

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業  
「ピーマン産地の連携による線虫抵抗性選抜システムの開発と  
土壌病虫害複合抵抗性台木品種の育成」

## 線虫抵抗性ピーマン台木品種育成素材選抜のための 接種検定手法マニュアル



2013年3月

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
九州沖縄農業研究センター

# 接種法について

ピーマンの線虫抵抗性を調査する際には、一定数のネコブセンチュウ2期幼虫を接種して行う精密な手法(精密法)と、線虫汚染土に苗を定植して行う簡易な手法(簡易法)が利用できる。育種段階やデータの活用目的によってどちらの方法を利用するかを決定する。

精密法では接種圧が一定なため試験間のデータがある程度比較可能である。しかし、接種線虫の準備と接種作業に労力がかかるため、多くの苗を一度に検定するのには不向きである。

一方、簡易法では作業量が少なく、多くの苗を一度に検定するのに向いている。しかし、土壌の線虫密度を試験間で統一できない点や、同一試験内でも調査株により線虫接種圧が大きく異なる可能性がある点に注意する必要がある。

# 試験に用いる線虫について

試験に用いる線虫は、単一卵の由来の線虫個体群(単卵の系統)を使用することが望ましく、線虫の発育もそろい、安定した結果が期待される。しかしながら、作成には長期間を要することから、現地圃場から採取した線虫由来の個体群を使用せざるを得ない場合もある。このような遺伝的背景の異なる線虫を含む個体群を使用する場合は、卵の形成までの有効積算温度も異なる可能性があることから、根こぶ指数で判定する場合は被害の過大評価にならないよう十分に気をつける(すなわち、早く孵化した2世代目の線虫が根に侵入し、こぶを作ってしまう場合があり得る)。

本マニュアルでは対象の有害線虫をネコブセンチュウに絞っている。また、ネコブセンチュウの中には、市販のピーマンに寄生する種が複数あるが、問題となる種はサツマイモネコブセンチュウであり寄生性が最も高い。他種の寄生率は低く、問題とならないと考えてよい。実際、現地圃場から分離されるのはほとんどがサツマイモネコブセンチュウである。

標準となるネコブセンチュウを入手したい場合は下記に問い合わせる。

九州沖縄農業研究センター生産環境研究領域線虫害研究グループ(096-242-7734)  
宮崎県総合農業試験場生物工学部(0985-73-2125)

# 概 略(精密法)

## STEP 1 播種

- ベンレート500倍液灌注後, 催芽器で30°C, 4日間処理する.
- 検定品種(系統)を128穴セルトレイに播種し, 25°C前後に置いて育苗する.
- 線虫増殖対照として感受性ピーマン品種「京鈴」等, 非増殖対照として抵抗性トウガラシ系統LS2341等を用意する.

## STEP 2 移植

- 播種後約3~4週間, 本葉2~4枚程度で, 径6cmポリポットへ移植する.
- 移植後5日間, 根系を发育させる.

## STEP 3 接種

- サツマイモノコブセンチュウ2期幼虫300頭/株を接種する.
- 接種後3日間は鉢底から抜けるまでの灌水をしない.
- 新聞紙などをかぶせて日よけとする.

## STEP 4 調査

- 有効積算温度500~600日度経過時点で行う(发育零点13.2°C)
- 以下のいずれかの方法で調査を行う.
  - 根こぶ程度調査: 0~4の5段階で被害程度を判定する.
  - 卵のう数調査: 根系をよく水洗した後, 0.1%フロキシムBで10秒程度染色し, よく水洗した後, 計数する.
  - 卵のう程度調査: 上記と同様に卵のうを染色した後, 0~4の5段階で被害程度を判定する.

## STEP 5 判定

- 根こぶ程度: 平均1未満で抵抗性, 1~2未満で実用的抵抗性, 2以上を感受性とする.
- 卵のう数: 株あたり平均1個未満で強抵抗性, 1~2個未満で抵抗性, 2~10個未満で弱抵抗性, 10個以上で感受性とする.
- 卵のう程度: 平均1未満で抵抗性, 1~2未満で実用的抵抗性, 2以上を感受性とする.

