

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

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

はじめに

ハダニ類、アザミウマ類、コナジラミ類などの微小昆虫における薬剤抵抗性に加え、これまで容易に防除ができていたワタアブラムシでネオニコチノイド系殺虫剤抵抗性系統の発生が平成 24 年度九州地方で確認され、さらに、チョウ目害虫に卓効を示すジアミド系殺虫剤に抵抗性のチャノコカクモンハマキが静岡で確認されるなど、害虫防除における殺虫剤抵抗性問題の拡大が強く懸念されている。栽培体系・防除体系の画一化・広域化に伴い、殺虫剤抵抗性害虫の常発化、広域化、多様化が起きていることから、抵抗性害虫対策には、地域を超えた連携が不可欠となっている。

本研究会では、国内外で殺虫剤抵抗性が顕在化している上記の害虫を対象に、抵抗性問題の現状と管理対策における課題ならびに研究機関の果たすべき役割について検討し、独法や都道府県の研究担当者、普及部門担当者、農薬メーカーを含む関係者の情報共有の促進と協力関係の構築に資する。

プログラム・目次

11月27日

13:30-13:35 開会挨拶 農研機構中央農業総合研究センター所長 寺島一男

13:35-13:50 開催趣旨説明 農研機構中央農業総合研究センター 後藤千枝

第1部 殺虫剤抵抗性害虫の発生の現状と対策構築における課題

13:50-14:20 ハダニ類 日本曹達株式会社 小田原研究所 山本敦司 1

14:20-14:50 アザミウマ類 大阪府立環境農林水産総合研究所 柴尾 学 7

14:50-15:20 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 11

15:20-15:35 休憩

15:35-16:05 アブラムシ類 宮崎県総合農業試験場 松浦 明 14

16:05-16:35 チョウ目害虫 日本農薬株式会社 総合研究所 西松哲義 19

16:35-17:05 遺伝子情報を利用した薬剤抵抗性の機構解明と診断技術開発
農業生物資源研究所 篠田徹郎 24

17:30-19:30 情報交換会

11月28日

第2部 感受性検定法の検討

9:00-10:40 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 26

アブラムシ類 宮崎県総合農業試験場 松浦 明 30

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 32

アザミウマ類 大阪府立環境農林水産総合研究所 柴尾 学 35

チョウ目害虫 日本農薬株式会社 総合研究所 西松哲義 39

10:40-11:00 休憩

11:10-11:40 遺伝子解析を応用した抵抗性系統の検出法について

農研機構果樹研究所 品種育成・病害虫研究領域 土田 聡 43

岡山大学 資源植物科学研究所 園田昌司 45

11:40-12:10 総合討論

12:10-12:15 閉会挨拶 農業生物資源研究所理事 町井博明

ケーススタディから殺ダニ剤抵抗性マネジメントを考える

日本曹達株式会社 小田原研究所 殺虫剤研究グループ
山本 敦司

1. はじめに

農薬の安全性を目的とした世界的な農薬規制強化の時代に入り、殺虫剤の登録数減少の予測とそれに伴う殺虫剤抵抗性マネジメントの必要性が改めてクローズアップされている(山本, 2012)。殺虫剤抵抗性マネジメントの理論とその戦略の研究は1970~1980年代に精力的に実施された(Georghiou, 1983)。しかし、現実的にはそれが必ずしも作物栽培の現場で有効に機能しているとは言い切れない。そして、殺虫剤抵抗性マネジメントに対して、1) 抵抗性発達を遅延させることができるのか、2) 抵抗性が発達した後にその殺虫剤を使用しなければ感受性が回復するのか、という現実的で単純な2つの疑問がよく訊かれる。本稿では、抵抗性を発達させ易い生物学的な諸特性を持つハダニ類にフォーカスする。特に、殺ダニ剤ヘキンチアゾクス抵抗性のケーススタディから上記2つの疑問にアプローチし、包括的な殺ダニ剤抵抗性マネジメントのヒントを得たい。

2. 殺ダニ剤抵抗性発達の現状

殺虫剤抵抗性データベースによれば、殺虫剤抵抗性の報告は2011年現在の累積事例で10,000件に迫っている(Whalon et al., 2011)。抵抗性報告事例数のランキングはナミハダニが1位、リンゴハダニが7位であり、ハダニ類は全世界的にも薬剤抵抗性が問題である。本項では、日本でのハダニ類の薬剤抵抗性問題が複雑化している現状とその対策の課題について概説する。

殺ダニ剤および殺ダニ活性を有する化合物は、作用機構別に13グループに分けられ、それに加え作用機構が解明されていないものが4剤ある(IRAC, 2013)。一見有効な殺ダニ剤の種類が多いように思われるが、抵抗性発達に応じて基幹となる殺ダニ剤が変遷してきた経緯がある。日本では2013年現在で、基幹の作用機構のグループの殺ダニ剤は、3剤(内1剤は開発中)の電子伝達系複合体II阻害剤と、2剤の脂質生合成阻害剤である。具体的には、それぞれ、「シフルメトフェン、シエノピラフェン、ピフルブミド(開発中)」と「スピロジクロフェン、スピロメシフェン」である。また、これらとは異なる作用機構を持つと推定される2つの殺ダニ活性化合物、NC-515とNA-89、が開発中である。しかし、この2剤が登録され実使用されるまでには少なくとも7~8年の期間を待たなければならないだろう。したがって、現在基幹の5剤の抵抗性発達遅延策が急務であるとともに、それ以外の殺ダニ剤については抵抗性発達が一部の地域で顕在化していることから、感受性回復の可能性を研究することが重要である。さらに、開発中の2剤は、上市前に抵抗性マネジメント戦略を構築しておくことが求められる。

ハダニ類は、ハダニ種、特にテトラニカス属とパノニカス属の間で、食性の幅や移動分散性などの生物特性が異なり、施設作物と野外果樹園ではハダニ種の個体群構造が異なる(刑部, 2001; 刑部・上杉, 2009)。このことは、抵抗性に関与する特性もハダニ種と加害作物により異なることを

意味している。即ち、殺ダニ剤代謝能力差や抵抗性発達の地域的個体群間・局在性の相違などの抵抗性に関わる特性差である。したがって、同じ殺ダニ剤であってもハダニ種・地域個体群の違いや加害作物によって、殺ダニ剤抵抗性マネジメントはケースバイケースで考えなければならない困難さがある。例えば、ヘキシチアゾクスではナミハダニ (Herron & Rophail, 1993) とミカンハダニ (Yamamoto et al., 1995a) では、抵抗性の遺伝はそれぞれ、不完全優性の単一主働遺伝子支配と不完全劣性の単一主働遺伝子支配と異なり、おそらく抵抗性の分子機構も異なるのであろう。また、ナミハダニの別系統では、少なくとも3つ以上のヘキシチアゾクス抵抗性遺伝子に支配されていた (Asahara et al., 2008)。

殺ダニ剤間の交差抵抗性は複雑さを増しており、異なる作用機構を持つ殺ダニ剤間での交差抵抗性事例が報告されている (刑部・上杉, 2009)。例えば、ナミハダニの一部個体群において、キチン生合成阻害剤エトキサゾールと脱共役剤クロルフェナピルの抵抗性遺伝子は、同一染色体上で連鎖しており、これが原因で交差抵抗性を示した (Uesugi et al., 2002)。おそらく薬物代謝に関与する抵抗性遺伝子の連鎖かも知れない。また、ナミハダニの別の個体群では、ミトコンドリアの電子伝達系複合体 I 阻害剤ピリダベンと複合体 II 阻害剤シエノピラフェンは、共通の薬物代謝酵素による交差抵抗性を示した (Sugimoto & Osakabe, 2013)。

以上のように、1) ハダニ種による生物学的特性の違い、2) 殺ダニ剤抵抗性諸特性のハダニ種・地域個体群による違い、3) 交差抵抗性の複雑化、4) 基幹となる殺ダニ剤作用機構の少なさ、および5) 下記で述べるローテーション散布実施上の根拠の弱さ、の少なくとも5点が殺ダニ剤抵抗性およびその対策の現状の課題である。

3. 殺ダニ剤抵抗性発達の遅延対策

殺ダニ剤抵抗性発達の遅延対策として、現実的には作用機構が異なり交差抵抗性を示さない複数の殺ダニ剤のローテーション散布が推奨されている。その成功事例として、1980年代後半の岩手県でのリンゴのハダニ類に対するヘキシチアゾクスとシヘキサチンの隔年使用による防除体系がある (鈴木, 2010)。ローテーション散布の成功には、“抵抗性の欠如”と“未使用期間中の感受性回復”が理論的な基礎2条件となる。しかし現実では、上記の岩手県の事例も含め、この2条件、特に“感受性回復”、が必ずしも防除対象ハダニ類で確認されているわけではない。だが、ローテーション散布を実施する上で、技術的な根拠を持たせるのはハードルの高い課題である。

最近、抵抗性発達遅延策の理論的なアイデアとして「高薬量・保護区戦略」が提案された (Gould, 1998; 鈴木, 2012a,b)。それを成功させるには多くの制約があるが、その基本概念と事例を紹介する。

3-1. 高薬量・保護区戦略

高薬量・保護区戦略の基本概念 (図1) は次のとおりである。1) 抵抗性遺伝子 R と感受性遺伝子 S をもつヘテロ個体 RS の害虫を防除できる高薬量の殺虫剤を害虫個体群に処理する。それによって、処理後に生き残る抵抗性遺伝子 R を持つ個体 (即ち、RR 個体と RS 個体) の数を最少化させる。2) ここで感受性個体群 SS の保護区を設定する。そして、防除で生残した RR 個体と RS 個体が保護区の SS 個体と交尾し繁殖する。次世代の個体群中で抵抗性遺伝子を持つ個体の大部分は RS 個体となる。3) 殺虫剤を再び高薬量で処理することで、RS 個体は防除区で再び除去される。

