

## 論文

# 養菌性キクイムシ坑道由来の真菌類 *Raffaelea quercivora* 及び<sup>\*1</sup> *Hormoascus* sp. の液体培地及び寒天培地上における二型性

畑 邦彦<sup>\*2</sup> ・ 大楠美佐子<sup>\*3</sup> ・ 竹尾漢治<sup>\*3</sup> ・ 曾根晃一<sup>\*2</sup>

畑 邦彦・大楠美佐子・竹尾漢治・曾根晃一：養菌性キクイムシ坑道由来の真菌類 *Raffaelea quercivora* 及び *Hormoascus* sp. の液体培地及び寒天培地上における二型性 九州森林研究 57 : 117-119, 2004 ナラ・カシ類集団枯損の病原菌とされるカシノナガキクイムシの共生菌 *Raffaelea quercivora* の培養試験を行い、酵母形態の存在を確認した。*R. quercivora* は寒天培地では主として菌糸で生長したが、液体培地では酵母細胞もかなり出現した。一方、ヤチダモノナガキクイムシの共生酵母 *Hormoascus* sp. は液体培地ではほとんど酵母だったが、寒天培地では菌糸もかなり発達した。このように、寒天培地か液体培地かという基質の物理的な特性がこれらアンブロシア菌の形態形成に重要な意味を持つと考えられた。一方、培地の組成によってもそれぞれの形態の出現しやすさは異なった。

キーワード：*Raffaelea quercivora*, *Hormoascus* sp., 二型性, 酵母, 培地

Hata, K., Ohkusu, M., Takeo, K. and Sone, K.: Dimorphism of *Raffaelea quercivora* and *Hormoascus* sp. obtained from gallery walls of ambrosia beetles on liquid and agar media Kyushu J. For. Res. 57 : 117-119, 2004 Morphology of *Raffaelea quercivora*, pathogen of oak wilt in Japan and forming symbiotic association with an ambrosia beetle *Platypus quercivorus*, were observed on artificial culture media and the existence of yeast form of this fungus were found out. On agar media, *R. quercivora* grew largely as hyphal form, while yeast cells considerably emerged in liquid culture. Another symbiont of ambrosia beetle, *Hormoascus* sp. from *Crossotarsus nipponicus* grew mostly as yeasts in liquid culture, but hyphae also developed on agar. Thus, physical features of culture media, agar or liquid, were considered to have significance in morphogenesis of these ambrosia fungi. Medium composition also affected the occurrence of each form.

Key words : *Raffaelea quercivora*, *Hormoascus* sp., dimorphism, yeast, medium

## I. はじめに

現在日本各地で大きな被害を出しているナラ・カシ類の集団枯損は、養菌性キクイムシであるカシノナガキクイムシ (*Platypus quercivorus* Murayama) の加害が引き金となって生じる。この被害には病原菌の関与が疑われ、「ナラ菌」と呼ばれる菌が候補とされてきた。最近の研究から、「ナラ菌」がキクイムシの共生菌として知られる *Raffaelea* 属の菌であることが明らかになり、Kubono and Ito (2002) により *Raffaelea quercivora* Kubono & Ito として記載された。養菌性キクイムシの共生菌はアンブロシア菌と呼ばれる一群の菌だが、アンブロシア菌の多くは、ambrosial phase と呼ばれる酵母型の成長様式を有していることが知られており、*Raffaelea* 属においても ambrosial phase の存在が知られている (Batra, 1967)。このように菌糸と酵母という異なる栄養成長を行う真菌を、二型性真菌と呼ぶ。これは医真菌学においては特に重要な概念で、例えば人間に重篤な病気を引き起こす真菌で、環境中では菌糸状態で生育するが、人体組織内では酵母として生育を行うものは少なくない (山口ら, 1987)。なお、ここでは酵母とは、単細胞で増殖する真菌類の栄養体と定

義する。

*R. quercivora* に関しては、その被害の重要性から分離・培養・接種に関わる研究は行われているが (伊藤ら, 1998 ; 村田ら, 2002), 二型性そのものに関わる知見はほとんどない。そこで、本研究においては、*R. quercivora* が実際に酵母形態を持っているのか、また、持っているとするばどのような条件下で生じるのか、それらを明らかにする手始めとして、異なる培地における生育形態の観察を行った。また、別種の養菌性キクイムシの共生酵母である *Hormoascus* sp. を比較対照として同様の観察を行った。

