

論文 (Original article)

昆虫病原性糸状菌 *Beauveria bassiana* に感染したマツノマダラカミキリ成虫の死体上における菌糸の叢生不良の要因について

島津 光明^{1)*}・高務 淳¹⁾

Factors affecting poor mycelial growth on cadavers of *Monochamus alternatus* infected with an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*

SHIMAZU Mitsuaki^{1)*} and TAKATSUKA Jun¹⁾

Abstract

Factors of the host insect and of the pathogen contributing to poor mycelial growth of *Beauveria bassiana* on adult cadavers of Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) were investigated. To check quality of the formulation causing cadavers with poor mycelial growth, conidial densities and germination rates of the *B. bassiana* formulation were inspected, but analyses revealed that both were high enough to satisfy the standard. To check factors of the host insects, *M. alternatus* adults with various rearing histories were inoculated with this formulation. These experiments revealed that the fungus produced better mycelial growth on the adults that were grown on pine as compared to those on an artificial diet, and on young adults than on older adults. To check possible problems of the fungus isolate, the original isolate and 3 reisolates (from the formulation bearing poor mycelial growth on the inoculated adults, from a cadaver with poor mycelial growth, and from a cadaver fully covered with mycelia obtained by inoculation of the original isolate) were compared in their characters. No difference of mortality and mycelial growth on host cadavers was found when the beetles were injected with hyphal bodies of the original and 3 reisolates. However, when shaken in liquid medium, densities of hyphal bodies and mycelia of the reisolate from the formulation was only 1/10 of the original and the other 2 reisolates. No difference in genomic DNA among the original and 3 reisolates was found by RAPD analysis with 11 primers. The poor mycelial growth of *B. bassiana* on host cadavers was considered to be caused by combination of several factors, such as days after eclosion, larval diet, and proliferation potential of fungus in the hemocoel.

Key words : *Beauveria bassiana*, *Monochamus alternatus*, mycelia, hyphal body, artificial diet

要旨

昆虫病原性糸状菌を接種された寄主からの菌糸の叢生が悪い要因を調査した。その現象はマツノマダラカミキリに *Beauveria bassiana* の不織布製剤を接種したときに起こることがあった。叢生不良を多く生じた製剤の問題点を調べるため分生子密度と分生子の発芽率を調査したが、これらは十分高く、規格値を満たしていた。寄主昆虫側の要因を調べるため、この製剤を飼育履歴の異なるマツノマダラカミキリ成虫に接種したところ、人工飼料で飼育された成虫よりも自然枯死木由来の成虫の方が、またその中でも日齢の古い成虫よりも日齢の若い成虫の方が、体上の菌叢叢生が良好であった。菌株側の問題点を調べるため、原株と3つの再分離株（叢生不良を多く生じた製剤由来、原株を接種して叢生の悪かった死体と良かった死体由来）の性状を比較した。原株と3つの再分離株には、注射接種による死亡率と菌叢発育度合に差は見られなかった。しかし、叢生不良ロットからの分離株では、液体振盪培養における菌糸とハイファルボディの密度が、他の株の1/10しかなかった。11種類のプライマーを用いRAPD法でこれらの分離株のゲノムDNAを比較したが、差異は見いだせなかった。寄主死体における *B. bassiana* の叢生が悪い現象には、いくつかの要因の組合せ、すなわち羽化後の日齢、幼虫時代の餌、血腔内における菌の増殖能などが関わっていると考えられた。

キーワード：*Beauveria bassiana*, マツノマダラカミキリ, 菌糸, ハイファルボディ, 人工飼料

原稿受付：平成18年3月14日 Received March 14, 2006 原稿受理：平成18年7月19日 Accepted July 19, 2006

* 森林総合研究所森林昆虫研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の里1 Department of Forest Entomology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687 Japan; e-mail: shimazu@ffpri.affrc.go.jp

1) 森林総合研究所森林昆虫研究領域 Department of Forest Entomology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

緒言

一般に、*Beauveria bassiana* などの硬化病菌類、すなわち不完全菌類の昆虫病原性糸状菌に感染した昆虫は、死後、湿度の高い状態に保つと、数日で体節間膜から菌糸が外生し、やがて分生子を形成するに至る。この独特の外観は肉眼で容易に判別できることから、硬化病菌の感染の有無の簡便な同定手段に用いられている。ところが、菌を接種後に感染によって昆虫が死亡しても、死体上に菌糸がほとんど、あるいは全く叢生しない場合が起こることがある。この現象は、昆虫病原性糸状菌による死亡率を調査するにあたりしばしば経験され、そのことを指摘した論文もあったが (Shimazu, 1994; Shimazu et al., 2002; Shimazu 2004)、原因は調べられずにいた。しかし、糸状菌で死んだ寄主昆虫体上に菌が叢生しないことは、殺虫率に問題がなくても、効果判定を誤らせたり、製剤化した場合はその印象を損ねることになる。マツノマダラカミキリに強い病原性を有し、マツ材線虫病防除への利用が期待されている *Beauveria bassiana* F-263 株においてもこの現象が見られる。そこで本菌株を不織布製剤化する過程で生じた叢生率の悪いロットを利用して、寄主昆虫死体上の菌の叢生に影響すると考えられる要因を調査した。

