

マメノメイガ細胞質多角体病ウイルスのマメノメイガに対する病原性

遅 玉成*¹・津田勝男[†]・坂巻祥孝・櫛下町鉦敏

(害虫学研究室)

平成17年8月10日 受理

要 約

マメノメイガ細胞質多角体病ウイルス(MvCPV)のマメノメイガ幼虫に対する病原性を検討した。MvCPVの多角体を1齢幼虫から5齢幼虫に経口接種した結果、幼虫の感受性は齢が進むにしたがって低下した。MvCPVの2齢幼虫および3齢幼虫に対する50%致死濃度は、それぞれ 1.9×10^7 および 4.9×10^7 多角体/mlであった。一方、4齢幼虫および5齢幼虫では 1.0×10^8 多角体/mlの接種濃度で感染が認められなかった。ウイルスを接種する際の接種濃度と接種時期は生存期間および死亡時の体重に影響することが示唆された。若齢幼虫に接種して感染個体からウイルスを回収するのは困難であったが、3齢幼虫に接種した場合に感染個体は終齢幼虫まで発育したため、死亡個体からウイルスを回収することが可能であった。以上のことから、MvCPVを効率良く増殖するためには、3齢幼虫を用いる必要があると考えられた。

キーワード：マメノメイガ、細胞質多角体病ウイルス、病原性、LC₅₀、ウイルスの増殖

緒 言

マメノメイガ *Maruca vitrata* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) はアフリカからアジア熱帯・亜熱帯圏、オーストラリア、太平洋の島々にまで分布するマメ科作物の害虫で、日本でも北海道から沖縄まで全国で記録されている[3, 11]。本種の幼虫は、ダイズ (*Glycine max*)、アズキ (*Vigna angularis*)、ササゲ (*V. unguiculata*) など主要なマメ科作物の花および莢に潜り込み、花卉および葯、子房、子実を加害する[4, 12]。本種は日本においては、特にアズキおよびササゲの主要害虫のひとつとして挙げられている[2, 7]。しかし、わが国における本種の生態的な研究は立ち遅れており、発生消長などの断片的な報告があるのみである[2, 7]。

マメノメイガに対する天敵微生物は、原虫では真胞子虫類 (Apicomplexa) の *Mattesia* 属の1種[10]、微胞子虫類 (Microspora) の *Nosema* 属の1種[8, 10]、細菌では *Bacillus* 属の1種と *Clostridium* 属の1種[11]

が報告されている。Odindo et al. [9]は死亡した幼虫から糸状菌、*Bacillus*属細菌、顆粒病ウイルス、不明なウイルス包埋体を発見したが、これらの微生物の性状、病原性、実用性は検討していない。Cherry et al. [1]は細胞質多角体病ウイルスがマメノメイガに感染したと報告している。本研究では、マメノメイガ細胞質多角体病ウイルスを防除に利用することを目的として先ずマメノメイガに対する病原性を検討し、さらにウイルス多角体の増殖方法を検討した。

材料および方法

1. 供試ウイルス

マメノメイガ細胞質多角体病ウイルス (以下MvCPV) は、国際熱帯農業研究所アフリカ生物防除センター (Benin) から分譲された。多角体浮遊液を人工飼料に滴下してマメノメイガ幼虫に経口接種した。ウイルスに感染致死した幼虫の体液を回収

*¹ 現在 山東省落花生研究所, 中国 青島 266100

Present address: Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China

[†]: 連絡責任者: 津田勝男 (鹿児島大学農学部害虫学研究室)

Tel/Fax (099) 285-8685, E-mail: tsuda@agri.kagoshima-u.ac.jp

し、遠心分離器（コクサンH-26F，多本掛遠心機）で500rpmで5分間遠心して残渣などの異物を沈殿させて取り除き，上清を4000rpmで20分遠心して多角体を沈殿させた。この操作を3回反復して多角体を粗精製した。粗精製した多角体は蒸留水に浮遊し，使用するまで4℃で保管した。

