長崎県のブロッコリー圃場から採集したコナガ個体群における 各種薬剤の殺虫効果とジアミド系薬剤の抵抗性遺伝子頻度

柴田 真信^{1)†}・上杉 龍士^{2)*}・平山 千穂¹⁾

(¹⁾ 長崎県病害虫防除所・²⁾ 農研機構中央農業研究センター)

Effect of several insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus Hood collected from broccoli fields in Nagasaki Prefecture, and frequency of diamide resistance gene. Masanobu Shibata^{1)†}, Ryuji Uesugi²⁾, and Chiho Hirayama¹⁾

(¹⁾Nagasaki Plant Protection Office, Isahaya, Nagasaki 854-0062, Japan. ²⁾Central Region Agricultural Research Center, NARO, Kannondai 2-1-18, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan)

長崎県内のブロッコリー圃場から採集したコナガ3個体群の3齢幼虫に対し、パクチョイ葉を用いた葉片浸漬法によって11薬剤における殺虫効果を検討した。その結果、全ての個体群でエマメクテン安息香酸塩乳剤、スピノサド水和剤、スピネトラム水和剤、BT剤、ピリダリル水和剤、カルタップ水溶剤の処理96時間後の補正死虫率がいずれも96.7%以上と高かった。一方、ジアミド系薬剤であるフルベンジアミド水和剤、クロラントラニリプロール水和剤の補正死虫率は0～70.0%であり、安定した殺虫効果は得られなかった。また、新規のジアミド系薬剤であるシアントラニリプロール水和剤の補正死虫率は70.4～100%であった。さらに、同3個体群においてジアミド系薬剤抵抗性遺伝子頻度を調査した結果、全ての個体群で抵抗性遺伝子頻度が50%を超えていた。

Keywords : leaf dip method, insecticide resistance, flubendiamide, chlorantraniliprole, cyantraniliprole

緒 言

コナガ (*Plutella xylostella* Linnaeus) はアブラナ科野菜の重要害虫であり、年間の発生回数が多く (山田, 1997)、殺虫剤抵抗性の発達が著しいことが知られている (浜, 1986)。近年、鹿児島県、茨城県、千葉県のコナガ個体群におけるジアミド系薬剤に対する感受性の低下が確認されており (福田ら, 2014; 井上ら, 2015; 清水ら, 2014)、クロルフェナビル水和剤やピリダリル水和剤については一部地域で殺虫効果の低下が報告されている (福田ら, 2014; 井上ら, 2015; 吉澤ら, 2016)。長崎県内のブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*) 産地でも、2014年頃からコナガの被害が大きな問題となっているが、使用

頻度の高い防除薬剤であるジアミド系薬剤の殺虫効果を確認できるデータは示されていない。効果的な薬剤による防除体系を構築するためには、県内のコナガ個体群に対してジアミド系を含む各種薬剤の殺虫効果を把握する必要がある。そこで、長崎県のブロッコリー産地である雲仙市、諫早市および松浦市の生産圃場から採集したコナガ個体群を対象に、葉片浸漬法による薬剤感受性検定を行った。また、広く普及しているジアミド系薬剤の抵抗性リスクを把握するために、抵抗性遺伝子マーカーを用いた遺伝子診断を行った。ジアミド系薬剤であるフルベンジアミド、クロラントラニリプロールに対するコナガの抵抗性は、薬剤の標的となるリアノジン受容体タンパクにおいて4946番目のアミノ酸がグリシン (GGG) からグルタミン酸 (GAG または GAA) へと変異 (G4946E) することで生じる (Trocza et al., 2012)。そこで、野外採集個体から抽出したゲノム DNA について G4946E を含むエクソン領域を PCR により増幅し、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を解析することで、G4946E の遺伝

† shibata.masanobu@pref.nagasaki.lg.jp

* 現在 農研機構東北農業研究センター

* Present address: Tohoku Agricultural Research Center, NARO, Akahira 4, Shimo-Kuriyagawa, Morioka, Iwate, 020-0198, Japan

