

ハスモンヨトウ核多角体病ウイルスの分離と 選抜クローンを用いた微生物農薬の実用化

岐阜県生物工学研究所 ^{かみ}神 ^や谷 ^{かつ}克 ^み巳
揖斐川工業株式会社 ^そ祖 ^ぶ父 ^え江 ^{ゆう}勇 ^き氣

はじめに

核多角体病ウイルス (Nuclear polyhedrosis virus ; NPV) は、バキュロウイルス科に属する昆虫固有のウイルスである。このウイルスは多数ウイルス粒子が包埋されている多角体と呼ばれる包埋体を細胞核内に形成する。昆虫が多角体を植物とともに摂食すると、腸内のアルカリ条件下で多角体が溶解され、遊離されたウイルス粒子が中腸円筒細胞から体腔へ侵入することによって感染する。

ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* の防除可能な天敵微生物の検索は、国内では約 40 年前から行われ、病原性の高い微生物の一つとして、ハスモンヨトウ核多角体病ウイルス (SINPV = SpltNPV) の生物的防除資材としての利用が試みられてきた (岡田, 1977)。野外における防除効果は実用レベルであると確認されたものの (浅山ら, 1985)、化学合成農薬に比べ遅効性であることや安定した大量生産技術が確立されていないなどの問題点があり実用化には至っていない。近年、環境保全型農業への関心の高まりから、そのウイルスの利用は再び注目され実用化に向けた研究開発が行われている。

本稿では、SpltNPV の病原性を強化して防除効果を高めるために、自然界から分離した株について遺伝子解析手法を利用してウイルス粒子の分類を行い、遺伝子型ごとの病原性を比較することにより防除効果の高い株を選抜して微生物農薬として開発を行ってきたので、その選抜株の特徴および圃場における防除効果について報告する。

I 野外 SpltNPV の分離

自然界の核多角体病ウイルスには、遺伝的に多様性が認められることが明らかになっている (GETTIG and MCCARTHY, 1982)。遺伝的に異なる各々のウイルスは、細胞培養系を用いたプラーク純化により遺伝的に単一なクローンとして分離可能である。また、それらの遺伝的に異なるクローンは、殺虫力にも差があることが明らかになっている (KAMIYA et al., 2001)。

これまでの圃場試験に利用されてきた SpltNPV としては、野外で採集した罹病幼虫個体を一つの分離株として用いられてきた。しかし、遺伝的に異なるクローンが混在している可能性があり、防除効果の確実性や遺伝的な安定性に関しては不確定のままであった。そこで、日本各地で採集・保存されていた株の分譲を受けるとともに、新たに野外罹病虫 (図-1) の採集を行い、それぞれについてハスモンヨトウ由来の培養細胞を用いたプラーク純化によりクローンの分離を行った (KAMIYA et al., 2004)。野外罹病虫由来の 17 種類のサンプルから合計 189 クローンを分離し、各クローンのゲノム DNA を抽出して、制限酵素によるフラグメントのパターンを比較したところ、パターンが異なるクローンが 33 種類得られた。それらのクローンは、部分的にパターンに違いが見られるものの類似しているものが存在し、大きく三つのグループに分類可能であったことから、それぞれ A, B, C タイプとした (図-2)。A タイプは 20 パターン得られ、ハスモンヨトウの近縁種である *Spodoptera litoralis* から分離された NPV の一種と類似していた (CHERRY and SUMMERS, 1985)。また、B タイプは 10 パターン存在し、国内をはじめ中国やフィリピンなどでこれまでに分離・報告されている NPV と一致した (MAEDA et al., 1990)。一方、C タイプは残り 3 パターンで、これまでに報告された NPV とは類似性を示さなかった。分譲を受けたサンプルに含まれる遺伝子タイプは様々であり、過半数の株で複数のクローンが混在していた。



図-1 核多角体病ウイルスに感染して死亡したハスモンヨトウ幼虫

Development of a Microbial Pesticide with Selected Clones of Nuclear Polyhedrosis Viruses Isolated from the Common Cutworm in Japan. By Katsumi KAMIYA and Yuki SOBUE

(キーワード: ハスモンヨトウ, 核多角体病ウイルス, 微生物農薬)

