

## *Beauveria*属昆虫病原糸状菌 2種のミール培養と ナガチャコガネに対する感染力

川合志歩<sup>1</sup>・櫻井健一郎\*・斉藤三四郎\*・廣森 創・西東 力  
(静岡大学農学部・\*J-オイルミルズ)

Production of Entomopathogenic Fungi *Beauveria* spp. on Cereal Meals and their Virulence against the Yellowish Elongate Chafer, *Heptophylla picea* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae)

Shiho KAWAI<sup>2</sup>, Kenichiro SAKURAI, Sansiro SAITO, Hajime HIROMORI and Tsutomu SAITO

### 摘 要

昆虫病原糸状菌 (*Beauveria brongniartii*および*B. amorpha*) を用いたナガチャコガネ *Heptophylla picea*防除のため、搾油粕 (ダイズミールおよびナタネミール) による培養法を検討し、培養ダイズミールの感染力を室内試験で調べた。その結果、両菌ともこれらのミールで培養できることが明らかとなった。*B. amorpha*培養ダイズミール (菌密度:  $4.0 \times 10^7$  CFU/gミール, CFU: colony forming unit) の少量処理区 ( $2.0 \times 10^4$  CFU/g 土) においても幼虫の死亡率は最終的に100%を示し、高い感染力が確認された。また、培養ダイズミールを11月に畑にすき込んだところ (菌密度:  $3.3 \times 10^5$  CFU/g乾土), 60日後にも $10^4$  CFUレベルが維持されていた。昆虫病原糸状菌の培養ミール物は肥料効果と殺虫効果を併せ持つ資材として有望と考えられる。

近年、ナガチャコガネ *Heptophylla picea* Motschulsky によるチャの被害が全国的に問題となっている。被害は幼虫が根を食害するもので、激しく食害されると萌芽しなくなる (刑部, 1986)。本種の防除には化学合成農薬が用いられているが、必ずしも十分な効果は得られていない。一方、チャは健康食品としてのイメージが強いことから、化学合成農薬の代替技術も期待されている。

静岡大学農学部応用昆虫学研究室では、昆虫病原糸状菌によるナガチャコガネ防除法の研究に取り組んできた。その結果、成虫に対して *Beauveria brongniartii* が、幼虫に対して *B. amorpha* がそれぞれ高い病原性を示すことが明らかにされている (Hiromori et al., 2004; 柳沼ら, 2004a, 2004b; Yaginuma et al., 2006)。吉岡ら (2006) は、この *B. amorpha* 菌株の分生子を水に懸

濁して土壌に散布する方法が幼虫に対して効果があると述べている。一方、昆虫病原糸状菌をフスマ、米ぬか、オオムギ種子などで培養し、この培養物をそのまま圃場に処理する手法もある (新田, 1993; Aregger, 1992)。本研究では、肥料として利用されているミール (ダイズやナタネなどの搾油粕) に着目し、*B. brongniartii* と *B. amorpha* のミール培養を試みた。また、培養ミールのナガチャコガネに対する感染力を室内試験で検討した。さらに、培養物を畑にすき込んだ場合の菌密度の推移を調べた。

### 材料および方法

#### 1. 供試菌

当研究室で保存している *Beauveria brongniartii* (菌株: PBbr1) と *B. amorpha* (HpBa1) を供試した。両菌ともナガチャコガネの幼虫から分離されたものであ

1 現在 理研グリーン研究所

2 Address: Shizuoka University, Faculty of Agriculture, Ohya, Suruga, Shizuoka 422-8529, Japan  
2007年5月7日受領  
2007年10月22日登載決定

る。

## 2. 供試ミール

(株) J-オイルミルズ静岡工場で生産されたダイズミールおよびナタネミールを供試した。実験には搾油後3日以内のミールを用いた。

## 3. 供試虫

2006年6月、静岡県島田市のチャ栽培農家の圃場でナガチャコガネ成虫を採集し、プラスチック製の飼育箱(縦15 cm, 横35 cm, 高さ20 cm)でメヒシバを与えて飼育した。成虫に対する感染性の試験には、採集5日後の個体を用いた。供試個体の雌雄は区別しなかった。残りの成虫はオガクズを敷いた飼育箱に入れて産卵させた。孵化した幼虫は滅菌土を入れたアイスクリームカップ(直径7 cm, 高さ3.5 cm)に移し、ニンジンを与えて個体飼育した。幼虫に対する感染性の試験には2齢幼虫を用いた。

