

イネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアル



平成 28 年 12 月



九州沖縄農業研究センター

目次

1. はじめに	2
2. 感受性検定手法の種類と特徴	
1) 幼苗・葉しょう浸漬法	3
2) 微量局所施用法	3
3) ピメトロジンの感受性検定法	3
3. 供試虫の採集と飼育	
1) 供試虫の採集方法	4
2) 種の識別	5
3) 累代飼育法	6
4. 供試薬剤と薬液の準備	10
5. 微量局所施用法	
1) 微量局処施用装置（バーカード等）を用いた方法	11
2) ハミルトンの簡易器具を用いた方法	14
3) ピメトロジンに対する感受性検定	15
6. 結果の解析	
1) 薬液の換算（キャリブレーション）	18
2) プロビット法による半数致死薬量（LD ₅₀ 値）の算出	18
3) ピメトロジンに対する感受性検定における半数効果薬量（ED ₅₀ 値）の算出	18
参考文献	21
付録. 必要器具リスト	22

1. はじめに

トビイロウンカとセジロウンカはアジア地域の熱帯から温帯にかけて広く分布する。これら 2 種の寄主植物はイネ（一部野生イネを含む）に限られており、休眠性を持たず耐寒性も低いことから、冬にイネがなくなる温帯地域では周年発生できない。ベトナム北部や中国の海南島付近が周年発生できる北限にあたる。日本のような周年発生できない地域では、周年発生できる地域から、梅雨時期に吹く南西の風に乗って毎年飛来して発生を繰り返す。日本に飛来したトビイロウンカやセジロウンカは、秋にイネが収穫された後には寄主植物がなくなるため、日本では越冬できない。また、秋に南方向に吹く風は台風以外には頻度が少ないため、日本から中国南部やベトナム北部の周年発生地への「戻りの移動」はめったに起こらないと考えられている。

一方、ヒメトビウンカは上記 2 種と異なり、イネ以外にもイネ科作物や越年性のイネ科雑草など多くの植物を寄主として利用できる。また、幼虫態で休眠するため温帯地域でも越冬できる。日本では北海道まで広く分布して周年発生している。このため、ヒメトビウンカは国をまたぐような長距離移動は普通は起こらないと考えられているが、近年、6月上旬頃の麦刈りの時期に中国から大量に飛来する事例も確認されている。

一般的に、害虫に対する薬剤抵抗性は、ある場所で同じ薬剤を使い続けることによって発達する。しかし、イネウンカ類のような長距離移動性害虫では、飛来源で薬剤を多用することによって抵抗性が発達し、それが日本に飛来するという特徴がある。このような害虫では、飛来源で薬剤感受性を継続的にモニタリングするか、あるいは毎年日本に飛来したウンカの薬剤感受性を調査する必要がある。現在では前者については飛来源のベトナムや中国では継続的なモニタリングはほとんど行われていないため、日本に飛来する虫の感受性を検定する必要がある。

イネウンカ類の薬剤感受性の検定手法については、次項に解説するように半数致死薬量（LD₅₀ 値）や半数効果薬量（ED₅₀ 値）を求める方法と半数致死濃度（LC₅₀ 値）や半数効果濃度（EC₅₀ 値）を求める方法がある。LD₅₀ 値や ED₅₀ 値を用いることによって、異なる年代や場所で得られた感受性データを直接比較することができる。これに対して、LC₅₀ 値や EC₅₀ 値については同時に試験した感受性系統の値との比較しかできない。このため、実用濃度での効果試験等ではなく感受性の変動を調べることを目的とする薬剤感受性検定においては、LD₅₀ 値や ED₅₀ 値を求める手法が確立されている薬剤では、極力その手法で感受性検定を行うべきである。

本マニュアルでは、LD₅₀ 値や ED₅₀ 値を求めることができるイネウンカ類の薬剤感受性検定法と、感受性検定を行う際に必要な供試虫（ウンカ）の採集法や飼育法について解説する。

2. 感受性検定手法の種類と特徴

1) 幼苗浸漬法、葉しょう浸漬法

イネの幼苗や葉しょうを、濃度を変えた薬液に浸漬し、風乾した後に供試虫を放飼して、一定時間後の死亡率を調査する方法。比較的簡単な手法であるため国内外で古くから行われているが、半数致死濃度 (LC₅₀ 値) しか算出できないため、異なる年代や異なる場所で行われた試験データを直接比較することが困難である。現在は次項の微量局所施用法がイネウシカ類の薬剤感受性検定の標準的手法となっているため、微量局所施用法では検定が不可能な昆虫成長阻害剤(IGR 剤)の場合にのみ、この手法を行うことが望ましい。

2) 微量局所施用法

バーカード社の微量局所施用装置などを用いる方法である。局所施用装置は比較的高価であるが、半数致死濃度ではなく半数致死薬量 (LD₅₀ 値) が算出可能であり、イネウシカ類の標準的な薬剤感受性検定法として国内外で古くから使われている。安価な小型ディスペンサーを用いた簡易検定法も確立されている(Sanada-Morimura and Matsumura, 2011)。ただし、この手法では、ブプロフェジンなどの昆虫成長阻害剤(IGR 剤)やピメトロジン剤などのように致死効果が明瞭に表れない薬剤の感受性を検定することができない。

3) ピメトロジンの感受性検定法

ピメトロジンはウシカ類の吸汁行動を阻害するものの殺虫効果が不明瞭なため、ウシカ類の薬剤感受性検定において標準的な手法である微量局所施用法による半数致死薬量 (LD₅₀ 値) が算出できない。これまで IRAC (Insecticide Resistance Action Committee、薬剤抵抗性対策委員会) では、葉しょう浸漬法によって成虫に薬剤を施用したのちにイネ苗に産卵させて次世代孵化幼虫数を数える手法が提唱されている (No.005)。しかしこの方法では半数効果濃度(EC₅₀ 値)は算出できるものの半数効果薬量(ED₅₀ 値)が算出できない。そこで九州沖縄農業研究センターでは、微量局所施用法と次世代幼虫数の抑制効果とを組み合わせる半数効果薬量(ED₅₀ 値)を算出する、ピメトロジンの感受性検定法を新たに開発した。