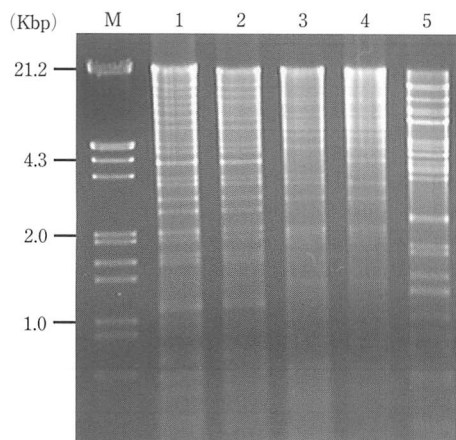


図-2 SpltNPV クローンの制限酵素切断フラグメントのパターン比較

M：分子量マーカー，1，2：Aタイプクローン（A6，A8），3，4：Bタイプクローン（B2，B5），5：Cタイプクローン（C1），ゲノム DNA を *XhoI* で切断。

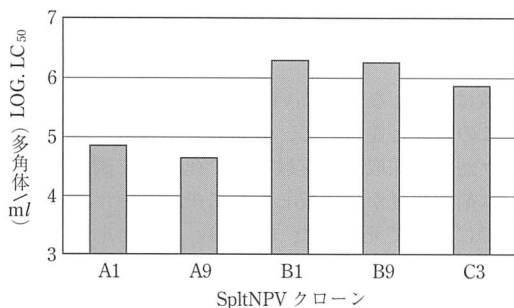


図-3 半数致死濃度による SpltNPV クローンの病原性の比較

3 齢脱皮直後のハスモンヨトウ幼虫に，それぞれ多角体濃度の異なるウイルス液を接種した後，25℃条件下で人工飼料を与えて飼育して死亡率を調査した。得られた死亡率より半数致死濃度を算出した。

II 優良株の選抜

病原性の高いクローンのみを選抜して利用することにより，病原性の弱いクローンが排除されて，高い防除効果が安定して得られる効果的な生物的防除資材の開発が可能であると考え，ハスモンヨトウ 3 齢幼虫を用いた生物検定により SpltNPV 3 タイプクローンについて病原性を評価した (KAMIYA et al., 2004)。飲下させた多角体の数と死亡率をもとに算出した半数致死濃度 (LC₅₀) により病原性を比較したところ，タイプ間で大きく異なっていることが明らかになった。病原性は，B タイプが最も弱く，ついで C タイプ，A タイプは最も強く，B タイプに比べると最大で 44 倍の LC₅₀ 差が認められた (図-3)。一方，半数致死時間 (LT₅₀) に関しては，A および B タイプでは同じタイプ内のクローン間でも差が認められたため，両タイプの特徴を明確にできなかったが，C タイ

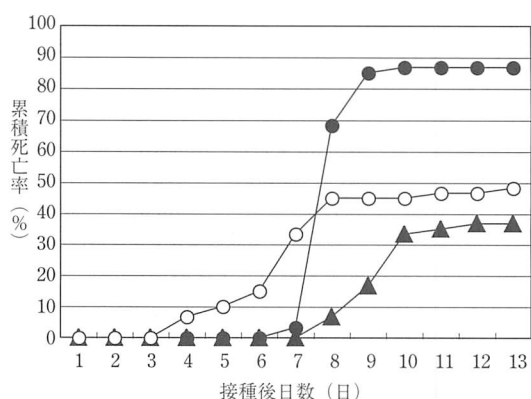


図-4 死亡率の経日変化による SpltNPV クローンの病原性の比較

4 齢脱皮直後のハスモンヨトウ幼虫に，ウイルス液を接種 (4.5×10^4 個多角体/幼虫) した後，25℃条件下で人工飼料を与えて飼育して死亡率を調査。●：Aタイプクローン，▲：Bタイプクローン，○：Cタイプクローン。

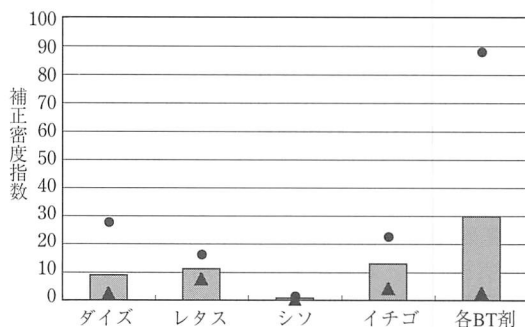


図-5 IG-104 水和剤の各公的試験における防除効果

2004～06 年度新農薬実用化試験成績 (生物農薬) をもとに作成。ダイズ (露地 6 例)，レタス (露地 3 例)，シソ (露地 1 例，施設 1 例)，イチゴ (施設 3 例)。各 BT 剤はダイズ (露地 4 例)，レタス (露地 2 例)，イチゴ (施設 2 例) の値より算出。棒グラフ：平均値，●：最大値，▲：最小値。

