ナラタケモドキとワタゲナラタケのフユザクラ接ぎ木苗への接種試験

小野里光^{1,2}・太田祐子³・河辺祐嗣^{*3}

ナラタケモドキはサクラ類の根株腐朽病菌として近年問題となっている。そこで、被害林から分離されたナラタケモドキとワタゲナラタケを用いてサクラ苗への接種試験を行った。ナラタケモドキ接種苗4本のうち1本が接種4年後に枯死した。それらすべての接種苗の根系に菌糸束は認められなかったが、根株の外樹皮、内樹皮および形成層に菌糸膜が形成され、枯死苗では地際部の形成層を取り巻いていた。一方、ワタゲナラタケ接種苗は4本すべて枯死しなかった。それらすべての接種苗の根系に多数の菌糸束が絡み付いていたが、菌糸膜の形成は外樹皮の一部に限られ、内樹皮と形成層での菌糸膜形成は接種苗1本の細い根数本のみに認められた。接種苗からはそれぞれの接種菌が再分離された。対照苗3本はすべて枯死せず、菌糸膜や菌糸束の形成も認められなかった。これらの結果から、ナラタケモドキはサクラ苗の内樹皮と形成層に侵入し、さらに枯死させることが明らかになった。

キーワード：ナラタケモドキ、ワタゲナラタケ、サクラ類、接種、病原性

Hikaru Onozato,^{1,2} Yuko Ota,³ Yuji Kawabe^{*,3} (2011) Inoculation of Cherry Seedlings with *Armillaria tabescens* and *A. gallica*. J Jpn For Soc 93: 196–199 Fatal root rot caused by *Armillaria tabescens* is common on cherry trees planted in parks and on streets in Japan. Inoculation experiments using Japanese isolates of *A. tabescens* and *A. gallica* were conducted on 3-year-old cherry seedlings. Four years after inoculation, one of four seedlings inoculated with *A. tabescens* was dead, and all seedlings had mycelial fans of *A. tabescens* beneath the bark. No rhizomorphs were observed on tree root systems or inocula. All seedlings inoculated with *A. gallica* were still alive at the end of the experiment, despite having many rhizomorphs on the root systems and inocula. Mycelial fans of *A. gallica* were found in the periderm of some fine root of one inoculated seedling. Each isolate was reisolated from the inoculated seedling. Neither mycelial fan nor rhizomorphs were formed in all non-inoculated seedlings and they did not die. These results clearly show that *A. tabescens* is pathogenic to cherry seedlings.

Key words: *Armillaria tabescens*, *Armillaria gallica*, *Cerasus* spp., inoculation, pathogenicity

I. は じ め に

ナラタケモドキ (*Armillaria tabescens* (Scop.) Emel) を病原菌とするならたけもどき病は、果樹、緑化樹、観賞樹などに根株腐朽を引き起こす病害として汎世界的に知られる (Rhoads 1950; Tsopelas 1999)。日本では果樹園 (藤井・畑本 1974; 金子・小河 1983, 1988)、公園 (小野里ら 2009)、庭園 (佐藤・鈴木 2002; 長谷川・太田 2003)、街路 (Hasegawa 2005; 金子・小河 1988) など人工的な環境において、広葉樹と針葉樹の両方に発生する。近年、公園や街路などに植栽されているサクラ類の衰退と枯死を引き起こす病害として、ならたけもどき病が問題となっており、その防除が重要課題となっている (Hasegawa 2005; 小野里・河辺 2005; 小野里 2006)。

ならたけもどき病が発生している群馬県下の桜山公園 (フユザクラ [*Cerasus* × *parvifolia* 'Fuyu-zakura' H. Ohba] およびソメイヨシノの植栽) において、杭捕捉試験法 (Mallett and Hiratsuka 1987) によりナラタケ属菌の分布

調査を行ったところ、ナラタケモドキは捕捉されず、病原性の弱いとされるワタゲナラタケ (*A. gallica* Marxm. & Romagn.) が捕捉されたことから、ワタゲナラタケは土壌中に広範囲に生息し、ナラタケモドキは感染したサクラ類の根株に生息すると考えられた (小野里ら 2009)。ならたけもどき病被害地においてワタゲナラタケが同所的に存在する例は他にもあり (坂上ら 2004)、ナラタケモドキとワタゲナラタケはそれぞれの生態と病原性が異なると考えられる。フユザクラは、冬季と春季に2度花が咲くサクラ品種として有名である。桜山公園は国指定名勝・天然記念物「三波川 (サクラ)」が所在するフユザクラの名所で、桜山公園ではフユザクラの枯死跡にフユザクラ接ぎ木苗 (台木はアオハダザクラ [*Prunus lannesiana* (Carr.) Wils., 別名: アオバザクラ]) を補植するケースが多く、補植苗に対するならたけもどき病の影響が懸念される。そこで本研究では、桜山公園で分離されたナラタケモドキとワタゲナラタケの菌株を用いて、フユザクラへの接種試験を行い、両種の病原性を比較したので報告する。なお、ナラタケモドキとワ