3. 供試虫の採集と飼育

1) 供試虫の採集方法

- ・トビイロウンカ、セジロウンカでは、可能な限り飛来世代の成虫を採集するのが望ましい。
- ・トビイロウンカについては飛来世代の飛来数が少ないため、採集困難な場合には増殖世代を採集してもかまわない。
- ・採集数は多いに越したことはないが、最低でも1個体群で雌50頭を目標とする。増殖世代の虫を採集する場合でも、成虫を採集することが望ましい。増殖世代の虫を採集する際には、圃場内の広い範囲から偏りなく採集する。
- ・採集は薬剤を使用していない水田で行う。
- ・採集は、捕虫網を用いたすくい取り法（図1）や、白色トレーに払い落としたあとに吸虫管を用いて供試虫を吸い取って集める（図2）。
- ・野外から採集したウンカには、カマバチ（図3）やネジレバネなどの寄生性天敵に寄生されている個体がある。採集後、室内においてこれらの天敵に寄生されている個体は完全に除去することが望ましい。
- ・採集時にクモやカタグロミドリカスミカメ（図4）などの捕食性天敵が紛れ込むと累代飼育の際に増殖率が低下する原因となるので、注意深く取り除く。



図1. 捕虫網によるすくい取り



図2. 吸虫管による吸い取り



図3. カマバチの幼虫が寄生したトビイロウンカ



図4. 卵を捕食するカタグロミドリカスミカメ

2) 種の識別

- ・トビイロウンカ、セジロウンカ、ヒメトビウンカの3種について、他種が混入しないように注意深く選別する。
 - ・選別のポイント (図5)
 - ①トビイロウンカ：茶色～黒褐色で背に少しテカリがある。翅もわずかに茶色。
 - ②セジロウンカ：背中に白いすじが特徴。全体的に白っぽい。
 - ③ヒメトビウンカ：雌は茶色～褐色でトビイロウンカに似るが、体サイズは小さくテカりは無い。翅はトビイロウンカに比べ白い。雄は背と目が黒色。
- ※より詳しい見分け方は宇根ら(1989)などを参照されたい。



図5. トビイロウンカ (上段)、セジロウンカ (中段)、ヒメトビウンカ (下段) の雌成虫 (左)、雄成虫 (中)、幼虫 (右)

3) 累代飼育法

イネウンカ類の薬剤感受性検定の際には、多くの供試虫が必要である。例えば 1 薬剤の感受性検定でも長翅型の雌成虫が 250 頭程度必要となる。このため、採集したイネウンカ類を室内で累代飼育し、個体数を増やす必要がある。なるべく、幼虫の密度を高いまま飼育を効率よく行うことにより、多くの長翅型の供試虫を得ることができる (図 6)。



図 6. 高密度条件下で飼育したヒメトビウンカの幼虫

①飼育環境

- ・飼育は一般的な恒温室や恒温槽で行う。
- ・飼育温度は 25℃、16 時間日長 (明期 16 時間、暗期 8 時間)。
- ・湿度は 70~80%に保つのが望ましい。過湿になりやすい場合には、除湿器を入れるなどして湿度を下げる。

②飼育容器とイネ芽出し苗の準備

- ・飼育容器は「ツマグロヨコバイ大量飼育箱」などの容器 (図 7) を用いる。
- ・事前に 3~4 日間水に浸漬して鳩胸状態になったイネ種子を用いる。鳩胸状態のイネは 5℃の冷蔵庫で 2~3 週間保管可能である。
- ・飼育皿に、水で湿らせてほぐしたピートモス (手で強く握ると、一握りの塊がすぐに崩れない程度) を敷き詰め、皿の高さ (厚み) ぎりぎりまで満遍なく押し固め、水を十分に注ぐ (水が表面にしみ出てこない程度) (図 8)。
- ・資料皿あたり 100g 程度の種子を播種する (図 9)。播種量を十分にすることで、飼育の際の増殖率を高めることができる。播種後、さらに水を、ピートモスの表面にうっすらとしみ出て、種子の下部が浸る程度まで注ぐ。皿を傾けるとこぼれ出る場合があるため、恒温室等に設置してから、如雨露などで水を注ぎ入れる。
- ・播種後はアクリルケース (図 9 のものは特注) を被せ、25℃、16 時間日長の恒温室で保管する (図 10)。保管するには、ウンカ類の飼育ケージ等とは別の恒温室に保管して、ウンカ類がイネ芽出し苗に混入しないようにする。ピートモスの表面が白っぽく乾燥しないように適宜水やりをする。

