

論文の内容の要旨

独立行政法人
農業・食品産業技術総合研究機構
北海道農業研究センター

氏 名 奈良部 孝

論文題目 日本産ネコブセンチュウの種分布および
生物的防除法に関する研究

ネコブセンチュウ (*Meloidogyne* spp.) は世界的に最も広く分布する線虫グループであり、我が国においては、施設園芸や露地野菜、畑作における連作障害の主因の一つとなっている。その防除には主に殺線虫剤が使用されているが、毎回施用による高コスト要因や土壌・環境への悪影響などの弊害も多いため、化学薬剤に代わる防除法の確立が急務である。本研究では、防除のための基礎情報を得るため、ネコブセンチュウの簡便な同定法の確立と、種および系統ごとの寄生性と分布など生理生態的特性の解明を行った。また、化学薬剤に代わり得る生物的防除素材として、天敵細菌 *Pasteuria penetrans* の諸性質を解明し、実用場面での防除法の開発と効果の実証を行った。

1. 日本産ネコブセンチュウの分類学的研究および地理的分布の解明

ネコブセンチュウの種の同定と我が国における分布の解明

本研究では、北海道から沖縄までの全国約 280 か所のネコブセンチュウを用いて、従来の形態に基づく同定および新手法であるアイソザイム解析による同定を行った。この結果、我が国の施設園芸や露地野菜、畑作地帯に分布するのは、サツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウの4種であった。変異の大きい形

態データに代わり、エステラーゼ+リンゴ酸デヒドロゲナーゼのアイソザイムが正確な種の同定に利用できることを明らかにした。また、従来全国的に分布するとされていたジャワネコブセンチュウは、沖縄を中心とした暖地のごく一部にしか分布しないことを明らかにした。サツマイモネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウは全国的に、キタネコブセンチュウは沖縄を除き全国的に検出されたが、施設栽培ではサツマイモネコブセンチュウが圧倒的に多くを占め、露地では3種はそれぞれ、沿岸部平地、内陸部畑地、標高の高い内陸部・山間地において検出割合が多かった。

これら主要4種の他、わが国固有と考えられる8種を含めた12種のネコブセンチュウについてアイソザイムによる明確な同定が可能であった。アイソザイム同定を行った種の形態について、種内・種間差異を詳細に検討したところ、雌成虫の会陰紋形態と雄成虫の頭部形態を合わせて、それぞれ比較・観察することによって、形態による正確な同定が可能であることを示した。

アレナリアネコブセンチュウの分化型とその生理生態的特性の解明析

ミトコンドリア DNA のシトクロムオキシダーゼサブユニット II 遺伝子と 16s リボゾーム RNA 遺伝子領域間を増幅するプライマー (c2f3/1108) を用いて、PCR 法で増幅し得られた DNA 断片を本邦産ネコブセンチュウ個体群間および海外の報告と比較した。この結果、サツマイモネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウおよびキタネコブセンチュウでは、それぞれ断片長が 1.7, 1.7, 0.5 kb となり、海外の線虫データと一致した。しかし、本邦産アレナリアネコブセンチュウには海外で知られる 1.1kb 以外に多型が認められた。本種はエステラーゼアイソザイムの差異から A 2 型と A 1 型が存在し、A 2 型は 1.7kb と 1.1kb に分かれ、A 1 型はすべて 1.7kb であったことから、3つの分化型 (それぞれ A 2-J、A 2-O、A 1 系統と命名) が確認できた。

