る 6 齢幼虫 (岡本・岡田, 1968; 片山・佐野, 1989) が確認できなかったことから (Fig. 2), 葉面積の減少は主として若齢幼虫に起因し, 収量の減少に大きく影響したものと考えられる。したがって, 莢伸長期における約 23% の葉面積の減少率でも 25% 程度の減収を引き起こす可能性は高いものと考えられる。

この結果は多くの切葉試験の調査報告と一致しなかった。すなわち, TURNIPSEED (1972) は, ダイズの生育段階に関わらず 30% の切葉では減収しないことを示し, 斉藤ら (1983) や TALEKAR and LEE (1988) は, 莢伸長期に減収をまねく切葉率は 50% 以上, THOMAS et al. (1974) や前田・城所 (1982) は 60% 以上と報告し, 切葉率 25% 程度では収量への影響を認めていない。一致しなかった原因としては, 中齢以上の幼虫の加害により, 実際に被害された葉面積が 23% 以上に進展したことがあげられる。さらに, 被害葉面積率は試験区の中央の 5 株から推定したのに対し, 収量調査は試験区の全 25 株で行い, 5 株から推定した値が試験区全体の被害葉面積率をどの程度反映しているのかという問題が残る。また, 切葉実験では切葉によって下層葉に対する光環境の改善がはかられ, 下層葉の物質生産量の増加が減収の回避につながっているのかもしれない。

手軽に利用できる携帯用分光反射計を利用して, ダイズ群落のハスモンヨトウ幼虫による被害葉面積率を非接触, 非破壊で推定した。しかし, 山本ら (1991) も指摘しているように, 分光反射特性はダイズの生育段階, 葉の重なりや葉身の傾斜などの葉群の状態, 太陽の高度などによって影響を受ける可能性がある。したがって, 今後はこれらの影響と分光反射特性の関係や被害解析のデータを積み重ねる必要がある。将来的には, 被害

葉面積率と減収の動的予測が可能になり, さらに防除の可否の判断基準にも利用できるものと考えられる。

引用文献

- BEGUM, A. and W.G. EDEN (1965) *J. Econ. Entomol.* **58**: 591—592.
- 樋口博也 (1991) 応動昆 **35**: 131—135.
- 片山 順・佐野康二 (1989) 応動昆 **33**: 57—62.
- 前田正孝・城戸 隆 (1982) 北日本病虫研報 **33**: 106—107.
- 野田政春・藤吉 臨・酒井久夫 (1981) 九病虫研会報 **27**: 121—123.
- 岡本大二郎・岡田齊夫 (1968) 中国農試報告 **E2** 号: 111—141.
- 斉藤 隆・川本 均・桐谷圭治 (1983) 応動昆 **27**: 203—210.
- TALEKAR, N.S. and H.R. LEE (1988) *J. Econ. Entomol.* **81**: 1363—1368.
- THOMAS, G.D., C.M. IGNOFFO, K.D. BIEVER and D.B. SMITH (1974) *J. Econ. Entomol.* **67**: 683—685.
- THOMAS, G.D., C.M. IGNOFFO, D.B. SMITH and C.E. MORGAN (1978) *J. Econ. Entomol.* **71**: 871—874.
- TODD, J.W. and L.W. MORGAN (1972) *J. Econ. Entomol.* **65**: 567—570.
- TURNIPSEED, S.G. (1972) *J. Econ. Entomol.* **65**: 224—229.
- 山本晴彦・本條 均 (1990) 農業気象 **46**: 19—22.
- 山本晴彦・寒川一成・渡邊朋也・樋口博也 (1991) 農業気象 **47**: 15—20.

