

## 北米産タモ類(ビロードトネリコ・アメリカトネリコ)における

### Ash dieback の発生実態：札幌羊ヶ丘における事例

森林総合研究所 北海道支所 山口 岳広

#### はじめに

近年欧州ではタモ類に壊滅的な被害を及ぼす Ash dieback(タモ類枝枯病)が問題となっている<sup>(1,2,5,14)</sup>。この病原菌は子のう菌である *Hymenoscyphus fraxineus*(種名は幾度か変遷<sup>(1,2,3,5,15)</sup>)でアジア由来とされている<sup>(7,12)</sup>。日本ではヤチダモなどの複葉に内生菌として生息し落葉後の葉軸に子実体を形成しており<sup>(8,9)</sup>普遍的に見られる種であるが、自然感染によるヤチダモへの罹病事例は報告されていない。北アメリカ大陸では *H. fraxineus* は分布せず、本病も現在のところ侵入は確認されていないようだが、北米原産のタモ類はビロードトネリコ(*Fraxinus pennsylvanica*: green ash)とアメリカトネリコ(*F. americana*: white ash)を含め多くの種で *H. fraxineus* の人工接種も含め発病が報告されている<sup>(4,13)</sup>。札幌羊ヶ丘にはたまたまこの 2 種の北米産タモ類が植栽されており、病原菌の子実体も普通に存在するなど発病条件が揃っていることから、これらの樹木における Ash dieback の罹病実態を明らかにするため調査を行った。また、比較的簡易で短時間な判定手法を探るため特異的プライマー<sup>(10)</sup>を用いた PCR 法により、罹病部から病原菌の検出を試みたので以下に報告する。

#### 材料と方法

調査対象としたのは札幌市羊ヶ丘の森林総研北海道支所実験林内に植栽されているビロードトネリコと、同じく森林総研北海道支所樹木園内植栽のアメリカトネリコである。ビロードトネリコは支所実験林内の約 800m<sup>2</sup>の区域に 1993 年に植栽され、完全に枯死せずに現在まで生存している個体を調査した。枝枯れの発生調査は 2017・2018・2021 年の 6 月～10 月(開芽から落葉まで)におおよそ 2 週間の間隔で各生存個体を目視により調査し、枝枯れの発生が確認された場合はその枝を採取すると共に発生個体と発生枝数を記録した。ただし、虫害・シカ食害等他の原因による枯れが明確な場合はその数から除外した。

平面での分布を把握するため 2017 年に生存木の座標位置をコンパス測量により測定した。各個体の衰退度を表すための着葉量調査は、枝枯れ調査と同じ年および 2023 年に各 6～7 月に行なった。個々の枝ぶり(枯れ枝を含む)から想定される着葉量を 100 として実際の生存木の着葉量の割合を百分率で推定した。

アメリカトネリコは樹木園に 1974～5 年頃植栽されたと推定され、現在 5 本が生存しているが各個体とも数本の株立ち状態となっている。枝枯れの発生調査方法および PCR による病原菌の検出方法はビロードトネリコ同様である

が、調査は 2017・2018・2021 年に加え 2020 年にも同様に行なった。

PCR 法による *H. fraxineus* の検出には Phire Plant Direct PCR Kit (ThermoFischer Scientific 社, USA)を使用した。枯枝を実験室に持ち帰り病斑部の内樹皮変色部分から直径 0.5mm の円盤 2 枚を採取して上記 Kit 付属の抽出バッファーで DNA を抽出した。この抽出物をテンプレートとし *H. fraxineus* 特異的プライマー<sup>(10)</sup>(表-1)を用いて PCR を行なった。サーマルサイクラーの温度・時間設定はキットのマニュアルに従った(表-1)。増幅産物の確認は 1%アガロースゲルを用いた電気泳動にて行った(図-1)。DNA 染色剤は EZ-Vision(AMRESCO 社, USA)を使用し、*H. fraxineus* の子実体由来の DNA 抽出物をポジティブコントロールとした。トランスイルミネーター上でバンドの発色が認められたサンプルを陽性とした。

表-1 使用した *H. fraxineus* 特異的プライマーの配列<sup>(10)</sup>とサーマルサイクラーの設定

基本的に Kit 添付マニュアルの推奨温度とした。

forward 5'-AGCTGGGGAAACCTGACTG-3'  
reverse 5'-ACACCGCAAGGACCCATC-3'

