

日本における主要な有害線虫の簡易同定法

日本たばこ産業株式会社葉たばこ研究所 **お** **お** **る** **い** **ゆ** **き** **お**
大 **類** **幸** **夫**

はじめに

有害線虫の耕種防除法には、輪作や抵抗性品種の利用と並んで、対抗植物を栽培する方法がある。対抗植物は根に殺虫成分を含むことから、有害線虫の密度を積極的に低下させる特性を持っている。寄主範囲が広いネコブセンチュウおよびネグサレセンチュウを中心に、これら線虫の密度抑制に有効な対抗植物が探索され、その実用化が検討されている（佐野，1992）。このような植物を、輪作・間作体系に組み込むことによって有害線虫を防除していくことが、化学農薬の環境に対する悪影響が問われている今日、極めて重要と考えられる。

それぞれの抵抗性作物や対抗植物は、有効である対象線虫が特定の種類に限られる。したがって、輪作に際しては、事前に線虫の種類や密度を調査し、その結果に基づいて適切な抵抗性作物および対抗植物を選定することが必要である。むやみに輪作すると逆に線虫害を増大させる危険性がある。こうしたことから、線虫の種を迅速かつ正確に同定することは、基礎的な研究や植物検疫のみならず、防除対策上も極めて重要である。

有害線虫の中でも、ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウおよびシストセンチュウ（図-1）は世界に広く分布し、作物に与える被害が大きく、農業上重要な防除対

象となっている。日本では、未記載種を含めると、ネコブセンチュウ 13 種（荒城，1992）、ネグサレセンチュウ 22 種（水久保，1992）、シストセンチュウ 8 種（清水・百田，1992）の生息が知られている。

本稿では、線虫分類の専門家でなくても迅速・簡便に有害線虫を同定できる方法として、①アイソザイムパターンによるネコブセンチュウの構成種の判定法、②ネコブセンチュウの天敵細菌 *Pasteuria penetrans* の寄主特異性を利用したネコブセンチュウ第 2 期幼虫の同定法、③ PCR 法によるネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウおよびシストセンチュウのそれぞれ 1 頭からの同定法、などを紹介する。

I ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウ およびシストセンチュウの従来の同定法

伝統的に行われてきた形態による同定法は、多数の調査個体の標本を作成し、顕微鏡で観察して分類に有効とされる形態形質を観察測定しなければならない。種の判定は、これらの観察測定データを種の判定基準と照合し、総合的に勘案して行われる。しかし、種の量的形質の判定基準の一部は種間でオーバーラップしており、さらに質的形質にも種内変異がある。そのため、形態による正確な種の判定には高度な熟練が必要とされている。

実際の同定は、ネコブセンチュウでは雌成虫の会陰部周辺の紋様（ペリニアルパターン）の形態観察が簡便な方法として最もよく用いられている。また、判別寄主植物に同定しようとするネコブセンチュウを接種し、その寄生性を 1~2 か月後のゴール形成程度で確認し、種とレースを判定する方法も用いられている。ネグサレセンチュウでは雌成虫の形質が重視され、それらの形態と計測値に基づいて同定され、雄成虫および幼虫の形質による同定は困難な場合が多い。シストセンチュウの同定は、主に第 2 期幼虫、雌雄成虫およびシストの形態と計測値に基づいて行われる。

走査電子顕微鏡（SEM）は高額なため、広く一般に利用することはできないが、第 2 期幼虫および成虫の頭部正面像を SEM で観察することができれば同定精度はさらに向上する（岡本・八重樫，1981；八重樫・岡本，1981；百田・大島，1976）。

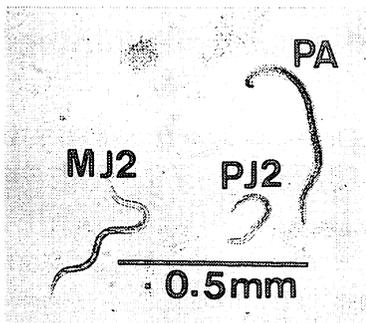


図-1 MJ2：ネコブセンチュウの第2期幼虫
 PJ2：ネグサレセンチュウの第2期幼虫，PA：ネグサレセンチュウの雌成虫

Convenient Identification Methods of Main Important Plant-Parasitic Nematodes in Japan. By Yukio ORUI