# 概 略(簡易法)

## STEP 1 播種

- ベンレート500倍液灌注後, 催芽器で30°C, 4日間処理する.
- 検定品種(系統)を128穴セルトレイに播種し, 25°C前後に置いて育苗する.
- 線虫増殖対照として感受性ピーマン品種「京鈴」等, 非増殖対照として抵抗性トウガラシ系統LS2341等を用意する.

## STEP 2 移植・接種

- 播種後約3~4週間, 本葉2~4枚程度の苗を, 線虫を増殖させた汚染土, あるいは現地汚染圃場を詰めたタフブネ・プランター等に移植する.

## STEP 3 調査

- 有効積算温度500~600日度経過時点で行う(発育零点13.2°C)
- 以下のいずれかの方法で調査を行う.
  - 根こぶ程度調査: 0~4の5段階で被害程度を判定する.
  - 卵のう程度調査: 根系をよく水洗した後, 0.1%フロキシシンBで染色し, よく水洗した後, 0~4の5段階で卵のう程度を判定する.

## STEP 4 判定

- 根こぶ程度: 平均1未満で抵抗性, 1~2未満で実用的抵抗性, 2以上を感受性とする.
- 卵のう程度: 平均1未満で抵抗性, 1~2未満で実用的抵抗性, 2以上を感受性とする.

# 精密法

## (2期幼虫接種)

### 線虫の準備

- ① 線虫抵抗性を持たないトマト品種(「プリッツ」,「強力米寿」等)やピーマン品種(「京鈴」等)に線虫を接種する。または, 線虫汚染土に定植する。接種頭数は土壌500gあたり2,000頭程度を目安とする(写真1)。試験規模を考え, 十分な線虫が回収できるように用意する。
- ② 接種後40~50日程度(発育零点13.2°Cで500~600日度)経過したら根を掘り上げ, 洗浄後(写真2)に根上の卵のうをピンセットを用いて採取する(写真3)。大規模な試験の場合は大量の線虫が必要になるため, アスピレーターを用いて効率よく採取する方法もある(写真4)。
- ③ 採取した卵のうを脱脂綿上で孵化させる(写真5,6)。アスピレーターで採取した場合は根の残渣が多く腐敗を起こしやすいため, 卵のうをガーゼでくるんで水に浸し, エアレーションを行う。
- ④ 線虫懸濁液の濃縮が必要な場合は, 懸濁を半日以上静置してから上澄みを除去する。  
※ネコブセンチュウは水より重い性質を利用する。
- ⑤ よく攪拌した懸濁液からガラスチップマイクロピペットを用いて100 $\mu$ Lをとり, 懸濁液中の線虫数を計数し, 懸濁液の線虫濃度を調査する。

### 土壌の準備

線虫に汚染されていない土を準備する。市販の培養土でよいが, 事前に線虫分離を行って有害線虫が含まれていないことを確認しておくことが望ましい。現地土壌を用いる場合は殺線虫処理を行う。

※土壌の種類は検定結果に影響し, 黒ボク土で線虫寄生性が高い傾向が見られるが, 他の要因によるデータのばらつきも大きいため重視しなくてよい。現地で利用されている土壌を用いればよい。

