



日本中央競馬会
特別振興資金助成事業

機能微生物による
蜜源植物増殖総合研究事業
報告書

平成 30 年 3 月

一般社団法人 日本養蜂協会

目 次

はじめに	2
専門委員芳名	4
機能微生物による蜜源植物増殖総合研究事業推進委員会開催記録	5
Ⅰ. 食害等に対するレンゲ等の抵抗性の強化試験	7
Ⅱ. 害虫を駆除する益虫の効率的培養方法の開発試験	25
Ⅲ. 低温性メタリジウム菌による害虫の殺滅試験 【共同研究：鹿児島大学】	39

はじめに

レンゲの繁殖・開花は、春の水田、農村を彩る日常の景観として形成されてきたが、現在の化学肥料優先の風潮の中でレンゲ植栽は減少し、近年の植栽面積は最盛期の10%近辺にとどまっている。一方、このような状況においても、レンゲが水田の肥料源として寄与する役割ばかりか、レンゲ栽培による水稲の品質向上などが再認識され、レンゲの播種を積極的に行う自治体や農業団体数は増加傾向に転じている。

レンゲの根圏には窒素固定菌が共生している。この菌は空気中の窒素を土壌に導入して、植物の利用できる栄養に変換する。このように、レンゲは土壌を肥沃化する貴重な植物の一つであり、実際レンゲ栽培が盛んな時期には水稲への施肥は格段に少なかった。レンゲは、また、蜜蜂の貴重な蜜源植物でもある。日本人のハチミツの摂取量は、欧米と比較すると少ないが、その理由は、百花蜜のような味、臭いが比較的強い製品を敬遠するところにある。一方、淡白な味で、かつ臭いも少ないレンゲ・ハチミツを好む人は多く、このレンゲ蜜は百花蜜の約2倍の価格で販売されている。

そして、現在の健康ブームおよび食事内容の西欧化にともない、朝食などではコーヒー、果物、ハチミツの取り合わせを採用する人が増え、ハチミツの需要は増加している。加えて、食品への安全意識の高まりで、国産ハチミツの価格は外国産と比較して2倍近辺にある。

このようにレンゲ価値の再認識が進む状況ではあるが、ここで大きな問題が顕在化する。すなわち、レンゲを摂食する害虫アルファルファタコゾウムシ（以降タコゾウムシ）が国外より侵入し、2006年以降では東北、北海道を除く全国に出現、レンゲの生長、開花の不良にいたる大被害をもたらしている。このレンゲを食害するタコゾウムシの駆除研究は長年に渡って行われている。例えば、タコゾウムシの幼虫を死滅させる益虫蜂（ヨーロッパトビチビアメバチ）を導入して、九州、中国、関西地方においてその増殖が試みられている。また、レンゲを遅く播種することによって開花を遅らせ、タコゾウムシ幼虫の成長期においてレンゲを未生長にとどめる手法も試みられた。しかし、いずれの方法においても、タコゾウムシの食害を減らして、レンゲを持続的に繁殖させるような成果を得るまでには至っていない。このような実験実態においては、レンゲ植栽推進をとりやめる研究機関のある現状も認めざるを得ない。

このような背景において、「機能微生物による蜜源植物増殖総合研究事業」がはじまり、(一社)日本養蜂協会が事務局を担当、研究経過を検証するために設置された推進委員会のもとに、以下の3つの研究が展開された。

- (1) 食害等に対するレンゲ等の抵抗性の強化試験
- (2) 害虫を駆除する益虫の効率的培養方法の開発試験
- (3) 低温性メタリジウム菌による害虫の殺滅試験

これらの研究においては、①他生性 (allochthonous) の有用機能微生物を用いてレンゲ根圏の自生性 (autochthonous) の微生物環境を人為的に改善することで、レンゲの生長促進と病害耐性強化を進めるのみならず、②昆虫などが微生物と共存することで活性化する特質を利用して、害虫であるアルファルファタコゾウムシを駆除する益虫ヨーロッパトビチビアメバチの効率的生産方法の開発を行っている。生物圏の自生性微生物相はその生息環境に最も迅速かつ持続性ある生存適応した自然微生物群集によって構成されている。したがって、その微生物相を人為的に改変するためには、高度な微生物学的な知識と手法が必要である。さらに、③害虫アルファルファタコゾウムシに感染して害虫を死滅させることが知られている真菌メタリジウムについて、これまでは高温環境において機能を発現する菌株が使用されていたが、レンゲ開花時期の低温期においても活性を発現する低温株を開発する研究も進められた。

長い歴史のあるレンゲの生長、繁殖研究は、旧くて新しい課題と言われるが、本研究においてレンゲ繁殖増進への道が開けるものと考えている。

機能微生物による蜜源植物増殖総合研究事業推進委員会委員長
筑波大学名誉教授 關 文威

専門委員芳名（敬称略、順不動）

【機能微生物による蜜源植物増殖総合研究事業推進委員会】

《委員長》

關 文威 国立大学法人筑波大学 名誉教授

《委員》

前田昌調 国立大学法人宮崎大学 名誉教授

浅井辰夫 国立大学法人静岡大学 農学部 特任准教授

吉村信映 岡山県養蜂組合連合会 元会長【平成 27 年】

須崎哲也 宮崎県畜産試験場 家畜バイテク部長

【平成 28 年～29 年】

《オブザーバー》

山本 淳 国立大学法人鹿児島大学水産学部 教授

機能微生物による蜜源植物増殖総合研究事業推進委員会開催記録

◎平成 27 年度

(1) 第 1 回事業推進委員会

日 時：平成 27 年 6 月 16 日（火）13:30～15:30

場 所：東京都中央区新川二丁目 6-16 馬事畜産会館 2 階会議室

出席者：7 名

(2) 第 2 回事業推進委員会

日 時：平成 28 年 3 月 8 日（水）13:30～15:30

場 所：東京都中央区新川二丁目 6-16 馬事畜産会館 2 階会議室

出席者：7 名

◎平成 28 年度

(1) 第 1 回事業推進委員会

日 時：平成 28 年 6 月 29 日（水）13:30～15:30

場 所：東京都中央区新川二丁目 6-16 馬事畜産会館 2 階会議室

出席者：9 名

(2) 第 2 回事業推進委員会

日 時：平成 29 年 3 月 17 日（金）13:30～15:30

場 所：東京都中央区新川二丁目 6-16 馬事畜産会館 2 階会議室

出席者：9 名

◎平成 29 年度

(1) 第 1 回事業推進委員会

日 時：平成 29 年 6 月 12 日（月）13:00～15:00

場 所：東京都中央区新川二丁目 6-16 馬事畜産会館 2 階会議室

出席者：9 名

(2) 事業報告会

日 時：平成30年2月28日（水）15:00～17:00

場 所：東京都千代田区大手町1-4-1

KKRホテル東京11階「丹頂の間」

講 演：宮崎大学名誉教授 前田昌調

(3) 第2回機能微生物による蜜源植物増殖総合研究事業推進委員会

日 時：平成30年3月23日（金）13:30～15:30

場 所：東京都中央区新川二丁目6-16 馬事畜産会館2階会議室

出席者：9名

I . 食害等に対するレンゲ等の 抵抗性の強化試験

食害等に対するレンゲ等の抵抗性の強化試験

宮崎大学 名誉教授 前田昌調

アルファルファタコゾウムシ（以降、タコゾウムシ）（図 1）によるレンゲの食害は、2006 年以後急速に拡大している。この研究は、害虫の攻撃からレンゲを守るために、微生物を使用したレンゲ抵抗性の増進を内容としている。同時に、使用する微生物の機能による（レンゲ植栽以後に植える）農産物の疾病防除と収量増大についても試みた。これらの研究により、レンゲの生長・開花が促進され、また農作物の疾病減少、収量増大という、レンゲ植栽の付加価値増進に至る効果が期待できる。

植物は移動性に欠けるため、害虫や病原菌に対しては忌避物質（アレロパシー物質など）を生産、あるいは共生微生物の働き等によって自らを防御している。そして、この防御の過程では、植物の自生基盤である土壌の状況、特に微生物の組成が重要な要素となる。

（1）肥料は微生物を経由して栄養となる

通常、肥料を投与すると、その肥料が直接的に栄養となって植物の生長を促進すると考えがちだが、実際には「肥料」→「微生物の増殖」→「栄養物質の生産」→「植物の生長」という流れが主経路となる。そして、この経路は全体の 70%程度を占めると報告されている。肥料は物質的栄養であり、これに対して微生物は生体的栄養素を供給しているため、植物は物質よりも生きた生物からの栄養をより有効に利用する。

また、植物は根付近（根圏）においては、自身に適合するような微生物を増やす作用、すなわち微生物組成を作り変えることが明らかになっており、有機肥料中などに生息する微生物が当該植物に適した栄養を生産するかは不明であっても、上記のプロセスにおいて適切な微生物種が根圏で増殖することになる。

