

ワタアブラムシ *Aphis gossypii* 死体上における *Lecanicillium* spp.の生育に及ぼす湿度の影響

渡邊敏弘¹⁾・相内大吾²⁾・加藤 拓¹⁾・谷 昌幸¹⁾・小池正徳^{1),*}

¹⁾ 帯広畜産大学畜産学部, ²⁾ 帯広畜産大学原虫病研究センター

(2009年12月7日受付; 2010年1月21日受理)

Effect of relative humidity to the growth of *Lecanicillium* spp. on cotton aphid cadaver, *Aphis gossypii*

TOSHIHIRO WATANABE, DAIGO AIUCHI, MASAYUKI TANI, TAKU KATO and MASANORI KOIKE

Lecanicillium sp. hybrid strains 2aF4 and 2aF43 have high potential of biological control to control cotton aphid and greenhouse whitefly. In this investigation, we evaluated the biomass (quantity of conidia and hyphal bodies) of *Lecanicillium* spp. on cotton aphid cadaver in different humidity conditions. Five *Lecanicillium* spp. strains were inoculated with cotton aphid cadaver and maintained in 4 different humidity conditions. The biomass of Vertalec® (*Lecanicillium longisporum*), Mycotal® (*L. muscarium*), B-2 (*L. muscarium*) and two hybrid strains exhibited high values ($1.0 \times 10^4 \sim 3.4 \times 10^5$ cfu/cadaver) in high relative humidity (RH) conditions (98% and 100%) than lower RH conditions (77% and 86%). Especially, 2aF43 might have started to growth under low humidity (86% RH) condition comparing to other strains. The modes of conidiation were clearly differed among tested strains. Vertalec® and 2aF43 produced sparse hyphae with many spore heads on outside of fungal colony, while other strains produced more fluffy hyphae covering cadaver with less spore heads. So hybrid strain 2aF43 has possibility to spread the disease against other healthy aphids. Therefore, 2aF43 can be expected useful biological control agent of aphid.

Key words : Biological control, Relative humidity, Fungal growth, *Lecanicillium* spp., *Aphis gossypii*

結 言

昆虫寄生性アナモルフ菌類 *Lecanicillium* spp. (ZARE and GAMS, 2001) は、多くの有害節足動物の微生物的防除資材として、世界中で利用されている (GOETTEL et al., 2008)。日本ではオランダの Koppert Biological Systems 社が製造しているアブラムシ防除用の Vertalec® (*L. longisporum*) とコナジラミ・アザミウマ防除用の Mycotal® (*L. muscarium*) が(株)アリスタライフサイエンス社から上市されている。しかし、*Lecanicillium* 属菌の防除効果は環境要因に大きく影響を受け、その中でも特に湿度条件は重要な要因となることが知られている (DRUMMOND et al., 1987)。一方、帯広畜産大学構内で分離された B-2 (KOIKE et al., 2004) は、低湿度条件下でも高い葉面生存能力を示すことが明らかとなった。そこで、より効果的な系統の作出を目的として Vertalec®, Mycotal® および B-2 の 3 系統間でプロトプラスト融合を実施し (AIUCHI et al., 2008a), 作出した 174 菌株から 13 菌株を微生物的防除資材の有用系統として選抜した (相内ら, 2007)。しかしながら、選抜した菌株が実用レベルの湿度条件で効果を示すか否かはまだ明らかになっていない。そこで本研究では、融合株がアブラムシ死体上で生育を行う際、どの程度の相対湿度を要求するかを明らかにするため、4 段階の異なる湿度条件下 (相対湿度 77%~100%) におけるワタアブラムシ死体上で菌の生育量の評価をした。

