

植物防疫基礎講座

農業害虫および天敵昆虫等の薬剤感受性検定マニュアル(28)

線 虫 類

農林水産省九州農業試験場 ^さ佐 ^の野 ^{ぜん}善 ^{いち}一

は じ め に

近年、各地で施設を利用した野菜類の集約的な栽培が盛んに行われるようになった。大規模な産地形成が進み、特定の作物が長期間連作されている。こうした栽培環境は、基本的に連作によって密度が上昇していく植物寄生性線虫類にとっては非常に好適であり、当然のことながら線虫の被害が大きな問題となっている。これらを防除するために、殺線虫剤の恒常的な施用が常態化している。

こうした背景の下で、殺線虫剤に対する抵抗性発達を示唆する事例が報告されており、抵抗性の現状や検定法を整理しておく必要性は高いと思われる。しかし、殺線虫剤については抵抗性に関する体系的な研究は少なく、薬剤感受性検定法が標準化されているわけではない。ここでは、殺線虫剤抵抗性の現状、薬剤感受性の検定における基本的な留意事項、および薬剤感受性を検討するために用いられた二、三の検定法を紹介する。

I 植物寄生線虫の殺線虫剤抵抗性の現状

殺線虫剤は、1943年にD-D、1945年にEDBの殺線虫効果が明らかにされてから実用的に利用されるようになった。1954年にはDBCPの有効性が明らかとなり、以後1980年代の初めまで、これらのハロゲン化アルキル系くん蒸剤3種が主要線虫防除剤として使用されてきた。これらはいずれも、土壤中に注入または混入された殺線虫成分がガス状となって土壤中を拡散し、線虫を直接死亡させる、文字どおりの殺線虫剤である。しかし、発がん性や地下水汚染等のマイナス面があることが明らかとなり、1981年にDBCPが、1983年にEDBが使用禁止となった。現在引き続き使用されているD-Dも、一方の混合物である1,2-dichloropropaneが除かれ、有効成分の1,3-dichloropropeneからなる製剤である。こうした背景の中で、新たな殺線虫剤の実用化が進められ、最近では有機リン系やカーバメート系の非くん蒸型

殺線虫剤の使用が増加してきている。

ハロゲン化アルキル系くん蒸剤：

前述のように、殺線虫剤は少数のくん蒸剤が30年以上もの長期間使用されてきた。CASTRO and THOMASON (1971) は、EDBを反復処理することによって、実験的にはニセネグサレセンチュウ (*Aphelenchus avenae*) の抵抗性系統を選抜できたというが、ハロゲン化アルキル系くん蒸剤に対する抵抗性線虫の出現は、これまで報告されていないとしている。しかし、一般圃場で抵抗性の発達が疑われた事例が我が国の神奈川県から報告された。近岡・竹澤 (1982) は、年1回ずつ10年間、主にEDBを施用してきた施設栽培圃場のサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) は、D-DとEDBに対する感受性が低い傾向を示すことを明らかにしている。これはくん蒸剤に対する感受性の低下が問題となった唯一の事例で、線虫では薬剤抵抗性の発達事例が、昆虫やダニと比べて非常に少ないように思われる。WRIGHT (1981) は、土壌くん蒸剤の場合は、通常年1回、多くて2回の施用であり、殺線虫成分はガス化して速やかに消失すること、さらに土壌中では処理後も線虫が生き残りやすいことから淘汰圧が低くなり、抵抗性が発達しにくいと考察している。こうしたくん蒸剤の施用条件や防除効果の特異性のほかに、その作用機作からも抵抗性は発達しにくいと考えられる (FOOT, 1980)。ハロゲン化アルキル系くん蒸剤の作用機作として、MOJE (1959) はSH基やNH₂基との置換反応による線虫の酵素等の阻害を提案している。また、CASTRO and BELSER (1978) は、チトクローム系の鉄センターの酸化による呼吸阻害や主要なエステラーゼ、プロテアーゼ等の水酸基との置換反応によることを示す結果を得ている。このように、くん蒸剤が線虫の特定の酵素ではなく、様々な構成成分に非特異的に作用するとすれば、抵抗性は発達しにくくなることが予想される。

