

## 千葉県富津海岸で認められたカイガラムシの寄生菌について

佐藤大樹 (森林総研)・田中宏卓 (鳥取県立博物館)

**要旨:** 千葉県富津市海岸の松林林床に生えるトベラ上のミカンワタカイガラムシに、糸状菌による流行病が認められた。寄主は、葉の裏側、又は葉の付近の枝に付着して死亡しており、白色の密な菌糸により虫体はすべて覆われていた。葉の裏の死虫の輪郭からは放射状に菌糸が伸長していた。枝の死亡個体を取り外して保湿したところ、新たな細い倒卵形の分生子がシンポジオ型で形成された。このことから、死体は菌核的役割をしており、高湿度の時に分生子形成をして次の感染に貢献していると考えられた。培養菌株は 25°C が至適温度であり、サブローしょ糖液体培地の振盪培養により 25°C, 24 時間暗条件で良好に短菌糸となって増殖した。

**キーワード:** シンポジオ型, 無性世代, 不完全菌, 流行病

**Abstract:** An epizootic by an entomopathogenic fungus was observed on a soft scale insect (*Pulvinaria aurantii*) inhabiting on both leaves and twigs of *Pittosporum tobira* which was undergrowth of pine plantation (*Pinus thunbergii*) for windbreak in the beach of Futtsu city, Chiba prefecture. The host insects were fully covered with white mycelia. Cadavers on leaves showed radial outgrowth of hyphae from the bodies. Obovoidal sympodioconidia were produced when the cadavers were removed from the twigs and were kept in moisture chambers. This suggests that the cadavers have a role of sclerotia and contributing for next infection by producing conidia under humid condition. Isolates showed maximum growth at 25°C, and production of hyphal bodies in Sabouraud sucrose liquid medium at 25°C, 24-hour dark condition.

**Keywords:** Sympodioconidia, Anamorph, Fungi imperfecti, Epizootic

## I はじめに

カイガラムシは森林害虫として、薬剤による防除の他、天敵による防除についても研究が行われている(3, 9)。とりわけ、猩紅(しょうこう)病菌と呼ばれる *Fusarium* 属のグループは寄生蜂と共に、カツラマルカイガラムシ *Diaspidiotus macroporum* の個体群に影響を与えていることが知られている(9)。猩紅病は日本では3種類の *Fusarium* 属菌が引き起こし(4)、一番多く認められるのは、*F. coccophilum* によることが知られている(1)。その一方、その他のカイガラムシ病原菌類は、記載的記録に限られるのが現状である(2)。新たな天敵微生物として、防除資材の可能性を探るために、猩紅病以外のカイガラムシの病原菌を探索し、分離された糸状菌の基礎的な知見を得たので報告する。

## II 材料と方法

1. 採集: 富津海岸脇にあるマツ林の下層に生育するトベラから枝を切り、葉や枝に付着し白色菌糸に覆われ

たミカンワタカイガラムシ(*Pulvinaria aurantii*)を採集した。

2. 分生子形成の確認: 枝上の虫体を20頭取り外して5頭ずつ一枚の滅菌スライドガラスの上に乗せたものを4枚作製した。これらを保湿するためにプラスチック容器に敷いた濡れたティッシュペーパー上に静置した。それらを25°C, 24時間明条件(24L)下で3日間培養した。分生子形成の有無をまず光学顕微鏡により判定した。続いて、分生子形成の様式を走査型電子顕微鏡で観察した。保湿した虫体を風乾し、白金パラジウムで虫体表面全体のコーティングを行い、走査電子顕微鏡(リアルサーフェスビュー3D顕微鏡, キーエンス社)を用いて加速電圧5KVで観察した。コントロールとして、保湿しなかったカイガラムシを同様の方法で観察した。

3. 発芽時間の検討: 虫体(試料番号2012-15, および2012-16, 以下同様に表記)の体表に保湿により形成された分生子を9cmシャーレに用意した水寒天培地(寒天20g, 水1000ml)に、白金耳で塗布し、18, 24時間後に200個の分生子を400倍で観察し、発芽管の有無を判定した。