このような処理を繰り返すことで、防除個体群中の抵抗性遺伝子 R 頻度を低頻度に抑制し、理論的には殺虫剤抵抗性発達を遅延させることができる。

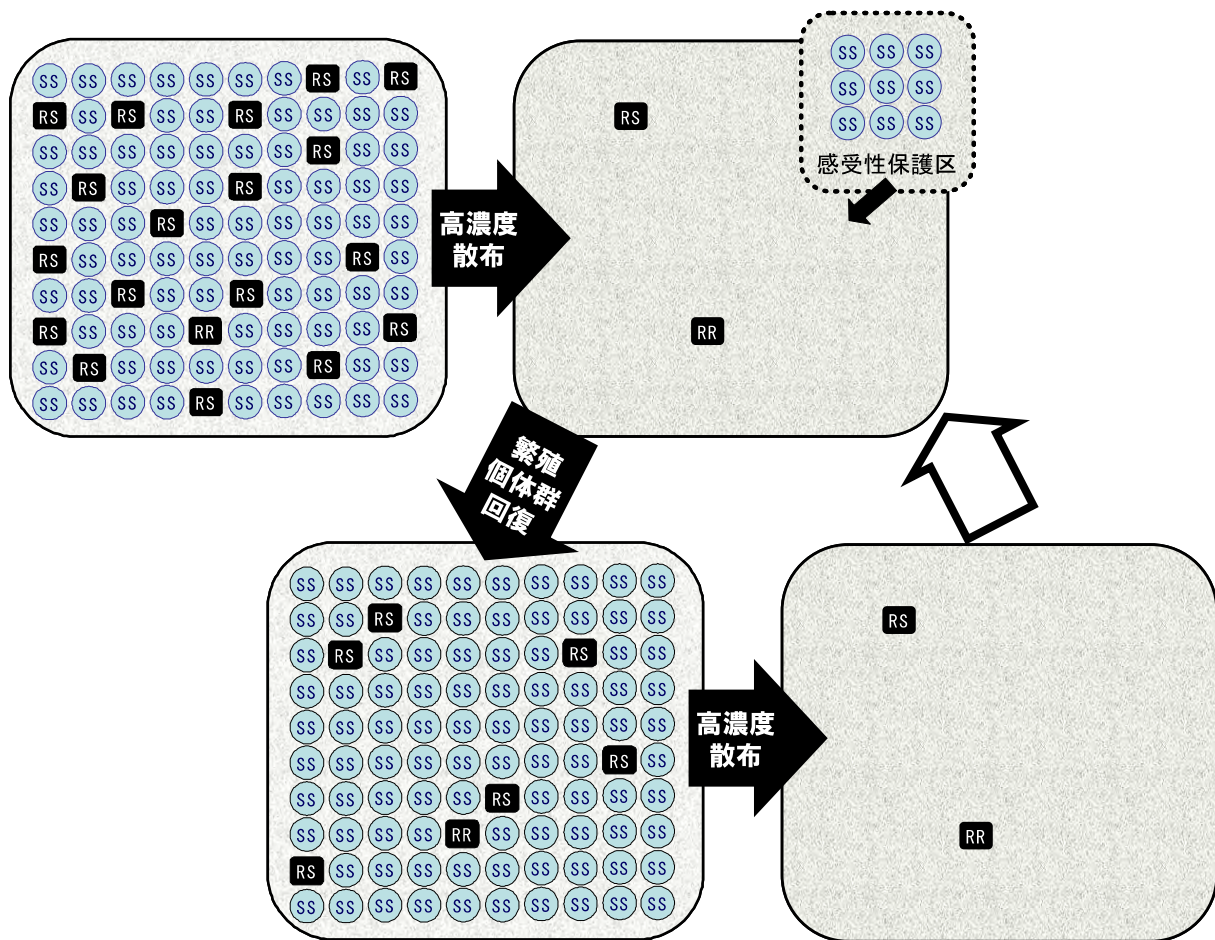


図1. 高薬量・保護区戦略の基本概念の模式図 鈴木 (2011a,b) より山本作図

3-2. 高薬量・保護区戦略のケーススタディ

高薬量・保護区戦略が野外で有効であったと推察される事例として、ミカンハダニに対するヘキシチアゾクス剤の圃場淘汰試験を紹介する。この事例では、抵抗性発達の速度は遅く、6年間で18回もの連続散布で抵抗性が発達した。その理由として、1) 抵抗性が不完全劣性の遺伝をすること、2) 散布濃度がヘテロ個体を殺せる高濃度であったこと、3) 抵抗性発達が樹ごとに異なっており感受性個体が常に存在して保護区となっていたなど、高薬量・保護区戦略の基本条件が揃っていたことが考えられた (山本ら, 1995 ; Yamamoto et al., 1995 ; 山本, 2012b)。

3-3. 殺ダニ剤抵抗性マネジメントに高薬量・保護区戦略は有効か？

ハダニ類において、高薬量・保護区戦略は有効なのだろうか。これを、産雄単為生殖という繁殖様式の点と、抵抗性の遺伝様式の点から考察した (山本, 2012b)。

まず、半倍数性の産雄単為生殖を行うハダニ類と、雌雄とも二倍体である昆虫類との比較を行った。その結果、ハダニ類に対しても高薬量・保護区戦略は有効であるが、昆虫類よりも有効度合いは低かった。次に、殺ダニ剤抵抗性の遺伝様式による違いを比較した。その結果、劣性遺伝では、

実用濃度を低く設定してもヘテロ接合体を防除できる高濃度となる確率が高いため、高薬量・保護区戦略が有効となる場合があると推察した。優性遺伝の場合では、ヘテロ接合体が防除できるレベルまで実用濃度を上げることができる場合には、見かけ上の劣性遺伝となり高薬量・保護区戦略が有効であった。しかし、農薬登録上の制約で実用濃度を高く設定できない場合には、いわゆる低濃度散布とならざるを得ず、高薬量・保護区戦略そのものが成立しなくなってしまう。

以上のように、殺ダニ剤抵抗性マネジメントでの高薬量・保護区戦略は、制約はあるが理論的に有効な方法である。しかし、現実的な実防除場面では、ハダニ種による移動分散性の違い、交差抵抗性、農薬登録上の制限、および感受性保護区設定の生産者の理解などの要因と課題に左右されるだろう。高薬量・保護区戦略の実用性の議論は今後の課題である。

4. 発達した抵抗性の感受性回復

害虫個体群中で一度発達した抵抗性が感受性へ回復する条件として、1) 感受性個体群の移入、2) 抵抗性遺伝子の適応度コスト、3) 劣性～不完全劣性の遺伝様式が考えられる。この3条件の感受性回復への貢献度を、刑部（2001）の数理モデルによって計算し考察した。

4-1. 感受性回復の条件

・感受性個体群の移入： まず、感受性個体群の移入によって個体群中の抵抗性遺伝子頻度は低下し、一定の頻度に収束する。移入量が多い程、また雌だけでなく雌雄ともに移入する方が感受性回復程度は高かった。

・適応度コスト： 抵抗性遺伝子の適応度コストも感受性回復に貢献すると計算されたが、適応度コストが大きくても抵抗性遺伝子頻度は大幅に低下することは無かった。また、野外における抵抗性個体の適応度コストが十分に大きい事例は報告されておらず、現実的にも適応度コストの貢献度は高くないケースが多いと考えられる。

・遺伝様式： 感受性個体群の移入のある条件で、抵抗性の遺伝様式に関わらず抵抗性遺伝子頻度が低下し感受性が回復した。しかも遺伝様式による抵抗性遺伝子頻度には差は見られなかった。しかし劣性～不完全劣性遺伝の場合、殺ダニ剤の感受性検定ではヘテロ個体 RS に対して殺ダニ剤が効く結果となる。したがって、劣性～不完全劣性遺伝では優性遺伝に比べ、見かけ上の感受性回復が期待される。

4-2. 感受性回復のケーススタディ

感受性回復の事例を紹介する。ミカンハダニに対し殺ダニ剤ヘキシチアゾクスの圃場選抜試験を実施したかんきつ園で、抵抗性発達後にヘキシチアゾクスの使用を中止した。その結果、中止後33ヶ月の間にヘキシチアゾクス感受性が徐々に回復した。しかし、抵抗性個体が個体群中から完全に消滅することは無かった。この感受性回復現象は、室内の実験的な個体群でも確かめられた（Yamamoto et al., 1996）。ヘキシチアゾクス抵抗性の各種実測パラメータを用いて、刑部の数理モデルで検証したところ、圃場と同様に感受性回復が認められた（山本・天野, 2013）。したがって、野外での感受性回復の要因は、1) 感受性個体群がこのかんきつ園に残存していたこと、2) 抵抗性が不完全劣性遺伝すること、および3) 抵抗性遺伝子を持つ個体の繁殖能力が劣ることであると

推察された (Yamamoto et al., 1995a,b; Yamamoto et al., 1996)。

4-3. 一度発達した抵抗性の感受性回復は期待できるか？

感受性回復は、抵抗性マネジメントのローテーション散布を成功させる条件の一つである。一度発達した殺ダニ剤抵抗性の感受性回復は、条件により期待できるが制約は非常に多い。今回は検討しなかったが、交差抵抗性の複雑さやハダニ種による移動分散性の違いは、感受性回復を攪乱させる要因であるため、その影響度は今後の必要な研究課題である。高度に殺ダニ剤抵抗性が発達してしまった場合には、抵抗性遺伝子を個体群中から使用前の低頻度レベルまで除去することは、理論的な計算結果や上記の実証例からも困難と考えられる。だが、抵抗性が劣性～不完全劣性遺伝する場合には、見かけ上の感受性回復が生じるため、防除効果の回復が期待できるだろう。

感受性回復を期待するには、基本3条件の中で“感受性個体の存在”が最も有効と考えられた。ハダニ類の要防除水準を考慮し、感受性個体群の温存や導入ができる栽培体系と防除体系の提案が必要だろう。

5. 最後に、殺ダニ剤抵抗性マネジメントの成功に向けて

殺ダニ剤の使用回数を代表的な作物の地区防除暦採用面積から推定したところ、マシン油を除く殺ダニ剤の年間の平均使用回数は、青森県のりんご、愛媛県のかんきつ類および静岡県で、平成21年にそれぞれ約1.4回、約1.9回および約1.8回であった。この使用回数の少なさを参考にすると、果樹類と茶では、抵抗性マネジメントとハダニ防除に有効な殺ダニ剤が揃っていれば、地区防除暦による殺ダニ剤抵抗性マネジメントは、以前よりも普及が可能な状況に近づいてきたとも考えられる。施設野菜や花き類では明確な統計は無いが、果樹類や茶に比べて殺ダニ剤の使用回数は一般的に多いと考えられ、殺ダニ剤抵抗性マネジメントのハードルはより高いだろう。

殺ダニ剤抵抗性マネジメントの成功のためにはその計画性が重要であり (山本, 2013)、次の7点について提案したい。1) 殺ダニ剤抵抗性の諸特性の研究。抵抗性の遺伝様式や適応度コストなどの殺ダニ剤抵抗性の特性は、対象となる作物とハダニ種と殺ダニ剤の組合せで地域個体群ごとに異なる。2) ハダニ類の種類ごとの移動分散性と個体群構造の実態把握。特に野外の果樹と施設野菜・花き類での生息環境が異なる個体群における実態。3) ハダニ類の要防除水準の見直し。これは感受性回復の原動力となる感受性個体群を広域に温存あるいは導入することが、栽培現場に理解されるかという判断も考慮したい。4) 殺ダニ剤登録の推進。特に、防除コストと安全使用基準も考慮したできるだけ高濃度の登録。5) 新規作用機構の殺ダニ剤の開発。6) 殺ダニ剤の感受性モニタリングの継続的な実施。7) さらに、理論だけでなく過去の抵抗性研究のケーススタディを精査することによっても、抵抗性マネジメントの成功へのヒントが見えてくるだろう。

今回は、殺ダニ剤の混用散布の有効性、殺ダニ剤の作用機構と抵抗性の分子機構に関しては言及しなかった。抵抗性遺伝子の正確なモニタリング法である遺伝子診断技術 (土田, 2013) はハダニ類に対しては、残念ながらこれまで普及された実績が無い。しかし、抵抗性の分子機構の研究はこの遺伝子診断法開発に貢献できるため、今後の成果に期待したい。

6. 引用文献

- Asahara, M. et al. : *J.Econ. Entomol.*, **101**, 1704-1710, (2008).
- Georghiou, G P.: "Pest Resistance to Pesticides," pp. 769-792, (1983).
- Gould, F : *Annu. Rev. Entomol.*, **43**, 701-726, (1998).
- Herron, G A. & J. Rophail: *Exp. Appl. Acarol.*, **17**, 423-431, (1993).
- IRAC: <http://www.irc-online.org/> (2013年2月3日閲覧).
- 刑部正博: *ダニの生物学*, pp. 173-193, (2001).
- 刑部正博・上杉龍士: *日本農薬学会誌*, **34**, 207-214, (2009).
- Sugimoto, N & Mh. Osakabe : *Pest. Manag. Sci.*, Article first published online: 13 OCT 2013
DOI: 10.1002/ps.3652, (2013).
- 鈴木敏夫: *岩手農研セ研報*, **10**, 113-126 (2010).
- 鈴木芳人: *植物防疫*, **66**, 380-384, (2012a).
- 鈴木芳人: *日本農薬学会誌*, **37**, 405-408, (2012b).
- 土田聡: *植物防疫*, **67**, 6-12, (2013).
- Uesugi, R. et al. : *J.Econ. Entomol.*, **95**, 1267-1274, (2002).
- Whalon, M. E. et al.: "*Global Insect Resistance / 2011 Insect Resistance Database Report*,"
http://www.irc-online.org/wp-content/uploads/2009/09/S3RDatabase_2011.pdf (2012年7月7日閲覧).
- 山本敦司: *日本農薬学会誌*, **37**, 392-398, (2012a).
- 山本敦司: 第17回農林害虫防除研究会報告～新潟大会～, p.32, (2012b).
- 山本敦司: 平成24年度長野県病虫害防除シンポジウム, 講演要旨, 5-12, (2013).
- 山本敦司・天野睦大: 第18回農林害虫防除研究会報告～奈良大会～, p.5, (2013).
- 山本敦司ら: *日本農薬学会誌*, **20**, 307-315, (1995).
- Yamamoto, A. et al. : *J. Pesticide Sci.*, **20**, 513-519, (1995a).
- Yamamoto, A. et al. : *J. Pesticide Sci.*, **20**, 521-527, (1995b).
- Yamamoto, A. et al. : *J. Pesticide Sci.*, **21**, 37-42, (1996).

殺虫剤抵抗性害虫の発生の現状と対策構築における課題 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

アザミウマ類は多くの農作物に被害を及ぼす害虫である。アザミウマ類は体長が 1~2 mm と微小であるため発生初期の発見が困難であるとともに、多くの薬剤に対して抵抗性を発達させている。本稿では近年、農業現場においてとくに発生が多いミナミキイロアザミウマの殺虫剤抵抗性や、ネギアザミウマ、ミカンキイロアザミウマ、ヒラズハナアザミウマ、チャノキイロアザミウマの薬剤感受性について、大阪府で実施した既登録農薬の薬剤検定結果をまとめて紹介するとともに、アザミウマ類の薬剤抵抗性対策に向けた課題を考察した。

ミナミキイロアザミウマ *Thrips palmi* Karny

ミナミキイロアザミウマは 1978 年に宮崎県のピーマンで初めて発生が確認された侵入害虫で、キュウリ、メロン、ナス、ピーマン等の果菜類に被害を及ぼす。大阪府では 1984 年以降にナスやキュウリで被害が拡大したが、1990 年代後半には有効薬剤の使用により本種の発生はほとんど認められなくなった。しかし、2000 年代から再び発生が目立ち始め、近年ではナスやキュウリでの被害が再発している。ナスやキュウリでは本種に対する多くの登録薬剤があるが、大阪府内の個体群に対する各種薬剤の殺虫効果は十分に調べられていなかった。そこで、2003 年に富田林市の施設キュウリより採集した個体群を用い、殺虫効果をナス葉片浸漬法 (柴尾, 2013) により調査した。その結果、マラソン・B PMC 剤、ネオニコチノイド系のイミダクロプリド剤など 5 剤、マクロライド系のスピノサド剤とエマメクチン安息香酸塩剤の殺虫効果は高く、有機リン系のアセフェート剤など 3 剤、カーバメート系のメソミル剤、合成ピレスロイド系のシペルメトリン剤など 4 剤の殺虫効果は低かった (辻野ら, 2005)。その後、2006 年に富田林市の施設キュウリにおいて本種に有効と考えられるスピノサド剤およびクロルフェナピル剤を散布しても十分な防除効果が得られない事例が発生した。そこで、同施設キュウリより採集した個体群を用い、殺虫効果をソラマメ葉片浸漬法 (柴尾, 2013) により調査した。その結果、スピノサド剤とクロルフェナピル剤に対する感受性は低く、大阪府における感受性低下個体群の初確認となった (柴尾ら, 2007)。当時、クロルフェナピル剤に対する感受性低下個体群は高知県で確認されていたが、スピノサド剤に対する感受性低下個体群は全国でも報告がなかった。また、2007 年に富田林市の施設ナスより採集した個体群を用い、殺虫効果をソラマメ葉片浸漬法により調査したところ、ネオニコチノイド系のチアメトキサム剤の殺虫効果が低く、ネオニコチノイド系剤についても感受性低下が認められた (柴尾・田中, 2012a)。さらに、2012 年に大阪府内で採集した 4 地域の個体群についてソラマメ葉片浸漬法により殺虫効果を調査したところ、ネオニコチノイド系の 6 剤、その他の系統のピリダリル剤、マクロライド系のスピネトラム剤などの殺虫効果が低く、エマメクチン安息香酸塩剤を除いて有効な薬剤は認められなかった (柴尾, 未発表)。

ネギアザミウマ *Thrips tabaci* Lindeman

ネギアザミウマはネギ、タマネギ、キャベツ、アスパラガスなど野菜類、施設ミカンやカキに被害を及ぼす害虫である。ネギでは本種に対する多くの登録薬剤があるが、大阪府内の個体群に対する各種薬剤の殺虫効果は十分に調べられていなかった。そこで、2002年に羽曳野市（研究所内）の露地タマネギより採集した個体群を用い、殺虫効果をソラマメ催芽種子浸漬法（柴尾，2013）により調査した。その結果、有機リン系のダイアジノン剤など4剤、マラソン・B PMC剤、合成ピレスロイド系のシペルメトリン剤、ネオニコチノイド系のイミダクロプリド剤、マクロライド系のスピノサド剤とエマメクチン安息香酸塩剤、フェニルピラゾール系のフィプロニル剤の殺虫効果は高く、合成ピレスロイド系のペルメトリン剤、ネオニコチノイド系のアセタミプリド剤、その他の系統のクロルフェナピル剤の殺虫効果は低かった（柴尾・田中，2003）。また、2005年に羽曳野市（研究所内）の貯蔵タマネギで採集した個体群から本種雄成虫の出現が確認され、大阪府内においても産雄単為生殖系統の存在が明らかになった。そこで、同年に採集した個体群を用い、殺虫効果をソラマメ催芽種子浸漬法およびソラマメ葉片浸漬法により調査したところ、ネオニコチノイド系のチアメトキサム剤とジノテフラン剤の殺虫効果が低いことが判明した（柴尾・田中，2012b）。

ミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis* (Pergande)

ミカンキイロアザミウマは1990年に千葉県、埼玉県の花き類で初めて発生が確認された侵入害虫で、キク、バラ、ガーベラなど花き類、イチゴ、キュウリなど野菜類、施設ミカンなど果樹類に被害を及ぼしている。大阪府では1994年以降に水ナス、キク、カーネーションなどで被害が発生している。本種は侵入害虫であり、大阪府内の個体群に対する各種薬剤の殺虫効果は不明であった。そこで、1996年に富田林市の施設ナスおよび2002年に羽曳野市（研究所内）の施設ナスよりそれぞれ採集した個体群を用い、殺虫効果をナス葉片浸漬法により調査した。その結果、1996年の個体群では有機リン系のプロチオホス剤など3剤、カーバメート系のメソミル剤、ネライストキシン系のチオシクラム剤とカルタップ剤、マクロライド系のエマメクチン安息香酸塩剤、その他の系統のクロルフェナピル剤の殺虫効果は高く、有機リン系のイソキサチオン剤とスルプロホス剤、合成ピレスロイド系のシペルメトリン剤など5剤、ネオニコチノイド系のイミダクロプリド剤とニテンピラム剤の殺虫効果は低かった（羽室・柴尾，2000）。また、2002年の個体群では有機リン系のプロチオホス剤など2剤、マラソン・B PMC剤、ネライストキシン系のチオシクラム剤、マクロライド系のスピノサド剤の殺虫効果は高く、有機リン系のアセフェート剤、カーバメート系のカルボスルファン剤、合成ピレスロイド系のアクリナトリン剤など3剤、ネオニコチノイド系のアセタミプリド剤など3剤、その他の系統のトルフェンピラド剤とクロルフェナピル剤の殺虫効果は低かった（柴尾・田中，2006）。さらに、2007年に貝塚市の施設ナスで採集した個体群についてソラマメ葉片浸漬法により殺虫効果を調査したところ、マクロライド系のスピネトラム剤とその他の系統のピリダリル剤の殺虫効果は高かったが、ネオニコチノイド系の6剤の殺虫効果は低かった（柴尾，未発表）。

ヒラズハナアザミウマ *Frankliniella intonsa* (Trybom)

ヒラズハナアザミウマはイチゴ、トマト、イチジクなどに被害を及ぼす害虫である。大阪府内の

個体群に対する各種薬剤の殺虫効果は十分に調べられていなかったため、1999年に岸和田市の休耕地のシロツメクサより採集した個体群を用い、殺虫効果をナス葉片浸漬法により調査した。その結果、有機リン系のアセフェート剤など5剤、カーバメート系のメソミル剤、合成ピレスロイド系のフェンバレレート・マラソン剤など3剤、ネライストキシシン系のチオシクラム剤とカルタップ剤、マクロライド系のスピノサド剤、その他の系統のクロルフェナピル剤の殺虫効果は高かったが、合成ピレスロイド系のエトフェンプロックス剤、ネオニコチノイド系のイミダクロプリド剤など3剤、マクロライド系のエマメクチン安息香酸塩剤の殺虫効果は低かった（羽室・柴尾，2000）。

チャノキイロアザミウマ *Scirtothrips dorsalis* Hood

チャノキイロアザミウマ（在来系統）はブドウ、カンキツ、カキ、チャ、イチゴなどに被害を及ぼす害虫で、近年では国内の一部でピーマン、シシトウ、マンゴーなどに被害を及ぼすチャノキイロアザミウマ新系統の発生が確認されている。2003年に羽曳野市（研究所内）の露地ブドウにおいて本種（在来系統）に有効と考えられる合成ピレスロイド系のペルメトリン剤を散布しても十分な防除効果が得られない事例が発生した。そこで、2005年に同露地ブドウより採集した個体群を用い、合成ピレスロイド系の6剤の殺虫効果をブドウ葉片浸漬法により調査した。その結果、アクリナトリン剤とシフルトリン剤の殺虫効果は高かったが、ペルメトリン剤の殺虫効果は低く、薬剤の種類により殺虫効果が異なっていることが判明した（柴尾・田中，2008）。

アザミウマ類の薬剤抵抗性対策に向けた課題

ここまでアザミウマ類5種の大阪府における薬剤検定結果をまとめて紹介したが、アザミウマ類の薬剤抵抗性対策に向けた今後の課題は四つある。まず、アザミウマ類の簡易薬剤検定法の確立が必要である。本稿では演者が開発したソラマメ催芽種子浸漬法、ソラマメ葉片浸漬法、ナス葉片浸漬法などにより検定を実施した。また、ミナミキイロアザミウマでは森下（1997）、ミカンキイロアザミウマでは片山（1997）、チャノキイロアザミウマでは河合（1997）が薬剤検定法を紹介している。しかしながら、演者の検定法を含めてこれらの各検定法にはそれぞれ一長一短がある。また、作用機作が薬剤により異なるため、同一の検定法により全ての薬剤の殺虫効果を十分に評価できない。したがって、簡易な検定法については各薬剤の作用性を踏まえた手法の確立・統一が望まれる。二つめとして、遺伝子診断等による抵抗性検定技術の開発が必要である。いくら簡易な検定法でも、薬剤を害虫に処理する手法には採集、飼育、判定の作業に時間と労力、経験が必要である。遺伝子診断にはこの欠点を補完し、大量の検体を即座に判定する能力が期待される。今のところ、この目的で実用化された遺伝子診断法は少なく、合成ピレスロイド抵抗性ネギアザミウマを識別する遺伝子診断法（土田，2011）が発表されているにすぎない。今後は殺虫剤の系統ごとの遺伝子診断法を早期に実用化する必要がある。三つめとして、薬剤抵抗性を発達させにくい薬剤散布手法の確立が必要である。一般的に薬剤抵抗性の発達を抑制する方法として薬剤のローテーション散布があげられるが、ほ場におけるローテーション散布の実効性は不明な点が多く、ミナミキイロアザミウマのように有効薬剤が非常に少ない場合にはローテーションが成り立たない場合がある。最後に四つめとして、抵抗性個体の感受性回復を識別する手法の開発が必要である。いくつかの害虫種では一定期間の薬剤の不使用により薬剤の感受性が回復する事例が報告されており、アザミウマ類について

も感受性回復を把握するための遺伝子診断や薬剤使用再開の目安となる閾値の設定が必要である。ただし、ミナミキイロアザミウマでは1年以上にわたり薬剤無淘汰で飼育しても有機リン系や合成ピレスロイド系の感受性が回復しない事例があり（柴尾，未発表）、抵抗性獲得メカニズムを遺伝的に解析しなければ技術的困難を伴うことが予想される。

引用文献

- 羽室弘治・柴尾 学（2000）関西病虫研報 42：43－44.
- 片山晴喜（1997）植物防疫 51：235－238.
- 河合 章（1997）植物防疫 51：587－589.
- 森下正彦（1997）植物防疫 51：232－234.
- 柴尾 学（2013）植物防疫 67：248－251.
- 柴尾 学・田中 寛（2003）関西病虫研報 45：61－62.
- 柴尾 学・田中 寛（2006）今月の農業 50(2)：78－82.
- 柴尾 学・田中 寛（2008）関西病虫研報 50：171－172.
- 柴尾 学・田中 寛（2012a）関西病虫研報 54：67－69.
- 柴尾 学・田中 寛（2012b）関西病虫研報 54：185－186.
- 柴尾 学・岡田清嗣・田中 寛（2007）関西病虫研報 49：85－86.
- 土田 聡・森下正彦・望月雅俊（2011）2010年果樹研究所普及成果情報.
- 辻野 護・長町知美・柴尾 学（2005）関西病虫研報 47：147－148.

