

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14757

研究課題名(和文) デイゴの萎凋・枯死現象にデイゴヒメコバチの虫えい形成はどう関わっているのか

研究課題名(英文) Does *Quadrastichus erithrinae* contribute to the decline of coral tree (*Erythrina variegata*)?

研究代表者

黒田 慶子 (Kuroda, Keiko)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：20353675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：デイゴの衰退木樹幹から *Fusarium solani* 種複合体 (FSSC) に属する菌が高頻度で検出され、その分布範囲では水分通導が停止していたことから、この菌による衰退枯死の可能性が示された。優占的に検出される2菌株の健全苗木への接種により、落葉を経た枯死が高率で発生し、その病原性が確認された。従ってデイゴの衰退・枯死は菌類による萎凋病(新病害)であり、デイゴヒメコバチは枯死の主因ではない。この2菌株は、FSSCの中で *Ambrosia Fusarium Clade* に属することが EF-1 領域の解析により判明し、養菌性キクイムシとの共生が示唆された。

研究成果の概要(英文)： *Fusarium solani* species complex (FSSC) was dominantly detected from trunks of the declining coral tree, and the water conduction of the trunks was blocked in the area of fungal distribution. The pathogenicity of two dominant strains was confirmed by the artificial inoculation of healthy seedlings with candidate fungal strains. The present investigations revealed the decline and mortality of coral trees are caused by a fungus that belongs to FSSC, and *Quadrastichus erithrinae* is not the cause of the decline. The pathogenic fungus is included in the *Ambrosia Fusarium clade* of FSSC and symbiotic relationship of the pathogenic fungus with ambrosia beetles was suggested.

研究分野：森林病理学

キーワード： *Fusarium solani* species complex 種複合体 マメ科 デイゴヒメコバチ 萎凋病 通水阻害 軟腐症状

1. 研究開始当初の背景

(1) マメ科落葉高木のデイゴ (*Erythrina variegata*) はインド～マレーシア原産で、沖縄県には江戸時代に導入され、緑化樹・観光資源として重用されてきた。しかし 2000 年代から、沖縄県を含むアジア圏、ハワイ、米国等の広域で不開花および衰退枯死が増加している (図 1)。原因はアフリカ原産のデイゴヒメコバチ (*Quadrastichus erythrinae*) 産卵による葉への虫こぶ (ゴール、虫えい) 形成とされてきた (Kim et al. 2004)。日本では九州・本州に植栽されるアメリカデイゴ (*E. cristagalli*) への被害拡大も危惧されている。

(2) デイゴは葉量減少の後に急激に幹表面が軟化し (軟腐症状)、腐敗臭と共に枯死する。病理学的観点では、葉への昆虫寄生や葉量減少のみで急激に枯死すると考えにくい。寄生によって樹木の生理に異常が発生したか、未知の微生物の感染もあり得ると推測される。しかし「被害はデイゴヒメコバチが原因である」という説が流布したことから、生理・病理学的観点での原因究明は行われてこなかった。

(3) 被害対策として、沖縄県では殺虫剤の樹幹注入が実施されているが、被害は軽減していない。ハワイではアフリカ大陸から天敵昆虫デイゴカタビロコバチを導入し、生物防除に取り組んでいるものの、効果の評価は定まっていない。沖縄ではこの外国産天敵の導入が進められているが、外来寄生蜂の導入は生態系攪乱が危惧され、その前に真の原因解明を急ぐ必要がある。

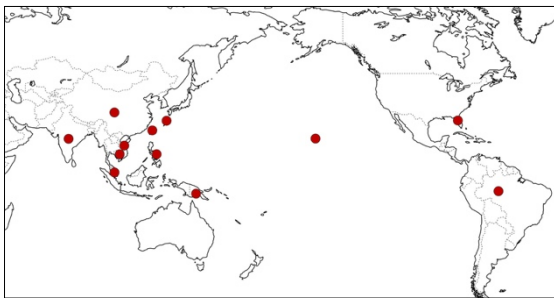


図1 デイゴ属 (*Erythrina* spp.) 樹木の被害分布

2. 研究の目的

(1) デイゴの衰退枯死現象の原因について、現在の定説の論理的矛盾を追及し、衰退の過程を検証して真の原因を究明する。デイゴヒメコバチ寄生の影響を明らかにすると共に、樹幹の「軟腐」を経て枯死へと至るプロセスに関わる微生物の探索を行う。

(2) デイゴと寄生者共に外来生物であること、米国やインド等の多地域で同時期に被害が増加していることから (図 1)、積極的な対策を行わなければ本属樹種の維持は難しいと思われる。原因の特定を行った後に、被害軽減に効果的な管理手法を提案する。

