

クスノオオキクイムシとアンブロシア菌の
共生機構とその適応的意義

梶 村 恒

Symbiotic interactions between the ambrosia beetle, *Xylosandrus mutilatus*
(BLANDFORD) (Coleoptera : Scolytidae) and its associated fungi, and their
adaptive significance

Hisashi KAJIMURA

目 次

第1章 序 論	
1-1. 養菌性キクイムシおよびアンブロシア菌の研究の歴史と現状	93
1-2. 共生の概念とその生物学的意義	94
1-3. 本研究の目的と意義	96
第2章 調査地と供試材料（キクイムシおよび坑道）	
2-1. 調査地の概要	97
2-2. キクイムシおよび坑道の採取	
2-2-1. 坑道内キクイムシとその坑道	98
2-2-2. 飛翔分散成虫とその坑道	99
2-3. 供試材料と研究内容	99
第3章 クスノオオキクイムシ個体群の生態的特徴	
3-1. 諸 言	99
3-2. 材料と方法	
3-2-1. クスノオオキクイムシの概要	99
3-2-2. クスノオオキクイムシの生活史	100
3-2-3. キクイムシ類の穿入パターン	100
3-2-4. クスノオオキクイムシの発育過程および坑道の形成過程	100
3-3. 結 果	
3-3-1. クスノオオキクイムシの生活史	100
3-3-2. 異なる種類の寄主木における穿入パターン，産卵坑道率および繁殖成功率	102
3-3-3. キクイムシの発育過程と坑道の形成過程	103
3-3-4. 次世代体サイズと坑道長，成育時期との関係	105
3-4. 考 察	
3-4-1. 寄主木選好性と繁殖成功との関連性	106
3-4-2. クスノオオキクイムシ成虫の資源依存的産卵	108
3-4-3. クスノオオキクイムシの次世代生産と資源利用様式	109
第4章 坑道内共生菌	
4-1. 諸 言	110
4-2. 材料と方法	
4-2-1. SEM（走査型電子顕微鏡）観察法	110
4-2-2. 分離培養法	111
(a) 直接接種法	111
(b) 希釈平板法	111
4-2-3. 分離菌の同定法	112
4-3. 結 果	
4-3-1. SEM 観察	112
4-3-2. キクイムシの成育に伴う共生菌相の動態	112
(a) 水平坑道	112
(b) 垂直坑道	116
4-3-3. 異なる種類の寄主木の坑道内における主要共生菌	116

4-4. 考 察	
4-4-1. クスノオオキクイムシの食物資源としての共生菌	116
4-4-2. 坑道位置と共生菌の動態との関連性	117
4-4-3. 食物資源の時間的変化パターンとその利用形態	118
第5章 mycangia (孢子貯蔵器官) 内共生菌	
5-1. 諸 言	119
5-2. 材料と方法	
5-2-1. SEM 観察法および共生菌放出行動の観察法	119
5-2-2. 分離培養法	119
(a) 直接接種法	119
(b) 希釈平板法	120
5-2-3. 分離菌の同定法	120
5-3. 結 果	
5-3-1. mycangia の微細構造と共生菌の放出	121
5-3-2. キクイムシの成育に伴う共生菌相の動態	121
5-3-3. 温度処理による共生菌相の変化	122
5-4. 考 察	
5-4-1. mycangia 内への共生菌の獲得	122
5-4-2. 温度が共生菌の維持に与える影響	126
5-4-3. クスノオオキクイムシの主栄養源と共生菌の接種方法	127
第6章 クスノオオキクイムシの人工飼育	
6-1. 諸 言	128
6-2. 材料と方法	
6-2-1. 卵および孵化幼虫の採取	128
6-2-2. 飼育方法と実験計画	128
6-3. 結 果	
6-3-1. 各アンブロシア菌におけるキクイムシ飼育結果	129
6-3-2. 菌面積と蛹重, 蛹化率との関係	131
6-3-3. 発育速度と蛹重との関係	131
6-4. 考 察	
6-4-1. クスノオオキクイムシの主栄養源と他の菌類の役割	132
6-4-2. 他種キクイムシの共生菌の利用可能性	133
6-4-3. 寄主木成分がキクイムシの繁殖に与える影響	134
6-4-4. クスノオオキクイムシの種内競争	134
第7章 数種キクイムシと共生するアンブロシア菌の化学的分類	
7-1. 諸 言	135
7-2. 材料と方法	
7-2-1. 泳動試料の調整	135
7-2-2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	137
7-3. 結 果	
7-3-1. 各アンブロシア菌の泳動パターンと構成タンパク	137
7-3-2. アンブロシア菌間の類縁度	138

7-4. 考 察	
7-4-1. アンブロシア菌の化学的分類法としてのタンパク質分析	138
7-4-2. <i>Ambrosiella</i> 属のキクイムシ種特異性	139
第8章 総合考察	
8-1. クスノオオキクイムシの繁殖戦略	
8-1-1. 共生菌の獲得, 維持, 接種戦略	140
8-1-2. 次世代生産戦略	142
8-2. キクイムシ類とアンブロシア菌の共進化	
8-2-1. キクイムシ類の生態的特徴とアンブロシア菌の類縁度について	143
8-2-2. アンブロシア菌における種特異性の進化	144
8-3. キクイムシ類とアンブロシア菌の共生機構の特性	147
謝 辞	149
引用文献	150
摘 要	157
Summary	161
写 真	167

梶村 恒：名古屋大学農学部森林保護学研究室（現：日本学術振興会特別研究員（PD））
 Hisashi KAJIMURA : Laboratory of Forest Protection, School of Agricultural Sciences, Nagoya
 University, Nagoya 464-01, Japan
 ＊本論文は名古屋大学に提出した博士学位論文である。
 （受理：1995年12月7日）

第1章 序 論

1-1. 養菌性クイムシおよびアンブロシア菌の研究の歴史と現状

クイムシ類は、鞘翅目ゾウムシ上科に属する昆虫の一群であり、形態的にナガクイムシ科 (Platypodidae) とクイムシ科 (Scolytidae) に分類される。また、食性や生息場所の違いから、樹皮下穿孔性クイムシ (bark beetles) と養菌性クイムシ (ambrosia beetles) の2つのグループに大別される。クイムシ科の約半数を占める樹皮下穿孔性クイムシは、樹木の形成層や師部を摂食するグループで、一部の種では青変菌と呼ばれる *Ceratocystis* 属の植物病原菌と共生関係を持ち、健全木を加害する場合がある (Francke-Grosmann, 1967; Whitney, 1982)。これに対して、養菌性クイムシは衰弱木や伐倒木の材質部奥深くまで穿孔し、その坑道内でアンブロシア菌 (ambrosia fungi) と総称される共生菌を培養する習性を持っており、幼虫はこの菌類を食物として利用している。また、このグループの成虫は、mycangia (単数形 mycangium) と呼ばれる孢子貯蔵器官を備え、この器官によって共生菌の孢子を貯蔵・運搬していることが知られている。現在、養菌性クイムシであることが確認されているのは、ナガクイムシ科のほぼ全種とクイムシ科の10族である (Beaver, 1989)。

このような養菌性クイムシの存在が初めて明らかにされたのは、今から150年以上も前のことである。Schmidberger (1836) は、クイムシが坑道内で正体不明の白色物質を摂食しているのを発見し、この物質を ambrosia (ギリシア神話では不老不死のための食物を意味する言葉) と命名した。さらに Hartig (1844) は、この物質が木材に由来するものではなくクイムシによって培養された菌類であることを明らかにした。以来、これらの菌類は、ambrosia fungi (アンブロシア菌) と呼ばれるようになり、またこれを食物としているクイムシの一群も、ambrosia beetles (養菌性クイムシ) と名付けられた。

その後、Hubbard (1897), Neger (1908) など多くの研究者によって坑道内のアンブロシア菌の観察が行われ、この菌がモニリオイドチェーン (monilioid chain) と呼ばれる独特の生育形態を持つことが明らかになった。しかし、アンブロシア菌の新しい坑道内への伝播方法は長い間不明であった。Neger (1911) は、この菌がクイムシ成虫の消化管を通じて定着すると考え、また Doane and Gilliland (1929) は、外骨格への菌の付着による運搬を示唆した。ところが、新成虫の消化管内に菌が全く存在しなかったり、体表上には様々な雑菌が付着しているなどの矛盾が指摘されるようになり、これらの考えは次第に説得力を失っていった。その後、Nunberg (1951) がクイムシの体内に共生菌の孢子を貯蔵、保護して運搬する特別の器官を発見し、さらに Francke-Grosmann (1956) により、種々のクイムシについてこの器官の存在が確認された。この発見により、クイムシとアンブロシア菌との相互関係は (相利) 共生的であることが示唆され、またその継続性も一応保証されることになった。この孢子貯蔵器官は、Batra (1963) によって mycangia と命名され、その存在位置によって、口腔、前胸背、前胸側板、基節窩、前・中胸背、鞘翅の6つの型に大別された (Francke-Grosmann, 1963, 1967)。現在までに約20タイプの mycangia が発見され、その種特異性が示唆されているが、まだ存在位置の確認されていない種が数多く残されている (Beaver, 1989)。

一方、クイムシと共生するアンブロシア菌の対応関係については、これまでに多くの研究者により議論されてきたが、体系化されるまでには至っていない。これは、クイムシ自体の同定が難しいこと、また mycangia の存在位置の特定とそこからの菌の分離に高度なミ

クロテクニクを必要とすることのほかに、アンブロシア菌が、坑道内では ambrosia 状、mycangia 内では酵母状、培養基上では菌糸状に生育する場合が多く、このような多形態性 (pleomorphism) (Batra, 1967) のためにその同定が非常に困難であること、などに起因している。

初期においては、アンブロシア菌はすべて同一の属である (Fisher *et al.*, 1953) か、キクイムシの種ごとに特殊化している (Graham, 1952) か、あるいは同一種内においても異なる系統の菌を持ちうる (Francke-Grosmann, 1956) などの考え方が支配的であった。また、Francke-Grosmann (1963) は、分類学上近縁なキクイムシの共生菌は近縁もしくは同種であり、同種のキクイムシから分離された異なる系統の菌は変種であると考えた。これに対して Batra (1963) は、共生菌は 1 種のみではなく数種が複合的に共存しているという説を提出した。

さらに Batra (1966) は、アンブロシア菌と総称されてきた共生菌をキクイムシの成育における菌の重要性によって、①主要共生菌 (primary ambrosia fungi: 以下, PAF) と②副次的共生菌 (auxiliary ambrosia fungi: 以下, AAF) とに分類することを提唱した。PAF は、高度に種特異的で分布範囲が共生するキクイムシの分布範囲と一致し、幼虫成育期の坑道や飛翔期あるいは穿入期の成虫の mycangia から定常的に分離される菌と定義される。これは幼虫や成虫の食物となり、穿入期および幼虫成育期の坑道内では他の菌よりも優占的になると考えられた。一方 AAF は、坑道内や mycangia 内に常在せず、また種特異性もみられないが、幼虫あるいは新成虫の補助的な食料となりうる菌であるとされた。この提案は、これまで分離場所や分離時期などが混乱したまま同定、記載されていたアンブロシア菌を再検討し、また菌とキクイムシとの相互関係を正確に理解する上で大きな役割を果たした。

その後 Batra (1967) は、これまで明らかにされたアンブロシア菌の諸性質を検討し、8 属 12 種の PAF に関する検索表を作成した。また、Francke-Grosmann (1967), Kok (1979), Norris (1979) からもアンブロシア菌の記載を行い、Carpenter (1988) は AAF について *Ambrodiscus* 属を創設した。現在のところ、記載されているアンブロシア菌の大部分は不完全菌類であり、完全世代が判明した一部の種については子囊菌類、半子囊菌類、あるいは担子菌類に属することが確認されている (Beaver, 1989)。

近年では、キクイムシが種特異的な 1 種類の PAF を食物としているのではなく、PAF と AAF、さらにはバクテリアや細菌類までもを包含する 1 つの共生微生物複合体 (mutualistic microbial complex) を摂食しているという考え方が提出され、養菌性キクイムシの研究は新たな展開を見せつつある (Haanstad and Norris, 1985; Beaver, 1989)。

1-2. 共生の概念とその生物学的意義

共生 (symbiosis) という用語は、2 種またはそれ以上の生物が 1 つの生活の場を共有し、そのことによって少なくとも 1 種の生存様式が影響を受ける関係に対して、1879 年に de Bary によって初めて提唱された (Ahmadjian and Paracer, 1986)。これは、両種がともに利益を得る“相利共生” (mutualism)、一種だけ利益を得て他種は影響を受けない“片利共生” (commensalism)、一種は利益を得るが他種は害を受ける“寄生” (parasitism) の 3 様の形態を含む、広い意味での共生の定義である。これらの共生現象は、動物、植物、菌類などの

すべての生物の種間関係に存在する連続的な系列で、進化的観点からみると寄生は片利共生および相利共生の起源とされる (Ahmadjian and Paracer, 1986)。

また、共生関係は 2 者間に生じる相対的な利益だけでなく、共生者 (symbionts) の存在位

置、共生関係の種特異性、共生者間の相互依存度、共生関係の一貫性、共生による副産物の有無により分類できる (Starr, 1975; Ahmadian and Paracer, 1986)。すなわち、共生者が宿主 (host; 2つの共生者のうちの個体サイズの大きい方) の細胞外に存在するか細胞内で生存するかにより、外部共生 (ectosymbiosis) と内部共生 (endosymbiosis) に分類され、また共生者が1種のみ生物と共生関係を結ぶ場合 (oligophilic symbiosis) と、多種と共生関係を結ぶ場合 (polyphilic symbiosis) とに区別できる。さらに、共生関係には、一方の共生者の存在なしには成立しないような義務的な関係 (obligate symbiosis) と、どちらかの共生者にとっては必須でないような関係 (facultative symbiosis) があり、また、生きた共生者から栄養を得る場合 (biotrophic symbiosis) と死亡した共生者から栄養を得る場合 (necrotrophic symbiosis) がある。共生関係の一貫性についても様々な程度があり、たとえば送粉共生の場合その関係が送粉者の滞在時に限定されるのに対して、内部共生は恒常的に一貫性を持続し、捕食寄生も宿主が死亡するまでは一貫性のある関係である。加えて、共生関係の発達には、共生者に形態上あるいは化学的に新たな変化をもたらす場合がある。*Rhizobium* 属のバクテリアとマメ科植物の共生によって生じる根粒と、その内部で生産されるレグヘモグロビンなどはその代表例である。

共生関係は、その生物学的な機能の面からも大きく次のような4つのカテゴリーに分けられる (Smith and Douglas, 1987)。まず、栄養補給に関与する消化共生系は、共生者が生産あるいは分解した産物を栄養源として利用する場合である。この時、多くの共生者は宿主生物から生育に適した環境を提供されており、この共生系は相利的である場合が多い。このほか、移動能力を持たない共生者と移動を可能にしてくれる寄主生物との間には運搬共生系が成立し、また一方の共生者が他方の体表に付着した病原菌や害虫を駆除してこれを餌とする関係は、浄化共生系と呼ばれている。さらに、共生関係が具体的に観察されないところでも、生育環境の安定に関与する共生系が存在する。この系は、ある生物種が酸素や二酸化炭素などの環境因子を一定に保ち、このことによって生育を保障された生物が環境条件を整えてくれた生物種に対して栄養的利益を与えるという相互関係である。

共生は、生物間の競争を軽減する存在様式の1つである。すなわち、環境の違いに適応し独自の進化をたどって多様化した各々の生物は、他種の生物と継続的に密接な共同体を形成することにより、単独では克服できない異なる環境に適応できる (石川, 1992)。また、共生関係の成立した生物種間の相互には、その関係が義務的であるほど共進化が起りやすい (Boucher *et al.*, 1982)。共進化 (coevolution) とは、ある種の作用が、それとかわりを持つ他種の形質に対する淘汰圧となり、その変化がまた元の種の形質の変化を促すような共同進化のことであり、競争あるいは捕食-被食関係を含むほとんどすべての種間関係においてみられる (Ehrlich and Raven, 1967)。共進化は、2種間のみで起こる場合 (pairwise coevolution) と多種が関与する場合 (diffuse coevolution) があるが、いずれも相互作用する種個体群内の遺伝的变化とそれに伴う相互適応と相互種分化を繰り返すことにより進行している。

また、共生は生物の進化を1つの方向に導く原動力になり、その緊密度が最大限に達した場合に新しい生物の出現を招くものと考えられている。そして、生物の進化が、種分化による多様化とこの共生による複雑高度化の相互作用によって生じることが予想されている (Margulis, 1981)。この仮説は連続内部共生説 (SET: serial endosymbiotic theory) と呼ばれるもので、ダーウィン流の適応と自然選択による生物進化論に対抗するものである。

最近では、地球上の多種多様な生物が全体として持続的に共存している様相を、地球共生

系という多様な生物のグローバルなつながりとみなし、その存続基盤である多数の生物の共存を維持、促進する機構を探る試みが始まっている（東・安部，1992）。すなわち、細胞という小さな共生系から生物群集あるいは地球上の全生物からなる大きな共生系に至る様々な場合において、共存を支える仕組みと其中で生じている相互作用が解明され、その総合化が図られている。今日、共生という生物学的現象は、生物の細胞から群集、そして生態系全体における相互作用系の進化を説明する上での有力な手段として再認識されている。

1-3. 本研究の目的と意義

これまで多様な共生現象が、アプローチの上でも生態学、進化生物学から細胞・分子生物学まで、研究対象も動物、植物から原生動物、細菌、ウイルスに至るまで、様々な専門領域の研究者により探究されてきた。この中で、養菌性キクイムシとアンブロシア菌の共生関係も、植物遺体を利用する昆虫と微生物との消化共生系という多様な連合システムの一つであり、昆虫学、微生物学、樹病学だけでなく栄養生理学、進化生態学的な視点からも大きな興味を持たれている（松本，1992）。

しかし既述したように、現在までに調べられたキクイムシとアンブロシア菌はごく一部にすぎず、またそれぞれの生理、生態についても不明な点が数多く残されているため、両者の分類学的な位置づけや種分化の機構、共進化的意義は依然として混沌としたままである。また、様々なアプローチから得られている知見も、その研究対象であるキクイムシの種が異なるために、すべてのキクイムシ～アンブロシア菌間の共生システムに適用することはできない。さらに、養菌性キクイムシの研究における最大の問題は、野外研究の蓄積がきわめて乏しい上に、そこから導き出される考察や仮説に対して実験的手法による検証がほとんど行われていないことであろう。したがって、これまで得られた断片的な知見を生かす上でも、野外調査と実験的手法を併用した総合的な生態研究が望まれるところである。

そこで本研究では、養菌性キクイムシの1種であるクスノオオキクイムシ (*Xylosandrus mutilatus* (BLANDFORD) WOOD) を研究対象の中心とし、

- ① 寄主木の種類によってクスノオオキクイムシの繁殖成功度は異なるのか（第3，6章）、その差異は穿入パターンにも反映されているのか（第3章）。
- ② 本種は次世代生産のためにどのように食物資源を利用、分配しているのか（第3，6章）。
- ③ キクイムシの成育段階に伴い、坑道内および mycangia 内の共生菌相は時空間的にどのような動態を示すのか、また菌の量と質はどのように変化するのか（第4，5章）。
- ④ 共生菌はいつ mycangia 内へ獲得され、どのように維持・放出されているのか、また維持機構を発現させる要因は何か（第5章）。
- ⑤ 本種の栄養源となる共生菌は何か、また他種のキクイムシの共生菌は利用可能か（第4，5，6章）。
- ⑥ 本種および他種のキクイムシの共生菌は生化学的に異なるのか、その類似性はキクイムシの類縁関係、生活様式と何らかの関連性があるのか（第7章）。
- ⑦ 本種とアンブロシア菌の繁殖戦略、その共生システムの成立過程とはいかなるものか（第8章）。

といった点を様々な手法を用いて明らかにし、本種とアンブロシア菌の相互作用・共生機構を総合的に解明することを試みた。とくに、共生という生活様式の有効性およびそのメカニズムを定量的な尺度を用いて評価し、また人為的な作用を加えることによりそれらを実証する点に力を注いだ。そして、微視的あるいは巨視的な見方を相互にフィードバックさせなが

ら、キクイムシとアンブロシア菌の共生の意義を機能的・進化的両面からより多面的にとらえようとした。

本研究により、森林昆虫としてのキクイムシとアンブロシア菌の共生機構の一端を解明できるだけでなく、森林生態系という複雑なシステムの中での生物の適応や進化のプロセスを理解する上でも多くの示唆が得られるものと考えられる。

第2章 調査地と供試材料（キクイムシおよび坑道）

2-1. 調査地の概要

本研究の調査地は、愛知県北東部に位置する名古屋大学農学部附属演習林（愛知県北設楽郡稲武町：北緯 35°11′，東経 137°33′，標高約 980 m）に隣接する広葉樹林（中田和林道沿線）である（図 2-1）。調査地は温帯中部に属し、過去 5 年間（1988-1992 年度）の年平均気温は約 8℃，年間降水量は 2000 mm 前後である。また土壌型は、適潤性褐色森林土（BD～BD(d) 型）に分類される。

調査林分は、本地域（スギ，ヒノキ，カラマツ造林地）内にわずかに残存する薪炭林の一部であり，ブナ・ナラ類（コナラ，ミズナラ），シデ類（アカシデ，クマシデ），カエデ類（コハウチワカエデ，ウリハダカエデ），リョウブ，シロモジなどで構成されている（写真 2-1）。

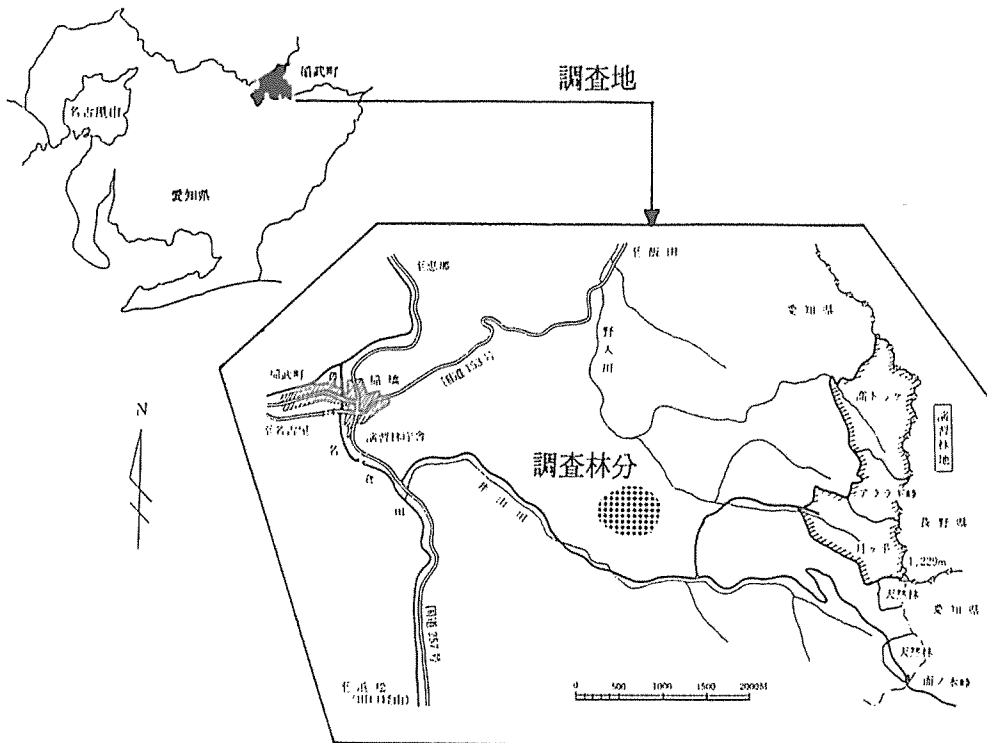


図 2-1. 調査地の概念図.

2-2. キクイムシおよび坑道の採取

2-2-1. 坑道内キクイムシとその坑道

キクイムシおよび坑道の採取は、1988年12月から1993年2月までの約4年間にわたって行った。供試樹種は、本調査林分における優占樹種であるシロモジ (*Lindera triloba*) (1988-1992年度), コハウチワカエデ (*Acer sieboldianum*) (1991-1992年度), ウリハダカエデ (*Acer rufinerve*) (1992年度), リョウブ (*Clethra barbinervis*) (1992年度) の4種とした。

採取方法は、餌木採集法を用いた(馬場・平嶋, 1992)。供試木を1988-1992年の6~9月に毎週約5本ずつ(1990年度は他の月にもシロモジを毎月約5本ずつ)伐倒し, そのまま林内に放置して枯損させた。枯損木へのキクイムシの穿入は, 樹体外へのフラスの排出により確認した。キクイムシが穿入した試料木(以下, 穿入木)は各成育段階に到達するまで林内放置を続け, その後適宜実験室に搬入した。成育段階は, 経過日数およびフラスの排出状態

表 2-1. 本研究で行われた測定および実験項目一覧。

測定・実験項目	測定・実験を実施した年度					関連する本論の章
	1988	1989	1990	1991	1992	
[坑道]						
生態調査						
供試木サイズ			S	SK	SKUR*	第3章
穿入孔数			S	SK	SKUR	第3章
坑道長			S	SK	SKUR	第3章
共生菌調査						
直接接種法	S	S	S		SKUR	第4章
希釈平板法				S		第4章
顕微鏡下計測				S		第4章
SEM 観察	S	S				第4章
[キクイムシ]						
生態調査						
坑道内子係数			S	SK	SKUR	第3章
体サイズ			S	SK		第3章
共生菌（mycangia）調査						
直接接種法		S	S		SKUR	第5章
希釈平板法				S	S	第5章
顕微鏡下計測				S	S	第5章
SEM 観察			S			第5章
人工飼育実験				S	S	第6章
[分離菌]						
形態・培養学的実験	S	S	S	S	SKUR	第4，5，7章
化学的分類実験			S			第7章

*使用した供試木

S : シロモジ (*Lindera triloba*)

K : コハウチワカエデ (*Acer sieboldianum*)

U : ウリハダカエデ (*Acer rufinerve*)

R : リョウブ (*Clethra barbinervis*)

を示す。

により推定した。なお、搬入の際、穿入木は約 1.5 m に切断して試料材とし、その切断面にはシリコンペーストを塗布して材の乾燥を防いだ。

実験室へ搬入後、まず試料材の表面にキクイムシの穿入位置をマークした。この穿入位置を中心として 1 つの坑道が含まれるように試料材を細断した後、それぞれの試料片を割材し坑道内壁を露出させて、親成虫と卵、幼虫、蛹、未成熟新成虫、新成虫、および各成育段階の坑道の採取を行った。なお、ここで未成熟成虫とは、脱蛹後体色の十分黒化していない虫体の軟質な成虫のことをさし、また坑道の成育ステージは、坑道内に卵、幼虫、蛹、成虫が混在している場合でも、その中の最大成育段階を示すものとした。

2-2-2. 飛翔分散成虫とその坑道

越冬期の成虫および坑道の採取も、各年度の 12~2 月に同様の方法によって行った。また、この時期に林内から回収したキクイムシ穿入木の一部は、翌春まで名古屋大学農学部東山構内に設置した野外網室 (1.8×1.8×1.8 m) 内に静置した。この中で坑道から脱出、分散飛翔し始めたキクイムシを採集して飛翔成虫試料とし、同時にキクイムシ飛翔分散後の坑道も採取した。

2-3. 供試材料と研究内容

本研究の個々の内容とそれぞれ対象とした供試材料の関係を表 2-1 に示す。なお、供試材料の処理、取扱いおよび測定方法などは調査、実験ごとに異なるため、これらについては各章において述べる。

第 3 章 クスノオオキクイムシ個体群の生態的特徴

3-1. 諸 言

養菌性キクイムシ (ambrosia beetles) は、樹幹内奥深くまで穿った坑道内でアンブロシア菌 (ambrosia fungi) と総称される菌類を培養する習性を持っており、彼らの幼虫や成虫がこの菌糸や胞子を食物として利用している。すなわち、キクイムシは樹木という営巣資源を利用して坑道を形成し、その中で繁殖するアンブロシア菌という食物資源を消費して子孫を残している。

本章では、未知の部分の多いクスノオオキクイムシ (*Xylosandrus mutilatus* (BLANDFORD) WOOD) の生活史と生態を明らかにし、また寄主木への穿入パターン、穿孔後のキクイムシの発育過程と坑道の形成過程を定量的に解析することにより、本種個体群の生態的特徴、とくに次世代生産における資源 (寄主木および食物) 利用様式について考察する。

3-2. 材料と方法

3-2-1. クスノオオキクイムシの概要

クスノオオキクイムシ (写真 3-1) は、日本全土および朝鮮半島、台湾、東南アジアなどに分布し、各種の広葉樹やスギの材部を加害する (林ら, 1984)。坑道は、樹幹の横軸に沿って形成される水平坑道とその上下に長く分枝する垂直坑道により構成され、その形状から長梯子孔と呼ばれている (加辺, 1959)。

雌成虫は体長約 3.5 mm と比較的大型で、体色は黒色である。外部形態的には、前胸背の前縁中央に 2 つの突起が存在し、上翅が非常に短く、点刻列は不規則で斜面部は急に切断さ

れた状態になっている(野淵, 1980a)。また, 1 夫多妻性および雄雌異型であり, 雄は軟弱で雌よりかなり小型である(Nobuchi and Takahashi, 1965)(写真 3-1)。

なお, 本種は以前 *Xyleborus* 属に分類されていたが, 前肢の基節が互いに離れていることから近年 *Xylosandrus* 属へ改属された(Wood, 1989)。

3-2-2. クスノオオキクイムシの生活史

本調査地におけるクスノオオキクイムシの生活史を, 1988-1989 年の 6~9 月, および 1990 年 4 月から 1991 年 3 月に伐倒放置したシロモジを用いて調査した。それぞれの時期に伐倒したシロモジへの本種の飛来, 穿入の有無は, 定期的な野外観察により確認した。穿入後は穿入孔周辺の変化(フラス排出状況, 坑道外への脱出など)を継続して野外観察するとともに, 約 1 週間毎に穿入木の一部を実験室に搬入して割材し, 坑道を露出させることにより材内における本種の生活史の調査を行った。

3-2-3. キクイムシ類の穿入パターン

キクイムシ類の穿入パターンの調査には, 様々なサイズ(地際直径 2~8 cm)のシロモジ, コハウチワカエデ, ウリハダカエデ, リョウブを供試木として使用した。各供試木は, 1992 年の 6~9 月(クスノオオキクイムシの飛翔分散期)に林内で伐倒し, 約 1 か月以上放置した。キクイムシ類の穿入が終了した後, 穿入木の樹幹, 枝を適当な長さに切断し, これらの材をすべて個別に実験室へ搬入した。採集した材に認められる穿入孔をクスノオオキクイムシとその他のキクイムシに大別した後, それぞれの穿入孔数と穿入木個体の地際直径を測定した。また, 一部の穿入木については, 割材して坑道内に存在するキクイムシ成虫を採集し, キクイムシ種の確認を行った。

3-2-4. クスノオオキクイムシの発育過程および坑道の形成過程

材内におけるクスノオオキクイムシの発育過程および坑道の形成過程の調査は, シロモジ, コハウチワカエデの全成育段階(穿孔~越冬: 1991-1992 年度)の坑道を用いて行った。割材してそれぞれの坑道を露出させ, 1 つの坑道内に存在する子孫(卵, 幼虫, 蛹, 未成熟新成虫, 新成虫)の数を記録し, またその生重をマイクロバランス上で測定した。同時に, 水平坑道と垂直坑道の長さもそれぞれ測定した。

また, ウリハダカエデ, リョウブの新成虫期から越冬期(1992 年度)の坑道については, 新成虫数と坑道長を記録した。

3-3. 結 果

3-3-1. クスノオオキクイムシの生活史

クスノオオキクイムシは, 本調査地において 1 年で 1 世代を経過した(図 3-1)。雌成虫は 7 月下旬をピークとして 6 月下旬から 9 月上旬まで飛翔分散し, 伐倒放置した供試木に飛来して樹皮上を活発に動き回る。本種の飛翔から穿入までに要する期間, およびこの間の行動については不明であるが, この供試木上歩行はおそらく寄主木の探索行動であると考えられる。

材の状態が穿入に好適であると判断すると, 雌成虫は穿入位置を決定し, まず材表面から鉛直方向に穿孔を始め, その後ほぼ年輪に沿った形で水平坑道を形成する。水平坑道の形成後, 成虫は水平坑道の途中から材繊維方向に垂直坑道を形成する(図 3-2)。この間, 穿入孔

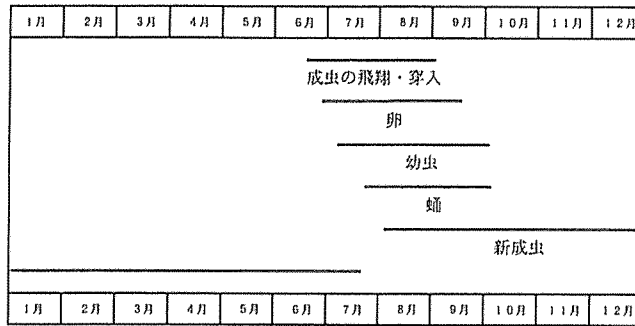


図 3-1. 本調査地におけるクスノオオキクイムシの生活史.

