

## ネコブセンチュウ混合個体群の混合比の 判別寄主による推定方法

荒城 雅昭 (九州農業試験場)

**Estimation of species composition of *Meloidogyne* spp. mixed populations using differential host plants.** Masaaki ARAKI (Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto, 861-11 Japan)

Populations consisting of *Meloidogyne incognita* race 1, 2, 3, *M. javanica* or *M. hapla* collected in Kyushu were inoculated to the North Carolina standard hosts and sweet potato cultivars, Norin 1 and Norin 2 with a standardized inoculation method adding 1,000 second-stage juveniles to each potted differential host plant. *Meloidogyne* spp. and races were distinguishable by the host or nonhost status of the differential host plants. When artificially mixed *M. incognita* race 1 and *M. javanica* were inoculated to tobacco (NC95) and pepper, suppressive interference of the latter against the former seemed to occur, but a linear formula could be applied to extrapolate the ratio of species in a naturally occurring mixed populations previously estimated morphologically. This method may be useful in estimating the ratio of *Meloidogyne* spp. present in mixed populations, but further work remains to be done on other *Meloidogyne* spp. and races.

ネコブセンチュウ (*Meloidogyne* spp.) に限らず、病害虫の防除に際しては加害種の同定が重要である。ネコブセンチュウの場合にもその同定法の確立は、被害回避の作付体系策定、抵抗性品種の育成・利用等に必要不可欠である。複数の種が混合発生した場合にも対応でき、そのレースも併せて解明できる方法の確立が望まれている。

ネコブセンチュウ混合個体群の混合比を推定しようとする場合、100頭の雌成虫の会陰紋を検鏡することはほとんど実現不可能と思われる。また、ネコブセンチュウのレースは形態的方法では検出ができないか、非常に困難で、判別寄主を用いる以外に検出する方法がない。現在でもネコブセンチュウの一部の種は生化学的方法で同定が可能となっているが、レースについては生化学的あるいは免疫学的、遺伝学的方法による検出の可能性はあるが、その方法は確立されていない。

TAYLOR and SASSER (1978) が開発した標準判別寄主試験では接種方法を標準化しなくともネコブセンチュウの主要 4 種の単独個体群はジャワネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウ race 2 を除いて同定できる。しかし、キタネコブセンチュウとサツマイモネコブセンチュウ race 1 または 2 の混合個体群の寄主反応がアレナリアネコブセンチュウ race 1 と同じになる等、接種

方法を標準化しない限り正確な同定が難しい場合がある。一方判別寄主による同定方法では、1 本の検定植物に 1,000 頭の二期幼虫を接種することは容易に実行でき、検出限界も通常の寄生率を約 50% と仮定しても 0.2% であり、反復数を容易に増やせることから充分 0.1% を越えるものと考えられる。標準判別寄主による同定方法は形態的同定方法より時間と手間を要するが、接種方法を標準化した場合には判別寄主を持つ種、レースの間では、形態的同定方法よりも高い精度で混合個体群を検出、種を同定し、混合個体群の混合比を推定できると考えられる。

筆者は、低密度で混合発生している種の検出、種および種内のレースの同定、混合個体群の混合比の推定を可能にする判別寄主を用いて同定方法を確立するため、まずネコブセンチュウの単卵のう分離系統および單一レースから成ると考えられる個体群を判別寄主 1 本当り 1,000 頭のネコブセンチュウ二期幼虫を接種するという標準化を加えた接種方法で接種して、各種ネコブセンチュウの標準判別寄主に対する反応の把握に努めた。次に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を人為的に混合して判別寄主に接種することにより、種間の相互作用の有無を検討した。また形態的方法により

予め混合比が判明している混合個体群に接種方法を標準化した判別寄主による同定法を適用して、この方法のこれら2種の混合個体群に対する有用性を確認し、混合個体群の混合比の推定方法を提案した。以下にこれらの試験の結果を報告する。

