

昆虫病原微生物の分離と数種農業害虫によるスクリーニング

Collection of entomopathogens and laboratory bioassay against agricultural pests

野田孝博・西口達郎・田中正美

Takahiro NODA, Tatsuro NISHIGUCHI and Masami TANAKA

要 約

昆虫病原微生物の分離と数種の農業害虫に対する生物検定を行った。昆虫病原糸状菌では県内外 49 地点からサンプリングした植物葉、土壌、死亡昆虫より *Beauveria bassiana* 601 株、*Beauveria amorpha* 22 株、*Beauveria bronginaritii* 2 株、*Nomuraea rily* 34 株を分離した。分離した昆虫病原糸状菌はハスモンヨトウおよびマメハモグリバエで生物検定を行い病原性を示す菌株を確認した。*Beauveria* 属の分離を分離部位で比較すると植物葉からが土壌からより約 2 倍の効率で病原性を示す菌株が分離された。昆虫病原細菌では全国 26 都府県 342 地点の土壌や養蚕農家の塵をサンプルとして *Bacillus thuringiensis* の分離を試みた。その結果 131 株を分離した。H-serotyping により 17 の H-serotype が確認された。鱗翅目昆虫（カイコ、ハスモンヨトウ）、双翅目昆虫（アカイエカ、マメハモグリバエ）、半翅目昆虫（ワタアブラムシ、ホソヘリカメムシ）に対し生物検定を行い殺虫活性を示す菌株を確認した。

キーワード：昆虫病原微生物、*Beauveria*、*Nomuraea*、*Bacillus thuringiensis*、生物検定、ハスモンヨトウ、マメハモグリバエ、ワタアブラムシ、ホソヘリカメムシ

I 結言

1948 年、マメコガネの天敵微生物である芽胞細菌 *Bacillus popilliae* が昆虫病原性細菌製剤として最初に登録されて半世紀となる¹⁾。その後、細菌、糸状菌、微胞子虫、ウイルスといったさまざまな昆虫病原微生物が害虫管理のため研究開発されてきた。また、近年は微生物殺虫剤としての利用のみならず、遺伝子組換え技術により耐虫性作物へ応用する研究も盛んになっている。

このような中、自然界には未知の菌株が多数存在することが示唆されており、微生物殺虫剤や耐虫性品種の育成に利用可能な優良菌株の探索が世界的に行われている。

本実験は、殺虫寄主範囲が特異的で、殺虫活性の高い有用な新規菌株の探索を目的として実施したものである。

II 材料及び方法

1. 昆虫病原糸状菌の探索

1) 昆虫病原糸状菌の分離

(1) 植物葉からの *Beauveria* spp. (以下 *Beauveria* 菌) の分離

熊本県内を中心に 49 地点の雑木林の直接日光に当たらない木陰から、種を特定せず自生する植物からランダムに葉を採取し供試サンプルとした。採集した葉は滅菌

済みの 0.02% ツイン 40 水溶液 (以下 ツイン液) と共にポリ袋に入れ 20 ~ 30 回振とうした後、採集した葉を除去した。得られた ツイン液はスイングローターを用いて 3000rpm (約 1500 × g) で 30 分間遠心し、沈殿を 2ml の ツイン液にけん濁した。このけん濁液から 0.2ml を *Beauveria* 菌の選択培地²⁾ (ペプトン 3g、CuCl₂、クリスタルバイオレット 2mg、寒天 15g、蒸留水 1 リットル) に滴下してコンラージ棒により均等に広げ、25 °C に保温した。培養開始 3 日目から 14 日間、菌の出現を観察し、*Beauveria* 菌と思われるコロニーを白金耳でかき取り、酵母エキス加用 Sabouraud 麦芽糖寒天 (SMY) 培地に移植し、25 °C で培養した。約 2 週間後、形成された巨大コロニーについて菌叢の状態および水溶性色素産生の有無および分生子の色について調査した。さらに巨大コロニーに形成され分生子をスライド培養し、sporogenous cell や cluster の形成、胞子の縦横比等の形態を光学顕微鏡で観察し、青木³⁾ の検索表にしたがって同定した。

(2) 土壌からの *Beauveria* 菌の分離

熊本県内を中心に 30 地点の雑木林から深さ 2 ~ 3cm の表土を採取し供試サンプルとした。採集した土壌の約 10g をとり、10 倍量の 0.03% ツイン 80 水溶液に入れて攪拌し 5 分程度静置した後、上澄みを滅菌したガーゼでろ過し供試液とした。菌の培養および分離は植物葉からの場合と同様の方法で行った。なお、*Beauveria* 菌のコ

ロニーが少ない場合はスイングローターを用いて 3000rpm (約 1500 × g) で 30 分間遠心し、約 10 倍に濃縮して供試液とした。

(3) 死亡昆虫から昆虫病原糸状菌の分離

平成 12 年 9 ~ 11 月に県内 51 地点のダイズのほ場か菌糸に覆われて死亡している鱗翅目昆虫の幼虫 54 頭を、菊池水源 (熊本県菊池市) 付近の雑木林から孢子に覆われて死亡している鞘翅目昆虫の成虫 2 頭を、さらに熊本県農業研究センター内のクワほ場から節間部から菌糸を叢生して死亡しているゴマダラカミキリ成虫 1 頭を採集した。採集した個体は 75% アルコールで殺菌したフィルムケースに入れ実験室 (合志町 農業研究センター) に持ち帰り、滅菌した白金耳で死亡個体上に形成された分生子に触れ SMY 平板培地に塗抹し、パラフィルムで封じ 25 °C で培養した。数日間培養し目的菌と思われる独立したコロニーを白金耳でかき取り SMY 平面培地に移植した。形成された孢子はスライド培養し、分生子形成の構造や孢子の色を観察し、青木³⁾ の検索表にしたがって同定した。

2) 分離した昆虫病原糸状菌の生物検定

(1) 供試昆虫

ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura* FABRICIUS)

熊本県農業研究センターのサトイモほ場より採集したハスモンヨトウを人工飼料 (インセクタ LFS : 日本農産工業) を餌に累代飼育した。試験には 3 齢幼虫を供試した。

マメハモグリバエ (*Liriomyza trifolii* BURGESS)

野外のトマトより採集したマメハモグリバエをインゲン (新江戸川) で累代飼育している個体群を供試した。試験には蛹化 24 時間以内の蛹を用いた。

(2) 供試菌株

ハスモンヨトウに対しては植物葉から分離した *Beauveria* 菌 124 菌株と土壌から分離した *Beauveria* 菌 324 菌株、および野外で菌を叢生して死亡した個体から分離した *Nomuraea rileyi* 29 菌株を供試した。マメハモグリバエの蛹に対しては植物葉から分離した 55 株と土壌から分離した 107 株を供試した。各菌株は SMY 培地で 25 °C、25 日間培養し分生子を形成させ、得られた分生子はツイン 80 の 0.03% 水溶液にけん濁後、トーマ血球計算板で 1ml 当りの分生子数を求め、これを 6×10^7 分生子/ml に調整して供試液とした。