からはチューブ状のフラスが盛んに排出されるが、本種のフラスは軟質のため約 2 cm 程度伸びると地上へ落下する。穿入してから約 3 週間後、アンブロシア菌の白色菌層が坑道内壁を覆い始めた頃に産卵が開始される。卵は数個ずつ塊状に産下される。成虫は産卵後、穿入孔に蜘蛛の糸の様なものを張り巡らし、最終的にこの糸状膜で坑道を封鎖する（写真 3-2）。雌成虫単独で坑道の管理を行う本種にとって、この膜は外敵の侵入防止あるいは坑道内の湿度調整に必須のものと推測されるが、その詳細は不明である。

孵化幼虫は坑道内のアンブロシア菌を摂食しながら成長し、3~4 週間で蛹化、羽化する。この時期のフラスはすべて幼虫が排出する黒色糸状の糞であり、とくに終齢幼虫期に多い。蛹は頭部を垂直坑道の末端部に向けてすきまなく一列に並ぶように存在し（写真 3-3）、新成虫もこの状態で黄色~茶色~黒色へと次第に着色・硬化し、成熟していく。雄成虫は雌成虫よりも早く羽化し、同一坑道内の多数の雌成虫と交尾した後に坑道外へ出る。脱出した雄成虫は、寄主木上を歩行したり、あるいは別の坑道（と思われる）の穿入孔付近に密集しているのが観察されるが、他坑道の雌成虫との交尾に成功しているかどうかは不明である。また、

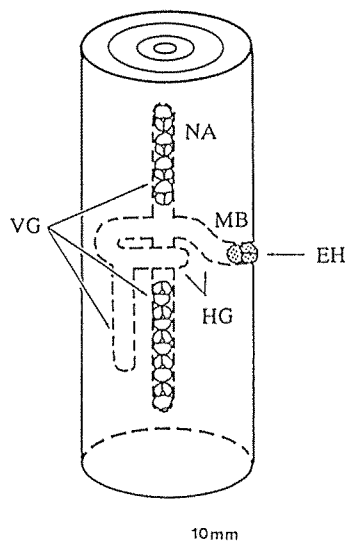


図 3-2. クスノオオキクイムシの坑道型.

EH: 穿入孔, HG: 水平坑道, VG: 垂直坑道, MB: 親成虫, NA: 新成虫

脱出雄成虫の坑道外における生存期間はかなり短いことが予想される。一方、雌成虫は交尾後そのまま材内で成虫越冬し、翌春再び外界へ脱出、新しい寄主木に穿入して繁殖する。

3-3-2. 異なる種類の寄主木における穿入パターン、産卵坑道率および繁殖成功率

異なる樹種、サイズの寄主木へ穿孔したキクイムシ類の数を、図 3-3 に示す。シロモジへは、クスノオオキクイムシ以外のキクイムシ類(ミカドキクイムシ(*Scolytoptatypus mikado*), サクキクイムシ (*Xylosandrus crassiusculus*), ハンノキキクイムシ (*Xylosandrus germanus*), ハネミジカキクイムシ (*Xylosandrus brevis*), ツヅミキクイムシ (*Xyleborus amputatus*) など)が優占的に穿孔した。その穿孔数は、寄主木のサイズに依存していた。コハウチワカエデにおいては、他種のキクイムシ類よりもクスノオオキクイムシの方が優占的となる場合が多く、その穿孔数も寄主木のサイズが大きくなるにつれて増加した。リョウブへのキクイムシ類の穿孔数は、他の樹種と比べてかなり少なかった。また、穿入部位の材の直径は、ミカドキクイムシ、サクキクイムシ、ハンノキキクイムシ、クスノオオキクイムシ、ハネミジカキクイムシ、ツヅミキクイムシの順に小さくなる傾向があった。

図 3-4 は、各寄主木の単木(主樹幹)あたりのクスノオオキクイムシの穿孔数を比較したものである。単木あたりで比較することにより、樹種による枝部資源量の差異の影響がなくなり、樹種間の穿孔数の違いをより正確に検出できると考えられる。シロモジとコハウチワカエデへのクスノオオキクイムシの穿孔数は、ウリハダカエデとリョウブよりも多い傾向が認められた。

穿入した樹種により、クスノオオキクイムシの産卵坑道率と繁殖成功率は有意に異なった(G-test, $p < 0.01$) (表 3-1)。産卵坑道率は、ウリハダカエデ、リョウブ、シロモジ、コハウチワカエデの順に大きくなり、またウリハダカエデにおける繁殖成功率は他の樹種の約 50%以下となった。ただし、ここでいう産卵坑道率とは、1 cm 以上の垂直坑道を有する坑道(産卵坑道)(図 3-5 参照)の数を割材して露出させた坑道(調査坑道)の数で除したものであり、繁殖成功率とは雌新成虫が存在する坑道(繁殖坑道)の数を産卵坑道数で除したものである。すなわち、

産卵坑道率(%) = 産卵坑道数 / 調査坑道数

繁殖成功率(%) = 繁殖坑道数 / 産卵坑道数

と定義した。また、ウリハダカエデにおける雌新成虫数が約 2, 3 個体であったのに対し、他の樹種では平均 5 個体以上であった(表 3-1)。

表 3-1. 各寄主木におけるクスノオオキクイムシの産卵坑道率、繁殖成功率、雌新成虫数.

樹 種	調査坑道数	産卵坑道率 ^{a)} (産卵坑道数)	繁殖成功率 ^{b)} (繁殖坑道数)	雌新成虫数 (平均±標準誤差)
シロモジ	230	30.0% ($n=69$)	91.3% ($n=63$)	5.0±0.5
コハウチワカエデ	115	37.4% ($n=42$)	72.1% ($n=31$)	6.7±0.9
ウリハダカエデ	78	15.4% ($n=12$)	33.3% ($n=4$)	2.5±0.6
リョウブ	30	20.0% ($n=6$)	83.3% ($n=5$)	5.4±1.2

a) 産卵坑道率(%) = 産卵坑道数 / 調査坑道数

b) 繁殖成功率(%) = 繁殖坑道数 / 産卵坑道数

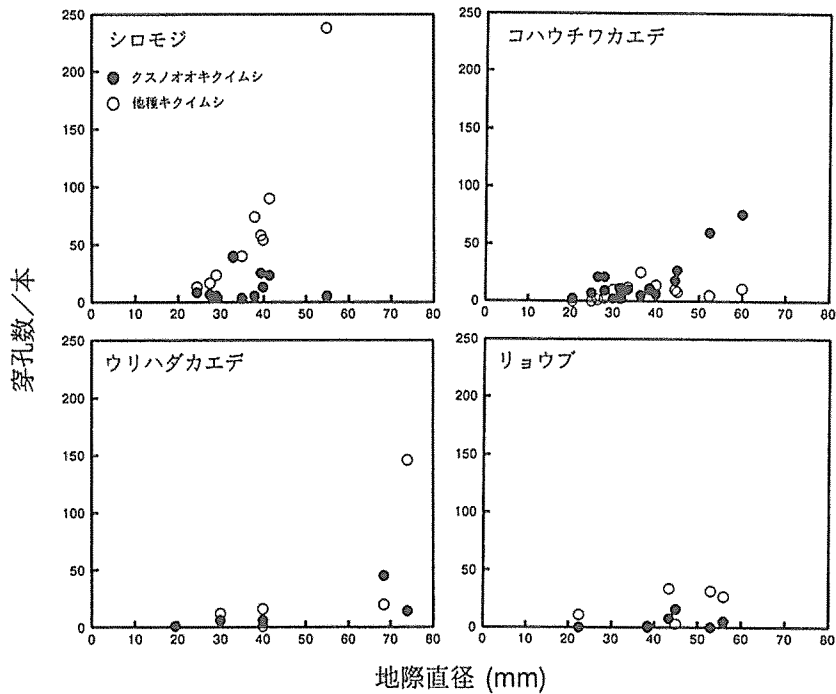


図 3-3. 異なる樹種、サイズの寄主木におけるキクイムシ類の穿孔数.

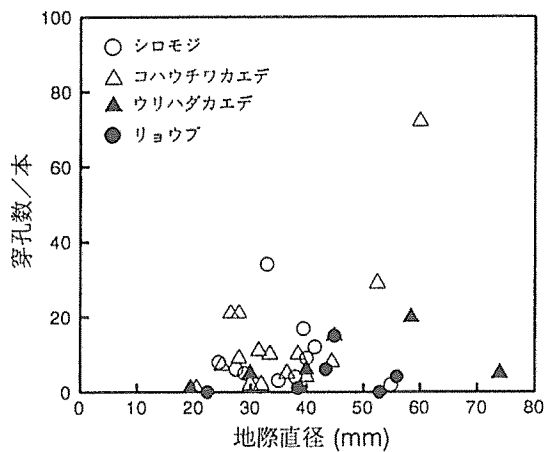


図 3-4. 各寄主木の単木（主樹幹）あたりのクスノオオキクイムシの穿孔数.

3-3-3. キクイムシの発育過程と坑道の形成過程

クスノオオキクイムシの子孫数とそのステージ構成の時間的変化を表 3-2 に示す。供試木（シロモジ、コハウチワカエデ）を伐倒後、20 日以内に産卵が開始された。産卵開始後 20 日間で新成虫が出現し、この時期には全成育ステージが存在した。子孫数（＝産卵数）は 60 日後まで増加していくが、その後は雄成虫の脱出と幼虫の死亡により子孫数は減少した。この幼虫の死亡は、栄養源であるアンブロシア菌の枯渇によるものと考えられる。また、卵から

雌成虫および雄成虫へと成育した結果、生重はそれぞれ約 90 倍および約 16 倍に増加し、雌成虫の生重は雄成虫の約 5.5 倍であった。性比は極端に雌に偏り、約 1:8 (♂:♀) であった。

図 3-5 に、本種の坑道形成過程を示す。水平坑道は約 2 cm 形成され、その後垂直坑道が約 1 cm 形成された時に産卵が行われた。幼虫期から蛹期にかけて垂直坑道は約 2 倍に拡張され、幼虫の成育終了後（おそらく新成虫により）さらに延長された。最終的に、本種の坑道の全長は平均 6 cm となった。

また、全成育ステージにおいて、坑道あたりの子孫数と坑道長との間には、正の相関が認められた（図 3-6）。すなわち、大きい坑道ほど多くの子孫が存在する傾向が認められた。しかし、回帰直線の傾き（回帰係数）は、卵期（0.68）～蛹期から新成虫期～越冬期（0.16）にかけて大きく低下した。これは、前述した産卵終了後の坑道延長と幼虫の死亡などによるものと考えられる。

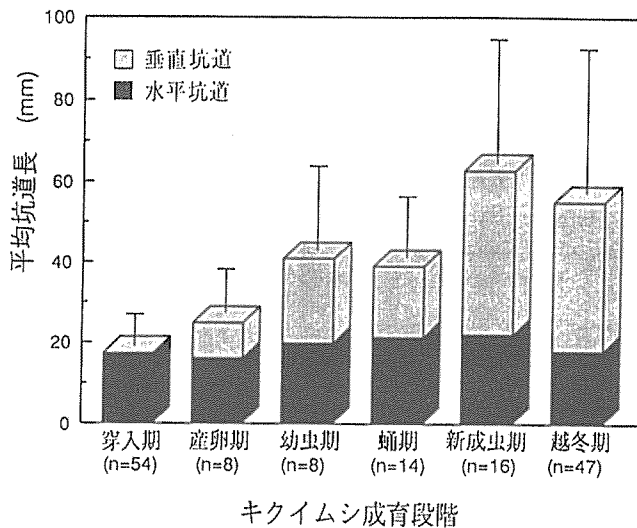


図 3-5. クスノオオキクイムシの坑道形成過程。
縦線は全坑道長の標準偏差を示す。

表 3-2. クスノオオキクイムシの発育過程。

伐倒後の日数 (調査坑道数)	坑道あたりの平均子孫数 (平均±標準誤差)								
	卵	幼虫			蛹		新成虫		合計
		1 齢	2 齢	終 齢	雄	雌	雄	雌	
<20 (n=24)	5.3±8.3	0.2±0.6	—	—	—	—	—	—	5.5±8.6
20—40 (n=21)	0.2±0.6	3.1±4.5	0.6±1.4	1.1±2.2	0.1±0.3	1.2±1.7	0.2±0.4	0.2±0.5	6.8±8.2
40—60 (n=38)	—	2.2±4.1	0.3±0.8	0.1±0.4	—	0.3±0.9	0.7±0.7	7.1±4.7	10.7±6.6
60< (n=22)	—	—	—	—	—	—	—	6.4±6.6	6.4±6.6
平均生重(mg)	0.11±0.03	0.64±0.30	2.58±0.72	6.93±2.85	2.56±0.45	10.30±2.24	1.81±0.59	9.99±0.95	
(平均±標準誤差) (n=111)	(n=136)	(n=21)	(n=15)	(n=5)	(n=46)	(n=32)	(n=552)		

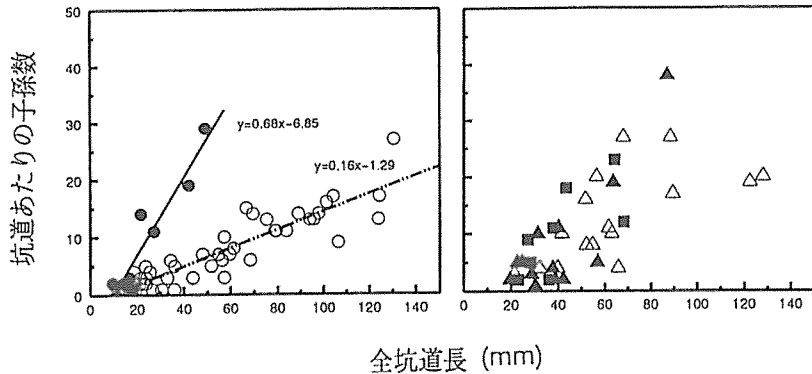


図 3-6. 全坑道長と坑道あたりの子孫数の関係.

●：卵期 ($r=0.94$, $p<0.01$, $n=8$), ■：幼虫期 ($r=0.72$, $p<0.05$, $n=8$),
▲：蛹期 ($r=0.83$, $p<0.01$, $n=14$), △：新成虫期 ($r=0.65$, $p<0.01$, $n=16$),
○：越冬成虫期 ($r=0.90$, $p<0.01$, $n=47$)

3-3-4. 次世代体サイズと坑道長、成育時期との関係

坑道あたりの雌蛹および雌新成虫（次世代）の平均生重（体サイズ）と坑道長との関係を図 3-7 に示す。6 cm 以下の坑道では、蛹は 9 mg 以下、新成虫は 8 mg 以下と、次世代の平均体サイズが極端に小さい場合があった。また、坑道長 6 cm で各坑道を二分して、その中の蛹および新成虫の生重頻度分布を比較した(図 3-8)。その結果、6 cm 以上の坑道内の蛹および新成虫の平均生重は、6 cm 以下のものより有意に大きかったが (U -test, $p<0.01$), 6 cm 以上の坑道でも生重の小さい個体が存在し、逆に 6 cm 以下の場合でも生重の大きい個体が産出されていることが明らかになった。つまり、両坑道内の次世代の体サイズ範囲はほぼ同一であった。したがって、各坑道内における次世代の平均体サイズの相違は、その体サイズ構

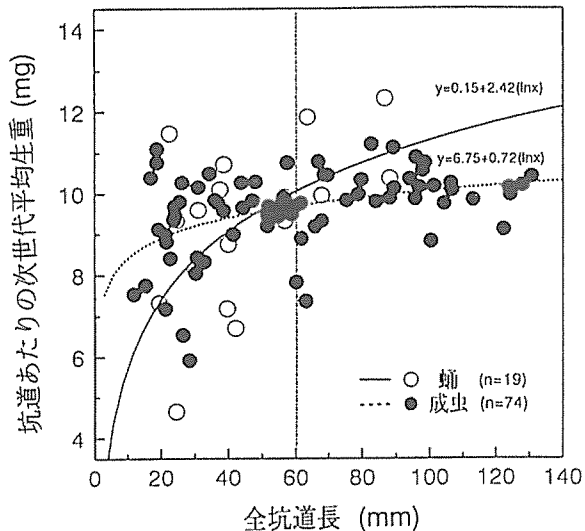


図 3-7. 全坑道長と坑道あたりの次世代平均生重の関係.

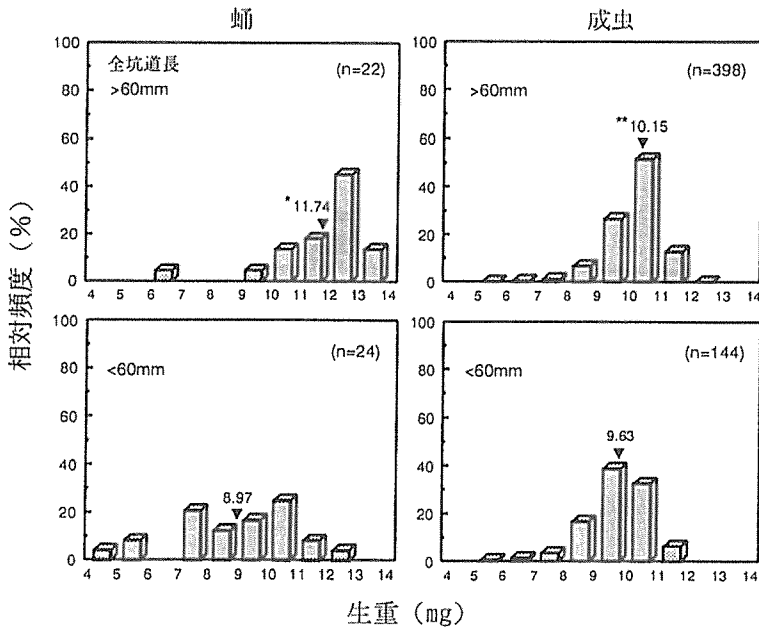


図 3-8. 全坑道長 60 mm 以上および以下の坑道内に存在する次世代の生重相対頻度分布. アステリスクを付した全坑道長 60 mm 以上と以下の坑道内に存在する蛹および成虫の平均生重の間には, Mann-Whitney's *U*-test による有意差 (1%) があることを示す.

成により生じるものと推察された。

また、坑道長ではなく同一坑道内の各個体 (5 個体以上) をその成育時期の遅速によりグループ分けし、この成育時期グループ間で蛹および新成虫の生重頻度分布を比較した (図 3-9)。蛹の成育時期は、坑道内における新成虫の有無により分類した。すなわち、蛹が最大成育ステージの場合はこの蛹を同一坑道内の幼虫よりも早く蛹化した個体と考え、新成虫が混在する場合はこの坑道内に存在する蛹を新成虫に続いて蛹化した遅いグループであると判断した。また、新成虫については、その体色 (黄色～茶色～こげ茶色～黒色) の濃い個体ほど早く脱蛹羽化したものと考えた。その結果、蛹、新成虫ともに早い時期に成育した個体の方が平均生重が有意に大きく (*U*-test, Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$), また生重の範囲もより大きい方へとシフトしていた。

3-4. 考 察

3-4-1. 寄主木選好性と繁殖成功との関連性

養菌性キクイムシ (ambrosia beetles) は、樹皮下穿孔性キクイムシ (bark beetles) と比較して一般に穿入樹種の範囲がきわめて広い種類が多い。これは、樹皮下穿孔性キクイムシが形成層および韌皮部を直接摂食するのに対して、養菌性キクイムシの食物源は本質的には自らが持ち込むアンブロシア菌であり、この共生菌の寄主木に対する種特異性が低いとされている (野淵, 1974; Beaver, 1979; Atkinson and Equihua-Martinez, 1986)。すなわち、養菌性キクイムシの広食性は、共生するアンブロシア菌の寄主特異性の低さを反映した

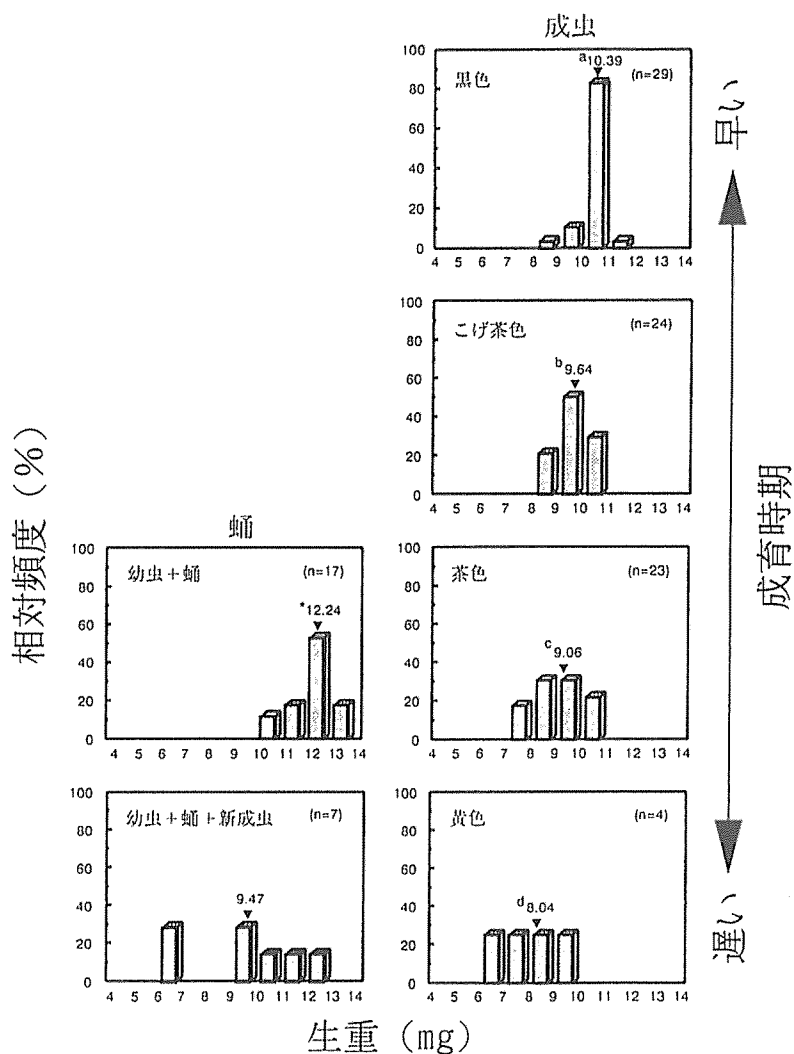


図 3-9. 同一坑道内に存在する次世代を成育時期の違いにより分類した場合の生重相対頻度分布.

蛹の成育時期は、坑道内における共存新成虫の有無によって、また新成虫の成育時期は成虫の体色の差異によって分類した。アステリクスを付した成育時期の早い蛹と遅い蛹、および異なる英字を付した各成育時期の成虫の平均生重の間には、Mann-Whitney's *U*-test および Kruskal-Wallis test による有意差（5%）がそれぞれあることを示す。

ものと考えられている。

今回の調査でも、クスノオオクイムシは生息地内の優占樹種4種すべてを寄主木として選択し、繁殖に成功した。しかし、その選好性の程度は樹種により異なる傾向がみられ、本種の産卵坑道率および繁殖成功度は、選好性の高い寄主木において高いことが明らかになった。広食性とされる養菌性クイムシの寄主木選好性に関しては、*Trypodendron lineatum*についても知られており、樹木の形態的要因とともに、そこに含まれる揮発性物質が化学的要因として決定的な役割を果たしていることが明らかにされている(Chapman, 1966; Chapman and Dyer, 1969; Shore *et al.*, 1987)。また、寄主木選好性と繁殖成功との依存性も示唆されている(Shore *et al.*, 1987)。養菌性クイムシの寄主選択は、至近的メカニズムとしては、おそらく生息地に存在する寄主の嗅覚および視覚による発見であろう。そして、寄主木内ではアンブロシア菌と樹木との相互作用が生じ、その結果がクイムシの繁殖に反映されていると考えられる。すなわち、共生菌が比較的多くの寄主木内で生育できることは予想されるが、その生育にはある程度の変異があり、この変異がまたクイムシの繁殖にも変異をもたらす。このような樹木を介した相互進化により、現在の養菌性クイムシの寄主木選好性と繁殖成功との依存性が確立されているものと推察される。

また、樹木側から見ると、シロモジのように多くのクイムシ類に選択されるもの、コハウチワカエデのようにクスノオオクイムシに優占的に利用されるもの、リュウブのようにクイムシ類にほとんど穿孔されないものというように、クイムシ類による利用形態が大きく異なっていた。この結果もまた、各種クイムシおよび各種アンブロシア菌と樹木との相互作用の総和として解釈できるが、より具体的な解答を得るにはさらに研究が必要である。加えて、養菌性クイムシは、生息地内の樹種が少ない場合、優占樹種を集中的に加害することが知られており(Beaver and Browne, 1979; Atkinson and Equihua-Martinez, 1986; Noguera-Martinez and Atkinson, 1990)、その寄主木選好性を、寄主木の多様性と寄主特異性の程度との関連性(Stevens, 1986)といった観点から考察することも必要であろう。

3-4-2. クスノオオクイムシ成虫の資源依存的産卵

養菌性クイムシの次世代生産は、坑道内で繁殖するアンブロシア菌の発育に依存している(Kaneko, 1965; Beaver, 1989)。また、同一寄主木における共生菌の繁殖の程度(食物資源量)は、親成虫によって形成される坑道の大きさに依存するものと考えられ、クスノオオクイムシのように坑道全体をアンブロシア菌の繁殖場所として利用する種類の場合(第4章参照)、全坑道長(水平坑道長と垂直坑道長を加えたもの)が食物資源の相対量を表す指標になると考えられる。

本研究において、クスノオオクイムシの産卵は、水平坑道の完成後垂直坑道を形成する際に開始され、この頃アンブロシア菌は確実に坑道内で繁殖している(第4章参照)。このことは、共生菌の定着が産卵を誘導することを示唆し、共生菌の摂食による卵巣成熟の可能性(French and Roeper, 1975; Kingsolver and Norris, 1977)を暗示するものである。また、産卵期から蛹期における全坑道長と子孫数間の正の相関関係にも示されるように、産卵行動は坑道の拡張とともに比較的長期間継続した。すなわち、本種の産卵は、坑道長を指標とする食物資源量に依存して行われているものと考えられる。樹皮下穿孔性クイムシにおいても、しばしば母坑道長と産卵孔数(=産卵数)との間に正の相関が認められている(Foltz *et al.*, 1976; Anderbrant, 1990; Zhang *et al.*, 1992)。しかし、そこでの母坑道長はその周辺に存在する形成層の量を間接的に表す指標と考えられ、実際に各幼虫が摂食できる形成層の量

は、他個体の産出した幼虫との競争により親成虫が産卵時に予想した量をかなり下まわるものと推察される。これに対して、本種のような養菌性キクイムシの場合には、将来の食物資源量をより正確に把握することが可能であり、その資源量に応じて産卵数を調節しているものと考えられる。

ミカドキクイムシは、産卵孔に共生菌を植え付け、この中に卵を1個だけ産下する(Kinura *et al.*, 1991)。これと対照的に、クスノオオキクイムシは、数個の卵を各垂直坑道、時には水平坑道にも産下するが、その卵数が各坑道内の局所的資源量に依存したものであるかどうかは不明である。しかしながら、本種の親成虫の産卵様式はおそらく食物資源の時空間的分布(第4章参照)と密接に関連したものであろう。そして、各坑道内で孵化した幼虫はその中に確実に存在する食物資源を、その探索にエネルギーをほとんど費やすことなく、孵化直後から容易に獲得することができるものと考えられる。

3-4-3. クスノオオキクイムシの次世代生産と資源利用様式

クスノオオキクイムシ幼虫は坑道内のアンブロシア菌を約40日間共同利用し、この間、坑道長と子孫数との間には正の相関関係が一貫して成立した。他種の養菌性キクイムシについても、新成虫数と排出されるフラス量(Shore *et al.*, 1987)あるいは坑道体積(French and Roeper, 1975)との間に同様の関係が見い出されている。このような関係は、親成虫による資源依存的な産卵の結果であると考えられるが、同時にキクイムシの次世代数が成虫自身の産卵能力だけでなく、食物資源となる共生菌の量、あるいはそれを増大させるための坑道形成・坑道管理能力によっても大きく左右されることを示唆している。

次世代まで成育できた個体は、蛹化あるいは脱蛹羽化する時期が他の姉妹より遅いものほど、すなわち幼虫期に共生菌の摂食時期が遅かった個体ほど、その生重は大きく減少した。さらに本研究において、次世代における体サイズの変異が坑道長に関係なく生じるという事実も発見された。このような変異を生み出す要因は、幼虫期における量的、質的な食物の利用効率(食物利用度: food availability)の違いであると考えられ、この違いは種内競争による食物資源の量的な減少あるいは質的な低下(第4章参照)によるものであることが予想される。つまり、幼虫期の遅れに伴って食物資源をめぐる競争が激化し、その結果、食物利用度が大きく低下するため、体サイズの小さい個体が産出されるものと推察される。

これまで、樹皮下穿孔性キクイムシと比較して、養菌性キクイムシの種内競争は次世代生産に関してそれほど大きな抑制因子にはならないと考えられてきた(Beaver, 1974; 野淵, 1980b)。しかし、本研究の結果が示すように、坑道内における本種の種内競争は、その次世代体サイズにも大きな影響を与えているものと思われる。

一方、本種の資源非依存的な体サイズの変異は、坑道内の食物資源量とは無関係に体サイズの大きい次世代を残している、とも解釈できる。樹皮下穿孔性キクイムシについては、体サイズの大きい個体はその産卵能力、生存率、飛翔力などが高いことが示されている(Atkins, 1967; Safranyik, 1976; Sahota and Thomson, 1979)。養菌性キクイムシの体サイズに関しても、これらの適応度要素(fitness components)やmycangia内における共生菌の保持能力、あるいは坑道形成能力などとの間に相関性があるかも知れない。クスノオオキクイムシの卵の孵化は不斉一であり、孵化時期が早い幼虫ほどその食物利用度は坑道内の食物資源量とは関係なく大きくなるであろう。この結果として、本種は将来多くの子孫を残す可能性のある体サイズの大きい個体を確実に生産することができるものと考えられる。

第4章 坑道内共生菌

4-1. 諸 言

クスノオオキクイムシの生活史とその生態的特徴(第3章)の調査により、本種の坑道内で白色のアンプロシア菌が繁殖していることが確認され、成虫および幼虫がこの食物資源を利用し、次世代を残していることが明らかになった。しかし、この白色菌層がどのような菌種であるのか、また本種がどのような菌類と共生関係を結んでいるのかを解明するためには、微生物学的手法による研究が不可欠である。

一般に、自然界の微生物集団を研究する主な方法には、直接試験、分離培養法、および代謝活性のアセスメントの3つがある(Atlas and Bartha, 1987)。つまり、微生物は顕微鏡を用いて観察するか、培養することによって肉眼的なコロニーを形成させるか、あるいは酵素や栄養素の回転速度、呼吸量といった生体量の間接的指標を得ることによってその生態が明らかにできる。

そこで本章では、キクイムシの各成育段階ごとに坑道内から菌類の分離を行うと同時に、SEM(走査型電子顕微鏡)を用いて実際の坑道内における共生菌の生育状況を観察することにより、本種の生活史と共生菌相との関連性を明らかにし、本種の主要共生菌(PAF)および副次的共生菌(AAF)(Batra, 1966)を特定しようと試みた。さらに、これまで困難とされた共生菌の定量的評価を試み、その動態をより明確なものにしようとした。また、異なる穿入樹種で繁殖する本種のPAFについてもその一致性を検証した。

4-2. 材料と方法

4-2-1. SEM(走査型電子顕微鏡)観察法

可視光線よりもはるかに波長の短い電子線を用いるSEMは、実体顕微鏡に比べてその解像度、焦点深度を飛躍的に向上させた顕微鏡である。しかし、高真空下で試料に電子線を照射し、その反射二次電子を増幅させ陰極線管(CRT)上に映し出しているため、観察試料はこの電子線照射に耐えられるように物理的・化学的に安定化(固定)させる必要がある。また、非電導性の生物試料の場合は、その表面を電導性物質でコーティングする必要がある。これは、試料の帯電による二次電子の発生不良を避けるとともに、その発生量を増加させるためである(赤堀, 1982)。本実験では、坑道内共生菌の固定にオスミウム酸(OsO_4)蒸気固定法を用いた。この方法によれば、菌組織に損傷を与えないために自然状態の坑道内共生菌が観察でき、またオスミウム酸自体に電導性があるためにより安定した画像が得られる。コーティングは炭素と金の二重蒸着法を用い、観察にはJSM-T20(日本電子製)を使用した。

SEM観察には、シロモジ材中の各キクイムシ成育段階(穿入期、産卵期、幼虫期、蛹期、新成虫期、越冬期、飛翔期:1988, 1989年度)における水平坑道および垂直坑道を使用した。観察試料は、以下のような手順で調整した(Batra *et al.*, 1986)。まず、割材して坑道を露出させ、その中に存在する親成虫あるいはその子孫を取り除き、坑道内壁を採取した。次に、坑道内壁に触れないように注意しながら、5~10 mm角のブロック状に切り分け、内壁を上面にして小ペトリ皿内に置き、これを2%オスミウム酸溶液1 mlとともに秤量ビン内に封入、固定した。24時間以上放置して十分黒変させた試料を、吸引デシケーターに入れて10時間以上乾燥させた後、銀ペーストにより試料載台に接着し、真空蒸着装置中で炭素、金を蒸着した後、SEM観察した。

4-2-2. 分離培養法

微生物を分離，培養することの大きな利点は，活性状態にある生きた微生物を検出できること，その後それらを同定できることである。この分離培養法には様々な方法があるが，本研究では各キクイムシ成育段階の坑道内に存在する菌類をまず確実に分離し，次にそれらの相対的な数量や活性を比較するための指標を得ることを目的として，直接接種法と希釈平板法をそれぞれ採用した（青島ら，1983；山里ら，1986）。

(a) 直接接種法

本法は，シロモジ材中の各キクイムシ成育段階（穿入～産卵期，幼虫～蛹期，未成熟新成虫期，成熟新成虫期，越冬期，飛翔期：1988，1989，1990年度）における水平坑道および垂直坑道からの共生菌の分離に使用した。また，コハウチワカエデ，ウリハダカエデ，リュウブの穿入～産卵期の水平坑道（1992年度）からも本法による共生菌の分離を行った。本法の詳細は，以下の通りである。

まず，キクイムシ穿入材を坑道を含む適当な大きさに切断し，その表面を99%アルコールで数回拭いた後，火炎滅菌したナタを用いて割材した。そして，坑道内から親成虫あるいはその子孫を取り除き坑道内壁を露出させた後，すぐにこの中で繁殖している菌層の一部を白金耳でかき取り，平板培地に無菌的に接種した。培養は25℃一定，全暗条件で行い，生育した菌類はそれぞれ数回再分離を繰り返して純粋分離株とした。使用した培地は，PD，YM，CM，YEME 寒天培地（表4-1）であり，各培地には細菌による汚染を防ぐために硫酸ストレプトマイシンを添加した。

表4-1. 培地組成.

