昆虫病原性糸状菌 *Beauveria amorphae* のナガチャコガネ幼虫に対する 殺虫活性と付着能力の関係

柳沼 大^{1,2,*}・廣森 創¹・廿日出 正美¹

¹ 静岡大学農学部

² 岐阜大学連合農学研究科

Relationship between Virulence and Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria amorphae* (Strain: HpBa-1) to the Yellowish Elongate Chafer, *Heptophylla picea* (Motschulsky) (Coleoptera: Scarabaeidae). Dai YAGINUMA,^{1,2,*} Hajime HIROMORI¹ and Masayoshi HATSUKADE¹ ¹Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, Shizuoka University; Ohya, Shizuoka 422-8529, Japan. ²United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University; Gifu 501-1193, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 48: 101-108 (2004)

Abstract: We isolated an entomopathogenic fungus, *Beauveria amorphae* (Strain: HpBa-1), from *Heptophylla picea* larva. When the larvae were inoculated with HpBa-1, 90.0% cumulative mortality was obtained in 30 days. However, the cumulative mortality was low when the larvae were inoculated with *Metarhizium anisopliae* (Strain: PMA-7) isolated from *H. picea* larvae. The high virulence of HpBa-1 to *H. picea* larvae was analyzed by investigating the conidial adhesion and germination of HpBa-1 on larval cuticle. Numerous HpBa-1 conidia adhered to the *H. picea* cuticle and most conidia on the *H. picea* cuticle remained over time. HpBa-1 conidia germinated on *H. picea* cuticle 96 h postinoculation. However, few PMA-7 conidia adhered to the *H. picea* cuticle as compared to HpBa-1 and did not germinate on the cuticle 96 h postinoculation. From these results, conidial adhesion and germination on the cuticle of *H. picea* is one factor causing high virulence of HpBa-1 to the larvae.

Key words: *Beauveria amorphae*; entomopathogenic fungus; *Heptophylla picea*; cuticle; adhesion

緒 言

ナガチャコガネ *Heptophylla picea* (Motschulsky) (Coleoptera: Scarabaeidae) は、沖縄を除く日本全土に広く分布し、チャやハスカップを加害する害虫として知られている (刑部・小泊, 1984; 柿崎ら, 1991)。

静岡県では、特にチャ園においてナガチャコガネの発生が増加している (刑部・小泊, 1984)。本種では成虫によるチャの葉の食害は問題とならない (Nishigaki, 1988) が、幼虫による根の食害が一番茶の収量を大幅に減少させるため重要害虫となっている (刑部・小泊, 1984)。現在、チャ園におけるナガチャコガネ防除には、成虫および幼虫を対象として化学合成農薬を使用している。しかし、栽培作業上の問題、あるいは本種幼虫が潜土性であるという理由により十分な防除効果が得られず、難防除害虫となっている (刑部・小泊, 1984)。そのため、より効率的な防除方法の確立が望まれている。

コガネムシ類幼虫防除における化学薬剤の代替資材として、昆虫病原性のウイルス、線虫、細菌、糸状菌を素材とした微生物農薬が高い効果を発揮すると考えられる。特に

昆虫病原性糸状菌は、多くが土壌中に存在する微生物であり、コガネムシ類幼虫の防除素材として適していると考えられる。実際に、古くからコガネムシ類幼虫の防除素材としての研究がなされており (長谷川・小山, 1941)、コガネムシ類幼虫に対し高い殺虫活性を持つ菌株が報告されている (Poprawski and Yule, 1991; Villani et al., 1994; Yokoyama et al., 1998)。しかし、昆虫病原性糸状菌を素材としたコガネムシ類幼虫の防除資材は、日本国内では使用されていない。昆虫病原性糸状菌は自然条件下での殺虫活性が不安定であり、このことが実用化を妨げる理由の一つであると考えられる。

昆虫病原性糸状菌によるナガチャコガネ幼虫の防除を確立するためには、糸状菌の殺虫メカニズムを解明することが重要である。昆虫病原性糸状菌は、宿主昆虫へ経皮的に侵入する (St. Leger et al., 1989)。昆虫の表皮は、昆虫病原性糸状菌の侵入に対し効果的な生体防御機構としての役割を担っていることが報告されている (St. Leger et al., 1991; Butt et al., 1995)。しかし、昆虫表皮がどの程度の生体防御能を保持しているかについての報告は少ない。そこで、昆虫病原性糸状菌の殺虫活性に関わる要因として宿主表皮へ

* Corresponding author

2003 年 6 月 23 日受領 (Received 23 June 2003)

2004 年 1 月 27 日登載決定 (Accepted 27 January 2004)