2. 供試昆虫

マメノメイガは，鹿児島大学構内で2003年7月に採集した幼虫をササゲの花を用い，温度 25 ± 2 ℃，湿度60%前後に設定した昆虫飼育室内で累代飼育した。

3. マメノメイガ幼虫のMvCPVに対する感受性

MvCPVの多角体浮遊液を蒸留水で希釈し多角体濃度が 10^9 – 10^4 多角体/mlとなるように調整し接種液とした。人工飼料の細片（3mm×3mm×3mm）1個に接種液を12 μ lずつ滴下した。多角体を滴下した人工飼料細片1個を内径60mmのプラスチックシャーレに入れ，これに幼虫を1頭ずつ入れて48時間摂食させた。幼虫が人工飼料細片を摂食した後，病原体を含まない人工飼料を与えて飼育を継続した。飼育は 25 ± 2 ℃，14L10Dの条件下で行った。接種後の幼虫は毎日観察して病徴の発現および死亡により感染を確認した。得られた感染死亡率のデータより，50%感染致死濃度（LC₅₀，多角体/ml）を吉田（1992）のプロビット法で算定した。

結果および考察

1. マメノメイガ1齢幼虫のMvCPVに対する日齢別感受性

マメノメイガの孵化1日後から3日後の1齢幼虫にMvCPVを接種した場合の感染率と感染幼虫の生存日数をTable 1に示した。孵化1日後の幼虫では， 10^8 区では全個体が接種2日後までに死亡した。これらの個体は人工飼料の摂食が確認できなかったため，餓死したと考えられた。 10^7 区でも20頭のうち19頭が同様に死亡した， 10^6 区でも約半数の個体が死亡した。これらの餓死と考えられる個体は，接種濃度が低いほど少なくなる傾向が見られたことから，孵化幼虫が接種液に含まれていたウイルスあるいは体液を忌避したことが考えられる。このように孵化1日後の幼虫では，実際のウイルス接種虫数が十分ではなかったが，接種濃度が低いほど感染率が低くなる傾向は認められた。なお，感染した個体は接種6日後から20日に死亡した。孵化2日後の幼虫に接種した場合も孵化1日後幼虫と同様の傾向を示し，高濃度のウイルスを接種した区では接種2日後までに多くの個体が死亡した。感染した個体は接種5日後から21日に死亡した。孵化3日後の幼虫では接種2日後までの死亡が少なく，対照区と同程度であっ

Table 1. Larval susceptibility of *Maruca vitrata* to *Maruca vitrata* cytoplasmic polyhedrosis virus in the first larval instar and LC₅₀ values^a

Larval age	Virus dose (PIB/ml)	No. of larvae	No. of dead larvae due to unknown reason	No. of infected larvae	Infection rate (%)	Survival period ^b (days)	LC ₅₀ (PIB/ml)
1-day old	1.0×10^8	20	20	0	—	—	3.68×10^4
	1.0×10^7	20	19	1	100	$8.0 \pm 0 a$	
	1.0×10^6	20	11	8	88.9	$13.3 \pm 5 a$	
	1.0×10^5	20	3	11	64.7	$14.4 \pm 5 a$	
	Control	10	2	0	0.0	—	
2-days old	1.0×10^8	30	28	2	100	$10.5 \pm 1 a$	3.11×10^5
	1.0×10^7	20	15	5	100	$10.0 \pm 5 a$	
	1.0×10^6	20	4	11	68.8	$13.3 \pm 5 a$	
	1.0×10^5	20	7	4	30.8	$11.8 \pm 4 a$	
	Control	10	3	0	0.0	—	
3-days old	1.0×10^8	10	5	4	80.0	$11.8 \pm 6 a$	4.45×10^6
	1.0×10^7	10	3	5	71.4	$11.6 \pm 6 a$	
	1.0×10^6	10	4	2	33.3	$8.3 \pm 5 a$	
	1.0×10^5	10	3	0	0.0	—	
	Control	10	4	0	0.0	—	

^a Polyhedral inclusion bodies were administered orally to first-instar larvae at different days after hatching.

^b Mean \pm SD followed by the same letters are not significantly different (Tukey-Kramer's test, $p > 0.05$).