供試菌株の製剤化と試料の提供をいただいた日東電工株式会社メディカル事業部研究開発センターの樋口俊男博士にお礼申し上げる。また本研究は、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業 (1550) 「昆虫病原菌を利用したマツノマダラカミキリ成虫駆除法の確立」を受けて行われた。

材料と方法

基本とする菌は、熊本県で採集されたマツノマダラカミキリ幼虫の死体から分離された *Beauveria bassiana* F-263 で、この原株およびそれから派生した継代履歴あるいは接種で得られた叢生度合の異なる死体からの再分離株 3 株 (F-263A, F-263Y, F-263N, 詳細は後述) を実験に供した。

原株 (F-263) は、初代培養以後、薄い濃度の懸濁液 (約 1×10^5 conidia/ml) をマツノマダラカミキリに浸漬接種し、早期に死亡し、死後菌が十分叢生した死体から再分離することを約 1 年に 1 回の割合で反復しながら維持し、保存してきたもの、F-263A は原株の分生子をマツノマダラカミキリ成虫の付節に塗布接種して死亡した成虫のうち、体の一部だけしか叢生しなかった個体からの再分離株、また、F-263Y は同じく全身に菌を叢生した個体からの再分離株、また、F-263N は原株をもとに日東電工株式会社で製剤化した不織布培養物を同社でマツノマダラカミキリ成虫に歩行させて接種した際に、死亡虫からの菌の叢生が悪かったロットからの再分離株である。

1. 成虫に接種後菌糸の叢生が悪かった不織布製剤ロッ

トの菌量と発芽率

不織布製剤の品質を調べるため、形成されている分生子密度とその発芽率を計測した。

日東電工株式会社で原株から製剤化し、死亡虫からの菌の叢生が悪かった不織布培養物で、F-263N の分離源として使用したものの菌量と発芽率を調査した。製剤から、約 2.5cm 角の四角形を切り取ってそれぞれ実寸を計測したのち、Tween80 水溶液 (300ppm) 100ml に入れ、試験官用ミキサーで 1 分間攪拌して分生子懸濁液を得た。この分生子濃度をトーマの血球計算盤を用いて計数し、単位面積あたりの分生子密度を求めた。製剤のサンプルは 3 点採取した。また、製剤からのサンプル採集時に、微量の分生子を滅菌ガラス棒で 1 % 酵母エキス加用 Sabouraud ブドウ糖寒天培地 (pH 6.5、以下 SDAY 培地と略) に塗布し、20 時間後に顕微鏡で約 100 個の分生子について観察し、わずかでも発芽管を伸長しているものを発芽として発芽率を計測した。

2. 不織布製剤の歩行接種によるマツノマダラカミキリ成虫の死亡率と菌糸の叢生

寄主の状態が菌糸叢生度合に影響するかどうか調べるため、餌と日齢の異なるマツノマダラカミキリ成虫に、不織布製剤上を歩行させ、死体上における菌糸の叢生を調査した。

供試したマツノマダラカミキリ成虫は、研究室内でカイコ用人工飼料にアカマツ内樹皮と乾燥酵母を加えた飼料 (上田・遠田, 1996) で飼育したもの (人工飼料育) と、千葉県長生郡白子町で採集したクロマツの枯死木を、茨城県つくば市の森林総合研究所構内の網室に置いて、羽化脱出させたもの (枯死木由来) を用いた。

1 で使用した不織布製剤を並べ、その上にマツノマダラカミキリ成虫を置き、5cm 以上歩かせてることによって接種した。接種された成虫は、130 φ × 60 mm のプラスチックカップに入れ、アカマツの枝を与えて個体飼育し、毎日生死を調査した。死亡した個体は、餌を捨てた飼育カップ中に残し、その中に水で湿して丸めたキムワイプ® を入れることで温室として 25°C で 2 週間以上置き、菌糸の叢生の有無を調査した。人工飼料育の成虫は羽化後 35 日 ~ 79 日のものを 19 頭、枯死木由来の成虫は、羽化後 2 ~ 11 日のものと羽化後 32 ~ 35 日のものを各 15 頭供試した。

枯死木由来の成虫で、接種後死亡したもののうち、羽化後の日齢の異なる群のそれぞれから全身に叢生したものと体の一部に生じたものについて菌を分離し、コロニーの外観を比較した。

3. 各再分離株の注射による病原性

菌糸叢生の程度が異なる死体から分離した株は、注射接種による病徴が異なるかどうかを調査した。マツノマダラカミキリ成虫は、実験 2 で供試したと同様の枯死木由来のもので、羽化後 33 ~ 49 日のものを供試した。原株、F-263N、F-263Y、F-263A の各株を、1 % 酵母エ

キス加用 Sabouraud しょ糖液体培地 (pH 6.5、シリコン消泡剤 KM-70 を 333ppm 添加、以下 SSY 培地と略) で 25℃、2 日間振盪培養した。この培養液をキムワイブ® で濾過して菌糸を取り除き、ハイファルボディの懸濁液を作った。これを滅菌生理食塩水で希釈し、あらかじめ CO₂ 麻酔しておいたマツノマダラカミキリ成虫個体あたり 2.4×10^4 個のハイファルボディをツベルクリン用シリンジで注射接種した。接種された成虫は、130 φ × 60 mm のプラスチックカップに入れ、アカマツの枝を与えて個体飼育し、毎日生死を調査した。死亡した個体は、湿室処理して 25℃ で 20 日以上置き、菌糸叢生の有無を調査した。

