

# 九州沖縄地域における有害線虫の分類と地理的分布

九州沖縄農業研究センター 岩 堀 英 晶

## はじめに

九州沖縄地域は温帯から亜熱帯までの広い地域を含み、暖地を好む線虫の増殖に好適な温暖地域である。また、高冷地などの一部地域では、関東以北と共通する北方系の線虫種が分布している。したがって、九州沖縄地域は他地域と比べて問題となる線虫の種類も多い。

九州沖縄地域における主な有害線虫は、第一にネコブセンチュウ類 (*Meloidogyne* spp.) であり、ネグサレセンチュウ類 (*Pratylenchus* spp.) がそれに次ぎ、共に広く分布している。シストセンチュウ類 (*Heterodera* spp., *Grobodera* spp.) は、一部地域に限って、あるいは断続的に分布するものが多い。

これら有害線虫の地理的分布は古くから調査が行われてきたが、ここ 10 年間の精力的な調査によって従来の有害線虫の地理的分布に次々と新たな知見が付け加えられてきた (岩堀ら, 2000; 2001; 岩堀・佐野, 2003; 岩堀ら, 2008; UESUGI et al., 2009)。これらの成果は、有害線虫 1 頭を用いた DNA 解析による分類同定法が可能になったことに負うところが大きい。また、同じ種の中でも寄生性の異なる個体群やレースの存在が一部の有害線虫で明らかになってきた (MIZUKUBO et al., 2003; SANO and IWAHORI, 2005) ため、より細やかな調査が必要とされている。

本稿では、九州沖縄地域の主要な有害線虫と、これらの地理的分布、および PCR-RFLP 法による同定法について紹介する。

## I 九州沖縄地域における主要有害線虫と、その地理的分布

### 1 ネコブセンチュウ類 (*Meloidogyne* spp.)

ネコブセンチュウ類は寄主範囲が広いものが多く、最も広域に分布し世界的にも最重要種であるサツマイモネコブセンチュウ (*M. incognita*) は、メロン、スイカ、キュウリ、ニガウリ等のウリ科作物や、ナス、トマト、ピーマン、タバコ等のナス科作物に好んで寄生する。多

数の線虫の寄生を受けることによって作物は大きな減収を招き、初期密度が高い場合には萎凋枯死に至ることも多い。施設栽培は線虫の好む高温が維持されるため、その被害はより激しいものとなる。サツマイモ、ゴボウ、ニンジン、ダイコン等の根菜類は枯死することはほとんどないものの、線虫の寄生によって根系の形状が大きく奇形化するため、特に外見を重視する日本では商品価値を失うことによる経済的損失が大きい。これらの直接的な加害に加え、土壌伝染性の病気を助長することから、線虫対策として土壌燻蒸剤を中心とした殺線虫剤の使用が欠かせないのが現状である。

#### (1) サツマイモネコブセンチュウ (*M. incognita*)

本種は東北地方から南西諸島まで広く分布し、本地域でも最も普遍的に検出される最重要線虫種である。近年では北海道においてもハウス内で越冬することが確認されている。寄主範囲も広く、イチゴやラッカセイを除けば、被害程度の差はあるものの、主要な作物のほぼすべてに寄生すると考えてよい。九州沖縄地域の主要作物であるサツマイモは本種の好適な寄主であり、減収とともに、加害を受けた塊茎にくびれ、亀裂、発育不良が生じることから大きく商品価値が低下するため被害が大きい。

サツマイモには古くから抵抗性品種が知られていたが、抵抗性品種を犯す線虫個体群の存在もまた知られていた。このことから、佐野ら (2002) は、いくつかの線虫個体群と様々なサツマイモ品種の組み合わせで接種試験を行い、サツマイモネコブセンチュウにはサツマイモ品種に対して寄生性の異なる四つのレースが存在することを明らかにした。また、各レースと寄主反応が同じサツマイモ品種から 5 品種を用いることでレースを判別する手法を開発した。九州沖縄地域で収集した多数の個体群についてレースの調査を行ったところ、これまでに先述の 4 レースを含む 9 のレースが確認されている (SANO and IWAHORI, 2005; 表-1)。興味深いことには、これらレースの地理的分布には特徴があり、熊本県以北では最も寄生できる品種が少ない SP1、宮崎県、鹿児島県では SP2、沖縄県では寄生できる品種が多い SP4 および SP6 が優占レースとなっていた (表-2)。

