

オオタバコガの休眠性の地理的変異と遺伝子発現に  
関する生態遺伝学的研究

(研究課題番号 14360028)

平成 14 年度～平成 16 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (B) (1))

研究成果報告書

平成 17 年 3 月



研究代表者 藤崎 憲治

(京都大学・農学研究科・教授)

## はしがき

地球温暖化は急速にしつつあると言われているが、それにつれて害虫の分布範囲、発生量、発生回数、および発生時期などが大きく変わる可能性が指摘されつつある。高温要求性の高い南方性の害虫であっても、今後わが国での発生量の増大と、その結果としての作物被害の増加が懸念される。このような害虫の典型として、ワタ、コムギ、トウモロコシなどの重要作物やさまざまな野菜・花卉類の世界的大害虫であるオオタバコガが挙げられる。本種はかつてはわが国では発生が少なくほとんど全く問題になっていなかったが、1994年夏の猛暑を期に、西日本や北陸の各地を中心に多発するようになり、現在では東北や北海道南部でも発生するようになってきている。世界的な重要害虫であるだけに、国外では多くの研究がなされてきたが、わが国での研究実績はきわめて少なかった。本種は亜熱帯起源であるため、温帯での気候適応は十分になされていないものと考えられるが、今後温帯の気候にどのように適応していくかを予測することは重要である。そのためには温帯における冬という厳しい時期を生き延びるための休眠性や耐寒性に関する基礎的研究が不可欠である。本研究は、このような背景の中で、オオタバコガの休眠特性やその地理的変異、および休眠性に関する遺伝子発現について明らかにすることを試みたものである。得られた結果は以下のように要約される。

1. 鹿児島、岡山、石川の各県から採集されたオオタバコガの地域個体群を用いて、18°C、11L13D~15L9Dの5段階の日長条件において休眠誘導反応を調べたところ、雄において誘導率がより高いという結果を得た。また、個体群間での休眠率の差は雌において小さかったが雌においては大きく、鹿児島個体群において雌の休眠率をもっとも低く、石川個体群においてもっとも高いという地理的傾向が見られた。さらに、同一条件での追試から、この傾向は累代飼育によって変化しないことが確認された。性差は個体群間交雑後も消失しなかったため、近交弱勢による付随的な結果でないことが分かった。休眠を同一条件で継続して観察した結果、休眠期間に関してはどの条件においても雌雄共にかなりの個体変異が存在した。しかし、蛹の平均休眠期間は常に雄よりも雌で短いことが確認され、さらに休眠覚醒後の発育期間も雌において有意に短いことが分かった。

2. 三重、千葉で採集したオオタバコガを京都、千葉の半野外条件で飼育し、休眠誘導パターンを観察した。千葉では近縁種タバコガとの比較も行った。どちらの地点においてもオオタバコガは休眠蛹を誘導し越冬することが可能であったが、休眠誘導に直接関与する低温によって、蛹化前に死亡するというリス

クも伴った。三重個体群の室内実験 (18°C ; 11L13D~15L9D) において観察された休眠率の雌雄差は半野外では観察されず、さらに半野外では室内実験に比べて休眠誘導率が日長の変化に大きく反応した。これらの結果から、実際の休眠誘導における複数の要因の関与が示唆され、またオオタバコガの越冬可能性には秋の外気温の影響が大きいことが分かった。一方、タバコガはより温帯に適した休眠誘導機構を有し、夏の高温条件下でも休眠を誘導した。

3. 三重県、滋賀県、長野県、新潟県、および沖縄県においてオオタバコガ幼虫を採集し、そのうち沖縄県を除く4個体群の系統を作成したが、それらで休眠性における明確な地理的勾配は検出されなかった。