* 連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: ykawa@affrc.go.jp

¹ 群馬県林業試験場 〒370-3503 群馬県北群馬郡榛東村大字新井 2935 (Gunma Prefecture Forestry Experiment Station, 2935 Arai, Shinto, Kitagunma-gun, Gunma 370-3503, Japan)

² 現所属: 群馬県環境森林部 〒371-8570 前橋市大手町 1-1-1 (Present address: Gunma Prefecture Greenery Advancement Division, 1-1-1 Otemachi, Maebashi 371-8570, Japan)

³ 独立行政法人森林総合研究所森林微生物研究領域 〒305-8687 つくば市松の里 1 (Department of Forest Microbiology, Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba 305-8687, Japan) (2011 年 1 月 31 日受付; 2011 年 5 月 13 日受理)

タゲナラタケ両種の日本産分離菌株を用いたサクラ類苗木に対する接種試験は、本報告が初めてである。

II. 材料と方法

1. 接種菌株

接種試験に使用したナラタケモドキの菌株 (Isolate No. WD2636) は、群馬県藤岡市にある桜山公園 (北緯 36 度 9 分 30 秒, 東経 139 度 1 分 28 秒) において、フユザクラの枯死木根株部に発生した子実体から 2002 年に分離したものである。また、ワタゲナラタケの菌株 (Isolate No. WD2637) は、同上地において行ったコナラ枝を用いた杭捕捉試験法 (小野里ら 2009) により捕捉されたワタゲナラタケの根状菌糸束から 2002 年に分離したものである。これらの菌株は、日本産の既知の単孢子分離菌株との対峙培養、および核リボソーム DNA の IGS 領域の PCR-RFLP 解析により、それぞれナラタケモドキとワタゲナラタケと同定された (小野里ら 2009)。これらの菌株は森林総合研究所微生物生態研究室に保管されている。

2. 接種源

接種源の作成は Mallett and Hiratsuka (1987) の方法を改変した以下の方法により行った。ソメイヨシノの直径 15~20 mm、長さ約 20 cm の枝を 10 本ずつ高圧滅菌耐性プラスチックバックに入れ、121℃で 1 時間滅菌した。滅菌したサクラ枝に、滅菌水 300 mL、PDA (Difco) 14.6 g を添加し、121℃で 15 分間滅菌した。さらにそのサクラ枝の入った滅菌培地に PDA 平板培地で 2 週間培養した菌体を移植し、25℃、暗黒下で約 2 カ月間、菌がサクラ枝に蔓延するまで培養した。対照区には、菌体の移植以外は同様に処理したサクラ枝を接種源とした。

3. 供試苗

供試苗にはアオハダザクラの台木に接ぎ木された 3 年生のフユザクラを用いた。通常、フユザクラはアオハダザクラを台木として接ぎ木繁殖が行われている。本試験に用いた 11 本の苗の樹高は 121.0 ± 19.3 cm (平均 $\pm$ 標準偏差)、地際直径は 14.8 ± 2.7 mm (同左) であった。

供試苗は、2002 年 5 月、鹿沼土と腐葉土を 5 対 8 の割合で混合した用土を入れた素焼き鉢 (直径 35 cm、深さ 30 cm) に 1 本ずつ植栽した。供試苗の植栽時に、根に接するように試験管 (直径 19 mm、長さ 21 cm) 7 本を埋めた。鉢植えした供試苗は群馬県林業試験場構内の屋外に設置さ

れた挿し床 (軽量ブロックで囲われた中に床土として荒い鹿沼土が深さ約 50 cm 敷かれる) に埋めた。その後供試苗には灌水や施肥を行わず、試験終了まで自然条件下においていた。