### 材料および方法

#### 供試ネコブセンチュウ

ネコブセンチュウ各種およびサツマイモネコブセンチュウのレースの典型例としては、サツマイモネコブセンチュウ race 1：熊本県西合志町九州農業試験場18号圃場産個体群由来単卵のう分離系統(N18-5)，同 race 2：鹿児島県東串良町産個体群をタバコ (NC95) で選抜した寄主分離個体群 ( $Hi_{22}$ )，同 race 3：長崎県諫早町産個体群をワタで選抜した寄主分離個体群 ( $Is_{33}$ )，ジャワネコブセンチュウ：熊本県合志町産個体群由来単卵のう分離系統 (G1-18)，キタネコブセンチュウ：福岡県粕屋町産個体群由来単卵のう分離系統 (Ks-3) を供試した。

自然発生の混合個体群としては、鹿児島県高山町産 (Ko)，鹿児島県種子島西之表市産 (No8)，大分県大分市産 (Oh)，熊本県大津町産 (Oz)，長崎県愛野町産 (Ai3)，鹿児島県奄美大島住用町産 (Su)，鹿児島県東串良町産 (Hi) を用いた。

#### 判別寄主の種類および育成

用いた判別寄生主は標準判別寄主試験 (TAYLOR and SASSER, 1978) に用いられる6種の他、サツマイモにおけるサツマイモネコブセンチュウのレースの検出を行うために加えたサツマイモの2品種を含む8種である (Table 2)。それぞれのネコブセンチュウ個体群、単卵のう分離系統に対し、各種検定植物はそれぞれ4本を供試し、線虫を接種しない対照を同数準備した。サツマイ

モネコブセンチュウ (N18-5 単卵のう分離系統) とジャワネコブセンチュウ (G1-18 単卵のう分離系統) を人為的に混合して接種した際には、両種の判別寄主であるタバコ (NC95)，ピーマンおよびトマトを5回反復で供試した。

各種判別寄主は、径9cmのポリエチレン製のポットを用い、土壌1kg当たり窒素、リン酸、カリウム各0.02gを施した滅菌土を詰め、各種判別寄主をTable 1に示したタイムスケジュールに従って播種、挿苗あるいは移植し、所定の日数適宜灌水管理して育成した。サツマイモは、よく充実し葉の着生している茎を一節ごとに切断、まとめて挿苗し、ポットの底に根が集中するのを防ぐため54日後に掘り上げ断根した上で、ポットに定植した。

#### 標準化した接種方法

ネコブセンチュウの個体群、単卵のう分離系統は、滅菌土で育成したトマト苗を汚染土壤に移植、約120日間適宜灌水管理しながら生育させ増殖した。

接種に用いた二期幼虫は、ネコブセンチュウの寄生したトマトの根を掘り上げ、軽く水洗した後水道水に浸漬、通気しながら室温で孵化させた。原則として孵化開始後2日目から3日目にかけて孵化した2期幼虫を500メッシュのふるいで集め、その懸濁液の濃度を約200頭/mlに調整した後、各種検定植物を育成したポットにメスピベットで二期幼虫の懸濁液約5ml (二期幼虫1,000頭) を注ぎ接種した。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の人為混合に際しては、濃度を調整した両種の懸濁液を所定の体積比で混合した後接種した。

接種後各種検定植物は所定の日数 (Table 1) 適宜灌水管理しながら生育させ、その後根を掘り上げ水洗、0.5% フロキシンB水溶液に浸漬して、卵のうを染色した後約1cmの長さに切断、バットの上に広げて卵のう数、根こぶ数を計数した。

Table 1. Timetable for the differential host tests of *Meloidogyne* populations

Day	1 : Transplanting of tomato seedlings for propagation of populations.
Day	22 : Sprouting of pepper.
Day	27 : Sowing of pepper, tobacco and cotton, cotton to each pot. Cutting of sweet potatoes to one node.
Day	42 : Sowing of peanut to each pot.
Day	43 : Sprouting of tomato.
Day	48 : Sowing of tomato to each pot.
Day	54 : Transplanting of pepper, tobacco and sweet potatoes to each pot. Sweet potato roots pruned. Sowing of watermelon to each pot.
Day	70 : Start of hatching with galled roots soaked and aerated.
Day	72 : One-day-old second-stage juveniles collected by sieving. Adjustment of the concentration of inoculum and inoculation.
Day	120 : Counting of egg masses and root galls started.

