

農業害虫における殺虫剤抵抗性遺伝子診断技術の開発とその利用

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
果樹研究所

と
土

だ
田

さとし
聡

は じ め に

環境に配慮しつつ、安定した農業生産を維持するためには、適切な殺虫剤を効率的に散布して害虫管理を行う必要があることは言うまでもない。しかし、実際には様々な害虫で薬剤抵抗性が発達し、アブラムシ類やハダニ類等で防除薬剤の選択の幅が狭まっている。一方、新規農薬の開発にはコストがかかり、新たな殺虫剤の開発、登録数の減少が予想され、現在使用可能な薬剤の可能な限りの延命を図ることも重要な課題となっている。したがって、適切な殺虫剤の選択に加え、殺虫剤抵抗性発達の管理を行うことを目的として、圃場における殺虫剤抵抗性害虫の発生割合をモニタリングすることは重要な意味を持つ。殺虫剤抵抗性検定には、これまで生物検定法が広く用いられてきたが、近年、新たな手法として遺伝子診断法が注目されている。遺伝子診断法の開発には、抵抗性発達の分子メカニズムの理解が前提となる。殺虫剤抵抗性の要因は様々であるが、主たるメカニズムは生理生化学的要因、とりわけ解毒代謝活性の増大あるいは作用点の薬剤感受性の低下であるとされている。近年、それらに関する分子レベルでの研究が進み、様々な害虫種の殺虫剤抵抗性の発達要因となる遺伝的変異が突き止められている。各種殺虫剤に対する抵抗性の発達メカニズムは、本誌で園田 (2012) により詳述されている。そこで、本稿では、各種殺虫剤の作用点、あるいは解毒代謝酵素の遺伝子コード領域で生じた変異部位をターゲットとし、これまでに開発されている遺伝子診断法を紹介するとともに、遺伝子診断法の利点や問題点について述べる。さらに、事例研究として、ワタアブラムシの各種殺虫剤抵抗性遺伝子診断法の開発と、その野外個体群におけるモニタリングへの利用に関する研究を紹介する。

I 遺伝子診断に用いられる手法の開発とその使用例

1 遺伝子診断法開発のための遺伝的多型の探索

遺伝子診断法の開発には、殺虫剤抵抗性発達に関与す

るタンパク質の遺伝子配列における、感受性系統と抵抗性系統間の違いを知る必要がある。しかし、新たな害虫種を材料として解析を始めるとき、その塩基配列は不明であり、その種に特異的な PCR プライマーは設計できない。そこで、他の生物種における先行研究で明らかになっている保存性の高いアミノ酸配列の領域に縮重プライマー (degenerate primer) を設計して遺伝子を増幅する。縮重プライマーは遺伝暗号表に沿って独自に設計することも可能であるが、例えば、有機リン系あるいはカーバメート系殺虫剤抵抗性に関与するアセチルコリンエステラーゼ遺伝子 (Kozaki et al., 2001)、合成ピレスロイド抵抗性に関与するナトリウムチャンネル遺伝子 (Martinez-Torres et al., 1997; Forcioli et al., 2002) 等のプライマーは汎用性が高く、新たな害虫種でも利用できる。抵抗性個体に共通の変異が見つかれば、それらをターゲットとした遺伝子診断法の開発が可能となる。

表-1 にこれまでに殺虫剤抵抗性個体の識別方法として開発された遺伝子診断法を害虫ごとに示す。抵抗性遺伝子解析並びに遺伝子診断法の開発は、ハエ、カ等の衛生害虫でも数多くの成果があるが、事例数が膨大となるため、本稿では対象を農業害虫に絞って紹介する。また、個体ごとに DNA オートシーケンサーを用いて塩基配列を決定する方法も遺伝子診断法の一つと言えるが、多数のサンプルの解析手法としては不向きであると判断し、本稿では事例には加えない。

2 害虫種および診断対象となる遺伝子

遺伝子診断法は高度に複合抵抗性を発達させている種を中心に開発されており、アブラムシ類やコナガで開発事例が多い。また、タバココナジラミやトビイロウンカにおいても複数の剤に対する診断法が開発されている。その他、コウチュウ目、アザミウマ目、ハエ目、ハダニ類等で抵抗性遺伝子診断法が多数開発されている。

診断対象となる遺伝子は、有機リン系およびカーバメート系殺虫剤の作用点であるアセチルコリンエステラーゼ、ピレスロイド系および有機塩素系殺虫剤の作用点である電位依存性ナトリウムチャンネルが中心となっている。これらの遺伝子では種を超えて抵抗性の主要因となる共通の突然変異が多数見つかったことが (Kono and Tomita, 2006; Rinkevich et al., 2013)、遺伝子診断の開発