4. 各再分離株間の増殖速度の比較

各再分離株間で寒天培地上の菌糸成長速度が異なるかどうかを調べた。原株、F-263N、F-263Y、F-263A の各株を SSY 培地で 25℃、2 ~ 5 日間振盪培養した培養物を、植菌後の径が 4mm になるように直径をあらかじめ調整した白金耳で 1 滴取り、9cm シャーレに固めた SDAY 培地の中央に植菌した。これをクリーンベンチ内で風乾後、25℃ 暗黒で培養した。植菌直後と 15 日後に直交する 2 方向の菌叢直径を計測した。培養は各株それぞれ 4 反復した。

同様に、叢生度合が異なる株のハイファルボディの増殖能を調べた。原株、F-263N、F-263Y、F-263A の各株を SDAY 平板培地で 25℃ 3 日培養し、分生子形成前の菌叢を、直径 5mm のコルクボーラで打ち抜いて種菌ディスクを作った。200ml 容の三角フラスコに作った 50ml の SDY 培地 (SSY 培地のしょ糖をブドウ糖で置き換えたもの) に、前述の種菌ディスクを 1 個接種し、25℃ 暗黒で振盪培養し、1、2、4、7 日後に微量をサンプリングして適宜希釈した上で血球計算盤にてハイファルボディと菌糸を計数し、元の密度に換算した。培養は各菌株それぞれ 3 反復した。

5. 各再分離株の遺伝的解析

各再分離株のゲノム DNA 間に変異があるかどうかを RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法を用いて調べた。原株、F-263A、F-263Y、F-263N の各株を 15ml の液体培地 (2% グルコース、1% ペプトン) で 25℃、2 日間、180rpm で振盪培養した後、10ml の液体培地 (2% グルコース、1% ペプトン、0.1% 酵母エキス) を加え、同条件でさらに 1 日間振盪培養した。培養後、遠心分離 (13000g、3 分間) により集菌し、10mM ジチオスレイトールを含んだプロトプラスト緩衝液 (0.6M 塩化カリウム、0.1M クエン酸、pH 5.8) 1ml に懸濁した。15 分後、遠心分離により集菌し、1ml の滅菌蒸留水に懸濁することにより洗浄した。その後、同様に遠心分離により集菌し、30mg の Glucanex® (Sigma-Aldrich, Inc.) を含むプロトプラスト緩衝液 300μl に懸濁し、ときどきタッピングしながら 1 時間インキュベートし、プロトプラストにした。プロトプラストは遠

心 (2000g、5 分間) により分離した後、300μl の緩衝液 (100mM Tris-Cl、10mM EDTA、2% SDS) により破壊・溶解した。その後、0.06mg の Proteinase K を加え、55℃ で 16 時間インキュベートした。続いて、0.06mg の RNase A を加え、37℃ で 1 時間インキュベートした。溶液中の DNA は、PUREGENE™ (Gentra Systems, Minneapolis) により精製し、濃度と精製度を分光光度計により計測した。RAPD PCR は、Operon Technologies 社の 10mer のランダムプライマー 11 種類 (OPA4、OPA7、OPA9、OPA11、OPA13、OPB10、OPC2、OPC5、OPC8、OPC11、OPC13) を用いて行った。PCR は、1.5mM MgCl₂、1×PCR buffer (タカラバイオ)、200μM dATP、dCTP、dGTP、dTTP (タカラバイオ)、0.4μM RAPD プライマー、10ng 鑄型 DNA、0.625U Taq DNA polymerase (rTaq HS、タカラバイオ) を含む 25μl 容液で行った。反応条件は、94℃、4 分 (1 サイクル)、94℃、1 分、37℃、1 分、72℃、2 分 (35 サイクル)、72℃、7 分 (1 サイクル) とした。PCR で増幅された断片は、1.5% のアガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し検出した。

結果

1. 成虫に接種後叢生の悪かった接種源の不織布製剤の菌量と発芽率

不織布製剤上の分生子密度は $3.1 \sim 3.9 \times 10^8/\text{cm}^2$ であった。また、不織布製剤から採取した分生子の発芽率は 91.1 ~ 95.6% であった。

2. 不織布製剤の歩行接種によるマツノマダラカミキリ成虫の死亡率と菌糸の叢生

不織布製剤を歩行させたマツノマダラカミキリ成虫の最終的な死亡率は、人工飼料育、枯死木由来のいずれの場合も 100% であった。致死日数の中央値は人工飼料育の成虫で 12.0 日、枯死木由来で日齢の古い成虫では 14.0 日、同じく日齢の若い成虫では 12.0 日であった (Fig. 1)。死亡曲線のパターンに明瞭な差は認められなかった (二元反復測定分散分析、 $p=0.0608$)。

