

植物防疫基礎講座：線虫の見分け方(3)

ネグサレセンチュウ・ネモグリセンチュウ

独立行政法人農業技術研究機構

みずくぼたかゆき
水久保隆之

中央農業総合研究センター

はじめに

ネグサレセンチュウ (*Pratylenchus*) とヒルシュマニエラ属のネモグリセンチュウ (*Hirschmanniella*) は農業上重要な種を多数含む属である。両者ともプラティレンクス科 (*Pratylenchidae*) に属している。この科は平坦な唇部、がっしりした口針、円錐形の（したがって細長くない）尾部を主な共通の形態的な特徴としている。*Pratylenchus* 属と *Hirschmanniella* 属の生態的な相違点は、ネグサレセンチュウが森林や草原に棲息するのに対し、ヒルシュマニエラ属は水田などの湿地に棲息することである。本稿では表題の2属について、種レベルの特徴をなるべく多くの図を使って解説する。あわせて、分子生物学的な同定法も紹介する。

I 形態観察を行う前に

1 標本作りのエラーを避けよう

形態観察の精度は標本の良否に大きく依存する。概論になるが、最初に標本作製に関する重要な注意をした

い。

線虫の同定では、口針長や V 値（頭端一陰門/体長の百分率）の値が極めて重要である。これらの量的形質は、個体群内では変動係数 ($CV = \text{標準偏差} / \text{平均値}$) がおおむね 3% で安定し、異所的個体群間でも種内変異がほとんど見られない。だからこそ、口針長や体長を測り損ねると、正しい同定ができないことになる。図-1 に口針長の計測エラーが起こる一例を示した。線虫は 60℃ で湯煎して殺せば、まっすぐに伸びて死ぬ。しかし、高温のお湯や固定液で瞬時に殺し、いびつに湾曲した姿勢で固まった個体 (図-1 A) をスライドグラスにマウントすると頭部が傾斜する (図-1 B) ため、観察された平面図では口針が実際より短くなる (図-1 C)。唇部が傾斜していると唇部体環数も正しく識別できない。さらに、固定液中で死んだ線虫は異常収縮を示す。収縮

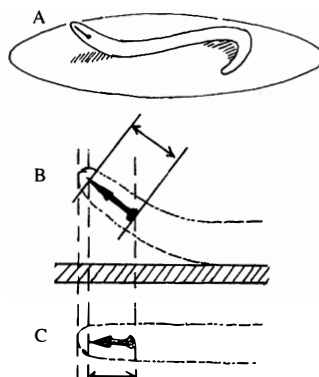


図-1 計測エラーの原因 (原図)

A: 線虫が熱でなく固定液によって死ぬと、いびつに変形して固定される。B: A のような標本を使うと、口針が水平面より傾斜している場合もある。C: B を上から観察した平面象では口針が実際より短く見える。

は体の前方や後方で大きく、中部食道球は前方にせり上がる。このような標本では a, b, c, V などの実測値の比率（ディメンジョン）が大幅に狂う。異常サンプルを測らないことは常識だが、傾斜が軽微に思えるとき、サンプル数が少ないときは不適当な標本も計測しがちである。死亡時に収縮した標本はラクトフェノールに入れて加熱しても直らない。60℃ で正しく湯煎した後、TAF 等で固定することが肝要である。

2 唇部体環の見方

線虫の分類では、唇部(頭)の体環数は種を分ける重要な同定形質であるが、唇部の開始点がどこにあるか解説している資料を見かけない。線虫には固い唇部骨格（口針伸出筋を支持する骨化部）があり、その前縁部より先が唇部である (図-2 B)。また、唇部の正面には唇盤と呼ばれる口腔開口部を取りまく小さな円盤がある (図-4: OD)。これもまれに側面から観察される場合もある (図-2 A) が、唇盤は体環に勘定しない。唇部骨格のアーチが小さいネグサレセンチュウでは、唇部の境界が分かりやすいが、唇部がドーム型で、唇部骨格のアーチも強いネモグリセンチュウでは境界が引きにくい。注意が必要である。

Identification of *Pratylenchus* spp. and *Hirschmanniella* spp. in Japan. By Takayuki Mizukubo

