ハスモンヨトウにおける核多角体病ウイルスの 経卵伝達に関する研究

I. 雄成虫のウイルス汚染処理による次世代幼虫へのウイルス感染¹⁾

増田俊雄*²⁾・岩花秀典*・阿久津喜作**

* 東京農工大学農学部

** 東京都農業試験場

Studies on Transovum Transmission of the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Spodoptera litura* (SINPV). I. Infection of SINPV to the Next Generation Larvae through the Male Moths Contaminated with SINPV. Toshio MASUDA,³⁾ Hidenori IWAHANA (Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan) and Kisaku AKUTU (Tokyo Agriculture Experiment Station). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **34**: 1–6 (1990)

The nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera litura* (SINPV) was transmitted by male moths contaminated with polyhedral inclusion bodies (PIBs) of SINPV to the next generation. The clasper or abdomen of male moths were treated with powder or suspension of PIBs. The treated moths were mated with untreated females. So, the clasper treatment with PIBs powder was most effective in SINPV infection of the next generation larvae in all treatments. SINPV was transmitted by the male moths self-contaminated with PIBs powder placed around the sex-pheromone source. PIBs were observed on claspers of self-contaminated male moths and also on the eggs oviposited by females mated with contaminated males using SEMed. Many PIBs were microscopically observed in the feces of the male moths which sucked sucrose solution containing PIBs placed around the sex-pheromone source, and the next generation larvae were infected with SINPV.

緒 言

昆虫ウイルスを利用して害虫を防除するには、散布するウイルスの濃度、対象害虫の発育ステージやウイルスに対する生態防御反応などを十分に調査し、最も効率的な散布方法を決定する必要がある。昆虫のウイルスに対する感受性は、一般的にはふ化直後の幼虫期が最も高いといわれている。この時期に幼虫がウイルスと接触すれば、少量のウイルスでも感染が成立することが期待できる。

KNIPLING (1960) はウイルスの経卵伝達が可能ならば標的害虫の個体群に大きな損害を与えることができる事を示唆した。この考えをもとに、人為的にウイルスの経卵伝達を引き起こせる研究はおもに Baculovirus を用い

て行われ、成虫の生殖器への汚染により *Colias eurytheme* とその核多角体病ウイルス (以下 NPV と略す) (MARTIGNONI and MILSTEAD, 1962), *Pieris brassicae* とその顆粒病ウイルス (以下 GV と略す) (TACHELL, 1981), アメリカシロヒトリ *Hyphantria cunea* とその NPV (KUNIMI, 1982) で経卵伝達が起こることが報告されている。また, *Trichoplusia ni* と *Heliothis zea* では、それぞれの NPV 汚染蔗糖液を成虫に吸汁させることで、そのウイルスの経卵伝達が起こることが示された (ELMORE and HOWLAND, 1964; HAMM and YOUNG, 1974)。

著者らは、ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* を用いて、合成性フェロモンを利用することによりハスモンヨトウの NPV で汚染した雄成虫から、雌成虫を介して次世代幼虫に NPV を経卵伝達させることが可能か否かを検討

1) 本報告の要旨の一部は、日本応用動物昆虫学会第 28 回大会 (1984 年 4 月宇都宮) で発表した。

2) 現在 宮城県園芸試験場

3) Present address: Miyagi Prefecture Horticultural Experiment Station, Takadate, Natori, Miyagi 982-12, Japan.

1988 年 11 月 11 日受領 (Received November 11, 1988)

1989 年 10 月 23 日登載決定 (Accepted October 23, 1989)

したので、その結果を報告する。

なお、本文に入るに先立ち、ハスモンヨトウ NPV を分譲していただき、数々のご助言を賜った農業研究センター・岡田斉夫博士に厚く御礼申し上げる。

材料および方法

1. 供試昆虫およびウイルス

ハスモンヨトウは 25°C, 16L-8D, 人工飼料で累代飼育した個体群を供試した。蛹期に雌雄を分け、25°C, 24L で羽化させた。雄成虫は羽化後 2~3 日の個体を用い、実験前に 15 分間暗黒条件下において性的興奮を引き起こさせて(玉木ら, 1973) から供試した。