材料と方法

供試菌株は、融合株の 2aF4, 2aF43 とその親株の Mycotal®, B-2 (いずれも *L. muscarium*) およびアブラムシ防除用製剤の Vertalec® (*L. longisporum*) を用いた。各菌株は、サブローデキストロース寒天培地を用い、25°C で 7~14 日間培養した。分生子懸濁液は、Tween 20 を 0.01% (v/v) 添加した滅菌水を培地上に加えコンラージ棒で分生子を削ぎ落とし、ガーゼでろ過した後、血球計算板で分生子濃度を 1.0×10^7 分生子/ml に調整した。

本試験には、帯広畜産大学構内のガラス室 (25°C, L:D=16:8) でキュウリ (夏すずみ:タキイ種苗) を餌として累代飼育したワタアブラムシを供試した。供試するワタアブラムシはキュウリの葉ごと酢酸エチルの充満した密閉容器内に約 20 分間入れ死亡させた。試験には、光学実体顕微鏡下で死亡を確認した無翅の雌成虫のみを用いた。

相対湿度の設定は、FORNEY and BRANDL (1992) と LUZ and FARGUES (1999) の方法に準じ、塩化ナトリウム (NaCl), 塩化カリウム (KCl) の飽和水溶液および蒸留水に 15.5% グリセロール (w/w) を添加し調整した。その溶液を接種実験で用いるプラスチックケース内 (170 mm×120 mm×60 mm) に入れ、予め温湿度計 (株式会社佐藤計量器製作所, SK-L200THα) を用いて実測値を測定した。その結果、塩化ナトリウムと塩化カリウムではそれぞれ 4 日間 (77.4±0.8%, 85.8±0.9%), グリセロール水

* 〒080-8555 帯広市稲田町西 2 線 11 番地
Tel: 0155-49-5216, Fax: 0155-49-5229
E-mail: koike@obihiro.ac.jp

溶液では5日間(97.8±0.5%)、誤差が1%以内で安定したため、10日間の試験期間で、塩化ナトリウムと塩化カリウム飽和水溶液は接種3日目と7日目に、グリセロール水溶液は接種5日目に水溶液の交換を実施した。相対湿度100%には蒸留水を用い、交換はしなかった。

また、ワタアブラムシ死体の接種試験は以下のように実施した。まず分生子懸濁液に死体を30秒間浸漬し、10頭ずつスライドガラス上に載せた。次に各水溶液が底に入ったプラスチックケース内に金属製の台を設置し、その上にスライドガラスを静置した後、暗条件下25℃で培養した。各菌株5反復行い、菌の生育は希釈平板法によって colony forming unit (cfu) 値を測定した。本試験における cfu 値は、生育可能な菌糸片および発芽可能な分生子を合わせた菌のバイオマスとして示す。接種3, 4, 5, 7および10日目にスライドガラスごと滅菌水に懸濁し、アブラムシ死体上から菌体を採るため超音波洗浄機(株式会社エスエヌディ, US-2: 38KHz)を用いた(30秒×3回)。次に、適切な濃度に希釈した懸濁液0.2 mlを糸状菌用ローズベンガル寒天培地上に塗布し、暗条件下25℃で培養した。その後、生じたコロニーを倒立顕微鏡下で同定し *Lecanicillium* 属菌のコロニー数をカウントした。その値をアブラムシ1頭当たりの cfu 値に換算した。希釈平板は1菌株につき5プレートに塗布し、各試験3反復で実施した。また、本試験中に菌株間で分生子塊の付き方および菌の生育に差が有ることを見出したため、相対湿度100%の実験に用いた感染アブラムシ死体上における分生子塊の形成様式を、光学実体顕微鏡下で観察した。

