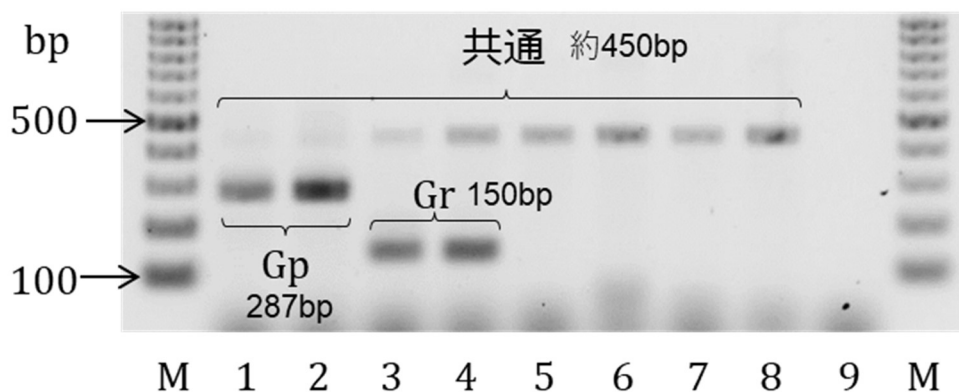


禁転載

ジャガイモシストセンチュウ類 2種の同時判別技術 標準作業手順書

公開版



目次

はじめに	1
免責事項	4
I 技術の特徴	5
1. 技術の概要と適用場面	5
2. 技術の優位点と導入メリット	8
(既存技術の概要)	11
II Gr/Gp 判別作業実施手順	13
1. 技術の構成	13
2. 幼虫からの DNA 抽出の手順	14
(1) 準備するもの	14
(2) 実施手順	15
3. シストからの DNA 抽出の手順	17
(1) 準備するもの	17
(2) 実施手順	18
4. マルチプレックス PCR の手順	19
(1) 準備するもの	19
(2) プライマー配列とプライマーミックスの調製	20
(3) 実施手順	21
5. 電気泳動と判定	22
(1) 準備するもの	22
(2) 実施手順	23
補足情報	25
1. ジャガイモシストセンチュウ類の生態	25
2. ジャガイモシストセンチュウ類による被害	26

3. 抵抗性品種の特徴とその利用	28
4. ふるい分けシスト流し法による土壌からのシスト分離法	28
参考資料	30
担当窓口、連絡先	31

はじめに

2015年8月、北海道網走市の一部のほ場において、日本では未確認であったジャガイモシロシストセンチュウ *Globodera pallida*（以下、Gp と省略）が発見されました。Gp は、既に日本へ侵入している近縁のジャガイモシロシストセンチュウ *Globodera rostochiensis*（以下、Gr と省略）と同様に、南米を原産地とするバレイショの重要害虫で、世界の主要バレイショ栽培地帯に発生が拡大しています。本種が加害すると根の養水分吸収が妨げられ、著しい減収となります（ジャガイモシロシストセンチュウ類の詳しい生態および被害については、補足情報の1および2（25～27ページ）を参照ください）。

両線虫種は植物防疫法（<https://elaws.e-gov.go.jp/document?lawid=325AC0000000151>）に定められる「検疫有害動植物」の一つであり、輸入検疫の対象害虫ですが、それと同時に本線虫類は種いもと一緒に移動・分散するリスクがあることから、国内検疫（種馬鈴しょ検疫）の対象害虫でもあります。これらの線虫が発生した畑では種いもの生産ができなくなりますので、種いも生産農家にとっては大きな損害となります。

Gp および Gr の形態および生態に違いはほとんどなく、顕著な違いは抵抗性を巡る状況（抵抗性品種育成の難易や抵抗性打破リスク）が異なることくらいです（補足情報3（28ページ）を参照ください）。これらの線虫は通常、「シスト」と呼ばれる状態で土壤中に潜在しています（図1）。シストの中には線虫の卵が数百個（多くは100～400個）内蔵されています。シスト内の卵は乾燥や低温（凍結）に対して非常に強く、バレイショを栽培しなくても土壤中で10年以上生存することができるとともに、農作物や農業機械に付着した土壌とともに別のほ場に容易に移動し、発生地域が拡大する原因になります。

これらシストセンチュウに対する実用的な防除対策は抵抗性品種を活用することですが、Gp に対する抵抗性品種は、その発生時に日本で利用できるものはありませんでした。国

内において Gp の発生が拡大し、まん延することはわが国のバレイショ生産にとって非常に大きな脅威であることから、2016 年秋以降、Gp のまん延を防止するため、植物防疫法に基づき、国（農林水産省）による緊急防除（詳しくは次ページコラムを参照ください）が開始されました。

緊急防除において Gp を的確に防除するには、その発生範囲・発生ほ場を明確にする必要があります。土壌中に Gp がいるかどうかの調査は、一般的に補足情報 4（28～29 ページ）に記載の方法で土壌中からシストを分離して調査するか、または、カップ検診（手法は「バレイショのジャガイモシロシストセンチウ抵抗性検定マニュアル」https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/134414.html に記載）を用いて調査します（図 I - 2）。しかしながら、特に北海道では Gr が既に広く分布していますので、シストが検出されただけでは Gp の発生を判断できません（シストの形状で Gr と Gp を見分けることは困難）。検出されたシストの種判別には、これまで PCR-RFLP 法（後述）が用いられていましたが、1 個体ずつしか処理できないうえ、制限酵素処理を要するため、多くの手間がかかり、非効率でした。また、カップ検診では、種いもに Gr 抵抗性品種を用いれば Gp だけが検出されるはずですが、稀に日和見感染的に寄生してシストを形成する Gr が認められます。本調査は緊急防除の実施を決める重要な根拠であると共に、Gp 発生の有無は生産者にとっても重大事項ですので、正確を期すためにカップ検診で検出されたシストについても種判別を行う必要があります。そこで、これらのシストを迅速、正確かつ簡便に判別する技術の開発を行いました。

本手順書で紹介する技術は、新たに設計したプライマーを用いたマルチプレックス PCR 法によって、Gp と Gr を特異的に識別するものです。既存技術と比較して、簡便さ、コスト、時間、信頼性（偽陰性・偽陽性への対策）などにおいて優位な技術となっています。今後の Gp 発生調査や防除効果確認調査、あるいは土壌検診や植物検診で検出され

たシストの種判別に寄与すると期待されます。本手順書が、これら調査の効率化・精度向上のため有効な手引きとなることを期待いたします。



図 1 ジャガイモシロシストセンチュウのメス成虫とシスト

左：バレイシヨの根に着生したメス成虫（白色）とシスト（褐色）。

直径約 0.5～0.7mm。

右：シストを壊して内部の卵を露出させた様子

緊急防除とは、国内に侵入・発生した病害虫により、農作物等に大きな被害が生じる恐れがある場合に、その病害虫を駆除し、又はまん延を防止するため、植物防疫法第 4 章「緊急防除」に基づき、緊急的に実施される防除措置です。Gp の緊急防除では、1) 寄主植物の栽培禁止、2) Gp のまん延防止のため植物防疫官が必要と認めるものの廃棄、3) 病害虫付着の恐れのある植物・容器等の移動制限、といった対策とともに、Gp が確認されたほ場における防除及び病害虫付着の恐れのある農機具等の洗浄等の基本的なまん延防止対策が実施されます。詳しくは「植物防疫法：<https://elaws.e-gov.go.jp/document?lawid=325AC0000000151>」および農林水産省ホームページ「ジャガイモシロシストセンチュウに関する情報：https://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/keneki/k_kokunai/gp/gp.html」掲載の最新情報を参照下さい。

免責事項

- 農研機構は、利用者が本手順書に記載された技術を利用したこと、あるいは技術を利用できないことによる結果について、一切責任を負いません。
- 本手順書に記載の図 I -1, I -2, I -3 および II -5 は農研機構 普及成果情報：緊急防除の効率化に貢献するジャガイモシストセンチュウ類 2 種の同時診断技術（病害虫・鳥獣害 2019 年）より転載または一部転載されたものです。その他の図はクリエイティブ・コモンズ 4.0 表示の CC-BY に該当し、引用元を明記すれば資料の再配布・加工は営利・非営利目的に関わらず認められています。
- 本手順書に記載の方法は、Sakai et al. (2019) (Nematol. Res. 49, 19-27) において検証された範囲において有効性を確認したものであり、検出感度や特異性について必ず同じ結果が得られることを保証したものではありません。

I. 技術の特徴

1. 技術の概要と適用場面

本技術は、複数の標的 DNA 断片を同時に増幅するマルチプレックス PCR 法により、ジャガイモシストセンチュウ類 2 種（Gr および Gp）を同時に判別する技術です（図 I-1）。

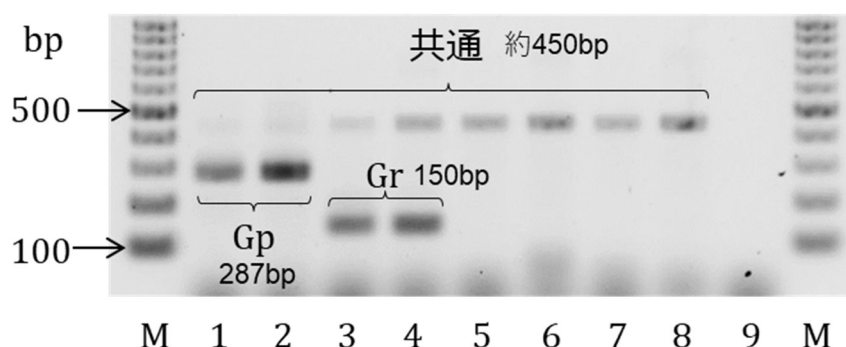


図 I-1 新規判別技術によるジャガイモシストセンチュウ類の判別

1,2: Gp 3,4: Gr 5-8: 他のシストセンチュウ 9: 滅菌水 M: マーカー

本技術によって判別しようとする対象は、主に以下のものです：

- 土壌検診（土壌採取 + シスト分離¹）の結果得られるシスト
- カップ検診（カップ内の検診土壌にバレイシヨを植え付け、暗黒で約 60 日培養）の結果得られるシスト

これらの検診が行われる発生調査等として以下が挙げられます：

- Gp 発生地域における防除対策の効果確認のための調査
- Gp 発生地域周辺における発生範囲特定のための調査
- Gp 未発生地域における発生調査
- 種いも生産圃場における指定種苗検疫

¹ 補足情報 4(p 28, 29)参照

これらの調査・検査で得られたシストが Gp であるか Gr であるか（あるいはそれ以外か）を迅速、正確かつ簡便に判別するために本技術を用います（図 I -2、3）。なお、Gp または Gr が発生するほ場の土壌を用いて調査・研究を行う場合には、事前に植物防疫所に届出を行う必要があります。



