

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658276

研究課題名（和文） 環境を考慮した新規拮抗微生物によるカンキツグリーニング病の防除

研究課題名（英文） Control of citrus greening disease using environment-friendly new microorganisms

研究代表者

清水 進 (SHIMIZU SUSUMU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：20187454

研究成果の概要（和文）：本研究はカンキツグリーニング病（Citrus huanglongbing, HLB）の病原細菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Ca. Las*) を媒介するミカンキジラミ *Diaphorina citri* 中で、同細菌と拮抗する微生物を各地で分離して、それらの抑制力を利用した新規生物的防除法の確立を目指している。沖縄およびベトナムより糸状菌に感染したキジラミより糸状菌を分離し、同定を行い病原性を調査して有望な菌株を得た。

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  $\alpha$ -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

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：昆虫病理学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：カンキツ、グリーニング病、ベクター

## 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を応用した HLB の防除に関する研究は皆無である。

## 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ベトナムと沖縄県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* 媒介抑制効果のメカニズムを調査する。

### 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ミリから2ミリ、成虫は体長約3ミリで、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か月以上生存する。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(図1)。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はら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。



図1 媒介虫の成虫(左)および幼虫(右)

- ①沖縄県で採取した寄生菌罹病ミカンキジラミの頭顕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。
- ②改良した分離方法と培地によりベトナムと沖縄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。
- ③得られた菌株の菌学的性状および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から系統解析して同定を試みた。
- ④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

①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2、左)、雑菌に比較して生長速度が極端に遅いこと(図2、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。

②寄生菌の分離 沖縄およびベトナムの死

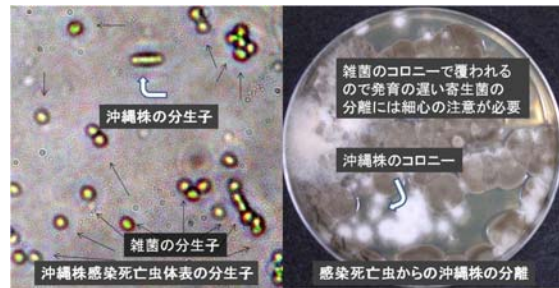


図2 ミカンキジラミからの寄生菌の分離



図3 ミカンキジラミからの寄生菌の分離株

亡虫より上記の事に注意して寄生菌の分離を行った。その結果、図3に示したように数株の分離株を得ることができた。

③沖縄およびベトナム株の菌学的性状 両国の代表的菌株の菌学的性状調査を行った結果、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、楕円形の分生子を形成していた。分生子の大きさは  $4.95 \times 2.22$  ( $\mu\text{m}$ ) あった。一方、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  $2.72 \times 2.34$  ( $\mu\text{m}$ ) と、沖縄株に比べて小型であった。なお、ベトナムおよびタイの死亡虫からは従来報告されている *Paecilomyces fumosoroseus* と思われる菌株が多数分離されたがその性状については現在調査中である。

rDNA-ITS領域をダイレクトシーケンスにより沖縄およびベトナムにおいて新規と考えられる分離株の塩基配列を決定したところ、どちらも *Paecilomyces* 属に属するという結果を得た。

そこで、*Paecilomyces* 属の種同定に多様されるβ-チューブリン領域の塩基配列を用いて相同性の高い種とともにフリーソフト Gene Doc を用いてマルチプルアライメントを行った。比較したβ-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)。

β-チューブリン領域の塩基配列に基づく系統樹からも沖縄株は *P. javanicus*、ベトナム株は *P. lilacinus* と相同性が高いと示唆された。

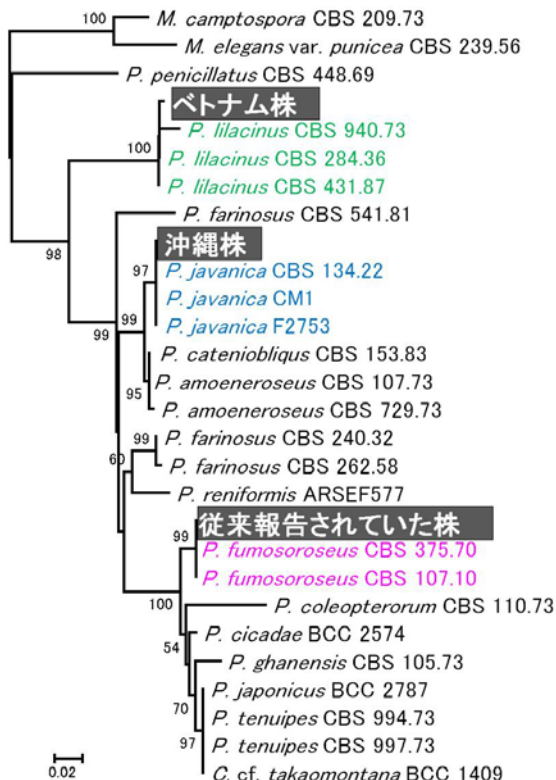


図4 ミカンキジラミ寄生菌の系統樹

菌学的に類縁関係があるとされる *P. javanicus*, *P. tenuipes*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus*, *P. marquandii* の既報の文献との菌学的性状を再度詳細に調査した結果、菌学的にも矛盾がなく沖縄株は *P. javanicus*, ベトナム株は *P. lilacinus* と同定された。なお、本研究で初めて寄生が認められた沖縄株は図3のように特徴的な分生子を有していた。

