

減農薬レタス圃場に発生するキンウワバの種構成と タマナギンウワバの飛翔行動解析

千葉大学大学院 園芸学研究科 ^{いがらし はしやま あおい のむら まさし} 五十嵐(橋山)葵*・野村 昌史
長野県野菜花き試験場 ^{くりはら じゅん とよしま こうろう} 栗原 潤・豊嶋 悟郎

はじめに

フェロモンは、生物が生産分泌し、同種他個体に特定の行動や生理的反応を引き起こす物質と定義される。昆虫のフェロモンに関する研究は国内外で盛んに行われており、ウェブサイト「フェロベース」(<http://www.pherobase.com/>)には現在までに900属を超えるチョウ目昆虫のフェロモンに関する情報が蓄積されている。多くのガ類の場合、オスはメスが放出する性フェロモンを追跡することで、相手に定位し交尾に至る。この行動を利用し、世界の農業分野では、チョウ目害虫の交尾かく乱法やモニタリング法が広く活用されている。これらの手法のなかでも交尾かく乱法はIPM(総合的病害虫管理)の一端を担うものと有望視されている。

交尾かく乱法では、ターゲットとする害虫種の合成性フェロモンを吸着させた資材(交尾かく乱剤)を圃場に大量に配置することで、フェロモンが充満し、交尾行動が阻害され、結果的に交尾率が低下する。しかし交尾かく乱剤を用いて減農薬栽培を行うことで、予期せぬ昆虫の発生が問題になることもある。そのような一例として、タマナギンウワバ(チョウ目:ヤガ科:キンウワバ亜科)が挙げられる。過去に、筆者らが長野県において交尾かく乱剤を用い、レタスの減農薬栽培をしたところ、圃場には交尾かく乱剤の対象種であるはずのタマナギンウワバが発生し、さらに複数種のキンウワバ類の発生が見られた。

キンウワバ類は日本に60種ほど分布しており、外部形態が類似している種が多い。そのため、農業現場では詳細な識別が困難で、「キンウワバ類」という括りで捉えられていることが多い。しかしながら、効率的な害虫管理を行うためには、圃場の害虫相を種レベルで正確に把握することが重要となる。そこで、筆者らはレタス圃

場に発生するキンウワバ3種に対し、外部形態に頼らない分子生物学的な同定法を構築した。さらに、この同定法を圃場で採集した種不明個体に適用することで、圃場におけるキンウワバの種構成を示すことができたので、その成果を紹介する。

また、交尾かく乱剤施用圃場でタマナギンウワバが発生する要因の一つとして、既交尾のメスが、圃場内へ侵入し産卵している可能性が考えられた。この可能性について検証するため、タマナギンウワバメス成虫の飛翔能力を実験室内で評価したので、併せて紹介する。

I 分子同定法の条件設定

本研究で構築した同定法の対象種は、過去の調査において交尾かく乱剤施用レタス圃場での発生が特に顕著であった、タマナギンウワバ、キクギンウワバおよびキクキンウワバとした。これら3種のうち、タマナギンウワバは、現在市販されている野菜類用複合交尾かく乱剤の対象種に指定されており、農林有害動物・昆虫名鑑(日本応用動物昆虫学会, 2006)にも、レタスを加害する昆虫として記載されている。キンウワバ類の同定は、主に成虫の前翅斑紋に基づいて行われている。また幼虫の場合は腹部にある刺毛配列を用いて、AからFまでの6グループに分類することが可能であるが(一瀬, 1962)、各グループには複数種が含まれるため、刺毛配列のみでは種を特定できないことがある。例えば、タマナギンウワバとキクギンウワバは同じAタイプの刺毛配列を持つため、両種が同時期に発生する場所では、幼虫期の同定はほぼ不可能になる。また、寄生蜂が脱出した後の個体や罹病した個体では、体の損傷や変色により、刺毛配列を確認できない場合があり、ふ化以前の卵の状態では識別できない。しかし、種不明個体が大多数を占めれば、圃場の害虫相を正確に把握できなくなる。そこで、外部形態に頼らず、簡便で確実に同定できる技術として、分子同定技術を用いることにした。

現在、様々な分子同定技術が用いられているが、筆者らはMultiplex PCR法を採用した。通常のPCRでは1組二つのプライマーを使って、単独のDNA領域を増幅する。それに対し、Multiplex PCRでは三つ以上のプラ

