

ハダニ類の薬剤感受性検定法

はじめに

ハダニ類は茶や果樹、果菜類、花き類などの害虫であり、葉裏に寄生し、吸汁加害により商品価値の低下や生育障害をもたらす。野菜、花き類生産で主に問題となるのはナミハダニ黄緑型 *Tetranychus urticae* Koch (green-form) (写真 1) とカンザワハダニ *T. kanzawai* Kishida (写真 2) で、前者は薄緑色～緑色で、腹部に2つの点が見える場合が多い。後者の体色はやや黒みを帯びた赤色である。ただ、赤色の *Tetranychus* 属のハダニは複数種あり、正確な種同定には雄の挿入器の形状を調べるか分子生物学的手法が必要である。

ハダニ類は卵→幼虫→第1静止期→第1若虫→第2静止期→第2若虫→第3静止期→成虫というステージを経過する。ナミハダニ黄緑型やカンザワハダニは25℃程度ならば卵から成虫まで2週間足らずで発育するので、施設栽培などでは年間10世代以上を重ねる。



写真1 ナミハダニ黄緑型

写真2 カンザワハダニ

ハダニ類は薬剤抵抗性の発達しやすい害虫として知られており、その理由として以下の4つが挙げられている(真梶、1996)。
①薬剤散布面積に比べ、ハダニ類の行動範囲は狭い。このため、隔離された集団で薬剤の淘汰を受けることになり、均質な集団になりやすい。
②ハダニ類は発育日数が短く、発生回数が多い。このため、薬剤の淘汰を受ける機会が多くなる。
③ハダニ類の性決定は単数倍数性なので、抵抗性遺伝子を持つ雄との交雑で抵抗性が発達しやすい。
④ハダニ類の行動習性として近親交配が行われやすい。

ハダニ類の中で薬剤抵抗性が問題となるのは、前述の2種と *Panonychus* 属のミカンハダニ *Panonychus citri* (McGregor)、リンゴハダニ *Panonychus ulmi* (Koch) である。これらのハダニは多くの薬剤に抵抗性を発達させているため、薬剤感受性情報がないと有効な殺ダニ剤を選択できない。一例として奈良県の促成栽培イチゴでの簡易薬剤感受性検定の結果を示す(表)。現在、生産者が使用している主要な殺ダニ剤を供試しているが、全ての供試個体群に有効な殺ダニ剤は見い出せない。また、供試個体群ごとに効果のある殺ダニ剤が異なる。このような状況は、日本各地の促成イチゴ栽培で発生するナミハダニ黄緑型でも散見される。

表 イチゴのナミハダニ黄緑型雌成虫に対する殺ダニ剤の効果(奈良県・2014年)

採集地	48時間後の補正死亡率(%)					
	ビフェナゼート	ミルベメクチン	エマメクチン	アセキノシル	シエノピラフェン	シフルメトフェン
奈良市山町	28.8	83.7	93		26	16.4
奈良市大和田	100	92.2	100	100	100	
奈良市北の庄	19.9	14.5	81.2	33.3	10.3	
奈良市北の庄	91.7	14.6	77.2	53.9	11.4	
天理市西井戸堂	100	100	100		10.4	0
田原本町宮ノ森	56.5	74.5	88	29.2	5.4	
田原本町多	98.8	42.2	87.2	86.6	23.8	
桜井市東田	12.5	100	61.7		4.9	2.4
橿原市十市町	37.8	85.3	100	39.5	59	
橿原市東池尻町	38.8	80.4	100	40	7	
明日香村平田	71.3	91.7	90.4	50.5	9.3	
明日香村平田	77.8	95.7	73.4	9.4	4	
大淀町佐名伝	96.8	46.8	14.6	23.1	100	
五條市霊安寺	83.1	21.2	51.7	74.7	3.9	
五條市岡	77.7	96.6	92		28.3	53.8

*:空白は未実施

標準的薬剤検定法

以上のような状況にあるため、有効な殺ダニ剤を把握するには薬剤感受性検定が必要になる。これまでに報告されている主な検定法は3つある。

- ①ハダニ類を乗せた葉片に殺ダニ剤を散布する方法 (浜村、1996)
- ②ハダニが寄生する葉片を殺ダニ剤に浸漬する方法 (高梨ら、2009)
- ③葉片を殺ダニ剤に浸漬し、風乾後にハダニ類を接種する方法 (IRAC の検定法)

