

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660276

研究課題名(和文) 酸素濃度調節による無農薬害虫防除への挑戦

研究課題名(英文) Deoxidant-induced anoxia as a challenging pesticide-free measure for controlling agricultural pests

研究代表者

大山 克己(OHYAMA, KATSUMI)

千葉大学・環境健康フィールド科学センター・特任准教授

研究者番号：20456081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、無酸素処理による苗の無農薬害虫防除法に資するために、無酸素処理時間が害虫および苗の生存率におよぼす影響を把握し、苗の生育を阻害することなく害虫を死に至らしめる(防除する)方法の開発を目指した。その結果、無酸素処理を12時間以上とした場合、Tetranychus属2種のハダニ雌成虫の生存率および卵の孵化率はいずれも0%となった。他方、インゲン苗およびイチゴ苗に無酸素処理を実施したところ、両者ともに葉に生理障害が認められた。ただし、新たに展開する葉には、それは認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a pesticide-free measure during the transplant production period, deoxidant-induced anoxia was tested for controlling agricultural pests without any degradation of transplants. As the results, adult survival and egg hatchability of two Tetranychus spider mites reached 0% when anoxia duration was longer than 12 h. Under this condition, leaves of kidney bean and strawberry transplants showed physiological disorders, whereas newly-developed leaves were normal.

研究分野：環境調節工学

キーワード：酸素 無農薬 防除 ハダニ類

1. 研究開始当初の背景

近年、効率的な植物生産を目的として、温室や植物工場のような植物生産システムが用いられるようになってきている。このような植物生産システムでは、生物相が比較的単純であり、すなわち、天敵が少ない、もしくは、いないために、一旦害虫が侵入すると、その数が爆発的に増大し、被害が深刻化することが多い。温室の場合、害虫侵入は、「換気窓などからの侵入」と「作業者の衣服や機材、植物苗（以下、苗）などに付着して持ち込まれる侵入」に大別される。前者に関しては、換気窓にメッシュスクリーンを張る、換気窓を害虫が飛翔しない高さに調節するなどといった対策が施されている。しかし、後者に関しては、慣例法として、化学農薬が用いられているが、一般的に苗は農薬等に弱いという性質があり、一方で使用できる化学農薬と使用回数は制限されているため、抜本的な対策はないのが現状である。他方、現在の環境配慮型の農業においては、化学農薬使用量の低減が求められる。すなわち、環境保全との調和を可能とする、化学農薬を利用しない害虫防除法が理想である。既存の天敵（生物農薬）を利用する生物的防除は長期的に見れば有効であるが速効性は低く、コストは高い。それゆえ、苗のような生産期間の短い対象にはあまり適さない。したがって、苗生産時は、その他の手法、例えば、物理環境調節法を利用する物理的防除が適している。しかし、現在までに苗付着性害虫に対する物理的防除法は確立していない。

植物は、無酸素条件下でも体内の炭水化物を利用して呼吸（嫌気呼吸）できるので、ある一定時間以内であれば生存可能である（Salisbury and Ross, 1998）。また、無酸素条件下において、多くの植物、特に C3 植物（光合成経路にカルビン - ベンソン回路しか持たない植物）では、純光合成速度の増大（たとえば、Forrester et al, 1966）および栄養生長の促進（Quebedeaux et al, 1973）が報告されている。したがって、植物にとって、短期間の無酸素処理の影響はごくわずかであることが予想され、むしろ生育促進に繋がる可能性もある。他方、害虫である昆虫類およびダニ類は、生物の中でも比較的無酸素条件に耐えられるといわれている。Ishigaki et al (2012) は、走査型電子顕微鏡でのキチマダニの観察中、ほぼ真空条件にもかかわらず足が動いており、30 分間の真空条件においた後、通常の状態に戻したところ 2 週間生存したと報告している。しかし、さらに長時間無酸素（真空も含む）条件下におかれた場合、害虫は嫌気呼吸をできないことから、やがては死に至るはずである。しかし、害虫の無酸素条件下における致死時間は明確になっていない。

2. 研究の目的

本研究では、物理環境調節法を駆使し、か

つ、園芸学的、昆虫類およびダニ類の生理・生態学的観点より、以下の項目を明らかにすることを目的とした。これらの調査から、化学農薬に頼らない苗の害虫フリー化技術の確立を検討する。

- (1) 無酸素処理が害虫（ハダニ類）の生存率におよぼす影響
- (2) 無酸素処理が苗の生育におよぼす影響
- (3) 植物苗の生育には影響が少ないものの害虫は致死する無酸素処理時間