(キーワード：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，同定法，*Pasteuria penetrans*，PCR)

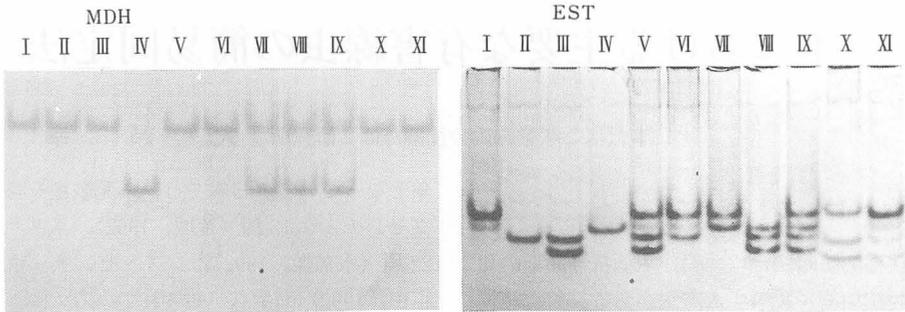


図-2 日本のタバコ畑に生息するネコブセンチュウ4種を各種組み合わせたとときのポリアクリルアミド・ゲル上でのリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) とエステラーゼ (EST) のアイソザイムパターン

供試サンプル：I, サツマイモネコブセンチュウ；II, アレナリアネコブセンチュウ (A-1)；III, アレナリアネコブセンチュウ (A-2)；IV, キタネコブセンチュウ；V, サツマイモネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウ (A-2)；VI, サツマイモネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウ (A-1)；VII, サツマイモネコブセンチュウとキタネコブセンチュウ；VIII, アレナリアネコブセンチュウ (A-2) とキタネコブセンチュウ；IX, サツマイモネコブセンチュウ, アレナリアネコブセンチュウ (A-2) およびキタネコブセンチュウ；X, ジャワネコブセンチュウ；XI, ジャワネコブセンチュウとサツマイモネコブセンチュウ

*：アレナリアネコブセンチュウのESTパターンには1本型 (A-1) と2本型 (A-2) がある。

II ネコブセンチュウのアイソザイムパターンによる同定法と地理的分布

エステラーゼ (EST) とリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) のアイソザイムパターンで種を識別する方法は、ネコブセンチュウの雌成虫から正確かつ簡便に同定できる方法として世界的に用いられている (ESBENSHADE and TRIANTAPHYLLOU, 1990)。このアイソザイムパターンによる同定法は実用的価値を高めるため、簡便な方法が考案されている。例えば、ネコブセンチュウが寄生して寄主植物に形成されたゴールごと磨砕してESTのアイソザイムパターンで寄生種を判定する方法 (IBRAHIM and PERRY, 1993)、1枚のゲルでESTとMDHのアイソザイムパターンを同時染色して雌成虫1頭から同定する方法 (ESBENSHADE and TRIANTAPHYLLOU, 1990)、3種のネコブセンチュウ雌成虫をまとめて磨砕した抽出タンパク質のアイソザイムパターンから種の構成を判定する方法 (奈良部ら, 1989)、などがある。

筆者は、奈良部ら (1989) の方法を用いてタバコ畑におけるネコブセンチュウの地理的分布を調査した (ORUI et al., 1997)。すなわち、採集したタバコ畑の土壤にタバコあるいはトマトの苗を植えて土壤に生息する第2期幼虫を雌成虫になるまで温室で育成し、その根から雌成虫を摘出し、20~30頭をまとめて磨砕して抽出したタンパク質のアイソザイムパターンから、それらの種の構成を判定した。219箇所タバコ畑土壤に生息していたそれぞれのネコブセンチュウの種の構成は、図-2に示