(3) 生物検定法

a. ハスモンヨトウに対する生物検定

供試虫を各菌株のけん濁液に約 5 秒間浸漬接種し、ろ紙上に移し余分な水滴を除いた。その後、ろ紙を敷いたシャーレにクワの葉片を餌として 5 個体ずつ放飼した。

検定は 2 反復で行った。シャーレは 25 °C、16L8D の恒温室に置いて 1 週間 24 時間ごとに生死を観察した。なお死亡虫のうち *Beauveria* 菌および *N.rileyi* を叢生した個体を感染死亡虫とした。

b. マメハモグリバエに対する検定

マメハモグリバエにおいて昆虫病原糸状菌を散布剤として使用する場合、接触の可能性のあるのは葉から脱出した直後の老熟幼虫や蛹、成虫である。このため今回の検定は蛹でおこなった。オートクレーブで滅菌した脱脂綿を敷いた 6cm シャーレに蛹を 10 個ずつならべ、供試液をパスツールピペットを用いて蛹 1 個あたり約 30ul ずつ滴下した。試験区は 1 区 10 個 2 反復でおこない接種後 5 ~ 10 日間、24 時間ごとに体表面上の菌叢生の有無を確認した。菌叢が確認された個体は光学顕微鏡で sporogenous cell や cluster の形成などを観察し、*Beauveria* 菌と同定された個体を感染死亡虫とした。

2. 昆虫病原細菌の探索

1) *Bacillus thuringiensis* (以下 *B.thuringiensis*) の分離

平成 10 ~ 11 年に、全国 26 都府県 119 地点、県内 10 町村 98 地点の山林土壌、県内 35 戸 125 地点の養蚕農家における養室の塵埃を採取し供試サンプルとした。*B. thuringiensis* の分離は菊田⁴⁾ および Travers et al.⁵⁾ に従った。すなわち土壌サンプル 1g を 10ml の滅菌水を加え攪拌した後、5 分程度静置し上清を 80 °C、5 分間の加熱処理した。加熱した上清は段階希釈 (10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-6}) し、希釈液から 0.1ml を肉エキスペプトン寒天平板培地 (ペプトン 10g、肉エキス 10g、NaCl 1.4g、寒天 15g、水 1000ml) に塗布し、30 °C で 2 ~ 4 日間培養した。コロニーの形態から *Bacillus* 属と思われる菌株を肉エキスペプトン寒天斜面培地で 5 ~ 7 日間培養し、位相差顕微鏡で芽胞及び副芽胞小体 (parasporal inclusion、以下 PI) の有無を確認し、PI が確認された菌を *B.thuringiensis* とした。

2) H-serotype の判定

De Barjac and Bonnefoi⁶⁾ によって鞭毛抗原 (H-antigen) 血清型による BT 菌の分類が提唱されており、現在、この分類に従って 67 の H-serotype (13 の subclass) ならびに wuhanensis など鞭毛を持たない 8type が報告されている^{7) 8)}。そこで本実験で分離した 65 菌株において鞭毛抗原抗体反応による H-serotyping を行った。抗体の作成は Ohba & Aizawa⁹⁾ に準じた。サンプルより得られた分離株は肉エキスペプトン液体培地による振とう培養を 30 °C、2 時間行い、作成された H 抗血清による抗原抗体反応に供した。抗原抗体反応はのせガラス法で行い光学顕微鏡で 100 ~ 150 倍程度で凝集反応を観察し、凝集塊を

形成されたものを陽性とした。なお、自発凝集と抗原抗体反応による凝集を区別するため血清の対照として生理食塩水を用いた。

3) PI の分子量推定

分離した 131 菌株について N.S.Goodman¹⁰⁾らの方法により PI を精製し、SDS-PAGE により¹¹⁾PI の分子量を推定した。すなわち、肉エキスペプトン寒天平板培地において 30℃で 5～7 日間培養し、PI の形成を確認した株を試料とした。芽胞、PI、栄養体細胞やその他 debris が混在する培養物から PI を分離するため、試料に 1M NaCl、0.01%Triton-X を加えボルテックスでけん濁し 8,000 × g、15 分間遠心後、上清を捨て得られた沈殿を蒸留水に浮遊させ 33℃で 1 時間振とうした。その後、得られた湿重 1 g 程度の沈殿と上層液（デキストラン硫酸ナトリウム 500 : 0.12g、ポリエチレングリコール 6000 : 28.12g、NaCl : 7.0g、DW : 400ml）30ml と下層液（デキストラン硫酸ナトリウム : 4.0g、ポリエチレングリコール 6000 : 2.8g、NaCl : 1.05g、DW : 40ml）10ml を 50ml 遠沈管にいれ、よく混合した。約 1 時間静止したのち下層液および界面上の沈降物を残し上層液を除去し、上層液が透明になるまで 3～5 回同様の操作を繰り返した。遠心し得られた沈殿を滅菌水で遠沈とけん濁を 2～3 回、繰り返し洗浄した後、適量量の滅菌水にけん濁した。得られたけん濁液は緩衝液（62.5mM Tris-HCl pH6.8、25%glycerol、2%SDS、0.01%Bromophenol Blue、5%β-mercaptoethanol）との比が 1 : 2 となるように混合してスラブゲル上にのせ電気泳動を行った。電気泳動に供試した分子量測定用のマーカーは Bio-Rad 社の SDS-PAGE スタンダード（high）を用いた。

4) 分離した *B. thuringiensis* の殺虫活性検定

B. thuringiensis の産生する PI は鱗翅目¹²⁾、双翅目¹³⁾、鞘翅目¹⁴⁾、膜翅目¹⁵⁾の昆虫に殺虫活性を示すことが知られており、さらに近年 Payne,J.M.ら¹⁶⁾や Frederick¹⁷⁾らによって半翅目昆虫のアブラムシに対し殺虫活性を示すことが報告されている。そこで本実験では鱗翅目昆虫としてカイコ、ハスモンヨトウ、双翅目昆虫としてアカイエカ、マメハモグリバエ、さらに半翅目昆虫としてワタアブラムシ、ホソヘリカメムシの 3 目 6 種の昆虫に対し生物検定をおこなった。

(1) 供試昆虫

a. 鱗翅目昆虫

カイコ (*Bombix mori* LINNAEUS)

独立行政法人農業生物資源研究所動物生命科学研究所より分譲いただいた蚕種（日 137 × 支 146）をふ化させ、0 日齢の 1 齢幼虫を供試した。

ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura* FABRICIUS)

熊本県農業研究センターのサトイモほ場より採集したハスモンヨトウを人工飼料（インセクタ LFS : 日本農産工業）を餌に累代飼育した。試験には 3 齢幼虫を供試した。

b. 双翅目昆虫

アカイエカ (*Culex pipiens pallens* COQUILLET)

ovitrap 法¹⁸⁾により野外から卵塊を採集し、室内でふ化させた。得られた幼虫を飼育し、中齢の幼虫を供試した。

マメハモグリバエ (*Liriomyza trifolii* BURGESS)

野外のトマトより採集したマメハモグリバエをインゲン（新江戸川）で累代飼育している個体群を供試した。幼虫が潜行している葉の表皮をピンセットを用いて剥ぎ、濡らした面相筆を用い幼虫を取り出して供試した。

c. 半翅目昆虫

ワタアブラムシ (*Aphis gossypii* GLOVER)