サーマルサイクラーの設定

98°C 5min, 98°C 5s→64.3°C 5s→72°C 20s 35 cycle,  
72°C 1min → 4°C Hold

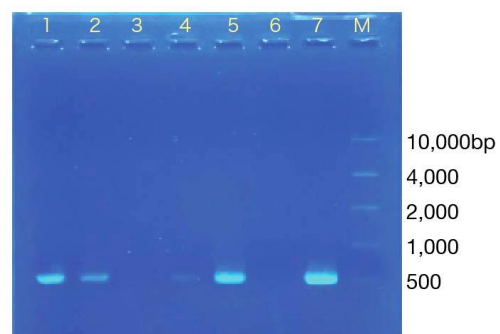


図-1 PCR 産物の電気泳動の例

レーン 1～3：ビロードトネリコ枯枝，4～6：アメリカトネリコ枯枝，レーン 3・6 は陰性，レーン 7：ポジティブコントロール(*H. fraxineus* 子実体抽出物)，M：サイズマーカー。

**結果**

1)被害の概況

a)ピロードトネリコ

2017年の調査開始時点において既に生存木のほとんどに梢端枯れと胴枯れの症状が見られ、主幹上部が枯死し幹の中ほどから下部にある枝や萌芽枝で生存が維持されている個体も多かった(図-2)。主幹上部が折損あるいは傾斜した生存木個体もあり、調査開始時点で既に枯死し倒伏・折損していた個体もあった。枝枯れは当年枝ばかりでなく2~3年生のやや太い枝でも発生していた。同一個体で複数の枝枯れ発生も見られるが、同時多発ではなく点々と発生して年々枯枝が増加している状態であった。ただし、明らかに虫害等別の要因による枝枯れ被害もいくつか観察された。枯れ枝の増加に伴い林分全体で衰退枯死が進み、

2017~2023年の間に約77%が完全に枯死しており(図-3)、林分全体で衰退が進展している状況であった。

b)アメリカトネリコ

植栽個体数が少ないためピロードトネリコほど目立たないが、同様に主幹部の胴枯れや過去の枝枯れの発生が見られた(図-4・5)。調査期間内では特定の1個体で枝枯れが多く発生しており、この期間内に枯死した個体はなかったが、調査初年と最近の状態を比較すると年々の枝枯れの蓄積で明らかに衰退が進行していた。

2)調査月・調査年別の枝枯れ発生動向

ピロードトネリコ・アメリカトネリコどちらも早い年では6月(後半)から枝枯れがはじめていた(図-6)。全般的には気温の高くなる7~8月の発生が多く、稀に10月(前半)の発生もあった。アメリカトネリコでは個体数が少ないこ