したESTおよびMDHのアイソザイムパターンにより容易に判定できた。この調査により沖縄・九州以北のタバコ畑には、宮城・山形県を北限としてサツマイモネコブセンチュウ、岩手・秋田県を北限としてアレナリアネコブセンチュウ、主に東日本を中心としてキタネコブセンチュウの主要3種がそれぞれ分布していることがわかった。ジャワネコブセンチュウは琉球諸島の一部でのみ確認された。各種のネコブセンチュウの分布が重なり合う地域では同一の畑に2種以上が混棲していることが多いことも判明した。寄主範囲が広いこれら3種のネコブセンチュウは、野菜・作物畑でもタバコ畑と同様な分布を示していると思われる。なお、この方法は雌成虫を供試できる条件下で種の構成を把握したい場合に最適な方法である。

III *Pasteuria penetrans* の寄主特異性を利用したネコブセンチュウの識別

P. penetrans は、ネコブセンチュウに対して寄主特異性が高い、直径約4 μ mの円盤型をした線虫寄生性細菌の一種である (西沢, 1990)。*P. penetrans* にはネコブセンチュウの種に対して寄主特異性が異なるいくつかの系統があり、ネコブセンチュウの第2期幼虫が動き回っている間に、その体表に種特異的に付着・寄生する。

上述したように、野菜・作物畑には主としてサツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウおよびキタネコブセンチュウの主要3種が生息していることが日本におけるネコブセンチュウの地理的分布の特徴で

ある。そこで、これら主要3種については第2期幼虫に対する、*P. penetrans*の寄主特異性を利用した識別法が考案されている。

その一つは、*P. penetrans*が寄主特異的に付着した第2期幼虫同士が集合塊を形成することを利用した同定法(奈良部・安達, 1993)である。サツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウおよびキタネコブセンチュウに対してそれぞれ寄主特異性のある*P. penetrans*の3系統の各孢子懸濁液を系統別にマイクロプレートのウェルに注入する。次に、同定しようとする多数の第2期幼虫を含む線虫懸濁液をそれぞれのウェルに添加する。第2期幼虫の水中での運動に伴い、ウェル中の*P. penetrans*系統の寄主特異性に適合した第2期幼虫だけに孢子が多数付着し、孢子が付着した第2期幼虫は、さらに孢子を介して他の幼虫とも互いに付着しあい、目に見える大きな集合塊を形成する。適合しない*P. penetrans*系統と第2期幼虫の組み合わせのウェルでは、第2期幼虫は互いに分散し、集合塊は形成されない。つまり、ネコブセンチュウの種はこの集合塊を形成したウェルに注入した*P. penetrans*系統によって判定できることになる。ただし、この方法では、集合塊を作らせるために多くの第2期幼虫が必要となるのに併せ、優占種と混在している他の少数の種を同定することは難しい。また、この方法は土壌サンプルから分離される第2期幼虫の密度を調べることを考慮していない。

そこで、ネコブセンチュウの第2期幼虫を1頭ごとに種を識別し、同時に種ごとに密度も決められる方法として寄主特異的な*P. penetrans*の孢子を染色し、これを利用したネコブセンチュウの同定法(ORUI and OZAWA, 1999)が考案されている。すなわち、サツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウおよびキタネコブセンチュウに対してそれぞれ寄主特異性のある*P. penetrans*の3系統の孢子を Brilliant Blue G で青色に、Acridine Orange で橙色に、Methyl Violet で紫色にそれぞれ染め分け、これらを第2期幼虫体表に接触させて、種特異的に付着した染色孢子の色によって3種のセンチュウを1頭ごとに同定する方法である。この3色で染め分けた染色孢子の混合液と3種のネコブセンチュウの第2期幼虫を混ぜ合わせると、最も多く付着した染色孢子の色によって、1頭ごとに種を判定できることがわかった。さらに、図-3に示したプロセスに従って、土壌試料からベルマン法で分離したネコブセンチュウ、自活性線虫およびネグサレセンチュウを含む線虫の懸濁液を実際に供試した場合、染色孢子はネコブセンチュウの第2期幼虫にのみ付着し、最も多く付着した染色孢子の色によって種を判定することも可能であった。染色孢子を利用したネコブセンチュウの同定法は、ネコブセンチュウの第2期幼虫を1頭ごとに識別し、試料中の第2期幼虫の密度を同時に把握できる。さらに、他の方法では難しい種の混在比の推定が可能なところに、この方法の

