

ネコブセンチュウに関する研究

福岡県立香住丘高等学校 生物部 2年 森重泰成

1 研究目的

植物寄生性センチュウは、数多くの種類が存在しているがその多くは植物の生育などを阻害し、見た目を悪くし、品質を低下させるといった悪影響をもたらすことが知られている。その中でも、ネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) は被害が大きいとされており、人参、トマト、ナスなどをはじめとした数多くの植物に寄生し被害をもたらすとされている。また、センチュウによる農作物の被害総額は世界で1億7300万米ドルと見積もられている(1987年アメリカセンチュウ学会調査, 2013年の物価水準で金額換算)*1。このことから、センチュウが忌避する物質を特定することによりその物質を使って農業被害を防ぎたいと考えこの研究を選択した。

2 先行研究

ネコブセンチュウにはアレナリアネコブセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウなどの種類が存在しているうえ、検出地などにより若干性質の異なるレースなども存在している。ネコブセンチュウは九州沖縄地域において日本で最も分布しており、寄主範囲も広く、植物寄生性センチュウの中で最も有名であるネコブセンチュウは、ウリ科作物やナス科作物の他、根菜類を好んで寄生している。

表1 ネコブセンチュウの作物に対する走化性*2

線虫	トマト	タバコ	ピーマン	ラッカセイ	イチゴ	サツマイモ
	ブリッツ	NC95	カリフォルニアワンダー	フローレンナーまたは千葉半立	さちのか	高系14号
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						
本州型	+	+	+(±)	-	-	+(±)
沖縄型	+	+	±(-)	-	-	-
ナンヨウネコブセンチュウ	+	+	±	-	-	±
ジャワネコブセンチュウ	+	+	-(±)	-	-	-
キタネコブセンチュウ	+	+	+	+	+	-

+: 感受性 (>20), ±: やや感受性 (2-20), -: 抵抗性 (<2); () 内の数値はポット試験において500頭接種した時に着生した平均卵数数。
() は一部個体群で見られた反応。

検定品種が異なれば、それぞれの線虫に対する反応が変わる可能性がある。

表1より、センチュウには特定の作物に対して寄生するものとそうでないものがあることがわかる。また、アレナリアネコブセンチュウの本州型と沖縄型で走化性が異なるように同一種でもレースが異なると異なる植物に寄生することがあるとわかる。

3 仮説

先行研究より、すべてのセンチュウが全く同じ種類の植物に寄生するわけではないことがわかる。

また、ネコブセンチュウを含めた植物寄生性センチュウはアブラナ科の植物では増殖率が低い*3ことが知られている。その原因は大根に含まれる辛み成分であるイソチオシアネートだと推測される。

そこで、センチュウが大根を本当に忌避するのか、また忌避するとすればどの物質に対して忌避を示しているのかを明らかにするために寒天プレートを用いた二次元的な行動解析法を用いて研究する。

4 研究方法

4.1 予備実験

ベルマン法を用いてネコブセンチュウ汚染土壌からネコブセンチュウを分離する。

(1) 準備

ベルマン用漏斗, 網皿, ガラス管瓶, キムワイプ, はかり, ネコブセンチュウ汚染土壌

(2) 操作手順

- ①ベルマン用漏斗にガラス管瓶を取り付け、漏斗がいつぱいになるまで水道水を満たす。
- ②網皿にキムワイプを敷く。
- ③網皿にネコブセンチュウ汚染土壌を入れる。
- ④網皿を漏斗にセットし、網皿の下部を水に浸す。
- ⑤漏斗をポリフィルムで覆い、25℃のインキュベーター内で3日間分離する。



図1 ベルマン装置



図2 分離したネコブセンチュウ

4.2 実験1

ネコブセンチュウを用いておろし大根及びワサビに含まれる物質に対する走化性を確認する。

(1)準備

1.5%寒天プレート(径9mm ペトリ皿), 計数シート, おろし大根, センチュウ, ワサビ

(2)操作手順

①センチュウ懸濁液(100 μ l)をマイクロピペットで計り取り図3のセンチュウ滴下点へと滴下する。同様におろし大根の汁(10 μ l)とすりおろしたワサビ0.1gを1mlの水で攪拌した液体(10 μ l)を図3の検定物質滴下点へと滴下する。対照実験を行うために検定物質滴下点に水を滴下したものと検定物質を何も滴下しなかったもので同時に実験を行った。また,この実験ではコンタミネーションを防ぐためにオートクレーブで121 $^{\circ}$ C,20分滅菌をした上,作業はすべてクリーンベンチ内で行った。

