

昆虫病原糸状菌 *Beauveria bassiana* のイネドロオイムシに対する病原性

石本 万寿広

Masuhiko ISHIMOTO :

Pathogenicity of entomogenous fungus, *Beauveria bassiana*,
to the rice leaf beetle, *Oulema oryzae* (Kuwayama)

現在、水稲害虫の防除は化学合成農薬に大きく依存しており、化学合成農薬によらない害虫防除技術の開発が求められているが、これまでに実用化された技術は一部に限られている。イネドロオイムシは、新潟県における水稲の主要な初期害虫であるが、その防除は専ら殺虫剤の育苗箱施用あるいは本田期の散布により行われており、他に有効な防除法がない状況にある。

害虫の生物的防除法の一つとして、昆虫病原糸状菌による防除法が挙げられる。昆虫病原糸状菌は、昆虫に感染し、死亡させる糸状菌をさすが、多くの昆虫種で多様な種が分離されている¹⁾。水稲害虫からの分離例も多く、生物防除の有効な素材の一つと考えられる。

イネドロオイムシでは、越夏・越冬場所であるススキなどで白色の糸状菌を叢生し死亡している成虫がしばしば認められ、数十個体のまとまった死亡事例も観察される。新潟県内9市町村、17地点から越冬世代成虫を採集し室内飼育し死亡した個体から昆虫病原糸状菌の分離を行った結果、12地点で *B. bassiana* が分離されている(石本, 未発表)。また、越冬世代成虫のほかに、幼虫、新成虫からも *B. bassiana* が分離されている(佐藤, 未発表)。これらのことから、*B. bassiana* がイネドロオイムシの自然界での死亡要因の一つであると推察される。一方、昆虫病原糸状菌の感染には高湿度条件が必要であるが、イネドロオイムシの発育には特に卵期および若齢幼虫期に高湿度を必要とすることから²⁾、多発生する場合は、糸状菌の利用においても好適な湿度条件が期待できる圃場環境と考えられる。

これらのことから、室内接種試験により、その病原性を明らかにし、本菌を用いたイネドロオイムシの生物的防除技術の可能性を検討した。

材料および方法

1. 供試菌

当センターにおいてイネドロオイムシ成虫から分離された *B. bassiana* Nb-3 菌株を用いた。

2. 菌の培養

菌の培養は、新田³⁾の方法を一部改変して行った。

1) 液体培養

水1ℓに対し大豆50gを加え約30分間弱火で煮て、二重ガーゼでろ過して得られたろ液を培地とした。これを500mlの三角フラスコに150ml入れ高圧滅菌し、冷却後、少量の種菌を加え、25℃、全暗条件で、110rpm、3~4日間振とう培養した。

2) 固体培養

通気孔つきのポリプロピレン製培養袋(三富産業社製、大きさ:32cm×45cm、商品名:サンバック)にくず米300gおよび水150ml(水1ℓに対しクロラムフェニコール50mgを含む)を入れ、くず米に十分吸水させたのち、60分間高圧滅菌した。冷却後、培養袋を開封し、上記の液体培養物を3ml添加し、再度密封し、25℃、全明条件で15~20日間培養した。培地が固化し、分生子形成が不良になるのを防ぐため、培養期間中に数回、培地をもみほぐした。培養後は開封し、室内で風乾した。

3. 接種源の調製

固体培養物に0.05%Tween80液を加え、二重ガーゼでろ過したろ液の分生子濃度を調整し、接種源とした。濃度の測定は血球計算板を用いて行った。

4. 供試虫

試験は1995年から1997年に行ったが、各年とも5月中・下旬に三島郡寺泊町から越冬世代成虫を採集し、採集した越冬世代成虫あるいはそれらをイネ苗を餌として飼育して得られた、卵、幼虫を用いた。飼育は20℃、16L:8Dで行った。