Table 2. Numbers of egg masses per plant formed by selected *Meloidogyne* populations consisting of single species or races to differential host plants

Differential host plants (Cultivars)	N18-5	Hi <sub>22</sub>	Is <sub>33</sub>	G1-18	Ks-3*
Tobacco (NC95)	0	37.5 (20-59)	0	158.8 (17-352)	162.5 (52-214)
Cotton (Deltapine 16)	0	0	61.5 (25-140)	0	1.8
Pepper (California Wonder)	395.0 (308-503)	140.8 (75-179)	251.5 (197-303)	0	13.5 (6-28)
Watermelon (Charlston Grey)	28.8 (7-46)	24.5 (19-34)	42.3 (31-52)	40.3 (16-102)	0
Peanut (Florrunner)	0	0	0	0	31.3 (10-68)
Tomato (Rutgers)	258.8** (199-383)	303.3 (263-347)	221.5 (82-297)	355.8** (96-552)	408.8** (367-465)
Sweet potato (Norin 1)	140.8 (64-177)	57.0 (20-86)	1.3 (0-3)	0	0
Sweet potato (Norin 2)	0.3	50.0 (17-76)	0	0	0

Means of four replicates of numbers of egg masses with ranges in parentheses.

\*: Numbers of root galls. \*\*: Cultivar Fukuju 2 was used.

N18-5: *M. incognita* race 1, Hi<sub>22</sub>: *M. incognita* race 2, Is<sub>33</sub>: *M. incognita* race 3, G1-18: *M. javanica*, Ks-3: *M. hapla*.

試験は主として九州農業試験場線虫制御研究室の温室で行い、時に線虫制御研究室環境制御装置（アメリカ Sherer 社製グロースチャンバー）を用いた。気温は20～30℃に調節した。

#### 形態的方法による混合比の推定

トマトの根に単独で寄生したネコブセンチュウ雌成虫10頭とそれらが産出していた卵のうから蒸留水中で孵化させた二期幼虫を組にして形態を調査、雌成虫1個体1個体を同定し、混合比を推定した。

#### 結果

九州産ネコブセンチュウ各種、レースの単卵のう分離系統および單一種、單一レースからなる個体群の寄主反応の一例を Table 2 に示した。よく知られていることではあるが、サツマイモネコブセンチュウ race 1 はピーマン、スイカ、トマトに、ジャワネコブセンチュウはタバコ (NC95)、スイカ、トマトに、キタネコブセンチュウはタバコ (NC95)、ピーマン、ラッカセイに寄生した。サツマイモネコブセンチュウ race 2 は race 1 の寄主の他、タバコ (NC95) とサツマイモ (農林 2 号) に、同 race 3 はワタに寄生した。

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の判別寄主であるピーマン及びタバコ (NC95) に形成された卵のう数、根こぶ数は、トマトに形成されたそれらと大きな違いはなかった。キタネコブセンチュウだ

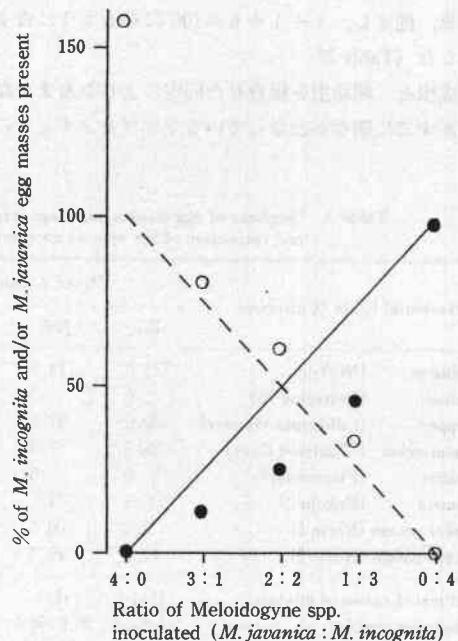


Fig. 1. Host response of artificially mixed populations of *M. incognita* (on pepper: ●) and *M. javanica* (on tobacco (NC95): ○). Expected values are shown with solid (for *M. incognita*) or broken (for *M. javanica*) lines.

