

# タマネギバエ *Delia antiqua* の羽化自記記録装置の開発

新井哲夫<sup>1)</sup>、盛谷 亨<sup>2)</sup>、渡邊 優<sup>3)</sup>

## Development in automatic recording apparatus of adult eclosion of onion fly, *Delia antiqua*

Tetsuo ARAI, Tohru MORIYA, Yutaka WATANABE

### 1 タマネギバエ *Delia antiqua* の羽化リズム研究に関する経過

実験材料のタマネギバエは、北海道のタマネギ畑で採集され、北海道立中央農業試験場で累代飼育されていた系統を、1975年および1981年に譲り受けたものである。それ以後タマネギバエは、弘前大学農学部応用昆虫学研究室、1987年から芦屋大学生命工学研究室、2003年以降現在に至るまで、山口県立大学環境生態学研究室及び芦屋大学で累代飼育されている。

著者の一人である新井は、タマネギバエの休眠や羽化時刻の決定に対する環境の影響に関する研究を1975年に始めた。1991年までの実験における羽化数は2時間ごとに調査した。羽化数調査の一部は、当時弘前大学の学生であった千田勤子（1980～1981年）・渡康彦（1982～1983年）（現在芦屋大学教授）の両君、及び当時芦屋大学の学生であった北井徹・小崎幸成の両君（1990～1991年）が手伝ってくれた。それらの研究結果の一部は、「タマネギバエの羽化時刻」（新井哲夫・渡康彦）として応用動物昆虫学会第26回大会（1982）において、また「Adult eclosion rhythm in the onion fly, *Hylemia antiqua*」（Arai・Watari・Kitai・Kosaki）として第4回生物リズム札幌シンポジウム（1991）において発表した。新井は、1975年から現在まで、タマネギバエの羽化時刻に対する光周期・温度周期の影響や光・温度の信号の影響及び休眠に対する光周期の影響に関する実験を進めてきた。現在は、光周期と温度周期の組み合わせならびに光と温度の単一信号を組み合わせた条件が羽化時刻にどのように影響するか、また蛹休眠に対する光周期や温度の影響について実験を継続している。芦屋大学在任中の2003年まで、タマネギバエの羽化リズムに関して、渡康彦（当時芦屋大学講師・助教授）と共同で研究を進めた。また、

タマネギバエの成虫の活動リズムについても共同で研究し（Watari & Arai: 1997, 1998, 1999）、Watari（2000）は、タマネギバエの成虫の活動リズムに関して学位論文をまとめ、「Entrainment of circadian locomotor activity rhythm in the onion fly, *Delia antiqua*」として岩手大学連合大学院から博士（農学）の学位を得ている。

### 2 羽化個体数の計測方法の開発

羽化数の調査方法は、1991年を境にして異なる。1975～1991年の羽化個体数は、全て肉眼による計測であった。透明なチューブ（内径の直径 3.5 mm・長さ25 mm）にそれぞれ蛹を1個入れ、羽化した成虫が脱出しないように、両端を脱脂綿で栓をし、それらをシャーレに入れてそれぞれの条件下に保ち、2時間ごとに羽化した成虫の入ったチューブを取り出して、羽化数を計測した。暗期中の羽化数調査は、非常に弱い赤色光を用いた。1回の調査に要する時間は、1～5秒であった。

1991年以降の羽化数の計測は、赤外線センサーを用いた自記記録装置で記録した。芦屋大学で開発した1号装置における赤外線センサーは、「竹中電気」の製品を使用し、現在も引き続き使われており、データは直接パーソナルコンピュータに入力されるようになっている（図1-A）。山口県立大学生態学研究室で使用している2号装置では、恒温器内にデータ記録計測装置を設置し、実験終了後にデータ記録計測装置とパーソナルコンピュータを接続して解析するシステムを採用している（図1-B）。

1号装置におけるパーソナルコンピュータシステム（NEC:PC98）で構成される計測・記録・解析に関わるソフトウェアは、清水徹博士によって開発され、現在も継続して改良されており、彼の協力なくしてタマネギバエの活動や羽化の時刻に関する研究

1) 山口県立大学生活科学部 教授

2) 芦屋大学教育学部 助教授

3) 芦屋大学教育学部 教授

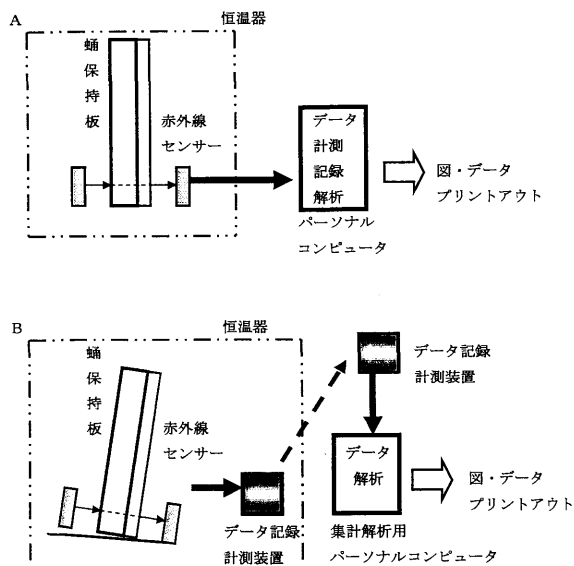


図1 羽化数自記録装置  
A: 1号装置 B: 2号装置

の進展はありえず、この場を借りてお礼申し上げる。また彼と緊密に連絡を取り合ったのは、渡康彦である。その後1号装置に改良が加えられ、さまざまな実験に使用されている(齋藤, 2005; 渡ら, 2005)。山口県立大学で使用している2号装置のデータ記録計測装置は、著者の一人である盛谷によって主に開発されたもので、詳しくは後述する。

羽化個体数の計測を赤外線センサーで記録するにあたり、赤外線センサー通過時の検知をどのようにするかが問題であった。最初の装置は、羽化した成虫が壁面を伝って上昇する性質を利用し、赤外線センサーを横切る成虫を直接計測するものであった。しかし羽化した全ての成虫がセンサーを横切るとは限らず、またセンサーを通過した成虫の一部が壁面を降下し、再びセンサーを横切ることがあったため、羽化数を正確に記録できないことがわかった。そこでSaunders(1976)の羽化記録装置を参考にし、落下した玉をセンサーによって検知させる方法にした。Saundersは、羽化成虫の脱出を防ぐために布を用いたが、著者の一人である新井は、大小2つの玉の使用を考案・試作し、1990年に実用化した(図2)。それ以後この方法を用いた装置は、両大学において使用されており、Watari(2002a)が示したものが1号装置である。羽化した成虫が直接押す大きい玉を奥にすえて成虫の脱出防御用とし、大きい玉の前にやや小さい玉を置き、その小玉が落下して赤外線センサーを横切ることによって計測される構造にした。大きい玉の落下を防ぐため、小玉の落下口に止め板(ストッパー)を装着した。この止め板によって大きい玉の落下を防ぐことができ、かつ羽化成虫は蛹保持装置内に残され、小さい玉のみを落下させ

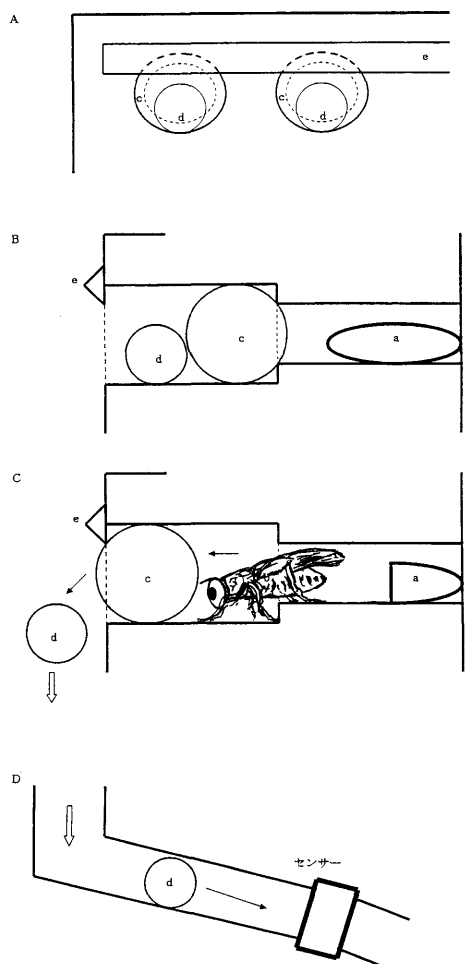


図2 蛹保持板と計測用大玉・小玉の配置

- A: 正面図
- B~D: 側面図
- B: 蛹(a)をセットした状態。
- C: 蛹(a)から脱出した成虫(b)が大玉(c)を押し、小玉(d)を落下させ、大玉ストッパー(e)で止まり、成虫の脱出を防いだ状態。
- D: 落下した小玉(d)がセンサーを通過して計測される。

ることができる。蛹は、小玉の落ちる反対側から玉の方向に向かって頭部を前にして挿入してセットし、蛹挿入口をアクリル板で密閉することにより成虫の脱出を防いだ。

蛹を保つ保持板として既製品を最初用いたが、その形状が正方形や隙間のある構造のため、隙間から成虫が脱出する場合があります、データが不正確になる可能性が大きく、この点を改良しなければならなかった。そこで、透明のアクリル板に円形の穴を開け、成虫の脱出を完全に防ぐように改良した(図2)。使用する材料の選択及び製作技術に関して、1号装置・2号装置ともに本論文の共著者である盛谷・渡邊の専門的知識及び技術によるところが大きい。このようにして製作された試作装置は、羽化数を正確に計測したため、この装置によって実験を進めることにした。1990年に完成した1号装置の実際の組み

立て作業は、主に渡が行った。この装置の開発によって、以後の羽化数は正確に計測されるようになった。しかし1号装置は、蛹保持板が垂直に保たれていたため、自記記録装置にセットするときのほんの少しの振動や不注意によって小玉がころがり落ちることがあった。山口県立大学環境生態学研究室において使用している2号装置では、蛹保持板を少し傾斜させ、小玉の落下を防ぐように改良されている。また1号装置で使用している小玉のビーズ球が不完全な球形であるため、センサーに到達する前に途中で止まる場合があった。そこで2号装置では完全な球形の小玉を使用し、また小玉が転がってセンサーを通過する際のアクリル板の傾斜角度を工夫することによって途中で止まることがなくなり、正確に計測されるようになった。以上のように、タマネギバエの羽化数自記記録装置の開発は、1号装置においては、新井・清水・盛谷・渡邊・渡の5名による共同研究の結果であり、2号装置は、新井・盛谷・渡邊の3名によるものである。なお2号装置では、タマネギバエのほか、ヨトウガ *Barathra brassicae* やアメリカシロヒトリ *Hyphantria cunea* の羽化数も記録できるように改良されている。

### 3 データ記録計測装置の開発

実験を開始した1975年から1991年まで、羽化数は肉眼で計測された。1991年以降、赤外線センサーを用いた装置を開発することによって、年間を通していろいろな処理の実験を連続的に実施することが可能となり、実験及びその記録と解析は飛躍的に容易になった。ここでは、山口県立大学環境生態学研究室で使用中の2号装置におけるデータ記録計測装置について論じる。

本装置は、ワンチップマイクロコンピュータモジュール（秋月電子通商）を利用したデータ記録計測装置であり、一定時間ごとに赤外線センサーを通過する直径約3mmの完全な球形の球を計数・記録する。

本装置の機能は、①内蔵時計の時刻や日付、計測間隔を設定する「タイマー設定」、②設定された時間間隔で赤外線センサーからの情報を計数・記録する「計測」、③計測したデータを集計分析用のパーソナルコンピュータに転送（シリアル通信）する「データ出力」の3つから成り立っている。

電源を入れるとシステムが起動し、オープニングメッセージを表示した後、現在時刻と計測間隔の設定値が表示される（図3）。スーパーキャパシタによるバックアップ電源により内蔵時計は常に動作しているため、その都度時刻設定の必要はない。次に操作キーを押すと、上記の3機能を選択するメニュー画面が表示されるので、必要に応じて①タイマー設

