SOP20-305K

禁転載

盆栽、植木及びそれらの苗木の輸出の障害となるオオハリセンチュウ等植物寄生性線虫の判別標準作業手順書

－　公開版　－

（これはサンプル版です）

農研機構

目次

はじめに ・・・・・・・ 1

免責事項 ・・・・・・・ 4

Ⅰ．造形樹輸出の障害となる線虫 ・・・・・・・ 5

Ⅱ．オオハリセンチュウの判別 ・・・・・・・ 7

１．　土壌の採取 ・・・・・・・ 8

２．　オオハリセンチュウが含まれる線虫群集の分離 ・・・・・・・ 8

（１）改変湿式ふるい分けベルマン法 ・・・・・・・ 8

（２）ベルマントレイ法 ・・・・・・・ 15

３．　線虫１個体の溶解 ・・・・・・・ 18

４．　PCR ・・・・・・・ 19

（１）オオハリセンチュウか否かの判別 ・・・・・・・ 21

（２）オオハリセンチュウ種の推定 ・・・・・・・ 22

Ⅲ．技術の活用事例 ・・・・・・・ 23

１．　造形樹から分離された線虫の判別 ・・・・・・・ 23

２．　造形樹の線虫群集 DNA からのオオハリセンチュウ検出 ・・・・・・・ 24

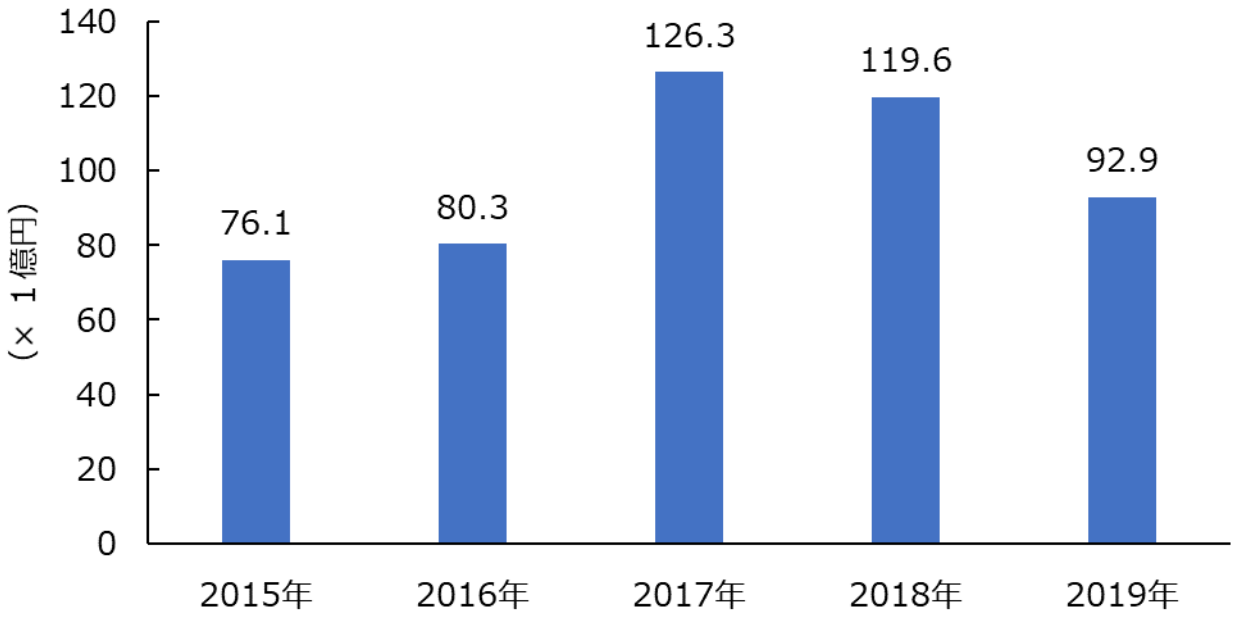
用語解説 ・・・・・・・ 26

参考資料 ・・・・・・・ 28

担当窓口、連絡先 ・・・・・・・ 28

はじめに

枝振りや大きさなどの樹形に人が手を加えて作られる盆栽や植木は、伝統技術に裏打ちされた芸術品です。日本庭園への評価の高まりや「BONSAI」ブームを受けて、海外で高い人気を維持しており、盆栽 、植木及びそれらの苗木（以下、これらを総称する場合は「造形樹」と表記します）を輸出する際にはそのための検査や検疫に合格して、輸出相手国が輸入を禁止する病害虫が付着していないことを示す必要がありますが、輸出相手国の検疫で不合格となる理由の多くが、植物寄生性線虫の検出によるものです（植物に寄生しない線虫は検疫対象ではありません）。造形樹の輸出額は 2017 年には約 126 億円でしたが、その後は減少して 2019 年は約 93 億円でした（図Ａ）。これは、主要な輸出相手国で植物寄生性線虫の侵入を防ぐために検疫条件が強化されたことで、輸出可能な造形樹の量が減少したことが主な原因と考えられています。



図Ａ　植木等の輸出額の推移

2019 年　農林水産物輸出入概況の公表資料のうち
２　農林水産物の輸出実績（2019 年金額上位 20 品目）から作成

植物防疫所が実施する線虫を対象とした輸出検査では、全ての土壌や根を調査することはできないため、根の周囲の土壌の一部を採取して調査しており、輸出検査に合格して輸出された樹木から、相手国の検疫で植物寄生性線虫が検出されることがあります。その場合は線虫が検出された樹木だけではなく、当該樹木を含む荷口全体が不合格になり、高額な経済的損失が生じてしまいます。このため輸出促進に向けて、線虫汚染のない造形樹の生産技術や、商品価値の低下を抑えながら樹木から線虫を除去する技術の開発が求められています。