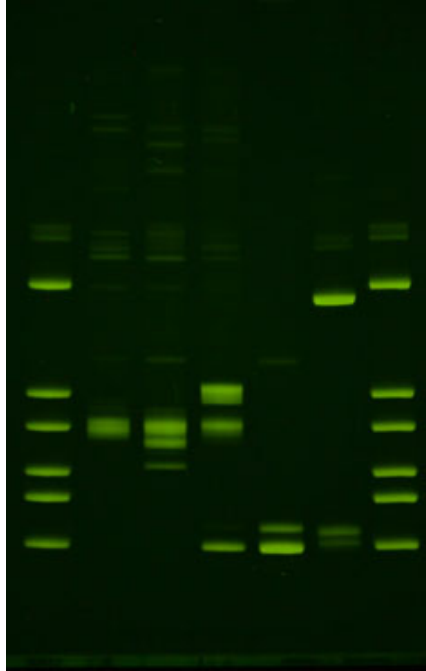


ネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウ の多種同時診断技術マニュアル



国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

北海道農業研究センター

も く じ

はじめに	1
技術のアウトライン・前提	2
技術の特徴	4
Protocol	
Ⅰ. 線虫分離	5
Ⅱ. 線虫の回収・濃縮	5
Ⅲ. DNA 抽出	8
Ⅳ. PCR	10
Ⅴ. ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)	11
Ⅵ. 種判定方法	
1. PAGE バンドパターンの特徴	14
2. 各種の判定指針	17
3. バンドパターンの具体的調査事例	22
その他の情報および留意事項	25
おわりに	26
引用文献	26
診断工程の簡易フロー図	27

はじめに

作物に生育障害が発生した際、その原因究明において有害線虫の診断が必要となるケースは多々ある。このような場合、一般的には土壌や被害根からベールマン法等によって線虫を分離し、顕微鏡で観察しながら、その形態を元に原因種を調査するが、これには専門的知識と技術が不可欠であるため、その実施は一部の線虫専門研究者だけに限られる問題がある。近年では PCR-RFLP や種特異的プライマーを利用した PCR などの分子生物学的手法を用いた種判別法が開発され、診断技術のハードルはかなり低くなった（詳しくは「線虫学実験」(水久保隆之・二井一禎編、京都大学学術出版会)を参照)。しかし、これらの生化学的診断法を実施する場合でもある程度の専門的知識や技術は必須であることから、汎用的な利用を図るにはさらなる簡易化や現場適応性の向上が必要である。これにはまず、その地域に発生する可能性がある有害種全種を同時に検索でき、そのどれであるかを簡易な 1 工程で判定できることが重要であると考えられる。これは発生種診断においては必要な特性であるが、それを比較的簡易に実現できる手法はなかった。今回、生物群集解析技術を応用することにより、この特性を担保できる技術を開発した(Kushida and Kondo, 2015)。これを用いれば、線虫に関する専門的な知識、特に形態に関する知識が無くてもマニュアル的な操作を行うだけで発生している有害線虫種を把握できる。以下に本技術の詳細を示すので、線虫害の原因種調査や被害解明、分布・発生実態調査等に活用いただきたい。本法により今後、線虫診断を気軽に取り組めるようになれば幸いである。

2016 年 6 月

北海道農業研究センター 生産環境研究領域 線虫害グループ

串田 篤彦

技術のアウトライン・前提

1. 診断対象線虫種 (種名の ABC 順に記載)

ネグサレセンチュウ属 *Pratylenchus* sp. 9 種

ミナミネグサレセンチュウ *P. coffeae*

ノコギリネグサレセンチュウ *P. crenatus*

クマモトネグサレセンチュウ *P. kumamotoensis*

チャネグサレセンチュウ *P. loosi*

ムギネグサレセンチュウ *P. neglectus*

キタネグサレセンチュウ *P. penetrans*

ニセミナミネグサレセンチュウ *P. pseudocoffeae*

クルミネグサレセンチュウ *P. vulnus*

モロコシネグサレセンチュウ *P. zaeae*

ネコブセンチュウ属 *Meloidogyne* sp. 4 種

アレナリアネコブセンチュウ *M. arenaria*

キタネコブセンチュウ *M. hapla*

サツマイモネコブセンチュウ *M. incognita*

ジャワネコブセンチュウ *M. javanica*

本法で検出、種判定できる線虫種は、上記のネグサレセンチュウ 9 種、ネコブセンチュウ 4 種である。ただし、アレナリアネコブセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウは検出できるが、種を特定することはできない。これら 13 種は、国内の畑地に分布するネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウのほぼ全てを網羅していることから、全国で診断に利用できる。(チャネグサレセンチュウは一般畑地から検出されることはまず無いが、国内の農業にとって重要種であるため、ここでは含めた。) これらの他、ナンヨウネコブセンチュウ(*M. microcephala*) が国内の畑地には分布するが、これまでの検出例が少ないため、本技術の対象に含めていない(後述)。なお、ミナミネグサレセンチュウは国内に宿主寄生性がやや異なる 3 種の PCR-RFLP フェノタイプ(A, B, C)の存在が知られているが(Mizukubo *et al.* 2003)、本法ではそれがフェノタイプ A であるか、それ以外(B または C)かも同時に把握できる(詳細は後述)。

2. 供試サンプルについて

本法では、線虫 DNA を用いて種の検出や判定を行うが、その DNA は土壌から直接抽出するのではなく、土壌から線虫を一端分離し、そこから DNA を調整する。近年の土壌病害診断の多くは、土壌から微生物由来 DNA を直接的に抽出して検定に用いられるが、この方法では供試できる土壌の量が極めて少ないため、土壌中に偏在しがちな線虫を評価するには適当ではない。作業工程が増えてしまうが、ベールマン法を介すことにより、数十 g の土壌を調査対象にできるので、適切な検出感度を確保できる。また、被害植物根なども供試することができ、フレキシブルな調査が可能である。また、ベールマン法では生きた線虫だけが分離されるので、土壌からの直接 DNA 抽出のように死亡した線虫を評価してしまうリスクがない。ただし、卵のように活動性がないステージの線虫はベールマン法では分離できないため、評価できない欠点がある。

3. 本技術の種判別機構

本技術は、リボソーム DNA (rDNA)-ITS1 領域の配列長が線虫種間で異なることを利用して多種を同時に区別する。まず、ネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウ両属に対して特異性を有するグループ特異的プライマーにより、両属線虫種の該当領域 DNA だけを PCR 増幅し、僅かな DNA サイズ差を検出できるポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により、DNA バンド位置に違いを生じさせ、そのバンド位置によって発生種を判定する。

技術の特徴

1. 簡易な作業工程, 迅速な診断

作業工程は極めてシンプルであり, 線虫サンプルから DNA を抽出し, PCR と PAGE を 1 回ずつ行うだけで結果が得られる。PAGE は市販されているゲルを使用するため, 面倒なゲル作製は必要なく, 実施者によらず高い再現性が期待できる。線虫サンプルが準備できれば, DNA 抽出から発生種の判定までおよそ 9 時間で完了し, 迅速な診断が可能である。

作業工程において, 線虫に関する専門知識は全く要さないため, 非専門家でも当マニュアルに沿って操作するだけで, これまで専門家だけの領域だった線虫種判別が可能である。

2. 高感度な検出

本法では線虫サンプル中にネグサレセンチュウまたはネコブセンチュウが 1 頭しか存在しない場合でも, それを検出することができる。ネグサレセンチュウは齢期 (発育ステージ) によって大きさが異なるが, 最も小さい 2 期幼虫も 1 頭いれば検出可能である。ネコブセンチュウ 3 種 (アレナリア, サツマイモ, ジャワ) は種を区別できないが, 高感度に検出できることにより, 早期の警戒に活用することができる。

3. 複数種の同時把握

実際の畑地では, 複数の植物寄生性線虫種が同時発生している場合がある。特に同属の複数種が混発した場合には, それらを正確に把握することはこれまで困難だったが, 本法では 1 枚のゲル上に複数のバンドとして検出でき, それらを同時に把握することができる。

Protocol

I. 線虫分離

まず、土壌から線虫を分離する。分離方法については、各機関で用いられている方法に基づく。
※土壌からネグサレセンチュウまたはネコブセンチュウを分離するには、ベールマン法が最も広く用いられている。汎用法なので、手順などの詳細はここでは省略する。以下の文献等を参照のこと。(ベールマン法にはベールマンロート法およびベールマントレイ法がある)

ベールマンロート法：「線虫学実験」 p192-193 (佐野, 2014)

ベールマントレイ法：PCR-DGGE 法による土壌線虫相解析法 p2-4 (農業環境技術研究所ホームページ技術マニュアル http://www.niaes.affrc.go.jp/project/edna/edna_jp/manual_nematode.pdf) または大場・岡田(2008)を参照。

II. 線虫の回収・濃縮

【必要機材, 試薬類】 (汎用的消耗品については省略)

- ・小型高速遠心機(1.5ml プラスチックチューブをかけられ、一般的な生化学実験に用いられるもの。ただし、冷却の要はない)

