

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月10日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380082

研究課題名（和文） 樹木病原菌の伝播・繁殖機構の分子生態学的解明

研究課題名（英文） Molecular ecological study of dissemination and reproduction of tree pathogenic fungi

研究代表者

松下 範久（Matsushita Norihisa）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00282567

研究成果の概要（和文）：ブナ科樹木萎凋病菌，サクラてんぐ巣病菌，ベッコウタケのマイクロサテライトマーカーを作製し，被害地におけるこれら3種の遺伝構造を明らかにした。また，ナラタケモドキ，ベッコウタケ，コフキササルノコシカケの感染木について，樹体内の菌種分布をT-RFLP解析により明らかにした。さらに，F-WGA染色法を用いて，木部内における病原菌の菌糸の詳細分布を明らかにした。以上の結果から，これらの病原菌の伝播・繁殖様式について考察した。

研究成果の概要（英文）：To know the dispersal and reproductive mechanisms of tree pathogenic fungi, we developed polymorphic microsatellite markers of *Raffaelea quercivora*, *Taphrina wiesneri*, and *Perenniporia fraxinea*. Using these markers, we investigated the genetic structure of these fungi in seriously damaged sites. In addition, we investigated distribution of *Armillaria tabescens*, *Ganoderma applanatum*, and *P. fraxinea* within the trunk of infested trees using T-RFLP analysis. We also examined finer scale hypha distribution in the xylem of infested trees using hyphal staining with F-WGA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林保護，植物病原体，ナラ類集団枯損，腐朽病害，伝染環，孢子繁殖，マイクロサテライトマーカー，terminal RFLP法

1. 研究開始当初の背景

近年，様々な病原菌による森林や緑化樹木の衰退・枯死被害が，全国各地で発生している。これらの病原菌に対する防除対策を講ずるためには，各病原菌の伝染環を明らかにする必要がある。現在，主要な病原菌については伝染環の概要が知られているが，それらの伝染環は断片的な情報と推論によって繋がられている部分が多い。特に，①病原菌の伝播過程や伝播距離，②病原菌の伝播・蔓延に

果たす孢子繁殖と菌糸繁殖の役割，③樹体内における病原菌の存在部位や空間分布の変化については，ほとんど解っていない。

一般に，野外における生物の移動や繁殖を把握する上で，マイクロサテライトマーカー（SSRマーカー）による多型解析が極めて有効であることが知られている。今後，上記の課題①と②を含め，多くの植物病原体の移動・繁殖特性の解明にSSRマーカーを用いた解析が有効であると考えられる。

一方、近年、野外における菌類の存在部位を特定するために、種特異的 DNA マーカーを用いた解析法や terminal RFLP (T-RFLP) 法といった新たな菌種同定法が用いられている。これらの方法を用いることにより、上記の③の課題を克服できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、現在、全国各地の森林や緑化樹木に甚大な被害を及ぼし、かつ今後の被害拡大が懸念されている 5 種の樹木病原菌 [(ブナ科樹木萎凋病菌の *Raffaelea quercivora*, サクラてんぐ巣病菌の *Taphrina wiesneri*, ならたけもどき病菌のナラタケモドキ (*Armillaria tabescens*), 広葉樹の根株心材腐朽菌のベッコウタケ (*Perenniporia fraxinea*), 広葉樹の幹心材腐朽菌のコフキサルノコシカケ (*Ganoderma applanatum*)] の伝播・繁殖様式を、分子生態学的手法により詳細に解明する。さらに、T-RFLP 法による解析や種特異的 DNA マーカーを用いた解析により、樹体内における各菌の空間分布を把握し、樹体内における各菌の蔓延過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 伝播・繁殖機構の解明

R. quercivora, *T. wiesneri*, ベッコウタケについて、SSR マーカーを用いたジェネット解析および集団遺伝構造解析を行った。

(2) 樹体内蔓延機構の解明

ナラタケモドキ、ベッコウタケ、コフキサルノコシカケについて、T-RFLP 法による解析や種特異的 DNA マーカーを用いた解析により、樹体内および周辺土壌中における各菌の空間分布を調査した。

