人工飼料によるニカメイチュウの累代飼育に関する研究

第5報 人工飼料の栄養条件と休眠幼虫の健康度¹

釜 野 静 也・湯 嶋 健

農林省農業技術研究所

(1967年5月19日受領)

On the Successive Rearing of Rice Stem Borer on the Artificial Diets under Aseptic Conditions. V. Nutritional Relationship between Components of Artificial Diets and Physiological Weakness of Diapausing Larvae. Seiya KAMANO and Takeshi YUSHIMA (National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Kita-ku, Tokyo) *Jap. J. appl. Ent. Zool.* 11 : 119—124 (1967)

The larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* WALKER, were reared on several artificial diets of different compositions under diapause-inducing condition (25°C and 12 hr photoperiod). After 60 days of aseptic rearing, the larvae were kept at 8°C for 60 days, then they were incubated at 25°C for pupation. When the larvae were reared on diets containing rice bran or rice germ seedlings, most of the larvae survived after low temperature treatment. On the other hand, if the larvae were reared on four other kinds of diets which lack in plant materials above-mentioned, 80% of larvae died during the course of low temperature treatment. The larval blood proteins are divided into three main protein bands by agar gel electrophoresis technique; that is, albumin and globulin bands moving to anode side and another globulin band moving to cathode side. Of these bands, the globulin band moving to cathode side was more clearly detected in the diapausing larvae which were reared on suitable diet than that of the larvae reared on unsuitable diet. Accordingly, the inspection of protein fractions of haemolymph by means of an electrophoresis technique seems to be very useful to approach nutritional studies in insects.

ま え が き

ニカメイチュウの幼虫が完全な発育を遂げ、しかも次世代を得るためには、栄養源としてアスコルビン酸が必要である(釜野, 1964)。また、アスコルビン酸を適量添加した人工飼料によって生育した不休眠幼虫の体液蛋白と、野外から採集した不休眠幼虫のそれとは非常によく似ていることを、寒天ゲル電気泳動によって確かめた。

一方アスコルビン酸を欠いた飼料で生育した雌幼虫の体液では、明らかに特定の蛋白分画が顕著に減少する(湯嶋・釜野, 1964)。

本報告では、組成の異なる幾つかの人工飼料を用いてニカメイチュウを休眠条件で飼育し、その生育過程を調べるとともに、幼虫の体液蛋白を寒天ゲル電気泳動法を用いて調べた。その結果、飼料の成分によって幼虫の生育にかなりの差があり、その生育の良否と電気泳動法に

1 本報告の一部は昭和41年度(1966)日本応用動物昆虫学会において発表した。

よって得られた体液蛋白分画との間に明瞭な関係のあることを見出したので報告する。

なお、本実験を行なうにあたっては、当時の当研究所昆虫科長深谷昌次博士より御助言を得た。また著者の一人釜野の研究室長岩田俊一博士からは種々御援助を受けた。供試昆虫については、岡山県農業試験場のお世話になった。また本研究を行なうに当たり、その研究費の一部は文部省特定研究「生物圏の動態」によった。記して感謝の意を表したい。

材料および方法

ニカメイチュウ：前報(釜野, 1964)とほとんど同じ方法によった。すなわち岡山産の越冬幼虫から出発して得た卵を用い、飼育はすべて無菌状態で行なわれた。

人工飼料：釜野(1964)の不休眠幼虫の飼育試験で得た結果を基礎として標準飼料を作り(第1表)、これに基づいて他の5種類の飼料を調製した。なお第2表には標準

第1表 標準飼料の組成

水	50.0ml
粉末寒天	0.6g
粉末汙紙	1.0
ブドウ糖	0.5
ショ糖	0.5
カゼイン	1.0
エビオス	1.0
Wesson の無機塩	0.2
コレステロール	0.02
コリンクロライド	0.1
アスコルビン酸ソーダ	0.2
1%ホルマリン	2.0ml

第2表 各実験区飼料の標準飼料との組成の相異*

実験区	カゼイン	アスコルビン酸ソーダ	米ぬか	イネの芽出し
1	1.0g	0.2g	...	...
2	0.5	0.2	...	...
3	1.5	0.2	...	...
4	1.0	0.4	...	...
5	1.0	0.2	2.0g	...
6	1.0	0.2	...	20.0g

