

令和元年6月17日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04948

研究課題名(和文) イメージング技術を用いた南根腐病による樹木枯死メカニズムの生理学・組織学的解明

研究課題名(英文) Physiological and anatomical elucidation of the mechanism of tree death caused by root rot disease using several imaging techniques

研究代表者

矢崎 健一 (Yazaki, Kenichi)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：30353890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：小笠原地域で被害が拡大している南根腐病による樹木枯死メカニズムの解明のため、実験的に実生を罹病させた。根系に存在する菌の顕微鏡イメージより病気の進行を定義し、病気の進行と葉の生理特性や根の機能との関係を、生態的特性の異なるアカギとシャリンバイとで比較した。その結果、病気の進行に対し、葉の萎凋や顕著な根の枯損がみられる前に、根系の機能阻害と同時に気孔の閉鎖や光合成系の損傷が発生していた。また、種によって病気ストレスを回避する反応が異なっていた。この結果は、野外における南根腐病を地上部の反応から早期に発見することにつながるといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小笠原・沖縄で甚大な被害を及ぼしている南根腐病の枯死について、樹木病理学の観点から調査を行った。その結果、水分欠乏による葉の萎凋・枯損よりも先に、葉で多くの生理的なストレスが発生していることが示された。このことは、病気の早期発見の手法開発にも繋がるといえる。また、小笠原での野外調査において多くのプロットで南根腐病が進行していることがわかり、本病害の対策の必要性を科学的に示した。

研究成果の概要(英文)：We have examined the physiological mechanisms of tree death caused by root rot disease, that have been expanded in the Bonin Islands, using the potted seedlings with artificial inoculation of *Pyrrhoderma noxium*. Along with the index of damage based on the microscopy images of invaded mycelia in the root tissues of potted seedlings, we investigated the response of several leaf physiological traits and the root function to the disease progress in two woody plant species with contrasting leaf economical strategies, *Bischofia javanica* and *Raphiolepis umbellate*. In both species, the depression of stomatal opening, photosynthesis and root function was found in the initial stages before the visible leaf damage and root decay, although the intrinsic mechanism of photosynthetic damage were different between species. This fact will be contribute to rapid detection of root rot diseases by field survey in the visible above-ground parts.

研究分野：樹木生理学

キーワード：蛍光染色 南根腐病 気孔反応 クロロフィル蛍光 通水特性 小笠原

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

南根腐病は、担子菌類である *Pyrrhoderma noxium* (*Phellinus noxius*) を病原とする樹木の病害で、樹木の根に感染することで、葉の変色や枝枯れを引き起こし、やがて枯死に至らしめる。熱帯地方に広く分布し、大規模な集団枯損を起こす病原菌で、我が国においては沖縄、南西諸島および小笠原諸島において被害が報告されている。街路樹、果樹園、林縁や乾燥性の立地で被害が顕著で、宿主を選ばない多犯性であることから、今後の被害の拡大が懸念されている。

意外なことに、南根腐病に罹病した樹木が枯死する病理学的なプロセスについて、ほとんど明らかになっていない。根が枯損することから、吸水が阻害される乾燥枯死と考えられていたものの、病理学的・生理学的な根拠はこれまで示されていない。従来、樹病病理学においては、葉の萎凋を病気の進行の指標の一つとみなされてきたが、水分欠乏ストレスと異なり、罹病木は水ポテンシャルが唐突に低下することが多いため、水ポテンシャル以外の病徴を指標とすることが妥当である。樹木が非生物・生物ストレスを受けた際、葉の気孔反応や光合成クロロフィル蛍光反応を調べることで植物体のストレス状態を評価することができる。同様に、各器官において通水コンダクタンス（水の通りやすさ）の変化を調べることで、水の流れから植物体の状態を診断することが可能である。以上より、病気の進行状態を把握できる適切な指標を定義し、各種生理特性変化との関係を調べることで、南根腐病の枯死メカニズムを明らかにするために必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、南根腐病による樹木の枯死メカニズムを生理学的・解剖学的に明らかにすることである。そのため、苗木への接種試験により南根腐病の病気の進行過程を解剖学的イメージング技術によって評価し、苗木の生理反応との関係を明らかにすることを目的とした。また、生理特性の種間の相違に基づき、脆弱性の違いの有無およびその要因を考察した。加えて、野外の被害地を継続的に調査することで、被害の拡大・収束状況を把握し、立地環境と病害進行との関係を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