4. 亜熱帯と温帯で採集したオオタバコガとタバコガの個体群において、実験室内で発育中の幼虫に変温と変日長の処理を与えることによって、それぞれの条件下で蛹休眠が誘導される割合を調べた。温帯で採集されたタバコガ個体群では、幼虫期間中に変温処理と変日長処理が両方とも与えられたときにすべての個体が休眠を誘導した。また、好適な温度条件で発育中の個体でも日長が 16 L から 12 L に変化したことに反応してほぼ 100% の個体で休眠が誘導された。温帯起源のタバコガは秋の温度条件に関わらず日長条件に反応して休眠を誘導しているのではないかと予想された。温帯で採集されたオオタバコガでは、幼虫期間中に変温処理と変日長処理が両方とも与えられたときに最も高い割合で休眠が誘導されたが、休眠誘導率が 100% となることはなかった。またタバコガとは異なり、変日長の処理が与えられただけでは休眠はほとんど誘導されなかった。この傾向は温帯で採集されたオオタバコガの個体群間に共通していた。亜熱帯起源であるオオタバコガでも日長と共に気温が低下することを感受して休眠誘導することが可能であると分かり、温帯での季節適応が進化していることが予想された。一方、亜熱帯で採集されたすべてのオオタバコガ個体群およびタバコガ個体群では、変温処理と変日長処理の両方が与えられてもほとんどの個体で休眠が誘導されなかった。亜熱帯個体群では休眠性を持たないことが予想されたが、低温短日の恒温条件下での休眠誘導率を亜熱帯で採集されたオオタバコガにおいて調べたところ、温帯個体群と同様に休眠を誘導した。この結果、オオタバコガの亜熱帯個体群では温度や日長の変化に反応して休眠を誘導するのではなく、低温が長く続いたときに休眠を誘導するということが予想された。これは秋が比較的温暖で晩秋まで外気温が発育下限温度を下回らない亜熱帯では有効な休眠誘導メカニズムである可能性がある。これらの結果から、オオタバコガでは温帯と亜熱帯のそれぞれの気候区において特殊な季節適応が進化したという可能性が示唆された。

5. 休眠覚醒の環境要因を明らかにするために、とりあえず冷却 (5°C) の効果を調べたが、恒温・一定日長で誘導された休眠は、冷却期間の有無や長短にか

かわらず、25°C条件下に移すとすぐに覚醒した。

6. 異なる齢期の幼虫を短日と長日の間で移し替えを行い、休眠誘起の日長感受期を調べた。卵から20°C、短日で飼育した幼虫を5齢初期から長日に移して飼育すると休眠は阻止された。しかし、本幼虫を5齢中期あるいは後期に長日に移すと休眠に入った。一方、卵期から長日で飼育した幼虫を5齢初期から短日に移して飼育すると休眠が誘起された。しかし、5齢中期あるいは後期に短日に移しても休眠は誘起されなかった。これらの結果から、オオタバコガの蛹休眠の日長感受期は5齢幼虫初期と推定された。なお、一部蛹では3齢あるいは4齢幼虫期に休眠の日長感受期があった。

7. オオタバコガが北日本で越冬できるか否かを明らかにするために、休眠蛹と非休眠蛹の低温耐性と糖含量を比較した。非休眠蛹は20°C、長日(14L:8D)飼育で、休眠蛹は20°C、短日(10L:14D)飼育で得た。これらの蛹を20°Cから0°Cまで、5°C/5日間隔で温度を低下させ、低温順化した。順化温度が0°Cに達した後、時間を追って蛹の生存率を調査した。なお、非休眠蛹はアイススポットが移動開始から消失するまでの4ステージ(アイススポット移動開始直後、4日目、7日目、14日目)に分け、低温順化した。アイススポット移動開始4日目の蛹を低温順化した場合、最も低温耐性が高かったことから、非休眠蛹として蛹化4日目齢を供試した。しかし、本非休眠蛹は0°Cで約1ヶ月以内に殆ど全て死亡した。また生き残っている蛹を20°Cに移しても羽化しなかった。一方、休眠蛹の約半数が112日以上生存した。非耐凍性昆虫は冬季過冷却点を低下させることで、低温耐性を増強していることが知られている。しかし、オオタバコガの休眠蛹と非休眠蛹の過冷却点は、低温順化してもしなくても変わらず、いずれも-17°C前後であった。これは、オオタバコガ蛹の低温耐性は過冷却点とは関係ないことを示している。蛹に含まれる主要な糖はトレハロースとグルコースであった。休眠蛹では、トレハロース含量が低温順化中と0°Cに達してから58日目まで増加がみられた。その間グルコース含量は低いままであった。非休眠蛹でも低温順化中にトレハロースは増加するが、その増加量は休眠蛹より少なかった。なお、多くの昆虫で順化中に蓄積がみられるグリセロールのような糖アルコールは検出されなかった。これらの結果から、順化中に増加したトレハロースが休眠蛹の低温保護物質として作用していると考えられる。0°C順化84日以後トレハロース含量の低下に伴ってグルコース含量の増加がみられた。非休眠蛹では羽化の前にトレハロース含量が低下し、グルコースが増加したことから、休眠蛹の休眠は低温順化によって84日後には打破されたと思われる。なお、20°Cに置いたままの休眠蛹の休眠は蛹化90日目まで破れず、トレハロースとグルコース含量は蛹化直後と同じ量であった。以上の結果から、オオタバコガの休眠蛹では平均気温が0°Cより高い地域では越冬可能であるが、非休