である。②については簡便な方法で、おおまかに効果のある薬剤を把握するのに適している。ただ、野外から採集してきた葉には様々なステージのハダニが混在していることから、特定のステージを対象とした調査には適さない。

また、③の方法はミトコンドリア電子伝達系 I 阻害剤 (IRAC コード 21A : テブフェンピラド乳剤、ピリダベン水和剤、フェンピロキシメート水和剤等) などを対象としたものである。現在、果菜類や花き類栽培で主に使用される殺ダニ剤は、塩素イオンチャンネルアクチベーター (IRAC コード 6 : ミルベメクチン乳剤、エマメクチン安息香酸塩乳剤等)、ミトコンドリア電子伝達系複合体 II 阻害剤 (IRAC コード 25a : シフルメトフェン水和剤、シエノピラフェン水和剤、IRAC コード 25b : ピフルブミド水和剤)、作用機構が不明の剤 (IRAC コード UN : ビフェナゼート水和剤) である。

そこで、これらの殺ダニ剤を①と③の方法で処理し、効果を比較した。その結果、ミトコンドリア電子伝達系複合体 II 阻害剤のシエノピラフェン水和剤、作用機構が不明のビフェナゼート水和剤では両法での補正死亡率に差はなかった。しかし、塩素イオンチャンネルアクチベーターのエマメクチン安息香酸塩乳剤は、③の方法での補正死亡率が①の方法に比べて低くなった (図 1)。

