昆虫病原性糸状菌 *Paecilomyces fumosoroseus* の blastospore の性状

清水 進¹⁾・鮎沢 啓夫

九州大学農学部

Nature of Blastospores Produced by an Entomopathogenic Fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. Susumu SHIMIZU²⁾ and Keio AIZAWA (Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **32**: 182–186 (1988)

The viability of blastospores produced by *Paecilomyces fumosoroseus* was lost more rapidly than that of conidia at 25°C or 37°C in the air and at 25°C in the water, respectively. No remarkable differences in the resistance against germicidal agents (phenol, mercuric chloride, and cresol soap), high temperature treatment, and ultraviolet irradiation were observed between blastospores and conidia. However, the resistance of the blastospores against sonication was lower than that of the conidia. Blastospores were more virulent than conidia against silkworm larvae by injection, but not by smearing. When blastospores were injected into silkworm larvae, the cell numbers increased more rapidly than when conidia were injected. Agglutinin titers (reciprocal dilution of rabbit antiserum) of anti-blastospore rabbit serum and anti-conidia rabbit serum were less than 10 against conidia and 320 against blastospores, respectively.

赤きょう病菌 *Paecilomyces fumosoroseus* のカイコ *Bombyx mori* に対する病原性は弱い、カイコノウジバエ *Blepharipa zebina* およびモモンクイガ *Carposina niponensis* に対しては強い病原性が示されるので、赤きょう病菌による両種害虫の防除試験が行われ、いずれの場合にもすぐれた効果が示された (青木, 1946; 関口, 1955, 1959)。

糸状菌による害虫防除には主として分生子が使用されているが、分生子の量産は必ずしも容易ではなく、糸状菌による微生物的防除においては糸状菌の大量培養法を確立する必要がある。

大量培養法の一つとして短時間の振とう培養による blastospore の量産があり、SAŠINÁKOVÁ (1966) は培地組成の検討を行い、振とう培養により大量の *B. bassiana* の blastospore を得ることに成功した。また *Metarhizium anisopliae* の blastospore の産生においては培地に少量の Tween 80 を添加するといっそう効果的である (MÜLLER-KÖGLER, 1967)。しかし、blastospore の量産を目的とする場合 blastospore の性状に関する知見を蓄積する必要がある。

著者らは赤きょう病菌 *Paecilomyces fumosoroseus* の blastospore の性状について分生子と比較検討したので、その結果を報告する。

材料および方法

1. 供試菌株とその培養

赤きょう病菌 *Paecilomyces fumosoroseus* を L-broth (ペプトン 1%, 食塩 0.5%, 酵母エキス 0.3%, ショ糖 2%, pH 6.8~7.0) で 28°C, 7~10 日間振とう培養して得られた blastospore ならびに L-broth 寒天培地で 28°C, 30 日間培養して形成された分生子を集菌し供試した。

2. blastospore の精製

培養菌体を 3 回遠心洗浄 (3,000 rpm, 10 分) 後、1,000 rpm, 10 分間遠心し、上清をミリポアフィルター (孔径 8 μm) で濾過した。濾液を 4,000 rpm, 20 分間遠心して blastospore を集菌した。試料は顕微鏡で観察し、精製度 99% 以上であることを確認した。

3. blastospore と分生子の安定性の比較

乾燥状態における安定性の試験の場合には 25°C あるいは 37°C で 5 日および 10 日間保存後、水浮遊状態における安定性の試験の場合には 25°C で 4, 8, 12 および 16 日間保存した後、L-broth 寒天培地で培養して集落数を算定し生存百分率で表わした。

1) 現在 京都市左京区・京都工芸繊維大学繊維学部

2) Present address: Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.
1987 年 8 月 10 日受領 (Received August 10, 1987)

4. blastospore と分生子の物理的処理に対する安定性の比較

高温処理は各種温度 (30, 40, 50, および 60°C) で 60 分間行った。超音波処理は 24 W (20 Kc/sec) で所定時間 (2, 4, 6, 8 および 10 分間) 処理した。また、紫外線処理は東芝 15 W の殺菌燈を用い 50 cm の距離から 30, 60, 90 および 120 秒照射した。以上の処理菌体はいずれも L-broth 寒天培地で培養して、集落数を算定後、無処理区と比較し、結果を生存百分率で表わした。なお、blastospore および分生子は水に懸濁した後、上記の物理的処理を行った。