Species Structure of Plusiine Moths Found in the Pheromone-treated Lettuce Fields and Analysis of Flight Activity of *Autographa nigrisigna*. By Aoi IGARASHI (HASHIYAMA), Masashi NOMURA, Jun KURIHARA and Goro TOYOSHIMA

(キーワード: キンウワバ, Multiplex PCR, フライトミル, アクトグラフ)

* 現所属: 富士フーズ株式会社

イマーを同時に使って PCR を行うことで、複数の領域を増幅し、その結果生じる増幅断片の数や長さの違いから種を識別する（川崎ら，2005）。この手法はプライマーの設計やアニーリング温度の設定に多少時間がかかるが、設定条件が決定すれば、複数の個体を短時間で同定できるので、圃場での大規模な発生調査などに適している。

はじめに、長野県の3地域で採集したキクギンウワバ、タマナギンウワバ、キクキンウワバについて、ダイレクトシーケンス法を用いて、ミトコンドリア DNA の CO I (Cytochrome Oxidase I) と tRNA (transfer RNA) 領域の塩基配列 875 bp を決定した。ここで、得られた塩基配列をコンピュータープログラム Amplify 3X に読み込み、Multiplex PCR に応用できるプライマー認識部位を検索した。検索条件として以下の3点が挙げられる。

①増幅断片のサイズの違いが、アガロースゲル上で判別可能なこと。

②ターゲットの領域以外で、認識部位を持たないこと。

③各プライマーの最適アニーリング温度が、近似していること。

これらに従い、キクギンウワバの配列を基に、二つのプライマーを新たに設計した。既存のプライマーを加え、合計四つのプライマーを用いて Multiplex PCR を行った後、目的とする断片の増幅確認、そして、断片長を調べるために、アガロース電気泳動を行った。その結果、アガロースゲル上のバンドパターンから3種を識別することができた（図-1）。

II 分子同定法の適用

DNA 抽出条件および PCR 反応条件を決定したので、実際に千葉県、東京都、神奈川県、兵庫県の4地域で採集した標本 44 個体に対して、今回の Multiplex PCR 法を適用した。その結果、3種の識別が可能であった。そこで、野外で採集したが、種が不明な卵、幼虫、蛹約 100 個体に対してもこの手法を適用したところ、成虫と同様に種特異的なバンドが得られ、そのパターンから種を特定できた。また、寄生や罹病によって死亡した個体についても、種同定することができた。

以上のことから、本手法はキンウワバ類3種の識別に有効であると考え、圃場における種構成の把握に利用した。2009年6～8月、長野県軽井沢町に交信かく乱剤施用圃場と無施用圃場を設け、それぞれの圃場にレタス 126 株を3作期栽培した。各作期の収穫時期に、それぞれの圃場からレタス 90 株に寄生していたキンウワバ類の卵 21 個体、幼虫 134 個体、蛹 34 個体を採集した。それらを成虫に至るまで個別飼育し、羽化後に成虫の前翅斑紋から同定を行い、幼虫期に死亡した個体は、刺毛配列で同定をした。約半数が刺毛配列 A タイプを示したが、レタスには同じ A タイプを持つキンウワバ類が2種（タマナギンウワバおよびキクギンウワバ）発生するため、種を特定できなかった。そこで、刺毛配列 A タイプを示した個体に Multiplex PCR を用いた。その結果、刺毛配列 A タイプを示して死亡した個体の種が特定され、交信かく乱剤施用圃場と無施用圃場のキンウワバ種構成を明示することができた（図-2）。種構成を見ると、