ハスモンヨトウ核多角体病ウイルス (SINPV (農業研究センターから分譲)) は、多角体懸濁液の濃度を 2×10^8 PIBs (多角体)/ml として原液とした。多角体粉末は 2×10^8 /ml の懸濁液を滅菌シャーレに注入し、2~3 日間自然乾燥させた後、ガラス棒で碎いて粉末状にして使用した。

2. 合成性フェロモン

武田薬品工業株式会社製のハスモンヨトウ性フェロモン剤、フェロディン SL® (発生子寮用) を用いた。

3. 人為的汚染による次世代幼虫の感染

性的興奮を引き起こさせた雄成虫を合成性フェロモンに近づけ、把握器を突出させた。その際、把握器やヘアーペンシル部分に多角体懸濁液 (2×10^8 PIBs/ml) と多角体粉末を脱脂綿の小球にまぶして付着させた。また把握器を突出させずに腹部に多角体粉末を付着させただけの雄成虫も併せて供試した。得られた SINPV 汚染雄成虫をそれぞれ 1 個体ずつ未処理処女雌成虫を収容したケージ (30×30×30 cm) 内に放飼し、自由に交尾させた。12 時間後に雌成虫だけを産卵用容器 (プラスチック製、直径 9 cm, 高さ 5 cm の円筒形、パラフィン紙を裏打ち) に 1 個体ずつ収容して採卵した。

産下された卵塊はパラフィン紙ごと切り取りアイスクリームカップ (直径 7.5 cm, 高さ 4 cm, 底にペーパータオルを裏打ち) に収容し、25°C でふ化させた。卵塊を切り取る際、卵塊以外に付着した多角体を極力少なくなるよう余分な部分ではできるだけ切り落とした。ふ化幼虫は 30 個体ずつ新しいアイスクリームカップに収容して、サツマイモ葉を与えて飼育、観察し (2 週間)、乳白色に膨潤して死亡している個体を NPV 感染死亡虫とした。

対照区は未処理の雌雄成虫によって得られた幼虫を同様にして飼育、観察した。

4. 多角体粉末汚染フェロモン源での自己汚染による次世代幼虫の感染

正方形の板 (30 cm×30 cm, 黒色のラシヤ紙で被覆) の中央にフェロディン SL® をおき、フェロディン SL® を中心に直径約 8 cm の円内に多角体粉末 (多角体懸濁液 2×10^8 /ml 約 5 ml 分) を散布して、汚染フェロモン源とした。

ビニールハウス (1.8 m×3.6 m×2.0 m, 気温 20°C, 暗黒) 内に汚染フェロモン源を設置し、雄成虫を 20 個体放飼した。観察には赤色ランプを用い、汚染フェロモン源に誘引され、把握器の突出や交尾の試み (把握器を広げて腹部を曲げる行動) を起こした雄成虫を採集し、未処理処女雌を収容したプラスチック製容器 (直径 15 cm, 高さ 9 cm) にそれぞれ 1 個体ずつ入れて交尾させた。その後、3. と同様の方法で採卵し、ふ化した幼虫を 20 個体ずつアイスクリームカップに収容し、人工飼料を与えて飼育、観察した。

また、この方法によって自己汚染した雄成虫の把握器と、汚染雄成虫と交尾した未処理雌成虫が産下した卵における、多角体の付着状況を走査電子顕微鏡 (JEOL, JSM-25S) を用いて観察した。

5. 多角体添加蔗糖液吸汁による次世代幼虫の感染

2×10^8 /ml の多角体を含んだ 5% 蔗糖液を脱脂綿に含ませ、フェロディン SL® から 10 cm 程度はなして 4 か所に設置した。フェロモンに誘引され多角体添加蔗糖液を吸汁し、吸汁終了後動きだした雄成虫を採集し、3. と同様の方法で次世代幼虫を得て、人工飼料で飼育、観察した。

