

Ecology of Fungivorous Nematodes and Their Use for Suppression of Plant Diseases

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): Damping-off diseases, Feeding habits, Fungi, Fungivorus nematodes, Inorganic nitrogen, Organic matter decomposition, Reproduction, Suppression, Temperature 作成者: 岡田, 浩明 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001195

糸状菌食性線虫の生態及び植物病害抑制への利用

岡 田 浩 明^{*1)}

抄 録：糸状菌食性のニセネグサレセンチュウと *Aphelenchoides* 属線虫について、植物病害抑制への利用の可能性及び無機態窒素の生成作用について検討した。また、*Filenchus* 属線虫の増殖への餌糸状菌や培地の影響を調べた。ニセネグサレセンチュウの福島市系統は糸状菌 *Rhizoctonia solani* による野菜苗立枯病に対して発病抑制効果が高かった。糸状菌による有機物分解を模した実験系で、窒素生成への線虫増殖及び温度の影響を検討するため、ニセネグサレセンチュウと *Ap. composticola* を用いて実験した。糸状菌種が *Rh. solani* の場合は線虫の増殖適温で窒素生成が最大になり、線虫の増殖が土壌中の窒素動態に影響する可能性が示唆された。ただし、他の菌の場合は温度の影響が認められなかった。土壌環境の生物指標としての線虫の利用には、分類群ごとの食性や生活史特性の解明が必要である。しかし、Tylenchidae 科の線虫は、様々な土壌環境に頻出するにもかかわらず食性が不明であった。そこで、世界に広く分布する *Filenchus* 属線虫について糸状菌食性の有無を培養実験で検討した。*Filenchus* 属の3種6系統は、寒天培地のみならず土壌ベースの培地上でも糸状菌を摂食して増殖し、野外の土壌中で *Filenchus* 属が糸状菌食性を発揮することが示唆された。

キーワード：温度、糸状菌、糸状菌食性線虫、食性、増殖、苗立枯病、発病抑制、無機態窒素、有機物分解

Ecology of Fungivorous Nematodes and Their Use for Suppression of Plant Diseases : Hiroaki OKADA^{*1)}

Abstract : Fungivorous nematodes of the *Aphelenchus avenae* and *Aphelenchoides* species were examined for their ability to suppress fungal diseases of plants and mineralize nitrogen in soil. Nematode species of the genus *Filenchus* were also examined for their reproduction as affected by food fungal species and culture media. The Fukushima-city isolate of *Ap. avenae* was determined effective at preventing cauliflower damping-off caused by the fungus, *Rhizoctonia solani*. *Ap. avenae* and *Ap. composticola* were inoculated into microcosms to examine the influences of nematode reproduction and temperature on nitrogen mineralization by fungi and the nematodes in organic-matter decomposition. When *Rh. solani* was tested in the microcosms, mineralization was the greatest at the optimal temperature of nematode reproduction, suggesting that reproduction did affect soil nitrogen dynamics. However, no such effect appeared for the other fungus. Determination of feeding habits and life history parameters of each nematode taxon is essential in employing nematodes as bio-indicators in soil environments. However, the feeding habits of a common taxon, family Tylenchidae, have not yet been determined. A worldwide representative of the family, genus *Filenchus*, was thus examined to determine whether its species have fungal-feeding habits. Six isolates representing three species of the genus were confirmed to feed on Basidiomycota and other fungi on both agar- and soil-based media to reproduce, suggesting that the *Filenchus* species display fungal-feeding habits in field soils.

Key Words : Damping-off diseases, Feeding habits, Fungi, Fungivorous nematodes, Inorganic nitrogen, Organic matter decomposition, Reproduction, Suppression, Temperature

^{*1)} 現・農業環境技術研究所(National Institute for Agro-Environmental Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan)
2005年12月8日受付, 2006年2月9日受理

目 次

I 緒 論	156	2) 無機態窒素生成に対する温度と線虫種の影響	169
II 糸状菌食性 <i>Aphelenchida</i> 目線虫の増殖と植物病害抑制への利用	159	4. 考察	171
1. 緒言	159	1) 菌糸生育と線虫増殖率に対する温度の影響	171
2. ニセネグサレセンチュウと <i>Aphelenchoides</i> 属線虫の増殖に及ぼす植物病原菌種の影響	160	2) 菌と線虫による窒素の無機化作用に対する温度の影響	172
1) 材料と方法	160	3) 糸状菌による有機物分解系で糸状菌食性線虫は窒素の無機化に貢献するか?	173
2) 結果と考察	160	IV 新たに糸状菌食性が発見された <i>Filenchus</i> 属線虫	174
3. 土壌病原性糸状菌 3 種 5 株を摂食した東北地方のニセネグサレセンチュウ 4 系統の増殖	161	1. 緒言	174
1) 材料と方法	161	2. 稲藁堆肥中から発見された <i>Filenchus</i> 属線虫の形態	175
2) 結果と考察	162	1) 材料と方法	175
4. 糸状菌性植物病害に対するニセネグサレセンチュウの発病抑制効果	163	2) 結果と考察	175
1) 材料と方法	163	3. <i>Fi. misellus</i> とニセネグサレセンチュウの増殖, 体サイズ, 性比に対する餌糸状菌種の影響	176
2) 結果	164	1) 材料と方法	176
3) 考察	165	2) 結果	178
III 無機態窒素生成に及ぼす線虫種と温度の影響	166	3) 考察	178
1. 緒言	166	4. <i>Filenchus</i> 属線虫 3 種 6 系統の増殖に及ぼす培地と糸状菌種の影響	181
2. 材料と方法	166	1) 材料と方法	181
1) 材料生物の由来	166	2) 結果	182
2) 材料生物の生育と増殖に対する温度の影響調査	167	3) 考察	185
3) 無機態窒素生成に対する温度と線虫種の影響試験	167	V 総合考察	188
3. 結果	168	引用文献	190
1) 生物の生育と増殖に対する温度の影響	168	Summary	196

緒 論

線虫は線形動物門 (Pylum Nematoda) に属し、海洋、陸水及び土壤に幅広く生息する動物である。海底や陸上で自由生活をする種は 1 m² 当たり 100 万頭生息すると言われ、自由生活性と寄生性を加えた種数は 1 億を越えると予想されている。線虫は、昆虫と異なり脚、翅、循環器等の器官を持たず、体を構成する細胞数も少ないが、神経、腸、筋肉等高等動物と同様の器官は有するため、生理学や遺伝学、発生学等のモデル生物として利用されてきた。その中で最も有名なものは、土壤に生息する細菌食性線虫

の *Caenorhabditis elegans* である。この線虫は体長 1 mm と小型で、多数の系統を小さいスペースで維持できることや増殖が非常に速いこと等、室内実験に有利な条件を備えるため、卵から成虫に至るまでの細胞系譜がすべて追跡され、ゲノムの全塩基配列が解読される等、基礎生物学の様々な分野で利用されている。この線虫を初めて研究に利用した Brenner, Horvitz 及び Sulston 博士らは、2002 年度のノーベル賞医学生理学賞を受賞した (三輪 2003)。

一方、全線虫種の 25 % を占める (白山 2003) 寄生性線虫については、動植物を加害する有害動物として、農学、医学、獣医学の分野でそれぞれ研

究が進められている。人畜に寄生する線虫には、糞線虫 (*Strongyloides* 属), 反芻動物の胃虫 (*Haemonchus* 属), 腸結節虫 (*Oesophagostomum* 属), 鉤虫 (*Ancylostoma* 属), 肺虫 (*Dictiocaulus* 属), 住血線虫 (*Angiostrongylus* 属), 回虫 (*Ascaris* 属), 盲腸虫 (*Heterakis* 属), 蟯虫 (*Oxyuris* 属), 食道虫 (*Gongylonema* 属), 糸状虫 (*Filaria* 属) 等多数が挙げられ, 畜産学や医学では重要な研究対象になっている (城間・佐藤 1997, 石井 1998)。

農作物等の植物で特に問題になるのは Tylenchida 目に属するネコブセンチュウ (*Meloidogyne* 属), シストセンチュウ (*Heterodera*, *Globodera* 属), ネグサレセンチュウ (*Pratylenchus* 属), イモグサレセンチュウ (*Ditylenchus* 属) 等である (水久保 2003)。ネコブセンチュウは幼虫が植物根に侵入し, 植物細胞を変成させながら成長し成虫になる。線虫に多数寄生された植物根は瘤状に膨れ, 生育が遅れ, 極端な場合は枯死する。宿主範囲が広く, 特に, トマト, キュウリ, ナス, ニンジン, サツマイモ等での被害が大きい (水久保 2003), マメ科植物にも寄生し, 土壤中の線虫密度が高いと収量が低下する (岡田 1996a)。シストセンチュウはネコブセンチュウと異なり宿主範囲が狭く, *Heterodera* 属線虫はマメ科, *Globodera* 属線虫はナス科に限定される。しかし, 卵を内蔵した雌成虫の体がそのまま耐久性のあるシストとなって土壤中に長く生存するため, 一度発生すると防除困難で, 激発圃場では収獲皆無となる (水久保 2003)。ネグサレセンチュウは前 2 者と異なり, 幼虫と成虫がともに植物根内部で移動しながら加害し, 宿主範囲は広い。特に, ダイコン等の根菜類で外見上の商品価値を落とす。

一方, 寄生性線虫には害虫に寄生する有益な線虫もいる。昆虫病原性線虫 (Rhabditida 目の *Steinernema* 及び *Heterorhabditis* 属) は体内に共生細菌を持ち, 宿主昆虫体内に侵入後, これら細菌を放出, 増殖させて宿主をすみやかに殺す (石橋 1992)。*Steinernema* 属線虫は, 宿主範囲が比較的広くかつ 1 週間以内に寄主昆虫を殺せること, 人工的な大量培養が可能であることから, 農業害虫に対する生物的防除資材として世界各国で盛んに研究され, 一部の種はすでに生物農薬として市販, 利用されている。Tylenchida 目線虫には共生細菌を持たない昆虫寄生性線虫が存在するが, 宿主昆虫の發育遅延や蔵卵数の低下をもたらすものの (岡田 1995a, 1996b),

宿主昆虫を直ちに殺すことは少なく, また, 線虫の大量培養が困難なため, 生物的防除資材としての実用化には至っていない。

このように動植物に寄生する線虫も多数存在するが, 土壤中に生息する線虫の多くは自由生活性で, 特に, 糸状菌食性や細菌食性等, 低次の栄養段階において微生物を食べる種が多い (Freckman 1982)。農耕地や森林の土壤生態系では, 植物有機物の分解で発生する養分やエネルギーが食物網の中の各栄養段階を通じて循環, 消費されていく。その中で, 微生物食性の線虫は, 有機物分解に直接関わる糸状菌や細菌を摂食し, 余分な窒素等を排出する (Ferris *et al.* 1997, Ingham *et al.* 1985, Trofymow・Coleman 1982)。また, 摂食を通じて微生物の増殖を刺激したり, 微生物の細胞や胞子を体表に付着して未分解の有機物へ運搬する等の作用で有機物分解を促進し, 養分の流れに大きく関与するといわれる (Freckman 1982)。例えば, 米国の草原において, 土壤中の無機態窒素の生成量全体への寄与率を各生物群毎に調べた研究では, 動物の中では細菌食性線虫が原生動物と並んで大きいことが示された (Hunt *et al.* 1987, Ingham *et al.* 1989)。糸状菌食性線虫の寄与率は細菌食性線虫より小さかったが, 有機物の種類によっては, 線虫の働きで生成する窒素量が大きくなる可能性が実験的に示されている (Chen・Ferris 1999)。このことは, 自然の土壤生態系の機能や働きを理解し, その保全のために役立つのみでなく, 有機物分解に関与する生物相の適正な管理により土壤養分の循環を制御し, 化学肥料への依存を減らした持続的農業栽培の実現のためにも重要である。そのため, 欧米を中心に, こうした線虫の生理生態について基礎研究が行われている。特に, 有機物の種類や C/N 比, 分解に関わる糸状菌の種類, 温度等の影響を調べ, どのような環境条件の下で線虫による無機態窒素 (多くはアンモニア) の生成 (実際には過剰窒素の排出) が最大になるかを明らかにしようとしている (Ferris *et al.* 1998, Chen・Ferris 1999, 2000, Huixin *et al.* 2001)。さらに, 一部の種類の糸状菌食性の線虫は, 口針を菌糸細胞に突き刺し, 細胞内容物を吸収することで菌糸を殺すため, 土壤中の植物病原性の糸状菌の密度を直接減らし, 野菜類での糸状菌病の発生を抑制する生物防除資材として, 化学農薬への依存を減らした農業に貢献すると期待されている (崔ら 1988)。

一方、土壌線虫全般は次のような特徴を持つため、欧米では1990年代以降、土壌環境評価の生物指標として線虫を利用する研究が盛んに行われている(岡田 2005)。

1. 多細胞動物のモデルとして医学、理学研究で利用され、遺伝子発現や細胞系譜の情報が豊富である。
2. どのようなタイプの土壌にも高密度で生息する。
3. 土壌中の水孔に生息し、環境ホルモンを含め水溶性の化学物質に反応しやすい。
4. 土壌からの抽出が容易である。
5. 分類群(科や属等)により生理生態学的特性が多様で、ある群は農耕地から森林にまで生息するが、他の群は森林にしか生息しない等、群ごとに生息可能な環境の範囲が異なる。
6. 細菌食、糸状菌食、肉食、雑食、植物食性等、分類群ごとに食性(餌のタイプ)が異なり、各科が土壌食物網の下位(有機物分解に関わる微生物を食べる位置)から上位(他の動物を食べる位置)に渡って存在する。また、食性の判定が形態的特徴から可能である。

群集レベルで指標とする場合は、線虫の各科を食性及び生活史特性によって機能群(functional guild)に振り分け、その出現頻度を推定する作業が不可欠である(岡田 2005)。しかし、分類群によっては振り分けに必要な、生理生態的性質に関する情報が不足している(Okada *et al.* 2005a)。その中では特に、Tylenchida 目の Tylenchidae 科の線虫を糸状菌食性として扱うか否かが大きな問題とされている(Bongers・Bongers 1998)。この科の線虫は微細な口針を持つことから、植物根毛と糸状菌菌糸の両方を摂食すると推定されていた。しかしながら、実際に糸状菌を餌に用いて培養に成功した例が世界的にもなく、そのため、糸状菌食性線虫ではなく植物食性線虫とされ、自由生活性線虫の種構成に基づき土壌生態系の攪乱程度等を推定する群集指数の計算から除外されていた(Bongers 1990, Ferris *et al.* 2004)。一方、一部の線虫種で断片的に糸状菌食性が観察されていることから、こうした群集指数に Tylenchidae 科を含めるよう主張する研究者も多く(Forge・Simard 2001, McSorley・Frederick 2004, Okada *et al.* 2004, Wang *et al.* 2004)、本科の糸状菌食性について検討することが線虫群集研究にとっ

て重要な課題になっていた。

このように、農学や環境科学のための糸状菌食性線虫の生態学的研究が不可欠であるが、実際の研究は一部の種を除いて進んでいない。そこで、本研究ではまず、農業への直接の貢献を目指し、糸状菌食性が知られている Aphelenchida 目の線虫を利用した野菜類の苗立枯病の発生抑制を試みた(Ⅱ)。線虫の増殖率が高い糸状菌ほど、その菌による病害を抑制できる可能性が高いと考え、Aphelenchida 目の2種、ニセネグサレセンチュウ(*Aphelenchus avenae*)と *Aphelenchoides* 属の未記載種の線虫の増殖に、餌としての植物病原性糸状菌の種類が及ぼす影響をまず明らかにした。次いで、病害防除資材としてすでに実績のあるニセネグサレセンチュウ(崔ら 1988)について、採集地を異にする線虫系統の間での増殖率を比較した。その結果に基づき、増殖率が最も高い系統を選抜した。そして、病原性糸状菌の汚染土壌を作製し、選抜した線虫を接種し、植物を生育させ、そこでの病害の発生を実際に抑制できるかポットレベルで検証した。

次に、窒素循環の仕組みを理解し、土壌生態学へ貢献することを目指し、有機物分解に関わる糸状菌の菌糸生育やそれを摂食する Aphelenchida 目線虫の増殖に及ぼす温度の影響を調べた(Ⅲ)。その後、これら生物による無機態窒素の生成への温度の影響を、筒状のカラムを用いたマイクロコスモ実験で調べた。

最後に、今まで糸状菌食性が証明されていなかった Tylenchidae 科の中で、世界中に分布し、各種土壌環境によく出現する *Filenchus* 属の線虫について、糸状菌を餌に用いた培養を試み、糸状菌食性を証明した(Ⅳ)。そして、線虫の増殖率や体サイズ、性比への影響を明らかにすることで、線虫の餌としての各種糸状菌の好適性を明らかにした。そのことと、ニセネグサレセンチュウとの比較を通じて、糸状菌食性線虫としての *Filenchus* 属の生態学的特徴を明らかにした。さらに、日本各地から採集した3種6系統の *Filenchus* 属線虫について、寒天培地に加え、土壌を材料にした培地での糸状菌による培養を試み、*Filenchus* 属線虫における糸状菌食性の一般性、線虫の群集生態学及び植物寄生性線虫の進化におけるその重要性について議論した。最後に、今回得られた知見に基づき、糸状菌食性線虫の農業現場での活用法、土壌中の物質循環や線虫群集研究に

における糸状菌食性線虫の生態研究の意義について総合的に論じた（V）。

本研究はすでに論文等の形で公表されているが（岡田 1995b, Okada 1995, Okada and Ferris 2001, Okada *et al.* 2002, 岡田 2002, Okada and Kadota 2003, Okada *et al.* 2005b), 未発表のデータを追加して上記のようにとりまとめた。

本研究の発案及び遂行は著書自身によるものであるが、実施にあたり多くの方々に御助言や御支援いただいた。昆虫学から線虫学への転向のきっかけを与えていただいた清水啓博士、植物病理学の観点から御助言いただいた野村良邦博士と門田育生博士、土壤動物学の観点から御助言するとともに海外留学を勧めてくださった中村好男博士、実験準備等を手伝っていただいた原田啓基氏、研究の実施にあたり様々な便宜を図っていただいた総務部福島分室及び業務科の方々等、著者が所属した農林水産省東北農業試験場（現独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 東北農業研究センター）の関係者の方々に礼を申し上げます。また、線虫の生理、生態及び分類学的観点から御助言いただいた佐賀大学名誉教授の石橋信義博士、九州沖縄農業研究センターの皆川望博士、中央農業総合研究センターの水久保隆之博士、オランダ Wageningen University の Tom Bongers 博士、実験に使用した糸状菌種の同定をしていただいた花き研究所の月星隆雄博士、線虫の同定に御協力いただいたベルギー Ghent University の Etienne Geraert 及び Wim Bert の両博士、線虫の採集に御協力いただいた福島県農業試験場及び青森県農業試験場の方々にお礼申し上げます。さらに、米国滞在時の研究及び論文作成で御助言いただいた University of California, Davis 校の Howard Ferris 博士と Carl Chen 博士をはじめ Department of Nematology の諸氏、公表論文の作成で御助言をいただいたニュージーランドの Land Care Research の Gregor Yeates 博士、米国の University of Vermont の Deborah Neher 博士及びチェコ共和国の Institute of Soil Biology の Ladislav Háněl 博士にも礼を申し上げます。最後に、本論文の完成に向けて御助言及び御指導いただいた岡山大学の中筋房夫教授、積木久明教授、宮竹貴久助教授及び、研究報告への投稿に当たり御校閲いただいた東北農業研究センター畑地利用部長の新田恒雄博士にお礼申し上げます。

なお、本研究のうち、線虫の無機態窒素生成作用

に関する研究は、旧科学技術庁の長期在外研究員制度によって、University of California, Davis 校線虫学科に 1998 年から 2000 年にかけて客員研究員として滞在している間に行った。

糸状菌食性 Aphelenchida 目線虫の増殖と植物病害抑制への利用

1. 緒 言

糸状菌食性線虫のうち Aphelenchida 目の線虫は、一般に植物病原性の糸状菌を摂食した場合に増殖率が高いことから、こうした菌が引き起こす植物病害に対する防除資材として期待され、研究されてきた（崔ら 1988）。線虫の増殖率が高い植物病原菌ほど、線虫による防除の可能性が高いため、各種病原菌について、線虫による選好性や線虫の増殖性が検討されてきた。また、線虫の増殖性は、糸状菌の種類のみでなく、線虫の種類や地域系統によっても大きく異なる（Choi・Ishibashi 1989, Pillai・Taylor 1967b）。従って、ある種（系統）の線虫を病害防除に使用する場合、対象病原糸状菌での増殖性を事前に把握しておく必要がある。本章では、福島県福島市で採取したニセネグサレセンチュウと *Aphelenchoides* 属の未記載種（*Aphelenchoides* sp.）による病害抑制の可能性を検討するため、これら線虫について、*Pythium*, *Fusarium*, *Botrytis* 及び *Rhizoctonia* 属の植物病原糸状菌を餌として与えた時の増殖性を調査した。また、病害防除資材としての実績が多いニセネグサレセンチュウについては、同じ餌糸状菌種での増殖性が線虫の地域系統によって異なることが知られている（Choi・Ishibashi 1989）。特に *Pythium* 属菌に対する違いは極端で、アメリカ産及び九州産の系統がほとんど増殖しないのに対し（Mankau・Mankau 1963, Ali *et al.* 1999）、著者が予備試験を行ったところ、福島県産の系統は非常に良く増殖した。そこで、ニセネグサレセンチュウについて、福島市採取の系統の他、東北地方の 3 カ所で採取した系統についても、*Pythium*, *Fusarium* 及び *Rhizoctonia* 属の植物病原糸状菌を摂食させて増殖特性を比較した。

以上の試験で線虫増殖率が高かった線虫種（系統）と糸状菌種との組合せについて、その糸状菌による植物病害の発生を、線虫の接種により実際に抑制できるか検討するため、ポットを用いた試験を行った。

なお、*Filenchus misellus* (線虫)、*Fusarium oxysporum* (糸状菌) というように、同じ英文字で始まる生物学名が複数あるので、本稿では文頭の場合も含め、初出以降は *Fi. misellus*, *Fu. oxysporum* 等と表記した。

2. ニセネグサレセンチュウと *Aphelenchoides* 属線虫の増殖に及ぼす植物病原菌種の影響

1) 材料と方法

福島県福島市のコンニャク (*Amorphophallus konjac*) 畑の土壌から採集した線虫を用いた。ニセネグサレセンチュウは単為生殖性の雌1頭から、*Aphelenchoides* sp. は1対の雌雄成虫から確立した系統を用いた。野菜の苗に立枯れを引き起こす病原菌の1種 *Rhizoctonia solani* AG-4, IIA (MAFF305225) を餌にして試験に用いる線虫を培養した。供試菌として *Rh. solani* の他に、多種の野菜に苗立ち枯れを起こす *Pythium ultimum* (MAFF305637)、ダイコン萎黄病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* (MAFF305123) 及び *Botrytis cinerea* (東北農業試験場畑病虫害研究室より提供) を用いた。このうち *Bo. cinerea* は土壌伝染性ではないが、糸状菌食性線虫の培養に適した菌としてよく使われるため、本試験に供試した。

各線虫種についての試験は別々に行った。試験用の糸状菌菌叢を用意するため、糸状菌培養用の PDA (Potato Dextrose Agar) 10ml を分注した直径9cm のガラスシャーレに上記4種の菌を別々に接種した。これらを、菌叢がシャーレ全体を覆うまで25℃で培養した。次に、線虫をバールマン装置で抽出し、殺菌剤の0.5%ヒビテン (Hibitane®) に15分間、次いで1000ppm 硫酸ストレプトマイシンに15分間浸漬して表面殺菌した。これらの操作によって得たニセネグサレセンチュウの雌成虫20頭、または *Aphelenchoides* sp. の雌雄各10頭を、糸状菌菌叢が全面を覆ったシャーレ1枚に各々接種した。線虫種と糸状菌種との各組み合わせにつき5個の反復を設けた。線虫接種後、シャーレを25℃、24時間暗黒の条件下に置いた。20日後、培地をバールマン漏斗に移し、4日間25℃において線虫を抽出し、シャーレごとに線虫個体数を調査し増殖率を計算した。

線虫を土壌や培地、植物組織等から抽出する方法は、生きた線虫の運動性を利用する方法と、運動性を利用せず、物理的に土壌粒子と線虫とを分離する

方法の二つに大きく分けられる。前者にはバールマン法、後者にはふるい分け法や遠心法等がある (佐野 2004)。バールマン法で用いる抽出装置は単純な構造で、ゴム管でガラス管ビンに連結した漏斗に水を入れ、キムワイパーやティッシュペーパーを敷いた網皿を上に乗せただけのものである。ワイパーの上に土壌を載せ、それに完全に浸透するまで水を追加し、適温で1-3日おくと線虫が自力で水中へ泳ぎだし、下方にあるガラス管ビンに沈殿する。この方法はふるい分け法や遠心法に比べ、かかる労力が非常に少なくすみ、多数の土壌サンプルを処理するのに効率的である。しかし、土壌の種類によっては線虫の抽出効率が非常に低く、また、漏斗の傾斜部に線虫が停留して管ビンに回収されないこともある。さらに、線虫分類群の中には運動がもともと非常に緩慢だったり、体表面に微小突起があるために土壌粒子間での移動が遅いものがあり、運動が活発で突起を持たない分類群に比べ、バールマン法での抽出率が非常に低い。このような欠点があるものの、糸状菌食性線虫等運動が活発な線虫を、同じタイプの土壌や培地から抽出する場合には効率的な抽出方法であるため、本研究全般で線虫の個体数調査にバールマン法を用いた。

線虫の増殖率は $R = P_f / P_i$ (P_f は接種20日後の個体数、 P_i は接種頭数でニセネグサレセンチュウ、*Aphelenchoides* sp. とも20頭) として算出した。分散を等しくするために増殖率のデータを対数変換した後、それに対する餌糸状菌の種類の影響を分散分析し、有意な場合は Tukey 法で増殖率を比較した。ただし、対数変換しても分散が等しくならない場合は、ノンパラメトリックの Kruskal-Wallis の検定で餌糸状菌種の影響を分析し、影響が有意な場合は Steel-Dwass 法で増殖率の比較を行った。

