

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292089

研究課題名(和文) 萎凋病に対する樹木の感受性変動の生理学的解明

研究課題名(英文) Physiological investigation on the susceptibility of trees against infection with wilt diseases

研究代表者

黒田 慶子 (Kuroda, Keiko)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20353675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ナラ枯れ(ブナ科樹木萎凋病)やイチジク株枯病などの伝染性萎凋病では、感染後に生き延びる個体が一定割合存在する。同一菌株の接種実験でも同様の傾向があることから、宿主樹木の生理状態および生息環境と病気の進行しやすさとの関係について検討した。ナラ枯れでは高齢の大径木ほど枯死しやすいとされるが、カシノナガキクイムシ穿孔数が同程度のナラ類大径個体間で枯れやすさを比較すると、土壌水分の多い場所で枯れにくい傾向が認められた。また、イチジク株枯病菌の接種実験から、主幹横断面における通水停止範囲の割合がその個体の生死の決定要因となることがわかった。被害予測の指標には樹木生理や土壌環境の情報を含めるのが望ましい。

研究成果の概要(英文)：A certain percentage of trees survives after the infection with wilt diseases such as Japanese oak wilt caused by *Raffaelea quercivora* or fig wilt caused by *Ceratocystis ficicola*. We hypothesized that physiological stress of host trees and environmental condition may affect the mortality rate of infected trees because the rates fluctuate when a same strain of the pathogen is inoculated. By the comparison of aged oak trees with the similar numbers of *Platypus quercivorus* attack, survival rate of host trees were higher on the wet soil than on the dried soil of ridges. From the inoculation experiments of fig wilt, the enlargement of crosscut area of dysfunctional xylem was shown to be an important factor directly deciding the survival or mortality of the hosts. As indicators to predict the damages by wilt diseases, information of tree physiology and environment will be helpful.

研究分野：森林病理学および生理学

キーワード：ナラ枯れ ブナ科樹木萎凋病 イチジク株枯病 水ストレス 通水障害 木部樹液 土壌水分

### 1. 研究開始当初の背景

マツ枯れ被害の多い日本では、樹木萎凋病について基礎から応用まで幅広く先進的研究が行われてきた。国際交流は活発で、図書の共同執筆もある (Kuroda 2008 他)。近年の萎凋病研究では、樹木と病原体の相互作用について以下の2点が重要課題として把握されつつある：(1) 樹木細胞が感染に対して過剰な防御を行うことにより、樹幹の通水能力が低下し枯死へと向かうことがわかり、主要萎凋病について発病メカニズムに関する研究が進められている (Ichihara et al. 2000, Kuroda 2012, Takahashi et al. 2010 等)。しかし防御反応と通導停止の関係については未解明の部分が多く残る。(2) 病原体 (菌株) が同一であっても、病気の進みややすさや感染後の枯れやすさは、宿主の側の生理的活性や環境条件により変動する。病原力の強さを菌株間で比較する前に、まず同一菌株に対する樹木の感受性差の発生理由を究明する必要がある。現状では、樹齢や枯死率に関する観測事例 (佐藤ら 2004 等) から便宜的に感受性を判断しており、ナラ枯れ対策を誤る原因にもなっている。

### 2. 研究の目的

近年被害が増加しているナラ枯れなどの伝染性樹木萎凋病では、感染後に生き延びる個体が一定割合存在し、その割合が場所により変動する。病原体媒介甲虫の密度が等しい場合や、同一菌株の接種実験でも同様に個体差が出ることから、樹木側の生理的要因が病気の進行に関わるものと推測される。本研究の目的は、樹木の萎凋病に対する感受性 (病気の進みややすさ) と生理的および環境因子との関係を明らかにすることである。感染前の樹木の水分通導能力の差や感染後の細胞の反応に注目する。この研究により、樹木の感受性を上げないような環境改善や、激害化の警戒が不要な場所の特定が可能となり、被害対策の決定に有用な情報が得られる。また、発病メカニズムに共通点の多い樹木萎凋病全般について成果が適用できる。

