

アブラムシに対する *Bacillus thuringiensis* 結晶性毒素の生物検定法

野田孝博・田中正美 (熊本県農業研究センター)

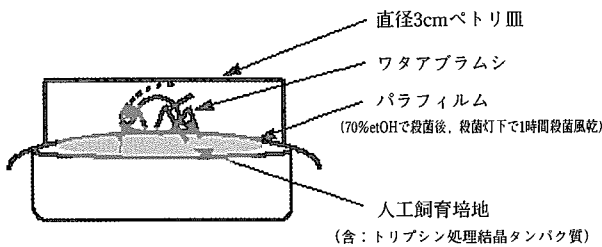
Takahiro Noda and Msami Tanaka :

Bioassay of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins toward the Aphid Using an Artificial Diet

Bacillus thuringiensis の生産する昆虫殺虫性結晶蛋白質 (以下 ICP) は鱗翅目³⁾、双翅目²⁾、鞘翅目⁴⁾、膜翅目⁶⁾ の昆虫に殺虫活性を示すことが知られている。また、近年 US PATENT (5, 468, 636 1993) や Frederick ら¹⁾ によって半翅目昆虫のアブラムシに対し殺虫活性を示すことが報告されている。今回著者らが分離した BT 菌で生物検定を行うに当たり、Frederick ら¹⁾ の方法を一部改変することにより、性状の分からない ICP で検定が可能となったのでその方法について報告する。

1. 材料および方法

基本的に Frederick¹⁾ の方法を踏襲した。つまり、ICP を可溶化トリプシンにより部分分解を行い活性化毒素とした後、モモアカアブラムシ用人工飼料⁵⁾ 中に 100ng/ml の活性化毒素濃度となるよう混入した。この際、Frederick¹⁾ は既知の ICP を利用したため活性化時に使用したトリプシンや DTT 等の試薬を等電点沈殿法により排除した。しかし、著者らが分離した菌株は未同定で未知のものが大半であり等電点の情報を得ておらず、等電点沈殿法が利用できないため未知の ICP においても生物検定ができるよう試薬等の排除のステップを省略した検定法を検討した。この際、活性化時に使用した試薬が人工飼料に混入した状態となるので、それらを混入するときの最高濃度 (トリプシン: 150 μ g/ml, DTT: 500 μ M/ml) で人工飼育培地に混入し、アブラムシの生育に与える影響を調査した。供試虫はキュウリを餌に室内で累代飼育しているワタアブラムシ胎生成虫を使用し、試薬の混入区と未混入区において各区15頭10反復で行った。人工飼料育の概要は第1図のとおりである。また、活性化された ICP が人工培地中で安定に存在できるかについて、トリプシン処理直後から48時間後まで活性化毒素フラグメントを SDS-PAGE により調査した。



第1図 人工飼料混入法による生物検定法

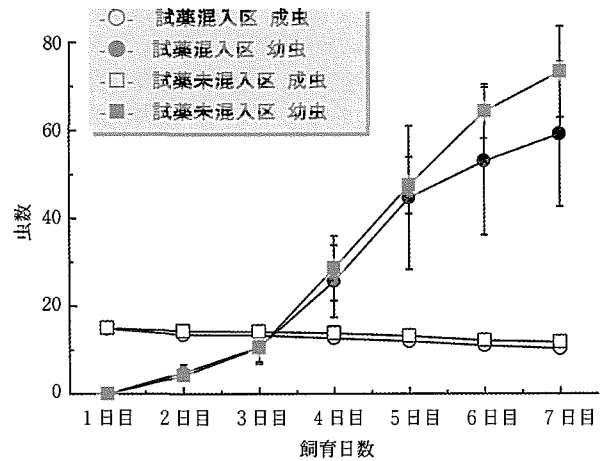
2. 結果および考察

1) ICP の活性化時に使用した試薬が人工飼育培地に混入した場合、ワタアブラムシの生育は試薬未混入区に比べ抑制される傾向がみられるが、両区とも幼虫の増殖が確認され、人工飼料を交換せず少なくとも一週間飼育可能であった (第2図)。

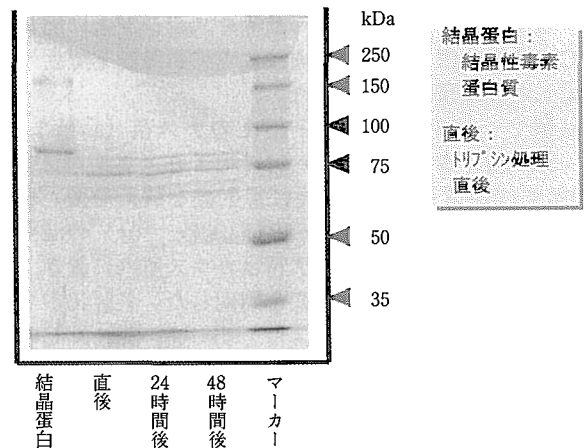
2) トリプシン処理による ICP の活性化フラグメントは少なくとも48時間は分解が進まなく安定であった (第3図)。

このことにより、ICP の活性化に使用した試薬を排除することなく、少なくとも48時間は活性化毒素を吸汁し

ていると判断されるため、これらの方法でアブラムシの生育に及ぼす活性化毒素の影響を検定することが可能と考えられた。



第2図 B T 結晶性毒素タンパク質の活性化時に使用した試薬の影響



第3図 SDS-PAGE による活性化された結晶性毒素タンパク質の確認

引用文献

- 1) Frederick S.Walters & Leigk H.English, Entomologia Experimentalis et Applicata. 77, 211-216, 1995.
- 2) Goldbreg, L. J. Margalit1, Mosquito News. 37, 355-358, 1997.
- 3) ISHIWATA, 大日本蚕糸会報第124号論説. 1901.
- 4) Krieg, A., A. M. Huger, GA. Langenbruch & W. Schnetter, Journal of Applied Entomology. 96, 500-508, 1983.
- 5) Mittler, T. E. and P. Koshi, Entomologia Experimentalis et Applicata. 17, 1-4, 1974.
- 6) Payne, J. M &, M. K. Kennedy, J. B. Randall & H. Meiter, US. patent, Number 5 260 058, 1993.