

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(39)

天敵生物：昆虫寄生菌

宮城県園芸試験場 増 田 俊 雄

昆虫に寄生し病気を引き起こす糸状菌（カビ）は昆虫寄生菌や昆虫病原糸状菌と呼ばれ、数多くの種類が知られている。現在、我が国で農薬登録を取得した昆虫寄生菌製剤は、クワ、カンキツ類およびイチジクなどのカミキリムシ類を対象とした *Beauveria brongniartii* の不織布製剤「バイオリサ・カミキリ」があるが、今後、施設栽培を中心としたコナジラミ類やアブラムシ類などの昆虫寄生菌製剤として *Verticillium lecanii* や *Beauveria bassiana* の散布製剤が登録されてくるものと考えられる。昆虫寄生菌は同一種に分類されていても、菌株によって害虫類に対する病原力が異なる場合が多く（Hall, 1982; Kanagaratnam et al., 1982; 増田・菊池, 1992; 増田, 1992; 津田ら, 1996, 1997; 増田, 1998）、製剤に含まれる昆虫寄生菌や採集した寄生菌の病原性を調査しておくことはきわめて重要である。そこで、今回は野外で比較的普通に見られ、また、すでに製剤の委託試験が実施されている *V. lecanii* と *B. bassiana* の害虫類に対する病原性の検定法について述べる。

I 接種液の準備

1 昆虫寄生菌製剤

製剤は含まれる昆虫寄生菌の孢子濃度がわかっている、それに基づいて製剤を滅菌水で希釈する。孢子濃度は1 ml あたり 1×10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 個というように、10 倍単位で階段希釈するとよい。通常の場合はこれを接種液として用いてよいが、正確を期するような試験の場合は製剤に含まれている菌を一度分離し、培地（ブドウ糖 40 g, ペプトン 10 g, 寒天 15~20 g, 蒸留水 1,000 ml）上で培養してそれを用いる。製剤からの菌の分離は以下のように行う。製剤を10 倍単位で数段階に希釈し、それぞれの希釈液を約1 ml、直径9 cm のシャーレに固化させた0.2%の酵母エキスを加用した

サブロー寒天培地に入れて均一にのばす。25℃前後で2~5 日程度培養すると菌糸が伸びてくるので、一面に菌糸が発生しているものは除外し、菌のコロニーが重なり合わないようなシャーレを選ぶ。選んだシャーレを裏側から実体顕微鏡で観察し、そのなかから菌糸がそれぞれ離れているコロニーに油性ペンで印をつけておく。クリーンベンチの中で、印をつけたコロニーの部分を培地ごと切り取り、新しい培地に移して再び培養する。菌が十分に伸びたら（菌種によって異なるが、おおむね7~20 日間）、界面活性剤（Tween 20, 0.01~0.02% など）を加用した滅菌水で孢子を懸濁し、血球計算盤で濃度を決定したあと、試験用に10 倍単位で希釈する。通常は $10^4 \sim 10^8$ 個/ml の濃度範囲で行う。なお、菌を保存する場合は、試験管の斜面培地で培養した後、5℃に保持すると3 か月から1 年間は生存している。凍結させておけば、さらに長期期間保存が可能である。

製剤からの分離は比較的簡単であり、雑菌が混じることもほとんどない。また、現在試験などに用いられている製剤は、複数の菌株やほかの菌種が混合されているものはないので、明らかに菌糸の様子（色や形）が異なるもの以外は目的の菌と考えてよい。

2 病死虫からの昆虫寄生菌の分離

寄生菌に感染して死亡した昆虫は体表面や体節間から菌糸や孢子が発生していることが多く、比較的に見つけやすい。死亡虫が複数いる場合は、なるべく新鮮な死亡虫（死亡直後のもの）を選ぶ。また、周辺の生存虫からも目的の菌が高率でとれる場合がある。*V. lecanii* はアブラムシ類やコナジラミ類に発生する場合が多く、*B. bassiana* は半翅目の成幼虫、鱗翅目の幼虫、鞘翅目の成虫などで見つかることが多い。アブラムシ類、コナジラミ類の *V. lecanii* の分離は以下のように行う。死亡虫を潰さないようにピンセットや細筆などで70~75%エタノールの中に浸し、1~3 分程度表面消毒する。サンプルが多くある場合は、体表面消毒の時間を何段階かに変えて行うとよい。表面消毒後は滅菌したろ紙上に引き上げてエタノールをとばし、乾いたらシャーレに流した0.2%の酵母エキスを加用したサブロー寒天培地においてふたをする。その後、25℃程度の恒温器に入れて培

Methods for the Measurement of Susceptibility of Agricultural Insect Pests and Natural Enemies to Pesticides. Entomopathogenic Fungi. By Toshio MASUDA

