

学位論文

高緯度北極・スピッツベルゲン島の *Rhytisma* 属菌に
関する生態学的研究

総合研究大学院大学

複合科学研究科 極域科学専攻

増本翔太

目次

要旨（日本語要旨）	1
Abstract（英語要旨）	5
第1章 はじめに.....	8
1-1 植物寄生菌の生態系における役割.....	8
1-2 高緯度北極の環境と植物寄生菌.....	9
1-3 研究目的.....	12
第1章の図表.....	13
第2章 同定.....	16
2-1 背景と目的.....	16
2-2 方法.....	18
2-2-1 標本の収集および形態観察	18
2-2-2 分子系統解析	19
2-3 結果.....	20
2-3-1 形態学的特徴	20
2-3-2 分子系統解析	22
2-4 考察.....	23
第2章の図表.....	26
第3章 生態分布.....	33
3-1 背景と目的.....	35
3-2 方法.....	35
3-2-1 調査地.....	35

3-2-2	発生場所に関する調査	35
(1)	ライントランセクト調査	35
(2)	感染率調査	36
3-2-3	感染率の経年変化	37
3-3	結果	38
3-3-1	発生場所に関する調査	38
(1)	ライントランセクト調査	38
(2)	感染率調査	39
3-3-2	感染率の経年変化	40
3-4	考察	40
	第3章の図表	44
第4章	生活史	53
4-1	背景と目的	53
4-2	方法	55
4-2-1	キョクチヤナギのフェノロジー	55
4-2-2	子実体の成熟	56
(1)	野外環境中における子実体成熟	56
(2)	水分環境が子実体成熟に与える影響	57
4-2-3	胞子の散布	58
(1)	野外環境中における胞子散布	58
(2)	水分環境が胞子散布に与える影響	60
(3)	胞子の発芽実験	60
4-2-4	ヤナギ葉上での子実体形成	61
4-2-5	日本に生育する <i>Rhytisma</i> 属菌の生活史	61
4-3	結果	62

4-3-1	キョクチヤナギのフェノロジー	62
4-3-2	子実体の成熟	63
(1)	野外環境中における子実体成熟	63
(2)	水分環境が子実体成熟に与える影響	64
4-3-3	胞子の散布	65
(1)	野外環境中における胞子散布	65
(2)	水分環境が胞子散布に与える影響	66
(3)	胞子の発芽実験	66
4-3-4	ヤナギ葉上での子実体形成	67
4-3-5	日本に生育する <i>Rhytisma</i> 属菌の生活史	67
4-4	考察	68
第4章の図表		76
第5章 宿主への影響		96
5-1	背景と目的	96
5-2	方法	98
5-2-1	光合成活性および生産量への影響	98
(1)	光合成活性への影響	98
(2)	生産量への影響	102
5-2-2	炭素・窒素量への影響	104
5-3	結果	105
5-3-1	光合成活性および生産量への影響	105
(1)	光合成活性への影響	105
(2)	生産量への影響	106
5-3-2	炭素・窒素量への影響	107
5-4	考察	107

第 5 章の図表.....	113
第 6 章 総合考察.....	123
第 6 章の図表.....	133
謝辞.....	137
引用文献.....	139

要旨

植物寄生菌は、宿主植物に対して生物間相互作用をもたらすことで植物の進化を促す一方で、宿主植物の個体群動態に影響することで、植物種の共存や多様性の維持・促進に寄与するため、生態系において重要な役割を担っている。高緯度北極域に広がるツンドラは低温、短い無雪期間、少ない降水量および貧栄養な土壌といった生物の生存にとって厳しい環境である。植物寄生菌の生育は、このような環境によって強く制限されると考えられる。同時に、宿主植物もこれらの厳しい環境の影響を受け、矮小化や短い着葉期間といった形態・生態学的な特徴を有している。このため、寄生菌がツンドラ環境で生育するためには、北極の環境と同時にそのような特徴を持つ宿主植物にも適応しなければならない。しかし、北極環境における植物寄生菌のこれまでの研究では、簡易的な生育種の報告が主であり、基本的な生態学的特徴や、寄生菌がいかにして北極環境および宿主植物に適応しているかについてはほとんど不明である。

本研究では、高緯度北極域のノルウェー領・スバルバル諸島・スピッツベルゲン島において、キョクチャナギの寄生菌である *Rhytisma* 属菌を対象に調査を行った。キョクチャナギはスピッツベルゲン島において優占し、高い一次生産力を保持しているため、本生態系にとって重要な植物種である。このキョクチャナギを寄生菌として頻繁に確認できる種に *Rhytisma* 属菌がある。そこで、スピッツベルゲン島に生育する *Rhytisma* 属菌の分類学的および生態学的な特徴を明らかにすることで、本菌がツンドラ生態系において、その環境や宿主植物にどのように適応しているかについて解明することを本研究の目的とした。

キョクチャナギに寄生する *Rhytisma* 属菌の種同定のために、2章ではスピッツベ

ルゲン島の複数地点で採集された標本の形態および DNA 塩基配列の特徴を明らかにした。その結果、採取された *Rhytisma* 属菌の形態学的特徴および遺伝学的特徴は、既報種と異なっていたため、新種・*Rhytisma polaris* として報告した。

本菌の発生場所とそれを左右する環境要因について明らかにするため、3 章ではスピッツベルゲン島・ニーオルスンの氷河後退域において、*R. polaris* の空間的・時間的な発生の変動とそれに影響を与える環境要因の調査を行った。1-300m スケールの発生調査では、*R. polaris* の発生と地面の斜度および土壌水分量に有意な相関が認められた。したがって、斜度が小さいことで土壌水分量が多くなるような場所において、高頻度で *R. polaris* が発生していることが示された。10cm-1m スケールでの感染率調査では、感染率と感染落葉数に有意な相関が認められたことから、感染源である子実体の密度が発生率を決定していることが示唆された。また、2008 から 2013 年にかけて行った感染率の経年変化調査では、*R. polaris* は毎年同じ場所で繰り返し発生していることが明らかになった。

R. polaris の生態学的な特徴を明らかにするために、4 章では本菌の生活史において重要な発育段階である子実体成熟、孢子散布およびヤナギ葉上での子実体形成について注目し、それらの過程と環境要因との関係について調査した。その結果、*R. polaris* は温帯域に生育する近縁種と比較して、早い時期に子実体成熟を開始することで、雪解け後から *R. polaris* の子実体が成熟するまでの期間を著しく短くしていることが明らかになった。ヤナギ葉上での子実体形成では、*R. polaris* は近縁種と比較して 2 倍以上の速度で子実体を形成した。これは、*R. polaris* が宿主の短い着葉期間に適応した結果と考えられた。さらに、子実体成熟と孢子散布には雪解け後に液体の水の供給が必要であり、孢子の散布範囲は著しく狭いことが明らかになった。乾燥したツンドラ環境下では子実体成熟・孢子散布が可能な水分環境に恵まれた場所は限定され、孢子の散布範囲が狭いことも影響して、*R. polaris* は限られた狭い範

圃に毎年生育していると推測でき、これは3章の調査結果と一致した。

R. polaris によるキョクチャナギへの影響を明らかにするために、5章ではキョクチャナギの光合成生産と栄養分の移動に与える影響を調査した。その結果、*R. polaris* に感染したヤナギ葉において、*R. polaris* の子実体に覆われた範囲の光合成活性は無くなるが、それ以外の範囲の活性は健全葉と同等であることが明らかとなった。この結果に基づいてモデル計算を行ったところ、*R. polaris* が感染した葉は、健全葉と比較して、着葉期間を通して約9%の純生産量の損失があることが推定された。また、*R. polaris* に感染することで落葉の際にヤナギから失われる窒素・炭素量は、健全葉と比較して窒素で約7倍、炭素で約4倍になることが明らかになり、本菌の感染はキョクチャナギの物質の収支に小さくない影響を与えていることが示唆された。

総合考察（6章）では、以上の結果を踏まえ、北極ツンドラ生態系におけるキョクチャナギに寄生する *R. polaris* の適応性について考察した。北極域の環境は、生育期間の短さと少ない降水量という2つの大きな制約を *R. polaris* に与えていた。そして、*R. polaris* は雪解け前から子実体成熟と速い子実体形成を行うことで、無雪期間および宿主のフェノロジーが短い環境下でも一年で生活史を完結させることを可能にしていた。また、本菌の子実体成熟と孢子散布には液体の水が必要であったが、降雨の少ない北極環境下では、降雨からの水分供給のみではそれらの生育段階が達成できず、次世代を残せないと考えられた。そのため、本菌の生育には、降雨以外の水分の供給、具体的には雪解け水の利用が必要であり、雪解け水が安定的に供給される場所で毎年繰り返し生育していることが示唆された。同じヤナギ個体に毎年繰り返し発生することは、宿主植物に対して継続的に負の影響を与えることになり、それによって宿主が弱ってしまえば自らの生育場所を失ってしまう可能性が考えられた。しかしながら、*R. polaris* は経年的な観測でも宿主植物のシュート数に

影響を与えていないことから、同じヤナギ個体に毎年繰り返し発生する分布様式を可能にしていると考えられる。

北極域は近年、気候変動が顕著であることから世界的に注目されている。しかしながら、生態系において重要な役割を担う植物寄生菌の研究はほとんど行われていない。北極生態系の多様性評価や保全に向けて、そこに生育する植物寄生菌についてさらなる研究が必要である。

Abstract

Plant pathogens play an important role in ecosystems because they prompt the evolution of plants by inducing host-pathogen co-evolutions and/or enhance plant species diversity by influencing the structure of plant communities. In the High Arctic tundra, plant pathogens have to cope with not only the harsh environmental conditions (notably: low temperatures, a short snow-free season, low precipitations and nutrient-poor soils), but also with the host plants' specific features. Indeed, in this extreme environment plants are dwarf and have short growth periods. However, past studies of plant pathogens in the High Arctic mainly consisted in species identifications only. It remains unknown today whether the ecological features described for these pathogens reflect adaptations to the environment and/or to the host plant. In this study, we clarified the taxonomical and ecological features of the parasitic fungi *Rhytisma* sp. on *Salix polaris* (polar willow) and aimed to elucidate the adaptations of *Rhytisma* to tundra environments and host plants.

This study was conducted Spitsbergen Island, Svalbard, Norway (77°N-79°N). The genus *Rhytisma* (Ascomycota) is known to cause tar spot disease to woody plants. *S. polaris* is a dominant dwarf shrub species and has a high primary production compared with other vascular plant in this area. *Rhytisma* sp. was the most common parasitic fungus on this willow.

To identify *Rhytisma* sp. on *S. polaris*, we collected specimens from 5 regions on Spitsbergen Is. and determined their morphological and molecular features. We found that the characteristics of these specimens distinctly differed from that of other published *Rhytisma* species, based on both of morphological and molecular feature. Therefore, we identified these specimens as a new species, *Rhytisma polaris*.

We investigated a pattern of occurrence of *R. polaris* and examined the environmental factor which affected the pattern. We measured frequency of *R. polaris* occurrence at 1-300m and 10-100cm scale on a glacier foreland. At 1-300m scale, the occurrence correlated with slope angle and soil water content. We suggest that *R. polaris* is likely to occur where slope angle is low and soil moisture is high. At 10-100cm scale, the occurrence correlated

significantly with the number of fallen leaves which were infected by *R. polaris* last year. We hence propose that *R. polaris* may likely occur at the same place as the previous observation year. We also investigated the change of occurrence rate (incidence) from 2008 to 2013. We found that the high incidence observed in 2008 on a specific area remained high at that area over the following years, and that the area with a low incidence measured in 2008 maintained a lower incidence in every year.

To clarify the ecological features of *R. polaris*, we investigated three important growth stages of the life cycle: ascostroma maturation, spore dispersal and ascostroma development. We found that *R. polaris* was able to mature ascostroma quicker after snowmelt than its related *Rhytisma* species growing in the temperate zone. This original process observed in *R. polaris* seemed to stem from its ability to starting to mature ascostroma before the snow cover in the previous year. *R. polaris* could also develop ascostroma more rapidly than related *Rhytisma* species on the host leaves. These features are likely to reflect an adaptation to the host shorter leaf period.

Another intriguing ecological characteristic of *R. polaris* is that it needs liquid water for ascostroma maturation and spore dispersal. Because the tundra environment is characterized by low precipitations in the growing season, *R. polaris* may likely use snowmelt water for ascostroma maturation and spore dispersal. In addition, we clarified that the spore dispersal range was very short (about 2-3m). The combined characteristics that *R. polaris* both needs snowmelt water and cannot disperse spore widely would imply that its spatial distribution is narrow and strongly limited from one year to the following. As a matter of fact, this conclusion conforms to our previous result that spatial patterns of occurrence of *R. polaris* were highly consistent between years.

To clarify the effect of *R. polaris* on its host plant, we investigated its influence on the photosynthetic activity, the primary production and the nutrient dynamics of *S. polaris*. In the leaves infected by *R. polaris*, the photosynthetic activity in the part covered with ascostroma fell below detectable levels, but the activity of the other parts were similar to healthy leaves. Based on the results of photosynthetic activity, we estimated the primary production of *S. polaris* by a model. We found that on average, an infected leaf loses 9% production compared with a healthy one. Regarding the nutrient dynamics, infected leaves

lost 7 times more nitrogen and 4 times more carbon than healthy leaves. Year-round effects of *R. polaris* on the host were investigated from the change in the number of *S. polaris* shoots due to differences of *R. polaris* incidence from 2008 to 2013. The number of shoots on high incidence plots didn't decrease significantly compared with low incidence plots. We thus concluded that year-round effects is not severe, such as to cause host plant dead.

Finally, we discuss the specific adaptation of *R. polaris* to the Arctic ecosystem based on all the results we presented. It is considered that both the short leaf period of host plant and low precipitation in the Arctic tundra strongly affect the life cycle of *R. polaris*. By starting ascostroma maturation earlier and developing ascostroma rapidly, *R. polaris* was able to complete their life cycle within the short leaf period of the host plant. Moreover, the fact that the fungus relies on snowmelt water constrained its inter-annual distribution, and it is suspected that such a repetitive occurrence pattern may severely affect the host plant. However, we did not observe any dead *R. polaris* even in higher incidence conditions. Then, *R. polaris* was able to keep the spatial pattern.

The High Arctic is getting much attention now because of a rapid and severe local climate change. Although it is known that plant pathogens are able to affect plant community composition, studies on plant pathogen in the Arctic region are still currently too scarce, especially regarding the ecological features of the pathogens and/or their effects on host plant. In order to clarify the High arctic ecosystem structure and to predict the response of this ecosystem to ongoing changes, we highlight here a need for further studies about plant pathogens in the High Arctic.

第1章 はじめに

1-1 植物寄生菌の生態系における役割

植物寄生菌は一次生産者である植物に寄生し、時に植物個体に病害を引き起こす。そのため、18世紀後半から農作物のような有用植物に寄生する植物寄生菌種を対象として、植物病理学などの応用的な学問分野で研究が進展してきた(久能ほか 1998; Agrios 2005; 大木 2007)。最近では、自然環境下における寄生菌と植物の種間関係を生物学的な視点から捉えた研究がされ始め、その関係が互いの生物の進化を促したり、植生の多様性に影響したりすることが明らかになりつつある(Bishop et al. 2000; Gilbert 2002)。寄生菌と宿主植物の関係性の特徴として、寄生菌は宿主から栄養を吸収すること、寄生菌は宿主を住処として利用すること、宿主側に利益はないことが挙げられる(Begon et al. 1986; 八杉ほか 1996)。このため、寄生菌と宿主植物の間には、敵対的な生物間相互作用が働いていると言える。具体的には、寄生菌と宿主植物との間に寄生菌側の寄生しようとする力(寄生能力)と宿主側のそれに抵抗しようとする力(抵抗性)が働く。この結果、寄生菌は寄生能力、宿主植物は抵抗性を互いに発達させ、それぞれの分化が起こる、いわゆる共進化が引き起こされるとされている(Flor 1956, 1971; McDowell and Simon 2006; McHale et al. 2006)。したがって、進化生物学的な観点から、寄生活動は寄生菌と植物の互いの種分化の原動力になり得ると考えられる。一方、生態学的な観点から、寄生菌は植物種の共存や多様性の維持・促進に寄与すると考えられている(Connell 1971; Karanz 1990; Castello et al. 1995)。例えば、森林において寄生菌の病原性が樹木個体の枯死や個体群レベルでの死亡率の増加を引き起こす場合、宿主樹木の個体群動態の変化が他種の樹木との種間競争に影響を及ぼすことが明らかにされている(大園 2011)。これは、寄

生菌が植物を枯死させることによる短期的な多様性への影響と、植生の変化を促す長期的な多様性への影響を及ぼしうることを示唆している。まとめると、寄生菌は植物の種分化を生みだし、植生の多様性を維持・促進するという生態系において重要な役割を担っている。

1-2 高緯度北極の環境と植物寄生菌

北極圏の中でも高緯度に位置する地域では、ツンドラ植生が広がっている。ツンドラとは、樹木のない極地域またはそこに発達する植生を中心とした景観を指す (Chernov 1985)。ツンドラ地域は低温、短い無雪期間、少ない降水量および貧栄養な土壌といった生物の生存にとって厳しい環境である。このような環境は、他の生物と同様に植物寄生菌にも大きな制限を与えていると考えられる。また、寄生菌の生育にとって必要不可欠である宿主植物も環境の影響を受けて、温帯域などと異なる形態・生態学的な特徴を保持している。このため、寄生菌がツンドラ環境で生育するためには、このような特徴を持つ宿主植物にも適応しなければならない。例えば、ツンドラの植物は植物体が矮小化する特徴的な形態を持つ。このことは、寄生菌にとって住処としての植物体が小さくなってしまっただけでなく、寄生菌が宿主から得る栄養分の量にも影響する。寄生菌にとって、宿主植物の存続は自身を存続させるために必要不可欠である。ツンドラ環境によって現存量や分布を強く制限されている植物に対して、寄生菌が宿主植物の適応度を大きく下げってしまうような悪影響を与えれば、寄生菌自身の適応度も低下してしまうと考えられる。したがって、北極ツンドラにおいて、寄生菌は過酷な環境要因と、その影響を受けた宿主に適応しながら、宿主に過度な影響を与えずに生育しなければならない。このような制限は、北極で寄生関係を成立させることを困難にすると考えられる。しかし、北極域

では多くの植物寄生菌種の存在が報告されている (Parmelee 1989; Smith et al. 2004; Elvebakk et al. 1996; Tojo and Newsham 2012)。

北極域は近年、地球温暖化が最も顕著な場所であるとされ (IPCC 2007)、その影響が生態系に及ぼす影響が懸念されている。温暖化とそれに伴う環境変動は、植物寄生菌に影響を与え、その結果、宿主植物群落および生態系に変化をもたらす可能性が指摘されている (Woods et al. 2005; Dukes et al. 2009; Thompson et al. 2010; Olofsson et al. 2011)。しかし、北極環境下における植物寄生菌のこれまでの研究では、そのほとんどの生育種がカタログとしてまとめられている程度の簡易的な報告がなされているのみであり、詳細な種の記載や遺伝的特徴の決定といった基本的な知見でさえ得られておらず、分布や生態および宿主植物への影響に関する研究はほとんどなかった。

本研究では、ツンドラ生態系において植物寄生菌がいかにして環境に適応し、そこに生育する植物に対して寄生活動を成立させているかについて、その一端を明らかにするため、高緯度北極域のノルウェー領・スバル諸島・スピッツベルゲン島において、キョクチャナギ (学名: *Salix polaris* Wahlenb.) の寄生菌・*Rhytisma* 属菌を対象に調査を行った。スピッツベルゲン島 (図 1-1) は、気候区分では Cool-Arctic に分類され (Bliss 1979; Longton 1988)、陸上の約 60% が氷河に覆われている。氷河のない沿岸部では、荒地や湿地帯を除けば、矮小化した植物が優占するツンドラ植生が広がっている (図 1-2)。そのスピッツベルゲン島のツンドラ植生を代表する植物の一つがキョクチャナギであり、本種は特に遷移中・後期において高い被度を誇る優占種である (Nakatsubo et al. 1998; Skarpe and van der Wal 2002; Ohtsuka et al. 2006)。キョクチャナギは北極ツンドラ地域に広く分布する木本植物であり (Bliss and Matveyeva 1992)、ツンドラの環境に適応した結果、その形態は温帯域のヤナギ

と比較すると極端に矮小化しており、幹の直径は最大で 1cm 程度、葉の大きさも直径 1cm に満たない (図 1-3)。着葉期間は約 50 日であり、雪解け後 1、2 週間で展葉した後、その着葉期間中に光合成生産を行って、開花・結実などの繁殖活動を行う。また、本種は同所に生息する他の維管束植物と比較して、高い一次生産力を保持していることが示されているため (Muraoka et al. 2002, 2008)、この地域の生態系にとって非常に重要な植物種であると言える。一方、*Rhytisma* 属菌は主に樹木植物の葉に寄生し、葉上に特徴的な黒い子実体 (図 1-3) を形成することから、黒紋病 (tar spot disease) の病原菌として古くから認知されてきた (Fries 1818, 1823)。本属菌は生きた宿主植物のみを利用して養分を取得することができる絶対寄生性の菌類であり、1 種の *Rhytisma* 属菌は 1 属内の 1 種あるいは数種の植物にしか感染できない、すなわち種から属レベルでの宿主特異性を持つ (Cannon and Minter 1986; Hou and Piepenbring 2005; Lantz et al. 2011)。本属の菌類は、スピッツベルゲン島においてキョクチャナギを宿主とする寄生菌の中で最も頻繁に確認できる種として報告されており (Lind 1928; Hagen 1941; Lid 1967)、過酷な北極環境および着葉期間が短く、矮小化したキョクチャナギに適応していると考えられる。したがって、本菌の生態を解明することは、ツンドラ生態系における植物寄生菌の環境および宿主の生態への適応を解明するための一例となり得ると考えた。また、スピッツベルゲン島の生態系におけるキョクチャナギの重要性を考慮すると、その寄生菌である *Rhytisma* 属菌の生態および本菌とキョクチャナギ間の相互作用を解明することは、現在の生態系を理解し、その将来予測をする上で重要な情報となる。

1-3 研究目的

本研究では、スピッツベルゲン島のキョクチャナギに寄生する *Rhytisma* 属菌の分類学的および生態学的な特徴を明らかにすることで、生物の生育・生存が厳しいとされるツンドラ生態系において、本菌が持つツンドラ環境や宿主植物に対する適応性について解明することを目的とした。

本研究論文は、第2章にて、スピッツベルゲン島に生育する *Rhytisma* 属菌の分類学的な位置づけを明確にするために、形態的・分子生物学的な手法を用いて、複数地点で採集した *Rhytisma* 属菌の種同定を行った。第3章にて、ニーオルスンの氷河後退域における本菌の発生場所の空間的・時間的変動について調査を行い、*Rhytisma* 属菌の分布とそれに影響を与える環境要因との関係を明らかにした。第4章では、生活史を通じて本菌の生態学的特徴を明らかにするために、*Rhytisma* 属菌の生活史の中で重要な段階である子実体の成熟から孢子散布、そしてヤナギ葉上での子実体形成について注目し、それらの過程と水分環境との関係について調査した。第5章では、本菌がキョクチャナギの光合成生産に与える影響と *Rhytisma* 属菌－キョクチャナギ間の炭素・窒素物質の移動を明らかにすることで、*Rhytisma* 属菌が宿主であるキョクチャナギに与える影響を論じた。最後に、第6章では、調査結果をまとめ、ツンドラ生態系における *Rhytisma* 属菌が、いかにして北極環境とキョクチャナギの生態に適応し、寄生活動を行っているかについて総合的に考察した。

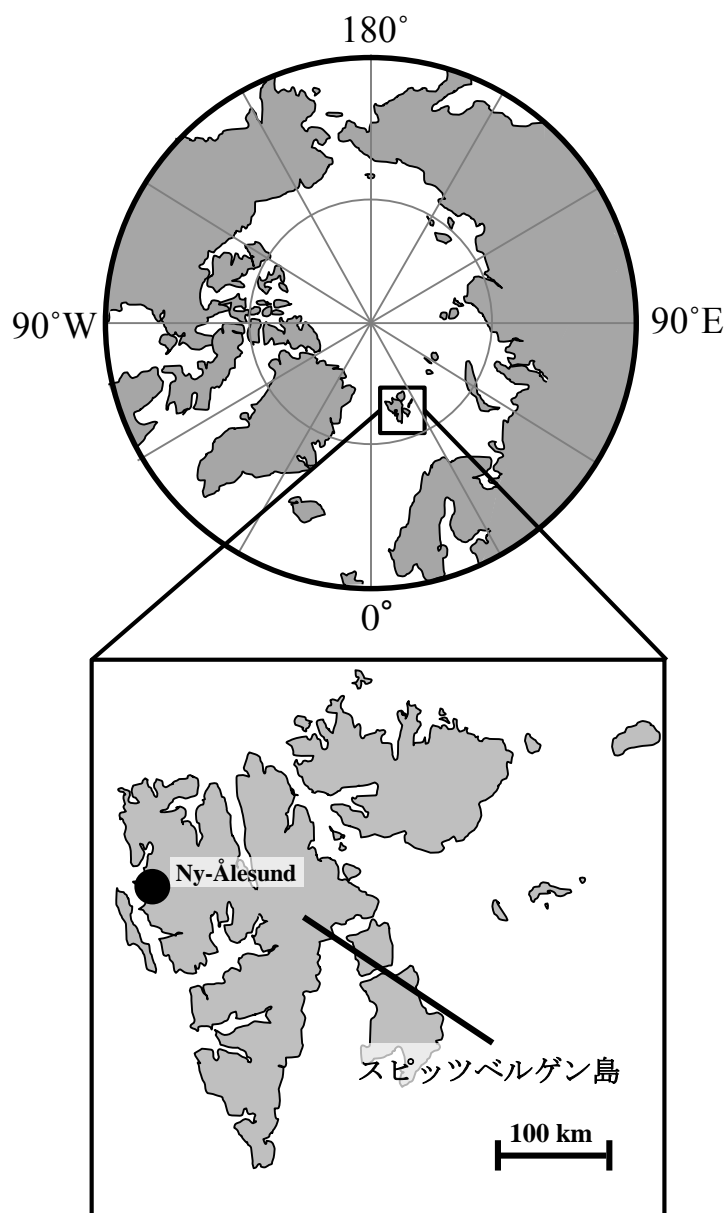


図1-1. ノルウェー領スピッツベルゲン島とニーオルスン (黒丸) の位置。

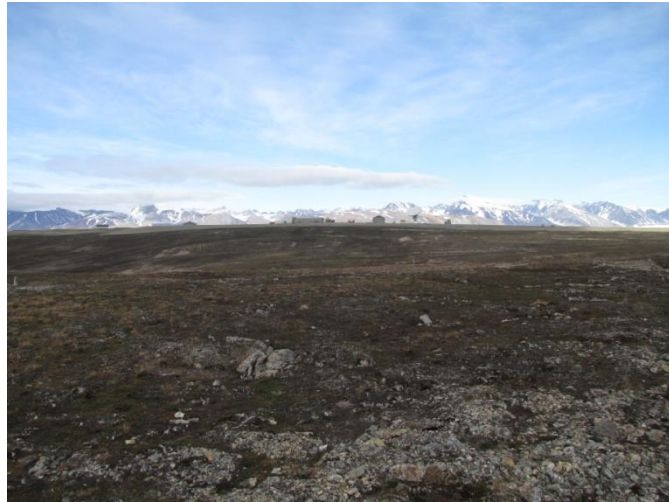


図1-2. スピッツベルゲン島・ニーオルスンの様子。
高木が生育しないツンドラ植生である。

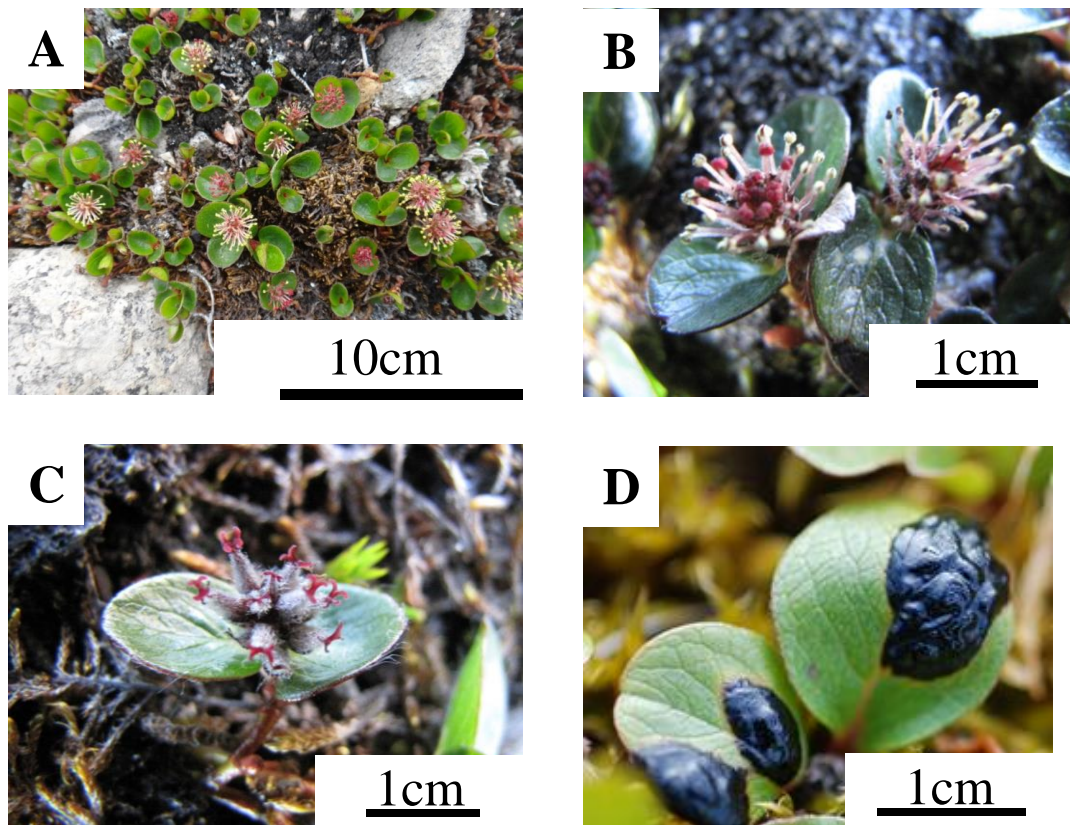


図1-3. キョクチャナギとそれに寄生する*Rhytisma*属菌の子実体。キョクチャナギは匍匐性の矮性低木である (A)。キョクチャナギは雌雄異株で雄株に雄花 (B) を雌株に雌花 (C) をつける。*Rhytisma*属菌は葉上に特徴的な黒い子実体を形成する (D)。

第2章 同定

2-1 背景と目的

生物の生理・生態学的性質を明らかにするためには、対象種の分類学的位置を知ることが重要である。菌類の種同定の手法として古くから行われてきたのが、肉眼および顕微鏡を用いて行われる菌類の各器官の形態観察に基づいた形態分類学的手法である。微生物である菌類は肉眼での形態観察に限界があり、顕微鏡観察によって形態的特徴の詳細な観察が行われてきた。植物寄生菌を含む菌類は、栄養体や繁殖体の形態や有性生殖の有無で大きく分類される。種レベルでの同定において最も重要であるのは有性器官の形態であり、その形や大きさの差異に基づいて分類が行われてきた。しかし、形態的特徴に基づく分類だけでは形態の変異性の高い菌類の分類は困難である。例えば、*Fusarium* 属菌に代表されるような形態の変異性の高いグループでは、分類形質としての形態的特徴をめぐって学派間で対立が起こるなど、分類体系の混乱が多く見られた (Wollenweber and Reinking 1935; Snyder and Hansen 1940, 1941, 1945)。このような中、20世紀後半になり、種の再定義や新しい研究手法の導入が相次ぎ、既存の分類体系の問題点が明らかになってきた。特にDNA塩基配列を基にした分子系統学的手法が分類研究に導入されると、菌種や菌株間の関係はもとより、有性時代が確認できない菌種の分類学的な位置の決定まで原理的には可能となった。分子分類学的手法は、それまで行われてきた形態による分類形質やそれらに基づいた分類結果を進化・類縁関係から再検証し、これまで単一と考えられてきた多くの形態種が複数の種内種（隠蔽種）を含んでいたことを明らかにした (O'Donnell et al. 1998, 2004; Gams et al. 1997)。また、これまで別種と扱われてきた無性世代種と有性世代種が同一の種であることが明らかになっている

(Hietala et al. 2001; Liu et al. 2001)。

Rhytisma 属は、1818年に菌類分類学の創始者である Elias Magnus Fries によって設立され、種の再編を繰り返しながら、現在は熱帯から北極域にかけて 17 属の双子葉植物を宿主として 23 種が報告されている (Saccardo 1889; Petrak 1947; Woo and Partridge 1969; Cannon and Minter 1986; Minter 1996, 1997a, b; Hudler et al. 1998; Ganley et al. 2004; Hou and Piepenbring 2005; Kirk et al. 2008; Thuang 2008; Suto 2009; Wang et al. 2009; Hou et al. 2010; Lantz et al. 2011)。*Rhytisma* 属の形成する子実体は特徴的であるため、肉眼でも容易に見つけられる。このため、菌類分類学の創成期から多くの種が報告されてきた。Fries の後、Saccardo (1889) が *Rhytisma* 属内の種の詳細な形態を記載しており、その後も主に有性器官である子実体や子のう、子のう胞子の形や大きさを指標にした形態学的特徴に基づく分類が行われてきた。一方、*Rhytisma* 属菌の分類に分子生物学的手法が用いられたのは、Hudler (1998) がセイヨウカエデ (*Acer platanoides*) に寄生する *R. americanum* を新種として報告するために ITS 領域の PCR 産物を RFLP 分析したのが初めてである。しかしながら、現在 *Rhytisma* 属内で塩基配列が一部でも報告されている種は、分類種全 23 種中 6 種のみであり、真菌類の種同定に最も一般的に使用されている rDNA-ITS 領域に限定すると 4 種のみである。これは、*Rhytisma* 属菌が寄生する主に植物が、カエデやヤナギなどの人間の経済活動にはあまり重要でない樹木植物に寄生するため、昨今の研究対象としては注目されていないことが原因であろう。

これまでの研究で、ヤナギ属 *Salix* L. に寄生する種として、*R. salicinum* と *R. umbonatum* が報告されており、それらは温帯域を中心に広く分布することが報告されている (Cannon and Minter 1986)。一方、ツンドラ地域においては、*R. salicinum* のみが報告されており、その地域と宿主はアラスカにおいて *Salix barclay* (Collet 2004)、

アイルランドにおいて *S. herbacea*, *S. lanata*, *S. phyllicipholia* (Pyatt 1984) そして、スピッツベルゲン島において *S. polaris* および *S. polaris* と *S. herbacea* の交雑種 (Lind 1928; Hagen 1941; Lid 1967; Elvebakk et al. 1996) である。スピッツベルゲン島は *Rhytisma* 属菌の分布が報告されている北端にあたるが、*Rhytisma* 属菌はこの島に優占する *S. polaris* を宿主とする寄生菌の中で最も頻繁に確認できる種として報告されている (Lind 1928; Hagen 1941; Lid 1967)。しかし、スピッツベルゲン島を含め、それらの北極域に生育する *Rhytisma* 属菌の詳細な形態の記載と DNA のデータに基づいた分類はなされていない。

そこで本章では、スピッツベルゲン島に生育する *Rhytisma* 属菌の分類学的な位置を明確にするため、スピッツベルゲン島内の 4 カ所から採集した *Rhytisma* 属菌 10 標本を用いて、詳細な形態の観察に基づいた種の同定を行った。さらに、形態による分類を補足するため、真菌類の分類に最も利用されている rDNA-ITS および LSU 領域の塩基配列を決定し、それらを用いた系統解析を行った。

2-2 方法

2-2-1 標本の収集および形態観察

供試標本の収集はスピッツベルゲン島内のニーオルスン (78°55'36"N, 11°51'25"E) とスチュファレット (78°57'34"N, 11°40'13"E)、ロングイヤービン (78°14'59"N, 15°24'32"E)、バレンツブルグ (78°03'57"N, 14°12'31"E) において 2012 年 7 月下旬から 8 月上旬にかけて行った (図 2-1)。この年の宿主生葉上に発達した未成熟な子実体と、前年の落葉上で成熟した子実体を採集し観察した。宿主植物は全てキョク

チヤナギ (*Salix polaris*) であった。形態観察は実体顕微鏡 (Nikon, SMZ1500) と光学顕微鏡 (Nikon, Eclipse E600) を用いて行った。子実体をはじめとする表 2-1 で示した器官について形態的特徴を観察した。採集した子実体の切片を作成し、それらを水またはラクトフェノール染色液を用いて行った。特に、子のう胞子をはじめとした微細器官については、光学顕微鏡の 400–1000 倍の倍率下で無作為に抽出した 30 個を用いて測定した。

2-2-2 分子系統解析

スピッツベルゲン島の 4 カ所から採集し、形態観察実験において形態的特徴を確認した 10 標本に加えて、同島のホーンズド (77°00'00"N, 15°33'00"E) において 2013 年 9 月中旬に採集した未成熟の子実体、3 標本をサンプルとして用いた。それぞれの子実体から Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) 法 (Doyle and Doyle 1990) を用いて DNA を抽出し、PCR により増幅した rDNA-ITS 領域と LSU 領域の塩基配列を解析に用いた。rDNA-ITS 領域の PCR では、プライマー ITS1F/ITS4 (White et al. 1990) を用い、rDNA-LSU 領域の PCR ではプライマー LR0R/LR5 (Vilgalys and Hester 1990) を用いた。抽出した DNA 1 μ l を鋳型として、各プライマー (5 μ M) を 1.2 μ l、dNTP Mixture (4 mM) を 4.0 μ l、2 \times PCR buffer for Kod FX を 10 μ l、Kod FX DNA (1U/ μ l, TOYOBO, Osaka, Japan) を 0.4 μ l と水 2.2 μ l を加えて全量を 20 μ l とした。反応プログラムは 94°C で 2 分間の変性後、98°C で 10 秒間、52°C で 30 秒間、68°C で 1 分 30 秒間を 25 サイクルに設定し、PCR を行った。得られた PCR 産物から 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) を用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。また、近縁と思われる種の rDNA-ITS および LSU 領域の塩基配列を DDBJ のデータベース

