

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02988

研究課題名（和文）日本に生存する外国産トネリコ類のAsh dieback発病回避メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms to avoid occurrence of Ash dieback on the introduced ash species surviving in Japan

研究代表者

山岡 裕一（Yamaoka, Yuichi）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00220236

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：北海道で生存するセイヨウトネリコ等の外国産樹種が、ヨーロッパで猛威を振るっている *Hymenoscyphus fraxineus* の被害（Ash dieback）を受けずに生存している原因を調査するため、着葉期のトネリコ類複葉での本菌の挙動、苗を用いた接種試験、切り葉での本菌の挙動、葉圏菌類相の比較、分離した葉圏菌類の本菌に対する拮抗作用を調査した。その結果、北海道大学構内で生存するセイヨウトネリコは、本菌の感染を許すものの、その後の葉組織内での増殖を抑制することが分かった。その原因として、本菌に対する拮抗作用を有する葉圏菌類の存在が影響していることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移入種により深刻な植物病害が発生した場合、これまでは、その植物集団が過去に移入種の病原菌と遭遇したことがなかったため、抵抗性を獲得していない、或いは抵抗性を有する集団が選抜されていなかったためと考えられている。今回の研究成果で、北海道では抵抗性を有する個体が選抜された可能性もあるが、植物体自体の抵抗性だけではなく、そこに共存する葉圏菌類集団が発病に影響している可能性を示したことは、菌類の生態に関する重要な知見と考える。また、今後、植物体上での *H. fraxineus* を含む葉圏菌類間の相互作用の詳細を解明することにより、様々な植物病害防除への応用が可能になると考える。

研究成果の概要（英文）：To clarify why some introduced ash species planted in Hokkaido, including on the campus of Hokkaido University, grow well without suffering serious diseases such as Ash dieback, monitoring of the behavior of *Hymenoscyphus fraxineus* in the leaves of ash trees, comparison of resistance by inoculation experiments using seedlings, detection and isolation of phyllosphere fungi from the leaves of the ash trees, and screening of phyllosphere fungi against *H. fraxineus* were conducted. As a result, European ash (*F. excelsior*) trees planted on the campus of Hokkaido University were infected with *H. fraxineus* similar to other ash species, but they showed the ability to inhibit growth of *H. fraxineus* in the infected cells and tissues. Some phyllosphere fungi, *Diaporthe pseudomangiferae* and *Aureobasidium pullulans* were antagonistic to *H. fraxineus*, indicating they may contribute to the inhibition of *H. fraxineus* in European ash.

研究分野：植物寄生菌学

キーワード：植物病理学 樹病学 菌類 抵抗性 葉圏菌類 拮抗作用 移入種

1. 研究開始当初の背景

トネリコ属 (*Fraxinus*) は北半球の主に温帯地域に分布するモクセイ科の落葉広葉樹である。日本には、野球のバットやテニスのラケット等に使用されるヤチダモ (*Fraxinus mandshurica*) やアオダモ (*F. lanuginosa* f. *serrata*) などが、ヨーロッパでは、木材として産業上極めて重要なセイヨウトネリコ (*F. excelsior*) などの有用樹種が分布している。

1992 年、ポーランドにおいてセイヨウトネリコの葉から枝、やがては生立木全体が枯れあがる新病害、Ash dieback が発生した。この病害はその後周辺諸国に次々に広がり、各地で甚大な被害を起し、2012 年までに、スカンジナビア半島、イギリス、ロシアにまで広がった (Gross et al. 2014)。被害の拡大は衰える兆しが無く、セイヨウトネリコの全分布域にまで拡大し生態的にも経済的にも甚大な被害を及ぼすことが予想されるが、有効な防除法がなかった。また、ヨーロッパからアフリカ北西部、アジア南西部にまで分布するホソバトネリコ (*F. angustifolia*)、北アメリカに分布する *F. nigra* やピロードトネリコ (*F. pennsylvanica*) が、本菌に感受性であることが確認されており (Drenkhan and Hanso 2010, Kirisits et al. 2010)、これらの地域では、本病原菌の侵入が警戒されている。