（キーワード：天敵微生物、昆虫寄生菌、病原性検定、ボーベリア・バッシアナ、パーティシリウム・レカニ、*Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*）

養する。*V. lecanii* は白色～淡黄色の菌そう色であり、このような菌ができたなら試験管の斜面培地に移しさらに培養する。菌が発育してきたらクリーンベンチ内で白金耳に滅菌水をつけて菌そうの表面から胞子をかき取り、9 cm シャーレで固化させた培地にギザギザの線を描くように薄くのばす。シャーレを変えてそれを数回繰り返す。慣れてくれば、昆虫の体表面に発生した菌から直接胞子をかき取って、同様に行ってもよい。*B. bassiana* は体表面に多くの胞子を作ることが多いので、死亡虫からの直接かき取りが効率的である。処理後は25℃前後で2～5日間培養し、昆虫寄生菌製剤の場合と同様にして試験に供試する。得られた菌は検索表を用いて種を同定するが（青木，1989），はっきりしない場合は専門家に依頼する。

II 検 定 方 法

1 虫体浸漬（散布）法

昆虫寄生菌の病原性を確認するうえで最も一般的であり、I で得られた昆虫寄生菌の胞子接種液に直接供試虫を浸漬（散布）し、その後の感染発病を観察する方法である（増田・前田，1998；増田・菊地，1992；増田，1993；増田，1998）。

1) アブラムシ類の場合

供試虫は野外で採集されたものでも室内飼育されたものでもよいが、ステージは脱皮による影響を受けない無翅胎生雌虫が適している。供試虫を $10^4 \sim 10^8$ 胞子/m^l の範囲で希釈した接種液に1～5秒間浸漬し、その後、ろ紙上に引き上げて体表に付着した懸濁液を取り除く。処理後水分が乾燥し歩行を始めた供試虫のうち、脚部や触覚などが破損していない外見上健全な虫を選んで、餌植物とともに飼育容器に5～10個体収容する。1濃度あたりの供試虫数は20個体以上が望ましい。感染には高湿度が必要なので飼育容器は密閉できるネジ口式のスチロール管瓶（径3 cm，高さ85 cm）などがよいが、パ

ラフィルムなどで密閉すればプラスチックシャーレも使用できる。飼育容器内の湿度は餌植物の水分によりほぼ100%になる。このとき、容器内部に水滴が発生して供試虫が溺死することがあるので、菌以外の要因による死亡虫の発生をできるだけ防止するため容器にろ紙を敷いたりペーパータオルを折りたたんで入れておく。餌植物は常に新鮮なものを与えるようにする。接種後は定温器などに入れて飼育するが、高温条件では餌条件の悪化やほかの要因による死亡虫の発生が多くなるので、筆者は20℃で試験している。調査は接種7日後ぐらいまでできれば毎日、供試虫の生死の判別で行う。死亡虫は湿室条件下において接種菌による死亡虫数を確認する。

2) 鱗翅目害虫の場合

鱗翅目害虫による作物への被害はほとんどが幼虫によるものなので、コナガ幼虫に対する *B. bassiana* の病原性検定を例に説明する。コナガは1齢から4齢を経過して蛹化するが、1齢幼虫は体サイズが小さいので扱いにくく、また、2,3齢幼虫は齢期間が短いので齢期後半に接種を行うと感染前に脱皮して正確なデータが取れなくなるので、病原性検定には体サイズが最も大きく齢期間も長い4齢幼虫を用いて行うとよい。

接種方法は1)のアブラムシ類に対する方法とほぼ同様で、供試虫を浸漬処理しろ紙上で風乾させた後、ろ紙を敷いたプラスチックシャーレ（径9 cm）内に餌のキャベツ生葉とともに5～10個体収容する。コナガの場合はアブラムシ類ほどデリケートでなくてよく、温度条件も20～25℃の範囲でよい。また、供試虫の数が多い場合などは接種液をハンドスプレーなどで散布してもよく、虫体浸漬とほぼ同様の結果が得られる。調査はアブラムシと同様である。

