

培地組成および培養期間がマツノマダラカミキリより分離された *Beauveria bassiana* 分生子形成に及ぼす影響

誌名	日本応用動物昆虫学会誌
ISSN	00214914
著者	本林, 隆 国見, 裕久 森田, 芳昭
巻/号	32巻3号
掲載ページ	p. 187-191
発行年月	1988年8月

培地組成および培養期間がマツノマダラカミキリより分離された *Beauveria bassiana* 分生子形成に及ぼす影響

本林 隆*・国見裕久*,¹⁾・森田芳昭*・土屋大二**

* 東京都蚕糸指導所

** 東京都農業試験場林業分場

Effect of Nutritional Composition of Medium and Duration of Culture Time on Conidial Production of *Beauveria bassiana* Isolated from the Pine Sawyer, *Monochamus alternatus* HOPE (Coleoptera: Cerambycidae). Takashi MOTOBAYASHI, Yasuhisa KUNIMI,²⁾ Yoshiaki MORITA (The Tokyo Metropolitan Sericultural Center, Akikawa, Tokyo 197, Japan) and Daiji TSUCHIYA (Forest Experiment Branch, Tokyo Agriculture Experimental Station, Itukaichi-machi, Tokyo 190-01, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **32**: 187-191 (1988)

The optimum nutritional composition of the medium most suitable for the cultivation of *Beauveria bassiana* was determined on the basis of the conidial production. Sorbitol at an optimum concentration of 1.2% was the most effective carbon source for the production of conidia. Milled dry pupae of the silkworm at an optimum concentration of 0.8% in a combination with 1.0% peptone was the most effective source of organic nitrogen. Higher concentrations of milled dry pupae appeared to exert an inhibitory effect. Carrageenin was a more favorable coagulating agent than agar from the economical point of view although conidial production on carrageenin-medium was the same as that on agar-medium. The maximum production of conidia was obtained at day 10 of incubation. Germination rate of conidia was constant at about 90% during day 6 to day 20 of incubation.

緒 言

近年、マツノマダラカミキリが媒介するとされるマツノザイセンチュウに起因する松枯損が全国的に広がり、大きな社会問題となっている。片桐・島津 (1980) は、日本各地で採集したマツノマダラカミキリ病死体から *Beauveria bassiana* を分離し、本菌が微生物的防除の素材として有望であることを示唆した。*B. bassiana* は古くから微生物的防除の素材として注目されており、わが国では、本菌を利用したマツカレハの防除 (日高, 1933), ミカンネコナカイガラムシの防除 (森本ら, 1959 a, b, 1960 a, b) などの試みがある。また、ソ連においては *B. bassiana* の製剤 BOVERIN が大量に生産され、*Leptinotarsa decemlineata* の防除のために大規模に使用されている (WEISER, 1982; FERRON, 1981)。同様な試みはアメリカ、チェコスロバキア、フランス、ユーゴスラビアでも行われている (COUCH, 1982)。*B. bassiana* の大量培養は、液

体培養と固型培養の2段階培養が一般的に行われているが (PRISTAVKO and GORAL, 1967; COUCH, 1982; HALL and PAPIEROK, 1982), 固型培地の組成および培養期間によっては分生子の収量が著しく異なることが報告されている (BELL, 1974; FERRON, 1981; SAMŠIŇÁKOVÁ et al., 1981)。しかしながら、マツノマダラカミキリから分離された *B. bassiana* では、分生子生産のための最適な培養条件についてはほとんど検討されていない。そこで本研究では、マツノマダラカミキリより分離された *B. bassiana* について、培地組成および培養期間が分生子の形成に及ぼす影響について検討したので報告する。

本文に入るに先立ち、供試菌を分与いただき、さらに有益なご指導をいただいた農林水産省林業試験場、片桐一正博士および島津光明氏に深く感謝の意を表す。また、本研究に対して有益なご助言をいただいた東京農工大学青木襄児教授に深謝する。

1) 現在 東京農工大学農学部

2) Present address: Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1987年10月15日受領 (Received October 15, 1987)

材料および方法

1. 供試菌および種菌の培養方法

供試した菌は、農林水産省林業試験場天敵微生物研究室より分与された *Beauveria bassiana* F-263 株で、分与後、当研究室において継代培養したものである。

