

生物的防除部会ニュース No.4 1

平成 22 年 5 月 28 日発行

目 次

1. 昆虫病原性ウイルスを利用したヤガ科害虫の防除 頁 1 ~ 4
(平成 21 年度第三回講演会、平成 22 年 2 月 26 日講演)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
中央農業総合研究センター総合的害虫管理研究チーム 後藤千枝氏
2. 昆虫寄生性菌類、その新たなる利用法：とくに *Lecanicillium* 属菌について 頁 5 ~ 10
(平成 21 年度第三回講演会、平成 22 年 2 月 26 日講演)
帯広畜産大学 環境微生物学研究室 小池正徳氏
3. 平成 22 年度総会および第一回講演会のお知らせ 頁 11

昆虫病原性ウイルスを利用したヤガ科害虫の防除

後藤千枝

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

中央農業総合研究センター総合的害虫管理研究チーム

中央農研センター総合的害虫管理研究チームは、「土着天敵等を活用した虫害抑制技術の開発」を目標に掲げ、生物の潜在的な機能を開拓して害虫と線虫の防除に活用する技術づくりに取り組んでいる。ここでは、私たちが進めている昆虫病原性ウイルスを利用したヤガ科害虫の防除技術の開発研究について、国内外の関連情報も含めて紹介したい。

1. 昆虫病原性ウイルス

ウイルスは、核酸とタンパク質でできた膜で構成される微小な構造体で、生きている細胞に侵入し、その代謝システムを利用して自己複製する。インフルエンザやエイズなどヒトに病気をもたらすウイルスが話題にのぼる事はよくあるが、バクテリアやアメーバ、植物、昆虫などありとあらゆる生物がウイルスの感染の対象となることは一般にはあまり知られていない。昆虫は時として多発生し農林業に大きな被害を与えるが、高密度になった害虫にウイルスによる流行病が起きた場合は急激な個体数の減少が観察される。昆虫に病原性を持つウイルスのなかでも、生物顕微鏡で確認できる大きさの病原粒子を形成する核多角体病ウイルス(NPV)と顆粒病ウイルス(GV)は、古くから研究者の注意を引く存在であり、ゲノム遺伝子の解析からモデルを用いた野外における流行の機構解明まで多様な研究の蓄積がある。

NPVとGVは、環状2本鎖DNAウイルスで棒状粒子を形成し、いずれもバキュロウイルス科に分類される。バキュロウイルス科には、ゲノム情報の解析結果に基づき4属が設けられ、チョウ目昆虫由来のNPVは*Alphabaculovirus*、GVは*Betabaculovirus*、ハチ目昆虫(ハバチ類)由来のNPVは*Gammabaculovirus*、ハエ目昆虫(カ)由来のNPVは*Deltabaculovirus*に分類される。本稿では、チョウ目害虫の病原である

*Alphabaculovirus*をNPV、*Betabaculovirus*をGVと呼び、これらを中心に話を進めることにする。

2. バキュロウイルス感染のしくみ

ウイルス感染幼虫の細胞には、ウイルス粒子が入ったタンパク質の塊(包埋体)が形成され、これが個体間の感染を担う。NPVでは、複数のウイルス粒子が入った直径0.5~15 μ mの包埋体(多角体)が形成され(図1)、

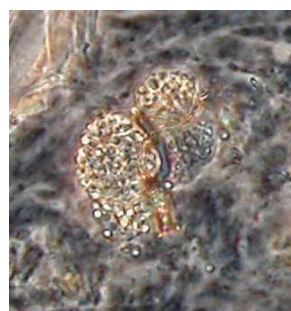


図1 NPV感染幼虫体内に形成された多角体(生物顕微鏡)

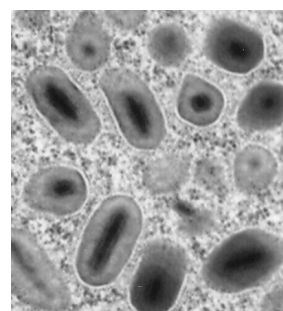


図2 GV感染幼虫体内に形成された顆粒体(透過型電子顕微鏡)

GVではウイルス粒子1個が入った1 μ m未満の長楕円体の包埋体(顆粒体)が形成される(図2)。感染死体か

ら飛散した多角体や顆粒体は、餌とともに新たな宿主幼虫の消化管に入ると、強アルカリ性の消化液によって溶かされ、遊離したウイルス粒子が宿主中腸の細胞に侵入し、感染が始まる。中腸細胞では、細胞間の感染を担うウイルス粒子が複製され、これが体液中に芽生する。出芽型ウイルス粒子による感染の場合は脂肪体や血球細胞などで、幼虫の全身に感染が広がる。感染細胞では出芽型の粒子とともに個体間の感染を担う包埋型の粒子が作られ、これがウイルスゲノムの指令で大量に作り出されるタンパク質に包み込まれて多角体あるいは顆粒体として蓄積されることになる。感染から致死に至るまでの期間は、NPVでは5-10日