このように、サツマイモネコブセンチュウには様々なサツマイモ品種に対して寄生性を異にするレースが存在する。圃場に生息するレースが判定できれば、それに対

表-1 サツマイモネコブセンチュウのサツマイモ5品種に対するレース反応

サツマイモ検定品種	レース									
	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP8	SP9	
農林1号	+	+	+	+	-	+	-	+	-	
農林2号	-	+	-	+	+	-	+	+	-	
種子鳥紫7	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
エレガントサマー	-	-	-	+	-	+	-	-	+	
ジェイレッド	-	-	-	-	-	-	-	+	-	

+: 感受性, -: 抵抗性. (SANO and IWAHORI, 2005 より)

表-2 九州沖縄地域におけるサツマイモネコブセンチュウのレース分布

調査県	調査個 体群数	レース出現率 (%)									
		SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP8	SP9	
佐賀	4	75.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
長崎	11	63.6	18.2	0.0	0.0	0.0	9.1	9.1	0.0	0.0	
熊本	30	83.3	10.0	3.3	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	
宮崎	28	25.0	67.9	0.0	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	
鹿児島	43	9.3	74.4	0.0	4.7	2.3	0.0	7.0	2.3	2.3	
沖縄	13	15.4	0.0	0.0	53.8	7.7	23.1	0.0	0.0	0.0	
計	129	37.2	43.4	0.8	7.0	1.6	5.4	3.1	0.8	0.8	

(SANO and IWAHORI, 2005 より)

抗する非寄主品種を選択でき、防除をする必要もなくなる。しかしながら、現在九州沖縄地域で主に作付けされている高系14号やコガネセンガンはすべてのレースに対して感受性であり、これら品種の圃場では線虫対策が不可欠である。本地域ではレースの地理的分布がほぼ明らかにされたが、他の地域ではほとんど解明されておらず、サツマイモの産地では今後明らかにしていく必要がある。

トマト栽培においては、抵抗性打破系統の発生が問題となっており、九州沖縄地域のみならず各地域で線虫抵抗性遺伝子(Mi gene)をもったトマト品種(台木を含む)で被害が多発している。抵抗性打破系統もまたレースの一種と考えられ、長期連作を行っているハウス栽培で発生が多い。

#### (2) アレナリアネコブセンチュウ (*M. arenaria*)

本種には後述するミトコンドリアDNAの解析により遺伝的に大きく異なる2系統が存在し、それぞれ本州型および沖縄型と呼ばれている。本州型は東北から九州にかけて、沖縄型は主に沖縄県に分布している。日本では分布範囲の狭い沖縄型が本種の原因種と考えられ、より世界的に分布している。従来、沖縄型は沖縄県で稀に見つかる程度であったが、最近の筆者らの調査によ

り、沖縄県ではむしろ最も広く分布する種であることが明らかとなった(岩堀ら, 2008)。

本州型および沖縄型は寄生性においても若干の違いが見られ、前者がサツマイモの高系14号に対して寄生性をもつのに対し、後者は全く寄生性をもたない(表-3)。また、本州型の中にも寄生性の違いが見られ、一部の個体群ではピーマンと高系14号に強い寄生性を示した(表-3)。九州ではダイズ圃場(特に畑ダイズ)において高い頻度で本種の本州型が検出される。

#### (3) ナンヨウネコブセンチュウ (*M. microcephala*)

本種はアレナリアネコブセンチュウ本州型と極めて近縁な種と考えられ、エステラーゼのアイソザイムパターンが異なること、尾部形態がわずかに異なること等で識別できる。また、後述のPCR-RFLP法によっても識別可能である。これまでの調査では、寄主範囲はアレナリアネコブセンチュウ本州型とほぼ同じである(表-3)。九州沖縄地域における分布は限られており、これまでに宮崎県と沖縄県でわずかに検出されているが、これは両者の識別が困難なことによるものと思われ、今後検出例が増えるものと予想される。

#### (4) ジャワネコブセンチュウ (*M. javanica*)

本種はこれまで形態的に近似するアレナリアネコブセ

表-3 ネコブセンチュウ類の各種作物に対する寄生性

線虫	トマト	タバコ	ピーマン	ラッカセイ	イチゴ	サツマイモ
	ブリッツ	NC95	カリフォルニアワンダー	フローランナーまたは千葉半立	さちのか	高系14号
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						
本州型	+	+	+(±)	-	-	+(±)
沖縄型	+	+	±(-)	-	-	-
ナンヨウネコブセンチュウ	+	+	±	-	-	±
ジャワネコブセンチュウ	+	+	- (±)	-	-	-
キタネコブセンチュウ	+	+	+	+	+	-

+: 感受性, ±: やや感受性, -: 抵抗性. ( ) は一部個体群で見られた反応. 品種が異なればそれぞれの線虫に対する反応が変わる可能性がある.