※線虫の除去には65°C, 24時間以上の加熱があればよい。



写真1 線虫増殖用接種トマト



写真2 根の洗浄

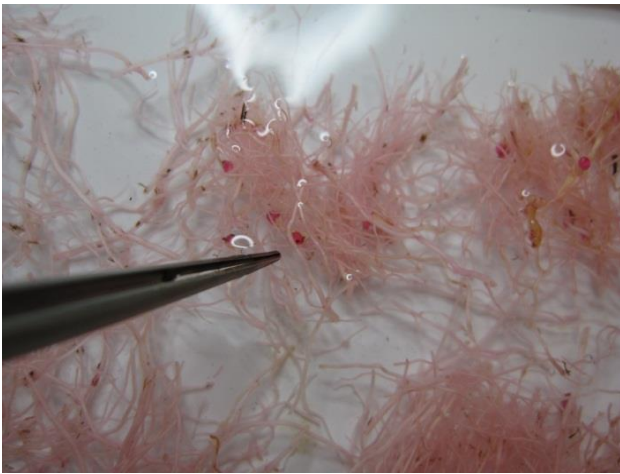


写真3 ピンセットを用いた卵のう採取

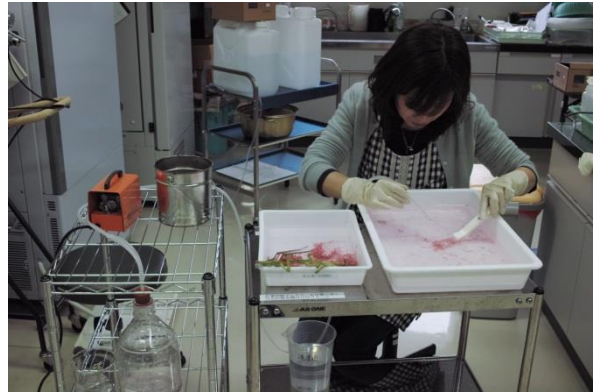


写真4 アスピレーターを用いた卵のう採取



写真5 ガーゼ上の採取した卵のう

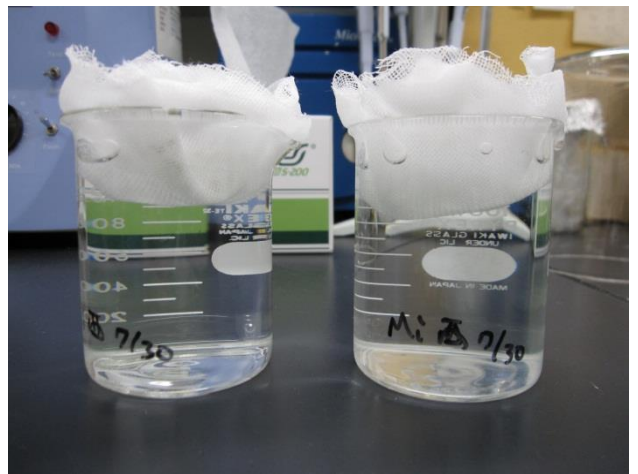


写真6 2期幼虫の孵化および回収

## <細部チェック>

### 線虫の増殖

- ✓ 播種後1カ月程度(草丈10~15cm)の感受性トマトまたはピーマン等に種線虫を接種する。
- ✓ ポットは径12cmのものを使用。透明ポリポットを用いると根や卵のうの発達が観察できる。
- ✓ 接種頭数は2,000~4,000程度。卵のうであれば10~20個を培養土中に埋め込む。
- ✓ 25~30°Cで管理した場合、5~6週間目に卵のうが回収できる。
- ✓ 6週以上経過すると卵のうの中の卵が孵化してしまい、幼虫の回収率が低下する。
- ✓ 管理場所の土壌温度をデータロガーでモニターし(センサーをポットに挿しておく)、有効積算温度が500~600日度(サツマイモネコブセンチュウで発育零点13.2°C)経過したのを確認してから卵のうを回収することが望ましい。

### 卵のうの回収

- ✓ 十分に熟した卵のうを着けた被害株(接種後40~50日程度、サツマイモネコブセンチュウであれば発育零点13.2°Cで500~600日度経過したもの)を用意する。
- ✓ よく根を洗う。無理に手でしごいて土を落とすのは好ましくない。卵のうまで落としてしまう可能性がある。
- ✓ アルミトレイに根を載せ、ピンセットを用いて卵のうを根から採取する。
- ✓ 卵のうは無染色のまま採取することが望ましいが、見えづらく採取が困難な場合は0.01%フロキシシンB、または0.01%エリオグラウシン水溶液に20秒程度浸漬し、流水でよく洗い、薄く染色した後採取する。
- ✓ 脱脂綿にガーゼ(約10cm角)を重ねたものをシャーレに敷いて適度に湿らせ、その上に採取した卵のうを並べる。なるべく中央部に寄せる。
- ✓ すぐに根から採取しない場合は、根を湿らせたキムタオル等に包み、さらにビニール袋に包んで10~12°Cのインキュベータに保存する(ただし、1~2週間以内)。
- ✓ 採取した卵のうをすぐに分離に用いない場合は、シャーレに蓋をし、ビニール袋に包んで10~12°Cのインキュベータに保存する。ただし、すみやかに(1~2週間以内)試験に供する。増殖用に用いるのであれば数ヶ月~1年間は保存可能。
- ✓ 複数種・系統線虫を扱う時はコンタミに注意する。