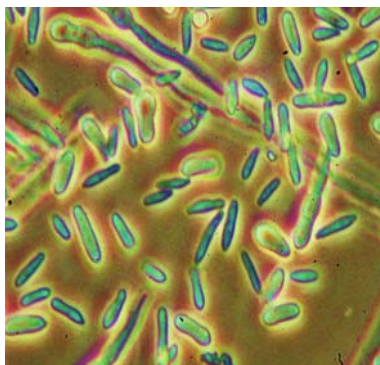


図5 沖縄株の分生子

④ 沖縄およびベトナム株の病徴

沖縄およびベトナム株の接種分生子濃度を  $10^7$ /ml (実用濃度) に調整し、病徴を調査したところ、沖縄株は通常の死亡形態を呈するのに対し(図6、上)、ベトナム株は口吻を葉面に突き刺したまま死亡する特徴を有していた(図6、下)。また、成葉の表面に卵が産み散らかされているなど異常行動が観察で

きたことから、東アジアには多種多様の機能を有する分離株がさらに多く存在する可能性が高いと考えられる。



沖縄株罹病死亡個体



ベトナム株罹病死亡個体

図6 各菌株の病徴

⑤ 定量病原力調査 各種濃度の分生子を使用してミカンキジラミ成虫について病原力の調査を実施した。沖縄株の殺虫活性は、アメリカで実用化が期待されている分離株の  $10^7$ /ml 接種区よりも沖縄株の  $10^6$ /ml 接種区の死亡率が高く、10倍以上の殺虫活性が認められ(図7)、沖縄株の実用化にともなう詳細な解析が急務となった。さらに、同株はインドネシア株の100倍以上の病原力を示した。

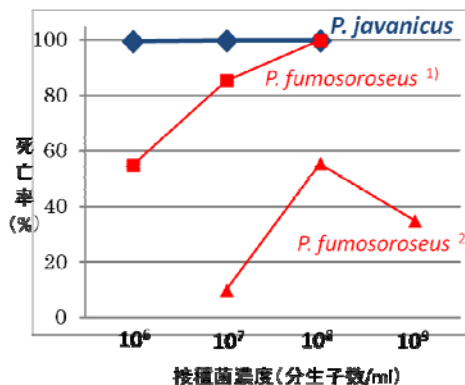


図7 沖縄株 *P. javanicus* と既報の分離株の病原力比較

1) Hoy et al. (2010) *Florida Entomologist*, 93, 24-32.  
2) Subandiyah et al. (2000) *Mycoscience*, 41, 509-513.

一方、ベトナム株の分生子 $10^8$ ,  $10^7$ および $10^6$ /mlをそれぞれミカンキジラミ成虫に接種した場合の死亡率は73%、57%および20%となり、既報の分離株の死亡率とほぼ同等になった。

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. 沖縄およびベトナムの寄生菌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、寄生菌が雑菌に被われること、生長が遅いことがその分離を難しくしていることが判明した。

2. rDNA-ITS領域と $\beta$ -チューブリン遺伝子の塩基配列の系統解析から、沖縄株は *P. javanicus*, ベトナム株は *P. lilacinus* と同定できた。2菌株ともミカンキジラミ寄生菌としては新種の寄生菌であった。

3. 両株を健全ミカンキジラミに接種し、その病原力を調査したところ、既報の病原性寄生菌と比べ、沖縄株の病原力は極めて強かったが、ベトナム株の病原力は既報とほぼ同じであった。

## 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)

(1) Oumi N., Keiichi H., Iiyama K., Yasunaga-Aoki C., and Shimizu, S. Phylogenetic analysis of *Metarhizium* spp. isolated from soil in Japan. *Applied Entomology and Zoology* 46, 301-309 (2011)

(2) Tuan D.H. and Ichinose, K. Control strategy of citrus greening based on the vector population density. In JIRCAS Working Report No. 72, pp. 21-24. (2011)

[学会発表] (計 12 件)

① 清水 進 *Metarhizium* 属糸状菌の研究動向と 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

② 西 大海・飯山和弘・青木智佐・清水 進 *Metarhizium* 糸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

③ Oumi Nishi, Kazuhiro Iiyama, Chisa Yasunaga-Aoki, Susumu Shimizu 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

④ 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タイワン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キャンパス 奈良

⑤ 田原彰子・飯山和弘・青木智佐・清水 進 ミカンキジラミ寄生菌の性状 日本蚕糸学会第 65 回東北支部・第 62 回関東支部・第 77 回関西支部・第 67 回九州支部合同大会 昆虫機能・利用学術講演会 2011. 11. 5 岩手大学農学部 岩手

⑥ Oumi Nishi, Kazuhiro Iiyama, Chisa Yasunaga-Aoki, Susumu Shimizu Phylogenetic and pathogenic divergence within *Metarhizium majus* lineage. International Conference on Invertebrate Pathology and Microbial Control, OECD Symposium on Disease in Aquatic Crustaceans & 44th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2011. 8. 10 Halifax, Nova Scotia, Canada

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 進 (SHIMIZU SUSUMU)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 20187454

### (2) 研究分担者

市瀬 克也 (ITINOSE KATUYA)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄研究センター・糸満支所  
農林水産技官  
研究者番号: 70355642