

植物防疫基礎講座：線虫の見分け方(8)

昆虫病原性線虫

独立行政法人農業環境技術研究所 よし
吉 だ
田 むつ
睦 ひろ
浩

はじめに

昆虫病原性線虫は、昆虫病原性細菌と共生関係にある線虫類で、その殺虫活性の高さから害虫管理のための素材として世界各国で研究されており、生物農薬として利用されている種もある。本線虫類は、通常 Rhabditida 目の Heterorhabditidae 科および Steinernematidae 科に属する線虫を指す。前者には *Heterorhabditis* 属、後者には *Steinernema* 属と *Neosteinernema* 属が知られている。*Neosteinernema* 属は 1 種がフロリダから知られているのみなので、本稿での解説は省略する。*Heterorhabditis* 属は現在までに 9 種が認められており、日本から *H. indica*, *H. megidis* の 2 種の分布が報告されている (YOSHIDA et al. 1998)。また、日本からはまだ報告されていないが、欧米各国では生物農薬として広く使用されている *H. bacteriophora* が研究のために導入されている。*Steinernema* 属は現在までに 31 種が認められており、日本からは *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. kushidai*, *S. monticolum* の 5 種の分布が報告されている (真宮・小倉, 1990; STOCK et al., 1998; YOSHIDA, 1998; YOSHIDA et al., 1998)。これら 5 種のほかに、リボソーム DNA の ITS 領域の RFLP 解析によって既知種とは異なる RFLP 型を示すグループが、未記載種として 7 種報告されている (吉田ら, 1995; YOSHIDA et al., 1998)。また、日本からはまだ記録がない *S. glaseri* を成分とする線虫製剤が、生物農薬としてすでに市販されている。*H. bacteriophora* および *S. glaseri* はともに韓国では分布が記録されているので (CHOO et al., 1995; STOCK et al., 1997)、これら導入線虫も野外から検出される可能性がある。そこで、導入種 2 種も含めた既知種 9 種を中心に未記載種 7 種も含めて形態による見分け方について述べる。

I 昆虫病原性線虫の検出

昆虫病原性線虫は通常、土壤中に感染態 (耐久態) 第

Identification of Entomopathogenic Nematodes in Japan.
By Mutsuhiro YOSHIDA

(キーワード：昆虫病原性線虫, *Heterorhabditis* 属, *Steinernema* 属, 感染態幼虫, 形態, 同定)

3 期幼虫として存在しており、昆虫体内においてのみ成育・繁殖する。その期間はせいぜい 2~3 週間である。本線虫類を検出する方法には、野外で採集した昆虫から遊出してくる感染態幼虫を収集する方法と、採取した土壌や直接野外に昆虫を埋設し死亡した昆虫から検出するトラップ法がある。昆虫死体から遊出してくる感染態幼虫を収集する方法には、ホワイトのトラップ (口絵-1) がよく使われている。また、土壌からもベルマンロート法や 2 層遠心法を使って分離できるが、様々な線虫とともに分離されるため、単一種の個体群を得ようとする場合は適当でない。これらの中で最も広く利用されている方法が、ハチノスツツリガ幼虫を使ったトラップ法である。この方法はハチノスツツリガ幼虫が多くの昆虫病原性線虫に対して感受性が高く、飼育が非常に簡単で大量に供試できる点を利用したものである。日本から記録された昆虫病原性線虫は、すべてこの方法により検出されている。しかし、ハチノスツツリガを用いたトラップ法では、野外における寄主が特定できず、特に鱗翅目以外の昆虫に特化している種の検出には適さないと考えられている。防除の対象となる害虫の天敵を探索するために、対象害虫をトラップとして使う方法も用いられている。例えば、*S. kushidai* の検出にはドウガネブイブイ幼虫、*S. riobrave* の検出には *Heliothis zea* の前蛹がトラップとして使われた。また、野外から感染死亡した昆虫を探索することにより、種特異的な殺虫活性を示す種が得られている。ケラ類から得られた *S. scapterisci* がその代表で、ケラ類の防除に使用されている。

