

平成 25 年度

(独) 農研機構中央農業総合研究センター・(独) 農業生物資源研究所合同主催による研究会

## 殺虫剤抵抗性にどう対処すべきか

—これからの薬剤抵抗性管理のありかたを考える—

講演要旨集 web 掲載版

2 日目 講演要旨

開催日：2013 年 11 月 27 日、28 日

場所：農林ホール（農林水産省農林水産技術会議事務局筑波事務所 2F）

主催：(独) 農研機構中央農業総合研究センター・(独) 農業生物資源研究所



## 生物検定法について ハダニ類

奈良県農業総合センター 国本佳範

ハダニ類は薬剤抵抗性の発達しやすい害虫として知られており、その理由として以下の4つが挙げられている（真梶、1996）。①薬剤散布面積に比べ、ハダニ類の行動範囲は狭い。このため、隔離された集団で薬剤の淘汰を受けることになり、均質な集団になりやすい。②ハダニ類は発育日数が短く、発生回数が多い。このため、薬剤の淘汰を受ける機会が多くなる。③ハダニ類の性決定は単数倍数性なので、抵抗性遺伝子を持つ雄との交雑で抵抗性が発達しやすい。④ハダニ類の行動習性として近親交配が行われやすい。

ハダニ類の中で薬剤抵抗性が問題となるのは、*Tetranychus* 属のナミハダニ黄緑型、カンザワハダニ、*Panonychus* 属のミカンハダニ、リンゴハダニなどである。これらのハダニ類はすでに多くの薬剤に抵抗性を発達させてきたため、薬剤感受性情報がないと有効な殺ダニ剤を選択できない。そこで、薬剤感受性検定が必要になる。検定法としては散布処理（浜村、1996）や葉片浸漬（高梨ら、2009）などがあるが、ここでは一般的な浜村（1996）に基づく散布処理について概説する。

### 検定の流れ

検定は、①供試個体群のサンプリング、②リーフディスクの準備、③供試ハダニの接種、④処理前計数、⑤薬剤散布、⑥処理後計数、⑦評価、の順に行われる。

### 供試個体群のサンプリング

ハダニ類が寄生する植物葉ごと大きめのビニル袋に採集する。ビニル袋にはあらかじめ丸めた新聞紙などを入れておきビニル袋内面の結露を防ぐ。採集の際、寄生葉に生じた吸汁痕だけを頼りに採集すると葉裏にはほとんど雌成虫がいない場合もあるので、必ず、葉裏を観察し、雌成虫の寄生を確認する。圃場全体からできるだけ遺伝的偏りが生じないように、かつ検定に十分な頭数を採集するのだが、言葉で書くのは容易であるが、実際には難しい。例えば、露地のリンゴ園では、ハダニ類の風分散によりリンゴ樹間をハダニ類が往復し、遺伝的交流が進んでいることが知られている（Uesugi et al.,2009b）。これに対し、カンキツ園では同じ樹内の局所個体群間でも遺伝的分化が検出されている（Osakabe. et al.,2005）。さらに、施設栽培のバラでは 30m程度の栽培畦内でも遺伝的な分化が生じており、遺伝的に類似しているのは 3m程度の範囲内と報告されている（Uesugi. et al.,2009a）。このように栽培作物ごとに遺伝的交流の程度は様々であり、ハダニ類の分散方法なども考慮してサンプリングする箇所や点数を決める。

### リーフディスクの準備

野菜や花に寄生するナミハダニ黄緑型やカンザワハダニはインゲンマメで飼育できるの

で、検定にもインゲンマメの初生葉を用いる。しかし、ミカンハダニやリンゴハダニはインゲンマメでの飼育は難しい（筆者は不成功）。そこで、寄主植物を用いる。これらの葉片を9cmのシャーレ上に設置する。この際、インゲン葉は湿らせたろ紙やスポンジ上に容易に置くことができる。しかし、葉面の凹凸が大きい葉の場合にはクリスタルバイオレットを混ぜた寒天ゲルを用いる。この詳細は浜村（1996）などを参照されたい。インゲン葉の場合は葉表を上置き、湿らせたクッキングペーパーで2～3cm四方に囲み、逃亡を防止する。ろ紙を用いた場合の準備所用時間は、20分/25シャーレ程度である。

#### 供試ハダニの接種

圃場から持ち帰った寄生葉から雌成虫を葉片上に接種（移動）する。寄生葉にはカブリダニ類などの天敵が入っていたり、複数種が同所的に発生している場合もあるので、注意する。接種には面相筆や小筆を用いる。寄生葉を実体顕微鏡下に置き、元気な雌成虫の腹面側に筆の先端を入れ、掬い上げる。吸汁中の個体は口針が抜けずに掬えない場合がある。このような時は、小筆で腹部末端に触れると口針を抜くので、それを確認してから掬い上げる。また、葉の表面に細かい刺毛などがある場合は、必ず、刺毛に沿って筆を動かすようにする。逆方向に動かすと掬い上げようとした個体あるいは筆先が刺毛にからんでしまい作業効率が悪い。掬い上げた個体はすみやかにリーフディスクの葉に移す。ハダニが乗った筆先を軽く葉面にあて、手前に引くように動かせばよい。筆先が乾いているとハダニが柄のほうに動いてくるので筆先は湿らせておく。雌成虫を供試する場合、1シャーレに20～25頭を接種する。（無処理＋濃度勾配数あるいは供試薬剤数）×3シャーレ×20～25頭が必要になるので、これを踏まえて十分な数の雌成虫を採集しておく。採集してきた寄生葉の状態や作業者の習熟度により異なるが、接種に要する時間は4～5分/シャーレ程度である。

#### 処理前計数

リーフディスクに接種後、数時間放置してから、実体顕微鏡下で正常に活動している個体を残し、異常個体を除去する。同時にハダニが吐出した糸も除いておく。その後、葉片上の個体数を計数する。殺卵剤を供試する場合は、24時間程度産卵させてから、雌成虫と糸を除去し、卵を計数する。

#### 薬剤散布

半数致死濃度(LC<sub>50</sub>)を求める場合には5段階程度の濃度勾配をつけた薬液を用意する。薬剤の効果を確認する場合には各薬剤を常用濃度に希釈しておく。回転式散布塔がある場合には、2～3mg/cm<sup>2</sup>になる量を散布する。簡易に行う場合にはハンドスプレーを用いて散布してもよい。散布後は25℃前後の部屋に置き、リーフディスクが乾かないよう水を補う。

## 処理後計数

雌成虫の場合は 48 時間後に実体顕微鏡下で生死を判定する。生死の判定は正常活動個体を生存虫、小筆で触っても動かない死亡個体および異常行動個体を死亡虫とする。ミルベメクチンなどにやや感受性が低下してきた個体は 48 時間後でも死亡はしていないが、吸汁活動はなく、第 1 脚をせわしなく上下に動かす行動を繰り返す。このような場合は死亡と見なしている。

卵の場合は無処理区の孵化を確認してから（4～7 日後）、処理区の孵化状況を調べる。厳密には孵化後に幼虫が死亡している場合でも孵化とする。しかし、検定の目的が実用的な効果を調べたい場合ならば孵化直後に幼虫が死亡した場合には殺卵活性ありと評価しても良い。この場合には、無処理区が第 1 静止期ないしは第 1 若虫になった時期に判定する。

## 評価

各濃度別あるいは薬剤別に死亡率が出るので、定法により半数致死濃度や補正死亡率を求める。半数致死濃度が出れば、感受性系統との比較により抵抗性比が求められる。また、回帰直線が得られれば、その傾きから供試個体群の抵抗性に関する均一性も評価できる。ある個体群を対象に経時的に半数致死濃度を記録していけば、その個体群の感受性のモニタリングを行うことができる。さらに、ある個体群に対して、異なる殺ダニ剤のローテーションを行った場合、その後の半数致死濃度を比較できれば、ローテーションの効果が評価できるかもしれない。一方、常用濃度での補正死亡率でも、経時的なデータがあれば感受性の推移は把握できる。何より、実用上効果がない薬剤がわかるので、現場での防除効果不足の原因が薬剤によるのか付着不足によるのかが明確にできる（國本、1999）。

## 簡易法

半数致死濃度は上述の方法で求めることになるが、圃場での実用性を評価する場合には、簡易な方法も考えられる。リーフディスクを用いた散布処理で最も面倒なところは、ハダニの接種である。これを省略できれば時間的にも労力的にも随分と楽になる。

まず、採集してきたハダニ寄生葉を直接、薬液に浸漬する葉片浸漬法（高梨ら、2009 など）がある。ただ、この方法ではハダニの様々なステージが混じり、計数が面倒であること、サンプリング葉の保管方法が悪いとしおれて供試できないこと、葉裏の刺毛やハダニの吐出糸などがあると薬液の付着が不十分になること、などの問題点がある。

2 つ目にあらかじめ用意した鉢植えインゲン株元に寄生葉を放置し、雌成虫を移動させて検定する方法がある（国本、未発表）。移動する個体の多くは雌成虫であり、元気な個体しかインゲン葉にたどり着けない。移動確認後に計数してから薬剤散布する。ただ、サンプリング前にタイミング良くインゲンを準備しておくのが難しい。

3 つ目には紙袋を用いた方法がある（溝部ら、2013）。この方法は、採集した寄生葉に

常用濃度の薬剤を散布した後、紙袋に入れるだけである。翌日、生存虫がいれば紙袋の上部をハダニが歩行している。死亡していれば袋の上部にはハダニはいない。おおまかに実用性を評価する目的ならばこの方法でも十分かも知れない。

おわりに

検定はあくまでも手段である。ハダニの抵抗性そのものを管理する目的で  $LC_{50}$  をモニタリングするのか、効果のある殺ダニ剤を明確にする目的で常用濃度での死亡率を評価したいのか、その目的に応じた精度、速さ、労力を考慮した無理のない検定法を用いる。

引用文献

浜村徹三 (1996) 植物ダニ学 (江原昭三・真梶徳純編). 323-330. 全国農村教育協会.

國本佳範 (1999) 近畿中国農業研究 97 : 9-12.

溝部信二ら (2013) 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨集. 58.

Osakabe Mh. et al. (2005) *Exp. Appl. Acarol.* 36:25-40.

真梶徳純 (1996) 植物ダニ学 (江原昭三・真梶徳純編) 186-203. 全国農村教育協会.

高梨祐明ら (2009) 東北農研研報 110 : 177-186.

Uesugi R. et al. (2009a) *Exp. Appl. Acarol.* 47:99-109.

Uesugi R. et al. (2009b) *Exp. Appl. Acarol.* 48:281-290.

(生物検定法について：アブラムシ類)

## 幼苗処理法を用いたワタアブラムシの薬剤感受性検定手法

宮崎県総合農業試験場 生物環境部

松浦 明

幼苗処理法による検定手順(熊本県, 2000 及び曾根ら, 1998 に準じて実施。)

### ①検定容器の準備・作成(図1参照)

- ・ガラス管瓶 (直径 15mm、高さ 40mm : 検定植物支持用)
- ・パラフィルム (5cm×5cm, 5cm×2.5cm)
- ・スチロール容器 (本体部と管瓶固定部)  
ラボランスチロール棒瓶 S-70 使用。

#### ア. 本体部

容器の本体部の底を切り取り、換気口として側面 4 カ所に直径 6mm の穴を開け、テロンゴスを貼る。

注 1) 容器の底は、まずアクリルカッター等で、底の縁に沿って傷を付けた後に、金槌で打ち抜く。残った破片は、丁寧に取り除くこと (1 時間で 10~15 個作成可能)。

注 2) 側面の換気口は、上下部 2 カ所ずつにハンドドリルで開ける。この際に直接 6mm 径のドリルで開けると、容器が割れるので、まず小径のドリルで開けた後、6mm のドリルで大きく開けると良い。

#### イ. 管瓶固定部

容器の蓋を用い、管瓶の直径よりわずかに小さい穴を開ける。

注 1) 管瓶を使って、油性ペンで縁取り後、線の内側をカッターで切っていく。

(1 時間で 20~30 個位は作成可能)

### ②検定手順

1) きゅうり、ピーマンの幼苗を、水を十分に入れた管瓶に入れ、切れ込みを入れた蓋で、苗の茎を挟んで管瓶に被せ、パラフィルム (5cm×2.5cm) で固定する。

注 1) 28℃の定温器内できゅうり (エクセレント節成 2 号) は播種 6 日後、ピーマン (京鈴、京ゆたか) は 12 日後に使用可能な大きさに育つ。

注 2) 検定植物は、採集したワタアブラムシが増殖可能かどうかを確認後に選定する。

注 3) 宮崎総農試で使用している管瓶と同じものは既に販売していないため、同様のもので

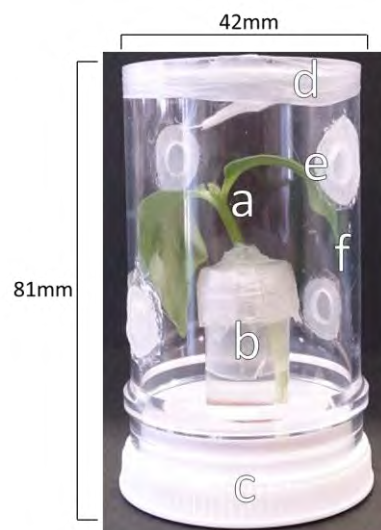


図1 幼苗処理法検定容器  
a:検定植物, b:水入り管瓶, c:スチロール容器の蓋(管瓶固定部), d:パラフィルム, e:換気口(径6mm, 4カ所), f:スチロール容器(本体部)。

代用を。また、切れ込みを入れた蓋は必須では無く、パラフィルムだけで固定可能。

2)展着剤トリトン X-100 (0.1~0.2%) を加えた水道水で、薬液を希釈後、検定植物を 10 秒間浸漬し、風乾する。

注) トリトン X-100 加用水道水は、20 倍程度の高濃度液を作成しておき、検定前に薄めて使用する。

3)穴を開けたスチロール容器の蓋に、管瓶を差し込み固定後、同じくスチロール容器の本体部を被せる。

4)ワタアブラムシ無翅成虫を 10 頭接種し、開口部をパラフィルム (5cm×5cm) で覆う。

注 1) 成虫の移動は、実体顕微鏡下で成虫 (尾片の形状による) であることを確認しながら、細筆を用い行う。細筆の先をあごの下付近に差し込むような感じですくい取ると良い。この際、アブラムシが口針を抜くまで待つ必要は無い。

注 2)できるだけ大きさは揃え、元気な個体を選んで移動させる。

注 3)移動後に容器内の接種数を確認すること。特に冬は静電気により、容器の外側などに付着することがあるので注意。

5)接種 72 時間後 (25°C16L8D) に成虫の生死を判定する。幼虫の生死の調査は不要。

注 1)生死の判断は、検定植物を適宜観察しやすいように切り分け、実体顕微鏡下で行う。

飼育容器の内側にも、アブラムシが付着していることがあるので、注意する。

注 2)遅効性薬剤であるピメトロジン (チェス)、ピリフルキナゾン (コルト)、フロニカミド (ウララ) を供試する場合は、検定期間を 4 日以上設ける。

### ③その他

1)曇り防止のため、飼育容器の洗浄は、表面に傷をつけないように、スポンジは使わず、手か柔らかい布で行う。

2)検定用ワタアブラムシの増殖は、検定 2 週間位前から、新しい植物を使って飼育する。演者はきゅうり (本葉 6~8 枚) やピーマン (本葉 12 枚) を各 4~6 株に対して、株当たり 100~200 頭位を接種している。

3)発生ほ場から採集した個体群を直接検定に供試するのは、寄生蜂等や散布農薬の影響等が懸念されるので避けた方が無難である。また、飼育の際も、寄生蜂の混入には特に注意する。

### 引用文献

熊本県農業研究センター(2000) ウリ科野菜幼苗を使用したワタアブラムシの薬剤感受性検定法。

九州農業研究成果情報 15:455-456.

曾根信三郎ら(1998) キュウリ幼苗を用いたミナミキイロアザミウマの薬剤効力検定法. 応動昆 42:215-220.



## 感受性検定法の検討 —生物検定法について— コナジラミ類

熊本県農業研究センター 生産環境研究所  
樋口 聡志

タバココナジラミの感受性検定法について紹介する。なお、タバココナジラミはバイオタイプによって薬剤感受性や寄主適合性などが異なるため、上田（2006）および三浦（2007）を参考に検定する個体群のバイオタイプの識別を行う。

### 成虫の検定法

タバココナジラミ成虫の検定法は、浜村（1997）にキャベツ葉浸漬・水挿法が紹介されている。また、徳丸（2013）は、キャベツ葉浸漬・水挿法を参考にした検定法を報告している。ここでは、浜村（1997）のキャベツ葉浸漬・水挿法を改良した、簡便で検定にスペースをあまり必要としない検定法を紹介する。

検定容器として直径35mm、高さ10mmの小型プラスチックシャーレを用いる。シャーレの底面は、カッターで切り取って目合い0.1mm以下のゴースを貼り、供試虫を放飼するためにはんだごてを用いて側面に直径3mm程度の穴を開ける（図1）。試験に供試するキャベツは、播種から約1か月経過した結球前の苗から直径5～10cmの若い葉を用いる。キャベツ葉と小型プラスチックシャーレを用いた検定手順を図2に示す。今回の方法は、無処理での120時間後の生存率が95%以上であり、キャベツ葉浸漬・水挿法と同様に高かった。また、4種薬剤を用いた2種類の検定法でのLC<sub>50</sub>値は、同様な結果を示した。このことから、今回の小型プラスチックシャーレを用いた検定法は、タバココナジラミ成虫の検定法として活用できると考えられる。さらに、本検定法は、キャベツ葉浸漬・水挿法に比べて、準備作業などが簡便であり、検定容器を置くスペースが約1/6となる。

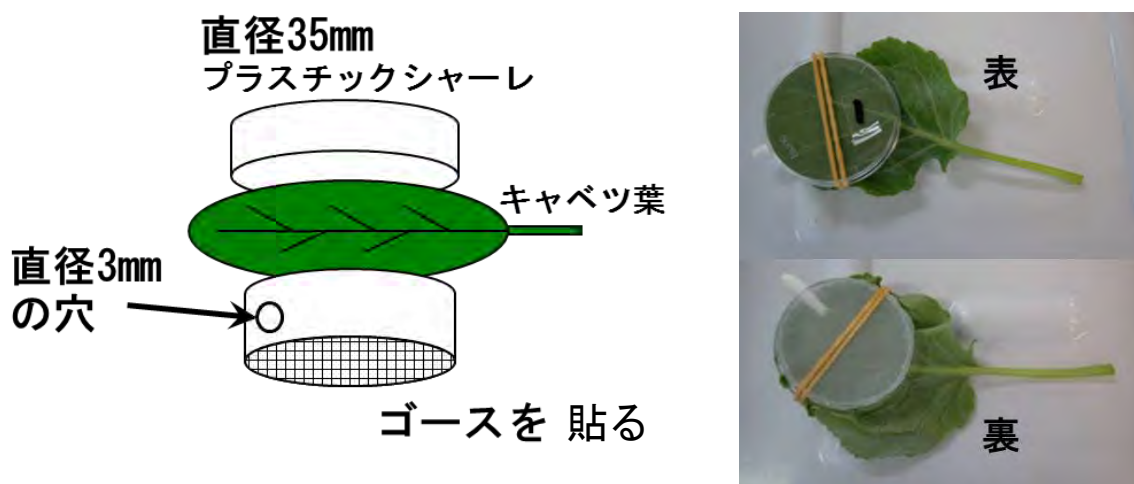


図1 成虫の感受性検定に用いる検定容器

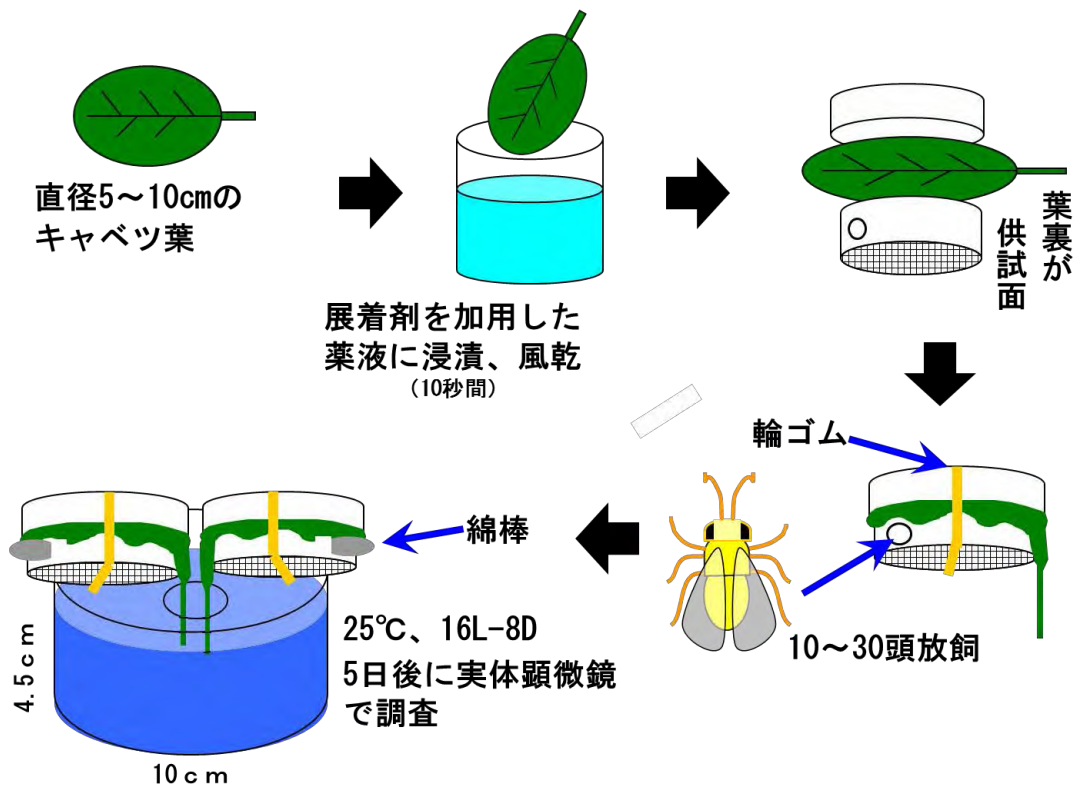


図2 タバコナジラミ成虫の感受性検定法の手順

### 幼虫の検定法

タバコナジラミ幼虫の検定法は、浜村（1997）および徳丸（2013）に紹介されている。これらの検定法は、キャベツ葉に成虫を放飼、産卵後、幼虫へ発育したところで薬液に浸漬する。しかし、施設果菜類などから採集したバイオタイプQは、キャベツへの産卵数が少ない（樋口、未発表）。また、小林（2007）は、バイオタイプQがキャベツへの定着が悪く、インゲンを用いた検定法を報告している。そこで、今回のバイオタイプQ幼虫の検定法としては、インゲンを用いた手法を紹介する。

バイオタイプQ幼虫の検定手順を図3に示す。ウンカ用の飼育箱に入れた完全に展開しているインゲン初生葉に、タバコナジラミ成虫を24時間放飼し、産卵させる。成虫除去の7~8日後、インゲン葉から直径25mmのリーフディスクを作製し、固着した1齢幼虫以外を除去する。固着した1齢幼虫をカウント後、展着剤を加用した薬液に10秒間浸漬する。風乾後、水分を含ませた脱脂綿の上に静置する。生死の調査は、薬剤処理の7~8日後に行う。なお、これらの検定作業は、25°C、16L-8Dで行う。今回のインゲン葉を用いた検定法による無処理区の生存率は、93%以上と高かった。また、バイオタイプQ・熊本個体群の感受性は、ピリダベン、トルフェンピラド、フェンピロキシメートおよびミルベメクチンで高く、IGR剤および合成ピレスロイド剤で低かった。

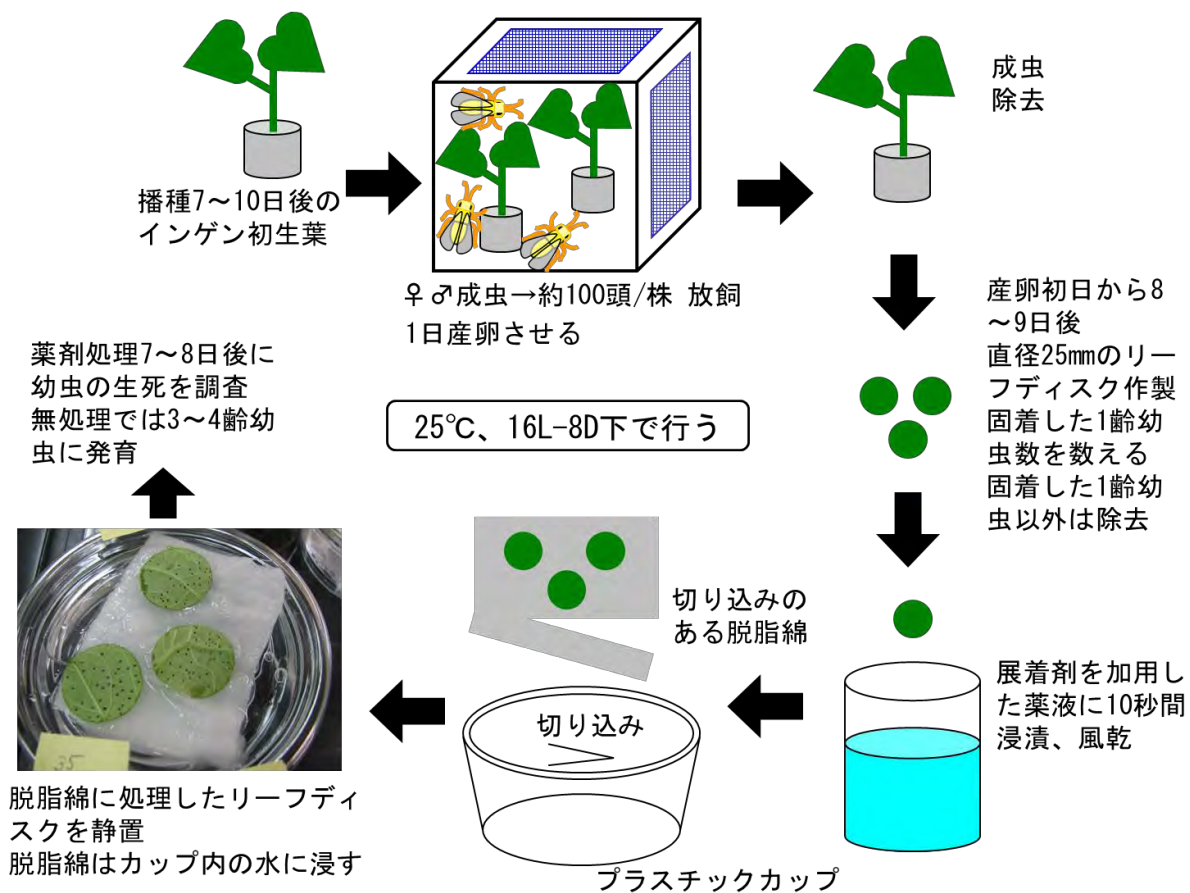


図3 タバココナジラミ幼虫の感受性検定法の手順

## 引用文献

- 浜村徹三 (1997) 植物防疫 51 : 290-293.  
 小林政信 (2007) 植物防疫 61 : 21-26.  
 三浦一芸 (2007) 植物防疫 61 : 315-318.  
 徳丸 晋 (2013) 植物防疫 67 : 307-310.  
 徳丸 晋・林田吉王 (2010) 応動昆 54 : 13-21.  
 上田重文 (2006) 九病虫 52 : 44-48.

(生物検定法について：アザミウマ類)

## 感受性検定法の検討 アザミウマ類

(地独) 大阪府立環境農林水産総合研究所

柴尾 学

### はじめに

日本において農作物を加害するアザミウマは3科44種が知られている(日本応用動物昆虫学会, 2006)。アザミウマ類は広食性のものが多く、吸汁による直接的な加害に加えて、ウイルス病を媒介して被害を拡大させる。さらに、殺虫剤に対して高度に抵抗性を発達させた種もある。そのため、アザミウマ類を効果的に防除するには、殺虫剤抵抗性の現状を迅速に把握し、適切な薬剤を選択する必要がある。本稿では演者が開発したアザミウマ類の簡易な殺虫剤感受性検定法について紹介する。

### 供試虫の入手と累代飼育

供試虫の入手：ミナミキイロアザミウマとネギアザミウマは主に作物の葉に生息することから、ほ場面積に合わせて約10か所から成虫を葉ごと採集し、チャック付ポリ袋に入れて持ち帰る。その際、袋内が過湿にならないようにペーパータオルなどを入れておく。ミカンキイロアザミウマとヒラズハナアザミウマは主に作物の花に生息することから、ほ場面積に合わせて約10か所から成虫を花ごと採集し、同様にチャック付ポリ袋に入れて持ち帰る。また、花にチャック付ポリ袋をかぶせ、袋内で花を数回たたいて成虫を袋内に落下させて捕獲した後、ポリ袋のチャックを閉じて持ち帰る花たたき法(柴尾, 2009)で採集してもよい。持ち帰った成虫は、千脇ら(1994)と柴尾(2011)が示した手法のとおり形態的特徴によって同定を行う。

供試虫の累代飼育：入手したアザミウマ類の個体数が不十分な場合には、村井(2002)に従って累代飼育を行い増殖させる。餌はレース鳩の餌として市販されているソラマメを流水中で発芽させて剥皮したソラマメ催芽種子を用いる。飼育容器は小型のタイトタッパーを用い、容器の底とソラマメの上にキッチンペーパーなどを敷く。蓋には5mmほどの穴をあけてナイロンメッシュ(目合0.1mm以下)を貼り付けておく。25℃の恒温室内で飼育し、飼育容器には蛍光灯の光が直接当たらないようにする。蛍光灯が当たるとソラマメの水分が蒸発して容器内面に水滴が付着し、アザミウマ類が溺死することがある。なお、累代飼育を長期間行くと、その間に殺虫剤感受性が変動する可能性があるため、飼育虫は採集2世代後くらいまでに供試することが望ましい。

### ソラマメ催芽種子浸漬法

供試虫：検定には主に雌成虫を用いる。前述の累代飼育により得られた飼育虫の場合には、羽化後7日以内の雌成虫を用いる。供試虫の移し替えにはマイクロピペット用チップ、ビニルチューブホース、ナイロンメッシュで製作した吸虫管を用いる(図1)。小型吸引ポンプをビニルチューブホースに接続すると効率的に供試虫を吸引でき、スムーズな移し替えが可能である。幼虫で検定することもできるが、供試虫の移し替えなどの操作は雌成虫の方が扱いやすい。

ソラマメ催芽種子の準備：大型のビーカーに前述のソラマメ種子を入れ、実験室内において流水中で発芽させる。発芽までに要する時間は夏期では3日前後、冬期では5～7日である。発芽させたソラマメは検定の直前に皮を剥き、カッターを用いて4分割しておく（図2）。

検定作業の準備：薬剤は市販の製剤を水道水で所定の実用濃度に希釈する。水和剤やフロアブル剤にはポリ（オキシエチレン）＝ノニルフェニルエーテル・ポリナフチルメタンスルホン酸ナトリウム等の展着剤（5,000倍）を加用する。検定容器として内径2.5cm、高さ5cmの透明の円筒型スチロール棒瓶（容量15ml、蓋は使用しない）を用いる。検定容器の開口部を密封するための薄膜フィルム（パラフィルムなど）と検定容器内の湿度を調節するためのろ紙片（1×4.5cm）を準備しておく。小型のラベルシールに供試虫の採集場所、供試薬剤名などの情報を記入しておく。

検定の手順：

①検定容器にラベルシールを貼り付ける。

②薬液を検定容器に注入して満たした後に薬液を除去し、ペーパータオル上で開口部を下にして検定容器を置き、内面に付着した薬液を乾かす。薬液が乾いたら、開口部を上にして置き、ろ紙片を1～2枚入れる。対照として、薬液を注入しない無処理の検定容器も用意する。

③4分割したソラマメ催芽種子を薬液に30秒間浸漬し、割りばしを用いてよく攪拌した後、ペーパータオル上に取り出して風乾させる。風乾後、ソラマメ催芽種子を検定容器に入れる。対照として、ソラマメ催芽種子を水道水に浸漬・風乾後、薬液を付着させていない無処理の検定容器に入れる。

④吸虫管を用いて10～15頭の供試虫を吸い取り、検定容器内でマイクロピペット用チップを軽く叩きながら供試虫を検定容器に移す。直後に検定容器の開口部を薄膜フィルムで覆って密封する（図2）。各薬剤および無処理の反復は3～5とする。

⑤検定容器は25℃の恒温室に24～72時間静置する。その際、蛍光灯の光が検定容器に直接当たらないようにするとともに、恒温室内の相対湿度が50～60%になるように調整する。所定時間経過後、検定容器内の生存虫（面相筆の先でつついて動くもの）と死亡虫（動かないもの）を計数し、死亡率を算出する。無処理についても同様に調査し、無処理の死亡率で各薬剤の死亡率を補正する。

### ソラマメ葉片浸漬法

検定法は基本的にソラマメ催芽種子浸漬法に従うが、以下の点が異なる。

ソラマメ葉片の準備：園芸用プランターなどに育苗用培土を入れ、前述のソラマメ種子を播種する。これをアザミウマ類が発生していないガラス室内に置き、適宜灌水して草丈20cm前後になるまで育苗する（図3）。育苗に要する時間は夏期では2週間前後、冬期では4週間前後である。検定の直前に苗から葉を切り取り、葉片（1.2×1.2cm）を作製しておく。

検定の手順：ソラマメ催芽種子浸漬法の手順に従うが、③ではソラマメ葉片を薬液に30秒間浸漬し、ペーパータオル上に取り出して風乾させる。風乾後、ソラマメ催芽種子浸漬法と同様に検定容器に入れる（図4）。

### ナス葉片浸漬法

検定法は基本的にソラマメ催芽種子浸漬法に従うが、以下の点が異なる。

ナス葉片の準備：園芸用プランターなどに育苗用培土を入れ、ナス種子（品種は千両二号など）を播種する。アザミウマ類が発生していないガラス室内に置き、適宜灌水して草丈 20 cm 前後になるまで育苗する。育苗に要する時間は夏期では 2 か月前後、冬期では 3 か月前後である。検定の直前に苗から葉を切り取り、葉片（1.2×1.2 cm）を作製しておく。

検定の手順：ソラマメ催芽種子浸漬法の手順に従うが、③ではナス葉片を薬液に 30 秒間浸漬し、その後はソラマメ葉片浸漬法に準じる。

### 検定法の特徴と問題点

ソラマメ催芽種子浸漬法では累代飼育に用いるソラマメ催芽種子をそのまま検定に利用できる。葉片・虫体散布法（森下，1997）で用いられる回転式薬剤散布塔などの機器を事前に準備する必要がなく、ソラマメ催芽種子の準備に要する期間は 3～7 日であり、供試虫の入手または累代飼育虫の準備ができ次第に検定できる。欠点としては、主に雌成虫を用いるため脱皮阻害剤など幼虫に作用する薬剤、効果の発現が遅い薬剤、効果の発現に虫体への薬液の直接的な接触が必要な薬剤の検定は難しい点が挙げられる。また、一部の薬剤ではソラマメ催芽種子浸漬法による死亡率がソラマメ葉片浸漬法による死亡率と比較して顕著に低くなる場合がある。この原因は、ソラマメ催芽種子の表面が滑らかなため薬液の付着しにくいことが影響したのではないかと推測される。

ソラマメ葉片浸漬法では累代飼育に用いるソラマメの葉片をそのまま検定に利用できる。ソラマメ葉片の準備に要する期間は 2～4 週間であり、ソラマメ催芽種子浸漬法よりも長いように見えるが、ソラマメ苗を絶えず準備しておけば実際の所要期間は短くて済む。さらに、ソラマメ催芽種子浸漬法では一部の薬剤の死亡率が顕著に低くなる場合があるが、ソラマメ葉片浸漬法ではそのような例は認められず、ソラマメ催芽種子浸漬法よりも安定的に薬剤の効果を評価できると考えられる。欠点としては、ソラマメ催芽種子浸漬法と同様に脱皮阻害剤など幼虫に作用する薬剤、遅効的な薬剤、薬液と虫体の直接的な接触で作用する薬剤の検定は難しい点が挙げられる。

ナス葉片浸漬法では寄主作物であるナスの葉片をそのまま検定に利用できる。ナス葉片の準備に要する期間は 2～3 か月であるが、ソラマメ葉片浸漬法と同様、ナス苗を絶えず準備しておけば実際の所要期間は短くて済む。寄主作物を用いた葉片浸漬法はナス以外の作物にも応用できる。なお、ナス、キク、インゲンなど葉が比較的厚いものであれば検定可能であるが、キュウリなど葉が薄いものでは葉が乾燥して検定には不適なので、その場合には子葉を用いることがある。

### 引用文献

千脇健司・佐野敏広・近藤 章・田中福三郎（1994）植物防疫 48：521－523.

森下正彦（1997）植物防疫 51：232－234.

村井 保（2002）植物防疫 56：305－309.

日本応用動物昆虫学会（2006）農林有害動物・昆虫名鑑増補改訂版. 日本植物防疫協会，東京，387pp.

柴尾 学（2009）農及園 84：1027－1029.

柴尾 学（2011）植物防疫 65：504－509.



図1 吸虫管および吸引ポンプ



図2 ソラマメ催芽種子浸漬法



図3 ソラマメ苗

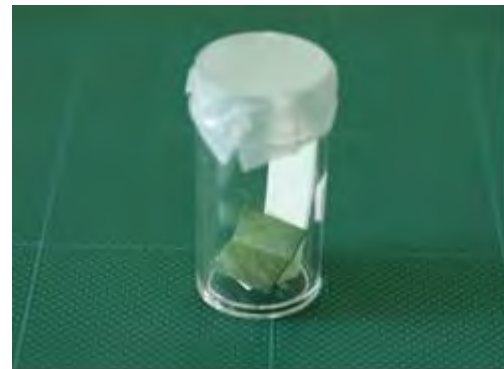


図4 ソラマメ葉片浸漬法

(生物検定法について：チョウ目害虫)

## チョウ目害虫の薬剤感受性検定法

日本農薬株式会社 総合研究所  
西松 哲義

### はじめに

古くから殺虫剤の効果は、供試する害虫、殺虫剤、種々検定条件（供試作物、処理方法、調査方法）により変動することが知られており、野外から採集したチョウ目害虫の感受性を正確に把握するには、その害虫の特性、殺虫剤の特性を理解した上で、検定条件を設定する必要がある。

一般的な薬剤感受性検定法としては、①殺虫剤原体をアセトンなどで溶解し虫体に塗布する局所施用法、②虫体を薬液に浸漬する虫体浸漬法、③餌となる作物を薬液に浸漬して供試虫に与える飼料浸漬法等が挙げられる。それぞれの方法に長所短所があり、感受性検定の目的や害虫種によって選定することが好ましい。チョウ目害虫の薬剤感受性検定法については、多くの文献や著書にも記載され、また、参考資料にも示したが、IRACのホームページや植物防疫誌に掲載されているので参考にされたい。

チョウ目害虫においては、多くの薬剤や各地域から採集した多くの個体群の感受性をより簡便に迅速に検定すること、そして感受性検定結果から使用現場での効果（食害抑制効果など）を推定することを目的とする場合、実際の寄生物を使った飼料浸漬法が好ましいと考えられる。

以下に、代表的な感受性検定法として、当社において、コナガ、ハスモンヨトウ、オオタバコガ等に採用しているカンラン葉浸漬法の手順を紹介するとともに、特にその過程で留意すべき点（※印）を述べ、他のチョウ目害虫に対する感受性検定の参考に供したい。

### 1. 供試虫ならびに材料の準備

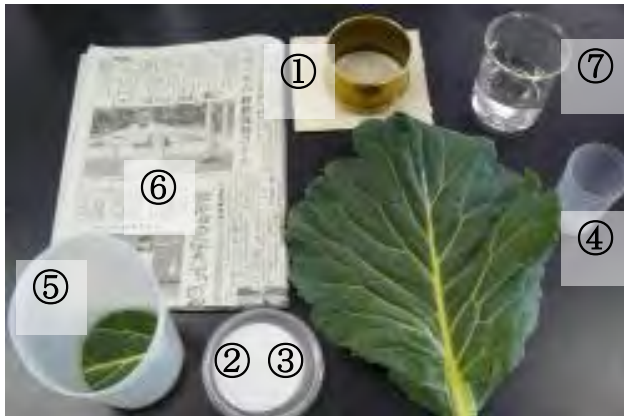
- 1) 供試薬剤：適宜市販の薬剤を選定。
- 2) 供試虫/供試ステージ：コナガ/3令、ハスモンヨトウ/3令、オオタバコガ/3令
  - ※ 作用症状を観察するには、より発育令期が進んだ個体が望ましいが、供試数の確保やハンドリング上、容易な3令を供試している。
  - ※ 同一令であっても、摂食量に違いが生じるので、基本的に脱皮1日後以内の虫を供試する。
- 3) 供試作物：コナガ；パクチョイ/品種：不明（5-6葉期以上/温室栽培）  
ハスモンヨトウ、オオタバコガ；  
カキバカンラン/品種：ハイクロップ（15葉期以上/温室栽培）
  - ※ 供試虫に何らかの影響のある薬剤の散布履歴のない作物を供試する。
  - ※ 基本的に作物の種類だけでなく、供試作物の栽培条件により生育や栄養状態（成分組成等）が異なり、それが供試虫の摂食量や生理状態に影響を及ぼす場合があるので、可能な限り同一条件で栽培した同一葉期の作物を供試する。
  - ※ 調査期間が長期にわたることがあるので、葉肉が厚く緑色の濃い日持ちする葉位を選ぶ。
  - ※ 作物の葉脈などにより凹凸が著しい場合や、肉厚が異なる場合は、薬剤の付着量や摂食量



に影響を及ぼすことがあることから、可能な限り均一な葉を選抜する。

#### 4) 薬剤処理に必要な備品

- ① 葉片をくり抜く金型（直径約7cm）※ハサミ等で代用可能だが、一定の大きさの葉片を得るのに最適である。
- ② 葉片や供試虫を入れるシャーレ ※アイスクリームカップなどで代用可
- ③ 濾紙を敷いたシャーレ ※害虫の食害等による加湿を防ぐ
- ④ 薬液を調整する容器 ※葉片を十分に浸漬できる液量が入る大きさ
- ⑤ 葉片を浸漬する容器 ※葉片が入る大きさ
- ⑥ 葉片を風乾させる新聞紙 ※ペーパータオルなど、余分な薬液を吸収し易い素材
- ⑦ 葉片を薬液から取り出すピンセット ※洗浄水、容器も必要、割り箸などで代用可
- ⑧ 薬剤および希釈する水 ※展着剤は必要に応じて、希釈する水に加えておく
- ⑨ 保護具 ※保護メガネ、手袋、マスク等



## 2. 感受性検定法の手順

### 1) 供試虫の飼育

野外から採集した害虫は、採集時に検定に必要な量を採集することができたら、その世代で感受性検定に供試することが望ましいが、通常、必要数を確保するために飼育・増殖する。それぞれのチョウ目害虫の飼育法については、紙面の都合もあり本稿では割愛するが、詳細は「昆虫の飼育法(1991) 湯島 健・釜野静也・玉木佳男編、日本植物防疫協会発行」を参照されたい。ここでは、特に注意すべき点を以下に記す。

コナガ：通常は「昆虫の飼育法」に記載された方法で良好な累代飼育が可能であるが、各地域から採集した個体群によっては、カイワレダイコン実生が餌として適さず、累代飼育が困難な場合がある。当社では、野外採集個体群を感受性検定に供試する場合、その飼育にはパクチョイ成葉を用いることで良好に個体群が維持されている。

ハスモンヨトウ・オオタバコガ：人工飼料（インセクタ LFM）を用いた飼育が簡便である。オオタバコガの場合、1-4 令の若令期間は集合飼育でも問題はないが、5-6 令の老令期間は、共食いにより虫数が激減するので仕切り版などを用いて個体飼育する。

### 2) 供試作物葉片の準備

- ① 作物葉から直径7cmの葉片をくり抜く。

※ 切り口などへの薬剤の浸透の違いなども活性に影響を及ぼすことがあるので、一定の大きさの葉片を用いる。

②葉片を水で洗浄し、夾雑物を除去し、風乾する。

※ 夾雑物（ホコリなどのゴミ）も局所的に薬剤の付着量に影響を及ぼす。

### 3) 薬液の調整、処理

① 希釈用の容器に所定量の薬剤を計量し、水（水道水）を加えて所定濃度の薬液を調整し、目的によって、段階的に希釈する。

※ 特にカンラン葉などの薬液が付着し難い作物葉を用いる場合は、薬液を均一に付着させるために展着剤（例：マイリノー1/10000）を加えた水（水道水）を用いる。

② 薬剤を処理する容器に薬液、葉片を投入し、約 20 秒間浸漬処理する。処理中は容器を揺すり、葉片に薬液が均一に付着するようにする。

※ 処理時間により薬剤の付着量が異なるので、処理時間は一定時間とする。

③ 処理後の葉片はピンセット（割り箸等）で取り出し、新聞紙上に広げ風乾する。

※ 異なる薬剤・異なる濃度の薬液を同時に処理する場合は、コンタミを避けるため、薬剤・薬液毎に、ピンセット等を洗浄する。

④ 葉片の片面が乾いた後、上下を反転させ、両面ともに十分に風乾させる。

※ 塗れた状態だと過湿状態になり、作物の劣化や、供試虫が薬滴に捕捉され死亡したりするので注意する。また、気候や季節により風乾に要する時間が異なるので、過度の乾燥を避けるよう注意する。

