

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 24日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580059

研究課題名（和文） 交信かく乱法が効かない害虫種に対する原因究明と分子同定法の導入

研究課題名（英文） The causes for the appearance of pest species that showed no effect for mating disruption, and introduction of molecular identification method of plusiine species

研究代表者

野村 昌史（NOMURA MASASHI）

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：50228368

研究成果の概要（和文）：交信かく乱法が効かない種として、調査期間中8種のキンウワバ類の発生が認められた。しかし幼虫期における同定が困難であったため、Multiplex PCRによる分子同定法を適用したところ、長野県のレタス圃場ではタマナギンウワバが優占していることが明らかとなった。またタマナギンウワバが発生する原因を調べたところ、既交尾メス成虫のかく乱区域外からの飛び込みと交信かく乱剤の成分ではタマナギンウワバへのかく乱効果が不十分なこと、他の害虫種の成分がかく乱効果を阻害していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We found 8 plusiine species at the lettuce field of Nagano during the study period. Although identification for larval stage has been difficult, we applied a molecular identification method by Multiplex PCR. So, we showed *Autographa nigrisigna* is dominant species in the lettuce field of Nagano Prefecture. We also examined the cause for the appearance of *A. nigrisigna*. We showed that the disturbance effect on *A. nigrisigna* is insufficient. And the components of the mating disruption agent for other pest species is inhibit the disturbance effect for *A. nigrisigna*. We also showed mated female adults of *A. nigrisigna* are flying into the field from the outside of the area.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：交信かく乱、分子同定法、アクトグラフ、フライトミル

1. 研究開始当初の背景

現在、総合的害虫管理(IPM)の考え方が浸透しはじめ、施設野菜では天敵昆虫を使用する農家も増加しつつある。また露地栽培でも、性フェロモン成分を活用した複合交信かく乱剤を利用した減農薬栽培を確立しようとしている(浜村, 2006)。

露地栽培における複合交信かく乱剤については、果樹ではシンクイガ等の防除に成果をあげているものの、野菜類では専用の交信かく乱剤が販売されはじめたが、一部のターゲット害虫において、交信かく乱されていると推定されているにもかかわらず、圃場には幼虫が見られるという事例がある(橋山ら, 2009)。しかし、その原因については全くわかっていない。

現状としては・・・

- ・ 交信かく乱区では、ターゲット害虫のオス成虫は調査用トラップに入らず、つなぎメスの交尾率も低い
- ・ しかし、作物によっては一部のターゲット害虫の幼虫が見られ、食害している
- ・ さらにターゲット以外の害虫が、交信かく乱区で増加している

となっており、交信かく乱によって効果がみられる種と、効果がみられない種というものが存在していることが明らかとなっている(橋山ら, 2008; 2009)。

野菜類は害虫種も多く、性フェロモンを利用するチョウ目害虫種すべてに、交信かく乱が引き起こされるわけではない。このため、交信かく乱区でも新たな害虫種が発生することは、想定できるものであるが、ターゲットとしている害虫種の発生がみられるというのは問題である。

このターゲット種ながら、圃場での加害がみられる害虫として、キンウワバ類があげられる。

現在の複合交信かく乱剤では、ターゲット害虫としてタマナギンウワバとイラクサギンウワバの2種類が登録されている。しかしながら我々が調査しているレタス圃場では、交信かく乱区においても両種幼虫の発生が認められる(橋山ら, 2009)。

また、キンウワバ類は約 60 種日本に分布しているが、農生態系に発生するのは約 10 種である。そして食草としてはキク科、アブラナ科、ウリ科、マメ科、イネ科など広範囲にわたり、生態・生活史など不明なことが多い。また、キンウワバの性フェロモン成分は種によって大きく異なり、含有成分では交信かく乱できない種も含まれることから、ターゲット害虫2種以外にはかく乱効果がないものもある。実際、成分が大きく異なるキクキンウワバ(Ando et al., 1998)は、交信かく乱区でもトラップへの誘引阻害が起こら

ない。このためレタスでは、交信かく乱区でもキクキンウワバの食害が顕著であり、その対策が求められている。

さらにキンウワバの幼虫について、「圃場で発生しているキンウワバの種がわからない」という問題もみられる(橋山ら, 2008)。キンウワバ類は、成虫幼虫ともに外見上は一見識別できない種が多く、以前から問題となっていた。それが発生量増加により、表面化したのであるが、種によって農薬の感受性が異なるために、正しい種を把握していないと無駄な防除対策を講じることになる。