## 2期幼虫の回収

- ✓ 水道水を満たした100mLビーカーに200個程度の卵のうを載せた脱脂綿＋ガーゼをセットする。水は蒸留水でもよいが、空気を十分に含んだものを用いる(酸素が不足すると線虫の回収率が低下する)。
- ✓ 25°C±2°Cの実験室、あるいはインキュベータ内で管理する。25°C未満では回収率が低下する。
- ✓ 水の蒸発に注意し、卵のうが水面上に出ないように適宜水を補給する。あるいは、一回り大きなガラス容器をかぶせるなどして水分蒸発を防ぐ。
- ✓ 5日間静置する。2期幼虫がビーカー底面に集積している(特に周円部)のが見えるくらいであれば充分。
- ✓ どうしても必要線虫数が足りない場合は、新たなビーカー＋水を用意して同様に5日間静置する。その際、最初に回収した2期幼虫は10～12°Cのインキュベータに保存する。
- ✓ 参考データ
  - 200個の卵が充実した卵のうから回収できる2期幼虫数の目安
    - 5日目までに25,000～50,000頭(卵のう1個あたり125～250頭)
    - 10日目までにほぼ同数
    - キタネコブは概して少なめ

## 線虫頭数の調整

- ✓ 上澄みを除去し、ビーカーの水を40mLにする。
- ✓ よく攪拌して100 $\mu$ L中の線虫数を計数する。計数は最低5回行う。
- ✓ 平均値を元に総線虫数を算出し、試験に余裕を持って足りるかどうかを確認する。
- ✓ 接種予定頭数が含まれる2期幼虫懸濁液量を算出する。
- ✓ 接種頭数調整の例

反復	100 $\mu$ L中の2期幼虫数			全量40mL			
	Mi	Ma本	Ma沖	Mm	Mj	Mh	
1	106	66	79	82	84	65	
2	108	67	77	81	97	63	
3	118	66	92	76	98	59	
4	124	61	91	70	92	66	
5	125	74	91	68	92	57	
平均	116.2	66.8	86.0	75.4	92.6	62.0	
300頭	258.2	449.1	348.8	397.9	324.0	483.9 ( $\mu$ L)	

- ✓ マイクロピペットはチップがガラス製のものを用いる。  
例: 柴田科学社製「ガラスデジフィット」¥41,000～46,500, 専用ガラスチップ10本入 ¥4,200～4,600 ([http://www.sibata.co.jp/pickup/pickup\\_pipet.html](http://www.sibata.co.jp/pickup/pickup_pipet.html))



## ピーマン苗の準備

- ① 催芽器(写真7)で30°C4日間の処理を行い、128穴セルトレイ等に播種後(写真8)3~4週間育苗を行う(本葉2枚程度)。催芽器がない場合はそのまま播種を行うが、接種時には生育のそろった苗を選んで用いる。このような場合は必要量より多めに播種しておく。
- ② 苗を6cmポットに移植する。透明ポリポットを用いると根や卵のうの発達が観察できる。より大きなポットを用いた場合、寄生数がやや少なくなる場合があるが、検定結果には大きく影響しない。移植後は5~7日間根系を発育させる。
- ③ 検定するピーマン系統の他、感受性の指標となる線虫増殖対照として感受性ピーマン品種「京鈴」等、非増殖対照として抵抗性トウガラシ系統LS2341等を用意する。サツマイモネコブセンチュウ以外の種で接種試験する場合は、感受性のトマト(「プリッツ」,「強力米寿」等)を同時に用意する。

## 接種

- ① 移植後5~7日経過したら、株元にネコブセンチュウ2期幼虫300頭を含む懸濁液を、ガラスチップマイクロピペットを用いて接種する(写真9,10)。予備試験で感受性品種の卵のう形成数が少ないと判断した場合には、接種頭数を500頭とする。  
※感受性品種で100個以上の卵のうが形成されるようにする。
- ② 線虫の流出を防止するため、接種直後はポット底より水が漏れ出ない程度に灌水を制限する。また、土壌の乾燥による線虫の死亡を防ぐため、寒冷紗や新聞紙等で日除け(写真11)を行う。このような管理は少なくとも3日間継続する。以降は通常の管理を行う(写真12)。
- ③ 反復数は5以上とする。



写真7 催芽器



写真8 セルトレイ播種



写真9 ガラスチップマイクロピペット



写真10 6cmポットを用いた接種



写真11 接種後の日よけ



写真12 接種した植物の育成

## 調査

- ① 移植後40～50日程度(発育零点13.2°Cで500～600日度経過後)したら掘りあげ、根を洗浄(写真13,14)した後にフロキシシンB(0.015%水溶液15分浸漬, または0.1%水溶液10秒浸漬)による卵のう染色を行う(写真15). 染色後は水で余分なフロキシシン水溶液を洗い流す(写真16). 根こぶ指数調査のみを行う場合は卵のう染色は省略してもよい.

※サツマイモ, アレナリア, ナンヨウ, キタ, ジャワいずれのネコブセンチュウ種でもこの基準が適用できる.

根こぶ程度: 0:こぶなし, 1:非常に少ない(5個以下を目安), 2:比較的少ない(5-20個を目安), 3:散見～多い, 4:非常に多く, こぶが連なる.

根こぶ指数 = 各処理の平均値 × 25

- ② 赤く染色された卵のうを直接計数する(写真17,18). または, 卵のう指数として評価する. 根こぶ程度(下記簡易法参照)で調査を行ってもよいが, 接種密度が300～500頭である精密法では根こぶ程度は最大でも2～3程度となるため, 感受性-抵抗性品種の差が小さくなる.

卵のう程度: 0:卵のうなし, 1:1-5個, 2:5-20個, 3:20-約100個, 4:約100個以上.

卵のう指数 = 各処理の平均値 × 25



写真13 根の水洗1



写真14 根の水洗2



写真15 フロキシシンBによる染色



写真16 染色液の洗い流し



写真17 赤く染まった卵のう

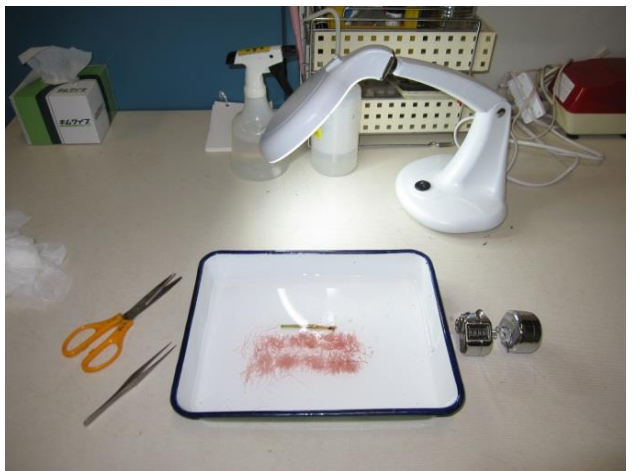


写真18 卵のう数調査

## <細部チェック>

### 接種

- ✓ 検定植物ポット内に2期幼虫懸濁液をよく振り混ぜながら接種する(線虫は水に沈みやすいため).
- ✓ スターラーを用意し、懸濁液を絶えず攪拌しながら行うとなおよい.
- ✓ 2期幼虫懸濁液は6~9cmポットの場合で500~1,000 $\mu$ Lが望ましい(少なすぎると接種頭数のばらつきが大きくなり、多すぎると鉢底から流れ出す危険性がある).
- ✓ 土壌は灌水後1~2時間程度経過したものが望ましい(接種によって鉢底から水が落ちない程度に充分湿っている).