Hiroki SATO, (Forestry and Forest Products Res. Inst. Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Hirota TAKANAKA, (Tottori Prefectural Museum, Higashimachi 2-124, Tottori 680-0011), An entomopathogenic fungus on scale insect in Futtsu, Chiba prefecture

4. 分離：葉裏についたカイガラムシ3頭のカイガラムシ(2012-7, 8, 9)の体表を白金耳で触れ、9cm シャーレに用意した、ストレプトマイシン、ペニシリンを添加した酵母抽出物添加のサブロー寒天培地(酵母抽出物 10g, ペプトン 10g, ブドウ糖 20g, 寒天 20g, 水 1000ml)

(SDY)に塗布して分離した。保湿して、体表に分生子形成させた虫体のうち、3頭について(2012-14, 15, 16), 上述同様の方法でサブロー培地上に分離した。

5. 培養温度条件の検討：上述のSDY上で25°C, 24L条件で予備培養した2012-7, 15, 16由来のコロニーから、1mm×1mmの大きさにコロニーを切り抜いた。切り抜いた寒天片を新たなSDYの中心に接種し、10, 15, 20, 25, および30°C, 24時間暗条件(24D)で培養して7日後に直径を測定した。各設定温度についてシャーレ3枚に接種した。

6. 大量培養方法の検討：分生子大量形成条件を検討するために培地の検討を行った。サブロー液体培地(SD, 前述のサブロー寒天培地から寒天を抜いたもの), サブローしょ糖液体培地(SS, サブロー液体培地のブドウ糖をしょ糖20g/lに変更したもの), 馬鈴薯ブドウ糖液体培地(PD)であり、これらを10mlずつ、細胞培養用のプラスチックフラスコに分注した。まず、2012-7, 8, 9, 14,の個体由来の菌株を、SDY上で25°C, 24L条件で予備培養した。これらのコロニーから1mm角の大きさに切り出し上述の培地に接種した。25°C, 24D条件で振盪培養(100往復/分)し、増殖状態を肉眼および、光学顕微鏡で観察した。

増殖の認められた液体培養物0.5mlを9cmシャーレ内のSDY培地の表面全体に塗布して25°C, 24L条件で培養し、7日後に分生子の形成の有無を確認した。

### III 結果

#### 1. 観察

肉眼および実態顕微鏡観察により、葉上の死亡個体では、体表面から葉上に放射状に菌糸が伸長していた(図1)。一方、枝上の個体では、放射状の菌糸の伸長はほとんど認められなかった(図2)。SEM観察により、葉上の死体では、体表および葉上の菌糸に形成された分生子形成細胞から長倒卵形の分生子がシンポジオ型に形成されていた。採集直後の枝上の死体には、体表に殆ど分生子は認められなかった(図3, 5)。一方、3日間保湿後の同死体には、葉上の死体の場合と同様にシンポジオ型の分生子形成様式と、同形の分生子が認められた(図4, 6)。分生子は長倒卵形、 $3.9-6.5 \times 1.6-2.0 \mu\text{m}$  ( $5.1 \pm 0.6 \times 1.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , 平均±標準偏差)であった(図7)。

#### 2. 発芽時間

試料番号2012-15の分生子の発芽率は、18時間後89.5%, 24時間後97%, 2012-16では同96%, 100%であった。

#### 3. 培養温度の検討

3株とも25°Cの成長が一番速く、20°C, 30°Cの順に生長が速かった(図8)。

#### 4. 大量培養方法の検討

6日後、SS培地は菌の増殖により濁っていたが、他のSD, PD培地では接種した寒天片から伸長したコロニー、およびそれがちぎれてできた菌糸が球状に増殖していたが、培地の濁りは認められなかった。濁った培地では、単細胞の菌糸と、枝分かれをした菌糸が認められた。培養を継続したところ、7日目に、SD培地でもSS培地と同様の単細胞の菌糸が認められたが増殖は遅く、14日間培養した後でも、培地が濁ることは無かった。PDでは、14日目まで、単細胞の菌糸は認められなかった。