（2）土壌の微生物をなくすと植物は生育できない

しかし、土壌から微生物を排除したり、あるいは微生物の組成が不適切な場合には、植物は生育困難な状況に陥る。例えば、肥料過多の場合には腐敗菌が多くなり、過度の農薬使用では、微生物の減少あるいは組成の変化が生じる。

(3) 土壤に適切な微生物を投与する

植物の根は、自身にとって適当となる微生物を増やす機能を持っているが、ここで、長期にわたり除草剤、防虫剤等の農薬あるいは化学肥料を使用した場合には、微生物の組成が不適切に固定されることになる。このような状況は、土壤の劣化などと言われる。

ここで、人為的に適切な微生物を供給する方法があり、本研究では、レンゲの植栽時において機能微生物を投与する手法を採用した。

(4) レンゲ繁殖に使用した機能微生物

使用した微生物はシュウドモナス属 MS-1 株細菌で、この細菌は病原菌（病原細菌、真菌、ウイルス）の増殖を抑制し、さらに蜜蜂の群増大と動植物の免疫増進効果をあらわす。そして、この菌株については、動物と植物とを対象にして長期の安全性試験を実施している。このような経緯により、本菌株を研究で採用した。

(5) 機能微生物によるレンゲの生長促進

まず、機能微生物とレンゲ種子とを混合して、小トレーに植栽した。この結果、微生物投与区でレンゲ生長の増進することが確認できた（図 2、3）。

次に、機能微生物を凍結乾燥法によって生きたまま粉末化する作業を行った。この乾燥粉末中では、細菌の約 95% が生存している。そして、この生菌粉末とレンゲ種子とを混合し播種器を用いて圃場に散布した（図 4、5、6、7）。なお、生菌とレンゲ種の混合重量比は、2～5% とした。

この作業は、いずれも 10 月下旬から 11 月上旬の時期に行い、平成 26 年は、鹿児島県の 1 か所（予備試験）、平成 27 年は、鹿児島県 1 か所、熊本県 5 か所、宮崎県 2 か所、平成 28 年は宮崎県 2 か所、平成 29 年は宮崎県 2 か所において実施した。

播種した翌年の 4 月下旬から 5 月にかけてレンゲ生育状況の調査を行い（熊本県については、震災のため中止）、この結果いずれの地区においても機能微生物＋レンゲ種子の播種区でレンゲの生長がよく、微生物を使用しなかった試験区と比較して 150～200% の生長増進効果が認められた（図 8、9、10、11、12）。

そして、鹿児島において植栽したレンゲについて、その全糖含量を測定したところ、糖分は微生物投与区において微生物無投与区の 2 倍となった（表 1）。

さらに、レンゲ+機能微生物を播種し、次年度は（微生物を使用せず）レンゲ種のみを植えた圃場においても、微生物投与区のレンゲの生長は無投与区よりも良好であった（図 13）。この結果は、微生物の機能が 1 年後においても発現することを示唆している。

（6）機能微生物によるレンゲ害虫被害の防除

機能微生物を使用することによりレンゲ生長の促進効果が現れたが、同時にアルファルファタコゾウムシ（以下タコゾウムシ）の食害が軽減した。

当初、私達は、微生物を使用することで害虫タコゾウムシの増殖が加速され、レンゲ食害が増大すると危惧した。しかし、実際には、レンゲ繁殖の初期にタコゾウムシの食害があったものの、その後レンゲの生長が優った。そしてレンゲは、食害の拡大することなく生長・開花した。植物は健全に成長すると、害虫に対する忌避物質を産出して虫を排除するが、今回の試験においても、レンゲによる害虫忌避物質の産出があるように考えた。

加えて、例年のタコゾウムシによるレンゲ食害あるいは繁殖不良は、水田土壌の性状劣化が進行する中で、レンゲ生長を支える栄養素や微生物機能が欠如するところから生じており、本研究で投与した有用微生物がこのマイナス要因を緩和したものと考えた。

（7）レンゲ植栽における付加価値の増進

レンゲは、根圏の窒素固定微生物によって、空気中の窒素ガスを土壌中に導入する。このため、レンゲ植栽によって土壌の栄養価の増すことが分かっている。このような効果があるため、以前は田植前にレンゲを植栽する地域が多くあったが、近年の化学肥料優先の趨勢のためレンゲ繁殖面積は減少している。

しかし、このような状況においても、レンゲの栄養価に対する評価は（依然として）高く、（本プロジェクトに推進委員として参加している）静岡大学農学部浅井辰夫特任准教授は、20 年にわたってレンゲ植栽と無肥料による水稻栽培を行い、化学肥料使用に匹敵する水稻収量を得ている。

ここで、使用している微生物が多くの動植物病原菌の増殖を抑制することが判明し（図 14、15）、さらに、水稻の黒こうじ病菌の増殖を抑制することが分かったため（図 17）、本微生物を水稻苗に散布した（図 19、20）。その結果、黒こうじ病の発症は例年よりも大幅に減少した（表 2、3）。稲の黒こうじ病（図 16、18）は全国的に発症する真菌性疾病で、大きな被害を起こしている。本研究で採

用した機能微生物の作用には持続性があり、微生物を水田に一回投与するのみで、その後に生育する水稻の黒こうじ病等の疾病防除に効果をあらわした。

なお、事例 1 の水稻栽培においては、2016 年 11 月に（機能微生物を混合した）レンゲ種子を植え、2017 年 6 月に田植えを行ったが、この時に水稻には機能微生物を散布していない。この条件において、11 月の刈入れ時の黒こうじ病の発症が、非常に少ないことを確認した。この結果は、レンゲ+機能微生物に持続性があり、水稻の疾病防除に効果があらわれたことを示唆している。

また、ナスに対する機能微生物の給与では、収量が約 1.5 倍に増加し、その実も大きいという結果を得た（図 21、22、23）（表 4）。

機能微生物をレンゲ種子にコーティングする方法の検討については、コーティング剤を試験したが、機能微生物粉末が吸湿性を保持し、低湿度の状態でもレンゲ種子に付着することが分かり、コーティング剤の使用は必要ないと判断した。

（8）使用した機能微生物の安全性

本研究で採用した機能微生物シュウドモナス属 MS-1 株は、土壌細菌の一種である。シュウドモナス属の種は、土壌微生物の約半数を占める一般的な細菌で、その中で病原性を持つ株は少なく、大半は自然細菌、一般細菌と呼べる。そこで、16SrRNA 解析を基にした分類同定を行ったところ、MS-1 株は病原菌とは一致しないことが証明された。さらに、1 ヶ月間のラットへの大量経口投与試験、あるいは稚魚や小動物（蜜蜂など）への長期間投与試験、さらに多くの植物の発芽・生長試験を経て、その安全性が確認された。また MS-1 株は、病原菌（病原細菌、真菌、ウイルス）を排除する拮抗作用を示し、かつ動植物の免疫機能増進効果をあらわすが、例えばバチルス菌のような自然界において優勢かつ病原性の少ない種とは競合することが少ない。このような経緯により、本微生物（MS-1 株）は、植物の肥料、動物の飼料として登録されている。

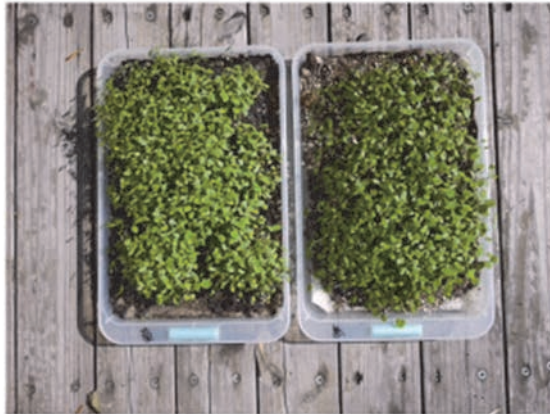


成虫



幼虫

図1. アルファルファタコゾウムシ.
提供 (一社)日本養蜂協会



微生物
添加

微生物
無添加



微生物
添加

微生物
無添加

図2. レンゲの植栽と微生物(シュウドモナス菌MS-1株).



微生物
添加

微生物
無添加

図3. レンゲの生長と微生物(シュウドモナス菌MS-1株).



図4. レンゲの種に微生物(MS-1株生菌粉末)を混合.



図5. レンゲの種に微生物(MS-1株生菌粉末)を混合.



図6. レンゲの種を散布した播種器.



図7. レンゲの種と微生物の散布.



微生物無投与
2015年4月



微生物投与
2016年4月

図8. レンゲの繁殖状況の比較.