②温度などの外的要因の影響を無くするためセンチュウが最も活動しやすいとされる25 $^{\circ}$ Cのインキュベーターの中で①で作成したシャーレを24時間静置する。ネコブセンチュウは土壤中で生息しているため日光はあてないようにした。

③走化性の度合を測定する。計数シートを用い,それぞれの分割区中のセンチュウ数を測定し,以下の式にあてはめ相対密度を測定する。

$$\text{相対密度} = \text{頭数割合}(\%) / \text{面積割合}(\%)$$

検定物質滴下点の近接分割区の相対密度が2以上になる物質は誘引物質,逆にこれらの区が0または0近くになり,そこから離れるごとに相対密度が上がるものは忌避物質と分かる。

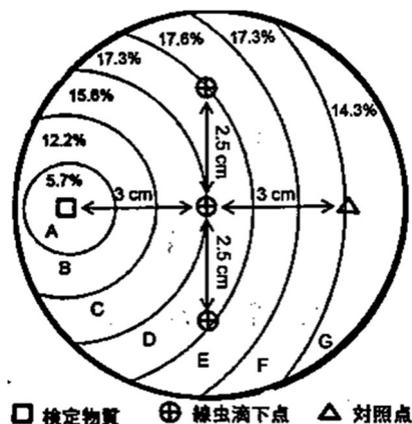


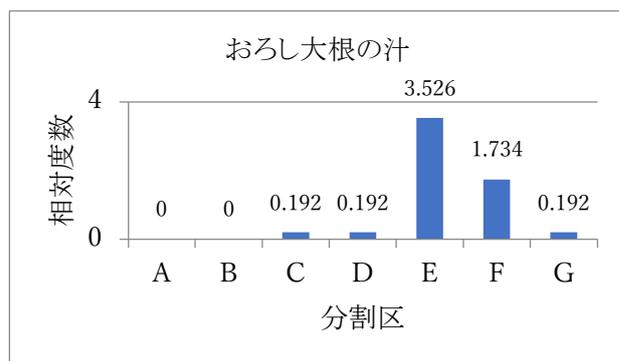
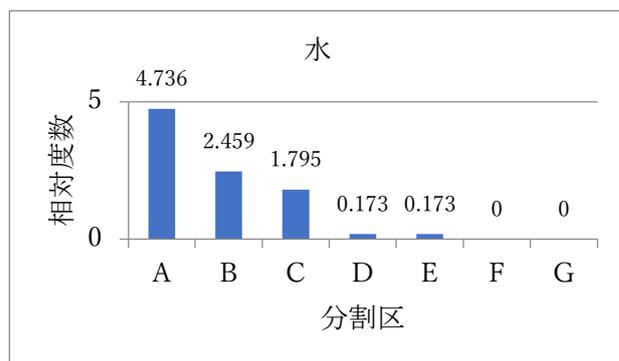
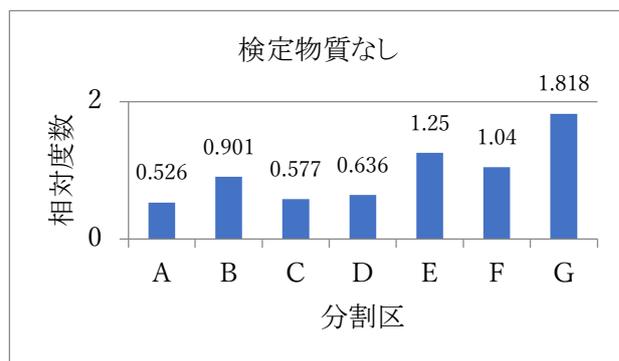
図3 計数シート

4.2 実験2

実験1と同様の操作手順で実験を行い実験1にておろし大根の汁,すりおろしたワサビを水で攪拌した液体でコロニーが形成された反省から,寒天培地にそれぞれ抗生物質を混合して実験を行った。実験結果をより正確なものにするために静置期間を24時間から48時間静置に変更した。実験1は1反復のみ実行したが,実験2では3反復行った。