の分生子の付着量に着目し、ナガチャコガネ幼虫を用いて本菌株の殺虫メカニズムを解明することを目的とした。

筆者らは、野外において採集したナガチャコガネ幼虫から *Beauveria amorpha* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) の菌株 HpBa-1 を分離した。本論文では、ナガチャコガネ幼虫に HpBa-1 を 2 種類の方法で接種し、宿主表皮が昆虫病原性糸状菌の殺虫活性の強弱にどの程度影響を与えるのかについて調査した。さらにナガチャコガネ幼虫表皮上での HpBa-1 分生子の挙動を調査し、殺虫活性との関係を考察した。その結果、HpBa-1 の分生子付着量とナガチャコガネ幼虫に対する殺虫活性との間に関連が見られたので報告する。

本文に入るに先立ち、*B. amorpha* を同定して頂いた独立行政法人森林総合研究所の島津光明博士、また菌株を分譲していただいた独立行政法人農業生物資源研究所の宮本和久博士に感謝の意を表する。

材料および方法

1. 供試虫

供試虫としてナガチャコガネ幼虫を用いた。また、対照昆虫としてドウガネブイブイ幼虫を用いた。いずれも 3 齢まで飼育した後、実験に使用した。以下、供試虫は全て 3 齢幼虫を示す。

ナガチャコガネ *Heptophylla picea* (Motschulsky) は、本間ら (1994) の方法に改変を加え飼育した。野外で採集した成虫に餌としてメヒシバを与え 20°C, 16L:8D で飼育し産卵させた。卵を湿らせた乾熱滅菌土 (150°C, 4 時間) に移植した。孵化幼虫に餌としてニンジン片を与え、プラスチックカップで個別飼育した。20°C, 24D で 3 齢になるまで飼育したものを実験に使用した。

ドウガネブイブイ *Anomala cuprea* (Hope) は、西垣 (1991) の方法に準じて飼育した。野外で採取した成虫に餌として人工飼料 (廿日出ら, 1984) を与え、25°C, 16L:8D で飼育し産卵させた。卵を湿らせた腐葉土に移植し、孵化幼虫をプラスチックカップで個別飼育した。25°C, 24D で 3 齢になるまで飼育したものを実験に使用した。

各試験における、処理後の飼育条件はナガチャコガネ幼虫で 20°C, 24D, ドウガネブイブイ幼虫で 25°C, 24D とした。処理した供試虫は、乾熱滅菌土 (150°C, 4 時間) に滅菌蒸留水を混合した試験土壌 (滅菌土:滅菌水 = 2:1 w/w) を詰めたプラスチックシャーレに移植した。餌としてニンジン片を与えた。本条件で各設定時間まで飼育を行った。

2. 供試糸状菌および分生子懸濁液の作製

供試糸状菌として、当研究室でナガチャコガネ幼虫の感染虫から分離した *B. amorpha* (Strain: HpBa-1), *Metarhiz-*

ium anisopliae (Strain: PMA-7), ドウガネブイブイ幼虫の感染虫から分離した *M. anisopliae* (Strain: ACMA-5) および農業生物資源研究所より分譲していただいたキボシカミキリ *Psacotheta hiralis* (Pascoe) 由来の *Beauveria brongniartii* (Strain: Bb876) を用いた。

各菌株を 1% 酵母エキス加用 Sabouraud dextrose 寒天培地 (SDAY) で 25°C, 24D 条件で 1~2 週間培養し分生子を形成させた。滅菌蒸留水 (0.05% Tween 80 を含む) を用いて、培養した各菌株の分生子を回収し、分生子懸濁液を作製した。各菌株の分生子懸濁液を、トーマの血球計算盤を用いて所定濃度に調整した。注入接種の試験のみ、生理食塩水 (150 mM NaCl, 50 mM KCl) を用いて分生子懸濁液を作製した。

3. ナガチャコガネ幼虫に対する HpBa-1 を含む各菌株の殺虫活性

(1) 虫体浸漬法による殺虫試験

虫体浸漬法により、経皮的に接種試験を行った。

4 菌株 HpBa-1, PMA-7, ACMA-5, Bb876 を供試した。各菌株の分生子懸濁液の濃度を 1.0×10^7 分生子/ml に調整し、浸漬処理を行った (30 秒間)。処理後 30 日間死亡の有無を確認した。コントロールとして滅菌蒸留水 (0.05% Tween 80 を含む) に浸漬処理した。各処理区につき、ナガチャコガネ幼虫およびドウガネブイブイ幼虫をそれぞれ 30 頭供試した。