図 I -2 ジャガイモシストセンチュウ類判別技術の適用場面

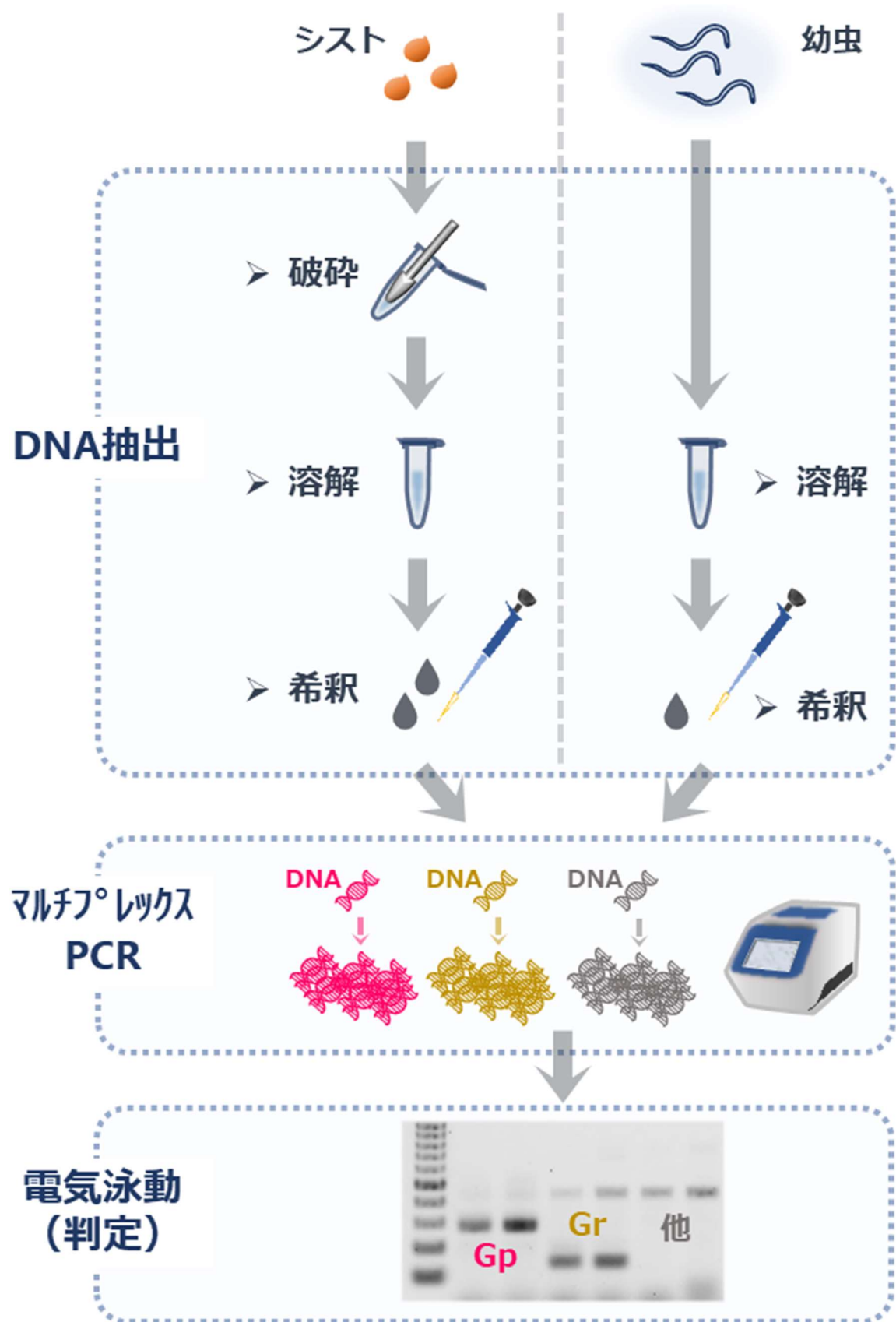


図 I -3 本技術によるジャガイモシストセンチュウ類判別の工程概要

2. 技術の優位点と導入メリット

本技術は、既存技術（11～12 ページ）と比較して簡便さ、コスト、時間、信頼性（偽陰性・偽陽性への対策）などにおいて優位な技術となっています（表 I -1：時間、コスト比較）。

表 I -1 各診断法の作業工程、時間および試薬代の比較

新規 マルチプレックス PCR 法	既往の マルチプレックス PCR 法*	従来法 (PCR-RFLP 法)
1. PCR 反応液調製 (30 分)	1. PCR 反応液調製 (30 分)	1. PCR 反応液調製 (30 分)
2. PCR 反応 (1 時間 5 分)	2. PCR 反応 (1 時間 20 分)	2. PCR 反応 (1 時間 30 分)
3. 電気泳動・染色 (1 時間)	3. 電気泳動・染色 (1 時間)	3. 電気泳動・染色 (1 時間)
		4. 制限酵素反応調製 (30 分)
		5. 制限酵素処理 (4 時間以上)
		6. 電気泳動・染色 (1 時間)
(合計 2 時間 35 分)	(合計 2 時間 50 分)	(合計 8.5 時間以上)
試薬代** : 324 円	371 円	770 円

※ 反応液調製は一律 30 分とし、PCR 反応時間は使用機種により若干異なる。

* 従来法と同じ DNA 抽出と Bulman and Marshall (1997) の診断法の場合

** 幼虫 1 頭から DNA を抽出して結果を得るまでの試薬代試算

- 従来法である PCR-RFLP 法と比較して、作業工程、時間および試薬コストが半分以下で実施可能です（PCR-RFLP 法は植物防疫所の実施手順に準拠して試算）。
- 既往のマルチプレックス PCR 法と比較して、偽陰性および偽陽性を防止する措置を取り入れており信頼性が高くなっているうえ、時間やコストのうえでも優れています。

上記の優位性を得るために、本技術は既存技術に対して以下の改良を施しています。

【DNA 抽出法の改良】

幼虫から DNA を抽出する最も簡便な方法は、抽出反応液中に幼虫を移し、60℃・20 分の熱処理を行うというものです（Tanaka *et al.*, 2012）。この方法のデメリットとして以下が挙げられます：

- ✓ 試薬キットを用いること。
- ✓ 微小な幼虫を針などでチューブに移す必要があること（熟練を要する）。

とりわけ線虫にはプラスチックに付着する性質があるため、プラスチックチップを用いるマイクロピペットで線虫を移すことが困難であることが課題でした。そこで、本技術では以下の改良を行いました：

- ① 界面活性剤溶液中であれば線虫がプラスチックに付着しなくなることを利用して、マイクロピペットで簡便に幼虫をチューブに移すことが可能となるよう工夫しました。
- ② 試薬キットを用いず、基礎試薬を組み合わせることでコストを削減しました。
- ③ 上記の方法をシストからの DNA 抽出に応用しました。

【マルチプレックス PCR 法の改良】

本技術では以下の改良を行いました：

- ① PCR 反応をより短時間で行えるよう、通常 3 ステップの PCR サイクルを 2 ステップに

するため、より種間変異が期待できるミトコンドリア DNA のサブゲノムに着目してプライマーを設計しました。ジャガイモシストセンチュウ類のミトコンドリア DNA は複数のサブゲノム (scmtDNA) から構成されており、GrとGpではscmtDNAの構成や配列に大きな種間差が見られます。Grについては、Gr-scmtDNA Iの非コード領域に、GpについてはGp-scmtDNA IVの非コード領域に特異的プライマーを設計しました (図 I-4、配列は p20)。

- ② 既往技術にはなかったシストセンチュウ共通プライマーを組み込んで非標的種でもバンドが見られるようにしました (偽陰性の回避、図 I-1)。共通プライマーは、核リボソーム RNA 遺伝子領域において、主なシストセンチュウ類に共通する配列から設計しました (図 I-4、配列は p20)。
- ③ 過去に増幅させた同領域の DNA が PCR 反応液に混入 (キャリーオーバー) することによって生ずる偽陽性を防ぐため、混入した DNA を除去できる工程 (市販の試薬キットによるウラシルを用いたキャリーオーバー防止 PCR) を導入し、正確性を向上させました (偽陽性の防止)。