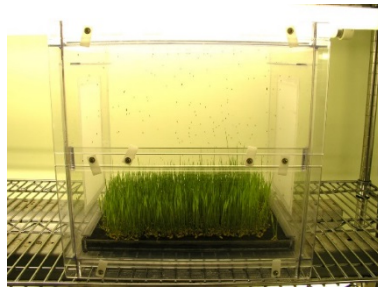


図 7. ツマグロヨコバイ大量飼育箱



図 8. 飼育皿にピートモスを敷き詰めて水を十分に注ぐ

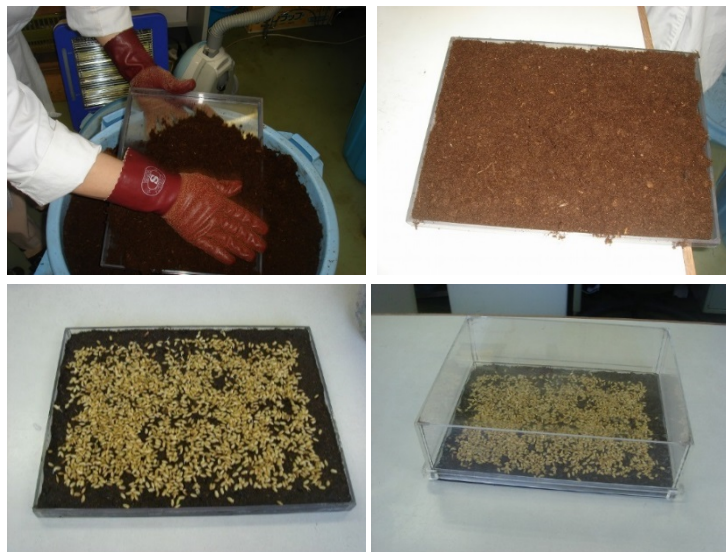


図 9. 鳩胸状態に催芽したイネ粃を播種し、アクリルケースを被せる



図 10. 播種後は恒温室内の蛍光灯下に置く

③飼育サイクル

- ・播種後 5～10 日の芽出し苗を飼育に使用する。
- ・芽出し苗を入れた飼育箱に十分な量の成虫を入れ、7 日間産卵させる（図 11）。
- ・産卵開始から 7 日目に成虫を掃除機等で吸い取って除去し、苗を水道水で洗浄する。
- ・産卵終了から 7 日目にふ化幼虫がたくさん出てきたら、産卵時の芽出し苗を取り除き、新しい芽出し苗を入れる。
- ・その後 1 週間に 1 回、餌を交換する。
- ・餌を交換する際には、飼育箱を傾けて虫を箱の後方に払い落とした後、古い芽出し苗を引き抜いて新しい芽出し苗を入れる（図 12）。餌交換の際に一部の虫が逃げ出すこともあるが、1 箱換えるごとに掃除機で丁寧に吸い取って処分し、種や系統間で虫が混ざらないようにする。

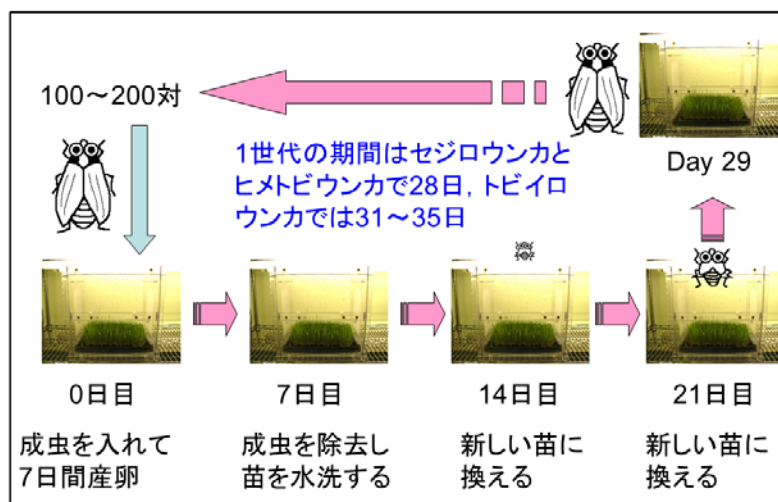


図 11. ウンカの飼育サイクル

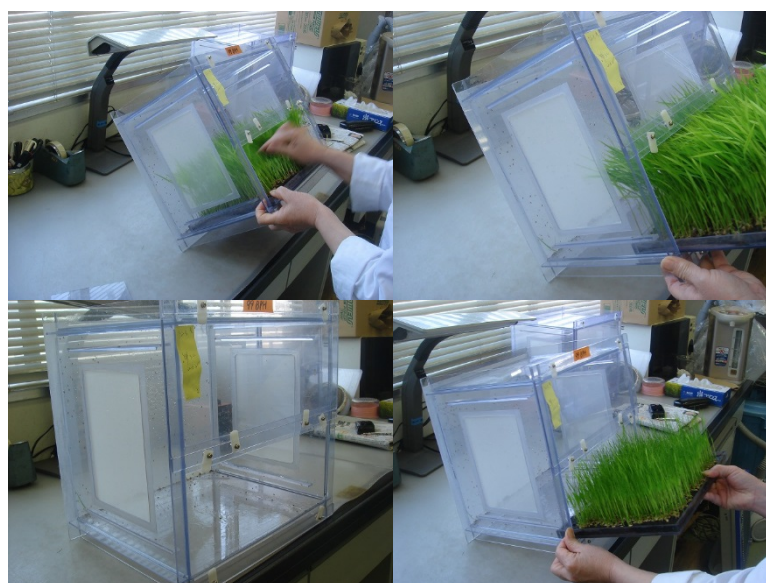


図 12. 餌の交換

④カビ防止

- ・湿度が高い恒温室での飼育では、昆虫病原性のカビが蔓延する場合がある。このため、飼育ケージ及びイネ芽出しは清潔に保つ必要がある。
- ・飼育ケージの洗浄時には塩素系漂白剤などで除菌する。
- ・産卵させたイネ芽出しは、産卵開始後 7 日目で成虫（生存虫及び死骸）を除去し、イネ芽出しの先端まで水がかぶるような大きめの洗浄用タッパに入れ、流水下で十分に洗浄する。カビが多発生している場合、特に密集しているイネ芽出しの根元も十分に洗浄し、死骸が残らないよう注意する。
- ・ピートモスがある程度流出するため、幼虫がふ化してくる約 7 日目後（産卵開始から 14 日目）までは乾燥に注意して水やりを行う（ただし、水のやり過ぎはカビの発生を助長するので避ける）。
- ・幼虫期にカビが発生した場合は、殺菌剤（アゾキシストロビン剤・TPN 剤など）をイネ芽出しの水やりの際に使用する。また、イネ芽出しを頻繁に替える、健全幼虫を新しいケージに吸虫管で移す（同じ飼育ケージを長期間使用しない）、恒温室の湿度を低めに保つことで対処する。

