

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380079

研究課題名(和文) アジア地域における *Raffaelea* 属菌の分類学的検討と病原性に関する比較研究研究課題名(英文) Comparative studies on taxonomic and pathogenicity of *Raffaelea* groups in Asia

研究代表者

伊藤 進一郎 (Ito, Shin-ichiro)

三重大学・生物資源学研究科・招へい教授

研究者番号：90092139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：1980年以降、日本ではブナ科樹木に萎凋枯死が発生し、被害は拡大している。この被害は、カシノナガキクイムシが伝搬する *Raffaelea quercivora* によって発生することが明らかとなった。本研究では、アジア地域でカシノナガキクイムシ科昆虫に随伴する *Raffaelea* 属菌を調べ、それらの病原性を明らかにすることを目的とした。その結果、タイ、ベトナム、台湾で採集したカシノナガキクイムシ科昆虫からは *Raffaelea* 属菌類が検出された。それらの菌類は、ミズナラに対して親和性があること、またタイの1菌株がミズナラに対して病原性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Japanese oak wilt has been obvious and expanded since 1980's. The damage is caused by *Raffaelea quercivora* carried by *Platypus quercivorus*. The aim of this project was to collect Platypoidae insects and their accompanying fungi around Asian countries, and to clarify pathogenicity of isolated fungi. Raffaelean fungi were isolated from Platypoidae insects in Thailand, Vietnam and Taiwan. From inoculation test, it is clear that isolated fungi have affinity to *Quercus crispula* and one isolate from Thailand has pathogenicity against *Quercus crispula*.

研究分野：森林保護

キーワード：ブナ科樹木 萎凋病 カシノナガキクイムシ *Raffaelea*属菌類 親和性 病原性

1. 研究開始当初の背景

ナラ類 (*Quercus* spp.) は、世界の森林を構成する主要な樹種であるとともに、重要な森林資源である。1980 年以降、世界各地でナラ類が衰退、枯死する被害が大きな問題となってきた。日本でも、1980 年以降日本海側の地域でナラ類 (主にミズナラとコナラ) が集団的に枯死する被害が拡大して社会問題となっている。代表者らによって、被害は養菌性のカシノナガキクイムシ (*Platypus quercivorus*; 以下、カシナガ) によって伝播される新種の病原菌 (*Raffaelea quercivora*) によって発生することが病理学的に明らかにされた。この被害は、養菌性キクイムシが関与した世界で最初の森林被害である。代表者らが本種を新種として報告した時点では、11 種の *Raffaelea* 属菌が記載されていたが、それらはいずれも腐生的な菌類として報告されており、今回の被害はこの分類群による世界で初めての樹木の萎凋枯死被害でもある。それ以降、2003 年頃に韓国ソウル市周辺でナラ類が枯死する被害が発生し、*P. koryoensis* が伝播する *R. quercus-mongolicae* による被害であることが示唆されたが、病理的な検証はなされていない。アメリカでは、クスノキ科の樹木において *Xyleborus glabratus* が伝播する *R. lauricola* によって枯死することが、病理学的に明らかにされた。さらにポルトガルでは、コルクガシ (*Quercus suber*) が *P. cylindrus* によって伝播される *Raffaelea* sp. によって衰退・枯死しており、現在菌の同定が行なわれている。最近も腐生的な *Raffaelea* 属の菌類が報告されているが、その分類には大きな混乱が見られ、*Raffaelea* 属の菌類を早急に再検討する必要性がある。

これまでに、代表者らが行なってきた「養菌性キクイムシが伝播する菌類による樹木の衰退・枯死に関するアジアでの緊急調査」の中で、次のことが明らかになってきた。

- * タイでは、常緑性ナラ類の林分において、カシナガがトラップされ、それらが穿入した材部から *Raffaelea* 属菌が分離された。分離された菌類は、遺伝的に *R. quercivora* に類似しており、予備的な接種試験の結果、日本のミズナラに対して病原性を示した。
- * 中国とベトナムとの国境付近の天然林において、常緑性のナラ類の枯死や枝枯れ被害が発生していることが明らかとなった。調査の結果、枯死木には *Platypus* 属の昆虫が穿入しており、坑道から *Raffaelea* 属菌が検出された。
- * マレーシアのナラ類の林分とアカシア属樹木の造林地で *Platypus* 属の昆虫がトラップされ、それらの穿入が確認された。
- * フィリピンでは、ナラ類の林分で *Platypus* 属昆虫がトラップされ、それらの穿入が確認された。