非くん蒸型の殺線虫剤：

有機リン系やカーバメート系の薬剤が主要なものである。薬剤は土壌中に均一になるように混和されるが、多くの薬剤は線虫に接触した有効成分による直接的な作用とともに、浸透移行的な作用を持っている。線虫に対す

Methods for the Measurement of Susceptibility of Agricultural Nematode Pests to Nematicides. By Zenichi SANO
(キーワード：線虫類、薬剤感受性、検定法)

る作用機作は主にアセチルコリンエステラーゼの阻害によるが、殺線虫作用のほかに、侵入行動や摂食行動等、線虫の正常な寄生活動をかく乱する、いわゆる制線虫作用によって線虫を防除する場合がある (BUNT, 1975; WRIGHT, 1981)。

これらの薬剤では、抵抗性の発達を示唆する事例が圃場の線虫個体群や室内の実験個体群で示されている。SMOLIK (1978) は、害虫防除のためにカルボフランを4~5年間使用した圃場のスクリプナーネグサレセンチュウ (*Pratylenchus scribneri*) が薬剤耐性を獲得したことを報告した。また、アルジカルブを4週間から6週間おきに施用した温室栽培のバラの *Paratylenchus hamatus* (ピンセンチュウの一種) では、初期には線虫密度が低く抑制されたがやがて増加し、施用開始16.5か月後には当初に比べて著しい高密度となった (MACDONALD, 1976)。この現象は薬剤抵抗性の発達を示唆する。YAMASHITA and VIGRIERCHIO (1986, 1987 a, b, c, d, 1988) はブドウの線虫を対象に、非くん蒸型殺線虫剤の防除効果についてポットや圃場レベルの膨大な試験を行っている。LD₅₀ や LD₉₅ は算出されていないため定量的な比較ができないことが惜しまれるが、低薬量 (sub-nematicidal) のアルジカルブ、カルボフラン、オキサミルおよびフェナミホスで連続的に処理されたサツマイモネコブセンチュウやクルミネグサレセンチュウ (*P. vulnus*), *Xiphinema index* (オオガタハリセンチュウの一種), *Criconebella xenoplax* (ワセンチュウの一種) では、いずれの薬剤に対しても感受性が低下することが明らかにされている。感受性が低下した状態は殺線虫剤の施用を中止した後も2年間以上は維持され、さらに交差抵抗性と考えられる傾向も観察された (VIGRIERCHIO, 1990)。同様の感受性の低下をうかがわせる現象は、フェナミホスで実験的に連続処理されたナミクセンチュウ (*Ditylenchus dipsaci*) でも観察されている (BUNT, 1975)。

自活性土壌線虫の *Rhabditis* では、より明瞭な薬剤感受性の低下が実験的に確かめられている。カーバメート系殺線虫剤のアルジカルブまたはオキサミルを含む培地で6年間、約300世代継続培養した *R. oxycerca* では、5~10倍の薬剤抵抗性の増大が見られた。また、アルジカルブを投与した個体群はオキサミルに対しても抵抗性を示し、交差抵抗性が観察された (KAMPFE and WISCHGOLL, 1984)。これらの線虫ではアセチルコリンエステラーゼ活性の増大も確認されている (BELOW, et al., 1987)。大西ら (1981) は、有機リン剤のIBP (*O*, *O*-diisopropyl-benzyl thiophosphate) でも同様の現象が

認められることを報告している。

II 薬剤感受性検定法と検定上の留意事項

薬剤感受性の検定は、対象とする線虫の入手、薬液の調製、処理、効力の評価という手順で実施することになるが、その際の留意事項は基本的には浜 (1996) のために準ずる。

供試線虫の入手：

薬剤感受性の検定に当たって、まず対象とする線虫の種を厳密に同定しなければならない。レースの存在がわかっている種については、レースまで明確にしておく。同一圃場に複数の種が発生している場合もあるが、種の識別は低倍率の顕微鏡では難しい。この場合は、特定の種だけが増殖する寄主植物等を用いて線虫を種類別に分離し、単一種だけの個体群を養成する必要がある。いずれにしろ、線虫の同定は容易ではないので、専門家に依頼することを勧めたい。

線虫は運動能力が小さい。そのため大量の土壌を人為的に移動するようなことがないかぎり、圃場間の移動は少ない。このことから、線虫の薬剤抵抗性の発達は、個々の圃場で使用される薬剤の種類や頻度に応じて、圃場ごとに異なることが予想され、感受性検定も圃場単位で行うのが妥当と思われる。

検定する線虫は、ネコブセンチュウ (*Meloidogyne* spp.) やネグサレセンチュウ (*Pratylenchus* spp.) のように、地下部の根やイモに寄生する種類では、被害根や根圏の土壌を採集して分離する。ハセンチュウ (*Aphelenchoides* spp.) やクキセンチュウ (*Ditylenchus* spp.) 等、地上部の芽や茎葉に寄生する種類は、被害部位から分離する。土壌や感染植物は、いずれの場合も圃場の個体群を代表するように採集する必要がある。密度推定のための土壌のサンプリングでは (皆川, 1992; BARKER, 1985), 1筆30地点以上から土壌を採取するとされているが、感受性検定の場合はもっと少なくてもよいかもしれない。土壌は、一般に線虫密度が高い畝の深さ15 cm前後から採取する。根や茎葉の場合も、まんべんなく採取するように心がける必要があろう。採取した土壌中の線虫は、ベルマン法 (BAERMANN, 1917) やふるい分け法 (COBB, 1918), 遠心分離法, あるいはそれらを組み合わせた方法によって分離することができる。根や茎葉の線虫も、ベルマン法の応用やミストチャンバーを利用することにより分離できる。

分離した線虫は、直接感受性検定に供するか、またはいったん増殖してから検定を行う。直接検定を行う場合は、採集時の個体群の生理状態や年齢構成によって薬剤感

受性が変化し、あるいは線虫分離法の影響を受けることがあるので注意を要する。線虫の薬剤感受性は、发育ステージによって異なり (EVANS and THOMASON, 1971; 近岡, 1983), 体内の貯蔵養分の保有量によっても変化する (佐野, 1976)。低水分等によって生理的活性が低下した線虫では、臭化メチルに対する感受性が低下することも報告されている (FRECKMAN, et al., 1974)。分離法の問題としては、その特性によって特定の線虫が選別される危険性があることである。活動性に依存するベルマン法では、活動力の高い個体が優先的に分離されることから、圃場個体群の平均的な感受性の把握には、線虫を機械的に、短時間で、大量に分離することができる、ふるい分け法と2層遠心浮游法 (高木, 1970) の組み合わせが適しているように思われる。この場合も、遠心分離には線虫に対する悪影響の少ないショ糖液等の比重液を用いる、土壤粒子等の夾雑物はできるだけ除去する等の注意が必要である。

圃場から採集した線虫を、一定の条件で1, 2世代培養してから検定を行うと、線虫採集に伴って生じる薬剤感受性の振れは小さくなくなると思われる。ネコブセンチュウの場合は、採集した土壤や根、あるいは分離した2期幼虫をトマトなどの好適寄主植物に接種して増殖させ、形成された卵囊からふ化させた新鮮な2期幼虫を供試する。ネグサレセンチュウの場合も同様に寄主植物で増殖させ、感染した根や根辺土壤から分離した線虫を用いる。ネグサレセンチュウはカルスにより容易に培養できるが、通常の根で増殖した線虫との感受性の差異を検討しておく必要がある。増殖のための接種源とする線虫も当然圃場個体群を代表するように採集する。

なお、採集した線虫感染土壤に直接薬剤を処理する方法では (後藤・佐野, 1971), 土壤の物理化学的要因や生息する微生物等が、薬剤の分解、吸着、拡散等に影響するため (McKENRY and THOMASON, 1974; VIGLIERCHIO, 1990), 線虫自身の薬剤感受性の厳密な検定法としては難点がある。むしろ、薬剤感受性の傾向の把握や個々の土壤における薬剤の有効性の検討に利用するのが適当と考えられる。

供試薬剤および検定法：

くん蒸剤では、脱脂綿塊等の担体に線虫を接種し、これを殺線虫成分をガス化させた密閉容器内に入れてくん蒸処理する (近岡, 1966; McKENRY and THOMASON, 1974) か、殺線虫成分を乳化させた薬液中で線虫を浸漬処理する (MOJE, 1959; 佐野・後藤, 1972)。非くん蒸剤では薬液浸漬処理により検定を行う。浸透移行性による作用は、薬剤を処理した植物における線虫の寄生や増

殖を基準として検定する (BUNT, 1975; 近藤・石橋, 1984)。供試線虫数は200頭程度、5反復以上とし、薬量段階は死亡率50%を中心に6段階以上とることが望ましい。処理温度や処理時間は殺線虫率に大きく影響することから (McKENRY and THOMASON, 1974; 佐野ら, 1988) 統一する必要がある。薬剤の特性にもよるが、25℃ 24時間が適当と考えられる。

殺線虫活性は、線虫の活動の有無によって判定できるが、顕微鏡観察では多くの時間を要するため、その間に線虫が変化する恐れがあり、また、一次的に静止した線虫を死亡虫と判定する可能性がある。もともと活動が緩慢なネコブセンチュウやネグサレセンチュウ等では、和紙や脱脂綿等をフィルターとして用い、通過できるかどうかで判定するのがより効率的で客観的である (佐野・後藤, 1972)。ネコブセンチュウでは、処理後寄主植物に接種し、形成された根こぶ数を調査することによって判定することもできる。薬剤の作用が制線虫作用、すなわち線虫の行動かく乱による侵入や发育阻害である場合も、根こぶ数や寄生虫数を基準に判定する (BUNT, 1975; 近藤・石橋, 1984)。

III 感受性検定法

供試線虫の土壤からの分離法：

IIの留意事項を踏まえて圃場から採集した土壤を十分に混合してから500gを分取し、ふるい分け分離を行う。土壤を線虫浮游用の8lのポリバケツに入れ、少量の水で土塊を崩しながら約4lの水に線虫を浮游させる。約5分間 (腐植や粘土分の多い土壤) 静置して、土壤粒子を沈殿させた後、大きい浮遊物を100メッシュのふるいを通して除去しながら、線虫浮遊液を、容量10l以上のポリバケツに集める。この過程を2回繰り返す。次に、線虫浮遊液を300メッシュの分析ふるい、400メッシュの分析ふるいの順に2回ずつ通して、線虫を回収する。これによって得られた線虫懸濁液は、比重1.2のショ糖液を用いて2層遠心浮游法で処理し、混在する微少なゴミや土壤粒子をできる限り除去する (佐野ら, 1984)。線虫密度にもよるが、この方法で10,000頭以上の線虫が容易に得られる。ネコブセンチュウやシストセンチュウ (*Heterodera* spp. および *Globodera* spp.) の2期幼虫、ネグサレセンチュウ、ニセフクロセンチュウ (*Rotylenchulus reniformis*), ピンセンチュウ等の分離に利用できるが、回収率は線虫の体長によって変化すると考えられる。

供試線虫 (ネコブセンチュウ) の増殖法：

圃場から採集した土壤約2.5kgを径20cmの素焼鉢

に、いれ、線虫感受性のトマト苗を植える。トマトは抵抗性品種が育成されているので注意する。土壌の線虫密度は、ベルマン法による土壌 20 g 当たりの分離虫数が数 10 頭程度が適当で、密度が高すぎる場合は殺菌土壌で希釈する。分離した線虫を殺菌土壌に接種してもよい。25°C前後で 40～50 日間栽培後に根を掘り上げ、洗い、形成された卵嚢をピンセットで採取する。卵嚢を脱イオン水に浸したガーゼあるいは脱脂綿薄層の上に置いて 25°Cでふ化させる。第 1 日目にふ化・遊出した 2 期幼虫は除去し、第 2～6 日の間にふ化・遊出する 2 期幼虫を 24 時間ごとに採集し検定に供する。24 時間当たりのふ化 2 期幼虫数は、30 頭/卵嚢が目安となる。

密閉容器内綿球くん蒸法 (近岡, 1966; 1983) :

くん蒸にはガラス製のデシケーター (中盤直径 25 cm) を用いる。くん蒸剤の処理濃度が算出できるように、デシケーターの容量を正確に測定しておく。対象とする線虫を 200 頭程度含む線虫懸濁液を約 0.3 g の脱脂綿綿球に 1 ml ずつ注入し、5 cm 角が 0.3 g の脱脂綿薄層にのせ、全体をガーゼで包んで上部を輪ゴムで止める。これを腰高シャーレに 5 個ずつ収容して、デシケーターの中板上に配置する。乾燥を防ぐために、デシケーターの底部に蒸留水 100 ml を入れる。所定量のくん蒸剤を、デシケーター中盤中央に置いたシャーレ内の脱脂綿

小球に滴下して容器を直ちに密閉し、25°Cで 24 時間くん蒸する。

殺線虫活性は線虫の脱脂綿通過能から判定する。すなわち、くん蒸後脱脂綿を網皿上に広げ、これを脱脂綿下面が水に浸るようにベルマンロートに設置し、25°C前後で 24 時間の間に通過する線虫を顕微鏡で計数する。 $(1 - \text{処理区の線虫数} / \text{無処理区の線虫数}) \times 100$ により殺線虫率を求め、プロビット法によって半数致死濃度を算出する。

なお、McKENRY and THOMASON (1974) は、くん蒸剤をミネラルオイルと共に入れた大型ガラス容器内で線虫をくん蒸し、測定した容器内のくん蒸剤のガス濃度に基づいて殺線虫作用を検定する方法を開発している。

薬液浸漬法 (佐野・後藤, 1972) :

薬液浸漬容器として内径 12 mm × 高さ 60 mm, 容量 6.5 ml のガラス管瓶を用いる。類似サイズのふた付きサンプル瓶でもよい。薬剤は原体あるいは純品を蒸留水で希釈し、3～4 段階の希釈液を作る。水溶性の低い薬剤の場合は適当な乳化剤を用いて乳化させる。

供試線虫約 200 頭を含む 0.5 ml の線虫懸濁液と薬剤の希釈液および蒸留水を薬液浸漬容器 (ガラス管瓶) に入れ、総量 5 ml の所定濃度の処理液を作成する。細いガラス棒でかくはんしたあとガラス管瓶をパラフィルム

