



天敵微生物を利用した食葉性昆虫の生物防除システムの開発に関する研究

大津，康成

(Degree)

博士（農学）

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3267

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003267>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 307 】

氏 名・（本 籍） 大津 康成 （ 大阪府 ）

博士の専攻分野の名称 博士（農学）

学 位 記 番 号 博い第89号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

天敵微生物を利用した食葉性昆虫の生物防除システム
の開発に関する研究

審 査 委 員

主 査 教 授 眞山 滋志
教 授 内藤 親彦
教 授 安田 武司
助教授 土佐 幸雄

(氏名: 大津 康成 NO.1)

近年、化学農薬による人体および環境に与える影響から、化学農薬や肥料の投入を抑制し、環境を保全しながら農業生産が続けられる環境保全型農業が推し進められており、農薬の使用を最終手段と考え、天然に存在する微生物を利用して作物害虫を駆除する生物防除法の適用が期待されている。

そこで、今後の環境保全型農業の実施にむけて、様々な害虫に適用できる天敵微生物を利用した新しい生物防除法を開発するため、標的として昆虫の中腸内に存在するペリトロフィック膜 (PM) に着目した。PM はキチンで構成され、消化吸収に関与する上皮組織の保護膜として機能することが知られており、PM の損傷は食物の分解、栄養分の吸収を抑制することが報告されている。そこで、キチン分解酵素 (キチナーゼ) を分泌する細菌を自然界から分離し、腸管内に定着させ、キチンで構成されるPMを標的とした食薬性害虫の生物防除システムを確立することが可能であると考えた。この戦略の有効性を、ナス科作物を食害するニジュウヤホシテントウ成虫をモデル害虫として検討した。

まず、本害虫の中腸PMに及ぼすキチナーゼの影響を検討するため、クローニングしたグラム陽性細菌 *Kurthia zopfii* 由来のキチナーゼ遺伝子 (*chiSH1*) を大腸菌内で過剰発現させ精製した。次に、精製したキチナーゼ溶液を本害虫から摘出した中腸に処理して、走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、対照区では、繊維状のPMが観察されたが、キチナーゼ処理区において顕著なPMの分解が観察された。さらに、本害虫の摂食行動に及ぼすキチナーゼの影響を検討するため、キチナーゼ溶液を処理した本害虫のトマト葉摂食量を調査した。その結果、キチナーゼ処理区において顕著な摂食面積の減少が認められた。このことから、キチナーゼ処理によるPMの分解が本害虫の摂食行動に影響を及ぼしたと考えた。

次に、本害虫を生物防除するための有効な微生物資材として、トマト葉面に生息する細菌 (*Enterobacter cloacae* KPM-007E 株) に *chiSH1* を導入した KPM-007E/*chi* 株をキチナーゼ生産株として供試した。また、KPM-007E/*chi* 株はそれらに特異的に感染する溶菌型バクテリオファージ (EcP-01) に感染した際、大量のキチナーゼが細胞外へ放出する。そこで、KPM-007E/*chi* 株および EcP-01 を利用した食薬性害虫の生物防除法として、複数の微生物を混合・内包できるアルギン酸マイクロビーズ (直径 100 μ m 以下) に包埋することを考えた。まず、KPM-007E/*chi* 株および EcP-01 を包埋したビーズによるPMの分解を検討するため、ビーズをPM上に置き、一定時間処理した後、走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、混合包埋したビーズの周縁部でPMの分解が観察され、本法の有効性が示された。次に、KPM-007E/*chi* 株および EcP-01 を混合したビーズを噴霧処理したトマト植物を本害虫に 30 日間摂食させた。その結果、細菌を包埋していないビーズ処理区と比較して 81.6%の産卵抑制効果および 54.4%の摂食抑制効果を得た。以上のことから、キチン分解性細菌およびバクテリオファージを包埋したアルギン酸ビーズを利用したニジュウヤホシテントウ成虫の生物防除法を確立した。