* 上に掲げた表の成分以外はすべて第1表と同じで実験区 No.1 は第1表に示した標準飼料。

飼料と異なっている点だけを示した。実験区の特徴は、第2表から明らかなように、No. 2は低蛋白、No. 3 は高蛋白、No. 4は高アスコルビン酸、No. 5 および No. 6 ではそれぞれ米ぬかおよびイネの芽出しなどの植物に由来する未知物質を含んでいることである。なお標準区であるNo. 1 の飼料は、既に報告したように(釜野, 1964)、不休眠条件で飼育した場合には、次世代を得るに必要な栄養条件を備えている。

飼育法：上記の飼料を200ml の三角フラスコに入れ、112°C で30分間オートクレーブで滅菌後常法にしたがい上述したように飼育は無菌状態で行なわれた。飼育温度は25°Cで照明時間は12時間の短日条件とした。60日間飼育した後、得られた休眠している終令幼虫をフラスコより取り出し、セロハンチューブを入れた丸罐に収容し8°Cに60日間保存して休眠離脱の条件とした。この後、さらに25°Cに加温して蛹化する状態を調査した。

電気泳動：平面寒天ゲル電気泳動法によった。寒天ゲルは第3表に示す組成のものを煮沸溶解してからナイロン布で汙過した後、厚さが1.2mmになるように縦13cm×横21cmのガラス板上に流した。放冷後、体液を含ませた汙紙片(1.5mm×10mm)をガラス板の端より50mm

第3表 寒天ゲルの組成

ベロナール緩衝液	40ml	
ベロナール	1.66g	を溶かして 1000 ml に する
ベロナールソーダ	10.51g	
乳酸カルシウム	0.40g	
水	15ml	
粉末寒天	400mg	
ポリビニルピロリドン	200mg	

* 電解槽の組成はベロナール緩衝液を稀釈せず使用。

の点に並べて原点とした。冷蔵庫中(5°C)に1時間おいて寒天中に体液を浸み込ませた後汙紙片を取り去り、直ちに電気泳動した。

泳動は2.5mA/cm(横幅)で3.5時間行なった。泳動の先端の蛋白質と原点との距離は約50mmとなる。蛋白染色はアミドブラック10B(アルコール90ml+酢酸10ml+アミドブラック10B 5g)で20分間行なった。染色後直ちに10%酢酸水でバックグラウンドが充分透明になるまで脱色した。

結果および考察

飼育結果：第4表に見られるように、いずれの区にお

第4表 種々の人工飼料による休眠条件下での幼虫の生育

実験区	孵化虫数	生存虫数	軽量 個体数*	(%)	平均虫体重 (mg)
1	142	112	28	25.0	71.4
2	179	169	55	32.0	58.4
3	167	139	25	18.0	76.2
4	187	139	46	33.1	62.9
5	174	117	5	4.3	125.8
6	156	136	0	0	144.0

* 50mg 以下のものを軽量個体とした。

いても、飼育後60日の無菌状態の三角フラスコ中にある限りにおいては、ほとんど死亡しない。しかし体重においては、No. 1～No. 4 区に比較し、未知物質を含んだ区である No. 5 および No. 6 区では遥かに重い。

人工飼料で飼育されたニカメイチュウの体重は、餌の配合によってかなり差異があるが、その体重の大小がそのまま雌の健康度を示しているわけではない（釜野、未発表）。しかし、一方では休眠幼虫の体重が50mg に達しない場合には、野外における越冬はきわめて困難であるという事実が実験発生予察の諸観察からよく知られている。したがって実験区 No. 1 から No. 4 までの幼虫には50mg 以下のものが多数含まれているから、越冬するには不十分なことが容易に想像される。不休眠状態で飼育した場合には累代飼育が可能な No. 1 の区においても約25%がそのような不適当な幼虫であったことは注目すべきであろう。