これまでの研究成果から Ash dieback の病原菌、*Hymenoscyphus fraxineus* (子囊菌類、ピョウタケ目) は、日本を含む東アジア起源であり、なんらかの原因でヨーロッパに侵入し、起源地とは異なる宿主に病原性を発揮し、侵略的外来種として急速に拡大したと考えられている (Zhao et al. 2012, Gross et al. 2014)。本菌は日本のヤチダモ上で初めて発見されたが、日本ではヤチダモ落葉の葉柄上で子実体を発生する腐生菌として認識されており (Hosoya et al. 1993)、ヤチダモを始めとするトネリコ属樹木で、Ash dieback のような病害発生は全く報告されていなかった。2015～2017 年度に科学研究費の助成を受けて実施した研究の成果から、本菌は、日本のヤチダモにおいては、夏に子嚢胞子が生葉に感染した後内生菌として生活し、落葉の時期になると活動が活発になり、冬の間には落葉葉軸上で偽菌核を形成し、翌年の夏に子実体を形成することが分かった (Inoue et al. 2018)。そのため、本菌はヤチダモに感染するものの、Ash dieback のような病害を引き起こさないことが分かった。

この研究遂行中に、北海道において人工的に植栽され、dieback 症状が認められないセイヨウトネリコ、ピロードトネリコ、アメリカトネリコ個体があることが分かった。周辺にはヤチダモが多数存在しヤチダモ落葉葉軸上では毎年多数の子嚢盤が発生し、子嚢胞子の自然暴露を受けているにもかかわらず生存していると考えられた。その原因を突き止めることにより、ヨーロッパでの本病害防除に貢献することができるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、dieback 症状を示していない外国産トネリコ属植物が有する発病回避メカニズムを解明することを目的とし、これら外国産トネリコ属植物の発病個体、無発病個体を活用し、(1) 無発病個体とそれから育成した苗を用いた接種試験等による抵抗性評価とそのメカニズムの解明、(2) 無発病個体生葉に生息する *H. fraxineus* と拮抗する微生物の探索とその機能の解明、(3) 発病回避機能を高めている諸要因の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 無発病個体とそれから育成した苗を用いた接種試験等による抵抗性評価とそのメカニズムの解明

① トネリコ類 3 種の苗木を用いた *H. fraxineus* 接種試験

北海道大学札幌キャンパス (以下北大) 内で採取したセイヨウトネリコの苗、種苗業者から購入したヤチダモとホソバトネリコ・レイウッドの苗をポット植えにし、密閉型グロースキャビネット (24°C、14 時間照明) または自然光型グロースキャビネット (25°C) で遮光条件下で育てた。接種源の子嚢盤は北大ならびに筑波大学菅平高原実験所 (長野県上田市、以下菅平) のヤチダモ落葉葉軸上で発生したものをを用いた。苗を 22°C に 2 日間湿室に保ち、子嚢胞子を植物体全体に落下接種した。また、複葉葉軸および茎への接種には単子嚢胞子分離菌株 Su-2003s (菅平で採取した子嚢盤より分離) をを用いた。葉軸への接種では、葉軸にメスで切り込みを入れ培養菌株の含菌寒天片を挿入し、茎への接種では、直径 4 mm のコルクボーラーで皮層をくりぬき、同サイズの含菌寒天片を挿入した。コントロールでは、無菌の寒天片を接種源とした。

② *Hymenoscyphus fraxineus* の感染挙動の観察

子嚢盤が形成された葉軸をシャーレの裏に固定し、セイヨウトネリコとホソバトネリコの小葉に子嚢胞子を 20°C、高湿度条件で 24 時間落下させた。接種葉は 40 ppm ジベレリン水溶液で

