

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月23日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08108

研究課題名(和文) 苗と害虫の低酸素濃度耐性の差を利用した無農薬害虫防除手法の確立

研究課題名(英文) Treatment of Low oxygen concentration for controlling pest without agrochemicals

研究代表者

大山 克己(Ohyama, Katsumi)

大阪府立大学・研究推進機構・特認准教授

研究者番号：20456081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、無酸素および低酸素の条件に暴露することによるナミハダニ防除を確立するための基礎知見を得ることを目的とした。処理後8日目のナミハダニの生存率は、酸素濃度0.5%以下の場合有意に低下し、半数致死濃度(LC50)は0.55%であった。また、産卵数は、酸素濃度1%以下の場合、有意に低下した。他方、植物体を、殺ダニ効果のある濃度(0.5%)で処理したところ、トマト植物体は処理後枯死したが、インゲンマメとキュウリでは、初出葉は残存し、また、障害の出た頂芽に代わって側芽が発達した。これらより、低酸素処理は、植物種によっては、ナミハダニの物理的防除に利用できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の研究で、脱酸素剤をもちいた無酸素条件(O₂濃度0%)において、25℃で8～12h処理することにより、カンザワハダニ、ナミハダニおよびミカンハダニに対する致死作用が認められたことが報告されている。しかし、致死O₂濃度の閾値は、依然不明なままである。本研究では、ナミハダニの致死O₂濃度を明らかにした点に学術的意義がある。また、低酸素処理が、植物種によっては、ナミハダニの物理的防除に利用できる可能性を示した点には、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the potential use of anoxic and hypoxic conditions for controlling the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). The survival and fecundity of adult *T. urticae* females at 8 days after treatment significantly decreased when the O₂ concentration was lower than 0.5% and 1%, respectively; the lethal concentration at 50% survival (LC50) was 0.55%. The miticidal hypoxic condition (0.5% O₂) led to physiological disorders in host plants; the degree of physiological disorders differed among the plant species tested. Although tomato seedlings died after the hypoxia treatment, in kidney bean and cucumber seedlings the primary leaves remained and lateral buds developed instead of the apical buds that ceased. Hypoxia treatment could be useful as a physical measure for controlling spider mites depending on plant species or cultivars.

研究分野：農業環境工学

キーワード：酸素濃度 ナミハダニ 防除 生存率 インゲン キュウリ トマト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナミハダニ (*Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)) は、1100 種以上の植物種を食害する (Migeon and Dorkeld, 2017)。世界的に広がりを見せる害虫であるこの節足動物は、化学農薬に含まれる 95 種類にも及ぶ成分に対する耐性を迅速に獲得してしまうために、防除することが難しい (Mota-Sanchez and Wise, 2017)。化学農薬の代替として、捕食性のカブリダニを利用した生物防除法 (Greco et al., 2017) と、ダニを窒息させるという特徴のある石油由来のオイル散布による物理防除法 (Marcic, 2012) とが効果を上げつつある。

1980 年代より、野菜や果樹、観葉植物の防除として、CO₂ 濃度を調節した空気が使用されてきた (Aharoni et al., 1981)。たとえば、CO₂ 濃度 60%、30 の空気で 16 h 処理することで、イチゴ植物体の生理障害を引き起こすことなく、ナミハダニの致死率を 100% にできる (Oyamada and Murai, 2013)。この方法では、CO₂ 濃度を 60% に上昇させる際、容器中の空気を置換するので、O₂ 濃度は約 8% まで低下する。休眠中の雌成虫であったとしても、CO₂ 濃度 20%、O₂ 濃度 0.4%、40 の空気で 15.5 h 処理することで、99% の致死率になる (Whiting and van den Heuvel, 1995)。しかし、このような CO₂ 濃度を高めた空気を利用する方法の致死作用は、害虫の神経系に対する電子伝達阻害効果による麻酔作用 (Nicolas and Sillans, 1989) を有する CO₂ 濃度を高めた結果としてなのか、それとも有酸素呼吸で必要とされる O₂ の不足に起因するのかが明らかでない。

最近の研究で、脱酸素剤をもちいた無酸素条件 (O₂ 濃度 0%) において、25 で 8~12 h 処理することにより、カンザワハダニ、ナミハダニおよびミカンハダニに対する致死作用が認められたことが報告されている (Suzuki et al., 2015; Wang et al., 2016)。しかし、致死 O₂ 濃度の閾値は、依然不明なままである。また、無酸素処理は、ナミハダニの寄生するインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) 植物体に害を与える (Suzuki et al., 2015)。しかし、植物の低酸素条件に対する耐性は古くから知られるとともに、いくつかの研究では光合成の促進効果を報告している。たとえば、O₂ 濃度を 1% にまで低下させると、光呼吸が抑制されるために、ダイズ (*Glycine max* L.) の光合成量は増大したことが報告されている (Forrester et al., 1966)。それゆえ、ナミハダニに対して殺ダニ効果のある O₂ 濃度の閾値を調べることは、CO₂ 濃度を高めることにより引き起こされた低酸素条件の効果を明らかにできる可能性がある。また、無酸素条件よりも植物にやさしい可能性のある、低酸素条件をもとにしたダニ類の防除法の確立につながる。