4. 接種処理

接種処理は、2003 年 6 月に、Shaw III (1977) の方法を改変した以下の方法により行った。鉢植え時に埋め込んだ試験管を孔が崩れないように引き抜いた後、孔内に露出した根にメスで傷を付け、孔ごとに 1 本の接種源を挿入した。ナラタケモドキとワタゲナラタケではそれぞれ 4 本の苗に、無接種の対照区では 3 本の苗に接種処理を行った。接種後約 3 カ月ごとに葉の萎凋および変色などの根株腐朽病害に特徴的な病徴の有無を観察した。2007 年 12 月から翌年 5 月までに順次、接種苗および未接種苗を鉢から取り出し、用土を洗い落とした後、菌糸束および菌糸膜の有無と存在部位 (外樹皮、内樹皮、形成層) を調査した。菌の再分離は、菌糸膜または菌糸束を分離源として、クロラムフェニコール (和光、大阪) を 50 mg/L 添加した PDA 平板培地で行った。分離菌株の同定は、核リボソーム DNA の IGS1 領域の PCR-RFLP 解析 (小野里ら 2009) により行った。また、接種源のサクラ枝からも再分離と種の同定を行った。接種苗と無接種苗の生育について、2003 年 6 月から 2007 年 12 月までの地際部直径増加量、および 2006 年の 1 本当たり主要な枝 5 本の枝伸長量を測定した。また、接種苗の根量を対照区の無接種苗のものと比較した。

III. 結果と考察

ナラタケモドキの接種苗のうちの 1 本は、2007 年 8 月に全身の葉が萎凋し、その後枝枯れと幹枯れにより枯死が確認された (表-1)。枯死苗 (図-1 (a)) の根株および壊死側根の形成層には白色の菌糸膜が取り巻いており (図-1 (c), (d)), 菌糸膜は地上約 5 cm まで及んでいた (図-1 (b))。枯死に至らなかった接種苗にも、地際や根株および主要な根の外樹皮、内樹皮、形成層に菌糸膜が認められた (表-1) が、菌糸膜は地際部の形成層を取り巻いてはいなかった。菌糸膜および接種源からナラタケモドキが再分離された。これより、ナラタケモドキは、サクラ苗の内樹皮および形成層に侵入し定着すること、場合によっては枯死させることが明らかとなった。根系と根株および接種源のサクラ枝には、菌糸束は認められなかった (図-1 (a))。

表-1. ナラタケモドキとワタゲナラタケを接種したフユザクラ接ぎ木苗の枯死本数、根状菌糸束・菌糸膜の認められた本数、および平均地際部直径増加量・平均枝成長量

接種した ナラタケ属菌の種	接種苗数 (本)	枯死苗数 (本)	根株と根に菌糸束が 認められた苗数 (本)	菌糸膜が認められた部位と苗数 (本)			平均地際部直径増加量* (標準偏差) (mm)	平均枝伸長量** (標準偏差) (cm)
				外樹皮	内樹皮	形成層~本部		
ナラタケモドキ <i>Armillaria tabescens</i>	4	1	0	4	4	4	9.9 (2.9) ^a	6.5 (3.3)
ワタゲナラタケ <i>A. gallica</i>	4	0	4	4	1	0	15.3 (4.9) ^b	12.0 (1.7)
無接種 (対照区)	3	0	0	0	0	0	19.8 (5.2) ^b	15.5 (7.0)

* 2003 年 6 月から 2007 年 12 月の間の地際部直径増加量の平均値。Tukey-Kramer 法による多重比較分析 ($\alpha=0.05$) により異記号で有意差あり、同記号で有意差なし。** 2006 年の苗 1 本当たり主枝 5 本の枝伸長量の平均値。一元配置分散分析 ($\alpha=0.05$) および Tukey-Kramer 法 ($\alpha=0.05$) による多重比較分析で有意差なし。

図-1. ナラタケモドキの接種により枯死したフユザクラ接ぎ木苗

細根は適宜切断され、接種源は取り除かれている。(a) 菌糸束は認められない、(b) 地際から地上 5 cm までの幹部樹皮下の白色の菌糸膜、(c) 木部が壊死している根幹部樹皮下の白色の菌糸膜、(d) 壊死した側根部樹皮下の白色の菌糸膜。

図-2. ワタゲナラタケを接種したフユザクラ接ぎ木苗の根株と根

根は適宜切断されている。接種源から発生した多数の菌糸束が根株と根に絡み付き付着している。

すべてのワタゲナラタケの接種苗においては、枯死したものはなかった(表-1)が、多数の菌糸束が接種苗の地際や根系に絡み付いていた(図-2)。菌糸束が付着した根系の外樹皮には菌糸膜がわずかに形成されていた(図-3)が、菌糸膜が内樹皮および形成層に侵入していたのは4本中1本で、その細い根に数カ所だけであった(表-1)。菌糸膜、菌糸束および接種源よりワタゲナラタケが再分離された。これよりワタゲナラタケは外樹皮には侵入するが、内樹皮および形成層に侵入し定着することはまれであると考えられた。ワタゲナラタケは、欧米における接種試験の結果や野外観察では生きた組織に侵入することはほとんどないことから、病原性が弱い種であるとされている(Gregory *et al.* 1991; Guillaumin *et al.* 1993)。ワタゲナラタケによる野外での被害例は、ギリシャでリンゴやプラム(Tsopelas 1999)、北アメリカでチェリー(Proffer *et al.*