プのクローンは LT₅₀ が最も短かった。これは，C タイプは非常に早い時期から致死する個体が認められるため，4 齢幼虫を用いた場合にも同様の結果が得られた (図-4)。A および B タイプは接種後 7～10 日目にかけて死亡したが，C タイプは接種後 4 日目から死亡個体が出現し，8 日目までに感染虫のほとんどが死亡した。また，一定濃度の多角体を接種した場合の累積死亡率は A タイプが最も高くなった。以上のことから，A タイプは殺虫力強い特長を有しているのに対し，C タイプは致死時間が短いというこれまで利用されてきた SpltNPV で問題となっていた遅効性を改善する可能性のある有用な特性を有することが明らかとなった。そこで，A タイプのクローンと C タイプのクローンを混合して用いることにより，より早く確実にハスモンヨトウ幼虫を殺虫

表-1 IG-104 水和剤のダイズにおける圃場試験結果

供試薬剤	100 葉当たり寄生虫数 (匹)				補正密度指数		
	散布前	3 日後	5 日後	8 日後	3 日後	5 日後	8 日後
IG-104 水和剤	220.0	72.7	4.3	0.7	42.5	6.2	3.1
BT 剤 (A 剤)	149.3	23.3	5.3	5.0	20.1	11.2	32.1
無処理	281.0	218.3	88.7	29.3	100	100	100

試験場：徳島県農林水産総合技術センター、品種：サチユタカ、播種：2004 年 7 月 7 日、定植：2004 年 7 月 21 日、区制・面積：1 区 12 m² (6.0 × 2.0 m)、40 株/区、3 連、散布：2004 年 9 月 25 日。

できると判断し、二つのクローンを混合して製剤化することで、新規の生物的防除資材を開発した。

III SplitNPV の実用化

1 製剤の調整

選抜した二つのクローンそれぞれを虫体培養により大量増殖して製剤を調整した。製剤調整に当たり、形状は利便性と保存性を考慮して、固形製剤の一つである水和剤とした。製剤は 100 g 当たり本ウイルスにより死亡した老齢幼虫 100 個体分を含有し、それ以外に増量剤、界面活性剤等を混合して IG-104 水和剤 (仮称) とした。

2 圃場における防除効果

本剤の圃場におけるハスモンヨトウ防除効果を評価するため、2004～06 年度に (社) 日本植物防疫協会による公的農業試験研究機関における防除試験を、4 作目、計 14 例実施した。試験結果から本剤の評価の対象となった補正密度指数 (散布 6～10 日後) は、4 作目ともに平均値は 0.8～12.9 にあり、防除効果が高かった (図-5)。また、防除効果が比較的低かった場合でも 4 作目とも補正密度指数は 30 以下であり、作目、気温、天敵の有無などの条件が異なっても防除効果は安定していた。試験は露地または施設において実施され、ともに高い防除効果が得られており、露地における降雨等の影響による防除効果の低下は見られなかった。SplitNPV は経口感染であり、気温が低くなるとハスモンヨトウの摂食量が減少するために秋以降の散布では薬効が低下することが懸念されたが、夏季 (7～9 月) の試験が多かったダイズと比較して、秋季 (9～10 月) の試験が多かったレタス、イチゴでも十分な防除効果が確認できた。一方、対照として使用した各 BT 剤による補正密度指数 (散布 3～10 日後) は、平均で 30 前後、最小値は 2.5 であったが、最大値は 88.0 と効果にばらつきがあった。それらのことより薬効の発現は BT 剤のほうが早い、本剤のほうが調査期間内に多くのハスモンヨトウ幼虫を殺生しており、防除効果は高かった。

徳島県立農林水産総合技術支援センター農業研究所が 2004 年 9 月にダイズの圃場で実施した試験においては、散布 3 日後より明らかな薬効が現れ、8 日後には補正密

