

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：47119

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24255018

研究課題名(和文) アジアの農業環境に配慮した新規微生物によるカンキツグリーニング病防除基盤の確立

研究課題名(英文) Control of citrus greening disease using new microorganisms in Asian agricultural environment

研究代表者

清水 進 (SHIMIZU, SUSUMU)

西日本短期大学・その他部局等・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) 33,900,000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環境に優しい新規生物的防除資材の発掘とそれによるHLB防除基盤の確立を目的とした。

タイ、ベトナム、沖縄および奄美大島で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規寄生菌であり、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。

研究成果の概要(英文)：The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, (Hemiptera: Psyllidae) was discovered in Okinawa in 1998 and apparently arrived without its natural enemies. 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.

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 3 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に応用した HLB の防除に関する研究は皆無であった。

2. 研究の目的

HLB 防除には媒介虫寄生菌の網羅的な調査が国際的に緊急かつ必要不可欠な課題であるが、残念ながら既報の分離株は極めて少数に限られる。そこで、分離株の報告が少ない理由を先ず調査する。次に調査の結果より改良した分離方法によりタイ、ベトナム、沖縄および奄美大島におけるミカンキジラミの天敵糸状菌を分離して種類を明らかにし、その糸状菌による同虫の Ca. Las 媒介抑制を目的とした。

3. 研究の方法

HLB の媒介虫ミカンキジラミの幼虫は体長 1 mm から 2 mm、成虫は体長約 3 mm で、体色は赤褐色ないし黒褐色、前翅には特徴的なまだら模様があり、2 ヶ月以上生存する。成虫は樹木上で吸汁する際、頭を下にして腹部を持ち上げ、翅を斜め上に突き出す姿勢をとるといった特徴がある。体長が小さいことから、その死亡虫の採取には細心の注意を払い先ず沖縄において寄生菌に感染して死亡したミカンキジラミ採取し、以下の実験を行った。

沖縄県で採取した寄生菌罹病ミカンキジラミの顕微鏡下での観察および各種培地を使用して最適な分離方法と分離培地を開発した。

改良した分離方法と培地によりタイ、ベトナム、沖縄および奄美大島より採取した寄生菌罹病ミカンキジラミより寄生菌を分離した。

新規寄生菌については rDNA-ITS 領域と β -チューブリン遺伝子領域の塩基配列の情報および菌株の菌学的性状から同定を試みた。

ミカンキジラミからカンキツ類への Ca. Las の伝播を抑制する天敵糸状菌の検索をベトナムと沖縄で実施するとともに媒介昆虫に対する病原性を調査した。

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(図 1、左)、雑菌に比較して生長速度が極端に遅いこと(図 1、右)が原因あることを先ず明らかにした。

また、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。

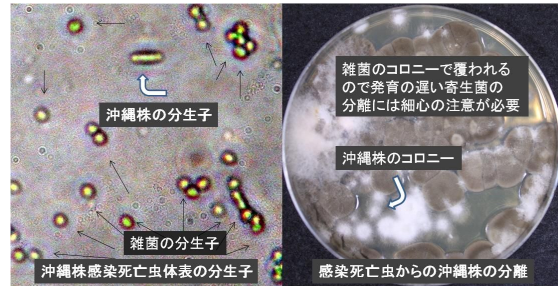


図 1 ミカンキジラミからの寄生菌の分離

寄生菌の分離 タイ、ベトナム、沖縄および奄美大島の死亡虫より上記の事に注意して寄生菌の分離を行った(図 2)。その結果、数株の分離株を得ることができた。



図 2 寄生菌に感染したミカンキジラミ

菌学的性状 各地域の代表的菌株の菌学的性状調査を行った結果、タイおよびベトナム株のコロニーは赤紫色を呈し、表面は綿毛状であり、円形の分生子を形成していた。分生子の大きさは 2.72×2.34 (μm) と、沖縄株に比べて小型であった。これらの分離株は二つのグループに大別され、その一つは従来報告されている *Isaria fumosorosea* と思われる菌株で、それよりコロニー形態がピロード状で分生子が球形の分離株が多数分離されミカンキジラミでは新規寄生菌と考えられた。

沖縄株のコロニーは白色を呈し、その表面は羊毛状であり、連鎖的に楕円形の分生子を形成していた。分生子の大きさは 4.95×2.22 (μm) あった(図 3)。分生子の色調は L-broth 寒天培地上ではクリーム色であったが、PDA では赤紫色を呈した。



図3 沖縄株の分生子形成様式

沖縄株の成長速度は雑菌よりはかなり遅いが他の昆虫病原性糸状菌と比較すると早く、分生子形成も早く、接種3日後には多数の分生子が認められた(図3)。

一方、奄美大島から分離した株は分生子形成細胞の基部が膨れ、分生子は亜球形(2~3×2.0~2.5μm)でジグザク状に形成されたことより *Beauveria bassiana* と同定された。

沖縄およびベトナムより分離され、新規寄生菌と考えられる分離株について rDNA-ITS 領域と α-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(図4)。