死亡虫における保湿後の菌糸叢生の程度は、人工飼料育の成虫では、菌が全身に叢生したものはなく、体の一部に生じたもの 3 頭、全く生じなかったもの 16 頭であった。また、枯死木由来で日齢の古い成虫では、全身に叢生したもの 3 頭、体の一部に生じたもの 6 頭、全く生じなかったもの 6 頭、同じく日齢の若い成虫では、全身に叢生したもの 9 頭、体の一部に生じたもの 3 頭、全く生じなかったもの 3 頭で (Fig. 2)、日齢が古い成虫は叢生しにくい傾向がみられたものの、 χ^2 検定では $p=0.0821$ で、有意差とはいえなかった。

体外に菌糸を少しでも生じた枯死木由来成虫の死体のうち、日齢の古いもの 8 頭と若いもの 2 頭を無作為に選り、菌を SDAY 培地に画線分離して得られたコロニーから、300 株の菌を分離し、分生子形成まで培養して比

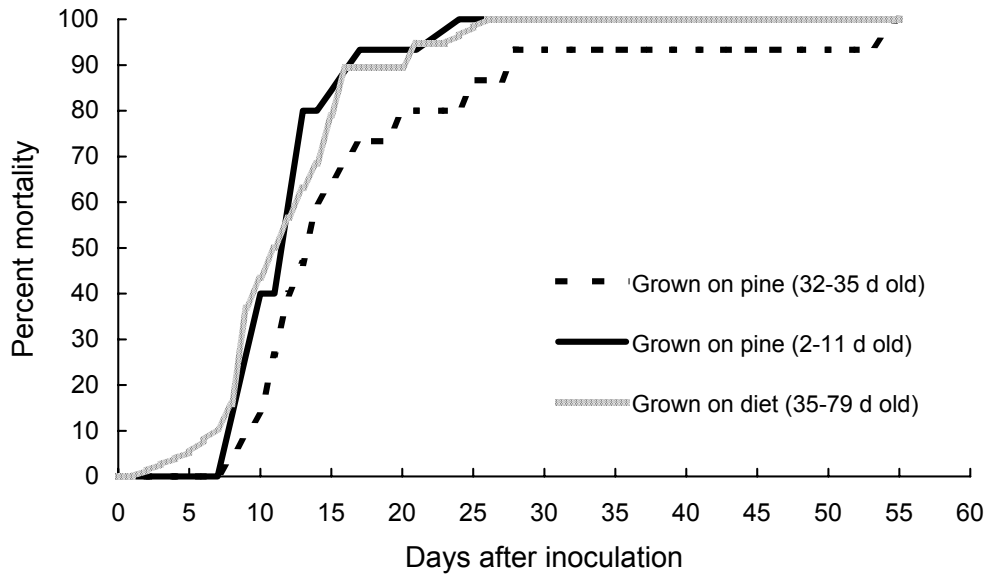


Fig. 1. *Beauveria bassiana* 不織布製剤上を歩行させた飼育履歴の異なるマツノマダラカミキリ成虫の累積死亡率。
Accumulated mortality of various rearing histories of *Monochamus alternatus* adults inoculated with *Beauveria bassiana* on nonwoven fabric formulation.

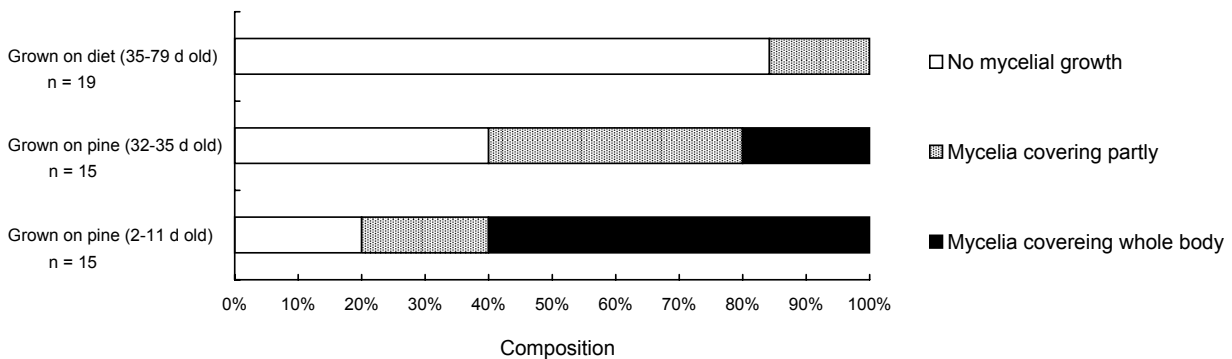


Fig. 2. *Beauveria bassiana* 不織布製剤上を歩行させて得られた飼育履歴の異なるマツノマダラカミキリ成虫死体上の菌糸叢生状態。
Mycelial growth of *Beauveria bassiana* on various rearing histories of *Monochamus alternatus* adults inoculated with nonwoven fabric formulation of the fungus.