60 日間の無菌状態での飼育が終了してから、幼虫をフラスコから取り出して秤量し、上述の理由から予め50mg 以下の個体はすべて取り除いた後、8°C の低温に

保存した。その低温処理期間の生死の結果は第5表に示した。

第5表に示されるように No. 1 の区より No. 4 の区までの死亡率はきわめて高く、No. 5 および No. 6 の区ではほとんど死亡しない。これは従来得られている越冬率と体重との間に高い相関があるという知見とよく一致している。ただし、本実験の場合には、同一飼料で飼育されたものの間での体重の相違ではないから、No. 1 から No. 4 までの区の供試虫の間での相関は見られない。

60日間の低温処理後、再び25°Cにもどして保温した結果は第5表に示した。70日までの加温期間中の生存虫率は、No. 6 の区を除いて約20%できわめて低いが、No. 6 の区では約85%が生存している。このように、No. 5 と No. 6 の区の虫体重の間には大きな差が見られないにもかかわらず、70日間の加温期間を通じて死亡率に顕著な差が見られる。イネの芽出しは、単に幼虫の体重を増加させるだけではなく、休眠幼虫の生理的あるいは生化学的な性質を正常にさせる要因を含んでいることが考えられる。

140 日後まで加温を続けた場合の蛹化率はこの区でも低く、芽出しを含んだ No. 6 で17.5%、米ぬかを含んだ No. 5 で9.0%、低蛋白のNo. 2 の区で10%が蛹化したにすぎず、他の区では数%に止まっている。はじめに述べたように、不休眠条件下で飼育すれば、標準区の No. 1 の飼料によって累代的に飼育が可能である（釜野、1964）。したがって、休眠条件下では、幼虫成熟に要する日数の延長、低温期間の経過、さらに生育に必要な温度での加温という、不休眠状態と比較して遥かにきびしい要因のあることをあらためて痛感させる。ともあれ、現在のところ、アスコルビン酸を添加させただけでは休眠を経過

第5表 低温処理中の生存率およびその後の加温による蛹化

実験区	低温処理虫数*	低温処理60日後の		加温70日後の			加温140日後の		平均蛹化 前期間	蛹化の幅
		生存虫数	生存虫率	幼虫数	蛹数	生存虫率	蛹数	蛹化率		
1	70	36	51.4%	16	0	21.8%† (44.4)‡	2	2.9%† (6.6)‡	115.0 ^日	90—140 ^日
2	90	32	35.6	7	7	15.6 (43.2)	9	10.0 (28.1)	63.9	45—90
3	100	47	47.0	12	5	19.0 (36.2)	5	5.0 (10.7)	48.0	30—70
4	90	50	55.6	15	5	21.1 (40.0)	5	5.6 (10.0)	36.0	30—40
5	100	96	96.0	21	4	25.0 (26.1)	9	9.0 (9.4)	76.7	60—100
6	120	119	99.2	101	0	74.2 (74.2)	21	17.5 (17.6)	104.3	80—140

* 50mg 以下の軽量個体は除いてある。

† 数値は低温処理虫数に対する百分率。

‡ ()内の数値は低温処理60日後の生存虫数に対する百分率。

して蛹化にまでもっていくには充分でなく、さらに栄養条件の検討が必要であるように思われる。また休眠離脱のための条件についても詳しく調べる必要がある。ニカメイチュウの生育には蛋白質と炭水化物が必要であり、蛋白質の含有量が少ない場合には生育は急速に悪くなる (ISHII and HIRANO, 1957)。したがって、低蛋白の No. 2 の区の虫体重は最も劣っている。それにもかかわらず蛹化率の点では米ぬかを含んだ No. 5 の区とほぼ同等であるのは興味ある点である。幼虫初期の生育には、餌の成分として高蛋白質、後期の生育は高炭水化物の餌が望ましいとしており (ISHII and HIRANO, 1957)、同様のことはアワノメイガについても報告されている (BECK, 1956)。また高炭水化物の餌で飼育すると幼虫の脂肪含有量が高くなることがニカメイチュウ (ISHII and HIRANO, 1957) やチャイロコメノゴミムシダマシ (LECLERCQ, 1948) などでも知られている。ニカメイチュウの休眠幼虫が不休眠幼虫よりも脂肪含有量が高いことは、古くから知られているが (深谷, 1950)、この No. 2 の餌が休眠幼虫として生育する上で、蛋白質・炭水化物の割合が適していたとも考えられる。しかし、本実験では蛋白質の量のみを変化させただけで、炭水化物の量の変化を考慮した組み合わせを欠いている。この点については、さらに今後の実験にまちたい。