眠蛹は越冬できないと思われた。また、休眠蛹の低温耐性にはトレハロースが関係していると思われた。

8. オオタバコガの休眠誘導における日長反応の分子機構を遺伝子発現レベルで解析するために、まず、岡山県瀬戸内市牛窓のキャベツ畑から採集した複数の個体群を 10L14D20°C の条件下で卵から蛹まで飼育したところ、それらの休眠率に大きな差異が見られた。高い休眠率の群を群内で交配して得られた群の休眠率は高く、逆に低い休眠率の群からは休眠率の低い群が得られたことから、この休眠率の大きな差異は遺伝的変異によるものだと考えられた。

休眠誘導における分子機構を遺伝子発現レベルで解析するためには、短日で高い休眠率、逆に、長日で低い休眠率を示す群が必要である。日長条件の差による休眠率の差異はできるだけ大きくなければならない。そこで、選抜することにより、高休眠率群と低休眠率群の作製を試みた。しかしながら、選抜は進んだものの、群内での交配を繰り返すことにより、近親交配が進み、卵数が減少し、孵化率も著しく低下したため、群を維持することはできなかった。群内における交配だけでは群が維持できないので、低休眠の群間で交配し、新たな群を作製したところ、休眠率は大きく高まり、もはや低休眠率の群とは言えなくなった。このことから、休眠率の変異には複数の遺伝子座が関与し、しかも、それらの遺伝子座間には非相加的な関係があることが示唆された。休眠率に関わる遺伝子座間における非相加的エピスタシスが存在することが示唆されることから、多様な遺伝率を示す表現型が様々な遺伝子型により構成されていることが考えられた。逆に、高休眠率群の群間で交配した場合も同様に、休眠率は大きく減少したことから、複数の遺伝子座とその非相加的相互作用が休眠率に影響していることが示唆された。

高休眠率群と低休眠率群を、維持可能な群として得ることは、このような群内交配による選抜では困難であると考えられたので、つぎに、群間交配をしながら、選抜を繰り返すことにした。4つの群を用いてローテーション交配し、非休眠個体を選抜することにより、低休眠率群を安定に作製することにした。その結果、数回の選抜で低休眠率の群を得ることができたが、その後、休眠率は上昇し、やがて、休眠率が約 50%にまで高まり、再び減少した。おそらく、表現型が安定するまでには、多数の交配を繰り返す必要があると考えられる。研究材料として適切な高休眠率群をローテーション交配で作出することも開始したが、同様の困難が予想され、実際、十分に休眠率の高い群は得られなかった。

ローテーション交配しながら選抜することがなぜ不安定な休眠率を示す結果となったのか、遺伝子座間のエピスタシス、その他の原因を検討している過程で、幼虫期間と休眠の間に相間があることを発見した。幼虫期間の短い個体は非休眠になりやすく、長い個体は休眠しやすかった。おそらく、成長速度、あ

るいは、成育期間と関わりのある遺伝子が休眠誘導にも関与していると思われる。

#### 研究組織

研究代表者：藤崎憲治（京都大学・農学研究科・教授）

研究分担者：積木久明（岡山大学・資源生物科学研究所・教授）

吉田英哉（岡山大学・資源生物科学研究所・助手）

#### 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	4,700	0	4,700
平成 15 年度	2,200	0	2,200
平成 16 年度	2,100	0	2,100
総計	9,000	0	9,000

#### 研究発表

##### (1) 学会誌

K. Shimizu and K. Fujisaki (2002) Sexual differences in diapause induction of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hb.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology* 37: 527-533.

Y. Izumi, K. Anniwaer, H. Yoshida, S. Sonoda, K. Fujisaki and H. Tsumuki (2005) Comparison of cold hardiness and sugar content between diapausing and non-diapausing pupae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Physiological Entomology* 30:36-41.