2) 結果と考察

ニセネグサレセンチュウの場合は分散分析と Tukey 法で、*Aphelenchoides* sp. の場合は Kruskal-Wallis 法と Steel-Dwass 法で増殖率に対する糸状菌種の影響を分析した。いずれの線虫種でも増殖率に対する餌糸状菌種の影響が有意で (ニセネグサレは ANOVA で $P < 0.001$, *Aphelenchoides* sp. は Kruskal-Wallis 検定で $P < 0.001$)、増殖率は餌糸状菌の種類によって各々大きく異なった (図1)。

ニセネグサレセンチュウの増殖率は、*Py. ultimum* や *Rh. solani* を摂食した場合の方が、*Bo. cinerea*

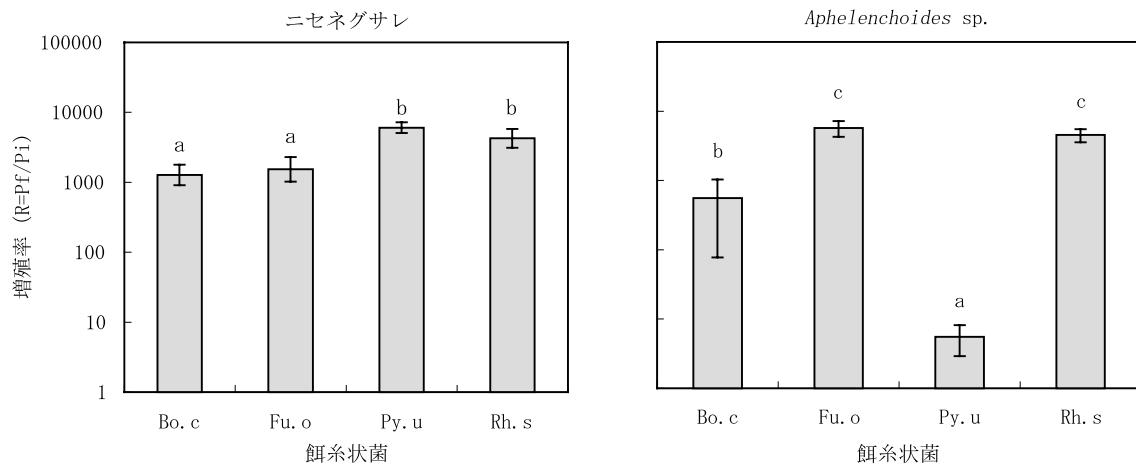


図1 4種類の糸状菌を摂食したときのニセネグサレセンチュウと *Aphelenchoides* sp.の増殖率

シャーレ当たり線虫20頭を接種し、25℃で20日間培養後、シャーレごとに抽出した線虫頭数を接種頭数で割って算出。糸状菌のBo. c, Fu. o, Py. u, Rh. sは各々*Bo. cinerea*, *Fu. oxysporum*, *Py. ultimum*, *Rh. solani*を示す。グラフ中の縦棒は、95%信頼区間を示す。同一英文字の値にはTukey法（ニセネグサレセンチュウ）またはSteel-Dwass法（*Aphelenchoides* sp.）で有意差がない（ $P>0.05$ ）。

や *Fu. oxysporum* の場合より有意に高くなった（Tukey 検定, $P<0.05$ ）。*Pythium* 属菌上でのニセネグサレセンチュウの増殖については、研究者間で結果が著しく異なる。米国のある系統の線虫は *Py. ultimum* と *Py. irregulare* ではまったく増殖しなかったが（Mankau・Mankau 1963, Pillai・Taylor 1967b）、*Py. arrhenomanes* では良く増殖し、この糸状菌が起こすトウモロコシの根腐病をこの線虫で防除可能であった（Rhoades・Linford 1959）。このような、*Pythium* 属菌の種間での同一線虫系統の増殖率の違いや、米国の線虫系統と本研究の系統と間の *Py. ultimum* 上での増殖の有無の違いが、どのような原因によるのかは不明である。しかし、今回の試験に用いたニセネグサレセンチュウの系統は、*Pythium* 属菌が起こす植物病害、少なくとも *Py. ultimum* が起こすものに対しては、生物防除資材としての効果が期待される。また、*Rh. solani* もニセネグサレセンチュウにとって好適な餌であった。そこで、*Py. ultimum* 及び *Rh. solani* が起こす病害について、この線虫による抑制効果を検討した（「4 糸状菌性植物病害に対するニセネグサレセンチュウの発病抑制効果」に記載）。

Aphelenchoides sp.では、餌としての供試糸状菌の好適性がニセネグサレセンチュウの場合と異なった。つまり、*Aphelenchoides* sp.の増殖に最も適した糸状菌は *Fu. oxysporum* f. sp. *raphani* 及び *Rh.*

solani で、*Bo. cinerea* や *Py. ultimum* より線虫増殖率が有意に高かった（Steel-Dwass 検定, $P<0.05$ ）。このことから、*Fusarium* 属菌と *Rhizoctonia* 属菌が起こす病害に対する *Aphelenchoides* sp.の抑制効果も検討すべきと考えられるが、*Aphelenchoides* 属の線虫は、*Aphelenchus* 属のそれと異なり、植物の地上部に加害する種がいるので（Evans *et al.* 1993）、当該線虫の病害抑制への利用に際して注意が必要である。

3. 土壌病原性糸状菌3種5株を摂食した東北地方のニセネグサレセンチュウ4系統の増殖

1) 材料と方法

ニセネグサレセンチュウの系統間での増殖性を比較するため、福島県会津坂下町、郡山市及び青森県黒石市で採集し、単為生殖性の雌1頭から作製した線虫系統（以下、会津、郡山、黒石系統）に加え、2で用いた福島市採取の線虫系統（以下、福島系統）について増殖率を調査した。線虫の餌としては、2で用いた *Rh. solani* 及び *Py. ultimum* に加え、*Fu. oxysporum* の3菌株（ネギ萎凋病菌、*Fu. oxysporum* f. sp. *cepae*；キュウリつる割病菌、*Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*；トマト萎凋病菌、*Fu. oxysporum* f. sp. *lycopersici*、いずれも東北農業試験場畑病虫害研究室より提供）の計3種5菌株を用いた。各菌株について個別に試験を行い、線虫4系統の間の増殖率を比較した。糸状菌菌叢を2の場合と同様に

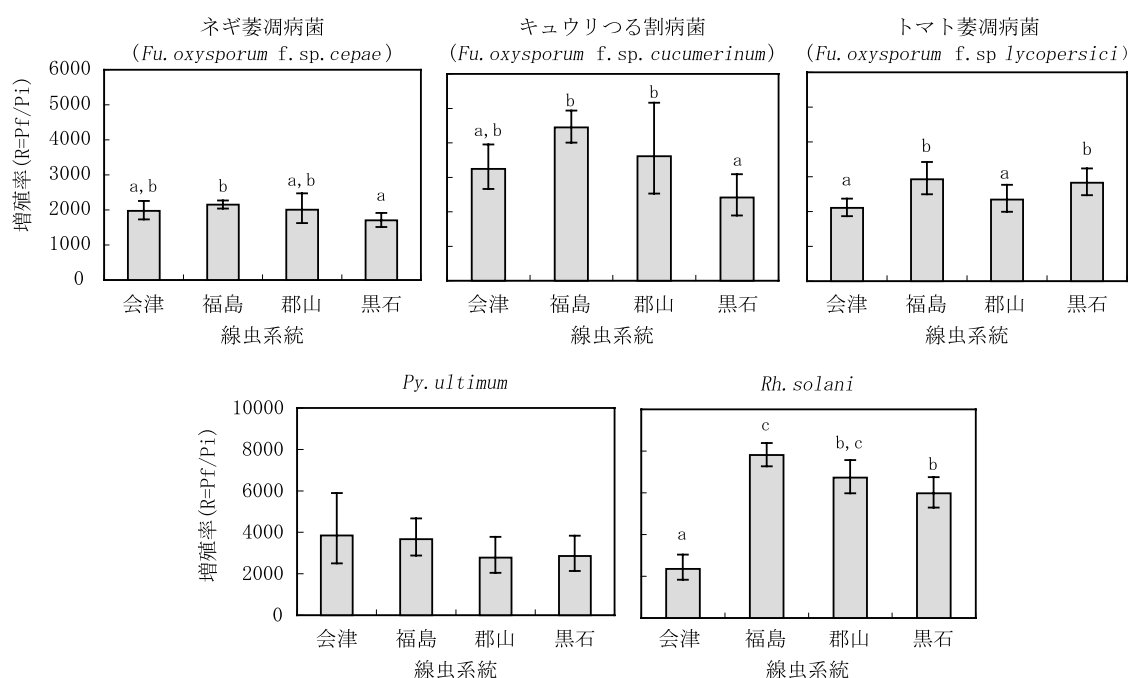


図2 5種類の糸状菌各々における線虫系統の増殖率の違い

会津、福島、郡山、黒石は各々福島県会津坂下町、福島市、郡山市、青森県黒石市で採集された線虫系統を示す。増殖率は、シャーレ当たり線虫20頭を接種し、25℃で20日間培養後、シャーレごとに抽出した線虫頭数を接種頭数で割って算出。グラフ中の縦棒は95%信頼区間を示す。同じ糸状菌の中の同一英文字の値にはTukey法で有意差がない($P>0.05$)。

PDA上に生育させ、*Rh. solani*で事前に培養した線虫を表面殺菌し、菌が生育したシャーレにいずれかの線虫系統の雌成虫20頭を接種した。各系統につき5反復を設定した。線虫接種後、シャーレを25℃、24時間暗黒の条件に置いた。20日後、2と同様の方法で線虫を抽出して増殖率を算出した。増殖率のデータを対数変換した後、それに対する線虫系統の影響をANOVAで分析し、有意な場合はTukey法で増殖率を比較した。

2) 結果と考察

*Py. ultimum*では増殖率に対する線虫系統の影響は有意でなく($P=0.1493$)、増殖率は系統によらずほぼ同じであった(図2)。他の糸状菌では、増殖率に対する線虫系統の影響は有意で($P<0.05$)、増殖率は系統間で異なった。*Fu. oxysporum*の3系統を餌にした場合は、有意でない場合があるものの、総じて福島系統の線虫が他の系統より増殖率が高く、逆に黒石系統は、トマト萎凋病菌(*Fu. oxysporum* f. sp. *lycopersici*)の場合を除き低かった(図2)。*Rh. solani*でも福島系統の増殖率が最高で、逆に会津系統が最低であった。供試した糸状菌3種5株を通して、福島系統の線虫が他の系統より増殖

率が高い傾向があった。

植物寄生性線虫の場合、同じ植物種を餌にした場合の増殖率が線虫種内の系統(レース)によって顕著に異なることが知られている。例えば、ダイズシストセンチュウ(*Heterodera glycines*)ではダイズ品種(判別寄主)における増殖率を異にするレースが世界全体で12確認されている(相場2003)。ネコブセンチュウは一般にシストセンチュウに比べて寄主範囲が広いが、サツマイモネコブセンチュウ(*Meloidogyne incognita*)でも、植物種(判別寄主)における増殖率が異なる4レースが国際的に識別され、線虫防除を考える上で重要なポイントになっている(相場2003)。同じ餌条件での増殖率が線虫種内の系統で異なることは、糸状菌食性線虫のニセネグサレセンチュウでも知られている。例えば、Choi・Ishibashi(1989)は、九州地方で採取した線虫5系統の増殖率を3種の糸状菌(*Rh. solani*, *Fu. oxysporum*, *Bo. cinerea*)を与えて比較し、どの菌でも鹿児島系統の線虫が他の系統より増殖率が高かったと述べている。Choi・Ishibashi(1989)はまた、5系統の線虫の増殖率の順位は餌とした糸状菌の種類によらず不変であるため、増殖率の違いは糸

状菌種の違いではなく、線虫各系統の潜在的な増殖率の違いによると結論した。本研究では、東北地方で採取したニセネグサレセンチュウの4系統について調査し、やはり線虫系統間での増殖率の違いが見られた。しかし、例えば、キュウリつる割病菌 (*Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) では福島系統に比べ増殖率が有意に低く、4系統中最低だった黒石系統の線虫が、トマト萎凋病菌 (*Fu. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) では福島系統とならび他より増殖率が高くなる等、系統間の順位に糸状菌種を通じた一貫性はなかった。従って、増殖率の系統間の違いは、各系統が有する潜在的な増殖率の違いに加え、供試糸状菌の、餌としての好適性が各線虫系統で異なることが原因と考えられる。試験した線虫4系統の中では福島系統が総じて増殖率が高いので、餌として供試した糸状菌による植物病害の抑制に用いるには、この系統が最適と考えられる。

4. 糸状菌性植物病害に対するニセネグサレセンチュウの発病抑制効果

1) 材料と方法

2及び3の試験の結果、野菜類に対する病原性糸状菌である *Pythium*, *Fusarium* 及び *Rhizoctonia* 属の菌で増殖率が高かった福島系統のニセネグサレセンチュウについて、これら3菌によって引き起こされる病害に対する発病抑制試験をポットレベルで行った。また、*Rhizoctonia* 属の菌については、比較のため、会津及び郡山系統の線虫についても発病抑制効果を検討した。供試野菜として、*Rhizoctonia* 属に対してはカリフラワー (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), *Pythium* 属にはハウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.), *Fusarium* 属菌にはキュウリ (*Cucumis sativus* L.) を用いた。

(1) *Rh. solani* によるカリフラワーの苗立枯病に対する効果

Rh. solani を餌に PDA 培地上で培養した福島系統の線虫を供試した。また、*Rh. solani* で汚染された試験土壌を作製した。常法 (大畑 1995) により、菌をフスマに接種し、25℃で17日間培養して汚染源とした。そのフスマを体積比5%で滅菌した黒ボク土壌に混入し、菌汚染土壌を作製した (1994年8月16日)。それを500mlのプラスチックポットに200ml入れて菌汚染区とした。同様にして菌汚染土を入れ、直後に、培地から抽出した線虫10万頭をポットに接種して菌・線虫区とした。一方、菌

を入れない滅菌黒ボク土を入れたポットを滅菌区とした。また、餌の糸状菌がない場合に線虫が植物を摂食して生育を阻害するか検討するため、滅菌土壌を入れたポットに線虫10万頭を接種したものを線虫区とした。各試験区5反復とした。線虫接種8日後にカリフラワー (タキイ、スノーキング) の催芽種子を1ポットに5個播種し、自然日長、温度のガラス室内におき、必要に応じて灌水した。線虫接種18日後に出芽前立ち枯れによる未出芽の株数を、26日後に発病株数 (未出芽株数、萎凋株数及び萎縮株数の合計とした) を調査した。未出芽株数及び発病株数を処理区間で比較した。互いにデータの分散が異なる区があったため、Kruskal-Wallis の検定を行い、Steel-Dwass 法で平均値の比較を行った。

会津及び郡山系統の線虫を用いた試験でも、福島系統の場合と同様にして菌汚染土壌、滅菌土壌を用意した (1998年6月4日)。2系統の試験を同時に行うため、菌汚染区、菌・線虫区 (会津)、菌・線虫区 (郡山)、線虫区 (会津)、線虫区 (郡山)、滅菌区の6試験区を作り、反復を各5とした。結果の項で述べるとおり、線虫区では線虫の加害によると考えられる植物体の萎縮が見られたが、糸状菌による病害症状と外見上区別困難だったので、これらの症状及び未出芽や萎凋症状を示した株を「生育阻害株」として、線虫接種28日後にその株数を調査した。

(2) *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* によるキュウリのつる割病に対する効果

Rh. solani の場合と同様に菌汚染源の調整及び、それを用いた試験区の作製を行った (1997年6月3日)。線虫は福島系統を用いた。ただし、準備できる線虫個体数に限りがあったので、線虫区を除く3処理区 (菌汚染、菌・線虫及び滅菌区) のみとし、反復数は各5個とした。線虫接種後は25℃、暗黒条件下にポットを置いた。8日後に子葉展開期のキュウリ苗 (タキイ、ときわ地這) を1ポット3株ずつ定植し、自然日長及び温度のガラス室内におき、必要に応じて灌水した。つる割病が発生した幼苗は萎凋症状を示すので、その症状が出た株を「発病株」とし、その数を線虫接種28日後に調査した。

(3) *Py. ultimum* によるハウレンソウの苗立ち枯れに対する効果

一谷 (1995) の方法により、菌をベントグラス種子に接種し、25℃で4日間培養したものを菌汚染源とした。その種子を重量比0.5%の割合で滅菌黒

ボク土に混入して菌汚染土を作成した。それをを用い *Fu. oxysporum* の場合と同様にして菌汚染区、菌・線虫区及び滅菌区を作製した (1994 年 10 月 12 日)。各処理区 5 反復とした。線虫接種 20 日後に全ポットにハウレンソウ (サカタのタネ, オリオン) の種子を 3 個ずつ播種した。病害の発生を促すため、実験期間中ポットにビニール袋をかぶせ、25℃の過湿状態におき、日長は 14 時間明期 - 10 時間暗期とした。線虫接種 40 日後に発病株数 (未出芽株と萎凋株数の合計) を試験区間で比較した。

2) 結 果

(1) *Rh. solani* によるカリフラワーの苗立枯病に対する効果

福島系統の試験では、カリフラワーの播種直前に試験ポットを観察すると、菌汚染区では地表に *Rh. solani* の大型の白色菌叢が多数出現していた (図 3)。菌・線虫区でも少数の菌叢が出現していたが、大きさは総じて微小であった。線虫区と滅菌区では菌叢はまったく出現しなかった。カリフラワーを播種した後の未出芽数及び発病株数は、いずれについても処理区間で有意差が認められた (Kruskal-Wallis 検定, 各々 $P<0.05$, $P<0.01$)。菌汚染区では、未出芽数と発病株数のいずれも他の処理区より有意に多く (表 1, Steel-Dwass 検定, $P<0.05$)、出芽前立ち枯れによりほとんどの株が出芽しなかった (図 3)。一方、菌・線虫区、線虫区及び滅菌区では、

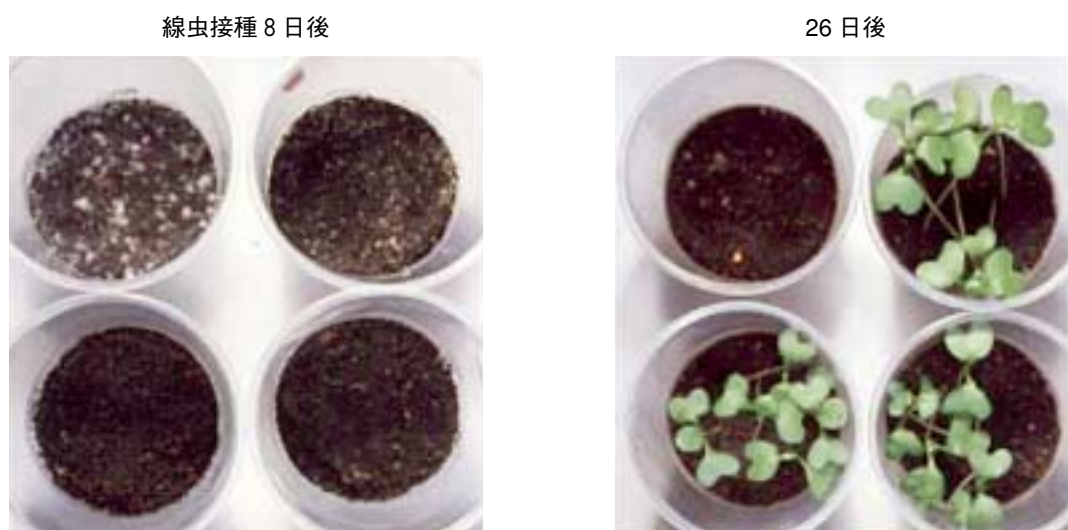


図 3 *Rh. solani* によるカリフラワー苗立枯病に対する福島系統のニセネグサレセンチュウの発病抑制効果

左の写真が線虫接種 8 日、右が 26 日 (播種 18 日) 後。どちらでも、写真内の左上が菌汚染、右上が菌・線虫、左下が線虫、右下が滅菌区。左の写真の菌汚染区と菌・線虫区の地表には *Rh. solani* の白い菌叢が点在する。

表 1 *Rh. solani* によるカリフラワーの苗立枯病に対する福島系統のニセネグサレセンチュウの発病抑制効果

処理区 ^{a)}	未出芽株数 ^{b)}	発病株数 ^{c)}
菌汚染	4.4 ± 0.2a	4.4 ± 0.2a
菌・線虫	0.0 ± 0.0b	0.2 ± 0.2b
線虫	0.0 ± 0.0b	0.0 ± 0.0b
滅菌	0.0 ± 0.0b	0.6 ± 0.2b

a) 各 5 反復。

b) 菌・線虫区、虫区での線虫接種 8 日後に全区でポット当たり 5 粒ずつ播種し、18 日後に調査、平均 ± s. e. で表示。

c) 発病株数は未出芽数、萎凋株数、萎縮株数の合計。線虫接種 28 日後に調査、平均 ± s. e. で表示。

注. 同列の同一英文字の平均値には Steel-Dwass の多重比較で有意差がない ($P>0.05$)。

表 2 *Rh. solani* によるカリフラワーの苗立枯病に対する会津および郡山系統のニセネグサレセンチュウの発病抑制効果

処理区 ^{a)}	未出芽株数 ^{b)}	生育阻害株数 ^{c)}
菌汚染	5.0 ± 0.0b	5.0 ± 0.0b
菌・線虫 (会津)	0.8 ± 0.2a	2.2 ± 0.4a, b
菌・線虫 (郡山)	2.4 ± 0.9a, b	2.8 ± 1.0a, b
線虫 (会津)	0.0 ± 0.0a	1.2 ± 0.7a, b
線虫 (郡山)	0.0 ± 0.0a	0.8 ± 0.2a
滅菌	0.0 ± 0.0a	0.0 ± 0.0a

a) 各 5 反復。

b) 菌・線虫区、線虫区での線虫接種 8 日後に全区でポット当たり 5 粒ずつ播種し、18 日後に調査、平均 ± s. e. で表示。

c) 生育阻害株数は、糸状菌による未出芽、萎凋、萎縮株及び線虫による萎縮株数の合計。線虫接種 28 日後に調査、平均 ± s. e. で表示。

注. 同列の同一英文字の平均値には Steel-Dwass の多重比較で有意差がない ($P>0.05$)。

表3 *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* によるキュウリのつる割病に対するニセネグサレセンチュウ福島系統の抑制効果

処理区 ^{a)}	発病株数 ^{b)}
菌汚染	3.0 ± 0.0b
菌・線虫	3.0 ± 0.0b
滅菌	0.0 ± 0.0a

a) 各5反復。

b) 菌・線虫区での線虫接種8日後に全区でポット当たり3株ずつ定植, 28日後に調査, 平均±s.e.で表示。

注. 同列の同一英文字の平均値にはSteel-Dwassの多重比較で有意差がない ($P>0.05$)。表4 *Py. ultimum* によるハウレンソウの苗立枯病に対するニセネグサレセンチュウ福島系統の防除効果

処理区 ^{a)}	発病株数 ^{b)}
菌汚染	3.0 ± 0.0b
菌・線虫	3.0 ± 0.0b
滅菌	0.0 ± 0.0a

a) 各5反復。

b) 菌・線虫区での線虫接種20日後に全区でポット当たり3粒ずつ播種, 40日後に調査, 平均±s.e.で表示。

注. 同列の同一英文字の平均値にはSteel-Dwassの多重比較で有意差がない ($P>0.05$)。

未出芽株及び発病株がほとんど無く, 播種した種子の多くが健全に出芽, 生育した。

会津及び郡山系統の試験では, 未出芽数及び生育阻害株数いずれについても処理区間で有意差が認められた (Kruskal-Wallis 検定, 各々 $P<0.01$, $P<0.01$)。未出芽数は菌汚染区と菌・線虫区 (郡山) で他の処理区より有意に多かった (表2, Steel-Dwass 検定, $P<0.05$)。その後, 菌・線虫区 (会津) と線虫区 (会津) で萎凋や萎縮株が増えたため, この両区, 菌汚染区及び菌・線虫区 (郡山) との間では生育阻害株数に有意差が無くなった (Steel-Dwass 検定, $P>0.05$)。一方, 線虫区 (郡山) と滅菌区ではほとんど生育阻害株がなかった。

(2) *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* によるキュウリのつる割病に対する効果

発病株数が試験区間で有意に異なったものの (Kruskal-Wallis 検定, $P<0.01$ 及び Steel-Dwass 検定, $P<0.05$), 菌汚染区と菌・線虫区ではすべての株が発病したことから, 線虫の発病抑制効果は認められなかった (表3)。

(3) *Py. ultimum* によるハウレンソウの苗立枯れに対する効果

Rh. solani の接種によってほとんどの種子が出芽しなかった試験と異なり, どの区でも出芽する種子が多かった。しかし, 菌汚染区と菌・線虫区ではやがて苗立枯れが同程度に発生し, 両試験区間で有意な差がなかったことから (表4, Steel-Dwass 検定, $P>0.05$), 線虫の発病抑制効果は認められなかった。一方, 滅菌区ではまったく発病株がなかった。

3) 考 察

Rh. solani によるカリフラワーの苗立枯病の発病抑制試験では, 福島系統の線虫の試験, 会津と郡山

系統の試験でも, 菌汚染区では病害の発生が著しく, ほとんどの株が出芽前の立ち枯れを起こし, 出芽しなかった (表1)。菌・線虫区では, 福島系統の線虫は病害発生を良く抑えた。カリフラワーの播種直前の試験ポットの地表を観察したところ, 菌汚染区では *Rh. solani* の大型の白色菌叢が多数出現していたのに対し, 菌・線虫区では少数の小型菌叢の出現にとどまっていたことから (図3), 後者の試験区で立ち枯れの発生が抑えられたのは, 線虫が菌の増殖を抑えたためと考えられる。福島系統のニセネグサレセンチュウは, 追試験でも *Rh. solani* による病害の発生を良く抑えた (岡田, 未発表)。