(2) 注入接種法による接種試験

昆虫病原性糸状菌の通常の感染過程 (経皮感染) を無視して、各菌株を宿主の血体腔内に直接注入し殺虫活性を比較した。

3 菌株 HpBa-1, PMA-7, Bb876 を供試した。各菌株の分生子懸濁液の濃度を 1.0×10^7 分生子/ml に調整し、供試虫の胸部第 3 脚基部よりマイクロシリンジを用いて $1 \mu\text{l}$ ずつ注入接種した。処理後 14 日間死亡の有無を確認した。また、コントロールとして生理食塩水を注入接種した。各処理区につき、ナガチャコガネ幼虫およびドウガネブイブイ幼虫をそれぞれ 30 頭供試した。

4. 各菌株の宿主昆虫表皮上における付着能力

宿主表皮上における各菌株の分生子の付着数を、蛍光顕微鏡を用いて調査した。

分生子の蛍光標識は、Hung and Boucias (1992) の方法に適宜改変を加え行った。Carbonate-Bicarbonate Buffer (0.01% Tween 80, pH 9.6, 以下 CB buffer 溶液) を用いて HpBa-1, PMA-7 の分生子懸濁液を作製した。この懸濁液を遠心分離 ($2,000 \times g$, 4°C, 10 分間) し、沈殿に CB buffer 溶液を加え再び遠心分離 ($2,000 \times g$, 4°C, 10 分間) した。上清を捨て沈殿した分生子に蛍光色素 FITC (Fluorescein Isothiocyanate) を CB buffer で溶解したもの (濃度 0.1%) を加え、20°C で 1 時間放置した。その後、滅菌蒸留水で

遠心洗浄 ($2,000\times g$, 4°C , 10 分間) した (5 回). 上清を捨て, 沈殿した分生子に滅菌蒸留水 (0.05% Tween 80 を含む) を加え分生子懸濁液とし, 濃度を 2.0×10^7 分生子/ml に調整した.

表皮への付着数の算出は, Altre et al. (1999) を参考にし, 以下のように行った. 濃度調整した各菌株の分生子懸濁液に, 供試虫を浸漬処理した (30 秒間). 浸漬処理 1 時間後および 24 時間後に供試虫を解剖し, 胸部第 3 脚周囲の表皮を摘出したものをサンプルとし, 蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, BX-FLA) を用いて観察した. 解剖はメラニンを抑制するため鞘翅目昆虫用のリンゲル氏液 (NaCl 9.8 g, KCl 0.77 g, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, Na_2HPO_4 0.47 g, KH_2PO_4 0.45 g, 滅菌蒸留水 1,000 ml, pH 7.2) 中で行った. 分生子の付着数は, 蛍光顕微鏡 1 視野中に存在する分生子を計数し, 顕微鏡 1 視野の面積から表皮 1mm^2 に付着している分生子数を算出した. 供試虫 1 頭から 1 サンプル摘出し, 計数は 1 サンプルあたり 3 カ所を行った. 各処理区につき, ナガチャコガネ幼虫およびドウガネブイブイ幼虫をそれぞれ 10 頭供試した.

5. 各菌株の宿主表皮上における発芽能力の調査

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて, 糸状菌処理後の宿主表皮の観察を行い分生子の状態について調査した.

滅菌蒸留水 (0.05% Tween 80 を含む) を用いて, HpBa-1, PMA-7 の分生子懸濁液を作製した. 分生子懸濁液の濃度を 1.0×10^7 分生子/ml に調整した. 濃度調整した分生子懸濁液に, 供試虫を浸漬処理した (60 秒間). 分生子の発芽の有無を確認するために, 接種試験での発病までの時間を考慮して設定時間を処理 48 時間後および 96 時間後とした. 設定時間経過後の供試虫を固定し, SEM で付着分生子およびその挙動について観察した. 各処理区につき, ナガチャコガネ幼虫およびドウガネブイブイ幼虫をそれぞれ 10 頭供試した. 固定法を以下に示す.

まず, 前固定として 0.2% タンニン酸を添加した 5% グルタルアルデヒド水溶液で 2 時間, さらに 2% タンニン酸を添加した 5% グルタルアルデヒド水溶液を用いて, 3 時間アスピレーターで脱気した. 前固定を行った後, 供試虫を蒸留水で洗浄した (6 回). その後, 1% オスミウム酸水溶液に 12 時間浸漬し, 後固定した. 再び蒸留水で洗浄し (6 回), エタノールシリーズ (30~100%) で脱水した. これを酢酸イソアミルに置換し臨界点乾燥を行った後, 金を蒸着した. これをサンプルとし, SEM (JSM-T300, 日本電子社) で観察を行った (25kV).