(キーワード: ネグサレセンチュウ, ネモグリセンチュウ, 有害線虫, 同定法, 野菜類, イネ, レンコン)

表-1 日本産ネグサレセンチュウの検索表

和名(ネグサレセンチュウを省略)・種名 ^{a)}	唇部体環	V (%) 平均：最小～最大	口針長 (μm 平均：範囲)	受精囊	雄	尾部形態 ^{b)}	尾端の体環	後部子宮枝 ^{c)}	痕跡 卵巢
パイナップル	2	86：82～89	19：17～22	空	×	A, B', F, G	無	1<	×
チャ	2	82：77～85	16：15～18	卵形<	○	B, D	無	<1	×
ムギ	2	82：80～85	16：15.5～17.0	空	×	H	無一偽	≒1	×
マキバ	2	81：78～86	16：13.0～16.6	空	×	B	無	1<	×
ミナミ	2	80：76～84	16：14.0～17.8	卵形<	○	A, B, B', F, G	無一偽	1<	○
<i>P. yamagutii</i>	2	79：78～82	16：15.3～18.0	<卵形	○	B, D	無	≒1	×
<i>P. okinawaensis</i>	2	79：77～82	17：16～18	卵形<	○	A, B	真	≒1	×
スクリブナー	2	77：73～80	14：14～15	空	×	B, B', C	無	1<	×
シリコブ	2	73：70～77	15：13.9～16.5	空	×	A, F, G, F'	偽	1<	○
<i>P. japonicus</i>	2～3	86：82～89	19：17.5～20.8	空	×	cly	無	1<	×
ニセミナミ	2～3	80：79～82	16：14.9～17.8	卵形<	○	B, B', D	無	1<	○
ウンゼン	2～3	77：75～79	14：13.9～15.2	長楕円	○	A, B, B', F	偽	1<	×
ノコギリ	3	83：80～85	16：14.2～16.0	空	×	B''	真	1<	×
キタ	3	80：78～85	16：14～17	<卵形	○	A, B, B'	無一偽	≒1	×
スズラン	3	79：77～80	16：15.0～16.5	球形	○	F, G	真	1<	×
ソーン	3	77：75～78	15：15.0～15.5	空	×	cyl: A, F, F'	無	≒1	×
モロコシ	3	73：67～75	15：13.5～16.0	空	×	B, D	無	1<	○
クルミ	3～4	80：76～84	14：13.5～16.5	楕円<	○	B, C, C'	無一偽	1<	○

^{a)} 未記載種は省略, ^{b)} 図-9 のタイプ記号を参照, ^{c)} 後部子宮枝/陰門部の体幅。

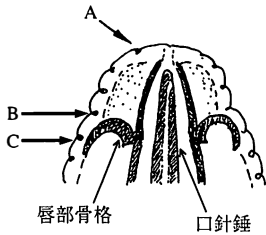


図-2 唇部の体環数の数え方 (原図)

A：唇盤 (oral disk) の境界：唇盤は普通体環と見なさない。B：唇部骨格より先にある条溝：ここから先が唇部である。C：唇部骨格前縁部より後ろの体環は胴体 (body) の体環：唇部ではない。ここに示した線虫模式図の唇部には3体環あることになる。

II ネグサレセンチュウ *Pratylenchus* 属の同定

ネグサレセンチュウには89種が確定されており (Siddiqi, 2000), 国内では種を同定して報告されたものが18種ある。この内のソーンネグサレセンチュウとスクリブナーネグサレセンチュウは過去に1度しか検出されていないため、現在は分布していない可能性もある。18種の同定テーブルを表-1に示した。この表で同定する場合は、最初に唇部体環を調べ、次にV値、口針長、受精囊の形等で絞り込むとよい。最初に言及したように、口針長とV値は同定に不可欠な形質であるから、できるだけ10頭以上を計測していただきたい。尾部の

形状 (側面の輪郭) は変異に幅があるが、種を決定するとき十分参考になる形質である。以下に形質の解説を行う。

1 唇部の側面の輪郭 (図-3)