3. 研究の方法

- (1) 無酸素処理がナミハダニ非休眠雌成虫の生存率におよぼす影響

供試サンプルの準備

ナミハダニ (*Tetranychus urticae* Koch) の雌成虫をインゲン葉上に接種し、気温 25 °C および明期 16 h d⁻¹ の条件（以下、実験室条件）下で、24 h 産卵させた。24 h 後、葉上から雌成虫を取り除いて卵のみの状態とし、同条件下で孵化させ、成虫まで飼育した。

無酸素処理

成虫化後 5 日目以内の非休眠雌成虫を、メンブレンフィルタ（孔径：0.5 μm）で塞いだ換気孔を有するポリプロピレン製のチューブ（容積：1.5 mL；以下、チューブ）内に入れた（5 頭 / チューブ）。そのチューブをポリカーボネート製の容器（容積：2.5 L；以下、容器）内に設置した。容器内に脱酸素剤を投入し、酸素ガス分圧を 0 kPa（無酸素状態）まで低下させた。処理区は、脱酸素剤投入後、3、6、12 および 24 h 維持する 4 区とし、各処理時間が経過した時点で、容器内から脱酸素剤を取り出した。無処理区の容器内には脱酸素剤を入れず、酸素ガス分圧は容器外と同じ 21 kPa とした。なお、これら処理は全て実験室条件下で実施した。

生存率の算出および統計処理

処理開始後 24 h 経過した時点で、無処理区および各処理区におけるチューブ内の雌成虫 (N = 25-100) を取り出し、インゲン葉片（直径：12 mm；以下、葉片）に接種した（5 頭 / 葉片）。無酸素処理による麻痺または致死を判別するために、この状態で 2 日間維持し、生存率を算出した。本試験を 4 回反復し、無処理区および各処理区間におけるそれぞれの生存率を逆正弦変換し、変換後の平均値の差を分散分析後のダネット検定によって、危険率 5% 以下の有意水準でそれぞれ比較した。

- (2) 無酸素処理がナミハダニ休眠雌成虫の生存率におよぼす影響

供試サンプルの準備

ナミハダニ雌成虫をインゲン葉上に接種し、実験室条件下で、24 h 産卵させた。24 h 後、葉上から雌成虫を取り除いて卵のみの状態とし、同条件下で孵化させた。気温 18 °C および明期 8 h d⁻¹ の条件（休眠誘導条件）下で、成虫まで飼育した。

無酸素処理

成虫化後 15 日目以内の休眠雌成虫を、チューブ内に入れ（5 頭 / チューブ）、チューブごと容器内に設置した。容器内に脱酸素剤を投入し、酸素ガス分圧を 0 kPa（無酸素状態）まで低下させた。処理区は、脱酸素剤投入後、3、6、12 および 24 h 維持する 4 区とし、各処理時間が経過した時点で、容器内から脱酸素剤を取り出した。無処理区の容器内には脱酸素剤を入れず、酸素ガス分圧は容器外と同じ 21 kPa とした。なお、これら処理は全て実験室条件下で実施した。

生存率の算出および統計処理

処理開始後 24 h 経過した時点で、無処理区および各処理区におけるチューブ内の雌成虫（N = 25-100）を取り出し、葉片に接種した（5 頭 / 葉片）。無酸素処理による麻痺または致死を判別するために、この状態で 2 日間維持し、生存率を算出した。本試験を 4 回反復し、無処理区および各処理区間におけるそれぞれの生存率を逆正弦変換し、変換後の平均値の差を分散分析後のダネット検定によって、危険率 5% 以下の有意水準でそれぞれ比較した。

（3）無酸素処理がカンザワハダニ非休眠雌成虫の生存率におよぼす影響

供試サンプルの準備

カンザワハダニ（*Tetranychus kanzawai* Kishida）の雌成虫をインゲン葉上に接種し、実験室条件下で、24 h 産卵させた。24 h 後、葉上から雌成虫を取り除いて卵のみの状態とし、同条件下で孵化させ、成虫まで飼育した。

無酸素処理

成虫化後 5 日目以内の非休眠雌成虫を、チューブ内に入れ（5 頭 / チューブ）、チューブごと容器内に設置した。容器内に脱酸素剤を投入し、酸素ガス分圧を 0 kPa（無酸素状態）まで低下させた。処理区は、脱酸素剤投入後、3、6、12 および 24 h 維持する 4 区とし、各処理時間が経過した時点で、容器内から脱酸素剤を取り出した。無処理区の容器内には脱酸素剤を入れず、酸素ガス分圧は容器外と同じ 21 kPa とした。なお、これら処理は全て実験室条件下で実施した。