けが寄生するラッカセイや同種だけが寄生しないスイカに形成された卵のう数、根こぶ数はトマトに形成されたそれらに比べ少なかった。

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をそれぞれ単独、あるいは3:1, 1:1, 1:3で混合して両種の判別寄主であるタバコ (NC95), ピーマンおよび両種の共通の寄主であるトマトに接種して形成された卵のう数、トマトに形成された卵のう数に対する割合 (%) を Fig. 1 にグラフで示した。この値は両種の間に何の関係もない場合、Fig. 1 に破線および実線で示した直線上に並ぶと考えられる。実際の値は、この理論値と大幅に異なることはなかったが、常にジャワネコブセンチュウが理論値より多く、サツマイモネコブセンチュウが理論値より少なかった。

混合個体群の混合比は、対象となる種がサツマイモネコブセンチュウ (race 1 または 3), ジャワネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウの 3 種の場合は、  
 $i:j:h = (\text{ピーマン卵のう数} - \text{ラッカセイ卵のう数}) : (\text{ラッカセイ卵のう数})$

(ただし  $i$ : サツマイモ,  $j$ : ジャワ,  $h$ : キタネコブセンチュウ, ( ) 内が負でスイカに卵のうが見られない場合は 0 に置き換える。)

で計算、推定し、 $i + j + h = 100$  になるように表すことにした (Table 3)。

雌成虫と二期幼虫を組合せた同定によりおおまかな混合比がすでに明らかとなっているネコブセンチュウの混

合個体群に、接種方法を標準化した判別寄主法を適用し、2 つの方法により得られた混合比の比較を試みた。

Table 3 にはサツマイモネコブセンチュウの標準判別寄主におけるレースの混合比の試算例も上げた。

サツマイモネコブセンチュウのジャワネコブセンチュウの混合比に関しては、本判別寄主法による推定値は、形態的による推定値と常にかなりよく一致した。ただしジャワネコブセンチュウの割合が常に若干高く算出された。キタネコブセンチュウと他のネコブセンチュウの混合比に関しては、Oz 個体群ではよく一致したが、他の 2 例のキタネコブセンチュウが多数を占めるサツマイモネコブセンチュウとの混合個体群では充分な一致は見られなかった。

## 考 察

アメリカ合衆国ノースカロライナ州立大学で発見された標準判別寄主試験 (TAYLOR and SASSER, 1978) では、Table 2 に示した判別寄主の内サツマイモを除く 6 種をネコブセンチュウ汚染土に播種あるいは苗を移植して、ある期間の後根系に形成された根こぶまたは卵のうの有無を調べネコブセンチュウの同定を行う。TAYLOR and SASSER, 1978 も勧めていることではあるが、筆者は、接種方法を標準化するとともに根系に形成された根こぶ数、卵のう数を計数することにより、Table 2 に示したような寄主反応を得、これを基にネコブセンチュウの混合個体群に対して高精度で種の検出および同定を行ない、その混合比を推定する方法を提案した。

Table 3. Numbers of egg masses per plant formed by naturally occurring mixed *Meloidogyne* spp. populations and estimation of the species compositions