殺虫剤抵抗性害虫の発生の現状と対策構築における課題 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

はじめに

施設野菜類の栽培で問題となるコナジラミ類は、タバココナジラミとオンシツコナジラミの2種である。これらの害虫は、寄主植物を吸汁することによる草勢低下や排泄物によるすす病の発生、さらにはウイルス病を引き起こす。特に、タバココナジラミが媒介するTYLCVによるトマト黄化葉巻病およびCCYVによるウリ類退緑黄化病の被害は大きく、生産現場で問題となっている。

これらの被害を引き起こすタバココナジラミは、薬剤感受性や寄主適合性などの生物的特徴が異なる多くのバイオタイプの存在が知られている (Perring, 2001)。我が国の施設野菜類で問題となるタバココナジラミは、バイオタイプ Q と B である。特に、2004年に初確認されたバイオタイプ Q (Ueda and Brown, 2006) は、国内での分布域を拡大しているとともに、各種薬剤に対する感受性が低く、防除が困難な害虫である。本講演では、コナジラミ類のなかからバイオタイプ Q に関する殺虫剤抵抗性の現状および抵抗性管理における課題などについて紹介する。

バイオタイプ Q における殺虫剤抵抗性の現状

バイオタイプ Q 成虫に対する薬剤感受性の報告では、京都府 (徳丸・林田, 2010)、福岡県 (浦・嶽本, 2008)、熊本県 (樋口, 2006)、大分県 (岡崎ら, 2010) および宮崎県 (松浦, 2006) の個体群に対して、ピリダベン、ジノテフランおよびニテンピラムの殺虫効果が認められている。ただし、これらの薬剤に対しても、近年の報告において感受性低下が示唆されている事例もある (近・岩瀬, 2012)。

殺虫剤抵抗性の発達を防止するためには、作用性の異なる薬剤のローテーション散布が望まれる。この技術が機能するには、薬剤の使用により感受性が低下しても、他の薬剤を使用している期間にその薬剤に対する感受性が元のレベルに回復することが重要であり、抵抗性発達の様相を明らかにすると同時に、いったん生じた抵抗性の安定性の検討が必要である (浜, 1988)。そこで、バイオタイプ Q 成虫において、ネオニコチノイド系 7 薬剤、ピメトロジンおよびエトフェンプロックスの感受性の安定性について検討した。2004年に採集した熊本個体群を薬剤無淘汰で累代飼育し、LC₅₀値の変動をみた。最も感受性が回復傾向を示したイミダクロプリドの LC₅₀値は、累代当初 1000ppm 以上であったが、累代飼育 50 か月後では 131ppm となった。しかし、イミダクロプリド水和剤の常用濃度は 50ppm であり、感受性が回復傾向であったバイオタイプ Q に対しても、実用上の防除効果は低いと考えられる。他の 8 薬剤の LC₅₀値は大きな変動がなかった。これらの結果からバイオタイプ Q の抵抗性は、遺伝的に安定していることが示唆される。

バイオタイプ Q に対する薬剤防除

ここではモデルケースとして、トマト黄化葉巻病が問題となる、促成トマト栽培におけるバイオタイプ Q の防除体系を取り上げる。感受性検定や圃場試験の結果などを基に、バイオタイプ Q に対する有効薬剤を表 1 に示した。

促成トマト栽培におけるバイオタイプQの防除は、①成虫侵入の有無と量、②増殖の速さにより3つの時期に分けられ、その時期ごとに使用薬剤や散布間隔を変える必要がある。すなわち、熊本県の定植～11月中旬では、TYLCVの感染抑制効果が認められている粒剤を定植時期に処理することが基本である（大矢・植草，2009）。定植後も野外からの侵入が多いので、ウイルスの感染を防ぐために成虫を対象に防除する。11月下旬～3月中旬では、野外から成虫の侵入がないため、バイオタイプQを増やさないことが重要であり、幼虫を対象とした薬剤でも十分な効果が期待できる。殺成虫効果のある薬剤は、春以降の防除に用いることができるように可能な限り使用しない。3月下旬以降では、ハウス内の温度が高くなり、バイオタイプQの増殖が早くなるため、感染防止および野外へ成虫を出さないために殺成虫効果のある薬剤を主体に選択する。これらの時期ごとの防除のねらいと各薬剤の特性から考えられる薬剤の使用時期を表1に示した。

表1 バイオタイプQに対する有効薬剤の使用時期と防除効果

系統名	成分名	使用時期 ¹⁾			防除効果 ²⁾	
		I	II	III	成虫	幼虫
電子伝達系阻害剤	ピリダベン	○		○	◎	◎
	トルフェンピラド			○	△	○
	フェンピロキシメート		○		×	○
ネオニコチノイド系	ジノテフラン	○		○	○	○
	ニテンピラム	○		○	○	○
	アセタミプリド		○		△	○
	チアクロプリド		○		△	○
マクロライド系	ミルベメクチン		○		×	○
	レピメクチン	○		○	○	○
	スピネトラム	○		○	○	○
環状ケトエノール系	スピロメシフェン		○		×	○
	スピロテトラマト		○		×	○
その他	ピリフルキナゾン	○		○	◎	○
気門封鎖剤			○		○	○
微生物殺虫剤			○		○	○

1) 使用時期 I：定植～11月中旬，II：11月下旬～3月中旬，III：3月下旬以降

2) 防除効果 ◎：非常に高い，○：高い，△，やや低い，×：低い

殺虫剤抵抗性管理における課題

バイオタイプQに対する防除対策は、ハウス開口部への防虫ネットの展張、粘着板の設置および近紫外線除去フィルムの被覆など薬剤以外の方法もある。しかし、トマトハウスに侵入したバイオタイプQやTYLCVの感染を抑制するためには殺虫剤の使用が不可欠であり、防除体系を維持するためには殺虫剤抵抗性管理が重要となる。抵抗性発達を遅延させる管理対策として、異なる系統の薬剤による混用処理やローテーションが考えられる。これらの対策は有効薬剤が多いと実施しやすく、新規の作用機構を持つ殺虫剤開発の貢献度が高い（山本，2012）。バイオタイプQに対する有効薬剤は、栽培が長期となる促成トマトでは、ローテーションなどを実施するにはその数が十分ではない。特に、定植時期の処理剤は、ネオニコチノイド系薬剤であるジノテフランおよびニテンピラム粒剤の2剤となる。定植後の薬剤散布では、成虫の発生やウイルス感染を抑制するためにネオニコチノイド系薬剤を使用するケースが多く、同一系統薬剤の連続使用による抵抗性の発達が懸念される。さらに、トマト栽培において殺虫剤抵抗性管理をより難しくしているのは、授粉昆虫を利用

している場合、その期間は授粉昆虫に影響の小さい薬剤が求められるなど、薬剤の選択に制限が増えることである。

殺虫剤抵抗性の管理対策として、組替え作物（Bt 作物）の抵抗性管理に基づいた高薬量／保護区戦略の活用が期待されている（鈴木，2012）。高薬量／保護区戦略は、Bt 作物の商業的栽培における抵抗性管理の研究結果に基づいており、Bt 作物の栽培において抵抗性発達を抑制している。しかし、高薬量／保護区戦略をトマト栽培のタバココナジラミに適用することは容易ではない。その理由として、この対策では殺虫剤が使用されない保護区を設け、感受性のタバココナジラミを温存する必要があるが、感受性個体も TYLCV を媒介して被害を引き起こすためである。TYLCV に感染すると収量が激減するため、トマトハウス内では媒介虫であるタバココナジラミの密度は可能な限り低く抑えたい。しかし、これでは保護区の効果が期待できない。トマト栽培で高薬量／保護区戦略を導入する方法の一つとして、TYLCV の被害を低減できるトマト黄化葉巻病抵抗性品種の利用が考えられる。抵抗性品種であれば、ある程度のタバココナジラミ密度は許容できるかもしれない。ただし、タバココナジラミを多発生させることは、TYLCV 抵抗性を打破する新たな系統の発生が危惧される。

トマト栽培が終了したハウスでは、TYLCV を保毒したタバココナジラミを野外に出さないために、ハウス開口部を閉め切る密閉処理が実施されている。この防除対策は、殺虫剤抵抗性管理の観点からも有効と考えられる。同一系統の薬剤を複数回散布した後の栽培終了時のトマトハウスでは、抵抗性を獲得したタバココナジラミが発生していることも考えられる。そのため、栽培終了時の密閉処理でタバココナジラミを死滅させることは、地域に抵抗性個体を定着させないと予想される。現在は TYLCV の伝染環を断ち切るための出さない対策であるが、この対策が殺虫剤抵抗性発達を遅延させることが明らかになれば、タバココナジラミが寄生する他作物での出さない対策の実施率や他の抵抗性管理対策への関心が高くなるなどの効果も期待される。

引用文献

- 浜 弘司（1988）応動昆 32：205-209.
樋口聡志（2006）今月の農業 50（9）：84-88.
近 達也・岩瀬亮三朗（2012）植物防疫 66：442-449.
松浦 明（2006）今月の農業 50（2）：57-61.
岡崎真一郎ら（2010）大分農林水産研研報（農業編）4：13-22.
大矢武志・植草秀敏（2009）関東病虫研報 56：133-135.
Perring, T. P. (2001) Crop Prot. 20：725-737.
鈴木芳人（2012）植物防疫 66：380-384.
徳丸 晋・林田吉王（2010）応動昆 54：13-21.
Ueda, S. and J. Brown（2006）Phytoparasitica 34：405-411.
浦 広幸・嶽本弘之（2008）福岡農総試研報 27：23-28.
山本敦司（2012）農薬誌 37：392-398.