このことから、本マニュアルではハダニを乗せた葉片に殺ダニ剤を散布する方法① (浜村、1996) を標準的な検定法とし、その方法を説明する。

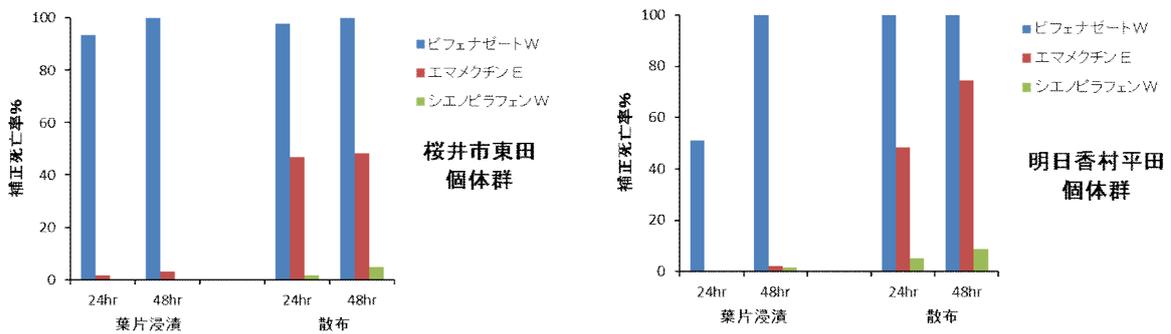


図1 葉片浸漬と散布による補正死亡率の比較

検定の流れ

検定は、①供試個体群のサンプリング、②リーフディスクの準備、③供試ハダニの接種、④処理前計数、⑤薬剤散布、⑥処理後計数、⑦評価の順に行われる。

ー参考：ハダニの雌雄、ステージの見分け方ー

検定を行うにはハダニの雌雄やステージを見分ける必要がある。ここではナミハダニ黄緑型を例に簡単に説明する。写真3の左は雄成虫（左の2頭）と雌成虫（左）である。

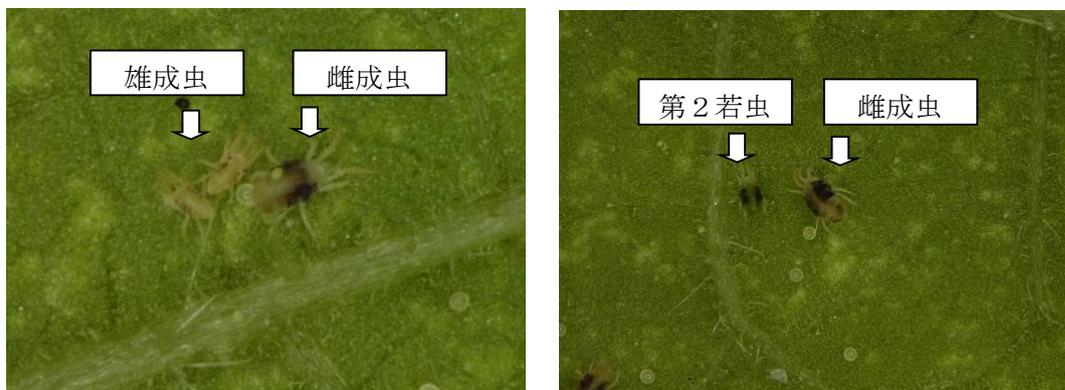


写真3

雌成虫は体が大きいことから判断しやすい。一方、雄成虫は雌成虫に比べ細く、葉巻型をしている。体色もやや黄色がかった場合が多い。雄成虫は脱皮前の第三静止期の雌を抱えるようにして脱皮を待つので、この状態を観察することで雄成虫を確認するとよい。

写真3の右は第二若虫（左）と雌成虫（右）である。第二若虫は第三静止期を経て成虫になる。雌成虫よりも一回り小さく、腹部全体が緑色で、雌成虫に比べて体に対して脚が短い印象を受ける。

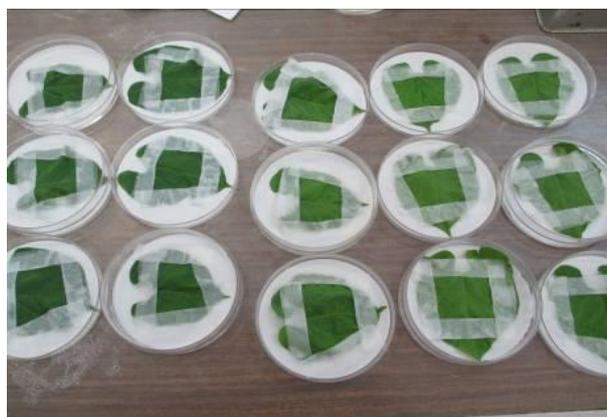
①供試個体群のサンプリング

ハダニ類が寄生する作物の葉を採集し、大きめのビニル袋に入れる。ビニル袋にはあらかじめ丸めた新聞紙などを入れておき、ビニル袋内面の結露を防ぐ。採集の際、寄生葉に

生じた吸汁痕だけを頼りに葉を取ると葉裏にはほとんど雌成虫がいない場合がある。必ず、葉裏を観察し、雌成虫の寄生を確認する。この際、1つの発生箇所から採集するのではなく、ほ場全体の複数の発生箇所から採集する。露地のリンゴ園では、ハダニ類の風分散によりリンゴ樹間をハダニ類が移動分散し、遺伝的交流が進んでいることが知られている (Uesugi et al., 2009b)。これに対し、カンキツ園では同じ樹内の局所個体群間でも遺伝的分化が検出されている (Osakabe. et al., 2005)。さらに、施設栽培のバラでは 30m 程度の栽培畦内でも遺伝的な分化が生じており、遺伝的に類似しているのは 3 m 程度の範囲内と報告されている (Uesugi. et al., 2009a)。このように栽培作物ごとに遺伝的交流の程度は様々であり、ハダニ類の分散方法なども考慮して採集する箇所や点数を決める。

②リーフディスクの準備

野菜や花に寄生するナミハダニ黄緑型やカンザワハダニはインゲンマメで飼育できるので、検定にもインゲンマメの初生葉を用いる。しかし、ミカンハダニやリンゴハダニはインゲンマメでの飼育は難しいので、寄生していた植物等を用いる。



インゲン葉の場合、直径 9 cm のシャーレに湿らせた濾紙か厚さ 1 cm 程度のスポンジを敷き、その上に葉表を上にしてインゲン葉を置く。湿らせたクッキングペーパー片で中央に 2 ~ 3 cm 四方になるように井桁状に囲み、逃亡を防止す

写真3 インゲン葉のリーフディスク

る (写真3)。濾紙を用いた場合のリーフディスク準備所用時間は、24 シャーレで 20 分程度である。

なお、葉面の凹凸が大きいカンキツ葉のような場合には濾紙の代わりにクリスタルバイオレットを混ぜた寒天ゲルを用いる。この詳細は浜村 (1996) などを参照されたい。