一方, 会津, 郡山系統の線虫の抑制効果は劣り, カリフラワー5本のうち2, 3本での発病を許した。線虫による植物への加害作用を見るために設けた線虫区では, 福島, 郡山系統の線虫の場合はほとんど加害が認められなかった。しかし, 会津系統の線虫は, カリフラワー5本につき1本程度, 生育を阻害した (表2)。

Fu. oxysporum f. sp. *cucumerinum* によるキュウリのつる割病及び *Py. ultimum* によるハウレンソウの苗立枯れに対する福島系統の線虫の発病抑制試験のいずれでも, 菌・線虫区ですべての株が発病し, 線虫による抑制効果はまったく認められなかった (表3, 4)。

崔ら (1988), 石橋 (1993), Klink・Barker (1968) 及び Barker (1964) は, *Rh. solani*, *Fu. oxysporum*, *Pythium* sp. による野菜の苗立枯れに対しニセネグサレセンチュウが優れた防除効果を示したと述べている。一方, 小林・築尾 (1993) は *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* の汚染土壌を用いた場合, キュウリのつる割病に対するニセネグサレセンチュウの発

病抑制効果は小さく、線虫による病害防除の効果は線虫の処理方法等によって異なると述べている。また、本研究で用いた福島、会津、郡山の線虫系統の間で *Rh. solani* に対する発病抑制効果が異なったことから、線虫による病害抑制効果は用いる線虫系統にも影響されると考えられる。さらに、本研究で明らかのように、対象とする糸状菌種によっても線虫の抑制効果は異なる。本研究では、福島系統の線虫が *Rh. solani* に対して発病抑制効果が高いのに対し、*Fu. oxysporum* や *Py. ultimum* で効果がないことが示された。後二者の菌で効果がなかった原因の1つは、土壤中で線虫による摂食量を上回るほど菌が増殖したためであると考えられるが、その他にも、植物体内への菌の進入経路の特徴も原因と考えられる。つまり、*Fu. oxysporum* や *Py. ultimum* は土壤中に多数広がる根から植物体に侵入する（一谷 1984、駒田 1984）。一方、*Rh. solani* は土壤中の種子の表皮、根及び茎の地際部から侵入することが知られるが（杉本 1984）、出芽後は主に地際部から侵入するという見解がある（Baker 1970）。*Fu. oxysporum* や *Py. ultimum* 等根から侵入する病原菌の場合、線虫の摂食によって土壤中の菌密度が低下したとしても、残存した菌糸が、多数分岐した植物根のいずれかに入れば病害が発生してしまうであろう。一方、*Rh. solani* の場合、線虫の摂食で土壤中の菌密度を低下させれば、出芽前の植物体や出芽後の植物体地際部へ菌が侵入する機会が減り、発病抑制可能と考えられる。

Rh. solani と福島系統のニセネグサレセンチュウとの組合せについては、今後、野菜の種類等試験の条件や規模を変えて、発病抑制効果についてさらに検討すべきである。また、今回の試験では、有機物上で増殖中の菌（菌糸）を汚染源として用いたが、農家圃場の土壤中では、耐久態である菌核の形で *Rh. solani* が存在すると考えられる。さらに、実際の土壤中では、線虫捕食菌や肉食性線虫等ニセネグサレセンチュウの天敵になりうる生物も存在する。このような状況でも本線虫による発病抑制が可能であるか否かの検討が、圃場での実用化に向けて必要である。

崔ら（1988）によると、病原菌を接種しない滅菌土壤中ではニセネグサレセンチュウが植物を摂食し生育阻害を起こす場合がある。実際、本研究でも会津系統がそのような状況で、わずかなが

らもカリフラワーの生育阻害をもたらした（表2）。実際の圃場では、土壤中に何かしら線虫の餌になる菌があるので、線虫による植物への加害は起こらないと期待されるが（崔ら 1988）、線虫散布処理を行った直後には播種しない等の注意をする必要がある。

無機態窒素生成に及ぼす線虫種と温度の影響

1. 緒 言

土壤中の有機物分解や養分循環への土壌糸状菌及びそれを食べる糸状菌食性線虫の関わりを検討するため、これらの生物による窒素の無機化作用が研究されている（Anderson *et al.* 1981, Ingham *et al.* 1985, 岡田 2002, Trofymow・Coleman 1982）。有機物分解系における養分の無機化率は糸状菌や線虫の種類等の生物学的要因や、分解される有機物のC/N比等の化学的要因に影響を受ける（Chen・Ferris 1999, 2000）。また、土壌の温度や水分量にも影響される。これは、土壌生物の代謝、成長、繁殖等の活動がこうした要因に影響されるからである（Adams *et al.* 1982, Fujie *et al.* 1996, Stanton・Sartori 1990, Yeates 1996, Young *et al.* 1998）。従って、有機物分解の過程での、土壌糸状菌や糸状菌食性線虫の働きによる養分の無機化に対する温度等物理的要因の影響を知ることは、土壌中の物質循環におけるこうした生物の作用を評価するために必要である。本研究では、糸状菌2種、*Rh. solani* と *Bo. cinerea* の菌糸生育速度及び、これらの菌を摂食する線虫2種、ニセネグサレセンチュウと *Aphelenchoides composticola* の増殖速度に対する温度の影響を明らかにしようと試みた。さらに、これらの生物が有機物分解の過程で生成する無機態窒素の量に対する温度の影響をカラムマイクロソムを用いて実験的に検討した。

2. 材料と方法

1) 材料生物の由来

線虫としてニセネグサレセンチュウと *Ap. composticola* を供試した。その理由は、これらが農耕地土壤に普通に見られる代表的な糸状菌食性線虫であり、多種の糸状菌を摂食するが（Giannakis・Sanders 1989, Mankau・Mankau 1963）、高等植物は摂食しないためである（Hesling 1977）。また、予備試験の結果、これらの線虫は互いに増殖適温が若干異なるため、温度の影響の受け方が異なると期

待される。線虫は2種とも、米国 University of California, Davis 校構内の「持続的農法システムプロジェクト (Sustainable Agriculture Farming System Project)」の試験区圃場の土壌から採取し (Chen・Ferris 1999), *Rh. solani*, *Bo. cinerea*, *Fu. oxysporum* 菌を順次餌として与えて 22-25℃で継代培養したものである。糸状菌としては *Rh. solani* と *Bo. cinerea* を供試した。なぜなら、1) これらの菌は共にニセネグサレセンチュウと *Ap. composticola* にとって好適な餌であり (Mankau・Mankau 1963, 本稿のⅡ), 2) 窒素測定用のカラムに充填する、有機物を混入した砂の培地で菌叢がよく生育し (Chen・Ferris 2000), 3) 予備試験の結果、菌叢生育に適した温度が菌種間で互いに異なり、温度の影響の受け方が異なると期待されたからである。このうち、*Rh. solani* は著名な土壌伝染性植物病原菌である。一方、*Bo. cinerea* も植物病原性菌であるが土壌生息性ではない。しかし、前述のように *Bo. cinerea* は *Rh. solani* とは異なる温度反応性を持つと期待されるため、あえて今回の試験で用いた。2種の菌は共に University of California, Davis 校植物病理学科の保存菌コレクションから提供された。菌は本試験まで、PDA 培地上で 22 - 25℃で継代培養した。

2) 材料生物の生育と増殖に対する温度の影響調査

(1) 糸状菌

糸状菌の生育速度は砂培地 (アルファルファとセルロースを有機物として混入した砂) の上で測定した。この培地を用いたのは、後述のように無機態窒素量を測定するカラムシステムに一般的な土壌よりも適していたからである。培地を作るため、繊維状のセルロース 0.89g (Whatman 社製, C/N 比は 645/1) と、約 0.8 mm に粉碎した乾燥アルファルファ (*Medicago sativa*) の茎葉 0.4g (C/N 比は 11/1) を、直径 100, 高さ 20 mm のガラスシャーレ内で 20g の砂と混ぜた。用いた砂は事前に硫酸処理して有機物を分解、除去した。砂培地中の有機物全体の最終的な C/N 比は 35/1 になった。作製した培地を滅菌するため、121℃でオートクレーブを 30 分間ずつ二度行った。その後、*Rh. solani* か *Bo. cinerea* のいずれかが生育した PDA 培地を直径 10 mm に切り取って砂培地上に接種した。その後シャーレを 15, 20, 25, 29℃に置いた。この温度範囲は、実

際に大学構内の試験圃場で作物栽培期間中に記録されているものである (Venette・Ferris 1997)。菌糸の生育速度を測るため、培地上の菌叢の直径を、菌叢がシャーレの外縁に達するまで毎日記録した。データをもとに菌糸生育速度 (mm/day) を各菌ごとに算出した。

以上の生育試験は、2 菌種について同時に行った。各菌の各温度について、5 反復を設けた。菌種と温度を要因として ANOVA を行い、次いで回帰分析によって、各菌の生育速度に対する温度の影響を明らかにした。

(2) 線虫

糸状菌の試験で用いたのと同様の砂培地をシャーレに入れ、餌として *Rh. solani* か *Bo. cinerea* のいずれかを接種し、菌叢を生育させた。ニセネグサレセンチュウと *Ap. composticola* を *Rh. solani* で培養した後、無菌条件下で抽出し、全面に菌叢が広がったシャーレに、どちらかの線虫 20 個体を接種した。シャーレを 15, 20, 25, 29℃に置いて 21 日間線虫を増殖させた。その後シャーレごとに培地をバールマン漏斗に乗せ、各温度下で 24 時間線虫を抽出し、個体数を調査した。各シャーレごとに線虫の増殖率 $R = P_f / P_i$ (P_f は 21 日後の個体数, P_i は接種頭数で 20) を算出した。ニセネグサレセンチュウと *Ap. composticola* の試験は別々に行い、各菌種 - 温度の組合せごとに 4 反復を用意した。統計分析に先立ち、必要に応じてデータを対数またはべき乗変換して分散を等しくした。菌種と温度を要因として ANOVA を行い、次いで回帰分析によって線虫各種の増殖率に対する温度の影響を検討した。

3) 無機窒素生成に対する温度と線虫種の影響試験

有機物分解による無機態窒素生成に対する温度と線虫種との影響を調べるため、Chen・Ferris (1999) の方法によりカラムマイクロコズムを作製し、15, 20, 25, 29℃に置いた。カラムには、有機物を分解する糸状菌として *Rh. solani* か *Bo. cinerea* のいずれかを入れた。各菌につき、菌のみ接種、菌とニセネグサレセンチュウを接種、菌と *Ap. composticola* を接種の 3 タイプのカラムを 3 反復ずつ作製した。

(1) カラムの作製

長さ 300 mm, 直径 40 mm の塩化ビニルパイプの一端に蓋をした容器をカラムとして用いた (Ferris et



図4 無機態窒素測定に用いたカラムマイクロコズム
図は滲出法による測定を実施している場面。

al. 1998, 図4)。後述する窒素滲出液を回収するため、蓋の中心に直径6mmの穴を開けた。また、カラムに入れる砂培地の流出を最小限にとどめるため、0.24mm目のステンレス網を内側から蓋に張った。窒素をあらかじめ除去した砂380gにアルファルファ茎葉片2.28gとセルロース粉末5.05gを混入し（最終的なC/N比は35/1）、培地を作製した。培地は116℃で2回オートクレーブして滅菌し、カラムに入れた。糸状菌の接種のため、あらかじめシャーレ内で菌を生育させた砂培地をカラム内の培地に混入させた。線虫を含むカラムには、ニセネグサレセンチュウか *Ap. composticola* いずれかを、砂培地1g当たり50個体の密度になるように接種した。作製したカラムは完全無作為配置で各温度の恒温室内に置いた。実験終了時（カラム作製から22日後）に各カラムから80gの培地を取り出し、線虫をベールマン漏斗で抽出して密度を調べ、線虫の増殖率を算出した。

(2) 窒素生成量の調査

定期的な滲出法 (Chenn・Ferris 2000, Ferris et al. 1998) により、カラム内で無機化された窒素の量を調査した。すなわち、カラムの下側の蓋の穴にゴム栓をし、60mlの蒸留水を上から注いだ。その4分後に栓を外し、カラムの培地内に生成された窒素を30分かけて溶出した。溶出した液量を記録後、その6mlを窒素分析用の試験管に入れ、-10℃で保存した。培地の水分の偏りを最小限にするため、窒素の回収後にカラムを水平に置いた。窒素の定量のため、試験管に採った溶液を解凍し、4MのKClを6ml加えて1時間攪拌した。拡散電導度計

(diffusion conductivity analyzer) によってアンモニア態 (NH_4^+) と硝酸態 (NO_3^-) の窒素の量を各々計測し、その和を無機態窒素の量とした。以上の調査を3日おきに行った。各々のカラムについて、21日間に生成した無機態窒素の総量を算出した。2種の糸状菌各々の実験について、線虫の種類と温度がカラム内の無機態窒素生成量と線虫増殖率に及ぼす影響を調べるため、2元配置ANOVA、回帰分析及びTukeyの多重比較を行った。また、各温度において、対照区(菌のみ)と、線虫接種区(菌+ニセネグサレセンチュウ, 菌+ *Ap. composticola*)との間で窒素生成量に違いがあるか検討するため、Dunnettの多重比較を行った。

3. 結 果

1) 生物の生育と増殖に対する温度の影響

糸状菌の菌糸生育速度に対して菌種の主要効果が有意となり (ANOVA, $P<0.01$), *Rh. solani* はどの温度でも *Bo. cinerea* より生育が速かった (図5)。また、菌種と温度との相互作用も有意であった ($P<0.01$)。 *Rh. solani* は温度とともに生育速度が増加したが、 *Bo. cinerea* は15-25℃の範囲で温度とともに生育がわずかに速まったものの、25-29℃では生育速度が小さくなった。2菌種の温度反応曲線はいずれも3次関数で回帰できたが、その形状は両者で異なった ($P<0.01$, 図5)。

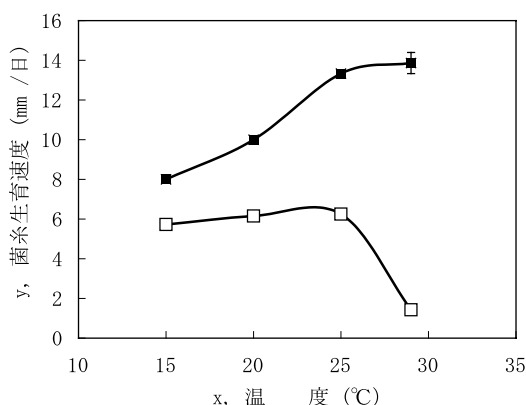


図5 アルファルファとセルロースを混入して作製した砂培地での *Rh. solani* (黒点) と *Bo. cinerea* (白点) の菌糸生育速度 (y, mm/日) に対する温度 (x, °C) の影響

15, 20, 25, 29℃での培養試験の結果に基づき、生育速度から温度への回帰曲線を推定した (*Rh. solani*: $y=55.93-7.73x+0.39x^2-0.01x^3$, $r^2=0.953$, *Bo. cinerea*: $y=72.05-10.58x+0.55x^2-0.01x^3$, $r^2=0.993$, ただしxは温度, yは菌糸生育速度)。シンボル上の縦棒は標準誤差を示すが、多くの場合誤差が小さく、縦棒がシンボルの中に含まれている。

線虫のうちニセネグサレセンチュウでは、増殖率に対する温度の主要効果のみ有意で (ANOVA, $P<0.01$), 餌糸状菌種による増殖率の違いは見られなかった。増殖率は温度と共に増加し, その反応曲線はどの菌種の場合でも 3 次関数で回帰され ($P<0.01$), 菌種間で曲線の形状に違いがなかった (図 6)。増殖率が最高になる温度は, *Rh. solani* を餌にした場合で 29 °C, *Bo. cinerea* の場合 27.5 °C と推定された。

Ap. composticola では、増殖率に対する温度と菌種の主要効果がともに有意で (ANOVA, $P<0.01$), 温度によらず, *Rh. solani* を餌にした場合の方が *Bo. cinerea* の場合より増殖率が高くなる傾向があった (図 7)。温度反応曲線はいずれの菌種の場合も 3 次関数で回帰され ($P<0.01$), 餌の菌種によらず線虫増殖率は 23 – 24 °C で最高に, 29 °C で最低になり, 曲線の形状は菌種間で似ていた (図 7)。

2) 無機態窒素生成に対する温度と線虫種の影響 (1) *Rhizoctonia* の試験

29 °C の *Ap. composticola* のカラム 2 本とニセネグサレセンチュウのカラム 1 本のデータは, 異臭がする等, カラム内に細菌が混入, 増殖した可能性があったため, 統計分析から除外した。無機態窒素の

総量に対する温度と線虫種との相互作用が有意で (ANOVA, $P<0.05$), 菌+線虫のカラムでは温度の影響が認められたが, 菌のみのカラムでは認められなかった。温度と窒素量との関係は, ニセネグサレセンチュウのカラムでは 2 次関数で, *Ap. composticola* のカラムでは 3 次関数で回帰できた (図 8)。前者のカラムでは, 15 – 20 °C では温度が上がると窒素量が減ったが, それ以上の温度域では窒素量が増加し, 29 °C で最大になった。一方, *Ap. composticola* のカラムでは 20 °C で窒素生成量が最大になった。線虫を接種したカラムの多くは, その温度における対照区 (菌のみ接種) のカラムと比較して窒素量に違いがなかった。しかし, 29 °C のニセネグサレセンチュウのカラムはその温度の対照区より窒素量が有意に多く, 15 °C の *Ap. composticola* のカラムでは対照区より有意に少なかった (Dunnett の多重比較検定, $P<0.05$, 表 5)。

線虫を接種したカラムでの線虫増殖率に対しては, 温度の主要効果及び温度と線虫種との相互作用が有意に影響していた (ANOVA, $P<0.01$)。増殖率はニセネグサレセンチュウのカラムでは 29 °C で, *Ap. composticola* のカラムでは 20 °C で最高であった (図 9)。増殖率と温度との関係はニセネグサレ

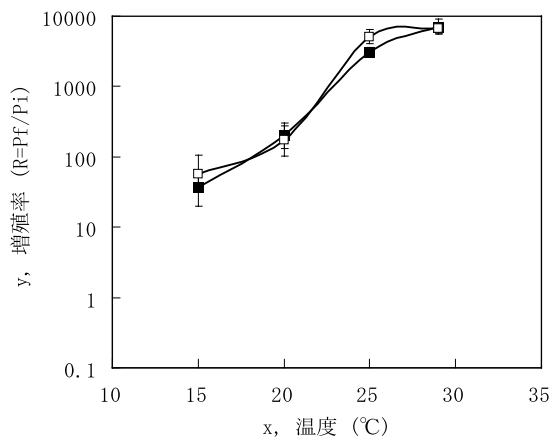


図 6 シャーレ試験において, *Rh. solani* (黒点) または *Bo. cinerea* (白点) を摂食したニセネグサレセンチュウの増殖率 ($R=Pf/Pi$, ただし Pf は 21 日後に抽出された線虫個体数, Pi は接種個体数で 20 頭/シャーレ)

培養試験の結果に基づき, 生育速度から温度への回帰曲線を推定した (*Rh. solani*: $y=35.56-5.14x+0.25x^2-0.004x^3$, $r^2=0.968$, *Bo. cinerea*: $y=71.03-10.35x+0.50x^2-0.007x^3$, $r^2=0.985$, ただし x は温度, y はデータの分散を同じにするためべき乗変換した後の線虫増殖率)。増殖率は, 再変換した後対数で表示。シンボル上の縦棒は 95% 信頼区間を示す。

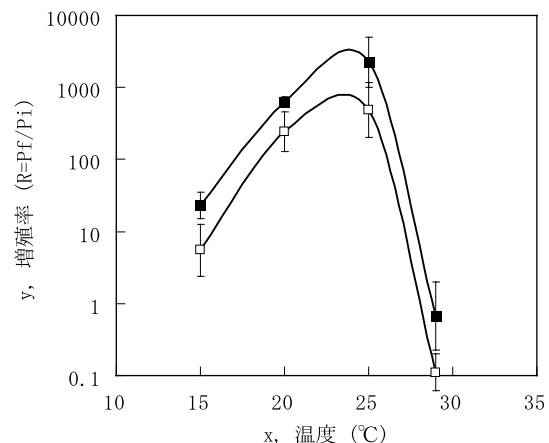


図 7 シャーレ試験において, *Rh. solani* (黒点) または *Bo. cinerea* (白点) を摂食した *Ap. composticola* の増殖率 ($R=Pf/Pi$, ただし Pf は 21 日後に抽出された線虫個体数, Pi は接種個体数で 20 頭/シャーレ)

培養試験の結果に基づき, 生育速度から温度への回帰曲線を推定した (*Rh. solani*: $y=31.14-5.53x+0.32x^2-0.01x^3$, $r^2=0.963$, *Bo. cinerea*: $y=41.44-6.88x+0.38x^2-0.01x^3$, $r^2=0.962$, ただし x は温度, y はデータの分散を同じにするためべき乗変換した後の線虫増殖率)。増殖率は, 再変換した後対数で表示。シンボル上の縦棒は 95% 信頼区間を示す。

センチュウでは直線（1次関数）で、*Ap. composticola*では曲線（2次関数）で回帰できた（回帰分析、 $P<0.01$ ）。

（2）*Botrytis* の試験

無機態窒素の全生成量に及ぼす温度と線虫接種の影響のうち、温度の影響は有意でなく、温度への回帰は求められなかった（図10）。一方、線虫の主要効果は有意で、線虫を接種したカラムでは、接種しないカラム（対照区）より窒素生成量が有意に少なかった（Tukeyの多重比較検定、 $P<0.01$ 、表6）。温度ごとに見ると、29℃では、ニセネグサレセンチュウ

ユウまたは *Ap. composticola* のカラムで、対照区より有意に窒素量が少なかったが、他の温度では、線虫を接種したカラムと対照区とで有意差がなかった（Dunnettの多重比較、 $P<0.01$ 、表5）。線虫増殖率に対する温度の主要効果、及び温度と線虫接種との相互作用が有意であった（ANOVA、 $P<0.01$ ）。ニセネグサレセンチュウと *Ap. composticola* のいずれでも、20℃で増殖率が最高になり、前者では15℃で、後者では29℃で最小になった（図11）。増殖率と温度との関係はニセネグサレセンチュウでは3次関数で、*Ap. composticola* では2次関数で回

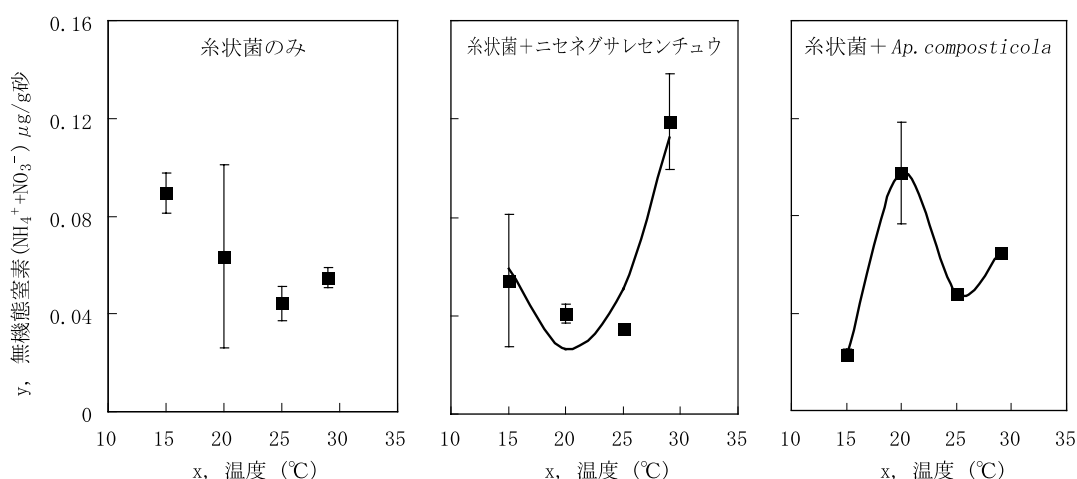


図8 *Rhizoctonia* の試験で検出された無機態窒素 ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) の21日間の総量に対する温度の影響

29℃のカラムのうち糸状菌+ニセネグサレセンチュウの1本と糸状菌+*Ap. composticola*の2本は、細菌が混入した可能性があったので統計分析から除外した。シンボル上の縦棒は標準誤差を示す。窒素量から温度への回帰曲線は糸状菌+ニセネグサレセンチュウと糸状菌+*Ap. composticola*で各々有意($P<0.05$)。次の式で表示できた。糸状菌+ニセネグサレセンチュウ： $y=0.4896-0.0454x+0.0011x^2$ ， $r^2=0.5519$ ，糸状菌+*Ap. composticola*： $y=-3.1061+0.4403x-0.0198x^2+0.0003x^3$ ， $r^2=0.7649$ 。ただし、 x は温度(℃)， y は窒素量(μg/g砂)。

表5 「菌のみ」と「菌+線虫^{a)}」の処理区（カラム）の無機態窒素量 ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) の比較