なお、No. 6 の区の蛹化前期間は 104.3 日で他の区のと比較して長い、このことは No. 6 の区で生育した幼虫の方が、長期の加温に耐えて蛹化し得たことを示している。ちなみに、蛹化の幅として第 5 表中に示した日数の大きい方の数値は、最後に蛹化した個体の蛹化前期間を示したもので、この時期に幼虫であった個体はその後の加温期間中に全部死亡した。

電気泳動：小池 (1962) はニカメイチュウ幼虫の体液蛋白を濾紙泳動によって分離し、陽極側に泳動する蛋白をアルブミン (A) とグロブリン 1 (G₁)、陰極側に泳動するグロブリン 2 (G₂) の三分画に大別した。また休眠幼虫の体液虫中の G₂ 分画は、不休眠幼虫のそれと比較して、その量が少ないとしている (小池, 1962)。われわれは別の実験によって、不休眠幼虫の蛋白分画 G₂ は、野外より採集した第 1 世代の幼虫においても、人工食餌で飼育したものにおいても、休眠幼虫のそれと比較して極めて含有量が低いことを知った。この点については小池 (1962) の結果と全く異なっている。これらの分画の生育に伴う変化については別に報告するが、ここでは G₂ の分画が明瞭に見出せる点は休眠幼虫の特徴の一つであることを述べて置きたい。

この休眠幼虫においては、G₂ の分画が明瞭に見出せるという点を指標として、飼育 60 日後の三角フラスコより取り出した幼虫の体液蛋白を、寒天電気泳動によって調査したのが第 1 図である。

図からわかるように、いずれの区においても、アスコルビン酸が飼料中に含まれているから、G₁ の分画には顕著な差が見られない。しかし、No. 1 から No. 4 の区における G₂ の分画は、No. 5 および No. 6 の区のと比較して、明らかに不明瞭であることが認められる。この結果は、さきに述べた生育 60 日後の虫体重、あるいはその後の 60 日間の低温保存中の生存率について、各区の間に見られる相違をよく反映している。

イエバエの産卵能力は、成虫に対する栄養と密接な関係があり、特に蛋白質を摂取することが必要であることが知られている。最近 BODNARYK and MORRISON (1966) は成虫の食餌と体液蛋白との関係を電気泳動によって調べた。その結果、雌成虫の体液中に、餌として蛋白質を与えた場合には、飼育 2 日後から顕著に増加する特定の蛋白分画が存在するが、飼料中に蛋白を欠いた場合にはこれらの分画の増加が見られないことを報告している。このような事実から、体液蛋白の電気泳動による研究は、栄養と虫の生理的な状態を調べるのに役立つであろうとしている。われわれは既にニカメイチュウの不休眠幼虫について同様なことを報告したが (湯嶋・釜野, 1964)、休眠幼虫ではこのようなことを知る上で G₂ の分画が指標となることを知った。

しかし、第 1 図に見られるように、No. 5 と No. 6 の区との間には泳動像に顕著な差が見られない。この二者の間には、低温保存後の加温期間における生存率においていちじるしい差が見られることを、第 5 表によって述べたが、このような微妙な差異を見出すには、さらに詳細な研究が必要であろう。

ま と め

ニカメイチュウを種々の異なった人工飼料によって、休眠条件下で無菌飼育し、生育、低温処理期間を通しての生存率、蛹化させるための加温期における生存率および蛹化率を調べた。また、幼虫の体液蛋白を寒天電気泳動によって分画し、生存率との関係を調べた。

その結果はつぎの通りである。

1) 不休眠条件では累代飼育が可能な餌でも、休眠条件下で飼育した場合には、まだ満足すべき飼料とはいえない。

2) アスコルビン酸添加だけでなく、蛋白質と炭水化

第1図 組成の異なった6種類の飼料で飼育した休眠幼虫の体液蛋白の電気泳動像 A: アルブミン, G₁: グロブリン1, G₂: グロブリン2, O: 原点。
G₁の濃いのは雌, うすいのは雄。1, 2, 3, ……6 は飼料No. を示す。