③供試ハダニの接種

圃場から持ち帰った寄生葉から雌成虫をリーフディスクに接種する。寄生葉にはカブリダニ類などの天敵がいたり、複数種が同所的に発生している場合もあるので、これらが混入しないように、対象のハダニを面相筆や小筆を用いて接種する。寄生葉を実体顕微鏡下に置き、活発な雌成虫の腹面側に筆の先端を入れ、すくい上げる。



写真4

吸汁中の個体は、口針が抜けずに小筆ですくえない場合がある。このような時は、小筆で腹部末端に触れると口針を抜くので、それを確認してからすくい上げる。また、葉の表面に細かい刺毛などがある場合は、必ず、刺毛に沿って筆を動かすようにする。逆方向に動かすと搦り上げようとした個体あるいは筆先が刺毛にからんでしまい作業効率が悪い。搦り上げた個体はすみやかにリーフディスクの葉上に移す。ハダニが乗った筆先を軽く葉面にあて、手前に引くように動かせばよい。筆先が乾いているとハダニが柄のほうに動いてくるので筆先は常に湿らせておく。雌成虫を供試する場合、1シャーレに20~25頭を接種する。供試頭数は〔(無処理+濃度勾配数あるいは供試薬剤数) × 3 反復 × 20~25 頭〕が必要になるので、これを考慮して十分な数の雌成虫を採集しておく。採集してきた寄生葉の状態や作業者の習熟度により異なるが、接種に要する時間は1シャーレに4~5分程度である。

殺卵剤の検定の場合、上述と同じ方法で雌成虫を接種し、12~24時間程度放置してリーフディスクの葉上に産卵させる。1枚のリーフディスクに50~100卵程度産卵させると計数などを行いやすい。ナミハダニ黄緑型の場合、一晩放置した場合の雌成虫の産卵数は1頭当たり10個程度(25℃)である。

④処理前計数

リーフディスクの葉片上に接種後、数時間放置してから、実体顕微鏡下で正常に活動している個体を残し、異常個体を小筆で除去する。同時にハダニが吐出した糸も除いておく。その後、葉片上の個体数を計数する。殺卵剤を供試する場合は、雌成虫と糸を除去し、卵を計数する。計数する際は葉脈に囲まれた範囲を単位として計数していくと、数え間違いにくい。

⑤薬剤散布

半数致死濃度(LC₅₀)を求める場合には、5段階程度の濃度勾配をつけた薬液を用意する。薬剤の効果を確認する場合には各薬剤を常用濃度に希釈しておく。無処理には希釈に用いた水を用いる。なお、展着剤の加用は不要である。回転式散布塔がある場合には、2~3 mg/cm²になる量を散布する。回転式散布塔がない場合は、プラモデルの塗装などに使われているエアブラシ(タミヤスプレーワーク®HG トリガータイプエアブラシ、株式会社タミヤ)とターンテーブル(TAu、アズワン株式会社)を用いた簡便な散布装置を用いると良い(写真5)。ここに示した機器の場合、エアブラシ先端からターンテーブルまでの距離が約30cm、実験台からエアブラシまでの高さも約30cm程度になるよう固定し、エアブラシの末端の竜頭を完全に閉めこんでから1.5回転程度緩めた状態で使用すると約2 mg/cm²の付着量になる。エアブラシから吐出される薬液粒子径は回転式散布塔の粒子径とほぼ同様であり、均一な散布が可能である。より簡易に行う場合にはハンドスプレーを用いるが、散布薬量を一定にすることは困難である。散布後は25℃前後の部

屋に置き、リーフディスクが乾かないよう水を補う。



写真5 エアブラシを用いた簡易な回転式散布装置

⑥ 処理後計数

雌成虫の場合は、散布 48 時間後に実体顕微鏡下で生死を判定する。生死の判定は正常活動個体を生存虫、小筆で触っても動かない死亡個体および異常行動個体を死亡虫とする。無処理区の個体は正常に行動しているのので、先に無処理区を計数してから処理区を観察すると異常行動を判定しやすい。ミルベメクチンなどにやや感受性が低下した個体は、48 時間後でも死亡していないが、吸汁活動はなく、第 1 脚をせわしなく上下に動かす行動を繰り返す。このような場合は死亡と見なす。