5. 接種

1) 卵

イネ苗に産下された卵塊を、周囲のイネ葉ごと長さ数cmに切り取り、分生子懸濁液に5秒間浸漬接種した。接種後は、底部に水で湿らせたろ紙を敷いた直径9cmのガラスシャーレに移し、飼育した。ふ化幼虫は、底部に少量の水とイネ苗を入れた試験管(直径18mm, 長さ180mm)で個体飼育した。1処理当たり10卵塊を供試した。

2) 幼虫, 成虫

ポリエチレン製カップ(直径8.5cm, 高さ4cm)で育成した3~4葉期のイネ(10本/カップ)にガラス製円筒(直径7cm, 高さ17cm)を接続し、カップ当たり20頭を放虫し、分生子懸濁液2mlを噴霧接種した。接種翌日から、底部に少量の水とイネ苗を入れた試験管(直径18mm, 長さ180mm)で個体飼育した。なお、この時点での死亡個体は、調査から除外した。試験は原則として3反復で行った。

いずれも、対照には0.05% Tween80液を同様に接種した。接種後の飼育は、20°C, 16L:8Dで行った。

6. 調査

卵への接種試験では、ふ化終了後に卵塊ごとのふ化率を調査し、ふ化6日後または7日後にふ化幼虫の生死を調査し、死亡個体はその後の菌叢生の有無を調査した。幼虫、越冬世代成虫への接種試験では、経時的に生死を調査し、死亡個体は、その後の菌叢生の有無を調査した。

LT₅₀は、死亡率をAbbott¹⁾の式で補正し、プロビット変換して算出した。

結 果

1. 卵に対する病原性

分生子濃度、卵の日齢が異なる条件で、分生子懸濁液を接種し、病原性を比較した。菌および対照として0.05% Tween80液を接種した卵、ふ化幼虫いずれにも、一部、接種菌と明らかに異なる糸状菌が叢生した。それが要因で未ふ化あるいは死亡した幼虫が認められた卵塊については、結果から除外した。

0~4日齢の卵塊に接種した場合の卵塊当たりの平均ふ化率は、対照では日齢による違いは認められず、いずれもほぼ100%であったが、*B. bassiana*の接種では0日齢で0%、1日齢で37.3%、2~4日齢では対照と同等でほぼ100%であった(第1表)。また、卵塊別のふ化率は1日齢の場合、0~100%の広い範囲に分布し、卵塊によりふ化率が大きく異なったが、他の日齢では卵塊による差は極めて小さかった(第2表)。卵塊への*B. bassiana*接種でのふ化幼虫の死亡率はいずれもほぼ100%であったが、菌叢生率は日齢により異なり、日齢の進んだ卵塊への接種で高い傾向であった(第1表)。

1日齢の卵に対し、分生子濃度を $1 \times 10^6 \sim 10^8$ の3水準で接種した結果を第3表に示した。ふ化率は、接種濃度により異なり、 1×10^8 で明らかに低下した。ふ化幼虫の死亡率は40.4~100%で、濃度が高いほど高かった。死亡個体の菌叢生率も濃度が高いほど高かった。殺卵効果とふ化幼虫の殺虫効果を併せた死亡率でみた場合、 1×10^7 以上の濃度では80%以上の高い効果が認められた。

第1表 *B. bassiana*の日齢の異なるイネドロオイムシ卵に対する病原性¹⁾

日齢	処理	調査卵塊数	平均卵数/卵塊	ふ化率 ²⁾	ふ化幼虫	
					死亡率 ³⁾	菌叢生率 ⁴⁾
0	接種	9	10.0	0±0	-	-
	対照	8	10.4	100±0	11.7±5.29	0
1	接種	9	12.0	37.3±11.44	100±0	39.4
	対照	9	11.4	98.9±1.11	11.1±4.44	0
2	接種	7	11.0	100±0	100±0	76.9
	対照	9	10.8	97.8±2.22	9.8±2.27	0
3	接種	10	11.8	100±0	98.9±1.11	81.6
	対照	8	10.9	100±0	16.1±4.83	0
4	接種	10	11.6	97.7±1.84	100±0	90.3
	対照	10	10.8	100±0	13.9±4.84	0

注1) 分生子接種濃度: 1×10^4 分生子/ml

2) 卵塊当たりの平均ふ化率±S.E.

