

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23405025

研究課題名(和文) 養菌性キクイムシが伝播する菌類による樹木の衰退・枯死に関するアジアでの緊急調査

研究課題名(英文) Emergency research in Asian countries on the decline and death of trees caused by fungi carried by ambrosia beetles

研究代表者

伊藤 進一郎 (Ito, Shin-ichiro)

三重大学・生物資源学研究科・招へい教授

研究者番号：90092139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：1980年以降、日本ではブナ科樹木に萎凋病枯死が発生し、被害は拡大している。この被害は、カシノナガキクイムシ(Platypus quercivorus)が伝播するRaffaelea quercivoraが原因であることが明らかにされた。本研究では、アジア各地域における樹木の衰退・枯死の被害実態とそれに関わる甲虫、病原菌の解明を行った。その結果、タイ、ベトナム、台湾においてナガキクイムシ科昆虫が採取され、そこからRaffaelea属菌が検出された。以上より、養菌性キクイムシと随伴する菌類の関係が東南アジアで潜在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Japanese oak wilt has been obvious and expanded since 1980's. The damage is caused by an fungus, Raffaelea quercivora carried by Platypus quercivorus. The aim of this project was to survey the occurrence conditions of this damage around the Asian countries. Intensive field surveys revealed that Platypodidae insects were collected from forests in Thailand, Taiwan and Vietnam, and Raffaelean fungi were also detected from the insects. These results suggest that intimate associations between ambrosia beetles and their accompanying fungi might potentially be prevalent at forest ecosystems in the south-east Asian countries.

研究分野：農学A

科研費の分科・細目：森林科学

キーワード：Raffaelea quercivora アジア ブナ科 現地調査

## 1. 研究開始当初の背景

ナラ類 (*Quercus* spp.) は、世界の森林を構成する主要な樹種であるとともに、重要な森林資源である。1980 年以降、世界各地でナラ類が衰退、枯死する被害が大きな問題となってきた。日本でも、1980 年以降日本海側の地域でナラ類(主にミズナラとコナラ)が集団的に枯死する被害が拡大して社会問題となっている。代表者らによって、被害は養菌性のカシノナガキクイムシによって伝播される新種の病原菌 (*Raffaelea quercivora*) によって発生することが病理学的に明らかにされた。この被害は、養菌性キクイムシが関与した世界で最初の森林被害である。また、代表者らが *R. quercivora* を新種として報告した時点では、11 種の *Raffaelea* 属菌が記載されていたが、それらはいずれも腐生的な菌類として報告されており、今回の被害はこの分類群による世界で初めての樹木の萎凋枯死被害でもある。しかしそれ以降、2003 年頃韓国ソウル市周辺でナラ類が枯死する被害が発生し、*Platypus koryoensis* が伝播する *R. quercus-mongolicae* による被害であることが明らかにされた。またアメリカでは、クスノキ科の樹木が *Xyleborus glabratus* が伝播する *R. lauricola* によって枯死することが、病理学的に明らかにされた。さらにポルトガルでは、cork oak が *P. cylindrus* によって伝播される *Raffaelea* sp. によって衰退・枯死しており、現在菌の同定が行なわれている (Dr. Maria de Lurdes Inacio, 私信)。一方、最近腐生的な *Raffaelea* 属の菌類が報告されているが、その分類には大きな混乱が見られ、*Raffaelea* 属の菌類を早急に再検討する必要性がある。

これまでに、代表者らが行ってきた「養菌性キクイムシが伝播する菌類による樹木の衰退・枯死に関するアジアでの緊急調査」の中で、次のことが明らかになってきた。

- \* タイでは、常緑性ナラ類の林分において、*P. quercivorus* がトラップされ、それらが穿入した材部から *Raffaelea* 属菌が分離された。分離された菌類は、遺伝的に *R. quercivora* に類似しており、予備的な接種試験の結果、日本のミズナラに対して病原性を示した。
- \* ベトナムでは、中国との国境付近の天然林において、常緑性のナラ類の枯死や枝枯れ被害が発生していることが明らかとなった。調査の結果、枯死木には *Platypus* 属の昆虫が穿入しており、坑道から *Raffaelea* 属菌が検出された。
- \* マレーシアのナラ類の林分とアカシア属樹木の造林地で *Platypus* 属の昆虫がトラップされ、それらの穿入が確認された。
- \* フィリピンでは、ナラ類の林分で *Platypus* 属昆虫がトラップされ、それらの穿入が確