Development and Application of Molecular Diagnostics for Insecticide Resistance Gene in Agricultural Insect Pests. By Satoshi Toda

(キーワード: 殺虫剤抵抗性, 遺伝子診断)

表-1 殺虫剤抵抗性遺伝子診断法が開発された農業害虫種およびその手法

害虫種名	対象農薬	対象遺伝子	診断する変異の形態	診断方法	文献
モモアカアブラムシ <i>Myzus persicae</i>	有機リン系	カルボキシエステラーゼ	一塩基多型	PCR-REN	13)
	カーバメート系 (pirimicarb)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (S431F)	PCR-RFLP	9)
	ピレスロイド系	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (L1014F)	対立遺伝子特異的 PCR	15)
	ピレスロイド系 (deltamethrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (M918T, L1014F)	リアルタイム PCR	3)
ワタアブラムシ <i>Aphis gossypii</i>	有機塩素系 (DDT)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (F979S)	PCR-RFLP	9)
	シクロジエン系	GABA 受容体	一塩基多型 (A302G)	対立遺伝子特異的 PCR	5)
	有機リン系 (fenitrothion, malathion)	カルボキシエステラーゼ	塩基長多型	PCR	43)
	有機リン系 (fenitrothion, malathion)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (A302S)	PCR-RFLP	48)
	カーバメート系 (pirimicarb)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (S431F)	PCR-RFLP マルチプレックス PCR	48)
	ピレスロイド系 (fenpropathrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (M918L)	PCR-RFLP	45), 46)
ネギアザミウマ <i>Thrips tabaci</i>	ピレスロイド系 (lambda-cyhalothrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (L1014F)	PCR-RFLP	31)
	ピレスロイド系 (cypermethrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (M918T, L1014F)	PCR-RFLP	47), 50)
タバココナジラミ <i>Bemisia tabaci</i>	有機リン系 (pirimiphos methyl)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (F331 W)	PCR-RFLP	52)
	ピレスロイド系 (alfa-cypermethrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (T929 V)	対立遺伝子特異的 PCR	52)
	ピレスロイド系 (fenpropathrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (T929 V)	バイロシーケンス	1)
	シクロジエン系	GABA 受容体	一塩基多型 (A302G)	対立遺伝子特異的 PCR	4)
トビイロウンカ <i>Nilaparvata lugens</i>	カーバメート系 (carbofuran, carbosulfan)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (F331H, I332L)	量的シーケンシング	25)
	ネオニコチノイド系 (imidacloprid)	ニコチン性アセチルコリン受容体	一塩基多型 (Y151S)	対立遺伝子特異的 PCR	28)
ミカンコミバエ <i>Bactrocera dorsalis</i>	有機リン系 (fenitrothion)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (I214 V, G488S, Q643R)	PCR-RFLP	17)
コナガ <i>Plutella xylostella</i>	有機リン系 (DDVP), カーバメート系 (carbaryl, carbofuran)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (A298S, G324A)	量的シーケンシング	19)
	有機リン系 (EPN, DDVP), カーバメート系 (thiodicarb)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (A298S, G324A)	対立遺伝子特異的 PCR	18)
	ピレスロイド系 (fenvalerate, cypermethrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (T929I, L1014F)	対立遺伝子特異的 PCR	22)
	ピレスロイド系 (fenvalerate, cypermethrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (T929I)	rt PASA	23)
	ジアミド系 (flubendiamide, chlorantraniliprole)	リアノジン受容体	一塩基多型 (G4946E)	バイロシーケンス	51)
コドリナガ <i>Cydia pomonella</i>	ピレスロイド系 (diflubenzuron, deltamethrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (L1014F)	対立遺伝子特異的 PCR	8)
	有機リン系 (azinphos-methyl)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (F399 V)	PCR-RFLP 対立遺伝子特異的 PCR	10)
トマトキバガ <i>Tuta absoluta</i>	ピレスロイド系 (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (M918T, T929I, L1014F)	リアルタイム PCR	16)
コロラドハムシ <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	有機リン系 (azinphosmethyl)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (S291G)	PCR-RFLP	30)
ケシクスイの一種 <i>Meligethes aeneus</i>	ピレスロイド系 (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (L1014F)	バイロシーケンス	34)
コクゾウムシ <i>Sitophilus zeamais</i>	ピレスロイド系, 有機塩素系 (DDT)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (T929I)	リアルタイム PCR	6)
コクストモドキ <i>Tribolium castaneum</i>	シクロジエン系	GABA 受容体	一塩基多型 (A302G)	対立遺伝子特異的 PCR	2)
ナミハダニ <i>Tetranychus urticae</i>	有機リン系 (monocrotophos)	アセチルコリンエステラーゼ	一塩基多型 (G228S, A391T, F439 W)	量的シーケンシング	24)
ミツユビナミハダニ <i>Tetranychus evansi</i>	ピレスロイド系 (bifenthrin)	ナトリウムチャネル	一塩基多型 (M918T)	PCR-RFLP リアルタイム PCR	35)