Bacillus thuringiensis の *cryIIIA* 遺伝子の 増幅と同定

浅野真一郎・佐々木潤・伴戸久徳・飯塚敏彦
北海道大学農学部

Amplification and Detection of *cryIIIA* Gene from *Bacillus thuringiensis* Strains. Shinichiro ASANO, Jun SASAKI, Hisanori BANDO and Toshihiko IIZUKA (Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **38**: 300—302 (1994)

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *cryIII* gene, subsp. *tenebrionis*, subsp. *tolworthi*

土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* は, グラム陽性の芽胞形成菌で芽胞形成期に, ある種の昆虫に対して強い特異的殺虫活性を示す結晶タンパク質 (insecticidal crystal protein: ICP) を産生することが知られている。ICP をコードしている遺伝子は, その ICP の特異的殺虫活性によって *cryI* から *cryIV* に分類されている (HÖFTE and WHITELEY, 1989)。すなわち, *cryI* 遺伝子は鱗翅目昆虫に対して, *cryII* 遺伝子は双翅目・鱗翅目昆虫, *cryIII* 遺伝子は鞘翅目昆虫, *cryIV* 遺伝子は双翅目昆虫に対して殺虫活性を有している。

cryI 遺伝子ならび *cryII* 遺伝子は, その遺伝子の同定のために合成したオリゴヌクレオチド DNA プライマーによって, *B. thuringiensis* 菌株の有するそれぞれの遺伝子を同定できることを既に報告した (飯塚ら, 1992; 浅野ら, 1993)。現在, *cryIII* 遺伝子は, *cryIIIA* 遺伝子 (SEKAR et al., 1987), *cryIIIB* 遺伝子 (STICK et al., 1990), *cryIIIC* 遺伝子 (LAMBERT et al., 1992 a) な

らびに *cryIIID* 遺伝子 (LAMBERT et al., 1992 b) の 4 つの異なる塩基配列と殺虫活性をもつ遺伝子が報告されている。本実験では、鞘翅目昆虫に対して殺虫活性をもつ *B. thuringiensis* 菌株の *cryIII* 遺伝子を検索する目的で、その遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチド DNA プライマーを合成した。この *cryIII* 特異的プライマーを用いて、*cryIII* 遺伝子を有すると報告されている *B. thuringiensis* の亜種 *tenebrionis* ならびに亜種 *tolworthi* で *cryIII* 遺伝子の増幅と同定を行ったので報告する。

材料と方法

供試菌株：供試した *B. thuringiensis* 菌株は、北海道大学農学部応用分子昆虫学講座保存の亜種 *tenebrionis* (Dr. T.R. SHIEH から分与された) ならびに亜種 *tolworthi* (Dr. H. de BARJAC から分与された) の系統株とした。

B. thuringiensis 菌株から DNA の抽出：*B. thuringiensis* 菌株から DNA の抽出は、IIZUKA et al. (1981) の方法に従って行った。

オリゴヌクレオチド DNA プライマーの合成：*cryIII* 遺伝子特異的オリゴヌクレオチド DNA プライマーの合成は、*cryIII* 遺伝子 (*cryIIIA*, *cryIIIB*) のそれぞれの遺伝子において特異的領域を選び、その DNA 塩基配列をもとに DNA 合成機 (Applied Biosys Co. Ltd.) で合成した。

B. thuringiensis 菌株から *cryIII* 遺伝子の増幅と同定：供試菌株からの *cryIII* 遺伝子の増幅は、浅野ら (1993) の方法に従って行い、増幅された DNA はプラスミドベクターである Bluescript SK (−) の *Sma* I サイトにつなぎ込み、クローニングしたのちダイデオキシ法による塩基配列の決定ならびに制限酵素地図の作成によって *cryIII* 遺伝子の同定を行った。

