

Laboratory Bioassay Method of the Sex Pheromone of *Spodoptera litura* (F.). Yoshio TAMAKI, Hiroshi NOGUCHI and Takeshi YUSHIMA (National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Tokyo, 114) Received April 19, 1973. *Botyu-Kagaku*, 38, 147, 1973. (with English Summary 150)

22. ハスモンヨトウ性フェロモンの室内生物試験法¹⁾ 玉木佳男, 野口 浩, 湯嶋 健 (農林省農業技術研究所) 48. 4. 19 受理

ハスモンヨトウ雄成虫の行動および性フェロモンに対する反応におよぼす2, 3の条件を検討し, 性フェロモンの室内生物試験法を設定した。すなわち, 20°C, 65% RH, 全照明下で羽化した3日目の雄成虫を暗黒下におき, 2~3時間を経てからピペットにより性フェロモンを含む風を与え, 把握器を伸展し交尾行動をとる個体数を調査する。

本法によって 2×10^{-4} FE (雌当量)/mlまでの性フェロモン活性の検定が可能である。

ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* (F.) の雌成虫は性フェロモンを分泌し, これによって雄成虫が誘引される (Yushima *et al.*, 1973)。性フェロモンの活性成分の単離と構造決定, あるいは雌成虫による性フェロモン生産の動的側面の追求には感度の高い安定な活性度検定のための生物試験法の設定が不可欠である。さらにこの方法はできるだけ簡便であることが望ましい。

夜行性りん翅目昆虫の性フェロモンの室内生物試験法については多くの報告があり, いずれもそれぞれの種の配偶行動に応じて設定されている。多くの場合, その昆虫が配偶行動をとる時間帯をそのまま, あるいは人工的な照明周期によって昼夜を逆転させて室内生物試験が行なわれている (Shorey *et al.*, 1964; Sekul and Cox, 1967; Bartell and Shorey, 1969)。本法の一つの欠点は試験可能な時刻が, ある一定の時間帯に限定されることである。この欠点を補った第2の方法として成虫を羽化後全照明条件下に数日間放置して配偶行動の circadian rhythm を破壊した後, 照明下で試験する場合がある (Berger *et al.*, 1964; Roelofs and Feng, 1967; Sanders, 1971)。しかし, 本法においては性フェロモンに対する感度が第1の方法に比して著しく低いという欠点を伴う。著者らはすでにチャノコカクモンハマキ *Adoxophyes fasciata* WALSINGHAM の性フェロモンの生物試験法として上述の欠点を克服した方法, すなわち試験時刻についての制限がなく, 感度の高い方法を設定することに成功した。(玉木, 1969) この方法によれば全照明下で羽化した雄成虫を数日後の任意の時刻に一定時間の暗黒期を与えて性フェロモンに対する反応を高めると同時に安定した検定値が得られる。

本報告ではこのチャノコカクモンハマキ性フェロモ

ンの生物試験法の原理を適用したハスモンヨトウ性フェロモンの生物試験法について述べる。

本文に入るに先立ち, 供試昆虫の大量飼育を担当された山谷相子氏に感謝の意を表す。

材料と方法

供試昆虫はすでに報告した人工飼料 (Yushima *et al.*, 1973) により 25°C, 16時間照明下で累代飼育したものである。蛹は雌雄に分けた後, 直径 22 cm, 深さ 15 cm のプラスチック製ポットに収容し, 20°C, 65% RH の全照明条件の室内において羽化させ, 24時間ごとに羽化した雄を蛹と分離して 30×30×30 cm のステンレス製網籠に収容して同じ室内に放置した。この室内への雌成虫の投入および性フェロモン抽出物による汚染には十分注意した。

性フェロモン抽出物の生物試験は 20°C, 65% RH の条件下で行ない, 暗黒下での観察は赤色フィルターを装着した懐中電灯 (3 V) の光, または 20 V の電圧下における 2 C の白熱電球による薄明によっておこなった。

性フェロモン抽出液は羽化2~3日目の未交尾の雌成虫の腹部末端をメチレンクロライドとともに磨砕し, 滲液を 30~40°C で減圧濃縮し, フロリシカルラムを通して精製したものをを用いた。抽出液は 1 ml 当り 2頭分の雌成虫腹部末端を含むものを原液とし, 必要に応じてこれを10倍ごとに希釈して用いた。各試料液は 10 μ l を駒込ピペットの内壁に付着させ溶媒を蒸発させたのちに, 径 9 cm, 深さ 10 cm のステンレス製網籠* に 5頭ずつ収容された雄成虫に向けて空気とも吹きつけた。くり返しは4~6回とし, 1濃度当り合計20~30頭の雄を使用した。なお, 比較のために共通摺り合わせガラス部品を用いて Shorey and Gaston

