

分子生物学的手法を用いたセンチュウ密度と被害程度の予察

国立大学法人東京農工大学大学院 農学研究院

教授 豊田 剛己

はじめに

線虫は、地球上のいたるところに生息し、非常に多種多様な生物です。土壤中に生息している線虫は、何を食べるのかによって大まかに分類されています。細菌を食べる細菌食性線虫、糸状菌（カビ）を食べる糸状菌食性線虫、他の線虫を食べる捕食性線虫、何でも食べる雑食性線虫、これらは総括して自活性線虫と呼ばれ、窒素やリンといった植物の成長に必須な栄養元素を土壤中で効率的に循環させています。そのため、これら自活性線虫は、農業生産において有用生物と位置づけられています。これらは、土壤に生息している線虫の種類では約 70%を占めるといわれています。残りの 30%の種類が植物に寄生し、農業生産現場において線虫害を引き起こす植物寄生性線虫（写真1）です。ネコブセンチュウ（*Meloidogyne* spp.）、ネグサレセンチュウ（*Pratylenchus* spp.）、シストセンチュウ（*Globodera* spp.、*Heterodera* spp.）は我が国においては三大線虫と呼ばれ、野菜などの作物への被害がよくみられます。



ネコブセンチュウ

Meloidogyne spp.

サツマイモ・ニンジンなどに寄生



ネグサレセンチュウ

Pratylenchus spp.

ダイコン・ゴボウなどに寄生



シストセンチュウ

Globodera spp.

ダイズ・ジャガイモに寄生

写真1 植物寄生性線虫の例

これらによる被害を防ぐために、薬剤の使用、太陽熱消毒、対抗植物や抵抗性品種の利用がなされています。その中でも薬剤は手軽で比較的安価なため、最も普及している線虫害防除策の1つです。線虫害防除に使用される薬剤は、くん蒸剤（1,3-ジクロロプロペン、クロルピクリンなど）と非くん蒸剤（粒剤とも呼ばれます）（ホスチアゼート、カズサホス、オキサミル、イミシアホスなど）の2つの種類があります。特に前者は、ほかの土壤病害や雑草に対しても効果を有するため、多くの農耕地で使用されています。しかし、くん蒸剤特有の異臭や環境、特に使用者への影響が懸念され、さらに近年では、農耕地と住宅地の混在化などが進み、これらの影響がより危惧されるようになっていきます。

2007（平成 19）年の農林水産研究基本計画に「環境保全型農業生産システムの確立」があげられ、化学合成農薬および化学肥料の使用量の削減が重要な要素技術として明記されました¹⁾。化学肥料に関しては、これまで多くの研究が行われ、土壤診断法やそれに基づく対処法が確立され、適切な施用がなされるようになりました²⁾。一方、農薬使用に関しては、使用量・回数・時期などの

使用方法について明確な基準はあるものの、農薬使用の可否を判断する科学的根拠に基づいた基準については、その例は少なく、あまり普及していません。そのため、農薬は、生産者の経験や勘に基づいて、もしくは慣習的に使用されることが多々あります³⁾。今まで研究を進めてきた中で、植物寄生性線虫が生息していない、あるいはその密度がきわめて低いため、線虫による被害が発生しないと判断される圃場においても、くん蒸剤が使用される場合が多くあることがわかってきました。

現代の農業、そして食料の安定供給は、農薬抜きでは考えられません⁴⁾。しかし一方では、農薬使用量の削減が求められています。そのため、農薬使用の必要性を判断する診断法を作成し普及させることは、不必要な農薬使用の削減につながり、環境保全型農業生産システムの確立の一步になると考えています。こうした背景の下、農薬使用の必要性を判断する新しい方法やその基準に関して「分子生物学的手法を用いたセンチウ密度と被害程度の予察」の確立を目標に、技術開発を行いました。

技術概要

線虫害の程度は、土壤中の植物寄生性線虫数と関係があることが知られ、要防除水準(線虫害が確認される土壤中の線虫密度)に関する研究は多くなされてきました。つまり、線虫による作物への被害が現れるかどうかは、「土壤中の線虫数」がキーポイントとなります。むろん、作物の品種や栽培管理、気象条件なども影響することは言うまでもありませんが。そこで、農薬使用(土壌消毒)前の土壌中に生息している植物寄生性線虫数を推定し、線虫害が発生するかどうかを見極め、農薬使用が必要かどうかを判断するという一連の流れを想定して、本技術を開発しました(図1)。このために、1) 土壤中の植物寄生性線虫数を把握する方法の開発、2) 作物に被害を及ぼす線虫数の把握(=要防除水準の作成)するための研究を行いました。

