

植物防疫基礎講座

農業害虫および天敵昆虫等の薬剤感受性検定マニュアル(40)

昆虫病原性線虫(天敵線虫スタイナーネマ)

株式会社エス・ディー・エスバイオテック たなべ ひろし やまなか さとし 田辺 博司・山中 聡

I 天敵線虫における薬剤感受性評価

我が国において昆虫病原性線虫(以下、天敵線虫とする)が生物農薬としてはじめて商品化されたのは *Steinernema carpocapsae* (商品名バイオセーフ) である。本剤は1993年に芝草の重要害虫であるシバオサゾウムシ幼虫ならびにスジキリヨトウ、シバツトガ、タマナガ等の鱗翅目幼虫を対象に販売が開始された。

その後、芝草地のコガネムシ類、シバオサゾウムシ幼虫を対象とした *Steinernema kushidai* (商品名芝市ネマ) が1997年に農薬登録され、翌2000年には *Steinernema glaseri* (商品名パイオトピア) が芝草地のコガネムシ類幼虫、カンショのコガネムシ類幼虫を対象に上市された。

これらの天敵線虫製剤は、化学農薬にも広く耐性を持つ耐久型の生育ステージである感染態3期幼虫を製剤化したものである。したがって、天敵線虫における薬剤感受性評価は、野外においてこの天敵線虫と併用できる化学農薬を明確にするということだけではなく、混合施用による殺虫効果の向上や化学農薬投入量の軽減化を期待した研究が行われてきた。

II 化学農薬との混用適合性

現在、国内において普及している天敵線虫製剤は水和剤または水和顆粒(WDG)であり、通常の化学農薬と同様に希釈、散布できる。ただし、確実な防除効果を得るには、線虫を散布した後「後散水」を行い、線虫を効果的に土壤中へ到達させる必要がある。芝草の土壌害虫を対象とする場合、通常の施用量は25万頭/m²であるが、その際300 ml/2 l/m²の水量が必要となる。これに加えて、後散水を行うと化学農薬の散布に比べ総水量が多くなり、労力軽減の目的で、除草剤など他の薬剤と

混用あるいは近接散布する場合が多い。

また、天敵線虫製剤は対象害虫の幼虫期が防除対象ステージであるため、成虫防除に別途殺虫剤を散布する場合や病害に弱い洋芝では殺菌剤との同時施用が必要となる場合もある。

したがって、ゴルフ場での使用では、特に、混用適合性や散布間隔を明確におこなねばならない。

一方、海外では、IPM(総合的害虫管理)の観点から、多くの化学農薬との混用適合性を評価する研究が1980年代初頭より積極的に行われてきた。

S. carpocapsae は、極めて広範な化学農薬に対し耐性を持つことが知られており、混用の可能性が示唆されているが(ROVESTI and DESEO, 1990)、一部の有機リン剤(フェナミホス)、カーバメート剤(メソミル、オキサミル)では、宿主昆虫体内での線虫の生育や増殖性に影響があることがわかっている(HARA and KAYA, 1982; HARA and KAYA, 1983 a; HARA and KAYA, 1983 b)。また、ROVESTIら(1988)は、*Heterorhabditis bacteriophora* に対する化学農薬75剤の影響を薬剤溶液への直接浸漬法で評価し、酢酸トリフェニル錫、ドジン、カルベンダジム(殺菌剤)、アラクロル、パラコート(除草剤)、パラチオン、ホレート、テルブホス、フォノホス、イソフェンホス+フォキシム、アルジカルブ、カルボフラン、メソミル(殺虫剤)、フルベンザミン(殺ダニ剤)、メタムナトリウム、フェナミホス(殺線虫剤)の16剤が実用濃度以下で影響があることを報告している。

これらの実験室レベルでの薬剤感受性評価は、通常長時間各薬剤の水溶液に浸漬してその生死や、生育、増殖性への影響を評価している。これは、天敵線虫にとっては極めて過酷な条件であり、この条件で影響が認められない剤は天敵線虫に対し実場面でも影響がないといえる。