3. 研究の方法

(1) デイゴヒメコバチ寄生に関連する微生物探索とその影響の検出

① 公園等に植栽された外見健全な個体、葉量減少および虫こぶ形成のある個体、および萎凋直前と推定される個体から試料を採取し (図 2, 3)、葉・枝・主幹の断面の観察、解剖による顕微鏡観察を行う。樹木細胞の壊死や枯死過程における組織の変化などから、枯死の直接的原因を追求する。

② 各試料の複数部位から採取した組織 (図 3) を無菌培養し、微生物の検出を行う。虫こぶの無い葉および未寄生の実生苗について、微生物 (内生菌) の保持状況を確認する。また、デイゴヒメコバチの産卵・寄生に伴う微生物感染について探索する。未知の微生物が衰退に関与する可能性が認められた場合は、分類・同定を行う。

(2) デイゴの枯死原因と対策に関する検討

デイゴヒメコバチによる微生物媒介の可能性について調査する。枯死前の衰退木に微生物感染が認められた場合は、健全苗木への接種実験によってその病原性を検証する。

樹木の枯死までの過程で起こる組織レベルの現象を明らかにする。衰退原因の仮説として以下の 3 つの妥当性について検討する。(a) デイゴヒメコバチ寄生により病原微生物が感染し、衰退枯死を起こした。(b) 寄生に伴って樹木生理に異常が起こり、内生菌が活性化あるいは病原微生物の感染が容易になった。(c) 蜂寄生が樹木細胞に生理的異常を引き起こし枯死した。

以上の仮説を検証して衰退～枯死の原因を確定すると共に、被害軽減のために効果的な手法を提案する。

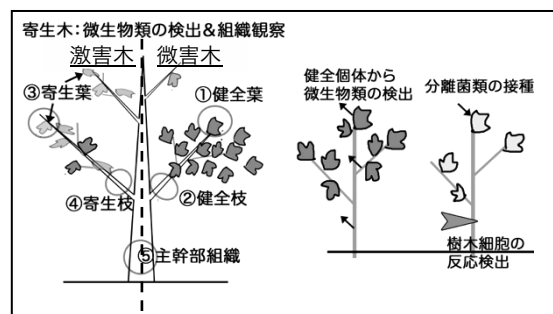


図 2 微生物の検出と発症への関与の検討

4. 研究成果

(1) デイゴヒメコバチおよびデイゴ衰退木からの微生物検出

デイゴヒメコバチの虫こぶ組織 (図 4) では樹木細胞の増生と肥大が起こっていたが、細胞壊死など微生物感染による異常は認められなかった。虫こぶから検出された *Fusarium equiseti* をデイゴの健全苗に接種したが、宿主

細胞には変色や細胞壊死は起こらず、病原性は認められなかった。

一方、葉量が減少した激害木(図3a)では、樹幹内に木部変色が認められた。特に樹幹基部では横断面全体に変色が広がっていた(図5a)。変色部からは虫こぶの *Fusarium equiseti* とは別種の *Fusarium solani* 種複合体(以下 FSSC と略記)に属する菌が優占的に検出された。木部の変色は衰退木の太枝と幹に認められ(図5), その組織内には顕微鏡下で菌糸の分布が観察された。また、組織からの分離・培養によって FSSC の分布範囲と重なることがわかった。このことから、木部の変色は菌の活動に対して木部細胞が防御反応を起こした結果であると推察された。樹木萎凋病の例では、このような変色域で水分通導が停止していることが知られている(森田ら 2016, 隅田ら 2016)。衰退木への色素液注入では、変色域の拡大に応じて水分通導が停止(図5a)あ

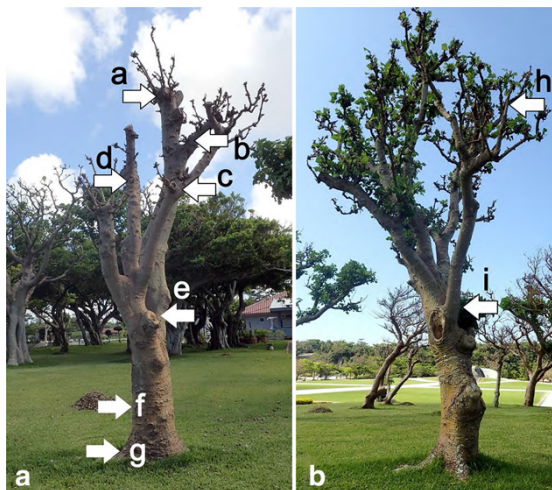


図3 デイゴ(*Erythrina variegata*) 衰退木
a: 激害木(個体:P2), b: 微害木(個体:P3)
2015年7月29日に平和祈念公園(沖縄県糸満市)において試料採取
a~i: 解剖と菌分離試料の採取位置

