

Lecanicillium spp. の葉面処理による ワタアブラムシ *Aphis gossypii* に対する致死効果

堀江早弥佳¹⁾・相内大吾^{1), 2)}・渡邊敏弘¹⁾・谷 昌幸¹⁾・
山中 聡³⁾・小池正徳¹⁾

¹⁾ 帯広畜産大学畜産学部, ²⁾ 岩手大学大学院連合農学研究所, ³⁾ (株) アリスタライフサイエンス

(2008年11月25日受付; 2009年2月4日受理)

Lethal effect of *Lecanicillium* spp. leaf application against cotton aphid, *Aphis gossypii*.

SAYAKA HORIE, DAIGO AIUCHI, TOSHIHIRO WATANABE, MASAYUKI TANI, SATOSHI YAMANAKA and MASANORI KOIKE

Lecanicillium muscarium hybrid strain 2aF43 has high pathogenicity against cotton aphid, greenhouse whitefly and high viability under low humidity condition. In this study we investigated the correlation between fungal viability on the leaf surface and pathogenicity against cotton aphid. Vertalec® (*L. longisporum*), Mycotal® (*L. muscarium*) and 2aF43 were sprayed to ventral cucumber leaf, and incubated at glasshouse (25 °C; 5.6%RH) and greenhouse (21.2 °C; 60.4%RH). The fungal viability was evaluated by the dilution plating method on 14, 21 and 28 days post inoculation (dpi), and bioassay against *A. gossypii* by leaf disk method was conducted at same periods. Vertalec® showed low viability on the leaf, however high pathogenicity against *A. gossypii* under two experiment. In contrast, Mycotal® showed low pathogenicity and high viability. Hybrid strain 2aF43 showed high viability and high pathogenicity through all investigation. To effective control, fungal persistence with high pathogenicity is needed under given cultivate condition. Therefore, the hybrid strain probability to be useful biological control agents.

Key words : *Aphis gossypii*, *Lecanicillium* spp., Viability on leaf surface, *Verticillium lecanii*

結 言

昆虫寄生性糸状菌 *Lecanicillium* spp. (旧 *Verticillium lecanii*) は多くの農業害虫に対して寄生性を示すことから、生物防除資材として世界中で広く利用されている (FARIA and WRIGHT, 2007)。日本では、Koppert Biological Systems よりアブラムシ防除用に Vertalec® (*L. longisporum*)、コナジラミ、アザミウマ防除用に Mycotal® (*L. muscarium*) が販売されている。通常、*Lecanicillium* spp. を用いて十分な防除効果を得るためには、高湿度条件が必要であり (DRUMMOND et al., 1987, HSIAO et al., 1992)、その利用場が施設栽培に限られている (SHAH and PELL, 2003)。一方、帯広分離系統の B-2 (MAFF238429) (*L. muscarium*) は低湿度条件下でも葉面で高い残存能力を示すことが明らかになっている (KOIKE et al., 2004)。そこで、AIUCHI et al. (2008) は高い病原性を持つ Vertalec® と Mycotal® に B-2 の高い生存能力を付与することを目的としてプロトプラスト融合を行い、結果として 174 菌株の融合株を得た。さらにワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover やオンシツコナジラミ *Trialeurodes vaporariorum* Westwood の両害虫に対する病原性試験、および低湿度条件下でのキュウリ葉面上における残存能力、胞子形成量などの特性を調査し (相内ら, 2007; AIUCHI et al., 2008)、その結果 2aF43 (Mycotal×B-2) を選抜した (AIUCHI unpublished)。よって本研究では 2aF43 を用い、ガラス室とビニールハウス条件下でキュウリ葉面上の経時的な菌密度と、散布葉を用いて

ワタアブラムシに対する病原性の調査を行った。

材料と方法

供試昆虫：帯広畜産大学ガラス室内でキュウリを餌として累代飼育したワタアブラムシの成虫を用いた。

供試菌株：供試菌株の Vertalec®, Mycotal® はオランダの Koppert Biological Systems 社製造物を、国内で販売しているアリスタ・ライフサイエンスより分譲を受け、製剤からの単胞子分離したものをを用いた。プロトプラスト融合株は Mycotal と B-2 間から作出された 2aF43 を用いた。各菌株をジャガイモ煎汁ブドウ糖液体培地 (PDB) において 14 日間、25 °C で振とう培養し、blastospore を得た。培養液をろ過後、胞子懸濁液を 3 回遠心洗浄 (3,000 rpm, 5 分) し、血球計算盤を用いて胞子濃度を 1.0×10^7 blastospore/ml に調整した。