5. blastospore と分生子に対する消毒薬の影響

昇汞水 (0.001 および 0.01%), 石炭酸 (0.1, 0.3, 0.5 および 0.8%) およびクレゾール石けん液 (0.1, 0.3, 0.5, 0.7 および 0.8%) で 28°C, 10 分間処理後、3 回遠心洗浄 (3,000 rpm, 10 分) し、L-broth 寒天培地で培養して集落数を算定後、無処理区と比較し、結果を生存百分率で表わした。

6. blastospore と分生子のカイコに対する病原力

blastospore または分生子浮遊液の 10 倍階段希釈液をカイコ幼虫 (蚕品種: 日 124×支 124, 4 齢起蚕) に塗布 (0.05 ml/幼虫) または注射 (0.005 ml/幼虫) 後、25°C で 10 日間飼育した。各接種区の病死蚕数を調査し、その結果を REED and MUENCH (1938) にしたがって LD₅₀ (菌数/幼虫) を算定した。なお、菌数は L-broth 寒天培地

で培養し、集落数より算定した。

7. blastospore および分生子のカイコ幼虫体液中における増殖

blastospore および分生子をそれぞれカイコ幼虫 (蚕品種: 日 124×支 124, 4 齢起蚕) に 5.0×10^2 個/幼虫 (0.005 ml/幼虫) を注射後、経時的に体液を採取し、血球計算盤で体液中の赤きょう病菌の菌数を算定した。

8. blastospore および分生子の調製

L-broth 寒天培地で 28°C, 30 日間培養後、分生子を 0.005% Tween 80 液中に集菌し、脱脂綿を用いて濾過し、精製度 99% 以上の分生子を調製した。また 20 ml の L-broth に 10^6 個の分生子を接種し、28°C, 8 日間振とう培養した。培養液を 1,000 rpm, 5 分遠心し、その上清をさらに 3,000 rpm, 20 分遠心した沈殿を水に浮遊して脱脂綿で濾過し、精製度 99% 以上の blastospore を調製した。精製分生子および blastospore を Vibrogen (glass beads 細胞破碎機, 70 サイクル/秒, glass beads

Fig. 1. Survival of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* in the air (A) and in the water (B). ●: Blastospores, ○: Conidia.

Fig. 2. Resistance of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against temperature treatment (A), sonication (B), and ultraviolet irradiation (C). ●: Blastospores, ○: Conidia.

の直径は 0.1 mm) で 30 分細胞破碎処理し抗血清調製用の抗原とした。

9. 抗血清の調製

blastospore 抗原の場合は 11 回, 分生子抗原の場合は 7 回ウサギに静脈注射し抗血清を調製した。

10. 凝集反応

抗血清とホルマリン処理精製 blastospore または分生子を等量混合し, 37°C で 2 時間反応させた後, さらに 4°C で 1 夜放置し, 凝集素価を測定した。

結 果

blastospore と分生子の乾燥状態および水中における安定性を比較した結果を Fig. 1 に示した。いずれの場合も blastospore は分生子よりも不安定であった。

高温処理では分生子および blastospore は容易に発芽力を失い両者の感受性には有意差は認められなかった。

Fig. 3. Resistance of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against mercuric chloride (A), phenol (B), and cresol soap (C). ●: Blastospores, ○: Conidia.

超音波処理では blastospore は分生子より容易に発芽力を失った。また紫外線に対する感受性は分生子, blastospore と同程度であった (Fig. 2)。

各種消毒薬に対する分生子および blastospore の感受性の試験結果を Fig. 3 に示した。各種消毒薬に対する両者の感受性には有意差は認められなかった。

次に blastospore および分生子のカイコ幼虫に対する病原力を Table 1 に示した。塗布法では blastospore および分生子の LD₅₀ 値はそれぞれ 1.3×10⁵ および 1.4×10⁵ 個/幼虫で, 両者の病原力には有意差は認められなかった。しかし注射法では blastospore と分生子では病原力に有意差が認められた。この場合, blastospore は分生子より約 50 倍高い病原力を示す結果が得られた。また蚕蛹においても注射法で blastospore が分生子より高い病原力を示した。

blastospore および分生子をカイコ幼虫に注射した場合, 体液中に産生された blastospore 数の増加を Fig. 4 に示す。blastospore 接種区では 3 日後に菌数は 10⁷ 個/ml に達し, カイコ幼虫は死亡した。blastospore 注射区

Table 1. Virulence of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* against the silkworm, *Bombyx mori*

	LD ₅₀ (Number of cells/larva)	
	Smearing	Injection
Blastospores	1.3×10 ⁵	4.5
Conidia	1.4×10 ⁵	2.4×10 ²

Silkworm strain used: C124×J124, 4th instar larvae.