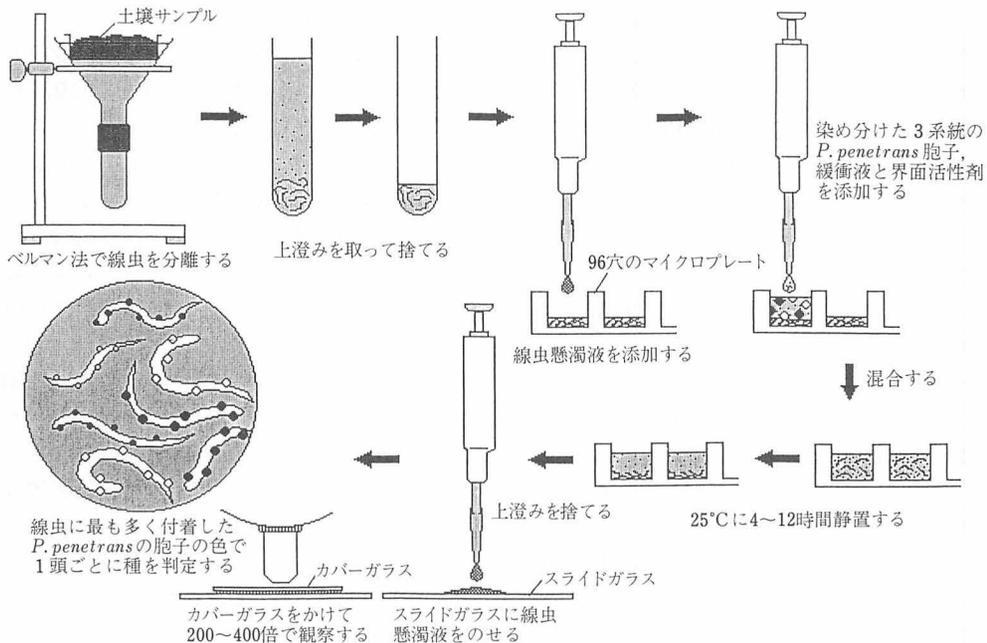


図-3 染色した寄主特異性の高い*P. penetrans*の孢子による土壌サンプル中の主要なネコブセンチュウ3種の種判定プロセス

特徴がある。

以上述べたとおり、染色孢子を利用した方法は第2期幼虫を1頭ごとに同定でき、ベルマン法で分離した第2期幼虫を種ごとに定量することができる。一方、第2期幼虫を多数供試できる場合は、第2期幼虫同士の集合塊を利用する同定法のほうが、顕微鏡を使わず肉眼で簡便に種を同定できる点で有利となろう。これらの二つの方法は、調査・研究の状況に応じて使い分けられるべきであろう。

IV PCR法による有害線虫の同定

ネコブセンチュウおよびシストセンチュウの第2期幼虫あるいはネグサレセンチュウのような微小な線虫をアイソザイム解析で同定するためには、多数の線虫が必要となる。一方、PCR法を用いれば、こうした線虫の1頭からでも種の識別は可能である。

安定したPCR産物を得るため簡便な鋳型DNAの調整法として、1頭の線虫をlysis buffer (10 mM Tris-HCl: pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% IGEPAL CA-630 (Sigma) および 100 µg/ml proteinase K) 中で破碎し、proteinase Kを失活するための熱処理をして鋳型DNAとする方法がある。この方法によって、1頭の線虫から抽出した鋳型DNAをPCR反応液に直接加えたとき、安定して確実にPCR増幅できる (ORUI, 1996)。

