

〈一般研究課題〉 森林新興感染症Beech Leaf Diseaseの解明と
国際防疫への提言

助成研究者 中部大学 長谷川 浩一



森林新興感染症Beech Leaf Diseaseの解明と 国際防疫への提言

長谷川 浩一
(中部大学)

Understanding Beech Leaf Disease: An Emerging Forest Threat and Proposals for International Plant Protection

Koichi Hasegawa
(Chubu University)

Abstract :

Beech leaf disease (BLD), caused by the nematode *Litylenchus crenatae*, is a newly emerging forest disease in North America. Since it was first reported on American beech (*Fagus grandifolia*) in northeastern Ohio in 2012, BLD has rapidly spread to several other U.S. states and one Canadian province. In 2019, a nematode was also isolated from leaf blisters on Japanese beech (*Fagus crenata*) in Iwate Prefecture, Japan, and was identified as *L. crenatae*. Although the nematodes found in North America and Japan belong to the same species, there have been no reports of beech tree mortality associated with this nematode in Japan. To investigate the relationship between *F. crenata* and *L. crenatae*, we surveyed leaf blister symptoms in beech forests across Japan and attempted to detect the presence of the nematode. Symptomatic leaves were found in seven of eight surveyed beech forests across seven prefectures, and *L. crenatae* was successfully isolated from them. None of the affected trees showed signs of decline or mortality and appeared to be in good health. These findings suggest that *L. crenatae* may be a native species in Japan, forming a non-pathogenic, possibly symbiotic relationship with Japanese beech trees.

1. はじめに

北半球の温帯地域に生息するブナ属*Fagus*樹種は、豊かな自然生態系を育む広大なブナ林を形成

し、日本そしてヨーロッパにて世界遺産として大切に保護されている。近年、北米のブナ *F. grandifolia* に「葉ぶくれ」が生じて集団で枯れていくブナ枯れ病「Beech Leaf Disease : BLD」が問題となっていて、その病原体として線虫の1種 *Litylenchus crenatae* が断定された (Carta, et al., 2020)。2012年にオハイオ州で初めてBLDが報告されて以来、ペンシルベニア州、ニューヨーク州、コネチカット州、マサチューセッツ州、メイン州、ロードアイランド州、ニュージャージー州、ウエストバージニア州、カナダ・オンタリオ州へと瞬く間に広がっていった (Ewing et al., 2019; Vieira et al., 2023)。本線虫によって引き起こされる症状として、葉脈間の組織に帯のような膨れ (Blister) が生じ、そのなかで線虫が増殖していることが確認されている。線虫はまた冬芽にも移動して組織を摂食し、その結果ブナは翌年の新葉を展開できなくなってしまう、本病に感染してからおよそ5年以内に枯死してしまう。

BLDの病原体が線虫であることが発表される以前、2018年に日本の岩手県にある森林総合研究所東北支所敷地内に植林されたブナ *F. crenata* に葉ぶくれが観察され、そこから線虫 *L. crenatae* が分離・新種記載されていた (Kanzaki et al., 2019)。しかし、日本のブナがBLDによって枯死するといった報告は全くなく、そして葉ぶくれがどれくらい蔓延しているのかといった情報も全くなかった。2023年に実施した我々の予備調査から、中部3地域 (静岡県川根本町、長野県菅平高原、新潟県湯沢町) の健全なブナにも葉ぶくれが普通にみられ、そしてそこから線虫 *L. crenatae* が分離されることを確認した。したがって、線虫 *L. crenatae* は「日本あるいはアジアが原産地」であり、「日本の森林生態系のなかでブナとバランスのとれた関係が成り立っていた」が、「何らかの原因で北米に侵入」し、「北米のブナに病原性を発揮」してしまった「森林振興感染症」ではないかといった仮説を立てた。

本申請研究では、アメリカBLD研究チーム (USDA Forest Service, USDA ARS, The Connecticut Agricultural Experiment Station) と共同で、日本と北米における線虫 *L. crenatae* の生息分布の調査と遺伝子多型解析をおこない、線虫感染症が北米ブナ林にて突如蔓延した理由、枯死メカニズム、病原体の侵入・拡散経路を明らかにすることを目的とする。我が国はじめ世界のブナ林のリスク評価といった、国際防疫上重要な意義を持つ研究である。

2. 試料および実験方法

2.1. 調査地

日本国内におけるブナ葉ぶくれ状況を調査するために、7道県 (北海道、青森県、岩手県、新潟県、静岡県、愛媛県、鹿児島県) に広がる8か所のブナ林を対象とした (表1)。各地点では、地上からブナの葉を見上げ、陰になっている部分や葉ぶくれ症状がみられる疑いのある箇所を特定した。その後、高枝切りばさみを用いて葉ぶくれ症状のある葉を含む枝を切断し、葉サンプルを採取した。なお、サンプリングを実施するにあたり、全ての場所において申請し許可を頂いている。