Fig. 4. Production of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* in the silkworm hemolymph after the injection of blastospores or conidia. Silkworm strain used: C124×J124, 4th instar larvae. ●: Blastospores, ○: Conidia.

Table 2. Agglutinin titers of anti-conidia or anti-blastospore rabbit serum against conidia or blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus*

Antiserum	Antigen	Agglutinin titer							
		10	20	40	80	160	320	640	control
Anti-conidia serum	Conidia	±	—	—	—	—	—	—	—
	Blastospores	+	+	+	+	+	+	—	—
Anti-blastospore serum	Conidia	±	—	—	—	—	—	—	—
	Blastospores	+	+	+	+	+	+	—	—

Agglutinin titer: Reciprocal dilution of rabbit antiserum.

Agglutination: Incubated at 37°C for 2 hr, followed by overnight at 4°C.

Table 3. Agglutinin titers of anti-conidia or anti-blastospore rabbit serum against homogenized conidia of *Paecilomyces fumosoroseus*

Antiserum	Agglutinin titer							
	10	20	40	80	160	320	640	control
Anti-conidia serum	+	+	+	+	+	+	—	—
Anti-blastospore serum	+	+	+	+	+	+	—	—

Homogenized conidia: Conidia were homogenized with glass beads in a Mickle-type disintegrator.

Agglutinin titer: Reciprocal dilution of rabbit antiserum

Agglutination: Incubated at 37°C for 2 hr, followed by overnight at 4°C.

と分生子注射区の増殖速度間には約3日の差が認められた。

次に凝集反応によって blastospore と分生子の血清学的性状を比較検討した (Table 2 および Table 3)。抗分生子血清の凝集素価は分生子に対し10倍以下, blastospore に対し320倍であった。抗 blastospore 血清の凝集素価は blastospore に対し320倍, 分生子抗原に対しては10倍以下であった。また破砕分生子抗原に対する凝集反応では抗分生子血清および抗 blastospore 血清の凝集素価は320倍であった。

考 察

害虫防除に糸状菌を利用する場合, 分生子および blastospore の安定性は重要な問題である。赤きょう病菌の分生子は30°Cに保存すると, 2~3か月, 20, 10および0°C保存の場合は4か月以上生存する (河上・三国, 1965)。また *Beauveria bassiana* および *Metarhizium anisopliae* 分生子は21°Cでは数か月で発芽力が失われるが, 8°Cでは少なくとも1年間は発芽力を保持する (STEINHAUS, 1960; CLERK and MADELIN, 1965)。*Beauveria brongniartii* の blastospore を23°Cに保存した場合, 4か

月で完全に死滅する (BLÁCHÈRE et al., 1973)。一般に分生子の発芽力は高温になるにしたがって低下するが, 低温条件下では, その発芽力は長期間保持される。また blastospore の生存期間は短いとされている。

いままで同一菌種の分生子および blastospore の安定性についての比較はもちろん, blastospore の安定性についての検討はほとんどなされていなかった。本実験の結果, blastospore の発芽力はいずれの場合 (乾燥保存および水中保存) も分生子のそれよりも早く失われた。blastospore の感染力を長期間保存するためには, 低温保存のほか適当な安定剤の添加が必要であると考えられる。BLÁCHÈRE et al. (1973) は *B. brongniartii* の場合, シリカ粉末およびパラフィン添加により blastospore の発芽力を長期間保存することができた。また, FARGUES et al. (1983) は *B. bassiana* の blastospore をベントナイトで被覆することにより, 土壌中で長期間活性を維持させた。

物理的処理および各種消毒処理において blastospore および分生子はほぼ同程度の安定性を示した。しかし超音波処理に対しては blastospore が分生子よりも高い感受性を示したが, これは両者の細胞壁構造の差異によるものと考えられる。

青木 (1957) によれば *B. bassiana* の円筒形胞子 (本文の blastospore に相当するものと考えられる) および分生子のカイコ幼虫に対する病原力を比較し, 注射法では円筒形胞子の病原力は分生子より大であるが, 塗布法では病原力に有意差がない。河上 (1962) によれば塗布法で *B. bassiana* の円筒形胞子はカイコ幼虫に対して分生子よりもやや強い病原力を示すが, 長時間培養下の円筒形胞子の病原力は弱い。BELL (1975) によると *Nomuraea rileyi* の分生子は *Trichoplusia ni* に対して塗布法で病原性を有するが, blastospore は病原性はないとしている。また, HALL (1981) は *Verticillium leanii* の blastospore は *Macrosiphoniella sanborni* の成虫に対して分生子よりやや病原力がおちると報告している。しかし, 精製 blasto-

spore を用いた本実験の場合、注射法では blastospore の病原力が分生子よりも強かったが、塗布接種では両者間に有意差が認められなかった。

注射法で認められた blastospore の強い病原力はカイコ幼虫体液中における増殖速度に起因すると考えられるが、blastospore が分生子より増殖速度が早いことは振とう培養試験でも確認された。