一方、野外で実際に同時施用した場合、線虫が直接薬液に暴露される時間は限られており、処理後、土壤中に残留した農薬が、直接浸漬した場合と同等のダメージを与える可能性は低い。したがって、ここで影響があるとされている剤でも実場面で致命的な影響には至らないものもあると考えられる。

Methods for the Measurement of Susceptibility of Agricultural Insect Pests and Natural Enemies to Pesticides. (40) Entomopathogenic Nematodes. By. Hiroshi TANABE and Satoshi YAMANAKA

(キーワード: 昆虫病原性線虫, 天敵線虫, スタイナーネマ, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, IPM, 総合防除, 化学農薬, 混合施用)

筆者らが *S. carpocapsae*, *S. glaseri* について現在使用されている芝草用化学農薬約 40 剤について、実場面における線虫への影響を独自に評価したところ、混用で線虫の効果に致命的な影響を及ぼす剤はわずか数剤であり、これらの薬剤も混用ではなく、数日から1週間程度間隔において近接散布することで、線虫の効果発現に対する影響は消失した。

III 農薬との混用による活性向上

1 行動特性への影響

石橋ら (1993 a, b) は、直接浸漬法で影響がある剤でも、圃場で *S. carpocapsae* と混合施用すると、各々単独で施用するよりも高い防除効果が得られることを示した。これは低薬量の化学農薬が線虫の宿主に対する感染行動を向上させる効果があることに起因している。

天敵線虫の特徴的な宿主探索行動の一つとして Nictation (線虫が尾部末端を土壌粒子などに固定し、垂直に立ちあがった状態で静止し、宿主昆虫が近づくと待ち受ける) という行動があり、アセフェート、パーメスリン、オキサミル等の低濃度溶液 (50 ppm) に浸漬処理すると、この行動をとる線虫が有意に多くなり、ハスモンヨトウ幼虫に対する感染力が向上することを示した。

これらの化学薬剤は天敵線虫が感染性を持たないアブラムシ等の吸汁性害虫や植物寄生性線虫防除に用いられる剤であり、鱗翅目、鞘翅目幼虫類に感染力が高い天敵線虫と混用、体系的処理を行うことで総合防除手段として極めて有望であり、今後の研究課題として非常に興味深い部分である。

2 混用による活性向上

コガネムシ幼虫類に対する化学殺虫剤の表面散布では、薬剤が生息部位にまで浸透せず、十分な効果が望めない。一方、天敵線虫の中でも、土壌中で宿主昆虫を探索して感染することができるクルーザータイプ (探索型、これに対し、宿主昆虫が近寄ってくるのを待ち受けるタイプの線虫はアンブッシュタイプ、待伏型と呼ばれる) の線虫はこれらの土壌害虫防除に効果的な線虫である (GAUGLER and CAMPBELL, 1991)。しかしながら、対象害虫の生育ステージ、環境要因などの条件が満たされていないと、この効果的な性質が発揮できず、線虫単独での効果が不十分となることもあり得る。したがって、これを補足するために化学農薬や他の生物農薬との混合施用により安定した防除効果を得る研究も行われている。

KOPPENHÖFER and KAYA (1998) は、殺虫剤イミダクロ

プリドが昆虫病原性糸状菌の感染力を有意に向上させる現象に着目し、天敵線虫 (*H. bacteriophora*) とイミダクロプリドを混用することで、相乗効果ともいえる高い防除効果が得られることを見出した。

このような、天敵線虫にとって「共力剤」として利用できる化学農薬の種類、方法、作用機作などを明らかにしていくことで、総合防除の概念に促した体系防除技術が見出される期待は大きい。

IV 薬剤感受性評価法

1 供試生物の準備

冒頭に示したように、すでに国内で3種の天敵線虫が上市されており、これらの入手は容易である。通常、製剤の状態では5°Cで保存すれば製造日から3か月程度の保存が可能である。しかし、供試線虫の生理的な条件を統一して評価するためには、昆虫へ感染、増殖させた感染態3期幼虫を用いるのが望ましい。