4. 研究成果

(1) 伝播・繁殖機構の解明

① ブナ科樹木萎凋病菌

ブナ科樹木萎凋病は、カシノナガキクイムシ (*Platypus quercivorus*) の大量穿孔によって樹体内に持ち込まれる病原菌 *R. quercivora* によって引き起こされる。2010 年には本州および九州の 30 都府県で本病の被害が発生しており、現在も被害は増加傾向にある。

本病の蔓延過程を明らかにするために、9 府県 (福島, 新潟, 富山, 石川, 愛知, 兵庫, 京都, 鳥取, 広島) 10 地点の被害林分から採集した *R. quercivora* とカシノナガキクイムシについて、それぞれ 4 遺伝子座と 5 遺伝子座の SSR マーカーを用いて遺伝構造を解析した。その結果、*R. quercivora* が 5 つのグループに、カシノナガキクイムシが 6 つのグループに遺伝的に分化していた。また、い

れのグループも分布範囲が広がったことから、*R. quercivora* とカシノナガキクイムシは、どちらも急速に分布を拡大していると推測される。このことは、本病害が流行病的な要素を多分に含むことを示唆しており、本病を終息させるためには広域的な防除を行う必要があると考えられる。

R. quercivora の伝播・繁殖様式を明らかにするために、カシノナガキクイムシ雌成虫 5 匹の菌嚢内とカシノナガキクイムシが生活している 5 本の坑道内における *R. quercivora* の遺伝子型を、3 遺伝子座の SSR マーカーを用いて調査した。その結果、各成虫の菌嚢からは、3 つ以上の遺伝子型の *R. quercivora* が検出された。また、各坑道からは、5~10 遺伝子型の *R. quercivora* が検出された。以上のことから、カシノナガキクイムシの雌成虫は、遺伝的に多様な *R. quercivora* を菌嚢内に入れて罹病木から脱出し、新たな宿主の樹体内に侵入した後に、それらの菌を坑道壁に植え付けると推測される。このことから、カシノナガキクイムシは、*R. quercivora* を樹体内の坑道という安定した環境に運ぶだけではなく、その遺伝的な多様性を維持する役目も担っていると考えられる。

② サクラてんぐ巣病菌

サクラてんぐ巣病は、サクラ類の枝の一部に隆起が生じ、この部分から枝梢がほうき状に叢生する病害である。本病は、沖縄県を除く日本全国で発生しており、特に、ソメイヨシノが大きな被害を受けている。本病は、子の菌類の *T. wiesneri* によって引き起こされるが、本菌の伝播・繁殖様式には不明な点が多い。

T. wiesneri のてんぐ巣内における伝播様式を明らかにするために、5 個のてんぐ巣からそれぞれ 5 本の枝を選び、そのうち 1 本の枝のすべての罹病葉と、残りの各枝の罹病葉 1 枚内に生育する *T. wiesneri* の遺伝子型を、7 遺伝子座の SSR マーカーを用いて調査した。その結果、1 つのてんぐ巣内の *T. wiesneri* の遺伝子型は単一であり、異なるてんぐ巣間の *T. wiesneri* の遺伝子型は異なっていた。これらのことから、*T. wiesneri* は、てんぐ巣内で無性的に繁殖しながらてんぐ巣を発達させるとともに、子の胞子の散布により枝から枝へ分布を拡大すると推測される。

T. wiesneri のてんぐ巣間および樹木個体間の伝播様式を明らかにするために、東京大学田無演習林において、約 0.5 ha の樹木園内に植栽されたソメイヨシノ 6 本に形成された 61 個のてんぐ巣中の *T. wiesneri* の遺伝子型を、7 遺伝子座の SSR マーカーを用いて決定し、クラスタ解析と空間的自己相関の解析を行った。その結果、樹木個体内での *T.*

wiesneri の遺伝構造が比較的均一であったことから、本病の感染源は主に同一樹木内のてんぐ巣であると考えられる。また、樹木個体毎に遺伝構造が異なっていたことから、樹木間の遺伝的交流は制限されており、周辺樹木からの子のう胞子による感染はまれであると推測される。

