

線虫天敵糸状菌の培養物による
植物の線虫害軽減に関する研究

2014. 3.

東京農工大学大学院
生物システム応用科学府
生物システム応用科学専攻

渡 邊 貴 由

目次

第1章 緒言	-----4
1. 線虫について	-----4
2. 線虫を捕捉・寄生する糸状菌	-----4
1) 線虫捕捉菌と線虫寄生菌の定義	
2) 線虫捕捉菌および線虫寄生菌の歴史と分類	
3) 線虫捕捉菌の線虫捕捉方法と特徴	
4) 線虫寄生菌の線虫への寄生方法と特徴	
5) 線虫捕食菌や線虫寄生菌と土壤環境との関係	
6) 線虫捕捉菌および線虫寄生菌が産生する酵素	
3. 線虫捕捉菌、線虫寄生菌の線虫防除への試み	-----12
1) 線虫害抑止土壤について	
2) 線虫捕捉菌の生物防除に関する既存の研究	
3) 線虫寄生菌の生物防除に関する既存の研究	
4. 本研究の目的	-----16
第2章 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物に使用する線虫捕捉菌の単離	-----17
1. 概論	
2. 材料および方法	
1) 材料	
2) 方法	
3. 結果	
4. 考察	
第3章 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物に使用する線虫寄生菌の単離	-----24
1. 概論	
2. 材料および方法	
1) 材料	
2) 方法	
3. 結果	

4. 考察

第4章 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物を使用する際の指標となるネコブセンチュウ初期密度とナス収量の関係の解析 -----33

1. 概論

2. 材料および方法

1) 材料

2) 方法

3. 結果

4. 考察

第5章 植物の線虫害軽減を目的とした線虫寄生菌 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物のポット試験、無底ポットおよび圃場を用いた線虫害抑制効果の確認 -----46

1. 概論

2. 材料および方法

1) 材料

2) 方法

3. 結果

4. 考察

第6章 総合考察 -----73

第7章 総合摘要 -----78

引用文献 -----81

論文目録

第1章 緒言

線虫のうち、ネコブセンチュウなどの植物寄生性線虫は農業上、重要な害虫であり、その防除は作物の安定生産のためには不可欠である。また、土壌中には線虫の天敵微生物（線虫天敵微生物）が存在し、線虫を捕捉や寄生して資化し、土壌中の食物連鎖を構成している。これらの線虫天敵微生物を利用することで線虫を生物的に防除できる可能性があり、これらの生理生態を解明することは重要である。

1. 線虫について

線虫とは線形動物門に属する動物の総称であり、体は線状で、体長は数 mm 以下である（石橋 2003）。線虫は、動物や植物に寄生する寄生性線虫とそれ以外の自由生活性線虫（自活性線虫）に大別され、植物寄生性線虫にはネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウおよびシストセンチュウなどがあり、作物に被害を及ぼしている（石橋 2003）。植物寄生性線虫の作物への年間被害額は、世界中で 1000 億アメリカドルと推定されている（Oka ら 2000）。現在、線虫害を防除するために殺線虫剤が使用されているが、人や動物への健康被害および環境汚染が問題となり、使用禁止になった殺線虫剤もあり、殺線虫剤に替わる安全な線虫防除方法の探索が行われている（Oka ら 2000）。

2. 線虫を捕捉・寄生する糸状菌

1) 線虫捕捉菌と線虫寄生菌の定義

土壌中に生息する微生物の中には、線虫を捕捉・摂食する線虫捕捉菌と、線虫、卵またはシストに寄生し資化する線虫寄生菌が存在する（Barron 1977）。ただし、線虫捕捉菌と線虫寄生菌の区別は、明瞭ではなく、名称の定義も不確定である。ここでは、Barron（1977）の定めた区分に従い、線虫を捕捉する器官を菌糸に形成する糸状菌を「線虫捕捉菌」とし、捕捉器官を形成せず線虫、卵およびシストに寄生する糸状菌を「線虫寄生菌」と定義する。線虫捕捉菌や線虫寄生菌が、このような機能をどのように獲得してきたのか興味深い。

2) 線虫捕捉菌および線虫寄生菌の研究の歴史と分類

線虫捕捉菌の研究の歴史は古く、1852年に Fresenius により線虫捕捉菌の記載がある (Fresenius 1852)。その後、1870年に Voronin が線虫捕捉菌に形成された網状の器官を観察したが、その機能までは解明できなかった (Voronin 1870)。線虫捕捉菌の線虫捕捉作用は、1888年に Zopf によってようやく解明された (Zopf 1888)。一方、線虫寄生菌の発見は、線虫捕捉菌に比べて新しく、卵に寄生する糸状菌は、1960年代に Ellis により温室の土壌から発見された (Ellis ら 1962)。その後、様々な線虫寄生菌が単離された。このような線虫捕捉菌や線虫寄生菌について分類、生理、生態および生物防除への利用に関する研究がなされている (Barron 1977)。

線虫捕捉菌および線虫寄生菌の分類を表 1-1 と表 1-2 に示す。線虫捕捉菌は、子囊菌のオルビリア科、担子菌のヒラタケ科および所属不明のトリモチカビ科に属す (表 1-1)。

表 1-1. 線虫捕捉菌の分類

門	亜門	綱	目	科	属
子囊菌 Ascomycota	チャワタケ Pezizomycotina	ズキンタケ Leotiomycetes	ビヨウタケ Helotiales	オルビリア Orbiliaceae	<i>Arthrobotrys</i> <i>Dactylella</i> <i>Monacrosporium</i>
担子菌 Basidiomycota	ハラタケ Agaricomycotina	ハラタケ Agaricomycetes	ハラタケ Agaricales	ヒラタケ Pleurotaceae	<i>Hohenbuehelia</i> <i>Nematoctonus</i> <i>Pleurotus</i>
所属不明 Incertae sedis			トリモチカビ Zoopagales	トリモチカビ Zoopagaceae	<i>Stylopage</i>

線虫寄生菌は、子囊菌のマユハキタケ科、ビオネクトリア科、バツカクキン科、ネクトリア科、ニクザキン科およびオピオコルディシピタ科、担子菌類のヒラタケ科、ツボカビ門のツボカビ科および所属不明のゼンマイカビ科、トリモチカビ科およびメリスタクラ科に属している (表 1-2)。

表 1-2. 線虫寄生菌の分類

門	綱	目	科	属
子囊菌 Ascomycota	ユーロチウム菌 Eurotiomycetes	ユーロチウム Eurotiales	マユハキタケ Trichocomaceae	<i>Paecilomyces</i>
	フンタマカビ Sordariomycetes	ポタンタケ Hypocreales	ビオネクトリア Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>
			バツカクキン Clavicipitaceae	<i>Drechmeria</i> <i>Lecanicillium</i> <i>Pochonia</i> <i>Verticillium</i>
			ネクトリア Nectriaceae	<i>Nectria</i>
			ニクザキン Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>
			Ophiocordycipitaceae	<i>Haptocillium</i> <i>Harposporium</i> <i>Hirsutella</i> <i>Podocrella</i> <i>Purpureocillium</i>
担子菌 Basidiomycota	ハラタケ Agaricomycetes	ハラタケ Agaricales	ヒラタケ Pleurotaceae	<i>Hohenbuehelia</i> <i>Nematoctonus</i>
ツボカビ Chytridiomycota	ツボカビ Chytridiomycetes	ツボカビ Chytridiales	ツボカビ Chytridiomycetes	<i>Catenaria</i>
所属不明 Incertae sedis		トリモチカビ Zoopagales	ゼンマイカビ Cochlonemataceae	<i>Euryancale</i>
			トリモチカビ Zoopagaceae	<i>Rhopalomyces</i>
		ハエカビ Entomophthorales	Meristacraceae	<i>Meristacrum</i>

表 1-1 と表 1-2 は、現在の分類を基準に作成している (Gams・Zare 2001、Lopez-Llorca ら 2010a、Luangsa-ard ら 2011、Zare ら 2001) が、今後、遺伝子解析などの進展により変更される可能性がある。例えば、線虫捕捉菌の分類は、分生子の形、隔壁および大きさや分生子柄の先端の分岐や修飾により行われていた (Drechsler 1937) が、オルビリア科の線虫捕捉菌について、rDNA の ITS などの塩基配列を指標に再分類が検討されている。Hagedorn・Scholler (1999) によると、オルビリア科の線虫捕捉菌は、*Arthrobotrys*、*Dactylellina*、*Gamsyella* および *Drechslerella* の 4 つの属に分けられる。一方、Li ら (2005) は、オルビリア科の線虫捕捉菌を *Arthrobotrys*、*Dactylellina* および *Drechslerella* の 3 つの属に分けた。rDNA の ITS および β -tubulin 遺伝子の塩基配列により、*Gamsyella* に属していた線虫捕捉菌を *Arthrobotrys* または *Dactylellina* へ加え、*Gamsyella* は解体された (Li ら 2005)。一連の研究

の中で遺伝子配列による分類は捕捉器官の形態による分類に比較的近いことが示唆された (Hagedorn・Scholler 1999、Liら 2005)。

3) 線虫捕捉菌の線虫捕捉方法と特徴

線虫捕捉菌の菌糸には線虫を捕捉する器官 (線虫捕捉器官、線虫捕捉器などと呼ばれる。) が種に応じて形成され、捕捉器官には網状、分枝状、収縮環、非収縮環、球形で非収縮環などの形態がある (Barron 1977)。最も簡単な捕捉器官としては、*Stylopage* が形成する粘着性の分泌物に覆われた菌糸がある (Barron 1977)。Hagedorn・Scholler の提唱した区分では、*Arthrobotrys* では網状、*Dactylellina* では有柄の球形または非収縮環と有柄の球形、*Gamsylella* では無柄の球形または分岐状、*Drechslerella* では収縮環である (Hagedorn・Scholler 1999)。Liらの提唱した区分では、*Arthrobotrys* では網状もしくは無柄の球形、*Dactylellina* では有柄の球形または非収縮環と有柄の球形、*Drechslerella* では収縮環である (Liら 2005)。収縮環とは、線虫が侵入した瞬間、環を形成している3つの細胞が膨張し、線虫を捕獲する捕捉器官である (Barron 1977)。*Nematoctonus* は、有柄もしくは無柄の粘着性の球を有する菌糸を形成する (Barron 1977)。*Nematoctonus* および *Pleurotus* には、線虫の排泄物などにより線虫の存在を能動的に感知し、線虫に対する毒性物質または麻痺物質を産生し、線虫を不動化させた後で、栄養菌糸から感染菌糸を伸長させ、不動化した線虫の口腔もしくは肛門部から菌糸を侵入させ分解吸収するものもある (田場・諸見里 2000、Satouら 2008)。線虫捕捉菌は、捕捉した数時間後には線虫の表皮を破壊し、線虫体内に感染菌糸を侵入させ、24時間後には線虫体内に菌糸が蔓延し、内容物が資化される (Barron 1977)。線虫捕捉菌からセリンプロテアーゼが産生されることが知られており、感染に重要な役割を担っていると考えられる (Liら 2006)。線虫捕捉菌は、土壌や根圏中では腐生性であり、条件的寄生菌である (Barron 1977)。これらは、線虫もしくはアミノ酸やペプチドなどの有機物を感知して、捕捉器官を形成する (Barron 1977)。Pramer と Stoll によって捕捉器官形成誘導物質が発見され、“Nemin (ネミン)” と名づけられた (Pramer・Stoll 1959)。その後の研究で、様々なペプチドが捕捉器官形成を誘導することが認められ、バリンが含まれるジペプチドの誘導能力が高いことが分かった (Wootton・Pramer 1966)。しかしながら、バリンが含まれるペプチドの存在が必ずしも捕捉器官形成を誘

導するわけではなく、栄養状態によっても左右され (Barron 1977、Arevalo ら 2009)、*A. dactyloides* では貧栄養状態などの悪環境において多数の捕捉器官形成の誘導が生じたことから、線虫捕捉菌の捕捉器官形成において線虫の存在だけでなく、栄養が欠乏状態であることが重要である (Balan ら 1972)。

4) 線虫寄生菌の線虫への寄生方法と特徴

線虫寄生菌の線虫などへの感染は、菌糸、孢子および遊走子によって行われる。菌糸による感染としては、*Paecilomyces*、*Purpureocillium*、*Pochonia*、*Lecanicillium*、*Nectria*、*Trichoderma* および *Rhopalomyces* において認められる。菌糸による感染は、線虫卵を主に標的とする。線虫は雌雄異体で、交尾による有性生殖を行い、その受精卵は厚い卵膜 (ビテリン層、キチン層、脂質層) に包まれて、体外に産出される (石橋 2003)。卵の近くまで伸長した菌糸により卵殻の表層のビテリン層が分解され (Khan ら 2006、Hallmann ら 2009、Szabó ら 2012)、菌糸から産生されたセリンプロテアーゼ、キチナーゼによりビテリン層の下にあるキチン層と脂質層を分解し、感染する (Khan ら 2006、Hallmann ら 2009)。ネコブセンチュウではビテリン層が 10~40nm あり、キチン層も 400nm と厚い (Khan ら 2004)。線虫種によって土壌中での卵の存在形態が違い、ネコブセンチュウの受精卵はゼラチン状物質で覆われた卵塊となり土壌粒子に包まれて生存し (石橋 2003)、ネグサレセンチュウでは一まとめに産卵することなく一つまたは数個で排出され (Timper・Brodie 1993)、シストセンチュウでは雌成虫表皮がタンニン化したシストの中に卵が存在する (石橋 2003)。線虫の表皮はコラーゲンを主成分とする角皮で構成されており (中園 1992)、シストの殻は雌成虫の体表がタンニン化したものである (中園 1992)。そのため、線虫寄生菌が放出するセリンプロテアーゼにより多少は溶解するが、線虫への感染は肛門などの開口部から行われる (Khan ら 2006)。孢子による感染としては、孢子が線虫体表に付着し感染する方法と孢子が線虫に摂食され体内で発芽し感染する方法の 2 種類に大別される。前者に属する線虫寄生菌としては、*Clonostachys*、*Drechmeria*、*Haptocillium*、*Hirsutella* および *Nematoctonus* があり、粘着性の孢子が線虫の表皮に付着し、表皮を破壊し、体内に感染する (Barron 1977)。後者に属する線虫寄生菌としては、*Harposporium*、*Meristacrum* および *Podocrella* があり、孢子が線虫に摂食されることで感染する経口感染であり、植物寄生線虫は口針があるため、孢子が通

過できず、これらの線虫寄生菌に感染することはない (Barron 1977)。遊走子により感染する線虫寄生菌としては、*Catenaria* がある。遊走子が線虫の口腔もしくは肛門部に誘引され、侵入し寄生する。線虫体内に遊走子嚢が形成され、成熟すると表皮を破壊して遊走子が体外に放出される (Barron 1977、中園 1992)。線虫寄生菌は、土壌中では分生子、厚膜胞子や遊走子嚢中で生存しているものが多い (中園 1992)。

線虫寄生菌は、条件的寄生菌と絶対寄生菌に大別される。前者には、*Paecilomyces*、*Purpureocillium*、*Pochonia*、*Nectria*、*Trichoderma*、*Catenaria* および *Rhopalomyces* が属している。後者には、*Drechmeria* および *Hirsutella* が属している。ただし、どちらも線虫を感知するとセリンプロテアーゼ、キチナーゼなどの分解酵素を産生し、線虫の表皮を破壊して感染する (Hallmann ら 2009)。この寄生には分解酵素が関与していることから線虫以外の生物に対して病原性を発現する可能性もある。実際に *Purpureocillium lilacinum*、*Paecilomyces variotii*、*P. fumosoroseus* および *P. viridis* (= *Chamaeleomyces viridis*) が人間に対する病原菌 (皮膚などへの寄生) として報告されている (北見ら 2005)。また、*Nectria radicumicola* (= *Cylindrocarpon destructans*) は、作物の病原菌でもある一方、*Clonostachys rosea* は、灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) の拮抗菌としても知られる。線虫寄生菌である *Trichoderma atroviride* は、灰色カビ病菌 (*B. cinerea*) の存在下でキチナーゼ遺伝子の発現が確認されたとの報告もある (Klemsdal ら 2006) ので、キチナーゼが拮抗作用に関与している可能性がある。また、*P. lilacinum* がポリ塩化ビニルの資化菌として分離された報告もあり、*P. lilacinum* はプラスチックの分解菌としても期待されている (Pradeep ら 2013)。

5) 線虫捕食菌や線虫寄生菌と土壌環境との関係

線虫捕食菌や線虫寄生菌と土壌環境との関係について様々な調査がされている。線虫捕捉菌の生育については寒天培地上では生育適温が 25°C 付近にあり、最適 pH は線虫捕捉菌の種類により異なり、pH4.2 と pH7.0 の 2 箇所にあるものと pH4.2 付近にあるものがある (三井 1983)。一方、土壌中では、線虫捕捉菌の捕捉活性については 20°C で最も高く、網状の捕捉器官を形成する糸状菌の場合は、土壌 pH5.0~6.0 および pH7.1~7.5 で検出される確率が高まり、球状の捕捉器官を形成する糸状菌の場合は、pH6.25~6.8 以下で検出される確率が

高くなった(三井 1983)。線虫寄生菌では *Pochonia chlamydosporia* の場合、有機物が少ない土壌よりも有機物に富む土壌のほうがよく増殖するが、ネコブセンチュウ卵への寄生率には著しい違いがなかった(De Leij・Kerry 1991)。また、単離株によって土壌への定着性が違い、定着性が高いものほど線虫抑制効果が高いと考えられる(De Leij・Kerry 1991)。*P. lilacinum* のネコブセンチュウ卵への孵化阻害は、*P. lilacinum* の土壌への接種からネコブセンチュウ卵の接種までの時間的間隔および接種したネコブセンチュウ卵数とに有意差がなかったことから、*P. lilacinum* が接種された時点で孵化阻害が得られ、その孵化阻害効果がネコブセンチュウ卵密度に依存しないと考えられ、また、線虫が存在しない環境でも作物の根に害を及ぼすことなく根域に生残することが知られている(Anastasiadis ら 2008)。*Hirsutella rhossiliensis* の孢子形成は、温度、土壌 pH、土壌水分、土壌有機物に影響され、至適温度: 20~25°C、至適 pH: 5.5~7.0 であり、高有機物含量で高まる(Timper・Brodie 1993、Rui ら 2005)。テンサイシストセンチュウ (*Heterodera schachtii*) への寄生率は、粗砂よりも壤土の方が高かった(Rui ら 2005)。また、*H. rhossiliensis* の定着や活性も土壌 pH に影響される(Rui ら 2005)。鶏糞堆肥、牛糞堆肥施用では堆肥施用により増殖した微生物との競合に負け、*H. rhossiliensis* の線虫への寄生は高まらなかった(Hildaldo-Diaz・Kerry 2010)。

6) 線虫捕捉菌および線虫寄生菌が産生する酵素

線虫捕捉菌および線虫寄生菌が産生するセリンプロテアーゼについても研究がされており、セリンプロテアーゼが感染に重要な役割を担っていることが明らかになった(Khan ら 2006、Li ら 2006、Hallmann ら 2009)。線虫の表皮は厚い柔軟性のある外骨格であり、コラーゲンなどのタンパク質により構成されており、セリンプロテアーゼによって表皮が破壊され、感染する(Li ら 2006)。また、線虫寄生菌から産生されたセリンプロテアーゼにより線虫の卵殻にある脂質層が溶解され、線虫寄生菌は線虫卵に感染する(Khan ら 2006、Hallmann ら 2009)。セリンプロテアーゼとは、活性部位にセリン残基のあるプロテアーゼであり、代表的なものにトリプシン、キモトリプシン、トロンビン、プラスミンおよびエラスターゼなどがある(今堀・山川 1984)。活性部位には、セリンのほかにアスパラギン酸とヒスチジンが共通に存在する(今堀・山川 1984)。セリンプロテアーゼには一次構造や立体構造上の類似が見られ

ることから進化的には一群の酵素であろうと考えられている（今堀・山川 1984）。線虫捕捉菌 *A. oligospora* のセリンプロテアーゼ PII の特徴は、線虫寄生菌の産出するセリンプロテアーゼに比べて、分子量が 35 kDa および 38 kDa と大きく、*pI* が 4.6 および 4.9 と低いことである（Li ら 2006）。Soares ら（2013）は、産生条件の違う *Monacrosporium sinense* のプロテアーゼを自活性線虫 *Panagrellus redivivus* に供試し、致死率を調査したところ、プロテアーゼ産生条件のうち、水分、温度、グルコース濃度、イーストエキス濃度および分生子数の違いは *P. redivivus* の致死率に影響を与えず、一方、*pH* および培養時間について致死率において有意差があったことを報告している。一方、菌糸を用いて線虫に感染する線虫寄生菌である *P. chlamydosporia*、*P. suchlasporia*、*P. lilacinum* および *L. psalliotae* の産生するセリンプロテアーゼは、分子量が 32~33 kDa、*pI* が 10.2 であり、線虫捕捉菌のセリンプロテアーゼと生化学的特長が違う（Li ら 2006）。また、*Pochonia rubescens* および *P. chlamydosporia* からはそれぞれ分子量 32 kDa のアルカリセリンプロテアーゼ P32 および VCP1 が産生され、卵殻が溶解される（Lopez-Llorca ら 2010a）。また、胞子を用いて線虫に感染する線虫寄生菌である *Clonostachys rosea* からは 2 種類のセリンプロテアーゼ（PrC および Lmz1）が検出された（Li ら 2006）。PrC は、他の線虫寄生菌のセリンプロテアーゼに類似があった（Li ら 2006）。PrC、Lmz1 とも分子量が 33 kDa、至適温度が 60°C であったが、*pI* が違った（Li ら 2006）。また、*P. lilacinum* のプロテアーゼ活性は、ビテリン、キチンおよびニワトリ卵黄を液体培地に添加することで高くなり、液体培地にタンパク質を添加することでプロテアーゼ産生が誘導されることが示唆された（Khan ら 2003）。線虫寄生菌は、前述のプロテアーゼおよびキチナーゼが寄生の鍵となる（Atkins ら 2003a）。また、*P. lilacinum* から精製したセリンプロテアーゼを処理したところ、卵殻の脂質層がなくなり、ビテリン層の分解が観察され、また、ジャワネコブセンチュウ卵の発育の停止、孵化率の低下が起きたとの報告もある（Khan ら 2004）。線虫に対する運動性阻害に関しては、*C. rosea* 培養液から精製したセリンプロテアーゼよりも精製前の画分の方が線虫の運動性阻害効果が高かったことから、セリンプロテアーゼ以外の要因も運動性阻害に関与していることが示唆された（Li ら 2006）。

P. lilacinum の産生するキチナーゼは *pH* 3~6 の領域で活性が高くなり、37~50°C の領域で活性が高くなった（Khan ら 2003）。また、これらの分解酵素の分解力は、単離株によって違い、寄生率に影響する（Freitas ら 1995、

Hallmann ら 2009、Lopez-Llorca ら 2010b)。Freitas ら (1995) が行った室内試験において Cayrol や Jatala が単離した菌株のジャワネコブセンチュウ卵への寄生率が 100%であったのに対し、Castro が単離した菌株の寄生率は 2~9%であった。同様に、Dallemole-Giaretta ら (2012) もブラジルで単離した *P. clamydosporia* 単離株の厚膜胞子を接種した温室内試験においてジャワネコブセンチュウ卵への寄生率が単離株によって違いがあることを報告している。また、Regaieg ら (2011) も *V. leptobactrum* についても単離した株にジャワネコブセンチュウ卵への寄生率が異なることを報告している。*P. clamydosporia* のキチナーゼ産生は、グルコースなどにより抑制され、卵塊により促進されたことから、土壌中に資化しやすい物質が存在すると卵への寄生率が低くなる可能性がある (Anastasiadis ら 2008)。また、ネコブセンチュウ卵を包んでいるゼラチン様物質が線虫寄生菌の寄生を妨げているとする報告がある一方、*P. lilacinum* の感染が卵と卵塊で変わらないとする報告もある (Anastasiadis ら 2008)。

これらの研究をまとめると、線虫捕捉菌や線虫寄生菌は、線虫もしくは線虫卵の存在を認識してセリンプロテアーゼやキチナーゼを産生する傾向にある。また、線虫や線虫卵が存在しない場合でも線虫表皮を構成するコラーゲンやタンパク質、線虫卵を構成するキチンもしくはキトサンにより分解酵素の産生が誘導されることから、コラーゲンやキチンなどを土壌に施用することで線虫捕捉菌や線虫寄生菌の線虫への防除効果が高まる可能性がある。

3. 線虫捕捉菌、線虫寄生菌の線虫防除への試み

1) 線虫害抑止土壌について

特定の土壌病害について土壌の種類により発病を抑止する土壌があり、特に顕著に抑制する土壌は「発病抑止土壌」として知られている (日本土壌協会 2013)。同様の現象が線虫についてもあり、線虫害が発生しない、もしくは発生が軽微となる「線虫害抑止土壌」がしばしば認められる (Pyrowolakis ら 2002、Hallmann ら 2009、豊田 2011、Bao ら 2013)。線虫密度の減少に線虫捕捉菌や線虫寄生菌が関与していることが知られており (中園 1992、日本土壌協会 2013)、「線虫害抑止土壌」から線虫捕捉菌や線虫寄生菌が分離された報告もある (De Leij・Kerry 1991、Pyrowolakis ら 2002、Hallmann

ら 2009、豊田 2011、Yang ら 2012)。ラッカセイ圃場および施設栽培圃場のうち、線虫捕捉菌の検出の高い土壌では植物寄生性線虫の増殖率あるいは密度が低い傾向にあり、畑土壌における線虫捕捉菌量は、総線虫密度が高いときに大きい傾向が見られる(三井 1983)。土壌中の線虫捕捉菌や線虫寄生菌の活性には餌となる線虫の密度が影響していると考えられ(Hildaldo-Diaz・Kerry 2010)、線虫捕捉菌が堆肥施用した土壌から検出されやすく、自活性線虫密度が高いと線虫捕捉菌数が高くなるとの報告がある(中園 1992)。さらに、圃場の土壌表面に有機物マルチをすることで自活性線虫数が増加し、それともない線虫捕捉菌数が増大し、結果としてネグサレセンチュウが減少した報告もある(Stirling ら 2011a、2011b)。同様に、液体豚糞尿施用によりダイズシストセンチュウの二期幼虫の密度が低下した原因として、液体豚糞尿を施用することで、揮発性脂肪酸などの殺線虫物質が供給されるとともに線虫を餌にする微生物(線虫捕捉菌や線虫寄生菌)の活性が上がったことが考えられた(Bao ら 2013)。また、線虫感受性作物の連作により植物寄生性線虫が増殖することで、線虫の天敵も増殖し「線虫害抑止土壌」になったとの報告もある(Hildaldo-Diaz・Kerry 2010)。同様にテンサイシストセンチュウによる作物被害が連作により一旦激しくなった後、被害が減少するといった例が観察された(日本土壌協会 2013)。また、線虫捕捉菌は、土壌中で線虫以外にダニやワムシなどの土壌生物を捕捉する(Abiko ら 2005)ので、これらの土壌動物相も線虫捕捉菌の生育に影響を及ぼしている可能性があり、線虫捕捉菌は土壌生物の食物連鎖の中で重要な位置を占めていると考えられる。これらの「線虫害抑止土壌」での線虫抑制機構に関する知見は、線虫害を防除する手段に利用できる可能性が高い。

2) 線虫捕捉菌の生物防除に関する既存の研究

線虫捕捉菌の生物防除への応用試験は、Linford が初めて行った(Linford 1937)。パイナップル葉残渣をネコブセンチュウ汚染土壌に添加し、線虫と線虫捕捉菌密度の推移を観察したところ、パイナップル葉残渣添加により自活性線虫密度が一時的に増加したことで、線虫捕捉菌の活性が高まり、その後、自活性線虫密度が初期密度よりも低下した(Linford 1937)。同時に植物寄生性線虫密度も低下したために、線虫害が軽減された(Linford 1937)。これは、有機物マルチによる線虫害抑止機構と同じである。次に、Linford・Yap (1939)

は、線虫捕捉菌 *Arthrobotrys*、*Dactylella* をパイナップル畑に接種したが、線虫害の抑制効果は小さかった。線虫捕捉菌の接種試験において線虫害抑制が認められない原因として以下のことが挙げられる。まず、接種した線虫捕捉菌は、土壤中で他の土壤生物との競合に弱いことが考えられる。また、線虫への栄養的な依存度が低く、接種した線虫捕捉菌が線虫を捕捉し続けるとは限らないと考えられる。さらに、線虫捕捉菌密度と捕捉活性の関係も重要な要素であると考えられるが、*Dactylella haptotyla* は相関があるが、*A. oligospora* は相関がないので、用いる菌種の特性に注意する必要がある。線虫捕捉菌は、捕捉器官に迷い込んだ線虫を捕捉することから捕捉する線虫に選択性がなく、また、線虫防除にとって要である卵やシストのような運動性のない状態の線虫は、捕捉されにくいいため、防除効果が低くなってしまう。したがって、線虫捕捉菌の接種では植物寄生性線虫の生物防除は難しいと考えられる。ただし、「線虫害抑止土壌」に線虫捕捉菌が高い密度で存在すると考えられるとの報告もあり (Hildaldo-Diaz・Kerry 2010)、また、線虫捕捉菌は堆肥を投入することで活性化することが知られており、その効果は、他の堆肥に比べて窒素含量が高い鶏糞堆肥で著しく増大し、鶏糞堆肥中の窒素の無機化過程において土壤中の自活性線虫数が増大した結果、これらを餌とする線虫捕捉菌が活性化したとの知見もある (Wachira ら 2009)。このため、線虫捕捉菌の接種ではなく、自活性線虫数を操作して線虫捕捉菌に適した土壤環境を提供することで、土着の線虫捕捉菌を活性化させ、植物寄生性線虫を防除できる可能性がある。

線虫捕捉菌の実用、市販化は、1978年に Gayrol らによりマッシュルーム栽培のキノコセンチュウ (*Ditylenchus myceliophagus*) 防除を目的とした *A. robusta* が最初である (西沢 1988)。翌 1979 年にはネコブセンチュウ防除を目的とした *A. tortor* (= *A. irregularis*) が実用、市販化となり、国際的にも注目されたが、国内で行われた *A. tortor* の効果試験では、防除効果は認められなかった (西沢 1988)。日本での線虫捕捉菌の微生物資材としては、エムシー・ファーティコム株式会社の線虫捕捉菌 *Monacrosporium phymatopagum* を用いた生物農薬「ネマヒトン」があったが、販売量が少なく、登録を維持することが経済的に困難と判断したため、2013 年 4 月 9 日に農薬登録が失効になった (農林水産消費安全技術センター 2014)。生物農薬「ネマヒトン」については、1981 (昭和 56) 年に研究開発を開始し、1984 (昭和 59) 年から 1985 (昭和 60) 年に日本葉たばこ技術開発協会が試験を実施した結果、線虫防除効果が有効であり、作物安全性が高いことが認められ、1990 (平成 2) 年 7 月か

らタバコのサツマイモネコブセンチュウを対象とした生物農薬として販売を始めた。2001（平成13）年にトマト、2003（平成15）年にミニトマトに適用拡大登録された。ただし、「ネマヒトン」は、コストが極めて高く、劇的な防除効果に乏しかった（水久保・津田 2010）ので、普及が進まなかった。したがって、このような微生物資材を普及するためには、低コストでなければならない。

3) 線虫寄生菌の生物防除に関する既存の研究

線虫寄生菌の生物防除への応用試験は、*Paecilomyces*、*Purpureocillium*、*Pochonia*、*Hirsutella* および *Trichoderma* を用いて主に行われている。*Paecilomyces*、*Purpureocillium*、*Pochonia* および *Trichoderma* は、卵に主に寄生する条件的寄生菌であり、*Hirsutella* は、幼虫や成虫に寄生する絶対寄生菌である。絶対寄生菌は、条件的寄生菌に比べて線虫に対して影響が大きいので、線虫害抑制に寄与できると考えられるが、絶対寄生菌の栄養源は、線虫に限られ、土壌中において増殖は期待できず（Hildaldo-Diaz・Kerry 2010）、絶対寄生菌は生物防除に使用する微生物として適さないと考えられる。条件的寄生菌 *P. lilacinum* および *P. chlamydosporia* は、生物防除資材として試験された線虫寄生菌である。これらの菌は世界中に生息している普遍的な菌である（Hallmannら 2009）。これらを培養した培養物による線虫害抑制効果判定試験において効果があるものもあり、一部は商品化されている（Hallmannら 2009）。

線虫寄生菌の実用、市販化は、*P. lilacinum*、*P. chlamydosporia* および *Trichoderma* の菌株で行われた（Hallmannら 2009）。*P. lilacinum* では、ドイツの Prophyta 社の「BioActWG」、南アフリカの BCP 社の「BCP」があり、*P. chlamydosporia* では、キューバの「KlamiC」がある（Hallmannら 2009）。また、*Trichoderma* では、イスラエルの「BioNem」（Sikoraら 2000）、アメリカの「T-22□Planter Box」（Bennettら 2009）がある。「BioActWG」は、*P. lilacinum* 251 株の孢子（ 10^{10} conidia/g）を製剤化したものであり、資材の組成は、*P. lilacinum* 251 株の孢子 6%、スキムミルク粉末 6%、グルコース 78% および水 10% である（Anastasiadisら 2008）。線虫抑制効果を高めるためにオイルケーキ、葉や種の残渣などの有機物との併用試験や分解酵素を増大させる遺伝子組換え、他の微生物資材や太陽熱処理との併用試験も行われており（Hewlett 1988、Freitasら 1995、Siddiquiら 2000、Anastasiadisら 2008、Hallmann

ら 2009、Hildaldo-Díaz・Kerry 2010、Lopez-Llorca ら 2010b、Wang ら 2010、Hashem・Abo-Elyousr 2011)、また、*P. chlamydosporia* は根こぶ内の卵に寄生できないことから他の防除法との併用試験も行われている (Atkins ら 2003a)。

しかし、気候や土壌環境および植物寄生性線虫の種類が異なるので、海外から微生物資材を輸入し圃場に散布しても、微生物資材に含まれる微生物の土壌への定着が難しく、線虫害抑制効果を発揮しにくいかもしれず、微生物資材に使用する微生物は土着菌が望ましいとの指摘がある (Affokpon ら 2011)。したがって、「BioActWG」などの海外製の微生物資材が海外事例と同様の結果が日本で得られるとは限らず、日本国内で使用する場合には国内で単離した微生物を使用した方がよい。

4. 本研究の目的

本試験の目的は、線虫に対して寄生もしくは捕捉作用の強い糸状菌 (線虫天敵微生物) を日本国内の線虫害抑止土壌および生産者圃場の土壌などから単離することおよび線虫天敵微生物の培養物による線虫害抑制効果を室内試験ならびに圃場試験で確認することである。

第2章 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物に使用する線虫捕捉菌の単離

1. 概論

線虫捕捉菌は、子囊菌のオルビリア科、担子菌のヒラタケ科および所属不明のトリモチカビ科に属し、線虫捕捉菌の菌糸には、網状、分枝状、収縮環、非収縮環、球形で非収縮環などの形態の線虫を捕捉する器官が種に応じて形成される（Barron 1977）が、線虫がいない環境では捕捉器官が形成されない場合が多い（日本線虫学会 2004）。線虫捕捉菌は、捕捉した数時間後には線虫の表皮を破壊し、線虫体内に感染菌糸を侵入させ、24 時間後には線虫体内に菌糸が蔓延し、内容物が資化される（Barron 1977）。