リーフカルチャーしてさらに2日間同条件に保った。その後、密閉型グロースキャビネットに移し、20°C、14時間照明の条件下で培養した。接種5日後と7日後に接種小葉を各3枚採取し、ラクトフェノールトリパンブルー染色し、付着器形成、宿主細胞への侵入とその後の菌糸生長、宿主細胞の反応を光学顕微鏡で観察した。

一塩基多型 (SNP) マーカーを用いたトネリコ属植物の *H. fraxineus* に対する感受性・非感受性の判別

Hymenoscyphus fraxineus に対するトネリコ属植物の感受性・非感受性の判別に有効とされる MADS BOX 転写因子コード領域の一塩基多型マーカー (Harper et al. 2016) を解析した。

(2) 無発病個体生葉に生息する *H. fraxineus* と拮抗する微生物の探索とその機能の解明

①トネリコ属植物の葉圏菌類相を調査

北大で健全に生育するセイヨウトネリコに着目し、本種を含むトネリコ属植物3種5個体と、ノルウェーで Ash dieback の病徴が確認されたセイヨウトネリコ1個体について、メタゲノム解析によって葉圏菌類を網羅的に検出した。さらに、北大の植物については内生菌の分離・培養調査を行った。

②葉圏菌類の *H. fraxineus* に対する拮抗作用

トネリコ属植物から分離された主要な内生菌と *H. fraxineus* の対峙培養を行った。また、内生菌の浸出物を含む寒天培地上での *H. fraxineus* 子嚢胞子発芽試験、*Aureobasidium pullulans* の細胞懸濁液と培養濾液を処理したセイヨウトネリコの生葉上での子嚢胞子発芽試験も行った。

③ *Hymenoscyphus fraxineus* の植物組織への侵入・定着に対する *A. pullulans* の影響

北大に生育しているセイヨウトネリコに由来する樹高約70cmの苗木の葉に、*A. pullulans* の細胞懸濁液を浸漬接種し、2週間後にこの処理葉に *H. fraxineus* の子嚢胞子を接種した。その後、被接種葉中での *H. fraxineus* の菌体 DNA 量を継時的に検出し、比較検討した。DNA 検出には、プローブを用いた定量 PCR を行った。

(3) 発病回避機能を高めている諸要因の検討

① *Hymenoscyphus fraxineus* とトネリコ属植物との宿主 - 寄生者相互関係

Hymenoschyphus fraxineus とトネリコ属植物との宿主 - 寄生者相互関係を明らかにするため、植物種毎の本菌の定着状況と子実体形成の有無を調査した。調査対象は、北大と森林総合研究所北海道支所(以下森総研北)に植栽されているトネリコ属7種9個体とその近縁属1種とし、これらの植物の着葉期の複葉と落葉後の葉軸から *H. fraxineus* の DNA 検出を行った。また、落葉軸上での子実体発生調査を行うことで、本菌の生活環を推察した。

②北海道大学札幌キャンパス内に植栽されたトネリコ類の発病モニタリング

北大に植栽されたセイヨウトネリコ、ピロードトネリコおよびヤチダモの供試木、ならびにその樹下に更新している実生について発病状況を調査した。

③トネリコ類と共存する他樹種の内生菌類相

トネリコ類と共存する他樹種にもトネリコ類と共通する内生菌が存在するのではと考え、北海道大学構内で供試木としたトネリコ類と近接するナナカマド (*Sorbus commixta*) から内生菌の分離、同定を行った。

4. 研究成果

(1) 無発病個体とそれから育成した苗を用いた接種試験等による抵抗性評価とそのメカニズムの解明

①トネリコ類3種の苗木を用いた *H. fraxineus* 接種試験

子嚢胞子を落下接種した結果、ヤチダモで最も顕著な病徴が現れ、接種38日後以降落葉が見られた。セイヨウトネリコでは接種後16日、ホソバトネリコでは接種後20日から、紫色から黒色の小斑点が形成され、特にホソバトネリコでより早く、多くの苗で形成されたが、接種3ヶ月までに落葉は認められなかった。複葉葉軸への有傷接種では、ホソバトネリコに比べセイヨウトネリコとヤチダモでは病徴の進展が遅く、また、茎部への有傷接種では、ホソバトネリコでは皮層部と材部に顕著な変色が見られたのに対し、セイヨウトネリコとヤチダモでは顕著な変色部はほとんど形成されなかった。以上の結果より、供試したセイヨウトネリコ苗は何らかの抵抗性を発揮していると考えられた。

