

未成熟時にラズベリーケトンを与えたウリミバエ成虫の雄におけるキュウルアへの誘引抑制

佐々木 幹了¹⁾・金田 昌士²⁾・及川 恵

横浜植物防疫所調査研究部

Suppression of cue-lure attraction in male *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) provided with raspberry ketone supplements as immature adults. Motonori Sasaki¹⁾, Masashi Kaneda²⁾ and Megumi Oikawa (Research Division, Yokohama Plant Protection Station 1-16-10, Shin-yamashita, Naka-Ku, Yokohama, 231-0801 Japan. ¹⁾Risk Analysis Division, Yokohama Plant Protection Station. ²⁾Yokohama, Kanagawa Prefecture, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* 58: 9-13 (2022).

Abstract: There is a risk of melon flies, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), re-invading, despite the species having been eradicated from Japan using the sterile insect technique (SIT). Accordingly, the SIT program continues even after eradication in Okinawa prefecture. In the SIT program, *B. cucurbitae* are typically released as immature adults, two days after emergence. Previous studies have shown that exposing some fruit flies to lure compounds as mature adults can suppress subsequent response to those lure. Males of *Bactrocera tryoni* (Froggatt) fed a raspberry ketone supplemented diet for two days when newly emerged showed lower attraction to cue-lure traps than control males. Here, we examined whether adding raspberry-ketone to the adult diet of male melon flies produced effects under laboratory conditions similar to those observed for *B. tryoni*. The present study showed that the raspberry ketone-supplemented diet had a significant impact on time to attraction to euge-lure (contained cue-lure) traps of *B. cucurbitae* males, but no significant effect on the survival of *B. cucurbitae*.

Key Words: *Bactrocera cucurbitae*, male, attraction, cue-lure, raspberry ketone

緒 言

ウリミバエ *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) は、かつて我が国の一部地域に発生していたが、不妊虫放飼法（以下、「SIT」という。）により1993年に根絶が達成された（Koyama *et al.*, 2004; Yoshizawa, 1997）。沖縄県では台湾等の発生地域からウリミバエが再侵入する危険性が存在することから、根絶後も侵入リスクの高い地域で、不妊虫の放飼が継続されるとともに、侵入を早期に発見するため、ウリミバエの雄を誘引するキュウルア（以下、「CL」という。）によるトラップ調査や寄主果実調査が県内全域で実施されている（Ohishi *et al.*, 2018）。根絶後の両調査において、ウリミバエはトラップ調査で3回、寄主果実調査で1回発見されており（Ohishi *et al.*, 2018）、発見回数はミカンコミバエ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) と比較して僅かではあるものの、定着すると再根絶までかなりの時間と労力が

必要となる。

沖縄県では、特殊病害虫防除事業によるウリミバエ侵入防止対策として、うるま市以南の沖縄本島中南部地域、宮古群島、八重山群島を対象にウリミバエの不妊虫を放飼している。不妊虫の放飼は週あたり5月から9月は6,400万頭、10月から4月は4,600万頭の規模で実施されており、沖縄本島中南部地域及び八重山群島（与那国島を除く）では成虫の航空放飼、宮古群島及び与那国島では蛹の地上放飼により行われている（沖縄県農林水産部, 2021）。再侵入に備えて、沖縄県が県全域に534個、那覇植物防疫事務所が県内の海空港等に30個の侵入警戒トラップを設置しているが、令和元年度は沖縄県のトラップに約33.4万頭、那覇植物防疫事務所のトラップには約2.7万頭の不妊虫が誘殺された。誘殺虫の回収や不妊虫と野生虫との識別作業には多大な労力が費やされている。