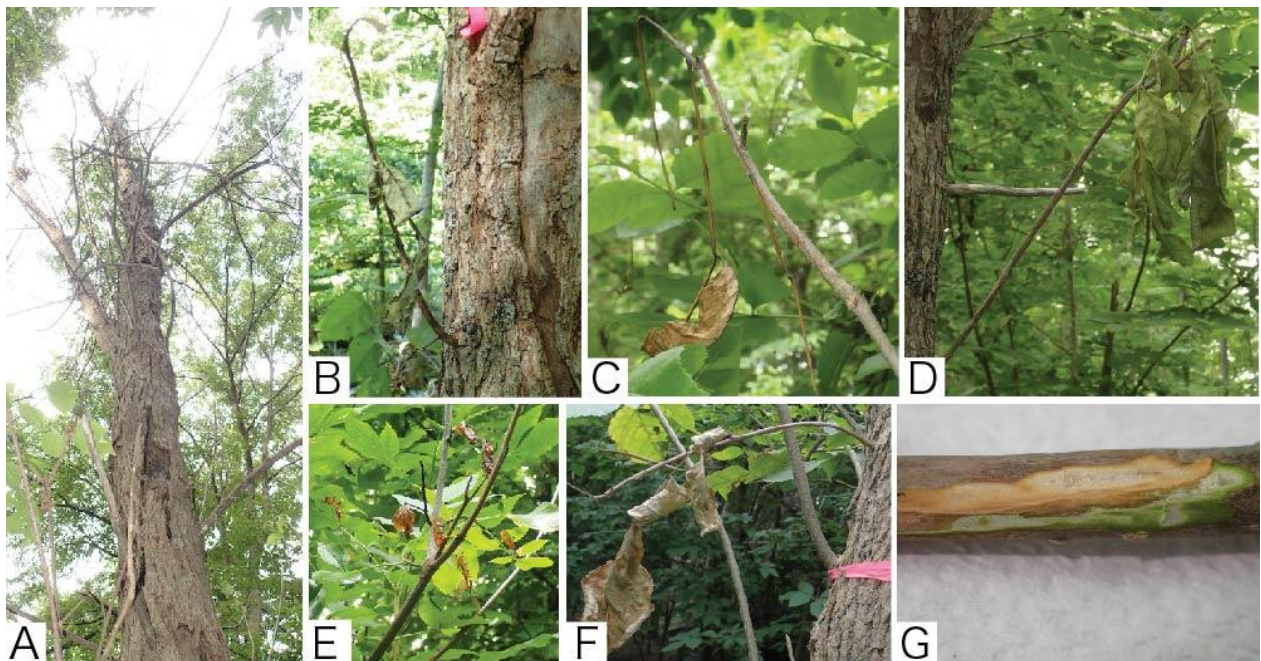


図-2 A:ピロードトネリコの典型的な衰退木, B-F:枝枯れ症状の例, G: 内樹皮の変色部

Aの樹高は枯死梢端部含めて約12m, 枯死枝のおおよその地上高は B:1.4m, C:1.8m, D:1.5m, E:2m, F:1.6m。ここに示した枯枝は全てPCR陽性を示した。

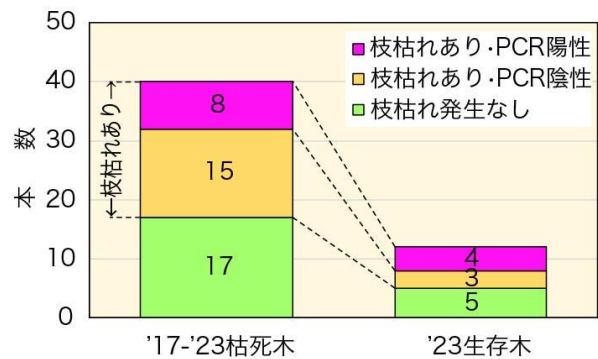
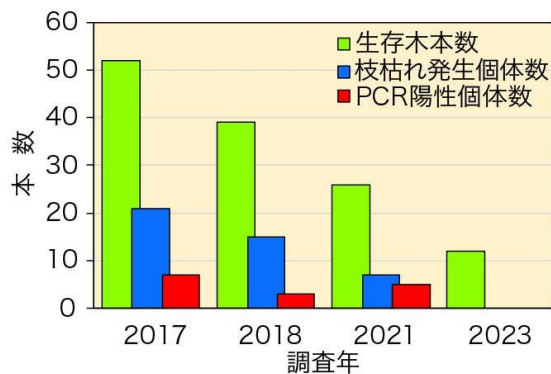


図-3 ピロードトネリコの調査年別生存木・枝枯れ発生・PCR陽性の個体数(左)と枯死木・生存木別に見た枝枯れ発生・PCR陽性の個体数(右)

