

平成30年6月25日現在

機関番号：47119

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14866

研究課題名(和文)ミカンキジラミに特異的な寄生菌の植物内生菌機能に基づくカンキツグリーニング病防除

研究課題名(英文)Control of Citrus huanglongbing using entomopathogenic fungus *Isaria javanica*

研究代表者

清水 進 (SHIMIZU, SUSUMU)

西日本短期大学・緑地環境学科・特任教授

研究者番号：20187454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：カンキツグリーニング病(HLB)の病原細菌Candidatus *Liberibacter asiaticus*(Ca. Las)の媒介虫ミカンキジラミ体中で、同細菌と拮抗するミカンキジラミ寄生菌を東南アジア各国で分離した。ミカンキジラミからカンキツ類へのCa. Las伝播を抑制する寄生菌の選抜して新規生物的防除資材の発掘とそれらの内生菌機能によるHLB防除基盤の確立を目的とした。

各種寄生菌を分離し同定した結果、沖縄から分離した分離株は媒介虫では新種寄生菌であり、同虫に対する殺虫スピードは早く、強い病原力を有していた。さらに、圃場における防除効果も高かった。また、同株の内生菌機能を検討した。

研究成果の概要(英文)：The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, (Hemiptera: Psyllidae) was discovered in Okinawa in 1998. Control of *D. citri* is important because this phloem-feeding pest vectors Candidatus *Liberibacter asiaticus* (Ca. *L. asiaticus*), a phloem-residing γ -proteobacterium that causes citrus greening disease or Huanglongbing. This research contributes the first steps towards evaluating entomopathogenic fungi for its potential use in an IPM program to suppress *D. citri* populations. Fungal pathogens that killed adult *D. citri* in Thailand, Vietnam, Okinawa and Amami-oshima were identified and characterized. *Isaria javanica* from Okinawa has a high virulence against *D. citri* and was effective on control of *D. citri* in laboratory and field applications. Endophytic characteristics of *I. javanica* were also studied.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：カンキツグリーニング病 媒介虫 ミカンキジラミ 寄生菌 拮抗微生物 防除

1. 研究開始当初の背景

HLB はアジア・アフリカの熱帯・亜熱帯地域におけるカンキツ類の最も恐ろしい病害で、最近では南北アメリカ大陸にも被害が拡大している。わが国では1988年に西表島で、現在では沖縄県のほぼ全域と鹿児島県の一部で確認され北上が懸念されている。HLB に対する有効な農薬がなく、健全な苗木の定植とその後の媒介虫の侵入・増殖の阻止が唯一の防除手段となっている。Ca. Las の培養が不可能なこと、低濃度で局在することなどから、Ca. Las の検出法の研究が主に行われている。特定重要病害の媒介虫にも拘わらず、ミカンキジラミの寄生菌（昆虫病原性糸状菌）に関する研究は極めて少なく、同定された寄生菌は5種に限られる。さらに、国内外においてミカンキジラミの病原細菌媒介機能を低下させる寄生菌の調査とそれを応用したHLBの防除に関する研究は皆無であった。

沖縄県の罹病虫から分離した沖縄株 *Isaria javanica* はミカンキジラミ寄生菌としては世界で初めての報告で、以下のような特徴を有していた。キジラミ類に特異的で、同虫に強い病原力を有し、短時間で致死に至る。感染致死後、同菌に覆われるが、その後の雑菌の増殖のため、野外の罹病虫からの分離は難しい。すなわち、本病の生態は殆ど解明されておらず、その解明が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

先ず罹病ミカンキジラミからの *I. javanica* の分離法を確立し、野外での *I. javanica* の生態を明らかにする。また、葉上での動態と植物内生菌機能を明確にする。

次に、*I. javanica* の植物葉上での動態と内生菌機能より、ミカンキジラミに対する新しい微生物防除理論と基盤を確立することを目的とした。

また、多数のミカンキジラミ寄生菌を同定し、系統解析することにより、ミカンキジラ

ミ寄生菌の全体像を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

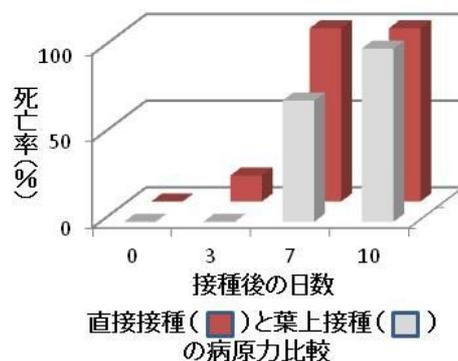
分離方法の検討：同分生子は楕円形で長径が約 $6.5\mu\text{m}$ 、短径が約 $3\mu\text{m}$ である(第1図)。そこで、各種手法を用い、大きさで分ける方法を検討した。次に、昆虫病原性糸除菌用の各種選択培地 Sabouraud, DOC-PDA、L-broth 寒天培地 に各種抗生物質などを加える方法で *I. javanica* 用の選択培地を開発を目指した。また、同株の菌学的性状を調査した。