(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) よりダウンロードし、比較のために用いた。さらに、形態が明確に示されている標本の塩基配列と比較を行うため、英国王立博物館 (KEW) に保存されていた標本、*Rhytisma salicinum* (IMI 286910) と *Rhytisma umbonatum* (IMI 288524) の塩基配列データの決定を供試標本と同様の方法で試みた。採集した標本より得た DNA 塩基配列は比較のために DDBJ のデータベースよりダウンロードした塩基配列データ (表 2-2, 2-3) と共に、Clustal W version 1.8 (Thompson et al. 1994) でアラインメントし、配列上のギャップおよび不明瞭に決定された配列部分は全て除去し、分子系統解析した。分子系統樹は MEGA5 (Tamura et al. 2011) を用いて近隣結合法 (Saitou and Nei 1987) により作成した。距離推定には、Kimura 2-parameter モデル (Kimura 1980) を用い、ブートストラップ値を 1000 回計算して分岐の信頼性を評価した。

2-3 結果

2-3-1 形態学的特徴

形態観察により本菌の形態的特徴は、*Rhytisma* 属内のいずれの既報種にも該当しなかったため、本菌を新種として報告した (Masumoto et al. 2013)。新種記載文および形態学的特徴は下記のとおりである。

Rhytisma polaris S. Masumoto, M. Tojo, M. Uchida and S. Imura

ETYMOLOGY: referring to the polar where the specimens have been collected. Stroma 2.3–7.1 mm in diam., black, shiny, roughly circular or irregular; Praphyses 110–150 × 0.8–3.2

μm filiformes; Asci $100\text{--}170 \times 11\text{--}18 \mu\text{m}$, clavate; Ascospores $55\text{--}80 \times 3.2\text{--}5 \mu\text{m}$, filiform or cylindric clavate

HOLOTYPUS: Norway, Spitsbergen Island, Ny-Ålesund, $78^{\circ}55'36''\text{N}$, $11^{\circ}51'25''\text{E}$, on *S. polaris*, 20/08/2012, S. Masumoto

PARATYPUS: Norway, Spitsbergen Island, Ny-Ålesund, $78^{\circ}55'47''\text{N}$, $11^{\circ}52'08''\text{E}$, On *S. polaris*, 20/08/2012, S. Masumoto, Stuphallet, $78^{\circ}57'34''\text{N}$, $11^{\circ}40'13''\text{E}$ on *S. polaris*, 20/08/2012, S. Masumoto, Longyearbyen, $78^{\circ}14'59''\text{N}$, $15^{\circ}24'32''\text{E}$, on *S. polaris*, 01/08/2012, M. Tojo, and Barentsburg, $78^{\circ}03'57''\text{N}$, $14^{\circ}12'31''\text{E}$, on *S. polaris*, 31/07/2012, M. Tojo

形態的特徴（図 2-2）：

子実体は葉の両面に形成され、葉面から 1-3 mm ほど隆起している。黒く、つやがあり、荒い円形または不定形で、しわを持ち、直径 2.3-7.1 mm。7 月上旬から落葉までの間に宿主葉上で見られる。生葉上にみられる子実体は未成熟で黄色の縁がある。

宿主葉上で形成された子実体は落葉上で越冬し、翌年の雪解けから約 2 週間で成熟する。子実層は、葉の表面側のみ、まれに両面に形成され、不定形の単室、大きさは $300\text{--}2,000 \mu\text{m}$ 。成熟した子実体では、表面に複数の不定形の亀裂が入り、子実層が露出する。子実体の断面の様子から、子実層は褐色、厚さ $150\text{--}360 \mu\text{m}$ 、直径 $4\text{--}7 \mu\text{m}$ の多角・円形菌糸組織で構成された黒色の外壁に覆われ、子実層の下層または周囲の子座基底部は、白色、厚さ $60\text{--}190 \mu\text{m}$ 、直径 $4\text{--}7 \mu\text{m}$ の多角・円形菌糸組織で構成される。

側糸は無色、糸状、無隔壁、未分枝、 $110-150 \times 0.8-3.2 \mu\text{m}$ 。子のうは無色、細い棍棒状、 $100-170 \times 11-18 \mu\text{m}$ 、8個の胞子を含む。子のう胞子は無色、糸状、 $55-80 \times 3.2-5 \mu\text{m}$ 、先端と周囲を厚さ $0.7-2.3 \mu\text{m}$ の薄いゼリー状の鞘で覆われている。

分生子子座はヤナギ生葉上で子実体発達前に形成され、黒色、つやがあり、円形または不定形、直径 $200-350 \mu\text{m}$ である。分生子形成細胞は平滑、円筒形、 $20-26 \times 1.5-2.0 \mu\text{m}$ 。分生子は無色、無隔壁、倒卵形体もしくは楕円形、 $3.0-3.5 \times 1.5-2.0 \mu\text{m}$ である。

今回の観察に用いた標本は大阪府立大学（堺・大阪）の the fungal collection に保管されている（Nos. OPU1574-1583）。同時に英国王立博物館（KEW）のハーバリウムにもサンプルの一部が保管されている（Nos. K(M) 187837-187840）。

2-3-2 分子系統解析

分子系統解析の結果、スピッツベルゲン島から採取した 13 標本の全ての rDNA-ITS 領域の塩基配列と 11 標本の rDNA-LSU 領域の塩基配列を決定した(表 2-2, 3)。しかし、英国王立植物園 (KEW) から譲渡された標本である *R. salicinum* (IMI 286910) と *R. umbonatum* (IMI 288524) に関しては塩基配列を決定できなかった。これは 20 年以上の保存期間の間にサンプル組織中の DNA が破壊されており、塩基配列をうまく増幅できなかったためと思われる。このため、*R. umbonatum* の塩基配列は手に入れることができず、*R. polaris* と比較することはできなかった。rDNA-ITS 領域および LSU 領域を用いた分子系統学解析の結果を図 2-3 と図 2-4 にそれぞれ示した。ITS 領域を用いた系統樹内において、スピッツベルゲン島の標本 (AB714536-AB714545) は単一のクレードを形成し、標本間の DNA 相同性も全てのサンプルで

完全に一致した（図 2-3）。これらの標本に系統的に最も近縁であったのは、*R. salicinum* AY465515 株および AY465516 株（Ganley et al. 2004）の塩基配列であったが、その相同性はそれぞれ 88.1%、91.2%と低かった。一方、LSU 領域を用いた解析においても、*R. polaris* の標本間（AB714555–AB714562）では高い相同性を示し（99.1–100%）、系統樹内でも単一のクレードに形成した（図 2-4）。さらに、スピッツベルゲン島の標本とスウェーデン（FJ495191; Lantz et al. 2011）および中国（HM140566; Wang et al. 2009）から報告された *R. salicinum* の LSU 領域の配列との相同性は 96.8–97.3%と *R. polaris* の標本間の相同性と比較するとやはり低い値となった。本研究で明らかになった塩基配列は DDBJ に登録した（Accession Nos. ITS: AB714536–AB714545, LSU: AB714555–AB714562）。

2-4 考察

スピッツベルゲン島内で採取されたキョクチャナギ寄生する *Rhytisma* 属菌は形態学的特徴および分子学的特徴ともに既報種と異なったため、*Rhytisma* 属の新種 *Rhytisma polaris* と報告した（Masumoto et al. 2013）。

R. polaris の形態学的に最も特徴的な点は、子のう胞子が既報の *Rhytisma* 種に比べて幅広い点にある（表 2-1）。*Rhytisma* 属菌はその全ての種が宿主に対して種から属レベルの高い特異性を持つため（Cannon and Minter 1986, Hou and Piepenbring 2005）、特にヤナギ属に寄生する既報の *Rhytisma* 属菌種との形態比較を以下に行っている。*Rhytisma* 属内でヤナギ属に感染することが知られているのは *R. salicinum* と *R. umbonatum* である。この 2 種の形態的特徴は似ており、シノニム（異タイプ異名）

として扱われる場合もあるが、Minter (1997a, b) は子実体の形や子のう胞子のサイズ、子実体が宿主葉の両面に形成されるか片面のみに形成されるかの違いで 2 種を別種と判断している。本研究でも、これに従い 2 種を別種として形態比較を行った。まず、*R. polaris* と *R. salicinum* の形態学的な相違点は以下の通りである。*R. polaris* と *R. salicinum* は子のう胞子の幅と形が異なる。加えて、*R. polaris* の子実体が葉の両面に形成されるのに対し、*R. salicinum* のそれは一般的に葉の表面にのみ形成される。一方、*R. polaris* は *R. umbonatum* と比較して、子実層の形、子実体の亀裂の形、子のうと子のう胞子のサイズと形が異なっている。以上のことから、*R. polaris* は、*R. salicinum* と *R. umbonatum* の 2 種とも異なる形態的特徴を持っていることが明らかになった。また、*R. polaris* と *R. salicinum* の違いは胞子の子実体の形成面と胞子の幅のみであったが、*R. polaris* と *R. umbonatum* の違いは子実層などの比較的マクロな形にまで及んだことから、*R. polaris* は、形態的には、2 種の中でも *R. salicinum* の方に比較的近縁であることが示唆された。

rDNA-ITS 領域を用いた分子系統解析では、スピッツベルゲン島内の 13 標本の塩基配列は、ITS 領域と LSU 領域ともに非常に高い相同性を示し、単系統を形成した。一方、*R. polaris* の塩基配列は *Rhytisma* 属内では *R. salicinum* に系統的に最も近いことが示された。しかしながら、この相同性は、スピッツベルゲン島内のサンプル間の相同性と比較すると非常に低い値であった。以上のことから、分子系統解析においても、*R. polaris* は *R. salicinum* の近縁種ではあるものの、既報のどの *Rhytisma* 属種とも異なる特徴を持つことが支持された。また、本研究で採集された *R. polaris* の標本の ITS 領域および LSU 領域の相同性は高く、スピッツベルゲン島内の本菌は遺伝的な均一性が高いことが示唆された。この理由としては、スピッツベルゲン島が氷から開放された最終氷期の後、本菌がこの地に侵入・定着した可能性が考えられ

る。Alsos et al. (2009) は、スピッツベルゲン島に生育する *Salix herbacea* の個体群が、スカンジナビア半島に由来しながら、独立したグループを形成していることを遺伝的に示している。キョクチャナギとそれに寄生する本菌も *S. herbacea* と同様に分布を拡大してきた可能性があるが、これに関しては、周北極レベルでの遺伝的な多様性を明らかにする必要がある。

スピッツベルゲン島の植生カタログにおいて *S. polaris* に寄生する *Rhytisma* 属菌は *R. salicinum* と記載されてきた (Lind 1928; Hagen 1941; Lid 1967)。今回の調査はスピッツベルゲン島内 5 カ所で標本の採集を行ったが、*R. salicinum* の特徴に合致した標本は発見できなかった。Cannon and Minter (1986) は *Rhytisma* 属の記載の問題点として、標本が生葉上の未熟な子実体であること、記載が未成熟の段階の子実体を見ているものが少なくないと指摘している。これまでの研究では、その形態・塩基配列とも詳細な記載に基づいたものではなかったため、*S. polaris* が有性器官の未発達な状態で採集され、*R. salicinum* と同定された可能性が考えられる。

近年、地球規模の温暖化が最も顕著である北極域では、生物多様性の損失が懸念されており、そこに生育する生物の情報の蓄積および生物の保全施策をこうじる必要があるとされている (CAFF 2010)。そのためには適切な分類によって北極域の生物の多様性を把握する必要がある。今後も北極域における *Rhytisma* 属の正確な分類を進めるにあたっては、春から夏にかけて落葉上で成熟した胞子を形成している子実体を同定に用いることが重要である。また、未だ *Rhytisma* 属菌の塩基配列データの蓄積が少ないため、データベースの充実と塩基配列に基づく分子系統学的解析も *Rhytisma* 属の分類や多様性の把握にとって重要となる。

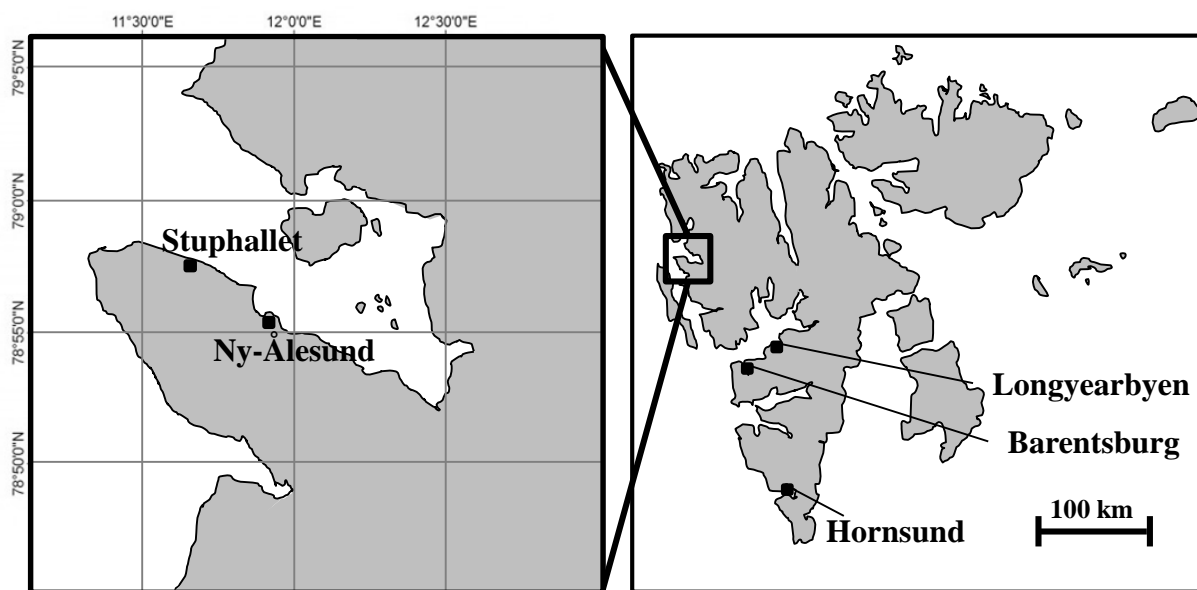


図2-1. 標本の採集場所 (■)。

表2-1. *R. polaris* とその近縁種の形態。

菌種 (宿主)	菌番号	場所	子実体		子のう		子のう胞子		引用		
			直径 (mm)	形 / 亀裂 / 葉面	長さ × 幅(μm)	形	長さ × 幅(μm)	形		鞘の厚み (μm)	
<i>R. polaris</i> (<i>S. polaris</i>)	OPUI574 (Type標本)	Ny-Ålesund, Spitsbergen, Norway	4.0-5.5	I/IS/AM	100-160 × 11-16 (av. 120.2 × 13.1)	C	60-85 × 3.5-5.0 (av. 73.1 × 4.5)	C, CC	0.5-2.5 (av. 1.2)	Present study	
	OPUI575	Ny-Ålesund, Spitsbergen, Norway	3.5-4.0	R/IS/AM	90-170 × 11-18 (av. 122.6 × 13.4)	C	60-80 × 3.5-5.5 (av. 72.7 × 4.2)	C, CC	0.5-2.0 (av. 1.2)	Present study	
	OPUI576	Ny-Ålesund, Spitsbergen, Norway	3.5-5.5	I/IS/AM	110-155 × 11-16 (av. 133.1 × 13.8)	C	60-85 × 3.0-5.0 (av. 75.2 × 4.2)	C, CC	0.5-2.0 (av. 1.1)	Present study	
	OPUI577	Stuphallet, Spitsbergen, Norway	2.5-3.5	I/IS/AM	90-160 × 11-14 (av. 130.2 × 12.5)	C	60-85 × 4.0-5.0 (av. 71.8 × 4.3)	C, CC	0.5-2.0 (av. 1.1)	Present study	
	OPUI578	Stuphallet, Spitsbergen, Norway	3.5-7.0	I/IS/AM	100-155 × 11-17 (av. 113.9 × 13.2)	C	55-80 × 3.5-5.0 (av. 72.0 × 4.1)	C, CC	0.5-2.5 (av. 1.2)	Present study	
	OPUI579	Stuphallet, Spitsbergen, Norway	4.0-4.5	R/IS/AM	85-155 × 11-16 (av. 120.3 × 12.6)	C	60-85 × 4.0-5.0 (av. 74.2 × 4.4)	C, CC	0.5-2.5 (av. 1.2)	Present study	
	OPUI580	Longyearbyen, Spitsbergen, Norway	3.0-4.5	I/IS/AM	90-170 × 11-15 (av. 139.6 × 13.0)	C	65-90 × 3.5-5.0 (av. 75.3 × 4.2)	C, CC	0.5-2.0 (av. 1.2)	Present study	
	OPUI581	Longyearbyen, Spitsbergen, Norway	2.5-3.5	I/IS/AM	100-165 × 11-18 (av. 126.9 × 13.5)	C	60-80 × 3.5-5.0 (av. 67.0 × 4.2)	C, CC	0.5-2.5 (av. 1.2)	Present study	
	OPUI582	Longyearbyen, Spitsbergen, Norway	3.0-4.5	I/IS/AM	105-165 × 11-16 (av. 118.5 × 12.7)	C	55-90 × 4.0-5.0 (av. 75.9 × 4.3)	C, CC	0.5-2.0 (av. 1.1)	Present study	
	OPUI583	Barentsburg, Spitsbergen, Norway	3.0-5.0	I/IS/AM	110-160 × 11-15 (av. 130.0 × 13.0)	C	60-80 × 4.0-5.0 (av. 72.3 × 4.4)	C, CC	0.5-2.0 (av. 1.2)	Present study	
	<i>R. salicinum</i> (<i>Salix</i> spp.)		Seven European countries	ND		120-150 × 10-15	C	60-90 × 1.5-3.0	F, C	ND	Saccardo (1889)
	<i>R. salicinum</i> (<i>Salix</i> spp.)	IMI286910	Himachal Pradesh, India	Up to 25	I/IS/AD	140-210 × 13-16	NC	60-95 × 3.0-3.5	F	0.5-1.0	Cannon and Minter (1986)
	<i>R. umbonatum</i> (<i>Salix</i> spp.)	IMI288524	Himachal Pradesh, India	1-3 (-4.5)	R/CS/AM, AD	90-140 × 16-20	NC	70-110 × 3.0-3.5	F	1.0-2.0	Cannon and Minter (1986)
<i>R. acerinum</i> (<i>Acer</i> spp.)		Seven European countries	15		120-130 × 9-10	C	65-80 × 1.5-3.0	F		Saccardo (1889)	
<i>R. huangshanense</i> (<i>Rhododendron simsii</i>)	Hou et al. 564	Huangshan Mountains, Anhui, China	0.25-1.0	OI/LS/AM	70-110 × 7-10	CC	35-60 × 2-2.5	F	No sheath	Wang et al. (2009)	

表中の略号: *I* 不定形; *R* ほぼ円形; *OI* 円状または不定形; *IS* 不定形; *CS* 円形; *LS* 直線形; *AM* 両面性; *AD* 表面性; *C* 棍棒形; *NC* 細い棍棒形; *CC* シリンダー形; *F* 糸状; *ND* 未記載。

表2-2. ITS領域を用いた分子系統解析に用いた菌株とそのGenBank accession number。Hornsundの標本は*R. polaris*と思われるが、詳細な形態観察を行えていないため、cf. (confer)を使用している。

菌株番号	GenBank accession number	宿主植物	採集場所
<i>Rhytisma polaris</i>			
OPU1574	AB714536	<i>Salix polaris</i>	Ny-Ålesund, Spitsbergen, Norway
OPU1575	AB714537	<i>Salix polaris</i>	Ny-Ålesund, Spitsbergen, Norway
OPU1576	AB714538	<i>Salix polaris</i>	Ny-Ålesund, Spitsbergen, Norway
OPU1577	AB714539	<i>Salix polaris</i>	Stuphallet, Spitsbergen, Norway
OPU1578	AB714540	<i>Salix polaris</i>	Stuphallet, Spitsbergen, Norway
OPU1579	AB714541	<i>Salix polaris</i>	Stuphallet, Spitsbergen, Norway
OPU1580	AB714542	<i>Salix polaris</i>	Longyearbyen, Spitsbergen, Norway
OPU1581	AB714543	<i>Salix polaris</i>	Longyearbyen, Spitsbergen, Norway
OPU1582	AB714544	<i>Salix polaris</i>	Longyearbyen, Spitsbergen, Norway
OPU1583	AB714545	<i>Salix polaris</i>	Barentsburg, Spitsbergen, Norway
<i>Rhytisma cf. polaris</i>			
H-1		<i>Salix polaris</i>	Hornsund, Spitsbergen, Norway
H-2		<i>Salix polaris</i>	Hornsund, Spitsbergen, Norway
H-3		<i>Salix polaris</i>	Hornsund, Spitsbergen, Norway
<i>R. salicinum</i>	AY465515	<i>Salix bebbiana</i>	Long Canyon, Idaho, USA
<i>R. salicinum</i>	AY465516	<i>Salix scouleriana</i>	Moscow Mountain, Idaho, USA
<i>R. acerinum</i>	GQ253100	No data	No data
<i>R. huangshanense</i>	GQ253101	<i>Rhododendron simsii</i>	Huangshan Mountains, Anhui, China
<i>Coccomyces australis</i>	EF191242	<i>Nothofagus antarctica</i>	Argentina
<i>Davisomycella medusa</i>	AY465525	<i>Pinus onderosa</i>	Little Belt Mountains, Montana, USA

表2-3. LSU領域を用いた分子系統解析に用いた菌株とそのGenBank accession number。Hornsundの標本は*R. polaris*と思われるが、詳細な形態観察を行えていないため、cf. (confer)を使用している。

菌株番号	GenBank accession number	宿主植物	採集場所
<i>Rhytisma polaris</i>			
OPU1574	AB714555	<i>Salix polaris</i>	Ny-Ålesund, Spitsbergen, Norway
OPU1575	AB714556	<i>Salix polaris</i>	Ny-Ålesund, Spitsbergen, Norway
OPU1576	AB714557	<i>Salix polaris</i>	Ny-Ålesund, Spitsbergen, Norway
OPU1578	AB7145458	<i>Salix polaris</i>	Stuphallet, Spitsbergen, Norway
OPU1580	AB714559	<i>Salix polaris</i>	Stuphallet, Spitsbergen, Norway
OPU1581	AB714560	<i>Salix polaris</i>	Stuphallet, Spitsbergen, Norway
OPU1582	AB714561	<i>Salix polaris</i>	Longyearbyen, Spitsbergen, Norway
OPU1583	AB714542	<i>Salix polaris</i>	Barentsburg, Spitsbergen, Norway
<i>Rhytisma cf. polaris</i>			
H-1		<i>Salix polaris</i>	Hornsund, Spitsbergen, Norway
H-2		<i>Salix polaris</i>	Hornsund, Spitsbergen, Norway
H-3		<i>Salix polaris</i>	Hornsund, Spitsbergen, Norway
<i>R. salicinum</i>	FJ495191	No data	No data
<i>R. salicinum</i>	HM140566	<i>Salix cinerea</i>	Sweden
<i>R. acerium</i>	EU833992	No data	No data
<i>R. acerinum</i>	FJ495190	No data	No data
<i>R. huangshanense</i>	FJ495192	<i>Rhododendron simsii</i>	Huangshan Mountains, Anhui, China
<i>R. punctatum</i>	HM140565	<i>Acer pseudosieboldianum</i>	Kamchatka, Russia
<i>R. andromedae</i>	HM140564	<i>Andromeda polifolia</i>	Sweden
<i>R. panamense</i>	GQ253099	<i>Comarostaphylis arbutoides</i>	Panama
<i>Coccomyces strobi</i>	DQ470975	No data	No data
<i>Lophodermium juniperinum</i>	HM140544	<i>Juniperus communis</i>	Sweden
<i>Duplicariella phyllodoces</i>	HM140516	<i>Phyllodoce coerulea</i>	Sweden

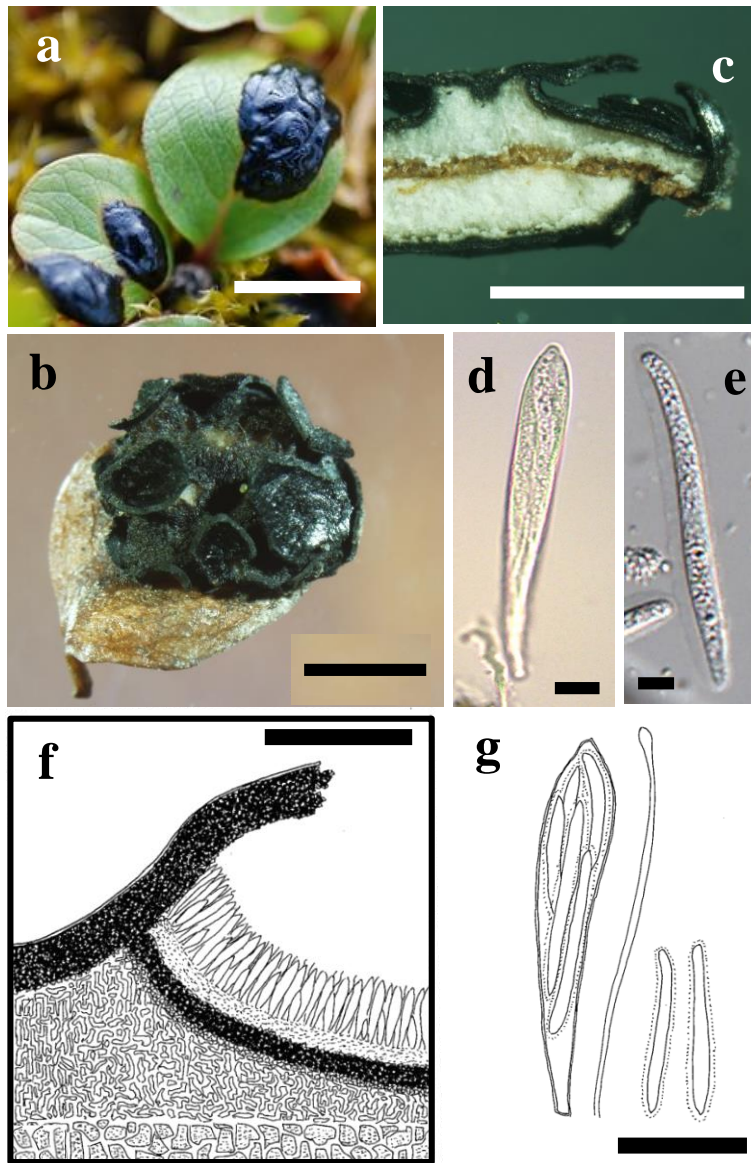


図2-2. *Rhytisma polaris* の形態 (OPU1574) (a) 葉の上に形成された子実体 (bar = 2 mm)。 (b) 落葉上で成熟した子実体 (bar = 2 mm)。 (c) 子実体の断面の様子 (bar = 2 mm)。 (d) 子のう胞子を含む子のう (bar = 10 μm)。 (e) 子のう胞子 (bar = 5 μm)。 (f) 子実体の断面のスケッチ (bar = 200 μm)。 (g) 子のう、副生体、子のう胞子のスケッチ (bar = 50 μm)。

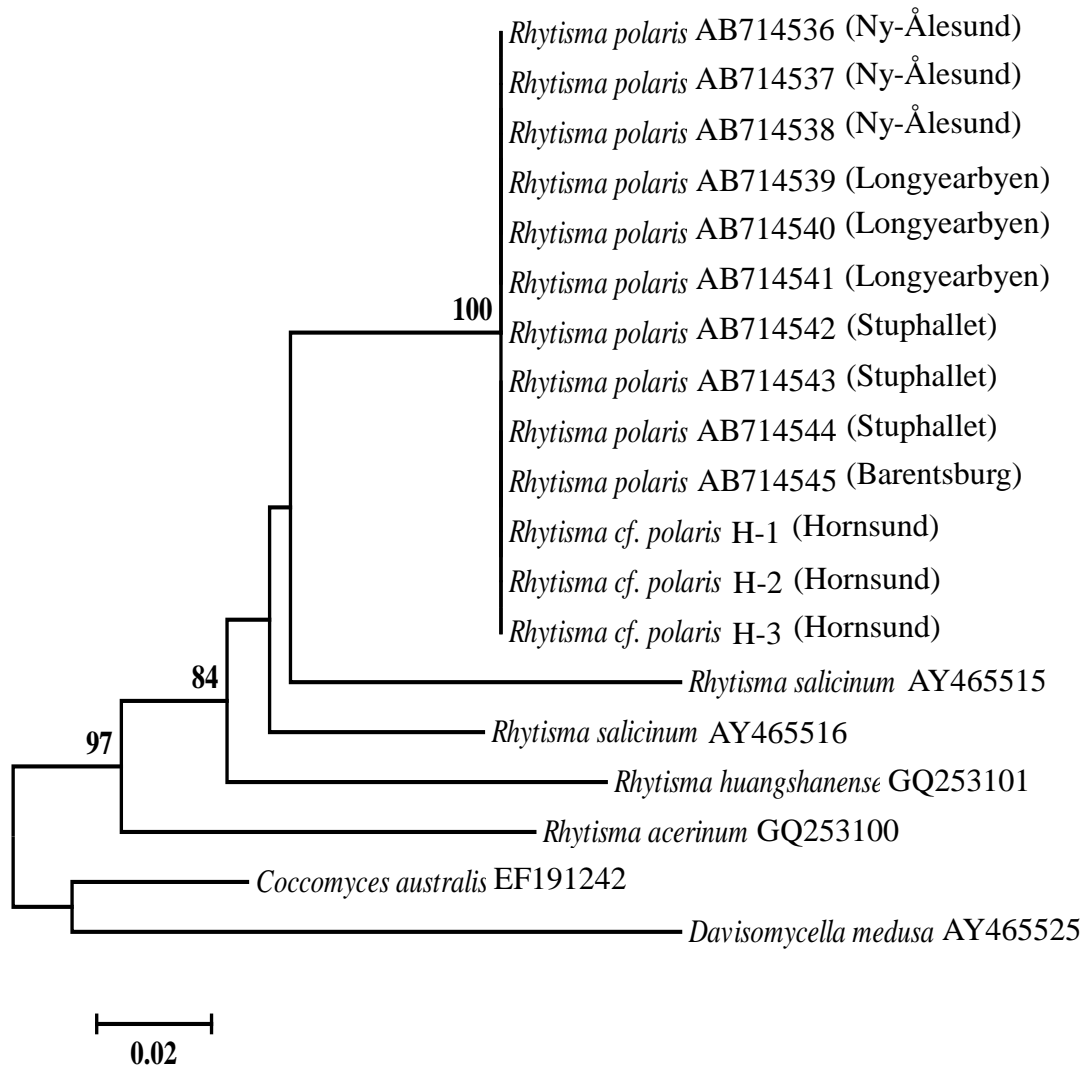


図2-3. *Rhytisma*科の標本中における*Rhytisma polaris*の系統樹上の位置。rDNA-ITS領域の塩基配列に基づき近隣結合法で作成した。ブースト値は、クラスターを支持する枝にそれぞれ数字で50%以上のときのみ示した(1000反復)。0.02で示すスケールは進化距離を表し、枝長の長さは置換塩基数の割合で示した。種名以下のアルファベット及び数字はGenBank登録番号を示す。Hornsundの標本は*R. polaris*と思われるが、詳細な形態観察を行えていないため、*cf.*を使用している。

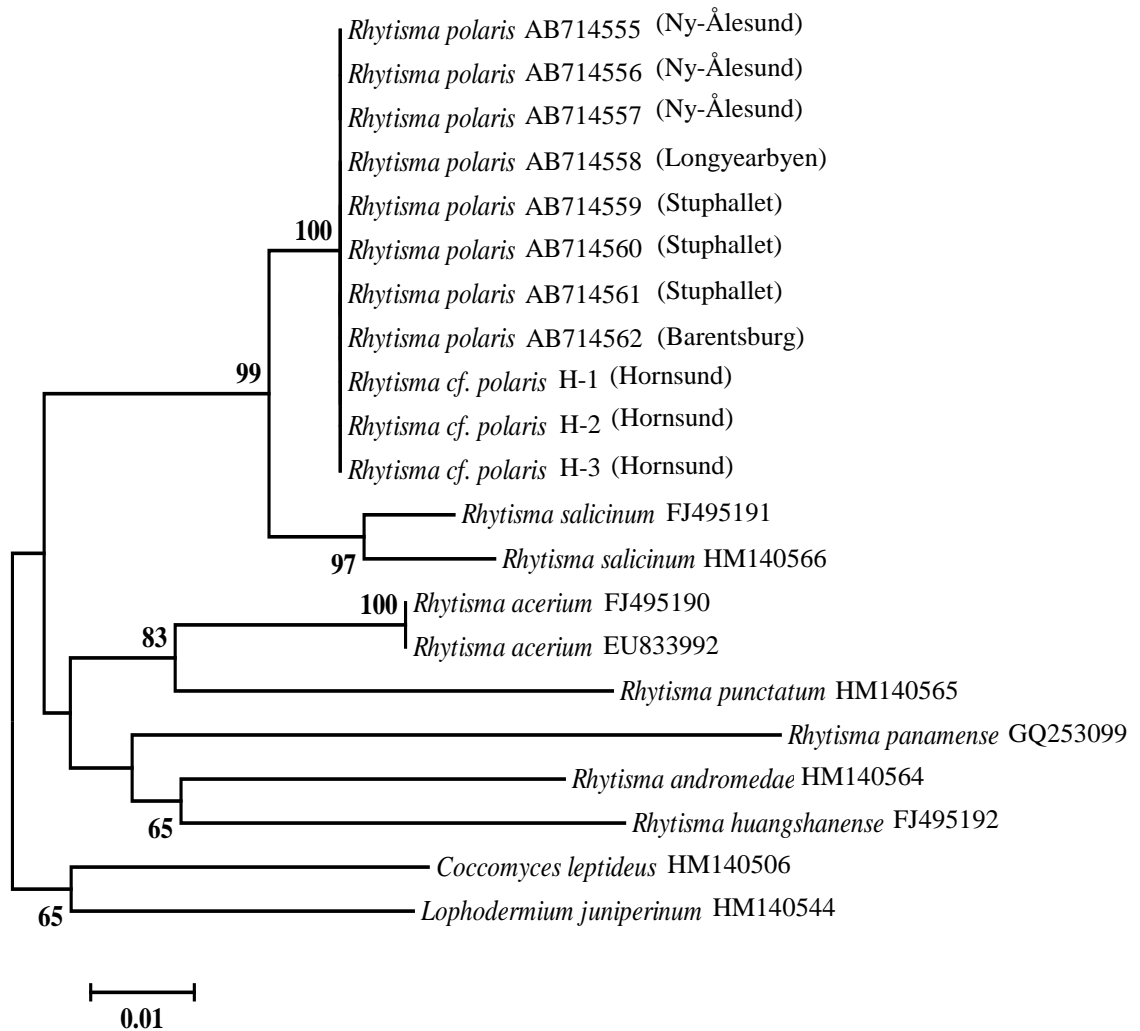


図2-4. *Rhytisma*科の標本中における*Rhytisma polaris*の系統樹上の位置。rDNA-LSU領域の塩基配列に基づき近隣結合法で作成した。ブースストラップ値は、クラスターを支持する枝にそれぞれ数字で50%以上のときのみ示した(1000反復)。0.01で示すスケールは進化距離を表し、枝長の長さは置換塩基数の割合で示した。種名以下のアルファベット及び数字はGenBank登録番号を示す。Hornsundの標本は*R. polaris*と思われるが、詳細な形態観察を行えていないため、cf.を使用している。

第3章 生態分布

3-1 背景と目的

特定の種の分布に関して考察する場合、地理的・地史的要因を重要視して分布域を示す場合を地理的分布と呼び、分布域とそれを規定する環境要因を強調して言及する際には、特に生態分布と呼ぶ（八杉ほか 1996）。*R. polaris* の地理的分布については、2章でスピッツベルゲン島の複数地点に存在していることが確認できた。本菌の地理的分布について、さらなる広範囲で議論するためには、*R. polaris* が寄生する可能性がある北極域のヤナギ種を対象として *Rhytisma* 属菌の標本を集める必要がある。しかしながら、調査の都合上、そのような周北極域にわたる標本採集は本研究では行っていない。そのため、本章では *R. polaris* の地理的分布については議論せず、後者の *R. polaris* の生態分布について明らかにすることを目的として本菌の発生場所の調査を行った。

R. polaris の発生は様々な環境要因に影響されている。*Rhytisma* 属菌の発生と環境要因との関係を示した研究としては、Bevan and Greenhalgh (1976) や Kosiba (2007) が環境汚染、主に大気中や土壌中の硫黄酸化物や窒素酸化物の増加によって *R. acerinum* の発生率が高まることを示している。しかしながら、*Rhytisma* 属の発生場所を決定する、より基本的な自然環境中の要因について示した研究はこれまでに無い。そこで、まずは *R. polaris* の発生に影響する環境要因を検討した。第一に、*R. polaris* の発生に必要不可欠であるのが宿主の存在である。キョクチャヤナギの絶対寄生菌である *R. polaris* の分布には、宿主の存在が第一条件であり、キョクチャヤナギの密度が本菌の発生を決定づける環境要因の一つであると考えられた。キョクチャヤナギはスピッツベルゲン島に広く分布することが知られており、その中でも氷河後退

域の遷移中・後期で旺盛に生育している (Nakatsubo et al. 1998; Robinson et al. 1998)。

このため、本研究ではニーオルスンの遷移中・後期地域を調査地とした。次に、*Rhytisma* 属の発生の増加や、子実体の成熟に多雨や湿潤条件が影響することが先行研究で示されていたため (Jones 1925; Bavan 1976)、その場所の水分環境の指標として土壌水分量を調査項目に加えた。第三に、その他の物理的な環境条件を考慮した。*Rhytisma* 属の発生を決定する環境要因についての情報が無いため、植物の分布に影響する環境要因を参考とした。Jenny (1958) および Major (1951) は、植物の分布をその外側から決定し、群集の逆作用に影響を受けない物理的な環境要因として、大気候、生物相、地形、土壌の母材、遷移が始まってからの時間、の 5 つを挙げている。地域を限定した比較的小さなスケールで分布傾向を見る場合、「大気候」と「生物相」は共通しているとみなせ、他の 3 つの要因が分布の変動に対して中心的な意味をもつこととなる (石塚 1977)。さらに、本研究では調査範囲を遷移中・後期地域に限定したため、「遷移の時間」も同一と見なせる。また、*R. polaris* はキョクチヤナギの絶対寄生菌であるため、ヤナギ葉上で生育する本菌の分布にとって「土壌の母材」は関係がないと考えた。このため、生物群集から独立な物理的な環境要因として、残った「地形」のみを調査項目とし、具体的には地面の角度 (斜度) を測定した。