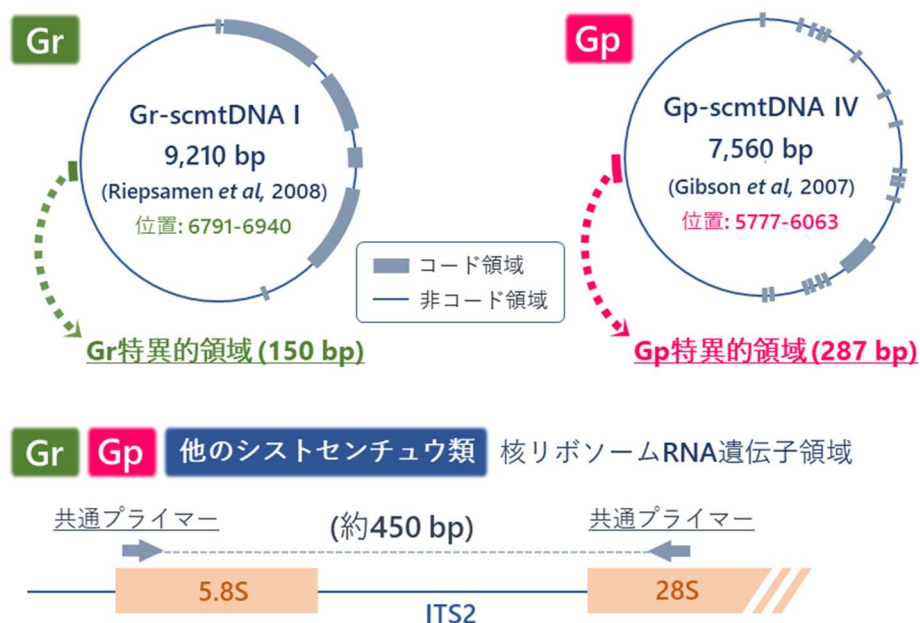


図 I-4 各プライマーの標的領域

既存技術の概要

【PCR-RFLP 法】

PCR 法により増幅した DNA を、制限酵素（特定の塩基配列を認識して DNA を切断する酵素のこと）を用いて切断した際に生じる断片の数やサイズの種間差を利用して種判別する方法です。日本においては線虫の主な診断法として従来用いられています（図 I -5）。PCR 増幅と制限酵素処理を行うため、工程が多くなり手間と時間を要します。また、複数個体をまとめて調査するには適してなく、多個体を調査する必要がある場合には手間がかかります（複数種が混在する可能性があり、同時に処理するとバンドパターンが乱れるため）。

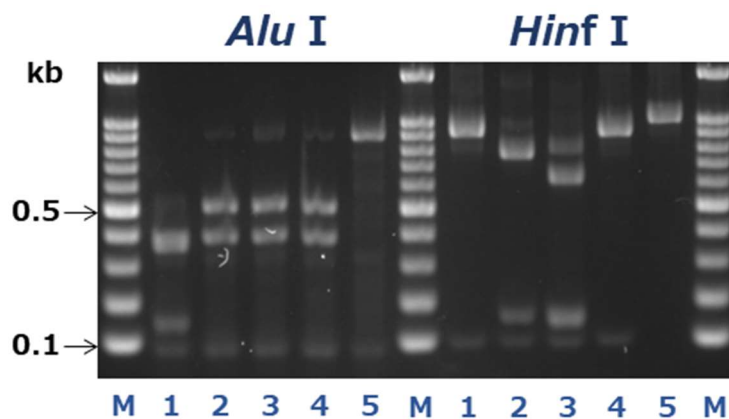


図 I -5 PCR-RFLP 法による判別

rRNA 遺伝子領域を 2 種類の制限酵素（*Alu I* および *Hinf I*）で処理したパターン。
1. Gp 2. Gr 3. *Globodera ellingtonae* 4. *G. tabacum*（タバコシストセンチュウ） 5. *G. artemisiae*（ヨモギシストセンチュウ） M. 分子量マーカー

【既往のマルチプレックス PCR 法】

マルチプレックス PCR 法では、複数の個体を同時に調査可能です。しかし、既往の方法は、いずれも Gp 特異的バンドと Gr 特異的バンドの 2 つのみを検出する方法で、供試したシストが他のシストセンチュウ種（ヨモギシストセンチュウ、ダイズシストセンチュウなど）だった場合、増幅バンドが得られないために「Gp または Gr とは別種のシスト」であるのか、あるいは「DNA 抽出や PCR 反応等の不具合による偽陰性」であるのか区別が付きません（図 I -6）。

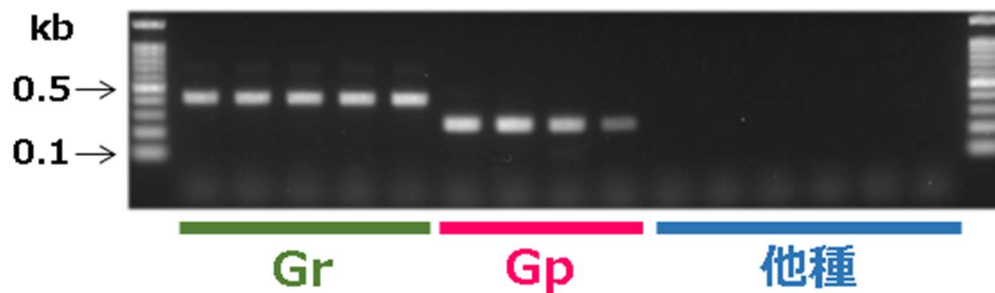


図 I -6 既往のマルチプレックス PCR 法による判別

Bulman and Marshall (1997) の方法を例示。

Ⅱ. Gr/Gp 判別作業実施手順

1. 技術の構成

本技術は、マルチプレックス PCR 法により Gr および Gp 由来の DNA 断片を特異的に増幅することによって、これらの線虫種を同時に判別する診断技術です。また、共通プライマーセットを用いて、Gr や Gp だけでなく他のシストセンチュウ種にも共有される DNA 断片を増幅することで、検定の成否を確認することができ、陰性である（Gr でも Gp でもない）場合も明確に確認できます。以下の 3 つの工程を経て判別に至ります。

- 1) DNA 抽出（幼虫から、またはシストから）
- 2) マルチプレックス PCR 法による DNA 断片の増幅
- 3) 電気泳動による PCR 産物の確認

なお、本判別技術では偽陽性防止のためウラシルを用いたキャリーオーバー防止 PCR 法を用います。この方法では、チミンの代わりにウラシルを取り込ませて PCR を行います。PCR 反応の前にウラシルを除去する酵素（Uracil DNA Glycosylase : UNG）を作用させ、ウラシルを含む前回以前の PCR 産物が混入しても、増幅の鑄型とならないようにします（Longo *et al.*, 1990）。ウラシルと UNG を用いた PCR のための構成試薬については、メーカー各社から様々に提供されていますが、本手順書では、技術開発ならびに検証過程で使用したタカラバイオ社の *TaKaRa Taq*TM HS PCR Kit, UNG plus²を用いた手順を示しています。他メーカーの試薬等を使用する場合は、手順、反応条件等の調整が必要な場合があります。

² キャリーオーバー防止の原理についてはタカラバイオ社のパンフレットを参照ください。
(<http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/r013.pdf>)

2. 幼虫からの DNA 抽出の手順

(1) 準備するもの

[試薬類]

- ✓ 10% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液 (市販溶液を推奨)
- ✓ Tris-EDTA (TE) バッファー (pH 8.0) (市販溶液を推奨)
- ✓ プロテイナーゼ K (20 mg/ml) (市販溶液を推奨)
- ✓ 1 M ジチオスレイトール (DTT) 溶液³ (市販溶液を推奨)

[器具・消耗品]

- ✓ 実体顕微鏡
- ✓ ヒートブロックまたはサーマルサイクラー
- ✓ 卓上小型遠心機
- ✓ ボルテックスミキサー (小型)
- ✓ マイクロピペット
- ✓ ピペットチップ (フィルターチップ推奨)
- ✓ パスツールピペットとスポイト
- ✓ PCR チューブ
- ✓ 50 ml プラスチックチューブ
- ✓ シラキューズ時計皿
- ✓ ピンセット

³ PCR チューブに 100 μ l ずつ分注して冷凍保存しておきます。

(2) 実施手順

【0.1% SDS 溶液の準備】

- ① 10% SDS⁴と TE バッファーを 1:99 で混合⁵して 0.1% SDS 溶液を調製します。
- ② 0.1% SDS 溶液を適量⁶シラキウス時計皿に注ぎます（図Ⅱ-1）。



図Ⅱ-1 シラキウス時計皿

【0.1% SDS 溶液に入った幼虫の準備：幼虫懸濁液を得ている場合】

- ① 0.1% SDS 溶液を多めに注いだシラキウス時計皿を用意しておきます。
- ② 実体顕微鏡下で幼虫懸濁液からパスツールピペットを用いて幼虫をごく少量の水と共に吸い取ります。
- ③ ①の時計皿に②で吸った幼虫を含む懸濁液を加え、ピペットで液を 2～3 回出し入れして混和させます。

【0.1% SDS 溶液に入った幼虫の準備：シストを得ている場合】

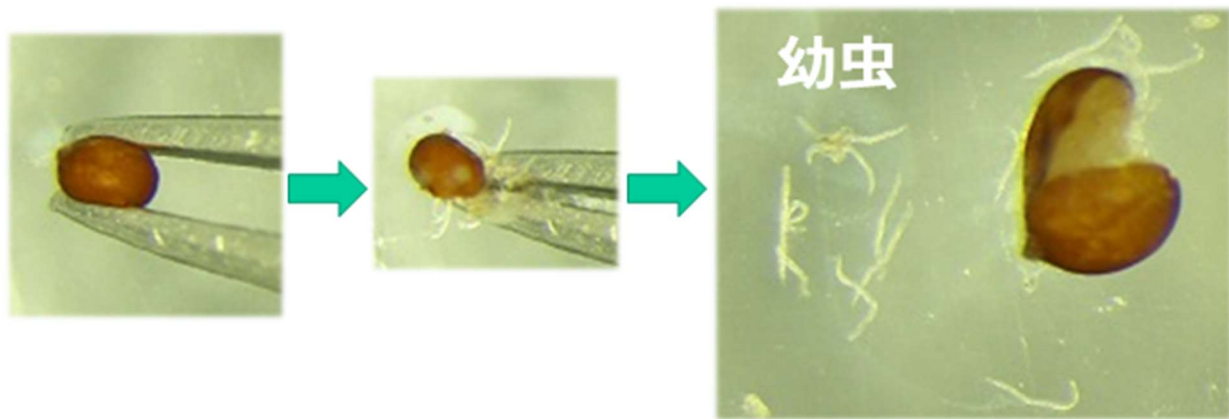
- ① 0.1% SDS 溶液を注いだシラキウス時計皿にシスト 1 個をピンセットで入れます。
- ② 液中でシストをピンセットでつまみ、力を入れてシストをつぶします。

⁴ 10% SDS 溶液は室温が低いと析出するため、加温して完全に溶解させてから用いる。

⁵ 50 ml チューブを用いて、チューブの目盛りを利用して大まかに調製すれば良いです。

⁶ 皿の全面に液が広がる程度に 0.1% SDS 溶液を注ぎます。

③ 卵から数頭以上の幼虫が放出されますので、その幼虫を用います（図Ⅱ-2）。



図Ⅱ-2 シストからの幼虫の割り出し

【溶解液の準備】

① プロテイナーゼ K と 1 M DTT⁷ を 1:1 の割合で混合し、ボルテックスミキサーで軽く混和しスピンドウンして溶解液とします⁸。

【幼虫からの DNA 抽出】

- ① 幼虫の入った 0.1% SDS 溶液から幼虫 1 頭⁹を 19 μ l の溶液ごとマイクロピペットで吸い取り¹⁰、PCR チューブに移します。
- ② 溶解液 1 μ l を加えてフタを閉じます。特に混和の必要はありません。
- ③ ヒートブロックまたはサーマルサイクラーにセットし、55 $^{\circ}$ C・30 分間処理ののち 95 $^{\circ}$ C・10 分間の熱処理を加えます。熱処理後に滅菌水 80 μ l を加えて混和・希釈し、計 100 μ l とします¹¹。

⁷ 冷凍してある分注品を室温融解後ボルテックスミキサーでよく混和しスピンドウンしておきます。

⁸ 溶解液は数時間室温で保存可能です。

⁹ 同一シスト由来であれば、幼虫を複数頭(数頭程度)吸っても問題ありません。

¹⁰ 先に溶液だけを吸ってから幼虫を吸い取ることで、幼虫をチップ先端側に保持できます。

¹¹ 短期保存は冷蔵、長期保存は冷凍(-20 $^{\circ}$ C)します。当該 DNA 抽出液を PCR に用いる場合、さらに希釈する必要はありません。

3. シストからの DNA 抽出の手順

(1) 準備するもの

[試薬類]

- ✓ 「2. 幼虫からの DNA 抽出の手順」で準備した 0.1% SDS 溶液および溶解液

[器具・消耗品]

「2. 幼虫からの DNA 抽出の手順」の器具・消耗品（パスツールピペットとシラキース時計皿を除く）のほかに、下記のもの：

- ✓ ホモジナイザー（ニッピ社のバイオマッシャー[®]II¹²を用います、図 II-3）
- ✓ シリコンチューブ（内径 3 mm×外径 9 mm、長さ 10 cm 程度にカットしたもの：ホモジナイザーのグリップ¹³として使用します）



