ワタアブラムシに対する薬剤感受性検定法の違いが 検定結果に及ぼす影響

松浦 明^{1)2)†}

(¹⁾ 宮崎県総合農業試験場・²⁾ 九州大学大学院生物資源環境科学府)

Effect of different insecticide bioassay methods on mortality of *Aphis gossypii* Glover. Akira Matsuura^{1)2)†} (¹⁾Miyazaki Agricultural Research Institute, Miyazaki, Miyazaki 880-0212, Japan, ²⁾Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan)

ワタアブラムシの薬剤感受性検定には様々な手法が利用されているため、結果の相互比較が困難な状況である。統一的な薬剤感受性検定法の基準を検討するため、植物体浸漬法である Munger cell 法と幼苗処理法の検定結果の比較を行った。幼苗処理法はキュウリ幼苗、Munger cell 法はキュウリ成葉を用いて、イミダクロプリド、ニテンピラム、アクリナトリン、アセフェート、ピメトロジンに対するネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシ無翅雌成虫の感受性を調査した。イミダクロプリド2,000倍の補正死虫率は、Munger cell 法が6.7%であったのに対し、幼苗処理法では80.0%とかなり高かった。そこで各薬剤のLC₅₀値を比較した結果、Munger cell 法のLC₅₀値はそれぞれ204.41, 380.10, 0.42, 13.00, 1.97ppm、幼苗処理法では、30.57, 144.26, 0.16, 7.20, 0.74ppm となり、Munger cell 法は幼苗処理法より高い値を示した。したがって、抵抗性害虫の早期発見を目的に、常用濃度のみで検定を行う場合は、Munger cell 法が適していると考えられた。

Keywords : cotton aphid, LC₅₀, Munger cell method, neonicotinoid, seedling treatment method

緒 言

ワタアブラムシ (*Aphis gossypii* Glover) は多くの農作物を害する重要害虫である。本種は殺虫剤に対する抵抗性を発達させるため難防除害虫となっている。1980年代には有機リン剤やカーバメート剤 (浜, 1987), そして合成ピレスロイド剤 (西東, 1990) への強い抵抗性が確認されている。1990年代にアブラムシ類に卓効を示すネオニコチノイド剤が登場した後は、ネオニコチノイド剤やその他の薬剤への抵抗性発達は認められず、抵抗性問題は沈静化したようにみえた。しかし、2012年に宮崎県および大分県のピーマンとキュウリで採集されたワタアブラムシは、複数のネオニコチノイド剤に対して高い抵抗性を示し、実用的な防除効果の低下が認められた (岡崎, 2013; Matsuura and Nakamura, 2014)。

ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシに対する他系統の殺虫剤の殺虫効果が既に明らかにされていたことから、生産現場では代替薬剤による防除が可能となっている (松浦, 2015)。しかし、他系統の殺虫剤に対する抵抗性をも併せ持つワタアブラムシの出現が懸念されている。

殺虫剤抵抗性害虫の基幹防除剤に対する抵抗性レベルを正確に把握することは、効率的防除体系の構築と害虫の抵抗性管理において重要である。また、既知の代替薬剤の感受性を明らかにすることも、生産現場における被害拡大を防ぐための防除体系を構築する上で重要である。そのためには、対象害虫の抵抗性レベルを相対的に比較評価できる情報が必要である。

ワタアブラムシを含むアブラムシ類に対する薬剤の殺虫効果および薬剤感受性は、局所施用法 (西東ら, 1995; 西東, 2013) や虫体浸漬法 (浜, 1987) および植物体浸漬法 (熊本県, 2000; 岡崎, 2013; Matsuura and Nakamura, 2014) など、様々な生物検定法によ

† matsuura-akira@pref.miyazaki.lg.jp

り明らかにされてきた。局所施用法は、各殺虫剤の原体を用い、対象害虫の体重当たりの致死薬量を明らかにできるため、相互比較が可能である（竹内, 2013）。しかしながら、使用器材が高価であり、手法も簡便とは言いがたい。虫体浸漬法や植物体浸漬法は、局所施用法に比べ簡便であるが、検定薬剤として市販品を用いる上、検定環境により、虫体ならびに植物体への薬液の付着量が一定でない欠点がある（細辻, 1985）。このため、異なる試験機関で実施された検定結果の相互比較が困難な状況となっている。

ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの感受性調査では、植物体浸漬法である幼苗処理法（Matsuura and Nakamura, 2014）や Munger cell 法（岡崎ら, 2013）が利用されてきた。両手法は、局所施用法や虫体浸漬法より簡便なため、ワタアブラムシの薬剤抵抗性モニタリングに適していると考えるが、上述したような欠点（細辻, 1985）を持つため、両手法間で検定結果の差が生じる可能性が大きい。したがって、植物体浸漬法を用いて、ワタアブラムシの薬剤抵抗性の状況を効率的にモニタリングするためには、両手法の特性を明らかにし、検定薬剤に適した検定法や検定期間等の統一的な基準を示すことが必要である。

そこで本研究では、両手法の特性と各検定結果の比較を行い、ワタアブラムシの薬剤抵抗性をモニタリングするための手法としての適性を評価したので報告する。

本研究は、農林水産省委託研究プロジェクト「ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発（PRM2103）」により実施した。

材料および方法

1. 供試ワタアブラムシ

検定に使用したワタアブラムシは2012年に宮崎県串間市の冬春キュウリほ場から採集後、無翅胎生雌成虫1個体からキュウリを用いて累代飼育を行った系統を用いた。この系統はネオニコチノイド剤抵抗性であることを確認済みである（Matsuura and Nakamura, 2014）。なお、累代飼育中に殺虫剤の散布は行っていない。

2. Munger cell 法および幼苗処理法における各種殺虫剤の効力の違い（試験1）

供試薬剤はネオニコチノイド系のイミダクロプリド水和剤およびニテンピラム水溶剤、ピレスロイド系のアクリナトリン水和剤、有機リン系のアセフェート水和剤、ピメトロジン系のピメトロジン顆粒水和剤の5

剤を用いた。薬剤は5～6段階で倍量希釈した薬液を検定に供試した（第1表）。各希釈倍率とも1区10頭の3反復で実施した。

薬液処理は幼苗処理法（曾根ら, 1998 ; 熊本県, 2000）と Munger cell 法（Immaraju et al., 1992 ; 岡崎ら, 2014）に基づき、後述のとおり各薬液に植物体を浸漬した。幼苗処理法は、検定植物として播種6～8日後のキュウリ（品種：エクセレント節成2号）の幼苗を供試した。キュウリ幼苗は水道水を入れた管瓶（直径15mm高さ40mm）に根元を入れ、パラフィルム®で固定した。これを展着剤トリトン X-100（ポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル）2,000倍を添加した各薬液に10秒間浸漬した。風乾後、スチロール容器（直径42mm、高さ75mm、容量70ml）の蓋の中央に直径15mmの穴を1カ所あけ、管瓶を差し込み固定し、底面を切り取ったスチロール容器（側面にテトロンゴースで覆った直径6mmの穴4カ所を開けた）を、植物体に被せた。上部からワタアブラムシ無翅雌成虫10頭を接種し、開口部をパラフィルムで覆った。

Munger cell 法による検定は、下から順にアクリル板（5×7cm、厚さ2mm）、約1mlの水を滴下したクッキングペーパー（5×7cm）、薬液に10秒間浸漬・風乾した直径5cmのキュウリ葉片、その上に直径4cmの穴を開けたアクリル板（5×7cm、厚さ5mm）を重ねた検定容器を用いた。容器内の葉片上に無翅雌成虫を接種後、容器上にテトロンゴース（200メッシュ）を張った穴あきアクリル板（5×7cm、厚さ2mm、穴径4cm）をかぶせ、二方をクリップで固定した。なお、検定期間中はワタアブラムシ接種面を上に向けて静置した。

両手法とも無翅雌成虫を接種後、25℃ 16L8Dの条件下で静置し、イミダクロプリド、ニテンピラム、アクリナトリンおよびアセフェートは72時間後、遅効性薬剤であるピメトロジンは96時間後に実体顕微鏡下で生死の判定を行った。死虫率は Abbott（1925）の補正式を用いて求め、Probit 法により LC_{50} 値を算出した。検定法間の補正死虫率は、アークサイン変換後に一元配置分散分析（ANOVA）を用いて比較した。解析には統計解析ソフト R（version 2.15.1）を用いた。