3) オンシツコナジラミの場合

(1) 成虫

ウンカ飼育容器などに成虫を放飼し、その中に50 ml/三角フラスコに水差ししたイチゴやインゲンの葉など餌植

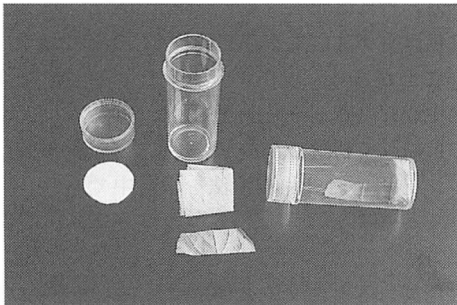


図-1 アブラムシ類の検定用飼育容器

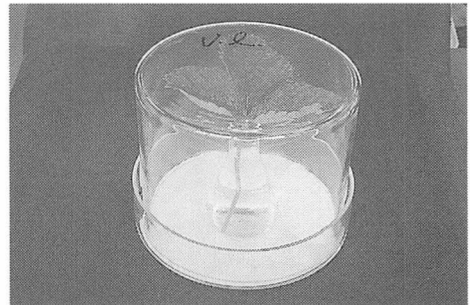


図-2 オンシツコナジラミ成虫の検定用飼育容器

物を入れて一昼夜おき、成虫を餌植物に50個体程度定着させる。ハンドスプレーなどで成虫が逃げないように静かに接種液を噴霧し、成虫数をカウントした後、三角フラスコごと腰高シャーレに収容して、25°C前後で飼育する。1濃度あたり3反復以上で実験するのが望ましい。成虫の試験では供試虫の逃亡のおそれがあるので、調査は外側から見て死亡虫の発生が認められてからになるが、筆者は *V. lecanii* を用いた試験で接種4日後に実施している。

(2) 幼虫など

ハダニ薬剤検定試験などで用いられるリーフディスク法で行う。幼虫の寄生が認められるイチゴやインゲンなどの植物を採集し、直径2cm程度に打ち抜いて使用する。発育ステージを分けて試験する場合は(1齢, 2齢, 3齢幼虫など)、実体顕微鏡下で極細の針を用いてほかのステージをあらかじめ取り除いておく。1リーフディスクあたりの幼虫数は、30個体前後が調査しやすい。このリーフディスクにハンドスプレーなどで接種液を噴霧し、風乾する。処理したリーフディスクは塩化ビニール製アイスクリームカップのふたに穴を開けてカップに入れた水を舌状に切った部分から吸水させるようにしたろ紙上に置いて、25°C前後で飼育する。反復数は3~5反復とする。調査は実体顕微鏡を用い、接種5~7日後

までできれば毎日行い、菌糸の発生があったり、変色や陥没が認められるものを死亡虫として計数する。

4) アザミウマ類(ミカンキイロアザミウマ)の場合
微小な昆虫なので、筆者は最も体の大きい雌成虫を用いて実施している。直径10cmの亚克力円筒の片側開口部にゴースを張りつけた飼育容器にミカンキイロアザミウマ雌成虫をいれ、他方開口部をパラフィルムなどでシールする。接種液をゴース側からハンドスプレーなどで噴霧し、その後すぐにシールしたパラフィルムを交換するとともに、ゴースを張りつけた開口部を下にしてペーパータオル上におき、余分な水分を吸収させる。動き出した雌成虫を選び、吸虫管で5個体ずつ飼育容器に移す。飼育容器は直径5.5cmのプラスチックシャーレを逆さにして用い、フタの部分に湿らせた同サイズのろ紙を2枚敷き(餌の乾燥や供試虫の逃亡を防ぐため)、直径約4cmに切り取ったパラフィルムをのせて、その上に餌のソラマメ催芽種子を置く。シャーレの底(皿)には直径3mmの穴を開け、ゴースを張りつけて換気できるようにしておく。1濃度あたりの供試虫数は20個体以上が望ましく、20~25°Cで飼育する。調査は供試虫の生死の判別で行い、死亡虫は湿室条件下において接種菌による死亡虫数を確認する。

2 葉片浸漬法

虫体浸漬法よりも簡便であるが、供試虫の処理葉への接触程度で効果が振れる場合がある。供試虫が積極的に餌植物を摂食するような場合は有効な方法である。筆者はアブラムシ類、コナガ幼虫、ミカンキイロアザミウマで実施しているが、コナガ幼虫では虫体浸漬法よりも感度が鈍いようである。アブラムシ類やミカンキイロアザミウマについては虫体浸漬と変わらない結果を得ている。手順は、供試虫の餌植物を接種液に10秒間程度浸漬して風乾後、飼育容器に供試虫と処理葉を入れてその後は虫体浸漬法と同様に飼育する。調査も虫体浸漬法と同様である。

ミカンキイロアザミウマの検定については、本虫は微小であり、特に雌成虫に対する検定の場合、餌替えや調査中に供試虫が逃亡することが多く、正確な結果を得られないことがある。現在、現場でできる簡易な薬剤検定、昆虫成育制御剤や昆虫寄生菌など検定に時間がかかるものに対して利用できる方法としてマイクロピペットのチップを用いた葉片浸漬法を検討中であり、紹介する。

