

琉球大学学術リポジトリ

Pasteuria

penetransのサツマイモネコブセンチュウへの付着に及ぼす土壌の影響

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): 生物防除, サツマイモネコブセンチュウ, 出芽細菌, アルミニウムイオン キーワード (En): Biological control, Meloidogyne incognita, Budding bacterium, Al ion 作成者: 諸見里, 善一, 土田, 大輔, 田場, 聡, Moromizato, Zen-ichi, Tsuchida, Daisuke, Taba, Satoshi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3618

Pasteuria penetrans のサツマイモネコブセンチュウへの 付着に及ぼす土壌の影響

諸見里善一*・土田 大輔**・田場 聡***

Zen-ichi MOROMIZATO, Daisuke TSUCHIDA and Satoshi TABA :
The effect of soil on the adhesion of *Pasteuria penetrans*
on southern root-knot nematodes

キーワード：生物防除, サツマイモネコブセンチュウ, 出芽細菌, アルミニウムイオン
Key words : Biological control, *Meloidogyne incognita*, Budding bacterium, Al ion

Summary

Pasteuria penetrans, a budding bacterium parasitizes the root-knot nematodes. Therefore, the biological control by the bacterium has been established. However, as the effects of biopesticides depend on soil environment in generally, it is very important to examine the condition of compatibility with soils. In this study, for the efficient operation of biological control of root-knot nematodes with *P. penetrans*, the effects of the soils on adhesive ability of the bacterium to nematodes were examined. Southern root-knot nematodes and *P. penetrans* were inoculated into the 3 types of sterile soils, Kunigami Mahji, Shimajiri Mahji and Jahgaru, distributed in Okinawa Island and the difference of adhesion of the bacterium to the nematodes were investigated. The rate of adhesion was high level even at low concentration, increasing with the concentration in other soils, and has come to the peak at the standard concentration (P 2:50,000/g). The difference among the soils in pH and chemical concentration were also investigated. There was no significant difference in pH among the soils. The adhesive level was better in Shimajiri Mahji which had high aluminum content. When aluminum chloride (0.1%) was added to pure water, the rate of adhesion was significantly increased.

緒 言

ネコブセンチュウはウリ科、ナス科、アブラナ科などの主要作物に大きな被害を与え、沖縄県でもこの線虫による野菜の被害が年々ひどくなり大きな問題となっている。これまで有害線虫の防除にはD-D剤やクオルピクリンなどの殺線虫剤が用いられてきたが、効果が一時的で、また非選択的の性質が強いため自活性線虫や捕食性線虫などの有益な線虫や他の天敵微生物なども死滅させ、その後有害線虫が急増するリサージェンスが指摘されている。そのため、化学薬剤の単用だけでなく、生物防除を取り入れ

*琉球大学農学部生物生産学科

**合資会社比嘉酒造

***沖縄県農業試験場

た総合防除の確立が望まれている^{3, 8, 11, 13, 14}。出芽細菌, *Pasteuria* 属菌 (写真1) は線虫に寄生し (写真2), その造卵機能を著しく阻害して遅効的ではあるが線虫個体数を激減させることから生物農薬として実用化されている。本菌は熱や乾燥に強く, また殺線虫剤にも耐性であるが, 絶対寄生菌であるため大量培養ができないなどの欠点を有する^{9, 11, 14}。また, 生物農薬は環境条件により効果が大きく左右される。佐野¹⁰は土壌水分含量が多いと本菌の線虫への付着の機会が増えることを指摘している。さらに, Birdら²は線虫への付着にはレクチンと炭水化物が関与していることを示唆している。また, Nakasono ら⁷はパストリア菌の密度は低温条件 (26°C) に比べ高温条件 (30°C) では10倍に増えることを明らかにし, さらに Giannakou ら⁵ および Hatz ら⁶は高温処理することによって付着率が高くなることを報告している。しかし彼らも指摘しているように線虫への付着にはほかにも数多くの要因が考えられる。このことから本研究では本菌が沖縄県の土壌に適合し, 高い効果を発揮するかを明らかにするため, 本菌のサツマイモネコブセンチュウへの付着に及ぼす土壌の影響とそれに関連する要因を検討した。