ウリミバエとともにかつて我が国の一部地域に発生していた

¹⁾横浜植物防疫所リスク分析部

²⁾神奈川県横浜市

ミカンコミバエは、メチルオイゲノール（以下、「ME」という。）の誘殺板を利用した雄除去法（以下、「MAT」という。）で1986年に根絶が達成された（Koyama *et al.*, 2004；Yoshizawa, 1997）。MEやCLなどに雄が強く誘引されるミバエ類の防除管理では、MATで野生虫の発生密度を低下させたのち、SITによる根絶防除が試みられている（Akter *et al.*, 2017a）。MATとSITを同時に行い、根絶防除を迅速に進めることができると理想的だが、MATで野生虫の発生密度を低下させるために設置した誘殺板やベイトステーション等には、SITで放飼した不妊虫も誘殺されるため、野生の雌と交尾できる雄の不妊虫を大幅に減少させることになり、同時併用は効率的ではないと考えられている。

このような背景から、これらのミバエ類が発生しMATやSITによる防除が試みられている地域では、SITで放飼する不妊虫の雄の誘引物質への反応性を低下させる研究が行われてきた。ミカンコミバエではME、ウリミバエではCLやラズベリーケトン（以下、「RK」という。CLほど揮発性は高くはない植物化学物質でRKの合成化学物質がCL。）に雄を暴露させることで、その後の各ルアーへの反応は低下することがこれまでの研究から知られている（Chambers *et al.*, 1972；Shelly, 1994；Shelly & Villalobos, 1995；Shelly *et al.*, 1996；Shelly, 2000；Tan *et al.*, 2002）。しかし、SITで放飼される羽化2～3日後の未成熟な不妊虫に対し、この特性を十分に引き出すための暴露条件は見出されていないため、この特性をSITで放飼する不妊虫に適用することは困難であった。

ウリミバエと同様にCLに誘引されるクインスタンドミバエ *Bactrocera tryoni* (Froggatt) では、MATとSITを用いた防除方法がオーストラリアで研究されてきたが、RKを混合した餌を羽化直後から48時間与えると、その後のCLへの反応は低下することが報告され、SITで放飼するクインスタンドミバエ不妊虫のCLへの反応を抑制できる可能性が示された（Akter *et al.*, 2017a；Khan *et al.*, 2017）。このため、ウリミバエについても羽化後にRKを混合した餌を与えて、その後の雄の日齢とCLへの反応性について調査を行い、沖縄県で継続されているSITで航空放飼される不妊虫のトラップ誘殺虫を減少させることができないか検討を行った。

材料及び方法

1. 供試虫

農林水産大臣の許可（許可番号62Y222）を得て、横浜植物防疫所調査研究部害虫担当で昭和62年から飼育している奄美大島産ウリミバエを用いた。飼育施設内に設置されたスクリーンケージ（30×30×45 cm）（以下、「ケージ」という。）で本種は飼育され、飼育施設は一定条件（温度：26±1℃，相対湿度：60±10%，光周期：明期14時間および暗期10時間，薄明薄暮期：明期の最初と最後の1時間）で維持された。

幼虫には、人工飼料として水150 ml、35%塩酸0.25 ml、p-ヒドロキシ安息香酸メチル0.1 g、ソルビン酸0.1 g、乾燥酵母（Ebios, Asahi Food & Healthcare, Japan）5 g、砂糖7.5 g、トイレットペーパー

7.5 g及び小麦ふすま37.5 gの混合物を与えた。成虫には、加水分解酵母（AY-65, Asahi Food & Healthcare, Japan）とグラニュー糖を重量比1：4の割合で混合したもの（以下、「成虫餌」という。）を与え、給水のために水寒天（寒天粉末48 g：水道水5 l）の切片を与えた。

2. 羽化後に与えた餌とその給餌方法

沖縄県が継続しているウリミバエ不妊虫の航空放飼では、羽化2日後の不妊虫が放飼されており（沖縄県農林水産部, 1994）、羽化から放飼までの間、不妊虫には段ボールに粗糖を塗布したものが餌として与えられている。本試験では、放飼される不妊虫の8割以上を占める航空放飼への適用を想定し、以下の手順で餌を作成し羽化後の成虫に与えた。