## 4. ミール培養の試験

ミール50 gと水30 gを三角フラスコ(500 ml)に入れ、オートクレーブで滅菌した。ここに、あらかじめサブロー液体培地で振とう培養(3日間)した菌液(1 ml)を接種した。培養に適したミール選定の試験には、ダイズミール、ナタネミールおよび混合ミール(ダイズミール:ナタネミール=1:1)を供試し、25℃で培養した。培養温度の試験にはダイズミールを供試し、15, 20, 25および30℃で培養した。培養期間中、数日おきにフラスコを激しく振ってミールを攪拌した。各試験とも1区3本のフラスコを用いた。

培養物の菌量はCFU(colony forming unit)として求めた。すなわち、培養ミール2 gに滅菌蒸留水200 mlを加えたものをミキサー(1分間)にかけ、テトロンゴースでろ過したのち、ろ液の菌量を平板希釈法(サブロー寒天培地)で測定し(25℃, 4日後)、ミール1 g当たりのCFUを算出した。接種源として用いた液体培地の菌密度は、*B. brongniartii*が $5.9 \text{ CFU} \times 10^6/\text{ml}$ 、*B. amorpha*が $1.6 \text{ CFU} \times 10^9/\text{ml}$ であった。

## 5. 感染力の試験

成虫の試験は次のように行った。プラスチックカップ(縦・横7 cm, 高さ5.5 cm)に黒ボク土(pH5.3, 水分含有量:40.2%)70 gを入れ、成虫2匹を放したのち、*B. brongniartii*培養ダイズミール(1週間培養、 $3.7 \times 10^7 \text{ CFU/g}$ ミール)を土表面に添加し、プラスチック製のフタをした。ミールの添加量は、土重量の5%( $1.9 \times 10^6 \text{ CFU/g}$ 土)、0.5%( $1.9 \times 10^5 \text{ CFU/g}$ 土)

あるいは0.05%( $1.9 \times 10^4 \text{ CFU/g}$ 土)とした。これを23℃, 16L:8Dの恒温機に入れ、死亡個体を3日間隔で調べた。餌としてメヒシバを与えた。対照区は無処理とした。1処理当たり30個のプラスチックカップを用いた(1処理60匹)。

幼虫の試験は、前述の成虫の試験と同じ黒ボク土(pH5.3, 水分含有量:35.7%)を用いて、次のように行った。*B. amorpha*培養ダイズミール(1週間培養、 $4.0 \times 10^7 \text{ CFU/g}$ ミール)を供試土に5%( $2.0 \times 10^6 \text{ CFU/g}$ 土)、0.5%( $2.0 \times 10^5 \text{ CFU/g}$ 土)あるいは0.05%( $2.0 \times 10^4 \text{ CFU/g}$ 土)投入し、十分に混和したのち、プラスチックカップに50 gずつ入れた。ここに2齢幼虫を1匹ずつ放し、23℃, 16L:8Dの恒温機内でニンジン片(1×2×2 cm)を与えて飼育した。対照区は無処理とした。1処理当たり20個のプラスチックカップを用いた(1処理20匹)。

## 6. 土中における菌密度の推移

2006年11月1日、静岡大学内の畑(埴壤土、3ヶ月前までトマトを栽培し、その後は放置)に幅40 cm, 長さ2 mの畝を作った。ここに*B. amorpha*培養ダイズミールを散布し、土壌(深さ約20 cmまで)とよく混和した。ミールの処理量は、土(比重約2)の重量の0.5%(400 g)とした。処理の当日、10日後、30日後、60日後および100日後に、畝の3箇所から0~20 cmの範囲の土壌を採取し、ひとまとめにした。この土壌10 gを滅菌蒸留水(Tween80を0.05%添加)90 mlとともに三角フラスコ(200 ml)に入れ、振とう機(200 rpm, 15分間)で攪拌した。得られた土壌懸濁液の菌量を選択培地(Ingliš et al., 1996)による平板希釈法で調べ(25℃, 7日後)、乾土1 g当たりのCFUを算出した。なお、試験に用いた畑では植物の栽培や除草等の管理作業を行わなかった。また、菌培養ミールを処理した際、供試菌の寄主となり得る昆虫は観察されなかった。

## 結 果

### 1. ミール培養の試験

ダイズミール、ナタネミールおよび混合ミール(ダイズミール:ナタネミール=1:1)のいずれにおいても、*Beauveria brongniartii*と*B. amorpha*は培養7日後に $10^7 \text{ CFU}$ レベル、14日後に $10^8 \text{ CFU}$ レベルに達した(第1表)。培養温度については、両菌とも25℃においてCFUが最大となった(第2表)。