### 接種後の管理

- ✓ 接種後3日間は灌水を控える. やむを得ない場合は、洗瓶や霧吹きなどで、鉢底から水が出ないように乾いた鉢のみに灌水する.
- ✓ 管理場所は金網台上など水はけのよい場所とする. コンクリート台やバット内など、灌水によって滞水する環境は線虫の流亡やコンタミの原因となる.

### 調査

- ✓ よく根を洗う. 無理に手でしごいて土を落とすのは好ましくない. 卵のうまで落としてしまう可能性がある.
- ✓ 卵のうの染色は計数の当日に行うのが望ましいが、すぐに計数しない場合は根を湿らせたキムタオル等に包み、さらにビニール袋に包んで10~12 $^{\circ}$ Cのインキュベータに保存する(ただし、何日も経過すると色素が拡散し、根も傷んで見つらくなる).
- ✓ 適度に水を張ったアルミトレイに根を置き、ピンセットを用いて根をよく広げ、カウンターで卵のうを計数する.
- ✓ 根が多く、卵のうが探しづらい場合は、ハサミで根を適度に切り刻んでからピンセットで根をよく広げ計数する.

# 簡易法

(汚染土壌接種)

## 線虫汚染土壌の準備

- ① 土壌を充填したタフブネやプランター等の容器で線虫抵抗性のないトマト(「プリッツ」,「強力米寿」等)やピーマン(「京鈴」等)を栽培し,土壌の線虫密度を上昇させる.栽培期間は25~30°Cで50日以上(発育零点13.2°Cで500~600日度以上)を目安とする.土壌の線虫密度を調査する際は,容器の数か所から採取した土壌を良く混和し,20g 3反復をベルマン法に供試する.

※汚染土壌として現地圃場の土壌を使用することもできる.しかし,線虫の性質は均一でなく,また他の病害虫を持ち込む恐れがある.

- ② 50日以上経過後,増殖に利用した植物根を細断して土壌に戻し,容器内の土壌を可能な限り均一になるよう混和する.ベンレート500倍液を灌注しておく.

## ピーマン苗の準備と移植

精密法に準じて準備したピーマン苗を,タフブネ(写真19)やプランター等に移植する.

## 調査

移植後40~50日程度(発育零点13.2°Cで500~600日度経過後)したら掘りあげ,根こぶ指数または卵のう指数のいずれかを調査する.根こぶ指数は以下を目安とする.

※簡易法では接種圧が高く,卵のう形成数が非常に多くなるため,卵のう数を直接計数するのは困難となる.

※図を描くのが難しく,あいまいになるので,数の目安で示した.

根こぶ程度: 0:こぶなし(写真20), 1:非常に少ない(5個以下を目安), 2:比較的少ない(5-20個を目安), 3:散見~多い, 4:非常に多く,こぶが連なる(写真21).

根こぶ指数 = 各処理の平均値 × 25

卵のう程度: 0:卵のうなし, 1:1-5個, 2:5-20個, 3:20-約100個, 4:約100個以上.