に拍車がかかった一因であろう。その他、有機リン系、カーバメート系殺虫剤の解毒代謝活性の増大に關与するカルボキシエステラーゼやシクロジエン系殺虫剤の作用点である GABA 受容体でも開発事例がある。

また、近年世界的に抵抗性の発達が問題となり始めているネオニコチノイド系およびジアミド系殺虫剤においても抵抗性の分子メカニズムに關する研究が進み、それぞれの作用点であるリアノジン受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体における変異を対象とした遺伝子診断法が開発されるようになってい

る。一方、シトクロム P450 酸化酵素は、解毒代謝活性を増大させ、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系殺虫剤等の抵抗性発達に關与する。この遺伝子を対象とした診断法はキイロショウジョウバエ (Schmidt et al., 2010) やイエバエ (Rinkevich et al., 2007) では開発事例があるが、農業害虫ではまだない。

3 診断する変異の形態と遺伝子診断手法

鈴木 (2004) による有機リン系殺虫剤抵抗性ワタアブラムシの遺伝子診断法は、感受性系統とのカルボキシエステラーゼ遺伝子の塩基長差を利用した PCR 法である。しかし、多くの場合、このような塩基長の多型は得られないため、一塩基多型 (SNP) を利用した解析手法が用いられる。

対立遺伝子特異的 PCR (Allele specific PCR: AS-PCR, ASP-PCR などと略され、PASA と呼ばれる) は、抵抗性対立遺伝子に特異的な PCR プライマーを設計し、抵抗性、感受性両対立遺伝子に適合するプライマーとの PCR により増幅産物が得られるかどうかで診断する方法であり、遺伝子診断の基本的な手法と言える。

マルチプレックス PCR (Multiplex PCR) も対立遺伝子特異的 PCR の一方法と言えるが、プライマーを3種類以上加え、増幅される PCR 産物のサイズの大小で抵抗性遺伝子を識別する方法である。この方法は複数の領域を同時に増幅可能であることから、サンプル DNA 抽出が成功しているかどうかの検証も可能となる利点がある。

これらの方法に対し、制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) 解析を PCR と組合せた PCR-RFLP 法は、特定の塩基配列を認識して DNA を切断する制限酵素を利用した方法である。多型部位が何らかの制限酵素の認識配列に一致することが条件となり、さらに処理工程が多いという制約はあるが、主要な抵抗性突然変異部位 (例えば、アセチルコリンエステラーゼの S431F やナトリウムチャネルの L1014F) が適合したことから、これまで最も適用事例の多い手法となっている。また、PCR-REN (restriction-enzyme)

は逆に、鋳型 DNA を制限酵素で処理した後に PCR を行い、多型を検出する方法である。

一方、PCR 反応において蛍光物質により標識したプローブと呼ばれる DNA 断片を利用し、リアルタイムで目的遺伝子の増幅をモニタリングするリアルタイム PCR 法も広く用いられている方法である。専用の機器類を必要とする方法であるが、電気泳動が省略されることによる検出時間の短さ、診断の確実性を利点とする。

パイロシーケンス法 (pyrosequencing) は、反応系に対し、4 種のヌクレオチドの順次投入とその除去を繰り返し、DNA ポリメラーゼによりヌクレオチドが DNA に取り込まれる際、酵素反応により生じる発光を CCD カメラで記録する方法である。やはり専用の機械を必要とするが、処理効率に優れる方法である。

PCR 反応を利用しない遺伝子診断法として、serial invasive signal amplification reaction (SISAR) 法がある。この方法は DNA の三重鎖構造を特異的に認識して切断するクリベース (エンドヌクレアーゼの 1 種) を利用した、いわゆるインバーダー法を用いたものである。Lee et al. (2010) により、アタマジラミのピレスロイド系殺虫剤抵抗性遺伝子診断で用いられているが、現在までに農業害虫での適用事例はない。

一方、以下の手法では集団 (個体群) 単位で抽出した DNA を使用することで、一度の解析で集団内における抵抗性遺伝子の頻度を明らかにすることができる。

まず、量的シーケンシング (Quantitative Sequencing: QS) 法は、一塩基多型部位におけるシーケンスシグナルのピーク比をもとに対立遺伝子の割合を推定する方法である。また、real-time PASA (rt PASA) 法はリアルタイム PCR と対立遺伝子特異的 PCR を組合せ、集団単位の対立遺伝子頻度を推定する方法である。特に、抵抗性対立遺伝子頻度が低いときに効力を発揮する方法とされ (Lee et al., 2010)、細かな値を推定できない QS 法を補完する手法とも言える。

