

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658150

研究課題名(和文) 昆虫便乗性線虫による昆虫病原微生物デリバリーシステム

研究課題名(英文) Utilization of entomophilic nematodes as carriers of entomopathogenic microbes

研究代表者

神崎 菜摘 (Kanzaki, Natsumi)

独立行政法人森林総合研究所・森林微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：70435585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：バックグラウンド情報としてマツノマダラカミキリ、およびその近縁種の保持線虫相調査を行った結果、マツノザイセンチュウをはじめ、ニセマツノザイセンチュウ、*Contortylenchus genitalicola* など、複数種(合計6種類)の線虫と何らかの相互関係を有していることを確認した。そして、昆虫便乗性自由生活性線虫の一種、*Diplogasteroides* sp. を新種、*D. andrassyi* として記載した。これに、*Beauveria bassiana* F263 株と *Metarhizium* sp. を伝搬させたところ、高い伝搬効率を得るには口腔のより広い種が適していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The nematode fauna associated with the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* was examined. In total, six species on nematodes including pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* and *Contortylenchus genitalicola* were isolated. Within these nematode species, undescribed *Diplogasteroides* sp. was considered as a candidate for the carrier of entomopathogenic microbes. The nematode species was then, described as *D. andrassyi* n. sp., and feeding experiment was conducted, i.e., the nematode's ability to carry the microbes were examined. The experiment suggested that the nematode species which has wider stoma can be more effective carrier than *D. andrassyi*.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：生物防除 天敵微生物 昆虫嗜好性線虫 昆虫

1. 研究開始当初の背景

害虫を対象とした生物防除資材には、昆虫病原糸状菌、ウイルス、昆虫病原細菌、昆虫病原線虫など、多様なものがあり、いずれも多くの場面で実用に供され、高い効果を上げているものも多い。しかし、これらが効果的に働くためには、いずれも標的とする害虫との直接接触が必要であり、その効果を安定的に発揮できる環境条件は限られている。たとえば、昆虫病原線虫では、土壌など、比較的空隙のある場所において、自ら移動して宿主昆虫を探索するもの、土壌内部であまり動かず、移動してきた宿主昆虫に機会依存的に感染するものなどが知られている。また、昆虫病原糸状菌では、胞子の散布、もしくは設置により、標的とする昆虫がこれに直接接触し、感染することを前提に施用される。すなわち、木材内部など、資材が浸透しにくい基質では標的昆虫への接触の機会が少なく、安定的な効果を発揮させるのが難しい。このため、一回の注入、ないしは散布により、化学薬剤同様の効果を得るためには病原体を標的昆虫までの確に到達させるためのステップが必要である。このためのステップを考えた際、申請者らは線虫に着目した。材内に生息する線虫の中には、特定の昆虫に高い指向性を示す「昆虫便乗線虫」が存在し、これらの中には腸内に菌類の胞子を保持しているものも多くみられる。しかしながら、これら線虫が木材内における糸状菌の分散にどの程度寄与しているかは明らかになっておらず、そのキャリアとしての可能性は未知数であった。

2. 研究の目的

本申請研究では、1) 木材内部での移動分散能力が高く、2) 昆虫病原糸状菌に対しては耐性があり、かつ、3) 標的昆虫への高い指向性を有する線虫に昆虫病原糸状菌の胞子を取り込ませ、これをキャリアとして用いることにより、通常の昆虫病原微生物の到達が難しい木材害虫に対して病原菌資材を効率的に施用する方法の確立を目指す。同時に、糸状菌の分散における微小動物(ここでは線虫)の寄与を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

初年度の試験に用いる糸状菌、線虫株は既に森林総合研究所において維持培養されているものを用いた。また、カミキリは維持培養系統の他、試験地で発生したマツ類枯損木から大量に採集することが可能であったため、これらを用いた。

・材料の選択(神崎・前原)

昆虫病原菌、および昆虫嗜好性線虫株のうち、カミキリに対して強い病原性を発揮する菌株、強い指向性を持つ線虫を選定した。試験開始段階で最も有力な候補と考えられたのは、既にカミキリ成虫を対象とした防除資材にも利用されていた *Beauveria bassiana*

F263 株、および、国内で広くカミキリから分離される細菌食性線虫の一種、*Diplogasteroides* sp. であった。

・マツノマダラカミキリ関連線虫相の調査
本試験に用いる千代田試験地産のマツノマダラカミキリに関して、実験のためのバックグラウンド情報として、随伴、寄生線虫相の調査を行った。調査は、千代田試験地で採集した丸太から羽化脱出したマツノマダラカミキリを解剖し、虫体から線虫の分離、培養、同定という手順で行った。また、比較のため、マツノマダラカミキリ近縁種、ヒゲナガカミキリ、シラフヒゲナガカミキリなどに関してそれぞれ故田尾なる産地のものを用いて、同様の調査を行った。