子頻度を算出し、ジアミド系薬剤抵抗性の遺伝子診断を行った。

本文に先立ち、コナガの採集に協力してくださった田中慶輔（JA 島原雲仙）・江里口正晴（長崎県島原振興局）・古場直美（長崎県病害虫防除所）、本研究の遂行とまとめに際し懇切なるご指導とご助言をいただいた日本典秀・長坂幸吉（農研機構中央農業研究センター）の諸氏に厚くお礼申し上げる。

なお、本研究の一部は、農林水産省「ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発プロジェクト（PRM-01）」の助成を受けたものである。

材料および方法

1. 薬剤感受性検定

試験には、2016年9月に長崎県雲仙市、諫早市および松浦市のブロッコリー圃場から採集したコナガを用いた。各地点から30～50頭のコナガ成虫をすくい取りによって採集後、継代飼育した第2世代の3齢幼虫を供試した。飼育はコマツナ (*Brassica rapa* var. *perviridis*, 品種:「楽天」) およびパクチオイ (*Brassica rapa* var. *chinensis*, 品種:「白茎優愛菜」) を用いて25±1℃, 16L8Dの室内で行った。

供試薬剤として県内のブロッコリー栽培で使用頻度の高い薬剤に加え、他県での薬剤感受性検定で殺虫効果が高いと判断された計11薬剤を用いた（第1表）。薬剤は蒸留水を用いて常用濃度に希釈し、全ての処理

区に展着剤（ポリアルキレングリコールアルキルエーテル）が0.01%濃度になるように加用した。

検定はパクチオイ葉の葉片浸漬法によって実施した。希釈した薬液にパクチオイ葉片（直径7cm）を20秒間浸漬し、室内で風乾した。処理後は湿らせたろ紙を敷いたプラスチックシャーレに置き、コナガ3齢幼虫10頭を放飼して蓋を閉じ、25℃, 16L8D条件下に維持した。試験は1剤あたり3反復実施し、96時間後の生存、死亡虫を計数し、補正死虫率(%) $\{(\text{対照区生存虫率} - \text{処理区生存虫率}) / \text{対照区生存虫率}\} \times 100$ (Abbott, 1925) によって処理区の効果を評価した。なお、幼虫の生死の判定において正常に動けない個体は苦悶虫とし、死亡とみなした。また、処理96時間後のパクチオイ葉片の被害程度を観察し、摂食した面積を6段階（被害した面積が0%：被害度0, 5%以上～10%未満：被害度1, 10%以上～30%未満：被害度2, 30%以上～50%未満：被害度3, 50%以上～80%未満：被害度4, 80%以上～100%：被害度5）に分けて評価し、3反復の平均で算出した。

2. ジアミド系薬剤の抵抗性遺伝子診断

抵抗性遺伝子診断を行ったコナガは、2016年9月に長崎県内の雲仙市、諫早市および松浦市のブロッコリー圃場各1圃場から採集した成虫・蛹・幼虫を用いた。解析に用いた個体数は雲仙市、諫早市および松浦市でそれぞれ35, 32, 29頭である。

第1表 コナガ3齢幼虫に対する各種殺虫剤の殺虫効果

供試薬剤名			補正死虫率(%)			
			雲仙市	諫早市	松浦市	
ジアミド系						
	フルベンジアミド水和剤	20.0	2,000	70.0	20.7	18.5
	クロラントラニプロール水和剤	5.0	2,000	56.7	3.4	0.0
	シアントラニプロール水和剤	10.3	2,000	100	75.9	70.4
マクロライド系						
	エマメクチン安息香酸塩乳剤	1.0	1,000	100	100	100
スピノシン系						
	スピノサド水和剤	25.0	5,000	100	100	100
	スピネトラム水和剤	11.7	2,500	100	100	100
BT剤						
	BT(aizawai 株)水和剤	10.0	1,000	100	100	100
	BT(kurustaki 株)水和剤	10.0	1,000	100	100	100
その他						
	クロルフェナピル水和剤	10.0	2,000	86.7	82.8	100
	ピリダリル水和剤	10.0	1,000	96.7	100	100
	カルタップ水溶剤	75.0	1,500	100	100	100
無処理区（生存虫率）				100	96.6	90.0

