

5-5 ナミハダニの薬剤抵抗性生物検定法

5-5-1 はじめに

ナミハダニには黄緑型と赤色型が存在し、野菜類、花き類、果樹類など様々な農作物を加害する。中でも、ナミハダニ黄緑型は薬剤抵抗性の発達が著しく、既に使用可能な薬剤がほとんどない事例も少なくない。ハダニ類の防除を目的として市販されている殺ダニ剤の、作用機作に基づく系統は多岐に渡るが、ナミハダニ黄緑型はその多くに対して感受性を低下させており（例えば、今村・國本, 2016）、現在、実用的に使用されている主な系統は、アベルメクチン系、ミルベマイシン系、ミトコンドリア電子伝達系複合体III阻害剤、テトロン酸及びテトラミン酸誘導体など、そのごく一部である。

したがって、ナミハダニ黄緑型の管理を行う際は、既存の登録薬剤の中で効果のあるものを選定し、生物的防除法や物理的防除法との組み合わせなど、抵抗性の発達を抑制する管理法に基づいた防除の実践が重要である。このことは、新規に開発される薬剤における抵抗性管理においても極めて重要であり、抵抗性発達の兆し（抵抗性パッチの存在あるいはごく低頻度の抵抗性遺伝子を近隣で検出など）が確認されれば、早いタイミングで薬剤を変更するか、他の防除法との組み合わせを検討し、新規薬剤の防除効果の維持に努める必要がある。

抵抗性レベルの把握には対象とする殺ダニ剤ごとの遺伝子診断が望ましいが、殺ダニ剤が市販されてから感受性が低下しはじめるまでの期間が短く、遺伝子診断手法の開発が追いついていない殺ダニ剤もある。そこで、遺伝子診断手法が開発されるまでの間、生物検定法（薬剤感受性検定）で対応する必要がある。そこで、本稿では、ナミハダニ黄緑型に対する簡易な生物検定法について記載する。



図1 イチゴ葉上でのナミハダニ黄緑型多発の様子

5-5-2 供試虫の入手と飼育

(1) 供試虫の入手方法

大きなビニル袋に丸めた新聞紙等を入れたものを準備する。これにハダニが発生している葉を切除して入れる。新聞紙等の紙は、採集した葉から蒸散した水分の結露を防止し、ハダニが袋内で死亡するのを防ぐ目的で入れるものである。葉の鮮度維持のために入れる訳ではないので、新聞紙をあらかじめ水で湿らせないように注意する。

ハダニは圃場内では集中分布する事が多く、発生圃場では、所々にハダニが多発して吐糸に覆われた、いわゆる‘つぼ’が観察されるため、このような場所を手がかりにすると比較的容易に採集できる。ただし、ハダニの多発によって褐変・劣化した葉には、既にハダニが寄生していない場合が多い。従って、葉を集める際には、‘つぼ’の部分の褐変・劣化した葉は避けて、その周囲の比較的新鮮な葉の葉裏を観察し、寄生の有無を確認して採集する。また、施設内ではハダニの移動分散が抑制されるので、同じ圃場内でも場所によって薬剤感受性が異なる集団がパッチ状に分布する。そのため、1カ所から大量に採集せず、圃場全体の複数の発生箇所から採集する。

感受性検定において殺成虫効果を見る場合は、通常は1薬剤につき雌成虫約20頭×3反復で実施する。これに無処理区を加えた頭数が必要になる。必要な採集個体数は、採集した個体を直接使用するか、実験室で増殖して使用するか、また検定に用いる薬剤数などによって異なる。採集した日のうちに雌成虫に対して薬剤処理を行う場合は、持ち帰る途中の死亡や検定操作時のロスも考慮して、少なくとも必要頭数の2倍以上を採集しておくのが無難であり、採集個体数が多いほど、採集葉から検定葉にハダニを移し替える際の手間は削減される。

