

## 東京大学秩父演習林におけるナミダタケモドキによる根株心腐の感染経路の検討

### 一支障木伐採根の解体による予備的調査結果一

原口竜成<sup>1</sup>・平尾聡秀<sup>1</sup>・山田利博<sup>1</sup>

1 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林秩父演習林

**要旨**：ナミダタケモドキによる根株心腐被害林において、作業道開設支障木の伐採根を調査・解体し、根からの感染可能性について検討を行った。2019年開設作業道の150mの区間で43本のサワラ伐採根を調べた結果、65%の伐採根に根株心腐が確認された。6本の伐採根を対象にDNA解析によるナミダタケモドキの検出と解体による侵入経路の推定を行った。その結果、1本の伐採根からナミダタケモドキが分離されたほか、腐朽材から抽出したDNAのアンプリコンシーケンスにおいて、全伐採根から *Serpula* 属菌が検出された。さらに、5本の伐採根で腐朽部は根を通じて土壌と接していた。これらの結果から、本林分における被害の原因菌はナミダタケモドキである可能性が高く、根を通じて感染する可能性が示された。

**キーワード**：ナミダタケモドキ、根株心腐、サワラ

### Investigation of the infection route of *Serpula himantoides* causing butt rot in the University of Tokyo Chichibu Forest

#### - Results of the preliminary survey by dissecting stumps of obstructive trees -

Ryusei HARAGUCHI<sup>1</sup>, Toshihide HIRAO<sup>1</sup>, Toshihiro YAMADA<sup>1</sup>

1 The University of Tokyo Chichibu Forest

**Abstract**: We surveyed and dissected the stumps of trees that had become obstacles during the establishment of the work road in the stand where the butt rot caused by *Serpula himantoides* occurred to investigate the possibility of infection from the roots. The survey was carried out on a 150 m section of the work road that was established in 2019. Butt rot was observed in 65% of the stumps of 43 *Chamaecyparis pisifera* trees. Six stumps were subjected to DNA analysis for the detection of *Serpula himantoides* and dissection for the estimation of the infection route. As a result, *Serpula himantoides* was isolated from one stump, and *Serpula* spp. were detected in all stumps by amplicon sequencing of DNA extracted from decayed wood. In five stumps, the decayed area was in contact with the soil through the roots. These results indicate that the causal agent of butt rot in this stand is most likely *Serpula himantoides*, which can be infected through the roots.

**Key-word**: *Serpula himantoides*, butt rot, *Chamaecyparis pisifera*

#### I はじめに

東京大学秩父演習林（埼玉県秩父市）のサワラ高齢林の一部では、ナミダタケモドキ (*Serpula himantoides*) による根株心腐被害が確認されている (2)。

本菌に感染した生立木は幹と根株の心材が褐色に腐朽し、腐朽が進行した感染木の風倒も発生している。このため防除対策についての検討が必要であるが、本菌の林内への定着や樹体への侵入といった感染経路は明らかになっていない。

根株心腐病菌には立木の根を経由して感染することが

報告されているものがあるが、実際に根を掘取り・解体して針葉樹根株心腐の感染経路を調べた事例は少ない。国内の針葉樹の事例はカラマツやトドマツについての事例がほとんどであり (例えば 9, 8, 4, 5), サワラについての事例はない。海外ではナミダタケモドキの根からの感染の事例が1980年代に1例報告されている (10)。これらの事例では根株心腐病菌が根株・主根 (図-1) から侵入したことが報告されている。

2019年から2020年にかけて秩父演習林のサワラ根株心腐被害林分を通過する作業道の開設に伴い、幅員およ

び路肩に位置するサワラが支障木として伐採され、残置された伐採根を調べる機会が得られた。

本研究では、この伐採根を解体して調べることで、根株心腐の発生状況を把握し、分子生物学的手法を用いて本林分における根株心腐病菌と考えられるナミダタケモドキの検出を行った。また、伐採根の一部を解体することで、本菌の根からの感染可能性について検討を行った。

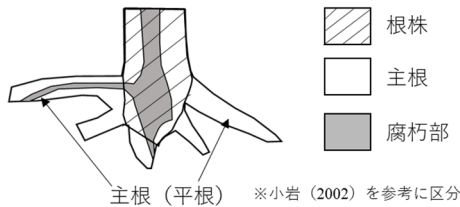


図-1. 本研究における伐採根の部位区分

Fig.1 Classification of roots in this study.