<注意>

一度カビが発生してしまうと完全な防除が難しいため、飼育ケージの除菌、産卵イネ芽出しの洗浄については、カビが発生していなくても通常の作業として行い、カビの発生を予防することが重要である。

4. 供試薬剤と薬液の準備

- ・薬液の保存瓶（0～10番、必要に応じ11番以降も作る）にラベルを貼る。
- ・薬液の保存瓶（0番、1%）に原体 25mg 前後を正確に秤量する。ピメトロジン剤は溶解しづらい薬剤なので、薬液の保存瓶（0番、0.02%）に原体 2mg 前後を秤量する。
- ・秤量した原体が1%となるようにアセトンを加えて原体を溶かす（25mg なら 2.5ml）。ピメトロジンの場合は、0.02%となるようにアセトンを加えて原体を溶かす（2mg なら 10ml）。
- ・1～10番の保存瓶にアセトンを 1ml ずつマイクロピペッターで入れる。
- ・0番の瓶から薬液を 1ml とり、1番に移す。移した後、ゆっくりと薬液を吸い込んで戻し薬液とアセトンを 2～3 回ほど攪拌して、濃度を希釈する。
- ・1番→2番、2番→3番、と同様の作業を繰り返して、段階希釈液を調製する。
- ・他の薬剤を調製するときにはマイクロピペッターのチップを交換して、薬剤間のコンタミネーションを防ぐ。
- ・使用後は薬液瓶のまわりにパラフィルムを巻いた上で、-20℃程度で冷凍保存する。希釈した薬液の保存期間の目安は概ね 6 ヶ月までとし、それ以上経過した場合には新たに薬液を作成する。

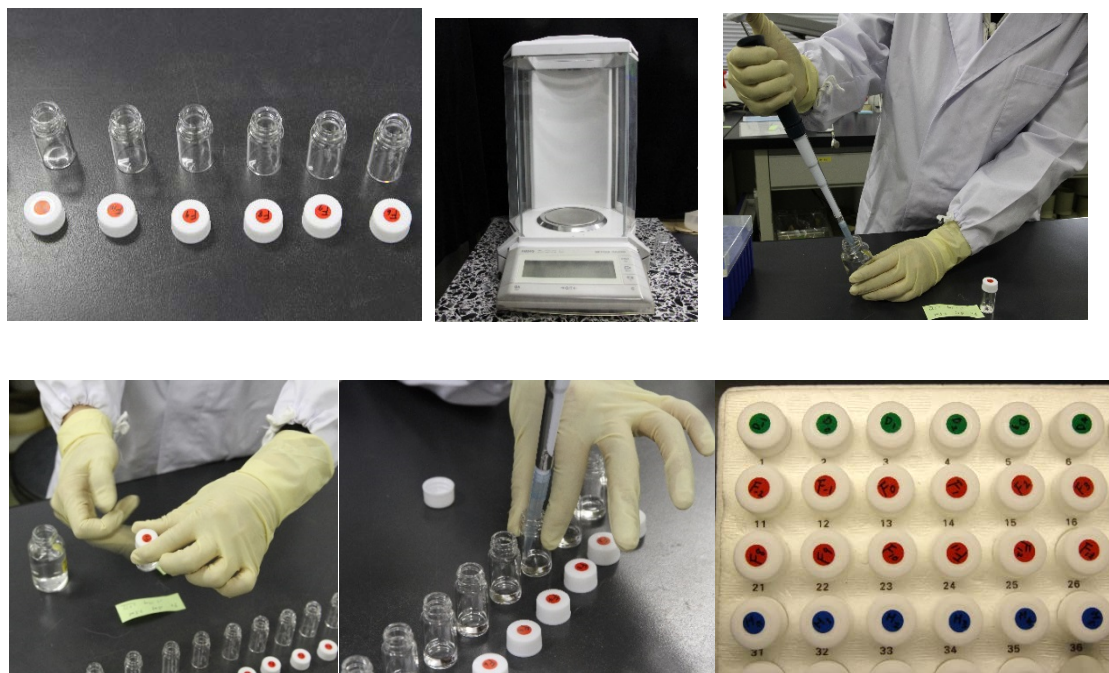


図 13. 薬液の準備

5. 微量局所施用法

1) 微量局所施用装置（バーカード等）を用いた方法

①施用後の虫の飼育容器の準備

- ・局所施用後に供試虫を1~2日保管しておくために、芽出し苗をティシュペーパーで巻いて湿らせ、透明アクリル容器に入れる（図14）。この時の芽出し苗は播種後7-10日程度のもので、一つのアクリルケージには苗を15-20本束ねてティシュペーパーで巻いたものを一つ入れる。必要であれば、ケージ内に芽出し苗が収まるように、イネの葉を切断して、その長さを調整する。



図14. 飼育用の餌の準備

②虫の準備

- ・成虫羽化後5日目以内の個体を準備する。
- ・長翅型の雌成虫のみを15頭ずつ吸虫管で集めて、両切りガラス管など（図15）に入れる。
- ・供試虫の生体重を測定しておく（あとのLD₅₀値の計算に使う）。15頭程度をまとめて1回測って割り算すればよい。
- ・局所施用処理の直前に炭酸ガス（図14）をガラス管内に充満させ十分に麻酔をする（15リットル/minで5-10秒）。セジロウンカは覚醒しやすいので少し長めに炭酸ガスを暴露させて麻酔をする。



図15. 両切りガラス管（左）と炭酸ガスポンペ（右）

③薬液の処理

- バーカードの局所施用装置（図 16）には 50 μ l のマイクロシリンジを装着する。1 回転の目盛りは大きい方から 2 番目に合わせる。このときの薬量は 0.083 μ l となる。
- 薬液をマイクロシリンジに 10 μ l 程度吸い上げる。この時、シリンジ内に気泡が入らないようにゆっくり薬液を吸い上げる。
- シリンジをセットした後、シリンジの針の先端から薬液が出てくることを確認する。
- 最初はアセトンのみで対照区で薬液処理を行い、その後、薬剤を 5～6 濃度の段階で施用し、薄い濃度の処理区から順に薬液処理する。各処理区（濃度）で繰り返しは 3 程度行う（15 個体×繰り返し 3）。薄い濃度の順に処理するため、処理区ごとにシリンジを洗浄する必要はない。
- 処理した虫は、繰り返しごとに飼育容器に入れる（15 個体/容器）。
- 施用する 5～6 濃度の幅は、薬剤の種類や供試する虫個体群がその薬剤に感受性か抵抗性かなどの情報を考慮して選定する。過去に参考となるデータがある場合は、おおよそ半数程度の虫が死亡する濃度を中程度の濃度の処理区とし、濃い方と薄い方の濃度に、それぞれ処理区を選定する。参考となるデータが無い場合は、本試験の前におおよその濃度の幅がわかるように、以下のような前試験を行うことを推奨する。
- できるだけ広い範囲の濃度段階で薬液を処理し（繰り返しは 1 のみ）、24 時間後の死亡率を確認する。全ての個体が死亡しているような濃い濃度や、全ての個体が生存している薄い濃度を除外し、半分程度死亡している濃度を、中程度の濃度の処理区となるように、濃度段階を選定する。



図 16. 局処施用処理

④シリンジの洗浄

薬液の処理が完了し、シリンジを保存ケースに戻す場合、あるいは同じシリンジを用いて他の薬剤で続けて処理を行う場合は、以下の手順で、できるだけ速やかに使用したシリンジをアセトンで十分に洗浄する。

- ・薬液を完全にシリンジから排出し、シリンジの先端の外側をアセトン（パスツールピペットなどを利用）で十分に洗い流す。
- ・シリンジの内部を洗浄するため、押し出し棒（プランジャー）を取り外し、棒全体をアセトンで洗浄する。
- ・シリンジの先端とは反対側の穴に数滴のアセトンを垂らし、押し出し棒の先端で穴を突くようにしてアセトンを内部に注ぎ込み、最後に押し出し棒を入れて先端から排出する。これを数回繰り返す。
- ・押し出し棒を内部に戻し、アセトンをシリンジの最大量まで吸い上げ、排出する。これを 20 回程度繰り返す。

※必ずしもこの方法に従う必要はないが、これに準じた手法でシリンジ内部の薬液を完全に洗浄する。

⑤生死の判定

- ・薬液処理 24 時間後に虫の生死判定を行う。机上でアクリルケージを軽く叩いて、芽出し苗についた生存虫を叩き落とし、芽だし苗をケージ内部から取り出す。活発に飛び回る個体や、足が痙攣している苦悶虫の中でも壁にしっかり掴まっている個体を「生」、アクリルケージの底で死亡した個体や、転倒し自力で起き上がれない、または壁に掴まることができない苦悶虫の個体は「死」と判定する。
- ・24 時間後で効果があきまりしない薬剤（セジロウンカに対するフィプロニル剤など）では 48、72 時間後も観察する。この場合、24 時間後の結果確認では、イネの芽だしをケージから取り出さずに、ケージの底で死亡した個体のみ計数する。

2) ハミルトンの簡易器具を用いた方法

- ・微量局所施用装置は比較的高価なため、より安価な器具であるハミルトン社製のマイクロディスペンサー（図 17）を用いる方法である。
- ・この器具の場合には 10 μ l のマイクロシリンジを装着することで、ディスペンサーのボタンを 1 回押すことで 0.24 μ l の薬液を施用できる。
- ・薬液処理と処理後の観察は、微量局所施用装置を用いた方法と同様に行う。
- ・この方法では、ウンカ 1 頭あたりの薬液施用量が微量局所施用装置による方法の 0.08 μ l の約 3 倍となるため、アセトンのみを処理する対照区における死亡率がヒメトビウンカではやや高くなる傾向がある（図 18）。このため、この手法はトビイロウンカとセジロウンカにのみ適用することが望ましい。



図 17. ハミルトン社製（左）とパーカード社製（右）アプリケーター

ハミルトン社製アプリケーターに 10 μ l のシリンジを装着した簡易施用法：個体あたり最小施用量は 0.24 μ l。パーカード社製アプリケーターに 50 μ l のシリンジを装着した一般施用法：個体あたり施用量は 0.08 μ l。
ハミルトン社製の標準価格：US\$ 300、パーカード社製：US\$ 3,000

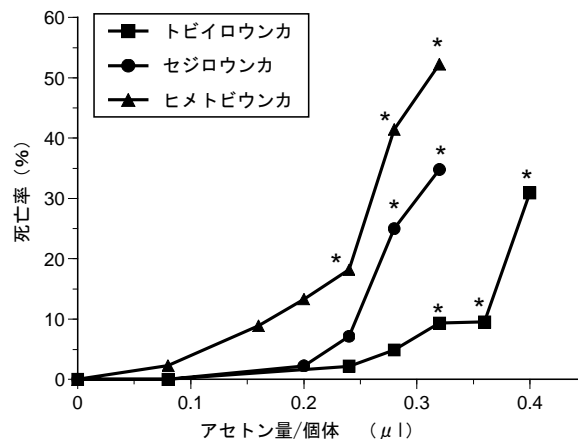


図 18. アセトン施用量に対する死亡率 (%)