### 2. 感染力の試験

第1表 各ミールにおける *Beauveria brongniartii* と *B. amorpha* の発育<sup>a)</sup>

菌種	ミール	CFU( × 10 <sup>7</sup> )gミール <sup>b)</sup>			
		7日後	14日後	21日後	33日後
<i>B. brongniartii</i>	ダイズミール	7.4 ± 0.5	26.0 ± 5.2	36.0 ± 3.8	35.7 ± 2.3
	ナタネミール	9.2 ± 1.7	20.7 ± 3.8	43.3 ± 4.2	40.2 ± 5.8
	混合ミール	6.5 ± 0.6	18.3 ± 0.4	43.3 ± 6.7	41.7 ± 3.4
<i>B. amorpha</i>	ダイズミール	2.2 ± 0.3	33.7 ± 2.2	40.0 ± 3.2	70.0 ± 8.7
	ナタネミール	4.1 ± 0.7	46.7 ± 1.9	56.3 ± 5.2	63.3 ± 3.8
	混合ミール	2.6 ± 0.1	35.7 ± 0.3	66.0 ± 3.8	59.0 ± 0.6

a) 液体培養した *B. brongniartii* (菌濃度: 5.9 CFU × 10<sup>6</sup>/ml) と *B. amorpha* (1.6 CFU × 10<sup>6</sup>/ml) を各ミール (ミール 50g + 水 30g) に接種 (1ml) し, 25 恒温条件下で発育状況を調査した。

b) 平均値 ± 標準誤差

第2表 各温度における *Beauveria brongniartii* と *B. amorpha* の発育<sup>a)</sup>

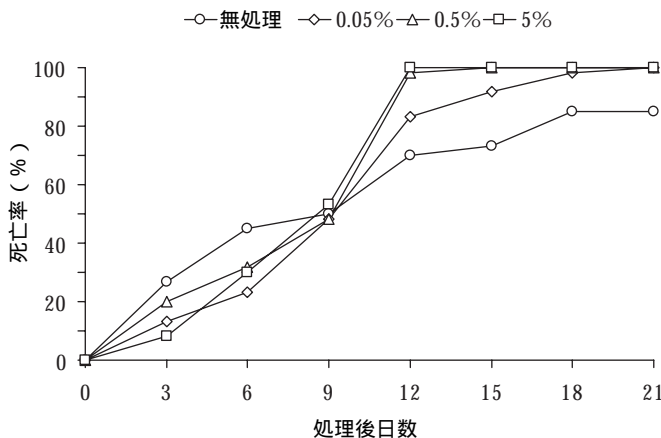
菌種	温度 ( )	CFU( × 10 <sup>7</sup> )gミール <sup>b)</sup>
<i>B. brongniartii</i>	15	1.9 ± 0.4
	20	25.7 ± 1.1
	25	42.6 ± 1.3
	30	0.6 ± 0.1
<i>B. amorpha</i>	15	3.0 ± 0.6
	20	25.0 ± 1.2
	25	46.3 ± 1.3
	30	1.6 ± 0.2

a) 液体培養した *B. brongniartii* (菌濃度: 5.9 CFU × 10<sup>6</sup>/ml) あるいは *B. amorpha* (1.6 CFU × 10<sup>6</sup>/ml) をダイズミール (ミール 50g + 水 30g) に接種 (1ml) し, 各温度で 14 日間培養した。

b) 平均値 ± 標準誤差

菌培養ミールの成虫に対する感染力の試験では, 対照区 (無処理) でも死亡率が高かった (第1図)。ただし, 処理12日後以降の死亡率を比較すると, ミール処理区における死亡率は対照区のそれを上回った。また, 死亡個体を回収し, 湿らせたろ紙を敷いたプラスチックシャーレ (直径9cm) に入れて観察したところ, ミール処理区の死亡個体の一部から *B. brongniartii* が発育した。対照区の死亡個体からは本菌の発育はまったく観察されなかった。

菌培養ミールの幼虫に対する感染力の試験結果を第2図に示した。対照区 (無処理) の死亡率は処理39日後まで20%以下にとどまった。これに対し, ミール処理区の死亡率は, 少量処理区 (土重量の0.05%, 2.0 × 10<sup>4</sup> CFU/g 土) でも21日後に50%以上を示し, 39日後には100%となった。ミール処理区の死亡個体からは