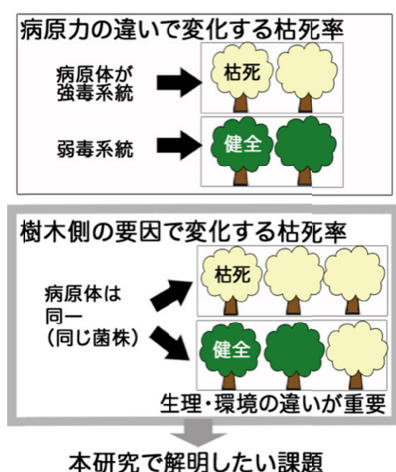


図1 樹木の感受性のとらえ方

### 3. 研究の方法

(1) 管理下にあるモデル樹木苗を用いた樹木生理と発病の関係性の解明

ナラ・カシ類の実生苗はサイズや成長速度にばらつきが大きいので、挿し木によるクローン苗が利用できるイチジクを供試木とする。イチジク株枯病 (病原菌: *Ceratocystis ficicola*) の強病原性菌株 (東広島市) を培養して苗木に接種し、3~4日ごとに根ごと抜いて試料を採取する。酸性フクシン水溶液の吸入により通導低下を追跡する。

接種木の病徴を肉眼で観察するとともに、光学顕微鏡により、感染に対する樹木細胞の防御反応を観察する。蛍光抗体法を用いて、樹幹内の菌の分布、菌の周囲の細胞生存率を検出する。また、接種木の水ストレス (灌水制限) と病徴進展、通導障害部の拡大の関係を明らかにする。

(2) 自然環境下における感受性変動要因の検出および応用技術への発展

1) イチジク農園での調査: イチジク株枯病発生地域において、被害多発農園と無被害農園のイチジクの生理状態を比較する。樹木の管理方法、灌水、整枝などの条件とともに、水ストレスの状況を把握し、罹病および枯死率との関係について検討する。

2) ナラ枯れ発生地域での計測と調査: ナラ枯れ未被害林分、未被害個体において樹幹内の水分状態、樹液流を計測する。個体差や場所 (斜面の上部、下部) による差を明らかにする。被害地の斜面上部と下部で土壌水分を比較し、枯死との関係について情報を得、感受性の変動を明らかにする。

(3) 総合的検証と応用への発展

上記課題(1)と(2)で得られた情報から、感受性に強く関わりと推測される要因を明らかにする。ナラ枯れの自然感染地で、その要因を指標として、枯れやすい場所と枯れにくい場所の判別を試みる。

### 4. 研究成果

(1) モデル樹木を用いた樹木生理と発病の関係性の解明

イチジク品種「蓬萊柿」の挿し木2年生苗 (枝長 101.5cm、接種部位直径 13.6mm) の主幹下部に、枝枯病菌 *Ceratocystis ficicola* を4点接種した。接種実験は H25 年、26 年の2回実施した。

病徴発現前の個体を中心に光学顕微鏡で観察したところ、接種1週間後には接種部周辺の道管内腔で菌糸が観察され、さらに日数と経過に伴い、放射柔細胞や軸方向柔細胞内への菌糸の侵入が確認された。菌糸の周囲では宿主の防御反応による二次代謝物質の生産が増加し、柔細胞内および同館、木部繊維等の細胞壁尾は黄色~褐色に着色した。この変色部位 (傷害心材) では、同館の水分通導が停止することが知られている。柔細胞内の

デンプンは接種後に徐々に減少してやがて消失し、防御物質の生産に消費されたものと推測された。接種2～3週間後には接種部周辺の木部では変色範囲がさらに拡大した。葉の黄変や萎凋という外部病徴の発現前の段階で、