線虫捕捉菌の単離法には土壌を直接寒天ペトリ皿に撒く方法、土壌懸濁液を濾紙で濾過し濾紙を寒天ペトリ皿に載せる方法やオートクレーブ滅菌した後に土壌に埋めたアマ茎を寒天ペトリ皿に載せる方法がある（三井 1983、日本線虫学会 2004）。これらの方法の問題点は、以下の通りである。1. 土壌に存在する線虫捕捉菌以外の微生物の影響が大きく、培養時に寒天ペトリ皿上に雑菌が蔓延し、目的とする線虫捕捉菌の検出が困難になる。2. 培養期間が 4~6 週間と長く、効率性に欠ける。これらの問題点を解決するために、本研究では線虫捕捉菌の単離に二層遠沈浮遊法を併用した。二層遠沈浮遊法とは線虫を土壌から分離する方法の一つで、比重液を用いた遠心分離法である（日本線虫学会 2004）。線虫分離の際によく用いられるベルマン法との最大の違いは、死亡した線虫も分離できることである（日本線虫学会 2004）。また、遠心分離と篩い分けすることで土壌粒子や土壌有機物も除去され、線虫のみが存在する溶液を得ることができる。したがって、二層遠沈浮遊法をもちいることにより、線虫捕捉菌に捕捉され死亡した線虫が得られやすくなるといえる。この死亡した線虫を含む線虫懸濁液を用いることで、土壌そのものを使用した場合に比べて他の土壌微生物の影響が低くなり、培養期間が短縮できる可能性がある。なお、二層遠沈浮遊法は、伊藤賢治氏（北海道農業研究センター）より教わった簡易法で実施した。

2. 材料および方法

1) 材料

供試土壌は、北海道沙流郡・トマト圃場、青森県青森市・ネギ圃場、青森県青森市・ハウレンソウ圃場、青森県南津軽郡・トマト圃場、秋田県山本郡・トマト圃場、山形県庄内市・施設栽培隔離土壌、山形県天童市・トマト圃場、山形県天童市・メロン圃場、山形県最上郡・水田、宮城県黒川郡・ハウレンソウ圃場、茨城県石岡市・トルコキキョウ圃場、茨城県土浦市・ダイコン圃場、群馬県吾妻郡・キャベツ圃場、新潟県新潟市・トマト圃場、静岡県伊豆市・ゴルフ場、静岡県菊川町・チャ圃場、静岡県静岡市・チャ圃場、愛知県知多郡・ダイコン圃場、京都府京田辺市・チャ圃場、兵庫県神戸市・軟弱野菜圃場、鹿児島県出水市・ミニトマト圃場、長崎県大村市・キュウリ圃場、長崎県大村市・トルコキキョウ圃場、熊本県熊本市・ナス圃場、熊本県熊本市・ピーマン圃場、鹿児島県鹿谷市・イチゴ圃場、鹿児島県霧島市・タバコ圃場、鹿児島県曾於市・メロン圃場およびタイ CHACHOENGSO 市未耕地土壌である。なお、供試土壌のうち、愛知県知多郡・ダイコン圃場は、線虫害抑止土壌である（豊田 2011）。

また、供試堆肥は、豚糞堆肥（（有）レクスト・宮崎県えびの市）、牛糞堆肥（自家堆肥・茨城県つくば市）、馬糞堆肥（大井競馬場・東京都品川区）、汚泥（茨城白菜組合・茨城県古河市）である。

試薬は、すべて一級以上のものを使用した。

2) 方法

50mL 容プラスチック製ファルコンチューブに 40%シヨ糖液 15 mL を入れ冷凍庫に入れ凍結させた後、予め冷却しておいた水道水 5mL を重層し、冷凍庫で凍結させた。次に、土壌または堆肥 10g をファルコンチューブの凍結した氷の上にのせた。つぎに水 15 mL を加え、ファルコンチューブの蓋を締め、30 秒間手で水平振とうし、土壌懸濁液を作成した。湯煎で氷を溶かした後、遠心分離（3000rpm・1 分間）した。65 μ m と 25 μ m の篩を重ね、50 mL 容プラスチック製ファルコンチューブ内の溶液を注ぎ込み、65 μ m の上にある残さを洗ビンで洗いそそぎ、25 μ m の上の線虫を洗ビンで集め、ガラス製試験管に移し、数時間静置した。次に、ガラス製試験管内の水を約 1mL となるまでガラス製スポイトを用いて捨て、下層の水 約 1mL を 1%素寒天培地に塗布した。インキュベーター内で培養（25 $^{\circ}$ C・1 週間）した後、実体顕微鏡（オリンパス）を用いて線

虫捕捉菌の存在を観察し、線虫捕捉菌の分生子を無菌的に 0.03%コロイダルキチン培地に植菌して単離した。0.03%コロイダルキチン培地の組成は、コロイダルキチン 0.3g/L、 K_2HPO_4 0.7g/L、 KH_2PO_4 0.3g/L、 $MgSO_4$ 0.5g/L、 $FeSO_4$ 0.01g/L、 NH_4NO_3 0.3g/L、寒天 15g/L である。

3. 結果

供試した土壌のうち、茨城県土浦市・ダイコン圃場、新潟県新潟市・トマト圃場、愛知県知多郡・ダイコン圃場、京都府京田辺市・チャ圃場、長崎県大村市・キュウリ圃場、長崎県大村市・トルコキキョウ圃場、熊本県熊本市・ナス圃場および鹿児島県曾於市・メロン圃場から線虫捕捉菌が検出された(表 2-1)。堆肥からは線虫捕捉菌は分離されなかった。単離した線虫捕捉菌は、捕捉器官の形態からすべて *Arthrobotrys* であった。単離した線虫捕捉菌のうち、生育が旺盛な *Arthrobotrys* sp. TF006 を大量培養に供試した。また、*Arthrobotrys* sp. TF001、*Arthrobotrys* sp. TF003 および *Arthrobotrys* sp. TF006 については独立行政法人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センターに寄託した。株式会社テクノスルガ・ラボによる試験結果では、*Arthrobotrys* sp. TF006 の ITS-5.8S rDNA 塩基配列は、アポロン DB-FU および国際塩基配列データベースに対する相同性検索の結果、*Arthrobotrys oligospora* Fresen. と推定され(96.5~99.5%)、分生子の形態から *A. oligospora* と確認された(写真 2-1、2-2、表 2-2、2-3)。



写真 2-1. 単離された線虫捕捉菌 *Arthrobotrys oligospora* TF006

供試土壌から二層遠沈浮遊法を用いて抽出した線虫懸濁液 約 1 mL を 1%素寒天培地に塗布し、インキューベーター内で培養(25°C・1週間)した後、実体顕微鏡(オリンパス)を用いて観察した。捕捉器官(T)の形態から *Arthrobotrys* 属と判明した。



写真 2-2. 単離された線虫捕捉菌 *Arthrobotrys oligospora* TF006 の分生子
Arthrobotrys oligospora TF006 を 0.03% コロイダルキチン培地に植菌し、インキュベーター内で培養
 (25℃・1 週間) した後、生物顕微鏡 (オリンパス BH-2) を用いて観察した。分生子 (S) の形態などか
 ら *Arthrobotrys oligospora* と同定した。

表 2-1. 単離した線虫捕捉菌

名称	分離した圃場	特許生物寄託センター 寄託番号
<i>Arthrobotrys</i> sp. TF001	茨城県土浦市・ダイコン圃場	FERM P-19282
<i>Arthrobotrys</i> sp. TF002	長崎県大村市・キュウリ圃場	
<i>Arthrobotrys</i> sp. TF003	熊本県熊本市・ナス圃場	FERM P-19283
<i>Arthrobotrys</i> sp. TF004	京都府京田辺市・チャ圃場	
<i>Arthrobotrys</i> sp. TF005	鹿児島県曾於市・メロン圃場	
<i>Arthrobotrys</i> sp. TF006	長崎県大村市・トルコキキョ ウ圃場	FERM P-19284
<i>Arthrobotrys</i> sp. TF007	新潟県新潟市・トマト圃場	
<i>Arthrobotrys</i> sp. TF008	愛知県知多郡・ダイコン圃場 (線虫害抑止土壌)	

表 2-2. アポロン DB-FU BLAST 検索結果. *Arthrobotrys* sp. TF006 の ITS の塩基配列と上位の塩基配列との相対率 (株式会社テクノスルガ・ラボによる試験結果)

登録名	株名	Accession No.	相対率	BSL
<i>Arthrobotrys javanica</i>	CBS534.63	U51947	478/529 (90.4%)	
<i>Monacrosporium thaumasium</i>	CBS176.37	U51972	470/529 (88.8%)	
<i>Monacrosporium eudermatum</i>	CBS770.85	U51975	464/522 (88.9%)	
<i>Monacrosporium eudermatum</i>	CBS769.85	AF106530	463/527 (87.9%)	
<i>Arthrobotrys thaumania</i>	CBS322.94	AF106526	463/530 (87.4%)	
<i>Monacrosporium eudermatum</i>	CBS377.97	AF106528	468/526 (89.0%)	
<i>Duddingtonia flagrans</i>	CBS565.50	U51961	464/468 (92.7%)	
<i>Arthrobotrys musiformis</i>	CCRC32665	U51948	463/528 (87.7%)	
<i>Arthrobotrys cladodes</i>	CBS433.81	U51952	463/528 (87.7%)	
<i>Arthrobotrys cladodes</i>	CBS433.81	U51945	463/528 (87.7%)	
<i>Arthrobotrys superba</i>	CBS109.52	U51949	461/529 (87.1%)	
<i>Monacrosporium elegans</i>	CBS300.94	AF106522	459/525 (87.4%)	
<i>Arthrobotrys botryospora</i>	CBS321.83	U51955	453/527 (86.0%)	
<i>Dactylella gampsospora</i>	CBS127.83	U51960	452/524 (86.3%)	
<i>Monacrosporium lobatum</i>	CBS329.94	AF106524	434/530 (81.9%)	
<i>Monacrosporium arcuatum</i>	CBS174.89	AF106527	441/528 (83.5%)	
<i>Monacrosporium leptosporum</i>	CBS560.92	AF106529	444/525 (84.6%)	
<i>Dactylella lysipaga</i>	CBS486.63	U51959	443/529 (83.7%)	
<i>Arthrobotrys polycephala</i>	CBS486.63	U51951	454/526 (86.3%)	
<i>Monacrosporium haptotylum</i>	CBS325.94	AF106523	430/521 (82.5%)	
<i>Dactylella mammillata</i>	CBS229.54	AY902794	431/527 (81.8%)	
<i>Dactylella copepodii</i>	CBS487.90	U51964	391/464 (84.3%)	
<i>Dactylella candida</i>	CBS200.50	U51957	436/521 (83.7%)	
<i>Dactylella candida</i>	CBS200.50	U51963	436/521 (83.7%)	
<i>Monacrosporium tentaculatum</i>	CBS206.64	AF106531	432/526 (82.1%)	
<i>Monacrosporium psychrophilum</i>	CBS319.94	U51977	311/338 (92.0%)	

注) BSL はバイオセーフティレベル (レベル 2 以上を標記) を意味する。

注) 網掛けは、系統樹の作成に使用した配列データを示す。

表 2-3. 国際塩基配列データベース BLAST 検索結果. *Arthrobotrys* sp. TF006 の ITS の塩基配列と上位の塩基配列との相同率（株式会社テクノスルガ・ラボによる試験結果）

登録名	株名	Accession No.	相同率
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	ATCC96709	EF445989	655/672 (97.5%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	-	AM412778	657/674 (97.5%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	920	AY773462	634/646 (98.1%)
<i>Arthrobotrys</i> sp.	R251	HQ649929	637/655 (97.3%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	BCRC34588	GU799560	630/647 (97.4%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	-	EU977526	598/601 (99.5%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	YMF1.01837	FJ557237	597/600 (99.5%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	128	EU977563	597/600 (99.5%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	-	EU977523	594/597 (99.5%)
<i>Arthrobotrys superba</i>	127	EU977558	595/600 (99.2%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	-	EU977505	573/576 (99.5%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	-	EU977502	573/580 (98.8%)
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	KRCF711	AB374287	555/575 (96.5%)
<i>Arthrobotrys conoides</i>	670	AY773455	577/670 (86.1%)
<i>Arthrobotrys conoides</i>	GED	JN191309	564/662 (85.2%)
<i>Arthrobotrys vermicola</i>	103	EU977508	480/529 (90.7%)
<i>Arthrobotrys javanica</i>	CBS534.63	U51947	482/530 (90.9%)
uncultured Ascomycota	-	HM162289	469/524 (89.5%)
uncultured Ascomycota	-	HM162089	469/524 (89.5%)
uncultured Ascomycota	-	HM161982	469/524 (89.5%)
uncultured Ascomycota	-	HM162153	468/521 (89.8%)
uncultured Ascomycota	-	HM162166	468/521 (89.8%)
<i>Arthrobotrys musiformis</i>	ATCC96675	EF445993	474/531 (89.3%)
uncultured Ascomycota	-	HM162273	469/524 (89.5%)
uncultured Ascomycota	-	HM161956	469/524 (89.5%)
<i>Arthrobotrys conoides</i>	SBUGM12	AF106534	476/533 (89.3%)
<i>Duddingtonia flagrans</i>	CBS565.50	U51961	480/536 (89.6%)

注) 網掛けは、系統樹の作成に使用した配列データを示す。

4. 考察

線虫捕捉菌が茨城以北の東北地方や北海道の土壌から得られなかったのは、地温による影響が考えられた。寒天培地を用いた *Arthrobotrys* sp. TF001 と *Arthrobotrys* sp. TF007 の室内試験においてこれらの線虫捕捉菌が 20℃以上でコロニーを形成したことから、線虫捕捉菌の生育に地温が大きく影響していることが考えられた。茨城以北では地温が低くなりやすいと考えられ、線虫捕捉菌が住みにくい環境であるとも考えられる。したがって、線虫捕捉菌の培養物を施用して植物の線虫害軽減が起きる条件として地温が 20℃以上であることが考えられる。*Arthrobotrys* sp. TF001、*Arthrobotrys* sp. TF007 の生育最適温度を調査したところいずれも 25℃でコロニーが最大になった（データは未記載）。線虫捕捉菌の最適培養温度は 25℃付近であり（三井 1983）、この報告に一致した。

線虫害抑止土壌から線虫捕捉菌が単離されたことから、今回供試した線虫害抑止土壌も線虫害抑制に線虫捕捉菌が関与している可能性が示唆された。

第3章 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物に使用する線虫寄生菌の単離

1. 概論

線虫寄生菌は、子囊菌のマユハキタケ科、ビオネクトリア科、バツカクキン科、ネクトリア科、オピオコルディシピタ科およびニクザキン科、担子菌類のヒラタケ科、ツボカビ門のツボカビ科および所属不明のゼンマイカビ科、トリモチカビ科およびメリスタクラ科に属し、線虫寄生菌の線虫などへの感染は、菌糸、孢子および遊走子によって行われる。

線虫寄生菌は、寄生された線虫や卵などから単離する(日本線虫学会 2004)。菌糸により線虫に感染する *Paecilomyces*、*Pochonia* は、卵、卵嚢、またはシストを 0.8%ゲランガム培地のペトリ皿に散布して培養して単離する(日本線虫学会 2004)。また、孢子により線虫に感染する *Drechmeria*、*Harposporium*、*Hirsutella* および *Nematoctonus* は、ベルマン法または二層遠心分離法で分離した線虫を 0.8%ゲランガム培地のペトリ皿に塗布し培養して単離する(日本線虫学会 2004)。一方、遊走子により線虫に感染する *Catenaria* は、ベルマン法を用いて検出でき、ベルマン法で分離した線虫を 0.8%ゲランガム培地のペトリ皿に散布し培養して単離する(日本線虫学会 2004)。

本研究の目的の1つは、ネコブセンチュウ卵に寄生する土着の糸状菌を得ることであり、ネコブセンチュウ罹病株の根にあるネコブセンチュウ卵から卵に寄生する線虫寄生菌の単離を試みた。また、線虫害抑止土壌(愛知県知多郡・ダイコン圃場)(豊田 2011)からサツマイモネコブセンチュウ卵に寄生する線虫寄生菌の単離も試みた。線虫害抑止土壌は線虫害が発生しにくい土壌であることから(豊田 2011)、線虫害抑止土壌に線虫感受性作物を栽培しても作物の根に根こぶが形成されないと考えられた。そこで、希釈した線虫害抑止土壌を用いる「線虫害抑止土壌の持つ効力の転移試験(Westphal 2005)」を応用して線虫害抑止土壌から線虫寄生菌が得られるか検討した。

2. 材料および方法

1) 材料

線虫寄生菌の単離に用いたネコブセンチュウ罹病株および土壌

スイカ（熊本県上益城郡）、トマト（茨城県土浦市）、ナス（茨城県土浦市）、トマト（岐阜県中津川市）、ナス（茨城県土浦市）、ピーマン（鹿児島県鹿屋市）、モロヘイヤ（茨城県土浦市）のネコブセンチュウ罹病株および線虫害抑止土壌（愛知県知多郡・ダイコン圃場）

線虫寄生菌：*Purpureocillium* sp. EP015

A-3 圃場：片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内

淡色黒ボク土壌・砂 30%、シルト 40%、粘土 30%・LiC、pH(H₂O) 5.7

サツマイモネコブセンチュウの卵嚢

片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内圃場土壌を乾熱滅菌（140℃・2時間）した滅菌土壌をワグネルポットに充填した後、トマト（強力米寿）苗を定植した。次に、定植1週間後にトマト苗の株際に穴を開けサツマイモネコブセンチュウ懸濁液（500頭/mL）1mLを接種した後、ガラス温室内で約2ヶ月間栽培した。栽培終了後にポットからトマト苗を取り出し、流水で根を洗浄し、実体顕微鏡で観察しながら根に発生したネコブセンチュウの卵嚢を摘出した。

作物：ナス「千両2号」（タキイ種苗）

0.03%コロイダルキチン培地

コロイダルキチン 0.3g/L、K₂HPO₄ 0.7g/L、KH₂PO₄ 0.3g/L、MgSO₄ 0.5g/L、FeSO₄ 0.01g/L、NH₄NO₃ 0.3g/L、寒天 15g/L

ローズベンガル平板寒天培地

KH₂PO₄ 1g/L、MgSO₄・7H₂O 0.5g/L、ペプトン 5g/L、グルコース 10g/L、ローズベンガル 0.033g/L、寒天 17g/L（pH6.8）

実体顕微鏡：オリンパス

生物顕微鏡：オリンパス BH-2

試薬は、すべて一級以上のものを使用した。

2) 方法

実験 1. ネコブセンチュウ被害株の根にあるネコブセンチュウ卵からの線虫寄生菌の単離

生産者圃場で採取された根こぶの出来たネコブセンチュウ被害根を洗浄した

後、実体顕微鏡を使用して根こぶの根の表面から突出しているネコブセンチュウの卵嚢をピンセットで採集した後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に卵嚢を1分間浸漬し、表面殺菌した。次に、卵嚢を滅菌水で洗浄し、1%素寒天培地に置き、インキュベーター内で培養（25℃・1週間）した。実体顕微鏡を用いて線虫寄生菌の存在を観察し、線虫寄生菌の分生子を無菌的に0.03%コロイダルキチン培地に植菌した。

実験 2. 線虫害抑止土壌からの線虫寄生菌の単離

線虫害抑止土壌 600mL と A-3 圃場土壌（ネコブセンチュウ・ネグサレセンチュウ汚染土壌）200mL を混合した後、1L 容プラスチック製ポットに充填し、約2ヶ月間育苗したナス苗を中央に定植した。ガラス温室内で3ヶ月栽培した後根をサンプリングした。以下、実験1と同じ操作を行った。

実験 3. 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物に使用する線虫寄生菌として選抜した *Purpureocillium* sp. EP015 のサツマイモネコブセンチュウ卵への寄生率の測定

「微生物利用土壌改良資材の効果判定技術の開発（農林水産技術会議事務局）」において開発された卵寄生菌の土壌線虫抑制効果判定法（寄生率）を用いた（農林水産技術会議事務局 1993）。線虫寄生菌のサツマイモネコブセンチュウ卵への寄生率の測定方法は、以下の通りである。スライドガラスに予めオートクレーブ滅菌（121℃・20分間）しておいた0.8%ゲランガムを1滴落とし、サツマイモネコブセンチュウ卵嚢を滴下したゲランガムに移した。ゲランガムが固まった後、白金耳を用いてローズベンガル培地で3週間培養した *Purpureocillium* sp. EP015 分生子 1白金耳を接種した。直径9cmのペトリ皿にろ紙を敷き、V字状に曲げたガラス棒をろ紙上に置き、ろ紙に十分水を含ませた後、スライドガラスをガラス棒の上に載せ（写真 3-1）、25℃のインキュベーター内で1週間培養した。培養後、卵嚢に水を滴下し、カバーガラスをかけ、生物顕微鏡で観察し、*Purpureocillium* sp. EP015 に寄生されたサツマイモネコブセンチュウ卵数と寄生されていない卵数を計数し、寄生率を算出した。

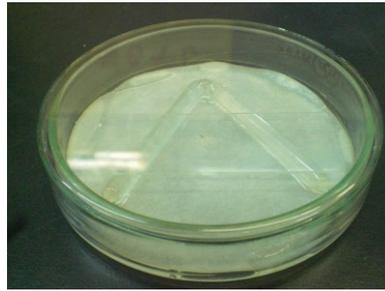


写真 3-1. *Paucyocillium* sp. EP015 のサツマイモネコブセンチュウ卵への寄生率の測定の方法
 直径 9cm のペトリ皿にろ紙を敷き、V 字状に曲げたガラス棒をろ紙上に置き、ろ紙に十分水を含ませた後、
 ゲランガムに封入し *Paucyocillium* sp. EP015 分生子を接種したサツマイモネコブセンチュウ卵を載
 せたスライドガラスをガラス棒の上に載せ、蓋をした。

3. 結果

実験 1. ネコブセンチュウ被害株の根にあるネコブセンチュウ卵からの線虫寄生菌の単離

スイカ（熊本県上益城郡）、トマト（茨城県土浦市）、ナス（茨城県土浦市）、
 ピーマン（鹿児島県鹿屋市）およびモロヘイヤ（茨城県土浦市）の根から採取
 した卵嚢から線虫寄生菌が単離された（表 3-1）。

表 3-1. 単離した線虫寄生菌

名称	分離源	特許生物寄託センター 寄託番号
<i>Paecilomyces</i> sp. EP001	ナス罹病株（茨城県土浦市）	FERM P-19279
<i>Paecilomyces</i> sp. EP002	ナス罹病株（茨城県土浦市）	FERM P-19280
<i>Paecilomyces</i> sp. EP003~013	ナス罹病株（茨城県土浦市）	
<i>Paecilomyces</i> sp. EP014	モロヘイヤ罹病株（茨城県土浦市）	
<i>Paecilomyces</i> sp. EP015	スイカ罹病株（熊本県上益城郡）	FERM P-19281
<i>Paecilomyces</i> sp. EP016	ピーマン罹病株（鹿児島県鹿屋市）	
<i>Paecilomyces</i> sp. EP017	トマト罹病株（茨城県土浦市）	
<i>Paecilomyces</i> sp. EP018~021	線虫害抑止土壌（愛知県知多郡・ダイコン圃場）	

ネコブセンチュウ卵から単離した糸状菌は、分生子などの形態からすべて
Paecilomyces 属であると考えられた（写真 3-2、3-3）。*Paecilomyces* sp. EP015
 が生育旺盛であったので、大量培養に供試した。また、*Paecilomyces* sp. EP001、
Paecilomyces sp. EP002 および *Paecilomyces* sp. EP015 については独立行政法
 人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センターに寄託した。株式会社テクノス

ルガ・ラボによる試験結果では、*Paecilomyces* sp. EP015 の ITS-5.8S rDNA 塩基配列は、アポロン DB-FU および国際塩基配列データベースに対する相同性検索の結果、子囊菌門の一種である *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hywel-Jones & Samson あるいはそれに近縁な *Purpureocillium* sp. と推定された(表 3-2、3-3)。以降、*Paecilomyces* sp. EP015 は、*Purpureocillium* sp. EP015 と表記する。



写真 3-2. *Purpureocillium* sp. EP015 のコロニー (写真提供：株式会社テクノスルガ・ラボ)
PDA 平板培地に植菌し、25°Cのインキュベーター内で 14 日間培養した。ピンク色、ビロード状のコロニーが形成された。



写真 3-3. *Purpureocillium* sp. EP015 の分生子の様子 (写真提供：株式会社テクノスルガ・ラボ)
PDA 平板培地に植菌し、25°Cのインキュベーター内で 14 日間培養した。栄養菌糸から直立した分生子柄の先端付近でフィアライドが輪生して形成されていた。フィアライドの先端部は細くなり、先端部からレモン型の分生子が連鎖して形成されていた。

表 3-2. アポロン DB-FU BLAST 検索結果. *Purpureocillium* sp. EP015 の ITS の塩基配列と上位の塩基配列との相同率（株式会社テクノスルガ・ラボによる試験結果）

登録名	株名	Accession No.	相同率	BSL
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CBS940. 73	AY624190	535/538 (99. 4%)	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	JCM9332	AB103380	557/581 (95. 9%)	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	BCC2012	EU828665	557/582 (95. 7%)	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	UWFP674	AY213667	553/579 (95. 5%)	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	ATCC10114	AY213665	553/579 (95. 5%)	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	UWFP853	AY213668	553/580 (95. 3%)	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	BCC15610	EF411236	538/562 (95. 7%)	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CBS431. 87	AY624188	508/538 (94. 4%)	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CBS284. 36	AY624189	508/538 (94. 4%)	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	JCM8437	AB104884	437/451 (96. 9%)	
<i>Haptocillium sphaerosporum</i>	CBS522. 80	AJ292413	348/362 (96. 1%)	
<i>Drechmeria coniospora</i>	CBS596. 92	AF106018	343/357 (96. 1%)	
<i>Haptocillium zeosporum</i>	CBS335. 80	AJ292419	346/362 (95. 6%)	
<i>Verticillium campanulatum</i>	IMI356051	AJ292416	343/362 (94. 8%)	
<i>Haptocillium glocklingiae</i>	CBS101434	AJ292418	345/364 (94. 8%)	
<i>Haptocillium balanoides</i>	CBS250. 82	AJ292414	342/363 (94. 2%)	
<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>aleophilum</i>	NBRC30728	AB111494	336/376 (89. 4%)	
<i>Hypocrea pilulifera</i>	CBS814. 68	Z48813	338/374 (90. 4%)	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	CBS821. 91	AF359257	340/377 (90. 2%)	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	CBS126. 65	AF501331	340/377 (90. 2%)	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	ATCC18648	Z31019	340/377 (90. 2%)	
<i>Lecanicillium fusisporum</i>	CBS164. 70	AJ292428	329/367 (89. 6%)	
<i>Haptocillium sinense</i>	CBS567. 95	AJ292417	329/362 (90. 9%)	
<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>aleophilum</i>	CBS3570. 80	AF324876	330/370 (89. 2%)	

注) BSL はバイオセーフティレベル（レベル 2 以上を標記）を意味する。

注) 網掛けは、系統樹の作成に使用した配列データを示す。

表 3-3. 国際塩基配列データベース BLAST 検索結果. *Purpureocillium* sp. EP015 の ITS の塩基配列と上位の塩基配列との相同率（株式会社テクノスルガ・ラボによる試験結果）

登録名	株名	Accession No.	相同率
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	DT030H4	HQ842841	573/574 (99. 8%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	NRRL22958	GU980033	573/574 (99. 8%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	ATT161	HQ607867	573/574 (99. 8%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	BMP3057	HQ832987	573/574 (99. 8%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	IBT24622	GU980032	572/574 (99. 7%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	IBT27820	GU980035	572/574 (99. 7%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-	FJ765024	572/574 (99. 7%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-	FJ765023	573/575 (99. 7%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	BMP2977	HQ832986	571/575 (99. 3%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CBS94073	JF896087	571/574 (99. 5%)
uncultured fungus	-	GQ921755	566/574 (98. 6%)
Fungal endophyte sp.	P1201A	EU977225	555/557 (99. 6%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	BMP2886	HQ832983	550/550 (100. 0%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	FJ765018	562/574 (97. 9%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CG190	EU553286	539/540 (99. 8%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CG271	EU553303	538/540 (99. 6%)
<i>Hypocreales</i> sp.	MS523a	JQ905664	533/534 (99. 8%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	BMP2889	HQ832984	538/541 (99. 4%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	LF592	FR822835	531/533 (99. 6%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	Vega287	DQ287248	528/529 (99. 8%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CBS940. 73	AY624190	535/538 (99. 4%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	DN01	JN007854	528/530 (99. 6%)
<i>Paecilomyces</i> sp.	INBio3692B	GU827505	529/532 (99. 4%)
<i>Isaria takamizusanensis</i>	F896	GU980040	557/581 (95. 9%)
<i>Isaria takamizusanensis</i>	DT07811	JF896089	555/579 (95. 9%)
<i>Isaria takamizusanensis</i>	F1724	GU980039	554/581 (95. 4%)
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	DT011C9	HQ842838	557/581 (95. 9%)

注) 網掛けは、系統樹の作成に使用した配列データを示す。

実験 2. 線虫害抑止土壌からの線虫寄生菌の単離

線虫害抑止土壌希釈土で栽培したナスの根から採取した卵嚢から線虫寄生菌が単離された（表 3-1）。一方、希釈に用いた線虫汚染土壌で栽培したナスの根から抽出した卵嚢からは線虫寄生菌が検出されなかった。ネコブセンチュウ卵から単離した糸状菌は、分生子などの形態からすべて *Paecilomyces* 属であると考えられた。

実験 3. 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物に使用する線虫寄生菌として選抜した *Purpureocillium* sp. EP015 のサツマイモネコブセンチュウ卵への寄生率の測定

Purpureocillium sp. EP015 のサツマイモネコブセンチュウ卵への寄生が確認され、*Purpureocillium* sp. EP015 のサツマイモネコブセンチュウ卵への寄生率は、57.8%であった。

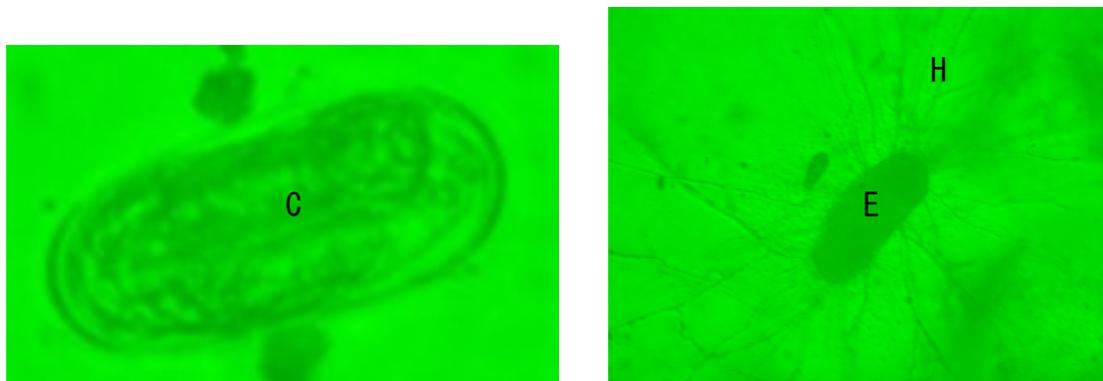


写真 3-4. サツマイモネコブセンチュウ卵の様子 左 : *Purpureocillium* sp. EP015 に寄生されていないサツマイモネコブセンチュウ卵、右 : *Purpureocillium* sp. EP015 に寄生されたサツマイモネコブセンチュウ卵

寄生されていない卵内部では細胞分裂中の細胞（C）が観察された。一方、寄生された卵内部は菌糸で充満しており（E）、卵から菌糸（H）の発生が観察された。

4. 考察

ネコブセンチュウ卵嚢から単離され選抜した *Purpureocillium* sp. EP015 は、

ITS-5.8S rDNA 塩基配列の解析の結果、線虫卵に寄生する代表的な線虫寄生菌 *Purpureocillium* 属と判明し、また、室内試験においてサツマイモネコブセンチュウ卵への寄生が確認されたことから、線虫卵に寄生する糸状菌である可能性が高い。また、*Purpureocillium* sp. EP015 のサツマイモネコブセンチュウ卵への寄生率は、57.8%であった。*Purpureocillium* sp. EP015 の寄生率は、既知の線虫寄生菌 *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium*) のサツマイモネコブセンチュウ卵への寄生率 31.9% (農林水産技術会議事務局 1993) に比べて高く、*Purpureocillium* sp. EP015 の培養物が植物の線虫害軽減できる可能性が高いことが示唆された。

線虫害抑止土壌希釈土で栽培したナスの根から採取した卵嚢から線虫寄生菌が単離されたことから、今回供試した線虫害抑止土壌も線虫害抑制に線虫寄生菌が関与している可能性が示唆された。

第4章 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物を使用する際の指標となるネコブセンチュウ初期密度とナス収量の関係の解析

1. 概要

定植前の土壌中の植物寄生性線虫と作物の収量との関係に関する情報は、植物寄生性線虫がもたらす作物の収量低下の予想や最適な防除方法を選択するうえで基礎となり、今までに様々な研究機関で要防除水準が調査されている（表4-1）。本研究で使用する圃場に生息するサツマイモネコブセンチュウおよびキタネコブセンチュウであり、栽培試験ではナスを供試した。サツマイモネコブセンチュウによるナスの要防除水準は国外の報告であり（Schomaker・Been 2006）、日本で設定されたことはない。そこで、植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物を使用する際の指標としてネコブセンチュウ初期密度とナス収量の関係を解析し、ナスの収量低下が発生する基準値を設定することにした。

表 4-1. 植物寄生性線虫の要防除水準

対象線虫名	対象作物名	要防除水準	許容水準の考え方	文献
ジャガイモシストセンチュウ	ジャガイモ	10卵/乾土1g フェンウィック法	減収率2~8%	山田 1987
ダイズシストセンチュウ	ダイズ（スズタカ）	1.5シスト/乾土50g 浮遊ふるい分け法	減収率5%	斉藤 1985
サツマイモネコブセンチュウ	キュウリ	2頭/25g ベルマン法		b
	トマト	2頭/25g ベルマン法		b
	ゴボウ	2頭/25g ベルマン法		b
	ニンジン	20~30頭/20g ベルマン法	異常根がない	佐野 1988
	ナス	1頭/20g ベルマン法		Schomaker・Been 2006
	ホウレンソウ	40卵・頭/20mL		Di Vitoら 2004
キタネコブセンチュウ	ゴボウ	2頭/生土25g ベルマン法	商品化率80%	a
	ニンジン	2頭/生土25g ベルマン法	商品化率80%	a
	ニンジン	3~38卵/20mL		Guginoら 2006
キタネグサレセンチュウ	ゴボウ	5頭/25g ベルマン法	商品価値に影響	a
	ダイコン	10頭/50g ベルマン法	被害斑	大林 1989
	ダイコン	10頭/25g ベルマン法	商品価値に影響	a
	ダイコン	1頭/30g ベルマン法		b
	ダイコン	2.5頭/20g リアルタイムPCR法		Satoら 2009
ニンジン	5頭/25g ベルマン法	商品価値に影響	a	
a：中国和年編（1992）				
b：日本植物防疫所（2011）				