さらに、千葉県千葉市内の約 500m×500m の範囲内に植栽された 38 本のソメイヨシノのてんぐ巣 585 個について、田無演習林と同様の調査・解析を行った。その結果、複数のクラスタからなる単木が存在していたことから、外部由来の子のう胞子による感染が複数回起こっていると推測される。また、樹冠が接した個体間のクラスタ構造が類似していたことから、樹冠が接しているとのう胞子による伝播が起こりやすいと推測される。

以上のことから、サクラてんぐ巣病の防除対策は比較的狭い範囲を対象にして考えれば良いこと、また、罹病枝を早めに除去することが、本病の被害の蔓延を防ぐために重要であることが示唆された。

③ ベッコウタケ

ベッコウタケは、様々な広葉樹の根や根株の心材を腐朽させるべっこうたけ病の病原菌である。近年、本病の被害が全国各地の街路樹や緑化樹に頻発しており、腐朽が進行した樹木は倒木被害を引き起こす危険があるため、早急な防除対策の構築が求められている。そこで、ベッコウタケの繁殖様式と伝播距離を明らかにすることを目的として、ベッコウタケの SSR マーカーを作製し、遺伝構造の解析を行った。

dual-suppression PCR 法により、5 遺伝子座の SSR マーカーを作製した。さらに、これらの 5 遺伝子座のマーカーについて、栃木県宇都宮市日光街道桜並木と神奈川県横浜市のいずみ野駅前桜並木由来のベッコウタケ 20 菌株を用いてマーカーの特性を調査した。その結果、対立遺伝子数は 2 から 6 で、ヘテロ接合度の観察値と期待値は 0.20-0.65, 0.18-0.62 であった。

千葉県松戸市の常盤平さくら通り (約 3.1 km) に植栽されたソメイヨシノ (一部オオシマザクラ) 全 624 本について、ベッコウタケの子実体発生の有無を調査した。その結果、28 本のソメイヨシノから、ベッコウタケの子実体が発生していた。そのうちの 14 本からは、複数の子実体が発生していた。

発生していた子実体のうちの 46 個の子実体から DNA を抽出し、作製した SSR マーカーを用いて各子実体の遺伝子型を決定した。さらに、得られた結果から、空間的自己相関の解析を行った。その結果、46 個の子実体は、30 タイプの異なる遺伝子型に区別された。複数の子実体が発生していた 14 本の罹

病木のうちの 11 本からは、それぞれ単一の遺伝子型の子実体が発生していた。残りの 3 本からは、それぞれ異なる 2 タイプの遺伝子型の子実体が発生していた。また、樹木個体間では、2 本で同じジェネットの子実体が発生していたが、その他は樹木個体毎にすべて子実体の遺伝子型が異なっていた。以上のことから、ベッコウタケの感染は担子胞子によって起こり、1 回あるいは少数回感染したベッコウタケが、樹体内で無性的に蔓延した後、子実体を発生させると考えられた。

空間的自己相関の解析を行った結果、遺伝子型の分布に有意な空間的自己相関は認められなかった。したがって、担子胞子は広い範囲で散布され、感染はランダムに起こっていると推測された。

以上のことから、本菌は担子胞子により感染し、その担子胞子の伝播距離は数キロメートル以上であることが示唆された。そのため、感染源を除去することにより本病を防除することは困難であると考えられる。今後、本菌の侵入門戸や侵入過程を明らかにし、本菌の樹体への侵入を防ぐための対策を講ずることが重要であると考えられる。

(2) 樹体内蔓延機構の解明

① ナラタケモドキ

ナラタケモドキは、根株腐朽病害であるならたけもどき病の病原菌である。本病の被害木は、成長速度の低下や葉の変色などの病徴を示し、最終的には枯死に至る。近年、日本各地で本病による緑化木の衰退・枯死被害が増加している。一般に、ナラタケ属菌は、土壌中に根状菌糸束を伸ばして樹木の根に感染する。しかし、ナラタケモドキは、野外で根状菌糸束を作ることがまれであり、感染経路も不明である。そこで、ナラタケモドキの感染経路を明らかにするために、ならたけもどき病によるソメイヨシノ枯死木の根株内および周辺土壌中におけるナラタケモドキの分布を調査した。

