

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23677

研究課題名（和文）昆虫寄生菌の土壌中における生残と感染に対する物理的ストレスと土壌静菌作用の影響

研究課題名（英文）Effects of physiological stresses and soil fungistasis on survival and infection of entomopathogenic fungi in soil

研究代表者

西 大海（Nishi, Oumi）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：30747879

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：昆虫寄生菌Metarhizium属の SMZ2000株が、土壌導入によるミカンキイロアザミウマに対する防除効果と土壌表層での定着能力において、Beauveria属のGHA株を含め他の供試菌株よりも高いことを明らかにした。これらの能力に関係し得る生理学的特性を評価した結果、SMZ2000株はGHA株と比較して、高温・紫外線ストレス耐性は同程度であったが、蛹に対する病原力は高く、土壌静菌作用下での発芽能力は低いことが明らかとなった。また病原性に関して、第1蛹よりも第2蛹の方が感受性が高く、蛹接種により羽形成異常が生じることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫寄生菌を土壌生息害虫の防除に効果的に利用するためには、土壌環境が昆虫寄生菌の生残や感染に及ぼす影響の理解が重要である。本研究では施設栽培作物の重要害虫であり蛹期を土壌表層で生活するミカンキイロアザミウマを対象として、土壌環境の昆虫寄生菌への影響を評価し、土壌中での発芽能力が低い菌株でも高い防除効果と土壌定着能力を示し得ることを明らかにした。また、アザミウマ蛹に対する病原性に関して、第1蛹よりも第2蛹の方が感受性が高いことや、蛹期の感染により羽化成虫において翅形成異常が生じるなど新規の重要な知見が得られた。本成果は昆虫寄生菌の土壌導入による効果的なアザミウマ防除法の開発に資する。

研究成果の概要（英文）：Entomopathogenic fungus Metarhizium sp. SMZ2000 strain had the highest control efficacy against western flower thrips and persistence among tested fungal strains including Beauveria sp. GHA strain when it was introduced into soil surface. As a result of evaluation of physiological characters possibly related to the high control efficacy and persistence in soil, SMZ2000 was almost equivalent to GHA in heat and UV stress resilience, however, SMZ2000 was higher in virulence against pupal stage of thrips and lower in germination capacity under soil fungistasis. Regarding pathogenicity, second pupa is more susceptible to fungal infection than first pupa. In addition, infection in pupal stage caused deformation of wings in adult.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：昆虫寄生菌 微生物的防除 土壌定着能力 紫外線耐性 高温耐性 土壌静菌作用 アザミウマ

1. 研究開始当初の背景

土壌中には多くの昆虫寄生菌が生息しており、その一部は土壌生息害虫の防除に利用されている。しかし、土壌環境における物理的環境ストレスや微生物相が昆虫寄生菌の定着や感染におよぼす影響に関する基礎的知見が乏しく、現行の防除法には菌株選抜および施用、製剤法などにおいて改良の余地があると思われる。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、重要害虫であるアザミウマ類を対象とし、蛹期アザミウマの生息する土壌環境中における昆虫寄生菌の定着性と病原性に対する生物的(土壌細菌による拮菌作用)および非生物的環境因子(UV および高温ストレス)の影響を明らかにする。さらに、これらの影響に関する菌株間差異を明らかにし、土壌生息害虫に対する防除効果と菌株特性の関連性を解明する。

3. 研究の方法

昆虫寄生菌として、アザミウマ成虫に対して強い病原性を持つ *Metarhizium pingshaense* SMZ2000 (SMZ)、アザミウマを含む広範囲の害虫防除剤で使用されている *Beauveria bassiana* GHA、欧米で土壌散布型のアザミウマ防除剤として使用されている *M. brunneum* ARSEF 1095 株 (=F52)を用いた。供試虫として、ミカンキイロアザミウマの雌個体を用いた。

昆虫寄生菌のアザミウマに対する病原性は、土壌に混合してその中で蛹化させる方法と蛹に接種する方法とで行った。土壌混合による影響評価では、昆虫寄生菌の分生子を混合した土壌の上にソラマメを置き、その上に2齢幼虫を放飼した。その2日後に土壌に潜っていない個体を除去後、その後の羽化成虫数を記録し、羽化率と生存率により評価した。蛹期には第1蛹と第2蛹があり、それぞれの期間はおよそ23hと51hであるが、蛹に対する接種試験では、それぞれ脱皮後6時間以内の個体を供試した。

分生子の日射耐性は、プレート寒天培地に塗布した分生子を、温度上昇の影響を避けるため氷上に置いた状態で、直射日光下に曝した後、通常の培養条件(室内25度)で培養し、紫外線(UVA+UVB)積算量と生存率(処理区と対照区のCFU比)の関係から評価した。日射耐性は同様の方法で評価し、高温処理はプレート寒天培地を高温に設定したインキュベータに一定時間置くことにより行った。