第1図 *I. javanica* の分生子形成様式

植物葉上の *I. javanica* 動態調査

I. javanica 分生子 ($10^6/\text{mL}$: 通常の糸状菌製剤の実用濃度の10分の1の濃度) を直接成虫に接種すると100%の死亡率は7日後に得られるが、葉上に散布し成虫を放飼した場合10日間を要する(第2図)。



第2図 *I. javanica* のミカンキジラミに対する病原力

つまり、葉上接種でも長時間ではあるが同

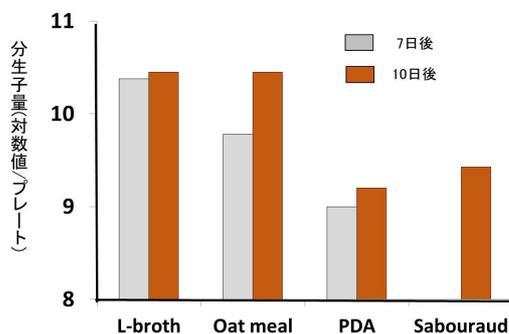
様な効果が生じる。さらに、直接接種では効果が少ない、より低濃度の葉上散布でも同様に高い効果が得られる。そこで、各種植物の葉上に各種濃度の *I. javanica* を接種し経時的に、その動態を詳細に調査する。

分離同定には従来の菌学的手法による分離・同定と分子遺伝手法による系統解析を用いた。なお、系統解析には 28S rRNA 領域と α -tubulin 遺伝子領域の情報を使用した。

4. 研究成果

分離方法の検討：既報の分離株が極めて少数に限られる原因を調査するため沖縄県で採取した寄生菌罹病虫を材料にその原因を調査した。その結果寄生菌に感染したミカンキジラミは死後急速に雑菌に被われること、雑菌に比較して生長速度が極端に遅いことが原因あることを先ず明らかにした。また、各種寒天培地を用い選択培地を検討した結果、分離用培地にはクロラムフェニコール加用 L-broth 寒天培地が最適である結果を得た。

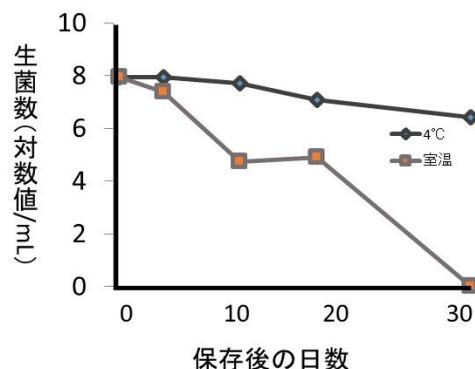
② *I. javanica* の性状：十分量の分生子を得るために各種寒天培地を用いて分生子形成量を調査した。分生子形成量は L-broth 寒天培地およびオートミール寒天培地において良好な結果を得た。とくに、L-broth 寒天培地において分生子形成は早く、大量に形成された(第3図)。一方、PDA およびサプローズ寒天培地において分生子形成量は極めて少なかった。



第3図 各種培地における分生子形成量

次に、分生子の安定性を水中保存と大気中保存の両条件で検討した。水中に保存した場

合、4 および室温保存とも生菌数は1ヶ月で10分の一に、2ヶ月で100分の一に減少した。同様な傾向は大気中に保存した場合も認められた(第4図)。他の昆虫病原性糸状菌 (*B. bassiana*, *M. anisopliae* および *I. fumosorosea* など) と比較すると室温において *I. javanica* 分生子は極端に不安定であった。このことも同菌の分離例が少ないことの一因と考えられた。



第4図 *I. javanica* の大気中における安定性

③ 植物葉上の *I. javanica* 動態調査

沖縄株の分生子を柑橘類の葉上に散布後、成虫を放飼して、葉上からの感染を試みた。散布後、成虫を放飼した場合、高い死亡率が得られた。

同株の成虫に対する病原性を成虫直接接種と葉上接種で比較検討すると、両者において大差は認められなかった。このことは葉上においてはなんらかの要因により感染が容易になっているものと考えられた。