結果と考察

本実験で合成した、*cryIII* 遺伝子同定のための 5′ 末端側の DNA プライマーは *cryIIIA*, *B* 遺伝子において相同性の高い領域の配列 (3AB 5 primer: 5′-CCGAACAATCGAAGTGAA) であり、両 *cryIII* 遺伝子において共通の DNA プライマーとした。また、3′ 末端側のプライマーは両 *cryIII* 遺伝子の塩基配列より特異性が高い領域を選び、*cryIIIA* 遺伝子においては (3A31primer: 5′-ATAGATGGTCACTACTACTT), *cryIIIB* 遺伝子においては (3B31primer: 5′-GAATCCTGTGCACCTAA) を DNA 合成機によってそれぞれ合成した。それぞれの DNA プライマーを混合し、抽出した *B. thuringiensis* 菌株の DNA をテンプレートとして PCR 法によって *cryIII* 遺伝子の増幅を行った。その結果、亜種 *tenebrionis* 株から増幅された DNA (約 2,000bp) をクローニング、制限酵素地図作製ならびに遺伝子構造解析を行ったところ、増幅された DNA が報告されている *cryIIIA* 遺伝子と完全に一致していることが明らかとなった。また、亜種 *tolworthi* から抽出した DNA をテンプレートとした PCR 法によって *cryIII* 遺伝子を増幅させたところ、約 1,300bp の大きさの DNA が増幅された (Fig. 1)。この増幅された DNA

Fig. 1. Total DNA samples from *Bacillus thuringiensis* strains analyzed by PCR with mixture of *cryIII*-specific primers. Lane 1. λ -HindIII marker; Lane 2. *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*; Lane 3. *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*.

について、クローニングした *cryIIIA* 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションによる解析を行ったところ、わずかしきハイブリダイゼーションが認められなかったことから、ひきつづき増幅された DNA のクローニングを行い、その構造解析を行った。その遺伝子の構造解析の結果、本実験で供試した亜種 *tolworthi* は、報告されている *cryIIIB* 遺伝子を有していないことが明らかとなった。

本実験の結果、*cryIIIA* 遺伝子については、PCR 法と本実験でクローニングした *cryIIIA* 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行うことによって、今後 *B. thuringiensis* 菌株から同定を行うことが可能となった。*cryIIIB* 遺伝子については、*B. thuringiensis* 菌株から *cryIIIB* 遺伝子をクローニングした後、この遺伝子同定のための DNA プローブの作成を行いたい。また、この他、*cryIIIC* 遺伝子および *cryIIID* 遺伝子それぞれの遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、*B. thuringiensis* 菌株から PCR 法によって、それぞれの *cryIII* 遺伝子の増幅ならびにクローニングを行い、サザンハイブリダイゼーションのためのプローブ作成を試み、今後全ての *cryIII* 遺伝子の同定を行うつもりである。

引用文献

- 浅野真一郎・伴戸久徳・飯塚敏彦 (1993) 日蚕雑 62: 223—227.
 HÖFTE, H. and H.R. WHITELEY (1989) *Microbiol. Rev.* 53: 242—255.
 IIZUKA, T., R.M. FAUST and R.S. TRAVERS (1981) *J. Sericult. Sci. Jpn.* 50: 120—133.
 飯塚敏彦・浅野真一郎・山本敬司 (1992) 第 62 回日本蚕糸学

会, p. 33 [講要].

LAMBERT, B., W. THEUNIS, R. AGUDA, K.V. AUDENHOVE, C. DECOCK, S. JANSSENS, J. SEURINCK and M. PEFFEROEN (1992 a) *Gene* **110**: 131–132.

LAMBERT, B., H. HÖFTE, K. ANNYS, S. JANSSENS, P. SOETAERT and M. PEFFEROEN (1992 b) *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:

2536–2542.

SEKAR, V., D.V. THOMPSON, M.J. MARONEY, M.R. BOOKLAND and M.J. ADANG (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7036–7040.

SICK, A., F. GAERTNER and A. WONG (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**: 1305.