## II 材料と方法

**1. 調査地および調査実施時期** 調査地は埼玉県秩父市大滝に位置する東京大学秩父演習林 31 林班内のサワラ高齢級林分である。林分面積は 1.93 ha であり、2021 年時点の林齢は 94 年生である。本林分の一部ではナミダタケモドキによる根株心腐被害が報告されている (2)。

本林分では 2019 年と 2020 年に幅員 2.5 m の作業道が開設された。このうち 2019 年開設区間にプロットを設定した。プロットの延長は 150 m であり、幅は路肩を含む 4 m とした。プロット内には幅員部分の伐採根が掘取られて路肩に残置されているほか、路肩部分の伐採根が掘取られずに残置されている。

作業道開設後約 1 ヶ月経過した 2020 年 1 月に、プロットにおいて根株心腐被害の発生状況調査、ナミダタケモドキの検出のためのサンプル採取、および伐採根の解体による腐朽部の形状確認を行った。

**2. 根株心腐の発生状況の把握** プロットで確認された伐採根のうち、損傷が激しいもの・伐採断面が地際であったものを除く 43 本の伐採根を対象に、根株心腐の発生状況を調査した。調査は、チェーンソーで伐採根の地上高 50 cm の横断面を露出させた後、腐朽部 (空洞や褐色に変色した部分) の有無を目視で確認し記録した (図-2)。また、地上高 50 cm の直径を輪尺で 2 方向から測定し、腐朽部が確認できた伐採根ではその直径も測定した。測定結果を基に、対象地の本数腐朽率と腐朽径比率 (腐朽部直径/伐採根直径) を算出した。

**3. ナミダタケモドキの検出** 掘取られた伐採根のうち、根株心腐が確認され、かつ、安全に作業可能な 6 本 (伐採根 A~F) を対象に、根切り用ソーチェーンを装

備したチェーンソーを用いて縦断面を露出させ、この縦断面から採取した腐朽材サンプルを用いて菌の分離とアンプリコンシーケンスの 2 つの方法で根株心腐の原因菌と考えられるナミダタケモドキまたは *Serpula* 属菌が検出されるかを調べた (図-2)。

菌の分離では、分離用の腐朽材をチェーンソーとノミを用いて地上高 50 cm の高さで腐朽部の縁から横 3 cm の位置で採取した。1%次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した腐朽材小片 6 個を PDA 培地上で 22°C・20 日間培養し、分離菌株を得た後、NucleoSpin Plant II (タカラバイオ社) を使用して規定のプロトコルにより DNA を抽出した。分離菌の rDNA の ITS 領域を ITS5 (12) /ITS4 (12) のプライマーペアを用いて PCR 増幅し、決定した塩基配列を国際塩基配列データベース (DDBJ) 上の登録配列と照合し (相同性 99%以上) 同定した。

アンプリコンシーケンスでは、解析用の腐朽材を地上高 50 cm と 0 cm で火炎滅菌したドリルを用いて腐朽部の縁から横 3 cm の位置で採取した。凍結乾燥した 5 mg の腐朽材から菌の分離と同じ方法で DNA を抽出した。抽出した菌類の rDNA の ITS2 領域を gITS7 (3) /ITS4ng (11) のプライマーペアを用いて PCR 増幅し、Illumina Miseq (2×300 bp) によるアンプリコンシーケンス解析を行い PIPITS 2.3 パイプライン (1) と UNITE 真菌データベースにより分類した。

