

ジャガイモに寄生するシストセンチュウ

—ジャガイモシロシストセンチュウとジャガイモシストセンチュウ—

北海道農業研究センター ^{うえ}植 ^{はら}原 ^{たけ}健 ^と人

はじめに

ジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochensis*) は、ジャガイモに減収を引き起こす重要線虫である。1972年に北海道後志管内真狩村で発生が確認されて以来 (YAMADA et al., 1973), 年々発生地を広げている。現在では北海道内での発生地が 13,000 ha を超え、1992年には長崎県で 2004 年には青森県でも発生が確認されている。ジャガイモに甚大な被害を及ぼすシストセンチュウは他に ジャガイモシロシストセンチュウ (*G. pallida*) という別種の線虫がいる。 *G. pallida* はヨーロッパ、ロシア、ペルー、ボリビア、パナマ、インド、ニュージーランド等に分布しているが、国内では確認されていない。両種は、同じ南米原産で、ナス科植物を寄主としており、作物ではジャガイモ、トマト、ナスに寄生する。本稿では、ジャガイモシストセンチュウと同様に輸入禁止対象害虫として指定され、警戒されているジャガイモシロシストセンチュウについて、寄生性や形態におけるジャガイモシストセンチュウとの違いと、遺伝子診断による両種の識別法について説明する。

I 寄生型：パソタイプ

ジャガイモシストセンチュウ (以下: *G. rostochensis*; 図-1A, C) とジャガイモシロシストセンチュウは (以下: *G. pallida*; 図-1B, D) は、元々は一つの種であったものが、二つに分けられた類縁種である (STONE et al., 1973)。

別種に分けられた経緯は、これらの線虫に対する抵抗性品種育成が大きく影響している。第2次世界大戦後ジャガイモに大きな被害を及ぼすシストセンチュウが問題であった英国では、抵抗性品種育成が大きな目標であった。1952年にジャガイモの野生種である *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* が抵抗性をもつことが報告されて (ELLENBY, 1952), その抵抗性遺伝子である H₁ を取り入れたジャガイモ品種が普及しだした。しかし間もなく、この抵抗性品種で増殖する個体群が発見され、その

後この個体群は別のジャガイモ野生種 *S. multidissectum* では増殖できないことが報告された (DUNNETT, 1961)。異なる寄生性を示すこれらの線虫個体群を区別するために、パソタイプが提唱され、*Solanum tuberosum* ssp. *andigena* で増殖しない方をパソタイプ A, もう一方をパソタイプ B と呼んだ。さらに、そのどちらの野生種でも増殖する個体群が見つかりこれをパソタイプ E とした。これは、オランダで寄生性の異なるパソタイプ A, B, C, D という四つのパソタイプが報告されており、オランダの C と区別するためパソタイプ E としたものである。そして、英国のパソタイプ B と E が、パソタイプ A とは種が異なるとして新種となった。パソタイプ A が、現在の *G. rostochensis* でパソタイプ B と E が現在の *G. pallida* である。当時パソタイプの数は各国で異なっていたが、統一化が進められ、表-1 に示す国際方式が提唱され (KORT et al., 1977), 8 種の判別寄主に対する寄生性の違いから *G. rostochensis* が Ro1 ~ Ro5 の五つ、*G. pallida* が Pa1 ~ Pa3 の三つ、合計八つのパソタイプとなっている (表-1)。

日本国内では、現在のところほぼ単一の系統が侵入して広がったと考えられており、最も寄生性の弱い *G. rostochensis* パソタイプ Ro1 のみの発生が確認されている。

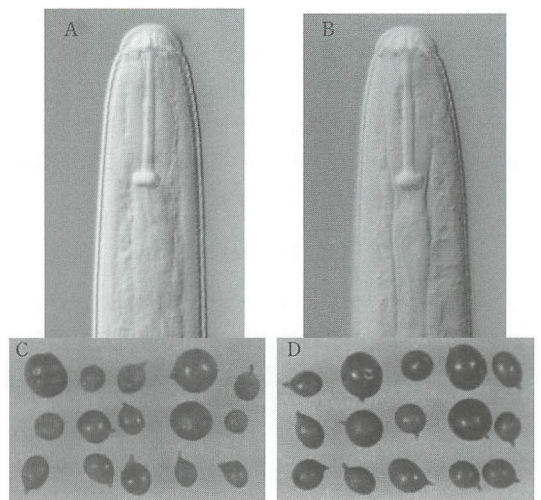


図-1 2期幼虫の頭部とシスト

A, C: *G. rostochensis*, B, D: *G. pallida*.