ガラス室試験：供試植物には 3~4 葉展開したキュウリ (夏すずみ:タキイ種苗) を用い、菌散布区にはそれぞれの胞子懸濁液を Nalgene aerosol spray bottle (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) によって滴る程度に散布した後、ガラス室内 (平均 25 °C, 5.6%RH) で生育させた。葉面の菌密度は希釈平板法によって評価した。散布 2, 3, 4 週後に散布葉からリーフパンチを用いてリーフディスクを採取し、滅菌水中に懸濁した。懸濁液を適切な濃度まで希釈し、糸状菌用ローズベンガル寒天培地上に塗布し、25 °C の暗条件下で 10 日

^{1), 2)} 〒080-8555 帯広市稲田町西 2 線 11 番地
連絡先: koike@obihiro.ac.jp

間培養した。倒立顕微鏡下で *Lecanicillium spp.* のコロニー数を調査し、1 cm² 当りの colony forming units (cfu) に換算した。1 菌株につき 5 枚のプレートを使用し、3 反復行った。

次に散布葉における病原性試験を実施した。すなわち、葉面の菌密度の評価と同時に散布葉から直径 50 mm のリーフディスクを作成し、シャーレ (60×16mm) に湿らせたろ紙と共に入れ、1 処理につき 20 頭のワタアブラムシ成虫を移植した。パラフィルムで密封した後、25 °C、16L : 8D の条件下で飼育し、3, 5, 7 日後の死亡個体数を調査した。各処理につき 3 反復行い、このとき死体上に菌の叢生が確認できたものを感染個体とした。加えて、散布 2 週間後の葉裏を糸状菌用ローズベンガル寒天培地上に直接押し付け、5 日後に出現する糸状菌を観察した。

ビニールハウス試験：ガラス室での試験と同様に 3~4 葉展開したキュウリへ散布を行い、その後ビニールハウス内 (平均 21.2 °C, 60.4%RH, 最高 54.7 °C, 99.9%RH, 最低 5.1 °C, 5.0%RH) へ移し生育させた (2007.5.29~2007.6.26)。同じく葉面の菌密度評価も、散布 2, 3, 4 週後に希釈平板法を用いて同様に調査した。散布葉における病原性試験は 2, 3 週目にガラス室での試験と同様の病原性試験を行い、1, 3, 5 日後の死亡個体数を調査した。

データ解析：本実験で得られた葉面残存量の比較には一元配置の分散分析を用い、Tukey 法による多重比較検定を行った。病原性の評価に当たっては、それぞれの試験で得られた死亡個体数からプロビット法 (国見, 1993) により半数致死日数 (LT₅₀) を求めた。

結 果

ガラス室試験

低湿度 (平均 5.6%RH) ガラス室におけるキュウリ葉面上菌密度の評価結果を Table 1 に示した。まず Vertalec[®]処理区では、2, 3, 4 週間後のいずれにおいても検出限界を下回った。Mycotal[®]処理区においては、2 週間後に最も高い値となりそれ以降は低い値で推移し、いずれの週においても Vertalec[®]との間に有意な差は見られなかった (p>0.05)。融合株 2aF43 処理区では、2, 3 週間後では他の 2 株より有意に高い cfu 値を示した (p<0.01)。4 週後では Mycotal[®]との間に有意な差は見られなかったも

の、3 株中最も高い cfu 値を示した。

散布葉における病原性評価の結果として LT₅₀ 値を Table 1 に示した。Vertalec[®]処理区では 2 週間後の LT₅₀ 値は 4.7 日だったのに対し、3 週間後には死亡個体はみられなかった。2aF43 処理区は試験期間を通じて最小の LT₅₀ 値を示し、4 週間後の Mycotal[®]処理区での LT₅₀ 値 (12.4 日) の半分の値となった (6.2 日)。

糸状菌用ローズベンガル培地に散布 2 週間後のキュウリの葉を押しつけたところ Vertalec[®], Mycotal[®]処理区では *Lecanicillium spp.* のコロニーはわずかに葉の一部から検出されたのに対し、2aF43 処理区では押し付けた葉の全域よりコロニーが形成された (Fig. 1)。