② *Hymenoscyphus fraxineus* の感染挙動の観察

セイヨウトネリコとホソバトネリコのリーフカルチャーでは、*H. fraxineus* 子嚢胞子の付着器形成率に差は認められなかった。しかし、*H. fraxineus* の菌糸が最初に侵入した細胞から隣の細胞に侵入する率は、セイヨウトネリコ（接種後5日で $0\pm 0\%$ 、接種後7日で $3\pm 4.7\%$ ）では、ホソバトネリコ（接種後5日で $9\pm 6.8\%$ 、接種後7日で $24\pm 10.3\%$ ）に比べ有意に低かった。これらの結果から、抵抗性セイヨウトネリコは *H. fraxineus* の侵入を抑制することはできないものの、侵入後に拡散を抑制する機構があることが考えられた。

一塩基多型（SNP）マーカーを用いたトネリコ属植物の *H. fraxineus* に対する感受性・非感受性の判別

北大産セイヨウトネリコ、同ヤチダモは SNP マーカー“A”を持つ感受性、ホソバトネリコは“A/G”を持つ非感受性のパターンであることが明らかとなった。感受性 SNP マーカーが確認された北大産セイヨウトネリコと同ヤチダモに病害発生が認められないのは、本病害への抵抗性が別の要因によることが示唆された。その一方で、感受性樹種として知られるホソバトネリコについては、供試個体が抵抗性個体である可能性が考えられた。

（2）無発病個体生葉に生息する *H. fraxineus* と拮抗する微生物の探索とその機能の解明

① トネリコ属植物の葉圏菌類相を調査

北大産セイヨウトネリコの健全葉の内生菌群集については、分離・培養法により生葉から 14 科 15 属 22 種が分離され、その中で *Aureobasidium pullulans*、*Diaporthe* spp. および *Colletotrichum* spp. が高頻度で分離された。メタゲノム解析では、186 種が検出された。高頻度で検出されたのは *A. pullulans* で、次いで *Papiliotrema flavescens* であり、これらの菌類は北大で健全に生育するセイヨウトネリコ生葉の内生菌群集における優占種と示唆された。他の樹種やノルウェー産のセイヨウトネリコとの比較によって、北大産セイヨウトネリコの内生菌類相および葉圏菌類相が特徴付けられた。

② 葉圏菌類の *H. fraxineus* に対する拮抗作用

Aureobasidium pullulans およびその他の内生菌と *H. fraxineus* の対峙培養の結果、*Diaporthe pseudomangiferae* は *H. fraxineus* の菌糸伸長を強く抑制した。また、内生菌の浸出物を含む寒天培地上での子嚢胞子発芽試験では、*A. pullulans*、*Colletotrichum fioriniae*、*Talaromyces marneffei* の浸出物が *H. fraxineus* の子嚢胞子の発芽を阻害した。*Aureobasidium pullulans* の細胞懸濁液と培養濾液を処理したセイヨウトネリコの生葉上での子嚢胞子発芽試験では弱い発芽抑制効果が認められた。

③ *Hymenoscyphus fraxineus* の植物組織への侵入・定着に対する *A. pullulans* の影響

定量 PCR では、被接種植物の核リボソーム DNA 外部転写スペーサー（ETS）領域を指標とした相対菌体 DNA 量を求めた。その結果、接種 9 週間後までの *H. fraxineus* の相対菌体 DNA 量は処理区と未処理区の間で量的な違いや有意な傾向は認められなかった一方で、接種 18 週間後の試料において、無処理区よりも処理区での本菌の相対 DNA 量が顕著に少ない結果が認められた。この結果から、葉の老化に伴い組織内で *H. fraxineus* が活動を開始する時期になると、*A. pullulans* の定着による何らかの生育抑制効果が発揮された可能性が示唆された。

