

ネグサレセンチュウの検出方法に関する研究 ミナミネグサレセンチュウ検出法としてのインキュベーション法について¹⁾

野口 義弘
(徳島県農業試験場)

は し が き

昭和34年から土壤病害虫対策事業が発足して全国に検診員が設置され、線虫に関する研究は急速に発展し、検診方法についても幾多の新技术が確立されてきた。しかしネグサレセンチュウについては寄生状況が不明確で、その病斑は経験者においても線虫によるものか、他の病害によるものかは判断に苦しむことが多い。検診にあたっては土壤検診のみでは不十分で、植物検診でも根からの線虫検出によって始めてわかり、根からの検出調査をする必要がある。根からの検出法としては、直接顕微鏡下で組織を解剖する方法、ミキサーにより組織を摩砕し検出する方法、ベルマン法、インキュベーション法等があるが、比較的少量の根からの検出、活動的な線虫を多量に必要とする接種試験を行なう場合などでは、インキュベーション法による分離方法が最もよいのではないと思われる。筆者は1964年から土壤病害虫特殊調査としてミナミネグサレセンチュウについてインキュベーション法に関する試験を試みたので概要を報告する。

試験の方法および成績

(1) インキュベーション法に用いる容器の条件とネグサレセンチュウ遊出数

目的および試験方法：インキュベーション法は、広口ビン、シャーレに水洗いした根を入れ20~25℃に置くことにより線虫は遊出するが、これに用いる容器の条件によって遊出が異なるかどうかを検討した。供試根は8月20日に採取したタバコの根を用いた。採取後5日間8℃に保存し、水洗いした細根を1cm位に切りよく混ぜ合わせた後、各容器に10g入れて25℃定温器中と25~34℃の室温に保存し、2~3日置きに分離調査した。分離方法は、容器に少量の水を入れて攪拌後、25メッシュと325メッシュの篩を重ねて液を注ぎ込み、325メッシュの篩に集めた線虫を夾雑物を除くためベルマン法で分離した。各3反覆で実施。用いた容器および方法は次のとおりである。

- A 500ml広口びん、蓋は少しずらし通気をはかった。
- B 500ml広口びん、蓋は完全にした。
- C ポリエチレン製500ml広口びん、蓋は完全にした。
- D 径15cmシャーレ、蓋の裏に濾紙をあて水分を保った。
- E 径15cmシャーレ。

調査結果：ミナミネグサレセンチュウの遊出数は第1表のようで、シャーレの蓋の裏に濾紙をあて水分を保ったものが最大であった。とはいっても、処理の間で遊出数には大差がない。ネグサレセンチュウの遊出数には通気性が関係するといわれるが、本試験の結果は関係がないようで、室温に置いた場合、蓋を完全にしたものが蓋をずらして通気をはかったものより多く遊出している。蓋を開けることにより根の表面が乾燥するのではないかと思われ、供試根の乾燥が遊出数に関係するように考えられ、容器の種類がネグサレセンチュウの遊

1) A study on surveying methods of *Pratylenchus nematodes*.

By Yoshihiro Noguchi. Proc. Assoc. Pl. Prot. Sikoku,

No. 2 : 79-82 (1967)

第1表 インキュベーション法に用いる容器の条件とネグサレセンチュウの検出数¹⁾

調査月日 処理	調査月日									計
	8 27	8 29	8 31	9 2	9 4	9 7	9 10	9 13		
25°C	A	235	324	234	160	62	26	19	9	1069
	B	211	366	333	135	79	77	29	15	1245
	C	404	280	210	180	75	98	21	7	1275
	D	314	456	324	191	102	88	41	32	1548
	E	205	314	297	180	112	72	41	9	1230
室温	A	241	377	252	93	34	10	6	6	1019
	B	253	298	265	86	33	34	11	5	985
	C	373	306	202	113	52	23	8	6	1083
	D	177	496	307	72	47	36	13	16	1164
	E	90	347	143	87	43	31	7	9	757

註 1) 3 反覆平均。

出数に関係するとは考えられない。

(2) 加温温度がネグサレセンチュウの遊出に及ぼす影響

目的および試験方法：インキュベーション法の加温温度が遊出数に影響することを知るため、32°C、25°C、18°Cの温度下でしらべた。また、資料を保存するのに適当と思われる5°Cでも遊出するか、一定期間保存した後25°Cでインキュベーションした場合、遊出数に影響があるかも調査した。美馬郡脇町で採取したオカボの根を3日保存後に供試した。第1試験同様水洗いした根を1cm位いに切り混ぜ合わせた後、500cc広口びん1個に10g入れ所定温度の定温器中に保存し、2~3日置きに分離した。広口びんは蓋を少しずらし通気をはかった。5°C区では広口びんに入れたまま、5日、10日、15日、20日間保存した。それぞれ保存後は25°Cに加温、2~3日置きに分離調査した。分離方法は第1試験と同様とした。各3反覆で実施した。

