

# 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 <sup>くし</sup>串 <sup>だ</sup>田 <sup>あつ</sup>篤 <sup>ひこ</sup>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な知識、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、種の特定まではできないため、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バ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バ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)またはシーケ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)

を評価する。今回開発した技術は、RISA法の原理を応用し、rDNA-ITS1領域の配列長が線虫種間で異なることを利用して多種を同時に区別する。具体的には、バンドの検出感度や識別性をよくするためにネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウ両属に対して特異性を有するグループ特異的プライマーを開発し、これら線虫種だけの該当DNA領域をPCR増幅する。そして、PAGEによって各種のDNA長差(多型)を検出し、そのバンド位置によって種を識別する。

## II 技術の特徴

### 1 シンプルな工程

線虫サンプルから抽出したDNAをもとに、PCRとPAGEを1回ずつ行うだけで結果が得られる。PAGEは市販ゲルを使用するため、面倒なゲル作成は必要なく、高い再現性も期待できる。線虫サンプルを準備した後、DNA抽出から発生種の判定までおよそ9時間で完了し、迅速な診断が可能である。本技術では、線虫に関する専門知識は必要ではないため、非専門家でもマニュアル的な操作だけで、高度な線虫種判別が可能である。

### 2 高感度な検出

線虫サンプル中にネグサレセンチュウまたはネコブセンチュウが1頭しか存在しない場合でも、それを検出できる。ネグサレセンチュウは齢期(发育ステージ)によって大きさが異なるが、最も小さい2期幼虫でも1頭いれば検出可能である。

### 3 複数種の同時把握

実際の畑地では、複数の植物寄生性線虫種が同時発生している場合がある。特に同属の複数種が混発した場合には、それらを正確に把握することはこれまで困難だったが、本法では1枚のゲル上に複数のバンドとして検出でき、同時把握が可能である。

## III 手順

今回開発した技術は、線虫サンプルから抽出したDNAを元に有害線虫を検出、種判別するものであるが、土壌からの線虫分離やDNA抽出は基本的に既存の方法(大場・岡田, 2008)を用いた。そのため、本稿ではDNA抽出までの工程の紹介は省略し、以降の操作について解説する。

### 1 PCR

#### (1) プライマー

Forward ; PNem-F 5'-AACCAATTTAATCGCAGTG-3'

Reverse ; PNem-R1 5'-GGGCTCATYAAGTCTTAARCC-3'

PNem-R2 5'-GGCTCATTGAGTCTTAAACTGC-3'

これらを混合して用いる。これらはネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウに対して高い特異性を有する。シストセンチュウ(ダイズシスト、ジャガイモシスト等)やフトラセンのDNAも増幅するが、これらのバンドは対象種のバンド分布域外に位置するので、たとえこれらが混在してもバンドの識別性は阻害されない。

#### (2) PCR反応液組成(25 $\mu$ l反応系) DNA抽出液以外はいずれも終濃度

1  $\times$  PCR Buffer

0.2 mM dNTPs

0.8  $\mu$ M プライマー各種

1 unit PCR Taq

2.5  $\mu$ l DNA抽出・精製液

#### (3) PCR反応

95 $^{\circ}$ C 3分  $\rightarrow$   $\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} \ 30 \text{秒} \\ 56^{\circ}\text{C} \ 30 \text{秒} \\ 72^{\circ}\text{C} \ 50 \text{秒} \end{array} \right\} \times 30 \text{ サイクル} \rightarrow 72^{\circ}\text{C} \ 7 \text{分}$

## 2 PAGE

#### (1) ゲル : e-PAGEL (ATTO, 図-1) E-R15L (ポリアクリルアミド/ビス濃度 : 15%)

#### (2) その他の必要機材 : 泳動槽 (ATTO AE-6530P型, PAGEL仕様), パワーサプライ (一般的なもの) (図-2)

#### (3) 泳動バッファー : トリス・グリシンバッファー (25 mM トリス + 192 mM グリシン)

#### (4) 手順

1) ゲルを袋から取り出し、プレートホルダー (AE-6530P 取扱説明書参照) にセットする。

2) 泳動槽に泳動バッファーを約 200 ml 注ぎ、ゲルをセットしたプレートホルダーを入れる。



図-1 e-PAGEL

(ゲルサイズ : 90  $\times$  83 mm, ゲルは袋に逆さに入っている)