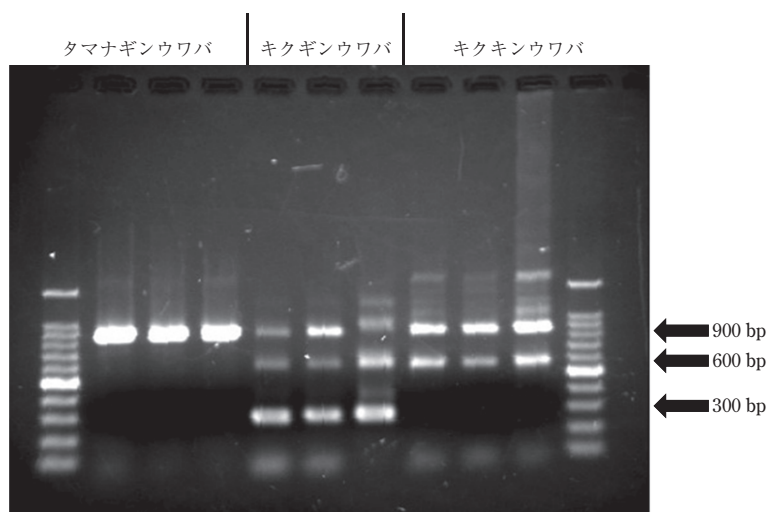


図-1 キンウワバ類3種に Multiplex PCR を適用し得られたアガロースゲル上のバンドパターン

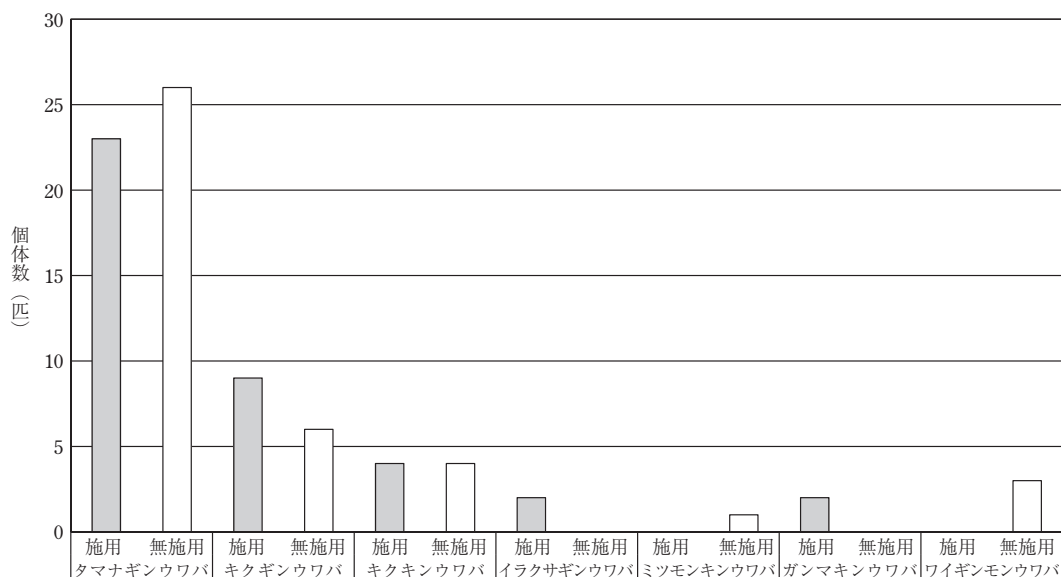


図-2 第1作期の交信かく乱剤施用圃場と無施用圃場における Multiplex PCR 適用後のキンウワバ種構成

各圃場にはタマナギンウワバが優占的に発生していることが明らかとなった。また、タマナギンウワバ以外に、これまで害虫という認識がなかった種を含む6種のキンウワバ類が、圃場に発生していることがわかった。

近年、遺伝子技術は様々な場面で用いられているが、Multiplex PCR に関しては、プライマーのデザインやアニーリング温度の設定など基礎的な実験を扱った文献が大半を占める一方で、実際にその技術を応用した例は、まだ少ないのが現状である。実験設定などの問題をクリアできれば、Multiplex PCR の実用性は飛躍的に高まり、形態から種の違いを明らかにできない今回のような場合、この技術が応用される機会も増えていくと予想される。

III フライトミルによる飛翔能力評価

交信かく乱剤は、オス成虫のメス成虫探索行動を阻害する資材であり、メス成虫側の行動を制御することはできない。すでに他の場所で交尾を終えたメス成虫が、産卵のために圃場に飛来する際、交信かく乱剤は効力を示すことができない。そのため、交信かく乱剤はこうしたメス成虫の飛び込みの影響を受けないよう、大面積に処理をすれば効果が得やすい(小川, 1990)。しかし、一般に交信かく乱剤は高価な資材であり、農家にとっては、大面積の処理は大きな負担となる。交信かく乱を行うにあたり、ターゲットとする害虫の飛翔や交尾の詳細を把握しておくことは、処理面積を設定する際に重要な情報となる。そして、交尾前後におけるメスの移動実態を知ることは、交尾終了後メスが交尾場所から産卵場所