熊本県農業研究センターでキュウリを餌に累代飼育し、得られた胎生雌成虫を供試した。

ホソヘリカメムシ (*Riptortus Clevatus* THUNBERG)

熊本県農業研究センターのダイズほ場より採集した成虫を、ダイズを餌に累代飼育し、得られた中齢幼虫を供試した。

(2) 供試菌株

山林土壌から分離された 54 株とおよび養蚕家における養室の塵埃から分離した 77 株、合計 131 菌株を供試した。

(3) 殺虫活性検定法

a. カイコに対する殺虫活性検定

供試菌株を平板培地で 7 日間程度培養し、胞子や栄養体細胞、PI、その他培養代謝物等を含む培養物の全てを滅菌水で OD₆₀₀ = 1.5～2.0 になるようけん濁した。ソーセージ状の人工飼料（シルクメイト : 日本農産工業）を約 5mm 厚に切り、さらに半月型に 2 分割し、ろ紙を敷いた 9cm シャーレに置き、調整した *B.thuringiensis* けん濁液 1ml を全体に滴下した。表面がもとの人工飼料程度に乾くまで放置し、幼虫を放飼した。室温 25℃、16L8D で 2 日間飼育し、生育と生死を調査した。なお検定は 1 区 10 頭 2 反復でおこなった。

b. ハスモンヨトウに対する殺虫活性検定

人工飼料にインセクタ LFS を用い、カイコに対する殺虫活性検定と同じ方法で試験を実施した。ただし生育と生死の状況は飼育 3 日後に調査した。

c. アカイエカに対する殺虫活性検定

カイコの場合と同様に調整した 3ml のけん濁液を試験管に注ぎ、ふ化 5 日目の幼虫をバイオピペットで 10～15 頭移して、24 時間後に死亡率を調査した。なお検

定は2反復でおこなった。

d. マメハモグリバエに対する殺虫活性検定

N.S.GOODMAN ら¹⁰⁾の方法で精製したPIを人工飼料に混入する方法でおこなった。精製したPIは滅菌水で1mg/mlの濃度に調整し、300 μ lを人工飼料全体に滴下し、表面がもとの培地程度に乾くまで待って幼虫を放飼した。なお、人工飼料は3cmペトリ皿に分注しやすいように沖繩農試¹⁹⁾の方法に水を約30%増量して使用した。検定は1区10頭2反復でおこない、5日後の蛹化虫数で生存率を調査した。

e. ワタアブラムシに対する殺虫活性検定

アブラムシに対する殺虫活性検定は1995年にFrederick ら¹⁷⁾の方法を一部改変した野田²⁰⁾らの方法により実施した。すなわちPIを可溶化し、トリプシンによりプロセッシング反応を行い活性型毒素とした後、使用した試薬を排除することなくモモアカアブラムシ用人工飼料²¹⁾に活性型毒素を含む全タンパク量で100ng/mlの濃度となるよう混入し吸汁させた。試薬の混入区と未混入区において各区15頭2反復で行い、7日後の死亡率及び産子数を調査した。なお人工飼料育はParafilm 'M'を用いるWalters ら²²⁾の方法で行った。

f. ホソヘリカメムシに対する殺虫活性検定

検定は野田²³⁾の方法を参考にして作成した容器を使用した。すなわち、上径6.5cmと上径5.5cmの2つの透明アイスクリームカップを上下に重ね、上方のカップに直径5mmの穴を開け円筒形に巻いたろ紙を下方の容器の底に着くように立てた。下方の容器にカイコの場合と同様に調整した培養けん濁液10mlを入れ、中央を貫通したろ紙を介して吸汁させた。対照として滅菌水用い、各区10頭2反復で行い、7日後の死亡率を調査した。

III 結果及び考察

1. 昆虫病原糸状菌の探索

1) 昆虫病原糸状菌の分離

(1) 植物葉からの *Beauveria* 菌の分離

クワ、イラクサ、マユミ、ナンキンハゼ、アカメガシワ、セイタカアワダチソウ、キズタ、イノバラ、カナメモチ、ヤブマオ、フジ、アザミ、センダン、ネムノキ、ユズリハ、フキ、ヌルデ、クズ、カエデ、マユミ、グミ、カンツバキ、ドクダミ、アラカシ、ワルナスビ、ガガイモ、マテバシイ等25種類の植物葉から198菌株が分離された。分離された *Beauveria* 菌の88.9%に当たる176菌株は *B.bassiana* であった。また、イラクサから *B.amorpha* が11菌株(5.6%)、クワおよびドクダミから *Peacilomces andoi* が11菌株(5.6%)分離された(第1表)。

SMY 培地で約20日培養した場合の性状をみると、分生子の色は白からクリーム色を呈した。粉状の菌叢で培地の変色がないものが86.6%と最も多く、次いで綿状の菌叢で培地の変色のないものが8.8%、綿状の菌叢で水溶性の赤い色素を産生し培地を赤く変色させるものが2.3%であり、粉状の菌叢で培地を赤変させるものは観察されなかった。その他、菌叢が粉状で培地がオレンジ色～褐色に変色するものもみられた(第4表)。

(2) 土壌からの *Beauveria* 菌の分離

山林土壌から *Beauveria* 菌を444菌株分離した。95.0%に当たる422菌株が *B.bassiana* であったが、その他に *B.amorpha* が11菌株(2.5%)、*B.bronginaritii* が1菌株(0.2%)、*P.andoi* が10菌株(2.3%)分離された(第2表)。

SMY 培地で約20日培養した場合の性状をみると、胞子の色は植物葉から分離した菌株と同様、白からクリーム色を呈した。綿状の菌叢で培地を赤変させるものが59%と最も多く、次いで綿状の菌叢で培地の変色のないものが23.5%、粉状の菌叢で培地の変色がないものが13.9%、粉状の菌叢で培地を赤変させるものが2.3%であった。その他、冬虫夏草のように分生子柄束をシャーレ上面まで伸ばすものや、菌糸がいぼ状に隆起してくるものも見られた(第4表)。

(3) 野外の死虫昆虫からの分離

ゴマダラカミキリ成虫の死亡個体からは *B.bassiana* と *B.bronginaritii* 各1株が、未同定の鞘翅目昆虫の死亡個体からは *B.bassiana* が分離された。鱗翅目幼虫の死亡個体に叢生した菌糸には淡緑色の胞子が形成された。スライド培養し担子硬の頂端付近を観察すると3～5段の輪生状短枝を形成し、これに分生子の着生が観察された。分生子は3.5～4.5 \times 2～3 μ mの楕円形で淡緑色であった。これらのことから今回採集した鱗翅目幼虫の死亡個体から分離された昆虫病原糸状菌はすべて *Nomuraea rilyi* と同定された(第3表)。

