

速報

Paecilomyces lilacinus* のハチノスツヅリガに対する初期感染の観察¹佐藤大樹*²

佐藤大樹：***Paecilomyces lilacinus* のハチノスツヅリガに対する初期感染の観察** 九州森林研究 59：222-224, 2006 昆虫病原糸状菌 *Paecilomyces lilacinus* の、ハチノスツヅリガ幼虫の皮膚における初期感染の観察をおこなった。酵母抽出物添加 Sabouraud dextrose agar 上で *P. lilacinus* を培養し、(25℃, 24L, 11日間), 分生子の形成されたコロニー上に 5-10mm の幼虫を置いて転がすことにより分生子を体表に付着させ、48時間保湿した。分生子は24時間で発芽し、48時間後クチクラと接触した菌糸先端は膨張していた。72時間後、菌糸がクチクラを貫通し、体内で増殖していた。初期感染を詳細に観察する為には、接種48から72時間の間を観察すればよいと考えられた。

キーワード：*Paecilomyces lilacinus*, 発芽, ハチノスツヅリガ

Sato, H.: **Observation on initial infection process of *Paecilomyces lilacinus* to larvae of *Galleria mellonella*.**

Kyushu J. For. Res. 59 : 222-224, 2006 The initial infection process of *Paecilomyces lilacinus*, an entomopathogenic fungus, was observed under a scanning electron microscope and a light microscope. Larvae of *Galleria mellonella* (5 to 10 mm in body length) were put on a sporulating colony on Sabouraud dextrose agar with yeast extract (25C, 24L, 11-old) and dusted with the conidia of that fungus. Each of the larvae was kept in a moist chamber for 48h after that inoculation. Conidia germinated within 24h. At 48h, tips of the hyphae contacting with the cuticle of the larvae were observed to have expanded. Seventy-two h after the inoculation, hyphal penetration of the host's cuticle and proliferating hyphae in the haemocoel were observed. To examine the initial infection process of this fungus in more detail, it appears that the specimens should be prepared from 48 to 72 h after the inoculation.

Key words: *Paecilomyces lilacinus*, germination, *Galleria mellonella*.

I. はじめに

Paecilomyces lilacinus は線虫および昆虫に感染する糸状菌であり、土壤中に一般的に存在する。本菌は海外では線虫の防除資材としての可能性の検討が行われている (Cabanillas and Barker, 1989)。日本においては、本菌は今までにカメムシ目、ハエ目、チョウ目から記録がある (国見, 1993)。*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* のように害虫の微生物的防除資材として利用されている昆虫病原菌は、感染過程が明らかにされているが (Zacharuk, 1981; Vey and Fargue, 1977), 本菌では、一部害虫防除実験が行われているものの (Gökçe and Er, 2005), 昆虫に対する感染過程は殆ど明らかになっていない。本菌の感染過程の基礎的知見を得る為、実験昆虫として一般的に使用されているハチノスツヅリガに接種し、発芽からクチクラ貫通までの所要時間と形態変化を明らかにすることを目的として初期感染過程を観察した。

II. 材料と方法

1. 供試菌：トビイロケアリ (*Lasius japonicus*) 由来の、*Paecilomyces lilacinus* (富山県産) を用いた。
2. 培養方法：シャーレ内の1%酵母抽出物添加サブロー寒天培地 (以後SDY) の全面に分生子を塗布し、25℃, 24Lで11日間培養し、培地の全面に分生子形成されたコロニーを用いた。
3. 供試昆虫：ハチノスツヅリガ (*Galleria mellonella*) を、30℃, 24Dでミツバチの巣礎を餌として飼育し、体長約5-10mmの幼虫を使用した。
4. 接種方法：供試虫を上述のシャーレ内の分生子上に小ピンセットで置いてから転がして、体表上に分生子を付着させた。接種後35mm×35mm×10mmのプラスチックカップで個体飼育し、最初の48時間は滅菌蒸留水でぬらした濾紙を容器に入れて保湿し、その後濾紙を取り除き、巣礎を与えて飼育した (24D, 25℃)。
5. 組織切片の作成：接種48, 72時間後に幼虫を2.5%グルタルアルデヒド (リン酸緩衝液 pH7.3) で一晩固定し、アセトンで脱水した。続いてスパーのエポキシ樹脂に包埋し、2μmの切片を超ミクロトームで作成した。切片はトルイジンブルーで染色して光学顕微鏡観察を行った。
6. 走査電子顕微鏡試料の作成：光学顕微鏡試料と同様にグルタルアルデヒドで固定し、リン酸緩衝液で洗浄の後、4酸化オスミ

*¹ Sato, H.: Observation on initial infection process of *Paecilomyces lilacinus* to larvae of *Galleria mellonella*

*² 森林総合研究所九州支所: Kyushu Res. Center, For. & Forest Prod. Res. Inst.