(宮崎県川南町・永友肆郎養蜂園の圃場)



図9. 機能微生物によるレンゲ繁殖効果. 2016年5月
鹿児島県養蜂協会による採蜜実演風景 於:鹿児島県さつま川内市

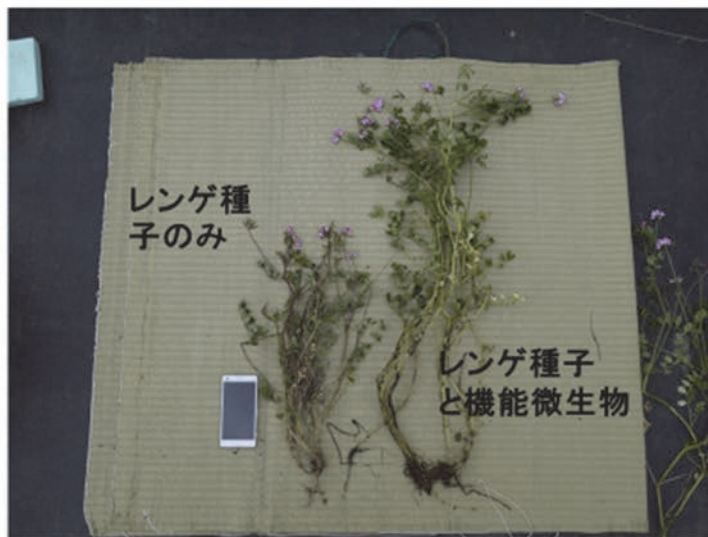


図10. 機能微生物によるレンゲ繁殖効果. 2016年5月



図11. 鹿児島県養蜂協会によるレンゲ播種の看板.
於:鹿児島県さつま川内市



図12. 鹿児島県養蜂協会によるレンゲ播種の看板.
於:鹿児島県さつま川内市

表1. 機能微生物を投与したレンゲの糖度

日本食品分析センター 2016年5月

検体	試験項目	結果	注	方法	報告書No.
レンゲ (微生物投与)	全糖分	0.6%	1	ソモギー変法	16052514003-0101
レンゲ (微生物無投与)	全糖分	0.3%	1	同上	16052514004-0101

注1:ブドウ糖換算. 加水分解条件:2.3%塩酸、65℃、15分間



図13. 1年半後のレンゲ圃場. 於:鹿児島県さつま川内市

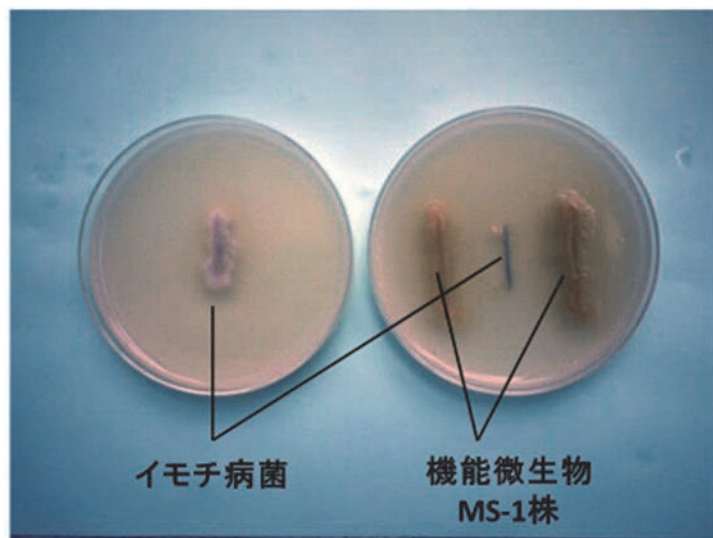


図14. 機能微生物MS-1株による稲イモチ病菌の抑制.

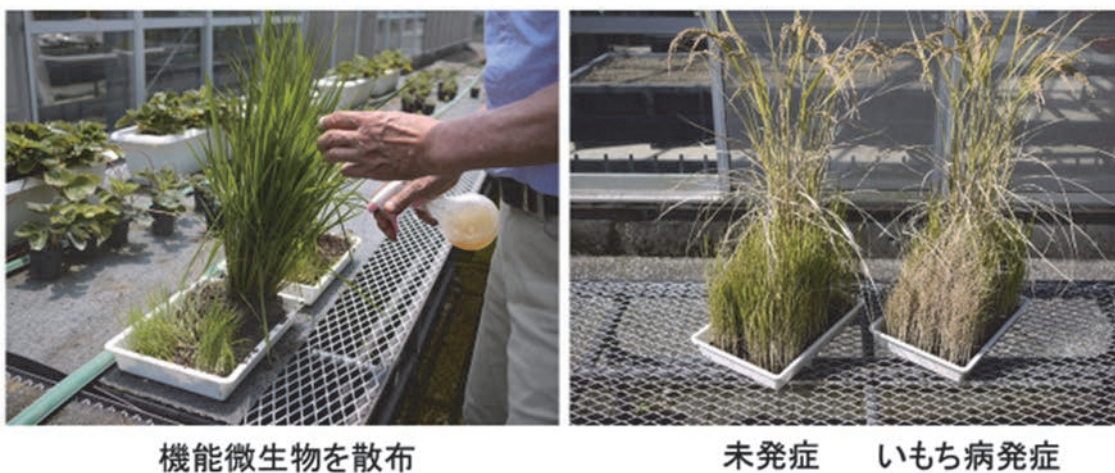


図15. いもち病防除実験(水稻).



図16. 黒こうじ病菌が発生した稲穂.

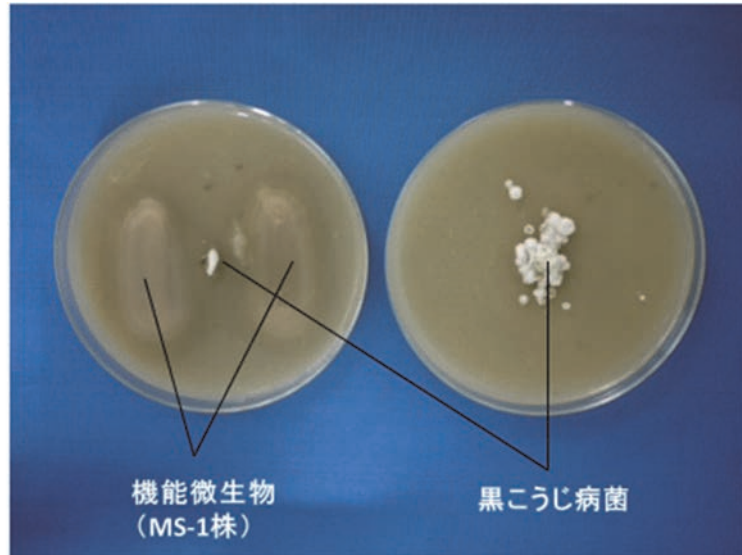


図17. 機能微生物による黒こうじ病菌の増殖抑制.



図18. 黒こうじ病が発生した水稻.



図19. 機能微生物の水稻への給与(事例1).

表2. 稲作成績 (事例1)

	俵数 (1俵:60Kg)	黒こうじ米の量 (升)
2015年	約150	2~3
2016年	同上	0.5以下



図20. 機能微生物の水稻への給与(事例2).

表3. 稲作成績 (事例2)

	俵数 (1俵:60Kg)	黒こうじ米の量 (升)
2015年	約320	約5
2016年	同上	1以下



図21. 宮崎県佐土原ナス.



図22. ナスに菌株MS-1を給与.



図23. ナスの生育(植栽3か月後).

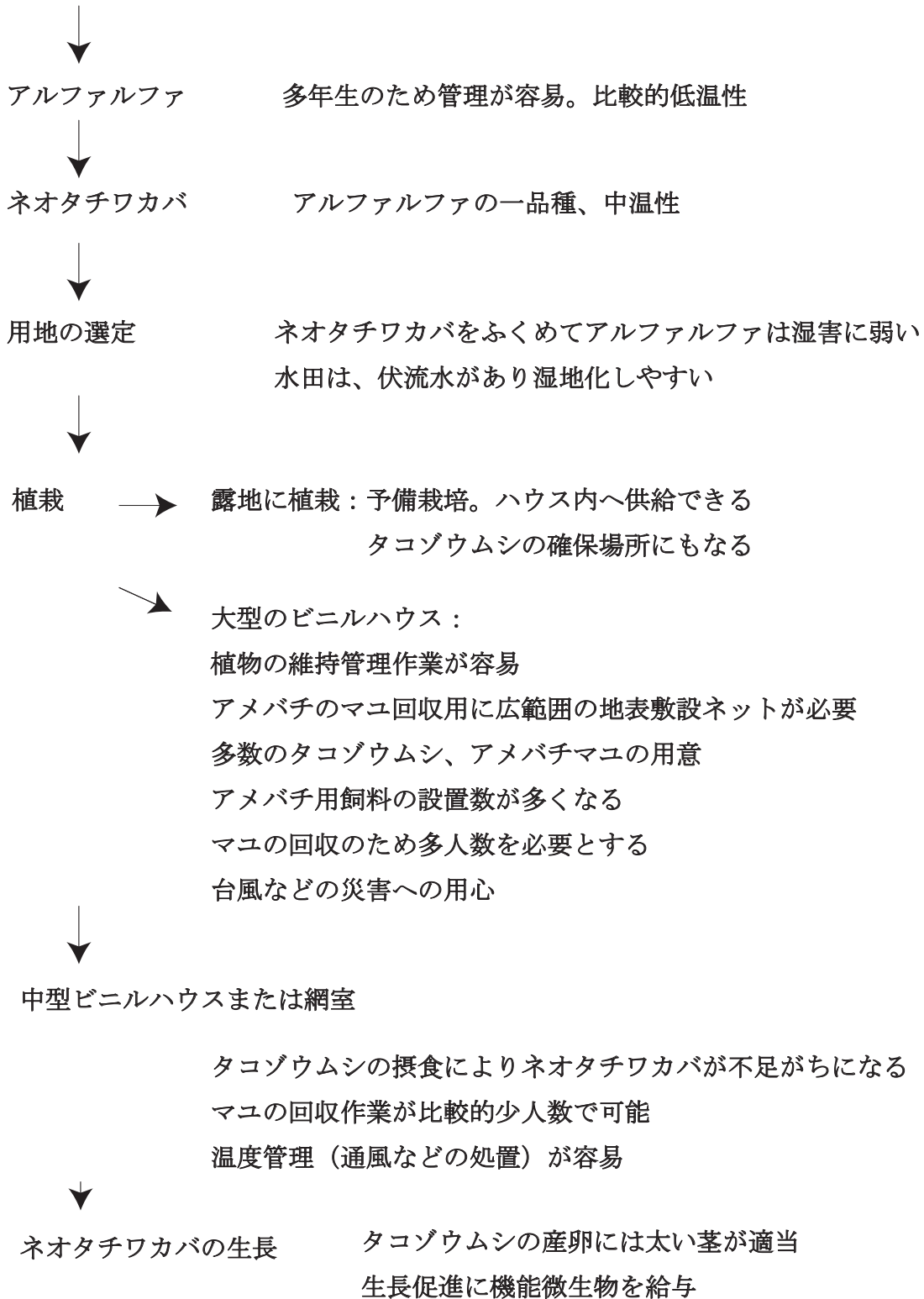
表4. ナスの結実数(40本あたりの総数)