2) 分離した昆虫病原糸状菌の生物検定

(1) ハスモンヨトウに対する生物検定

供試した448菌株の *B.bassiana* のうち162菌株(36.2%)がハスモンヨトウに対する病原性を示し、100.0%の死亡率を示したものが37菌株あった(第5表)。供試菌株のうち植物葉から分離されたものは124菌株であり、59.7%にあたる74菌株において病原性が確認された。そのうち39.5%にあたる49菌株で80%以上の高い死亡率を示した。一方、供試菌株のうち土壌から分離されたものは324菌株であり、27.2%にあたる88菌株において病原性が確認された。そのうち14.2%にあたる46菌

株で 80%以上の高い死亡率を示した。植物からの分離株と土壌からの分離株を比較すると植物葉からのほうが約 2.2 倍の確率で病原性を示す菌株が分離された。さらに 80%以上の高い死亡率を示す菌株においては植物葉から分離された菌株が土壌から分離した菌株より約 2.8 倍の確率で分離された (第 1 図)。

鱗翅目幼虫から分離された *N.rilryi*29 菌株で検定した結果、すべての菌株で 80.0%以上の死亡率で、そのうち 75.9%にあたる 22 菌株で 100.0%の死亡率を示した (第 5 表)。

(2) マメハモグリバエに対する生物検定

供試した 162 菌株の *B.bassiana* のうち 52 菌株 (32.1%) でマメハモグリバエに対する病原性を示し、100.0%の死亡率を示したものが 6 菌株あった (第 5 表)。供試菌株のうち植物葉から分離されたものは 107 菌株であり、38.37%にあたる 41 菌株において病原性が確認された。そのうち 17.8 %にあたる 19 菌株で 80%以上の高い死亡率を示した。一方、供試菌株のうち土壌から分離されたものは 55 菌株であり、20%にあたる 11 菌株において病原性が確認された。そのうち 5.5 %にあたる 3 菌株で 80%以上の高い死亡率を示した。植物からの分離株と土壌から

の分離株を比較すると植物葉からのほうが約 1.9 倍の確率で病原性を示す菌株が分離された。さらに 80%以上の高い死亡率を示す菌株においては植物葉から分離された菌株が土壌から分離した菌株より約 3.2 倍の確率で分離された (第 3 図)。

Beauveria 菌について分離源による病原性を比較すると、本実験で供試した 2 種の昆虫ともに植物葉からの分離した *B.bassiana* が土壌から分離したものより高率に病原性を示す菌株が分離される傾向が見られた。このことは野外における汚染源である感染昆虫から飛散した分生子が生物層の多様な土壌よりも、生物層のより単純な植物葉上の方が生存できる確率が高いためや、土壌においては腐食生活により適応した菌株が多く、病原性を保持している菌株の割合が少ないのではないかと考えられた。

自然界では季節的な消長の変動等も考えられるので、菌株が分離するために、分離部位のみならず分離時期等も考慮すれば、選択培地による、より効率的に病原性を示す *Beauveria* 菌の分離が可能になると考えられる。

第 1 表 植物葉からの昆虫病原糸状菌の分離

分離場所	分離源	菌 種				総数
		B.ba	B.am	B.br	P.an	
植 物 葉	クワ	13			9	22
	イラクサ	11	11			22
	ナンキンハゼ*	16				16
	アカメカシワ	16				16
	セイタカアワダチソウ	15				15
	キス*タ	14				14
	イノハ*ラ	13				13
	カナメモチ	9				9
	ヤフ*マオウ	8				8
	フシ*	8				8
	アサ*ミ	7				7
	センタ*ン	5				5
	ネムノキ	5				5
	ユス*リハ	5				5
	フキ	5				5
	ヌルテ*	4				4
	クス*	2				3
	カエテ*	3				3
	マユミ	3				3
	ク*ミ	3				3
	カンツハ*キ	2				2
	ト*ク*タ*ミ				2	2
	アラカシ	2				2
	ワルナスビ*	1				1
ガ*カ*イモ	6				1	
マテハ*シイ					0	
	小 計	176	11	0	11	198
	割 合 (%)	88.9	5.6	0.0	5.6	

B.ba = *B.bassiana*, B.am = *B.amorpha*, B.br = *B.bronginaritii*, P.an = *P. andoi*

第2表 土壌からの昆虫病原糸状菌の分離

分離場所	分離源	菌種				総数
		B.ba	B.am	B.br	P.an	
土壌	自然林土壌	422	11	1	10	444
	割合(%)	95.0	2.5	0.2	2.3	

B.ba = *B.bassiana*、B.am = *B.amorpha*、B.br = *B.bronginaritii*、P.an = *P.andoi*

第3表 死亡昆虫からの昆虫病原糸状菌の分離

分離場所	分離源	菌種					総数
		B.ba	B.am	B.br	P.an	N.ri	
死亡昆虫	コマダラカミキリ	1		1			2
	鞘翅目成虫(未同定)	2					2
	鱗翅目幼虫					34	34
	小計	3	0	0	1	34	38
	割合(%)	5.2	0.0	0.0	2.6	89.5	

B.ba = *B.bassiana*、B.am = *B.amorpha*、B.br = *B.bronginaritii*、P.an = *P.andoi* N.ri = *N.rilry*

第4表 分離した *Beauveria* 菌の SMY 培地状での性状

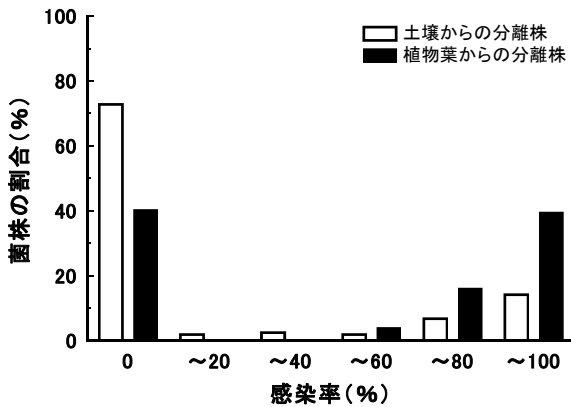
分離源	菌叢	培地の赤変	菌株数	割合(%)
植物葉	粉状	—	187	86.57
	粉状	+	0	0.00
	綿状	—	19	8.80
	綿状	+	5	2.31
	その他		5	2.31
土壌	粉状	—	66	13.87
	粉状	+	11	2.31
	綿状	—	112	23.53
	綿状	+	281	59.03
	その他		6	1.26

+: 水溶性赤色の色素を産生する
 -: 水溶性赤色の色素を産生しない

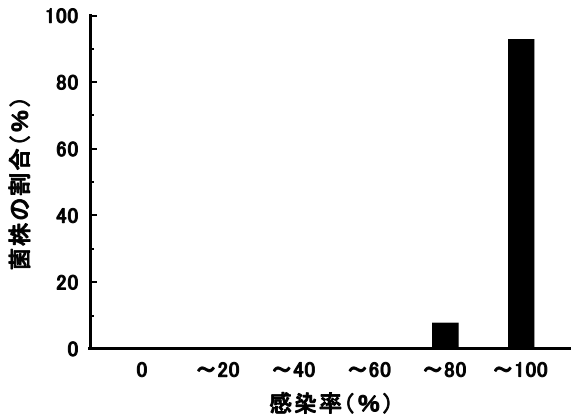
第5表 分離した昆虫病原糸状菌のハスモンヨトウ及びマメハモグリバエに対する生物検定