ンチュウ本州型と混同されてきたが、エステラーゼのアイソザイムパターンが異なり、また、PCR-RFLP法によって識別が可能になった。サツマイモネコブセンチュウとは寄主範囲が異なり、サツマイモ、ピーマンには寄生しない(表-3)。九州沖縄地域における分布は極めて限られており、これまでに鹿児島県最南部と沖縄県先島諸島で数回検出されているのみである。

#### (5) キタネコブセンチュウ (*M. hapla*)

本種は北方系の線虫とされ、その地理的分布は九州の比較的標高の高い地域に限られ、平地では発生が少ないと考えられてきた。しかし、近年の調査で九州の平地林野ではサツマイモネコブセンチュウよりも普通に見られることが明らかにされた。また、沖縄本島の一部においても本種が確認され、予想以上に南方まで分布しているものと考えられる。イチゴ、ラッカセイ、ジャガイモでの被害が見られるが、スイカ、アスパラガス、サツマイモ、イネ科には寄生しない。

#### (6) 亜熱帯性ネコブセンチュウの分布拡大

主に沖縄県に分布が限られている種を亜熱帯性線虫と呼んでおり、先述の中ではアレナリアネコブセンチュウ沖縄型、ナンヨウネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウの3種がこれに該当する。近年問題となっている気候の温暖化に伴って、これらの種の分布域が北上することが懸念される。実際、アレナリアネコブセンチュウ沖縄型は福岡県で、ナンヨウネコブセンチュウは宮崎県で、ジャワネコブセンチュウは鹿児島県で検出されており、それを裏付ける結果となっている。今後、これら3種のより詳細な地理的分布がなされれば、一層温暖化の影響が明白になってくるかも知れない。

一方で、これら3種の発育零点を調査した結果では、他の温帯域のネコブセンチュウとさほど変わるところは

なく、さらには熊本県合志市の露地圃場で越冬できることが確認された(岩堀、未発表)。したがって、これらの分布拡大には、温暖化よりもむしろ種苗や種芋の移動によるなどの人為的要因のほうが大きくかかわっていると考えられる。しかしながら、温暖化によって1世代経過に要する日数が短縮され、増殖が加速されることが予想されることから、たとえ人為的要因で分布が広がったにしても、新しい土地での定着がより容易になると予測される。

## 2 ネグサレセンチュウ類 (*Pratylenchus* spp.)

ネグサレセンチュウ類は、ネコブセンチュウ類に比してやや寄主が限られるものの、卵以外の全ての発育ステージで根への侵入が可能であり、根内を移動しながら細根やイモの腐れを引き起こす。線虫の侵入口からは二次的に腐敗菌が侵入し、イモ類や根菜類では腐れの拡大が作物の移送中にも進行するため被害はより大きいものとなる。

### (1) ミナミネグサレセンチュウ (*P. coffeae*)

本種は東北地方から南西諸島まで広く分布し、九州沖縄地域で最も普遍的に検出される種である。本地域ではダイズ、サツマイモ、サトイモ圃場でよく検出される。ただし、沖縄県での検出例は少ない。本種は後述するリボソームDNAのITS領域のRFLPパターンにより、A型、B型、およびC型に分けられ、これらの間には不完全な生殖隔離が生じている(MIZUKUBO et al., 2003)。これらのITS領域の塩基配列を海外のものと比較した結果、A型は世界に広く分布するものと同じであったが、B型とC型とは遺伝的に離れていることから日本固有の系統と考えられている。これらの系統には寄生性に差があり、A型はサツマイモに寄生するが、BおよびC型は寄生しない。近年、鹿児島県でカンキツ類に寄生性