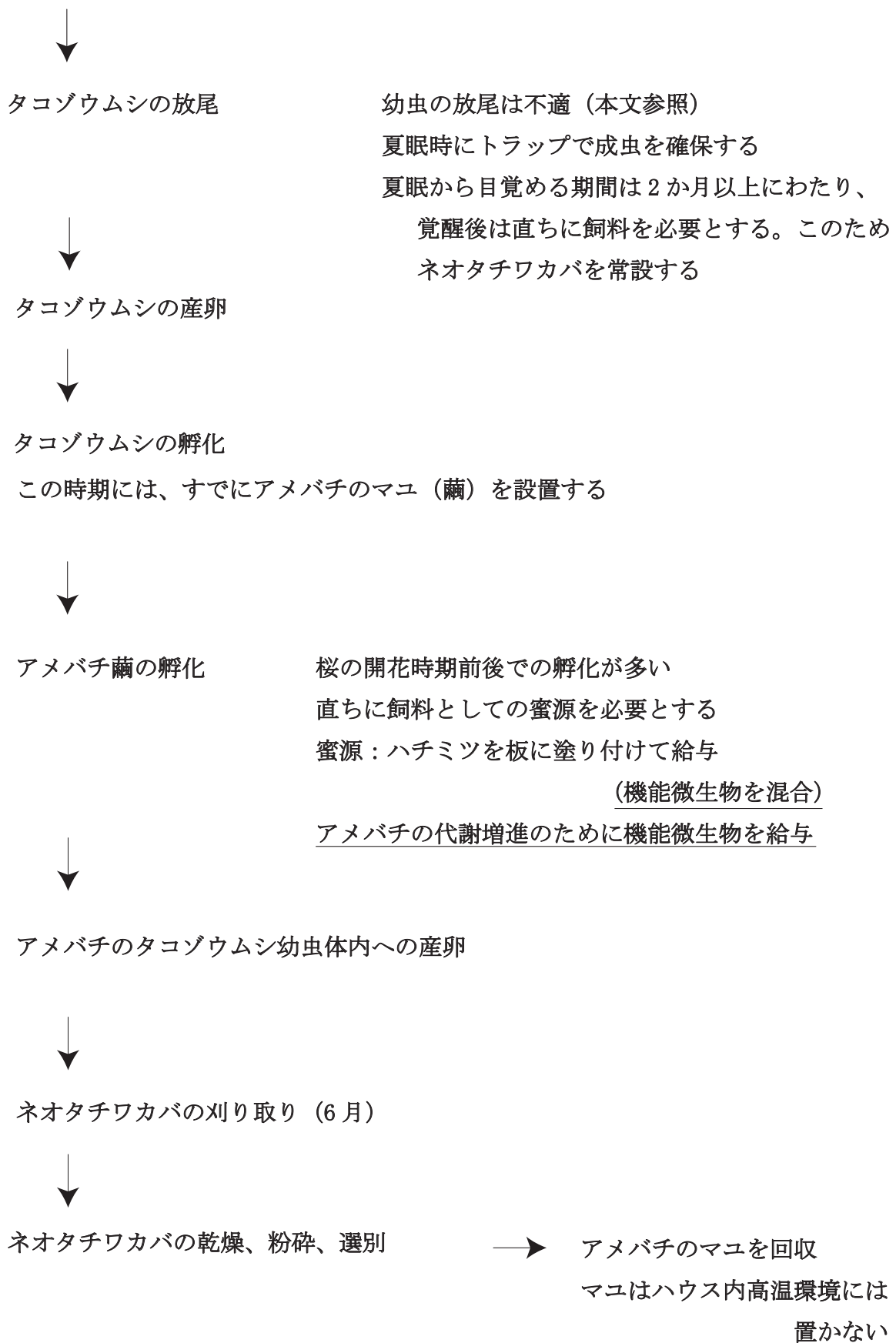
機能微生物MS-1株	調査したナス本数	結実総数
給与	40	227
無給与	40	147

Ⅱ. 害虫を駆除する益虫の効率的 培養方法の開発試験

本事業における研究から得た知見を基にして、ヨーロッパトビチビアメバチ（以降：アメバチ）のマユ生産にかかわるフローシートを作製した。

レンゲ、あるいは代替植物（アルファルファ）を植える





(1) アメバチのマユ生産の概要

アメバチ (図 1) によるアルファルファタコゾウムシ (以降: タコゾウムシ) の駆除では、まずアメバチがタコゾウムシ幼虫の体内に産卵してマユをつくる。そして、この産卵によりタコゾウムシ幼虫の成長が阻害される。すなわち、害虫タコゾウムシが排除されることになる。さらに、この害虫幼生体内で形成されたアメバチのマユを回収することにより、次年度用のタコゾウムシ駆除の益虫 (アメバチ) を確保することができる (図 2)。

このマユの採集では、アルファルファの一種であるネオタチワカバを植栽し、そこに害虫タコゾウムシを放飼して産卵させる。ネオタチワカバの植栽では、地表には小網目サイズのネットを敷設する。さもないと、土壌表面に落ちたアメバチのマユの識別、採集が困難となる。次に、5月下旬~6月にはネオタチワカバを刈り取り、敷設したネット上に放置して乾燥させる。この時にハウス内が高温になると、翌年におけるマユの孵化率が低下する。こうして、刈り取ったネオタチワカバをシート上において細かく粉砕し、篩 (ふるい) にかけて落下するマユを回収する。この回収には、相当の人数が必要であり、従来の研究においては全費用の中で最大の人件費を計上している。また、夏から翌年春までのマユの保管では、適度の保湿を必要とし、さらに季節の推移感を付与する上で、室外での保管が望ましい。

(2) アメバチの産卵

アメバチの産卵は、桜の開花時期の約 1 ヶ月間に行われ、産卵対象となるタコゾウムシ幼虫のサイズは 3mm 以下である。この小サイズの幼虫を野外において採集することは難しく、またタコゾウムシ幼虫を益虫アメバチに投与して、ただちに益虫が幼虫に対して産卵するとは限らない。このため、幼虫を益虫アメバチに給与する方法としては、タコゾウムシ成虫をアメバチと併存させることが必要となる。次に、アメバチがマユから孵化した際には、ただちに飼料が必要であり、ここではプラスチックシャーレ内にハチミツを塗り、その中に土壌菌 MS-1 株の生菌粉末を混合した。MS-1 株粉末の混合比は 10% (V/V) とした。この微生物の投与によりマユの生産数が増加した。これは、機能微生物 MS-1 株によってアメバチの代謝活性が増進したことに起因すると考えた。

(3) タコゾウムシの確保

タコゾウムシは、野外ではレンゲやカラスノエンドウに寄生しているが、成虫を必要とする2~3月には幼虫は見られるものの、成虫は土壌付近に隠れており確保することが意外に難しい。このため経年を通してハウス内に保存する必要がある。