処理区	無機態窒素(μg/g砂) ^{b)}							
	<i>Rhizoctonia</i>				<i>Botrytis</i>			
	15℃	20℃	25℃	29℃	15℃	20℃	25℃	29℃
菌のみ	0.089	0.063	0.044	0.055	0.169	0.423	0.324	0.398
菌+ニセネグサレセンチュウ	0.054 (-0.035) ^{c)}	0.041 (-0.022)	0.035 (-0.009)	0.119 ^{d)} * (0.064)	0.186 (0.017)	0.059 (-0.364)	0.127 (-0.197)	0.149* (-0.249)
菌+ <i>Ap. composticola</i>	0.023* (-0.066)	0.097 (0.034)	0.048 (0.004)	0.064 ^{e)} (0.009)	0.075 (-0.094)	0.132 (-0.291)	0.070 (-0.254)	0.125* (-0.273)

a) 菌+ニセネグサレセンチュウ，菌+*Ap. composticola*。

b) 21日間に検出された窒素の総量。

c) 括弧内の数値は、「菌のみ」の窒素量から「菌+線虫」のそれを引いたもので、線虫が無機化した窒素の推定量を示す。負の値は「菌のみ」より「菌+線虫」の方が窒素量が少ないことを示す。

d) 3反復のうち、細菌の混入の可能性があった1反復を除外して統計分析した。

e) 3反復のうち2反復で細菌の混入の可能性があったので、統計分析しなかった。

注。*は「菌+線虫」の窒素量が対照区（「菌のみ」）と有意に異なることを示す（Dunnettの多重比較、 $P<0.05$ ）。

帰できた。

4. 考 察

温度は土壌生物の活動に影響を与える重要な要因の1つである。本研究では、*Rh. solani*と*Bo. cinerea*の菌糸生育速度と、これらの菌を摂食するニセネグサレセンチュウと*Ap. composticola*の増殖率及び、菌と線虫による砂培地中の窒素の無機化作用に対する温度の影響を実験的に調べた。

1) 菌糸生育と線虫増殖率に対する温度の影響

*Rh. solani*と*Bo. cinerea*は菌糸生育の最適温度が異なっていた。前者は25–29℃、後者は20–25℃で菌糸生育速度が最大になった(図5)。この結果は既存の報告と同様である(Blakeman 1980, Sherwood 1970)。線虫の増殖の最適温度も線虫種間で異なっていた(図6, 7)。ニセネグサレセンチュウのそれは28℃以上で、既存の報告と一致し

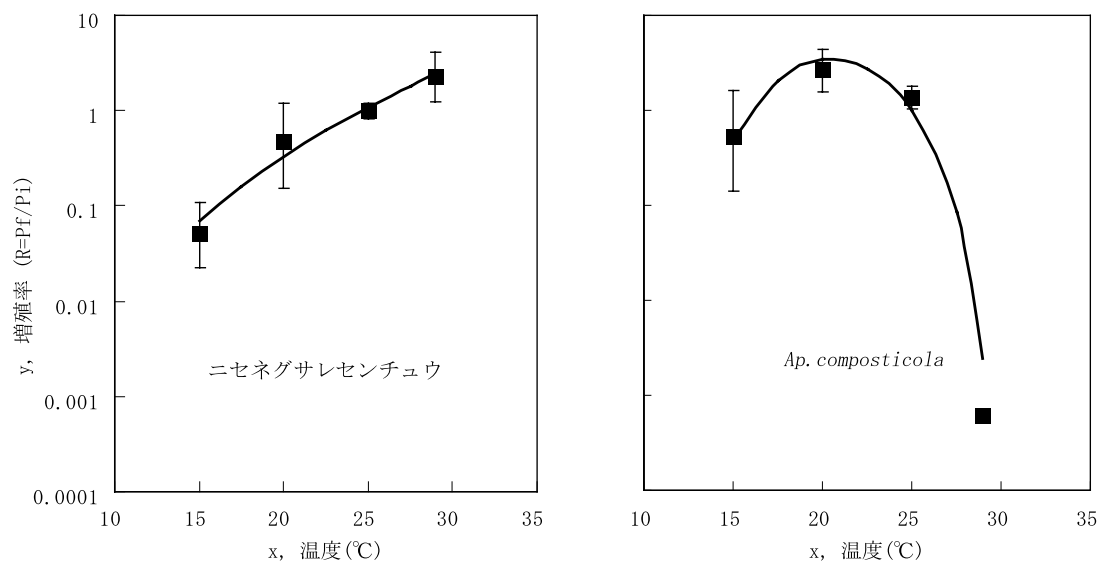


図9 *Rhizoctonia*のカラム試験におけるニセネグサレセンチュウと*Ap. composticola*の増殖率 ($R=Pf/Pi$) に対する温度の影響

線虫2種いずれについても、増殖率から温度への有意な回帰曲線が得られた ($P<0.05$)。ニセネグサレセンチュウ: $y = -0.0268 + 0.0418x$, $r^2 = 0.8593$, *Ap. composticola*: $y = -4.2263 + 0.5363x - 0.0131x^2$, $r^2 = 0.8581$ 。ただしxは温度 (°C), yはべき乗変換後の線虫増殖率で、再変換後に対数で表示。縦棒は95%信頼区間を示す。

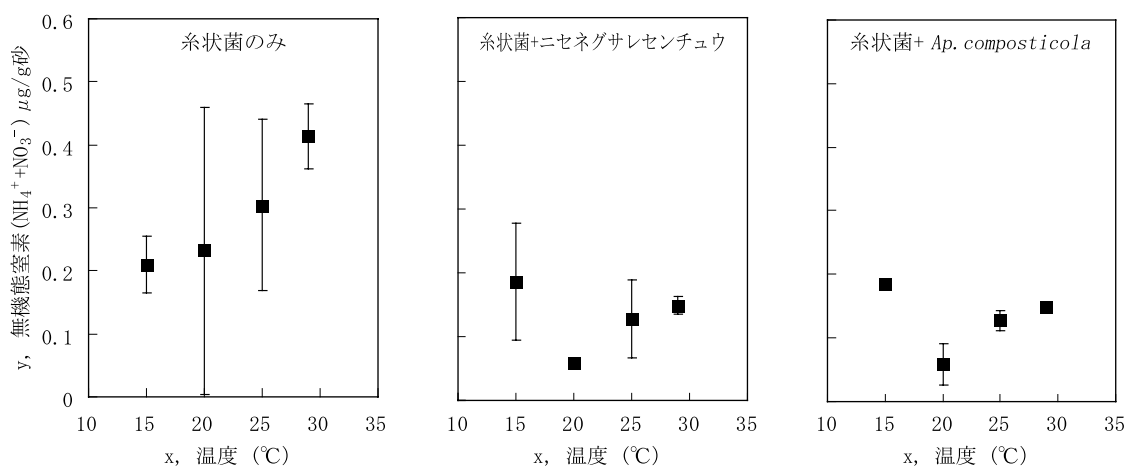


図10 *Botrytis*の試験で検出された無機態窒素 ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) の21日間の総量に対する温度の影響

糸状菌のみ、糸状菌+ニセネグサレセンチュウおよび糸状菌+*Ap. composticola*のいずれのカラムでも、窒素量から温度への有意な回帰曲線は得られなかった ($P>0.05$)。シンボル上の縦棒は標準誤差を示す。

た (Mendis・Evans 1983, Pillai・Taylor 1967a)。*Aphelenchoides* 属線虫の最適温度は種によって異なることが知られている (Huang *et al.* 1972, Rossner・Nagel 1984, Wallace 1960, Younes 1969)。今回得られた *Ap. composticola* の最適温度の 23℃ は、20℃とする他の報告 (Younes 1969) より若干高めであった。

2) 菌と線虫による窒素の無機化作用に対する温度の影響

(1) *Rhizoctonia* の場合

カラム内で生成される無機態窒素の量に対する温度の影響は、菌のみの区と、菌＋線虫の区とで異なった。菌のみの区では、15－29℃の範囲の温度は窒素の生成量に影響しなかった (図8)。すべての

表6 *Botrytis* の試験における無機態窒素量 (NH_4^+ + NO_3^-) に対する線虫接種の主要効果

処理区	無機態窒素 ($\mu\text{g/g}$ 砂) ^{a)}
菌のみ	0.329a
菌＋ニセグサレセンチュウ	0.130b
菌＋ <i>Ap. composticola</i>	0.100b

a) 4つの温度区の各3反復のデータをプールし、1処理区12反復として分析。

注. 同じ英文字を付けた値には有意差がない (Tukey の多重比較, $P>0.05$)。

カラムで、内部の有機物 (アルファルファとセルロース)、及び接種源の菌は均一に分布していたと考えられる。従って、どの温度でも菌糸が速やかに生育し、菌量の実験開始後速やかにカラムの収容限界に達した可能性がある。糸状菌による窒素の無機化作用は、菌糸の生育速度と生育程度に影響されと考えられるので、菌量が収容限界に達すると、菌による無機化も一定となり、結果として、温度間での窒素量の違いが出なかった可能性がある。一方、菌と線虫をともし入れた区では、窒素量に対する温度の影響が有意であった。すなわち、ニセグサレセンチュウのカラムでは 29℃ で、*Ap. composticola* のカラムでは 20℃ で窒素量が最大になった。これらの温度は、カラム内での各々の線虫の増殖率の最適温度 (図9) に一致する。さらに、29℃ という温度は、シャーレ試験におけるニセグサレセンチュウの増殖の最適温度にも一致している。一方、20℃ という温度は、*Ap. composticola* のシャーレ試験における 23℃ よりも少し低い。この違いは、カラムで 50 頭/g 砂、シャーレで 1 頭/g 砂という接種頭数の違いが影響したためかもしれない。25℃ のカラムでは、試験期間の途中で線虫密度が収容限界に達し、その後密度が低下したために、最終的には 20℃ より密度が下がったのであろう。以上の結果から、線虫増殖の最適温度で無機態窒素量

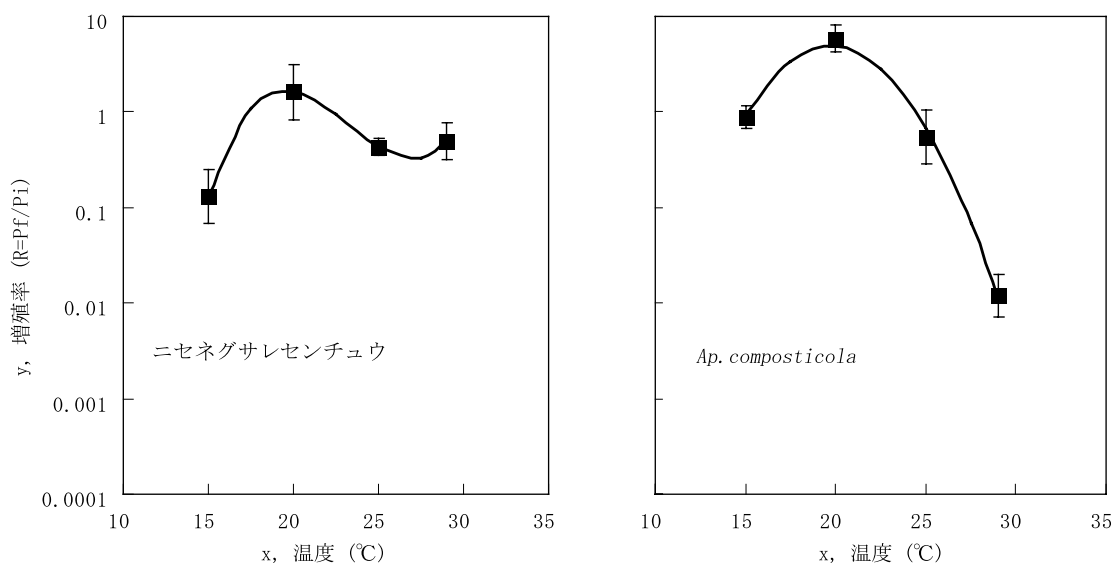


図11 *Botrytis* のカラム試験におけるニセグサレセンチュウと *Ap. composticola* の増殖率 ($R=Pf/Pi$) に対する温度の影響

線虫2種いずれについても、増殖率から温度への有意な回帰曲線が得られた ($P<0.05$)。ニセグサレセンチュウ: $y = -40.136 + 5.4505x - 0.2407x^2 + 0.0035x^3$, $r^2 = 0.8476$, *Ap. composticola*: $y = -11.4462 + 1.2271x - 0.0310x^2$, $r^2 = 0.9734$ 。ただし x は温度 (°C), y は対数変換後の線虫増殖率で再変換後に対数で表示。縦棒は95%信頼区間を示す。

が最大になったのは、糸状菌菌糸に対する線虫の摂食圧がその温度で最大になり、結果として、菌糸の中に蓄えられた有機態窒素の無機化が最大になったためであると考えられる。結論として、糸状菌による有機物分解系では、糸状菌食性線虫の増殖を通して間接的に温度が窒素の無機化量に影響すると考えられる。

(2) *Botrytis* の場合

菌のみ及び、菌と線虫をとともに入れたからカラムのいずれでも、無機態窒素量に対する温度の影響が有意でなかった(図10)。菌のみのカラムで、15–25℃の温度が窒素量に影響しなかったのは、この温度範囲で菌糸生育速度がほとんど同じであったためと考えられる(図5)。興味深いことに、*Bo. cinerea*の菌糸がほとんど生育しない29℃でもいくらかの窒素が検出された。これは、死んだ菌体や他の有機物が高温で加水分解したためと考えられる。菌と線虫を入れたカラムでは、後述のように、線虫による窒素の無機化作用は小さいため、温度による窒素量の違いが検出できなかったと考えられる。

3) 糸状菌による有機物分解系で糸状菌食性線虫は窒素の無機化に貢献するか？

今回の試験では、*Rh. solani* + ニセネグサレセンチュウの29℃の試験区を除き、菌 + 線虫の試験区で、菌のみのそれより窒素生成量が有意に多くなることはなかった。Chen・Ferris(1999)は、*Rh. solani* + ニセネグサレセンチュウや *Rh. solani* + *Ap. composticola*の試験区で、菌のみのそれより多くの窒素が検出されたと述べている。しかし、微生物 + 線虫の試験区と微生物のみのそれとの窒素量の差として推定される、無機態窒素生成への線虫の貢献度は、一般的には糸状菌食性線虫の方が細菌食性線虫より小さい(Ferris et al. 1998, Ingham et al. 1985)。その原因の一部は各々の生物の身体のC/N比の違いにあると考えられる。餌の微生物のC/N比より線虫のそれが大きいことは、微生物と同じ量の炭素で線虫の体をつくる場合に必要とする窒素が、微生物より少なくてすむことを意味する。微生物を摂食して獲得した窒素のうち、過剰な分を排出することで、線虫が土壌中の窒素増加に貢献すると考えられる。細菌食性線虫の身体のC/N比は6/1程度で、餌の細菌の4.5/1より大きいため、線虫は過剰な窒素を土壌中に多く排出する(Ferris et al. 1997)。一方、糸状菌食性線虫のC/N比は平均

9.5/1で、餌糸状菌の9/1に近い。従って、過剰分として排出できる窒素量は少ない(Chen・Ferris 1999, Griffin 1972)。無機態窒素生成への線虫の貢献度が小さかった他の原因には、実験に用いたカラムの環境が線虫の増殖に不適だったことがあげられる。今回の実験では、線虫種 – 糸状菌種 – 温度のすべての組合せにおいて、シャーレよりカラムの方で線虫の増殖率が低かった。最終的な線虫密度もカラムの方が低かった。例えば、20℃の *Rhizoctonia* 試験のニセネグサレセンチュウと *Ap. composticola* のカラムでの密度は各々28.8, 142.7/g砂で、シャーレでは214.4, 277.9/g砂であった。カラムでの密度が低かったのは、頻繁に行った溶出によって砂培地が過剰に湿っていたことによる可能性がある。

窒素生成への線虫の貢献が小さかったもう一つの原因として、カラムに入れた有機物のC/N比が考えられる。Chen・Ferris(1999)によると、カラムに入れた有機物のC/N比が大きくなると、菌のみを入れたカラムでは窒素生成量が小さくなった。この原因は、炭素に比べて窒素が少なくなると、いったん無機化された窒素のうち再び糸状菌に取り込まれてしまう量が増え、結果的にカラムで検出される無機態窒素量が減るためと考えられる。一方、線虫をとともに入れたカラムでは、有機物のC/N比によらず線虫が窒素を無機化するが、線虫自身は菌と異なり無機態窒素の再吸収を行わないため、カラム内の無機態窒素の量は大きいままで、結果として線虫による無機化の割合が高まったと考えられる。今回の実験では、線虫が無機化する窒素の量を測定可能なレベル以上に増やすため、有機物(アルファルファとセルロース)のC/N比を35/1と高めに設定した。しかし実際は、線虫による無機化量は小さかった。有機物のC/N比をさらに高く設定していれば、より多くの窒素を検出できた可能性がある。しかしその場合は、線虫が無機化した窒素が再び菌に取り込まれる前に検出する必要があり、そのため、窒素の測定間隔を今回(3日に一度)より短くしなければならない。無機態窒素生成への糸状菌食性線虫の貢献度が高まる条件とは、線虫と糸状菌いずれの増殖率も最高になるような条件であると考えられるが、その証明実験を行うには実験系(装置)に更なる工夫が必要である。

新たに糸状菌食性が発見された *Filenchus* 属線虫

1. 緒 言

Tylenchida 目線虫では, Anguinidae 科や Neotylenchidae 科で糸状菌食性の種が知られるが, Tylenchidae 科では糸状菌食性種の存在について見解が分かれていた。このことは, 窒素循環等の土壤生態系の機能の研究や, 環境指標としての線虫群集の利用研究において問題になっている。なぜなら, Tylenchidae 科の線虫は農耕地から森林までの様々な土壤環境において, 線虫群集の中の優占群であるためである。Tylenchidae 科の線虫が植物根を摂食することは確認されているが (Sutherland 1967, Wood 1973a), 糸状菌菌糸を摂食することは完全には証明されていない。

このような状況の中で, 著者は福島県福島市で, 稲藁堆肥中に生息する Tylenchidae 科の1種が糸状菌菌糸を摂食することを発見した (図12)。糸状菌を摂食する線虫としての本種の研究により, Tylenchidae 科の生態に関する貴重な情報が得られると期待された。そこでまず, この線虫の形態を精査して *Filenchus misellus* と同定した。次に, この線虫に9種10株の糸状菌をPDA上で摂食させた場合の増殖率, 体サイズ及び性比を測定し, 餌として好適な糸状菌種を明らかにすることで, 糸状菌食性線虫としての本種の特徴を把握しようとした。その際, 仮説として, 餌として好適な糸状菌を摂食した場合, この線虫は増殖率が高く, 体サイズが大きく, 性比が雌に偏ると考えた。また, 今回の試験では *Fi. misellus* のほかに, 農耕地に普通に生息する糸状菌食性線虫, すなわち, 本稿Ⅱ, Ⅲで試験に用いたニセネグサレセンチュウ (*Ap. avenae*) についても同様の調査を同時に行った。その理由は, ニセネグサレセンチュウが Aphelenchida 目の Aphelenchidae 科に属し (Hunt 1993), *Fi. misellus* (Tylenchida 目, Siddiqi 2000) とは分類学的に大きく異なるためである。さらにこの2種の線虫は, 生息地選好性も互いに異なる (Walker 1984, Geraert 1991, Hännel 2000)。従って, ニセネグサレセンチュウと比較することで, *Filenchus* 属線虫の生態学的特性をより鮮明にできると期待した。また, 2種の線虫の生息地選好性の違いを, 今回用いた糸状菌種の生息地の違いによって説明しようと試みた。



図12 寒天培地上で糸状菌菌糸を摂食するTylenchidae 科線虫

白い矢印は菌糸を, 黒い矢印は線虫が産んだ卵 (4個) を示す。右下の黒い棒はスケール (100 μm)。

糸状菌食性線虫としての *Filenchus* 属線虫の生態を解明するためには, これらが自然条件下でも糸状菌食性を実現しているか否かを検討する必要がある。そのためには, 寒天ベースの人工培地であるPDAだけでなく, 土壤中でも, 糸状菌を摂食した場合の増殖の有無を調べる必要がある。そこで, 先述した福島市の稲藁堆肥由来 *Fi. misellus*, 及び日本の異なる地域の農耕地から採集した3種5系統の *Filenchus* 属線虫について, PDA 及び土壌を用いた培地での増殖性を調査した。先述の *Fi. misellus* とニセネグサレセンチュウとの比較試験の結果から, これら *Filenchus* 属の線虫はすべて, PDA 及び土壌の双方において, 植物病原性菌よりも腐性菌で良く増殖するとの仮説を立てた。実際の試験では, 稲藁堆肥由来の *Fi. misellus* 1系統, 農耕地由来の *Fi. misellus* 1系統, *Fi. discrepans* 3系統及び未記載種の *Filenchus* 属の1種 (*Filenchus* sp.) 1系統 (表7) について, 6, 7種類の餌糸状菌を与えた場合の菌種間, 及びPDAと土壌培地 (有機物の粉末を土壌に混入して作製) との間での線虫の増殖率を比較した。また, 稲藁由来の *Fi. misellus* 1系統について, *Chaetomium globosum* を餌糸状菌として使用した場合の増殖率を, 異なる種類と量の有機物を混入した土壌培地の間で比較した。その理由は, *Ch. globosum* を餌にした場合, PDAに比べ土壌培地で *Filenchus* 属線虫の増殖率が著しく低いことが予備試験で観察されたためである。増殖率が低かつ

表7 試験に供試した *Filenchus* 属線虫の系統

種	系統 ^{b)}	生息地	地域	採集時
<i>Fi. misellus</i>	1 ^{c)}	稲藁堆肥	福島市	2000年11月
<i>Fi. misellus</i>	2	イタリアンライグラス畑	都城市	2001年 3月
<i>Fi. discrepans</i>	1	大麦畑	福島市	2001年 5月
<i>Fi. discrepans</i>	2	大麦畑	福島市	2001年 5月
<i>Fi. discrepans</i>	3	ダイズ畑	福島市	2002年 7月
<i>Filenchus</i> sp. ^{a)}	1	リンドウ畑	盛岡市	2002年11月

a) 未記載種。

b) 各系統は、単為生殖の雌成虫1頭から確立した。

c) ニセネグサレとの比較試験で供試した系統。

た原因として、土壌培地に混入したダイズ粉末が、餌としての糸状菌菌糸細胞の養分組成を、線虫の発育にとって不適にした可能性がある。さらに、ベールマン漏斗で線虫を抽出する際の効率についても検討した。その理由は、培地上に生育させる餌糸状菌の種類及び培地の種類 (McSorley 1987) が抽出効率に影響し、その結果、糸状菌間や培地間での線虫増殖率の比較を不正確にする可能性があるためである。

2. 稲藁堆肥中から発見された *Filenchus* 属線虫の形態

1) 材料と方法

福島市の東北農業試験場構内の稲藁堆肥置き場で2000年10月に採集した糸状菌食の *Filenchus* 属線虫を65℃で熱殺し、Seinhorst (1959) の方法によってTAF溶液で固定し、無水グリセリン溶液に移した。さらにグリセリン封入の永久プレパラートを作製し、雌21頭、雄5頭について、生物顕微鏡下で倍率200-1000で形態の観察及び計測を行った。

2) 結果と考察

雌の体は熱殺時に腹側にやや湾曲した (図13)。体長は340-400 μm であった (表8)。頭部は、円錐の先端を切断したような形状で、口針は微細であった (長さは平均7.2 μm)。中部食道球の直径は、その位置の体幅の約半分であった。後部食道球の形態は洋梨状で、食道に重ならなかった。尾は、長い円錐型をしていた。側帯には4本の側帯溝が認められた。体環は微細で幅が1 μm 以下、受精嚢は円形でオフセット型であった。V値は平均69.2%，後部子宮枝の長さは、陰門部位の体幅より短かった。雄は、雌とほぼ同じ形態的特徴を有していた (図13)。体長は316-340 μm であった。交接刺はやや湾曲していた。精子は原形質をほとんど含まず、直径2 μm 以下であった。形態値の測定の結果

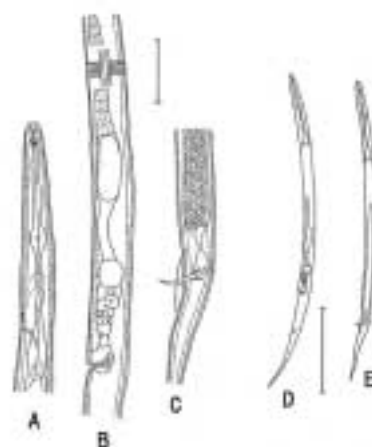


図13 稲藁堆肥から採集された線虫の形態

A：雌成虫の食道部； B：雌成虫の卵巣及び陰部；

C：雄成虫の交接刺周辺部； D：雌成虫の全身；

E：雄成虫の全身

スケールは、A、B、Cの上部にあるものは20 μm 、DとEの下部にあるものは100 μm を示す。

(表8)、稲藁堆肥から採集された線虫個体群の雌の形態値は、Brzeski (1997) が測定した *Filenchus misellus* (Andrássy 1958) Lownsbey & Lownsbey, 1985 の22個体群と同じものが多かった。体長と尾長、頭部末端から排泄孔までの距離及びTail/V-a比は、稲藁の個体群の方がBrzeski (1997) の22個体群の平均値より10%大きい、稲藁の個体群の値はいずれも、Brzeskiの個体群の最大値よりも小さかった。Brzeski (1997) は *Fi. misellus* の雄の形態には言及していないが、雌の形態的特徴と形態の諸測定値がBrzeski (1997) のそれとほとんど一致するため、堆肥の線虫個体群は、*Fi. misellus* であると結論された。

表8 稲藁堆肥で採集した *Filenchus misellus* (Andrássy, 1958) と Brzeski (1997) が調査した *Fi. misellus* 個体群の形態測定値