程度であるが、GV では1週間未満で致死するウイルスがある一方、感染幼虫が1ヶ月以上生存し老齢になってようやく死亡するウイルスも知られている。宿主死体はウイルス由来の酵素によって速やかに分解が進み(図3)、体外に流出した多角体や顆粒体が新たな個体に感染を引き起こすことになる。多角体や顆粒体は、紫外線や熱に弱い性質を持つが、低温暗黒条件下では安定で、土中などでは長期間感染性を保持する。



図3 NPV 感染により死体した幼虫
(体液が流出し始めている)

バキュロウイルスの増殖には宿主の生きた細胞が必要である。通常、ウイルスの生産は人工飼料を用いて室内で大量飼育した幼虫に包埋体を接種し、感染死体から包埋体を回収する方法で行われる。生産には、飼育温度や湿度調整のための光熱費、飼料代、飼育や回収作業のための人件費等が必要であり、化学合成農薬に比べて生産コストは高くなる傾向があるが、開発費や安全性試験の費用は低い。培養細胞を用いた包埋体生産の技術開発も続けられているが、コスト面では幼虫を用いる生産方法に勝るまでには至っていない。

3.バキュロウイルスを利用した害虫防除(海外の例)

1950年代以降、各国でバキュロウイルスを害虫防除に利用する試みが積極的に進められてきた。以下に例をあげて説明する。

米国では1975年にタバコガ類を対象に *Helicoverpa (Heliothis) zea* NPV 製剤が農薬登録され、工場で大規模に生産されたウイルスが販売されたが、その後新たに開発された化学合成殺虫剤との競合に破れる形で1982年に製造が中止された。現在米国で農薬登録のあるバキュロウイルスは、GVではコドリंगाGVならびにノシメダラメイガGVの2種類、NPVでは *H. zea* NPV など5種類である。

中国では、昆虫病原性ウイルスを用いた害虫防

除の実用化研究が盛んに行われ、ウイルス殺虫剤の生産量は世界一とされている。2006年時点で8種類のNPVと3種類のGV、1種類のCPVの登録がある。中でも、オオタバコガNPVは生産企業数が多く、広く普及している。遺伝子組換え技術を活用して防除効果の高い新ウイルスを開発する試みも積極的に進められ、組換えウイルスの圃場効果試験も行われている。

ヨーロッパでは、1987年以降各国でコドリंगाGVが微生物農薬として登録され、特に有機栽培果樹園で広く普及した。2003年頃、コドリंगा幼虫のウイルス感受性低下が懸念されるようになり、その後、複数の国で抵抗性個体群の存在が確認されるに至った。今のところ、抵抗性の発達が認められたのは一部地域の個体群のみであり、広域的な問題にはなっていないが、対応策として、抵抗性の遺伝様式や機構解明、抵抗性個体群に高い感染性を示すCpGVの新系統の探索などが進められている。

ブラジルでは、1970年代後半からヤガ科ダイズ害虫 *Anticarsia gemmatilis* を対象にNPVを利用した防除技術開発が始まり、1980年代には大規模な実証試験が行われ、1997年に農薬登録されるに至った。化学合成農薬よりも低いコストで防除が可能であったため施用面積は年々拡大し、2003年には散布面積は200万haに達した。ウイルスの生産は、安い人件費を背景に、圃場に発生した幼虫にウイルスを散布し、罹病死体を労働者に採集させ、これを原料に用いて製剤化する方法が取られていたが、供給量や品質が不安定であることから、近年は室内飼育幼虫を用いた生産に転換が図られている。

この他、インドや南米の複数の国でもNPVやGVの実用化が進められている。

4.日本におけるバキュロウイルスを利用した害虫防除の現状

日本でも、1970年代から80年代に害虫防除素材としてのウイルスの探索や利用技術の開発研究が積極的に進められた。このうち、チャの重要害虫であるチャノコカクモンハマキとチャハマキを対象にそれぞれに感染性を持つGVを混合した製剤の実用化が進められ、鹿児島県では、農家の共同体が生産したウイルスを用いた防除技術が広

く普及するに至った。上記の GV2 種混合製剤は、農薬取締法の改正に対応して、2003 年に農薬登録され、チャのみならず、リンゴのコカクモンハマキ防除にも使用できるようになった。

2007 年には、ハスモンヨトウ NPV がダイズで農薬登録され、その後、適用作物が拡大されて、いちご、キャベツ、しそなどでも利用できるようになった。ダイズやえだまめでは無人ヘリコプターによる散布も可能である。

この他に、オオタバコガ NPV 製剤やハスモンヨトウを対象とした新たな系統の NPV 製剤で新農薬実用化試験が実施されており、今後ウイルス製剤の登録数が増えていくことが期待される。