II 昆虫病原性線虫の形態について

本線虫類は感染態幼虫が昆虫の血体腔内に侵入して共生細菌を排出し、昆虫に敗血症を引き起こす。昆虫の死亡後、血体腔内で増殖し、通常 2 世代経過した後、新しい感染態幼虫が形成され、感染態幼虫が昆虫から遊出する。*Steinernema* 属線虫の大部分は通常 2 世代とも雌雄が出現し両性生殖により増殖するが、*Heterorhabditis* 属は第 1 世代では雌雄同体メスになり、第 2 世代では雌雄が出現する。本線虫類の同定には、*Heterorhabditis* 属では感染態幼虫および第 2 世代オス成虫、*Steinernema* 属では感染態幼虫、第 1 世代成虫の形質が重要に

なるので、それらの標本を作製する必要がある。したがって、昆虫病原性線虫を同定するためには、生きた感染態幼虫を分離した後、ハチノスツヅリガ幼虫等に再感染させて得た成虫の標本を用意するとよい。一般に *Heterorhabditis* 属でオス成虫を得るためには感染死亡後6~9日ごろに、*Steinernema* 属で第1世代成虫を得るためには3~5日ごろに、感染死亡虫を解剖する。解剖はリンガー液や1%塩化ナトリウム溶液中で行うとよい。感染態幼虫は感染死亡後、10日から20日ぐらいで遊出してくる。感染態幼虫の計測には遊出開始後1週間以内に得られた感染態幼虫を使う。遊出直後の感染態幼虫の多くは第2期幼虫の表皮を被鞘しているため計測には不向きである。計測は脱鞘した個体で行う。また、種をグルーピングするに当たって重要になる側帯の形状は、新鮮な感染態幼虫では体内に脂肪体が密に詰まっているため、生物顕微鏡では観察しにくい、数か月以上冷蔵保存した線虫を使うと観察しやすい。この観察は100倍で行う。標本の固定から永久標本作製までの流れは、植物寄生性線虫と同様であるから、本稿では省略する。

種の識別点となる形質は、*Heterorhabditis* 属では感染態幼虫の計測値(体長・頭端から排泄口までの距離(以下排泄口長と表記)・c値(体長/尾長))およびオス成虫の交接刺・尾部の形状、*Steinernema* 属では感染態幼虫の計測値(体長・排泄口長・尾長・a値(体長/体幅)・D値(%) (排泄口長/食道長×100)・E値(%) (排泄口長/尾長×100))および側帯の形状、第1世代オス成虫の交接刺の形状・長さ、尾部の形状、第1世代メス成虫の陰門開口部および尾部の形状等である。計測値はその平均値を比較することが多いので、20個体以上計測することが望ましい。以下に示す種の検索表に記してある数値はすべて平均値である。

III 形態による同定法

1 昆虫病原性線虫の識別

本線虫類は前述したように Rhabditida 目に属する。したがって、口腔および食道の形態(図-1)から Diplogasterida 目や Tylenchida 目等に属する昆虫と関連を持つ線虫類から以下のように識別できる。

1) 口針をもつ……………Tylenchida 目, Stichosomida 目(シヘンチュウ類等)等

1a) 口針を欠く……………2

2) 口腔は明瞭な歯をもち、食道は筋肉質で弁を備えた中部食道球と腺質の後部食道球をもつ

……………Diplogasterida 目

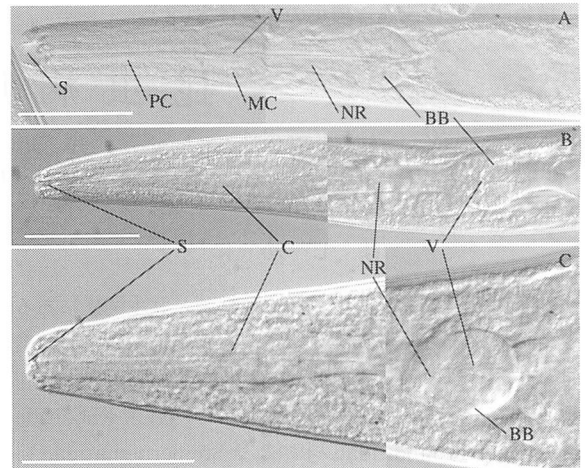


図-1 Diplogasterida 目および Rhabditida 目の成虫の体前部

A : Diplogasteroid 型 ; B : Rhabditoid 型 ; C : Rhabditoid 型 (*Steinernema* 属). BB (basal bulb) : 後部食道球, C (corpus) : 食道前部 ; MC (metacornus) : 中部食道球 ; NR (nerve ring) : 神経環 ; PC (procornus) : 前部食道 ; S (stoma) : 口腔 ; V (valve) : 弁 ; スケール : 50 μ m.