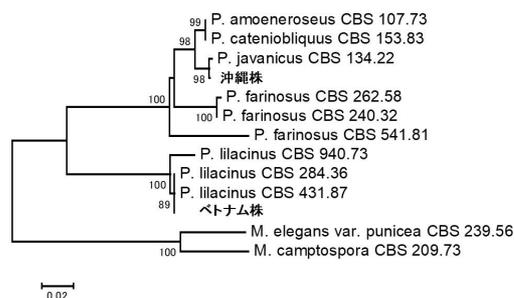
沖縄株による殺虫効果は室内および圃場レベルの試験でも認められ、両区に大差がないことから HLB の有力な生物的防除資材であることが判明した。

④ イネ科植物への影響

Metarhizium 属及び *Beauveria* 属糸状菌ではイネ科植物での内生菌機能が報告されている。カンキツ類での実験には長時間要することから *I. javanica* 分生子のイネ(日本晴、IR24)の種子を用いて発芽促進効果を検討し

た。日本晴、IR24 では *I. javanica* 接種区は無接種区と比べ発育が早い傾向が認められた。しかし、コントロール区として用いた *Metarhizium* 属糸状菌よりはその効果は劣った。

⑤分離菌株の系統解析: 沖縄などから分離された寄生菌について rDNA-ITS 領域と -チューブリン領域の塩基配列に基づく系統樹を作成した(第5図)。



第 5 図 沖縄株、ベトナム株の系統樹

その結果、沖縄株は *I. javanica* ,ベトナム株は *P. lilacinus*と同定された。

以上の結果を総括すると次のようになる。
カンキツグリーニング病
 (Citrus huanglongbing, HLB) は、カンキツ葉の篩部に局在する病原細菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (C a . Las) の感染により発生するカンキツ類の病害で、接木その他、ミカンキジラミ *Diaphorina citri* によって媒介される。日本においては、1988 年に沖縄県西表島で最初の発生が確認されて以降、分布域が北上し、現在は奄美群島での発生も確認されている。HLB は有効な治療法が確立されておらず、罹病した樹は数年以内に枯死する。そのため、日本を含む本病の発生地域では、カンキツ類の最も重要な病害として防除対策が進められている。本研究では、HLB の防除対策の一つであるミカンキジラミの防除を目的として、寄生菌罹病ミカンキジラミからの昆虫病原性寄生菌の分離を行い、その同定を試み、さらに、分離された

寄生菌の性状を調査し次のことが明らかになった。

1 . タイ、ベトナム、沖縄および奄美大島の罹病ミカンキジラミを用いて、病原性寄生菌の分離を試みた結果、タイおよびベトナムでは *I. fumosorosea* と *P. lilacinus* が優占種として分離された。このうち *P. lilacinus* は新規寄生菌であったが、人間にも病原性が報告されているためその後の防除試験からは排除した。

2 . 奄美大島からは *Beauveria bassiana* が分離された。沖縄からは *I. javanica* が分離され、新規寄生菌となった。

3 . ミカンキジラミの新規寄生菌のうち、*I. javanica* が成虫に対し今までにない強い病原性を示したので、以下の実験は *I. javanica* を中心に行った。

4 . *I. javanica* は沖縄のみで分離される理由は同菌の分生子の不安定性と、雑菌に被われることに起因しているものと考えられた。

5 . 形態的特徴に加え、rDNA-ITS 領域と -チューブリン遺伝子の塩基配列の系統解析からも、沖縄株は *I. javanic* ,ベトナム株は *P. lilacinus* と同定された。

6 . 室内および圃場試験において沖縄株はミカンキジラミ幼虫および成虫に対しても今までにない強い病原性を示した。

7 . 沖縄株のミカンキジラミ成虫への病原力は葉上接種および個体間の水平伝搬でも維持された。

8 . *I. javanica* 分生子をイネ種子に接種した場合、生育が早くなる傾向が認められた。

以上のことより、沖縄株は HLB の有力な生物的防除資材である。また、他の昆虫病原性糸状菌 (*B. bassiana*, *I. fumosorosea*, *M. anisopliae* など) と同様に植物と何らかの関連があり、そのことで、葉上での高率な感染が可能になるものと考えられ、今後同株の内生菌機能を集中的に追求する予定である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

清水 進 カンキツグリーニング病の媒介虫に寄生する *Isaria javanica* の性状 西日本短期大学 総合学術研究論集 8, 51-55 (2018) (査読無)

Nishi O., Shimizu S., and Sato H. *Metarhizium bibionidarum* and *M. purpureogenum*: new species from Japan. Mycological Progress, 16, 987-998(2017) (査読有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 進 (SHIMIZU SUSUMU)

西日本短期大学・緑地環境学科・特任教授

研究者番号：20187454