5. ウイルス間相互作用を活用した新たな微生物殺虫剤開発の試み

バキュロウイルスは一般に感染宿主域が狭く、感染できる対象は分離宿主のみか、あるいは分離宿主の近縁種に限られることが多い。国内外で実用化されたバキュロウイルス殺虫剤には、ハスモンヨトウ NPV のように 1 種類の害虫のみを防除対象としているものが多く、*H. zea* NPV のように複数種の害虫に効果が期待できるものは少ない。しかし、1 作物を加害する昆虫種は、チョウ目に限ってみても、複数であることがほとんどである。そこで、我々は複数害虫の防除が可能なウイルス殺虫剤の開発を目指し、2004 年から 2008 年度に実施された農林水産省プロジェクト研究「生物機能を活用した環境負荷低減技術の開発」において野菜類の重要害虫であるヨトウガ、オオタバコガ、ウワバ類などに感染性を持つヨトウガ NPV を主剤とする殺虫剤の開発に取り組むことにした。ウイルス殺虫剤の開発における課題としては、この他に防除コストの低減と効果の安定性向上がある。我々はプロジェクト開始までに実施した研究により、北海道でシロモンヤガから分離された GV には複数の宿主において NPV の感染性を高める作用があり、その活性成分が GV の顆粒体に含まれるタンパク質であることを確認しており、これを活用して、殺虫効果の向上ならびにコスト低減を図ることにした。

まず、人工飼料にヨトウガ NPV 多角体を単独で、あるいは GV 顆粒体のタンパク質成分(GVPs: 顆粒体をアルカリ溶解後中和し、超遠心によって

ウイルス粒子を除去したもの)とともに混合し、幼虫に 48 時間程度食べさせた後、個別飼育し、感染率を調べる実験を実施した。実験には、ヨトウガ、オオタバコガ、タマナギンウワバの 2 齢幼虫をそれぞれ供試した。この接種実験により、上記 3 種幼虫のヨトウガ NPV に対する感受性は、オオタバコガがヨトウガと同等あるいは若干高いが、タマナギンウワバではやや低いことが明らかになった。また、いずれの種でも GVPs の添加量の増加に従って NPV の感染率が上昇することが確認できた。

次に、圃場試験に用いるウイルス濃度決定の基礎データを得るために、キャベツ苗を用いた接種実験を行った。段階希釈した多角体けんたく液あるいは、多角体けんたく液に GVPs を添加したものに 30 秒間キャベツ苗を浸漬し、風乾した後、プラスチックカップに納め、2 齢幼虫を接種した(図 4)。48 時間後にキャベツ苗を摂食させた幼



図 4 キャベツ苗を用いた接種試験

虫を回収し、人工飼料で個別飼育して感染率を調べた。その結果、ヨトウガ NPV 単独接種の場合の 95%致死濃度はヨトウガでは 7.7×10^5 多角体/ml、オオタバコガでは 1.8×10^5 多角体/ml であり、タマナギンウワバでは 10^6 多角体/ml 以上であることが明らかになった。さらに、NPV の濃度を 1×10^4 多角体/ml 一定とし、GVPs の添加濃度を変えて感染致死率を調べた結果、供試幼虫の 95%を感染致死させるために必要な GVPs 濃度は、オオタバコガで $2.5 \mu\text{g}$ 顆粒体相当量/ml、ヨトウガの場合は、 $7 \mu\text{g}$ 顆粒体相当量/ml、タマナギンウワバでは $10 \mu\text{g}$ 顆粒体相当量/ml 程度であることが明らかになった。

これらの実験結果を元に、試作製剤を調整し、2008 年と 2009 年にキャベツならびにブロッコリー圃場でヨトウガを対象に効果試験を実施した。試験区には、中央の数株に室内飼育個体から

得たふ化直前の卵塊を接種する方法でヨトウガ幼虫を多発生させ、2 齢に達した頃に蓄圧式噴霧器で製剤を散布し、散布4 日後に幼虫を回収し、人工飼料で個別飼育して感染死亡率を調べた。NPV を 1×10^5 多角体/ml と GVPs を $10 \mu\text{g}$ 顆粒体相当量/ml 含む試作製剤の散布した場合には、NPV のみを 1×10^6 多角体/ml 含む製剤を散布した場合と同等の感染致死率を得ることができ、GVPs の活用によって製剤の生産コストの削減が可能であることを確認した。また、GVPs の濃度をさらに下げた製剤の効果試験でも良好な結果を得ている。今後は、オオタバコガやウバ類を対象にした圃場試験を行い、GVPs を添加した NPV の実用性を確認していきたいと考えている。

主な参考文献

- Eberlea, K. E. and Jehle, J. A. (2006) Field resistance of codling moth against *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) is autosomal and incompletely dominant inherited. *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 201-206.
- Jehle, J. A. et al. (2006) On the

- classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology* 151: 1257-1266.
- Hunter-Fujita, F. R. et al. Editors. (1998) *Insect Viruses and Pest Management*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Mukawa, S. and Goto, C. (2010) *Mamestra brassicae* Nucleopolyhedrovirus Infection and Enhancing Effect of Proteins Derived From *Xestia c-nigrum* granulovirus in Larvae of *Mamestra brassicae* and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on Cabbage. *Journal of Economic Entomology* 103: 257-264
- Rohrmann, G. F. (2008) *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.