供試菌分生子 2 白金耳量を、ペプトン 1%、酵母エキス 1%、スクロース 2% を含む液体培地 200 ml に接種し、25°C で 3 日間振とう培養した培養液を種菌液とした。なお、種菌液中の短菌子濃度は $4.0 \sim 5.0 \times 10^8$ 短菌子/ml であった。

2. 培地素材の検討

供試した培地の組成を Table 1 に示した。これらの培地 50 ml を加圧滅菌後約 50°C に冷却させ、種菌液 10 ml とともに直径 9 cm のガラスシャーレに流し込み、室温で固化させた。培養は 25°C、全明条件下で 10 日間行い、その後、培地を 24 時間真空凍結乾燥し、培地表面の分生子を絵筆ではき落として収穫した。得られた分生子は、0.1% Tween 40 溶液 50~100 ml に混入し、ホモジナイザーで 10,000 rpm、5 分間攪はん後、10 倍階段希釈液を作成した。これらの浮遊液の分生子数をトーマ血球計算盤によって計数し、分生子収量を算出した。

3. 培養期間の検討

Table 1 に示した培地 E および培地 F₁ 100 ml を加圧滅菌後、約 50°C に冷却させ、種菌液 20 ml とともに直径 15 cm のガラスシャーレに流し込み室温で固化させた。接種後 6 日目から 20 日目まで 1 日おきに培地 1 cm² をくり抜き、これらをデシケーターに入れ、室温で 24 時間乾燥させた後、培地表面の分生子をマイクロスペーテルでかき取って収穫した。得られた分生子は、0.1% Tween 40 溶液 10 ml に浮遊させ、収量を算出した。また、浮遊液の少量をとり、ツアベック培地を用いてスラ

イド培養を行った。25°C で 48 時間培養後、約 400 個の分生子を調査し、発芽率を算出した。

結果および考察

1. ソルビトール添加培地での分生子収量

培地の炭素源としてスクロースあるいはソルビトールを用いた培地 A および培地 B₁ での培養 10 日目の分生子収量を Table 2 に示す。

培地 A および培地 B₁ での *B. bassiana* の分生子収量 (分生子数/cm²) はそれぞれ、 0.2×10^8 および 1.1×10^8 で、糖としてソルビトールを用いた培地 B₁ のほうが収量が多かった。SAMŠIŇÁKOVÁ et al. (1981) によると、グルコース、ラクトース、スクロース、ソルビトールあるいはマルトースを添加した培地のなかでは、ソルビトールを添加した培地で *B. bassiana* の分生子収量が最も多い。グルコースやスクロースのような同化速度の速い炭素源は、孢子形成を抑制すると考えられており (TURIAN, 1973; SAMŠIŇÁKOVÁ et al., 1981)、ソルビトールのような同化速度の遅い炭素源を用いることが *B. bassiana* の分生子収量を増加させるのに有効であると思われる。

ソルビトールの添加濃度が分生子収量に及ぼす影響を明らかにするために、ソルビトールを、0, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 および 1.6% の濃度で添加した培地 B₂~B₈ に

Table 2. Influence of sugar addition on sporulation of *Beauveria bassiana* in solid medium

Sugar	Replication	No. of conidia ($\times 10^8$)/cm ²
Sucrose	6	0.2 ± 0.28
Sorbitol	9	1.1 ± 0.35

1) Each medium contained sugar and agar at a concentration of 1%.

2) Mean ± SE.

Table 1. Composition of solid media used for the experiment

Ingredient	Solid media (percentage)																					
	A	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	C	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	E	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	G	
Sucrose	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sorbitol	—	1.0	—	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Peptone	—	—	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	—	—	—	—	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Yeast Extract	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0	—	—	—	—	—	—	1.0
M.D.P ¹⁾	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0	0.5	0.8	1.6	—	1.0	0.4	0.8	1.2	1.6	—	—
Agar	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	—
Car-rageenin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0

1) Milled dry silkworm pupae.