採集したコナガのサンプルは99.5% エタノール中で保管した。また、虫体からの DNA 抽出は以下の方法で行った。1.5ml マイクロチューブ内のサンプルに PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific) を100 μ l 加え、4～6個 ジルコニアビーズ (1.5mm 半径) を加え、Multibeads shocker[®] Mb601 (Yasui Kikai) で破碎し、100℃ 20分 でインキュベートし、15,000×g で3分間遠心した。これを PCR 反応の DNA テンプレート溶液とした。

PCR によるコナガのリアノジン受容体 G4946E を含むエクソン領域の増幅は、10 μ l の反応液で行った。反応液の組成は、1U Ex Taq polymerase (TaKaRa), 1x Ex Taq buffer (2mM MgCl₂, TaKaRa), 0.5 μ M 両プライマー、0.2mM dNTP および0.5 μ l DNA テンプレート溶液である。PCR 反応は T100 Thermal Cycler (Biorad) を用いて、95℃ 4分の後、94℃ 30秒、60℃ 45秒、72℃ 30秒を37サイクル、72℃ 5分の温度条件で行った。実験当初の増幅に使用したプライマーペアは、P x R y R - L F (5'-AGACTGGCGCTACCAAGTGT-3') および PxRyR-R (5'-TGTTTCCCGTTATGCGTGAC-3') である。PCR により増幅された領域の塩基配列を解析するために、PCR 産物を ExoSAP-IT (Affymetrix) で精製後、PCR 反応で用いたものと同じプライマーを使い Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) で Forward 側からのシー

ケンス反応を行った。シーケンシング反応産物による塩基配列の解析は ABI3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) で行った。シーケンサーから出力された波形データをもとにして、感受性ホモ (SS) 型 (GGG/GGG), 抵抗性ホモ (RR) 型 (GAG または GAA/GAG または GAA), ヘテロ (SR) 型 (GGG/GAG または GAA) の3種類の遺伝子型を決定し、抵抗性遺伝子 (R) 頻度 (GAG または GAA) を算出した。また、ジアミド系薬剤抵抗性の遺伝様式は劣性遺伝である (坂田, 私信) ことから、表現型については、SS 型と SR 型を感受性型、RR 型を抵抗性型とした。

結 果

1. 各種薬剤の殺虫効果

コナガ3齢幼虫に対する各種薬剤の殺虫効果、食害抑制効果をそれぞれ第1, 2表に示した。雲仙個体群に対するジアミド系薬剤であるフルベンジアミド水和剤は、補正死虫率が70.0%, 食害度が1.7であった。一方、諫早個体群および松浦個体群の補正死虫率は、20.7% および18.5% であり、雲仙個体群より低かった。雲仙個体群に対するクロラントラニリプロール水和剤の補正死虫率は56.7% であり、同系統であるフルベンジアミド水和剤と比較して低かった。他の2個体群では0～3.4% と殺虫効果はほとんど認められず、また食害度は3以上であった。

新規のジアミド系薬剤であるシアントラニリプロー

第2表 コナガ3齢幼虫に対する各種殺虫剤の食害抑制効果

供試薬剤名				食害度		
				成分量(%)	希釈倍数	雲仙市
ジアミド系						
	フルベンジアミド水和剤	20.0	2,000	1.7	2.7	3.3
	クロラントラニリプロール水和剤	5.0	2,000	2.3	3.3	3.0
	シアントラニリプロール水和剤	10.3	2,000	0.0	0.7	0.7
マクロライド系						
	エマメクチン安息香酸塩乳剤	1.0	1,000	0.0	0.0	0.0
スピノシン系						
	スピノサド水和剤	25.0	5,000	0.0	0.0	0.0
	スピネトラム水和剤	11.7	2,500	0.0	0.0	0.0
BT剤						
	B T (aizawai 株)水和剤	10.0	1,000	0.0	0.0	0.0
	BT(kurustaki 株)水和剤	10.0	1,000	0.0	0.0	0.0
その他						
	クロルフェナピル水和剤	10.0	2,000	1.3	1.3	0.0
	ビリダリル水和剤	10.0	1,000	0.0	0.0	0.0
	カルタップ水溶剤	75.0	1,500	0.0	0.0	0.0
無処理区				4.7	4.0	4.3