2023年は枝枯れとPCRの調査は行なっていない。



図-4 アメリカトネリコの衰退状況の比較  
同一木を 2017 年 9 月(左)と 2023 年 9 月(右)撮影。



図-5 アメリカトネリコにおける枝枯れ症状の例  
ここに示した枯枝は全て PCR 陽性を示した。

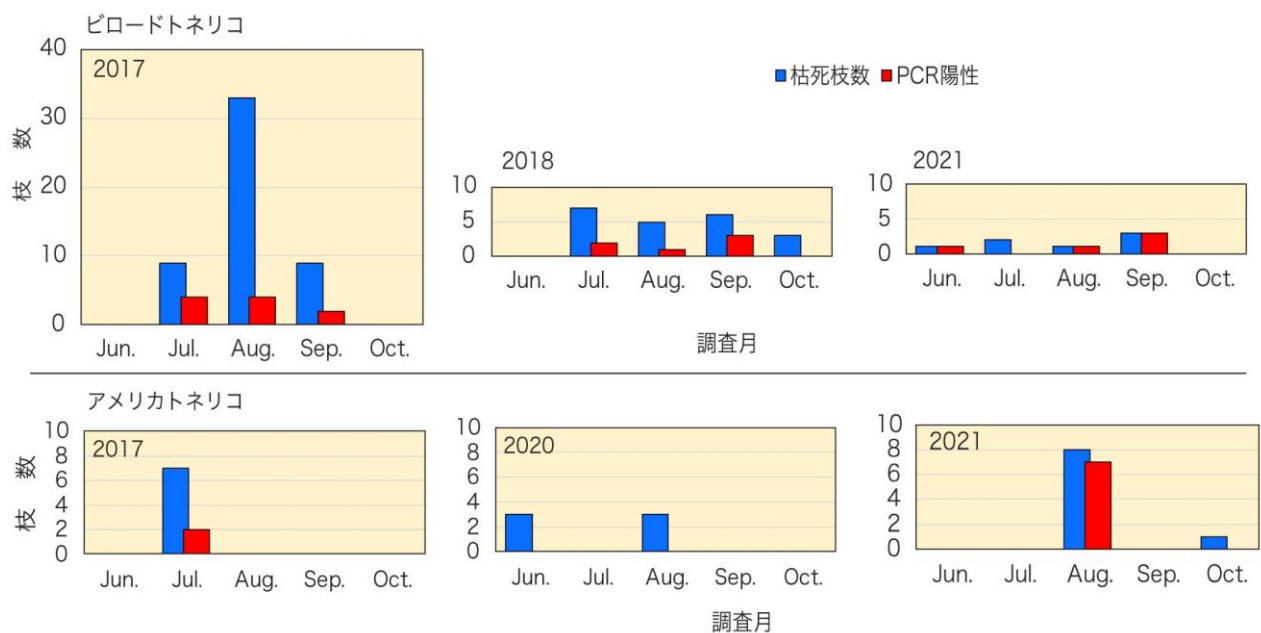


図-6 調査年・調査月別の枝枯れおよび PCR による *H. fraxineus* 陽性の枯れ枝数発生動向  
アメリカトネリコは 2018 年も調査したが枝枯れの発生はなかった。

ともあり発生は散発的で調査年によって枝枯れ発生数の変動が大きかった。また、調査期間内では 9 月の発生がなく、2018 年は枝枯れ発生が確認されなかったなど、枝枯れ発生にあまり明瞭な傾向は観察されなかった。さらに、ビロードトネリコは年々枝枯れの発生数が減少する傾向があった(図-3・6)。

PCR による *H. fraxineus* の検出頻度は、ビロードトネリコが全調査期間に生じた枯死枝で陽性率約 27%であったが、各年別・各月別では枯死枝の約 12~100%と各調査年・調査月により増減が大きかった(図-3・6)。また年を追うごとに陽性率が増加する傾向が見られた。アメリカトネリコでも全調査期間の枯枝で陽性率は 56%であったが各調査年の月別では陽性率の変動が大きく(図-6)、また 2020 年調査の枝枯れでは陽性を示した枯枝はなかった。

3)ビロードトネリコにおける調査年別の発生動向と枝枯れ発生数の平面分布

2017 年から 2023 年までの間に生存木個体の約 77%(40

本)が衰退枯死していたが(図-3)、この間の枯死木のうち約 58%の 23 本に枝枯れが生じ、そのうちの約 35%(8 本)が PCR 陽性であった。一方、2023 年の調査時点まで生き残っていた個体は 12 本で、2017~21 年の調査期間にその約 58%(7 本)に枝枯れが発生していた。そのうち約 57%の個体は PCR で *H. fraxineus* 陽性を示していた。枝枯れの発生比率は枯死木・生存木とも同じ程度であったが、陽性比率は枯死木で 35%、生存木の枝枯れが 57%と、後者のほうが高かった(図-3 右)。PCR 陽性の枯枝がある生存木個体も年を追うごとに減少しているが、陽性率は年々高くなる傾向が見られた。

枝枯れ発生と PCR 陽性木の平面分布を図-7 に示す。調査開始年の 2017 年では比較的着葉量の多い個体が全面的に分布していたが、年を追うごとに各個体での着葉量の減少と枯死木の増加が生じていた。特に調査年の間隔が開いている 2018~2021 年の 3 年間、2021~2023 年の 2 年間で生存個体数減少が大きかった。また、植栽区域の西側(図