採集したビニル袋は、直射日光を避けて日陰などに置き、採集後はなるべく早く検定を行う実験室内などに持ち込む。現地圃場で集めたサンプルを車等で持ち帰る場合、特に夏期には温度上昇に注意し、トランクなどに長時間入れておかないようにする。適度に保冷剤を入れたクーラーボックスがあれば安全である。



図2 ナミハダニ黄緑型寄生葉の採集

5-5-3 種の識別方法

ハダニ類の正確な種同定は専門知識・技能を要し、極めて困難である。ただ、ハダニ類の多くは、いわゆる‘赤ダニ’と称される赤い体色の種類であり、農作物を加害するハダニ類の中で、白い体色のいわゆる‘白ダニ’は、ほぼナミハダニ黄緑型のみである。柑橘類のミヤケハダニなどの例外もあるが、こういった種類は殺ダニ剤等を使用している圃場で発生することは稀である。従って、薬剤感受性検定による殺ダニ剤の選択を要するような慣



図3 ナミハダニ黄緑型の雌成虫

行防除圃場で発生する白ダニは、ナミハダニ黄緑型と見なすことができる。PCR-RFLP による *Tetranychus* 属ハダニ類の分類方法については有本ら（2014）が紹介している。

5-5-4 供試虫の累代飼育法

圃場から持ち帰ったハダニが少なかった場合や、時間の関係上、その日のうちに検定を実施出来ない場合は、採集したハダニを飼育によって維持、あるいは増殖させる必要がある。

ナミハダニ黄緑型は、次項の検定法で後述するように、感受性検定に使用するインゲンマメ（以下インゲン）の初生葉で累代飼育できるので、飼育・検定用に常にインゲンを増殖させておくと良い。

15 cm ポットにインゲンマメ種子（品種：長鶉菜豆）を 20 粒程度播種する。コンタミ防止のために人工気象器内で栽培する場合は、25°C、16L8D 程度が適切だが、20°C以上の温度と 12 時間以上の日長があれば、問題なく生育する。また、使用するのは初生葉なので、新芽が伸びてきたら適宜摘み取る。



図 4 インゲンの栽培

飼育の際は、ポットのインゲン上、もしくは地際で切除したインゲンを 200 mL 程度の三角フラスコに水差したものに、ハダニが寄生した葉を直接載せる。インゲンの本数はハダニの頭数や維持する期間に応じて適宜調整し、葉の劣化が進むと新鮮なインゲンに交換する。

なお、インゲンで飼育中に、ハダニの一部が周囲に分散するので、複数系統を維持する場合は異なる部屋に置くなどの工夫が必要である。

5-5-5 検定法

(1) インゲンリーフディスク法

1) リーフディスクの準備

直径 9 cm のプラスチックシャーレに濾紙を 2 枚敷き、水で十分に湿らせる。その上に、切除したインゲンマメの初生葉を、葉表を上にして置く。短冊状に切ったキッチンペーパーを 2 枚重ねて、インゲン葉上に井型に置き、水で十分に湿らせる（図 5）。



図 5 インゲンリーフディスク

2) 検定虫の接種

リーフディスク上の井型の内側に、ハダニを接種する。殺成虫効果を見る場合は、雌成虫約 20 頭を接種して試験に供する。殺卵効果を見る場合は、雌成虫 10 頭を接種して産卵させ、24 時間後に雌成虫を取り除いて試験に供する。

接種は通常、先端を湿らせた面相筆で行い、個体の後方からすくい上げるように採集する。ただしこの作業を効率的に行うには、ある程度慣れを要する。より簡易な方法として、加工したガラス製パスツールピペットを利用する方法を紹介する（國本・今村、2017）。