また、排泄物中の多角体量は次の方法で調査した。すなわち、前述の雄成虫と、マイクロピペットで 10 μ l の多角体添加蔗糖液の水滴をつくり口器を強制的に延ばして吸汁させた雄成虫をそれぞれ 10 個体供試し、1 個体ずつアイスクリームカップに収容した。吸汁 3, 6, 9, 12, および 24 時間後に、カップを新しいものと取り替え排泄の有無を調査した。排泄が認められた個体は、排泄物中の水分を蒸発させたのち、滅菌水 (1 ml) に懸濁してトーマ血球計算盤で多角体量を算出した。

結 果

1. 人為的汚染による次世代幼虫の感染

雄成虫の把握器に多角体懸濁液 (2×10^8 PIBs/ml) を塗布した試験、および把握器に多角体粉末を付着させた試験のすべての区において、次世代幼虫で SINPV 感染が認められた (Table 1)。多角体粉末を把握器に付着さ

せた雄成虫の次世代幼虫では、S1NPV 感染死亡率が、他の処理と比較して有意に高い値 ($66.2 \pm 9.8\%$) を示した。とくに汚染雄成虫 I の次世代幼虫の死亡率は 81.7% できわめて高かった。それに対して多角体懸濁液で処理した場合には、次世代幼虫の死亡率は最も低い値 ($17.6 \pm 4.1\%$) を示し、腹部に多角体粉末を付着させた試験では中間の値 ($32.8 \pm 3.8\%$) を示した。

Table 1. Mortality by S1NPV of the next generation larvae of *Spodoptera litura* after virus treatments of male moths

Male moths	Progeny	
	No. of larvae	Mortality by S1NPV (%)
Contamination of clasper with S1NPV suspension ^{a)}		
A	355	9.3
B	270	20.3
C	327	18.8
D	327	31.8
E	270	8.9
Mean $\pm$ S.E. ^{b)} = 17.6 ± 4.1		
Contamination of clasper with S1NPV powder		
F	300	41.0
G	330	62.4
H	300	74.7
I	330	81.7
Mean $\pm$ S.E. = 66.2 ± 9.8		
Contamination of abdomen with S1NPV powder		
J	360	23.9
K	330	29.1
L	330	39.1
M	360	39.2
Mean $\pm$ S.E. = 32.8 ± 3.8		
Non-treatment control	350	0

a) The concentration of PIBs was 2×10^8 PIBs/ml.

b) Standard error.

Table 2. Mortality by S1NPV of the next generation larvae following self-contamination of male moths of *S. litura* with PIBs powder at the sex-pheromone source

Male moths ^{a)}	Progeny	
	No. of larvae	Mortality by S1NPV (%)
A	397	52.4
B	406	48.3
C	333	55.0
D	370	12.0
E	367	64.0
Mean $\pm$ S.E. ^{b)} = 46.6 ± 9.8		
Non-treatment control	395	0.51

a) Male moths which exposed clasper around the sex-pheromone source.

b) Standard error.

2. 多角体汚染フェロモン源での自己汚染による次世代幼虫の感染

ビニールハウス内に設置した S1NPV 汚染フェロモン源に誘引され、把握器の突出や交尾の試みを起こした雄成虫 8 頭のうち、未処理処女雌と交尾し、次世代幼虫が得られた個体は、A～E の 5 個体であった。次世代幼虫の S1NPV 感染死亡率 ($46.4 \pm 8.9\%$) は、汚染雄成虫 E の次世代幼虫でもっとも高く (64.0%)、D は他の 4 例と比較して低い値 (12.2%) であった (Table 2)。

走査電子顕微鏡観察の結果、S1NPV 多角体粉末で汚

Fig. 1. Scanning electron micrograph of PIBs on the clasper of *S. litura* self-contaminated with PIBs powder placed around the sex-pheromone source ($\times 1,000$).

Fig. 2. Scanning electron micrograph of PIBs on the surface of egg (allow) oviposited by the untreated female moth that mated with the male moth self-contaminated with PIBs powder placed around the sex-pheromone source ($\times 3,000$).

Table 3. Mortality by SINPV of the next generation larvae after male moths of *S. litura* sucked sucrose solution containing PIBs

Male moths	Progeny	
	No. of larvae	Mortality by SINPV (%)
A	200	16.0
B	300	38.3
Non-treatment control	100	0

The concentration of PIBs was 2×10^8 PIBs/ml.