供試菌種	<i>Beauveria bassiana</i>					<i>Nomuraea rilry</i>				
	対照昆虫	供試菌株数	感染菌株数(割合%)	発病状況		供試菌株数	感染菌株数(割合%)	発病状況		
			感染率(≦ <)	菌株数	割合(%)			感染率(≦ <)	菌株数	割合(%)
ハスモンヨトウ	448	162 (36.2)	0	286	63.8	29	29 (100.0)	0	0	0.0
			0~20	6	1.3			0~20	0	0.0
			20~40	8	1.8			20~40	0	0.0
			40~60	11	2.5			40~60	0	0.0
			60~80	42	9.4			60~80	2	6.9
			80~100	58	12.9			80~100	5	17.2
			100	37	8.3			100	22	75.9
マメハモグリバエ	162	62 (32.1)	0	110	67.9	—	—	0	—	—
			0~20	4	2.5			0~20	—	—
			20~40	5	3.1			20~40	—	—
			40~60	9	6.5			40~60	—	—
			60~80	12	7.4			60~80	—	—
			80~99	16	9.9			80~99	—	—
			100	6	3.7			100	—	—

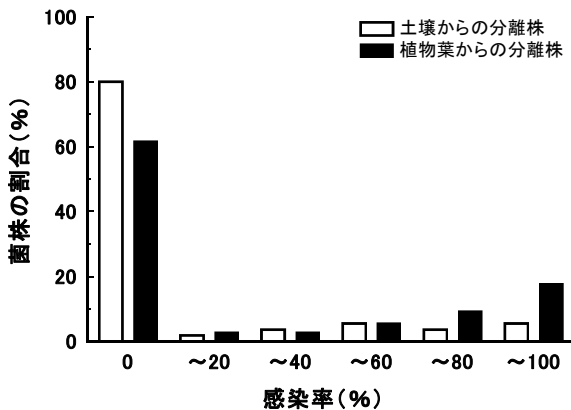
—: 未検定



第1図 *B. bassiana* の分離源の違いによるハスモンヨトウに対する感染率の分布



第3図 *Nomuraea rileyi* のハスモンヨトウに対する感染率の分布



第2図 *B. bassiana* の分離源の違いによるマメハモグリバエに対する感染率の分布

2. 昆虫病原細菌の探索

1) *B. thuringiensis* の分離

本菌は天敵微生物製剤の主流となっている芽胞細菌であり、土壌や植物葉、水中など様々なところから分離される。今回、著者らは全国 26 都府県 119 地点、県内 10 町村 98 地点の山林土壌、県内 35 戸 125 地点の養蚕農家における蚕室の塵埃をサンプルとして分離した。サンプリングした土壌及び塵埃から *B. thuringiensis* の分離状況を第 6 表に示す。分離源別にみると土壌からは 191 のサンプルより 4530 コロニーを検鏡し *Bacillus* 属と考えられる芽胞細菌は 3608 コロニーあり、そのうち PI を産生していた *B. thuringiensis* は 54 株 (1.50%) であった。一方、養蚕農家の蚕室の塵埃からは 175 のサンプルから 3589 コロニーを検鏡し *Bacillus* 属と考えられる芽胞細菌を 3369 コロニーであり、そのうち PI を産生していた *B. thuringiensis* は 77 株 (2.29%) であった (第 6 表)。

2) H-serotype の判定

土壌から分離した 52 菌株と養蚕家における蚕室の塵埃から分離された 13 菌株について H-serotype の同定を行った。

土壌から分離された 52 菌株における H-serotype は 3abc (kurisutaki) が 11 株と最も多く、次いで 7 (aizawai) が 10 株、4ac (kenyae) と 10ab (darmstadiensis) が 5 株、3ac (alesti) が 4 株、4ab (sotto) と 8ab (morrisoni) が 3 株、27 (mexicanensis) が 2 株、14/19 (israensis / tochiogensis)、6a6c (oyamensis)、8a8b (tenebrionsis)、119-72 (kumamotoensis)、23 (japonensis)、17 (tohokuensis)、24 (leonensis)、3a3d (sumiyosiensis)、3a3d3e (fukuokaensis) が各 1 株であった。

養蚕家の蚕室における塵埃から分離された 13 菌株の H-serotype は 4ab (sotto) が 4 菌株と最も多く、次いで 7 (aizawai)、4ac (kenyae)、14/19 (israensis / tochiogensis) が各 2 菌株、22 (shandongiensis) が 1 菌株、残り 2 株は H-serotype を決定できなかった。蚕室の塵埃においては感染個体からの汚染と考えられる蚕に殺虫活性の高い 4ab (sotto) および 7 (aizawai) が蚕室の塵埃から分離された株の 30.8% を占めていた。なお、H-serotype を決定できなかった 2 菌株は運動性 (鞭毛) がなかったためなのか新規の H-serotype なのか今後の検討が必要である

我が国において、*B. thuringiensis* の分離は土壌および養蚕農家の塵埃を中心になされ、Ohba and Aizawa 以来 H-serotype と serovar の分布に関し数多く報告がなされている^{24) 25) 26) 27) 28)}。養蚕を行っている環境においては、カイコに殺虫性の高い serovar が特異的に分離され、森林または桑以外の作物を扱っている畑の土壌からは養蚕を行っている環境において見られなかった

serovar が分離されることも示唆されている。今回、著者らにおいても同様の傾向が見られ、養蚕を行っている環境においては、aizawai, kurisutaki, sotto などのカイコに殺虫性の高い serovar が高率で分離された（第7表）。

3) PI の分子量推定

2003年6月時点で塩基またはアミノ酸配列が決定されて GenBank に登録されてい B. thuringiensis の IP は Cry タンパク質と Cyt タンパク質を合わせ 277 種（<http://www.biols.susx.ac.uk/home/neilcrickmore/bt/toxins.html>）ある。IP の分子量は 8.6kDa (Cry11Aa2) ~ 152.4kDa (Cry5Aa1) と広範であるが、タンパク質のサイズでは 125 ~ 135kDa に約 45%、75

~ 85kDa に約 30%、35 ~ 45kDa に約 10% の分布となっている。今回の SDS-PAGE の結果、130kDa 付近の PI を生産する株が 5 菌株と最も多く、その他 106kDa、87kDa、65kDa、45kDa であった。PI 分子量を不明とした株は、2 層分配法が機能せず PI の単離が困難であったため電気泳動の際、PI と考えられるバンドが明確でなく多くのバンドが観察されたため不明と記した。これらは 7 日以上培養でも PI を菌体外に放出しない株や菌体外に放出しても、今回設定した条件では分配できないものも多くあり、PI を菌体外へ出す前処理の方法や 2 層分配法における各層の濃度などの条件を菌株によって検討する必要がある（第8表）。