図 II-3 バイオマッシャー[®]II（ニッピ社）

- ①専用チューブ、②専用破砕棒、③グリップ用シリコンチューブ、
- ④使用時。

¹² チューブ内と破砕棒の両方に加工が施してあり、破砕効率が高くなっています。

¹³ 付属グリップもありますが、数が不足する場合に、本品で補充します。

(2) 実施手順

- ① 専用チューブに 0.1% SDS 溶液 30 μl とシスト 1 個を入れます。
- ② 専用破碎棒にグリップをはめてチューブに挿し、力を入れて回転させながらシスト殻が粉々になるまでシストを破碎します（図 II-4）。
- ③ 液を残すように破碎棒を抜きます¹⁴。
- ④ 破碎液 19 μl を PCR チューブに移します。
- ⑤ 溶解液 1 μl を加えます。混和は不要です。
- ⑥ ヒートブロックまたはサーマルサイクラーにセットし、55 $^{\circ}\text{C}$ ・60 分間 + 95 $^{\circ}\text{C}$ ・10 分間の熱処理を加えます。
- ⑦ 熱処理後に滅菌水 80 μl を加えて混和・希釈し、計 100 μl の抽出液とします¹⁵。
- ⑧ 抽出液の一部または全部を滅菌水でさらに 10 倍希釈し、PCR の鋳型として用います。

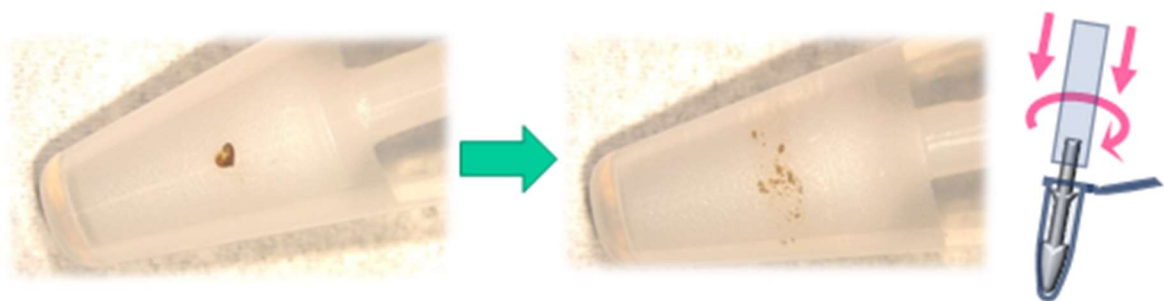


図 II-4 バイオマッシャーII によるシスト破碎

シストがチューブ内側面に来るようにして破碎棒を当て、力と回転を加えてシスト殻が粉碎されるまで破碎します。

¹⁴ 破碎棒は滅菌後廃棄。グリップは再利用します。

¹⁵ 短期保存は冷蔵、長期保存は冷凍します。

4. マルチプレックス PCR の手順

(1) 準備するもの

[試薬類]

- ✓ 鋳型 DNA（上記で用意したもの）
- ✓ プライマーミックス（後述）
- ✓ *TaKaRa Taq*TM HS PCR Kit, UNG plus（タカラバイオ社）
- ✓ 脱イオン蒸留水（分子生物学実験用）

[器具・消耗品]

- ✓ サーマルサイクラー
- ✓ 卓上小型遠心機
- ✓ ボルテックスミキサー（小型）
- ✓ マイクロピペット
- ✓ ピペットチップ（フィルターチップが望ましい）
- ✓ PCR チューブ
- ✓ 1.5 ml チューブ（プライマーミックス、反応液調製用）
- ✓ チューブラック（PCR チューブ用および 1.5 ml チューブ用）

(2) プライマー配列とプライマーミックスの調製

① 以下の 6 本のプライマーについて、ストック溶液 (100 μ M)¹⁶を用意します。

[Gr 用 ①] GRmt1SP2f : CAATGGTGAGATGGAGTCCCTTGTGT

[Gr 用 ②] GRmt1SP2r : CGAGCCAACCCAGTAACACCACCAGAG

[Gp 用 ①] GPmt4SP4f : CGAAGAGGCGTCACGAACCAGGAGA

[Gp 用 ②] GPmt4SP7r : CGCAGGCCTAACTCCTTCCTCTTCT

[共通 ①] 5.8Sf2 : CGGTGGATCACTCGGCTCGT

[共通 ②] 28Sr : CTCGCCGTTACTAAGGGAATCCTCG

※ いずれも 5'→3'。各プライマーの Tm 値 (°C) は、上から順に 70.7, 74.9, 75.5, 70.1, 70.7, 70.7

② ストック溶液を以下の割合で混合してプライマーミックス¹⁷を調製します。

GRmt1SP2f 5 μ l

GRmt1SP2r 5 μ l

GPmt4SP4f 15 μ l

GPmt4SP7r 15 μ l

5.8Sf2 10 μ l

28Sr 10 μ l

滅菌水 40 μ l

100 μ l

¹⁶ DNA 受託合成サービス(ユーロフィンジェノミクス社、ファスマック社など)を利用し、カラム(OPC)精製・TE バッファー溶解 100 μ M 液として発注します。凍結(-20°C)保存で少なくとも 1 年以上は保存できます。使用時は室温溶解後よく混和して用います。

¹⁷ 冷蔵(4°C)保存します。6 か月以上保存可能ですが、3 か月程度での更新が望ましいです。

(3) 実施手順

- ① 鋳型 DNA を除く反応液（各 9 μ l 分）について、下記組成の上から順に加えて反応本数分をまとめて¹⁸調製し、9 μ l ずつ PCR チューブに分注します。

[反応液組成（1 反応分）]

滅菌水	6.85 μ l
10×PCR Buffer for UNG plus	1.00 μ l
dU plus dNTP Mixture	0.80 μ l
プライマーミックス	0.20 μ l
UNG	0.10 μ l
Takara Taq HS (5 U/ μ L)	0.05 μ l
	(小計 9.00 μ l)
<u>鋳型 DNA</u>	<u>1.00 μl</u>
	10.00 μ l

- ② 分注した反応液に鋳型 DNA を 1 μ l 加えます¹⁹。
- ③ サーマルサイクラーにセットし以下の温度処理を施します²⁰。

25°C・10 分 → 95°C・2 分 → [98°C・10 秒 → 68°C・40 秒]×35 回

¹⁸ まとめて調製する量は、必要本数よりも多い偶数本数とします。これは、ピペッティングの誤差が生じて分注時に不足が生じる場合があることと、0.1 μ l 未満の容量は扱いづらいためです。

¹⁹ ピペッティングによる混和はしなくて良いです。フタを閉めた後スピンドウンしておきます。

²⁰ 反応済の PCR 産物は、次の電気泳動まで冷蔵しておきます。

5. 電気泳動と判定

(1) 準備するもの

[試薬類]

- ✓ 2.0% アガロースゲル
- ✓ 1×TAE バッファー²¹
- ✓ 6×ローディングダイ²²
- ✓ 分子量マーカー²³
- ✓ DNA 染色試薬²⁴

[器具・消耗品]