さらに、トマトの葉面に生息するキチン分解性細菌の分離を行ったところ、キチナーゼを多量に分泌する細菌 (*Alcaligenes paradoxus* KPM-012A 株) が得られた。ニジュウヤホシテントウに及ぼす KPM-012A 株包埋ビーズの影響を調査したところ、70.4%の産卵抑制効果および 36.2%の摂食抑制効

(氏名: 大津 康成 NO.2)

果を得ることに成功した。以上の結果から、キチン分解性細菌を内包したアルギン酸ビーズの葉面散布により本害虫の生物防除が可能であることが明らかになった。

一方、この抑制効果は成虫に限定されており、幼虫に対しては認められなかった。そこで、成虫だけでなく幼虫に対しても効果を示すキチン分解性を有する昆虫病原性細菌を分離し、両者に適用可能な生物防除法を検討した。まず、キチン分解性昆虫病原細菌を分離するため、トマト葉面から分離したキチン分解性細菌からニジュウヤホシテントウ幼虫に対して病原性を示す細菌 (*Pseudomonas fluorescens* KPM-018P 株) を選抜した。次に、本幼虫に対する KPM-018P 株の病原性を調査するため、本菌を噴霧処理したトマト植物を 3 齢幼虫に摂食させることにより、本菌の病原性を検討したところ、100%の致死効果を得た。さらに、本菌の生物防除資材としての有効性を検討するため、様々な作物害虫 (ハスモンヨトウ、オオタバコガ、シルバーリーフコナジラミ、ミカンキイロアザミウマおよびトマトハモグリバエ) に対する本菌の病原性を調査したところ、すべての供試害虫において病原性を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、KPM-018P 株を生物防除資材として利用することにより本菌の病原因子によるニジュウヤホシテントウ幼虫への致死効果、ならびにキチン分解能による成虫への摂食および抑制効果の両者が期待され、ニジュウヤホシテントウの総合的な生物防除が行えることが示唆された。さらに、本菌の害虫への適用範囲から、様々な作物害虫への適応が期待された。

氏名	大津康成		
論文 題目	天敵微生物を利用した食葉性昆虫の生物防除システムの開発に関する研究		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	眞山滋志
	副 査	教授	内藤親彦
	副 査	教授	安田武司
	副 査	助教授	土佐幸雄
	副 査		
要 旨			
近年、化学農薬の人体および環境に与える影響から、化学農薬や肥料の投入を抑制し、環境を保全しながら農業生産が続けられる環境保全型農業が推し進められており、そのなかで、天然に存在する微生物を利用して作物害虫を駆除する生物防除法の適用が期待されている。本研究は、ナス科植物の害虫、ニジュウヤホシテントウをモデルとして用い、天敵微生物を利用した新しい生物防除法の開発を試みたものである。 第1章におけるこれまでの生物防除法のレビューに引き続き、第2章、第3章では、昆虫の中腸内に存在するペリトロフィック膜 (PM) をターゲットとした戦略について検討した。PMはキチンで構成され、消化吸収に関与する上皮組織の保護膜として機能することが知られている。そこで、キチン分解酵素 (キチナーゼ) を分泌する細菌を自然界から分離し、腸管内に定着させれば、食葉性害虫の食物消化吸収を阻害することが可能であると考えた。 第2章では、まず、ニジュウヤホシテントウの中腸PMに及ぼすキチナーゼの影響を検討するため、クローニングしたグラム陽性細菌 <i>Kurthia zopfii</i> 由来のキチナーゼ遺伝子 (<i>chsH1</i>) を大腸菌内で過剰発現させ精製した。次に、精製したキチナーゼ溶液を本害虫から摘出した中腸に処理して、走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、対照区では、繊維状のPMが観察されたが、キチナーゼ処理区において顕著なPMの分解が観察された。さらに、本害虫の摂食行動に及ぼすキチナーゼの影響を検討するため、キチナーゼ溶液を処理した本害虫のトマト葉摂食量を調査した。その結果、キチナーゼ処理区において顕著な摂食面積の減少が認められた。このことから、キチナーゼ処理によるPMの分解が本害虫の摂食行動に影響を及ぼしたと考えた。次に、本害虫を防除するための有効な微生物資材として、トマト葉面に生息する細菌 (<i>Enterobacter cloacae</i> KPM-007E 株) に <i>chsH1</i> を導入した KPM-007E/chi 株をキチナーゼ生産株として供試した。また、KPM-007E/chi 株はそれらに特異的に感染する溶菌型バクテリオファージ (EcP-01) に感染した際、大量のキチナーゼが細胞外へ放出する。そこで、KPM-007E/chi 株および EcP-01 を利用した食葉性害虫の生物防除法として、複数の微生物を混合・内包できるアルギン酸マイクロビーズ			