ハウス内での害虫タコゾウムシの採集は、害虫が光源に向かって集まること、また隙間に入り込む習性のあることを利用して、ハウス上部の天井に集まる個体、あるいは段ボール紙の間隙や、2枚の木材を数mmの隙間をつくって張り合わせたトラップを用いる。こうして集めたタコゾウムシの保管は、室内で行うと夏の高温、晩秋の低温という温度変化を体感できないためか、春先の産卵などの行動に遅滞があるように思えた。このため、室外の日陰において、適度の湿度を加えて保存した。なお、タコゾウムシの夏眠からの覚醒は全個体が同時に行うことはなく、9月末より約2か月にわたってばらばらに目覚める。そして覚醒後には、ただちに植物飼料の摂食をはじめめるため、ネオタチワカバの植栽を夏の終わりより並行させる必要がある。このネオタチワカバの供給は、ポット植栽のものを与える方法とハウス内に植栽する方法とがある。

(4) ネオタチワカバの生長

タコゾウムシは、ネオタチワカバに寄生して産卵を行うが、この害虫は卵を植物の茎に産み付ける。そして、太い茎を選択するので、その生長を促進する必要がある。ここで肥料として少量の石灰、燐を供給するが、有機肥料は適さない。一方、土壌菌MS-1株は植物の生長促進効果をあらわすため、ネオタチワカバの種子をポットにいれ発芽させる際には、種にMS-1株生菌粉末を給与した。生菌粉末の量は、種に対して2~5%（重量比）でよい。この結果、1回の投与により、ネオタチワカバの生長は促進される。MS-1株の供給は、1回あるいは2回で充分であり、それ以上の追加投与を必要としない（図3）。

なお、ネオタチワカバを露地でも栽培すれば、ハウス内の枯死個体の代替として用いることができる。本研究でネオタチワカバの種子に機能微生物を投与しない場合には、液状の微生物を散布・供給した（図4、5、6）。また、この露地のネオタチワカバに寄生するタコゾウムシを夏眠時にトラップで採捕することで、害虫の確保もより容易になる。

栽培地の選定では、水田として使用してきた用地は、地表数10cm下に伏流水があつて土壌全体が湿地化している場合があるため、湿害に弱いネオタチワカ

バには適さない。

(5) 小型ハウス、あるいは中型網室の設置

大型ハウス（例：6 x 20 m）の場合は、ネオタチワカバへの水補給などの作業が楽になるが、地表全体へのトビチビアメバチのマユ採集用のネットの敷設、そして多数のアメバチマユとタコゾウムシの準備、また、マユから孵化したアメバチへの飼料供給等、規模の拡大に伴って作業量、準備資材が増す。加えて、マユの採集時において、乾燥・粉碎したネオタチワカバの分別に多くの人員を必要とする。

このため、本研究では、1m x 0.6 x 1.1（高さ）の網室を作製し、植木鉢に植栽したネオタチワカバを定期的に供給した。タコゾウムシに摂食されたネオタチワカバは刈り取り、網室内に放置し、新たな植木鉢を追加することになる。各植木鉢にはマユやタコゾウムシが土中に埋没しないようにネットを敷設する必要がある。植木鉢に植えるネオタチワカバは、露地栽培のものを利用した（図 7、8、9、10、11）。

(6) トビチビアメバチのマユの生産

中型網室に、ネオタチワカバを植栽した植木鉢を 2 基、タコゾウムシ成虫（40 尾）、アメバチのマユ（各トレーに 50 個）を設置したところ、タコゾウムシは産卵し、幼虫は植物を摂食した。そして、3 月下旬にはアメバチのマユよりの孵化がはじまった。6 月にネオタチワカバを刈り、そのまま乾燥のために放置、7 月下旬にマユを計数した。その結果、生産したマユは少なく 102 個を計数した（表 1）。この網室での作業では、タコゾウムシの成虫を前年より保存していたが、野外個体と比較して活力が劣るように思った。また、設置したアメバチのマユの孵化率が低い（36.8%）ことも、マユ生産数低減の原因と思えた。

一方、予備実験用に用意した小型網室（図 12）においては、各々にマユを 20 個、タコゾウムシ成虫 20 尾を設置した。この結果、微生物給与区では 42 個、無給与区では 28 個のマユが確保できた（表 2）。しかし翌年の実験では、保存したタコゾウムシ成虫数に不足があったため、野外よりタコゾウムシ幼虫を採捕して使用した。幼虫はカラスノエンドウに多く寄生し、その採集は容易であったが、サイズは約 5mm の個体が多くあった（タコゾウムシ幼虫採集の例：図 13、14）。そして、この網室においては、マユの生産は確認できなかった。この結果については、タコゾウムシ幼虫の成長期がアメバチの産卵期と合致しない、すなわちア

メバチは、より小さい幼虫に産卵する習性があることに起因すると思えた。

なお図 13、14 にあるように、宮崎県庁のグループは、毎年宮崎県小林市においてタコゾウムシ幼虫を採集し、幼虫体内のアメバチのマユを計数している。この調査では、時には 10% の割合で卵が害虫幼生体内から見つかっているが、これは、同市において、アメバチのマユを毎年放飼することによる。一方本試験では、タコゾウムシ幼虫を宮崎市内で確保したが、幼虫体内のマユの存在は確認できなかった。

謝辞：本プロジェクトの設定においては、日蜂協・川原秀男副会長のご尽力によるところが大きく、研究の実施では日蜂協事務局の多くのご苦勞がある。そして、研究の開始する前年には予備調査が行われ、九州 7 県の日蜂協会員団体からご支援をいただいた。また、レンゲの播種では鹿児島県、熊本県、宮崎県の日蜂協会員に、水稻の疾病防除試験では、宮崎県養蜂組合、宮崎県総合農業試験場、JA えびの市のご協力をいただいた。岡山県養蜂組合連合会からはトビチビアメバチのマユを、奈良県養蜂農業協同組合よりはタコゾウムシ成虫、そして雪印種苗（株）よりはネオタチワカバ苗、種の提供をいただいた。さらに、微生物による小動物の代謝増進についての知見およびレンゲ米栽培については、關文威筑波大学名誉教授と浅井辰夫静岡大学農学部特任准教授にご教示をいただいた。ここに、厚く謝意を表します。

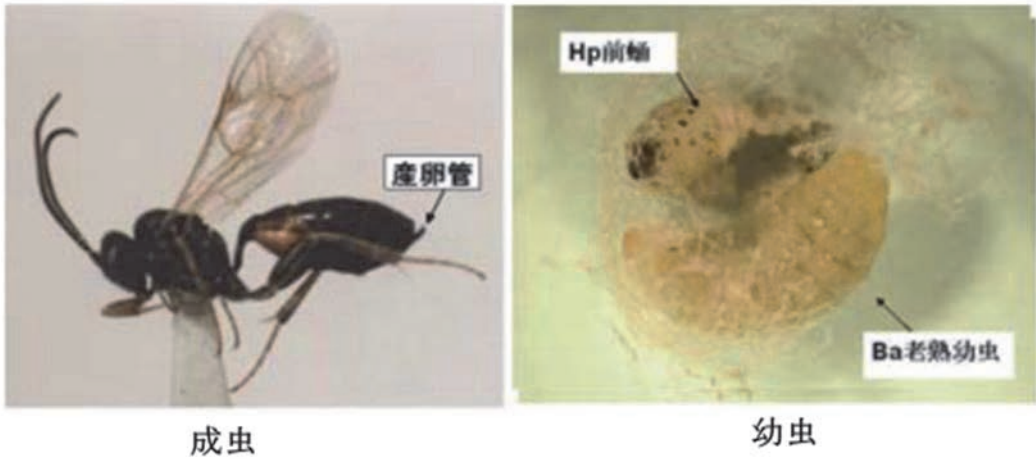


図1. ヨーロッパトビチビアメバチ.

(引用:天敵導入促進事業、門司植物防疫所、2017年)

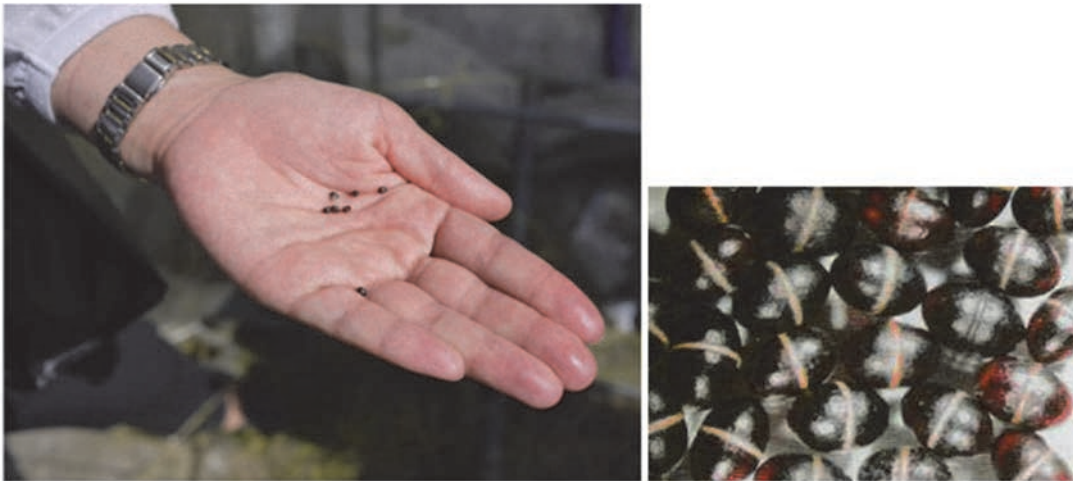


図2. ヨーロッパトビチビアメバチのマユ(繭).