生存率の算出および統計処理

処理開始後 24 h 経過した時点で、無処理区および各処理区におけるチューブ内の雌

成虫（N = 25-100）を取り出し、葉片に接種した（5 頭 / 葉片）。無酸素処理による麻痺または致死を判別するために、この状態で 2 日間維持し、生存率を算出した。本試験を 4 回反復し、無処理区および各処理区間におけるそれぞれの生存率を逆正弦変換し、変換後の平均値の差を、分散分析後のダネット検定によって、危険率 5% 以下の有意水準でそれぞれ比較した。

（4）無酸素処理がカンザワハダニ休眠雌成虫の生存率におよぼす影響

供試サンプルの準備

カンザワハダニ雌成虫をインゲン葉上に接種し、実験室条件下で、24 h 産卵させた。24 h 後、葉上から雌成虫を取り除いて卵のみの状態とし、同条件下で孵化させた。休眠誘導条件下で、成虫まで飼育した。

無酸素処理

成虫化後 15 日目以内の休眠雌成虫を、チューブ内に入れ（5 頭 / チューブ）、チューブごと容器内に設置した。容器内に脱酸素剤を投入し、酸素ガス分圧を 0 kPa（無酸素状態）まで低下させた。処理区は、脱酸素剤投入後、3、6、12 および 24 h 維持する 4 区とし、各処理時間が経過した時点で、容器内から脱酸素剤を取り出した。無処理区の容器内には脱酸素剤を入れず、酸素ガス分圧は容器外と同じ 21 kPa とした。なお、これら処理は全て実験室条件下で実施した。

生存率の算出および統計処理

処理開始後 24 h 経過した時点で、無処理区および各処理区におけるチューブ内の雌成虫（N = 25-100）を取り出し、葉片に接種した（5 頭 / 葉片）。無酸素処理による麻痺または致死を判別するために、この状態で 2 日間維持し、生存率を算出した。本試験を 4 回反復し、無処理区および各処理区間におけるそれぞれの生存率を逆正弦変換し、変換後の平均値の差を、分散分析後のダネット検定によって、危険率 5% 以下の有意水準でそれぞれ比較した。

（5）無酸素処理がナミハダニ卵の孵化率におよぼす影響

供試サンプルの準備

ナミハダニ雌成虫をポリスチレン製のシャーレ（直径：90 mm；以下、シャーレ）内に接種し、実験室条件下で、24 h 産卵させた。24 h 後、シャーレ内から雌成虫を取り除いて卵のみの状態とした。

無酸素処理

上記のシャーレを容器内に設置した。容器内に脱酸素剤を投入し、酸素ガス分圧を 0 kPa（無酸素状態）まで低下させた。処理区は、

脱酸素剤投入後、3、6、12 および 24 h 維持する 4 区とし、各処理時間が経過した時点で、容器内から脱酸素剤を取り出した。無処理区の容器内には脱酸素剤を入れず、酸素ガス分圧は容器外と同じ 21 kPa とした。なお、これら処理は全て実験室条件下で実施した。

孵化率の算出および統計処理

処理開始後 24 h 経過した時点で、無処理区および各処理区におけるシャーレ内の卵 (N = 20-197) を取り出し、葉片に接種した (10 卵/葉片)。処理開始後 7 日目に、無処理区および各処理区における卵数および幼虫数を観察し、孵化率を算出した。本試験を 4 回反復し、無処理区および各処理区間におけるそれぞれの孵化率を逆正弦変換し、変換後の平均値の差を、分散分析後のダネット検定によって、危険率 5% 以下の有意水準でそれぞれ比較した。

(6) 無酸素処理がカンザワハダニ卵の孵化率におよぼす影響

供試サンプルの準備

カンザワハダニ雌成虫をシャーレ内に接種し、実験室条件下で、24 h 産卵させた。24 h 後、シャーレ内から雌成虫を取り除いて卵のみの状態とした。

無酸素処理

上記のシャーレを容器内に設置した。容器内に脱酸素剤を投入し、酸素ガス分圧を 0 kPa (無酸素状態) まで低下させた。処理区は、脱酸素剤投入後、3、6、12 および 24 h 維持する 4 区とし、各処理時間が経過した時点で、容器内から脱酸素剤を取り出した。無処理区の容器内には脱酸素剤を入れず、酸素ガス分圧は容器外と同じ 21 kPa とした。なお、これら処理は全て実験室条件下で実施した。