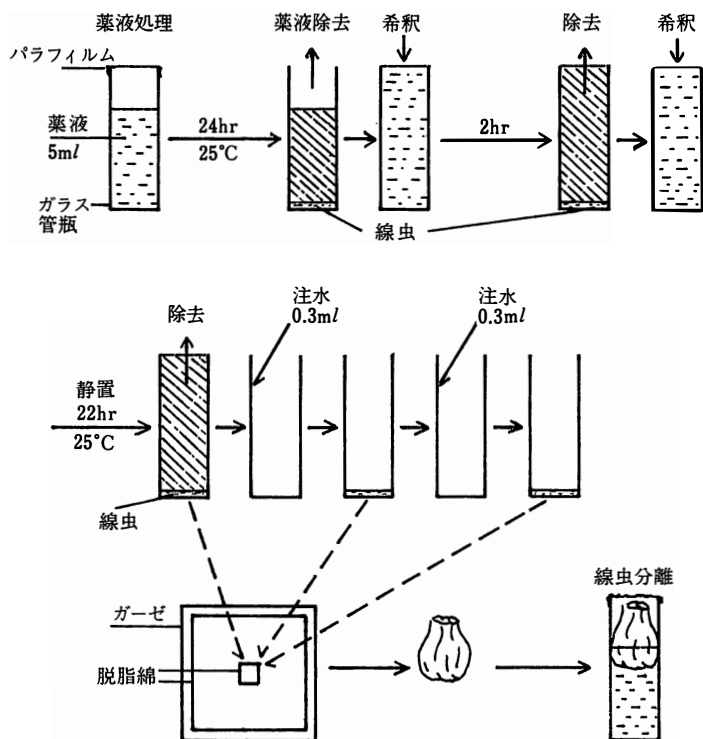


図-1 薬液浸漬法の手順 (説明は本文参照)

で密封し、25°Cで24時間処理する。処理後パラフィルムを除去し、管瓶底に約0.3 mlの線虫および薬液を残して、上部の薬液をピペットで静かに吸引除去する。管瓶には蒸留水を満たし、薬液を希釈する。線虫を沈殿させるため2時間静置したあと、約0.3 mlの線虫を含む希釈液を残して再度上部の液を吸引除去する。管瓶には蒸留水を満たし、25°Cで22時間静置して線虫の反応を安定させる。

生死判定は線虫のフィルター通過能によって行う。フィルターは、一片5 cmのガーゼ上に4 cm角の脱脂綿薄層(約0.2 g)を重ね、その中央に同じ脱脂綿薄層の1 cm角の小片を置いて作成する。22時間静置したガラス管瓶から約0.3 mlの線虫液を残して上部の液を吸引除去する。底部の線虫を駒込ピペット(先端内径約1 mm)で吸い出し、フィルター中央の小片に滴下する。ピペットで約0.3 mlの水を管瓶に入れ、底部に残る線虫を洗い移す。これを再度繰り返し、線虫の残留を防ぐ。脱脂綿小片が底部に来るようにフィルターの4角を合わせ、あらかじめ約5 mlの水を入れた同じサイズの管瓶に、フィルターの底が水に浸るように入れ、上部をパラフィルムで封じたあと、25°Cで24時間線虫を分離する。分離された線虫は、生死判定の際と同じ要領で管瓶からスライドグラスまたはシラキウス時計皿に移し、顕微鏡により計数する。殺線虫率は密閉容器内綿球くん蒸法と同じ方法で算出する(図-1)。

おわりに

集約的な栽培が一般化しているわが国では、作物の有害線虫が増殖しやすく、殺線虫剤の施用は今後とも不可欠と考えられる。近年、有機リン系やカーバメート系の非くん蒸型の薬剤が増加してきているが、作用機作がアセチルコリンエステラーゼの阻害によるこれらの殺線虫剤では、従来のくん蒸剤に比べて薬剤抵抗性が発達する危険性は高いかもしれない。これらの殺線虫剤を将来にわたって効果的かつ安定的に利用していくためには、薬剤感受性の検定法を確立し、感受性を踏まえた的確な施用を行うとともに、抵抗性の発達に備える必要がある。

本稿では、薬剤感受性検定上の留意事項とともに二つの検定法を紹介した。しかし、土壌線虫は微小であるがゆえに、薬液処理、処理後の薬液の除去、洗浄、生死判定等の操作が非常に煩雑で、いずれの方法も標準的な方法としては、さらに改善する必要があると思われる。また、制線虫作用や浸透移行性による殺線虫活性の解析のための検定法は紹介しなかった。これについては、