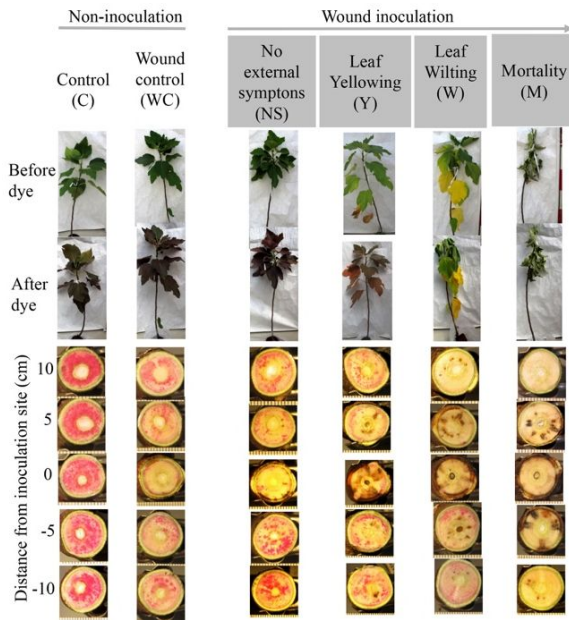


図2 株枯病菌接種後のイチジクの通水阻害の進行と病徴進展  
酸性フクシンによる通水範囲の染色（赤色部）および防御反応による木部の変色

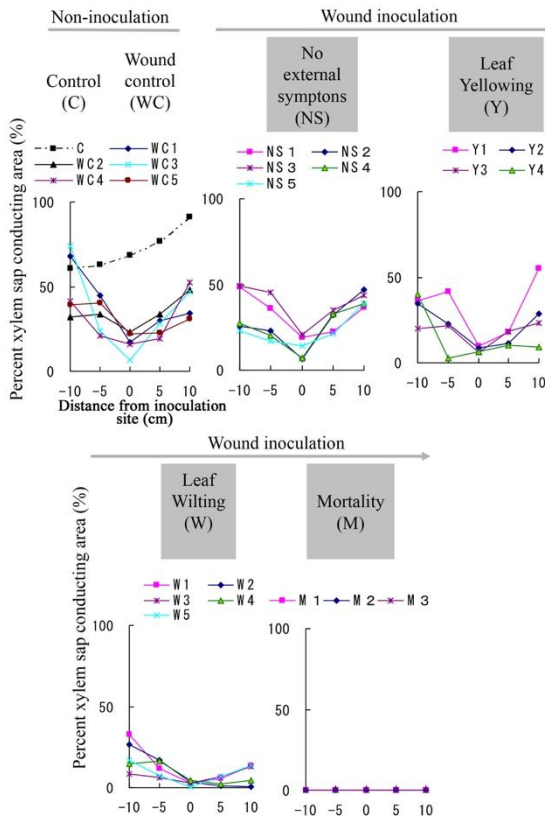


図3 株枯病菌接種後のイチジク木部における通水領域の低下と病徴進展  
Percent xylem sap conducting area: 図2の染色範囲の面積

ことが判明した（図2）。

これらの結果から、株枯病菌の接種部位の周辺で道管の通水が停止すること、その結果、枝葉への水分供給が停止し、萎凋～枯死に至ることが示唆された（図3）。感染から枯死までに樹幹組織内で観察される現象は、*Ceratocystis polonica* によるエゾマツの萎凋病および *Raffaelea quercivora* によるナラ枯れとの共通点が認められた。

H26年には、土壌水分量と発病しやすさ（感受性）の関係を明らかにするため、イチジク苗への灌水コントロールを行い、接種苗と対照区苗の主幹下部に熱流束センサーを装着して水分通導の変化を追跡した。「非保水区」では接種10日後から萎凋個体が発生したが、「保水区」の病徴発現は2週間後以降で、葉が萎凋せずに落葉する例が目立った。落葉個体でも接種部位付近で木部が広く変色し、通水範囲が著しく減少していた。熱流束の値から、健全苗では晴天の昼間は幹の外側（大気）から内側（主幹内部）への熱移動が大きく、木部樹液が低温傾向であることが推測された。接種苗で萎凋開始個体では、熱流束値が最大値を示す時刻が健全木よりも早まる傾向があった。これは樹液流動が緩慢になり、外気温の影響が大きくなったためと推測した。

(2)自然環境下における感受性変動要因の検出および応用技術への発展

1)イチジク農園での調査

東広島市内の農園では、幹下部で枝を強制的に90度曲げて樹高を低く作る栽培方法である。屈曲部の樹皮には縦方向の亀裂が高頻度で形成されていた。幹太さ10cm程度以下の若齢木は土壌経由の感染が主体であった。一方、アイノキイムシ媒介により感染枯死した個体は高樹齢（16-20年生、直径20cm以上）の農園で認められた。加齢にともなう水ストレス増加や樹皮の傷の影響で、キクイムシ穿入や通水阻害が促進された可能性がある。

2)ナラ枯れ感受性に関わる生理的要因の解明

里山二次林に試験地を設定し、カシノナガキクイムシの穿入木・健全木について樹液流速を測定した。甲虫穿入密度が高いコナラ・アバマキでは、萎凋症状が出る前に、健全木と樹液流動の変動パターンが変化した（図4）。晴天で十分に蒸散がある時間帯に、キクイムシ穿入木では時々樹液流速が変動して値が低下する状況が検出された。樹液流は停止していないが、通導阻害が進行しているものと推測された。