本試験のデータ解析には、一元配置の分散分析を行ない Tukey 法による多重比較検定を行った。

結 果

各相対湿度下におけるワタアブラムシ死体上での各菌株の生育の推移を Table 1 に示した。相対湿度

77%では、接種3~10日目にかけて全菌株ともに菌のバイオマス量が、0~88 cfu/死個体と低い値で推移した。2aF43処理区は接種4日目を除いて、他の処理区に対し有意に高い値を示しているが ($p<0.05$)、菌糸の叢生は確認されなかった。相対湿度86%においても相対湿度77%と同様に cfu 値の増減なく推移した。また、菌糸の叢生は確認されなかったが、接種7~10日目にかけて 2aF43 処理区の1頭当たりの cfu 値が18 cfu/死個体から 1.2×10^2 cfu/死個体と他の菌株に比べ大幅に増加した ($p<0.01$)。相対湿度98%では B-2 処理区を除いた処理区において、接種5日目から cfu 値は上昇傾向を示し、接種7日目には5日目の約3~7倍に達した。さらには、Mycotal®と 2aF43 処理区では接種10日目に7日目の約200倍の cfu 値を示した ($p<0.01$)。相対湿度100%においては、接種3日目から全菌株ともに $6.5 \times 10^3 \sim 7.2 \times 10^4$ cfu/死個体と高い値を示し、Vertalec®および Mycotal®処理区が接種7日目にピークを示したのに対し、B-2, 2aF4 および 2aF43 処理区は接種10日目まで増加し続けた。

次に、光学実体顕微鏡の観察では、供試菌株間における分生子塊の形成様式に相違が確認された。すなわち、Vertalec®と 2aF43 はアブラムシの死体上で比較的薄いまばらな菌糸を伸ばし、コロニー中心部よりも外側の部分に多くの分生子塊を形成した。それに対し、Mycotal®, B-2 および 2aF4 は厚い菌糸の層がアブラムシの死体全体を覆っており、前述の様な外側に形成された豊富な分生子塊の形成は観察されなかった (Fig. 1)。

考 察

相対湿度77%および86%において菌が検出されたことから、低湿度条件下において菌自体がアブラムシ体表上で少なくとも7~10日間程度生存していると考えられる。しかし、いずれの菌処理区間においても菌の叢生は認められなかった。一方、

Table 1. The growth of *Lecanicillium* spp. on cotton aphid cadaver in different relative humidity (RH) conditions.