以上のことから、本章では、*R. polaris* の発生場所とそれを決定する要因として、ヤナギの被度、土壌水分量および地形についての調査を行い、*R. polaris* の生態分布を明らかにすることを目指した。

3-2 方法

3-2-1 調査地

本章を含め、これ以降の調査はスピッツベルゲン島・ニーオルスンで行っている。ニーオルスは北緯 78.5 度、東経 11.5 度に位置しており（図 1-2）、2001-2010 年の年平均気温は -4.3 度で、年平均降水量は 421mm、無雪期間は 7 月から 8 月までの約 2 ヶ月間である。

3-2-2 発生場所に関する調査

(1) ライントランセクト調査

2009 年 8 月、調査地においてライントランセクト法を用いて *R. polaris* の発生に関する調査を行った。植生がよく発達した南西向き斜面に 3 本のライン（図 3-1 の a-c）を設置した。全てのラインの幅は 1m、長さはライン a が 225m、ライン b が 230m、ライン c が 240m とし、各ラインの間隔は 30m とした。このライン上の全ての 1m² 方形区内の (1) *R. polaris* 発生の有無、(2) キョクチャナギの被度、(3) 土壌水分量および (4) 斜度を測定した。(1) ~ (4) の測定方法はそれぞれ以下のとおりであり、各方形区内の図 3-2 に図示した場所で測定した。

(1) *R. polaris* 発生の有無：1m² 区内に 1 枚以上感染葉がある場合を「発生」とし、発生がまったく見られない場合を「未発生」とした。

(2) キョクチャナギの被度：1m² 区内のキョクチャナギの被度を 10 段階で評価した。それぞれの段階の方形区内のキョクチャナギの被度（C%）は以下の通りである。

被度 + : $1 \leq C\% < 10$ 被度 1 : $10 \leq C\% < 20$ 被度 2 : $20 \leq C\% < 30$

被度 3 : $30 \leq C\% < 40$ 被度 4 : $40 \leq C\% < 50$ 被度 5 : $50 \leq C\% < 60$

被度 6 : $60 \leq C\% < 70$ 被度 7 : $70 \leq C\% < 80$ 被度 8 : $80 \leq C\% < 90$

被度 9 : $90 \leq C\% \leq 100$

(3) 土壌水分量：土壌水分計（typeHH2, Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK）を用いて、1m²区内の中心地点の相対的土壌水分率を測定した。

(4) 斜度：長さ 1m 幅 10cm の角材を方形区の端、ライン方向に設置し（図 3-2）、その上にクリノメーター（211-0016, Kamiyama-seisakusyo, Tokyo）を置いて斜度を測定した。

これらのデータに関して、統計解析ソフト StatView for Windows Ver. 5.0（SAS Institute, Inc., Cary, NC）を用いて、各環境における *R. polaris* の発生について分散分析による統計解析を行った。

(2) 感染率調査

ライントランセクト調査において、1m²方形区内においても *R. polaris* の発生に偏りが見られたため、より細かなスケールでの *R. polaris* の発生場所について調査を行った。この調査スケールでの *R. polaris* の発生要因として感染源の有無が考えられた。*R. polaris* も他の *Rhytisma* 属菌と同様に、落葉上から胞子を散布し、宿主葉に感染すると考えられたので、感染源である昨年の感染落葉は、発生に大きな影響を及ぼしていると考えられた。そこで、*R. polaris* の発生が多く見受けられた図 3-1 の地点 D（78°55'17"N, 11°51'88"E）において、2010 年 8 月に 1m²方形区中にランダムに選択した 30 個の 10cm² 方形区（図 3-3）内のキョクチャナギ全葉数と *R. polaris* 感染葉数および前年の感染落葉数を測定した。そして、統計解析ソフト StatView for Windows Ver. 5.0（SAS Institute, Inc., Cary, NC）を用いて、方形区内の感染率（感染

葉数／全葉数) と全葉数および感染率と感染落葉数の相関関係について統計解析を行った。また、感染の範囲の大きさを明らかにするため、感染率を算出した調査区の周りの調査区(例えば、図 3-3C の調査区 8 番に対する調査区 18、21、2 番)を隣り合う区とし、その隣り合う区の間での感染率の差を算出し、その確率分布を求めた。

3-2-3 感染率の経年変化

野外環境下における *R. polaris* 感染率の経年変化を明らかにするため、同所におけるキョクチャナギの健全シュート数と *R. polaris* 感染シュート数を 5 年間にわたって計 4 回計測した。調査では、図 3-1 の地点 E (78°55'49"N, 11°52'01"E) において 15cm 四方の方形区を 14 カ所設置し、2008、2010、2012 および 2013 年の 8 月に方形区内におけるキョクチャナギのシュート数と *R. polaris* 感染シュート数を計測し(図 3-4)、それを基に感染率(*R. polaris* 感染シュート数／キョクチャナギのシュート数)を算出した。2008 年に 14 カ所の調査区を設置するにあたって、3 つの種類の調査区、(A) *R. polaris* の感染率が 10%以上の調査区、(B) 感染率が 10%以下の調査区、(C) 感染が見られない調査区、を意図的に選んだ。計測したデータに関して、統計解析ソフト StatView for Windows Ver. 5.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC) を用いて、シュート数の変化や感染率の変化についての統計解析を行った。なお、この調査データに関しては、大阪府立大学の東條元昭准教授が採取したデータを使用させて頂いている。

3-3 結果

3-3-1 発生場所に関する調査

(1) ライントランセクト調査

全調査方形区 695 区のうち、679 区でキョクチャナギの生育が確認でき、そのうち被度 4 の方形区が 98 区と最も多く、被度 9 の方形区が 3 区と最も少なかった（図 3-5A）。*R. polaris* の発生が見られたのは 363 区であり、53%の発生率となった。*R. polaris* の発生区と非発生区の被度の有意差検定を行った結果、*R. polaris* 発生区の被度と非発生区の被度を比較して有意な差は無かった（t 検定 $P>0.05$ ）。また、被度ごとの *R. polaris* 発生率（*R. polaris* 発生方形区数／方形区数×100）は、被度+の方形区群において12%と比較的低い値をとり、次に被度1と被度9方形区群で約30%、それ以外の被度では60%前後であった。被度別の発生率の統計解析では、被度+の方形区群と被度2以上の方形区群との間に有意な差が見られた（t 検定 $P<0.05$ ）。被度9の方形区はラインcに3区のみ出現であったため、分散分析には用いることができなかった。

R. polaris の発生区と非発生区の土壌含水率の有意差検定を行った結果、発生区の含水率は非発生区の含水率と比較して有意に高かった（t 検定 $P<0.05$ ）。また、全方形区を土壌含水率10%区切りにグループ化し、各グループの方形区数と発生区率を算出した（図 3-5B）。含水率20～30%の方形区が178区と最も多く、含水率0～10%であった方形区が2区と最も少なかった（図 3-5B）。各土壌含水率における *R. polaris* 発生率（*R. polaris* 発生方形区数／方形区数×100）は土壌含水率の高い方形区ほど高くなる傾向を示した（図 3-5B）。しかし、各グループ間の有意差検定を行った結果、各土壌含水率別の発生率に有意な差が見られたのは含水率20～30%の方形区群と含水率30～40%の方形区群の間、および含水率20～30%の方形区群と含水率

40～50%の方形区群の間でのみであった (t 検定 $P<0.05$)。また、含水率 0～10%の方形区は区数が 2 区のみ (ライン a と b で一区ずつ) であったため、分散分析に用いることができなかった。

R. polaris の発生区と非発生区の斜度の有意差検定を行った結果、発生区の斜度は非発生区の斜度と比較して有意に小さかった (t 検定 $P<0.05$)。さらに全方形区 3°区切りにグループ化し、各グループの方形区数と発生区率を算出した (図 3-5C)。斜度の測定では、斜度 0～2°であった方形区が 303 区と最も多く、斜度 12～14°であった方形区が 32 区と最も少なかった (図 3-5C)。さらに各斜度範囲における *R. polaris* 発生率 (*R. polaris* 発生方形区数 / 方形区数 × 100) は斜度の低い方形区ほど高くなる傾向にあった (図 3-5C)。各グループ間で有意差検定を行った結果、斜度 0～2°の発生率が、他のグループでの発生率に比べて有意に高かった (t 検定 $P<0.05$)。また、斜度 3～5°の発生率と他のグループの間にも有意な差が認められ、斜度 0～2°のグループの次に発生率が高かった (t 検定 $P<0.05$)。

(2) 感染率調査

1m² 方形区内での 30 区の 10×10cm 方形区の感染率は 0-30% (平均 10%) となり、それぞれの方形区の感染率は大きく異なっていた (図 3-6A)。図 3-6B では隣り合う区の間での感染率の差の分布を示した。隣り合う方形区は重複無しで 29 組が確認できた。感染率の差が 5%以内であった組が最も多かったが、感染率の差が 10%以上であった場合も多く見受けられた (図 3-6B)。次に図 3-7 において、感染率 (*R. polaris* 感染葉数 / キョクチャナギ全葉数) と全葉数および感染落葉数の関係について示した。感染率と全葉数、感染率と感染落葉数の間には共に有意な正の相関関係が認められた (感染率対全葉数: $r=0.48, p<0.05$, 感染率対感染落葉数 $r=0.61, p<0.05$)。

しかしながら、全葉数と感染落葉数との間にも相関関係が確認できたため ($r=0.50$, $p<0.05$)、感染率、全葉数および感染落葉数について偏相関分析を行った。その結果、相関係数は有意な相関関係にあったのは感染率と感染落葉数との間でのみ認められた ($r=0.49$, $p<0.05$)

3-3-2 感染率の経年変化

表 3-1 に各調査年のヤナギシュート数、感染シュート数、感染率を示した。ヤナギシュート数は調査区ごとに見た際には大きく年変動したが、調査区内の平均シュート数に大きな変化はなかった (表 3-1)。一方、感染シュート数と感染率の経年変動は、全シュート数とは異なる傾向を示した。平均感染シュート数は年変動が大きく、それにともなって平均感染率も年によって大きく異なった。しかしながら、調査区ごとの感染率は、2008 年に感染率の高かった区は、その後も比較的高い感染率を維持し、逆に 2008 年に感染率が低かった区は感染率が比較的低いままであった。表 3-1 で示した 2008 年の感染率によって分けられた調査区群 A-C において、2010 年と 2012 年の計測でも群間の測定値に有意な差が見られた (Kruskal-Wallis 検定、 $P<0.05$)。しかしながら、2013 年の計測では、全ての調査区で感染率が著しく高く、A-C の調査地群間で有意な差は見られなかった (Kruskal-Wallis 検定 $P>0.05$)。

3-4 考察

ライントランセクト調査の結果、キョクチヤナギの被度が著しく低い場所を除けば、その被度にかかわらず *R. polaris* が発生しており、土壌含水率が高く、斜度が小

さい場所に発生しやすいことが明らかになった。

統計解析の結果、斜度と土壌含水率の間には有意な相関関係が確認された ($R=0.19$ $P<0.05$)。Thorntwaite (1948) は、土壌水分量 (M) の収支を降水量 (P) と流出量 (O) および蒸散量 (E) によって以下のように表している。

$$\text{土壌水分量 (M)} = \text{降水量 (P)} - \text{流出量 (O)} - \text{蒸散量 (E)}$$

本調査地の範囲を考えると、降水量は変わらないと見なせるだろう。流出量は一般に傾斜面では多くなるため、傾斜の急な場所ほど土壌水分量は低くなる。蒸散量は、地温気温の上昇につれて増加するものであるため、斜面の方位に影響される。今回の調査は南西向き斜面で行われており、全ての方形区の方位は同じであるとみなせる。従って、調査地における土壌水分は地面の斜度に大きく影響されるはずである。つまり、斜度が低い場所では土壌水分量が大きくなり、その水分環境が *R. polaris* の発生に有利に働いていると考えられた。*Rhytisma* 属の一部の種では、湿った環境下で子実体の成熟や胞子の散布を行うことが示されており (Jones 1925; Weber and Webster 2002; Hisang and Tian 2007)、降雨や雪解け水などの水分条件が、土壌水分量と *R. polaris* の発生を同時に増加させることで、2つの間に相関が見られた可能性が考えられる。また、斜度およびそれに伴う土壌水分量はヤナギの被度にも影響している可能性が考えられたため、統計解析を行った結果、斜度とヤナギの被度との間には、有意な相関関係が認められたが ($R=0.36$ $P<0.05$)、土壌含水率とヤナギの被度には有意な相関関係が認められなかった ($R=0.06$ $P>0.05$)。このことから、キョクチヤナギと *R. polaris* の水分要求性は異なっており、両者をあえて比較するとすれば、ヤナギの方が乾燥した場所でも生育できると考えられた。以上をまとめると、本調査地において、斜度に影響され土壌水分量が高まる場所が存在し、その土壌水分量の高い場所において高頻度で *R. polaris* が発生していると考えられた。

一方、1m² 方形区内での感染率調査では、10×10cm 方形区内の感染率と感染落葉数の間に有意な相関関係が見られたことから、10cm～1m スケールでの感染率には、感染源である感染落葉の有無が大きな影響を及ぼしていることが示唆された。また、隣り合う方形区の間でも感染率に大きな差が見られたことから、感染落葉から次の年に新しい感染葉ができる範囲は著しく狭いと予想された。この理由としては、胞子の散布範囲が狭いこと、もしくは感染源から離れた胞子の感染力が著しく落ちることが可能性として考えられるが、これについては4章で詳しく調査している。

2008年からのシュート数の経年変化調査では、ヤナギのシュート数の変化と感染シュート数の変化が、異なる傾向を示した。ヤナギの平均シュート数が変化しなかったことは、調査地の遷移段階が後期にあり、ヤナギの現存量が安定していることを示した。逆に各方形区においてヤナギのシュート数は急激に変化した。この原因は環境の変化によるものとは考えづらい。それよりは、ヤナギの寿命やトナカイなどによる被食といった影響を受けた結果と考えられる。一方、感染シュート数は、調査区全体で年ごとに大きな変化を示した。これは *R. polaris* の発生が降雨量に強く影響されているためと考えられる。調査年前後の夏期(7-8月)の降雨量は大きな年変化を示し、2013年の降雨量が著しく高くなっていることが見て取れる(図3-8)。このことから、*R. polaris* の発生に降水量が何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

調査区ごとの感染率を比較すると、著しく降水量の多かった2013年を除いて、感染率の高い場所は例年高く、低い場所は例年低いという傾向が見られた。これは、*R. polaris* が例年同じ場所で発生していることを示唆しており、ライントランセクト調査で明らかになった地形に影響を受けた水分環境が発生率に影響していること、

感染率調査で明らかになった感染源からの距離で発生範囲が限定されることと関係していると考えられた。

本章で、*R. polaris* の発生場所とその環境要因について調査を行った結果、生態分布を決定する要因として、斜度、土壌水分量と降水量で示された水分環境および感染源となる感染落葉からの距離が示唆された。これらの環境要因とともに、*R. polaris* の生態が相まって、本章で見たような分布様式が形成されると考えられる。そこで次章では、本菌の生活史を明らかにしたうえで、特に落葉上での *R. polaris* の子実体成熟および胞子の散布と水分環境がそれらに与える影響に注目して、本菌の生態学的な特徴の解明を目指した。

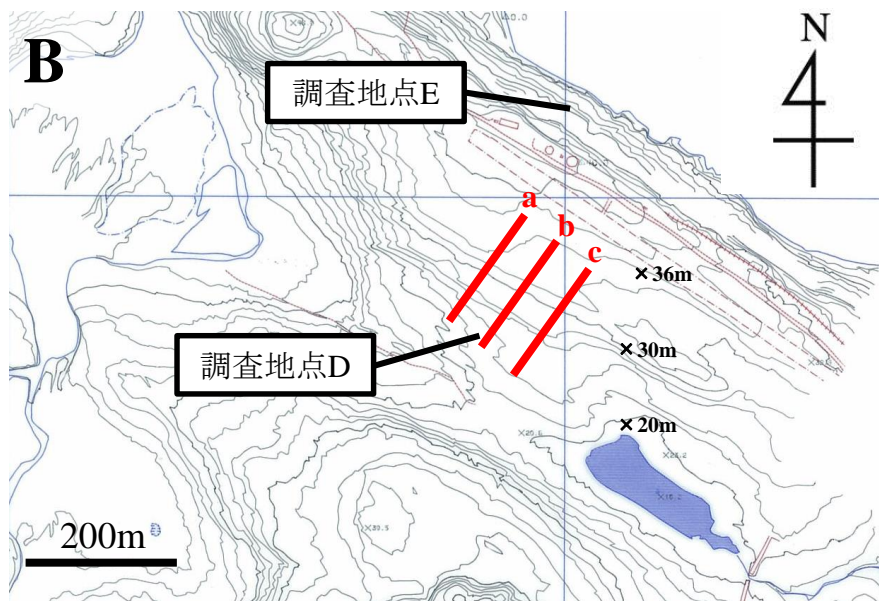
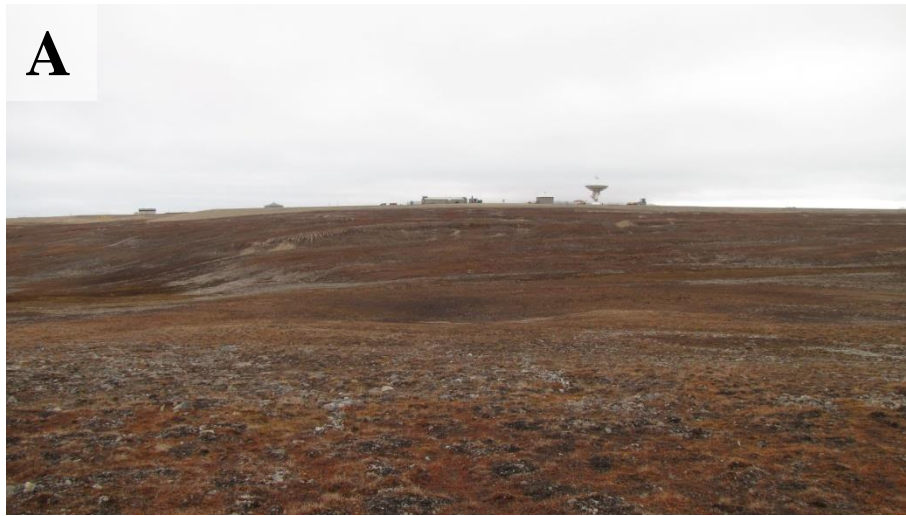
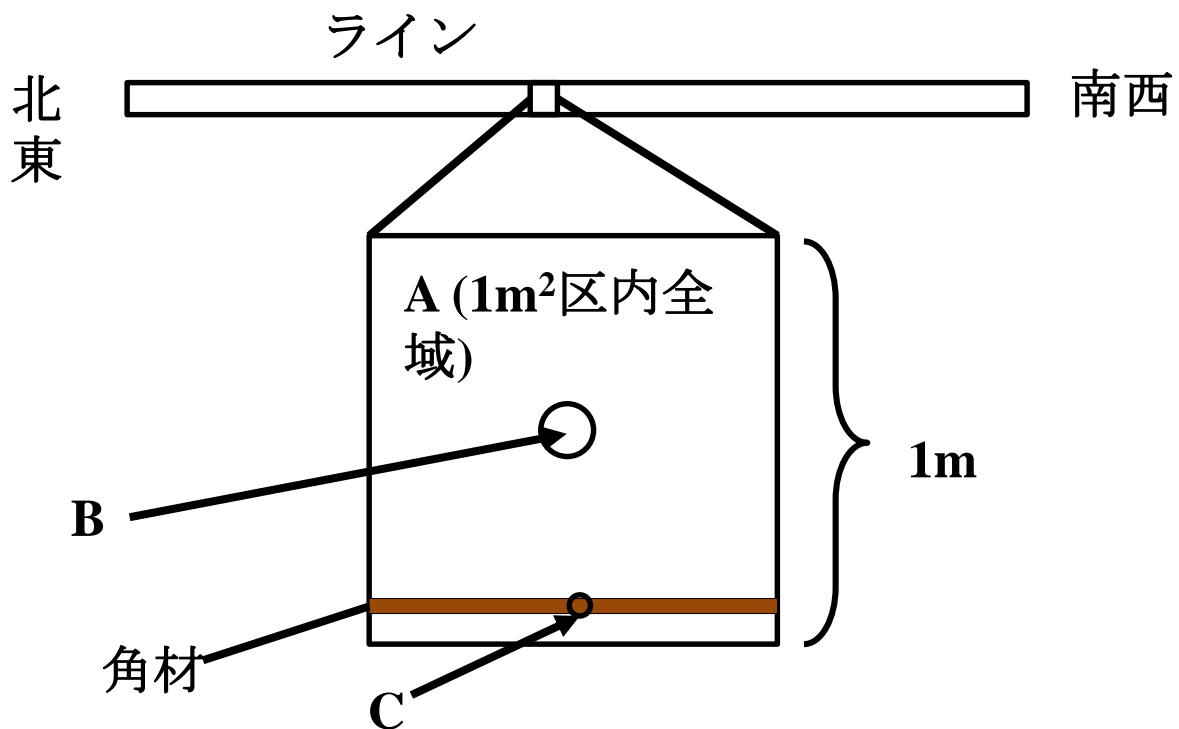


図3-1. ライントランセクト法を用いた分布調査。調査地の様子 (A) と地図上の場所 (B)。赤線で示した場所で調査を行った。



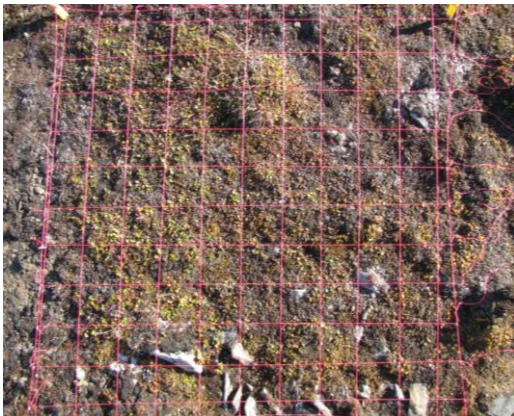
測定項目	単位	測定場所
<i>R. polaris</i> 発生の有無	発生または未発生	A
キョクチャナギの被度	10段階	A
土壌含水率	%	B
斜度	度	C

図3-2. ライン上の各方形区において計測した項目と計測位置。

(A)



(B)



(C)

20	15	94	87	65	70	9	88	52	98
48	54	95	77	27	28	57	79	1	76
18	8	21	69	97	35	68	3	26	63
82	2	36	60	4	30	46	100	53	45
93	55	49	22	74	47	29	64	44	81
72	90	78	66	32	71	96	84	56	83
19	24	62	6	80	51	25	91	13	39
85	67	14	41	43	38	5	7	61	34
33	31	17	75	16	37	86	12	59	89
99	92	42	10	40	11	23	58	50	73

← 1m →

図3-3. 感染率調査の調査地の様子 (A)。1m²の調査地を100区画に区切り (B)、作成した乱数表の黄色部である1-30の30カ所 (C) について感染率の調査を行った。

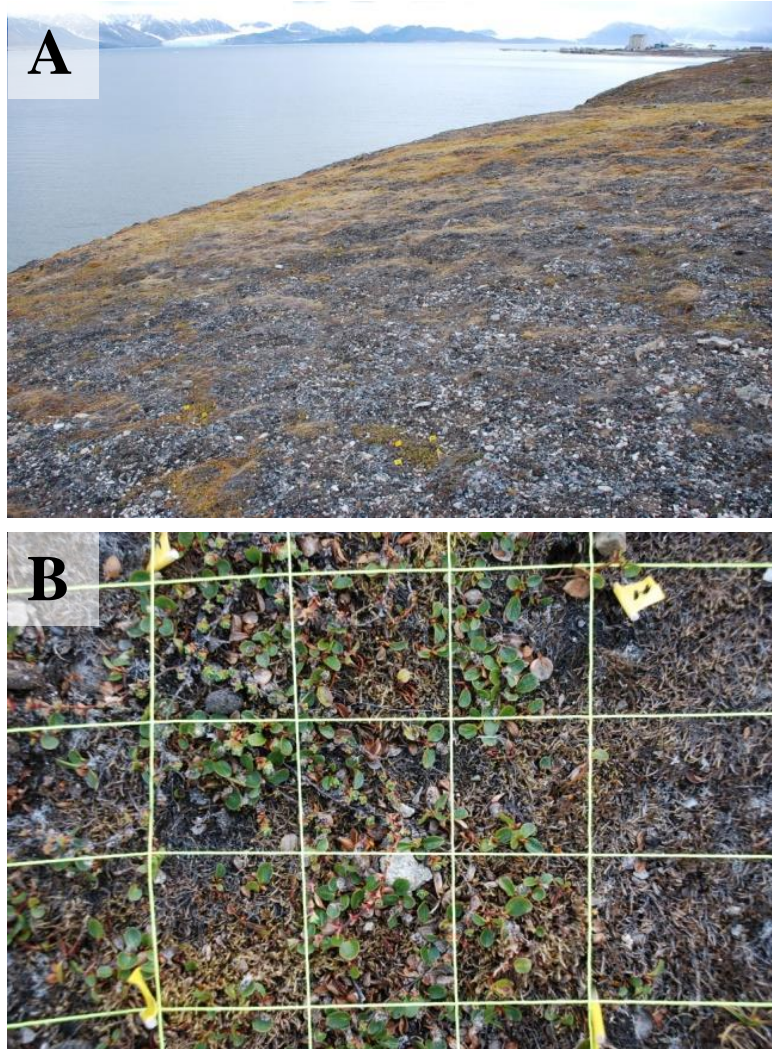
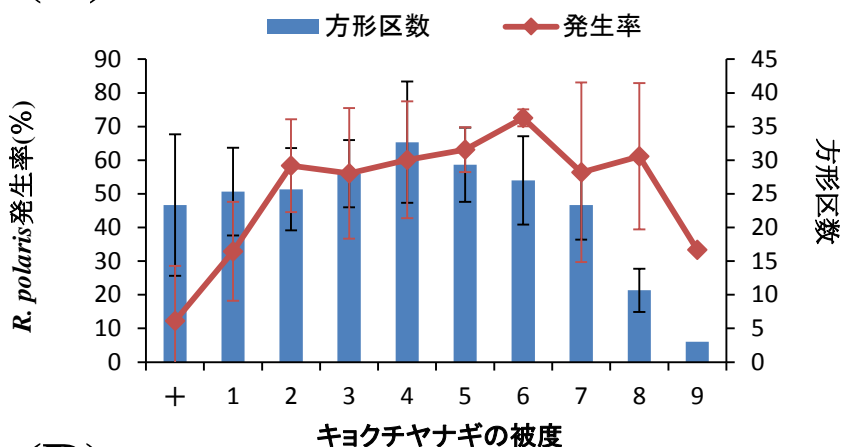
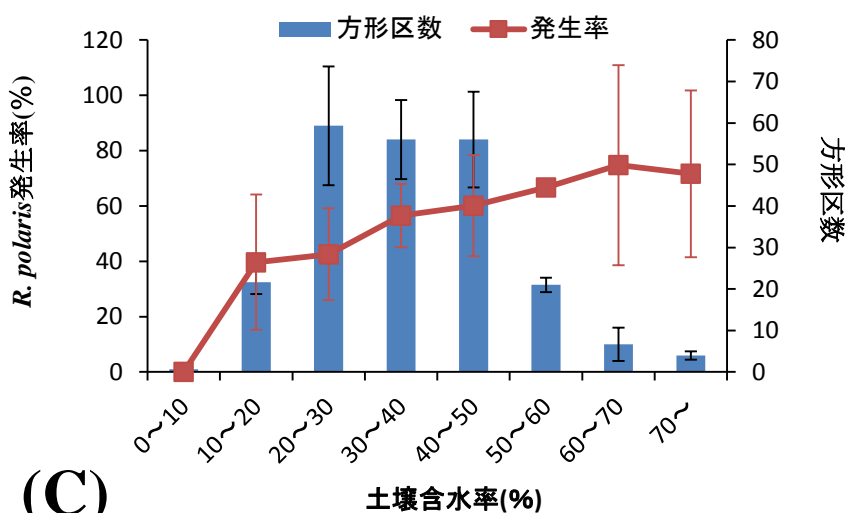


図3-4. キョクチヤナギのシュート数の経年変化の調査場所の様子。
調査地の全景 (A) と調査区 (1マスは5×5cm) (B)。

(A)



(B)



(C)

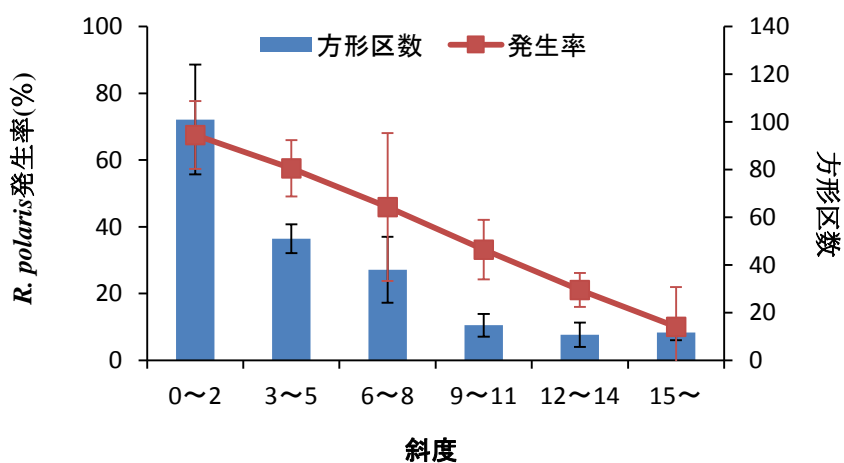


図3-5. ライントラセクト調査における環境傾度ごとの*R. polaris*の発生率。キョクチャナギの被度段階ごとの方形区数と発生区率 (A)。土壌含水率10%範囲ごとの方形区数と発生区率 (B)、斜度ごとの方形区数と発生区率 (C)。

A

9.7	8.5					0.0			
				30.6	19.1				17.4
3.9	27.9	16.7					0.0	6.7	
	6.5			3.0					
			2.4			10.5			
0.0	1.9		0.0			10.2		27.6	
		0.0				0.0	10.9		
		1.8		3.9			5.0		
			14.3		2.7	8.8			

B

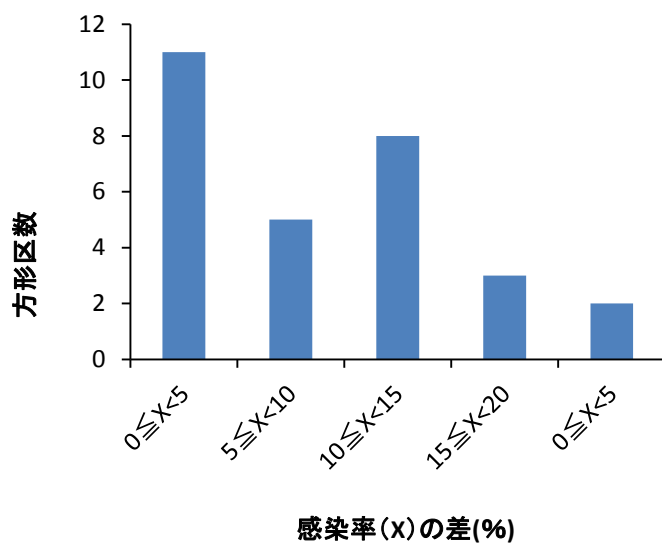


図3-6. 感染率の調査における10×10cm方形区ごとの感染率 (A) と隣り合う方形区間の感染率差の分布 (B)。

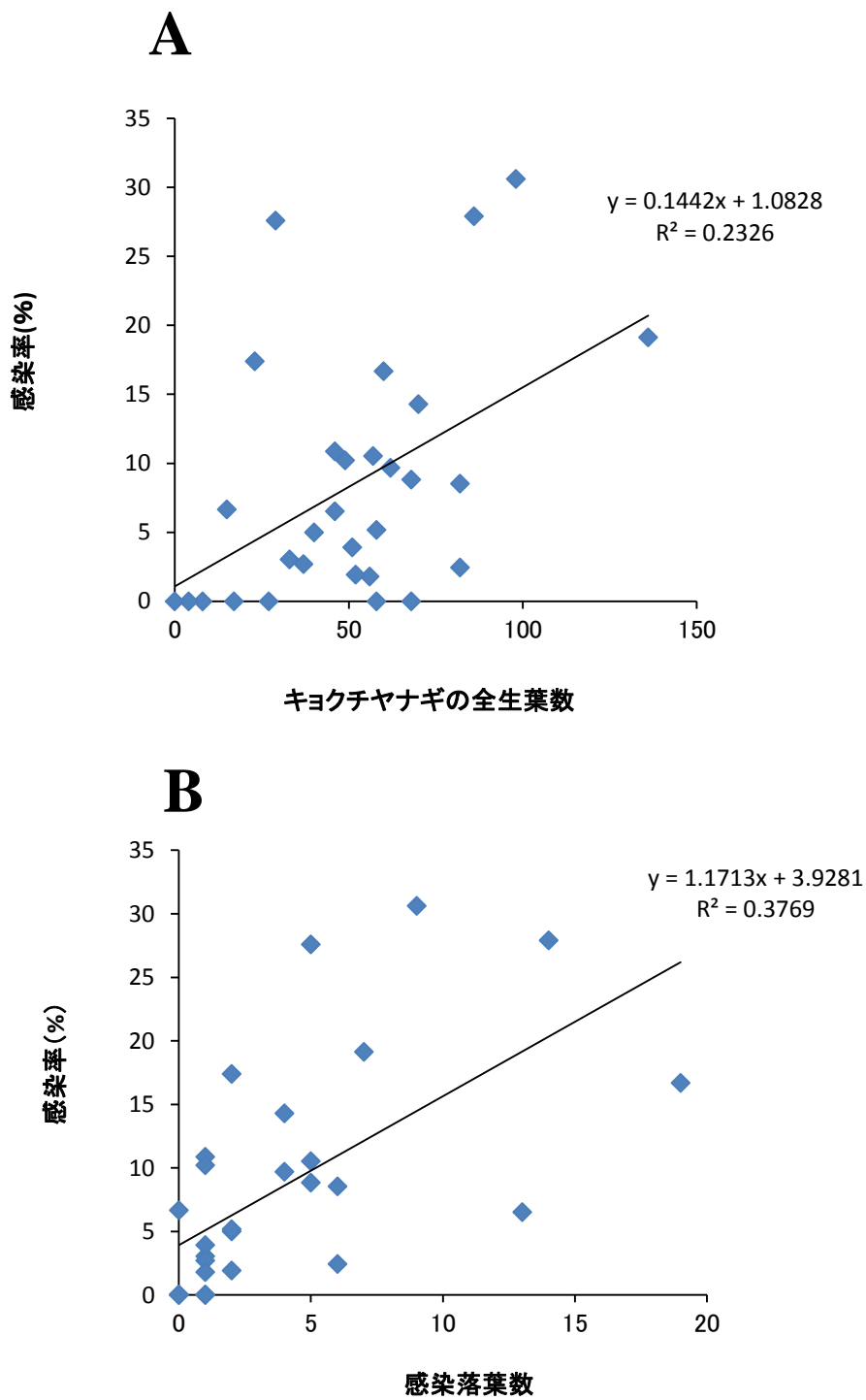


図3-7. キョクチヤナギの全生葉数と感染率の関係 (A) および感染落葉数と感染率の関係 (B)。

グループ	調査区 No.	全シュート数				感染シュート数				感染率 (%)			
		2008 年	2010 年	2012 年	2013 年	2008 年	2010 年	2012 年	2013 年	2008 年	2010 年	2012 年	2013 年
A	1	137	170	173	145	47	51	21	72	34	30	12	50
	2	111	167	200	145	30	25	8	127	27	15	4	88
	3	113	195	137	153	35	29	11	43	31	15	8	28
	4	95	140	140	95	25	17	13	51	26	12	9	54
B	5	129	71	68	94	1	1	1	28	1	1	1	30
	6	129	77	127	112	4	3	0	25	3	4	0	22
	7	89	40	40	36	4	1	0	17	4	3	0	47
	8	115	115	120	160	5	3	0	28	4	3	0	18
	9	104	134	132	132	9	9	4	36	9	7	3	27
	10	124	223	203	177	11	16	14	52	9	7	7	29
C	11	99	77	84	105	0	0	0	9	0	0	0	9
	12	117	144	165	128	0	0	1	24	0	0	1	19
	13	128	93	125	126	0	0	1	43	0	0	1	34
	14	156	40	29	24	0	6	1	8	0	15	3	33
	平均	118	120	125	117	12	12	5	40	10	10	4	34

表3-1. 2008、2010、2012および2013年のヤナギシュート数、感染シュート数および感染率（感染シュート数／ヤナギシュート数×100）。
（グループA）2008年の感染率が10%以上の調査区、（グループB）2008年の感染率が10%以下の調査区、（グループC）2008年に感染が見られなかった調査区。