ナラ枯れ被害発生中の林分（兵庫県篠山市）では、発生初年度（被害を目視で発見した年）から枯死木を除去しないままにすると、2～3年目で林内のナラ類の多数にカシノナガキクイムシの穿入が起こり、全く無被害の個

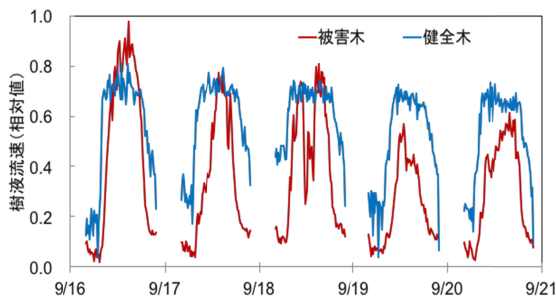


図4 コナラ被害木および健全木の樹液流速

体は確認できなくなった。しかし、同斜面のナラ類（アベマキ、コナラ）総数 87 本に対して枯死本数 20、枯死割合は 23%という低率であった。昨年度調査の段階で、カシノナガキクイムシ穿入密度が 1 頭/100 cm<sup>2</sup>以上であった個体で、H27 年度も生存が確認された個体があった。斜面中腹～下部で生残木（穿入があったが枯れなかった個体）が目立ったこと、穿入が多くて枯れない例が認められたことから、病徴進展を止めた要因として土壤水分量が多かったことが考えられる。つまり夏季の蒸散量が多い時期に、樹幹下部でカシノナガキクイムシの孔道形成により通水障害が進んだ個体が生存し続けられるかどうかは、根からの水分供給に依存する可能性が考えられる。

自然環境下における感受性変動要因の検出および応用技術への発展のために、伐採試料について樹幹の年輪解析を行った。その結果、コナラ・アベマキ樹幹の肥大成長速度は、菅（樹齢 40 年～60 年生）、東木之部（60～80 年生）、矢代（70～100 年生）の順に速い傾向があった。同じ調査区内でも個体により成長速度に差が見られ、土壤水分の少ない尾根部は中腹部以下より成長が遅い傾向が見られた。幹直径が 10cm に達するのに多くの個体が約 10～25 年の時間を要した。萌芽更新減少・ナラ枯れ被害増加の太さの目安となる直径 30cm に達するのは 35 年からで、40 年以上以降徐々に個体が増えていった。40 年以上放棄された里山林は、萌芽更新能力の低下やナラ枯れ被害の発生が懸念されるが、本研究の調査地の中で、高樹齢個体の多かった矢代地区でカシノナガキクイムシ穿入個体が多かった。

### (3) 感受性指標による自然感染リスクの推測

カシノナガキクイムシ穿孔数が同程度の個体で、土壤水分の多い場所で枯れにくい傾向が認められた。ナラ枯れ被害木は大径木ほど枯れやすいことは指摘されているが、大径木で穿孔被害がありながら生存する場合があること、その要因として土壤水分あるいは土壤の性質に関わる可能性が示唆された。

ナラ枯れの感受性に関わると推測される要因を 樹齢、肥大成長速度、土壤水分を指標とし、篠山市内の自然感染地において、枯れやすい場所と枯れにくい場所の特徴を

まとめた。ナラ枯れ被害の発生時期が最も速かったのは菅、引き続き矢代の尾根から下方にかけての被害増加があり、東木之部の被害はその 1 年後に開始した。矢代の斜面下部ではカシノナガキクイムシの穿入が多いにも関わらず生存した個体が目立った。またその隣接地の圃場（稲作）に接する斜面最下部では穿入個体の大半が生存していた。この点からも、土壤水分が多い場所では枯死に至りにくいと推測された。

防除対策では樹齢や幹直径に加えて植生・環境データを含めて被害リスクの高さを判断するのが望ましい。

## 引用文献

Ichihara, Y., Fukuda, K., Suzuki, K.: Early symptom development and histological changes associated with migration of *Bursaphelenchus xylophilus* in seedling tissues of *Pinus thunbergii*, Plant Disease, 84 (6): 675-680, 2000

Kuroda, K.: "Pine Wilt Disease" (Zhao et al. eds), Chap. 20 and 21 Physiological Incidences Related to Symptom Development and Wilting Mechanism. Springer, 2008

Kuroda, K.: Monitoring of xylem embolism and dysfunction by the acoustic emission technique in *Pinus thunbergii* inoculated with the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. J. For. Res. 17:58-64, 2012.