しかしながら、一部の樹種を除いて、線虫は樹木に明瞭な生育不良を生じさせないことから、栽培及び流通の過程で生産者や輸出関係者が、その存在に気付くことは困難です。線虫の汚染防止技術や除去技術を開発するためには、樹木やそれを栽培する土壌から植物寄生性線虫を的確に検出する技術が必要になりますが、線虫は微小かつ透明であること、土壌中には植物に無害な線虫も多く棲息していること、樹木の根の周囲の土壌には農耕地とは異なる多様な植物寄生性線虫が発生していること、オオハリセンチュウなど一部の線虫は野菜などを加害する線虫と同じ手法では土壌から分離されにくいこと、線虫の形態的特徴から植物寄生性か否かを見分けることは専門家にしかできないこと、これらが技術開発上の課題でした。

農研機構では、これまで農林水産省による革新的技術開発・緊急展開事業において、造形樹の輸出拡大に向け、その主要な生産地域である埼玉県[1)]、千葉県[2)]、香川県[3)]及び福岡県[4)]等と連携し、輸出検疫対象となる病害虫の問題解決に取り組んできました。2019 年には、「EU 諸国向け輸出のための植木、盆栽及び苗木の線虫対策マニュアル」を発行しています。このたび、関係都道府県の**公設試における今後の線虫対策技術の開発に資するため、**植物寄生性線虫のうち検疫上重要な種群が含まれるオオハリセンチュウを対象として、新たに開発した手法を加えた遺伝子情報に基づく判別技術を標準作業手順書として整理しました。本判別技術を利用すれば、線虫分類の専門家ではなくても手順に従って作業することでオオハリセンチュウと他の線虫を判別することができ、公設試等において広く対策技術の開発に取り組むことが可能になります。線虫対策技術の開発促進によって経済的損失のリスクが軽減され、造形樹輸出の拡大につながることを期待いたします。

本手順書で対象とする植物寄生性線虫の種類は、今後の改訂で拡充する予定です。本手順書の内容の一部は、農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」の支援を受けて実施した研究の成果です。

参考：　輸出用の造形樹の生産に関する情報

1) 埼玉県の輸出盆栽
https://www.pref.saitama.lg.jp/hana-midori/chishiki-joho/901-20100105-4-1.html

2) 千葉県産農林水産物・加工品の輸出額
https://www.pref.chiba.lg.jp/ryuhan/export/table.html

3) グラフで見る香川県の農業・水産業　４．農産物の生産と流通の現状
https://www.pref.kagawa.lg.jp/documents/12177/1-5.pdf

4) 福岡県花き振興計画
https://www.pref.fukuoka.lg.jp/uploaded/life/355835_53948501_misc.pdf