- ✓ アガロースゲル電気泳動装置（サブマリン型）
- ✓ 卓上小型遠心機
- ✓ ボルテックスミキサー（小型で可）
- ✓ マイクロピペット
- ✓ ピペットチップ（フィルターチップが望ましい）
- ✓ チューブラック
- ✓ UV トランスイルミネーターおよびゲル撮影装置

²¹ 市販の 50× 溶液を脱イオン水で希釈し、冷蔵保存しておきます。

²² ローディングバッファーとも呼ばれます。ニッポンジーン社 6×Loading Buffer Double Dye を推奨。

²³ 100 bp ラダーマーカーを推奨しますが、任意のマーカーで良いです。

²⁴ 任意の試薬で良いです。安全性の面から、Biotium 社の GelRed™または GelGreen™を推奨します。

(2) 実施手順

- ① PCR 産物（各 10 μ l）に 6×ローディングダイを 1 μ l ずつ加えます。
- ② 色が均一になるまでボルテックスミキサーでよく混和してスピンドウンします。
- ③ 電気泳動装置にゲルをセットします²⁵。
- ④ ダイを混合した PCR 産物を 2 μ l 取り、ゲルの穴（ウェル）にゆっくり注ぎ入れます。
- ⑤ サンプルの両側とその他に必要なウェルにマーカーを 2 μ l ずつ注ぎ入れます。
- ⑥ 100 V・40 分間通電します。
- ⑦ 電気泳動が終わったゲルを 20～30 分間染色します。
- ⑧ 染色後のゲルに UV を照射しゲル撮影装置で泳動像を観察・記録します（図 II -5）。

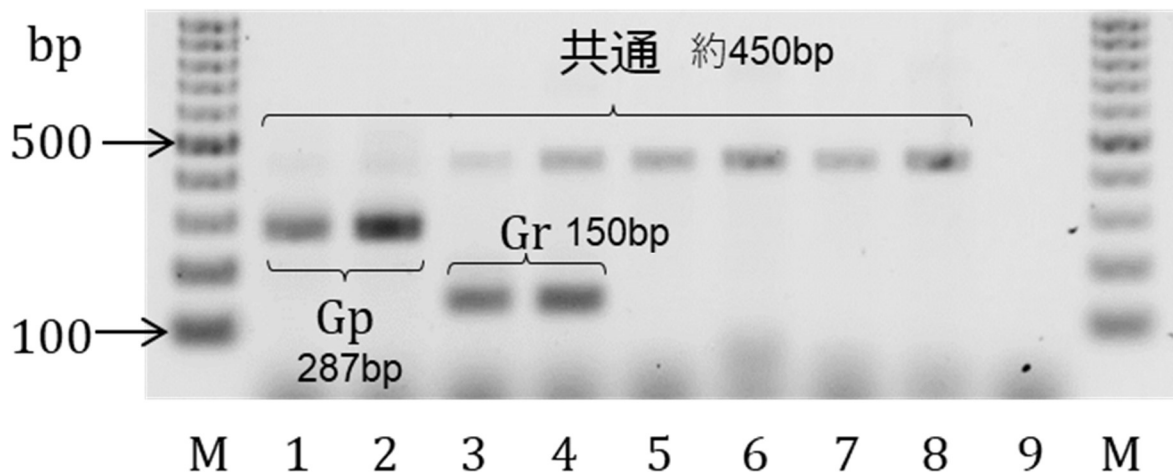


図 II -5 新規マルチプレックス PCR 診断法

1,2: Gp 3,4: Gr 5,6: *Globodera ellingtonae*
7,8: ダイズシストセンチュウ 9: 滅菌水 M: マーカー
1,3,5,7: 幼虫 1 頭からの抽出 DNA
2,4,6,8: シスト 1 個からの抽出 DNA

²⁵ ゲルが浸る量のバッファーを注いでからゲルをセットし、ゲルが覆われるまでバッファーを足します。

- Gr では 150 bp、Gp では 287 bp の特異的バンドが見えます。
- シストセンチュウ共通の増幅産物として約 450 bp のバンドが見えます²⁶。
- 共通バンドしか見えない場合には、Gp や Gr 以外のシストセンチュウ種（またはそれ以外の線虫種）であることを表します。
- 共通バンドも見えない場合には、なんらかの理由で PCR 増幅自体が失敗していると考えられますので、検定不能として再検定を行います。

本手法により Gp 検出と判断された場合は、より詳細な調査が必要です。速やかに都道府県の病害虫防除所または農林水産省の各植物防疫所までお知らせください。

²⁶ Gp および Gr の場合には、共通バンドが薄かったり見えなかったりする場合があります。

補足情報

1. ジャガイモシストセンチュウ類の生態

ジャガイモシストセンチュウ類はバレイショやトマトなどの根に寄生する植物寄生性線虫です。この線虫類は通常、「シスト」と呼ばれる状態で土壌中に潜在しています。シストの中には線虫の卵が数百個（多くは 100～400 個）内蔵されています。シストが存在する畑にバレイショを栽培すると、その根から放出される特異的な物質（「ふ化促進物質」と呼ばれます）に反応してシスト内卵が一斉にふ化し、幼虫（体長 0.5 mm 程度）が根に侵入



図補-1 ジャガイモシストセンチュウ類の生活環（一生）

して定着し、養分を吸収しながら肥大成長します（図補-1、左下より時計回り）。雌は肥大して球形になり、雄成虫（体長約 1.0～1.5mm）との交尾後に自らの体内に産卵し、体内が卵で充満すると一生を終え、体皮が硬化してカプセル状となった「シスト」を形成します。シストは収穫作業時に根から容易に脱落し、土壌中に分散し、翌年以降の感染源になります。

2. ジャガイモシストセンチュウ類による被害

ジャガイモシストセンチュウ類の寄主範囲は非常に狭く、好適な寄主作物はバレイショ、トマト、ナスに限られます。わが国では Gr によるトマトの被害が北海道で確認されていますが、ナスの被害は確認されていません。Gp による被害は今のところバレイショのみです。ジャガイモシストセンチュウ類が寄生すると、バレイショの地上部に萎凋や下葉の黄化などの症状が現れ、高密度の寄生を受けた場合、枯死に至る場合もあります（図補-2）。

このため、被害を受けるとバレイショは十分生育できず減収します。バレイショを栽培するごとに線虫密度が増加するため、被害は年々大きくなり、北海道の Gr 高密度圃場では 30～40%の減収となります。