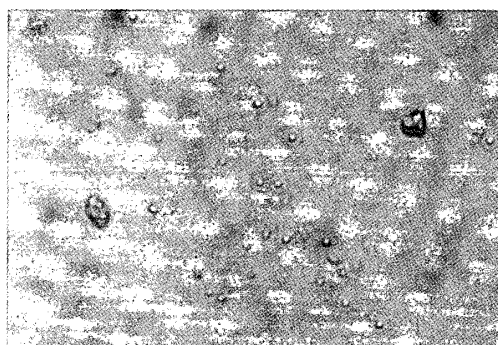


写真1. *Pasteuria penetrans* の顕微鏡写真

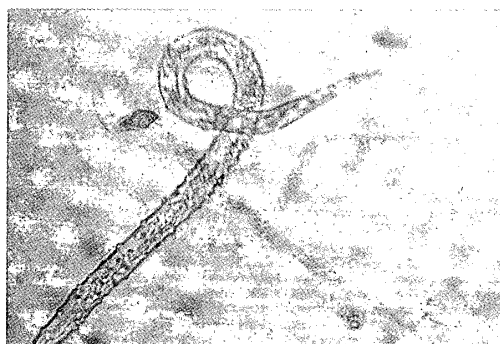


写真2. サツマイモネコブセンチュウ体表面に付着した *P. penetrans*

材料および方法

供試土壌

沖縄県に分布する代表的な3種類の土壌, 国頭マージ, 島尻マージおよびジャーガルを用いた。土壌は1×1mm (JIS規格) 目の篩にかけたものを供試した。供試土壌の採取地や特性は表1に示した。

表1. 供試土壌の特性

	供 試 土 壌		
	国頭マージ	島尻マージ	ジャーガル
採取場所	沖縄県名護市	沖縄県糸満市	沖縄県西原町
土壌 pH	4.4	7.6	8.0
母 材	国頭礫層	サンゴ石灰岩	泥灰岩
性 質	排水不良	やや排水不良	極端な排水不良
採 取 年	1998年	1998年	1998年

供試出芽細菌

出芽細菌, *Pasteuria penetrans* は株式会社ネマティックの製剤を用いた。

供試線虫

サトウキビ圃場 (島尻マージ) から採集した土壌にトマト (福寿2号) を定植して3日後に形成されたサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) の卵嚢を採取し, 蒸留水内で孵化させた第2期幼虫を使用した。

P. penetrans の線虫への付着に及ぼす土壌の影響

採取した各土壌をオートクレーブで120℃、1時間滅菌した後に、40gをシャーレに入れ、*P. penetrans*を3段階の濃度（P1：孢子数 2×10^3 個/土壌1g、P2：孢子数 5×10^4 個/土壌1g、P3：孢子数 2×10^5 個/土壌1g）に分けて接種し、よく攪拌した後にサツマイモネコブセンチュウ第2期幼虫約500頭を接種した。一区につき3個のシャーレを用い、3日後にベールマン法によって線虫を回収し、菌の付着数を測定した¹⁾。

P. penetrans の線虫への付着に及ぼす土壌滲出液の影響

三角フラスコに土壌1,000gと蒸留水1,000mlを入れ、120℃で20分間滅菌した後、濾紙で濾過した液を試験管に9.5ml取り、これに3段階に濃度を変えた本細菌孢子懸濁液0.1mlとサツマイモネコブセンチュウ第2期幼虫約150頭を入れ、3日後に付着数を観察した。