	稲藁堆肥の個体群								Brzeski (1997) の22個体群			
	雄 (N=5)				雌 (N=21)				雌			
	平均	S.E.	最小	最大	平均	S.E.	最小	最大	平均 ^{a)}	S.E. ^{b)}	最小 ^{c)}	最大 ^{d)}
L (体長, μm)	330.4	5.2	316	340	357.7	3.6	340	400	320	11.4	264	371
L' (頭部先端～肛門の距離, μm)	268.6	5.1	255	280	294.4	3	281	330	269	8.7	228	310
a (体長÷最大体幅)	34.9	0.2	34	35	27.6	0.5	23.9	31.3	28.6	0.8	24.6	32
b (体長÷食道長)	4.1	0.1	3.9	4.3	4.5	0	4.2	4.8	4.1	0.1	3.7	4.5
c (体長÷尾長)	5.3	0.1	5.2	5.7	5.7	0	5.3	5.9	6.1	0.3	4.9	7.3
c' (尾長÷肛門部体幅)	7.9	0.2	7.4	8.5	7.9	0.1	7.3	9	7.5	0.5	5.2	10
V (頭部先端～陰門の距離÷L, %)	—	—	—	—	69.2	0.2	67	70.9	69	0.9	65	73
V' (頭部先端～陰門の距離÷L', %)	—	—	—	—	84	0.2	81.4	85.5	82.6	0.4	81	84.4
T (精巢長÷L, %)	39.2	1.2	36	43	—	—	—	—	—	—	—	—
口針長 (μm)	6.8	0.2	6.4	7.2	7.2	0.1	6.4	8	6.8	0.2	6	7.5
食道長 (μm)	80.8	0.5	80	82	80.2	0.8	73.6	88	77.9	2.1	72	89
MB (頭部先端～中部食道球中心の距離÷食道長, %)	48.5	0.8	46	51	46.6	0.3	43.9	49.1	44.6	0.1	44	45
頭部先端～食道腺開口部の距離 (μm)	60	1.2	57	64	61.3	0.7	53.6	68	53.5	1.5	47	61
H-v (頭部先端～陰門の距離, μm)	—	—	—	—	247.4	2.6	234	277	—	—	—	—
V-a (陰門～肛門の距離, μm)	—	—	—	—	47	0.7	42	54	—	—	—	—
交接刺長 (μm)	13.2	0.2	13	14	—	—	—	—	—	—	—	—
副刺長 (μm)	3.8	0.2	3.2	4	—	—	—	—	—	—	—	—
尾長 (μm)	61.8	0.7	60	64	63.3	0.8	58	72	54.3	3.4	36	66
Tail/V-a (尾長÷V-a)	—	—	—	—	1.4	0	1.1	1.5	1.2	0.04	1	1.4
頭部先端～頸突起の距離 (μm) ^{e)}	64	0	64	64	67.7	0.9	62.4	75.2	—	—	—	—

a) 22個体群の平均値。

b) Brzeski (1997) に示されていた標準偏差 (S.D.) から計算。

c) 最小平均値。

d) 最大平均値。

e) 雄では3, 雌では18個体でのみ測定。

3. *Fi. misellus* とニセネグサレセンチュウの増殖, 体サイズ, 性比に対する餌糸状菌種の影響

1) 材料と方法

(1) 供試した線虫と糸状菌

試験に用いた *Fi. misellus* は, 稲藁堆肥から採取した単為生殖雌成虫1頭を起源とする系統を用いた。また, 比較のため, 東北農業試験場畑病害研究室から提供されたニセネグサレセンチュウの福島系統も試験に用いた。供試した餌糸状菌は9種10株で, 担子菌の *Agaricus bisporus*, *Coprinus cinereus*, *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ), 子囊菌の *Chaetomium cochlioides*, *Chaetomium funicola*, *Ch. globosum*, 植物病原菌の *Fu. oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Py. ultimum*, *Rh. solani* である。このうち, 植物病原菌4株は, 第2章で示したように, Aphelenchida 目の *Aphelenchus* 属や *Aphelenchoides* 属線虫の増殖に適した菌である。*Ag. bisporus* と *Pl. ostreatus*

は, *Fi. misellus* と同じ Tylenchida 目に属する他種の線虫がよく増殖することが知られている (Cayrol 1962, Tsuda・Futai 2000)。ただし, *Pl. ostreatus* は線虫捕食菌としても知られている (Thorn・Barron 1984)。*Co. cinereus* と *Chaetomium* 属の3株は, *Fi. misellus* を最初に採集した稲藁堆肥中に生息していた。*Ag. bisporus*, *Co. cinereus*, *Pl. ostreatus*, *Ch. cochlioides* 及び *Ch. funicola* は, 各々 IFO30774, IFO30628, IFO30776, IFO30576, IFO31835 として財団法人発酵研究所から提供された。他の糸状菌株は東北農業試験場畑病害研究室から提供された。

(2) 増殖率の測定

Rh. solani を餌として *Fi. misellus* とニセネグサレセンチュウを培養後, 各々を無菌条件下で抽出した。一方, 10倍希釈の PDA 培地 (寒天濃度 1.5%) を 10ml 分注した直径 90 mm のガラスシャーレに, 糸状菌 10 株のいずれか 1 つを接種して菌叢を生育させた。菌叢がシャーレ全面に広がってから, 2 種

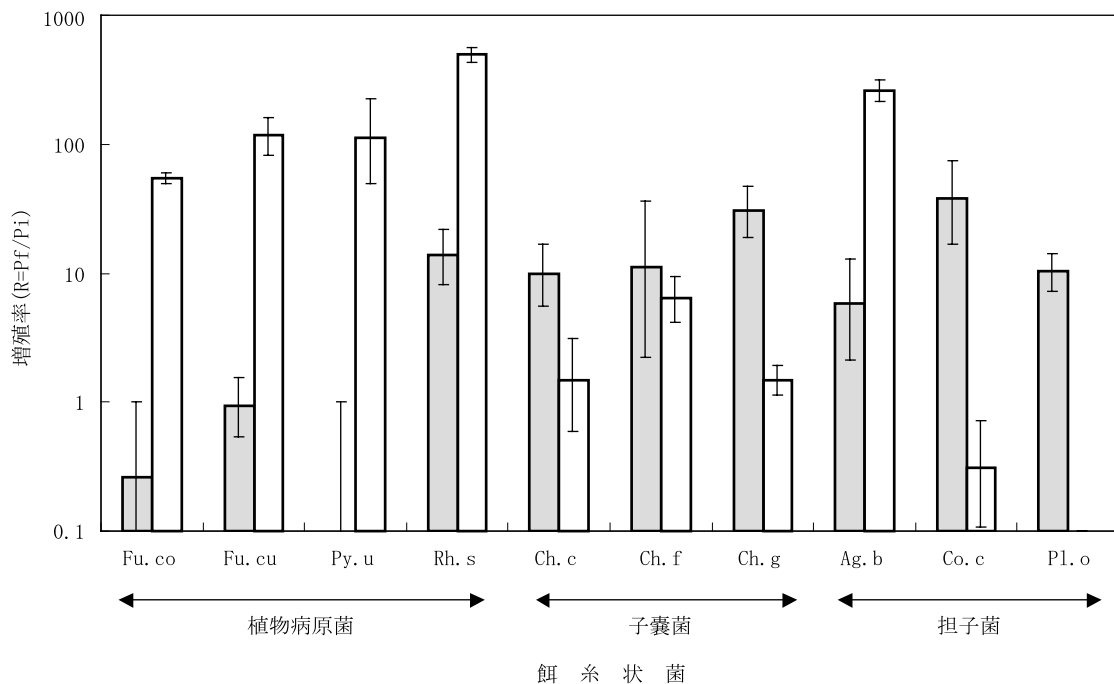


図 14 25℃で40日間糸状菌叢で培養した後の線虫の増殖率 (R=Pf/Pi)

網掛けは*Fi.misellus*, 白抜きはニセネグサレセンチュウを示す。Fu.co, Fu.cu, Py.u, Rh.s, Ch.c, Ch.f, Ch.g, Ag.b, Co.c及びPl.oは、各々*Fu.oxysporum* f.sp. *conglutinans*, *Fu.oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *Py.ultimum*, *Rh.solani*, *Ch.cochlioides*, *Ch.funicola*, *Ch.globosum*, *Ag.bisporus*, *Co.cinereus* 及び *Pl.ostreatus* を示す。各増殖率における縦棒は、データを再変換した後の95%信頼区間を示す。

の線虫いずれかを、シャーレ1枚に30頭ずつ接種した。どの線虫-菌株の組合せについても4反復(シャーレ4枚)を用意した。シャーレを25℃, 24時間暗黒の条件に置き、40日後に線虫をバールマン漏斗で抽出した。シャーレごとに線虫個体数を調査し、増殖率 $R = Pf/Pi$ (Pfは抽出個体数, Piは接種頭数で30頭)を算出した。分散を等しくするためデータをべき乗変換した後、線虫増殖率に対する線虫種と菌株の影響を検討するため2元配置ANOVAを行った。

(3) 体サイズと性比の測定

増殖率の測定を終えた線虫について体サイズと性比を調査した。十分な個体数を得るため、各線虫種-菌株の組合せについて4反復分の材料を足し合わせて用いた。熱殺した線虫をSeinhorst (1959)の方法によってグリセリンに置換し、永久プレパラートを作製した。各線虫種-菌株の組合せについて、無作為に選んだ10頭の雌成虫の体長と最大体幅を顕微鏡下で測定した。また、性比を調査するため、42から100頭の成虫について、雄の個体数を記録した。体サイズについて、10個体の平均の体長及

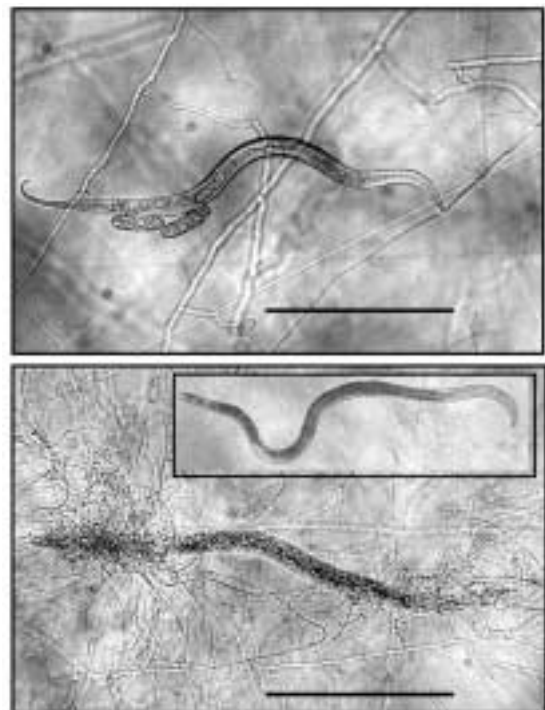


図 15 *Pl.ostreatus* の菌叢上における線虫の反応

上：菌糸を摂食して産卵する*Fi.misellus*。
下：菌糸に捕捉され摂食されるニセネグサレセンチュウ。捕捉される前の写真も示す。図中のスケールはいずれも100μmを示す。

び体幅と、線虫増殖率との間に有意な相関があるか、Spearmanの順位相関法で検定した。性比についても増殖率との間の相関の有無を調べた。

2) 結 果

(1) 線虫増殖率

増殖率に対する線虫種と菌株との間の交互作用が有意であった(ANOVA, $P < 0.001$)。 *Fi. misellus* では、 *Rh. solani* を除く全ての植物病原菌株で、40日後の線虫密度が接種密度(30頭/シャーレ)を下回り、増殖率が1より低くなった(*Fu. oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Py. ultimum* での増殖率は各0.26, 0.94, 0.0, 図14)。しかし、非病原性の菌株すべてで、増殖率は1を上回った($5.8 < R < 38$)。 *Fi. misellus* は、線虫捕食菌である *Pl. ostreatus* の菌糸をも摂食して、産卵、繁殖した(図15)。一方、ニセネグサレセンチュウでは、植物病原菌の4株と担子菌の *Ag. bisporus* で増殖率が高かった($R > 50$, 図14)。一方、子囊菌の3株(*Chaetomium* spp.) では増殖率は低いか中程度であった($1 < R < 7$)。また、担子菌2株、 *Co. cinereus* と *Pl. ostreatus* では増殖率が1未満であった(*Co. cinereus* では $R = 0.31$, *Pl. ostreatus* では0.0)。ニセネグサレセンチュウの幼虫と成虫は *Pl. ostreatus* の菌糸に捕捉、摂食され、まったく増殖できなかった(図15)。

(2) 体サイズと性比

Fu. oxysporum f. sp. *conglutinans*, *Py. ultimum* の試験区の *Fi. misellus* と、 *Co. cinereus*, *Pl. ostreatus* の試験区のニセネグサレセンチュウについては、得られた個体数が少なかったため、体サイズと性比の統計分析から除外した。 *Fi. misellus* では、増殖率と雌成虫の体長及び最大体幅との間に有意な相関は認められなかったが(図16, $P > 0.05$)、線虫増殖率 R が0.94と低かった *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* では得られた成虫の体長が最小(平均 $325 \mu\text{m}$)で、増殖率が最高であった *Co. cinereus* から得られた線虫は体長も最大であった(平均 $412 \mu\text{m}$)。一方、ニセネグサレセンチュウでは、体長と最大体幅のいずれもが線虫増殖率と有意な相関があった(図17, $P < 0.05$)。増殖率が最高の *Rh. solani* では、線虫の体長($573 \mu\text{m}$)と体幅($25 \mu\text{m}$)も最大になった。一方、増殖率が最低だった *Ch. cochlioides* では体長($480 \mu\text{m}$)と体幅($19 \mu\text{m}$)も最小であった。

Fi. misellus 成虫の性比は、餌糸状菌株の種類に

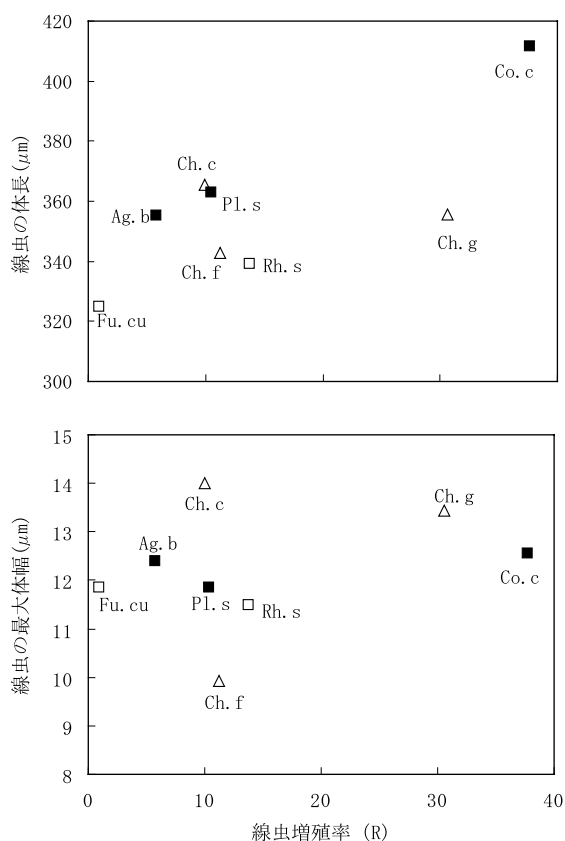


図16 *Fi. misellus* における増殖率と体長(上)および最大体幅(下)との関係

菌の名前の表示は図14と同じ。□が植物病原菌、△が子囊菌、■が担子菌。線虫標本の数不足していたので *Fu. oxysporum* f. sp. *conglutinans* と *Py. ultimum* でのデータは統計分析から除外した。増殖率は各糸状菌における4反復のデータの平均で示す。増殖率と体長及び最大体幅との間には有意な相関がない(体長, Spearmanの順位相関係数 $\rho = 0.429$, $P > 0.05$; 体幅, $\rho = 0.084$, $P > 0.05$)。

より7-21%まで変化したが、それと増殖率との間には有意な相関が認められなかった($P > 0.05$, 図18)。ニセネグサレセンチュウでは、どの菌株でも雄がまったく出現せず、性比はゼロであった。

3) 考 察

(1) 線虫の餌としての糸状菌

増殖率から判断すると、 *Fi. misellus* にとって良い餌は *Chaetomium* 属の子囊菌、供試した全ての担子菌(*Ag. bisporus*, *Co. cinereus*, *Pl. ostreatus*)及び植物病原菌の *Rh. solani* であった(図14)。対照的に *Fusarium* 属と *Pythium* 属の植物病原菌は不適な餌であった。増殖率と体長との相関は有意ではなかったが、他の菌の試験区で得られた線虫より *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* で培養した線虫

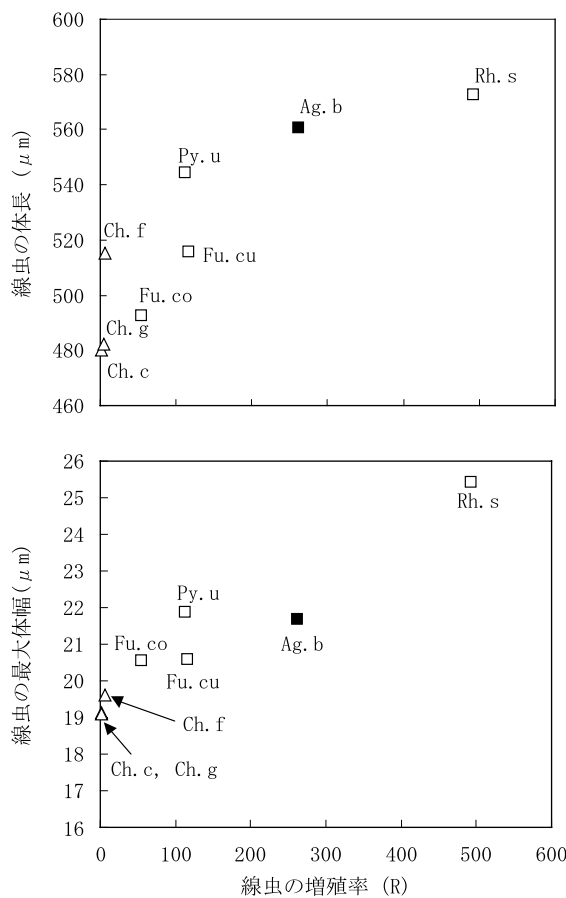


図 17 ニセネグサレセンチュウにおける増殖率と体長（上）及び最大体幅（下）との関係

菌の名前の表示は図14と同じ。□が植物病原菌、△が子囊菌、■が担子菌。線虫標本の数不足していたので、*Co. cinereus* と *Pl. ostreatus* のデータは統計分析から除外した。増殖率は各糸状菌における4反復のデータの平均で示す。増殖率と体長（Spearman の順位相関係数 $\rho=0.952$, $P<0.05$ ）、増殖率と体幅（ $\rho=0.905$, $P<0.05$ ）のいずれの間にも有意な正の相関がある。

の方が体長が小さく、反対に、*Co. cinereus* や *Ch. globosum* で培養した線虫は大きかった（図16）。一方、線虫の体幅も増殖率と有意な相関がなかったが（図16）、これは、体内に卵を保持していた線虫の体幅が、餌の菌株の種類によらず他の個体より大きかったためである可能性がある。

増殖率、線虫の体長と体幅の傾向から判断して、ニセネグサレセンチュウにとっての良い餌菌株は植物病原菌の4株すべて（*Fu. oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Py. ultimum*, *Rh. solani*）と担子菌の *Ag. bisporus* であった（図14, 17）。一方、*Chaetomium* 属の子囊菌と、*Coprinus* 属、*Pleurotus* 属の担子菌は不適

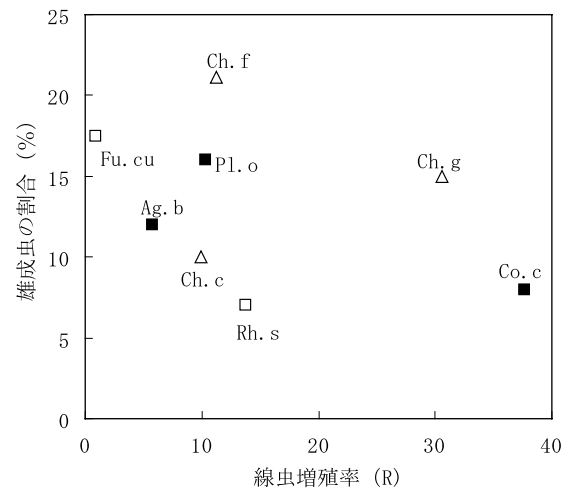


図 18 *Fi. misellus* における増殖率と性比（全成虫に占める雄成虫の割合）との関係

菌の名前の表示は図14と同じ。□が植物病原菌、△が子囊菌、■が担子菌。線虫標本の数不足していたので、*Fu. oxysporum* f. sp. *conglutinans* と *Py. ultimum* でのデータは統計分析から除外した。増殖率は各糸状菌における4反復のデータの平均で示す。増殖率と性比には負の相関があるが有意でない（Spearman の順位相関係数 $\rho=-0.405$, $P>0.05$ ）。

な餌と考えられた。Mankau・Mankau (1963) は、*Pythium* 属を除く植物病原菌の多くはニセネグサレセンチュウにとって良い餌であるが、腐生菌の多くは不適な餌であると示唆した。今回の試験結果はその指摘とおおむね一致する。*Pythium* 属菌についても、ニセネグサレセンチュウにとって良い餌であるとの報告があり（Townshend 1964）、*Pythium* 属菌で増殖率が高かったとする今回の結果は妥当と考えられる。

植物寄生性線虫では、抵抗性品種等不適な餌植物に寄生すると雄成虫が増えて増殖率が低下する一方、感受性品種等好適な餌では逆に雌が増えて増殖率が高くなることが知られている（Dropkin 1959, Sano et al. 1983）。しかし、今回の試験で用いた糸状菌食性の *Fi. misellus* については、性比と増殖率との間に有意な相関が検出されなかった（図18）。これは、線虫の培養期間が40日と短く、餌菌株の種類に応じて線虫の性比が十分変化しなかったためである可能性がある。ニセネグサレセンチュウでは菌株の種類によらず雄成虫がまったく出現しなかった。これは他の研究者の報告とも一致する（Townshend 1964）。ニセネグサレセンチュウでは、餌糸状菌の種類よりも、培養温度等の物理的条件の

方が雄の出現に大きく影響するためと考えられる (Hansen *et al.* 1972)。

(2) 線虫にとっての *Pl. ostreatus* 菌は敵か餌か?

Pl. ostreatus の菌糸は、Rhabditidae 科や Parasitaphelenchidae 科の線虫を捕食することが知られている (Thorn・Barron 1984, Mamiya 1997)。また、Iotonchiidae 科の線虫は、本菌の子実体を摂食するが、菌糸には逆に捕食される (Tsuda・Futai 2000, 津田私信)。*Pl. ostreatus* の菌糸は ostreatin と呼ばれる毒物質を分泌し、線虫を麻痺させ (Barron・Thorn 1987)、菌糸にある粘着突起で線虫を捕捉し、消化する (Saikawa・Wada 1986)。今回の試験でも、ニセネグサレセンチュウは本菌の菌糸に捕らえられて摂食されたため (図 15)、線虫の増殖率はゼロになった (図 14)。対照的に *Fi. misellus* は本菌の菌糸を摂食し (図 15)、増殖した (図 14)。従って、*Pl. ostreatus* は *Fi. misellus* にとって好適な餌であると同時に、ニセネグサレセンチュウにとっては捕食者であると言える。おそらく、*Fi. misellus* は本菌が分泌する毒物質に対する耐性を持つのであろう。*Fi. misellus* とニセネグサレセンチュウの、*Pl. ostreatus* に対する異なった捕食-被捕食関係は、これら 2 種の線虫の生息地選好性に影響を与えている可能性がある。このような捕食-被捕食関係は、*Fi. misellus* が Tylenhida 目、ニセネグサレセンチュウが Apelemchida 目というように、2 種の線虫が属する系統の特性の違いに起因するかもしれない興味深い属性である。

(3) 餌糸状菌及び線虫の生息地

線虫の餌としての糸状菌の好適性と糸状菌の生理生態的特性から、*Filenchus* 属線虫と *Aphelenchus* 属線虫の生息地選好性の違いを説明できる可能性がある。まず、マイクロハビタット (1 筆の畑等) のレベルでは、土壤有機物の豊富な畑に *Filenchus* は *Aphelenchus* より多く生息すると予想される。なぜなら、*Filenchus* は、植物体のセルロースやリグニンの分解者として知られる *Agaricus*, *Chaetomium*, *Coprinus*, *Pleurotus* 及び *Rhizoctonia* (Hayes 1978, Kurtzman 1978, Stevens 1981, Domsch *et al.* 1993, Dix・Webster 1995) でよく増殖するからである。生きた植物が存在しない土壤に植物残差を鋤込んだ後、*Filenchus* が *Aphelenchus* よりも著しく

密度が高くなったという McSorley・Frederick (1999) の報告がこの予想を支持している。ただし、*Filenchus* のマイクロハビタット選好性を明確にするには、この属の線虫の植物食性の有無についても検討する必要がある。なぜなら、この属が含まれる Tylenchidae 科のある属には植物根を摂食する線虫がいることが知られているためである (Sutherland 1967, Wood 1973a)。

農耕地、草原、森林といったマクロハビタットのレベルでは、*Filenchus* はどの環境にも生息し (Geraert 1991, Ruess 1995, Hännel 2000)、一方、*Aphelenchus* は主に農耕地と草原に生息地が限られることが知られている (Walker 1984, Yeates *et al.* 1997)。このような線虫の生息地の違いは、今回の試験で用いた菌株の生息地選好性で説明ができる (図 19)。*Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* は一般的に、森林よりも農耕地や草原に生息する (Clarke・Christensen 1981, Walker 1984, Domsch *et al.* 1993, Watanabe 1994)。*Agaricus* 属には森林に生息する種もいるが、*Ag. bisporus* はやはり農耕地や草原に多い (Phillips 1991)。*Chaetomium* と *Coprinus* は農耕地から森林まで広く生息する (Burgess 1965, Phillips 1991)。従って、*Filenchus* はどの環境にも、*Rhizoctonia*, *Agaricus*, *Coprinus*, *Chaetomium*, *Pleurotus* といった好適な餌糸状菌を持つが、*Aphelenchus* は *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Agaricus* といった好適な餌を農耕地と草原にしか持たない。このような説明は、*Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* といった