天敵線虫の増殖法:

(1) 直径6 cmのシャーレにろ紙を敷き、天敵線虫を任意の濃度に希釈した溶液を作成し、約200~1,000頭/0.4 ml/シャーレを接種する。

(2) ハチミツガ終齢幼虫であれば3~5頭/シャーレ、コガネムシ類3齢幼虫であれば1頭/シャーレを放飼し、25°C暗黒下に3~4日間静置する。

(3) 死亡した昆虫を取り出し、滅菌水に浸漬して体表を洗浄し、新たにろ紙敷きのシャーレ等に移す。

(4) 10~14日間程度25°C (±3°C) 暗黒下に静置すれば、宿主昆虫体内で生育増殖した次世代の感染態幼虫が宿主体外へ出現するので、これらの線虫を洗い出し、試験管等を集める。

(5) 蒸留水10~20 mlで3回沈殿洗浄した後、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液に15分間程度浸漬する (感染態3期幼虫以外のステージを除去する)。

(6) 再度蒸留水で3回洗浄した後に、ペールマン法により洗浄過程に発生した死亡線虫、ゴミなどを除去する。

(7) 3時間程度で遊出した健全な線虫だけを回収する。得られた線虫は、滅菌蒸留水の懸濁液とし、5~10°C下に保管し、回収から2週間以内の線虫を各種試験に供試する。

2 混用適合性評価法

天敵線虫の混用適合性を評価するには、実用濃度の各薬剤溶液に一定時間浸漬処理し、線虫の生死を調査するのが一般的である。ただし、天敵線虫の実場面での効果は、宿主昆虫への感染力 (線虫の侵入数) や、死亡宿主

体内で増殖した次世代線虫の二次感染なども野外での持続的な効果発現には重要である。したがって、薬剤浸漬による線虫の生死だけではなく、侵入線虫数、増殖性なども確認する必要がある。以下に ZIMMERMAN (1990) が示した方法の改変法を示す。

(1) 各供試薬剤は、実用濃度に希釈調整し、直径 35 mm 高さ 10 mm のシャーレに 4 ml ずつ分注する。

(2) 供試線虫懸濁液を約 400 頭/0.1 ml になるよう調整し、薬剤を分注したシャーレに接種する。薬剤や水分の蒸発などで、条件が変化しないよう、パラフィルムでシールしておく。対照には蒸留水のみを使用する。

(3) 各剤ごとに 3 連制で試験を行い、1~24 時間(試験目的に応じて設定する)浸漬後、各シャーレ内の溶液を良くかくはんして、ピーターの 1 ml 計数盤に取り、線虫の生死数を顕微鏡下で調査する。

(4) 静止している線虫は、目視調査だけでは生死判別が難しいので、細い針などで刺激を与えて確認する。

(5) 残った線虫一薬剤懸濁液を 1 ml とり、ろ紙敷きの直径 9 cm シャーレに接種し、ハチミツガ終齢幼虫 10 頭(×3 連制)を放飼し、25°C 暗黒下に置く。

(6) 処理 2 日後、3 日後に供試昆虫の生死を調査する。死亡虫は体表を滅菌蒸留水で洗浄した後、新たなろ

紙敷きシャーレに移し、25°C 暗黒下に置く。

(7) 死亡 5 日後に虫体を解剖し、感染した線虫の生育、増殖状況を確認する。また、死亡昆虫の一部は、解剖せず次世代の感染態幼虫が正常に出現するかどうかを確認する。

3 行動特性評価法

本法は、薬液浸漬による Nictation 行動の変化を評価し、さらに、この行動を取る個体の昆虫に対する感染力の変化を評価する手法である (ISHIBASHI and TAKII 1993 a)。ただし、本報告で調査対象としているのは *S. carpocapsae* 1 種であり、Nictation 行動をとらない線虫種では本法での評価はできない。