ウムで一晩後固定した。アセトンで脱水後、第三ブタノールに置換して凍結乾燥を行った。乾燥後、白金パラジウムを蒸着し、日本電子 JSM-840A 走査電子顕微鏡 (20KV) で観察を行った。

7. 培地上での発芽実験：接種で用いた分生子を SDY 上に 1 白金耳塗布して 25℃, 24 時間後の発芽状態を観察した。

Ⅲ. 結果

1. 培地上の発芽：24 時間で 100% 発芽した。2 カ所から菌糸を伸張した分生子がほとんどであった。

2. 体表上の発芽：接種直後、体表には長楕円形の分生子が多数付着していた (図 1)。転がした時に菌糸も一部付着していた。24 時間後、体表上の発芽率は 90% であった (N = 400) (図 2)。膨張した分生子、殆ど変化のない分生子も混在していた。

3. 菌糸の伸長と表皮の貫通：48 時間後、菌糸は体表を伸張し、菌糸先端の体表と接する部分が膨張していた (図 3, 4)。組織観察により、菌糸の接触部分は、供試昆虫のクチクラが褐色化していた。72 時間後、クチクラを貫通する菌糸が多数観察された (図 5)。菌糸の膨張した部分から貫通していた。この時期に一部死亡する個体が出現した。死亡個体は肉眼的に、クチクラの黒い病斑がはっきりと認められ、組織切片では脂肪体、血体腔内に菌糸が進入していた。

Ⅳ. 考察

Paecilomyces lilacinus の初期感染の経過を観察し、48 時間経過後は、殆どすべての分生子が発芽し、昆虫との接触部分では膨張し、72 時間までに体内に侵入することが判明した。体内に侵入する際に、菌糸の接触部分が膨張し、付着器化することは、

Metarhizium anisopliae, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* でも知られている (Zacharuk, 1981; Vey and Fargue, 1977; Gökçe and Er, 2005)。観察された膨張部分は、これらの糸状菌で認められる付着器様の構造と同様であると思われる。*M. anisopliae* の場合には、付着器からベグ状に菌糸が侵入することが知られているが、今回は侵入直後の菌糸の観察はできなかった。今後、クチクラへの菌糸の侵入過程を調査するには、接種後 48-72 時間に試料を作成し観察することがよいと考えられた。

引用文献

- Cabanillas, E. and Barker, K. R. (1989) Impact of *Paecilomyces lilacinus* inoculum level and application time on control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *J. Nematol.* 21: 115-120.
- Gökçe, A and Er, M. K. (2005) Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29: 331-339.
- 国見裕久 (1993) 日本産昆虫の天敵微生物目録 (天敵微生物の研究手法 岩花ら, 222pp, 植物防疫協会, 東京). 192-222.
- Vey, A. and Fargue, J. (1977) Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Lepitnotarsa decemlineta* larvae during ecdysis. *J. of Invertebr. Pathol.* 30: 207-215.
- Zacharuk, R. Y. (1981) Fungal diseases of terrestrial insects (*In* Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Davidson, E. W. (ed.). 562pp. Allanheld, Osmun & Co. Publishers, Inc., New Jersey), 367-401.