へどの程度移動可能なのかを知る手がかりとなる。

筆者らは、タマナギンウワバメス成虫の飛翔距離と飛翔時間を調べるために、フライトミル装置を用いた(図-3)。フライトミルは野外とは異なり、風の影響はなく、さらに強制的に供試虫を飛ばすため、自由飛翔とは区別して考える必要がある。しかしながら、フライトミルはその個体が持つ飛翔ポテンシャルを評価し、さらに他個体や他グループと比較することができるため、今回採用した。フライトミルは MORIYA (1995) を基に、チョウ目昆虫用に一部改良して設計した。フライトミルの本体は、厚さ3 cm の発泡スチロールを「コの字」型に切り出すことで得た。さらに、バルサ材木(高さ0.3 × 幅0.3 × 長さ20 cm)をローターとし、その中心には昆虫標本用の針(直径0.4 × 長さ40 mm)を差し込み、主軸とした。ローターの一端には昆虫を、もう一端には釣り合いを取るために、重りを取り付けた。また飛翔の妨げにならないよう、昆虫の前胸背板に少量のボンドを塗布し、ローターと接着させた。フライトミルの上下には、データロガーに接続している1組の赤外線型センサーを取り付けた。実験には、4, 5, 6日齢の未交尾および既交尾メス成虫を供試した。各日齢の未交尾個体は羽化直後のメス6匹をコンテナにまとめて入れ、所定日数飼育することで得た。各日齢の既交尾個体は、羽化直後のメス3匹とオス3匹をコンテナに入れ、所定日数飼育することで得た。メス成虫が飛翔すると、ローターが回転し、センサー間の赤外線が遮断される。その遮断回数を1時間ごとに集計した。実験室内は温度25℃、湿度70%、

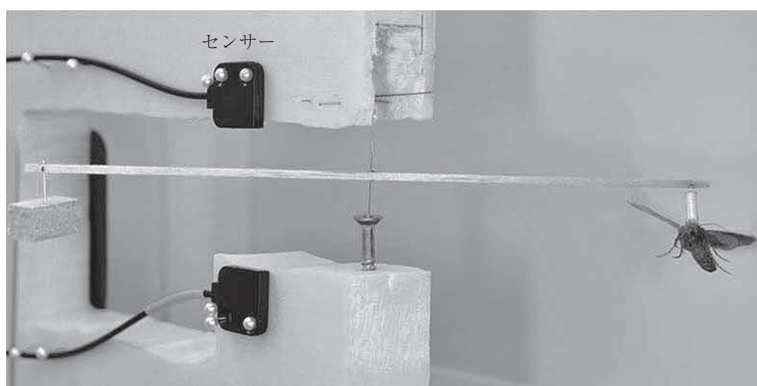


図-3 タマナギンウワバメス成虫を設置したフライトミル装置

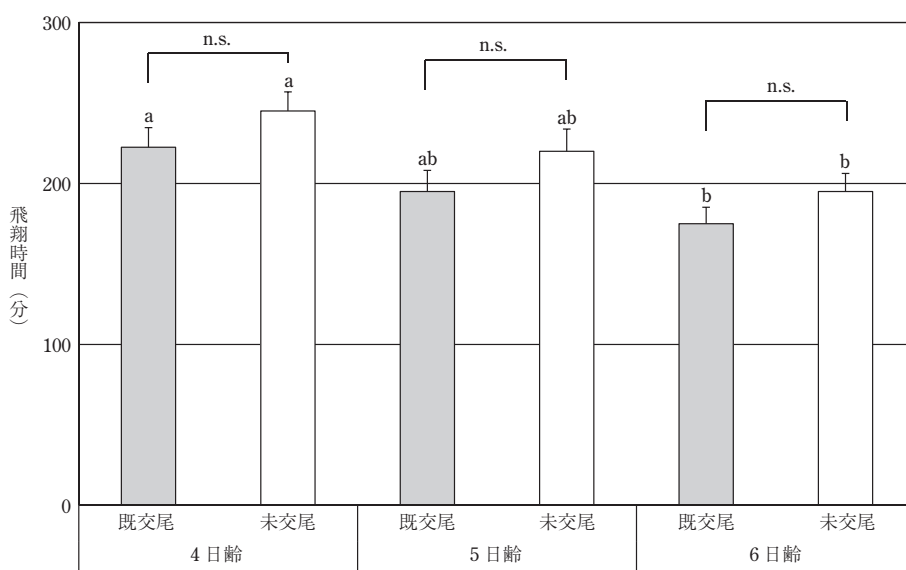


図-4 タマナギンウワバメス成虫の1日当たりの平均飛行時間

図中の n.s. は既交尾、未交尾間で有意差がないことを示す (Mann-Whitney *U* test).