ビニールハウス試験

ビニールハウス内におけるキュウリ葉面上における菌密度の評価結果を Table 2 に示した。Vertalec[®]処理区では 2 週間後の cfu 値が最も高い値を示し、その後減少した。Mycotal[®]処理区では散布 2 週間後の cfu 値が最も低く、翌週には倍増し、4 週目で減少しつづけた。2aF43 処理区はいずれの週においても他の 2 菌株より有意に高い cfu 値を示し (p<0.01,)、Mycotal[®]と同様に、3 週目で最も高い cfu 値を示した。

散布葉による病原性評価の結果として LT₅₀ 値を Table 2 に示した。Vertalec[®]処理区での LT₅₀ 値は 2 週間目より 3 週間目で高くなったが (それぞれ 2.3 日, 3.0 日)、Mycotal[®]処理区では反対に 2 週間目から 3 週間目にかけて減少した (それぞれ 4.5 日, 3.0 日)。これら 2 菌株に対して 2aF43 処理区では、2 週目 3 週目とも LT₅₀ 値に変化は見られなかった (3.00 日)。

考 察

ガラス室における試験では全菌株で菌密度が減少し続けたことから、試験環境が菌の生存および生育に適さなかったと考えられる。*Lecanicillium spp.* は胞子の発芽や胞子形成にも低湿度の影響を受けるため (Hall, 1981)、5.6%RH という極めて低い湿度がこれらを阻害した主な要因であると考えられる。Vertalec[®]処理区では試験期間全体を通じて葉面の菌密度は検出限界を下回っていた (Table 1)。しかしながら、散布 2 週間後の葉を用いた病原性

Table 1. LT₅₀ values of adult cotton aphid fed on a fungal sprayedcucumber leaf disk and fungal viability under glasshouse condition.

	2 weeks post inoculation				3 weeks post inoculation				4 weeks post inoculation						
	viability (cfu/cm ²)	SD	LT ₅₀ (95% confidence limits)	slope	viability (cfu/cm ²)	SD	LT ₅₀ (95% confidence limits)	slope	viability (cfu/cm ²)	SD	LT ₅₀ (95% confidence limits)	slope			
Vertalec	N.D.	N.D.	a	4.7 (4.4-4.9)	11.5	N.D.	a	* ^a	* ^a	N.D.	N.D.	a	- ^b	- ^b	
Mycotal	4.7 × 10 ²	8.3 × 10 ²	a	6.7 (4.4-5.0)	8.5	3.3	6.2	a	13.5 (9.5-37.)	3.6	7.3	1.1 × 10	ab	12.4 (9.1-36.0)	4.1
2aF43	3.7 × 10 ³	2.2 × 10 ³	b	3.0 (4.4-5.0)	5.6	2.9 × 10	1.7 × 10	b	5.5 (5.1-6.0)	7.0	1.7 × 10	1.5 × 10	b	6.2 (5.7-6.9)	5.8

Within the same week, cfu value with the same letter are not significantly different (one way ANOVA, p<0.01) according to Tukey's test.

*No infected aphids were determined ^aNot tested S.D.=standard deviation. N.D.=Not detected (under detection threshold).

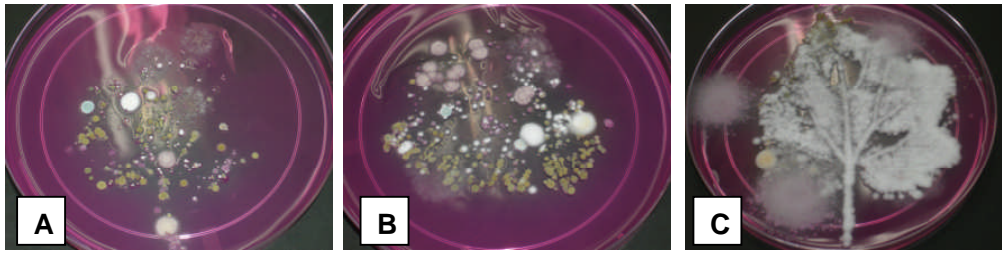


Fig.1 Observations of distribution of *Lecanicillium* spp. on ventral cucumber leaf at 3 weeks post inoculation under glasshouse condition. (A) Vertalec. (B) Mycotal. (C) 2aF43.