2. 研究の目的

本課題は、上記に挙げた問題を詳細に検討し、交信かく乱区に発生するキンウワバ等の構成と性フェロモン成分を明らかにし、さらに生態的な知見を加味することで、交信かく乱剤を利用した防除法の改善を目的として研究を行った。

まず、交信かく乱の有無で害虫相に差がみられるのかどうかを確認した。これまで長期にわたり交信かく乱を行ってきた長野県軽井沢町の圃場と、近隣の慣行栽培圃場において、キンウワバ等害虫種を比較した。この調査で、交信かく乱の有無と害虫相、特にターゲット昆虫の発生種とその季節変動を明らかにする。そして加害がみられる交信かく乱ターゲット種等については、性フェロモン成分を解析し、既知種は成分の変化について調べた。

次に、発生する害虫類、特に形態が酷似するキンウワバ類の確実な同定を行う必要がある。研究代表者は、キンウワバ類の分類、分子系統解析に長年携わってきたので、成虫の形態による同定は問題ないが、卵や幼虫では同定が困難である。そこで本研究課題では、各ステージの詳細な形態形質を画像で記録するとともに、卵や若齢幼虫でも同定可能な遺伝子による分子同定法の開発を行った。また、キンウワバ類やヨトウガ類、オオタバコガ等の優占種については、行動解析実験から交尾の有無による雌成虫の移動性の違いを明らかにした。そして開発した分子同定法を適用し、圃場の害虫相比較、移動性など生態形質を加味し、新たな防除法を検討した。

3. 研究の方法

(1) 野外調査

長年にわたり複合交信かく乱剤を施用している長野県軽井沢町茂沢地区の圃場と、対照区として近隣で慣行栽培している圃場を用いて作物を加害する害虫調査を行った。

作物については、地域で作付面積が大きく、キク科であることから様々な害虫種の発生がみられるレタスを中心に調査を行なった。調査は、1作につき100株で2反復調査を行

った。調査は1区 80 株を選定し、定植3週間後の生育期および6週間後の収穫期に行い、発生しているチョウ目およびその他の害虫種の種構成を6~7月、7~8月および8~9月の3作調査した。

野外調査は、主に研究代表者野村、研究分担者中牟田および実験補助の大学院生（橋山）が行った。また栽培管理は主として研究協力者の長野県野菜花き試験場の栗原 潤氏が担当した。

また、交信かく乱区と非交信かく乱区に設置する性フェロモントラップについては、各ターゲット種のかく乱効果を確認するとともに、キンウワバ類については、ターゲット種のイラクサギンウワバとタマナギンウワバ、および非ターゲット種のキクキンウワバ、キクギンウワバの4種について誘引阻害を調べた。

(2) 室内飼育

調査区に発生したチョウ目害虫は、持ち帰り、羽化させて種の同定を行い「新たな害虫」の存在の有無を調べた。また、羽化した個体の他に、幼虫や蛹のステージでの死亡個体については、その死亡要因を明らかにし、交信かく乱の有無と寄生率や病死率の違いがあるのかどうかを確認した。予備調査により、レタスを加害するキンウワバ類は、キクギンウワバ、タマナギンウワバ、イラクサギンウワバ、キクキンウワバに加え、加害未記録種としてワイギンモンウワバ、イネキンウワバ、ミツモンキンウワバが同定され、合計7種ものキンウワバ類が加害していることが明らかとなった。この他に、最近レタスでの加害が問題になってきた、ニセタマナヤガやホソバセダカモクメなどの加害未記録害虫も、発育実験等から年間発生消長や休眠などの性質を明らかにした。

(3) 分子同定

発生したキンウワバ類については、その発生種が多いので、飼育し羽化した成虫の同定では、寄生や罹病による幼虫の死亡により、「不明種」の割合が多かった。そこで各種のミトコンドリア遺伝子塩基配列解析を行い、その結果から複数のプライマーセットで増幅を行い、その増幅産物の数や大きさで識別を行う“マルチプレックス PCR”により、全個体の塩基配列を調べずに簡便に種の同定を行う技術の活用を試みた。これまでに、この方法でキンウワバ3種の同定可能、という見通しを得ているので（橋山ら、2008）、さらに多くの種を分けられるようなプライマーセットを検討した。