Cyst-nematode Parasites of Potatoes. By Taketo UEHARA

(キーワード: ジャガイモシロシストセンチュウ, ジャガイモシストセンチュウ, パソタイプ, PCR-RFLP 法)

表-1 パソタイプと判別品種

| 判別品種 | パソタイプ | | | | | | | |
|---|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-----|-----|
| | <i>G. rostochiensis</i> | | | | | <i>G. pallida</i> | | |
| | Ro1 | Ro2 | Ro3 | Ro4 | Ro5 | Pa1 | Pa2 | Pa3 |
| <i>Solanum tuberosum</i> spp <i>tuberosum</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>S. tuberosum</i> spp <i>andigena</i> (H ₁) | - | + | + | - | + | + | + | + |
| <i>S. kurtzianum</i> KTT 60.21.19 | - | - | + | + | + | + | + | + |
| <i>S. vernei</i> G-LKS 58.1642/4 | - | - | - | + | + | + | + | + |
| <i>S. vernei</i> (VT ¹) ² 62.33.3 | - | - | - | - | ± | - | - | + |
| <i>S. vernei</i> 65.346/19 | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <i>S. multidissectum</i> P55/7 (H ₂) | + | + | + | + | + | - | + | + |
| <i>S. vernei</i> 69.1377/94 | - | - | - | - | - | - | - | - |

Ro1は *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* 由来の単一優性の抵抗性遺伝子 H₁ 遺伝子をもつジャガイモ品種には寄生できない。それに加え線虫側の Ro2, 3, 5 のような H₁ 遺伝子をもつ抵抗性品種に対して寄生性を司る遺伝子は劣性であることが明らかにされたことから、国内の Ro1 が分化して Ro2, 3, 5 が出現・優先化する可能性は非常に低いと考えられている (串田・百田, 2005)。国内では‘キタアカリ’をはじめ H₁ 遺伝子をもつ優良品種が多数育成されており、H₁ 抵抗性品種の栽培は、土壌中の *G. rostochiensis* パソタイプ Ro1 の密度を高い割合で減少させ、H₁ 抵抗性品種の栽培は極めて有効な防除法となっている。しかし、他のパソタイプ用の抵抗性品種は国内では育成されていない。Ro1 と Ro4 以外の *G. rostochiensis* と *G. pallida* は H₁ 遺伝子をもつ抵抗性ジャガイモ品種にも寄生、増殖し被害を及ぼすことになる。特に *G. pallida* の Pa2 と Pa3 に対する *Solanum vernei* 由来の抵抗性因子はポリジーン (DALE and PHILLIPS, 1982) で、Pa2 と Pa3 に対する優良抵抗性品種の育成は難しいと聞く。現在の英国においても優良な抵抗性品種の少ない *G. pallida* の発生地域拡大は恒に注意が向けられている。

II 形 態

宿主作物の根に寄生している間 *G. rostochiensis* は、シスト化する過程において雌成虫の体表皮が濃黄色になる時期が長い場合ゴールデン・ネマトードと呼ばれる。一方、*G. pallida* は、和名ではジャガイモシロシストセンチュウ、英名では Pale cyst nematode と呼ばれるように白色の時期が長い。北海道の *G. rostochiensis* と英国の *G. pallida* を比較した試験において、接種 42 日目の新生雌成虫の体色は *G. rostochiensis* の 73% が黄色であり、*G. pallida* の 96% は白色であると報告されている (稲垣,

1980)。完全に成熟すると、両種ともシストは茶褐色または褐色のシストとなり、色で識別することは難しい。形態的には、かつては同じ種であったようによく似ている。シストセンチュウの大きな特徴はシストのステージであり、シストの頭部の反対側の体後部 (末端域) に陰門と肛門があり、それらの計測値で両者の識別ができる。*Globodera* 属では、末端域に一つの円形の窓が認められ、肛門はその近くに認められる (図-2)。窓縁から肛門までの距離と窓の長さの比 Granek' s ratio が同定に極めて重要な値である。以下に主要な計測値をあげる。なお括弧内は目安となる平均的な値である。*G. rostochiensis* は円窓型の窓縁から肛門までの距離が 33 ~ 77 (> 55) μm で窓長が 8 ~ 20 (< 19) μm で Granek' s ratio は 1.3 ~ 9.5 (> 3) 倍となる。一方、*G. pallida* は距離が 22 ~ 67 (< 50) μm で窓長が 18 ~ 21 (> 19) μm で Granek' s ratio は 1.2 ~ 3.5 (< 3) 倍となる。また、2 期幼虫の頭部の口針長と口針節球の形状が識別の重要な指標である。口針長は *G. rostochiensis* が 21 ~ 23 (22) μm で *G. pallida* は 21 ~ 26 (> 23) μm であり、*G. pallida* のほうがやや長く。口針節球は *G. rostochiensis* では前縁が後ろに傾斜してまわく、一方、*G. pallida* は前縁が鋸型である (FLEMING and POWERS, 1992; 図-3)。

これらの形態的指標が 2 種を識別する際非常に重要であるが、計測値には 2 種間でオーバーラップが認められ、複数個体を丹念に計測する必要がある。国内には同じ *Globodera* 属の線虫としてヨモギに寄生するヨモギシストセンチュウ (*G. hypolysi*)、タバコ・トマトおよびナスに寄生するタバコシストセンチュウ (*G. tubacum*) の発生も報告されている。これら 2 種の形態計測値についても *G. rostochiensis* と *G. pallida* の形態計測値とオーバーラップしており、種同定を複雑化させると考えられる。*G. rostochiensis* と *G. pallida* は世界的に最重要線虫

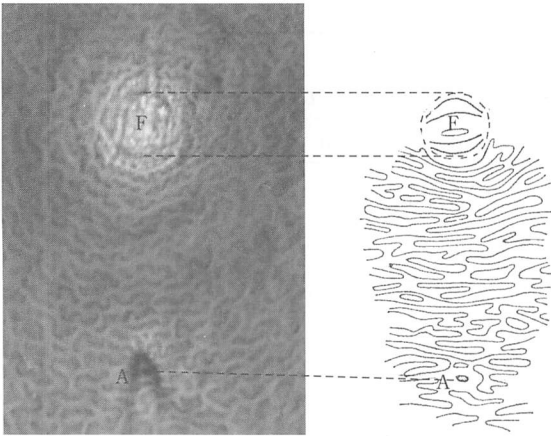


図-2 ジャガイモシストセンチュウのシスト末端部の写真と略図

A: 肛門, F: 嚢. 略図はSTONE, 1973より改写.

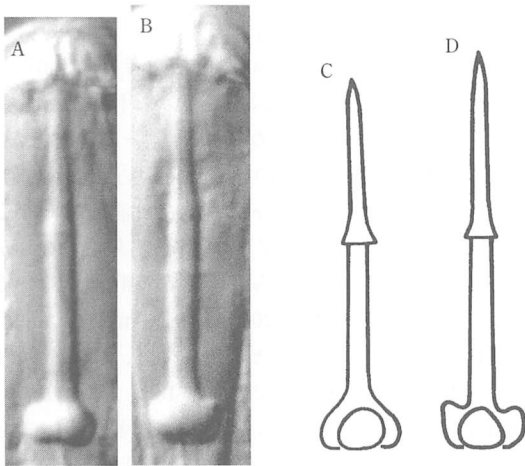


図-3 口針の形態

A, C: *G. rosthochiensis*, B, D: *G. pallida*, C, D: STONE, 1973より改写.

であるため慎重な計測が必要とされる。英国・スコットランドの検査研究機関では *G. pallida* と疑わしいサンプルは3人が計測して同定に慎重を期している。

III 遺伝子診断

線虫の分類・同定の基本は形態観察におかれているが、線虫は微小・軟弱で、標本作製・形態計測等にかんがりの経験が求められる。そこで、形態的同定を補完する技術として、遺伝子診断法が極めて有効である。線虫の識別によく使用される遺伝子診断法としてPCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment

Length Polymorphism) 法という方法があり、*G. rosthochiensis* と *G. pallida* もこの方法で識別ができる (SUBBOTIN et al., 1999; 植原ら, 2006)。本方法は、リボソームDNA (rDNA)-ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域の塩基配列の違いから選択した制限酵素を用い、PCRで増幅したrDNA-ITS領域を、制限酵素で処理し、電気泳動のバンドパターンとして検出し、その違いを識別の指標とする方法である。以下に詳細に説明する。

1 方法

PCR-RFLP法は遺伝子診断法としては比較的簡便な方法である。その具体的な方法は、まず実態顕微鏡下でシストをピンセットで割り2期幼虫を取り出す。抽出用緩衝液 (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20, 0.01% ゼラチン, 60 μg/ml プロテイナーゼ K) 15 μl をスライドグラス上に滴下し、その中に2期幼虫1頭を入れ、針先で切断し、マイクロピペットを用いてマイクロテストチューブに移し、冷凍庫で凍結した後、65°Cで1時間、95°Cで10分間熱処理したものを鋳型DNAとする。特に遠心操作や不純物を除く操作は必要ない。次にPCR増幅には、rDNAの18S遺伝子と28S遺伝子とに挟まれた5.8S遺伝子および二つのITS領域を増幅するプライマーを用いる (FERRIS et al., 1993)。センスおよびアンチセンスプライマーの配列はそれぞれ5'-CGTAACAAGGTAGCTGTAGC-3', 5'-TCCTCCGCTAAATGATATG-3'である。PCRはチューブ当たり25 μlの容量で行い、反応液の組成は200 μMのdNTP, 0.2 μMの各プライマー濃度とし、1.0 unitのTaq DNAポリメラーゼおよびTaq DNAポリメラーゼに添付の10倍濃度緩衝液を2.5 μl加え、1反応当たり4 μl程度の鋳型DNA溶液を加えて計25 μlとする。反応は、94°Cで3分間の後、94°Cで30秒、50°Cで30秒、72°Cで1分のサイクルを40回繰り返した後、72°Cに5分間とした。制限酵素はAluIおよびHinfIを使用する。制限酵素処理は、PCR産物5.0 μlと制限酵素0.5 μl (5 unit程度) および制限酵素に添付の緩衝液を適量加えた計10.0 μlの溶液で行った。反応条件は37°C, 16時間程度とした。制限酵素処理したPCR産物の電気泳動には、2.0%のアガロースゲル (Sigma Type II-A) を用い、電極用緩衝液にはTAE緩衝液を用いた。ミニサブマリン電気泳動装置を使用し、室温条件下において100 V定電圧で約30分の泳動を行った。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド溶液 (0.5 μg/ml) で染色し、UV照射下で検出されたバンドパターンを写真撮影した (図-4)。

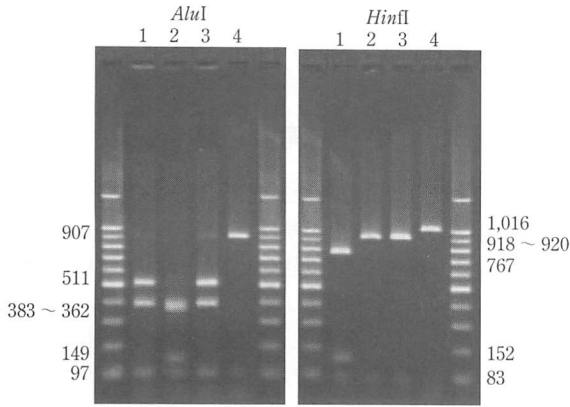


図-4 PCR-RFLPによる泳動像
1: *G. pallida*, 2: *G. rostochiensis*, 3: *G. tubacum*,
4: *G. hypolysi*.

2 遺伝子診断結果

制限酵素処理する前の PCR 増幅産物は、*G. rostochiensis* および *G. pallida* も約 1,000 bp である (表-2)。それを制限酵素 *AluI* で処理すると図-4 の 1 レーンと 2 レーンの違いのように *G. pallida* と *G. rostochiensis* が識別可能である。この場合、*G. pallida* と *G. tubacum* が識別できないので、別の制限酵素 *HinII* を使用するとそれらは識別可能であり、二つの制限酵素 *AluI* と *HinII* を用いた二つの電気泳動像から *G. pallida*・*G. rostochiensis*・*G. tubacum*・*G. hypolysi* 4 種が識別可能となる。*G. pallida* と *G. rostochiensis* については他の制限酵素 *AfaI* や *TaqI* の使用も有効であると報告されている (HAFEZ et al., 2007)。

PCR-RFLP 法を用いた種の識別は、電気泳動像から正確な DNA 断片サイズを把握する必要があるため表-2 に 4 種から得られる断片サイズをまとめた。さらに、rDNA-ITS 領域の塩基配列を決定し比較することにより正確に同定が可能となる (PYLYPENKO et al., 2005)。最近、アメリカ合衆国でも *G. pallida* の発生が確認された。アメリカ合衆国の場合においても形態計測に加え、rDNA-ITS 領域を使った PCR-RFLP 法と塩基配列の決定を行い、初発生の報告としている (HAFEZ et al., 2007)。*Globodera* 属線虫の同定には遺伝子診断が極めて有効といえそうである。

表-2 PCR-RFLP 法で確認される DNA 断片サイズ (bp)

| 線虫種 | 酵素処理前の DNA 断片 | 制限酵素 | |
|-------------------------|---------------|-----------------------|--------------|
| | | <i>AluI</i> | <i>HinII</i> |
| <i>G. pallida</i> | 1,002 | 511, 382, 97, 12 | 767, 152, 83 |
| <i>G. rostochiensis</i> | 1,001 | 381, 362, 149, 97, 12 | 918, 83 |
| <i>G. tubacum</i> | 1,003 | 511, 383, 97, 12 | 920, 83 |
| <i>G. hypolysi</i> | 1,016 | 907, 97, 12 | 1,016 |

おわりに

ジャガイモに大きな被害を及ぼす *G. pallida* と *G. rostochiensis* について、寄生型 (パソタイプ)・形態・遺伝子診断法について説明した。なお、パソタイプは判別品種を用いた寄生性で調査するしかなく、形態はもちろん遺伝子診断法では識別できない。これら両種はともにジャガイモに甚大な被害を及ぼし、増殖率も高く、防除することが困難な難防除害虫である。現在までのところ、国内に発生しているのは最も寄生性の弱いと考えられる *G. rostochiensis* のパソタイプ Ro1 であり、国内で育成されているジャガイモシストセンチュウ抵抗性品種は H1 遺伝子をもち Ro1 に極めて強い抵抗性を有している。その防除対策には抵抗性品種栽培が極めて有効である。併せて、今後とも、適切な輪作体系の確保と健全種イモの使用が線虫対策には欠かせない。

引用文献

- DALE, M. F. B. and M. S. PHILLIPS (1982): J. Agri.Sci. 99: 325 ~ 328.
- DUNNETT, J. M. (1961): Res. Scott. Pl. Breedn. Stn. 1961: 39 ~ 46.
- ELLENBY, C. (1952): Nature 170: 1016.
- FERRIS, V. R. et al. (1993): Fundam. Appl. Nematol. 1: 177 ~ 184.
- FLEMING, C. C. and T. O. POWERS (1998): Potato cyst nematodes biology, distribution and control CAB International, Wallingford, p. 91 ~ 114.
- HAFEZ, S. L. et al. (2007): Plant Disease 91: 325.
- 稲垣春郎 (1980): 研究成果 (農林水産技術会議事務局) 127: 28 ~ 29.
- KORT, J. H. et al. (1977): Nematologica 23: 333 ~ 339.
- 串田篤彦・百田洋二 (2006): 日線誌 35: 87 ~ 90.
- PYLYPENKO, L. A. et al. (2005): Euro. J. Plant Pathol. 111: 39 ~ 46.
- STONE, A. R. (1973): Nematologica 18: 591 ~ 606.
- SUBBOTIN, S. A. et al. (1999): Russ. J. Nematol. 7: 57 ~ 63.
- 植原健人ら (2006): 日線誌 36: 33 ~ 37.
- YAMADA, E. et al. (1973): Jpn. J. Nematol. 2: 12 ~ 15.