昆虫寄生性菌類、その新たな利用法

：特に *Lecanicillium* 属菌について

小池正徳

帯広畜産大学 環境微生物学研究室

を助長している。」と指摘された

はじめに

アナモルフ菌類である *Beauveria bassiana*、*Lecanicillium* 属菌（旧 *Verticillium lecanii*）、*Metarhizium anisopliae* および *Isaria fumosorosea*（旧 *Paecilomyces fumosoroseus*）は広く知られている昆虫寄生菌類であり、分生子やプラストスポアが容易に培養が可能で、微生物農薬資材として製剤化されている（Goettel et al., 2005; Faria and Wraight, 2007）。さらに、ここ 10 年これら昆虫寄生菌類は植物病原菌に対しても作用することが示されてきた（Kang et al., 1996; Verhaar et al., 1997, 1998; Askary et al., 1998; Dik et al., 1998; Benhamou and Brodeur, 2000, 2001; Milleret et al., 2004; Ownley et al., 2004, 2008, 2010; Kavkova and Curn, 2005）。このような昆虫寄生菌類は、多様な作用を有する生物農薬として開発できる可能性を秘めている。そこで我々は有害節足動物、植物寄生性線虫および植物病原菌に対する多面的な微生物防除資材としての *Lecanicillium* 属菌の能力について概説する。

1. *Lecanicillium* 属の学名

最近まで、*Verticillium* 属は節足動物、線虫、植物、菌類など多様な宿主を持つ幅広い種を含んでいた。しかし、リボソーム RNA 遺伝子、 β チューブリン遺伝子等のシーケンス解析の結果から、すべての昆虫寄生性の *Verticillium* 属は新規の *Lecanicillium* 属（*L. attenuatum*、*L. lecanii*、*L. longisporum*、*L. muscarium* および *L. nodulosum*）に再分類された（Zare et al., 2000; Gams and Zare, 2001; Zare and Gams, 2001）。この再分類により過去の報告では複数の種が関与していた可能性が生じており、「最近の論文では、リボソーム RNA 遺伝子のシーケンス解析をせずに、単純に属名を *Verticillium* から *Lecanicillium* へ置き換えている形跡があり、混乱

（Sugimoto et al., 2003; 小池ら, 2007a）。本稿では、これまでの論文で新種名が確認されていないものに限り、旧 *Verticillium lecanii* を *Lecanicillium* 属菌とした。

2. 昆虫およびダニに対する病原体としての *Lecanicillium* 属菌

Lecanicillium 属菌は広い宿主範囲を持ち、様々な目の昆虫から分離され（Zare and Gams, 2001）、昆虫寄生性であるアナモルフ菌類の典型的な発病経路をたどることが知られている。すなわち、宿主クチクラへの分生子の付着、分生子の発芽、クチクラへの侵入、血体腔内における blastospore の生産、宿主の死因となる菌糸の分枝と組織への侵入、そして死個体の体表において分生子形成に至る（Askary et al., 1999）。いくつかの *Lecanicillium* 属菌の系統は *in vitro* で有毒な代謝産物を産生することが知られており、宿主を死に至らしめる能力と関連する可能性があることが指摘されている（Claydon and Grove, 1982; Gindin et al., 1994）。

現在では、害虫防除のため、*Lecanicillium* 属菌を有効成分とした生物農薬は世界において少なくとも 15 種類の製剤が流通もしくは開発中である（Faria and Wraight, 2007）。*L. attenuatum* はポーランドではイモムシ、アメリカ合衆国では落葉（Zare and Gams, 2001）、および韓国ではアブラムシから分離された（Kim et al., 2007）。また *L. lecanii* は、主にカタカイガラムシ科の一種の病原体として分離される（Zare and Gams, 2001）。*L. nodulosum* は様々な昆虫類とダニ類、および朽木を栄養源とする（Zare and Gams, 2001）。

さらに *L. muscarium* は、広い宿主範囲を持ち様々な分離源（主に昆虫類や菌類）に由来しており、コナジラミとアザミウマに対し Mycotal[®]、コナジラミとアブラムシ、ダニに対して Verticillin[®] が生物

農薬として製剤化され、日本においても販売されている (Faria and Wraight, 2007)。また、*L. longisporum* ではアブラムシに対し Vertalec®、コナジラミとアザミウマに対して Vertirri® が製剤化されている。Zare and Gams (2001) は、“Vertalec” として移譲された株が *L. longisporum* もしくは *L. muscarium* を有効成分とすることを証明した。これにより、最初の Vertalec は *L. muscarium* を有効成分としていたが、後に *L. longisporum* に代わったか、もしくは菌株が異なるにも関わらず Vertalec として各国で販売されたことが推測される。しかし、Vertalec はより小さな分生子を形成する *L. muscarium* を有効成分としたことはなく、よって *L. muscarium* として同定された “Vertalec” は別種の混入があったか、もしくは誤同定であったと考えられている。すなわち、Vertalec は Zare and Gams (2001) に *L. longisporum* として同定された CBS102072 株のみを有効成分とし、Mycotal は *L. muscarium* のみを有効成分としている (W. Ravensberg, 私信)。

