

# ジャガイモシスト線虫防除 用生態的農薬の実用化

福澤 晃夫 [北海道東海大学工学部生物工学科/教授]

西村 弘行 [北海道東海大学工学部生物工学科/教授]

佐藤 敦 [北海道東海大学工学部生物工学科/講師]

百田 洋二 [北海道農業研究センター線虫研究室/室長]

副島 洋 [雪印種苗株式会社技術研究所/研究員]

## 背景・目的

ジャガイモシスト線虫は、ジャガイモトマトを寄主とする世界的に重要な農害虫である。日本へは、昭和30年代にペルーから輸入した肥料鳥糞石に、ジャガイモシスト線虫のシストが混入して侵入したことが、知られている。昭和47年に至り北海道羊蹄山麓で発生が最初に確認された。その5年後、斜里・網走地区で発生したが、この地域へは、別経路でペルーより侵入したことが確認されている。その後、中標津、函館等へと次第に発生地が拡大した。昨年夏に、我が国のジャガイモの33%を生産する十勝平野の一角上士幌町に発生し、台問題となった。北海道の7支庁9000haに被害が拡大し、道産の年産量227万トンのジャガイモが脅威にさらされているが、根本的防除方法が無い。北海道外では、1992年に九州雲仙地区、昨年青森県でも発生が確認された。

ヨーロッパでは、1852年にこのシスト線虫の発生が確認され、それ以後ここから世界各地に伝搬し、昨年インドネシアで発生し、現在世界五十数カ国へ拡大している。世界的規模で被害が発生し、農業関係者の長年の努力にも拘わらず、防除が進展しない理由は、このセンチウの特異な生態による。休眠中の線虫に対して通常の農薬の効果が低く、撲滅ができないためである。この線虫は、極めて寄主特異性が強く、寄主の根が分泌する孵化促進物質に反応して寄生するという特異な整理生態的特徴を持つ。そこで、孵化に関わる生理活性物質をまず解明し、次いでこれを逆に利用して線虫を防除する、いわゆる生態的農薬の開発を目的として研究を行った。防除方法として、輪作体系で、寄主作物の栽培されていない時に、孵化促進物質を散布し、強制的に孵化させ餓死させれば、環境に負荷を与えずに、防除が可能となる。

## 内容・方法

### 2-1. シスト線虫孵化促進物質の歴史

ジャガイモの根から、ジャガイモシスト線虫の卵内2齢幼虫の孵化を引き起こす物質が分泌されている現象を、オランダのBaunackeが1922年最初に報告し、孵化促進物質(Hatching Factor)と呼ばれている。その後、英国のA.R. Todd卿ほか世界の科学者が孵化促進物質の単離と同定

を試みた。しかし、活性物質が微量で不安定なため単離できなかった。

一方、北海道大学・理学部の正宗、福澤らは1985年、近縁種であるダイズシスト線虫の孵化促進物質グリシノエクレピンAを単離し、その構造を報告した。(図1左図)

その後、ジャガイモシスト線虫の孵化促進物質については、オランダの Mulderらは1992年特許として、ソラノエクレピンAを報告した。(図1右図)両方とも類似の構造を持つことが分かる。しかし、後者はその構造から、極性が低く、水溶性ではなく活性本体ではないことを推定した。

### 2-2. ソラノエクレピンAが活性本体でないことの確認

温室栽培したトマト根の浸出液を、水を注いで採取し、濾過した。濾液2Lを分液ロートに入れ、1-プロパノール、1-ブタノールで各5回ずつ抽出した。濃縮して水層から222mg、ブタノール層から5mg、プロパノール層から4mgの残留物が得られた。これらの孵化促進活性を検定したところ、濃度 $10^{-4}$ g/mlで、順に91%、79%、52%の孵化率を示した。(図2)この結果、量的にも孵化率においてもペンタノール抽出物は、極性が低く水溶性が無いことが確認できた。Mulderらは、ペンタノールの抽出物より出発して、ソラノエクレピンAを単離しているので、孵化活性の本体ではないと結論した。

### 3. ジャガイモシスト線虫の生態と生活環

ジャガイモシスト線虫の雌成虫は、秋に死んでシスト化し、体内に約400個の卵を残し、この卵内の2齢幼虫は休眠し、耐久型となる。翌春、近くに寄主が栽培されなければ、土壤中で休眠したまま最長20年もの間生存可能である。春になり気温や水分など外的条件が整い、かつ寄主作物が近くに栽培されると孵化促進物質に感応して孵化が起こる。シストから遊出した幼虫は、寄主の根から分泌される未知の誘引物質の濃度に沿って移動し寄生する。もし寄主植物が無れば、土壤中で次に寄生する機会を長年待つことができる。植物根に侵入した幼虫は、約1ヶ月でⅢ、Ⅳ期幼虫を経て、成虫になる。しかし、この線虫は1年に1回のみの発生であって、年1サイクルである。(図3)

次の4節で述べるように、孵化促進物質には、孵化促進物質の活性を100倍以上に強める孵化共力因子2種類が付随し、これによって、実際の孵化が起こることを解明した。

### 4. 孵化促進物質及び孵化共力因子の分離と製剤化スキーム

近年北海道でトマトの水耕栽培が大規模に行われるようになった。使用後に排出される水耕液は32倍希釈でもこの線虫を孵化させる力を持ち、孵化剤として利用可能である。孵化活性本体は複数存在し、いずれも水溶性である。また孵化には共力因子IとIIが相乗的に作用し、活性がそれぞれ100倍と1000倍に強められる。孵化促進物質の不安定性の原因は、この共力因子の不安定性に起因することを見出

した。不安定性については、7節で述べる。

トマト水耕液を樹脂HP-20に通して、活性物質を吸着させた。これを2-プロパノールで脱着し、濃縮して粗原料を得た。共力因子は、別途トマト根を真空処理し、低温で捕集して共力因子の粗原料とした。

孵化促進物質の製剤化では、天然の蟻促進物質をそのまま利用し、これに共力因子I、IIを添加して高孵化活性であれば、可能となる。(図4)