卵の場合は無処理区の孵化を確認してから（処理 4～5 日後）、処理区の孵化状況を調べる。厳密には孵化後に幼虫が死亡している場合は孵化したとみなす。しかし、検定の目的が実用的な効果を調べることならば、孵化直後に幼虫が死亡した場合には殺虫活性があると評価して良い。この場合には、無処理区が第 1 静止期ないしは第 1 若虫になった時期に判定する（参考：幼虫は脚が 6 本、第 1 若虫は脚が 8 本）。なお、薬剤の種類によっては効果の発現が遅いものもあるので、詳細な調査の場合には、あらかじめ農薬の原体メーカー等に作用機作や適切な評価時期を確認する必要がある。

⑦ 評価

各濃度別あるいは薬剤別に算出した死亡率から、定法により半数致死濃度や補正死亡率を求める。半数致死濃度が判明すれば、感受性系統との比較により抵抗性比が求められる。同じ圃場で経時的に半数致死濃度を記録していけば、その個体群の感受性のモニタリングを行うことができる。さらに、ある個体群に対して、異なる殺ダニ剤のローテーションを行った場合、その後の半数致死濃度を比較できれば、ローテーションの効果が評価できるかもしれない。一方、常用濃度での補正死亡率でも、経時的なデータがあれば感受性の推移は把握できる。何より、実用上効果のない薬剤がわかるので、現場での防除効果不足の原因が薬剤によるのか付着不足によるのかを明確にできる（國本、1999）。

簡易検定法

半数致死濃度は上述の標準的な検定法で求めることになるが、圃場での実用性を評価する場合には、簡易な方法でも良い。標準的な検定法で最も時間を要する作業は、ハダニの接種である。1枚のリーフディスクにサンプリングしてきた葉からハダニを10頭接種するのに要する時間は、初めての人で10分程度、慣れた人でも2分程度かかる。単純に計算すると6供試薬剤3反復の検定を行うなら、接種に要する時間だけで1時間半～7時間となる。これは、作業経験のない人が感受性検定を実施する上での大きな障害になると考えられる。そこで、いくつかの簡易検定法を紹介する。

サンプリング葉を用いた散布法

手順

- ①水を含ませたろ紙を敷いた直径9cmのシャーレを用意する。
- ②採集してきたハダニ寄生葉を実体顕微鏡下で観察し、雌成虫がかたまって寄生している部分を切り取る。この時、カブリダニ等の混入がないように注意する。
- ③切り取った葉片をろ紙上に置き、ペーパータオルで囲み、逃亡を防ぐ。
- ④実体顕微鏡下で死亡個体や行動異常個体を小筆を用いて除去する。
- ⑤雌成虫数を計数した後、供試薬剤を散布する。

ただ、この方法には以下の問題点がある。

1. ハダニの様々なステージが混じり、計数が面倒であること
2. サンプリング葉の保管方法が悪いと凋れたり、結露して供試できないこと
3. 葉裏の刺毛やハダニの吐出糸などがあると薬液の付着が不十分になること

これらの問題点のうち、[1]と[2]はサンプリング法と輸送方法の改善である程度解決できる。具体的には、サンプリング時にハダニの発生が著しい葉は避け、その周辺部分を観察し、主に雌成虫のみが寄生する葉を選ぶようにする。葉に糸が張るような発生のツボからはすでに多くの雌成虫が分散している。雌成虫はツボ周辺の比較的新しい葉に定着するので、これを探すとよい。また、採集した葉は高温の車内に放置したりせず、すみやかに実験室に持ち帰る。すぐに帰ることができない場合は、葉が直接保冷剤に触れないようにして、クーラーボックスに入れて保管する。実験室に持ち帰った後、直ちに袋から取り出し、乾かすことで結露時間を短くする。[3]については、展着剤を加用して付着を向上させる。

この方法では精度の高い感受性検定はできないが、「産地内の生産者ごとにどの薬剤に効果があるのか把握したい」というような検定は可能である。

水挿し法

管瓶に水挿ししたインゲン茎に接するようにハダニ寄生葉を放置し、雌成虫を移動させ

ること、小筆によるハダニ接種を行わないようにした方法である（国本ら、2016、印刷中）。移動する個体の多くは雌成虫であり、移動前の葉に寄生する雌成虫数とインゲン葉移動後の雌成虫数の間には正の相関がある（図2）。移動確認後に計数してから、希釈した薬液に5秒程度浸漬する。この方法は薬剤散布に特別な器材を必要としないが、サンプリング前にインゲンマメを準備しておく必要がある。約2週間前に鉢に播種し、日当たりの良い窓際などで栽培する。また、他のハダニやカブリダニ等の侵入を防ぐために鉢受けに水を張る。