**4. 伐採根の解体による腐朽部の形状確認と侵入経路の推定** ナミダタケモドキ検出用の腐朽材サンプルを採取した後、腐朽部の形状を確認しながら根株を解体し、腐朽部が根を通じて土壌と接しているか調べた。

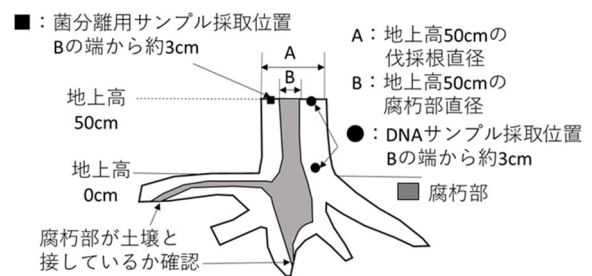


図-2. サンプル採取の概要

Fig.2 Overview of sample collection.

## III 結果

**1. 根株心腐の発生状況 (表-1)** 調査対象の伐採根のうち 28 本の断面で腐朽部が確認され、本数腐朽率は 65.1%であった。腐朽被害木の伐採根平均直径は 35.3 cm、腐朽部平均直径は 11.3 cm、平均腐朽径比率は 30.2%であった。

2. ナミダタケモドキの検出 (表-2) 腐朽材からの菌の分離では1本(伐採根B)からナミダタケモドキが分離された。その他の伐採根からは *Trichoderma* 属菌や *Mortierella* 属菌が分離され、ナミダタケモドキは分離されなかった。

アンプリコンシーケンスの結果、全サンプルから *Serpula* 属菌が検出された。全リード数における *Serpula* 属菌のリード数の割合は0.1~16.4%であった。OTU (Operational Taxonomic Unit) をオープンアノテーションツール FUNGuild (6) により区分したところ、全サンプルの全地上高において *Serpula* 属菌は木材腐朽菌内の優占度が高かった。

3. 伐採根の解体による腐朽部の形状確認と侵入経路の推定 (図-3) 伐採根を解体した結果、伐採根Cを除く5本の伐採根で腐朽部が根を通じて土壌と接していることが確認できた。伐採根Cは腐朽部が大きく解体できなかった。伐採根の腐朽部の形状は、いずれも地上高0 cmの腐朽部の径が地上高50 cmの径よりも大きかった。腐朽部と土壌との接点は、伐採根A・D・E・Fの4本では根株の真下に確認された。伐採根Bでは腐朽が主根(平根)方向に伸び土壌と接していることが確認できた。接点はいずれも地表下30 cm未満の浅い位置であった。伐採根Eでは主根(平根)にも腐朽部が見られたが、腐朽部の形状が複雑であったため、根株の腐朽および土壌と接しているか確認できなかった。

害率である。本研究のプロットと前回の報告の調査プロット間の距離は約100 mであることから、本林分における根株心腐の発生はこの2地点を結んだ100 mの範囲にも及んでいる可能性がある。

北海道におけるカラマツ高齢林の事例(13)では、本数腐朽率22.1%で腐朽径比率は40~60%が多かったと報告されている。この事例と比較すると、本林分における被害は、林分レベルでの被害率(本数腐朽率)が高く、単木レベルの被害(腐朽径比率)は低い傾向がみられた。

菌の分離ではナミダタケモドキは1本の伐採根から分離された。環境試料からの木材腐朽菌の分離は成長の速い菌が存在するため実用的でないことが指摘されており(7)、本研究においてもサンプル中のナミダタケモドキよりも *Trichoderma* 属菌等の成長の速い菌が伸長した可能性が考えられる。なお、*Trichoderma* 属菌・*Mortierella* 属菌はアンプリコンシーケンスにより全伐採根より検出されている。

アンプリコンシーケンスにより、ナミダタケモドキが分離できなかった伐採根からも *Serpula* 属菌を検出することができた。前報(2)と同様の被害状況であることと併せて、本林分における根株心腐病菌はナミダタケモドキである可能性が高いと考えられる。また、*Serpula* 属菌は地上高50 cm・0 cmのいずれにおいても検出されていることから、伐採根の中に広く分布している可能性が

IV 考察

1. 根株心腐の発生状況と原因菌 今回の調査では本数腐朽率65%の根株心腐の発生が確認された。この腐朽率は前報(2)における本数腐朽率(67.9%)と同様の被害

表-1. 根株心腐被害の発生状況

Table 1. The occurrence of butt rot.