死亡率は処理後 24 時間後の値。*：ダネットの多重比較検定 $P < 0.05$

3) ピメトロジンに対する感受性検定

①施用後の虫の飼育容器の準備

- 通常の微量局所施用法では処理後 24~48 時間の間飼育を行うのみであるが、本手法では、薬液を施用した雌成虫を施用後 1 週間産卵させ、さらにその苗を 1 週間程度保管するため、大型試験管（直径 3cm×高さ 30cm）を用いる。
- 播種 7-10 日後のイネ芽出し苗（室内光の植物培養器で育成）20 本をティッシュペーパーで根の部分を巻き（試験管の内側にぴったりとはまる程度の厚さにする）、イネ芽出し苗の根元から葉の先端まで 15cm のところでカットする（図 19）。イネ芽出し苗にはウンカ類に抵抗性を持たないジャポニカ種（うるち米）を用いる。一般にジャポニカ種はセジロウンカに対して殺卵作用を示すが、幼苗期にはその作用がほとんどみられないため（Suzuki et al., 1996）、本検定での使用に大きな問題は無い。育苗には粒径が大きめの育苗箱用床土を使用し、育苗箱（プラスチック容器）に厚めに床土を入れ（3cm 程度）、十分な光量（8,000lx 程度）で育苗する。ティッシュペーパーに巻く際には、根に着いた床土を全て洗い流してから使用する。
- このイネ芽出し苗を大型試験管に入れ、水あるいは 1%の液体肥料水をティッシュペーパーの上端まで（約 20ml）注ぎ入れる。ティッシュペーパーの上端を超えない程度に、十分に水分がいきわたるようにする。底部に気泡が残らないように注意する。
- 試験管の底の部分からティッシュペーパーの上部 2cm までに 1%寒天を溶かして注ぐ（図 20、図 21）。1%寒天は一端沸騰させて完全に寒天を溶解させた後、40℃まで温度を下げってから用いる。寒天を入れることで、水中落下による死亡やウンカが試験管の底に潜り込んでしまうことを防ぐことができる。
- 試験管に通気性のある蓋（メッシュ付シリコン栓やナイロンゴースなど）を被せる。ふたを被せる。

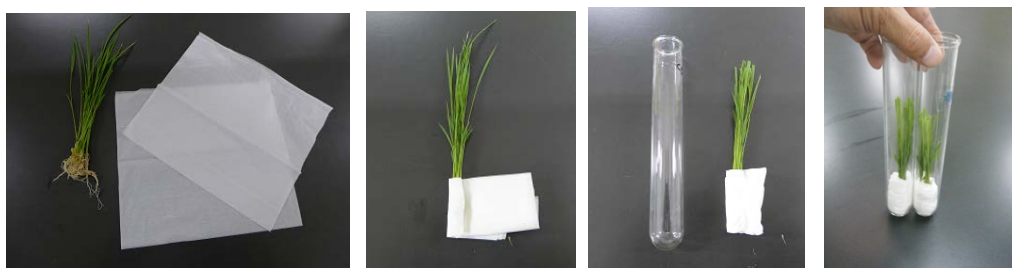


図 19. 飼育用の餌の準備



図 20. 注ぎこんだ寒天

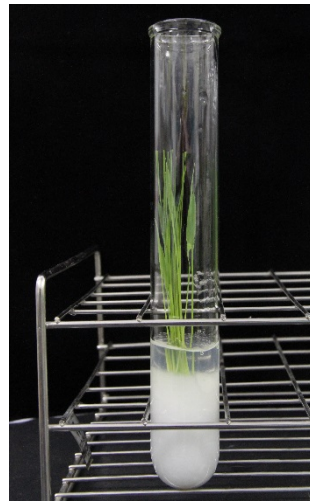


図 21. 飼育容器

②施用手順

- ・羽化 3 日以内の長翅雌成虫を通常の微量局所施用法と同様に、炭酸ガスで麻酔して、アセトンに溶かした薬液を微量局所施用装置で $0.08\mu\text{l}$ 塗布する。
- ・薬液は 5～6 濃度の段階で施用し、アセトンのみの対照区も用意する。1 濃度段階につき 4 反復とする。
- ・施用後に大型試験管に雌 5 頭と雄 3 頭（雄は薬液を施用しない）を入れ、7 日間産卵させる。各大型試験管に十分な光量（ $8,000\text{lx}$ 程度）が均等に当たるように、ある程度間隔を開けて試験管立てに設置する（図 22）。



図 22. 処理後の飼育容器は蛍光灯下に置いて十分な光量をあてる

③処理後の観察

- ・局所施用処理の 7 日後に、産卵を終えた成虫を除去して試験管と苗を洗浄し、その 8 日後にふ化幼虫を区毎に計数する（図 23）。

- ふ化幼虫を計数する際には、可能であれば目視で行うが、ふ化幼虫の数が多い場合や、数日後に計数したい場合などは、試験管に 50~70%エタノールを注入して固定後に、ガラスシャーレに移して計数する。
- ふ化幼虫は小さいため、拡大鏡を使用して脱皮殻などと誤認しないよう注意する。
- 孵化幼虫の計数に時間を要する場合、エタノールの蒸散と幼虫の劣化を防ぐために、試験管の口をパラフィルムで覆い、試験管を冷蔵庫もしくは冷蔵室に入れて保管する。



図 23. ふ化幼虫（左）と局所施用 15 日後の飼育容器（右）

6. 結果の解析

1) 薬量の換算 (キャリブレーション)

- ・以下の式を用いて、供試した薬液の濃度 (参照: 4. 供試薬剤と薬液の準備) を、薬量 (虫 1g あたりに塗布した薬剤の重さ ($\mu\text{g/g}$)) に変換する。

$$Y(\mu\text{g/g}) = \frac{a(\mu\text{l}) \times b(\%) \times 1,000}{100 \times c(\text{g})} = \frac{a(\mu\text{l}) \times b(\%) \times 10}{c(\text{g})}$$

$Y(\mu\text{g/g})$: 薬量 (虫 1g あたりに塗布した薬剤の重さ)

$a(\mu\text{l})$: 虫 1 個体に塗布した薬液の量 (参照: 5-1) -③薬液の量)

