

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15397

研究課題名(和文) 非蜜源作物に対するニホンミツバチによる加害行動の解明

研究課題名(英文) gnawing behavior of Japanese honeybee to non-flowering crops

研究代表者

横井 智之 (YOKOI, Tomoyuki)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：80648890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニホンミツバチがレタスの葉に対してかじりとりを行なう加害行動を示す生態的な意義を解明するために、飛来行動およびレタスの成分分析、レタス成分に対する反応実験を行なった。野外観察によって、本加害行動は秋時期に通常の花粉や花蜜採餌と同様に外勤個体の一部が行なっていることが明らかになった。またレタスに含有されているラクチュコピクリンが、かじり取り行動の解発物質と仮定して、バイオアッセイを行なったところ、レタス内の糖類など別物質が解発物質として機能している可能性が高いことが明らかになった。本研究により、ラクチュコピクリン以外の物質がミツバチによる加害を生じさせていると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ニホンミツバチがレタスのような作物の葉を加害する行動がどのように引き起こされているのかが明らかになった。レタス内の糖類が解発物質となってミツバチを引き寄せている可能性が高く、今後他の作物においても、同様の現象が起こりうるのかを検証する上でも重要な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the ecological significance of gnawing behavior of Japanese honeybee to the lettuce, I conducted the field survey, chemical analysis by using HPLC-MAD and GC, and bioassay experiments using lettuce extracts. Workers visit and gnawed lettuce leaves like they use other floral resources. Then, we hypothesized that specific chemicals (lactucopicrin) would affect as releaser stimulus to honeybee workers. We conducted bioassay in the field using lettuce visiting workers. Although workers did not react to the lactucopicrin solutions, they showed licking behavior to 100% water-fraction extract solutions, that are not included lactucopicrin but sugar and other chemicals. These results suggest that several chemicals in lettuce induce the gnawing behavior of Japanese honeybee.

研究分野：行動生態学

キーワード：解発物質 ラクチュコピクリン かじり行動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大量生産されている栄養価の高い農作物は、人間のみならず、昆虫類にとっても繁殖や生存を向上させるための魅力的な餌資源となっている。そのため昆虫の中には、野生植物から作物へと資源の利用転換をはかる種が多く存在している。花粉や花蜜を利用するミツバチのような種は、授粉行動によって食料生産の手助けをしてくれる益虫という評価を受けてきた (National Research Council 2007, Gemmill-Herren 2016)。しかし近年、レタス畑に飛来するニホンミツバチが確認され、葉や芯をかじる行動が明らかになった (横井 2005)。レタスは代表的な栽培農作物の一つであり、花茎の抽だいが起こる前に収穫するためにミツバチ類の蜜源植物とはならない。このような非蜜源植物をニホンミツバチが利用する行動は、国内外において実体の把握と調査はほとんど行なわれていなかった。その背景には、養蜂業者や農業生産者、研究者のいずれも、非蜜源植物である農作物へのニホンミツバチの飛来は予期しておらず、かじられた痕があったとしても、本種との関連性を見出せなかったためと考えられる。ニホンミツバチを含めたミツバチ類の基礎生態については、巣内行動や天敵への対抗戦略、花上における花粉・花蜜の採餌行動について研究がなされているが (Seeley 1995, 佐々木 1999)、非蜜源植物を利用する行動とその目的については、知見がないのが現状である。