た。孵化2日後および孵化3日後ともに接種濃度が低いほど感染率が低くなる傾向が認められた。感染した個体は2, 3, 4 齢まで発育したが, 接種5日後から20日に死亡し, 虫体の大きさは対照区と比較すると小さかった。マメノメイガ1 齢幼虫の各日齢におけるLC₅₀をTable 1に示した。LC₅₀値は, 1日目から3日目までは約10倍ずつ低下し, 日齢が進むにしたがって感受性が低下する傾向が認められた。

2. マメノメイガ2 齢幼虫のMvCPVに対する感受性

MvCPVを接種したマメノメイガ2 齢幼虫の感染率をTable 2に示した。2 齢幼虫においても最高濃度の 2.4×10^9 多角体/mlの接種濃度で, 接種個体の半数以上が接種2 日後までに死亡したが, それより

低い接種濃度では接種2 日後までに死亡は少なかった。また, 接種濃度が低いほど感染率は低下した。 2.4×10^8 多角体/ml以下の接種濃度では, 蛹化後に死亡する個体が認められ, 2.4×10^7 多角体/mlと 2.4×10^6 多角体/mlでは幼虫期および蛹期に死亡する個体がほぼ同数であった。このことから, 接種濃度が低ければ遅い発育段階で死亡することが考えられた。

次にMvCPVを接種したマメノメイガ2 齢幼虫の生存期間および蛹重をTable 3に示した。幼虫期に死亡した個体の生存期間はばらつきが大きく, 各接種濃度における平均生存日数は最短が9.3日, 最長が12.8日で, 接種濃度による差は認められなかった。なお, 死亡した幼虫は2, 3, 4 齢であった。一方,

Table 2. Larval susceptibility of *Maruca vitrata* to *Maruca vitrata* cytoplasmic polyhedrosis virus in the second and third larval instar^a

Larval instar	Virus dose (PIB/ml)	No. of larvae	No. of dead larvae due to unknown reason	No. of infected larvae	No. of infected pupae	Infection rate (%)
2nd	2.4×10^9	20	11	9	0	100
	2.4×10^8	25	0	15	2	68.0
	2.4×10^7	25	1	5	5	41.7
	2.4×10^6	25	3	3	4	31.8
	2.4×10^5	25	1	4	1	20.8
	2.4×10^4	25	1	3	0	12.5
	Control	20	3	0	0	0
3rd	2.4×10^9	12	1	10	0	91
	2.4×10^8	20	1	9	4	68.4
	2.4×10^7	20	0	4	3	35.0
	2.4×10^6	20	2	4	1	27.8
	2.4×10^5	20	0	0	0	0.0
	Control	20	2	0	0	0

^a Polyhedral inclusion bodies were administered orally to second-instar and third-instar larvae at different concentrations.

Table 3. The larval period and pupal weight of second-instar larvae of *Maruca vitrata* after peroral inoculation of *Maruca vitrata* cytoplasmic polyherdosis virus^a

Virus dose (PIB/ml)	Died in larval stage		Died in pupal stage		Alive				
	n	Survival period ^b (days)	n	Larval period ^b (days)	Pupal weight ^b (mg)	n	Larval period ^b (days)	Pupal period ^b (days)	Pupal weight ^b (mg)
2.4×10^9	9	10.2 ± 2.3 a	0	—	—	0	—	—	—
2.4×10^8	15	10.9 ± 1.7 a	2	15.5 ± 0.7 a	19.1 ± 0.9 a	8	13.3 ± 2.1 a	7.8 ± 0.7 a	38.5 ± 6.1 a
2.4×10^7	5	12.8 ± 2.5 a	5	15.2 ± 3.7 a	29.6 ± 8.7 a	14	13.1 ± 2.2 a	7.5 ± 0.7 a	41.3 ± 8.6 a
2.4×10^6	3	9.3 ± 3.5 a	4	17.8 ± 2.5 a	32.3 ± 9.0 a	15	12.7 ± 1.4 a	7.9 ± 0.7 a	41.5 ± 5.4 a
2.4×10^5	4	11.3 ± 3.8 a	1	17.0	27.2	19	12.5 ± 1.1 a	7.6 ± 0.8 a	42.8 ± 3.8 a
2.4×10^4	3	11.3 ± 1.5 a	0	—	—	21	12.4 ± 1.7 a	7.6 ± 0.6 a	44.4 ± 6.6 a
Control	0	—	0	—	—	17	12.8 ± 1.1 a	7.4 ± 0.7 a	45.4 ± 6.8 a

^a Polyhedral inclusion bodies were administered orally to second-instar larvae at different concentrations.