第1図 *Beauveria brongniartii* 培養ミール処理後のナガチャコガネ成虫の死亡率の推移

*B. amorphae*が発育したが、対照区の死亡個体からは本菌の発育は認められなかった。

### 3. 土中における菌密度の推移

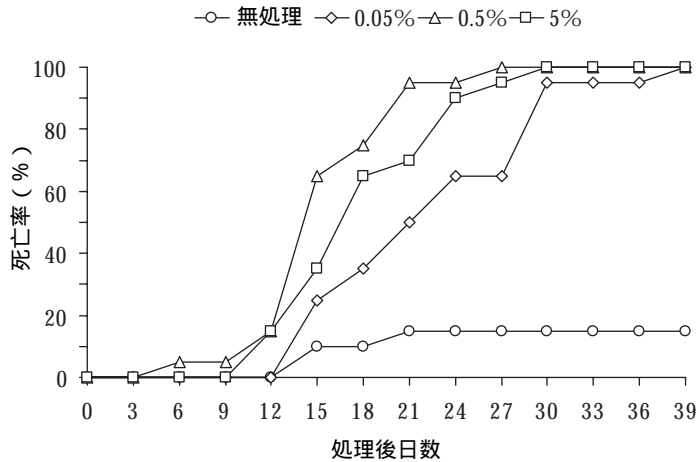
*B. amorphae*培養ダイズミールを畑にすき込み、菌密度の推移を調べた（第3図）。処理直後の菌密度は $3.3 \times 10^5$  CFU/g乾土であった。菌密度は処理10日後にやや増加したが（ $7.1 \times 10^5$  CFU）、その後は徐々に減少し、30日後に $3.3 \times 10^5$  CFU、60日後に $1.9 \times 10^4$  CFU、100日後に $1.4 \times 10^3$  CFUとなった。

図には示さなかったが、処理175日後の菌密度は検出限界（ $10^2$  CFU）以下であった。

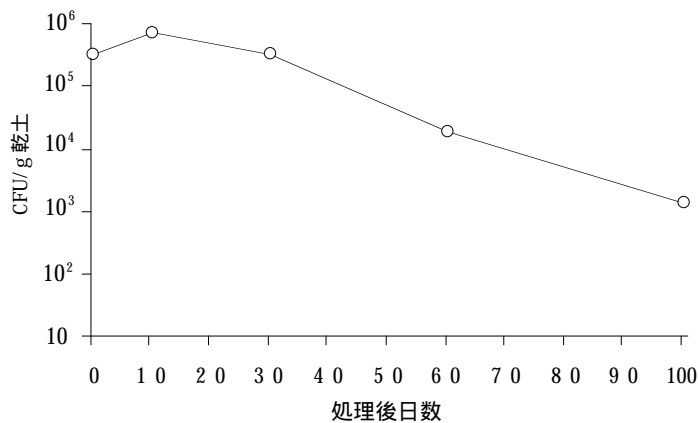
### 考 察

食用油の生産量などから推定すると、わが国におけ

るミール排出量は年間360万トンと推定される。ミールは肥料としても利用されていることから、これを昆虫病原系状菌の大量培養に利用することができれば、肥料効果と防除効果を併せ持つ新たな農業資材として開発できると考えられる。そこで、ダイズミール、ナタネミールおよび混合ミールを供試して昆虫病原系状菌（*Beauveria brongniartii* および *B. amorphae*）の培養を試みたところ、いずれのミールでも菌密度は培養7日後に $10^7$  CFU/gレベル、培養14日後に $10^8$  CFU/gレベルを示し、ミール単独で培養できることが明らかとなった（第1表）。供試した3種類のミールのうち、ダイズミールは粒子が粗く（数mm）、取り扱いが容易であったことから、感染力の試験および土中における菌



第2図 *Beauveria amorphae*培養ミール処理後のナガチャコガネ幼虫の死亡率の推移



第3図 *Beauveria amorphae*培養ミールを畑にすき込んだ場合の菌密度の推移  
処理150日後の菌密度は $10^2$  CFU/g乾土以下であった。

密度の調査には菌培養ダイズミールを用いた。

ダイズミールは肥料や飼料として用いられており、ダイズミールそのものにナガチャコガネに対する殺虫活性はないと考えられた。このため、培養ミールの感染力の試験では、対照区は無処理とした。成虫に対する感染力については、対照区においても死亡率が高かった(第1図)ことから、試験結果は判然としなかった。ナガチャコガネ成虫の寿命は20日程度と短いため(Nishigaki, 1988)、死亡の主要因は寿命によるものであったと考えられる。しかし、少なくとも培養ミールによって感染することは確認された。このため、培養ミールの処理によって若い成虫が感染すれば、成虫の終息は早まり、産卵数も減少すると思われる。