Takahashi, Y., Matsushita, N. and Hogetsu, T.: Spatial Distribution of *Raffaella quercivora* in Xylem of Naturally Infested and Inoculated Oak Trees, Phytopathology, 100(8):747-755, 2010

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kajii, C., Morita, T., Kuroda, K.: Laticifers of *Ficus carica* and their potential role in plant defense. IAWA journal 35(2):109-115, 201 査読有

隅田臯月・森田剛成・軸丸祥大・黒田慶子: *Ceratocystis ficicola* 接種によるイチジク株枯病発病過程の解剖学的研究 樹木医学研究 19: 96-97, 2015 査読有

Azuma, W., Ishii, H., Kuroda, Katsushi, Kuroda, Keiko: Function and structure of leaves contributing to increasing water storage with height in the tallest *Cryptomeria japonica* trees of Japan. Trees 30: 141-152, 2015 査読有

黒田 慶子: 樹木の中の水の流れをどうとらえるか、学術の動向. 日本学術会議 21(2):62-65, 2015 査読無

黒田 慶子, 里山の健康低下とその要因〔1〕-ナラ枯れの発生理由と対策-. 農業および園芸, 養賢堂, 90(4):456-463, 2015 査読無

隅田 皇月, 森田 剛成, 黒田 慶子: イチジク株枯病菌 *Ceratocystis ficicola* の土壌から宿主への侵入経路の解明, 樹木医学研究 20:30-31, 2016 査読有

森田 剛成, 軸丸 祥大, 黒田 慶子: 株枯病菌を接種したイチジク苗木における病徴の進展過程 (1) 木部の通水阻害と萎凋症状の関係, 植物病理学会報, 82 :3 01-309, 201 査読有

隅田 皇月 梶井 千永 森田 剛成 黒田 慶子: 株枯病菌を接種したイチジク苗木における病徴の進展過程 (2) 宿主細胞の防御反応と内部病徴に関する解剖学的検討 植物病理学会報, 82 :310-317, 2016 査読有

[学会発表](計 20 件)

Sasaki, T., Kuroda, K., Ishii, H., Hotta, K., Matsukawa, M.; Japanese oak wilt and grazing damage by shika deer are threatening the health of secondary forests, "Satoyama", URBIO, 2014 (Korea, Incheon)

黒田 慶子・隅田 皇月・梶井 千永・森田 剛成: 株枯病菌を接種したイチジクにおける病徴の進展 (2) 宿主の防御反応に起因する内部病徴と通水阻害, H26 日本植物病理学会大会, 2014 年 6 月 (札幌)

隅田 皇月・森田 剛成・軸丸 祥大・黒田 慶子: *Ceratocystis ficicola* 接種によるイチジク株枯病発病過程の解剖学的研究, 樹木医学会第 19 回大会, 2014.11(盛岡)

隅田 皇月・黒田 慶子・森田 剛成・軸丸 祥大: *Ceratocystis ficicola* 接種によるイチジク株枯病発病メカニズムの検討 (1) 解剖学的手法による発病過程の追跡, 日本森林学会大会, 2015. 3 (札幌)

黒田 慶子・隅田 皇月・森田 剛成・軸丸 祥大: *Ceratocystis ficicola* 接種によるイチジク株枯病発病メカニズムの検討 (2) 宿主の水分生理と病徴進展, 日本森林学会大会, 2015. 3 (札幌)

Kuroda K., Sumida S, Morita T, Jikumar S.: Wilt mechanism of *Ficus carica* infected with *Ceratocystis ficicola*: detection of Xylem dysfunction prior to symptom development, V International symposium on fig, International Society for Horticultural Science. 2015. 8 (Italy, Naples)

Sumida S, Morita T, Jikumar S, Kuroda K.: Wilt mechanism of *Ficus carica* infected with soil-borne *Ceratocystis ficicola*, V International symposium on fig, International Society for Horticultural Science. 2015. 8 (Italy, Naples)