6. 統計解析方法

虫体浸漬法による供試菌株間の殺虫活性は, HpBa-1 とそれ以外の菌株間の処理 30 日後の死亡数を χ^2 -test および Fisher's exact test で比較した ($\alpha=0.01$). 注入接種法による供試菌株間の殺虫活性は, HpBa-1 とそれ以外の菌株間の処理 14 日後の死亡数を χ^2 -test および Fisher's exact test で比較した ($\alpha=0.01$). 付着分生子数の試験は, 各処理区, 処理 1 時間後および処理 24 時間後の付着分生子数を Mann-Whitney U test で比較した ($\alpha=0.01$).

結 果

1. 経皮的処理を行った場合のコガネムシ類幼虫に対する殺虫活性

ナガチャコガネ幼虫に HpBa-1, PMA-7, ACMA-5, Bb876 を経皮的に接種した各菌株の殺虫活性を Fig. 1 に示す. HpBa-1 がナガチャコガネ幼虫に対して最も強い殺虫活性を示し, 他菌株の殺虫活性との間に有意差が確認された ($\chi^2=41.9$; $\text{df}=1$; $p<0.01$ [PMA-7], $\chi^2=26.9$; $\text{df}=1$; $p<0.01$ [ACMA-5], $\chi^2=41.9$; $\text{df}=1$; $p<0.01$ [Bb876]). HpBa-1 処理区において, 処理 12 日後に感染死亡虫がはじめて確認された. その後, 徐々に増加し処理 30 日後で累積死亡率が 90.0% に達した. 他菌株では, 処理 30 日後に PMA-7 処理

Fig. 1. Cumulative mortality of *Heptophylla picea* larvae by the dipping method. The concentration of each conidial suspension was 1.0×10^7 conidia/ml. ■: HpBa-1, □: PMA-7, ○: ACMA-5, ●: Bb876, ◇: distilled sterilized water containing 0.05% Tween 80.

Fig. 2. Cumulative mortality of *Anomala cuprea* larvae by the dipping method. The concentration of each conidial suspension was 1.0×10^7 conidia/ml. ■: HpBa-1, □: PMA-7, ○: ACMA-5, ◇: distilled sterilized water containing 0.05% Tween 80.

Fig. 3. Cumulative mortality of *Heptophylla picea* larvae injected with each conidial suspension. The concentration was 1.0×10^7 conidia/ml. ■: HpBa-1, □: PMA-7, ●: Bb876, ◇: saline.

区で 3.3%, ACMA-5 処理区で 20.0%, Bb876 処理区で 3.3% の累積死亡率が確認された。

また、比較対照としてドウガネブイブイ幼虫を供試して同様の試験を行った (Fig. 2)。処理 30 日後における累積死亡率は HpBa-1 処理区で 3.3%, PMA-7 処理区で 16.7%, ACMA-5 処理区で 20.0% であった。HpBa-1 と他菌株の殺虫活性との間に有意差は確認されなかった ($p > 0.01$ [PMA-7], $p > 0.01$ [ACMA-5])。

2. 血体腔内に注入接種を行った場合のコガネムシ類幼虫に対する殺虫活性

ナガチャコガネ幼虫の血体腔内に、HpBa-1, PMA-7, Bb876 の分生子を直接注入接種した結果を Fig. 3 に示す。HpBa-1 処理区で処理 4 日後にはじめて感染死亡虫が現れ、処理 6 日後に累積死亡率が 100.0% に達した。PMA-7 処理区で処理 1 日後、Bb876 処理区で処理 5 日後にはじめて感染死亡虫が確認された。処理 14 日後の累積死亡率は HpBa-1 で 100.0%, PMA-7 処理区で 80.0%, Bb876 処理区で 16.6% であった ($p > 0.01$ [PMA-7], $\chi^2 = 39.5$; $df = 1$; $p < 0.01$

[Bb876])。

対照としてドウガネブイブイ幼虫に HpBa-1, PMA-7, Bb876 を注入接種した場合の殺虫活性を調査した (Fig. 4)。感染死亡虫がはじめて確認されたのが、HpBa-1 処理区で処理 2 日後、PMA-7 処理区で処理 4 日後、Bb876 処理区で処理 6 日後であった。処理 14 日後の累積死亡率は HpBa-1 で 100.0%, PMA-7 処理区で 100.0%, Bb876 処理区で 80.0% であった ($p > 0.01$ [Bb876])。

3. 蛍光顕微鏡観察による宿主表皮に対する各菌株の付着能力の調査

ナガチャコガネ幼虫に HpBa-1 を経皮的に処理した場合、処理直後である 1 時間後における付着分生子数は 536 ± 16.4 分生子/mm² であった (Table 1)。顕微鏡観察の結果から、HpBa-1 の分生子がナガチャコガネ幼虫表皮に高密度で付着していることが確認できた。また、HpBa-1 分生子は表皮全体に付着しており、特に体毛の基部や関節間膜のような凹凸のある部分に凝集した状態で付着していた (Fig. 5A)。HpBa-1 処理 24 時間後では、付着分生子数は

Fig. 4. Cumulative mortality of *Anomala cuprea* larvae injected with each conidial suspension. The concentration was 1.0×10^7 conidia/ml. ■: HpBa-1, □: PMA-7, ●: Bb876, ◇: saline.