$b(\%)$: 薬液の濃度

$c(\text{g})$: 虫 1 個体の生体重 (g) (参照: 5-1) -②虫の準備)

※各項目の()内の単位に注意する。薬液の比重は 1 ($1\mu\text{l}=1\text{mg}$) とした。

2) プロビット法による半数致死薬量 (LD_{50} 値) の算出

- ・市販のソフトウェア Polo-Plus(Leora Soft)を用いてプロビット回帰を行い、 LD_{50} 値、その信頼限界と回帰直線の傾き(b)を算出する。

3) ピメトロジン検定における半数効果薬量 (ED_{50} 値) の算出

- ・対照区の平均ふ化幼虫数 (図 24) が、トビイロウンカとセジロウンカでおおよそ 100 頭、ヒメトビウンカでおおよそ 50 頭を超えない場合には、虫やイネの状態など実験条件に不具合があった可能性が考えられるため、実験をやり直す。
- ・濃度段階別の薬量 (対数変換) とふ化幼虫数 (幼虫数+0.5 を平方根変換) との関係を直線回帰して (図 25)、対照区の平均ふ化幼虫数の 50%が出現する薬量=半数効果薬量 (ED_{50} 値) を算出する。

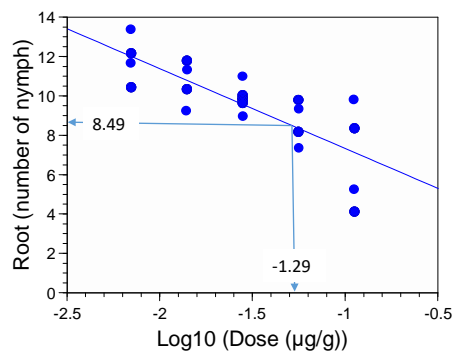
Kumamoto strain										
Conc. (ppm)	Dose ($\mu\text{g/g}$)	Log_{10} (Dose)	No. of nymphs				$\sqrt{\text{No. of nymphs}+0.5}$			
			Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4
0	0	-	150	144	122	160	-	-	-	-
0.2	0.007	-2.155	147	130	99	128	12.12	11.40	9.95	11.31
0.4	0.014	-1.854	135	127	111	117	11.62	11.27	10.54	10.82
0.8	0.028	-1.553	121	88	104	75	11.00	9.38	10.20	8.66
1.6	0.056	-1.252	95	77	84	120	9.75	8.77	9.17	10.95
3.1	0.112	-0.951	88	75	70	99	9.38	8.66	8.37	9.95
6.3	0.223	-0.652	59	64	32	67	7.68	8.00	5.66	8.19

対照区(0 ppm)の平均ふ化幼虫数を算出 $= (150+144+122+160)/4 = 144$

図 24. 対照区の平均ふ化幼虫の算出 ※数値は実測値ではない。

ED₅₀値の計算

- Log_{10} (薬量)を独立変数、 $\sqrt{\text{次世代幼虫数}}$ を従属変数として、回帰直線を算出。
- 対照区の $\sqrt{\text{次世代幼虫数の半数}+0.5}$ となる Log_{10} (薬量)から、ED₅₀値を算出。



$$f(x) = -4.0x + 3.3 \quad R^2=0.64, P<0.05 \text{ (直線回帰分析)}$$

$$\text{平方根変換}(50\% \text{ 対照区の子世代ふ化幼虫数}) = \sqrt{144+0.5}/2 = 8.5$$

$$8.5 = -4.0x + 3.3$$

$$x = -1.3$$

$$\text{Log}_{10}(X) = -1.3$$

$$X = 10^{-1.3} = 0.0501$$

$$\text{ED}_{50} = 0.050 \text{ (}\mu\text{g/g)}$$

図 25. ED₅₀ 値の計算のための回帰直線

- ・この手法を用いて算出したトビイロウンカの ED₅₀ 値は表 1 のとおりである (Tsujiimoto et al., 2016)。
- ・この手法はトビイロウンカのみならずセジロウンカ、ヒメトビウンカにも適用できる (真田ら、未発表)。

表1 本感受性検定法を用いたトビイロウンカ2系統のピメトロジンに対する薬量と次世代幼虫数との関係及びED₅₀値

薬液 濃度 (ppm)	1971年大阪採集系統					2011年熊本採集系統				
	薬量 (μg/g)	次世代 ¹⁾ 幼虫数	抑制率 ²⁾ (%)	ED ₅₀ 値(μg/g) (95%信頼限界)	回帰直線 の傾き(b)	薬量 (μg/g)	次世代 ¹⁾ 幼虫数	抑制率 ²⁾ (%)	ED ₅₀ 値(μg/g) (95%信頼限界)	回帰直線 の傾き(b)
0	0	214	-			0	144	-		
0.2	-	-	-	0.036	-7.0	0.007	129	10	0.091	-3.0
0.4	0.016	191	11	(0.014-0.079)	<i>p</i> <0.05	0.014	123	15	(0.018-1.652)	<i>p</i> <0.05
0.8	0.032	90	58			0.028	100	31		
1.6	0.063	89	58			0.056	95	34		
3.1	0.123	56	74			0.112	82	43		
6.3	-	-	-			0.223	44	69		

¹⁾ 試験管あたりの幼虫数

²⁾ 抑制率(%)=100×(無処理区の幼虫数－処理区の幼虫数)/無処理区の幼虫数

(農研機構九州沖縄農業研究センター 松村正哉、真田幸代、藤井智久)