表1. 調査したブナ林

道県名	サイト名	Google Map 位置情報
1. 北海道	黒松内	https://maps.app.goo.gl/mM5guqZJwJmXpkEL7
2. 北海道	奥尻島 21 世紀復興の森	https://maps.app.goo.gl/zbF5ddvTQsEhhUCS7
3. 青森県	白神山地	https://maps.app.goo.gl/DER9fRqsgK4zV1CL9
4. 岩手県	安比高原、ブナの駅	https://maps.app.goo.gl/mXLkAMRDDz4vvNvj8
5. 新潟県	静岡大学苗場試験地	https://maps.app.goo.gl/Zjzh38ixbmiPSANt7
6. 静岡県	静岡大学山犬段試験地	https://maps.app.goo.gl/JBT3RjRs4m2R2ix08
7. 愛媛県	瓶ヶ森	https://maps.app.goo.gl/ipxxfCtsbGc6vQbE7
8. 鹿児島県	紫尾山	https://maps.app.goo.gl/4xqYm8g1WWLeJMju7

2.2. 線虫の抽出

葉ぶくれが見られる箇所をおおよそ1 cm角の大きさにはさみで切り刻み、脱イオン水の入ったシラキース時計皿に移して室温で2日間あるいは冷蔵庫で1週間ほど浸漬した。線虫がいる場合は葉から泳ぎ出てくるので、線虫ピッカー(細い針をホルダーに付けたもの)にて拾い上げて回収し、形態観察及び遺伝子解析をおこなった。

2.3. COXI遺伝子配列の決定

PCRチューブ1本あたり滅菌水 5 μ LとProteinase K solution 0.1 μ Lを入れ、そこに線虫1頭を移したのち55℃で60分のタンパク質分解処理をおこなった。続いて95℃で10分間の変性処理をおこなったのち、これをテンプレートにCOXI遺伝子をPCRにより増幅させた。PCRに使用したプライマーは、Lcc_amiCOX1_For, 5' - CTC TGT CTT GAC TCT TCA TGC - 3' およびLcc_amiCOX1_Rev, 5' - CCT CTC AGA TAA TCA GGG TAG TCC - 3' の組み合わせを使用し、およそ1.2 kbの遺伝子断片を得た。PCR産物をゲル精製したのち、PCR時に使用したプライマーおよびLcc_amiCOX1_ForII, 5' - GGT TAG TTC TTT ACT GGG AGG G - 3' を用いてシーケンスをおこなった。

3. 実験結果

3.1. 葉ぶくれの発生状況

日本国内におけるブナ林の北限は北海道寿都郡黒松内町であり、国の天然記念物(歌才ブナ林)として保護されている。また、南限は鹿児島県の大隅半島に位置する、鹿屋市垂水市をまたぐ高隈山とされているが、今回のサンプリング南端は同県出水市と薩摩郡をまたぐ紫尾山にて実施した(表1)。紫尾山以外の地点すべてのブナ林(*F. crenata*)にて葉ぶくれ症状を確認することができ。白神山地や安比高原(図1)で葉ぶくれを示す葉の頻度が多く、中部以西と比較して北海道や東北が症状の多い傾向が見られた。調査対象の個体すべての葉にこの症状が現れていることはなく、葉ぶくれ症状が多数の葉に認められる個体においても衰弱しているようには見られなかった。



図1. 岩手県安比高原で確認された葉ぶくれの様子。

3.2. 線虫の分離

計58本のブナ樹木から葉ぶくれを示す葉をサンプリングして線虫抽出を試みたところ、49本(84%)から多数の線虫を分離することができた。雄及び雌成虫の形態的特徴から *Litylenchus crenatae* であると推定した(図2)。