ネコブセンチュウの種の同定には、ミトコンドリアDNAのcytochrome oxidase subunit II遺伝子とlarge subunit rRNA 遺伝子領域間のPCR-RFLP法が有効であり (POWERS and HARRIS, 1993; ORUI, 1998)、日本に生息する10種についてはこの領域のPCR産物を*Ssp* Iあるいは*Vsp* I + *Hinf* Iのどちらか一方と*Mse* Iの組み合わせ処理したRFLPパターンをもとに同定できる (ORUI, 1998)。また、この方法により、アレナリアネコブセンチュウのPCR産物の大きさが日本産とアメリカ産で異なっていることがわかった。すなわち、ESTのアイソザイムパターンは、ESBENSHADE and TRIANTAPHYLLOU (1990) が示したアレナリアネコブセンチュウのパターンを示しているが、PCR産物の大きさは、日本産が1.7 kbであるのに対し、アメリカ産では、1.1 kbであった。アレナリアネコブセンチュウは分布が広く、農作物に大きな被害を与える重要種であるので、この線虫の分類上の位置づけは今後さらに検討する必要がある。

CENIS (1994) は、短い塩基数のランダムプライマーを用いて解析するRAPD (random amplified polymor-

phic DNA) 法でネコブセンチュウの主要4種を同定している。さらに、RAPD法によるネコブセンチュウの同定法の実用的価値を高めるため、第2期幼虫1頭からでも種の識別が可能なる方法が検討されている。鋳型DNAをlysis bufferで調整し、10塩基のランダムプライマー (Operon社) のOPA-01を用いてPCR増幅したとき、日本産ネコブセンチュウの第2期幼虫の1頭からでも容易に同定できる安定した種特異的なRAPDパターンを確認している (大類, 投稿中)。バンドパターンはシャープさに欠け、マイナーバンドが多いものの、RAPD法はPCR産物の電気泳動パターンで判定でき、RFLP法のようにPCR産物の制限酵素の処理行程を必要としないところに利点がある。

ネグサレセンチュウのrDNAのITS (internal transcribed spacer) 領域のPCR-RFLP法は、卵から成虫までのすべての発育ステージに雌雄に関係なく適用でき、これらの増幅産物を制限酵素*Alu* I, *Hha* I, *Hinf* I および *Taq* Iで処理した断片パターン (図-4) により種を識別できる (ORUI, 1997; ORUI and MIZUKUBO, 1999)。東日本の151箇所のタバコ畑に生息するネグサレセンチュウの地理的分布の調査に、この方法が適用されている (大類・水久保, 1999)。すなわち、土壌からベルマン法で分離したネグサレセンチュウを顕微鏡下ですくいとり、1頭ごとに磨砕して鋳型DNAを調整し、PCR増幅した。次に、PCR産物を*Alu* Iおよび*Hinf* Iで処理したRFLPパターンで1頭ごとに同定したが、RFLPパターンに変異もなく容易に識別できることがわかっている。また、この調査により、ミナミネグサレセンチュウと形態的に酷似した近縁種が東日本に広く分布していることも確認されている。

ジャガイモシストセンチュウ、*Heterodera* 属線虫4種のITS領域のPCR-RFLP法は、これらの増幅産物を制限酵素*Alu* I, *Mse* Iおよび*Tha* Iのいずれか1種と*Rsa* Iで処理した断片パターンにより識別が可能であった。また、関東地方の17箇所の作物畑の土壌からベルマン法で分離されたシストセンチュウの第2期幼虫について、*Alu* Iおよび*Rsa* I処理したRFLPパターンによる同定を行った結果、この方法はベルマン法で分離された第2期幼虫の同定に利用できるものと思われた (大類, 1997)。広い地域からの採集個体群を供試した場合に想定されるRFLPの変異パターンや、海外からの侵入が危惧されている種のRFLPパターンの把握は、今後の課題であると思われる。