Table 2. LT50 values of adult cotton aphid fed on a fungal sprayed cucumber leaf disk and fungal viability under greenhouse condition.

	2 weeks post inoculation					3 weeks post inoculation				4 weeks post inoculation	
	viability (cfu/cm ²)	SD	LT ₅₀ (95% confidence limits)	slope		viability (cfu/cm ²)	SD	LT ₅₀ 5% confidence limit	slope	viability (cfu/cm ²)	SD
Vertalec	1.08 × 10 ⁵	5.99 × 10 ⁴ a	2.3 (2.14-2.87)	3.63		9.09 × 10 ⁴	4.86 × 10 ⁴ a	3.03 (2.72-3.40)	4.53	5.26 × 10 ⁴	2.70 × 10 ⁴ a
Mycotal	1.32 × 10 ⁵	6.62 × 10 ⁴ a	4.5 (4.10-4.97)	6.35		2.45 × 10 ⁵	7.45 × 10 ⁴ a	2.97 (2.67-3.31)	4.62	2.29 × 10 ⁵	6.50 × 10 ⁴ b
2aF43	2.20 × 10 ⁵	6.15 × 10 ⁴ b	3.0 (2.60-3.31)	5.6		6.02 × 10 ⁵	3.94 × 10 ⁵ b	3.00 (3-3.00)	3.20	2.79 × 10 ⁵	4.78 × 10 ⁴ b

Within the same week, cfu value with the same letter are not significantly different (one way ANOVA, p<0.01) according to Tukey's test.

S.D.=standard deviation.

試験では死亡個体が確認され、3週間目では確認されなかった。これにより Vertalec[®]が少なくとも2週間目には検出限界以下ではあるが活性を有した状態で残存しており、3週間目で活性を失ったかあるいは死滅したと考えられる。このため、より詳細な菌密度の測定が必要である。Mycotal[®]処理区での菌密度は Vertalec に比べ高いにもかかわらず、LT₅₀ 値は Vertalec[®]より高い値を示した。一般的に散布濃度が高ければ死亡率も上昇するが、Vertalec[®]に内在するアブラムシへの病原性の高さ (CHANDLER et al., 1993) が菌密度の低さを補ったと考えられる。2aF43 の菌密度は他の処理区に比べ試験を通して最も高く、週の経過に伴い LT₅₀ 値は緩やかに増加したが、4週間目では Mycotal[®]と同程度の菌密度だったのも関わらず、2aF43 は Mycotal[®]の半分の LT₅₀ 値を示した。また Fig. 1 で示されるように 2aF43 処理区では散布2週間後でも他の菌株に比べて明らかに菌密度が高く、その分布は葉の全面にわたることから、ワタアブラムシが接触する機会も増加することが期待される。

次にビニールハウスでは Vertalec 処理区における菌密度が試験期間を通じて最も低く、Mycotal[®]と 2aF43 処理区の菌密度が変動していた3~4週間後にかけても低下し続けた (Table 2)。これは試験15~16日目において15時間にわたり湿度が100%に保たれたことによると考えられ、Vertalec のもつ生存・増殖に対する湿度の閾値が Mycotal[®]や 2aF43 に比べ高いことを示している。Vertalec[®]処理区の LT₅₀ 値を見ると菌密度の低下とともに上昇し、Mycotal[®]処理区では菌密度の上昇とともに LT₅₀ 値は低下した。2aF43 処理区において、菌密度の増減

にかかわらず LT₅₀ 値が変動しなかったのは、菌密度の高い散布3週間後の病原性試験で移植3日後のワタアブラムシ死亡率が100%に達したためである。同じく3日後の死亡率を見ると散布2週間後における死亡率は38.9%であり (data was not shown)、病原性と菌密度が関連していると考えられる。また 2aF43 はキュウリ葉面上でも菌糸を伸張し、分生子形成にいたることが知られている (GOETTEL et al., 2008)。2aF43 および Mycotal[®]処理区では2~3週間目にかけて菌密度が上昇し4週間目の菌密度はガラス室試験と比較して4~5オーダー高いものだった。このことはキュウリ葉面において散布した分生子が生存だけではなく少なくとも菌糸を展開しており、さらに分生子形成が行われている可能性を示唆している。