●接種試験

P. noxium の系統 KPN92 をおがくず・米ぬか混合培地で培養し、約 1 リットルのプラスチックポットの底に 1.5cm 厚で敷き詰めたものを接種源とした。種子より育成したシャリンバイ (*Rhaphiolepis indica* var. *umbellata*、乾性低木) およびアカギ (*Bischofia javanica* var. *Blume*、湿性高木) の実生を、根を接種源に接触させて移植したものを供試木とした。供試木を人工光利用型ファイトトロン内で温度 28/23 度、湿度 60/70% (昼/夜)、日照時間 11 時間 (最大 PAR 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で育成した。毎日十分な灌水を行い、接種源が浸水しないようポット内の余剰な水を排出した。

●蛍光染色による *P. noxium* の樹体内進行のイメージング

定期的供試木を採取し、生理測定 (後述) を行った後、根より小片を採取し、ホルマリン固定して保存した。小片からクリオスタットで 20 μm 厚の切片を作成し、蛍光標識した小麦胚芽凝集素

(F-WGA) によって選択的に *P. noxium* 菌糸を染色した (図 1)。切片を蛍光顕微鏡で 460-490nm 励起で観察し、菌の進行状態を確認した。一個体より三箇所から採取した根の小片においてそれぞれ観察し、菌の進行状態にしたがってスコアを設定 (図 1 参照)、スコアの和をその個体の感染度 (Infection score, IS) と定義した (図 1)。

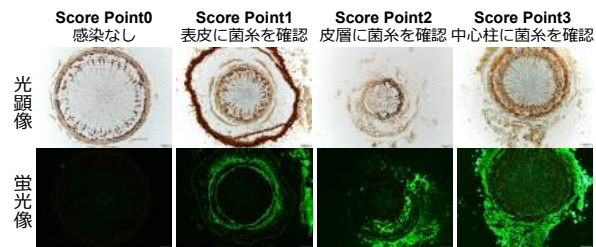


図1 F-WGAによる *P. noxium* の組織内局在観察およびスコア化
下段の蛍光像において、菌糸がF-WGAで染色され、緑色の蛍光を発している。

●葉の生理特性および水ポテンシャル

供試木の気孔コンダクタンスをポロメータ AP4 (Delta-T 社) で、クロロフィル蛍光を Mini PAM (Waltz 社) で定期的に測定した。クロロフィル蛍光の測定は暗順化後および日中に行った。測定後、測定葉を採取し凍結保存した。その後直ちに地上部を地際部で切断し、プレッシャーチャンバーで幹の水ポテンシャル (ψ) を測定した。凍結保存した葉を凍結乾燥後に粉碎し、ABA 濃度を測定した。また、葉への病徴が現れだした頃に、まだ萎凋していない個体の葉内 CO_2 -光合成特性 (A/C_i curve) を光合成測定装置 (Li-6400, Li-Cor 社) で測定し、最大光合成速度とカルボキシレーション効率を求めた。

●根の通水機能の評価

根全体を掘り出して洗浄し水で満たされたコップに浸漬、主根断面を水で満たされたチューブに接続した。根をコップごとプレッシャーチャンバーの加圧部に入れて 0.05-0.2MPa で加圧し、単位時間・圧力あたりに根系を通過する水の量を電子天秤で測定した。測定後、根に付着していた土や菌糸を全て取り除いてスキャンし、根の形態を根系解析ソフトウェア (Win Rhizo, Regent 社) で解析した。前述した通水量を細根 (<2.0mm 径) の表面積の総和で除することで、細根表面積あたりの根の透水コンダクタンス (K_r) を求めた。また、ポットの土壤中より