アルファベットが異なる場合は日齢間で有意差があることを示す (Steel-Dwass test, $P < 0.05$).

縦棒は標準誤差を示す。

日長 12L12D に保持した。明期開始 4 時間後、メス成虫をコンテナから取り出し、口吻を伸ばして 3% ハチミツ水溶液を 15 秒間強制的に与えた。その後、フライトミル 1 基にメス成虫 1 匹を設置し、24 時間のうち暗期 12 時間中に飛翔した時間と距離を記録した。フライトミルのデータによると、1 日当たりの平均飛行時間において、各日齢の既交尾メスと未交尾メスの間で、有意な差は見られなかった (図-4)。同様に、1 日当たりの平均飛行距離も、交尾の有無による違いは見られなかった (図-5)。飛行時間と飛行距離は既交尾メス、未交尾メスともに日齢を経るごとに減少した。以上の結果より、タマナ

ギンウワバは、既交尾メスの飛行時間や距離が、未交尾個体と変わらず、飛行能力が高かったことから、交尾済みのメスが、圃場へ侵入する可能性が高いことが示唆された。

IV アクトグラフによる飛行能力評価

フライトミルでは、虫体を装置に固定しているため、自由飛行とは異なり、野外での飛行実態をそのまま反映しているとは言い難い。そこで、フライトミルとともにアクトグラフ装置を併用することで、虫体を固定しない状況での活動性を測定し、飛行能力を総合的に評価した

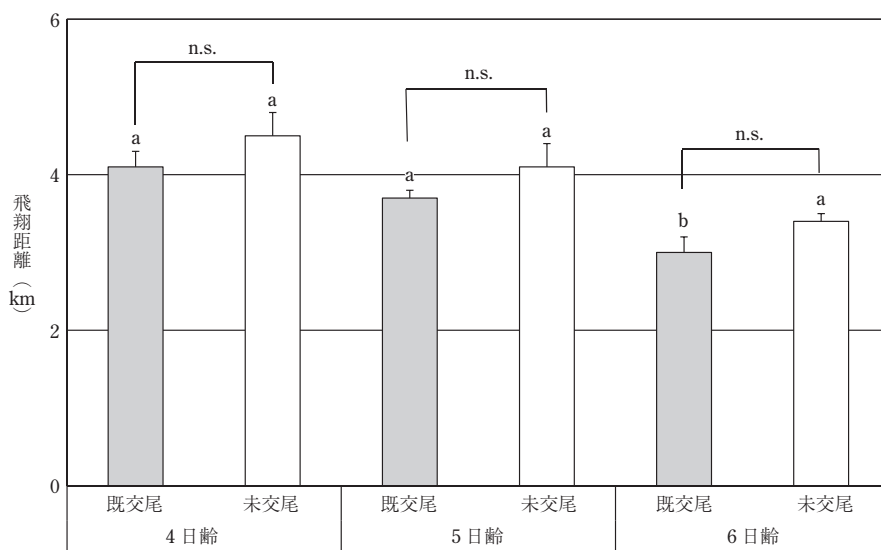


図-5 タマナギンウワバメス成虫の1日当たりの平均飛翔距離

図中の n.s. は既交尾, 未交尾間で有意差がないことを示す (Mann-Whitney *U* test).

アルファベットが異なる場合は日齢間で有意差があることを示す (Steel-Dwass test, $P < 0.05$).