Table 1. Adhesion of FITC-labeled fungal conidia to the cuticle of *Heptophylla picea* and *Anomala cuprea* larvae^a

Insects	Strain	Hours after application ^b	
		1 h	24 h
<i>H. picea</i>	HpBa-1	536 ± 16.4 a ^c	312 ± 9.6 a
	PMA-7	78 ± 3.6 a	22 ± 0.8 b
<i>A. cuprea</i>	HpBa-1	106 ± 5.0 a	14 ± 0.5 b
	PMA-7	120 ± 5.9 a	26 ± 1.3 b

^a The larvae were treated with each fungus by the dipping method (30 s). The larvae were reared individually 1 h and 24 h after each application. The concentration of each suspension was 2.0×10^7 conidia/ml.

^b Numbers within rows indicate the number of conidia on 1 mm² of cuticle from near the third leg. Data are shown as mean ± SE.

^c Numbers within rows followed by the same letter were not significantly different. Significant differences were tested between 1 h and 24 h by Mann-Whitney *U* test ($p < 0.01$).

312 ± 9.6 分生子/mm² であり (Table 1), 処理 1 時間後の付着分生子数との間に有意差は認められなかった ($U = 20.0$, $Z = -2.3$, $N_1 = 10$, $N_2 = 10$, $p > 0.01$). また顕微鏡観察により, 残存している分生子は処理直後と同様に凝集した形で高密度に付着していた (Fig. 5B). PMA-7 処理 1 時間後の付着分生子数は 78 ± 3.6 分生子/mm² であり (Table 1), 個々の分生子が宿主表皮上にまばらに付着している状態が観察された (Fig. 5C). PMA-7 処理 24 時間後における付着分生子数は 22 ± 0.8 分生子/mm² であり, 多くの分生子が離脱し有意に減少していた ($U = 8.5$, $Z = -3.1$, $N_1 = 10$, $N_2 = 10$, $p < 0.01$) (Table 1 and Fig. 5D).

ドウガネブイブイ幼虫に HpBa-1 を処理した場合, 処理 1 時間後における付着分生子数は 106 ± 5.0 分生子/mm² であった (Table 1). ナガチャコガネ幼虫に対する付着数と比較すると, 付着分生子数は約 1/5 であった. また, 両処理区で時間の経過と共に分生子は離脱し, 処理 24 時間後

の付着分生子数は HpBa-1 処理区で 14 ± 0.5 分生子/mm², PMA-7 処理区で 26 ± 1.3 分生子/mm² となり, 有意に減少していた ($U = 0.0$; $Z = -3.9$; $N_1 = 10$; $N_2 = 10$; $p < 0.01$ [HpBa-1], $U = 3.0$; $Z = -3.6$; $N_1 = 10$; $N_2 = 10$; $p < 0.01$ [PMA-7]) (Table 1).

4. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による両菌株の宿主表皮上での発芽能力の調査

ナガチャコガネ幼虫に HpBa-1 を処理した場合, 処理 48 時間後において分生子は表皮の至る所に多く付着していたが, 発芽しているものは存在しなかった. 処理 96 時間後に観察を行ったところ分生子の明確な発芽を確認することができた (Fig. 6A). HpBa-1 はナガチャコガネ幼虫表皮上で発芽管を伸長させ, 発芽管の外部には不定形の沈着物が観察された (Fig. 6A). ナガチャコガネ幼虫表皮上において, 多くの HpBa-1 分生子が Fig. 6A の様に発芽し, 宿主体内へと侵入していた. これに対し, PMA-7 処理区では処理 48 時間後および 96 時間後で発芽を確認できなかった (Fig. 6B).

ドウガネブイブイ幼虫に両菌株をそれぞれ処理した場合, 48 時間後および 96 時間後において表皮上に分生子はほとんど確認できず, また付着しても発芽は観察されなかった.