ソメイヨシノ枯死木の根株内におけるナラタケモドキの分布を調べるために、千葉県松戸市の常盤平さくら通りにおいて、ソメイヨシノ枯死木の根株を掘り取り、実験室に持ち帰った。さらに、この個体の植栽前に生育していたソメイヨシノの根が土壌中に残っていたため、そのうちの 4 本も採集した。採集した根株の地際部 (直径 24 cm) および 15 本の根 (直径 3 cm~11 cm) から円板を切り出した。さらに、各円板の木口面から、2 cm 間隔の格子状にドリルを用いて約 1 cm の深さまで材を削り、材片を採取した。植栽柵中に残っていた根からも、同様に材片を採取した。得られた材片から DNA を抽出し、rDNA-ITS 領域の T-RFLP 解析とシーケンシングにより、材片中の菌種を同定した。

根株の地際部では、樹皮下のほぼ全縁にナラタケモドキの菌糸膜が見られ、周辺部の辺材で変色が見られた。また、根株から採取したすべての根にも、樹皮下にナラタケモドキの菌糸膜が見られ、木口面の全体あるいは周縁部で材の変色が見られた。しかし、根や根株の周辺に、ナラタケモドキの根状菌糸束は見られなかった。採取した材片のうち、変色部からはナラタケモドキが検出され、他種の菌はほとんど検出されなかった。以上のことから、ならたけもどき病により宿主が枯死に至る頃には、ナラタケモドキが根株全体に蔓延していることが解った。また、ナラタケモドキは、樹皮から材の内側に向かって侵入し、材の変色をもたらしていると考えられる。

植栽柵に残っていた前植栽木の根の樹皮下にはナラタケモドキの菌糸膜が観察され、4本の根のうちの2本の材内からはナラタケモドキが検出された。また、どの根からも他種の菌は検出されなかった。これらのことから、ナラタケモドキは、宿主が枯死した後も、土壤中に残された根の中で数年以上生存しているものと推測される。

枯死木周辺の土壤中におけるナラタケモドキの分布を調べるために、同調査地においてソメイヨシノ枯死木の地際部から約50 cm離れた位置に土壤断面を作り、土壤サンプルを採取した。また、同時にソメイヨシノの根を採集し、その根に付着していた土壤も採取した。採取した土壤0.1 gからDNAを抽出し、rDNA-ITS領域のプライマー対と、ナラタケモドキの種特異的プライマー対を用いたnested-PCRを行い、DNA増幅の有無を確認した。ナラタケモドキの種特異的プライマーは、DNAデータベースから取得した日本産ナラタケ属菌のITS領域の配列をアライメントし、ナラタケモドキに特異的な配列を含むように設計した。

採集した6本の根の樹皮下にはナラタケモドキの菌糸膜が観察されたが、根状菌糸束は見られなかった。採集した根のうちの3本の周りに付着していた土壤から、ナラタケモドキの培養菌糸と同じ分子長のDNA断片が増幅された。また、土壤断面のうち、多くの根が観察された位置から採取した土壤からも、同じ分子長のDNA断片が増幅された。これらのことから、根の近傍では、土壤中にもナラタケモドキが生存していると考えられる。

以上の結果から、ナラタケモドキは、宿主の根に感染した後、樹皮や辺材を侵しながら根株全体に蔓延して宿主を枯死させ、その後、数年以上、根や根株の中で生存していると考えられる。また、これらの根や根株から菌糸を伸長させて、周辺の根に感染すると推測される。そのため、ならたけもどき病の被害木を伐採する際に土壤中に根や根株を残してしまうと、その中で生存していた菌が、土壤

を介して新たな樹木に感染する恐れがある。したがって、本病が発生した場所に新たな植栽を行う場合には、植栽前に枯死木の根株と根を土壤ごと完全に除去する必要があると考えられる。