をもつ A 型個体群が見いだされた。本地域はカンキツ類の生産が盛んなことから、今後の分布拡大に十分注意する必要がある。

これらの型は地理的分布にも特徴があり、A 型は三重県から沖縄県に至る最も暖かい地域で検出され、B 型は関東から九州にかけての暖地に分布している。C 型は中部や関東から東北地方の冷涼な地域に分布し、九州沖縄地域ではこれまで検出されていない。

#### (2) クルミネグサレセンチュウ (*P. penetrans*)

本種は北海道から九州に広く分布するが、ミナミネグサレセンチュウほどの普通種ではない。寄主範囲は広く、バラ科樹木、鑑賞木、林木苗等から検出されている。農作物では、九州北部各県の地床栽培イチゴ圃場で被害が報告されている。近年、福岡県の一部においてカンキツ類に寄生性をもつクルミネグサレセンチュウが見つかった。これまで日本ではカンキツ類に対する本種の寄生性は知られておらず、また世界的に見ても報告は少ない。成木での被害は少ないと思われるが、苗木生産では生育阻害の要因となると考えられる。先述のミナミネグサレセンチュウのカンキツ類寄生系統と併せ警戒が必要である。

#### (3) キタネグサレセンチュウ (*P. penetrans*)

本種は北方系の線虫とされるが、北海道から九州まで広く分布している。九州における地理的分布域は断続的で、比較的標高の高い地域に限られ、高原地域のゴボウやダイコンで検出されている。平地での分布はまれであるが、キク圃場では平地での検出も少なくない。近年の調査では沖縄本島の 1 キク圃場でも本種が検出された (UESUGI et al., 2009)。

#### (4) クマモトネグサレセンチュウ (*P. kumamotoensis*) およびニセミナミネグサレセンチュウ (*P. pseudocoffeae*)

クマモトネグサレセンチュウは、その存在は以前から知られていたが、2003 年宮崎県の露地キク圃場で、キタネグサレセンチュウと混生して寄生していたことから再発見され、新種記載が行われた (MIZUKUBO et al., 2007)。九州沖縄地域のキク圃場におけるネグサレセンチュウ類の調査を行った結果、古くからキクの重要な有害線虫として知られていたキタネグサレセンチュウの検出率が 22%であったのに対し、クマモトネグサレセンチュウが 29%と、後者のほうがより高い検出率であった (UESUGI et al., 2009)。また、かつて宮崎県の一部で確認されていたにすぎなかったニセミナミネグサレセンチュウも 9%の検出率を示し、本地域のキク圃場におけるネグサレセンチュウ類分布の新たな知見となった。現在のところ、

これら 2 種は本地域でのみ検出されているが、他地域での調査が行われていないことから、その地理的分布は拡大する可能性がある。

#### (5) その他の種類

九州沖縄地域の広い範囲でモロコシネグサレセンチュウ (*P. zaeae*) がイネ科牧草地、トウモロコシ、サトウキビ、シバ圃場等で検出されているが、その密度は低いことが多い。また、チャネグサレセンチュウ (*P. loosi*) が本地域の茶園では必ずと言ってよいほど検出され、密度もかなり高い。本種は様々な果樹木本類にも寄生するため、茶園跡地を果樹園にすることは避けるべきである。

### 3 シストセンチュウ類 (*Heterodera* spp., *Grobodera* spp.)

シストセンチュウ類は、成熟して蔵卵した雌がそのまま死んでシストとなり土壤中に散逸する。表皮がタンニン化することによって物理的に強靱となり、また乾燥にも強くなることで高い耐久性をもち、種によっては数年～数十年土壤中で生存することができるため、その防除は困難を極める。寄主範囲は非常に狭く、自らの名前に冠された作物およびその近縁種に限られることが多い。寄主植物の根から出されるふ化促進物質に感応してふ化し、それ以外の要因では容易にふ化は起こらない。また、比較的冷涼な気候を好むものが多い。

#### (1) ダイズシストセンチュウ (*H. glycines*)

本種はダイズ、アズキ、インゲン等のマメ科作物を好んで寄生する世界的にも重要な線虫であり、関東以北では普通に分布する。九州では各地で散発的に検出される。ダイズ連作圃場での検出が主であり、水田転換畑での発生は今のところほとんどない。