## II. 材料及び方法

*Raffaelea quercivora* はマテバシイ被害木のカシノナガキクイムシ坑道より分離された R01031303株 (本論文では R 1 株と称する) と、ミズナラ被害木由来の a-7-2株 (本論文では R 2 株と称する) の二菌株、別種キクイムシ共生菌としてブナのヤチダモノナガキクイムシ (*Crossotarsus nipponicus* Blandford) 坑道由来の酵母 *Hormoascus* sp. の F20-1 株 (本論文では H 1

<sup>\*1</sup> Hata, K., Ohkusu, M., Takeo, K. and Sone, K.: Dimorphism of *Raffaelea quercivora* and *Hormoascus* sp. obtained from gallery walls of ambrosia beetles on liquid and agar media

<sup>\*2</sup> 鹿児島大学農学部 Fac. Agric., Kagoshima Univ., Kagoshima 890-0065

<sup>\*3</sup> 千葉大学真菌医学研究センター Res. Ctr. Pathogenic Fungi Microbial Toxicoses, Chiba Univ., Chiba 260-8673

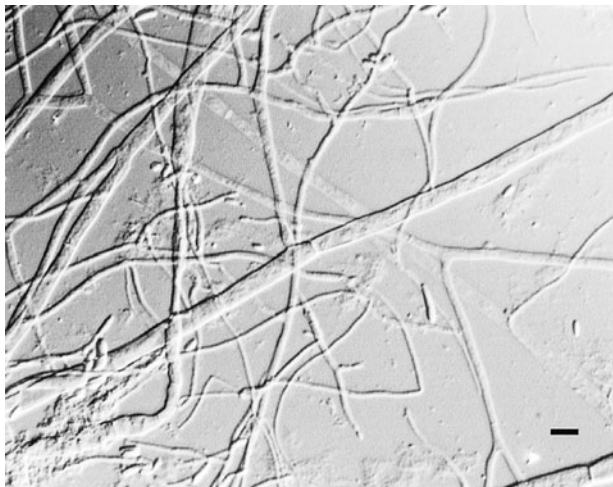


写真-1. MEA上における *R. quercivora* (R2株) の培養形態。分生子や酵母細胞もわずかに見受けられるが、基本的には菌糸が発達した。  
Morphology of *R. quercivora* (Strain R2) on MEA. Although a few conidia or yeast cells were present, mostly hyphae dominated.

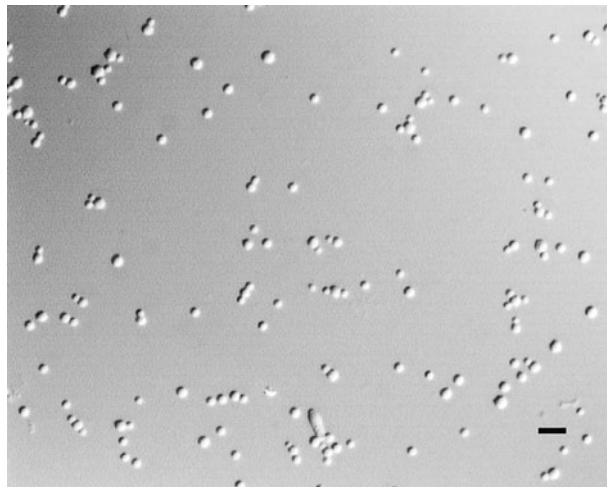


写真-3. MEB上における *Hormoascus* sp. の培養形態。専ら酵母として生育し、菌糸は見られなかった。  
Morphology of *Hormoascus* sp. on MEB. They grew as yeasts and no hyphae were observed.

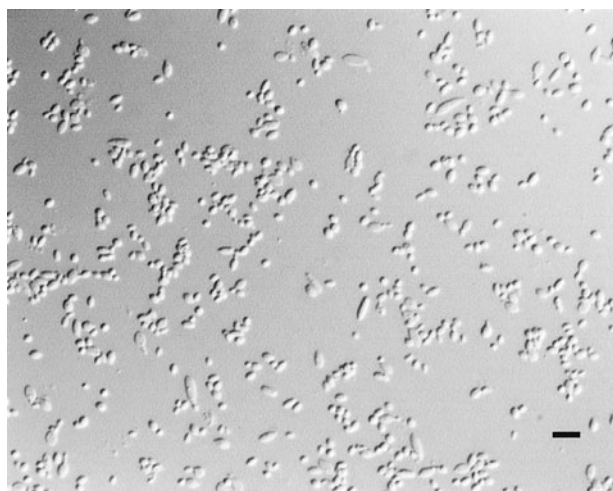


写真-2. MEB上における *R. quercivora* (R1株) の酵母細胞。画面上にはないが菌糸も存在した。  
Yeast cells of *R. quercivora* (Strain R1) on MEB. Although not in this photo, hyphae were also present.