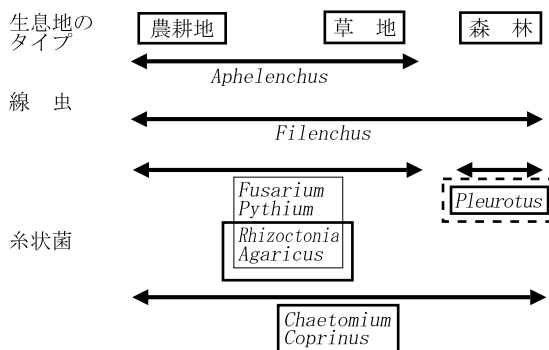


図 19 糸状菌と線虫の生息地の概念図

細線および太線で囲った糸状菌は、各々ニセネグサレセンチュウ (*Ap. avenae*) と *Fi. misellus* にとって好適な餌であることを示す。点線で囲った糸状菌はニセネグサレセンチュウに対する捕食者。

Aphelenchus にとっての好適な餌糸状菌が多い小麦畑でこの線虫の密度が高く、好適な菌が少ない森林で逆にこの線虫が少ないという Walker (1984) の報告によっても支持される。今回の試験結果は、森林に *Aphelenchus* が少ない原因としてもう一つの要因があることを示唆している。つまり、線虫捕食菌 *Pl. ostreatus* の存在である。この菌やその近縁種の菌は森林に普通に生息しており (Barron・Thorn 1987)、その菌糸で *Aphelenchus* を摂食し (図 15)、この線虫の森林での生存率を下げている可能性がある。対照的に *Filenchus* は *Pleurotus* を摂食することができる。このことは、森林に *Filenchus* が生息する事実と矛盾しない。*Pleurotus* 属の菌と線虫との生態学的な関係は、今回の試験で明らかになったように、線虫の種類によって異なる。森林に普通に見られる線虫属の 1 つ、*Aphelenchoides* の場合、*Pleurotus* 属菌との関係は中立であるようだ。なぜなら、この線虫を菌が生育する培地に入れると、単に動き回るかコイル状に体を丸めるだけで菌を摂食しないし、また、菌も線虫を摂食しないためである (岡田 未発表)。森林土壌中の食物網構造を分析するためには、各線虫分類群と *Pleurotus* 属菌との関係を明らかにする必要がある。

4. *Filenchus* 属線虫 3 種 6 系統の増殖に及ぼす培地と糸状菌種の影響

1) 材料と方法

(1) 線虫、糸状菌及び培地

表 7 に示す 6 系統の線虫を用いた。種の同定は、稲藁由来の *Fi. misellus* について行ったのと同様に、標本を作製して形態値を測定し、Brzeski (1997) 等の検索表に基づいた。新種と考えられる *Filenchus* 属線虫の 1 種 (以下、*Filenchus* sp. と表示) は、体長が小さい (雌成虫 10 個体の平均で 318.7 μ m)、尾が長い (70.0 μ m)、a 値 (体長を最大体幅で割った値) が小さい (23.3) という形態的特徴を有する。これを含め、試験に用いた 6 系統の線虫 (表 7) はすべて、供試する直前に *Rh. solani* を餌にして培養した。試験に用いた餌糸状菌は次の 6 種である。うち 4 種は腐生菌で [*Rh. solani*, *Co. cinereus*, *Pl. ostreatus* (以上担子菌), *Ch. globosum* (子囊菌)], 2 種が植物病原菌である [*Fu. oxysporum*, (不完全菌類), *Py. ultimum* (卵菌類)]。これらの菌を選んだ理由は、線虫増殖率の観点から、各菌が *Fi. misellus* にとって好適あるいは不適な餌である

ことが前回の試験で明らかにされているためである。これらの菌のうち、*Pl. ostreatus* (ヒラタケ) は Rhabditidae 科及び Aphelenchidae 科の線虫を摂食することが知られている (Thorn・Barron, 1984; 本稿Ⅳの 3)。また、*Rh. solani* は腐生菌の他、植物病原性菌としての性質も有する (Domsch et al. 1993)。腐生菌 *Flammulina velutipes* (担子菌) も、線虫を増殖させることが予備試験で判明していたので、*Filenchus* sp. の試験に供試した。供試菌のうち *Fu. oxysporum*, *Ch. globosum*, *Rh. solani* 及び *Py. ultimum* は東北農業試験場畑病害研究室から提供された。*Co. cinereus*, *Pl. ostreatus* 及び *Fl. velutipes* は独立行政法人製品技術評価機構の生物資源センター (千葉県木更津市) から、各々菌株番号 NBRC30628, NBRC30776, NBRC4901 として分譲された。

試験用の培地として次の 2 種類を用いた。その 1 つ「土壌培地」は、黒ボク土 (炭素含量 0.50, 窒素 0.09 %) にダイズを混入して作製した。ダイズを用いたのは、それが畑の緑肥として利用されているからである。実際には、風乾したダイズの鞘と茎 (炭素 47.1, 窒素 3.58 %) を 1 mm 以下の長さに切断して用いた。5 mm の目の篩を通した土壌 15 g にダイズ 45 mg をガラスシャーレ (直径 90 mm) 内で混ぜ合わせた。その地表にさらに 45 mg のダイズを振り播き、糸状菌の菌叢が土壌表面に一樣に生育するようにした。その後 8 ml の蒸留水を培地に加え、121 $^{\circ}$ C、30 分間のオートクレーブで滅菌した。*Filenchus* sp. の試験ではダイズが入手できなかったため、代わりに小麦のフスマを用いた。ダイズの場合と同様にして土壌に混入した。土壌培地の他に用いたのは、一般糸状菌培養用の PDA 培地 (Potato Dextrose Agar) であるが、濃度を通常の 1/10 にして用いた (寒天濃度 1.5 %)。実際には、2 g の PDA 粉末 (ニッスイ, 炭素 40.4, 窒素 0.63 %) と 6.75 g の寒天粉末 (和光製薬, 炭素 43.7, 窒素 0.10 %) を 500 ml の蒸留水に添加し、121 $^{\circ}$ C で 20 分間オートクレーブ滅菌して作製した。作製した培地はガラスシャーレに 10 ml ずつ分注した。

(2) 線虫の増殖率測定

線虫の系統、餌糸状菌種及び培地の種類が線虫の増殖率に及ぼす影響を調べるため、線虫の種類ごとに試験を行った。試験区を作るため、あらかじめ 7 種の菌のいずれかを生育させた PDA 培地の切片 1

cm²を、試験用シャーレ内の土壌培地と PDA 培地に接種した。一方、各系統の線虫を無菌条件下で抽出した。菌叢が培地全体を覆った後、各シャーレに、いずれかの線虫系統の 30 個体を接種した。*Fi. misellus* 及び *Fi. discrepans* の試験では、線虫系統、菌種及び培地の組合せ 1 つにつき 3 反復、*Filenchus* sp. の試験では 4 反復を設けた。シャーレは 25℃全暗条件に 46 日間置いた。その後線虫を抽出するために、シャーレ内の培地を、金網上の JK ワイパー (Kimberly-Clark) 上に置き、さらにそれをバールマン漏斗上に置いた。PDA 培地の場合、1 片 9 mm²以下に裁断してからワイパーに乗せた。25℃で 24 時間経過後、線虫を回収し個体数を調査した。シャーレごとに、線虫増殖率 (R) を抽出個体数/接種個体数 (30) として算出した。増殖率を対数変換した後、それに対する線虫の系統、糸状菌種及び培地の種類の影響を ANOVA で分析した。

(3) *Ch. globosum* を餌にした場合の線虫の増殖に及ぼす培地の影響

前回の試験で、PDA 培地上で *Ch. globosum* を摂食してよく増殖することが示された、稲藁堆肥由来の *Fi. misellus* の系統 1 を供試した。土壌培地に入れる有機物として、小麦フスマとダイズ鞘茎を用いた。さらに、寒天を除いた PDA 培地に栄養条件を合わせるため、PDB (Potato Dextrose Broth, Difco Laboratories) も有機物として、土壌培地に供試した。各有機物につき 45 mg を 15 g の土壌と混合し、さらに 45 mg を培地表面に振りかけ、有機物の総量をシャーレ当たり 90 mg とした。ダイズについては、その総量をシャーレ当たり 20 mg 及び 50 mg に調整した土壌培地も作製した。これは、有機物量が 90 mg より少ないと糸状菌の菌糸が細くなり、線虫が容易に摂食できると期待したためである。土壌培地の対照として 1/10 濃度の PDA 培地を使用した。*Ch. globosum* を各培地に接種し、その菌叢がシャーレ全面に広がった時、線虫を 30 個体ずつ接種した。各培地につき 4 反復で、シャーレは 25℃、全暗に 44 日間おいた。その後線虫を抽出し、増殖率を算出し、ANOVA で培地の種類の影響を分析した。

(4) 抽出効率

1/10 濃度の PDA 培地と、フスマを混入した土壌培地を他の試験と同様に作製して試験に供試した。*Fi. misellus* にとって好適な餌である *Rh. solani*,

Ch. globosum 及び *Co. cinereus* のみを今回は使用した。菌叢がシャーレ全面に広がった時、*Fi. misellus* の系統 1, *Fi. discrepans* の系統 1 または *Filenchus* sp. の系統 1 のいずれかを 515 頭/シャーレの割合で接種した。培地と菌種とのいずれの組合せについても 4 反復を用意した。*Fi. misellus* と *Filenchus* sp. のシャーレは 25℃に 24 時間放置し、線虫が培地の中に潜行するのを待った。しかし、後述するように *Fi. misellus* と *Filenchus* sp. の抽出率は著しく小かった。これは 24 時間の中で線虫が多数死亡したためであろうと考え、*Fi. discrepans* の試験では 1 時間しか放置しなかった。各々の放置時間の経過後、3 種の線虫をバールマン漏斗で 24 時間 25℃で抽出した。抽出された線虫の個体数を調査し、次式によって抽出効率を算出した。

抽出効率(%) = 抽出個体数/接種個体数(515) × 100
そして、抽出効率に対する菌種と培地の影響を ANOVA で分析し、各線虫種について、t 検定と Tukey の多重比較で平均値の差の比較を行った。尚、データは等分散であったので、対数変換等は行わなかった。

2) 結 果

(1) 線虫の増殖

Fi. misellus の増殖率に対して、線虫系統、糸状菌種及び培地との間の交互作用が有意であったが (ANOVA, $P < 0.005$)、用いた線虫 2 系統についての結果は似ていた。PDA 培地では、*Ch. globosum* と *Co. cinereus* を餌にすると線虫の増殖率は 14 以上と高くなった (図 20)。*Rh. solani* と *Pl. ostreatus* の場合は増殖率が中から高程度であった (1-15)。*Fu. oxysporum* と *Py. ultimum* では概して増殖率が低かった (< 1.5)。土壌培地上の線虫増殖率は、同じ線虫系統-菌種の PDA 培地の場合より低いか同程度であった。土壌培地では PDA 培地と同様な菌種と増殖率との関係が認められた。つまり、*Co. cinereus* での増殖率はやはり高く ($R > 12$)、*Rh. solani* と *Pl. ostreatus* では小さいか中程度であった ($0.4 < R < 2.7$)。さらに、*Fu. oxysporum* と *Py. ultimum* とでは増殖率は非常に低かった (< 0.1)。しかし、*Ch. globosum* については、PDA 培地の場合 ($R > 14$) と結果が大きく異なり、土壌培地で 0.1 より小さかった。

Fi. discrepans の試験では、PDA 培地では 3 系統の線虫全てについて増殖率を調査したが、土壌培地

では培地量の不足のため、系統3についてしか調査できなかった。統計分析のANOVAでは、線虫系統と培地とを組み合わせで1要因とし、それと菌種との計2要因が線虫増殖率に与える影響を検討した。その結果、これら2要因間の交互作用が有意であった ($P<0.05$)。PDA培地では3系統の線虫いずれについても、*Rh. solani*では増殖率は高く ($R>14$)、

Ch. globosum と *Co. cinereus* では中程度 (5-10), *Fu. oxysporum*, *Py. ultimum* 及び *Pl. ostreatus* では小から中程度であった (0.3-5) (図21)。一方、土壌培地では、*Fi. discrepans* の系統3の増殖率は、どの菌種でもPDA培地の場合より概して小さかった。つまり、*Rh. solani* と *Co. cinereus* では $R=3-21$, *Fu. oxysporum*, *Py. ultimum*, *Ch. globosum* 及び

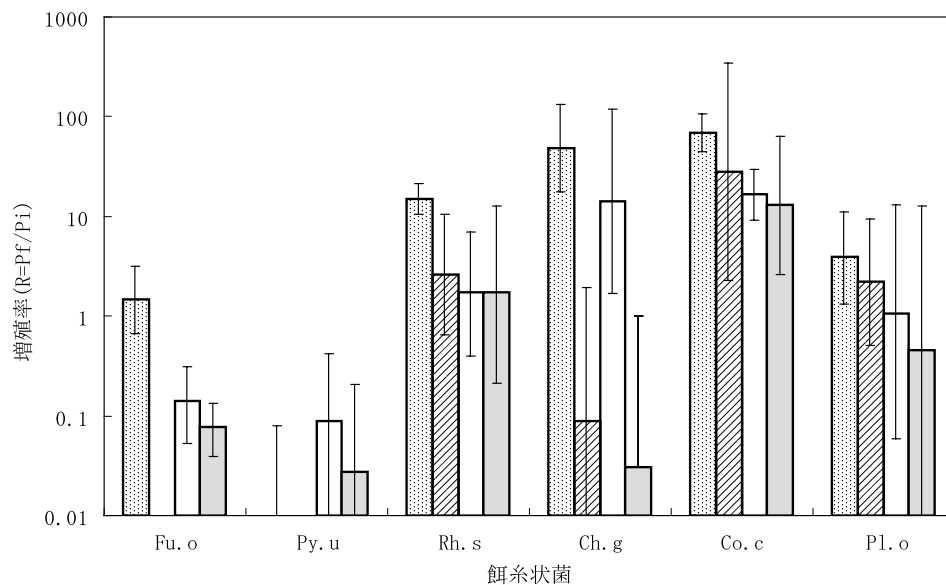


図20 25℃で46日間糸状菌菌叢で培養した後の *Fi. misellus* の増殖率 ($R=Pf/Pi$)

点刻は線虫系統1-PDA, 斜線は系統1-土壌培地, 白抜きは系統2-PDA, 網がけは系統2-土壌培地。Fu. o, Py. u, Rh. s, Ch. g, Co. c および Pl. o は、各々 *Fu. oxysporum*, *Py. ultimum*, *Rh. solani*, *Ch. globosum*, *Co. cinereus* 及び *Pl. ostreatus* を示す。縦棒は再変換後の95%信頼区間を示す。

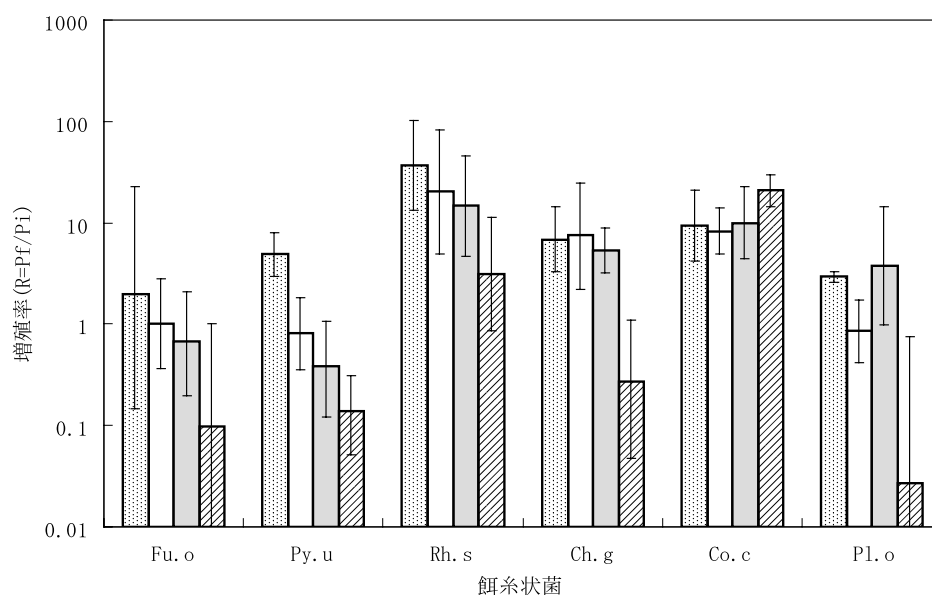


図21 25℃で46日間糸状菌菌叢で培養した後の *Fi. discrepans* の増殖率 ($R=Pf/Pi$)

点刻, 白抜き, 網がけはPDA上の増殖率で各々線虫系統1, 2, 3を, 斜線は土壌培地上の系統3の増殖率を表す。餌糸状菌の略名は図20と同じ。縦棒は、再変換後の95%信頼区間を示す。

Pl. ostreatus では0.3未満であった。

Filenchus sp.の試験では、菌種-培地間の相互作用が増殖率に対して有意であった (ANOVA, $P<0.01$)。PDA では、*Rh. solani*, *Co. cinereus* 及び *Fl. velutipes* では増殖率は4 - 13と高めであったが、*Fu. oxysporum*, *Py. ultimum* 及び *Pl. ostreatus* では0.2-4と小さめであった。(図22)。*Fi. misellus* や *Fi. discrepans* の場合 (図20, 21) と異なり、

Ch. globosum はPDA培地でも *Filenchus* sp. の増殖を抑制した ($R=0.05$)。土壌培地では、どの菌種の場合もPDA培地より線虫増殖率が低いか同程度であった (図22)。

(2) *Ch. globosum* を餌にした場合の線虫の増殖に及ぼす培地の種類の影響

培地の種類は明らかに *Fi. misellus* の増殖率に影響した (ANOVA, $P<0.01$)。PDAにおける増殖率

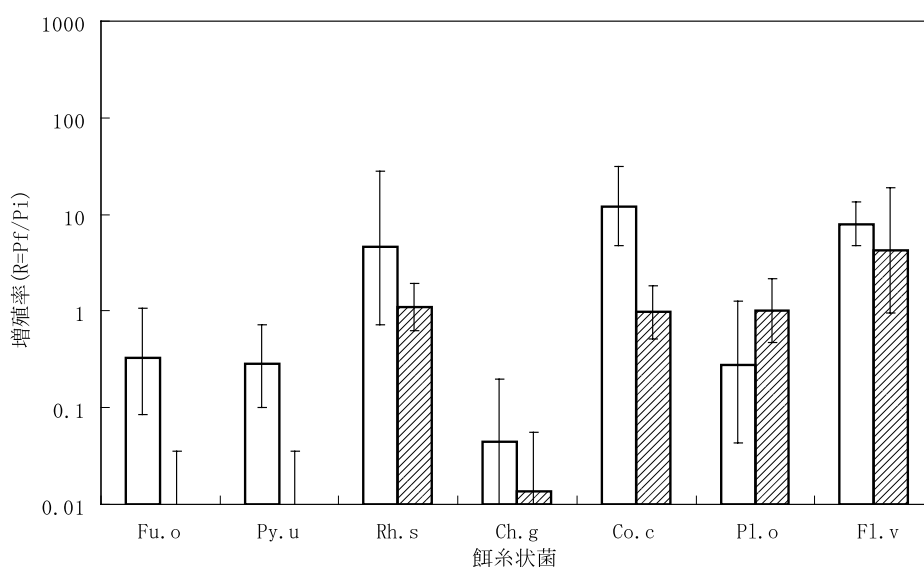


図22 25℃で46日間糸状菌菌叢で培養した後の *Filenchus* sp.の増殖率 ($R=Pf/Pi$)

白抜きと斜線は各々PDAと土壌培地。餌糸状菌の略名は図20と同じ。ただし、Fl. vは *Fl. velutipes* を示す。縦棒は、再変換後の95%信頼区間を示す。

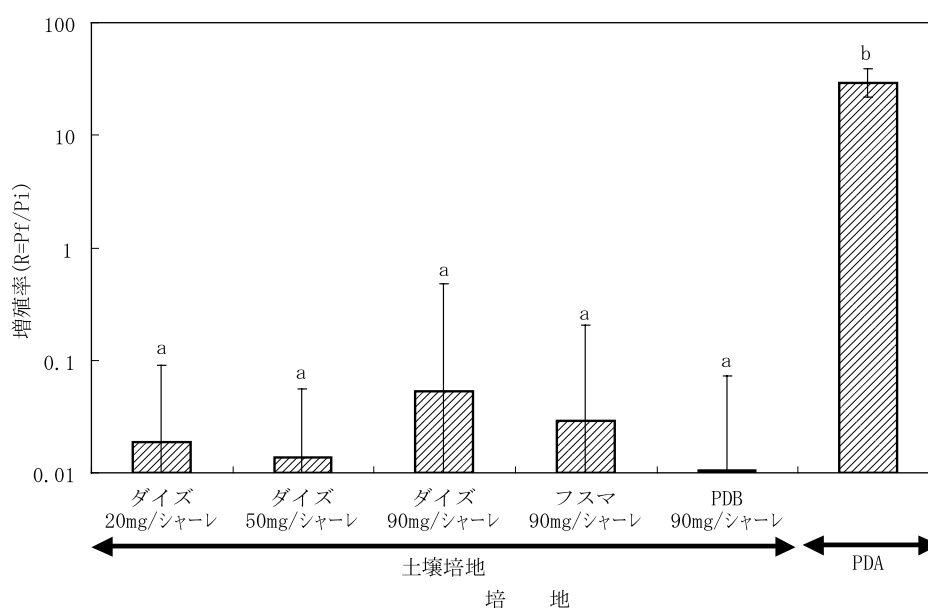


図23 異なる種類の培地に生育させた *Ch. globosum* を餌として25℃で44日間培養した *Fi. misellus* の増殖率 ($R=Pf/Pi$)

縦棒は再変換後の95%信頼区間を示す。同一英文字はTukey検定で有意差がないことを示す ($P<0.05$)。

は $R=29.0$ と高かった (図 23)。一方、土壌培地では、混入した有機物の種類と量によらず、増殖率が 0.06 未満と非常に低く、線虫がほとんど繁殖していなかった。

(3) 線虫の抽出効率

Fi. misellus のベールマン漏斗での抽出効率は 2.9-7.5 % で (表 9)、それに対する培地と餌糸状菌の交互作用が有意に影響していた (ANOVA, $P<0.01$)。つまり、菌ごとに見ると、*Co. cinereus* の場合、土壌培地では PDA より、抽出される線虫個体数が有意に少なかった (t 検定, $P<0.05$)。しかし、*Ch. globosum* と *Rh. solani* の場合、抽出個体数は培地間で有意差がなかった ($P>0.05$)。次に培地ごとに見ると、PDA の場合、菌種は線虫の抽出率に有意な影響を与えなかった (Tukey 検定, $P>0.05$)。一方、土壌培地では、*Rh. solani* の場合、他の菌より抽出率が有意に高かった ($P<0.05$)。

Fi. discrepans の抽出率は 2.7 - 10.7 % であった (表 9)。糸状菌種が抽出率に及ぼす主要効果が有意で (ANOVA, $P<0.05$)、*Co. cinereus* の場合の抽出率は、PDA でも土壌培地でも、他の菌より高かった。ただし、菌種間での抽出率の差は土壌培地でのみ有意であった (Tukey 検定, $P<0.05$)。菌種ごとにみると、抽出率の培地間の差は有意でなかった (t 検定, $P>0.05$)。

Filenchus sp. の試験では抽出率は 1.4-6.7 % であ

った (表 9)。抽出率への菌種と培地の主要効果がともに有意であった (ANOVA, 各々 $P<0.01$, $P<0.01$)。PDA でも土壌培地でも、*Ch. globosum* の場合に抽出率が有意に高かった (Tukey 検定, $P<0.05$)。また、菌種によらず、土壌培地では PDA より抽出率が有意に低かった (t 検定, $P<0.05$)。

3) 考 察

(1) 抽出効率が線虫の増殖率測定に与える影響

Fi. discrepans の実験では線虫を培地に潜らせる時間がわずか 1 時間で、*Fi. misellus* や *Filenchus* sp. の場合の 24 時間に比べてかなり短かったが、同じ糸状菌 - 培地の組合せで比較すると、*Fi. discrepans* の抽出効率は他の 2 種の線虫のそれと概して差がなく、線虫 3 種全体の抽出効率は 1-11 % だった (表 9)。これは、ベールマン漏斗によって土壌から抽出された Tylenchidae 科線虫の効率 (6 - 21 %, Minagawa 1979) に比べて概して低い。その原因は、実験で使用した培地が、Minagawa (1979) が調査した土壌とは異なる物理的特徴を有していたことや、線虫が培地内を移動するときに菌糸のネットワークが障害物になった可能性等が考えられる。抽出効率が 1 - 11 % という結果から、図 20 から図 23 に示した増殖率は過小評価されており、実際の線虫増殖率はそれらの 9 - 100 倍であると推測できる。従って、本試験で算出した増殖率が 0.11 より高い場合に、実際に線虫が増えたと考えら

表 9 線虫の抽出効率

線虫 ^{a)}	菌	抽出効率 ^{b)}		
		PDA	土壌培地 ^{c)}	
<i>Fi. misellus</i>	<i>Rh. solani</i>	5.24 a	7.48 a	ns
	<i>Ch. globosum</i>	4.32 a	2.91 b	ns
	<i>Co. cinereus</i>	6.89 a	4.51 b	*
<i>Fi. discrepans</i>	<i>Rh. solani</i>	4.85 a	3.35 a, b	ns
	<i>Ch. globosum</i>	5.78 a	2.67 a	ns
	<i>Co. cinereus</i>	6.7 a	10.73 b	ns
<i>Filenchus</i> sp.	<i>Rh. solani</i>	3.74 a	1.99 a, b	*
	<i>Ch. globosum</i>	6.65 b	3.54 a	*
	<i>Co. cinereus</i>	3.11 a	1.36 b	*

a) *Fi. misellus* と *Filenchus* sp. では接種後 24 時間、*Fi. discrepans* では接種後 1 時間で抽出。

b) 抽出個体数 / 接種個体数 (シャーレ当たり 515 頭) $\times 100\%$ として計算。4 反復の平均値で示す。同じ線虫種と培地との組合せにおいて、同じ英文字の菌種の値には有意差がない (Tukey の多重比較, $P>0.05$)。同じ線虫種と菌種との組合せにおいて、* は培地の値に t 検定で有意差有り ($P<0.05$)、ns は無し ($P>0.05$)。

c) フスマを有機物として混入して作製。

れる。

培地間で比較すると、どの糸状菌種を生育させた場合でも、土壌培地での線虫3種の抽出効率はPDAより概して低かった(表9)。初めの線虫密度が同じでも、培地が異なれば抽出効率も異なることが知られている(Kimpinsk・Welch 1971, McSorley 1987)。今回の実験で土壌培地での抽出効率が低かったのは、粘土等の微小の土壌粒子が、ベールマン漏斗で抽出する際に培地内での線虫の移動を阻害したためと考えられる。また、土壌培地でのこのような相対的に低い抽出効率が、線虫増殖率がPDAより土壌培地で低く表われた(図20, 21, 22)原因の1つと考えられる。

PDAにおいて生育させた糸状菌種の違いは、線虫の抽出効率にほとんど影響しなかった。従って、線虫増殖率による、線虫の餌としての糸状菌の好適性の評価には、糸状菌種ごとの抽出効率は影響していないと考えられる。一方、土壌培地では、菌種は抽出効率に有意な影響を及ぼし、しかも、最大の抽出効率を与える糸状菌種が線虫種間で異なった。それでもなお、*Rh. solani*と*Co. cinereus*が線虫の増殖に適した餌であり、*Ch. globosum*は不適な餌であるという評価は変わらないと思われる。なぜなら、*Rh. solani*と*Co. cinereus*での抽出効率は*Ch. globosum*での4倍程度なのに対し(表9)、前2者の菌での線虫増殖率は後者の菌でより11倍以上高いためである(図20, 21, 22)。

(2) 線虫の増殖に対する餌糸状菌と培地の影響

Fi. misellus, *Fi. discrepans*及び*Filenchus* sp.の実験で、線虫の増殖率は餌糸状菌と培地の両方の影響を受けることが示された(図20, 21, 22)。PDA培地を使用したときの線虫増殖率は、*Rh. solani*, *Ch. globosum*及び*Co. cinereus*を餌にした場合に、*Fu. oxysporum*, *Py. ultimum*や*Pl. ostreatus*の場合より高かった。これは、すでに報告した*Fi. misellus*の場合(Ⅳの3)と同様の結果である。PDA培地での今回の結果は、「*Filenchus*属線虫は、腐生性菌(*Ch. globosum*, *Co. cinereus*, *Rh. solani*, *Pl. ostreatus*, *Fl. velutipes*)を餌にした場合に、植物病原菌(*Fu. oxysporum*, *Py. ultimum*)の場合よりも増殖率が高い。」という仮説を支持する。しかし、*Pl. ostreatus*を餌にした場合は、*Co. cinereus*や*Rh. solani*の場合ほど線虫が繁殖しなかった。また、*Filenchus* sp.は*Ch. globosum*では繁

殖しなかった。これらの問題点については後で考察する。

土壌培地での培養試験の結果は、いくつかの点でPDAの場合と異なった。まず、同じ菌種のもとでの線虫の増殖率は、土壌培地の方がPDAより低く、また、3種の線虫いずれも*Ch. globosum*では繁殖しなかった。すでに述べたように、抽出効率を考慮すると、増殖率が0.11を越えた場合に線虫が実際に増殖したと考えられる。このことを考慮しても、土壌培地における*Ch. globosum*は、*Fi. misellus* 2系統と*Filenchus* sp.1系統を繁殖させなかった(図20, 22)。このような*Ch. globosum*の餌としての不適性は、土壌培地に混入する有機物の種類や量を変えても変わらなかった(図23)。*Ch. globosum*はchaetoglobosinのような、人体に有害なマイコトキシンを産生することが知られている(Nielsen et al. 1999)。*Ch. globosum*がどのような環境条件の下でこのような毒物を産生するのか、また、この毒物が線虫にも有害であるか否かは不明であるが、土壌培地の中ではこの菌が多量の毒物を産生し、線虫の繁殖を抑制した可能性がある。*Filenchus* sp.はもともと、*Fi. misellus*や*Fi. discrepans*よりこの毒物に感受性が高いために、土壌培地だけでなくPDAでも繁殖できなかったと考えられる。結局のところ、土壌培地においては、腐生菌*Ch. globosum*は*Filenchus*属にとって好適な餌ではなかった。おそらく、この菌は野外でも*Filenchus*属線虫にとって好適な餌ではない可能性が高い。

(3) 線虫の餌としての*Pl. ostreatus*(ヒラタケ)

*Pl. ostreatus*は線虫捕食菌として知られている(Thorn・Barron 1984)。しかし、今回の試験の結果から、*Pl. ostreatus*は、*Rh. solani*や*Co. cinereus*ほど好適ではないにしろ、*Filenchus*属線虫の増殖に適した餌であることがわかった。実際、供試した6系統の線虫のいずれもが、PDAまたは土壌培地で、*Pl. ostreatus*を摂食し、0.11以上の増殖率を示した(これより値が大きいと線虫が実際に増殖したと考えられる。図20, 21, 22)。これは前回の*Fi. misellus*の試験と一致する(Ⅳの3)。*Pl. ostreatus*が所属するPleurotaceae科を研究している菌類学者は、この科を分類学的に定義する際の重要な形質として線虫捕食能をあげている(Thorn et al. 2000)。しかし、線虫がこの菌類に捕食されるのではなく、逆に線虫がこの菌類を摂食、増殖する場合

があるという今回の発見は、この形質について再検討を迫るものである。その後著者により、Dorylaimida 目線虫の *Tylencholaimus parvus* も *Pleurotus* 属の線虫捕食菌 (*Pl. ostreatus* 及び *Pl. plumonarius*) を摂食して増殖することが発見されている (Okada *et al.* 2005a)。従来線虫捕食能を有すると言われてきた *Pleurotaceae* 科の菌類が、どの種の線虫についても捕食能を発揮するか否かは明らかではない。むしろ、*Filenchus* 属や *Tylencholaimus* 属線虫のように、逆に線虫が菌を食べる場合が他にも発見される可能性がある。様々な線虫種を用いた今後の研究で、菌の分類体系と線虫捕食能との関係を明らかにすることにより、菌と線虫との生態的な相互作用が解明されることを期待する。

(4) Tylenchidae 科における糸状菌食性

Maturity Index 等、線虫群集を利用した環境指標を考案したオランダの Bongers らは「線虫研究者にとって最も重要な問題の1つは今もって、Tylenchidae 科の扱いである。このグループは糸状菌食者として扱うべきか、それとも植物根（の外皮細胞）食者なのか?」, と問題提起している (Bongers・Bongers 1998)。この背景には、Tylenchidae 科の線虫があらゆる土壤環境から普通に検出され、1つの調査地点の全線虫の最高で40%を占めるくらい高い頻度で出現する事実がある (Yeates・Bird 1994, Wright・Coleman, 2000)。Tylenchidae 科線虫の食性に関する情報はこれまで少なく (Yeates *et al.* 1993), 線虫群集の研究における本科線虫の食性群への振り分けは研究者によって異なっていた。すなわち、植物食群 (Freckman・Ettema 1993), 植物随伴群 (plant associate, 食性は不確かだが植物根圏に生息するの意, Yeates *et al.* 1999), 糸状菌食群 (Forge・Simard 2000), 植物根食兼糸状菌食群 (Ruess 1995, Hånél 2000, 2001) 等に振り分けられていた。植物食群や植物随伴群の線虫は、土壤環境よりも宿主植物の有無に大きく影響されるので、土壤環境への攪乱程度を評価する Maturity Index (Bongers 1990) や、土壤中の有機物の分解経路のタイプを評価する Channel Index (Ferris *et al.* 2001) 等の線虫群集指数の計算から除外される。その場合、群集構造について、除外しなかった場合と比べて著しく異なる分析結果をもたらす可能性がある。従って、本科線虫の食性を明らかにし、Bongers 氏の疑問に

答えることは、線虫生態学者にとって重要である。

Tylenchidae 科線虫が植物組織を摂食することはすでに確認されている (Sutherland 1967, Wood 1973a)。一方、糸状菌を摂食することは、Wood (1973b) と Brzeski (1998) が、各々 *Tylenchus* 属と *Filenchus* 属について断片的に観察しているとはいえ、十分調査されているとは言えない。糸状菌食性の有無を十分に検討することは、窒素循環等土壤生態系の機能における Tylenchidae 科線虫の役割を理解し、また、線虫群集の分析を適切に行う上で不可欠である。Tylenchidae 科線虫の中でも、農耕地から森林土壤まで普遍的かつ世界的に出現する *Filenchus* 属線虫については、糸状菌食性を有することを示す間接的な証拠がすでに得られていた。Hánél (2000) によると、森林の林床において、糸状菌の子実体の密度と土壤中の本属線虫の密度が比例した。また、McSorley・Frederick (1999) によると、生きた植物を除去した畑土壤に有機物を施用し、線虫群集の動態を調査したところ、植物食性線虫の密度が増加しなかったのに対し、*Filenchus* 属線虫は増加した。これは、有機物を栄養源として生育した糸状菌を線虫が摂食したためと考えられる。本研究では、前回の試験で用いた稲藁堆肥由来の *Fi. misellus* の1系統に加え、採集地が互いに異なる畑土壤由来の *Filenchus* 属線虫の新たな5系統、つまり、宮崎県都市の *Fi. misellus* の1系統、福島県福島市の *Fi. discrepans* の3系統及び岩手県盛岡市の未同定種 (*Filenchus* sp.) の1系統 (表7) についても、培養実験によって糸状菌食性を証明した (図20, 21, 22)。しかも今回は、PDAのような寒天ベースの培地だけでなく、土壌ベースの培地でも、これらの線虫が *Rh. solani* や *Co. cinereus* 等の菌を摂食して増殖することを確認した。以上の証拠は、*Filenchus* 属線虫において、糸状菌食性は例外的な習性ではないこと、また、自然の土壤中でもこれらの線虫が糸状菌を食べて繁殖していることを示唆している。従って、*Filenchus* 属線虫は、植物食性 (Freckman・Ettema 1993) や植物随伴性 (plant associate, Yeates *et al.* 1999) と考えるよりも、糸状菌食性 (Forge・Simard 2001), あるいは植物根食兼糸状菌食性 (Ruess 1995, Hånél 2000) と判断する方が妥当である。その場合、*Filenchus* 属線虫は線虫群集指数の計算に含むべきであると考ええる。実際、本稿に記した著者の調査結

果（公表論文としては Okada *et al.* 2002, Okada and Kadota 2003）を引用し、*Filenchus* 属、さらには Tylenchidae 科の線虫を糸状菌食性、あるいは植物根及び糸状菌食性として扱った研究論文が発表されている（Háněl 2004, McSorley and Frederick 2004, Wang *et al.* 2004, Forge *et al.* 2005, Wang and McSorley 2005）。しかし、まだ疑問が残っている。*Filenchus* 属線虫は、Aphelenchidae 科線虫のニセネグサレセンチュウのように、ほとんど糸状菌菌糸ばかり食べている真の糸状菌食者（Hunt 1993）なのか、それとも、植物根の外皮細胞と糸状菌菌糸のいずれをも摂食する線虫なのか？この疑問に答えるにはさらなる研究が必要である。さらに、Tylenchidae 科全体としての生態学的地位を明らかにするには、*Filenchus* 属だけでなく他の属についても食性を検討することが重要である。

（5）線虫の進化における糸状菌食性

Filenchus 属における糸状菌食性の確認は、線虫進化の研究にも貴重な知見を提供する。Tylenchida 目の現存の植物寄生性線虫は糸状菌食の祖先から進化したと考えられている（Maggenti 1981, Poinar 1983）。今回の糸状菌食性の発見は、この仮説を支持するものである。なぜなら、*Filenchus* 属を含む Tylenchidae 科の線虫は、微細な摂食器官（口針と食道）や長く糸状に延びた尾等、祖先的な形態的特徴を持つため、Tylenchida 目の中でも原始的なグループとされているためである（Siddiqi 2000）。ただし、植物寄生性への進化に関するこの仮説を厳密に吟味するには、Tylenchida 目において、科やそれ以下の分類群を単位とした分子系統樹解析を行い、Tylenchidae 科線虫の原始性を確かめる必要がある。

総 合 考 察

本研究では、土壤中に生息する糸状菌食性線虫の生態について、農業や環境科学への利用の観点から基礎的研究を行った。対象にした線虫は、農耕地における代表的な糸状菌食性線虫である Aphelenchida 目のニセネグサレセンチュウ及び *Aphelenchoides* 属の1種と、農耕地から人手の入らない森林土壤まで幅広い土壤環境に生息するものの、今まで糸状菌食性が確認されていなかった Tylenchida 目の *Filenchus* 属線虫である。

Aphelenchida 目の線虫については、土壤伝染性糸状菌による植物病害の発病抑制を目指し、病原性糸状菌でよく増殖する線虫系統の選抜を行った。特にニセネグサレセンチュウについては、すでに九州産の系統や米国産の系統で、植物病原性糸状菌を好適な餌として増殖し、実際に防除効果が認められていることから（崔ら 1988）、本研究では東北地方（主に福島県）で採集された系統に絞って調査した。対象糸状菌は、野菜類の立枯病を起こす土壌性糸状菌である *Fusarium*, *Rhizoctonia* 及び *Pythium* 属の菌とした。その結果、いずれの菌株においても、福島県福島市で採集した線虫系統が、福島県会津坂下町、同郡山市及び青森県黒石市で採集した系統と同じか、それより高い増殖率を示した。そこで、実際にポット試験を行い、*Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinam* によるキュウリのつる割病、*Rh. solani* によるカリフラワーの苗立枯病及び *Py. ultimum* によるハウレンソウの苗立枯れに対する福島系統の線虫の発病抑制効果を検討した。その結果、*Fusarium* と *Pythium* による病害の発生抑制はできなかった。しかし、カリフラワーの苗立枯病には線虫による発病抑制効果が認められ、かつ、増殖試験から予想されたとおり、福島系統の線虫が他の系統より発病抑制効果が高かった。従って、増殖率が高い系統を選択すれば、ニセネグサレセンチュウは、*Rh. solani* によるブロッコリー等の苗立枯病の発生抑制に、少くとも補助的手段として、利用できる可能性がある。そのため、カニ殻等糸状菌病低減効果がある有機資材の施用や、病原性喪失菌の定植前接種による病害抵抗性誘導処理等（石井 2003）との併用により、実際に圃場において *Rh. solani* 属菌による病害発生を抑制する効果があるか検討すべきである。

圃場施用のためのニセネグサレセンチュウの安価な大量培養法については、ジュース滓等を培地として利用する方法が開発されているが（石橋 1993）、病害抑制資材としての本線虫の圃場レベルでの実用性を判断するには、病原性糸状菌の菌核等の耐久態や、本線虫にとって天敵となる線虫捕食菌等が土壤中に存在する場合での試験が不可欠である。

土壤伝染性の植物病原性糸状菌の多くは、条件的な植物寄生者で、宿主が存在しない場合は耐久態を形成し、活動を停止する。しかし、利用可能な有機物があれば、活動を再開し、有機物を分解して養分

を獲得している。従って、こうした菌による植物病害の防除を実施するために糸状菌食性線虫を施用することは、土壤中の糸状菌が貯蔵した窒素等の養分を開放し、植物生育を促進する効果もあると期待される。そのため、糸状菌食性線虫による無機態窒素排出に関する基礎研究が様々に行われ、線虫の窒素排出機能を最大化する糸状菌の種類、有機物のC/N比等が明らかにされてきた (Chen・Ferris 1999, 2000)。しかし、土壤中での重要な物理要因である温度が排出機能に及ぼす影響については調べられていなかった。そこでⅢでは、ⅡとⅣで用いたニセネグサレセンチュウの米国 California 州系統と *Ap. composticola* について、増殖や窒素排出に関する温度の影響を調べた。その際の仮説として、有機物に由来する無機態窒素の生成には、有機物分解にかかる生物の発育や増殖が影響するので、増殖適温が異なる生物が存在すると、それによって窒素生成量への温度の影響の仕方が異なると考えた。具体的には、ニセネグサレセンチュウの増殖適温が 30℃ 以上なのに対し、*Ap. composticola* は 25℃ 弱である。一方、これらの線虫が良く増殖する餌糸状菌の生育適温も種によって異なり、*Rh. solani* では 30℃ 以上なのに対し、*Bo. cinerea* は 25℃ 弱である。従って、これら生物種の組合せによって、排出される窒素量への温度の影響の仕方が異なると期待された。そこで、線虫と菌との組み合わせ 4 通りについて、有機物を分解させた時の窒素生成量を 15, 20, 25, 29℃ において測定した。その結果、*Bo. cinerea* では、線虫の有無によらず、窒素量への温度の影響がなかったが、*Rh. solani* では、排出量が最大になる温度が、組み合わせた線虫の増殖適温とほぼ一致し、有機物分解による窒素排出には、線虫を仲立ちとして温度が影響する可能性があることがわかった。線虫を通して窒素量に影響する要因として、糸状菌の種類や有機物の C/N 比が知られているが、それらに加え、本研究で明らかになった温度の影響は、土壤中の有機物由来窒素の適正な管理を行う上で重要な知見である。畑土壌中の有機物分解に関わる糸状菌とそれを摂食する線虫の種類及び各々の増殖適温を明らかにし、それに基づき無機態窒素生成の温度反応パターンを明らかにすれば、畑土壌中での温度変化に基づいて窒素生成量を予測することができる可能性がある。そして、過剰な窒素肥料の投入を抑えた作物栽培管理が可能になると期

待される。また、すでに述べたように、植物病害防除を目指して線虫を人為的に畑土壌に施用する場合も、線虫による土壌窒素の増加が期待できる。

Tylenchida 目の Tylenchidae 科線虫については、環境指標等へ利用するための線虫群集の研究の中での取り扱いが重要であるにもかかわらず、糸状菌食性であるという定まった見解が無かった (Bongers・Bongers 1998)。そこで本研究では、Tylenchidae 科の中で、世界的にも広く分布する *Filenchus* 属線虫について、糸状菌食性の有無を培養実験によって検討した。その結果、3 種 6 系統の線虫が、糸状菌を摂食し、PDA のような寒天培地のみならず土壌をベースにした培地でも増殖することがわかった。このことは、自然の土壌中でも *Filenchus* 属線虫が糸状菌を摂食して増殖し、糸状菌食性がこの属の線虫の一般的な習性である可能性を示した。このことから、*Filenchus* 属線虫は線虫群集の分析においては、糸状菌食性、または植物根食兼糸状菌食性として、Maturity Index (Bongers 1990) 等の生態学的指標の計算に含めるべきと思われる。ただし、糸状菌のみを食べるのか、糸状菌と植物根の両方を食べるのかの判別は、土壌生態系での当該線虫の生態的地位を考える上で重要な問題であり、今後検討する必要がある。

培養試験の中で *Filenchus* 属線虫が、従来線虫捕食菌と考えられてきた *Pl. ostreatus* (Thorn・Barron 1984) の菌糸をも摂食し増殖することが発見された。これは世界的にも初めての報告である。*Filenchus* 属線虫がどのような機作でヒラタケ菌糸による捕食を免れているのか、そのことに生態学的な意義があるのか、ヒラタケ近縁種の菌糸をも摂食できるのか、ヒラタケを摂食できる線虫は他にもいるのか等様々な疑問があり、この現象の解明は、糸状菌と線虫との相互作用についての興味深いテーマといえる。

シスト、ネコブ、ネグサレセンチュウ等農業生産上重要な植物寄生性線虫及び、*Deladenus* 属等、害虫防除資材として重要な昆虫寄生性線虫の両方を含む Tylenchida 目の中でも、原始的といわれる Tylenchidae 科の線虫で (Siddiqi 2000)、糸状菌食性が証明されたことは、線虫の進化を考える上でも意義があると思われる。なぜなら、植物や昆虫に寄生する現存の線虫は、もともと土壌や有機物の中で糸状菌を食べている線虫から進化したと考えられて

いるからである (津田 2000, Poinar 1983)。ただし, Tylenchidae 科の原始性は, 今のところ形態学的特徴に基づくものである, 分子生物学的手法等を用いて原始性を確認する必要がある。

応用的には, *Filenchus* 属線虫についても, Aphelenchida 目線虫について検討したように, 植物病害の発病抑制への利用や, 土壌中の窒素循環等への関わりを検討することにより, 同線虫が持つ有用機能を用いた新たな農業技術が開発される可能性がある。

引用文献

- 1) Adams, H. S.; Osborne, W. W.; Webber, A. J. Jr. 1982. Effect of temperature on development and reproduction of *Globodera solanacearum* (Osborne's cyst nematode, tobacco pest, Virginia). *Nematropica* 12 : 305-311.
- 2) 相場 聡. 2003. 第17章 線虫のレース, 線虫の生物学 (石橋信義編). 東京. 東京大学出版会. p. 238-250.
- 3) Ali, M. R.; Amin, B.; Adachi, T.; Ishibashi, N. 1999. Host and temperature preference, male occurrence and morphometrics of fungivorous nematode, *Aphelenchus avenae* isolates from Japan. *Jpn. J. Nematol.* 29 : 7-17.
- 4) Anderson, R. V.; Coleman, D. C.; Cole, C. V. 1981. Effects of saprotrophic grazing on net mineralization. *Ecol. Bull.* 33 : 201-216.
- 5) Baker, K. F. 1970. Types of *Rhizoctonia* disease and their occurrence. In *Rhizoctonia solani*: biology and pathology. Edited by J.R. Parameter Jr. Berkeley, University of California Press. p. 125-148.
- 6) Barker, K. R. 1964. On the disease reduction and reproduction of the nematode *Aphelenchus avenae* on isolates of *Rhizoctonia solani*. *Plant Dis. Rep.* 48 : 428-436.
- 7) Barron, G. L.; Thorn, R. G. 1987. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Can. J. Bot.* 65 : 774-778.
- 8) Bedding, R. 1993. Biological Control of *Sirex noctilio* using the Nematode *Deladenus siricicola*. *Nematodes and the biological control of pests.* (Bedding, R., Akhurst, R. and Kaya, H. eds.). East Melbourne, CSIRO Publications. p.11-20.
- 9) Blakeman, J. P. 1980. Behaviour of conidia on aerial plant surfaces. In *The Biology of Botrytis.* (Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. eds.). London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, Academic Press. p. 115-152.
- 10) Bongers, T. 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* 83 : 14-19.
- 11) Bongers, T.; Bongers, M. 1998. Functional diversity of nematodes. *Appl. Soil Ecol.* 10 : 239-251.
- 12) Brzeski, M. W. 1997. Redescription of some species of the genus *Filenchus* Andr ssy, 1954 (Nematoda, Tylenchidae). *Miscel lania Zoologica.* 20 : 45-64.
- 13) Brzeski, M. W. 1998. Nematodes of Tylenchina in Poland and Temperate Europe. Warszawa. Muzeum i Instytut Zoologii Polska Akademia Nauk. p. 49.
- 14) Burges, A. 1965. The soil microflora-Its nature and biology. In *Ecology of Soil-borne Plant Pathogens* (Baker, K. F. and Snyder, W. C. eds.). Prelude to Biological Control. University of California Press, Berkeley, p. 21-32.
- 15) Carlson, R. M. 1978. Automated separation and conductimetric determination of ammonia and dissolved carbon dioxide. *Anal. Chem.* 50 : 1528-1531.
- 16) Cayrol, J. C. 1962. Importance des maladies vermiculaires dans les champignonnières fran aises. *Mushroom* 5 : 480-496.
- 17) Chen, J.; Ferris, H. 1999. The effects of nematode grazing on nitrogen mineralization during fungal decomposition of organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 31 : 1265-1279.
- 18) Chen, J.; Ferris, H. 2000. Growth and nitrogen mineralization of selected fungi and fungal-feeding nematodes on sand amended with organic matter. *Plant Soil* 218 : 91-101.