縦棒は標準誤差を示す。

(図-6)。実験に用いたアクトグラフ装置の設計は、尹ら (2012) に従った。遮光性プラスチック製の箱 (幅 70 × 奥行き 45 × 高さ 55 cm) に赤外線遮断型アクトグラフ装置を設置する。箱の天井部には 20 W 白色蛍光灯 2 本を付けた。蛍光灯は明期の際、点灯するようタイマー制御した。アクトグラフ装置の中央には直径 13 cm × 高さ 20 cm の円筒形プラスチック製容器 (実験ケージ) を設置した。この実験ケージの上部には 2 組の赤外線センサーを対角線上に設置した。赤外線センサーはデータロガーに接続されており、このデータロガーでセンサーからの情報を記録した。実験ケージの底面には 3% ハチミツ水溶液を満たしたプラスチック製容器 (直径 7 × 高さ 3.5 cm) を置いた。実験には、4, 5, 6 日齢の未交尾および既交尾メス成虫を供試した。各日齢の既交尾と未交尾メス個体はフライトミル実験で供試した個体と同様の方法で得た。この実験ケージ内にメス 1 匹を 24 時間放飼し、飛翔によるセンサーの遮断回数を 1 時間ごとに集計した。センサーの遮断回数が多いほど、その個体の活動性が高いことになる。実験室内はフライトミル実験時と同じ温度、湿度、日長に保持した。フライトミル実験と同様、明期開始 4 時間後にハチミツ水溶液を与えてから実験に供試し、24 時間のうち暗期 12 時間中の飛翔活性として記録した。アクトグラフのデータから、各日齢の既交尾メスによるセンサー遮断回数は、同じ日齢の未交尾メスに比べ有意に多かった (図-7)。このことから

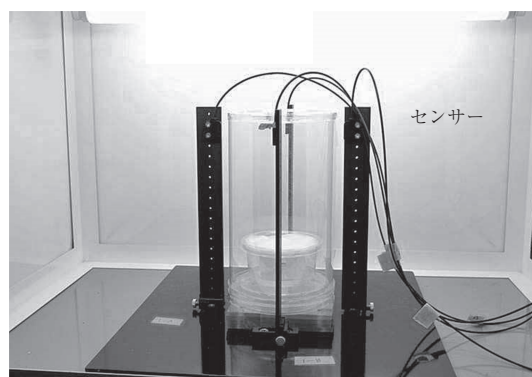


図-6 タマナギンウワバメス成虫を設置したアクトグラフ装置

既交尾メスは、未交尾メスよりも夜間活発に飛翔していると考えられた。

夜間、ビデオカメラを用いて行動を観察したところ、既交尾メスはケージ内を飛翔しては着地し、着地した先で産卵、そしてまた飛翔を繰り返すことがわかった。また、その産卵数は、日齢を経るごとに増加した。既交尾メスの高い活動性は飛翔行動と産卵行動に起因しており、この二つの行動はリンクして起きることが示唆された。以上のことから、夜間における既交尾メスの高い活動性が明らかとなり、野外でも交尾済みのメスは、産卵時に移動分散する可能性が考えられた。