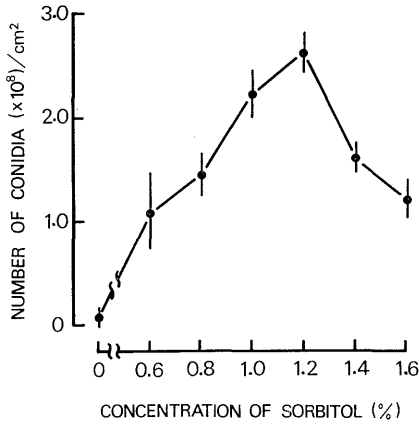


Fig. 1. Effect of concentration of sorbitol on sporulation of *Beauveria bassiana*. The basal medium contained 1% peptone and 1% agar. Vertical lines show standard errors calculated from nine replications.

Table 3. Effect of nitrogen source on sporulation of *Beauveria bassiana* in solid medium

Nitrogen source	Replication	No. of conidia ($\times 10^8$)/cm ²
Peptone	9	2.8 \pm 0.50
Peptone+Yeast Extract	9	3.3 \pm 0.42
Milled dry pupae (MDP)	9	3.5 \pm 0.92
MDP+Peptone	9	3.8 \pm 0.87

- 1) The basal medium contained 1% sorbitol and 1% agar.
- 2) Concentration of each nitrogen source was 1%.
- 3) Mean \pm SE.

おける培養 10 日目の分生子収量を調査した。その結果を Fig. 1 に示す。

ソルビトール濃度が 1.2% までは、添加したソルビトール濃度の増加に伴って分生子収量は増大したが、1.2% 以上の濃度では分生子収量は減少した。

2. 窒素源が分生子収量に及ぼす影響

培地の窒素源として、ペプトン、酵母エキスあるいは蚕蛹粉末を組み合わせ添加した 4 種類の培地 C, D₁, E および F₁ の培養 10 日目の分生子収量を調査した。その結果を Table 3 に示す。

これらの培地での *B. bassiana* 分生子収量 (分生子数/cm²) はほぼ同じで、培地間での有意差は認められなかった。このように、培地の窒素源として蚕蛹粉末のみを用いた培地でも、ペプトンおよび酵母エキスを窒素源とした培地と同等の分生子収量が得られた。従来から *B. bassiana* の培養に蚕蛹の利用が試みられていること (森

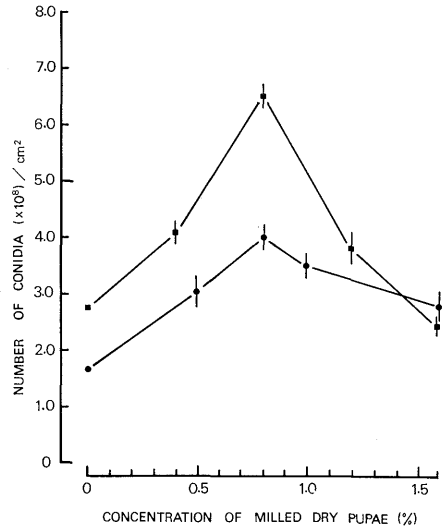


Fig. 2. Effect of concentration of milled dry silkworm pupae on sporulation of *Beauveria bassiana*. ●: basal medium contained 1% sorbitol and 1% agar, ■: basal medium contained 1% peptone, 1% sorbitol and 1% agar. Vertical lines show standard errors calculated from nine replications.

Table 4. Conidial production of *Beauveria bassiana* on agar-medium and carrageenin-medium

Coagulating agent	Replication	No. of conidia ($\times 10^8$)/cm ²
Agar	3	4.3 \pm 0.54
Carrageenin	6	4.2 \pm 0.63

- 1) The basal medium contained 1% peptone, 1% yeast extract and 1% sorbitol.
- 2) One percent of coagulating agent was added to the basal medium.
- 3) Mean \pm SE.