- ・ガラス製のパスツールピペット（7595D-5X；Corning Co. Ltd.）の先端部分を基部で切断し、アルコールランプで先端を丸く加工する。
- ・上の加工を施したパスツールピペット末端（エアーポンプの接続部分）にはビニルチューブにナイロンメッシュ（20XX-75、Sefar NYTAL）を貼り付けたものを装着する（図 6）。
- ・実体顕微鏡下でこの吸虫管を用いてハダニ雌成虫を吸引し、ビニルチューブを外してナイロンメッシュに溜まったハダニをインゲン葉上へ落とす。



図 6 パスツールピペットの加工

ここで用いた吸虫装置は香川県と徳島県が共同で特許出願中の「虫の保持装置及び虫の薬剤感受性検定方法（特願 2016-062863）」の吸虫方式である。

3) 薬液の準備

薬剤は市販の製剤を用い、水道水を用いて所定の濃度に希釈し、薬液を調製する。展着剤は加用しない。対照区は水道水処理とする。

4) 薬剤処理と飼育

回転式散布塔で、リーフディスクに $2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 相当量の供試剤を散布する。ただし、回転式散布塔を所有していない場合は、エアブラシとコンプレッサー（タミヤスプレーワーク HG、株式会社タミヤ）を用いる。散布量を均一にするため、ターンテーブル（アズワン（株）、T-Au）を用いる（國本ら、2017）（図 7）。処理後容器の上に新聞紙等を被せて飼育する（図 8）。



図 7 簡易散布装置



図 8 処理後の飼育管理

5) 効果の判定

薬剤処理 48 時間後に生存虫数と死亡虫数を実体顕微鏡下で計数し、死亡率を算出する。この際、対照区の正常な個体と比較して、歩行異常を示す個体や苦悶している個体は死亡虫に含める。また、キッチンペーパー上で溺死している個体は計数しない。

対照区についても同様に調査し、対照区の生存率から各薬剤の補正死亡率 (Abbott, 1925) を以下の式により算出する。

$$y = \frac{x_{cont} - x_{test}}{x_{cont}} \times 100 (\%)$$

y : 補正死亡率、 x_{cont} : 対照区の生存率、 x_{test} : 薬剤処理区の生存率

(2) 簡易検定法

労力をかけられない場合や散布塔の設備がない場合は特別な器具を必要としない簡易検定法でもよい。具体的な手順は以下のとおりである。

- ・ 初生葉が展開したインゲンをプラスチック製の管瓶 (図 9) に水差しし、切れ込みを入れたスポンジ栓に茎を挟んでふたをする。
- ・ これを発泡スチロール製の箱に穴をあけた部分に差し込み、管瓶の上部と発泡スチロール面が一致するように設置する。
- ・ この茎元にハダニが寄生する葉を置き、室温で一晩放置する (図 10)。
- ・ 翌朝にはインゲン葉裏にハダニが移動しているので、雌成虫数を計数する。
- ・ 所定濃度に希釈した殺ダニ剤を入れたビーカーにインゲン葉ごと 5 秒間浸漬し、再び水差しする。
- ・ 24~48 時間後に生死を判定する。



図 9 プラスチック管瓶



図 10 水差しインゲンを用いた簡易接種法

(執筆：井村岳男)

文献

Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entmol. 18 : 265-267.

- 有本 誠・佐藤 雅・上杉龍士・刑部正博（2014）輸入検疫で発見される *Tetranychus* 属ハダニ類の PCR-RFLP による識別法. 植物防疫 68: 66-70.
- 今村剛士・國本佳範（2016）奈良県内のイチゴに寄生するナミハダニ黄緑型の薬剤感受性. 奈良農研セ研報 47 : 34-36.
- 刑部正博（2016）フィールド&ラボ～知って得する豆知識③～簡単、便利～ハダニ採集用小型吸虫管. 植物防疫 70 : 126-128.
- 國本佳範・今村剛士（2017）ナミハダニの薬剤感受性検定における簡易な接種法の開発. 植物防疫 71 : 154-158.
- 國本佳範・今村剛士・土井 誠・中野亮平・刑部正博（2017）回転式散布塔に代わる散布装置の構築. 応動昆 61 : 192-194.