認された。

さらに、アジア地域の各国の研究者から下記の情報を得た。

- \* 台湾では、国立公園内でナラ類が衰退・枯死しており、キクイムシ類の穿入がある。
- \* ラオスの造林地で、キクイムシ類が穿入した樹木の被害が発生している。
- \* ネパールでも、キクイムシ類が穿入したナラ類の衰退(枯死)が発生している。
- \* インドネシアでは、*Raffaelea* 属菌と近縁の菌類により樹木に萎凋症状が発生している。

## 2. 研究の目的

1980 年以降、ブナ科樹木の萎凋病によるナラ類の枯死被害は 31 府県で発生した。この被害は、カシノナガキクイムシが伝播する病原菌 *R. quercivora* によることが代表者らの研究から判明した。現在遂行中の基盤研究(B)海外において、アジアの広い地域で *Raffaelea* 属菌および近縁種やそれらを伝播する甲虫のキクイムシ類によるナラ類の衰退・枯死の発生が明らかになってきた。本研究では、現在までに採集された、あるいは今後の調査で採集される *Raffaelea* 属菌の日本と海外のナラ類に対する病原性の比較、分類に混乱のある *Raffaelea* 属菌の形態学的、分子遺伝学的な検討、考察を加えることを目的とする。

以上より、*Raffaelea* 属菌の分類体系を整理し、アジア各地の菌株の病原性を明らかにすることによって、アジア地域における今後の被害の拡大を予察し、防除に対する検討が可能になる。

なお、いずれの調査も関係各所からの調査許可、輸入許可を取得し遂行した。

## 3. 研究の方法

**(1)世界の *Raffaelea* 属菌に関する情報の収集**  
アジア圏における病原菌 (*Raffaelea* 属菌) と養菌性キクイムシの分布実態を明らかにするため、タイ、インドネシア、中国、台湾、ベトナムのブナ科の森林を探索した。タイは年 4 回、その他の国は年 1 回の探索調査を実施した。養菌性キクイムシの捕獲のため、簡易ベットトラップ 10 基をタイでは 3 林分、その他の国では 1 林分に設置し、1 回の調査で平均 3 回程度回収した。帰国後、ナガキクイムシ科とキクイムシ科の昆虫、それらが穿入した材部が採集された場合は坑道や変色部から菌の分離を行った。分離された菌株の一部は(2)で形態観察を行い、捕獲されたナガキクイムシ科の一部は(3)で同定を行った。

### **(2)アジア地域で採集された *Raffaelea* 属菌の分類学的な検討**

タイ北部に位置するチェンマイの森林で捕獲されたキクイムシ類および周辺の材より分離

された *Raffaelea* 様菌株の形態観察を行った。培地上で形成された分生子の大きさと形状、分生子柄の長さとの観察・計測は光学顕微鏡により行い、分生子の形成様式の観察は走査型電子顕微鏡(以下、SEM)により行った。光学顕微鏡観察には、6菌株 (RST6, RST58, RST74, RST79, RST136, RST268), SEMの観察にはそのうちの4菌株 (RST6, RST74, RST136, RST268) を用いた。

### (3) アジア地域で採集された *Platypus* 属昆虫の分類学的な検討

タイ北部に位置するチェンマイの森林で、200 × 450 m のプロットを設置し、そのプロット内に約 50 × 50 m のサブプロットを5つ設けた。各サブプロット内において、トラップ法と伐倒木の割材による方法で、キクイムシ類の採取を行った。採取されたものの体表ともし確認されればマイカンギアから菌類の分離を行った。得られた分離菌株の分類所属の推定のため、28SrDNA 領域の塩基配列にもとづく BLAST 解析を行った。*Raffaelea* 属菌が分離されたキクイムシ類は、実態顕微鏡下でさらに外部形態を観察し(図2)、Wood (1993) に従い属レベルで形態類別を行った。さらに、同属と類別されたものはその中でタイプ分けを行った。

### (4) アジア地域で採集された *Raffaelea* 属菌の病原性の検討

三重大学園場内において2009年6月に多点接種、同年8月に1点接種を行った。両接種とも、日本産のアラカシ、外国産コナラ属の *Q. palustris*, *Q. robur*, *Q. rubra* の苗木を用い、多点接種では各樹種 *R. quercivora* 接種木13個体、対照木8個体、無処理木3個体、1点接種では接種木5個体、対照木3個体を供試した。多点接種では、苗木の幹直径1 cm の部位とそこから軸方向に7 mm の部位に、1列に3か所ずつ直径1.6 mm、深さ3 mm の穴を9か所あけた。それらの穴に *R. quercivora* を蔓延させた爪楊枝の先端を埋め込み、パラフィルムとガムテープで巻いた。対照木には、滅菌した爪楊枝を用いた。1点接種では、苗木の幹直径1 cm の部位にあけた直径1.4 mm、深さ3 mm の穴に同様に接種を行った。多点接種では、枯死個体は枯死直後に、生残個体は接種1か月後に採取し、1点接種では接種14日後にすべての苗木を採取し、1%酸性フクシン水溶液に12時間以上浸漬した。その後、通水状況を観察するとともに、再分離試験を行った。さらに、1点接種においては、プラニメーターを用いて、接種部横断面における変色域の割合を算出した。