P. penetrans の線虫への付着に及ぼすpHの影響

0.1Mクエン酸および0.2Mリン酸第2ナトリウムを用いてpH4.0から8.0までの緩衝液を作成し、これを試験管に9.5ml取り、前述の濃度の細菌懸濁液0.1mlとサツマイモネコブセンチュウ第2期幼虫150頭を入れ、3日後に付着数を観察した。

供試土壌の滲出液成分の分析

乾燥土壌を粉砕した後に、 1×1 mmの篩にかけた。20gの土壌に30mlの超純水を加え30分間振とうし、これを吸引濾過した後、遠心分離機にかけ、上澄み液を採取し、さらに吸引濾過し透明の状態にした。この試料を光プラズマ分析装置（島津ICPS-2000）を用いて定量分析した。

P. penetrans の線虫への付着に及ぼすアルミニウムの影響

0.1%塩化アルミニウム9.5mlが入った試験管にサツマイモネコブセンチュウ第2期幼虫150頭と濃度の異なる細菌懸濁液0.1mlを入れ、3日後に付着の状態を観察した。

結 果

土壌の影響

各土壌区とも孢子濃度が高くなるにつれて、付着率および付着数とも高くなる傾向が認められた（表2）。島尻マージではP1（低濃度区）でも付着率が高く、施用基準であるP2区では100%の付着率を示した。付着数では3土壌区間で大きな差異は認められなかったが、P2区では他の土壌区に比較して島尻マージで多く、P3区ではさらに増加した。また孢子の付着数も濃度に比例して増加する傾向を示した。

土壌滲出液の影響

P2区以上の濃度区では100%またはそれに近い付着率であったが、P1区では他区に比べ島尻マージ区でいくぶん高い付着率が認められた。また平均付着数も島尻マージで高い傾向があった（表3）。

pHの影響

土壌滲出液の影響が土壌とほぼ似た傾向を示したことから、土壌の化学的要因であるpHの影響を調べた。酸性の国頭マージからアルカリ性のジャーガルの範囲であるpH4から8までの範囲で検討したところ、P2区以上では付着率が100%であり、また付着数もpHによる大きな差異は認められなかつ

た。P 1 区では33%から70%の変動が見られたが、一定の傾向は認められなかった (表4)。

表2. *P. penetrans* のサツマイモネコブセンチュウへの付着に及ぼす各土壌の影響

土 壤	付着率 (%) ¹⁾	付 着 数 ²⁾
国頭マーヅ		
P 1 ³⁾	43.03	2.00 0~5 ⁴⁾
P 2	87.40	4.12 0~10
P 3	91.03	4.96 0~22
島尻マーヅ		
P 1	78.97	2.31 0~7
P 2	100.00	6.73 2~13
P 3	100.00	11.79 3~21
ジャーガル		
P 1	44.53	1.00 0~7
P 2	76.24	4.00 0~12
P 3	99.30	7.04 0~27

¹⁾ 2期幼虫に対する *P. penetrans* の付着率。 ²⁾ 2期幼虫1頭当たりの平均付着菌数。

³⁾ P 1 : 孢子数2,000/土壌1g, P 2 : 孢子数50,000/土壌1g, P 3 : 孢子数200,000/土壌1g。

⁴⁾ 付着孢子数の最小値~最大値。

表3. *P. penetrans* のサツマイモネコブセンチュウへの付着に及ぼす各土壌浸出液の影響

土 壤	付着率 (%) ¹⁾	付 着 数 ²⁾
国頭マーヅ		
P 1 ³⁾	17.65	1.63 0~8 ⁴⁾
P 2	98.76	14.33 0~20
P 3	100.00	11.71 2~18
島尻マーヅ		
P 1	21.13	1.37 0~5
P 2	100.00	21.66 3~30
P 3	100.00	25.17 6~41
ジャーガル		
P 1	18.97	1.36 0~9
P 2	100.00	19.34 2~25
P 3	100.00	20.22 8~23

