

## 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

相内 大吾<sup>1</sup>・馬場 ゆき子<sup>2</sup>・稲見 圭吾<sup>3</sup>・新屋 良治<sup>4</sup>・谷 昌幸<sup>1</sup>  
倉持 勝久<sup>1</sup>・堀江 早弥佳<sup>1</sup>・小池 正徳<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>帯広畜産大学環境微生物学研究室

<sup>2</sup>北海道大学植物病理学研究室

<sup>3</sup>東京農工大学植物病理学研究室

<sup>4</sup>京都大学微生物環境制御学研究室

Screening of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) Hybrid Strains Based on Evaluation of Pathogenicity against Cotton Aphid and Greenhouse Whitefly, and Viability on the Leaf Surface. Daigo AUCHI,<sup>1</sup> Yukiko BABA,<sup>2</sup> Keigo INAMI,<sup>3</sup> Ryoji SHINYA,<sup>4</sup> Masayuki TANI,<sup>1</sup> Katuhisa KURAMOCHI,<sup>1</sup> Sayaka HORIE<sup>1</sup> and Masanori KOIKE<sup>1,\*</sup> <sup>1</sup>Department of Agro-environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine; Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan. <sup>2</sup>Division of Bioresources and Product Science, Hokkaido University; Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan. <sup>3</sup>Department of Bioregulation and Biointeraction, Tokyo University of Agriculture and Technology; Tokyo 183-8509, Japan. <sup>4</sup>Department of Environmental Science and Technology, Kyoto University; Kyoto 606-8502, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 51: 205-212 (2007)

**Abstract:** In a previous study, protoplast fusion was performed among 3 strains of the entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii*, as a result of which 174 hybrid strains were obtained. The aim of the present study was to screen desirable hybrid strains that have a wide host range or durable effects. Initially, 43 hybrid strains were used in bioassays against the cotton aphid. Of these strains, 30 induced equal or higher mortality as compared to Vertalec (41.9%). Secondly, 50 hybrid strains were used in bioassays against the greenhouse whitefly. Of these strains, 37 exhibited an equal or higher infection rate as compared to that of Mycotal (36.2%). Finally, 50 hybrid strains were applied to cucumber leaves in order to test strain viability under low humidity conditions (ca. 13% RH). Two weeks after strain application, 17 hybrid strains exhibited equal or higher viability as compared to B-2 (1.5E+03 cfu/cm<sup>2</sup>). These results indicated some hybrid strains whose parental characteristics had not only recombined but also whose pathogenicity or viability had improved. Finally, we selected 13 candidate hybrid strains that exhibited high values in each experiment, and these hybrid strains can be expected to be highly effective as biological control agents.

**Key words:** Biological control; *Lecanicillium* spp.; protoplast fusion; screening; *Verticillium lecanii*

### 緒 言

昆虫寄生性糸状菌 *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viégas (*Lecanicillium* spp.) は生物防除資材としてヨーロッパを始め世界中で広く使用されており、アブラムシやコナジラミ、カイガラムシ、アザミウマ、ハダニなどの節足動物に対する寄生性を示す。日本では北沢ら (1984) によって初めてアブラムシ類とオンシツコナジラミから分離され、その後アブラムシ類 (西東, 1988) やコナジラミ類 (増

田・菊地, 1993; 西東, 1993) の防除試験が報告されている。また、*V. lecanii* はうどんこ病やさび病などの植物病原菌に対する寄生性や拮抗性 (Hall, 1980; Spencer and Atkey, 1981; Verhaar et al., 1998), シストセンチュウやネコブセンチュウなどの植物寄生性線虫に対する寄生性 (Gintis et al., 1983; Meyer and Wergin, 1998; Eapen et al., 2005) も知られており、各方面で研究が進められている。現在オランダの Koppert Biological Systems よりアブラムシ防除用に Vertalec®, オンシツコナジラミ防除用に Mycotal® が販売され

\* E-mail: koike@obihiro.ac.jp

2007年1月29日受領 (Received 29 January 2007)

2007年4月9日登載決定 (Accepted 9 April 2007)

DOI: 10.1303/jjaez.2007.205

ており、2001年には日本でも農業登録された(西東, 2001; Shah and Pell, 2003)。また、帯広分離系統のB-2 (MAFF238429)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となっている(Koike et al., 2004)。更に著者らはこれらVertalec, Mycotal, B-2の3系統間で硝酸還元能欠損変異を遺伝子マーカーとして用い、ポリエチレングリコール法によるプロトプラスト融合を行った(Aiuchi et al., 2004)。その結果Vertalec×Mycotal間で126菌株、Vertalec×B-2間で4菌株、Mycotal×B-2間で44菌株の融合株を得た(Fig. 3)。Zare and Gams (2001)は形態学的、分子生物学的解析により*V. lecanii*を*Lecanicillium*属の数種に再分類した。この新分類法に基づくとVertalecは*L. longisporum*、MycotalとB-2は*L. muscarium*となり旧分類法では種内融合であるが、新分類法ではVertalec×Mycotal、Vertalec×B-2間の融合は種間融合となる。*V. lecanii*は基本的に高い病原性を得るためには高湿度条件を要求する(Milner and Lutton, 1986; Hsiao et al., 1992)。そのため*V. lecanii*製剤の利用の場面は施設栽培に限られている。このプロトプラスト融合による育種はアブラムシ、コナジラミへの高い病原性に葉面における高い残存能力を付加することでより低いレベルの湿度要求を示し、効果の持続性が高い菌株や予防的施用が可能な菌株、またはアブラムシ、コナジラミ両害虫に対して高い病原性を持つ菌株を作出することを目的として行った。

本研究では、実際にこれらの融合株の中に有用な菌株が存在するかどうかを明らかにし、有用な菌株を選抜するためにワタアブラムシ*Aphis gossypii*とオンシツコナジラミ*Trialeurodes vaporariorum*に対する接種試験とキュウリ葉面上における低湿度条件下での(平均13.5% RH)残存能力の評価を実施した。