3. Munger cell 法の供試葉片の上下方向が殺虫剤の効力に及ぼす影響（試験2）

Munger cell 法における供試虫の接種面の上下方向を変えた場合の LC_{50} 値を調査した。接種面が上の場合は、穴あき板の面が上を向き、供試ワタアブラムシが検定植物の上に存在する。下向きはその逆である。

第1表 Munger cell 法と幼苗処理法によって推定されたネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシに対する各種薬剤の LC₅₀値

系統 ^{a)}	供試薬剤	有効成分 (%)	検定濃度 (ppm)	希釈倍率 (倍)	LC ₅₀ 値 (ppm)		LC ₅₀ 値比 (倍) ^{b)}
					Munger cell 法	幼苗処理法	
ネオニコチノイド (4A)	イミダクロプリド水和剤	10	25 ~ 400	4,000 ~ 250	204.41	30.57	6.7
ネオニコチノイド (4A)	ニテンピラム水溶剤	10	25 ~ 400	4,000 ~ 250	380.10	144.26	2.6
ピレスロイド (3A)	アクリナトリン水和剤	3	0.0375 ~ 0.6	800,000 ~ 50,000	0.42	0.16	2.6
有機リン (1B)	アセフェート水和剤	50	0.78 ~ 25	640,000 ~ 20,000	13.00	7.20	1.8
ピメトロジン (9B)	ピメトロジン水和剤	50	0.3125 ~ 10	800,000 ~ 50,000	1.97	0.74	2.7

a) IRAC の分類に従った。b) LC₅₀値比 = Munger cell 法値 / 幼苗処理法値。

試験は2回行い、供試薬剤はイミダクロプリド水和剤を用いた。希釈倍率や Munger cell 法の試験手順は試験1と同様である。

結 果

1. Munger cell 法および幼苗処理法における各種殺虫剤の効力の違い (試験1)

各薬剤の補正死虫率は、イミダクロプリドでは250~2,000倍、ニテンピラムでは250倍および500倍、アクリナトリンでは5万倍および10万倍、ピメトロジンでは5万倍と40万倍で、補正死虫率に両手法間で有意差が認められた (第1図)。なかでも、イミダクロプリド2,000倍希釈では Munger cell 法の6.7%に対し、幼苗処理法が80.0%、ニテンピラムの500倍では Munger cell 法の20.0%に対し、幼苗処理法が66.7%と、Munger cell 法に比べて幼苗処理法の結果がかなり高くなった。これら以外でもニテンピラム4,000倍とアセフェートの20,000倍を除き、Munger cell 法より幼苗処理法の値が高かった。(第1図)。

推定された LC₅₀値は検定法によって大きく異なった。Munger cell 法の LC₅₀値は、ネオニコチノイド剤のイミダクロプリドが204.41ppm、ニテンピラムが380.10ppmであったのに対し、幼苗処理法では30.57ppmと144.26ppmと低かった。Munger cell 法の LC₅₀値は幼苗処理法より高い値を示し、幼苗処理法の値に対する Munger cell 法の値 (LC₅₀値比) は、それぞれの薬剤で6.7倍と2.6倍の差が認められた。他の3薬剤のアクリナトリン、アセフェート、ピメトロジンの3剤の LC₅₀値も Munger cell 法が幼苗処理法より高く、1.8~2.7倍の差が認められた (第1表)。

2. Munger cell 法の供試葉片の上下方向が殺虫剤の効力に及ぼす影響 (試験2)

ワタアブラムシの接種面を下に向けた場合の LC₅₀値は、1回目が72.2ppm、2回目が70.1ppmであった。

第2表 Munger cell 法のワタアブラムシ接種面の方向が LC₅₀値に及ぼす影響

供試薬剤	接種面の方向	LC ₅₀ 値 (ppm)	
		1回目	2回目
イミダクロプリド水和剤	下	72.2	70.1
	上	78.0	50.1

上に向けた場合は78.0ppmと50.1ppmとなり、接種面の上下方向の違いに大きな差は認められなかった (第2表)。

考 察

今回比較した Munger cell 法と幼苗処理法は、どちらも薬液に浸漬後風乾した検定植物にワタアブラムシを接種しており、基本的な手順は同じである。しかし、Munger cell 法の補正死虫率は、幼苗処理法より低く、LC₅₀値は幼苗処理法より高い値を示した。特にイミダクロプリドにおける両検定法の差は LC₅₀値比で6.7倍と大きく、ワタアブラムシでは類似の検定手法であっても、検定結果が異なることが明らかとなった (第1表)。

農業害虫の薬剤感受性の調査では、まず複数の薬剤の常用濃度における感受性を調査し、感受性低下が疑われる薬剤を対象に、LC₅₀値を求め抵抗性レベルを比較することが多い (例えばワタアブラムシでは、西東, 1990; 早田・大久保, 1992; アザミウマ類では、西ら, 2013; 岡崎ら, 2014など)。そのため、常用濃度での薬剤感受性を適切に把握することが、抵抗性害虫の早期発見には重要である。今回の試験においては、常用濃度である希釈倍率2,000倍の補正死虫率が、ニテンピラムでは Munger cell 法および幼苗処理法とも20%以下と低かったため、どちらの手法でも感受性低下を判定することが可能であった (第1図)。一方、イミ

ダクロプリドの補正死虫率は、Munger cell 法が6.7%と低かったのに対し、幼苗処理法は80.0%と高い死亡率を示した（第1図）。このため、常用濃度のイミダクロプリドの検定において、幼苗処理法ではネオニコチノイド剤に対する感受性低下を見逃す可能性が考えられる。このことから、抵抗性の早期発見を目的に、常用濃度のみで検定を行う場合は、Munger cell 法が幼苗処理法より適した手法であると考えられた。ただし、Munger cell 法では、検定開始72時間以降に葉片が稀に乾燥枯死し、試験が遂行できなかった事例が認められた。そのため、ピメトロジンのような96時間後以降に生死の判定を行う必要がある遅効性殺虫剤では、反復数を増やすなど、葉片の乾燥枯死対策が必要となる。72時間後までに判定する場合ではMunger cell 法を用い、遅効性薬剤の検定を実施する場合は、幼苗処理法を用いるなど状況に応じて使い分けることも重要と考えられる。

今回、手法により結果が異なった要因はいくつか考えられる。田中・浅野（1978）がハスモンヨトウ *Spodoptera litura* (Fabricius) 3 齢幼虫に対して行った葉片浸漬法と虫体浸漬法の比較では、アセフェート、プロチホス、PAPの3剤では葉片浸漬法より虫体浸漬法の死虫率が明らかに低かった。これはこの3剤が経皮毒性より経口毒性が高いことによるものと推察されている。つまり供試虫に対する各供試薬剤の作用性の違いが要因として挙げられる。しかし、今回ワタアブラムシについて検討した2つの手法は、どちらも植物体浸漬法であるため、供試薬剤の作用性は同等と考えられる。また、供試した5薬剤全てにおいて、Munger cell 法の LC_{50} 値の方が高かった。以上のことから、各薬剤の作用性が補正死虫率の違いに影響したとは考えられない。

次に両検定法の検定位置の高さの違いが影響したのではないかと考えた。幼苗処理法では接種位置が検定

第1図 Munger cell 法および幼苗処理法における各種殺虫剤の補正死虫率。

■はMunger cell 法、□は幼苗処理法を示す。*は両検定法の同一希釈倍率間で有意差があることを示す（アークサイン変換後一元配置分散分析、 $P < 0.05$ ）。

容器の底から約5cmの高さに存在する。そのため、このような試験状況では、検定濃度が致死濃度に至っていても、衰弱し検定植物から落下して、検定容器の底部で死亡したと考えられる個体が観察されることが多い。したがって、本法では死虫率が高く評価される傾向にあると考えられた。一方、Munger cell 法では、接種面を上に向けて検定した。この状態では、ワタアブラムシの下に、供試植物が存在するため、弱った個体でも吸汁が可能で試験期間内に死に至らないのではないかと考えられた。そこで試験2では、供試虫の接種面を葉の下側にして再検定を行った。上記の仮説が正しいのであれば、下側に接種したアブラムシは衰弱すると幼苗処理法同様に落下するため、上面に接種した場合より死亡率が高くなるはずである。しかし、Munger cell 法接種面の上下の差異は、死虫率に影響を及ぼさなかった。この要因としてMunger cell 法の高さが5mmと低く、落下したワタアブラムシの再寄生が可能となった可能性が考えられ、今後、高さを変えた条件で更に検討する必要がある。

