

アワヨトウ幼虫における相変異と緑きょう病菌感染抵抗性

誌名	日本応用動物昆虫学会誌
ISSN	00214914
著者	満井, 順 国見, 裕久
巻/号	32巻2号
掲載ページ	p. 129-134
発行年月	1988年5月

アワヨトウ幼虫における相変異と緑きょう病菌感染抵抗性

満井 順¹⁾・国見 裕久

東京農工大学農学部

Effect of Larval Phase on Susceptibility of the Armyworm, *Pseudaletia separata* WALKER (Lepidoptera: Noctuidae) to an Entomogeneous Deuteromycete, *Nomuraea rileyi*. Jun MITSURU²⁾ and Yasuhisa KUNIMI (Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **32**: 129-134 (1988)

Larval susceptibility in solitary and gregarious phases of *Pseudaletia separata* to *Nomuraea rileyi* was examined under laboratory conditions. The larvae reared in isolation were more susceptible and died in a shorter period of time than those reared in crowds when the final-instar larvae were inoculated percutaneously with *N. rileyi*. The difference of susceptibility was also observed when gregarious larvae were reared in isolation after the inoculation. The pale larvae which were produced under crowded rearing conditions were more susceptible than the black larvae when *N. rileyi* was inoculated percutaneously. However, no differences in the susceptibility and time of death were observed between the solitary larvae and the gregarious larvae when *N. rileyi* was inoculated subcutaneously.

緒 言

イネ、ムギ、トウモロコシ、牧草などの害虫で、個体数の変動が激しく、大発生時に長距離移動するアワヨトウ (*Pseudaletia separata*) には、生息密度の高低に応じて形態的にも、生理・行動上からも著しく異なる個体が出現する相変異と呼ばれる現象が知られている (Iwao, 1962)。アワヨトウの低密度型幼虫は、全体に黄緑～赤褐色であるのに対して、高密度型幼虫は著しく黒化し、発育の促進、摂食量や活動性の増大などが認められる (Iwao, 1962, 1963; SHIBAZAKI and ITO, 1969; 柴崎, 1969)。また、高密度型幼虫では、飢餓や不適食草に対する耐性の増大が認められることなどから、大発生時に起こりうる食物不足の状況によく適応した特性をもつといわれ、さらに、高密度型成虫の飛翔筋の発達が顕著で、翼荷重が小さいなどのことから、移動に適した特性をもつといわれている (Iwao, 1962; 巖, 1971)。

しかし、低密度で出現する淡色型幼虫と、高密度で出現する黒色型幼虫とで、病気に対する感受性に差があるかどうかについては、ほとんど知られていない。著者らは、アワヨトウ幼虫の生息密度に依存した相の違いが、緑きょう病菌 (*Nomuraea rileyi*) に対する感染抵抗性に及ぼす影響について調査したので、その結果を報告する。

本文に入るに先立ち、本研究中、有益なご助言をいただいた東京農工大学農学部の福原敏彦博士、アワヨトウ幼虫を分与いただいた農業環境技術研究所の八木繁実博士、緑きょう病菌を分与いただいた東京農工大学農学部の青木襄児博士に対し深く感謝の意を表する。

材料と方法

1. 供試昆虫

供試したアワヨトウは、東京農工大学農学部害虫学研究室から卵塊を譲り受けた後、数世代飼育して得た幼虫を用いた。幼虫は、人工飼料またはトウモロコシの生葉を用いて集合飼育した。人工飼料は、服部・阿津沢 (1980) の飼料にヒドロキシ安息香酸とソルビン酸をそれぞれ 800 ppm 添加したものをを用いた。飼育は、25°C、長日条件下 (16L-8D) で行った。

2. 供試菌

供試した緑きょう病菌は、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) から分離された菌株で、東京農工大学農学部の青木襄児博士より譲り受けた。実験には、酵母エキスを加えた Sabouraud maltose 寒天培地で、25°C、16~20 日間培養して得た分生胞子を用いた。

3. 幼虫体色の識別

体色型の判定は、Iwao (1962) の方法に従い、ほとん

1) 現在 日本曹達株式会社生物研究所

2) Present address: Biological Laboratory, Nippon Soad Co., Ltd., Takada, Odawara 250-02, Japan.