研究代表者は 2005 年から継続して全国各地におけるレタスカじり行動の発生報告をまとめ、ニホンミツバチが飛来するレタス畑で食害度と季節性に関する野外調査を行なった (Yokoi 2015)。全国的にレタスの露地栽培が行なわれる春 (5月~6月) と秋 (9月~10月) に、野外調査を行なった結果、秋季のみにレタス畑へのニホンミツバチの飛来行動が確認された。秋季レタス株の生育状況を調査したところ、定植後 1ヶ月が経過して結球した成熟株が選好してかじられている傾向がみられた。さらにレタス以外にキク科園芸種であるダリアでの葉芽をかじる行動も全国各地から報告を受けている。これらの事実から、ニホンミツバチにとっては、キク科植物に含有される物質を秋季に摂取する必要があると推測される。そこで、研究代表者は、ニホンミツバチは秋季にキク科の植物に含有される物質を摂取する必要があるとあり、レタスのような農作物への利用転換を図ることで、より大量に必要な成分を摂取していると考えた。なぜ秋季にキク科由来物質を摂取するのかという究極要因を明らかにするためには、植物に含有される物質の同定や含有物質量の測定、抽出物への選好性実験によるミツバチの反応試験を行ない、基礎的な知見を蓄積する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、ニホンミツバチによるレタス利用の定量調査およびレタス抽出物に対する選好性実験、植物体に含有される成分特定のための化学的分析による研究を行なうことで、ニホンミツバチにおける新たな植物成分利用の意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) ミツバチによるレタス利用行動の日周期性

ニホンミツバチによる日中のレタス訪問数の変化を調べるため、栃木県茂木町のレタス畑において春季 (5月) と秋季 (10月) に野外調査を行なった。日の出から日没まで 1時間ごとに畑内の畝を 10分間歩き、レタス株上で葉または芯 (茎) をかじっているニホンミツバチを計数し、時間あたりのレタス訪問数を記録した。個体ごとのレタス滞在時間を調べるため、晴天日を 4日間選び、畑内の畝をおよそ 30分間歩いて、レタス滞在時間と訪れていたレタス型を記録した。滞在時間は、個体がレタスの葉に着地してから内部に潜り込む、または葉をかじる行動を示した後に飛び去るまでの時間とした。2017年と 2018年 10月の調査では、前述のレタス訪問数を記録した後に滞在時間を記録した。畑周辺の巣からレタスへの出巣個体の飛来時刻と滞在時間、飛来個体数を記録した。

(2) 植物含有成分の特定

ニホンミツバチの外勤個体がレタス滲出液を経口摂取していることは、研究代表者が野外観察によって確認している。レタスにはラクチュコピクリンという、キク科植物に見られる二次代謝産物のセスキテルペンラクトン類が含有されている。しかし、化学物質の特定および植物体内の含有量は不明である。そこで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC-DAD 及び MS) を用いた化学分析を行ない、植物含有成分の特定を試みた。対象とするサンプルは、栃木県茂木町のレタス株を用いた。春季および秋季に野外から採集したレタス葉について HPLC-DAD 及び MS 分析を実施し、ラクチュコピクリンの定量を行なった。

(3) レタス由来物質に対するニホンミツバチの集合性と反応

レタス芯部分からの抽出物に対するニホンミツバチの選好性を検証するためにバイオアッセイ試験を行なった。ラクチュコピクリンの合成試薬を用いた試験と野外で採集したレタスから抽出し、各画分に分けた溶液を用いた試験の 2つを行なった。レタス片をメタノール抽出後、濾過した溶液を、水画分 0%・40%・90%・100%まで分け、反応があった画分については、さら

に分画して反応試験を行なった。反応試験はレタス飛来個体を野外で採集し、5個体ずつアクリルケース内に入れ、各溶液を塗布した金属板を10分間提示し、なめとる行動の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) ミツバチによるレタス利用行動の解明

レタスへの飛来行動は午前10時から増加し、12時をピークに減少して17時過ぎには飛来しなくなることが分かった(図1)。結球タイプ(玉レタス)と非結球タイプ(サニーレタス)の2品種において飛来数を比較したところ、非結球タイプへの飛来個体数の方が多かった。全ての個体は芯あるいは芯周辺の葉をかじる行動を示した。また、後脚に花粉団子をつけていた個体はいずれの観察日においても存在しなかった。ただし、滞在時間については、レタス品種や訪問時刻による差はみられなかった。これにより飛来個体は品種による選好性を示す可能性があることが明らかになった。