表-2 薬剤散布 1 日後に採取したハスモンヨトウ幼虫の死亡率

供試薬剤	死亡率 (%) ^{a)}					
	1 日後	2 日後	3 日後	4 日後	5 日後	6 日後
IG-104 水和剤	7.4	37.0	70.4	100	100	100
BT 剤 (A 剤)	6.7	10.0	20.0	27.6	44.8	44.8
無処理	0	0	0	0	0	0

^{a)} 薬剤散布翌日に採取したハスモンヨトウ幼虫を、25℃条件下で人工飼料を与えて飼育して死亡率を調査。それぞれ供試薬剤に起因する死亡を示したものを対象に死亡率を算出。

度指数は 3.1 となって高い防除効果が確認できた (表-1)。この試験と並行して、散布翌日に各区からハスモンヨトウ幼虫を採取して実験室内で死亡率を調査したところ、本剤散布区から採取したハスモンヨトウ幼虫は 4 日後までにすべて死亡した (表-2)。対照とした BT 剤との比較においては、圃場試験、および採取したハスモンヨトウ幼虫の死亡率確認試験ともに調査終了時には本剤の方が高い死亡率を示した。

次に香川県農業試験場が 2005 年 9 月にレタスの圃場で実施した試験においては、本剤散布区は散布 10 日後で補正密度指数が 10 以下となり、高い防除効果が認められた。散布約 1 か月後の圃場ではハスモンヨトウ幼虫の食害に起因する欠株が無処理区、BT 剤 (B 剤) 散布区の順で目立つものの、本剤散布区において被害は抑制されており、遠観的にも防除効果が高かったことがわかった (図-6)。

なお、ハスモンヨトウ幼虫の自然発生程度や感染幼虫密度によっては、感染死亡体から流出した多角体による 2 次感染も起きることがわかっており (中込, 1998)、散布後の長期間の残効性が期待できる。

3 寄主植物による病原性の比較

ハスモンヨトウ幼虫は多食性で、約 80 種類の植物を害することが知られている (岡本ら, 1968)。近年、ハスモンヨトウ幼虫に対する BT 剤の殺虫活性が生物検定に使用した寄主植物種によって異なる事例が報告されている (長岡ら, 1998; 及川ら, 1999; 浅野ら, 2004)。SplitNPV については岡田 (1977) がマメ科植物を中心に 15 種類の寄主植物葉について調査を行い、病原性に差

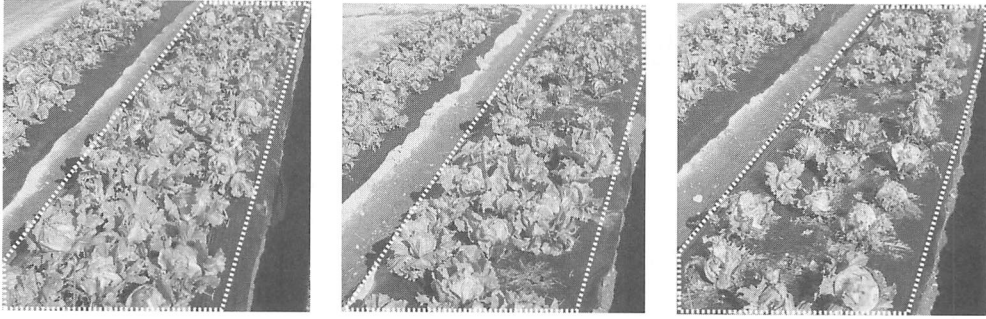


図-6 レタスの散布後の被害状況 (2005 年 10 月 20 日)

左：IG-104 水和剤散布区，中：BT 剤 B 剤散布区，右：無処理区．試験場：香川県農業試験場，品種：しずか，播種：2005 年 8 月 18 日，定植：2005 年 9 月 12 日，区制・面積：1 区 9.8 m² (7.0 × 1.4 m)，3 連，散布：2005 年 9 月 26 日．