2. 材料および方法

1) 材料

B-4 圃場：片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内 広さ：6m×18m

淡色黒ボク土壌・砂 30%、シルト 40%、粘土 30%・LiC、pH(H₂O) 5.8、
全炭素 24.0kg/kg 土壌、全窒素 3.3g/kg 土壌
作物：ナス「千両2号」（タキイ種苗）
肥料：「くみあい有機入り化成特8号」（片倉チッカリン）
線虫捕捉菌*：*Arthrobotrys* sp. TF006
線虫寄生菌*：*Purpureocillium* sp. EP015
MPS 液体培地：麦芽エキス 20g/L、ペプトン 1g/L、シュークロース 20g/L
バーミキュライト*：「バーミキュライトGS」（ハットリ）
サンプリング用スコップ：「線虫スコップ」（藤原製作所）
ローズベンガル平板寒天培地
KH₂PO₄ 1g/L、MgSO₄・7H₂O 0.5g/L、ペプトン 5g/L、グルコース 10g/L、
ローズベンガル 0.033g/L、寒天 17g/L （pH6.8）
エッグアルブミン平板寒天培地
エッグアルブミン 0.25g/L、グルコース 1g/L、K₂HPO₄ 0.5g/L、MgSO₄・
7H₂O 0.2g/L、Fe₂(SO₄)₃ 0.01g/L、寒天 15g/L （pH6.8）
FastDNA™SPIN Kit for Soil：MP Biomedicals
Fast Prep™-24：MP Biomedicals
7300Fast Real-Time PCR system：Life Technologies
Power SYBR Green：Life Technologies
Meloidogyne hapla の特異的プライマー：
Mh-f：5' ATGTTGGTACGCAGCGATTTGTA 3'
Mh-r：5' CAGCGGGTGATCTCGACTGA 3'
Meloidogyne incognita の特異的プライマー：
RKNf：5' GCTGGTGTCTAAGTGTGCTGATAC 3'
RKNr：5' GAGCCTAGTGATCCACCGATAAG 3'
小型耕耘機：こまめ F220J（本田技研工業）
試薬は、すべて一級以上のものを使用した。

* この試験の当初の目的は、線虫天敵糸状菌の培養物を圃場に施用したときのナスの線虫
害軽減を観察することであったので、線虫捕捉菌 *Arthrobotrys* sp. TF006 および線虫
寄生菌 *Purpureocillium* sp. EP015 を B-4 圃場に施用した。バーミキュライトはこれ
らの線虫天敵糸状菌の培養液を吸着させる単体として使用した。これらの線虫天敵糸
状菌による線虫害軽減が観察されず、*Arthrobotrys* sp. TF006 および *Purpureocillium*
sp. EP015 の土壌への定着が確認できなかったことから、線虫天敵糸状菌などの処理が

なかったものと考え、ネコブセンチュウ初期密度とナス収量の関係およびネコブセンチュウ初期密度とナスの根こぶ指数の関係を解析した。

2) 方法

線虫天敵糸状菌の培養物施用 2 週間前に B-4 圃場に肥料 10kg (N-P₂O₅-K₂O=20-20-20kg/10a) を施用した後、小型耕耘機で耕耘し、12 区画に分割した。区の大きさは、幅 3m、長さ 3m である。耕耘直後に土壌をサンプリング用スコップで深さ 20cm まで 6 か所からサンプリングし、ネコブセンチュウ密度をベルマン法 (26°C 2 晩) およびリアルタイム PCR 法 (Minら 2012) で調査した。ベルマン法で調査したネコブセンチュウ初期密度によりネコブセンチュウ高密度区 (8~10 頭 / 20 g) とネコブセンチュウ低密度区 (1~3 頭 / 20 g) の 2 区に分け、それぞれ処理区を設定し、処理をした (2011 年 5 月 31 日)。設定した区は、①対照区 (無処理)、②MPS 液体培地のみ施用区 (450g/区)、③バーミキュライトのみ施用区 (450g/区) および④線虫天敵糸状菌の培養物施用区 (900g/区) である*。線虫天敵糸状菌の培養物は、MPS 液体培地で *Arthrobotrys* sp. TF006 と *Purpureocillium* sp. EP015 を培養した培養液 450g をバーミキュライト 450g に吸着させたものである。それぞれを区全面に均一となるように施用した。施用した後、スコップを用いて混合し、ナス苗 8 株 (2 列×4 株) を定植した (2011 年 5 月 31 日)。ナスの列ごとに調査し、2 連とした。栽培期間中に灌水、薬剤処理および追肥は行わなかった。出荷サイズになったナスを適宜、収穫し、重量を測定した。栽培終了後に栽培したすべてのナスの根 96 株をスコップで掘りあげ、根こぶ程度を 10 段階評価し、根こぶ程度の平均値を根こぶ指数とした (2011 年 8 月 24 日)。また、根こぶ程度調査直後に栽培後土壌をサンプリング用スコップで深さ 20cm まで株間からサンプリングし、ネコブセンチュウ密度をベルマン法 (26°C 2 晩) で、*Arthrobotrys* sp. TF006 は「第 2 章 線虫捕捉菌の単離」に記載の方法で調査した。また、*Purpureocillium* sp. EP015 はローズベンガル寒天培地を用いた希釈平板法により土壌中の生菌数を調査した。調査方法は以下の通りである。土壌 10g を滅菌水 90mL に加え、10 分間水平振盪した後、懸濁液を滅菌水で 10 倍ごとに希釈し、ローズベンガル寒天培地に混釈した。30°C で 3 日間培養したのち、*Purpureocillium* sp. EP015 のコロニーを計数した。

* この試験の当初の目的は、線虫天敵糸状菌の培養物を圃場に施用したときのナスの線虫害軽

減を観察することであったので、線虫捕捉菌 *Arthrobotrys* sp. TF006 および線虫寄生菌 *Purpureocillium* sp. EP015 を B-4 圃場に施用した。パーミキュライトはこれらの線虫天敵糸状菌の培養液を吸着させる単体として使用した。これらの線虫天敵糸状菌による線虫害軽減が観察されず、*Arthrobotrys* sp. TF006 および *Purpureocillium* sp. EP015 の土壌への定着が確認できなかったことから、線虫天敵糸状菌などの処理がなかったものと考え、ネコブセンチュウ初期密度とナス収量の関係およびネコブセンチュウ初期密度とナスの根こぶ指数の関係を解析した。



写真 4-2. 栽培試験の様子（平成 23 年 8 月 23 日撮影）

Zech の定めた根こぶ程度（10 段階評価）（Netscher・Sikora（1990））

- 0：根こぶなし
- 1：根こぶがわずかに認められる
- 2：小さな根こぶが“1”よりもあり、一見して根こぶが発見できる
- 3：たくさん小さな根こぶがあるが、被害は目立たない
- 4：たくさん小さな根こぶがあり、いくつかは大きな根こぶがある
- 5：大きな根こぶが根域の 25%にある
- 6：大きな根こぶが根域の 50%にある
- 7：大きな根こぶが根域の 75%にある
- 8：健全な根がないが、地上部はまだ緑色をしている
- 9：すべての根こぶが腐敗しつつあり、枯死しつつある
- 10：枯死している

3. 結果

ナスを定植する前に採取した土壌中のネコブセンチュウ初期密度は、ベルマン法を用いたときは0~24頭/20g土壌であり、リアルタイムPCR法を用いたときはサツマイモネコブセンチュウでは0.6~713 J2/20g土壌、キタネコブセンチュウでは0~115 J2/20g土壌であった。ベルマン法とリアルタイムPCR法を用いて求めた線虫密度は相関関係があり ($p < 0.001$)、リアルタイムPCR法で求めた線虫密度はベルマン法に比べて26倍高かった (図4-1)。また、ベルマン法ではネコブセンチュウが検出されなかった土壌からリアルタイム法ではサツマイモネコブセンチュウ 56 J2/20g土壌、キタネコブセンチュウ 17 J2/20g土壌を検出した (図4-1)。

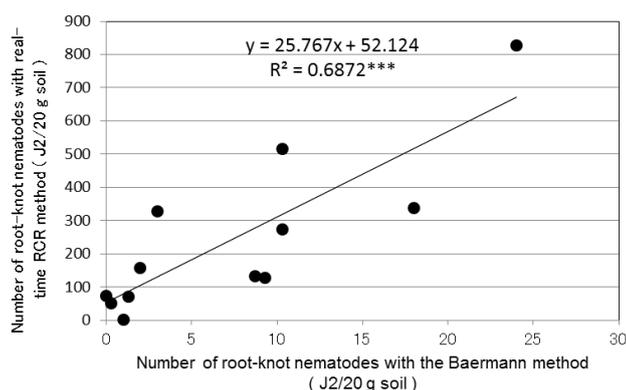


図4-1. ベルマン法を用いて求めたネコブセンチュウ初期密度とリアルタイムPCR法を用いて求めたネコブセンチュウ密度 (サツマイモネコブセンチュウ密度とキタネコブセンチュウ密度の合計) の関係 ($P < 0.001$)

収量について有意差 (t 検定・ $p < 0.05$) は観察されず、線虫天敵糸状菌の培養物 (*Arthrobotrys* sp. TF006 および *Purpureocillium* sp. EP015 の液体培地培養液をバーミキュライトに吸着したもの) 施用による効果が観察されなかった (図4-2)。収量低下はベルマン法で求めたネコブセンチュウ初期密度 2頭/20g土壌以上で観察された (図4-3)。

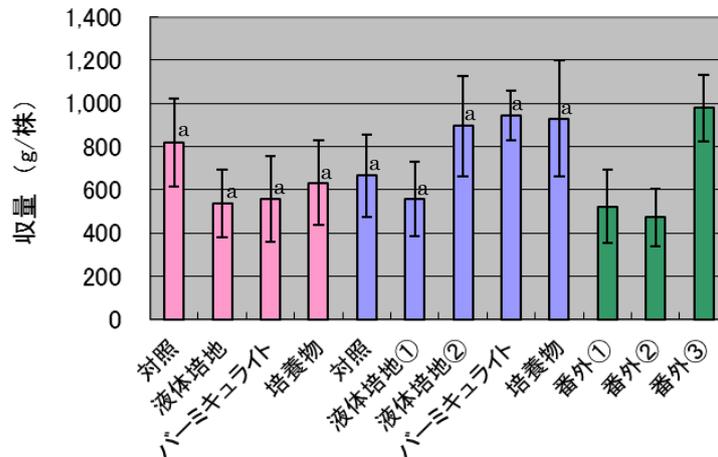


図 4-2. 処理の違いによるナス収量への影響 赤色の棒グラフは、ネコブセンチュウ高密度区 (8 ~10 頭 / 20 g)、青色の棒グラフは、ネコブセンチュウ低密度区 (1~3 頭 / 20 g) および緑色の棒グラフは番外区を示す。また、「液体培地」は、MPS 液体培地のみ施用区、「バーミキュライト」は、バーミキュライトのみ施用区、「培養物」は線虫天敵糸状菌培養物施用区を示す。有意差検定は、t 検定 ($p < 0.05$) をすべての区間で行った。

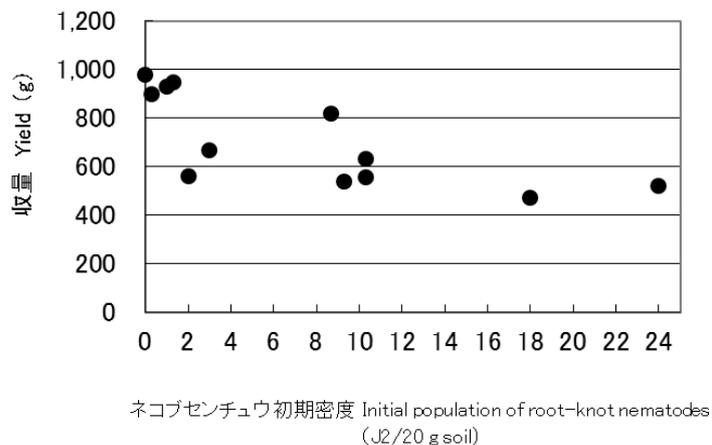


図 4-3. ベルマン法で調査したネコブセンチュウ初期密度とナス収量との関係

一方、リアルタイム PCR 法ではサツマイモネコブセンチュウとキタネコブセンチュウの初期密度の合計で 128 J2/20g 土壌以上で収量低下が観察された (図 4-4A)。サツマイモネコブセンチュウ初期密度では 115 J2/20g 土壌以上で収量低下が観察された (図 4-4B)。キタネコブセンチュウ初期密度と収量について相関関係は観察されなかった ($p=0.2$) (図 4-5C)。

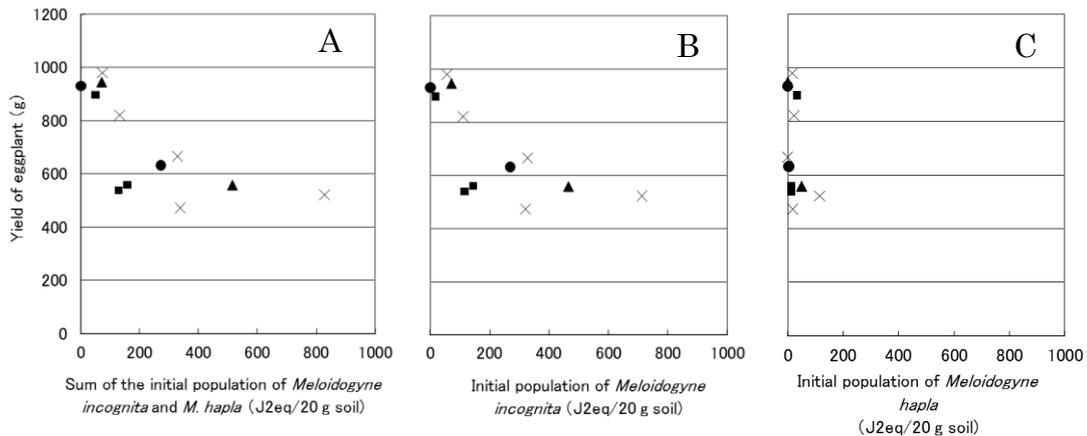


図 4-4. サツマイモネコブセンチュウとキタネコブセンチュウの初期密度の合計 (A)、サツマイモネコブセンチュウ初期密度 (B) およびキタネコブセンチュウ初期密度 (C) とナス収量の関係

× : 対照区、■ : MPS 液体培地のみ施用区、▲ : パーミキュライトのみ施用区および● : 線虫天敵糸状菌培養物施用区を示す。

根こぶはすべての根で観察され、根こぶ程度は1~7であった。根こぶ指数について有意差 (t 検定・ $p < 0.05$) は観察されず、ネコブセンチュウ高密度区 (8~10 頭/20g 土壌) では、対照区と線虫天敵糸状菌培養物施用区はほぼ同等であった (図 4-5)。一方、有意差は観察されなかったが、ネコブセンチュウ低密度区 (1~3 頭/20g 土壌) では対照区に比べて線虫天敵糸状菌培養物施用区は1/3に低下した (図 4-5)。

ベルマン法で求めたネコブセンチュウ初期密度、リアルタイム PCR 法で求めたサツマイモネコブセンチュウおよびキタネコブセンチュウ初期密度の合計およびサツマイモネコブセンチュウ初期密度が増加するにつれて根こぶ指数が増加する傾向が観察されたが、相関関係は観察されなかった ($p=0.09$ 図 4-6、 $p=0.42$ 図 4-7A、 $p=0.40$ 図 4-7B)。一方、根こぶ指数とキタネコブセンチュウ初期密度とには相関関係は観察されなかった ($p=0.6$) (図 4-7C)。

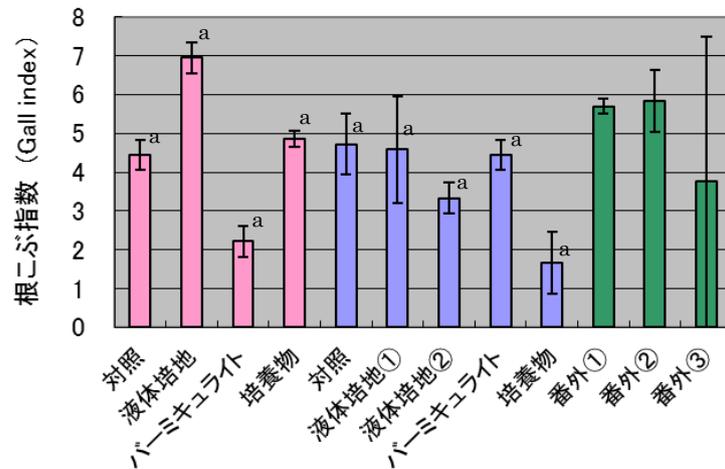


図 4-5. 処理の違いによるナスの根こぶ指数への影響

赤色の棒グラフは、ネコブセンチュウ高密度区（8～10 頭 / 20 g）、青色の棒グラフは、ネコブセンチュウ低密度区（1～3 頭 / 20 g）および緑色の棒グラフは番外区を示す。また、「液体培地」は、MPS 液体培地のみ施用区、「バーミキュライト」は、バーミキュライトのみ施用区、「培養物」は線虫天敵糸状菌培養物施用区を示す。有意差検定は、t 検定 ($p < 0.05$) をすべての区間で行った。

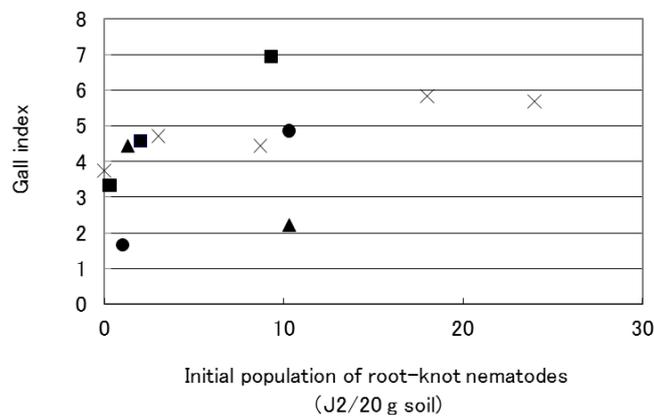


図 4-6. ベルマン法で調査したネコブセンチュウ初期密度とナスの根こぶ指数との関係

×：対照区、■：MPS 液体培地のみ施用区、▲：バーミキュライトのみ施用区および●：線虫天敵糸状菌培養物施用区を示す。

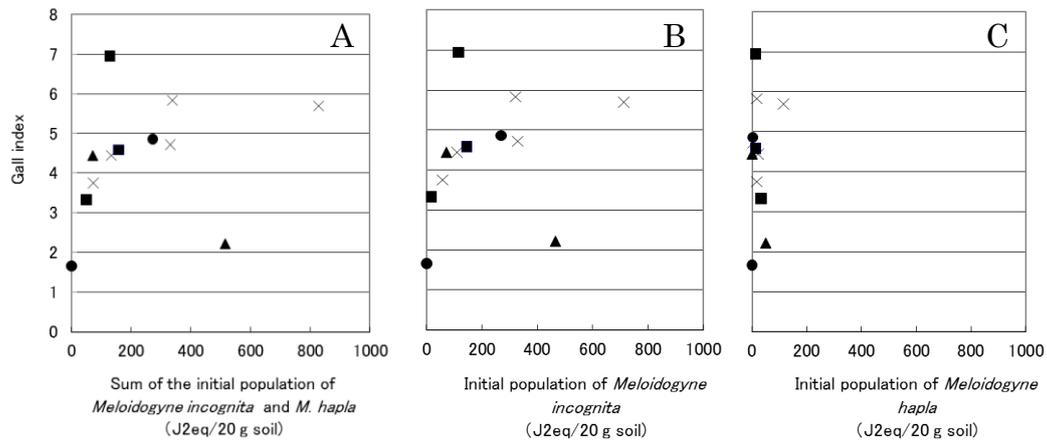


図 4-7. サツマイモネコブセンチュウとキタネコブセンチュウの初期密度の合計 (A)、サツマイモネコブセンチュウ初期密度 (B) およびキタネコブセンチュウ初期密度 (C) と根こぶ指数の関係

× : 対照区、■ : MPS 液体培地のみ施用区、▲ : バーミキュライトのみ施用区および● : 線虫天敵糸状菌培養物施用区を示す。

試験区 (12 区) をベルマン法で求めたネコブセンチュウ初期密度の違いで 0 ~2 頭/20g 土壌および 2 頭/20g 土壌以上の 2 グループに分け、ナス積算収量を調査したところ、収穫前半には収量の差は観察されなかったが、定植 50 日後から有意な差が観察された ($p < 0.05$) (図 4-8)。ナス収量については、根こぶ指数 5 以上で収量低下が観察された (図 4-9)。

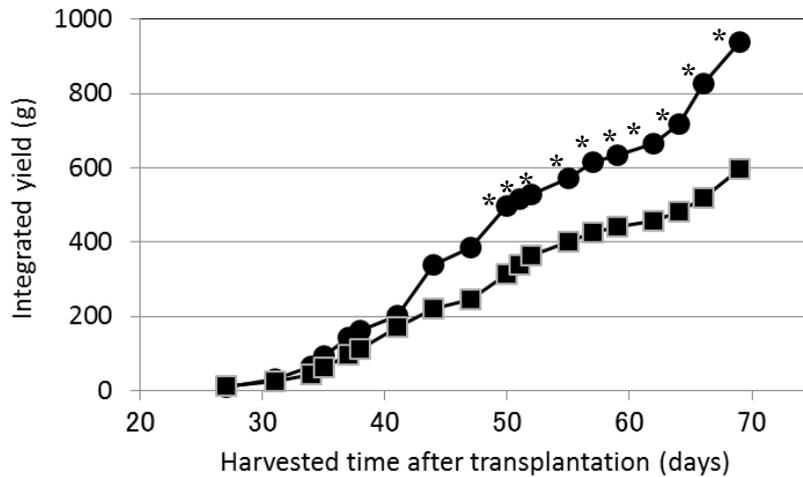


図 4-8. ベルマン法で求めたネコブセンチュウ初期密度の違いによるナスの積算収量への影響
 ●は、ベルマン法で求めたネコブセンチュウ初期密度が 0~2 頭/20g 土壌、■は、2 頭/20g 土壌以上の区を示す。*は、t 検定で有意差 ($p < 0.05$) が見られたことを示す。

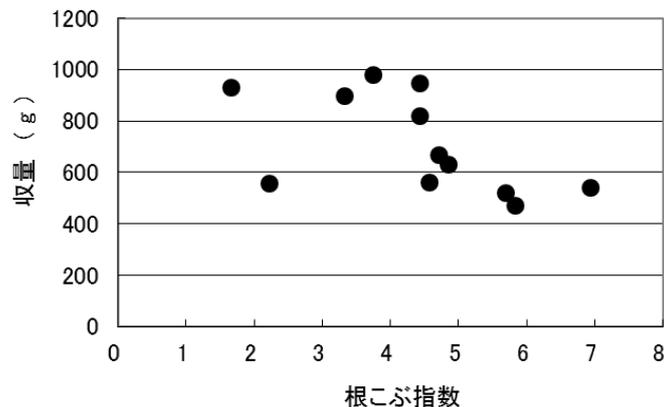


図 4-9. 根こぶ指数とナス収量の関係

栽培後土壌のネコブセンチュウ密度についても有意差 (t 検定・ $p < 0.05$) は観察されなかったが、ネコブセンチュウ高密度区 (8~10 頭/20g 土壌) では、線虫天敵糸状菌培養物施用区は対照区に比べて 1/20 に低下し、バーミキュライトのみ施用区とほぼ同等であった (図 4-10)。ネコブセンチュウ低密度区 (1~3 頭/20g 土壌) では対照に比べて線虫天敵糸状菌培養物施用区は 1/2 に低下した (図 4-10)。線虫天敵糸状菌培養物施用区の栽培後土壌から *Arthrobotrys* sp. TF006 および *Purpureocillium* sp. EP015 は検出されなかった。

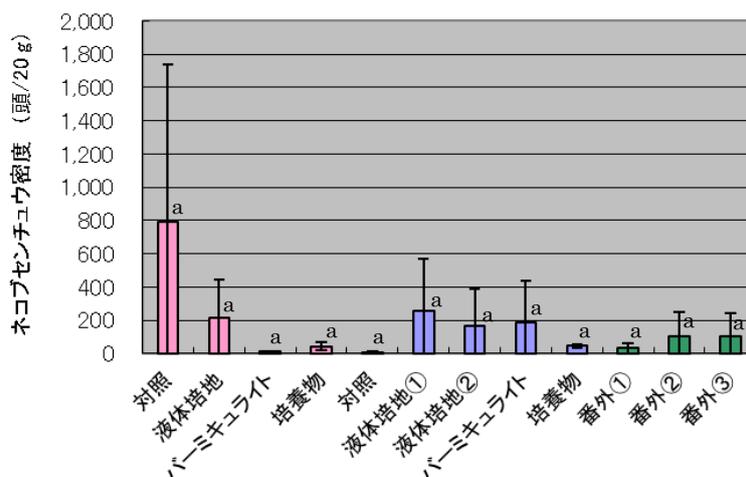


図 4-10. ベルマン法で調査した栽培終了時のネコブセンチュウ密度

赤色の棒グラフは、ネコブセンチュウ高密度区（8～10 頭 / 20 g）、青色の棒グラフは、ネコブセンチュウ低密度区（1～3 頭 / 20 g）および緑色の棒グラフは番外区を示す。また、「液体培地」は、MPS 液体培地のみ施用区、「バーミキュライト」は、バーミキュライトのみ施用区、「培養物」は線虫天敵糸状菌培養物施用区を示す。有意差検定は、t 検定 ($p < 0.05$) をすべての区間で行った。

4. 考察

・ネコブセンチュウ初期密度とナス収量の関係

ナスの収量低下はベルマン法で求めたネコブセンチュウ初期密度 2 頭/20g 土壌以上で観察された。この値は既報のサツマイモネコブセンチュウのナスの要防除水準 1 J2/20g 土壌 (Schomaker・Been 2006) と極めて類似した。一方、ニンジンでは播種時のサツマイモネコブセンチュウが 20～30 J2/20g 土壌のときに収量低下が起きた (佐野 1988)。米国では、2 年間の研究でニンジンのキタネコブセンチュウの要防除水準が有機質土壌では 3.0～14 卵/20mL、無機質土壌では 12～38 卵/20mL と推定された (Gugino ら 2006)。ホウレンソウの収量低下はサツマイモネコブセンチュウが 40 卵・J2/20mL 以上で観察され (Di Vito ら 2004)、また、ゴボウ、キュウリおよびトマトの要防除水準は、1.6 J2/20g 土壌であった (日本植物防疫所 2011、中園 1992)。Vovlas ら (2005・2008) は、ジャワネコブセンチュウとサツマイモネコブセンチュウのジャガイモとセロリの要防除水準をそれぞれ 10～13 卵・J2/20g 土壌、3 卵・J2/20g 土壌と推

定した。総合すると、今回のナスの収量低下のネコブセンチュウ密度は、ゴボウ、セロリ、キュウリおよびトマトと同等で、ニンジンやホウレンソウに比べてかなり低かった。既報ではニンジンやホウレンソウの栽培期間が2ヶ月であり、今回のナスや他の作物の栽培期間は4ヶ月以上であった。栽培期間の長さが収量低下の起きる植物寄生性線虫密度の違いの原因かもしれない。実際、定植時のネコブセンチュウ密度が違っていても収穫前半では収量に差が見られなかったが、定植50日後から収量に有意な差が観察された ($p < 0.05$)。この結果は、栽培期間が短いときにはネコブセンチュウの要防除水準が高くなることを示唆している。

一方、リアルタイムPCR法ではサツマイモネコブセンチュウとキタネコブセンチュウの初期密度の合計で128 J2/20g 土壌以上でナスの収量低下が観察された。サツマイモネコブセンチュウ初期密度では115 J2/20g 土壌以上で収量低下が観察された。これらの収量低下が起きた線虫密度はベルマン法で求めた線虫密度に比べてかなり高かった。このことは、キタネグサレセンチュウに対するダイコンの要防除水準を推定した報告 (Sato ら 2010) に類似している。Sato らは、要防除水準をベルマン法では1頭/20g 土壌以下と推定したが、リアルタイムPCR法では5 J2 相当/20g 土壌とした。この理由として、ベルマン法では抽出できない卵や耐久態線虫をリアルタイムPCR法では計数できることが挙げられる。

・ネコブセンチュウ初期密度と根こぶ指数の関係

ベルマン法で求めたネコブセンチュウ初期密度、リアルタイムPCR法で求めたサツマイモネコブセンチュウおよびキタネコブセンチュウ初期密度の合計およびサツマイモネコブセンチュウ初期密度が増加するにつれて根こぶ指数が増加する傾向が観察されたが、相関関係は観察されなかった。一方、キタネコブセンチュウについては、キタネコブセンチュウ初期密度が増加するにつれて根こぶ指数が増加する傾向は観察されなかった。根こぶ指数は、サツマイモネコブセンチュウの初期密度に伴い増加する傾向が観察された。根こぶの大きさはサツマイモネコブセンチュウとキタネコブセンチュウで違い、サツマイモネコブセンチュウは比較的大きな根こぶを形成する (Hunt・Handoo 2009)。サツマイモネコブセンチュウが形成した比較的大きな根こぶに比べてキタネコブセンチュウが形成したより小さな根こぶを見つけるのが難しく、キタネコブセン

チュウの根こぶを過小評価したと考えられる。

- ・ナス収量と根こぶ指数の関係

ナス収量については、根こぶ指数 5 以上で収量低下が観察された。根こぶ程度 5 の根の状態は、「大きな根こぶが根域の 25%にある」であることから、根こぶが連続して発生し大きくなるとナス収量に影響することが示唆された。したがって、根こぶ指数 5 がナス収量低下の指標になると考えられた。

- ・線虫天敵糸状菌培養物の施用による線虫害軽減効果

ナス収量について処理区間の有意差は観察されなかったこと、また、ナスの根こぶ指数についても処理区間の有意差は観察されなかったことから、線虫天敵糸状菌を培養した菌液をバーミキュライトに吸着させて作製した線虫天敵糸状菌培養物では施用による収量への効果は判然とせず、培養した菌液をバーミキュライトへ吸着させて施用する方法では施用効果が観察されにくいと考えられた。バーミキュライトへ吸着させて施用する方法において *Purpureocillium* sp. EP015 の処理効果が発揮されない原因の一つとして、線虫天敵糸状菌培養物施用区の栽培後土壌から *Arthrobotrys* sp. TF006 および *Purpureocillium* sp. EP015 は検出されなかったことから、*Arthrobotrys* sp. TF006 および *Purpureocillium* sp. EP015 が土壌での定着が不十分であったことが挙げられる。特に線虫捕捉菌は土壌に接種しても定着しにくく、線虫に対する効果が不安定であることが報告されており（田場ら 2006）、今回の試験でも線虫捕捉菌 *Arthrobotrys* sp. TF006 の土壌への定着が確認されなかったことから、線虫捕捉菌の培養物による線虫害の防除は難しいことが示唆された。

第5章 植物の線虫害軽減を目的とした線虫寄生菌 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物のポット試験、無底ポットおよび圃場を用いた線虫害抑制効果の確認

線虫寄生菌の生物防除への応用試験は、*Paecilomyces*、*Purpureocillium*、*Pochonia*、*Hirsutella* および *Trichoderma* を用いて主に行われ、これらを培養した培養物による線虫害抑制効果判定試験において効果があるものもあり、一部は商品化されている (Hallmann ら 2009)。

線虫の受精卵は厚い卵膜 (ビテリン層、キチン層、脂質層) に包まれており (石橋 2003)、線虫寄生菌はセリンプロテアーゼ、キチナーゼなどの分解酵素を産生し、線虫卵の卵膜を破壊して感染する (Hallmann 2009)。したがって、キチンを含む有機物を施用することで、土壤微生物のキチナーゼ産生を誘導し、土壤中のキチナーゼ活性が高まる可能性があり、実際にキチンまたはキトサンを施用したところネコブセンチュウ害が軽減したとの報告もある (Sarathchandra ら 1996、Radwan ら 2012)。また、*Purpureocillium lilacinum* と 0.1%キチン添加でサツマイモネコブセンチュウを抑制し、ナス、トマトなどで線虫害が軽減されたとの報告もある (農山漁村文化協会 2007)。

そこで、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物の効果的な施用方法を検討するため、ポット試験を供試して *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量および施用時期について検討した。また、野外に設置した無底ポットに *Purpureocillium* sp. EP015 培養物を施用し、施用後の土壤中の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数の推移を調査し、*Purpureocillium* sp. EP015 の施用後の土壤中の生残性を明らかにした。次に、圃場試験により *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の効果的な施用方法を確認することであり、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用方法 (全面全層施用および植穴施用) について検討した。また、キチンを含む有機質肥料であるカニガラを *Purpureocillium* sp. EP015 培養物と同時に施用し、その併用効果についても検討した。

さらに、植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物に使用する線虫寄生菌として選抜した *Purpureocillium* sp. EP015 の迅速なモニタリング手法の確立を試みた。現在、目的とする微生物の生菌数を評価する手法として、選択培地を用いた希釈平板法 (土壤微生物研究会 1977、Mitchell ら 1987) や分子生物学的手法を用いた PCR 法 (Mauchline ら 2002、Atkins ら 2003b、Smith・Jaffee 2009) やリアルタイム PCR 法 (Bohm ら 1999、Bates 2001、

Atkins ら 2003b、Atkins ら 2005) がある。第 3 章において単離し選抜した線虫寄生菌は、*Purpureocillium lilacinum* あるいはそれに近縁な *Purpureocillium* sp. と推定された (表 3-2、3-3)。そこで Atkins ら (2005) が開発した *P. lilacinum* の特異的プライマーを本単離菌についても応用し、土壌中での *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数が迅速に分析可能か検討した。

2. 材料および方法

1) 材料

線虫寄生菌 : *Purpureocillium* sp. EP015

Purpureocillium sp. EP015 培養物 : 実験 2~4 生菌数 8.9×10^7 cfu/g、
実験 5、6 生菌数 8.5×10^9 cfu/g

注) 生菌数はローズベンガル平板寒天培地を用いた希釈平板法 (30°C・3 日間培養) により調査した。

Purpureocillium sp. EP015 は、「二段階培養法」で培養した。天敵微生物の大量培養は、二段階で培養する「二段階培養法」が一般的である (岡田ら 1993)。「二段階培養法」では、第一段階では液体培地を用いて培養し、短菌糸が浮遊した接種菌液を作製した。第二段階では接種菌液を固体培地に接種し、培養した。なお、*Arthrobotrys* sp. TF006 は、「二段階培養法」での大量培養法が確立できなかったため、供試しなかった。

滅菌 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物 : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物をオートクレーブ滅菌 (121°C・60 分間) したもの

A-3 圃場 : 片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内

淡色黒ボク土壌・砂 30%、シルト 40%、粘土 30%・LiC、pH(H₂O) 5.7

B-4 圃場 : 片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内 広さ : 6m×18m

淡色黒ボク土壌・砂 30%、シルト 40%、粘土 30%・LiC、pH(H₂O) 5.8

無底ポット (32 ポット) : 片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内 大きさ : 0.18m²

淡色黒ボク土壌・砂 30%、シルト 40%、粘土 30%・LiC、pH(H₂O) 5.5



写真 5-1. 無底ポット 左：無底ポット全景、右：無底ポット
塩ビ管（直径約 50cm・高さ約 50cm）を土壤に埋設した。

作物

- 実験 2～4：ホウセンカ「スペシャルダワーフミックス」（サカタのタネ）
 実験 5：ダイコン「冬の浦総太り」（カネコ交配）、サツマイモ「ベニコマチ」（TOKITA）
 実験 6：ナス「千両 2 号」（タキイ種苗）

肥料

- 実験 5：菜種油かす
 カニガラ（カナダ輸入品）
 実験 6：「有機入り化成 046 号」（片倉チッカリン）
 カニガラ（カナダ輸入品）

堆肥

- 実験 5：1 回目「牛ふん堆肥」（牧野） TN1.3%、TP0.7%、TK1.8%、2
 回目「ソィールパワー」（瑞穂農場） TN1.2%、TP1.6%、TK2.4%
 実験 6：「牛ふん堆肥」（牧野） TN1.3%、TP0.7%、TK1.8%

サンプリング用スコップ：「線虫スコップ」（藤原製作所）

サツマイモネコブセンチュウ卵

サツマイモネコブセンチュウ卵懸濁液は以下の方法で事前に調整した。
 ガラス温室内で継代しているネコブセンチュウ汚染土壌で約 2 か月間栽培したホウセンカの根を約 1cm に鉋を用いて切断し、1%次亜塩素酸ナト

リウム溶液 100mL に添加した後、ミキサーで粉砕した（10 秒・5 回）。脱塩水を加え、2Lにした後、125 μ m および 20 μ m の篩を重ねて濾過した。20 μ m 篩の上にある卵をメスシリンダー内に洗い流し、定容した後、顕微鏡を用いてネコブセンチュウ卵数を計数した。

カニガラ粉末：カナダ輸入品

農薬：「ネマトリンエース粒剤（登録 No. 20265）」（石原産業）

MPS 液体培地：麦芽エキス 20g/L、ペプトン 1g/L、シュークロース 20g/L

小型耕耘機：こまめ F220J（本田技研工業）

ガラス温室

9cm ポリポット（黒色）：「90 号」（TOKAI）

ポリポット（白色）：「プラ鉢 5 号」（オーヤマ）

保温マット：「農電・園芸マット 1-306」（筑波電器）

FastDNA™SPIN Kit for Soil：MP Biomedicals

Fast Prep™-24：MP Biomedicals

7300Fast Real-Time PCR system：Life Technologies

P. lilacinum の特異的プライマー：

PLrtF: 5' GAC CCA AAA CTC TTT TTG CAT TAC G 3'

PLrtR: 5' AGA TCC GTT GTT GAA AGT TTT GAT TCA TTT GTT TTG 3'

Power SYBR Green：Life Technologies

ローズベンガル平板寒天培地

KH₂PO₄ 1g/L、MgSO₄・7H₂O 0.5g/L、ペプトン 5g/L、グルコース 10g/L、ローズベンガル 0.033g/L、寒天 17g/L（pH6.8）

エッグアルブミン平板寒天培地

エッグアルブミン 0.25g/L、グルコース 1g/L、K₂HPO₄ 0.5g/L、MgSO₄・7H₂O 0.2g/L、Fe₂(SO₄)₃ 0.01g/L、寒天 15g/L（pH6.8）

試薬は、すべて一級以上のものを使用した。

2) 方法

実験 1. 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物に使用する線虫寄生菌として選抜した *Purpureocillium* sp. EP015 の土壤中の生菌数の迅速な分析方法の確立

MPS 液体培地で *Purpureocillium* sp. EP015 を振盪培養 (30°C・1 週間) した培養液 (以下、培養液と呼ぶ。) を滅菌水で 100 倍および 1 万倍に希釈した後、2mm 篩で篩い分けした A-3 圃場土壌 90g に培養液または培養液希釈液 (100 倍および 1 万倍希釈) 10mL を接種し、混和し、*Purpureocillium* sp. EP015 の接種量の違う 3 種類の培養液接種土壌を作製した。FastDNA SPIN Kit for Soil を用いて 3 種類の培養液接種土壌 400mg から DNA を回収した。DNA 回収方法は以下の通りである。スキムミルク以外はすべてキットに含まれている試薬を使用した (これらの詳細な組成は不明である。)。スキムミルク 100mg と試料 400mg を入れた破碎用チューブ (Lysing Matrix E) に Sodium Phosphate Buffer 978 μ L と MT Buffer 122 μ L を加え、Fast Prep で 5.5m/s で 30 秒間破碎した。遠心分離 (14,000 \times g、1 分間) した後、上清 400 μ L を新しいエッペンドルフチューブに移した。次に PPD 溶液 250 μ L を加えて転倒混和し、遠心分離 (14,000 \times g、5 分間) した。上清を 5mL チューブに移し、Binding Matrix Suspension (よく攪拌しながら使用する。) 1mL を加え、2 分間手で振盪した後、静置した。沈殿した Binding Matrix を避けて上清 500 μ L を取り除いた後、Binding Matrix を再懸濁して 600 μ L を SPIN Filter に移し、遠心分離 (14,000 \times g、1 分間) した。流下液を捨て、残りの懸濁液を同様の操作で SPIN Filter に移し、遠心分離 (14,000 \times g、1 分間) した。回収した Binding Matrix に SEWS-M 溶液 500 μ L を加え、遠心分離 (14,000 \times g、1 分間) した。流下液を捨てた後、SEWS-M 溶液を完全に除去するために遠心分離 (14,000 \times g、2 分間) し、SPIN Filter を Catch Tube に載せ替えた。Matrix を 5 分間風乾させた後、DES 溶液 80 μ L を加え穏やかに懸濁し、遠心分離 (14,000 \times g、1 分間) し、溶出液を Catch Tube に回収した。以上が、DNA 回収方法である。次に回収した DNA を滅菌水で 10 倍に希釈し、滅菌水 7.1 μ L、Power SYBR Green 12.5 μ L、PLrtF (50pmol/ μ L) 0.2 μ L、PLrtR (50pmol/ μ L) 0.2 μ L および 10 倍希釈鋳型 DNA 5.0 μ L を混合した後、リアルタイム PCR で Ct 値を測定した。DNA 増幅条件は、95°C・10 分間の後、95°C・15 秒→60°C・1 分間を 50 サイクルで行った。

また、ローズベンガル寒天培地を用いた希釈平板法により培養液接種土壌中の生菌数を調査した。調査方法は以下の通りである。培養液接種土壌 10g を滅菌水 90mL に加え、10 分間水平振盪した後、懸濁液を滅菌水で 10 倍ごとに希釈し、ローズベンガル寒天培地に混釈した。30°C で 3 日間培養したのち、コロニーを計数した。

実験 2. ポット試験を用いた *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の効果の確認

約 2mm の篩で篩い分けした A-3 圃場土壌 150g に *Purpureocillium* sp. EP015 培養物 1.5g を施用し、次にサツマイモネコブセンチュウ卵懸濁液 (76 卵/mL) 5mL (50 卵/20g 土壌相当) を添加し、よく混合した後、9cm ポリポット (黒色) に充填した。対照区に *Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、農薬 (ネマトリンエース粒剤 20kg/10a 相当処理 30mg/ポット) 処理区および滅菌 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区 (1.5g/ポット) を設けた。試験は 4 連で行った。処理直後にポットの中央に 4 葉の展開したハウセンカ苗を定植し、9cm ポットに日光が当たらないようにするために 9cm ポットを白色のポリポットの中に入れガラス温室内で栽培した。なお、この試験は冬季に実施したので、地温を保つために保温マット上で栽培した (地温を保つため、灌水に用いる水は前日にバケツに入れ温室内の床に放置しておいた汲み置きの水を使用した。)。定植 6 週間後に薬さじを用いて 4 カ所から土壌約 1g 採取した後、ハウセンカをポットから取り出し、流水で根を洗った。根にできた根こぶを計数したのち、乾燥機 (65°C・12 時間) で乾燥させ、地上部と根重を計量した。採取した土壌を供試して、リアルタイム PCR 法により栽培後土壌中の *Purpureocillium* sp. EP015 の菌数を調査した。リアルタイム PCR 法の方法は、実験 1 に従った。

実験 3. ポット試験を用いた *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量の検討

約 2mm の篩で篩い分けした A-3 圃場土壌 150g に *Purpureocillium* sp. EP015 培養物 300 mg、600 mg、900mg、1.2g および 1.5g をそれぞれ施用し、次にサツマイモネコブセンチュウ卵懸濁液 (76 卵/mL) 5mL (50 卵/20g 土壌相当) を添加し、よく混合した後、9cm ポリポット (黒色) に充填した。対照区に *Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区および農薬 (ネマトリンエース粒剤 20kg/10a 相当処理 30mg/ポット) 処理区を設けた。試験は 4 連で行った。処理直後にポットの中央に 4 葉の展開したハウセンカ苗を定植し、9cm ポットに日光が当たらないようにするために 9cm ポットを白色のポリポットの中に入れガラス温室内で栽培した。以下、実験 2 と同じ操作を行った。

実験 4. ポット試験を用いた *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用時期の検討

約2mmの篩で篩い分けしたA-3圃場土壌 150gに *Purpureocillium* sp. EP015 培養物 900mg を施用し、次にサツマイモネコブセンチュウ卵懸濁液 (76 卵/mL) 5mL (50 卵/20g 土壌相当) を添加し、よく混合した後、9cm ポリポット (黒色) に充填した。対照区に *Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区および農薬 (ネマトリンエース粒剤 20kg/10a 相当処理 30mg/ポット) 処理区を設けた。試験は4連で行った。*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用0 および1、2週間後にポットの中央に4葉の展開したハウセンカ苗を定植し、9cm ポットに日光が当たらないようにするために9cm ポットを白色のポリポットの中に入れてガラス温室内で栽培した。以下、実験2と同じ操作を行った。

実験5. 無底ポットを用いた *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用後からの土壌中の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数の推移

1) ダイコン栽培試験

施肥前に全無底ポット内の土壌を深さ1mまで掘出し、均一になるようにブルーシートの上でスコップを用いて混合した後、無底ポットに土壌を戻した。肥料20g/ポット、堆肥720g/ポットおよび *Purpureocillium* sp. EP015 培養物を1ポットあたり36g、72g および144g 施用し (それぞれ、100kg/10a、200kg/10a および400kg/10a に相当する。) 混合した (2012年9月27日)。対照区として *Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区を設けた。試験は8連で行った。施用して約2週間後にダイコン種子3粒を無底ポットの中央に播種した (2012年10月10日)。栽培期間中に灌水、薬剤処理および追肥は行わなかった。早霜のため、ほとんどのダイコンが枯死したので、試験を中止した。播種3ヶ月後 (2013年1月21日) に無底ポット内の土壌をサンプリング用スコップで深さ20cmまで4か所からサンプリングし、植物寄生性線虫 (ネコブセンチュウおよびネグサレセンチュウ 写真5-3) 密度をベルマン法 (26°C 2晩) で、*Purpureocillium* sp. EP015 密度はリアルタイムPCR法で調査した。リアルタイムPCR法の方法は、実験1に従った。



写真 5-3. ネコブセンチュウ（左）、ネグサレセンチュウ（右）

ネコブセンチュウは、一般的に頭部（H）にある口針（S）が細く、尾（T）が尖っている。ネグサレセンチュウは、一般的に頭部（T）にある口針（S）が太く、尾（T）が丸まっている。

2) サツマイモ栽培試験

2013年4月1日に無底ポット内の土壌をサンプリング用スコップで深さ20cmまで4か所からサンプリングし、栽培前土壌のネコブセンチュウ密度をベルマン法（26℃ 2晩）で、*Purpureocillium* sp. EP015 密度はリアルタイム PCR法で調査した。リアルタイム PCR 法の方法は、実験1に従った。次に堆肥720g/ポットを施用し、混合した。2週間後（2013年4月17日）に菜種油かすまたはカニガラ180g/ポットを施用し、さらに *Purpureocillium* sp. EP015 培養物を1ポットあたり36g、72g および144gを施用し（それぞれ、100kg/10a、200kg/10a および400kg/10aに相当する。）、混合した。*Purpureocillium* sp. EP015 培養物処理区は前作と同様にした。試験は4連で行った。サンプリング用スコップで深さ20cmまで4か所からサンプリングし、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用時の土壌のネコブセンチュウ密度をベルマン法（26℃ 2晩）で、*Purpureocillium* sp. EP015 密度はリアルタイム PCR 法で、一般糸状菌数をローズベンガル平板寒天培地を用いた希釈平板法（30℃・3日間培養）で、一般細菌数および一般放線菌数をエッグアルブミン平板寒天培地を用いた希釈平板法（30℃・7日間培養）で調査した。次に、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用してから約3週間後にサツマイモツル苗を無底ポットの中央に1株定植した（2013年5月7日）。定植時にサンプリング用スコップで4か所からサンプリング用スコップで深さ20cmまでサンプリングし、定植時の線虫密度などを上

記の方法で調査した。定植後の1週間は灌水をした。栽培期間中に4週間ごとに土壌をサンプリング用スコップで深さ20cmまで4か所からサンプリングし、ネコブセンチュウ密度などを上記の方法で調査した。約5ヶ月間栽培した後、根重、根こぶ指数（5段階評価法）を測定した（2013年9月20日）。また、栽培終了直後の土壌をサンプリング用スコップで深さ20cmまで4か所からサンプリングし、線虫密度などを上記の方法で調査した。

根こぶ指数（5段階評価法）判定基準

0：根こぶなし。

1：根こぶがわずかに認められるが被害は目立たない。

2：一見して根こぶが認められる。大きな根こぶやつながった根こぶは少ない。

3：大小の根こぶが多数認められる。根こぶに覆われて太くなった根も見られるが、根域全体の50%以下。

4：多くの根が根こぶだらけで太くなっている。

実験6. 圃場でナスを栽培したときの *Purpureocillium* sp. EP015 の培養物の施用によるナス収量および根こぶ指数への影響

Purpureocillium sp. EP015 培養物施用4週間前に堆肥240kgを散布した後、小型耕耘機を用いて耕耘した（2013年3月11日）。堆肥施用約2週間後に24区画に分割した（2013年3月29日）。区の大きさは、幅1.5m、長さ3mである。土壌をサンプリング用スコップで深さ20cmまで6か所からサンプリングし、ネコブセンチュウ密度をベルマン法（26℃ 2晩）で調査した。サンプリング直後に肥料15kg（N-P₂O₅-K₂O=15-21-24kg/10a）を施肥し、小型耕耘機を用いて混合した。区は、① *Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、② *Purpureocillium* sp. EP015 培養物全面全層施用区（以下、全面全層区と呼ぶ。）、③ *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区（以下、植穴施用区と呼ぶ。）、④ カニガラ混合 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区（以下、カニガラ併用区と呼ぶ。）を設けた。試験は、5連で行った。*Purpureocillium* sp. EP015 培養物を全面全層処理した後、マルチをかけ、マルチに植穴を開けた。植穴は株間が均一になるように配列し、次に植穴処理をした（2013年4月1日）。植穴処理した大きさは、直径20cm、深さ20cmである（体積：6,280cm³）。それぞれの区の施用方法は、全面全層区では、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物

450g を全面に均一に散布しスコップを用いて混和した。植穴施用区では、マルチにあけた植穴に *Purpureocillium* sp. EP015 培養物 110g を処理しスコップを用いて混和した。カニガラ併用区では、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物をカニガラと等重量混合したもの 220g を植穴に処理しスコップを用いて混和した。次に、培養物を処理して 2 週間後にナス苗を 1 区当たり 4 株定植した (2013 年 4 月 15 日)。降霜で全株枯死したので、すべてのナス苗を植えなおした (2013 年 5 月 10 日)。約 5 ヶ月間栽培した。出荷サイズになったナスを適宜、収穫し、重量を測定した。栽培終了後に栽培したすべてのナスの根 96 株をスコップで掘りあげ、根こぶ程度を 10 段階評価し、根こぶ程度の平均値を根こぶ指数とした (2013 年 10 月 7 日)。また、調査直後に栽培後土壌をサンプリング用スコップで深さ 20cm までサンプリングした。EP015 培養物無施用区および全面全層区については株間 6 か所を、植穴施用区と EP015 培養物無施用区については植穴の土壌 4 か所をサンプリングした。土壌のネコブセンチュウ密度をベルマン法 (26°C 2 晩) で、*Purpureocillium* sp. EP015 密度はリアルタイム PCR 法で調査した。リアルタイム PCR 法の方法は、実験 1 に従った。

3. 結果

実験 1. 植物の線虫害軽減を目的とした線虫天敵糸状菌の培養物に使用する線虫寄生菌として選抜した *Purpureocillium* sp. EP015 の土壌中の生菌数の迅速な分析方法の確立

土壌中の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数が多くなるにつれて、Ct 値が低下し、相関関係が認められた ($p < 0.05$) (図 5-1)。

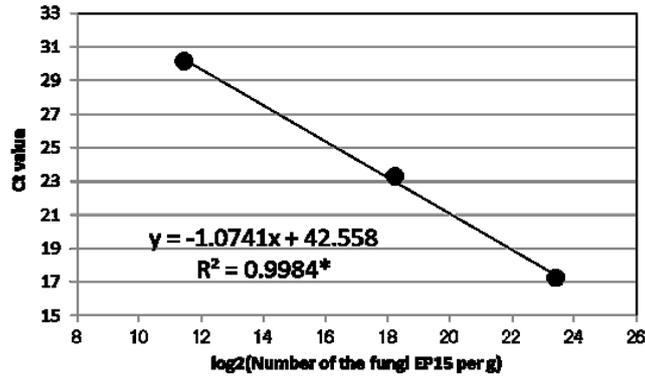


図 5-1. 土壌中の *Purpureocillium* sp. EP015 生菌数と Ct 値との関係 ($p < 0.05$)

実験 2. ポット試験を用いた *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の効果の確認

ネコブ密度について農薬処理区と滅菌 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物（以下、EP015 培養物と呼ぶ。）無施用区との間で有意差（t 検定・ $p < 0.05$ ）が観察された（表 5-1）。有意差（t 検定・ $p < 0.05$ ）が観察されなかったが、EP015 培養物施用区のネコブ密度は EP015 培養物無施用区のネコブ密度に比べて約 40% 低下し、滅菌 EP015 培養物施用区は EP015 培養物無施用区とほぼ同等であった（表 5-1）。EP015 培養物施用区の栽培後土壌から *Purpureocillium* sp. EP015 が 1.0×10^5 cfu/g で検出された（表 5-1）。

表 5-1. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用の違いによるネコブ密度の違い

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、nematicide は、農薬（ネマトリンエース粒剤 20kg/10a 相当処理 30mg/ポット）処理区、autoclaved FA は、滅菌 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区、および FA は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区である。異なるアルファベット間で t 検定において 5%水準の有意な差があることを示す。sd は、標準偏差の値を示す

	根乾燥重		ネコブ数		ネコブ密度		<i>Purpureocillium</i> sp. EP015	
	g	sd	個	sd	個/g	sd	cfu/g	sd
control	0.178 ^a	0.021	63.5 ^a	21.2	377.1 ^{ab}	180.0	-	-
nematicide	0.180 ^a	0.017	14.3 ^b	5.7	81.3 ^a	37.4	-	-
autoclaved FA	0.081 ^b	0.013	32.5 ^{ab}	13.0	392.5 ^b	135.2	-	-
FA	0.093 ^b	0.033	15.3 ^b	11.9	226.2 ^{ab}	213.5	1.0×10^5	9.1×10^4

実験 3. ポット試験を用いた *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量の検討

ネコブ密度について EP015 培養物無施用区と EP015 培養物 600kg/10a 施用区

との間で有意差 (t 検定・ $p < 0.05$) が観察され、EP015 培養物 600kg/10a 施用区
のネコブ密度は EP015 培養物無施用区の約 1/6 になった (表 5-2)。EP015 培養
物施用区の栽培後土壌から *Purpureocillium* sp. EP015 を $10^4 \sim 10^6$ cfu/g 検出
した (表 5-2)。

表 5-2. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量の違いによるネコブ密度の違い

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、nematicide は、農薬 (ネマトリンエース粒剤
20kg/10a 相当処理 30mg/ポット) 処理区、FA200kg/10a~1t/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物
施用区である。異なるアルファベット間で t 検定において 5%水準の有意な差があることを示す。sd は、
標準偏差の値を示す。

	根乾燥重		ネコブ数		ネコブ密度		<i>Purpureocillium</i> sp. EP015	
	g	sd	個	sd	個/g	sd	cfu/g	sd
control	0.261 ^{abcd}	0.092	70.3 ^a	11.9	295.5 ^a	86.8	-	-
nematicide	0.371 ^{abc}	0.138	53.3 ^{abc}	28.4	141.2 ^{ab}	47.5	-	-
FA200kg/10a	0.187 ^{abcd}	0.101	38.0 ^b	11.5	278.6 ^{ab}	154.0	1.4×10^{5a}	1.6×10^5
FA400kg/10a	0.205 ^{abcd}	0.093	52.5 ^{abc}	31.1	328.7 ^{ab}	193.3	7.1×10^{4a}	4.7×10^4
FA600kg/10a	0.285 ^{ab}	0.046	13.5 ^c	4.0	51.4 ^b	23.8	2.5×10^{5a}	1.7×10^5
FA800kg/10a	0.123 ^{acd}	0.031	17.3 ^{bc}	13.3	125.9 ^{ab}	100.0	1.2×10^{5a}	8.9×10^4
FA1t/10a	0.098 ^{bd}	0.024	15.3 ^{bc}	7.2	164.7 ^{ab}	69.5	1.1×10^{6a}	1.2×10^6

実験 4. ポット試験を用いた *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用時期の検討

ネコブ密度について農薬 (ネマトリンエース粒剤) 処理区と EP015 培養物施用直後にハウセンカを定植した区との間で有意差 (t 検定・ $p < 0.05$) が観察された (表 5-3)。EP015 培養物施用区では、施用から定植までの期間が長くなるに伴い、ネコブ密度が低下する傾向が観察された ($p=0.24$) (図 5-2)。施用 2 週間後に定植した区では EP015 培養物無施用区の約半分になり、農薬処理区とほぼ同等であった (表 5-3)。EP015 培養物施用区の栽培後土壌から *Purpureocillium* sp. EP015 を $10^3 \sim 10^5$ cfu/g 検出した (表 5-3)。

表 5-3. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用時期の違いによるネコブ密度の違い

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、nematicide は、農薬（ネマトリンエース粒剤 20kg/10a 相当処理 30mg/ポット）処理区、600kg/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区を示す。また、0W は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用直後にハウセンカを定植、1W は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用 1 週間後にハウセンカを定植、2W は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用 2 週間後にハウセンカを定植した。異なるアルファベット間で t 検定において 5%水準の有意な差があることを示す。sd は、標準偏差の値を示す。

	根乾燥重		ネコブ数		ネコブ密度		<i>Purpureocillium</i> sp. EP015	
	g	sd	個	sd	個/g	sd	cfu/g	sd
control	0.488 ^{abc}	0.162	18.0 ^{ab}	8.2	39.6 ^{ab}	20.1	-	-
nematicide	0.577 ^{ab}	0.150	5.5 ^{ab}	4.1	9.1 ^a	5.3	-	-
600kg/10a-0W	0.295 ^{ac}	0.007	14.8 ^a	5.9	50.4 ^b	20.7	4.6×10^{5a}	5.0×10^5
600kg/10a-1W	0.243 ^{abcd}	0.104	4.3 ^{ab}	2.9	22.4 ^{ab}	14.3	9.5×10^{3a}	5.6×10^3
600kg/10a-2W	0.160 ^d	0.027	2.8 ^b	2.0	17.2 ^{ab}	12.5	1.1×10^{4a}	1.3×10^4

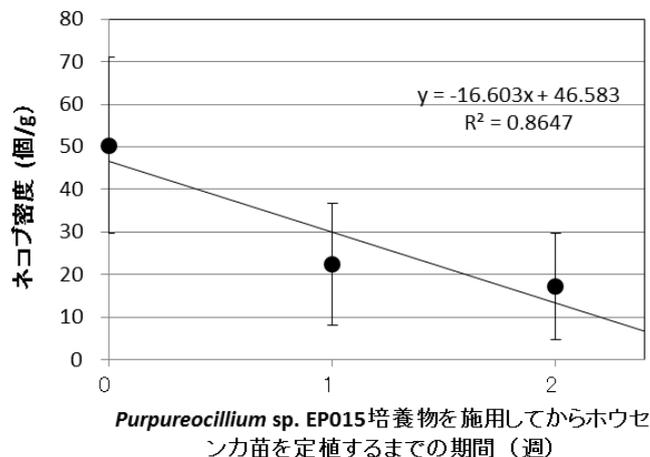


図 5-2. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物を施用してからハウセンカ苗を定植するまでの期間とハウセンカのネコブ密度の関係

実験 5. 無底ポットを用いた *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用後からの土壤中の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数の推移

1) ダイコン栽培試験

ダイコンを播種してから 3 ヶ月後の無底ポット内の土壤の植物寄生性線虫密

度については、ネコブセンチュウでは EP015 培養物無施用区と EP015 培養物 200kg/10a 施用区および EP015 培養物 400kg/10a 施用区の間で有意差が観察され ($p < 0.05$)、EP015 培養物 400kg/10a 施用区が最も線虫密度が低く、対照区に比べて 1/3 に低下した (図 5-3)。

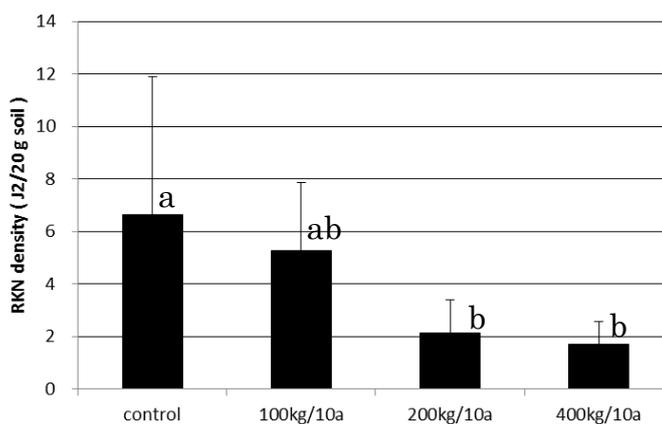


図 5-3. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量の違いによるネコブセンチュウ密度への影響

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、100kg/10a~400kg/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区である。異なるアルファベット間で Tukey-Kramer の HSD 検定において 5%水準の有意な差があることを示す。

一方、ネグサレセンチュウでは有意差 (t 検定・ $p < 0.05$) が観察されなかったが、EP015 培養物 400kg/10a 施用区が最も線虫密度が低く、EP015 培養物無施用区に比べて 1/2 に低下した (図 5-4)。

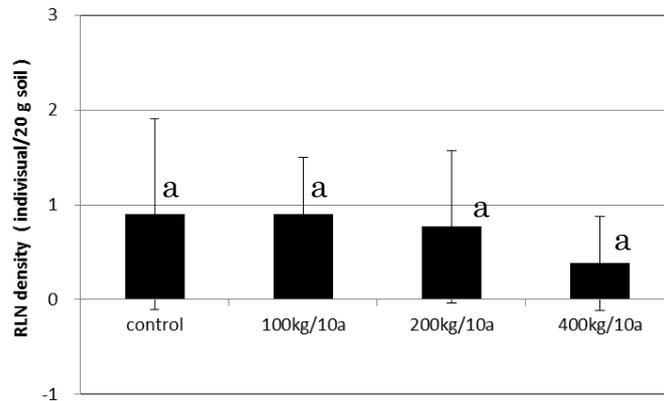


図 5-4. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量の違いによるネグサレセンチュウ密度への影響

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、100kg/10a~400kg/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区である。異なるアルファベット間で t 検定において 5%水準の有意な差があることを示す。

栽培後土壤中の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数は有意差 (t 検定・ $p < 0.05$) が観察されなかったが、EP015 培養物 400kg/10a 施用区と EP015 培養物 200kg/10a 施用区の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数はほぼ同等であった (図 5-5)。

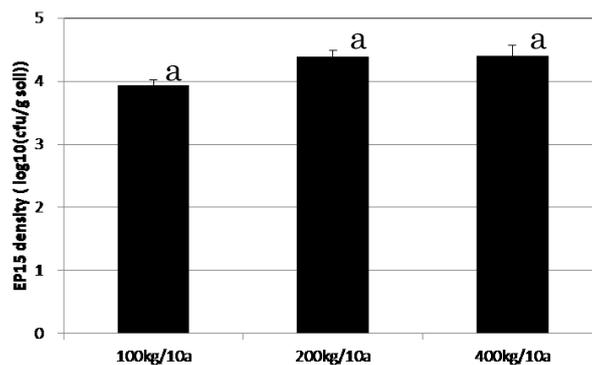


図 5-5. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量の違いによる栽培後土壤中の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数への影響

100kg/10a~400kg/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区である。異なるアルファベット間で t 検定において 5%水準の有意な差があることを示す。

2) サツマイモ栽培試験

ネコブセンチュウ密度は、サツマイモ苗定植後に減少し、定植 12 週間後から上昇した（図 5-6）。定植 20 週間後（収量調査時）では、菜種油かす施用区では、ネコブセンチュウ密度が、EP015 培養物 100kg/10a 施用区が最も低く、次に EP015 培養物 400kg/10a 施用区、次に EP015 培養物無施用区であり、EP015 培養物 200kg/10a 施用区が最も高く、それぞれ EP015 培養物 100kg/10a 施用区に比べて 2 倍、7 倍および 13 倍であった。カニガラ施用区では、EP015 培養物 400kg/10a 施用区が最も低く、次に EP015 培養物無施用区、次に EP015 培養物 200kg/10a 施用区であり、EP015 培養物 100kg/10a 施用区が最も高く、EP015 培養物 400kg/10a 施用区に比べてそれぞれ 9 倍、11 倍および 26 倍であった。また、菜種油かす施用区とカニガラ施用区を比較したとき、EP015 培養物 100kg/10a 施用区以外の区では、ネコブセンチュウ密度はカニガラ施用区が菜種油かす施用区に比べて 38~81%低下した。

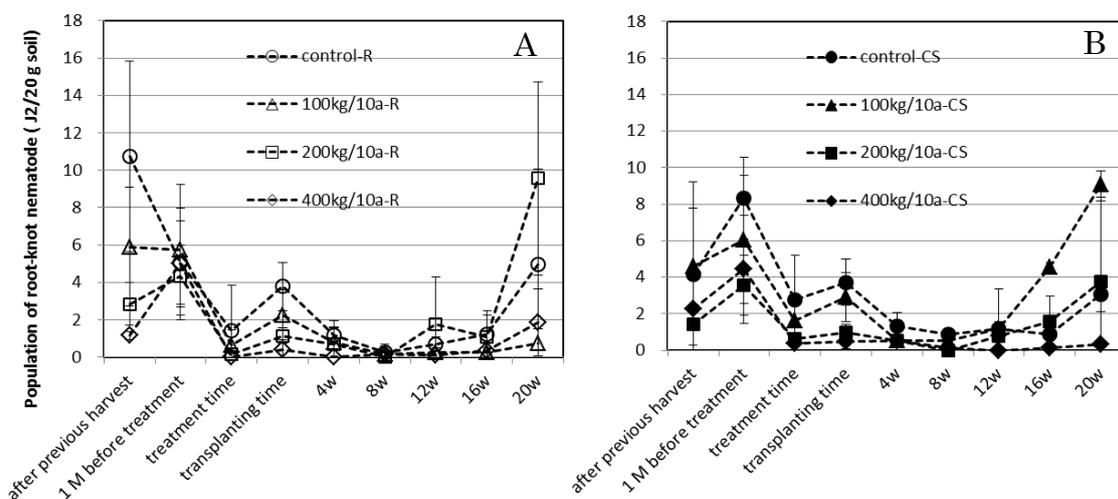


図 5-6. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量と有機質肥料の違いによるネコブセンチュウ密度の推移への影響 A: 菜種油かす施用、B: カニガラ施用

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、100kg/10a~400kg/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区、R は、菜種油かす施用区および CS は、カニガラ施用区を示す。after previous harvest は、前作後、1M before treatment は、施用 1 ヶ月前（堆肥施用時）、treatment time は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物および有機質肥料施用時、transplanting time は、サツマイモ苗定植時、4W~20W は、定植 4 週間後~20 週間後（収穫時）を示す。

Purpureocillium sp. EP015 の生菌数は、EP015 培養物施用直後から減少した (図 5-7)。定植 20 週間後 (収量調査時) では、菜種油かす施用区では、*Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数は、EP015 培養物 100kg/10a 施用区が最も低く、次に EP015 培養物 200kg/10a 施用区であり、最も高い区は、EP015 培養物 400kg/10a 施用区であった。EP015 培養物 100kg/10a 施用区に比べて EP015 培養物 200kg/10a 施用区で 1.5 倍、EP015 培養物 400kg/10a 施用区で 1.7 倍であった。一方、カニガラ施用区では、EP015 培養物 200kg/10a 施用区が最も低く、次に EP015 培養物 100kg/10a 施用区であり、最も高い区は EP015 培養物 400kg/10a 施用区であった。EP015 培養物 200kg/10a 施用区に比べて EP015 培養物 100kg/10a 施用区で 1.6 倍、EP015 培養物 400kg/10a 施用区で 1.9 倍であった。菜種油かす施用区とカニガラ施用区を比較したとき、EP015 培養物 200kg/10a 施用区以外の区では、*Purpureocillium* sp. EP015 密度はカニガラ施用区が菜種油かす施用区に比べて 1.2~1.5 倍であった。

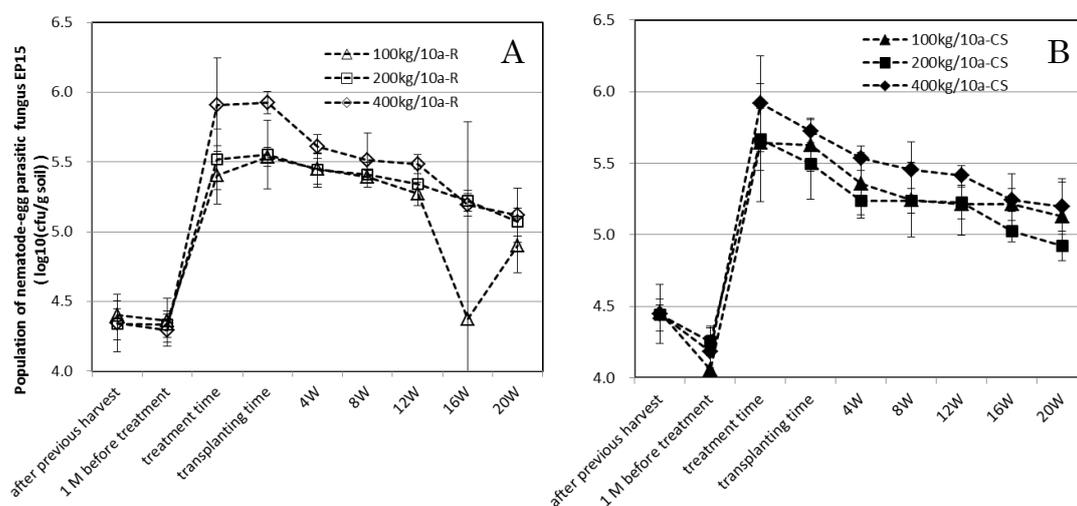


図 5-7. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量と有機質肥料の違いによる *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数の推移への影響 A: 菜種油かす施用、B: カニガラ施用

control は *Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、100kg/10a~400kg/10a は *Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区、R は菜種油かす施用区、CS はカニガラ施用区を示す。after previous harvest は前作後、1M before treatment は施用 1 ヶ月前 (堆肥施用時)、treatment time は *Purpureocillium* sp. EP015 培養物および有機質肥料施用時、transplanting time はサツマイモ苗定植時、4W~20W は定植 4 週間後~20 週間後 (収穫時) を示す。