2a) 口腔は小さな歯を備え、食道は筋肉質で弁を備えた明瞭な後部食道球をもつ……………Rhabditida 目

Rhabditida 目線虫の中には絶対寄生、任意寄生、便乗等昆虫と様々な関係をもつグループが含まれるが、昆虫病原性細菌と共生関係にあり、積極的に昆虫類を殺し、昆虫死体内で増殖するグループは *Heterorhabditidae* 科と *Steinernematidae* 科のみである。Rhabditida 目や Diplogasterida 目の任意寄生性線虫の中にも、しばしば昆虫に敗血症を起こし死体内外で増殖するグループがあるが、これらのメス成虫は昆虫病原性線虫の第1世代メス成虫のように2~3mm以上に巨大化することはない。トラップ法を使って検出する場合でも、土壌サンプルから取り出したハチノスツヅリガ幼虫の死体の表面上で腐生性の Rhabditidae 科や Diplogasteridae 科などが増殖し、その耐久態が多数発生することがあるので注意していただきたい。特に、同じ Rhabditida 目に属する耐久態幼虫から本線虫類の感染態幼虫を形態的に区別することはしばしば困難であるが、*Heterorhabditis* 属では腸前部に多数の細菌細胞が見られること、*Steinernema* 属では感染態幼虫がその腸内に共生細菌を収めた嚢をもつこと(口絵-3)で、他の Rhabditidae 目の耐久態幼虫から識別できる。もしくは、ハチノスツヅリガに再感染させ、メス成虫の大きさを比較してみるとよい。

2 属の識別

Heterorhabditis 属と *Steinernema* 属は、感染態幼虫における排泄口と神経環の位置関係 (口絵-3), オス成虫の交接翼の有無で識別できる (図-2)。 *Heterorhabditis* 属は排泄口が神経環より後方に位置し、交接翼をもつ。 *Steinernema* 属は排泄口が神経環より前方に位置し、交接翼をもたない。かつては、感染態幼虫の頭端部に突起が見られることが *Heterorhabditis* 属の特徴 (口

絵-3 B) であったが、 *Steinernema* 属にもそのような特徴を備えた種が見つかったため、属の識別形質と見なせなくなった。しかし、現時点で記録されている未記載種も含めた日本産の *Steinernema* 属にはそのような特徴をもつ種は記録されていない。

このほかに感染死亡した昆虫の状態でも区別できる。感染死亡したハチノスツヅリガの場合、その体色と表皮の状態からどちらの属の感染か判断できる (口絵-2)。 *Heterorhabditis* 属の感染死亡個体は、通常赤褐色化し乾燥硬化するとともに、蛍光を発する。 *Steinernema* 属の感染死亡個体は、汚白色・淡黄色・黄褐色等に変色し、軟化する。

3 種の識別

ここでは、感染態幼虫の形質による識別法を解説する。表-1と表-2に計測値を示したが、比較のために既知種のデータを POINAR (1986, 1990), HOMINICK et al. (1997) 等からの引用した。

(1) *Heterorhabditis* 属 (表-1)

日本産の2種は感染態幼虫の体長で明瞭に区別できる。しかし、導入種 *H. bacteriophora* を考慮に入れた場合、本種は多くの計測値で *H. indica* と重複するが、c値により識別できる。

体長 > 700 μm *H. megidis*
体長 < 700 μm

c値 > 6.0 *H. bacteriophora*

c値 < 6.0 *H. indica*

1) *H. megidis*

本種は、北米・北西ヨーロッパから知られており、日本からは主に渥美半島から房総半島にかけて検出されている。本属で最も体長が長い種で、排泄口長が 115 μm 以上という特徴からも識別できる。