3. 植物寄生性線虫に対する *Lecanicillium* 属菌の寄生性

Lecanicillium 属菌は、植物寄生性線虫に対しても寄生性を示し、線虫防除資材としても製剤化が期待されている。*L. psalliotae*、*L. antillanum* および他の *Lecanicillium* 属菌はネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita* の卵に寄生する (Gan et al., 2007; Nguyen et al., 2007)。さらに、実験室や温室レベルでは *Lecanicillium* 属菌がダイズシストセンチュウ *Heterodera glycines* (SCN) の雌成虫、シストおよび卵に対し寄生することで、線虫密度を低下させることが認められた (Meyer et al., 1997)。また、紫外線照射によって得られた変異株は SCN に対する防除効果を増大させた (Meyer & Meyer, 1996)。

いくつかの報告では、2 期幼虫 (J2) を含む成熟卵に比べ未熟卵は菌に高い感受性を有することが示された (Irving & Kerry, 1986; Kim & Riggs, 1991; Chen & Chen, 2003)。また、Meyer ら (1990) は *Lecanicillium* 属菌 (*V. lecanii* として記載されている) のある系統は SCN 黄色雌成虫体内における健全卵数を減少させるが、シスト内の卵に

は影響を与えないことを示した。この系統は SCN 卵に定着することなく生育を阻害するが、他の系統でこのような現象は確認されていない。

4. 植物病原菌に対するアンタゴニスト・パラサイトとしての *Lecanicillium* 属菌

Lecanicillium 属菌は、うどんこ病 (Verhaar et al., 1997, 1998; Askary et al., 1998; Dik et al., Miller et al., 2004)、さび病 (Spencer & Atkey, 1981; Leinhos & Buchenauer 1992)、青かび病 (Benhamou & Brodeur, 2000)、および苗立枯れ病 (Benhamou & Brodeur, 2001) に関与する多くの植物病原菌類に対して作用する。これらの菌は、抗生や寄生を通して植物病原菌を防除する可能性がある (Kiss, 2003)。*Lecanicillium* 属菌のある系統は糸状菌の寄生菌として、うどんこ病菌の菌糸や分生子に付着し、キチナーゼ等の酵素を産出する。その結果、うどんこ病菌の胞子や菌糸に侵入し、死に至らしめる (Askary et al., 1997)。Leinhos と Buchenauer (1992) は、いくつかの *Lecanicillium* 属菌がライグラス冠さび病 *Puccinia coronato* の夏胞子の胞子嚢に侵入し、定着可能であったことを報告した。青かび病菌 *Penicillium digitatum* に対する *Lecanicillium* 属菌の作用機作は、接触する前の宿主となる病原菌の細胞の変化にあると考えられた (Benhamou & Brodeur, 2000)。一方、苗立枯れ病 *P. ultimum* では植物病原菌への寄生に加え、宿主の植物組織内での定着と連動し、植物の全身誘導抵抗性を引き起こす (Benhamou & Brodeur, 2001)。

Hirano ら (2008) は、*L. muscarium* (blastospore) をキュウリ根部へ接種すると、全身誘導抵抗性を引き起こすことを見出した。*L. muscarium* を前接種した植物は対照区に比べ、うどんこ病の病斑は明らかに小さく、発生程度も軽減



図 1. *Lecanicillium muscarium* による メロン萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*) の防除効

した。*L. muscarium*の根部処理は、土壌病害（トマト - *Verticillium dahliae*、ダイコン - *V. dahliae*、およびメロン - *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis*）において、発病率や萎凋程度を減少させることを、楠木ら（2006）と Koike ら（2007b）は明らかにした（図 1）

5. プロトプラスト融合による育種と選抜

5-1 窒素利用能変異株（nit 変異株）を用いた細胞融合

前述のように、Mycotal® (*L. muscarium*) と Vertalec® (*L. longisporum*) は、害虫防除用として製剤化されている系統である。日本においてモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) より分離された B-2 (*L. muscarium*) はメロンやキュウリの葉面に高密度で定着し外生菌としての高い能力を示す (Koike et al., 2004)。これらの 3 菌株を用いて、生物防除資材として有用な形質をもつ新たな系統を作出するために、プロトプラスト融合を行った (Aiuchi et al. 2004, 2008)。Vertalec × Mycotal, B-2 × Mycotal, および B-2 × Vertalec 間で多くの融合株を得た。融合したプロトプラストを視覚的に選抜するために nit 変異株 (Correll et al., 1987) を使用した。これによって作出された融合株の形態的な特性は親株 (nit 変異株) と異なっていた。さらに、プロトプラスト融合の結果を確認するためにゲノミック DNA 解析を行なった。プロトプラスト融合はゲノミック DNA において認められたが、ミトコンドリア DNA (mtDNA) には認められなかった。両解析からは、親株の組み合わせによってどちらかのバンドパターンにかたよる傾向がみられた。これらのゲノミック解析より融合や組換えを確認した。これらの結果から遺伝子多型を高い頻度で検出できる PCR 産物の制限酵素切断パターンによる多型検出や、ランダムプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応等の解析はプロトプラスト融合の確認に有用であることが示された (Aiuchi et al., 2008)。