## 5. 粗原料の調整

トマトとジャガイモを本学の温室にて栽培し、その根そのものと根浸出液および水耕液を採取し研究に用いた。本学の研究に用いた。本学の圃場でジャガイモを栽培し、土壌中に残留する孵化促進物質と孵化阻害物質の研究に用いた。研究の進展に伴い次第に規模が拡大し、トマト水耕液が大量に必要となった。そこで、トマト(品種レッドオーレ等)2棟11,000株の水耕液を、栗山町の農園より購入し実験に用いた。水耕液中の孵化促進物質等の活性物質を活性炭とダイイオンHP-20(40L)吸着筒を通過させた。水耕液からの吸着用カートリッジ2基購入し使用した。

吸着期間1ヶ月のカートリッジより種々の濃度の含水2-プロパノールで脱着した。濃縮し、1ヶ月当たり約100gの粗原料が得られた。粗原料を水と酢酸エチルで分配分離し、水層と二つに分離した。酢酸エチル層に約30%、水層に約70%の物質が移行した。抽出液80Lの濃縮に時間が掛かり、45℃でローリーエバポレーター3台を使用して1ヶ月の時間を要した。この間に、共力因子が消失し、失活することが後に分かった。濃縮物の活性を図5に示した。

## 6. 生物検定法

ジャガイモシスト線虫の孵化率検定には、北海道農業研究センターの隔離温室で培養したシストを用いた。土壌から分離したシストを水に7日以上浸漬し、前処理とした。検定時にシストを壊して中の卵を取り出し、篩を通して卵を集める。シラキウス時計皿1枚当たり約120個の卵が入るように調整する。通常の孵化促進活性を調べるときは、ここに供試液を加え、暗所7日静置後、卵と幼虫を計数して孵化率を求めた。孵化阻害活性試験の際は、調整した濃度の孵化標準液を、総ての皿に添加し、標準孵化率からの減少率を検定した。共力因子の生物検定法もこれと同様に行うことができる。

## 7. 孵化促進物質の不安定性

ジャガイモ(またはトマト)を温室にて栽培し、培地(バーミキュライト)に水を注ぎ、浸出物を得た。濾過後、凍結乾燥し孵化活性を測定した。一方、凍結乾燥後、室温に2ヶ月間放置した物質を同時に生物検定に付した。凍結乾燥した直後は $10^{-5}$ g/mlの濃度で活性値が約82%であった。2ヶ月放置し

た物質は同じ濃度では、28%となり、失活したことが分かった。(図6)

そこで失活速度の決定を次の方法で行った。トマト根の浸出物を所定の濃度に希釈し、5℃の冷蔵庫に保存した。5℃では失活しないと仮定した。室温22℃に取り出した期間(日数)を10日間、5日間、0日間として一斉に生物検定を行った。室温取り出し日数を横軸に、縦軸に孵化率を示した。この際意図して低濃度での失活課程を調べた。失活速度は1次反応速度式に基づいていることを推測でき、半減期は約10日であった。(図7)

実際の圃場では、作物の根から常時孵化促進物質が分泌されるため、不安定性は線虫の孵化に作用後速やかに消失すると見られる。作物が栽培されない年には、孵化が抑制される方が、線虫の生存にとっては都合が良い。

つぎの研究目標として、失活原因の解明を優先し、第9節に記載した。

### 8-1. 孵化促進物質の少量分離(分離スキーム、クロマト分離、HPLC)

ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の単離を行うために、まず少量で活性画分の分離条件を検討した。(この段階では共力因子を考慮していない)原料として、02年10月にトマト栽培温室内の廃液タンクから、水耕液廃液の循環流路を作り、その中にさらしの袋に入れた樹脂 HP-20(1kg)を浸した。2週間後、実験室内で、蒸留水、25%、50%、100% MeOH(各10L)により溶出を行った。減圧濃縮後、得られた各溶出画分の全量を蒸留水10mlに溶解し、その一部を1800倍希釈した溶液を用いて孵化促進活性を調べた。なお、以降、分離過程で得られたすべての画分は、同様に全量を蒸留水10mlに溶解し、その一部を1800倍希釈した溶液を用いて孵化促進活性の検定を行った。

最も強い活性が認められた50%MeOH溶出画分(186.2mg)を、図8に示すスキームに従い、Toyopearl HW40FおよびHW40Sを用いたゲル濾過により分離を行い、活性画分1.2mgを得た。

次いで、HPLCによる分画を試みた。

ジャガイモシストセンチュウの孵化促進物質は、カルボキシル基を持つことが推測されていることから、分離に用いるカラムとして順相分離と弱アニオン交換分離の二つの性質を併せ持つNH<sub>2</sub>カラムを選択した。移動相として40%メタノール(0.1%酢酸)を使用し、溶出物の検出は、示差屈折率検出器およびUV検出器(測定波長254nm)を用いた。

得られたクロマトグラムを、図10に示した。

また、Fr.iの一部を、図10中に示すように、Fr.1ならびにFr.2-1~2-6に分画し、各々の孵化促進活性を調べたところ、Fr.2-1および2-2に活性が認められた。しかしながら、この時点で

HPLC分画前のFr.iの孵化促進活性が、図9Cに示した活性の1/3以下(終濃度 $3.4 \times 10^{-8}$ g/ml、孵化率6%)と著しく低下したため、以降の分画を断念した。

現在、トマト水耕液よりHP20吸着物の大量調製を行い、孵化促進物質の分離・精製を進めている。この際共力因子を考慮して分離・精製を進める。

## 8-2. 孵化促進物質の大量分離

この段階では、孵化共力因子の存在が確認されていなかったため、通常分離・精製の結果を述べる。

水耕液をHP-20樹脂に吸着させ、2-プロパノールで脱着し、濃縮して粗原料とした。ステンレス40Lのカートリッジから、50%含水2-プロパノールで脱着すると、80Lの溶出液が得られ、溶出パターンを図11に示した。

吸着・脱着物は水溶性が高く、溶出した分画No.7(28L)付近に大量に溶出した。後の溶出に当たっては、含水率を減らすグラジエント法で分離溶出させた。

溶出液が大量になり、濃縮に1ヶ月を要した。このため、完全に失活状態になり、孵化活性値は $10^{-4}$ g/mlの濃度で約70%となった。(図5参照)

濃縮物を粗原料とし、次いで溶媒による分配分離を行い、酢酸エチル抽出物、残る水層濃縮物に分画した。これらを同時に生物検定に付した結果を既に述べた(前述図5を参照)

本来最も活性の高かった、水層が高活性であるものの、酢酸エチル層が以外に高活性であった。後に、共力因子Iが脂溶性であることが分かり、酢酸エチル層に、因子Iが移行したためと考えられた。

今後のカラムクロマト分離においては、共力因子Iを添加しながら分離精製を進める予定である。

大量分離の手順として、溶媒分画を始めに行うのが一般的である。ついでHP-20樹脂カラム、トヨパールHW-40カラム等で分離精製し、試料が数十mgに減少した段階でHPLC分離を行う予定である。

今回の実験では、溶媒分画せずに粗濃縮物をHP-20カラムクロマト分離を行ったので図12に示した。粗原料をHP-20に吸着させ、水を減少させるグラジエント法での分離パターンと孵化活性を示した。活性は10%までと、30-50%の含水溶媒で大きく活性物質を2分できた。活性値はかなり高く出ているのは、生物検定にあたり、卵を皿に分注後、更に1週間放置したためであり、水の水のみの活性も孵化率が46%に上昇していた。(図12)

## 9-1. 共力因子の存在証明と分離方法

ジャガイモシスト線虫の孵化促進物質は、不安定で本体の単離は成功していない。不安定性の原因は、共力因子が付随し、しかもこれが揮発性かつ不安定であることを見出した。

共力因子I、IIはいずれも揮発性であるため、トマト水耕液

を濃縮した際失活した。共力因子が揮発性と仮定し、樹脂HP-20の脱着物を凍結乾燥し、水に再度溶かし、凍結乾燥し、これを3回繰り返して失活させた。別に、トマト水耕液を濃縮し、ロータリーエバポレーターの溶媒溜に共力因子の活性があることをつぎのようにして確認した。(図13)

凍結乾燥物を検定する時に、エバポレーターの凝縮水を2.5mlずつ添加して孵化活性を測定した。その結果、繰り返し凍結乾燥物が $10^{-4}$ g/mlで49%の孵化率に低下した。(グラフの◆マーク)

樹脂HP-20吸着物(粗原料)の活性を米印のグラフで示した。失活物質に、前述の凝縮水を添加した場合、 $10^{-7}$ g/mlの濃度で約50%の活性を示した。従って活性は約100日に上昇し、この因子を共力因子Iと呼ぶことにした。(図13)

次に第2の共力因子の存在が予測できた。即ち、前述の記載と同様の実験を行った際、図14のように失活物質を①◆で示した。これに温室栽培中のトマト根浸出液を500倍希釈で添加した時の結果を⑥×マークのグラフで示した。

活性は、 $10^{-8}$ から $10^{-7}$ g/ml程度の低濃度でブロードなピークやシャープなピークが現れ、第2の共力因子を想定した。それは、特に新鮮な根浸出物を添加した場合にのみ強く現れた。これが孵化促進物質の主たる不安定性の原因と予想した。(図14)

ピークの形状と濃度が種々変化するが、新たなピークを第2の因子、共力因子IIと呼ぶことにした。

次に、さきの溶媒溜の凝縮水2Lを取り、エーテル抽出し、濃縮したが、TLC上でスポットを確認できなかった。

そこで、トマト水耕液中の濃度が極めて低いためと判断し、吸着済みの樹脂HP-20から真空下で直接共力因子IIの脱着と捕集を試みた。捕集物を、共力因子IとIIの粗原料としてこれを生物検定に付すと、共力因子活性が現れた。(図15)

図15の説明：共力因子IIの効果は▲マークのグラフで $10^{-9}$ g/mlの濃度で現れた。なお、◆マークのグラフは、HP-20樹脂から2-プロパノール溶出液の活性を示した。この試料からは、共力因子Iが失われていないため、単独で $10^{-6}$ g/mlの濃度まで活性があると見なされた。これは、濃縮しなければ、共力因子Iで飽和した状態になっていることを示す。孵化促進物質本体の活性は、純化する前の段階で濃度 $10^{-4}$ 、共力因子Iが添加されると $10^{-6}$ 、ここにさらに、共力因子IIが添加されると $10^{-9}$ g/mlに上昇することが確認できた。

真空捕集で共力因子Iを単離すると、量的に少ないため、HP-20から直接溶媒で抽出した。しかし、この原料は不順物が多く単離するためには、大量で純度の高い原料を出発物質とする必要があった。そこで出発原料をトマト根そのものに改め、真空にして、-45℃と-196℃で蒸発する揮発性物質を捕集した。低温トラップで得られた前者を共力因子I、後者を



共力因子Ⅱとし、単離用の粗原料とした。

## 9-2 共力因子Ⅰ、Ⅱの分離と解析

共力因子Ⅰの原料をトマト根として真空中捕集したが、収量が少なく、単離するためにはより改良が必要であった。真空捕集した共力因子を含む水を2L取りエーテルで5回抽出し、濃縮した・得られた物質11mgのTLCをヘキサン-エーテル(1:1)で展開した。TLCでRf0.5を中心にはほぼ全部の物質がこの低極性領域に現れた。そこで、根(約2L)そのものを2-プロパノールで抽出し、濃縮後水とヘキサンで分配分離を行った。有機層を乾燥後濃縮して、160mgの因子Ⅰの原料を得、ついでシリカゲルクロマト分離を行い、3画分に分けた。IRより、炭化水素、ケトン、脂肪酸の存在が推測できた。TLCの展開図とIRスペクトルを図16に示した。現在継続して単離・精製を行っている。

共力因子Ⅱの単離または同定に向けて、まずガスクロマトグラフ分析を行った。カラム温度が40℃ではほぼ先端に流出したため、GC-MS分析では、カラム温度を30℃に設定した。保持時間の短い低沸点側3つのピークについてマススペクトルを測定した。(図17)その結果m/z58、46、59のピークが確認できた。(図17、18、19、20)現在これら3つの分子式を決定中である。

### 10-1. 2002年度の圃場散布試験

倶知安町富士見のジャガイモシスト線虫発生圃場に、トマト水耕液散布用に借上げた。トマト水耕液を濃縮することなくそのまま散布し、散布量は広さ1m<sup>2</sup>当たり18Lとした。散布を5/9、6/16、7/18、8/13(月/日)の4回行った。散布日に散布前の土壌試料を採取した。持ち帰った土に含まれるシストのうち、新しいシストを選択して拾い、含まれる卵と空卵を計数し、空卵率の経時変化を追跡した。(図21)当初、5月の空卵率は33%であったが、8月13日の採取シストでは、94.5%まで上昇した。空卵を実体顕微鏡下で計数することはかなり難しい作業で、2003年度に、乾土20gに含まれる全シスト内の線虫頭数を計測する方法に改めた。簡単な散布実験で、95%の幼虫を孵化させて、餓死させることが確認できた。

### 10-2. 2003年度の圃場散布試験

倶知安町の前年と同じ圃場にて、2003年度も、トマト水耕液の散布実験を行った。5月、6月、7月、8月の4回散布し、その都度土を採取し風乾した。乾燥後乾土20g中の全シストを取り分け、全線虫頭数を計数し、平均値から線虫密度を求めた。測定方法を詳述すると、まず圃場の土壌を5月に基準値用に3地点で採取した。ここに水耕液を18L/m<sup>2</sup>散布し、その後散布毎に散布前の土壌から3反復の土壌試料を集め、直ちに室温で風乾した。完全に乾燥後、20g(2反復)の乾土を水に懸濁させ、全シストを浮かせて網でシストをすくい取った。シストを壊し全卵と全幼虫を水20mlにて攪拌し、1mlを3

回採取し、卵と幼虫の総和頭数を求め、平均値の20倍を乾土20g当たりのジャガイモシスト線虫の密度とした。

この結果当初5月に3,700頭が、9月採取時では平均値は18反復の値が8.8頭(0.2%)に激減した。圃場の線虫の99.8%が孵化し、餓死したことになる。(図22)

さらにこのデータを補足するため、並行して北海道農業研究センターの隔離温室で、同様のポット試験を行った。この結果、乾土20g当たりの線虫頭数は、4.4%に減少していた。圃場試験より減少率が少ないのは、1ヶ月に一度のみの散布(トマト水耕液吸い上げ)で、実際の圃場より乾燥期間が長いためである。この結果は、圃場土壌でのバールマン法による土壌中に遊出している幼虫の計数結果でも支持された。(図23)

## 11. ジャガイモ栽培跡地に残留する孵化阻害物質と孵化促進物質

水耕廃液には有用な孵化促進物質の他に孵化阻害4物質と高濃度の無機肥料が含まれる。圃場に施用する前に無機塩等を除く目的で水耕液をポリスチレン系樹脂を通過させた。当初活性炭吸着を検討したが、脱着効率が悪く後にHP-20樹脂を使用した。

一方、圃場には、安定で長期間残留する孵化促進物質と逆に孵化を阻害する物質も残留する。孵化剤散布以前に圃場に残るこれらの活性物質の動態を知る必要がある。

ジャガイモ栽培後3ヶ月の跡地から生土を採取しメタノールで抽出した。濃縮すると0.1%の収量で有機物が得られた。この物質の孵化促進作用と、10<sup>-6</sup>から10<sup>-8</sup>g/mlの濃度で約12%の孵化を促進した。同じ試料の孵化阻害活性を調べるために、トマト根浸出液を、単独で約60%の孵化率を示すように添加して、ここ標準孵化率からの減少率を孵化阻害率とした。その結果、図23、24に示すように、最大22%の減少が見られた。1つの混合物に、孵化活性と孵化阻害活性を示す2種類の物質が共存していることが分かった。酢酸エチルと水で分配抽出すると孵化阻害物質は、酢酸エチル層に移行し、やや脂溶性物質であることが分かった。

つぎに、孵化促進物質は水溶性であることから、跡地の土壌を水のみで抽出し、濾過後凍結乾燥した。このものの孵化促進活性を調べると、10<sup>-4</sup>g/mlで約52%であった。(図25)■マークが単独の孵化率である。この試料にトマト根浸出液を1000倍に成るように添加したところ、驚いたことに、孵化率(共力因子Ⅱの活性効果で、10<sup>-10</sup>g/mlの超低濃度で90.5%の高孵化率が現れた。繰り返し実験でも同じ結果を確認した。このような特異な活性ピークがある狭い濃度で度々観測された。この理由は、孵化阻害物質が試料中に存在するため、10<sup>-8</sup>g/ml濃度まで孵化阻害物質に抑制されており、均衡が壊れた濃度10<sup>-10</sup>g/mlで孵化が爆発的に起こる

ものと推測できる。これを引き起こすのは、共力因子Ⅱの作用で、これを解明し利用すると、生態的農薬として微量で活性を持つ農薬の開発が可能となる

#### 12. 今後の研究方向と問題点

土壌散布したトマト水耕液そのものは活性であるが、散布量を減少させ、水を除いた製剤化が必要である。このためには、濃縮時に失われる共力因子Ⅰ、Ⅱの構造決定・同定を行い、濃縮孵化製剤を強化する必要がある。孵化促進物質の活性本体が未知のため、共力因子を添加した生物検定法を用いて、分離精製し、単離と構造決定が必要である。

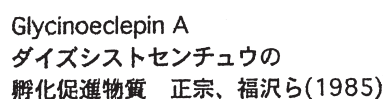
#### 13. まとめ

- (1) ジャガイモシスト線虫の孵化は、孵化促進物質とともに、孵化共力因子の存在が、必須であり、共力因子ⅠとⅡが

存在する。これらが相乗的に働く活性が10万倍以上になる。

- (2) 孵化促進物質が不安定とされ、活性本体が単離できない理由は、この共力因子に起因することを解明した。生物検定に当たり、共力因子を考慮すれば、孵化促進物質本体の単離が可能となる。