本種にはダイズに対して寄生性の異なるレースの存在が明らかとなっている。保持する抵抗性遺伝子が異なるダイズ 4 品種に対する寄生性の差から判別する国際基準レースとして理論上 16 のレースが考えられているが、これまでに 12 レースが知られている。日本では三つのレース (1, 3, 5) のみが知られている。近年、レース 3 と判別されながらも、抵抗性の下田不知系品種に対して寄生性をもつ個体群ともたない個体群が存在することが明らかとなり、国際基準レースでは対応できない事例が報告されている。

#### (2) ジャガイモシストセンチュウ (*G. rostochiensis*)

本種はジャガイモ、トマト、ナスに寄生し、植物防疫上世界的に移動が厳しく制限されている。国内においても同様で、本種が検出された圃場では種芋生産ができなくなる。1972 年に北海道で初検出され、92 年には長崎県でも検出された。近年では東北や中部地方の一部で

も発生が報告され、全国的に拡大する様相を見せている。九州沖縄地域では長崎県以外での発生を見ていないが、今後とも分布地拡大に対する警戒が必要である。本種にもいくつかのレースが知られているが、日本の個体群はすべて同一の Ro1 である。

#### 4 ニセフクロセンチュウ (*Rotylenchulus reniformis*)

本種は関東以西の暖地に分布し、九州沖縄地域南部の畑地ではごく普通に検出される。寄主範囲は極めて広い。サツマイモ圃場では時に高密度で検出されるが、作物への加害程度は低いと考えられ、海外ではいくつかの作物で被害報告があるものの、日本では本種による実質的な被害は少ないと思われる。

本種には有性生殖型と単為生殖型があることが古くから知られ、日本では単為生殖型が一般的である。しかしながら世界的には雄と雌が 1:1 で出現する有性生殖型が普通で、単為生殖型の報告は日本以外では極めて少ない。中園 (1983) はこれらに形態と寄生性の差違、および地理的分布に特徴がある (有性生殖型は長崎県南部にのみ分布する) ことを報告した。現在では後述するリボソーム DNA の ITS 領域の RFLP パターンにより明確に識別できることが明らかとなっている。

近年、九州沖縄地域における詳細な地理的分布が調べられ (岩堀ら, 2000; 2001; 岩堀・佐野, 2003), 長崎県南部と五島列島, および沖縄県では、日本ではまれな有性生殖型が逆に優占していることが明らかとなった。沖縄県における分布は自然分布と思われるが、長崎県の一部における特徴的な隔離分布は極めて興味深い。

## II DNA 解析による主要有害線虫の識別

線虫の形態による同定には専門知識が必要であり、かなりの習熟が必要である。修得には専門家の指導を受けることが望ましく、教科書を読んだだけでは同定することは困難である。一方、多くの生物同様、線虫学の分野においてもこの 20 年で DNA による生物の同定技術法の開発が飛躍的に進み、誰もが手軽に線虫の DNA の塩基配列まで解析できるようになった。極端なことを言えば、その線虫の形態や生理生態情報を知らなくても DNA の塩基配列情報さえわかれば種の同定が可能となった (ただし塩基配列情報と形態による同定情報が対応している場合に限る)。PCR-RFLP や DNA 塩基配列決定といった、今や基礎的技術となった DNA 解析法を用いて、既報あるいはインターネット上の情報と比較することにより、主要な有害線虫については現在たやすく同定できるような状況にある。本稿では、日本でよく検出

される有害線虫について、PCR-RFLP による識別法を述べる。なお、線虫からの DNA 抽出法や PCR の詳細な手順については既報 (大類ら, 2004; 酒井, 2008 等) を参照されたい。

### 1 ネコブセンチュウ類

PCR-RFLP 法や DNA 塩基配列決定によるネコブセンチュウ類の識別には、POWERS and HARRIS (1993) のプライマーを用いて PCR を行い、ミトコンドリア DNA の COII から 16SrDNA の領域を増幅させて解析に用いることが多い。この領域の塩基配列情報は、既報のみならず、インターネット上の塩基配列検索サイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>) でも数多くのネコブセンチュウ種の情報が登録されている。主要種について PCR-RFLP の結果を表-4 に示す。