## 材料および方法

### 1. ワタアブラムシ若齢幼虫に対する接種試験

供試菌株は親株であるVertalec, Mycotal, B-2と融合株のうちVertalecとMycotalを親株に持つ11菌株(AaF, BbF)、VertalecとB-2を親株に持つ4菌株(2BF)、MycotalとB-2を親株に持つ29菌株(2aF)の合計43菌株を用いた。これらの融合株はワタアブラムシに対する予備接種試験(分生子濃度 $1 \times 10^7$ 個/ml)で死亡率60%を超えた株と培地上での生育試験の結果に基づいて、計155株から一次選抜された菌株である(Fig. 3)。各菌株はジャガイモブドウ糖寒天培地(PDA)上で、25°Cで10~14日間培養した。分生子懸濁液は培地に滅菌水を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盤で濃度を $1 \times 10^6$ 個/mlに調整した。本試験ではガラス室内でキュウリを餌として飼育した1, 2齢のワタアブラムシ若齢幼虫を用いた。直径90mmのシャーレに2cm四方の湿らせたろ紙と

キムワイブ(6層のキムワイブをろ紙で挟んだもの)を入れ、その上に同じサイズのキュウリリーフディスクを置いた。50頭の幼虫を細筆を用いてリーフディスクに移植し、定着させた後分生子懸濁液を噴霧接種した(約0.6ml)。対照区は滅菌水のみ同様に接種した。室温で乾燥させた後パラフィルムでシールし、25°C, 16h:8h(L:D)の条件下で飼育した。各処理につき5反復行い、接種3日後幼虫死亡個体上で菌の叢生が認められたものを素寒天培地へ移して培養し、光学顕微鏡下で*V. lecanii*であることが確認できた個体を死亡虫とした。

### 2. オンシツコナジラミ若齢幼虫に対する接種試験

供試菌株はVertalec, Mycotal, B-2の親株3菌株と、融合株のうちAaF系統11菌株、BbF系統10菌株、2BF系統2菌株、2aF系統27菌株の合計50菌株を用いた。これらの融合株はワタアブラムシに対する接種試験と培地上での生育試験の結果を踏まえて選抜された菌株である(Fig. 3)。各菌株はPDA上で7~14日間、25°Cで培養し、前述の方法で接種濃度 $1 \times 10^5$ 個/mlに調整した。供試昆虫はガラス室内でキュウリを餌植物として飼育したオンシツコナジラミを用いた。オンシツコナジラミが発生しているキュウリの葉を採取し、直径1cmのコルクボーラーでリーフディスクを打ち抜いた。1, 2齢のオンシツコナジラミ若齢幼虫以外の卵、3齢、4齢幼虫、蛹をあらかじめ微針を用いて実態顕微鏡下で取り除き、1処理につき50頭以上の若齢幼虫を供試した。接種はNalgene aerosol spray bottle (Nalgene Nunc International, Rochester, NY)を用いて分生子懸濁液をリーフディスクに噴霧接種し、対照区は滅菌水のみを同様に処理した。室温で乾燥させた後、9cmシャーレに湿らせたキムワイブとろ紙を敷き、その上にリーフディスクを静置しパラフィルムでシールした。処理後は25°C, 16h:8h(L:D)の条件下で飼育した。各処理につき3反復行い、接種3日後幼虫体上に菌糸の叢生が確認できたものを感染個体とした。

### 3. キュウリ葉面上における残存能力の評価

供試菌株は親株のVertalec, Mycotal, B-2と、融合株のうちAaF系統14菌株、BbF系統10菌株、2BF系統2菌株、2aF系統24菌株の合計50菌株を用いた。これらの融合株にはワタアブラムシに対し高い病原性を示した株(死亡率60%以上)、低い病原性を示した株(死亡率10%以下)、分生子形成能が高い株、分生子形成能が低い株、分生子サイズの大きい株と小さい株が含まれている(Fig. 3)。葉面における残存能力が害虫に対する病原性だけでなく、キュウリうどんこ病などの病害抑制効果にも影響する可能性を考慮してこれらの基準で供試菌株を選抜した。各菌株はジャガイモブドウ糖液体培地(PDB)で振とう培養し、blastosporeを得た。ビニールハウスで散布する際、大量の胞子が必要となること、またblastosporeは分生子に比べ環

境耐性が低いことからより厳しい条件で試験するため、ここでは敢えて blastospore を用いた。ガーゼでろ過した後、孢子懸濁液を3回遠心洗浄 (3,000 rpm, 5分) し、血球計算盤を用いて孢子濃度  $1 \times 10^7$  spore/ml に調整した。供試植物はプラスチックポットに植え、4葉展開したキュウリ (北進) を用い、菌処理区には孢子懸濁液を、対照区には滅菌水を Nalgene aerosol spray bottle によって滴る程度葉裏に散布した。処理後は  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、乾燥条件のとれる冬場 (12~3月) のガラス室内で生育させた (平均 13.5%RH)。残存能力は希釈平板法によって評価した。散布 1, 14, 28 日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。そして適当な段階まで希釈し、懸濁液 0.2 ml をローズベンガル培地上に滴下しコンラージ棒で培地全体に広げ、 $25^\circ\text{C}$  で 10 日間暗条件下で培養した。生じた *V. lecanii* のコロニー数を倒立顕微鏡下で計数し、その値を  $1 \text{ cm}^2$  当たりの Colony forming unit (cfu) に換算した。1 反復につき 5 枚プレートし、各菌株で 3 反復行った。

## 結 果

### 1. ワタアブラムシ若齢幼虫に対する接種試験

ワタアブラムシの幼虫に対する接種試験の結果を Fig. 1 に示した。親株内で最も高い死亡率を示したのが Vertalec で 41.9%、融合株では 2aF31 で 84.5% となった。反対に最も低い病原性を示したのは生育試験の結果から選抜された BbF6 で 12.5% であった。高い病原性を示した上位 20 株の内 BbF15, 2aF30, 2aF35 を除く 17 菌株は全て予備接種試験の結果から選抜された菌株であり、BbF15 と AaF10I を除く株は全て B-2 との融合株であった。さらに、融合株 43 菌株中 30 菌株が Vertalec の平均死亡率を上回り、上位 4 菌株については Vertalec に対し有意に高い死亡率を示した ( $p < 0.05$ , Tukey 法による多重比較検定)。