Fig. 3. Change in the number of PIBs in the feces of male moth of *S. litura* after sucking sucrose solution containing PIBs. A: Compulsory feeding ($10 \mu\text{l}$). B: Free feeding. The concentration of PIBs was 2×10^8 PIBs/ml.

染されたフェロモン源で把握器の突出や交尾の試みを起こした雄成虫では、把握器内に付着した多くの多角体が確認された (Fig. 1)。上記処理方法で SINPV 汚染した雄成虫と交尾した未処理処女雌が産下した卵表面には多角体の塊りの付着が認められた (Fig. 2)。

3. 多角体添加蔗糖液吸汁による次世代幼虫の感染

フェロモンに誘引され多角体添加蔗糖液 (2×10^8 PIBs/ml) を吸汁した雄成虫の次世代幼虫における SINPV 感染死亡率は、16.0% と 38.8% であった (Table 3)。

多角体添加蔗糖液を吸汁させた雄成虫の排泄物中の多角体量を Fig. 3 に示した。食下された多角体は吸汁後 3 時間にはすでに排泄され始めその後しだいに減少し、 $10 \mu\text{l}$ 強制吸汁、フェロモン源での自由吸汁のどちらの場合も、ほぼ同様の傾向が見られた。

考 察

TATCHELL (1981) は *P. brassicae* の雌成虫の腹部先端に、*P. brassicae* の GV を含んだオイルペーストを付着させたところ、経卵伝達が高率で起こることを示したが、雄成虫に付着させた場合には低率であったと報告した。KUNIMI (1982) はアメリカシロヒトリとその NPV を用いて経卵伝達を確認したが、雄成虫に付着させた場合には感染がみられなかった。雄成虫を汚染して交尾時にウイルスを雌成虫に伝搬し、さらに卵表面まで伝搬させるには、汚染した雄成虫が交尾に至るまでウイルスを十分に保持していなければならないので、汚染部位や汚染方法を十分考慮に入れる必要がある。NORDIN (1976) はアメリカシロヒトリを供試し、その NPV 多角体粉末で雄成虫の全身を汚染した結果、汚染雄成虫と交尾した雌成虫を介して卵に多角体が付着し、ふ化幼虫に核多角体病が発生したと報告した。しかし彼の実験では、汚染雄成虫と未処理雌成虫の交尾から産卵までを同一容器で行わせているため、汚染雄成虫が卵を直接汚染している可能性が高いものと考えられる。

このような問題を回避するため、本実験では交尾、採卵および幼虫飼育の各段階で新しい容器を使用し、汚染雄成虫からの直接的汚染を排除した。3 種類の汚染処理を施した雄成虫の次世代幼虫では、いずれの場合にも SINPV による感染死亡虫が認められた (Table 1)。とくに多角体粉末を把握器に付着させた試験で次世代幼虫の死亡率が高かった。一方、多角体懸濁液を用いた場合は死亡率が低下した。この原因は雄成虫の把握器やヘアーペンシル部分が水分をはじきやすく、多角体懸濁液では付着量が少なかったためと考えられる。また多角体粉末を腹部に付着させた場合にも、把握器に付着させた試験と比較して次世代幼虫の感染が低くなったことから、雄成虫への汚染部位によってウイルスの保持に差が生じるものと考えられた。

把握器は、通常は雄成虫の腹部内に存在し、交尾のときにのみ突出されるので、この部分に多角体粉末を取り込ませることができれば雌成虫と交尾するまで十分な多角体量を保持することができ、多くの多角体を卵表面まで伝搬することができると考えられる。

性フェロモンの誘引性を利用して昆虫病原体による流行病を次世代へと伝搬させる試験は、SHAPAS ら (1977) が貯蔵穀物害虫の *Trogoderma glabrum* (カツオブシムシの 1 種) とその病原原生動物 *Mattesia trogodermae* (分裂胞子虫類) を供試して行った。すなわち *M. trogodermae*

胞子で汚染した性フェロモン源に、*T. glabrum* の雄成虫を誘引して自己汚染させ、交尾によって未処理の雌成虫に胞子を伝搬させる。その後、その雌成虫は幼虫が食下する餌を汚染したり、産卵時に卵へ胞子を伝搬することで、次世代に *M. trogodermæ* による流行病を引き起こさせる実験であった。

