

5-1 コナガの薬剤抵抗性生物検定法

5-1-1 はじめに

コナガでは、基幹防除剤であるジアミド剤に対して抵抗性を発達させた個体群が出現して、防除が困難となりつつある。コナガのジアミド剤に対する抵抗性を早期に把握できる遺伝子診断法が開発され検定が容易になったが、当該個体群・地域で抵抗性レベルが高い場合は、代替薬剤の使用が必要になる。それら代替薬剤に対する抵抗性の検定は、依然として生物検定に頼らざるをえない。生物検定においては、方法により結果が異なることがあるため、統一された方法で検定を行う必要がある。本稿では、標準的な生物検定法について紹介する。

5-1-2 供試虫の入手と飼育

(1) 供試虫の入手方法

コナガ *Plutella xylostella* Linnaeus はアブラナ科圃場より採集する。成虫を採集すれば寄生蜂に寄生されている心配はないが、採集効率が低く採集後の移送や取り扱いにも注意が必要であることから、通常は幼虫、蛹を採集する。ただし、寄生されている場合が多いため、可能な限り多くの個体数を採集する。幼虫であれば3~4齢が扱い易いが、若齢の場合は寄生葉ごとサンプリングする

(1齢幼虫は潜葉している)。いずれの場合も次世代を得、齢期を揃えて検定に供するが、個体群の感受性レベルを適正に捉えるためにも、圃場内の複数個所から可能な限り多くを採集する。少数しか採集できなかった場合はF-2以降の世代を検定に供試することになるが、個体群としての感受性を必ずしも反映しない可能性があることを考慮しておく。

(2) 種の識別方法

幼虫で採集する際、アオムシ、ヨトウムシ類、ウワバ類と混発している場合が多いが、これらとは形態および刺激に対する反応の違いにより容易に区別できる。近縁にヒロバコナガ *Leuroperna sera* Meyrick があるが、薬剤で防除されている圃場での発生頻度は極めて低い。成虫の上翅の幅と斑紋が異なるので、雑草地や無農薬栽培圃等で採集した個体群では、念のため羽化時に確認しておく。「野菜害虫発生予察用フェロモントラップに混入する非標的チョウ目昆虫識別の手引」(農研機構, 2017) も適宜参照すると良い。

(3) 供試虫の累代飼育法

通常は根本（1991）に記載されているカイワレダイコンを用いた方法で累代飼育が可能である。しかし、野外採集の場合、個体群によってはカイワレダイコン実生が餌として適さず、累代飼育が難しいことがある。このような場合、パクチョイ葉を与えることで飼育・維持が良好となる事例がある。

5-1-3 幼虫に対する飼料（葉片）浸漬法

(1) 検定の準備

1) パクチョイ葉片の準備：温室内ポットや露地で5-6葉期以上にまで生育させたパクチョイ（品種：白茎優愛菜）から十分に展開した葉を切り取る。調査期間が長期になることがあるので、葉肉が厚く緑色の濃い日持ちする葉を選ぶ。直径7 cmの金型により葉をくり抜き、円形の葉片を試験に必要な枚数用意する。均一な大きさへの調整と浸漬処理作業が煩雑でないこと、食害程度を調査し易いことを充たしていれば、円形の葉片に固執する必要はない。また、作物種も他のアブラナ科で代用可能であるが、個体群によっては硬化したキャベツ葉での生存率が低い場合があり、ここではパクチョイを選択した。なお、足立（1997）の方法では5×5 cmのキャベツ葉片が採用されている。



図1 葉片をくり抜く

2) 薬液と検定容器の準備：薬剤は市販の製剤を用い、展着剤（マイリノー10000倍など）を加用した水道水を用いて所定濃度に段階希釈し、検定用薬液を調製する。併せて、葉片を浸漬するためのガラスビーカー（またはプラスチック製ディスポーサブルビーカー）を検定する薬剤ごとに準備しておく。検定容器はシャーレ（直径9 cm）を用いるが、葉片の乾燥を防ぐため水1 mlで湿らせた露紙（直径7 cm）を入れ、蓋をして試験区No.を記載しておく。

(2) 検定の手順

1) 浸漬処理：浸漬用の容器に薬液と葉片を投入して約 20 秒間浸漬処理する。処理中は容器を振って、葉片の両面に薬液が均一に付着させる。コントロール区の葉片は、展着剤を加用した水道水に同じ手法で浸漬する。処理後、容器から葉片をピンセットで取り出し、ペーパータオル（新聞紙等でも代用可）上に置いて風乾する。異なる薬剤を同時に検定する場合は、薬剤数分のピンセットを用意するか、1 薬剤の処理が終わるごとにピンセットを洗浄する。葉片の片面（上面）が乾いたら裏返して両面ともに風乾する。濡れた状態のまま試験に供試すると、供試虫の歩留まり低下（水滴での溺れ等）や、作物の劣化が早まる等の影響が出るので注意する。葉片が乾いたら湿らせた露紙を敷いたシャーレに 1 枚ずつ入れる。