SDY培地に塗りつけた培養物において、コロニーは培地全体のコロニー上に分生子の形成が確認された。

### IV 考察

猩紅病によるカイガラムシへの影響が知られている一方、他の病原菌による報告は殆どない。今回は異なる糸状菌による流行病を見つけることができた。分離された菌はシンポジオ型の分生子形成様式から、昆虫病原菌 *Beauveria* (ボタntaxケ目) に似ているが、*Beauveria* 属が分生子形成細胞の根元が膨らむのに対し本菌は、膨らまない点で異なっている。培養をしたときに単細胞の菌糸が形成されたが、これは、冬虫夏草を含むボタntaxケ目の多くの昆虫病原菌で認められる短菌糸と呼ばれる構造だと考えられる。これらから、今回分離された菌はボタntaxケ目に属することが推定される。しかし、糸状菌の同定に際し、形態的特徴が似ていても分類学的に大きく異なる場合があるので、今後、分子系統解析を加味して同定をする必要がある。

葉上の死体に直接触れて分離ができたことにより、死体周辺に残存する分生子は発芽能力を持ち、感染源となりうると考えられた。さらに、保湿して分生子が体表に多数形成されたことにより、死体が一種の菌核として菌の保存の役割を果たし、湿度の高いときには分生子形成をして環境中に分生子を供給していると考えられる。

*Beauveria bassiana* は培養温度が30°C前後まで、温度の上昇と共に生長速度が速まること、20-33°Cまでは20時間でほぼ100%発芽することが知られている(7), 同じく昆虫病原菌の *Paecilomyces catenianulatus* の場合も18時間で

ほぼ100%発芽し(5), 最適培養温度が25°Cであることが知られている(6)。さらに, 今回の菌は短菌糸を形成した。このことから, カイガラムシ類の猩紅病菌 *F. coccophilum* (8)と同様に, まず25°Cで振盪培養により予備培養を行い, それを培地に流し込んで分生子形成をさせる方法を踏襲して調査を行うことができる。

今回得られた糸状菌は, コロニーの表面全体に分生子が形成された。*F. coccophilum* では, 培地上にスポロドキア(分生子座)と呼ばれる分生子形成のための器官に集中的に分生子が形成され(8)、シャーレ内での分生子形成は局所的である。さらに, *F. coccophilum* の分生子は大型で100µmを超える場合がある。一方, 今回の糸状菌の分生子は, 長さが5µm程度と小型である。従って, 今回の菌はシャーレ一枚当たりの分生子生産数が多いことが推定される。さらに, 分生子が小型であれば, 分生子懸濁液を作った場合, 沈殿が起りにくいという利点がある。これらの特徴は, 実用に向く特徴だと考えられる。

#### V おわりに

今回分離されたカイガラムシ寄生菌は, 容易に培養でき, 微生物的防除に有望な資材になる特性および可能性を持っていると考えられた。今後は分子系統学的な糸状菌の同定と接種実験が必要である。

#### VI 参考文献

(1) 青木襄児(1974) カイガラムシに着生するネクトリ

ア属菌の分類学的考察 応動昆18: 115-120

(2) 小林義雄・清水大典(1983) 冬虫夏草菌図譜, 280pp, 保育社, 大阪

(3) 岡田充弘・近藤道治・小山泰弘・山内仁人(2012) カツラマルカイガラムシによる広葉樹被害に関する研究 長野県森林総合センター研究報告 26: 1-16

(4) 佐藤大樹(2011) 昆虫に感染する *Fusarium* 菌, 駒田・小川・青木編, フザリウム-分類と生態・防除-全国農村教育協会, 東京: pp389-393

(5) 佐藤大樹・島津光明・前原紀敏(2005) 昆虫病原糸状菌 *Paecilomyces cateniannulatus* および *P. fimosoroseus* の分生子の発芽特性について, 九州森林研究, 58: 75-77

(6) SHIMAZU, M. (2001) *Paecilomyces cateniannulatus* Liang, a commonly found, but an unrecorded entomogenous fungus in Japan. Appl. Entomol. Zool. 36: 283-288

(7) SHIMAZU, M. (2004) Effects of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures Appl. Entomol. Zool., 39: 469-475