(殺虫剤抵抗性害虫の発生の現状と対策構築における課題：アブラムシ類)
国内におけるネオニコチノイド系殺虫剤抵抗性ワタアブラムシの発生

宮崎県総合農業試験場 生物環境部
松浦 明

はじめに

多くの野菜、花き、果樹の重要害虫であるワタアブラムシ (*Aphis gossypii* Glover) は、吸汁加害による生育障害やすす病を起こすとともに多くの植物ウイルスを媒介することが知られている。本種は1980年頃から、有機リン剤やカーバメート剤に対する抵抗性が(浜, 1987)、また、1980年代の終わり頃には、合成ピレスロイド剤にまで高度の抵抗性が確認され(西東, 1990)、防除が非常に困難であった。しかし、1990年代以降は、高い基礎活性と浸透移行性に優れた各ネオニコチノイド剤の登場により、現地の防除は比較的容易となっていた。

ところが、2012年に宮崎県、大分県の両県で栽培されているピーマンおよびきゅうりに発生したワタアブラムシのネオニコチノイド剤に対する感受性低下が確認された(松浦・中村 2012; 岡崎, 2012, 2013; 宮崎県, 2012; 大分県, 2013)。2013年10月現在では、和歌山県、高知県にまで発生地域が広がっており、今後も各地で問題となると思われる。本講演では、これまでのネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの発生経緯や各剤に対する感受性の情報とともに、寄生性や抵抗性関連遺伝子についての調査結果について紹介する。

宮崎県および大分県におけるワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性の現状

1) 発生経緯

宮崎県では、2012年4月に複数の冬春ピーマン、きゅうりほ場において発生が確認された。現地の情報では、2月頃からワタアブラムシが目立ってきたため、ネオニコチノイド剤による防除を行ったが、効果が十分でなく多発したとのことであった。前作では同様の発生が確認されていないため、この作での発生が宮崎県での初発生と考えられる。また、大分県では、2011年の夏秋ピーマン圃場1か所においてネオニコチノイド系の薬剤に対して防除効果が得られない事例が確認され、翌2012年の同じく夏秋ピーマンの定植直後である5月から県内全域の産地でワタアブラムシが多発生した。

2) 感受性検定

宮崎県では幼苗処理法(熊本県, 2000; 曾根ら, 1998)、大分県ではマンジャーセル法(鶴田ら, 1999)を用いて、それぞれ葉片浸漬法により、市販のネオニコチノイド剤7剤に対する薬剤感受性を、常用濃度により調査した。

宮崎県では、2008年採集の感受性個体群(きゅうりにより累代飼育)のネオニコチノイド剤に対する補正死虫率は96.4~100%と高かったが、新たに2012年に現地から採集した5個体群は、イミダクロプリド水和剤26.7~65.5%、クロチアニジン水溶剤20.0~35.7%、チアメトキサム水溶剤7.1~42.3%、ジノテフラン水溶剤0~27.3%、ニテンピラム水溶剤6.7~32.1%の低い補正死虫率となり、5剤の感受性低下が確認された。また、アセタミプリド水溶剤は86.2~100.0%、チアクロプリド水

和剤は 90.2~100.0%となり、2 剤の常用濃度における感受性低下は確認されなかった (表 1)。

大分県で採集された個体群も同様に感受性の低下が確認されたが、宮崎県では感受性低下が確認されなかったアセタミプリドとチアクロプリドでも常用濃度における感受性低下が確認された (表 2)。

表1 宮崎県で採集したワタアブラムシ無翅成虫に対する各薬剤の殺虫効果(補正死虫率%)

薬剤名	希釈倍率	きゅうり		ピーマン			きゅうり	感受性
		Miyazaki	Kushima	NichinanA	NichinanB	Miyakonojyo		
イミダクロプリド水和剤	2000	45.5	26.7	43.3	57.1	65.5	100	
クロチアニジン水溶剤	2000	27.3	23.3	20.0	35.7	34.5	100	
チアメトキサム顆粒水溶剤	3000	27.3	26.2	42.3	7.1	13.8	96.4	
ジノテフラン顆粒水溶剤	2000	27.3	6.7	0	0	3.4	96.4	
ニテンピラム水溶剤	2000	13.6	22.4	6.7	32.1	20.7	100	
アセタミプリド水溶剤	2000	100	96.7	100	100	86.2	100	
チアクロプリド顆粒水和剤	2000	100	90.2	92.3	100	100	100	

表2 大分県で採集したワタアブラムシ無翅成虫に対する各薬剤の殺虫効果(補正死虫率%)

薬剤名	希釈倍率	ピーマン				きゅうり	感受性
		BA-01	BA-02	TA-01	KA-01		
イミダクロプリド顆粒水和剤	5000	21.7	55.1	5.3	4.8	100	
クロチアニジン水溶剤	2000	1.2	0	0	0	100	
チアメトキサム顆粒水溶剤	2000	28.4	7.2	0	1.6	100	
ジノテフラン顆粒水溶剤	2000	2.2	2.8	0	1.6	98.3	
ニテンピラム水溶剤	1000	4.4	0	0	0	98.3	
アセタミプリド水溶剤	4000	91.2	79.8	65.0	45.8	100	
チアクロプリド顆粒水和剤	2000	82.2	32.5	51.7	70.0	100	

また、各ネオニコチノイド剤の半数致死濃度 LC₅₀ 値に対する抵抗性比を調査したところ、常用濃度で感受性低下が確認された 5 剤では約 40~700 倍と高くなっていましたが、感受性低下が確認されなかったアセタミプリドとチアクロプリドでもそれぞれ高くなっており、今後の更なる抵抗性発達が懸念される結果であった (松浦・中村, 2012)。

ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性個体群の確認は、国内では今回が初めての事例である。海外では中国のワタ産地でイミダクロプリドとアセタミプリド (Wang et al., 2007)、オーストラリアの同じくワタ産地で、クロチアニジン、チアメトキサム、アセタミプリド (Herron and Wilson, 2011) で発生が確認されているが、宮崎、大分県で確認された個体群のような複数のネオニコチノイド剤に対して高い抵抗性を示す個体群は、海外でも確認されていない。

これまでワタアブラムシに対する切り札として使用されてきたネオニコチノイド剤に対する抵抗性の発達により、非常に深刻な被害が想定されたため、感受性検定と併せて他系統剤の感受性についても調査を実施した。その結果、宮崎、大分両県の個体群で発生したネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシは、有機リン、合成ピレスロイド、カーバメート系に対して総じて感受性が高かった。また、その他系統のトルフェンピラド、ピメトロジン、ピリフルキナゾン、フロニカミドの感受性も高かったため(松浦・中村, 2012 ; 岡崎, 2012)、メジャー作物ではとりあえず代替薬剤に困る状況にはなっていないが、今後その他系統剤での抵抗性発達を懸念するところである。

一方、農薬登録数が少ないマイナー作物では、ネオニコチノイド剤が主要なアブラムシ剤となっ

ている作物もあり、抵抗性ワタアブラムシが寄生する作物によっては問題となる可能性がある。

3) 寄主植物

ワタアブラムシには寄生性の異なるバイオタイプの存在が報告されており（稲泉，1985；西東，1991），ネオニコチノイド剤抵抗性個体群がどのような寄生性を示すかは防除対策上重要な情報となる。

ネオニコチノイド剤抵抗性個体群の発生は、現在、宮崎県ではピーマン、きゅうり、ズッキーニ、大分県ではピーマンで確認されているが、宮崎県のきゅうりとピーマンから採集した個体群を6種類の作物に接種した結果、両作物の個体群とも、ピーマン、きゅうり、メロン上での増殖率が高く、なす、イチゴ、キク上の増殖率は低かった。また、2008年にきゅうりより採集した感受性個体群も、同様の結果であった（松浦・土田，2013）。なお、他の作物への寄生性は現在調査中である。

4) 遺伝的特性

宮崎県内で採集された抵抗性個体群7系統と2008年に採集された感受性個体群1系統のミトコンドリアCOI遺伝子塩基配列を決定し、DNAデータベースに登録された種内系統データ（Komazaki et al, 2010；駒崎，2012）と照合した結果、8個体群は全て同一のハプロタイプであり、抵抗性および感受性系統間に遺伝的な変異は認められなかった（松浦・土田，2013）。

5) 抵抗性機構

宮崎県内と大分県内で採集した抵抗性ワタアブラムシ個体群では、ニコチン性アセチルコリン受容体のアミノ酸の一部が変異していることがシーケンス解析で確認された（平田ら，2013；平田ら，準備中）。この作用点でのアミノ酸変異は、既にヨーロッパで発生しているネオニコチノイド剤抵抗性モモアカアブラムシでも同様に確認されている（Bass et al., 2011）。また、ワタアブラムシでは、中国のイミダクロプリド抵抗性個体群で既に確認されているが（Shi et al., 2012），中国の個体群は、イミダクロプリドを用い、実験室内で60世代選抜淘汰した個体群であり、今回、宮崎、大分両県のような自然発生個体群での作用点変異の確認は、初めての事例ではないかと思われる。今後は、抵抗性の分子機構の知見を利用して、正確なモニタリング法である抵抗性遺伝子診断技術の開発に期待したい。

さいごに

ネオニコチノイド剤はアブラムシに対する特效薬であることから、これまで園芸作物の栽培において、非常に広く普及していた殺虫剤である。

今回のワタアブラムシのネオニコチノイド剤に対する抵抗性発達は非常に大きな問題であるが、宮崎県では代替剤が明らかとなっていることから、とりあえず生産現場において大きな被害にはつなげていない。しかし、現在、宮崎県の施設ピーマン、きゅうりでのアブラムシ防除では、ネオニコチノイド剤に代わり、ピメトロジンなどのその他の系統の剤が集中して使用されていることから、今後、これらの剤に対する感受性低下が進む可能性も否定できず、将来を楽観視できる状況にはないと考えている。

そのため、今後も継続したモニタリングによる抵抗性発達の徴候を早期に把握することが重要であり、宮崎県では本年度より主要な薬剤に対する感受性の継続調査を行っているところである。また、現在、国内ではネオニコチノイド剤抵抗性が確認されていないモモアカアブラムシについても、

既に海外では、抵抗性が確認されており、今後はモモアカアブラムシの感受性も把握する必要があると考えている。

今後、宮崎県では定期的なモニタリングや寄主植物および有性世代発生の有無などの生態解明を行いながら、抵抗性を発達させる恐れのない生物農薬や気門封鎖剤を活用した防除技術の評価も併せて進め、安定した防除体系の構築に努めていきたいと考えている。

引用文献

- Bass et al. (2011) Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neuroscience* 12:51.
- 浜 弘司(1987) アブラムシの薬剤抵抗性. 植物防疫 41:159-164.
- 稲泉三丸(1985) ワタアブラムシの生活環とバイオタイプ. 植物防疫 39:426-430.
- Herron and Wilson (2011) Neonicotinoid resistance in *Aphis gossypii* Glover (Aphididae: Hemiptera) from Australian cotton. *Australian Journal of Entomology* 50:93-98.
- 平田晃一ら (2013) ワタアブラムシにおけるネオニコチノイド剤抵抗性機構. 第 57 回応動昆虫大会 : 50. (講要)
- 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.
- Komazaki et al. (2010) Diversity of Japanese *Aphis gossypii* and comparison with other *Aphis* species based on the mitochondrial cytochrome oxidase I sequence. *Entomological Society of America* 103:916-924.
- 駒崎進吉 (2012) ワタアブラムシの種内分化を DNA 解析してわかったこと. 植物防疫 66:18-23.
- 宮崎県 (2012) 平成 24 年度病害虫防除情報第 6, 14 号. <http://www.jppn.ne.jp/miyazaki/>
- 松浦 明・土田 聡 (2013) ネオニコチノイド系薬剤抵抗性ワタアブラムシの寄主植物とミトコンドリア COI 遺伝子解析. 第 57 回応動昆虫大会 : 49. (講要)
- 松浦明・中村正和 (2012) 宮崎県における複数のネオニコチノイド系薬剤に対して感受性が低下したワタアブラムシの発生. 九病虫研会報 59. (印刷中). (講要)
- 中村 正和・松浦 明 (2012) 宮崎県で発生したネオニコチノイド系薬剤感受性低下ワタアブラムシに対する代替薬剤の検討. 九病虫研会報 59. (印刷中). (講要)
- 大分県 (2013) 平成 25 年度病害虫発生予察特殊報第 2 号. <http://www.jppn.ne.jp/oita/>
- 岡崎真一郎 (2012) 近年大分県の夏秋ピーマンで多発生するワタアブラムシに対する各種薬剤の殺虫効果. 九病虫研会報 59. (印刷中). (講要)
- 岡崎真一郎 (2013) ネオニコチノイド系薬剤に対して感受性低下した初確認. 第 57 回応動昆虫大会 : 49. (講要)
- 西東 力 (1990) ワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover の薬剤抵抗性. III. 合成ピレスロイド剤抵抗性個体群の発生. 応動昆虫 34:174-176.
- 西東 力 (1991) ワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover の薬剤抵抗性. V. 寄主選好性と有機リン剤抵抗性の関係. 応動昆虫 35:145-152.