- 19) 崔 東魯, 石橋信義, 田中欽二. 1988. 菌食性線虫と昆虫寄生性線虫の混合施用による土壌病害虫防除. 佐賀大学農学部彙報 65 : 27-35.
- 20) Choi, D. R.; Ishibashi, N. 1989. Propagation of five *Aphelenchus avenae* isolates on six species of fungi and five substrates. Jpn. J. Nematol. 19 : 13-17.
- 21) Clarke, D. C.; Christensen, M. 1981. The soil micro-fungal community of a South Dakota grassland. Can. J. Bot. 59 : 1950-1960.
- 22) Dix, N. J.; Webster, J. 1995. Fungal Ecology. London, Chapman and Hall. 549 p.
- 23) Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H. 1993. Compendium of Soil Fungi. Vol.1. Eching, IHW-Verlag, 859 p.
- 24) Dropkin, V. H. 1959. Varietal resistance of soybeans to *Meloidogyne*-A bioassay system for separating races of root-knot nematodes. Phytopathology 49 : 18-23.
- 25) Evans, K.; Trudgill, D. L.; Webster, J. M. 1993. Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. Wallingford, Oxon, OX10, 8DE, UK., CABI. 648 p.
- 26) Ferris, H.; Venette, R. C.; Lau, S. S. 1997. Population energetics of bacterial-feeding nematodes: carbon and nitrogen budgets. Soil Biol. Biochem. 29 : 1183-1194.
- 27) Ferris, H.; Venette, R. C.; Meulen, H. R.; Lau, S. S. 1998. Nitrogen mineralization by bacterial-feeding nematodes: verification and measurement. Plant Soil 203 : 159-171.
- 28) Ferris, H.; Bongers, T.; de Goede, R. G. M. 2001. A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept. Appl. Soil Ecol. 18 : 13-29.
- 29) Ferris, H.; Venette, R. C.; Scow, K. M. 2004. Soil management to enhance bacterivore and fungivore nematode populations and their nitrogen mineralisation function. Appl. Soil Ecol. 25 : 19-35.
- 30) Forge, T. A.; Simard, S. W. 2001. Structure of nematode communities in forest soils of southern British Columbia: relationships to nitrogen mineralization and effects of clearcut harvesting and fertilization. Biol. Fert. Soil. 34 : 170-178.
- 31) Forge, T. A.; Bittman, S.; Kowalenko, C. G. 2005. Responses of grassland soil nematodes and protozoa to multi-year and single-year applications of dairy manure slurry and fertilizer. Soil Biol. Biochem. 37 : 1751-1762.
- 32) Fortuner, R. 1970. On the morphology of *Apehenchoides besseyi* Christie, 1942 and *A. siddiqii* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoidea). J. Helminthol. 44 : 141-152.
- 33) Freckman, D. W. 1982. Nematodes in Soil Ecosystem. Austin, University of Texas Press. 206 p.
- 34) Freckman, D.W.; Ettema, C. H. 1993. Assessing nematode communities in agroecosystems of varying human intervention. Agric. Ecosyst. Environ. 45 : 239-261.
- 35) Fujie, A.; Takata, Y.; Tachibana, M.; Yokoyama, T. 1996. Insecticidal activity of an entomopathogenic nematode, *Steinernema kushidai* (Nematoda: *Steinernematidae*) against *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae under different soil moisture conditions. Appl. Entomol. Zool. 31 : 453-455.
- 36) Geraert, E. 1991. Tylenchidae in Agricultural Soils. In *Manual of Agricultural Nematology* (Nickle, W. R. ed.). New York, Marcel Dekker, Inc. p. 1035.
- 37) Giannakis, N.; Sanders, F. E. 1989. Interactions between mycophagous nematodes, mycorrhizal and other soil fungi. Agric. Ecosyst. Environ. 29 : 163-167.
- 38) Griffin, D. M. 1972. Ecology of Soil Fungi. London, Chapman and Hall. 193p.
- 39) Háněl, L. 2000. Seasonal changes of soil nematodes, other soil microfauna and fungus fruiting bodies in a spruce forest near České Budějovice, Czech Republic. Biologia, Bratislava. 55 : 435-443.
- 40) Háněl, L. 2001. Succession of soil nematodes in pine forests on coal-mining sands near Cottbus, Germany. Appl. Soil Ecol. 16 : 23-34.
- 41) Háněl, L. 2004. Response of soil nematodes inhabiting spruce forests in the Sumava Mountains

- to disturbance by bark beetles and clear-cutting. For. Ecol. Manage. 202 : 209-225.
- 42) Hansen, E. L.; Buecher, E. J.; Yarwood, E. A. 1972. Sex differentiation of *Aphelenchus avenae* in axenic culture. Nematologica 18 : 253-260.
 - 43) Hayes, W. A. 1978. Section A *Agaricus bisporus*, 8. Biological Nature. In *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (Chang, S. T. and Hayes, W. A. eds.). New York, San Francisco, London, Academic Press. p. 191-217.
 - 44) Hesling, J. J. 1977. *Aphelenchoides composticola*. In C. I. H. *Descriptions of Plant-Parasitic Nematodes* (Willmott, S., Gooch, P. S., Siddiqi, M. R. and Franklin, M. T. eds.). Farnham Royal, Slough, U. K., Commonwealth Agricultural Bureaux. Set 7, No. 92.
 - 45) Hinz, P. N.; Eagles, H. A. 1976. Estimation of a transformation for the analysis of some agronomic and genetic experiments. Crop Sci. 16 : 280-283.
 - 46) Huang, C. S.; Huang, S. P.; Lin, L. H. 1972. The effect of temperature on development and generation periods of *Aphelenchoides besseyi*. Nematologica 18 : 432-438.
 - 47) Huixin, L.; Inubushi, K.; Miwa, J. 2001. Effects of temperature on population growth and n mineralization of soil bacteria and a bacterial-feeding nematode. Microb. Environ. 16 : 141-146.
 - 48) Hunt, D. J. 1993. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their Systematics and Bionomics. Oxon, UK., CAB International. 352 p.
 - 49) Hunt, H. W.; Coleman, D. C.; Ingham, E. R.; Ingham, R. E.; Elliott, E. T.; Moore, J. C.; Rose, S. L.; Reid, C. P. P.; Morley, C. R. 1987. The detrital food web in a shortgrass prairie. Biol. Fert. Soil. 3 : 57-68.
 - 50) 一谷多喜郎.1984. 第3章 病原の生態と発病のしくみ I 病原の生活環 3) *Pythium* 菌 新版 土壌病害の手引き (宇井格生編). 日本植物防疫協会. p. 130-132.
 - 51) 一谷多喜郎.1995. 各論 ピシウム菌による病害作物病原菌研究技法の基礎 -分離・培養・接種- (大畑貫一, 荒城隆雄, 木曾 皓, 工藤 晟, 高橋廣治編). 東京, 日本植物防疫協会. p. 288-292.
 - 52) Ingham, E. R.; Coleman, D. C.; Moore, J. C. 1989. An analysis of food-web structure and function in a shortgrass prairie, a mountain meadow, and a lodgepole pine forest. Biol. Fert. Soil. 8 : 29-37.
 - 53) Ingham, R. E.; Trofymow, J. A.; Ingham, E. R.; Coleman, D. C. 1985. Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. Ecol. Monogr. 55 : 119-140.
 - 54) 石橋信義. 1992. V 昆虫寄生性線虫 -生態と利用. 線虫研究の歩み (中園和年編). つくば市, 日本線虫研究会. p. 223-227.
 - 55) 石橋信義. 1993. 有用線虫の探索とその大量生産ならびに施用法のシステム化 課題番号 02506001 平成4年度科学研究補助金 文部省試験研究 A (1) 研究成果報告書. 172 p.
 - 56) 石井英夫. 2003. 植物防疫における病害抵抗性誘導利用の現状と展望. 今月の農業 47(10) : 13-18.
 - 57) 石井俊雄. 1998. 獣医寄生虫学・寄生虫病学 2 蠕虫 他. 東京, 講談社サイエンティフィク. 429 p.
 - 58) Kimpinski, J.; Welch, H. E. 1971. Comparison of Baermann funnel and sugar flotation extraction from compacted and non-compacted soils. Nematologica 17 : 319-320.
 - 59) 清原友也, 田村弘忠, 二井一禎, 真宮靖治. 1992. IV 植物寄生性線虫 -発生生態と加害性マツ材線虫 2) マツノザイゼンチュウの生態. 線虫研究の歩み (中園和年編). つくば市, 日本線虫研究会. p. 201-222.
 - 60) Klink, J. W.; Barker, K. R. 1968. Effect of *Aphelenchus avenae* on the survival and pathogenic activity of root-rotting fungi. Phytopathology 58 : 228-232.
 - 61) 小林紀彦, 築尾嘉章. 1993. 菌食性線虫によるキュウリつる割病の生物防除. 日本植物病理学会報 59 : 280.
 - 62) 駒田 旦. 1984. 第3章 病原の生態と発病のしくみ I 病原の生活環 5) *Fusarium* 菌 新版 土壌病害の手引き (宇井格生編). 日本植物防疫協会. p. 134-138.
 - 63) Kurtzman, R. H. Jr. 1978. Section C, Other genera. 18. *Coprinus fimetarius*. In *The Biology and*

- Cultivation of Edible Mushrooms* (Chang, S. T. and Hayes, W. A. eds.). New York, San Francisco, London, Academic Press. p. 393-408.
- 64) Little, T. M.; Hills, F. J. 1978. *Agricultural Experimentation*. New York, John Wiley. 350 p.
- 65) Maggenti, A. R. 1981. *General Nematology*. New York, Springer-Verlag. 372p.
- 66) Mamiya, Y. 1997. The ability of the oyster mushroom (*Pleurotus osteratus*) to capture the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Jpn. J. Nematol.* 27 : 99.
- 67) Mankau, R.; Mankau, S. K. 1963. The role of mycophagous nematodes in the soil. 1. The relationships of *Aphelenchus avenae* to phytopathogenic soil fungi. In *Soil organisms* (Doeksen, J. and Drift, J. eds.). Amsterdam, North-Holland Publ. Co. p. 272-280.
- 68) McSorley, R. 1987. Extraction of nematodes and sampling methods. In *Principles and Practice of Nematode Control in Crops* (Brown, R. H. and Kerry, B. R. eds.). Sydney, Academic Press. p. 13-48.
- 69) McSorley, R.; Frederick, J. J. 1999. Nematode population fluctuations during decomposition of specific organic amendments. *J. Nematol.* 31 : 37-44.
- 70) McSorley, R.; Frederick, J. J. 2004. Effect of extraction method on perceived composition of the soil nematode community. *Appl. Soil Ecol.* 27 : 55-63.
- 71) Mendis, A. H. W.; Evans, A. A. F. 1983 Population development and oxygen consumption of three isolates of *Aphelenchus avenae* (Nematoda: Aphelenchidae). *Nematologica* 29 : 309-322.
- 72) Minagawa, N. 1979. Efficiencies of two methods for extracting nematodes from soil. *Appl. Entomol. Zool.* 14 : 469-477.
- 73) 三輪 錠司. 2003. 第 5 章 モデル生物 - *Caenorhabditis elegans* 線虫の生物学 (石橋信義編). 東京, 東京大学出版会. p.46-74.
- 74) 水久保隆之. 2003. 第 19 章 線虫による農作物の被害 線虫の生物学 (石橋信義編). 東京, 東京大学出版会. p.265-281.
- 75) 名和行文. 2003. 第 8 章 人類と寄生虫 線虫の生物学 (石橋信義編). 東京, 東京大学出版会. p.97-115.
- 76) Nielsen, K. F.; Gravesen, S.; Nielsen, P. A.; Andersen, B.; Thrane, U.; Frisvad, J. C. 1999. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia* 145 : 43-56.
- 77) 大畑貫一. 1995. 総論 作物病原菌研究技法の基礎 - 分離・培養・接種 - (大畑貫一, 荒城隆雄, 木曾 皓, 工藤 晟, 高橋廣治編). 東京, 日本植物防疫協会. p.1-22.
- 78) 岡田浩明. 1995a. キスジノミハムシ体内から発見された Tylenchida 目昆虫寄生性線虫に関する知見. *日線虫学誌* 25 : 130.
- 79) 岡田浩明. 1995b. 野菜の苗立枯病に対する菌食性線虫の抑制効果. *北日本病虫研報* 46 : 210.
- 80) Okada, H. 1995. Propagation of two fungivorous nematodes on four species of plant-pathogenic fungi. *Jpn. J. Nematol.* 25 : 56-58.
- 81) 岡田浩明. 1996a. アレナリアネコブセンチュウの播種前密度がダイズの収量と生育におよぼす影響. *北日本病虫研報* 47:105-106.
- 82) 岡田浩明. 1996b. *Howardula* sp. の寄生によるハムシ幼虫の発育異常と死亡. *日線虫学誌* 26 : 46.
- 83) Okada, H.; Ferris, H. 2001. Effect of temperature on growth and nitrogen mineralization of fungi and fungal-feeding nematodes. *Plant Soil* 234 : 253-262.
- 84) Okada, H.; Tsukiboshi, T.; Kadota, I. 2002. Mycetophagy in *Filenchus misellus* (Andrássy, 1958) Raski & Geraert, 1987 (Nematoda : Tylenchidae), with notes on its morphology. *Nematology* 4 : 795-801.
- 85) 岡田浩明. 2002. ミニレビュー (「土壌動物を観察する夏の学校」講義ノート) 土壌生態系における線虫の働き - 特に無機態窒素の動態への関わり -. *根の研究* 11 : 3-6.
- 86) Okada, H.; Kadota, I. 2003. Host status of 10 fungal isolates for two nematode species, *Filenchus misellus* and *Aphelenchus avenae*. *Soil Biol. Biochem.* 35 : 1601-1607.
- 87) Okada, H.; Harada, H.; Kadota, I. 2004. Application of diversity indices and ecological indices to evaluate nematode community

- changes after soil fumigation. Jpn. J. Nematol. 34 : 89-98.
- 88) 岡田浩明. 2005. 土壤生態系を評価するための線虫群集指数. 植物防疫 59 : 423-426.
- 89) Okada, H.; Harada, H.; Tsukiboshi, T.; Araki, A. 2005a. Characteristics of *Tylencholaimus parvus* (Nematoda: Dorylaimida) as a fungivorous nematode. Nematology (in press).
- 90) Okada, H.; Harada, H.; Kadota, I. 2005b. Fungal-feeding habits of six nematode isolates in the genus *Filenchus*. Soil Biol. Biochem. 37 : 1113-1120.
- 91) Phillips, R. 1991. Mushrooms in North America. Boston, Toronto, London, Little, Brown and Company. 319 p.
- 92) Pillai, J. K.; Taylor, D. P. 1967a. Effect of temperature on the time required for hatching and duration of life cycle of five mycophagous nematodes. Nematologica 13 : 512-516.
- 93) Pillai, J. K.; Taylor, D. P. 1967b. Influence of fungi on host preference, host suitability, and morphometrics of five mycophagous nematodes. Nematologica 13 : 529-540.
- 94) Poinar, G. O. 1983. The Natural History of Nematodes. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice-Hall. 323p.
- 95) Rhoades, H. L.; Linford, M. B. 1959. Control of *Pythium* root rot by the nematode *Aphelenchus avenae*. Plant Dis. Rep. 43 : 323-328.
- 96) Rössner, J.; Nagel, S. 1984. Untersuchungen zur Ökologie und Vermehrung des mycophagen Nematoden *Aphelenchoides hamatus*. Nematologica 30 : 90-98.
- 97) Ruess, L. 1995. Nematode fauna in spruce forest soils: a qualitative/ quantitative comparison. Nematologica 41 : 106-124.
- 98) Saikawa, M.; Wada, N. 1986. Adhesive knobs in *Pleurotus ostreatus* (the oyster mushroom), as trapping organs for nematodes. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 27 : 113-118.
- 99) Sano, Z.; Nakasono, K.; Araki, M. 1983. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* in some enemy and host plants. Proc. Assoc. Plant Protect. Kyushu 29 : 132-136.
- 100) 佐野善一. 2004. 第6章 土壤線虫・植物寄生性線虫. 2 線虫の分離法. 2.1 土壤からの分離法. 2.1.1 ベルマン法, 2.1.2 二層遠心浮遊法. 線虫学実験法 (線虫学実験法編集委員会編). つくば市, 日本線虫学会. p.87-90.
- 101) Seinhorst, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. Nematologica 14 : 67-69.
- 102) Sherwood, R. T. 1970. Physiology of *Rhizoctonia solani*. In *Rhizoctonia solani, Biology and Pathology* (Parmeter, J. R. Jr. ed.). Berkeley, Univ. Calif. Press. p. 69-92.
- 103) 白山義久. 2003. 第1章 線虫の世界. 線虫の生物学 (石橋信義編). 東京, 東京大学出版会. p.3-11.
- 104) 城間祥行, 佐藤良也. 1997. 日本における糞線虫と糞線虫症. 福岡, 九州大学出版会. 191 p.
- 105) Siddiqi, M. R. 2000. Tylenchida Parasites of Plants and Insects, 2nd edition. Wallingford, CABI Publishing. 833p.
- 106) Stanton, J. M.; Sartori, M. 1990. Hatching and reproduction of the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, from potato fields in Western Australia as influenced by soil temperature. Nematologica 36 : 457-464.
- 107) Stevens, R. B. 1981. Mycology Guidebook. Seattle and London, University of Washington Press. 712p.
- 108) 杉本利哉. 1984. 第3章 病原の生態と発病のしくみ I 病原の生活環 6) *Rhizoctonia* 菌 新版 土壤病害の手引き (宇井格生編). 日本植物防疫協会. p. 138-140.
- 109) Sutherland, J. R. 1967. Parasitism of *Tylenchus emarginatus* on conifer seedling roots and some observations on the biology of the nematode. Nematologica 13 : 191-196.
- 110) Thorn, R. G.; Barron, G. L. 1984. Carnivorous mushrooms. Science 224 : 76-78.
- 111) Thorn, R. G.; Moncalvo, J. M.; Reddy, C. A.; Vilgalys, R. 2000. Phylogenetic analyses and distribution of nematophagy support a monophyletic Pleurotaceae within the polyphyletic pleurotoid-lentinoid fungi. Mycologia 92 : 241-252.

- 112) Trofymow, J. A.; Coleman, D. C. 1982. The role of bacterivorous and fungivorous nematodes in cellulose and chitin decomposition in the context of a root/rhizosphere/soil conceptual model. In *Nematodes in soil ecosystems* (Freckman, D. W. ed.). Austin, Texas, University of Texas Press. p. 117-138.
- 113) 津田 格. 2000. 第3章 微生物が関与する森林の栄養連鎖－動物との関係を中心に－ 3.3 キノコに棲息する線虫 森林微生物生態学 (二井一禎, 肘井直樹編). 東京, 朝倉書店. p. 91-101.
- 114) Tsuda, K.; Futai, K. 2000. The insect-parasitic stage and life cycle of *Iotonchium unguatum* (Tylenchida: Iotonchiidae), the causal agent of gill-knot disease of the oyster mushroom. *Jpn. J. Nemat.* 30 : 1-7.
- 115) Venette, R. C.; Ferris, H. 1997. Thermal constraints to population growth of bacterial-feeding nematodes. *Soil Biol. Biochem.* 29 : 63-74.
- 116) Walker, G. E. 1984. Ecology of the mycophagus nematode *Aphelenchus avenae* in wheat-field and pine-forest soils. *Plant Soil* 78 : 417-428.
- 117) Wallace, H. R. 1960. Observations on the behaviour of *Aphelenchoides ritzemabosi* in *Chrysanthemum laeves*. *Nematologica* 5 : 315-321.
- 118) Wang, K. H.; McSorley, R.; Marshall, A. J.; Gallaher, R. N. 2004. Nematode community changes associated with decomposition of *Crotalaria juncea* amendment in litterbags. *Appl. Soil Ecol.* 27 : 31-45.
- 119) Wang, K. H.; McSorley, R. 2005. Effects of soil ecosystem management on nematode pests, nutrient cycling, and plant health. Feature Story. January 2005. APS (The American Phytopathological Society) net. <http://www.apsnet.org/online/feature/nematode>.
- 120) Watanabe, T. 1994. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Lewis Publishers, Florida, 411p.
- 121) Wood, F. H. 1973a. Life cycle and host-parasite relationships of *Aglenchus costatus* (de Man, 1921) Meyl, 1961 (Nematoda: Tylenchidae). *N. Z. J. Agric. Res.* 16 : 373-380.
- 122) Wood, F. H. 1973b. Nematode feeding relationships, feeding relationships of soil-dwelling nematodes. *Soil Biol. Biochem.* 5 : 593-601.
- 123) Wright, C. J.; Coleman, D. C. 2000. Cross-site comparison of soil microbial biomass, soil nutrient status, and nematode trophic groups. *Pedobiologia* 44 : 2-23
- 124) Yeates, G.; Bongers, T.; de Goede, R. G. M.; Freckman, D. W.; Georjeva, S. S. 1993. Feeding habits in nematode families and genera - an outline for soil ecologists. *J. Nematol.* 25 : 315-331.
- 125) Yeates, G. W.; Bird, A. F. 1994. Some observations on the influence of agricultural practices on the nematode faunae of some South Australian soils. *Fundam. Appl. Nematol.* 17 : 133-145.
- 126) Yeates, G. W. 1996. Nematode ecology. *Rus. J. Nematol.* 4 : 71-75.
- 127) Yeates, G. W.; Bardgett, R. D.; Cook, R.; Hobbs, P. J.; Bowling, P. J.; Potter, J. F. 1997. Faunal and microbial diversity in three Welsh grassland soils under conventional and organic management regimes. *J. Appl. Ecol.* 34 : 453-470.
- 128) Yeates, G. W.; Wardle, D. A.; Watson, R. N. 1999. Responses of soil nematode populations, community structure, diversity and temporal variability to agricultural intensification over a seven-year period. *Soil Biol. Biochem.* 31 : 1721-1733.
- 129) Younes, T. 1969. Caractéristiques biologiques et modalités parasitaires d'un nêmatode mycophage, *Aphelenchoides composticola* (Franklin, 1957). *Annls. Zool. Ecol. Anim.* 1 : 407-417.
- 130) Young, I. M.; Griffiths, B. S.; Robertson, W. M.; McNicol, J. W. 1998. Nematode (*Caenorhabditis elegans*) movement in sand as affected by particle size, moisture and the presence of bacteria (*Escherichia coli*) . *Europ. J. Soil Sci.* 49 : 237-241.

Ecology of Fungivorous Nematodes and Their Use for Suppression of Plant Diseases

Hiroaki OKADA

Summary

Nematodes are ubiquitous animals in marine, freshwater and soil environments. The number of their species has been estimated at over one hundred million. However, ecological and physiological studies have been focused mainly on parasitic species, which are harmful to human beings, domestic animals, crops and vegetables. Some free-living nematodes species, however, are considered useful for agricultural production and environmental sciences. In this study, fungivorous free-living nematodes, which commonly occur in agricultural soils, were examined for their abilities to suppress plant diseases, and to increase soil inorganic nitrogen for plant growth. Other common free-living species were also examined to determine if they have fungal-feeding habits, to reduce ambiguity in their feeding-group classification in nematode community analysis.

1. Population growth of fungivorous nematodes of the order Aphelenchida, and their use for suppression of fungal plant-diseases

To test whether they suppress soil-borne plant-pathogenic fungi, nematode species or isolates collected in the Tohoku region of northern Japan were measured for their reproduction rates on the fungi. The *Aphelenchus avenae* isolate, collected in Fukushima city in Fukushima prefecture, reproduced well on major fungal pathogens causing vegetable damping-off, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. An unidentified *Aphelenchoides* species from Fukushima city also showed good reproduction on another pathogenic fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, as well as on *Rh. solani*. *Aphelenchus avenae* was also examined to determine whether its four isolates from different localities in Tohoku area had different reproduction rates when cultured on *Rh. solani*, *Py. ultimum* and *Fu. oxysporum*. Generally on any fungus, the Fukushima-city isolate did better than the other nematode isolates. Thus, this isolate was tested preferentially in pot experiments to determine whether it was able to prevent cucumber wilt by *Fu. oxysporum* f. sp. *cucumerinam*, cauliflower damping-off by *Rh. solani*, and spinach damping-off by *Py. ultimum*. The nematode isolate was found effective at preventing cauliflower damping-off, but was found ineffective on the other plant diseases. The other *Ap. avenae* isolates were also tested against cauliflower damping-off, but were not effective. It was concluded that *Ap. avenae* was effective at preventing damping-off caused by *Rh. solani*, if a nematode isolate with large population growth on the fungus was selected.

2. Effects of fungivorous nematodes and temperature on nitrogen mineralization in soil dominated by fungal decomposers

When nematodes feed on fungi, they excrete inorganic nitrogen such as ammonium; hence, nematodes may help increase soil fertility. The nematode activity may be affected by physical factors, such as soil temperature or moisture. Thus, the effect of temperature on the growth and the nitrogen excretion of two

fungal and two nematode species from US were examined in microcosm experiments. In dish microcosms, the optimal temperatures for hyphal growth of the two fungi differed; the temperature was 29 °C or higher for *Rh. solani*, while slightly less than 25 °C for *Bo. cinerea*. The optimal temperatures for reproduction of the two nematode species also differed; the temperature was 29°C or higher for *Ap. avenae*, while slightly less than 25 °C for *Ap. composticola*. To determine the effect of temperature on nitrogen excretion by the organisms when they decompose organic matter, alfalfa and cellulose, column microcosms were established. For each of the two fungal species, columns with the fungus alone, and columns with the fungus plus *Ap. avenae* or *Ap. composticola*, were prepared at 15, 20, 25 and 29 °C, to measure the cumulative amount of nitrogen excreted and nematode reproduction rates in 21 days. In the *Bo. cinerea* experiment, the amount of nitrogen was not affected by temperature in either the fungus alone or fungus plus nematode columns, although nematode reproduction was affected. Also in the *Rh. solani* experiment, the nitrogen amount detected was not affected by temperature in the fungus alone column. In the fungus plus nematode columns, however, the nitrogen amount and the nematode reproduction rate were greatest at the temperature close to the optimal for each nematode species determined in the dish microcosm. It was concluded that temperature might influence nitrogen mineralization in organic matter decomposition by fungi, through reproduction of fungivorous nematodes. These results suggest that it may be possible not only to reduce plant disease, but also to enhance nitrogen mineralization under appropriate soil temperature, by applying fungivorous nematodes.

3. Examination of fungal-feeding habits in the nematode species of the genus *Filenchus*

Nematode community analysis is expected to be a useful tool for soil ecosystem diagnosis, such as degree of artificial disturbance or of fertility status. In the analysis, nematode classification, based on feeding habits and life history traits, is essential. The feeding habits of nematode species of the family Tylenchidae, often predominating in nematode communities, have been unclear, although the nematodes have sometimes been observed feeding on plant roots. Determination of fungal-feeding habits in the family is important for nematode ecologists. A species of Tylenchidae was found in a pile of rice straw for composting. This finding suggested the possibility of fungal feeding in Tylenchidae. The nematode species was identified as *Filenchus misellus* based on morphological characteristics. Nematode species of the genus *Filenchus*, a major member of Tylenchidae, were thus examined in culture experiments to determine whether they were able to feed on fungi. *Fi. misellus* from rice straw compost was compared with *Ap. avenae* for reproduction rates as affected by food fungal species on PDA, because *Ap. avenae* is quite different from *Fi. misellus* in terms of systematic positions and habitats. *Fi. misellus* reproduced well feeding on Ascomycota and Basidiomycota fungi, including *Pleurotus ostreatus*, which is known as a nematode-trapping fungus. It was suggested that the ecological characteristics of *Fi. misellus* were quite different from those of *Ap. avenae*, which reproduced well on plant-pathogenic fungi. The six nematode isolates representing three *Filenchus* species, collected from soils of different localities in Japan, also showed reproduction by feeding on fungi growing on soil-based media as well as on agar-based PDA. These results suggest that fungal-feeding habits are not unusual in the genus in field soils. It was concluded that the appropriate classification of *Filenchus* species in nematode community analysis is fungal, or fungal and plant root feeders.