3) ふ化後6~7日の卵塊当たりの平均死亡率±S.E.

4) (菌叢生死亡個体数/総死亡個体数)×100

第2表 *B. bassiana*を日齢の異なる卵に接種した場合のふ化率の分布

日齢	ふ化率別卵塊数 ¹⁾					
	0	0<, ≤25	25<, ≤50	50<, ≤75	75<, <100	100
0日	9(100)					
1日	2(22)	1(11)	4(44)		1(11)	1(11)
2日						7(100)
3日						10(100)
4日					2(20)	8(80)

注1) ()内は比率, 空欄は0

本試験では、ふ化幼虫の生死の調査はふ化後6～7日の1回のみで、調査時に幼虫の齢期は確認しなかったが、死亡個体は1齢または2齢と推定された。また、その後、同様に卵塊に接種した試験で、ふ化幼虫の死亡数を齢期別に調査した結果、1齢期の死亡の割合が高かったことから、本試験でもふ化幼虫の死亡の多くは1齢期であったと推察された。

2. 幼虫に対する病原性

第4表には1～4齢の各齢期の幼虫に接種した場合の死亡率を示した。1, 2齢期接種では、接種9日後以降、

第3表 異なる接種濃度における*B. bassiana*のイネドロオイムシ1日齢の卵に対する病原性

接種濃度 (分生子/ml)	調査 卵塊数	平均卵数/卵塊	ふ化率 ¹⁾	ふ化幼虫	
				死亡率 ²⁾	菌叢生率 ³⁾
1 × 10 ⁶	10	11.8	89.6 ± 2.65	40.4 ± 4.91	16.4
1 × 10 ⁷	7	9.9	90.6 ± 8.05	86.2 ± 4.74	31.5
1 × 10 ⁸	7	11.9	53.0 ± 10.56	100 ± 0	73.3
対 照	10	10.7	98.5 ± 1.04	12.8 ± 6.05	0

注1) 卵塊当たりの平均ふ化率 ± S.E.

2) ふ化後6日の卵塊当たりの平均死亡率 ± S.E.

3) (菌叢生死亡個体数/総死亡個体数) × 100

第4表 *B. bassiana*のイネドロオイムシ幼虫に対する病原性

接種齢期 ¹⁾	接種濃度 ²⁾ (分生子/ml)	幼 虫 期						補正死亡率 ³⁾ (a)	蛹 期		幼虫期+蛹期 推定感染死亡率 (a) + (b)
		齢 期 別 死 亡 率							死亡率	菌叢生死亡率 ⁴⁾ (b)	
		1 齢	2 齢	3 齢	4 齢	合 計					
1 齢	1 × 10 ⁶	0	25.1	5.3	1.7	32.1 (6.7) ⁵⁾		19.3			
	1 × 10 ⁷	5.1	37.0	11.9	1.7	55.7 (23.2)		47.4			
	対 照	0	8.7	5.4	1.8	15.8 (0)					
2 齢	1 × 10 ⁶ *		7.5	12.5	2.5	22.5 (12.5)		5.7			
	1 × 10 ⁷		5.2	28.0	24.1	57.2 (31.5)		48.0			
	1 × 10 ⁸		55.0	32.2	5.6	92.5 (45.7)		90.8			
対 照		1.9	3.5	12.4	17.8 (0)						
3 齢	1 × 10 ⁶ *			2.5	17.5	20.0 (46.7)		14.1	42.5 (29.9) ⁵⁾	12.5	26.6
	1 × 10 ⁷			0	25.0	25.0 (8.3)		19.5	66.7 (32.4)	21.7	41.2
	1 × 10 ⁸			35.6	27.1	62.7 (34.8)		60.0	37.3 (85.7)	32.1	92.1
対 照			3.4	3.4	6.8 (0)			51.1 (0)	0		
4 齢	1 × 10 ⁷				11.7	11.7 (41.7)		3.4	86.7 (69.6)	60.0	63.4
	1 × 10 ⁸				38.3	38.3 (62.0)		32.6	61.7 (88.5)	53.3	85.9
	対 照				8.5	8.5 (0)			65.7 (0)	0	