手順

用意するもの

プラスチック管瓶（写真6、口径30mm、高さ100mm）、スポンジ栓、初生葉が展開したインゲンマメ、はさみ、ビーカー（200ml）

- ①初生葉が展開したインゲンマメ一方の葉を除去した後、水を入れたプラスチック管瓶に挿し、切れ込みを入れたスポンジ栓で茎をはさみ管瓶に固定する。
- ②管瓶と同じ高さの発砲スチロール製の箱に管瓶を埋め込む。
- ③ハダニが寄生する植物葉をインゲン茎の株元に触れるように静置し、24時間程度置く（写真）。
- ④管瓶からインゲンを外し、実体顕微鏡下で移動したハダニ雌成虫数を計数する。
- ⑤ビーカーに希釈した供試薬剤を入れ、そこにインゲン葉を5秒間浸漬し、管瓶に戻す。
- ⑥24～48時間後にハダニの生死を確認する。



写真6 プラスチック管瓶

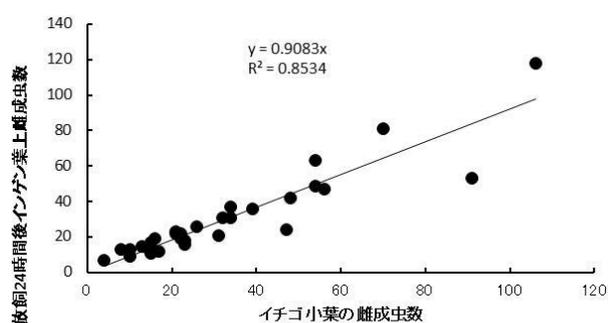


図2 放飼前のイチゴ小葉上ナミハダニ雌成虫数とインゲンへの移動後のナミハダニ雌成虫数の関係



写真7 水挿し法

紙袋法

この方法は、採集したハダニ寄生葉を常用濃度の薬剤に 10 秒間浸漬した後、紙袋に入れる（写真 8）だけである（溝部ら、2013）。翌日、生存虫がいれば紙袋の上部縁をハダニが歩行している。死亡していれば袋の上部にはハダニはいない。これで生死を判定できる。おおまかに実用性を評価する目的ならばこの方法でも十分である。



写真 8 紙袋法（写真提供：山口県病害虫防除所 溝部信二氏）

なお、これらの方法は全て植物体を利用する方法である。より簡便な検定法をめざす場合は、植物体を用いない方法がある。すでに RCV 法（Kwon et al., 2010、内壁に薬液を塗布したガラス管にハダニを吸引して評価する方法）やガラス管の内面に薬液を含む基質膜を被覆することでハダニの生存率を高める工夫とした方法（中野・相澤、私信）などが開発されており、今後、活用が期待される。

おわりに

感受性検定はあくまでも手段である。ハダニの抵抗性発達を管理する目的で LC_{50} をモニタリングするのか、効果のある殺ダニ剤を明確にする目的で常用濃度での死亡率を評価したいのか、その目的に応じた精度、速さ、労力を考慮した無理のない検定法を用いることが重要である。

引用文献

浜村徹三（1996）植物ダニ学（江原昭三・真梶徳純編）. 323-330. 全国農村教育協会.

國本佳範（1999）近畿中国農研 97：9-12.

國本佳範・今村剛士（2016）関西病虫研報 58（印刷中）.

Kwon D.H. et al.(2010) J. Asia-Pacific Entomol. 13:333-337.

溝部信二ら（2013）第 57 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨集. 58.

望月雅俊（1998）植物防疫 52：96-98.

Osakabe Mh. et al.(2005) Exp.Appl.Acarol.36:25-40.

真梶徳純（1996）植物ダニ学（江原昭三・真梶徳純編）186-203. 全国農村教育協会.

高梨祐明ら（2009）東北農研研報 110 : 177-186.

Uesugi R. et al.(2009a) *Exp.Appl.Acarol.*47:99-109.

Uesugi R. et al.(2009b) *Exp.Appl.Acarol.*48:281-290.