(4) 性フェロモン成分解析

圃場で採集されたキンウワバ等の加害種

については、性フェロモン成分をフェロモン腺から抽出して GC-MS により解析を行った。これによってターゲット種ならば組成の変化などの有無や、これまでフェロモン成分がわかっていなかった種の成分を明らかにするという基礎的な知見を明らかにした。

(5) 成虫の活動性

キンウワバ類やオオタバコガ等の優占種の害虫については、成虫の活動性についても調べた。交信かく乱には「既交尾雌の飛び込み」という問題が常に取りざたされているが、本当に「既交尾雌が長距離飛翔して飛び込んでくるのか？」は明らかではなかった。

そこで、未交尾雌と既交尾雌の飛翔活動性や、交尾によって活動が変化するかを解明するために、活動記録装置（アクトグラフ）や飛翔測定装置（フライトミル）を用いて成虫の活動性を明らかにする。メスの活動性が交尾後も高いなら、「飛び込み」も十分考えられるが、低下した場合には多くの個体で確認したうえで評価を行なった。

4. 研究成果

(1) 分子同定技術の開発

本研究では確実に卵と幼虫期での同定が行なえるように分子生物学的な手法を構築することを目指した。レタスでの発生が特に顕著であったキンウワバ類3種を対象に、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) 領域の塩基配列約 900 bp を決定した。この塩基配列を基に、それぞれの種に特異的なプライマーを設計し、マルチプレックス PCR を行なった。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。さらに、本手法を日本国内の

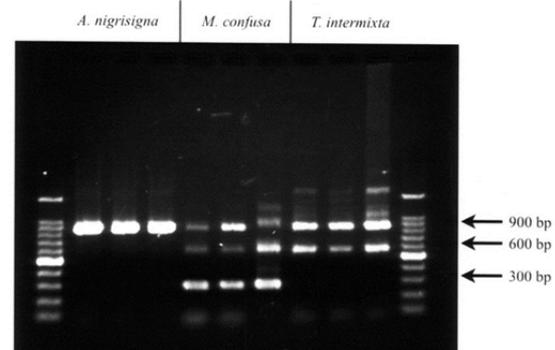


図1 マルチプレックス PCR パターン

様々な地点で採集したキンウワバの生体や病気や寄生によって死亡した個体に適用したところバンドパターンから3種を見分けることができた。このように、外部形態による同定に加え、分子同定を行なうことで、圃

場におけるキンウワバ類種構成をより明確に示すことが可能となった。

そして圃場におけるキンウワバの不明幼虫にこの手法を適用したところ、多くの幼虫はタマナギンウワバであることが示され、長野県のレタス圃場では、交信かく乱剤のターゲット種であるタマナギンウワバが優占種となっていることが明らかとなった。

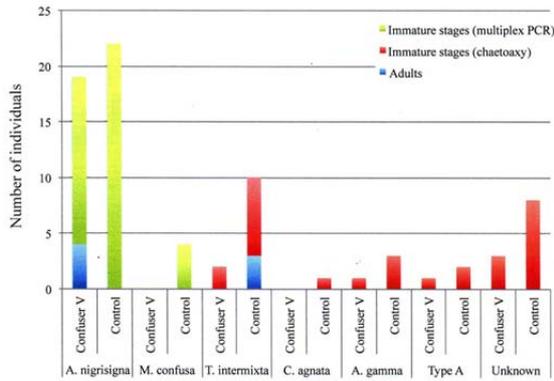


図2 不明種への分子同定の適用

(2) タマナギンウワバの発生の要因解析

本研究では交信かく乱剤を施用したレタス圃場でタマナギンウワバが発生する要因として以下の可能性を掲げ、それぞれの可能性について検証を行なった。

- ・ 既交尾メスの圃場外からの飛び込み
- ・ コンフューザーV®の微量成分の欠如
- ・ コンフューザーV®の他種用成分の影響

1 点目の可能性を検証するため、交尾の前後におけるメス成虫の飛翔能力を調べた。飛翔能力の推定にはフライトミルおよびアクトグラフ装置を用いた。フライトミルを用いた実験では、交尾の有無によって飛翔時間や