較した結果、分離株間にコロニーの外観と培地の着色における肉眼的差異は認められなかった。

3. 各再分離株の注射による接種

ハイファルボディを注射された成虫は、いずれも数日で死亡し、死亡率はどの株でも 100%であった。また、平均致死日数は、F-263N が 2.65 日、原株が 3.15 日、F-263Y が 2.95 日、F-263A が 3.15 日であった。また、菌糸叢生の度合を全身叢生、一部叢生、叢生なしに分けて、再分離株の違いによる叢生度合別の虫数について、株間の有意差はみられなかった (χ^2 検定、 $p=0.8549$)。

4. 各再分離株の増殖速度

平板培地上の 15 日後の菌叢直径は、F-263N が 48.4 ± 0.45 mm (平均±標準誤差、以下同)、原株が 42.3 ± 0.68 mm、F-263A が 39.9 ± 0.52 mm、F-263Y が 43.0 ± 1.74 mm で、F-263N は他の株より有意に大きかった

が、原株、F-263A、F-263Y の間では有意差がなかった (一元配置分散分析、 $p=0.0005$ 、および Tukey-Kramer の多重比較検定；有意水準 5%、Fig. 3)。

ハイファルボディの密度の増殖パターンは株間で差がみられ (二元反復測定分散分析、日×株交互作用、 $p<0.0001$)、F263N が他の 3 株より増殖が悪かった。7 日後の ml あたりのハイファルボディ密度は、F-263N が $1.81 (\pm 0.76) \times 10^8$ 、原株が $1.16 (\pm 0.91) \times 10^9$ 、F-263Y が $6.84 (\pm 1.22) \times 10^8$ 、F-263A が $9.47 (\pm 1.49) \times 10^8$ であった (Fig. 4)。また、菌糸密度の増殖パターンでも株間に差がみられ (二元反復測定分散分析、日×株交互作用、 $p=0.0109$)、やはり F-263N が他の 3 株より増殖が悪かった。7 日後の ml あたりの菌糸密度は、F-263N が $5.33 (\pm 2.41) \times 10^6$ 、原株が $3.33 (\pm 0.35) \times 10^7$ 、F-263Y が $2.40 (\pm 1.01) \times$

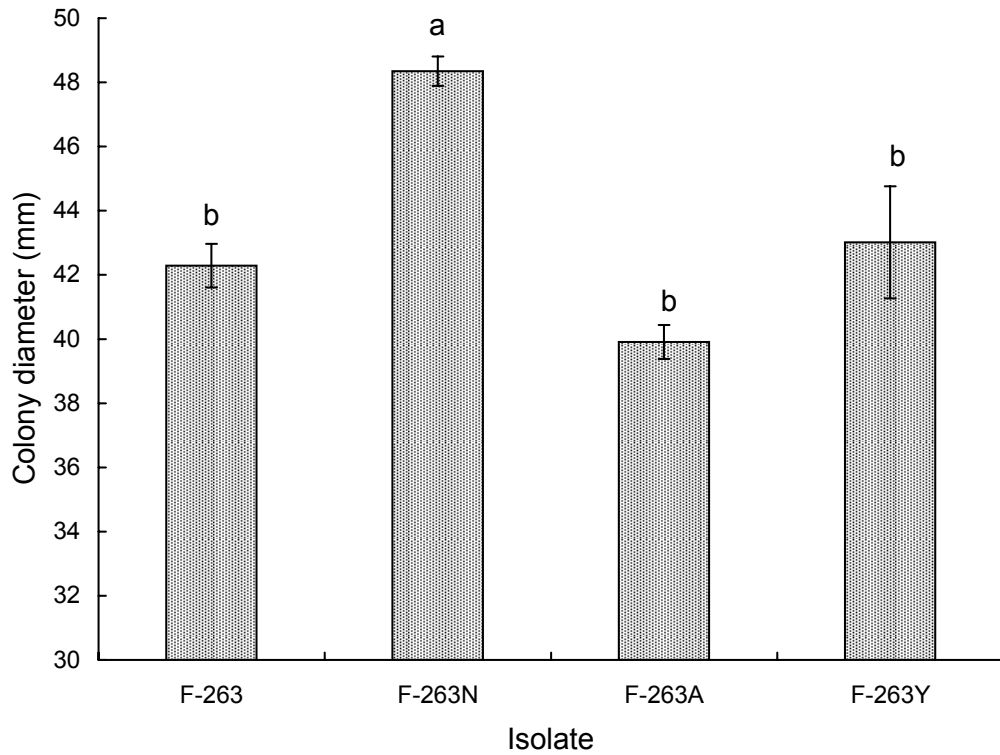


Fig. 3. *Beauveria bassiana* F-263 各再分離株の集落の成長速度 (平均±標準誤差) SDAY 平板培地で 25°C 15 日間培養、異なる文字間には有意差があることを示す (Tukey-Kramer の多重比較検定, $p < 0.05$)。 Mycelial growth of various reisolates of *Beauveria bassiana* F-263 cultured on SDAY plates at 25°C for 15 d (mean ± SE, different letters indicate significant difference by the Tukey-Kramer's multiple comparison test, $p < 0.05$).