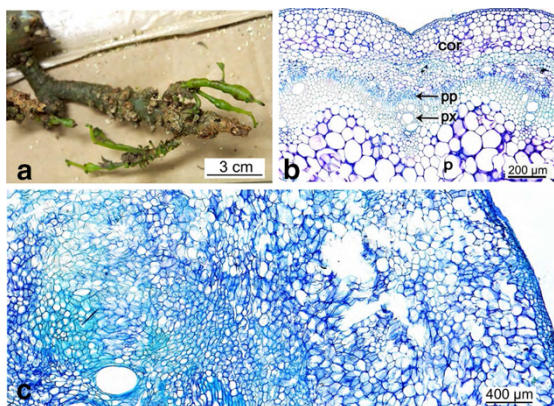


図4 デイゴヒメコバチ虫こぶの形状と組織
(a)外観, (b)デイゴの正常葉柄および(c)虫こぶ形成部の組織(光学顕微鏡観察)
虫こぶのある組織(c)では、正常葉柄に見られる皮層(cor), 一次師部(pp), 一次木部(px), 髓(p)の境界が不明瞭。葉柄細胞の壊死は認められない。

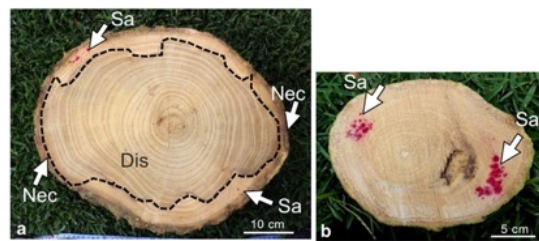


図5 衰退デイゴ樹幹における通水阻害と木部変色(2015年7月29日採取, 図3参照)
a: 激害木(図3a, P2)に認められた木部変色(Dis: 点線内部), 師部と形成層の壊死(Nec), および樹液流動の低下(Sa)
b 微害木(図3b, P3)における樹液流動の継続(矢印)。
水分通導状況は、伐倒前3時間の酸性フクシン水溶液吸入により確認した(Sa)。



図6 候補菌株を接種したデイゴ苗の病徴進展
菌株: Strain A 沖縄島起源
接種: 2016年7月20日

るいは低下(図5c)していることが判明した。

虫こぶの多いデイゴが枝先からは壊死~枯死しないこと、激害木では樹幹下部を中心に水分通導が停止し軟腐症状を経て枯死していることから、デイゴヒメコバチとデイゴの枯死との直接的な関係が認められないことが判明した。また、虫こぶからは病原性のある菌が検出されないことから、この寄生蜂は病原菌の媒介者ではないことが示された。

一方、樹幹変色および水分通導の停止部位から FSSC に属する菌が複数株検出され、この優占的に分布する菌が病変の原因である可能性が高いと推察された。従ってそれらの菌の病原性を確認する必要があると判断した。

(2) 優占的に検出された *Fusarium solani* 種複合体の病原性と発病メカニズム

健全なデイゴ苗木(1~2年生)を用いて、孢子接種による病原性の確認を行った。特に FSSC に属する strain A の関与に注目し、①水耕栽培下での根への接種と②ポット植えの主幹への付傷接種の2タイプの接種を行った。

接種実験では、自然被害木で認められたのと同様の落葉、軟腐症状(細胞壊死)、萎凋などの病徴が発現することを確認し、それらから接種菌株の再分離に成功した(図6)。従って Strain A はコッホの原則を満たしており、病原性があると判定した。この strain A の DNA の塩基配列(ITS および EF1- α 領域)デ

一タから、本菌は FSSC の Clade3 に属することが判明したが(図 7)、既報告の種とは塩基配列は一致しなかった (Aoki et al. 2014)。

Strain A は主幹下部で分布範囲が広いことから、根や主幹基部からの感染が疑われる。沖縄本島では、距離が 30km 程度離れた琉球大学構内と平和祈念公園から DNA の ITS 領域塩基配列が全く同一の菌株が検出されたため、さらに距離の離れた石垣島の被害地における菌の分布と発病について比較検討する必要が出てきた。

(3) 病原性を有する菌株の分布と伝播

当初の計画では、デイゴヒメコバチ寄生後のデイゴの衰退・枯死現象の進行プロセスを明らかにする予定であった。しかし本研究の途上で、枯死原因として FSSC に属する菌が関わる可能性が高く、デイゴヒメコバチは衰退の主因で無いことが判明した。そのことから FSSC に属する菌株の地理的分布や検出菌株の遺伝的多様性の解析など、病原菌に関する情報を得るための研究に重点を移した。