2) *H. bacteriophora*

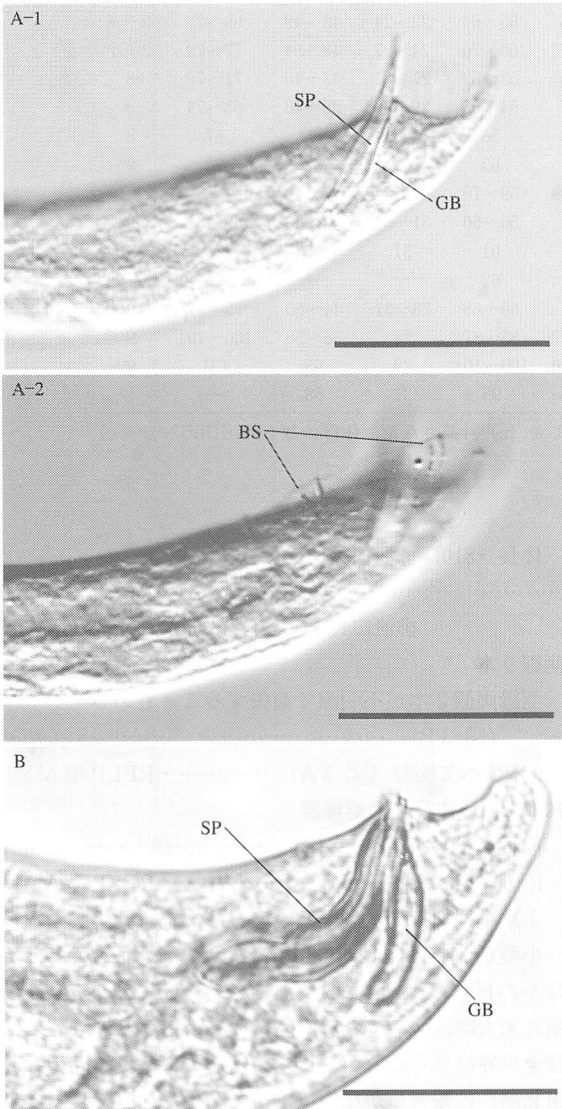


図-2 昆虫病原性線虫オス成虫の尾部
A: *Heterorhabditis indica* 第2世代 (A-1とA-2はフォーカスを変えて撮影した)。B: *Steinernema feltiae* 第1世代。BS (bursa): 交尾翼; GB (gubernaculum): 導対; SP (spicule): 交接刺; スケール: 50 μm。

表-1 *Heterorhabditis* 属線虫3種の感染態幼虫の形態比較

	産地	N ^{a)}	体長	排泄口長	c値
<i>megidis</i>	日本	4	717~772	120~128	6.3~6.5
	USA ^{b)}	1	768	131	6.5
	ベルギー ^{b)}	1	707	117	6.6
<i>indica</i>	日本	13	482~627	87~110	5.1~5.9
	インド ^{b)}	1	528	98	5.3
	パキスタン ^{b)}	1	520	94	4.8
<i>bacteriophora</i>	— ^{b)}	1	588	103	6.2
	アルゼンチン ^{b)}	2	540~590	94~100	6.1~6.4
	オーストラリア ^{b)}	1	570	104	—
	スペイン ^{b)}	1	590	102	6.2

