

容器内土壌接種による線虫捕食菌の線虫密度抑制効果の評価

中園 和年・Jerome T. GASPARD (九州農業試験場)

Effectiveness of two nematophagous fungi added to soil in vitro.

Kazutoshi NAKASONO and Jerome T. GASPARD (Kyushu National Agricultural Experiment Station, Kikuchi-gun, Kumamoto 861-11)

The survival of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles (J2) and free living nematodes (F1) in soil infested with the nematophagous fungi *Arthrobotrys dactyloides* (constricting rings) and *Dactylella haptotyla* (sticky knobs) was evaluated under various conditions. The system for testing survival consisted of 10 g of an Andosol soil in 4.5cm diam petri dishes infested with a standard inoculum of 0.05 g wet weight fungi/10 g soil. Nematodes were added in a 0.5ml suspension of water. J2 survival was 8% of control when *D. haptotyla* was added to soil 2 days prior to adding nematodes but it was 85% in *A. dactyloides* infested soil under the same conditions. J2 numbers declined rapidly in *D. haptotyla* infested soil with 10% survival after 24 hours whereas J2 survival in *A. dactyloides* soil was 50% after 6 days. F1 nematode survival was affected in a similar way by both fungi. Steam sterilization did not appear to affect the trapping of J2 or F1 by either fungi under these experimental conditions.

糸状菌による線虫捕食現象は1988年に ZOPF により初めて見出されて以来、有害線虫の生物的防除への利用の可能性が期待され (DUDDINGTON, 1957)、捕食菌の種類、分布、培養、生理、生態、利用法の各分野にわたる多くの研究報告が見られる (BARRON, 1977; KERRY, 1984; MANKAU, 1980)。その種類は世界的に約150種 (内部寄生菌や卵寄生菌は除く) が知られ、その分布は普遍的である。わが国では31種が同定された (三井, 1983)。これらの菌の線虫捕食法は種ないし属によって特徴的に異なり、捕食効果にも違いがある (BARRON, 1977; 三井, 1983)。

捕食菌の線虫捕食効果の評価法としては、実験室的には寒天培地上での捕食実験法が古くより採用されている (HEINTZ, 1978)。土壌中における捕食効果ないし線虫密度抑制効果の評価法には、(1)被捕食線虫の分離調査、(2)土壌処理による菌活性の刺激、または抑制、及び(3)菌の土壌への投与、の3法がある (KERRY, 1984)。一方、寒天培地上では高い捕食効果を示す菌であっても圃場への投与によってその効果を再現させるのはかなり困難であり、生物的防除資材としての天敵微生物の実用までにはなお多くの未解決の問題がある (COOKE, 1968; GASPARD et al., 1990; 西澤, 1988)。

筆者らは寒天培地の無菌的 (貧微生物相) 段階と圃場の雑菌的 (富微生物相) 段階の中間条件における捕食効

果の評価法を開発する目的で、容器内土壌接種による2捕食菌の線虫密度抑制効果を比較試験したので報告する。

材料および方法

供試捕食菌とその培養: 菌糸上に収縮性の環を形成し、この環に線虫が頭部または尾部を挿入したとき、瞬間的に収縮して線虫を捕える *Arthrobotrys dactyloides* (収縮性環形成菌、以下単に環形成菌と呼ぶ) と菌糸上に形成した粘着性のこぶによって線虫を接着して捕える *Dactylella haptotyla* (粘着性こぶ形成菌、以下単にこぶ形成菌と呼ぶ) の2種を供試した。両菌種とも、あらかじめ九州農業試験場内土壌から分離したものを、市販のカゴメトマトミックスジュースの上澄み液20%添加培養液 (2l容の三角フラスコに800ml) に接種し、27°Cで約2週間振とう培養して接種原菌糸体を準備した。

供試線虫: サツマイモノコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) の2期幼虫 (以下、ネコブ幼虫と呼ぶ) と自活性線虫 (*Rhabditis* 類を含む未同定の数種) を、高圧滅菌した黒ボク土で育てたトマト (*Lycopersicon esculentum*, 福寿2号) に接種し、温室内で約50日間培養した後、篩分け→ベルマン法により線虫を分離して供試した。

捕食効果試験: (1) 菌接種日数および線虫捕食日数と生存虫数一供試1か月前に高圧滅菌して非滅菌容器に保管した黒ボク土 (場内圃場土, 含水比40%) の10gを