さらに、アジア地域の各国の研究者から下記の情報を得た。

- * 台湾では、国立公園内でナラ類が衰退・枯

- 死しており、キクイムシ類の穿入がある。
- * ラオスの造林地で、キクイムシ類が穿入した樹木の被害が発生している。
- * ネパールで、キクイムシ類が穿入したナラ類の衰退 (枯死) が発生している。
- * インドネシアで、*Raffaelea* 属菌と近縁の菌類により樹木に萎凋症状が発生している。

2. 研究の目的

1980 年以降、我が国におけるブナ科樹木の萎凋病によるナラ類の枯死被害は 31 府県に拡大している。この被害は、カシノナガキクイムシが伝播する病原菌 *R. quercivora* によることが代表者らの研究から判明した。本研究では、現在までに採集された、あるいは今後の調査で採集される *Raffaelea* 属菌の日本と海外のナラ類に対する病原性の比較、分類に混乱のある *Raffaelea* 属菌の形態学的、分子遺伝学的な検討、考察を加えることを目的とする。以上より、*Raffaelea* 属菌の分類体系を整理し、アジア各地の菌株の病原性を明らかにすることによって、アジア地域における今後の被害の拡大を予察し、防除に対する検討を可能にする。

3. 研究の方法

(1) アジア地域で採集された *Raffaelea* 属菌の病原性の検討

(1)-1 モンゴリナラに対する *Raffaelea quercus-mongolicae* の病原性の評価

モンゴリナラに対する *R. quercus-mongolicae* の病原性を評価するため、2012 年 7 月 3、4 日に韓国ソウル市の Korea Forest Research Institute において自生するモンゴリナラ成木の枝と実生にそれぞれ *R. quercus-mongolicae* の 1 点接種、多点接種を行った。1 点接種では、成木 17 個体由来の各個体枝 2 本計 34 本を供試し、多点接種では 10m 以内に自生する 16 対の実生計 32 個体を供試した。1 点接種では、枝直径 8 mm の部位にあけた直径 1.4 mm、深さ 3.5 mm の穴をあけ、そこに *R. quercus-mongolicae* を蔓延させた爪楊枝の先端を埋め込み、パラフィルムとガムテープで巻いた。対照として滅菌した爪楊枝を用い、同成木個体に接種枝と対照枝それぞれ 1 本ずつとなるように接種を行った。多点接種では、同様に接種を行ったが、接種点は実生の幹直径 8 mm の部位とそこから軸方向に 5 mm の部位に、3 列に 4 か所ずつあけた直径 1.4 mm、深さ 3.5 mm の穴計 12 か所とし、接種木と対照木が対になるよう接種を行った。接種後は病徴観察を行い、1 点接種では接種 8 週間後に供試枝を、多点接種では接種 5 週間後に供試実生を採取し、1% 酸性フクシン水溶液に 12 時間以上浸漬した。その後、非通水域の割合の算出した。

(1)-2 タイ北部で採取された *Raffaelea* 属菌のミズナラ苗木に対する病原性

タイ北部で採取された *Raffaelea* 属菌 3 菌株

のミズナラに対する病原性を評価するため、三重大学人工気象室内において、ミズナラ苗木に対し、タイ北部で採取された *Raffaelea* 属菌 3 菌株 (RTH6, RTH74, RTH136) と *R. quercivora* 1 菌株を用いた多点接種を行った (1 次試験)。さらに、供試した菌株のうちタイ菌株 1 菌株と *R. quercivora* 1 菌株を用いて、再度ミズナラ苗木に対する多点接種と 1 点接種を行った (2 次試験)。両試験とも、多点接種では、苗木の幹直径 8 mm の部位とそこから軸方向に 5 mm の部位に、1 列に 4 か所ずつ直径 1.4 mm、深さ 3.5 mm の穴を 12 か所あけた。それらの穴に *R. quercivora* を蔓延させた爪楊枝の先端を埋め込み、パラフィルムとガムテープで巻いた。対照木には、滅菌した爪楊枝を用い、各菌株接種木 20 個体、対照木 20 個体を供試した。1 点接種では、苗木の幹直径 8 mm の部位にあけた直径 1.4 mm、深さ 3.5 mm の穴に同様に接種を行った。いずれの接種においても病徴観察を行い、枯死個体は枯死直後に、生残個体は接種 1 か月後に採取し、1% 酸性フクシン水溶液に 12 時間以上浸漬した。その後、非通水域の割合を算出した。