② ベッコウタケ

ベッコウタケの樹体内蔓延機構を明らかにするために、べっこうたけ病の病徴や標徴が見られたイヌエンジュ樹体内におけるベッコウタケの空間分布を調査した。

べっこうたけ病が蔓延している島根県松江市内の国道485号線のイヌエンジュ並木の中から、外観が異なる3本のイヌエンジュを供試した。各供試木を伐倒し、地際から20 cmと60 cmの部位の円板を採取して、実験室に持ち帰った。各円板の木口面から、ナラタケモドキでの調査と同様の方法で材片を採取し、材片中の菌種を同定した。また、ベッコウタケが検出された腐朽部と非腐朽部から横断切片を作成してF-WGA染色を行い、材組織内における菌糸の詳細分布を観察した。

いずれの供試木においても、樹皮に近い周縁部と中央部の心材が腐朽していた。また、地際60 cmよりも地際20 cmの方が、円板面積に占める腐朽部の割合が大きかった。TRFLP解析の結果、地際20 cmの円板のうち、1本の供試木では、心材内の腐朽部の一部からHymenochaetaceae sp.が検出された。この供試木の他の腐朽部からはベッコウタケが検出され、他の2本の供試木の腐朽部からもベッコウタケが検出された。腐朽部からは、これら以外の菌種は、ほとんど検出されなかった。また、腐朽部周辺の心材と一部の辺材からもベッコウタケが検出された。地際60 cmの円板では、心材の腐朽部や、地際20 cmの円板でベッコウタケが検出された上部の非腐朽部からベッコウタケが検出された。

解剖観察の結果、腐朽部では木繊維や道管、放射柔組織といったほとんどの部位に菌糸が蔓延していた。一方で、非腐朽部では、道管とその周囲の半径約50 μmにある木繊維にのみ菌糸が分布していた。また、心材と辺材にはU肋起光下で青白色に蛍光する帯が観察され、この帯内には菌糸が観察されなかった。この帯はスベリン・リグニン様物質が蓄積した防御帯であり、この部位が辺材であったときにベッコウタケの侵入に対して形成されたものと推測される。しかし、この防御帯より外側（樹皮側）でも本菌が観察されたことから、防御帯の形成は、心材内におけるベッコウタケの蔓延の抑制には効果がないと考えられる。

以上のことから、ベッコウタケは、地際部または根から侵入した後、心材の中央部や周縁部の道管内を上部に垂直方向に伸長し、その後、水平方向へ蔓延すると考えられる。さ

らに腐朽が進行すると、心材の周縁部から辺材へも菌糸が侵入していき、その結果、宿主が衰退・枯死すると推測される。

③ コフキササルノコシカケ

近年、全国各地の街路樹や公園樹において、コフキササルノコシカケによる腐朽病害が多発している。本菌については、幹の心材部を腐朽させる白色腐朽菌であることが明らかにされているが、樹体内での蔓延過程については不明な点が多い。そこで、コフキササルノコシカケの子実体が発生したギンヨウアカシアとイロハモミジの樹体内におけるコフキササルノコシカケの空間分布を調査した。

コフキササルノコシカケの子実体が発生していたギンヨウアカシアとイロハモミジを1本ずつ伐倒して円板を採集し、ナラタケモドキやベッコウタケでの調査と同様の方法で材片を採取し、材片中の菌種を同定した。

両樹種ともに、いずれの円板も中央部が腐朽しており、腐朽部面積の割合は地際に近いほど大きかった。また、腐朽部の材片のすべてとその周辺の非腐朽部の心材と辺材の一部からは、コフキササルノコシカケのみが検出された。これらのことから、コフキササルノコシカケは、根または地際部に近い部位から樹体内に侵入した後に、心材部を腐朽させながら樹体内に蔓延したものと推測される。