Strain A とは ITS 領域の 1 塩基のみ異なる Strain B も複数の地点および個体から優占的に検出された。その中で沖縄島および石垣島起源の 2 菌株を用いて、デイゴの健全苗に接種実験を行った。胞子をポット苗木の根元に接種した結果、落葉から枯死への病徴進展は Strain A と同一であり (図 6)、この 2 菌株共に病原性を有することが判明した。これらの結果から、デイゴの衰退・枯死は FSSC に属する菌 (種名は未同定) による萎凋病 (新病害) であると判断した。

石垣島と沖縄島の 400km 離れた場所で同じ遺伝子配列 (ITS 領域) の菌が採取されたこと、沖縄島内で数十 Km 離れた 3 か所から Strain A, B の両方が検出されたことから、沖縄県の

広域で病原菌の感染が起こっていると推測される。DNA 解析により、この菌株 A, B は FSSC の中で Ambrosia *Fusarium* Clade に属することが判明し、養菌性キクイムシとの共生が示唆された。Euwallacea 属の養菌性キクイムシは、Strain A, B と近縁種のアボカド病原菌の媒介者として知られている (Eskalen et al. 2012)。石垣島と沖縄島のデイゴから同属キクイムシの数種を発見したことから、今後さらに研究を進展させ、甲虫との共生関係の解明を含めた伝播経路の調査が必要と考えている。

(4) 結論および研究の発展方向

本研究開始時の 3 つの仮説のうち、(a) 「デイゴヒメコバチ寄生により病原微生物が感染し衰退した」事実はなく、これは否定できた。また、病原菌が発見されたので、(c) 「寄生に起因する樹木生理の異常により枯死した」ことも否定できた。しかし、(b) の「寄生による生理異常等により病原微生物の感染が容易になった」かどうかは未解明で、詳細を明らかにする必要がある。

デイゴ衰退枯死の主因が菌類であるため、被害軽減の対策には従来の殺虫剤の施用ではなく、殺菌剤の樹幹注入の効果が期待できる。試行的に殺菌剤の注入を行ったが、効果の判定には至っていない。

デイゴ属衰退の記録があり石垣島から地理的に近い台湾、さらに熱帯アジアのインドなどでも同じ原因で衰退が起こっている可能性があり、広域での調査及び研究が必要である。

<引用文献>

- ① Aoki T, O'Donnell K, Geiser DM (2014) Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *J Gen Plant Pathol* 80:189-201
- ② Eskalen A, Gonzalez A, Wang DH, Twizeyimana M, Mayorquin JS, Lynch SC (2012) First report of a *Fusarium* sp. and its vector tea shot hole borer (*Euwallacea fornicatus*) causing *Fusarium* dieback on avocado in California. *Plant Dis* 96:1070
- ③ Kajii C, Morita T, Jikumaru S, Kajimura H, Yamaoka Y, Kuroda K (2013) Xylem dysfunction in *Ficus carica* infected with wilt fungus *Ceratocystis ficicola* and the role of the vector beetle *Euwallacea interjectus*. *IAWA J* 34:301-312
- ④ Kim IK, Delvare G, La Salle J (2004) A new species of *Quadrastichus* (Hymenoptera: Eulophidae): a gall-inducing pest on *Erythrina* (Fabaceae). *J Hymenoptera Res* 13(2):243-249
- ⑤ 森田剛成, 軸丸祥大, 黒田慶子: 株枯病菌を接種したイチジク苗木における病徴

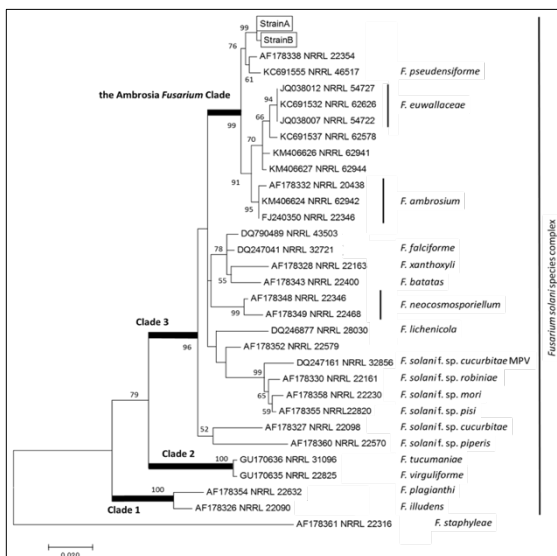


図7 EF-1 α nucleotide sequencesに基づいて推定したStrain A, BのML系統樹 FSSCの3つのcladeおよびAmbrosia *Fusarium* Cladeを太字で示す。