10種の唇部を示した。ネグサレセンチュウの唇部前縁は平たいが、この輪郭には種間の相違がある。ムギネグサレセンチュウ、パイナップルネグサレセンチュウでは唇部前縁が屋根形に傾斜する。屋根の縁が終わるところで角張る。他の種では前縁部は放物線を描いて傾斜する。唇部が胴部 (食道部) からくびれることはほとんどなく、唇部と胴は連続している。クルミネグサレセンチュウは幅に対して相対的に高い唇部をもち、パイナップルネグサレセンチュウやムギネグサレセンチュウは低い唇部を持っている。

2 受精囊形の形

有性生殖をする種は、交尾によって得た精子を受精囊に蓄える。受精囊は柔軟な袋だが、種ごとに膨張の限度があるらしく、それが受精囊の形を決めている。キタネグサレセンチュウの受精囊は少ししか膨張しないので、限度まで貯精すると球形になる。しかし、精子の量が少ないときおよび線虫がやせている (=体幅が狭い) ととき、受精囊は卵形や楕円形 (長短径比2程度) になるので注意する。ミナミネグサレセンチュウやチャネグサレセンチュウでは多量に貯精すると長径が短径の4倍以上

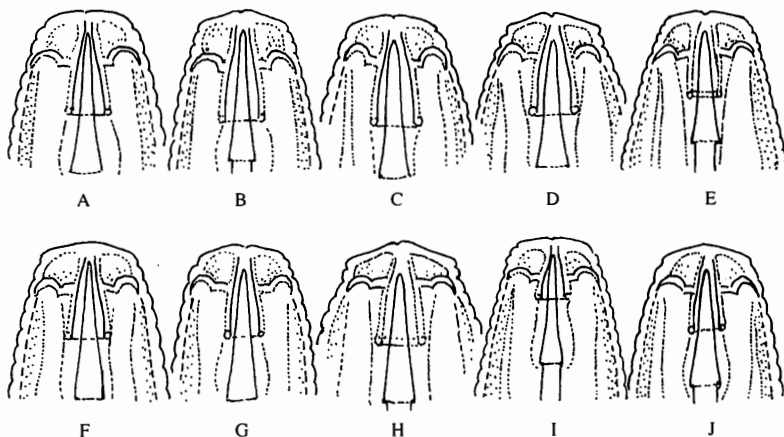


図-3 ネグサレセンチュウの唇部形態(原図)

A: キタネグサレセンチュウ *Pratylenchus penetrans*, B: クルミネグサレセンチュウ *P. vulnus*, C: ミナミネグサレセンチュウ *P. coffeae*, D: ムギネグサレセンチュウ *P. neglectus*, E: モロコシネグサレセンチュウ *P. zeae*, F: チャネグサレセンチュウ *P. loosi*, G: ニセミナミネグサレセンチュウ *P. pseudocoffeae*, H: パイナップルネグサレセンチュウ *P. brachyurus*, I: ノコギリネグサレセンチュウ *P. crenatus*, J: マキバネグサレセンチュウ *P. golihi*.

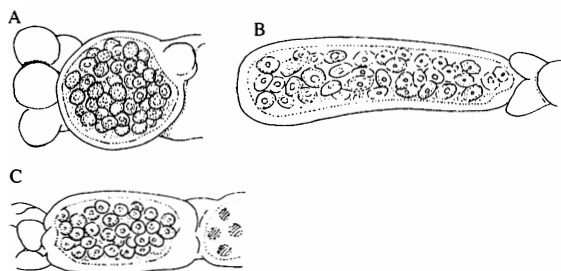


図-4 受精嚢の形(原図)

A: 球形, B: 長楕円形, C: 卵形.

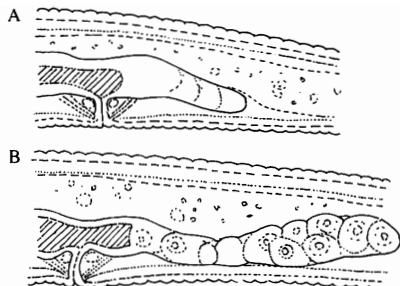


図-5 ネグサレセンチュウの雌の後部子宮枝(原図)

A: 未分化の後部子宮枝, B: 卵巣の組織が痕跡的に残った後部子宮枝.