(2005年11月14日 受付：2005年12月5日 受理)

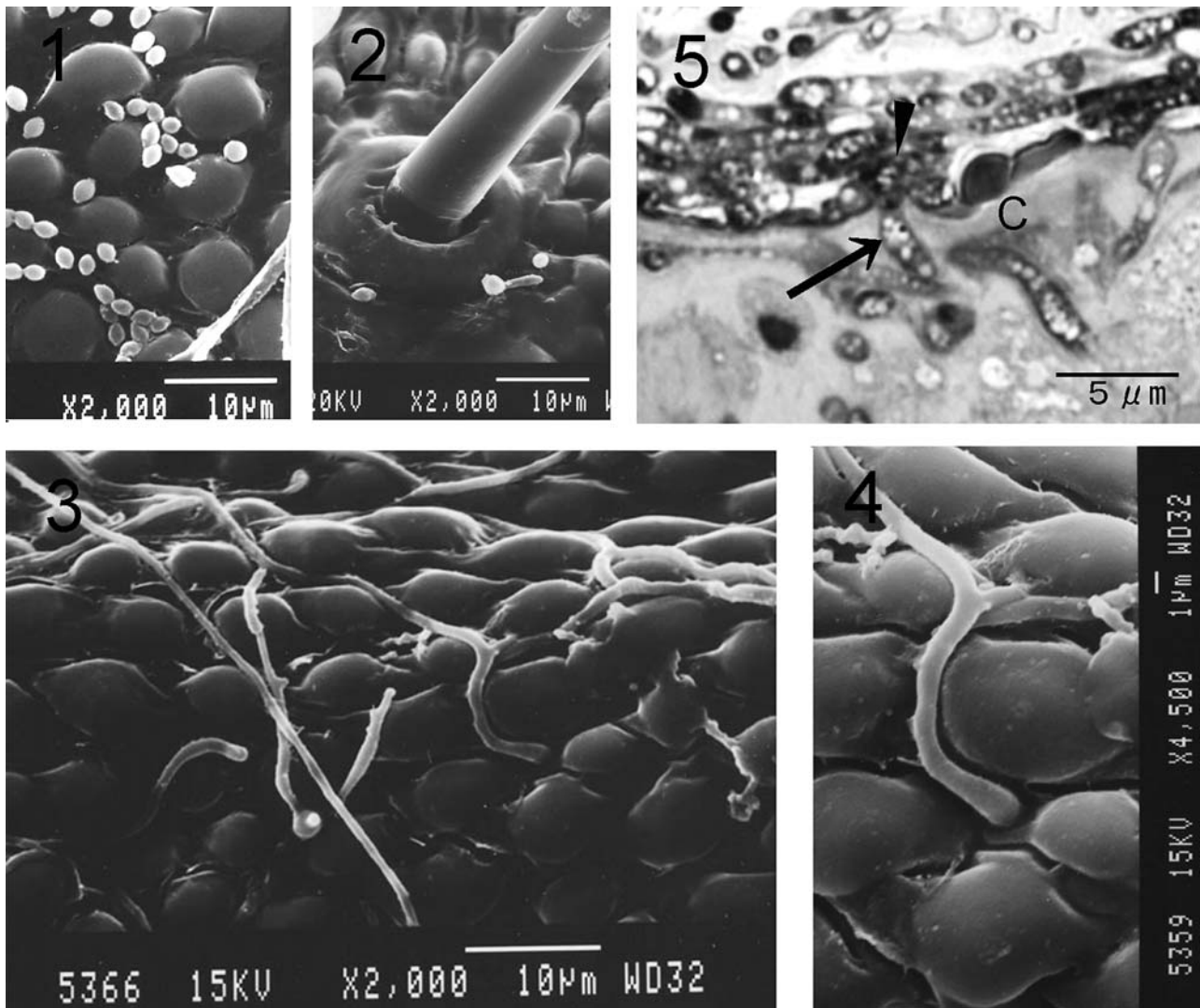


図1 - 5. 図1. 接種直後の分生子. Fig. 1. Conidia on cuticle of a *Galleria mellonella* larva immediately after inoculation.
 図2. 24時間後. 発芽した分生子. Fig. 2. At 24h. A germinating conidium. 図3. 48時間後. 先端の膨張した菌糸.
 Fig. 3. At 48h. Expanded hyphal tips. 図4. 48時間後. 図3の拡大. Fig. 4. At 48h. Higher magnification
 of an expanded hyphal tip in Fig. 3. 図5. 72時間後. クチクラから侵入した菌糸 (矢印). C:クチクラ. やじり印:
 菌糸膨張部. スケール 5 μ m Fig. 5. At 72h. A hypha penetrating cuticle of the *Galleria mellonella*
 larva (arrow). C: cuticle. Arrow head: expanded part of a hypha. Scale: 5 μ m.