^b Mean ± SD followed by the same letters are not significantly different (Tukey-Kramer's test, $p > 0.05$).

蛹化後に死亡した個体の幼虫期間と生存して羽化に至った個体の幼虫期間について差は認められなかったが、幼虫期間は長い傾向があり、死亡個体の蛹重は軽い傾向が認められた。蛹重については、接種濃度の間に有意差は認められなかったが、低濃度では重い傾向が認められた。CPVは感染しても死亡せずに羽化する個体があると報告されていることから、生存個体の中にも感染個体が含まれている可能性がある。蛹期に死亡した感染個体の幼虫期が延びて蛹重が軽くなっていることから、生存個体の中に感染個体が含まれていれば、対照区よりも幼虫期間が延びて蛹重が軽くなることが予想される。しかし、生存個体の幼虫期間と蛹重は対照区との間に差はなく、接種濃度による差も認められなかった。このため、生存個体の中に感染個体が含まれているかは確認できなかった。

3. マメノメイガ 3 齢幼虫の MvCPV に対する感受性

MvCPV を接種したマメノメイガ 3 齢幼虫の感染率を Table 2 に示した。3 齢幼虫では 2.4×10^9 多角体/ml の接種濃度でも 100% の感染率は得られず、 2.4×10^5 多角体/ml では、感染が認められなかった。MvCPV を接種したマメノメイガ 3 齢幼虫の生存期間を Table 4 に示した。幼虫期に死亡した個体の生存期間は接種濃度による差は認められなかった。一方、蛹化後に死亡した個体は、生存して羽化に至った個体と比較して有意差は認められなかったが、幼虫期間は長い傾向があり、蛹重は軽い傾向が認められた。蛹重については、2 齢幼虫と同様に低濃度で接種した場合に重くなる傾向が認められた。生存個体の比較では、 2.4×10^9 多角体/ml と 2.4×10^8 多角体/ml で幼虫期間と蛹重は対照区との間に有意差は認められなかったが、幼虫期間は長く、蛹重は軽い傾

向が認められた。このことから生存個体の中に感染個体が含まれている可能性が考えられる。

4. 各齢幼虫の MvCPV に対する感受性

MvCPV のマメノメイガの 2 齢、3 齢、4 齢および 5 齢幼虫に対する LC_{50} 値を Table 5 に示した。2 齢幼虫および 3 齢幼虫では、3 齢幼虫の LC_{50} 値が大きいですが、どちらも 10^7 のレベルで差がなかった。一方、4 齢および 5 齢幼虫については 1.0×10^8 多角体/ml の接種濃度では感染しなかった。

ウイルスは生体内でしか増殖できないため、ウイルスを大量に生産するためには宿主昆虫を利用する。宿主昆虫を利用したウイルス生産では、先ず宿主昆虫にウイルスを接種して成育した感染個体からウイルスを回収する。このため、より大量のウイルスを回収するためには発育が進んだ幼虫に接種する必要があると考えられるが、一般的に発育が進んだ幼虫は感受性が低下する傾向があるため、発育段階毎の感受性を検討する必要がある。また、CPV は、感染部位が中腸細胞に限られているため、感染個体から回収できるウイルスの量はごくわずかである。マツカレハ CPV では野外個体群を利用した増殖技術が確立し、実用化された [5, 6] が、ウイルスの回収量については検討されていない。本研究では 4 齢幼虫および 5 齢幼虫に対しては MvCPV を感染させることができなかった。また、1 齢幼虫はほとんど発育せずに 2 齢または 3 齢で死亡したためウイルスの回収は困難であった。このため、2 齢幼虫または 3 齢幼虫に接種して、ウイルスを回収する必要があると考えられる。

本研究において、2 齢幼虫に 2.4×10^9 多角体/ml で接種した場合、感染率は 100% であったため、ウイルスの回収は可能であった。しかし、接種した個

Table 4. The larval period and pupal weight of third-instar larvae of *Maruca vitrata* after peroral inoculation of *Maruca vitrata* cytoplasmic polyherdosis virus^a