まず、PCR 産物サイズでアレナリアネコブセンチュウ沖縄型 (1,100 bp) とキタネコブセンチュウ (540 bp) が識別できる。その他はすべて 1,700 bp であるので制限酵素による PCR 産物の切断を行う。サツマイモネコブセンチュウは *Hinf* I で切断され、ナンヨウネコブセンチュウは *Tsp*45 I で切断されることから識別できる。残るアレナリアネコブセンチュウ本州型とジャワネコブセンチュウは *Mse* I でそれぞれ 160 bp と 85 bp のバンドが現れることから識別でき、九州沖縄地域の主要なネコブセンチュウ類は三つの制限酵素を用いた PCR-RFLP 法によって同定可能である。*Mse* I はサツマイモネコブセンチュウも識別できるので *Hinf* I を省略することもできる。キタネコブセンチュウについては、PCR 産物が 550 bp 前後のサイズをもつ希少種がいくつかあり (ORUI, 1998), これらの可能性もあることを考慮しておく必要がある。

POWERS and HARRIS (1993) のプライマーはすべてのネコブセンチュウ種で PCR による増幅が見られるため、極めて有用である反面、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本州型、ジャワネコブセンチュウの識別を、*Mse* I 処理後に生ずる DNA 断片の小ささからアクリルアミドゲルを用いて行わなければならない、手軽なアガロースゲルで行うことができない。そこで、調査圃場に生息する線虫種がこれら 3 種である可能性が高い場合には、HARRIS et al. (1990) のプライマーを用いる。九州沖縄地域の平地圃場ではほとんどこれで事足りると考えてよい。アレナリアネコブセンチュウ本州型とナンヨウネコブセンチュウは、このプライマーを用いた PCR-RFLP 法では識別できないが、これらは寄主反応がほぼ同一と考えてよいため、実用上の問題は少ない。生ずる DNA 断片サイズが大きいいため、アガロース

表-4 ネコブセンチュウ類の POWERS and HARRIS (1993) プライマーを用いた PCR-RFLP による DNA 断片サイズ

線虫	PCR 産物サイズ (bp)	制限酵素		
		<i>Hinf</i> I	<i>Mse</i> I	<i>Tsp45</i> I
サツマイモネコブセンチュウ	1,700	1,300, 400	100	1,700
アレナリアネコブセンチュウ				
本州型	1,700	1,700	160	1,700
沖縄型	1,100	1,100	60	1,700
ナンヨウネコブセンチュウ	1,700	1,700	160	1,000, 700
ジャワネコブセンチュウ	1,700	1,700	85	1,700
キタネコブセンチュウ	540	540	110(130)	540

—: 切断部位なし, ( ): 種内変異. (ORUI, 1998 および岩堀, 未発表より)

ゲルでも容易に識別できる。これらの PCR-RFLP の結果を表-5 に示す。

## 2 ネグサレセンチュウ類

ネグサレセンチュウ類の PCR-RFLP 法による識別には、核リボソーム DNA の ITS 領域を増幅させる FERRIS et al. (1993) のプライマーを用いて解析することが多い。この領域は後述のシストセンチュウ類やニセフクロセンチュウ等、他の分類群の線虫に対しても有効であり、ネコブセンチュウ類同様にインターネット上にも数多く塩基配列情報が登録されている。主要種について PCR-RFLP の結果を表-6 に示す。制限酵素として *Alu* I と *Hinf* I を用いる。ミナミネグサレセンチュウに対しては種特異的検出プライマーが開発されている (UEHARA et al., 1998) ので、これを利用してよいが、A 型、B 型、C 型の識別はできない。これら以外の種については ORUI and MIZUKUBO (1999) を参照されたい。

## 3 シストセンチュウ類

ネグサレセンチュウ類同様、FERRIS et al. (1993) のプライマーを用いて解析することが多い。主要種について PCR-RFLP の結果を表-7 に示す。制限酵素は、ヘテロデラ属では *Alu* I と *Rsa* I, グロボデラ属では *Alu* I と *Hinf* I を用いる。九州沖縄地域での検出例はないが、ダイズシストセンチュウと同属であるクローバーシストセンチュウ (*H. trifolii*), イネシストセンチュウ (*H. elachista*), およびジャガイモシストセンチュウと同属であるヨモギシストセンチュウ (*G. hypolysi*), タバコシストセンチュウ (*G. tabacum*), ジャガイモシロシストセンチュウ (*G. pallida*) (国内未発生) についても比較のため併せて示した。

## 4 ニセフクロセンチュウ

ネグサレセンチュウ類同様、FERRIS et al. (1993) のプライマーを用いて解析する。単為生殖および有性生殖型

表-5 ネコブセンチュウ類の HARRIS et al. (1990) プライマーを用いた PCR-RFLP による DNA 断片サイズ

線虫	PCR 産物サイズ (bp)	制限酵素	
		<i>Hinf</i> I	
サツマイモネコブセンチュウ	1,770	900, 410, 290, 170	
アレナリアネコブセンチュウ			
本州型	1,770	900, 700, 170	
沖縄型	—	—	
ナンヨウネコブセンチュウ	1,770	900, 700, 170	
ジャワネコブセンチュウ	1,770	1,600, 170	
キタネコブセンチュウ	—	—	

—: 増幅なし. (HARRIS et al., 1990 および岩堀, 未発表より)

について PCR-RFLP の結果を表-8 に示す。制限酵素は *Rsa* I と *Taq* I を用いるが、いずれかのみでも差し支えない。本種については、形態に不慣れなうちは雄をネコブセンチュウ類あるいはネグサレセンチュウ類と混同しやすいので注意要する。

## おわりに

九州沖縄地域における主要な有害線虫について、現在までに明らかになったことをトピック的に述べてきた。本地域は様々な気候帯を含み、また、作付けされる作物も多様であることから、寄主ごとの十分な調査がなされているとは言い難い。また、近年の調査のほとんどは筆者らのグループが行ってきたものであり、調査人員の不足は否めない。今後さらなる調査を継続的に行い、気候の温暖化が有害線虫の地理的分布に与える影響についても解析していきたい。

「線虫の種同定は難しい」という声に対し、本稿ではネコブセンチュウ類、ネグサレセンチュウ類、シストセンチュウ類、およびニセフクロセンチュウについて、こ

表-6 ネグサレセンチュウ類の FERRIS et al. (1993) プライマーを用いた PCR-RFLP による DNA 断片サイズ

線虫	PCR 産物サイズ (bp)	制限酵素	
		<i>Alu</i> I	<i>Hinf</i> I
ミナミネグサレセンチュウ			
A 型	1,070	470, 215, 180, 100	670, 240, 160
B 型	1,070	470, 205, 100	670, 240, 160
C 型	1,070	470, 205, 100	670, 400
クルミネグサレセンチュウ	770	400, 380, 280, 105, 70	450, 420, 330, 310, 270, 260, 190, 170, 110
キタネグサレセンチュウ	770	380, 320	380, 140, 100
クマモトネグサレセンチュウ	770	380, 270, (205), 105	800, 450, 340
ニセミナミネグサレセンチュウ	1,000	390, 320, 200	620, 240, 130

( ) : 種内変異. 数値は筆者が原著論文の写真から推定したものを含む. (ORUI, 1996, MIZUKUBO et al., 2003 および UESUGI et al., 2009 より)

表-7 シストセンチュウ類の FERRIS et al. (1993) プライマーを用いた PCR-RFLP による DNA 断片サイズ

線虫	PCR 産物サイズ (bp)	制限酵素		
		<i>Alu</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Rsa</i> I
ヘテロデラ属				
ダイズシストセンチュウ	1,020	340, 280, 190, 130		820, 230
クローバーシストセンチュウ	1,020	340, 280, 190, 160		820, 580, 230
イネシストセンチュウ	1,090	330, 200, 170		630, 460
グロボデラ属				
ジャガイモシストセンチュウ	1,000	380, 360, 150, 100	920, 80	620, 220, 170
タバコシストセンチュウ	1,000	510, 380, 100	920, 80	
ジャガイモシロシストセンチュウ	1,000	510, 380, 100	770, 150, 80	
ヨモギシストセンチュウ	1,020	910, 100	1,020	

一部の数値は一桁目を四捨五入した. (大類, 1997 および UEHARA, 2008 より)

表-8 ニセフクロセンチュウの FERRIS et al. (1993) プライマーを用いた PCR-RFLP による DNA 断片サイズ

線虫	PCR 産物サイズ (bp)	制限酵素	
		<i>Rsa</i> I	<i>Taq</i> I
ニセフクロセンチュウ			
単為生殖型	950	860, 90	520, 310
有性生殖型	940	560, 380	520, 230, 70

れらが形態的に識別できるという前提で、その先の種や系統 (型) の識別までを形態に頼らず、PCR-RFLP 法で行う方法を述べた。DNA 解析による有害線虫の識別法に関しては、内外含め数多くの方法が提唱されており、どれに従えばよいのか混乱する状況である。本稿では、主にこれまで日本でなされた報告を参考にし、識別

のためのプライマーを二つに絞る (ネコブセンチュウ類では補助的にもう一つ追加した)、使用する制限酵素についても最小限にして、識別手法の標準化を試みた。これから有害線虫の種同定を試みようとする方々の参考になれば幸いである。

最後に、本稿で紹介した地理的分布調査は、九州沖縄各県の線虫担当者、および線虫問題に関心のある方々による多くの貴重な情報や試料の提供なくしてはなし得なかった。この場を借りてお礼申し上げたい。

#### 引用文献

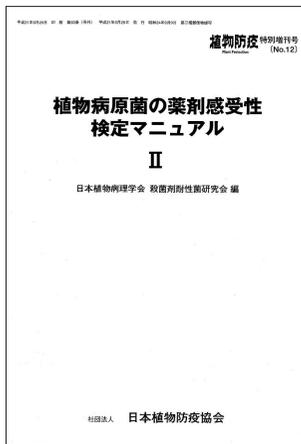
- 1) FERRIS, V. R. et al. (1993): *Fundam. appl. Nematol.* **19**: 177 ~ 184.
- 2) HARRIS, T. S. et al. (1990): *J. Nematol.* **22**: 518 ~ 524.
- 3) 岩堀英晶ら (2000): *九病虫研会報* **46**: 112 ~ 117.
- 4) ————ら (2001): 同上 **47**: 112 ~ 117.
- 5) ————・佐野善一 (2003): 同上 **49**: 83 ~ 87.

- 6) ———ら (2008) : 同上 54 : 132 ~ 137.  
 7) MIZUKUBO, T. et al. (2003) : Jpn. J. Nematol. 33 : 57 ~ 76.  
 8) ——— et al. (2007) : ibid. 37 : 63 ~ 74.  
 9) 中園和年 (1983) : 農技研報告 C 38 : 67 pp.  
 10) ORUI, Y. (1996) : Appl. Entomol. Zool. 31 : 505 ~ 514.  
 11) ——— (1998) : ibid. 33 : 43 ~ 51.  
 12) ——— and Mizukubo, T. (1999) : ibid. 34 : 205 ~ 211.  
 13) 大類幸夫 (1997) : 日本線虫学会誌 27 : 67 ~ 75.  
 14) ———ら (2004) : 線虫学実験法, 日本線虫学会, つくば, p.60 ~ 71.  
 15) POWERS, T. O. and T. S. HARRIS (1993) : J. Nematol. 25 : 1 ~ 6.  
 16) 酒井啓充 (2008) : 植物防疫 62 : 581 ~ 584.  
 17) SANO, Z. and H. IWAHORI (2005) : Jpn. J. Nematol. 35 : 1 ~ 12.  
 18) 佐野善一ら (2002) : 日本線虫学会誌 32 : 77 ~ 86.  
 19) UEHARA, T. et al. (1998) : Nematologica 44 : 357 ~ 368.  
 20) ——— (2008) : 植物防疫 62 : 567 ~ 570.  
 21) UESUGI, K. et al. (2009) : Nematol. Res. 39 : 17 ~ 22.

！ 新刊 ！

植物防疫特別増刊号 No.12

## 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル II



日本植物病理学会 殺菌剤耐性菌研究会 編  
 B5判 175ページ  
 価格 : 3,150円 (税込)

◆主な殺菌剤に対するイネ、ムギ、マメ類、野菜、果樹等の主要な病原菌の感受性検定方法を詳しく解説した第2弾。

内容：イネいもち病：MBI-D剤, QoI剤  
 コムギ赤かび病菌：ベンゾイミダゾール剤  
 マメ類灰色かび病：フルアジナム剤  
 テンサイ褐斑病菌：DMI剤  
 野菜類灰色かび病菌：メパニピリム剤  
 その他31種類の病原菌と薬剤の組み合わせについて解説  
 付録：殺菌剤耐性菌に関する国内文献集

お問い合わせとご注文は

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11  
 郵便振替口座 00110-7-177867 TEL 03-3944-1561 FAX 03-3944-2103  
 ホームページ：http://www.jpfa.or.jp/ メール：order@jpfa.or.jp