糸状菌数は、EP015 培養物を施用してから上昇し、定植後からは減少した（図 5-8）。定植 20 週間後（収量調査時）では、菜種油かす施用・EP015 培養物 100kg/10a 施用区とカニガラ施用・EP015 培養物 200kg/10a 施用区に有意差が観察された（ $p < 0.05$ ）が、他の区には有意差は観察されなかった。菜種油かす施用区では、EP015 培養物 100kg/10a 施用区が最も低く、次に EP015 培養物無施用区、次に 200kg/10a 施用区であり、EP015 培養物 400kg/10a 施用区が最も高く、EP015 培養物 100kg/10a 施用区に比べてそれぞれ 1.7 倍、2.1 倍および 2.2 倍であった。一方、カニガラ施用区では、EP015 培養物無施用区が最も低く、次に EP015 培養物 100kg/10a 施用区、次に EP015 培養物 400kg/10a 施用区であり、EP015 培養物 200kg/10a 施用区が最も高く、EP015 培養物無施用区に比べてそれぞれ 1.1 倍、2.0 倍および 2.3 倍であった。菜種油かす施用区とカニガラ施用区を比較したとき、EP015 培養物 200kg/10a 施用区および EP015 培養物 400kg/10a 施用区では、カニガラ施用区の糸状菌数が菜種油かす施用区に比べて高く、菜種油かす施用に比べて 1.2~1.4 倍であった。

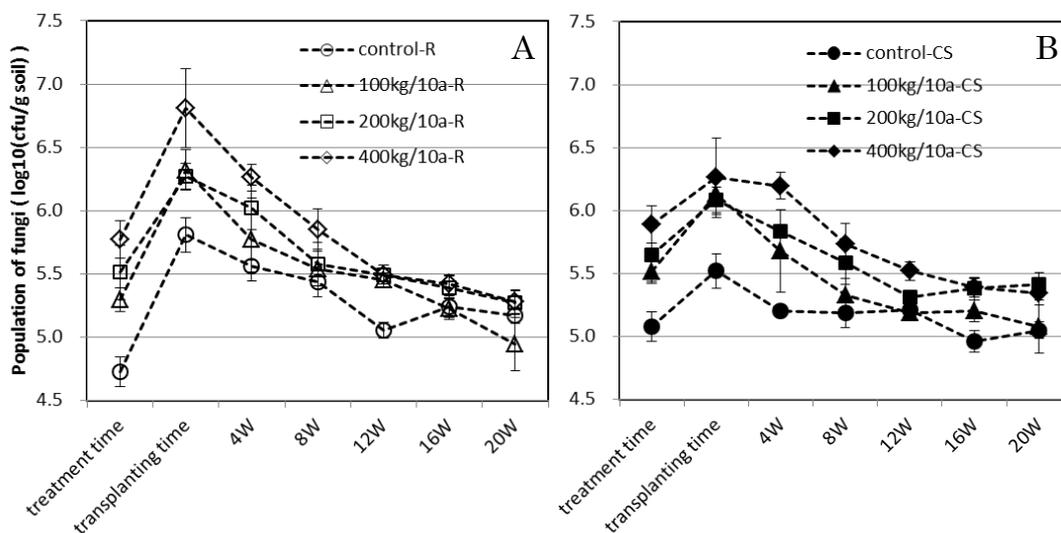


図 5-8. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量と有機質肥料の違いによる糸状菌数の推移への影響 A: 菜種油かす施用、B: カニガラ施用

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、100kg/10a~400kg/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区、R は、菜種油かす施用区および CS は、カニガラ施用区を示す。treatment time は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物および有機質肥料施用時、transplanting time は、サツマイモ苗定植時、4W~20W は、定植 4 週間後~20 週間後（収穫時）を示す。

細菌数は、EP015 培養物を施用してから上昇し、定植後からは減少した（図 5-9）。定植 20 週間後（収量調査時）では、菜種油かす施用区では、EP015 培養物無施用区と EP015 培養物 100kg/10a 施用区は同数で最も低くなり、これらの区に比べて EP015 培養物 200kg/10a 施用区および 400kg/10a 施用区では同数で最も高く、EP015 培養物無施用区および EP015 培養物 100kg/10a 施用区に比べて EP015 培養物 200kg/10a 施用区および 400kg/10a 施用区は 1.2 倍であった。一方、カニガラ施用区では、細菌数の違いは観察されなかった。菜種油かす施用区とカニガラ施用区を比較したとき、細菌数の違いは観察されなかった。

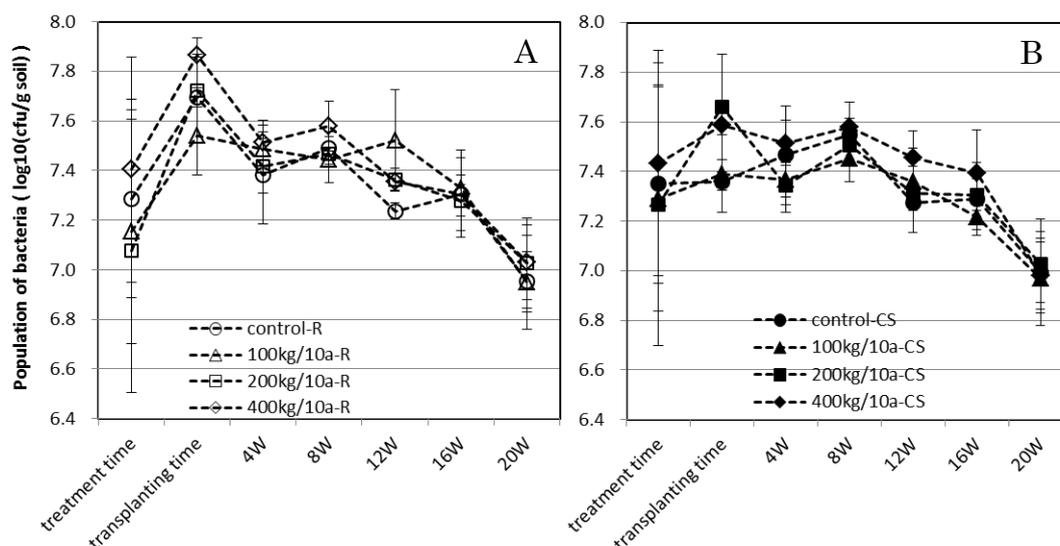


図 5-9. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量と有機質肥料の違いによる細菌数の推移への影響 A: 菜種油かす施用、B: カニガラ施用

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、100kg/10a~400kg/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区、R は、菜種油かす施用区および CS は、カニガラ施用区を示す。treatment time は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物および有機質肥料施用時、transplanting time は、サツマイモ苗定植時、4W~20W は、定植 4 週間後~20 週間後（収穫時）を示す。

放線菌数は、栽培期間中に緩やかに増加した（図 5-10）。定植 20 週間後（収量調査時）では、菜種油かす施用区、カニガラ施用区とも、EP015 培養物無施用区が最も低く、次に EP015 培養物 100kg/10a 施用区、EP015 培養物 200kg/10a 施用区であり、EP015 培養物 400kg/10a 施用区が最も高く、EP015 培養物 100kg/10a 施用区に比べて菜種油かす施用区ではそれぞれ 1.1 倍、1.4 倍および

1.9 倍であり、カニガラ施用区ではそれぞれ 1.2 倍、1.4 倍および 1.4 倍であった。菜種油かす施用区とカニガラ施用区を比較したとき、栽培期間中の放線菌数の平均値は菜種油かす区に比べてカニガラ施用区が高く、1.4 倍であった。

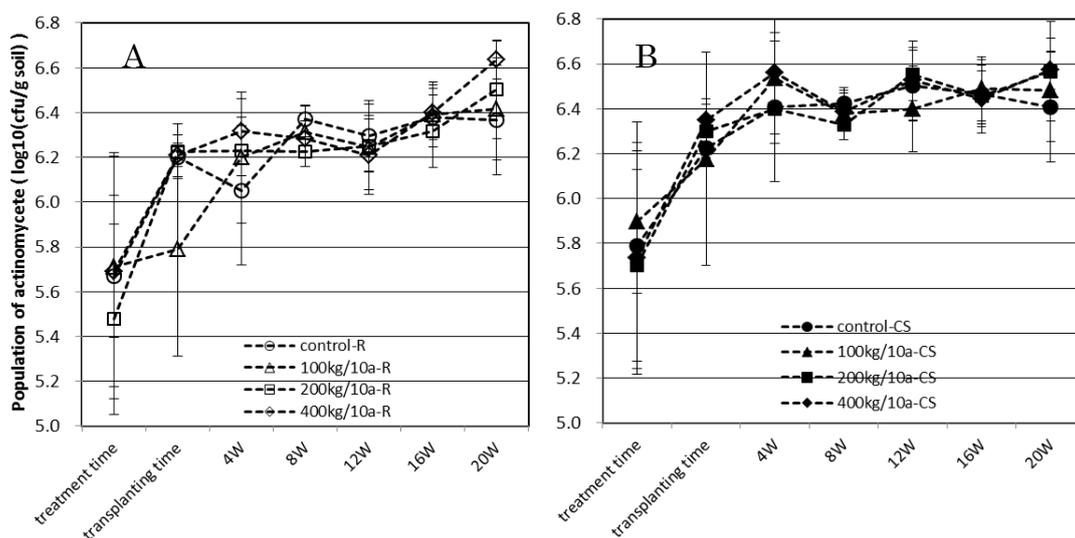


図 5-10. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量と施肥の違いによる放線菌数の推移への影響 A : 菜種油かす施用、B : カニガラ施用

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、100kg/10a~400kg/10a は、線虫卵寄生菌 EP15 培養物施用区、R は、菜種油かす施用区および CS は、カニガラ施用区を示す。treatment time は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物および有機質肥料施用時、transplanting time は、サツマイモ苗定植時、4W~20W は、定植 4 週間後~20 週間後（収穫時）を示す。

収量は、有意差 (t 検定・ $p < 0.05$) が観察されなかったが、カニガラ施用区よりも菜種油かす施用区の方が高かった (図 5-11)。菜種油かす施用区では、EP015 培養物 100kg/10a 施用区が最も低く、次に EP015 培養物 200kg/10a 施用区であり、EP015 培養物 400kg/10a 施用区が最も高かった。カニガラ施肥区については EP015 培養物施用量と収量について傾向が観察されなかった。また、根こぶ指数は、有意差は観察されず、全体的に低かった (図 5-11)。

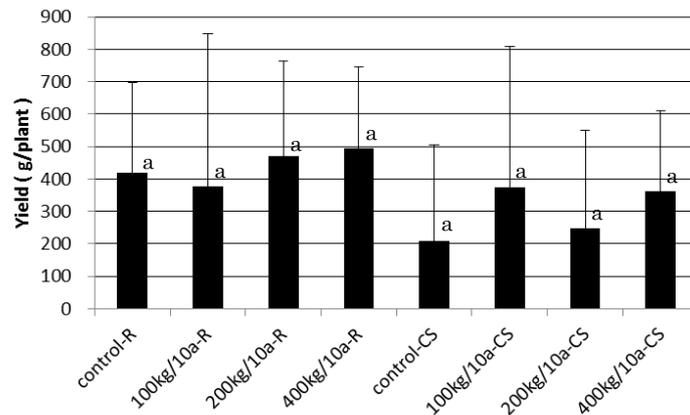


図 5-11. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量と施肥の違いによるサツマイモ収量への影響

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、100kg/10a～400kg/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区、R は、菜種油かす施肥区および CS は、カニガラ施肥区を示す。異なるアルファベット間で t 検定において 5% 水準の有意な差があることを示す。

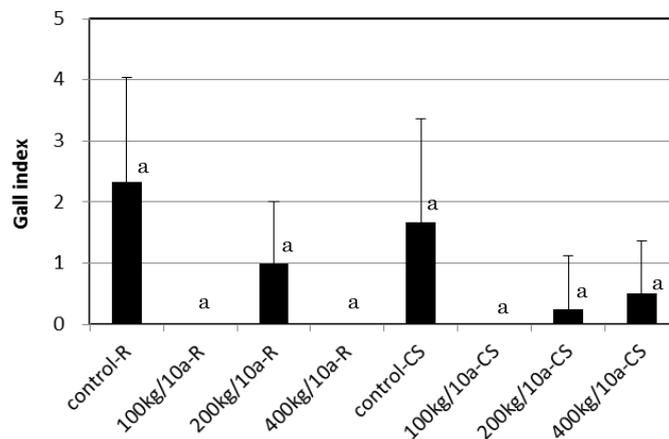


図 5-12. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用量と施肥の違いによるサツマイモの根こぶ指数への影響

control は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、100kg/10a～400kg/10a は、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区、R は、菜種油かす施肥区および CS は、カニガラ施肥区を示す。異なるアルファベット間で t 検定において 5% 水準の有意な差があることを示す。

実験 6. 圃場でナスを栽培したときの *Purpureocillium* sp. EP015 の培養物の施用によるナス収量および根こぶ指数への影響

ナスの収量は、処理区間で有意差（t 検定・ $p < 0.05$ ）はなかったが、カニガラ併用区は EP015 培養物無施用区に比べて約 10% 増収した（図 5-13）。根こぶ指数は、EP015 培養物無施用区とカニガラ併用区との間に有意差（t 検定・ $p < 0.05$ ）が観察され、カニガラ併用区の根こぶ指数は EP015 培養物無施用区に比べて 1/3 低下した（図 5-14）。また、有意差（t 検定・ $p < 0.05$ ）はなかったが、全面全層区および植穴施用区の根こぶ指数も EP015 培養物無施用区に比べて約 20% 低下した（図 5-14）。栽培後土壌のネコブセンチュウ密度は、処理区間で有意差はなかった（図 5-15A、B）。株間では EP015 培養物無施用区と全面全層区ではほぼ同等であり（図 5-15A）、植穴では EP015 培養物無施用区と植穴施用区ではほぼ同等、EP015 培養物無施用区に比べてカニガラ併用区では約 45% 低下した（図 5-15B）。栽培後土壌から *Purpureocillium* sp. EP015 が全面全層区の株間では 2.4×10^4 cfu/g、植穴施用区の植穴では 5.1×10^5 cfu/g、カニガラ併用区の株穴では 1.7×10^6 cfu/g の密度で検出された（図 5-16）。

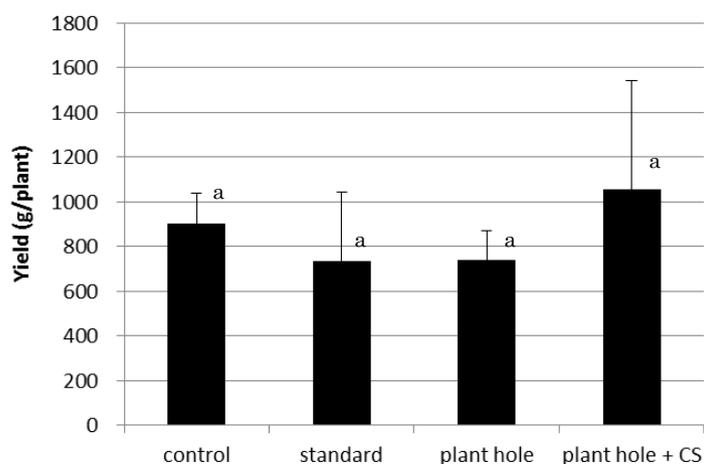


図 5-13. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物処理によるナスの収量の違い

control : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、standard : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物全面全層施用区、plant hole : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区および plant hole+CS : カニガラ混合 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区を示す。異なるアルファベット間で t 検定において 5% 水準の有意な差があることを示す。

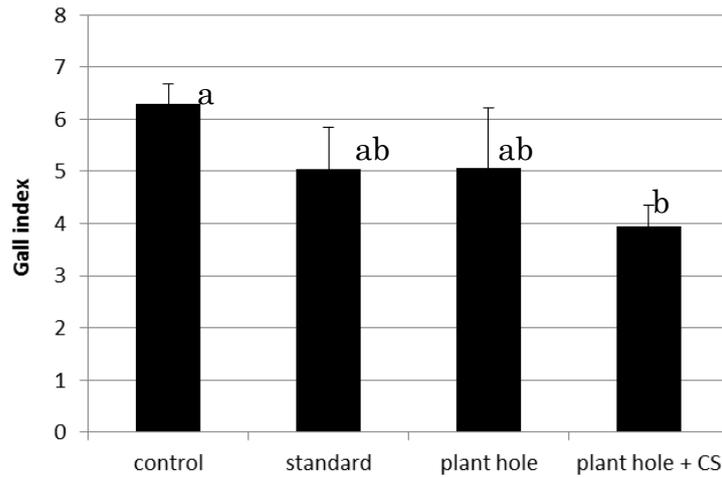


図 5-14. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物処理によるナスの根こぶ指数の違い

control : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、standard : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物全面全層施用区、plant hole : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区および plant hole+CS : カニガラ混合 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区を示す。異なるアルファベット間で t 検定において 5%水準の有意な差があることを示す。

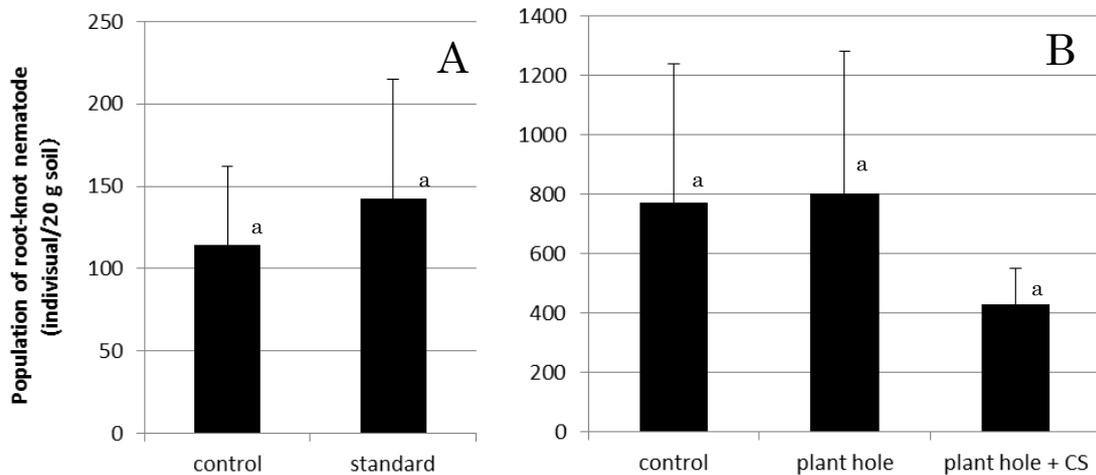


図 5-15. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物処理による栽培後土壌（株間：A、植穴：B）のネコブセンチュウ密度の違い

control : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物無施用区、standard : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物全面全層施用区、plant hole : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区および plant hole+CS : カニガラ混合 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区を示す。異なるアルファベット間で t 検定において 5%水準の有意な差があることを示す。

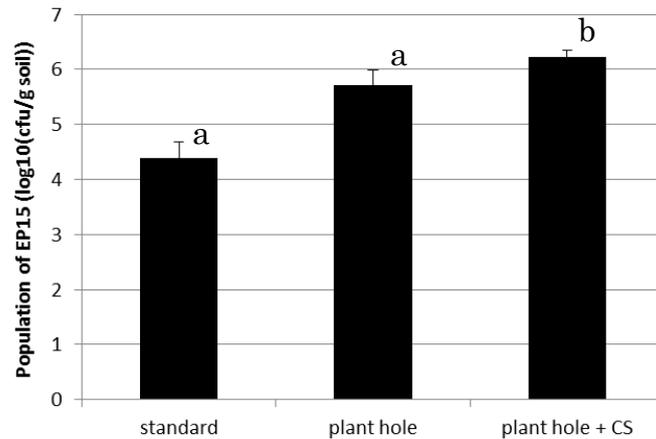


図 5-16. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物処理による栽培後土壌の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数の違い

standard : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物全面全層施用区、plant hole : *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区および plant hole+CS : カニガラ混合 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物植穴施用区を示す。異なるアルファベット間で t 検定において 5%水準の有意な差があることを示す。

4. 考察

土壌中の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数が多くなるにつれて、Ct 値が低下し、相関関係が認められた ($p < 0.05$) ことから、リアルタイム PCR 法で土壌中の *Purpureocillium* sp. EP015 の計数が可能と考えられた。

Purpureocillium sp. EP015 培養物（以下、EP015 培養物と呼ぶ。）の効果の確認では、ネコブ密度について有意差（t 検定・ $p < 0.05$ ）が観察されなかったが、EP015 培養物施用区のネコブ密度は、EP015 培養物無施用区のネコブ密度に比べて約 40%低下し、滅菌 EP015 培養物施用区のネコブ密度は EP015 培養物無施用区のネコブ密度とほぼ同等であったことから、ネコブ密度の低下は培養基材による効果ではなく、培養基材に培養した *Purpureocillium* sp. EP015 によるものであることが示唆された。

EP015 培養物の施用量の検討では、ネコブ密度について EP015 培養物無施用区と EP015 培養物 600kg/10a 施用区との間で有意差（t 検定・ $p < 0.05$ ）が観察され、EP015 培養物 600kg/10a 施用区のネコブ密度は EP015 培養物無施用区の約 1/6 になったことから、EP015 培養物の施用効果が確認でき、EP015 培養物の施用量が 600kg/10a が望ましいことが分かった。EP015 培養物を 600kg/10a 施

用したときの *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数は 5.3×10^5 cfu/g である。一方、*P. lilacinum* 251 株の分生子製剤「BioActWG」の標準施用量 4~8kg/ha (Anastasiadis ら 2008) を施用したときの土壌中の *P. lilacinum* 251 株の分生子密度は、 $2.7 \times 10^5 \sim 5.4 \times 10^5$ 分生子/g となり、EP015 培養物を 600kg/10a 施用したときの *Purpureocillium* sp. EP015 の菌密度と極めて近い値になった。これらのことから *Purpureocillium* 属の糸状菌で線虫を防除するためには $2.7 \times 10^5 \sim 5.4 \times 10^5$ 分生子/g 以上の菌数が必要と考えられる。EP015 培養物を 600kg/10a 相当よりも多く施用した区では、有意差は観察されなかったものの、600kg/10a 相当施用区よりもネコブ密度が高くなる傾向が観察された。施用時の土壌中の *Purpureocillium* 属の菌数は 5.3×10^5 cfu/g 以上となり、線虫害抑制に十分な菌数が確保されていると考えられる。培養に使用している基材がネコブセンチュウ卵に対して孵化促進やネコブセンチュウの寄生に対して促進効果を有しているのかもしれない。

次に、EP015 培養物の施用時期の検討においても、ネコブ密度について有意差 ($p < 0.05$) は観察されなかったが、EP015 培養物施用区では、施用から定植までの期間が長くなるに伴い、ネコブ密度が低下する傾向が観察されたことから、EP015 培養物と線虫卵の接触期間を長くすることにより EP015 培養物の効果が助長されることが示唆された。Anastasiadis ら (2008) が行った「BioActWG」施用時期の検討の試験においては、*P. lilacinum* のネコブセンチュウ卵への孵化阻害は、「BioActWG」の施用からネコブセンチュウ卵の接種までの時間的間隔と被害度に有意差がなかったことから、「BioActWG」が施用された時点で孵化阻害が得られたと報告しており、今回の結果とは異なった。しかし、「BioActWG」の圃場試験では定植から 2 週間前に「BioActWG」を施用しており、また、「BioActWG」中の *P. lilacinum* 251 株の分生子が発芽し、線虫卵に寄生するまでの時間が必要である (Anastasiadis ら 2008) と考察していることから、培養物を施用してから作物を植えるまでにある程度の時間が必要と考えられる。

無底ポットにおいてダイコンを栽培したときの EP015 培養物の施用による影響において、ダイコンを播種してから 3 ヶ月後の無底ポット内の土壌の植物寄生性線虫密度については、ネコブセンチュウでは EP015 培養物無施用区と EP015 培養物 200kg/10a 施用区および EP015 培養物 400kg/10a 施用区の間で有意差が観察された ($p < 0.05$) ことから EP015 培養物による線虫害軽減効果が観察されたと考えられる。栽培後土壌の *Purpureocillium* sp. EP015 の生残菌数が EP015

培養物 200kg/10a 施用区と EP015 培養物 400kg/10a 施用区でほぼ同等であったことから EP015 培養物を 400kg/10a 施用しても EP015 培養物 200kg/10a 施用と同程度しか定着しない可能性が示唆された。また、ネコブセンチュウ密度が EP015 培養物 200kg/10a 施用区と EP015 培養物 400kg/10a 施用区で有意差 (t 検定・ $p < 0.05$) がないことことから、ネコブセンチュウ防除を目的とした場合、EP015 培養物 200kg/10a 施用区で線虫害軽減効果が発揮されると考えられる。

無底ポットにおいてサツマイモを栽培したときの EP015 培養物の施用による土壤微生物相、ネコブセンチュウ数およびサツマイモへの影響について調査したところ、*Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数は EP015 培養物の施用直後から緩やかに減少し、どの処理区も 10^5 cfu/g 土壤になったので、EP015 培養物を多量に施用しても 10^5 cfu/g 土壤になってしまう可能性が示唆された。また、EP015 培養物施用区の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数はカニガラ施用区よりも菜種油かす施用区の方がやや高かったことから、カニガラが *Purpureocillium* sp. EP015 に対して負の影響を与えたことが考えられる。カニガラ施用区では菜種油かす施用区に比べて栽培期間中の放線菌数が高かった。放線菌はキチナーゼを産生することが知られ、糸状菌の細胞壁を溶かす作用を有することが言われている (石沢・鈴木 1973)。したがって、放線菌数が多いカニガラ施用区で糸状菌数の減少が観察されたことから、放線菌により糸状菌が溶菌した可能性が示唆され、カニガラを施用することで糸状菌の *Purpureocillium* sp. EP015 が定着しにくくなることが考えられた。

圃場試験においてナスの収量について EP015 培養物無施用区とカニガラ併用区で有意差が観察され、カニガラ併用区は EP015 培養物無施用区に比べて約 10%増収した ($p < 0.05$)。一方、根こぶ指数は、EP015 培養物無施用区とカニガラ併用区との間に有意差 ($p < 0.05$) が観察され、カニガラ併用区の根こぶ指数は対照区に比べて 1/3 低下した。EP015 培養物無施用区およびカニガラ併用区の根こぶ指数はそれぞれ 6.3、4.0 であり、ナスの収量低下が発生する根こぶ指数が 5 以上であったことから、ナスの収量増加の原因は根こぶ指数の低下が関与していることが示唆された。カニガラ併用区の根こぶ指数が低下した原因として、カニガラ併用区の株穴の栽培後土壤から *Purpureocillium* sp. EP015 が 1.7×10^6 cfu/g の密度で検出されたことから、ナスの栽培期間を通して *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数が線虫を防除するために必要な菌数は 5.3×10^5 cfu/g 以上であったことが挙げられる。また、全面全層区および植穴施用区の根こぶ指数も EP015 培養物無施用区に比べて約 20%低下したことから、

EP015 培養物施用によりナスの根こぶ指数が低下したと考えられる。

第6章 総合考察

線虫天敵微生物の線虫防除への応用は、古くから研究、実施されているが、微生物資材として販売されている線虫天敵微生物は少ない。また、土壌中での線虫天敵微生物の動態や線虫天敵微生物、他の土壌微生物、植物寄生性線虫および作物との相互関係まで明らかにした研究は比較的少ない。

本研究は、このような観点から部分的であるが、土壌から単離した線虫天敵微生物の工場レベルでの大量培養法を確立して微生物資材を開発し、さらに、線虫防除にとって最適な線虫天敵微生物培養物の施用方法を室内試験および野外試験において検討した。また、作物の収量と植物寄生性線虫初期密度との関係を解析し、収量低下が起きる植物寄生性線虫初期密度を明らかにした。

以上の結果を総合的に検討し、土壌中での線虫天敵微生物の動態、他の土壌微生物、植物寄生性線虫および作物と線虫天敵微生物との関係を明らかにしようと試みた。

1. 土壌中での線虫天敵微生物の動態

線虫害が発生しない、もしくは発生が軽微となる「線虫害抑止土壌」がしばしば認められ (Pyrowolakisら 2002、Hallmannら 2009、豊田 2011)、線虫密度の自然的衰退減少に線虫捕捉菌や線虫寄生菌が関与していることが知られており (中園 1992、日本土壌協会 2013)、「線虫害抑止土壌」から線虫捕捉菌や線虫寄生菌が分離された報告もある (De Leij・Kerry 1991、Pyrowolakisら 2002、Hallmannら 2009、豊田 2011、Yangら 2012)。本報告でも愛知県の線虫害抑止土壌から線虫捕捉菌 1 菌株、線虫寄生菌 3 菌株単離したことから、この線虫害抑止土壌の線虫害抑止にこれらの菌が関与している可能性が示唆され、この土壌がこれらの菌にとって生息しやすい環境であることが考えられた。この土壌は化学肥料をまったく使用せず、堆肥だけを連用し栽培していることから、堆肥により自由生活性線虫 (自活性線虫) が増加し、それにともない線虫天敵微生物が増加したことが考えられた。これは、Linford (1937) が行ったパイナップル葉残渣試験と同じ作用機作であると考えられる。パイナップル葉残渣をネコブセンチュウ汚染土壌に添加し、線虫と線虫捕捉菌密度の推移を観察したところ、パイナップル葉残渣添加により自活性

線虫密度が一時的に増加したことで、線虫捕捉菌の活性が高まり、その後、自活性線虫密度が初期密度よりも低下した。線虫天敵微生物を土壤中に定着させやすくするためには、このような線虫天敵微生物が生息しやすい環境を整えることが重要である。

本研究の圃場試験で線虫捕捉菌 *Arthrobotrys* sp. TF006 を接種して栽培試験を実施したところ、栽培後土壌から *Arthrobotrys* sp. TF006 が検出されなかった。Linford・Yap (1939) は、線虫捕捉菌 *Arthrobotrys*、*Dactylella* をパイナップル畑に接種したが、線虫害の抑制効果は小さかったことが報告されており、原因に接種した線虫捕捉菌の定着性の問題が挙げられている。したがって、線虫捕捉菌は接種するだけでなく、圃場に堆肥を大量に投入するなどして、接種した土壌を自活性線虫が多くなるような環境にしなければ、線虫捕捉菌は土壌に定着しにくいと考えられる。

一方、本試験の無底ポットおよび圃場試験において *Purpureocillium* sp. EP015 については *Purpureocillium* sp. EP015 培養物を施用した場合には土壌への定着が観察され、線虫捕捉菌よりも土壌への定着性がよいと考えられた。土壌中での *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数の推移は、施用後から徐々に低下し、栽培後土壌では生菌数が $10^4 \sim 10^5$ cfu/g 土壌になった。ポット試験の結果では、線虫害抑止効果が発揮される土壌中の *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数が 5.3×10^5 cfu/g 土壌であった。本試験に供試した栽培後土壌での *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数が 5.3×10^5 cfu/g 土壌以下になったことから、供試土壌と同様の土壌条件では作物を作付けるごとに *Purpureocillium* sp. EP015 培養物を施用しなければ線虫害軽減効果が持続しないと考えられた。

2. *Purpureocillium* sp. EP015 と他の土壌微生物との相互関係

線虫寄生菌 *Purpureocillium* の菌糸からセリンプロテアーゼ、キチナーゼ産生され、これらの酵素が線虫卵への寄生に重要な働きをすることが知られている (Khan ら 2006、Hallmann ら 2009)。糸状菌の細胞壁はグルカンとキチンで構成されており、放線菌が産生する β -1, 3-グルカナーゼやキチナーゼにより糸状菌が溶菌することが知られている (石沢・鈴木 1973)。したがって、線虫寄生菌 *Purpureocillium* や放線菌の産生するキチナーゼが糸状菌に影響を与える可能性が考えられる。本研究では、無底ポット試験において *Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用区では *Purpureocillium* sp. EP015 以

外の糸状菌数が対照区（無処理区）に比べて低下することが観察されたことから、*Purpureocillium* sp. EP015 の産生するキチナーゼが糸状菌に影響を与えた可能性が示唆された。また、放線菌数は、菜種油かす施肥区に比べてカニガラ施肥区の方が多く、*Purpureocillium* sp. EP015 およびその他の糸状菌数は菜種油かす施肥区に比べてカニガラ施肥区の方が低く推移する傾向にあったことから、これらも放線菌の産生するキチナーゼにより影響を受けている可能性も示唆された。一方、*Purpureocillium* sp. EP015 と細菌との関係は観察されず、これらとの相互作用が小さいことが示唆された。

3. *Purpureocillium* sp. EP015 と植物寄生性線虫卵との相互作用

線虫天敵微生物は、絶対寄生性と条件的寄生性(腐生性)に分けられる(Barron 1977)。絶対寄生性線虫天敵微生物は、線虫が存在しないと生育できないが、条件的寄生性線虫天敵微生物は、線虫以外の有機物を資化して生育でき、土壤中での定着性が絶対寄生性菌に比べて高いと考えられる。また、条件的寄生性菌は栄養培地での培養も可能であり、大量培養が容易である。条件的寄生性菌はこれらのメリットの反面、線虫に依存しなくても生育できることから、線虫防除に対する力価が絶対寄生性菌に劣ることが考えられる。

本研究で供試した線虫寄生菌 *Purpureocillium* sp. EP015 は、条件的寄生性菌であり、線虫卵に寄生する。植物寄生性線虫卵に汚染された土壤に *Purpureocillium* sp. EP015 培養物を施用することで、土壤中の植物寄生性線虫数の低下が観察されたことから、*Purpureocillium* sp. EP015 が線虫卵に寄生し、線虫卵を破壊することで、植物寄生性線虫数が低下したことが示唆され、線虫害抑制効果を発揮する菌数は、 5.3×10^5 cfu/g 土壤（培養物の施用量として 600kg/10a 相当）であることが明らかになった。さらに、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物を施用してから時間をおいて定植することで線虫害抑制効果が高くなる傾向であったことから、培養物中の *Purpureocillium* sp. EP015 の菌糸もしくは分生子から発芽した菌糸が線虫卵に到達し、寄生するまでの猶予時間がある程度必要であることが考えられた。この結果は、Anastasiadis ら (2008) が行った *Purpureocillium lilacinum* 251 菌株を製剤化した「BioActWG」施用時期の検討において、「BioActWG」の施用からネコブセンチュウ卵の接種までの時間的間隔と被害度に有意差がなかったとする試験結果とは異なった。しかし、Anastasiadis ら (2008) は、「BioActWG」の圃場試験では定植から 2 週間

前に「BioActWG」を施用しており、また、「BioActWG」中の *P. lilacinum* 251 株の分生子が発芽し、線虫卵に寄生するまでの時間が必要であると考察していることから、線虫卵に寄生作用を有する線虫天敵微生物の場合、培養物を施用してから作物を植えるまでにある程度の猶予時間が必要と考えられる。

キチンまたはキトサンを施用したところネコブセンチュウ害が軽減したとの報告があり、キチンまたはキトサンを施用することで土壌中のキチナーゼ活性が高まり、キチンで構成される線虫卵殻が溶解し、死滅すると考えられている (Sarathchandra ら 1996、Radwan ら 2012)。本研究では、圃場試験においてキチンを含有するカニガラを施用することで、*Purpureocillium* sp. EP015 の線虫害抑止効果が高まる傾向にあることが観察され、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物を植穴処理する場合、カニガラを併用した条件で *Purpureocillium* sp. EP015 の定着性が増した。したがって、カニガラを施用することで *Purpureocillium* sp. EP015 のキチナーゼ産生が誘導され、線虫卵の卵殻であるキチン層がより溶解しやすくなる環境になり、ネコブセンチュウ数が低下したことが考えられる。また、*Purpureocillium* sp. EP015 がカニガラを資化することで栄養状態が良好となり、*Purpureocillium* sp. EP015 の生残性が良好になることが考えられた。

Purpureocillium sp. EP015 は線虫卵を資化することから線虫卵が多く存在する土壌環境の方が定着する可能性が高いと考えられる。線虫卵の多寡が *Purpureocillium* sp. EP015 の定着性にどの程度影響するかまでは、今回の研究では明らかにできなかった。

4. 作物と植物寄生性線虫との相互作用

本研究においてナスの収量低下はベルマン法で求めたネコブセンチュウ初期密度 2 頭/20g 土壌以上で観察された。この値は既報のサツマイモネコブセンチュウのナスの要防除水準 1 J2/20g 土壌 (Schomaker・Been 2006) と極めて類似した。一方、リアルタイム PCR 法ではサツマイモネコブセンチュウとキタネコブセンチュウの初期密度の合計で 128 J2/20g 土壌以上でナスの収量低下が観察された。サツマイモネコブセンチュウ初期密度では 115 J2/20g 土壌以上で収量低下が観察された。したがって、これらの線虫密度以下に線虫天敵微生物を処理することで制御できれば、作物の収量低下を回避することが可能であると考えられる。また、栽培期間の長さが収量低下の起きる植物寄生性線虫密度に

影響することが示唆され、定植時のネコブセンチュウ密度が違っていても収穫前半では収量に差が見られなかったが、定植 50 日後から収量に有意な差が観察された ($p < 0.05$)。この結果は、栽培期間が短いときにはネコブセンチュウの要防除水準が高くなり、栽培期間の長い作物は少ないネコブセンチュウ数で収量低下が起きることを示唆している。

ナス収量については、根こぶ指数 5 以上で収量低下が観察された。根こぶ程度 5 の根の状態は、「大きな根こぶが根域の 25%にある」であることから、根こぶが連続して発生し大きくなるとナス収量に影響することが示唆された。したがって、根こぶ指数 5 がナス収量低下の指標になると考えられた。

6. 今後の課題

線虫天敵微生物の効果を解明するためには植物寄生性線虫、土壤微生物および作物との関係に関する研究が重要である。今後、線虫天敵微生物の土壤中での挙動と、挙動の違いによる植物寄生性線虫に与える効果の解明が特に重要と考えられる。線虫天敵微生物を用いた線虫害防除は、その要因が複雑であるため、総合的解析が必要であり、解決しなければならない課題が多いと感じる。

線虫害を軽減する手法を得るためには、すでに存在している線虫害抑止土壤の機構を解明することが重要である。線虫害抑止土壤での線虫害の抑制には線虫天敵微生物の働きが大きい。しかし、線虫天敵微生物を接種するだけでは線虫害が軽減されないこともあり、線虫天敵微生物の生息しやすい、また、定着しやすい土壤環境の解明もしなければならない。さらに、普通の土壤を線虫害抑止的にするために線虫天敵微生物を非根圏で定着させるよりも、根圏に線虫天敵微生物を高密度で定着させ、根圏に侵入してくる植物寄生性線虫を阻止し、また、植物寄生性線虫の増殖を抑制する方法が線虫害軽減効果が高いと感じる。したがって、根圏での線虫天敵微生物の挙動に関する研究も重要である。

第7章 総合摘要

本研究は、作物（ナス「千両2号」）の収量とネコブセンチュウ初期密度との関係を解析し、収量低下が起きるネコブセンチュウ初期密度および根こぶ指数（10段階評価）を明らかにした。さらに、線虫防除にとって最適な線虫寄生菌 *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の施用方法を室内試験および野外試験において検討した。これらの結果を要約すると以下の通りである。

1. 線虫捕捉菌の単離

供試した土壌から線虫捕捉菌が検出され、単離した線虫捕捉菌は、孢子や捕捉器官の形態からすべて *Arthrobotrys* であると考えられた。

単離した線虫捕捉菌のうち、生育が旺盛な *Arthrobotrys* sp. TF006 を大量培養に供試した。

株式会社テクノスルガ・ラボによる試験結果では、*Arthrobotrys* sp. TF006 の ITS-5.8S rDNA 塩基配列は、アポロン DB-FU および国際塩基配列データベースに対する相同性検索の結果、子囊菌門の一種である *Arthrobotrys oligospora* Fresen. と推定された（96.5～99.5%）。

2. 線虫寄生菌の単離

ネコブセンチュウに感染した根から摘出した卵嚢から線虫寄生菌が単離され、また、線虫害抑止土壌希釈土で栽培したナスの根から摘出した卵嚢から線虫寄生菌が単離され、単離した糸状菌は、孢子などの形態からすべて *Paecilomyces* sp. もしくは近縁の属であると考えられた。

単離した線虫寄生菌のうち、*Paecilomyces* sp. EP015 が生育旺盛であったので、大量培養に供試した。

株式会社テクノスルガ・ラボによる試験結果では、*Paecilomyces* sp. EP015 の ITS-5.8S rDNA 塩基配列は、アポロン DB-FU および国際塩基配列データベースに対する相同性検索の結果、子囊菌門の一種である *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hywel-Jones & Samson あるいはそれに近縁な *Purpureocillium* sp. と推定された（以降、*Paecilomyces* sp. EP015 は、*Purpureocillium* sp. EP015 と表記する。）。

3. ナスの収量低下が起きるネコブセンチュウ初期密度および根こぶ指数

ナスの収量低下はベルマン法で求めたネコブセンチュウ初期密度 2 頭/20g 土壌以上で観察された。

一方、リアルタイム PCR 法ではサツマイモネコブセンチュウとキタネコブセンチュウの初期密度の合計で 128 J2/20g 土壌以上で収量低下が観察された。

サツマイモネコブセンチュウ初期密度では 115 J2/20g 土壌以上で収量低下が観察された。

ナスの収量低下が起きる根こぶ指数（10 段階評価）は、5 であった。

4. *Purpureocillium* sp. EP015 培養物の線虫害抑制に対する効果的な施用方法

Purpureocillium sp. EP015 培養物の最適な施用量は、600kg/10a であった。

Purpureocillium sp. EP015 培養物の最適な施用時期は、定植から 2 週間前であった。

野外の無底ポット試験において *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数は *Purpureocillium* sp. EP015 培養物施用直後から緩やかに減少し、栽培後には *Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数が 10^5 cfu/g 土壌になった。

圃場試験において、*Purpureocillium* sp. EP015 培養物とカニガラを同時に植穴施用することによりナスの収量増加が観察され、根こぶ指数は 5 以下になった。栽培後の *Purpureocillium* sp. EP015 生菌数が *Purpureocillium* sp. EP015 培養物とカニガラを同時に植穴施用した区では 10^6 cfu/g 土壌になった。

Purpureocillium sp. EP015 培養物とカニガラを同時に施用したとき、菜種油かすと同時に施用したときに比べて、*Purpureocillium* sp. EP015 の生菌数が少なくなった。この原因に、カニガラ施用区では菜種油かす施用区に比べて放線菌数が高かったことから放線菌による影響が考えられた。

5. 線虫寄生菌の迅速なモニタリング手法の確立

リアルタイム PCR 法で *Purpureocillium lilacinum* 特異的プライマーを用いて土壌中の *Purpureocillium* sp. EP015 の菌密度の検量線を作成し、土壌中の *Purpureocillium* sp. EP015 の迅速な菌数調査が可能になった。

謝辞

本研究にあたって御指導を賜った東京農工大学教授 豊田剛己博士に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究に対して助言をいただいた東京農工大学名誉教授 浜田竜之介博士に厚く感謝の意を表します。

さらに、本研究の機会を与えられ終始激励、御指導を賜った片倉チッカリン株式会社 西見徹社長、取締役 伊藤敬専務執行役員、佐久間 藏執行役員、野口勝憲技術顧問に衷心より感謝いたします。

また、本研究の遂行と取りまとめに絶えず御指導、御意見、激励を賜った片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所 太田文十前所長、紀岡雄三所長に深く感謝いたします。

最後に実験に御協力いただいた片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所、東京農工大学 豊田研、岡崎研、橋本研の皆様に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- Abiko S, Saikawa M and Ratnawati (2005) Capture of mites and rotifers by four strains of *Dactylella gephyropaga* known as a nematophagous hyphomycete. *Mycoscience*, **46**, 22-26
- Affokpon A, Coyne DL, Htay CC, Agbèdè RD, Lawouin L and Coosemans J (2011) Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 600-608
- Anastasiadis IA, Giannakoub IO, Prophetou-Athanasiadouc DA and Gowen SR (2008) The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection*, **27**, 352-361
- Arevalo J, Hidalgo-Díaz L, Martins I, Souza JF, Castro JC, Carneiro MDG and Tigano MS (2009) Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, **34**, 158-163
- Atkins SD, Hidalgo-Díaz L, Kalisz H, Mauchline TH, Hirsch PR and Kerry BR (2003a) Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp) in organic vegetable production. *Pest Management Science*, **59**, 183-189
- Atkins SD, Clark IM, Sosnowska D, Hirsch PR and Kerry BR (2003b) Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media, and baiting. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 4788-4793
- Atkins SD, Clark IM, Pande S, Hirsch PR and Kerry BR (2005) The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, **51**, 257-264
- Bao Y, Chen S, Vetsch J and Randall G (2013) Soybean yield and *Heterodera glycines* responses to liquid swine manure in nematode suppressive soil

- and conducive soil. *Journal of Nematology*, **45**, 21-29
- Barron GL (1977) The Nematode-destroying Fungi, Topics in Mycobiology, No.1, Canadian Biological Publications, Ontario
- Bates JA, Taylor EJA, Kenyon DM and Thomas JE (2001) The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. *Molecular Plant Pathology*, **2**, 49-57
- Bennett AJ, Mead A and Whipps JM (2009) Performance of carrot and onion seed primed with beneficial microorganisms in glasshouse and field trials. *Biological Control*, **51**, 417-426
- Bohm J, Hahn A, Schubert R, Bahnweg G, Adler N, Nechwatal J, Oehlann R and OBwald W (1999) Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology*, **147**, 409-416.
- Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Lopes EA, Pereira OL, Zooca RJF and Ferraz S (2012) Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection*, **42**, 102-107
- De Leij FAAM and Kerry BR (1991) The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue Nématol*, **14**, 157-164
- Di Vito M, Vovlas N and Castillo P (2004) Host-parasite relationships of *Meloidogyne incognita* on spinach. *Plant Pathology*, **53**, 508-514
- 土壤微生物研究会編 (1977) 土壤微生物実験法, 養賢堂, 469p, 東京
- Drechsler C (1937) Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia* **29**, 447-552
- Ellis JJ and Hesseltine CW (1962) *Rhopalomyces* and *Spinellus* in pure culture and the parasitism of *Rhopalomyces* on nematode eggs. *Nature*, **193**, 699-700
- Freitas LG, Ferraz S and Muchovej JJ (1995) Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. *Nematropica*, **25**, 109-115

- Fresenius G (1852) Beiträge zur Mykologie. *Heft 1-2*, 1-80
- Gams W and Zare R (2001) A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. *Nova Hedwigi*, **72**, 47-55
- Gugino BK, Abawi GS and Ludwig JW (2006) Damage and management of *Meloidogyne hapla* using oxamyl on carrot in New York. *Journal of Nematology*, **38**, 483-490
- Hagedorn G and Scholler M (1999) A reevaluation of predatory orbiiliaceous Fungi. I. Phylogenetic analysis using rDNA sequence data. *Sydowia* **51**, 27-48
- Hallmann J, Davies KG and Sikora R (2009) Biological Control Using Microbial Pathogens, Endophytes and Antagonists. *In* Root-Knot Nematodes, Ed. RN Perry, M Moens and JL Starr, p.380-411, CABI, Wallingford
- Hashem M and Abo-Elyousr KA (2011) Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. *Crop Protection*, **30**, 285-292
- Hewlett TE, Dickson DW, Mitchell DJ and Kannwischer-Mitchell ME (1988) Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a Biocontrol Agent of *Meloidogyne javanica* on Tobacco. *Journal of Nematology*, **20**, 578-584
- Hildaldo-Diaz L and Kerry BR (2010) Integration of Biological Control with Other Methods of Nematode Management. *In* Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes, Ed. A Ciancio and KG Mukerji, p.29-49, Springer, Dordrecht
- Hunt DJ and Handoo ZA (2009) Taxonomy, identification and principal species. *In* Root-Knot Nematodes, Ed. RN Perry, M Moens and JL Starr, p. 55-97, CABI, Wallingford
- 石橋信義編 (2003) 線虫の生物学, 東京大学出版会, 290p, 東京
- 石沢修一・鈴木達彦 (1973) 土壤微生物の生態, 共立出版, 142p, 東京
- 今堀和友・山川民夫 (1984) 生化学辞典, 東京化学同人, p.703, 東京
- Khan A, Williams K, Molloy MP and Nevalainen H (2003) Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein Expression and Purification* **32**, 210-220
- Khan A, Williams KL and Nevalainen HKM (2004) Effects of *Paecilomyces*

- lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles, *Biological Control*, **31**, 346–352
- Khan A, Williams KL and Nevalainen HKM (2006) Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*, *Biological Control*, **51**, 659–678
- 北見由季・香川三郎・飯島正文 (2005) 顔面に生じた *Paecilomyces lilacinus* 感染症の1例, *Japanese Journal of Medical Mycology*, **46**, 267–272
- Klemsdal SS, Clarke JL, Hoell IA, Eijsink VGH and Brurberg M (2006) Molecular cloning, characterization, and expression studies of a novel chitinase gene (*ech30*) from the mycoparasite *Trichoderma atroviride* strain P1. *FEMS Microbiology Letters*, **256**, 282–289
- Li J, Yang J, Huang X and Zhang K (2006) Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry*, **41**, 925–929
- Li Y, Hyde KD, Jeewon R, Cai L, Vijaykrishna D and Zhang K (2005) Phylogenetics and evolution of nematode-trapping fungi (Orbiliiales) estimated from nuclear and protein coding genes. *Mycologia*, **97**, 1034–1046
- Linford MB (1937) Stimulated activity of natural enemies of nematodes. *Science*, **85**, 123–124
- Linford MB and Yap F (1939) Root-knot nematode injury restricted by a fungus. *Phytopathology*, **29**, 586–609
- Lopez-Llorca LV, Gómez-Vidal S, Monfort E, Larriba E, Casado-Vela J, Elortza F, Jansson H, Salinas J and Martín-Nieto J (2010a) Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genetics and Biology* **47**, 342–351
- Lopez-Llorca LV, Maciá-Vicente JG and Jansson HB (2010b) Mode of action and interactions of nematophagous fungi. *In* Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes, Ed. A Ciancio and KG Mukerji, p.51–76, Springer, Dordrecht
- Luangsa-ard J, Houbraken J, van Doorn T, Hong S, Borman AM, Hywel-Jones NL and Samson RA (2011) *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, **321**,

141-149

- Mauchline TH, Kerry BR and Hirsch PR (2002) Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective planting. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1846-1853
- Min YY, Toyota K and Sato E (2012) A novel nematode diagnostic method using the direct quantification of major plant-parasitic nematodes in soil by real-time PCR. *Nematology*, **14**, 265-276
- 水久保隆之・津田新哉 (2010) ネコブセンチュウによる植物病害を防御する方法. 特許第 5168687 号
- Mitchell DJ, Kannwischer-Mitchell ME and Dickson DW (1987) A semi-selective medium for isolation of *Paecilomyces lilacinus* from soil. *Journal of Nematology*, **19**, 255-256
- 三井康 (1983) わが国における線虫捕食菌の種類と分布および生理・生態に関する研究, *農業技術研究所報告 C 病理・昆虫*, **37**, 127-211
- 中園和年編 (1992) 線虫研究の歩み—日本線虫研究会創立 20 周年記念誌, 日本線虫研究会, 383p, 茨城
- Netscher C and Sikora RA (1990) Nematode parasites of vegetables. In Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, Ed. M. Luc, RA Sikora and J Bridge, p.237-283, CABI, Wallingford
- 日本土壤協会編 (2013) 土壤診断と対策—生理障害、土壤病害虫、コスト低減等対策—, 日本土壤協会, 287p, 東京
- 日本植物防疫所 (2011) 都道府県が設定している要防除水準 (野菜), http://www.jppn.ne.jp/jpp/bouteq/bojosuijun_data/yasai.pdf
- 日本線虫学会編 (2004) 線虫学実験法, 日本線虫学会, 247p, 茨城
- 西沢務 (1988) A26 線虫捕食菌 *Arthrobotrys tortor* による線虫密度抑制効果試験例, *日本応用動物昆虫学会大会講演要旨*, **32**, 45
- 農林水産技術会議事務局 (1993) 微生物利用土壤改良資材の効果判定技術の開発, *研究成果*, **282**, 1-67
- 農林水産消費安全技術センター (2014) 登録・失効農薬情報 登録失効農薬一覧 No.9 <https://www.acis.famic.go.jp/toroku/sikkou9.html>
- 農山漁村文化協会編 (2007) 農業技術体系, 7-①各種肥料・資材の特性と利用, 市販有機質肥料, p. 257-286, 農山漁村文化協会, 東京

- 大林延夫 (1989) ダイコンを加害するキタネグサレセンチュウの防除に関する研究. *神奈川県園芸試験場研究報告*, **39**, 1-90
- Oka Y, Koltai H, Bar-Eyal M, Mor M, Sharon E, Chet I and Spiegel Y (2000) New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Management Science*, **56**, 983-988
- 岡田齊夫・岩花秀典・国見裕久・島津光明編 (1993) 天敵微生物の研究手法. 日本植物防疫協会, 222p, 東京
- Pradeep S, Faseela P, Sarath Josh MK, Balachandran S, Sudha Devi R and Benjamin S (2013) Fungal biodegradation of phthalate plasticizer in situ. *Biodegradation*, **24**, 257-267
- Pramer D and Stoll NR (1959) Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. *Science*, **129**, 966-967
- Pyrowolakis A, Westphal A, Sikora RA and Becker JO (2002) Identification of root-knot nematode suppressive soils. *Applied Soil Ecology* **19**, 51-56
- Radwan MA, Farrag SAA, Abu-Elamayem MM and Ahmed NS (2012) Extraction, characterization, and nematicidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell waste. *Biology and Fertility of Soils*, **48**, 463-468
- Regaieg H, Ciancio A, Raouani NH and Rosso L (2011) Detection and biocontrol potential of *Verticillium leptobactrum* parasitizing *Meloidogyne* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**, 1615-1623
- Rui M, Liu X, Jian H and Li S (2005) Detection of *Hirsutella* spp. and *Pasteuria* sp. parasitizing second-stage juveniles of *Heterodera glycines* in soybean Wields in China, *Biological Control* **33**, 223-229
- 齊藤浩一 (1985) ダイズシストセンチュウ密度とダイズの生育・収量の関係. *関東東山病害虫研究会年報*, **32**, 227-228
- 佐野善一 (1988) 夏播きニンジンにおけるサツマイモネコブセンチュウの密度と被害. *九州病害虫研究会報*, **34**, 127-130
- Sarathchandra SU, Watson RN, Cox NR, di Menna ME, Brown JA, Burch G and Neville FJ (1996) Effects of chitin amendment of soil on microorganisms, nematodes, and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), *Biology and Fertility of Soils*, **22**, 221-226

- Sato E, Min YY, Toyota K and Takada A (2009) Relationships between the damage to radish caused by the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans*, its density prior to cultivation and the soil nematode community structure evaluated by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science and Plant Nutrition*, **55**, 478-484
- Sato E, Goto K, Min YY, Shirakashi T, Toyota K and Suzuki C (2010) Quantitative detection of *Pratylenchus penetrans* from soil by using soil compaction and real-time PCR. *Japanese Journal of Nematology*, **40**, 1-6
- Satou T, Kaneko K, Li W and Koike K (2008) The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **31**, 574-576
- Schomaker CH and Been TH (2006) Plant growth and population dynamics. *In* Plant Nematology Ed. RN Perry and M Moens, p. 275-301, CABI, Wallingford
- Siddiqui IA, Qureshi SA, Sultana V, Ehteshamul-Haque S and Ghaffar A (2000) Biological control of root rot-root knot disease complex of tomato. *Plant and soil*, **227**, 163-169
- Sikora RA, Oka Y, Sharon E, Hok CJ and Keren-zur M (2000) Achievements and research requirements for the integration of biocontrol into farming systems. *Nematology*, **2**, 737-738
- Smith ME and Jaffee BA (2009) PCR Primers with Enhanced Specificity for Nematode-Trapping Fungi (*Orbiliiales*). *Microbial ecology* **58**, 117-128
- Soares FEF, Braga FR, Araújo JV, Geniêr HLA, Gouveia AS and Queiroz JH (2013) Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. *Parasitology Research*, **112**, 1557-1565
- Stirling GR, Halpin NV and Bell MJ (2011a) A Surface Mulch of Crop Residues Enhances Suppressiveness to Plant-Parasitic Nematodes in Sugarcane Soils. *Nematropica*, **41**, 109-121
- Stirling GR, Rames E, Stirling AM and Hamill S (2011b) Factors associated with the suppressiveness of sugarcane soils to plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, **43**, 135-148
- Szabó M, Csepregi K, Gálber M, Virányi F and Fekete C (2012) Control

- plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of chi18-5 and chi18-12 genes in nematode. *Biological Control*, **63**, 121-128
- egg-parasitism
- 田場聡・諸味里善一 (2000) *Monacrosporium phymatopagum* の感染菌糸による線虫捕捉. *日本線虫学会誌*, **30**, 30-34
- 田場聡・諸見里善一・高江洲和子・大城篤・那須奏美 (2006) 線虫捕捉菌 *Monacrosporium elliposporum* と殺線虫剤の混合剤ビーズによるサツマイモネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita* の防除. *日本応用動物昆虫学会誌*, **50**, 115-122
- Timper P and Brodie BB (1993) Infection of *Pratylenchus penetrans* by Nematode-pathogenic Fungi. *Journal of Nematology*, **25**, 297-302
- 豊田剛己 (2011) 発病抑止土壌に関する最近の研究動向, *土づくりとエコ農業*, **505**, 31-37
- Voronin M (1870) *Sphaeria lemneae*, *Sordaria coprophila*, *Arthrobotrys oligospora*. In Beiträge Zur Morphologie Und Physiologie Der Pilze. III, Ed. A Bary and MS Voronin, p325-360, Heinrich Ludwig Brönnner, Frankfurt
- Vovlas N, Mifsud D, Landa BB and Castillo P (2005) Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant Pathology*, **54**, 657-664
- Vovlas N, Lucarelli G, Sasanelli N, Troccoli A, Papajova I, Palomares-Rius JE and Castillo P (2008) Pathogenicity and host-parasite relationships of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on celery. *Plant Pathology*, **57**, 981-987
- Wachira PM, Kimenju JW, Okoth SA and Mibey RK (2009) Stimulation of nematode-destroying fungi by organic amendments applied in management of plant parasitic nematode. *Asian Journal of Plant Sciences*, **8**, 153-159
- Wang J, Wang J, Liu F and Pan C (2010) Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita* eggs by overexpression of a serine protease. *Biotechnology Letters*, **32**, 1159-1166
- Westphal A (2005) Detection and description of soils with specific nematode suppressiveness. *Journal of Nematology* **37**, 121-130

- Wootton LMO and Pramer (1966) Valine-induced morphogenesis in *Arthrobotrys conoides*. *Bacteriol. Proc.*, 75
- 山田英一 (1987) ジャガイモシストセンチュウの生態と防除に関する研究. 北海道立農業試験場報告. 61, 1-98
- Yang J, Loffredo A, Borneman J and Becker JO (2012) Biocontrol efficacy among strains of *Pochonia chlamydosporia* obtained from a root-knot nematode suppressive soil. *Journal of Nematology* 44, 67-71
- Zare R, Gams W and Evans HC (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 73, 51-86
- Zopf W (1888) Zur Kenntnis der Infektions-Krankheiten neiderer Thiere und Pflanzen. *Nova Acta Leopoldina : Abhandlungen der Kaiserlich Leopoldinisch-Carolinisch Deutschen Akademie der Naturforscher*, 52, 314-376

(様式8)

論文目録

学位論文

1. 題目：線虫天敵糸状菌の培養物による植物の線虫害軽減に関する研究

2. 冊数：1

3. 関連論文の印刷公表の方法及び時期

- (1) Takayoshi Watanabe, Hiroaki Masumura, Yuzo Kioka, Katsunori Noguchi, Yu Yu Min, Risa Murakami, Koki Toyota
Development of a direct quantitative detection method for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in andosol and analysis of relationship between the initial population of *Meloidogyne* spp. and yield of eggplant
Nematological Research 43 巻 2 号 2013 年 12 月 (予定) (本文の第 9 章と関係)

参考論文

題目：線虫天敵糸状菌の培養物による植物の線虫害軽減に関する研究

- (1) 渡邊貴由・増村弘明・紀岡雄三・野口勝憲
線虫を捕捉・寄生する糸状菌の紹介と線虫防除への試み
土と微生物 66 巻 1 号 2012 年 4 月 pp. 32-37 (本文の第 1 章と関係)
- (2) Koki Toyota, Takayoshi Watanabe
Recent Trends in Microbial Inoculants in Agriculture
Microbes and Environments 28 巻 4 号 2013 年 12 月 (予定) (本文の第 1 章と関係)

平成 25 年 12 月 日申請

学位申請者氏名 _____ (印)

Development of a direct quantitative detection method for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in andosol and analysis of relationship between the initial population of *Meloidogyne* spp. and yield of eggplant in an andosol

Takayoshi Watanabe^{1,3}, Hiroaki Masumura¹, Yuzo Kioka¹, Katsunori Noguchi²,
Yu Yu Min^{3,4}, Risa Murakami³ and Koki Toyota³

A real-time PCR-based detection method was developed for the root-knot nematodes (RKNs) *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in andosol. Different numbers of second-stage juveniles (J2) were artificially added into 20 g of soil not containing *M. hapla* and *M. incognita* and then DNA was extracted from the soils. There were significant correlations ($r^2 = 0.8857$, $P < 0.05$ in *M. incognita* and $r^2 = 0.9978$, $P < 0.01$ in *M. hapla*) between the threshold cycle (Ct) values and the number of nematodes added. Next, soils were collected at transplanting time from different sites (12 plots) in a field naturally infested with *M. incognita* and *M. hapla* to measure the initial population densities. RKNs were distributed heterogeneously in the field: the initial population ranged from 0 to 24 J2/20 g soil with the Baermann method, while that of *M. incognita* and *M. hapla* from 0.6 to 713 J2eq/20 g soil and from 0.0 to 115 J2eq/20 g soil, respectively, with the real-time PCR method. The yield was determined by the sum of commercial sized eggplants harvested for 3 months of the cultivation period. The yield decreased in the plots with an initial population of RKNs more than 2 J2/20 g soil with the Baermann method. In real-time PCR, the yields were low in the plots with the sum of initial *M. incognita* and *M. hapla* more than 128 J2eq/20 g soil. The present study established a quantification method with real-time PCR for *M. incognita* and *M. hapla* in andosol and evaluated the relationship between the initial population of *Meloidogyne* spp. and the yield of eggplant.

Nematol. Res. 43(2), 21-29 (2013)

Key word: Ct value, gall index, real-time PCR, root-knot nematode

INTRODUCTION

Root-knot nematodes (RKNs), *Meloidogyne* spp., cause significant losses of yield and quality in many crops all over the world, and the annual global losses have been estimated as US\$100 billion worldwide (Oka *et al.*, 2000). There are four common species of RKN in the tropical and temperate areas: *M. incognita*, *M. hapla*, *M. arenaria* and *M. javanica* (Moens *et al.*, 2009). Among them, *M. incognita* and *M. hapla* are distributed widely in Japan, and cause damage to cash crops, fruit and root vegetables, such as cucumber, tomato, eggplant and sweet potato in Japan (Ichinohe, 1992).

The species of RKNs are separated from each other on the basis of the morphology of perineal pattern, stylet knob

shape, and the length of stylet and dorsal gland orifice (Moens *et al.*, 2009). However, it is difficult to identify species of RKNs with traditional techniques, and the identification of RKNs needs mature skills and a long time even for specialists. Thus, an alternative identification method is required. New identification methods of RKNs have been developed with some enzymes, such as esterase and malate dehydrogenase, and with DNA-based methods (Blok *et al.*, 2009). The rapid development of DNA technology has been a breakthrough for overcoming the weak points of traditional identification methods (Atkins *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2007). Since Madani *et al.* (2005) reported real-time PCR specific primers for quantitative purposes of the potato cyst nematode *Globodera pallida* and the sugarbeet cyst nematode *Heterodera schachtii*, many specific primers have been designed for different plant-parasitic nematodes such as *Bursaphelenchus xylophilus* (Leal *et al.*, 2007), *Pratylenchus penetrans* (Sato *et al.*, 2007), *M. incognita* and *G. rostochiensis* (Toyota *et al.*, 2008), *M. javanica*, *P. zaei* and *Xiphinema elongatum* (Berry *et al.*, 2008), *H. glycines* (Goto *et al.*, 2009) and *P. thornei* (Yan *et al.*, 2012). However, no specific primers have been developed for *M. hapla* until now.

¹ Tsukuba Research Institute, Katakura Chikkarin Co., Ltd., 5-5511 Namiki, Tsuchiura, Ibaraki, 300-0061, Japan.

² Katakura Chikkarin Co., Ltd., 1-13-5 Kudankita, Chiyoda, Tokyo, 102-0073, Japan.

³ Graduate School of Bio-Applications and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakacho, Koganei, Tokyo, 184-8588, Japan.

⁴ Presently at Plant Pathology Department, Yezin Agricultural University, Pinmanar, Myanmar.

Andosol is the major soil type in agricultural land in Japan and the most serious damage is caused by RKNs in this soil type (Takakura, 1984). Chemical control with fumigant or non-fumigant types of nematicides is frequently used, as an insurance against nematode damage, without a survey of plant-parasitic nematodes in fields. In almost all eggplant-producing areas of the country, nematicides are routinely used for the prevention of yield losses caused by RKNs (Hagiya, 1992). To avoid such an insurance-like application of nematicides, information about the economic threshold level is essential. Economic threshold levels have been developed using the Baermann method for *Meloidogyne* spp. in carrot (Sano, 1988), burdock (Yamada, 1992), spinach (Di Vito *et al.*, 2004), potato (Vovlas *et al.*, 2005), carrot (Gugino *et al.*, 2006), eggplant (Schomaker and Been, 2006), celery (Vovlas *et al.*, 2008), and cucumber and tomato (Plant protection station, 2011). However, these economic threshold levels may be underestimated and variable. The extraction efficiency of nematodes from soil using the Baermann method is estimated at about 50%, and the method fails to extract eggs and dormant forms of nematodes (Ingham, 1994). Indeed, the Baermann method extracted only 30% of plant-parasitic nematodes recovered by the double-layer centrifugation method which extracts passive nematodes in soil as well as active nematodes (McSorley and Frederick, 2004). In addition, Den Nijs and Van Den Berg (2013) revealed that the variance of *Meloidogyne* counts was the highest for the Baermann method, and concluded that the Baermann method is not advisable for survey purposes. An alternative quantification method with real-time PCR has been developed that enables quantifying all forms of nematodes (Goto *et al.*, 2009; Min *et al.*, 2011). In fact, *M. incognita* was detected with the real-time PCR method in soils which *M. incognita* could not be detected with the Baermann method (Min *et al.*, 2012), suggesting economic threshold levels should be evaluated based on the nematode populations determined with real-time PCR. According to our previous reports, calibration curves for estimating the density of a target nematode in soil differed depending on the type of soils used (Sato *et al.*, 2010), but were similar within a single soil type, andosols (Goto *et al.*, 2010). Min *et al.* (2011) used sandy soils for quantifying *M. incognita*, but no calibration curve was developed for andosols, the major soil type in Japan, at present.

The objectives of this study were to develop a rapid quantification method using real-time PCR for *M. incognita* and *M. hapla* in an andosol and to evaluate the relationship between the initial population of *Meloidogyne* spp. and the yield of eggplant in an andosol.

MATERIALS AND METHODS

Soil and nematode:

Andosol without *Meloidogyne* spp. was collected from fields in Tokyo Metropolis, Japan, and used to make a calibration curve. The absence of *Meloidogyne* spp. was confirmed by the Baermann method and the real-time PCR method, as described below. Nematodes were purchased from the NIAS (National Institute of Agrobiological Sciences) Genebank in Japan.

Primers:

Specific primers for *M. hapla* [Mh-f (5' - ATGTTGGTACGCAGCGATTTGTA-3') - Mh-r (5' CAGCGGGTGATCTCGACTGA-3')] were designed based on the ITS1 sequences of *M. hapla* (AY268108), *M. incognita* (AB053484) and *M. arenaria* (AF077086) (Table 1). Specific primers for *M. incognita* used in this study were RKNf (5'-GCTGGTGTCTAAGTGTGCTGATAC-3') - RKNr [5'-GAGCCTAGTGATCCACCGATAAG-3'] reported by Toyota *et al.* (2008) (Table 1).

Primer specificity was evaluated using *M. hapla* and *M. incognita* with real-time PCR. DNA was extracted from individual J2s, according to the method of Iwahori *et al.* (2000) with slight modifications. A nematode was put into a drop of water on a glass slide, air-dried and cut with a sterile needle under a microscope. Then, 10 µl of lysis buffer (10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl buffer (Tris-HCl), pH 8.0, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% IGEPAL CA-630, 100 µg/ml proteinase K) was added to the nematode. The buffer with the nematode was transferred into a 200 µl tube, frozen at -85°C for 15 min. After thawing, the sample was incubated at 65°C for 1 h to degrade the nematode's body and then at 98°C for 10 min to inactivate proteinase K. This solution was used as a DNA template in real-time PCR described below.