にもなることがあるが、精子の量が少ないと卵形(長短径比1.3程度)であることもまれではない。

3 後部子宮枝(図-5)

後部子宮嚢ともいい、本来後方にあった卵巣の名残である。多くの場合退化した袋である(A)が、痕跡的な卵母細胞などを持っている種もある(B)。痕跡卵巣はミナミネグサレセンチュウ、モロコシネグサレ等4種で見られるが、これらの種内でも目立たないときがある。後部子宮枝を陰門部の体幅で割った値(U値と呼ぶ)は、識別形質として重要である。

4 尾部の側面の輪郭(図-6)

尾部形状の形容のために FREDERICK and TARJAN (1989) が提唱した呼称(図-6)がよく使われる。しかし、これは元来イシクセンチュウの尾部を形容するために考案

された用語法をネグサレセンチュウに無理に当てはめたのである。イシクセンチュウの尾部は中心線に対しシンメトリカル(背腹対称)であるが、ネグサレセンチュウの尾部は一般に背腹対称ではない。正確な形容に不向きだが、なお適用できるケースはある。

5 尾部の体環(図-7)

尾端の体環の有無は独立種を設けるとき、大きく考慮される。例えば、尾端の体環の有無についてキタネグサレとネグサレセンチュウの属の基準種である *P. pratensis* および *P. fallax* (キクネグサレセンチュウ) との相違が問題視され、論議されたことがある。筆者の見聞の範囲では、尾端に体環のような切れ込みをもつ個体が現れない種は皆無と言ってよい。例えば、図-7のA、

B, Cはすべてキタネグサレの尾端である。キタネグサレの12の地域個体群間で体環の出現頻度には5~45%の開きがあった(MIZUKUBO, 1996)。種内変異で出現するこのような体環は幅が不規則であるが、出現頻度が100%の場合は体環幅は安定している(ノコギリネグサレセンチュウ)(図-7 D)。前者を偽体環、後者を真正体環と区別して扱えば、混乱は收拾される。

6 ネグサレセンチュウの尾部輪郭パターン(図-8)

国内のネグサレセンチュウの尾部輪郭のパターンは図

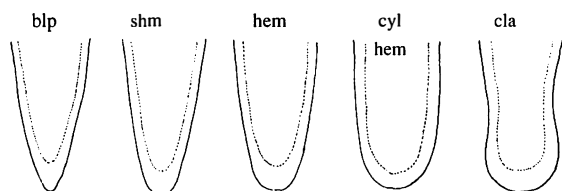


図-6 線虫尾部の形状の呼称(原図)

blp: 鈍く尖る (bluntly pointed), shm: 亜半球形 (subhemispherical), hem: 半球形 (hemispherical), cly: 筒状 (cylindrical), cla: 棍棒状 (clabate).

-8におおむね網羅される。ネグサレセンチュウでは中心線より腹側に先端が偏った形が基本型である(図-8 A)。尾端に体環がないとき、クチクラの平滑な部位は腹側で狭く、背側で広い。これの変化の延長に先端が切れた形(truncate: F)や中央が窪んだ尾端(G)がある。クルミネグサレセンチュウ(C)やチャネグサレセンチュウ(D)の尾は側面から見たとき尖っていない。しかし、腹側から見ると尖っている。すなわち、これらの尾端は魚の尾びれのようなへら状であって、標本の尾部が傾いてわずかに腹か背を向けるだけで先端が尖って観察されるのである。他の種では尾端は左右にひし

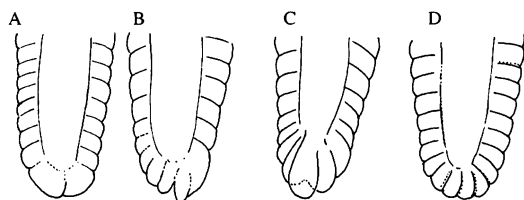


図-7 尾部体環の種類(原図)