(1)-3 4 か国で採取された *Raffaelea* 属菌のミズナラ苗木における定着

2014 年 5 月 9 日、ミズナラ苗木に対して 4 菌株 (タイ、ベトナム、台湾、韓国) を接種した。苗木の直径 8 mm の部位に接種孔 (直径 1.4 mm、深さ 3.5 mm) を 1 点あけ、そこに接種源を埋め込み、パラフィルムとガムテープを巻いた。接種 2 週間後、各個体の根元を切断し、採取を行った。採取した個体は、1% 酸性フクシン水溶液に 12 時間以上浸漬し、接種点横断面における非通水域の割合を算出した。接種点から上部 1 cm までの箇所と接種点上部 4-5 cm の箇所から分離片を 10 片作成し、再分離試験を行った。

(2)世界の *Raffaelea* 属菌に関する情報の収集

(2)-1 キクイムシ類昆虫と *Raffaelea* 様菌株の探索

アジア圏における病原菌 (*Raffaelea* 属菌) と養菌性キクイムシ類昆虫の分布実態を明らかにするために、タイ、インドネシア、中国、台湾、ベトナムのブナ科の森林を探索した。アジア圏における *Raffaelea* 属菌と養菌性キクイムシの分布実態を明らかにするために、タイ、インドネシア、中国、台湾、ベトナムのブナ科の森林を探索した。タイは 4-5 月と 8-9 月、11-12 月、3 月の各年度 4 回 (ただし、2013 年度は 3 月を除く 3 回、2014 年度は 8-9 月と 11-12 月の 2 回)、その他の国は年 1-2 回の探索調査を実施した。養菌性キクイムシの捕獲のため、簡易ペットトラップ 10 基をタイでは 3 林分、その他の国では 1 林分に設置し、平均 3 回程度回収した。帰国後、捕獲されたナガキクイムシ科とキクイムシ科の昆虫、それらが穿入した材部 (坑道とその周辺) から

菌の分離を行った。

(2)-2 中国重慶市のシイ類衰退現象に関わる要因

中国重慶市において、2006 年頃からシイ類樹木の衰退・枯死が認められるようになった。被害木は先端部が枯れ下がり、樹冠全体の葉量が徐々に減少して衰退し、やがて枯死する。中国国内にはシイ属は 64 種自生するが、被害の認められる樹種は中国南部に広く分布する *Castanopsis fargesii* および *C. carlesii* var. *supinulosa* の 2 種のみである。同様の被害は寧波でも確認されており、各地で潜在的に被害が発生していると推測されるが、その原因は不明である。本研究では、中国で発生しているシイ類の衰退現象に関わる要因を明らかにするために、重慶市の被害林分 (調査地は、重慶市中心から 35 km 北西に位置する重慶市縉雲山国家級自然保護区内の北緯 29°50'08.4", 東経 106°22'45.1", 標高 800 m に位置する) におけるシイ類の地上部、特に枝葉と幹の健全性と、病原菌の関与の有無、根の健全性、土壌の物理性および化学性の調査を行った。

4. 研究成果

(1)アジア地域で採集された *Raffaelea* 属菌の病原性の検討

(1)-1 モンゴリナラに対する *Raffaelea quercus-mongolicae* の病原性の評価

供試した 50% 以上の枝と実生から本菌が再分離された。このことから、*R. quercus-mongolicae* はモンゴリナラに定着することが可能であると証明された。枯死した枝や実生は観察されず、両接種とも接種部付近でのみ通水阻害が確認された。本菌の接種枝における非通水域の割合と材変色長は、対照のものに比べ有意に大きかった (対応のある t 検定, $p < 0.05$, 図 1)。以上のことから、モンゴリナラに対する *R. quercus-mongolicae* の病原性を証明することはできなかったが、本菌はモンゴリナラに対して材変色と通水阻害を引き起こすことが可能であることが示唆された。