¹⁾ 2期幼虫に対する *P. penetrans* の付着率。 ²⁾ 2期幼虫1頭当たりの平均付着菌数。

³⁾ P 1 : 孢子数2,000/土壌浸出液1g, P 2 : 孢子数50,000/土壌浸出液1g, P 3 : 孢子数200,000/土壌浸出液1g。 ⁴⁾ 付着孢子数の最小値~最大値。

表4. *P. penetrans* のサツマイモネコブセンチュウへの付着に及ぼす pH の影響

孢子濃度 ¹⁾	pH									
	4		5		6		7		8	
	A ²⁾	B ³⁾	A	B	A	B	A	B	A	B
P 1	41.32	2.51	64.77	2.65	33.37	1.20	70.34	1.66	64.21	1.71
P 2	100.00	10.33	100.00	10.75	100.00	10.15	100.00	10.10	100.00	10.72
P 3	100.00	12.25	100.00	18.85	100.00	17.85	100.00	17.25	100.00	14.95

¹⁾ P 1 : 孢子数2,000個/g, P 2 : 50,000/g, P 3 : 200,000/g。 ²⁾ 2期幼虫に対する *P. penetrans* の付着率。

³⁾ 2期幼虫1頭当たりの平均付着菌数。

供試土壌の成分含量

pH の影響が認められなかったことから、土壌成分の影響を検討した。その結果、国頭マージはマグネシウム含量が多く、全体的にはリン、カリウム、カルシウム、アルミニウムが乏しく、一方、ジャーガルはリン酸、カリ、カルシウム含量が多かった。また島尻マージは他2土壌に比べてアルミニウム含量が著しく多かった（表5）。

表5. 供試土壌の成分含量

土 壤	成 分				
	P	K	Ca	Mg	Al
国頭マージ	0.01 ¹⁾	1.87	1.91	2.31	0.71
島尻マージ	0.01	0.98	2.99	1.50	10.69
ジャーガル	0.79	3.71	11.44	1.12	6.30

¹⁾値はmg/100 g。

アルミニウムの影響

島尻マージでは低濃度区（P 1 区）でも他の土壌区より付着率が高く、さらに他土壌区と比較してアルミニウム含量が高かったことから、蒸留水に塩化アルミニウム（0.1%）を添加した区と無添加区を設定しその影響を検討した。その結果、アルミニウム添加区は全濃度区で付着数で2倍の増加が、また付着率で15%以上の増加が認められた（表6）。

表6. *P. penetrans* のサツマイモネコブセンチュウへの付着に及ぼすアルミニウムの影響

胞子濃度	付 着 数				付 着 率			
	Al + ¹⁾		Al -		Al +		Al -	
P 1 ²⁾	3.62	Aa ³⁾ 0 - 7 ⁴⁾	1.86	Ba 0 - 9	57.33	Aa	42.30	Ba
P 2	17.66	Ab 0 - 27	9.56	Bb 0 - 15	83.33	Ab	68.16	Bb
P 3	21.44	Ac 0 - 36	12.88	Bc 0 - 19	94.27	Ac	76.73	Bc

¹⁾Al + : 0.1% 塩化アルミニウム添加区, Al - : 無添加区。 ²⁾P 1 : 胞子数2,000個/g, P 2 : 50,000/g, P 3 : 200,000/g。 ³⁾ダンカンの新多重範囲検定 (P < 0.05) により大文字はアルミニウム添加区と無添加区間でまた小文字は胞子濃度区間での有意差を示す。 ⁴⁾付着胞子数の最小値~最大値。