2. 研究の目的

本研究では、殺ダニ効果のある O₂ 濃度の閾値を明らかにするために、ナミハダニに無酸素 (O₂ 濃度 0%) および低酸素 (O₂ 濃度 0.5~2%) 処理を実施した。あわせて、ナミハダニの物理防除法としての適性を明らかにするために、殺ダニ効果のある O₂ 濃度の条件が植物の実生におよぼす影響を調べた。

3. 研究の方法

供試ダニ

本研究で使用したダニ個体群は、秋田県のリンゴ (*Malus pumila* Mill. 'Fuji') を栽培している果樹園で収集されたものである。ダニ個体群を維持するために、インゲンマメをピートモスの圧縮培土上で、気温 25、相対湿度 50%、明期 16 h d⁻¹、光合成光量子束密度 (PPFD) 200 μmol m⁻² s⁻¹ の条件下で 7 日間育成した。育成に先立ち、おがくずを利用して、暗黒下で 3 日間おき、種子を発芽させた。1 日おきに水道水を与えた。実験室内では、ダニ個体群を、ポリスチレンの容器内の水を浸したろ紙と脱脂綿上においたインゲン初生葉上で育成した。容器は、4 つの換気孔 (10 mm) のある蓋でとした。換気孔は、ガス透過性のフィルタでとした。初出葉は、2 週間に 1 回取り換えた。

新しい雌個体群は、ふ化同期法 (Suzuki, 2017) を用いて得た。この個体群より、ポンプ吸引システム (Cazaux et al., 2014) を利用して、齢のまばらな約 40 個体の雌成虫を集め、ポリスチレンの容器内の水を浸したろ紙と脱脂綿上においたインゲン初生葉に接種した。容器は、換気孔のある蓋でとした。25、16 h d⁻¹ 明期としたインキュベータにおいて、雌成虫に 24 時間産卵させた。産卵後、ポンプ吸引システムを用いて雌成虫を取り除き、葉上には卵のみが残るようにした。卵は、上記のインキュベータ内で引き続き 7~8 日間飼育した。なお、飼育終了時には、ほとんどの雌は第 3 静止期 (第 2 若虫の静止状態) に至っていた。第 3 静止期の雌を、細筆を利用して、直径 35 mm のシャーレに移した。その後、シャーレを、ポリスチレンの容器内の水に浸した脱脂綿上においた。容器は、相対湿度を 100% 近くまで高めるために、換気孔のない蓋でとし、18 に設定したインキュベータ内に置いた。このような条件では、第 3 静止期の打破 (最終脱皮) は、24 h 抑制される (Suzuki et al., 2017)。つづいて、蓋をあげ、第 3 静止期の雌を、25、相対湿度 50% の条件に暴露すると、3 h 以内に最終脱皮が引き起こされる。このようにして育成した新しい雌成虫を、育成用容器内のインゲン初出葉に、ただちに移し、25 で 24 h 吸汁をさせた。この最終脱皮後 24 h 経過した雌成虫を、無酸素および低酸素処理の試験に利用した。

ハダニを用いた無酸素および低酸素試験

試験装置は、O₂ 濃度 0、0.5、1、2 および 21%の計 5 本のガスボンベ（バランスガス：N₂、CO₂ 濃度 0.05%）、圧力調整器、流量計、蒸留水を入れたガス加湿用ポリカーボネート製容器（1.0 L）、アクリル製容器（9.3 L）、蓋つきポリプロピレン製遠沈管（1.7mL）およびインキュベータ、温湿度センサ、O₂ 濃度センサ、データロガーおよび PC により構成される。ポリプロピレン製遠沈管の蓋部分には、8 mm の換気孔を作成し、ガス透過フィルムでとじた。細筆を用いて、20～25 個それぞれの遠沈管に、2 個体のナミハダニ雌成虫を入れた。遠沈管をチューブラックに並べた後、インキュベータ内で 25℃、暗黒化に設定したアクリル製容器に設置した。それぞれの O₂ 濃度のガスは、ガスボンベより、加湿用容器を介して、0.1 MPa、3 L min⁻¹ でアクリル製容器内に供給した。O₂ 濃度は、1 分ごとに測定し、記録した。

それぞれの O₂ 濃度のガスを供給している間、アクリル製容器の出口側バルブは開放し、容器内空気を入れ替えた。O₂ 濃度がそれぞれ 0、0.5、1、2 および 21%に達して 45 min 経過した後、出口側バルブを閉じ、遠沈管に入れたナミハダニ雌成虫を 25℃ で 24 h、無酸素または低酸素処理した。

処理終了後、直径 10 mm のインゲンマメリーフディスク上に移し、育成容器に入れた後、25℃、16 h d⁻¹ の通常大気下に設定したインキュベータ内で、7 日間育成した。リーフディスクは、2 日に 1 回交換した。顕微鏡を利用して、処理をしたナミハダニの生存率および繁殖能力を調査した。なお、リーフディスク上、または、脱脂綿上に移動したナミハダニは、リーフディスクから逃げ出したと判断し、生存率および繁殖能力の調査からは除外した。試験は 3 回反復した。

植物を用いた無酸素および低酸素試験

生存率のデータよりハダニの致死濃度を求めた後、13 日育成したインゲンマメ、20 日育成したキュウリおよび 23 日育成したトマトを用いて、致死濃度の条件が植物におよぼす影響を調べた。アクリル製容器内で 25℃、暗黒の条件下において、実生をハダニの致死濃度である O₂ 濃度または O₂ 濃度 21%で処理した。その後、実生を通常大気下に戻し、25℃、相対湿度 50%、明期 16 h d⁻¹、PPFD 200 μmol m⁻² s⁻¹ の条件下において、5 日間育成した。シュートの生体重量は、電子天秤で測定した。また、それぞれのシュートを 60℃ で 24 h 乾燥し、シュートの乾物重を求めた。

統計処理

生存曲線は、R の「survfit」機能を用いて、Kaplan-Meier 法により描画した。対照区とそれぞれの無酸素または低酸素条件との生存曲線の有意差は、R の「survdif」機能を用いて、log-rank 検定により解析した。50 および 95%の致死をもたらず O₂ 濃度（それぞれ、LC₅₀、LC₉₅）は、R の「LL.4」機能を用いて、処理後 8 日目の生存率のデータにもとづいて、4 パラメータロジスティック回帰により推定した。回帰式のあてはまり度合いは、R の「modelfit」機能を用いて、ANOVA モデルと比較した。処理区間における産卵数の差の有意性は、R の「pairwise.wilcox.test」を用いて、Bonferroni 修正をした Wilcoxon-Mann-Whitney 検定により検定した。対照区と低酸素処理区の生体重量および乾物重の差の有意性は、R の「t.test」機能を用いて、Student の t 検定により解析した。産卵数、生体重量および乾物重の結果は、R の「boxplot」機能を用いて、箱ひげ図としてあらわした。統計処理およびグラフの描画は、R (ver. 3.3.2, R Core Team, 2016) を用いて行った。

4. 研究成果

ナミハダニにおよぼす無酸素および低酸素の影響

対照区（O₂ 濃度 21%）と比べて、O₂ 濃度 0%（無酸素）および 0.5%（低酸素）で処理したナミハダニの生存率は、有意に低下した。無酸素処理 1 日後ではすべてのナミハダニは死亡したが、低酸素処理では、処理後 8 日経過しても 15%のナミハダニが生存していた。しかし、O₂ 濃度 1 および 2%で処理したナミハダニの生存曲線は、対照区のそれと同じであった。生存率より計算した無酸素または低酸素処理後 8 日目の LC₅₀ および LC₉₅ は、それぞれ 0.55%（95%信頼区間：0.15～0.95%）および 0.45%（95%信頼区間：0.03～0.86%）であった。

無酸素処理ではすべてのナミハダニは生存できなかったため、産卵数は低酸素処理または対照区の 8 日後に生存していたナミハダニのみ評価した。O₂ 濃度 0.5 および 1%で処理したナミハダニの産卵数は、対照区と比べて有意に低下した。それに対して、O₂ 濃度 2%で処理したナミハダニの産卵数には差が見られなかった。

植物におよぼす無酸素および低酸素の影響

ナミハダニ雌成虫の致死濃度である O₂ 濃度 0.5%で 24 h 処理したインゲンマメ実生の生体重量および乾物重は、処理後 5 日目において、対照区のそれと同じであった。しかし、低酸素処理したキュウリとトマトの生体重量および乾物重は、対照区と比べて有意に低下した。低酸素処理したインゲンマメおよびキュウリ実生では茎頂に、また、トマト実生では全体に、それぞれの対照と比較して、生理障害が認められた。