### 2. オンシツコナジラミ若齢幼虫に対する接種試験

オンシツコナジラミの幼虫に対する接種試験の結果を Fig. 2 に示した。親株内で最も高い感染率を示したのは B-2 で 72.3%、融合株の中では 2aF1 で 94.7% だった。一方、最も低い感染率を示した融合株は生育試験の結果から選ばれた AaF30 で 6.6% だった。融合株 50 菌株中 18 菌株が B-2 の平均感染率を超え、コナジラミ防除用の微生物防除資材として販売されている Mycotal の平均感染率 (36.2%) を 37 菌株が上回った。さらに、B-2 と感染率上位の融合株間に有意な差は認められなかったが、上位 9 菌株は Mycotal に比べ有意に高い感染率を示した ( $p < 0.05$ , Tukey 法による多重比較検定)。

### 3. キュウリ葉面上における残存能力の評価

キュウリ葉面上における残存能力の評価結果は Table 1 に示した。まず親 3 株だが、Vertalec は散布 1 日後の調査

でのみ検出でき ( $8.5\text{E}+02 \text{ cfu/cm}^2$ )、その後 2 週と 4 週間後の調査では検出限界を下回った。Mycotal は散布 1 日後には高い値を示したものの ( $9.1\text{E}+04 \text{ cfu/cm}^2$ )、その後の調査では低い値で推移していた。B-2 は 1 日、2 週間後の調査では比較的高い値を示したが (それぞれ  $1.2\text{E}+04 \text{ cfu/cm}^2$ ,  $1.5\text{E}+03 \text{ cfu/cm}^2$ )、その後低下した。散布 1 日後の融合株の cfu 値は上が AaF53 の  $1.0\text{E}+05 \text{ cfu/cm}^2$ 、下が 2aF10 の  $1.7\text{E}+02 \text{ cfu/cm}^2$  となった。また、上位 20 菌株中 16 菌株が Vertalec と Mycotal の組み合わせの AaF, BbF 系統の株であった。散布 2 週間後の融合株の cfu 値は上が 2aF26 の  $3.5\text{E}+03 \text{ cfu/cm}^2$ 、下は 2aF10 と 2aF33 が検出限界を下回った ( $< 1.7\text{E}+01 \text{ cfu/cm}^2$ )。また、融合株上位 20 株中 10 株が B-2 との融合株であったが、残りの 10 株は Vertalec と Mycotal の融合株でありこちらも高い値を示していた。散布 4 週間後の融合株の cfu 値は上が BbF8 の  $7.5\text{E}+03 \text{ cfu/cm}^2$ 、下は 7 菌株が検出限界を下回った ( $< 1.7\text{E}+00 \text{ cfu/cm}^2$ )。散布 2 週間後の時点で融合株 50 菌株中 17 菌株が有意な差は認められなかったが B-2 の平均 cfu 値を上回った。

## 考 察

3 つの試験の結果から、いずれも親株よりも高い能力を示す融合株が含まれていたことが明らかとなった。これらの融合株は、当初の両親の特性を併せ持つ株を得るといった融合の目的を超え、どの親に由来するかにかかわらず一つの特性についてのみ高い値を示したり親株とは関係の無い特性が高められている。例えば 2aF33 は Mycotal と B-2 の融合株でありオンシツコナジラミに対する感染率は 94.1% と高い値を示しているが (Fig. 2)、葉面での残存能力は散布 2 週間後で検出限界を下回っている (Table 1)。また、BbF8 は Vertalec と Mycotal の融合株であるが散布 4 週間後の葉面での残存能力が  $7.5\text{E}+03 \text{ cfu/cm}^2$  と最高値を示した (Table 1)。これらの多様性はプロトプラスト融合後の遺伝的变化による影響であると推察される。ただし、それが遺伝子の重複による量的な変化なのか遺伝子の発現量の変化なのか、構造遺伝子の変異による病原性や残存能力にかかわる酵素や毒素の変化によるものなのかは更なる研究が必要とされる。

ワタアブラムシに対する予備接種試験において、AaF 系統は 2.6~89.8%、BbF 系統は 4.2~82.5%、2BF 系統は 53.8~69.9%、2aF 系統は 2.4~100% と同じ親の組み合わせでも非常に多様な死亡率を示した。ここでは主に病原性の高い融合株に着目しているが、例えば AaF 系統に予備接種試験に用いた 87 菌株中親株の Vertalec の病原性を下回った株が 74 株あるように、融合の影響が必ずしも望ましい方向に働くわけではないことを示している。さらに Harman and Hayes (1993) は植物病原菌の微生物防除資材である *Tri-*