Preparation of calibration curves:

Different numbers (5, 20, 80, and 500) of *M. incognita* or *M. hapla* J2 were added to 20 g of the reference soil. Each infestation level was prepared in triplicate and DNA was extracted in duplicate using the method reported by Min *et al.* (2012). Soil specimens were air-dried at 60°C for one night, and each of the 20 g air-dried soil samples were pulverized in duplicate with a ball mill (Mixer Mill MM400, Retsch Co., Ltd., Haan, Germany) for 2 min. Soil (0.5 g) was put into a 2-ml tube with 0.75 g of zirconia beads (0.1 mm in diameter) and 0.25 g of glass beads (0.5 mm in diameter), and 1,000 µl of lysis buffer (0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0) and 100 mg

Table 1. Comparison of sequences in the positions of the primers used in this study.

<i>M. hapla</i> specific primers	Sequence in the position of forward primer (5'-3')	Sequence in the position of reverse primer (5'-3')
<i>M. hapla</i> (AY268108) ¹	ATGTTGGTA-CGCAGCGATTG—T—AA	CAG—CGGGTATCTCGA—CTGA
<i>M. incognita</i> (AB053484)	·AAG·A·T·TTGTTT·CA—GT ^{2,3}	·····G·····
<i>M. arenaria</i> (AF077086)	·AAG·A·T·TTGTTT·CA—GT	·····G·····
<i>M. javanica</i> (GQ395513)	···AATC·—A—T·	···GCA·A·C·A·CA·TATCT·TT
<i>M. camelliae</i> (JX912885)	T·····CGT·TT·GA···A—GGCCGG·	·····C·A·····
<i>M. graminis</i> (JN241896)	·C·····T·····G·····	·····
<i>M. graminicola</i> (JN241866)	·AAA·T·T-TATT·GTT··T—C	·····
<i>M. incognita</i> specific primers	Sequence in the position of forward primer (5'-3')	Sequence in the position of reverse primer (5'-3')
<i>M. incognita</i> (AB053484)	GCT—GGTGTCT—AAGTGT—GCTGATAC	GAGCC—TAGTGATCCA—CCGATAAG
<i>M. hapla</i> (AY268108)	·····G·····R·T·	·····G·····
<i>M. arenaria</i> (AF077086)	·····G·····	·····G·····
<i>M. javanica</i> (GQ395513)	···TTTC·A··TC—GC···C·G·GA·T	·····AATT·····GCGAGAG·····
<i>M. camelliae</i> (JX912885)	·····A··G·TGAACCGGGC·AA·C··A·C·A	·····G·····CG·
<i>M. graminis</i> (JN241896)	·····T·····T·	·····G·····G··
<i>M. graminicola</i> (JN241866)	A·····G·····T·	··A··G·····G··

The *M. incognita* primers were reported by Toyota *et al.* (2008).

¹ Numbers in parentheses after the species names indicates the accession number.

² Dots indicate the same base as above.

³ Hyphens indicate deletion of the corresponding base.

of skim milk were added. The soil was bead-beaten at 5,000 rpm for 1 min two times, followed by centrifugation (13,000 × g for 5 min). Then, 600 µl of the supernatant was transferred to a new 2-ml tube, and 377 µl of 5 M NaCl and 270 µl of 10% hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) were added to the tube. After 10 min incubation at 60°C, 500 µl of chloroform was added, and the tube was centrifuged at 15,000 × g for 20 min. The supernatant (1.1 ml) was transferred to a new 2-ml tube, 500 µl of chloroform was added, and the tube was centrifuged at 15,000 × g for 20 min. The supernatant (1.0 ml) was transferred to a new 2-ml tube, then mixed with 600 µl of 20% polyethylene glycol 8,000 (PEG) solution (20% PEG, 1.6 mM NaCl) and centrifuged at 15,000 rpm for 20 min at 4°C to collect DNA as a pellet. The DNA pellet was washed with 1.0 ml of 70% ethanol and centrifuged at 15,000 rpm for 5 min at 4°C then dried using VC-15Sp (TAITEC Co., Ltd., Koshigaya, Japan) for 20 min, and suspended in 100 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). The DNA was diluted 10-fold and used as a template in real-time PCR.

Real-time PCR protocol:

Real-time PCR was performed in a StepOne Real time PCR System (Life Technologies Co., Carlsbad, CA) with a final volume of 10 µl containing 2 µl of 10 times diluted template DNA, 0.4 µl of 10 µM either primers for *M. hapla* or primers for *M. incognita* and 5 µl of Fast SYBR® Green Master Mix (Life Technologies) under the manufacturer's recommended conditions (95°C for 10 s, 95°C for 5 s and 60°C for 20 s, at increasing and decreasing rates of 0.2°C/s)

for 45 cycles). A negative control was also included using distilled water instead of a template DNA. Real-time PCR was done once per each DNA extract, since replicate samples showed almost identical values in real-time PCR.

The Baermann method:

Each soil sample was mixed well, and 20 g of the sub-sample was put in triplicate on two layers of tissue paper (Kimwiper®S-200, NIPPON PAPER CRECIA Co., LTD., Tokyo, Japan) supported on a 1 mm-mesh window screen (Baermann funnel). The Baermann funnels were incubated at 25 °C for 72 h, after being filled with water to the top of the funnel. The extracted nematodes were counted using a microscope.

Field experiments:

Field experiments were conducted in 2011 in a field of Tsukuba Research Institute of Katakura Chikkarin Co., Ltd., Ibaraki, Japan, which was naturally infested with *M. hapla* and *M. incognita*. No fumigants or contact nematicides had been applied in the field since 2009. The properties of the soil were: andosol, 30% sand, 40% silt, 30% clay; LiC, pH (H₂O) 5.8, total C = 24.0 g/kg soil, total N = 3.3 g/kg soil. The field was divided into 12 plots (each 3 × 3 m). Nematode densities at transplanting were assessed using a composite soil sample collected from six sites of each plot. The initial populations of RKNs were measured by the Baermann method and the real-time PCR method as described above. After basal fertilization (N-P₂O₅-K₂O = 20-20-20 kg/10 a), the plot soil was mixed well with a shovel.

The plots were mulched with a protective plastic cover to reduce evaporation, soil erosion and weeds. Eight 1-month-old eggplants, *Solanum melongena* L. 'senryou 2', were transplanted into each plot (total number of plants = 96) and cultivated in 2011 for about 3 months from May 31 to August 24 without irrigation and pesticide application. The yield was determined by weighing all the eggplant's commercial size fruits. After cultivation, eggplant roots were carefully dug out from soil with a shovel, and carefully washed to remove the attaching soil completely. The gall index of roots was assessed per plant using Zeck's scale of 0 to 10 (0: no knots on roots, 10: all roots severely knotted or no root system) (n = 96) (Zeck, 1971). However, this scale is based on the galls caused by only *M. incognita*, *M. arenaria*, or *M. javanica*, but not by *M. hapla*.

Statistical analysis:

Statistical analysis was performed using the software Excel Statistics 2002 (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan).

RESULTS

Primer specificity:

The sequences in the position of Mh forward primer are different between *M. incognita* and *M. hapla*, while the sequences of *M. incognita* in the position of RKN primers are similar to those of *M. hapla* (Table 1). Thus, the newly designed primers Mh for *M. hapla* did not amplify DNA from *M. incognita*, while primers RKN for *M. incognita* amplified DNA from *M. hapla* at an efficiency of as low as 15% (date not shown).

Preparation of the calibration curve:

When the andosol in Tokyo was inoculated with RKN J2 at densities of 5 to 500 individuals/20 g of soil, highly significant correlations ($r^2 = 0.8857$, $P < 0.05$ in *M. incognita* and $r^2 = 0.9978$, $P < 0.01$ in *M. hapla*) were observed between the Ct values and the number of RKN J2 inoculated into the soils (Fig. 1).

Analysis of relationship between the initial population of *Meloidogyne* spp. and yield of eggplant:

In the Baermann method, both *M. hapla* and *M. incognita* were counted as RKNs since it was impossible to distinguish the species with microscopic observation. The number of RKNs ranged from 0 to 24 J2/20 g soil. In the real-time PCR method, the numbers of *M. incognita* and *M. hapla* were separately measured using the calibration curves obtained in Fig. 1 and ranged from 0.6 to 713 J2eq/20 g soil and from 0 to 115 J2eq/20 g soil, respectively. There was a significant correlation in the number of RKNs between the Baermann and the real-time PCR method ($P < 0.001$), although their absolute values were 26 times different (Fig. 2). There was one site in which RKNs were not detected in the Baermann method, but present at densities of 56 *M. incognita* J2eq/20 g soil and 17 *M. hapla* J2eq/20 g soil with the real-time PCR method.

There was a significant correlation between the initial population of RKNs with the Baermann method at transplanting and the yield ($P = 0.007$) (Fig. 3). The yield decreased in the plots with an initial population of RKNs more than 2 J2/20 g soil.

In the case of real-time PCR, yield decreased in plots

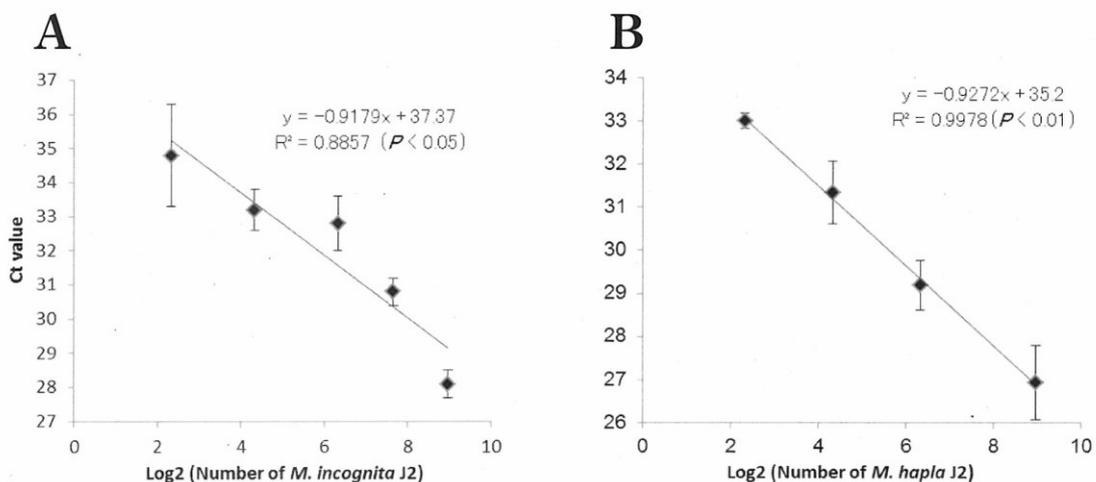


Fig. 1. Relationship between the Ct value and the number of *Meloidogyne incognita* J2s (A) ($P < 0.05$) or *M. hapla* J2s (B) inoculated in andosol ($P < 0.01$).

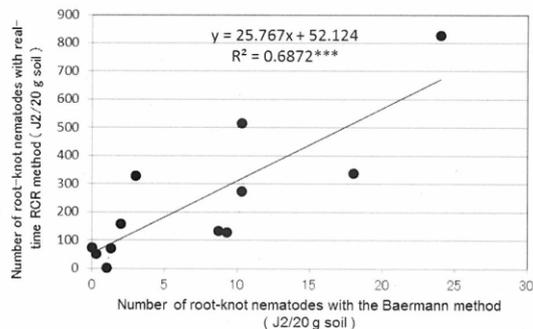


Fig. 2. Relationship between the number of root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita* and *M. hapla*) in andosol with the Baermann method and the sum of *M. incognita* and *M. hapla* with the real-time PCR method ($P < 0.001$).

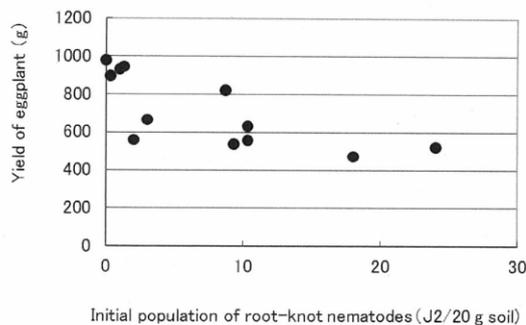


Fig. 3. Relationship between the yields of eggplant and the initial population of root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita* and *M. hapla*) in andosol with the Baermann method.

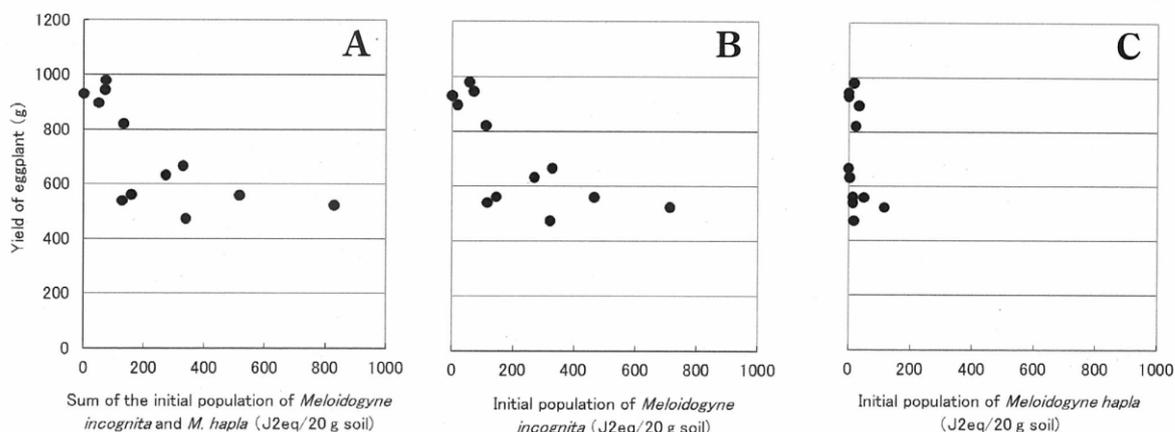


Fig. 4. Relationship between the yields of eggplant and the initial population of sum of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* (A), *M. incognita* (B), and *M. hapla* (C) in andosol with the real-time PCR method.

with the sum of initial *M. incognita* and *M. hapla* more than 128 J2eq/20 g soil (Fig. 4A). Based on the initial populations of *M. incognita*, yield losses were observed in plots containing over 115 J2eq/20 g soil (Fig. 4B). In contrast, there was no significant correlation between the yield and the initial population of *M. hapla* ($P = 0.2$) (Fig. 4C).

In the present study, galls were observed on all the eggplant roots in all the plots and the gall index ranged 1 to 7. It tended to increase with the initial populations of RKNs with the Baermann method, the sum of *M. incognita* and *M. hapla* and of *M. incognita* with the real-time PCR method, although there were no significant correlations between them ($P = 0.09$ in Fig. 5, $P = 0.42$ in Fig. 6A, $P = 0.40$ in Fig. 6B). In contrast, there were no such relations between the gall index and the initial populations of *M. hapla* ($P = 0.6$) (Fig. 6C).

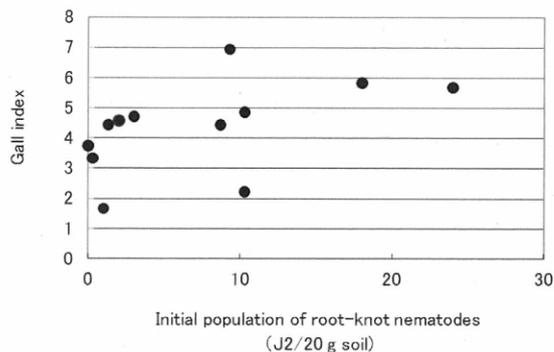


Fig. 5. Relationship between the gall indices and the initial population of root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita* and *M. hapla*) in andosol with the Baermann method.

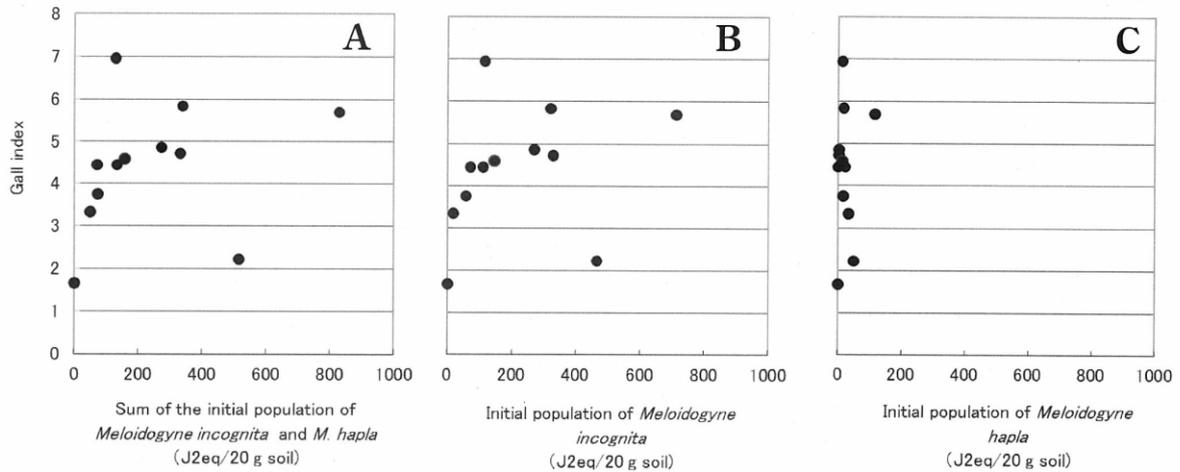


Fig. 6. Relationship between the gall indices and the initial population of sum of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* (A), *M. incognita* (B), and *M. hapla* (C) in andosol with the real-time PCR method.

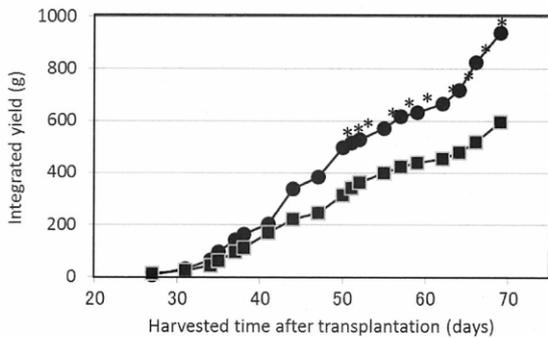


Fig. 7. Effect of the initial density of root-knot nematodes (RKNs) with the Baermann method on cumulative yields of eggplants in the plots.
 ●: 0 to 2/20 g soil of the initial density of RKNs, ■: more than 2/20 g soil of the initial density of RKNs. Asterisks indicate a significant difference between the two treatments by Student's t-test ($P < 0.05$).

Periodical change in eggplant yield:

Twelve plots were separated into two groups based on the initial densities of RKNs (0-2 and >2 J2/20 g soil) and periodical changes in the yields were calculated. There were no marked differences in the yield pattern in the initial period between the two groups, but significant differences became obvious 50 days after transplanting ($P < 0.05$) (Fig. 7).

DISCUSSION

Knowledge of the relationship between pre-plant plant-parasitic nematode population densities in soil and plant

growth is essential for the prediction of yield losses caused by nematodes and for choosing the best management practices. This study developed the real-time PCR primers Mh and RKN which sensitively quantified *M. hapla* and *M. incognita*, respectively, in andosol (Fig. 1). This method is advantageous in determining nematode densities, as our previous study already reported (Min *et al.*, 2012). In the field test, RKNs were detected with real-time PCR in the soil which RKNs were not detected with the Baermann method (Fig. 2). This kind of result was in agreement with the previous study (Min *et al.*, 2012). These results further support the merits of the real-time PCR method, especially in enumerating the densities of nematodes not easily detected with the Baermann method, such as dormant or quiescent nematode forms. However, there could be some technical errors in the density estimated with the real-time PCR method, because the andosol used for preparing the calibration curves was different from the andosol used for the field study. Goto *et al.* (2010) reported that the Ct values of soils with the same density of the target nematode were not the same among three kinds of andosols, although the difference among the single soil type, andosol, was much smaller than that between two different soil types (andosol and sandy soil). In addition, the density of *M. incognita* might be overestimated. The primer set RKN amplifies DNA even from *M. hapla* at an efficiency of 15%, as this defect was already reported in a previous paper (Toyota *et al.*, 2008), indicating that 100 individuals of *M. hapla* are detected as 15 individual of *M. incognita*. For example, in a field containing 100 individuals of *M. hapla* and 15 individual of *M. incognita*, the density of *M. incognita* is estimated as 30 individuals of *M. incognita*, two times higher than the actu-

al density. Therefore, caution is needed when quantifying *M. incognita* in fields infested with a large population of *M. hapla*. However, the density of *M. incognita* was much higher than that of *M. hapla* in the field used in this study and therefore, the false detection of *M. hapla* as a small population of *M. incognita* should not be a serious problem, since *M. incognita* would be estimated as 101.5 in a field containing 100 individuals of *M. incognita* and 10 individuals of *M. hapla*. In fields with mixed populations of *M. incognita* and *M. hapla*, the quantification of *M. hapla* using the primer set Mh is essential, since the primer set does not amplify DNA from *M. incognita* at all, enabling the quantification of only *M. hapla*.

Yield losses were observed in plots with an initial population of RKNs more than 2 J2/20 g soil measured with the Baermann method. This level is quite similar to that in a previous study in which the economic threshold level for eggplant was estimated at 1 J2/20 g soil of *M. incognita* (Schomaker and Been, 2006). In contrast, the yield in carrot decreased in fields with 20 to 30 J2/20 g soil of *M. incognita* at seeding time (Sano, 1988). In US, the damage threshold density in carrot estimated in a two-year study on *M. hapla* was 3.0 to 14 eggs/20 ml in organic soil and 12 to 38 eggs/20 ml in mineral soil (Gugino *et al.*, 2006). The yield loss in spinach was observed in soils with more than 40 eggs and J2s of *M. incognita*/20 ml soil (Di Vito *et al.*, 2004). Also, the economic threshold level in burdock, cucumber and tomato was 1.6 J2/20 g soil (Plant protection station, 2011, Yamada, 1992). Vovlas *et al.* (2005 and 2008) estimated the tolerance limits to *M. javanica* and *M. incognita* in potato and celery as 10 to 13 and 3 for eggs and J2s/20 ml soil, respectively. Collectively, the yield loss level of this study in eggplant was comparable to that in burdock, celery, cucumber and tomato, and markedly lower than that in carrot and spinach. While carrot and spinach were cultivated for two months in the previous studies, eggplant and the other vegetables were cultivated for over four months. The length of the cultivation period might cause different yield loss levels. Indeed, there were no differences in the yields in the initial period between the plots having different initial populations of RKNs, but significant differences became obvious 50 days after transplanting ($P < 0.05$) (Fig. 7). This result suggests that crops with shorter cultivation periods might show higher tolerance levels to RKNs.

In the case of real-time PCR, the yield decreased in the plots with more than 128 J2eq/20 g soil of *M. incognita* and *M. hapla* or 115 J2eq/20 g soil of *M. incognita* (Fig. 4A, B). These yield loss levels were much higher than the level obtained with the Baermann method. A similar result is reported in a combination of radish and *P. penetrans*; the

economic threshold level was less than 1 individual/20 g soil with the Baermann method, while 5 J2eq/20 g soil with the real-time PCR method (Sato *et al.*, 2010). This may be due to the real-time PCR method detecting eggs and dormant forms of nematodes that are not detected with the Baermann method.

The gall index tended to increase with the initial population of *M. incognita*, when the gall index was estimated with the Zeck's scale which measures galls caused by *M. incognita*, *M. arenaria*, and *M. javanica*. The gall size is different between *M. incognita* and *M. hapla*, and the former makes relatively larger galls on lateral roots (Hunt and Handoo, 2009). Thus, relatively larger galls formed by *M. incognita* might have made it difficult to see smaller galls of *M. hapla*, and therefore galls caused by *M. hapla* might be underestimated in this study.

In conclusion, we developed a rapid quantification method using real-time PCR for *M. incognita* and *M. hapla* in an andosol and evaluated the relationship between the initial population of *Meloidogyne* spp. and the yield of eggplant in an andosol.

LITERATURE CITED

- Atkins, S. D., Manzanilla-Lopez, R. H., Franco, J., Peteira, B. and Kerry, B. R. (2005). A molecular diagnostic method for detecting *Nacobbus* in soil and in potato tubers. *Nematology* 7, 193-202.
- Berry, S., Fargette, M., Morand, S. and Cadet, P. (2007). Reliability of PCR-based techniques for detection and discrimination of plant-parasitic nematodes of sugarcane. *Nematology* 9, 499-514.
- Berry, S. D., Fargette, M., Spaul, V. W., Morand, S. and Cadet, P. (2008) Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zaei*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22, 168-176.
- Blok, V. C. and Powers, T. O. (2009) Biochemical and molecular identification. In: *Root-Knot Nematodes* (Perry, R. N., Moens, M. and Starr, J. L. eds.), CABI, Wallingford 98-118.
- Den Nijs, L. and Van Den Berg W. (2013) The added value of proficiency tests: choosing the proper method for extracting *Meloidogyne* second-stage juveniles from soil. *Nematology* 15, 143-151.
- Di Vito, M., Vovlas, N. and Castillo, P. (2004) Host-parasite relationships of *Meloidogyne incognita* on spinach. *Plant Pathology* 53, 508-514.
- Goto, K., Sato, E. and Toyota, K. (2009) A novel detection method for the soybean cyst nematode *Heterodera*

- glycines* using soil compaction and real-time PCR. *Nematological Research* 39, 1-7.
- Goto, K., Sato, E., Gang, L. F., Toyota, K. and Sugito, T. (2010) Comparison of calibration curves prepared by soil compaction and ball milling methods for direct quantification of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* in soil. *Nematological Research* 40, 41-45.
- Gugino, B. K., Abawi, G. S. and Ludwig, J. W. (2006) Damage and management of *Meloidogyne hapla* using oxamyl on carrot in New York. *Journal of Nematology* 38, 483-490.
- Hagiya, S. (1992) Plant parasitic nematodes in Kanto district. In: *Senchu kenkyu no ayumi* (Nakasono, K. ed.), Syowado, Saga, 306-309. (in Japanese)
- Hunt, D. J. and Handoo, Z. A. (2009) Taxonomy, identification and principal species. In: *Root-Knot Nematodes* (Perry, R. N., Moens, M. and Starr, J. L. eds.), CABI, Wallingford, 55-97.
- Ichinohe, M. (1992) Historical review of nematological researches in Japan. In: *Senchu kenkyu no ayumi* (Nakasono, K. ed.), Syowado, Saga, 3-9. (in Japanese)
- Ingham, R. E. (1994). Nematodes. In: *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties* (Weaver, R. W. ed.) Madison, WI, USA, American Society of Agronomy, 459-490.
- Iwahori, H., Sano, Z. and Ogawa, T. (2000) Distribution of main plant-parasitic nematodes in sweet potato and taro fields in Kyushu and Okinawa, Japan. 1. Survey in the central and southern parts in Kyushu Island (Kumamoto, Miyazaki and Kagoshima Prefs.) and development of an effective DNA analysis method for species identification. *Kyushu Plant Protection Research* 46, 112-117. (in Japanese with English summary).
- Leal, I., Green, M., Allen, E., Humble, L. and Rott, M. (2007) Application of real-time PCR method for the detection of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood samples from lodgepole pine. *Nematology* 9, 351-362.
- McSorley, R. and Frederick, J. J. (2004) Effect of extraction method on perceived composition of the soil nematode community. *Applied Soil Ecology* 27, 55-63.
- Madani, M., Subbotin, S. A. and Moens, M. (2005) Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye. *Molecular and Cellular Probes* 19, 81-86.
- Min, Y. Y., Toyota, K., Goto, K., Sato, E., Mizuguchi, S., Abe N., Nakano, A. and Sawada, E. (2011) Development of a direct quantitative detection method for *Meloidogyne incognita* in sandy soils and its application to sweet potato cultivated fields in Tokushima prefecture, Japan. *Nematology* 13, 95-102.
- Min, Y. Y., Toyota, K. and Sato, E. (2012) A novel nematode diagnostic method using the direct quantification of major plant-parasitic nematodes in soil by real-time PCR. *Nematology* 14, 265-276.
- Moens, M., Perry, R. N. and Starr, J. L. (2009) *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: *Root-Knot Nematodes* (Perry, R. N., Moens, M. and Starr, J. L. eds.), CABI, Wallingford, 1-17.
- Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M., Sharon, E., Chet, I. and Spiegel, Y. (2000) New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Management Science* 56, 983-988.
- Oka, Y. and Mizukubo, T. (2008) Tomato culture filtrate stimulates hatching and activity of *Meloidogyne incognita* juveniles. *Nematology* 11, 51-61.
- Plant protection station (2011) *Todofuken ga setteisiteiru yobosuijun (yasai)*. http://www.jppn.ne.jp/jpp/bouteq/bojosuijun_data/yasai.pdf (in Japanese)
- Sano, Z. (1988) Relation between population density of *Meloidogyne incognita* and yield of carrot plant in summer plantings. *Proceeding of the Association for Plant Protection of Kyushu* 34, 127-130. (in Japanese)
- Sato, E., Min, Y. Y., Shirakashi, T., Wada, S., and Toyota, K. (2007) Detection of root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans* (Cobb), in a nematode community using real-time PCR. *Japanese Journal of Nematology* 37, 87-92.
- Sato, E., Goto, K., Min, Y. Y., Shirakashi, T., Toyota, K. and Suzuki, C. (2010) Quantitative detection of *Pratylenchus penetrans* from soil by using soil compaction and real-time PCR. *Japanese Journal of Nematology* 40, 1-6.
- Schomaker, C. H. and Been, T. H. (2006) Plant growth and population dynamics. In: *Plant Nematology* (Perry, R. N. and Moens, M. eds.), CABI, Wallingford, 275-301.
- Takakura, S. (1984) Spread and increase in population of the plant parasitic nematodes in some field converted from paddy fields. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan* 35, 176-179. (in Japanese)
- Toyota, K., Shirakashi, T., Sato, E., Wada, S. and Min, Y. Y. (2008) Development of a real-time PCR method for the potato-cyst nematode *Globodera rostochiensis* and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Soil Science and Plant Nutrition* 54, 72-76.
- Vovlas, N., Mifsud, D., Landa, B. B. and Castillo, P. (2005) Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant Pathology* 54, 657-664.

- Vovlas, N., Lucarelli, G., Sasanelli, N., Troccoli, A., Papajova, I., Palomares-Rius, J. E. and Castillo, P. (2008) Pathogenicity and host-parasite relationships of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on celery. *Plant Pathology* 57, 981-987.
- Yamada, E. (1992) Plant parasitic nematodes in Hokkaido district. In: *Senchu kenkyu no ayumi* (Nakasono, K. ed.), Syowado, Saga, 297-300. (in Japanese)
- Yan, G., Smiley, R. W. and Okubara, P. A. (2012) Detection and quantification of *Pratylenchus thornei* in DNA extracted from soil using real-time PCR. *Phytopathology* 102, 14-22.
- Zeck, W. M. (1971) A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. *Pflanzenschutz-Nachrichten* 24, 141-144.

Received : 7 February, 2013

線虫を捕捉・寄生する糸状菌の紹介と線虫防除への試み

渡邊貴由^{1*}・増村弘明¹・紀岡雄三¹・野口勝憲²¹⁾ 片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所, 〒300-0061 土浦市並木五丁目 5511 番地²⁾ 片倉チッカリン株式会社, 〒102-0073 千代田区九段北一丁目 13 番 5 号

Introduction of nematophagous fungi and biological control of nematodes using the fungi

Takayoshi Watanabe¹⁾, Hiroaki Masumura¹⁾, Yuzo Kioka¹⁾, Katsunori Noguchi²⁾¹⁾ Tsukuba Research Institute, Katakura Chikkarin Co., Ltd. 5-5511 Namiki, Tsuchiura, Ibaraki, 300-0061, Japan²⁾ Katakura Chikkarin Co., Ltd. 1-13-5 Kudan kita, Chiyoda, Tokyo, 102-0073, Japan

Key words : nematophagous fungi, nematode-trapping fungi, nematode-parasitic fungi, nematode-suppressive soil, biological control

1. 線虫について

線虫とは線形動物門に属する動物の総称である¹⁾。一般に線虫の体は糸状で、体長は数 mm 以下である¹⁾。線虫は、動物や植物に寄生する寄生性線虫とそれ以外の自由生活性線虫（自活性線虫）に大別され、自活性線虫は糸状菌食性と細菌食性に分けられる¹⁾。口唇は身体の前部に位置し、植物寄生性線虫と糸状菌食性の自活性線虫の口唇には口針を持つ¹⁾。日本にいる代表的な植物寄生性線虫は、ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウおよびシストセンチュウであり、作物に被害を及ぼしている¹⁾。また、線虫は雌雄異体で、交尾による有性生殖を行う¹⁾。その受精卵は厚い二層構造の卵膜に包まれて、体外に産出される¹⁾。ネコブセンチュウの受精卵はゼラチン状物質で覆われた卵塊となり土壌粒子に包まれて生存する¹⁾。また、シストセンチュウは雌成虫の体内が卵で充満され表皮がタンニン化したシストとなる¹⁾。線虫は生涯に4回脱皮を行い、1回目の脱皮は卵の中で行われ、二期幼虫として孵化する¹⁾。孵化した幼虫は身体全体が成長し、生殖腺が発達して成虫となる¹⁾。

2. 線虫を捕捉・寄生する糸状菌

土壌中に生息する微生物の中には、線虫を捕捉・摂食する線虫捕捉菌と線虫、卵またはシストに感染し資化する線虫寄生菌が存在する。ただし、線虫捕捉菌と線虫寄生菌の区別は、明瞭ではなく、名称の定義も不確定である。ここでは、Barronの定めた区分に従い、線虫を捕捉する器官を菌糸に形成する糸状菌を「線虫捕捉菌」とし、捕捉器官を形成せず線虫、卵およびシストに寄生する糸状菌を「線

虫寄生菌」と定義する²⁾。線虫捕捉菌や線虫卵寄生菌は、このような機能をどのように獲得してきたのか興味深い。

線虫捕捉菌の歴史は古く、1852年にFreseniusによる記載がある³⁾。その後、1870年にVoroniinが線虫捕捉菌に形成された網状の器官を観察したが、その機能までは解明できなかった⁴⁾。線虫捕捉菌の線虫捕捉作用は、1888年にZopfによってようやく解明された⁵⁾。一方、線虫寄生菌の発見は、線虫捕捉菌に比べて新しく、卵に寄生する糸状菌は、1960年代にEllisにより温室の土壌から発見された⁶⁾。その後、様々な線虫寄生菌が単離された。このような線虫捕捉菌や線虫寄生菌について分類、生理、生態および生物防除への利用に関する研究がなされている²⁾。

線虫捕捉菌および線虫卵寄生菌の分類を表1と表2に示す。線虫捕捉菌は、子囊菌のオルピリア科、担子菌のヒラタケ科および所属不明のトリモチカビ科に属している（表1）。線虫寄生菌は、子囊菌のマユハキタケ科、ピオネクトリア科、バツカクキン科、ネクトリア科、オピオコルディシビタ科およびニクザキン科、担子菌類のヒラタケ科、ツボカビ門のツボカビ科および所属不明のゼンマイカビ科、トリモチカビ科およびメリスタクラ科に属している（表2）。表1と表2は、現在の分類を基準に作成している^{7,8,9)}が、今後、遺伝子解析などの進展により変更される可能性もある。なお、ネコブセンチュウ卵から*Lecanicillium*が分離されたとの報告もあり¹⁰⁾、*Lecanicillium*を線虫寄生菌として表2に記載した。一方、線虫寄生菌のうち卵菌綱に分類されていた*Myzocytiium*, *Nematophthora*, *Haptoglossa*については、卵菌綱が菌界から原生物界に移動したため、表2には記載していない。

線虫捕捉菌の菌糸には、網状、分枝状、収縮環、非収縮環、球形で非収縮環などの形態の線虫を捕捉する器官が種に応じて形成されている²⁾。最も簡単な捕捉器官としては、*Stylopage*が形成する粘着性の分泌物質に覆われた菌

2012年2月9日受付・2012年2月26日受理

* Corresponding author.