成 分	培 地			
	PD	YM	CM	YEME
Glucose	20 g	10 g	20 g	—
Potato extract	4 g	—	—	—
Peptone	—	5 g	10 g	—
Yeast extract	—	3 g	5 g	10 g
Malt extract	—	3 g	—	25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	—	2 g	—
K ₂ HPO ₄	—	—	5 g	—
Agar	15 g	15 g	15 g	15 g
Distilled water	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml

(b) 希釈平板法

本法による共生菌の分離は，シロモジ材中の各キクイムシ成育段階（穿入期，産卵期，1齢幼虫期，終齢幼虫期，蛹期，新成虫期，越冬期，飛翔期：1991年度）における水平坑道および垂直坑道について行われた。

菌体試料は，以下のような手順で調整，分離した。直接接種法と同様の方法で露出させた坑道内壁から，マイクロスポーンを用いて菌層をすべて剝し取り，無菌的に滅菌水に懸濁した。この懸濁液には，滅菌水 10 ml に対して総坑道長 10 cm の内壁に存在する菌体が含まれるようにした。そして，菌体が十分に分散するように一定の超音波処理（30 W，10 秒×2）を行った後，10 倍ずつ5～6段階希釈し，各希釈液の一定量をコンラージ棒を用いて5枚のPDA平板培地全面に塗布した。培養は25℃一定，全暗条件で行い，出現したコロニーはそれぞれ再

分離を繰り返して純粋分離した。そして、適当な希釈度、塗布量、平均コロニー数から、最初の懸濁液中に生存した各菌類の数（生菌数）を算出した。

また、分離された共生菌の中で *Ambrosiella* sp. については、その孢子および菌糸の大きさが他の分離菌よりも十分に大きく、判別可能であったため、希釈培養後の各菌体試料中の本菌の孢子数および菌糸数を Thoma 血球計算盤を用いて直接計測した。これらの計測数は、顕微鏡下での菌の生死が区別できないことから、死菌を含めた全菌数である。

以上の各分離菌の生菌数、*Ambrosiella* sp. の孢子数および菌糸数は、すべて坑道 1 cm あたりに換算した。

4-2-3. 分離菌の同定法

分離した菌類は、形態学的、培養学的諸性質を調べ、Batra (1967), von Arx (1981), Barnett and Hunter (1987) (主に不完全菌)、飯塚・後藤 (1973)、長谷川 (1984)、Barnett *et al.* (1990) (酵母類)、宇田川ら (1978 ab) (主に子囊菌) などに従ってその分類学的位置の検索を行った。同定の困難であった分離菌は、各方面の専門家に確認あるいは同定を依頼した。また、未同定の分離菌は、糸状菌類あるいは酵母類といった分類群として取り扱った。

4-3. 結 果

4-3-1. SEM 観察

穿入直後の坑道、とくに後から形成される垂直坑道は、材の組織が露出したままの状態であった。穿孔後の時間経過とともに、次第に坑道内壁に直径 5~10 μm の円形~楕円形の孢子を中心とする菌体が認められるようになった(写真 4-1)。産卵期になると、水平坑道内の全面を菌層が被覆し(写真 4-2a)、また垂直坑道でもその先端部を除いてほぼ全体に共生菌が繁殖していることが確認された。この共生菌は、直径約 10 μm の円形~楕円形あるいは卵形の分生子、およびモニリオイドチェーンと呼ばれる数珠状に連鎖した分生子柄を備え(写真 4-2b)、このモニリオイドチェーンが先細りになっていないという形態的特徴から *Ambrosiella* sp. に属するものと考えられた(Batra, 1967)。この菌の孢子形成は坑道内側に向かって行われ、しばしば分生子柄とその先端の分生子が隆起、密生した柵状構造を形成することが観察された。

幼虫期にも、*Ambrosiella* sp. がさらに活発に繁殖して厚い菌層を形成したが、菌の繁殖状態には大きな変化が生じた。すなわち、キクイムシ幼虫の摂食によると思われる菌体の変形および剥離(写真 4-3a)、粘質物質による分生子の被覆(写真 4-3b)、分生子表面への微小付着物(写真 4-3c)、菌糸体の繁殖(写真 4-3d)などが所々で観察された。このような繁殖状態は、蛹期まで継続したが、菌層は次第に衰退して不均質となり、脱蛹羽化後には材組織の露出する割合が多くなった(写真 4-4)。また、越冬期以降は、さらに荒れた状態を呈し、外界から侵入したと思われる菌体も認められた。

4-3-2. キクイムシの成育に伴う共生菌相の動態

(a) 水平坑道

図 4-1a に、直接接種法により分離された共生菌の種構成とその相対的優占度の変化を示す。ここで優占度とは、分離されたすべての菌株数(分離数)に占める各菌種の菌株数の割合である。また、分離数をすべての接種点の数(供試数)で除した値を分離率とし、分離された共生菌の豊富さの指標として使用した。すなわち、

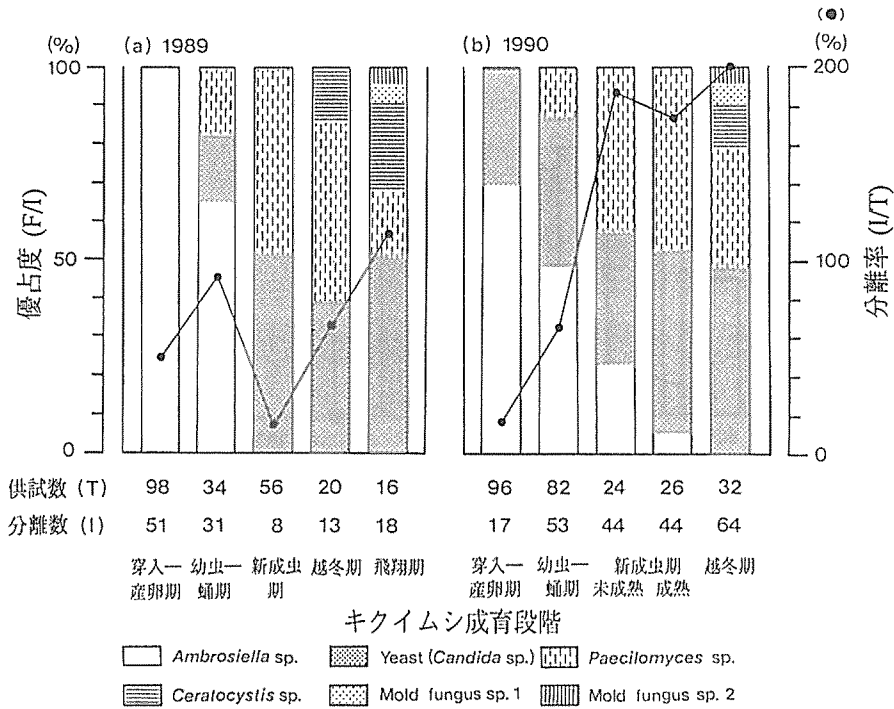


図 4-1a. 水平坑道内共生菌の動態 (直接接種法).

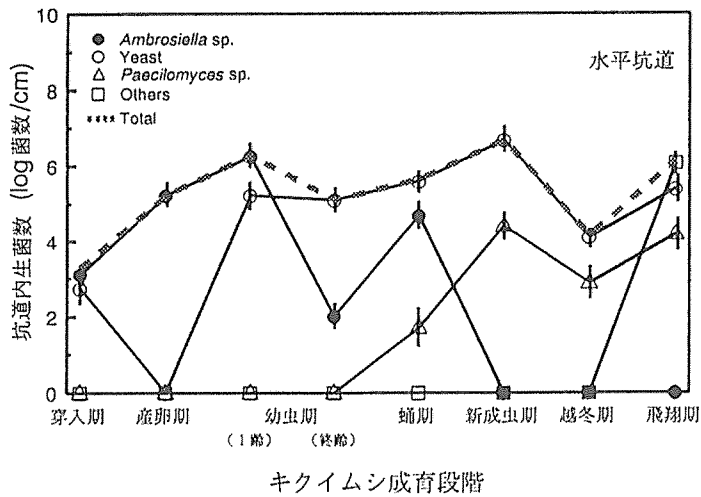


図 4-1b. 水平坑道内共生菌の生菌数の変化 (希釈平板法).

縦線は標準偏差を示す.

優占度(%) = 各菌種の菌株数 / 分離数

分離率(%) = 分離数 / 供試数

と定義した。

1989 年度における分離率は穿入・産卵期から幼虫・蛹期にかけて上昇し, 1990 年度にはその後も上昇し続けた。また, 共生菌相は両年度ともに *Ambrosiella* sp., 酵母類, *Paecilomyces*

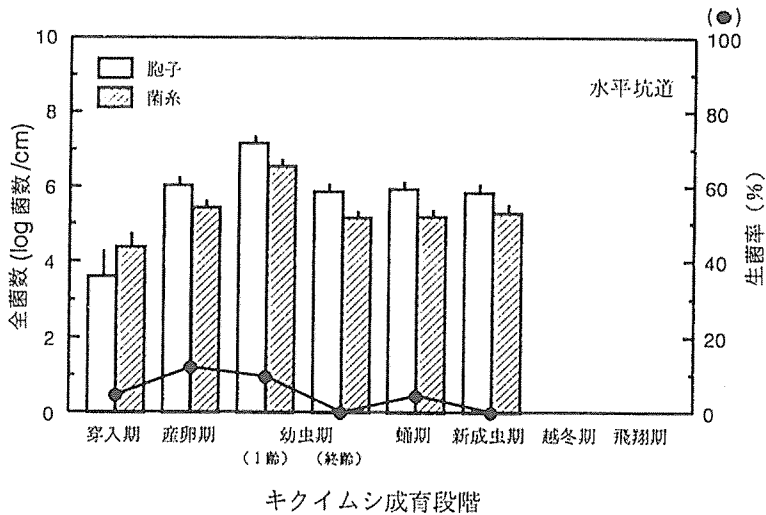


図 4-1c. 水平坑道内 *Ambrosiella* sp. の胞子数と菌糸数（直接計測）および生菌率の変化。縦線は標準偏差を示す。

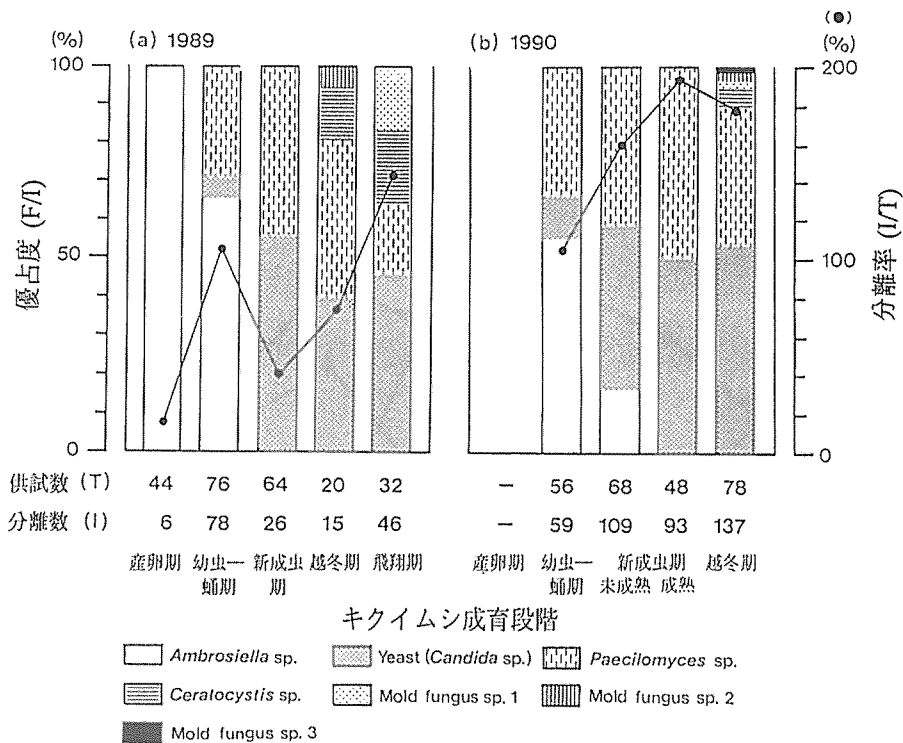


図 4-2a. 垂直坑道内共生菌の動態（直接接種法）。

sp. により構成されていた。穿入・産卵期には、*Ambrosiella* sp. が優占種であったが、その後は酵母類、*Paecilomyces* sp. が次第に優占的となり、越冬期以降には *Ceratocystis* sp. およびその他の糸状菌も分離された。

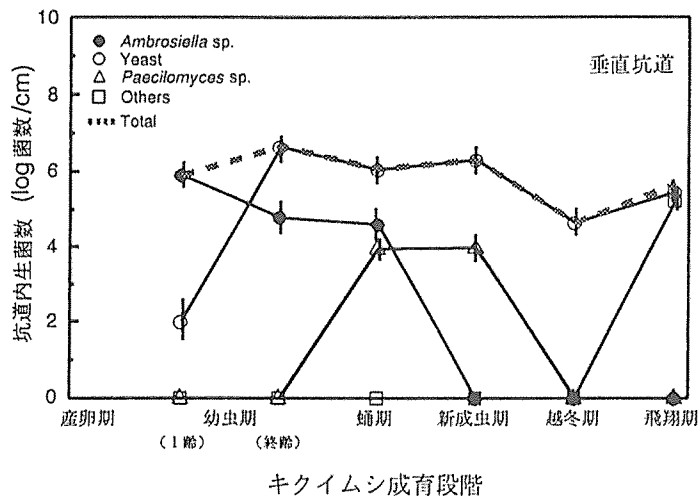


図 4-2b. 垂直坑道内共生菌の生菌数の変化 (希釈平板法).
縦線は標準偏差を示す.

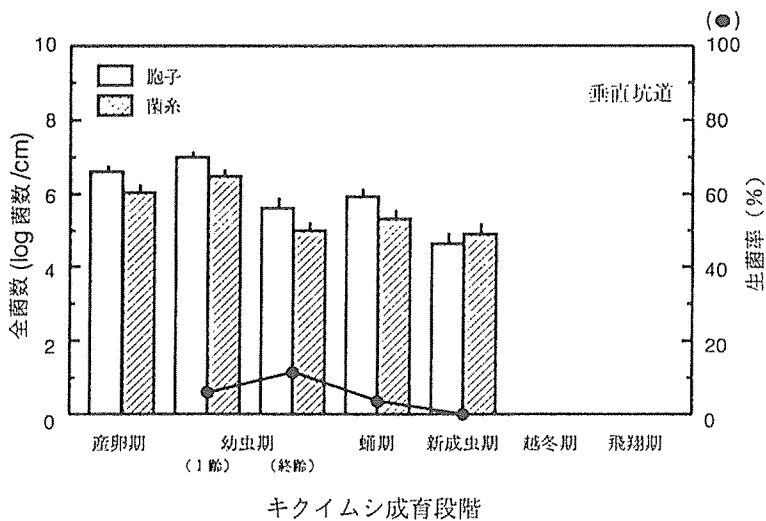


図 4-2c. 垂直坑道内 *Ambrosiella* sp. の胞子数と菌糸数 (直接計測) および生菌率の変化.
縦線は標準偏差を示す.

一方、希釈平板法によっても、*Ambrosiella* sp., 酵母類, *Paecilomyces* sp. が分離され、坑道 1 cm あたりの生菌数で表された各分離菌の動態も直接接種法の結果とほぼ一致した (図 4-1b)。*Ambrosiella* sp. は 1 齢幼虫期までは優占種として増加したが、終齢幼虫期には大きく減少し、その後蛹期に一時的増加傾向をみせたものの、新成虫期以降は全く分離されなかった。これに対して、酵母類は幼虫期から継続して優占種となり、また *Paecilomyces* sp. も蛹期から分離され、新成虫期以後に優占的となった。共生菌全体の生菌数は、各成育段階における優占種の生菌数を反映し、穿入～1 齢幼虫期までは *Ambrosiella* sp. の増殖に伴い確実に増加するが、それ以降は酵母類の生菌数の増減により不安定なものとなった。

図 4-1c に、顕微鏡下で計測した *Ambrosiella* sp. の坑道 1 cm あたりの胞子数および菌糸数の変化を示す。また、生菌数を全菌数で除した値を生菌率として菌の活性度の基準として考えた。すなわち、

$$\text{生菌率(\%)} = \text{生菌数} / (\text{胞子数} + \text{菌糸数})$$

と定義した。

Ambrosiella sp. の全菌数は、1 齢幼虫期まで急増し、終齢幼虫期に大きく減少した後、新成虫期までその数を維持した。また、生菌率は、産卵期に最も高くなった。

(b) 垂直坑道

垂直坑道内における共生菌相の遷移は、基本的に水平坑道と同様の傾向を示した（図 4-2a）。相違点は、幼虫～蛹期において *Paecilomyces* sp. が分離数の約 30% を占め、同時期の水平坑道よりもその優占度が大きかったことである。また、図 4-2b に示すように、水平坑道と比べて 1 齢幼虫期から終齢幼虫期にかけての *Ambrosiella* sp. の生菌数の減少が小さく、また酵母類の優占度が終齢幼虫期から大きくなり、*Paecilomyces* sp. の場合は蛹～新成虫期にかけて優占的になった。また、*Ambrosiella* sp. の全菌数の変化は、水平坑道と同じパターンを示したが、生菌率は終齢幼虫期に最大となった（図 4-2c）。

4-3-3. 異なる種類の寄主木の坑道内における主要共生菌

コハウチワカエデ、ウリハダカエデ、リョウブの穿入～産卵期の水平坑道内から直接接種法による共生菌の分離を行った結果、すべての樹種から *Ambrosiella* sp. の分離に成功した。その優占度は、コハウチワカエデが 95%、ウリハダカエデが 91%、リョウブが 88% であった。また、各樹種ともに少数の酵母類の分離株が得られたが、この酵母類の種構成の違いを明らかにすることはできなかった。

4-4. 考 察

4-4-1. クスノオオキクイムシの食物資源としての共生菌

今回の分離培養実験によって、クスノオオキクイムシは坑道内において異なる 3 つのグループの菌類と複合的に共存していることが明らかになり、この結果は Batra (1963) の複合共生菌説を支持するものであった。しかし、それぞれの共生菌の相対的優占度や生育状態は、水平坑道と垂直坑道ともにクイムシの成育ステージの進行に伴い大きく変化した。このことは各共生菌が本種の食物資源としてそれぞれ異なる重要性を持っていることを示唆している。

すなわち、*Ambrosiella* sp. は幼虫の出現前までに優占的に増殖したが、幼虫の摂食行動の開始とともに量的、質的に衰退し始め、その後優占度が大きく低下した。こうした遷移様式は、SEM 観察によっても確認された。また、酵母類は幼虫の摂食開始後、*Paecilomyces* sp. は摂食終了後からその優占度が増大し、とくに酵母類は幼虫摂食とは無関係に恒常的かつ豊富に存在した。これらの結果から、Batra (1966) の提唱した主要共生菌 (PAF) に相当するものは *Ambrosiella* sp. であり、また副次的共生菌 (AAF) は酵母類および *Paecilomyces* sp. と考えられる。つまり、クスノオオキクイムシは *Ambrosiella* sp. を主たる食物資源として摂食し、また酵母類あるいは *Paecilomyces* sp. を副次的に体内に取り込んでいる可能性がある。

さらに、*Ambrosiella* sp. はシロモジだけでなくコハウチワカエデ、ウリハダカエデ、リョウブの穿入～産卵期の坑道内にも定着していた。したがって、クスノオオキクイムシは、寄

主木の樹種に特異的なものではなく、*Ambrosiella* sp. という同一の食物資源を摂食しているものと考えられ、同種キクイムシにおける樹種特異的共生菌 (Graham, 1952; 高木, 1967) は、少なくとも同一地域内の PAF については存在しないものと推察される。

4-4-2. 坑道位置と共生菌の動態との関連性

Beaver (1989) は、共生菌相あるいは細菌類を含む共生微生物複合体 (mutualistic microbial complex : Haanstad and Norris, 1985) において、各種微生物の坑道内における優占度が坑道部位あるいはそこを利用するキクイムシの成育時期によって変わりうることを示唆した。本研究では、この仮説を支持する知見がいくつか得られた。

まず、垂直坑道は水平坑道の後に形成され、また分離培養実験や SEM 観察によって示されたように、菌の植え付け時期も水平坑道より明らかに遅いにもかかわらず、産卵期という同一時間断面において、両坑道の *Ambrosiella* sp. の全菌数はほぼ等しいものであった。したがって、垂直坑道における *Ambrosiella* sp. の繁殖は水平坑道よりも活発であるものと考えられる。一般にアンブロシア菌は、その菌糸を木質部組織中に侵入、分枝させ、セルロースやリグニンを分解することによって栄養源を得ている (Haack and Slansky, 1987)。このことを考慮すれば、キクイムシや他の菌類による影響の少ないと考えられる産卵期における *Ambrosiella* sp. の繁殖速度の違いは、坑道の形成される部位による影響、つまり材組織の構造や材繊維の結晶性といった物理的要因、あるいは材の化学成分などによるものであると推察される。

また、酵母類は水平坑道においては卵の孵化開始から、垂直坑道では幼虫が終齢まで成育した頃から優占種となった。このことは、坑道の形成過程と時間的に一致し、酵母類の生息域が坑道の形成とともに次第に拡大していくことを示唆している。また、この酵母類が、成虫の mycangia 内に混入し、あるいは体表に付着して坑道内へ持ち込まれたのか、外界から単独で侵入してきたのかは不明であるが、その坑道内での生息域の拡大は幼虫の行動様式とも密接な関係があるものと考えられる。すなわち、クスノオオキクイムシの幼虫が成長するに

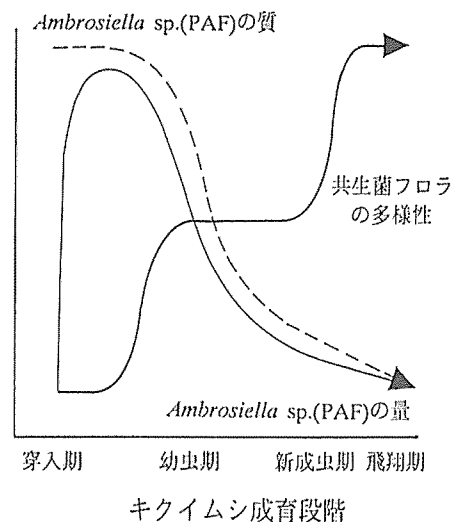


図 4-3. 坑道内における共生菌の動態を示すモデル。

つれて垂直坑道へ移動し、必ずこの坑道内で蛹化、新成虫となる（第3章参照）ことから、この幼虫の移動とともに、体表に付着するかあるいは排泄物を介して、酵母類が水平坑道から垂直坑道へ定着することが予想される。

さらに、*Ambrosiella* sp. の生菌率は、水平坑道においては産卵期から1齢幼虫期にピークに達し、垂直坑道では終齢幼虫期に大きくなった。このことは、*Ambrosiella* sp. の活性度が、坑道位置により異なる時期に増大する可能性を示し、また上述した幼虫の移動時期と対応しているようにみえる。アンブロシア菌の繁殖は、キクイムシ幼虫の摂食による物理的刺激あるいは分泌物質による化学的刺激などによって促進されることが示唆されている（Batra, 1966; French and Roeper, 1972; Kinuura *et al.*, 1991）。しかし、本研究では、幼虫期における *Ambrosiella* sp. の量的増殖を裏付ける結果は得られず、幼虫により一方的に搾取されているものと考えられた。また、分生子などへの付着物(写真 4-3c)、菌体自体の変形や剝離(写真 4-3a) など、質的にも決して好影響を受けている様子は認められなかった。本種の *Ambrosiella* sp. の生理的活性と幼虫の存在との正確な関連性については、今後の研究を待ちたい。

4-4-3. 食物資源の時間的変化パターンとその利用形態

本章で得られた結果を総合すると、クスノオオキクイムシの食物資源となる主要共生菌 (PAF) は *Ambrosiella* sp. と考えられ、彼らはこの菌を様々な樹種の寄主木内に持ち込み、水平坑道と垂直坑道からなる坑道型の空間全体をその繁殖場所として利用しているものと思われる。そして、坑道内における *Ambrosiella* sp. の量あるいは質の時間的変化パターンと他の菌類との共存様式は、坑道位置により多少の違いがあるが、おおよそ図 4-3 のようにモデル化できる。

まず、*Ambrosiella* sp. は、キクイムシ成虫による坑道形成とその内壁への接種胞子の植え付けにより繁殖を始め、その量を急激に増加させていく。孵化幼虫が現れ始めた頃、最大量に達するが、その後幼虫の発育とともに加速度的に減少し、同時に菌の質的狀態も大きく低下していく。また幼虫発育期からは、酵母類および *Paecilomyces* sp. といった副次的共生菌 (AAF) が共存することによって坑道内共生菌の種数は増加し、越冬期以降になると外界からの侵入菌が加わる結果、共生菌フロラはさらに多様なものとなる。

資源の季節的、すなわち時間的変化は、急増、瞬発、定常的更新、恒常、急減という5つの基本タイプに分類される (Price, 1984)。この分類に従えば、本種の食物資源である *Ambrosiella* sp. の坑道内における量的変化は、急増タイプあるいは急増・急減タイプに、また質的变化は急減タイプにそれぞれ類型化されるであろう。

第5章 mycangia (孢子貯蔵器官) 内共生菌

5-1. 諸 言

mycangia は、キクイムシ体内の様々な位置に存在し、彼らの食物となる共生菌の孢子を貯蔵、保護する特別な器官であると考えられている (Francke-Grossmann, 1963, 1967; Beaver, 1989)。したがって、クスノオオキクイムシの坑道内に存在した共生菌、とくに本種の主栄養源であることが示唆された *Ambrosiella* sp. (第4章参照) は、この mycangia 内で優占的に保持されているはずであり、このことが明らかになれば、本種とアンブロシア共生菌との相互関係はより明確なものとなる。しかしながら、本種の mycangia については、その詳細な構造や器官内の共生菌は全く明らかにされておらず、わずかに野淵 (1974) が本種と *Xyleborus dispar* の mycangia の構造上の類似性について触れているに過ぎない。

そこで、キクイムシとアンブロシア菌の共生関係を明らかにする上で重要な鍵となるこの mycangia の役割を解明することを目的として、本種の mycangia の構造と器官内共生菌の貯蔵状態を SEM レベルで解明し、またキクイムシの各成育ステージにおいて mycangia 内からの共生菌の分離培養実験を行った。そして、これらの結果から共生菌の獲得から放出に至る過程、すなわちいつ共生菌が mycangia 内へ獲得され、どのように維持、放出されているのかについて考察した。さらに、これらの仮説を証明するために、キクイムシに様々な人為的処理を加えた実験系を設定し、その反応を調査した。

5-2. 材料と方法

5-2-1. SEM 観察法および共生菌放出行動の観察法

SEM 観察には、シロモジ材中の越冬成虫および飛翔成虫 (1990 年度) を供試した。mycangia の解剖操作は、これまでしばしば大きな変形あるいは破壊を伴ったが、小型解剖皿 (直径 3 cm シャーレ内にパラフィンを流入・硬化させたもの) 上で虫体とその周囲を昆虫針で固定しながら前胸背と中胸背を慎重に広げることにより、成虫を生存させたままの極めて自然状態に近い mycangia が観察可能となった (写真 5-1a, 写真 5-2a)。SEM 試料は、この解剖状態の成虫を解剖皿ごと 2% オスミウム酸溶液で蒸気固定し、脱水後成虫を解剖皿から試料載台に移動、貼付してカーボン、金蒸着を施して調整した。

また飛翔成虫については、体表面の雑菌を除去した後、PDA 培地上を歩行させてその共生菌放出行動を観察した。雑菌の除去方法としては、 HgCl_2 やアルコールによって虫体表面を洗浄する方法 (Baker and Norris, 1968; Haanstad and Norris, 1985) があるが、この方法ではキクイムシ成虫を衰弱させ、また mycangia 内共生菌にも影響を与える可能性があるため、次のような無菌化法 (Francke-Grossmann, 1956; Batra, 1985; Batra *et al.*, 1986) を採用した。

まず、濾紙を敷いたペトリ皿を滅菌した後、この濾紙を滅菌水で湿らせ、その上をキクイムシ成虫に 2 時間這わせた。次に、ペトリ皿を交換して別の湿った濾紙の上を 6 時間這わせた後、乾いた濾紙の上を 6 時間這わせた。そして、この 6 時間毎の湿乾濾紙上での歩行を 3 回繰り返させることによって、キクイムシの体表面に付着した雑菌を取り除いた。

5-2-2. 分離培養法

(a) 直接接種法

本法による共生菌の分離は、

- ① シロモジを寄主木とする各成育段階（未成熟新成虫期，成熟新成虫期，越冬期，飛翔前期，飛翔期，穿入～産卵期，幼虫期）の成虫（1989 年度）
- ② シロモジ材内で蛹化した個体を滅菌ペトリ皿内（25℃，全暗条件下）で脱蛹，成熟させた個体，および未成熟成虫を同様に成熟させた個体（1989 年度）
- ③ シロモジ材内で成虫越冬している個体を，5℃および25℃の全暗条件下で4，8，12，16日間滅菌ペトリ皿内に置いた個体（1990 年度）
- ④ シロモジ，コハウチワカエデ，ウリハダカエデ，リョウブから飛翔分散した成虫（1992 年度）

について行われた。

①，②の成虫は，前述した Francke-Grosmann (1956)，Batra (1986) の方法により雑菌を除去した後，また③の成虫は恒温庫から取り出してすぐに，④の成虫も採集した直後にそれぞれ小型解剖皿上に静置し，実体顕微鏡下で改良型ウェッケル剪刀などを用いて無菌的に解剖した。そして，摘出した mycangia を坑道内からの共生菌の分離方法と同様に各平板培地に直接接種し，25℃一定，全暗条件下で培養した。

(b) 希釈平板法

本法は，シロモジを寄主木とする各成育段階（成熟新成虫期，越冬期，飛翔期，穿入期，産卵期，1 齢幼虫期，終齢幼虫期，蛹期：1991 年度）の成虫に適用した。なお，穿入期については，水平坑道長が 2 cm 以上と以下，産卵期については，卵数が 10 個以上と以下の場合にそれぞれ分類した。また，シロモジ材内で成虫越冬している個体と，これらを，5℃，15℃，20℃，25℃の4段階の温度条件下で，6，12，18，24，30 日間無菌かつ全暗状態に置いた個体（1992 年度）の mycangia から，本法による共生菌の分離を行った。

各成育段階，各温度処理区ともに，成虫の雑菌除去は行わず，直接接種法と同様の方法で mycangia を摘出した。各 5 個体（生重約 9 mg の個体）の mycangia を滅菌水 500 μ l に懸濁し，坑道内共生菌の希釈平板法と同様の調整，分離操作を行った。また，各分離菌の生菌数，*Ambrosiella* sp. の孢子数および菌糸数も同様の方法で算出し，1 個体あたり（= 1 つの mycangia あたり）に換算した。

また，昆虫の律動的運動は代謝における化学反応の一指標と考えられ，昆虫の温度反応の研究にはこの律動的運動量が用いられている（一瀬ら，1980）。そこで，温度とクスノオオキクイムシの活動量あるいは代謝量との関係を明らかにするために，本種の成虫の起上運動速度を測定した。ただし，ここでいう起上運動とは，転倒して仰向けになった成虫が前肢，中肢および後肢を大きく動かしながら体を反転，正位させる行動のことをいい，本種は転倒直後からこのような行動を示す。測定は，各成虫個体を恒温庫から取り出した直後に濾紙上に落下，転倒させ，この時点から成虫が完全に起き上がるまでの時間を計測することによって行った。各温度処理区ともに 10 個体の成虫を供試し，その平均値を代謝量の相対的指標と考えた。

5-2-3. 分離菌の同定法

直接接種法および希釈平板法によって mycangia から純粋分離された菌類については，その形態学的，培養学的諸性質を第 3 章で述べた文献と照合して同定を行った。また，未同定の分離菌も，糸状菌類あるいは酵母類といった分類群として取り扱った。