離脱した根を枯損部として回収、根の乾燥重量の総和と枯損部の乾燥重量の比より枯損率を算出した。

●野外調査

東京都小笠原村の父島・母島の計 46 カ所に 2013 年に設置したプロットにおいて、被害状況を継続して調査した。

4. 研究成果

接種後、アカギは約 20 日、シャリンバイは約 60 日で葉が萎凋し始めた個体がみられた(図 2)。感染度 (IS) は日数によって増加したが、アカギで増加が早かった (図 3)。このことからアカギの方が菌の侵入に対してより脆弱であるといえる。

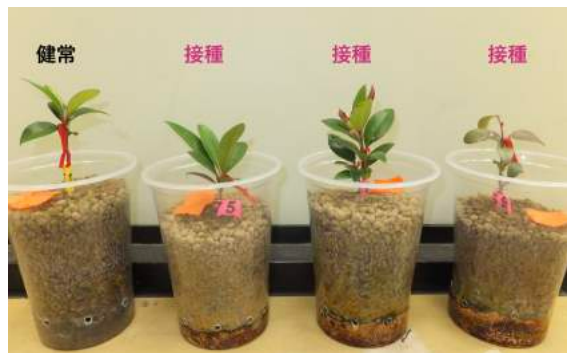


図2 接種から二ヶ月後のシャリンバイの状態
接種木において葉の萎凋や枯損がみられる。ポット下部の層が接種源で、根が接するように移植した。水はいずれも十分に与えた。

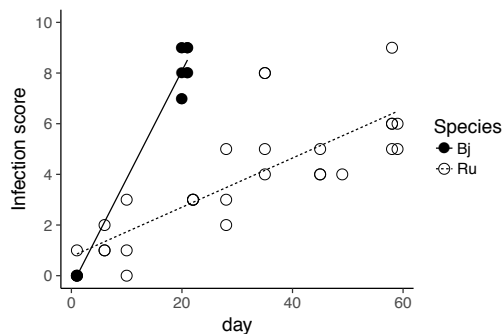


図3 病気の進行の種間差
実線はアカギ、破線はシャリンバイにおける、接種後の日数とIFとの関係を示す ($p < 0.05$)。Bj: アカギ、Ru: シャリンバイ

水ポテンシャルは IS とは関係が認められなかった一方、気孔コンダクタンス (相対値) は両樹種とも IS にともなって顕著に低下した (図 4)。アカギにおいては ABA の増加が認められた (図 4)。また、根の K_r は IS の増加と共に両樹種とも低下傾向にあったが、根の枯損はシャリンバイにのみ認められた (図 5)。これらのことから、シャリンバイは、主に根の枯損によって気孔が閉鎖する一方、アカギは ABA の増加と根の機能低下が気孔の閉鎖を引き起こすことが示唆された。

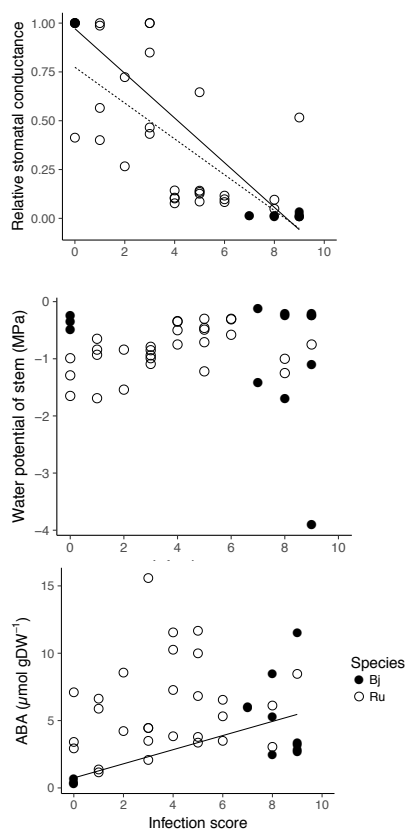


図4 感染度 (IF) と気孔コンダクタンス、水ポテンシャルおよびABA含量の変化
実線はアカギ、破線はシャリンバイにおける、IFとの関係を示す ($p < 0.05$)。気孔コンダクタンスは、個体間のばらつきが大きかったため、各個体毎の相対値 (測定値/測定期間中の最大値) で示した。Bj: アカギ、Ru: シャリンバイ。

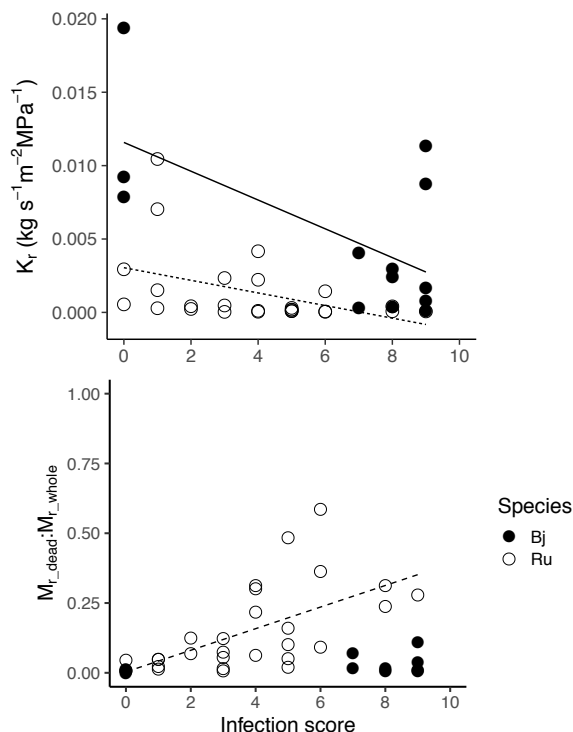


図5 感染度 (IF) と根の透水コンダクタンスおよび枯損率
実線はアカギ、破線はシャリンバイにおける、IFとの関係を示す ($p < 0.05$)。Bj: アカギ、Ru: シャリンバイ。

光合成速度は両樹種とも低下していたが、シャリンバイでより低下が顕著であった（図6）。この理由として、炭酸固定効率が低下していたこと、また光阻害を受けていたこと（ $F_v:F_m$ の低下、図7）が考えられた。アカギにおいてはNPQが増加していた（図7）ことから、病気の進行に対して余剰な光エネルギーを消費するための熱放散機能が働いたことが考えられた。

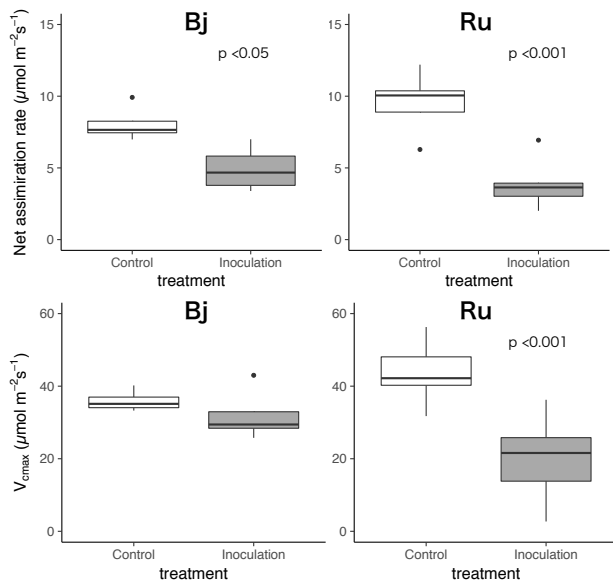


図6 最大光合成速度（上段）およびカルボキシレーション効率（ V_{cmax} 、下段）
最大光合成速度はCO₂濃度400ppm、飽和光にて測定した。 V_{cmax} は25度の値に換算した。接種（Inoculation）処理では、萎凋・枯損していない葉にて測定した。Bj: アカギ、Ru: シャリンバイ。