## 4. 研究成果

(1) 世界の *Raffaelea* 属菌に関する情報の収集  
タイでは、8月を除き毎回キクイムシ類が捕獲され、*Raffaelea* 様の菌が分離された(表1)。インドネシアは、2012年、2013年に調査を実施したが、昆虫、*Raffaelea* 様菌株は得られなかった。中国では、3年間とも菌は検出されなかった。台湾は、2012年、2013年、虫から *Raffaelea* 様菌が検出された。ベトナムは、一昨年に虫から *Raffaelea* 様の菌株を検出した。調査した国でキクイムシ類が捕獲された場合、いずれもナガキクイムシ科昆虫が含まれていた。このことは、東南アジアに本昆虫が広く分布することを示唆している。さらにタイと台湾では、カシノナガキクイムシが採集された。本種は、広く東南アジアに分布しており、日本で見いだされる個体は、他国を經由して伝播してきたのかもしれない。検出された随伴菌において、*Raffaelea* 属菌はナガキクイムシ科の昆虫からのみ分離された。そのため、地理的分布に関わらず、ナガキクイムシ科の昆虫と *Raffaelea* 属菌の間には、共生関係が構築されていた可能性がある。

表1. ナガキクイムシ科昆虫の捕獲の有無と *Raffaelea* 様菌株の取得

	2011	2012	2013
タイ			
インドネシア	-	×	×
中国	×	×	×
台湾	×		
ベトナム	×		×

全球規模での本属の発見、記載を把握するため、2011-2013年を対象として“*Raffaelea*”をキーワードで Google Scholar で検索をしたところ、321件ヒットした。そのうち、新規に記載された種は認められなかったが、以下の5種 (*R. ellipticospora*, *R. fusca*, *R. lauricola*, *R. quercivora*, *R. subfusca*) が新規調査地で見いだされており、調査事例の増加に伴い、同属の分布範囲が拡大傾向にあると推察された。本研究で対象とした *R. quercivora* はインドネシア、タイ、台湾、ベトナムからも見いだされており、上記の傾向を支持している。したがって、本属の潜在的分布範囲は現在認識している以上に広く、我が国でブナ科樹木の萎凋病を引き起こす原因菌 *R. quercivora* は媒介者であるカシノナガキクイムシに随伴して分散しているものと考えられた。

### (2) アジア地域で採集された *Raffaelea* 属菌の分類学的な検討

分生子形成様式において、光学顕微鏡下ではシンポジオ型と判別されるものが観察された(データ示さず)。SEM においても同様の型が3菌株 (RST6, RST74, RST136) で観察

され(図1 a, b), 場所を変えながら分生子を産出した脱落痕が観察できる(図 a 中矢印). 分生子はすべて全出芽型で形成された. さらに, アネ口型の分生子形成様式も 3 菌株(RST6, RST74, RST136)で観察され, 分生子を生じるごとに先端部が少し伸び, 前の分生子が離れた後の環状紋が見られた(図 c, d 矢印). 部分的には環紋間の距離が非常に短く密であった. RST268 は分生子柄の形成がほとんどなく, 分生子柄の太さは基底部と先端でほぼ同じで分生子は全出芽型で形成された. フィアロスポラの形成が観察された(データ示さず).