殺虫剤抵抗性に關与する突然変異部位を含む遺伝子の塩基配列情報は、文献あるいは DNA データベースから容易に入手できる。したがって、表-1 に記した遺伝子診断法は用途や状況に応じて別の方法に作成し直すことは可能である。また、診断法は開発されていないものの、抵抗性に關与する変異を明らかにした報告も数多くあり、それらについても遺伝子診断法の開発は可能である。ffrench-CONSTANT et al. (2000), KONO and TOMITA (2006), Rinkevich et al. (2013) 等に総説されているので、参考にされたい。

II 遺伝子診断の利点と問題点

殺虫剤抵抗性の遺伝子診断には、生物検定と比較して以下のような利点がある。

まずは抵抗性個体（遺伝子）の検出の正確さである。遺伝子診断では薬剤の殺虫効果以外の死亡要因、例えば薬液による溺死や、採集あるいは検定処理中に負ったダメージ、虫の栄養状態等に起因する要因を排除できる。したがって、対照区を設定して死虫率を補正する必要はない。また、生物検定法では一定数の健全な個体を必要とするため、場合により野外採集虫の短期間の飼育、増殖が必要となる。これにより野外個体群の遺伝的構成が変化し、感受性の値にずれが生じる可能性があるが、遺伝子診断では問題とならない。

次に、供試虫のサンプリングおよび取り扱いの容易さである。遺伝子診断は死亡虫でも評価が可能であるため、採集虫を液浸標本などで輸送・保存することも可能となる。また、例えば発生消長調査用の粘着板への捕捉虫などでも診断することができる。

また、個体ごとに複数の殺虫剤抵抗性を評価することが可能な点が挙げられる。これは微量の DNA で診断できるが故の利点であり、複合抵抗性の発達を個体レベルでモニタリングすることも可能となる。

さらには、劣性抵抗性遺伝子の診断が可能になるという利点もある。*kdr* 遺伝子および *super-kdr* 遺伝子によりもたらされるノックダウン抵抗性形質は、一般に完全劣性遺伝あるいは不完全劣性遺伝するとされている (SHONO, 1985)。したがって、抵抗性遺伝子をヘテロ接合体で保有する個体の表現型は感受性となり、表面的には抵抗性がマスクされてしまう。もし、劣性抵抗性遺伝子がかく低頻度で存在していた場合、生物検定法では検出が難しいと考えられるが、遺伝子診断では高感度で検出できる。これにより、将来的な抵抗性発達の予測をより早い段階で行うことも可能になるであろう。

一方、遺伝子診断が抱える限界や問題点として以下のような点が挙げられる。

まずは一つの診断法で診断可能な殺虫剤抵抗性の対象が特定の化合物系統に限定されることである。解毒代謝活性増大に起因する殺虫剤抵抗性の場合とは異なり、作用点抵抗性では抵抗性の分子メカニズムが化合物系統ごとに異なる。したがって、診断法が開発されるためにはそれぞれの抵抗性メカニズムが解明され、遺伝的変異の存在が明らかになることが前提となる。また、抵抗性の発達が解毒代謝活性の増大などの要因と複合的に生じている場合、単一の遺伝子診断では野外個体群の感受性レ

ベルを正確に診断できない可能性もある (Kwon et al., 2012)。

さらに、時間的、金銭的コストの問題がある。遺伝子診断には DNA の抽出、試薬の調整、機器による解析と多くの工程があり、とりわけ微小害虫の場合、DNA の抽出工程に多大な手間がかかる。また、以前に比べ PCR に用いるサーマルサイクラーなどの設備、機器の普及は進んでいるものの、高額機器、試薬の使用により、生物検定に比べて高コストとなる。

前出の量的シーケンシング (QS) 法、あるいは rt PASA 法といった、集団単位で解析を行う方法は、これらのコストを軽減する方法として開発された。ただし、これらの方法はあくまで対立遺伝子頻度の解析法であることから、ホモ接合体とヘテロ接合体の区別ができない (Lee et al., 2010)。したがって、表現型としての抵抗性個体頻度との間にはずれが生じる可能性があり、現段階では解析結果の防除薬剤選定といった解析結果の直接的利用には問題点を残していると言える。

III 殺虫剤抵抗性遺伝子診断法の開発とその利用 (ワタアブラムシの場合)

ワタ、野菜、果樹等の世界的な重要害虫であるワタアブラムシ (*Aphis gossypii*) は、各種殺虫剤に対して抵抗性を発達させている。本種は抵抗性発達の分子メカニズムの解明が進んでおり、有機リン系殺虫剤抵抗性にはカルボキシルエステラーゼによる捕捉・結合活性の増大が関与すること (SUZUKI and HAMA, 1998)、ピリミカーブ (カーバメート) およびピレスロイド系殺虫剤抵抗性は作用点における突然変異が原因となることが明らかになっている (TODA et al., 2004; 土田・駒崎, 2007)。

