

学 位 論 文 題 名

アブラムシ類に殺虫活性を示す細菌の検索と
活性物質の単離・同定に関する研究

学位論文内容の要旨

1986～1990年に北海道十勝支庁管内の18市町村でアブラムシ類および寄主植物など617個体のサンプルを採集し、そのサンプルから1,100菌株の細菌を分離した。分離菌株培養液をスプレーする（噴霧処理）、あるいはパラフィルムを通して分離菌株培養液を吸汁させる（経口接種）方法により殺虫活性を評価する生物検定法を開発しアブラムシ病原細菌の探索を行った。1,100菌株中582菌株を対象に噴霧処理による殺虫活性菌株の選抜を行った結果、ジャガイモヒゲナガアブラムシ（*Aulacorthum solani*）およびモモアカアブラムシ（*Myzus persicae*）に対して強い殺虫活性を示す6菌株が選抜された（HS菌株）。また、1,100菌株中518菌株を対象に経口接種とジャガイモ塊茎腐敗試験により選抜を行った結果、ジャガイモに対して病原性がなくジャガイモヒゲナガアブラムシに対して強い殺虫活性を示す6菌株が選抜された（HP菌株）。噴霧処理におけるHS菌株の殺虫活性は短期間（処理後2～4日後）で発現したが、経口接種におけるHP菌株の殺虫活性の発現には接種後8～10日間を要した。一方、温室内のキュウリに寄生するワタアブラムシ（*Aphis gossypii*）に対してHS菌株とHP菌株を噴霧処理した結果、HS菌株はワタアブラムシに対して強い殺虫活性を示したが、HP菌株はほとんど殺虫活性を示さなかった。

HS菌株はグラム陰性の桿菌で、PHBを蓄積せず、蛍光色素を産生し、アルギニンジヒドロラーゼ活性が陽性で、鞭毛が1～4本あり、レバンを産生し、炭素源としてサッカロースとキシロースを利用するなどの性状から *Pseudomonas fluorescens* と同定された。HP菌株の3菌株（HP890972, HP891941, HP892182）は、グラム陰性の桿菌で、フェニルアラニンジアミナーゼ陽性、マロン酸塩とサリシンを利用し、エスクリンを加水分解することから *Pantoea agglomerans* と同定された。HP菌株の他の3菌株（HP891192, HP891592, HP891632）は、グラム陰性の桿菌で、鞭毛が2本以上あり、黄色色素を産生せず、リシンデカルボキシラーゼ陽性であることから *Xanthomonas maltophilia* と同定された。

HS菌株中最も強い殺虫活性を示したHS870031菌株を肉エキスペプトン液体培地で24時間培養した後、遠心分離により得た培養上清および沈殿を用いてジャガイモヒゲナガアブラムシに噴霧処理を行った。その結果、培養上清は強い殺虫活性を示し、処理2日後には死虫率が100%に達したが、沈殿部の殺虫活性は低く、処理12日後でも死亡率は30%であった。このことは産生された殺虫活性物質が菌体外に放出されることを示唆している。また、HS870031菌株を肉エキスペプトン液体培地を用い25℃で培養した培養上清の噴霧処理によるジャガイモヒゲナガアブラムシに対する殺虫活性を経時的に調査したところ、幼虫に対しては培養16時間以後に、成虫に対しては20時間以後に殺虫活性が認められた。一方、HP菌株中最も強い殺虫活性を示したHP890972菌株を肉エキスペプトン平板培地で培養し、段階希釈したものをジャガイモヒゲナガアブラムシ成虫に経口接種したところ、接種液の菌体濃度が高いほど、また接種時間が長いほど虫体内から再分離される生菌数は多くなるとともに、ジャガイモヒゲナガアブラムシが死亡するまでに要する日数は短くなった。しかし、死亡個体中の生菌数は死亡時期や接種菌液の菌体濃度とは関係なくほぼ一定のレベル（ 10^7 cfu/成虫）であった。