Strains	RH	Mean number of fungal bodies and conidia (cfu/cadaver) ± SE				
		3 dpi ^a	4 dpi	5 dpi	7 dpi	10 dpi
Vertalec	77%	1.0E+01 ± 1.6E+01 a ^b A ^c	1.2E+01 ± 1.6E+01 ab	2.1E+01 ± 2.8E+01 a	1.2E+01 ± 1.6E+01 a	0.0E+00 ± 0.0E+00 a
Mycotal		1.5E+01 ± 1.3E+01 a	2.0E+01 ± 2.9E+01 ab	1.7E+01 ± 2.2E+01 a	2.8E+01 ± 3.1E+01 a	1.0E+01 ± 1.3E+01 a
B-2		5.0E+01 ± 1.4E+01 a	1.0E+01 ± 2.1E+01 ab	3.3E+00 ± 8.8E+00 a	0.0E+00 ± 0.0E+00 a	3.3E+00 ± 8.8E+00 a
2aF4		1.0E+01 ± 1.6E+01 a	5.0E+00 ± 1.4E+01 a	3.3E+00 ± 8.8E+00 a	1.0E+01 ± 1.8E+01 a	1.2E+01 ± 2.8E+01 a
2aF43		4.5E+01 ± 3.0E+01 b	2.7E+01 ± 2.0E+01 b	5.2E+01 ± 2.7E+01 b	8.8E+01 ± 5.3E+01 b	3.3E+01 ± 2.6E+01 b
Vertalec	86%	9.0E+01 ± 8.6E+01 b	5.2E+01 ± 5.4E+01 b	3.2E+01 ± 3.2E+01 a	1.0E+01 ± 1.3E+01 a	3.2E+01 ± 4.1E+01 a
Mycotal		7.8E+01 ± 6.5E+01 b	3.0E+01 ± 2.9E+01 ab	4.0E+01 ± 5.4E+01 a	2.0E+01 ± 3.2E+01 a	1.5E+01 ± 1.8E+01 a
B-2		3.3E+00 ± 8.8E+00 a	1.2E+01 ± 1.6E+01 a	6.7E+01 ± 1.1E+01 a	6.7E+00 ± 1.5E+01 a	6.7E+00 ± 2.0E+01 a
2aF4		5.8E+01 ± 6.9E+01 ab	1.2E+01 ± 1.6E+01 a	1.0E+01 ± 1.6E+01 a	2.3E+01 ± 3.3E+01 a	1.3E+01 ± 1.2E+01 a
2aF43		8.2E+01 ± 4.0E+01 b	5.0E+01 ± 3.0E+01 b	4.0E+01 ± 3.4E+01 a	1.8E+01 ± 2.2E+01 a	1.2E+02 ± 1.3E+02 b
Vertalec	98%	5.0E+01 ± 5.3E+01 a	9.0E+01 ± 8.0E+01 b	1.0E+02 ± 1.1E+02 ab	7.0E+02 ± 4.5E+02 c	1.0E+04 ± 5.8E+03 a
Mycotal		3.3E+01 ± 3.7E+01 a	2.0E+01 ± 2.7E+01 a	5.5E+01 ± 4.7E+01 a	5.8E+01 ± 4.5E+01 a	1.1E+04 ± 1.6E+03 a
B-2		3.2E+01 ± 2.6E+01 a	5.7E+01 ± 3.3E+01 ab	4.5E+01 ± 4.6E+01 a	6.7E+01 ± 5.5E+01 a	1.7E+00 ± 8.5E+00 a
2aF4		1.1E+01 ± 1.2E+02 a	7.7E+01 ± 6.2E+01 b	1.0E+02 ± 7.6E+01 ab	5.4E+02 ± 2.5E+02 bc	6.0E+04 ± 8.7E+03 b
2aF43		2.6E+01 ± 2.0E+02 b	1.1E+02 ± 5.2E+01 b	1.7E+02 ± 7.7E+01 b	4.2E+02 ± 2.2E+02 b	8.1E+04 ± 2.7E+04 c
Vertalec	100%	7.2E+04 ± 2.2E+04 b	8.4E+04 ± 2.7E+04 c	1.3E+05 ± 5.4E+04 c	3.4E+05 ± 8.9E+04 c	2.3E+05 ± 9.4E+04 c
Mycotal		1.6E+04 ± 8.1E+03 a	2.6E+04 ± 1.6E+04 ab	8.7E+04 ± 4.1E+04 b	1.6E+05 ± 2.9E+04 b	5.8E+04 ± 2.5E+04 b
B-2		6.5E+03 ± 2.8E+03 a	8.0E+03 ± 3.2E+03 a	2.4E+04 ± 1.1E+04 b	8.3E+04 ± 4.7E+04 b	1.5E+05 ± 6.0E+04 b
2aF4		9.6E+03 ± 2.5E+03 a	3.4E+04 ± 1.1E+04 b	7.2E+04 ± 3.6E+04 b	1.4E+05 ± 1.9E+04 b	2.4E+05 ± 5.3E+04 c
2aF43		5.6E+04 ± 2.9E+04 b	8.5E+04 ± 2.9E+04 c	9.7E+04 ± 2.4E+04 bc	1.2E+05 ± 2.0E+04 ab	2.7E+05 ± 6.2E+04 c

^a Days post inoculation.

^b The small different letters indicate intraday significant difference (one way ANOVA, $p<0.05$) in each RH conditions according to Tukey's test.

^c The different capital letters indicate the significant difference (one way ANOVA, $p<0.05$) among RH conditions in same strains and dpi according to Tukey's test.

