

## 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(42)

## 天敵生物：糸状菌製剤

静岡県科学技術室 さい西 とう東 つとむ力

## はじめに

昆虫に寄生する糸状菌は数多くの種類が知られている(青木, 1989)。このうち、*Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Aschersonia aleyrodis*などは製剤化され微生物農薬として使用されている(西東, 1994)。我が国では *V. lecanii* 製剤がキュウリのワタアブラムシ, およびナス, ピーマンのアブラムシ類を対象として, また *B. brongniartii* 製剤がカンキツ, カエデのゴマグラカミキリ, およびイチジク, クワのキボシカミキリを対象として, それぞれ農薬登録されている。

*V. lecanii* 製剤は, アブラムシ類(西東, 1988)のほかにも, コナジラミ類(西東, 1993; 増田・菊地, 1993), ミナミキイロアザミウマ(西東, 1992)などに対する防除効果が実証されており, 施設園芸における総合的な病害虫管理技術の一翼を担う防除資材と見られている。このため, 本菌に対する薬剤の影響については比較的よく研究されている。

ここでは *V. lecanii* を例にとって, 薬剤が昆虫寄生菌に及ぼす影響を調べる手法を紹介したい。

## I 薬剤の影響の概況

薬剤が昆虫寄生菌の働きを低下させる場面は二つ想定される(西東・薮田, 1996)。一つは, 寄生菌散布の前後に薬剤を散布したケースで, 分生子の発芽が阻害され感染しにくくなることである。もう一つは, 寄生菌に感染・死亡した病死体に薬剤が散布されたケースで, 死体上への菌糸の発育が阻害されるため, 分生子は形成されなくなり, 伝染源として役割を果たさなくなることである。*V. lecanii* では, こうした薬剤の影響について培地上の試験(WILDING, 1972; OLMERT and KENNETH, 1974; HALL, 1981; 西東, 1988; 西東・薮田, 1996)ならび

に寄主を用いた試験(WILDING, 1972; HALL, 1981; 西東・薮田, 1996)の両面から検討されている。

表-1は, 薬剤添加培地を用いて分生子の発芽と菌糸の発育の状況を調べたものである。この結果を見ると, 殺菌剤の多くが強度の阻害作用を示し, また殺虫剤の中にも作用の強いものが存在することがわかる。ただし, 分生子発芽と菌糸発育に対する影響の強さは必ずしも一致していない。例えば, TPNは分生子の発芽を完全に阻害しているが, 菌糸の発育に対する作用はあまり強くない。また, ベノミル, フェナリモル, トリホリン, NACでは文献によって作用の強さが大きく相違しており, この原因として菌株による薬剤感受性の違い(OLMERT and KENNETH, 1974; HALL, 1981), 製剤に含まれる界面活性剤や増量剤の違い, 実験方法の違いなどが考えられる。

表-2は, 寄主のアブラムシを用いて薬剤の散布が感染を阻害するかどうかを調べた結果である。この結果によると, 薬剤散布後に菌液を散布したり, 薬剤と菌液を同時に散布した場合は, 薬剤(キャプタン, チウラムなど)によっては感染率を著しく低下させるが, 菌液散布後に薬剤を散布した場合は, 薬剤の種類にかかわらず比較的よく感染している。

表-3は, 本菌に感染させたオンシツコナジラミ幼虫に薬剤が付着した場合, 病死体上に菌糸が発育するかどうかを調べたものである。キノメチオネート, トリフルミゾール, ベノミルなどは病死体上への菌糸の発育を抑制することから, こうした薬剤を本菌散布後に使用した場合は, 分生子の形成量が減少し, 病気がまん延しにくくなることが考えられる。

上記のような実験結果に基づいて, *V. lecanii* と併用できる薬剤と併用しにくい薬剤がそれぞれ選定されている(LEDIEU, 1985; HASSAN and OOMEN, 1985; 西東・薮田, 1996)。また, 本菌と殺菌剤の散布間隔の検討も行われており, 影響の大きい殺菌剤を使用した場合は7日以上経過してから本菌の散布を行う必要があるとされている(GARDNER et al., 1984)。

ちなみに, *V. lecanii* の他にも *B. bassiana* (OLMERT and KENNETH, 1974; RAMARAJE URS et al., 1967; CLARK

Methods for the Measurement of Susceptibility of an Entomopathogenic Fungus, *Verticillium lecanii*, to Chemicals. By Tsutomu SAITO.