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.

Shi et al. (2012) The mutation in nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit may confer
resistance to imidacloprid in *Aphis gossypii* (Glover). Journal of Food, Agriculture &
Environment 10:1227-1230.

Wang et al. (2007) Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to selected insecticides
on cotton from five cotton production regions in Shandong, China. J. Pestic. Sci. 32:372-378.

チョウ目害虫の殺虫剤抵抗性

日本農薬株式会社 総合研究所
西松 哲義

はじめに

農作物に被害をもたらす主要な害虫には、チョウ目、カメムシ目、コウチュウ目、アザミウマ目、ハエ目、ハチ目などがあるが、特にチョウ目（蝶、蛾）害虫は、その幼虫による食害の大きさから、度々多くの作物に被害をもたらす問題となっている。統計資料に基づくと、全世界の殺虫剤の販売額のうち、チョウ目害虫を対象に処理される殺虫剤の販売額は、その約30%を占め、処理面積で見ると44%にも及ぶ¹⁾。また、国内においては、1998年～2010年に各都道府県病害虫防除所から発表された警報・注意報は375件あり、その70%がチョウ目害虫であったという²⁾。以上のことから、チョウ目害虫は、農業生産上、重要度の高い害虫種群とって過言ではないだろう。

1. 世界におけるチョウ目害虫の抵抗性発達事例

これまで多くの害虫種で殺虫剤に対する抵抗性発達事例が報告されているが、被害の甚大さから最重要害虫といえるチョウ目害虫においても、多くの種で殺虫剤抵抗性が報告され問題となっている。報告によると1914年から2007年までに抵抗性が報告された害虫種は306種に上り、その28%をチョウ目害虫が占める。また、延報告件数は全体で4,875件になり、そのうちチョウ目害虫は他害虫種群に比べて最も多い36%を占め、抵抗性発達の観点から見ても重要な害虫種群といえる³⁾。

そのチョウ目害虫に関する抵抗性の報告事例を害虫種別にみると、国内でも多くの薬剤に対する感受性低下が報告されているオオタバコガ、コナガ、シロイチモジヨトウ、ハスモンヨトウなどが上位を占める⁴⁾。どのような薬剤に抵抗性を発達させているかという観点からみると、幅広い殺虫スペクトラムを示す有機リン、カーバメート剤、合成ピレスロイド剤だけでなく、チョウ目害虫に特異的に高い効果を示すベンゾイルフェニルウレア系、ジアシルヒドラジン系、オキサダイアジン系、フェニルピラゾール系、フェニルピロール系、天然物殺虫剤のマクロライド系、スピノシン系、BT系、そして行動制御剤であるフェロモン剤と、あらゆる殺虫剤に対する抵抗性の事例が報告されている。また、その抵抗性機構も多岐にわたり、薬物酸化酵素（MFO）、グルタチオンSトランスフェラーゼ、カルボキシエステラーゼ等の解毒代謝能の増大や、作用点の変異などが報告されている⁵⁾。

以上のようなチョウ目害虫の殺虫剤に対する抵抗性発達は、新規な薬剤が導入される度に問題となり、最近、その問題に対処するため、IRAC（Insecticide Resistance Action Committee、殺虫剤抵抗性管理委員会）には、チョウ目害虫を対象としたIRM（Insecticide Resistance Management）施策の推進を目的に独自のワーキンググループも設立されている。

2. コナガの殺虫剤抵抗性について

前述したように、多くのチョウ目害虫で殺虫剤に対する抵抗性が発達し問題となっているが、中

でも、コナガにおける薬剤抵抗性は、世界的にみても重要な課題として認識され、1985年から2011年までに6回にわたり開催された「コナガおよびアブラナ科野菜害虫の管理に関する国際ワークショップ」でも取り上げられるほどである。また、国内においても、古くから多くの研究者によって、生理、生態、生化学的側面から薬剤抵抗性に関する研究が体系的に検討されている。本稿では、研究内容の詳細は割愛するが、ごく最近、総説⁵⁾も著されているので参考にして頂きたい。

1) タイにおける薬剤抵抗性発達

タイではアブラナ科野菜の栽培面積の拡大と栽培の周年化により、各種害虫による作物の被害が顕在化し、特にコナガ、シロイチモジヨトウ、ハイマダラメイガなどのチョウ目害虫の被害は普遍的な問題となっている。中でも、コナガは年間発生世代数が多く密度も高いため、最重要害虫となっている。これら、害虫の防除は殆ど殺虫剤に依存している状況であるが、コナガは極めて短期間で抵抗性を発達させ多くの薬剤が使用不能となり、新規な薬剤が次々に導入されても、高度な抵抗性の発達により使用薬剤が目まぐるしく変遷するという歴史を持っていた。その抵抗性も既存薬剤と交差抵抗性関係のないBT剤やアバメクチン剤が1970年代後半、および1980年代後半に導入されたことで比較的落ち着いていた⁶⁾。

その様な状況の中で、日本農薬(株)では、2007年末にフルベンジアミド剤を新規なチョウ目害虫防除剤として上市したが、そのわずか1-2年後の2008年末から2009年にかけて、タイ現地農家からフルベンジアミド剤の防除効果が低下したとの情報を得た。その後、2009年-2010年にかけてタイ現地での薬剤の使用状況の調査、現地コナガの感受性モニタリングを実施し、さらにその抵抗性の特性検討、抵抗性機構の解明に取り組んできた。2009年に4地域から6個体群、2010年には6地域から8個体群の延14個体群を採集し感受性を検討したところ、地域差はあるものの、バンコク周辺で採集した多くの個体群で、フルベンジアミドに対する感受性が著しく低下していることを確認した。採集した個体群の飼育維持の難しさから、抵抗性の全貌を解明するには至っていないが、これまで得られた情報を提供し、今後の国内での抵抗性対策に供したい。

なお、フルベンジアミドに関するコナガの薬剤感受性モニタリングは、タイ以外の国でも実施しているが、概ねIRACジアミド部会から提供される情報⁸⁾と同様であることを確認している。本稿では紙面の都合もあり、タイのコナガを用いた研究を中心に紹介したい。

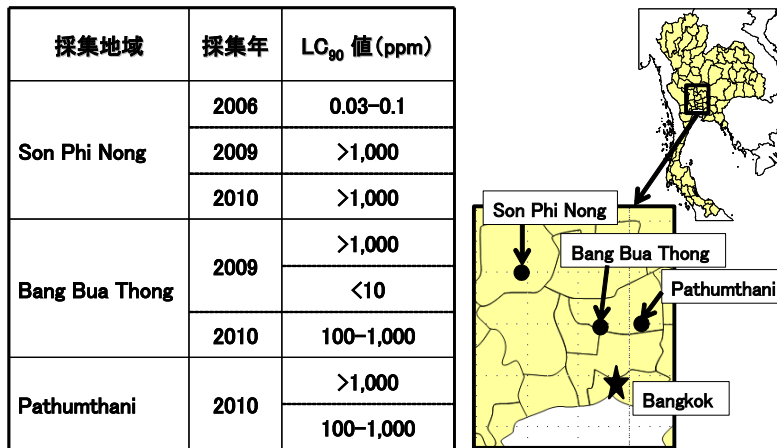
2) 2009年-2010年に採集したタイ産コナガの薬剤抵抗性

図1にタイから採集した個体群のフルベンジアミドに対するLC₉₀値を示したが、2009年に採集した3個体群で、極めて高い抵抗性が確認された。ただし、Bang Bua Thong地域で採集した2個体群では、顕著な感受性差が認められた。さらに2010年に採集した3個体群では、若干の差はあるものの、いずれの個体群でも高い抵抗性が確認された。フルベンジアミドの上市1年前にも1個体群を採集して検定しているが、当時の個体群は日本農薬(株)で維持している大阪感受性系統と同等の感受性を示していることから、タイにおけるフルベンジアミドに対する感受性低下は、2007年以降の本剤の使用による淘汰によってもたらされたものと考えられた。

図2には、2009年に採集した1個体群(Ban Pla Ma)と2010年に採集した3個体群(Son Phi Nong, Suphanburi, Pathunthani)の各種殺虫剤に対する感受性を示したが、フルベンジアミドとは異なる作

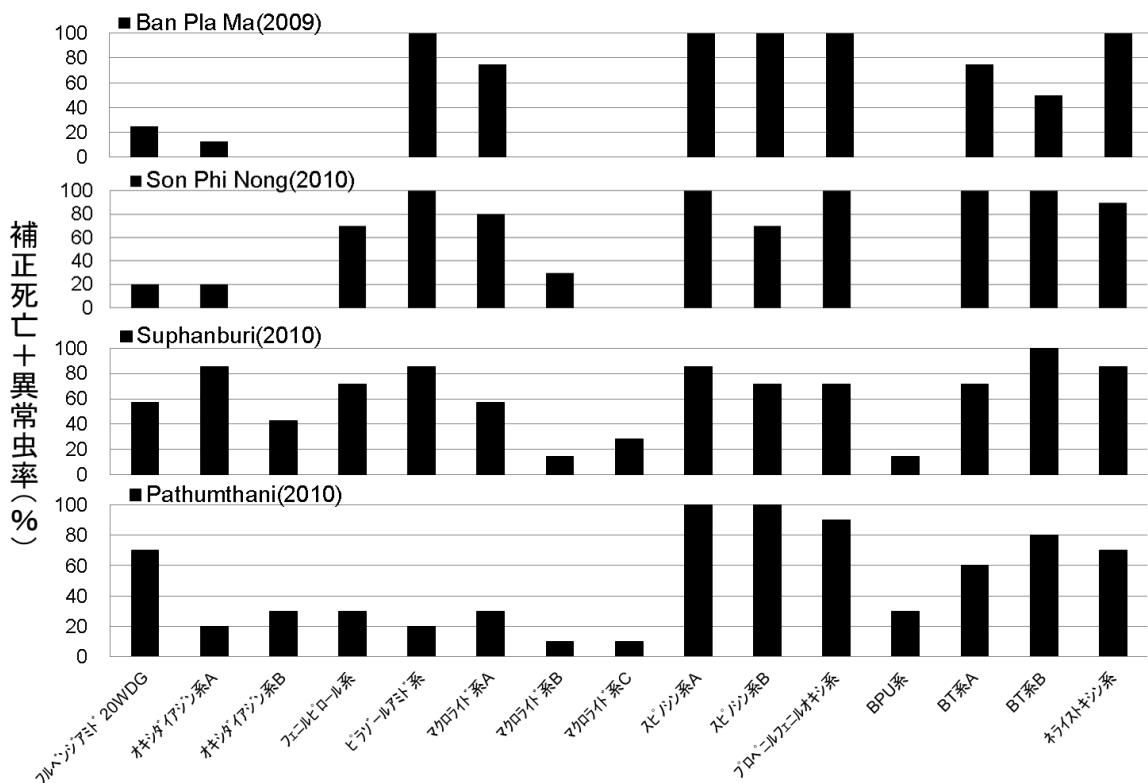
用機作の薬剤に対しても感受性が低下していることが示唆され、タイ採集個体群は多くの薬剤に複合抵抗性を発達させていると考えられた（未発表）。各個体群のそれぞれの薬剤に対する感受性に若干の相違が認められるが、それは採集地域での薬剤散布履歴と関係しているものと推察される。さらに、飼育が比較的容易であった Pathumthani 個体群の遺伝様式を正逆交雑により検討したところ、およそ優劣中間型で複数の遺伝子支配を受けている様相を示した。

日本農薬(株)では、販売初年度から現地販社を通じて、異なる作用機作を示す薬剤のローテーション散布を推奨していたが、以上のような状況から、2010年以降、感受性低下の著しいバンコク近郊地域でのアブラナ科野菜を中心としたフルベンジアミドの販売を自粛している。