※ベールマントレイ法で分離した場合には、さらに以下の機材が必要である。

- ・10ml ガラス遠沈管をセットできるスウィング型遠心機(冷却の要なし。例 日立 CT6E)
- ・10ml ガラス遠沈管 (下部が細くなっているタイプ) プラスチック製は線虫が付着してしまうので不可。
- ・M9 バッファー(0.05%Tween20 添加)：
Na₂HPO₄ 6g, KH₂PO₄ 3g, NaCl 5g を蒸留水に溶解し、1L に定容。オートクレーブ滅菌し、1M MgSO₄(滅菌済み)を 1ml 加え、Tween20 を終濃度で 0.05%になるように加える(常温保存)
※TE バッファーに Tween20 を 0.05%になるように加えたものでも代用可。

【手順】

(1) ベールマンロート法で分離した場合

ベールマンロート法において分離した線虫を取り出す方法としては、ロート下部に接続したゴム管

をピンチコックで閉じ、分離後にピンチコックを開けて最下部に沈んだ線虫を取り出す方法と、右の写真のようにガラス管瓶(またはサンプル瓶)を接続し、分離後に管瓶を外して回収する方法があるが(線虫は管瓶の底に集まる)、作業効率の点で後者が推奨される。



図1 ベールマンロー
ートによるセンチュウ分離

- 1) ロートから管瓶を静かに外す。冷蔵庫内に数時間静置する。
- 2) 線虫は底にたまっているので、舞い上げないように上澄みを吸い出す(残量をできるだけ少なくする。約 500 μ l)。
- 3) パストツールピペットで 1.5ml プラスチックチューブに移す。この時、ピペットマンなどを用い、プラスチックチップを使って移してはいけない(チップ壁に線虫が付着してしまうため)。0.05%Tween20 添加 M9 バッファを管瓶に少し(200~500 μ l)入れ、とも洗いしながら 1.5ml チューブへ線虫を回収する。この操作を2回行うが、あふれないように注意する(最終ボリュームは 1.3~1.4ml)。

4) 遠心(8,000rpm, 20sec.)

遠心によって線虫は下に沈むが、一般的な小型高速遠心機使用では右図のように一方(外側方向)の壁面に集まっている。これを底に集めるために、チューブを半回転させてローターに再セットし、もう一度遠心する。



この辺に線虫が集まる

- 5) 上澄みを 50 μ l 程度まで静かに除去し(プラスチックチップを使用しても良い。筆者は 1ml チップで 0.2ml 程度まで一気に吸い取り、その後は 200 μ l チップで小刻みに吸い取っている。)、新たに M9 バッファを 1ml 加え、再び遠心する。(これにより、溶液が M9 バッファに置換されるので、以降はプラスチック器具でセンチュウを扱うことができる。)

- 6) 同様に約 50 μ l まで上澄みを除去し、DNA 抽出まで凍結保存する(-20 $^{\circ}$ C)。

(2) ベールマントレイ法で分離した場合

本法で線虫を分離した場合、線虫を濃縮する(水を除去する)作業が必要であり、以下のように行う。本項では、ベールマントレイ内の線虫を回収する工程から解説する。

- 1) ベールマン篩を取り外した後、トレイ内の水(線虫が含まれる)を大きく揺すり、線虫を浮遊させてビーカーに移し入れる。トレイ内壁を洗浄瓶でよく洗い流して回収する。(使用するビーカーの大

きさは、トレイの大きさ=回収する水の量に合わせる)
る)

- 2) ビーカーを冷蔵庫に入れ、1晩静置する。
- 3) 上澄みを吸い上げ、捨てる。アスピレーターまたは小型吸引ポンプ(図2、自作)を利用すると効率的である。線虫を回収したビーカーの大きさが100ml以上の場合は、残った線虫液を50mlビーカーに移し入れ(よくとも洗いをする)、再び冷蔵庫内で8時間以上静置し、沈降させる。最初から50mlビーカーに回収した場合は4)以降へ。

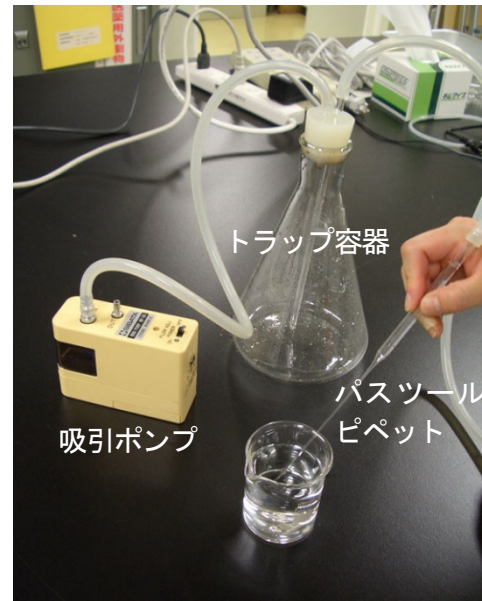


図2 上澄み吸引除去装置

- 4) 上澄みを静かに吸い上げて除去し、約7~8mlにする。
- 5) ビーカー内の線虫液を10mlの円錐型ガラス遠沈管に移す。数mlのM9バッファーをビーカーに入れ、とも洗いをして遠沈管に回収する。とも洗いは2回実施を推奨するが、溢れないように注意。
- 6) スウィング型遠心器にセットし、遠心(2000rpm, 10min.)して線虫を底部に集める。
- 7) 上澄みを吸引除去して約1mlにする。
- 8) M9バッファーを約9ml加え、遠心する(2000rpm, 10min.)。
- 9) 上澄みを吸引除去して1ml弱にする。(以降は、プラスチック器具を使用できる)
- 10) 1ml弱に濃縮した線虫液をピペットチップを使って1.5mlプラスチックチューブに移す。M9バッファーで遠沈管をともしながら全ての線虫を移す(最終ボリュームは1.3~1.4ml)。
- 11) 遠心(8,000rpm, 20sec.)して、線虫を集める(注:(1)-4)を参照)。
- 12) 上澄みを静かに吸い出す(約50 μ lになるまで)。
- 13) 冷凍保存する(-20 $^{\circ}$ C)。

III. DNA 抽出

ガラスビーズによって線虫を破碎し、プロメガの DNA 抽出キット「Wizard SV Genomic DNA Purification System」を用いて線虫 DNA を抽出・精製する。本法は、前記した農業環境技術研究所の「PCR-DGGE 法による土壌線虫相解析法」マニュアルに掲載されている抽出法を準用している。また、この方法は、大場・岡田(2008)でも紹介されている。

【必要器材】

- ・細胞破碎装置(ビーズ振とう式。TOMY MS-100, MP-Biomedicals FastPrep-24 など)
- ・破碎用チューブ

所有する細胞破碎装置にセット可能な 2 ml マイクロチューブに ϕ 0.1 mm ガラスビーズ (TOMY 精工, 型番 GB-05) 0.1 g, ϕ 1.2 mm ジルコニアシリカビーズ (バイオメディカルサイエンス社製, 型番 ZS12-0001) 4 個を入れたものを用意し、オートクレーブ滅菌しておく。

- ・20%(w/v)スキムミルク

サンプル中に混在している土壌に DNA が吸着してしまうことを防ぐために使用する。土壌によっては、ベールマン分離時に土壌粒子が混入しやすいものがある。スキムミルク (difico) を標記濃度で蒸留水に溶解後、オートクレーブで 115 °C, 1 分の加熱処理をする。1.5ml プラスチックチューブに小分けして -20 °C で保存しておく。

- ・Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega 社製, 型番 A2360) 室温保存
- ・小型高速遠心機(1.5ml チューブをセットし, 15,000rpm 回転できるもの)

【手順】

- 1) 1.5ml チューブの底に集めた線虫を破碎用チューブにパスツールピペットを使って移す。(分離された線虫数や夾雑物が多い場合, プラスチックチップでは詰まる場合があるので推奨できない。)まず, パスツールピペットで (線虫+ゴミ) の塊を軽く攪拌し, 崩しつつ破碎チューブに移し入れる。
- 2) 元の 1.5ml チューブに 150 μ l の Nuclei Lysis Solution (キット添付) を足し, とも洗いをする→破碎用チューブへ回収。
- 3) とも洗いは 2 回行う (計 300 μ l 使う) → 液量は計 350~400 μ l になる。
- 4) 20%スキムミルクを 50 μ l 足す。

- 5) 細胞破碎機にセットし、破碎する (MS-100 の場合, speed : 6.5m/sec., 45 秒を 3 回)。
注 : 機械が熱くなるので, 5~10 分程度休ませながら行う。休ませているときは, チューブを破碎機から外しておく(チューブが熱くなってしまう)。なお, 使用する細胞破碎機によって破碎に必要な作動条件(スピード, 時間)が異なる可能性があることから, 事前に調査しておくことが望ましい。
- 6) 泡を消すために 13,000G で 1 分間遠心する。
- 7) Wizard SV Lysis Buffer (キット添付) を 400 μ l 足し, ボルテックスする(ボルテックスミキサーによって攪拌すること)。遠心 (フラッシュ) し, ビーズ類を底に集める。
- 8) 上澄みを SV Minicolumn Assembly (キットの説明書を参照)に移す。可能な限り回収する。
- 9) Assembly を 13,000G で 3 分間遠心。Assembly から Minicolumn を外し, collection tube 内の液を捨て, 外した Minicolumn を再び collection tube にジョイントする。
- 10) Minicolumn 内に SV Wash solution (99.5%エタノール添加済み) 650 μ l を添加する。13,000G で 1 分間遠心し, collection tube 内の液を捨てる。この洗浄操作を 4 回繰り返す。
- 11) 4 回目に collection tube 内の液を捨てたあと, 再び minicolumn を collection tube にジョイントし, 13,000G で 2 分間遠心し, メンブレン(Minicolumn 内の白い層)を乾燥させる。
- 12) Minicolumn を新しい 1.5ml チューブにジョイントし, 室温の Nuclease-free water 250 μ l を注入する。室温で 2 分間インキュベートしたのち, 13,000G で 1 分間遠心する。
- 13) 溶出量は約 250 μ l。Minicolumn は廃棄し, 精製した DNA は冷凍保存する(-20 $^{\circ}$ C)。

IV. PCR

【必要機材，試薬類】

- ・ PCR 装置
- ・ Taq 酵素（本法は，Takara の Ex Taq Hot Start Version を用いて手法の最適化を行っているため，当 Taq の使用を推奨する）
- ・ プライマー

Forward ; PNem-F 5'-AACCAATTTAATCGCAGTG-3'

Reverse ; PNem-R1 5'-GGGCTCATYAAGTCTTAARCC-3'

PNem-R2 5'-GGCTCATTGAGTCTTAAACTGC-3'

※ Y, R は混合塩基を示し，Y は T と C の混合を，R は A と G の混合であることを示す。

これら 3 種を混合して用いるが，PNem-R2 はモロコシネグサレセンチュウ検出用プライマーであるため，北海道のように本種が検出される可能性がほとんど無い地域では，リバースプライマーとしては PNem-R1 だけを用いれば実用上問題ない。これらのプライマーは，対象のネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウ計 13 種と一部の植物寄生性線虫種の DNA (rDNA-ITS1 領域) を選択的に増幅する。ネグサレ，ネコブセンチュウ以外で DNA が増幅する種は，シストセンチュウ(ダイズシストセンチュウ，ジャガイモシストセンチュウなど)，フトラセンセンチュウである。フトラセンセンチュウは，国内での確認は極めて希である。

【手順】

1) PCR 反応液の調整

Takara Ex Taq Hot Start Version を使用。Total volume : 25 μ l/サンプル

10 \times PCR Buffer (添付) 2.5 μ l

dNTPs (添付) 1.5 μ l

プライマー(PNem-F, PNem-R1, PNem-R2) それぞれ 0.8 μ M(終濃度)

Taq (添付) 0.15~0.2 μ l

DNA 抽出・精製液 2.5 μ l

DW(生化学実験グレード，滅菌) (up to 25 μ l)

2) PCR 反応

95 $^{\circ}$ C 3分

→ (95 $^{\circ}$ C 30秒 → 56 $^{\circ}$ C 30秒 → 72 $^{\circ}$ C 50秒) \times 30 サイクル

→ 72 $^{\circ}$ C 7分

V. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

ATTO から市販されているプレキャストゲル(既製ゲル)を使用する。

【必要機材, 試薬類】

- ・泳動槽

ATTO AE-6530P 型 (PAGEL 仕様) ¥42,000 (2016/6/1 時点) 図 3

本機にはゲルを 2 枚セットできる。1 枚だけ泳動したい場合は, ダミープレート(DP-5, ¥1,800)が必要。

- ・パワーサプライ(一般的なもの。100 または 150V 定電圧条件が得られるもの) 図 3
- ・プレキャストゲル(図 4)

ATTO e-PAGEL E-R15L (ポリアクリルアミド/ビス濃度 : 15%, 18 検体/ゲル, 10 枚入り, ¥13,800 (2016/6/1 時点) 冷蔵(凍結厳禁)

- ・トリス・グリシンバッファー(泳動バッファー)

25mM トリス+192mM グリシン : DW にトリス 3.03g, グリシン 14.4g を溶かし, 1L にメスアップして作製(冷蔵)。5 倍濃度を作製してストックしておくといよい。

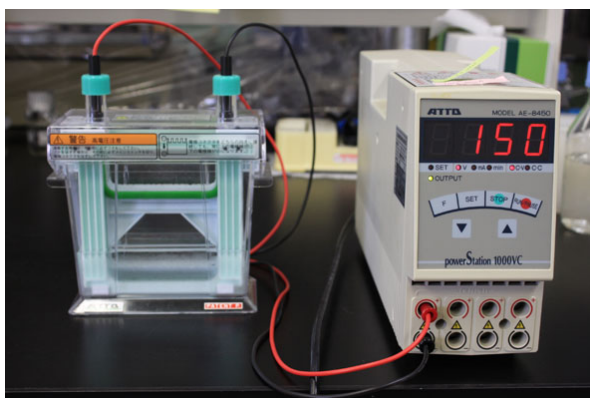


図 3 泳動槽(左)とパワーサプライ(右)



図 4 プレキャストゲル e-PAGEL
ゲルサイズ: 90 × 83mm ゲルは上下逆さに袋に入っている。

【手順】

- 1) ゲルを袋から取り出し, セットされているコームを外す。コームの 2 カ所に突起があるので, そこに爪をかけて**左右同時に**少しずつ引き抜く。この際, 左右どちらかだけを早く引き抜くと, バンドがいびつになる傾向がある。

- 2) ゲルをプレートホルダーにセットする(製品取扱説明書を参照)。1枚で泳動する場合は、反対側にダミープレートをセットする。
- 3) 泳動槽にトリス・グリシンバッファールをおよそ 200ml 入れる。製品取説にはゲル板の上縁付近までバッファールを入れることで、「ゲルを両面から恒温化し、スマイリングを防ぐ」とあるが、ほとんど効果は認められない。低温のバッファールを満たすことにより、かえって移動が遅くなる。
- 4) ゲルをセットしたプレートホルダーを泳動槽に入れ、上部槽にバッファールを満たす。バッファールが漏れていないかチェックする。シールとの密着が甘いと泳動バッファールが漏れて泳動中に著しく減少する。多くの場合、漏れは微量で気づきにくいので継続的に観察する必要がある。
- 5) コーム穴を軽く洗浄する。(10ml くらいのシリンジに上部槽のバッファールを吸い取り、コーム穴内に噴射する)
- 6) PCR 産物 4 μ l およびマーカーをアプライする。この時に使用するローディングダイは、一般的なものでよい。両端のレーンはバンドが著しく傾くので、用いない。
- 7) リード線を接続し、150V 定電圧で 270 分泳動する。
- 8) 泳動終了後、ゲルをガラス板から取りはずし、エチジウムブロマイド溶液(約 0.5 μ g/ml・泳動バッファール) またはサイバーゴールド核酸染色液(泳動バッファールに 1 万倍希釈) に 30~40 分漬けて染色する。※ゲルの表裏に注意する
- 9) UV で視覚化し、撮影する。

種判別用マーカーについて

種判別用マーカーは、北海道農業研究センターが無料提供する(200 レーン分)。マーカーの構成種は、泳動位置が上からミナミネグサレセンチュウ(フェノタイプ B と C, 種名の「センチュウ」を以下省略), ミナミネグサレ(フェノタイプ A), ノコギリネグサレ, キタネグサレ, ムギネグサレ, クルミネグサレ, モロコシネグサレ, キタネコブの 7 種 8 本である(図 5。ただし、多くの図に用いられているマーカーの種構成はこれと異なる)。マーカーの分譲申請は、電子メールにて「線虫種判別用マーカー分譲希望」と記し、以下の必要事項も明記の上、行って下さい。

申請先： 北海道農業研究センター生産環境研究領域 線虫害グループ担当者

メールアドレス： Nema-G*ml.affrc.go.jp (実際には*を@ に入れ替えて下さい)

記載事項： 申請者氏名、所属、使用目的

なお、申請を受け付け後、担当者から必要な手続きについての連絡があります。分譲に必要な作業ですのでご協力をお願いいたします。

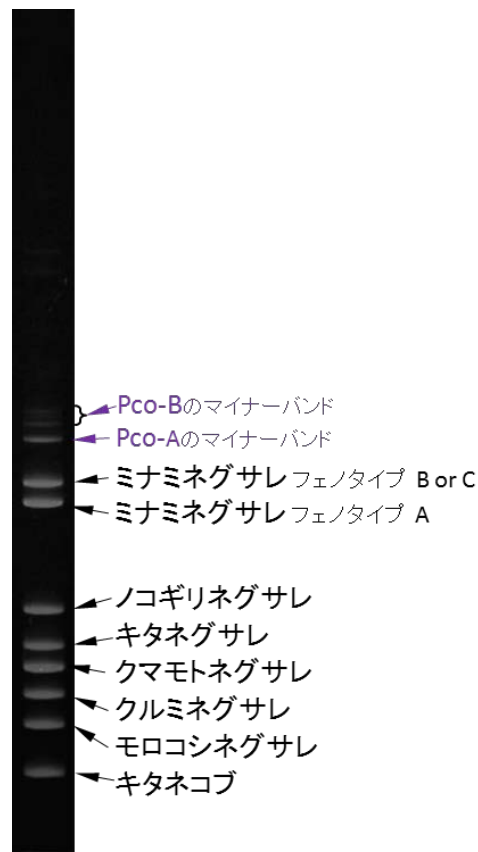


図 5 種判別用マーカー

ミナミネグサレのみマイナーバンド(一部の特徴的なもの)を付随する。マーカーは、メインバンドの配列をクローニングして得たプラスミドを元に作製しているが、マイナーバンドが出現する理由については現時点で不明である。

VI. 種判定方法

本技術は 1 枚のゲル上で多種を同時に検出・識別する、ある意味欲張った技術であることから、バンド判定には多少の複雑性が共存する。そのため、判定を容易にするために PAGE バンドパターンの特徴や判定の指針を以下にまとめた。バンド解析による種判定は、以下の「バンドパターンの特徴」を把握した上で、「種判定指針」に基づいて行う。一方、バンドが検出されなかった場合は、診断対象種がいないと判定できる。ただし、慣れないうちは操作ミスによる DNA 抽出や PCR の失敗などの可能性もあるので、操作にあたってはポジティブコントロールを必ず設ける。DNA 抽出では、いずれかの対象種が確実に含まれる線虫サンプルも同時に供試し、PCR では、予め DNA が増幅することを確認したサンプルも同時に供試する。

1. PAGE バンドパターンの特徴

1) 各種のバンドの位置関係

各種のバンドの位置関係を図 6 に示す。各種は、それぞれ 1 本のメインバンドまたは数本のバンドで構成されるメインバンド帯を示すほか (以下、いずれもメインバンド)、複数以上のマイナーバ

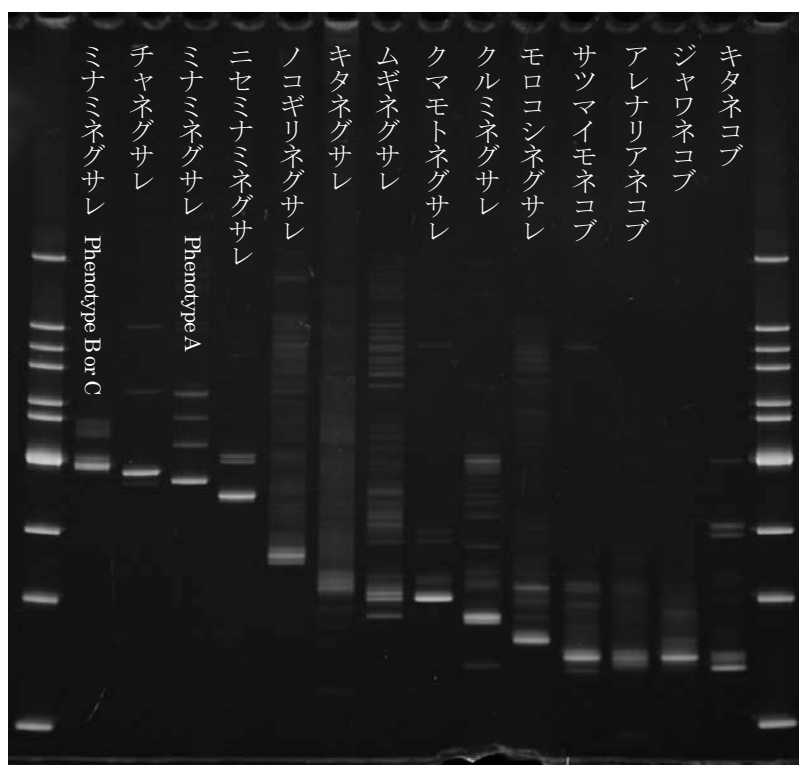


図 6 各種由来バンドの位置関係

両端は 100bp マーカーで、太いバンドは 500bp を示す(非変性型 PAGE なので、等間隔ではない)。10%T ゲル(e-PAGEL E-R10L) を使用し、100V で 200 分泳動した。10%T ゲルは両サイドの歪みが少ないが、15%T ゲルに比べてバンド分離性がやや劣る。

ンドを形成する。マイナーバンドのほとんどは、メインバンドの上部に位置し、スミアなバンド帯を形成する種もあるが、そのパターンはかなり規則的なので、種判別の参考情報にもできる。メインバンドの位置は種ごとに異なるので、それを基準に種を識別できる(マーカーはメインバンドに符合するように作製している)。しかし、以下の各組み合わせについてはメインバンド位置が重なるまたは極めて近接するため、種判定できないか、判定に注意を要する。①サツマイモネコブ、アレナリアネコブ、ジャワネコブ：メインバンド位置が互いに重なるため、種を特定できない(→サツマイモネコブセンチュウ類と判定)。②ムギネグサレとクマモトネグサレ：メインバンド位置がほぼ重なるが、ムギネグサレはメインバンドのやや下に1本のマイナーバンドを付随する特徴的なバンドパターンを示すので、それにより判別できる(詳細は p20)。③ミナミネグサレのフェノタイプ C とチャネグサレ：メインバンド位置がほぼ重なるが、ミナミネグサレはメインバンドの約 100bp 上に2本1セットのマイナーバンドを形成するが、チャネグサレにはそれが無いことで判別できる(詳細は p18)。

2) 各種バンドの特徴 1

複数の種でメインバンドが明瞭でないが、これはそれらのメインバンドが1本のバンドではなく、近接する複数のバンドで構成される場合が多いためである(ノコギリネグサレ、キタネグサレ、ムギネグサレなど)。これは、rDNA リピート間に配列長の変異があるためと考えられる(変異がない、または少ない種は明瞭なメインバンドを形成する)。

3) 各種バンドの特徴 2

線虫個体数が多いほど該当するバンドは太く、濃くなる(図 7)。特に、メインバンドが複数バンドで構成される種は太いバンドを形成する傾向がある。

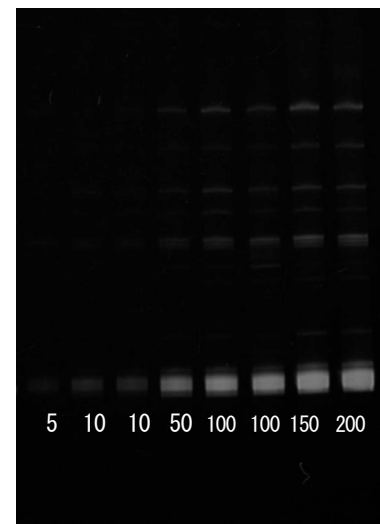


図 7 個体数とバンド濃淡の関係
数字は個体数を示す。本図の PCR、泳動条件は一連とは異なる。

4) メインバンド位置の安定性 (種内変異の有無) について

バンド位置を基準に種を判定するには、その位置が種内で不変である必要がある。複数の地域個体群を入手できた8種(キタネグサレ、クマモトネグサレ、ムギネグサレ、ノコギリネグサレ、ミナミネグサレ、アレナリアネコブ、キタネコブ、サツマイモネコブ)計60個体群を用いて調査した結果、ミナミネグサレには個体群間でバンド位置に変異が認められた(図 8 左)。ミナミネグサレ個体群はメインバンド位置やマイナーバンドを含めたパターンによって大きく二つに分けられ、この違いは、Mizukubo *et al.* (2003)が報告する PCR-RFLP フェノタイプ(A, B, C)の違いと対応していた(各フェノタイプは宿主寄生性もやや異なる)。フェノタイプ B および C に分類される個体群のメインバンドは、フェノタイプ A のメインバンドよりもやや上に認められ、さらにマイナーバンドを

フェノタイプ A はメインバンドの上に 1~3 本ほぼ等間隔で出現させ、フェノタイプ B および C は 570~580bp 付近に 2 本形成させる特徴があり、両者で異なるパターンを示す。このことから、本種についてはそのフェノタイプもある程度特定できる。一方、フェノタイプ B または C のメインバンド位置には個体群間で微妙な違いがあり、中でも僅かに下方に位置するフェノタイプ C のメインバンドとチャネグサレのメインバンド位置は完全に一致するため(図 9)、メインバンド位置だけでは種を判定できない。これらの種判定の仕方は後述する(p ~)。

また、アレナリアネコブにも僅かであるが、メインバンド位置に変異が認められた(図 8 右、4 の個体群だけメインバンド位置が僅かに下へずれている)。しかし、このずれはごく僅かであり、いずれもキタネコブのマーカールよりも上に位置することから、種判定への影響はない(種判定の仕方は後述)。国内に分布するアレナリアネコブは、本州型と沖縄型の二つに区分される(奈良部 2004)。沖縄型は南西諸島を中心に分布し、九州以北に分布するアレナリアネコブはほとんどが本州型である。これらは形態では区別できず、アイソザイムパターンも一致するが、mtDNA の COII 領域には大きな違いがある。寄生性もやや異なることから本州型を別種とすべきとの意見もある(奈良部私信)。バンドパターンを調査した 4 個体群のうち、4 のみが沖縄型であり、その他は本州型だったことから、この違いがパターンに反映している可能性がある。これを明確にするには、さらに多くの個体群についてその塩基配列やバンドパターンを調査、比較する必要がある。

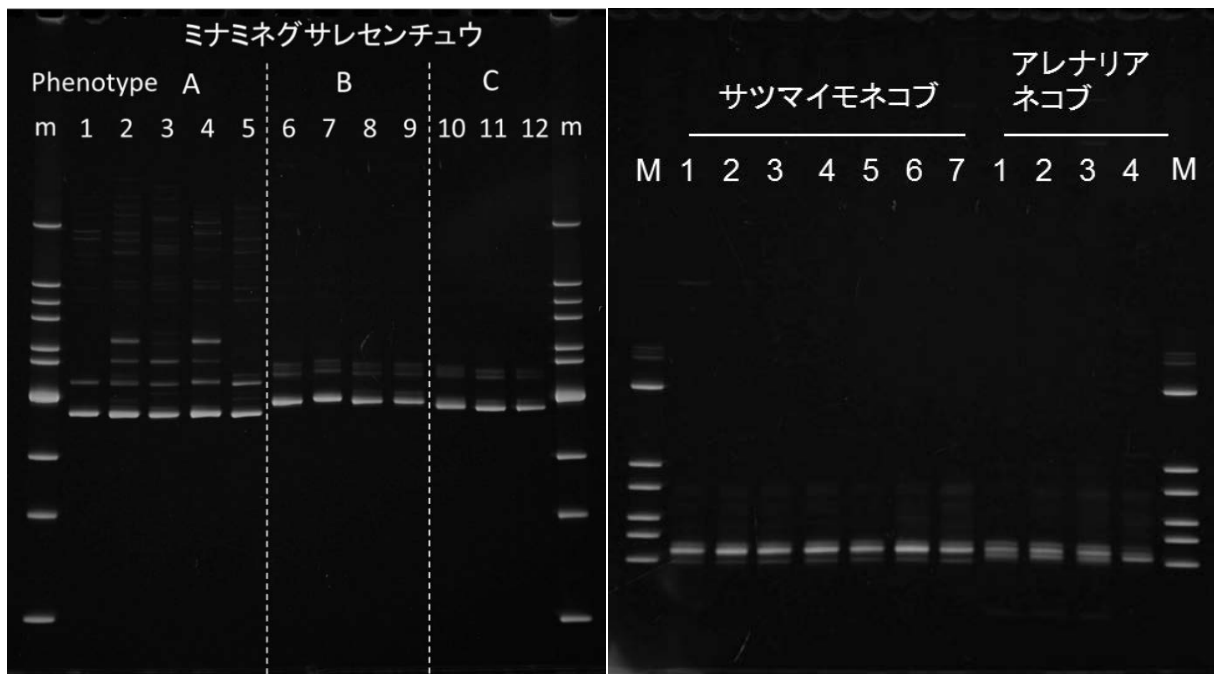


図 8 PAGE バンドパターンの種内変異

10%T ゲルを用い 100V, 190 分(左), 210 分(右)泳動。数字は異なる地域個体群を示し、m は 100bp マーカー、M は種判別用マーカー(上からミナミネグサレ B or C, ノコギリネグサレ, キタネグサレ, クルミネグサレ, モロコシネグサレ, キタネコブ)を示す。Kushida and Kondo (2015) より転載(一部)。

2. 各種の判定指針

本技術では、多くの種で多数のマイナーバンドが検出されているので、種を明確に検出・判別することは難しい印象も受ける。実際の種判定は、それほど難儀ではないものの、いくつかの要領を抑えておくことが重要である。以下にその判定のためのポイントをまとめ、それに続いて具体的な判定の仕方を種ごとに解説する。

判定のポイント 1: マーカー分布域内のバンドだけを判定する

使用するプライマーは、診断対象種以外に複数の植物寄生性線虫種(シストセンチュウおよびフトラセンセンチュウ)の DNA を増幅することが確認されている。これらのバンドは、550bp~650bp に出現し、診断対象種の中で最上部のバンド(ミナミネグサレのフェノタイプ B, 約 480bp)のさらに上に検出される。種判別用マーカーには、この最上部の種と最下部の種(キタネコブ)を設定しているため、この範囲外にバンドが検出された場合、それは診断対象種ではないと判断して良い。

判定のポイント 2: マーカーを基準に判定する

基本的にマーカーに符合する位置のバンドまたはマーカーとの位置関係から診断対象種であることが分かるバンドだけを評価する。線虫個体数が多いほどバンドは太く、濃くなる傾向にあるが(図 7)、マーカーはその中心に位置するように作られているので、その位置関係を基準に判定する。

判定のポイント 3: 太い(高輝度の)メインバンドがある場合、薄いバンドは無理に評価しない

たとえば、ノコギリネグサレ、サツマイモネコブなどはメインバンド上部に薄いバンドを多数形成し、当該種が高密度でいる場合にはそれらも濃くなるため、その付近に位置する他種メインバンドの検出を妨げることが懸念される。しかし、それらのバンドを無理に評価する必要はない。たとえ、バンド位置が重なる種が混発していたとしても、マイナーバンドと判別できない輝度では密度は極めて低く(数頭以内)、それは被害発生の主要因ではない。この場合、高輝度のメインバンドを形成しているノコギリネグサレまたはサツマイモネコブが高密度であり、被害の原因種である。

具体的な判定の指針

以下に各種の具体的な判定指針を示す。また、マイナーバンドパターンの特徴や事例も紹介するので、混発種の判定の参考にする。

① ミナミネグサレ(フェノタイプ B または C) マーカー ←マーカーがあることを示す

本該当種は、フェノタイプおよび個体群によってメインバンド位置がやや異なるが(図 8)、その違いはごく僅かであるうえ、マイナーバンドを含めたバンドパターンも酷似するので、同一種(グループ)として判定できる。しかし、これらの中でやや下方に出現するフェノタイプ C のメインバンド位置は、チャネグサレのメインバンドと重なるため、その位置だけで種を判定することはできない

(図 9)。そのため本種はマイナーバンドを含めたバンドパターンで判定する。両フェノタイプはメインバンドの約 100bp 上方に輝度が均等な 2 本のマイナーバンドを形成するが(図 8, フェノタイプ C のマイナーバンド 2 本の間隔は B に比べてやや狭いことに注意), チャネグサレにはそれがない(図 6, 9)。以上から, マーカー付近にシャープかつ明瞭なメインバンド 1 本を形成し, その上方(約 100bp)に 2 本のマイナーバンドを形成した場合, 本種と判断する。マーカーにはこの 2 本のマイナーバンドも含まれているので, 参考とする(図 5、マーカーはフェノタイプ B から作製)。マイナーバンドは, 個体数が少ない場合には薄くなるが, 僅か数頭でも確認できる。マイナーバンドが全く確認できないほどの場合は, 本種の密度は極めて低く, 被害に直結する危険性は低い。

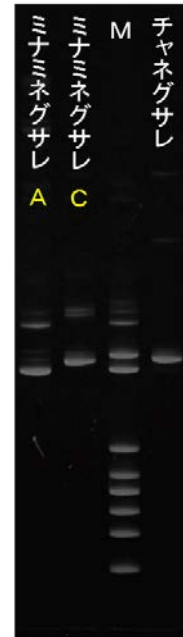


図 9 ミナミネグサレとチャネグサレのバンドの位置関係 M は種判別用マーカーを, A と C はフェノタイプを示す。

② チャネグサレ

ミナミネグサレ(フェノタイプ B or C)マーカーのすぐ下にシャープかつ明瞭なバンド 1 本を形成するが(③よりも①のマーカーに近い。図 9), ミナミネグサレに特徴的なマイナーバンドが検出されない場合, 本種と判定できる。しかし, ミナミネグサレが極低密度の場合はそのマイナーバンドを確認しにくいいため, 本種との判別は難しい(例: 図 12-No.31)。メインバンド上部にマイナーバンドが全く確認できない場合は, どちらの種にしても極低密度の可能性が高く, この場合は種の判定を保留する。種を特定する必要がある場合は, PCR サイクル数を増やして DNA を再増幅させ, マイナーバンドパターンをチェックすることで判定できる。一方, 本種にもマイナーバンドが複数出現するが, 種の判別根拠にするには, 複数個体群での普遍性評価が必要である。

③ ミナミネグサレ(フェノタイプ A) マーカー

マーカーと同じ位置にシャープかつ明瞭なバンド(メインおよびマイナー)を形成した場合, 本種と判定する。本フェノタイプのメインバンド位置は, 個体群間でほぼ一定である(図 8)。マイナーバンドも複数(個体数が多い場合は多数)形成するが, その下端の 1 本(メインバンドの上方約 100bp)は個体群間で共通し, 輝度も比較的高く, マーカーにも含まれているので種判別の基準にできる(図 8)。

④ ニセミナミネグサレ

メインバンドの位置で判定する。ミナミネグサレ(フェノタイプ A)およびノコギリネグサレのマーカー間のミナミネグサレに近い位置に明瞭かつシャープなバンドを形成した場合, 本種と判定で

きる(図 6)。両マーカー間にメインバンドを形成するのは本種だけである。これより下部にメインバンドが位置する種(ムギネグサレやクルミネグサレなど)の個体数が多い場合、そのマイナーバンドが、両マーカー間に検出されるが、これらは連続分布し、薄いので由来が明白であり、無視する(本種のメインバンドは上記のように明瞭かつシャープである)。また本種は、メインバンドの上方に近接する 2 本のシャープなマイナーバンドを形成した(図 6)。複数の個体群で確認する必要があるが、このようなシャープなマイナーバンドは種内で共通する特性があることから、このマイナーバンドパターンも種判定の根拠にできる可能性がある。