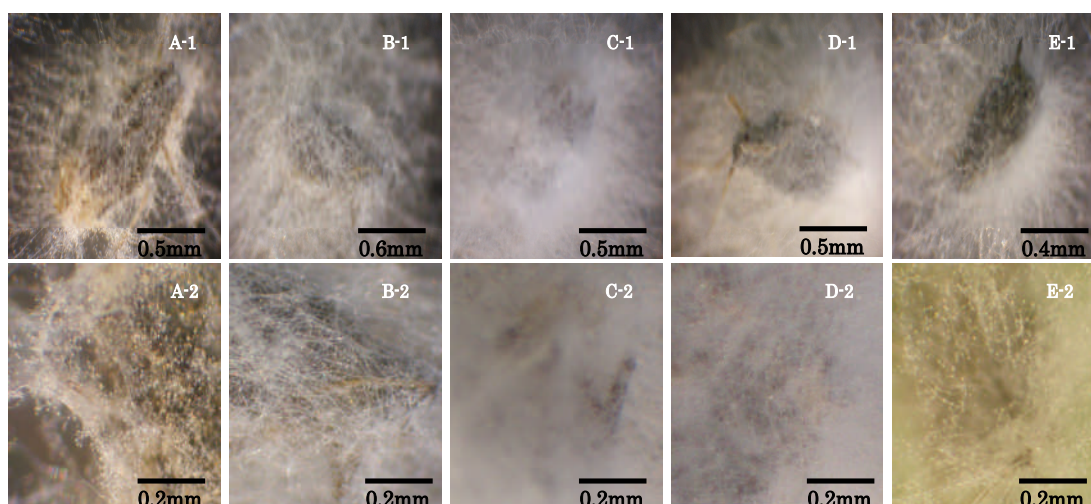


Fig. 1. The mode of conidiation in *Lecanicillium* spp. on cotton aphid cadaver. A-1: The cadaver of cotton aphid infected by Vertalec with sparse hyphae (5 days post inoculation). A-2: Extended figure of A-1. There were many spore head outside of sparse hyphae. B-1: The cadaver of cotton aphid infected by Mycotal with fluffy hyphae (4 days post inoculation). B-2: Extended figure of B-1. There were less spore heads outside of fluffy hyphae. C-1: The cadaver of cotton aphid infected by B-2 with fluffy hyphae (5 days post inoculation). C-2: Extended figure of C-1. There were less spore heads outside of fluffy hyphae. D-1: The cadaver of cotton aphid infected by 2aF4 with fluffy hyphae (7 days post inoculation). D-2: Extended figure of D-1. There were less spore heads outside of fluffy hyphae. E-1: The cadaver of cotton aphid infected by 2aF43 with sparse hyphae (4 days post inoculation). E-2: Extended figure of E-1. There were many spore head outside of sparse hyphae. The bars indicate the each length of infected aphid cadaver.

相対湿度 98%では5日目、相対湿度 100%では3日目から菌の叢生が確認された。過去の研究から、Vertalec®と Mycotal®共に相対湿度 92%において生育が可能であるが報告されている (HELYER et al., 1992)。また、相対湿度 85%において発芽は可能であるが、相対湿度 76%においては確認されていない (KOPE et al., 2007)。ゆえに、本試験に供試した菌株は相対湿度 86%において、アブラムシ体表上で発芽は行なっていたと考えられるが、菌の叢生は確認されなかったため、アブラムシ体表上での菌の生育もしくは分生子の再形成に至らなかったと推察される。ただし、2aF43 に関しては相対湿度 86%で接種7日目から10日目にかけて cfu 値が約7倍に増加していることから、菌の叢生は確認できないまでも、アブラムシ体表上で分生子が発芽し軽微な生育を行なっていたと推定できる。

これまで *Lecanicillium* 属菌を用いて実際に防除を行う際、高い効果を得るためには相対湿度 100%以上を14時間~16時間継続する必要があるとされてきた (MILNER and LUTTON, 1986)。しかし、融合株は相対湿度 98%において接種10日目の cfu 値が、相対湿度 100%における接種5日目と同等の cfu 値を示した。融合株は相対湿度 98%においても十分な菌の生育が可能であり、相対湿度が 100%に満たない環境下においても防除効果を示すことが期待される。また、上記のように 2aF43 は、相対湿度 86%でも生育することが考えられる。以上の結果から、2aF43 が他の菌株と比較して明らかに低湿度に対し適応しており、これは非常に有望な特性であると考えられる。