(8) SHIMAZU, M. (2009) Media for conidial production of the entomopathogenic fungus, *Fusarium coccophilum* (Anamorphic fungi: Phialosporae) Appl. Entomol. Zool., 44: 397-402

(9) 浦野忠久・齊藤 正一・蛭田利秀・布川耕市・大澤正嗣・岡田充弘(2010) カツラマルカイガラムシによる被害状況と寄生バチの発育及び羽化消長. 121回日森学講集(CD-ROM)

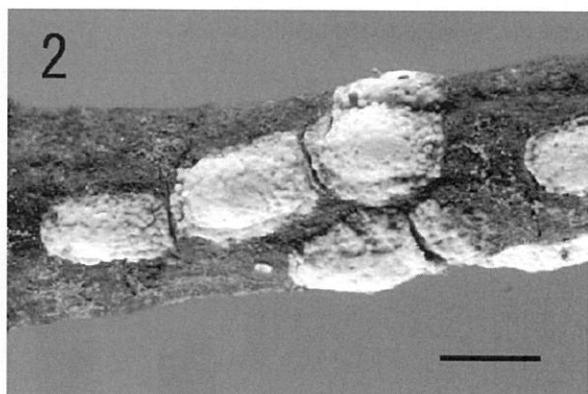
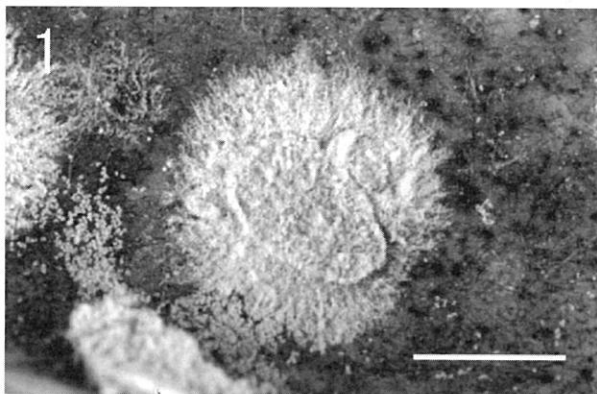


図-1. 葉上のミカンワタカイガラムシと虫体を覆い体外に伸長する寄生菌. スケール 2mm. 図-2. 枝上のミカンワタカイガラムシと虫体を覆う寄生菌. スケール 2mm.

Fig.1. A cadaver on a leaf. Hyphal extension from the body is visible. Scale 2mm. Fig.2. Cadavers on a twig without external hyphal extension. Scale 2mm.

