食塩水浮遊法によるイモゾウムシの死亡卵の除去

大野 豪*・佐々木 智基・小濱 継雄

沖縄県ミバエ対策事業所

Screening Dead Eggs of the West Indian Sweet Potato Weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae), by the Brine-flotation Technique. Suguru OHNO,* Tomonori SASAKI and Tsuguo KOHAMA Fruit Fly Eradication Project Office, Okinawa Prefectural Government; Naha, Okinawa 902-0072, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 49: 255-258 (2005)

Abstract: In the artificial rearing of the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus*, dead eggs should be screened before egg-seeding on an artificial diet because they could become sources of bacterial or fungal contamination of the diet. We tested whether the dead eggs of the weevil could be removed using the brine-flotation technique. When the eggs were mixed with 14% saltwater in a glass a few days before hatching and freshwater was gently added to the glass, we were able to recognize three categories of eggs: (1) Eggs floating on the surface of the freshwater, (2) eggs suspended at the boundary between the saltwater and freshwater, and (3) eggs that had sunk to the bottom of the saltwater. The hatchability of (1) and (2) did not differ significantly, while the hatchability of (3) was extremely low (<11%) and significantly lower than that of (1) and (2). Therefore, the number of dead eggs to be planted on a diet can be reduced by discarding the (3) eggs. Saltwater submersion of the eggs, *per se*, did not produce any undesirable effect on hatching. However, the mean hatchability of (1) and (2) was 72%, indicating that dead eggs could not be thoroughly excluded by the brine-flotation technique.

Key words: Bacterial/fungal contamination; brine-flotation technique; dead eggs; *Euscepes postfasciatus*; specific gravity

緒 言

沖縄県では、特殊病害虫に指定されているサツマイモの害虫イモゾウムシ *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (甲虫目: ゾウムシ科) の不妊虫放飼法による根絶防除のため、人工飼料を用いた本種の大量増殖法の開発が進められている(山岸・下地, 2000)。現在、沖縄県ミバエ対策事業所では、山岸・下地(2000)に記述されている方法をもとに、試験的な採卵・飼育が行われている。この方法で回収された卵の孵化率は70%前後であり(沖縄県ミバエ対策事業所, 未発表データ)、孵化しない卵(以下、死亡卵)がかなりの割合で含まれる。人工飼料(Shimoji and Kohama, 1996b; Shimoji and Yamagishi, 2004)を用いた本種幼虫の飼育においては、卵を通じたバクテリアやカビによる飼料の汚染がしばしば問題になっている(下地, 2003; 大野ら, 2004, 2005a)。死亡卵はバクテリア・カビの発生源になるため、採卵から飼料への接種までの間に死亡卵を生じさせないための工夫、および生じてしまった死亡卵を除去するための方法、の双方が必要とされている。本研究では、

後者の死亡卵除去法のひとつとして、以下に説明する食塩水浮遊法が使用可能かどうかを検討する。

本種の卵は、糞や飼料の小片等の塵から分離するため、卵と塵の混合物に14%食塩水を加えて攪拌したのち静置し、上から真水を静かに注ぎ、食塩水と真水の境界に浮遊する卵をピペットで吸い取って回収されている(塵の多くは食塩水に沈み、一部は真水の表面に浮く; 大野ら, 2004を参照)。この分離法は、食塩水に対する卵と他の塵の比重の差を利用したものであり、人糞中に含まれる寄生虫の卵やシストの回収法として一般的で、食塩水浮遊法(brine-flotation technique)と呼ばれている(たとえば、小宮ら, 1960)。イモゾウムシの死亡卵と正常卵の間で卵表面の性質(たとえば、外傷の有無)が異なっていれば、食塩水に対する比重も異なるかもしれない。もしこの予想が正しければ、飼料への接種直前にもう一度食塩水浮遊法を適用することにより、死亡卵が除去できる可能性がある。そこで本研究では、孵化直前(採卵から6日間保管後)の卵に対する食塩水浮遊法の適用によって卵を複数の群に分け、それらの間で孵化率を比較した。昆虫類の死亡卵除去に対す

* E-mail: oonosugr@pref.okinawa.jp

2005年4月21日受領(Received 21 April 2005)

2005年8月24日登載決定(Accepted 24 August 2005)

DOI: 10.1303/jjaez.2005.255

る食塩水浮遊法の適用の試みはこれまでに報告されていない。

本文に入るに先立ち、イモゾウムシの採卵作業に協力していただいた琉球産経(株)の皆様には厚くお礼申し上げる。

材料および方法

本研究で供試したイモゾウムシは、1994年8月に沖縄県読谷村のサツマイモ圃場から採集され、沖縄県ミバエ対策事業所において、 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明期14時間：暗期10時間の条件下でサツマイモ塊根を用いて累代飼育されたものである(年当たり5世代、各世代の親虫数は7,500頭以上)。

2003年3月から5月にかけてサツマイモ塊根から自然脱出したイモゾウムシ成虫から採卵し、14%食塩水を用いた食塩水浮遊法によって卵を回収した(詳細は大野ら、2004を参照)。一回の採卵で得られた10,000~20,000卵を蒸留水ですすいだのち、これらをひとまとめにして黒色ナイロンゴースで水切りし、ろ紙を敷いたプラスチックシャーレにゴースごと入れた。卵が入ったシャーレは、 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度60~90%、明期14時間：暗期10時間に保たれた恒温器中に使用まで保管した。 25°C では、本種卵の孵化は産卵日から7日後に始まるため(Shimoji and Kohama, 1996a)、試験には6日齢の卵を用いた。保管後の卵は互いに接着し合って固まりとなっていたため、使用の直前に蒸留水をかけ、面相筆を用いて丁寧にほぐした。以上の作業を、2003年5月から6月にかけて必要な回数だけ(下記参照)繰り返した。

試験1. 食塩水浸漬の孵化への影響

食塩水浸漬そのものによる孵化への悪影響の有無を確認するため、食塩水浮遊法の検討に先立って以下の試験を行った。保管後ほぐした卵から面相筆を用いてランダムに100個選り出し、湿らせたろ紙と黒色ナイロンゴースを敷いたシャーレ内に並べた。残りの卵は、14%食塩水に30分浸漬したのち蒸留水ですすぎ、これらから同様に100個選んで別の同様なシャーレ内に並べた。これら2シャーレは上記と同じ恒温器に戻し、翌日から処理後6日目(採卵後12日目)まで毎日孵化幼虫数を数えた。大野ら(2005b)にならい、群ごとの孵化率、孵化までの平均日数、および孵化までの日数の変動係数(孵化のばらつきの指標)を算出した。以上の作業を、異なる日に回収された卵を用いて12回繰り返したのち、これら3変数をそれぞれ、Wilcoxonの符号付順位検定を用いて2群間で比較した。

試験2. 食塩水浮遊法による卵の分離

死亡卵除去に対する食塩水浮遊法の有用性を評価するため、以下の試験を行った。保管後ほぐした卵をピーカーに移し、14%食塩水を注いで攪拌し、外見上水の流れがなくなるまで静置した。続いて、上から蒸留水を静かに注いで再び静置したのち、食塩水と蒸留水の境界に浮遊する卵

(以下、境界浮遊卵)、および他の位置に存在する卵の有無を肉眼で確認した。境界浮遊卵と他の卵をピペットで吸いとり分け、それぞれを蒸留水でよくすすいだのち、各群から可能であれば100卵をランダムに選んだ(最大数が100に満たない場合はすべての卵を用いた)。食塩水注入から卵のすすぎまでの作業は30分以内に行った。卵は試験1と同様にシャーレに並べ、双眼実体顕微鏡下で観察したのち恒温器に戻し、処理後6日目まで毎日孵化幼虫数を数えて孵化率を算出した。孵化幼虫数が20を超えた群については、孵化までの平均日数と孵化までの日数の変動係数も算出した。以上の作業を、異なる日に回収された卵を用いて12回繰り返した。卵は境界浮遊卵を含めて3群に分けることができたため(結果を参照)、孵化率は2群ごとにWilcoxonの符号付順位検定で比較し、その後Sequential Bonferroni法(Rice, 1989)によって検定グループ全体の有意確率を5%に調整した。

結 果

試験1. 食塩水浸漬の孵化への影響

食塩水に30分浸漬した卵と浸漬していない卵の間で、孵化率、孵化までの平均日数、および孵化までの日数の変動係数に有意差はなかった(Wilcoxonの符号付順位検定、いずれの変数も $p>0.1$ 、データは省略)。このため、食塩水浸漬そのものによる孵化への悪影響はないとみなし、続く試験を行った。なお、食塩水浸漬卵と非浸漬卵のデータをプールした場合、12反復を通した孵化率の平均は74.4%(範囲52.0~95.0%)であった。

試験2. 食塩水浮遊法による卵の分離

12回の食塩水浮遊法の試行のすべてにおいて、食塩水と真水の境界に浮遊する卵のほか、蒸留水の表面に浮かぶ卵(以下、表面浮遊卵)と食塩水に沈む卵(以下、沈下卵)が観察された(Fig. 1)。実際の卵数は数えていないが、いずれの試行においても、境界浮遊卵が他の2群の卵より外見上はるかに多かった。12反復のうち1回で表面浮遊卵が71個しか回収できなかったが、他の場合では3群すべてから100卵が得られた。いずれの反復においても、境界浮遊卵と表面浮遊卵の間には実体顕微鏡下での形態の違いはみられなかったが、沈下卵には、退色して縮んでいるもの、あるいは膨張しているものが多数観察された(正常卵との区別が困難なものも存在したため、類別データは記録しなかった)。表面浮遊卵の孵化率は、71個だけ回収された1反復において低かった(39.4%)が、他の反復では境界浮遊卵の孵化率と同程度であった(Table 1)。それに対し、沈下卵の孵化率は著しく低く、高くても11%であった(Table 1)。境界浮遊卵と表面浮遊卵の間に孵化率の有意差はなかったが、これら2群と沈下卵の間では孵化率が有意に異なった(Wilcoxonの符号付順位検定、Sequential Bon-