ピリミカーブの作用点はアセチルコリンエステラーゼであるが、ワタアブラムシには二つの異なるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) が存在する (Li and HAN, 2002)。ピリミカーブ抵抗性ワタアブラムシでは、それらのうちキイロシヨウジョウバエの AChE 遺伝子 *Ace* にパラログスな (遺伝子が種分化でなく重複によって生じた) *Ace-paralogous* AChE (AP-AChE) に、二つのアミノ酸置換、すなわち S431F (431 番目のアミノ酸がセリンからフェニルアラニンに変異) および A302S (302 番目のアミノ酸がアラニンからセリンに変異) が存在する (TODA et al., 2004)。A302S はその抵抗性比の低さから、主要因とは言えないまでも有機リン系殺虫剤抵抗性への関与が予想され、S431F はピリミカーブ抵抗性に重要な役割を果たすと考えられている。

一方、ピレスロイド系殺虫剤抵抗性のワタアブラムシ

において、同剤の作用点であるナトリウムチャネル遺伝子上に、イエバエで明らかになっていた、いわゆる *super-kdr* 突然変異 (M918T) (918 番目のアミノ酸がメチオニンからスレオニンに変異) と同じ位置に、メチオニンからロイシンへの変異 (M918L) が共通して見ついている (土田・駒崎, 2007)。

筆者らは、ワタアブラムシに特異的なプライマーを設計し、これらの一塩基多型部位を標的とした遺伝子診断法を開発することにより、野外個体群における遺伝子型頻度のモニタリングを試みている (TODA et al., 2008)。アセチルコリンエステラーゼの A302S は *Hae* III による PCR-RFLP 法で、S431F は *Ssp* I による PCR-RFLP 法に加え、Multiplex PCR による診断を可能にした (TODA et al., 2008)。一方、ナトリウムチャネルの M918L 変異の検出は 2 通りの塩基置換が見つかるため (土田・駒崎, 2007)、その両方に対応できるように 2 種類の制限酵素 (*Bsr* I または *Ssp* I) による PCR-RFLP 法での診断法を開発した (土田・駒崎, 2003)。図-1 に S431F 変異を検出するための 2 通りの手法の電気泳動像を示す。

調査した鳥取、愛媛のナシ、および愛媛、長崎のミカンで採集されたクローンからは 12 通りの遺伝子型が検出された。遺伝子型頻度分布は個体群により大きく異なり、また時間の経過とともに変動していた (表-2)。EN-3 や EN-4 ではすべての剤に対して抵抗性対立遺伝子をもつ複合抵抗性を発達させた個体が高頻度で検出された。一方、TP-1、TN-2 および 3、EM-2 および 3 ではピレスロイド系殺虫剤抵抗性 (M918L が RS) の比率が 20% 以下と低く、さらに長崎のカンキツ (NC-1 および NC-2) ではすべて感受性対立遺伝子をホモ接合体でもつクローンの頻度が 70% 以上の高頻度で検出された。ワタアブラムシではこれらの主要殺虫剤のほとんどが効力を失っていると考えられていたが、場所や時期によっては感受性遺伝子頻度が高く、これらの剤を有効な防除薬剤として選択肢に加えることも可能であることが示唆された。

主要な化合物系統にことごとく抵抗性を発達させてきたワタアブラムシではあったが、ネオニコチノイド系殺虫剤の登場により、その防除に大きな障害はなくなっていた。しかし、最近国内の一部地域において、同剤に対する抵抗性の発達が確認され、抵抗性系統の今後の分布拡大が強く懸念されている (松浦・土田, 2013; 岡崎, 2013)。したがって、本抵抗性の遺伝子レベルでの解析が進み、抵抗性遺伝子診断法が開発できれば、ネオニコチノイド剤の抵抗性管理への利用が期待される。

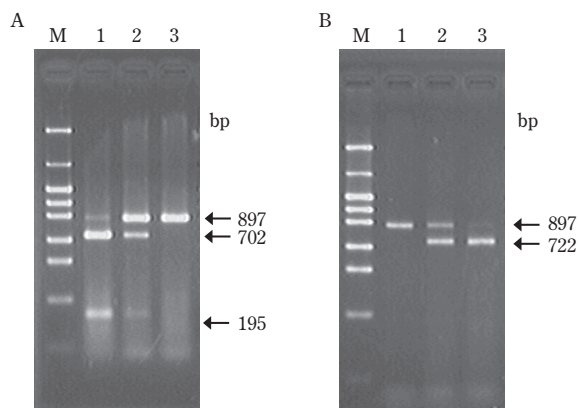


図-1 PCR-RFLP 法 (A) および MultiplexPCR 法 (B) によるワタアブラムシのピリミカーブ抵抗性遺伝子 (S431F) 診断法 (TODA et al., 2008 を改変) いずれも、レーン 1: 感受性 (SS), 2: 抵抗性 (RS), 3: 抵抗性 (RR)。