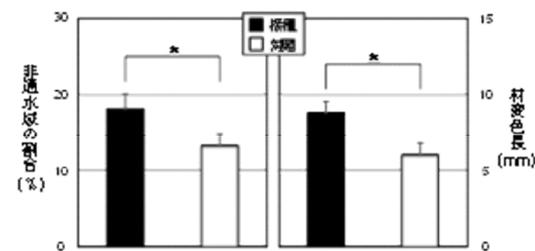


図 1. モンゴリナラ枝における非通水域の割合と材変色長

バーは、平均値 (非通水域の割合: $n=5$, 材変色長: $n=11$) + SE を示す。アスタリスクは処理間に有意差があったことを示す。

(1)-2 タイ北部で採取された *Raffaelea* 属菌の

ミズナラ苗木に対する病原性

1次試験において、RTH74と*R. quercivora*接種木の枯死率は対照木に比べ有意に高かった（Fisherの正確確率検定、 $p < 0.05$ 、データ示さず）。さらに、それらの枯死木では、接種部付近より上部で通水が停止していた。それら2菌株を用いた2次試験の多点接種では、*R. quercivora*接種木の枯死率は対照木に比べ有意に高かったが（Fisherの正確確率検定、 $p < 0.05$ 、図2）、タイ菌株接種木と対照木との間に有意差は認められなかった。また、生残木における通水域の割合は両菌株とも対照木に比べ、有意に高かった（図2）。1点接種では、非通水域の割合と材変色長とも、*R. quercivora*接種木と対照木との間でのみ有意差が認められた（t検定、 $p < 0.05$ 、データ示さず）。以上のことから、タイ北部にはミズナラに対する病原性を有する*Raffaelea*属菌が存在する可能性が指摘された。

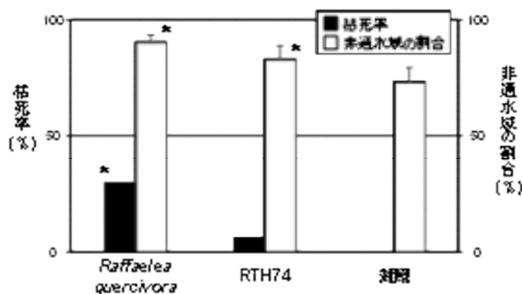


図2. 2次試験の多点接種における枯死率と非通水域の割合

いずれも $n=20$ 、ただし RTH74 では $n=15$ である。非通水域の割合は、平均値 + SD を示す。アスタリスクは対照木と有意に異なったことを示す。

(1)-3 4 国で採取された *Raffaelea* 属菌のミズナラ苗木における定着

再分離試験の結果、いずれの菌株においても、供試した 80% 以上の個体から各 *Raffaelea* 属菌が再分離された。また、すべての菌株において、接種点から上部 1 cm までの箇所からのみ再分離が確認された。また、対照木からは分離されなかった。以上のことから、タイとベトナム、台湾、韓国のいずれの国で採取された *Raffaelea* 属菌株であっても、ミズナラに定着可能であるが、その範囲は接種部付近に限定されることが示唆された。また、そのうちベトナムの菌株においては通水障害を引き起こす能力を有している可能性が指摘された。

(2)世界の *Raffaelea* 属菌に関する情報の収集

(2)-1 キクイムシ科昆虫と *Raffaelea* 様菌株の探索

タイでは、毎回ナガキクイムシ科昆虫が捕獲され、それらまたはそれらが穿入した材部から *Raffaelea* 様の菌が分離された（表1）。インドネシアは、2012-2013 年度に調査を

実施し、2012 年度に材部から *Raffaelea* 様菌株が得られた。中国では、ナガキクイムシ科甲虫が捕獲されたが、4 年間ともそれらと材部からは *Raffaelea* 様菌は検出されなかった。台湾は 2011 年を除き、虫または材部から *Raffaelea* 様菌が検出された。ベトナムでの調査は 2011-2013 年度に実施し、2013 年度を除き、虫または材部から *Raffaelea* 様菌が検出された。

調査したいずれの国においても、ナガキクイムシ科昆虫が捕獲された。このことは、東南アジアに本昆虫が広く分布することを示唆している。検出された多くの *Raffaelea* 様菌はナガキクイムシ科の昆虫から分離された。そのため、地理的分布に関わらず、ナガキクイムシ科昆虫と *Raffaelea* 属菌の間には、共生関係が構築されていた可能性がある。