5-3. 結 果

5-3-1. mycangia の微細構造と共生菌の放出

クスノオオキクイムシの mycangia は、前胸背と中胸背の間の節間膜が陥没した一對のポーチ状をなし、その開口部（約 0.2×0.4 mm）は虫体背面に存在した（写真 5-1a, 写真 5-2a）。この部分は正常な状態では節間膜により完全に被覆されており、その確認は不可能である。

越冬期の mycangia 内膜上には、平坦な板状の物質が付着し（写真 5-1b, c）、この付着物は開口部周辺でも多数観察された（写真 5-1d）。また、開口部を閉鎖する節間膜は、この時期には起伏の少ない状態を呈していた（写真 5-1e）。

一方、飛翔成虫の mycangia は、越冬期と比較して全く異なる様相を呈した（写真 5-2a, b）。この時期の mycangia は、2つのポーチ内に共生菌を高密度に保持し、その節間膜は体内方向へ大きく拡張して菌塊の周囲を覆っていた。開口部側の菌塊表面上は粘液状物質により完全に被覆され（写真 5-2c）、また菌塊内部では直径 $5 \mu\text{m}$ 前後の貯蔵孢子が出芽と分裂により生育、存在していることが確認された（写真 5-2d, e）。さらに、貯蔵孢子的表面からも粘液物が分泌されていることが確認された（写真 5-2e）。また、前胸背基部側の節間膜にも形態的に大きな変化が見られた。この部分の膜組織は隆起、肥大し（写真 5-2f）、その表面からは刺状突起物が多数形成されていた（写真 5-2g）。また、この突起物に関与するか、あるいは何らかの分泌腺と考えられる小孔も存在した。

また、飛翔期あるいは穿入～産卵期において、成虫の前・中胸背の間隙より貯蔵孢子が滲出する現象が、自然状態で観察された（写真 5-3a）。また、培地上を歩行させた成虫の中に、その共生菌放出の方法を如実に示すと思われる個体が存在した（写真 5-3b）。この成虫は培地上で転倒し、背面より露出した孢子塊が培地表面に接着したために移動不可能な状態に陥っていた。この観察個体のほか、他の個体を投入した培地上においても、同様の菌塊が多数付着、発芽しており、明らかに雑菌と思われる菌類以外はすべて *Ambrosiella* sp. であった。

5-3-2. キクイムシの成育に伴う共生菌相の動態

mycangia 内から分離された共生菌相の変遷および分離率を、図 5-1a に示す。未成熟新成虫および越冬成虫からは、*Ambrosiella* sp., 酵母類, *Paecilomyces* sp., *Ceratocystis* sp. が分離された。越冬期には *Paecilomyces* sp. が優占的になり、また分離率が低下する傾向が認められた。しかし、これら以外の成育段階の成虫からは、*Ambrosiella* sp. のみが分離され、優占種となった。また、蛹を無菌的に脱蛹、成熟させた成虫の mycangia からは共生菌が分離されなかったのに対し、未成熟成虫に同様の処理を加えた場合には、*Ambrosiella* sp. のみが 100% 分離された。

希釈平板法によって mycangia 内から分離できたのは、*Ambrosiella* sp. のみであり、直接接種法によって分離された酵母類, *Paecilomyces* sp., *Ceratocystis* sp. などは検出できなかった。図 5-1b に、1 個体あたりの mycangia 内に生存した *Ambrosiella* sp. の菌数の変化を示す。成熟新成虫の *Ambrosiella* sp. は越冬期には検出できなかったが、飛翔期に最大量となり、その後産卵期までに急減し、幼虫期以降はその生菌数がさらに減少した。全菌数の変化もほぼ同様のパターンを示したが、産卵後の大きな減少傾向は認められなかった（図 5-1c）。また、飛翔成虫の mycangia 内では孢子の割合が極めて大きくなり、生菌率も穿入後期をピークとして飛翔期から産卵期にかけて高いことも明らかになった。

また、コハウチワカエデ、ウリハダカエデ、リョウブの各寄主木から飛翔分散した成虫の

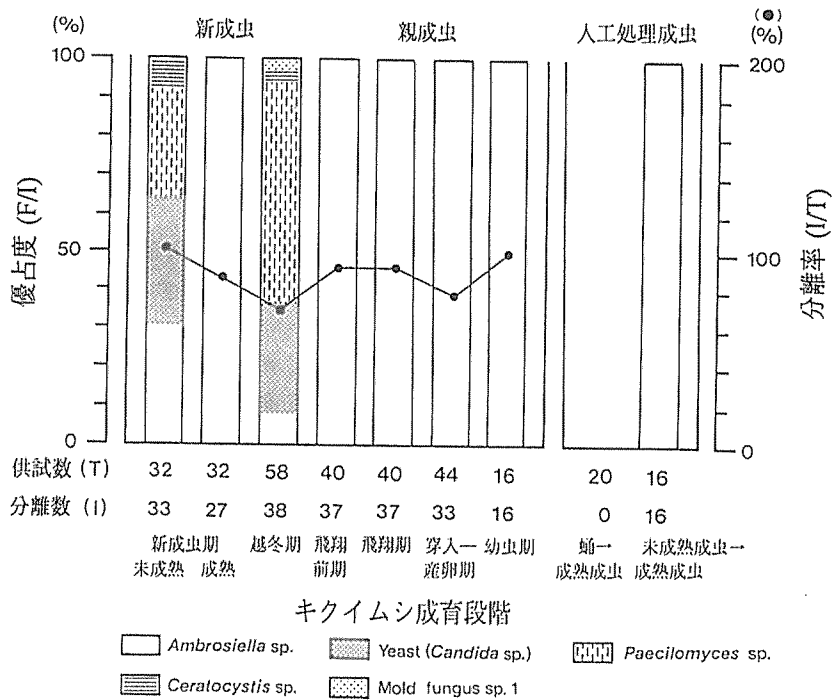


図 5-1a. mycangia 内共生菌の動態 (直接分離法)。

mycangia 内からは, *Ambrosiella* sp. のみが 100% 分離され, これらの分離株はシロモジから飛翔分散した成虫の mycangia 内から分離された *Ambrosiella* sp. と同一種と考えられた。

5-3-3. 温度処理による共生菌相の変化

越冬成虫を 5℃ 下に置いた場合, mycangia 内から酵母類, *Paecilomyces* sp. が継続して分離され, どの処理期間においても *Paecilomyces* sp. が優占種となった。分離率は処理期間が長くなるにつれて減少した。これに対して, 25℃ 処理区では, すべての処理期間において *Ambrosiella* sp. のみが分離され, 分離率は増加傾向にあった (図 5-2a)。

4 段階の温度処理による越冬成虫の mycangia 内 *Ambrosiella* sp. の生菌数の変化を, 図 5-2b に示す。20℃ および 25℃ 処理区においてのみ, 生菌数の継続的な増加が認められた。しかし, どの処理日数においても, 25℃ 処理区の方が 20℃ 処理区より有意に生菌数が多かった。また, 両処理区ともに 12 日後から孢子あるいは菌糸の存在が確認されたが, 有意な増加傾向が認められたのは 25℃ 処理区の孢子数のみであった (図 5-2c)。生菌率は, 両処理区ともに処理期間の後期に大きくなった。

また, 4 段階の温度処理区の中で, 20℃ および 25℃ 処理区の成虫の律動的運動速度が最も速く, すなわち転倒から最も短い時間で起き上がることができた (図 5-3)。

5-4. 考 察

5-4-1. mycangia 内への共生菌の獲得

一般に, mycangia 内への共生菌の獲得時期は脱蛹直後であると考えられ (Francke-Grosmann, 1963; Beaver, 1989), ハンノキキクイムシ (*Xylosandrus germanus*) の場合は

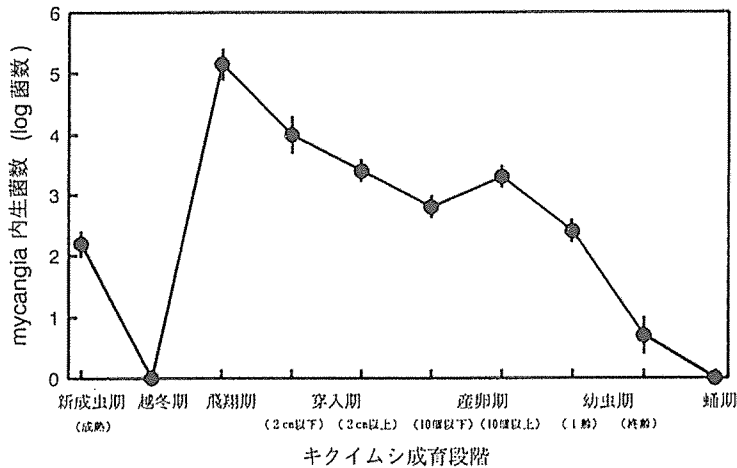


図 5-1b. mycangia 内 *Ambrosiella* sp. の生菌数の変化 (希釈平板法).
縦線は標準偏差を示す. 穿入期は水平坑道長が 2 cm 以上と以下, 産卵期は卵数が 10 個以上と以下の場合にそれぞれ分類した.

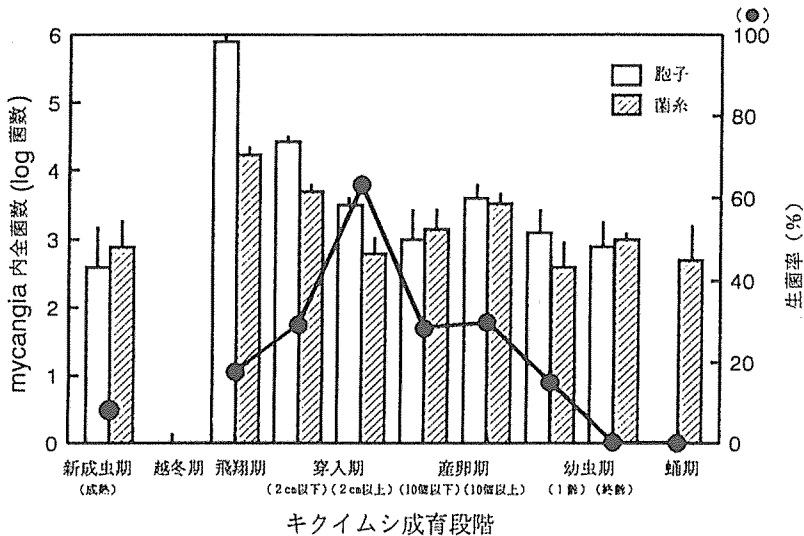


図 5-1c. mycangia 内 *Ambrosiella* sp. の胞子数と菌糸数 (直接計測) および生菌率の変化.
縦線は標準偏差を示す. 穿入期は水平坑道長が 2 cm 以上と以下, 産卵期は卵数が 10 個以上と以下の場合にそれぞれ分類した.

新成虫の羽化後 4 日以内に行われることが明らかにされている (Kaneko and Takagi, 1965)。また、樹皮下穿孔性キクイムシの *Dendroctonus* 属の数種については、mycangia 内へは複数の共生菌が獲得され、この中で種特異的な菌種のみが器官内で生育できることが示唆されている (Whitney, 1971; Barras and Perry, 1972; Paine and Birch, 1983)。クスノオオキクイムシの場合、脱蛹直後の未成熟な新成虫の mycangia 内から、低率ながら *Ambrosiella* sp. が分離され、酵母類, *Paecilomyces* sp. および *Ceratocystis* sp. も共存していた。これらはいずれも、この時期に坑道内から分離される菌であった。したがって本種は、新成虫の脱蛹後かなり早い時期に坑道内に存在する菌を非選択的に mycangia 内へ取り込んでい

るものと推察される。また、蛹を人工的に脱蛹、成熟させた成虫、すなわち坑道内に接触させず無菌的に成熟させた成虫の mycangia 内には共生菌が存在しなかったのに対して、坑道内で脱蛹した未成熟成虫を無菌的に成熟させた場合は、実際の成熟成虫と同様に *Ambrosiella* sp. のみが分離された。この結果により、本種における共生菌の mycangia 内への獲得が脱蛹直後であることが実験的に証明されるとともに、非選択的に取り込まれた共生菌の中で

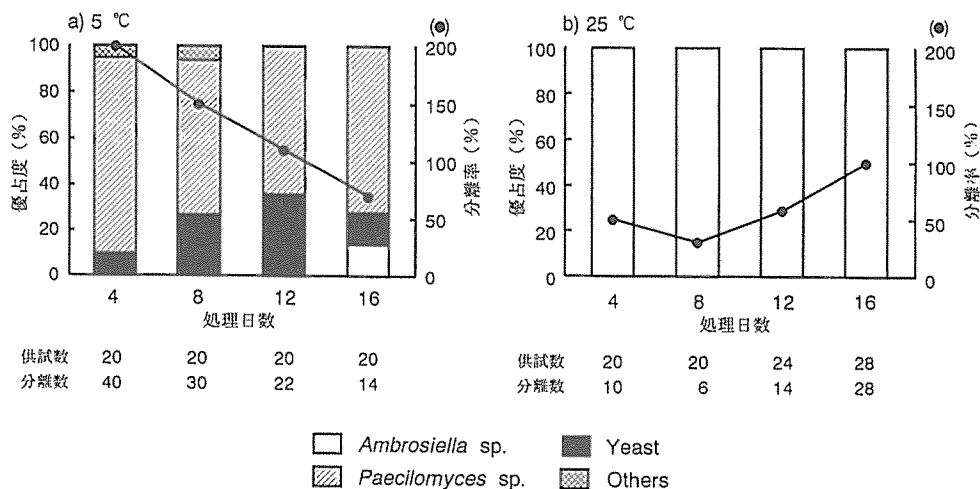


図 5-2a. 温度処理越冬成虫の mycangia 内から分離された菌類 (直接分離法)。

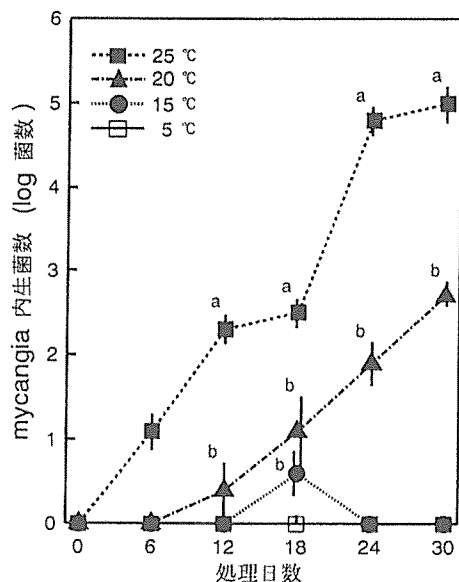


図 5-2b. 温度処理による越冬成虫の mycangia 内 *Ambrosiella* sp. の生菌数の変化 (希釈平板法)。

縦線は標準偏差を示す。同一英字を付した各温度処理区の生菌数の間には、Duncan's multiple range test による有意差 (1%) がないことを示す。

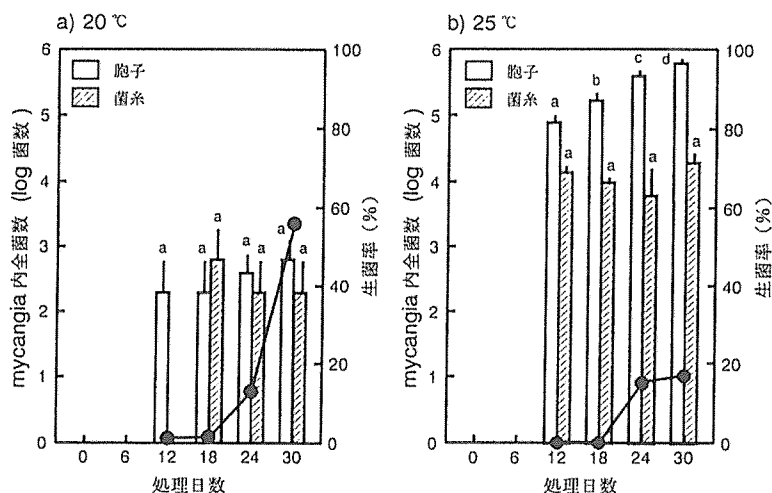


図 5-2c. 温度処理による越冬成虫の mycangia 内の *Ambrosiella* sp. の胞子数と菌糸数(直接計測) および生菌率の変化。

縦線は標準偏差を示す。同一英字を付した各処理日数区の胞子数, 菌糸数の間には, Duncan's multiple range test による有意差 (1%) がないことを示す。

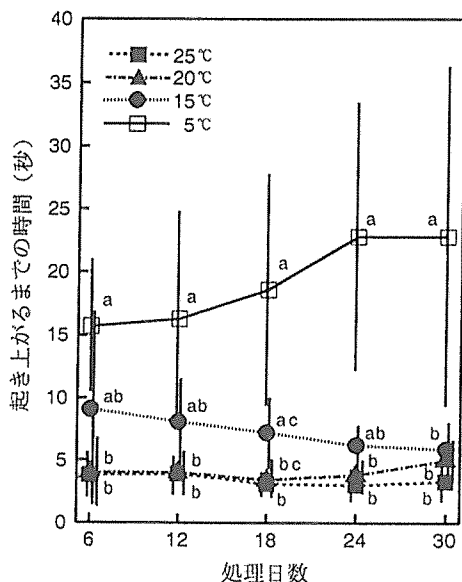


図 5-3. 温度処理による越冬成虫の律動的運動の変化。

縦線は標準偏差を示す。同一英字を付した各温度処理区の起上時間の間には, Kruskal-Wallis test による有意差 (5%) がないことを示す。

Ambrosiella sp. のみがその後 mycangia 内で純粋培養されることが初めて明らかにされた。mycangia 内への共生菌の取り込み方法については, Batra and Batra (1967) が母孔内での未成熟成虫の揺さぶり行動 (rocking movement) による菌の獲得を唆している。また高木 (1967) は, ハンノキクイムシやシノコクイムシ (*Xyleborus compactus*) の脱蛹直

後の新成虫が、歩行運動に伴い中胸背と後胸背の間から mycangia の膜を反転・突出させ、この膜に孢子や菌糸を付着させて取り入れることを発見した。このような共生菌の取り込み方法は、mycangia の位置や形状に由来すると考えられ(Beaver, 1989)、ハンノキキクイムシやシイノコキクイムシと類似した構造の mycangia を備えるクスノオオキクイムシにおいても、おそらく新成虫が坑道内で動き回る際に同様の方法で坑道内壁に存在する菌を mycangia 内に獲得しているものと推察される。そして、これら一連の行動は、共生菌の獲得が受動的ではなくむしろキクイムシの側からの積極的な働きかけである可能性を示唆するものと考えられる。

5-4-2. 温度が共生菌の維持に与える影響

クスノオオキクイムシ成虫の mycangia 内に取り込まれた *Ambrosiella* sp. は、新成虫の成熟に伴い器官内で優占種となったが、越冬期に入ると再びその優占度が低下し、酵母類、*Paecilomyces* sp. が高頻度で分離された。共生菌獲得時の *Ambrosiella* sp. の優占度は、坑道内の共生菌相の相対的優占度を反映したものであると考えられるが、越冬期における *Ambrosiella* sp. の優占度の低下は取り込まれた共生菌の量的あるいは質的衰退によるものと推察される。このことは、SEM 観察によっても確認されている。ところが、分離培養実験や SEM 観察によって明らかになったように、飛翔期が近づくにつれて mycangia 内の *Ambrosiella* sp. の孢子は出芽と分裂を繰り返しながら大量に増殖し、唯一の優占種となった。すなわち、越冬成虫の mycangia 内において、ほとんど存在しないかあるいはその形状を全く変えてしまった状態にあると思われた *Ambrosiella* sp. は、飛翔期にかけてその生理的活性を回復し、mycangia 内で優占的に繁殖できるものと考えられる。

このような mycangia 内における共生菌の選択的培養に関しては、mycangia の付属腺がある種の化学物質を分泌して雑菌の生育を抑制するか、あるいは共生菌の生育を促進するかのいずれか、またはその両方であることが指摘されており (Schneider and Rudinsky, 1969; Happ *et al.*, 1971; Barras and Perry, 1972)、また共生菌自身によって生産される抗生物質もこのような作用に重要な役割を果たすことも示唆されている (Nakashima *et al.*, 1982)。本研究において、飛翔成虫 mycangia 内の貯蔵孢子表面から粘液物が分泌されていることが SEM 観察により発見されたが、この分泌物は共生菌の生産した抗生物質である可能性もある。また、菌塊表面上を被覆する粘液状物質あるいはこの部分を閉鎖する節間膜の隆起、肥大現象やその表面からの刺状突起物の形成、小孔の存在といった多くの傍証は、mycangia 内からの分泌物の存在を暗示するものである。しかし、このような mycangia 内の形態的、化学的、生理的变化が実際に貯蔵孢子の増殖とどのような関連性があるのかについては今後より詳細な研究が必要である。

また、これまで共生菌の選択的培養や mycangia 付属腺からの分泌は、成虫の飛翔期に活発になるとされていた (Schneider and Rudinsky, 1969; Barras and Perry, 1972; Nakashima, 1979; Paine and Birch, 1983)。しかし、クスノオオキクイムシの場合は、越冬期以前の新成虫が成熟したかなり早い時期においてもこの選択的培養が行われていた。新成虫が8月から出現するという本種の生活史を考慮すれば、この選択的培養はキクイムシの成育段階というよりも、キクイムシの存在する物理的環境、とくに温度や湿度といった要因によって発現するものであると考えられる。つまり、ある温湿度条件下において、mycangia の付属腺の分泌が活発になるか、あるいは共生菌自体の生理的活性が高まり抗生物質の生産が開始されるか、またはその両方により mycangia 内で *Ambrosiella* sp. 1 種のみが培養されるものと推察

される。

本研究で行われた越冬成虫の温度処理により、5℃では越冬成虫の mycangia 内共生菌相と同じままであったが、25℃になると *Ambrosiella* sp. のみが選択的に培養されることが明らかになった。この選択的培養は20℃と25℃のみで起こり、また処理期間が長くなるにつれて生菌率は大きくなり、生理的活性はともに向上することが示唆された。しかし、実際に mycangia 内で増殖した *Ambrosiella* sp. の量は、25℃の方が20℃より有意に多く、また20℃では処理期間を延長してもその菌量は一定のままであったのに対し、25℃の場合は貯蔵胞子の量が継続的に増加して30日後には飛翔成虫の貯蔵量と同量となった。これらの結果は、mycangia 内における共生菌の選択的培養の発現が温度により規定されることを実証し、またこの培養の程度、スピードが温度条件によって微妙に異なることを示唆している。さらに、温度処理はキクイムシ自体の律動的運動にも影響を与え、高温処理によってキクイムシの生理的反応が大きくなることが明らかになった。そして、この傾向が温度処理と選択的培養の発現との関係と一致することから、キクイムシの生理的活性の向上と mycangia の付属腺の活性化あるいは分泌の開始との密接な関連性が示唆される。

5-4-3. クスノオオキクイムシの主栄養源と共生菌の接種方法

飛翔分散期および穿入期に mycangia 内から分離された共生菌は、すべて *Ambrosiella* sp. であった。このことは、*Ambrosiella* sp. がクスノオオキクイムシによって積極的に運搬されていることを意味し、坑道内に存在した *Ambrosiella* sp. が本種の mycangia 内に由来するものであることを示唆している。また、本種の飛翔成虫は、寄主木とした樹種に関係なく *Ambrosiella* sp. を mycangia 内に保持して分散飛翔しており、この事実は本種が寄主木の樹種に特異的なものではなく、*Ambrosiella* sp. という同一の食物資源を摂食している（第4章）という仮説を支持するものである。以上のことから、*Ambrosiella* sp. がクスノオオキクイムシの主栄養源（PAF）であることが強く示唆され、また本種と種特異的に密接な関係を持っているものと考えられる。

mycangia 内の *Ambrosiella* sp. は、飛翔期に貯蔵胞子の形で最も多く存在したが、その大部分が産卵期までに減少した。したがって、クスノオオキクイムシ成虫は、産卵までに完成される水平坑道内にはすべての内壁に *Ambrosiella* sp. を植え付けることが可能であるが、垂直坑道の場合はこの段階までに形成された部分のみにしか接種できないと考えられる。垂直坑道における *Ambrosiella* sp. の繁殖が水平坑道よりも活発である（第4章）ことを考えれば、このような貯蔵胞子の坑道内への配分は、本種にとって適応的な共生菌の接種様式であるのかも知れない。また、生菌率はこの時期に高く、このことは坑道内へ接種される *Ambrosiella* sp. が生理的に活性の高い状態にあることを示唆している。

本種のアンブロシア菌の放出経路は、人工培地上で観察されたように、成虫の前・中胸背面に存在する mycangia の開口部であると思われる。そして、実際の接種は、mycangia 内で大量増殖していた *Ambrosiella* sp. 貯蔵胞子が開口部から溢出し、成虫の穿孔活動に伴って坑道内壁に接触またはペースト状に塗布されることによって起こるものと推察される。この共生菌の接種方法も、おそらく mycangia の位置や形状に由来するものと考えられ、たとえば本種と同じく前胸背付近に mycangia の存在する *Dendroctonus* 属においても、成虫の穿孔中に mycangia が圧迫されることにより、菌の胞子が器官内から搾り出されることが示唆されている（Whitney, 1982）。

第6章 クスノオオキクイムシの人工飼育

6-1. 諸 言

本研究では、これまで野外におけるクスノオオキクイムシの生態(第3章)を明らかにし、また本種の穿孔材から採取される坑道内およびキクイムシ成虫の mycangia 内における共生菌の存在様式(第4, 5章)を解明してきた。そして、これらの結果から、本種とアンブロシア菌の相互関係に関するいくつかの考察や仮説を導き出した。この中で mycangia の機能の一部については、キクイムシ成虫をとりまく生物的、非生物的諸条件を人為的に除去あるいは付加することによって、実験的に証明することができた。

本章では、まだ検証されていない以下のような問題、すなわち

- ① 本種は、主要共生菌 (PAF) である *Ambrosiella* sp. を摂食することによって実際に成育できるのか、酵母類および *Paecilomyces* sp. (AAF) や他種のキクイムシの PAF では成育可能か (第4, 5章),
- ② 共生菌をめぐる本種の種内競争は、その生存率や体サイズにどの程度の影響を与えるのか (第3章),
- ③ 繁殖成功度の異なる寄主木の樹木成分は、本種の成育にどのような影響を及ぼすのか (第3章),

といった点を明らかにすることを目的として、本種の卵あるいは孵化幼虫に対して人工的に制御した様々な成育条件を与え、各条件下における本種の反応や潜在能力を検出しようと試みた。

6-2. 材料と方法

6-2-1. 卵および孵化幼虫の採取

飼育実験には、シロモジ材中の坑道内に産下されたクスノオオキクイムシの卵とこの卵に由来する孵化幼虫 (1991, 1992 年度) を用いた。まず、割材して坑道を露出させることにより卵塊を採取し、濾紙を敷いた滅菌ペトリ皿内に集めた。この中の一部は、卵の状態のまま供試したが、その他の卵は滅菌水で湿らせた濾紙の上に移し、25℃、全暗条件下で孵化させた。この孵化期間中、1日おきに湿った濾紙を交換し、また孵化した幼虫はすべて24時間以内に微小針を用いてそれぞれの飼育条件下に移した。また、卵および孵化幼虫の表面殺菌は行わなかった。

6-2-2. 飼育方法と実験計画

養菌性キクイムシの飼育方法には、①野外から持ち帰ったキクイムシ穿入木を好適な温湿度条件下で管理する、②実験室内で自然の木材に人為的に穿入させる、③木粉を固化した人工材や、④人工合成培地で培養したアンブロシア菌を摂食させる、などの方法がある (高木, 1967; Batra, 1985; Batra *et al.*, 1986)。

本研究では、④の方法を採用した。供試したアンブロシア菌は、クスノオオキクイムシの坑道内および mycangia 内から分離した *Ambrosiella* sp., *Paecilomyces* sp., *Candida* sp. (酵母類の一種) と、ミカドキクイムシ (*Scolytotrupes mikado*)、ハネミジカキクイムシ (*Xylosandrus brevis*)、サクキクイムシ (*Xylosandrus crassiusculus*) の坑道内から分離した *Ambrosiella* spp. である (写真6-1)。各キクイムシと共生する *Ambrosiella* spp. はいずれもモニリオイドチェーンと呼ばれる分生子柄を持つが、その形態的あるいは培養的性質が

異なることから、ここではそれぞれ *Ambrosiella* sp. 1, 2, 3, 4 と表記した。

各アンブロシア菌は、PDA 平板培地（直径 3 cm，培養面積 8 cm² あるいは直径 9 cm，培養面積 63 cm²），および PDA にシロモジ，コハウチワカエデ，ウリハダカエデ，リュウブの鋸屑（20 g/1000 ml）をそれぞれ添加した平板培地（直径 9 cm）に無菌的に接種した。その後，接種した菌が培地全面に繁殖するまで，25℃一定，全暗条件で約 1～3 週間培養した。各培地には細菌による汚染を防ぐために硫酸ストレプトマイシンを添加した。

採取した卵および孵化幼虫は，表 6-1 に示したような飼育密度，アンブロシア菌種，培地の種類の組み合わせで，25℃一定，全暗条件で無菌的に飼育した。なお，卵からの飼育の場合は，卵塊の状態のまま供試した区と 1 卵ずつ離して配置した区とを設けた。卵および孵化幼虫を投入した後，培養基は一度も交換しなかった。調査は毎日行い，各飼育個体の発育過程を観察するとともに，蛹化した個体は培養基から取り出してマイクロバランス上で生重を測定した。

表 6-1. 本研究で行われたクスノオオキクイムシ人工飼育の実験計画。

アンブロシア菌種	共生するキクイムシ種	培 地	飼 育 密 度	反復数
<i>Ambrosiella</i> sp. 1	クスノオオキクイムシ	PDA	1 孵化幼虫/菌面積8cm ²	N = 16
		PDA	2 孵化幼虫/菌面積8cm ²	N = 10
		PDA	5 孵化幼虫/菌面積8cm ²	N = 4
		PDA	10 孵化幼虫/菌面積8cm ²	N = 2
		PDA	2 卵（隔離配置）/菌面積63cm ²	N = 4
		PDA	5 卵（隔離配置）/菌面積63cm ²	N = 6
		PDA	5 卵（密着配置）/菌面積63cm ²	N = 6
		PDA	8 卵（隔離配置）/菌面積63cm ²	N = 1
		PDA+シロモジ鋸屑	8 孵化幼虫/菌面積63cm ²	N = 3
		PDA+コハウチワカエデ鋸屑	8 孵化幼虫/菌面積63cm ²	N = 3
		PDA+ウリハダカエデ鋸屑	8 孵化幼虫/菌面積63cm ²	N = 3
		PDA+リュウブ鋸屑	8 孵化幼虫/菌面積63cm ²	N = 4
<i>Paecilomyces</i> sp.	クスノオオキクイムシ	PDA	1 孵化幼虫/菌面積8cm ²	N = 30
<i>Candida</i> sp.	クスノオオキクイムシ	PDA	1 孵化幼虫/菌面積8cm ²	N = 30
<i>Ambrosiella</i> sp. 2	ミカドキクイムシ	PDA	1 孵化幼虫/菌面積8cm ²	N = 30
<i>Ambrosiella</i> sp. 3	ハネミジカキクイムシ	PDA	1 孵化幼虫/菌面積8cm ²	N = 34
<i>Ambrosiella</i> sp. 4	サクキクイムシ	PDA	1 孵化幼虫/菌面積8cm ²	N = 30

6-3. 結 果

6-3-1. 各アンブロシア菌におけるキクイムシ飼育結果

クスノオオキクイムシおよび他種キクイムシのアンブロシア菌による飼育で羽化個体が得られたのは，本種の *Ambrosiella* sp. 1 とハネミジカキクイムシの *Ambrosiella* sp. 3 を与えた場合であった（表 6-2）。本種の *Paecilomyces* sp. および *Candida* sp.，またミカドキクイムシおよびサクキクイムシの *Ambrosiella* sp. 2 および 4 では成虫まで成育できなかった。しかし，羽化率は *Ambrosiella* sp. 1 を与えた区（68.8%）の方が *Ambrosiella* sp. 3 を投与した区（17.6%）よりも有意に高く（G-test, $p < 0.01$ ），また雌蛹の平均生重も有意に大きかった。

Ambrosiella sp. 1 を用いて異なる幼虫密度で飼育した場合，菌面積 8 cm² あたり 5，10 個体になると有意に平均雌蛹重が小さくなった（表 6-3）。2 個体区においては，すべて 1 個体のみが蛹化して成虫となったが，終齢幼虫期に単独で摂食できた個体の蛹重の方が，終齢幼虫同士で競合した個体よりも有意に大きくなった（U-test, $p < 0.05$ ）。一方，菌面積 63 cm²

表 6-2. クスノオオキクイムシおよび他種キクイムシのアンブロシア菌によるクスノオオキクイムシ孵化幼虫の飼育結果 (菌面積8cm² あたり 1 幼虫)。

アンブロシア菌種	共生する キクイムシ種	供試個体数	平均発育日数 (生存個体数)			蛹重 (mg)* (平均±標準誤差)
			幼虫期	蛹期	合計 (±標準誤差)	
<i>Ambrosiella</i> sp. 1	クスノオオキクイムシ	n=16	♀ 11.9 (n=10)	6.7 (n=10)	18.6±2.9 (n=10)	7.59±0.51 ^a
			♂ 10.0 (n= 1)	5.0 (n= 1)	15.0 (n= 1)	3.00
<i>Paecilomyces</i> sp.	クスノオオキクイムシ	n=30	♀ —	—	—	—
			♂ —	—	—	—
<i>Candida</i> sp.	クスノオオキクイムシ	n=30	♀ —	—	—	—
			♂ —	—	—	—
<i>Ambrosiella</i> sp. 2	ミカドキクイムシ	n=30	♀ —	—	—	—
			♂ —	—	—	—
<i>Ambrosiella</i> sp. 3	ハネミジカキクイムシ	n=34	♀ 12.5 (n= 6)	4.8 (n= 4)	17.3±2.3 (n= 4)	6.41±0.54 ^b
			♂ 11.0 (n= 2)	3.5 (n= 2)	14.5±0.5 (n= 2)	2.14±0.13
<i>Ambrosiella</i> sp. 4	サクキクイムシ	n=30	♀ —	—	—	—
			♂ —	—	—	—

* 異なる英字を付した各飼育区の平均雌蛹重の間には、*t*-test による有意差 (1%) があることを示す。

表 6-3. *Ambrosiella* sp. 1 を用いた異なる孵化幼虫密度によるクスノオオキクイムシの飼育結果。

菌面積8cm ² あたりの 幼虫数(供試個体数)		平均発育日数 (生存個体数)			蛹重 (mg)* (平均±標準誤差)
		幼虫期	蛹期	合計 (±標準誤差)	
1 幼虫 (n=16)	♀	11.9 (n=10)	6.7 (n=10)	18.6±2.9 (n=10)	7.59±0.51 ^a
	♂	10.0 (n= 1)	5.0 (n= 1)	15.0 (n= 1)	3.00
2 幼虫 (n=20)	♀	10.6 (n= 8)	5.8 (n= 8)	16.4±1.5 (n= 8)	7.59±0.49 ^a
	♂	—	—	—	—
5 幼虫 (n=20)	♀	11.3 (n= 4)	8.5 (n= 4)	19.8±3.9 (n= 4)	6.54±0.24 ^b
	♂	9.0 (n= 1)	4.0 (n= 1)	13.0 (n= 1)	2.67
10 幼虫 (n=20)	♀	8.0 (n= 2)	7.0 (n= 2)	15.0±0.0 (n= 2)	5.96±0.28 ^b
	♂	8.0 (n= 1)	3.0 (n= 1)	11.0 (n= 1)	1.88

* 同一英字を付した各飼育区の平均雌蛹重の間には、Duncan's multiple range test による有意差 (1%) がないことを示す。

あたりの卵数および配置は、平均雌蛹重に大きな影響は与えなかった (表 6-4)。しかし、8 卵区は、1 個体あたりに換算した菌面積が 1 幼虫区とほぼ同じであるにもかかわらず、その平均雌蛹重は有意に大きかった (*U*-test, $p < 0.01$)。また、同一培養基上において、早く孵化した個体は後から孵化してくる個体よりも確実に早く成育を完了した。

表 6-5 に、寄主木の鋸屑添加培地上で生育させた *Ambrosiella* sp. 1 による飼育結果を示す。4 樹種の中でシロモジとコハウチワカエデの鋸屑を添加した場合のみ、羽化成虫が得られた。また、これらの平均雌蛹重間には、有意な差は認められなかった。

飼育実験の結果、クスノオオキクイムシの発育日数は、雌の場合、卵期が約 3 日、幼虫期は約 10~14 日、蛹期は約 7 日、卵から成虫羽化までは約 22 日前後であり、雄は約 3 日早く羽化することが明らかになった。これらの結果は、ほぼ野外個体群の結果 (第 3 章) と一致していた。また、雄の蛹重は雌の 3~4 分の 1 であった。しかし、野外個体と比較すると雄の蛹重は同じかむしろ大きかったのに対して、雌は小さい個体が多かった。

羽化成虫の多くは、ハンノキキクイムシ (Kaneko *et al.*, 1965) と同様に、その体色を十

表 6-4. *Ambrosiella* sp. 1 を用いた異なる卵密度および配置によるクスノオオキクイムシの飼育結果.