今回、2種類の検定法の特性とその利用に関して注意すべき点が明らかになった。今後は他の検定法やワタアブラムシと同様に殺虫剤抵抗性が問題となっているモモアカアブラムシ *Myzus persicae* (Sulzer) での比較検討を実施し、アブラムシ類の統一的な検定条件を明らかにする必要がある。

引用文献

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18 : 265-267.
- 浜 弘司 (1987) アブラムシの薬剤抵抗性. 植物防疫 41 : 159-164.
- 細辻豊二 (1985) 最新農業生物検定法. 全国農村教育協会 (東京), pp. 240.
- Immaraju, J. A., T. D. Paine, J. A. Bethke, K. L. Robb and J. P. Newman (1992) Western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) resistance to insecticides in coastal California greenhouse. J. Econ. Entomol. 85 : 9-14.
- 熊本県農業研究センター (2000) ウリ科野菜幼苗を使用したワタアブラムシの薬剤感受性検定法. 九州農業研究成果情報 15 : 455-456.
- 松浦 明 (2015) 宮崎県におけるネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの発生. 植物防疫 69 : 92-96.
- Matsuura, A. and M. Nakamura (2014) Development of neonicotinoid resistance in the cotton aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) in Japan. Appl. Entomol. Zool. 49 : 535-540.
- 西 優輔・佐野敏広・高馬浩寿・田中律子・長森茂之 (2013) 岡山県の促成栽培ナスにおけるミナミキイロアザミウマ個体群に対する各種薬剤の殺虫効果. 九病虫研究会報 59 : 81-85.
- 岡崎真一郎 (2013) 近年大分県の夏秋ピーマンで多発生するワタアブラムシに対する各種薬剤の殺虫効果. 九病虫研究会報 59 : 108 (講要)
- 岡崎真一郎・大坪亮介・加藤幸太郎 (2014) 大分県の夏秋ピーマンにおけるミカンキイロアザミウマ個体群の薬剤殺虫効果とスピノサド感受性低下個体群の初確認. 九病虫研究会報 60 : 79-83.
- 西 東 力 (1990) ワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover の薬剤抵抗性. Ⅲ. 合成ピレスロイド剤抵抗性個体群の発生. 応動昆 34 : 174-176.
- 西 東 力 (2013) 野菜・花き害虫: アブラムシ類. 農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル (農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル編集委員会編). 日本植物防疫協会 (東京) : pp. 79-82.
- 西 東 力・浜 弘司・鈴木 健 (1995) ワタアブラムシ *Aphis gossypii* (Glover) の薬剤抵抗性クローンの各種薬剤に対する感受性と協力剤の影響. 応動昆 39 : 151-158.
- 曾根信三郎・牧 孝匡・岩谷宏司・大津悠一 (1998) キュウリ幼苗を用いたミナミキイロアザミウマの薬剤効力検定法. 応動昆 42 : 215-220.
- 早田栄一郎・大久保宣雄 (1992) 果樹アブラムシ類の薬剤抵抗性. 第2報. ワタアブラムシ野外個体群およびクローンの薬剤感受性. 九病虫研究会報 38 : 155-159.
- 竹内博昭 (2013) 局所施用法による薬剤感受性検定方法の構築～ミナミアオカメムシなどダイズを害するカメムシ類を対象として～. 農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル (農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル編集委員会編). 日本植物防疫協会 (東京) : pp. 43-47.
- 田中浩一・浅野勝司 (1978) 殺虫剤の効力評価試験法に関する研究. 第1報. ハスモンヨトウ幼虫に対する試験. 九病虫研究会報 24 : 121-122.

(2016年3月21日受領, 7月28日受理)