第6表 *Bacillus thuringiensis* の分離状況

地区	都府県数	分離源	調査箇所数	検鏡数	芽胞細菌数	<i>B. thuringiensis</i>	検出率
東北	2	山林土壌	10	249	154	3	1.95
関東	3	山林土壌	13	290	182	2	1.10
北陸	3	山林土壌	16	336	141	3	2.13
甲信越	2	山林土壌	8	194	62	2	3.23
中部	4	山林土壌	16	301	195	1	0.51
近畿	3	山林土壌	6	133	97	3	3.09
中国	3	山林土壌	13	246	197	5	2.54
四国	2	山林土壌	7	150	93	2	2.15
九州	4	山林土壌	102	2631	2487	33	1.33
		土壌合計	191	4530	3608	54	1.50
		蚕室塵埃	175	3589	3369	77	2.29
	26		366	8119	6977	131	1.88

第7表 分離した *Bacillus thuringiensis* の H-serotype

H-serotype	Serovar	菌株数		計
		土壌	蚕室塵埃	
7	aizawai	10	2	12
3abc	kurisutaki	11		11
4ab	sotto	3	4	7
4ac	kenyae	5	2	7
10ab	darmstadiensis	5		5
3ac	alesti	4		4
8ab	morrisoni	3		3
14/19	israelensis/tochigiensis	1	2	3
27	mexicanensis	2		2
6a:6c	oyamensis	1		1
8a:8b	tenebrionis	1		1
119-72	kumamotoensis	1		1
23	japonensis	1		1
17	tohokuensis	1		1
24	leonensis	1		1
3a:3d	sumiyosiensis	1		1
3a:3d:3e	fukuokaensis	1		1
22	shandongiensis		1	1
Untypable			2	2

3) 分離した *B. thuringiensis* の殺虫活性検定

検定の結果、活性を示した 19 株を第 8 表に示す。

(1) 鱗翅目に対する殺虫活性検定

カイコ及びハスモンヨトウで生物検定を行った。9 菌株 (T-20、T-22、養-20-01、養-36-25、養-52-8、養-125-5、01-75-01、02-99-01、02-内-3-6) で殺虫活性が認められたが、ハスモンヨトウに活性を示しカイコに活性を示さない菌株はなかった。鱗翅目を対象とする *B. thuringiensis* 製剤はアメリカで選抜された HD-1 株 (血清型 3a:3b:3c) が主流となっている²⁹⁾。国内では養蚕業に対する安全性を考慮して鱗翅目害虫には毒性を示すがカイコに対しては毒性の低い菌株の選抜が試みられてきた。その結果、上記の HD-1 株と比較して約 1/200 の毒性しか示さず、コナガ、モンシロチョウ、アメリカシロヒトリに対しては同等の強い毒性を示す AF101 株 (血清型 4a:4b, servar. *sotto*) が分離された³⁰⁾。また殺虫活性スペクトルの拡大に関しては、従来本菌に対し感受性が低いとされていたハスモンヨトウに対して有効な AY 株 (血清型 7, servar. *aizawai*) が選抜された³⁰⁾。近年、血清型 7 の菌株にはハスモンヨトウをはじめとするヤガ科の幼虫に有効なものが多く分布することが報告されている。また血清型 6a:6b (servar. *entocidus*) に属する菌株中にもヨトウ類に著効を示すものが見いだされている³¹⁾。本実験で殺虫活性が認められた菌株においては活性の程度についても検討し、これまで分離されてきた既知の菌株との比較が必要である。

(2) 双翅目に対する殺虫活性検定

アカイエカに対し 6 菌株 (T-50、01-06-01、01-07-04、01-29-02、01-61-02、01-65-02) が殺虫活性を認め、いずれの菌株も鱗翅目に活性を示す菌株とは異なったものであった。しかしマメハモグリバエでは活性を示す菌株は認められなかった。双翅目に関しては 1970 年代に衛生害虫であるカの幼虫に対し広汎なスクリーニングが行われ、既存の菌株の中に実用に供しうるレベルの殺虫活性を示すものがいくつか見いだされている³²⁾。その後 1977 年に分離された ONR-60A 株 (血清型 14, servar. *israelensis*)³³⁾ は殺虫活性の強さおよびその特異性において既存の菌株をはるかに凌ぎ、現在市販されている製剤はこの株に基づいている。その後 ONR-60A に匹敵する 2 菌株が、73-E-10-2 株 (血清型 14)³⁴⁾、PG-14 株 (血清型 8a:8b)³⁵⁾ が分離されている。双翅目についても病原性の程度について検討し、これまで分離されてきた既知の菌株との比較が必要である。

(3) 半翅目に対する殺虫活性検定

半翅目においては Payne, J.M. ら¹⁶⁾ や Frederick¹⁷⁾ らによってアブラムシに対し殺虫活性を示すことが報告さ

れているのみである。今回、著者らは半翅目害虫であるワタアブラムシとホソヘリカメムシで生物検定を行った。

ワタアブラムシ対し、65kDa の PI を産生する株 (01-65-01) と PI の分子量を特定できていない 01-72-01 株の 2 菌株において活性が認められた。本実験では PI をトリプシンによりプロセッシング反応を行い活性型毒素として検定をおこなった。トキシンは結晶体の PI と比較して不安定なため散布剤として直接利用は困難と考えられる。しかしアブラムシが吸汁性害虫であることから遺伝子組換え作物への応用が期待できる。アブラムシは師部液を吸汁する害虫であるため、アブラムシ耐性の作物を遺伝子組み換え技術で作出するためには目的とするタンパク質を師部内で発現させなければならない。これらの技術の資料として、イネにおいて篩部液の窒素源はアミノ酸〜ペプチド程度の小分子量のものと思われていたが Christian Schorbert ら³⁶⁾ による 10kDa ~ 34kDa の蛋白質が同定されたこと、さらには Araki ら³⁷⁾ によりイネ篩部特異的発現を可能にする形質転換ベクターが開発されたことは活性型毒素程度の分子量のタンパク質を師管内に特異的に発現させることが可能であると考えられるため、活性を示した菌株についてはアブラムシ耐性遺伝子組換え作物への応用が期待される。

ホソヘリカメムシでは 2 菌株について活性が確認された。2 菌株は SDS-PAGE の泳動パターンが同じであるため同一の菌株であると考えられた (第 3 図)。菌体外毒素による影響を確認するためオートクレーブ滅菌 (121 °C、20 分) した培養液と精製した IP で検定を行った。その結果、精製した PI では活性を示さず、熱処理した培養物において活性を示した。このことから毒性を示したのは易熱性の PI ではなく耐熱性の菌体外毒素であると示唆された (第 4 図)。*B. thuringiensis* は食中毒を起こす *Bacillus cereus* (以下 *B. cereus*) と遺伝学的に類似し、*B. cereus* group に含まれる³⁸⁾。*B. thuringiensis* の中でも、*B. cereus* 同様の菌体外毒素を生産するものが報告されている^{39) 40)}。菌体外毒素としてはエンテロトキシン (下痢原生毒素)、セレオジン (溶血毒素)、嘔吐原生毒素の他、種々の膜障害作用を持つホスホリパーゼ等の酵素が報告されている⁴¹⁾。エンテロトキシン、セレオジン、膜障害作用を持つ酵素は易熱性タンパク質の毒素であり^{42) 43) 44) 45) 46) 47)}、今回ホソヘリカメムシに対して毒性を示したものではないと考えられる。耐熱性の外毒素としてハエの幼虫に強い殺虫活性を示す分子量約 700 のヌクレオチド系の物質や分子量約 1kDa のペプチドであるセレウリド (嘔吐毒) が報告されており⁴⁸⁾、これらがホソヘリカメムシに毒性を示したことも示唆さ