孵化率の算出および統計処理

処理開始後 24 h 経過した時点で、無処理区および各処理区におけるシャーレ内の卵 (N = 20-190) を取り出し、葉片に接種した (10 卵/葉片)。処理開始後 7 日目に、無処理区および各処理区における卵数および幼虫数を観察し、孵化率を算出した。本試験を 4 回反復し、無処理区および各処理区間におけるそれぞれの孵化率を逆正弦変換し、変換後の平均値の差を、分散分析後のダネット検定によって、危険率 5% 以下の有意水準でそれぞれ比較した。

(7) 無酸素処理がインゲン苗の生育におよぼす影響

供試サンプルの準備

インゲン (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Top Crop) の種子を、水で湿らせたおがくず内に播種し、気温 25 °C および連続暗期下で 3 日

間発芽処理を施した。3 日後、発芽した種子を培養土入りのポットに移植し、実験室条件および光合成有効光量子束密度 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (育苗条件) 下で 7 日間育苗した。育苗期間中は、水道水を用い毎日灌水した。

無酸素処理

発芽後 7 日目 (播種後 10 日目) の苗を容器内に設置した。容器内に脱酸素剤を投入し、酸素ガス分圧を 0 kPa (無酸素状態) まで低下させた。処理区は、上記実験から両種のハダニが死滅する最短時間とし、その処理時間が経過した時点で、容器内から脱酸素剤を取り出した。無処理区の容器内には脱酸素剤を入れず、酸素ガス分圧は容器外と同じ 21 kPa とした。なお、これら処理は全て実験室条件下で実施した。

処理後の観察および統計処理

処理開始後 24 h 経過した時点で、無処理区および処理区における容器内の苗を取り出し、育苗条件下で 7 日間維持した。処理前、処理後 1 日目および 7 日目の各時点における無処理区および処理区の苗を、デジタルカメラを用い撮影した。

処理後 7 日目において、苗 (N = 8) の地上部の生体重および乾物重を測定し、マン・ホイットニーの *U* 検定によって、無処理区および処理区間で、危険率 5% 以下の有意水準のもと、それぞれ比較した。

4. 研究成果

(1) 無酸素処理がナミハダニ非休眠雌成虫の生存率におよぼす影響

処理時間が 0、3、6、12 および 24 h のとき、ナミハダニ非休眠雌成虫の生存率はそれぞれ 96、90、7、0 および 0% であった。処理時間が 12 h 以上の場合、生存率は 0% となったことから、ナミハダニ非休眠雌成虫の防除には 12 h 以上の無酸素処理が必要であることが判明した。

(2) 無酸素処理がナミハダニ休眠雌成虫の生存率におよぼす影響

処理時間が 0、3、6、12 および 24 h のとき、ナミハダニ休眠雌成虫の生存率はそれぞれ 99、100、99、98 および 39% であった。いずれの処理時間においても生存率は 0% とならなかったことから、ナミハダニ非休眠雌成虫の防除には 24 h 以上の無酸素処理が必要であることが判明した。

(3) 無酸素処理がカンザワハダニ非休眠雌成虫の生存率におよぼす影響

処理時間が 0、3、6、12 および 24 h のとき、カンザワハダニ非休眠雌成虫の生存率は

それぞれ 96、85、0、0 および 0%であった。処理時間が 6 h 以上の場合、生存率は 0%となったことから、カンザワハダニ非休眠雌成虫の防除には 6 h 以上の無酸素処理が必要であることが判明した。

(4) 無酸素処理がカンザワハダニ休眠雌成虫の生存率におよぼす影響

処理時間が 0、3、6、12 および 24 h のとき、カンザワハダニ休眠雌成虫の生存率はそれぞれ 98、98、100、88 および 28%であった。いずれの処理時間においても生存率は 0%とならなかったことから、カンザワハダニ非休眠雌成虫の防除には 24 h 以上の無酸素処理が必要であることが判明した。

(5) 無酸素処理がナミハダニ卵の孵化率におよぼす影響

処理時間が 0、3、6、12 および 24 h のとき、ナミハダニ卵の孵化率はそれぞれ 89、81、60、0 および 0%であった。処理時間が 12 h 以上の場合、生存率は 0%となったことから、ナミハダニ卵の防除には無酸素処理を 12 h 以上施さなければならないことが判明した。