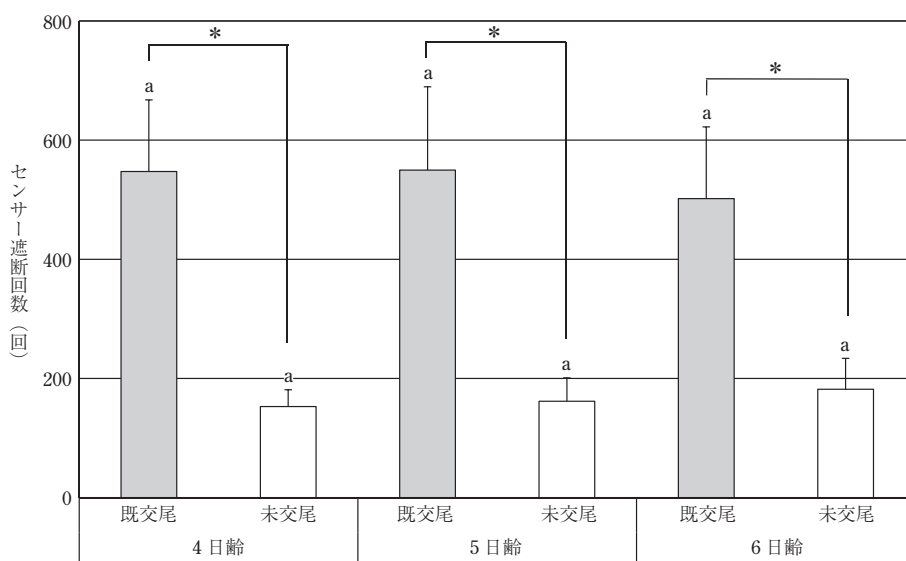


図-7 タマナギンウワバメス成虫の1日当たりの平均センサー遮断回数

図中の*は既交尾，未交尾間で有意差があることを示す (Mann-Whitney *U* test)。

アルファベットが異なる場合は日齢間で有意差があることを示す (Steel-Dwass test, $P < 0.05$)。

縦棒は標準誤差を示す。

おわりに

長野県軽井沢町のレタス圃場におけるキンウワバ類の種構成を明示し，タマナギンウワバメス成虫の圃場内飛び込みの可能性について室内実験で検証した。分子同定技術を用いることで，種が不明なキンウワバを手に入れたから DNA 抽出，PCR 操作および電気泳動を行い，約 5 時間で優占種 3 種のうちのいずれか，またはそれ以外かを判別することができるようになった。ただし本手法は，過去のレタス圃場での種構成調査をもとに構築した技術であるので，他の作物に発生するキンウワバには応用できない。レタス以外の作物で発生し，なおかつ，刺毛配列が判明しない個体を同定するには，成虫まで飼育し前翅斑紋を図鑑や標本と比較するか，もしくは DNA シークエンス法で得た塩基配列を既知の配列と比較する必要がある。今後は日本に生息するキンウワバ類の中でも，害虫として指定されている 10 種に対し分子同定技術を適用拡大していきたい。また，本手法は試験場などでの活用を目標としているが，今後はより簡便で特別な機材を必要としない方法を模索し，農業現場で気軽に使えるような技術を構築したい。

また，フライトミルおよびアクトグラフを用いた実験では，既交尾メスが飛翔する時間と距離，活動性を調べた。実験の結果，既交尾メスは実験室内で高い活動性を示し，産卵のために圃場内に侵入し産卵する可能性が考

えられた。概して，メス成虫による，圃場内への飛び込み産卵は交信かく乱剤の施用面積が広がれば広いほど起こりにくい。そのため，近隣の農家と協力し，施用面積を拡大することがタマナギンウワバを含め飛翔性を持つ昆虫の被害防止に繋がるだろう。また，メス成虫にとって産卵基質として魅力的なおとり植物を圃場周辺に配置することも飛び込み防止の一案として考えられる。しかしながら，タマナギンウワバの寄主選好性はこれまでほとんど研究されていない。害虫の交尾・産卵にかかわる生態的知見を深めることが，今後，より確かな防除を行ううえで必要不可欠となるだろう。今回，フライトミルやアクトグラフから得られたデータは，他種や他グループとの飛翔能力の比較には最適であるが，その個体の真の飛翔能力を正確に反映しているとは言い難い。今後はこのデータを活用し標識再捕獲法やライトトラップを利用して野外での飛翔実態をより詳細に明らかにしていきたい。

引用文献

- 1) 一瀬太良 (1962): 東京農工大学農学部学術報告書 6:1 ~ 127.
- 2) 川崎建次郎ら (2005): 昆虫テクノロジー研究とその産業利用。シーエムシー出版，東京，295 pp.
- 3) MORIYA, S. (1995): Appl. Entomol. Zool. 30:244 ~ 246.
- 4) 日本応用動物昆虫学会 編 (2006): 農林有害動物・昆虫名鑑 増補改訂版，日本応用動物昆虫学会，東京，387 pp.
- 5) 小川欽也 (1990): 化学と生物 28:295 ~ 303.
- 6) 尹 丁梵ら (2012): 応動昆 56:103 ~ 110.