直径4.2cmの小型シャーレ（非滅菌）にいれ、これに0.05gの菌糸体を数か所に分けて接種した。菌接種の後、または、25°Cの恒温器内に所定時間保存した後シャーレの土壤に、0.5mlの線虫懸濁液（ネコブ幼虫と自活性線虫を含む）を注入し、同上恒温器内に保存した。所定時間ごとにシャーレ内土壤の生存虫を2層遠心浮遊法（砂糖重33.3%の比重液、中園、1988）により分離調査した。シャーレ当たり、線虫接種頭数は、ネコブ幼虫が275頭、自活性線虫が715頭であった。なお、菌および線虫を接種したシャーレは乾燥防止のため、密閉プラスチック

容器に収納して保存した。

(2) 土壤の滅菌効果—土壤の滅菌または非滅菌条件の影響を知るため、ビニールハウス内碎試験区の休閑土（1987年に線虫増殖試験後、3年間休閑）を用い、試験の直前に高圧滅菌した土壤区（シャーレも滅菌）と非滅菌土壤区を設定し、上記と同じ方法による試験を行った。線虫接種頭数はネコブ幼虫がシャーレ当たり384頭、自活性線虫が73頭であった。供試土の含水比およびpHは滅菌区がそれぞれ59.3%、5.36、非滅菌区が65.1%、5.58であった。供試原土中の線虫数は10当たりネコブ幼

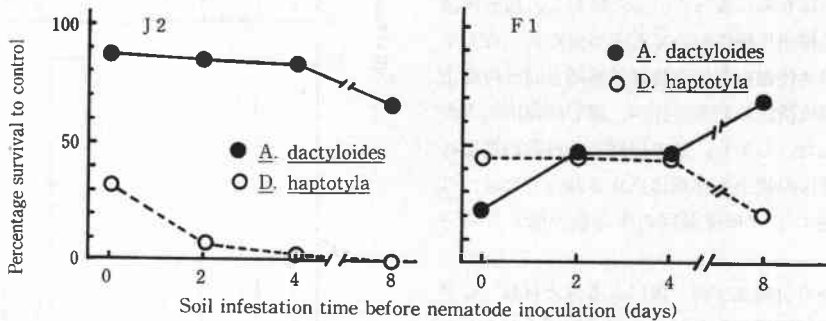


Fig. 1. Survival of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles (J2) or free living nematodes (F1) in 10g of andosol soil infested with 0.5g of *Arthrobotrys dactyloides* or *Dactylella haptotyla* hyphae 0, 2, 4 or 8 days prior to the addition of nematodes. An average of 274 J2 and 715 F1 were added in a 0.5ml water suspension to the soil in 4.5cm diam petri-dishes. Nematodes were extracted from soil in each petri-dish by a double layer centrifugal flotation technique four days after incubation at 25°C.

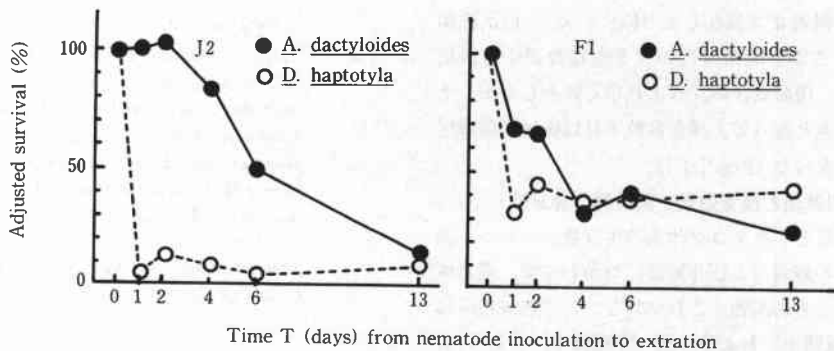


Fig. 2. Survival of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles (J2) and free living nematodes (F1) in 10g of andosol soil infested with 0.05g of *Arthrobotrys dactyloides* or *Dactylella haptotyla* 4 days prior to addition of nematodes. Soil was incubated in 4.5cm petri-dishes for 0, 1, 2, 4, 6 or 13 days at 25°C before nematode extraction.