腐朽の有無	本数	伐採根平均直径(cm)	腐朽部平均直径(cm)	平均腐朽径比率(%)
腐朽部あり	28	35.3	11.3	30.2
腐朽部無し	15	29.5		
合計	43	33.3		

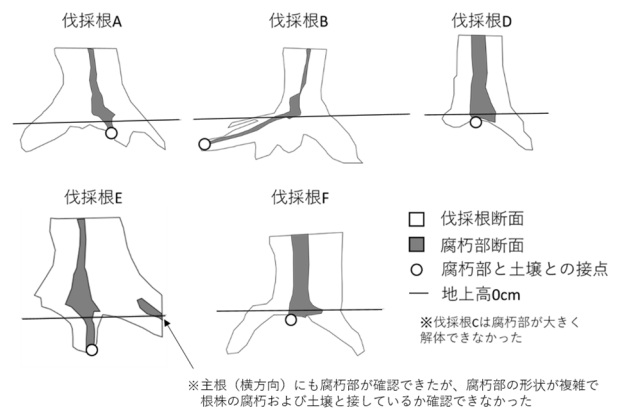


図-3. 伐採根解体結果の模式図

Fig. 3 Schematic diagram of dismantling results of cut roots.

表-2. 菌分離およびアンプリコンシーケンスによる *Serpula* 属菌の検出結果

Table 2. Results of fungi isolation and detection of *Serpula* spp. by amplicon sequencing.

伐採根名称	A		B		C		D		E		F	
分離された菌	<i>Trichoderma</i> 属菌		ナミダタケモドキ		<i>Trichoderma</i> 属菌		<i>Mortierella</i> 属菌		<i>Trichoderma</i> 属菌		<i>Mortierella</i> 属菌	
アンプリコンシーケンス												
サンプル採取地上高(cm)	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0
全リード数	28850	64056	34780	31658	72272	70053	31099	50012	45813	40693	35620	84911
<i>Serpula</i> 属菌リード数	2943	309	1187	2007	1122	76	1682	472	5209	6659	1493	569
<i>Serpula</i> 属菌リード数割合(%)	10.2	0.5	3.4	6.3	1.6	0.1	5.4	0.9	11.4	16.4	4.2	0.7
木材腐朽菌内上位1	<i>Serpula</i>	Agaricales	<i>Serpula</i>	<i>Serpula</i>	<i>Serpula</i>	Botrybasidiaceae	Agaricales	Agaricales	<i>Serpula</i>	<i>Serpula</i>	Agaricales	<i>Serpula</i>
木材腐朽菌内上位2	Helotiaceae	<i>Serpula</i>	Helotiaceae	Helotiaceae	Helotiaceae	<i>Serpula</i>	<i>Serpula</i>	Helotiaceae	Helotiaceae	<i>Peniophora</i>	<i>Serpula</i>	Agaricales
木材腐朽菌内上位3	Agaricales	Helotiaceae	<i>Acremonium</i>	Agaricales	<i>Peniophora</i>	Helotiaceae	Helotiaceae	<i>Serpula</i>	Agaricales	Helotiaceae	Helotiaceae	Helotiaceae

示唆された。今後、検出された *Serpula* 属菌がナミダタケモドキであることを確定するために、ナミダタケモドキの種特異的プライマーを用いた PCR による検出を行う必要がある。

**2. 伐採根の解体による腐朽部の形状確認と侵入経路の推定** 海外の事例ではナミダタケモドキによる感染が根株と主根から発生していたことが報告されている(10)。また、カラマツの事例でも根元直下における根の分岐付近からの侵入が報告されている(5)。本研究においても根株で腐朽部と土壌との接点を確認できたため、根株心腐病菌が根株あるいは根株直下の主根から侵入した可能性が高いと考えられる。