図-3. ワタゲナラタケを接種したフユザクラ接ぎ木苗の根の横断面

菌糸束(RH)が付着した外樹皮(OB)内に白色の菌糸膜(MF)が形成されている。

1988)に数例報告されているのみである。また、接種試験では、ワタゲナラタケがアーモンド(Tsopelas and Tjamos 1997)、サクラ接ぎ木苗(Proffer *et al.* 1988)、マツ(Rishbeth 1984, 1985)を感染枯死させ、病原性を示した例が報告されている。ワタゲナラタケの方がナラタケモドキよりも強い病原性を示した報告もある(Tsopelas and Tjamos 1997; Metaliaj *et al.* 2006)。今回の接種試験ではワタゲナラタケがサクラ苗の外樹皮に定着しているのが観察されたことから、宿主が何らかの理由で衰弱すると定着部位を徐々に拡大する可能性があると考えられる。なお、対照区の無接種苗は枯死せず、根系と根株、接種源に菌糸束と菌糸膜の形成は認められなかった。

ナラタケモドキ接種苗およびワタゲナラタケ接種苗の成長を対照区の無接種苗と比較した場合、ナラタケモドキの接種苗の細根量(データ示さず)は明らかに少なく、平均地際部直径増加量(2003年6月から2007年12月の間の地際部直径増加量の平均値)およびは平均枝伸長量(2006年

の苗1本当たり主枝5本の枝伸長量の平均値)は1/2以下であったのに対し、ワタゲナラタケの接種苗の細根量(データ示さず)は対照区の無接種苗とほぼ同じ、平均地際部直径増加量および平均枝伸長量はやや小さかった(表-1)。ナラタケモドキの接種によって苗の成長はかなり大きな影響を受けていたことが明らかになった。苗の平均地際部直径増加量については、ナラタケモドキ接種苗、ワタゲナラタケ接種苗および無接種苗の苗間に一元配置分散分析($\alpha=0.05$)で有意差が認められ、Tukey-Kramer法による多重比較分析($\alpha=0.05$)でナラタケモドキ接種苗と無接種苗およびワタゲナラタケ接種苗との間に有意差が認められた。平均枝伸長量については苗間に一元配置分散分析($\alpha=0.05$)およびTukey-Kramer法($\alpha=0.05$)による多重比較分析で有意差が認められなかった。

ワタゲナラタケの接種苗では根系と根株に多数の菌糸束の付着が認められたが、ナラタケモドキの接種苗には菌糸束が全く認められなかった。ナラタケモドキは培地上では菌糸束を形成するが、野外では菌糸束の形成が認められることはまれであり(Hasegawa 2005; Rishbeth 1982, 1991; Rhoads 1945; Termorshuizen 2000), ならたけもどき病被害地で行った杭捕捉試験では杭にはナラタケモドキの菌糸膜が形成されたが、菌糸束の形成はみられなかった(小野里ら 2009)と報告されている。今回の接種試験によっても野外では菌糸束を形成しないことが確認された。ナラタケモドキの土壤中の感染様式は、ワタゲナラタケのように菌糸束によって感染を拡大するのではなく、接種源との接触によるものと考えられた。

ナラタケモドキおよびワタゲナラタケの接種源は、接種処理の約4年後でも生きていることが確かめられた。このことから、ならたけもどき病で枯死したサクラ類の根株と根系にナラタケモドキが長期間生存し、周囲への感染源になると思われた。ナラタケモドキの感染拡大を阻止するには、枯死木の根株と根系の早期駆除が必要と考えられた。

本試験により、ナラタケモドキは接種源との接触によりフユザクラ苗木を感染・枯死させることが明らかになった。ナラタケモドキの病原性については、今後さらに菌株数、サクラ類の品種や変種数を増やして検討する必要がある。

接種源の作成方法についてご指導いただいた長谷川絵里氏((独)森林総合研究所関西支所)、サクラ類の分類についてご教示いただいた勝本俊雄氏((独)森林総合研究所森林植生研究領域)、統計分析についてご協力いただいた加賀谷(正田)悦子博士((独)森林総合研究所森林昆虫研究領域)と秋庭満輝氏((独)森林総合研究所森林微生物研究領域)、試験設定および結果調査にご協力いただいた群馬県林業試験場作業員の方々に厚くお礼申し上げます。