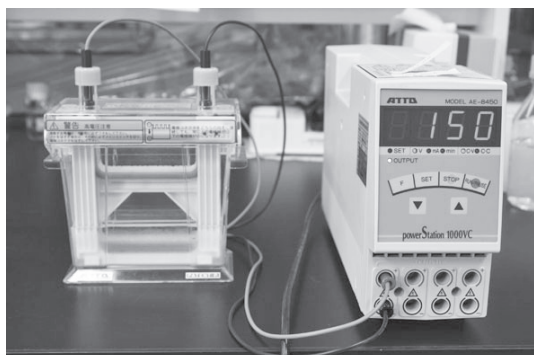


図-2 泳動槽 AE6530P 型 (ATTO) (左) とパワーサプライ (右) 泳動槽には図-1 のゲルを 2 枚セットできる。パワーサプライは、150 V 定電圧条件が得られれば機種は問わない。

- 3) 上部槽に泳動バッファーを充てんし、ウェルに PCR 産物を  $4\mu\text{l}$  ずつ入れる。ただし、両端のレーンはバンドが著しく傾くので、用いない。また、2レーンおきに種判別用マーカー（後述）を流す。
- 4) リード線をつなぎ、150 V 定電圧で 270 分間通電する。
- 5) 泳動終了後、ゲルを取り出し、エチジウムブロマ이드溶液（約  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 分）で染色する。
- 6) UV で可視化し、撮影する。

### 3 判定

バンドが検出された場合、種判別用マーカーと比較して発生種を判定する。その判定に際しては後述の判定ポイントを参考にする。バンドが検出されなかった場合は、診断対象種がいないと判定できる。ただし、慣れないうちは操作ミスによる DNA 抽出や PCR の失敗などの可能性もあるので、操作にあたってはポジティブコントロールを設ける。DNA 抽出では、いずれかの対象種が確実に含まれる線虫サンプルも同時に供試し、PCR では、あらかじめ DNA が増幅することを確認したサンプルも同時に供試する。

※種判別用マーカーは、北海道農業研究センターが無料提供する（100 レーン分/回、回数制限なし。申し込み方法は後述）。マーカーの構成種は、泳動位置が上からミナミネグサレ（フェノタイプ B と C）、ミナミネグサレ（フェノタイプ A）、ノコギリネグサレ、キタネグサレ、ムギネグサレ、クルミネグサレ、モロコシネグサレ、キタネコブの 7 種 8 本を予定している。

## IV バンドパターンの特徴

### 1 各種のバンドパターン

各種のバンドパターンを図-3 に示す。各種は、それ

ぞれ 1 本のメインバンドまたは数本のバンドで構成されるメインバンド帯を示すほか（以下、いずれもメインバンド）、複数のマイナーバンドを形成する。マイナーバンドのほとんどは、メインバンドの上部に位置し、スミアなバンド帯を形成する種もあるが、そのパターンはかなり規則的なので、種判別の参考情報となる。メインバンドの位置は種ごとに異なるので、それを基準に種を識別できる（マーカーはメインバンドに符合するように作製している）。しかし、サツマイモネコブ、アレナリアネコブ、ジャワネコブはメインバンド位置が互いに重なるため、検出できても種を判定できない（→サツマイモネコブセンチュウ類と判定）。ムギネグサレとクマモトネグサレのメインバンド位置も重なるが、ムギネグサレはメインバンドのやや下に 1 本のマイナーバンドを付随する特徴的なバンドパターンを示すので、それにより容易に判別できる。

### 2 ミナミネグサレの種内変異

国内に分布するミナミネグサレ個体群は、宿主寄生性がやや異なり、rDNA 領域の PCR-RFLP が異なる 3 種のフェノタイプ（A、B、C）が分布することが知られているが（MIZUKUBO et al., 2003）、そのフェノタイプ間でメインバンド位置が異なった。フェノタイプ B および C のメインバンドは、フェノタイプ A のメインバンドよ