Virus dose (PIB/ml)	Died in larval stage			Died in pupal stage			Alive		
	n	Survival period ^b (days)	n	Larval period ^b (days)	Pupal weight ^b (mg)	n	Larval period ^b (days)	Pupal period ^b (days)	Pupal weight ^b (mg)
2.4×10^9	10	10.2 ± 3.5 a	0	—	—	1	12	9	29.1
2.4×10^8	9	10.1 ± 2.4 a	4	12.5 ± 0.6 a	22.0 ± 3.2 a	6	12.8 ± 0.8 a	7.0 ± 0 a	22.8 ± 7.4 a
2.4×10^7	4	8.8 ± 2.0 a	3	11.7 ± 1.2 a	38.1 ± 3.0 a	13	10.9 ± 1.1 a	7.3 ± 0.7 a	44.2 ± 6.7 ab
2.4×10^6	4	7.8 ± 1.0 a	1	12	31.3	13	10.6 ± 0.9 a	7.5 ± 0.5 a	43.0 ± 4.8 ab
2.4×10^5	0	—	0	—	—	20	10.4 ± 0.5 a	7.3 ± 0.5 a	46.4 ± 2.9 b
Control	0	—	0	—	—	18	10.6 ± 0.6 a	7.2 ± 0.6 a	43.7 ± 4.9 ab

^a Polyhedral inclusion bodies were administered orally to third-instar larvae at different concentrations.

^b Mean ± SD followed by the same letters are not significantly different (Tukey-Kramer's test, $p > 0.05$).

Table 5. Larval susceptibility of *Maruca vitrata* to *Maruca vitrata* cytoplasmic polyhedrosis virus

Larval instar	LC50 (PIB/ml) and 95% confidence limit ^a		
	Lower limit	LC ₅₀	Upper limit
2nd	5.7×10^6	1.9×10^7	8.9×10^7
3rd	1.9×10^7	4.9×10^7	1.5×10^8
4th	n.a. ^b	$>10^{8c}$	n.a.
5th	n.a.	$>10^{8c}$	n.a.

^a Polyhedral inclusion bodies were administered orally to larvae of *Maruca vitrata*.

^b Data not available.

^c No infected larva were detected.

体の約半数は接種2日後までに死亡した。これに対し、3齢幼虫に接種した場合は不明死も少なく高い感染率が得られた。 2.4×10^8 多角体/ml以下の接種濃度で接種した場合は、2齢幼虫および3齢幼虫のいずれでも感染率が低下したため効率的ではないと考えられる。ただし、2齢幼虫および3齢幼虫のいずれも蛹期に死亡した個体の蛹重は、低濃度で接種した方が重くなる傾向が認められた。このことから、低濃度で接種した場合の感染個体は体が大きくなると考えられる。このため、1頭あたりのウイルス回収量も多くなることが期待される。今後はウイルス回収量を考慮して作業効率を検討する必要があると考えられる。

MvCPVには農薬と異なり即効性はなく、また、老齢幼虫、蛹、成虫には効果がない。ただし、MvCPVには、若齢幼虫の死亡率を高める効果とその世代の成虫が羽化した後の産卵数を減らす効果がある。鹿児島県で、マメノメイガの発生消長調査の結果[2]を踏まえてMvCPVを使用した防除を組入れた栽培体系を模索するならば、秋に栽培する露地抑制インゲン（8月上旬～9月中旬播種、10月上旬～11月中旬収穫）では播種・定植時および着蕾期（9月下旬～10月中旬）にMvCPVを散布することで、初期のマメノメイガ密度を下げ、さらに11月以降直接莢に食入する幼虫数を減らすことができるものと推測される。また、3～5月に莢を収穫する半促成インゲンの栽培体系（12月～1月播種）では、マメノメイガの発生は収穫後期だけと推測されるので、MvCPVを施用する場合には、収穫後期に得られる莢が蕾である時期（3月下旬～4月下旬）に散布するのが好適と考えられる。一方、夏～秋に収穫するササゲやアズキの場合は、マメノメイガの発生時期を避けることは困難であり、また飛来移動性が高い

ことから、一時的な防除では、その後の侵入個体の被害を避けることができない。しかし、8月末～9月に一時的にマメノメイガの発生が終息することを考慮すれば、9～10月に収穫する栽培体系で8月中旬までに化学農薬とCPVを併用して、周辺のマメノメイガ小発生時の被害を抑えることができると考えられる。