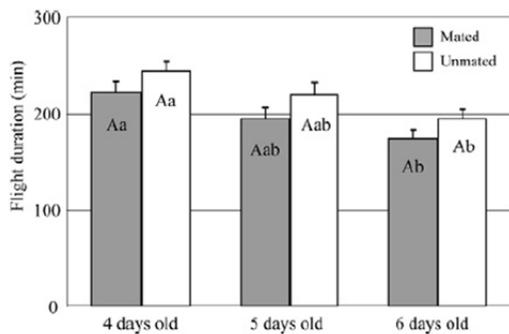


図3 フライトミルによる飛翔活性

飛翔距離に違いがみられなかったが、交尾を終えたメスでも1晩に、最高5時間6.3kmの飛翔が可能であることがわかった。アクトグラフを用いた実験では、既交尾メスは未交尾メスに比べ、夜間活発に動き産卵している

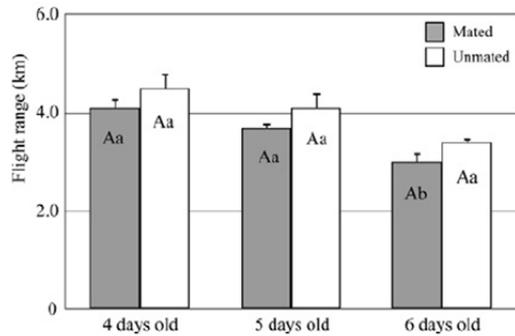


図4 タマナギンウワバ推定飛翔距離

ことがわかった。これらの結果より、交尾前後でメスの体力に大きな差はないが、交尾を終えたメスは寄主植物の探索と産卵のために活発に動き回ることがわかった。その結果、メスが交信かく乱剤を施用した圃場外で交尾を行ない、圃場内に侵入して産卵を行なう可能性もあると考えられた。

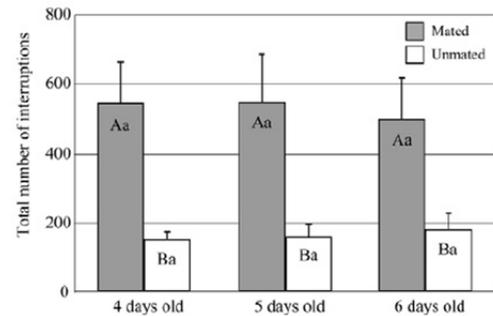


図5 交尾の有無と夜間の活動性

(3) コンフューザーV®の微量成分の欠如

本研究ではタマナギンウワバに特化した新規交信かく乱剤を作成し、その防除効果をコンフューザーV®と比較した。コンフューザーV®にはタマナギンウワバの性フェロモンのうち主要2成分のみが含まれているが、新規交信かく乱剤には4成分すべてが含まれており、メス成虫が放つ性フェロモンに近くなっている。野外試験の結果、新規交信かく乱剤処理区内に設置した性フェロモントラップにはオス成虫がほとんど誘殺されなかった。また、新規交信かく乱剤を用いると

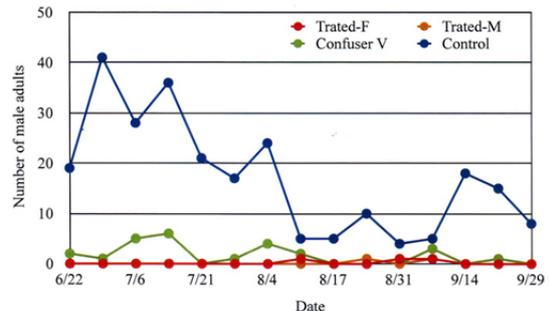


図6 かく乱剤の種類と誘引数の違い

一晩当たりのメス交尾率が 0 %を示し、圃場での幼虫発生数も低下したことから、本剤はコンフューザーV®に比べタマナギンウワバに対する防除効果が高いと考えられた。この結果より、コンフューザーV®にはタマナギンウワバの性フェロモンのうち微量 2 成分が欠如していることが防除効果の低下に起因していると示唆された。

(4) 性フェロモン成分解析

本研究では GC-EAD を用いてコンフューザーV®の各成分に対する触角の反応性を調べた。その結果、オス成虫は自身の性フェロモン成分以外にコナガ用およびハスモンヨトウ用の性フェロモン成分に強く反応することがわかった。さらに、これらの成分が本来のタマナギンウワバの性フェロモン成分