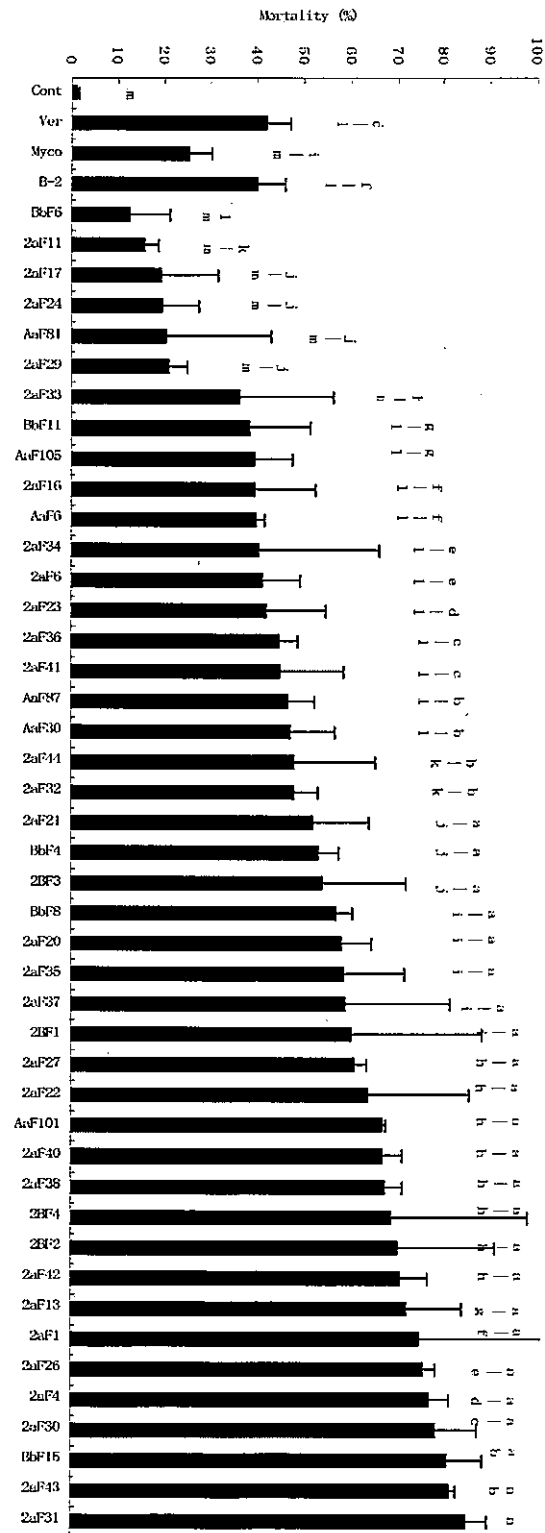


Fig. 1. Bioassay results for parental and hybrid strains of *K. lecanii* against cotton aphids. Bars indicate standard deviation and different letters indicate significantly different values ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test.

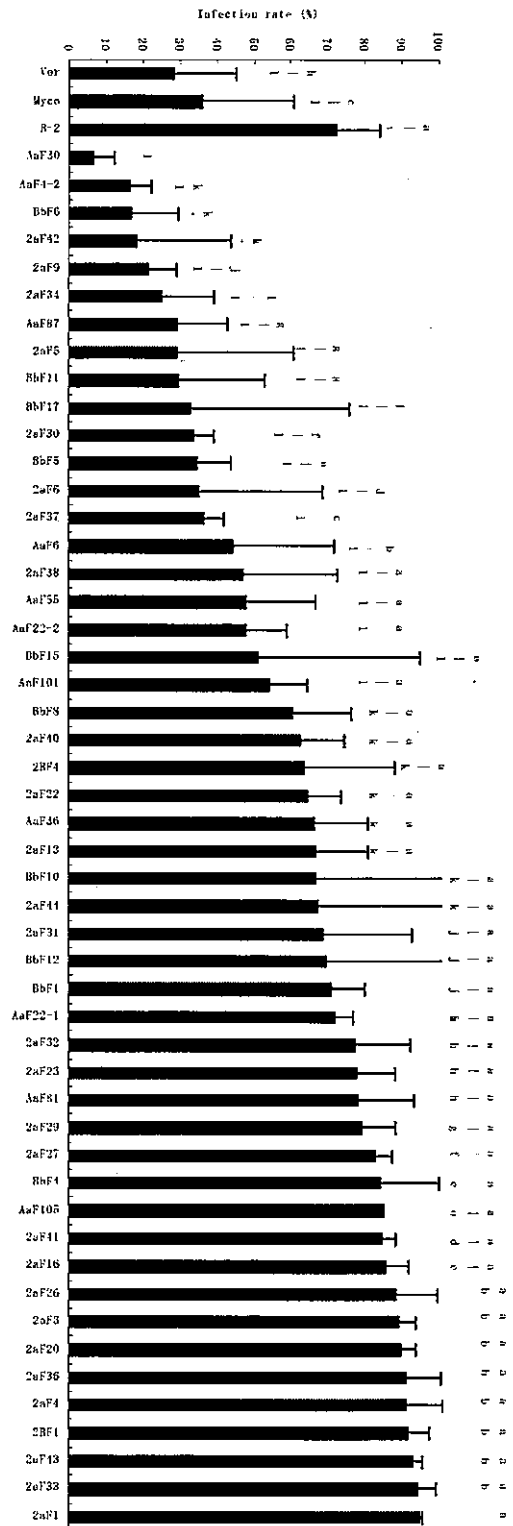


Fig. 2. Bioassay results for parental and hybrid strains of *K. lecanii* against greenhouse whitefly. Bars indicate standard deviation and different letters indicate significantly different values ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test.

Table 1. Viability of parental strains and hybrid strains of *V. lecanii* on cucumber leaf surface