の進展過程 (1)木部の通水阻害と萎凋症状の関係, 植物病理学会報, 82 :3 01-309, 2016

- ⑥ 隅田阜月, 梶井千永, 森田剛成, 黒田慶子: 株枯病菌を接種したイチジク苗木における病徴の進展過程 (2) 宿主細胞の防御応答と内部病徴に関する解剖学的検討, 植物病理学会報, 82 :310-317, 2016

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 木原健雄, 村上翼, 中馬いづみ, 亀山統一, 黒田慶子: デイゴ (*Erythrina variegata*) の軟腐症状および枯死要因の病理解剖学的研究, 樹木医学研究 20:95-96, 2016, 査読有
- ② 木原健雄, 高階空也, 村上翼, 平岡大輝, 中馬いづみ, 黒田慶子: デイゴ枯死被害における *Fusarium solani* species complex の病原性の検討, 樹木医学研究 21: 211-212, 2017, 査読有
- ③ Kuroda K, Chuma I, Kihara T, Murakami T, Takashina K, Hiraoka D, Kameyama N: First report of *Fusarium solani* species complex as a causal agent of *Erythrina variegata* decline and death after gall formation by *Quadrastichus erythrinae* on Okinawa Island, Japan, J Gen Plant Pathol 83:344-357, 2017. DOI 10.1007/s10327-017- 0738-3, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 木原健雄, 中馬いづみ, 黒田慶子, 亀山統一: デイゴ (*Erythrina variegata*) の軟腐症状および枯死要因の病理解剖学的研究, 樹木医学会第 20 回大会, 東京, 2015, 11
- ② 黒田慶子, 木原健雄, 村上翼, 中馬いづみ, 亀山統一: 沖縄におけるデイゴ (*Erythrina variegata*) の軟腐症状および枯死要因の検討, 第 127 回森林学会大会, 藤沢, 2016, 3
- ③ 木原健雄, 高階空也, 村上翼, 平岡大輝, 中馬いづみ, 黒田慶子: デイゴ枯死被害における *Fusarium solani* species complex の病原性の検討, 樹木医学会第 21 回大会, 神戸, 2016, 11
- ④ 黒田慶子, 中馬いづみ, 木原健雄, 村上翼, 高階空也, 平岡大輝, 亀山統一: デイゴ (*Erythrina variegata*) 衰退枯死の原因は *Fusarium solani* 種複合体に属する糸状菌である, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 盛岡市, 2017, 4
- ⑤ Kuroda K, Chuma I, Takashina K, Kihara Murakami T, Hiraoka D, Kameyama N: Causal agent of *Erythrina variegata* decline

and mortality is not a gall wasp *Quadrastichus erythrinae* but a fungus belonging to *Fusarium solani* species complex, 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference, Bali, Indonesia, Aug. 2017

- ⑥ Takashina K, Kihara T, Goto C, Chuma I, Kuroda K: Pathogenicity of a fungus belongs to *Fusarium solani* species complex to *Erythrina variegata*, 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference, Bali, Indonesia, Aug. 2017
- ⑦ 黒田慶子, 後藤千明, 高階空也, 名田勝貴, 中馬いづみ: 沖縄島と石垣島のデイゴ (*Erythrina variegata*) 衰退木から検出された *Fusarium* 属菌の病原性の確認, 樹木医学会 22 回大会, 小金井, 2017, 11
- ⑧ 高階空也, 黒田慶子, 中馬いづみ, 名田勝貴, 後藤千明, 亀山統一: デイゴ枯死に関与する *Fusarium solani* species complex の地理的分布, 樹木医学会 22 回大会, 小金井, 2017, 11
- ⑨ 黒田慶子, 中馬いづみ, 高階空也, 亀山統一, 梶村恒, 名田勝貴, 後藤千明: 沖縄のデイゴ衰退枯死に関わる *Fusarium* 属菌の分布と病原性の検討, 第 129 回森林学会大会, 高知, 2018, 3

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www2.kobe-u.ac.jp/~kurodak/Deigo_2.html
沖縄のデイゴの衰退と枯死: デイゴヒメコバチは枯死に関わっていない!!

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 慶子 (KURODA, Keiko)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 20353675

(2) 研究分担者

中馬 いづみ (CHUMA, Izumi)
神戸大学・大学院農学研究科
研究者番号: 90628926

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし