

## エタノールによる卵表面処理がイモゾウムシの 孵化後の生存・発育に及ぼす影響

大野 豪・佐々木智基・浦崎貴美子・小濱 継雄  
(沖縄県ミバエ対策事業所)

**The effect of egg-surface treatment with ethanol on post-hatching survival and development of the West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae).** Suguru Ohno, Tomonori Sasaki, Kimiko Urasaki and Tsuguo Kohama (Fruit Fly Eradication Project Office, Okinawa Prefectural Government; Naha, Okinawa 902-0072, Japan)

A recent study showed that when eggs of the West Indian sweetpotato weevil (*Euscepes postfasciatus*) were submerged for five minutes in 70% ethanol, bacterial contamination was reduced in the larval artificial diet without decreasing hatchability. As an alternative to the ordinary egg-surface sterilization method (5% formaldehyde 20 min submersion) in the artificial rearing of *E. postfasciatus*, we examined the utility of ethanol treatment of the weevil eggs in terms of post-hatching survival and development. We used survival rate (from egg hatching to adult eclosion), adult sex ratio, development time (from egg to adult), and body size represented by left elytra length as parameters for the survival and development of *E. postfasciatus*. Parameters measured in the present study did not vary significantly between the 70% ethanol-5 min and the 5% formaldehyde-20 min treatments. We conclude that ethanol can be used as an alternative sterilizing agent to formaldehyde for *E. postfasciatus* eggs in the artificial rearing of the species.

**Key words :** artificial rearing, egg-surface sterilization, ethanol, *Euscepes postfasciatus*, formaldehyde

### 緒 言

沖縄県では、特殊病害虫に指定されているイモゾウムシ *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) の不妊虫放飼法による根絶防除のため、人工飼料を用いた本種の大量増殖法の開発が進められている(山岸・下地, 2000)。一般に、昆虫類の人工飼育においては、バクテリアやカビの発生による飼料の汚染を防ぐための方法のひとつとして、ホルマリン等を用いた卵の表面殺菌が行われる(湯島ら, 1991; Sikorowski and Lawrence, 1994)。イモゾウムシの人工飼育において、表面殺菌が施されていない卵を人工飼料に接種した場合、接種後数日以内に人工飼料表面にバクテリアの発生が認められる(下地, 2004)。一方、卵を5%ホルマリンに20分間浸漬したのち接種を行うと、孵化率を低下させることなく飼料のバクテリア発生を抑制し、飼育虫の生存率を有意に上昇させることができる(下地, 2004)。

昆虫類の卵の表面殺菌において、卵がホルマリン等の殺菌液になじみにくい場合には、70%エタノール浸漬による前処理が行われることがある(湯島ら, 1991)。イモゾウムシの卵は水になじみやすいため前処理は必要とされないが、下地(2004)は、エタノールが本種卵の殺菌液としても使用可能であることを示唆した。彼は、30秒から5分間70%エタノールに浸漬した卵を人工飼料に接種して7日間観察を行い、孵化率の低下および飼料表面におけるバクテリア発生は認められないことを報告した。エタノールはホルマリンと比べて人体に対する毒性が低く、取り扱いが容易であるため、イモゾウムシの人工飼育にエタノールによる卵表面殺菌法を導入することのメリットは大きいと考えられる。しかし、この殺菌法が本種の飼育に導入可能かどうかを決定するためには、殺菌効果や孵化への影響だけでなく、孵化後の生存・発育に対する影響の有無を調べる必要がある。そこで本研究では、イモゾウムシのエタノール浸漬卵とホルマリン

浸漬卵をそれぞれ人工飼料に接種して羽化まで飼育し、孵化後の生存率、性比、発育期間および成虫の体サイズを比較した。

本文に入るに先立ち、イモゾウムシの採卵作業に協力していただいた琉球産経(株)の皆様には厚くお礼申し上げます。

## 材料および方法

### 1. 供試虫および採卵法

1994年に沖縄県読谷村で採集され、沖縄県ミバエ対策事業所において、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明期14時間：暗期10時間の条件下でサツマイモ塊根を用いて累代飼育され(年当たり5世代)、2003年2月から4月にかけて羽化した成虫を採卵に用いた。同様の飼育条件下では本種の産卵前期間は羽化後9-13日であることがわかっているため(Kohama and Shimoji, 1998)、羽化後サツマイモ塊根および成虫用人工飼料(Shimoji and Kohama, 1996b)の幼虫用人工飼料に含まれるサツマイモ粉末を、本種の寄主のひとつであるグンバイヒルガオ *Ipomoea pes-caprae* (L.) Sweet の葉粉末に置きかえたもの；山岸、未発表)を与えて2週間以上飼養された個体から採卵した。飼養中に産下された卵を除去し、同一日に産下された卵だけを得るために、採卵用成虫を一度水洗いし、新たな成虫用人工飼料を与えて一晩だけ摂食させた。翌朝、飼料の表面および周辺に産み落とされた卵を、糞や飼料の小片等の塵とともに水道水で洗い流した。卵を他の塵から分離するため、卵と塵の混合物に14%食塩水を加えて攪拌したのち静置し、上から蒸留水を静かに注ぎ、蒸留水と真水の境界に浮遊する卵をピペットで吸い取った。卵は蒸留水でよくすすいだのち、黒色ナイロンゴースで水切りし、ろ紙を敷いたプラスチックシャーレ内にゴースごと置いた。卵は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度60-80%、明期14時間：暗期10時間に保たれた恒温器中に使用まで保管した。

### 2. 卵の表面殺菌処理、人工飼料への接種および飼育

$25^\circ\text{C}$ では、イモゾウムシ卵の孵化は産卵日より7日後に始まることわかっている(Shimoji and Kohama, 1996a)。そこで、卵の表面殺菌および飼料への接種は採卵後6日目に行った。約10,000卵を2等分し、一方は室温( $23-25^\circ\text{C}$ )で保管した70%エタノール100 mlに5分間、他方は同様の5%ホルマリン100 mlに20分間浸漬した。浸漬中はおよそ1分おきに容器を軽く揺らして攪拌した。浸漬後の卵は、滅菌水で2度すすぎ、あらかじめエタノールで消毒し乾燥させたろ紙上に並べた。これをクリーンベンチ内に静置し、自然乾燥させた。幼虫

飼育のため、Shimoji and Kohama (1996b)の人工飼料が23 g入った直径9 cmのガラスシャーレを各処理区に12個ずつ用意した。飼料表面に直接卵を接種するより、溝をつけてその中に卵を接種したほうが生存率が高まることわかっているため(Shimoji and Yamagishi, 2004)、アルコールランプで加熱殺菌したカミノリを用い、シャーレごとに飼料表面に4本のおおむね平行な溝をつけた。それぞれの溝に、ランダムに選んだ10卵(シャーレ当たり40卵、各処理区につき合計480卵)を、エタノールで消毒し乾燥させた極細筆を用いてクリーンベンチ内で接種した。これらのシャーレの取り扱いと観察方法は、下地(2004)に準じ以下のおおむねとした。シャーレは周囲をセロハンテープで目張りし、上記の恒温器中に保管した。飼育終了まで週に2、3回、飼料表面のバクテリアやカビの発生の有無を肉眼で確認した後、恒温器中のシャーレの配置をランダムに入れ替えた。

### 3. 生存・発育の指標の測定

卵接種から5日後(採卵日から11日後)に、飼料表面を双眼実体顕微鏡の下で観察して未孵化卵を数え、孵化率を算出した。卵殻から脱出途中で死亡している個体は未孵化卵として計数した。成長したイモゾウムシ幼虫の多くはシャーレの底面に蛹室をつくるため、シャーレの外部から羽化個体を確認することができる(下地, 2004)。そこで、蛹室が確認され始めた日から毎日シャーレ底面を観察し、観察可能なすべての個体の羽化日を記録した。産卵から羽化までの日数を発育期間とした。最初の羽化が確認されてからおおむね1週間おきに蛹室内の成虫を取り出し、個別に保存した。観察可能な個体の羽化が終了した日の翌日以降に飼料を分解して残りの成虫を取り出し、正常に羽化した個体を計数し、孵化から羽化までの生存率を算出した。性による生存率の違いも考慮するため、破損あるいは紛失した個体を除くすべての羽化成虫の性を Kohama and Sugiyama (2000)の方法によって判別し、性比(雄の比率)を求めた。各シャーレから雌雄それぞれ2~5頭をランダムに選び、これまでに本種の体サイズの指標として用いられてきた左上翅長(Shimoji et al., 1999; 下地, 2004)を、双眼実体顕微鏡に設置された接眼マイクロメータを用いて計測した。

### 4. 統計解析

孵化率、生存率および性比の処理区間の比較には Fisher の正確確率検定を用いた。発育期間と左上翅長の比較では、性による差異も同時に考慮するため、性が既知の個体だけを分析対象とし、二元配置分散分析を行った。変数の分布を正規分布に近づけ、グループ間の

等分散性を満たすため、分析に先立って発育期間と左上翅長はともに対数変換した (Sokal and Rohlf, 1995)。すべての統計解析は JMP Ver. 5.0.1a (SAS Institute, Cary, N.C.) を用いて行った。

### 結果および考察

試験期間中、全てのシャーレにおいて、飼料表面にバクテリアやカビの発生は観察されなかった。測定したイモゾウムシの生存・発育の指標を Table 1 に示す。エタノール処理による孵化率の有意な低下はみられず、下地 (2004) の結果が再確認された。生存率と性比もまた、エタノール処理区とホルマリン処理区の間で有意に異ならなかった。発育期間に対する二元配置分散分析では、

処理、性および交互作用のいずれの効果も有意ではなかった (Table 2)。左上翅長に対する同様の分析では、性の効果だけが有意であり ( $P < 0.01$ ; Table 2)、雌のほうが大きいことがわかった (Table 1)。

以上の結果は、まず、少なくとも上記の実験条件では、イモゾウムシの卵表面の70%エタノール5分間処理が5%ホルマリン20分間処理と同等の殺菌効果をもつこと、そしてエタノール処理がホルマリン処理に比べ、少なくともイモゾウムシ雌雄の生存率、発育期間および体サイズには悪影響を及ぼさないことを示す。殺菌効果が同等で、イモゾウムシの孵化への悪影響および生存・発育への悪影響がいずれも検出されなかったことを考慮すると、エタノールはホルマリンに代わるイモゾウムシ卵の殺菌

**Table 1.** Comparisons of several parameters reflecting the survival and development of *E. postfasciatus* when 6-day-old eggs were treated for five minutes with 70% ethanol or twenty minutes with 5% formaldehyde<sup>a)</sup>

Parameter	Egg-surface treatment				Difference <sup>d)</sup>
	70% ethanol	(n)	5 % formaldehyde	(n)	
Hatchability (%)	88.3	(480)	88.3	(480)	n.s.
Survival rate (%) <sup>b)</sup>	59.2	(424)	60.4	(424)	n.s.
Adult sex ratio (%, proportion of males)	47.6	(248)	43.9	(255)	n.s.
Development period <sup>c)</sup>					
Male	43.8 ± 1.1 [35 - 61]	(48)	44.3 ± 1.0 [34 - 59]	(40)	See Table 2
Female	44.2 ± 0.8 [35 - 69]	(60)	43.6 ± 0.8 [34 - 66]	(65)	ibid.
Left elytra length <sup>d)</sup>					
Male	2.25 ± 0.01 [2.04 - 2.41]	(37)	2.27 ± 0.01 [2.13 - 2.43]	(33)	See Table 2
Female	2.30 ± 0.01 [2.15 - 2.49]	(43)	2.30 ± 0.01 [2.13 - 2.52]	(51)	ibid.

a) Insects were reared with Shimoji and Kohama's (1996b) artificial diet. b) Ratio of the number of adults that emerged relative to the number of hatched eggs. c) Days from oviposition to adult eclosion (mean ± S.E. [range]). d) Mean ± S.E. [range], in mm. e) n.s.; not significantly different between the two treatments (Fisher's exact probability test,  $P > 0.4$ ).

**Table 2.** ANOVA tables for the development period and the left elytra length of *E. postfasciatus* after egg surface treatment of the eggs with different sterilizing agents<sup>a)</sup>

Variable <sup>b)</sup>	Source	SS	df	F-value	P
Development period	Treatment	0.00001	1	0.002	0.961
	Sex	0.00003	1	0.008	0.929
	Treatment × Sex	0.00230	1	0.584	0.446
	Error	0.82185	209		
Left elytra length	Treatment	0.00025	1	1.109	0.294
	Sex	0.00229	1	10.064	0.002
	Treatment × Sex	0.00013	1	0.586	0.445
	Error	0.03646	160		

a) Eggs were steeped in 70% ethanol for 5 min or in 5 % formaldehyde for 20 min before being placed on the artificial diet. b) Both variables were log<sub>10</sub>-transformed prior to the statistical analyses.

液として、本種の人工飼育に十分に使用可能であると考えられる。

付加的な知見として、本研究では雌のほうが体サイズ(上翅長)において有意に大きいことが示された。Yasuda and Naito (1991) は、本研究で用いた材料と同一地域から1990年に採集したイモゾウムシを用いて6つの形態測定形質(上翅長は含まない)を雌雄間で比較し、全ての形質に統計的な有意差はみられないことを報告した。これらの結果の一見した不一致の理由は現時点では明らかではない。今後、同一条件下で飼育された野生虫と累代飼育虫の間で、同一形質の性差の比較を行う必要がある。

### 摘 要

イモゾウムシの卵を70%エタノールに5分間浸漬したのち人工飼料へ接種すると、孵化率を低下させることなく、飼料のバクテリアによる汚染を減少させられることが最近報告された。この方法が、従来の卵表面殺菌法(5%ホルマリンに20分間浸漬)に代わる手段として、本種の人工飼育に導入可能であるかを検討するため、孵化後の生存・発育に対する影響を比較した。生存・発育の指標として生存率、性比、発育期間および体サイズを測定したところ、すべての形質で、70%エタノール5分間浸漬処理と5%ホルマリン20分間浸漬処理の間に有意な差はなかった。我々は、エタノールはホルマリンに代わるイモゾウムシ卵の表面殺菌液として本種の人工飼育に使用可能であると結論した。

### 引 用 文 献

- Kohama, T. and Y. Shimoji (1998) Reproductive maturity of the female West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). Appl. Entomol. Zool. 33: 1-4.
- Kohama, T. and M. Sugiyama (2000) External characteristics for sexing the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). Entomol. Sci. 3: 43-45.
- 下地幸夫 (2004) サツマイモ害虫イモゾウムシの人工飼育法. 沖縄県特殊病害虫特別防除事業特別研究報告第3号. 沖縄県ミバエ対策事業所(那覇), pp. 73.
- Shimoji, Y. and T. Kohama (1996a) A simple method for collecting eggs of the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). Appl. Entomol. Zool. 31: 37-42.
- Shimoji, Y. and T. Kohama (1996b) An artificial larval diet for the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). Appl. Entomol. Zool. 31: 152-154.
- Shimoji, Y., M. Sugiyama and T. Kohama (1999) Marking of the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae) with Calco Oil Red dye I. Effect of dye added to the artificial larval diet on development of the weevils, yield of adults and long lasting internal coloration in the adult. Appl. Entomol. Zool. 34: 231-234.
- Shimoji, Y. and M. Yamagishi (2004) Reducing rearing cost and increasing survival rate of West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae) on artificial larval diet. Appl. Entomol. Zool. 39: 41-47.
- Sikorowski, P. P. and A. M. Lawrence (1994) Microbial contamination and insect rearing. Am. Entomol. 40: 240-253.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf (1995) Biometry. 3rd ed. W. H. Freeman and Company (N.Y.), pp. 887.
- 山岸正明・下地幸夫 (2000) 不妊虫放飼法によるゾウムシ類の根絶 (7) イモゾウムシの大量増殖・不妊化・マーキング・輸送・放飼. 植物防疫54: 476-478.
- Yasuda, K. and T. Naito (1991) External characters for discriminating sex in the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* Fairmaire (Coleoptera: Curculionidae). Appl. Entomol. Zool. 26: 422-424.
- 湯島 健・釜野静也・玉木佳男(編) (1991) 昆虫の飼育法. 日本植物防疫協会(東京), pp. 392.

(2004年3月3日受領; 5月26日受理)