A-C: 偽体環, D: 真正体環。

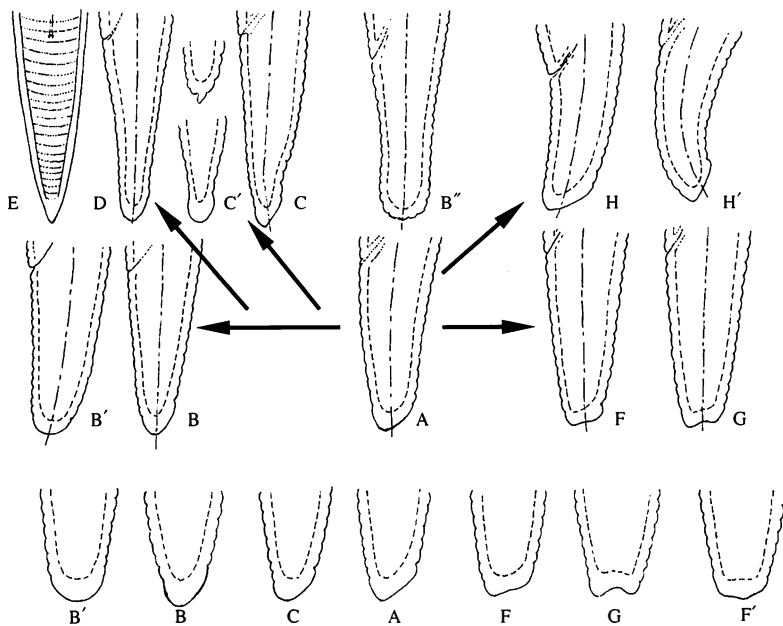


図-8 ネグサレセンチュウの雌尾部の形態パターンと遷移の方向(原図)

A: 突出部が中心線より前(腹方)にあるパターン(ほとんどすべての種に見られる基本パターン), B: 突出部が中心線上に戻ったパターン, C・D: 先端が先細になり、背部でやや膨らむパターン, E: C, Dの腹方図, F: 背方のクチクラが肥厚して垂下するパターン, G: 背方のクチクラがさらに肥厚し、中心線の下のカクチクラがくぼんで見えるパターン, H: 中心線より腹側が突出する基本パターンを維持しながら、無体環クチクラが背方に広がって、ナイフ型に見えるパターン, B'': 中心線に対称的なパターン。

表-2 ネグサレセンチュウ主要5種のrDNAのITS領域制限酵素断片長

制限酵素	略称	学名	制限酵素消化産物のサイズ							合計
Hinf I	キタ	<i>P. penetrans</i>	380	140	95	85	70			770
	ミナミ	<i>P. coffeae</i> ^{a)}	670	240	160					1,070
		<i>P. coffeae</i> ^{b)}	670	240	160					1,070
		<i>P. coffeae</i> ^{c)}	670	400	77					1,147
	チャ クルミ ムギ	<i>P. loosi</i>	470	230	182	180				1,062
		<i>P. vulnus</i>	455	424	308	261	183	155	110	1,632
		<i>P. neglectus</i>	605	135	91	81	64			976
Alu I	キタ	<i>P. penetrans</i>	380	320	45					745
	ミナミ	<i>P. coffeae</i> ^{a)}	470	220	180	97	95			1,062
		<i>P. coffeae</i> ^{b)}	470	205	205	102	100			1,082
		<i>P. coffeae</i> ^{c)}	470	205	205	92	90			1,062
	チャ クルミ ムギ	<i>P. loosi</i>	330	230	210	190	110			1,070
		<i>P. vulnus</i>	380	280	100	75				829
		<i>P. neglectus</i>	635	50	50					735

^{a)} サツマイモ病原型, ^{b)} 南西型(関東以西), ^{c)} 東北型(関東以北), キタネグサレセンチュウのデータはORUI (1996) から引用。他は原データ。

やげていないので全体に筒状となり尖って見えることが少ない。

7 分子生物学的方法

これまでの生物の分類単位 (taxa) は形態に基づいて認識されてきた経緯があって、タンパク質やDNAの組成を形質として扱う分子生物学的な同定法はこの形態種をなぞる分子的な形質(特徴)を探してきた。この必然として、分子生物学的な同定法は形態分類学の枠組みにとどまっている。分子的な同定はルーチン化された手続きを踏み、簡便である。しかし、Taqをはじめ制限酵素が高額で経済的ではない。RAPD-PCR、リバースドット法等種々の同定法が試みられたが、リボゾームDNAのITS領域を用いたPCR-RFLPは最も簡便で確実な同定結果を与える(ORUI, 1996; ORUI and MIZUKUBO, 1999)。国内主要5種のF194、F195プライマー(FERRIS et al., 1993)による泳動産物のHinfIとAluIによる消化物のサイズを表-2に示す。ミナミネグサレセンチュウには3系統がある。これらは形態では区別できないが、寄主植物の利用能力やたぶん低温耐性が異なる。また、系統間交雑をするとF₁の妊性が不十分である。