試験方法: 葉片浸漬法 (バクチャイ)
3.4 齢接種、処理3-5日後調査

図1 タイ採集個体群のフルベンジアミドに対する感受性



試験方法: カラン葉片浸漬法、供試虫: コナガ 3 令、供試薬剤: フルベンジアミドは100 ppm、他薬剤は、コナガに対する国内最高実用濃度

図2. タイ採集個体群の各種薬剤に対する感受性 (2009-2010)

3) フルベンジアミドに対するタイ産コナガの薬剤抵抗性機構⁷⁾

採集した多くの個体群がフルベンジアミドに対して高度の抵抗性を発達させていたことから、その抵抗性機構を解析すべく、Son Phi Nong 個体群を用いて各種検討を進めた。

代謝酵素阻害剤 (PBO : 酸化酵素(mfo)阻害、DEM : グルタチオン S - 転移酵素、TOCP : 加水分解酵素阻害剤、TPP : 加水分解酵素阻害剤) とフルベンジアミドとの共力作用を検討したが、いずれの阻害剤との混用でもフルベンジアミドに対する顕著な感受性回復は認められなかった。また、フルベンジアミドの顆粒水和剤と乳剤との活性差もほとんど認められなかったことから、本個体群のフルベンジアミドに対する抵抗性は、解毒代謝能の向上や皮膚透過性の低下以外の要因によるものと考えられた。

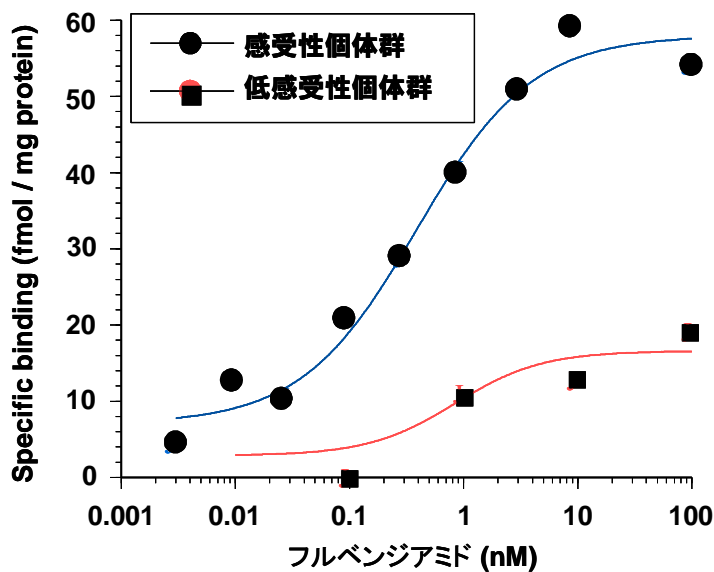


図3. フルベンジアミドに対して感受性の異なる個体群のリアノジン受容体におけるリアノジン結合量に及ぼすフルベンジアミドの影響

そこで、フルベンジアミドの作用点であるリアノジン受容体レベルでの検討を進めた。まず、感受性個体群 (2006 年 Son Phi Nong 採集個体群) と抵抗性個体群 (2010 年 Son Phi Nong 採集個体群) のリアノジン受容体を用いて、リアノジン結合量に対するフルベンジアミドの影響を検討したところ、抵抗性個体群でリアノジン結合量に及ぼすフルベンジアミドの作用が著しく低下していることが確認され、本抵抗性は作用点の変異によるものと考えられた (図3)。さらに、両個体群のリアノジン受容体のアミノ酸配列を比較検討したところ、抵抗性個体群において 839 番目のアミノ酸が、アラニンからプロリンに置換されていることが明らかとなった。本置換のもたらす影響を検討するため、カイコのリアノジン受容体を用いて 839 番目のアミノ酸をアラニン、もしくはプロリンに置換し、フルベンジアミドの作用を検討したところ、プロリン置換したリアノジン受容体で、フルベンジアミドの応答が低下することが確認された。

以上のことから、フルベンジアミドに対する抵抗性には、作用点であるリアノジン受容体のアミノ酸置換による変異が関与していると考えられた。

3) フルベンジアミドに対する薬剤抵抗性発達の要因

フルベンジアミドの抵抗性の要因を探るべく現地農家を訪問し、薬剤の使用実態を聴取した。その結果、タイにおいては、アブラナ科野菜のチョウ目害虫防除を目的に、一作期に7~16回の殺虫剤散布が実施され、そのうち4~10回の散布をフルベンジアミドに頼っていたことが明らかになった。また、実際の防除では、ラベルで推奨される濃度は遵守されていたものの、散布液量については推奨値の約1/2で散布されており、処理薬量が推奨値の約半分であったことも判明した。

以上のことから、有効な薬剤が少ない中での新規薬剤への偏重によるフルベンジアミドの使用頻度の高さが、年間を通じて恒常的に発生する本種への淘汰圧を高め、さらに低液量散布による散布ムラや低薬量での使用が本抵抗性発達を助長したものと考えられた。

3. 今後の課題

チョウ目害虫における抵抗性対策の課題を考えるに当たり、本稿ではタイにおけるコナガの薬剤抵抗性とフルベンジアミドに対する抵抗性発達に焦点を絞って情報を提供した。先のNIASシンポジウム「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方」第5回一殺虫剤抵抗性問題の最前線⁹⁾において、IRACジアミド部会の活動が紹介されているが、本会の正式な活動開始は2008年のことである⁹⁾。2007年にフルベンジアミドが上市されたタイにおいては、ローテーションで使用される有効剤が少なかったことも、フルベンジアミドの使用頻度の増加につながったと推察される。また、ローテーション防除の概念が、実際に薬剤防除に携わる農家レベルまで十分に浸透しにくいことも物語っている。

国内におけるチョウ目害虫の薬剤感受性低下の問題はコナガに限ることではなく、またフルベンジアミド以外の薬剤も直面する課題である。本研究会の開催趣旨にもあるように、薬剤抵抗性対策を考える上では、地域を越えた連携と独法や都道府県の研究担当者、普及部門担当者、農薬メーカーを含む関係者の情報共有の促進と協力関係の構築が不可欠であると考えられる。

日本農薬(株)では、現在、フルベンジアミド中心に国内ではコナガのみならず各種チョウ目害虫の薬剤感受性モニタリングを検討中である。今後の抵抗性対策に向けて、得られた情報を整理し、使用現場および指導機関にフィードバックする計画である。

引用文献

- 1) i-map SIGMA データベース (i-map SIGMA DB, 英国 Kynetec 社)
- 2) 武田 (2011) : 農業協同組合新聞 (<http://www.jacom.or.jp/tokusyu/2011/tokusyu110512-13448.php>)
- 3) Whalon M. E., et al. (2008) : Global Pesticide Resistance in Arthropods, 5-31
- 4) Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD), <http://www.pesticideresistance.com/index.php>
- 5) Michael J. F., et al. (2013) : Annu. Rev. Entomol, 58: 517-41
- 6) 桑原 (1996) : 農林業協力専門家通信, 17(3), 1-22
- 7) 犬飼ら (2013) : 日本農薬学会第 38 回大会講演要旨集, 68
- 8) IRAC Diamide Working Group : <http://www.irc-online.org/teams/diamides/>
- 9) 白石 (2012) : NIAS シンポジウム 第 5 回 講演要旨集, 50

遺伝子情報を利用した薬剤抵抗性の機構解明と診断技術開発

農業生物資源研究所昆虫科学研究領域 篠田 徹郎

薬剤抵抗性は、害虫集団中にもともといた薬剤に強い性質を持った少数の個体が、薬剤による淘汰・選抜を受け、生き残った個体同士が交配を繰り返した結果、集団内で抵抗性を持つ個体の割合が増大することによって起こる。薬剤に強くなる要因は、主に、標的部位の感受性の低下や、解毒分解酵素活性の増大と考えられるが、いずれの場合にも遺伝的な変異を伴う。この原因遺伝子の変異を明らかにできれば、PCR 法などを用いた薬剤抵抗性の遺伝子診断が可能になる。

遺伝子診断には、薬剤を用いた検定法に比べて、1. 迅速・高精度、2. 死虫を用いて検定可能、3. 劣性遺伝子でも検出可能、4. 個体単位で複数の薬剤に対する抵抗性の診断が可能、など多くのメリットがある（土田, 2012）。したがって、遺伝子診断法を用いれば、圃場における抵抗性個体の頻度を低密度なうちから、ほぼリアルタイムにモニタリングすることが可能になり、その結果に基づく適切な薬剤のローテーション等により、抵抗性発達の抑制・管理が可能となると期待される。一方、当然ながら、遺伝子診断法は、薬剤抵抗性の原因遺伝子、もしくはそれと強く連鎖した変異部位が不明な場合には利用できない。また実用的な観点からは、抵抗性の発生が一部の地域にとどまり、広い地域に蔓延する前に、遺伝子診断技術を開発することが重要である。昆虫のゲノム・遺伝子情報は、抵抗性原因遺伝子を素早く同定し、遺伝子診断技術開発をスピードアップするために非常に有効である。

昆虫のゲノム情報は、2000 年のショウジョウバエの全ゲノムを皮切りに、これまでに、ハマダラカ、セイヨウミツバチ、キョウソヤドリコバチ、カイコ、コクヌストモドキ、エンドウヒゲナガアブラムシなどで発表されており、現在も多数のゲノムプロジェクトが進行中である。生物研でも、最近、コナガのゲノムデータベースを構築し、公開している（上樂, 2012; Jouraku et al., 2013）。ゲノム配列情報は、詳細な連鎖地図と併せて、ポジショナルクローニングによる抵抗性原因遺伝子の同定に大きな威力を発揮する。例えば、カイコで BT 剤の抵抗性原因遺伝子として、新規な ABC トランスポーターの同定に成功している (Atsumi et al., 2012)。しかし、農業害虫種の数是非常に多く、自分が対象とする害虫のゲノム情報が得られる状況にはまだほど遠い。一方、近年、次世代シーケンサーによる塩基配列解析コストが急速に低下しており、それを用いて個人レベルで、対象とする害虫種の網羅的トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) や、Rad-seq (Restriction Site Associated DNA Sequence) と呼ばれる大規模ジェノタイプングを行い、抵

抗性遺伝子を解析することが可能になってきた。

本講演では、ゲノム情報や次世代シーケンサーを用いた抵抗性遺伝子の最近の解析事例、およびその将来展望について簡単に紹介したい。

参考資料

Atsumi et al. (2012) PNAS 109: E1591-E1598.

上樂明也 (2012) NIAS シンポジウム「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方」第 5 回 講演要旨集 33-37.

Jouraku et al. (2013) BMC Genomics 14:464.

末次克行 (2013) 静岡県植物防疫協会 (第 2 回) 研究会

土'田聡 (2012) NIAS シンポジウム「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方」第 5 回 講演要旨集 46-49.