ル水和剤の補正死虫率は、雲仙個体群では100%と高い殺虫効果が認められ、食害度も0であった。一方、諫早個体群松浦個体群は、補正死虫率が75.9%および70.4%、食害度がともに0.7であった。この2個体群に対するシアントラニプロール水和剤の殺虫効果および食害抑制効果は、雲仙個体群に比べて低かった。

BT 水和剤 (aizawai 株および kurustaki 株)、マクロライド系薬剤のエマメクチン安息香酸塩乳剤、スピノシン系薬剤のスピノサド水和剤、スピネトラム水和剤は、いずれの個体群においても補正死虫率が100%であり、食害度は0であった。

松浦個体群に対するクロルフェナピル水和剤は、補正死虫率が100%、食害度が0であった。一方、雲仙個体群および諫早個体群は、補正死虫率が86.7%および82.8%、食害度がともに1.3であった。この2個体群に対するクロルフェナピル水和剤の殺虫効果および食害抑制効果は、松浦個体群に比べて低かった。

ピリダリル水和剤、カルタップ水溶剤の補正死虫率は、全ての個体群で90%以上であり、食害度は0であった。

2. ジアミド抵抗性の遺伝子診断結果

野外で採集したコナガ個体でのジアミド抵抗性の遺伝子診断結果を第3表に示した。ジアミド抵抗性の遺伝子頻度は雲仙個体群では52.9%、諫早個体群では73.4%、松浦個体群では64.1%であった。また、劣性ホモ型となり表現型がジアミド系薬剤抵抗性であると推定される個体の頻度は、雲仙個体群では25.7%、諫早個体群では56.3%、松浦個体群では48.3%であった。

考 察

鹿児島県、千葉県、茨城県のコナガ個体群では、ジアミド系薬剤であるフルベンジアミド水和剤およびクロラントラニプロール水和剤の効果は低いが、マクロライド系、スピノシン系、BT 剤、カルタップ水溶剤の効果は高く、クロルフェナピル水和剤（鹿児島県、茨城県）、ピリダリル水和剤の効果は一部地域で低下

していると報告されている（福田ら, 2014; 井上ら, 2015; 清水ら, 2014）。長崎個体群に対するフルベンジアミド水和剤およびクロラントラニプロール水和剤の補正死虫率は地域によりばらつきがあるものの、諫早および松浦個体群では0~70.0%であり、上記報告と同様に殺虫効果が低いことが明らかになった。一方で、マクロライド系、スピノシン系、BT 剤、クロルフェナピル水和剤、ピリダリル水和剤、カルタップ水溶剤の補正死亡虫率は82.8~100%であり、ジアミド系薬剤と比較して高い殺虫効果が認められた。

新規ジアミド系薬剤であるシアントラニプロール水和剤については、これまでコナガの野外個体群に対する殺虫効果を調査した事例はなかった。本研究でシアントラニプロール水和剤に対するコナガの殺虫効果を調査したところ、雲仙個体群の補正死虫率は100%であった。しかし、諫早市と松浦市の2個体群では補正死虫率が75.9%、70.4%となり、ジアミド系薬剤以外の他の供試薬剤よりも殺虫効果は低かった。シアントラニプロール水和剤の殺虫効果が低下した個体群の発生要因として、従来のジアミド系薬剤との交差抵抗性が疑われる。一方で、従来のジアミド系薬剤と比較した場合、殺虫効果と食害抑制効果ともにシアントラニプロール水和剤が優れていた。

ジアミド系薬剤において、雲仙個体群と比較し諫早および松浦個体群の抵抗性発達程度が高いという傾向は生物検定と遺伝子診断で一致していた。一方で、生物検定におけるフルベンジアミド水和剤、クロラントラニプロール水和剤に対する補正死虫率と、第3表の表現型S（ジアミド系薬剤に感受性となることが予測される表現型）の値との間に若干の乖離があった。この原因としては生物検定に供試した個体群と、遺伝子診断に供試した野外個体群の間で世代に差があったことや、リアノジン受容体のG4946E以外のアミノ酸変異（Guo et al., 2014）、解毒分解酵素の関与（Wang et al., 2012）などが考えられる。