(3) まとめ

本研究では、ブナ科樹木萎凋病、サクラてんぐ巣病、べっこうたけ病について、SSRマーカーを用いたジェネット解析および集団遺伝構造解析により、病原菌の伝播・繁殖様式を詳細に解明することに成功した。特に、従来の対峙培養などの手法では明らかにできなかった、病原菌の伝播過程や伝播距離、病原菌の伝播・蔓延に果たす孢子繁殖と菌糸繁殖の役割を明らかにできたことは、これらの病気に対する今後の防除計画を考える上で、非常に重要な成果である。また、今回の研究手法は、樹木病害全般に適用可能である。したがって、本研究が植物病原菌の伝播・繁殖様式を解明するためのモデルケースとなり、今後、他の植物病原菌の伝染環の解明にも大きく貢献すると考えられる。

一方、ナラタケモドキ、ベッコウタケ、コフキササルノコシカケの樹体内分布を、詳細に明らかにできたことも、本研究の大きな成果である。これまで木材腐朽菌の樹体内動態については、対象とする菌が樹幹内で生育することに加えて、両菌が感染してから被害が顕在化するまでの期間が数年～数十年と非常に長いために、外観からの継続観察では明らかにできなかった。また、培養的な手法により、材中に含まれる菌種を同定する試みもなされてきたが、同定までに時

間がかかる上に、精度も低かった。それに対して、本研究で用いた T-RFLP 解析は、樹体内の菌種分布を短時間で高感度に検出できたことから、今後、他の木材腐朽病害に対しても、原因となる病原菌の特定や、その病原菌の樹体内蔓延過程の解明に広く用いられると予想される。

また、コフキササルノコシカケとベッコウタケは、どちらも樹木の心材を腐朽させる白色腐朽菌であるが、樹体内蔓延過程は兩種で異なるかと推測された。菌種ごとに樹体内蔓延過程が異なる理由を含めて、木材腐朽菌の樹体内動態については、まだまだ不明な点が多く残されている。今後、そのような不明点を一つ一つ明らかにして、木材腐朽菌の伝播・繁殖機構の全貌を明らかにし、木材腐朽病害の新たな防除法への道を拓いていきたい。

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 4 件)

- ① Mansournia MR, Wu BY, Matsushita N, Hogetsu T (2012) Genotypic analysis of the foliose lichen *Parmotrema tinctorum* using microsatellite markers: association of mycobiont and photobiont, and their reproductive modes. *The Lichenologist* 44: 419-440 (査読有).
- ② 松下範久・小松雅史・宝月岱造 (2011) ソメイヨシノの枝内におけるサクラてんぐ巣病菌の越冬部位の解明. *植物防疫* 65: 469-472 (査読無).

[学会発表] (計 11 件)

- ① 松下範久・小松雅史・堤真知子・高橋由紀子・宝月岱造 (2012) サクラてんぐ巣病菌の伝播・繁殖様式. 樹木病害研究会, 宇都宮大学, 2012年3月29日.
- ② 中達正人・高橋由紀子・松下範久・宝月岱造 (2012) ベッコウたけ病により衰弱したイヌエンジュの樹体内における腐朽菌の空間分布. 第123回日本森林学会大会, 宇都宮大学, 2012年3月28日.
- ③ 中達正人・高橋由紀子・松下範久・宝月岱造 (2011) コフキササルノコシカケの子実体が発生した広葉樹の樹体内における腐朽菌の空間分布. 樹木医学会第16回大会, 東京大学, 2011年11月27日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 範久 (Matsushita Norihisa)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号: 00282567

(2)研究分担者

呉 炳雲 (Go Heiun)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
助教
研究者番号：10396814

宝月 岱造 (Hogetsu Taizo)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
教授
研究者番号：10107170
(2011年度→2012年度：研究協力者)

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

佐々木 潔州 (Sasaki Kiyokuni)
東京大学・大学院農学生命科学研究科
技術専門職員

小松 雅史 (Komatsu Masabumi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任研究員 (2010年度)

高橋 由紀子 (Takahashi Yukiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任研究員 (2010年度)

中達 正人 (Nakatsuji Masahito)
東京大学・大学院農学生命科学研究科
(2011年度, 2012年度)

古川 夏未 (Furukawa Natsumi)
東京大学・農学部 (2012年度)