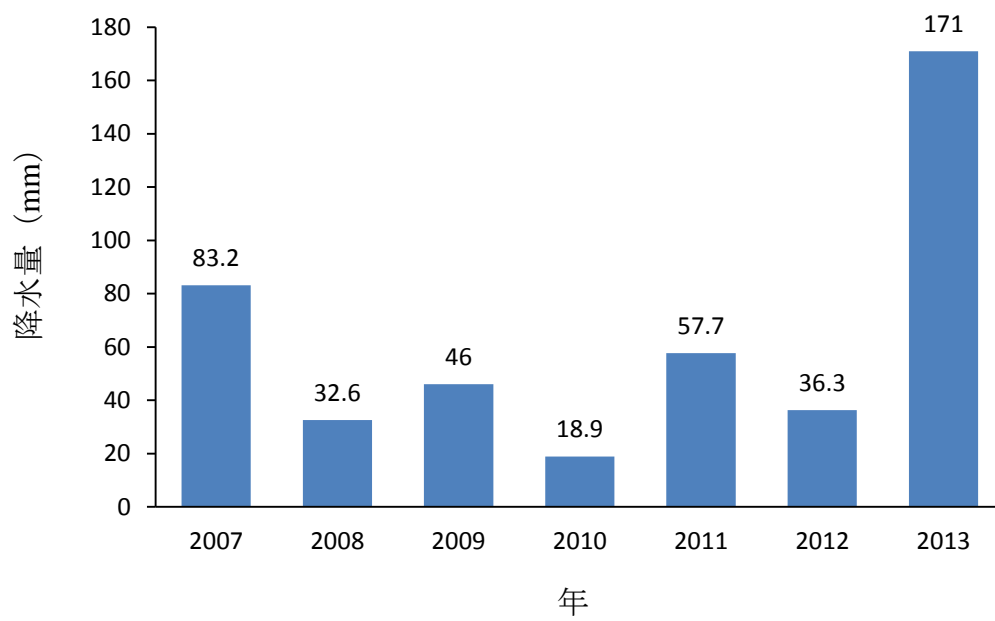


図3-8. 2008-2013年の7月1日から8月31日までの降水量。

第4章 生活史

4-1 背景と目的

生活史とは生物がいつどのような発育段階を経て出生から死亡に至るかの過程を示す言葉である（八杉ほか 1996）。植物寄生菌の生活史は宿主植物の生態や生活史に大きく影響を受ける。特に、*Rhytisma* 属を含む絶対寄生菌は、成長に必要な栄養を宿主植物に完全に依存するため、同属内の種でも宿主植物の生態が異なれば、その生態および生活史は異なる。*Rhytisma* 属菌についての先行研究は、形態的手法に基づいた分類に関する報告が主であり、その生態と生活史について詳しく調査を行っている研究は2例しかない（Jones 1925; Suto 2009）。現在明らかになっている本属菌の生態的な特徴として、子実体の形成が宿主の生葉上でのみ可能であること。胞子が宿主に感染し、次の胞子を作るまでの世代交代の周期は1年であること。子実体の成熟と胞子の散布は、落葉樹に寄生する種では、春から初夏にかけて前年の落葉で起こり、常緑樹に寄生する種では葉が生え替わる時期に前年の生葉上で起こること。さらに、それらの子実体成熟と胞子散布の際に水分環境が重要な環境要因になることなどが挙げられる。*Rhytisma* 属菌は1年でその生活史を一巡させるため、宿主である樹木植物の1年間のフェノロジーにその生活史は影響される。例えば、落葉樹のカエデ属に寄生する *R. acerinum* の生活史（Jones 1925）と常緑樹のモチノキ属に寄生する *R. ilicis-integrae*、*R. ilicis-latifoliae* および *R. ilicis-pedunculosae* の生活史（Suto 2009）は大きく異なっている。分類学的に *R. polari* と最も近縁と考えられる *R. salicinum* の生活史についても、簡易的ではあるが Cannon and Minter（1986）や Oguchi（1989）の中で以下のように記述されている。「*R. salicinum* は、ヤナギの葉が広がりきった初夏に葉上で発生が認めら

れ、晩夏もしくは初秋まで葉上で子実体を発達させる。子実体は落葉上で越冬し、翌年の春、子実体中で胞子を発達させ、これを散布する。散布された胞子は春を迎えて展葉した宿主の葉に感染し、潜伏期間を経て病徴が出現する」。寄生菌の生活史が宿主の生態に大きく影響されるとすると、キョクチャナギに感染する *R. polaris* の生活史は、ヤナギ属に寄生する *R. salicinum* やカエデ属に寄生する *R. acerinum* に近いと考えられる。無雪期間が約 2 ヶ月しかない北極域に生育するキョクチャナギは、雪解け後から展葉、開花、落葉などのフェノロジーを非常に短い期間で行う。*R. polaris* の生活史が、キョクチャナギのフェノロジーに大きく影響を受けるとすると、*R. polaris* の生活史における各段階も、宿主のフェノロジーに合わせて、速やかに行うことが重要になるだろう。そのため本研究では、無雪期間における *R. polaris* の生活史について、キョクチャナギのフェノロジーに対応する形で明らかにした。*R. polaris* の生活史の段階を雪解けからの季節順に見ていくと以下のように分けられる。1. 落葉上の子実体成熟、2. 胞子散布と感染、3. 子実体形成、4. 落葉上での越冬、である (図 4-1)。そして、4. 越冬以外の段階は無雪期間に行われる。そこで本章では、*R. polaris* の生活史の子実体成熟から子実体形成までの 3 段階について、調査を行った。

本論文 3 章では、その分布範囲において水分環境の重要性が示唆された。特に、*R. polaris* の生活史における各過程のうち、1. 子実体の成熟と 2. 胞子散布については水分環境に影響される可能性が高い。先行研究においても *Rhytisma* 属の繁殖過程に重要な影響を及ぼす環境に降水量が挙げられている。例えば、Oguchi (1989) は *R. salicinum* の湿潤な環境が維持されることで落葉上での子実層の発達が起こるとしている。また、Weber and Webster (2002) や Hsiang and Tian (2007) は、水を浸したろ紙上に成熟した *R. acerinum* の子実体を置くことで子のう胞子が放出さ

れることや湿潤な場所でより多く本菌の発生が見られると報告している。しかしながら、調査地であるスピッツベルゲン島の環境は極地半砂漠に分類され (Bliss and Svoboda 1984)、ニーオルスンの 2001-2010 年の年平均降水量は 418mm (ノルウェー気象局発表, <http://eklima.met.no>) であり、そのほとんどは冬期の降雪である。他の *Rhytisma* 属菌と同様に *R. polaris* の生活史にとって水分環境が重要であるならば、調査地域における夏期の降水量の少なさは、本菌の各発育段階に影響し、その生態や分布を特徴づける要因となり得る。つまり、水分環境の影響は *R. polaris* の生存全体に大きな影響を及ぼすと考えられる。

そこで本章では、まずキョクチヤナギのフェノロジー観察を行い、雪解け後からのヤナギの着葉期間や開花時期について明らかにした。その後、*R. polaris* の生活史の中の子実体成熟・孢子散布・子実体形成の過程と、それぞれの発育段階に対して水分環境が及ぼす影響について明らかにし、夏が短く、乾燥した環境である北極において、*R. polaris* がどのような生態学的特徴を持つのかを解明した。

4-2 方法

以下、生活史の各段階について明らかにしていく上で行った実験方法を示している。本章では、多数の調査が行われているため、表 4-1 に本章の研究で行った調査項目についてまとめている。

4-2-1 キョクチヤナギのフェノロジー

キョクチヤナギのフェノロジーを明らかにするため、展葉直後からのキョクチ

ヤナギの各発育段階を野外環境下で観察した。調査は 2011 年の 6 月から 8 月にかけて図 4-2 の D 地点 (78°55'15"N, 11°50'45"N) で行い、ヤナギ群落から孤立した個体の判別できるヤナギを調査対象とした (図 4-3)。観察では、ヤナギのフェノロジーを、展葉、開花、開花終了、結実、紅葉、落葉の 6 段階に分類し、計 20 個体のキョクチヤナギのフェノロジーを展葉から落葉までの間、3 日間隔で観察を行った。また、雪解けから展葉までの期間は観察が行えなかったため、後述する 4-2-2 (1-1) の調査地である雪解け時期を操作した区におけるヤナギの観察結果を参考とした。

4-2-2 子実体の成熟

(1) 野外環境中における子実体成熟

(1-1) 雪解け後からの子実体成熟過程

雪解け直後からの子実体の成熟過程を明らかにするために、雪解け後から定期的に子実体内部の子のうや子のう胞子の形成過程を、実体顕微鏡 (Nikon, SMZ1500) と光学顕微鏡 (Nikon, Eclipse E600) を用いて観察した。調査地は図 4-2 の A 地点 (78°55'48"N, 11°52'00"E) である。積雪下にある子実体を持つキョクチヤナギ落葉群を見つけ出し、積もった雪を排除した場所を調査地とした (図 4-4)。除雪した日である 2012 年 6 月 22 日を調査地の雪解け日としたが、この時期はニーオルスンにおける雪解け時期であり、この作為的な調査地の雪解け日は、周辺の雪解け日と大きな差はない。その後 2 日ごとに子実体がついた落葉を 3 つずつ無作為に採集し、子実体中の子のうと子のう胞子の発達を観察し、成熟過程を評価した。

(1-2) 複数地点での子実体成熟率

異なる地点での子実体の成熟率の違いを明らかにするために、複数の調査地点から子実体を無作為に 30 個程度採取し、それらの子実体の成熟度について顕微鏡を用いて観察した。調査地は (A) 北緯 78°55'48" 東経 11°52'00"、(B) 北緯 78°55'49" 東経 11°51'48"、(C) 北緯 78°55'35" 東経 11°51'07"、(D) 北緯 78°55'15" 東経 11°50'45" の 4 箇所とし、調査のための子実体採集は 7 月 13 日と 8 月 8 日の 2 回行った。子実体の成熟度は、4-3-1 (1-1) で明らかになった、子実体中の子のうち及び子のうち胞子の発達段階を観察することで下記の 4 段階に分類し評価した。

(A) 子のうち未形成：子実体中で子の中での形成が見られない。

(B) 胞子未形成：子実体中の子の中は形成されているが成熟時の大きさには到達しておらず、子の中で子の中胞子が形成されていない。

(図 4-10A)

(C) 胞子未成熟：子の中で子の中胞子が形成されているが、成熟時の大きさには到達していない。(図 4-10B)

(D) 成熟：子の中に子の中胞子が形成され、成熟時の大きさに到達している。(図 4-10C)

(2) 水分環境が子実体成熟に与える影響

子実体の成熟に水分が与える影響を明らかにするために、雪解け直前に子実体を採集し、異なる水分条件で培養した。水分条件は (A) 自然乾燥状態、(B) 高湿度状態、(C) 子実体が直接水に接触している状態 (接水状態) の 3 つに設定した。すべての水分条件で 6 反復、温度条件は 15°C、光条件は 24 時間明期で最大 2

週間培養を行った。(A) から (C) の水分条件は以下の方法で作出した (図 4-5)。

- (A) 自然乾燥状態 : 90mm プラスチックシャーレ内のろ紙上に採集した子実体を入れ、シャーレのふたを閉めずにインキュベータ内で培養した。培養中のインキュベータ内の湿度は 40-50%であった。
- (B) 高湿度状態 : 90mm プラスチックシャーレ内に十分に水をしみこませたろ紙を入れ、その上に子実体を入れた 30mm プラスチックシャーレを設置した。30mm シャーレのふたは閉めず、90mm シャーレをパラフィルムで密封し、インキュベータ内で培養した。90mm シャーレ内の湿度は 99.9%であった。
- (C) 接水状態 : 90mm プラスチックシャーレ内に十分に水をしみこませたろ紙を入れ、その上に採集した子実体入れ、シャーレをパラフィルムで密封し、インキュベータ内で培養した。

4-2-3 胞子の散布

(1) 野外環境中における胞子散布

(1-1) 胞子散布量の日々変化

野外環境下での胞子の散布量や時期を明らかにするために、定期的に胞子の捕集を行い、胞子散布状況を調査地点 A (図 4-2) で調査した。調査は 2012 年の 6 月から 7 月にかけて行った。胞子の捕集はワセリンを塗布したスライドガラスを用いた (以下胞子トラップ)。胞子トラップ設置には針金を用い、キョクチャナギの葉と同じ地上から高さ約 1cm に設置した (図 4-6)。調査のために感染落葉区 (*R. polaris* の子実体が付着した落葉がある 10×10cm 方形区) を 6 区設け、風の影響を

統一するために、全区の南側に孢子トラップを設置した。孢子トラップは6月24日から7月31日まで2日ごとに設置・回収した。回収した孢子トラップ上に捕集された孢子はラクトフェノール・コットンブルー染色液を用いて固定し、スライドガラス中央に置いた24×24mmカバーガラス内の孢子を計測し、捕集孢子数（個/cm²）を算出した。なお、24×24mm内の孢子の数が50以下の場合、すべての孢子数を計測し、それ以上の場合は図4-7に示した範囲（157mm²）の孢子数を計測した。また、散布孢子数と環境要因の関係を明らかにするため、実験期間中（6月24日から7月31日まで）の方形区周辺の温湿度と、ノルウェー気象局発表のニーオルスンの降水量のデータを解析に用いた。次に、降雨の有無と孢子散布の関係を明らかにするために、雨天時6時間（6月28日12-18時）と晴天時6時間（6月29日12-18時）の感染落葉区における孢子散布数を、孢子トラップを用いて調査した。さらに散布孢子数と感染率の関係を明らかにするために各方形区内の全キョクチヤナギ葉数と*R. polaris*感染葉数を7月15日、27日と8月10日の計3回にわたり測定した。そして、ヤナギの葉面積を0.5cm²として、調査区6区のヤナギ葉上に付着したと推定される総孢子数（総付着孢子数）をそれぞれの調査区的全調査期間中の捕集孢子数（総捕集孢子数）とヤナギ全葉数から以下の式で算出した。

$$\text{総付着孢子数 (個/調査方形区)} = \text{全葉数} \times 0.5\text{cm}^2 \times \text{総捕集孢子数} \quad (\text{式 4-1})$$

(1-2) 孢子の散布距離

野外環境中で、感染源である子実体のついた落葉が無い場所にどのくらいの孢子が飛来するのかを明らかにするため、(1-1)の調査で設置した感染落葉区の付

近に、ヤナギ落葉はあるが *R. polaris* の子実体が付着した落葉が存在しない方形区（10×10cm）（以下対象区）を 6 区設置した。この対象区において、（1-1）の方法と同様に、孢子トラップを 6 月 24 日から 7 月 31 日まで 2 日ごとに設置・回収し、捕集孢子数を計測した。また、散布孢子数と感染率の関係を明らかにするために各方形区内の全キョクチャナギ葉数と *R. polaris* 感染葉数（7 月 15 日、27 日と 8 月 10 日の 3 回）を測定した。さらに、孢子の散布距離を推測するために感染落葉区と対照区の各方形区間の位置関係を測定した。

（2）水分環境が孢子散布に与える影響

野外から成熟した子実体を採集し、異なる水分条件での孢子散布を検討した。水分条件は 4-2-2（2）で用いた 3 条件とした。すべての水分条件で 6 反復、温度条件は 15℃、光条件は 24 時間明所でおこなった。また、適正な水分条件下で孢子が散布されるまでの時間を明らかにするため、子実体が開裂し、子実層の露出までの時間を測定した。野外から採集した子実体のうち、成熟が確認された 13 個の子実体を一度乾燥させた。その後、それらを濡れたろ紙の上に置き、子実体が開裂するまでの時間を 5 分間隔で測定した。以上の 2 つの実験では、共に図 4-2 の地点 A から採集した子実体を実験に用いている。

（3）孢子の発芽実験

孢子の発芽に関する調査を行うために、成熟した子実体に水を含ませて、シャーレ内で孢子散布させ、その孢子を使用して孢子の発芽実験を行った。孢子が散布されたシャーレ内に水を張り、3、6、9、12 時間後に、シャーレ内から孢子が含まれる水を 2ml 採取し、含まれる全孢子数および発芽孢子数を用いて計測し、各

浸水時間後の発芽率を算出した。孢子数の計測は顕微鏡下で行い、発芽率の計測は全ての時間で、3反復を行った。また、孢子の乾燥耐性を調査するために、シャーレに散布された孢子を浸水させず、一定日数自然乾燥状態に置いた後、浸水させて12時間後の発芽率を計測した。

4-2-4 ヤナギ葉上での子実体形成

宿主葉上での *R. polaris* の子実体の形成時期と発達速度を明らかにするために、野外環境下で定期的に *R. polaris* の子実体の大きさを計測した。測定は図 4-2 の地点 C (78°55'34"N, 11°51'07"E) で行った。キョクチャヤナギ上に形成され始めた子実体 9 個体を対象に 2010 年 7 月 15 日から 8 月 26 日までの計測期間中 3 日ごとに同一個体の子実体の大きさを測定した。子実体の大きさは、キョクチャヤナギの主脈に平行方向の長さ (a) と垂直方向の長さ (b) をノギスで測定し (図 4-8)、子実体を楕円とみなして式 4-2 を用いて葉の表面を覆う面積を測定し、9 個体の面積の平均値±標準偏差を算出した。また、子実体形成と環境要因との関係を明らかにするために、調査区周辺の温度 (°C) と降水量 (mm) および光合成光量子束密度 (PPFD) のデータを計測し、面積の増加量 (mm²) との関係について解析を行った。

$$\text{子実体の葉面積 (mm}^2\text{)} = (a/2) \times (b/2) \times \pi \quad (\text{式 4-2})$$

4-2-5 日本に生育する *Rhytisma* 属菌の生活史

R. polaris と温帯域に生育する *Rhytisma* 属菌の生活史を比較し、生活史の各過程

における特徴を明らかにするため、日本国内に生育する *Rhytisma* 属菌の生活史に関する調査を行った。調査は 2011 年 4 月から 2012 年 6 月まで、約 1 ヶ月ごとに長野県上田市菅平高原および南佐久郡野辺山高原にて行った。調査種は、調査域における野生のイヌコリヤナギ (*Salix integra*) とそれに寄生する *Rhytisma* sp. である。調査内容は、イヌコリヤナギのフェノロジーの把握と *Rhytisma* sp. の雪解け後からの子実体成熟過程およびヤナギ葉上での子実体の形成であり、調査方法は、4-2-1、4-2-2 (1-1) および 4-2-4 と同様である。

4-3 結果

4-3-1 キョクチャヤナギのフェノロジー

キョクチャヤナギの各個体のフェノロジーの観察結果は図 4-9 と表 4-3 に示した。キョクチャヤナギは展葉から約 8 日で花をつけ、雄花は雌花より平均 1.5 日ほど早く花をつけた。さらに花期終了が展葉後約 16 日、開花後 1 週間であった。その後、雌花は展葉後 25 日で結実した。展葉後およそ 43 日で紅葉し、その後 1 週間ほどで落葉した。着葉期間は平均 50 日であった。また、別調査 (4-2-2 (1-1)) で計測した雪解けからヤナギの展葉までの期間は雪解け 7-10 日後であった。さらに、ヤナギの花期終了の直後の時期以降に、一部の調査区において *R. polaris* の子実体が形成され始めるのが観察された (図 4-9)。 *R. polaris* に感染した個体とそれ以外の個体で、その後のフェノロジー (紅葉と落葉) に有意な差は無かった (t 検定 $P>0.05$)。

4-3-2 子実体の成熟

(1) 野外環境における子実体成熟

(1-1) 雪解け後からの子実体成熟過程

除雪時である雪解け 0 日目（6 月 22 日）において、子実体の内部で子実体のうが既に形成され始めており、そのサイズは $56.0 \pm 10.9 \mu\text{m}$ と成熟した子実体のうの 2 分の 1 程度の大きさであった（図 4-10A）。また、子実体のうの中に子実体のう胞子は形成されていなかった。雪解け 8 日目（6 月 30 日）には子実体のうの中に子実体のう胞子が形成されているのが初めて観察された。この時、子実体のうのサイズは $103.6 \pm 9.8 \mu\text{m}$ と成熟子実体のうと変わらない大きさであったが、子実体のうに含まれる子実体のう胞子のサイズは $31.9 \pm 10.2 \mu\text{m}$ と、成熟した子実体のう胞子の半分程度であり、発芽は確認できなかった（図 4-10B）。また、子実体の外壁には既に亀裂が入っており、水分を吸収すると開裂し、子実層が露出した。成熟した子実体のう胞子（図 4-10C）を保持した子実体が初めて観察できたのは雪解け後 12 日目（7 月 4 日）であった。その後、最後の採集日である雪解け後 24 日目（7 月 16 日）までに採集されたサンプル中には、毎回成熟した子実体が確認できた。しかしながら、採集したサンプルが全て成熟している日は、調査期間を通して一度もなかったため、成熟率自体が低いと考えられた。

(1-2) 複数地点での子実体成熟率

サンプリング地点における子実体の成熟段階を、表 4-4 に示した。まず成熟率 I として成熟子実体数 / 全子実体数（成熟 + 未成熟子実体数）を求めた。その結果、7 月 13 日と 8 月 8 日の子実体成熟率 I を比較すると両日間に有意な差は無かった ($p > 0.05$)。7 月 13 日の調査では、成熟率 I が最も高かったのは地点 C（成熟率 73%）

であり、最も低かったのは地点 D（成熟率 18%）であった。一方、8 月 8 日の調査では成熟率 I が最も高かったのは地点 B（成熟率 70%）であり、最も低かったのは地点 C（成熟率 15%）であった。したがって、地点間の成熟率 I には一定の傾向は確認できなかった。

採集した子実体の中には、子実体中に子のをの形成が見られないもの（子のを未形成子実体）が多く存在していた。前の調査（1-1）では、雪解け直後の時点で子実体中に子のをの形成が確認できている。正常な子実体が雪解けの時点で子のをある程度の大きさまで形成しているとすると、子のを未形成子実体は何らかの原因により、雪解け前の時点で子実体を成熟させる能力が無いと考えられた。そこで、雪解け後からの子実体成熟率を明らかにするため、子のを未形成子実体を除いた成熟率（成熟率 II）を計算し、雪解け時点で成熟できる可能性があった子実体が、雪解け後にどの程度成熟したかを推定した。その結果、8 月 8 日の地点 C 以外の全ての調査区で成熟率 II は 50%以上となった。また、7 月 13 日と 8 月 8 日の子実体成熟率 II に有意な差は無かった ($p>0.05$)。7 月 13 日の調査では、成熟率 II が最も高かったのは地点 A（成熟率 80%）であり、最も低かったのは地点 D（成熟率 55%）であった。8 月 8 日の調査では成熟率 II が最も高かったのは地点 A（成熟率 90%）であり、最も低かったのは地点 C（成熟率 25%）であった（表 4-4）。

（2）水分環境が子実体成熟に与える影響

調査で設定した条件では、（A）自然乾燥状態や（B）湿潤状態では子実体の成熟は認められず、（C）接水状態で培養した時のみ子実体の成熟が認められた。（C）の条件で培養した際、子実体が成熟に必要な時間は約 5 日間（平均 108 時間）であった。

4-3-3 胞子の散布

(1) 野外実験における胞子散布

(1-1) 胞子散布量の日々変化

降雨時と晴天時の胞子散布に関する調査では、雨天時 6 時間（6 月 28 日 12-18 時）の捕集胞子数は 84 ± 26 個/cm²、晴天時 6 時間（6 月 29 日 12-18 時）の捕集胞子数は 0 個/cm² となり、胞子は雨天時に散布されていることが明らかになった。

胞子散布量の日々変化調査では、設置期間の降水量と捕集胞子数との間に強い相関が認められた（単回帰分析 $r=0.95$, $P<0.05$ ）。特に調査期間中の 2 日間の降水量が最も高かった 6 月 27-28 日では捕集胞子数は 140 ± 50 個/cm² と計測期間中最大となった（図 4-11）。その後、晴天日が続いたため、7 月 7-8 日を最後に 7 月 21-22 日まで胞子は捕集されなかったが、7 月 23-24 日の降雨で再び胞子の散布が確認できた。また、調査区内のヤナギ葉上に *R. polaris* の子実体の形成が最初に確認できたのは 7 月 15 日であった。

また、調査区 6 区のヤナギ葉上に付着したと推定される総胞子数（総付着胞子数）と感染葉数の間には有意な相関関係があった（単回帰分析 $r=0.83$ $P<0.05$ ）。

(1-2) 胞子の散布距離

対照区の捕集胞子数は感染落葉区に比べて著しく少なく（表 4-5）、感染落葉区では 140 ± 50 個/cm² の胞子が捕集された 6 月 27-28 日でも対照区における捕集胞子数は 8 ± 11 個/cm² であった。全感染落葉区の総捕集胞子数が 310 ± 90 個/cm²、感染率は $33.3 \pm 17.4\%$ であったのに対し、対照区の総捕集胞子数は 18 ± 13 個/cm²、感染率は $0.8 \pm 1.1\%$ であり、感染落葉区と対照区との間で総捕集胞子数と感染葉数が有意に異なった（Student-t 検定 $P>0.05$ ）。また、各対照区とそれぞれの対照区

から最も近い感染落葉群落までの距離は 60-460cm（平均 300cm）であった。この距離と各対照区の総捕集孢子数の間には強い相関関係があった（単回帰分析 $r=0.86$ $P<0.05$ ）。

(2) 水分環境が孢子散布に与える影響

実験の結果、(C) 接水状態で培養した場合に、子実体中から孢子が散布された。成熟した子実体が接水状態におかれると、子実体が水を吸収していくにつれて、外壁が亀裂部分から開き、子実層を露出する（図 4-12）。その状態で風や震動などの刺激をきっかけとして、露出した子実層から空気中に孢子が霧状に散布される様子が肉眼で確認できた。また、接水状態で培養した際に子実体が孢子を散布するまでに必要な時間は約 5-30 分であり、62%の子実体が水に接して 5 分以内に孢子を散布するところが観察された（図 4-13）。さらに、吸水により開裂した子実体を自然乾燥に置くと、子実体が水分を失うのに伴い、外壁が閉じ、孢子の散布は停止した。その子実体を再度接水状態におくと、再び孢子の散布が確認できた。接水状態以外の水分条件では子実体が開裂せず、孢子を散布することはなかった。

(3) 孢子の発芽実験

実験の結果、孢子は浸水後 3 時間後には発芽が確認でき、その後発芽率は上昇し、12 時間後には 80%の孢子が発芽した（表 4-6）。また、孢子の乾燥耐性の実験では、自然乾燥状態に 9 日間置いた孢子では、浸水 12 時間後の発芽率が 59%であった（表 4-7）。

4-3-4 ヤナギ葉上での子実体形成

ヤナギ葉上において *R. polaris* の子実体が形成され始めるのは、ヤナギの花期終了の直後であり、これはヤナギの展葉約 2 週間後にあたる (図 4-14)。その後、子実体のサイズはおおよそ $1.5 \pm 1.0 \text{ mm}^2/\text{day}$ と、ほとんど一定の速度で増加していった (図 4-14)。調査期間中、日降水量 (mm)、日積算温度 ($^{\circ}\text{C}$) および日射量 (PPFD) の積算値と子実体面積の増加量 (mm^2) と間には、いずれも有意な相関はなかった (単回帰分析 $P > 0.05$)。その後、ヤナギが紅葉すると子実体の成長は止まり、ヤナギ落葉までの約 1 週間の間に面積の増加は認められなかった。これらの観察結果より、子実体の形成期間は約 25 日間、面積の平均は $13.5 \pm 1.2 \text{ mm}^2$ となり、最大時にはヤナギ葉の約 27% を占めるに至ることが明らかになった。

4-3-5 日本に生育する *Rhytisma* 属菌の生活史

調査域において雪解けは 4 月下旬であり、イヌコリヤナギのフェノロジーは 5 月下旬に展葉、10 月下旬に紅葉し、11 月上旬に落葉した。着葉期間は約 6 ヶ月間であった。一方、調査した *Rhytisma* sp. の生活史については図 4-15 にまとめた。イヌコリヤナギに寄生する *Rhytisma* sp. は 4 月下旬の雪解けの直後には、子実体中に子のうは観察されず、雪解け後から子実体の成熟が始まり、約 2 ヶ月後の 6 月下旬に子実体の成熟が完了した。ヤナギ葉上における子実体形成が始まるのは 7 月下旬で、その後ヤナギが紅葉する 10 月下旬まで子実体は成長した。最終的な子実体の大きさは $16.8 \pm 3.7 (\text{mm}^2)$ であった。

4-4 考察

子実体成熟

子実体成熟における *R. polaris* の特徴的な点として、その子実体の成熟期間の短さが挙げられる。これまでその生活史が報告されてきた *Rhytisma* 属菌は温帯から亜寒帯域に分布するものであり、その子実体成熟は雪解けから初夏にかけての約 2 ヶ月間で行われている (Hsiang and Tian 2007)。それに対し、*R. polaris* は約 4 分の 1 の期間 (雪解け約 2 週間) で子実体が成熟する。これはキョクチヤナギのフェノロジーとその背景にある北極域の短い夏に適応した結果と考えられる。日本・長野県で調査したイヌコリヤナギに寄生する *Rhytisma* 属菌の野外観察では、雪解け直後の時点で子実体中に子の中の形成は確認できず、その後子実体中の子の中が成熟するまでに、やはり約 2 ヶ月を要した。イヌコリヤナギの展葉は雪解け後 1 ヶ月以上経過してからであり、着葉期間はその後約 6 ヶ月間あるため、子実体の成熟期間が 2 ヶ月であってもヤナギの生葉上での生育期間は十分に確保できる。それに対し、キョクチヤナギは雪解け後 1 週間ほどで展葉を始め、展葉開始からわずか 43 日で紅葉し、その 1 週間後には落葉する。*R. polaris* はヤナギの展葉から紅葉までに、感染から子実体形成までを行わなければならない、生葉上での生育のための時間を確保するためには雪解け後の速やかな子実体成熟は必要不可欠である。この早い成熟を可能にしているメカニズムについて詳しい調査は行っていないが、日本の *Rhytisma* sp. の子実体成熟は雪解け後に始まったのに対し、*R. polaris* の子実体は雪解け直後の時点で成熟が途中まで進行していることが明らかとなった。さらに、雪解け約 3 ヶ月前である 2012 年 3 月 21 日に時点で、子の中が成熟時の半分程度の大きさにまで成長している段階にまで進んでいることが確認できていることから、*R. polaris* は落葉から積雪前および積雪下で子実体の成熟を開

始・進行させており、雪解け後の成熟期間を短縮していることが示唆された。

子実体の成熟に液体の水が必要であることが明らかになった。これは子実体成熟のために水分が必要であり、液体の水でなければ子実体が吸水できないためであると考えられる。他の *Rhytisma* 属菌で詳細な子実体の成熟を調査されている種は *R. acerinum* と *R. punctatum* のみである (Jones 1925; Woo and Rartridge 1969; Duravetz and Morgan-Jones 1971)。これらの研究において、*Rhytisma* 属菌は湿潤な環境で子実体の成熟が起こるとされている。また、他の先行研究でも、簡易的な記載として子実体の成熟と水分環境との関係を示している (Oguchi 1989; Weber and Webster 2002; Hsiang and Tian 2007)。このため、子実体の成熟において水分を必要とする特徴は *Rhytisma* 属菌の複数種で共通するものであると考えられる。

複数地点でサンプリングした子実体の成熟率調査において、子実体成熟率 I は 50%以下であった。4-3-2 (1-1) の子実体成熟過程の調査でも、雪解け後 24 日目の 7 月 16 日で尚、未成熟の子実体は確認できたため、*R. polaris* の子実体成熟率は本来それほど高くないと考えられた。特に、子実体中に子の中の形成が見られないサンプルが全体の 32%含まれていた。先の記述のように、雪解け前の時点で子実体中の子の中が発達しているのが順調に発達した子実体であるとする、雪解けの時点で子実体中に子の中が形成されていない個体は、雪解け前の段階で何らかの理由によって発育不全となっていると考えられる。そして、野外環境下では、そのような子の中の形成が始まらない子実体が多数存在していることが明らかになった。これらの雪解け前の時点で成熟が見込めない状態である子実体を除いた子実体成熟率 II は 60%以上となり、調査地ごとの成熟率 II は、25-90%と大きな差があった。これは、調査地点ごとの雪解け後の環境要因 (特に水分環境) によるものと予想されるが、調査地ごとの水分環境の違いについての調査は行っていない

いため、この地域差が何によってもたらされるのかについての議論はこれ以上行わない。子実体成熟 I、II ともに、7月13日と8月8日の成熟率の間に差が無かったことは、調査を行った2012年について言えば、子実体の成熟は7月13日以降にはほとんど進んでいないことを示している。これは、2012年7月13日には、調査地全域で雪解けが終了していたこと、7月13日から8月8日までの降水量が少なかったことから、成熟に必要な水分供給が無かったことが原因として考えられる。また、ヤナギの着葉期間を考えた際、8月8日以降に子実体が成熟しても、その後の宿主葉上での子実体の形成のための時間が確保できないため、この時期以降に成熟しても、以降の生活史の段階に繋がらないと考えられる。また、子実体の越年、つまり本来成熟すべき年から一年を経ての成熟も難しい。8月8日にサンプリングされた子実体中では、成熟・未成熟のものに関わらず、子実体中に多くのバクテリアが観察された。これらのバクテリアは、子実体内部の組織を分解して増殖していた。したがって、未成熟子実体が翌年に成熟に達し、胞子を散布できる可能性は低いと考えられる。

胞子散布

胞子散布には子実体の成熟と同様に液体の水が必要であった。*R. polaris* の胞子自体は空中に散布される風媒性であるが、散布のための前段階として子実体が吸水することで外殻が開く必要があり、子実体の吸水には液体の水が必要であるためと考えられた。乾燥によって子実体が水分を失うと子実体の外殻は閉じるが、その後吸水すると再び開放し、胞子を散布した。この吸水-乾燥による開閉と、その際の胞子散布は他の *Rhytisma* 属菌種にも共通する特徴である (Jones 1925; Oguchi 1989; Weber and Webster 2002)。しかしながら、*Rhytisma* 属菌が吸水時に胞

子を散布するメカニズムについては明らかになっていない。盤菌類のうち *Rhytisma* 属を含む無弁子のうを持つ菌類は、図 4-16 に示したように、胞子の成熟後、子のう中の浸透圧が上がり、子のう先端の孔から胞子が大気中へ放出されると言われている（細矢 2008）。図 4-17 に示した *R. polaris* の胞子散布の仕組みは想像の域を超えないが、*Rhytisma* 属菌の子実層は側糸と子のうが密に詰まった構造をしているため、吸水による子実体基部の膨張や外殻が開く際の構造的な変化によって子実層に圧力が加わり、子のう内の液圧がうまれるのではないかと考えられる。

野外環境中において、胞子が捕集されるのが雨天時に限られていたことは、室内実験の結果と一致した。降雨中の胞子散布は、雨滴が子実体上を覆ってしまうと空気中への胞子の散布が妨げられてしまのではないかと想像できる。しかし、地面に無造作に転がっている子実体のちょうど真上に雨粒が落ち、そのまま雨滴が子実体上を覆ってしまう確率は低いと考えられる。ただし、降雨環境下での胞子散布は、雨滴の妨げにより散布範囲が限定され可能性はある。散布された胞子は水に浸った状態に置くと、3-6 時間で約 7 割の胞子が発芽した。Jones (1925) は *R. acerinum* について、胞子が発芽するためには水分が必要であることを示している。ヤナギ葉上が濡れている雨天時に胞子を散布することは、胞子の発芽にとっても効率的な仕組みと言える。

調査期間の後半（7 月 23-26 日）では、降水量に対する散布量は少なくなった。成熟した子実体が胞子散布を繰り返すうちに子実層中の胞子数が減少したことが原因と考えられるが、一つの子実体が複数回胞子散布を行う際の散布胞子数の変化を定量できていないため、詳細は不明である。また、胞子トラップ調査区内において、7 月 7 日から胞子の散布が確認できなかったこと、7 月 15 日からヤナギ

上で子実体の形成が観察できたことから考えて、散布された *R. polaris* の胞子がヤナギに感染し、子実体を作り始めるまでの期間（潜伏期間）は少なくとも 1 週間以上であることが明らかになった。

ヤナギの葉の大きさがおよそ 50mm^2 であるとする、感染落葉区のヤナギには、葉一枚につき約 150 個以上の胞子が付着すると推定される。しかしながら、調査区の感染率（感染葉数／全葉数）の平均は 33% となった。この感染率の値は調査域ではかなり高い方であるが、それでもヤナギ葉上に付着した胞子のうち感染に成功し、子実体を形成した胞子は約 500 個に 1 個の割合となる。

対照区と感染落葉区との距離は約 3m であったにも関わらず、感染落葉区と対照区の捕集胞子数に大きな違いがあったこと、対照区での捕集胞子数と対照区から落葉までの距離に強い相間があったことは、*R. polaris* の胞子散布範囲が著しく狭いことを示唆している。この特徴は、*R. acerinum* と *R. punctatum* を用いた室内実験でも示されており（Jones 1925; Woo and Partridge 1969）、*Rhytisma* 属菌の胞子サイズが大きく重いことに原因があると考えられる。*R. acerinum* においても、宿主植物の地面から葉までの高さ、50cm-500cm の間で低い場所の葉ほど感染率が高くなることが示されている（Leith and Foeler 1987）。胞子の散布範囲が狭いことは *R. polaris* の分布範囲を制限する要因になると考えられ、実際に対照区内での感染率は 3% 未満であった。

子実体形成

子実体の成長は気温、降水量および日射量に影響を受けておらず、その成長はヤナギの紅葉と同時に止まった。ヤナギが落葉に向けて葉から茎などの貯蔵期間へ養分を再吸収した結果が紅葉であるため、葉に栄養が無くなった時点で *R.*

polaris も成長できなくなつたと考えられる。すなわち、野外環境下で *R. polaris* の子実体形成を律速する要因は温湿度ではなく、ヤナギのフェノロジーであると示唆された。

R. polaris の子実体の形成期間は、日本に生育する *Rhytisma* 属菌の子実体形成期間よりも著しく短かった。北極や高山のように生育期間が制限される地域に生育する植物は、温帯産の同属種と比較して、雪解け後に速やかに開花、結実することが知られている（増沢 2009）。キョクチャナギもまた、他の温帯域のヤナギ属の他種と比べて著しく短いフェノロジーを持つ植物種である。長野県におけるイヌコリヤナギの着葉期間は約 180 日であり、キョクチャナギの着葉期間は約 50 日であった。これに対し、日本に生育する *Rhytisma* 属菌の子実体の生育期間は約 70 日であり、*R. polaris* の生育期間は約 25 日であった。これはキョクチャナギのフェノロジーに *R. polaris* が適応した結果と考えられる。

まとめ

以上に述べた本章での研究をまとめると、*R. polaris* の生活史の各段階とそれに要する期間は図 4-18 に示される。*Rhytisma* 属菌は 1 年間でその生活史を一巡させ、次の世代につなげる。*R. polaris* の生活史も、葉上での子実体形成や雪解け後の子実体成熟・胞子散布などの基本的な発育段階は他の *Rhytisma* 属菌のそれと同じであった。しかしながら、*R. polaris* の生活史と日本の *Rhytisma* sp. の生活史を比較すると、*R. polaris* は生活史の中で無雪期間に行われる各発育段階に割く時間が著しく短く（図 4-15, 4-18）、北極の短い夏とキョクチャナギの短い着葉期間に適応していることが示された。ニーオルスンの無雪期間は 6 月末から 8 月末までの約 2 ヶ月であり、キョクチャナギは雪解け後 1 週間で展葉が始まり、着葉期間は約 50