なお、1991年までのネグサレセンチュウの記載と検索表が下記のサイトで利用できる：

<http://nematode.unl.edu/pratyspp.htm>

IV ネモグリセンチュウ *Hirschmanniella* 属の同定

世界のヒルシュマニエラ属ネモグリセンチュウは33

表-3 ネモグリセンチュウの主要な形態的特徴および計測値の比較表

学名	<i>H. diversa</i>	<i>H. imamuri</i>	<i>H. oryzae</i>
和名	レンコンネモグリセンチュウ	イマムラネモグリセンチュウ	イネネモグリセンチュウ
唇部形状	半球状	半球状	平たん
唇部体環数	5~6	6	3~4
尾端の体環	なし	なし	あり
尾部形状	復側に先細の突起	復側に先細の突起	基部がくびれた針状の突起
口針長(μm)	22~24	29~32	16~19
V(%)	49~55	48~54	50~55
体長(mm)	2.0~2.5	2.15~3.60	1.14~1.63
交接刺(μm)	33~36	37~44	18~26

種に整理されている(SIDDIQI, 2000)が、国内からはこれまで2種：イネネモグリセンチュウとイマムラネモグリセンチュウだけが知られていた。これらは水稻を主に加害する(川島, 1992)。一方、1990年代はじめごろから、千葉県、茨城県等で肥大したレンコンの表皮に凹凸を伴う黒変の症状が見られるようになった。このレンコンの根からヒルシュマニエラ属の線虫が検出され、接種試験によって、この線虫がレンコンの黒変症の原因線虫であることが明らかにされた(三平, 1996)。千葉県の加害種はイマムラネモグリセンチュウと同定されたが、徳島県と同様の被害レンコンから検出された線虫の形態はイマムラネモグリセンチュウとは異なった(藍沢ら, 2002)。また、千葉県のレンコン加害個体群を調べたと

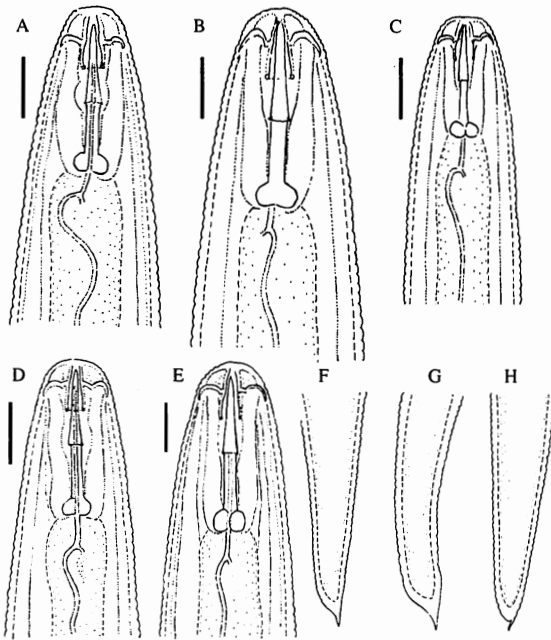


図-9 日本産ヒルシュマニエラ属3種の形態(原図)

A, D, F: *Hirschmanniella diversa* レンコンネモグリセンチュウ(新称), B, E, G: *Hirschmanniella imamuri* イマムラネモグリセンチュウ, C, H: *Hirschmanniella oryzae* イネネモグリセンチュウ, A-C: 雌の頭部; D-E: 雄の頭部, F-H: 雌の尾部; A-Eの棒線は10 μ m.