2) 供試虫の接種と保管：検定には採集次世代の極力 3 令脱皮後 1 日以内の幼虫を供試する。飼育容器から幼虫をバット等に広げ、3 令脱皮後摂食の進んでいない幼虫を選び、面相筆を用いてシャーレ当たり 10 頭ずつ接種する。3 令後期の幼虫を供試するとベンゾイル尿素系 IGR 剤に対する感受性を正しく評価できない場合があるので注意する。接種を終えた容器はひとまとめにして、個体群名（採集地と採集日）が分かるように記載し、一定の温湿度・日長条件（25℃、60～70% RH、16L8D が望ましい）の恒温室または恒温器内に静置する。

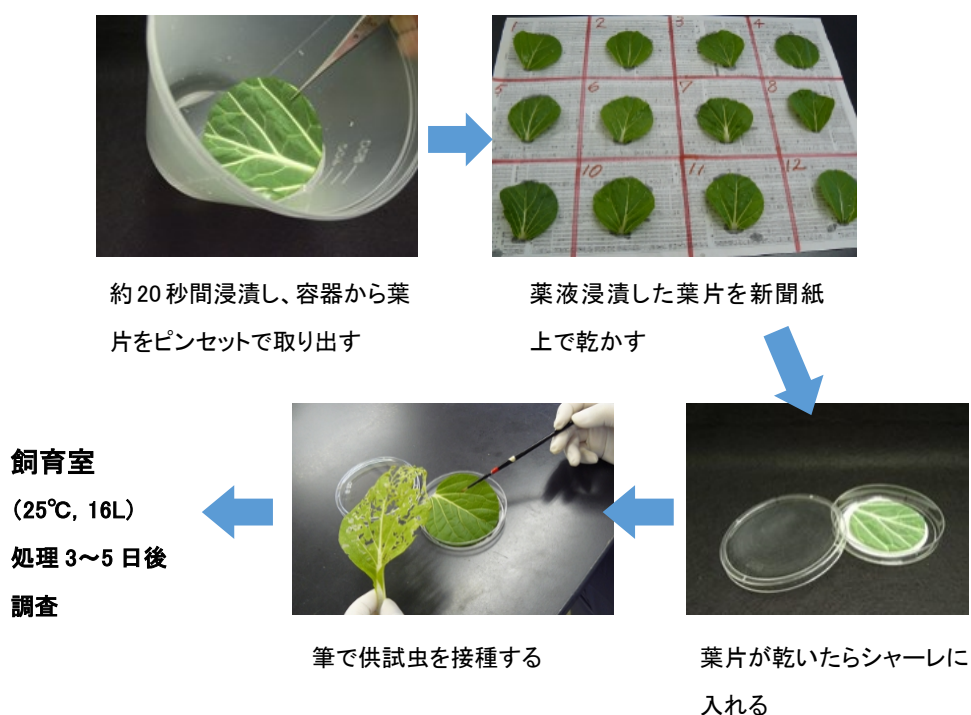


図 2 幼虫に対する葉片浸漬法

3) 調査と結果の解析：処理 3～5 日後に生存虫、異常虫、死亡虫を計数し、コントロール区の死亡率から Abbott (1925) の補正式を用いて各区の補正死亡率を算出し、各薬剤の殺虫活性を数値化する（薬剤の作用特性に応じて、予め観察期間や異常虫の判定基準を設定しておく）。供試虫が十分に確保できた場合には、各薬剤について殺虫活性が認められなくなる低濃度まで供試濃度を増やし、Bliss (1935) のプロビット法により半数致死濃度 (LC₅₀ 値) を算出する。虫数調査に併せ、食害程度を食害面積率のグレード評価（例えば、- : 0%, ± : 1-5%, + : 6-10%, ++ : 11-25%, +++ : 26-50%, ++++ : 51-75%, +++++ : 75-100% の 7 段階）で調査しておく。薬剤の作用性によっては死亡率と食害抑制効果が相関しない場合があるため、接触毒の強い薬剤や忌避剤等の場合は死亡率のみを注視せず食害程度も十分考慮の上考察する。