日であった。*R. polaris* が雪解け後に子実体を成熟させ、胞子を散布するまでおよそ 2 週間が必要である。これは 2012 年の野外環境中での観察の結果であり、室内実験から最適な水分条件においては最速で約 5 日間で成熟できると考えられる。しかし、胞子の散布が有効であるのはヤナギの展葉後である雪解け 1 週間後からであり、それよりも速い時期の胞子散布は感染する葉が未展葉であるため感染に失敗する可能性が高い。その後感染して子実体の形成が始まるまでの期間（潜伏期間）に 1 週間以上が必要となる。野外での観察から子実体の形成が始まる時期はヤナギ花期終了後（展葉約 2 週間後）であり、子実体の形成に費やされる期間は約 25 日間となる。*R. polaris* の子実体形成ヤナギが紅葉すると終了してしまうため、この期間の確保は本菌の生育に重要と考えられる。しかし、子実体の十分な成長のためにこの期間が最低どのくらい必要かは検証できていない。子実体の大きさと成熟率との間に相関は見出せていないため、翌年の子実体成熟のために必要なことは単純にそのサイズの大きさだけではないと考えられる。特に未成熟子実体の半分以上に及んだ子のう形成が見られなかった子実体は、雪解け前（さらに言えば積雪前）の時点で何らかの原因があると考えられ、ヤナギ葉上での生育が不完全であった可能性は大いに考えられる。子実体の形成についてはどの段階で翌年成熟できるポテンシャルをもつのか今後も調査が必要である。

子実体成熟と胞子散布に対して水分環境が顕著に影響していることは、本菌の生態的な特徴として重要な点である。子実体成熟は生活史における重要な過程であるが、ニーオルスンの僅かな降水量と成熟に与えられた時間はこれに強い制限を与えているだろう。すなわち、*R. polaris* の生育には、制限された時間の中で子実体成熟を可能にするための安定した水分供給が必要であり、それが可能である水分環境の恵まれた場所はニーオルスンの中では限られていると考えられる。ま

た、孢子散布の狭さは分布を制限する要因となるため、*R. polaris* は水分環境の恵まれた狭い範囲に生育すると推測できる。

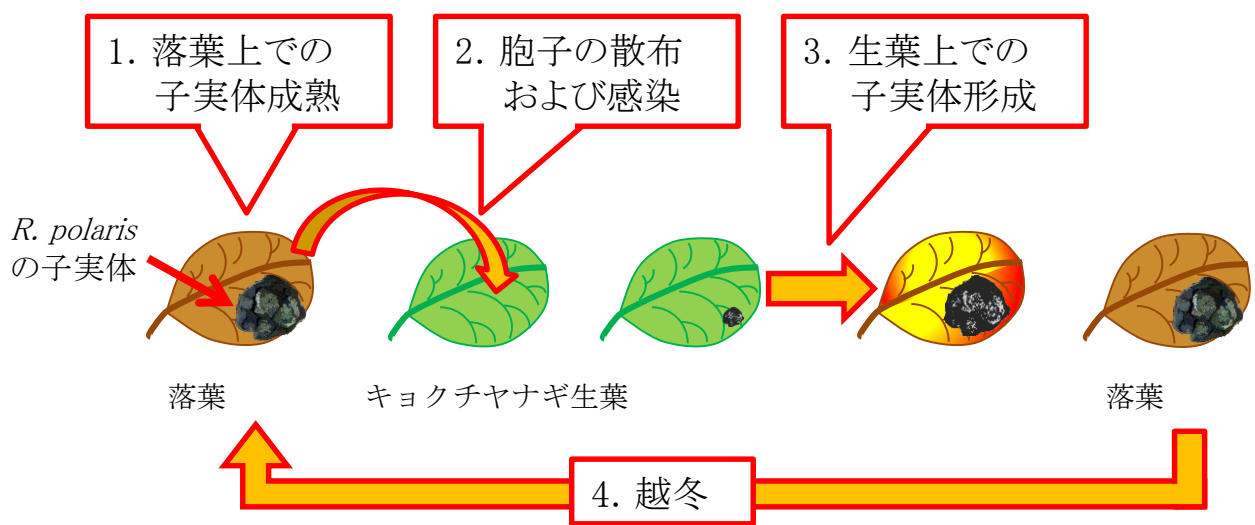


図4-1. *R. polaris*の生活史における生育段階。本研究では、無雪期間に行われる1から3の生育段階の調査を行った。

表4-1. 4章において行った*R. polaris*の生活史における各段階の調査項目。

	調査項目	実験場所	項目番号
	キョクチャナギのフェノロジー	野外	4-2-1
落葉上での 子実体成熟	雪解け後からの子実体成熟過程	野外	4-2-2 (1-1)
	複数地点での子実体成熟率	野外	4-2-2 (1-2)
	水分環境が子実体成熟に与える影響	室内	4-2-2 (2)
胞子の 散布・感染	胞子散布量の日々変化	野外	4-2-3 (1-1)
	胞子の散布距離	野外	4-2-3 (1-2)
	水分環境が胞子散布に与える影響	室内	4-2-3 (2)
	胞子の発芽実験	室内	4-2-3 (3)
生葉上での 子実体形成	ヤナギ葉上での子実体形成	野外	4-2-4

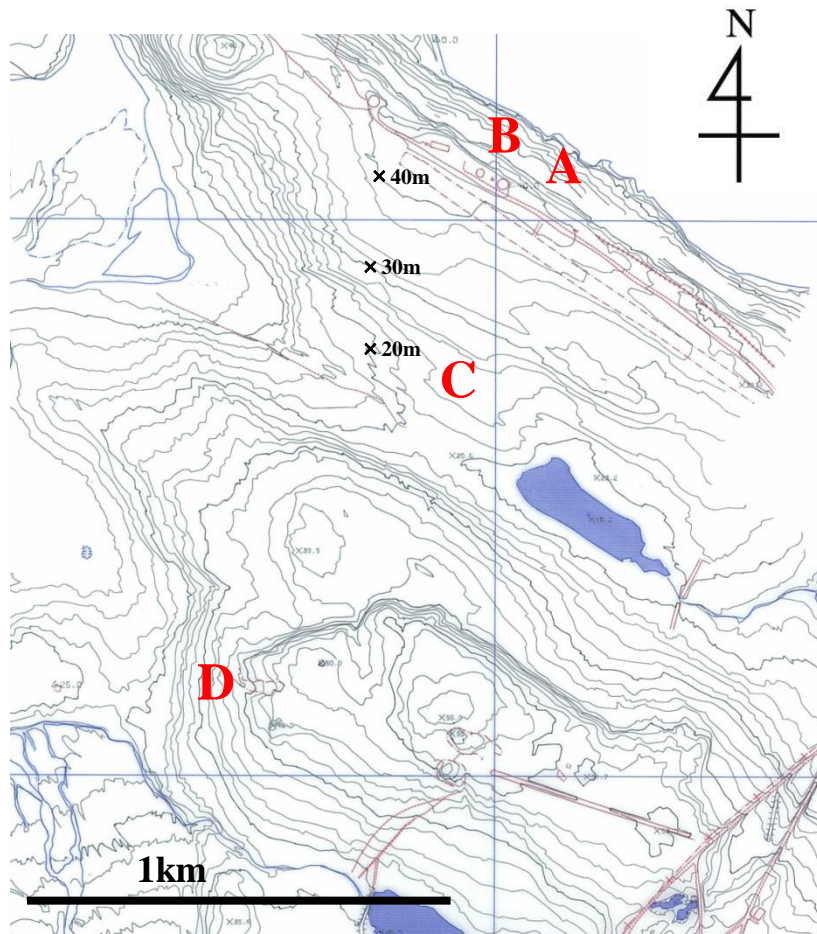


図4-2. 4章の研究で調査を行った場所。

表4-2. 図4-2に示した場所で行った調査内容。

見出し番号	調査項目	調査地点	調査年
4-2-1	キョクチヤナギのフェノロジー	D	2010
4-2-2 (1-1)	雪解け後からの子実体成熟過程	A	2012
4-2-2 (1-2)	複数地点での子実体成熟率	A, B, C, D	2012
4-2-3	野外環境中における孢子散布	A	2012
4-2-4	ヤナギ葉上での子実体形成	C	2010

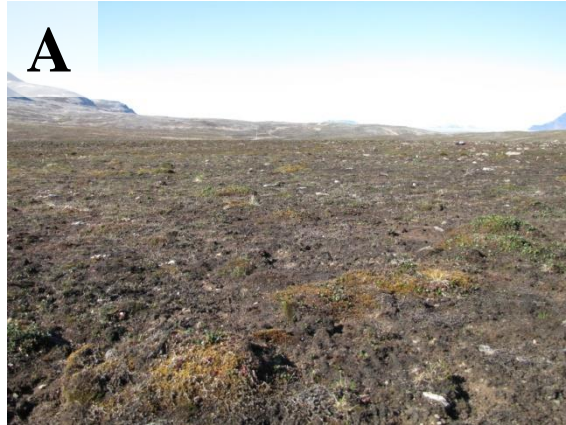


図4-3. キョクチヤナギフェノロジー調査区(A)。
群落より孤立したヤナギを一個体とした(B)。

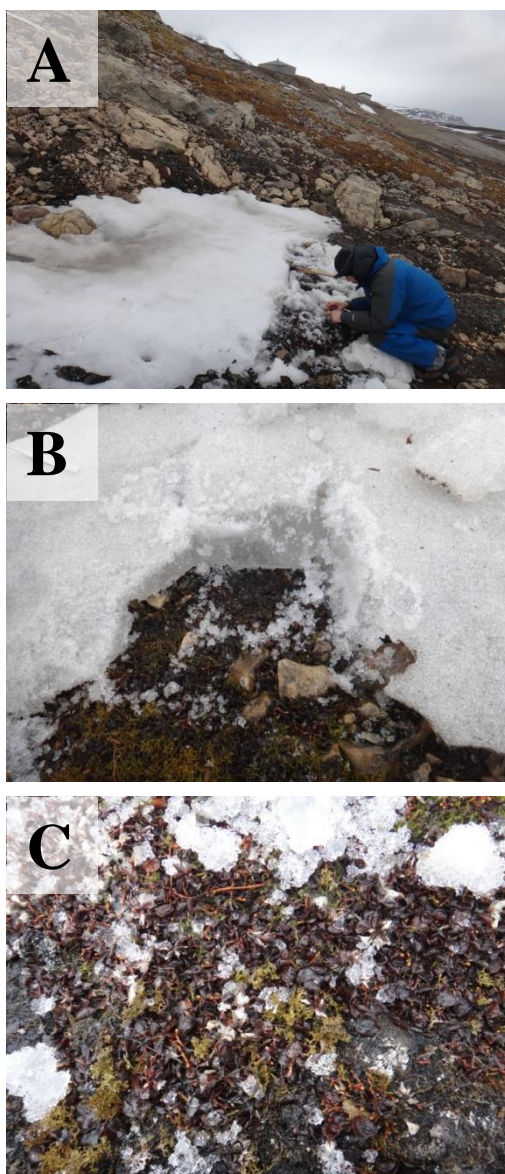
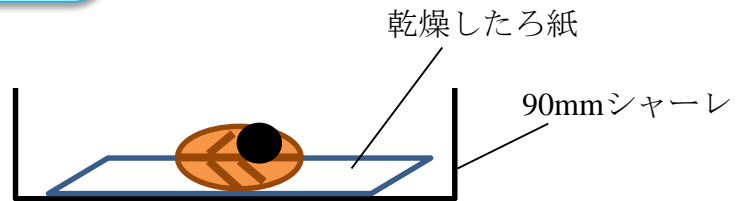
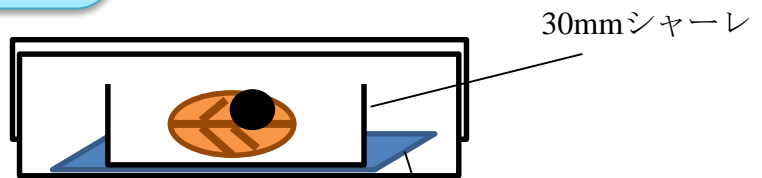


図4-4. 子実体の成熟過程に関する野外実験の様子。調査場所 (A)。積雪下から掘り出したヤナギ群落 (B, C)

(A)自然乾燥状態



(B)高湿度状態



(C)接水状態

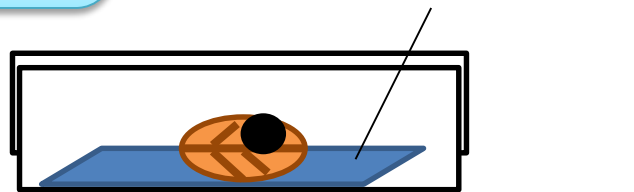


図4-5. 子実体成熟に関する室内実験の条件。(A)自然乾燥状態、(B)高湿度状態、(C)接水状態の条件で14日培養した。

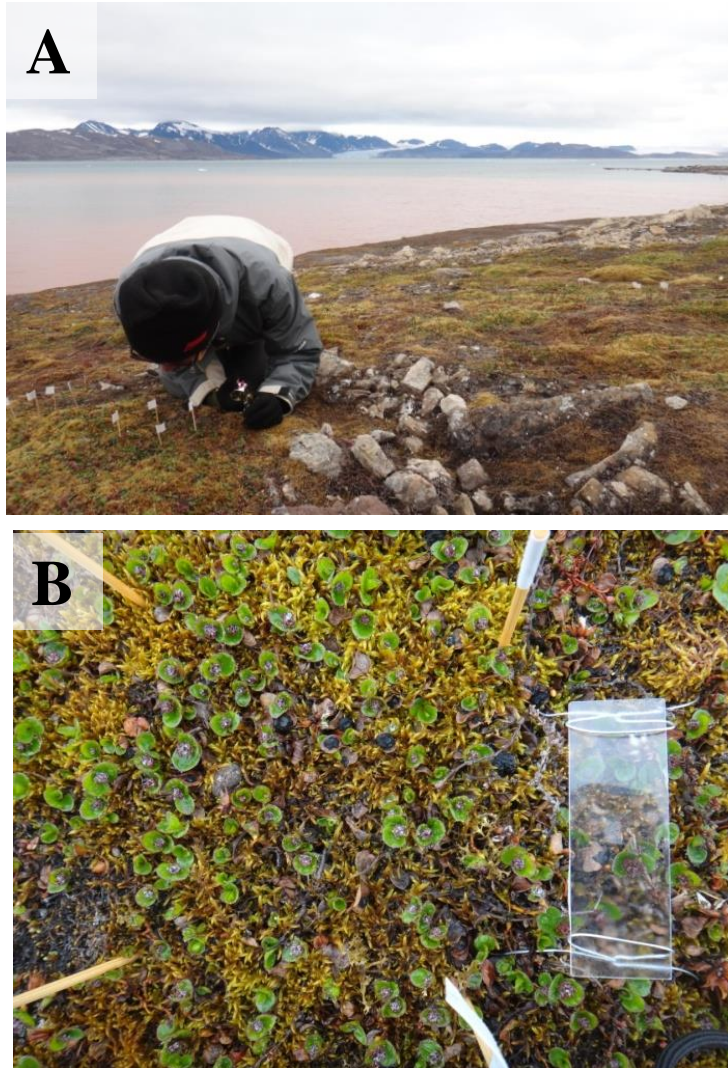


図4-6. 胞子散布の調査の様子 (A) と設置した胞子トラップ (B)。

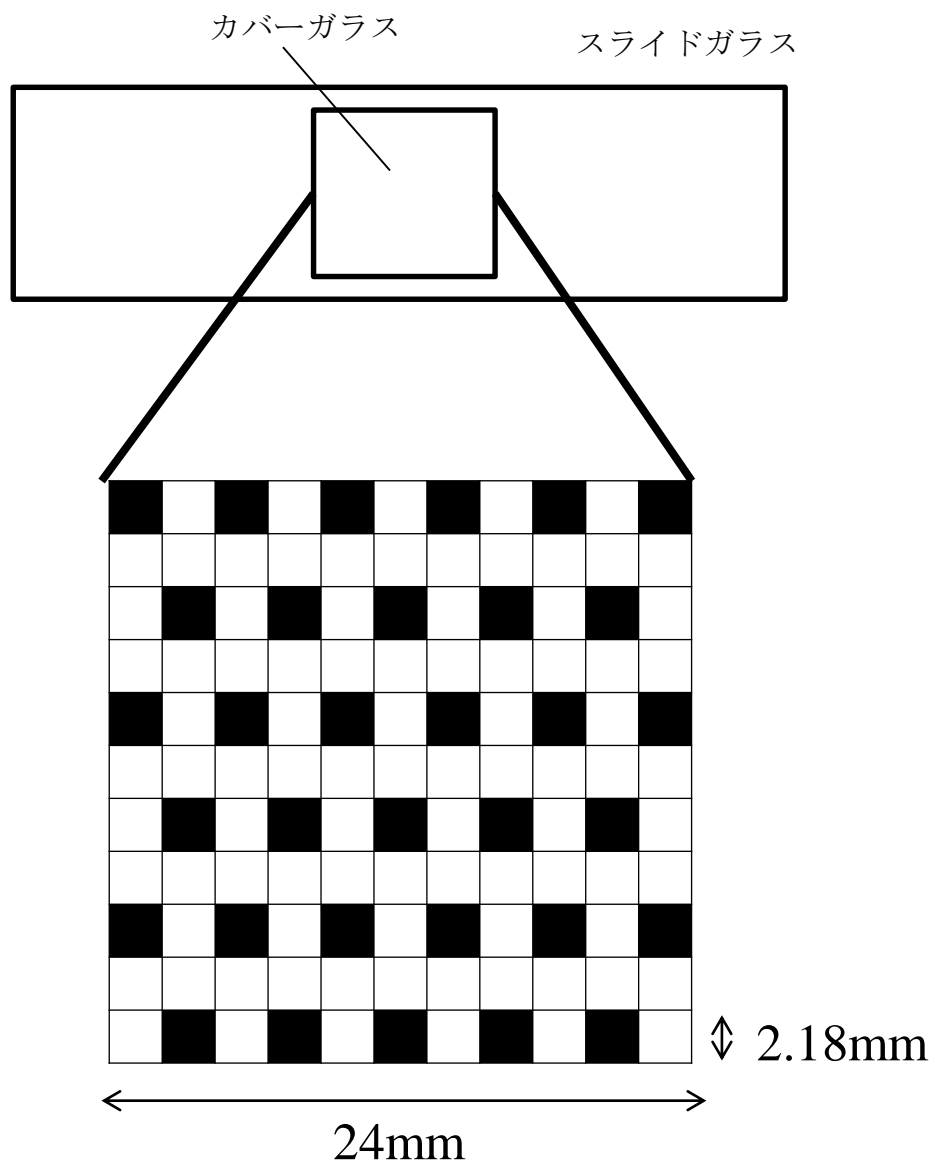
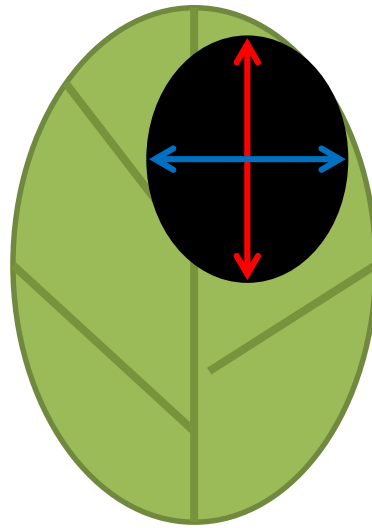


図4-7. 捕集した胞子の計測。カバーガラス24×24mm内の胞子を計測した。なお、24×24mm内の胞子の数が50個以下の場合、全ての胞子を計測し、それ以上の場合には■の範囲の胞子数を計測し、単位面積あたりの胞子数を推定した。



←→ a (mm)
←→ b (mm)

図4-8. 子実体の面積を算出するために長さを計測した場所。
(a) ヤナギの主脈に平行方向の長さ (b) ヤナギの
主脈に垂直方向の長さ

展葉からの日数



図4-9. キョクチャナギの展葉から落葉までの各発育段階の過程と日数。R. polarisの発生が確認できた調査区は、番号を灰色に塗りつぶした。

表4-3. キョクチャナギの展葉から各発育段階までの日数。

	展葉から各発育段階に至るまでの期間(日)				
	開花	花期終了	結実	紅葉	落葉
No.1	7	16		43	52
No.2	7	13		46	52
No.3	7	16		46	52
No.4	7	13		34	52
No.5	7	13		46	52
No.6	7	16		34	40
No.7	10	16		37	43
No.8	7	13		46	52
No.9	10	19		46	49
No.10	7	16		49	55
No.11	7	16	22	46	52
No.12	10	19		40	52
No.13	10	19	25	43	49
No.14	7	16	28	43	52
No.15	10	19	25	49	52
No.16	7	16	22	43	49
No.17	10	19	25	43	49
No.18	10	19	25	46	52
No.19	10	19		43	52
No.20	10	19	25	46	52
平均	8.4	16.6	24.6	43.5	50.5
標準偏差	1.5	2.3	1.9	4.3	3.4

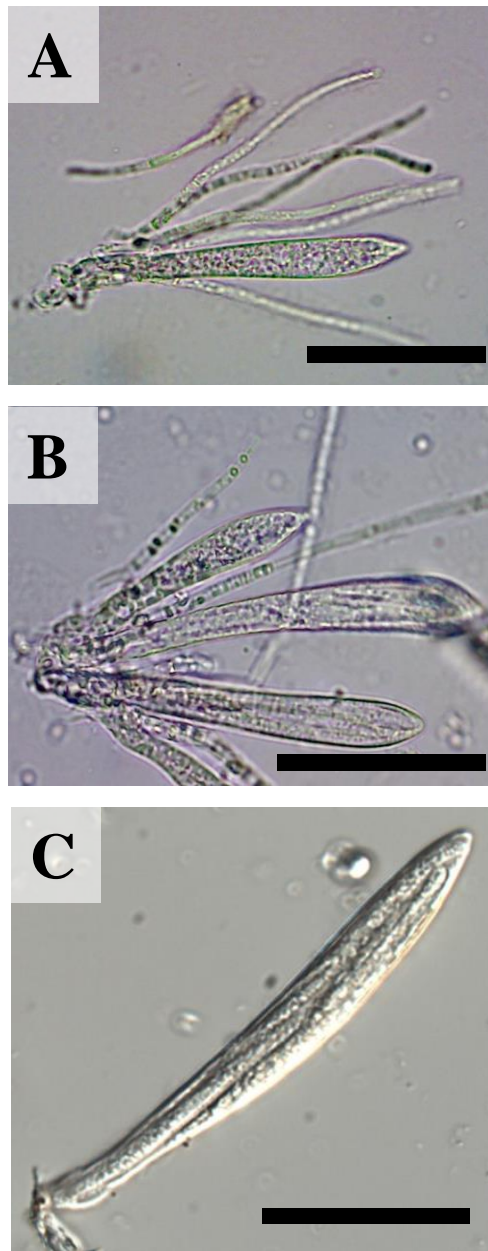


図4-10. 採集した子実体で観察された雪解け後の子のおよび子のお胞子の成熟過程。(A)子のおのサイズが成熟時の半分ほどであり、子のおの中に胞子は未形成であった。(B)子のおのサイズは成熟時と同等で、子のおの中に胞子が形成され始めている。胞子のサイズは成熟時の半分ほどであった。(C)成熟した胞子を含む子のお。
Bar=50 μ m。

表4-4. 7月13日と8月8日における各サンプリング地点における子実体成熟段階。

7月13日

調査地点	成熟	未成熟			未成熟合計	未成熟—未子のう	成熟率	
		孢子未成熟	子のう有・未孢子	子のう未形成			I	II
A	24	6	0	3	9	6	0.73	0.80
B	17	4	2	12	18	6	0.49	0.74
C	12	4	4	12	20	8	0.38	0.60
D	6	1	4	22	27	5	0.18	0.55
合計	59	15	10	49	74	25		
平均							0.44	0.67

8月8日

調査地点	成熟	未成熟			未成熟合計	未成熟—未子のう	成熟率	
		孢子未成熟	子のう有・未孢子	子のう未形成			I	II
A	18	2	0	12	14	2	0.56	0.90
B	23	4	4	2	10	8	0.70	0.74
C	5	6	9	14	29	15	0.15	0.25
D	15	1	7	8	16	8	0.48	0.65
合計	61	13	20	36	69	33		
平均							0.47	0.64

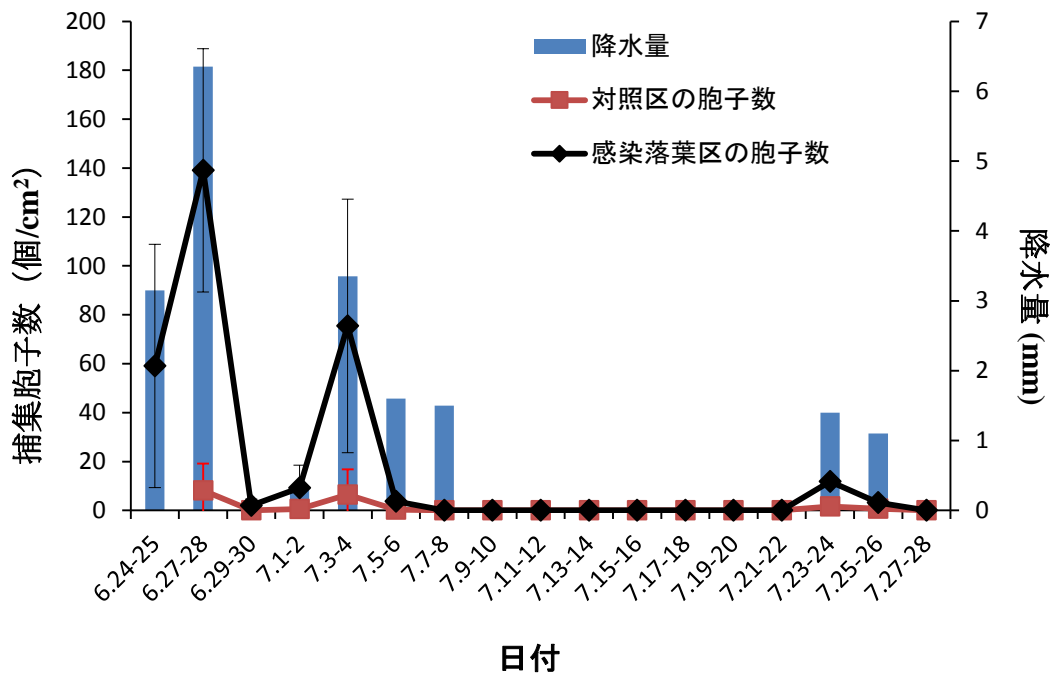


図4-11. 6月24日ー7月28日における2日ごとの降水量および感染落葉区と対照区の捕集胞子数。

表4-5. 孢子トラップを設置した各区の落葉数、感染葉数、全葉数、感染率、総捕集孢子数、総付着孢子数（6月24日－7月30日）。

感染落葉区

	落葉数	感染葉数	全葉数	感染率	総捕集孢子数	総付着孢子数
1	5	24	95	25.3	237	11274
2	7	50	120	41.7	412	24715
3	13	39	136	28.7	332	22604
4	21	6	56	10.7	352	9850
5	36	98	157	62.4	362	28389
6	25	33	107	30.8	170	9079
平均	18	42	111	33.3	311	17652
標準偏差	12	31	17	17.4	90	8541

対照区

	落葉数	感染葉数	全葉数	感染率	総捕集孢子数	総付着孢子数	感染落葉群落までの距離 (cm)
1	0	0	157	0.0	31	2426	280
2	0	0	120	0.0	19	1125	180
3	0	4	146	2.7	36	2649	60
4	0	2	219	0.9	7	760	460
5	0	0	151	0.0	9	642	350
6	0	2	157	1.3	6	436	460
平均	0	1	158	0.8	18	1340	298
標準偏差	0	2	33	1.1	13	957	159

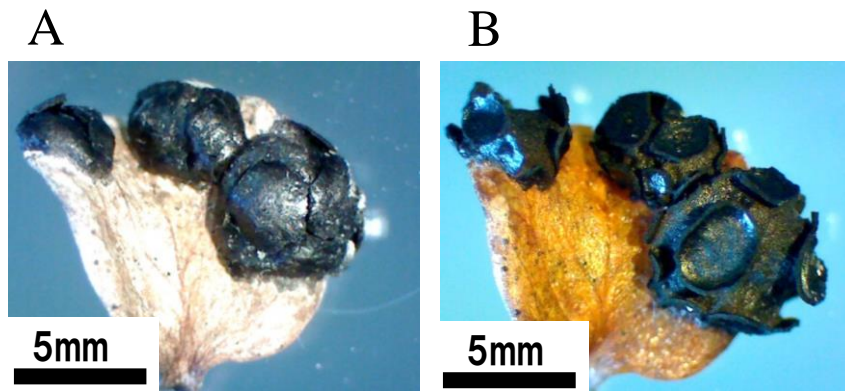


図4-12. 落葉上で成熟した子実体。乾燥時（A）と吸水時（B）

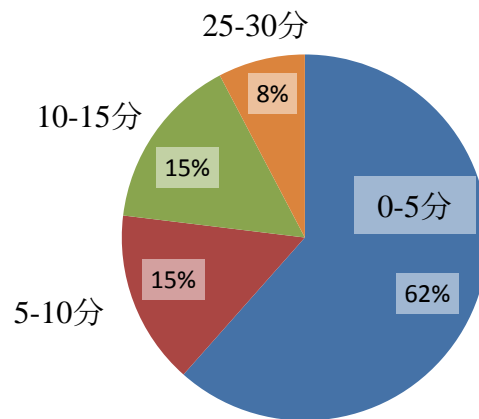


図4-13. 成熟した子実体を接水状態においた際に子実層が露出するまでの時間。

表4-6. 各浸水時間後の発芽率

サンプル番号	発芽率			
	3時間後	6時間後	9時間後	12時間後
1	0.30	0.77	0.77	0.81
2	0.44	0.85	0.86	0.88
3	0.41	0.54	0.70	0.72
平均値	0.39	0.72	0.72	0.80
標準偏差	0.07	0.16	0.16	0.08

表4-7. 各乾燥時間後の胞子の発芽率。*対照は乾燥させずに発芽率を計測。

サンプル番号	発芽率				
	*対照	1日後	3日後	6日後	9日後
1	0.82	0.34	0.63	0.69	0.55
2	0.88	0.48	0.34	0.71	0.63
3	0.63	0.83	0.76	0.58	0.61
平均	0.79	0.55	0.59	0.66	0.59
標準偏差	0.13	0.25	0.22	0.07	0.04