本ら, 1959 a) などから、蚕蛹粉末が培地の窒素源として有効であると考えられる。

培地に添加する蚕蛹粉末量と分生子収量の関係をみると、窒素源として蚕蛹粉末のみを添加した培地群 (D₁~D₄ および B₁) およびペプトン 1% と蚕蛹粉末を併用した培地群 (F₁~F₅ および C) のいずれにおいても、蚕蛹粉末を 0.8% 添加した培地で分生子収量が最も多くなった (Fig. 2)。

また、培地 F₄ および F₅ では、F₃ に比べて分生子収量が著しく減少した。*Hirsutella thompsonii* および *H. gigantea* では培地中の窒素源が過剰になると孢子形成が阻害されることが報告されているが (McCoy and KANAVEL, 1969; MacLeod, 1960), 蚕蛹粉末濃度の高い培地での

分生子収量の減少は、これと類似した現象と思われる。

3. 凝固剤について

凝固剤として、寒天あるいはカラゲランを用いた培地 E および培地 G について、培養 10 日目の分生子収量を調査した。その結果を Table 4 に示す。

両培地での分生子収量に差は認められなかった。カラゲランは食品用の凝固剤として市販されているもので、価格が寒天の 1/2 程度であり、培地のコスト軽減の面から寒天のかわりにカラゲランを凝固剤として用いることが有効であると思われる。

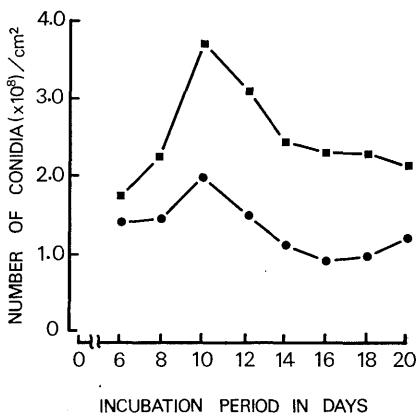


Fig. 3. Time for optimum conidial production of *Beauveria bassiana*. ●: medium contained 1% peptone, 1% yeast extract, 1% sorbitol and 1% agar, ■: medium contained 1% peptone, 1% milled dry pupae, 1% sorbitol and 1% agar.

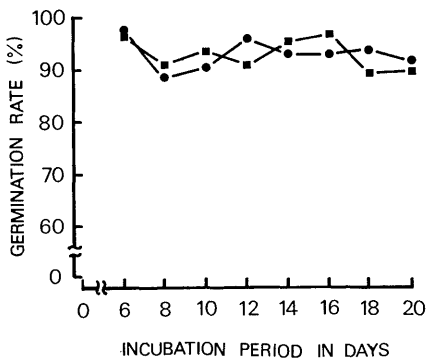


Fig. 4. Germination rate of conidia of *Beauveria bassiana* yielded at various incubation times. ●: medium contained 1% peptone, 1% yeast extract, 1% sorbitol and 1% agar, ■: medium contained 1% peptone, 1% milled dry pupae, 1% sorbitol and 1% agar.

4. 培養期間と分生子収量

培地 E および培地 F₁ における分生子収量は培養 10 日目にピークに達し、その後減少した (Fig. 3)。

SAMŠIŇÁKOVÁ et al. (1981) は、独自の半液体培地を用いた *B. bassiana* 分生子の培養で、培養 12 日目に分生子収量がピークに達することを報告している。

各培地の培養 6~20 日目に収穫した分生子の発芽率を調査した結果を Fig. 4 に示す。

培養後 6~20 日目の間で、分生子の発芽率は 90% 前後とほぼ一定であった。

摘 要

培地組成および培養期間がマツノマダラカミキリから分離された *Beauveria bassiana* の分生子形成に及ぼす影響を調査した。

1) スクロース添加培地と比べて、ソルビトール添加培地により多くの分生子が得られ、ソルビトールを 1.2% 添加したときに分生子収量が最も多かった。

2) 培地の窒素源として蚕蛹粉末が有効であった。蚕蛹粉末の最適添加濃度は 0.8% で、ペプトン 1.0% を併用することによって分生子収量は 1.5 倍増加した。

3) 凝固剤としてカラゲランあるいは寒天を用いた培地での分生子収量は両培地ではほぼ同じであった。

4) 調査した培地での分生子収量はいずれも培養 10 日目に最も多かった。また、収穫された分生子の発芽率は、培養 6~20 日目まで 90% 前後でほぼ一定であった。