考察

本研究では、1気圧(約101 kPa) 25℃で24 h無酸素処理した場合、すべてのナミハダニは死亡した。この殺ダニ作用は、約80 kPaに減圧された脱酸素剤を利用した無酸素処理の場合と同じであった(Suzuki et al., 2015; Wang et al., 2016)。このことは、25℃で24 h処理した場合、全圧が21 kPaの範囲で変化しても、殺ダニ作用は同じであることを示している。O₂濃度0.5%で低酸素処理した場合、生存率は1日経過後40%にまで急激に低下したが、O₂濃度1および2%で低酸素処理した場合は、8日経過しても対照区と差は見られなかった。処理反応データより推定したLC₅₀およびLC₉₅は、それぞれ0.55および0.45%であった。この閾値は、Held et al. (2001)がN₂を用いたナミハダニを低酸素処理(O₂濃度0.2~1.4%)による殺ダニ効果の検証結果と一致した。

容器内のCO₂濃度を高めることにより、殺ダニ効果が得られることが知られている(Oyamada and Murai, 2013)この場合、空気の入れ替えにより、容器内におけるO₂濃度は8%まで低下している。このO₂濃度はLC₅₀の濃度よりも高いことから、高CO₂濃度が殺ダニ効果を発揮することを示唆している。高CO₂濃度による殺虫効果は、アザミウマでも知られている(Carpenter et al., 1996; Seki and Murai, 2012a, 2012b)。高CO₂濃度は、害虫の神経系に対する電子伝達阻害効果の結果として、麻酔効果を持つ(Nicolas and Sillans, 1989)。しかし、本研究では、CO₂濃度を大気と同等のレベルである0.05%に維持することで、CO₂の持つ殺ダニ効果を排除した。

低酸素処理(O₂濃度1%)による殺ダニ効果は認められなかったが、処理したナミハダニの産卵数は減少した。産卵数の大幅な低下は、0.5%で低酸素処理したナミハダニで認められた。同様に、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の産卵数は、低酸素処理(O₂濃度7.5~15%)により減少するが、7.5%の低酸素処理のみに生存率の低下が認められたとの報告(Peck and Maddrell, 2005)がある。

低酸素処理(O₂濃度0.5%、25℃)により殺ダニ効果は得られるが、植物の生理障害も発生した。生理障害の程度は、植物種により異なっていた。すべてのトマト実生は、低酸素処理で死亡した。インゲンマメとキュウリ実生では、初生葉は残ったものの、ネクロシスと成長点の発達阻害が発生した。その後、頂芽の代わりに、側芽が発達した(データ未掲載)。インゲンマメでは、低酸素処理による障害は、初生葉ほとんどが枯れてしまった12 hの無酸素処理(Suzuki et al., 2015)と比べて緩和された。

本研究では、殺ダニ効果があるが植物には重篤な生理障害を引き起こさないO₂濃度を明らかにするために、無酸素および低酸素がナミハダニおよびその宿主となる植物におよぼす影響を調べた。無酸素で12 h、25℃とした場合(Suzuki et al., 2015)と比べて植物に対する害が緩和されるO₂濃度(トマトを除く)である0.5%にまで低下させた場合、殺ダニ効果が認められた(25℃で24 h処理した場合)。呼吸におけるO₂要求性やその他の生理機構の違いにより、トマトと他の2種類の植物(インゲンマメおよびキュウリ)の間で生理障害の発生度合いに差が生じた可能性がある。気温を30℃にまで高めた場合、6 hの無酸素処理で十分な殺ダニ効果が得られる(Wang et al., 2016)ので、低酸素処理の期間を短縮する際に気温のような環境条件を変更することは、トマトのような低酸素に感受性の高い植物の生理障害を緩和するのに役立つかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Yamakawa, S., K. Ohyama, W. Yamori and T. Suzuki (2018): Effects of anoxia and hypoxia on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) *Applied Entomology and Zoology* 53:535–541 DOI: <https://doi.org/10.1007/s13355-018-0585-5>

〔学会発表〕(計 3件)

1. 山川颯太・大山克己・矢守航・鈴木文詞(2017)ナミハダニの低酸素応答、第26回日本ダニ学会
2. 山川颯太・鈴木文詞(2017)酸素濃度調節によるナミハダニ防除の検討、第61回日本応用動物昆虫学会大会
3. 王至弘, 細見亜耶佳, 鈴木文詞, 北嶋康樹, 後藤哲雄(2016)真空処理によるハダニおよびカブリダニの成虫に対する防除効果および給水の影響、第25回日本ダニ学会

〔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：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 丈詞
ローマ字氏名：Suzuki Takeshi
所属研究機関名：東京農工大学
部局名：農学研究科
職名：特任准教授
研究者番号（8桁）：60708311

研究分担者氏名：矢守 航
ローマ字氏名：Wataru Yamori
所属研究機関名：東京大学
部局名：理学系研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90638363

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。