■ 免責事項

- 農研機構は、利用者が本標準手順書に記載された技術を利用した結果又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。

- 本手順書は公設試等の研究・指導機関での利用を想定しています。

- 本手順書に記載の図表は農研機構が著作権を有するものです。

Ⅰ．造形樹輸出の障害となる線虫

線虫とは線形動物門に属する動物の総称で、人間の生活と関わりの深い線虫の例としては、回虫やアニサキスが挙げられます。線虫のうち造形樹輸出の障害となるのは植物に寄生する種類のみですが、特定の種類が障害になるのではありません。樹木や農作物で実際に被害が生じる可能性があるのか否かにかかわらず、生きた植物を栄養源とするすべての線虫種が検査・検疫の対象となります。ここで問題となるのが、造形樹の根の周囲の土壌から検出されるが、農耕地土壌からの検出が稀な線虫の存在です（図 1-１）。野菜や畑作物の重要有害線虫（ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウ、シストセンチュウ）の取扱経験のある方であっても、造形樹輸出の障害となる様々な植物寄生性線虫には対応できないことがあります。

本手順書で対象としたオオハリセンチュウは、成虫の体長が 1～5 mm と大型の植物寄生性線虫です。EU 諸国向け盆栽の輸出条件として植物防疫所に登録された圃場で少なくとも 2 年間栽培管理することが義務付けられているほか、植物防疫所が実施する栽培地検査において、サンプリングされた盆栽の土壌からある種群（アメリカオオハリセンチュウグループ、Ⅱ－4－（2）参照）に属するオオハリセンチュウが検出された場合、その盆栽は当該年度中の輸出が認められないという、他の植物寄生性線虫よりも一段階厳しい取扱がなされています。これは同グループに植物ウイルス媒介性の種が含まれており、EU 諸国が域内侵入を特に警戒しているためです。ゆえに、造形樹輸出の障害となる植物寄生性線虫を取り扱う際には、オオハリセンチュウであるのか否かの判別に加えて、アメリカオオハリセンチュウグループに属する種か否かを判別することも重要です。

Ⅱ．オオハリセンチュウの判別

本手順書で紹介する「形態的特徴に基づいて線虫を見分ける能力を要しないオオハリセンチュウ判別技術」の全体構成を図 2-1 に示します。１． 及び２． では、線虫を土壌から分離して、顕微鏡下で視認できる状態にする操作について説明します。分子生物学的手法で線虫を判別する際に、オオハリセンチュウと他の土壌線虫とで取扱手法が大きく異なるのは２． の工程です。３． 及び４． では、土壌から分離した線虫群集中の１個体の線虫を溶解して鋳型 DNA として、オオハリセンチュウ判別用プライマーを用いた PCR（用語解説）に供試する方法について説明します。PCR 及びアガロースゲル電気泳動に係る操作には、本技術のために改変を要する点はありませんので、それらの説明は省略します。PCR 増幅に基づくオオハリセンチュウ判別の実例については、Ⅲ． 技術の活用事例 の項に示します。