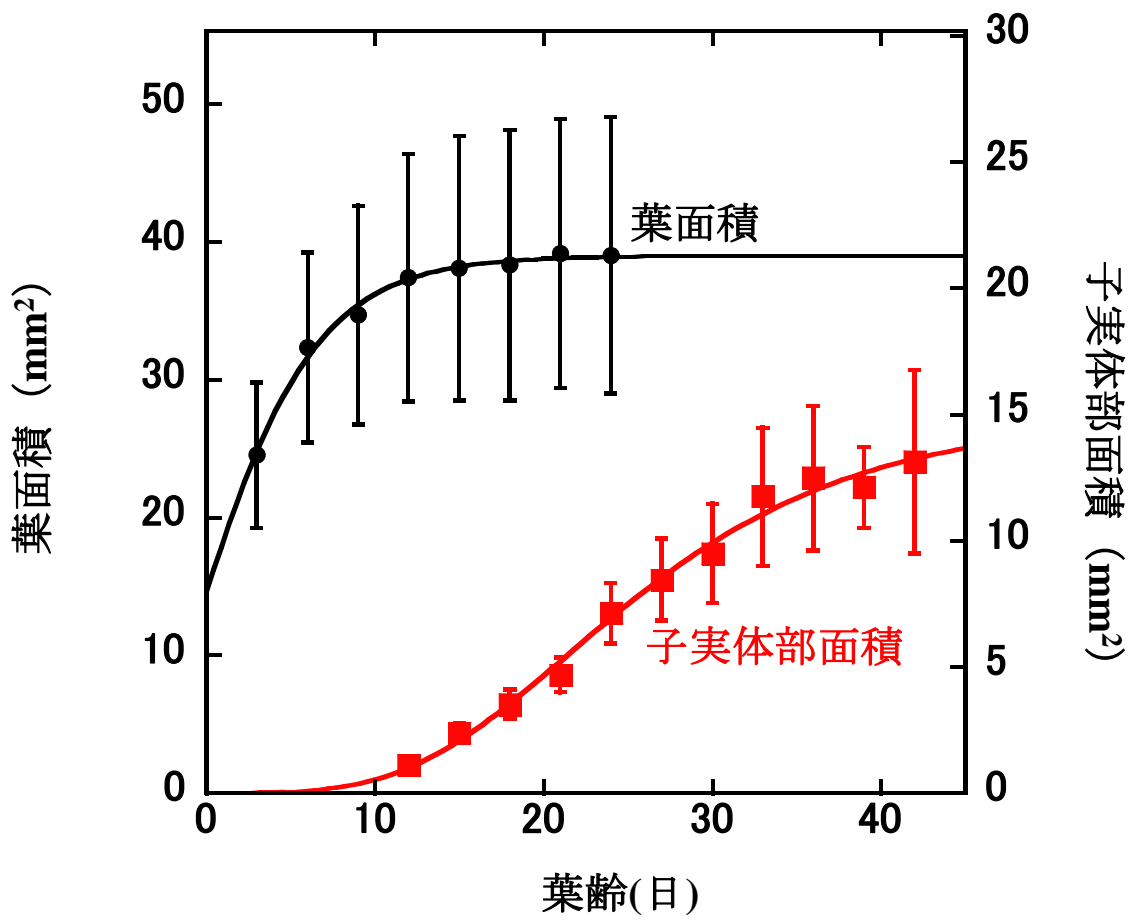


図4-14. キョクチヤナギの葉齢に伴うヤナギ葉面積および*R. polaris*の子実体面積の変化。

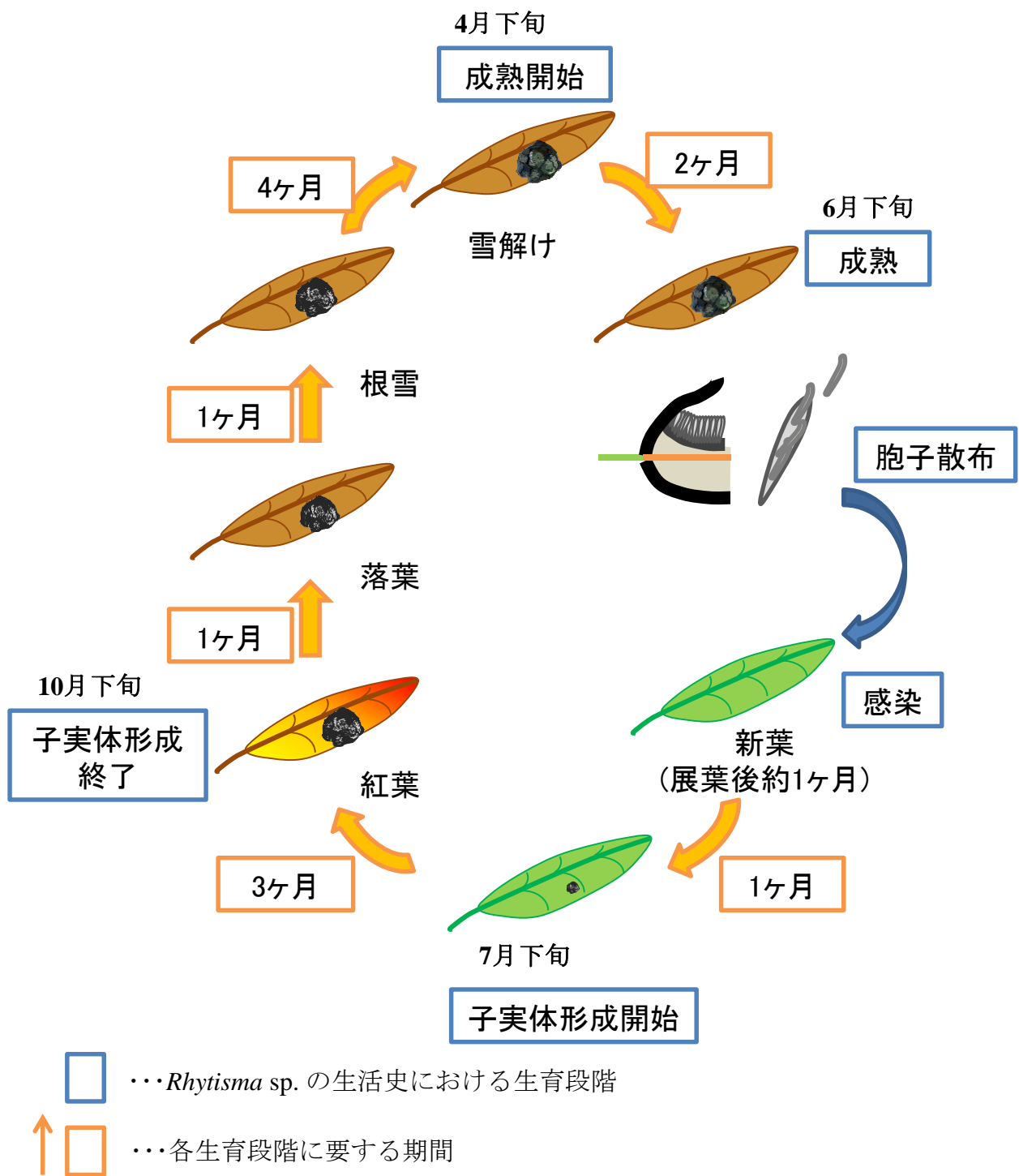


図4-15. 日本に生育する*Rhytisma* sp. の生活史における各生育段階とそれに要する期間

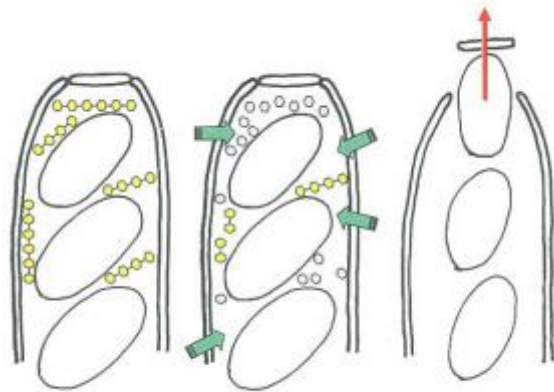


図4-16. 子のう胞子が射出される仕組み（細矢 2008 より）。

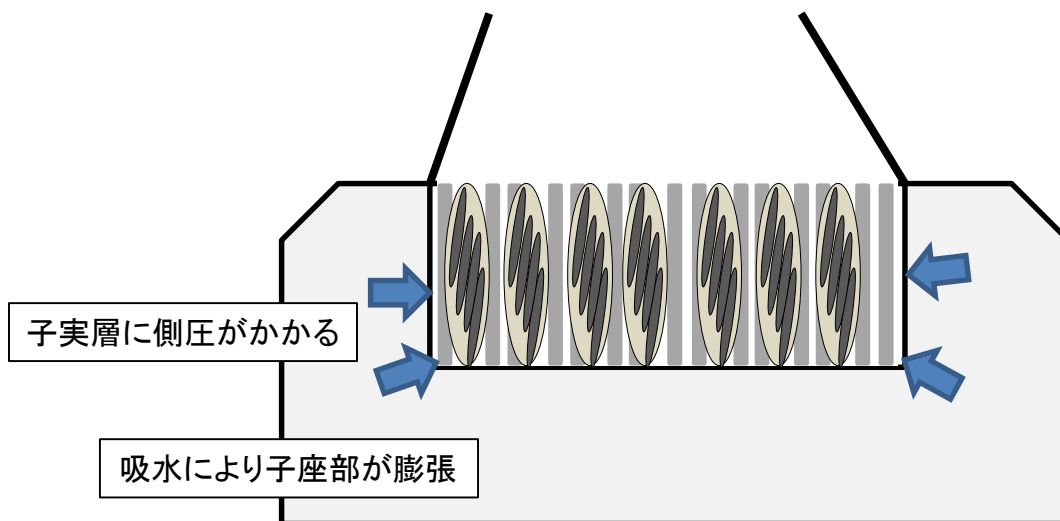


図4-17. *R. polaris*の子実体開裂時に胞子散布が起こる仕組みの想像図。

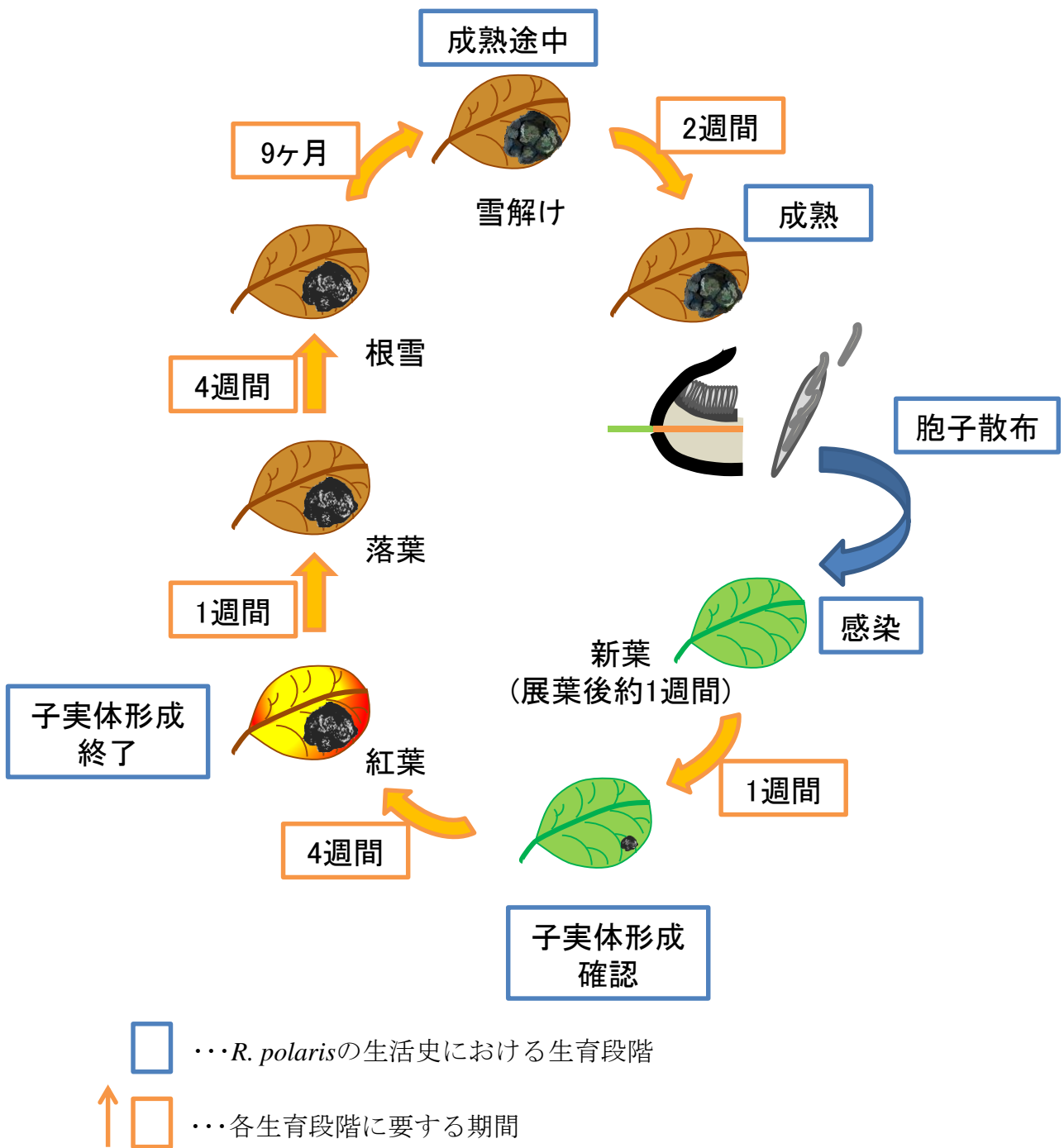


図4-18. *R. polaris* 生活史における各生育段階とそれに要する期間

第5章 宿主への影響

5-1 背景と目的

Rhytisma 属菌を含む絶対寄生菌は生きた植物に寄生し、その組織を分解する能力を発達させてきた。その結果、宿主植物に変形や枯死などの生理的な悪影響を及ぼす場合も多い。特に真菌類はウイルスや細菌などと比較して、植物の病原となる種数が多く、植物の生育にさまざまな障害を及ぼす。自然環境下においても寄生菌が樹木植物生育や繁殖の大きな阻害要因となり、群落単位での影響を与える場合も報告されている（佐橋 2004; 大園 2011）。ツンドラ生態系において、植物寄生菌が宿主植物に与える影響を調べた研究は少ないが、やはり植物寄生菌が植物個体や群落の生育に影響を及ぼすことが示されている（Tojo and Nishitani 2005; Tojo and Newsham 2012）。しかしながら、*Rhytisma* 属菌のような絶対寄生菌にとって、宿主植物の存続は自身を存続させるために必要である。寄生菌が宿主に強い悪影響を与え、宿主の適応度を下げてしまえば、その宿主に依存する寄生菌の適応度も低下してしまいかねないからである。特にツンドラ生態系では、低温、短い生育期間、乾燥、貧栄養といった環境が植物の分布や現存量を強く制限している。このような条件下で寄生菌が植物に与える影響は、植物の生育をますます厳しいものとする可能性があり、その影響が植物の適応度を大きく下げる場合には、それは寄生菌自身の適応度にも跳ね返ってくるだろう。2、3、4 章では、スピッツベルゲン島のキョクチヤナギに寄生する *Rhytisma* 属菌の特徴を分類学的な視点と生態学的な視点から示してきた。その結果、*R. polaris* は、これまで報告されてきた *Rhytisma* 属菌とは大きく異なった分類学的・生態学的特徴をもっており、その特徴は厳しい北極の環境とそこに生育する宿主植物に適応した結果、獲得されたものと考えられる。そして、

北極環境中に生きる脆弱な宿主植物に対して *R. polaris* が与える影響についても、本菌がツンドラ生態系で生存するための適応的な特徴があると考えられた。

Rhytisma 属菌が植物の生葉上に子実体を形成する現象は、その特徴的な病徴から黒紋病という植物の病気として認識されているものの、植物の落葉を早める、枯死させるといった顕著な悪影響を及ぼすことは報告されていない。そして、*Rhytisma* 属の菌類が宿主植物に及ぼす生理学的な影響を定量的に示した研究はこれまでに無い。本研究では、宿主の光合成と栄養分に対して、*R. polaris* が与える影響について注目した。植物にとって光合成は空気中の二酸化炭素を固定し、有機化合物を作り出すための重要な機能であり、寄生菌がそれに及ぼす影響はその植物個体の生存を大きく左右する可能性がある。また、キョクチャナギのように生態系における主要な生産者の役割を果たす種の生産量に対して *R. polaris* が及ぼす影響は北極生態系システムを考える上でも重要となり得る。一方、寄生菌である *R. polaris* はキョクチャナギから様々な栄養分を吸収し、自らの生命活動に使用している。本章では、ヤナギから *R. polaris* への炭素と窒素の移動について明らかにすることを目指した。炭素は、生物の構成元素としては酸素と並び最も多く、構造組織の形成に必要不可欠な元素である (Taiz and Zeiger 2004)。さらに、北極域の土壤環境は植物にとって貧栄養状態であると言われており、中でも植物の生命維持のために重要な元素である窒素化合物は欠乏状態であることが示されている (Yoshitake et al. 2007)。そこで本章では *R. polaris* がキョクチャナギに与える影響について明らかにするため、(1) 光合成活性および生産量への影響と、(2) ヤナギの炭素・窒素の損失量の影響から評価することを目的とした。

5-2 方法

5-2-1 光合成活性および生産量への影響

光合成生産は植物の物質生産能力の基本となる重要な機能である。*R. polaris* の感染がキョクチャナギの光合成生産にどのような影響を与えるかを明らかにするために、本菌がキョクチャナギの光合成活性に与える影響を測定した。また、この結果と Muraoka et al. (2002) のキョクチャナギの生産量推定モデル式を用いて、キョクチャナギの葉一枚あたりの生産量と *R. polaris* の感染によって失われる生産量を推定した。

(1) 光合成活性への影響

(1-1) 光合成活性の測定方法

R. polaris がキョクチャナギの光合成活性に与える影響を明らかにするために Portable pulse-amplitude modulated fluorometer (PAM-2100, Heinz Walz GMBH, Effeltrich, Germany) を用いてキョクチャナギの最大電子伝達速度 (rETR_{max}) を測定し、これを光合成活性の指標とした。電子伝達速度 (rETR) とは、ある光条件下における、クロロフィルの光化学系 II から発光する蛍光収率から求められる値である。PAM-2100 を用いた測定では、光化学系 II からの蛍光を測定し、光化学系 II を通る電子伝達の実効量子収率： $(F'_m - F) / F'_m$ を求めている。クロロフィルは吸収した光エネルギーを電子伝達、最終的には二酸化炭素固定に使用する。吸収した光エネルギーの中で、二酸化炭素固定に使われなかったエネルギーはたいてい熱として、ごくわずかに光として放出される。この光をクロロフィル蛍光と呼び、これを測定することにより、光合成活性の指標としている。

全ての測定において、実験毎に図 5-1 の地点 A からキョクチャナギ群落を土壤ご

とブロック状（20×20cm）に掘り出して使用した。掘り出した際の根への傷害などの攪乱の影響を考慮し、掘り出したブロックはプラスチックトレイにのせたまま野外環境で3日間静置した後、実験室に持ちこみ、光合成活性の計測を行った（図5-2）。計測の際は、ブロックごとに暗黒下で60分間暗順化させた後、計測する葉以外を暗幕で覆い、個葉ごとに計測した（図5-2）。経時的な計測実験に使用したヤナギブロックは、計測時以外はトレイにのせたまま水を十分に与えながら、屋外に置いた。PAM-2100の操作には、Win-control（Heinz Walz GMBH, Effeltrich, Germany）を用い、相対電子伝達速度（rETR）を以下の式として表した（McMinn and Hegseth 2004）。

$$rETR = (F'm - F) / F'm \times PAR \quad (\text{式 5-1})$$

F'm：最大蛍光強度

F：ある強さの光を当てた時の蛍光強度

PAR：光合成有効放射（ $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）

各個葉には6段階の照射強度の光（0, 253, 406, 636, 913, 1480 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photon flux density PAR）を180秒間隔で計測した。計測の間、温度と二酸化炭素濃度は操作せず、野外環境下と同じとした。得られたデータを基に、以下の回帰式から計測した葉の最大電子伝達速度（rETRmax）を算出した（Eilers and Peeters 1988; Zonneveld 1998; Ban et al. 2006）。

$$rETR = PAR / (aPAR^2 + bPAR + c) \quad (\text{式 5-2})$$

$$rETR_{\text{max}} = [b + 2(ac)^{0.5}]^{-1} \quad (\text{式 5-3})$$

a 、 b 、 c は適合曲線を描いた際の回帰係数である。

以下、(1-2) から (1-4) の調査において PAM-2100 を用いて行った 3 つの実験における光合成活性は全て同様の方法で測定している。また、これらの実験は全て 2010 年の 7 月から 8 月にかけて行った。さらに、3 つの実験ごとに異なるヤナギブロックを使用している。

(1-2) 感染葉とその対葉の光合成活性

R. polaris がヤナギの光合成活性に与える影響を明らかにするために、2010 年 7 月 25 日（採取後 8 日目）に、感染葉、病徴の認められない感染葉対葉の光合成活性の計測を行った。3 つの感染ブロックからそれぞれ 3 枚ずつ、計 9 枚の感染葉を選び、感染葉（図 5-3B）とその対葉（図 5-3C）の光合成活性を計測した。また対照実験として、3 つの非感染葉ブロックの非感染葉（図 5-3A）9 枚の光合成活性を測定した。

(1-3) 感染葉の病徴部・非病徴部の光合成活性

R. polaris 感染葉において、病徴部と非病徴部の光合成活性を明らかにするために、8 月 3 日に感染葉の病徴部（図 5-3D）と非病徴部（図 5-3E）のそれぞれの光合成活性を計測した。感染ブロック感染計測の際は、病徴部を計測する場合は非病徴部を黒い布で覆い、非病徴部を計測する場合は病徴部を黒い布で覆って計測した（図 5-2E）。また対照実験として、感染ブロックを採取した場所の付近から非感染葉ブロックを採取し、その非感染葉（図 5-3A）の光合成活性を測定した。

(1-4) 感染葉の光合成活性の経時変化

R. polaris の感染によってヤナギの光合成活性がどのように経時変化するかを明らかにするために、*R. polaris* の子実体が形成され始めた感染葉と非感染葉の光合成活性を経時的に測定した。感染ブロックと、その近くの非感染ブロックを3つずつ採取した。それぞれの感染ブロックから感染葉（図 5-3B）をそれぞれ3枚ずつ計9枚選び、それらの葉の光合成活性を7月17日から8月6日まで3日ごとに計測した。また、対照実験として非感染ブロックの非感染葉（図 5-3A）を感染葉と同様に9枚選び、光合成活性を計測した。蛍光活性の計測と同時に測定した感染葉と非感染葉の病徴部の大きさと葉の長径と短径を計測した（図 5-4）。キョクチヤナギの面積は式 5-5 を用いて算出した。*R. polaris* の子実体面積は、子実体のヤナギ葉の主脈方向の長さ（a, mm）と直交方向の長さ（b, mm）を計測した後、以下の式から面積を求めた。

$$R. polaris \text{ の子実体部面積 (mm}^2\text{)} = (a/2) \times (b/2) \times \pi \quad (\text{式 5-4})$$

$$\text{キョクチヤナギの葉面積 (mm}^2\text{)} = (\text{葉の長径}/2) \times (\text{葉の短径}/2) \times \pi \quad (\text{式 5-5})$$

(1-5) 感染葉の形態観察

感染による形態的な影響を観察するため、感染葉の病徴部と非病徴部について顕微鏡に形態観察を行った。*R. polaris* の子実体が形成されたヤナギ生葉を採集し、垂直方向の切片を作成した。実体顕微鏡（Nikon, SMZ1500）と光学顕微鏡（Nikon, Eclipse E600）を用いて、無作為に抽出した感染葉 30 サンプルの病徴部と非病徴部について観察を行った。

(2) 生産量への影響

(2-1) 葉齢に伴うキョクチャナギ光合成活性の変化

モデルによる生産量推定のためにキョクチャナギの葉齢に伴う光合成活性の変化と葉面積の変化を明らかにした。ヤナギ展葉直後の 2010 年 7 月 17 日から落葉した 8 月 24 日までの光合成活性を 3 日ごとに計測した。展葉開始直後の健全なヤナギ群落から 3 つのブロックを切り取り、ブロックからそれぞれ 3 枚ずつ非感染葉を選んで測定に用いた。また測定の際は、個葉の長径 (mm) と短径 (mm) を同時に計測し (図 5-4)、式 5-5 から葉面積を求めた。

(2-2) モデルを用いた生産量への影響の推定

R. polaris の感染がキョクチャナギの個葉あたりの純生産量に与える影響を明らかにするために、Muraoka et al. (2002) のモデルに基づいて、展葉から落葉までの感染葉と非感染葉の純生産量の推定を行った。先に行った葉齢に伴う光合成活性の調査 (5 章 2-1 (2-2) 参照) において、キョクチャナギの光合成活性が葉齢 40 日目で検出限界以下となったことから、今回のモデル式におけるキョクチャナギの葉の寿命を 40 日間とした。葉の純光合成生産量 (P_n) は、葉齢、光および温度に対する光合成 (Relative A_{max}) および温度に対する呼吸 (R_{leaf}) の応答の回帰式から計算される。光と温度のデータは 2002 年のものを使用した。モデル式は以下に示す。

光飽和状態における葉齢 X 日の葉の最大光合成速度: A_{max} ($\text{CO}_2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

葉齢 10 日目まで: $A_{max} = -1.5279 + 3.611X - 0.22908X^2$

葉齢 11 日目から 43 日目まで: $A_{max} = 18.797 - 9.3768 \log X$

温度 T_1 における相対的な A_{\max} (Relative A_{\max})

$$\text{Relative } A_{\max} = 0.2184 + 0.10427T_1 - 0.0035854T_1^2$$

温度 T_1 における呼吸速度: R_{leaf} ($\text{CO}_2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

$$R_{\text{leaf}} = 0.44246 \exp(0.10011T_1)$$

温度 T_1 における純光合成速度: A_{gmax} ($\text{CO}_2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

$$A_{\text{gmax}} = A_{\max} + R_{\text{leaf}}$$

ある入射光量子密度 I における光合成速度 A (Thornley 1976)。

$$A = \frac{\alpha I + A_{\text{gmax}} - \sqrt{\alpha I + 4\theta\alpha I A_{\text{gmax}}}}{2\theta} - R$$

光-光合成曲線の初期勾配 $\alpha = 0.06$

光-光合成曲線の曲度 $\theta = 0.8$

これをもとに、計測したキョクチャナギの葉面積と *R. polaris* の子実体面積の変化を考慮し、感染葉と非感染葉の1時間当たりの純光合成生産量を以下の式で示す。

$$\text{キョクチャナギの葉面積 (葉齢 9 日目まで)} = \text{葉齢} \times 0.1 \times 39 \times 10^{-6} \text{ (m}^2\text{)}$$

$$\text{キョクチャナギの葉面積 (葉齢 10 日目から 43 日目まで)} = 39 \times 10^{-6} \text{ (m}^2\text{)}$$

$$R. \text{ polaris の子実体面積} = 10.583 \times 0.039782^{\text{EXP}(-0.1217 \times (\text{葉齢}-11))} \times 10^{-6} \text{ (m}^2\text{)}$$

健全葉1枚当たり1時間当たりの純生産量 P_{salix} ($\text{CO}_2 \mu\text{mol leaf}^{-1} \text{h}^{-1}$)

$$= A \times \text{キョクチャナギの葉面積} \times (60 \times 60)$$

R. polaris 感染によって失われた1時間当たりの純生産量 P_{tar} ($\text{CO}_2 \mu\text{mol tar}^{-1} \text{h}^{-1}$)

$$= A \times R. \text{ polaris の子実体面積} \times (60 \times 60)$$

感染葉の1時間当たりの純生産量 P_{inf} ($\text{CO}_2 \mu\text{mol leaf}^{-1} \text{h}^{-1}$) = $P_{salix} - P_{tar}$

観察の結果にもとづき、*R. polaris* の感染によってキョクチヤナギの着葉期間は変化しない、ヤナギの葉面積は葉齢 10 日目から変化しない、葉齢 12 日目に *R. polaris* の子実体形成が始まると仮定し、感染葉と非感染葉の純生産量を推定した。

5-2-2 炭素・窒素量への影響

感染によるヤナギの炭素・窒素量への影響を明らかにすることを目的に、キョクチヤナギの葉と *R. polaris* の子実体の炭素・窒素含有量を測定し、キョクチヤナギから吸収され *R. polaris* の子実体として固定された炭素・窒素量を明らかにした。サンプルは 2012 年に採集したものを用いた。キョクチヤナギの葉は展葉直後の 7 月 1 日から落葉直前の 8 月 15 日まで 3 日間隔で非感染葉のみを採集し、*R. polaris* の子実体は 8 月 15 日に落葉直前の葉に付着しているものを採集した。全てのサンプルは葉齢を揃えるために同じ群落から採集した。炭素・窒素量の測定には、キョクチヤナギの葉を各採集日ごとに 3 枚ずつ、*R. polaris* の子実体を 6 個用いた。全てのサンプルは採集後、撮影した画像から画像処理ソフトウェア Image J (National Institutes of health, Bethesda, MD, USA) を用いて、ヤナギ葉と *R. polaris* 子実体の面積を求めた。その後、凍結乾燥機 (*Freeze Dryer FDU-810*, Eyela Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて乾燥させ、電子天秤 (Mettler Toledo Inc., Columbus, OH) を用いて乾燥重量を計測した。炭素・窒素量測定の際はサンプルをカッターで約半分分割し、半分を保存用とし、半分を分析用として乾燥重量を計測後、NC アナライザー (Sumigraph NC Analyzer NC-220F; Sumika Chemical Analysis Service, Ltd, Osaka, Japan) を用いて炭素・窒素量を測定した。

5-3 結果

5-3-1 光合成活性および生産量への影響

(1) 光合成活性への影響

(1-1) 感染葉とその対葉の光合成活性

感染葉(図 5-3B)と感染葉の対葉(図 5-3C)の最大光合成活性はそれぞれ 65.2 ± 15.4 と 72.1 ± 22.8 であり、どちらの値も非感染葉(図 5-3A)の値(67.4 ± 10.2)と有意な差は無かった(Student t-test, $p > 0.05$)。

(1-2) 感染葉の病徴部・非病徴部の光合成活性

感染葉の病徴部(図 5-3D)の光合成活性は測定限界以下であった。それに対して、非病徴部(図 5-3E)の最大光合成活性は 90.7 ± 23.0 であり、非感染葉(図 5-3A)の値(89.3 ± 15.3)と有意な差は認められなかった(Student t-test, $p > 0.05$)。

(1-3) 感染葉の光合成活性の経時変化

図 5-5 が示すように、計測期間中において *R. polaris* 感染葉と非感染葉の光合成活性は時間とともに直線的に低下し、計測期間中、両者の光合成活性の間に有意な差は見られなかった(Student t-test, $p > 0.05$)。また、計測期間中にヤナギの葉面積は有意に増加しなかったが(t 検定 $P > 0.05$)、*R. polaris* の子実体は成長した(図 5-5)。

(1-4) 感染葉の形態観察

病徴部の断面を観察すると、子実体に挟まれたヤナギ葉部の組織は黄変し、枯死していた(図 5-6C)。さらに、この部分には子実体の基部を構成する角・円形菌糸組織の形成が観察できた。反対に、非病徴部は葉緑体を保持していることが確認で

き、菌糸の侵入による組織の破壊も見られなかった（図 5-6D）。

（2）生産量への影響

（2-1）葉齢に伴うキョクチャナギ光合成活性の変化

展葉したキョクチャナギの葉の $rETR_{max}$ は時間の経過に伴って増加していき、葉齢 13-22 日でピークを迎え、その後徐々に下降し、葉齢 40 日目で検出限界以下となった（図 5-7）。葉面積は $rETR_{max}$ と同様に葉齢 11 日目までは増加し、12 日目以降は増加が止まった（図 5-7）。

（2-2）モデルを用いた生産量への影響の推定（図 5-8）

光合成活性に与える影響の結果（5-3-1（1-2）参照）により、感染葉の非病徴部と健全葉の光合成活性には有意な差が無かったことから、感染葉の非病徴部は健全葉と比較して光合成活性の低下はなく、健全葉と同等の光合成生産が行われていると考えられた。反対に感染葉の病徴部に関しては光合成活性が検出限界以下であったため、光合成生産は行われていないと考えられた。加えて、5-3-1（1-3）の結果から、*R. polaris* の子実体（病徴部）が成長しても、非病徴部の光合成活性へ影響を及ぼさないと判断された。以上のことから、モデルを用いた光合成生産量の推定において、*R. polaris* の影響を考慮する際には、*R. polaris* の子実体に覆われている部分（病徴部）の葉の光合成生産が 0 になり、それ以外の部分では光合成生産に影響はないと仮定し、子実体の成長を考慮して純生産量の推定を行った。その結果、キョクチャナギの健全葉では着葉期間中の純生産量は $449.2 \text{ CO}_2 \mu\text{mol leaf}^{-1}$ となった。それに対し、*R. polaris* 感染によって失われる純生産量は $39.3 \text{ CO}_2 \mu\text{mol leaf}^{-1}$ となり、感染葉は非感染葉に比べて感染後から落葉までの期間は約 12%、全着葉期間の生産量では、

約 9%の純生産量が減少すると推定された。

5-3-2 炭素・窒素量への影響

ヤナギの窒素含有量 (N mg/mg leaf) は展葉直後に最大値をとり、その後葉齢に伴って低下し、落葉直前に最小値になった (図 5-9A)。また、ヤナギの葉齢に伴う葉面積の増加も考慮したヤナギの葉一枚あたりの窒素量の推定値は葉齢 19 日目 (7 月 19 日) で最大値 (0.092±0.019mg) をとり、8 月 15 日 (葉齢 45 日目) に最小値 (0.003±0.007mg) となった (図 5-9B)。一方、*R. polaris* の子実体の窒素含有量は 0.006±0.002 (mg/mg tar) であり、子実体一個あたりの窒素量は 0.049±0.008mg と推定された (図 5-9A、B)。

ヤナギの炭素含有量 (C mg/mg leaf) は窒素含有量と同様に展葉直後に最大値をとり、その後葉齢に伴って低下し、落葉直前に最小値になった (図 5-10A)。ヤナギの葉齢に伴う葉面積の増加も考慮したヤナギの葉一枚あたりの炭素量の推定値は葉齢 24 日目で最大値 (1.73±0.25mg) を示し、葉齢 45 日目に 1.32±0.14mg となった (図 5-10B)。一方、*R. polaris* の子実体の炭素含有量は 0.451±0.002 (mg/mg tar) であり、子実体一個あたりの炭素量は 5.21±0.66mg と推定された (図 5-10A、B)。

5-4 考察

光合成活性への影響

本研究において光合成活性の指標としている rETR は PAM-2100 によって計測される $(F'm - F) / F'm$ から算出している (式 5-1)。 $(F'm - F) / F'm$ は葉緑体の行う光

合成反応における光化学系Ⅱの最大量子収率を表しているため、 $(F'm - F) / F'm$ は計測面積や葉緑体量に関わらず、葉緑体が健全であれば変化しない。つまり、感染葉を計測した際に非感染葉と光合成活性が有意な差が無かった結果は、感染葉においても非病徴部に残っているクロロフィルは健全であることを示唆している。これは非病徴部の光合成活性が健全葉の光合成活性の間に有意な差が無かったこととも一致する。病徴部の光合成活性は検出限界以下であったため、感染葉の光合成活性は、ちょうど健全葉の一部に暗幕（子実体）を被せられている状態と言える。また、感染葉と健全葉の光合成活性はともに葉齢の増加に伴い低下したが、計測期間中に両者の間に有意な差はなかった。これは、*R. polaris* の子実体が成長しても、非病徴部の光合成活性へ影響を及ぼさないことを示唆している。つまり、*R. polaris* が感染することで、子実体に覆われた範囲の光合成活性は無くなり、それ以外の範囲は全く影響を受けない、そしてそれは子実体が成長しても変わらないことが明らかになった。また、感染葉の対葉の光合成活性は健全葉と有意な差が無かったことから、感染葉の対葉の光合成活動に対しても *R. polaris* の感染による影響はないと考えられた。

病徴部の光合成活性が検出限界以下であったことは、病徴部の葉の組織が黄変し枯死している形態観察での結果と一致した。同時に、非病徴部は葉緑体を保持していることが確認でき、菌糸の侵入による組織の破壊は見られなかった。これは、感染葉の非病徴部が健全葉と同程度の光合成活性を維持していたことを支持する結果であった。これらことは、*R. polaris* が感染しても病徴部以外では葉緑体がダメージを受けないことを示唆している。Berger et al. (2004) は *Botrytis cinerea*（灰色カビ病菌）がトマトの葉に感染した際、葉の光合成活性が病徴部とそのごく近縁で低下するものの、それ以外の光合成活性には影響を与えないことを示している。しかし

ながら、この現象が植物の防衛応答によるものか寄生菌側の病原性の度合いに基づくものなのかについては明らかになっていない (Berger et al. 2007)。また、寄生菌の感染によって、病徴が現れる前の段階から光合成活性に影響を与えることも一部の宿主-寄生菌間で知られているが (Bonfig et al. 2006)、今回の調査において、*R. polaris* が感染から子実体形成までの潜伏期間にキョクチャナギの光合成活性に及ぼす影響については計測していないため、潜伏期間中の光合成への影響は評価できていない。

葉齢に伴うキョクチャナギ光合成活性の変化と生産量への影響

キョクチャナギの光合成活性が展葉直後から葉齢に伴って増加したのは、植物全般にみられる現象であり、葉の成長に伴って組織中の葉緑体が肥大化し、グラナが発達、クロロフィル含有量が増加したためであると考えられる (巽 1999)。その後、キョクチャナギは花期の終了 (展葉 24 日目) を境に、光合成活性の低下が始まる。この光合成活性の低下も、多くの植物でみられる現象であり、光合成器官の材料である窒素などの物質が、葉の加齢に伴い根や茎へ再吸収されると同時にチラコイドの破壊や葉緑体の縮小が起こる結果と考えられている (巽 1999)。葉齢に伴う窒素含有量の変化 (図 5-9) において、葉齢 20 日前後を最大にして窒素含有量の低下が見られることは、ヤナギ葉の光合成活性の低下と一致した。

モデルによって推定されたヤナギの光合成生産量は、展葉後急速に増大したが (図 5-8)、これは展葉後の光合成活性の増加と葉面積の増加を反映した結果である。その後、光合成活性の低下と葉面積増加が止まることで一日あたりの生産量は減少する。この時期、*R. polaris* はヤナギの葉に子実体を形成し始め、子実体による被覆によってヤナギの光合成生産は損失を受け始める。しかし、*R. polaris* の子実体は発

生から落葉までヤナギ葉を平均 18%被覆していたのに対し、純生産量の損失は 9%と低い値に抑えられている。この理由は、ヤナギの光合成生産量の大部分は *R. polaris* の子実体の形成前および発生初期に集中しているためである。

キョクチャナギの生産量の推定に用いた Muraoka et al. (2002) のモデルは、呼吸測定やバイオマス増加量を考慮している。しかしながら、今回のモデルによる評価は、光合成活性のみを指標にして、*R. polaris* の感染がキョクチャナギの葉一枚あたりの光合成生産量に与える影響を評価しているため、*R. polaris* の呼吸や感染によるヤナギのバイオマス変化の測定は行っていない。光合成活性の影響以外の原因でヤナギの生産量に対して *R. polaris* が何らかの影響を与えている可能性もあると考えられるため、より正確なモデルの構築のためには、今後はこれらの影響についても評価する必要がある。

窒素・炭素量への影響

ヤナギの健全葉の一枚当たりの窒素含有量 (mg/leaf) が展葉 15-24 日後で最大となったことは、この時期に葉面積が最大値に到達することと光合成活性が最大値をとることに関係していると考えられる。また、窒素含有量 (N mg/mg leaf) は落葉直前に急激に低下したが、これはヤナギが葉を落とす前に葉の窒素を茎や根といった貯蔵器官に転流しているためであると考えられる。窒素の転流は落葉樹に一般に起こることが知られており、ヤナギの落葉直前の窒素含有量 0.0034 ± 0.0036 (mg/mg leaf) は、他種のそれと同等の値であった (Berg et al. 1997)。一方、ヤナギの炭素含有量 (C mg/mg leaf) は、展葉直後が最も高い値をとり、徐々に低下していくという窒素含有量と同様の傾向を示した。しかし、窒素で見られたような落葉直前の顕著な減少は見られなかった。炭素は窒素と違い、細胞壁など構造組織の主要構成要素であ

るため、窒素のように葉に含まれていた大部分が転流されるような現象が起こらないことがこの理由と考えられる。

R. polaris の子実体の窒素・炭素含有量 (mg/mg tar) は炭素含有量に対して窒素含有量が低く、CN 比は 126 ± 33 となった。菌類の一般的な CN 比は、糸状体であれば 9-10 とされているので、これは非常に高い値である。一般に CN 比が 40 以上であれば、難分解性とされる。LeRoy et al. (2011) では、*R. punctatum* が宿主であるヒロハカエデ (*Acer macrophyllum*) のリターの分解を遅らせることが示されている。*R. polaris* の子実体は落葉後、翌年の子実体成熟および孢子散布まで他の腐性分解者から子実体の中に含まれる孢子を守る必要があるため、このような高い CN 比であることが考えられる。さらに、*R. polaris* の子実体はヤナギ葉面から大きく隆起していることによって、面積当たりの体積が非常に大きくなる。これによって、*R. polaris* の子実体の平均面積は 13.5mm^2 とヤナギ葉の 4 分の 1 程度であるにもかかわらず、子実体 1 個あたりの炭素量はヤナギ葉の一枚あたりに含まれる炭素量の最大値の約 3 倍、窒素量は最大値の約 0.8 倍の値をとった。

先述のとおり、ヤナギは窒素を落葉直前に転流させる。極域は一般的に土壌の窒素含有量が少なく、窒素欠乏状態であるため、窒素転流はヤナギの生存にとって重要だと考えられる。しかしながら、*R. polaris* に感染されたヤナギは本来転流により回収される予定であった窒素を子実体へ吸収され、落葉と共に失ってしまう。感染葉が失う窒素量 (*R. polaris* に吸収される窒素量) : 0.007mg は、健全葉が失う窒素量 (落葉によって失う窒素量) : 0.001mg と比較して、7 倍も大きくなることが明らかになった。したがって、感染率 10% の群落は非感染群落と比較して、窒素を 1.7 倍失うことになり、ヤナギの器官間での物質の移動に *R. polaris* が大きな影響を及ぼしていることを示す。

生産量の推定から、葉面積が 39mm² の感染葉が着葉期間中に純生産する炭素量は 4.92mg となり、感染葉が失う炭素量の推定値である 5.21mg とほぼ同等の値であった。この 5.21mg には、*R. polaris* の呼吸により空気中に放出された炭素は含まれていないため、感染葉におけるキョクチャナギと *R. polaris* の間での炭素量の収支は以下のように表すことができる。

感染葉の炭素量の収支 = 感染葉の純生産量 (4.92mg) - {*R. polaris* の子実体の炭素量 (5.21mg) + *R. polaris* の呼吸量 (X mg)}

つまり、炭素収支で考えると、ヤナギが *R. polaris* に感染された場合、感染葉で生産された炭素と同等からそれ以上の損失を受けることになる。さらに、葉を形成するために投資した炭素量を考慮すると、*R. polaris* の感染率が高いヤナギ群落では、*R. polaris* の感染がキョクチャナギの炭素収支に大きな負の影響を与えることが示唆された。

本研究では、*R. polaris* の呼吸量やヤナギの窒素増加量を計測していないため、土壌-キョクチャナギ-*R. polaris* の間の最終的な炭素・窒素収支については明らかにできていない。しかしながら、ニーオルスンにおけるキョクチャナギの優占度や一次生産能力を考慮した際には、*R. polaris* が本生態系の物質循環に大きな影響を及ぼす可能性はある。北極域の物質循環における本菌の影響や役割については今後明らかにしていく必要がある。

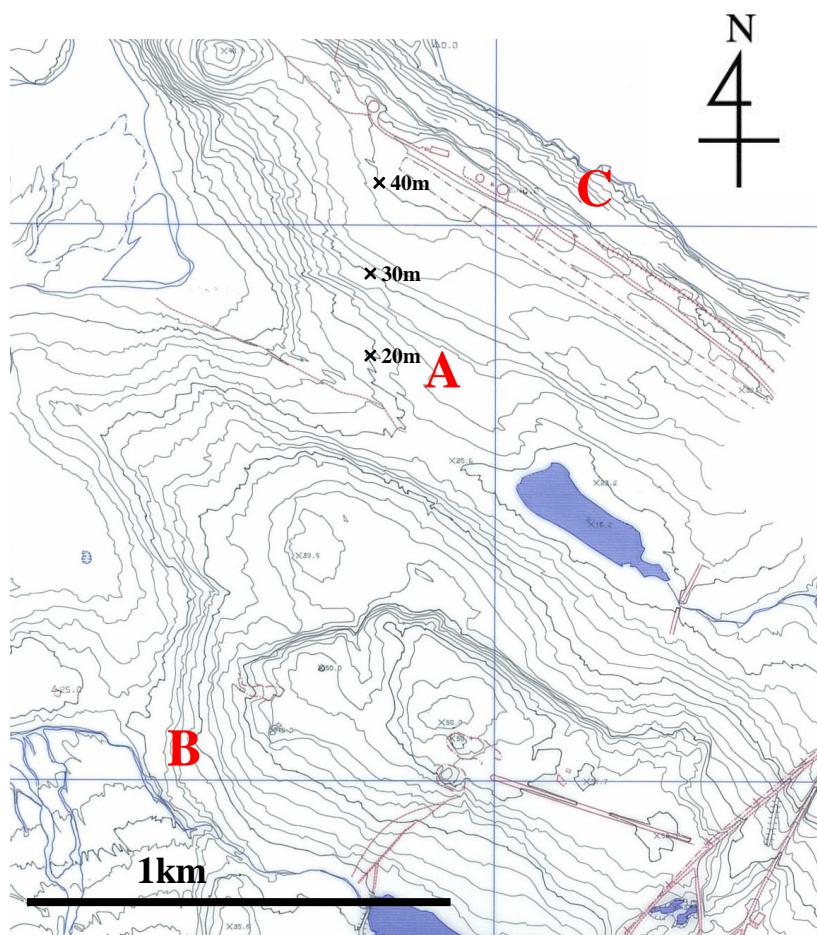


図5-1. 5章における調査を行った場所。

表5-1. 図5-1で示した場所で行った調査内容。

見出し番号	調査項目	調査地点	調査年
5-2-1 (1)	光合成活性への影響	A	2010
5-2-1 (2)	生産量への影響	B	2010
5-2-3	窒素・炭素量への影響	C	2012