菌面積63cm ² あたりの卵数および配置(供試個体数)		平均発育日数 (生存個体数)				蛹重 (mg)* (平均±標準誤差)
		卵期	幼虫期	蛹期	合計 (±標準誤差)	
2 卵隔離 (n= 8)	♀	2.9 (n= 7)	13.1 (n= 4)	6.3 (n= 4)	22.3±1.5 (n= 4)	9.39±1.05 ^a
	♂	—	11.1 (n= 1)	5.0 (n= 1)	19.0 (n= 1)	2.83
5 卵隔離 (n=30)	♀	2.9 (n=23)	13.9 (n=10)	6.0 (n= 5)	22.8±3.6 (n= 5)	9.03±0.80 ^{ab}
	♂	—	11.1 (n= 3)	5.0 (n= 3)	19.0±0.0 (n= 3)	1.93±0.55
5 卵密着 (n=30)	♀	3.3 (n=26)	14.4 (n= 9)	6.0 (n= 6)	23.7±3.3 (n= 6)	8.09±0.76 ^b
	♂	—	10.7 (n= 1)	5.0 (n= 1)	19.0 (n= 1)	2.72
8 卵隔離 (n= 8)	♀	4.8 (n= 8)	10.8 (n= 7)	5.7 (n= 7)	21.3±1.8 (n= 7)	8.58±0.55 ^{ab}
	♂	—	—	—	—	—

* 同一英字を付した各飼育区の平均雌蛹重の間には, Duncan's multiple range test による有意差 (5%) がないことを示す.

表 6-5. 各寄生木の鋸屑添加培地上で生育させた *Ambrosiella* sp. 1 によるクスノオオキクイムシ孵化幼虫の飼育結果 (菌面積63cm² あたり 8 幼虫).

樹種	供試個体数		平均発育日数 (生存個体数)			蛹重 (mg)* (平均±標準誤差)
			幼虫期	蛹期	合計 (±標準誤差)	
シロモジ	n=24	♀	11.8 (n=4)	4.7 (n=4)	16.5±1.4 (n=4)	8.06±0.48
		♂	—	—	—	—
コハウチワカエデ	n=24	♀	11.4 (n=9)	6.8 (n=9)	18.2±2.1 (n=9)	8.35±0.75
		♂	—	—	—	—
ウリハダカエデ	n=24	♀	—	—	—	—
		♂	—	—	—	—
リョウブ	n=32	♀	—	—	—	—
		♂	—	—	—	—

* *t*-test により有意差 (5%) なし.

分黒化しないまま短期間で死亡した。また, ハンノキクイムシ (Weber and McPherson, 1983) や *Xyleborus ferrugineus* (Norris and Chu, 1985) で確認された共食い現象 (雌成虫が交尾後に雄成虫を捕食する) は, 本研究では観察されなかった。

6-3-2. 菌面積と蛹重, 蛹化率との関係

Ambrosiella sp. 1 を用いた異なる幼虫密度, 卵密度による飼育結果 (表 6-3, 4) から, 孵化幼虫 1 個体あたりの菌面積に対してそれぞれの飼育区の平均蛹生重および蛹化率をプロットした (図 6-1)。平均蛹重, 蛹化率ともに 1 幼虫あたりの菌面積 10 cm² までは, 菌面積の増加につれてほぼ直線的に上昇した (Kendall's τ -test, $\tau=1.00$, $p<0.01$; $\tau=0.80$, $p<0.05$)。しかし, 菌面積が 10 cm² 以上になると増加傾向は小さくなり, それぞれある一定の上限値, すなわち平均蛹重は 9 mg, 蛹化率は 80% に到達した。

6-3-3. 発育速度と蛹重との関係

Ambrosiella sp. 1 による 1 幼虫区および 8 卵区, また *Ambrosiella* sp. 3 による 1 幼虫区について, 各飼育個体の雌蛹重と蛹化するまでの発育速度との関係を示した (図 6-2)。ただし, ここでいう発育速度とは, 孵化から蛹化までの日数の逆数で表すものとする。*Ambrosiella* sp. 1 の 1 幼虫区では, 蛹重と発育速度との間に正の相関が認められたが, 他の飼育区におい

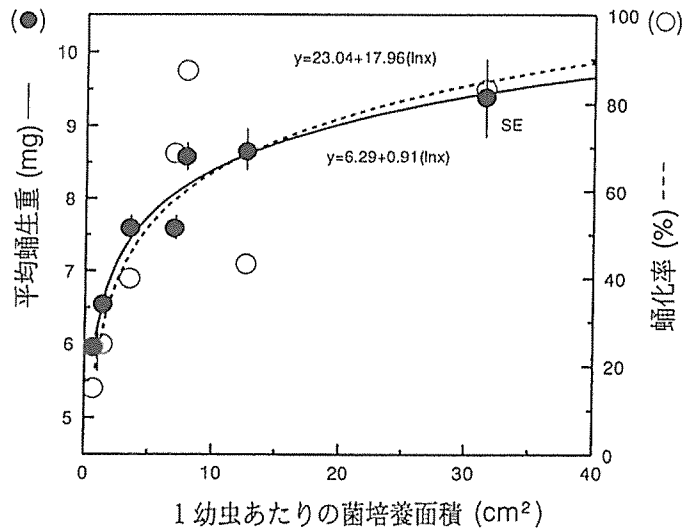


図 6-1. 幼虫あたりの菌培養面積と平均蛹生重および蛹化率の関係。

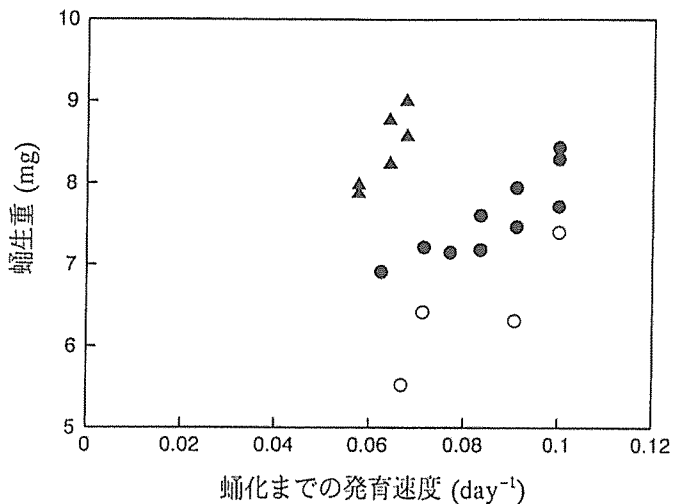


図 6-2. 蛹化までの発育速度と蛹生重の関係。

- ▲ : 8 卵/*Ambrosiella* sp. 1, 培養面積 68 cm² ($\tau=0.43$, $p>0.05$, $n=7$)
 ● : 1 幼虫/*Ambrosiella* sp. 1, 培養面積 8 cm² ($\tau=0.69$, $p<0.01$, $n=10$)
 ○ : 1 幼虫/*Ambrosiella* sp. 3, 培養面積 8 cm² ($\tau=0.47$, $p>0.05$, $n=4$)

ては統計的に有意な相関はみられなかった。

6-4. 考 察

6-4-1. クスノオオキクイムシの主栄養源と他の菌類の役割

各キクイムシ成育段階における坑道内および mycangia 内からの共生菌分離実験の結果より、クスノオオキクイムシの主要共生菌 (PAF) は *Ambrosiella* sp. であり、副次的共生菌 (AAF) は酵母類および *Paecilomyces* sp. であると推測された (第 4, 5 章)。本章の人工飼

育実験によって、PAFである *Ambrosiella* sp. 1 は確実に本種の栄養源となることが証明され、また AAF は単独では *Ambrosiella* sp. 1 の代用食にはなり得ないことが明らかになった。

PAF の生産するビタミン類やプロビタミンであるステロイド類は、養菌性キクイムシの変態に必須のものであると考えられており (Norris, 1966; Kok *et al.*, 1970; Kok, 1979), 本種の発育や変態にも、おそらく *Ambrosiella* sp. 1 の化学的作用が大きく貢献しているであろう。しかし、*Paecilomyces* sp. に属する菌が、昆虫病原性 (青木, 1989) あるいはセルロース分解性 (原口ら, 1985) などを有するのに対して、酵母類は栄養的に多くのビタミン類を含み、樹皮下穿孔性キクイムシの一種である *Ips cembrae* では、その正常な発育や変態に共生酵母 *Pichia* sp. により合成されるビタミン B 類が不可欠であることが発見されている (Gusteleva, 1982)。したがって、本種と共存する AAF、とくに酵母類がキクイムシ幼虫に必須微量元素を供給したり、あるいは *Ambrosiella* sp. 1 との相互作用によって新たな化学的作用を与えている可能性も否定できない。本実験において、羽化成虫が短期間で死亡したことも、あるいはこのような酵母類の役割が不足していたことに起因しているかも知れない。今後は、PAF と AAF を混合投与するような飼育実験を行い、AAF の間接作用や PAF と AAF との化学的相互作用を明らかにしていく必要がある。

また、キクイムシ成虫を用いた飼育実験により、PAF が存在しない場合にはキクイムシの産卵や繁殖が起らないことが示され (Norris and Baker, 1967; Kingsolver and Norris, 1977), さらに PAF を摂食した雌成虫の方が AAF や無関係な雑菌類 (non-ambrosia fungi : NAF) のみで飼育した成虫よりも多くの卵を産下できることも発見されている (Norris, 1979)。このようにキクイムシと共生する菌類は、幼虫の成育だけでなく成虫の産卵にも大きな影響を与えており、共生菌のキクイムシに対する役割や栄養価は、その全生活史を通じて総合的に検討されるべきであると考えられる。

6-4-2. 他種キクイムシの共生菌の利用可能性

ミカドキクイムシ (Kinuura *et al.*, 1991), ハネミジカキクイムシおよびサクキクイムシ (衣浦ら, 1990) と共生する *Ambrosiella* sp. 2, 3 および 4 は、いずれも各キクイムシの主要共生菌 (PAF) であることが示唆されている。これらの他種キクイムシの PAF の中で、クスのオオキクイムシはハネミジカキクイムシの *Ambrosiella* sp. 3 のみを利用することができた。このことは、*Ambrosiella* sp. 3 に含まれるタンパク質、核酸、多糖類および複合脂質などの菌体成分が、本種の栄養要求性に合致したことを意味している。また、*Ambrosiella* sp. 3 と本種の PAF である *Ambrosiella* sp. 1 との物質代謝能の類似性が高く、これらの菌種が近縁種である可能性も示唆している。しかしながら、*Ambrosiella* sp. 3 により成育したクスのオオキクイムシの成虫羽化率、平均蛹重がともに小さくなったことから、本種が *Ambrosiella* sp. 3 を摂食することによって得られる成長エネルギー、あるいはその栄養摂取効率は、*Ambrosiella* sp. 1 の場合よりも低いことが予想される。

Batra (1966) は、他種キクイムシの PAF、また AAF や NAF によっても人工飼育に成功している。しかし、この飼育実験は、木材中に人為的に形成した坑道に各供試菌を接種し、この中にキクイムシ成虫を穿入させたか、坑道内に存在した卵や幼虫に各共生菌を与えたもので、いずれもその成育効果が正確に検出されていないものと考えられる。なぜなら、成虫が穿入した場合は、mycangia 内から自分自身の PAF を接種、培養している可能性があり、また、坑道内の幼虫はすでに自種の PAF を摂食しているからである。これに対して、Kaneko

and Takagi (1966)は、本研究で行ったように(第5章)蛹期に坑道内から取り出して mycangia 内に共生菌を獲得させなかった成虫を用いて、これらが他種のキクイムシの PAF を利用して繁殖できることを証明した。キクイムシ類が潜在的に自種の共生菌以外の菌類を利用できるかどうかを正確に検討する際には、供試体のバイパス的機構を完全に封鎖した実験系、すなわち成虫による飼育ならばその mycangia 内を無菌化した成虫を、また幼虫の場合は本実験のように孵化直後の幼虫を用いた飼育実験を行うべきであろう。

6-4-3. 寄主木成分がキクイムシの繁殖に与える影響

クスノオオキクイムシ野外個体群は、シロモジやコハウチワカエデに対して強い選好性を示し、またこれらの樹種に穿入した場合、同一の食物資源である *Ambrosiella* sp. を利用するにもかかわらず、その産卵坑道率や繁殖成功率は他の樹種よりも大きくなった(第3, 4, 5章)。このような寄主木の樹種とキクイムシの繁殖成功との関連性は、本種の実験個体群においても認められた。すなわち、シロモジとコハウチワカエデの鋸屑添加培地上の *Ambrosiella* sp. 1 を摂食した場合にのみ、本種の孵化幼虫は成虫まで育成することができた。

寄主木の鋸屑を加えた培地中には、樹木成分の熱水可溶分である有機塩、糖、ガム、ペクチン類似物質、ガラクトン、タンニンなどの諸成分が溶出している(原口ら, 1985)。菌類は、この抽出成分中の糖、デンプン、アミノ酸などを栄養源として生長できるが、フェノール類やモノテルペン類などは抗菌作用を示し、その生育は阻害される。したがって、菌類の繁殖は樹木成分の組成により大きな影響を受けることが予想され、実際にリョウブの鋸屑添加培地では、他の樹種と比較して、*Ambrosiella* sp. 1 の繁殖がきわめて悪いことが観察されている。また、高等植物の二次代謝産物には、動物体内のホルモンバランスを破壊する、毒性によって阻害する(アルカロイドなど)、食味を減退させる(cucurbitacin 類など)あるいは栄養的価値そのものを減少させる(タンニン類など)といった摂食阻害作用があることが示唆されている(Harborne, 1977)。以上のことから、PDA にウリハダカエデやリョウブの鋸屑を添加した場合にキクイムシ幼虫の育成が不成功に終わった理由としては、これらの抽出成分が共生菌を介してキクイムシ幼虫に悪影響を与えたか、あるいは直接的に摂食を阻害したためであると推察される。

キクイムシ成虫を自然の木材に穿入させた飼育実験では、同一樹種であっても部位が異なればキクイムシの育成に大きな差異が生じ(Kaneko, 1965)、また合成培地に鋸屑を添加した場合でもその部位や状態によってキクイムシの繁殖成功が異なることが示されている(Saunders and Knoke, 1967)。これらの結果もまた、それぞれの部位、状態における樹木成分の組成の違いによるものであろう。今後、各樹種内に含まれる諸成分と共生菌の繁殖およびキクイムシの発育との関連性を明らかにすることによって、樹体内におけるキクイムシの繁殖や樹木をめぐるキクイムシとアンブrosia 菌との共進化に関する生化学的基盤が得られ、またキクイムシの寄主木選択についても進化的観点からの考察が可能になるであろう。

6-4-4. クスノオオキクイムシの種内競争

Ambrosiella sp. 1 の培養面積は、クスノオオキクイムシ幼虫の摂食できる食物資源量を表す指標である。今回の飼育実験の結果、幼虫 1 個体あたりの菌面積が 10 cm² 以下になると、その蛹化率、蛹重はともに大きく減少することが明らかになった。すなわち、体サイズおよび生存率に対する密度効果(種内競争)が認められた。このことから、食物資源である *Ambrosiella* sp. 1 の量が本種の次世代数の制限要因になること、また体サイズが各個体の獲得し

た資源量に依存し、この獲得量が種内競争の強さに大きく影響されること（第3章）が実験的に確認された。

8 卵区における1 幼虫あたりの菌面積は、平均的には1 幼虫区の菌面積とほぼ同じである。しかし、実際には早く孵化した個体がこの平均を上回る菌面積を消費して大型の個体となり、飼育区全体としても次世代の平均体サイズが1 幼虫区より大きくなった。この結果は、本種の野外個体群にみられる卵の孵化時期に依存した資源利用様式（第3章）の有効性を裏付けるものである。すなわち、幼虫からの飼育実験の結果から推測されるように、本種の幼虫が同時に摂食を始めた場合、おそらく彼らは食物資源の分配を重ねて共存共貧の状態に陥る、いわゆるスクランブル型の種内競争(Nicholson, 1954)を展開すると思われる。そして、利用できる食物資源量が少ない場合には、各個体が発育を完了できる最小の資源量を確保できず、個体群は崩壊する可能性がある。このような危険を回避する方法が、幼虫の不斉一な出現であり、また親成虫による資源依存的な産卵様式（第3章）であると考えられ、この結果、本種は実際の坑道内において全体の資源量に対応したある一定数の次世代を生産できる（第3章）ものと推察される。

また、単独で飼育した幼虫間において、発育速度が早い個体はその蛹重が大きくなった。この現象は、種内競争による資源の分配量の差によるものではなく、おそらく体サイズあるいは摂食速度における各個体間の遺伝的変異に起因するものと推測されるが、本研究ではその詳細を明らかにすることはできなかった。

第7章 数種キクイムシと共生するアンブロシア菌の化学的分類

7-1. 諸 言

生物の進化はDNA の進化であり、その塩基配列の順序や長さの一連の変化によるものである。また、タンパク質は各種アミノ酸から構成された高分子化合物であり、その一次構造はDNA の塩基配列によって規定されており、この塩基配列の反映の一つとして考えられる。したがって、微生物に存在するタンパク質の構造的性質を比較することによって、菌株間の相同性が識別でき、またその類縁関係を論じることにも可能となる(駒形, 1982)。そして、このタンパク質の構造的性質を最も簡便かつ迅速に研究する手段として電気泳動法が利用されている。すなわち、適当なpH、緩衝液および支持体を選び電場をかけることにより、各タンパク質をその荷電の差や分子の大きさ、形状に基づいて固有の移動度で陰極または陽極へ移動させることができる(平井ら, 1989)。

近年、微生物の分類にも血清学、生化学、遺伝学などの手法が導入されているが、この電気泳動法を用いたタンパク質分析やアイソザイムの遺伝子分析も多くの菌類に対して適用されており、その有用性が示唆されている(Shechter *et al.*, 1972; Reynolds *et al.*, 1983; Micales *et al.*, 1986; Hanson and Wells, 1991)。そこで本章では、SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法)を用いてクスノオオキクイムシを含む4 種の養菌性キクイムシと共生するアンブロシア菌のタンパク質分析を試み、その組成の相違から菌種間の類似性について検討した。

7-2. 材料と方法

7-2-1. 泳動試料の調整

供試したアンブロシア菌は、クスノオオキクイムシの坑道内から分離した *Ambrosiella* sp.

表 7-1. 各アンブロシア菌の構成タンパク質.

番号	分子量 (kDa)	存在するタンパク質 ^{b)}						
		FM ^{b)}	A1	P	C	A2	A3	A4
1	119.7	*	*				*	*
2	111.5	*					*	
3	104.9						*	
4	103.8	*	*				*	
5	98.7						*	
6	91.0	▲					▲	
7	90.0					*		
8	88.3					*		
9	87.4	▲	▲				*	*
10	84.7					*		
11	83.8	▲	▲				▲	▲
12	81.4	*					*	
13	79.7	*						
14	78.1	*	*	*		*		*
15	75.8	▲	*			*	▲	*
16	73.5	*	*				▲	▲
17	70.6							*
18	69.9	*	*	*			*	
19	69.1							*
20	67.1	▲	▲				*	
21	65.7						*	▲
22	64.4	▲	▲	*	*	*	*	
23	63.7							*
24	62.5	▲	▲				▲	▲
25	61.2					*		
26	59.9			*				
27	59.3	▲	▲			▲	▲	▲
28	58.2	▲	*			▲	▲	*
29	55.8			*	*			
30	55.2	▲	▲			▲	▲	▲
31	54.8				*			
32	53.1	▲	*	*		*	*	
33	52.5						*	*
34	51.4				*			
35	50.5	▲	*		*	*		*
36	49.4	*	*				*	
37	48.4							▲
38	47.9					*		
39	47.0	▲	*				*	
40	45.6				*			
41	45.1	▲	*	*		*	*	*
42	44.6				*			
43	44.2	*	*			*	*	
44	43.3							*
45	42.9			*	*	*		
46	42.4	▲	▲				*	
47	41.2							▲
48	39.5			*				
49	38.8	Λ	Λ		*	▲	Λ	
50	38.0							Λ
51	37.6	*	*				*	
52	36.8	*	*		*	*	*	
53	33.9						*	
54	32.9						*	
55	31.6					▲		▲
56	31.3	▲	▲				▲	
57	30.3				▲			
58	29.7			▲		*		
59	28.6	▲	▲			*	*	▲
60	27.2			*		Λ		
61	26.9	▲	▲				▲	
62	26.6							*
63	26.3				▲			
64	25.8	▲	*	▲				
65	25.0					*		*
66	24.5	*			*		*	
67	24.2					▲		*
68	24.0	*	*					
69	23.8				*			
70	21.5	▲	▲			*	*	▲
71	21.0				*			
72	20.6	▲	▲	▲			▲	
73	20.4				*			
74	19.6			*				
75	19.4	▲	*				*	*
総タンパク質数		37	31	14	16	25	37	28

a) A, 主要タンパク質; ▲, 副タンパク質; *, 微量タンパク質

b) FM, mycangia からの直接培養株; A1, *Ambrosiella* sp. 1; P, *Paeecilomyces* sp.; C, *Candida* sp.; A2, *Ambrosiella* sp. 2; A3, *Ambrosiella* sp. 3; A4, *Ambrosiella* sp. 4.

1, *Paecilomyces* sp., *Candida* sp. と, ミカドキクイムシ, ハネミジカキクイムシ, サクキクイムシの坑道内から分離した *Ambrosiella* sp. 2, 3, 4 である。これら 6 種のアンブロシア菌は, すべてシロモジ材に形成されたキクイムシ坑道 (1990 年度) から分離した。

試料の調整は以下の手順で行った。まず, 各供試菌を PDA 培地に接種し, 25℃, 全暗条件で約 10 日間培養した。この際, クスノオオキクイムシ飛翔成虫の mycangia も直接接種, 培養した。その後, 各供試菌体 0.1 g を培地上からサンプルチューブ (1.5 ml) に採取し, 滅菌水 300 μ l を加えてテフロンホモジナイザーおよび超音波処理 (30 W, 10 秒 \times 4) によって破碎した。破碎した菌体は, 2 時間加温乾燥した後, 緩衝液 200 μ l (pH 6.7, 0.5 M トリス塩酸, 10% SDS 溶液, 5 %2-メルカプトエタノール, 10%グリセロール, 0.01%ブロモフェノールブルーからなる) を加えて 5 分間煮沸し, 遠心分離 (16,000 \times g, 10 分) した後, その上清を泳動試料とした。

7-2-2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

本法は, 試料タンパク質を分離すると同時に, その分子量を測定できるという特徴を持っている。その原理は, 界面活性剤の一つである SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) でタンパク質を処理すると, SDS がタンパク質の分子量に応じた量比で結合することを利用している。SDS とタンパク質が結合すると, SDS-タンパク複合体の形成によって大きな陰荷電が生じ, 各タンパクが元来持っていた荷電が無視できるようになる。また, 複合体の形状はタンパク質の形状と関係なく, 互いに類似した棒状となる。このため, SDS-タンパク複合体は, ゲル分子のふり効果だけに依存して泳動され, 複合体の分子量の違い, すなわちタンパク質の分子量の大きさによって泳動速度が決まる。したがって, 分子量が既知の標準タンパク質の泳動度と試料タンパク質の泳動度を比較することによって, 試料タンパク質の分子量を推定することができる (平井ら, 1989)。

本研究のタンパク質分析は, Laemmli (1970) の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に従って行った。各泳動試料の 5 μ l を 10%ゲルに添加し, 定電流 20 mA で 5 時間泳動した。分離したタンパク質は銀染色法により発色させ, その相対移動度から分子量を推定した。

7-3. 結 果

7-3-1. 各アンブロシア菌の泳動パターンと構成タンパク

SDS-PAGE による各アンブロシア菌のタンパク質パターンを写真 7-1 に, またその構成タンパクを表 7-1 に示す。*Paecilomyces* sp. や *Candida* sp. に存在するタンパクはそれほど明瞭に染色されなかったが, *Ambrosiella* sp. 1, 2, 3, 4 およびクスノオオキクイムシ飛翔成虫の mycangia 内貯蔵菌は多数の明瞭なバンドを持った。mycangia 内貯蔵菌のバンドは 37 本, *Ambrosiella* sp. 1, 2, 3, 4, *Paecilomyces* sp. および *Candida* sp. のバンドはそれぞれ 31, 25, 37, 28, 14, 16 本存在し, 合計 75 種類の分子量を持つバンドが検出された。

mycangia から直接培養した菌に存在したバンドはすべて, *Ambrosiella* sp. 1 のバンドと一致した。このことは, クスノオオキクイムシの mycangia 内で貯蔵, 運搬されている菌が, 坑道内で繁殖している *Ambrosiella* sp. 1 と全く同一種であることを明示している。また, *Ambrosiella* sp. 1 と *Ambrosiella* sp. 3 は, よく類似した泳動パターンを示し, その主成分となる構成タンパクはともに分子量 38.8 kDa と推定された。これに対して, *Ambrosiella* sp. 2 および *Ambrosiella* sp. 4 の主要タンパクの分子量はそれぞれ 27.2 kDa, 38.0 kDa であった。また, *Ambrosiella* sp. 2 には 24.2 kDa, *Ambrosiella* sp. 4 には 41.2 kDa と 48.4 kDa

表 7-2. 各アンブロシア菌間の相違度^{a)} の比較.

FM ^{b)}							
A1	6						
P	37	31					
C	43	39	24				
A2	34	28	25	31			
A3	12	14	41	45	38		
A4	35	29	38	42	29	35	
	FM	A1	P	C	A2	A3	A4

a) 2つのアンブロシア菌株間において、一方の菌株のみにタンパク質が存在する場合に相違度があるとし、そのタンパク質の総数を相違度と定義した。

b) FM, mycangia からの直接培養株; A1, *Ambrosiella* sp. 1; P, *Paecilomyces* sp.; C, *Candida* sp.; A2, *Ambrosiella* sp. 2; A3, *Ambrosiella* sp. 3; A4, *Ambrosiella* sp. 4.