(キーワード: 昆虫病原糸状菌, パーティシリウム・レカニ, 薬剤感受性, 検定法, アブラムシ, コナジラミ)

et al., 1982; 西東, 1984; 藪田・西東, 1994), *M. anisopliae* (RAMARAJE URS et al., 1967; TEDDERS, 1981), *A. aleyrodis* (柳沼・於保, 1983), *N. rileyi* (IGNOFFO et al., 1975; JOHNSON et al., 1976), *Hirsutella* spp. (McCoy, 1977), *Entomophthora* spp. (SOPER et al., 1974; HOSTETTER et al., 1983) などで、それぞれ薬剤の影響が調べられている。

## II 培地上の試験

### 1 分生子の発芽に及ぼす影響 (西東・藪田, 1996) :(表-1)

薬剤添加培地に分生子を投入して発芽状況を調べる方法である。

#### 培地

サブロー液体培地および同寒天培地を用いる。PDA培地を用いてもよい。

#### 分生子懸濁液の調製

寒天培地で3週間ほど培養した菌体に滅菌蒸留水(界面活性剤トリトンX-100を0.02%加溶)を加え、ガラス棒などで軽くかき混ぜて分生子を懸濁させる。これを滅菌ガーゼでろ濾して菌糸や分生子の塊を除去したのち、遠心分離機(1,000 rpm, 3~5分)を用いて滅菌蒸留水で2回洗浄し、最終的に $10^7$ 個/mlの分生子を含む懸濁液を調製する。

#### 薬液の調製

液体培地に所定量の薬剤を添加し、十分に攪拌したものを薬液とする。薬剤の濃度は常用濃度(通常は1,000倍希釈)とするが、低濃度における影響も調べる場合は、3,000倍希釈, 10,000倍希釈等の濃度段階を追加する。ただし、検定の際に分生子懸濁液と混合(1:1)するので、薬液の調製段階では薬剤、培地とも設定濃度の2倍の濃度としておく。

#### 検定の手順

①分生子懸濁液と薬液を1:1の割合で混合したのち、プラスチック製のマイクロテストプレート(12×8 cm, 高さ1.2 cm, ホール直径8 mm, 96ウェル)に0.5 ml ずつ分注し(\*) (\*\*), ふたをして、25°Cの恒温器に収納する。1処理当たり4~5ウェルを使用する。

(\*)マイクロテストプレートの代わりにホールグラスを用いる手法もある(富山ら, 1962)。すなわち、分生子懸濁液と薬液の混合液を少量、白金耳でカバーグラスにつけ、これを裏返してホールグラスのホール部にかぶせる。この際、ホールの縁にワセリンを塗っておき、カバーグラスとホールグラスを密着させる。シャーレにガラス棒で作ったU字管を入れ、この上にホールグラスを