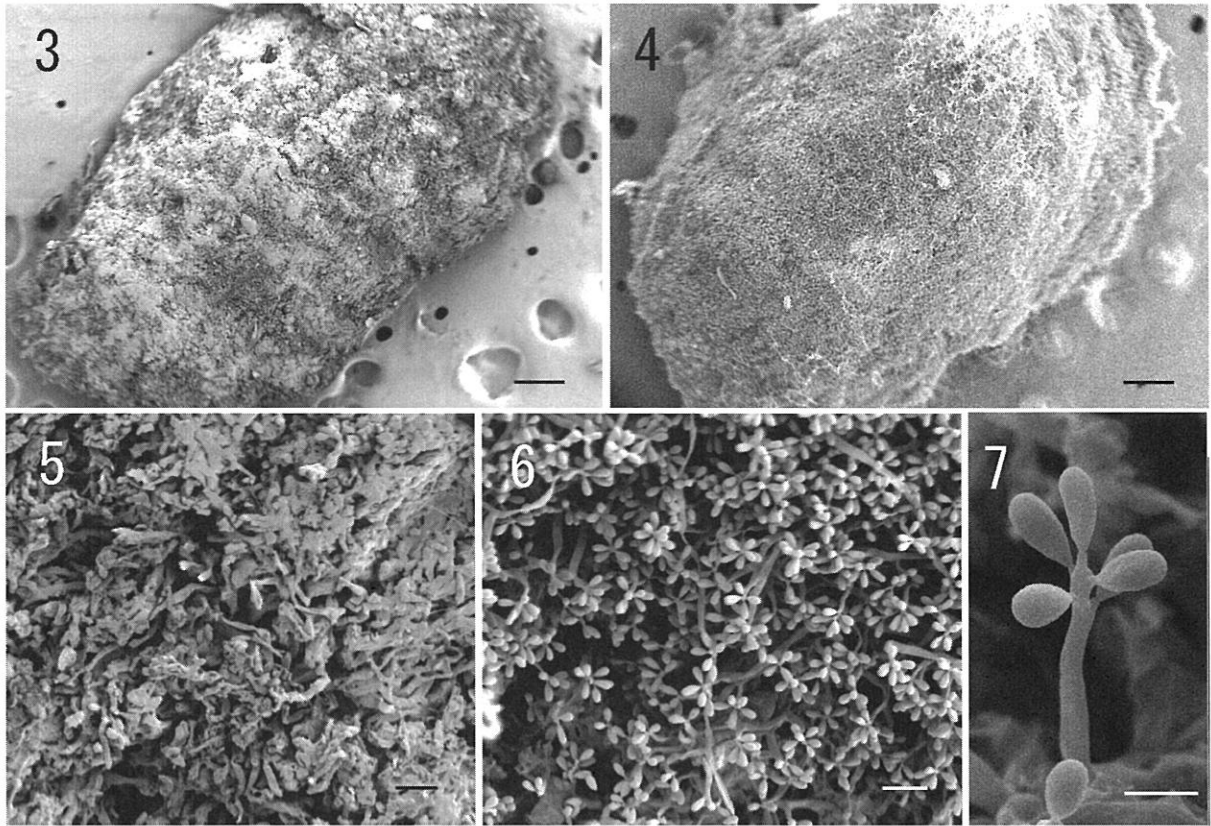


図3-7. 保湿前後の走査電子顕微鏡像。3. 保湿前のミカンワタカイガラムシの体表面。4. 保湿3日後のミカンワタカイガラムシの体表面。スケール200 $\mu\text{m}$ 。3. 4. 撮影倍率50倍。スケール200 $\mu\text{m}$ 。5. 保湿前の体表面(拡大)。6. 保湿3日後の体表面(拡大)。5. 6. 撮影倍率1000倍。スケール10 $\mu\text{m}$ 。7. 分生子および分生子形成細胞。撮影倍率5000倍。スケール5 $\mu\text{m}$ 。

Fig. 3-7. SEM images of surface of cadavers before and after incubation under moisten condition. Fig. 3. Entire image of a cadaver before incubation. Fig. 4. Three days after incubation. 3 and 4. Photographed at x50. Scale bars 200 $\mu\text{m}$ . 5. Surface image of a cadaver before incubation. 6. Three days after incubation. 5 and 6. Photographed at x1000. Scale bars 10 $\mu\text{m}$ . 7. A sympodula and conidia. Photographed at x5000. Scale bar 5 $\mu\text{m}$ .

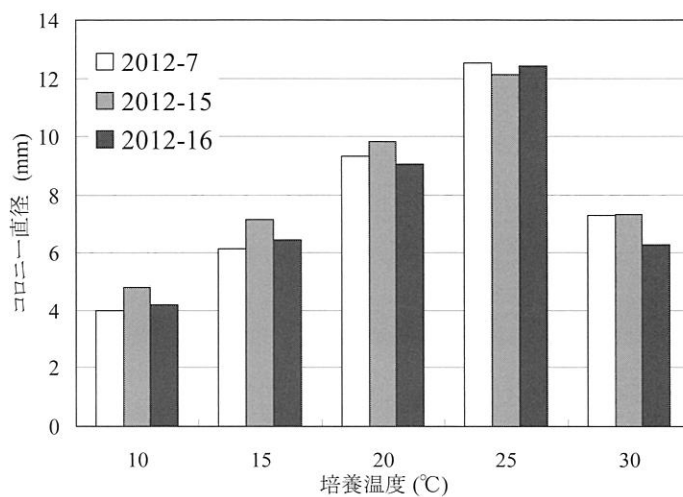


図-8. カイガラムシ寄生菌の菌叢と生育の関係  
2012-7, 15, 16: 試料番号

Fig. 8. Growth temperature test on fungal strains from scale insects  
2012-7, 15, 16: specimen number