RKを混合した餌（以下、「RK混合餌」という。）は、RK 0.2 g、99.5%エタノール1 mlを乳鉢に入れ、乳棒で十分にかき混ぜて溶解させたのち、蒸留水5 mlを入れて希釈し、グラニュー糖20 gを入れて乳棒で十分に練り、ろ紙（直径90 mm）5枚に薄く塗布し室内で乾燥させて作成した。RKを混合しない餌（以下、「砂糖餌」という。）は、蒸留水5 ml、グラニュー糖20 gを乳鉢に入れて乳棒で十分に練り、ろ紙（直径90 mm）5枚に薄く塗布し室内で乾燥させて作成した。

羽化前日の夕方にケージを2個用意し、蛹約2,000個を入れたプラスチックカップ（羽化容器）と水寒天をそれぞれのケージに置き、飼育施設内に設置した。羽化が概ね終了した羽化日の午前9時にRK混合餌（ろ紙5枚）、または砂糖餌（ろ紙5枚）のいずれかをケージの床に置き（Fig. 1）、蛹の入ったプラスチックカップはケージから取り出した。羽化2日後の午前9時にRK混合餌、または砂糖餌をそれぞれのケージから取り出し、羽化後にRK混合餌を48時間与えたケージを「RK区」、砂糖餌を48時間与えたケージを「コントロール」とし、その後、両ケージの供試虫には成虫餌と水寒天を適宜与えて飼育を続けた。なお、初日に羽化する個体は少ないため、本試験では2日目に羽化した個体のみを供試虫として用いた。



Fig. 1 *Bactrocera cucurbitae* fed on a raspberry ketone-supplemented diet in a screen cage.

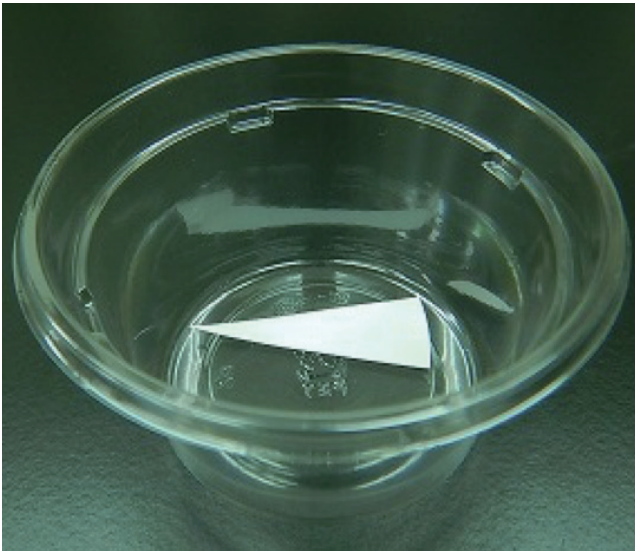


Fig. 2 Simple trap for male response of *Bactrocera cucurbitae* to euge-lure (contained cue-lure).

We used a simple trap comprising a clear cylindrical polyethylene terephthalate container, which was 40 mm high and with a 70 mm diameter opened top lid. A simple trap with a piece of filter paper dropped with 20 μ l euge-lure. euge-lure; ME 72 %, CL 8 %, insecticide 5 %, solvent 15 %

3. 雄日齢とキュウリアへの誘引の関係

コントロール及びRK区の雄の日齢とCLへの誘引の関係を明らかにするため、沖縄県でウリミバエの侵入警戒調査に使われている誘引殺虫剤を用いて、以下の試験を行った。

プラスチックカップ（開口部径7×高さ4 cm、フタなし）にろ紙を入れて、ユーゲルアD8（ME 72 %、CL 8 %、ダイアジノン（殺虫剤）5 %、有機溶媒 15 %の混合剤；サンケイ化学（株）20 μ lを滴下し、簡易トラップ（以下、「トラップ」という。）として使用した（Fig. 2）。ユーゲルアD8はトラップを使用する直前に滴下した。