HALL (1984) は、*Lecanicillium* 属菌の分生子塊の

付き方の違いが菌の拡散に影響を与え、特に菌糸の層の外側に分生子塊を多くつける Vertalec®は感染拡大能力に秀でている可能性を論じている。Mycotal® (Fig. 1, B-2)、B-2 (Fig. 1, C-2) および 2aF4 (Fig. 1, D-2) は Vertalec®様の分生子塊形成の特性を有していない。しかし、2aF43 (Fig. 1, E-2) は、Vertalec® (Fig. 1, A-2) と同様な分生子塊を形成する特性を持つことから、感染拡大能力に優れている可能性がある。この 2aF43 における特性は、プロトプラスト融合が菌の持つ様々な特性や基本的性状に対し変化を与えことにより得られた形質であり、融合後の遺伝的変化による影響であると推察される (相内ら, 2007; AIUCHI et al., 2008b)。

以上の結果から、低湿度条件下での菌の生育能力や感染拡大能力が期待される分生子塊の付き方を有する 2aF43 は、微生物防除資材として有用である。しかし、今回の試験にはアブラムシの死亡虫を供試しているため昆虫側の生体防御反応等は考慮していない。今後は、アブラムシ生体を用いて実験を行なう必要がある。また、感染個体から健全個体への菌の伝播と分生子塊の形成様式にどのような関係性があるのかもさらなる検討課題である。

摘 要

有用系統として選抜されたプロトプラスト融合株が、ワタアブラムシ死個体上においてどの程度の湿度条件下で効果を示すかを調査した。さらに、*Lecanicillium* 属菌の感染拡大は基本的に接触感染によって生じるため分生子塊の付き方も評価した。

相対湿度 86%および 98%条件下で 2aF43 が他の菌株よりも高い生育能力を示した。また分生子塊の付き方は、感染の拡大に秀でる Vertalec®と同様な付き方を有することが明らかとなった。以上の結果から、2aF43 は低湿度条件下での菌の生育および他個体への菌の感染拡大が期待され、微生物防除資材として有望視される。

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. (2008a) 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. Apl. Int.*, **20**, 1-16.

AIUCHI, D., BABA, Y., INAMI, K., SHINYA, R., TANI, M. and KOIKE, M. (2008b) Variation in growth at different temperatures and production and size of conidia in hybrid strains of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) *Appl. Entomol. Zool.*, **43**, 427-436.

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.

FORNEY, C. F. and BRANDI, D. G. (1992) Control of humidity in small controlled-environment chambers

using glycerol-water solution. *Hort Technology*, **2**, 52-54.

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 plantdiseases. *J. Invertebr. Pathol.*, **98**, 256-261.

HALL, R. A. (1984) Epizootic potential for aphids of different isolates of fungus *Verticillium lecanii*. *Entomophaga*, **29**, 311-321.

HELYER, N., GILL, G., BYWATER, A., CHAMBERS, R. and BROOKS, G. T. (1992) Elevated humidities for control of chrysanthemum pest with *Verticillium lecanii*. *Pestic. Sci.*, **36**, 373-378.

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/warp Bulletin*, **27**, 41-44.

KOPE, H. H., ALFARO, R. I. and LAVALLEE, R. (2007) Effect of temperature and water activity on *Lecanicillium* spp. conidia germination and growth, and mycosis of *Pissodes strobi* *BioControl.*, **53**, 489-500.

LUZ, C. and FARGUES, J. (1999) Dependence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on high humidity for infection of *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia*, **146**, 33-41.

MILNER, R. J and LUTTON, G. G. (1986) Dependence of *Verticillium lecanii* (Fungi: Hyphomycetes) on high humidities for infection and sporulation using *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) as host. *Environ. Entomol.*, **15**, 380-382.

ZARE, R. and GAMS, W. (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia*, **73**, 1-5.