(6) 無酸素処理がカンザワハダニ卵の孵化率におよぼす影響

処理時間が 0、3、6、12 および 24 h のとき、カンザワハダニ卵の孵化率はそれぞれ 97、85、4、0 および 0%であった。処理時間が 12 h 以上の場合、生存率は 0%となったことから、カンザワハダニ卵の防除には 12 h 以上の無酸素処理が必要であることが判明した。

(7) 無酸素処理がインゲン苗の生育におよぼす影響

ナミハダニおよびカンザワハダニの卵および非休眠成虫が死滅する 12 時間の無酸素処理をインゲン苗に施した結果、処理後 1 日目から初生葉が変色し、7 日目までに枯死が確認された(図 1)。なお、処理後 7 日目における処理区の苗地上部の生体重および乾物重は、無処理区のそれらと比較して有意に小さかった。

考察

本研究により、12 時間以上の無酸素処理で、苗への付着が特に懸念されるナミハダニおよびカンザワハダニの卵および非休眠成虫を完全に防除できることが示された。ただし、両種とも休眠に伴い、無酸素耐性を獲得し、24 時間の無酸素処理でも生存個体が確認された。したがって、これら休眠成虫に対しては 24 時間以上の無酸素処理が必要であることが判明した。他方、苗(インゲン)では、12 時間の無酸素処理によって、初生葉に重大

な生理障害が確認された。この原因としては、苗自体の低い無酸素耐性に加え、本研究で用いた脱酸素剤による減圧等の影響が考えられ、その他の物理環境(例えば、温度)との交互作用も踏まえ、本手法の改善が必要である。なお、本研究では、害虫(ハダニ)および苗(インゲン)の無酸素耐性をそれぞれ単独で調査した。今後、より生産現場の実態に合わせるために、害虫を接種した苗を用いた試験も実施する。これら一連の研究により、化学農薬に頼らない苗の害虫フリー化技術を確立していく予定である。



図 1 無酸素処理がインゲン苗の生育におよぼす影響(上:無処理、下:処理後 7 日目)

引用文献

- Forrester, M.L., Krotkov, G., and Nelson, C.D. 1966. Effect of oxygen on photosynthesis, photorespiration and respiration in detached leaves. I. Soybean. *Plant Physiol.* 41:422
- Ishigaki, Y., Nakamura, Y., Oikawa, Y., Yano, Y., Kuwabata, S., Nakagawa, H., Tomosugi, N., Takegami, T. 2012. Observation of Live Ticks (*Haemaphysalis flava*) by Scanning Electron Microscopy under High Vacuum Pressure. *PLoS ONE* 7(3): e32676. doi:10.1371/journal.pone.0032676
- Quebedeaux, B., Hardy, R.W.F. 1973. Oxygen as a New Factor controlling Reproductive Growth. *Nature* 243, 477 - 479
- Salisbury, F., Ross, C. 1998. *Plant Physiology*. Brooks Cole, 682pp.

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Suzuki, T., C.H. Wang, T. Gotoh, H. Amano and K. Ohyama (2015) Deoxidant-induced anoxia as a physical measure for controlling spider mites (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 65, 293-305. DOI:10.1007/s10493-015-9881-8

〔学会発表〕(計3件)

王至弘・鈴木丈詞・北嶋康樹・後藤哲雄 (2015) 酸素処理による害虫防除および天敵分離技術の開発～成虫篇～. 第59回日本応用動物昆虫学会大会, 山形大学小石川キャンパス・山形県・山形市, 2015年3月27-29日.

王至弘・鈴木丈詞・北嶋康樹・後藤哲雄 (2014) 無酸素処理による害虫防除および天敵分離技術の開発. 第58回日本応用動物昆虫学会大会, 高知大学朝倉キャンパス・高知県・高知市, 2014年3月26-28日.

鈴木丈詞・王至弘・北嶋康樹・後藤哲雄・天野洋・大山克己 (2013) 無酸素処理による植物苗の害虫フリー化技術の開発: ハダニ類に対する影響. 第22回日本ダニ学会大会, 静岡県総合研修所もくせい会館(静岡県職員会館)・静岡県・静岡市, 2013年9月27-29日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 克己(OHYAMA, Katsumi)
千葉大学・環境健康フィールド科学センター・特任准教授
研究者番号: 20456081

(2) 研究分担者

天野 洋(AMANO, Hiroshi)
京都大学大学院・農学研究科・教授
研究者番号: 00143264

(3) 研究協力者

鈴木丈詞(SUZUKI, Takeshi)
日本学術振興会・海外特別研究員
(西オンタリオ大学)
研究者番号: 60708311