複数個体群計測された種は平均値の最小値と最大値を示した。
a) 計測された個体群の数; b) 引用データ。

表-2 *Steinernema* 属線虫 13 種の感染態幼虫の形態比較

	産地 (系統)	N ^{a)}	体長	排泄口長	a 値	D 値 (%)	E 値 (%)	側線
<i>carpocapsae</i>	日本 (十王) ^{b)}	1	449	31	23	31	73	—
	(42) ^{b)}	1	544	33	21	26	60	9 ^{c)}
	USA (DD-136) ^{b)}	1	547	36	—	—	—	—
	チェコスロバキア ^{b)}	1	572	42	—	—	—	—
<i>kushidai</i>	日本 (浜北) ^{b)}	1	589	46	22.5	41	92	9 ^{c)}
	日本	11	550~662	43~51	21~27	38~49	85~100	9
MY 5	日本	1	693	49	23	45	70	6
MY 4	日本	1	695	64	25	53	92	2+ α
<i>monticolum</i>	韓国 ^{b)}	1	706	58	19	47	76	—
	日本	9	702~786	55~63	22~24	43~49	69~77	2+ α
MY 7	日本	4	734~837	60~70	24~27	48~54	77~79	2+ α
MY 3	日本	8	712~804	52~63	27~31	43~46	71~79	8
MY 6	日本	2	821~867	54~55	29~30	38~40	68~74	8
<i>kraussei</i>	日本	1	847	56	28	45	67	8
	ドイツ ^{b)}	1	951	63	29	47	80	8 ^{c)}
	北米 ^{b)}	7	849~1009	59~70	—	—	—	—
<i>feltiae</i>	日本	4	811~892	56~60	31~34	42~46	69~81	9
	フランス (SN) ^{b)}	1	817	61	31	45	78	9 ^{c)}
	ニュージーランド (NZ) ^{b)}	1	880	62	—	—	—	—
MY 2	日本	4	859~955	60~65	28~31	44~50	75~77	9
MY 8	日本	2	1120~1157	85~87	28	56~58	100~101	9
<i>glaseri</i>	USA (FL, NC) ^{b)}	2	1060~1200	100~104	29	65	131	9 ^{c)}
	スペイン ^{b)}	1	1260	96	31	58	—	—

複数個体群計測された種は平均値の最小値と最大値を示した。a) 計測された個体群の数；b) 引用データ；c) HOMINICK et al. (1997) より引用。

本種は、南北米大陸、ユーラシア大陸、オーストラリア大陸等とほぼ全世界に分布している。

3) *H. indica*

本種は、熱帯亜熱帯地域に広く分布しており、日本からは沖縄から福島県南部にかけての海岸部から検出されている。

(2) *Steinernema* 属 (表-2)

感染態幼虫の体長、排泄口長、a 値、D 値、E 値および側帯の状態から日本産 12 種および導入種 1 種は以下のようにグルーピングできる。

680 μ m > 体長：小型種群

D 値 > 35, E 値 > 80 *S. kushidai*

D 値 < 35, E 値 < 80 *S. carpocapsae*

680~1000 μ m：中型種群

側線 6 本 (図-3 E) RFLP 型 MY 5

側線 2+ α (図-3 D)

E 値 > 90 RFLP 型 MY 4

77 \leq E 値 < 90, a 値 \geq 24 RFLP 型 MY 7

E 値 \leq 77, a 値 \leq 24 *S. monticolum*,

側線 8 本 (図-3 C)

体長 < 810 RFLP 型 MY 3

体長 > 810, 排泄口長 \leq 55, D 値 < 42

..... RFLP 型 MY 6

排泄口長 \geq 56, D 値 > 42 *S. kraussei*

側線 9 本

亜縁両側 2 本が不明瞭で消失することもある

(図-3 B) *S. feltiae*

9 本すべて明瞭 (図-3 A) RFLP 型 MY 2

1000 μ m < 体長：大型種群

E 値 > 120 *S. glaseri*

E 値 < 120 RFLP 型 MY 8

1) 小型種

小型種 2 種は尾長が 60 μ m 以下という特徴からも、ほかの日本産 11 種から識別できる。*S. carpocapsae* は南北米大陸、ユーラシア大陸、オーストラリア大陸とほぼ全世界に見られるが、日本では過去に 2 例 (九州と関東北部) の報告しかない (木村・石橋, 1991; 真宮・小倉, 1990)。現在、本種を成分とする輸入線虫製剤が使用されているので、輸入系統が広くエスケープする前に土着系統の検出が望まれる。*S. kushidai* は日本特産種で、主として東海から四国にかけての太平洋沿岸部から検出されている。側帯は、両種とも図-6 B のタイプで