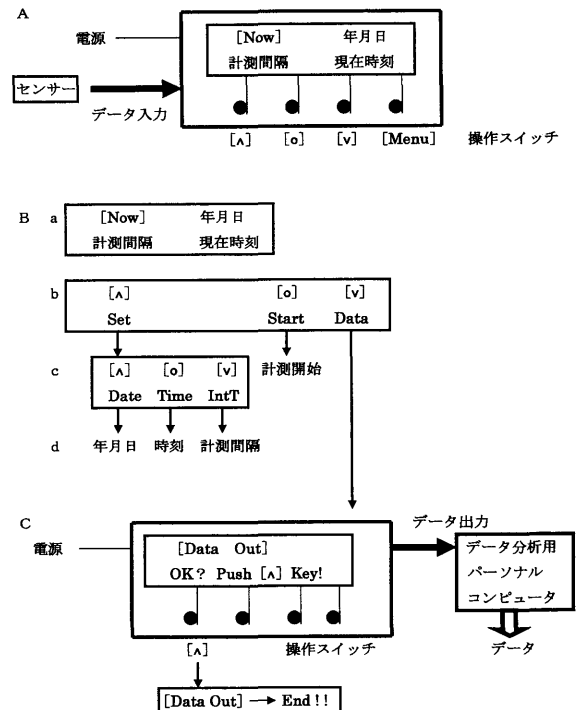


図3 データ記録計測装置の動作状態

- A: センサーからのデータ入力。  
 B: a; 表示画面。  
 b; 操作スイッチ [Menu] による表示画面。  
     [A] 年月日・現在時刻・計測間隔の入力。  
     [o] 計測開始。  
     [v] データ出力。  
 c; 操作スイッチ [A] による表示画面。  
 d; 年月日・現在時刻・計測間隔をそれぞれ入力。  
 C: 実験終了後、データ記録計測装置をデータ分析用パーソナルコンピュータに接続。操作スイッチ [Data] [v] → [Data Out] [A] により、データ記録計測装置からデータ分析用パーソナルコンピュータに出力。

定をした後、②計測を開始する。計測時において、表示画面には計測開始日、現在時刻、計測回数、現在の計測数など、必要最低限の情報が常に表示されている。また計測の終了は、基本的に手動で行うが、(a) 計数の合計が100になった場合（羽化全数の終了）、(b) 記録するメモリーの容量がいっぱいになった場合（約65000データ）には、計測を自動的に停止し、赤色のLEDを点滅させて計測の終了を知らせる。このように計測集積されたデータは、装置内の不揮発性メモリーに記録されており、電源を切っても失われることはない。実験が終了した後、改めて③集計分析用パーソナルコンピュータと本装置をシリアルケーブルで接続し、データを転送することができる。

以上のようにしてデータ記録計測装置から集計分析用パーソナルコンピュータに転送されて得られたデータから、タマネギバエ（ヨトウガ、アメリカシロヒトリ等）の羽化時刻に対する環境周期の影響や光・温度の信号の影響についての解析を進めるわけ

である。

#### 4 羽化実験結果の比較

羽化数の計測方法が、1991年を境にして異なっている。そこで同じ処理の実験結果について、1970年代と1991年以後の結果を見てみよう。1975年～1991年の実験は、肉眼による調査で、1991年以後は赤外線センサーを使用した自記録装置による結果である。不休眠蛹を用いた肉眼での観察は2時間間隔であったため、自記録装置における場合も不休眠蛹で2時間間隔の結果を示した(図4-A)。また自記録装置では、計測間隔を1分から1時間～2時間またはそれ以上と自由に設定することができ、ここでは同じデータを1時間間隔と2時間間隔の両方で示した(図4-B)。またコンピュータからプリントアウトした生データもそのまま示した(図4-C)。1987年～2003年の芦屋大学在任中における新井単独又は渡との共同でなされた研究は、いろいろな温度レベル(30・25・20・15℃)における光周期条件下での羽化時刻、温度周期条件下での羽化時刻、周期条件から恒常条件への移行による羽化リズムの持続性などであるが、それらと基本的に同様のデザインによる実験結果の一部は、Watari (2002, a,b)によって発表されている。

肉眼での観察と自記録装置の結果は、12L:12Dの光周期の下で、肉眼の結果のほうが若干遅くなる傾向が見られた(図4-A)。明期が12時間より短い光周期において、肉眼による結果と自記録装置による結果が異なったことから、1990年以後共同で研究を進めた渡と検討し、早急な発表を控え、実験を重ねることにした。実験材料のタマネギバエは30年以上実験室内で累代飼育されているため、作為的でないにしても人為的な選択が休眠性に対して影響したのではないかと考えられる結果が得られていることから、羽化時刻に対しても何らかの影響を与えている可能性が考えられ、現在この点についての解析を進めている(新井、未発表)。