誘引試験には5、7、10、13、16、19、22、25及び28日齢の雄を用いた。まず、誘引試験を実施する実験室内及びケージ内環境への供試虫の順化を目的として、室温を27℃に設定した実験室の実験台に成虫餌及び水寒天を置いたケージを設置し、コントロール、またはRK区のケージから雄20頭を取り出し、誘引試験当日の午前9時にそれぞれのケージへ放飼した。放飼から1時間後の午前10時に本ケージの床面中央にトラップを設置し、午前11時まで10分毎に誘殺数（床面での死虫を含む。）を記録した。コントロール、RK区の日齢について、それぞれ3反復ずつ、ケージを交互に並べて試験を実施した。データの解析にはR version 3.6.2を使用し、各日齢の誘殺数について疑似二項分布を仮定した一般化線形モデルを適用し、F分布を用いた逸脱度分析により処理効果を検定した。リンク関数はロジット関数とし、Holmの方法で検定の多重性を補正した。

4. 生存率の確認

RKを与えることが、生存率に及ぼす影響を明らかにするため、以下の試験を行った。

前述の「羽化後に与えた餌とその給餌方法」において、コントロールとRK区のケージから砂糖餌、またはRK混合餌を取り出した後、各ケージから成虫100ペアをそれぞれ別のケージへ放飼し、飼育施設内に設置した。本ケージには十分な量の成虫餌及び水寒天を置き、1週間おきに雌雄別に死虫数を記録し、死虫はその都度取り除いた。試験は羽化後17週目まで実施した。データの解析にはR version 3.6.2を使用し、Log-Rank検定により生存率に及ぼす影響を解析した。

結果

1. トラップ設置から1時間後の誘殺数

Fig. 3にトラップ設置から1時間後の各日齢雄のユーゲルアD8での平均誘殺率を示す。コントロールでは5日齢から誘殺が認められ、5日齢での誘殺率は18.3%であった。その後、誘殺率は急激に上昇し7日齢は69.5%、10日齢では95%に達し、それ以降は90%前後で推移した。RK区の雄で誘殺が認められた最も若い日齢は13日齢で、6.7%が誘殺された。16日齢は13.3%、19日齢では45%が誘殺され、その後、誘殺率は緩やかに上昇し、28日齢では76.7%が誘殺された。RK区では誘殺開始がコントロールより約1週間遅れ、誘殺率は13日齢がコントロールの1/13、16日齢は1/7、19日齢では1/2に低下した。トラップ設置から1時間後のRK区の誘殺数は5、7、10、13、16及び22日齢で、コントロールに対し有意に少なかった（補正後の $P < 0.05$ ）。

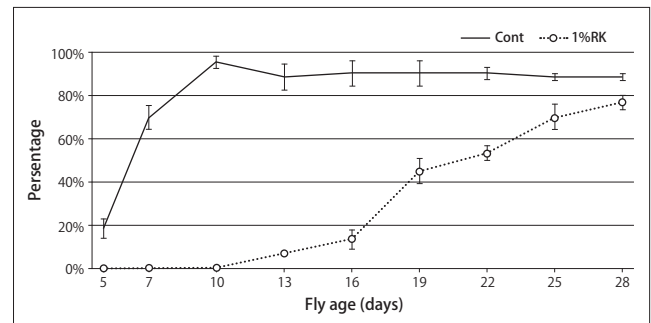


Fig. 3 The mean percentage (\pm S.E.) of male melon flies captured in the euge-lure (contained cue-lure) traps in screen cage trials an hour later.

20 males were released into regular screen cages (30 × 30 × 45 cm) separately with the diet and water at 9 AM. Simple trap with euge-lure (20 μ l) was placed in the center of regular screen cage at 10 AM. Thereafter, the number of male flies captured in the trap every ten minutes was recorded until an hour had elapsed. Trials were replicated three times for each age group of the fly-fed or unfed RK-supplemented diet.

2. 雌雄の生存率

Fig. 4に羽化後17週目までの雌雄の生存率を示す。雌雄の生存率は10週までRK区がコントロールをやや下回る傾向を示したものの、雌雄ともコントロールとRK区の生存率に有意差はなかった（ $P > 0.05$ ）。

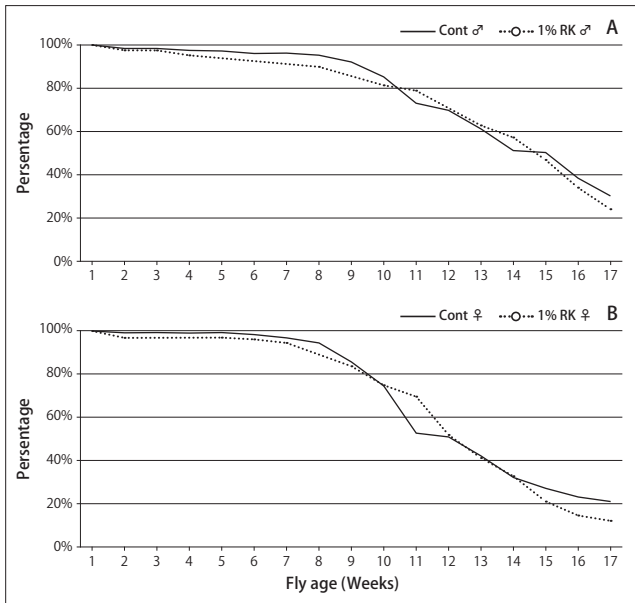


Fig.4 Survival percentage of melon flies (A : male, B : female).

100 pairs of males and females were released into separate regular screen cages (30 × 30 × 45 cm) with the same diet and water at two days after emergence. Thereafter, the number of dead individual male and female flies in each cage was recorded every week until seventeen weeks had elapsed.

考 察

クインスランドミバエに RK を混合した餌を羽化後 48 時間与え、その後の CL への反応を調査した報告は 2 本ある。Akter *et al.* (2017a) では RK を 1.25 %、または 5 % 混合した餌を与え、野外の小型ケージ (直径 3 × 高さ 2.2 m) と大型ケージ (8 × 24 × 5 m) を用いて、その後の CL への反応を比較している。RK を与えた雄では、コントロールと比較して CL への反応は 20 日以上抑制され、最も顕著な低下が認められた日齢は、小型ケージでは 20 日齢で両混合比ともに 5.5 倍、大型ケージでは 8 日齢で 1.25 % が 8 倍、5 % が 4 倍コントロールへの誘引が多かった。Khan *et al.* (2017) は不妊虫に RK を 0.5 %、1 %、または 2 % 混合した餌を与え、野外ケージ (直径 4 × 高さ 2.5 m) で、10 ~ 14 日齢の CL への反応を比較し、0.5 % と 1 % ではコントロールと比較して有意に低下したが、2 % では有意差がなかったとしている。

今回のウリミバエの調査では、羽化後に RK を 1 % 混合した餌を 48 時間与えた雄で、ユーゲルア D8 への反応はコントロールと比較して 20 日以上抑制され、最も低下が顕著だった 13 日齢では、コントロールへの誘殺が 13 倍多かった。クインスランドミバエの試験が行われた野外ケージと比較すると、ウリミバエの試験を行ったケージは、はるかに狭い空間での誘引試験であったが、RK を与えたウリミバエの CL に対する反応性は、明瞭に低下することが確認された。今回の調査結果は、沖縄県で継続されているウリミバエの SIT において、放飼前の不妊虫に RK を混合した餌を与えると、放飼後のトラップ誘殺虫を減少させることができる可能性を示唆するものであるが、沖縄県が SIT

で使用しているウリミバエの系統においても同様の効果を確認できるのか、そして効果が確認できた場合は CL への反応性低下を最大限に引き出す RK の混合比を見出す必要がある。

RK を混合した餌を羽化後に 48 時間与えたクインスランドミバエの生存率について、Akter *et al.* (2017b) は、RK を 1.25 %、2.5 %、3.75 %、5 % のいずれの混合比でクインスランドミバエに与えても、10 ~ 30 日齢における生存率への影響は認められなかったとしている。当所のウリミバエの調査においても、RK を与えたことによる生存率への影響は認められなかった。