考 察

今回, コガネムシ類幼虫の防除のために昆虫病原性糸状菌 *B. amorpha* (HpBa-1), *M. anisopliae* (PMA-7, ACMA-5) および *B. brongniartii* (Bb876) の 4 菌株を用いナガチャコガネ幼虫に対する殺虫活性を調査した. 供試した菌株の中から, ナガチャコガネ幼虫に非常に強い殺虫活性を示す *B. amorpha* の菌株 HpBa-1 を得ることができた (Fig. 1). PMA-7, ACMA-5 および Bb876 と比較すると, 有意に強い殺虫活性を示した ($\chi^2 = 41.9$; $df = 1$; $p < 0.01$ [PMA-7], $\chi^2 = 26.9$; $df = 1$; $p < 0.01$ [ACMA-5], $\chi^2 = 41.9$; $df = 1$; $p < 0.01$ [Bb876]). また, HpBa-1 はドウガネブイブイ幼虫に対して

Fig. 5. Fluorescent photomicrographs of FITC-labeled fungal conidia on *Heptophylla picea* cuticle. Scale: same magnification in the four figures (400 $\times$). A: 1 h after application of HpBa-1. B: 24 h after application of HpBa-1. C: 1 h after application of PMA-7. D: 24 h after application of PMA-7. The larvae were treated with fungi by the dipping method (30 s). The concentration of each suspension was 2.0×10^7 conidia/ml.

Fig. 6. SEM photomicrographs of fungal conidia on *Heptophylla picea* cuticle. Scale: 10 μ m both A and B. A: 96 h after application of HpBa-1. B: 96 h after application of PMA-7. CO: conidia, GT: germ tube, MU: mucus like substance. The larvae were treated with fungi by the dipping method (60 s). The concentration of each suspension was 1.0×10^7 conidia/ml.

はほとんど殺虫活性を示さず、本菌株は、ナガチャコガネ幼虫に対して、特に強い殺虫活性を持つ菌株であることが明らかとなった。

昆虫病原性糸状菌は、宿主に対し経皮的に感染する (St. Leger et al., 1989)。宿主表皮の構造、あるいは構成成分が、昆虫病原性糸状菌の感染に対する物理的・化学的な生体防御反応を示すという報告があり (Smith and Grula, 1981;

Bidochka and Khachatourians, 1988, 1992)、糸状菌の侵入に対し生体防御の場となることで、殺虫活性の強弱に影響を及ぼしていると考えられる。そこで、表皮を無視して分生子を直接宿主の血体腔内に注入接種し、経皮的処理の結果と比較して表皮が糸状菌の殺虫活性に与える影響を調査した。HpBa-1 は、注入接種でも経皮的処理と同様にナガチャコガネ幼虫に対して強い殺虫活性を示した。また、経皮的

処理と比較すると感染死亡虫がみられるまでの時間が短縮され、 LT_{50} 値が 19.8 日から約 1/4 の 5.2 日に短縮された。これらの結果は、分生子が表皮という分生子の侵入を阻害する防御構造を通過するのに時間を要することを示唆している。さらに、経皮的な処理でナガチャコガネ幼虫に対する殺虫活性が弱い PMA-7 および Bb876 でさえも注入接種すると殺虫活性を示すことから、ナガチャコガネ幼虫において表皮という構造が PMA-7、Bb876 分生子の侵入に対する障壁として効果的であると考えられる。ドウガネブイブイ幼虫においても、経皮的処理と比較すると、注入接種での累積死亡率が増加した。この結果からも、コガネムシ類幼虫の表皮が昆虫病原性糸状菌の侵入に対し抑制効果を持っていることが明らかとなった。

以上の結果より、コガネムシ類幼虫の表皮が昆虫病原性糸状菌の侵入に対する障壁となり、殺虫活性の強弱に影響を及ぼしていると考えられたため、宿主表皮上での分生子の挙動を調査した。ナガチャコガネ幼虫に HpBa-1 を処理した場合、処理直後における付着分生子数は非常に多く、時間が経過してもほとんどの分生子が離脱せずに残っていた (Table 1)。これに対し PMA-7 を処理すると、処理直後でさえも付着している分生子数は少なく、時間が経過するとほとんどが離脱してしまう結果となった (Table 1)。従って、HpBa-1 はナガチャコガネ幼虫表皮に対して極めて強い付着能力を持ち、離脱しないと考えられる。昆虫病原性糸状菌の中には宿主表皮に付着する際に、粘液を分泌するものが存在する (St. Leger et al., 1989)。粘液は、分生子が宿主表皮に付着する際に重要な役割を果たしている (Wraight et al., 1990; Clement et al., 1993)。HpBa-1 はナガチャコガネ幼虫表皮に対して強い付着性を示す粘液を持ち、一方 PMA-7 は分生子が粘液を持っていないか、あるいは持っても弱いために分生子が離脱したと推察できる。また、HpBa-1 は多くの分生子が凝集し、塊を形成して表皮全体に付着しており (Fig. 5A)、粘液が存在すれば分生子の付着に効果的に作用している可能性がある。昆虫病原性糸状菌 *Verticillium lecanii* の分生子は、ミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis* に対する付着能力が高く、他の糸状菌より強い病原性を示す (Schreiter et al., 1994) という報告があるように、分生子の付着能力の強弱が、菌株の殺虫活性に深く関与していると考えられる。