置き、ふたをして、恒温器に収納する。発芽状況は、ホールグラスのまま検鏡することができる。

(\*\*)寒天培地の薄膜上に分生子懸濁液を滴下する方法もある(HALL, 1981)。すなわち、オートクレーブに

表-1 *V. lecanii* の分生子発芽および菌糸発育に及ぼす薬剤の影響

薬剤 <sup>a)</sup> (製剤)	分生子発芽阻害率(%)			菌糸発育阻害率(%) <sup>b)</sup>		
	文献1 <sup>c)</sup>	2 <sup>d)</sup>	3 <sup>e)</sup>	文献1	2	3
<b>殺菌剤</b>						
チウラム・W	100	100		88	92	
マネブ・W	100	100		77	75	50
キャプタン・W	100	100		52	61	73
TPN・W	100	100		19	28	47
キノメチオネート・W	100	30	100		42	65
ベノミル・W	100	0	67	78	69	81
フェナリモル・W	100		0	100		59
ジネブ・W	72	10	100	30	28	38
ピンクロゾリン・W	3	0		22	67	64
トリホリン・E	0	100		100	94	72
イプロジオン・W	0	97		18	67	50
トリフルミゾール・W		25	100		100	92
水酸化第二銅・W		17	0		11	5
チオファネートメチル・W		5			50	85
ホセチル・W		3			19	
メプロニル・W		0	15		36	44
ポリオキシシン・E		0	0		28	4
プロシミドン・W			15			32
硫黄・F			23			39
<b>殺虫剤</b>						
マラソン・E	100	45		64	50	
ダイアジノン・E	100	10		65	53	
テトラジホン・E	100			42		
ベルメトリン・E	12	0		5	39	
NAC・W	0	100		40	54	
ケルセン・E	0	10		58	69	
ピリミカープ・E	0	6		67	14	
DMTP・E		90			53	
MEP・E		70			72	
イソキサチオン・E		7			56	
PAP・E		3			53	
プロチオホス・E		3			44	
DDVP・E		1			67	
メソミル・W		1			17	
DEP・E		0			36	
ジメトエート・E		0			19	
ブプロフェジン・W		0			17	
カルタップ・WS		0			8	
アセフェート・W		0			0	

a) W: 水和剤, E: 乳剤, F: フロアブル, WS: 水溶剤, 薬剤の濃度: 文献1は250~2,000倍希釈, 文献2および3は1,000倍希釈。b) 阻害率(%) = {(対照区の発芽率 - 薬剤区の発芽率) / 対照区の発芽率} × 100。c) HALL (1981)。d) 西東 (1988)。e) 西東・藪田 (1996)。

かけた寒天培地を熱いうちにスライドグラスに滴下して薄膜を作る。分生子懸濁液に所定濃度となるよう薬剤を添加したものを、この薄膜の上に1滴たらし。湿らせたろ紙を敷いたシャーレにガラス棒で作ったU字管を入れ、この上に被検液を滴下したスライドグラスをのせ、恒温器に収納する。検鏡時に水滴が培地に吸収され減少しているものは、薬剤の濃度が変化しているため棄却する。発芽状況を検鏡する際はカバーグラスをかける。

②恒温器に24時間収納した後、被検液をトーマ血球計算盤にとり、顕微鏡下で発芽率を調査する(\*)。発芽管の長さが分生子の長径の1/2以上のものを発芽とみなす。1ウェル当たり100個以上の分生子を検鏡する。

(\*)薬剤の微粒子が妨げとなって検鏡しにくい場合は、被検液を乾燥させたのち、ラクトフェノールに溶かしたコットンブルーで染色する(HALL, 1983)。

2 菌糸の発育に及ぼす影響(富山ら, 1962; 西東・藪田, 1996):(表-1)

薬剤添加培地に菌体片を接種し、菌糸の発育状況を調べる方法である。

培地

サブロー液体培地および同寒天培地を用いる。PDA培地を用いてもよい。

接種源の調製

3週間程度、平板培養したコロニーの外縁部からコルクボーラー(直径3~5mm)を用いて菌体片を打ち抜き、接種源とする。

薬剤添加培地の調製

オートクレーブで滅菌した寒天培地が40~50°Cに冷えたところで、所定量の薬剤を添加し、十分に攪拌した後、直径9cmのシャーレに分注する。薬剤の濃度は常用濃度(通常は1,000倍希釈)とするが、低濃度における影響も調べる場合は、3,000倍希釈、10,000倍希釈等の濃度段階を追加する。

検定の手順

①薬剤添加培地の中央に、接種源(菌体片)を菌叢面が接するように静置する(\*)。

(\*)薬剤添加培地の中央をコルクボーラーで打ち抜き、そこに接種源を埋め込む方法もある(HALL, 1981)。

②20~25°Cの恒温器で2~3週間培養したのち、シャーレの裏側からコロニーの直径を測定する。コロニーが楕円形の場合は、短径と長径の平均値を直径とする。1処理当たり5枚のシャーレを使用する。

III 寄主を用いた試験

1 感染に及ぼす影響(HALL, 1981):(表-2)