¹⁾ 本報告の一部は日本応用動物昆虫学会昭和47年大会 (静岡) で発表された。

* 雄成虫を収容する容器としてガラス製フラスコを用いると, 雄の反応が著しく低下する。

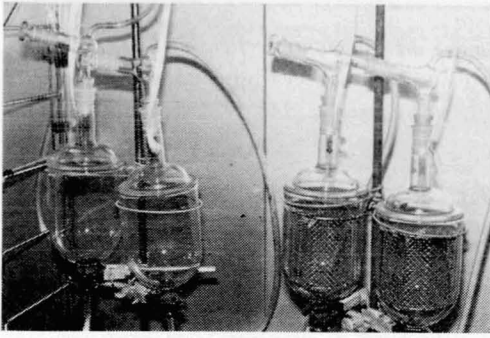


Fig. 1. An apparatus for bioassay of sex pheromone, assembled after Shorey and Gaston (1964).

(1964)に基づいて組み立てた装置(第1図)も検討した。この場合の空気の流速は毎分約200mlとした。

性フェロモンに対する雄の反応は腹部末端の毛状器管および把握器の伸展をもってその指標とし、必要に応じて翅の振動も合わせて記録した。

結果と考察

ハスモンヨトウ成虫の交尾時刻は自然光、および人工照明下において日没1~2時間または消灯1~2時間後である(Yushima *et al.*, 1973)。したがって、全照明下に数日経過した雄の場合においても消灯後1~2時間に雄の性フェロモンに対する反応の高い状態が見られるであろうとの予想のもとに、2, 3の観察と実験を行なった。

全照明下羽化3日目の雄成虫を暗黒状態に移し、性

フェロモンと接触させない状態のままその行動を観察したところ第2図のような結果を得た。すなわち、全照明下で静止状態を示していた雄成虫は消灯後10~20分で翅の振動、歩行または飛しょうを開始し、35分でこれらの行動は最高値を示した。そして以後徐々に行動は静まって、消灯後2時間半ではほぼ完全に静止状態に戻った。性フェロモンが存在していない状態でも消灯後30分ないし、1時間半は50%以上の個体が活発に活動しているため、この時間帯で性フェロモンに対する反応を識別するのはきわめて困難である。とくにイラクサギンウバ *Trichoplusia ni* において行なわれている成虫の翅の振動を指標とする方法(Shorey *et al.*, 1964)は全く適用できない。

全照明下羽化3日目の雄成虫の性フェロモンに対する反応性の変化を消灯後経時的に調査した結果を第3図に示す。この場合の反応の指標は把握器の伸展によった。高濃度のフェロモン溶液(2 FE/ml)に対しては消灯5分後に37%であった反応率が30分後に87%に上昇し以後多少の変動は見られるが消灯7時間後までかなり高い反応率を示した。また、低濃度のフェロモン溶液(2×10^{-2} FE/ml)に対しては消灯後30分~3時間がほぼ一定の反応率を示し、4時間目にこれが減少したのち徐々に高くなって7時間目に最高を示している。この2山を示す傾向は室内条件下での交尾時刻と交尾数、あるいは野外での処女雌による雄成虫の誘引数と時刻との関係においても見られる(Yushima *et al.*, 1973)。

以上の結果から性フェロモンの生物試験は雄成虫の活動が静まり性フェロモンに対する反応が比較的安定

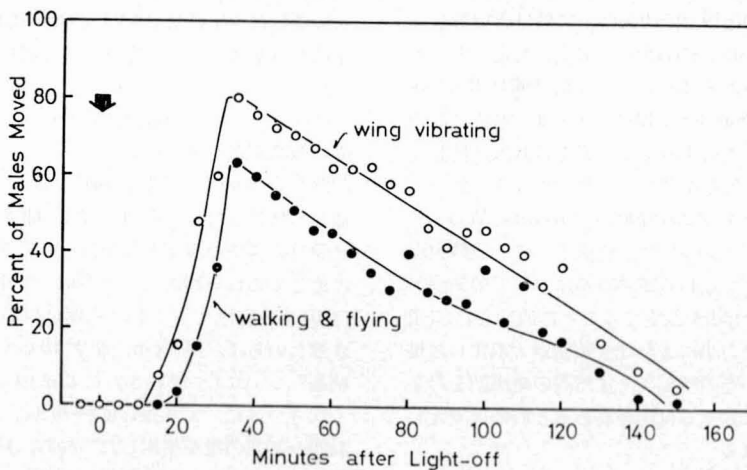


Fig. 2. Behavioral activity of male moths of *Spodoptera litura* (F.) after light-off. The male moths were kept in continuous light for 3 days after emergence and then the light was switched off.