1987年11月17日受領 (Received November 17, 1987)

ど体色の黒化の見られないI型から、体色黒化の最も著しいV型までの5段階に分け、6齢あるいは7齢脱皮後24時間以内に調べた。また、体色の黒化の程度の指標として、mean colour (Iwao, 1962) を算出した。

4. 飼育区の設定と検定法

(1) 単独および集合飼育虫での経皮接種試験

アワヨトウふ化幼虫150~250頭ずつを、プラスチック製容器(直径15cm, 高さ9cm)で密度区を設定するまで集合飼育した。1齢眠から50mlプラスチック製カップで1頭ずつ飼育(単独飼育区; 以下S区とする), あるいは430mlプラスチック製カップで20頭ずつ飼育(集合飼育区; 以下G区とする)する二つの密度区を設定した。アワヨトウ幼虫は、通常、6齢を経過して蛹化する6齢経過型であるが、若齢期の高密度育など、飼育条件によっては齢数が増加する(蔵, 1967)。本実験では、6齢経過型幼虫のみを供試した。両飼育区の脱皮直後の6齢幼虫に所定濃度の緑きょう病菌分生孢子懸濁液(Tween 40を0.02%添加)を、幼虫腹部背面に塗布した。風乾後、餌を与え、接種前と同じ飼育条件で10日間飼育した。各濃度20頭の幼虫を供試し、2連制で行った。飼育は、トウモロコシの生葉を用い、25°C, 16L-8D条件下で行った。

(2) 接種後の密度を一定にした場合の経皮接種試験

(1)の実験と同様に、S区とG区の2区を設定し、餌としてトウモロコシの生葉を与え飼育したところ、7齢経過型幼虫が最も多く出現した。その原因の一つとしては、時期的にトウモロコシの葉が劣化してきたことが考えられる。本実験においては、7齢経過型幼虫を用いた。S区のI型とG区のIII型の脱皮直後の7齢幼虫に所定濃度の緑きょう病菌分生孢子懸濁液(Tween 40を0.02%添加)を、幼虫腹部背面に塗布した。風乾後、両区の幼虫とも50mlのプラスチック製容器に1頭ずつ移し、10日間個体飼育した。各濃度20頭の幼虫を供試し、2連制で行った。飼育は、トウモロコシの生葉を用い、25°C, 16L-8D条件下で行った。

(3) 体色型を異にする幼虫での経皮接種試験

2齢まで容器当たり250頭、3齢から150頭、4齢から100頭、5齢から50頭の密度で、人工飼料により飼育して得た体色型II型とIV型の脱皮直後の6齢幼虫を供試した。両体色区の幼虫に所定濃度の緑きょう病菌分生孢子懸濁液(Tween 40を0.02%添加)を、幼虫腹部背面に塗布した。風乾後、430mlプラスチック製カップに1容器当たり5~9頭になるようにして10日間飼育した。飼育は、人工飼料を用い、25°C, 16L-8D条件下で

行った。なお、緑きょう病菌接種後3日間は、防腐剤を除いた人工飼料を与えた。

(4) 単独および集合飼育虫での注射接種試験

人工飼料で飼育したS区とG区の脱皮直後の6齢幼虫を供試した。両飼育区とも出現した幼虫は、ほとんどが6齢経過型で、実験には、ふ化から6齢までの所要日数が12日の6齢経過型幼虫を供した。幼虫をエチルエーテルで麻酔し、昆虫用の生理塩類溶液に懸濁させた所定濃度の緑きょう病菌分生孢子浮遊液を、支持台に固定したマイクロシリンジを用いて、1頭当たり4 μ lを幼虫の腹部背側に注射した。対照区の幼虫には、生理塩類溶液を同量注射した。注射後は、S区の幼虫は、50mlのプラスチック製カップで個体飼育し、G区の幼虫は、430mlのプラスチック製カップで1容器当たり15頭の密度で集合飼育した。前蛹になった個体は、湿らせたティシュペーパーを敷きつめたカップ内で蛹化させ、4日目以降に、脱皮が正常に行われたかどうかを確認した。各濃度15頭の幼虫を供試し、2連制で行った。飼育は、人工飼料を用い、25°C, 16L-8D条件下で行った。

結 果

1. 経皮接種での感染抵抗性

(1) 単独育と集合育での感染抵抗性

トウモロコシの生葉で飼育したS区とG区の6齢幼虫の体色型分布をFig. 1に示す。

S区、G区の6齢幼虫のmean colourは、それぞれ1.2および3.5であった。脱皮直後の6齢幼虫の平均体重は、S区で159mg, G区で130mgであり、単独飼育幼虫が集合飼育幼虫に比べて重かった。また、ふ化から6齢1日目までの所要日数は、S区で12日、G区で11日であった。