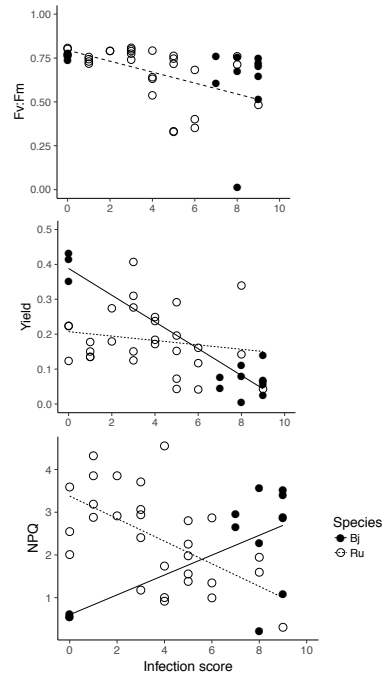
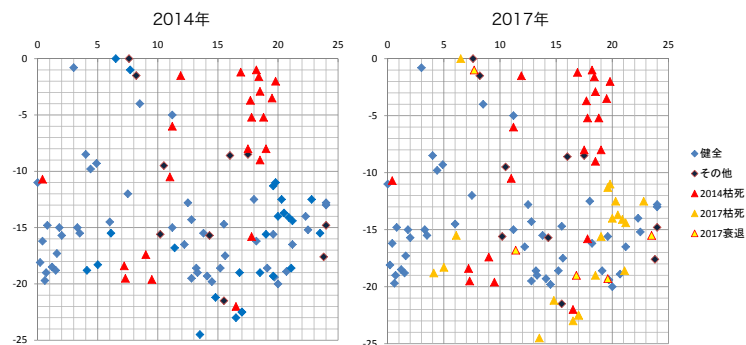


図7 感染度（IF）とクロロフィル蛍光パラメータ
上段より、 $F_v:F_m$ （光阻害の程度）、Yield（光化学系IIの電子伝達効率）およびNPQ（熱放散の程度）をそれぞれ示す。
実線はアカギ、破線はシャリンバイにおける、IFとの関係を示す（ $p < 0.05$ ）。Bj: アカギ、Ru: シャリンバイ。

野外においては、被害拡大地が46プロット中32プロットあり、被害は確実に進行しているといえる（図8）。しかしながら、南根腐病の拡大・収束を左右する明確な環境要因の差異は本研究では明らかにはならなかった。今後、より網羅的に各プロットにおいて微気象条件を評価する必要がある。

被害拡大地（父島大神山公園）



被害収束地（母島桑の木山）

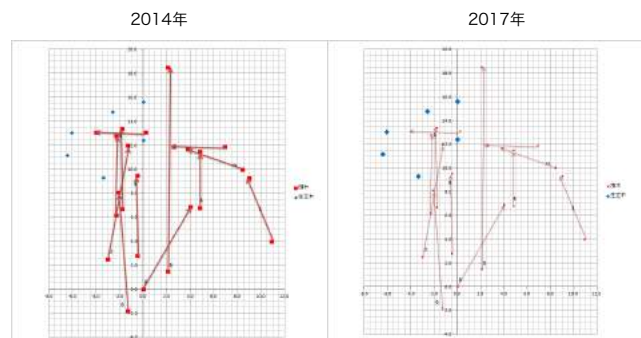


図8 調査地の被害の推移
各点は個々の個体を示す。下段の矢印は倒木を示す。

以上より、葉の枯損が顕著になるより前に、水ポテンシャルの低下を伴わない葉の気孔閉鎖や光合成系へのストレス反応が現れていることが明らかになった。換言すると、葉が萎凋しなくても、葉でのストレス反応を検知できれば樹病を早期に発見することができる可能性があるといえる。また、樹種間で菌の進行に伴うストレス反応が一部異なり、アカギでは熱放散やABAの蓄積など、ストレスを回避する反応を示した一方、シャリンバイは顕著なストレス回避反応は示さず、光阻害や炭酸固定効率の低下などの障害を示していた。アカギは半乾燥落葉性であり、葉を早期に落とす反応をしめす一方、乾性低木の樹種は葉を保持する傾向にある

(Yazaki et al. 2015)。乾燥ストレスへの応答の樹種特性が病気の進行に対する反応に影響した可能性がある。今後は、樹種の生理特性と樹病への反応をより関連づけた研究が、樹木病理学の進展に必要であろう。

(引用文献) Yazaki et al. (2015). *PLoS ONE*, 10(8), e0135117.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