寄主(害虫)を用いて、薬剤(殺菌剤)の散布が感染を阻害するかどうかを調べる方法である。以下にモモアカアブラムシとキクヒメヒゲナガアブラムシを用いた実験例を示す。

寄主の飼育

鉢植えのキクでアブラムシを飼育し、1鉢当たり数百匹に増殖したところで実験に供する(\*)。

(\*)モモアカアブラムシの飼育にはチンゲンサイも適している。また、ワタアブラムシの飼育にはメロン、コナジラミ類にはインゲンマメが適している(西東, 未発表)。いずれも成虫を1~2日間放飼して一斉に産仔・産卵させると、その後の発育段階を揃えることができる。脱皮の影響を除くため、アブラムシ類は無翅の成虫を、コナジラミ類は4齢幼虫(蛹)を調査対象とする。

菌液の調製

前項に準じて調製した分生子懸濁液(10<sup>8</sup>個/ml)、あるいは *V. lecanii* 製剤を常用濃度(1,000倍希釈)に希釈したものを菌液とする。

薬液の調製

薬剤は常用濃度(通常は1,000倍希釈)に希釈して散

表-2 *V. lecanii* の散布前後に薬剤を散布した場合のアブラムシの感染状況 (HALL, 1981を改変)

薬剤 <sup>a)</sup> (製剤)	薬液散布の時期		
	菌液散布 1日前	菌液散布 と同時	菌液散布 1日後
<b>試験1</b>			
(キクヒメヒゲナガアブラムシ)			
キャプタン・W (80%)	— <sup>b)</sup>	—	+++
チウラム・W (80%)	—	—	+++
ジオキサチオン・W (30%)	++	++	+++
トリホリン・E (19%)	+++	++	+++
対照(菌液のみ)		+++	
<b>試験2</b>			
(モモアカアブラムシ)			
TPN・W (54%)	—	—	+++
ジネブ・W (70%)	++	—	++++
対照(菌液のみ)		+++++	
<b>試験3</b>			
(モモアカアブラムシ)			
キノメチオネート・W (25%)	—	—	+++
対照(菌液のみ)		+++++	

a) W: 水和剤, E: 乳剤, 薬剤の濃度は常用濃度(250~1,000倍希釈)。b) 菌液散布5日後の死亡率(%)を7段階に区分。—: 死亡率0%, +: 1~15%, ++: 16~35%, +++: 36~65%, ++++: 66~85%, +++++: 86~99%, ++++++: 100%。

布する。低濃度における影響も調べる場合は、3,000倍希釈、10,000倍希釈等の濃度段階を追加する。

#### 検定の手順

①寄主を寄生させた鉢植え植物の全体に小型ハンドスプレーなどを用いて菌液を散布し、飼育箱に入れる。飼育箱は、湿度を高めるため、密閉性のよいものを用いる。

②薬液の散布は、菌液散布の前日、当日および翌日に行う。散布には小型ハンドスプレーなどを用いる。

③飼育箱は、20°C、16L8D条件下で管理し、菌液散布の5日後に死亡率を調べる。1処理当たり5鉢を使う。

#### 2 病死体上の菌糸発育に及ぼす影響 (西東・藪田, 1996) : (表-3)

薬剤が病死体に付着した場合、菌糸の発育が阻害されるかどうかを調べる方法である。以下にコナジラミ類における実験例を示す。

#### 寄主の飼育

鉢植えインゲンマメ (摘心して初生葉のみとする) を飼育箱に入れ、多数の成虫を1~2日間放飼して一斉に産卵させる。この場合、1鉢当たりの産卵数が数百個となるよう放飼数と放飼期間を調節する。産卵させたインゲンマメはそのまま管理し、幼虫が3~4齢に達したところで実験に供する。

#### 菌液の調製および薬液の調製

前項に準ずる。

#### 検定の手順

①幼虫を寄生させた鉢植えインゲンマメに小型ハンド

スプレーを用いて菌液を散布する。感染しやすくさせるため、ビニール袋か密閉性の高い飼育箱に入れ、これを恒温器 (25°C, 16 L 8 D) 内で管理する。

②3日後 (病死体に菌糸が発育する前)、葉柄部で葉を切り取り、薬液に1分間ほど浸漬する。ペーパータオル上で風乾させたのち、湿らせたペーパータオルを敷いたトレーに移す。トレーをビニール袋に入れて恒温器 (25°C) に収納する。