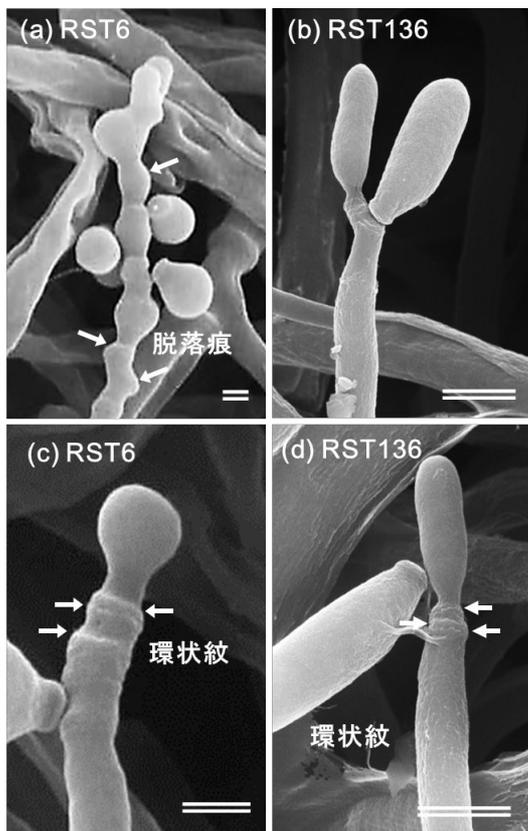


図1. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による分離菌株 (RST 6, RST136) の (a, b) シンポジオ型および (c, d) アネ口型の分生子形成様式 (a) および (c, d) の矢印はそれぞれ脱落痕, 環状紋を示す. バー = 2 μm.

### (3) アジア地域で採集された *Platypus* 属昆虫の分類学的な検討

ナガキクイムシ亜科は 81 頭採取され, 5 属 (*Crossotarsus* 属, *Diapus* 属, *Dinoplatypus* 属, *Platypus* 属, *Treptoplatypus* 属) 16 タイプに形態類別された. そのうち *Diapus* 属 1 タイプ, *Dinoplatypus* 属 1 タイプ, *Platypus* 属 2 タイプから *Raffaelea* 属菌と判断される糸状菌が分離された(図2). さらに, *Platypus* 属の 1 タイプにおいては, 供試した全 9 個体の体表とそのうち 3 個体のマイカンギアから *Raffaelea* 属菌が分離された. 以上の結果から, *Platypus*

属の 1 タイプにおいて *Raffaelea* 属菌を随伴している可能性が示唆された.

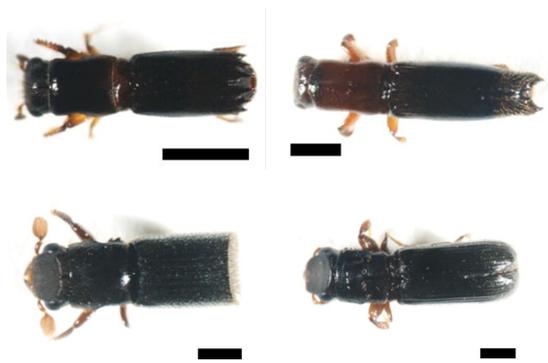


図2. *Raffaelea* 属菌が分離された養菌性クイムシ

(左上) *Diapus* 属, (右上) *Dinoplatypus* 属, (左下) *Platypus* 属 1, (右下) *Platypus* 属 2. バー = 1 mm

### (4) アジア地域で採集された *Raffaelea* 属菌の病原性の検討

両接種とも外国産コナラ属のほとんどの接種木から, *R. quercivora* が再分離された. このことから, 外国産コナラ属樹種においても本菌の定着が可能であると示された. 多点接種では, 対照, 無処理木で枯死は確認されなかったが, 接種木では *Q. rubra* のみが 5 個体枯死し, 枯死率は樹種間で有意に異なった (Fisher の正確確率検定,  $p < 0.05$ , データ示さず). このことから, *R. quercivora* は *Q. rubra* に対して病原性を有することが明らかとなった.

両接種とも, 変色域と非通水域は同所的に観察された. 1 点接種試験では, *Q. rubra* 接種木の接種部横断面における変色域の割合は, アラカシのものに比べ, 有意に高かった (Tukey 検定,  $p < 0.05$ , 図3). さらに, 各樹種の多点接種による枯死の程度と 1 点接種における変色域の割合は一致する傾向にあったため, 外国産コナラ属樹種においても本菌に対する感受性の指標として変色域, または同所的に形成が確認された非通水域の割合が有効であると考えられた.

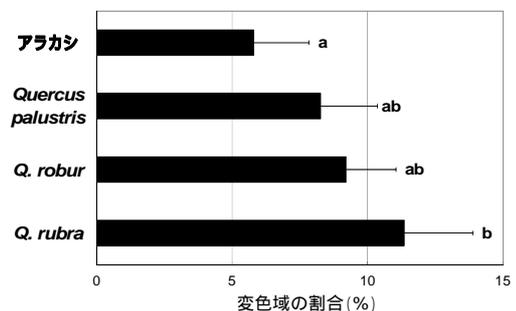


図3. コナラ属 4 樹種の接種木における変色域の割合

バーは, 平均値 (n = 5) + SD を示す. 異な

るアルファベット間には有意差が認められた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 31 件)