考 察

パストリア菌はネコブセンチュウ類に対して寄主特異性が高く、乾湿耐性、高温・低温耐性および化学薬剤耐性に優れ、土壌中で数年以上耐久生存するなど生物農薬としての利点を有している¹⁾。しかし、本菌はネコブセンチュウを直接死滅させるのではなく、線虫体表面から感染した細菌が造卵機能を阻害し、遅効的に線虫の個体数を減少させる。本菌が実質的な効果を発揮するには線虫への胞子付着率が50%以上、さらに安定した効果を維持するには80%以上が必要とされ、これには野菜類で約2ヵ年かかり、また付着数も5個以上が必要とされている^{1, 8, 13, 14)}。一方、生物農薬は一般に土壌環境条件によって効果が異なり、その施用にあたっては土壌との適合性を検討する必要がある。沖縄県の土壌は国頭マージ、島尻マージおよびジャーガルがほとんどであり、これらの土壌は母材の違いにより物理性や化学性が異なる（表1）。このことから、本研究ではこれらの土壌で本菌による生物防除を的確に行うためにサツマイモネコブセンチュウへの付着に及ぼす土壌の影響とその機作を検討した。3つの土壌の中で最も付着率が高かったのは島尻マージであった。この土壌では低濃度区でも80%近くの付着率を示し、標準区

では100%に達した。また、一頭当たり付着数も標準濃度区で平均6頭以上に達し、これは本菌の感染を確実にする付着数とされている5個を上回る。一方、国頭マーヅとジャーガル区では標準濃度や高濃度区でも100%には達せず、標準濃度区での付着数も5個を下回った。特に、国頭マーヅでは菌を高濃度に接種しても付着率の著しい増加は認められなかった。このように、各土壌区間で付着率や付着数に差異が認められたことから、その原因を土壌の化学性に注目し、土壌滲出液の影響を検討した。その結果、付着率は3土壌区間で約100%に達し差異は認められなかったが、一頭当たりの付着数では島尻マーヅ滲出液で多く、国頭マーヅでは少なかった。また、土壌の直接的影響に比べ、滲出液を使用した場合には低濃度区では差が認められなかったが、標準濃度区以上になると一頭当たりの付着数が著しく増加した。この違いは、土壌に接種した場合、菌の土壌粒子への吸着あるいは土壌粒子自体が障害となって線虫への付着する機会が少なくなったことによると考えられる。本菌の線虫への付着に及ぼす土壌滲出液と土壌の影響がほぼ一致することから、この原因を土壌の化学性にあると考え、土壌pHと土壌成分の両面から検討した。その結果、pH4から8の緩衝液中での付着率は標準区以上で100%に達し、付着数にも大きな差異は認められなかった。低濃度区においては付着率が33から70%程度、一頭当たりの付着数では1.2から2.65個の変動が見られたが、pH値との一定の関連性はないと考えられる。一方、各土壌の成分含量を比較すると、国頭マーヅはマンガンが、ジャーガルはリン、カリウム、カルシウムがまた島尻マーヅはアルミニウム含量が他の土壌と比較して多いことがわかった。このことから、試験管内に0.1%の塩化アルミニウムを添加し、付着率や付着数を無添加区と比較したところ、各濃度区で付着率が15%以上また付着数では約2倍の増加が認められた。土壌中で粘土粒子への細菌の付着にはカチオンが大きな影響を及ぼし、その中でもアルミニウムイオンの影響が最も強い¹⁵⁾。アルミニウムを添加するとこれが線虫の体表面のアニオンに吸着し、吸着されたアルミニウムイオンと *P. penetrans* のアニオンが引き合うことによって付着しやすくなると考えられる。アルミニウムイオンはフザリウム菌、疫病菌、半身萎ちょう病菌、リゾクトニア菌およびアファノミセス菌などの土壌病原菌を抑制する一方、植物に対してもその種類によっては有害であることが知られている^{4, 15)}。このことから、アルミニウムイオンの土壌への施用には慎重を要するものの、生物農薬としてのパストリア菌の増殖効果を高める手段としては有効であり、今後実質的レベルでの検討が必要である。Birdら²⁾は線虫への微生物の付着機作の一つはレクチンと炭水化物の相互作用によることを示唆しているが、本研究によってさらに土壌中のアルミニウムイオンが付着に及ぼす要因であることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたりパストリア水和剤を供試いただいた株式会社ネマティックに感謝いたします。