Differential hosts (Cultivars)		Mixed <i>Meloidogyne</i> sp. populations from different localities							
		Ko	No8	Oh	Oz*	Ai3	Su	Is	Hi
Tobacco	(NC95)	375.0	174.0	163.5	84.5	2.0	3.0	6.5	1.8
Cotton	(Deltapine 16)	0	0	0	16.0	0	0	5.3	0
Pepper	(California Wonder)	20.0	97.5	185.3	87.8	40.5	8.8	174.3	125.8
Watermelon	(Charlston Grey)	26.5	7.8	122.3	23.0	2.5	4.3	7.5	6.8
Peanut	(Florunner)	0	0	0.3	15.0	5.8	1.8	0	0
Tomato	(Fukujyu 2)	365.3	371.5	435.0	272.0	208.5	348.3	268.0	245.0
Sweet potato	(Norin 1)	2.5	90.5	35.8	25.8	7.0	32.0	44.8	11.0
Sweet potato	(Norin 2)	12.8	47.5	0	0	0.3	0	0	48.0
Estimated ratios of mixture between species (Ratios by morphology**)		i1:j1	i1:j1	i1:j1	h:i1:j1	h:i1	h:i1	i1:j1	i1:j1
		5.1:94.9 (10:90)	35.9:64.1 (50:50)	53.1:46.9 (60:40)	9.5:46.3:44.2 (10:60:30)	14.3:85.7 (80:20)	51.1:48.9 (90:10)	i96.4:3.6j (100)	i100j (100)
Estimated ratios of mixture between races of <i>M. incognita</i>							i1:i3	i1:i2	
							95.3:4.7	99.3:0.7	

\*: Numbers of root galls. \*\*: Estimated by examining ten combinations of a female and its ancestral second-stage juveniles.

h: *M. hapla*, i: *M. incognita*, j: *M. javanica*, 1: race 1, 2: race 2, 3: race 3.

ワタおよびスイカは根系の発達が他の判別寄主に比べ悪く、根系に形成される根こぶ数、卵のう数も関連して少なくなると観察された。これらの寄主は同定レースの判別に有用ではあるが、なるべく混合比の推定には用いないことにした。

混合個体群の混合比の計算には、主要な判別寄生に形成された卵のう数の平均値を用いた。卵のう数を用いて混合比を計算することとしたのは、ワタを寄主としないサツマイモネコブセンチュウ race 1 もしばしばわずかに、時にかなりの根こぶを形成するので、卵のう数の方が寄主反応をより正確に反映すると考えたためである。冬期気温が低めに経過した場合等に、温量の不足のため Table 2 の Ks-3 単卵のう分離系統 (*M. hapla*) のラッカセイのように、トマトを除く多くの判別寄主で卵のうの形成が悪くなることがあった。このような場合には一部あるいはすべての寄主反応のデータを根こぶ数のデータに置き換えて計算した。

混合比の計算方法は、種間の相互作用を無視して極めて単純な線形的なものとしたが、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の混合個体群の混合比はかなりよく推定できた。Fig. 1 に示したように、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の間には種間に干渉が存在する可能性がある。Table 3 に示した自然発生の両種の混合個体群の混合比の本方法による推定値において、形態的方法による推定値より常にジャワネコブセンチュウが多くなっていることも相互作用の存在を示唆している。しかし各種ネコブセンチュウの種およびレースがそれぞれの寄主に形成する卵のう数、根こぶ数は通常大きくバラつくこと (Table 2)、また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の場合には、理論値からのずれは無視できる程度であることから、推定方法に補正を加える意義は少ないと考えられた。

キタネコブセンチュウが混合発生する場合については、判別寄主であるラッカセイに形成される卵のう数、根こぶ数がトマトに比べかなり少なく、自然発生のサツマイモネコブセンチュウとキタネコブセンチュウの混合個体群の混合比の推定値は形態的方法によるものと一致しなかった。今後両種の間の相互作用の有無を調査した上で、補正方法等を検討したい。

サツマイモネコブセンチュウのレース間の混合比も理論的には本方法で推定可能である。補正を検討する必要はあるかもしれないが、とりあえずサツマイモネコブセンチュウの race 1 または 3 と race 2 または 4 の間の混合比は、タバコ (NC95) に形成される根コブ数、卵の

う数が感受性の対照であるトマトのそれとほぼ同じと期待してよいと考え、Table 3 の *Hi<sub>2</sub>* 個体群の例のように、  
 $1(3) : 2(4) = (\text{トマト卵のう数} - \text{タバコ (NC95) 卵のう数}) : (\text{タバコ (NC95) 卵のう数})$

(ただし 1 : race 1, 2 : race 2, 3 : race 3, 4 : race 4,  
 $1(3) + 2(4) = 100$ . ( ) 内が負となる時は 0 に置き換える。)