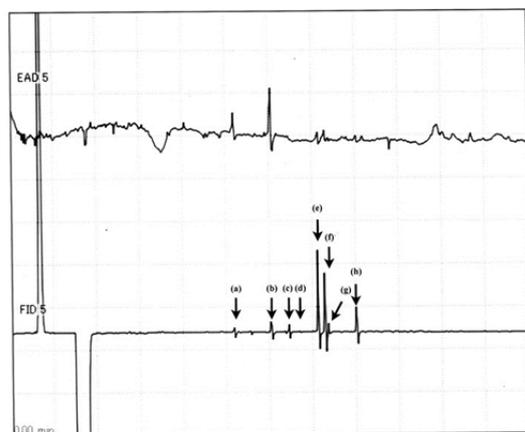


図7 かく乱剤の成分とオスの反応

に加わると、オス成虫の誘引性は低下し、交尾率は上昇することがわかった。これらの結果より、コンフューザーV®を処理した環境において、オス成虫はメス成虫が放つナチュラルの性フェロモンとコンフューザーV®が放つ疑似の性フェロモンを区別できるため、本物のメスを見つけ出し交尾に至ることができないのではないかと考えられた。

Table 4-4. Mating rate of *A. nigrisigna* females set out in pheromone treated and untreated field.

Area	Number of examined females	Mated	Unmated	Escape	Mating rate (%)
Treated-F	44	0	44	0	0 a
Treated-M	44	13	30	1	30.2 b
Control	44	35	7	2	83.3 c

Values followed by different letters are significantly different (χ^2 test, $p < 0.01$).

以上の検証結果をまとめると、既交尾メス成虫の活動性の向上とコンフューザーV®の成分に対するオス成虫の反応性の低下が、コ

ンフューザーV®を施用した環境でタマナギンウワバが発生する要因に大きく関与するものと考えられた。

Table 5-1. Mean mating rates of *A. nigrisigna* females in the sex pheromone treated cages.

Treatment	No. of moths per cage (♀×♂)	Replication	Mean mating rates (%)
Hexane (Control)	10 × 10	5	88 a
(A)	10 × 10	5	8 b
(B)	10 × 10	5	24 c

Means followed same letter are not significantly different at the 5% level by Tukey-Kramer's HSD test. (A): *A. nigrisigna* pheromone. (B): Z11-16Al, Z9E11-14Ac and *A. nigrisigna* pheromone.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Hashiyama A., Nomura M., Kurihara J. and Toyoshima G. (2013) Laboratory evaluation of the flight ability of female *Autographa nigrisigna* (Lepidoptera: Noctuidae), measured by actograph and flight mill, Journal of Economic Entomology 106: 690-694. 査読有り
- ② 橋山 葵・野村昌史・栗原潤・豊嶋悟郎 (2012) 交信かく乱剤を施用したレタス圃場におけるキンウワバ類の発生数および種構成について, 食と緑の科学 66:11-16. 査読有り
- ③ Hashiyama A, Nomura M., Kurihara J, Toyoshima G (2011) Application of molecular techniques to the identification of three plusiine species, *Autographa nigrisigna*, *Macdunnoughia confusa* and *Thysanoplusia intermixta* (Lepidoptera: Noctuidae) found in IPM lettuce fields in Japan, Journal of Economic Entomology 104, 1280-1285. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① 橋山 葵・野村昌史・栗原潤・豊嶋悟郎 (2013) 交尾の有無によるタマナギンウワバメス成虫の飛翔活動の違い, 第 57 回日本応用動物昆虫学会講演要旨集, 40 2013 年 3 月 28 日、日本大学生物資源科学部 (湘南キャンパス) で発表

- ② 橋山 葵・野村昌史・栗原 潤・豊嶋悟郎
(2011)成分の異なる2タイプの交信かく
乱剤によるタマナギンウワバへの防除
効果, 農林害虫防除研究会講演要旨
2011年6月10日山口県教育会館で発表

〔図書〕(計1件)

- ① 野村昌史・橋山 葵(2010)フェロモンに
よる発生予察法(分担執筆), タマナギ
ンウワバ, pp. 65-69.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 昌史 (NOMURA MASASHI)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号: 50228368

(2) 研究分担者

中牟田 潔 (NAKAMUTA KIYOSHI)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号: 70343788