経卵伝達を自滅的防除手段として用いる上で、フェロモンの誘引性を利用する方法は、NORDIN (1976), McCLELLAND and COLLINS (1978), 若村 (1980) などがその可能性を述べているが、農業害虫では試験は行われていなかった。本試験では S1NPV 汚染フェロモン源に誘引され、交尾行動を行って、自己汚染した雄成虫の次世代幼虫に S1NPV の感染が認められた (Table 2)。このように雄成虫に対し人為的な汚染処理を施さなくても、経卵伝達が認められたが、汚染雄成虫間で次世代の死亡率に差が大きかった。自己汚染は、S1NPV 汚染フェロモン源で雄成虫が交尾行動を行うことにより、自然に多角体粉末を付着させる方法であるため、その場で雄成虫が行った行動によって、多角体粉末の取り込みに差が生じる。そのため一部の雄成虫のように取り込みが不十分であったと推測される個体は、次世代幼虫の S1NPV 感染死亡率が低い値を示した。また S1NPV 汚染フェロモン源に誘引された雄成虫がすべて交尾行動を起こすとは限らず、これらの行動を解発させなければ、防除手段として用いた場合、次世代への高率な感染は期待できない。

HAMM and YOUNG (1974) は、*H. zea* を供試し、*H. zea* NPV を含む蔗糖液を雄成虫に摂食させることにより、交尾を通して雌成虫の生殖器を汚染し、ふ化幼虫に NPV が経卵伝達されることを示した。供試した雄成虫の個体数は少ないが、ハスモンヨトウにおいても同様の結果が得られ、次世代幼虫に感染が認められた (Table 3)。S1NPV 添加蔗糖液吸汁後の排泄物中から、多くの多角体が検出された (Fig. 3)。ここで示した値は 1 ml の滅菌水に懸濁させて計数した値であり、排泄物中の実際の多角体濃度はきわめて高いものと考えられる。

今回行った一連の試験によって、ハスモンヨトウ NPV は雄成虫を汚染することで、交尾した雌成虫を介して次世代へと経卵伝達されることがわかった。このことから性フェロモンにより誘引した雄成虫を、交尾行動や摂食行動の過程でウイルス汚染する方法は、自滅的防除手段の一つとして用いることが可能と考えられた。今後は次世代幼虫の S1NPV 感染率を高く安定させるため、S1NPV 汚染フェロモン源に誘引した雄成虫に交尾の試

みを高率で解発させる要因を解明し、その実用性を検討することが必要である。

摘 要

ハスモンヨトウの雄成虫を核多角体病ウイルスで汚染し、交尾させた雌成虫を介して次世代幼虫への経卵伝達が起こるか否かを検討した。

1) 把握器に S1NPV 多角体懸濁液あるいは多角体粉末を付着させた雄成虫、腹部に多角体粉末を付着させた雌成虫を、それぞれ未処理処女雌と交尾させ、次世代幼虫の発病を調査した。いずれの処理を行った雄成虫の次世代幼虫においても S1NPV の感染が認められ、多角体粉末を把握器に付着させた場合に、最も高い死亡率が得られた。

2) 多角体粉末を周囲に散布した合成性フェロモン源に雄成虫を誘引し、交尾行動の過程において、多角体に自己汚染した雄成虫を未処理処女雌と交尾させた。次世代幼虫には、S1NPV の感染が認められ、雄成虫への人為的汚染処理を行わなくとも経卵伝達を誘起することが可能であった。

また合成性フェロモン源に誘引され、S1NPV 添加蔗糖液を吸汁させて排泄により交尾器およびその周辺を汚染させた場合にも、次世代幼虫に S1NPV 感染が認められた。

