種 3 ヶ月後の試料では、表皮下および海綿状組織の細胞間隙で分枝した菌糸や膨らみを形成した菌糸が観察され(図版 15-A, B, C)、まれに柵状組織上部にまで達しているものも観察された(図版 15-D)。

分離試験の結果、表9に示したように、子う胞子接種試料および分生子接種試料において共に、接種 2日, 7日, 18日, 30日後の接種部ディスク葉片の10日目の培養結果は、2日, 7日後の葉片からは本菌もそれ以外の菌類も出現しなかった。18日, 30日後葉片では、本菌のみ出現した。また、90日後の葉の10日目の培養結果は、接種部葉片に本菌のみ出現が見られ、精子器形成が観察された葉片も確認された。非接種部葉片および葉柄では、菌類は出現しなかった。これに対して、対照の葉片からは、まったく菌類が分離されなかった。

以上の結果より、*M. buna* の葉内への侵入・感染は、模式図(図 11)に示したように、葉表面で子う胞子や分生子が発芽し、伸長した発芽管や菌糸の一部が気孔や孔辺細胞から侵入することによって達成され、菌糸は表皮細胞下および海綿状組織の細胞間隙へと伸長する。そして極めてまれに柵状組織上部の細胞間隙にまで達するものと考えられる。

接種 2 日および 7 日後の葉片から菌が分離されなかった原因は、葉の表面殺菌により葉表面の胞子、発芽管および十分に組織内に伸展していない菌糸が死滅したかまたは葉表面から流出してしまったことによると考えられる。小川学術参考保護林内の調査結果において 5 月の新葉から本菌が分離されなかったのも、同様に表面の子う胞子が表面殺菌で死滅したか殺菌に耐えられるほど十分には組織内に菌糸が伸展していなかったことが推察される。

Suske and Acker (1987, 1989, 1990)は、野外のドイツトウヒ(*Picea abies*)の針葉

表9. 接種生葉における*Mycosphaerella buna*の出現の有無

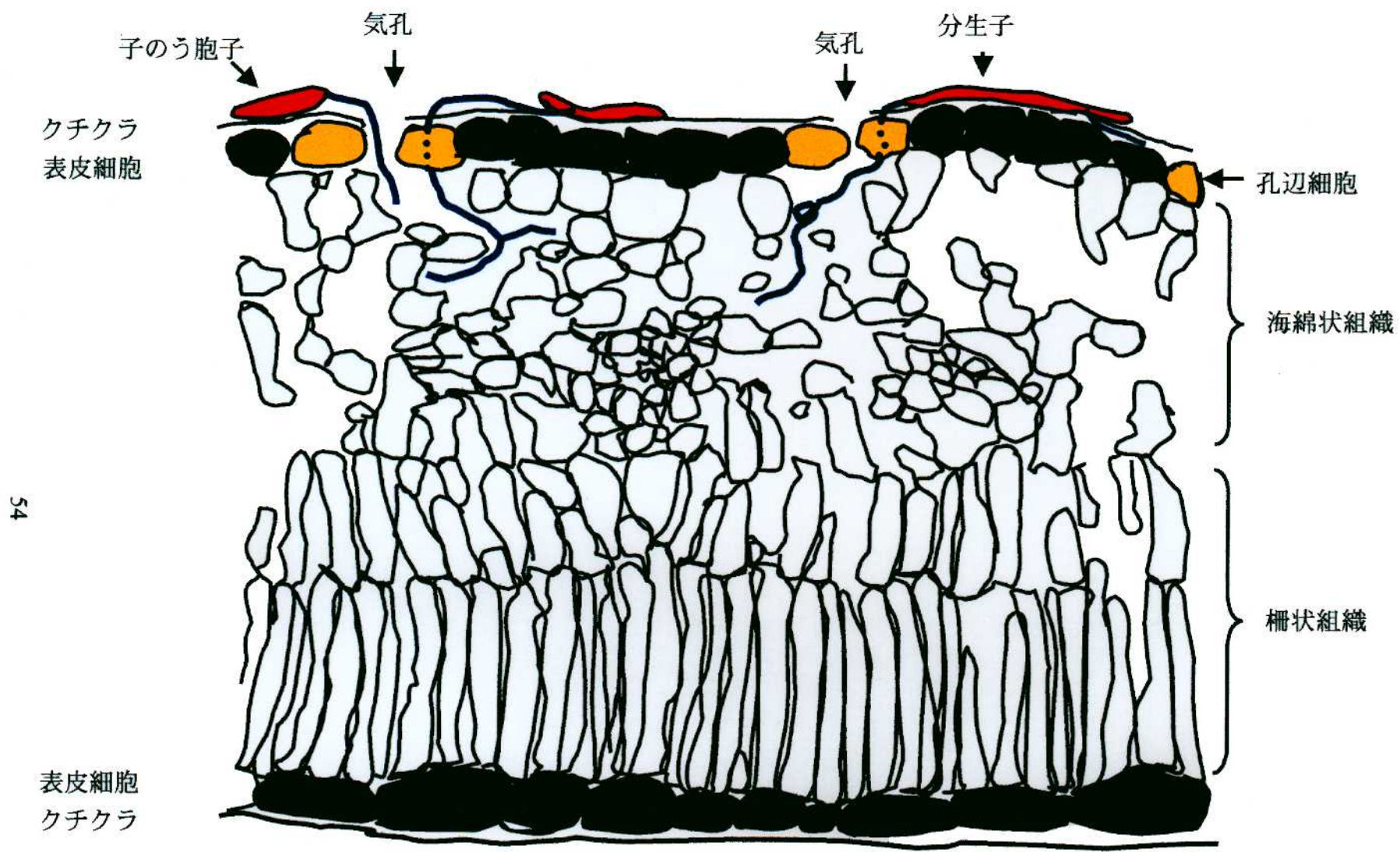
(培養10日目の結果)

接種日から採取 までの日数	2日	7日	18日	30日	90日	
分離・培養部位	ID	ID	ID	ID	IS	NI
分生子接種	-	-	+	+	+	-
子のう胞子接種	-	-	+	+	+	-
コントロール	-	-	-	-	-	-

*Mycosphaerella buna*の出現

+ : 有, - : 無

ID: 接種部ディスク葉片, IS: 接種部葉片, NI: 接種部を含まない葉片



54

図11. *Mycosphaerella bura* のブナ葉への侵入経路および存在部位の模式図

の解剖学的観察から無病徴の当年生やそれ以上の葉齢の針葉の葉肉組織の細胞間隙および細胞内に *Lophodermium piceae* の菌糸が観察され、細胞間隙の菌糸には分枝や顕著に膨らんだ部分も観察されたと報告している。また、ヨーロッパパプナの内生菌として知られる *Discula umbrinella* でも葉の孔辺細胞付近からの菌糸の侵入や表皮細胞および葉肉組織の細胞間隙の菌糸の存在が報告されている(Viret et al., 1993; Viret and Petrini, 1994; Viret et al., 1994)。このことから、本菌もブナ葉へ気孔周辺から侵入し、葉肉組織の細胞間隙に菌糸が存在していることが示唆された。