- (3) 現在トマト水耕液を孵化促進製剤としての実用化に向けて、活性物質を濃縮し、孵化共力因子で強化すれば、生態的農薬として使用可能となる。



濃度-log (g/ml)	14 (◇)	15 (□)	16 (△)
4	52.0%	78.0%	92.0%
5	42.0%	68.0%	88.0%
6	50.0%	50.0%	50.0%
7	30.0%	28.0%	30.0%

図3 シストセンチュウの生態と生活環

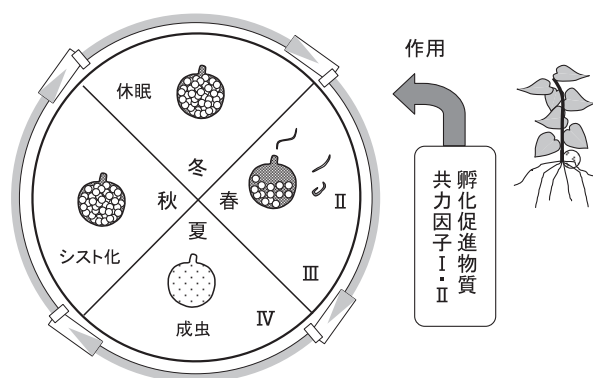


図4 瞬化促進物質及び共力因子の分離と製剤化スキーム

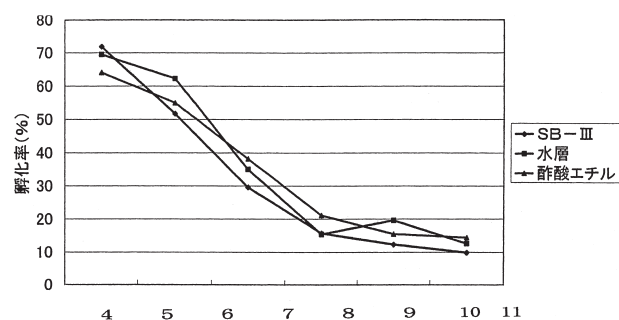
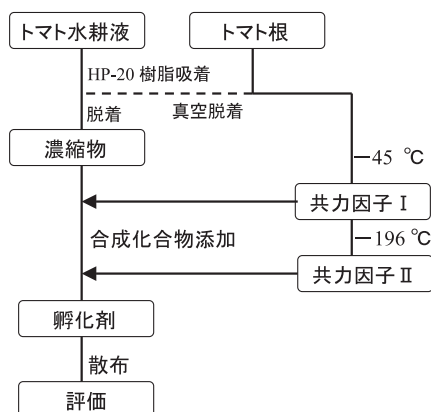


図5 原濃縮物、酢酸エチル層、水層濃縮物の孵化活性  
 説明：原濃縮物SB-Ⅲ(◆)。水層(■)。酢酸エチル層(▲)。3者の活性にあまり差が無いのは、酢酸エチル層に共力因子が移行したためである。