お わ り に

殺虫剤抵抗性発達の分子生物学的メカニズムの解明に関する研究は近年急速な進展を見せているが、これまで抵抗性の発達が手に負えないレベルになってから取り組まれることが多かった。したがって、抵抗性突然変異が解明されたときには、既に主たる防除薬剤でなくなった後であったり、薬剤登録自体が失効した後の場合もあった (TODA et al., 2008)。現場での活用という点において、遺伝子診断法が十分な評価を受けられていないのが現状である。

その一方で、SHIMOMURA et al. (2006) は、ネオニコチノイド剤の作用点であるニコチン性アセチルコリン受容体のアミノ酸配列を脊椎動物と昆虫とで比較し、抵抗性変異の起こりうる場所を予測したが、最近、モモアカアブラムシにおいて予測通りの変異が発見された (Bass et al., 2011)。これは、抵抗性発達メカニズムの解明の先回りに成功した画期的な事例と言える。

近年のゲノム解析技術の進展は殺虫剤抵抗性関連遺伝子の解析の高速化にもつながっており、シトクロム P450 酸化酵素の解析などで成果が上がっている。今後はいち早く殺虫剤抵抗性の分子メカニズムを解明して、遺伝子診断法を開発することにより、手遅れになる前に抵抗性の発達をモニタリングし、実際の防除に役立つ成果が増えることが期待される。また、同時に、分析機器のない現場でも容易に検定可能な、より簡略化された遺伝子診断法の開発も今後の重要な課題である。

表-2 ワタアブラムシ野外個体群における三つの殺虫剤タイプに対する抵抗性遺伝子型頻度の地理的、時間的変動^{a)}

個体 群名 ^{b)}	n ^{c)}	変異部位 ^{d)}			各変異部位の遺伝子型とその頻度 ^{e)}																	
		VSSC (M918L)	SS											RS								
		AChE (S431F)	SS			RS			RR			SS			RS			RR				
		AChE (A302S)	SS	RS	RR	SS	RS	RR	SS	RS	RR	SS	RS	RR	SS	RS	RR	SS	RS	RR		
TP-1	18	0	0	0	0	0.11	0	0	0.89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00			
TP-2	20	0	0	0	0	0.10	0	0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.60			
TP-3	30	0	0	0	0	0.03	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.37			
TN-1	30	0	0.03	0.07	0.07	0.28	0	0.03	0.03	0.03	0	0	0	0	0.10	0	0	0	0.35			
TN-2	29	0.07	0	0.17	0.03	0.45	0	0	0.03	0	0	0	0.03	0	0.07	0	0	0	0.14			
TN-3	27	0.11	0	0.04	0.07	0.19	0	0	0.44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.15			
EN-1	29	0	0	0	0	0.66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.35			
EN-2	21	0.13	0	0	0	0.30	0	0	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0	0.39			
EN-3	30	0	0	0	0	0.26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.74			
EN-4	33	0	0	0	0	0.15	0	0	0	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0.82			
EN-5	26	0.12	0	0	0	0.35	0	0	0	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0.50			
EM-1	18	0.33	0	0	0	0.17	0	0	0	0.17	0	0	0	0	0	0	0	0.33	0			
EM-2	23	0.35	0	0	0	0.09	0	0	0	0.39	0	0	0	0	0	0	0	0.17	0			
EM-3	28	0.04	0	0.07	0	0	0	0.07	0	0.71	0	0	0	0	0	0	0	0.04	0.07			
NC-1	29	0.76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.24			
NC-2	23	0.71	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0.23			
NC-3	30	0.36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.64			

^{a)} Toda et al. (2008) を改変し、ナトリウムチャンネル遺伝子解析結果を追記した。

^{b)} TP, TN は鳥取県のナシ, EN は愛媛県のナシ, EM は愛媛県のウンシユウミカン, NC は長崎県のナシの個体群を意味し、それぞれ 7 ～ 10 日おきに採集された個体群に 1 ～ 3 の番号を付した。TP のみ 2002 年、その他は 2003 年の、いずれも 5 ～ 6 月に採集された。

^{c)} 同一クローンで形成されると考えられるコロニーから 1 個体ずつ供試したため、反復数はコロニー数に相当する。

^{d)} VSSC はナトリウムチャンネル, AChE はアセチルコリンエステラーゼを意味し、VSSC (M918L), AChE (S431F), AChE (A302S) での変異はそれぞれ合成ピレスロイド、ピリミカーブ、有機リン剤への抵抗性に関与すると考えられる。