ナスノメイガの配偶行動と処女雌 トラップによる雄の誘引

安田 慶次・川崎建次郎¹⁾

沖縄県農業試験場

Mating Behavior of Eggplant Fruit-Borer, *Leucinodes orbonalis* GUENÉE (Lepidoptera: Pyralidae) and Capture of Males in Virgin-Female Traps. Keiji YASUDA and Kenjiro KAWASAKI² (Okinawa Agricultural Experiment Station, Naha 903, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **38**: 302–304 (1994)

Abstract: The mating behavior of the eggplant fruit-borer was observed in the laboratory under natural light conditions. Copulation occurred around 04:40 and the duration was 73 minutes. Virgin-female traps captured males both in a large-field cage, and in an eggplant field. Males were trapped between 04:00 and 05:00 in the field. This result coincided with the time of copulation observed in the laboratory.

Key words: eggplant fruit borer, mating behavior, sex-attractant trap

ナスノメイガ *Leucinodes orbonalis* GUENNE は東南アジア、アフリカに広く分布するナスの害虫である(高良・東, 1969)。日本では1964年に沖縄県那覇市で発見されて以来、全県下に分布を拡大した(玉城・宮良, 1982)。1980年後半より沖縄本島では被害はほとんど認められなくなったが、宮古島、石垣島では依然重要な害虫である(安田・桃木, 1988)。本種の幼虫は寄主植物の果実および茎の内部に食入するため、被害の発見が遅れることが多い。そのため、本種の性フェロモンを発生調査に利用することは有用と考えられ、トラップおよび合成性フェロモンの開発が必要となっている。そこで本種のフェロモントラップの開発に必要な知見を得るため、飛翔行動、交尾行動、交尾時刻、交尾継続時間、雌成虫による雄成虫の誘引についての調査を行ったので、その結果を報告する。

なお、本研究を進めるにあたり、多くの御助言を頂いた沖縄県農業試験場玉城信弘研究主幹、宮竹貴久研究員および農林水産省農業環境技術研究所山村光司博士に感謝する。

材料と方法

供試虫は野外から採集後、27°C、12L–12D(点灯午前6時)の条件でナスの果実で3世代飼育したものをを用いた。蛹化した蛹は腹部の形態の違いにより雌雄を分け、別々の直径8cm高さ4cmの円筒形透明スチロール容器に入れた。羽化は玉城・宮良(1982)および事前の観察により夜間のみに行われることが明らかであったので、調査前日の午前10時より当日の午前10時まで羽化したものをその日の羽化成虫(1日齢)とした。成虫は雌雄別々に上記と同様な容器に保管し、観察日まで餌として水で2倍に薄めたハチミツと水をそれぞれ脱脂綿に浸ませて与えた。

上記の容器に1日齢の1対の雌雄成虫および上記と同様の餌と水を入れ、合計52対の成虫について観察を行った。調査は沖縄県那覇市で、1991年9月3日と4日に行い、両日とも日の出が6時10分、日の入りが18時48分であった。調査中の室温はほぼ28°Cに保たれた。容器は窓際に置き、正午より24時間、はばたきと飛翔、および交尾の有無について連続的に観察を行った。交尾は雌雄の交尾器を結合させたものとし、交尾開始時刻および継続時間を調べた。夜間の観察は舞台照明用の赤色セラチンを前面に付けた懐中電灯の照明下で行った。

処女雌トラップへの誘引試験は野外網室と本種の発生が認められた露地ナス畑で行った。なお、雄成虫を誘引源とする試験は事前の調査で雌雄ともに誘引が認められなかったで行わなかった。調査に用いた網室は3m×2m×高さ1.8mで、その中へ6個の武田式粘着トラップ®、を直径1.2mの同心円上に30cmの高さで設置した。誘引源として1日齢の処女雌5頭を餌の10倍に薄めたハチミツを浸ませた脱脂綿と共にステンレス製網張りの直径5cmの半球形の容器に入れ、その容器をトラップ内へ一つ置きに合計3個置き、残りのトラップには餌のハ

1) 現在 蚕糸昆虫農業技術研究所

2) Present address: National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan. 日本応用動物昆虫学会誌(応動昆) 第38巻 第4号: 302–304 (1994)

1994年3月3日受領(Received 3 March 1994)

1994年5月28日登載決定(Accepted 28 May 1994)