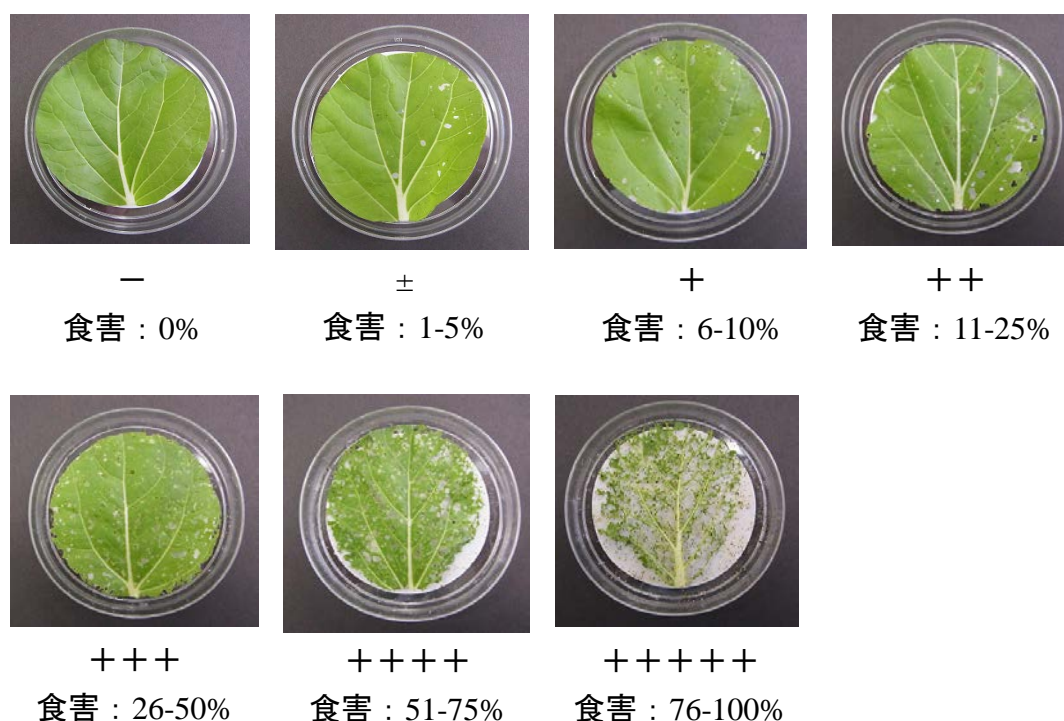


図 3 食害程度を食害面積率のグレード評価

生存虫、異常虫、死亡虫の数および食害程度を調査する

(3) 検定手法の特徴と問題点

本検定法の特徴として簡便性が挙げられる。特別な器具・機器を必要とせず、作物さえ準備しておけば、短期間で対象個体群の薬剤感受性を把握することができる。一方で、葉片への有効成分の付着量や供試虫の摂食・接触による取り込み量は一定に制御できないため、別途実施された試験結果との絶対的な比較には注意が必要となる。この点、局所施用法は供試虫の体重当たりの処理薬量が定量的であるため、異なる試験機関、異なる年次で実施された検定結果を直接比較することが可能である。ただし、マイクロアプリーターを用いた処理が必要となり、防除現場に速やかにフィードバックするには技術的な習熟が必要となる。また、溶媒を用いた経皮的な活性のみを評価するため、実製剤での防除効果を必ずしも反映しない場合がある。特に、近年開発された殺虫剤は経皮よりも経口活性の強いものが多く、このような剤の実圃場での防除効果を予測することを目的とする場合には、実製剤を用いて経口活性も評価できる葉片浸漬法が適していると考えられる。標準的な感受性系統を併行して検定に供試することを習慣づけておくと、別途実施された検定結果との差についても考察が可能になる。

5-1-4 結果の解析

コントロール区の死亡率に基づき Abbott (1925) の補正式を用いて各処理区の補正死亡率を算出し、各薬剤の殺虫活性を数値化する。供試虫が十分に確保できた場合には、供試濃度を増やし、Bliss (1935) のプロビット法により半数致死濃度 (LC50 値) を算出する。求めた値から抵抗性比を算出し、定点での感受性の季節的・年次的変動等の解析に用いる。また、感受性系統との正逆交雑や戻し交雑試験にも本検定法を活用すれば、抵抗性の遺伝様式を解析することが可能となる。

(執筆：藤岡伸祐)

文献

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18(2) :265-267.
- 足立年一. 1997. 植物貿易基礎講座 農業害虫および天敵昆虫等の薬剤感受性検定マニュアル(13) 野菜・花き害虫：コナガ. 植物防疫 51(9): 440-444.
- Bliss, C. I. (1935) The calculation of the dosage–mortality curve. *Ann. Appl. Biol.* 22(1): 134-167.
- 根本久 (1991) 昆虫の飼育法 (湯嶋健ら編) 日本植物防疫協会、東京、pp.113-115.

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（2017）野菜害虫発生予察
用フェロモントラップに混入する非標的チョウ目昆虫識別の手引.

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078755.html