^{e)} 感受性 (S), 抵抗性 (R) の遺伝子型を示すアミノ酸は、VSSC (M918L) では、それぞれメチオニンとフェニルアラニン, AChE (S431F) ではセリンとフェニルアラニン, AChE (A302S) ではアラニンとセリンである。VSSC (M918L) では抵抗性ホモ RR の個体が検出されなかったため表からは削除した。

引用文献

- ALON, E. et al. (2006) : Insect Biochem. Mol. Biol. **36** : 71 ～ 79.
- ANDREEV, D. et al. (1994) : Pest Manag. Sci. **41** : 345 ～ 349.
- ANSTEAD, J. A. et al. (2004) : Insect Biochem. Mol. Biol. **34** : 871 ～ 877.
- ANTHONY, N. et al. (1995) : Pestic. Biochem. Physiol. **51** : 220 ～ 228.
- et al. (1998) : Mol. Gene. Genet. **260** : 165 ～ 175.
- ARAÚJO, R. A. et al. (2011) : Insect Mol. Biol. **20** : 437 ～ 445.
- BASS, C. et al. (2011) : BMC Neurosci. **12** : 51.
- BRUN-BARALE, A. et al. (2005) : Pest Manag. Sci. **61** : 549 ～ 554.
- GUILLEMAUD, T. et al. (2005) : ibid. **61** : 91 ～ 96.
- et al. (2006) : Insect Biochem. Mol. Biol. **36** : 642 ～ 653.
- ffrench-CONSTANT, R. H. et al. (2000) : Annu. Rev. Entomol. **45** : 449 ～ 466.
- FIELD, L. M. et al. (1996) : Insect Mol. Biol. **5** : 197 ～ 202.
- FORCIOLI, D. et al. (2002) : J. Econ. Entomol. **95** : 838 ～ 848.
- GUILLEMAUD, T. et al. (2003) : Bull. Entomol. Res. **93** : 289 ～ 297.
- HADDI, K. et al. (2012) : Insect Biochem. Mol. Biol. **42** : 506 ～ 513.
- HSU, J. C. et al. (2006) : ibid. **36** : 396 ～ 402.
- KIM, J. I. et al. (2012) : J. Asia-Pacific Entomol. **15** : 481 ～ 407.
- KIM, Y. H. et al. (2011) : ibid. **14** : 29 ～ 33.
- KONO, Y. and T. TOMITA (2006) : Pestic. Biochem. Physiol. **85** : 123 ～ 132.
- KOZAKI, T. et al. (2001) : Insect Biochem. Mol. Biol. **31** : 991 ～ 997.
- KWON, D. H. et al. (2004 a) : Pestic. Biochem. Physiol. **78** : 39 ～ 48.
- et al. (2004 b) : ibid. **80** : 21 ～ 30.
- et al. (2010) : ibid. **96** : 36 ～ 42.
- et al. (2012) : J. Asia-Pacific Entomol. **15** : 635 ～ 639.
- LEE, S. H. et al. (2010) : Pestic. Biochem. Physiol. **97** : 109 ～ 114.
- LI, F. and Z. J. HAN (2002) : Genome **45** : 1134 ～ 1141.
- LIU, Z. et al. (2005) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102** : 8420 ～ 8425.
- MALEKMOHAMMADI, M. et al. (2012) : Pestic. Biochem. Physiol. **104** : 150 ～ 156.
- MARSHALL, K. L. et al. (2012) : J. Pestic. Sci. **37** : 169 ～ 172.
- MARTINEZ-TORRES, D. et al. (1997) : Pestic. Sci. **51** : 265 ～ 270.
- 松浦 明・土田 聡 (2013) : 第 57 回応動昆虫講要 : 49.
- NAUEN, R. et al. (2012) : Pestic. Biochem. Physiol. **103** : 173 ～ 180.
- NYONI, B. N. et al. (2011) : Pest Manag. Sci. **67** : 891 ～ 897.