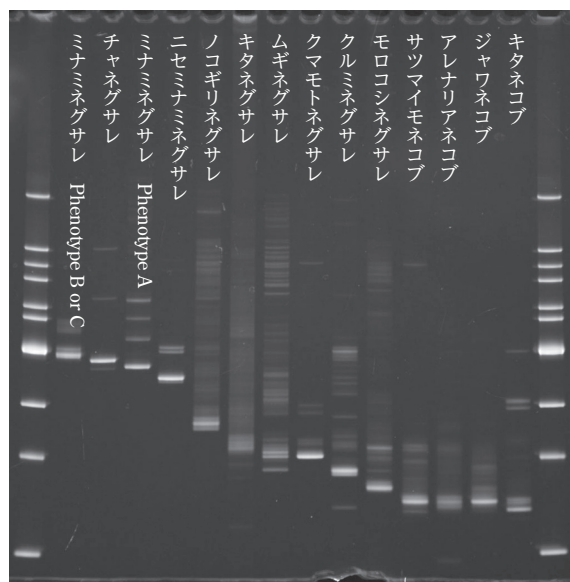


図-3 各種の PAGE バンドパターン（KUSHIDA and KONDO, 2015 より転載）

10% T ゲル（e-PAGE E-R10L）を使用し、100 V で 200 分泳動した際の泳動像。10% T ゲルは、15% T ゲルに比べて両サイドの歪みが少ないが、バンド分離性はやや劣る。両端は 100 bp マーカーで、太いバンドは 500 bp を示す。

りもやや上に認められ、それぞれチャネグサレのバンドを挟んで上下に分かれた(図-3)。したがって本法を行えば、ミナミネグサレについてはそのフェノタイプがAであるか、それ以外かを同時に判定することができる。

## V 種判定のポイント

図-3の各種バンドパターンでは、マイナーバンドが多く検出されているので、種の明確な判別が難しい印象を受けるが、種の判定は意外に容易にできる。以下に判定のためのポイントをまとめる。

### 1 マーカー分布域内のバンドだけを判定する

使用するプライマーは、診断対象種以外に複数の植物寄生性線虫種(シストセンチュウおよびフトラセンセンチュウ)のDNAを増幅することが確認されている。これらのバンドは、550 bp ~ 650 bp に出現し、診断対象種の中で最上部のバンド(ミナミネグサレのフェノタイプB, 約480 bp)のさらに上に検出される。種判別用マーカーには、この最上部の種と最下部の種(キタネコブ)を設定しているので、この範囲外にバンドが検出された場合、それは診断対象種ではないと判断してよい。

### 2 マーカーを基準に判定する

基本的にマーカーに符合する位置のバンドまたはマーカーとの位置関係から診断対象種であることがわかるバンドだけを評価する。線虫個体数が多いほどバンドは太く、濃くなる傾向にあるが、マーカーはその中心に位置するように作られているので、その位置関係を基準に判定する。

### 3 太い(高輝度の)メインバンドがある場合、薄いバンドは無理に評価しない

例えば、ノコギリネグサレ、サツマイモネコブなどはメインバンド上部に薄いバンドを多数形成し、当該種が高密度である場合にはそれらも濃くなるため、その付近に位置する他種メインバンドの検出を妨げることが懸念される。しかし、それらのバンドを無理に評価する必要はない。たとえ、バンド位置が重なる種が混発していたとしても、マイナーバンドと判別できない輝度では密度は極めて低く(数頭以内)、それは被害発生の主要因ではない。この場合、高輝度のメインバンドを形成しているノコギリネグサレまたはサツマイモネコブが高密度であり、被害の原因種である。

### 4 サツマイモネコブ類(アレナリアネコブ、ジャワネコブを含む)とキタネコブの判別

それぞれのメインバンド位置は明確に異なるので、種判別は難しくない(キタネコブのメインバンドは、2本見えるうちの下側)。しかし、両種のマイナーバンドが互

いのメインバンド位置にほぼ重なるため、両種が混発している場合を判定できない(ただし、両種が混発することは珍しい)。この場合、メインバンドだけを判定する。

## VI 判定例

異なる地域の5圃場から分離した線虫サンプルについて、本法を適用して得られたバンドパターンを図-4に示す。このバンドパターンから、両端の種判別マーカーとの比較や上記「判定のポイント」等に基づき、各圃場に発生している有害線虫は以下のように判定できる。

圃場1: キタネグサレの単独発生(以下、単発)