参考文献

- 1) Matsumura, M. et al. (2008) Species-specific insecticide resistance to imidacloprid and fipronil in the rice planthoppers *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* in East and South-east Asia. *Pest Manag. Sci.* 64: 1115-1121.
- 2) Matsumura, M. et al. (2014) Insecticide susceptibilities in populations of two rice planthoppers, *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera*, immigrating into Japan in the period 2005–2012. *Pest Manag. Sci.* 70: 615-622.
- 3) 松村正哉 (2015) 日本に飛来するトビイロウンカとセジロウンカの薬剤感受性の長期的変動. *植物防疫* 69: 13-17.
- 4) Robertson, J. L. et al. (2007) *Bioassays with arthropods*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 5) Sanada-Morimura, S. et al. (2011) Current status of insecticide resistance in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*, in Japan, Taiwan, and Vietnam. *Appl. Entomol. Zool.* 46: 65-73.
- 6) Sanada-Morimura, S. and M. Matsumura (2011) Effect of acetone solution in a topical application method on mortality of rice planthoppers, *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera*, and *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zoology* 46: 443-447.
- 7) Suzuki, Y. et al. (1996) Ovicidal reaction of rice plants against the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera* Horáth (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 31: 111-118.
- 8) Tsujimoto, K. et al. (2016) A new method for monitoring the susceptibility of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), to pymetrozine by combining topical application and measurement of offspring number. *Appl. Entomol. Zool.* 51: 155-160.
- 9) 宇根豊・日鷹一雅・赤松富仁 (1989) 減農薬のための田の虫図鑑. 農文協.

付録. 必要器具のリスト

1) 微量局所施用処理

- ・薬液原体（純度 90%以上のもの） 必要量
原体は農薬メーカーから分譲してもらうか、市販の試薬を購入する。
- ・アセトン 1本
- ・微量局所施用装置（マイクロ・アプリケータ）1台
バーカード社 Arnold Hand Microapplicator ないし同等品 1台（約 20～30 万円）
http://www.burkardscientific.co.uk/agronomics/hand_applicator.htm
- ・マイクロシリンジ（50 μ l のもの 1本）
→針先を鈍角のものに交換する
- ・ハミルトンの簡易器具を用いた方法の場合には、上記 2 点の代わりに以下を準備する
ハミルトン社マイクロディスペンサー 1台
マイクロシリンジ（10 μ l のもの 1本）
→針先を鈍角のものに交換する
- ・薬液保存用バイアル瓶（6ml のスクリュウ管瓶）100 本入り 1個
- ・薬液保存用バイアル収納容器（6ml のバイアル瓶を保管するスチロール製ホルダー）1個
- ・薬液保存用バイアル用ラベル（薬液瓶に貼り付けるラベル 直径 mm）
- ・マイクロピペッター（1,000 μ l～1,500 μ l、チップの先が細い物）1本
- ・プラスチック漏斗（直径 7 センチ、高さ 13cm 程度）1個
- ・時計皿（直径 6 センチ）1個
- ・ガーゼ（時計皿を包む）適量
- ・炭酸ガス麻醉装置（炭酸ガスボンベ）1式
- ・細筆、先の細いピンセット 各 1個

2) ピメトロジン感受性検定

- ・大型試験管（直径 3cm×高さ 20cm）30本
- ・試験管立て（直径 3cm×高さ 20cm の試験管 50 本用）1台
- ・1%寒天液（市販の粉寒天(無添加天草 100%など)）1L
- ・ティッシュペーパーあるいは脱脂綿 適量
- ・50-70%エタノール 2L
- ・液体肥料 1L
- ・柄長ピンセット（15cm）1本
- ・蓋用にカットしたナイロンゴースとゴムホース（またはメッシュ付シリコン栓）30対
- ・イネ芽出し（播種後 7 日目：1-2 葉期）1,000 本程度

- ・拡大鏡（ヘッドキャップ式）1個
- ・カウンター（数取器）1個
- ・シャーレとマス目のある台紙 各1個
- ・吸虫管 数本

3) ピメトロジン以外の薬剤の微量局処用法による感受性検定

- ・処理虫観察容器（直径7cm 高さ11cm程度、透明のものが観察しやすい）
→直径2cm程度のポンチでフタに穴を空けておく
- ・綿栓（直径2cm）1箱
- ・柄長ピンセット（15cm）1本
- ・拡大鏡（ヘッドキャップ式）1個
- ・吸虫管 数本
- ・柄長ピンセット（15cm）1本
- ・ティッシュペーパー 適量

4) 結果の解析

- ・Probit 計算プログラム PoloPlus Ver. 2
<http://leorasoftware.com/> 価格 \$250程度

5) 供試虫の累代飼育、イネ苗の育苗など

- ・プラスチック製飼育箱（外寸法：W34cm × D26cm × H34cm程度）
- +飼育皿（飼育箱底部の内側にぴったりはまり、容易に出し入れできるサイズ）
- ・ピートモス（粒経が比較的細かい物）
- ・育苗箱（プラスチック容器（外寸法：W15cm×D10cm×H3cm））（ピメトロジン検定に使用するイネ芽出し苗用）
- ・育苗箱用床土（肥料入り）（ピメトロジン検定に使用するイネ芽出し苗用）
- ・殺菌剤（アゾキシストロビン剤・TPN剤など）

イネウカ類の薬剤感受性検定マニュアル（2016年版）

本マニュアルは、平成 26 年度～27 年度に農林水産省委託プロジェクト研究：ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発プロジェクトにより実施した「ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発」（課題番号 PRM06）の成果をとりまとめたものである。

なお、本マニュアルに関するご意見・ご質問や本マニュアルの複製・転載を希望される場合には、下記問い合わせ先にご連絡いただきたい。

（本マニュアルに関するお問い合わせ先）



農研機構九州沖縄農業研究センター 産学連携室

〒861-1192 熊本県合志市須屋 2421

TEL:096-242-7682 FAX:096-242-7543

E-mail : q_info@ml.affrc.go.jp

ホームページ : www.naro.affrc.go.jp/karc

発行

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域 虫害グループ

編集責任者：松村 正哉

発行日：2016 年 12 月 26 日（改訂：2017 年 2 月 8 日 v.1.1）