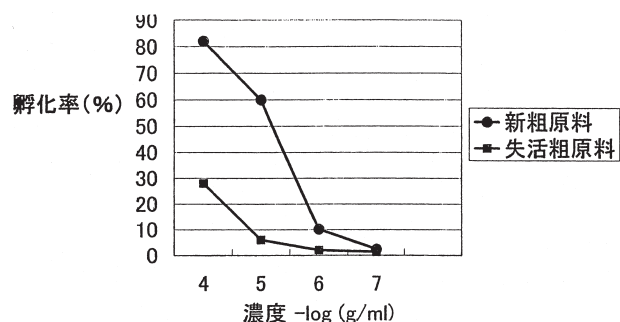


図6 ジャガイモ根侵出物の不安定性

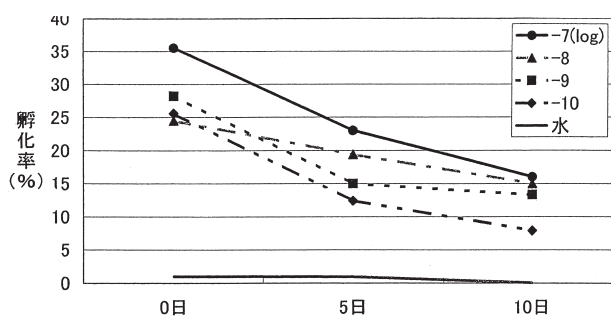


図7 トマト根侵出物の室温に於ける失活速度

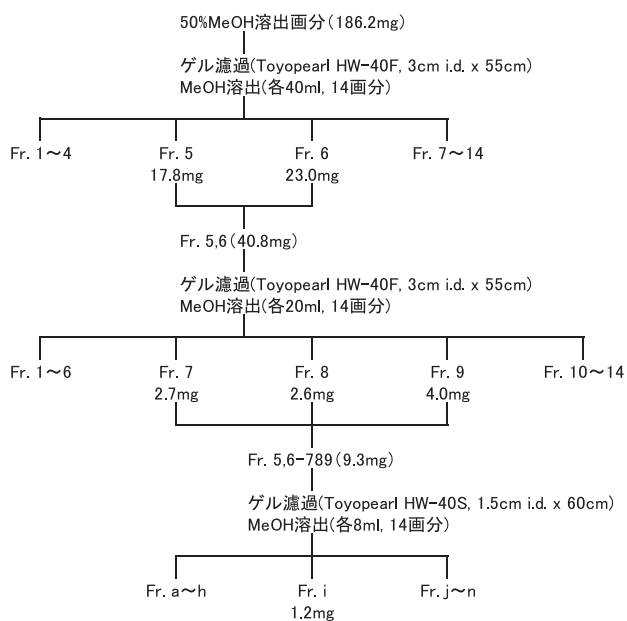


図8 ゲル濾過による活性画分の分離。

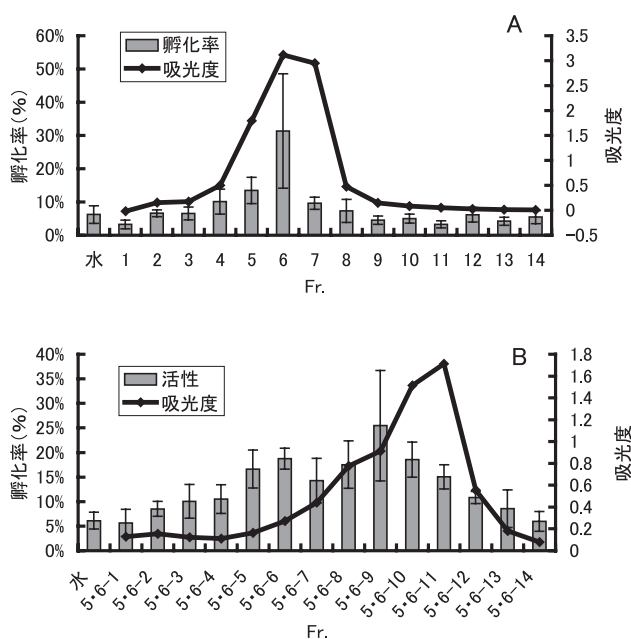


図9 ゲル濾過分離画分の孵化促進活性

A: HW-40F分離1回目、B: HW-40F分離2回目、C: HW-40S分離。

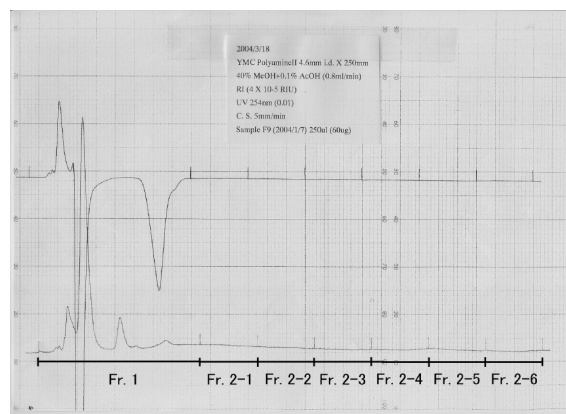


図10 得られたクロマトグラム

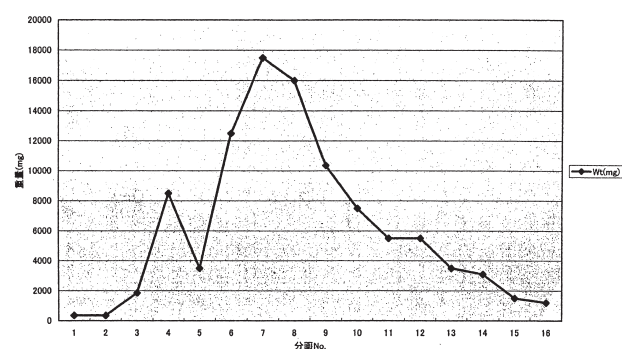


図11 Hp-20樹脂から2-プロパノールでの脱着

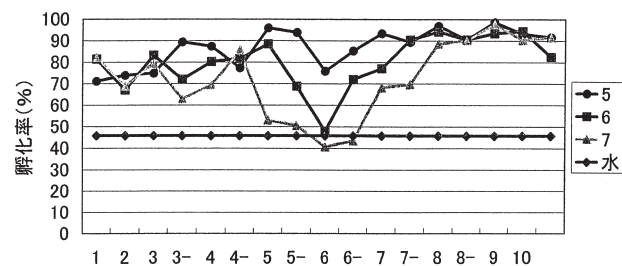


図12 樹脂HP-20のカラムクロマトグラフィーによる活性分離

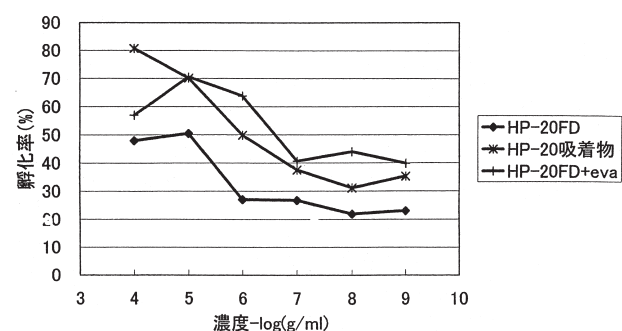


図13 共因子Iの存在



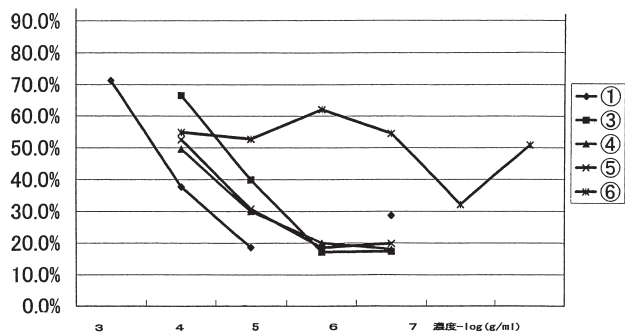


図14 共力因子Ⅱの存在

#### 4 共力因子Ⅱの効果

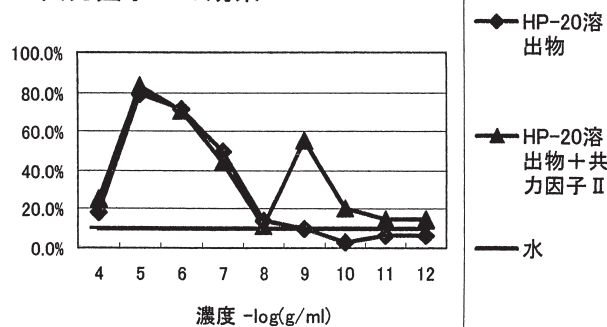


図15 樹脂Hp-20溶出液に共力因子Ⅰ及びⅡを添加した場合の孵化活性

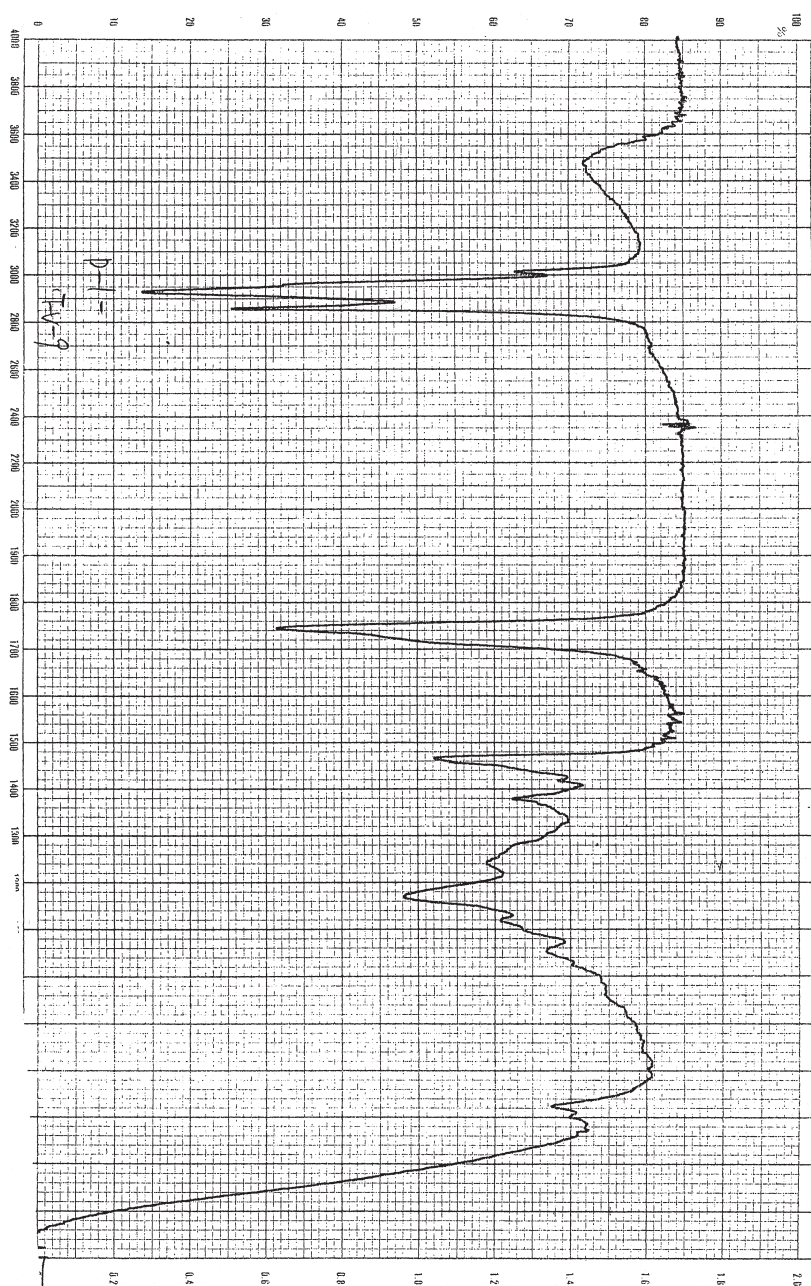


図16 共力因子Ⅰを含む物質のIRスペクトル



File: FUKUZA2 Date Run: 02-13-2004 Time Run: 14:24  
 Sample: TC-WAX 60m x 0.32mm He(2ml/min) 30C  
 Instrument: JEOL JMS600 Run By: MSro  