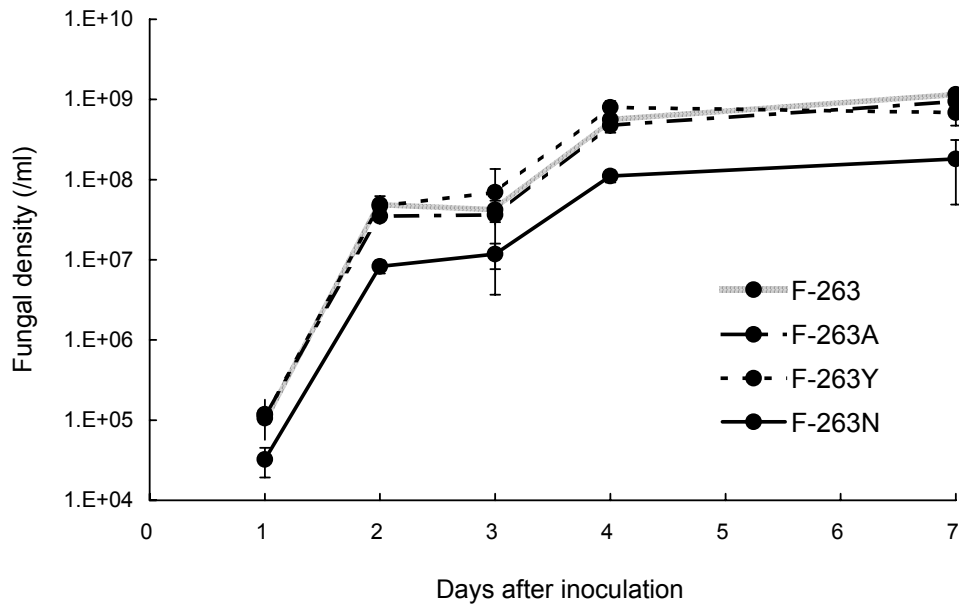


Fig. 4. *Beauveria bassiana* F-263 各再分離株のハイファルボディの増殖 (平均±標準誤差)。1% 酵母エキス加用 Sabouraud ブドウ糖液体培地で 25°C で振盪培養。 Densities of hyphal bodies of various reisolates of *Beauveria bassiana* F-263 shaker-cultured in SDY broth at 25°C (mean ± SE).

10^7 、F-263A が $3.47 (\pm 1.04) \times 10^7$ であった (Fig. 5)。

5. 各分離株の遺伝的解析

Fig. 6 に 6 種類のプライマーを用いた場合のバンドパターンを例として示した。原株、F-263A、F-263Y、F-263N の各株間で、供試した 11 種類のプライマーすべてについて RAPD 法によるバンドパターンに差異は検出されなかった。

考察

菌を接種して寄主昆虫が死亡しても、死体が硬化せず死後体外に菌が叢生しないという現象は、弱い病原菌を接種した場合や、感受性の低い虫に接種した場合によく経験される。これは、菌が寄主を殺しても十分増殖しない状態であると考えられ、要因は一つではないと考えられるが、寄主の固有の抵抗性、個体の生理状態、菌の増殖速度、寄主や菌の状態に影響する環境条件、などがあり得る。

本研究で扱った不織布培養物の問題は、F-263 の原株から大量に製剤化する過程で起こった現象で、マツノマダラカミキリ成虫に歩行接種させて得られた死亡虫からの菌の叢生が悪かったものである。同一ロットの製剤の提供を受け調査した結果、菌の発芽率は十分高かった。また、これまで原株を不織布に培養すると、 $3.5 \times 10^8 \pm 4.0 \times 10^7$ 個/cm² の分生子が形成されることがわかっており (Shimazu, 2004)、この製剤上の分生子数もこの値と一致していた。農薬登録における本製剤の規格値は $1 \sim 40 \times 10^7$ 個/cm² であり、製剤の規格上の問題は認められなかった。

しかし、本実験で製剤上でマツノマダラカミキリ成虫を歩行させた場合、菌を叢生しない場合が観察された。特に人工飼料育の成虫と、枯死木由来の日齢の古い成虫ではその傾向が強かった。人工飼料には防黴剤が含まれており、それが成虫まで残存している可能性が考えられる。寄主の体内に防黴剤が残留していれば、当然、体内での菌の増殖は阻害されると考えられ、それはある意味で菌に対する抵抗性が強いことと同様である。また、日齢の古い成虫は若い成虫より抵抗性が強いことが、付節に分生子を塗布して行った別の実験から明らかになっている (Shimazu, 2004)。すなわち抵抗性の強い成虫で、菌を叢生しない傾向が大きいと考えられた。

この不織布からの分離株 (F-263N) を注射して接種した実験では、継代履歴の異なる他の 3 つの株との間で、死亡率および菌の叢生度合について差は見いだせなかった。この実験では致死日数が 3 日前後であり、実験 2 でマツノマダラカミキリ成虫に不織布製剤上歩行で経皮接種した場合の致死日数 12 ~ 17 日と比べ、異例に短い日数で死亡が起きている。これは、本実験では分生子形成能の影響を除去するため、ハイファルボディを注射接種したことに起因すると考えられる。そのことから、注射で病原力の差、あるいは菌の叢生度合の差を示

すには接種量が多すぎたと考えられ、この実験結果だけでは叢生の悪い菌株の病原力が異なるかどうかは判定できなかった。

菌の増殖に着目して行った実験の結果では、F-263N はコロニー直径で表される菌糸成長は他の株よりむしろ速かったが、液体培養におけるハイファルボディと菌糸の密度が他の株の 1/10 程度で、液体培養における増殖が他の株に比べて遅いと考えられた。感染した菌は寄主の血体腔内でハイファルボディとして分裂または出芽で増殖することが知られている (Tanada and Kaya, 1993)。このため、ハイファルボディ分裂能が劣る F-263N が感染して寄主を殺したとしても、体内で十分菌が広がらないうちに細菌などが先に増殖し、死体の体外に菌の叢生が見られないという現象を引き起こす要因となりうる。虫体内での増殖速度は、病原力を司る要因の一つであり、F-263N が他株より遅いということは、病原力においても劣っている可能性があるが、病原力を比較する前述の実験の接種量では差を見いだせなかった。