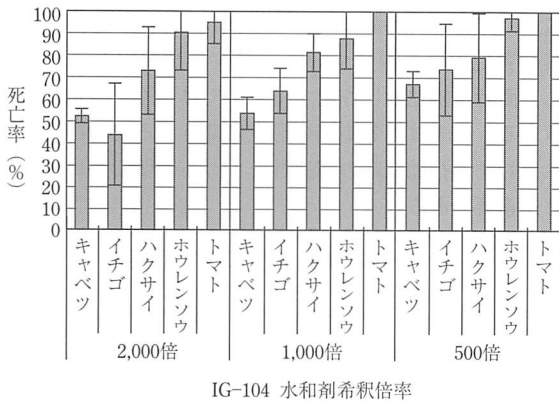


図-7 作目別・希釈倍率別の死亡率比較

4 齢脱皮直後のハスモンヨトウ幼虫に，各希釈倍率の本剤を浸漬させた寄生植物葉を 48 時間摂食させた後，25℃条件下で人工飼料を与えて飼育して死亡率を調査．浸漬の際には展着剤としてアブローチ (1,000 倍) を使用．供試品種は，キャベツ：味春甘藍，イチゴ：濃姫，ハクサイ：英熟，ホウレンソウ：オーライ，トマト：モモタロウエイト．

がなかったことを報告している。筆者らも SpltNPV を有効成分とする本剤のハスモンヨトウに対する殺虫活性を 5 種の寄生植物葉において比較した。試験はハスモンヨトウ 4 齢幼虫と 5 種の寄生植物葉を用いて葉片浸漬法で調査した。浸漬に用いた本剤の希釈倍率は 500 倍，1,000 倍，2,000 倍として，試験開始 10 日後の死亡率を比較した。

試験の結果，どの希釈倍率においてもトマトおよびホウレンソウでは高い死亡率が，キャベツおよびイチゴでは低い死亡率が得られた (図-7)。この原因として浸漬処理の際にキャベツ，イチゴでは葉面付着量が少ないことも考えられたが，浅野ら (2005) は BT 剤試験において殺虫活性と葉面付着量の間に明確な傾向は見られなかったことを報告している。またイチゴを用いた圃場試験では先に述べた通り，十分な防除効果が得られており，この原因については今後も調査が必要である。

おわりに

SpltNPV から選抜した IG-104 水和剤は，これまで問題となっていた遅効性が改善され，また殺虫力も強くなっている。さらに微生物農薬の特長である環境や人体にやさしい，抵抗性害虫出現の可能性が低いといったメリットがある。そのため，減農薬栽培における IPM の防除体系に組み入れて利用できるようにしていきたいと考えている。

今までにダイズ，レタス，シソおよびイチゴに寄生したハスモンヨトウ幼虫に対する圃場防除試験を実施してきた。今後は，ウイルス活性低下の原因となる紫外線や降雨の影響を受けにくい施設栽培作物を中心に試験を行うことにより適用拡大を図る。また，マイナー作物においては適用農薬が少なく，散布回数が制限されているなど，化学農薬散布に対する問題点が多くあるため，積極的に適用拡大を図る予定である。さらにダイズなどで最近使用が増えている無人ヘリによる高濃度散布，施設栽培におけるダクト散布にも対応する形状の製剤作製も検討している。

今後は各作物で圃場試験を継続的に実施するとともに，今春に登録申請を行う予定である。

引用文献

- 1) 浅山 哲ら (1987) : 愛知農総試研報 17 : 133 ~ 144.
- 2) 岡田齊夫 (1977) : 中国農試報 E12 : 1 ~ 66.
- 3) KAMIYA, K. et al. (2001) : J. Insect. Biotechnol. Sericol 72 : 57 ~ 64.
- 4) ——— et al. (2004) : Biol. Control 31 : 38 ~ 48.
- 5) GETTIG, R. R. and W. J. MCCARTHY (1982) : Virology 117 : 245 ~ 252.
- 6) CHERRY, C. L. and M. D. SUMMERS (1985) : J. Invertebr. Pathol 46 : 289 ~ 295.
- 7) MAEDA, S. et al. (1990) : J. Gen. Virol. 71 : 2631 ~ 2639.
- 8) 中込暉雄 (1988) : 愛知農総試研報 20 : 128 ~ 135.
- 9) 岡本大二郎ら (1968) : 中国農試報 E2 : 111 ~ 144.
- 10) 長岡広行ら (1998) : 九病虫研会報 44 : 76 ~ 78.
- 11) 及川雅彦ら (1999) : 関東東山病虫研報 46 : 89 ~ 92.
- 12) 浅野昌司 (2004) : 応動昆 48 : 307 ~ 314.
- 13) ——— (2005) : 同上 59 : 60 ~ 63.