Adjusted survival (%) =

$$\frac{\text{nematodes in fungal infested soil at } T_{(0 \rightarrow 13)}}{\text{initial nematodes in fungal infested soil}} \times \frac{\text{initial nematodes in non-infested soil}}{\text{nematodes in non-infested soil at } T_{(0 \rightarrow 13)}} \times 100$$

虫が1.2頭、自活性線虫が16.6頭であった。以上の試験にはいずれも対照として菌無接種区を設け5反復で行った。

結 果

(1) 菌接種日数および線虫捕食日数と生存虫数：線虫の接種に先立つ菌の接種培養日数を0, 2, 4および8日間とし、線虫接種後4日経過の時点でネコブ幼虫と自活性線虫の生存虫数を調べた結果、ネコブ幼虫の生存数(菌無処理対照区に対する%)は両菌種処理区間で明らかに異なった(Fig. 1-J2)。こぶ形成菌区では菌と線虫のほぼ同時接種(0日)でも40%に減り、2日後では数%, 8日後では0%になった。これに対し、環形成菌区では8日後の線虫接種においても65%がなお生存していた。他方、自活性線虫の生存数は菌接種と同日の線虫接種で、こぶ形成菌区の45%に比べ、環形成菌区の方が低く22%であった。しかし、菌の接種培養日数の増加に伴い、環形成菌区の線虫生存数は高まる傾向となり、8日間培養では逆にこぶ形成菌区の生存数が低くなった(Fig. 1-F1)。

線虫の接種から分離までの“菌による捕食日数”の効果をj知るため、菌接種から4日後の線虫接種を基点とし、0, 1, 2, 4, 6および13日後の線虫生存数を調べ、菌無接種区に対する補正密度に変換してFig. 2に示した。ネコブ幼虫の生存数はこぶ形成菌区では捕食日数の1日目から10%以下に激減し、13日後まで同じレベルの低密度であった。これに対し、環形成菌区の線虫生存数は2日後も減少せず、4日後から徐々に減り、13日後にようやく15%附近まで減少した(Fig. 2-J2)。自活性線虫の場合は、こぶ形成菌区における生存数が1日後に30%まで減じ、環形成菌区の70%より早く低下したが、その後はほぼ一定となって、捕食日数4日以後は両菌種区間の差はなくなった(Fig. 2-F1)。

(2) 土壌の滅菌と捕食効果：菌接種培養日数を7日、捕食期間を6日としたネコブ幼虫の生存数(シャーレ当たり)は土壌の滅菌および非滅菌にかかわらず、環形成菌区が多く、ともに30頭、これに対し、こぶ形成菌区はわずか0.4(滅菌土)および3頭(非滅菌土)であった。菌無接種区の生存数は滅菌土よりも非滅菌土において少なく、それぞれ42および14頭であった(Fig. 3-A)。

自活性線虫の生存数は供試原土中の虫数(16.6頭/10g土)を考慮しなければならないが、環形成菌区では滅菌土の方が非滅菌土よりも少なかったとはいえ、菌無接種区との差がなく、菌による捕食の効果とは見なしがたい。こぶ形成菌区では滅菌土での生存数が明らかに少なく、

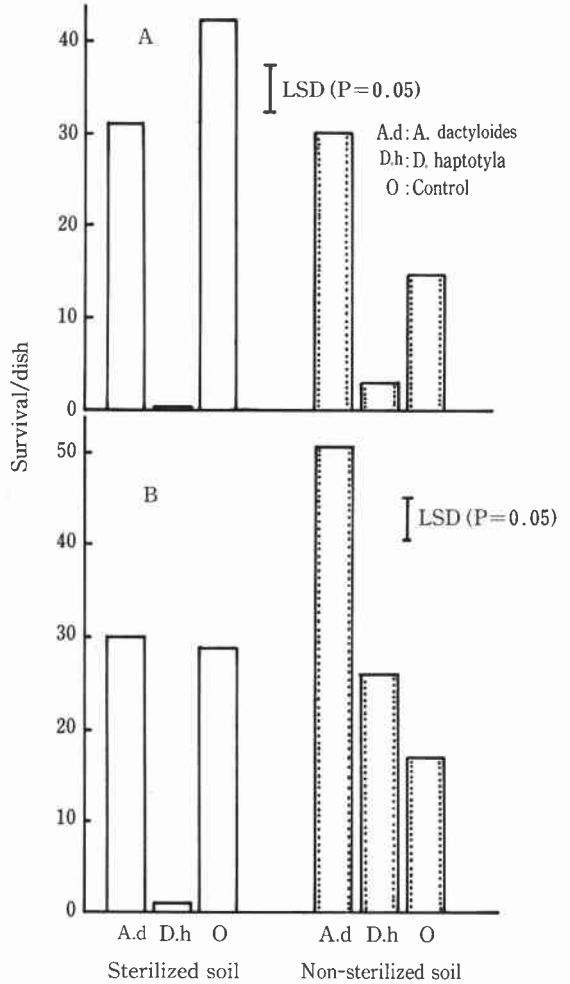


Fig. 3. Survival of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles (J2, A) and free living nematodes (F1, B) in 10g of sterilized or non-sterilized soil infested with 0.05g of *Arthrobotrys dactyloides* or *Dactylella haptotyla* hyphae 7 days prior to the addition of nematodes. Soil collected from a *M. incognita* infested field plot was steam-sterilized or used as collected. An average of 384 J2 and 73 F1 were added to the soil as in the previous test. Nematodes were incubated for 4 days at 25C before evaluating survival.