しかし、Khan *et al.* (2017) は RK を 1 %、または 2 % の混合比で与えたクインスランドミバエ不妊虫では、死虫数がコントロールと比較して有意に減少したとしており、羽化した不妊虫に RK を与えることが、その後の生存率を高める可能性を示唆している。また、Akter *et al.* (2017b) は、羽化後に RK を与えたクインスランドミバエの雄では、いずれの混合比においても交尾率が高まるとしていることから、沖縄県が SIT で使用しているウリミバエに RK を与え、その影響を評価する際には、雄の生存率に加えて、性的競争力など虫質の評価に関わる項目についても併せて調査することが望ましい。

Fezza & Shelly (2018) は、Akter *et al.* (2017a)、Akter *et al.* (2017b)、Khan *et al.* (2017) によるクインスランドミバエを用いた報告をもとに、比較が可能な試験条件を設定し、ハワイの野外ケージでウリミバエの調査を行ったが、雄の CL への反応、生存率、性成熟までの時間や性的競争力のいずれにおいても、羽化後に RK を与えた影響は認められなかったとしている。RK の混合方法について、Akter *et al.* (2017a) はブレンダーで RK を粉砕したのち混合、Khan *et al.* (2017) は当所と同様に RK を無水エタノールに溶解させてから混合している。Fezza & Shelly (2018) の実験手順は、Akter *et al.* (2017b) に従ったとしており、RK と餌の混合にはブレンダーを用いたと考えられる。クインスランドミバエと同様な方法で RK を与えたにも関わらず、ウリミバエでは CL への反応が抑制されなかった要因として、Fezza & Shelly (2018) は両種の羽化直後の雄では、摂取した RK の代謝機能や貯蔵性が異なることを示唆している。

しかし、当所の調査ではクインスランドミバエと同様にウリミバエでも CL への反応は抑制されたことから、羽化直後の両種雄の代謝機能や貯蔵性に CL への反応を左右するほどの差はないと考えられる。RK を摂取したウリミバエやクインスランドミバエでは、RK は変換されることなく直腸腺に蓄積することが知られており (Nishida, 1991 ; Nishida *et al.*, 1993 ; Tan and Nishida, 1995)、CL への反応性が当所の調査結果と大きく異なった要因として、Fezza & Shelly (2018) の供試虫は何らかの理由で十分に RK を摂取出来なかった可能性が高いと考えられる。ウリミバエの RK 摂取に影響を及ぼす可能性がある RK の混合方法や給餌方法には十分に留意する必要がある。

ウリミバエやクインスランドミバエの性的に未成熟な雄に RK を与えることの影響について、その後の CL への反応や生殖器官の発達と性的競争力、寿命に関するネガティブな報告はこれまでのところない。本研究で行った羽化直後のウリミバエに RK を 48 時間与えて、その後の CL への反応性低下を引き出す方法は、

沖縄県で継続されている SIT における不妊虫の生産から放飼までのオペレーションを変更する必要がなく、羽化後に与える粗糖に RK を混合するだけで適用することが可能である。トラップに誘殺される不妊虫の減少は、野生虫の迅速な検出にもつながることから、現在のウリミバエの侵入防止対策を強化及び効率化する有効かつ容易な改善手段のひとつになり得ると考えられる。