致死個体は、緑きょう病菌塗布接種後2日目から認め

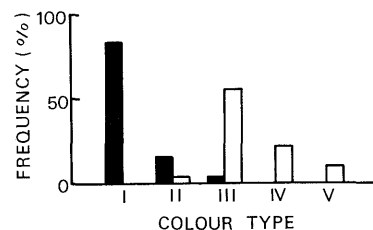


Fig. 1. Frequency distribution of colour types in the final-instar larvae of *Pseudaletia separata* reared on fresh leaves of maize at different densities. Solid and open columns indicate the larvae reared in isolation and in crowds, respectively.

られた。S区ではG区に比べ致死が急激で、 3.2×10^9 conidia/mlの接種濃度では、S区の幼虫は接種後4日目、5日目に多数感染致死したのに対して、G区の幼虫は4~8日目までの間に連続的に感染致死した。罹病虫の体表には黒色の病斑が形成され、病斑のとくに著しい個体の体表は、ほぼ全体にわたって黒色を呈した。病斑が形成された罹病虫は、行動が不活発になり、摂食を停止し、数日後に死亡した。死後1~2日目の個体の体液中には、緑きょう病菌の短菌糸が観察された。また、脱皮が阻害され、完全に蛹化できない個体が出現した。

累積感染致死率プロビットと菌接種後の日数との関係をFig. 2に示す。なお、累積感染致死率0~5%あるいは95~100%のデータは解析から除外した。

同じ接種濃度では、S区のLT₅₀はG区に比べて1~1.5日短かった。また、回帰直線の傾きは、どちらの接種濃度においてもS区がG区に比べ大きかったが、統計的に有意な差は認められなかった。

感染致死率プロビットと接種濃度の対数値との関係をFig. 3に示す。

S区およびG区のlog LC₅₀ (conidia/ml)は、それぞれ8.0および8.4で、G区の幼虫がS区の幼虫に比べ、緑きょう病菌に対して2.3倍抵抗性であることが示された。

(2) 接種後の飼育密度を一定にした場合

脱皮直後の7齢幼虫の平均体重は、S区で175 mg, G区で151 mgであり、(1)の実験同様、単独飼育幼虫が

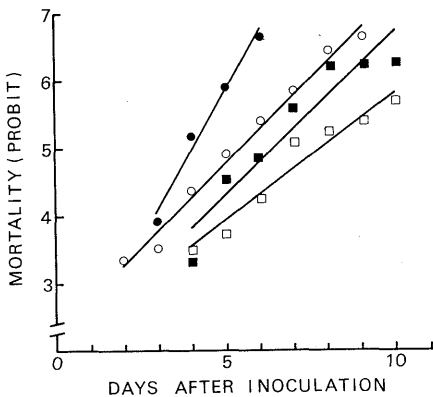


Fig. 2. Time-mortality response for *Pseudaletia separata* larvae inoculated with *Nomuraea rileyi* percutaneously. ●, ○: solitary and gregarious larvae inoculated with $10^{9.5}$ conidia/ml, respectively, ■, □: solitary and gregarious larvae inoculated with $10^{9.0}$ conidia/ml, respectively.

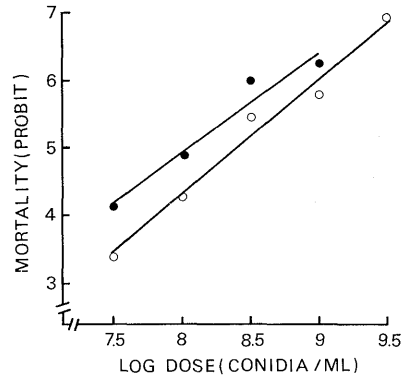


Fig. 3. Dosage-mortality regressions for solitary (●) and gregarious (○) larvae of *Pseudaletia separata* inoculated with *Nomuraea rileyi* percutaneously.