- 34) 岡崎真一郎 (2013): 第 57 回応動昆講要: 49.
 35) RINKEVICH, F. D. et al. (2007): Insect Biochem. Mol. Biol. **37**: 550 ~ 558.
 36) ——— et al. (2013): Pestic. Biochem. Physiol. (In press).
 37) SCHMIDT, J. et al. (2010): PloS Genet. **6**: e1000998.
 38) SHIMOMURA, M. et al. (2006): Mol. Pharmacol. **70**: 1255 ~ 1263.
 39) SHONO, T. (1985): J. Pestic. Sci. **10**: 141 ~ 146.
 40) 園田昌司 (2012): 植物防疫 **66**: 162 ~ 167.
 41) 鈴木 健 (2005): 農業環境研究成果情報 **21**: 28 ~ 29.
 42) SUZUKI, K. and H. HAMA (1998): Appl. Entomo. Zool. **33**: 11 ~ 20.
 43) 土田 聡・駒崎進吉 (2003): 平成 14 年度果樹試験研究成果情報: 29 ~ 30.
 44) ——— (2007): 応動昆中国支部会報 **49**: 7 ~ 12.
 45) TODA, S. and M. MORISHITA (2009): J. Econ. Entomol. **102**: 2296 ~ 2300.
 46) ——— et al. (2008): Appl. Entomol. Zool. **43**: 127 ~ 133.
 47) ——— et al. (2004): Insect Mol. Biol. **13**: 549 ~ 553.
 48) 土田 聡ら (2011): 平成 22 年度農研機構研究成果情報: <http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/fruit/2010/fruit10-08.html>.
 49) TROCZKA, B. et al. (2012): Insect Biochem. Mol. Biol. **42**: 873 ~ 880.
 50) TSAGKARAKOU, A. et al. (2009): Pestic. Biochem. Physiol. **94**: 49 ~ 54.

新しく登録された農薬 (25.6.1 ~ 6.30)

掲載は、**種類名**、登録番号: **商品名** (製造者又は輸入者) 登録年月日、有効成分: 含有量、**対象作物**: 対象病害虫: 使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、**適用雑草**等を記載。

「殺虫剤」

●イミシアホス液剤

23275: ネマキック液剤 (アグロ カネショウ) 13/6/12

イミシアホス: 30.0%

かんしょ: ネコブセンチュウ: 植付前 (全面散布土壌混和)

メロン: ネコブセンチュウ: 生育期 但し、収穫 14 日前まで (土壌灌注)

●クロラントラニプロロール水和剤

23278: シンジェンタ アセルプリン (シンジェンタ ジャパン) 13/6/12

クロラントラニプロロール: 18.4%

芝: スジキリヨトウ, シバツトガ, タマナヤガ, コガネムシ類幼虫: 発生前~発生初期

樹木類: ケムシ類: 発生前~発生初期

「殺虫殺菌剤」

●フィプロニル・オリサストロビン・トリシクラゾール粒剤

23274: ビームプリンス嵐箱粒剤 (BASF ジャパン) 13/6/12

フィプロニル: 1.0%

オリサストロビン: 7.0%

トリシクラゾール: 4.0%

稲 (箱育苗): いもち病, 紋枯病, イネミズゾウムシ, イネドロオイムシ, ウンカ類, ニカメイチュウ, イネツトムシ, イナゴ類

「殺菌剤」

●トリフルミゾールくん煙剤

23276: トリフミンジェット (日本曹達) 13/6/12

23277: 新富士トリフミンジェット (新富士化成薬) 13/6/12

トリフルミゾール: 10.0%

きゅうり, いちご, ピーマン, ししとう, メロン, すいか, さやえんどう, 実えんどう, なす, ズッキーニ: うどんこ病: 収穫前日まで

なす: すすかび病: 収穫前日まで

トマト, ミニトマト: 葉かび病: 収穫前日まで

こんにゃく: 乾腐病: 植付前

チューリップ: 球根腐敗病: 植付前

ばら: うどんこ病: —

きく: 白さび病: —

●フルキサピロキサド水和剤

23292: セルカディスフロアブル (BASF ジャパン) 13/6/13

フルキサピロキサド: 26.5%

西洋芝 (ペントグラス): 葉腐病 (ブラウンパッチ), フェアリーリング病: 発病初期

西洋芝 (ペントグラス): 雪腐小粒菌核病: 根雪前

日本芝: カーブラリア葉枯病, 葉腐病 (ラージパッチ): 発病初期

●ピロキロン粒剤

23294: クミアイコラトップ 1 キロ粒剤 12 (クミアイ化学工業) 13/6/26

ピロキロン: 12.0%

稲: いもち病: 葉いもちに対しては初発 10 日前~初発時, 穂いもちに対しては出穂 30 日前~5 日前まで

●ピロキロン粒剤

23295: クミアイコラトップ粒剤 24 (クミアイ化学工業) 13/6/26

ピロキロン: 24.0%

稲: いもち病: 葉いもちに対しては初発 10 日前~初発時, 穂いもちに対しては出穂 30 日前~5 日前まで

●ピロキロン粒剤

23296: クミアイコラトップ粒剤 5 (クミアイ化学工業) 13/6/26

ピロキロン: 5.0%

稲: いもち病: 葉いもちに対しては初発 10 日前~初発時, 穂いもちに対しては出穂 30 日前~5 日前まで

稲: もみ枯細菌病: 出穂 30 日前~5 日前まで

(50 ページに続く)