土壌拮菌作用は、分生子を土壌と直接的および間接的に土壌影響したに置き、発芽率を調査した。直接法では分生子を土壌に混合し、分生子を蛍光染色して観察した。間接法では分生子を接種した寒天を0.02 μm孔フィルターを介して土壌と接触させ、寒天上の分生子を観察した。

表層土壌における定着性はポット試験により温室で行った。底面吸水ポット入れた園芸培土表面に分生子懸濁液を散布し、定期的に灌水した。深さ2cmまでの土壌を定期的に採取し、選択培地により生菌数を定量した。

4. 研究成果

(1) 昆虫寄生菌のミカンキイロアザミウマに対する病原性

土壌混合試験では、SMZ株が最も高い効果を示した(図1)。その半数致死、半数羽化に対応する効果量は 1.7×10^7 および 4.0×10^7 分生子/mL土壌であった。

蛹に対する病原性試験では、第1蛹よりも第2蛹の方が感受性が高く、SMZでの半数致死量はそれぞれ、942.0および15.7分生子/個体であり、およそ60倍程度異なった(図2)。第2蛹においてはその期間は第1蛹よりも28h長く、体表に接種された分生子が脱皮により除去される前に侵入を完了しやすかったため感受性が高くなったと考えられた。このことは、第2蛹において脱皮後0-6hまたは24-30h経過した個体で感受性を比較すると、24-30hの方が感受性が低かったことから支持された。菌株間の比較では、第1蛹および第2蛹において、SMZが強い傾向を示したが、第2蛹の方で差異が大きかった。

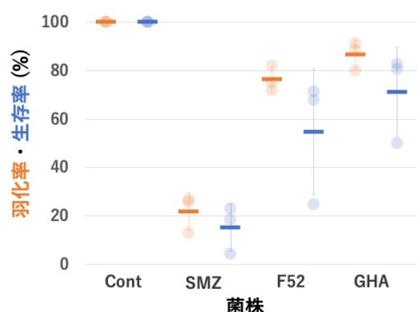


図1. 昆虫寄生菌の土壌混合によるミカンキイロアザミウマに対する防除効果

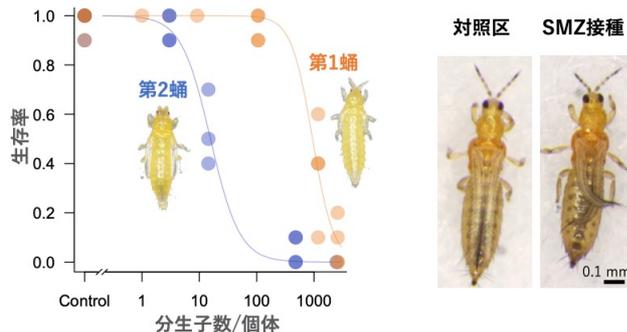


図2. SMZ株の蛹に対する病原力



図3. 昆虫寄生菌感染による翅形成不全

この2種の試験においては、接種区の羽化成虫には翅の形態異常が見られ(図3)、土壤混合試験での羽化成虫では、生存期間と産子数の減少が認められ、数世代にわたる影響では、羽化後の影響も防除効果に寄与することが示唆された。

(2) 高温および太陽光(紫外線)耐性

SMZとGHAの分生子は高温および日射ストレス耐性において同等であり、また両株とも発芽分生子では未発芽分生子と比較して同程度に高温耐性が低下することも明らかとなった(図4、5)。

高温および太陽光(紫外線)耐性の強い菌株の選抜のため、生息環境タイプとこれらの性状との関連を調査した。九州大学敷地内の林床と草地で地下0-2cmと8-10cmの土壤中の昆虫寄生菌を調査した結果、SMZと同種である広宿主域の昆虫寄生菌 *M. pingshaense* のPCR-RFLP型のRS13型とRS15型がもっとも高頻度で検出され、13型は深度0-2cmにおける生菌密度が8-10cmのよりも高く、15型はそれとは逆の傾向を示した。13型の株は15型よりも高温および太陽光耐性が高く、0-2cmの土壤からのスクリーニングにより、定着の高い菌株を効率的に選抜できることが示唆された。またSMZ株のPCR-RFLP型は13型であり、日射耐性も13型の土壤分離株と同等であることも明らかとなった。

(3) 土壤静菌作用

分生子を直接園芸培土に混合した場合、1週間以内ではSMZの発芽は全く観察されなかったが、GHA株ではわずかに観察された。分生子をフィルターを介して土壤静菌作用下に置いた場合も、GHA株の方が高い発芽率を示し、直接混合する方法に対応する結果となった(図6)。