HS870031菌株培養液上清に硫酸を添加し、遠心して得られた画分をワタアブラムシ成虫に対

する殺虫活性検定に供したところ0-30%硫酸沈殿画分が強い殺虫活性を示した。同様に、アセトンを追加して得られた画分では80%アセトン処理上清画分が殺虫活性を示した。このアセトン処理上清を逆相カラムに注入し、メタノールで溶出したところ60-80%メタノール溶液溶出画分が高い殺虫活性を示した。60-80%メタノール溶液溶出画分をHPLC (High Performance Liquid Chromatography) 分析した結果、殺虫活性を示したのは最大成分のNo.18のピークに対応する成分であった。No.18の成分を質量分析した結果、質量1125.7 (MH^+ : 1126.7) に最大質量のピークが認められ、これはviscosinの分子量と一致した。また、 m/z 1126.7の分子イオンをMS/MS分析した結果、得られた各メジャーピークの質量はviscosinの各構成アミノ酸が順次開裂した場合に生成が予想されるフラグメントに一致していた。よって、この殺虫活性物質をviscosin と推定した。

HS870031菌株およびHP890972菌株の圃場における防除効果を確認するために、施設栽培キュウリに発生するワタアブラムシに対して本分離2菌株培養液を散布した。HS870031菌株培養液の散布直後はアブラムシ密度が減少し防除効果は認められたが、残効期間が短く、一週間ほどでアブラムシ密度は回復した。一方、HP890972菌株培養液散布ではワタアブラムシに対する防除効果は認められなかった。また、本分離2菌株の標的外生物に及ぼす影響を調査した。その結果、HS870031菌株培養液散布はアブラムシの天敵類、ナミハダニ (*Tetranychus urticae*)、チリカブリダニ (*Phytoseiulus persimilis*) などに対して影響が認められたが、影響を及ぼす期間は非選択的殺虫剤と比較するとかなり短かった。一方、HP890972菌株培養液散布でも同様の影響が認められたが、HS870031菌株培養液散布に比較するとその影響は少なかった。さらに、施設栽培キュウリにおいて使用される代表的な農薬について本分離2菌株の生育に及ぼす影響を室内実験で調査した。糸状菌対象殺菌剤にはHS870031菌株に比べHP890972菌株に対して抗菌活性を示す薬剤が多かったが、細菌対象殺菌剤には逆にHS870031菌株に抗菌活性を示す薬剤が多かった。また、殺虫剤の中にも本分離2菌株に対して抗菌活性を示すものが認められた。

本分離2菌株培養液によるキュウリの浸根接種および浸種接種を行って、植物体に接種細菌を取り込ませ、そのキュウリを吸汁させることにより接種細菌を経口的にアブラムシに接種する方法を考案した。浸根接種では、接種細菌は植物体に取り込まれ、接種部位以外からも再分離された。さらに浸根接種時にそのキュウリ葉を吸汁したワタアブラムシの死亡個体からも高濃度の接種細菌が再分離された。また、浸種接種によっても接種細菌はキュウリの各部位から再分離され、浸種接種後キュウリ葉を吸汁したワタアブラムシからも接種細菌が再分離された。これらの結果は、いずれの接種法においても接種細菌は植物体に取り込まれ、アブラムシの吸汁時にアブラムシ体内に経口的に取り込まれて増殖することを示唆しており、これらの接種法を発展させることで経口接種により殺虫活性を示す菌株についてもアブラムシの防除に利用できる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 教 授 田 原 哲 士

副 査 教 授 諏 訪 正 明

学 位 論 文 題 名

アブラムシ類に殺虫活性を示す細菌の検索と 活性物質の単離・同定に関する研究

本論文は、図 9、表 34、102 ページからなる邦文で、別に3編の参考論文が添えられている。

アブラムシは農作物の重要な害虫であるが、近年、広食性のモモアカアブラムシやワタアブラムシにおいて有機リン剤や合成ピレスロイド剤に対する抵抗性が顕在化し、これらの防除が困難になってきている。本研究は、アブラムシの生物的防除に資する目的でアブラムシに殺虫活性を有する細菌の検索と殺虫活性物質の解析および接種方法の検討を行ったものである。得られた結果は次のごとくに要約される。