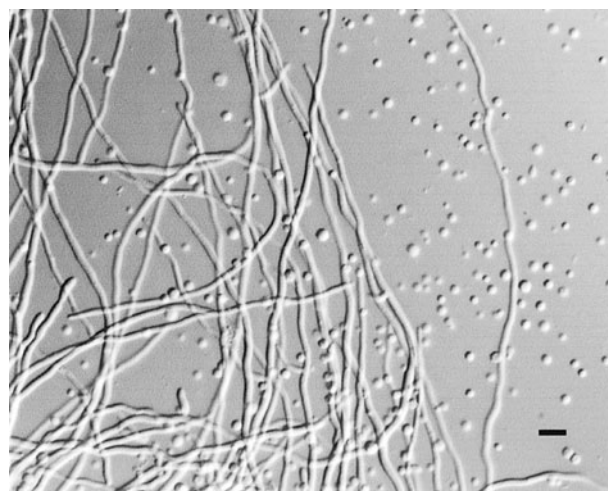


写真-4. MEA上における *Hormoascus* sp. の培養形態。酵母細胞だけでなく、菌糸もよく発達した。  
Morphology of *Hormoascus* sp. on MEA. Not only yeast cells but also hyphae were well-developed.

スケールバーはいずれも約 10  $\mu$ m  
Bars = ca. 10  $\mu$ m

株と称する)を用いた。

培地は、三種類の組成について、それぞれ寒天培地と液体培地として用いた。それぞれポテトデキストロース寒天培地 (PDA) 及び液体培地 (PDB), YPG (1%酵母エキス, 1%ペプトン, 1%グルコース) 寒天培地 (YPGA) 及び液体培地 (YPGB), 2%麦芽エキス寒天培地 (MEA) 及び液体培地 (MEB) である。これらの培地を用いて各供試菌株を20℃で12日間培養し (液体培地は振盪速度100rpmで振盪培養), ノマルスキー型微分干渉顕微鏡 (OLYMPUS BX-60) により観察を行った。

### Ⅲ. 結 果

*R. quercivora* は、培養条件によっては菌糸 (写真-1) だけでなく出芽増殖を伴う酵母細胞が生じることが確認された (写真-2)。*R. quercivora* は培地上で分生子も比較的容易に形成したので、酵母と分生子の区別は問題となりうるが、出芽している細胞の存在を以て酵母と確認出来る。一方、通常は酵母として生育する (写真-3) *Hormoascus* sp. の菌糸形態も観察された (写真-4)。

表-1. 各菌株の培地別の培養形態  
Table -1. Morphology of the cells of the strains in each culture media

|              | 培地   | R1   |      | R2   |      | H1   |     |
|--------------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 寒天培地         | PDA  | Y+   | H+++ | Y-   | H+++ | Y+++ | H++ |
| Agar media   | YPGA | Y+   | H+++ | Y-   | H+++ | Y+++ | H++ |
|              | MEA  | Y++  | H+++ | Y+   | H+++ | Y+++ | H++ |
| 液体培地         | PDB  | Y++  | H+++ | Y++  | H+++ | Y+++ | H±  |
| Liquid media | YPGB | Y+   | H+++ | Y+   | H+++ | Y+++ | H-  |
|              | MEB  | Y+++ | H++  | Y+++ | H++  | Y+++ | H-  |

Y: 酵母 yeast form H: 菌糸 hyphal form

-: 観察されない。Not observed.

±: それらしいものがわずかに観察される。Suspicious cells of that form rarely observed.

+: 存在は確認できるが、多くはなく、確認に手間取る。Certainly existed but rare.

++: かなりの量が存在し、容易に確認できる。Easily distinguishable.

+++ : 菌体の大半を占める。Most of the cells were that form.