一方 F-263A も、分離源は菌の叢生がほとんどない病死体であったが、増殖速度に関しては原株やその子孫である F-263Y との差が見られなかった。F-263A と F-263Y は、それぞれ原株の分生子を同時にマツノマダラカミキリ成虫の付節に筆で塗布接種して得られた死体からの分離株で、F-263A の分離源の成虫は日齢 10 日で接種、接種後 11 日で死亡し、脚の一部と触角だけに菌が生じたもの、F-263Y の分離源の成虫は日齢 2 日で接種、接種後 7 日で死亡し、全身に菌が生じていたという差異がある。マツノマダラカミキリ成虫は羽化脱出後 7 日を境に表皮の硬さが大きく異なるとされており (楨原, 私信)、両株の分離源となった成虫の表皮、ひいては抵抗性も大きく異なっていたと考えられる。そのことから、F-263A の由来となったマツノマダラカミキリ成虫で菌が叢生しなかったのは、寄主個体の方に原因があり、F-263A 自体の特性は原株や F-263Y と同じ物である可能性が高い。

F-263N は液体培養における増殖能が他の再分離株より劣っていたにもかかわらず、遺伝的変異が検出されなかったのは、株が表現型の可塑性を持つ証拠なのかもしれない。また、本研究では 11 種類のプライマーを用いたが、これらでスクリーニングできるのは全ゲノムのほんのわずかな部分だけであり、実際に遺伝的変異が起きていても、本研究では変異を検出できなかった可能性がある。RAPD 法は同一種内における菌の系統の識別にしばしば用いられ、*Beauveria bassiana* の系統解析も行われているが (Castrillo and Brooks, 1998; Castrillo et al., 2003; 2004)、本研究で用いた菌株はすべて同一原株由来の再分離株であり、継代培養中に生じた変化を検出できない可能性がある。Vandenberg and Cantone (2004) は、*Paecilomyces fumosoroseus* の継代培養中に生じた表現型に差異のある株を、14 種のプライマーを用いて

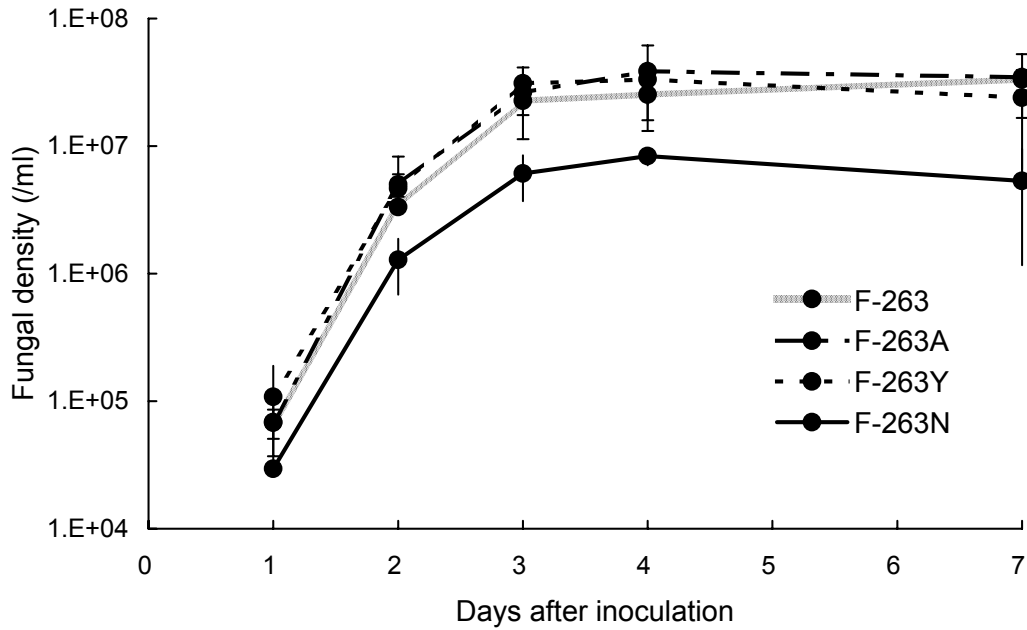


Fig. 5. *Beauveria bassiana* F-263 各再分離株の菌糸の増殖 (平均±標準誤差)。1% 酵母エキス加用 Sabouraud ブドウ糖液体培地で 25°C で振盪培養。
Densities of mycelia of various reisolates of *Beauveria bassiana* F-263 shaker-cultured in SDY broth at 25°C (mean ± SE).