表1. *Raffaelea* 様菌株の取得

	2012	2013	2014
タイ	○	○	○
インドネシア	○	×	-
中国	×	×	×
台湾	○	○	○
ベトナム	○	×	-

捕獲されたナガキクイムシ科甲虫またはその穿入材部から *Raffaelea* 様菌株が取得されたものを○で示し、調査を実施したが、その捕獲または菌株の取得ができなかったものを×、調査を実施していないものは-で示した。

(2)-2 中国重慶市のシイ類衰退現象に関わる要因

枝葉の健全性と衰退度には関連がなく、枝枯れは衰退の原因ではなく根または幹の障害の結果として見られる現象と考えられた（表2）。穿孔性甲虫の坑道も認められたが、幹の変色・腐朽面積、特に辺材周辺部における変色・腐朽と衰退度には関連があったことから、辺材腐朽による病害である可能性が考えられた。また、地際より胸高部での腐朽率が高いことから、根株腐朽の可能性は低いと考えられた。

表2. 各調査個体の衰退度と胸高横断面における変色、腐朽および空洞の面積割合

	衰退木			健全木
	D-1	D-2	D-3	H-1
個体番号	D-1	D-2	D-3	H-1
衰退度	3	2	4	1
変色率	11.7	63.7	23.8	4.8
腐朽率	2.2	39.9	4.0	0.2
空洞率	0	4.8	0	0.04

根の健全性調査より、衰退木では根重量、根端数ともに減少していることが認められた（表3）。土壌の物理性調査では、衰退木の

周囲では、土壌が堅密で孔隙が少ない傾向が見られた。土壌の化学性調査では、衰退木の周囲で pH が低く、可給態の元素が増加していた。これらの結果から、土壌密度が高くなり堅密化することにより根が成長不良になったため、根の衰退が先行して地上部の衰退を引き起こしている可能性が考えられる。

表 3. 調査木の根における根端数と菌根形成率

衰退度	根端数 (L)	菌根形成率 (%)
1	3100	46.4
2	1740	27.8
3	1490	25.0
4	631	19.0

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 29 件)

Torii M, Matsuda Y, Ito S (2014) Extent of colonization by *Raffaelea quercivora* of artificially inoculated living and gamma-ray-sterilized seedlings of two Japanese and three American oak species. *Forest Pathology* 44: 117-123, 査読有, doi: 10.1111/efp.12075

Torii M, Matsuda Y, Seo ST, Kim KH, Ito S, Moon MJ, Kim SH, Yamada T (2014) The effect of *Raffaelea quercus-mongolicae* inoculations on the formation of non-conductive sapwood of *Quercus mongolica*. *Mycobiology* 42: 210-214, 査読有, doi: 10.5941/MYCO.2014.42.2.210

Braun U, Crous PW, Nakashima C (2014) Cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) 2. Species on monocots (Acoraceae to Xyridaceae, excluding Poaceae). *IMA Fungus* 5: 203-390, 査読有, doi: 10.5598/imafungus.2014.05.02.04

Matsumura E, Fukuda K (2013) A comparison of fungal endophytic community diversity in tree leaves of rural and urban temperate forests of Kanto District, eastern Japan. *Fungal Biology* 117: 191-201, 査読有, doi: 10.1016/j.funbio.2013.01.007

Matsuda Y, Takano Y, Shimada M, Yamanaka T, Ito S (2013) Distribution of ectomycorrhizal fungi in a *Chamaecyparis obtusa* stand at different distances from a mature *Quercus serrata* tree. *Mycoscience* 54: 260-264, 査読有, doi: 10.1016/j.myc.2012.09.019

Obase K, Matsuda Y, Ito S (2013) *Enkianthus campanulatus* (Ericaceae) is commonly associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23: 199-208, 査読有, doi: 10.1007/s00572-012-0462-y

鳥居正人・松下知世・松田陽介・伊藤進一郎 (2012) *Raffaelea quercivora* の接種による外国産コナラ属 1 樹種の枯死。樹木医学

研究 16: 119-122, 査読有, <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009594865>