で、race 1 または 2 と race 3 または 4 の混合比は、Table 3 の Is 個体群のように、

$1(2) : 3(4) = (\text{ワタにおける卵のう数の最大値} - \text{ワタ卵のう数}) : (\text{ワタ卵のう数})$

(ただし  $1(2) + 3(4) = 100$ )

で、race 2 と race 3 の間の混合比は、

$2 : 3 = (\text{タバコ (NC95) 卵のう数}) : (\text{ワタ卵のう数})$

(ただし  $2 + 3 = 100$ )

でといった具合に計算できよう。

サツマイモネコブセンチュウのサツマイモにおけるレースも混合発生することが多い。これらのレースの混合比も同様に計算できると思われるが、この点については別の機会に検討することとした。

近年記載されたネコブセンチュウの中には、*M. crucianii* (寄主反応はサツマイモネコブセンチュウ race 2, GRACIA-MARTINEZ et al., 1982) や *M. microcephala* (寄主反応はアレナリアネコブセンチュウ race 2, CLIFF and HIRSCHMEANN, 1984) のようにネコブセンチュウ主要 4 種およびそのレースと同一の寄主反応を示す種が存在する。このような種は本方法では同定できないと思われるが、このような種の分布は極めて限定されており、形態的同定方法を併用すれば問題はないと考えられる。同様にジャワネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウ race 2 は区別できないが、本邦においてはアレナリアネコブセンチュウの発生は極めて少ない (荒城、未発表)。

アレナリアネコブセンチュウやサツマイモネコブセンチュウ race 4 の寄主反応、ジャワネコブセンチュウとキタネコブセンチュウの相互作用の有無等が未調査であるので、全ての種およびレースの組合せで本方法による混合比の推定ができるかどうか、さらに実験を行ない検討する必要が残されている。しかし、接種方法を標準化して卵のう数を計数する点は変える必要はないと思われる。

判別寄主による同定にはどうしてもかなりの時間を必要とする。作物が植えられていない場合は線虫の増殖に要する時期を含む約 120 日の時間がかかるが、実際の場面では、圃場に作付けされている作物がトマト等多くの

種やレースにほぼ等しく寄生を許す寄主ならば、その根から線虫を分離して接種することによって、かなりの手間と時間を短縮できよう。本方法はネコブセンチュウの密度の推定には適さないが、密度の推定は圃場にトマトやホウセンカ等を植え付け根こぶ指數を求めて生物検定を行えば可能である。

### 摘要

九州産サツマイモネコブセンチュウ race 1, 2, 3 およびジャワネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウの標準判別寄主およびサツマイモ農林1号、農林2号に対する寄主反応を、接種方法に判別寄主1本当り、1,000頭の二期幼虫を接種するという標準化を加え、形成された卵のう数、根こぶ数を計算して調査した。サツマイモネコブセンチュウ race 1 はタバコ (NC95)、ラッカセイに、ジャワネコブセンチュウはピーマン、ラッカセイに寄生せず、キタネコブセンチュウはこれらに寄生するスイカに寄生しないこと等から、これら3種およびそのレースが区別できることを確認し、種の検出、同

定を行なう方法を、混合個体群の混合比を推定する単純な計算式と共に提案した。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の混合個体群については人為的に両者を混合して判別寄主に接種したところ、両者の間に干渉が存在し、ジャワネコブセンチュウが多く評価される可能性が示唆された。混合比が予め形態的な方法によって明らかになっている自然発生の混合個体群に対してこの方法による推定を行なった結果は充分満足できるものであった。本方法を基本にしてネコブセンチュウが複数種の混合個体群でも、種の同定および混合個体群の混合比の推定を行うことができると考えられる。

### 引用文献

- 1) CLIFF, G. M. and HIRSCHMANN, H. (1984) J. Nematol. 16 : 183-193.
- 2) GRACIA-MARTINEZ, R., TAYLOR, A. L. and SMART, G. C. Jr. (1982) J. Nematol. 14 : 293-303.
- 3) TAYLOR, A. L. and SASSER, J. N. (1978) Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). North Carolina State University Graphics, Raleigh. 111pp.

(1992年5月22日 受領)