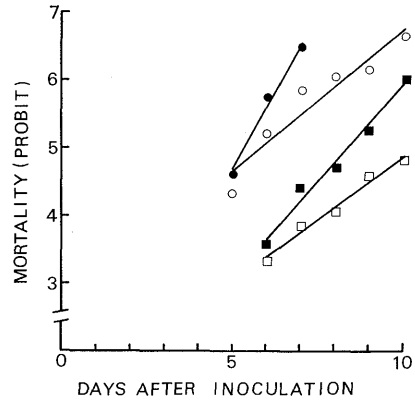


Fig. 4. Time-mortality response for *Pseudaletia separata* larvae inoculated with *Nomuraea rileyi* percutaneously. Gregarious larvae were reared in isolation after inoculation. ●, ○: solitary and gregarious larvae inoculated with 10^9 conidia/ml, respectively, ■, □: solitary and gregarious larvae inoculated with $10^{8.5}$ conidia/ml, respectively.

大きかった。7齢幼虫の体色型は、S区では、70%がI型、G区では65%がIII型であった。

緑きょう病菌接種後の日数と累積感染致死率プロビットとの関係をFig. 4に示す。

両区のLT₅₀を比較すると、接種濃度 10^9 では、S区がG区よりも半日短かった。また、実験(1)の同接種濃度のLT₅₀値と比べると、本実験でのLT₅₀値は、1~2日短かった。

感染致死率プロビットと接種濃度の対数値との関係をFig. 5に示す。

log LC₅₀ 値 (conidia/ml) は、S区およびG区で、そ

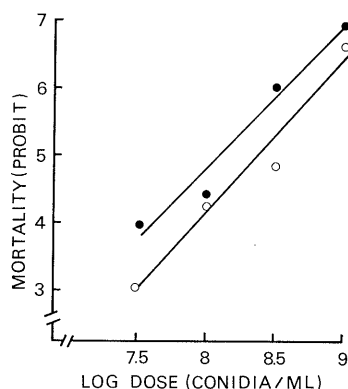


Fig. 5. Dosage-mortality regressions for solitary (●) and gregarious (○) larvae of *Pseudaletia separata* inoculated with *Nomuraea rileyi* percutaneously. Gregarious larvae were reared in isolation after inoculation.

れぞれ 8.1 および 8.4 と、G 区の幼虫が S 区の幼虫に比較して、2 倍抵抗性であった。

(3) 体色型を異にする幼虫の感染抵抗性

終齢幼虫の体色型を調査した。I 型、II 型、III 型、IV 型および V 型の幼虫の出現百分率は、それぞれ 0, 18.3, 72.0, 9.4 および 0.3 で、mean colour は 2.9 であった。本実験で用いた脱皮直後の 6 齢幼虫の平均体重は、体色型 II 型が 98 mg, IV 型が 87 mg で、体色の淡い幼虫が若干重かった。

両体色型幼虫に、緑きょう病菌分生孢子懸濁液を塗布接種した時の感染致死率を Table 1 に示す。

致死個体は接種後 4 日目から認められ、体色型 II 型の幼虫は、IV 型の幼虫に比べ感染致死率が高く、致死までの時間が短かった。接種濃度 3.2×10^8 conidia/ml

Table 1. Susceptibility of pale and black larvae of *Pseudaletia separata* inoculated subcutaneously with conidia of *Nomuraea rileyi*

Colour type ^{a)}	Dose ^{b)} (conidia/ml)	No. of larvae	Larval mortality (%)
II (pale)	Control	10	0
	3.2×10^7	17	46.2
	1.0×10^8	17	52.9
	3.2×10^8	24	87.5
IV (black)	3.2×10^7	11	9.1
	1.0×10^8	12	33.3
	3.2×10^8	13	50.0

a) Two types of larvae were produced under crowded rearing conditions.

b) Final-instar larvae were used.

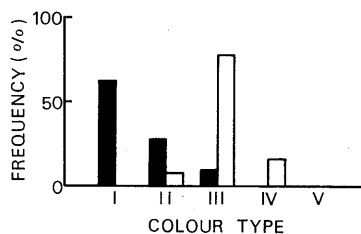


Fig. 6. Frequency distribution of colour types in the final-instar larvae of *Pseudaletia separata* reared on artificial diet at different densities. Solid and open columns indicate the larvae reared in isolation and in crowds, respectively.