図3. 機能微生物給与によるネオタチワカバの生長。
(生菌粉末を使用)



図4. 機能微生物給与によるネオタチワカバの生長.
(液体生菌を使用)



図5. 機能微生物給与によるネオタチワカバの生長
(右側2列に液体生菌を使用)



図6. 機能微生物給与によるネオタチワカバの生長.
(右側2列に液体生菌を使用)



図7. 中規模網室への益虫マユの設置.



図8. 中規模網室への益虫マユの設置.



図9. 中規模網室へのネオタチワカバの設置.

(植物は発育途中2017年1月)



図10. 摂食されたネオタチワカバ
(2017年3月)



図11. 中規模網室における益虫トビチビアメバチマユの生産.
(網室の全景)

表1. 中規模網室における益虫の生産

	マユ数
微生物給与	102



図12. アメバチ生産用の網室(2016年3月).

表2. 小網室における益虫の生産

	マユ数
微生物 有り	42
微生物 無し	28



図13. タコゾウムシ幼虫の採集。(宮崎県庁須崎哲也さんグループが幼虫体内のアメバチ菌を計数している.)



図14. タコゾウムシ幼虫の採集.(宮崎県庁須崎哲也さんグループが幼虫体内のアメバチ菌を計数している.)

Ⅲ. 低温性メタリジウム菌による 害虫の殺滅試験

【共同研究：鹿児島大学】

低温性メタリジウム菌による害虫の殺滅試験

鹿児島大学水産学部 教授 山本 淳

アルファルファタコゾウムシ（以下、本虫）はレンゲを食害する害虫であり、レンゲ採蜜に深刻な被害を与えている。蜂蜜はレンゲを介して生産するため、農薬の使用はその残留性やミツバチを殺虫する恐れがあるため本虫の駆除には、レンゲへの残留性がなく、ミツバチや環境に及ぼす影響の少ない防除法が望まれてきた。

櫻井ら（1998）は、中部・東海地方の土壌から分離した放線菌の一種 *Metarhizium anisopliae* を用いて本虫に対する微生物的防除効果を検討し、高い殺虫作用を示す菌株を得ている。笹栗ら（2008）は宿主範囲の異なる *M. anisopliae* をカイコに接種して、それらの病原性や性状を検討したところ、カイコ体液中の *M. anisopliae* の出芽胞子には宿主の免疫を回避するタンパク質が発現している可能性を示している。

これまで、本虫の駆除に用いられてきた *M. anisopliae* は比較的高温性で、13℃ではほとんど殺虫活性を示さなかったことから（櫻井ら、1998）、本虫が活性化する春先の低温期では有効な害虫防除効果が期待できなかった。このため、本プロジェクトでは低温環境である河川や汽水域および海水から低温域で増殖する株を探索し、その利用の可能性を検討した。

M. anisopliae 菌株の探索

採材

2015年6月から2017年1月までの間に、96ヶ所から539サンプルを採取した。2015年は鹿児島、長崎、京都、広島、山梨県内の主に湖沼・河川を対象として、底泥と水辺の土砂、さらに水辺に隣接する木立の表層の土砂を約10gずつ採取した。2016年には、錦江湾内外（水深100m以深）の底泥を20サンプルと、鹿児島市内の河口域に1定点を設けて底泥120サンプルを採取した。なお、山梨県を採取対象地のひとつとして選んだのは、同県の富士五湖地方の標高が700~1000mと高く、冬季の気温が低いためである（表1）。

サンプルの処理

採取したサンプルは図 1 に示した手順で処理し、培養した。出現した糸状菌のコロニーの一部をかきとり、検鏡して分生子の形態を確認後、*M. anisopliae* と疑われる 30 株を候補として分子生物学的同定に供するまで -80°C で保存した。なお、*M. anisopliae* の陽性対照として農業生物資源ジーンバンクから購入した *M. anisopliae* 635019 株（以下 MA19 株）を用いた。

候補株の分子生物学的手法による同定

凍結保存した候補株をサブロー寒天培地に接種し、 25°C で数日間培養し、出現したコロニーから DNA を抽出し、専用のキットのプロトコールにしたがって、D2 LSU rDNA を増幅、精製した後、サイクルシーケンシングを行い、DNA シーケンサーによって塩基配列を解析した（図 2）。得られた塩基配列情報を元に相同性解析し、種まで同定した。その結果、2015 年 9 月に山梨県本栖湖畔の木立で採取した土壌サンプルから得られた 1 株が *M. anisopliae* に同定された。

M. anisopliae 分離株（以下 MT1）の増殖温度と塩分耐性

MT1 を用いて、増殖温度と塩分耐性を調査した。すなわち、供試株を滅菌水に懸濁し、サブロー寒天培地に接種した後、 $8\sim 26^{\circ}\text{C}$ の 5 段階の温度で 4 日間培養し、増殖の程度を観察した。また、塩分耐性については、同様に調整した懸濁液を NaCl が $0\sim 4.5\%$ の 10 段階含まれるサブロー寒天培地に接種した後、 20°C で 4 日間培養し、増殖の程度を観察した。その結果、MT1 は 16°C でもわずかに増殖したが、最適範囲は 20°C 以上であると判断された（図 3）。また、MT1 は NaCl 濃度が $0\sim 2\%$ で良好に増殖し、 4.5% でもわずかに増殖したことから、広い塩分耐性を有すると判断された（図 4）。

なお、MT1 の中で 20°C 以下でも良好に増殖する変異株を得るために、 13°C で 15 代継代培養した株（以下 MT13）を得たが、増殖温度の変化は認められなかった。

本プロジェクトでは、*M. anisopliae* の低温適応株を得るために、河川源流部や山上湖の水辺の底泥や隣接する木立の表層の土砂に加えて、最下流の汽水域を中心に採材したが、目的とする株を分離することはできなかった。これらの採材場所は比較的日当たりのよい場所であったため、糸状菌や細菌類の現存量が少なかったと考えられた。

また、鹿児島湾内外の 20 箇所から底泥を採材した。採材期間中（3～6 月）の底層部の水温は 10～19℃と安定していたこと、前述の塩分耐性の結果からも低温適応菌の存在が期待されたが、サブロー寒天培地上には糸状菌と思われるコロニーは発育しなかった。

本虫に対する殺滅試験

殺滅試験は 2016 年 9 月、2017 年 8 月と 2017 年 12 月に、合計 3 回行った。

①2016 年 9 月の殺滅試験

櫻井ら（1998）の方法にしたがって、MT1 と MA19 を 25℃で培養し、分生子懸濁液を調整したが、分生子の濃度はいずれも 10^2 個/ml と既報に比べて 10^5 程度低い値であった。奈良県産本虫を 15 虫体ずつ二分し、MT1 処理区と MA19 処理区は本虫をそれぞれの分生子懸濁液に 1 分間浸漬した。処理後の本虫をプラスチック製の蓋付き容器に収容し、20℃のインキュベータ内に収容し 51 日間観察した（図 5）。この間、週に 2～3 回の頻度で死亡した個体の計数と攻撃菌の再分離を行い、同時に水とアルファルファのスプラウトを与えた。観察期間中に攻撃株による死亡が認められず、また、死亡した本虫から再分離もできなかったことから、懸濁液の分生子濃度が低いことが主な原因と考えられた。

櫻井ら（1998）は分生子の懸濁液を調整する際に 100ppm クロラムフェニコール・0.1%酵母エキス加サブロー寒天培地で菌株を培養し、十分な濃度の分生子懸濁液を得たが、本プロジェクトではこれが再現できなかった。そこで、以降の 2 回の殺滅試験では、寒天培地への接種時に対数増殖期の菌をなるべく多く得るために、100ppm クロラムフェニコール・0.1%酵母エキス加サブロー液体培地で数日間振とう培養する方法を採用したところ、その結果、 10^8 個/ml 程度の分生子懸濁液が安定して得られた（図 6）。

②2017 年 8 月の殺滅試験

前述の培養法によって、MT1, MT13, MA19 を 23℃で培養し、それぞれ 7×10^9 個/ml, 3×10^8 個/ml, 1×10^8 個/ml の分生子懸濁液を得た。1 菌株あたり 20 個体の本虫を浸漬処理後、①と同様にインキュベータ内に収容し、20℃で 35 日間観察した。この間、週に 2～3 回の頻度で死亡した個体の計数と写真撮影し、さらに攻撃菌の再分離を行うと同時に水とアルファルファのスプラウトを与えた。

結果を生残率で示した（図 7）。20℃試験区の場合、対照区といずれの試験区

においても観察終了時の生残率は70%以上であった。これらのうち、MT1区において9日後に死亡した1個体(図8a)から3株、21日後に死亡した2個体(図8b)から3株を分離した。いずれも、分離培養後の形態観察とD2 LSU rDNAの塩基配列解析によってこれらは攻撃菌と判断された。