 Inlet: GC Ionization mode: EI+ Printed by: MSro

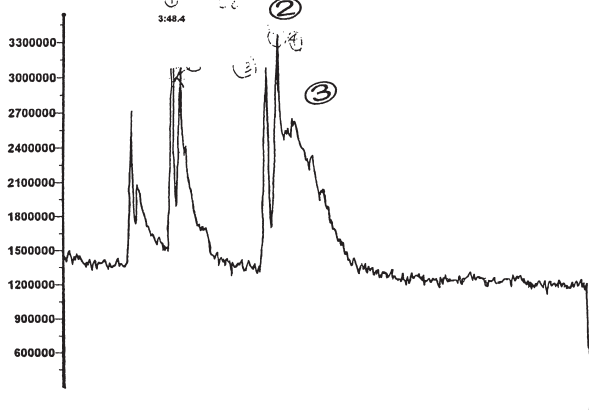


図17 GC=MSのGC分離

File: FUKUZA2 Date Run: 02-13-2004 Time Run: 1  
 Sample: TC-WAX 60m x 0.32mm He(2ml/min) 30C  
 Instrument: JEOL JMS600 Run By: M  
 Inlet: GC Ionization mode: EI+ Printed by: M

Scan: 92 (90) R.T.: 4:02.4  
 Base: m/z 43; 66.6%FS TIC: 1382828

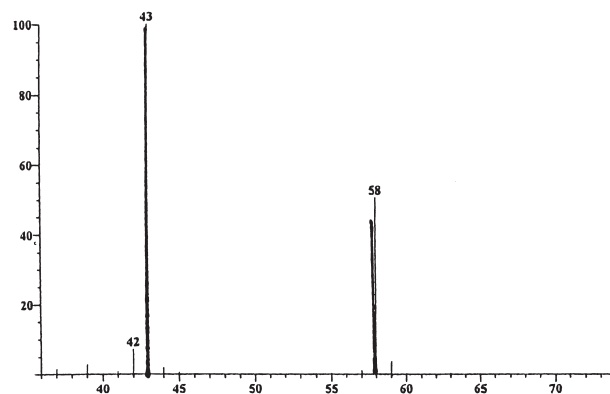


図18 ピーク①MS

File: FUKUZA2 Date Run: 02-13-2004 Time Run: 14:24:58  
 Sample: TC-WAX 60m x 0.32mm He(2ml/min) 30C  
 Instrument: JEOL JMS600 Run By: MSroute  
 Inlet: GC Ionization mode: EI+ Printed by: MSroute

Scan: 168 (177) R.T.: 6:34.1 #Ions: 122  
 Base: m/z 46; 44.5%FS TIC: 981704

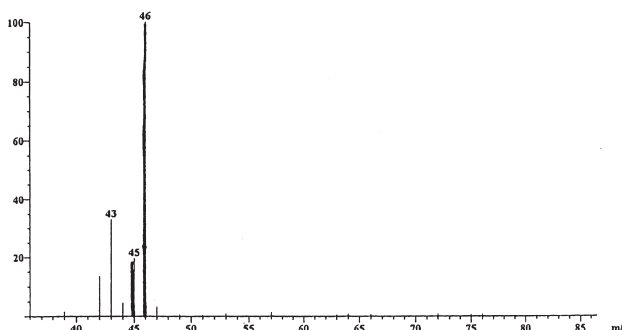


図19 ピーク②MS

File: FUKUZA2 Date Run: 02-13-2004 Time Run: 14:24:58  
 Sample: TC-WAX 60m x 0.32mm He(2ml/min) 30C  
 Instrument: JEOL JMS600 Run By: MSroute  
 Inlet: GC Ionization mode: EI+ Printed by: MSroute