	1 dpi <sup>a</sup>			14 dpi			28 dpi		
	mean (cfu/cm <sup>2</sup> )	SE		mean (cfu/cm <sup>2</sup> )	SE		mean (cfu/cm <sup>2</sup> )	SE	
Cont	0.0E+00	0.0E+00	e <sup>b</sup>	0.0E+00	0.0E+00	f	0.0E+00	0.0E+00	c
Ver	8.5E+02	1.7E+02	d-e	0.0E+00	0.0E+00	f	0.0E+00	0.0E+00	c
2aF10	1.7E+02	1.7E+02	e	0.0E+00	0.0E+00	f	0.0E+00	0.0E+00	c
2aF33	5.9E+03	2.5E+03	c-e	0.0E+00	0.0E+00	f	1.7E+00	1.7E+00	c
BbF1	1.2E+04	3.9E+03	c-e	3.4E+01	3.4E+01	f	6.8E+00	1.7E+00	c
2aF35	1.6E+04	2.8E+03	c-e	5.1E+01	2.9E+01	ef	2.1E+02	1.8E+02	c
2aF40	2.3E+04	6.8E+02	c-e	5.1E+01	2.9E+01	ef	1.7E+00	1.7E+00	c
BbF17	4.5E+04	8.4E+03	cd	5.1E+01	2.9E+01	ef	6.8E+00	1.7E+00	c
BbF14	3.5E+04	9.0E+03	c-e	6.8E+01	4.5E+01	ef	1.7E+00	1.7E+00	c
2aF34	1.9E+03	6.1E+02	c-e	8.5E+01	8.5E+01	ef	6.1E+01	1.6E+01	c
2aF20	1.2E+04	3.7E+03	c-e	1.0E+02	1.0E+02	ef	0.0E+00	0.0E+00	c
AaF30	2.4E+03	9.0E+02	c-e	1.0E+02	1.0E+02	ef	0.0E+00	0.0E+00	c
2aF22	1.5E+04	3.0E+03	c-e	1.2E+02	9.5E+01	ef	1.7E+00	1.7E+00	c
2aF36	2.7E+04	1.4E+04	c-e	1.7E+02	4.5E+01	ef	3.2E+01	1.9E+01	c
BbF18	2.7E+04	8.6E+03	c-e	1.7E+02	4.5E+01	ef	5.8E+01	2.6E+01	c
2aF29	1.2E+04	5.9E+03	c-e	1.9E+02	1.4E+02	ef	7.1E+01	6.9E+01	c
2aF3	1.5E+04	4.5E+03	c-e	2.0E+02	1.3E+02	ef	1.0E+01	7.8E+00	c
2aF31	4.2E+03	9.5E+02	c-e	2.4E+02	1.7E+01	ef	2.5E+01	5.9E+00	c
2aF4	1.5E+04	4.2E+03	c-e	2.4E+02	9.0E+01	ef	5.1E+00	2.9E+00	c
BbF5	3.0E+04	1.5E+04	c-e	2.4E+02	1.9E+02	ef	0.0E+00	0.0E+00	c
2aF16	1.1E+04	2.2E+03	c-e	2.7E+02	4.5E+01	ef	1.7E+01	1.5E+01	c
AaF33	5.3E+04	1.1E+04	bc	2.7E+02	1.2E+02	ef	1.0E+01	0.0E+00	c
AaF67	1.4E+04	3.1E+03	c-e	3.1E+02	7.8E+01	ef	1.7E+00	1.7E+00	c
BbF6	3.0E+04	6.7E+03	c-e	3.1E+02	8.8E+01	ef	0.0E+00	0.0E+00	c
2aF38	5.6E+03	1.8E+03	c-e	4.1E+02	2.5E+02	d-f	0.0E+00	0.0E+00	c
AaF92	3.0E+04	8.7E+03	c-e	4.2E+02	7.4E+01	d-f	1.4E+01	4.5E+00	c
BbF4	2.7E+03	1.7E+02	c-e	4.2E+02	2.3E+02	d-f	1.0E+03	3.8E+02	bc
Myco	9.1E+04	2.2E+04	ab	4.4E+02	3.9E+02	d-f	1.7E+00	1.7E+00	c
AaF60	2.6E+04	4.6E+03	c-e	5.1E+02	1.9E+02	d-f	1.7E+00	1.7E+00	c
BbF12	2.0E+04	6.6E+03	c-e	5.1E+02	4.1E+02	d-f	5.9E+01	3.6E+01	c
2aF42	3.9E+03	9.0E+02	c-e	6.1E+02	3.8E+02	c-f	3.4E+00	3.4E+00	c
AaF3	2.5E+04	1.0E+04	c-e	7.1E+02	1.0E+02	c-f	1.7E+00	1.7E+00	c
2aF41	5.8E+03	1.9E+03	c-e	7.3E+02	2.7E+02	c-f	5.1E+02	2.4E+02	c
AaF51	1.9E+04	6.0E+03	c-e	8.3E+02	1.5E+02	c-f	4.9E+02	3.4E+02	c
2BF2	1.2E+04	3.1E+03	c-e	8.8E+02	6.5E+02	c-f	5.1E+00	2.9E+00	c
AaF2	3.4E+04	8.5E+03	c-e	1.1E+03	3.3E+02	b-f	1.7E+00	1.7E+00	c
B-2	1.2E+04	3.6E+03	c-e	1.5E+03	2.4E+02	a-f	3.4E+00	1.7E+00	c
BbF8	1.6E+04	5.7E+03	c-e	1.5E+03	7.9E+02	a-f	7.5E+03	2.5E+03	a
2aF43	8.3E+03	5.3E+03	c-e	1.5E+03	4.1E+02	a-f	1.2E+01	1.7E+00	c
2aF1	1.0E+04	6.1E+03	c-e	1.6E+03	1.0E+03	a-f	5.9E+01	3.4E+01	c
2BF4	2.1E+04	2.8E+03	c-e	1.7E+03	5.3E+02	a-f	5.1E+00	5.1E+00	c
AaF36	2.1E+04	2.7E+03	c-e	1.8E+03	3.4E+02	a-f	1.8E+02	9.1E+01	c
2aF21	9.9E+03	4.8E+03	c-e	1.8E+03	3.1E+02	a-f	1.2E+02	8.6E+01	c
AaF53	1.0E+05	4.8E+04	a	1.9E+03	8.0E+02	a-f	2.3E+03	1.2E+03	b
2aF13	4.1E+03	5.1E+02	c-e	1.9E+03	6.5E+02	a-f	1.9E+01	1.4E+01	c
2aF30	7.0E+03	3.4E+02	c-e	2.0E+03	3.3E+02	a-f	4.8E+01	1.5E+01	c
BbF15	1.4E+04	6.8E+03	c-e	2.2E+03	5.0E+02	a-f	0.0E+00	0.0E+00	c
AaF10	1.4E+04	7.4E+02	c-e	2.2E+03	2.7E+02	a-e	0.0E+00	0.0E+00	c
AaF28	4.0E+04	2.0E+04	c-e	2.6E+03	5.2E+02	a-d	1.7E+00	1.7E+00	c
AaF105	4.6E+04	1.8E+04	c	2.8E+03	1.2E+03	a-c	5.6E+01	4.8E+01	c
2aF27	4.3E+04	4.9E+03	c-e	3.2E+03	1.3E+03	a-b	2.8E+02	3.7E+01	c
AaF83	8.7E+03	1.9E+03	c-e	3.3E+03	1.1E+03	a	1.1E+02	1.6E+01	c
2aF44	4.9E+03	1.7E+03	c-e	3.5E+03	6.9E+02	a	9.0E+01	3.2E+01	c
2aF26	1.1E+04	3.0E+03	c-e	3.5E+03	1.4E+03	a	1.4E+01	6.8E+00	c

<sup>a</sup> Days post inoculation.