③2017年11月の殺滅試験

②と同様にMT1, MT13, MA19を25°Cで培養し、それぞれ 1×10^8 個/ml, 7×10^8 個/ml, 8×10^8 個/mlの分生子懸濁液を得た。1菌株あたり30~25個体の本虫を浸漬処理後、①と同様にインキュベータ内に收容し、23°Cで36日間観察した。この間、週に2~3回の頻度で死亡した個体の計数と写真撮影し、さらに攻撃菌の再分離を行うと同時に水とアルファルファのスプラウトを与えた。

結果を生残率で示した(図9)。23°Cの試験区の場合、対照区といずれの試験区において、観察終了時の生残率は20°C試験区に比べて低い値を示した。すなわち、対照区では10日後から死亡個体が出現し、36日後には生残率が29%となった。MT13区とMA19区も対照区と同様に生残率が低下し、36日後の生残率はそれぞれ23%、24%であった。

これらの結果に対して、MT1区では22日後まで死亡個体が観察されなかったが、徐々に生残率が低下し、36日後には27%と他の試験区と同様の値を示した。これらのうち、MA19区では9日後の死亡した1個体(図8c)から2株を、17日後のMT1区では死亡した2個体(図7d)から2株を分離した。分離培養後の形態観察から攻撃菌と判断されたが、D2 LSU rDNAの塩基配列解析の結果、これらはいずれも攻撃菌とは異なる菌であった。なお、観察の終了時に各区の生残した本虫の半数をサブロー寒天培地に接種し、攻撃株の再分離を試みたが、いずれも再分離できなかった。

以上のように、2度の殺滅試験の結果、攻撃菌による本虫の死亡が確認されたのは8月の3個体だけであり、土中から採取した*M. anisopliae*の本虫に対する殺滅効果を確認することはできなかった。攻撃菌として用いた*M. anisopliae*株の増殖温度範囲は20~25°Cであり、16°Cでも僅かに増殖したことから、今回の温度設定は適当であったと考えられる。23°C試験区の場合、対照区が生残率が低かったことから、本虫のコンディションが悪かったことが推察されるが、それにもかかわらず、試験区が生残率は対照区とほぼ同程度であった。櫻井ら(1998)は本虫の2~3齢幼虫に対して*M. anisopliae*の殺虫活性を調査し、20°Cでも十分な効果を確認していることから、本プロジェクトで

使用した攻撃菌の殺虫活性に問題があったとも考えられるが、今後、幼虫を用いての殺滅試験を行う必要もあろう。

なお、殺滅試験の開始時までの飼育中に死亡した数個体をサブロー寒天培地に直接接種・培養したところ、数多くの糸状菌や細菌類がコロニーを形成した。これらの中から糸状菌 12 株と細菌 8 株を選抜し、Maeda (1999) の方法を参考にして *M. anisopliae* に対する増殖阻害効果を調査したところ、いずれの菌株も *M. anisopliae* の増殖阻害を確認できなかった (図 10)。

以上の結果を考え合わせると、本プロジェクトで土中から分離した *M. anisopliae* は本虫の殺虫活性が低かったと考えられる。予め虫体を数回通過させることにより、その殺虫活性を上げることも必要であろう。

謝辞

本プロジェクトを実施するに当たり、アルファルファタコゾウムシの入手や土壤の採取候補地の選定などに関して、日本養蜂協会副会長川原秀男氏をはじめ同協会事務局の多大なご尽力とご協力を頂いた。また、報告書の作成に当たっては、筑波大学名誉教授關文威先生と静岡大学農学部特任准教授浅井辰夫先生に有益なアドバイスを頂いた。記して感謝する。

文献

- Maeda, M. (1999): Repression of the growth of pathogenic microorganisms. In “Microbial Processes in Aquaculture” BIOCREATE Press, U.K. and Japan, pp. 68-69.
- 櫻井宏紀・高橋絵里・浅野貴博・井上敦夫 (1998) : 土壤より分離された糸状菌のアルファルファタコゾウムシに対する生物的防除効果. 岐阜大農研報, 63, 25-30.
- 笹栗頌子・飯山和弘・青木智佐・清水 進 (2009) : *Metarhizium* 属糸状菌のカイコに対する病原性に関する研究. Entomotech, 33, 14-47.

表 1 採材場所

年・月	箇所数	サンプル数	採取場所
2015年6月	2	13	鹿児島
7月	10	52	鹿児島、京都
8月	4	22	鹿児島
9月	18	109	鹿児島、広島、山梨
10月	6	39	鹿児島、長崎、山梨
11月	1	4	鹿児島
12月	2	14	鹿児島
2016年1月	2	31	鹿児島、山梨
2月	3	9	鹿児島、大分
3月	9	9	鹿児島
4月	24	64	鹿児島、山梨
5月	4	7	鹿児島、三重
6月	3	23	山梨
8月	2	12	鹿児島
9月	1	50	鹿児島
11月	1	40	鹿児島
12月	3	31	鹿児島
2017年1月	1	10	鹿児島
合計	96	539	