K. Anniwaer, H. Yoshida, Y. Izumi, S. Sonoda, and H. Tsumuki (2005) Pupal diapause of *Helicoverpa armigera*: sensitive stage for photoperiodic induction. *Applied Entomology and Zoology* 49 (in press).

(2) 口頭発表

吉田英哉・積木久明. 2002. オオタバコガの休眠の個体群内多様性. 応動昆中国支部会報 45: 27.

吉田英哉・泉 洋平・積木久明. 2003. オオタバコガの休眠の個体群内多様性(II). 第 47 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨: 77.

清水 健・藤崎憲治. 2003. オオタバコガとタバコガの休眠性の比較. 第 47 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨: 77.

K. Anniwaer・吉田英哉・積木久明. 2003. オオタバコガの休眠誘導の日長感受期. 応動昆中国支部会報46: 51.

泉 洋平・吉田英哉・A. Kurban・積木久明. 2003. オオタバコガの低温耐性 I. 応動昆中国支部会報 46: 51.

清水 健・藤崎憲治. 2004. オオタバコガとタバコガの休眠形質の種間および個体群間比較. 第 48 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨: 21.

清水 健・藤崎憲治. 2004. オオタバコガの温帯への適応とそれに関わる休眠戦略. 第 48 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨: 193.

K. Anniwaer・吉田英哉・積木久明. 2004. オオタバコガの温度による休眠誘導について (予報). 応動昆中国支部会報47.

泉 洋平・K. Anniwaer・吉田英哉・積木久明. 2004. オオタバコガの低温耐性 II. 応動昆中国支部会報47.

K. Anniwaer・吉田英哉・泉 洋平・積木久明. 2005. オオタバコガの温度による休眠誘導について. 第 49 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨: 108.

(3) ポスター発表

清水 健・藤崎憲治. 2003. オオタバコガの休眠誘導に見られる雌雄差とチョウ

目ヤガ科における雌性先熟性. 第 50 回日本生態学会大会講演要旨集: 209.

K. Fujisaki and K. Shimizu. 2003. Comparison of the diapause traits between two Japanese noctuid moths, *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). 韓日合同応用動物昆虫学会議. 釜山, 大韓民国.

清水 健・藤崎憲治. 2003. オオタバコガとタバコガの休眠性に関する個体群間比較. 第 21 回個体群生態学会シンポジウム. つくば市.

K. Shimizu and K. Fujisaki. 2004. Local adaptation and diapause traits of two noctuid moths, *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). XXII International Congress of Entomology. Brisbane, Australia.

清水 健・藤崎憲治. 2004. 亜熱帯性昆虫オオタバコガの温帯への適応と休眠特性. 第 51 回日本生態学会大会講演要旨集: 143.

Sexual differences in diapause induction of the cotton bollworm,

*Helicoverpa armigera* (Hb.) (Lepidoptera: Noctuidae)

目 次

1. Sexual differences in diapause induction of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hb.) (Lepidoptera: Noctuidae).

2. Diapause induction in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hb.) (Lepidoptera: Noctuidae) under outdoor conditions.

3. Inter-population variations and a geographical tendency in diapause induction under changing conditions in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae).

4. Comparison of cold hardiness and sugar content between diapausing and nondiapausing pupae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).

5. Pupal diapause of *Helicoverpa armigera*: sensitive stage for photoperiodic induction.

6. オオタバコガの休眠誘導に関する遺伝学的解析

MATERIALS AND METHODS

Wild rice-stalk borer larvae of *H. armigera* were collected in Kagoshima (Japan, 13°05'N, 131°36'E), Okazaki (13°08'N, 137°11'E) and Sakawa (Kumamoto, 13°24'N, 130°36'E) in late autumn of 1999, 2000 and 2001, on stem bolls, cotton bolls and cotton seed, respectively. In the laboratory, the larvae of each local population were maintained individually to prevent contamination under constant conditions (25°C, 16L:8D) with an artificial day:night cycle (16h:8h) using a light box (Jaxco, Ltd., Tokyo, Japan, Japan). For mating and oviposition, the 10 female pupae of *H. armigera* which were reared in a light box were collected and provided with cotton wool as a substrate for oviposition. They were fed with 10% sucrose solution. Embryonic eggs were removed from the