

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380093

研究課題名(和文)ニレ類立枯病の日本における被害発生リスク評価

研究課題名(英文)Risk assessment of Dutch Elm Disease pathogens in Japan

研究代表者

升屋 勇人(Masuya, Hayato)

独立行政法人森林総合研究所・東北支所・チーム長

研究者番号：70391183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では侵入種であるニレ類立枯病菌の日本国内における分布と病原力の評価から、被害発生や拡大のリスクを評価した。ニレ類立枯病菌のうち*Ophiostoma ulmi*および*O. novo-ulmi* ssp. *americana*は北海道にのみ分布していた。また本州には別の近縁種が生息することが明らかとなった。ケヤキ、ハルニレに対して、いずれの菌種であっても、比較的強い病原力を有していたため、高濃度に侵入すれば枝枯れを引き起こすと予想させた。本成果は北海道におけるニレ類の枯損発生を早期に警戒する必要性を示している。この一連の成果は日本におけるニレ類立枯病発生の早期発見、被害軽減に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：This study assessed the potential risk of outbreak of Dutch Elm Disease pathogens in Japan by using the data about the distribution of the pathogens and their virulence on Japanese elms. *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* ssp. *americana* could be detected only from Hokkaido area, but not from other area in Japan. However close associates of *O. ulmi* were found to be distributed in other area in Japan. All of the pathogens cause large necrosis on the bark of *Ulmus davidiana* and *Zelkova serrata*. Thus they can cause mortality of Japanese elms where they outbreak. This suggests that the outbreak of the vector insects and the pathogens should be monitored soon. These results highly contribute the early detection, treatment, and management of the Dutch Elm Disease in Japan.

研究分野：森林科学

科研費の分科・細目：森林保護

キーワード：樹皮下キクイムシ 侵入病害 *Ophiostoma* 萎凋病

1. 研究開始当初の背景

ニレ類立枯病は世界4大樹木病害の一つである。その病原菌である *Ophiostoma ulmi* 及び *O. novo-ulmi* は侵入生物ワースト 100 にも常にランクインされている。樹皮下キクイムシにより媒介され、後食加害に伴って樹体内に侵入し、大木をも枯死させる。本病害は過去2度のパンデミックがあり、一度目はアジア起源とされる *Ophiostoma ulmi* によるもので、ヨーロッパには20世紀初めに侵入しニレの集団枯損を引き起こし、さらに北米に渡り壊滅的被害をもたらした。2度目は、北米で *O. ulmi* が *O. novo-ulmi* の2つの亜種、*ssp. novo-ulmi* と *ssp. americana* に分化し、再度ヨーロッパに侵入して被害を起こしたと考えられている。侵入は丸太や材の移動による人為的な活動が原因と考えられる。定着は宿主となる樹木の存在と生活環を全うするための媒介者の存在が重要であるが、媒介者であるキクイムシは *Scolytus* 属が多く、生態的類似性から媒介者変換が起こりやすいことが、侵入後の生活環成立と拡散に寄与していると思われる。

この強力な病原菌による被害が世界で発生しているにもかかわらず、これまで日本においてはニレ類立枯病菌の調査は十分には行われてこなかった。近年、申請者らは日本においてニレ類立枯病菌の存在を北海道において初めて確認した(Masuya et al., 2009)。現時点では *O. ulmi* と *O. novo-ulmi ssp. americana* の2種類を確認したが、これらの起源や本州以南での分布については全く分かっていない。つまり、日本のニレ立枯病菌が土着種なのか侵入種なのかは全く不明である。従来から *O. ulmi* はアジア起源と考えられていたこと、*O. novo-ulmi ssp. americana* が北米で分化したと考えられていることから、現時点では *O. ulmi* は土着で、*O. novo-ulmi ssp. americana* は侵入種である仮説が有力と考えられるが、*O. ulmi* 自体の本当の起源がまだ十分には明らかになっていないことや、遺伝的解析が行われていないことなどから、侵入、分散過程についてはよくわかっていない。

日本産ニレ類にはハルニレ、アキニレ、オヒョウ、ケヤキがあげられるが、過去海外で接種試験により、これらは *O. ulmi*、*O. novo-ulmi* に対して抵抗性があるため枯損は発生し難いとされている。しかし、十分な検討は行われておらず、中度抵抗性とする結果もあれば感受性という報告もある。これは樹体サイズや接種方法が統一されていないことや、生育状況の違いなどから厳密に評価することが難しく、日本産ニレ類で枯損が発生しないかどうかについては全く検討されていないと言って良い。このことは今後国内で病害が大発生するリスクを厳密に評価する妨げになっている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、以下のことを明らかにすることで、本病害の大発生リスクを評価し、リスクマネジメントのための基礎データを確立する。

1. 日本国内における本病害の分布状況を明らかにする。
2. 採集された各種菌株について、各種遺伝子解析により、遺伝的構造を明らかにする。
3. 各菌の日本産ニレ類に対する病原力を明らかにする。
4. 媒介者の特定を行う。