海外のアレナリアネコブセンチュウには形態・寄生性等に関する変異系統や遺伝的多型が知られていることから、海外の線虫系統を入手し、本邦産3分化型について詳細な形態的差異や多型を調査した。その結果、A 2-J 系統はアレナリアネコブセンチュウの基本系統とは形態的にも異なり、我が国独自の系統と考えられる。また、A 2-O 系統はアレナリアネコブセンチュウの基本系統である米国産個体群とほぼ共通した。さらに、A 1 系統は雌成虫の会陰紋、雄成虫の頭部形状、2 期幼虫の尾端構造の3点が特異的であり、GPD アイソザイムも多型を示したことから、本系統をアレナリアネコブセンチュウから独立した新種である *Cliff & Hirschmann* と同定した。本種は南米および東南アジア以外の地域からは初検出であり、ナンヨウネコブセンチュウ (新称) と命名した。各分化型は分布域が異なり、A 2-J 系統は本州~九州に広く分布し、A 2-O 系統は沖縄のみに、A 1 系統は九州南部から沖縄に分布した。各作物に対する寄生性を調査した結果、サツマイモ品種「関東14号」に対する増殖が、A 2-J、A 2-O、A 1 でそれぞれ、多、無、僅、と明瞭に異なった。A 2-O は米国産アレナリアネコブセンチュウと、A 1 はタイ産 *M. microcephala* とそれぞれ同一傾向であったことから、寄生性についても海外系統との一致が認められた。

2. 天敵細菌 *Pasteuria penetrans* の特性解明とネコブセンチュウ防除の実証

天敵細菌の探索と分離株の寄生特性

我が国の各地圃場から 24 分離株の *Pasteuria penetrans* を探索し、ネコブセンチュウとの二者培養によって 9 分離株の増殖に成功した。各分離株の胞子は超音波処理や特定のプロテアーゼ処理によって付着活性が高まり、アルカリ条件下では胞子付着が阻害されることを明らかにした。各分離株はネコブセンチュウの種に対して宿主特異的な付着・寄生反応性を示した。すなわち、各分離株は寄生性によって 3 つのグループに分かれ、PPMI グループはサツマイモネコブセンチュウとジャワネコブセンチュウに、PPMA グループはアレナリアネコブセンチュウと *M. microcephala* に、PPMH グループはキタネコブセンチュウにそれぞれ特異的に寄生することを明らかにした。一方、沖縄以南のサツマイモネコブセンチュウには、いずれの天敵細菌分離株も寄生しない個体群があることが判明した。これら天敵細菌分離株の宿主特異性を利用して、野外から分離した未知種の同定に応用できることを明らかにし、簡便な同定法を開発した。

天敵細菌を用いたネコブセンチュウの防除

天敵細菌 *Pasteuria penetrans* の優良系統を選抜し、ネコブセンチュウ汚染土壌に胞子を混合し、作物を連作することによって、胞子量が土壌 1g 当たり 10^5 個で 2 作目から、同 10^4 個で 3 作目から殺線虫剤並みの防除効果が得られることを明らかにした。防除効果を得るための要因として、分離線虫に対する胞子付着率が重要であることを明らかにし、同付着率が 80% を越えると次回作から防除効果が明瞭に現れることを究明した。次に、露地トマトを 6 連作栽培しサツマイモネコブセンチュウの防除効果を圃場試験によって確認した。初年目 1 回のみ 1 m^2 当たり 5×10^9 個胞子処理区では、3 作後以降、幼虫 1 頭当たりの胞子付着率は 80% 前後を維持したものの、ポット試験並の防除効果は得られず、5 作目までは無処理区の収量をわずかに上回る程度であった。顕著な効果が現れたのは 6 作目で、その時の収量は殺線虫剤毎作処理区を上まわった。殺線虫剤の半量併用では、3 作目までの減収をある程度抑えることができたので、天敵細菌の効果が現れるまでの期間の対策として有効であった。なお、本細菌は 1998 年生物農薬として登録され、現在、一般農家でネコブセンチュウ防除に使用されている。

以上を要するに、本研究ではわが国のネコブセンチュウに対し、高精度で簡便な同定法を開発した。この手法の適用によって、わが国のネコブセンチュウの種分布を明らかにし、従来の矛盾点の多い定説を一新した。また、わが国に分布するネコブセンチュウ種にそれぞれ対応した天敵細菌系統を野外から分離し増殖することに成功し、その中から優良分離株を選抜し、野外の圃場試験において線虫防除効果を実証した。