Seo MY, Matsuda Y, Nakashima C, Ito S (2012) Taxonomic re-evaluation of *Raffaelea quercivora* isolates collected from mass mortality of oak trees in Japan. *Mycoscience* 53: 211-219, 査読有, doi: 10.1007/s10267-011-0154-z

[学会発表](計 48 件)

鳥居正人・松田陽介・伊藤進一郎 (2015) *Raffaelea quercivora* 菌株間のミズナラに対する病原力と樹木細胞壁分解に関わる酵素活性の差異。第 126 回日本森林学会大会, 北海道大学(札幌市), 2015/3/28

Torii M, Matsuda Y, Ito S (2014) Hyphal growth of *Raffaelea quercivora* within inoculated living and gamma-ray-sterilized seedlings of two Japanese and three American oak species. XXIV IUFRO World Congress, Salt Palace Convention Center, アメリカ合衆国(ソルトレイク), 2014/10/5

Torii M, Matsuda Y, Buranapanichpan S, Ito S (2014) Pathogenicity of three *Raffaelea* spp. isolates collected in northern Thailand against *Quercus crispula* seedlings. XXIV IUFRO World Congress, アメリカ合衆国(ソルトレイク), 2014/10/5

Torii M, Matsuda Y, Seo ST, Kim KH, Ito S, Moon MJ, Kim SH, Yamada T (2014) Is *Raffaelea quercus-mongolicae* a causal fungus contributing mass mortality of *Quercus mongolica* trees?. 3rd Korea-Japan Joint Symposium on Plant Pathology, Pukyong National University, 韓国(釜山), 2014/10/22

Torii M, Matsuda Y, Ito S (2014) Comparisons of virulence and hyphal growth within *Quercus crispula* trees among four *Raffaelea quercivora* isolates. 5th Asian Conference on Plant Pathology (ACPP2014), Empress Convention Center, タイ王国(チェンマイ), 2014/11/3

鳥居正人・松田陽介・Seo ST・Kim KH・伊藤進一郎・Moon MJ・Kim SH・山田利博 (2014) モンゴリナラに対する *Raffaelea quercus-mongolicae* の多点・1 点接種試験。第 125 回日本森林学会大会, 大宮ソニックシティ(大宮市), 2014/3/27

鳥居正人・松田陽介・伊藤進一郎 (2013) 樹木の組織構造が *Raffaelea quercivora* 菌糸の伸展に与える影響。第 124 回日本森林学会大会, 岩手大学(盛岡市), 2013/3/26

鳥居正人・長尾美咲・内山 潔・森 豊・松田陽介・伊藤進一郎 (2013) *Raffaelea quercivora* 菌株間のミズナラに対する病原力の差異とタンナーゼ, ラッカーゼ活性。第 3 回中部森林学会大会, 岐阜大学(岐阜市), 2013/10/19

鳥居正人・長尾美咲・内山 潔・森 豊・松田陽介・伊藤進一郎 (2013) *Raffaelea*

quercivora 菌株間のミズナラに対する病原
力と材内における菌糸伸長量の比較. 樹木
医学会第 18 回大会, 日本大学(藤沢市),
2013/11/24

Matsuda Y, Torii M, Yamada T, Ito S (2012)
Lessons from fungal inoculation experiments:
How oak trees wilt and die by the infection of
Japanese oak wilt pathogen?. International
Symposium on Oak Forest Preservation,
Korea Forest Research Institute, 韓国(ソウ
ル), 2012/8/27, 招待講演

〔図書〕(計 2 件)

福田健二(2014)樹木の成長様式と構造.
(堀大才編:樹木診断調査法,講談社)
p12-43(著書), 351p

福田健二(2014)樹木の生理(日本緑化
センター編:最新・樹木医の手引き,日
本緑化センター)p132-155, 700p

〔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

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/junkan/busshitsu/lab2/oak.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 進一郎 (ITO Shin-ichiro)
三重大学・生物資源学 研究科・
招へい教授
研究者番号: 90092139

(2) 研究分担者

福田 健二 (FUKUDA Kenji)
東京大学・新領域創成科学研究科・
教授
研究者番号: 303208954

中島千晴 (NAKASHIMA Chiharu)

三重大学・大学院生物資源学 研究科・
准教授
研究者番号: 20378318

松田 陽介 (MATSUDA Yosuke)

三重大学・大学院生物資源学 研究科・
准教授
研究者番号: 30324552