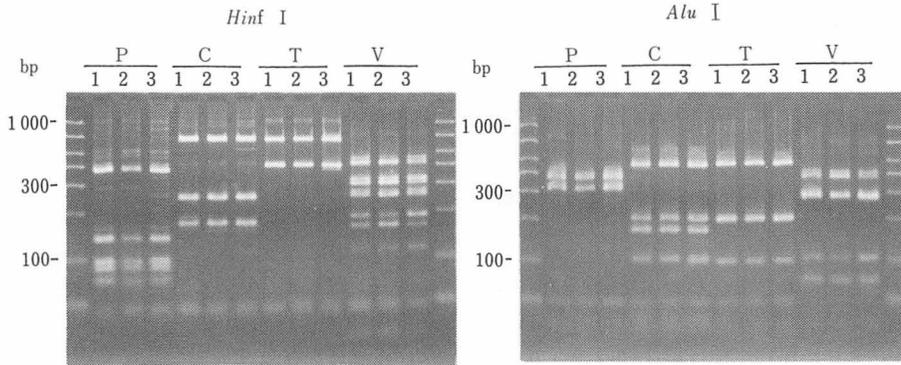


図-4 PCR-RFLP法によるネグサレセンチュウ1頭からの同定(リボゾームDNAのITS領域のPCR産物を *Hinf* Iおよび *Dra* Iで処理した種特異的なRFLPパターン)

P:キタネグサレセンチュウ, C:ミナミネグサレセンチュウ, T:ミナミネグサレセンチュウ近縁種, V:クルミネグサレセンチュウ. No.: 個体群No.

おわりに

線虫の形態による同定は、形態の変異が大きいうえ種判定基準が種間でオーバーラップすることがあるため、相当の困難が予想される。さらに顕微鏡による詳細な形態観察には、煩雑な作業が伴い熟練が必要である。一方、アイソザイムパターンによる方法、染め分けた3系統の *P. penetrans* の染色胞子の種特異的な付着性を利用した方法、PCR-RFLP法およびRAPD法による方法は、いずれも従来の同定法がもつ問題点をフォローし、形態による分類の知識がなくても種までの同定が可能な方法として推奨できる。特に、PCR法を用いた解析結果は、線虫分類の伝統的分類形質に付け加えられる新たな分類形質ともいえそうである。

また、ベルマン法で分離される有害線虫を1頭からでも同定できるPCR-RFLP法は、農業上重要な線虫の検疫上の監視技術として、極めて高い価値をもっていると思われる。

最後に、本稿を執筆するに当たり貴重なご助言をいただいた農林水産省農業研究センターの水久保隆之博士に厚くお礼を申し上げる。

引用文献

- 1) 荒城雅昭 (1992): 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会: 29~36.
- 2) CENIS, J. L. (1993): *Phytopathology* 83: 76~80.
- 3) ESBENSHADE, P. R. and A. C. TRIANTAPHYLLOU (1990): *J. Nematol.* 22: 10~15.
- 4) IBRAHIM, S. K. and R. N. PERRY (1993): *Fundam. Appl. Nematol.* 16: 187~191.
- 5) 水久保隆之 (1992): 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会: 40~47.
- 6) 百田洋二・大島康臣 (1976): *日線虫研誌* 6: 14~23.
- 7) 奈良部孝ら (1989): *日植病報* 56: 151.
- 8) ———・安達 宏 (1993): *植物防疫* 47: 29~32.
- 9) 西沢 務 (1990): 同上 44: 524~530.
- 10) 岡本好一・八重樫隆志(1981): *日線虫研誌* 10: 10~14.
- 11) ORUI, Y. (1996): *Appl. Entomol. Zool.* 31: 505~514.
- 12) ——— et al. (1996): *ibid.* 31: 225~231.
- 13) 大類幸夫 (1997): *日線虫誌* 27: 67~75.
- 14) ORUI, Y. (1998): *Appl. Entomol. Zool.* 33: 43~51.
- 15) ——— and N. OZAWA (1999): *ibid.* 34: 195~203.
- 16) ——— and T. MIZUKUBO (1999): *ibid.* 34: 205~211.
- 17) 大類幸夫・水久保隆之 (1999): *応動昆* 43: 75~79.
- 18) POWERS, T. O. and T. S. HARRIS (1993): *J. Nematol.* 25: 1~6.
- 19) 佐野善一 (1992) 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会: 253~257.
- 20) 清水 啓・百田洋二 (1992): 同上, 日本線虫研究会: 24~28.
- 21) 八重樫隆志・岡本好一(1981): *日線虫研誌* 10: 43~52.