E-mail: TAKAYOSHI_WATANABE@chikkarin.co.jp

表1 線虫捕捉菌の分類

門	亜門	綱	目	科	属
子囊菌 Ascomycota	チャワಂತケ Pezizomycotina	ズキンタケ Leotiomycetes	ビョウタケ Helotiales	オルビリア Orbiliaceae	<i>Arthrobotrys</i> <i>Dactylella</i> <i>Monacrosporium</i>
担子菌 Basidiomycota	ハラタケ Agaricomycotina	ハラタケ Agaricomycetes	ハラタケ Agaricales	ヒラタケ Pleurotaceae	<i>Hohenbuehelia</i> <i>Nematotonus</i> <i>Pleurotus</i>
所属不明 Incertae sedis			トリモチカビ Zoopagales	トリモチカビ Zoopagaceae	<i>Stylopaga</i>

表2 線虫寄生菌の分類

門	綱	目	科	属
子囊菌 Ascomycota	ユーロチウム菌 Eurotiomycetes	ユーロチウム Eurotiales	マユハキタケ Trichocomaceae	<i>Paecilomyces</i>
	フタマカビ Sordariomycetes	ボタタケ Hypocreales	ビオネクトリア Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>
			バツカクキン Clavicipitaceae	<i>Drechmeria</i> <i>Lecanicillium</i> <i>Pochonia</i>
			ネクトリア Nectriaceae	<i>Nectria</i>
			ニクザキン Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>
			Ophiocordycipitaceae	<i>Haptocillium</i> <i>Harposporium</i> <i>Hirsutella</i> <i>Podocrella</i>
担子菌 Basidiomycota	ハラタケ Agaricomycetes	ハラタケ Agaricales	ヒラタケ Pleurotaceae	<i>Hohenbuehelia</i> <i>Nematotonus</i>
ツボカビ Chytridiomycota	ツボカビ Chytridiomycetes	ツボカビ Chytridiales	ツボカビ Chytridiomycetes	<i>Catenaria</i>
所属不明 Incertae sedis		トリモチカビ Zoopagales	ゼンマイカビ Cochlonemataceae	<i>Euryancale</i>
			トリモチカビ Zoopagaceae	<i>Rhopalomyces</i>
		ハエカビ Entomophthorales	Meristacraceae	<i>Meristacrum</i>

糸がある²⁾。*Nematotonus*は、有柄もしくは無柄の粘着性の球を有する菌糸を形成する²⁾。*Monacrosporium*には、粘着性の分岐した菌糸を形成するものもあり、その分岐菌糸は、1~3つの細胞から形成されており、輪状や二次元の網状になることもある²⁾。*Arthrobotrys*, *Dactylella*の多くは、二次元の網状の捕捉器官にさらに輪が形成された三次元の網状の捕捉器官を形成する²⁾。*Monacrosporium*, *Arthrobotrys*のなかには、収縮する環を形成するものもあり、線虫が収縮環に侵入した瞬間、環を形成している3つの細胞が膨張し、線虫を捕獲する²⁾。*Nematotonus*, *Pleurotus*には、線虫の排泄物などにより線虫の存在を能動的に感知し、線虫に対する毒性物質または麻痺物質を産生するものもあり、線虫を不動化させた後で、栄養菌糸から感染菌糸を伸ばさせ、不動化した線虫の口腔もしくは肛門部から菌糸を侵入させ分解吸収する^{11,12)}。線虫捕捉菌は、捕捉した数時間後には線虫の表皮を破壊し、線虫体内に感染菌糸を侵入させ、24時間後には線虫体内に菌糸が

蔓延し、内容物が資化される²⁾。

線虫捕捉菌は、土壌や根圏中では腐生性であり、条件

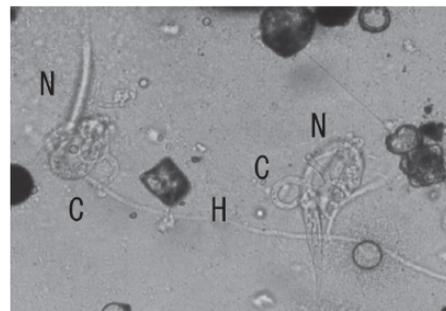


写真1 線虫を捕捉した*Arthrobotrys*属線虫捕捉菌

H: 菌糸, C: 線虫捕捉器官, N: 線虫
畑土壌から二層遠心浮遊法を用い分離した線虫を1.5%素寒天培地に塗布し、25℃で1週間培養した。線虫捕捉器官の形態は、3次元の網状である。捕捉された線虫体内には菌糸が蔓延していた。

的寄生菌である²⁾。これらは、線虫もしくはアミノ酸やペプチドなどの有機物を感知して、捕捉器官を形成する²⁾。PramerとStollによって捕捉器官形成誘導物質が発見され、“Nemin(ネミン)”と名づけられた¹³⁾。その後の研究で、様々なペプチドが捕捉器官形成を誘導することが認められ、パリンが含まれるジペプチドの誘導能力が高いことが分かった¹⁴⁾。しかしながら、パリンが含まれるペプチドの存在が必ずしも捕捉器官形成を誘導するわけではなく、栄養状態によっても左右される。*A. dactyloides*では貧栄養状態などの悪環境において多数の捕捉器官形成の誘導が生じたことから、線虫捕捉菌の捕捉器官形成において線虫の存在だけでなく、栄養が欠乏状態であることが重要であると考えられる¹⁵⁾。

線虫寄生菌の線虫などへの感染は、菌糸、胞子および遊走子によって行われる。菌糸による感染としては、*Paecilomyces*, *Pochonia*, *Lecanicillium*, *Nectria*, *Trichoderma* および *Rhopalomyces* において認められる。線虫の卵への感染は、卵の近くまで伸長した菌糸により卵殻の表層のビテリン層が分解され^{16,17)}、菌糸から産生されたプロテアーゼ、キチナーゼによりビテリン層の下にあるキチン層と脂質層が溶解し、感染する^{16,17)}。線虫の表皮はコラーゲンを主成分とする角皮で構成されており¹⁸⁾、シストの殻は雌成虫の体表がタンニン化したものである¹⁸⁾。そのため、線虫寄生菌が放出するプロテアーゼにより多少は溶解するが、線虫への感染は肛門などの開口部から行われる¹⁶⁾。胞子による感染としては、胞子が線虫体表に付着し感染する方法と胞子が線虫に摂食され体内で発芽し感染する方法の2種類に大別される。前者に属する線虫寄生菌としては、*Clonostachys*, *Drechmeria*, *Haptocillium*, *Hirsutella* および *Nematoctonus* があり、粘着性の胞子が線虫の表皮に付着し、表皮を破壊し、体内に感染する²⁾。後者に属す

る線虫寄生菌としては、*Harposporium*, *Meristacrum* および *Podocrella* があり、胞子が線虫に摂食されることで感染する経口感染であり、開いた口腔を持つ線虫に寄生する²⁾。遊走子により感染する線虫寄生菌としては、*Catenaria* がある。遊走子が線虫の口腔もしくは肛門部に誘引され、侵入し寄生する。線虫体内に遊走子嚢が形成され、成熟すると表皮を破壊して遊走子が体外に放出される^{2,18)}。線虫寄生菌は、土壌中では分生子、厚膜胞子、遊走子嚢で生存しているものが多い¹⁸⁾。

線虫寄生菌は、条件的寄生菌と絶対寄生菌に大別される。前者には、*Paecilomyces*, *Pochonia*, *Nectria*, *Trichoderma*, *Catenaria* および *Rhopalomyces* が属している。後者には、*Drechmeria* および *Hirsutella* が属している。ただし、どちらも線虫を感知するとプロテアーゼ、キチナーゼなどの分解酵素を産生し、線虫の表皮を破壊して感染する¹⁷⁾。この寄生には分解酵素が関与していることから線虫以外の生物に対して病原性を発現する可能性もある。

3. 線虫捕捉菌、線虫寄生菌の線虫防除への試み

線虫害が発生しない、もしくは発生が軽微となる「線虫害抑止土壌」がしばしば認められる^{17,19)}。「線虫害抑止土壌」の線虫抑制機構は、線虫害を防除する手段に利用できる可能性が高い。線虫密度の自然的衰退減少に線虫捕捉菌や線虫寄生菌が関与していることが知られており¹⁸⁾、「線虫害抑止土壌」から線虫捕捉菌や線虫寄生菌が分離された報告もある^{17,19)}。土壌中の線虫捕捉菌や線虫寄生菌の活性には餌となる線虫の密度が影響していると考えられ²⁰⁾、線虫捕捉菌が堆肥施用した土壌から検出されやすく、自活性線虫密度が高いと線虫捕捉菌数が高くなるとの報告がある¹⁸⁾。さらに、圃場の土壌表面に有機物マルチをすることで自活性線虫数が増加し、それにともない線虫捕捉菌数

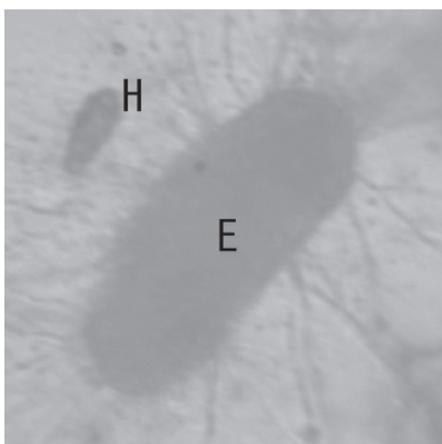


写真2 *Paecilomyces* 属線虫寄生菌に寄生された線虫卵

E: サツマイモネコブセンチュウ卵, H: 卵から発生した菌糸
 サツマイモネコブセンチュウ卵に *Paecilomyces* 属線虫寄生菌の胞子を接種し、25℃で1週間培養した。線虫寄生菌に寄生されていない卵(写真3)に比べて卵内の組織が観察できず、卵内は菌糸が充満していた。また、卵外への菌糸の発生も観察された。



写真3 線虫寄生菌に寄生されていない線虫卵

E: サツマイモネコブセンチュウ卵
 線虫寄生菌に寄生された卵(写真2)に比べて卵内の組織が明瞭に観察できる。

が増大し、結果としてネグサレセンチュウが減少した報告もある²¹⁾。また、線虫感受性作物の連作により植物寄生性線虫が増殖することで、線虫の天敵も増殖し「線虫害抑止土壌」になったとの報告もある²⁰⁾。また、線虫捕捉菌は、土壌中で線虫以外にダニやワムシなどの土壌生物を捕捉する²²⁾ので、これらの土壌動物相も線虫捕捉菌の生育に影響を及ぼしている可能性があり、線虫捕捉菌は土壌生物の食物連鎖の中で重要な位置を占めていると考えられる。

線虫捕捉菌の生物防除への応用試験は、Linford らが初めて行った²³⁾。パイナップル葉残渣をネコブセンチュウ汚染土壌に添加し、線虫と線虫捕捉菌密度の推移を観察したところ、パイナップル葉残渣添加により自活性線虫密度が一時的に増加したことで、線虫捕捉菌の活性が高まり、その後、自活性線虫密度が初期密度よりも低下した²³⁾。同時に植物寄生性線虫密度も低下したために、線虫害が軽減された²³⁾。これは、有機物マルチによる線虫害抑止機構と同じである。次に、Linford らは、線虫捕捉菌 *Arthrobotrys*, *Dactylella* をパイナップル畑に接種したが、線虫害の抑制効果は小さかった²⁴⁾。我々も線虫捕捉菌接種による線虫害抑制試験を実施したところ、滅菌土を用いたポット試験では接種菌の定着および線虫害抑制効果が確認できたものの、非滅菌土壌を用いたポット試験や圃場試験においては接種菌の定着が確認できなかった²⁵⁾。線虫捕捉菌の接種試験において線虫害抑制が認められない原因として以下のことが挙げられる。まず、接種した線虫捕捉菌は、土壌中で他の土壌生物との競合に弱いことが考えられる。また、線虫への栄養的な依存度が低く、接種した線虫捕捉菌が線虫を捕捉し続けるとは限らないと考えられる。さらに、線虫捕捉菌密度と捕捉活性の関係も重要な要素である。線虫捕捉菌は、捕捉器官に迷い込んだ線虫を捕捉することから捕捉する線虫に選択性がなく、また、線虫防除にとって要である卵やシストのような運動性のない状態の線虫は、捕捉されにくいいため、防除効果が低くなってしまふ。したがって、線虫捕捉菌の接種では植物寄生性線虫の完全な生物防除は難しいと考えられる。ただし、「線虫害抑止土壌」に線虫捕捉菌が高い密度で存在すると考えられるとの報告もあり¹⁹⁾、線虫捕捉菌の接種ではなく、自活性線虫数を操作して土着の線虫捕捉菌を活性化させることで植物寄生性線虫を防除できる可能性もある。

線虫捕捉菌の実用、市販化は、1978年に Cayrol らによりマッシュルーム栽培のキノコセンチュウ (*Ditylenchus myceliophagus*) 防除を目的とした *A. robusta* が最初である²⁶⁾。翌1979年にはネコブセンチュウ防除を目的とした *A. tortor* (= *A. irregularis*) が実用、市販化となり、国際的にも注目されたが、国内で行われた *A. tortor* の効果試験では、防除効果は認められなかった²⁶⁾。日本での線虫捕捉菌の微生物資材としては、エムシー・ファーティコム株式会社の線虫捕捉菌 *Monacrosporium phymatopagum* を用いた生物農薬「ネマヒトン」がある。

線虫寄生菌の生物防除への応用試験は、*Paecilomyces*, *Pochonia* および *Hirsutella* を用いて主に行われている。

Paecilomyces および *Pochonia* は、卵に主に寄生する条件的寄生菌であり、*Hirsutella* は、幼虫や成虫に寄生する絶対寄生菌である。絶対寄生菌は、条件的寄生菌に比べて線虫密度に対して影響は強いが、栄養源が線虫に限られるため、有機物施用などによる増殖が期待できない²⁰⁾。*Paecilomyces lilacinus* および *Pochonia chlamydosporia* は、生物防除資材として試験された線虫寄生菌である。これらの菌は世界中に生息している普遍的な菌である¹⁷⁾。これらを培養した培養物による線虫害抑制効果判定試験において効果があるものもあり、一部は商品化されている¹⁷⁾。

線虫寄生菌の実用、市販化は、*P. lilacinus* および *P. chlamydosporia* の菌株で行われた¹⁷⁾。*P. lilacinus* では、ドイツの Prophya 社の「BioActWG」、南アフリカの BCP 社の「BCP」があり、*P. chlamydosporia* では、キューバの「KlamiC」がある¹⁷⁾。

線虫卵寄生菌は、前述のようにプロテアーゼ、キチナーゼが寄生の鍵となる²⁷⁾。これらの分解酵素の分解力は、単離株によって違い、寄生率に影響する^{17, 28, 29)}。キチンを1%添加したところ、根圏や根内の微生物相が著しく変化して土壌のキチナーゼ活性が高まり、ネコブセンチュウを抑制したとの報告もあり²⁰⁾、キチナーゼが特に重要な役割を担っていると考えられる。*P. chlamydosporia* のキチナーゼ産生は、グルコースなどにより抑制され、卵塊により促進された²²⁾。線虫抑制効果を高めるためにオイルケーキ、葉や種の残渣などの有機物との併用試験や分解酵素を増大させる遺伝子組換えも行われており^{17, 20, 28, 30)}、また、*P. chlamydosporia* は根こぶ内の卵に寄生できないことから他の防除法との併用試験も行われている²⁷⁾。

4. 今後の展開

植物寄生性線虫の天敵を用いた生物防除は、発展途上の段階にある。線虫害防除の指標の一つとして「要防除水準」があるが(表3)、被害の許容については減収率5%、商品化率80%など様々である。「要防除水準」には検討の余地があると考えられるが、「要防除水準」を生物防除の当面の目標値として利用できる可能性もある。また、土壌中には様々な要因が存在し、生物防除のメカニズムには複数の要因が影響していると考えられ、防除メカニズムを明らかにすることも大切である。さらに、生物防除をより確実な防除法にするには、線虫に対してより効果的な天敵微生物の探索も重要となる。

要 旨

線虫を捕捉・寄生する糸状菌である「線虫捕捉菌」と「線虫寄生菌」について発見から生物防除への応用試験、製剤化までについて紹介した。このような糸状菌は、線虫害が発生しない土壌(線虫害抑止土壌)のメカニズムに関与していることが示唆されている。また、培養した培養物による線虫害抑制効果判定試験において効果があるものもあり、一部は商品化されている。しかし、植物寄生性線虫のこのような天敵を用いた生物防除は、発展途上の段階であ

表3 線虫の要防除水準

対象線虫名	対象作物名	要防除水準	許容水準の考え方	文献
ジャガイモシストセンチュウ	ジャガイモ	10卵 / 乾土 1g	減収率 2 ~ 8 %	18
ダイズシストセンチュウ	ダイズ (スズユタカ)	1.5 シスト / 乾土 50g	減収率 5 %	18
	ダイズ (トヨスズ)	29.5卵 / 乾土 1mL	減収率 5 %	18
	ダイズ (北見白)	6.8卵 / 乾土 1mL	減収率 5 %	18
サツマイモネコブセンチュウ	キュウリ	2頭 / 25g ベルマン法		31
	トマト	2頭 / 25g ベルマン法		31
	ニンジン	20頭程度 / 20g ベルマン法	異常根がない	18
キタネコブセンチュウ	ゴボウ	2 ~ 3頭 / 生土 25g	商品化率 80 %	18
	ニンジン	2 ~ 3頭 / 生土 25g	商品化率 80 %	18
キタネグサレセンチュウ	ゴボウ	5頭 / 25g ベルマン法	商品価値に影響	18
	ダイコン	10頭程度 / 50g ベルマン法	被害斑	18
	ダイコン	10頭 / 25g ベルマン法	商品価値に影響	18
	ダイコン	1頭 / 30g ベルマン法		31
	ニンジン	9.0頭 / 50g	M 級 3t/10a 以上等	18
	ニンジン	5頭 / 25g ベルマン法	商品価値に影響	18
	レタス	10頭 / 20g	生育遅延・収量低下	18

り、線虫害抑止土壌のメカニズムの解明など残された問題も多い。

引用文献

- 石橋信義編 (2003) 線虫の生物学, 東京大学出版会, 290p, 東京
- Barron GL (1977) The nematode - destroying fungi, topics in mycobiology, No.1, Canadian Biological Publications, 140p, Ontario
- Frenius G (1852) Beiträge zur mykologie. *Heft*, 1-2, 1-80
- Voronin M (1870) *Sphaeria lemnae*, *Sordaria coprophila*, *Arthrobotrys oligospora*. In Beiträge Zur Morphologie Und Physiologie Der Pilze.III, Ed. A Bary and MS Voronin, p. 325-360, Heinrich Ludwig Brönnner, Frankfurt
- Zopf W (1888) Zur kenntnis der infektiions - krankheiten neiderer thiere und pflanzen. *Nova Acta Leop. Carol.*, 52, 314-376
- Ellis JJ and Hesseltine CW (1962) *Rhopalomyces* and *Spinellus* in pure culture and the parasitism of *Rhopalomyces* on nematode eggs. *Nature*, 193, 699-700
- Gams W and Zare R (2001) A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. *Nova Hedwigia*, 72, 47-55
- Zare R, Gams W and Evans HC (2001), A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 73, 51-86
- Lopez - Llorca LV, Maciá - Vicente JG and Jansson HB (2010) Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes, Ed. A Ciancio and KG Mukerji, p. 51-76, Springer, Dordrecht
- Arevalo J, Hidalgo - Díaz L, Martins I, Souza JF, Castro JC, Carneiro MDG and Tigano MS (2009) Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. *Trop. Plant Pathol.*, 34, 158-163
- 田場 聡・諸味里善一 (2000) *Monacrosporium phymatopagum* の感染菌糸による線虫捕捉. 日本線虫学会誌, 30, 30-34
- Satou T, Kaneko K, Li W and Koike K (2008) The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 574-576
- Pramer D and Stoll NR (1959) Nemin:a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. *Science*, 129, 966-967
- Wootton LMO and Pramer (1966) Valine - induced morphogenesis in *Arthrobotrys conoides*. *Bacteriol. Proc. 66th annual meeting Los Angeles (Ca)*, 75
- Balan J and Lechevalier (1972) The predaceous fungus *Arthrobotrys dactyloides*: induction of trap formation. *Mycologia*, 64, 919-922
- Khan A, Williams KL and Nevalainen HKM (2006) Infection of plant - parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. *BioControl*, 51, 659-678
- Hallmann J, Davies KG and Sikora R (2009) Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In Root - Knot Nematodes, Ed. RN Perry, M Moens and JL Starr, p. 380-411, CABI, Wallingford
- 中園和年編 (1992) 線虫研究の歩み - 日本線虫研究会創立 20周年記念誌, 日本線虫研究会, 383p, 茨城
- 豊田剛己 (2011) 発病抑止土壌に関する最近の研究動向, 土づくりとエコ農業, 505, 31-37
- Hildaldo - Diaz L and Kerry BR (2010) Integration of biological control with other methods of nematode management. In Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes, Ed. A Ciancio and KG Mukerji, p. 29-49, Springer, Dordrecht
- Stirling GR, Halpin NV and Bell MJ (2011) A surface mulch of crop residues enhances suppressiveness to plant - parasitic

- nematodes in sugarcane soils. *Nematropica*, 41, 109-121
- 22) Abiko S, Saikawa M and Ratnawati (2005) Capture of mites and rotifers by four strains of *Dactylella gephyropaga* known as a nematophagous hyphomycete. *Mycoscience*, 46, 22-26
- 23) Linford MB (1937) Stimulated activity of natural enemies of nematodes. *Science*, 85, 123-124
- 24) Linford MB and Yap F (1939) Root-knot nematode injury restricted by a fungus. *Phytopathology*, 29, 586-609
- 25) 渡邊貴由・紀岡雄三・野口勝憲 (2011) *Paecilomyces* 属寄生菌と *Arthrobotrys* 属線虫捕食菌の培養物施用によるサツマイモネコブセンチュウ密度への影響, 日本線虫学会大会講演予行集, 19, 24
- 26) 西沢 務 (1988) 線虫捕食菌 *Arthrobotrys tortor* による線虫密度抑制効果試験例, 日本応用動物昆虫学会大会講演要旨, 32, 45
- 27) Atkins SD, Hidalgo-Diaz L, Kalisz H, Mauchline TH, Hirsch PR and Kerry BR (2003) Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. *Pest Manag. Sci.*, 59, 183-189
- 28) Lopez-Llorca LV, Gómez-Vidal S, Monfort E, Larriba E, Casado-Vela J, Elortza F, Jansson H, Salinas J and Martín-Nieto J (2010) Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genet. Biol.*, 47, 342-351
- 29) Freitas LG, Ferraz S and Muchovej JJ (1995) Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. *Nematropica*, 25, 109-115
- 30) Wang J, Wang J, Liu F and Pan C (2010) Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita* eggs by overexpression of a serine protease. *Biotechnol. Lett.*, 32, 1159-1166
- 31) (社) 日本植物防疫所 (2011) 都道府県が設定している要防除水準 (野菜), http://www.jppn.ne.jp/jpp/bouteq/bojosuijun_data/yasai.pdf

Research Highlight

Recent Trends in Microbial Inoculants in Agriculture

KOKI TOYOTA^{1*} and TAKAYOSHI WATANABE^{1,2}

¹Graduate School of Bio-Applications and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2–24–16 Nakacho, Koganei, Tokyo, 184–8588, Japan; and ²Tsukuba Research Institute, Katakura Chikkarin Co., Ltd., 5–5511 Namiki, Tsuchiura, Ibaraki, 300–0061, Japan

Soil microbes have great potential for agriculture. A wide variety of microbes have been utilized to enhance crop production. In the current issue, enhanced growth of rice plants is reported with the inoculation of a nitrogen (N)-fixing bacterium, *Azospirillum* sp. B510 (2), which possesses a disease-suppressive property against the rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) and the bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* (25). The importance of biological nitrogen (N) fixation has been recalled just recently in the N acquisition in tropical rain forest development (5).

The development of mass production and inoculation techniques makes culturable microbes much more attractive research targets among numerous and diverse soil microbes. Beneficial microbial inoculants in agriculture are mainly plant growth-promoting bacteria and fungi, and they function through different mechanisms, e.g., the supply of nutrients, the production of plant hormones, and the suppression of various crop pests.

N is the most limiting nutrient in crop production, on many occasions, and, thus, there are increasing applications of symbiotic or free-living N-fixing bacteria in sustainable agricultural systems. Biomass production of sugarcane and oil palm was increased by the inoculation of *Enterobacter* spp. (12) and *Bacillus sphaericus* (26) strains, respectively, both of which were isolated from the rhizosphere and possessed N-fixing ability. N fixation by the inoculants contributed to increased N nutrition in the host plants. An energetic screening revealed that diverse rhizobacteria possessing N-fixing ability had a plant growth-promoting effect on rice and were a source of biofertilizers (8).

Masunaka *et al.* (14) reported an example in which the solubilization of minerals in the soil is the main effect of a plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi*. The PGPF does not produce plant hormones (9) and behaves like mycorrhizal fungi in the establishment of symbiotic associations rather than fungal parasites. A lower production of an isoflavonoid, phytoalexin vesitol, a major defensive response of leguminous plants, was involved in their symbiotic associations.

Quorum sensing is a population density-dependent regulation mechanism used by bacteria to regulate gene expression; many Gram-negative plant pathogens control the expression of virulence factors with their quorum-sensing systems (22). *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) are signal compounds involved in quorum sensing, and AHL-

degrading bacteria have been utilized in the biocontrol of plant diseases (21). *Chryseobacterium* spp. (16) and *Microbacterium* spp. (23) have been isolated from potato roots and leaves, respectively, as AHL-degrading bacteria, and their application as biocontrol agents is expected.

Suppression of plant diseases is an important mechanism in plant growth promotion. Since the reports by Schroth's group (10, 18), great attention has been paid to colonization of the rhizosphere by fluorescent pseudomonads. More than 800 fluorescent pseudomonad strains were isolated from the phyllosphere and rhizosphere of potato plants and characterized for their phylogenetic position (20). Some of the strains showed high similarity to *Pseudomonas koreensis* and *P. vancouverensis*, both of which have been reported to be beneficial for biological control or plant growth promotion. For better performance of biocontrol agents against soil-borne pathogens, better colonization on plant roots is essential. Motility and chemotaxis are important traits for root colonization by biocontrol agents. Chemotactic responses of *P. fluorescence* Pf0-1 to amino acids have been studied, and the results revealed that chemotaxis to amino acids, major components of root exudate, and to chemoattractants other than amino acids has an important role in root colonization (15).

Since most plant diseases are caused by phytopathogenic fungi, and most phytopathogenic fungi contain chitin as the main component of their cell walls, chitinolytic microbes are expected to be beneficial for their biological control. A total of 100 chitinolytic bacterial isolates were obtained from the rhizospheres of various agronomic plants in Japan, and their phylogenetic positions were revealed (19). Isolates belonging to *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas* spp., and *Lysobacter capsici* have been identified, and their agronomic use is expected.

Plant-parasitic nematodes also cause serious economic damage to many agricultural crops. Effective antagonists against the nematodes have been used as biological control agents. For instance, the genus *Arthrobotrys* is a famous nematode-trapping fungus that has a wide geographical distribution and that captures a live nematode with adhesive trapping organs. Two kinds of such biological control agents are commercially available, Royal 300 and Royal 350 (24), although the fungus traps not only plant-parasitic nematodes but also free-living nematodes that are beneficial in crop production (4). The genera *Paecilomyces* and *Pochonia* are well-known nematode-egg-parasitic fungi that are capable of parasitizing nematode eggs and reducing their populations. *Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*) is the

* Senior Editor, Microbes and Environments;
E-mail: kokit@cc.tuat.ac.jp

main component of BioActs WG[®] and MeloCon[®] (1). Barra *et al.* (3) reported that *P. lilacinum* showed virulence against not only plant-parasitic nematodes but also insects, making this agent even more attractive. KlamiC[®] is a biological control agent containing *Pochonia chlamydosporia* (13). These fungal agents will be used as effective management tools against plant-parasitic nematodes. Bacterial inoculants have also been reported that suppress plant-parasitic nematodes. *L. antibioticus* has the ability to produce lytic enzymes and an antibiotic 4-hydroxyphenylacetic acid, and, in tomatoes, it reduced the severity of the disease caused by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (11).

Efforts are underway to develop yet-to-be cultivated microbes that will have future applications in agricultural use. Studies of the characterization of culturable microbes are still useful for unraveling their unexploited functions. Eida *et al.* (6, 7) phylogenetically and phenotypically characterized the cellulose-decomposing bacteria and fungi that inhabit composts. Some isolates displayed high cellulose- and hemicellulose-degrading abilities and could be used for improving biodegradation processes during composting, resulting in the production of plant growth-promoting materials.

To meet the demands of an increasing human population, global crop production needs to double, but current estimates are far below what is needed (17). Microbial inoculants should be maximized for different agricultural purposes to enhance crop production and remedy this situation.

References

- Anastasiadis, I.A., I.O. Giannakoub, D.A. Prophetou-Athanasiadou, and S.R. Gowen. 2008. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Prot.* 27:352–361.
- Bao, Z., K. Sasaki, T. Okubo, *et al.* 2013. Impact of *Azospirillum* sp. B510 inoculation on rice associated bacterial communities in a paddy field. *Microbes Environ.* 28:487–490.
- Barra, P., L. Rosso, A. Nesci, and M. Etcheverry. 2013. Isolation and identification of entomopathogenic fungi and their evaluation against *Tribolium confusum*, *Stophilus zeamais*, and *Rhyzopertha dominica* in stored maize. *J. Pest Sci.* 86:217–226.
- Barron, G.L. 1977. The Nematode-destroying Fungi, Topics in Mycobiology, No.1, Canadian Biological Publications, Ontario.
- Batterman, S.A., L.O. Hedin, M. van Breugel, J. Ransijn, D.J. Graven, and J.S. Hall. 2013. Key role of symbiotic dinitrogen fixation in tropical forest secondary succession. *Nature* 502:224–229.
- Eida, M.H., T. Nagaoka, J. Wasaki, and K. Kouno. 2011. Evaluation of cellulolytic and hemicellulolytic abilities of fungi isolated from coffee residue and sawdust composts. *Microbes Environ.* 26:220–227.
- Eida, M.H., T. Nagaoka, J. Wasaki, and K. Kouno. 2012. Isolation and characterization of cellulose-decomposing bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts. *Microbes Environ.* 27:226–233.
- Habibi, S., S. Djedidi, K. Prongjunthuek, F. MD. Mortuza, N. Ohkuma-Ohtsu, H. Sekimoto, and T. Yokoyama. Physiological and genetic characterization of rice plant growth-promoting rhizobacteria isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant Soil*, in press.
- Hyakumachi, M. 1994. Plant-growth-promoting fungi from turfgrass rhizosphere with potential for disease suppression. *Soil Microorganisms* 44:53–68.
- Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze, and M.N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885–886.
- Lee, Y.S., M. Anees, H.N. Hyun, and K.Y. Kim. 2013. Biocontrol potential of *Lysobacter antibioticus* HS124 against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, causing disease in tomato. *Nematology* 14:545–555.
- Lin, L., Z. Li, C. Hu, X. Zhang, S. Chang, L. Yang, Y. Li, and Q. An. 2012. Plant growth-promoting nitrogen-fixing Enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. *Microbes Environ.* 27:391–398.
- Manzanilla-López, R.H., I. Esteves, M.M. Finetti-Sialer, P.R. Hirsch, E. Ward, J. Devonshire, and L. Hidalgo-Díaz. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *J. Nematol.* 45:1–7.
- Masunaka, A., M. Hyakumachi, and S. Takenaka. 2011. Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for xolonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes Environ.* 26:128–134.
- Oku, S., A. Komatsu, T. Tajima, Y. Nakashimada, and J. Kato. 2012. Identification of chemotaxis sensory proteins for amino acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and their involvement in chemotaxis to tomato root exudate and root colonization. *Microbes Environ.* 27:462–469.
- Rashid, R., T. Morohoshi, N. Someya, and T. Ikeda. 2011. Degradation of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signaling molecules by potato root surface-associated *Chryseobacterium* strains. *Microbes Environ.* 26:144–148.
- Ray, D.K., N.D. Mueller, P.C. West, and J.A. Foley. 2013. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS One* 8:e66428.
- Schroth, M.N., and J.G. Hancock. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216:1376–1381.
- Someya, N., S. Ikeda, T. Morohoshi, M. Noguchi-Tsujimoto, T. Yoshida, H. Sawada, T. Ikeda, and K. Tsuchiya. 2011. Diversity of culturable chitinolytic bacteria from rhizospheres of agronomic plants in Japan. *Microbes Environ.* 26:7–14.
- Someya, N., T. Morohoshi, T. Ikeda, K. Tsuchiya, and S. Ikeda. 2012. Genetic diversity and ecological evaluation of fluorescent pseudomonads isolated from the leaves and roots of potato plants. *Microbes Environ.* 27:122–126.
- Uroz, S., Y. Dessaux, and P. Oger. 2009. Quorum sensing and quorum quenching: The yin and yang of bacterial communication. *ChemoBioChem* 10:205–216.
- von Bodman, S.B., W.D. Bauer, and E.L. Coplin. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:455–482.
- Wang, W.-Z., T. Morohoshi, N. Someya, and T. Ikeda. 2012. Diversity and distribution of N-acylhomoserine lactone (AHL)-degrading activity and AHL-lactonase (AiiM) in genus *Microbacterium*. *Microbes Environ.* 27:330–333.
- Yang, Y., L. Wang, X. Ji, *et al.* 2011. Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PLoS Pathog.* 7:1–12.
- Yasuda, M., T. Isawa, S. Shinozaki, K. Minamisawa, and H. Nakashita. 2009. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:2595–2599.
- Zakir, F.A.A., Z.H. Shamsuddin, K.A. Rahim, Z.Z. Zakaria, and A.A. Rahim. 2012. Inoculation of *Bacillus sphaericus* UPMB-10 to young oil palm and measurement of its uptake of fixed nitrogen using the ¹⁵N isotope dilution technique. *Microbes Environ.* 27:257–262.