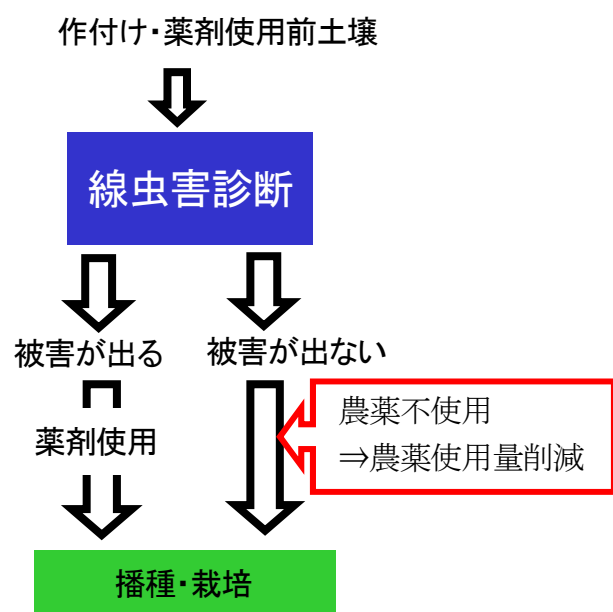


図1 不必要な農薬使用を回避する流れ

1) 土壤中の植物寄生性線虫数を把握する方法の開発

従来法では、線虫の数を数えるために、生きていて動く線虫が水中に泳ぎ出る性質を利用します。その性質を利用して土壌から線虫を分離し、分離された線虫について、顕微鏡下で体の形や長さなどの形態的特徴を基に種類の特特定を行い、その数を数えます。この方法は、安価で行えるのが利点で広く普及していますが、①時間がかかる(最低でも2-3日)、②種類の特特定に熟練した技術が必

要、③動かない線虫（例えば卵など）が観察できない、といった欠点もあります。そこで、これらの欠点を克服する技術として、分子生物学的手法（＝DNA を使う方法）で土壌中の植物寄生性線虫数を計数する方法を開発しました。開発した技術は、土壌を圧縮する、もしくは粉々に粉砕することで、土壌中にいる卵を含めた線虫の体を壊し、DNA を土壌中に放出させます。土壌から DNA を抽出して、特定の線虫由来の DNA 量をリアルタイム PCR により測定し、土壌中にいた線虫数を推定します（図 2）。本技術は、先にあげた方法に比べ、迅速（作業時間は最短で 6 時間）かつ簡便（基本的な技術だけで行える）に土壌中の植物寄生性線虫数を推定することが可能です。また、動かない線虫も計数できるようになり、より正確に土壌中の植物寄生性線虫数を把握することが可能となりました。