また、トドマツの解体事例では根部の腐朽が伐根から横に走る平根および伐根直下の杭根に認められたことが報告されている(9)。カラマツについても同様の報告がある(4)。今回の調査では、主根(平根)における腐朽部と土壌との接点は1本の伐採根で確認できたのみであった。このため、今後解析数を増やし、主根(平根)からの侵入の有無について調べる必要がある。

## V おわりに

今回の調査結果から、本林分においても前報(2)と同等の激甚な被害であること、根株心腐病菌はナミダタケモドキである可能性が高いこと、また、根株心腐病菌が根を通じて感染する可能性があることが明らかになった。

一方、本研究で調べた伐採根は解析目的で掘取ったものではないため、主根の一部や細根等が欠損していた。このため小岩(4)のような根を詳細に区分した解析はできていない。また、解体数も先行研究と比較して多いとは言えず、菌の分離やDNA抽出のためのサンプル採取部位も少ない。このため、今後、解析目的でサワラの根株を多数掘り出し、根株全体のサンプルを用いた詳細な検討を行う必要がある。

さらに、ナミダタケモドキの土壌中の分布は明らかになっておらず、これについて検討を行うことで樹体内への感染経路を明らかにしていく必要がある。

本研究で決定した塩基配列は国際塩基配列データベース(DDBJ)に登録した。伐採根Bから分離されたナミダタケモドキの塩基配列のアクセッション番号はLC659327である。アンプリコンシーケンスのDRR Runアクセッション番号はDRR328633-DRR328644である。

**謝辞**：本研究はサントリー天然水の森 東京大学秩父演習林プロジェクト研究助成金の助成を受けて行った。

## 引用文献

- (1) Gweon HS, Oliver A, Taylor J, Booth T, et al. (2015) PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 973-980
- (2) 原口竜成・平尾聡秀・山田利博 (2017) 東京大学秩父演習林におけるサワラ根株心腐被害の発生状況. *関東森林研究* 68 (2): 181-184
- (3) Ihrmark K, Bodeker, ITM, Cruz-Martinez K, Friberg H, et al. (2012) New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol Ecology* 82: 666-677
- (4) 小岩俊行 (2002) カラマツ根株心腐痛菌の侵入口. *日本林学会誌* 84: 9-15
- (5) 黒田吉雄・高見澤澄・佐藤美穂・杉山昌典 (2003) 若齢カラマツ人工林の林床における根株心腐病菌と罹患木の分布および腐朽菌の侵入部位. *筑波大学農林技術センター演習林報告* 19: 41-53
- (6) Nguyen NH, Song Z, Scott TB, Branco S, et al. (2016) FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* 20: 241-248
- (7) Nicolotti G, Gonthier P, Guglielmo F (2010) Advances in detection and identification of wood rotting fungi in timber and standing trees: Molecular Identification of Fungi, 251-276
- (8) 大槻晃太・榊田範久・川口知穂 (1997) 主要材質劣化病害(カラマツ根株心腐病)の被害実態の解明と被害回避法の開発. *福島県林業試験場研究報告* 30:115-125
- (9) 佐々木克彦・松崎清一・林康夫 (1983) トドマツ間伐試験地における腐朽菌害. *日本林学会大会学術講演集* 94: 543-544
- (10) Seehan G (1986) Butt rot in conifers caused by *Serpula himantoides* (Fr.) Karst. *European Journal of Forest Pathology* 16 (4) : 207-217
- (11) Tedersoo L, Bahram M, Polme S, Koljalg U, et al.(2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346:1078
- (12) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, 315-322
- (13) 山口岳広 (2012) カラマツ高齡林における根株腐朽被害と土壌硬度および透水性との関係-札幌羊ヶ丘での事例-. *北方森林研究* 60: 107-110