謝 辞

本調査で得られたデータに関する統計解析を行っていただいた横浜植物防疫所リスク分析部管理措置担当の松井淳調査官に厚く感謝申し上げます。

引用文献

- Akter, H., S. Adnan, R. Morelli, P. Rempoulakis, P. W. Taylor (2017 a) Suppression of cue lure attraction in male Queensland fruit flies provided raspberry ketone supplements as immature adults. *PLoS One* **12** (8), e0184086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184086>.
- Akter, H., V. Mendez, R. Morelli, J. Pérez, P. W. Taylor (2017b) Raspberry ketone supplement promotes early sexual maturation in male Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Pest. Manag. Sci.* **73**: 1764–1770.
- Chambers, D., K. Ohinata, M. Fujimoto, S. Kashiwai (1972) Treating tephritids with attractants to enhance their effectiveness in sterile-release programs. *J. Econ. Entomol.* **65**: 279–282.
- Fezza, T. J., T. E. Shelly (2018) Raspberry ketone-supplemented diet has no effect on fitness parameters or lure responsiveness in male melon flies, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *J. Asia. Pac. Entomol.* **21**: 1384–1388.
- Khan, M. A. M., N. C. Manoukis, T. Osborne, I. M. Barchia, G. M. Gurr, O. M. Reynolds (2017) Semiochemical mediated enhancement of males to complement sterile insect technique in management of the tephritid pest *Bactrocera tryoni* (Froggatt). *Sci. Rep.* **7**, 1–8.
- Koyama, J., H. Kakinohana, T. Miyatake (2004) Eradication of the Melon Fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: Importance of Behavior, Ecology, Genetics, and Evolution. *Annu. Rev. Entomol.* **49**: 331–349.
- Nishida, R (1991) Ecological significance of male fruit fly attractants. In *Proceedings of the International Symposium on the Biology and Control of Fruit Flies* (K. Kawasaki, O. Iwahashi and K. Y. Kaneshiro, eds.). Univ. Ryukyus, Okinawa, Japan: 237–245pp.
- Nishida, R., O. Iwahashi, K. H. Tan (1993) Accumulation of *Dendrobium superbum* (Orchidaceae) fragrance in the rectal glands by males of the melon fly, *Dacus cucurbitae*. *J. Chem. Ecol.* **19**: 713–722.
- 沖縄県農林水産部 (1994) 沖縄県ミバエ根絶記念誌. 沖縄県農林水産部 沖縄 日本: 349pp.
- 沖縄県農林水産部 (2021) 病害虫防除技術センター特殊病害虫防除事業. 1. ウリミバエ侵入防止対策. (オンライン), 入手先 <<https://www.pref.okinawa.jp/site/norin/byogaichubojokawata.html>>, (参照 2022-02-28)
- Ohishi T., T. Matsuyama, C. Himuro, S. Ohno, Y. Sadoyama, M. Kinjo, A. Honma (2018) The eradication projects and preventive control of quarantine pests in Okinawa, Japan. In *Proceedings of the 2018 International Symposium on Proactive Technologies for Enhancement of Integrated Pest Management of Key Crops* (Shih, H. T., C. J. Chang eds.). Taiwan Agricultural Research Institute Council of Agriculture, Executive Yuan. Taichung Taiwan: 31–48pp.
- Shelly, T. E (1994) Consumption of Methyl Eugenol by male *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae): Low Incidence of Repeat Feeding. *Fla. Entomol.* **77**(2): 201–208.
- Shelly, T. E. (2000) Effects of raspberry ketone on the mating success of male melon flies (Diptera: Tephritidae). *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* **34**: 163–167.
- Shelly, T. E., E. M. Villalobos (1995) Cue lure and the mating behavior of male melon flies (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* **78**: 473–482.
- Shelly, T. E., S. Resilva, M. Reyes, H. Bignayan (1996) Methyl eugenol and mating competitiveness of irradiated male *Bactrocera philippinensis* (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* **79**: 481–488.
- Tan, K. H. and R. Nishida (1995) Incorporation of raspberry ketone in the rectal glands of males of the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* Froggatt (Diptera: Tephritidae). *Appl. Entomol. Zool.* **30**: 494–497.
- Tan, K. H., R. Nishida, Y. C. Toong (2002) Floral synomone of a wild orchid, *Bulbophyllum cheiri*, lures *Bactrocera* fruit flies for pollination. *J. Chem. Ecol.* **28**: 1161–1172.
- Yoshizawa, O (1997) Successful Eradication Programs on Fruit Flies in Japan. *Res. Bull. Prot. Prot. Japan* **33** (Suppl.): 1–10.