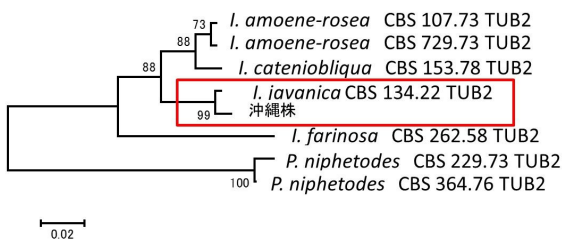


図4 沖縄株の塩基配列に基づく系統樹

その結果、沖縄株は *I. javanica* と同定され、同虫では新規寄生菌となった。

一方、ベトナムより分離された *I. fumosorosea* と類似した株は *Purpureocillium lilacinus* と同定され、同様に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。

新規寄生菌の沖縄株の性状を各種培地を用いて調査した。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が、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。

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。他の昆虫病原性糸状菌(*B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* など)と比較すると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。

沖縄株の防除効果 沖縄株のミカンキジラミの成虫に対する病原力は極めて強く、既報の株の100倍以上であった。そこで、幼虫に対する病原力を調査した結果、幼虫に対しても同様な病原力を示した(図5)。この病原力はイタドリマダラキジラミに対しても同様な病原力を示したが、他の昆虫(ミナミキイロアザミウマ、ハダニ類およびアブラムシ類など)に対する病原力は弱かった。

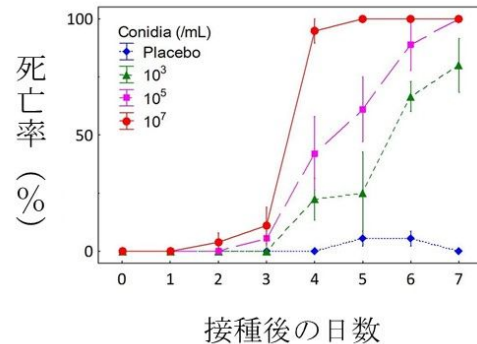


図5 沖縄株のミカンキジラミ幼虫に対する病原性

次に、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。10⁶~10³/mLの分生子を散布後、成虫を放飼した場合いずれの濃度においても高い死亡率が得られた。

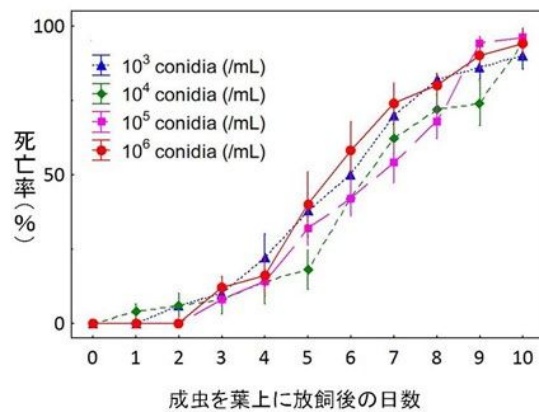


図6 沖縄株の葉上散布のミカンキジラミ成虫に対する影響

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した。10⁷/mLの分生子を接種した場合、葉上接種区において死亡するまでに長時間は要したが、両者において大差は認められなかった(図7)。さらに、10³/mL~10⁶/mL区においては直接接種区よりも高い病原性が認められた。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。

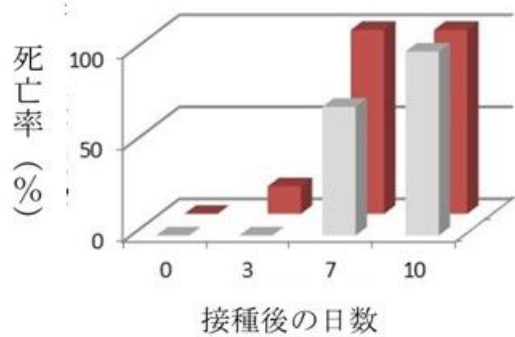


図7 沖縄株の直接接種 (赤) と葉上接種 (灰) のミカンキジラミに対する病原性

次に、沖縄株を接種した成虫から健全虫への水平伝搬の可能性を検討した。この場合、葉上接種と同様に高率の水平伝搬が認められた。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ることから HLB の有力な生物的防除資材であることが判明した。

以上の結果を総括すると次のようになる。カンキツグリーンング病 (Citrus Huanglongbing, HLB) は、カンキツ葉の篩部に局在する病原細菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Ca.Las*) の感染により発生するカンキツ類の病害で、接木の他、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。このうちの *P. lilacinus* 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. rDNA-ITS 領域と β -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. javanica*、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性は葉上接種および個体間の水平伝搬でも維持された。

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、今後その点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 5 件)

Nishi, O., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., and Shimizu, S. Comparison of the germination of *Metarhizium* spp. conidia from Japan at high and low temperature. *Letters in Applied Microbiology* 57, 554-560, (2013) (査読有)

Iwanami, T., Tuan, DH., and Ichinose, K. Asian citrus greening and assessment of current technique for reducing disease occurrences. *Journal of Agricultural Science and Applications*. 2, 13-21, (2013) (査読有)