れる。しかし今回の生物検定で外毒素も PI と同時に食下させたカイコ、ハスモンヨトウ、アカイエカで殺虫活性を示さなかったことは、ホソヘリカメムシに特異的に

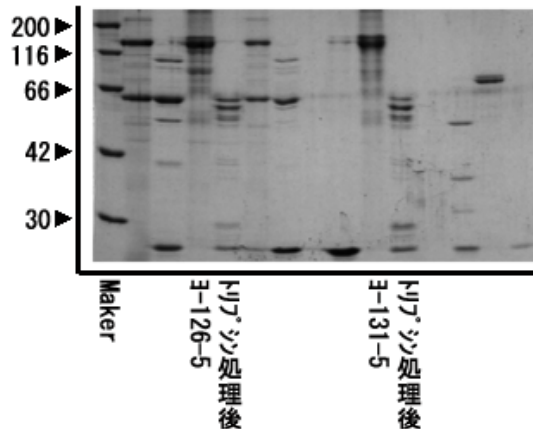
殺虫活性を示すことも考えられ、今後の検討が必要である。

第 8 表 生物検定で活性を示した B T 菌

菌株	H-serotype	servar	PI 形状	分子量	殺虫活性					
					鱗翅目		双翅目		半翅目	
					<i>B.mori</i>	<i>S.litura</i>	<i>C.pipiens</i>	<i>L.trifolii</i>	<i>A.gossypii</i>	<i>R.clevatus</i>
T-20	7	aizawai	●	—	+	+	—	—	—	—
T-22	3abc	kurisutaki	◆	87	+	+	—	—	—	—
T-50	10ab	darmstadiensis	●	130	—	—	+	—	—	—
養 -20-01	未同定	未同定	◆	—	+	+	—	—	—	—
養 -36-25	未同定	未同定	●	—	+	+	—	—	—	—
養 -52-08	未同定	未同定	●	—	+	+	—	—	—	—
養 -125-5	未同定	未同定	◆	—	+	+	—	—	—	—
01-06-01	未同定	未同定	◆	135	—	—	+	—	—	—
01-07-04	未同定	未同定	◆	45	—	—	+	—	—	—
01-29-02	未同定	未同定	●	—	—	—	+	—	—	—
01-61-02	未同定	未同定	●	—	—	—	+	—	—	—
01-65-01	未同定	未同定	●	65	—	—	—	—	+	—
01-65-02	未同定	未同定	◆	130	—	—	+	—	—	—
01-72-01	未同定	未同定	●	—	—	—	—	—	+	—
01-75-01	未同定	未同定	●	—	+	+	—	—	—	—
02-99-01	未同定	未同定	●	106	+	+	未検定	—	—	—
02-内 3-6	未同定	未同定	◆	—	+	+	未検定	—	—	—
02-ヨ-126-05	未同定	未同定	◆	134	—	—	未検定	—	—	+
02-ヨ-131-05	未同定	未同定	◆	136	—	—	未検定	—	—	+

※分子量の項の「—」：分子量特定できず

※殺虫活性の項「+」：殺虫活性あり、「—」：殺虫活性なし



第 4 図 ホソヘリカメムシ活性を示す菌株の SDS-PAGE

試験区	オートクレーフ処理培養液	精製 CP	滅菌水
死亡率 (%)	100	0	0

状態



第 5 図 ホソヘリカメムシに活性を示す B T 毒素

IV 総合考察

昆虫病原性糸状菌について *Beauveria bassiana* 601 株、*Beauveria amorpha* 22 株、*Beauveria brongiaritii* 2 株、*Nomuraea rileyi* 34 株が分離され、生物検定によりハスモンヨトウ、マメハモグリバエに対し病原性を示す菌株を確認した。検定は分離した一部の菌株で行っており、未検定の菌株で検定を進めるとともに、既知の有用な菌株と殺虫活性等を比較し有用性を検討する必要がある。

また、野外からの *Beauveria* 菌の分離について土壌からより植物葉からのほうが高率に病原性を示す菌株が分離されることを報告したが、筆者らが蚕桑技術協力試験全国協定課題で、桑園内における *Beauveria* 菌の生息および動態を5月から10月にかけて調査した結果、9月～10月にかけて高率に分離される傾向が見られた^{4) 5)}。自然界からより効率的に病原性を示す *Beauveria* 菌を分離するためには季節的な消長、分離源、気象状況等を考慮し検討する必要がある。

昆虫病原細菌の *B.thuringiensis* は131菌株が分離され、H-serotypeにより分類を試みた。しかし近年はPIをコードするDNAの塩基配列やPIのアミノ酸配列による分類が主流となりつつあり、これらの方法により分類を行い既知のPIと比較し相同性を検証し新規性を検討する必要がある。

また、生物検定により鱗翅目昆虫であるカイコに対し8菌株ハスモンヨトウに対し同じ株の8菌株、双翅目のアカイエカに対し6菌株、半翅目のモモアカアブラムシに対し2菌株、ホソヘカメムシで2菌株の活性を確認した。現在、鱗翅目害虫にはHD-1株AF101株AY株、双翅目害虫にはONR-60A株73-E-10-2株PG-14株等が主流であるが、本実験で活性を示した菌株と殺虫活性等の比較を行い有用性および新規性について検討する必要がある。半翅目昆虫のワタアブラムシに活性を示した菌株についてはPayne, J.M.¹⁶⁾らがクローニングした遺伝子やFrederick¹⁷⁾らが報告した菌株やと比較し有用性および新規性について検討する必要がある。さらにホソヘカメムシに活性を示した菌株については活性を示した毒素の特定が急がれる。

V 謝辞

本研究は「バイオテクノロジーの応用による害虫防除技術の開発」の一環として平成11年から平成15年の5年間実施したものである。

本研究を遂行するにあたり、天敵微生物全般にわたり河原畑勇九州大学名誉教授、荒武義信博士(元九州農業試験場養蚕研究室長)、糸状菌関係において島津光明博士(森林総合研究所)、*Bacillus thuringiensis* 関係におい

て大場道夫教授(九州大学)、水城 英一博士(福岡県工業技術センター)、蛋白質分析関係において荒木朋洋教授(九州東海大学)に常に適切なお指導とお教授を頂き深く感謝する。