・線虫による昆虫病原糸状菌伝搬能力の検証(前原)上記 *Diplogasteroides* sp. も含め、細菌食性線虫は細菌懸濁液を飲み込むことによって栄養摂取するが、飲み込まれた細菌のうち、かなりの部分は完全には消化されずそのまま排泄される。そして、この細菌懸濁液に糸状菌の胞子を加えることにより、線虫の消化管内に胞子を取り込ませ、伝搬させることは容易である。これを利用し、消化管内に胞子を取り込ませた線虫から糸状菌を経時的に再分離することで、線虫の胞子保持期間を明らかにする。また、滅菌した材内での線虫の分散様式を検証し、材から糸状菌の再分離を行うことにより、線虫による糸状菌伝搬能力を明らかにする。という手順で試験を行った

・室内実験による殺虫効果の検証(神崎)
病原菌伝搬能力の検証に続き、殺虫効果の検証を行った。実験は室内で行い、線虫分散時の抵抗の少ない寒天培地、比較的抵抗の大きい木粉、木材などの基質とし、これらの基質に胞子を保持した線虫に通過させ、どの程度の距離まで線虫が有効に胞子を伝搬し、殺虫効果を示すかを検討した。

・次年度に利用する実験材料の準備(神崎・前原)24年度分の2回の実証試験のうち、材内幼虫の準備をし、標的外昆虫の影響を排除するため、実験室内での飼育カミキリ個体に産卵させ、ここから得られた孵化幼虫をマツ類の丸太に接種する方法で材内幼虫を準備した。幼虫が不足する場合を考慮し、試験地で得た自然枯死木の中から条件にかなう材を選定、網室に保存したが、これは実験には用いなかった。

・材内幼虫に対する効果実証試験(神崎・前原)

前年のデータ、材料を元に線虫・糸状菌のカミキリ材内幼虫に対する殺虫効果を検証した。実験は森林総研構内の実験網室で行い、蛹化前の時期(5月)に丸太の中心部に線虫接種をした後、羽化脱出シーズン終了後(7-8月)に割材し、材内での幼虫死亡率、死亡要因などを確認した。羽化脱出に成功した個体はそのまま飼育し、生存期間、糸状菌感染の有無などを調査し、防除効果の検証を行った。

・樹皮下幼虫に対する効果実証試験の材料準備（神崎・前原）

野外でのカミキリ産卵シーズン（6-8月）に、前年同様の方法で孵化幼虫をマツ類丸太に接種し、樹皮下幼虫の入った丸太を作成する。同時に、幼虫が不足する可能性を考慮し、野外で捕獲したカミキリに実験網室内で丸太に強制産卵させることにより、予備の実験材料を確保したが、これらは実験には用いなかった。

・樹皮下幼虫に対する効果実証試験（神崎・前原）

この試験は樹皮下幼虫の材内穿孔前（9月）に行った。材内幼虫に対する効果実証試験と同様に樹皮下に糸状菌を保持した線虫を接種し、材内穿孔後（11-12月）に剥皮し、樹皮下幼虫の死亡率、死亡要因を確認する。材内穿孔に成功したカミキリ幼虫は割材して取り出し、生死、糸状菌感染の有無を調査した。

・研究結果のとりまとめ（神崎・前原）

全実験終了後（12-1月）に2年間の研究結果をとりまとめ、今後必要な追加実験の内容、さらには将来的な実用化の可能性を検討した。

4. 研究成果

最初に、この試験の材料として選んだマツノマダラカミキリに関して、その関連線虫相の調査を行った。この結果、マツノマダラカミキリは、マツノザイセンチュウをはじめ、ニセマツノザイセンチュウ、*Contortylenchus genitalicola* など、複数種（合計6種類）の線虫と何らかの相互関係を有していることを確認した。これらのうち、*Contortylenchus genitalicola* はこれまでも、マツノマダラカミキリに対する生物防除素材としての応用が期待されている。そして、本研究の素材としては、これらの中では、昆虫便乗性自由生活性線虫の一種、*Diplogasteroides* sp. が利用可能であると考えられた。

この線虫に関しては、培養試験の結果、細菌食性自由生活性線虫の標準的な培養法である、大腸菌 OP50 株と NGM 培地を用いた培養法が適用可能であることを確認できた。また、詳しい種の同定の結果、未記載種であることが明らかになったため、*Diplogasteroides andrassyi* n. sp. として新種記載を行った。さらに、複数の株を異なる種類のマツノマダラカミキリ近縁種（シラフヒゲナガカミキリ、ヒゲナガカミキリなど）から分離して、*Diplogasteroides* spp. の複数の培養株の確立を行った。

これらの線虫株を用いて、昆虫病原性糸状菌類の媒介試験を行った。

媒介試験に当たって、当初予定していた病原菌株、*Beauveria bassiana* F263 株以外に高い殺虫活性を有する可能性のある *Metarhizium* sp. を野外より分離し、菌株の

確立を行った。

室内系での線虫の菌類運搬能力、及び、これによって伝搬される菌類の殺虫活性に関しての検討を試みたところ、この実験に用いた *Diplogasteroides* spp. は口器の形状が比較的細長いため、糸状菌類の分生子取り込み効率が低く、また、その結果伝搬効率も低くなることが明らかになった（図1、2）。

