

ネグサレセンチュウとネコブセンチュウの 多種同時検出・種判別法

農研機構 北海道農業研究センター ^{くし}串 ^だ田 ^{あつ}篤 ^{ひこ}彦

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。しかし線虫の診断、特に種の同定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が、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。それには、発生する可能性がある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、こ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知識、特に形態に関する知識がな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。本稿では開発した技術の概要および特徴を紹介する。

I 技術の概要、前提条件

1 診断対象種

本技術で検出し、種判別できることを期した線虫種は、以下に記したネグサレセンチュウ (*Pratylenchus* sp.) 9種およびネコブセンチュウ (*Meloidogyne* sp.) 4種である。これらは、国内の畑地に発生し、農業上の被害を引き起こす両属線虫種のほぼすべてを網羅している。

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. zeae*

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*

この中でアレナリアネコブセンチュウ（以下、種名の「センチュウ」を省略）、サツマイモネコブ、ジャワネコブのネコブセンチュウ3種については、高感度検出できるものの、種の特定までできないため、本技術では「サツマイモネコブセンチュウ類」と判定している。種を判定する必要がある場合には、改めてPCR-RFLP法などを実施する必要がある。また、国内の畑地にはナンヨウネコブの分布も確認されているが、検出事例が非常に少ないことから、ここでは対象に加えなかった。

2 供試サンプル

有害線虫の診断調査は、一般的に検査対象土壌からベールマン法などを用いて土壌線虫群集を分離し、顕微鏡観察によって行われる。本法に供試する線虫サンプルは、これと同じく土壌から分離した線虫群集であり、そこからDNAを抽出して有害線虫種を検出する。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。従来の線虫検診で使われている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、適切な検出感度を確保できる。

3 種判別メカニズム

微生物群集解析手法の一つにRibosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)法がある。これはリボソームDNA (rDNA)のITS領域の長さが生物種間で異なることを利用し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)またはシークエンサーでその多型を検出することで群集

A New Method for Simultaneous Detection and Discrimination of Multiple *Pratylenchus* and *Meloidogyne* Species in Nematode Communities. By Atsuhiko KUSHIDA

(キーワード: ネグサレセンチュウ, ネコブセンチュウ, 種判別法, 多種同時)