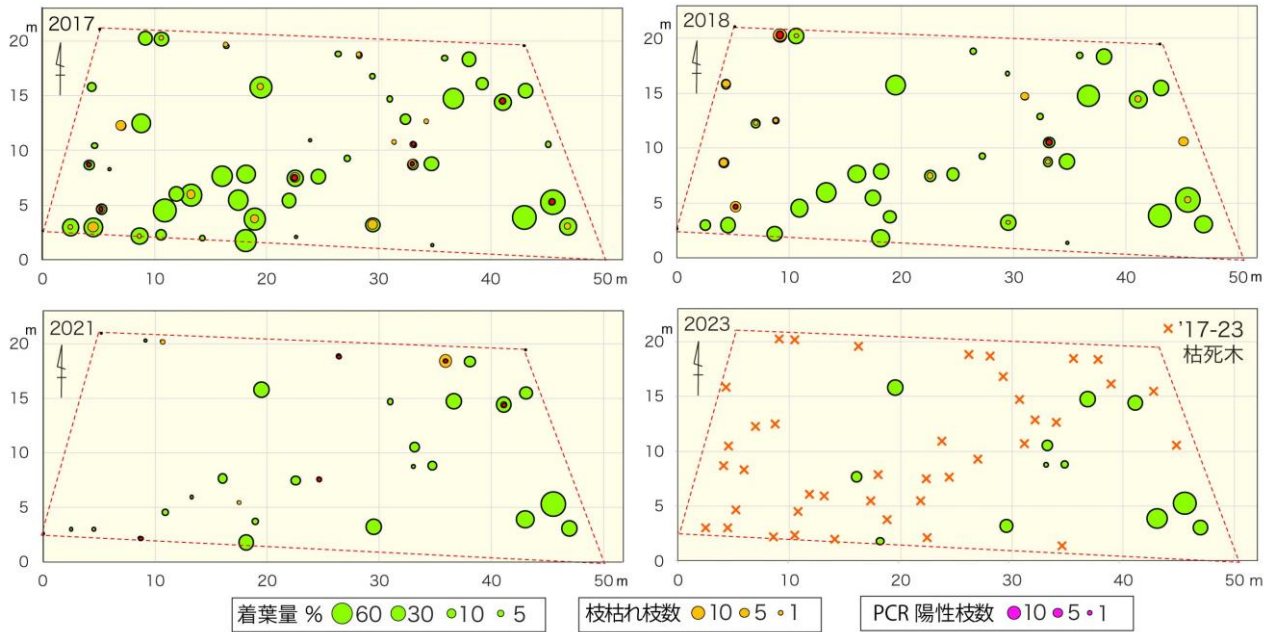


図-7 2017・2018・2021・2023年におけるピロートトネリコ生存木の着葉量と枝枯れ本数(枝数)・PCR陽性枝数  
 円の面積がそれぞれの数値を示す。2023年は着葉量のみ調査し、それまでに枯死した生存木の位置を示した。破線は植栽区域を示す。

上では左半分側)での個々の着葉量と個体数の減少が目立っていた。枝枯れも植栽区域西側で多く発生しており、着葉量が少ない個体で枝枯れが発生すると後年枯死に至っている例が多かった。

**考察**

以上の結果からも明らかのように、本研究の対象としたピロートトネリコとアメリカトネリコで観察された枝枯れや胴枯れなどの病徴は、欧州で報告されている Ash dieback<sup>(1,2,5,14)</sup>と類似していること、またヤチダモの植栽木や天然生木が周囲にあって病原菌 *H. fraxineus* が周辺に普通に存在する環境下であり、PCRにより枝枯れ壊死部位で病原菌の存在を確認していることから、両樹種の枝枯れ症状の多くは *H. fraxineus* による Ash dieback であると考えられる。ただ、*H. fraxineus* 陽性ではない枯死枝も発生しており、これらは他の糸状菌等による枝枯れの可能性もある。また虫害による枯死枝など他の要因による枝枯れもある程度発生していると推測される。ピロートトネリコへの接種試験では中庸程度の被害という報告<sup>(13)</sup>もあるが、本研究での6年間の調査では(調査以前も含め)欧州同様の激しい衰退枯死被害となっており(図-3・6)、枝枯れの平面分布においても特に着葉量が少ない個体で枝枯れが多発すると後年個体が枯死する例が多かった(図-6)ことから、やはりここでの衰退枯死には Ash dieback が大きく関わっていると考えられる。なお、ピロートトネリコでは年を追うごとに枝枯れ発生の個体数も枯れ枝本数も減少していた(図-3・6・7)。この理由は明確ではないが、一つには年々生存個体数や生きている枝の数が減少し感染・罹病の対象が減ったことが影響していることも考えられる。