注1) 1, 2齢期接種は接種後8日までのデータ

2) *は2反復平均, 他は3反復平均

3) Abbottの補正死亡率

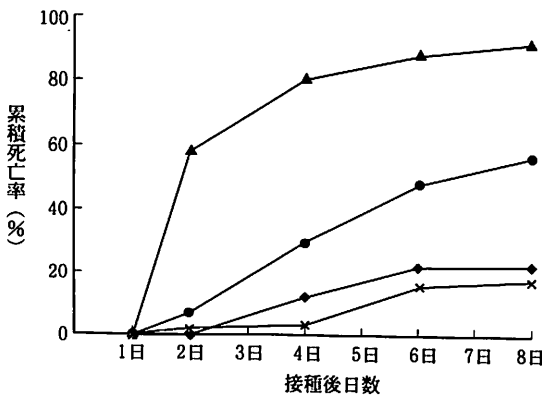
4) (菌叢生死亡個体数/供試個体数) × 100

5) 菌叢生率: (菌叢生死亡個体数/総死亡個体数) × 100

餌質の低下に起因すると思われる死亡が増加したことから、接種8日後までのデータを示した。また、3、4齢期接種では対照の蛹期の死亡率が高かったことから、蛹期については死亡後体表面に菌を叢生した個体を感染死亡個体として扱った。

いずれの齢期の接種においても、接種齢期およびその後の幼虫齢期、蛹期に死亡が認められた。また、接種濃度が高いほど死亡率が高く、致死期間も短かった。第1図には2齢幼虫に接種した場合の、接種後日数別の死亡率の推移を示した。1×10⁸では、接種4日後におよそ80%の死亡率を示したが、1×10⁶、1×10⁷では死亡率の増加は緩慢であった。

1×10⁸での2～4齢期接種の結果を比較した場合、接種齢期が進むほど幼虫期の死亡割合が低下し、蛹期の死亡割合が増加した。幼虫期と蛹期を併せた推定感染死亡率では、齢期による顕著な違いは認められなかった。



第1図 *B. bassiana*を接種したイネドロオイムシ2齢幼虫の死亡率の推移

注) ●: 1×10⁸ ●: 1×10⁷ ▲: 1×10⁶ ×: 対照

3. 成虫に対する病原性

越冬世代成虫に、1×10⁵～1×10⁸の濃度で、分生子懸濁液を接種した(第5表)。野外採集虫を用いたことから、対照として0.05% Tween80液を接種した場合にも、白色の菌を叢生した死亡虫が認められたが、その数はごくわずかで、試験に支障はないと思われた。

接種5日後から、対照と比べ明らかな死亡率の増加が認められた。接種9日後の補正死亡率は、1×10⁵は20.7%、1×10⁶は59.6%、1×10⁷は87.5%、1×10⁸は94.0%で濃度が高いほど高かった。また、LT₅₀は、1×10⁶は8.2日、1×10⁷は6.6日、1×10⁸は5.7日で、濃度が高いほど短かった。死亡虫の菌叢生率は、1×10⁶以上の濃度では、80%以上と高かった。