3) 以上のことから、合成性性フェロモンで誘引した雄成虫の交尾行動や摂食行動を利用したウイルス汚染処理による防除手段開発の可能性が示唆された。

引 用 文 献

- ELMORE, J.C. and A.F. HOWLAND (1964) Natural versus artificial dissemination of nuclear-polyhedrosis virus by contaminated adult cabbage loopers. *J. Insect Pathol.* **6**: 430—438.
- HAMM, J.J. and J.R. YOUNG (1974) Mode of transmission of nuclear-polyhedrosis virus to progeny of adult *Heliothis zea*. *J. Invertebr. Pathol.* **24**: 70—81.
- KNIPLING, E.F. (1960) Use of insects for their own destruction. *J. Econ. Entomol.* **53**: 415—420.
- KUNIMI, Y. (1982) Transovum transmission of a nuclear polyhedrosis virus of the fall webworm, *Hyphantria cunea* DRURY (Lepidoptera: Arctiidae). *Appl. Ent. Zool.* **17**: 410—417.
- MARTIGNONI, M.E. and J.E. MILSTEAD (1962) Trans-ovum transmission of the nuclear polyhedrosis virus of *Colias eurytheme* BOISDUVAL through contamination of the female

- genitalia. J. Insect Pathol. **4**: 113—121.
- MCCLELLAND, A.J. and P. COLLINS (1978) UK investigates virus insecticides. Nature **276**: 543—549.
- NORDIN, G.L. (1976) Transovum transmission of a nuclear polyhedrosis virus of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae). J. Kans. Entomol. Soc. **49**: 589—594.
- SHAPAS, T.J., W.E. BURKHOLDER and G.M. BOUSH (1977) Population suppression of *Trogoderma glabrum* by using pheromone luring for protozoan pathogen dissemination. J. Econ. Entomol. **70**: 469—474.
- 玉木佳男・野口 浩・湯嶋 健 (1973) ハスモンヨトウ性フェロモンの室内生物試験法. 防虫科学 **38**: 147—150.
- TATCHELL, G.M. (1981) The transmission of a granulosis virus following the contamination of *Pieris brassicae* adult. J. Invertebr. Pathol. **37**: 210—213.
- 若松定男 (1980) 性フェロモンによる害虫の直接防除. 植物防疫 **39**: 229—235.

新 刊 紹 介

進化論の見方 河田雅圭 (1989) 紀伊國屋書店, 東京, 235pp., 2,300 円

空前の辞書ブームだそうである。ただの漢字調べではなく、自分のものとなる言葉を探したい欲求がブームをささえているのか……。

「適応」や「進化」と言えば、だれもが自分の言葉を持っている、と思うほどに百花繚乱、議論沸騰である。そんなときにタイムリーな1冊だと思う。進化の理論をわかりやすく解説した好著である。“進化の理論”と言っても、ダーウィン以来の科学史ではなく、最近提出された理論や論争中の課題を紹介している。

植物の害虫抵抗性や、ウンカの細胞質不和合性(細胞内共生進化)など、応用の分野でも進化生物学の重要性が増している。しかし、進化生物学の理論は英語圏で発達したものがほとんどで、日本語で読める解説書や入門書はこれまでなかった。

本書は7章に分かれており、進化生態学から集団遺伝学、分子進化、発生学など、著者のレパートリーの広さを反映して、多方面から、現代の進化についての考え方を紹介している。説明は簡潔で、数式をほとんど用いずに解説していてわかりやす

い。2~4章に、さまざまな自然選択や進化の要因、生殖隔離の機構と種分化の様式が整理されていて便利である。これらのなかには、すでに他書で紹介されたものもある。しかし1冊の本で進化の問題のほぼすべてをカバーしたところにこの本の特徴がある。

また、随所に見られる批判的紹介も、問題点を整理するうえで有意義である。フンパエの最適交尾時間モデルを例として、最適化モデルへの批判と、その反論を紹介している。生活史戦略や捕食戦略など、応用昆虫学では今後とも最適化モデルが必要だけに心に留めておかなければならないだろう。断続平衡説への批判と、終章の今西「進化論」への批判は著者の労作である。

それぞれの内容はコンパクトであるが、巻末の引用文献(160編)がしっかりしているので、さらに詳しく知りたいときにも便利である。

「適応」と「進化」は現代のキーワードであるが、また誤解の多い言葉でもある。考え方を整理した本として、辞書としても活用できると思う。

(北海道林試道東支場 東浦康友)