引用文献

- 1) 浅野 千秋 土壌改良生物資材 (パストゥリア資材) の施用効果検定法の確定等の調査. ネマティック 7-23.
- 2) Bird, A.F., Bonig, I. and Bacic, A. (1989) Factors affecting the adhesion of microorganisms to the surfaces of plant-parasitic nematodes. *Parasitology* 98 : 155-164.
- 3) Chen, Z. X. and Dickson, D. W. (1998) Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology and Biological Control Potential. *J. Nematology* 30 (3) : 313-340.
- 4) 古屋 廣光, 高橋 正 (2000) 植物の土壌伝染性病害に対する土壌アルミニウムの影響 (交換性アルミニウムが作物生育に有利に働く?) *KASEAA* 38 (4) : 222-223.

- 5) Giannakou, I. O., Pembroke, B., Gowen, S. R. and Davies, K. G. (1977) Effects of long term storage and above normal temperatures on spore adhesion of *Pasteuria penetrans* and infection of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 43 : 185 - 192.
- 6) Hatz, B. and Dickson, D. W. (1992) Effect of temperature on attachment, development, and interaction of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *J. Nematology* 24 (4) : 512 - 521.
- 7) Nakasono, K., Gaspard, J. T. and Tateishi, Y. (1993) Effect of soil temperatures on spore increase of *Pasteuria penetrans* parasitizing *Meloidogyne incognita* in vinyl house condition. *Jpn. J. Nematol.* 23 (1) : 1 - 9.
- 8) 奈良部 孝 (1999) 寄生性細菌パストゥリアを用いたネコブセンチュウの防除の実用性. *植物防疫* 53 : 9 - 12.
- 9) 西澤 務 (1994) 土壌線虫の話. *タキイ種苗(株) 広報出版部*, 111 - 112.
- 10) 佐野 善一 (1997) *Pasteuria penetrans* のサツマイモネコブセンチュウへの付着効率に及ぼす土壌水分の影響. *日線虫誌* 27 : 88.
- 11) Stirling, G. R. (1984) Biological control *Meloidogyne javanica* with *Bacillu penetrans*. *Phytopathology* 74 : 55 - 60.
- 12) Thorne, G. (1940) *Duboscqia penetrans*, n. sp. (Sporozoa, Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev. *Proceedings of the Helminthological Society.* 7 : 51 - 53.
- 13) 上田 康郎 (1997) ネコブセンチュウの天敵出芽細菌の生態と防除効果. *植物防疫* 51 (12) : 571 - 575.
- 14) 上田 康郎・三平 東作 (1997) トマト・キュウリ栽培における天敵出芽細菌 (パストリア菌) のネコブセンチュウ防除効果. *関東東海農業の新技术* 13.
- 15) 和田信一郎 (1993) *土壌の事典*. 朝倉書店, 東京, 8 - 9 pp.

摘 要

Pasteuria penetrans はネコブセンチュウに寄生するため、本菌を用いた生物防除法が確立されている。しかし、一般に生物農業は環境に左右されるため土壌との適合性を検討する必要がある。本研究では、本菌によるネコブセンチュウの生物的防除を効果的に行うために、本菌の付着能に及ぼす影響を検討した。サツマイモネコブセンチュウと本菌を沖縄県に分布する3種類の土壌に接種すると島尻マージ土壌では低濃度区ですでに高い付着率を示し、他の土壌区では濃度が高くなるにつれて付着率も高くなった。土壌区間での付着率の違いを土壌 pH と土壌成分の面から検討した。その結果、pH の影響は認められなかったが、島尻マージは他の土壌に比較してアルミニウム含量が多く、また塩化アルミニウムを添加した水溶液中では付着効果が高くなったことから、アルミニウムイオンが本菌の線虫への付着を促進する効果が示唆された。