Table 1. Hatchability (%) of *E. postfasciatus* eggs that were separated into three categories (A, B, and C) defined in Fig. 1

Egg category	Replication No. ^a												Mean±S.E. ^b
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	91	71	74	76	39	76	67	60	74	76	70	65	70.0±3.5 a
B	76	74	80	70	69	79	73	72	71	80	69	66	73.3±1.3 a
C	10	8	4	2	2	0	2	11	1	4	1	1	3.8±1.1 b

^a For each replication, 100 eggs were randomly sampled from each category except the fifth replication of category A, where only 71 eggs could be obtained.

^b Same letters indicate no significant difference between categories (Wilcoxon signed-rank tests with the Sequential Bonferroni adjustment, $p>0.05$).

Fig. 1. Eggs of *E. postfasciatus* mixed with 14% saltwater in a glass with freshwater subsequently added gently to the glass. The following three categories of eggs were observed. A. Eggs floating on the surface of the freshwater. B. Eggs suspended at the boundary between the saltwater and freshwater. C. Eggs that had sunk into the saltwater.

feroni 法による調整済み $p<0.05$). 境界浮遊卵と表面浮遊卵の間で、孵化までの日数の平均と変動係数 (Table 2) はともに有意に異ならなかった (Wilcoxon の符号付順位検定, 両変数とも $p>0.4$).

考 察

本研究により、採卵から 6 日間保管後のイモゾウムシ卵のうち 14% 食塩水に沈むもの (沈下卵) は、食塩水と真水の境界に浮遊する卵 (境界浮遊卵) および真水の表面に浮く卵 (表面浮遊卵) と比べて、孵化率が著しく低く、その大部分が死亡卵であることが明らかになった。沈下卵が外見上の異常を示すものが多かったという事実は、正常卵と死亡卵の間で卵表面の状態が異なっており、食塩水に対する比重も異なるという当初の予想を支持する。本研究の結果から、人工飼料への本種卵の接種に先立って、食塩水に沈む卵を除去すれば、飼料に接種される死亡卵数をいくらか減らすことができると考えられる。

ただし、試験 2 における、食塩水に沈む卵を除去した残

Table 2. Comparisons of means and coefficients of variation (CV, %) of egg period of *E. postfasciatus* between categories A and B defined in Fig. 1^a

Egg category	No. of replications	Mean egg period ^b	CV of egg period ^b
A	12	9.2±0.1 (8.6–9.9)	13.9±0.8 (8.9–18.4)
B	12	9.1±0.1 (8.6–9.5)	13.6±0.8 (8.8–18.3)

^a Data were obtained from the same eggs used in Table 1.

^b Mean±S.E. (range); means were not significantly different between the egg categories (Wilcoxon signed-rank test, $p>0.4$ for both variables).

りの卵の孵化率 (境界浮遊卵と表面浮遊卵をプールした値; Table 1 から計算) は、12 反復の平均で 71.6% であった。この値は試験 1 における、食塩水浮遊法を適用していない卵の孵化率と大差ない。試験 1 から、食塩水浸漬そのものによる孵化への悪影響はないと判断されたため、この結果は、食塩水浮遊法では取り除けない死亡卵がかなりの程度存在することを示している。沈下卵は境界浮遊卵よりはるかに少なかったため、沈下卵の除去による接種卵の孵化率向上への効果は、あるとしても検出できないほど小さかったのかもしれない。食塩水浮遊法による死亡卵除去をイモゾウムシの人工飼育に導入するか否かを決定するためには、次の段階として、沈下卵の除去が、実際にバクテリア・カビによる人工飼料の汚染の抑制に寄与できるかどうかを確かめる必要がある。

真水の表面に浮かぶ卵が生じた理由は明らかでない。本研究で使用した卵は、採卵時に一度、他の塵との分離のために 14% 食塩水浸漬を経験しており、その時点では境界浮遊卵として回収された。このため、真水に浮く性質は保管中に獲得されたはずである。表面浮遊卵と境界浮遊卵との間で孵化までの日数に有意差がないので、卵の発育の違いによってこうした性質が生じた可能性は少ない。実体顕微鏡では確認できない小さな外傷によって、真水に浮くか否かの違いが生じたのかもしれない。本研究では、表面浮