の分子量を持つ特徴的なバンドがそれぞれ検出された。すべての *Ambrosiella* spp. に共通するバンドは、分子量 55.2 kDa と 59.3 kDa のタンパク質のみであった。

7-3-2. アンブロシア菌間の類縁度

各アンブロシア菌に存在するタンパク質の組成 (表 7-1) に基づき, Coats *et al.* (1990) の方法によってアンブロシア菌間の類縁度あるいは相違度を比較した (表 7-2)。すなわち, 2つの菌株を比較して一方のみに存在するバンドの総数を算出し, この数を相違度として2つのアンブロシア菌間の類縁性を表す指標とした。つまり, この相違度が小さい (バンド数が少ない) ほど, 比較した菌株間の類縁度は高いと考えることができる。この結果, mycangia 内貯蔵菌と *Ambrosiella* sp. 1 との相違度が最も小さく, また *Ambrosiella* sp. 1 と *Ambrosiella* sp. 3 は, その他の菌株間よりも類縁度が高いことが明らかになった。

7-4. 考 察

7-4-1. アンブロシア菌の化学的分類法としてのタンパク質分析

Batra (1966) の提唱した主要アンブロシア菌 (PAF) と副次的アンブロシア菌 (AAF) は, Nakashima *et al.* (1987) や本研究で示されたように (第 4, 5 章), キクイムシの成育段階に伴う共生菌の種構成やその相対的優占度の変遷を調査することによって比較的明確に判別することができる。そして, 分離された PAF の同定は, 人工培地上で分離菌の生殖器官を形成させ, その諸形質を観察するか (Batra, 1967; Haanstad and Norris, 1985; Nakashima *et al.*, 1987), 最近では Nakashima (1989), Nakashima *et al.* (1992) や本研究のように (第 4 章), 坑道内における自然状態の共生菌を SEM 観察することによって, それぞれの形態的特徴を Batra (1967) や Barnett and Hunter (1987) などのモノグラフと照合することによって行われてきた。しかし, 検索表に掲載されている菌種自体が少なく, また観察者がその形態的あるいは培養的性質を客観的に判断することが難しいために, アンブロシア菌の正確な分類, 同定は, とくに種のレベルにおいては非常に困難であり, 本研究においても種名まで特定できなかった。

さらに, アンブロシア菌はその存在場合によって異なる生育形式を示すことが知られてい

る (Batra, 1967; Beaver, 1989)。すなわち、本研究でも明らかになったように坑道内ではモニリオイド状となり分生子を形成するが、mycangia 内では酵母状の形態で存在している (第 4, 5 章)。この多形態性 (pleomorphism) は、アンブロシア菌の同定をより一層困難にし、また養菌性キクイムシの研究発展の大きな障害となってきた (Cooke and Rayner, 1984; Nakashima *et al.*, 1992)。

今回用いた電気泳動法により、クスノオオキクイムシの副次的共生菌 (AAF) である *Paecilomyces* sp. や *Candida* sp. と、各キクイムシの主要共生菌 (PAF) である *Ambrosiella* sp. 1, 2, 3, 4 との間に、バンドの数とその発色量に大きな差異のあることが明確になった。また、各キクイムシと共生する *Ambrosiella* spp. がそれぞれ独自の泳動パターンを示すことも明らかになった。これらの結果は、アンブロシア菌のタンパク質分析が、PAF と AAF とを分類し、また PAF を同定する上で有効な一手段となることを示唆している。さらに、各アンブロシア菌のタンパク質パターンから菌株間の相違度を定量的に算出することもできることから、単に形態や生理的性質の類似する菌種の分類、同定に有効であるだけでなく、その類縁関係の解明をも可能にするものと考えられる。

近年では、新しい化学的分類方法として、アンブロシア菌の補酵素 Q (ユビキノン) システムによる分類も試行されている (Yamada *et al.*, 1987)。今後、従来の形態的分類体系を再検討し、これと並行して化学的分類方法をさらに発展させていけば、アンブロシア菌の分類や同定はより簡単なものとなり、さらにはその系統発生や種分化の機構に関してもより多くの情報が得られるものと思われる。

7-4-2. *Ambrosiella* 属のキクイムシ種特異性

調査地内に生息する 4 種の養菌性キクイムシ、クスノオオキクイムシ (*Xylosandrus mutilatus*)、ミカドキクイムシ (*Scolytotrupes mikado*)、ハネミジカキクイムシ (*Xylosandrus brevis*)、サクキクイムシ (*Xylosandrus crassiusculus*) は、共通の寄主木であるシロモジに穿入し、その樹体内に形成した各坑道内で *Ambrosiella* 属の共生菌を PAF として利用している (第 4 章; 衣浦ら, 1990; Kinuura *et al.*, 1991)。そして、いずれの PAF もモニリオイドチェーンと呼ばれる分生子柄を備え、この形態が先細りにならないという特徴を持っている。しかし、異なる種類のキクイムシの坑道内で繁殖する *Ambrosiella* 属が、異なる分生子形態を示すことが SEM 観察により確認されており (Nakashima *et al.*, 1992)、今回の SDS-PAGE によっても各キクイムシと共生する *Ambrosiella* 属は明らかに異なる泳動パターンを示した。したがって、これらの *Ambrosiella* 属はそれぞれ異なる種であることが示唆され、また養菌性キクイムシは、同一地域の同種の寄主木に穿入しながらキクイムシの種ごとに異なる *Ambrosiella* spp., すなわち種特異的な PAF と共生関係を結んでいることが推察される。

また、ミカドキクイムシの PAF である *Ambrosiella* sp. 2 の主要タンパク質は、その分子量が他の *Ambrosiella* spp. よりも明らかに小さく、このことは *Ambrosiella* sp. 2 が他の *Ambrosiella* spp. と系統的にかなり疎遠であることを示唆している。そして、*Ambrosiella* sp. 2 が *Scolytotrupes* に属するミカドキクイムシの共生菌であり、他の *Ambrosiella* spp. がいずれも *Xylosandrus* 属のキクイムシ類と共生していることから、Francke-Grosmann (1967) のいうキクイムシとその共生菌との近縁性の一致、すなわち分類学上近縁なキクイムシではその共生菌も近縁である可能性が示唆された。また、同じ *Xylosandrus* 属のキクイムシ間でも、クスノオオキクイムシとハネミジカキクイムシの PAF である *Ambrosiella* sp. 1

と *Ambrosiella* sp. 3 の類縁度はとりわけ高く、このことはクスノオオキクイムシがハネミジカクイムシの *Ambrosiella* sp. 3 を利用できたという飼育実験の結果（第 6 章）を裏付けるものであった。

以上のことから、各キクイムシの主要共生菌（PAF）である *Ambrosiella* 属は、キクイムシの種に特異的な共生菌でありながら、その類縁性の程度は共生するキクイムシの分類学上の近縁度や生理、生態により微妙に異なるものと推察される。

第 8 章 総合考察

本章では、これまでの調査および実験の結果をもとに、クスノオオキクイムシとアンブロシア菌との共生機構について包括的に議論する。まず、本種の mycangia 内への共生菌の取り込みから放出に至る過程を微生物生態学的に考察し、その食物資源の獲得と配分の方法からキクイムシ側の繁殖戦略を論じた。また、キクイムシの生態的特徴と共生するアンブロシア菌との関連性およびその種特異性の成立過程については、他種のキクイムシ類との比較を通して進化生態学的に考察した。さらに、キクイムシとアンブロシア菌との共存を支える仕組みとその相互作用を総括し、また両者の共生機構の特徴を共生（symbiosis）の定義に従って詳細に検討した。

8-1. クスノオオキクイムシの繁殖戦略

8-1-1. 共生菌の獲得、維持、接種戦略

生物は、個体自身の生命活動を維持するために、また子孫を増やす繁殖活動を行うために無機物あるいは有機物を栄養源として利用しなければならない。そして生物は、冬の寒さや乾季の乾燥といった物理的環境要因、あるいは他種、同種生物との競争といった様々な相互関係に適応しながら、この栄養源の獲得のために様々な戦略をとっている。動物の採餌戦略は、その生活史、すなわち配偶子の産出から出生、成長、生殖、死亡に至るまでの一連の過程における生活史戦略の中でも重要な位置を占める（Pianka, 1988）。

養菌性キクイムシの場合、アンブロシア菌と呼ばれる菌類が食物資源であり、この共生菌を摂食することによって、成虫は卵あるいは精子という配偶子の生産が可能となり、その子孫もまた成長のためのエネルギーを獲得することができる。しかし、多くの動物、昆虫類が大量のエネルギーと時間を食物の探索に費やしているのに対して、養菌性キクイムシは時空間的に変動する食物資源を比較的容易に獲得しているものと考えられる。その理由は、彼らが成虫体内に胞子貯蔵器官（mycangia）を備えており、共生菌の胞子がこの器官により保護、運搬されているからである。

本研究によって、養菌性キクイムシの一種であるクスノオオキクイムシの mycangia の形態と機能について数多くの知見が得られた。これらの結果を総合すれば、本種が mycangia 内へ共生菌を取り込み、維持し、そして坑道内へ放出する方法、すなわち食物資源を獲得するための戦略は、以下のようなものと推察される（図 8-1）。

- ① 新雌成虫は、脱蛹して間もない未成熟な時期に坑道内壁に存在する共生菌を無作為に mycangia 内に取り込む。この共生菌の獲得は、前胸背と中胸背の間から mycangia を反転、露出させ、菌の胞子や菌糸を付着して取り込むと考えられる。
- ② mycangia 内に取り込んだ共生菌は、成熟新成虫期において一時的に食物資源（PAF）である *Ambrosiella* sp. のみが選択的に培養される。

③ 越冬期に入ると、PAFは質的、量的に衰退し、取り込み時に存在した副次的共生菌(AAF)が優占種となる。

④ 飛翔期が近づくと、PAFが再び優占的に活性化、増殖する。この選択的培養は継続的であり、この時期のPAFは最も多量に存在する。

以上のようなPAFの選択的培養あるいはAAFの繁殖抑制の発現は、温度により制御されている。その至近的要因としては、キクイムシの生理的活性が増大することによって起こると考えられる mycangia の付属腺からの分泌物、また PAF 自体の繁殖と PAF の生産する抗生物質による影響が考えられる。

⑤ 新たな寄主木に穿孔した成虫は、活性化した PAF 貯蔵胞子の大部分を産卵期までに mycangia 内から坑道内へ放出する。この放出は、mycangia を圧迫して、開口部から押し出した胞子塊を坑道内壁に接着、塗布することによって行われるものと思われる。

⑥ PAF の接種後、成虫はこの菌の繁殖あるいは子孫の養育に専念するが、次世代の成育とともに次第にその生理的活性が低下し、死に至る。成虫の衰弱に伴い、mycangia 内に残存する PAF の活性も低下してやがて死滅するものと思われる。

⑦ 親成虫の用意した PAF を摂食して成育した次世代は、脱蛹後に親成虫が行ったように坑道内の共生菌を mycangia 内へ獲得する (①に戻る)。

このように本種は、幼虫時期に利用した食物資源を摂食終了時にただちに成虫体内に取り込み、獲得した資源をその飛翔分散の季節性に合わせて選択的に維持、増殖させることがで

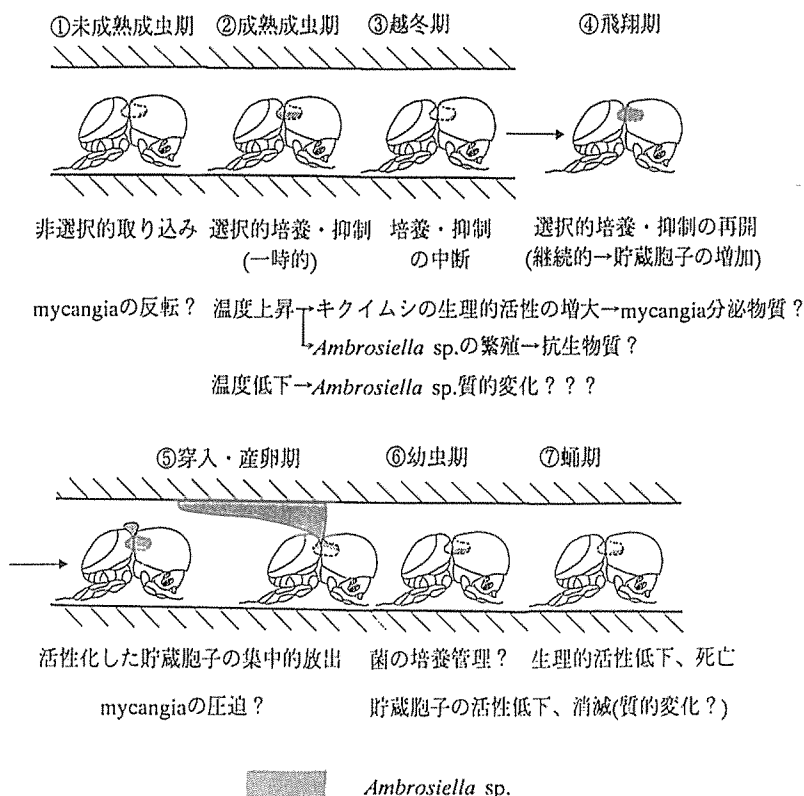


図 8-1. クスノオオキクイムシによる共生菌の獲得・維持・放出過程のシエマ。

きる。また、成虫は良質の食物が最も多くなった時期に新しい生息地へと移動し、ここで保持している資源をさらに増産して安全かつ確実に食物を子孫に供給することができる。この一連の過程において、本種にとって最もリスクの大きい作業は、新たな寄主木の発見と、この中での食物資源の定着、増殖であると思われる。しかし、穿入樹種の範囲を広げ、また PAF を坑道内壁へ確実に接種し、さらには坑道部位による PAF の繁殖力の違いによってその接種量を調節するという適応的な PAF 接種戦略を採用することによって、本種はこれらの諸問題を克服しているものと推察される。

このサイクルは、本種の繁殖の成功にとって、また本種とアンブロシア菌との共生関係が成立、永続するために必要不可欠なものである。同時に、PAF である *Ambrosiella* sp. の生息域の拡大もこのサイクリックな共生システムの成立によって可能になっているものと考えられる。

8-1-2. 次世代生産戦略

生物による資源の利用を考えるには、資源の獲得と獲得した資源の利用あるいは分配という二つの局面がある。前述したように、クスノオオキクイムシの資源獲得についてはそのメカニズムがおおよそ明らかになった。本研究によって得られた結果は、さらに第二の局面、すなわち本種がいかに食物資源を利用、分配して次世代を残しているのかという点についても一つの解答を与えた。

親成虫は、坑道サイズを拡大することによって、本種の食物資源(PAF)である *Ambrosiella* sp. の量を増大させることができる(図 8-2)。ここで彼らは、この PAF の一部を摂食して卵巣を発育させ、資源量に応じて産卵数を調節しているものと思われる。したがって、次世代の数は、親成虫の接種した PAF が坑道内で十分に繁殖できた場合の全資源量から、この親成虫および成虫までで育てず途中で死亡した幼虫の摂食分を差し引いた資源量によって決まるものと推察される。すなわち、

利用可能な資源量 = 全資源量 - 親成虫の摂食量 - 途中で死亡する幼虫の摂食量
により、次世代数が決定されているものと考えられる。

しかしながら、親成虫が長期間にわたって産卵し続けるために、幼虫の孵化時期は個体間

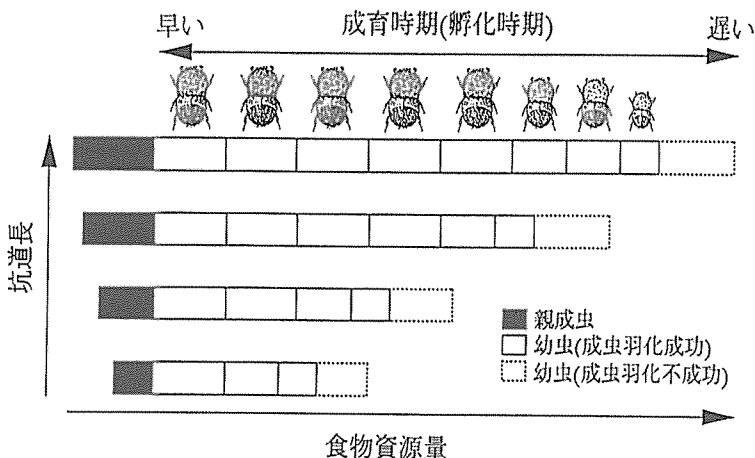


図 8-2. クスノオオキクイムシにおける資源利用様式のシエマ。

で大きく異なる。したがって、本種の幼虫はこの食物資源を一斉に摂食し始めるのではなく、早く産下されて早く孵化した個体から順次優占的に利用し、またいかなる坑道内(資源量下)においても、この早く孵化した個体ほど良質の食物資源を優占的に獲得して体サイズを大きくすることができものと推察される。すなわち、本種は、親成虫の産卵様式とその孵化幼虫の発育パターンが連結することによって、限られた食物資源量下でより大きな個体を効率的に生産することができるものと考えられる。各個体の適応度(繁殖成功度: fitness)は、その体サイズに依存すると考えられている(Charnov, 1982)。本種の次世代生産戦略は、全体の資源をある一定の個体数までが利用できるコンテスト型種内競争を基本とし、かつ体サイズの大きい次世代をより多く生産できるように資源を配分する、つまり親個体の適応度を最大化する方向に進化してきたものと考えられる。

今後、さらに多くの養菌性クイムシについて、その坑道内および mycangia 内におけるアンブロシア菌の時間的、空間的な存在様式を定量的に調査し、菌の動態と各種クイムシの生態を照合すれば、共生菌の獲得からその利用、分配といった食物資源の利用様式とそれに立脚した繁殖戦略の機構を明らかにすることができよう。さらにまた、クイムシ間の多様な資源利用と繁殖戦略の様式を比較・検討することによって、クイムシ類の生活史の進化の解明に重要な手がかりが得られるであろう。

8-2. クイムシ類とアンブロシア菌の共進化

8-2-1. クイムシ類の生態的特徴とアンブロシア菌の類縁度について

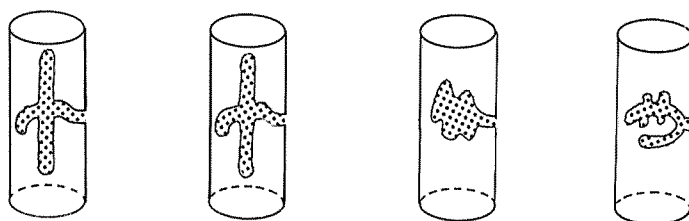
本研究において、クスノオオクイムシ (*Xylosandrus mutilatus*)、ミカドクイムシ (*Scolytotrupes mikado*)、ハネミジカクイムシ (*Xylosandrus brevis*)、サククイムシ (*Xylosandrus crassiusculus*) の主要共生菌 (PAF) である *Ambrosiella* 属の菌の化学的分類実験を行った結果、これら4種の PAF がそれぞれ異なる菌種であることが明らかにされ、また PAF 間の類縁関係が共生するクイムシの分類学上の位置だけでなく生理、生態とも何らかの関連性を持つ可能性が示唆された。また、Nakashima *et al.* (1992) によれば、PAF の種類が各クイムシの形成する坑道のタイプによって異なり、さらに坑道の位置によって PAF が異なる、すなわち複数種の PAF と共生するクイムシも存在すると考えられている。

Ipinae 亜科 *Xylosandrus* 属(クスノオオクイムシ、ハネミジカクイムシ、サククイムシ)と Scolytotrupinae 亜科 *Scolytotrupes* 属(ミカドクイムシ)という、系統分類学的に全く異なるクイムシ間では、習性、性比、mycangia のタイプなど、その生態的特徴に多くの相違点がある(表 8-1; 衣浦ら, 1990; Kinuura and Hiji, 1991)。また、*Xylosandrus* 属の中でも、サククイムシの世代数、越冬段階、坑道型が他の2種と異なるのに対して、クスノオオクイムシとハネミジカクイムシの生態的特徴はきわめて類似している。このようなクイムシ間の生態的特徴の相違性および類似性は、共生する PAF 間の類縁関係、すなわちミカドクイムシの *Ambrosiella* sp. (sp. 2) が他属の3種とかなり疎遠であり、一方でクスノオオクイムシとハネミジカクイムシの *Ambrosiella* sp. (sp. 3) はその類縁度がきわめて高いこととよく一致している。

自然界において、アンブロシア菌の存在場所は、クイムシがその体内に備えている mycangia 内と、彼らが形成する坑道内のみである。したがって、アンブロシア菌はクイムシの mycangia 内と坑道(樹木部位)内の諸環境に適応する方向に進化し、逆にアンブロシア菌を食物とするクイムシの方も、アンブロシア菌の進化の影響をこの部分において最も強

表 8-1. キクイムシ 4 種の生態的特徴の比較.

生態的特徴	キクイムシ種			
	クスノオオキクイムシ <i>Xylosandrus mutilatus</i>	ハネミジカキクイムシ <i>Xylosandrus brevis</i>	サクキクイムシ <i>Xylosandrus crassiusculus</i>	ミカドキクイムシ <i>Scolytoptatypus mikado</i>
世代	1 年 1 世代 (6~8月)	1 年 1 世代 (5~7月)	1 年 2 世代 (7~8月, 9~10月)	1 年 2 世代 (5~6月, 8~9月)
習性	1 夫多妻性	1 夫多妻性	1 夫多妻性	1 夫 1 妻性
性比(♀:♂)	8:1	10:1	10:1	1:1
越冬段階	成虫	成虫	幼虫	成虫
Mycangia 構造	ポーチ状 (前・中胸背)	ポーチ状 (前・中胸背)	ポーチ状 (前・中胸背)	ビット状 (前胸背)
穿入部位	枝条部~枝条部末端	枝条部末端	細幹部~枝条部	樹幹部
フラス状態	短く軟質のチューブ状	短く軟質のチューブ状	長く硬質のチューブ状	粉状
坑道型	長梯子孔 (共同部屋型)	長梯子孔 (共同部屋型)	材質共同孔 (共同部屋型)	梯子孔 (個室型)



く受けるものと思われる。以上のことから、キクイムシ類の生態的特徴の中でも、とくに坑道型や mycangia の類似性が高いほど共生する PAF はより近縁である可能性が示唆される。

樹皮下穿孔性キクイムシに関しては、個体群内の遺伝的変異が明らかにされ、またその行動、形態、分類学的位置、寄主木の樹種との関連性についても研究が進んでいる (Anderson *et al.*, 1979; Florence *et al.*, 1982; Sturgeon and Mitton, 1986; de Groot *et al.*, 1992)。養菌性キクイムシとアンブロシア菌についても、このような遺伝子レベルでの解析を行い、両者あるいは樹木を含めた 3 者間の相互関係に関する至近要因が明らかにになれば、その共進化のメカニズムに関する議論はより説得力のあるものとなろう。

8-2-2. アンブロシア菌における種特異性の進化

キクイムシ類と菌類との共生は、樹皮下穿孔性キクイムシが靱皮部とともにこの部位に伸長してきた菌を偶然に摂食したことからはじまったと考えられている。その後、キクイムシは、栄養価の低い材質部においても菌がキクイムシの成育に必要な栄養源を分解、合成できることを利用して樹幹内部へと進出し、捕食、寄生される危険の高い生息場所である樹皮下から逃れるとともに、その栄養摂取比率を木材からエネルギー効率の良い菌へと次第にシフトさせていった (Batra, 1966; Kirdendall, 1983; Beaver, 1989)。つまり、樹皮下穿孔性キクイムシは、新しい生態学的地位を利用することによってその食性を食靱皮部性から養菌性へと

表 8-2. キクイムシ類とアンブロシア菌との共生機構の特性.

共生関係の形質	共生者の組み合わせ					
	キクイムシ ~ <i>Ambrosiella</i> sp.(PAF)		キクイムシ ~酵母類(AAF)		キクイムシ ~ <i>Paecilomyces</i> sp.(AAF?)	
生物学的機能	積極的 運搬・保護	栄養補給	随伴的 運搬?	栄養補助?	随伴的 運搬?	共存
相対的利益	++	++	+? 0	+?	0	+?
共生者の位置	—	細胞外	—	細胞外	—	細胞外
栄養共生者の生死	—	生存	—	生存	—	—
関係の種特異性	高い (1種のみ)	高い (1種のみ)	低い? (多種)	低い? (多種)	低い? (多種)	低い? (多種)
相互依存度	高い (義務的)	高い (義務的)	低い?	低い?	低い	低い?
関係の一貫性	恒常的 (mycangia 内と坑道内)		一時的継続 (坑道内)		一時的継続 (坑道内)	
副産物の形成	mycangia と分泌液	坑生物質	なし?	微量 栄養素?	なし	なし

転換させたものと考えられている。

これに対して、樹皮下穿孔性キクイムシと養菌性キクイムシは、腐朽材を摂食する食材性を原始的な習性として、それぞれ独立的に進化したという説がある (Schedl, 1958; Berryman, 1989)。すなわち、初期のキクイムシと菌は、ともに材が腐朽した後に侵入し、共存するだけの関係であったが、この中で菌の代謝産物を利用して腐朽材をより早く発見するキクイムシが存在するようになった。この後、植物病原性のある菌と遭遇し、この病原菌を利用したり、あるいはフェロモンを生産して仲間を誘引し、集中攻撃を行うことによって、健全木を自力で枯死させるタイプが出現した。さらに、この過程で菌の病原性を弱めることにより樹木の誘導防御反応を抑え、栄養のある生きた韌皮部に穿入、摂食し始めたグループが、樹皮下穿孔性キクイムシへと進化した。一方、枯死木の材質部で菌との接触を繰り返すうちに坑道内で特定の菌を摂食、繁殖させるように進化したキクイムシが、現在の養菌性キクイムシであると考えられた。野淵 (1974) は、キクイムシ類の外部形態、前胃形態および生活様式に基づき、さらに複雑、多岐にわたる生活型の進化モデルを提出している。

そして、本研究によって、このように進化した養菌性キクイムシが種特異的な共生菌 (PAF) を栄養源としながらも、他種キクイムシの PAF も利用できる潜在能力を有することが初めて明らかにされた。しかも、前述したように、この利用可能な他種の PAF が自種の PAF の近縁種であり、キクイムシ同士も多くの共通する生活様式を持つことは、キクイムシとアンブロシア菌の共進化を考える上で非常に興味深い事実である。さらに、他種の PAF を利用した場合、キクイムシの適応度 (fitness) は低下するという重要な知見も得られた。これらの結果は、キクイムシ類がどのような共進化的過程を経由してアンブロシア菌との緊密な共生システムを成立させたのか、すなわち現在のキクイムシとアンブロシア菌 (PAF) との種特異的な共生関係の進化ルートを説明する新しい仮説を生み出すことができる。ここで、以下に示すような2つの方向性を持つ仮説、1種のキクイムシ対1種のアンブロシア菌とい

う形の共進化説と、複数の種からなるグループ間で起こる拡散された共進化説を提案したい。

まず第一の仮説は、1種対1種型共進化由来の種特異的共生関係 (pairwise coevolutionary mutualism : 以下, PCM) であり、キクイムシと菌類の関係が相利共生的になる以前にすでに1対1の特殊化が起こっていたとする考え方である。これは、樹皮下穿孔性あるいは食材性キクイムシが、遭遇した菌類の胞子 (子実体) を高頻度に摂食することを前提としている。すなわち、菌側は最も高いエネルギーを投資して形成する胞子をキクイムシに摂食されて大きな損失を受けるため、キクイムシの食害に対する物理・化学的防衛機構を発達させるようになる。もしこの時、胞子がキクイムシにとって十分大きい栄養価を含んでいれば、キクイムシは菌の防衛を乗り越えるような対抗手段を持つようになり、両者の軍拡競争の結果、キクイムシの多くは特定の菌に特殊化していくものと考えられる。

このような条件下では、利用される菌側にとって摂食されることは明らかに適応度の低下を招き、逆に利用するキクイムシ側にとってはプラスとなるので、両者の関係はキクイムシに利己的なものとなる。ところが、キクイムシが飛翔分散する際、偶然この菌の胞子を運ぶことによって、菌の適応度が上がる可能性がある。ここで、胞子を運搬されやすくするような突然変異が菌側に生じたとすれば、その系統は、自分のクローンを摂食される損失は変わらないとしても、その一部を新しい生息地へ定着させるという胞子分散機能を通して適応度を高めることができる。たとえば、胞子表面の粘性を大きくすることによってキクイムシの体表に付着しやすくする形質の進化などがこれに相当する。この段階では、キクイムシの方は胞子を偶然に運搬しているだけであり、その適応度には大きな変化はないが、この変異が菌の個体群中に十分広まれば菌の密度が上昇し、この菌に特殊化していたキクイムシに大きなプラスの効果をもたらすことができる。このため、キクイムシの方もより積極的にこの菌を運搬する努力を始め、ついには mycangia という胞子を貯蔵するための特別な器官を産出するようになる。そして、このような変化が蓄積することにより、両者の関係は相利共生的な方向へ進化し、やがてキクイムシは栄養源をこの菌のみに依存するようになるものと推測される。この PCM 仮説においては、起源となるキクイムシ間の生活様式が類似していれば、遭遇する菌類の生態も共通する部分が多いと考えられ、その後の特殊化と共進化により創出されるキクイムシとアンブロシア菌も互いに近縁種となることが予想される。

一方、多種対多種型の共進化的過程を経由して種特異的な共生関係 (diffuse coevolutionary mutualism : 以下, DCM) が成立することも可能である。このルートは、キクイムシが胞子ではなく菌糸体を摂食することから出発する。菌糸体の生体量は胞子よりも十分大きく、また栄養価はかなり低いものと考えられる。したがって、菌糸体を摂食された時の菌側の損失は、胞子の損失に比べてごくわずかであると思われる、キクイムシに対する菌の防衛は起こりにくい。また、キクイムシにとっても大量の菌糸体を摂食しなければ十分な栄養源が得られないので、特定の菌に特殊化する必然性は低いものと考えられる。この結果、キクイムシと菌との初期の関係は、ともに特定の相手を持たない、またほぼ中立的な関係であると推察される。そして、この多対多の関係においても、ある菌群 (または1種の菌) に運搬効率を高くするような突然変異株が出現すればこれらの菌の密度は大きくなり、その中立関係は相利的關係に移行し始める。しかし、キクイムシの栄養摂取効率は、どの菌の密度が高くなっても改善されないで、キクイムシ側としてはこれらの菌に特殊化することの利益は少ない。このため、この時点での両者の関係は少 (または1) 対多のままであると思われる。したがって、このような状況下でいずれかの菌がキクイムシへの報酬を増加させることができれば、その菌は運搬者を独占することが可能になり、菌同士の種間競争においても有利となる。こ

の報酬の増加は、おそらく最初は菌糸の栄養価を高めるという形で始まり、後には孢子を提供するという別の方法が登場したものと推測される。また、これと同調して、クイムシ側もより大きい報酬を与えてくれる菌を優占的に運搬する方法を発達させていくであろう。こうした共進化の結果、菌は多種類のクイムシの中から自分を最も優占的に運搬するパートナーを獲得し、またクイムシは自分の適応度を最も大きくする菌と種特異的関係を構築できるものと推察される。本研究における飼育実験によって、他種のクイムシを育成させることのできる PAF が存在し、この菌による他種クイムシの適応度が自種よりも小さいことは、DCM 型の進化の痕跡を示す一端であるのかもしれない。

8-3. クイムシ類とアンブロシア菌の共生機構の特性

本研究において、クスノオオクイムシの育成に必要な主要共生菌 (PAF) は *Ambrosiella* sp. であり、副次的な共生菌 (AAF) は、シロモジを穿入樹種とする場合には酵母類や *Paecilomyces* sp. であることが示唆された。また、同一樹種内で共存する他の 2 属 3 種のクイムシも、PAF として *Ambrosiella* 属の菌を保持し、これらの菌はクイムシの種ごとにそれぞれ異なることが明らかになった。これらのクイムシ類も、シロモジ由来の AAF として酵母類や *Paecilomyces* sp. と共生しているものと考えられているが (衣浦ら, 1990; Kinuura *et al.*, 1991), これらの菌が本種のものと同一種であるか、また樹種特異的なものであるのかは不明である。しかしながら、養菌性クイムシ類の多くが、種特異的 PAF を主たる栄養源として他の数種の菌類と共生していることは間違いなく、いわゆる多種間共生関係 (polyphilic symbiosis) を形成しているものと考えられる。そして、坑道内における共生菌の遷移様式は、クイムシの成育段階とともに本論で示したようなモデル (第 4 章) によってほぼ近似でき、また mycangia 内における共生菌の挙動およびそのメカニズムも、本章のシエマを用いて十分説明できるものと考えられる。さらに、本研究で得られた結果および過去の知見を総合して、クイムシ類と各アンブロシア菌との共生機構を Ahmadjian and Paracer (1986) の分類に基づき比較・整理すれば、その特性はおおよ次のように一般化できるであろう (表 8-2)。

クイムシは、PAF が樹木の材質部から分解、合成した産物を栄養源として利用している。木質部は、クイムシ自身の持つ消化酵素のみでは分解困難であるセルロースとリグニンで構成され、また窒素分やタンパク質、ビタミン類などの栄養分も不足している (Haack and Slansky, 1987)。したがって、クイムシは PAF を直接的に摂食することによって、低栄養基質から栄養価の高い食物を効率的に獲得することができるものと考えられる。一方、PAF は、クイムシの mycangia 内で優占的に培養、保護されることにより、風などの信頼性の低い媒体による自然分散に比べて、安全かつ確実に新しい生息地へ運搬されている。さらに、材組織が露出して物理的あるいは化学的に侵入しやすい状態にある坑道内壁に直接接種され、また坑道内の諸環境をその生育に好適になるように調整してもらうことによって、PAF は坑道内でも優占的に繁殖することができる。このように、PAF とクイムシとの間には、栄養源の獲得というクイムシ側の利益と好適な生息地への運搬および環境変化からの保護という PAF 側の利益との交換による相利共生関係 (mutualism) が成立しているものと考えられる。また、この関係は生物学的機能の面からみれば消化・運搬共生系に相当し、PAF が宿主であるクイムシの細胞外に存在することから外部共生 (ectosymbiosis) に分類される。なお、PAF はクイムシによって明らかに生存したまま摂食されている (biotrophic symbiosis)。

PAF とキクイムシはそれぞれ多くの近縁種を含んでいるが、両者の共生関係はおそらく 1 対 1 の種特異的なものであると考えられる。したがって、この関係は、お互いに他者の存在なしには繁殖できない、きわめて相互依存度の高い義務的な共生関係 (obligate symbiosis) である。そして、この共生関係が義務的であるために、両者間には共進化がより強く起こり (Boucher *et al.*, 1982), その結果、キクイムシは食物となる PAF を次世代に伝達するために mycangia という構造や機能の特殊化した孢子貯蔵器官を発達させ、一方 PAF 側は、他の菌類の繁殖を抑制するような抗生物質を生産し、また mycangia という特殊な環境に適応してこの器官内での生育形式を酵母型に変化させている。また、キクイムシによる共生菌の獲得戦略、すなわち幼虫が自分の摂食した PAF を脱蛹直後に坑道内から mycangia 内に取り込むことによって、両者の共生関係はその接触場所をサイクリックに転換させながら、ほぼ恒常的に一貫性を持続しているものと考えられる。

これに対して、AAF はキクイムシによって能動的に培養、運搬されているものではないと思われる。しかし、AAF は坑道内でキクイムシと共存しており、その成長過程で PAF ほど積極的ではないものの、幼虫あるいは新成虫によって摂食されているか、または間接的にキクイムシ体内に流入している可能性がある。そして、AAF が存在してもキクイムシの正常な発育がみられることから、AAF はキクイムシの次世代生産にそれほど不利な影響を及ぼしておらず、とくに酵母類についてはその成長に必要な微量栄養素を供給している可能性もある。したがって、AAF とキクイムシとの共生関係は原始的共同 (protocooperation) あるいは偏利共生 (commensalism) と呼ぶべきものであり、両者の関係は非義務的かつ坑道内だけに限定された一時的なものであると考えられる。また、AAF がキクイムシの mycangia 内で選択的に培養されず、キクイムシの成育も AAF に依存していないことから、AAF の多くは多種のキクイムシと共生する、つまり両者の共生関係の種特異性は低いことが予想される。しかし、この AAF のキクイムシ種特異性については、多種のキクイムシの AAF を正確に同定し、その種構成を比較することによって初めてその真偽を明らかにすることができる。また、AAF と穿入樹種との関連性や坑道内への侵入経路についても、キクイムシとアンブロシア菌との共生システムを考える上で、今後明らかにすべき必要があろう。

以上述べてきたように、キクイムシはその貢献度にいくらかの差異はあるものの、PAF と AAF と複合的に共生していると考えられる。そして、本研究では明らかにできなかったが、これらの共生菌間では多様な相互作用が生じており、この相互作用はキクイムシの存在により複雑高度化し、各共生者に何らかの影響を与えているものと推測される。同様に、Haanstad and Norris (1985) の示唆した、バクテリアや細菌類を含めた共生微生物複合体 (mutualistic microbial complex) を考えれば、この複合体にさらに多くの相互作用系が存在することは容易に想像できよう。このような様々な相互作用の影響を受けながら、キクイムシは mycangia および坑道内に生息する多種多様な微生物集団とともに全体として持続的に共存しているようにみえる。しかしながら、共生者同士は自分自身の適応度を低下させてまで協力し合っているわけではなく、適応度に対する利益が損失を相対的に上回った場合にのみ協力していると考えられる。つまり、共生関係は自然選択の圧力がある中でそれぞれの共生者がお互いを利用し合った結果としての提携に過ぎないと考えられる。