休眠蛹と不休眠蛹の羽化時刻は若干異なっており、休眠蛹の羽化時刻が不休眠蛹よりやや早くなる傾向が見られた(図4-B、C)。ここには示さないが、いろいろな光周期条件下においてもその傾向があり、1983年の時点およびその後の実験においてその事実は確認されていた(新井・渡、未発表)。同様の実験結果の一部は、Watari (2002a)によって発表されている。

次に温度周期(25℃:15℃、各12時間)と光周期(12L:12D)をいろいろな位相で組み合わせて羽化のパターンを調べた結果の一部を示す(図4-D)。温度と光の周期を組み合わせる実験は、ミカンコミ

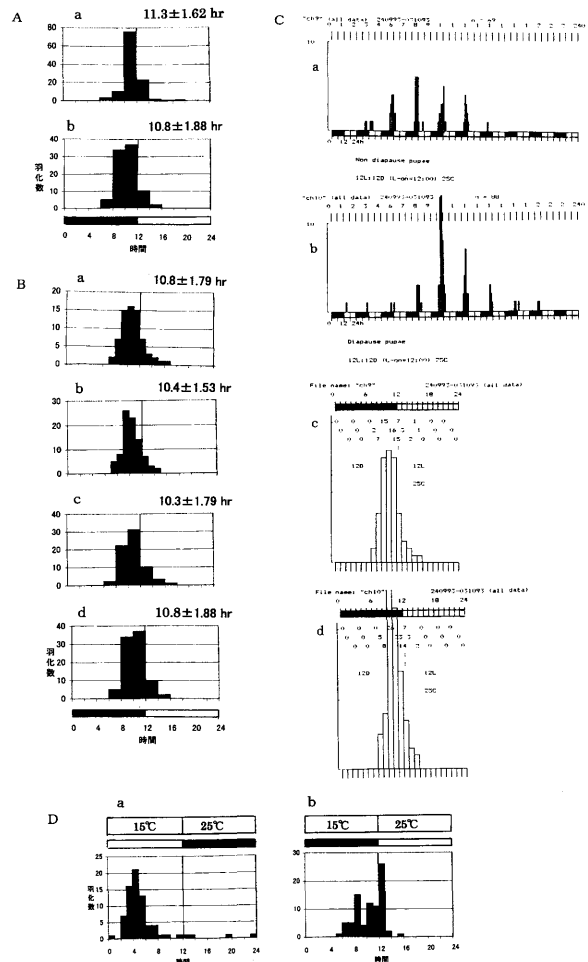


図4 羽化パターンの実例

- A: 25℃、12L:12Dにおける不休眠蛹を用いた2時間間隔の羽化パターン。  
 a; 肉眼での結果(1980年実験)。  
 b; 自記録装置での結果(1993年実験:1号装置)。  
 B: 25℃、12L:12Dにおける自記録装置による1時間・2時間間隔の羽化パターン(1993年実験、新井・渡による未発表データ:1号装置)。  
 a・b; 1時間間隔。  
 c・d; 2時間間隔。  
 a・c; 不休眠蛹。  
 b・d; 休眠蛹。  
 C: 25℃、12L:12Dにおける自記録装置で得られたコンピュータからの1時間間隔での生データ(1993年実験、新井・渡による未発表データ:1号装置)。  
 a・b; 全実験期間を通した羽化パターン。  
 c・d; 24時間にまとめた羽化パターン。  
 a・c; 不休眠蛹。  
 b・d; 休眠蛹。  
 D: 温度周期(25℃:15℃、各12時間)と光周期(12L:12D)を組み合わせた条件下における羽化パターン(2号装置)。  
 a; 低温相と明期が一致する条件。  
 b; 高温相と明期が一致する条件。

バエ *Dacus dorsalis* の羽化(新井、1976)やヒメクサキリ *Homorocoryphus jezoensis* (Arai, 1998) のふ化において報告されており、ヒメギス *Eobiana engelhardti subtropica* のふ化(新井、未発表)