1) 方法

検定用飼育容器にマイクロピペットの青チップを(1ml/用)用い、そのなかに供試虫と処理葉を入れる方法

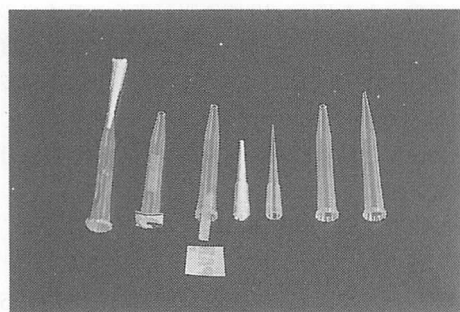


図-3 ミカンキイロアザミウマ葉片浸漬用飼育容器

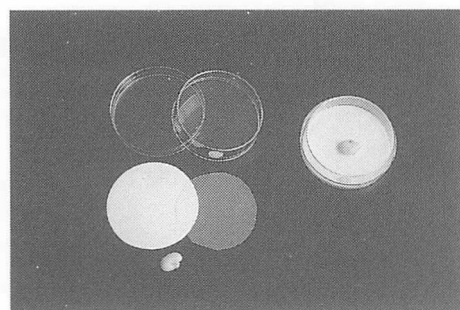


図-4 ミカンキイロアザミウマ虫体浸漬用飼育容器

で、先端を約1cm（直径3mm程度）切り取った青チップに短冊状に切った処理葉（キャベツ、5×15mm）をチップ中央部まで押し込んで、できるだけ処理葉が動かないようにセットする。チップの底をパラフィルムに強く押しつけて張りつけ、先端部から供試虫を放飼する。餌植物はキクの葉などでもよいが、キャベツはミカンキイロアザミウマの成虫がよく摂食し、餌持ちがよい。放飼は、吸虫管の先端に青チップを取り付けて成虫をチップ内に吸い取り、その先端部を飼育容器の放飼口に差し込んで側面を軽く叩いて落とし込む。放飼口には、湿度調節と逃亡防止のため、先端を約1cm切り取って（直径2mm程度）中にペーパータオル（キムワイブ）を詰めた黄色チップを押し込んで栓をする。1容器あたりの供試虫は5～10個体がよいと思われる。20～25℃で飼育する。

2) 調査

虫体浸漬（散布）法と同様に行う。

マイクロピペットのチップを用いた葉片浸漬法は、観

察容器内部を高湿度に保てることから昆虫寄生菌の感染に好適であり、餌持ちもよいこと、栓から余分な水分が抜け壁面に水滴がつきにくいので溺死等による処理以外の要因による死亡虫の発生が少ないこと、供試虫の放飼が簡単であること、外側からの観察が可能であり、外側から生死の判別が難しいときには底部のパラフィルムをはがして調査できること、場所を取らず、持ち運びができることなどから、有効な方法であると考えている。

引用文献

- 1) 青木襄児 (1989) : 昆虫病原菌の検索, 全国農村教育協会, 東京, 280 pp.
- 2) 津田勝男ら (1996) : 応動昆 40: 318～321.
- 3) ————ら (1997) : 同上 41: 95～98.
- 4) HALL, R. A. (1982) : J. Invertebr. Pathol. 27: 41～48.
- 5) KANAGARATNAM, P., et al. (1982) : Ann. Appl. Biol. 100: 1～11.
- 6) 増田俊雄・菊地 修 (1992) : 応動昆 36: 239～245.
- 7) ————・前田正孝 (1989) : 同上 33: 101～104.
- 8) ———— (1992) : 北日本病虫研報 43: 191～193.
- 8) ———— (1993) : 同上 44: 189～190.
- 9) ———— (1998) : 応動昆 42: 51～58.

発行図書

生物農薬ガイドブック 1999

社団法人日本植物防疫協会 編 A5判 口絵カラー21頁 本文158頁

定価 2,100 円税込み（本体 2,000 円） 送料 310 円

生物農薬（BT 剤を除く）についての概論と利用できる各剤の成分・特徴・適用内容・使用方法・使用上の注意点・使用例のデータについて詳しく解説。口絵では、剤ごとのパッケージ・内容物・対象病害虫雑草・処理場面などを掲載し、生物農薬の実用書として、技術指導書として最適です。

お申し込みは直接当協会へ、前金（現金書留・郵便振替）で申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11

郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03) 3944-1561(代) FAX (03) 3944-2103 メール: order@jppa.or.jp

発行図書

農薬ハンドブック 1998 年版

同書編集委員会 編 A5判 本文 925 頁

定価 8,400 円税込み（本体 8,000 円） 送料サービス

市販農薬を用途別に作用特性、使用上の注意、各製剤の使用方法・適用などについて解説。一般名・化学名・構造式・物理化学的性質、毒性・魚毒性を付録にまとめた農薬に関する解説書です。

お申し込みは直接当協会へ、前金（現金書留・郵便振替）で申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11

郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03) 3944-1561(代) FAX (03) 3944-2103 メール: order@jppa.or.jp