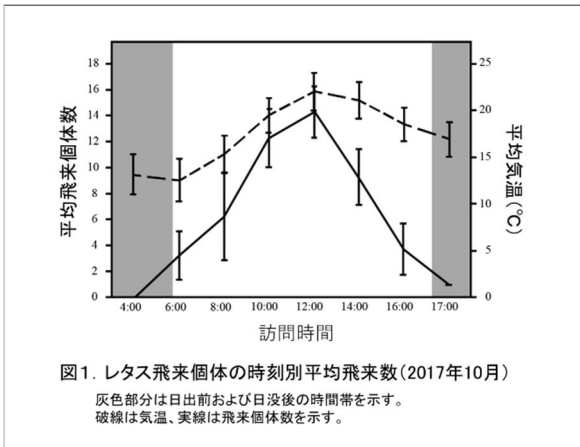


図1. レタス飛来個体の時刻別平均飛来数(2017年10月)
灰色部分は日出前および日没後の時間帯を示す。
破線は気温、実線は飛来個体数を示す。

(2) 植物含有成分の特定

レタス内に含有されているラクチュコピクリンの濃度は、品種や部位、品種と部位の交互作用で有意であり、季節による影響は受けていなかった。ラクチュコピクリン濃度は結球型の外葉で $53.5 \pm 11.4 \mu\text{g/g}$ (平均 \pm SE)、中心葉で $153 \pm 99.6 \mu\text{g/g}$ 、芯で $136 \pm 99.6 \mu\text{g/g}$ であった。一方、サニー型の外葉は $112 \pm 81.3 \mu\text{g/g}$ 、中心葉は $105 \pm 140 \mu\text{g/g}$ 、芯は $871 \pm 99.5 \mu\text{g/g}$ であった。サニー型の芯における含有濃度はサニー型の外葉や中心葉よりも有意に高い値であった(Tukey-KramerのHSD法、芯-外葉 $p = 0.001$ 、芯-中心葉 $p = 0.01$)。またHPLC分析の結果、ラクチュコピクリン類縁物質とみられるピークがすべてのレタス試料において確認された。これらの分析結果により、レタス株では、季節を問わず、芯に近い部分にラクチュコピクリンが多く含有されており、かじり行動の季節性を生じさせた原因はミツバチ側にあることが明らかになった。

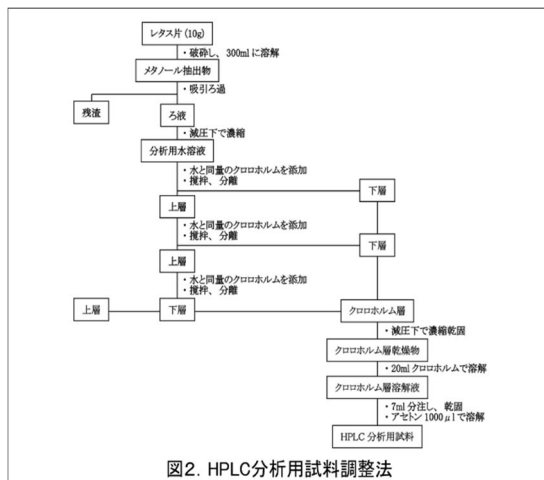


図2. HPLC分析用試料調整法

(3) レタス由来物質に対するニホンミツバチの集合性と反応

各溶液を塗布した金属板を10分間提示したところ、ラクチュコピクリン合成試薬単体を提示した実験では、液をなめとる行動を示す個体は全く観察されなかった。一方、レタス抽出液に対してはなめとる行動が86%の個体で確認された。次にラクチュコピクリン以外のレタス含有成分に対する反応を観察した。合計6つの画分処理区において、100%水画分処理した溶液に対して高い反応が見られ、GC分析によって、この溶液内には糖類が35%の割合を占めていることが明らかになった。また100%水画分溶液内にはラクチュコピクリンは検出されなかったため、解発物質として機能している可能性は低く、糖類をはじめとする別の物質がその役割を担っていることが示唆された。