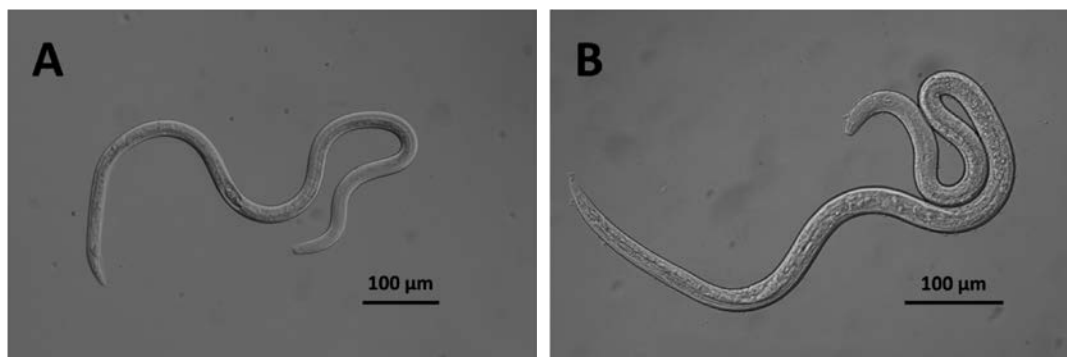


図2. 線虫 *L. crenatae* 雄成虫(A)と雌成虫(B)。

3.3. 遺伝子配列比較

日本産線虫から得られたCOXI遺伝子配列やく600 bpを比較したところ、北米産 *L. crenatae mccannii* との一致率が95-98%であり、同種 *L. crenatae* であると断定した。国内産線虫間で1.1bpの配列比較をおこなったところ、95-97%の一致率であった。これまで日米線虫をそれぞれ *L. crenatae crenatae* および *L. crenatae mccannii* と、両者を亜種として区別していたが、ともに同種 *L. crenatae* として統一することにした(Robert Marra, Paulo Vieira & Koichi Hasegawa私信)。

4. まとめ

森林新興感染症Beech Leaf Diseaseの解明に向けた一連の研究は、日米共同研究チームによって2023年度から始まり、2024年度は本財団資金により日本の実態解明に向けた調査を進めることが

できた。本報告では研究成果の一部として、線虫*L. crenatae*がほぼ全国のブナ林に生息していることをはじめて示した。使用したCOXI配列によって種の判別を可能としたが、地理的多型解析を進めるうえでの十分な変異が見当たらなかった。そのかわり15種類のマイクロサテライトマーカーを開発し、北米32か所から採集した線虫864個体を解析した結果、北米に分布する線虫は極めて均一なゲノム集団であることが分かった。一方で、日本の中部地域の16か所から採集した線虫178個体を解析した結果、地域ごとのみならず個体間で多くの多型が見られた。このことから、日本に生息する線虫*L. crenatae*は古来より日本の森林生態系のなかでブナとバランスのとれた関係が成り立っているのではないかと、そして北米に生息する線虫*L. crenatae*は他国・地域由来のある集団が北米に侵入して急速に生息域を拡大していったのではないかと、とする仮説を支持する結果であった。但し、今のところ北米産の線虫の遺伝子型と一致する日本産の線虫は見られず、日本産の線虫に関する更なる解析が必要であることと、ヨーロッパや中東そして中国といったその他の地域における実態の調査と遺伝子多型解析が必要である。今回の報告までに解析結果を終えることができず掲載できなかったものの、各地で採集した線虫のゲノムデータの取得も終わり日米比較を進めているところである。本線虫種のライフサイクルや、葉ぶくれ形成のメカニズムを調査し、なぜ日本のブナ*F. crenata*は枯死しないのにアメリカのブナ*F. grandifolia*は枯死してしまうのかについて調べ、ヨーロッパブナ*F. sylvatica*、東洋ブナ*F. orientalis*、そして中国ブナ*F. engleriana*など各国のブナの脅威について調査を継続している。

5. 謝辞

サンプル採取にご協力いただいた飯尾淳弘先生(静岡大学)、Dr. Paulo Vieira (USDA ARS), Ms. Danielle Martin (USDA Forest Service), Dr. Cameron McIntire (USDA Forest Service), Dr. Robert Marra (The Connecticut Agricultural Experiment Station)、杉山大騎君、加賀航士郎君、中垣内亜美さん(中部大学長谷川研究室)に感謝申し上げます。すべてのサンプル採取は、各ブナ林の管理事務所の正式な承認を得て実施しました。

参考文献

Carta, L.K., Handoo, Z.A., Li, S., Kantor, M., Baughan, G., McCann, D., Gabriel, C.K., Yu, Q., Reed, S., Koch, J., Martin, D., Burke, D.J. (2020) Beech leaf disease symptoms caused by newly recognized nematode subspecies *Litylenchus crenatae maccannii* (Anguinata) described from *Fagus grandifolia* in North America. *Forest Pathology* 50, e12580.

Ewing, C.J., Hausman, C.E., Pogacnik, J., Slot, J., Bonello, P. (2019) Beech leaf disease: An emerging forest epidemic. *Forest Pathology* 49, e12488.

Kanzaki, N., Ichihara, Y., Aikawa, T., Ekino, T., Masuya, H. (2019) *Litylenchus crenatae* n. sp. (Tylenchomorpha: Anguinidae), a leaf gall nematode parasitising *Fagus crenata* Blume. *Nematology* 21, 5-22.

Vieira, P., Kantor, M. R., Medina-Mora, C.M., Sakalidis, M.L., Handoo, Z.A. (2023) First Report of the beech leaf disease nematode *Litylenchus crenatae mccannii* (Nematoda: Anguinidae) in Michigan. Plant Disease 107, 2266.