やヨトウガの羽化（新井、未発表）でも研究されている（新井、1995）。タマネギバエにおいて、両方の周期を組み合わせた場合、そのどちらか一つの周期に依存して羽化するのではなく、両方の周期が羽化時刻の決定に関与していることがわかる。今後この点に関して解析を進めたいと考えている。

なお、図4-A-aは肉眼、図4-A-b、B、Cのデータは1号装置によって計測されたもので、新井・渡による共同研究で得られた未発表データからの引用であり、図4-Dのデータは2号装置によって計測された結果である。

## 5 おわりに

タマネギバエの羽化に関する研究は、1975年に始まった。1991年以前の羽化数は肉眼で調査したため、そのうちの3年間は、4名の学生の助力を得た。1991年以降は、自記記録装置の開発によって1年を通してさまざまな実験ができるようになった。自記記録装置の開発において、蛹を保持する装置の開発とソフトウェアを含めた赤外線センサー感知システムの開発は、非常に重要であり、その開発には多くの時間が費やされた。新井による2つの玉を使った装置の開発とともに、共著者による資材選択の知識と組み立て技術なくして装置の開発は実現しなかったであろう。また小玉の感知・計測・解析システムの開発には、共著者はもちろんであるが、清水徹博士の多大な協力があってこそ完成したものである。共同研究は、それに携わる研究者それぞれの知識と知恵の集積によって成しうるものであり、それなくして多くの成果は期待できない。羽化の自記記録装置の開発は、まさにその典型といえる。このようにして開発されたタマネギバエの羽化自記記録装置は、ヨトウガ・アメリカシロヒトリの羽化実験でも使用されており、改良が加えられることによって、より詳細な解析が可能になった。今後も、新たな結果やさまざまな未知の事柄を知る手がかりを得られることが期待される。

## 引用文献

- 新井哲夫 1976 ミカンコミバエの羽化の日周期性に対する温度と光の周期の影響 日本応用動物昆虫学会誌 20:69-76.
- 新井哲夫 1995 鳴く虫（キリギリスとコオロギの光周性 昆虫と自然 30(11):34-42.
- Arai, T. 1998 Effects of photoperiod and thermoperiod on hatching rhythm in *Homorocoryphus jezoensis* Matsumura et Shiraki (Orthoptera:Tettigoniidae). Entomological Science 1:491-494.
- 新井哲夫・渡康彦 1982 タマネギバエの羽化時刻 応用動物昆虫学会第26回大会
- Arai, T., Watari, Y., Kitai, T. and Kosaki, Y. 1991 Adult eclosion rhythm in the onion fly, *Hylemia antiqua*. 4<sup>th</sup> Sapporo Symposium on Biological rhythm, Sapporo, Japan
- 斎藤治 2005 昆虫行動記録ソフトウェアの応答高速化 芦屋大学論叢 41:31-36.
- Saunders, D.S. 1976 The circadian eclosion rhythm in *Sarcophaga argyrostoma*: some comparisons with the photoperiodic clock. Journal comp. Physiology. 110:111-133.
- Watari, Y. 2000 Entrainment of circadian locomotor activity rhythm in the onion fly, *Delia antiqua*. 学位論文（岩手大学連合大学院）
- Watari, Y. 2002a Comparison of the circadian eclosion rhythm between non-diapause and diapause pupae in the onion fly, *Delia antiqua*. Journal of Insect Physiology. 48:83-89.
- Watari, Y. 2002b Comparison of the circadian eclosion rhythm between non-diapause and diapause pupae in the onion fly, *Delia antiqua*: effect of thermoperiod. Journal of Insect Physiology. 48:881-886.
- Watari, Y. and Arai, T. 1997 Effects of photoperiod and aging on locomotor activity rhythm in the onion fly, *Delia antiqua*. Journal of Insect Physiology. 43:567-576.
- Watari, Y. and Arai, T. 1998 Effects of D<sub>2</sub>O on locomotor activity rhythm in the onion fly, *Delia antiqua*. Entomological Science. 1:477-483.
- Watari, Y. and Arai, T. 1999 Effect of dim light on locomotor activity rhythm in the onion fly, *Delia antiqua*. Zoological Science. 16:603-609.
- 渡康彦・斎藤治・田中一裕 2005 自然条件下でのタマネギバエの活動時刻・羽化時刻の研究 方法 芦屋大学論叢 41:95-102.