(1) 約 20,000 頭の感染態幼虫を 4 ml の薬液に懸濁し、直径 6 cm のシャーレに分注する。

(2) パーク堆肥を 1 mm のふるいにかけて乾熱滅菌したものを 2 g ずつ深さ約 4~5 mm になるように上記のシャーレに入れる。

(3) パーク堆肥表面にナイロンシープ (125 μm 孔, 6×6 cm) を置き、25°C 暗黒下で 24 時間静置する。

(4) シャーレ表層で Nictation 行動をとっている線虫を集めるために、ナイロンシープを取り出し、これを蒸留水をいれた 15 ml 遠沈管に入れて線虫を洗い出す。

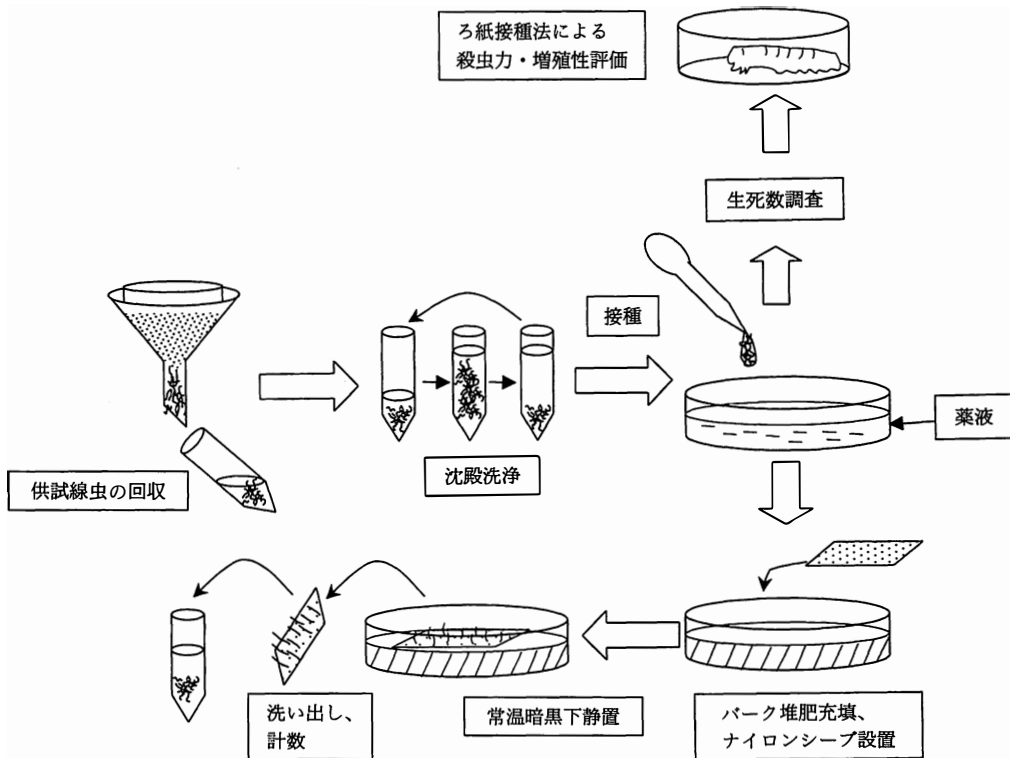


図-1 天敵線虫の薬剤感受性評価法概略図

(5) 遊出した線虫数を計数し、薬剤処理による Nictation 行動をとる個体数の変化を調査する。

(6) その後、約 50~100 頭/0.4 ml の線虫懸濁液を調整し、ろ紙敷きのシャーレに接種してハスモンヨトウ 終齢幼虫 1 頭を放飼する。

(7) 1 薬剤につき 3 連制で行い、適宜反復を取る。処理後 4~5 日後まで、供試昆虫の生死を確認し、各供試薬剤処理による感染力の変化を調査する。

4 半野外試験

化学薬剤との併用の可否を判断するためには、より実場面に近い条件で試験する必要がある。ここでは、KOPPENHÖFER (1998) らの示したポット試験法を参考とした。

(1) 1 l ポット (直径 14 cm, 高さ 11 cm) に砂壤土 (砂 87%, シルト 7%, クレイ 6%, 有機物 0.3%, pH 6.9) を高さ 9 cm 程度まで充填する。