1. Torii M, Matsuda Y, Ito S. (2014) Extent of colonization by *Raffaelea quercivora* of artificially inoculated living and gamma-ray-sterilized seedlings of two Japanese and three American oak species. *Forest Pathology* 44: 117-123, 査読有, 10.1111/efp.12075
2. Thongsandee W, Matsuda Y, Shimizu M, Ehara H, Ito S (2013) Isolation of endophytic streptomycetes from above- and below-ground organs of *Quercus serrata*. *Journal of Forest Research* 18: 179-189, 査読有, 10.1007/s10310-012-0337-2.
3. 鳥居正人, 松下知世, 松田陽介, 伊藤進一郎 (2012) *Raffaelea quercivora* の接種による外国産コナラ属 1 樹種の枯死. *樹木医学研究* 16: 119-122, 査読有, <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009594865>
4. Seo MY, Matsuda Y, Nakashima C, Ito S (2012) Taxonomic re-evaluation of *Raffaelea quercivora* isolates collected from mass mortality of oak trees in Japan. *Mycoscience* 53: 211-219, 査読有, 10.1007/s10267-011-0154-z
5. Thongsandee W, Matsuda Y, Ito S (2012) Temporal variations in endophytic fungal assemblages of *Ginkgo biloba* L. *Journal of Forest Research* 17: 213-218, 査読有, 10.1007/s10310-011-0292-3
6. Torii M, Matsuda Y, Murata M, Ito S (2011) Spatial distribution of *Raffaelea quercivora* hyphae in transverse sections of seedlings of two Japanese oak species. *Forest Pathology* 41: 293-298, 査読有, 10.1111/j.1439-0329.2010.00672.x

[学会発表](計 45 件)

1. 鳥居正人・松田陽介・Seo ST・Kim KH・伊藤進一郎・Moon MJ・Kim SH・山田利博 (2014) モンゴリナラに対する *Raffaelea quercus-mongolicae* の多点・1 点接種試験. 第 125 回日本森林学会大会. 大宮ソニックシティ (大宮市), 2014/3/27
2. 鳥居正人・松田陽介・伊藤進一郎 (2013) 樹木の組織構造が *Raffaelea quercivora* 菌糸の伸展に与える影響. 第 124 回日本森林学会大会. 岩手大学 (盛岡市), 2013/3/26
3. 今井光岳・谷口公美・鳥居正人・松田陽介・Buranapanichpan S・伊藤進一郎 (2013) タイ北部で採取された *Raffaelea* 属菌を随伴する養菌性キクイムシの形態. 第 124 回日本森林学会大会. 岩手大学 (盛岡市),

2013/3/26

4. Matsuda Y, Torii M, Yamada T, Ito S (2012) Lessons from fungal inoculation experiments. How oak trees wilt and dead caused by the pathogen of the Japanese oak wilt? International Symposium on Oak Forest Preservation, 韓国 (ソウル), 2012/8/27, 招待講演
5. Torii M, Matsuda Y, Ito S (2012) Hyphal growth of *Raffaelea quercivora* within both seedlings and sterilized woods. 3rd meeting of IUFRO Working Unit 7.03.12 "Alien invasive species and international trade", 東京大学 (文京区), 2012/6/10
6. Yamada T, Murata M, Torii M, Matsuda Y, Ito S (2011) An overview of Japanese oak wilt epidemic. Asian mycological congress 2011, Incheon University, 韓国 (仁川), 2011/8/7, 招待講演
7. Torii M, Matsuda Y, Ito S (2011) Effect of vessel arrangement on hyphal growth of *Raffaelea quercivora* within seedlings of five oak species. Asian mycological congress 2011, Incheon University, 韓国 (仁川), 2011/8/7

[図書](計 1 件)

1. 梶村 恒・升屋勇人 (2013) アンブロシア甲虫. 菌類の事典. (日本菌学会編). 朝倉書店, 東京, 332-333

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/junkan/busshitsu/lab2/oak.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 進一郎 (ITO Shin-ichiro)  
三重大学・生物資源学研究所・招へい教授  
研究者番号: 90092139

### (2) 研究分担者

福田 健二 (FUKUDA Kenji)  
東京大学・新領域創成科学研究科・教授  
研究者番号: 303208954

梶村 恒 (KAJIMURA Hisashi)  
名古屋大学大学院・生命農学研究科・准教授  
研究者番号: 10283425

中島千晴 (NAKASHIMA Chiharu)  
三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授  
研究者番号: 20378318

松田 陽介 (MATSUDA Yosuke)  
三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授  
研究者番号: 30324552