引用文献

- [1] Cherry, A., Le Gall, P., Goergen, G., James, B., Langewald, J., Neuenschwander, P., Tindou, M., assisted by Ajuonu, O., Attignon, S., Davies, H., Douro-Kpindou, O.K., Gbongboui, C., Hevief, G., Hountoundji, F.: Biological Control and Functional Biodiversity. Research Projects 1999. Project 3, 1-17 (1999)
- [2] Chi, Y., Sakamaki Y. and Kusigemati, K.: The seasonal abundance of the legume pod borer, *Maruca vitrata*, in Kagoshima, Japan. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University*, 38, 41-44 (2003)
- [3] 井上 寛・杉 繁郎・黒子 浩・森内 茂・川辺 湛: 日本産蛾類大図鑑. I 解説編. 352pp. 講談社, 東京 (1982)
- [4] Jackai, L. E. N. and Daoust, R. A.: Insect pests of cowpeas. *Annual review of entomology*, 31, 95-119 (1986)
- [5] Katagiri K.: Review on microbial control of insect pests in forests in Japan. *Entomophaga*, 14(2), 203-214 (1969)
- [6] 片桐一正: マツカレハ細胞質多角体病ウイルス (CPV). *農林水産技術会議研究成果*, 115, 62-68 (1979)
- [7] 片山 順・鈴木 勲: アズキ子実害虫の発生消長と被害. *京都農研報*, 12, 27-34 (1984)
- [8] Odindo, M. O. and Jura, G. Z. O.: Ultrastructure of *Nosema maruae* sp. n. (Microspora, Nosematidae), a pathogen of *Maruca testulalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Current Microbio*, 25, 319-325 (1992)
- [9] Odindo M. O., Otieno, W. A., Oloo, G. W., Kilori J. and Odhiambo, R. C.: Prevalence of microorganisms in field-sampled borers on sorghum, maize and cowpea in Kenya. *Insect science and its application*, 10(2), 225-228 (1989)
- [10] Okeyo-Owuor J. B., Oloo, G. W. and Agwaro P. O.: Natural enemies of the legume pod-borer *Maruca testulalis* Geyer (Lepidoptera: Pyralidae) in small scale farming systems of western Kenya. *Insect science and its application*, 12(1/2/3), 35-42. (1991)
- [11] Taylor, T. A.: The bionomics of *Maruca testulalis* Geyer (Lepidoptera: Pyralidae), a major pest of cowpea in Nigeria. *Journal of the West African Science Association*, 12, 111-129 (1967)
- [12] Taylor, T. A.: *Maruca testulalis*: an important pest of tropical grain legumes. In *Pests of Grains Legumes: Ecology and Control* (S. R. Singh, H. F. van Emden and T.A. Taylor eds.) pp. 193-200. Academic Press, London (1978)

Pathogenicity of *Maruca vitrata* cytoplasmic polyhedrosis virus to the legume pod borer, *Maruca vitrata* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae).

Yucheng CHI, Katsuo TSUDA[†], Yositaka SAKAMAKI and Kanetosi KUSIGEMATI
(Laboratory of Entomology)

Summary

The pathogenicity of *Maruca vitrata* cytoplasmic polyhedrosis (CPV) to *Maruca vitrata* was investigated to determine the lethal concentration and survival time. Polyhedral inclusion bodies (PIBs) were administered orally to first to fifth instar larvae of *Maruca vitrata*. The susceptibility of larvae decreased as the larval age increased. The median lethal concentration (LC₅₀) of second instar and third instar larvae were 1.9×10^7 and 4.9×10^7 PIBs/ml, respectively. The fourth instar and fifth instar larvae were not infected through 1.0×10^8 PIBs/ml. The inoculation concentration and larval stage at time of viral treatment affected the survival time and larval or pupal weight. For the mass production of *Maruca vitrata* CPV, the most effective method was to inoculate the 3rd instar larva with a concentration of about 10^9 PIBs/ml.

Key words : *Maruca vitrata*, *Maruca vitrata* cytoplasmic polyhedrosis virus, pathogenicity, mass production of virus

[†]: Corresponding to: Katsuo TSUDA (Laboratory of Entomology)