また、コガネムシ類幼虫は土壤中で餌を求めて移動を続ける。従って、土壌との摩擦により分生子が物理的に離脱する可能性も考えられる。*Diaprepes abbreviatus* の幼虫に付着した昆虫病原性糸状菌の分生子の離脱の要因の一つとして土壌中での動きが関連しているという報告がある (Quintela and McCoy, 1998)。HpBa-1 は凝集した状態で凹凸のある部位に多く付着しているため、ナガチャコガネ幼虫の動きによる離脱が生じにくいという要因も考えられる。

さらに、今回の SEM 観察において HpBa-1 をナガチャコガネ幼虫に処理した区においてのみ分生子の発芽が確認された (Fig. 6A)。昆虫疫病菌 *Entomophaga maimaiga* が、特異的に強い殺虫活性を示す宿主の表皮上において、他の疫病菌と比較すると高い発芽率を示すことが報告されている (Hajek and Eastburn, 2003)。このように分生子の発芽と殺虫活性には深い関係があり、HpBa-1 がナガチャコガネ幼虫表皮上で確実に発芽した結果、強い殺虫活性が示されたものと考えられる。また、HpBa-1 の発芽管の周囲に不定形の沈着物が確認された (Fig. 6A)。PMA-7 分生子はナガチャコガネ幼虫表皮上で発芽しなかったため、PMA-7 に同様の物質が存在するかどうかについては不明である。しかし今回の結果から、HpBa-1 分生子が発芽する際にこの沈着物を分泌することで、ナガチャコガネ幼虫表皮に強固に付着し確実に体内へと侵入した結果、感染が成立したものと考えられる。

今回の試験により、HpBa-1 はナガチャコガネ幼虫に対して強い殺虫活性を示すことが明らかとなった。コガネムシ類幼虫の表皮は昆虫病原性糸状菌の侵入に対し障壁として働くが、HpBa-1 はナガチャコガネ幼虫表皮に適合性が高く、分生子が付着、発芽することで表皮という障壁を突破し、侵入に成功していると考えられる。本試験により、HpBa-1 のナガチャコガネ幼虫に対する殺虫活性のメカニズムの一部が明らかとなった。今後は、HpBa-1 がナガチャコガネ幼虫体内に侵入した後のメカニズムを調査する必要がある。これらを明らかにすることで、HpBa-1 はナガチャコガネ幼虫に対する有望な防除素材と成り得ると考えられる。

摘 要

野外採集したナガチャコガネ幼虫より、本種幼虫に高い殺虫活性を示す昆虫病原性糸状菌 *Beauveria amorphae* の菌株 HpBa-1 を分離した。HpBa-1 をナガチャコガネ幼虫に処理すると 30 日で 90.0% の累積死亡率が確認されたのに対し、ナガチャコガネ幼虫から分離した *Metarhizium anisopliae* の菌株 PMA-7 での累積死亡率は低かった。その要因を解析するため、分生子がナガチャコガネ幼虫の表皮に対する付着能力および発芽能力を調査した。その結果、HpBa-1 はナガチャコガネ幼虫に対し強い付着能力をもち、処理後時間が経過しても離脱せずに宿主表皮上に多数付着しており、さらに処理 96 時間後には発芽することが確認された。一方、PMA-7 の分生子の付着能力は弱く、処理 96 時間後でも発芽は認められなかった。これらの結果より、HpBa-1 はナガチャコガネ幼虫に強い殺虫活性を示すと考えられた。