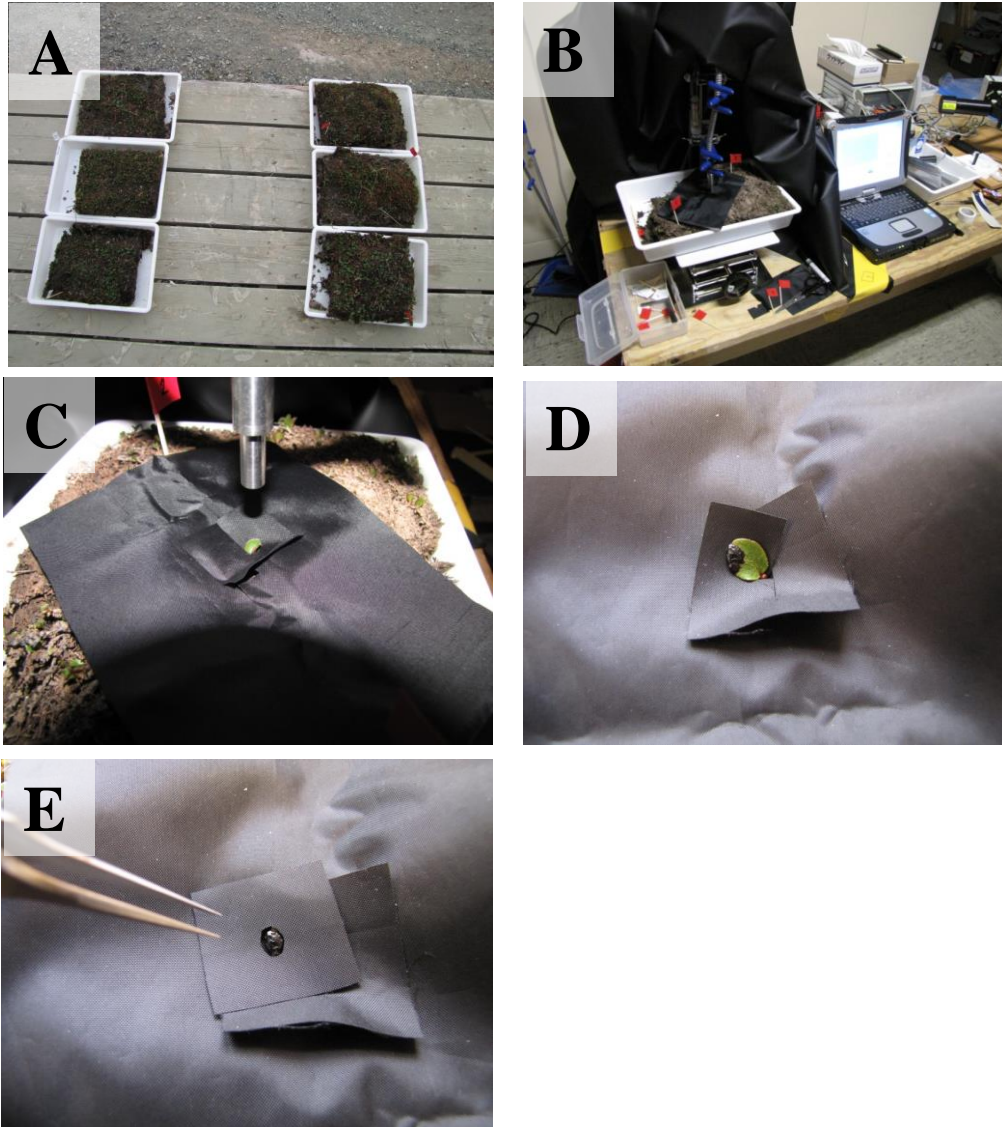


図5-2. 光合成活性計測用のヤナギブロック (A) 光合成活性計測の様子 (B, C, D) タール感染部のみの計測時 (E)

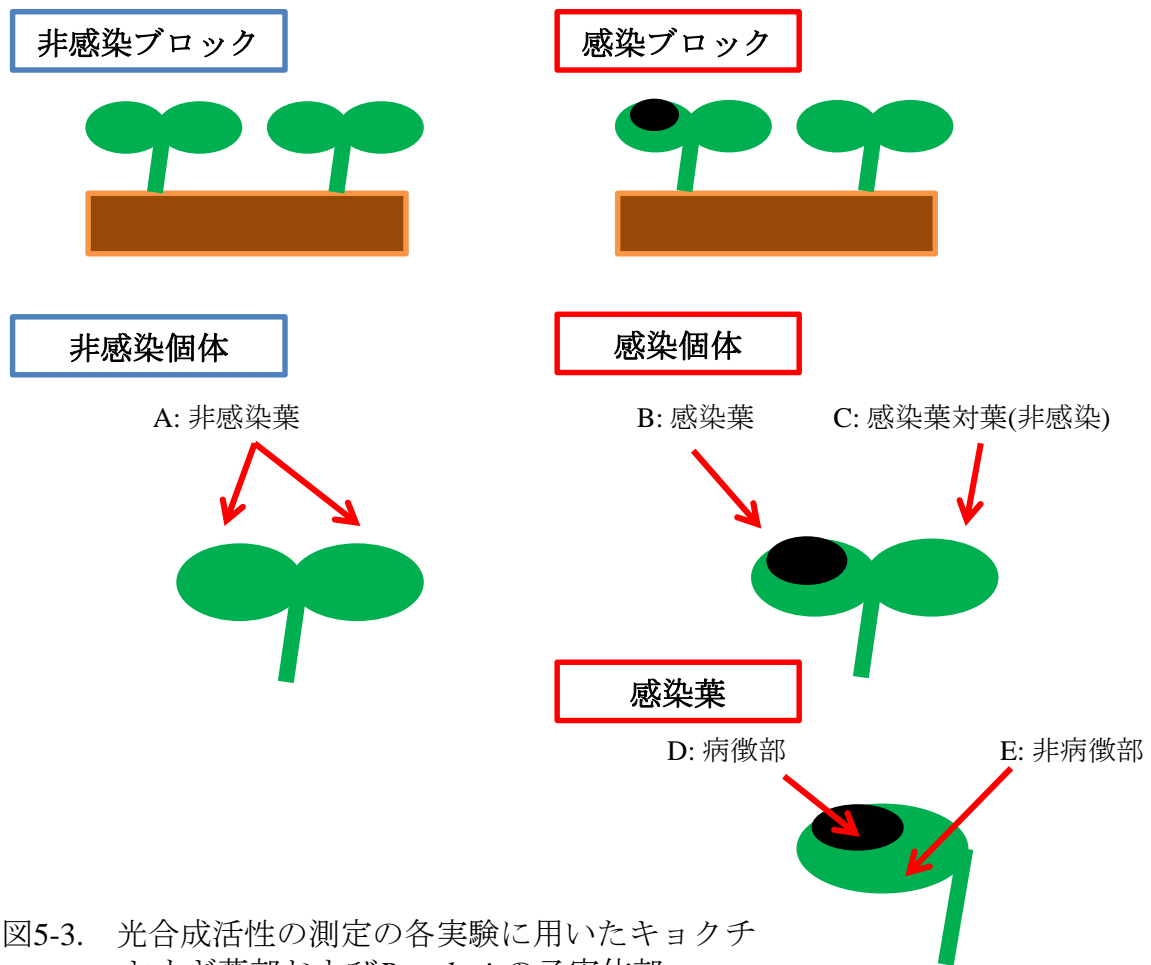


図5-3. 光合成活性の測定の各実験に用いたキョクチャナギ葉部および*R. polaris*の子実体部

表5-1. 図5-3に示したキョクチャナギ葉部および*R. polaris*の子実体部を用いた各実験

実験番号と実験名	測定した部分	測定日
(1-2) 感染葉とその対葉の光合成活性	A: 非感染葉 B: 感染葉 C: 感染葉対葉(非感染)	7月25日
(1-3) 感染葉の病徴部・非病徴部の光合成活性	A: 非感染葉 D: 病徴部 E: 非病徴部	8月3日
(1-4) 感染葉の光合成活性の経時変化	A: 非感染葉 B: 感染葉	病徴出現(葉齢約12日目)から落葉まで
(2-1) 葉齢に伴うキョクチャナギ光合成活性の変化	A: 非感染葉	葉齢0日から落葉まで

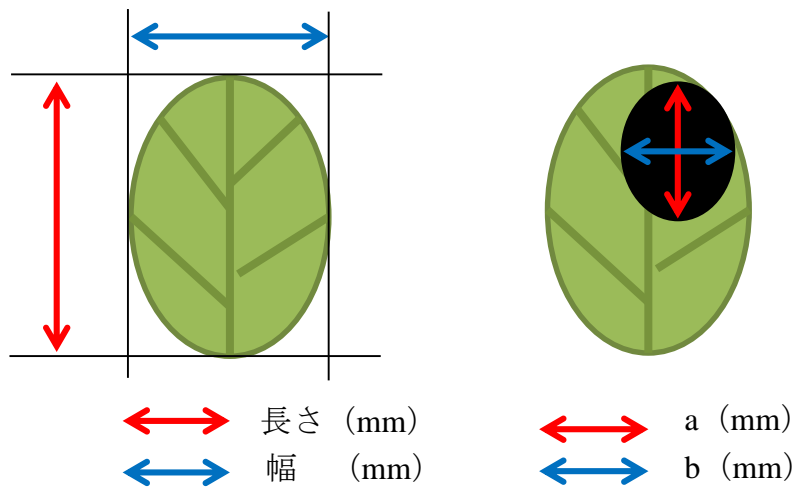


図5-4. キョクチヤナギ葉面積と *R. poaridis* の子実体面積を算出するために計測した長さ。ヤナギは葉の長さと同幅を計測し、子実体の面積は、**a** : ヤナギの主脈に平行方向の長さと同 **b** : ヤナギの主脈に垂直方向の長さを計測し、楕円の式から算出した。

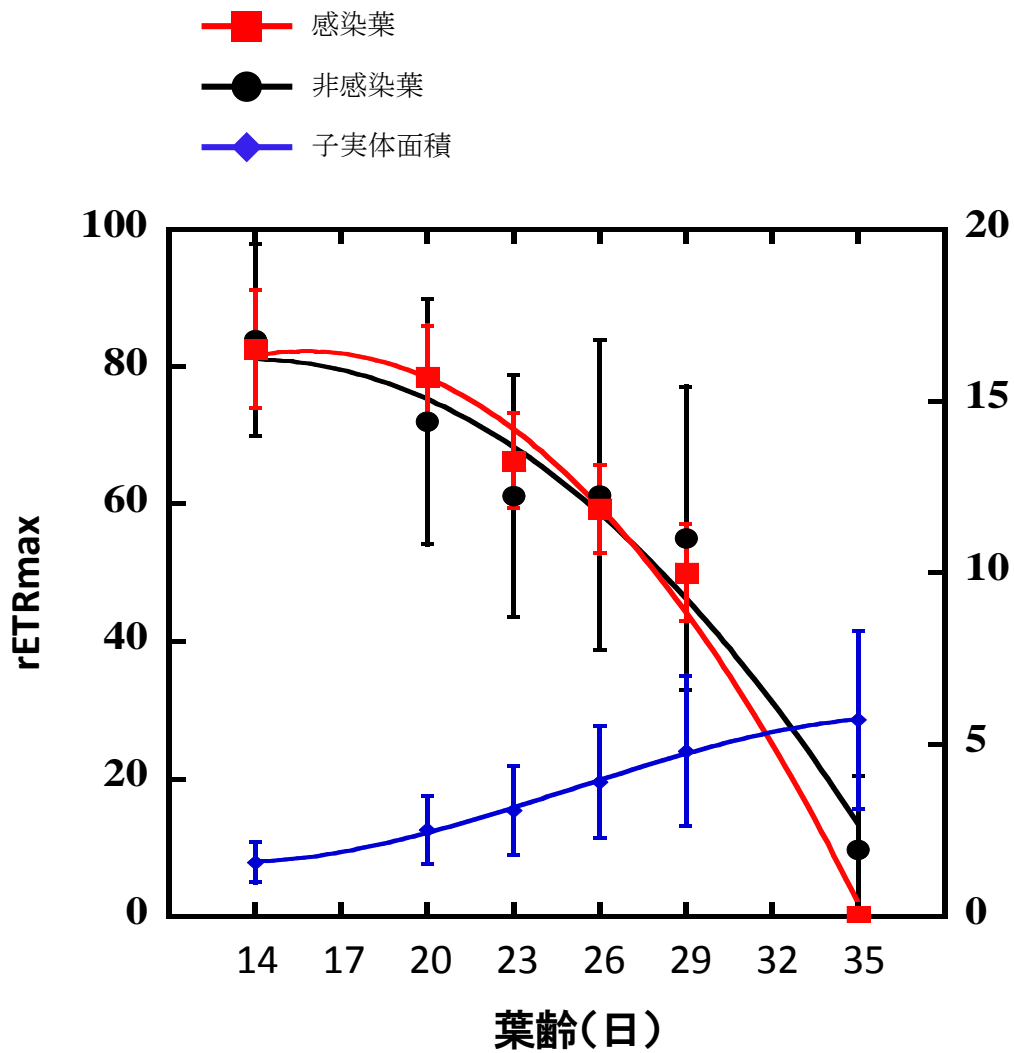


図5-5. キョクチヤナギの葉齢に伴う *R. polaris* 感染葉と非感染葉の rETRmax (光合成活性) の変化および子実体面積の変化。

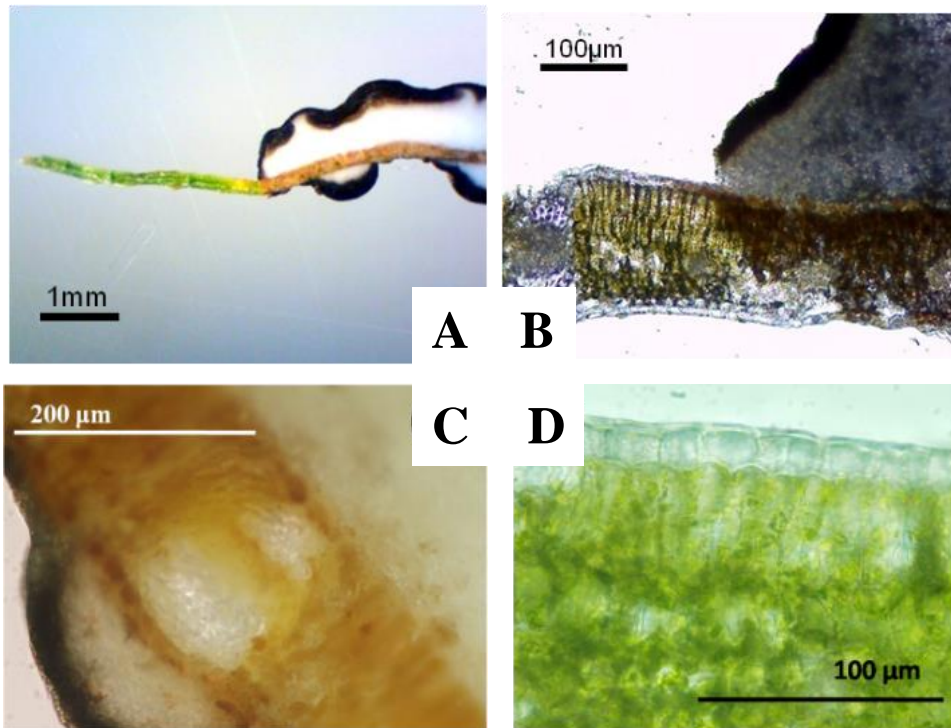


図5-6. 感染葉の断面写真 (A, B)。感染部には菌糸が進入し、葉の組織が枯死しているが (C)、非感染部は葉緑体を保持している (D)。

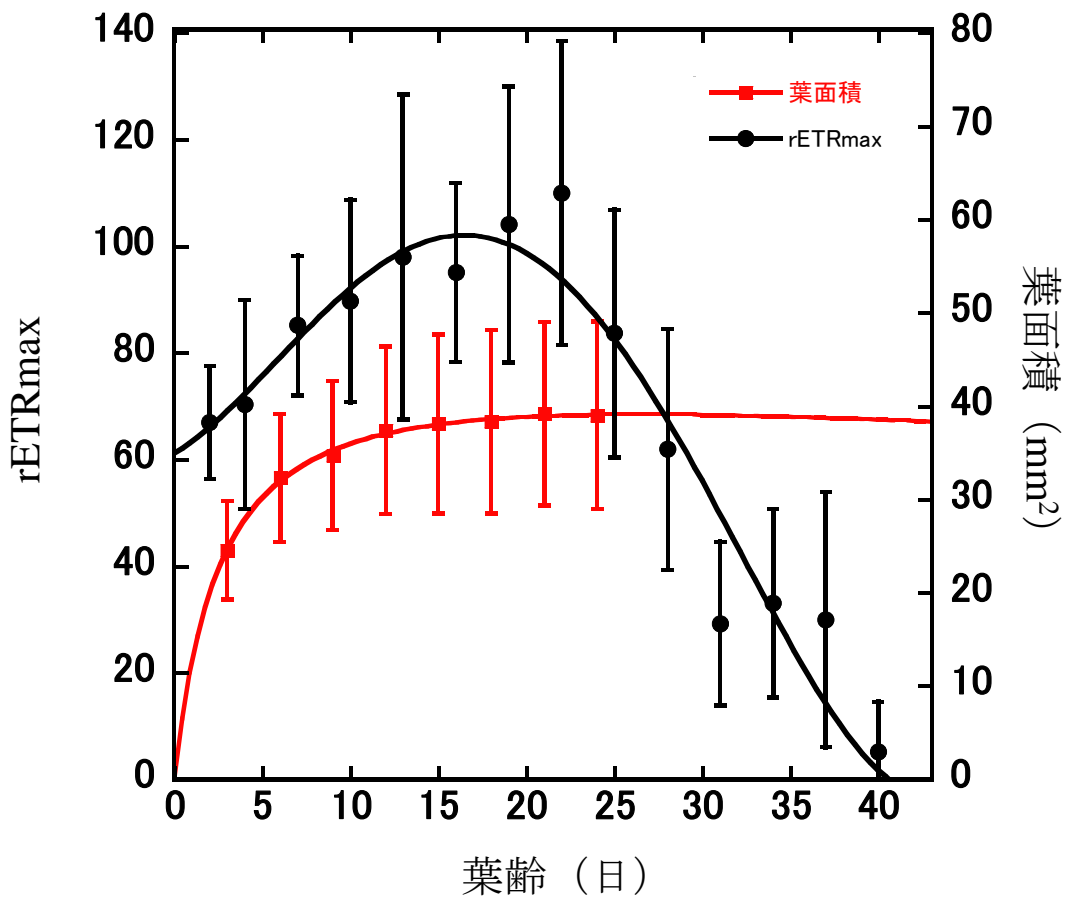


図5-7. 葉齢に伴うrETRmax（光合成活性）と葉面積の変化。

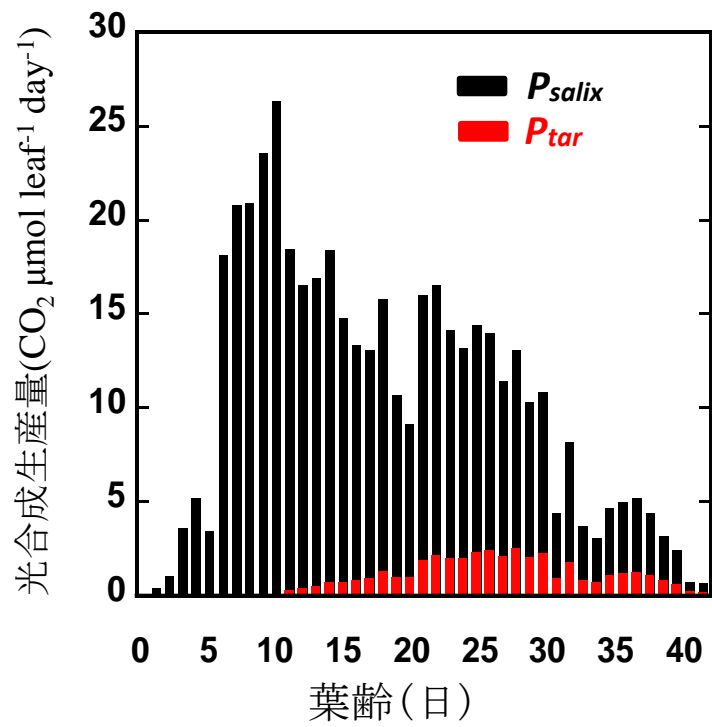


図5-8. モデルより推定したヤナギ生産量 (P_{salix}) と $R. polaris$ 感染によって失われる生産量 (P_{tar}) の日々変化。

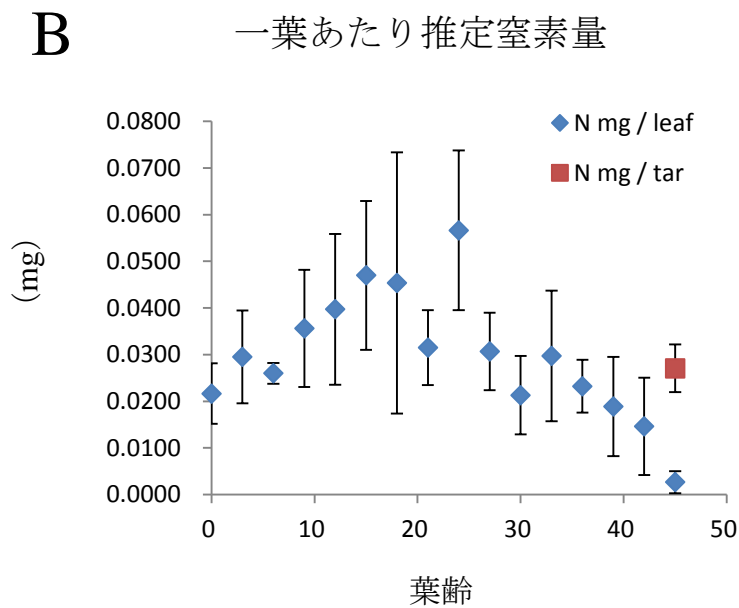
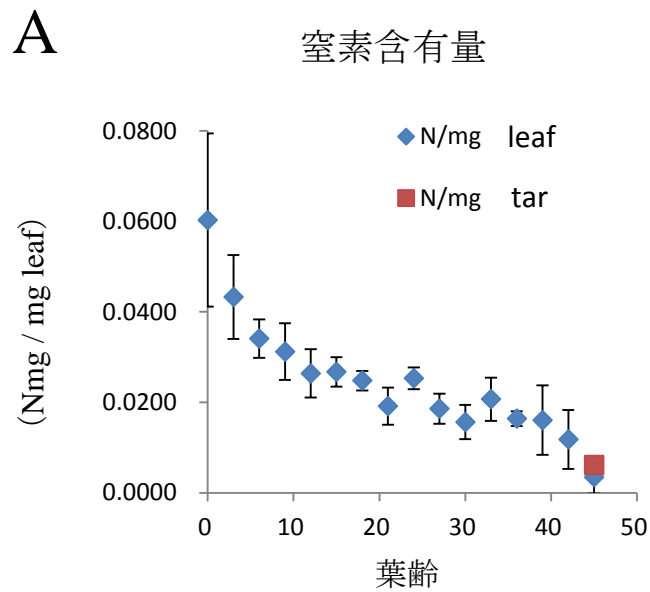


図5-9. キョクチャナギの葉の窒素含有量変化と落葉直前の*R. polaris*子実体の窒素含有量 (A) とそこから推定したヤナギ葉一枚当たりの窒素量変化と*R. polaris*の子実体1個あたりの窒素量 (B)。

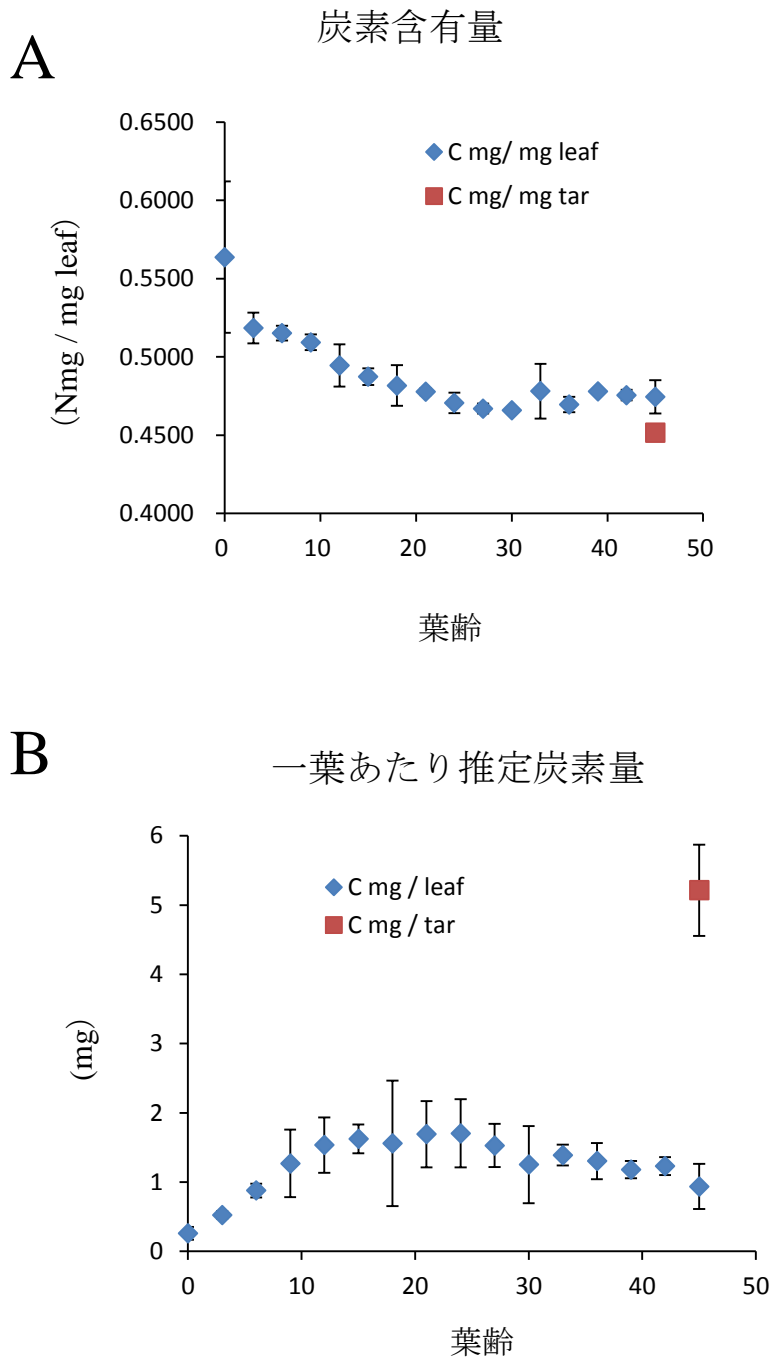


図5-10. キョクチャナギの葉の炭素含有量変化と落葉直前の*R. polaris*子実体の炭素含有量 (A) とそこから推定したヤナギ葉一枚当たりの炭素量変化と*R. polaris*の子実体1個あたりの炭素量 (B)。

第6章 総合考察

本研究において、スピッツベルゲン島内で採取したキョクチャナギに寄生する *Rhytisma* 属菌は形態学および分子学的特徴ともに既報種と異なっていたため、新種・*Rhytisma polaris* と報告した (Masumoto et al. 2013)。本章では、本菌の生活史に沿って、*R. polaris* がいかにして北極の環境とキョクチャナギの生態に適応し、寄生活動を行っているかについて総合的に考察する (図 6-1)。

図 6-1 A で示すように、本菌は雪解け後から子実体成熟完了までの期間が温帯域の近縁種と比較して著しく短い。4章における *R. polaris* の子実体の成熟に関する調査では、子実体は雪解け直後の時点で既に成熟途中であり、融雪前から子実体成熟に向けた子実体の形成がはじまっていることが示された。実際、ニーオルスンの約 200km 南に位置するホーンズンドにおいて、2013 年の夏に形成された子実体をその年の 9 月中旬に採取して観察したところ、子実体が形成されはじめていた (Data not shown)。したがって、子実体成熟が開始する時期は、前年のヤナギの落葉から根雪までの期間であることが示唆された。いつ成熟が進行しているのかについての詳細な調査は行っていないが、2つの可能性が考えられる。ひとつは、積雪期間中のような氷点下のときには、成熟の進行は休止している場合、もうひとつは、積雪下の低温下においても成熟を進行させていることである。Hoshino et al. (2003) は、スピッツベルゲン島から分離した担子菌類の *Typhula ishikariensis* が不凍タンパクを生成し、低温下でも生育が可能であることを報告している。*R. polaris* が同様の機構を有していれば、積雪下の低温でも子実体成熟を進行させることが可能であろう。一方、日本に生育する *Rhytisma* 属菌では、融雪後にならないと子実体成熟に向けた子実体形成は始まらない。これらのことは、*R. polaris* と

日本の *Rythisma* 属菌における子実体成熟開始のシグナルが異なることを示唆しており、*R. polaris* の本性質は、本菌が着葉期間の短いキョクチヤナギに寄生し、生育するために獲得したものと考えられる。

一方、子実体が成熟するためには液体の水の供給が必要であることが本研究から明らかになった。他の *Rhytisma* 属菌の子実体成熟にとっても水分環境は重要であることが示されており (Jones 1925; Woo and Partridge 1969; Duravetz and Morgan-Jones 1971)、この特徴は *R. polaris* にも共通していた。ニーオルスンにおける液体の水の供給源は、氷河から溶け出た水により形成された河川のような例を除けば、降雨と雪解け水の 2 つが考えられる。ツンドラ気候に分類されるニーオルスンでは、夏期の降雨量は少なくかつ年変動が極めて大きい (図 3-8)。図 6-2 では、過去 10 年間の 6 月 15 日から 7 月 15 日までの降雨量の積算値と 0.5 mm 以上降雨が記録された日数を示している。6 月 15 日は雪解け日であるが場所によって雪解け日はさらに遅い。7 月 15 日はヤナギの落葉時期を考慮した子実体成熟完了の最終期限である。ヤナギのフェノロジーを考慮すると、子実体の成熟に与えられた期間は約 2 週間である。したがって、子実体が成熟のために得られる降雨量は、実際にはこの 1 ヶ月間のうちの約 2 週間の降雨量となる。本研究結果から、子実体が成熟するためには雪解け後 5 日間程度水分が供給されている必要がある (4 章 3-1 (2) 参照)。そのため、2005 年や 2010 年のような降雨の少ない年では、子実体が成熟可能な水分は降雨のみでは賄えない (図 6-2)。一年で生活史を完結させる必要のある *R. polaris* が、重要な発育段階である子実体成熟を不安定な降雨による水分供給のみに依存して生育するのは不可能と考えられた。したがって、子実体の成熟を毎年安定して行うためには、降雨以外の安定的な水分供給、具体的には雪解け水の利用が重要であると考えられる。融雪水が集積する場所は、雪

解け後の一定期間は安定した水分供給が望めるため、*R. polaris* の子実体成熟にとって適した環境であると考えられる。逆に言うと、そのような場所でのみ毎年の子実体成熟が可能であり、3章で示したように、*R. polaris* の発生が緩斜面で雪解け水が滞留するような場所に制限されていると考えられた。

本研究では、*R. polaris* の分布を制限すると考えられる要因がもう一つ明らかになった。それは胞子の散布範囲である (図 6-1 B)。胞子トラップを用いた実験では、胞子散布は感染源 (去年の感染葉) から数 m の範囲に集中しており、この特徴も毎年同じ場所のヤナギに *R. polaris* の感染が集中する原因と考えられた。成熟し胞子散布を行える子実体の周囲は水分環境が恵まれていることを考慮すると、子実体周囲へ胞子を集中的に散布することは、次世代を残す上で合理的である。一方、3章のライントランセクト調査結果によると、*R. polaris* は集中分布している場所以外においても、感染率は低いものの広く発生していることが確認されている。これらの子実体は、数少ない比較的遠距離に散布された胞子が感染に成功した結果と考えられる。ヤナギ生葉に一旦感染してしまえば水は強い制限要因とはならないため、子実体の形成は可能となる。しかし、子実体の形成された場所が融雪水の集積する場所でなければ、翌年子実体は成熟できず、胞子の散布を行えないため、次世代は生育できる可能性が著しく低くなる。ただそ、降雨の多い年では、先述のように本来の分布域からはぐれ、例年であれば水分環境の影響で成熟に至らない子実体が、成熟に至ったり、胞子を散布できる。実際、2013 年のような著しく降雨量の多い年では、例年であれば感染率が 0%に近い場所でも *R. polaris* の感染が多くみられた (表 3-1)。したがって、*R. polaris* は降水量の多い年にその分布を拡大させ、その中で水分環境の適した場所に行き着いた個体が生残するという様式を繰り返しながら、分布を広げていると推察される。

本研究の調査では、孢子散布は降雨時のみに限られていた。この理由として、本研究を行った調査値では、子実体成熟後に雪解け水が供給されなかったことが考えられる。より水分環境の良い場所であれば、子実体の成熟後も雪解け水の供給によって孢子散布が晴天時にも行われているかも知れない。孢子の発芽には水が必要であるため、晴天時に散布された孢子はヤナギ葉上に到達しても、直ちに発芽することはできないだろう。しかし、孢子の発芽実験では、自然乾燥状態に置かれた孢子は、9日後でも浸水後12時間の発芽率が約6割と、乾燥に対してある程度の耐性を有していることが明らかとなった。この乾燥耐性により、晴天時に孢子が散布された場合でも、孢子はヤナギ葉上で待機し、次の降雨時に感染可能と考えられる。

R. polaris のヤナギ生葉上での子実体形成は (図 6-1 C)、日本の *Rhytisma* 属と比較して短期間のうちに行われていた。これは *R. polaris* がキョクチヤナギの短い着葉期間に適応した結果と考えられる。北極域や高山域のように生育期間が短い地域に生育する植物種は、温帯産の同種や近縁種と比較して、雪解け後に速やかに開花、結実することが知られている (増澤 2009)。例えば、ツリフネソウ属 (*Impatiens*) の一部の種は、幼形成熟を伴う一種の性成熟過程の縮小によって、成長開始後の比較的早い時期に開花・結実し、短い期間で成長を成し遂げることができる (Akiyama et al. 1991)。そして、その短い生育期間への適応のための早期の成熟は、それらの植物の体サイズの矮小化に繋がっていると考えられている (秋山 1997)。キョクチヤナギもまた、他の温帯域のヤナギ属と比較して生育期間が著しく短く、矮小化した植物種である。日本国内の調査では、長野県におけるイヌコリヤナギの着葉期間は約180日、それに寄生する *Rhytisma* sp. の生育期間は約90ヶ月であったのに対し、キョクチヤナギの着葉期間は約50日、*R. polaris* の

生育期間は約 30 日であった（図 4-15、図 6-3）。すなわち、*R. polaris* の子実体形成期間は、キョクチヤナギのフェノロジーに影響されて温帯産の他種よりもやはり短くなっていた。一方で、日本の *Rhytisma* sp. と *R. polaris* の子実体面積は 16.8 mm² と 13.5 mm² と大きな違いは見られなかった。これは、*R. polaris* が日本の *Rhytisma* 属菌と比較して 2 倍以上の速度で宿主上での子実体形成を行っていたからである（図 6-3）。したがって、*R. polaris* の子実体は小型化ではなく、成長速度を早めることで温帯産の *Rhytisma* 属菌と近い子実体の大きさを維持したまま、宿主植物の短い生育期間に適応していることが示された。このように、宿主植物が矮小化するのに対し、その寄生菌の子実体の大きさがほとんど変化しない現象は、キョクチヤナギのサビ病菌など他の植物寄生菌で見られるが（増本 未発表）、その普遍性や生理・生態学的意義については不明であるため、今後のさらなる研究が必要である。

本研究では調査を行わなかったが、寄生菌生活史の重要な段階である「感染」について考察する（図 6-1 D）。感染の段階は、寄生者と宿主植物の生理的な相互作用が盛んであり、寄生者が感染する力と宿主がそれに抵抗する力が働いている。孢子散布実験では、ヤナギの葉上に到達した孢子のうち子実体形成にまで至ったものは 500 個に 1 個ほどと推定された。したがって、環境からの制限と宿主植物の抵抗性が機能した結果、孢子が子実体の形成にまで至る確率は 500 分の 1 になると考えられる。*Rhytisma* の感染経路としては、孢子から発芽した菌糸が気孔や細胞間隙から植物組織中に侵入することや表皮細胞を破壊して侵入することが考えられる。植物体に侵入した後、菌糸は植物の抵抗性を抑制しながら増殖していく必要がある。例えば、*R. polaris* の子実体成長速度が温帯域の近縁種と比較して速いのは、植物の抵抗性を抑制する力が強く働いた結果なのかもしれない。一方、

宿主植物側の抵抗性は、寄生者の感染の有無に関係なく植物がもともと備えている静的抵抗性と、寄生者の感染行動の開始後に植物が活性化させる動的抵抗性に分けることができる（大木 2007）。また、この 2 種の抵抗性の中で、細胞壁の硬化などの構造的抵抗性と抗菌物質の生成などの化学的抵抗性がある。*Rhytisma* 属菌の分類・記載文には、「生葉上の子実体の周囲は黄色く縁取られている。」とする特徴の記載がよく見られる（Cannon and Minter 1986; Wang et al. 2009; Hou et al. 2010）。これは、宿主植物側の動的抵抗性・構造的抵抗反応のひとつである過敏感細胞死が起こっている可能性を示唆している。これは、病原菌の周囲の植物細胞を宿主側が自死させることで、寄生菌のそれ以上の拡大を防ごうとする抵抗性反応として知られている（久能ほか 1998; 大木 2007）。*R. polaris* においても、特に形成初期の子実体の周囲には、うっすらと黄色い縁取りが見える。このため、キョクチャナギが過敏感細胞死を起こしている可能性はあるが、*R. polaris* の子実体面積は宿主の紅葉までほぼ一定の速度で増加するため、この抵抗性反応が有効に働いているかは不明である。感染のメカニズムやそれに影響する環境要因は感染率を大きく左右するため、*R. polaris* がキョクチャナギの個体群動態に及ぼす影響を明らかにするためにも今後研究の発展が期待される。