⑤ ノコギリネグサレ マーカー

マーカーと同じ位置にバンドが認められた場合、本種が発生していると判定して良い。本種は上記 3 種と異なり、メインバンドは複数のバンドで構成されるため、やや太くなる傾向があるが、マーカーはそれらの中心に位置するように作製している。ただし、個体数が非常に少ない場合や泳動するレーン(端ほど湾曲)によってマーカーがごく僅かにずれて見える場合があるが(図 12-No.2, 7 など)、この近辺にバンドを形成するのは本種しかいない。密度が高い場合、メインバンド上部の広範囲に薄いバンドを多数形成するが、これらは無視して良い。上部に位置する 3 種 4 本(ミナミネグサレ、チャネグサレ、ニセミナミネグサレ)は 1 頭でも明瞭なバンドを形成するので、それらとの識別は容易である。

⑥ キタネグサレ マーカー

キタネグサレのメインバンドは複数のバンドで構成されるため、太く、あまりクリアではない。マーカーと同じ位置にこのようなバンドが認められた場合、本種が発生していると判定して良い。本種についても密度や個体群によってはマーカーから僅かにずれて見える可能性があるが、この付近にバンドを形成する種は本種しかいない。ただし、サツマイモネコブが高密度に存在する場合は、図 12-No.26 のように本種マーカー付近にマイナーバンドを形成するので、判別に注意する。しかし、このような場合、無理にキタネグサレを判定する必要はなく、基本的にサツマイモネコブだけを判定すれば良い(この場合にはサツマイモネコブの方が密度が遙かに多く、有害性が高い)。

また、本種が高密度にいる場合、ミナミネグサレのマーカー付近に薄いバンドを形成する場合がある(図 12-No.8, 9, 38, 40 など)が、これも無視する(ミナミネグサレ DNA は増幅性が高く、1 頭でも明瞭なバンドを形成する)。

⑦ ムギネグサレ

本種のメインバンドは 2 本のバンドで構成され、やや太い。形成位置はキタネグサレのメインバンドのすぐ下であり、その上下にマイナーバンドを 1 本ずつ形成する(図 6, 10)。上側のマイナーバンドはキタネグサレのバンド位置にほぼ重なるが(例: 図 12-No.24)、本種のメインバンドが確認できる場合、このマイナーバンドをもってキタネグサレの混発を疑う必要はない(キタネグサレの

バンドはもっと太い)。

本種のメインバンドは、クマモトネグサレのメインバンドと位置が重なるため、メインバンド位置だけで種を判定してはいけない(図 6, 10)。本種はメインバンド位置に加えて、下側のマイナーバンドの有無により種を判定する(ムギネグサレは必ずそれがあるが、クマモトネグサレには無い)。すなわち、クマモトネグサレのマーカ位置(本種メインバンドの下端に位置する)付近にメインバンドを形成し、その約 20bp 下に 1 本の特徴的なマイナーバンドが確認できる場合、本種と判定する。

本種のメインバンドはキタネグサレのメインバンドに近接するため、高密度のキタネグサレと本種が混発した場合は、図 12-No.12 のように両種のメインバンドが融合するので、その判定に注意する必要がある(下側のマイナーバンドを確認する)。

⑧ クマモトネグサレ マーカ

メインバンドの位置で判定する。マーカと同じ位置にシャープかつ明瞭なバンドを形成し、下側にマイナーバンドを付随しない場合、本種と判定する。上側には数本のマイナーバンドを形成するが(図 10)、多くが個体群間で共通ではないため、種判定には用いない。また、クマモトネグサレは九州地域においてキクの害虫として猛威をふるっており、その寄主作物はほぼキクに特化する(上杉 2013)ため、調査対象ほ場の栽培履歴も重要な種判定の根拠となる。クマモトネグサレの発生は現在のところ九州地方および山口県に限られるが、この他の地域においてもキク栽培圃場を対象とした診断の場合にはバンド判定に注意する必要がある。ムギネグサレと本種が同時発生した場合、本種の存在を見逃す可能性があるが、両種が同時発生することはまずない。

⑨ クルミネグサレ マーカ

マーカと同じ位置にバンドが認められた場合、本種が発生していると判定する。本種は高密度の場合、メインバンド上側に多数のマイナーバンドを形成するが(図 6)、これらは種判定の根拠にしない。

本種は、木本類を好適寄主とする種であり、リンゴやモモなどの果樹園から検出される。また、畑作(園芸作)ではイチゴの重要害虫としても知られ、イチゴほ場からの検出が多く報告されている。ただし、イチゴにはキタネグサレも寄生して被害をもたらすので、イチゴでの被害発生だけで種を判断することは禁物である。過去にはジャガイモでの被害発生が報告されているが、一般畑地から



図 10 クマモトネグサレおよびムギネグサレの PAGE バンドパターン
数字は異なる地域個体群を示す。
両端は種判別用マーカで、これまでと同じ種構成。

の検出例は少ない(図 12-No.27)。

⑩ モロコシネグサレ マーカー

マーカーと同じ位置にバンドが認められた場合、本種が発生していると判定する。本種も高密度の場合、メインバンド上側に多数のマイナーバンドを形成するので(図 6)、その評価には注意を要するが、基本的にそれらは無視して良い(判定のポイント 3)。

⑪ キタネコブ マーカー

マーカーと同じ位置に明瞭なバンドが確認された場合、本種が発生していると判断できる(図 12-6, 7, 28)。本種はメインバンドのやや上にマイナーバンド 1 本を形成するが、そのマイナーバンドは輝度が個体群によって大きく異なるため(ほとんど見えない場合もある)、種判定の根拠にはしない(図 11)。ただし、このマイナーバンドはサツマイモネコブ類のメインバンド位置にほぼ重なるので、サツマイモネコブ類が低密度で混発した場合にはそれを把握できない欠点がある(両種が混発するケースは非常に少ない)。また、本種はノコギリネグサレのマーカーの少し上などにマイナーバンドを形成し、個体数が多い場合には目立つことがあるので、図 11 のパターンを参考に判定に留意する(基本的にマーカーと重ならないので、問題にはならない)。

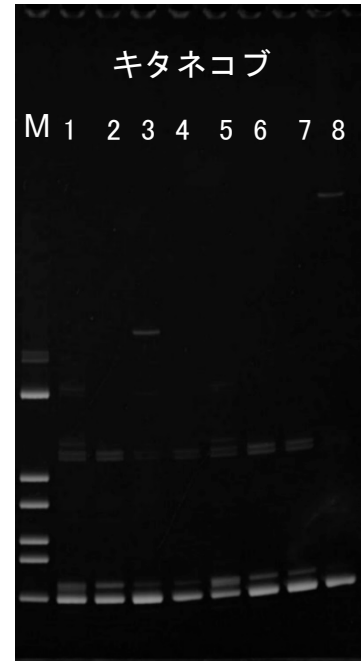


図 11 キタネコブの PAGE バンドパターン
数字は異なる地域個体群を示す。M は種判別用マーカーで、これまでと同じ種構成。Kushida and Kondo (2015) より転載

⑫ サツマイモネコブ, アレナリアネコブ, ジャワネコブ(→サツマイモネコブ類)

キタネコブのマーカーのやや上にメインバンドが認められた場合、本種が発生していると判定できる(図 6, 8 右, 図 12-26, 27, 30 など)。これらはメインバンドの上下に近接してマイナーバンドを 1 本ずつ形成する。個体数が多い場合、それぞれが融合し、太いバンドを形成するが、その中心位置はキタネコブマーカーと明確に異なるので、判別できる(注: アレナリアネコブの場合、図 12-52 のように 2 本バンドとして見える場合もある)。また、アレナリアのメインバンドの位置は個体群間で僅かに異なったが(図 8)、キタネコブマーカーのやや上であることに変わりはないので、同様に判定できる。サツマイモネコブの下のマイナーバンドは、キタネコブのメインバンドと位置と重なり、キタネコブも発生しているように見えるが、本種のメインバンドが検出された場合、この

バンドは本種のマイナーバンドであることが明らかなので評価する必要はない。一方、キタネコブが低密度で混発した場合は、このマイナーバンドのためにその混発を把握しにくくなるが、本マイナーバンドの輝度は基本的に低いので、その輝度からキタネコブの混発を高確度に把握可能である。

3. バンドパターンの具体的調査事例

国内各地域の畑土壌 52 筆から分離した線虫サンプルの PAGE パターンを図 12 に、各サンプルの採取地情報や顕微鏡観察による線虫数計数結果、バンドパターンに基づく種判定結果を表 1 に示した。全ての種を網羅できてはいないが、実際の畑土壌線虫群集を供試した際のバンドパターンのイメージをつかむのに参考としていただきたい。特に個体数によってバンドの見え方(イメージ)が異なるので、それを事前に把握しておくとな実際の調査時に有用である。

なお、実際には、一つのは場からは 1 種だけが検出される場合が多いが、ここでは複数種が混発した事例を多く掲載している。また、表 1 に記載した種判定結果は、従来法等による結果と全て一致した。