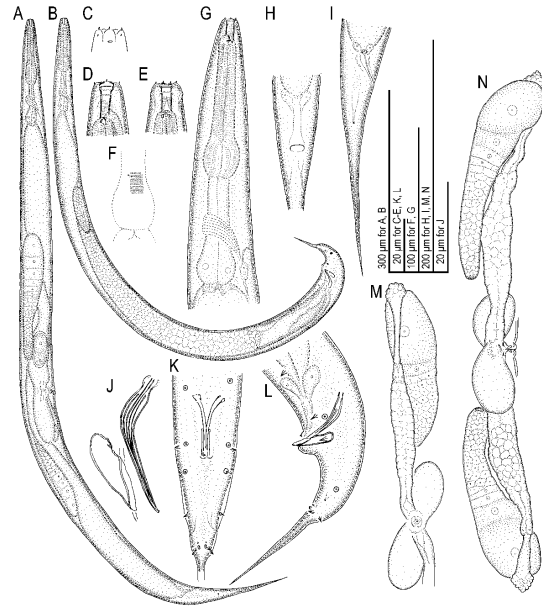


図1. *Diplogasteroides* sp. の一般形態。図はヒゲナガカミキリから分離、記載された *D. andrassyi* であるが、マツノマダラカミキリから分離されたものも一般形態は完全に一致する。

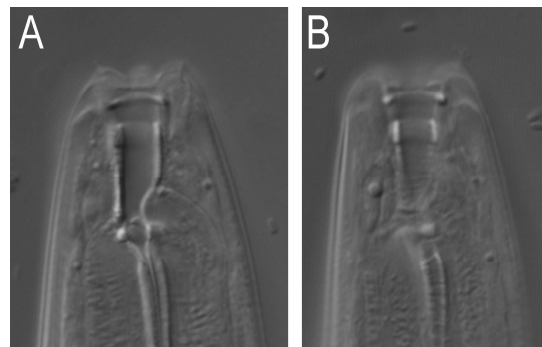


図2. *Diplogasteroides* sp. の口腔形態。口腔の幅は3-4 μm程度。

この問題点を補うため、より口器が広く、分生子、酵母など微生物の取り込み効率が高く、また、昆虫嗜好性が非常に高いと考えられる *Pristionchus* 属などを材料として検討する必要があると考えられた（図3）。

このため、野外より、特に木材穿孔性甲虫、木材利用昆虫に対して高い嗜好性を示す *Pristionchus* 属の複数種をクワガタムシ、シロアリ、コガネムシ類などから分離し、分離株の確立を行った。これらの種に関しては

複数の種を新種として記載し、現在、引き続き昆虫病原微生物キャリアとしての有効性を検証している。

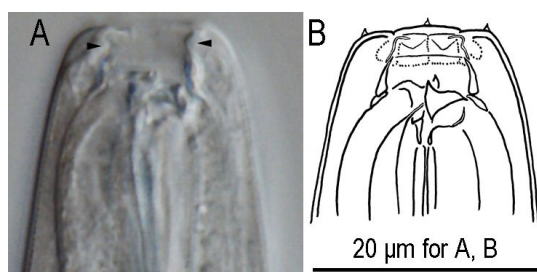


図3 *Pristionchus* 属線虫(*P. bucculentus*)の口腔形態。口腔幅は10 μm 近くあり、糸状菌の分生子を効率的に腸内に取り込むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Kanzaki, N., Tanaka, R. Hirooka, Y. & Maehara, N. (2013). Description of *Diplogasteroides andrassyi* n. sp., associated with *Monochamus grandis* and Pinaceae trees in Japan. *Journal of Nematode Morphology and Systematics* 16: 35-47. (査読有り)
2. Kanzaki, N., Maehara, N., Aikawa, T. & Nakamura, K. (2013). An entomoparasitic adult form in *Bursaphelenchus doui* (Nematoda: Tylenchomorpha) associated with *Acalolepta fraudatrix*. *Journal of Parasitology* 99: 803-815. (査読有り)
3. Kanzaki, N., Ragsdale, E.J., Herrmann, M., Sommer, R.J. & Susoy, V. (2013). Two androdioecious and one dioecious new species of *Pristionchus* (Nematoda: Diplogastridae): new reference points for the evolution of reproductive mode. *Journal of Nematology* 45: 172-194. (査読有り)
4. Maehara, N., Kanzaki, N., Aikawa, T. & Nakamura, K. (2013). Effects of two species of cerambycid beetles, tribe Lamiini (Coleoptera: Cerambycidae), on the phoretic stage formation of two species of nematodes, genus *Bursaphelenchus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Nematological Research* 43: 9-13. (査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Tanaka, S.E., Tanaka, R., Akiba, M., Takeuchi, Y. & Kanzaki, N. (2013). Amensalistic relationship between

Bursaphelenchus sp. and a Japanese native weevil, *Niphades variegatus*. Society of Nematologists 52nd Annual Meeting. 14-17 July, 2013 at Hilton Knoxville, Knoxville, TN.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 菜摘 (KANZAKI NATSUMI)

森林総合研究所・森林微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：70435585

(2) 研究分担者

前原 紀敏 (MAEHARA NORITOSHI)

森林総合研究所・東北支所・主任研究員

研究者番号：20343808