5-2 アブラムシ類やコナジラミ類をターゲットとしたスクリーニング

次にこれらの融合株 (172 株) を用いて、広い宿主範囲、強い繁殖力を持つ有望な *Lecanicillium* 融

合株の選抜を実施した (相内ら, 2007)。まず、ワタアブラムシ *Aphis gossypii* に対する接種試験を実施したところ、30 菌株が Vertalec の致死率 (42%) と同等かさらに高い値を示した。次に、オンシツコナジラミ *Trialeurodes vaporariorum* に対しては、37 菌株が Mycotal の感染率 (36.2%) と同等かそれ以上の効果を示した。最後に、低湿度条件下 (ca.13%RH) における生存力を評価するために、キュウリの葉へ散布し生存力を調査した。17 菌株が親株である B-2 の生存力 (2 週間後 1.5×10^3 cfu/cm²) と同等かそれを上回る値を示した。これらの結果から、融合株は親株の特徴を併せ持つだけでなく、病原性や生存力の向上が認められ、ある融合株ではキュウリ葉面の毛茸においても分生子を形成した。以上のスクリーニングにより、生物防除資材として高い効果を期待できる融合株 13 系統を最終的に選抜した。

5-3 ダイズシストセンチュウをターゲットとしたスクリーニング

Shinya ら (2008a) は、より効果的な対センチュウ用糸状菌製剤を開発する上で、プロトプラスト融合が有用な手段か否かを検討した。温室内のポット試験において、3 種の親株 (Vertalec®, Mycotal® および B-2) とそれらの融合株 162 菌株のうち、ダイズシストセンチュウ *H. glycines* (SCN) の防除に有効な系統を選抜した。いくつかの融合株は、土壌中の SCN 密度を低下させ、ダイズ植物体への被害を抑制した。特に、AaF42 (Vertalec: *L. longisporu* × Mycotal: *L. muscarium*) は対照区と比較して SCN 卵密度を 93% 低下させ、すぐれた効果を示した (図 2)。さらに、この系統は親株と比較しても、シスト数と卵密度を著しく減少させた。

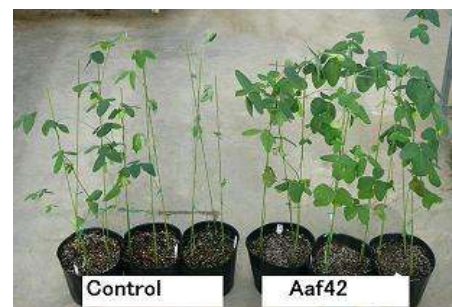


図2 選抜した融合株 AaF42 (Vertalec×Mycotal) のダイズシストセンチュウ被害抑制効果

また Shinya ら (2008b) は、SCN の成熟卵、未熟卵 (J1 未満の受精卵) および J2 における *Lecanicillium* 融合株の培養濾液の効果についても評価し、それらを親株と比較した。いくつかの融合株の培養濾液は、成熟卵の孵化を抑制し、特に AaF23 と AaF42 (Vertalec: *L. longisporum* × Mycotal: *L. muscarium*) は、未熟卵に対して高い孵化抑制作用を示した。しかし、多くの融合株は J2 に影響を与えなかった。これらの結果は、培養濾液中の酵素または他の代謝産物が、SCN の特定の生育段階に対して活性を有することを示唆している。加えて、各菌株の培養濾液による卵形態の変化を視覚的に評価すると、融合株と親株の間でその活性物質が未熟卵へ及ぼす作用に違いが認められた。プロトプラスト融合によってゲノムが改変された結果、親株より活性物質の産生量が増加したと考えられる。以上のことから、*Lecanicillium* 融合株により産生された活性物質は、SCN の被害抑制に関し重要な役割を果たしている可能性がある。

最後に、Shinya ら (2008c) は SCN 静止段階に対する *Lecanicillium* 融合株の病原性と作用機作を調査した。3つの異なる SCN 静止段階 (黄色雌成虫、未熟シスト、成熟シスト) に融合株を接種し、素寒天培地上で培養した。接種後3週目に (i) 卵寄生率、(ii) 蔵卵数、(iii) 成熟健全卵数を調査した。さらに、産卵数に関しては、より詳細な調査を実施した。その結果、いくつかの系統では、卵に対する感染能力が非常に高く、黄色雌成虫内の蔵卵数および成熟卵数を有意に減少させた。以上から、融合株は SCN シストより雌成虫に効果があり、SCN に対し複数の作用を及ぼす可能性が示唆された (図3)。