3. 研究の方法

ニレ類立枯病菌の分布は現在までのところ北海道の一部でのみ分布が明らかになっている。そこで、北海道を中心に採集を行い、最終的な採集範囲を全国のニレ類分布地域に広げる。特にニレ類が集中して分布している関東北部、中部地方における冷温帯林においてもサンプリングを行う。なるべく網羅的なサンプリングができるように、調査地を配置し、調査期間中、本州で約30か所、北海道では約10か所において採集を行う。

採集対象

採集対象はニレ類に穿孔するキクイムシ類およびその宿主樹木に限定する。ハルニレ、アキニレ、オヒョウ、ケヤキに穿孔しているキクイムシ類とそれらの孔道を採取し、分離に供試する。今までにニレ類への穿孔が知られているキクイムシ類は *Scolytus* 属を中心に複数種知られており、それらを採集対象とする。キクイムシの穿入孔が見つかったとき、鉋および鋸で樹皮を剥ぎ、キクイムシの繁殖孔道とその周辺の材を採取する。必要に応じて、穿孔している枝、幹ごと採取する。

分離法

Cycloheximide 添加1%麦芽エキス寒天培地に採取したキクイムシを半日這わせたあと、取り除き1週間20℃暗黒条件下で培養し、生育してきた単菌系体を実体顕微鏡下で滅菌ピンセットでつまみとり、2%麦芽エキス寒天培地に移植し、純粋培養菌株を確立する。同時に、キクイムシ孔道壁から2mm四方の樹皮片を切り取り、Cycloheximide 添加1%麦芽エキス寒天培地に移植、20℃暗黒条件下で培養し、生育してきた単菌系体を2%麦芽エキス寒天培地に移植し、純粋培養菌株を確立する。

DNA 解析

純粋培養菌株を、セロファンシートに乗せたポテトデキストロース寒天培地上で2週間生育させ、菌体を回収し、細胞壁分解酵素 Yatalase で処理後、精製し、DNA を抽出する。これは 96well プレートを用いたハイスループト DNA 抽出法で行う。

抽出した DNA は col、cu、ITS、MAT 遺伝子特異的プライマーを用いて、PCR を行い、各

遺伝子の塩基配列を定法により決定する。

分離菌株の同定

種間交雑をしやすい、変異しやすいことから、形態的特徴や DNA 解析のみでは *O. ulmi* と *O. novo-ulmi* の識別は困難である。そのため、形態、DNA 解析に加えて、予め確立してあるテスター菌株との交配試験を行うことで、各菌株の同定を行う。

病原性検定

接種源の確立

遺伝子解析により種間交雑の痕跡が認められた菌株については、予め設定した、交雑の痕跡が認められない標準菌株とともに接種試験に供試する。分生子懸濁液をプレートから作成し、グルコース、各種ミネラルを含む液体培地で7日間振盪培養する。得られた懸濁液は 1000 細胞/ml の濃度に設定する。

接種方法

接種にはハルニレ、アキニレ、ケヤキ、アメリカニレの苗木を使用する。苗木は予め挿し木で増殖させたものを使用する予定である。苗木の主幹に辺材部まで達する切れ込みを斜めに入れ、そこに分生子懸濁液を 2 mL 滴下する。その後切れ込みはパラフィルムで覆い、その上からビニールテープで保護する。各区で 10 本、コントロールも含め、合計で 50 本の苗木に接種を行う。病原力の判定は、予め苗木の葉の枚数をカウントしておき、外部病徴として葉の萎凋、喪失の程度を実際の落葉数で計算する。合わせて接種部付近の解剖学的観察により、壊死の程度を計測するとともに、通水領域の面積の割合を評価する。

遺伝的変異の解析

遺伝子データ解析

DNA 解析により得られたデータをもとに、各調査地におけるハプロタイプの出現頻度の算出を行う。また、交配試験と形態観察、ITS 領域の塩基配列により同定した *O. ulmi* と *O. novo-ulmi* における MAT、col、cu 遺伝子が本来の種類と同じか違うかを明らかにすることにより、種間交雑の有無を確認する。

VCG (vegetative compatibility group) 解析

対峙培養により形成される対線の有無や程度によって、遺伝的に同一か異なるかを判別する。同一と判断されたものは同一の VCG と判断する。これにより VCG の頻度、多様性を評価し、各地域で遺伝的に均一な集団が分布しているのか、それともより多様な集団が分布しているのかを明らかにする。これらにより *O. ulmi* および *O. novo-ulmi* が侵入種かどうかを判定する。また、それらの拡散ル-

ートの推定を行う。

4. 研究成果

・日本国内における本病害の分布状況
北海道を中心に倒木、枯死木の調査、および餌木によりベクターとなるキクイムシを捕獲し、分離した結果、調査した全ての地域において、*Scolytus* 属キクイムシからニレ類立枯病菌が検出された。よって少なくとも北海道においては、キクイムシとともに広く分布していることが明らかとなった。

分離された菌株について VCG を調査したところ、すでに遺伝的に多様なグループが広範囲に分布していることが分かった。地域ごとの多様性は高く、各地域間で同一の VCG がほとんど存在しなかったことから、分離された菌株がほぼ一つの VCG と考えられた。