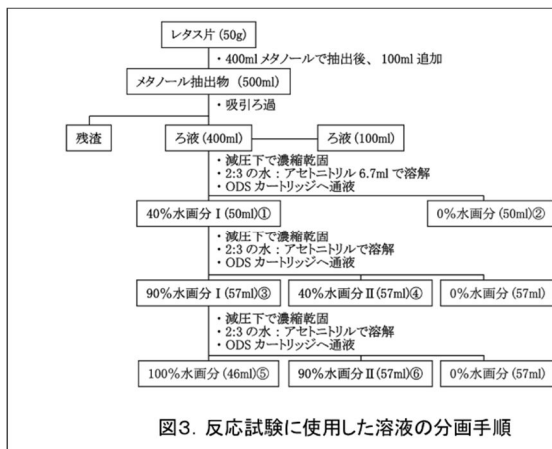


図3. 反応試験に使用した溶液の分画手順



図4. 反応試験の様子。
導入したミツバチ個体が、金属板上の溶液に反応した状況を示す。

本研究から、ミツバチがレタスをかじる際には、ラクチュコピクリン以外の物質が解発物質として効果をもち、ミツバチによる加害を生じさせていることが明らかになった。予想していたラクチュコピクリンに対するミツバチ個体の反応が見られなかったことから、本物質が解発物質ではないことが示されたが、レタス内に多く含有されている事実は今回行なった化学分析の結果から示されている。野外環境下では、糖類は主に花蜜を摂取することで取り込むことが多い。そのため、糖類はニホンミツバチが活動エネルギーとして摂取しているわけではない可能性が高い。そのため、糖類などを解発物質としてミツバチにおける摂食行動が生じ、その後ラクチュコピクリンが体内に取り込まれていることが考えられる。この点については、実際にラクチュコピクリンを摂取させた際に、個体の反応や生理的機能の変化を明らかにする必要がある。

解発物質についても、候補として糖類が挙がってきたが、今回見られた行動活性が糖類のみによって引き起こされたとは断定できない。糖と他の含有物質の組み合わせ、あるいは糖よりも少量で機能する他の化学物質が影響している可能性がある。100%水画分からイオン交換樹脂を用いて分けた溶液間では、検出された物質のピークが異なっていたことから、100%水画分に含まれていた物質を液性の異なる物質を3種の溶液にそれぞれに分けることができたといえる。この3種の溶液のどれか1つあるいは混合して組み合わせた溶液には、100%水画分に含まれていた解発物質が入っている可能性が高い。今後は、これらの溶液を用いて各組み合わせに対する反応試験を行なうと同時に、活性が見られた溶液内に含有される成分のスクリーニングと、それら成分についての行動活性試験による解発物質の特定が課題として挙げられる。

< 引用文献 >

1. Gemmill-Herren, B. (2016) *Pollination services to agriculture*. Routledge, NY.
2. National Research Council (2007) *Status of pollinators in North America*. The national academic press, Washington, D.C.
3. Seeley, T. (1995) *The wisdom of the hive*. Harvard University Press.
4. 佐々木正己 (1999) ニホンミツバチ 海遊舎。
5. 横井智之 (2005) レタスをかじるニホンミツバチ . ミツバチ科学, 26 巻 (3), pp98-100.
6. Yokoi T. (2015) Visitation and gnawing behavior of Japanese honeybee *Apis cerana japonica* to lettuce. *Apidologie*. Volume 46, pp489-494.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 横井智之・田中千聡 | 4. 巻 52 |
| 2. 論文標題 ニホンミツバチによるレタスカじり行動の実態解明にむけて | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 昆虫と自然 | 6. 最初と最後の頁 43 - 45 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Chisato S Tanaka, Aoi Nikkeshi, Mito Ikemoto, Kazumu Kuramitsu, Tomoyuki Yokoi |
| 2. 発表標題 Why do Japanese honeybees gnaw leaves of lettuces with eagerness? |
| 3. 学会等名 Annual Meeting of British Ecological Society（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田中千聡, 永野裕大, 日下石碧, 池本美都, 藏満司夢, 松山茂, 山路恵子, 横井智之 |
| 2. 発表標題 ニホンミツバチによるレタス齧り行動とレタス含有成分の関係 |
| 3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会年次大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田中 千聡・日下石 碧・横井 智之 |
| 2. 発表標題 ニホンミツバチによる非蜜源植物であるレタスへの飛来行動 |
| 3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会年次大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|