引用文献

- BELL, J.V. (1974) *Mycoses*. In: *Insect Disease*. (G.E. CANTWELL ed.), New York: Marcel Dekker Inc., pp. 185-236.
- COUCH, T.L. (1982) Production of *Hypomyces*. Proceedings of the 3rd International Colloquium on Invertebrate Pathology, Brighton, UK, pp. 188-190.
- FERRON, P. (1981) Pest Control by the Fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: *Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980*. (BURGES, H.D. ed.), New York: Academic Press, pp. 465-482.
- HALL, R.A. and B. PAPIEROK (1982) Fungi as biological control agents of arthropods of agriculture and medical importance. *Parasitology* 19: 205-240.
- 日高義実 (1933) 天敵応用マツカレハ防除について. *日林誌* 15: 1221-1231.
- 片桐一正・島津光明 (1980) マツノマダラカミキリの天敵微生物. *森林防疫* 29: 9-14.

- MACLEOD, D.M. (1960) Nutritional studies on the genus *Hirsutiella*. *J. Insect. Pathol.* 2: 139-146.
- MCCOY, C.W. and R.F. KANAVAL (1969) Isolation of *Hirsutiella thompsonii* from the citrus rust mite, *Rhylocoptruta oleivora* and its cultivation of various synthetic media. *J. Invertebr. Pathol.* 14: 386-390.
- 森本徳右衛門・竹下正二・岩川 孝・橋本博好 (1959 a) 黄きょう病菌によるミカンネコナカイガラムシの駆除試験. 高知大学学術研究報告 8 (4): 1-6.
- 森本徳右衛門・竹下正二・岩川 孝・橋本博好 (1959 b) 黄きょう病菌によるミカンネコナカイガラムシの駆除試験. 高知大学学術研究報告 8 (5): 1-10.
- 森本徳右衛門・竹下正二・岩川 孝・橋本博好 (1960 a) 黄きょう病菌によるミカンネコナカイガラムシの駆除試験. 高知大学学術研究報告 9 (2): 13-17.
- 森本徳右衛門・竹下正二・岩川 孝・橋本博好 (1960 b) 黄きょう病菌によるミカンネコナカイガラムシの駆除試験. 高知大学学術研究報告 9 (3): 19-23.
- PRISTAVKO, W.P. and V.M. GORAL (1967) The mass production of *Beauveria bassiana*. In: *Insect Pathology and Microbial Control*. (P.V. VAN DER LAAN ed.), Amsterdam: North-Holland Publ. Comp., pp. 185-236.
- SAMŠIŇÁKOVÁ, A., S. KÁLALOVÁ, V. VLČEK and J. KYBAL (1981) Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 169-174.
- TURIAN, G. (1973) Induction of conidium formation in *Neurospora crassa* by lifting of catabolite repression. *J. Gen. Microbiol.* 79: 347-350.
- WEISER, J. (1982) Persistence of fungal insecticides. In: *Microbial and Viral Pesticides*. (E. KURSTAK, ed.), New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 531-557.

新 刊 紹 介

Journal of Aphidology Vol. 1, nos. 1 & 2. Eds. K.D. Verma and D.R.C. Bakhettia (1988). Aphidological Society, India, 111 pp.

このたびインドの Aphidological Society から、標記の雑誌が発刊された。これは年2回の刊行を予定する同会の定期刊行誌で、会員はアブラムシに関するすべての分野の原著論文を投稿することができる。第1巻は1, 2号の合冊で、19篇の論文を掲載し、これを大まかに分野別に整理すると、分類学1篇、細胞学・組織学・生理学5篇、生態学7篇、ウイルス病学1篇、天敵の

分類・生態5篇という内容である。この学会の会員資格は「アブラムシに関心を持つ研究者」となっており、国籍を問わない。会費は団体会員は年間 U.S. \$30.00、個人会員は無料である。会員権取得、その他この雑誌に関する照会は、下記の窓口で受け付けてくれる。また、投稿規定の詳細を知りたい方は、筆者宛請求されたい。

Dr. S.P. Kurl, Secretary, The Aphidological Society, India, c/o Aphid Research Laboratory, Department of Zoology, M.M. Postgraduate College, Modinagar-201, 204, INDIA.

(査読 宮崎昌久)