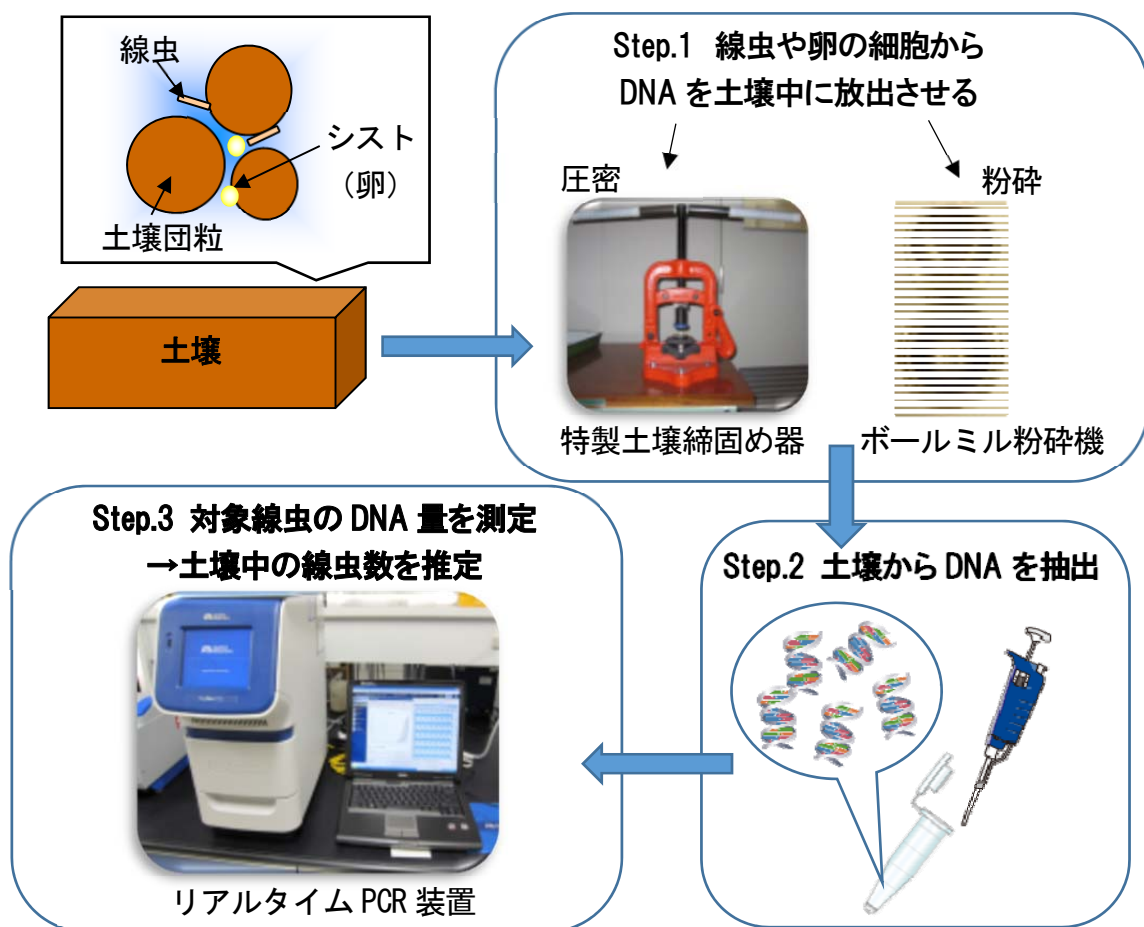


図 2 分子生物学的手法を用いた植物寄生性線虫数推定方法

2) 要防除水準の作成

線虫害防除のために、土壌消毒剤を頻繁に使用するダイコン、サツマイモについて要防除水準の作成を行いました。それぞれの作物で問題になる線虫種は異なるため、ダイコンではキタネグサレセンチュウ、サツマイモはサツマイモネコブセンチュウを対象としました。

薬剤使用前の土壌中の線虫数を、上記手法を用いて推定を行いました。収穫したダイコンおよびサツマイモについて、線虫による被害程度を調査しました。線虫数と被害程度の関係性から、被害が出ない線虫数（＝農薬を使用する必要のない線虫数）を算出し、要防除水準としました（表 1）。

また、その要防除水準の以下の圃場で、農薬を使用せずに栽培した場合の被害の有無を確認し、作成した要防除水準の正確性を確認しました。

表 1 分子生物学的手法を用いたダイコン及びサツマイモ栽培における要防除水準
(豊田,2012 を改変)

対象線虫	対象作物	地 域 (土壌型)	要防除水準 (頭/土壌 20g)	左記水準以下の被害発生率
キタネグサレ センチュウ	秋冬ダイコン	東京都多摩地域 (黒ボク土)	5 頭	0%
		神奈川県平塚市 (黒ボク土)	9 頭	0%
		神奈川県三浦市 (黒ボク土)	5 頭	9%
		愛知県木曽川流域 (灰色低地土)	5 頭	0%
サツマイモ ネコブセンチュウ	秋冬ダイコン	徳島県徳島市—鳴門市	50 頭	0%
	サツマイモ	(砂質土)	100 頭	0%

問題点・今後の課題

要防除水準は、ひとつの作物 - 線虫種の組み合わせでも土の種類や地域によって異なるため、土の種類や地域にあわせた水準を作成する必要があります。また、開発した植物寄生性線虫数推定法は、線虫だけでなく、ほかの土壌病害の原因となる病原菌数を測定することが可能です。そこで、ほかの微生物に対しても応用できるように技術開発を進めています。

本技術による植物寄生性線虫数の推定は、デザイナーフーズ株式会社あるいはアグリランドにて受託分析を行っています。また、いくつかの企業によって、類似の技術を用いた事業の展開が行われており、全国的に普及することが見込まれています。

引用文献

- 1) 農林水産省農林水産技術会議 2007. 農林水産研究基本計画－農林水産研究の重点と施策－. 平成 17 年 3 月 30 日決定 (平成 19 年 3 月 27 日改訂) .
- 2) 藤原俊六郎・安西徹郎・加藤哲郎 1996. 土壌診断の方法と活用. 農文協, 東京. p281.
- 3) 佐藤恵利華・豊田剛己 2013. 環境保全型野菜生産のための線虫害に対する土壌生物性評価. 土と微生物 67:54-57.
- 4) 鉾塚昭三・山本広基 1998. 土と農薬－環境中における農薬のゆくえ－. 日本植物防疫協会, 東京. p1.
- 5) 豊田剛己 2012. メタゲノム線虫診断の導入による殺線虫剤使用量の 30%削減 成果報告書 - 抜粋版 - 線虫診断・防除マニュアル, ありすみ印刷, 東京. p39.