高い防除効果をあげるためには寄生および病原性の高さだけでなく、散布した植物・昆虫体上における菌の生存、分生子の再生産など、環境への適応も重要である。特に *Lecanicillium* spp. の一連の感染様式は低湿度の影響を受けやすく (HALL, 1981)、夕方の涼しい時間の散布や、散布後に灌水することで高湿度条件を作り出すことが望ましいとされている。いずれの試験においても 2aF43 が低湿度条件下での高い生存能力を持つとともに、内在する病原性も高いことを示しており、生物防除資材として実用レベルでの高い防除効果を示すことが期待される。

摘 要

微生物的防除において高い防除効果をあげるた

めには病原性だけではなく、環境への適応も重要であり、特に *Lecanicillium* spp.の一連の感染様式は、低湿度の影響を受けやすい。本研究では *Lecanicillium* spp. プロトプラスト融合株である 2aF43 の防除効果を検討するために、低湿度ガラス室とビニールハウスにおける葉面菌密度と病原性の関連性を調査した。その結果、Vertalec[®]は高い病原性を持つものの生存能力が低く、逆に Mycotal[®]は病原性が低く、生存能力が高かった。これに対して、2aF43 は病原性と低湿度条件下における生存能力どちらにおいても高い能力を持つことが示された。これにより、2aF43 が実用レベルでの高い防除効果を示す生物防除資材となる可能性が期待できる。

文 献

- 相内大吾・馬場ゆき子・稲見圭吾・新屋良治・谷昌幸・倉持勝久・堀江早弥佳・小池正徳 (2007) ワタアブラムシ、オンシツコナジラミに対する病原性と葉面上での生存能力に基づいた *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) プロトプラスト融合株の選抜. 応動昆, **51**, 205-212.
- AIUCHI, D., INAMI, K., SUGIMOTO, M., SHINYA, R., TANI, M., KURAMOCHI, K. and KOIKE, M. (2008) A new method for producing hybrid strains of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) through protoplast fusion by using nitrate non-utilizing (*nit*) mutants. *Micol. Appl. Int.*, **20**, 1-16.
- AIUCHI, D., BABA, Y., INAMI, K., SHINYA, R., TANI, M. and KOIKE, M. (2008) Variation in growth at different temperatures and production and size of conidia in hybrid strains of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Appl. Entomol. Zool.*, **43**, 427-436.
- CHANDLER, D., HEALE, J. B. and GILLESPIE, A. T. (1993) Competitive interaction between strains of *Verticillium lecanii* on two insect hosts. *Ann. Appl. Biol.*, **122**, 435-440.
- DRUMMOND, J., HEALE, J. B. and GILLESPIE, A. T. (1987) Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Ann. Appl. Biol.*, **111**, 193-201.
- De FARIA, M. R. and WRAIGHT, S. P. (2007) Myco-insecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*, **43**, 237-256.
- GOETTEL, M. S., KOIKE, M., KIM, J. J., AIUCHI, D., SHINYA, R. and BRODEUR, J. (2008) Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *J. Invertebr. Pathol.*, **98**, 256-261.
- HALL, R. A. (1981) The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In *Microbial Control of Pests and Plant Disease* (H. Burges, ed.). Academic Press, London, pp. 483-498.
- HSIAO, W. F., BIDOCHKA, M. J. and KHACHATOURIANS, G. G. (1992) Effect of temperature and relative humidity on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*, toward the oat-bird berry aphid, *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae). *J. Appl. Ent.*, **114**, 484-490.
- KOIKE, M., HIGASHIO, T., KOMORI, A., AKIYAMA, K., KISHIMOTO, N., MASUDA, E., SASAKI, M., YOSHIDA, S., TANI, M., KURAMOCHI, K., SUGIMOTO, M. and NAGAO, H. (2004) *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) as epiphyte and their application to biological control of pest and disease in a glasshouse and a field. *IOBC/WPRS Bull.*, **27**, 41-44.
- 国見裕久 (1993) 天敵微生物の力価検定法, 天敵微生物の研究手法 特別増刊号2 (岡田斉夫ら編). 植物防疫, 東京, pp. 91-102.
- SHAH, P. A. and PELL, J. K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 413-423.