(2) 洋芝 (ペレニアルライグラス) を播種し温室内に静置し、3~5 週間程度経過したポットを試験に供試する。

(3) 試験を開始する 3 日前にコガネムシ終齢幼虫 9 頭を放飼しておく。24 時間以内に土壤中へ潜行しない供試昆虫は別の個体に交換する。

(4) 室温、地温とも 25°C 前後になるように管理する。

(5) ポット表層に天敵線虫約 4,000 頭/50 ml の懸濁液を均一に処理し、さらに、同量の水を処理して葉面などに残っている線虫を洗い流す。

(6) この線虫処理の際に混用適合性を評価する薬液を処理する。直接混合や、後散水を薬剤溶液とするなどいくつか条件が考えられるので、評価目的にそって、その都度試験を設計する。

(7) 近接散布による影響を評価する場合は、線虫を処理する前、または後に一定の日数 (1~7 日間) をおいて、薬剤を処理しておく。影響の有無により、処理間隔を長くして追試験を行う。

V 今後の問題点

天敵線虫製剤と化学農薬との併用の可能性を評価する場合、供試する薬剤の原体成分の影響よりも、製剤中に含まれる成分、特に乳剤型の薬剤では有機溶媒などが線虫に対して悪影響を及ぼす場合がある。したがって、既知の化学農薬であっても、剤型が変更されれば、併用の可能性が変化することも考えられ、今後の天敵線虫の安定使用、普及のためには迅速な影響性評価が必要である。

一方、長時間の直接浸漬法により線虫への影響の有無が論じられている過去の多くの検討では、薬剤の天敵線虫に対する作用機作、感染行動に対する薬剤の構造活性相関など、生物学的、毒物学的検討は全くなされてない。これらのことが明らかにされれば、併用の可能性はもちろん、体系的に用いることができる効果的な化学農薬もより明確になってくるものと思われる。

今後、天敵線虫製剤が総合防除の一端を担う生物農薬として普及していくためにはこれらの知見が重要である。

引用文献

- 1) HARA A. H. and H. K. KAYA (1982): J. Nematol. 14 (4): pp. 486~491.
- 2) _____ (1983 a): J. Econm. Entomol. 76(3): pp. 423~426.
- 3) _____ (1983 b): Environ. Entomol. 12: pp. 496~501.
- 4) GAUGLER R., and J. F. CAMPBELL (1991): Annals of Applied Biology 119: pp. 131~138.
- 5) ISHIBASHI, N. and S. TAKII (1993 a): J. Nematology 25(2): pp. 202~213.
- 6) ISHIBASHI N., (1993 b): Nematodes and the biological control of insect pests, Ed. Bedding R. et al. CSIRO Publications. pp. 105~113.
- 7) KOPPENHÖFER A. M. and H. K. KAYA (1998): J. Econ. Entomol. 91(3): pp. 618~623.
- 8) ROVESTI L and K. V. DESEO (1990): Nematologica 36: pp. 237~245.
- 9) ROVESTI L et al., (1988): Nematologica 34: pp. 462~476.
- 10) ZIMMERMAN R. J. and W. S. CRANSHAW (1990): J. Econ. Entomol., 83(1): pp. 97~100.

人事消息

(11月16日付)

植原健人氏 (北海道農試生産環境部線虫研究室) は、国際農林水産業研究センター生産利用部併任 (平成 12 年 12 月 31 日まで)

訃報

小林次郎氏 (元 秋田県農業試験場環境部主任専門研

究員、元 秋田県植物防疫協会 享年 74 才) におかれましては、12 月 1 日にご逝去されました。謹んでお悔やみ申し上げます。ご自宅は、秋田市保戸野金砂町 7-37。

岩崎真人氏 (現 農水省北海道農業試験場生産環境部 ウイルス研究室長) におかれましては、平成 12 年 12 月 11 日くも膜下出血のためご逝去されました。謹んでご冥福をお祈りいたします。