新良 貴歩美・東若菜・石井 弘明: ヒノキ鱗状葉の形態と生理機能に関する研究. 第 66 回応用森林学会. 2015.10 (岡山)

隅田 皇月, 森田 剛成, 黒田 慶子: イチジク株枯病菌 *Ceratocystis ficicola* の土壌から宿主への侵入経路の解明, 樹木医学会第 20 回大会, 日本樹木医学会, 2015, 11 (東

京)

Hotta K, Ishii H.: Visualizing and evaluating secondary forest restoration success using Bray-Curtis ordination: case studies from Japan. 2<sup>nd</sup> International Conference on Urban Tree Diversity. 2016.2 (Melbourne).

Shiraki A, Ishii H.: Leaf withering in ornamental cultivars of *Thuja orientalis* may be caused by water stress. 2<sup>nd</sup> International Conference on Urban Tree Diversity. 2016.2 (Melbourne).

Ichinose G, Iwasaki A, Ohsugi Y, Ishii H.: Vegetation recovery after removal of invasive *Trachycarpus fortunei* in a fragmented urban shrine forest. 2<sup>nd</sup> International Conference on Urban Tree Diversity. 2016.2 (Melbourne).

新良 貴歩美, 東若菜, 木原 健雄, 石井 弘明, 黒田 慶子. ヒノキ樹冠部における鱗状葉の通水性維持: transfusion tracheid の役割. 第 63 回日本生態学会大会. 2016.3 (仙台)

北川 皓平・堀田 佳那・木原 健雄・新良 貴歩美・石井 弘明・黒田 慶子. 放置里山林における森林再生を考慮した資源利用の検討. 第 63 回日本生態学会大会. 2016.3 (仙台)

姫野 早和・玉泉 幸一郎・石井 弘明・東若菜. Whole-tree pressure volume 法とデンドロメーター法を用いたスギの貯留水の測定と水輸送におけるその役割. 第 127 回日本森林学会大会. 2016.3 (藤沢).

石井 弘明, 新良 貴歩美, 東若菜, 黒田 慶子. 100 年生ヒノキ鱗状葉の通水性維持機構. 第 127 回日本森林学会大会. 2016. 3 (藤沢)

東若菜, 中島 悟, 石井 弘明, 黒田 慶子: 顕微赤外分光法による高木のスギ針葉の水分保持メカニズムの解明, 第 127 回日本森林学会大会, 2016. 3 (藤沢)

黒田 慶子, 劔持 章: マツ材線虫病予防薬の樹幹注入に起因する通水停止と枯死のリスク, 樹木医学会 21 回大会. 2016.11 (神戸)

北川 皓平, 堀田 佳那, 木原 健雄, 新良 貴歩美, 石井 弘明, 黒田 慶子: マツ枯れ・ナラ枯れ後の里山二次林における維持管理手法の検討, 樹木医学会 21 回大会. 2016.11 (神戸)

Kuroda, K., Kenmochi, A: Risk of killing uninfected pine trees by the repeated trunk-injection of nematicides to prevent pine wilt. The 9th International Symposium of Pine Wilt Disease. 2016.8 (Korea, Seoul)

Kitagawa, K., Hotta, K., Kihara, T., Shiraki, A., Ishii, H., Kuroda, K.: Sustainable management of "Satoyama" secondary forest after the extensive damages by pine wilt in the western Japan. The 9th International Symposium of Pine Wilt Disease. 2016.8 (Korea, Seoul)

[図書](計 2 件)

黒田 慶子: 海青社, 樹木医学の基礎講座,

第 III 部 樹木の生理と被害、18 章 木部樹液の動きと樹木の健康、26 章 ナラ枯れと樹木の健康管理、樹木医学会編(分担執筆と編集担当)182-192、283-294、2014  
黒田慶子：丸善、「植物学の百科事典」9 章 社会、マツ枯れ・ナラ枯れ、日本植物学会編(分担執筆)744-745、2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

黒田慶子

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~kurodak/Top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 慶子 (KURODA, Keiko)  
神戸大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：20353675

(2)研究分担者

石井 弘明 (ISHII, Hiroaki)  
神戸大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：50346251

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

森田剛成 (MORITA, Takeshige)  
広島県立総合技術研究所農業技術センター  
果樹研究部・研究員