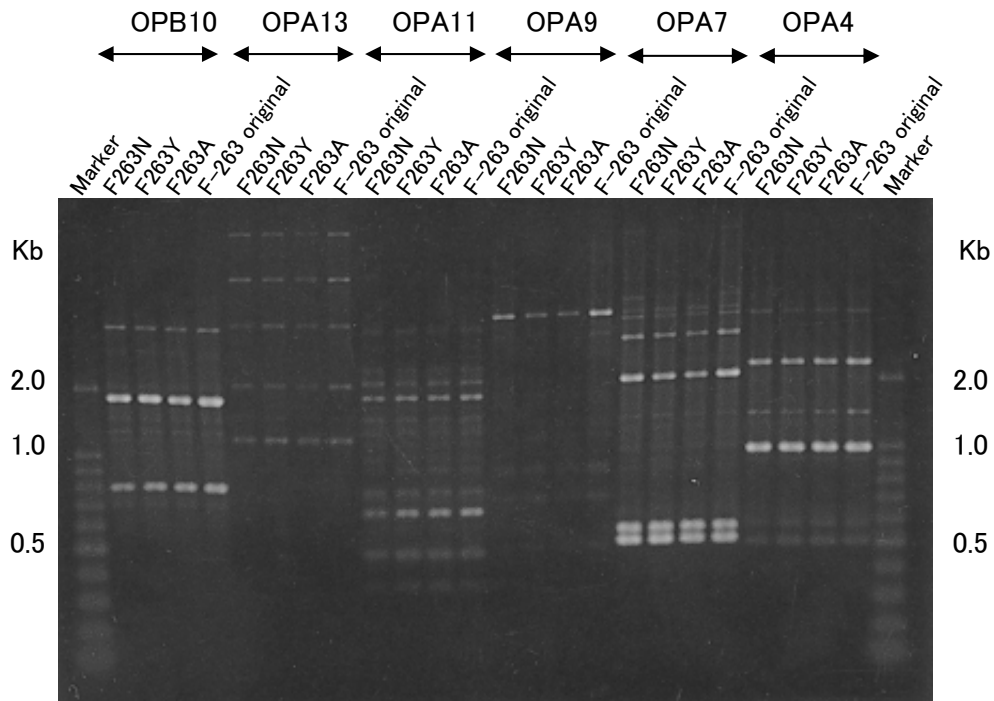


Fig. 6. *Beauveria bassiana* F-263 各再分離株の RAPD-PCR のバンドパターン。OPA4、OPA7、OPA11、OPA13、OPB10 は、用いたプライマー。
RAPD-PCR band patterns of various reisolates of *Beauveria bassiana* F-263. OPA4, OPA7, OPA11, OPA13, and OPB10 are primers used for the experiment.

RAPD 法で解析したが、遺伝的変異を検出することはできなかったと報告している。変異を検出するには、さらに多くのプライマーによる変異箇所のスクリーニングが要求されよう。

菌に感染して死亡した昆虫に菌が叢生しない場合、昆虫病原性糸状菌の生物検定における基準を、殺虫率とするか菌糸叢生虫率とするかによって結果が異なる可能性がある。また、殺虫率が同等であっても、菌糸の叢生が不良な場合それを知らない人は効果に疑問を感じたり、商品化されたものに対する印象を損ねることになる。そのため、製剤化にあたっての品質管理上は、感染死体に菌が叢生することが望ましい。今回の実験で得られた結果から、*B. bassiana* が寄主死体上に叢生しない現象は、菌自体と寄主の双方の要因が関わっていることが示唆された。寄主昆虫側の要因としては、羽化後の日齢、幼虫時代の餌などが関与していた。そこで、本菌の量産にあたっての生物検定に用いる成虫は、人工飼料を使わず、また日齢は若い方が望ましいといえる。また、菌側の要因では、固形培地上での増殖に問題がなくても、液体培地中での増殖が悪いことが叢生を悪くしている可能性が示された。そこで、大量生産に入る前の菌株のチェックで、液体培地中の増殖を調べることで、接種試験をしなくても叢生の良否を検知できると考えられた。

引用文献

- Castrillo, L. A. and Brooks, W. M. (1998) Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses, *J. Invertebr. Pathol.*, **72**, 190-196.
- Castrillo, L. A., Vandenberg, J. D., and Wraight, S. P. (2003) Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers, *J. Invertebr. Pathol.*, **82**, 75-83.
- Castrillo, L. A., Griggs, M. H., and Vandenberg, J. D. (2004) Vegetative compatibility groups in indigenous and mass-released strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: likelihood of recombination in the field, *J. Invertebr. Pathol.*, **86**, 26-37.
- Shimazu, M. (1994) Potential of the cerambycid-parasitic type of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for microbial control of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae), *Appl. Entomol. Zool.*, **29**, 127-130.
- Shimazu, M., Zhang, B. and Liu, Y.-n. (2002) Fungal pathogens of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) and their virulences, *Bulletin of FFPRI*, **1**, 123-130.
- Shimazu (2004) A novel technique to inoculate conidia of entomopathogenic fungi and its application for investigation of susceptibility of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, to *Beauveria bassiana*, *Appl. Entomol. Zool.*, **39**, 485-490.
- Tanada, Y. and Kaya, H.K. (1993) Fungal infections. In Tanada Y. and Kaya, H.K. "*Insect Pathology*", Academic Press, San Diego, 318-387.
- 上田明良・遠田暢男 (1996) マツノマダラカミキリの簡易な人工飼料飼育法, *日林関西支論*, **5**, 143-144.
- Vandenberg, D.J. and Cantone, F.A. (2004) Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity, *J. Invertebr. Pathol.*, **85**, 40-45.