PDA: Potato Dextrose Agar

YPGA: Yeast Peptone Glucose Agar

MEA: Malt Extract Agar

PDB: Potato Dextrose Broth

YPGB: Yeast Peptone Glucose Broth

MEB: Malt Extract Broth

各菌株の生育形態を培地別に見ると(表-1), 菌糸と酵母の出現の度合いは培地によって異なった。*R. quercivora* はR1, R2株共に寒天培地では菌糸が大半だったが, 酵母も若干出現した。特にMEAでは比較的容易に酵母が生じた。液体培地では両株ともに菌糸だけでなく酵母も生じた。MEBではむしろ酵母が主な生育形態であった。酵母細胞は, YPGBでは比較的サイズが大きく, 逆にMEBでは小さかった。*Hormoascus* sp. は液体培地ではほとんど酵母のみで生育したが, 寒天培地では菌糸も生じた。特に寒天の基質中では菌糸がかなり発達した。この際見られたのは典型的な菌糸と思われた。

#### IV. 考 察

本研究においては *R. quercivora* に酵母型の生育形態が存在することが確認された。*R. quercivora* の生活史を考える上で, 本菌の二型性が明らかになったのは重要と思われる。例えば, 野外ではカシノナガキクイムシの坑道壁で白色ペースト状に菌が繁殖する場合があります (Sone *et al.*, 1998), カシノナガキクイムシの栄養源となっていると考えられるが, 本菌の酵母型の細胞がこれに含まれている可能性もある。一方, カシノナガキクイムシの坑道周辺では, 材中の褐変部位から本菌が分離されるが (伊藤ら, 1998), 褐変の広がり方などから考えると, ここでは本菌は菌糸形態で生存している可能性が高いように思われる。このように, 本菌の二型性は養菌性キクイムシとの共生関係において生じる特異的な生育環境への適応である可能性もある。

また, 実用的には, 本菌の酵母細胞を安定的に生育させることができれば, 接種試験への応用が可能と思われる。現在行われている接種試験では爪楊枝や米ぬか・ふすま培地で培養された菌糸状態のイノキュラムが用いられているが (伊藤ら, 1998), 菌糸状態のイノキュラムを用いた場合, 接種源密度のコントロールはなかなか困難である。酵母細胞であれば, 接種源密度のコントロールは容易であるから, この種の接種試験に益するところは大であろうと思われる。

*R. quercivora* は培地によって生育形態が変化することが示された。すなわち, 本菌は寒天培地では基本的に菌糸の形態を取

たが, 条件によっては酵母も出現した。また, 液体培地では寒天培地に比べて酵母が比較的容易に出現した。一方, *Hormoascus* sp. は液体培地ではほとんど酵母だったが, 寒天培地では酵母中心ながら, 基質中には菌糸がかなり発達した。このように, 今回供試した二種の菌は, 寒天, 液体という基質の物理性に対して類似した反応を示した。

*Hormoascus* 属はサッカロミケス目の半子囊菌綱 (Kurtzman and Robnett, 1995), 一方 *Raffaelea* 属は *Ophiostoma* 属に近い真正子囊菌綱とされている (Jones and Blackwell, 1998)。このように全く系統の異なる両者が基質の物理性に対して類似した反応を示したのは, 両者が同じ養菌性キクイムシの共生菌であることを考えれば興味深い。例えば, 系統の異なる両者が類似した生育環境に適応した結果同様な形態形成反応を獲得したという可能性も考えられる。いずれにせよ, *R. quercivora* における酵母型の細胞の位置付け, また, 植物関連菌における二型性の性質については, 今回の知見をベースに今後のデータの積み上げが必要と思われる。

#### 謝 辞

本研究は千葉大学真菌医学研究センター共同利用研究'01-14として行われた。また, R2株及びH1株は森林総合研究所東北支所の升屋勇人博士より御提供いただいた。厚く御礼申し上げる。

#### 引用文献

- Batra, L. R. (1967) *Mycologia* 59: 976-1017.  
 伊藤進一郎ほか (1998) 日林誌 80: 170-175.  
 Jones, K. G. and Blackwell, M. (1998) *Mycol. Res.* 102: 661-665.  
 Kubono, T. and Ito, S. (2002) *Mycoscience* 43: 225-260.  
 Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1995) *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1): S824-S830.  
 村田政穂ほか (2002) 中森研 50: 107-108.  
 Sone, K. *et al.* (1998) *Appl. Entomol. Zool.* 33: 67-75.  
 山口英世ほか (1987) 病原真菌学, 413pp, 南山堂, 東京.  
 (2003年10月30日 受付; 2003年12月19日 受理)