一方、幼虫に対しては、培養ミールの少量処理区(土重量の0.05%、 $2.0 \times 10^4$  CFU/g 土)においても処理39日後に100%の死亡率が得られた(第2図)。この試験結果をもとに実際の畑へのミール処理量を試算すると、深さ20 cmまですき込む場合の必要量は1 a当たり約20 kgとなり、これは実際に処理可能な量と考えられる。

静岡県の場合、ナガチャコガネの成虫は5~6月に、幼虫は7月に発生する(刑部, 1986)。幼虫は、10月まで深さ11~20cmの土中に分布するが、11月から地表近く(0~10cm)に移動する(刑部・小泊, 1984)。この習性を利用して、*B. amorphae* の処理は10~11月に行うのが効果的と考えられている(柳沼ら, 2004b)。一方、温度と感染率の関係の面からも、10~11月の処理は妥当とみられる。たとえば、静岡県牧之原台地の場合、茶畑土壌の10月の平均地温は15 を超えており(柳沼ら, 2004b)、この程度の地温(15~20 )があれば、本菌によって高い死亡率が得られる(Hiromori et al., 2004)。そこで、本研究では11月に*B. amorphae* 培養ミールを畑にすき込んで菌密度の推移を調べた。その結果、少なくとも60日間にわたって $10^4$  CFU/g 乾土レベルが維持されていた(第3図)。感染力の試験結果からは、 $10^4$  CFUレベルの菌密度でも幼虫の死亡率は100%に達することが確かめられた(第2図)。これらの試験結果からも、10~11月に*B. amorphae* 培養ミールを茶畑土壌に処理すれば、ナガチャコガネ幼虫を効果的に防除できると考えられる。

ナガチャコガネに対する昆虫病原系状菌の処理法は標準化されていない。吉岡ら(2006)は、福岡県の茶

園で11月に*B. amorphae* の分生子懸濁液を土壌表面に散布した場合の菌密度を調べ、土壌中の菌密度は50日間ほとんど減少しなかったと報告している。さらに、散布24日後の土壌で幼虫を飼育したところ、60%以上の死亡率が得られた。このような分生子懸濁液を散布する方法も有力とみられる。一方、本研究のように菌培養物をそのまま処理する方法は、分生子の分離作業や懸濁液の調整作業が不要である。加えて、圃場に処理された後も菌はミールを栄養源として増殖し、土中の菌密度を高める可能性がある。培養ミールの処理後に菌密度がいったん上昇した(第3図)のはこのためと考えられる。また、1週間程度の短期培養物を土壌にすき込んだ予備試験でも、数日後にミールは菌糸と分生子で覆われて真っ白になり、処理後に菌密度が増加したことは明らかである。培養に要する経費などを考慮すれば、こうした短期培養物の処理が実用的と考えられるが、商業的な大量培養技術については、別途、検討しなければならない。

菌を培養したミールの肥料成分の分析結果は示さなかったが、ダイズミールの場合、主要な肥料成分(窒素約7%、リン約2%、カリ約3%)は培養30日後まで1%内外の増減にとどまっており、菌を培養してもミールの肥料効果は低下しないと考えられる。昆虫病原系状菌のミール培養物は肥料効果と殺虫効果を併せ持つ農業資材として有望と考えられる。

#### 引用文献

- Aregger, E. (1992) J. Invertbr. Pathol. 59 : 2 - 10.  
 Hiromori, H. et al. (2004) Appl. Entomol. Zool. 39 : 389 - 392.  
 Inglis, G. D. et al. (1996) Biol. Contr. 7 : 131 - 139.  
 Nishigaki, J. (1988) Appl. Entomol. Zool. 23 : 362 - 364.  
 新田 朗 (1993) 天敵微生物の研究手法, 植物防疫特別増刊号 (No.2) (岩花秀典ほか編). 日本植物防疫協会, 東京. pp. 116 - 121.  
 刑部 勝 (1986) 植物防疫 40 : 271 - 273.  
 刑部 勝・小泊重洋 (1984) 茶業技術研究 66 : 15 - 21.  
 柳沼 大ら (2004a) 応動昆 48 : 101 - 108.  
 柳沼 大ら (2004b) 応動昆 48 : 297 - 306.  
 Yaginuma, D. et al. (2006) Appl. Entomol. Zool. 41 : 287 - 293.  
 吉岡哲也ら (2006) 九病虫研会報 52 : 54 - 59.