引用文献

- Alt, J. A., J. D. Vandenberg and F. A. Cantone (1999) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 332–338.
- Bidochka, M. J. and G. G. Khachatourians (1988) *N*-Acetyl-D-glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2699–2704.
- Bidochka, M. J. and G. G. Khachatourians (1992) Regulation of extracellular *N*-Acetyl-D-glucosaminidase production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.* 39: 6–11.
- Butt, T. M., L. Ibrahim, S. J. Clark and A. Beckett (1995) The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycol. Res.* 99: 945–950.
- Clement, J. A., S. G. Martin, R. Porter, T. M. Butt and A. Beckett (1993) Germination and the role of extracellular matrix in adhesion of urediniospores of *Uromyces viciaefabae* on synthetic surfaces. *Mycol. Res.* 97: 585–593.
- Hajek, A. E. and C. C. Eastburn (2003) Attachment and germination of *Entomophaga maimaiga* conidia on host and non-host larval cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 12–22.
- 長谷川孝三・小山良之助 (1941) 森林害虫の生物的駆除に虫寄生伝染病原体の応用に関する研究・帝室林試報 4: 1–74. [Hasegawa, K. and R. Koyama (1941) Studies for biological control of forest pests, specially practice of entomopathogen. *Bull. For. Exp. Stn. Imperial Household* 4: 1–74.]
- 廿日出正美・山田幸一・飯塚安彦 (1984) ドウガネブイブイの累代飼育法について・応動昆 28: 14–19. [Hatsukade, M., K. Yamada and Y. Iizuka (1984) Rearing method for the production of successive generation of *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 28: 14–19.]
- 本間健平・多田茂男・中筋房夫 (1994) ナガチャコガネ幼虫の飼育法の検討・茶研報 79: 37–39. [Honma, K., S. Tada and H. Nakasuji (1994) Rearing method of larvae of a Scarabaeid, *Heptophylla picea* Motschulsky. *Tea Res. J.* 79: 37–39.]
- Hung, S. G. and D. G. Boucias (1992) Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 152–158.
- 柿崎昌志・佐藤龍夫・山口作英 (1991) ハスカップにおけるナガチャコガネの被害実態・北日本病虫研報 42: 161–166. [Kakizaki, M., T. Sato and S. Yamaguchi (1991) Occurrence of the yellowish elongate chafer, *Heptophylla picea* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae), on the blueberry honeysuckle, *Lonicera caerulea* L. var. *emphyllocalyx* Nakai. *Ann. Rept. Plant Prot. North Japan* 42: 161–166.]
- Nishigaki, J. (1988) Feeding habit of the yellowish elongate chafer, *Heptophylla picea* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae) on tea plant leaves. *Appl. Entomol. Zool.* 23: 362–364.
- 西垣定治郎 (1991) ドウガネブイブイ・昆虫の飼育法 (湯嶋健・釜野静也・玉木佳男 編). 日本植物防疫協会, 東京, pp. 224–227. [Nishigaki, J. (1991) *Anomala cuprea* (Hope). In *Rearing Methods of Insects* (K. Yushima, S. Kamano and Y. Tamaki eds.). Japan Plant Protection Association, Tokyo, pp. 224–227.]
- 刑部 勝・小泊重洋 (1984) チャを加害するナガチャコガネの生態・茶業技術研究 60: 15–21. [Osakabe, M. and S. Kodomari (1984) Bionomics of *Heptophylla picea* Motschulsky attacking tea plant. *Stud. Tea* 60: 15–21.]
- Poprawski, T. J. and W. N. Yule (1991) Incidence of fungi in natural populations of *Phyllophaga* spp. and susceptibility of *Phyllophaga anxia* (LeConte) (Col., Scarabaeidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina). *J. Appl. Ent.* 112: 359–365.
- Quintela, E. D. and C. W. McCoy (1998) Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. *J. Invertebr. Pathol.* 72: 220–230.
- Schreiter, G., T. M. Butt, A. Beckett, S. Vestergaard and G. Moritz (1994) Invasion and development of *Verticillium lecanii* in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Mycol. Res.* 98: 1025–1034.
- Smith, R. J. and E. A. Grula (1981) Nutritional requirements for conidial germination of *Munduca sexta* cuticle on growth and infection *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 222–230.
- St. Leger, R. J., T. M. Butt, M. S. Gottel, R. C. Staples and D. W. Roberts (1989) Production *in vitro* appressoria by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.* 13: 274–288.
- St. Leger, R. J., M. Goettel, D. W. Roberts and R. C. Staples (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 58: 168–179.
- Villani, M. G., S. R. Kueger, P. C. Schroeder, F. Consolieg, N. H. Consolieg, L. M. Preston-Wilsey and D. W. Roberts (1994) Soil application effects of *Metarhizium anisopliae* on Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) behavior and survival in turfgrass microcosms. *Environ. Entomol.* 23: 502–513.
- Wright, S. P., T. M. Butt, S. Galaini-Wright, L. L. Allee, R. S. Soper and D. W. Roberts (1990) Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Eyria radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. *J. Invertebr. Pathol.* 56: 157–174.
- Yokoyama, T., M. Hasegawa, A. Fujiie, M. Sawada and K. Noguchi (1998) Microbial control of scarab beetle larvae by a formulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in a sweet potato field. *Appl. Entomol. Zool.* 33: 215–218.