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(LC₅₀)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/cm²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

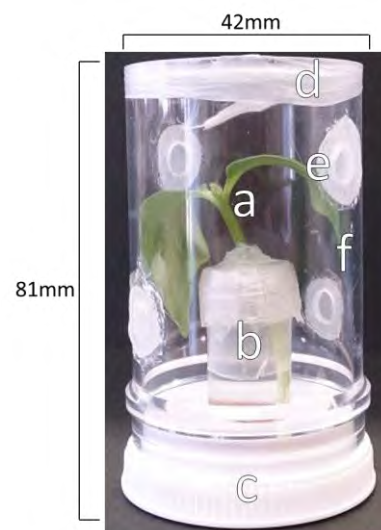


図1 幼苗処理法検定容器
a:検定植物, b:水入り管瓶, c:スチロール容器の蓋(管瓶固定部), d:パラフィルム, e:換気口(径6mm, 4カ所), f:スチロール容器(本体部)。

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 (0.1~02%) 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LC₅₀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。

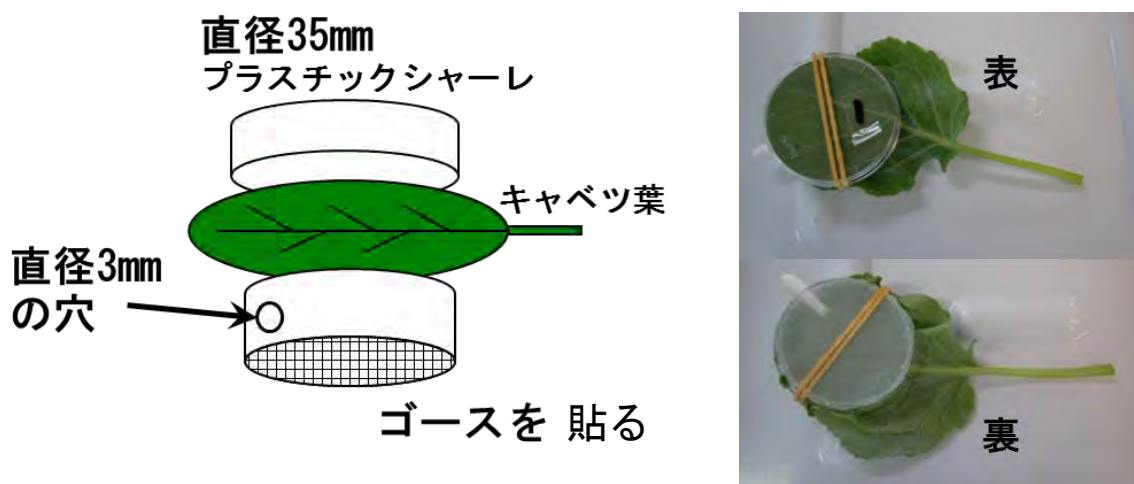


図1 成虫の感受性検定に用いる検定容器

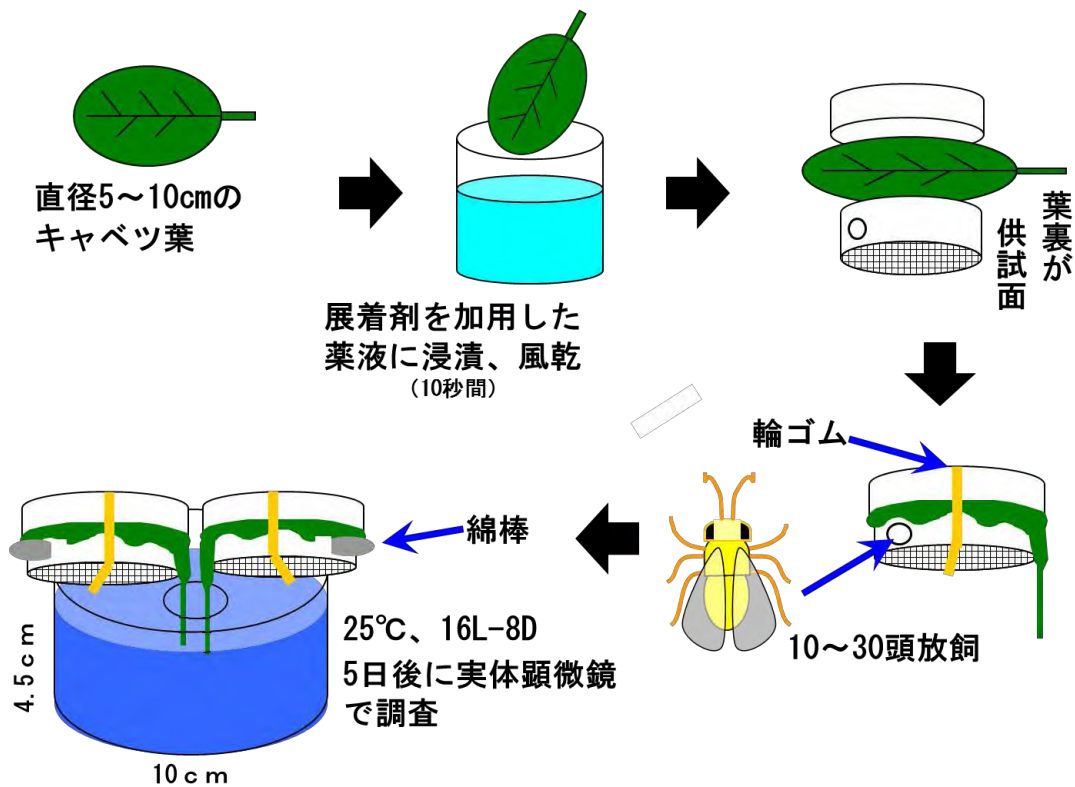


図2 タバコナジラミ成虫の感受性検定法の手順

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。

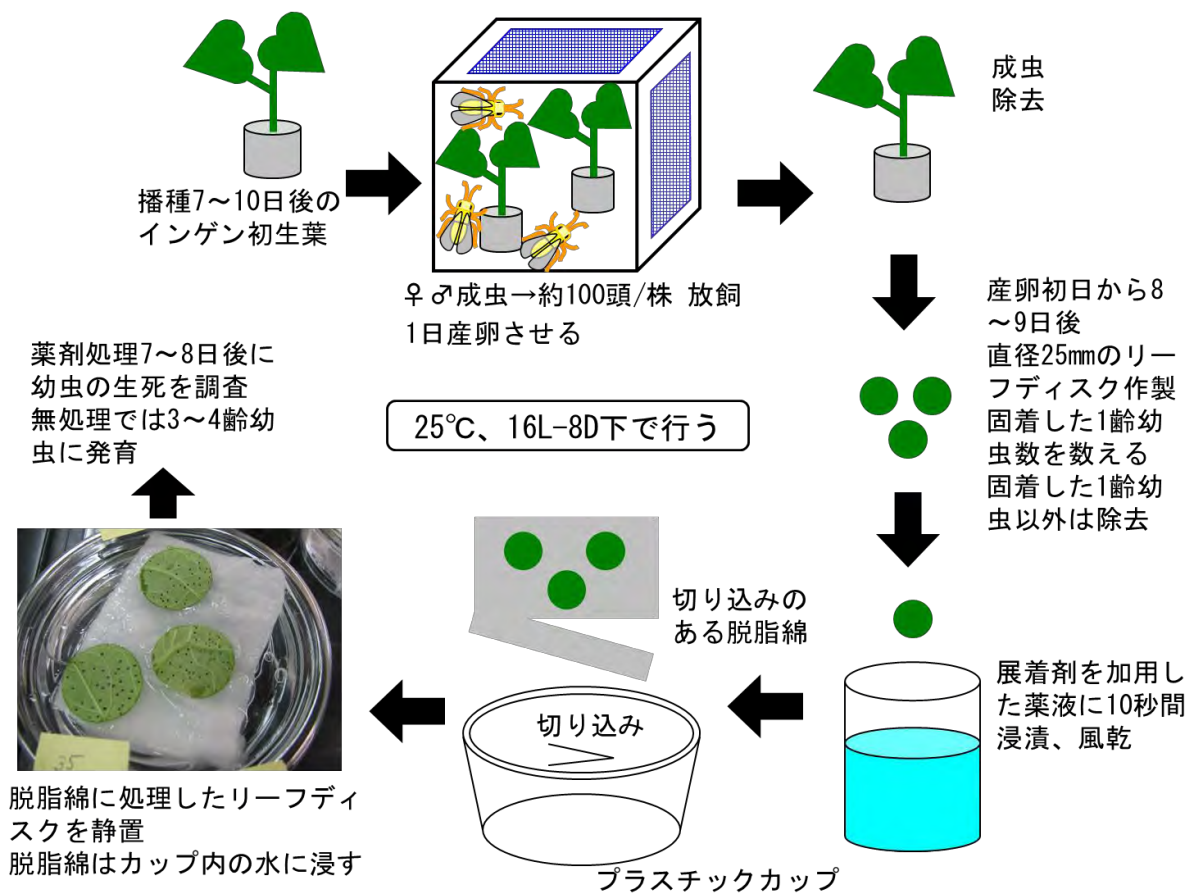


図3 タバココナジラミ幼虫の感受性検定法の手順

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うと、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。

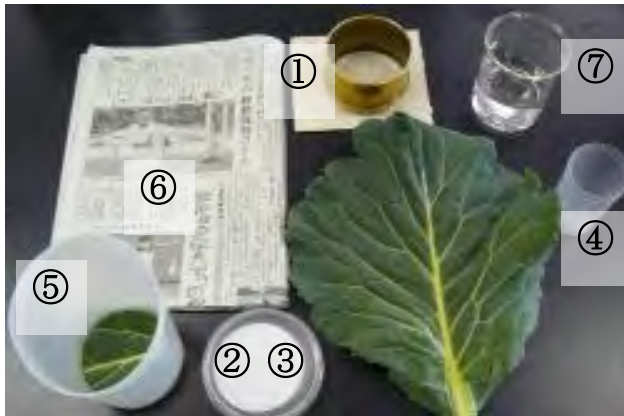
1. 供試虫ならびに材料の準備

- 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

ヌクレオチドターミネーターの取り込み効率の違いなどの影響を受けると予想される。そのため、より正確な頻度の推定には実測値の補正が必要となる。補正值は抵抗性型のアミノ酸(セリン)をコードするコドン(TCC)を持つ PCR 産物(抵抗性遺伝子)と感受性型のアミノ酸(アラニン)をコードするコドン(GCC)を持つ PCR 産物(感受性遺伝子)を様々な割合で混合したサンプルのダイレクトシーケンシング後、ピークの高さの実測値を期待値に対してプロットして得られた回帰式から算出される。抵抗性遺伝子と感受性遺伝子を 1:9、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、9:1 で混合し、ダイレクトシーケンシングを行った結果を図2に示した。抵抗性遺伝子の割合の増加に伴い、最初の塩基配列における T(赤)のピークが高くなっているのが分かる。回帰式を求めるには少々手間がかかるが、補正なしでも抵抗性遺伝子頻度の大まかな推定は可能である。手法の詳細については当日説明する予定である。

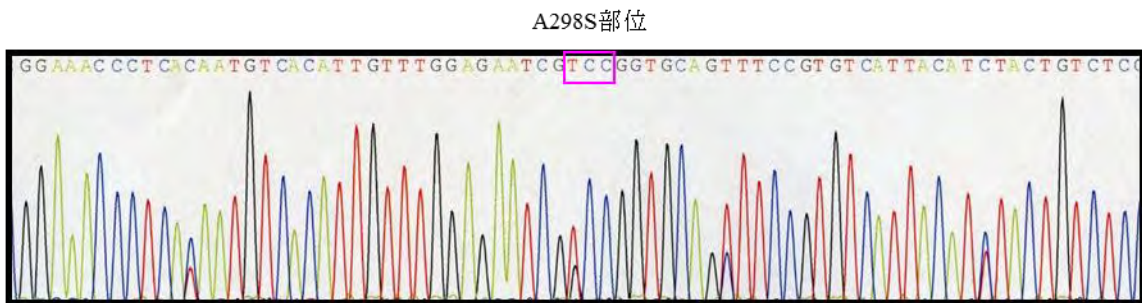


図1. コナガのAChE遺伝子のダイレクトシーケンシングの一部。

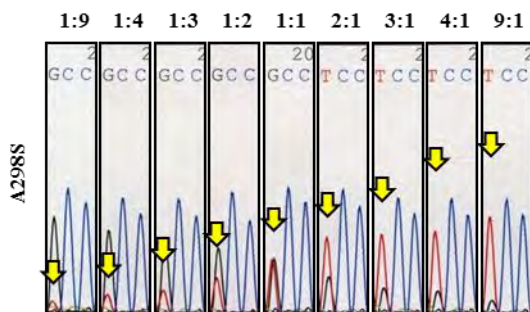


図2. 抵抗性遺伝子と感受性遺伝子のPCR産物を異なる割合で混合したサンプルのダイレクトシーケンシング。

引用文献

- Kwon et al., D.H. et al. (2008) J. Med. Entomol. 45: 912-920.
 Lee, D.-W. et al. (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 353: 591-597.

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