北海道以外の地域では *Ophiostoma ulmi* に酷似した菌がケヤキ、およびケヤキの穿孔していた *Scolytus frontalis* から検出された。それらは岩手、神奈川、宮崎において検出された。現在分類学的検討を行っている。

日本国内におけるニレ類立枯病菌の分布調査を行った結果、北海道の帯広周辺でハルニレから *Ophiostoma ulmi* と *O. novo-ulmi*、山形県でケヤキ由来のニレ類立枯病菌類似種が生息していることが明らかとなった。

・各菌の日本産ニレ類に対する病原力

ハルニレ、アメリカニレ、オヒョウ、アキニレ、ケヤキを用いて予備的接種試験を行った結果、従来の報告通り、アキニレにはほとんど壊死斑を形成することはなかった。一方で対照となるアメリカニレにおいては安定して広く導管の壊死が確認された。ハルニレ、ケヤキにおいても壊死が大きく形成されており、木によってはアメリカニレよりも広域に導管の壊死が認められた。接種した菌の病原力は今回用いた菌株では *O. ulmi* の方が *O. novo-ulmi* よりも強く、また両者とも日本産ニレ類に対して病原性があることが明らかとなった。

ハルニレ、オヒョウ、ケヤキに対して *O. ulmi*、*O. novo-ulmi*、ケヤキ由来の *O. ulmi* 類似菌を各 5 菌株接種したところ、菌株間で病原力に違いが認められた。全体的には *O. novo-ulmi* が平均して強い病原力を有していると考えられた。また、感受性はケヤキが最も高い感受性を有していた。これらの成果は本病菌のリスク評価において重要である。

各菌株について様々な密度の接種源を用いた病原力の評価を行い、各菌株の病原力と接種密度との関係を苗木を用いた人工接種により調査した。その結果、*Ophiostoma novo-ulmi* とケヤキ由来の *Ophiostoma* が強い病原力を有していたが、枝の枯死に必要な孢子濃度は最低でも 1 万個/100 μ l 以上であった。

まとめ

被害軽減には病害発生に対する早期警戒が必須である。本研究では侵入種であるニレ類立枯病菌の日本国内における分布と病原力の評価から、被害発生や拡大のリスクを評価した。本成果は北海道におけるニレ類の枯損発生を早期に警戒する必要性を示しており、今後北海道支所を中心とした経常経費でのモニタリングへと移行する。この一連の課題は日本におけるニレ類立枯病発生の早期発見、被害軽減に大きく貢献する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

岡部貴美子、升屋勇人、神崎菜摘 2011 森林生物資源の輸入と随伴侵入生物 地球環境 17: 127-133 査読有

升屋勇人 2010 外国から侵入した樹木病原菌 山林 12月号 p44-47 査読有

升屋勇人、市原優、窪野高德、神崎菜摘 2010 日本におけるニレ類立枯病菌の分布 森林防疫 59: 220-225 査読有

神崎菜摘、升屋勇人、岡部貴美子 2010 「随伴侵入」する微小生物の現状と問題点 森林防疫 60:4-10 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

山口岳広、石原誠、升屋勇人、市原優、神崎菜摘 2014 北海道南西部におけるニレ類衰退木の発生実態 第 125 回日本森林学会大会要旨 p.147 2014年3月29日 大宮

升屋勇人、市原優、石原誠、神崎菜摘、山口岳広 2013 ニレ類立枯病菌の日本産菌株における病原力比較 日本森林学会大会発表データベース P2-064 2013年3月27日 盛岡

Hayato Masuya、Yu Ichihara、Makoto Ishihara、Takehiro Yamaguchi、Natsumi Kanzaki 2012 Current status of the Dutch elm disease in Japan. IUFRO 7.03.12 - Alien invasive species and international trade 03 2012年7月3日 東京

升屋勇人、Brasier Clive、市原優、窪野高德、神崎菜摘 2012 日本産 *Ophiostoma ulmi* と *O. novo-ulmi* ssp. *americana* の遺伝的特徴 日本菌学会大会講演要旨集 Vol. 54、pp.76 2012年9月10日 札幌

升屋勇人、市原優、石原誠、神崎菜摘、山口岳広 2012 ニレ類立枯病菌の日本産ニレ類への病原性 日本森林学会大

〔図書〕(計 1 件)

Hayato Masuya、Yuuichi Yamaoka、Michael J Wingfield. 2013 Ophiostomatoid fungi and their associations with bark beetles in Japan. In: Ophiostomatoid fungi: expanding frontiers (Seifert KA, De Beer ZW, Wingfield MJ, eds). CBS Biodiversity Series 12 pp77-89 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

升屋 勇人 (HAHATO MASUYA)
森林総合研究所・東北支所・チーム長
研究者番号: 70391183

(2) 研究分担者

市原 優 (YU ICHIHARA)
森林総合研究所・関西支所・グループ長
研究者番号: 10353583

山口 岳広 (TAKEHIRO YAMAGUCHI)
森林総合研究所・北海道支所・チーム長
研究者番号: 00353897

石原 誠 (MAKOTO ISHIHARA)
森林総合研究所・北海道支所・主任研究員
研究者番号: 90353581