試験結果：32°C、25°C、18°C、5°Cの温度下で実施した結果、25°Cが最も多く遊出したが32°Cとはあまり差がない。この結果は第1試験の25°Cと25°C~34°C下の室温で置いた場合も同様の結果である。18°Cは遊出数が少なく、遊出のしかたは、32°Cと高温になると早く遊出し、18°Cと低くなるとおそくまで遊出する傾向がみられる。5°Cの低温下でも遊出数が少しみられたが、これは根の水洗、切断処理を行なう間に遊出したことが考えられるし、分離する場合篩に集まった中には根の組織片が入りこれをベルマン法で分離したためと考えられる。5°Cで保存した根は、25°Cに加温しても保存しない場合に比べると遊出数は少なくなっている。しかし保存を5日~20日しても各保存期間には差がみられなかった。

第2表 加温温度とネグサレセンチュウ検出数¹⁾

調査月日 温度	調査月日															計	
	10 21	10 23	10 26	10 28	10 30	11 2	11 4	11 6	11 9	11 11	11 13	11 16	11 18	11 20	11 23		11 25
25°C	2147	1633	1203	573	317	277	128	60	65	40	17	23	14	11	11	6	6525
32°C	1900	1657	877	750	193	313	237	103	50	37	17	20	8	6	12	6	6186
18°C	1790	1173	727	350	201	193	210	183	82	84	57	87	84	81	104	95	5501
5°C	325	39	29	12	12	22	18	7	8	8	4	8	—	—	—	—	492

註 1) 3 反覆平均。

(3) 土壤と寄生根を混合したときのインキュベーション法の結果

目的および試験方法：ネグサレセンチュウの検診は、土壤検診と根からの検出調査を行なうことが望ましいが労力を必要とするので、土壤と寄生根を混合したインキュベーション法で、しかも土壤のみを検出することによって調査の目的が達成できないかを知るため実施した。美馬郡脇町でミナミネグサレセンチュウの寄生するオカボの根と、その根辺土壤を採取し、根は水洗い後1cm位に切り、土壤は10メッシュの篩で、長い根、石等を篩分け、土壤200gに1cmに切った根10gを混合しポリエチレン袋に入れて密封25°C定温器中に保存した。保存後は10メッシュの篩で根と土壤を篩い分け、土壤は50gをベルマン法で、根は水洗い後2gをミキサー法の常法に従って10秒、15秒、20秒間摩砕し、400メッシュの篩に集めた線虫を100ccに稀釈、1ccを5反覆調査し2g当りの線虫数を求めた。保存期間は2日、4日、6日、10日、14日、20日、30日、40日、50日間とした。保存時の土壤水分は18.7%であった。

第3表 5°Cに保存した場合のネグサレセンチュウ検出数¹⁾

調査月日 保存日数	10.26	10.28	10.30	11.2	11.4	11.6	11.9	11.11	11.13	11.16	11.18	計
5日	1047	1333	630	643	272	180	159	51	25	40	19	5259
10日	1277	1200	717	457	480	167	70	68	42	22	28	4527
15日	1263	1223	660	610	430	250	123	65	49	29	24	4726
20日	1463	1440	483	620	350	287	202	81	39	19	16	5000

註 1) 3反覆平均。

試験結果：25°Cに保存することにより土壤からのネグサレセンチュウの検出数は増加し、寄生根を混合しないでも約2倍以上の検出数がみられた。篩で根を篩分けても土壤中にはかなりの細根片が必ず入り、これに寄生した線虫、卵から孵化した幼虫が遊出し検出されるためと考えられ、寄生根を混合することにより検出量は、はるかに多く検出され、根に残った線虫は期間が長くなるに従い減少しており、根に寄生した線虫は土壤中に十分遊出するものと考えられる。検出数は14日後まで増加し、14日間保存を最高としその後次第に減少している。これは14日頃までは孵化幼虫等が盛んに土壤中へ遊出するためで、その後は遊出数が次第に減少し、死亡虫が遊出数を上回ってくるためと考えられ、14~15日間保存がよいように思われる。