宿主への影響に関する調査（図 6-1 E）では、*R. polaris* はキョクチャナギの光合成生産には大きな影響を与えないが、感染部以外からも栄養分を吸収していることが明らかになった。先述したように *R. polaris* は毎年同じ場所のヤナギに感染するため、単年の光合成生産に与える影響は小さくても、その場所のヤナギ個体への負担は年を経て大きくなることが考えられる。そこで、長期間に及ぶ感染の影響を評価するため、3 章で行ったヤナギのシュート数と *R. polaris* の感染シュート数の経年変化のデータ（表 3-1）を用いて以下の解析を行った。調査グループ A、

B、C のシュート感染率（感染シュート数／全シュート数）は 2008、2010、2012 年においてグループ間に有意な差があり、その感染率は A、B、C の順に高かった（表 3-1, 3 章 3-3-3）。そこで、この 4 年間の感染率の高低がヤナギに及ぼす影響を評価するため、3 グループにおける各調査年の平均シュート感染率と 2008 年から 2010 年のヤナギのシュート数の増減の関係を図 6-4 に示した。もし、*R. polaris* の継続的な感染がヤナギのシュート数に負の影響を及ぼすとすれば、A グループのヤナギのシュート数は B、C グループと比較して減少傾向を示すと予想されたが、3 グループ間で有意な差は認められなかった（図 6-4）。したがって、*R. polaris* の感染は、経年的に見ても、シュート数を減少させるような影響を及ぼしていないことが示唆された。このように *R. polaris* が宿主植物に与える影響が大きくないことで、本菌が毎年同じ場所のヤナギ個体に感染し、生育することを可能にしていると考えられた。

寄生者が宿主に与える影響については、進化的適応の原理から考えて、病原性を次第に減少させ、穏やかな共生関係を結ぶ方向に向かうという考え方が古くから受け入れられてきた（Smith 1934; Swellengrebel 1940）。しかし、最近になってこれに異を唱える考え方を示した理論的研究・実験的研究も多く見受けられる。例えば、Ewald（1994）は、病原性の進化には病原体の生活史と感染様式が関係しているとする「病原体の適応悪性仮説」（adaptive severity hypothesis for pathogens）を発表している。鼻風邪を引き起こすライノウイルスなどのように、感染に直接的な接触を必要とする場合は、病原体が他の宿主に感染するために宿主が十分に活動的である必要がある。この場合は、病原体の悪性は低くなる方向へ進化した方が適応的と言える。一方、マラリアのように、病原体を伝播するベクター（マラリアの場合は蚊）が存在するような場合は、宿主が動けなくなっても、寄生者の

適応度に影響は無い。むしろ重い病気の症状で宿主が弱って動けない方が媒介する蚊が吸血行為を行いやすくなり、病原性が高くなる方向に進化する方が適応的と言える。また、動物非媒介性の寄主の中でも、宿主体外で長期間生存が可能な寄主の悪性は高い傾向にあると考えられている (Ewald 1987, 1994)。これは、宿主体外で長期間生存できる寄主ならば、宿主に動けないほどの影響を与えても、次の宿主が来るのを待つことができるためである。このように、寄生者の感染様式と宿主に与える悪性はトレードオフの関係が成り立っていると考えられる。

以上に挙げたのは、人や昆虫の寄生者についての研究結果であるが、植物寄生菌が宿主植物に対して大小様々な影響を与えている現状を鑑みれば、植物寄生菌の生態と宿主への影響の間にもこのような関係性は存在していると予想される。そこで、*R. polaris* の生態と宿主への影響について以下のように考えた。植物は動物と違い、その場所を動くことがないので、宿主の移動は望めない。この場合、媒介者を持たない *R. polaris* の悪性は小さくなるのが適応的である。また、*R. polaris* の孢子や子実体は、前年に形成されたものが翌夏に成熟するが、形成 2 年後の子実体中から発芽可能な孢子は確認できなかったことから、子実体や孢子で長期間生存し、感染機会を伺うことも考えにくい。そして、子実体が成熟できる場所は雪解け水を利用できる場所に限定され、子のう孢子の散布範囲が狭い結果、本菌は毎年限られた場所の同じヤナギ個体に感染し生育する。以上を考慮すると、本菌の宿主への影響は小さい方へと進化する方がより適応的であると考えられる。一方、宿主のバイオマスが小さいことは、*R. polaris* の宿主に与える影響を相対的に大きくするかもしれない。先述のように、キョクチヤナギは、温帯域に分布する他のヤナギ種と比較して、著しく矮小化しているにも関わらず、*R. polaris* の子実体の大きさは他の温帯のヤナギに寄生する *Rhytisma* 属菌のそれと大きく異なら

ない。すなわち、*R. polaris* は相対的に大きな子実体を形成しながらも、宿主に大きな影響を与えない。本菌が、このような二律背反的な 2 つの性質をどのように実現させているのかについて解明するには、北極と温帯それぞれのヤナギと *Rhytisma* 属菌の相互作用について今後さらに調査する必要がある。

北極域は近年の地球温暖化現象が最も顕著であるとされ (IPCC 2007)、それが生態系に及ぼす影響が懸念されている。特に、生育種やその遺伝的多様性が失われる恐れがあるため、それらの地理的分布範囲や遺伝的多様性を評価することの重要性が指摘されている (Hampe and Petit 2005)。調査を行ったスピッツベルゲン島があるスバルバル諸島では、171 種の維管束植物種が報告されている (Rønning 1996)。それに対し、スバルバル諸島内で報告されている 578 種の菌類のうち少なくとも 176 種は植物寄生菌であり (Tojo et al. 2013)、1 種の植物に対し 1 種以上の植物寄生菌が存在している計算になる。しかしながら、これらの寄生菌に関する研究は、簡易的な報告がカタログとしてまとめられているにとどまっており、詳細な種の記載や遺伝的特徴といった基本的な知見でさえ一部の種でしか明らかになっていない。これは、スバルバル諸島に限らず、北極域に生育する植物寄生菌について言える。例えば、スピッツベルゲン島で最も目につく寄生菌の一つであるキョクチャナギの *Rhytisma* 属菌でさえ新種であったことは、正確な分類学的な位置づけすらなされていない北極域の植物寄生菌の現状を示していると同時に、未だ報告されていない北極域に特異的に生育している植物寄生菌が数多く存在していることも想起させる。今後は北極域の寄生菌について、詳細な形態データや塩基配列データに基づいた同定・分類が必要である。

今後の温暖化によって、*R. polaris* がどのような影響を受けるかに関しては、本研究ではその生態と温度の関係についてほとんど調査を行っていないため議論す

ることはできない。一方、温暖化による水分環境の変化は *R. polaris* の生態に大きな影響を与える可能性がある。北極域における今後の気候の変動予測では、夏期の降雨量が増加し、冬期の積雪量も大きくなると予想されている (Houghton et al. 1996; Saha et al. 2006;)。降雨量や積雪量が増えれば、子実体の成熟に必要な水が供給される場所が増え、*R. polaris* の分布範囲が広がることが考えられる。実際に、夏の降水量が多かった 2013 年の感染率は著しく高かった。*R. polaris* の感染率の変化がキョクチャナギ個体群の動態に影響を与え、その影響が生態系の多様性に及ぶことも起こりうる。今後の北極域の温暖化に伴って、北極生態系がどのように変化するかを解明する上でも、本菌の生態およびキョクチャナギに与える影響についてさらなる研究が必要である。

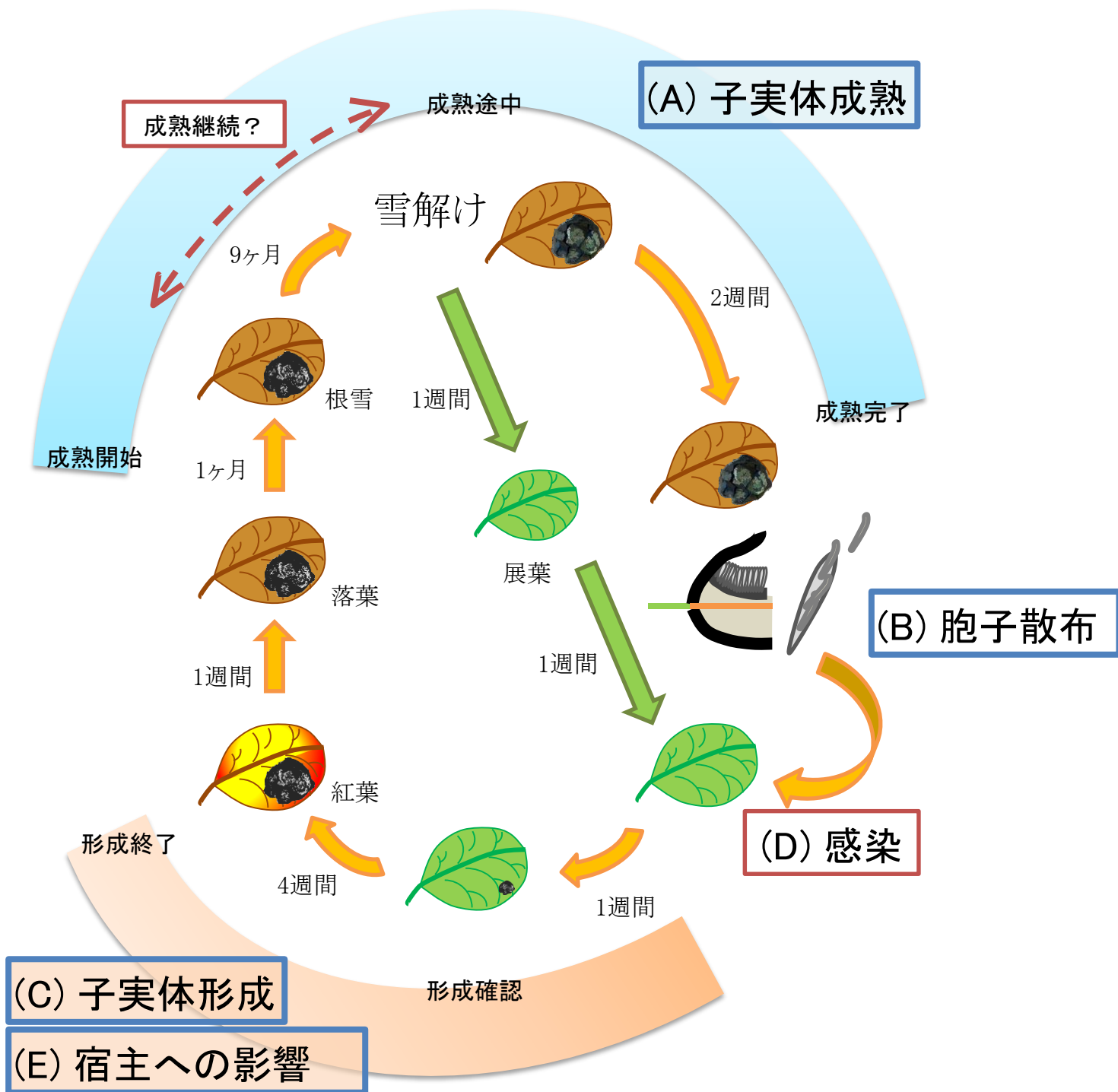


図6-1. *R. polaris*の生態学的な特徴の中で本研究で明らかになった点（青枠）と不明な点（赤枠）。

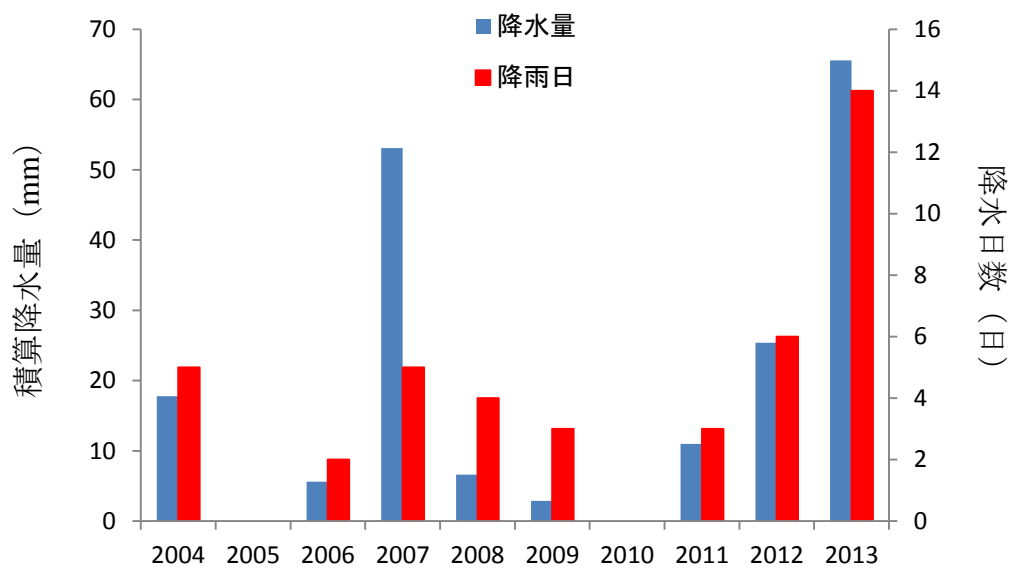


図6-2. 過去10年間（2004年-2013年）の6月15日から7月15日までの積算降水量（青棒）と0.5mm以上の降雨が観測された日数（赤棒）。

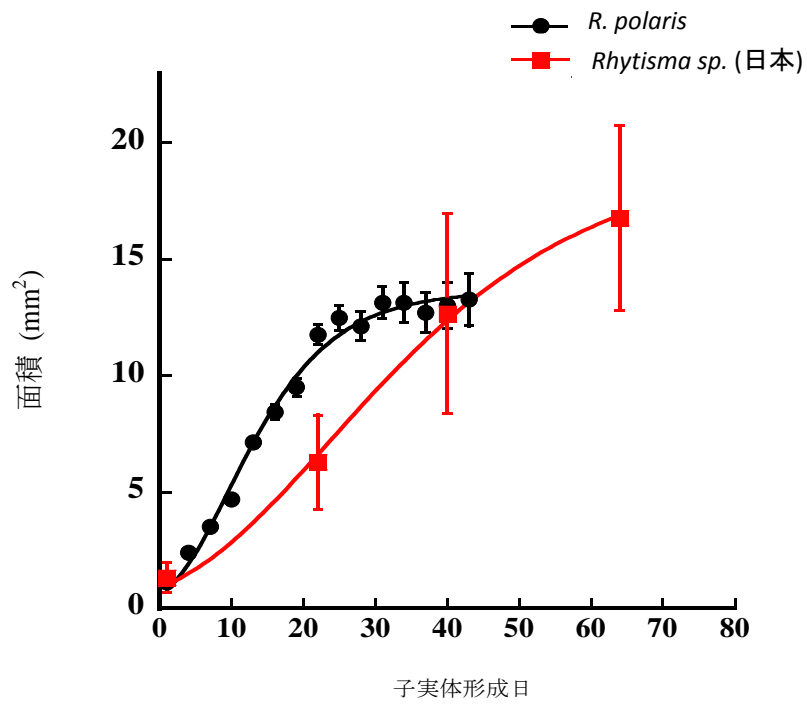


図6-3. *R. polaris*と*Rhytisma sp.* (日本)の子実体形成速度。横軸の子実体形成日は子実体が形成され始めた日からの日数を表している。

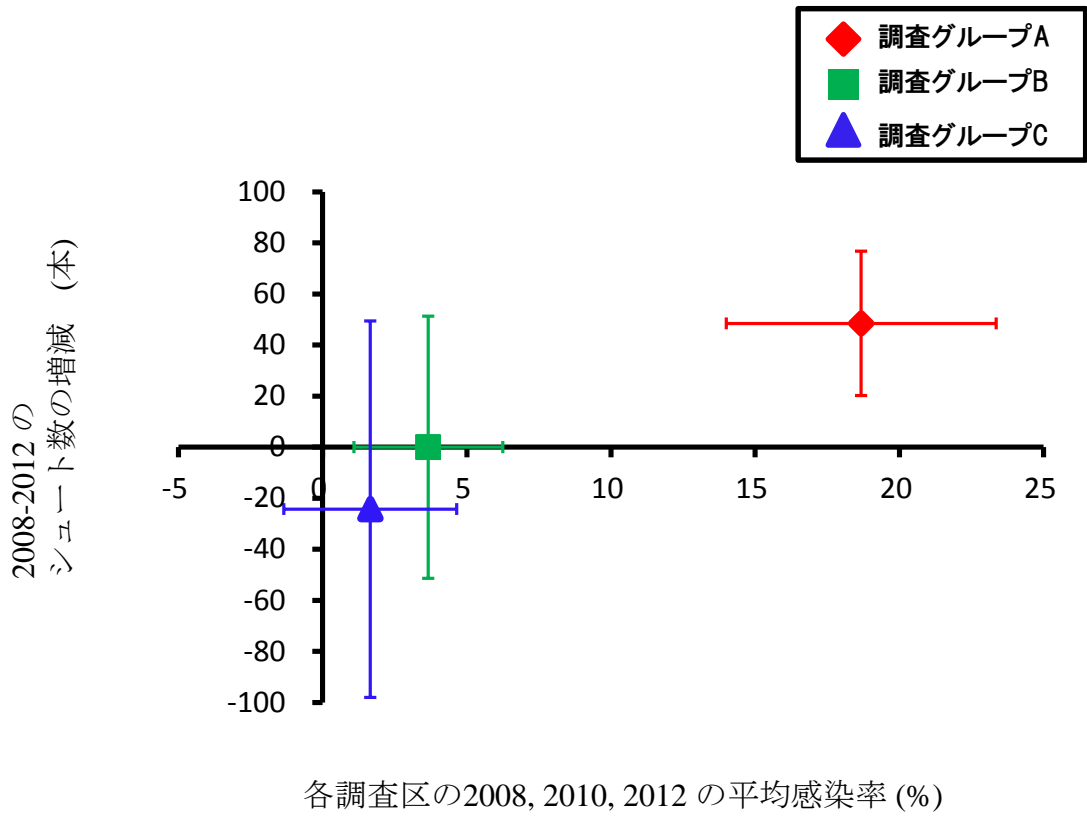


図6-4. 2008, 2010, 2012の平均感染率とシュート数増減の関係。
調査グループ間のシュート数増減に有意な差は無かった。

謝辞

本研究を行うにあたり、諸先生方をはじめとして多くの方々に多大なご協力、ご援助をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本研究をまとめるまで国立極地研究所教授の伊村智博士には、本研究に対して多く貴重なご意見と示唆に富んだご助言を頂き、終始本研究を支えていただきました。ここに深く感謝いたします。大阪府立大学生命環境科学域准教授の東條元昭博士には、学部時代からの6年以上、現地調査や研究計画、本研究へのデータの提供など多岐にわたり熱心なご指導・ご助言・激励をいただきました。心より感謝申し上げます。国立極地研究所准教授の内田雅己博士には、5年間の研究生活の中で公私にわたり大変お世話になり、研究計画、北極の現地調査、本論文の校閲まで常に熱心なご指導と多くのご助言をいただきました。心より感謝と敬意を申し上げます。国立極地研究所教授の小達恒夫博士と北方生態研究学房の小島覚博士には、本論文を御校閲頂き、有益な議論・ご助言を頂きました。深く感謝いたします。国立極地研究所名誉教授の神田啓史博士、特任教授の福地光男博士、准教授の工藤栄博士には、現地調査や研究について多くのご協力と的確なご助言をいただきました。深く感謝いたします。国立極地研究所の渡辺憲一技術補佐員には、遺伝子実験についての多くのご協力と貴重なご助言をいただきました。ここに深く感謝いたします。早稲田大学の田邊優貴子助教と新潟大学の菅直子助手、国立極地研究所の井上武史研究員には、現地での調査と実験に惜しみないご協力と貴重なご助言、暖かい励ましをいただきました。心より感謝いたします。

国立極地研究所の生物圏研究グループの教員、博士研究員、事務補佐員ならびに学生諸氏には普段の研究・実験から現場研究の準備にいたるまで、多岐にわたって多大なご支援、ご協力、激励をいただきました。皆様に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、サンプルの提供やデータ解析へのご助言に始まり、研究生活

を送るうえで必要な心構え、時に励ましの言葉を上記に特筆した方々を含め多くの方々から頂きました。この5年間に関った全ての方々のこれらのご尽力が無ければ本研究は成り立ちませんでした。深く感謝申し上げます。最後に、長年にわたり大学院における研
究生活を全ての面で支えてくれた家族と友人に心から感謝いたします。

引用文献

- Agrios GN (2005) Plant Pathology. Fifth Edition, Elsevier Academic Press, London, UK.
- Akiyama S, Ohba H, Wakabayashi M (1991) Taxonomic notes of the East Himalayan species of *Impatiens*. Studies of Himalayan *Impatiens* (Balsaminaceae) (1). In: Ohba H, Malla SB (Eds.) The Himalayan Plants. vol. 2, pp 67–89. The University of Tokyo Press, Tokyo.
- 秋山忍 (1997) 植物の矮小化. 精神のエクスペディション: The Challenge of mind (東京大学創立百二十周年記念東京大学展 (学問の過去・現在・未来 2)), 東京大学, 東京.
- Alsos IG, Alm T, Normand S, Brochmann C (2009) Past and future range shifts and loss of diversity in dwarf willow (*Salix herbacea* L.) inferred from genetics, fossils and modelling. *Global Ecology Biogeography*, 18: 223–239.
- Ban A, Aikawa S, Hattori H, Sasaki H, Sampei M, Kudoh S, Fukuchi M, Satoh K, Kashino Y (2006) Comparative analysis of photosynthetic properties in ice algae and phytoplankton inhabiting Franklin Bay, the Canadian Arctic, with those in mesophilic diatoms during CASES 03-04. *Polar Bioscience*, 19: 11–18.
- Bavan RJ, Greenhalgh GN (1976) *Rhytisma acerinum* as a biological indicator of pollution. *Environmental Pollution*, 10: 271–285.
- Begon M, Harper JL, Townsend CR (1986) Ecology, Individuals, Populations and Communities. Blackwell, Oxford.
- Berg B, McClaugherty C, Johansson MB (1997) Chemical changes in decomposing plant litter can be systemized with respect to the litter's initial chemical composition.

- Department of Forest Ecology and Forest Soils, Swedish University Agricultural Science Report, 74: 1–85.
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum*, 122: 419–428.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T (2007) Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions *Journal of Experimental Botany*, 58: 4019–4026.
- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T (2000) Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 5322–5327.
- Bliss LC (1979) Vascular plant vegetation of the southern circumpolar region in relation to antarctic, alpine and arctic vegetation. *Canadian Journal of Botany*, 57: 2167–2178.
- Bliss LC, Matveyeva NV (1992) Circumpolar arctic vegetation. In: Chapin III FS, Jefferies RL, Reynolds JF, Shaver GR, Svoboda J (Eds.) *Arctic ecosystems in a changing climate: an ecophysiological perspective*. pp 59–89, Academic Press, New York.
- Bliss LC, Svoboda J (1984) Plant communities and plant production in the western Queen Elizabeth Islands. *Holarctic Ecology*, 7: 325–344.
- Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta*, 225: 1–12.

- CAFF (2010) Arctic Biodiversity Trends 2010 - Selected Indicators of Change. CAFF International Secretariat, Akureyri, Iceland.
- Cannon PF, Minter DW (1986) The Rhytismataceae of the Indian subcontinent. *Mycological Papers*, 155:1–123.
- Castello JD, Leopold DJ, Smallidge PJ (1995) Pathogens, patterns, and processes in forest ecosystems. *Bioscience*, 45: 16–24.
- Chernov YI (1985) *The living tundra*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Collet DM (2004) *Willows of interior Alaska*. U.S. Fish and Wildlife Service, Yukon Flats National Wildlife Refuge, Fairbanks, Alaska.
- Connell JH (1971) On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. In: Den Boer PJ, Gradwell G (Eds.) *Dynamics of populations*. pp 298–312. PUDOC, Wageningen.
- Dukes JS, Pontius J, Orwig D, Garnas JR, Rodgers VL, Brazee N, Cooke B, Theoharides KA, Stange EE, Harrington R, Ehrenfeld J, Gurevitch J, Lerda M, Stinson K, Wick R, Ayres M (2009) Responses of insect pests, pathogens, and invasive plant species to climate change in the forests of northeastern North America: What can we predict? *Canadian Journal of Forest Research*, 39: 231–248.
- Duravetz JS, Morgan-Jones JF (1971) Ascocarp development in *Rhytisma acerinum* and *R. punctatum*. *Canadian Journal of Botany*, 49: 1267–1272.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13–15.
- Eilers PHC, Peeters JCH (1988) A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*, 42: 199–215.
- Elvebakk A, Gjørnum HB, Sivertsen S (1996) Part 4. Fungi II. Myxomycota, Oomycota,

- Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota, Basidiomycota: Uredinales and Ustilaginales. In: Elvebakk A, Prestrud P (Eds.) A catalogue of Svalbard plants, fungi, algae and cyanobacteria. pp 207–259. Norsk Polarinstitut, Oslo.
- Ewald PW (1987) Pathogens-induced cycling of outbreak insect populations. In Barbosa P, Schultz JC (Eds.) Insect outbreaks. pp 269–286. Academic Press, Inc., San Diego.
- Ewald PW (1994) Evolution of infectious disease. pp 298. Oxford University Press, Oxford and New York.
- Flor HH (1956) The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics*, 8 :29–54.
- Flor HH (1971) Current status of the gene for gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275–296.
- Fries EM (1818) *Kongliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 39: 104.
- Fries EM (1823) *Systema Mycologium*, 2: 565.
- Gams W, Nirenberg HI, Seifert KA, Brayford D, Thrane U (1997) Proposal to conserve the name *Fusarium sambucinum* (Hyphomycetes). *Taxon*, 46: 111–113.
- Ganley RJ, Brunfeldt SJ, Newcombe G (2004) A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 10107–10112.
- Gilbert, GS (2002) Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 40:13–43.
- Hagen A (1941) Micromycetes from Vestspitsbergen collected by Dr. Emil Hadač in 1939. *Skr. Norges Svalbard og Ishavs-Unders*, 49: 1–11.

- Hampe A, Petit RJ (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, 8: 461–467.
- Hietala AM, Vahala J, Hantula J (2001) Molecular evidence suggests that *Ceratobasidium bicorne* has an anamorph known as a conifer pathogen. *Mycological Research*, 105: 555–562.
- Hoshino T, Kiriaki M, Ohgiya S, Fujiwara M, Kondo H, Nishimiya Y, Yumoto I, Tsuda S (2003) Antifreeze proteins from snow mold fungi. *Canadian Journal of Botany*, 81: 1175–1181.
- 細矢剛 (2008) 菌類の胞子が散布される仕組み. 菌類の不思議. 国立科学博物館編. pp 113–117. 東海大学出版会, 神奈川.
- Hou C-L, Piepenbring M (2005) Known and two new species of *Rhytisma* (Rhytismatales, Ascomycota) from China. *Mycopathologia*, 159: 99–306.
- Hou C-L, Trampe T, Piepenbring M (2010) A new species of *Rhytisma* causes tar spot on *Comarostaphylis arbutoides* (Ericaceae) in Panama. *Mycopathologia*, 169: 225–229.
- Houghton JT, Meira Filho LG, Callander BA, Harris N, Kattenberg A, Maskell K (1996) *Climate change 1995, The Science of Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hsiang T, Tian XL (2007) Sporulation and identity of tar spot of maple in Canada. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica*, Special Edition; 71–74.
- Hudler GW, Jensen TS, Banik MT (1998) *Rhytisma americanum* sp. nov.: a previously undescribed species of *Rhytisma* on maples (*Acer* spp.). *Mycotaxon*, 68: 405–416.
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Solomon

- S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (Eds.) Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 石塚和雄 (1977) 群落の分布と環境 (植物生態学講座). 朝倉書店, 東京.
- Jenny H (1958) Role of the plant factor in the pedogenic functions. *Ecology*, 39: 5–16.
- Jones SG (1925) Life-history and Cytology of *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fries. *Annals of Botany*, 39: 41–75.
- Karanz J (1990) Fungal diseases in multispecies plant communities. *New Phytologist*, 116: 383–405.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111–120.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008). *Dictionary of the Fungi* (10th ed.). pp 602. CABI, Wallingford, UK.
- Kosiba P (2007) Impact of air pollution on the occurrence of *Rhytisma acerinum* „tar-spot” on maple leaves. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76: 333–343.
- 久能均、高橋壯、真山滋志、露無慎二 (1998) 新編植物病理学概論. 養賢堂, 東京.
- Lantz H, Johnston PR, Park D, Minter DW (2011) Molecular phylogeny reveals a core clade of Rhytismatales. *Mycologia*, 103: 57–74.
- LeRoy CJ, Fischer DG, Halstead K, Pryor M, Bailey JK, Schweitzer JA (2011) A fungal endophyte slows litter decomposition in streams. *Freshwater Biology*, 56: 1426–1433.
- Leith ID, Fowler D (1987) Urban distribution of *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fries (tar spot) on sycamore. *New Phytologist*, 108: 175–181.

- Lid J (1967) Synedria of twenty vascular plants from Svalbard. *Botanische Jahrbücher*, 86: 481–493.
- Lind JVA (1928) The micromycetes of Svalbard. *Skr Svalbard Ishavet*, 13: 1–61.
- Liu ZY, Yao YJ, Liang ZQi, Liu AY, Pegler DN, Chase MW (2001) Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis*. *Mycological Research*, 105: 827–832.
- Longton RE (1988) *Biology of Polar Bryophytes and Lichens*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Major J (1951) A functional, factorial approach to plant ecology. *Ecology*, 32: 293–412.
- Masumoto S, Tojo M, Uchida M, Imura S (2013) *Rhytisma polaris* : morphological and molecular characterization of a new species from Spitsbergen Island, Norway. *Mycological Progress*, DOI 10.1007/s11557-013-0918-2.
- 増澤武弘 (2009) 高山植物学. 共立出版, 東京.
- McDowell JM, Simon SA (2006) Recent insights in to R gene evolution. *Molecular Plant Pathology*, 7: 437–448.
- McHale LX, Tan PK, Michelmore RW (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptive guards. *Genome Biology*, 7: 212.1–11.
- McMinn A, Hegseth EN (2004) Quantum yield and photosynthetic parameters of marine microalgae from the southern Arctic Ocean, Svalbard. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 84: 865–871.
- Minter DW (1996) *Rhytisma andromedae*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, Sheet 1295. *Mycopathologia*, 136: 163–165.
- Minter DW (1997a) *Rhytisma salicinum*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, Sheet

1339. CAB International, Wallingford, UK.
- Minter DW (1997b) *Rhytisma umbonatum*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, Sheet 1340. CAB International, Wallingford, UK.
- Muraoka H, Noda H, Uchida M, Ohtsuka T, Koizumi H, Nakatsubo T (2008) Photosynthetic characteristics and biomass distribution of the dominant vascular plant species in a high Arctic tundra ecosystem, Ny-Ålesund, Svalbard: implications for their role in ecosystem carbon gain. *Journal of Plant Research*, 121: 137–145.
- Muraoka H, Uchida M, Mishio M, Nakatsubo T, Kanda H, Koizumi H (2002) Leaf photosynthetic characteristics and net primary production of the polar willow (*Salix polaris*) in a high arctic polar semi-desert, Ny-Ålesund, Svalbard. *Canadian Journal of Botany*, 80: 1193–1202.
- Nakatsubo T, Bekku Y, Kume A, Koizumi H (1998) Respiration of the belowground parts of vascular plants: its contribution to total soil respiration on a successional glacier foreland in Ny-Ålesund, Svalbard. *Polar Research*, 17: 53–59.
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90: 465–493.
- O'Donnell K, Ward TJ, Geiser DM, Kistler HC, Aoki T (2004). Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetic and Biology*, 41: 600–623.
- Olofsson J, Ericson L, Trop M, Stark A, Baxter R (2011) Carbon balance of Arctic tundra under increased snow cover mediated by a plant pathogen. *Nature Climate Change*,

1: 220–223.

Oguchi T (1989) Tar spot on willow caused by *Rhytisma salicinum*. Journal of Shenshu University, 22: 253–257.

Ohtsuka T, Adachi M, Uchida M, Nakatsubo T (2006) Relationships between vegetation types and soil properties along a topographical gradient on the northern coast of the Brøgger Peninsula, Svalbard. Polar Bioscience, 19: 63–72.

大木理 (2007) 植物病理学. 東京化学同人, 東京.

大園享司 (2011) 病原菌との相互作用が作り出す森林の種様性. 日本生態学会誌, 61: 297–309.

Parmelee JA (1989) The rusts (Uredinales) of arctic Canada. Canadian Journal of Botany, 67: 3315–3365.

Petrak F (1947) Kritische Studien über chinesische Pilze. Sydowia, 1: 332–377.

Poulin R (2011) Evolutionary ecology of parasites. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Pyatt FB (1984) *Rhytisma salicinum* (Pers.) Fr.: A common pathogen of *Salix* spp. in the Skaftafellsheidi region of Iceland. International Journal of Environmental Studies, 22: 249–254.

Robinson CH, Wookey PA, Lee JA, Callaghan TV, Press MC (1998) Plant community responses to simulated environmental change at a high arctic polar semi-desert. Ecology, 79: 856–866.

Rønning OI (1996) The Flora of Svalbard. No 10 in the series Polar Handbooks. NIP, Norway.

Saccardo PA (1889) Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum, vol 8. pp 753–764.

Sumptibus auctoris typis serninarii, Patavii.

Saha SK, Rinke A, Dethloff K (2006) Future winter extreme temperature and precipitation events in the Arctic. *Geophysical Research Letters* 33: L158818, doi:10.1029/2006GLO26451

佐橋憲生 (2004) 菌類の森. 東海大学出版会, 神奈川.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425.

Skarpe C, van der Wal R (2002) Effects of simulated browsing and length of growing season on leaf characteristics and flowering in a deciduous Arctic shrub, *Salix polaris*. *Arctic Antarctic and Alpine Research*, 34: 282–286.

Smith T (1934) *Parasitism and disease*. Princeton University Press, Princeton.

Smith JA, Blanchette RA, Newcombe G (2004) Molecular and morphological characterization of the willow rust fungus, *Melampsora epitea*, from arctic and temperate hosts in North America. *Mycologia*, 96: 1330–1338.

Snyder WC, Hansen HN (1940) The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27: 64–67.

Snyder WC, Hansen HN (1941) The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *American Journal of Botany*, 28: 738–742.

Snyder WC, Hansen HN (1945) The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany*, 32: 657–666.

Suto Y (2009) Three ascomycetes on leaves of evergreen *Ilex* trees from Japan: *Rhytisma ilicis-integrae* sp. nov., *R. ilicis-latifoliae*, and *R. ilicis-pedunculosae* sp. nov. *Mycoscience*, 50: 357–368.

- Swellengrebel NH (1940) The efficient parasite. In Proceedings of the Third International Congress of Microbiology. pp 119–127. Waverly, Baltimore, Maryland.
- Taiz L, Zeiger E (2004) 植物生理学第3版 (西谷和彦・島崎研一郎監訳). pp 66. 培風館, 東京.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- 巽二郎 (1999) 作物の形態と機能. 堀江武 (編) 作物学総論. pp 41–73. 朝倉書店, 東京.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.
- Thompson S, Alvarez-Loayza P, Terborgh J, Katul G (2010) The effects of plant pathogens on tree recruitment in the Western Amazon under a projected future climate: a dynamical systems analysis. *Journal of Ecology*, 98: 1434–1446.
- Thornley JHM (1976) *Mathematical Models in Plant Physiology*. Academic Press, London.
- Thornthwaite CW (1948) An approach toward a rational classification of climate. *Geographical Review*, 38: 55–94.
- Thuang MM (2008) Pathologic and taxonomic analysis of leaf spot and tar spot diseases in a tropical dry to wet monsoon ecosystem of lowland Burma. *Australasian Plant*

- Pathology, 37: 180–197.
- Tojo M, Masumoto S, Hoshino T. (2013) Phytopathogenic Fungi and Fungal-Like Microbes in Svalbard. In: Imai R, Yoshida M, Matsumoto N (Eds.) Plant and Microbial Adaptations to Cold in a Changing World. pp 263–284. Springer, Germany.
- Tojo M, Newsham KK (2012) Snow moulds in polar environments. *Fungal Ecology*, 5: 395–402.
- Tojo M, Nishitani S (2005) The effects of the smut fungus *Microbotryum bistortarum* on survival and growth of *Polygonum viviparum* in Svalbard, Norway. *Canadian Journal of Botany*, 83: 1513–1517.
- Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172: 4238–4246.
- Wang MM, Jin LT, Jiang CX, Hou CL (2009) *Rhytisma huangshanense* sp. nov. described from morphological and molecular data. *Mycotaxon*, 108: 73–82.
- Weber RW, Webster J (2002) Teaching techniques for mycology: 18. *Rhytisma acerinum*, cause of tar-spot disease of sycamore leaves. *Mycologist*, 16: 120–123.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. pp 315–321. Academic Press, New York.
- Woo JY, Partridge AD (1969) The life history and cytology of *Rhytisma punctatum* of bigleaf maple. *Mycologia*, 61: 1085–1095.
- Woods AK, Coates D, Hamann A (2005) Is an unprecedented *Dothistroma* needle blight

epidemic related to climate change? *BioScience*, 55: 761–769.

Wollenweber HW, Reinking OA (1935) *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Paul Parey, Berlin.

八杉龍一, 小関治男, 古谷雅樹, 日高敏隆 (1996) *岩波生物学辞典 第4版*. pp 734, 753. 岩波書店, 東京.

Yoshitake S, Uchida M, Koizumi H, Nakatsubo T (2007) Carbon and nitrogen limitation of soil microbial respiration in a High Arctic successional glacier foreland near Ny-Ålesund, Svalbard. *Polar Research*, 26: 22–30.

Zonneveld C (1998) Photoinhibition as affected by photoacclimation in phytoplankton: a model approach. *Journal of Theoretical Biology*, 193: 115–123.