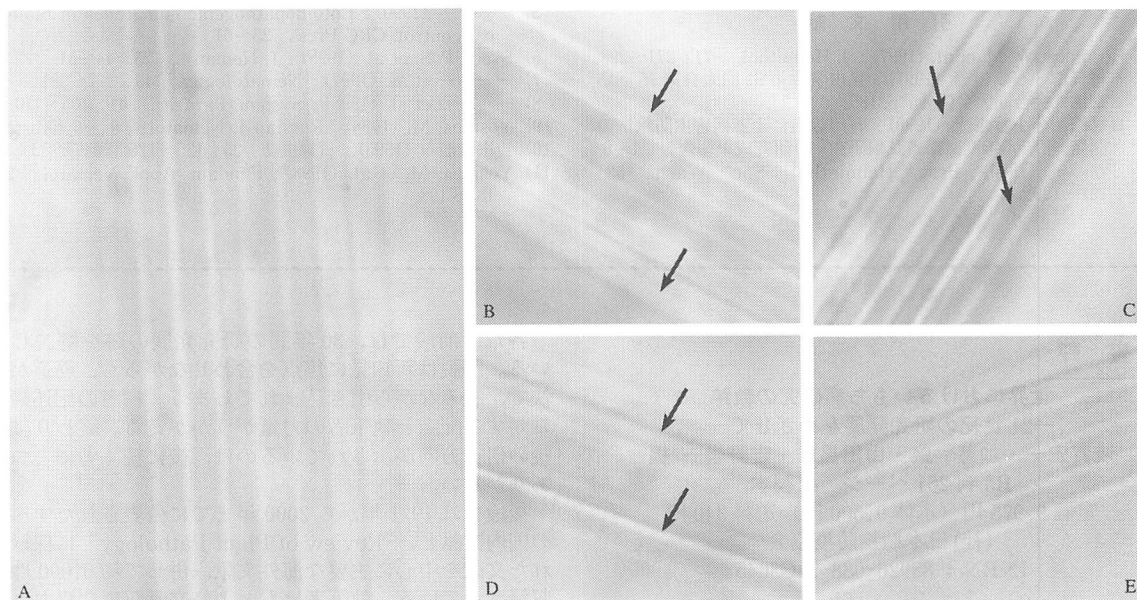


図-3 感染態幼虫の側帯

A：側帯はすべて明瞭な9本の側線からなる。B：側帯は9本の側線からなるが、亜縁部の2本（矢印）は不明瞭で消失することもある。C：側帯は8本の側線からなるが、亜縁部の2本（矢印）は不明瞭で消失することもある。D：側帯は亜縁部の2本のみ明瞭で、最縁部の2本および内部の側線は不明瞭。E：側帯はすべて明瞭な6本の側線からなる。

ある。

2) 中型種

S. monticolum は当初、RFLP 型 MY 1 として報告されたが (YOSHIDA et al., 1998), STOCK et al. (1998) において韓国産の *S. monticolum* と RFLP 型 MY 1 との 17 種の制限酵素による RFLP プロフィールの一致が示されたので、本稿でも STOCK et al. (1998) に従い、RFLP 型 MY 1 を *S. monticolum* とした。本種は RFLP 型 MY 3 とともに日本に最も広く、普通に分布している種である。両種が同所的に検出されたこともあるが、両種は側帯の形状のほか、a 値によりに識別できる。

S. krausseii はヨーロッパおよび北米、*S. feltiae* はヨーロッパ、南北米およびオセアニアと地球規模で見られるが、両種とも日本では北海道の海岸部から検出されているのみである。RFLP 型 MY 2 は *S. feltiae* と形態が非常に類似しており、北海道から渥美半島にかけての海岸部の類似した生息環境に分布している。

RFLP 型 MY 4 は与那国島からのみ検出されている。本種は形態的に *S. affine* に非常に類似している。RFLP 型 MY 5 は山梨から、MY 6 は長野および北海道から検出されているのみである。RFLP 型 MY 7 はヨーロッパで類似した RFLP プロフィールを示すグループが検出されており、日本国内の個体群にも変異が多いので、DNA レベル、形態レベルおよび交配実験による生物学

的レベルでの詳細な検討を要する。

3) 大型種

S. glaseri の識別形質として交接刺先端部に開口部の存在が挙げられるが、RFLP 型 MY 8 も同じような特徴をもっている。なお、MY 8 は西日本の海岸部から検出されている。側帯は、両種とも図-6 A のタイプである。

おわりに

本稿では、形態による日本産昆虫病原性線虫の見分け方を述べたが、“はじめに”で述べたように今回示した未記載種のグルーピングはすべて rDNA の ITS 領域の PCR-RFLP 解析によるグルーピングに裏付けられたものである。PCR-RFLP 解析を使えば、1 個体あれば 2~3 日以内で回答を得ることができる。しかし、既知種の RFLP データすべてが比較できるように、公開・印刷されていないため、現時点では PCR-RFLP 解析法はソーティングには有効かもしれないが、まだ種の同定には完全には対応できていない。したがって、昆虫病原性線虫の PCR-RFLP 解析による同定法については省略するが、興味のある方は HOMINICK et al. (1997) および YOSHIDA et al. (1998) を参照していただきたい。