氏名	大津康成
(直径 100 μm 以下) に包埋することを考えた。まず、KPM-007E/chi 株および EcP-01 を包埋したビーズによる PM の分解を検討するため、ビーズを PM 上に置き、一定時間処理した後、走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、混合包埋したビーズの周縁部で PM の分解が観察され、本法の有効性が示された。次に、KPM-007E/chi 株および EcP-01 を混合したビーズを噴霧処理したトマト植物を本害虫に 30 日間摂食させた。その結果、細菌を包埋していないビーズ処理区と比較して 81.6% の産卵抑制効果および 54.4% の摂食抑制効果を得た。以上のことから、キチン分解性細菌およびバクテリオファージを包埋したアルギン酸ビーズを利用したニジュウヤホシテントウ成虫の生物防除法が確立された。 しかし、組み換え微生物を環境中に散布する戦略は環境保護の面で適切とはいえない。そこで、第 3 章では天然のキチン分解性細菌の利用を検討した。トマトの葉面からキチン分解性細菌の分離を行ったところ、キチナーゼを多量に分泌する細菌 (<i>Alcaligenes paradoxus</i> KPM-012A 株) が得られた。ニジュウヤホシテントウに及ぼす KPM-012A 株包埋ビーズの影響を調査したところ、70.4% の産卵抑制効果および 36.2% の摂食抑制効果を得ることに成功した。以上の結果から、キチン分解性細菌を内包したアルギン酸ビーズの葉面散布により本害虫の生物防除が可能であることが明らかになった。 一方、この抑制効果は成虫に限定されており、幼虫に対しては認められなかった。そこで、第 4 章では、成虫だけでなく幼虫に対しても効果を示す方法を検討した。まず、トマト葉面から分離したキチン分解性細菌からニジュウヤホシテントウ幼虫に対して病原性を示す細菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i> KPM-018P 株) を選抜した。次に、本菌を噴霧処理したトマト植物を 3 齢幼虫に摂食させた。その結果、100% の致死効果を得た。このことから、本細菌を用いれば、幼虫・成虫を問わずニジュウヤホシテントウを防除できることが示唆された。 さらに、第 5 章では、本菌の生物防除資材としての有効性スペクトラムを検討した。ハスモンヨトウ、オオタバコガ、シルバーリーフコナジラミ、ミカンキイロアザミウマおよびトマトハモグリバエに対する本菌の病原性を調査したところ、すべての供試害虫において病原性を示すことが明らかとなった。 以上の結果から、KPM-018P 株を生物防除資材として利用することにより本菌の病原性因子によるニジュウヤホシテントウ幼虫への致死効果、ならびにキチン分解能による成虫への摂食および抑制効果の両者が期待され、さまざまな害虫の総合的な生物防除が行えることが示唆された。以上の研究は、食葉性害虫の新たな生物防除法の可能性を提示したものであり、学位申請者大津康成は、博士 (農学) の学位を得る資格ありと認める。	