### 4) 供試虫の接種、保持

シャーレに敷いた濾紙に約 1ml の水を滴下させた後、薬液を処理した葉片を入れる。その後、供試虫をピンセット、もしくは筆などで 10 頭/葉片ずつ接種し、一定の温・湿度、光条件下の恒温室、恒温器に静置する。

※ 温度・光・湿度条件は、供試種により調整する必要があるが、基本的には  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (16L8D)、60-70%RH の一定の条件で保持する。特に、温度は殺虫剤の活性の強さや発現速度に影響を及ぼすので注意する。

### 5) 効果の判定時期および判定方法

殺虫剤の作用性（作用機作）により、効果の発現時期は異なるが、基本的には、薬剤処理・接種 1-2 日、3-4 日後の数回、ピンセットや柄付針などによる刺激への応答の有無や異常症状、生死、食害程度（適宜、数段階で判定）を観察する。一般的には、正常に歩行できない個体は、死亡個体として補正死亡率を算出する。

※ 速効性と遅効性の殺虫剤があり、評価する薬剤に合わせて調査期間を設定する。特に、脱皮阻害剤などでは、無処理区の供試虫が脱皮を終える期間まで調査を継続する必要がある。また、食害抑制作用の強い剤の場合は、現場での防除効果を推定するには食害程度の調査も重要である。

## おわりに

チョウ目害虫を対象にした感受性検定法は、本稿で紹介した方法以外にも、各種文献や著書に総

説されているので参考にされたいが、前述したように殺虫活性は多くの要因で影響を受けることが知られている。経験的に、一つの要因による活性差はそれ程大きくない場合でも、複数の要因が重なるとその差は著しく異なってくることもある。特に、特定の薬剤の地域間差を複数の試験機関で検討されたデータで比較検討する場合は、検定方法や各種条件を、可能な限り統一する必要がある。今回の検定方法の紹介が、今後の薬剤感受性検定の一助になれば幸いである。

## 参考資料（植物防疫誌、IRAC掲載の感受性検定法概要）

### 1) 植物防疫誌（農業害虫および天敵昆虫の薬剤感受性マニュアルより）

対照害虫		試験方法						
和名	学名	供試ステージ	供試作物(餌)	処理法	保持	調査期間	調査方法	備考
ニカメイガ	<i>Chilo suppressalis</i>	5令幼虫 卵塊接種5日後	(イネ芽だし) ポット植のイネ株	局所施用法 イネ株散布法	25℃前後	1-2日 3-10日	生死、苦悶 株を分解して 生死を調査	植物防疫 50-12-523
コブノメイガ	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	3令幼虫 1令幼虫	草丈13cmのイネ苗	局所施用法 イネ葉身浸漬法	25℃ 16:8 light/dark	1-2日	生死 株を分解して 生死を調査	植物防疫 50-12-523
コナガ	<i>Plutella xylostella</i>	3令幼虫 4令幼虫	キャベツ	葉片浸漬法 局所施用法	25℃ 16:8 light/dark	1-3日	生死、苦悶	植物防疫 51-9-440
モンシロチョウ	<i>Pieris rapae</i>	3-4令幼虫 4令幼虫	キャベツ	葉片浸漬法 局所施用法	25℃ 16:8 light/dark	2日	生死	植物防疫 51-9-445
ハスモンヨトウ シロイチモンヨトウ	<i>Spodoptera. Litura</i> <i>Spodoptera exigua</i>	3令以降幼虫 3-4令幼虫	人工飼料 キャベツ	局所施用法 葉片浸漬法	25℃	1日	生死、異常 (歩行困難、 萎縮)	植物防疫 51-10-483
オオタバコガ	<i>Helicoverpa armigera</i>	3令幼虫	キャベツ	葉片浸漬法	25℃ 16:8 light/dark	3-7日	生死	植物防疫 51-10-488
チャノコカクモンハマキ チャハマキ	<i>Adoxophyes sp.</i> <i>Homona magnanima</i>	2-3令幼虫	チャ成葉 人工飼料	葉片浸漬法 人工飼料浸漬法	25℃ 16:8 light/dark	2-7日	生死、異常 (歩行困難)	植物防疫 52-1-48
リンゴコカクモンハマキ	<i>Adoxophyes orana fasciata</i>	5令幼虫 成虫	リンゴ新梢上中位葉	葉片浸漬法 中体浸漬法	25±1℃ 16:8 light/dark	2日 1日	生死、苦悶	植物防疫 52-9-419

### 2) IRAC (<http://emethods.irc-online.org/> E-METHODS より)

対照害虫		試験方法						
和名	学名	供試ステージ	供試作物(餌)	処理法	保持	調査期間	調査方法	備考
食葉性 チョウ目害虫	<i>Helicoverpa Heliothis</i>	幼虫	寄生作物	葉片浸漬法	25℃	2-3日	刺激に対する反応性	IRAC No.007
コリンガ	<i>Cydia pomonella</i>	1令幼虫	人工飼料	人工飼料への 薬剤の練り込み	22±2℃ 60% RH 16:8 light/dark	4-5日	ピンセットなどの刺激 に対する反応性	IRAC No.017
コナガ	<i>Plutella xylostella</i>	2-3令幼虫	アブラナ科作物	葉片浸漬法	25℃ 60% RH 16:8 light/dark	4日	ピンセットなどの刺激 に対する反応性	IRAC No.018
ハスモンヨトウ含む Spodoptera属 オオタバコガ含む Heliothis属	<i>Spodoptera exigua</i> <i>S. frugiperda</i> <i>S. litoralis</i> <i>S. Litura</i> <i>S. Eridania</i> <i>Helicoverpa armigera</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Helicoverpa zea</i>	2-3令幼虫	人工飼料	人工飼料への 薬剤の練り込み	24±3℃ 60% RH 16:8 light/dark	7日後	ピンセットなどの刺激 に対する反応性	IRAC No.020
トマトキバガ (仮)	<i>Tuta absoluta</i>	2令幼虫	トマト葉片	葉片浸漬法	25±2℃ 60-70% RH 16:8 light/dark	4-5日	ピンセットなどの刺激 に対する反応性 食害程度	IRAC No.022

# 遺伝子解析を応用した抵抗性系統の検出法について ～個体単位の診断法の開発方法と診断手順～

農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所  
土田 聡

## はじめに

殺虫剤抵抗性の発達は害虫防除における薬剤選択の幅を狭める。殺虫剤抵抗性が問題となり始めている状況において、抵抗性発達の進行を少しでも遅延させると同時に、有効な代替薬剤を把握して効果的な防除を行うためには殺虫剤抵抗性の動向をモニタリングすることは重要である。殺虫剤抵抗性発達のメカニズムは種々知られているが、生理生化学的要因により発達する抵抗性、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に起因する抵抗性が主たるメカニズムであると考えられている。それらに関しては、分子レベルでのメカニズム解明に関する研究が近年盛んに行われており、様々な害虫種において各種殺虫剤に対する抵抗性発達要因となる遺伝的変異が突き止められている。本講演では、遺伝子診断法の利点について述べるとともに、殺虫剤抵抗性突然変異部位をターゲットとした遺伝子診断法とその活用例を紹介する。