③5~7日後、菌糸が発育している病死体と発育していない病死体を実顕微鏡下で数える。1処理当たりインゲンマメ葉を3~4枚使い、合計100匹以上を観察する。

#### 引用文献

- 1) 青木襄児 (1989) : 昆虫病原菌の検索, 全農教, 東京, 280 pp.
- 2) CLARK, R. A. et al. (1982) : Environ. Entomol. **11** : 67~70.
- 3) GARDNER, W. A. et al. (1984) : J. Econ. Entomol. **77** : 514~518.
- 4) HALL, R. A. (1981) : Ent. exp. Appl. **29** : 39~48.
- 5) HALL, R. A. (1983) : J. Invertebr. Path. **42** : 384~386.
- 6) HASSAN, R. S. and P. A. OOMEN (1985) : Biological Pest Control. The Glasshouse Experience (N. W. Hussey and N. Scopes eds.), Blandford Press, Drset, pp. 145~152.
- 7) HOSTETTER, D. L. et al. (1983) : J. Econ. Entomol. **76** : 619~621.
- 8) IGNOFFO, C. M. et al. (1975) : Environ. Entomol. **4** : 765~768.
- 9) JOHNSON, D. W. et al. (1976) : ibid. **5** : 964~966.
- 10) LEDIEU, M. (1985) : Biological Pest Control. The Glasshouse Experience (N. W. Hussey and N. Scopes eds.), Blandford Press, Drset, pp. 153~161.
- 11) 増田俊雄・菊地 修 (1993) : 北日本病虫研報 **44** : 191~193.
- 12) McCoy, C. W. (1977) : J. Econ. Entomol. **70** : 748~752.
- 13) OLMERT, I. and R. G. KENNETH (1974) : Environ. Entomol. **3** : 33~38.
- 14) RAMARAJE Urs, N. V. et al. (1967) : J. Invertebr. Pathol. **9** : 398~403.
- 15) 西東 力 (1984) : 応動昆 **28** : 87~89.
- 16) ——— (1988) : 同上 **32** : 224~227.
- 17) ——— (1992) : 関東病虫研報 **39** : 209~210.
- 18) ——— (1993) : 同上 **40** : 221~222.
- 19) ——— (1994) : 植物防疫 **48** : 465~468.
- 20) ———・藪田実男 (1996) : 応動昆 **40** : 71~76.
- 21) SOPER, R. S. et al. (1974) : Environ. Entomol. **3** : 560~562.
- 22) TEDDERS, W. L. (1981) : ibid. **10** : 346~349.
- 23) 富山宏平ら (1962) : 病原菌の生理. 植物病理実験法 (明日山秀文ら 編), (社)日本植物防疫協会, 東京: pp. 335~380.
- 24) WILDING, N. (1972) : Pl. Path. **21** : 137~139.
- 25) 藪田実男・西東 力 (1994) : 関東病虫研報 **41** : 249~250.
- 26) 柳沼勝彦・於保信彦 (1983) : 第27回応動昆大会講演要旨 p. 69.

表-3 *V. lecanii* に感染させたオンシツコナジラミ幼虫を薬剤で処理した場合の病死体上への菌糸の発育状況

(西東・藪田, 1996 を改変)

薬剤 <sup>a)</sup> (製剤)	菌糸が発育しなかった 病死体 (%) <sup>b)</sup>
トリフルミゾール・W (30%)	91
キノメチオネート・W (25%)	68
ベノミル・W (50%)	60
ジネブ・W (72%)	7
硫黄・F (52%)	0
水酸化第二銅・W (50%)	0
ジチアノン・W (70%)	0
プロシミドン・W (50%)	0
ポリオキシソ・W (10%)	0
メプロニル・W (75%)	0
対照 (水)	0

a) W : 水和剤, F : フロアブル, 薬剤の濃度 : 1,000倍希釈, b) 薬剤処理7日後に検鏡。