

琉球列島のマングローブの樹木内生菌の寄生性および病原性

琉球大学大学院農学研究科 吉崎 走
琉球大学農学部 亀山 統一

Infectability and pathogenicity of endophytic fungi of mangrove trees in the Ryukyu Islands

So YOSHIZAKI (Graduate School of Agriculture, University of the Ryukyus)

Norikazu KAMEYAMA (Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus)

1. はじめに

マングローブ林は、熱帯・亜熱帯地域の潮間帯に成立する。潮間帯の前方では地表は常に冠水し、陸上植物が生育することはない。後背には連続して陸上森林が出現する。陸上森林と比較して、潮汐により周期的に塩分を含む水に樹冠下部が冠水すること、潮汐や河川流により林床の落葉落枝は土壌表面に安定せずに移動すること、しばしば強い潮風にさらされ樹体へ着塩することなどは、マングローブ林の大きな特徴である。一般の陸上森林の構成樹種における内生菌の多くは汎先駆落葉分解菌としての働きが知られている。すなわち、陸上森林では、その林床のリターが内生菌の重要な供給源と考えられる²⁾。しかし、マングローブ林においては、潮汐により林床のリターが安定して留まれないことなどから、内生菌の胞子の供給・感染の環境が大きく異なる。

そこで筆者らは、マングローブ林の後背林が、マングローブにおける内生菌群の重要な接種源である可能性に着目し、マングローブ林における樹木内生菌相とその後背林との関係について研究を進めてきた。その結果、マングローブと後背林の構成樹種の多くに共通して、*Colletotrichum* sp. 1、*Phyllosticta* sp.、*Phomopsis* sp. 1などが優占的に分離され、他に多種の内生菌が低率で分離された。マングローブと後背林の構成樹種から分離される内生菌には、共通のものも多いが、マングローブのみから分離される内生菌もあった。また、茎からはあまり分離されない *Phyllosticta* sp. が、展葉を終えたばかりの若い葉や大潮の際冠水する樹冠下部からも分離された。これらのことから、陸上森林がマングローブの内生菌群の接種源である可能性や、マングローブのシュートにおける内生菌の速やかな感染・定着が示唆された¹⁾。

マングローブ林と後背の陸上森林において、共通する内生菌の宿主への感染過程は同一であるのか。また、マングローブに特異的に内生する菌があるならば、その感染過程はマングローブ環境に影響を受けているのか。こうした内生菌の感染過程にマングローブ環境が及ぼす影響は検討に値する。一方、これまでに分離された多様な内生菌の宿主との相互関係、特に潜在的な病原性なども検討されるべきである。そこで筆者らは、琉球列島のマングローブから分離された樹木内生菌の感染性や病原性を検討するため、分離菌株の宿主への接種試験を試みた。その第一段階として、1) 実験室条件下でのメヒルギ葉面への接種方法の確立を目指し、その接種方法で示される主要な樹木内生菌のメヒルギ葉への感染性および病原性を検討した。次に、2) メヒルギから優占的に分離される菌群と、それら菌群と比較して低率で分離される菌群との間に感染力や病原性に違いがあるのか、確立さ

れた接種方法により比較検討した。

2. 材料および方法

接種試験の対象樹種はメヒルギ *Kandelia candel* (L.) Druce とし、外見上健全な成葉への実験室条件での接種を試みた。メヒルギのシュートは沖縄島比屋根湿地(沖縄市)で採取した。

実験室条件で切り取った葉やポット苗への接種試験を想定し、接種期間中の葉の萎凋や壊死を防ぐため、葉柄の切り口をワセリンで封じ、温室に置く等の処理を試みるとともに、葉面に付傷する方法も検討した。

接種は孢子(分生子)によることとし、供試する分離菌株は、メヒルギから優占的に分離される *Colletotrichum* sp. 1、*Phyllosticta* sp.、*Phomopsis* sp. 1、*Pestalotiopsis* sp. 1 とした。接種部に培養菌叢から得た孢子懸濁液を一定量安定して塗布するために、糊などで粘性をあげた孢子懸濁液を塗布する方法、また、様々な内径・材質のリング(高さ数 mm)を葉面に接着し、その中に一定量の懸濁液を滴下する方法を試し、もっとも簡易で確実な方法を検討した。接種区は、無傷・付傷(強度・軽度)の葉の表、無傷の葉の裏の3区とし、滅菌水処理した対照区を設けた。接種後、供試材料の状態、接種部における孢子の発芽・菌糸の伸長の状況、病徴形成・進展について肉眼・実体鏡・光顕で観察し、一週間後に接種部位からの菌の分離を試みた。病徴形成・進展については、滅菌水処理した対照区と比較して、接種部の変色の有無で評価し、変色の濃さの程度で変色大、変色中、変色小に類別した。