卵のう指数 = 各処理の平均値 × 25



写真19 タフブネによる検定



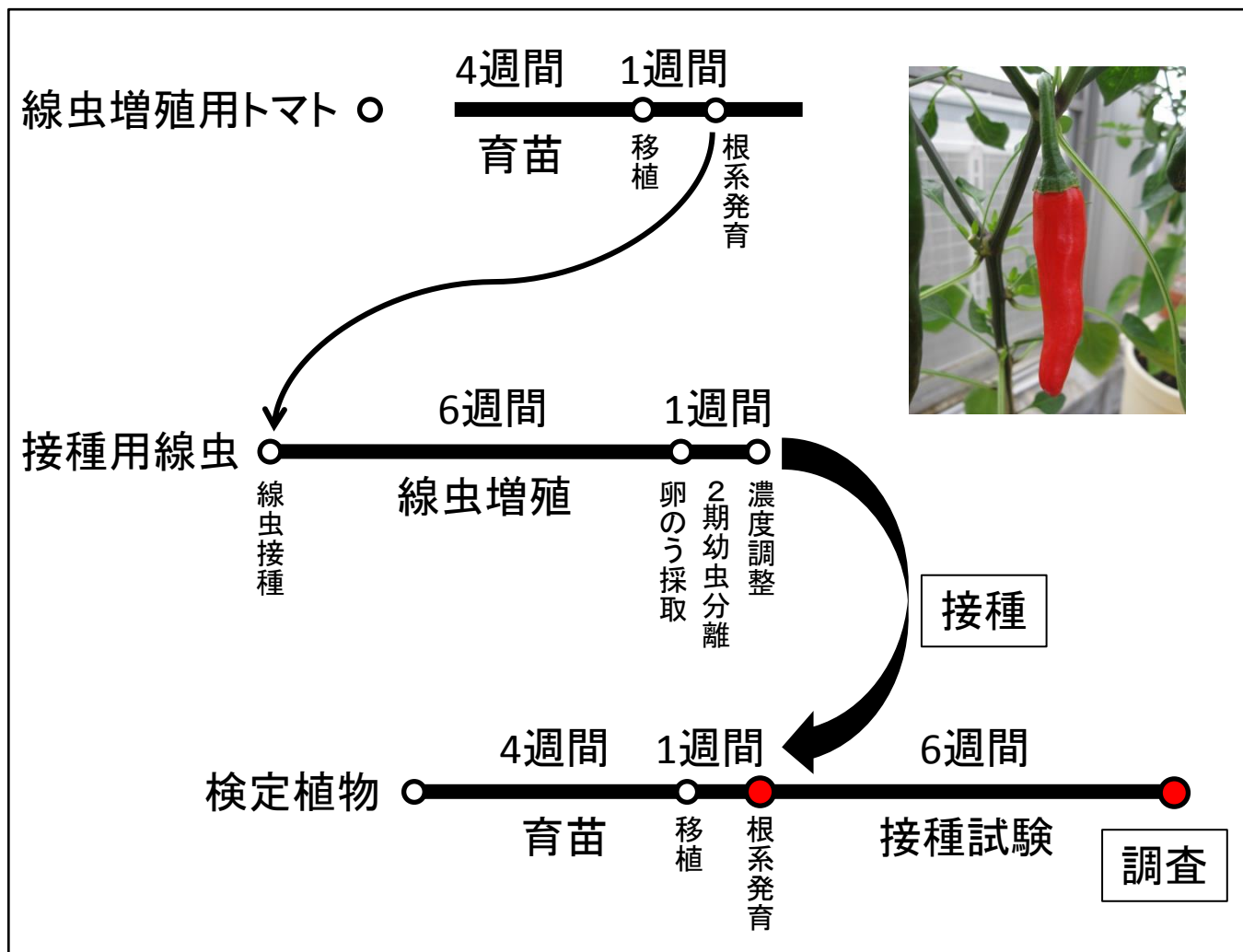
写真20 抵抗性  
(卵のうが全く見られない)



写真21 感受性  
(卵のうが多数見られる)

# 接種検定タイムスケジュール

(精密法, 平均約25°Cの場合)





無断複写・転載を禁じます

本マニュアルは、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「ピーマン産地の連携による線虫抵抗性選抜システムの開発と土壌病虫害複合抵抗性台木品種の育成」(2010～2012年度)[研究総括者:杉田 亘(宮崎県総合農業試験場)]において、九州沖縄農業研究センター担当課題の成果をとりまとめたものである。

本資料に関するお問い合わせ先

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域 線虫害研究グループ(岩堀・上杉)  
〒861-1192 熊本県合志市須屋2421 TEL:096-242-7734 FAX:096-249-1002