菌無接種区については逆に非滅菌土の生存数が少なかった(Fig. 3-B)。

考 察

Fig. 1 および 2 の試験における土壌は、供試1か月前に高圧滅菌し、その後の保存や試験条件は無菌的ではなかったため、供試時、雑菌によって十分に汚染されてい

たと思われる。この土壤条件下で環形成菌とこぶ形成菌は明らかにネコブ幼虫および自活性線虫の生存数を抑える効果または密度抑制の効果を示し、その効果には両捕食菌の間で違いが見られた。ネコブ幼虫に対してはこぶ形成菌が菌接種の初期から顕著な密度抑制効果を示し、自活性線虫に対しては環形成菌の効果が菌接種の初期に大きかった。COOKE (1963) は菌の土壤接種による試験で、自活性線虫の密度抑制には環形成菌の効果が粘着性網形成菌 (*Arthrobotrys oligospora*) に勝ったと報じている。本試験の結果も自活性線虫については同じとしても、ネコブ幼虫に対しては異なった。本試験で自活性線虫に対し、環形成菌の効果が特に初期段階で高まったのはこれら線虫の運動活性がネコブ幼虫よりも高かったことにより捕食器官である環への侵入機会が多かったためと考えられる。菌の土壤接種培養期間は4日以上が適当とみられる。

菌接種培養4日後の線虫接種から分離までの“線虫捕食期間”についても両菌種の間で効果の差異が見られた。ネコブ幼虫に対してこぶ形成菌はわずか1日の捕食で10%以下の生存数に減らし、環形成菌は13日の捕食期間でようやく前者の線虫生存数まで減少させたが、両菌区とも時間が経過しても0とはならなかった。自活性線虫に対してもほぼ類似の傾向であった。以上のことは、与えられた条件下の捕食菌の線虫捕食量には一定の限界ないし飽和点があることを示している。これは菌糸上の一つの捕食器官は1回の捕食でその役目(寿命)を終える(BARRON, 1977) ので、捕食ごとに新たな捕食器官を形成しない限り捕食の機会と容量が減るためと思われる。

COOKE (1963) も捕食の上限を報じている。

土壤の滅菌、非滅菌による両菌のネコブ幼虫に対する捕食効果には大差はなかったが自活性線虫に対してはこぶ形成菌の効果が異なった。菌無接種区の生存虫数が非滅菌土の場合にネコブ幼虫および自活性線虫とも少なかったことから、この供試原土には何らかの線虫天敵が生存していた可能性がある。

本試験では非滅菌土でも捕食菌による線虫密度抑制効果が簡単に検出されたが、その原因として供試土の微生物相が比較的単純であったか、“容器内”という人為的条件が影響した、などが考えられる。今後、実際圃場の微生物相と対比しつつ供試土の微生物相を選択的に改変しながら、捕食菌の捕食特性を追究する手法が必要である。

引用文献

- 1) BARRON, G. L. (1977) The nematode destroying fungi. Topics in Mycobiology. No. 1. Can. Biological Publications Ltd, Canada, 140pp.
- 2) COOKE, R. C. (1963) Ann. Appl. Biol. 51 : 295-299.
- 3) COOKE, R. C. (1968) Phytopathology. 58 : 909-913.
- 4) GASPARD, J. T., JAFFEE, B. A. & FERRIS, H. (1990), J. Nematology, 22 : 176-181.
- 5) DUDDINGTON, C. L. (1957) The friendly fungi, Faber and Faber Ltd, London, 188pp.
- 6) HEINTZ, C. E. (1978) Mycologia 70 : 1086-1099.
- 7) KERRY, B. R. (1984) Helminth, Abstracts, Ser. B. 53 : 1-14.
- 8) MANKAU, R. (1984) J. Nematology 12 : 244-252.
- 9) 三井康 (1983) 農技研報 C, 37 : 127-211.
- 10) 中國和年 (1988) 応動昆第32回大会講要, 42.
- 11) 西澤 務 (1988) 関東病虫研報 35 : 205-208.

(1991年6月10日 受領)