一方で、アメリカトネリコでは枝枯れの発生と衰退の兆候は見られるが、単的に植栽され本数が少なく、調査期

間内は実質的に枝枯れの発生が1個体に限られていたことから、その発生は散発的でピロートトネリコよりも被害は抑えられているようである。エストニアで植栽された両樹種での自然感染でもアメリカトネリコの被害が少ない傾向が報告されている<sup>(4)</sup>。一方、各種タモ類への接種試験では両樹種とも中程度の感受性とされている<sup>(13)</sup>。やはり、植栽地の環境や個体差によって感受性に違いが生じることは十分考えられるので、今後さらなる検証が必要であろう。

今回は通常行われる組織分離による方法ではなく PCR 法での病原菌検出を試みた。本菌は成長が比較的遅く<sup>(4,11)</sup>また枯死枝に多様な糸状菌が存在するため<sup>(16)</sup>通常の組織分離法では成長の速い他の糸状菌にカバーされて検出できない可能性を避けるため、さらに検出時間短縮のメリットも併せてこの手法を採用した。本研究では組織分離法との比較は行なっておらず、低い陽性率の検証ができなかった。また安全性を考慮して DNA 染色剤もやや感度が劣る製品を使用したこともあり、今後サンプル方法含めてこの手法を改良する余地はあるかもしれない。

最後に、本研究では少数事例ではあるが外来樹種の導入・植栽で図らずも壊滅的な被害を生じてしまう事が示された。やはり外来樹種の導入に関しては長期的な視点も含め慎重に進めるべきであろうと考える。

**引用文献**

- (1) Bakys R, Vasaitis R, Barklund P, Thomsen IM, Stenlid J (2009) Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. *Eur. J. Forest Res.* **128**: 51–60.
- (2) Bakys R, Vasaitis R, Barklund P, Ihrmark K, Stenlid J (2009) Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in

- declining *Fraxinus excelsior*. Plant Pathology **58**:284–292.
- (3) Baral HO, Queloz V, Hosoya T (2014) *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. IMA Fungus **5**: 79-80.
- (4) Drenkhan R and Hanso M (2010) New host species for *Chalara fraxinea*. New Disease Reports **22**: 16.
- (5) Gross A, Holdenrieder O, Pautasso M, Queloz V, Sieber TN (2014) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. Molecular Plant Pathology **15**: 5-21.
- (6) Gross A, Hosoya T, Queloz V (2014) Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Molecular Ecology **23**: 2943–2960.
- (7) Gross A, Holdenrieder O (2015) Pathogenicity of *Hymenoscyphus fraxineus* and *Hymenoscyphus albidus* towards *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. Forest Pathology **45**: 172–174.
- (8) Hosoya T, Otani Y, Furuya K (1993) Materials for the fungus flora of Japan. Trans Mycological Society of Japan **34**: 429–432.
- (9) 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**: 89–94.
- (10) Johansson SBK, Vasaitis R, Ihrmark K, Barklund P, Stenlid J (2010) Detection of *Chalara fraxinea* from tissue of *Fraxinus excelsior* using species-specific ITS primers. Forest Pathology **40**: 111-115.
- (11) Kirisits T, Dämpfle L, Kräutler K (2013) *Hymenoscyphus albidus* is not associated with an anamorphic stage and displays slower growth than *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on agar media. Forest Pathology **43**: 386-389.
- (12) McMullan M, Rafiqi M, Kaithakottil G, Clavijo BJ, Bilham L, Orton E, Percival-Alwyn L, Ward BJ, Edwards A, Saunders DGO, Accinelli GG, Wright J, Verweij W, Koutsovoulos G, Yoshida K, Hosoya T, Williamson L, Jennings P, Ioos R, Husson C, Hietala AM, Vivian-Smith A, Solheim H, MaClean D, Fosker C, Hall N, Brown JKM, Swarbreck D, Blaxter M, Downie JA, Clark MD (2018) The ash dieback invasion of Europe was founded by two genetically divergent individuals. Nature Ecology & Evolution **2**:1000-1008.
- (13) Nielsen LR, McKinney LV, Hietala AM, Kjær ED (2017) The susceptibility of Asian, European and North American *Fraxinus* species to the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* reflects their phylogenetic history. Eur. J. Forest Res. **136**: 59-73.
- (14) Pautasso M, Aas G, Queloz V, Holdenrieder O (2013) European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback - A conservation biology challenge. Biological Conservation **158**: 37-49.
- (15) 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.