考 察

水田は田面水の存在により高湿度が維持されやすく、昆虫病原糸状菌の利用には好適な条件であると考えられる⁵⁾。我が国では、これまで水稲害虫を対象とした圃場レベルの試験が、イネクロカメムシ⁶⁾、イネミズゾウムシ⁶⁾、ツマグロヨコバイ^{8,9)}で行われ、実用的な防除効果が認められている。

イネドロオイムシでは、前述のように *B. bassiana* が自然界での主要な死亡要因の一つであると推察され、また、多発生する場合は特に高い湿度条件が期待できる圃場環境で、糸状菌の利用にも好適な条件であると考えられる。昆虫病原糸状菌に関しては、桜井ら¹⁰⁾の *B. bassiana* を用いた試験があるが、卵に対する病原性は未検討で、幼虫に対しても部分的な試験に限られていて、その防除への利用法や実用性を評価するには未明な部分が多い。

今回の試験では、イネドロオイムシ成虫から分離した *B. bassiana* Nb-3 を用いて室内接種試験を行った結果、成虫の他に、卵、幼虫に対しても病原性を示した。

卵に対する病原性は殺卵効果とふ化幼虫に対する殺虫

第5表 *B. bassiana*のイネドロオイムシ成虫に対する病原性

接種濃度 (分生子/ml)	累積死亡率 (%)						LT ₅₀ (日)	菌叢生率 ¹⁾
	3日	4日	5日	6日	7日	9日		
1×10 ⁵	0	0	0	3.3	11.7	28.6 (20.7) ²⁾	—	61.9
1×10 ⁶	1.8	1.8	5.2	13.7	29.1	63.6 (59.6)	8.2	88.2
1×10 ⁷	6.7	6.7	15.4	38.3	60.0	88.8 (87.5)	6.6	88.3
1×10 ⁸	1.9	7.0	34.4	65.4	82.6	94.6 (94.0)	5.7	97.9
対 照	3.3	3.3	3.3	5.0	6.7	10.0		44.4

注1) (菌叢生死亡個体数/総死亡個体数)×100

2) Abbottの補正死亡率

効果として認められ、これらは、接種分生子濃度の他に卵の日齢により異なることが明らかとなった。殺卵効果は日齢の若い卵に対してのみ認められたが、ふ化幼虫に対する殺虫効果はいずれの日齢の卵でも認められ、その場合1, 2 齢期に死亡する割合が高いことから、それらを併せて評価した場合、日齢による病原性の極端な低下はないと考えられる。幼虫に対しては、1~4 齢のいずれの齢期への接種でも病原性が認められ、蛹期の死亡も含めた感染死亡率には接種齢期による顕著な違いはないと考えられた。しかし、接種齢期が進むほど幼虫期の死亡割合が低下し、見かけ上正常に蛹化する割合が高まる傾向が認められ、その場合、感染による幼虫期の摂食量の低下はほとんど生じないとみられた。従って、摂食量抑制の効果は、接種齢期が進むほど大きく低下すると考えられる。

桜井ら¹¹⁾は *B. bassiana* を用いた室内接種試験で、本試験の結果と同様に幼虫、成虫いずれにも病原性を認めている。しかし、病原性の程度については、試験方法が異なることから、本試験の結果との比較は困難と思われる。

イネドロオイムシは新潟県では5月中・下旬に越冬世代成虫が水田に侵入し、侵入後まもなく産卵を始め、引き続き幼虫が発生する。成虫の水田への侵入は必ずしも斉一でなく、産卵期間も長いことから、時期により構成割合は異なるが、6月中旬頃までは、成虫、卵、幼虫が圃場内に混在する。イネドロオイムシによるイネの被害は、幼虫と成虫による葉の食害により生じるが、成虫による食害は少なく実用上問題とならない。一方、幼虫の摂食量は齢期により異なり、齢期が進むほど摂食量が増加するが、特に3 齢期以降の食害量が多く、全幼虫期間の90%以上を占め¹⁰⁾、3, 4 齢幼虫の密度とイネの減収量と関係が深いことが明らかにされている³⁾。