物の割合などの検討が必要である。最もよく生育し、蛹化率も高かったのは、イネの芽出しを含んだ餌である。

3) 寒天電気泳動によって陰極側に泳動する体液蛋白を指標として、休眠幼虫の生理的活力を推定できる。

4) 電気泳動法は上述のように昆虫栄養生理の研究上、有用なテクニックとなるだろう。

引用文献

- BECK, S. D. (1956) The European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hubn.), and its principal host plant. II. The influence of nutritional factors on larval establishment and development on the corn plant. *Ann. Ent. Soc. Amer.* **49** : 582~588.
- BODNARYK, R. P. and P. E. MORRISON (1966) The relationship between nutrition, haemolymph proteins, and ovarian development in *Musca domestica* L. *J. Insect Physiol.* **12**: 963~976.

深谷昌次 (1950) 二化螟蟲, 北方出版社, 141pp.

ISHII, S. and C. HIRANO (1957) Effect of various concentration of protein and carbohydrate in a diet on the growth of the rice stem borer larva. *Jap. J. Appl. Ent. Zool.* **1**: 75~79.

釜野静也 (1964) 人工飼料によるニカメイチュウの累代飼育に関する研究 第2報 アスコルビン酸要求について, 応動昆 **8**: 101~105.

小池久義 (1962) ニカメイチュウ体液蛋白質の分画と人工培養の影響, ニューエントモロジスト **11**: 5~10.

LECLERCQ, J. (1948) Importance des glucides dans la nutrition des larves de *Tenebrio molitor* L. *Arch. Internat. Physiol. Acta* **56**: 28~34.

湯嶋 健・釜野静也 (1964) 人工飼料によるニカメイチュウの累代飼育に関する研究 第3報 アスコルビン酸要求と幼虫体液蛋白質との関係, 応動昆 **8**: 218~221.

新刊紹介

Natural enemies in the Pacific area (Biological control)

The eleventh Pacific Science Congress. Symposium No. 28. August 23~24, 1966, Tokyo. *Mushi*, Vol. 39, Supplement. 定価550円 (送料とも) 福岡虫の会 (福岡市箱崎九大農学部昆虫学会教室内)

第11回太平洋学術会議が1966年の夏、東京で開かれた。その1分科会である生物的防除部会はカリフォルニア大学の C. P. CLAUSEN教授を座長にシンポジウム (Symposium No. 28) を8月23~24日の両日開いた。太平洋地域の生物的防除に関する多くの話題が各国の学者から提供され、活発な論議が展開された。このたび、安松京三教授の骨折りで、シンポジウムの講演要旨およびその論議が上掲の題目のもとに発行された。

以下簡略に内容を紹介しておく。

太平洋地域の特定の害虫に関するもの:

HOYT, C. P. and A. CATLEY: Current research on the biological control *Oryctes*.

DAVIS, C. J.: Progress in the biological control of the southern green stink bug, *Nezara viridula* var. *Sma-ragdula* (FABRICIUS) in Hawaii.

NISHIDA, T.: On the ecology of stem borers in Asia (Research on the natural enemies of rice stem borers).

YASUMATSU, K.: Distribution and bionomics of natural enemies of rice stem borers (Research on the natural enemies of rice stem borers).

BESS, H. A.: Feasibility and problems of chemical control and biological control of rice stem borers (Research on the natural enemies of rice stem borers).

MURAKAMI, Y., R. MORIMOTO and H. KAJITA: Possibility of biological control of *Pseudococcus comstocki* in Japan.

CHEN, C. B.: The biological control of sugarcane borers in Taiwan, 1948—1966.

雑草の生物防除に関するもの:

HUFFAKER, C. B.: A comparison of the status of biological control of *St. Johnswort* in California and Australia.

WATERHOUSE, D. E.: The entomological control of weeds in Australia.

微生物防除に関するもの:

HALL, I. M.: The development and use of microbial insecticides containing entomogenous bacteria and viruses.

AIZAWA, K.: Problems of microbial control in Japan. 生物的防除の理論的な問題:

DELUCCHI, V.: The significance of biotaxonomy to biological control.

BEIRNE, B. P.: The future of integrated controls.

太平洋の特定地域の害虫や雑草の生物的防除:

GIVEN, B. B.: Biological control of weeds and insect pests in New Zealand. (渡辺千尚)