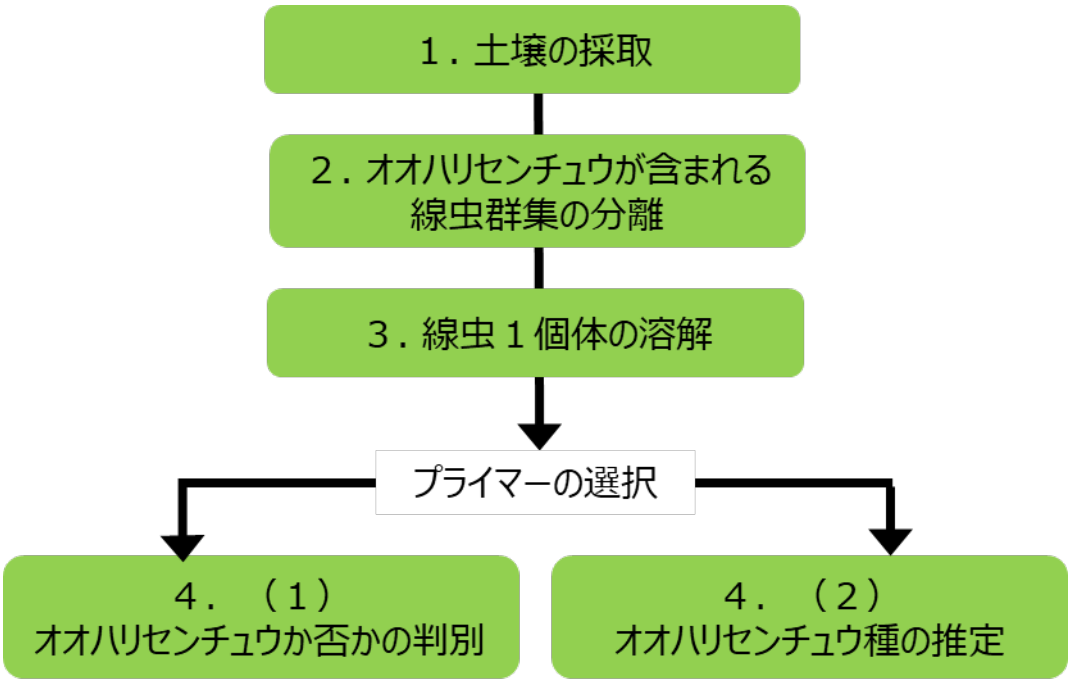


図 2-1 本標準手順書で紹介する技術の全体構成

Ⅲ．技術の活用事例

農研機構中央農業研究センターで実施した本技術の活用事例を紹介します。

１．造形樹から分離された線虫の判別

改変湿式ふるい分けベルマン法で、造形樹の根の周囲の土壌から線虫群集を分離し、そこに含まれる線虫１個体の溶解物を調製して、表 2-2 の各プライマーセット／ペアを用いて得た PCR 産物の 1.5%アガロースゲル電気泳動像を図 3-1 に示しました。電気泳動像のレーン１～３はイヌツゲ、レーン４はゴヨウマツ、レーン５及び９はツバキ、レーン６はクワ、レーン７～８は造形樹の培養土（未使用）から分離された線虫です。レーン１～６は、種同定された線虫又は 28S リボソーム RNA 遺伝子 D2–D3 領域配列の BLAST 検索結果に基づいて種を推定した線虫で、その結果を図 3-1 の注釈に示しています。レーン７～９は、形態的特徴から植物寄生性ではないと判断された対照の線虫です。