における LT_{50} は、II 型の幼虫で 7.8 日、IV 型の幼虫で 11.2 日であった。

2. 注射接種での感染抵抗性

S 区および G 区の 6 齢幼虫の体色型分布を Fig. 6 に示す。

平均体色値は S 区が 1.5, G 区が 3.1 であった。脱皮直後の 6 齢幼虫の平均体重は、S 区、G 区でそれぞれ 197 mg, 160 mg であった。

両飼育区の 6 齢幼虫に緑きょう病菌分生胞子を注射接種した時の感染致死率を Table 2 に示す。

感染致死する個体は、接種後 2 日目から認められ、その後 3 日目、4 日目に多数の個体が致死した。罹病虫の体表には、わずかに病斑が認められた。死後 1 日経過した幼虫の体液は粘性を帯び、白濁し、そのなかに無数の短菌糸が充満しているのが観察された。

BEHRENS-KÄRBER 法により算出した $\log LD_{50}$ (conidia/

Table 2. Mortality of solitary and gregarious larvae of *Pseudaletia separata* inoculated subcutaneously with conidia of *Nomuraea rileyi*

Rearing density ^{a)}	Dose (conidia/larva)	No. of larvae ^{b)}	Mortality (%)
1	Control ^{c)}	15	0
	4×10^3	30	0
	4×10^4	30	3.4
	4×10^5	30	36.7
	4×10^6	30	100.0
20	Control ^{c)}	15	0
	4×10^3	30	0
	4×10^4	30	6.9
	4×10^5	30	53.6
	4×10^6	30	96.4

a) Larvae were reared on artificial diet.

b) Final-instar larvae were used.

c) Physiological saline was injected.

larva) 値は、S 区および G 区でそれぞれ 5.7 および 5.6 と、ほぼ同じであった。

考 察

単独飼育および集合飼育されたアワヨトウ幼虫に、緑きょう病菌を経皮的に接種した結果、体色の黒化した集合飼育幼虫は、体色の淡い単独飼育虫に比べ致死率が緩慢で、致死率が低い傾向が認められた。両飼育条件での LT₅₀ と LC₅₀ の値の差は小さかったが、すべての実験条件下でこのような傾向が認められたことから、集合飼育幼虫は、単独飼育幼虫に比べ、経皮的に接種された緑きょう病菌に対し抵抗性であると考えられる。また、接種後は個体飼育した場合でも、接種前に集合飼育された幼虫は、単独飼育された幼虫よりも抵抗性であったことから、接種後の飼育条件の違いにより感染抵抗性の差異が生じたものではないと推察された。さらに、集合飼育で得られた体色の黒化した幼虫は、体色の淡い幼虫に比べ抵抗性であったことから、経皮感染抵抗性の違いは、緑きょう病菌接種時における体色黒化の程度と関係しているものと思われる。これに対して、注射接種では、体色黒化に伴う感染抵抗性の増大は認められなかった。このことから、体色黒化に伴う感染抵抗性の差異は、幼虫表皮に付着した分生胞子が発芽し、皮膚を貫通して体内に侵入する際に生じるものと思われる。

RIBA et al. (1982) は、経皮接種によって認められた *Beauveria bassiana* と *Nomuraea rileyi* に対する蚕品種間での感受性の差が、注射接種では認められなかったことから、本研究と同様、感受性の差は菌が外皮から侵入する際に生じたものであるとして、硬化病菌に対する生体防御機能としての外皮の重要性を主張している。

糸状菌の侵入に対する昆虫の皮膚の防御機能としては、クチクラの厚さまたは硬さが重要であるといわれ、とくに、外表皮のワックス層は、耐水性があり、病原微生物の侵入を防いでいると考えられている (BELL, 1974)。また、皮膚に遊離状態で存圧するカプリル酸、カプリン酸等の低級飽和脂肪酸が抗菌性をもつことが報告されている (小泉ら, 1954; 小泉・牧野, 1955) が、本研究では、これらの存在を明らかにすることはできなかった。

一方、アワヨトウ幼虫を高密度飼育したときに皮膚に沈着する黒色素は、インドールメラニンで (池本, 1971)、メラニン生成の酵素系であるフェノールオキシターゼ (PO) の活性は、黒色型幼虫が淡色型幼虫に比べて高い (IKEMOTO, 1972)。AOKI and YANASE (1970) によると、病原性の強い *B. bassiana* に感染したカイコ幼虫

では、PO が阻害され、病斑が形成されないのに対して、病原性の弱い *Paecilomyces fumosoroseus* に感染したカイコ幼虫では、皮膚の PO 活性が高く、皮膚に著しく病斑が形成される。さらに、メラニン化による病斑部には菌糸が認められていない (VEY and FARGUES, 1977) ことから、病斑形成は、昆虫病原糸状菌に対する昆虫の示す防御反応の一つと考えられている (青木, 1977)。これらのことから、アワヨトウの相変異によるメラニン堆積が、緑きょう病菌に対する感染抵抗性に関与していることも考えられるが、アワヨトウ幼虫の皮膚の、どのような生体防御機能の変化によって感染抵抗性の差異が生ずるのかについては、今後の課題である。