本県でのコナガの薬剤感受性については、過去にキャベツ圃場で採集した個体群に対して有機リン系薬

第3表 長崎県内のコナガにおけるジアミド抵抗性遺伝子診断結果

採集地点	採集日	供試虫数 (頭)	S ^{a)} S GGG/GGG	SR ^{b)} GGG/GAG	RR GAG/GAG	S遺伝子頻度 (%)	R遺伝子頻度 (%)	表現型S (%)	表現型R (%)
雲仙市	2016/9/16	35	7	19	9	47.1	52.9	74.3	25.7
諫早市	2016/9/17	32	3	11	18	26.6	73.4	43.8	56.3
松浦市	2016/9/20	29	2	13	14	29.3	64.1	51.7	48.3

a) Sは感受性。b) Rは抵抗性。

剤、フェンバレート、合成ピレスロイド系薬剤等での感受性低下の事例がある（長崎県病害虫防除所、1993；1994）。今回の試験により、諫早市および松浦市で採集したコナガ個体群に対して、ジアミド系薬剤、特にフルベンジアミド水和剤およびクロラントラニリプロール水和剤の殺虫効果が他の供試薬剤と比較して著しく低いことが判明した。また、ジアミド系薬剤抵抗性遺伝子の解析結果、遺伝子診断を行った3地点全てで抵抗性遺伝子の頻度が50%以上であった。県内ではブロッコリーが様々な作型で作付されており、各作型で本系統薬剤が多用され抵抗性遺伝子が選抜されたことによる感受性の低下が疑われた。今後、感受性の低下を防ぐためにコナガに対するジアミド系薬剤の使用を控える必要がある一方で、ブロッコリー栽培における大型チョウ目害虫の防除においては、依然としてブロッコリー栽培における定植前のジアミド系薬剤の灌注処理が必要とされている。そのため、定植後の散布剤におけるジアミド系薬剤の使用回数を減らし、今回の試験で効果が高いと判明した薬剤を中心とした防除体系を構築することが、ジアミド系薬剤の感受性が低下したコナガ個体群の密度を適切に管理することにつながると考えられる。

引用文献

- Abbott, W. S. (1925) J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Guo, L. et al. (2014) Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). Sci. Rep. 4: 6924.
- 浜 弘司 (1986) コナガの薬剤抵抗性. 植物防疫 40: 366-372.
- 福田 健・林川 修二 (2014) 鹿児島県内におけるコナガのジアミド系殺虫剤に対する感受性低下. 九病虫研会報 60: 75-78.
- 井上 麻里子・岡部 克・小河原 孝司 (2015) 茨城県におけるコナガに対するジアミド系薬剤を含む主要薬剤10種の殺虫効果. 関東東山病虫研報 62: 141-143.
- 長崎県病害虫防除所 (1993) 平成5年度植物防疫事業実績書: 88-89.
- 長崎県病害虫防除所 (1994) 平成6年度植物防疫事業実績書: 96.
- 清水 健・大谷 徹・河名 利幸・遠藤 正樹 (2014) 千葉県産コナガ個体群のジアミド系殺虫剤に対する感受性. 関東東山病虫研報 61: 137-140.
- Troccka, B. et al. (2012) Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. Insect Biochem. Mol. Biol. 42: 873-880.
- Wang, X. et al. (2012) Molecular cloning, characterization and mRNA expression of a ryanodine receptor gene from diamondback moth, *Plutella xylostella*. Pestic. Biochem. Physiol. 102: 204-212.
- 山田 偉雄 (1977) コナガの発生生態. 植物防疫 31: 202-205.
- 吉澤 仁志・大河原 一晶・櫻井 まさみ (2016) 群馬県におけるコナガに対する各種薬剤の殺虫および食害抑制効果. 関東東山病虫研報 63: 87-90.
- (2017年4月29日受領, 8月13日受理)