## 遺伝子診断のメリット

遺伝子診断の利点として以下のような点が挙げられる。

### ① 抵抗性個体（遺伝子）の検出の正確さ

遺伝子診断では薬剤以外の死亡要因、例えば薬液による溺死や虫の生理状態に起因する死亡といった要因を排除できるため、対照区を設定し、死虫率を補正する必要がない。また、十分な数の健全な個体を供試するための野外採集虫の増殖の必要がなく、野外個体群本来の感受性の値を歪めてしまう危険性が低い。

### ② 供試虫のサンプリングおよび取り扱いの容易さ

遺伝子診断は死亡虫でも実施可能であるため、採集虫を液浸標本等で輸送・保存することも可能となる。また、通常は発生初期の密度の低い段階での感受性診断は困難であるが、例えば発生消長調査用の粘着板への捕捉虫等でも診断することができ、早期のモニタリングも可能となる。

### ③ 劣性遺伝する抵抗性形質の診断が可能

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合成ピレスロイド剤に対するノックダウン抵抗性 (*kdr*) 形質は、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。しかし、遺伝子診断では劣性抵抗性遺伝子の存否を高感度で検出できるので、抵抗性発達の早期予測も可能になると考えられる。

### ④ 複数の殺虫剤に対する抵抗性の有無を個体単位で解析することが可能

微量のDNAで診断できるが故に、限られたサンプルから多くの情報が得られる。また、抵抗性遺伝子の個体レベルでの集積をモニタリングすることも可能となるであろう。

## 遺伝子診断法の開発 ～一塩基多型による作用点抵抗性の場合～

殺虫剤抵抗性遺伝子診断法は、主として殺虫剤の作用点となるタンパクの構造遺伝子の塩基配列を抵抗性、感受性系統間の比較により明らかになった一塩基多型部位をターゲットとして開発され

る。例えば有機リン剤やカーバメート剤の作用点はアセチルコリンエステラーゼ、合成ピレスロイド剤、ネオニコチノイド剤ではそれぞれ、ナトリウムチャンネルおよびニコチン性アセチルコリン受容体の構造遺伝子である。診断法の開発には様々な技術が利用されるが（土田, 2013）、本講演では、最も開発事例の多い対立遺伝子特異的 PCR および PCR-RFLP 法について紹介する。

対立遺伝子特異的 PCR（Allele specific PCR: AS-PCR, ASP-PCR などと略され、PASA とも呼ばれる）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いえる。マルチプレックス PCR（Multiplex PCR）も対立遺伝子特異的 PCR の一方法といえるが、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 と組み合わせた 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 やナトリウムチャンネルの 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。

#### 遺伝子診断法の適用例 ～合成ピレスロイド抵抗性ネギアザミウマの場合～

近年、各種殺虫剤に対するネギアザミウマの感受性低下が国内外において問題となっているが、合成ピレスロイドに対し極めて高い抵抗性程度を有する系統はいずれも、同剤の作用点であるナトリウムチャンネル遺伝子に、いわゆる *kdr* (L1014F)、および *super-kdr* (M918T) 突然変異を有する (Toda and Morishita, 2009)。一方、弱い抵抗性を示した系統においても *super-kdr* に相当する T929I 突然変異が確認されている。そこで、これら変異部位を標的とする PCR-RFLP 法あるいはマルチプレックス PCR 法による遺伝子診断法を開発し、カキ園に設置した青色粘着板捕捉虫を用いた抵抗性個体（遺伝子）頻度のモニタリング調査を実施したので紹介する。

#### おわりに

これまで、殺虫剤抵抗性発達メカニズムの解明は、抵抗性が手に負えないレベルになってから取り組まれるのが常であった。したがって、抵抗性突然変異の解明が既に主たる防除薬剤から外された後であったり、場合によっては薬剤登録自体が失効してしまった後であったりすることもあった。したがって、開発した殺虫剤抵抗性関連遺伝子の診断技術も実際の防除に役立terるという観点からは十分な評価を受けられないこともあった。しかしながら、近年の研究の進展により、殺虫剤抵抗性の発達メカニズムを事前に予測することさえ可能になってきている。したがって、今後は遺伝子診断技術を早期に開発することも可能となり、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。

#### 引用文献

- 土田 聡 (2013) 農業害虫の薬剤感受性マニュアル 植物防疫 特別増刊号 16: 129-135.  
Toda, S. and M. Morishita (2009) J. Econ. Entomol. 102: 2296-2300.

# 遺伝子解析を応用した抵抗性系統の検出法について —量的シーケンシングを用いた抵抗性遺伝子頻度の推定—

岡山大学資源植物科学研究所

園田 昌司

## はじめに

殺虫剤抵抗性は一般的には、1)皮膚透過性の低下、2)標的分子の感受性の低下、3)解毒分解酵素活性の増大によってもたらされる。ただし、皮膚透過性の低下の抵抗性への寄与は限定的であり、農業生産の現場で大きな問題となる抵抗性には主に、解毒分解酵素活性の増大と標的分子の感受性の低下が関わっていると考えてよい。感受性の低下による抵抗性の原因は、標的分子のアミノ酸変異による立体構造の変化とそれに伴う殺虫剤との相互作用の低下あるいは消失である。アミノ酸変異は遺伝子の塩基配列の変化によって引き起こされるため、塩基配列の違いを様々な手法で解析することにより、抵抗性に関する質的・量的な情報を入手できる。本稿では、Kwon et al. (2008)によって開発された量的シーケンシングを用いた個体群(集団)内における抵抗性遺伝子の頻度を推定する方法について、コナガの有機リン剤抵抗性に関わる遺伝子を例に簡単に紹介する。

## 量的シーケンシングを用いた抵抗性遺伝子の頻度を推定するための方法の原理

コナガの有機リン剤抵抗性には標的分子であるアセチルコリンエステラーゼ 1(AChE1)における2つのアミノ酸変異(A298SとG324A)が関与している(Lee et al., 2007)。感受性個体では298番目と324番目のアミノ酸はそれぞれアラニンとグリシンであるが、抵抗性個体ではアラニンがセリンに、グリシンがアラニンに変化している。アラニンをコードするコドンはGCC、セリンをコードするコドンはTCCである。そのため、298番目のアミノ酸配列の違いは当該コドンの最初の塩基配列の違いに由来する。同様に、グリシンをコードするコドンはGGAもしくはGGC、アラニンをコードするコドンはGCAなので、324番目のアミノ酸配列の違いは当該コドンの2番目の塩基配列の違いによってもたらされる。

以下、話を単純化するために、解析対象を298番目のアミノ酸のみに絞る。あるコナガ個体群のゲノムDNAよりAChE1遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンシングを行った結果の一部を図1に示した。298番目のアミノ酸をコードするコドンの最初の塩基配列部位にG(黒)とT(赤)のピークが存在している。これは、解析した個体群内に感受性型と抵抗性型のAChE1遺伝子を持った個体が存在することを意味する。そして、このピークの高さは、それぞれの遺伝子の個体群内における頻度をある程度反映している。この場合、感受性遺伝子と抵抗性遺伝子の頻度は大まかに以下の単純な数式で推定できる。

感受性遺伝子の頻度 = Gのピークの高さ / Gのピークの高さ + Tのピークの高さ

抵抗性遺伝子の頻度 = Tのピークの高さ / Gのピークの高さ + Tのピークの高さ

抵抗性に関わる塩基配列部位におけるピークの高さは、異なる蛍光色素でラベルされたジデオキシ



平成 25 年度（独）農研機構中央農業総合研究センター・（独）農業生物資源研究所合同主催  
による研究会「殺虫剤抵抗性にどう対処すべきか -これからの薬剤抵抗性管理のありかたを  
考える-」講演要旨集 web 掲載版

2014 年 3 月 20 日

発行：（独）農研機構中央農業総合研究センター・（独）農業生物資源研究所