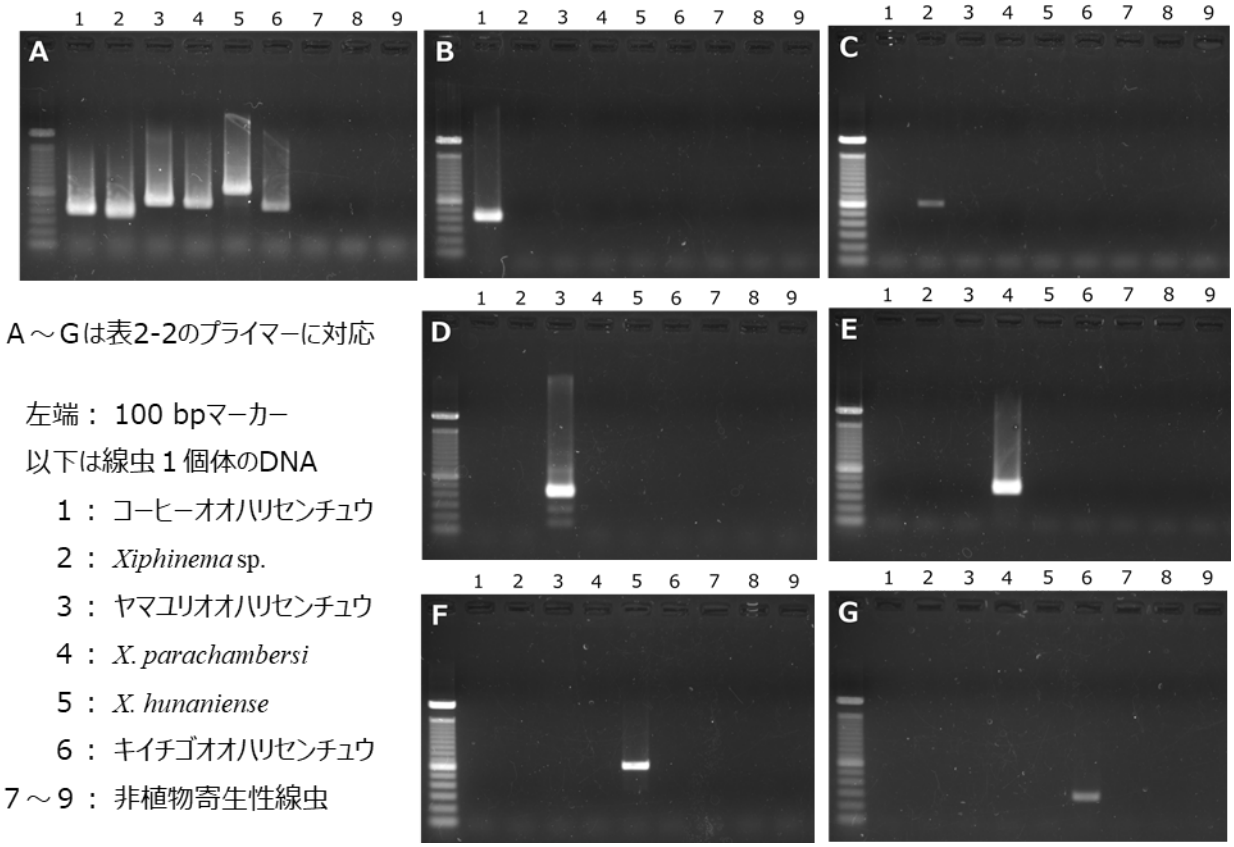


図 3-1　オオハリセンチュウ判別用プライマーを用いた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像

その結果、プライマーセットＡではレーン１～６の線虫（造形樹で発生が確認されている５種オオハリセンチュウ及びキイチゴオオハリセンチュウ）が１回の PCR で網羅的に増幅され、プライマーペアＢ～Ｇでは表 2-2 に示した判別対象のオオハリセンチュウ種のみが増幅されました。また、いずれのプライマーを用いた PCR でも、レーン７～９の対照線虫は増幅されませんでした。

２．　造形樹の線虫群集 DNA からのオオハリセンチュウ検出

表 2-2 のプライマーを用いた PCR は、線虫群集全体から抽出した DNA を供試した場合にも有効です。この方法を用いれば、その線虫群集にオオハリセンチュウ又は特定のオオハリセンチュウ種が存在していることを増幅バンドの有無から判断することができます。

参考資料６の方法で線虫群集全体から抽出した DNA を供試して、プライマーセットＡを用いて得た PCR 産物の３％アガロースゲル電気泳動像を図 3-2 に示しました。その結果、非植物寄生性線虫 1,000 頭、2,500 頭又は 10,000 頭に、コーヒーオオハリセンチュウ１頭を混入した線虫群集から抽出した DNA を供試した場合、いずれの線虫群集からも混入した１頭の存在を検出することが可能でした（図 3-2Ａ～Ｃ）。また、オオハリセンチュウの発生が認められたイブキ、イヌツゲ、キャラボク及びゴヨウマツの土壌から分離した線虫群集 DNA からも、この方法でオオハリセンチュウの存在を示す増幅が認められました（図 3-2Ｄ～Ｊ）。これらの樹種ではオオハリセンチュウ以外の植物寄生性線虫（ネグサレセンチュウやユミハリセンチュウ）及び植物寄生性ではない様々な線虫が発生していましたが、非特異的な増幅バンドは認められませんでした。

留意点として、コーヒーオオハリセンチュウとヤマユリオオハリセンチュウが混在した土壌の線虫群集 DNA を、プライマーセットＡを用いた PCR に供試した場合、前者に対応する増幅バンドは認められるものの、後者に対応する増幅バンドが認められない事例が確認されています（図 3-2Ｆ）。このことから、これ以外の組み合わせで複数種のオオハリセンチュウが混在している場合も同様に、個々の種に対応する増幅バンドが認められない可能性があります。

担当窓口、連絡先

外部からの受付窓口：

農研機構 植物防疫研究部門 研究推進部 研究推進室渉外チーム
IPP-Koho@naro.affrc.go.jp

農研機構
NARO
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

「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。