圃場2: キタネグサレとムギネグサレの混発

圃場3: ノコギリネグサレ, キタネグサレ, キタネコブの3種混発

圃場4: キタネコブの単発

圃場5: ミナミネグサレ(フェノタイプA)とサツマイモネコブ類の混発

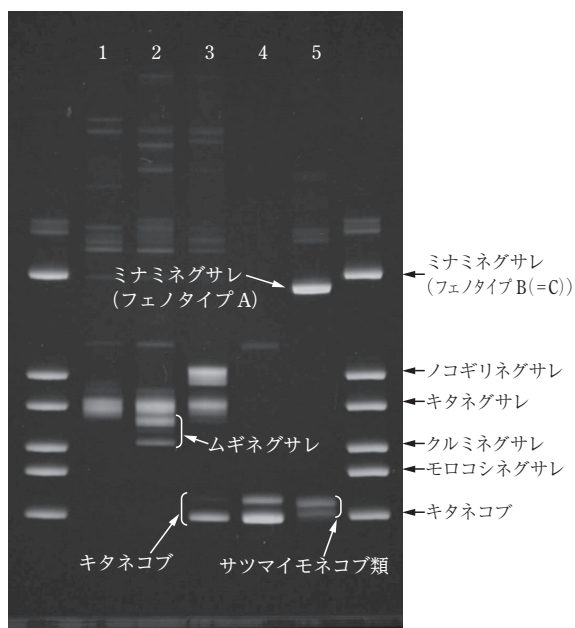


図-4 圃場線虫サンプルのバンドパターン

異なる地域の5圃場線虫サンプルについて調査した結果を示す。両端レーンは種判別用マーカーで、各種のメインバンド位置を示す。レーン5のミナミネグサレはフェノタイプAであり、フェノタイプBから作製したマーカーとはバンド位置がやや異なっている。また、レーン5のサツマイモネコブ類(上がメインバンド)については、アレナリアネコブまたはジャワネコブの可能性はある。

## VII その他の情報および留意事項

### 1 ランニングコスト

ランニングコストは、1 サンプル当たり約 584 円であり（2016 年 5 月 28 日時点）、主要なコスト品は以下の通りである。

- ・ DNA 抽出・精製キット Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System ¥320/1 サンプル（250 回分キット購入の場合）
- ・ Taq（Takara Ex Taq HS の場合）¥126/1 サンプル
- ・ PAGE ゲル ¥138/1 サンプル（ゲル 1 枚に 10 サンプルを泳動した場合）

### 2 個体数評価について

メインバンドの輝度は該当種の個体数を反映するので、バンド輝度からおおよその密度を推定できることがわかっている。DNA の増幅効率が種ごとに異なるなどの問題から、現時点でその調査技術は確立していないが、今後、簡易な密度推定法としての可能性を明らかにしていく予定である。

### 3 ナンヨウネコブについて

今回、技術開発の対象としなかったナンヨウネコブは、主として南西諸島に分布しているが、平成 26 年 11 月に大分県でサトイモに被害を発生させ、特殊報が発出されており、今後、九州以北でも検出事例が増える可能性がある。本種は、アレナリアネコブやジャワネコブと同じく、サツマイモネコブと発生生態や寄主範囲が類似し、DNA 上の変異も少ない。シークエンス解析では、rDNA-ITS の配列長は全く同じであったことから、上記 3 種と同じ位置にバンドを形成すると推察される。今後、これら 4 種も同時に種判別できる技術開発が求められる。

### 4 技術マニュアルおよび種判別マーカーの配布などについて

本技術工程の詳細を解説したマニュアルを北海道農業

研究センターホームページ上で公開しているので、参照されたい。また、上記種判別用マーカーの配布申し込み方法についてもマニュアル中に記載している。アドレスは以下の通りである。

<http://www.naro.affrc.go.jp/harc/contents/nematode/index.html>

## おわりに

近年、線虫調査技術を持った研究者、技術者が各地で減少し続け、線虫問題に十分な対応ができない状況が発生しつつある。さらに線虫種の調査・把握は高い専門性を要することもあり、線虫が関連する被害事例の多くが究明されないままになっていることが懸念される。本法では、専門知識が求められる顕微鏡観察の工程を排除し、マニュアルに基づいた生化学実験の工程だけで高感度な検出と種判定ができるようにした。また、国内の畑地で問題となるネグサレセンチュウとネコブセンチュウ全種の同時評価を可能にした。これにより、非専門家でも比較的簡単に線虫種の把握が可能である。線虫害の原因種調査や被害解明、分布・発生実態調査等に活用いただきたい。本法により今後、線虫診断を気軽に取組めるようになれば幸いである。

一方、本法については国内の様々な地域の圃場線虫群集を用いてその精度を検証しているが、まだ十分とは言えない。種や地域個体群によっては、新たなパターンが検出される可能性は捨てきれないため、今後も様々な事例調査を通してその可能性を評価し、診断精度の維持・向上を図っていく予定である。

## 引用文献

- 1) 大場広輔・岡田浩明（2008）：土と微生物 62：69～73.
- 2) KUSHIDA, A. and N. KONDO（2015）：日線誌 45：101～114.
- 3) MIZUKUBO, T. et al.（2003）：日線誌 33：57～76.