B. bassiana は、イネドロオイムシ卵、幼虫、成虫のいずれにも病原性を有することは、実際の利用に当たっては大きな利点であると考えられる。3, 4 齢幼虫に対しては摂食量抑制効果が低く、防除効果の低下が想定されるが、イネドロオイムシの発生時期を的確に把握し、それらの割合が低い時期に散布時期を設定することが可能であり、大きな欠点にはならないと考えられる。

以上のことから、*B. bassiana* はイネドロオイムシの防除素材としての利用性は高いと考えられるが、今後圃場散布での効果の確認が必要で、圃場散布時期や散布濃度については本菌の特性とイネドロオイムシの発生や被害の特徴を十分に考慮し、設定する必要がある。

摘 要

1. イネドロオイムシ成虫から分離した *B. bassiana*

Nb-3 のイネドロオイムシ卵、幼虫、成虫に対する病原性を、室内接種試験により明らかにした。

2. 卵に対しては、直接的な殺卵効果とふ化幼虫に対する殺虫効果が認められた。殺卵効果は日齢の若い卵、接種分生子濃度が高い場合に高かった。殺卵効果とふ化幼虫に対する殺虫効果を併せた効果では、卵の日齢に関わらず高い効果が認められた。

3. 幼虫に接種した場合、幼虫期に加え、繭期にも死亡が認められた。接種分生子濃度が高いほど死亡率が高く、致死期間も短かった。接種齢期が進むほど幼虫期の死亡割合が低下する傾向が見られた。

4. 成虫に対しては、接種分生子濃度が高いほど死亡率が高く、致死期間も短かった。1 × 10⁷ 濃度では、接種9日後の死亡率は87.5%、LT₅₀は6.6日であった。

5. 本菌は、卵、幼虫、成虫いずれに対しても病原性が認められ、生物的防除の素材として有望と考えられた。

引用文献

- 1) Abbott, W.S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- 2) 江村一雄・小嶋昭雄 (1978) イネクビボソハムシの要防除密度推定に関する研究 I. 水田での生存曲線と死亡要因の考察. *応動昆* 22: 260-268.
- 3) 小嶋昭雄・江村一雄 (1979) イネクビボソハムシの要防除密度推定に関する研究 II. 被害許容密度の推定. *応動昆* 23: 1-10.
- 4) 国見裕久 (1993) X. 日本産昆虫の天敵微生物目録. 天敵微生物の研究手法 (岩花秀典・岡田斉夫・国見裕久・島津光明編), 192-222, 日本植物防疫協会, 東京.
- 5) 松井武彦 (1994) イネ害虫の微生物的防除. *植物防疫* 48: 455-458.
- 6) 森本徳右衛門 (1954) 黒強病菌によるクロカメムシの駆除試験(1). *植物防疫* 8: 395-397.
- 7) 新田 朗 (1993) VII. 天敵微生物の大量増殖方法. 天敵微生物の研究手法 (岩花秀典・岡田斉夫・国見裕久・島津光明編), 116-121, 日本植物防疫協会, 東京.
- 8) Nitta, A. (1996) Microbial control of rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* and green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* with two entomogenous fungi. *FFTC Book Series* No.47.
- 9) 野瀬友利・青木要児・岡田斉夫 (1989) 糸状菌によるウンカ・ヨコバイ類の密度抑制効果. 第33回応動昆大会講演要旨 61.
- 10) 斎藤 満 (1974) イネドロオイムシの発生生態 1.

- 飼育温度と幼虫の摂食量. 北日本病虫研報 25: 50.
- 11) 桜井幸一・城所 隆・増田俊雄 (1995) イネドロオ
イムシの *Beauveria bassiana* による微生物防除

の試み. 第39回応動昆大会講演要旨 246.

(2000年6月23日受領)