引用文献

- 1) HOMINICK, W. M. et al. (1997): J. Helminthol., 71: 271~298.
- 2) 木村良徳・石橋信義 (1991): 昆虫学会第51回大会第35回応動昆大会合同大会講要: p. 185.
- 3) 真宮靖治・小倉信夫 (1990): 有用線虫による病害虫防除法の開発. 平成元年度文部省試験研究(1)研究成果報告書: 1~8.
- 4) POINAR (1986): Proc. Helminthol. Soc. Wash., 53: 121~129.
- 5) ——— (1990): Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press: 23~61.
- 6) Stock P. S. et al. (1995): J. Nematol., 25: 44~51.
- 7) ——— et al. (1997): Nematologica, 43: 377~381.
- 8) ——— et al. (1998): System. Parasitl., 41: 105~113.
- 9) YOSHIDA, M. (1998): Russian J. Nematol., 6: 86 (Abstr.).
- 10) 吉田睦浩ら (1995): 日線虫誌 25: 125~126 (講演要旨).
- 11) YOSHIDA, M. et al. (1998): Fundam. Appl. Nematol., 21: 185~198.

書評

世界におけるいもち病研究の軌跡

—21世紀の研究発展をめざして—

浅賀宏一・加藤 肇・山田昌雄・吉野嶺一 編

B5判 261ページ 上製本

定価 9,975円 (本体 9,500円) 送料 340円

(社)日本植物防疫協会

ISBN 4-88926-088-9-C3045

生産調整が始まった昭和45年(1970年)を境として、稲作はかつて経験したことのない苦境に立たされている。この苦境の打開に当たっては、技術の革新に期待されるところが大きい。このような時期に本書の出版は、まことに機を得たものである。

本書は、20世紀後半30年の世界のいもち病研究の軌跡の解説と関連文献の収録からなっている。解説と文献は、「1970年以前の研究史概説」、「病原菌」、「発生生態、疫学、発生予察」、「病態、抵抗性機作」、「品種抵抗性」、「防除」、「イネ以外の植物のいもち病」、「一般・その他」の八つの章に分けて記述され、付録として「日植病報講演要旨」が掲載されている。

各章の前段では、30年間の研究発展の跡を解説している。解説は新知見に焦点を合わせながらも、筋道が明快で、読みながら引き込まれてしまう。編者の記述構成に対する配慮と執筆者の力量がうかがえる。終わりに今後の研究方向が示されているのは、後に続く者にとつてありがたい。

後段では1971年から2000年までに公表されたすべての国内文献と、「Review of Plant Pathology」に採録された文献を中心に主要な海外文献、併せて約6,000件が収録されている。執筆者はもとより文献収集に協力された方々の苦勞のほどが偲ばれる。

付録では、2002年までの日本植物病理学会のいもち病関連の全講演要旨が収録されている。進歩の速い研究の現状、あるいは現場に近い研究機関の動向を知るうえで貴重な資料となっている。

知ることのできるのは過去のみである。将来の方向を予測し、そこに求められる技術を開発するには、過去の研究の正しい認識が不可欠である。その意味で本書が今後のいもち病研究の発展、ひいては稲作技術の改善に果たす役割は計り知れない。本書の出版を喜ぶとともに、より一層広く活用されることを切望して止まない。

(大畑 貫一)

!新刊図書!

世界におけるいもち病研究の軌跡

—21世紀の研究発展をめざして—

浅賀宏一・加藤 肇・山田昌雄・吉野嶺一 編

B5判 261頁 定価 9,975円税込み (本体 9,500円) 送料 340円

1971年以降に世界で発表された稲いもち病の関係論文延べ6,000件以上を分類別に収録し、その分野の専門家に研究内容の概論を執筆いただきました。巻末には「日本植物病理学会」のいもち病関係の講演要旨も収録してあります。いもち病研究に不可欠な書です。

お申し込みは直接当協会へ、前金(現金書留・郵便為替)で申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11

郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03)3944-1561 (代) FAX (03)3944-2103 メール: order@jppa.or.jp