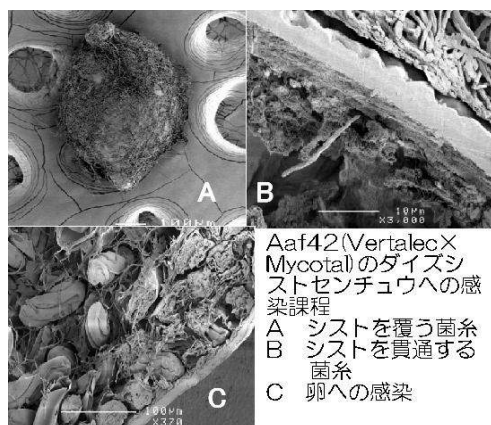


図3 ダイズシストセンチュウのシストにおける Aaf42 の感染過程

結論として、プロトプラスト融合により作出した

融合株の中に、高い防除効果を示す系統が認められた。それゆえ、微生物防除資材の製剤化に向けた *Lecanicillium* 属菌の育種において、プロトプラスト融合は有用な技術となるだろう。

6. *Lecanicillium* 属菌を用いたキュウリうどんこ病とアブラムシの同時防除

Lecanicillium 属菌の中で、*L. attenuatum*, *L. longisporum* およびリボゾーム RNA 遺伝子のシーケンス解析により、既知の種 (Zare & Gams, 2001) と相同性が見られなかった株 (DAOM 198499, Bissett, 私信) の3種は、アブラムシ防除とともに、キュウリうどんこ病菌 *Sphaerotheca fuliginea* の生育と孢子形成を抑制する可能性を示した (Askary et al., 1998; Kim et al., 2007, 2008)。

Askary ら (1998) は3系統の *Lecanicillium* 属菌 (DAOM 198499, 216596 および Vertalec (全て旧 *V. lecanii* として分類) を用いてチューリップヒゲナガアブラムシ *Macrosiphum euphorbiae* と *S. fuliginea* に対する防除効果を比較し、DAOM 198499 が同時防除において最も優れた効果を示したことを報告した。また、Vertalec はアブラムシに対しては有効であるが、キュウリうどんこ病に対しては効かないと述べている。Kim ら (2007) はキュウリうどんこ病に対する防除効果の検定をリーフディスク上で実施した。しかし、2系統間の作用に有意な差は認められなかった。Askary ら (1998) と Kim ら (2007) との結果が異なるのは *S. fuliginea* の系統の違いによるものと推測できる。さらに、*Lecanicillium* 属菌3系統を用いて上記の検定を実施したところ、キュウリうどんこ病に対する分生子と blastospore 間で防除効果に有意差は認められなかった (Kim et al., 2007)。

彼らは、続いてキュウリ植物体全体を用いたバイオアッセイを実施し、ワタアブラムシと *S. fuliginea* のどちらか一方、もしくは双方が蔓延したキュウリへ Vertalec を接種した (Kim et al., 2008)。対照として、放射線照射で不活性化した Vertalec (IR-Vertalec) も以降の実験に供試した。Vertalec はアブラムシ成虫に対し高い病原性 (LT50 値が7日) を示したが、IR-Vertalec はアブラムシへ影響を与えなかった。これに対し、

Vertalec は放射線処理の有無にかかわらず、水だけを有意に抑制した。同時防除の試験では、キュウリ植物体上でアブラムシを放飼し、*S. fuliginea* を接種した翌日、Vertalec を追接種した。その結果、アブラムシの生存数とうどんこ病菌の孢子形成は、水こ病の同時防除における Vertalec の有用性が示された (Kim et al., 2008)。Vertalec の処理によって、キュウリ葉面上にアブラムシとうどんこ病のどちらか一方、もしくは両方を接種したいいずれの場合でも病害虫の抑制力が認められた。

7. 結論

微生物農薬としての *Lecanicillium* 属菌の能力は多岐に渡る。また、自然界から分離された *L. longisporum* はアブラムシやうどんこ病に対して高い防除効果を示し、プロトプラスト融合が宿主範囲の拡大や効果の増大をもたらした。*Lecanicillium* spp. は昆虫寄生菌でありながら拮抗性や寄生性、誘導抵抗性により複数の植物病や害虫、線虫の防除において効果的な資材になることが期待される。しかし、我々の知る限りでは植物病原体や植物寄生性線虫防除用に製剤化された *Lecanicillium* 属菌はない。現在、プロトプラスト融合株については (株) アリスタライフサイエンスと共同研究中であり、オランダ・Koppert 社において製剤化が進んでおり、世界初のデュアルコントロール (害虫と病気を同時に防除する) 微生物資材を目指して実用化に向けた研究が進行中である。