ころ、形態の特徴は上記の徳島の個体群と一致した(未発表)。ここでは、レンコンを加害する第3の種を *Hirschmanniella diversa* SHER, 1968 と同定し、和名としてレンコンネモグリセンチュウを与える。本種はハワイを模式産地とし、ハスから検出されたが、今日まで追加記録がなかった。国内から知られる3種の形態図を図-9に、計測値および形態の特徴のまとめを表-3に掲載した。3種は口針長の明らかなギャップで区別できる。口針はレンコンネモグリセンチュウで約23 μ m, イマムラネモグリで30 μ m, イネネモグリでは17 μ mである。レンコンネモグリの同定の根拠については別途再記載を行って明らかにしたい。

参考文献

- 1) 藍沢 亨ら (2002): 第46回応動昆虫大会講要: p. 32.
- 2) FERRIS, V. R. et al. (1993): Fundam. Appl. Nematol., 16: 177~184.
- 3) FREDERIC, J. J. and A. C. TARJAN (1989): Revue Nematol. 12: 243~256.
- 4) 川島嘉内 (1992): 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会: 159~163.
- 5) 三平東作 (1996): 関東病虫研報 43: 261~263.
- 6) 水久保隆之 (1992): 線虫研究の歩み, 日本線虫研究会: 40~47.
- 7) MIZUKUBO, T. (1996): Systematics and Ecology of the Root Lesion Nematodes of the Genus Pratylenchus in Japan. Thesis, Kyushu Univ. 414 pp.
- 8) ORUI, Y. (1996): Appl. Entomol. Zool. 31: 505~514.
- 9) ORUI, Y. and T. MIZUKUBO (1999): Appl. Entomol. Zool. 34: 205~211.
- 10) Sher, S. A. (1968): Nematologica 14: 243~275.
- 11) SIDDIQI, M. R. (2000): Tylenchida parasites of plant and insects, 2nd edition. CABI Publishing, 833 pp.

(30ページから続き)

オキサジクロメホン0.8%

クロメプロップ3.5%

ベンスルフロメチル0.51%

移植水稻: 水田一年生雑草・マツバイ・ホタルイ・ウリカワ・ミズガヤツリ・ヘラオモダカ(九州)・ヒルムシロ(北陸を除く)・セリ・アオミドロ(北陸を除く)・藻類による表層はく離(北陸を除く): 移植後5~15日(ノビエ2.5葉期まで): (北陸, 近畿・中国・四国の普通期及び早期栽培地帯: 壤土~埴土), (関東・東山・東海の普通期及び早期栽培地帯, 九州の普通期及び早期栽培地帯: 砂壤土~埴土): 1回: 湛水散布

カフェンストロール・シクロスルフアムロン・ダイムロン粒剤

ネビロスーラジカルジャンボ (20937: ビーエーエスエフアグロ) 2002/10/16

カフェンストロール15%

シクロスルフアムロン3%

ダイムロン30%

移植水稻: 水田一年生雑草・マツバイ・ホタルイ・ウリカワ・ミズガヤツリ(北海道を除く)・ヘラオモダカ(北海

道, 九州)・ヒルムシロ(北海道, 東北, 関東・東山・東海)・セリ(北海道)・アオミドロ(北海道, 東北, 関東・東山・東海): 藻類による表層はく離(北海道, 東北, 関東・東山・東海): (北海道, 東北: 移植後3~15日(ノビエ2葉期まで)), (北陸, 関東・東山・東海, 近畿・中国・四国の普通期栽培地帯: 移植後3~12日(ノビエ2葉期まで): 壤土~埴土), (九州の普通期栽培地帯: 移植後3~12日(ノビエ2葉期まで): 砂壤土~埴土): 1回: 水田に小包装(パック)のまま投げ入れる。

カフェンストロール・シハロホップブチル・ピラゾスルフロンエチル粒剤

テクノスターワイドジャンボ (20941: 日産化学, 20942: エスディーエス, 20943: 明治製菓) 2002/10/31

カフェンストロール5.25%

シハロホップブチル3.8%

ピラゾスルフロンエチル0.525%

移植水稻: 水田一年生雑草・マツバイ・ホタルイ・ヘラオモダカ(北海道, 東北)・ウリカワ・ミズガヤツリ(北海道を除く)・ヒルムシロ(北陸を除く)・セリ・アオミドロ(北海道, 関東・東山・東海): 藻類による表層はく離(北(41ページへ続く))