さらに昆虫の飼育を担当して頂いた室津加奈江さん、実験のお手伝いをして頂いた大島佑季さんに対し心から感謝する。

引用文献

- 1)河原畑勇 農薬通信 第143号～146号 別刷 p6, 1998
- 2)Shimazu and Sato, Applied Entomology and Zoology.31, 291-296,1996
- 3)青木譲児 全国農村教育協会 1989
- 4)菊田浩典: 酪農学園大学要紀,15,1-69,1990
- 5)Travers,R.S., Martin,P.A.W. and Reichelderfer, C.F, Selective process for efficient isolation of *Bacillus* spp. Appl.Environ.Microbiol.,53 ,1263-1266.1987
- 6)De Barjac,H and Bonnefoi,A. Entomophaga. 7, 5-31.1962
- 7)Lecadet, M., Franchon E., Cosnao Dumanoir, U. and De Barjac. The 6th International Colloquium on invertebrate Pathology and Microbial Control Montpellier. p.37.1994
- 8)Lonc, E.,Lecadet,M.M.,Lachowicz,T.M.and Panek, E. Microbial. 24, 467-473. 1977
- 9)Ohba,M.and Aizawa, K. J.Invertebr.Pathol.32,303-309,1987
- 10)N.S.Goodman, R.J.Gottfried, M.H.Rogoff, Journal of Bacteriology, Aug, 485, 1967.
- 11)飯塚敏彦・寺江尚子, 日蚕雑 . 58, 308-314,1989.
- 12)Ishwatari,大日本蚕糸会報台1 2 4号論説. 1901.
- 13)Goldbreg,L.J.Margalit1, Mosquito News . 37, 355-358, 1997.
- 14)Krieg,A.,A.M.Huger,GA.Langenbruch & W.Schnetter, Journal of Applied Entomology. 96, 500-508, 1983.
- 15)Payne,J.M &,M.K.Kennedy, J.B.Randall & H.Meiter, US.patent, Number 5 260 058, 1993.
- 16)Payne, J. M. & J. C. Cannon,US.patent, Number 5 262 159, 1993.
- 17)Frederick S.Walters &Leigk H.English , Entomologia Experimentalis et Applicata . 77, 211-216, 1995.
- 18)小田 力, 熱帯学 9, 39-44, 1967
- 19)九州地域重要新技術研究成果, No34, 2000
- 20)野田孝博・田中正美,九農研, 65, 98, 2002.
- 21)Mittler,T.E.and P. Koshi, Entomologia Experimentalis et Applicata. 17,1-4, 1974.
- 22)Walter,F.S.,C.A.Mullin,C.Donaghy and E.M.Reever, Annals of the Entomological Society of America 83, 246-250, 1990

- 23) 野田隆志, 昆虫の飼育法, 日本植物防疫協会, Inc., 1989)
p33-35, 1991
- 24) Ohba M. and Aizawa, K. J. *Invertebr. Pathol.* 32, 303-309, 1978
- 25) Ohba M. and Aizawa, K. J. *Invertebr. Pathol.* 38, 307-309, 1981
- 26) 栢村鶴雄, 蚕糸報告 122, 101-105, 1984
- 27) 大場道夫. 鮎沢啓夫. 須藤信一郎, 九病虫報告 30, 152-155, 1984
- 28) Ohba M. and Aratake, Y. J. *Appl. Bacteriol.* 79, 203-209, 1994
- 29) H.T. Dulmag, J. *Invertebr. Pathol.*, 15, 232, 1970
- 30) K. Aizawa, N. Fujiyosi, M. Ohba and N. Yoshikawa, *Proc. 1st. intersect. Congr. IAMS*, 2, 597, 1975
- 31) B. Sneh, S. Schuster and M. Broza, *Entomophaga*, 26, 26, 179, 1981
- 32) K. Aizawa and M. Ohba, *Integrated Mosquito Control Methodologies*, volum 2. M. Laird and J. W. Miles, Academic Press, p. 199, 1985
- 33) L. J. Goldberg and Margalit, *Mosq. News*, 37, 355, 1977
- 34) L. E. Padua, M. Ohba and K. Aizawa, *J. Invertebr. Pathol.*, 36, 180, 1980
- 35) L. E. Padua, M. Ohba and K. Aizawa, *J. Invertebr. Pathol.*, 44, 12, 1984
- 36) Christian Schorbert, Lucian Baker, Judit Szederkenyi, Pia Grossmann, Ewaid Komor, Hiroaki Hayashi, Mitsuo Chino and William Lucas, *Planta* 205:12-22, 1998.
- 37) Araki Fukuda, Yutaha Ishiwatari, Keiko Abe, Mitsuo Chino, Toru Fujiwara and Hayasi, *Plant Nutrition-Molecular Biology and Genetics*, G. Gissel - Nielsen and A. Jenseneds, Kluwer academic publishers : Dordrecht, Boston, London, pp39 - 45, 1999
- 38) E. Helgason : *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2627 ~ 2630, 2000
- 39) B. A. Glatz and J. M. Goepflect : *Infect. Immun.*, 8, 25 ~ 29, 1972
- 40) W. M. Spira and J. M. Goepflect : *Appl. Microbiol.*, 24, 341 ~ 348, 1972
- 41) M. W. Slein and G. F. Jr. Logan, *J. Bacteriol.*, 90, 69 ~ 81, 1965
- 42) N. Agata et al. : *Microbiol.*, 141, 983 ~ 988, 1995
- 43) D. J. Beecher et al. : *Infect. Immun.*, 63, 4423 ~ 4428, 1995
- 44) J. M. Kramer and R. J. Gilbert : In *Foodborne bacterial pathogens* (M. P. Doyle ed), 21 ~ 71 (Marcel Dekker, Inc., 1989)
- 45) T. Lund and P. E. Granum : *FEMS Microbiol. Lett.*, 141, 151 ~ 156, 1996
- 46) K. Shinagawa et al. : *FEMS Microbiol. Lett.*, 80, 1 ~ 6, 1991
- 47) N. E. Thompson et al. : *Infect. Immun.*, 43, 887 ~ 894, 1984
- 48) N. Nagata et al. : *FEMS Microbiol. Lett.*, 121, 31 ~ 34, 1994
- 49) 蚕桑技術協力試験成績集, 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 p31 ~ 54, 1998
- 50) 蚕桑技術協力試験成績集, 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 p5 ~ 24, 1999

Summary

In recent years, under conventional modern agriculture with much applied chemical fertilizers and pesticides, new technologies are expected to develop for improving sustainable and environmentally friendly agriculture. Microbial control that uses various entomopathogens as one of the technology, is paid attention widely. First we have collected various entomopathogens. About 800 strains of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Beauveria amorpha*, *Beauveria brongniartii* and *Nomuraea rileyi* were isolated from dead insect and soil samples. In all 40 strains of entomopathogenic viruses Nuclear-Polyhedrosis Virus (NPV) were isolated from diseased Common cutworm collected in Kumamoto area. And in all 131 wild strains of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* were isolated from soil samples. Based on the H-serotyping result of 65 strains, we recognize 17 flora of *Bacillus thuringiensis*.

The aim of bioassay of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* was to isolate novel strains with different spectra of activity or toxicity. Heretofore, only activity against lepidopteran, dipteran, coleopteran and hymenopteran insects has been published. In our laboratory bioassay, the insecticidal crystal proteins or δ -endotoxin or β -exotoxin formed by *Bacillus thuringiensis* have a toxic activity against not only lepidopteran (silkworm, Common cutworm) and dipteran (*Culex pipiens pallens*) insect but also hemipteran insect (Cotton aphid, Bean bug). We present data describing the first known *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin activity toward heteropteran insects. This novel finding implies a potential control strategy for this important group of agricultural pests.