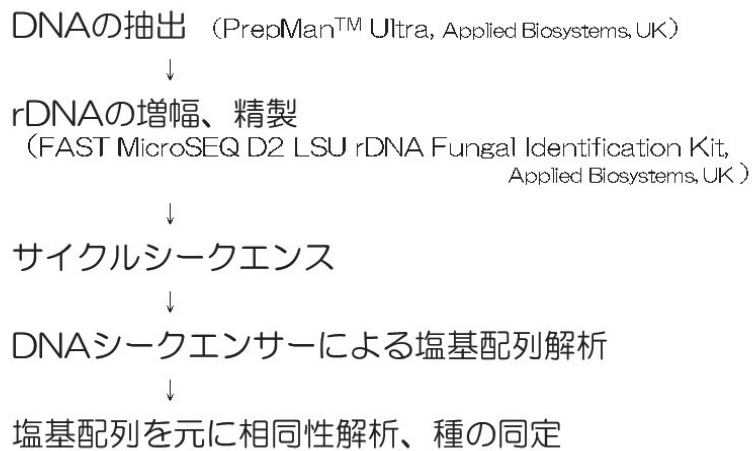


図1 候補株の同定方法

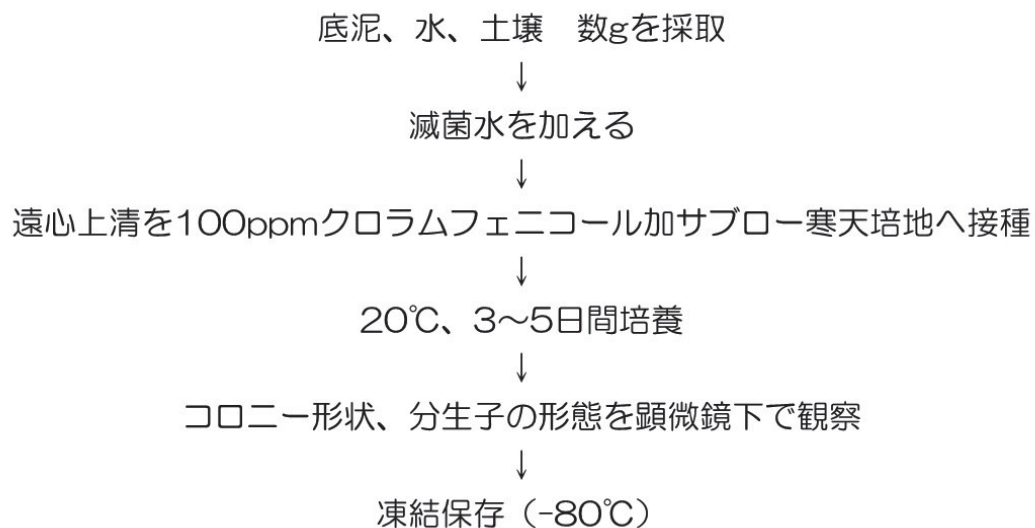


図2 サンプルからの菌分離・観察・保存手順



図3 増殖温度帯（48時間培養後の増殖）

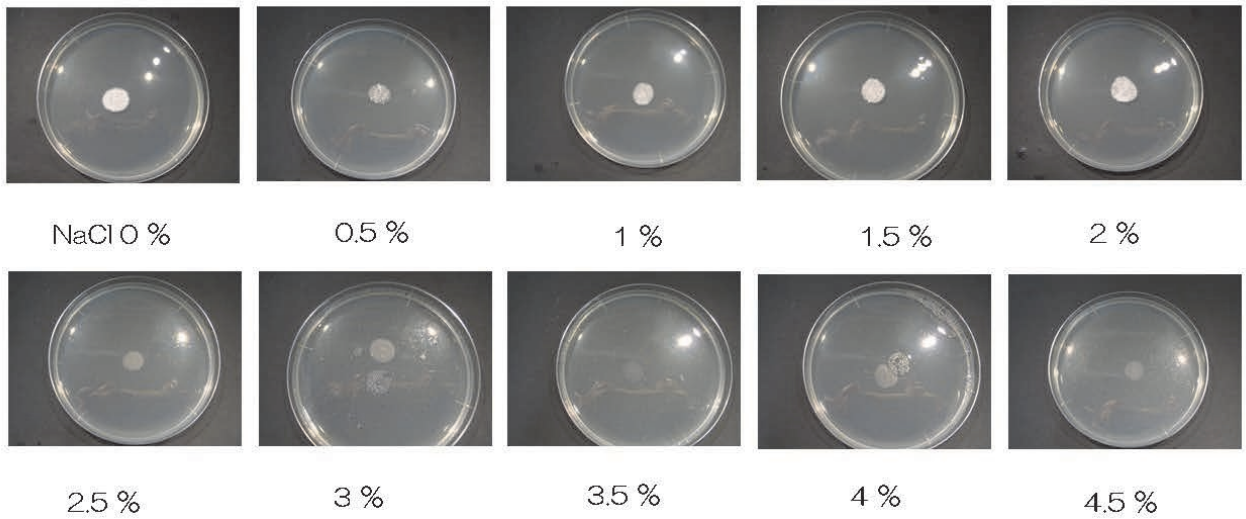


図4 MT1株の塩分耐性

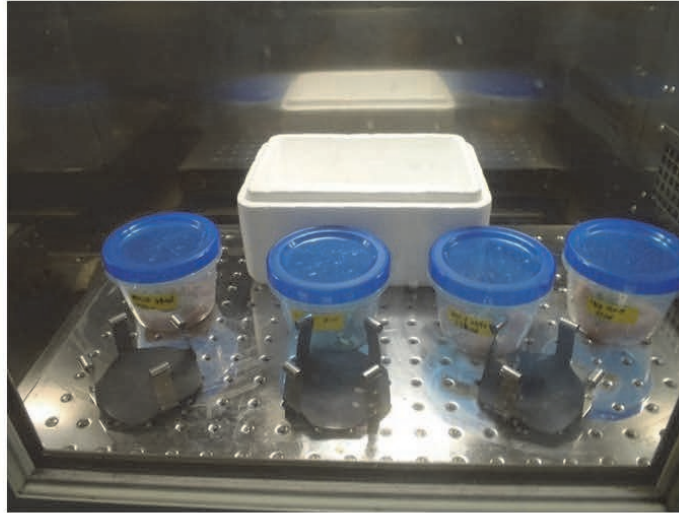


図5 浸漬処理後の本虫の収容方法

櫻井ら（1998）の方法

菌を100ppm CP*と0.1%YE**加サブロー
寒天培地に接種
↓
25℃で3～4週間培養
↓
0.02%Tween20水溶液に浮遊
(分生子数 $10^7 \sim 10^9$ 個/ml)

本プロジェクトでの改良法

菌を100ppm CPと0.1%YE加サブロー
液体培地に接種
↓
23～25℃で5～7日間振とう培養
↓
菌を100ppm CP*と0.1%YE**加サブロー
寒天培地に接種
↓
0.02%Tween20水溶液に浮遊
(分生子数 $10^7 \sim 10^9$ 個/ml)

図6 分生子浮遊液の調整法の改良

*; クロラムフェニコール
**; 酵母エキス

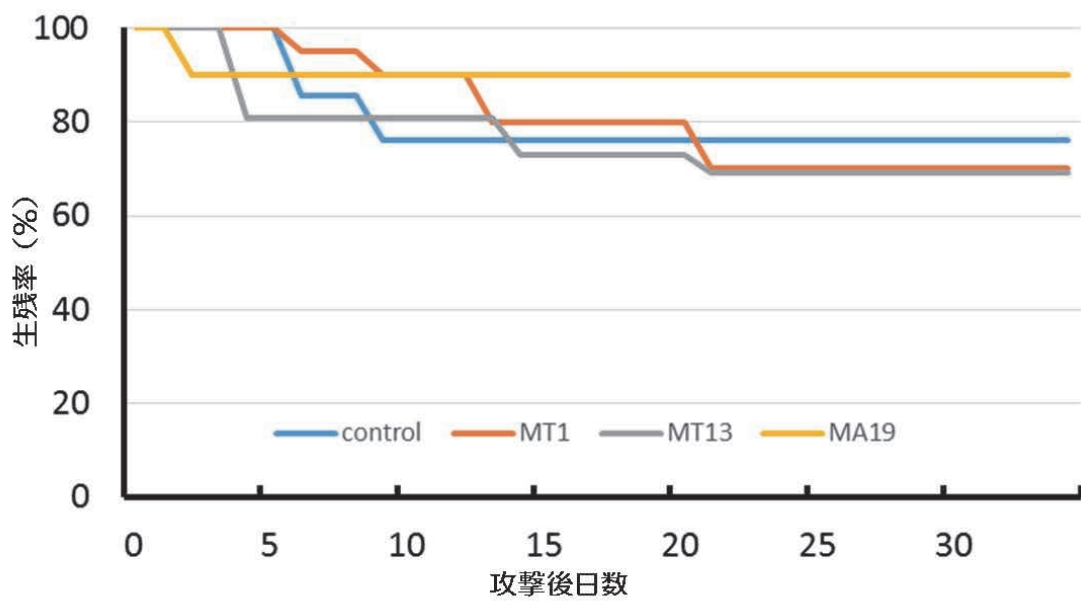


図7 20°C試験区での生存率

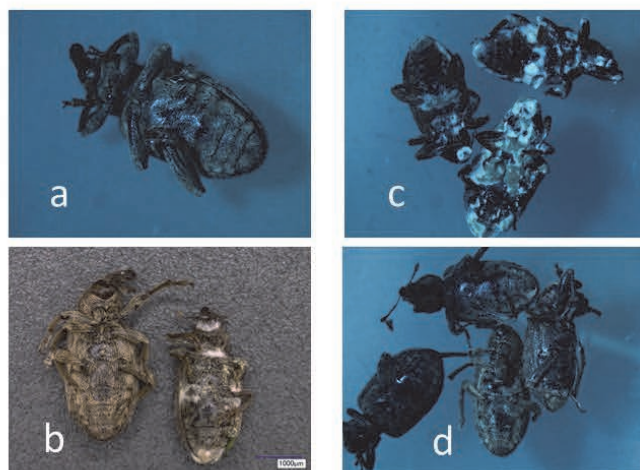


図8 攻撃後の死亡個体

a, 20°C MTI, 9日後: b, 同21日後:c, 23°C MTI, 21日後: d, MA19, 9日後

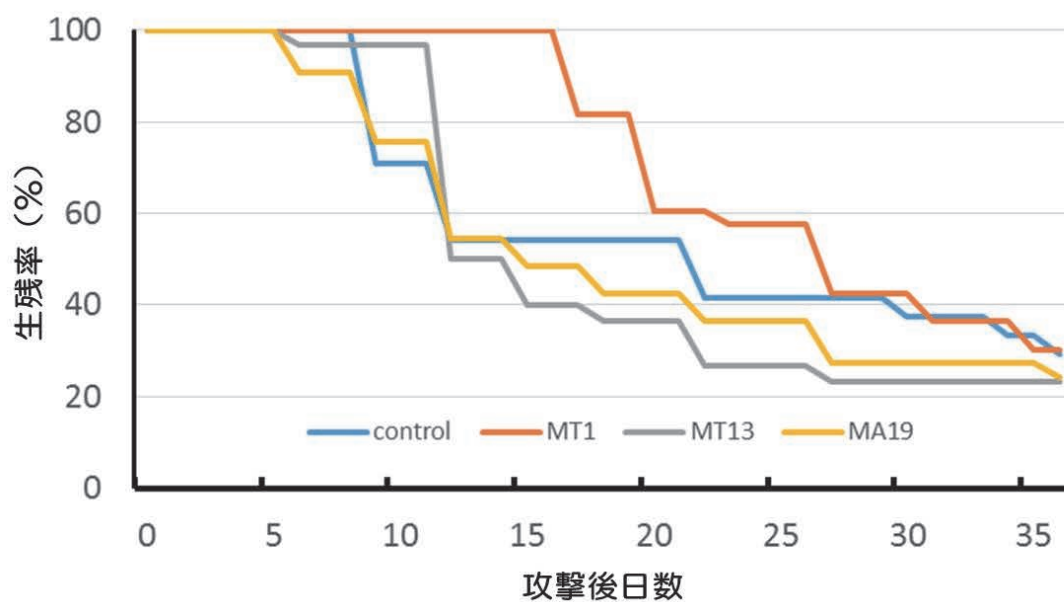


図9 23°C試験区での生残率



図10 本虫の体表から分離した真菌類・細菌類のMT1株に対する増殖阻害活性
いずれも増殖阻害を示さなかった。

機能微生物による蜜源植物増殖総合研究事業報告書

2018年3月発行

発行者 一般社団法人 日本養蜂協会
〒104-0033 東京都中央区新川二丁目 6-16
TEL 03-3297-5645
—著作権所有、禁転載複製—

印刷所 株式会社サンワ
〒102-0072 東京都千代田区飯田橋 2-11-8
(非売品)