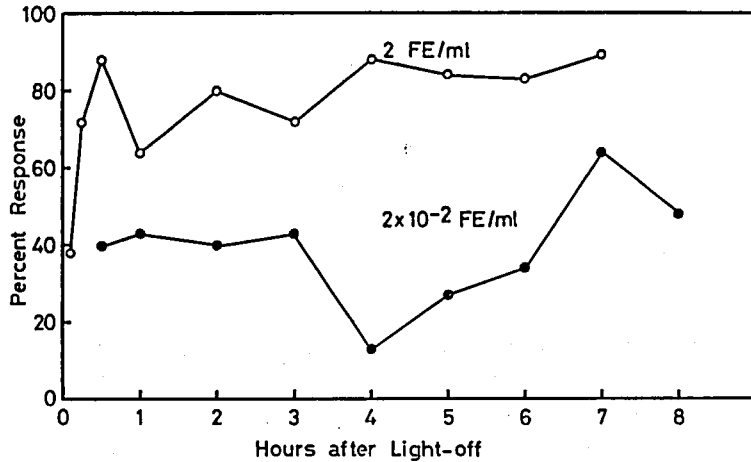


Fig. 3. Hourly responsiveness of male moths of *Spodoptera litura* (F.) to sex pheromone extract. The male moths were held in continuous light for 3 days after emergence, and then placed in the dark. Criterion of response is clasper extrusion.

している時間帯、すなわち消灯後2~3時間が適していると考えられる。

全照明下で羽化した雄成虫の羽化後の日数によるフェロモン感受性の変化は第4図に示すとおりである。この場合の性フェロモン抽出液は2 FE/mlの濃度のもを用い、反応の指標は把握器の伸展によった。消灯後2~3時間目に暗黒下で試験した場合は、羽化当日(1日目)の反応率0%が3日目には83%に上昇して

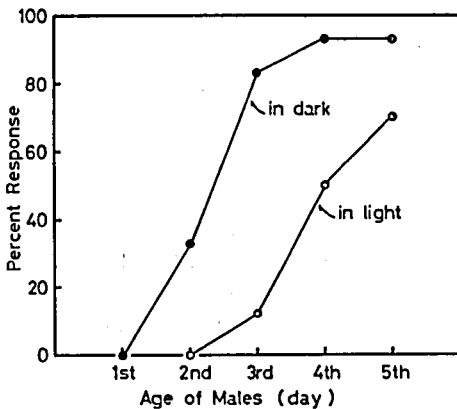


Fig. 4. Response of male moths of different ages to sex pheromone extract. The moths were held in continuous light after emergence and then used for assay in the light (hollow circle) or in the dark at 2-3 hours after light-off (solid circle). Criterion of response: clasper extrusion.

いる。他方、全照明下にそのままおき暗黒状態を与えないで照明下で試験した場合には、羽化3日目の雄でも12%の反応率しか示さない。しかし、この場合羽化5日目の雄では照明下でも70%の反応率を示していることは注目してよい。

全照明下羽化3日目の雄成虫を暗黒下におき2~3時間目に暗黒下で試験した場合、および全照明下羽化5日目の雄成虫をそのまま照明下で試験した場合の性フェロモン濃度と反応率の関係を第5図Aに示した。この場合の反応指標は把握器の伸展によった。羽化3日目の暗黒下の条件は羽化5日目の照明下の条件よりも雄成虫の性フェロモンに対する感度が高いことを示している。比較のために検討した Shorey and Gaston (1964) にもとづいた方法による結果を第5図Bに示したが、この方法では把握器の伸展を反応指標とするかぎりは性フェロモンに対する雄の感度が著しく低い。Shorey *et al.* (1964) がイラクサギンウワバについて、性フェロモンに対する反応指標として採用している翅の振動は、図に見られるとおり比較的高い感度を示しているが、この場合でも全照明下羽化3日目の成虫の暗黒条件下での把握器の伸展を指標とした反応率曲線(第5図A)とくらべてむしろ劣っていると考えられる。すでに述べたとおり、ハスモンヨトウ雄成虫は性フェロモンが存在しない条件でも消灯後約2時間までは翅の振動を伴う行動をとる個体が見られるので、翅の振動を反応指標とする方法は好ましくない。