引用文献

藤井新太郎・畑本 求(1974) ナラタケモドキによるモモの衰弱枯死. 植物防疫 28: 219-222

- Gregory SC, Rishbeth J, Shaw III CG (1991) Pathogenicity and virulence. In: *Armillaria* root disease. Agriculture handbook. Shaw III CG, Kile GA (eds) No. 691. United States Department of Agriculture, Forest Service, 76-87
- Guillaumin JJ, Mohammed C, Anselmi N, Courtecuisse R, Gregory SC, Holdenrieder O, Intini M, Lung B, Marxmüller H, Morrison D, Rishbeth J, Termorshuizen AJ, Tirrò A, van Dam B (1993) Geographical distribution and ecology of the *Armillaria* species in western Europe. *Eur J For Pathol* 23: 321-341
- 長谷川絵里・太田祐子(2003) ならたけもどき病により枯死したヒマラヤスギ. 日林学術講 114: 763
- Hasegawa E (2005) Decline of ornamental cherry trees along streets in Tsukuba city in Japan associated with *Armillaria tabescens*. In: Proceedings of the 11th International Conference on Root and Butt Rots. Mańka M, Lakomy P (eds) Cieszkowski Agricultural University, Poznań, 181-185
- 金子周平・小河誠司(1983) ナラタケモドキによる樹木の被害. 森林防疫 32: 120-121
- 金子周平・小河誠司(1988) 福岡県におけるならたけもどき病の発生. 森林防疫 47: 164-168
- Mallett KI, Hiratsuka Y (1987) Inoculation studies of lodgepole pine with Alberta isolates of the *Armillaria mellea* complex. *Can J For Res* 18: 292-296
- Metaliaj R, Sicoli G, Luisi N (2006) Pathogenicity of *Armillaria* isolates inoculated on five *Quercus* species at different watering regimes. *Phytopathol Mediterr* 45: 3-9
- 小野里光(2006) ならたけもどき病による樹木被害. 群馬県林試研究報告 11: 30-44
- 小野里光・河辺祐嗣(2005) ならたけもどき病の群馬県林業試験場樹木園における被害実態. 日林関東支論 56: 281-282
- 小野里光・河辺祐嗣・太田祐子・菊地泰生・金澤好一(2009) ならたけもどき病被害地におけるナラタケ属菌の杭捕捉法による検出. 日林誌 91: 201-207
- Proffer TJ, Lones AL, Perry RL (1988) Testing of cherry rootstocks for resistance to infection by species of *Armillaria*. *Plant Dis* 72: 488-490
- Rhoads AS (1945) A comparative study of two closely related root-rot fungi, *Clitocybe tabescens* and *Armillaria mellea*. *Mycologia* 37: 741-766
- Rhoads AS (1950) Clitocybe root rot of woody plants in the southeastern United States. *US Dept Agric Circ* No. 853: 1-25
- Rishbeth J (1982) Species of *Armillaria* in southern England. *Plant Pathol* 31: 9-17
- Rishbeth J (1984) Pathogenicity tests for *Armillaria*. In: Proceedings of the 6th International conference on Root and Butt Rots. Kile GA (ed) IUFRO, Melbourne and Gympie (AU), 131-139
- Rishbeth J (1985) Infection cycle of *Armillaria* and host response. *Eur J For Pathol* 15: 332-341
- Rishbeth J (1991) *Armillaria* in an ancient broadleaved woodland. *Eur J For Pathol* 21: 239-249
- 坂上大翼・松下範久・鈴木和夫(2004) 都市樹林地で数種の広葉樹に発生したならたけもどき病被害と病原菌のジェネット識別. 樹木医学研究 8: 36
- 佐藤咲枝・鈴木和夫(2002) ラカンマキを枯死させたナラタケモドキ. 森林防疫 51: 40
- Shaw III CG (1977) *Armillaria* isolates from pine and hardwoods differ in pathogenicity to pine seedlings. *Plant Dis Reporter* 61: 416-418
- Termorshuizen AJ (2000) Ecology and epidemiology of *Armillaria*. In: *Armillaria* root rot: Biology and control of honey fungus. Fox RTV (eds) Intercept Ltd, 45-56
- Tsopelas P (1999) Distribution and ecology of *Armillaria* species in Greece. *Eur J For Pathol* 29: 103-116
- Tsopelas P, Tjamos EC (1997) Occurrence and pathogenicity of *Armillaria tabescens* on almond in Greece. *Bull OEPP/Eppo Bull* 27: 455-461