（3）発病回避機能を高めている諸要因の検討

① *Hymenoscyphus fraxineus* とトネリコ属植物との宿主 - 寄生者相互関係

調査した 8 種 10 個体全ての複葉と落葉葉軸から本菌の DNA が検出された。その一方で、落葉後の葉軸上で子実体形成が確認された樹種は 4 種であった。このことから、*H. fraxineus* が複葉内に内生的に侵入・定着しても、その後、腐生的に活動した後に子実体を形成して子嚢胞子による感染を繰り返し得る宿主樹種は限定的であり、*H. fraxineus* との相互関係は植物種によって異なることが明らかとなった。また、代表的な東アジア産樹種と欧米産樹種について *H. fraxineus* の菌体 DNA 量を経時的に定量した結果、病徴を示している樹種間や、同樹種でも状態の異なる個体間では、複葉内の菌体量や拳動パターンには違いがあった。ヤチダモでは Inoue et al. (2018) の報告同様、落葉期に菌体量が急速に増加し、枝枯れ症状が見られた森総研北のピロードトネリコでも同様の傾向が見られた。一方、北大構内のセイヨウトネリコ他無病徴の外国産トネリコ類では *H. fraxineus* の子嚢胞子が飛散する夏に比べて落葉期になっても菌体量が殆ど増加しないか検出されず、植物体内で *H. fraxineus* の増殖が抑制されていることが示唆された。なお、子嚢胞子の飛散時期前のサンプルからも *H. fraxineus* が検出されたことから、枝部組織内に生息していた菌が、春に展開した葉内に伸展し定着している可能性が示唆された。今後、本菌が子嚢胞子によって複葉へ侵入・定着した後の、枝部への伸展と定着の有無について、接種試験および野外採集試料を用いた調査が必要である。

②北海道大学札幌キャンパス内に植栽されたトネリコ類の発病モニタリング

調査期間中、北大構内で植栽されたセイヨウトネリコ、ピロードトネリコおよびヤチダモの供試木、ならびにその樹下に更新している実生について発病状況を調査した結果、枝枯れや立ち枯れの症状は見られず、実生についても多数が無発病状態で生残していることを確認した。また、北大の試験地ではセイヨウトネリコ落葉葉軸上での子嚢盤形成が少ない可能性が示唆された。

③トネリコ類と共存する他樹種の内生菌類相

ナナカマドの外樹皮より子嚢菌エンドファイト 42 菌株を単離した。5.8srDNA を含む ITS 領域の塩基配列に基づく分子系統解析の結果、*H. fraxineus* の拮抗菌である *Diaporthe* 属菌 3 種 3 系統を得た。

(4) まとめ

本研究により、北海道で現在生存しているセイヨウトネリコは、*H. fraxineus* の子嚢胞子による感染は受けるが、その後の植物細胞、組織内での本菌の菌糸生長を抑制していることがわかった。また、この菌糸成長の抑制にはセイヨウトネリコに生息する *Aureobasidium pullulans* や *Diaporthe pseudomangiferae* などの葉圏菌類が関与していることが強く示唆された。

本菌の子嚢胞子は、dieback を発病しない抵抗性のヤチダモにも侵入可能であり、ヤチダモが緑の葉を維持している間は組織内で増殖することなく、落葉期になると一気に増殖することが確認されている (Inoue et al. 2018)。北海道で生存しているセイヨウトネリコ上でも本菌が同様に感染はするものの、その後の菌糸生長がヤチダモ同様或いはそれ以上に抑制され则认为られる。