次に確立された接種方法により、メヒルギから比較的低率で分離される *Pestalotiopsis* sp. 2、*Cladosporium* sp. 1、*Seimatosporium* sp. のメヒルギ葉への接種試験を試みた。接種区は、無傷・付傷(強度のみ)の葉の表の2区とし、対照区として滅菌水および前実験で供試した *Colletotrichum* sp. 1 を処理した区を設けた。接種一週間後に接種部位からの菌の分離を試みた。

3. 結果および考察

メヒルギのシュートを流水洗浄後、葉を葉柄から切り取り、80%エタノールで葉表面を清拭し、切り口をワセリンで封じて室温(22℃)・温室下に置いたところ、一週間以上葉肉組織が外観上健全に保たれた。また、葉表面に乾熱滅菌処理した220番の紙ヤスリをかけると、安定して表皮組織に付傷でき、かつ、上記条件の培養期間中、葉身組織に顕著な壊死は生じなかった。軽度の付傷方法として、葉表面を針穿刺で付傷した。この場合も、葉身組織に顕著な壊死は生じなかった。

一方、葉面への孢子の接種方法としては、培養菌叢から得られた分生子塊を滅菌水に懸濁し、光学顕微鏡で検鏡しながら攪拌・希釈して接種源とし、径5 mmの軟質樹脂製ストローを長さ数 mmに切り出した環を、ワセリンで葉面に貼り付け、このプール内に分生子懸濁液40 μ lを滴下し、一時間程度風乾後に室温(22℃)・温室下でインキュベートしたところ、葉の表裏・付傷の有無に関わらず径5 mmのプール内のみ均一に大量の分生子を与えることができた。分生子の密度は測定されていないが、分生子サイズが異なっても、接種部全域

に分生子の感染が可能な条件を簡便につくり出すことができたため、本法を採用した。

表1には優占的な菌群のメヒルギ葉への接種試験結果を、表2には非優占的な菌群のメヒルギ葉への接種試験結果を示した。表中のシンボル一つは一個の接種を示し、シンボル中の色の濃さは接種部位の変色の濃さを示し、シンボルの形は再分離試験により分離された菌種を示す。全供試菌株のいずれの接種区においても、接種部表面で孢子が速やかに発芽していた。強度の付傷区では、全供試菌種で全ての接種部位から同一菌種が再分離された。一部の菌種では、軽度の付傷区でも同一菌種が再分離された。このことから、供試した7菌種はいずれも傷感染の能力が高いことが示された。無傷区では *Phomopsis* sp. 1 以外の全菌種で、同一菌種が多少の差はあれ再分離された(表1、2)。供試材料は無菌ではないので、もともと内生している菌の存在を考慮しなくてはならないが、無傷区で同一菌種が再分離されたことは、これら菌種が傷や気孔を経ずに表皮組織を突破するクチクラ感染の能力を示すものと考えられ、供試した内生菌は孢子によるメヒルギ葉面への高い感染力をもつと推察される。本接種試験では、*Phomopsis* sp. 1 の無傷区において同一菌種が再分離されることはなかった。本菌はメヒルギから優占的に分離されてくる菌であり、メヒルギ葉への高い感染能力を推察させる。本試験の結果は、メヒルギ成葉への接種試験の結果であり、枝から伸びた菌糸が葉柄を経由し、葉内に侵入する垂直感染や出芽したばかりの若い葉(クチクラ層が未発達)への孢子による感染、また気孔からの感染など、宿主への他の感染経路がより強く働いている可能性がある。このように内生菌は宿主への多様な感染様式をもち、それらが複雑に絡み合いメヒルギ葉内の内生菌相が形成されると推察された。