さらに、この共生系においては、ある共生者の作用の変化に対応して他の共生者の形質が変化し、この変化がさらに他者の作用や形質の変化を促進するという、連鎖的かつ継続的な相互適応が起っていると予想される。したがって、共生系は決して固定化したものではなく、生態的条件によっては十分変化する可塑的なものであり、現在のキクイムシと PAF と

の種特異的共生関係も、AAF や他の共生微生物の突然変異、あるいは新たな微生物との遭遇などにより今後さらにダイナミックな様相を示す可能性がある。すなわち、本論において提出した共進化由来の種特異的共生関係 (PCM および DCM) の成立仮説で示したように、共進化の作用は共生関係の緊密性、特殊性を増大する方向に働くが、ある共生者に対する特殊化は必ずしも促進されるだけでなく、他の共生者の移出入や形質変異の程度によっては抑制もされうる不安定なものと考えられ、場合によっては種特異的パートナーが置換する可能性もあると推測される。つまり、現在のキクイムシとアンブロシア菌との共生関係は、長い進化の過程で形成されてきたある時間的断面での途中経過に過ぎないと考えられる。

養菌性キクイムシの中には、さらに多様な生態や生活様式を有するものが数多く存在し、また mycangia を備える樹皮下穿孔性キクイムシも発見されている。今後、これらのキクイムシとその共生菌の調査を行うことによって各キクイムシ類と共生菌との共生システムを解明し、またそれぞれのシステムを両者の連続的な共進化系統樹上の諸段階に位置づけ、総合化することによって、キクイムシ類と菌類との種分化の機構とその共進化的意義を明らかにしていきたい。

謝 辞

本研究は、名古屋大学農学部森林保護学研究室の肘井直樹助教授の御指導のもとで行われた。研究の遂行から本論文の作成にいたるまで、あらゆる面において丁寧なる御教示、御助力を頂いた。日頃の絶えざる御指導と激励とあわせて、心から深甚なる感謝の意を表したい。

森林保護学研究室の柴田毅式教授には、本論文の作成において適切な御指導を賜るとともに暖かい励ましを頂いた。ここに、心から謝意を表する次第である。また、名古屋大学農学部の只木良也教授、東京大学農学部の古田公人教授からは、御多忙にもかかわらず、それぞれの御専門の立場から本論文に関して数々の貴重な御意見、御批評を頂いた。心から厚く御礼申し上げる。

北海道大学農学部の中島敏夫名誉教授、飯塚敏彦教授には、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察方法について丁寧な御指導と養菌性キクイムシに関する様々な御教示を頂いた。名古屋大学農学部の故西村正陽教授、柘植尚志助教授からは、分離培養法をはじめとして菌類に関する多大なる御指導、御教示を賜った。また、信州大学農学部の林 康夫教授、森林総合研究所の島津光明博士、および元林業試験場樹病科長の佐保春芳博士には糸状菌類の同定について、東京家政大学の曾根田正己教授、名古屋大学農学部の川北一人博士には酵母類の同定について数多くの御教示を賜った。さらに、電気泳動法については、名古屋大学農学部の柳沼利信博士、北海道大学農学部の飯塚敏彦教授、静岡大学農学部の山田雄三教授から丁寧な御指導、貴重な御教示を頂いた。なお、柳沼利信博士には、実験の遂行においても多大なる御協力を頂いた。これらの方々の御助力が無くしては、本研究は到底達成しえないものであった。心から厚く御礼申し上げる。

名古屋大学農学部附属稲武演習林の山田金二、青木重昌、今泉保次技官、稲武町古橋会の北原宣幸氏には、演習林および調査林分の使用をはじめとして、何かと御面倒をおかけし、また数々の御便宜を図って頂いた。名古屋大学理学部 (現：年代測定資料研究センター) の永井ひろ美助手、元農学部技官の小林拓次郎氏にも、SEM の使用に際して幾多の便宜を図って頂いた。これらの方々にこの場をお借りして心から謝意を表する次第である。

また、本研究に取り組むきっかけを与えて下さるとともに、数多くの御教示を賜った森林保護学研究室の衣浦晴生博士 (現：森林総合研究所東北支所)、数々の協力と示唆に富む討論の場を与えられた浦野忠久氏 (現：森林総合研究所関西支所)、加藤一隆氏 (現：関西林木育種センター) に心から厚く御礼申し上げる。当研究室の大学院学生の大野義徳氏、彭 旭東氏、石田 朗氏、福田秀志氏、平野恭弘氏、吉田和広氏、および歴代の学部専攻学生諸氏にも、様々な形で惜しめない御協力を頂いた。これらの方々にも、心よりの感謝の意を表したい。

最後に、学部学生時から博士課程後期 2 年まで御指導を頂き、またつねに暖かい励ましと御支援を頂いた名古屋大学農学部森林保護学研究室の金光桂二元教授に、この場をお借りして改めて感謝の意を表するとともに、本論文の完成を御報告申し上げます。

引用文献

- Ahmadjian, V. and Paracer S. (1986) Symbiosis : an introduction to biological associations. 212pp. Univ. Press of New England, Hanover and London.
- 赤堀 宏 (1982) 医学・生物学電子顕微鏡観察法 (日本電子顕微鏡学会関東支部編). 379 頁. 丸善, 東京.
- Anderbrant, O. (1990) Gallery construction and oviposition of the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera : Scolytidae) at different breeding densities. Ecol. Entomol. **15** : 1-8.
- Anderson, W. W., Berisford, C. W. and Kimmich, R. H. (1979) Genetic differences among five populations of the southern pine beetle. Ann. Entomol. Soc. Am. **72** : 323-327.
- 青木襄児 (1989) 昆虫病原菌の検索. 280 頁. 全国農村教育協会, 東京.
- 青島清雄・椿 啓介・三浦宏一郎 (1983) 菌類研究法. 423 頁. 共立出版, 東京.
- Atkins, M. D. (1967) The effect of rearing temperature on the size and fat content of the douglas-fir beetle. Can. Entomol. **99** : 181-187.
- Atkinson, T. H. and Equihua-Martinez, A. (1986) Biology of bark and ambrosia beetles (Coleoptera : Scolytidae and Platypodidae) of a tropical rain forest in southeastern Mexico with an annotated checklist of species. Ann. Entomol. Soc. Am. **79** : 414-423.
- Atlas, R. M. and Bartha, R. (1987) Microbial Ecology : Fundamentals and Applications (2nd edition). 533pp. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California.
- 馬場金太郎・平嶋義宏 (1992) 昆虫採集学 (第 2 版). 678 頁. 九州大学出版会, 福岡.
- Baker, J. M. and Norris, D. M. (1968) A complex of fungi mutualistically involved in the nutrition of the ambrosia beetle *Xyleborus ferrugineus*. J. Invertebr. Pathol. **11** : 246-250.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1987) Illustrated genera of imperfect fungi (4th edition). 218pp. Macmillan Publishing Company, New York.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. (1990) Yeasts : characteristics and identification (2nd edition). 1002pp. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Barras, S. J. and Perry, T. (1972) Fungal symbionts in the prothoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis* (Coleopt. : Scolytidae). Z. Angew. Entomol. **71** : 95-104.
- Batra, L. R. (1963) Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. Trans. Kansas Acad. Sci. **66** : 213-236.
- Batra, L. R. (1966) Ambrosia fungi : extent of specificity to ambrosia beetles. Science **153** : 193-195.
- Batra, L. R. (1967) Ambrosia fungi : a taxonomic revision, and nutritional studies of some species. Mycologia **59** : 976-1017.
- Batra, S. W. T. and Batra, L. R. (1967) The fungus gardens of insects. Sci. Am. **217** : 112-120.
- Batra, L. R. (1985) Ambrosia beetles and their associated fungi : research trends and techniques. Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.) **94** : 137-148.
- Batra, L. R., Batra, S. W. T. and Nakashima, T. (1986) Some techniques to study

- ambrosia beetles and their associated fungi. Memoirs of Hokkaido Musashi Women's Junior College 18 : 73-94.
- Beaver, R. A. (1974) Intraspecific competition among bark beetle larvae (Coleoptera : Scolytidae). J. Anim. Ecol. 43 : 455-467.
- Beaver, R. A. and Browne, F. G. (1979) The Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera) of Penang, Malaysia. Orient. Insects 12 : 575-624.*
- Beaver, R. A. (1979) Host specificity of temperate and tropical animals. Nature 281 : 139-141.
- Beaver, R. A. (1989) Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. In Insect-Fungus Interactions (Wilding, N., Collins, N. M., Hammond, P. M. and Webber, J. F. eds.), 121-143. Academic Press, London.
- Berryman, A. A. (1989) Adaptive pathways in scolytid-fungus associations. In Insect-Fungus Interactions (Wilding, N., Collins, N. M., Hammond, P. M. and Webber, J. F. eds.), 145-159. Academic Press, London.
- Boucher, D. M., James, S. and Keeler, K. H. (1982) The ecology of mutualism. Ann. Rev. Ecol. Syst. 13 : 315-347.
- Carpenter, S. E. (1988) *Ambrodiscus*, a new genus of inoperculate discomycetes from ambrosia beetle galleries. Mycologia 80 : 320-323.
- Chapman, J. A. (1966) The effect of attack by the ambrosia beetle *Trypodendron lineatum* (Olivier) on log attractiveness. Can. Entomol. 98 : 50-59.
- Chapman, J. A. and Dyer, E. D. A. (1969) Characteristics of Douglas-fir logs in relation to ambrosia beetle attack. For. Sci. 15 : 95-101.
- Charnov, E. L. (1982) The theory of sex allocation. 355pp. Princeton Univ. Press, Princeton.
- Coats, S. A., Wicker, L. and McCoy, C. W. (1990) Protein variation among fuller rose beetle populations from Florida, California, and Arizona (Coleoptera : Curculionidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 83 : 1054-1062.
- Cooke, R. C. and Rayner, A. D. M. (1984) Ecology of Saprotrophic Fungi. 415pp. Longman, London and New York.
- de Bary, A. (1879) Die Erscheinung der Symbiose.*
- de Groot, P., Harvey, G. T. and Roden, P. M. (1992) Genetic divergence among eastern north American cone beetles, *Conophthorus* (Coleoptera : Scolytidae). Can. Entomol. 124 : 189-199.
- Doane, R. W. and Gilliland, O. J. (1929) Three Californian ambrosia beetles. J. Econ. Entomol. 22 : 915-921.*
- Ehrlich, P. R. and Raven, P. H. (1967) Butterflies and plants. Sci. Am. 216 : 104-113.
- Fisher, R. C., Thompson, G. H. and Webb, W. E. (1953) Ambrosia beetles in forest and sawmill. Their biology, economic importance and control. Part I. Biology and economic importance. For. Abst. 14 : 381-389.
- Florence, L. Z., Johnson, P. C. and Coster, J. E. (1982) Behavioral and genetic diversity during dispersal : analysis of a polymorphic esterase locus in southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*. Environ. Entomol. 11 : 1014-1018.

- Foltz, J. L., Mayyasi, A. M., Hain, F. P., Coulson, R. N. and Martin, W. C. (1976) Egg-gallery length relationship and within-tree analyses for the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera : Scolytidae). Can. Entomol. **108** : 341-352.
- Francke-Grosmann, H. (1956) Hautdrüsen als Träger der Pilzsymbiose bei ambrosiakäfern. Z. Morphol. Oekol. Tiere. **45** : 275-308.*
- Francke-Grosmann, H. (1963) Some new aspects in forest entomology. Ann. Rev. Entomol. **8** : 415-438.
- Francke-Grosmann, H. (1967) Ectosymbiosis in wood-inhabiting insects. In Symbiosis Vol. 2 (Henry, S. M. ed.), 141-205. Academic Press, New York and London.
- French, J. R. J. and Roeper, R. A. (1972) Interactions of the ambrosia beetle, *Xyleborus dispar* (Coleoptera : Scolytidae), with its symbiotic fungus *Ambrosiella hartigii* (fungi imperfecti). Can. Entomol. **104** : 1635-1641.
- French, J. R. J. and Roeper, R. A. (1975) Studies on the biology of the ambrosia beetle *Xyleborus dispar* (F.) (Coleoptera : Scolytidae). Z. Angew. Entomol. **78** : 241-247.
- Graham, S. A. (1952) Forest Entomology (3rd edition). 351pp. McGraw-Hill, New York.*
- Gusteleva, L. A. (1982) The interaction of wood-decomposing insects with microorganisms. In Konsortivnye Svyazi Derevai Dendrofil'nykh Nasekomykh (Isaev, A. S., ed.), 56-67.*
- Haack, R. A. and Slansky, F. (1987) Nutritional ecology of wood-feeding Coleoptera, Lepidoptera, and Hymenoptera. In Nutritional Ecology of Insects, Mites and Spiders (Slansky, Jr. F. and Rodriguez, J. G. eds.), 449-486. Wiley, New York.
- Haanstad, J. O. and Norris, D. M. (1985) Microbial symbiotes of the ambrosia beetle *Xyloterinus politus*. Microb. Ecol. **11** : 267-276.
- Hanson, L. C. and Wells, K. (1991) Characterization of three *Tremella* species by isozyme analysis. Mycologia **83** : 446-454.
- Happ, G. M., Happ, C. M. and Barras, S. J. (1971) Fine structure of the prothoracic mycangium, a chamber for the culture of symbiotic fungi, in the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*. Tissue & Cell **3** : 295-308.
- Harborne, J. B. (1977) Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press. London.*
- Hartig, T. (1844) Ambrosia des *Bostrychus dispar*. Allg. Forst-Jagdzeit. **13** : 73-74.*
- 原口隆英・寺島典二・臼田誠人・越島哲夫・坂井克己・諸星紀幸・寺谷文之・甲斐勇二・志水一允・榊原 彰 (1985) 木材の化学. 288 頁. 文永堂出版, 東京.
- 長谷川武治 (1984) (改訂版) 微生物の分類と同定 (上). 310 頁. 学会出版センター, 東京.
- 林 匡夫・森本 桂・木元新作 (1984) 原色日本甲虫図鑑Ⅳ. 438 頁. 保育社, 大阪.
- 東 正彦・安部琢哉 (1992) 地球共生系とは何か. 262 頁. 平凡社, 東京.
- 平井秀松・織田敏次・松橋 直・島尾和男 (1989) 新版電気泳動実験法 (電気泳動学会編). 546 頁. 文光堂, 東京.
- Hubbard, H. C. (1897) The ambrosia beetles of the United States. U. S. Dept. Agr. Div. Entomol. Bull. **7** : 9-35.*
- 飯塚 廣・後藤昭二 (1973) 酵母の分類同定法 (第2版). 183 頁. 東京大学出版会, 東京.
- 一瀬太良・石原 廉・松本義明・大羽 滋・岡田益吉・斎藤哲夫・吉武成美 (1980) 昆虫実

- 験法一材料・実習編一. 283 頁. 学会出版センター, 東京.
- 石川 統(1992)小さな世界の共生. “地球共生系とは何か” (東 正彦・安部琢哉編), 12-39. 平凡社, 東京.
- 加辺正明 (1959) 日本産キクイムシ類食痕図説. 290 頁. 明文堂, 東京.
- Kaneko, T. (1965) Biology of some scolytid ambrosia beetles attacking tea plants I. Growth and development of two species of scolytid beetles reared on sterilized tea plants. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. **9** : 211-217.
- Kaneko, T. and Takagi, K. (1965) Biology of some scolytid ambrosia beetles attacking tea plants IV. Parthenogenesis of *Xyleborus germanus* BLAN. in relation to the *Germanus* ambrosia fungus. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. **9** : 303-304.
- Kaneko, T., Tamaki, Y. and Takagi, K. (1965) Preliminary report on the biology of some scolytid beetles, the tea root borer, *Xyleborus germanus* BLANDFORD, attacking tea roots, and the tea stem borer, *Xyleborus compactus* EICHHOFF, attacking tea twigs. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. **9** : 23-29.
- Kaneko, T. and Takagi, K. (1966) Biology of some scolytid ambrosia beetles attacking tea plants VI. A comparative study of two ambrosia fungi associated with *Xyleborus compactus* EICHHOFF and *Xyleborus germanus* BLANDFORD (Coleoptera : Scolytidae). Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. **10** : 173-176.
- Kingsolver, J. G. and Norris, D. M. (1977) The interaction of *Xyleborus ferrugineus* (Coleoptera : Scolytidae) behavior and initial reproduction in relation to its symbiotic fungi. Ann. Entomol. Soc. Am. **70** : 1-4.
- 衣浦晴生・肘井直樹・金光桂二 (1990) *Xylosandrus* 属 2 種のキクイムシの共生菌. 日林誌 **72** : 441-445.
- Kinuura, H. and Hijii, N. (1991) Life history and reproduction of the ambrosia beetle, *Scolytoptatypus mikado* BLANDFORD (Coleoptera, Scolytidae). Jpn. J. Ent. **59** : 763-773.
- Kinuura, H., Hijii, N. and Kanamitsu, K. (1991) Symbiotic fungi associated with the ambrosia beetle, *Scolytoptatypus mikado* BLANDFORD (Coleoptera : Scolytidae)-succession of the flora and fungal phases in the gallery system and the mycangium in relation to the developmental stages of the beetle-. J. Jpn. For. Soc. **73** : 197-205.
- Kirkendall, L. R. (1983) The evolution of mating systems in bark and ambrosia beetles (Coleoptera : Scolytidae and Platypodidae). Zool. J. Linn. Soc. **77** : 293-352.
- Kok, L. T., Norris, D. M. and Chu, H. M. (1970) Sterol metabolism as a basis for a mutualistic symbiosis. Nature **225** : 661-662.
- Kok, L. T. (1979) Lipids of ambrosia fungi and the life of mutualistic beetles. In Insect-Fungus Symbiosis (Batra, L. R. ed.), 33-52. Allanheld and Osmun, Montclair, New Jersey.
- 駒形和男 (1982) 微生物の化学分類実験法. 352 頁. 学会出版センター, 東京.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227** : 680-685.
- Margulis, L. (1981) Symbiosis in cell evolution. 419pp. W. H. Freeman, San Francisco.*
- Micales, J. A., Bonde, M. R. and Peterson, G. L. (1986) The use of isozyme analysis in

- fungus taxonomy and genetics. *Mycotaxon* **27** : 405-449.
- 松本忠夫(1992)昆虫の消化共生系. “地球共生系とは何か”(東 正彦・安部琢哉編), 40-57. 平凡社, 東京.
- Nakashima, T. (1979) Notes on the time when the new female adults of the ambrosia beetle *Crossotarsus niponicus* BLANDFORD (Coleoptera : Platypodidae) harvest their symbiotic fungi into their mycetangia. *Ins. Matsum. N. S.* **17** : 1-19.
- Nakashima, T., Iizuka, T., Ogura, K., Maeda, M. and Tanaka, T. (1982) Isolation of some microorganisms associated with five species of ambrosia beetles and two kinds of antibiotics produced by Xv-3 strain in these isolates. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **61** : 60-72.
- Nakashima, T., Goto, C. and Iizuka, T. (1987) The primary and auxiliary ambrosia fungi isolated from the ambrosia beetles, *Scolytoptatypus shogun* BLANDFORD (Coleoptera : Scolytidae) and *Crossotarsus niponicus* BLANDFORD (Coleoptera : Platypodidae). *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **63** : 185-208.
- Nakashima, T. (1989) Observation on the ambrosia fungus, *Ambrosiella* sp., growing in the gallery of *Scolytoptatypus shogun* BLANDFORD (Coleoptera : Scolytidae) and on the concurrent damage of wood tissue. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **64** : 99-105.
- Nakashima, T., Otomo, T., Owada, Y. and Iizuka, T. (1992) SEM observations on growing conditions of the fungi in the galleries of several ambrosia beetles (Coleoptera : Scolytidae and Platypodidae). *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **65** : 239-273.
- Neger, F. W. (1908) Ambrosiapilze. *Ber. Deut. Botan. Ges.* **26** : 735-745.*
- Neger, F. W. (1911) Zur Übertragung des Ambrosiapilzes von *Xyleborus dispar*. *Naturwiss. Z. Land-Forstwirtschaft.* **9** : 223-225.*
- Nicholson, A. J. (1954) An outline of the dynamics of animal populations. *Austral. J. Zool.* **2** : 9-65.*
- Nobuchi, A. and Takahashi, K. (1965) Male of *Xyleborus mutilatus* Blandford and a new species of *Cryphalus* Erichson. *Akitu* **13** : 1-3.
- 野淵 輝 (1974) キクイムシ類の生活型の進化. *植物防疫* **28** : 75-81.
- 野淵 輝 (1980a) シイタケほだ木のアンブロシア穿孔虫(II). *森林防疫* **29** : 109-115.
- 野淵 輝 (1980b) 外材のキクイムシ類(Ⅰ)-生態, 南洋材と米材のキクイムシの同定分類-. 75 頁. 林業科学技術振興所, 東京.
- Noguera-Martinez, F. A. and Atkinson, T. H. (1990) Biogeography and biology of bark and ambrosia beetles (Coleoptera : Scolytidae and Platypodidae) of a mesic montane forest in Mexico, with an annotated checklist of species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **83** : 453-466.
- Norris, D. M. (1966) Chemical interdependencies among *Xyleborus* spp. ambrosia beetles and their symbiotic microbes. *In Organismen und Holz. International symposium, Berlin-Dahlem 1965* (Becker, G. and Liese, W. eds.), 479-488.
- Norris, D. M. and Baker, J. K. (1967) Symbiosis : effects of a mutualistic fungus upon the growth and reproduction of *Xyleborus ferrugineus*. *Science* **156** : 1120-1122.
- Norris, D. M. (1979) The mutualistic fungi of Xyleborini beetles. *In Insect-Fungus*

- Symbiosis (Batra, L. R. ed.), 53-63. Allanheld and Osmun, Montclair, New Jersey.
- Norris, D. M. and Chu, H. M. (1985) *Xyleborus ferrugineus*. In Handbook of Insect Rearing Vol. I (Singh, P. and Moore, R. F. eds.), 303-315. Elsevier, Amsterdam.
- Nunberg, M. (1951) Contribution to the knowledge of prothoracic glands of Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera). Ann. Mus. Zool. Pol. 14 : 261-266.
- Paine, T. D. and Birch, M. C. (1983) Acquisition and maintenance of mycangial fungi by *Dendroctonus brevicornis* LeConte (Coleoptera : Scolytidae). Environ. Entomol. 12 : 1384-1386.
- Pianka, E. R. (1988) Evolutionary Ecology (4th. edition). 468pp. Harper & Row Publishers, New York.
- Price, P. W. (1984) Alternative paradigms in community ecology. In A New Ecology : Novel Approach to Interactive Systems (Price, P. W., Slobodchikoff, C. N. and Gaud, W. S. eds.), 353-383. Wiley, New York.
- Reynolds, M., Weinhold, A. R. and Morris, T. J. (1983) Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. Phytopathology 73 : 903-906.
- Safranyik, L. (1976) Size and sex-related emergence, and survival in cold storage, of mountain pine beetle adults. Can. Entomol. 108 : 209-212.
- Sahota, T. S. and Thomson, A. J. (1979) Temperature induced variation in the rates of reproductive processes in *Dendroctonus rufipennis* (Coleoptera : Scolytidae) : a new approach to detecting changes in population quality. Can. Entomol. 111 : 1069-1078.
- Saunders, J. L. and Knoke, J. K. (1967) Diets for rearing the ambrosia beetle *Xyleborus ferrugineus* (Fabricius) in vitro. Science 157 : 460-463.
- Schedl, K. E. (1958) Breeding habits of arboricole insects in Africa. Proc. Int. Congr. Entomol., 10th 1957, 1 : 183-197.*
- Schmidberger, J. (1836) Naturgeschichte des Apfelborkenkäfers *Apathe dispar*, Beiträge zur Obstbaumzucht und zur Naturgeschichte der den Obstbäumen. Schädlichen Insekten 4 : 213-230.*
- Schneider, I. A. and Rudinsky, J. A. (1969) Mycetangial glands and their seasonal changes in *Gnathotrichus retusus* and *G. sulcatus*. Ann. Entomol. Soc. Am. 62 : 39-43.
- Shechter, Y., Landau, J. W. and Dabrowa, N. (1972) Comparative electrophoresis and numerical taxonomy of some *Candida* species. Mycologia 64 : 841-853.
- Shore, T. L., McLean, J. A. and Zanuncio, J. C. (1987) Reproduction and survival of the ambrosia beetle *Trypodendron lineatum* (Oliv.) (Coleoptera : Scolytidae) in Douglas-fir and western hemlock logs. Can. Entomol. 119 : 131-139.
- Smith, D. C. and Douglas, A. (1987) The biology of symbiosis. 302pp. Edward Arnold, London.*
- Starr, M. P. (1975) A generalized scheme for classifying organismic associations. In Symbiosis : Symposia of the Soc. for Experimental Biology (Jennings, D. H. and Lee, D. L., eds.), No. 29, 1-10. Cambridge Univ. Press, Cambridge.*
- Stevens, G. C. (1986) Dissection of the species-area relationship among wood-boring

- insects and their host plants. *Am. Nat.* **128** : 35-46.
- Sturgeon, K. B. and Mitton, J. B. (1986) Allozyme and morphological differentiation of mountain pine beetles *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (Coleoptera : Scolytidae) associated with host tree. *Evolution* **40** : 290-302.
- 高木一夫 (1967) アンブロシア甲虫類の研究展望 ハンノキキクイムシ, シイノコキクイムシを中心にして. 茶業技術研究 **34** : 1-10.
- 宇田川俊一・椿 啓介・堀江義一・三浦宏一郎・箕浦久兵衛・山崎幹夫・横山竜夫・渡辺昌平 (1978a) 菌類図鑑(上). 792 頁. 講談社, 東京.
- 宇田川俊一・椿 啓介・堀江義一・三浦宏一郎・箕浦久兵衛・山崎幹夫・横山竜夫・渡辺昌平 (1978b) 菌類図鑑(下). 556 頁. 講談社, 東京.
- von Arx, J. A. (1981) The genera of fungi sporulating in pure culture (3rd edition). 424pp. A. R. Gantner Verlag K. G., Vaduz.
- Weber, B. C. and McPherson, J. E. (1983) Life history of the ambrosia beetle *Xylosandrus germanus* (Coleoptera : Scolytidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **76** : 455-462.
- Whitney, H. S. (1971) Association of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera : Scolytidae) with blue stain fungi and yeasts during brood development in lodgepole pine. *Can. Entomol.* **103** : 1495-1503.
- Whitney, H. S. (1982) Relationships between bark beetles and symbiotic organisms. *In* Bark Beetles in North American Conifers (Mitton, J. B. and Sturgeon, K. B., eds.), 183-211. Univ. of Texas Press, Austin.*
- Wood, S. L. (1989) Nomenclatural changes and new species of Scolytidae (Coleoptera), part IV. *Great Basin Naturalist* **49** : 167-185.
- Yamada, Y., Banno, I., von Arx, J. A. and van der Walt, J. P. (1987) Taxonomic significance of the coenzyme Q system in yeasts and yeast-like fungi. *In* The expanding realm of yeast-like fungi (de Hoog, G. S., Smith, M. Th. and Weijman, A. C. M., eds.), 299-308. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- 山里一英・宇田川俊一・児玉 徹・森地敏樹 (1986) 微生物の分離法. 902 頁. R & D プラニンング, 東京.
- Zhang, Q. H., Byers, J. A. and Schlyter, F. (1992) Optimal attack density in the larch bark beetle, *Ips cembrae* (Coleoptera : Scolytidae). *J. Appl. Ecol.* **29** : 672-678.
- (* : indirectly cited)

摘 要

養菌性クイムシ (ambrosia beetle) は、樹木を介した昆虫と微生物との相互関係における進化の過程で、アンブロシア菌 (ambrosia fungi) と総称される菌類を自分の食糧として積極的に利用する習性を獲得した昆虫群である。本研究では、養菌性クイムシの一種であるクスノオオクイムシとアンブロシア菌の共生機構とその適応的意義を解明することを目的として、野外調査と実験的手法を併用した総合的な研究を行った。具体的には、(1)名古屋大学農学部附属演習林に隣接する広葉樹林 (愛知県北東部) における本種個体群の生態調査、(2)その坑道内および(3)孢子貯蔵器官 (mycangia) 内共生菌の走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察と分離培養実験、(4)本種の人工飼育実験、(5)アンブロシア菌の化学的分類実験を行った。

その結果、以下のことが明らかにされた。

(1) クスノオオクイムシ個体群の生態的特徴

- ① 本種は、本調査地において1年で1世代を経過した。飛翔分散は雌成虫のみが行い、7月下旬をピークとして6月下旬から9月上旬まで続いた。性比は、約1:8(♂:♀)であった。
- ② 寄主木の樹種別にみると、シロモジへは、本種を含む多種のクイムシが穿孔した。コハウチワカエデにおいては、本種が優占的に穿孔した。これらの寄主木への単木 (主樹幹) あたりの本種の穿孔数は、ウリハダカエデとリョウブよりも多かった。リョウブへは、他種のクイムシ類の穿孔も少なかった。
- ③ 本種の産卵坑道率は、ウリハダカエデ、リョウブ、シロモジ、コハウチワカエデの順に大きくなり、ウリハダカエデにおける繁殖成功率は他の樹種の約50%以下となった。また、ウリハダカエデにおける雌新成虫数が約2, 3個体であったのに対し、他の樹種では平均5個体以上であった。
- ④ 雌成虫は、水平坑道の完成後、垂直坑道を約1 cm 形成した時点 (供試木伐倒後20日以内) で産卵を開始し、卵を数個ずつ塊状に産下した。また成虫は、穿入孔を蜘蛛糸状の膜で封鎖することが初めて明らかになった。
- ⑤ 孵化幼虫は、産卵開始後20日間で蛹化、羽化した。この時期の坑道内には、卵から新成虫までの全成育ステージの個体が混在していた。子孫数は、供試木伐倒から60日後まで増加したが、その後は雄成虫の脱出と餌不足による幼虫の死亡により減少した。垂直坑道は幼虫期から蛹期にかけて約2倍に拡張され、幼虫の成育終了後 (おそらく新成虫により) さらに延長された。最終的に、本種の坑道の全長は平均6 cm となった。
- ⑥ 全成育ステージにおいて、坑道あたりの子孫数と坑道長との間には、正の相関が認められた。しかし、回帰直線の傾き (回帰係数) は、卵期 (0.68) ~蛹期から新成虫期~越冬期 (0.16) にかけて大きく低下した。
- ⑦ 各坑道あたりの雌蛹および雌新成虫の平均生重は、坑道長6 cm 以下の場合、極端に小さい場合があった。また、坑道長6 cm で坑道を二分し、それぞれの次世代の平均生重と体サイズの頻度分布を比較した。その結果、6 cm 以上の坑道の平均生重は6 cm 以下のものより有意に大きかったが、体サイズの分布範囲はほぼ同一であった。
- ⑧ 同一坑道内の各個体 (5個体以上) の成育時期を、蛹は坑道内における新成虫の有無、新成虫は体色によりグループ分けし、これらの成育時期グループに含まれる蛹および新成虫の生重頻度分布を比較した。その結果、蛹、新成虫ともに早い時期に成育した個体

の方が平均生重が有意に大きく、また生重の範囲もより大きい方へとシフトしていた。

(2) 坑道内共生菌

- ① シロモジ材の水平坑道から直接接種法により分離された共生菌は、主に *Ambrosiella* sp., 酵母類, *Paecilomyces* sp. であった。穿入・産卵期には、*Ambrosiella* sp. が優占種であったが、その後は酵母類, *Paecilomyces* sp. が次第に優占的となった。また、コハウチワカエデ、ウリハダカエデ、リョウブの穿入・産卵期の水平坑道からも *Ambrosiella* sp. が優占的に分離された。
- ② 希釈平板法によっても、*Ambrosiella* sp., 酵母類, *Paecilomyces* sp. が分離され、坑道1 cmあたりの生菌数で表された各分離菌の動態も直接接種法の結果とほぼ一致した。また、顕微鏡下で直接計測された *Ambrosiella* sp. の全菌数は、1 齢幼虫期までに急増し、終齢幼虫期に大きく減少した後、新成虫期までその数を維持した。
- ③ 垂直坑道の共生菌相の遷移様式は、水平坑道とほぼ同様の傾向を示したが、幼虫～蛹期において *Paecilomyces* sp. の優占度が同時期の水平坑道よりも大きく、また *Ambrosiella* sp. の生菌数が1 齢幼虫期から終齢幼虫期にかけて水平坑道ほど大きく減少しない点が異なっていた。
- ④ SEM 観察によって明らかにされた実際の坑道内の共生菌繁殖状況は、①～③のようなキクイムシの成育に伴う共生菌相の動態をおおよそ反映するものであった。