遊卵と境界浮遊卵の間に孵化率の有意差は観察されなかったが、孵化幼虫の生存・発育や羽化成虫の質に関わる形質の差は不明であり、今後調べる必要がある。また、12反復のうち、回収できた表面浮遊卵が最も少なかった1回において、孵化率が低かった原因も不明である。全体の卵数に占める表面浮遊卵の比率と孵化率との関係も調べる必要があるだろう。

摘 要

イモゾウムシの人工飼育において、死亡卵はバクテリアやカビによる人工飼料の汚染源になりうるため、これらは飼料への接種前に除去できることが望ましい。採卵後25°Cで6日間保管した、孵化直前のイモゾウムシ卵を14%食塩水に入れ、上から真水を静かに注いだ場合、(1)真水の表面に浮く卵、(2)真水と食塩水の境界に浮遊する卵、および(3)食塩水に沈む卵が存在することがわかった。(1)と(2)の間で孵化率は有意に異ならなかったが、(3)の孵化率は著しく低く(11%以下)、(1)・(2)のそれと有意に異なった。このため、食塩水を用いて(3)を取り除くことにより、人工飼料に接種される死亡卵数を減らすことができる。食塩水浸漬そのものによる孵化への悪影響は観察されなかった。しかし、(1)と(2)を合わせた平均孵化率は72%であり、これは食塩水浸漬だけでは除去できない死亡卵があることを示している。

引 用 文 献

- 小宮義孝・小林昭夫・杉山太幹・久津見晴彦(1960) 鉤虫卵検査法の再検討—冬期検査時における浮游法および培養法の鉤虫卵検出力について—。寄生虫学雑誌 9: 480–485。[Komiya, Y., A. Kobayashi, T. Sugiyama and H. Kutsumi (1960) Comparative studies on the technics for stool examination for hookworm ova during the cold climate, particularly on the recovering rate of hookworm ova with brine floatation technic and on culturing one with filter paper. *Jpn. J. Parasitol.* 9: 480–485.]
- 大野 豪・佐々木智基・小濱継雄(2005a) イモゾウムシ卵のエタノール浸漬による人工飼料のバクテリア汚染抑制：卵をファーセラン水溶液とともに飼料に接種した場合。九病虫研会報 51: 41–44。[Ohno, S., T. Sasaki and T. Kohama (2005a) Suppression of bacterial contamination of the artificial diet by ethanol-submersion of eggs of the West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae), before planting eggs suspended in a furcellaran solution on the diet. *Kyushu Pl. Prot. Res.* 51: 41–44.]
- 大野 豪・佐々木智基・小濱継雄(2005b) イモゾウムシ卵の保管中の明暗条件および保管後のファーセラン水溶液への浸漬が孵化に及ぼす影響。九病虫研会報 51: 45–48。[Ohno, S., T. Sasaki and T. Kohama (2005b) Neither light/dark conditions nor submersion of eggs in the furcellaran solution after incubation affect hatching of the West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). *Kyushu Pl. Prot. Res.* 51: 45–48.]
- 大野 豪・佐々木智基・浦崎貴美子・小濱継雄(2004) エタノールによる卵表面処理がイモゾウムシの孵化後の生存・発育に及ぼす影響。九病虫研会報 50: 40–43。[Ohno, S., T. Sasaki, K. Urasaki and T. Kohama (2004) The effect of egg-surface treatment with ethanol on post-hatching survival and development of the West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). *Kyushu Pl. Prot. Res.* 50: 40–43.]
- Rice, W. R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- 下地幸夫(2003) イモゾウムシの卵接種が起因となる人工幼虫飼料汚染の防止。沖縄農業 37: 57–60。[Shimoji, Y. (2003) Prevention of contamination on the artificial larval diet of West Indian sweetpotato weevil *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) from their inoculated eggs. *J. Okinawa Agric.* 37: 57–60.]
- Shimoji, Y. and T. Kohama (1996a) A simple method for collecting eggs of the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). *Appl. Entomol. Zool.* 31: 37–42.
- Shimoji, Y. and T. Kohama (1996b) An artificial larval diet for the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). *Appl. Entomol. Zool.* 31: 152–154.
- Shimoji, Y. and M. Yamagishi (2004) Reducing rearing cost and increasing survival rate of West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae) on artificial larval diet. *Appl. Entomol. Zool.* 39: 41–47.
- 山岸正明・下地幸夫(2000) 不妊虫放飼法によるゾウムシ類の根絶(7) イモゾウムシの大量増殖・不妊化・マーキング・輸送・放飼。植物防疫 54: 476–478。[Yamagishi, M. and Y. Shimoji (2000) Eradication of weevils by sterile-insect-release method (7) Mass-production, irradiation, transportation and release of the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire). *Plant Prot.* 54: 476–478.]