清水 進 *Metarhizium* 属糸状菌の最近の研究動向 ~ 分類と新機能を中心として ~ 蚕糸・昆虫バイオテック 83, 153-158 (2014) (査読有)

上地奈美・岩波徹 ミカンキジラミ *Diaphorina citri* 成虫 (半翅目: キジラミ科) の定位に対するカラー粘着とタップおよび反射資材の影響 *日本応用動物昆虫学会誌*, 58, 119-125 (2014) (査読有)

Fujiwara, K., Uechi, N., Shimizu, Y., Toda, S., Inoue, H., Yamaguchi, T., Iwanami, T., and Fujikawa T. Effective molecular detection of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in bulk insect samples from sticky traps. *Journal of Applied Entomology*, article first published online: 9 MAR 2016, DOI: 10.1111/jen.12315 (2016) (査読有)

[学会発表](計 15 件)

西 大海・飯山和弘・青木智佐・清水 進

Metarhizium 系状菌の昆虫と生息環境に対する適応進化 (シンポジウム (5) 昆虫寄生菌研究の最前線) 第 10 回昆虫病理研究会シンポジウム 2012. 9. 23 帯広畜産大学北海道

Oumi, N., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., and Shimizu, S. Host-dependent lineage diversification of Scarabaeidae-specific pathogen *Metarhizium majus*. 2012 International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2012, 8, 6 Centro de Convenciones de la UCA Puerto Madero, Buenos Aires, Argentina

西 大海・飯山和弘・青木智佐・清水 進 *Metarhizium majus* のシロテンハナムグリ病原性系統は台湾カブトムシ由来の系統とは独立の系統である 第 56 回日本応用動物昆虫学会 2012. 3. 28 近畿大学農学部奈良良キャンパス 奈良

清水 進 *Metarhizium* 属系状菌の研究動向と SMZ-2000 株の性状 第 57 回日本応用動物昆虫学会 2013. 3. 28 日本大学生物資源科学部 神奈川

清水 進 天敵系状菌による害虫防除の現状と課題 九州病害虫防除推進協議会創立 43 周年記念講和会 2013, 5, 16 福岡ガーデンパレス 福岡

Hayashi, T., Hayashi, M., Hoa, NV., Chau, NM., and Ichinose, K. Growing process of reduced and deformed citrus trees for yield augmentation, visualized in three dimensional computer graphics. International symposium on superfruits: myth or truth? 2013, 7, 1-3. Ho chi Minh City, Vietnam/

上地奈美・宮田伸一・岩波徹 ミカンキジラミ成虫の定位に対するカラー粘着とタップおよび反射資材の影響 第 58 回日本応用動物昆虫学会 2014, 3, 26 ~ 28. 高知大学高知

上地奈美・井上広光 カンキツグリーニング病と媒介虫ミカンキジラミの防除に関する成果と展望 第 58 回日本応用動物昆虫学会 2014, 3, 26 ~ 28. 高知大学 高知

Nishi, O., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., and Shimizu, S. Comparative virulence analysis of entomopathogenic fungus *Metarhizium* spp. in different ambient temperature conditions. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Science in Asia 2013, 11, 7 ~ 8. 宮崎大学 宮崎

Shimizu, S., Chau N. M., Hoa, N., Huynh N. V., Duong, T., Quoc T., Hayashi, T., and Ichinose, K. Pathogenicity of two entomopathogenic fungi isolated on *Diaphorina citri* and their potential reducible effect on the vector population.

4 th Internatinal Reseach Conference on Huanglongbing(HLB) 2015, 2, 9 ~ 13. Orland, Florida USA

Yuasa, K., Hoa, N.V., and Ichinose, K. No evidence of the huanglongbing transmission on young King mandarin tree by using scissors used for infected trees. 4 th Internatinal Reseach Conference on Huanglongbing(HLB) 2015, 2, 9 ~ 13. Orland, Florida USA

Yuasa, K., Hoa, N.V., and Ichinose, K. Extension project for improvements of King mandarin cultivation under sever Huanglongbing circumference in southern Vietnam. 4 th Internatinal Reseach Conference on Huanglongbing(HLB) 2015, 2, 9 ~ 13. Orland, Florida USA

清水 進 天敵系状菌を用いたミカンキジラミ防除の可能性 カンキツグリーニング病研究会 2015, 2, 4. つくば交際会館茨城

清水 進 天敵微生物による害虫 樹木 医実践技術講座 2015, 8, 29. 西日本短期大学 福岡

清水 進 天敵微生物を害虫つかった害虫防除 門司植物防疫所植物防疫官研修 2015, 10, 1. 門司植物防疫所 福岡

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

(2) 研究分担者

高木 正見 (TAKAGI MASAMI)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：20175425

上地 奈美 (UECHI NAMI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹試験場・品種育成・病害虫領域・研究員

研究者番号：40507597

市瀬 克也 (ICHINOSE KATUYA)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・国際農林水産産業研究センター・沖縄支所・農林水産技官

研究者番号：70355642