5 結果

実験1



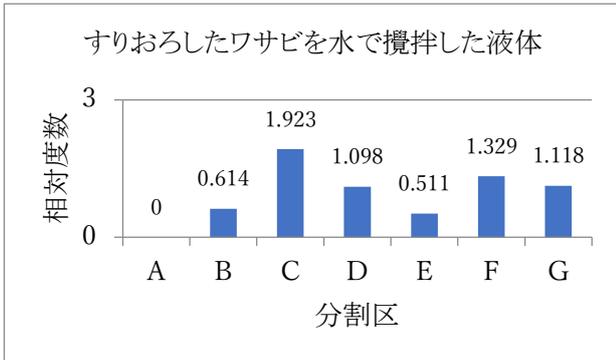


図4 実験1におけるネコブセンチュウの各物質に対する走化性

図4よりネコブセンチュウは検定物質が水であるときにおいて、分割区Aが最も相対度数が大きく、離れるにつれて小さくなった。おろし大根の汁に関しては、分割区A,Bにおいて相対度数が0であり分割区C,Dにおいても非常に低い値となっている。すりおろしたワサビを水で攪拌した液体については、分割区Aにおいて相対度数が0、分割区Bにおいて相対度数が0に近いものを示しているが、分割区C以降はさほど顕著な差が見られなかった。すりおろした大根の汁とすりおろしたワサビを水で攪拌した液体の滴下点でコロニーが形成されていた。

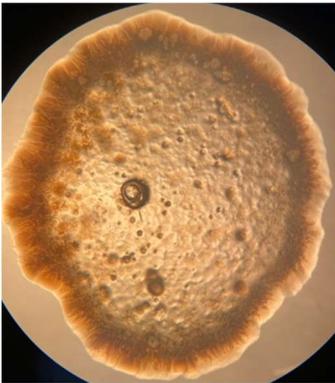


図5 形成されたコロニー

実験2

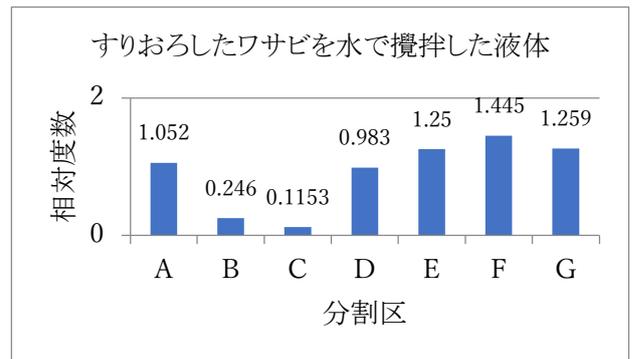
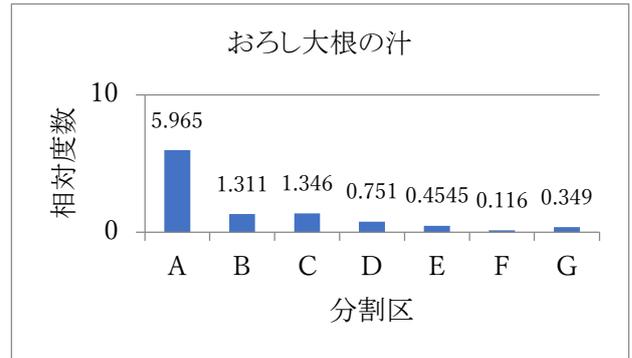
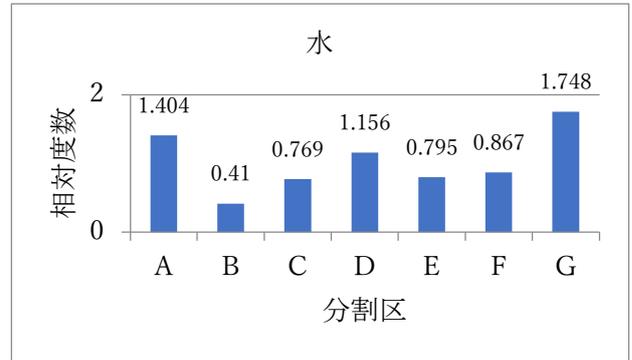
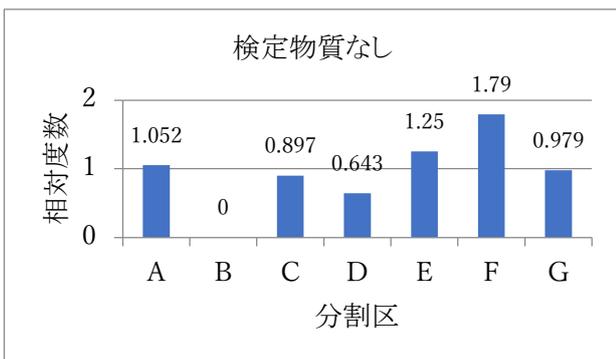