<sup>b</sup> Different letters indicate significantly different values ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test.

*choderma harzianum* でのプロトプラスト融合試験を行った結果、目的とするような効果の高い系統は稀であり全体の僅か2~4%しか得られなかったことを報告している。本試験では様々なタイプの融合株を得たが、当初目的としていた両親の特性を併せ持つような株は全体の約6.9%となった。

*V. lecanii* はキュウリの根内に侵入し定着することが知られているが (Benhamou and Brodeur, 2001), 葉面上における能動的な侵入の報告は無い (Askary et al., 1997). *V. lecanii* はキュウリ葉面の葉脈や毛状突起付近で植物からの滲出物を腐生的に利用して生育すると考えられている (Verhaar et al., 1997). 今回供試した菌株は少なくとも散布1日後までは残存したが, Vertalec と 2aF10 はその段階で既に低い値を示しており, 平均 13.5%RH という低湿度条件下での生存が困難であることを示している。また, その他の菌株も菌株間で差はあるが, 徐々に低下し続け, 散布2週間後で高い cfu 値を示した菌株でも4週目には低い値を

示した (Table 1). それに対し, AaF53, BbF4, BbF8 は他の菌株に比べ cfu 値の減少が止まり  $1.0E+03$  cfu/cm<sup>2</sup> 以上という高い値を保っており, 上記の条件で腐性的に葉面に定着しているものと考えられる。

前述の通り本試験において様々なタイプの融合株を得たことから, 単純に両親の特性に基づいた選抜よりも, それぞれの項目に対して成績の良い菌株や高いレベルで複数の特性を併せ持つ菌株を選抜した方がより効果的な株を選抜できることが予想された。そこで, どの親に由来するかという囲いを取り払い, 融合株自体の持つ病原性と残存能力に基づいて選抜した (Fig. 3). また, 葉面上での残存能力は平均 13.5%RH という低湿度条件で2週間高い値で残存できれば十分な効果が見込まれることから, 2週目の cfu 値を選抜の基準とした。まず, 3つの特性全てについて高い値を示した株として 2aF26 と 2aF43, ワタアブラムシとオンシツコナジラミに対し高い病原性を示した株として

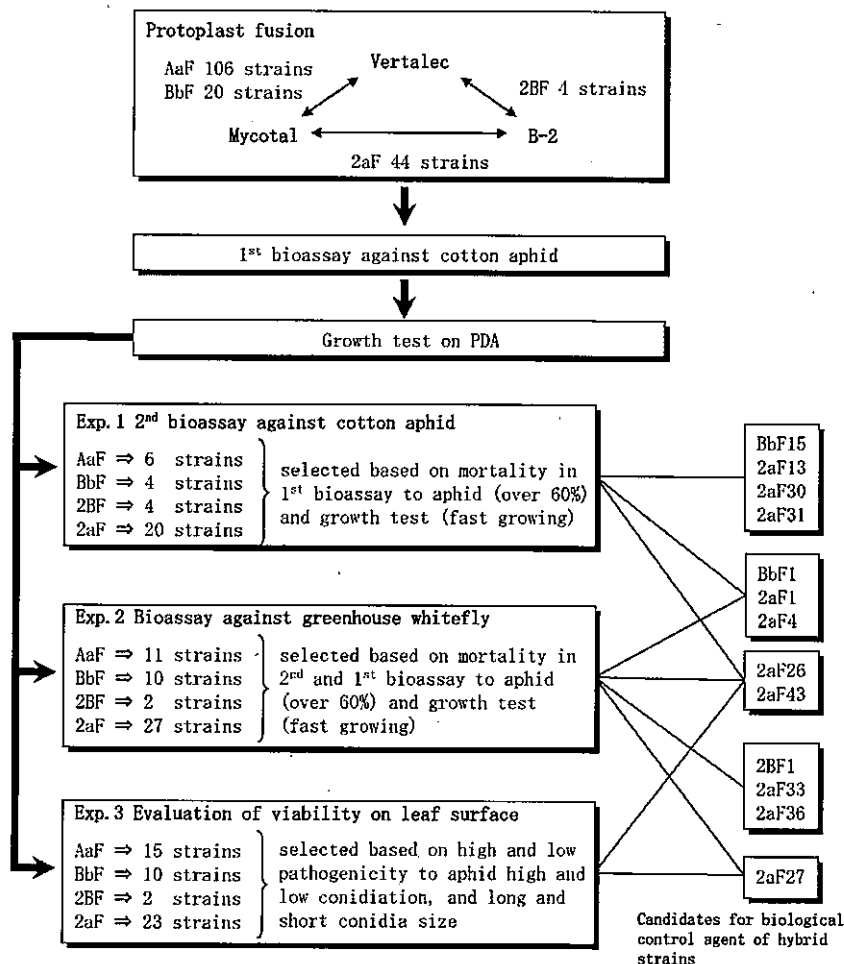


Fig. 3. Selection sequence for hybrid strains of *V. lecanii*. The number of hybrid strains described in each experiment is the number of strains applied for experiment. Data of the 1st bioassay against cotton aphids, the growth test, conidiation and conidia size are not shown here.

2aF1, 2aF4, BbF1, ワタアブラムシに対し病原性の高い株として 2aF13, 2aF30, 2aF31, BbF15, オンシツコナジラミに対し感染力の高い株として 2aF33, 2aF36, 2BF1, オンシツコナジラミに対し高い感染力を示し残存能力の高い 2aF27 を最終的に選抜した (Fig. 3).