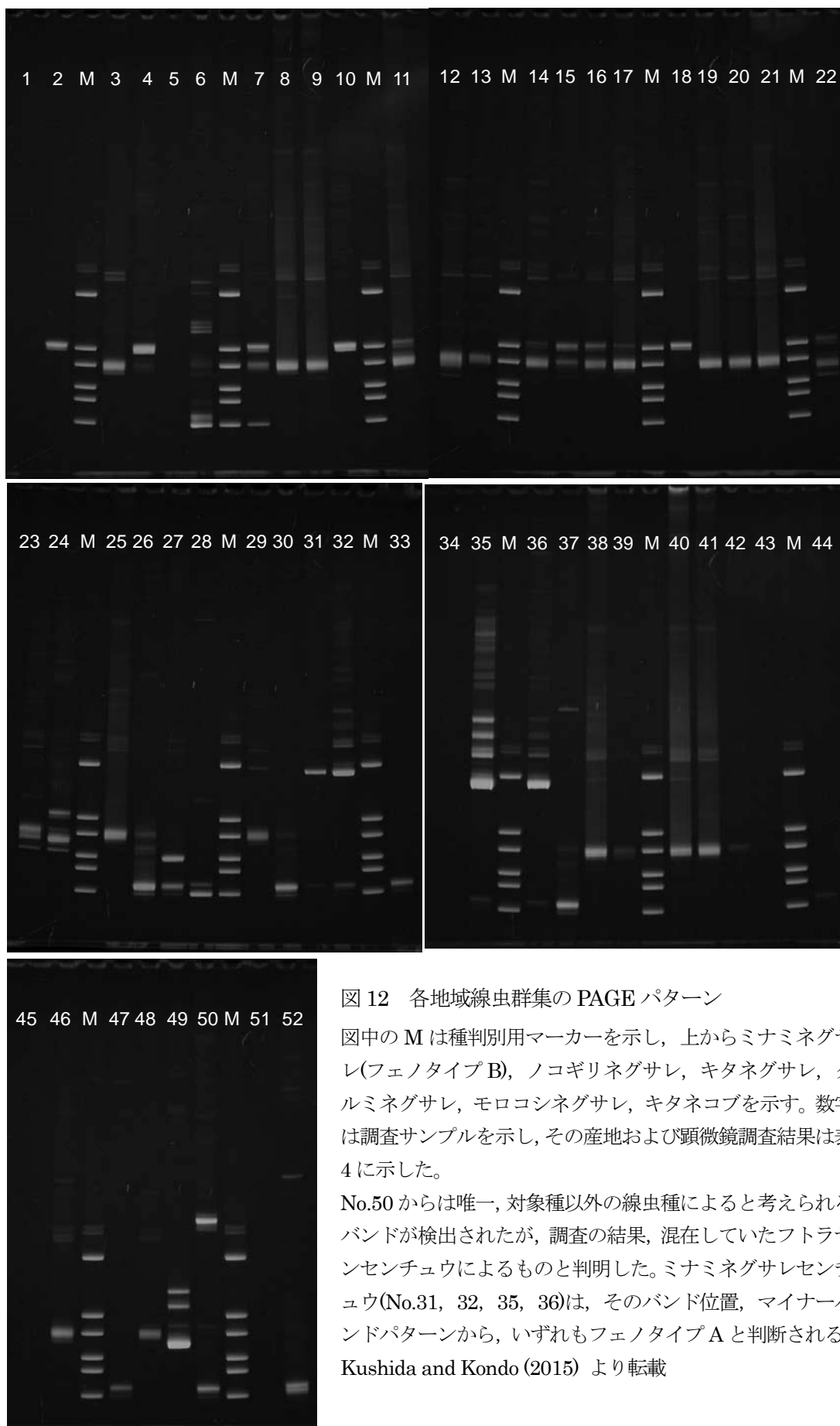


図 12 各地域線虫群集の PAGE パターン

図中の M は種判別用マーカを示し、上からミナミネグサレ(フェノタイプ B)、ノコギリネグサレ、キタネグサレ、クルミネグサレ、モロコシネグサレ、キタネコブを示す。数字は調査サンプルを示し、その産地および顕微鏡調査結果は表 4 に示した。

No.50 からは唯一、対象種以外の線虫種によると考えられるバンドが検出されたが、調査の結果、混在していたフトラセンセンチュウによるものと判明した。ミナミネグサレセンチュウ(No.31, 32, 35, 36)は、そのバンド位置、マイナーバンドパターンから、いずれもフェノタイプ A と判断される。

Kushida and Kondo (2015) より転載

表1 各地域線虫群集の調査結果

Sample No.	採取地		顕微鏡調査結果(頭/土壌20g)				PAGEによる判定結果 ²
	都道府県	市町村	ネグサレセンチュウ	ネコブセンチュウ	他の植物寄生性 ¹	自活性	
1.	広島	福山	0	0	Hop 12	114	nd
2.	北海道	足寄	14	0	0	300	Pcr
3.		厚沢部	24	0	0	606	Pp
4.		遠軽	41	0	0	963	Pcr, Pp
5.		北斗	0	0	0	348	nd
6.		北斗	2	192	0	157	Pp, Mh
7.		栗山	42	2	0	882	Pcr, Pp, Mh
8.		幕別	78	0	0	684	Pp
9.		芽室	69	0	0	523	Pp
10.		中札内	62	0	0	928	Pcr
11.		西興部	232	0	0	400	Pcr, Pp
12.		帯広	55	0	0	519	Pn, Pp
13.		音更	6	0	0	1005	Pp
14.		音更	46	0	0	1064	Pcr, Pp
15.		雄武	11	0	0	348	Pcr, Pp
16.		清水	31	0	0	204	Pcr, Pp
17.		新得	158	0	0	462	Pcr, Pp
18.		新得	40	0	0	1266	Pcr
19.		新得	26	0	0	766	Pp
20.		新得	32	0	0	1708	Pp
21.		大樹	170	0	0	925	Pp
22.		滝上	10	0	0	250	Pcr, Pn
23.		滝上	16	0	0	318	Pn, Pp
24.		湧別	36	0	0	671	Pcr, Pn
25.	群馬	伊勢崎	41	0	0	149	Pp
26.		伊勢崎	0	516	0	989	Mai
27.		伊勢崎	11	60	0	774	Pv, Mai
28.		伊勢崎	0	6	0	396	Mh
29.		長野原	26	0	0	1294	Pp
30.		渋川	0	107	0	450	Mai
31.	鹿児島	鹿屋	1	1	Rr 2	316	Pco, Mai
32.		鹿屋	40	18	Rr 14	530	Pco, Mai
33.	熊本	合志	0	48	0	207	Mai
34.	京都	綾部	0	0	0	867	nd
35.	宮崎	都城	59	3	0	485	Pco, Mai
36.		都城	13	4	Rr 101, Hop 12	327	Pco, Mai
37.	長野	阿智	0	177	0	153	Mai
38.		御代田	204	0	0	1880	Pp
39.		南牧	3	0	0	557	Pp
40.		川上	454	0	Para 70	475	Pp
41.		川上	101	0	0	428	Pp
42.		塩尻	1	0	0	646	Pp
43.	長崎	愛野	0	0	0	146	nd
44.	新潟	加茂	0	1	0	668	Mai
45.		長岡	0	0	0	138	nd
46.		新発田	11	0	0	395	Pp
47.		燕	0	38	0	85	Mai
48.		津南	2	0	0	444	Pp
49.	大分	豊後大野	253	0	Para 62	83	Pk
50.	東京	東久留米	0	221	Hop 12	23	Mai, Sc
51.	山形	最上	0	0	0	370	nd
52.		鮭川	0	102	0	774	Mai

¹ Hop: Hoplolaimidae, Para:ピンセンチュウ, Rr: ニセフクロセンチュウ. ² nd: バンドが確認されなかった, Mai: アレナリアネコブまたはサツマイモネコブまたはジャワネコブ, Mh: キタネコブ, Pco: ミナミネグサレ, Pcr: ノコギリネグサレ, Pk: クマトネグサレ, Pn: ムギネグサレ, Pp: キタネグサレ, Pv: クルミネグサレ, Sc: フラセン. 太字で示した種は, バンド輝度比較による優占種を示す. Kushida and Kondo (2015) より転載

その他の情報および留意事項

1. ランニングコスト

ランニングコストは、1 サンプルあたり約 584 円であり(2016 年 5 月 28 日時点)、主要なコスト品は以下の通りである。

- DNA 抽出・精製キット Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System
¥320/1 サンプル(250 回分キット購入の場合)
- Taq (Takara Ex Taq HS の場合) ¥126/1 サンプル
- PAGE ゲル ¥138/1 サンプル(ゲル 1 枚に 10 サンプルを泳動した場合)

2. 個体数評価について

メインバンドの輝度は該当種の個体数を反映するので、バンド輝度からおおよその密度を推定できることが分かっている。DNA の増幅効率が種ごとに異なる等の問題から、現時点でその調査技術は確立していないが、今後、簡易な密度推定法としての可能性を明らかにしていく予定である。

3. ナンヨウネコブについて

今回、技術開発の対象としなかったナンヨウネコブは、主として南西諸島に分布しているが、平成 26 年 11 月に大分県でサトイモに被害を発生させ、特殊報が発出されており、今後、九州以北でも検出事例が増える可能性がある。本種は、アレナリアネコブやジャワネコブと同じく、サツマイモネコブと発生生態や寄主範囲が類似し、DNA 上の変異も少ない。シーケンス解析では、rDNA-ITS の配列長は全く同じであったことから、上記 3 種と同じ位置にバンドを形成すると推察される。今後、これら 4 種も同時に種判別できる技術開発が求められる。