この試験法ではGHA株は発芽後にすぐに分生子を形成するマイクロサイクル分生子形成が起こっており、接種分生子と新生分生子が混在しているため、GHAの接種分生子の発芽率は実際にはさらに高くなる。SMZ株ではマイクロサイクル分生子形成はほとんど観察されなかった。

(4) 土壤定着能力

園芸培土の表層(地下0-2cm部位)での土壤定着性に関して、8週間の調査では、GHAよりもSMZの方が高い定着性を示した。冬季加温時のガラス温室ではSMZは表層土において生菌数密度が初期密度から増加したことから、環境ストレス耐性(死にくい性質)だけでなく、増殖する能力も定着に関与することが示唆された。

以上から土壤混合型の防除剤として効果が示されているSMZ株は、病原性と定着性において、高い能力を示すことが明らかとなった。高温耐性と紫外線耐性においては、GHA株と同等であったが、自然土壤の表層土壌に高頻度で生息する *M. pingshaense* と同じ遺伝子型に属し、それと同等のストレス耐性を示したことから、表層土壌環境に適応していると考えられた。

土壤静菌作用に関しては、GHA株の方が土壤中で発芽しやすいという点で、より土壤からの静菌作用を受けにくいことが示唆された。このGHA株の土壤中で発芽しやすい性質は、腐生増殖や感染に有利にはたらく可能性があるが、一方で発芽分生子は未発芽分生子より高温ストレス耐性が低いことから、定着に不利にはたらく可能性もある。本研究では土壤混合した場合の病原性と定着性はGHAよりもSMZの方が高く、土壤静菌作用に関する性状の防除効果への寄与は小さいと考えられた。

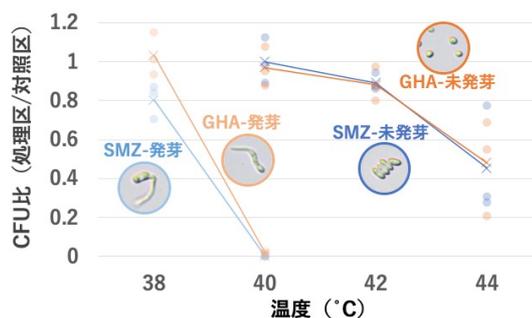


図4. 昆虫寄生菌の高温ストレス耐性

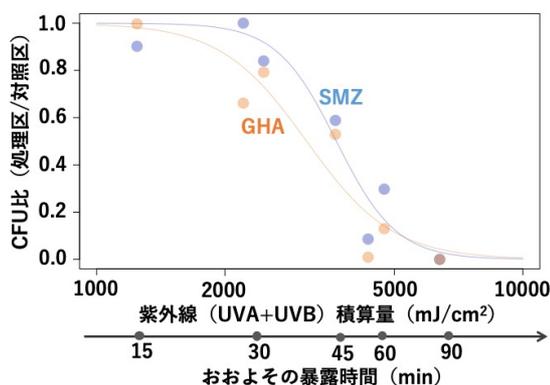


図5. 昆虫寄生菌の日射(紫外線)ストレス耐性

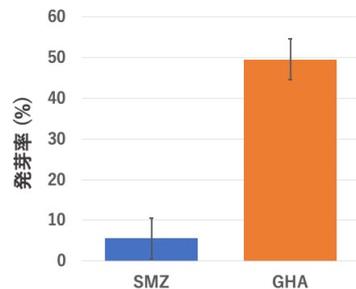


図6. 0.02 μm孔メンブレンを介して土壤に暴露された分生子の発芽率

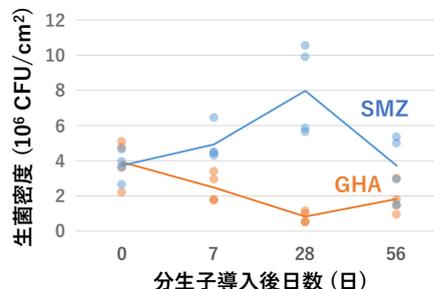


図7. 昆虫寄生菌の土壤定着能力の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oumi Nishi, Hirotooshi Sushida, Yumiko Higashi & Yuichiro Iida	4. 巻 Published online: 05 Jan 2020
2. 論文標題 Epiphytic and endophytic colonisation of tomato plants by the entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i> strain GHA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mycology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21501203.2019.1707723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西 大海、松岡 拓、青木智佐
2. 発表標題 昆虫寄生菌のミカンキイロアザミウマに対する病原性とその土壌混合による影響
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西 大海
2. 発表標題 Metarhizium属糸状菌の遺伝子型分類群ごとの土壌中の生菌密度
3. 学会等名 日本菌学会第64回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------