今回、3つの特性について調査し、その結果からこれら13の融合株を選抜したが、ワタアブラムシとオンシツコナジラミに対する接種試験は便宜上、*V. lecanii* にとって好適な環境条件下で行った。この接種試験はあくまでその菌株に内在する病原性の評価であり、今後さらにこの中から実用に耐え得るレベルの効果を持つ株を選抜する必要がある。我々は Yeo et al. (2003) が提唱する菌の持つ病原性だけではなく実際使用する際に直面する低湿度条件や不適な温度条件下での効果、非標的外生物への影響の評価、生育速度、発芽速度、生産力、合成化学農薬や天敵昆虫との親和性など様々な特性について調査し、使用する場所の非生物学的な条件に最も適した株を選抜するという“Biorational approach”に基づいた選抜を検討している。

これまで *V. lecanii* の高い湿度要求性について多くの報告がなされており (Ekblom, 1979; Drummond et al., 1987), 専ら *V. lecanii* 製剤はある程度の高い湿度を維持することのできる施設栽培で利用されている。例えば低湿度条件下で葉面に残存することができるという特性は、害虫の発生する前の段階で予防的な施用を可能にしたり、圃場での散布を可能にするなど様々な場面での利用の拡大をもたらす可能性を秘めている。展着剤などによる残存能力の改善も可能ではあるが、感染の拡大によって防除効果を上昇させることを期待するのであれば、やはり環境に耐性のある菌株が有用であろう。また、*V. lecanii* はエントモトラ目などの“specialist”に対し宿種範囲の広い“generalist”として扱われているが、菌株レベルで見ると緩い宿種特異性や病原力の違いが見られる (Kanagaratnam et al., 1982; Hall, 1984; 増田・菊地, 1992)。実際に *V. lecanii* 製剤としてアブラムシ防除用に Vertalec, コナジラミ防除用に Mycotal の2剤が販売されていることや、デンマークの Chr. Hansen's BioSystems 社から2種類の菌株を混合した MicroGermin A&F<sup>®</sup> (増田, 2005) が販売されている。Askary et al. (1998) はこの菌株レベルでの狭い宿種範囲や好適な環境を要求することが *V. lecanii* 製剤の発展を妨げている要因であるとしている。さらに、Chandler et al. (1993) は Vertalec と Mycotal をキクヒメヒゲナガアブラムシとオンシツコナジラミそれぞれに混合接種したところ、個々の株を接種した処理区よりも効果が劣り、菌株間の競争が原因であるとしている。

より効果的な害虫防除を行うために新規機能を有する有望菌株の探索は必須である (清水, 2000)。さらに、そのような有望な特性を持つ菌株を用い、プロトプラスト融合によって個々の菌株が持つ特性を統合することが可能であ

る (Couteaudier et al., 1996)。今回選抜した融合株のように一剤で複数の標的に対し防除効果を持つ、もしくは環境耐性を持つ菌株を作り出すことが可能であるプロトプラスト融合は微生物防除資材の育種という面から見て非常に有用な技術である。

## 摘 要

先の研究で (Aiuchi et al., 2004) 昆虫寄生性糸状菌 *Verticillium lecanii* のうち微生物農薬として販売されている Vertalec と Mycotal さらに帯広分離株の B-2 の3菌株間でプロトプラスト融合を実施し、その結果174菌株の融合株を得た。本研究はこれら融合株の中からワタアブラムシとオンシツコナジラミ両方に防除効果のある株や効果の持続性が高い株を選抜することを目的とした。まず、これらの融合株の内43菌株を用いワタアブラムシへの接種試験を行ったところ、30菌株が親株である Vertalec の平均死亡率 (41.9%) を上回った。次に、融合株50菌株を用いオンシツコナジラミに対する接種試験を実施し、37菌株が親株である Mycotal の平均感染率 (36.2%) を上回った。最後に、融合株50菌株を用いてキュウリ葉面上での残存能力を低湿度条件下 (13%RH) で評価したところ、散布2週間後17菌株が親株である B-2 の cfu 値 ( $1.5E+03$  cfu/cm<sup>2</sup>) を上回った。このように融合株の中には当初目的としていたような単純に親株の特性を併せ持つ株のみならず、親株を超える病原性や残存能力を持つ株が多数存在した。今回試験した3つの特性に基づいて13の融合株を選抜した。これらの融合株はいずれも各試験において高い値を示した菌株であり、微生物防除資材として高い防除効果が期待される。

## 引用文献

- Aiuchi, D., M. Koike, M. Tani, K. Kuramochi, M. Sugimoto and H. Nagao (2004) Protoplast fusion, using nitrate non-utilizing (*nit*) mutants in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.). *IOBC/wprs Bulletin* 27: 127-130.
- Askary, H., N. Benhamou and J. Brodeur (1997) Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology* 87: 359-368.
- Askary, H., Y. Carriere, R. R. Belanger and J. Brodeur (1998) Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphid and powdery mildew. *Biocont. Sci. Technol.* 8: 23-32.
- Benhamou, N. and J. Brodeur (2001) Pre-inoculation of Ri T-DNA transformed cucumber roots with the mycoparasites, *Verticillium lecanii*, induces host defense reactions against *Pythium ultimum* infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58: 133-146.
- Chandler, D., J. B. Heale and A. T. Gillespie (1993) Competitive interaction between strains of *Verticillium lecanii* on two insect hosts. *Ann. Appl. Biol.* 122: 435-440.
- Couteaudier, Y., M. Viaud and G. Riba (1996) Genetic nature, stability, and improved virulence of hybrids from protoplast fusion in *Beau-*