引用文献

- Aiuchi et al. (2004) IOBC/WPRS Bull. 27, 127-130.
- 相内ら (2007) 応動昆 51, 205- 212.
- Aiuchi et al. (2008) Micol. Apl. Int. 20, 1- 16.
- Askary et al. (1997) Phytopathology 87, 359-368.
- Askary et al. (1999) J. Invertebr. Pathol. 74, 1- 13.
- Askary et al. (1998) Biocontrol Sci. Technol. 8, 23
- を処理した対照区と比べて *S. fuliginea* の孢子形成処理の対照区と比較して、処理後 15 日目に有意に減少した。加えて、アブラムシ存在下ではうどんこ病菌の孢子形成が抑制されることもわかった。
- さらに温室実験で、アブラムシとキュウリうどんこ - 32.
- Benhamou & Brodeur (2000) Phytopathology 90, 932- 943.
- Benhamou & Brodeur (2001) Physiol. Mol. Plant Pathol. 58, 133- 146.
- Chen & Chen (2003) J. Nematol. 35, 271- 277.
- Claydon & Grove (1982) J. Invertebr. Pathol. 40, 413- 418.
- Correll et al. (1987) Phytopathology 77, 1640-1646.
- Dik et al. (1998) Eur. J. Plant Pathol. 104, 413-423.
- de Faria & Wraight (2007) Biol. Control 43, 237-256.
- Gams & Zare (2001) Nova Hedwigia 72, 329-337.
- Gan et al. (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 1309- 1317.
- Gindin et al. (1994). Phytoparasitica 22, 189-196.
- Goettel et al. (2005) In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.), Comprehensive Molecular Insect Science, vol. 6. Elsevier, Oxford, pp. 361 - 406.
- Hirano et al. (2009) Res. Bull. Obihiro Univ. 29, 83-95.
- Irving & Kerry (1986) Nematologica 32, 474-485.
- Kang et al. (1996) Korean J. Mycol. 24, 49- 55.
- Kavkova & Curn (2005) Mycopathologia 159, 53- 63.
- Kim & Riggs (1991) J. Nematol. 23, 275- 282.

- Kim et al. (2007) *Biol. Control* 40, 327- 332.
- Kim et al. (2008) *Biol. Control* 45, 404-409.
- Kiss (2003) *Pest Manag. Sci.* 59, 475- 483.
- Koike et al. (2004) *IOBC/WPRS Bull.* 27, 41- 44.
- 小池ら (2007) *応動昆* 51, 234- 237.
- Koike et al. (2007) US National Phase Appl. No. 11/568,369, 371(c).
- 楠木ら (2006) *Res. Bull. Obihiro Univ.* 27, 99- 107.
- Leinhos & Buchenauer (1992) *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 99, 482- 498.
- Meyer et al. (1990) *J. Nematol.* 22, 532- 537.
- Meyer et al. (1996) *Fundam. Appl. Nematol.* 19, 305- 308.
- Meyer et al. (1997) *J. Nematol.* 29, 282- 288.
- Miller et al. (2004) *Biocontrol Sci. Technol.* 14, 215 - 220.
- Nguyen et al. (2007) *Biocontrol Sci. Technol.* 17, 1047- 1058.
- Ownley et al. (2004) In: Lartey, R.T., Caesar, A.J. (Eds.), *Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost, India*, pp. 255 - 269.
- Ownley et al. (2008) *J. Invertebr. Pathol.* 98, 267 - 270.
- Ownley et al. (2010) *BioControl* 55, 113-128.
- Shinya et al. (2008a) *J. Invertebr. Pathol.* 97, 291 - 297.
- Shinya et al. (2008b) *Appl. Entomol. Zool.* 47, 227-233.
- Shinya et al. (2008c) *Jpn. J. Nematol.* 38, 9-18.
- Spencer & Atkey (1981) *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77, 535- 542.
- Sugimoto et al. (2003) *J. Invertebr. Pathol.* 82, 176- 187.
- Verhaar et al. (1997) *Biocontrol Sci. Technol.* 7, 543- 551.
- Verhaar et al. (1998) *Biocontrol Sci. Technol.* 8, 465- 477.
- Zare & Gams (2000) *Nova Hedwigia* 71, 465- 480.
- Zare & Gams (2001) *Nova Hedwigia* 73, 1- 50.

平成 22 年度総会および第一回講演会のお知らせ

下記の日程にて生物学的防除部会の平成 22 年度総会および第一回講演会を開催致します。皆様のご参加をお待ち致します。

記

平成 21 年度総会および第一回講演会の開催

総会開催

日時 平成 22 年 6 月 10 日（木） 午後 3 時～3 時 30 分
場所 東京農業大学世田谷キャンパス 2 号館 3 階 国際農業開発学科会議室
議題 1. 平成 21 年度事業報告
2. 平成 21 年度会計報告および監査報告
3. 平成 22 年度事業計画（案）
4. 平成 22 年度予算（案）
5. その他

講演会 上記総会終了後、同場所にて引き続き開催します。
講演 演題 1 「世界の農薬動向と欧米での農薬を取り巻く環境変化」
演者 田中俊美氏 (株)シプカム・ジャパン
演題 2 「迫りくる園芸作物栽培の危機—ミツバチの運命は？」
演者 下松明雄氏

なお、講演会終了後には、講演者を囲んでの懇親会を予定しています。
是非ご参集ください。

発行 東京農業大学総合研究所研究会
生物学的防除部会（代表 榊井昭夫）
〒156-8502 東京都世田谷区桜丘
1-1-1
TEL 03-5477-2411（直通）
FAX 03-5477-4032
e-mail t3adati@nodai.ac.jp