1) アブラムシ類に殺虫活性を示す細菌の検索

分離菌株培養液をスプレーする（噴霧処理）、あるいはパラフィルムを通して分離菌株培養液を吸汁させる（経口接種）方法により殺虫活性を評価する生物検定法を開発し、アブラムシに殺虫活性を有する細菌の探索を行った。その結果、噴霧処理によりジャガイモヒゲナガアブラムシ (*Aulacorthum solani*) およびモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) に対して強い殺虫活性を示す6菌株が選抜された (HS菌株)。また、経口接種によりジャガイモヒゲナガアブラムシに対して強い殺虫活性を示し、ジャガイモに対しては病原性がない6菌株が選抜された (HP菌株)。

分離菌株はいずれもグラム陰性の桿菌で、HS菌株はすべて *Pseudomonas fluorescens* (HS870031 他)と同定され、HP菌株の3菌株 (HP890972 他) は *Pantoea agglomerans*、他の3菌株は *Xanthomonas maltophilia* と同定された。

2) 殺虫活性物質の単離・同定

HS菌株中最も強い殺虫活性を示したHS870031菌株の培養上清は強い殺虫活性を示した。この培養液上清にアセトンを添加して得られた画分の殺虫活性を調べたところ、80%アセトン処理上清画分が殺虫活性を示した。この画分を逆相カラムに注入し、含水メタノールで溶出したところ60-80%メタノール溶出画分が高い殺虫活性を示した。この画分をHPLC

分析した結果、殺虫活性を示したのは最大成分のNo.18のピークに対応する成分であった。No.18の成分を質量分析した結果、質量1125.7 (MH^+ : 1126.7) に最大質量のピークが認められ、これは*Pseudomonas fluorescens* の生成する抗菌物質として報告されているviscosinの分子量と一致した。また、 m/z 1126.7の分子イオンをMS/MS法により分析した結果、得られた各メジャーピークの質量はviscosinの各構成アミノ酸が順次開裂した場合に生成が予想されるフラグメントに一致していた。よって、この殺虫活性物質をviscosin と推定した。

3) 分離菌株による施設栽培キュウリのワタアブラムシ防除

分離菌株の圃場における防除効果を調査した。HS870031菌株培養液の散布直後は施設栽培キュウリに発生するアブラムシ密度が減少し防除効果は認められたが、残効期間が短く、一週間ほどでアブラムシ密度は回復した。一方、HP890972菌株培養液散布ではワタアブラムシに対する防除効果は認められなかった。また、本分離2菌株の標的外生物に及ぼす影響を調査した結果、HS870031菌株培養液散布はアブラムシの天敵類、ナミハダニ

(*Tetranychus urticae*)、チリカブリダニ (*Phytoseiulus persimilis*) などに対して影響が認められたが、影響を及ぼす期間は非選択的殺虫剤と比較するとかなり短かった。一方、HP890972菌株培養液散布でも同様の影響が認められたが、その影響は少なかった。さらに、施設栽培キュウリにおいて使用される代表的な農薬について本分離2菌株の生育に及ぼす影響を室内実験で調査した結果、糸状菌対象殺菌剤にはHP890972菌株に対して抗菌活性を示す薬剤が多かったのに対して、細菌対象殺菌剤には逆にHS870031菌株に抗菌活性を示す薬剤が多かった。また、殺虫剤の中にも本分離2菌株に対して抗菌活性を示すものが認められた。

HP菌株の利用を目的として、浸根接種および浸種接種により細菌を経口的にアブラムシに接種する方法を考案した。キュウリを用いた実験では、いずれの接種法においても接種細菌は植物体に取り込まれ、アブラムシの吸汁時にアブラムシ体内に経口的に取り込まれて増殖することが示唆された。このことから、これらの接種法を発展させることで経口接種により殺虫活性を示す菌株についてもアブラムシの防除に利用できる可能性が示唆された。

以上のように、本研究はアブラムシに対する新規の生物的防除資材を提供すると共に、吸汁害虫に対する生物的防除資材の開発に際しての重要な知見を与えている。この成果は、学術的・実用的に高く評価される。

よって審査員一同は、橋本庸三が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。