1. Yazaki, K., Ogasa, M. Y., Kuroda, K., Utsumi, Y., Kitin, P., & Sano, Y. (2019). Xylem water distribution in woody plants visualized with a cryo-scanning electron microscope. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, e59154. <https://www.jove.com/video/59154>
2. Kono, Y., Ishida, A., Saiki, S.-T., Yoshimura, K., Dannoura, M., Yazaki, K., et al. (2019). Initial hydraulic failure followed by late-stage carbon starvation leads to drought-induced death in the tree *Trema orientalis*. *Communications Biology*, 2(1), 8. <http://doi.org/10.1038/s42003-018-0256-7>
3. Saiki, S.-T., Ishida, A., Yoshimura, K., & Yazaki, K. (2017). Physiological mechanisms of drought-induced tree die-off in relation to carbon, hydraulic and respiratory stress in a drought-tolerant woody plant. *Scientific Reports*. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-03162-5>

[学会発表] (計4件)

1. 矢崎 健一、木村 芙久、佐橋 憲生、秋庭 満輝、張 春花、小嶋 美紀子、竹林 裕美子、榎 原均、才木 真太郎、石田 厚、丸山 温、太田 祐子。南根腐病は樹木の根系よりも葉の光合成機能にダメージを与える。2019。日本森林学会大会
2. 木村 芙久、矢崎 健一、佐橋 憲生、鈴木 春花、吉村 謙一、才木 真太郎、太田 祐子、丸山 温。南根腐病の病徴進展に伴う罹病実生の根系機能の変化。2018。日本生態学会大会。
3. 矢崎 健一、才木 真太郎、石田 厚、張 春花、高橋 由紀子、飛田 博順、服部 力、秋庭 満輝、佐橋 憲生、太田 祐子。南根腐病罹病木の水利用特性と *Phellinus noxius* 菌糸の樹体内局在。2017。日本森林学会。
4. 木村 芙久、太田 祐子、丸山 温、島田 律子、矢崎 健一、吉村 謙一、才木 真太郎、甲野 裕理、石田 厚。小笠原諸島父島における南根腐病罹病木の生理特性。2017。日本生態学会

[その他]

1. 矢崎 健一、佐橋 憲生。どんな木も枯らす南根腐病が小笠原で広がっている！？2018。森林総合研究所公開講演会（東京都小笠原村）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐橋 憲生

ローマ字氏名：(SAHASHI, Norio)

所属研究機関名：森林総合研究所

部局名：きのこ・微生物研究領域

職名：チーム長

研究者番号 (8桁)：10202102

研究分担者氏名：太田 祐子

ローマ字氏名：(OTA, Yuko)

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：教授

研究者番号 (8桁)：60343802

研究分担者氏名：石田 厚
ローマ字氏名：(ISHIDA, Atsushi)
所属研究機関名：京都大学
部局名：生態学研究センター
職名：教授
研究者番号（8桁）：60343787

(2)研究協力者

研究協力者氏名：木村 芙久
ローマ字氏名：(KIMURA, Fuku)
研究協力者氏名：才木 真太郎
ローマ字氏名：(SAIKI, Shin-taro)
研究協力者氏名：丸山 温
ローマ字氏名：(MARUYAMA, Yutaka)
研究協力者氏名：鈴木 春花
ローマ字氏名：(SUZUKI, Chunha)
研究協力者氏名：高橋 由紀子
ローマ字氏名：(TAKAHASHI, Yukiko)
研究協力者氏名：秋庭 満輝
ローマ字氏名：(AKIBA, Mitsuteru)
研究協力者氏名：服部 力
ローマ字氏名：(HATTORI, Tsutomu)
研究協力者氏名：島田 律子
ローマ字氏名：(SHIMADA, Ritsuko)
研究協力者氏名：向 哲嗣
ローマ字氏名：(MUKAI, Tetsuji)
研究協力者氏名：山口 宗義
ローマ字氏名：(YAMAGUCHI, Muneyoshi)
研究協力者氏名：小嶋 美紀子
ローマ字氏名：(KOJIMA, Mikiko)
研究協力者氏名：竹林 裕美子
ローマ字氏名：(TAKEBAYASHI, Yumiko)
研究協力者氏名：榊原 均
ローマ字氏名：(SAKAKIBARA, Hitoshi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。