抗分生子血清に対する分生子抗原の反応は弱かったが、blastospore 抗原は強く反応した。抗分生子血清は破碎分生子抗原に対して高い凝集素価を示すので、分生子の表層は抗原性の低い物質で構成され、その内部には blastospore の表層との共通抗原が存在するものと考えられる。

摘 要

昆虫病原性糸状菌である赤きょう病菌 *Paecilomyces fumosoroseus* の blastospore の性状について分生子と比較検討した。乾燥状態での保存および水中保存のいずれの場合も blastospore は分生子よりも不安定であった。各種消毒剤(昇汞水、石炭酸、クレゾール石けん液)に対する感受性試験では blastospore と分生子の間に有意差が認められなかった。紫外線処理および高温処理に対する分生子および blastospore の感受性は同程度であったが、超音波処理に対して blastospore は分生子より感受性であった。カイコ幼虫に対する blastospore および分生子の LD₅₀ (菌数/1頭) 値はそれぞれ 4.5 および 2.4×10^2 で、blastospore が分生子よりも約 50 倍強い病原力を示した。しかし、塗布接種では両者の病原力の間には有意差が認められなかった。blastospore または分生子をカイコ幼虫に注射した場合、blastospore 注射区における菌数の増加は分生子注射区のそれより早かった。抗分生子血清の凝集素価は分生子に対して 10 倍以下、blastospore に対して 320 倍であった。抗分生子血清は破碎分生子抗原に対して高い凝集素価を示すので、分生子の表層は抗原性の低い物質で構成され、その内部には blastospore の表層との共通抗原が存在するものと考えられる。

引 用 文 献

- 青木 清 (1946) 赤きょう病菌による蠶繭の駆除。新生蚕糸 1: 20—21.
- 青木 清 (1957) 昆虫病理学, 東京: 技報堂, 493 p.
- BELL, J.V. (1975) Production and pathogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid media. J. Invertebr. Pathol. 26: 129—130.
- BLÁCHÈRE, H., J. CALVEZ, P. FERRON, G. CORRIEU and P. PERINGER (1973) Etude de la formulation et de la conservation d'une préparation entomopathogène à base de blastospores de *Beauveria tenella* (DELACR. SIEMASZKO). Ann. Zool. Ecol. Anim. 5: 69—79.
- CLERK, G.C. and M.F. MADELIN (1965) The longevity of conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. Trans. Brit. mycol. Soc. 48: 193—209.
- FARGUES, J., O. REISINGER, P.H. ROBERT and C. AUBART (1983) Biodegradation of entomopathogenic hyphomycetes: Influence of clay coating on *Beauveria bassiana* blastospores survival in soil. J. Invertebr. Pathol. 41: 131—142.
- HALL, R.A. (1981) The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970—1980. (BURGES, H.D. ed.), London and New York: Academic Press, pp. 483—498.
- 河上 清 (1962) 硬化病菌の円筒形胞子に関する研究 II. 振とう培養による硬化病菌の増殖。蚕試報 18: 147—156.
- 河上 清・三国辰男 (1965) 硬化病菌分生子の生存力と温度および湿度との関係 (続報)。蚕糸研究 No. 56: 42—46.
- MÜLLER-KÖGLER, E. (1967) On mass cultivation, determination of effectiveness, and standardization of insect pathogenic fungi. In: Insect Pathology and Microbial Control. (P. A. van der LAAN ed.), Amsterdam: North-Holland Publ., pp. 339—353.
- REED, L.J. and H. MUENCH (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493—497.
- SAŠINÁKOVÁ, A. (1966) Growth and sporulation of submerged cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. J. Invertebr. Pathol. 8: 395—400.
- 関口昭良 (1955) *Isaria fumosorosea* WIZE によるモモシクイガ防除に関する研究. I. 菌の同定および寄生性について。東北農試報 4, 152—153.
- 関口昭良 (1959) *Isaria fumosorosea* WIZE によるモモシクイガ防除に関する研究. 第2報. 接種試験・菌の生態および大量培養について。東北農試報 16: 89—93.
- STEINHAUS, E.A. (1960) The duration of viability and infectivity of certain insect pathogens. J. Insect Pathol. 2: 225—229.