減収以外の被害として、種いも生産の制限があげられます。シストは種いもに付着して他の圃場に容易に移動するため、シスト発生圃場では種いも生産ができなくなります。種いもは地域内だけでなく、全国に流通するため、種いも供給が制限された場合、影響はわが国全体のバレイショ生産に及びます。



図補-2 ジャガイモシストセンチュウ高密度発生圃場におけるバレイショ被害

(上) Gr 発生圃場で開花前に黄化・枯死したバレイショの地上部

(下) 高密度発生圃場の地表面に露出した多数シスト（褐色の粒子全てがシスト）

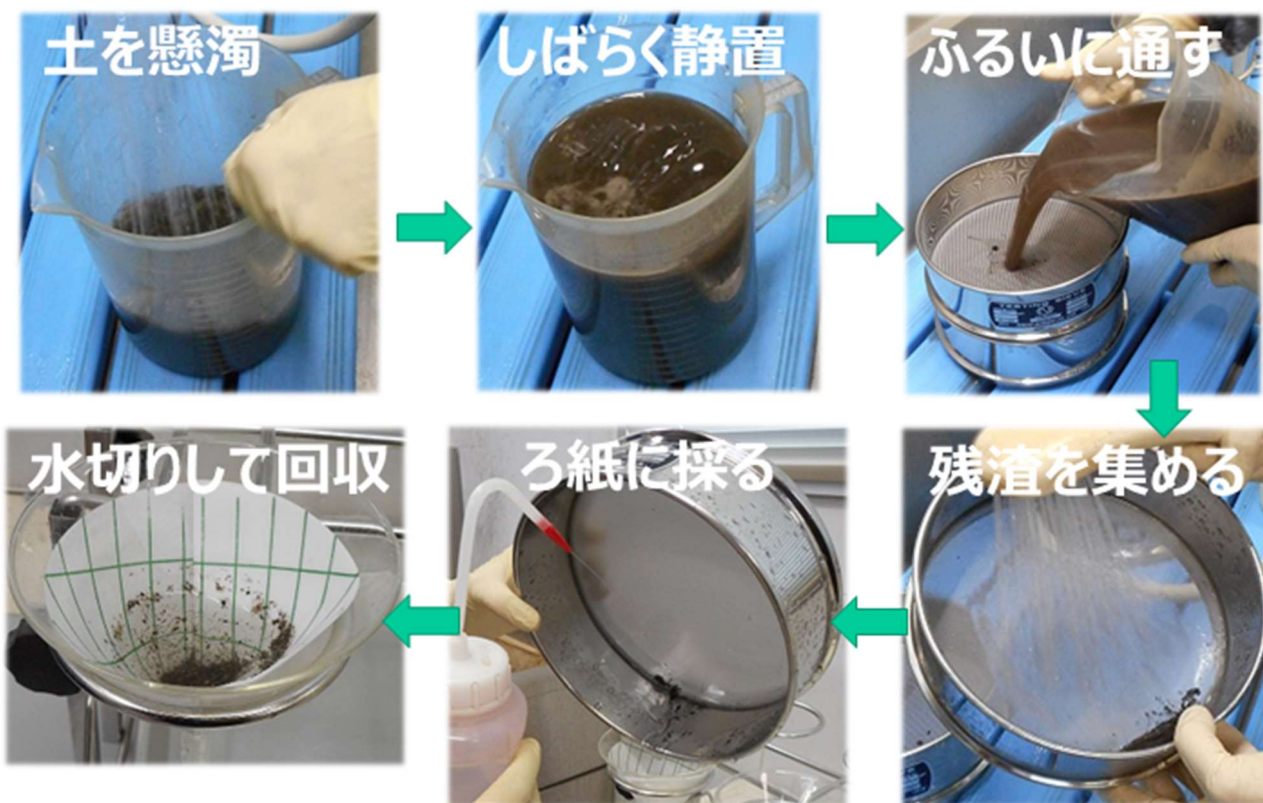
3. 抵抗性品種の特徴とその利用

ジャガイモシストセンチュウ類に対する最も実用的な防除・被害回避対策は、抵抗性品種を活用することですが、Gp と Gr では抵抗性を巡る状況に大きな相違があります。

Gr については単独で強力な抵抗性を示す抵抗性遺伝子 (*H1*) が見出されており、それを導入するだけで寄生したほとんどの Gr を死滅させることができる強力な抵抗性品種を育成できます。これまでに多くの抵抗性品種が国内でも育成されており、Gr の制御に活用されています。一方、Gp に対して *H1* 遺伝子は効果を示しません。Gp に対しては単独で強力な抵抗性を示す遺伝子が見出されてなく、強力な抵抗性品種を育成するには複数のマイナーな抵抗性遺伝子を集積させる必要があることから、その育成は非常に難しいとされています。また、強力な抵抗性品種を育成できても Gp の場合は、少数ながら次世代を生じ、それらが世代を繰り返すうちに増殖能力を獲得して抵抗性打破に至ることが知られています。そのため、世界的にも Gp は Gr より大きな脅威として認識されています。

4. ふるい分けシスト流し法による土壌からのシスト分離法（図補-3）

- ① 2～3 L 手付きポリビーカーに風乾土壌 50～100 g を入れ、さじでかき混ぜながら目盛りいっぱい程度まで水を注いで懸濁します。
- ② 10 秒程度静置した後、2 段重ねにしたふるい（上：目開き 850 μ m のふるい、下：目開き 212 μ m のふるい）に注ぎます（土壌残渣はビーカーに残すようにします）。
- ③ ビーカーの残渣に対して①～②を 2～3 回繰り返します。
- ④ 下のふるいの残渣を水流で集め、ロートにセットしたろ紙上に流し込みます。
- ⑤ 水が引いたろ紙を回収し、顕微鏡下でシストを確認します。



図補-3 ふるい分けシスト流し法

乾燥シストが水に浮く性質を利用して、重い土壌粒子と分けてふるいに集め、ろ紙に回収します。

参考資料

1. Sakai H. *et al.* (2019) *Nematol. Res.* 49 (2), 19-27.
2. 成果情報：緊急防除の効率化に貢献するジャガイモシロシトセンチュウ類 2 種の同時診断技術（農研機構 普及成果情報 病害虫・鳥獣害 2019 年）
https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/harc/2019/19_054.html
3. 植物防疫法：
<https://elaws.e-gov.go.jp/document?lawid=325AC0000000151>
4. 農林水産省 ジャガイモシロシトセンチュウに関する情報：
https://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/keneki/k_kokunai/gp/gp.html

担当窓口、連絡先

外部からの受付窓口：

農研機構 北海道農業研究センター 事業化推進室 011-857-9212



「農研機構」は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構のコミュニケーションネーム（通称）です。