以上の結果を総合し、ハスモンヨトウの性フェロモンの室内生物試験法として次のような操作によるもの

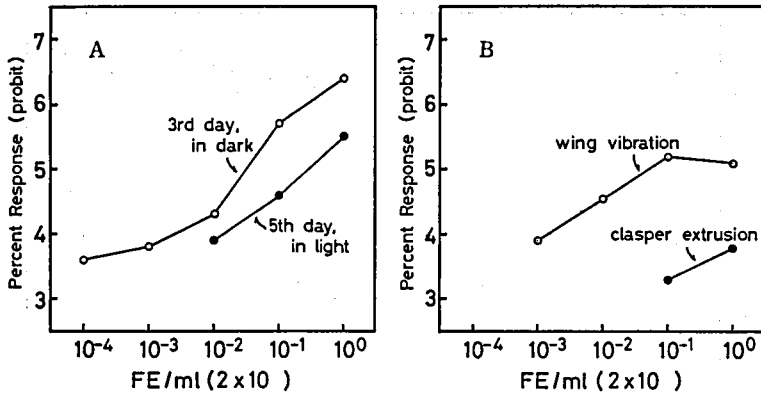


Fig. 5. Response of male moths of *Spodoptera litura* (F.) to sex pheromone extract of various concentration. The male moths were held in continuous light after emergence. A: Assayed with a puff of sample-air from a medicine-dropper in the light (solid circle) and in the dark at 2-3 hours after light-off (hollow circle). Criterion of response: clasper extrusion. B: Assayed with the use of an apparatus based on Shorey and Gaston (1964).

を設定した。

全照明下 (20°C, 65% RH) で羽化させた雄成虫をそのまま全照明下に保持する。羽化3日目の任意の時刻に各5頭の成虫を径9 cm, 深さ10 cmの網籠に入れたのち暗黒下に移す。暗黒期の2~3時間目に性フェロモン溶液10 μlを3~5 mlの駒込ピペット内壁に附着させ、ゴム球を装着し、数回空気を送って溶媒を蒸発させたのち、網籠中の雄成虫に向けて吹きつける。雄成虫の反応は腹部末端の毛状器管または把握器の伸展を指標とし、薄明または赤色光によってこれを観察する。

本法によって羽化2~3日目の雌成虫腹部末端のメチレンクロライド抽出物中の性フェロモン力価を2×100~2×10⁴FE/mlの範囲でほぼ定量的に検定することが可能である。

文 献

Bartell, R. J. and H. H. Shorey: *J. Insect Physiol.*, 15, 33 (1969).
 Berger, R. S., J. M. McGough, D. F. Martin and L. B. Ball: *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 57, 606 (1964).
 Roelofs, W. L. and K. C. Feng: *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 60, 1199 (1967).
 Sanders, C. J.: *Canad. Ent.*, 103, 631 (1971).
 Sekul, A. A. and H. C. Cox: *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 60, 691 (1967).

Shorey, H. H., L. K. Gaston and T. R. Fukuto: *J. Econ. Ent.*, 57, 252 (1964).
 Shorey, H. H. and L. K. Gaston: *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 57, 779 (1964).
 玉木佳男, 野口 浩, 湯嶋 健: *防虫科学*, 34, 107 (1969).
 Yushima, T., H. Noguchi and Y. Tamaki: *Appl. Ent. Zool.*, 8, 18 (1973).

Summary

A convenient laboratory bioassaying procedure of the sex pheromone of *Spodoptera litura* (F.) was developed.

Male moths of *S. litura*, which had been held in continuous light (20°C, 65% RH) from pupal stage, were placed in the dark at third day of emergence. At 2 to 3 hours after light-off, a puff of air from a medicine-dropper contaminated with sex pheromone was introduced into a wire-screen-cage (9 cm × 10 cm) in which five male moths were confined. Response of male moth was observed under diffuse light or with the aid of a red flash-light, and extrusion of clasper of the male moths was adopted as a criterion of the response.