第4表 土壤と根を混合した場合の検出数¹⁾

処 理	調査月日 成幼別 加温日数	10.29	10.31	11.2	11.4	11.8	11.12	11.18	11.28	12.8	12.18
			2日	4日	6日	10日	14日	20日	30日	40日	50日
採取土壤	成虫	130	126	55	99	80	73	44	39	38	47
	幼虫	170	417	423	351	485	540	465	473	401	387
	計	300	543	478	450	565	613	509	512	439	434
採取土壤+ 根の土壤	成虫		545	638	751	993	679	353	206	315	401
	幼虫		1813	1663	2034	2685	4240	3570	3088	1985	1980
	計		2358	2301	2785	3678	4919	3923	3294	2300	2381
ミキサー法 (根からの検出)	成虫		1640	720	650	440	245	85	10	10	5
	幼虫		715	635	570	335	465	310	145	90	60
	切断虫		25	110	60	65	65	30	20	0	0
	計		2380	1465	1280	840	775	425	175	100	65

註 1) 4回調査の平均。

総 合 考 察

ネグサレセンチュウの根からの検出法としてのインキュベーション法は、温度と水分が遊出数に影響するようである。シャーレの蓋の裏にろ紙をあて水分を保たせた状態でインキュベーションを行なうと遊出数が多くなり、室温に置いた場合、広口びんの蓋を完全にした方が遊出数が多くなっていることなどから考え、根の表面の水分が遊出数に関係するようと思われる。遊出温度については、32℃定温器中、25~34℃室温下でインキュベーションを行なっても25℃で行なった場合と大差がなく、18℃では遊出数が少ないことから、ミナミネグサレセンチュウの活動適温は25~30℃と考えられる。遊出状況も温度が高くなると早くなるようで、18℃と低くなるとおそくまで遊出がみられ、ベルマン法と同様の結果で線虫の活動が遊出数に関係する。一方、5℃の低温下でも、わずかであるが遊出されたが、これは根を処理する間に根の組織片中の線虫がベルマン法で分離中に遊出されることが考えられる。しかし、5~20日間5℃下で保存しても遊出数には変りがなかったので5℃前後の温度は、調査試料を保存しなければならない場合に適した温度と考えられる。

一般に採取土壌を室温で保存することにより線虫の検出数が増加することは、経験的に知られている。これは土壌中に入っている細根片に寄生した線虫やその卵から孵化した幼虫が遊出するためで、25℃定温器中に保存することにより幼虫数で約25倍の検出数がみられた。土擦中に根を混合した場合は、混合しない場合よりも4~6倍と多くなり、根から遊出することが十分考えられる。検出される線虫は幼虫が多く、2日間保存で70%以上、保存期間が長くなると幼虫の割合はさらに高くなり、20日間保存になると80~90%以上となっている。この幼虫の増加は孵化幼虫が検出されるためと思われる、インキュベーション法では卵の多少が検出数に影響することが大きい。千代西尾(1964)は梨の根を白色根と褐色根に分けてチャネグサレセンチュウを分離した結果、白色根に多く検出され、褐色根ではステージの進んだ線虫が多かったと報告している。白色根では線虫の繁殖が盛んに行なわれるため卵が多くなり、検出幼虫数が増加するのである。実際にインキュベーション法を実施すると、線虫はいつまでも検出され、2カ月後でも検出される。何日位でインキュベーションを打ち切ったらよいかは、卵が検出数に関係深いことから考え、卵期間でよいと思われる。後藤(1960)は、ミナミネグサレセンチュウの卵期間を高温時には10~20日と推定しており、筆者が本試験を実施した結果も、10日以降は検出数が非常に少なくなっているため、調査の期間は25~30℃の線虫活動適温下では14日前後でよいのではないかと考えられる。遊出線虫の分離法としては筆者は篩を使用して分離したが、孵化幼虫は400メッシュの篩でも篩の目を十分通ることが考えられ、第1、第2試験ではステージの進んだ線虫が多かった。孵化幼虫をも集め調査するには篩の使用をさけて、少量の水で洗い、その水すべてについて調査した方がよいと考えられる。

摘 要

根に寄生したミナミネグサレセンチュウの検出法として、インキュベーション法について検討した結果、遊出数の多少には、水分、温度、卵の多少が影響することがわかった。調査期間は25~30℃で14日前後がよいと思われる。なお、インキュベーション法は最適の条件下でも根に寄生した線虫の全てが遊出しないので、寄生線虫の総数を推定することはできない。

引 用 文 献

- 国井喜章・気賀沢和男・石橋信義(1960)：線虫の採集・分離，東京，農林省振興局研究部，pp. 47~57.
千代西尾伊彦(1964)：梨根の状態とネグサレセンチュウの遊出傾向について，昭和39年度応動昆虫大会講演要旨：34.
横尾多美男(1962)：日本産ネグサレセンチュウの分類並びに生態に関する調査，佐賀大学農学い報，14号：161~216.

(1967年4月22日 受領)