(3) mycangia 内共生菌

- ① 本種の mycangia は、前胸背と中胸背の間の節間膜が陥没した一對のポーチ状をなし、その開口部は虫体背面に存在した。
- ② SEM 観察により、越冬期の mycangia 内膜上には、平坦な板状の物質が付着していることが明らかになった。一方、飛翔成虫の mycangia においては、開口部側の菌塊表面が粘液状物質により被覆され、貯蔵胞子自体からも粘液物が分泌されていた。また、開口部を閉鎖する節間膜の膜組織が隆起、肥大し、その表面では刺状突起物が多数形成されていることが初めて確認された。
- ③ 未成熟新成虫および越冬成虫の mycangia 内からは、*Ambrosiella* sp. 以外に酵母類, *Paecilomyces* sp. などが分離された。しかし、その他の成育段階の成虫からは、*Ambrosiella* sp. のみが分離された。さらに、蛹を無菌的に脱蛹、成熟させた成虫の mycangia からは共生菌が分離されなかったのに対し、未成熟成虫に同様の処理を加えた場合には、*Ambrosiella* sp. が100%分離された。また、飛翔成虫の mycangia 内からは、飛翔分散した寄生樹種と関係なく、*Ambrosiella* sp. のみが分離された。
- ④ mycangia 内の *Ambrosiella* sp. 生菌数は、飛翔期に最大量となり、その後産卵期までに急減し、幼虫期以降はさらに減少した。全菌数の変化もほぼ同様のパターンを示したが、産卵後の大きな減少傾向は認められなかった。また、飛翔成虫の mycangia 内では胞子の割合が極めて大きくなった。
- ⑤ 越冬成虫を5℃下に置いた場合、mycangia 内の優占種は、常に酵母類と *Paecilomyces* sp. であった。これに対して、25℃処理区では、すべての処理期間において *Ambrosiella* sp. のみが分離された。また、越冬成虫に5, 15, 20, 25℃の4段階の温度処理を加えた場合、20℃および25℃処理区の *Ambrosiella* sp. 生菌数が、処理日数の延長とともに増加した。しかし、どの処理日数においても、25℃処理区の方が20℃処理区より有意に生

菌数が多く、また 25℃ 処理区の孢子数のみが有意に増加した。

(4) クスノオオキクイムシの人工飼育

- ① 本種の羽化個体が得られたのは、本種の *Ambrosiella* sp. 1 とハネミジカクイムシの *Ambrosiella* sp. 3 を与えて飼育した場合のみであった。本種の *Paecilomyces* sp. および *Candida* sp., ミカドクイムシおよびサククイムシの *Ambrosiella* spp. では成虫まで成育できなかった。しかし、羽化率は *Ambrosiella* sp. 1 を与えた処理区 (68.8%) の方が *Ambrosiella* sp. 3 を投与した区 (17.6%) よりも有意に高く、また雌蛹の平均生重も有意に大きかった。
- ② 4 樹種の鋸屑添加培地上で生育させた *Ambrosiella* sp. 1 によって飼育した結果、シロモジとコハウチワカエデの鋸屑を添加した場合のみ、羽化成虫が得られた。これらの平均雌蛹重間には、有意な差は認められなかった。
- ③ クスノオオキクイムシの発育日数は、雌の場合、卵期が約 3 日、幼虫期は約 10~14 日、蛹期は約 7 日、卵から成虫羽化までは約 22 日前後であり、雄は約 3 日早く羽化した。また、同一培養基上において、早く孵化した個体は遅れて孵化してくる個体よりも確実に早く成育を完了した。
- ④ 菌の培地上での面積を食物資源量の指標としたとき、孵化幼虫 1 個体あたりの *Ambrosiella* sp. 1 の菌面積が 10 cm² までは、平均蛹生重、蛹化率ともに菌面積の増加につれてほぼ直線的に上昇した。しかし、この面積以上になると増加傾向は小さくなり、平均蛹重は 9 mg、蛹化率は 80% の一定の上限値に到達した。
- ⑤ *Ambrosiella* sp. 1 の 1 幼虫区では、各飼育個体の雌蛹重と蛹化するまでの発育速度との間に正の相関が認められた。

(5) アンブロシア菌の化学的分類

- ① SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて、クスノオオキクイムシ、ミカドクイムシ、ハネミジカクイムシ、サククイムシと共生する 7 種のアンブロシア菌のタンパク質分析を行った結果、各クイムシの *Ambrosiella* spp. は、本種の *Paecilomyces* sp. や *Candida* sp. より多数の明瞭なバンドを持ち、またクイムシ種特異的な泳動パターンを示した。
- ② ミカドクイムシの *Ambrosiella* sp. は、他属の 3 種とかなり疎遠であり、一方、多くの共通する生活様式を持つクスノオオキクイムシとハネミジカクイムシの *Ambrosiella* sp. はその類縁性がきわめて高かった。

以上の結果を総合して、次のことが示唆された。

- ① 本種の主要な食物資源 (PAF) は *Ambrosiella* sp. であり、彼らはこの菌を様々な樹種の寄主木内に持ち込み、坑道全体をその繁殖場所としている。しかし、本種の繁殖成功は寄主木の樹木成分により大きな影響を受けるものと推察される。
- ② 親成虫は、坑道サイズを拡大することによって *Ambrosiella* sp. の量を増大させ、この資源量に応じて産卵数を調節している。早く孵化した幼虫は、良質の食物資源を優先的に利用して体サイズの大きい個体となる。このような資源利用様式により、本種は限られた資源量下でより大きな個体を効率的に生産できるものと思われる。
- ③ mycangia 内への共生菌の獲得は脱蛹直後に行われ、坑道内に存在する菌を非選択的

に取り込んでいる。その後、取り込まれた共生菌の中で PAF のみが選択的に培養される。この PAF の選択的培養の発現は温度により規定され、至近要因としては mycangia の付属腺からの分泌物や PAF の生産する抗生物質による影響が考えられる。また、坑道内への貯蔵胞子の接種様式が、坑道部位による PAF の繁殖速度の違いに対応した、適応的なものであることが示唆された。

- ④ 養菌性キクイムシは、同一樹木内で共存しながら種特異的な PAF と共生関係を成立させている。また、キクイムシ間の生態学的特徴を比較することによって、その類似性が高いほど共生する PAF はより近縁である可能性が示された。さらに、他種キクイムシの共生菌は自種の PAF の近縁種であれば潜在的に利用可能であるが、その場合にはキクイムシの適応度が低下することが初めて実証された。
- ⑤ ④の結果に基づき、キクイムシとアンブロシア菌との種特異的な共生関係の進化ルートを説明する新しい仮説 (PCM: pairwise coevolutionary mutualism, DCM: diffuse coevolutionary mutualism) を提案した。
- ⑥ 本研究結果をもとに、キクイムシとアンブロシア菌の共生機構の特質を明らかにし、また両者の相互作用系の特徴とその成立過程を共生 (symbiosis) の定義に従って詳細に検討した。

Summary

Ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae) are xylomycetophagous insects which have evolved mutualistic associations with micro-organisms in host trees. The present study has clarified symbiotic interactions between the ambrosia beetle, *Xylosandrus mutilatus* (BLANDFORD), and their associated fungi and its adaptive significance by various creative methods: (1) successive censuses of *X. mutilatus* field population, (2) scanning electron microscopy (SEM) observations and isolation experiments of fungal symbionts in gallery system, and those of fungal symbionts in mycangia of the beetle, (3) artificial rearing experiments of *X. mutilatus* on fungal diets and (4) protein analysis of fungi associated with several species of ambrosia beetles. The study was conducted in a mixed stand of deciduous trees and shrubs near the Nagoya University Forest, in the northeast of Aichi Prefecture, in central Japan.

The major results are summarized as follows.

(1) Biological features of *X. mutilatus* population in the field

- ① *X. mutilatus* was univoltine in the study area. From late June to early September, with a peak in late July, overwintered female adults made their dispersal flights in search of host trees suitable for colonization. The sex ratio of their offspring (♂ : ♀) was about 1 : 8.
- ② Many species of ambrosia beetles were found in freshly-felled trees of *Lindera triloba*, whereas few beetles invaded the trees of *Clethra barbinervis*. The trees of *Acer sieboldianum* were dominantly attacked by *X. mutilatus* adults, and the number of attacks by this insect per main trunk of *A. sieboldianum* was larger than that of *Acer rufinerve* and that of *C. barbinervis*.
- ③ The proportion of galleries in which female adults of *X. mutilatus* laid eggs to all galleries monitored (the proportion of oviposition) was lower in the order, *A. sieboldianum*, *L. triloba*, *C. barbinervis* and *A. rufinerve*. In *A. rufinerve*, the proportion of galleries in which adult eclosion occurred to the galleries oviposited (the proportion of reproduction) was less than half of that in *A. sieboldianum*, in *L. triloba* and in *C. barbinervis*. From a gallery system constructed in *A. rufinerve*, it was observed that 2 or 3 female adults emerged newly, but more than 5 female adults were observed in other three species of host trees.
- ④ A female adult began to lay clumped eggs in the gallery system when she excavated a side gallery (length of approx. 1 cm) soon after construction of a main gallery and within 20 days after tree-felling. It was found that the female adult spreads a thin membrane completely over the entrance hole before oviposition.
- ⑤ Twenty days after oviposition, pupation and adult eclosion occurred, and all developmental stages (eggs, larvae, pupae and new adults) were present in the gallery systems. The brood size increased until the 60th day after tree-felling, but thereafter decreased because the new male adults disappeared from the galleries and the larvae died due to shortage of the fungal food. The total length of the side

galleries at the end of the larva-pupa period was about twice that during the egg period. After brood development, further extension of the side galleries was most likely due to browsing by new adults, and resulted in an average main-side gallery of 6cm in length.

- ⑥ There was a positive correlation between the total length of gallery system and the number of offspring per gallery system at every growing stage of the brood population. However, the slope of the linear regression during the egg (0.68) to pupa period was less than that during the new adult to overwintering adult (0.16) period.
- ⑦ In gallery systems less than 6cm long, some of offspring (female pupae and new female adults) had an extremely light mean body weight, compared with other individuals that had developed in the gallery systems. The mean body weights of the offspring in the ≥ 6 cm long gallery systems were significantly greater than those in the < 6 cm long gallery systems. However, there were large size variations, within the same range, in offsprings from both ≥ 6 cm and < 6 cm long gallery systems.
- ⑧ Frequency distributions of female body weight were compared among the groups of pupae and new adults with different rates of development, which were classified according to the time of pupation (whether pupae alone were present or both pupae and eclosed adults coexisted together) and the time of eclosion determined by adult body colors in the same brood, respectively. The mean body weights of pupae and new adults were heavier in individuals that pupated and eclosed earlier, and the weight ranges also shifted from light towards heavy.

(2) Dynamics of fungal symbionts in the gallery system

- ① By the direct inoculation technique, three fungal groups, *Ambrosiella* sp., yeasts and *Paecilomyces* sp., were isolated from main galleries excavated in *L. triloba*, where *Ambrosiella* sp. was predominant during the boring-oviposition period, but then yeasts and *Paecilomyces* sp. gradually became co-dominant. From the galleries in *A. sieboldianum*, in *A. rufinerve* and in *C. barbinervis* *Ambrosiella* sp. was also isolated dominantly during the boring-oviposition period.
- ② The same three fungal groups were also found in galleries by the viable plate count technique. The number of colony-forming units of each fungal species per 1cm long galleries changed with the developmental stages of the beetle in the same manner, as the relative dominance of fungal symbionts isolated by the direct inoculation technique also changed. Direct microscopic observations using a counting chamber revealed that the total number of spores and hyphae of *Ambrosiella* sp. in the 1cm long galleries rose to a peak during the period from boring to 1st-instar larva, steeply declined during the last instar larva period and then reached a plateau until the new adult period.
- ③ The dynamics of the fungal flora in side galleries showed a trend similar to that in main galleries, except that *Paecilomyces* sp. was isolated more frequently during the larva-pupa period and that there was a slighter decrease in the viable count of *Ambrosiella* sp. during the period from 1st-instar larva to last instar larva.

- ④ These results were supported by SEM observations which revealed that growing phase of fungal symbionts in the gallery system at various developmental stages of the beetle.

(3) Dynamics of fungal symbionts in the mycangia

- ① It was shown that female adults of *X. mutilatus* have a pair of dorsal pouches formed by the intersegmental membrane between the pronotum and the mesonotum for carrying fungal spores.
- ② Under a SEM, it was observed that (1) there are only lamellar substances attached to the membrane in the mycangia of overwintering adults, (2) in contrast, during the dispersal period, every mycangial sac is tightly filled with fungal spores, the surfaces of which are covered with a sticky liquid and which also secretes viscous substances themselves and (3) the sacs are sealed by a swollen membrane that is equipped with many needle-like projections.
- ③ Only a single fungal species, *Ambrosiella* sp., was consistently stored in the mycangia in all adult stages, except for the periods of teneral and overwintering adults during which yeasts and *Paecilomyces* sp. predominated over *Ambrosiella* sp. No fungal spores occurred in the mycangia of the adult beetles reared under aseptic conditions from the pupal stage, whilst only *Ambrosiella* sp. was stored in those from the teneral adult stage. Regardless of species of host trees attacked, *Ambrosiella* sp. was the dominant fungus in the mycangia of the dispersing adults.
- ④ The viable count of *Ambrosiella* sp. per mycangia showed a maximum during the dispersal flight period and an abrupt decrease during the boring-oviposition period, followed by a gradual fall. The change in the total number of spores and hyphae of the fungus in relation to life history of the beetle was exactly similar to observed with the viable count, except for a slower decline after the oviposition period. Highest percentages of spores in *Ambrosiella* sp. were stored in the mycangia of the dispersing adults.
- ⑤ In the mycangia of the overwintering adults placed at 5°C, yeasts and *Paecilomyces* sp. were consistently co-dominant, whereas only *Ambrosiella* sp. was isolated from the mycangia at 25°C throughout the experimental period. In case of controlled-temperature treatments at 5, 15, 20 and 25°C, the number of colony-forming units of *Ambrosiella* sp. per mycangia increased greatly with time after treatments at 20 and 25°C, where the viable fungal number at 25°C was significantly larger than that at 20°C. It was the number of fungal spores at 25°C that increased significantly with treatment time.

(4) Artificial rearing experiments of *X. mutilatus* on fungal diets

- ① On diet plates of *Ambrosiella* sp. (sp. 1) associated with *X. mutilatus* and *Ambrosiella* sp. (sp. 3) associated with *Xylosandrus brevis*, hatched larvae of *X. mutilatus* successfully grew into adults, but no larvae survived on those of *Paecilomyces* sp. and yeast (*Candida* sp.) associated with *X. mutilatus*, *Ambrosiella*

- sp. (sp. 2) associated with *Scolytotlatypus mikado* and *Ambrosiella* sp. (sp. 4) associated with *Xylosandrus crasiussculus*. The percentage of emerged adults reared on *Ambrosiella* sp. 1 (68.8%) was significantly higher than that on *Ambrosiella* sp. 3 (17.6%), and the mean body weight of female pupae on *Ambrosiella* sp. 1 was also significantly heavier than that on *Ambrosiella* sp. 3.
- ② Of the four species of host trees, hatched larvae of *X. mutilatus* pupated and eclosed on *Ambrosiella* sp. 1 that was propagated on potato-dextrose agar mixed with saw dust of *L. triloba* and of *A. sieboldianum*. However, there was no significant difference in mean body weight of female pupae fed on dietary fungus of *L. triloba* or *A. sieboldianum*.
 - ③ The developmental periods of *X. mutilatus* females from eggs to 1st-instar larvae, pupae and teneral adults were about 3, 15 (13-17) and 22 days, respectively, and males emerged about 3 days earlier than females. In each diet plate, however, earlier-hatched larvae completed their development before later-hatched larvae.
 - ④ The mean pupal weight and the proportion of successful pupation were both positively correlated with increasing fungal area per individual larva, but both were likely to approach upper limits (9 mg and 80%, respectively) above a fungal area of about 10cm².
 - ⑤ There was a positive correlation between the pupal weight and the developmental rate during the period from 1st-instar larva to pupa in solitary reared females (one-larva per plate of *Ambrosiella* sp. 1).
- (5) **Protein analysis of fungi associated with several species of ambrosia beetles**
- ① Protein variations among seven ambrosia fungi associated with *X. mutilatus*, *S. mikado*, *X. brevis* and *X. crasiussculus* was examined by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). The genus *Ambrosiella* associated with the four different species of ambrosia beetles contained more visible proteins than *Paecilomyces* sp. and *Candida* sp. associated with *X. mutilatus*, showing the beetle species-specific patterns of protein bands.
 - ② The protein pattern of *Ambrosiella* sp. 2 associated with *S. mikado* differed greatly from that of other *Ambrosiella* spp. associated with *Xylosandrus* spp. On the contrary, there was a remarkable similarity in protein patterns of *Ambrosiella* spp. between *X. mutilatus* and *X. brevis*, both of which also presented an almost complete similarity in biological features.

All the present results suggest that :

- ① *X. mutilatus* utilizes *Ambrosiella* sp. as the most important food resource (primary ambrosia fungi : PAF) for its development, and uses the whole gallery system in various host trees as the space available for cultivating the fungus. The reproductive success of *X. mutilatus*, however, is most likely to be affected mainly by chemical ingredients contained in each species of the trees.
- ② A mother beetle may be capable of manipulating her fecundity according to the

expected quantities of food resource by expanding the gallery system for cultivating *Ambrosiella* sp. Earlier-hatched larvae in a brood can grow into large-sized progeny adults by predominantly utilizing fungal food resources of the best quality. The combination of resource-dependent oviposition by a mother beetle and dominant resource utilization by earlier-hatched individuals in a brood can contribute to the efficient production of larger females under limited resource conditions.

- ③ Immediately after eclosion, new female adults may take at least four associated fungal species, without any selection, into their mycangia from the walls of the galleries, and conditions may well be produced in the mycangia of both matured and dispersing beetles whereby only the spores of *Ambrosiella* sp. can proliferate. Temperature surrounding the adult beetles is probably a key factor that influences the activity of the gland cells and/or the viability of the fungal spores in the mycangia. The cells of mycangia may secrete some chemicals favoring the propagation of the PAF and/or inhibiting the growth of other contaminating fungi, and antibiotics produced by the PAF may also limit contamination by other microbes. It would be adaptive that a mother beetle can disseminate the PAF over the walls of both the main gallery and side galleries, allocating the amount of fungal spores according to growth rate of the PAF in each gallery.
- ④ Different species of ambrosia beetles living in the same tree have different symbiotic associations with their own specific fungi (PAF). As similarity of biological features among scolytid beetles increases, degrees of relatedness among PAF associated with the beetles also increases. Each PAF is most likely to have a nutritional potential as a food resource for scolytid larvae of other related species, but consequently giving lower “fitness” to the beetles.
- ⑤ From the results mentioned above (④), two new hypotheses, PCM (pairwise coevolutionary mutualism) and DCM (diffuse coevolutionary mutualism), are proposed for coevolutionary pathways between scolytid beetles and their species-specific PAF.
- ⑥ Finally, based on all results of the present study, symbiotic interactions between the ambrosia beetles and their associated fungi are clarified, and attributes of the interactions are discussed according to the definition of symbiosis.



写真 2-1. 調査林分の概況

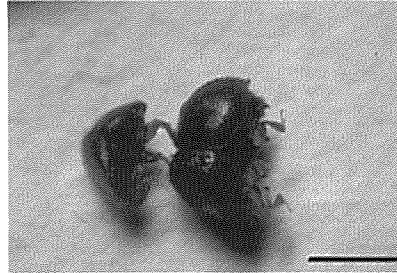


写真 3-1. クスノオオキクイムシ(左：雄成虫, 右：雌成虫).
(上：頭部, Bar=2 mm)

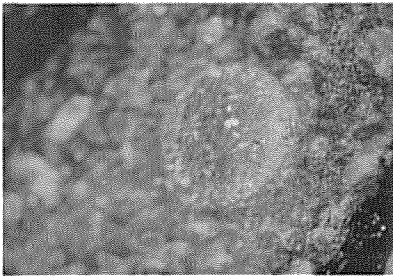


写真 3-2. 蜘蛛糸状の膜による穿入孔の封鎖 (産卵期).

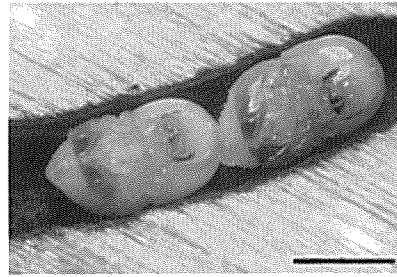


写真 3-3. クスノオオキクイムシの蛹化 (雌蛹).
(Bar=2 mm)

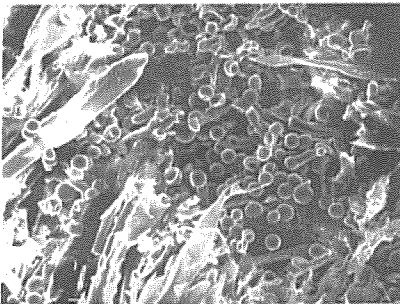


写真 4-1. 坑道内への共生菌の定着 (穿入期).
(SEM : Bar=50 μ m)

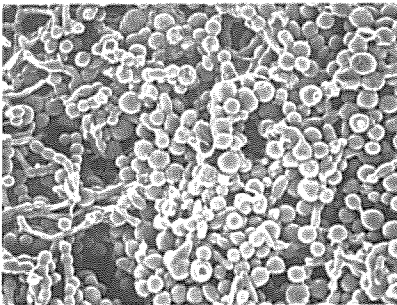


写真 4-2a. 共生菌の繁殖 (産卵期).
(SEM : Bar=50 μ m)

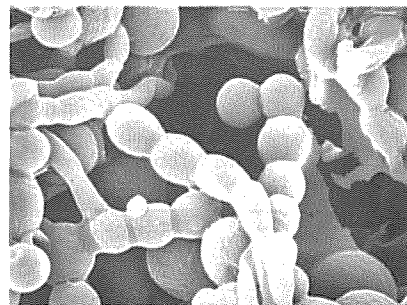


写真 4-2b. *Ambrosiella* sp.のモニリオイドチェーン (産卵期).
(SEM : Bar=10 μ m)

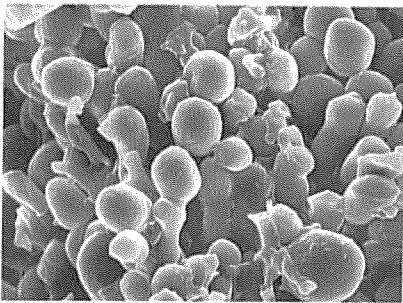


写真 4-3a. 共生菌の変形，剥離(幼虫期).
(SEM : Bar=10 μ m)

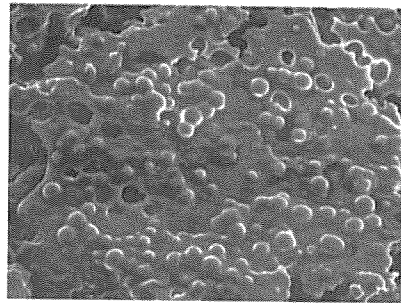


写真 4-3b. 粘質物質による被覆(幼虫期).
(SEM : Bar=50 μ m)

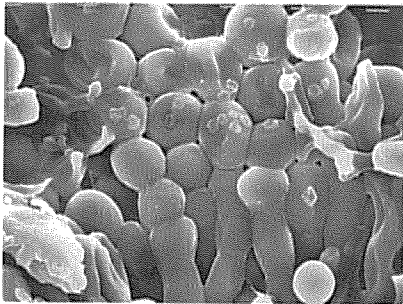


写真 4-3c. 分生子上の微小付着物(幼虫期).
(SEM : Bar=10 μ m)

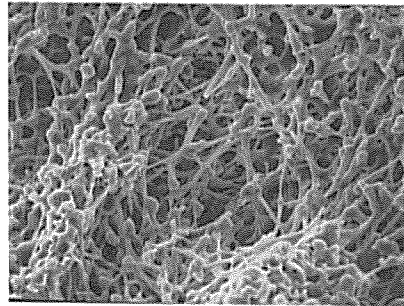


写真 4-3d. 菌糸体の繁殖(幼虫期).
(SEM : Bar=50 μ m)

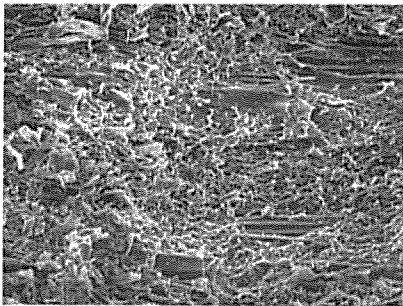


写真 4-4. 新成虫期の坑道.
(SEM : Bar=100 μ m)

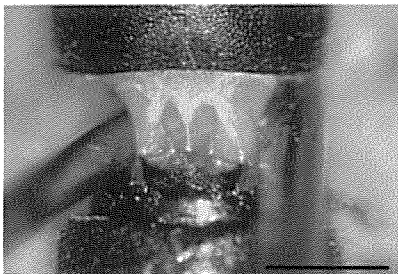


写真 5-1a. クスノオオキクイムシ雌成虫
の mycangia (越冬期).
(上 : 前胸背, Bar=1 mm)

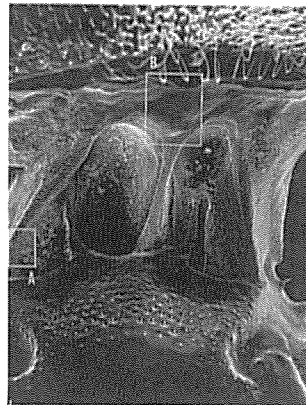


写真 5-1b. 越冬成虫の mycangia.
(上 : 前胸背, SEM : Bar=500 μ m)
写真中 A, B については, 写真
5-1d, e を参照.

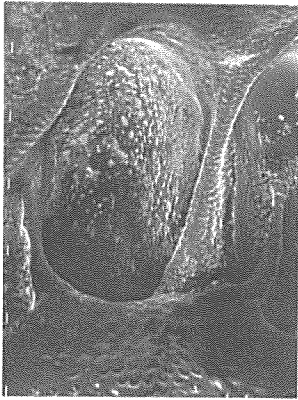


写真 5-1c. 越冬成虫 mycangia 内に付着する板状物質.
(SEM : Bar=100 μ m)

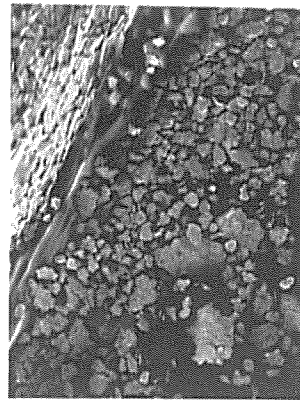


写真 5-1d. mycangia 周辺の節間膜に付着する板状物質 (写真 5-1b の A 部の拡大).
(SEM : Bar=50 μ m)

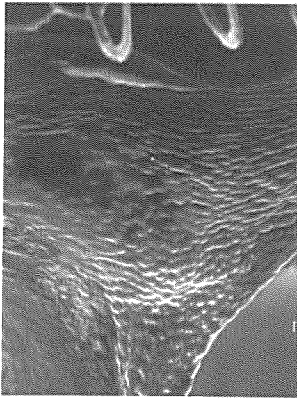


写真 5-1e. mycangia の前胸背基部側の節間膜 (開口部を封鎖する部分) (写真 5-1b の B 部の拡大).
(SEM : Bar=50 μ m)

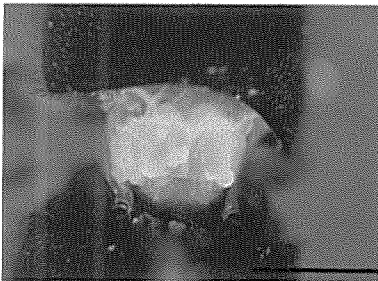


写真 5-2a. クスノオオキクイムシ雌成虫の mycangia (飛翔期).
(上 : 前胸背, Bar=1 mm)

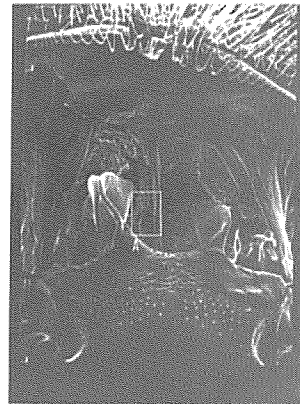


写真 5-2b. 飛翔成虫の mycangia.
(上 : 前胸背, SEM : Bar=500 μ m)
写真中 A については, 写真 5-2c を参照.

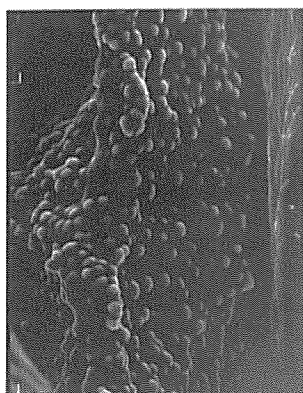


写真 5-2c. mycangia 内の貯蔵孢子 (開口部) (写真 5-2b の A 部の拡大).
(SEM : Bar = 50 μ m)

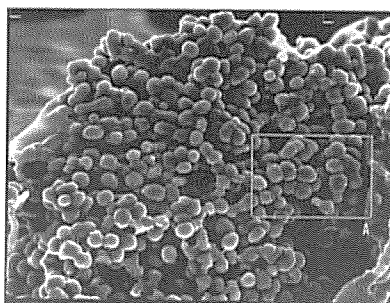


写真 5-2d. 飛翔成虫 mycangia 内の貯蔵孢子 (内部).
(SEM : Bar = 50 μ m)
写真中 A については、写真 5-2e を参照.

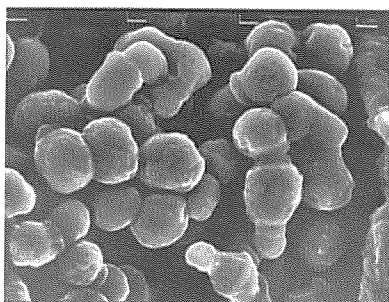


写真 5-2e. 貯蔵孢子の表面 (写真 5-2d の A 部の拡大).
(SEM : Bar = 10 μ m)

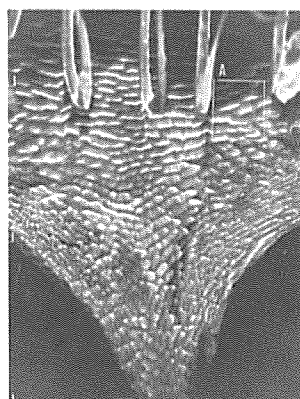


写真 5-2f. 飛翔成虫 mycangia の前胸背基部備の節間膜 (開口部を封鎖する部分).
(SEM : Bar = 50 μ m)
写真中 A については、写真 5-2g を参照.

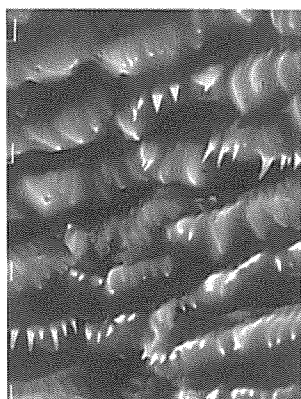


写真 5-2g. 節間膜組織の刺状突起 (写真 5-2f の A 部の拡大).
(SEM : Bar = 10 μ m)

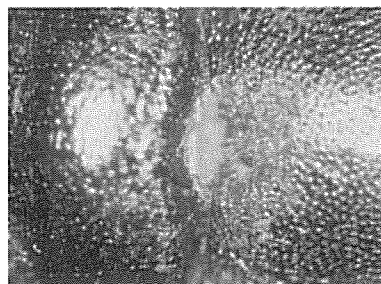


写真 5-3a. 貯蔵孢子の滲出 (飛翔成虫).

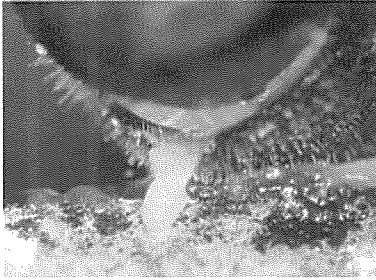


写真 5-3b. mycangia からの貯蔵胞子の放出。
(飛翔成虫)

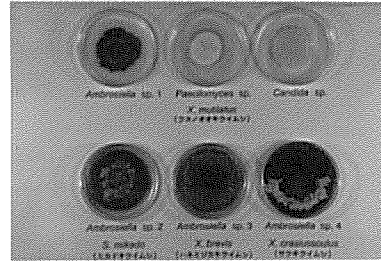


写真 6-1. クスノオオキクイムシの人工飼育に使用したアンブロシア菌。

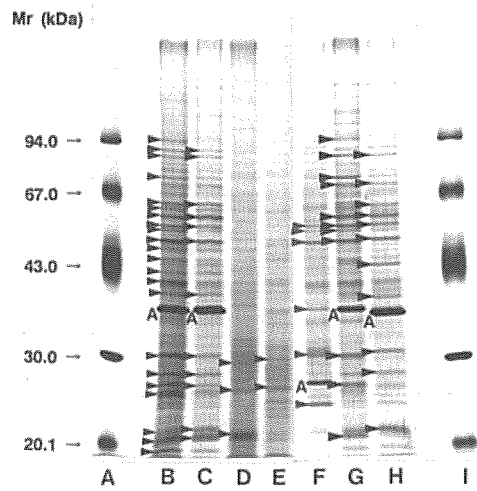


写真 7-1. SDS-PAGE による各アンブロシア菌のタンパク質パターン。

A, I : 分子量マーカー,
B : mycangia からの直接培養,
C : *Ambrosiella* sp. 1,
D : *Paecilomyces* sp., E : *Candida* sp.,
F : *Ambrosiella* sp. 2,
G : *Ambrosiella* sp. 3,
H : *Ambrosiella* sp. 4
A : 主要タンパク質, ▲ : 副タンパク質