摘 要

アワヨトウの相変異により生じた体色の淡い低密度型幼虫と、体色の黒化した高密度型幼虫の緑きょう病菌に対する感染抵抗性を調査した。

1) 1 齢眠から個体飼育 (単独飼育幼虫) あるいは 20 頭育 (集合飼育幼虫) した 6 齢脱皮直後の幼虫に緑きょう病菌分生胞子を塗布接種し、接種後もそのままの密度条件で飼育を継続したところ、単独飼育幼虫は集合飼育幼虫に比べ感染致死率が高く、致死までの時間も短かった。

2) 7 齢脱皮直後の単独飼育幼虫と集合飼育幼虫に、緑きょう病菌を塗布接種し、接種後はいずれも個体飼育したところ、単独飼育幼虫は集合飼育幼虫に比べ感染致死率が高く、致死までの時間も短かった。

3) 集合飼育して得られた 6 齢幼虫から体色の淡い個体と体色の黒化した幼虫を選び出し、緑きょう病菌を塗布接種したところ、体色の淡い幼虫は体色の黒化した幼虫に比べ感染致死率が高く、致死までの時間も短かった。

4) 単独あるいは集合飼育した 6 齢幼虫に緑きょう病菌を注射接種したところ、単独飼育虫と集合飼育虫に緑きょう病菌に対する感受性の差異は、認められなかった。

5) 以上のことから、アワヨトウの高密度型幼虫は、低密度型幼虫に比べ緑きょう病菌に対し抵抗性であり、抵抗性の差は、幼虫表皮の生体防御機能のなんらかの違いにより生ずると推察された。

引用文献

青木襄児 (1977) かびによる昆虫の病理. 防菌防黴 5: 488—494.

- AOKI, J. and K. YANASE (1970) Phenol oxidase activity in the integument of the silkworm, *Bombyx mori* infected with *Beauveria bassiana* and *Spicaria fumoso-rosea*. J. Invertebr. Pathol. 16: 459—464.
- BELL, J.V. (1974) Mycosis. In: Insect Diseases (G.E. CANTWELL ed.), New York: Marcel Dekker Inc., pp. 185—236.
- 服部 誠・阿津沢新二 (1980) 簡易人工飼料によるヨトウガおよびアワヨトウの大量飼育. 応動昆 24: 36—38.
- 池本 始 (1971) アワヨトウ幼虫の皮膚にみられる黒色素. 防虫科学 36: 128—131.
- IKEMOTO, H. (1972) Phenoloxidase in the armyworm, *Leucania separata* WALKER. Scientific Pest Control 37: 43—48.
- IWAO, S. (1962) Studies on the phase variation and related phenomena in some lepidopterous insects. Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ. 84: 1—80.
- IWAO, S. (1963) Some behavioural changes associated with phase variation in the armyworm, *Leucania separata* WALKER. 1. Reaction of larvae to mechanical stimuli. Jap. J. Appl. Ent. Zool. 7: 125—131.
- 巖 俊一 (1967) バッタ・ヨトウガ類の相変異. 植物防疫 21: 228—237.
- 巖 俊一 (1971) “こみあい”の生態学. 昆虫における過密と過疎の影響. 自然 26: 44—51.
- 小泉清明・牧野 潔・堀 英男 (1954) 昆虫体のリビッド抗菌性に関する研究. 第1報. 体表面リビッドの抗糸状菌性. 応動 19: 112—116.
- 小泉清明・牧野 潔 (1955) 昆虫体のリビッド抗菌性に関する研究. 第2報. 蚕の体表面の抗糸状菌性物質の推定. 応動 19: 143—147.
- RIBA, G., K. KATAGIRI and K. KAWAKAMI (1982) Preliminary studies on the susceptibility of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), to some entomogeneous hyphomycetes. Appl. Ent. Zool. 17: 238—243.
- SHIBAZAKI, A. and Y. ITO (1969) Respiratory rates of green and black larvae of the armyworm, *Leucania separata* (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Ent. Zool. 4: 100—101.
- 柴崎篤洋 (1969) アワヨトウ幼虫の飼育密度と個体の歩行能力について. 日生態会誌 19: 73—75.
- VEY, A. and J. FARGUES (1977) Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. J. Invertebr. Pathol. 30: 207—215.