学 会 だ よ り

○平成 25 年度日本学会会議公開シンポジウム

日 時：平成 25 年 11 月 16 日 (土) 13:00～17:00

場 所：東京大学農学部 1 号館 8 番教室

東京都文京区弥生 1-1-1

テーマ：「新しい植物保護技術への展望」

プログラム：

13:00～13:10 シンポジウム開催にあたって

(白石友紀 氏)

13:10～13:45 総合科学としての農業を支える低分子・遺伝子統合技術

(浅見忠男 氏)

13:45～14:20 トマトかいよう病の疫学的解析による伝染源の解明とその根拠に基づいた防除

(川口 章 氏)

14:20～14:55 炭疽病の分泌戦略を標的とする作物保護技術の基盤開発

(白須 賢 氏)

15:05～15:40 天敵利用による新たな害虫制御技術の開発について

(後藤千枝 氏)

15:40～16:15 雑草管理の将来展望と遺伝子組換え作物

(奥語靖洋 氏)

16:15～16:30 植物保護科学連合の活動と今後の研究の方向性の検討について

(松本 宏 氏)

16:30～17:00 総合討論

(藤崎憲治 氏)

URL: <http://www.scj.go.jp/ja/event/pdf2/178-s-2-1.pdf>

○第 21 回農業レギュラトリーサイエンス研究会

日 時：平成 25 年 12 月 9 日 (月) 10:00～17:00

場 所：東京農業大学 百周年記念講堂

東京都世田谷区桜丘 1-1-1

テーマ：「農薬の残留 (作物・土壌) に関する登録制度

〔広告掲載会社一覧〕

(掲載順)

石原バイオサイエンス(株)

……………ウララ, フロンサイド

サンケイ化学(株)……………ハッパ, サンクリスタル他

バイエルクロップサイエンス(株)

……………ボディーガード

日本農薬(株)……………フェニックス

日本曹達(株)……………ファンタジスタ, ファンベル

アリストライフサイエンス(株)……………スワルスキー

日産化学工業(株)……………スターマイト

Meiji Seika ファルマ(株)……………オリゼメート

クミアイ化学工業(株)……………プロポーズ

及び評価のあり方 (仮題)〕

プログラム：

1) レギュラトリーサイエンスとその農薬残留基準設

定への応用 (山田友紀子 氏, 入江真理 氏)

2) 作物残留試験の課題について—食品中残留農薬の

加工調理による影響— (坂 真智子 氏)

3) 土壌残留リスク管理手法 (更田真一郎 氏)

4) 後作物残留試験の課題

(岩船 敬 氏, 元木 裕 氏)

5) 欧米における土壌残留, 後作物残留規制の現状

(元場一彦 氏)

6) 土壌環境と農薬 (山本廣基 氏)

URL: <http://pssj2.jp/committee/regula/regula21.html>

主 な 次 号 予 告

次号 25 年 12 号に予定されている掲載記事は次のとおりです。

特集：ネギアザミウマが媒介するアイリス黄斑ウイルス (IYSV) 防除対策

四国におけるアイリス黄斑ウイルス (IYSV) の発生と防除対策

渡邊丈夫

ネギアザミウマの IYSV 獲得・媒介特性

石川浩一

ネギアザミウマのバイオタイプ

三浦一芸

四国におけるネギアザミウマ生殖系統の分布とその薬剤感受性

十川和士

画像処理によるネギアザミウマの自動識別

中野昭雄

多頭保虫虫検定法 (マス検定) による IYSV 検出法の開発

芝 章二

アイリス黄斑ウイルス (IYSV) 発生地での感染リスク評価

相澤美里

高知県の施設ニラにおけるアイリス黄斑ウイルス (IYSV) の伝染環境

矢野和孝

静岡県におけるアイリスイエロースポットウイルスによる被害実態と防除対策の現状

斉藤千温

長野県のトルコギキョウにおけるアイリス黄斑ウイルス (IYSV) の発生状況とその防除対策

藤永真史

佐賀県上場地域におけるアイリス黄斑ウイルスの発生状況と防除対策

善正二郎

植 物 防 疫

平成 25 年

11 月 号

(毎月 1 回 1 日発行)

＝禁無断転載＝

第 67 巻

平成 25 年 10 月 25 日印刷

第 11 号

平成 25 年 11 月 1 日発行

(通算 803 号)

編 集 植物防疫編集委員会

印 刷 所 三 美 印 刷 (株)

東京都荒川区西日暮里 5-9-8

定価 920 円

本体 877 円

平成 25 年分購読料
前金 10,500 円 後払 11,040 円
(送料サービス, 消費税込み)

— 発 行 所 —

〒114-0015 東京都北区中里2丁目28番10号

一般社団法人 日本植物防疫協会

電 話 (03) 5980-2181 (代)

FAX (03) 5980-6753 (支援事業部)

振 替 0 0 1 1 0-7-1 7 7 8 6 7 番