付傷区において、滅菌水を処理した対照区では接種部位の変色はみられなかったが、菌を接種した区では対照区と比較して顕著な変色がみられた。また、菌を接種した付傷区では、菌種により接種部の変色の濃さに差異がみられた。いずれの菌種でも接種期間中での変色域の拡大はなかった(表1、2)。この接種部での変色は、供試菌種による病徴形成、または、宿主の積極的な抵抗反応とみることができる。すなわち、接種菌株によって引き起こされる組織変化すなわち病徴形成に多様性が示されたことを意味し、また、与えた菌種により宿主の示す反応の差異は、これら菌種間により宿主の示す抵抗反応に多様性がみられたことを意味する。いずれの菌種でも変色域の拡大はみられなかったので、強い病原力を示す菌種はないといえるが、ストレス環境下で、高密度で孢子を感染させることにより、菌種により程度の異なる弱い病原力を示した。

本接種試験により内生菌の宿主への高い感染力が推察された。優占的な菌群と非優占的な菌群との間に感染力のパターンに違いはなかった。この接種試験が、自然条件下での感染をある程度反映しているとすれば、優占的な菌群と非優占的な菌群の違いをもたらす因子として、自然条件下での感染機会の多さ、すなわち、宿主組織に到達する孢子の量などに、より着目すべきことを意味する。また、自然条件下におけるマングローブは、生育する環境条件から葉に損傷を受けることは珍しくない。供試された全ての菌種で高率で傷感染が確認されたことから、傷を受けた宿主組織に内生菌が速やかに感染・定着し、結果として、より強い病原菌の感染と拮抗しているという可能性も推察された。

引用文献

- 1) 亀山 統一ら (2009) 琉球列島のマングローブにおける樹木内生菌, 日本森林学会大会講演集 120, 833
 2) 二井 一禎ら (2000) 森林微生物生態学, 30-31, 朝倉書店, 東京

表1 メヒルギから優占的に分離された内生菌のメヒルギ葉への接種試験

接種した菌種	葉の表						葉の裏					
	有傷			無傷			無傷					
	強度	軽度										
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	●	●	●				◇	◇	◇	◇	◇	○
	●	●	●				◇	◇	○	◇	◇	○
	●	●	●	◇	◇	◇	◇	◇	○	◇	◇	○
<i>Phyllosticta</i> sp.	◻	◻	◻				◻	◇	⊕	◻	⊕	○
	◻	◻	◻	○	○	○	◇	◇	○	◻	○	○
<i>Phomopsis</i> sp. 1	◻	◻	◻				◇	⊕	○	◻	⊕	○
	◻	◻	◻	⊕	⊕	○	⊕	○	○	⊕	⊕	○
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1	▲	▲	▲				▲	▲	⊕	▲	○	○
	▲	▲	▲				▲	⊕	○	⊕	○	○
	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	⊕	○	○	○	○
滅菌水	◇	⊕	○				◇	⊕	⊕	◇	⊕	○
	◇	○	○				◇	⊕	○	◻	⊕	○
	○	○	○	◇	⊕	○	◇	⊕	○	◻	⊕	○

表中の一つのシンボルが一個の接種を示し、シンボル中の色の濃さは接種部位の変色の濃さを、シンボルの形は再分離試験により分離された菌種を表す。

● 変色 (大)、● 変色 (中)、⊕ 変色 (小)、○ 変色なし。

◇ *Colletotrichum* sp. 1, ◻ *Phyllosticta* sp., ◻ *Phomopsis* sp. 1, ▲ *Pestalotiopsis* sp.

1, ⊕ その他の菌、シンボル中の網掛けなしは菌が分離されなかった。

表2 メヒルギから非優占的に分離された内生菌のメヒルギ葉への接種試験

接種した菌種	葉の表					
	有傷(強度)			無傷		
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2	▼	▼	▽	▽	⊕	○
	▼	▼		▽	○	
<i>Cladosporium</i> sp. 1	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	○
	⊕	⊕		⊕	⊕	
<i>Seimatosporium</i> sp.	★	★	★	★	⊕	○
	★	★		★	○	
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	◆	◆	◆	◆	◆	◆
	◆	◆		◆	◆	
滅菌水	◇	⊕	○	◇	□	○
	⊕	⊕		□	⊕	

表中の一つのシンボルが一個の接種を示し、シンボル中の色の濃さは接種部位の変色の濃さを、シンボルの形は再分離試験により分離された菌種を表す。

● 変色(大)、● 変色(中)、⊙ 変色(小)、○ 変色なし。

▽ *Pestalotiopsis* sp. 2, ⊕ *Cladosporium* sp. 1, ★ *Seimatosporium* sp., ◆ *Colletotrichum* sp. 1, □ *Phyllosticta* sp., ⊕ その他、シンボル中の網掛けなしは菌が分離されなかった。