- veria bassiana*. *Microb. Ecol.* 32: 1-10.
- Drummond, J., J. B. Heale and A. T. Gillespie (1987) Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Ann. Appl. Biol.* 111: 193-201.
- Eapen, S. J., B. Beena and K. V. Ramana (2005) Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *J. Invertebr. Pathol.* 88: 218-225.
- Ekbohm, B. S. (1979) Investigations on the potential of a parasitic fungus (*Verticillium lecanii*) for biological control of the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *Swedish J. agric. Res.* 9: 129-138.
- Gintis, B. O., G. Morgan-Jones and R. Rodriguez-Kabana (1983) Fungi associated with several developmental stages of *Heterodera glycines* from an Alabama soybean field soil. *Nematropica* 13: 181-200.
- Hall, R. A. (1980) Laboratory infection of insects by *Verticillium lecanii* strains isolated from phytopathogenic fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 74: 445-446.
- Hall, R. A. (1984) Epizootic potential for aphids of different isolates of fungus *Verticillium lecanii*. *Entomophaga* 29: 311-321.
- Harman, G. E. and C. K. Hayes (1993) The genetic nature and biocontrol ability of progeny from protoplast fusion in *Trichoderma*. In *Biotechnology in Plant Disease Control* (I. Chet ed.). Wiley-Liss, New York, USA, pp. 237-255.
- Hsiao, W. F., M. J. Bidochka and G. G. Khachatourians (1992) Effect of temperature and relative humidity on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*, toward the oat-brid berry aphid, *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae). *J. Appl. Ent.* 114: 484-490.
- Kanagaratnam, P., R. A. Hall and H. D. Burges (1982) Control of glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, by an 'aphid' strain of the fungus *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.* 100: 213-219.
- 北沢健治・藤沢一郎・今林俊一 (1984) アブラムシおよびオンシツコナジラミの天敵糸状菌 *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas の分離. 日植病報 50: 574-581. [Kitazawa, K., I. Fujisawa and S. Imabayashi (1984) Isolation of *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas affecting aphids and greenhouse whitefly in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 50: 574-581.]
- Koike, M., T. Higashio, A. Komori, K. Akiyama, N. Kishimoto, E. Masuda, M. Sasaki, S. Yoshida, M. Tani, K. Kuramochi, M. Sugimoto and H. Nagao (2004) *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) as epiphyte and their application to biological control of pest and disease in a glasshouse and field. *IOBC/wprs Bulletin* 27: 41-44.
- 増田俊雄 (2005) 昆虫病原糸状菌, *Beauveria bassiana* 及び *Verticillium lecanii* による園芸作物害虫の微生物的防除に関する研究. 宮農園研報 74: 1-88. [Masuda, T. (2005) The microbial control of horticultural pest insects using entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Bull. Miyagi Prefect. Agric. & Hort. Res. Cent.* 74: 1-88.]
- 増田俊雄・菊地 修 (1992) 異なった寄主より分離された *Verticillium lecanii* のオンシツコナジラミおよびアブラムシ類に対する病原性について. 応動昆 36: 239-245. [Masuda, T. and O. Kikuchi (1992) Pathogenicity of *Verticillium lecanii* isolates to whitefly and aphids. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 36: 239-245.]
- 増田俊雄・菊地 修 (1993) 昆虫病原糸状菌 (*Verticillium lecanii*) 製剤によるオンシツコナジラミの防除. 北日本病虫研報 44: 191-193. [Masuda, T. and O. Kikuchi (1993) Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, by *Verticillium lecanii* preparation. *Ann. Rept. Plant Prot. North Japan* 44: 191-193.]
- Meyer, S. L. F. and W. P. Wergin (1998) Colonization of soybean cyst nematode females, cysts, and gelatinous matrices by the fungus *Verticillium lecanii*. *J. Nematol.* 30: 436-450.
- Milner, R. J. and G. G. Lutton (1986) Dependence of *Verticillium lecanii* (Fungi: Hypomycetes) on high humidities for infection and sporulation using *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) as host. *Environ. Entomol.* 15: 380-382.
- 西東 力 (1988) *Verticillium lecanii* 製剤によるワタアブラムシの防除と農薬の影響. 応動昆 32: 224-227. [Saito, T. (1988) Control of *Aphis gossypii* in greenhouses by a mycoinsecticidal preparation of *Verticillium lecanii* and effect of chemicals on the fungus. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 32: 224-227.]
- 西東 力 (1993) *Verticillium lecanii* 製剤によるタバココナジラミとオンシツコナジラミの防除. 関東東山病虫研報 40: 221-222. [Saito, T. (1993) Control of two whitefly species, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*, by a preparation of *Verticillium lecanii*. *Ann. Rept. Kanto Pl. Prot. Soc.* 40: 221-222.]
- 西東 力 (2001) 微生物農薬 (パーティシリウム・レカニ製剤) による施設害虫の防除. 今月の農業 45: 72-77. [Saito, T. (2001) Control of greenhouse pest insects by mycoinsecticide (*Verticillium lecanii* formulation). *Japan Agricultural Technology* 45: 72-77.]
- Shah, P. A. and J. K. Pell (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 413-423.
- 清水 進 (2000) 昆虫病原糸状菌の資材化: 微生物の資材化: 研究の最前線 (鈴井孝仁・岡田齊夫・国見裕久・牧野孝宏・斎藤雅典・宮下清貴 編). ソフトサイエンス社, 東京, pp. 215-222. [Shimizu, S. (2000) Entomopathogenic fungus resources. In *Microbial Resources: Its Characteristics and Utilization* (T. Suzui, M. Okada, Y. Kunimi, T. Makino, M. Saito and K. Miyashita eds.). Soft Science, Inc., Tokyo, pp. 215-222.]
- Spencer, D. M. and P. T. Atkey (1981) Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two rust fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77: 535-542.
- Verhaar, M. A., K. K. Ostergaard, T. Hijwegen and J. C. Zadoks (1997) Preventative and curative applications of *Verticillium lecanii* for biological control of cucumber powdery mildew. *Biocont. Sci. Technol.* 7: 543-551.
- Verhaar, M. A., T. Hijwegen and J. C. Zadoks (1998) Selection of *Verticillium lecanii* isolates with high potential for biocontrol of cucumber powdery mildew by means of components analysis at different humidity regimes. *Biocont. Sci. Technol.* 8: 465-477.
- Yeo, H., J. K. Pell, P. G. Alderson, S. J. Clark and B. J. Pye (2003) Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manag. Sci.* 59: 156-165.
- Zare, R. and W. Gams (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simpllicium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73: 1-50.