WOMACK, 1981, 近藤・石橋, 1984等を参考にして標準的な方法を確立する必要がある。

引用文献

- 1) BARKER, K. R. (1985): An Advanced Treatise on Nematology (BARKER, K. R. et al. eds.) North Carolina State University Graphics, Raleigh, p. 3~17.
- 2) BAERMANN, G. (1917): Ned. Geneesk. Tijdschr. 57: 131~137.
- 3) BELOW, S. et al. (1987): Nematologica 33: 289~309.
- 4) BUNT, J. A. (1975): Meded. Landbouwhoges. Wageningen 75(10): 1~128.
- 5) CASTRO, C. E. and I. J. THOMASON (1971): Plant parasitic nematodes. Vol. II (ZUCKERMAN, B. M., et al. eds.) Academic Press, New York, p. 289~296.
- 6) ——— and N. O. BELSER (1978): Nematologica 24: 37~44.
- 7) 近岡一郎 (1966): 応動昆 10: 163~164.
- 8) ———・竹澤秀夫 (1982): 関東東山病虫研報 29: 168.
- 9) ——— (1983): 神奈川県農総研報 125: 1~72.
- 10) COBB, N. A. (1918): USDA Agri. Tech. Circ. 1: 1~48.
- 11) EVANS, A. A. and I. J. THOMASON (1971): Nematologica 17: 243~254.
- 12) FOOT, M. A. (1980): N. Z. Society for Parasitology 7: 599.
- 13) FRECKMAN, D. W. et al. (1980): J. Nematol. 12: 19~22.
- 14) 後藤 昭・佐野 善一 (1971): 九病虫研究会報 17: 81~84.
- 15) 浜 弘司 (1996): 植物防疫 50: 41~43.
- 16) KAMPFE, L. and S. WISCHGOLL (1984): Nematologica 30: 193~205.
- 17) 近藤栄造・石橋信義 (1984): 日線虫研誌 14: 8~14.
- 18) MACDONALD, D. H. (1976): J. Nematol. 8: 293~294.
- 19) MCKENRY, M. V. and I. J. THOMASON (1974): Hilgardia 42: 393~438.
- 20) McLEOD, R. W. and G. T. KHAIR (1975): Ann. appl. Biol. 79: 329~341.
- 21) 皆川 望 (1992): 線虫研究の歩み(日本線虫研究会編), p. 87~92.
- 22) MOJE, W. (1959): J. Agric. Food Chem. 7: 702~707.
- 23) 大西保行ら (1981): 日本獣医畜産大学研報 30: 49~55.
- 24) 佐野善一・後藤 昭 (1972): 九病虫研究会報 18: 1~6.
- 25) ——— (1976): 昭和51年度九州農試年報: 39~43.
- 26) ———ら (1984): 九病虫研究会報 30: 115~119.
- 27) ———ら (1988): 同上 34: 131~135.
- 28) SMOLIK, J. D. (1978): Pl. Dis. Reprtr. 62: 95~99.
- 29) 高木一夫 (1970): 応動昆 14: 108~110.
- 30) VIGRIERCHIO, D. R. (1990): Revue Nematol. 13: 3~9.
- 31) WRIGHT, D. J. (1981): Plant parasitic nematodes. Vol. III. (ZUCKERMAN, B. M. and R. A. RHODE, eds.) Academic Press, New York, p. 421~449.
- 32) ——— and WOMACK, N. (1981): Ann. appl. Biol. 97: 297~302.
- 33) YAMASHITA, T. T. and D. R. VIGRIERCHIO (1986): Revue Nematol. 9: 385~390.
- 34) ——— (1987 a): ibid. 10: 75~79.
- 35) ——— (1987 b): ibid. 10: 93~100.
- 36) ——— (1987 c): ibid. 10: 233~240.
- 37) ——— (1987 d): ibid. 10: 327~332.
- 38) ——— (1988): ibid. 11: 447~449.