北大構内で採取し、筑波大学構内で栽培した 2 年目以降のセイヨウトネリコ苗を供試した実験でも、同様に植物細胞、組織内での本菌の菌糸生長抑制効果が確認できたことから、これらの葉圏菌類が、苗に定着しているのか、日本の広い範囲に分布していて毎年容易に感染可能なのか今後調査する必要がある。今回の調査地内のナナカマドから、セイヨウトネリコから分離され本菌に拮抗作用を有する菌が検出されたことから、これらの内生菌類が少なくとも北海道では複数の樹種を利用していると考えられる。

北大構内では、少数ではあるが第 2 世代以降のセイヨウトネリコの個体が生存していること、毎年高密度で本菌の子嚢胞子に暴露されている状況下でも生き残っていることを考えると、何らかの抵抗性を有する個体が選抜されている可能性もあると考える。

今後、実験環境の条件検討を行うとともに、*A. pullulans* の培養濾液についても苗木を用いた in planta 試験を行い、*H. fraxineus* の定着量について検討すると同時に、北海道で健全に生育するセイヨウトネリコの抵抗性についてさらに調査する必要がある。

< 引用文献 >

- Drenkhan R, Hanso M (2010) New host species for *Chalara fraxinea*. New Disease Reports 22: 16.
- Gross A, Hosoya T, Queloz V (2014) Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Molecular Ecology 23: 2943–2960.
- Harper AL, McKinney LV, Nielsen LR, Havlickova L, Li Y, Trick M, et al. (2016) Molecular markers for tolerance of European ash (*Fraxinus excelsior*) to dieback disease identified using Associative Transcriptomics. Scientific Reports 6: 19335.
- Hosoya T, Otani Y, Furuya K (1993) Materials for the fungus flora of Japan. Trans Mycological Society of Japan 34: 429–432.
- Inoue T, Okane I, Ishiga Y, Degawa Y, Hosoya T, Yamaoka Y (2018) The life cycle of *Hymenoscyphus fraxineus* on Manchurian ash, *Fraxinus mandshurica*, in Japan. Mycoscience 60: 289–294.
- Kirisits T, Matlakova M, Mottinger-Kroupa S, Halmschlager E, Lakatos F (2010) *Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*). Plant Pathology 59: 411.
- Zhao YJ, Hosoya T, Baral HO, Hosaka K, Kakishima M (2012) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. Mycotaxon 122: 25–41.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岡根泉・山岡裕一
2. 発表標題 Hymenoscyphus fraxineusとトネリコ属植物との宿主 - 寄生者相互関係
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ichimura, R., Okane, I., Tamai, Y., Ishiga, Y. and Yamaoka, Y.
2. 発表標題 Endophytic fungal flora in the living leaves of Fraxinus excelsior healthily growing in Hokkaido, Japan.
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2019 (AMC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katho, S., Okane, I., Tamai, Y., Yamaguchi, T., Yamaoka, Y. and Ishiga, Y.
2. 発表標題 Behavior of Hymenoscyphus fraxineus in the leaves of four foreign ash species (Fraxinus spp.) in Hokkaido, Japan.
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2019 (AMC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市村理恵子・岡根 泉・玉井 裕・石賀康博・Halvor Solheim・山岡裕一
2. 発表標題 セイヨウトネリコの内生菌とHymenoscyphus fraxineusの相互作用
3. 学会等名 日本菌学会第65回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山正登・玉井 裕・重富顕吾・佐野 雄三
2. 発表標題 ナナカマド樹皮組織の内生菌叢解析
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamaoka, Y.
2. 発表標題 How does Hymenoscyphus fraxineus, a pathogen of Ash dieback live in Japan?
3. 学会等名 The 13th Japan-China-Korea International Postgraduate Academic Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	玉井 裕 (Tamai Yutaka) (50281796)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	石賀 康博 (Ishiga Yasuhiro) (50730256)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	
研究分担者	岡根 泉 (Okane Izumi) (60260171)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ノルウェー	Norwegian Institute	of Bioeconomy Research	