図6 実験2におけるネコブセンチュウの各物質に対する走化性

図6より検定物質が実験水の時実験2では実験1と異なり相対度数が2を超える分割区はなかった。おろし大根の汁に関しては、抗生物質であるアンピシリンナトリウムを寒天培地に混合したが、実験1で発生したコロニーよりかはかなり小さいもののコロニーが発生していた。しかし、コロニー内またはその近くにたくさんのネコブセンチュウが存在していた。



図7 すりおろした大根の汁に誘引されたセンチュウ



図8 コロニーに入ろうとするセンチュウ

すりおろしたワサビを水で攪拌した液体に関してはコロニーの形成はされていなかったが一定の個体数のネコブセンチュウが滴下点に存在した。しかし、分割区 B,C において相対度数が 0 に近くなっていた。

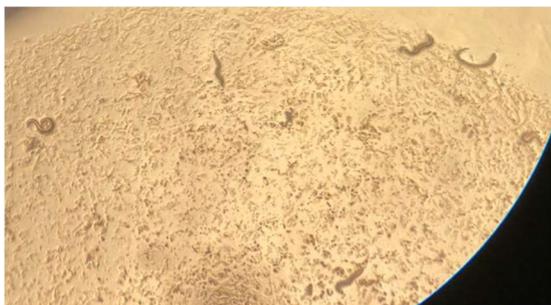


図 9 すりおろしたワサビを水で攪拌した液体に誘引されたセンチュウの個体

6 考察

実験1と実験2では静置期間、反復数、コロニーの発生日数の状況が異なるため単純比較はできない。その点を考慮して考察する。また、実験1でおろし大根の汁とすりおろしたワサビを水で攪拌した液体については、イソチオシアネートを含んでおり殺菌作用がある⁴⁾と考え、抗生物質を混合せずに実験した。その結果コロニーが発生したと考える。実験1ではセンチュウは水に誘引され、実験2では誘引されなかった。実験1と実験2で用いたセンチュウ懸濁液は同一のものではないため、センチュウが実験前までおかれていた水分の環境が異なっていたと考えられる。ネコブセンチュウは乾燥に非常に弱いため、実験1で用いたセンチュウは水分を必要としており、水に誘引されたのではないかと考える。また、おろし大根の汁に関しては、実験1では忌避を示し、実験2では誘引を示した。これは、コロニーの発生によって正確な実験結果が得られなかったと考えられる。しかし、実験1では過度な忌避を示したにもかかわらず実験2では過度な誘引を示したため、どちらの実験においても二酸化炭素のようなネコブセンチュウの忌避、誘引反応に多大なる影響を及ぼす物質または生物が存在していたことがわかる。すりおろしたワサビを水で攪拌した液体では実験1でコロニーが発生していたため実験1に関しては正確な実験結果が得られなかったが、実験2では結果に示したように誘引された個体と忌避した個体が同時に存在した。これは、一定のネコブセンチュウ

に関してはイソチオシアネートに対する忌避よりも水などといった誘引物質に対して優先的に反応したと考える。

7 展望

今回の実験ではコロニーの発生によりすりおろした大根の汁において正確な実験結果が得られなかった。今後は抗生物質の種類、濃度を変更しコロニーの影響がないようにした上でさらに反復回数を増やし、pH なども考慮しながら実験していきたい。また、ネコブセンチュウがコロニーに対して忌避、誘引を過度に示したことから、細菌類、菌類に対するネコブセンチュウの反応も実験していきたい。

8 参考文献

- (1) 水久保隆之, 有害センチュウの被害と対策,
https://www.snowseed.co.jp/wp/wp-content/uploads/grass/201605_04.pdf
- (2) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター
有害センチュウ総合防除技術マニュアル
https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/archive/files/nematode.pdf
- (3) 吉田睦浩, サツマイモネコブセンチュウセンチュウ研究の歩み, 日本センチュウ研究会, 1992年11月
- (4) 柴田貴広, 内田浩二, イソチオシアネート化合物,
<https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010921720.pdf>
- (5) 水久保隆之, 二井一禎, センチュウ学実験,
京都大学学術出版会, 2014
- (6) 近畿中国四国農業研究協議会, ダイコン栽培品種におけるイソチオシアネート含有量の差異,
<https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010832214.pdf>