4. 本技術の問い合わせ先

本技術に関する問い合わせは、電子メールにて以下のアドレスで受け付けます。

Nema-G*ml.affrc.go.jp (実際には*を@ に入れ替えて下さい)

おわりに

近年、線虫調査技術を持った研究者や技術者が各地で減少し続け、線虫問題に十分な対応ができない状況が生じている。さらに線虫種の調査・把握は高い専門性を要することもあり、線虫が関連する被害事例の多くが究明されないままになっていることが懸念される。本法では、専門知識が求められる顕微鏡観察の工程を排除し、マニュアルに基づいた生化学実験の工程だけで高感度な検出と種判定ができるようにした。また、国内の畑地で問題となるネグサレセンチュウとネコブセンチュウ全種の同時評価を可能にした。これにより、非専門家でも比較的簡単に線虫種の把握が可能であることから、各地域における線虫被害の究明や対策の推進に役立つことが期待される。また本法は、線虫の分布調査や発生生態調査などの基礎的研究、特に複数種の競合研究にも威力を発揮すると考えられるので、様々に活用していただければ幸いである。

一方、本法については国内の様々な地域の圃場線虫群集を用いてその精度を検証しているが、まだ十分とは言えない。種や地域個体群によっては、新たなパターンが検出される可能性は捨てきれないため、今後も様々な事例調査を通してその可能性を評価し、診断精度の維持・向上を図っていく予定である。また、本法の工程を更にシンプル化することも必要である。特に DNA 抽出工程で使用するビーズショッカー(細胞破碎機)を所有する機関はまだ少ないと推察されることから、これを用いない抽出法の確立が求められており、現在検討を進めている。これらの改善手法は、随時にマニュアルへ反映させていく予定である。

引用文献

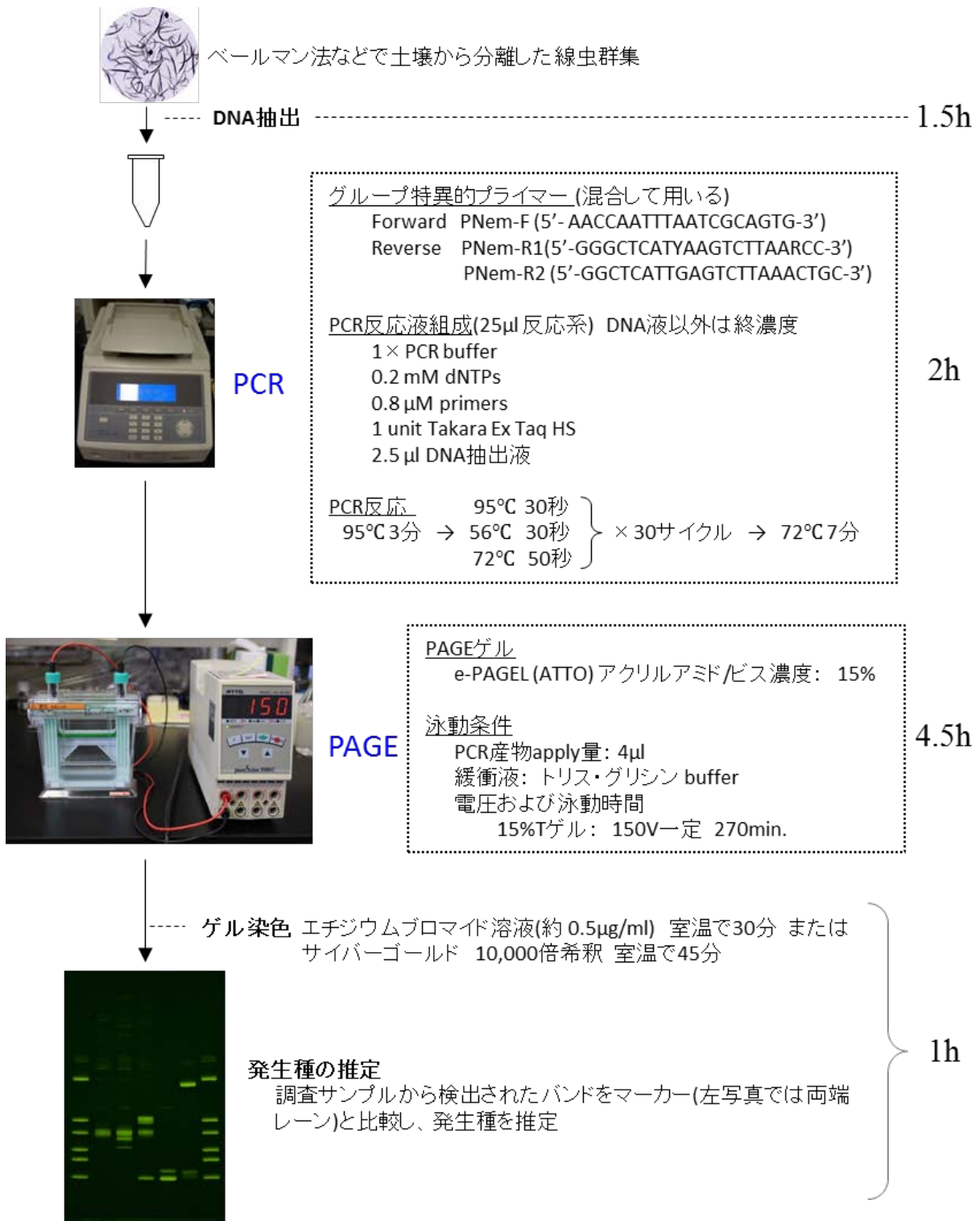
- Kushida A. and Kondo N. (2015) A simple method for the detection and discrimination of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* species in nematode communities. *Nematological Research* 45, 101–114.
- Mizukubo T., Orui Y., Hanada K. and Sano Z. (2003) Microevolutionary trend in *Pratylenchus coffeae* sensu strict (Nematoda: Pratylenchidae): the diversity in PCR-RFLP phenotype, compatibility on host plants and reproductive segregation. *Japanese Journal of Nematology* 33, 57–76.
- 奈良部 孝(2004) 線虫の見分け方 ; ネコブセンチュウ. 植物防疫特別増刊号 8, 11-16.
- 農業環境技術研究所 (2008) PCR-DGGE 法による土壌線虫相解析法 .
http://www.niaes.affrc.go.jp/project/edna/edna_jp/manual_nematode.pdf
- 大場広輔・岡田浩明 (2008) PCR-DGGE 法による土壌生物群集解析法(2) 土壌線虫相の解析. 土と微生物

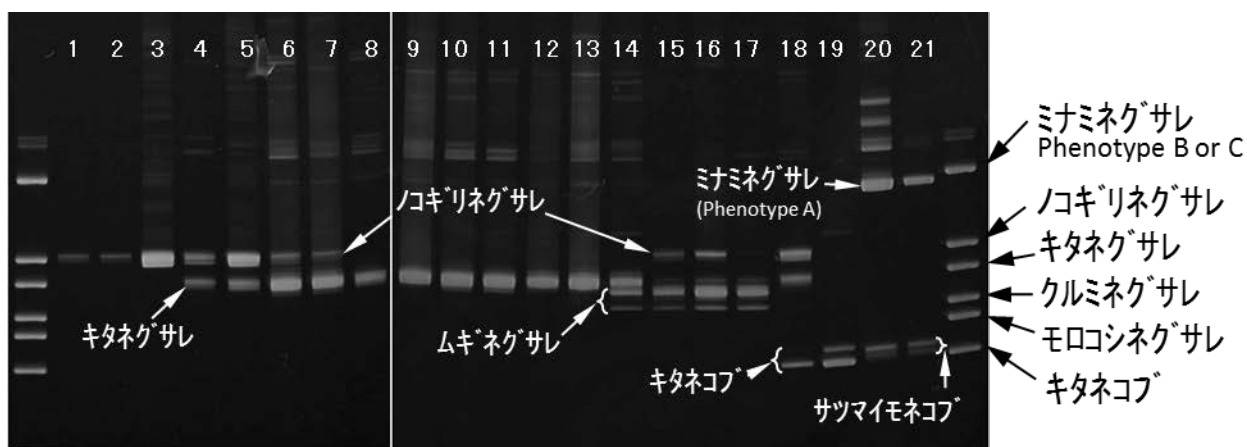
物 62, 69-73.

佐野善一 (2014) ベールマン法. 線虫学実験(水久保隆之・二井一禎編) 京都大学学術出版会
p192-193.

上杉謙太 (2013) 九州のネグサレセンチュウ問題ーキクを加害する新規発生種の分布と生態ー. 日本応
用動物昆虫学会誌 57, 61-67.

◆ 診断工程の簡易フロー図





各地の畑地由来線虫群集の PAGE パターン(わかりやすく並べ替えてある)。検出バンドから圃場 1~3 はノコギリネグサレの単独発生，圃場 4~7 はノコギリネグサレとキタネグサレの混発，圃場 8~13 はキタネグサレの単独発生，圃場 14 はキタネグサレとムギネグサレの混発，圃場 15, 16 はノコギリネグサレとムギネグサレの混発，圃場 17 はムギネグサレの単独発生，圃場 18 はノコギリネグサレ，キタネグサレ，キタネコブの 3 種同時発生，圃場 19 はキタネコブの単独発生，圃場 20, 21 はミナミネグサレとサツマイモネコブの混発と判定できる。両端レーンはマーカー。