Scan: 159 (164) R.T.: 6:16.1 #Ions: 132  
 Base: m/z 45; 60.5%FS TIC: 1537296

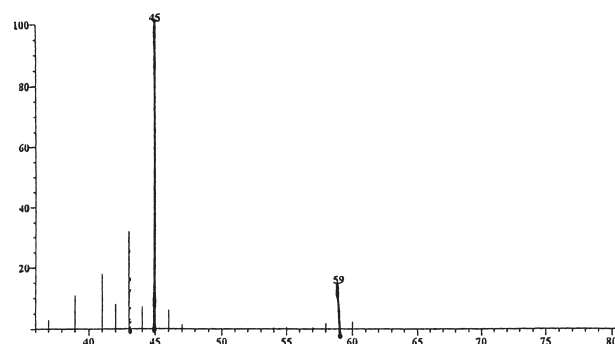


図20 ピーク③MS

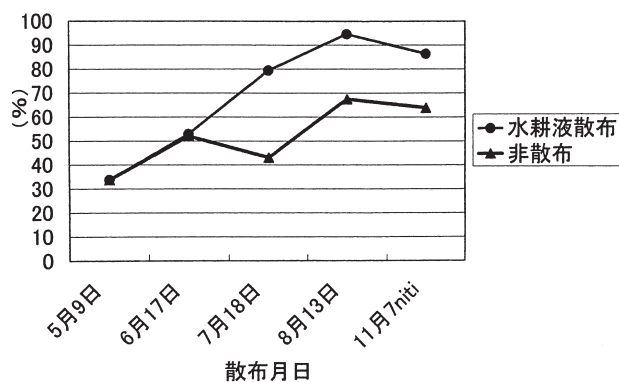


図21 トマト水耕液散布による空卵率の上昇

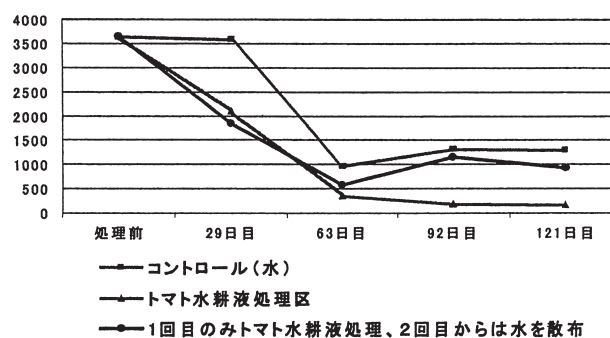
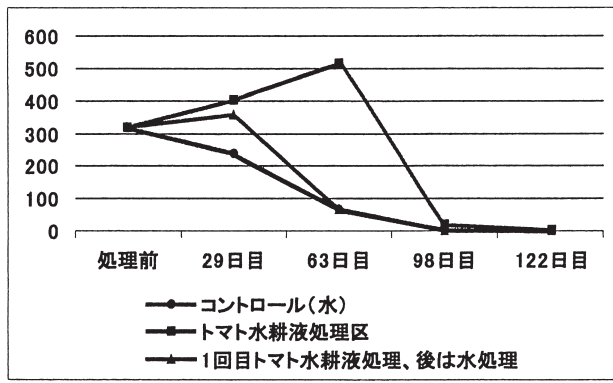


図22 トマト水耕液の圃場散布効果、ポット試験



(土壌20g中の卵幼虫数)

図23 ベールマン法による、遊出幼虫の動態

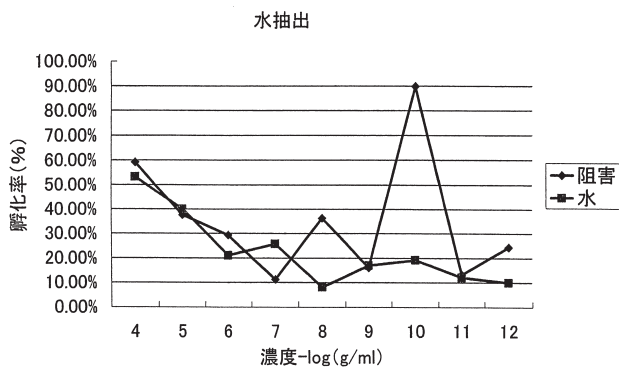
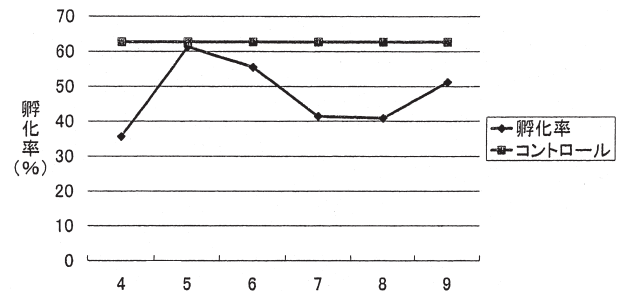


図25 土壌抽出物とトマト根侵出液(1/1000)の相互作用



土壌抽出物孵化活性

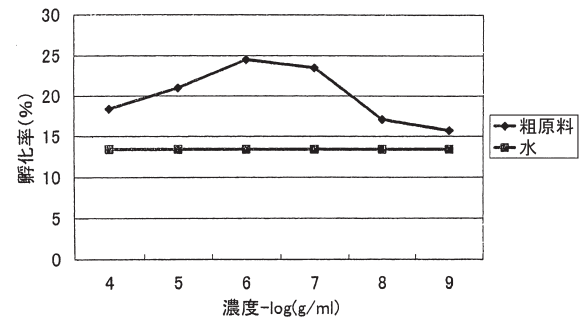


図24 ジャガイモ栽培跡地の孵化促進活性と孵化阻害活性