

研究成果名：ネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウの簡易診断技術

(研究課題名：ジャガイモシストセンチュウ類の実用的防除技術の開発)

担当部署名：北海道農業研究センター・大規模畑作研究領域

担当者名：串田篤彦

協力分担：北海道大学

予算(期間)：交付金 (2011-2015 年度)

1. 目的

国内各地において有害線虫種の診断需要は多いが、その実施には専門的知識や技術が不可欠なため、種判別ができるのは一部の線虫専門家に限られる問題があった。そこで、有害線虫の中でも診断需要が多いネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウについて、非専門家でもその診断を可能にするため、分子生物学的手法を応用し、線虫の形態を観察することなく簡易なルーチンワークだけで種判別できる技術を開発することを目的とした。診断の対象とする種は、国内の畑地に発生する計 13 種(キタネグサレセンチュウ(以下「センチュウ」を省略)、クマモトネグサレ、クルミネグサレ、チャネグサレ、ニセミナミネグサレ、ノコギリネグサレ、ミナミネグサレ、ムギネグサレ、モロコシネグサレ、アレナリアネコブ、キタネコブ、サツマイモネコブ、ジャワネコブ。以降これらを「対象種」と記す)であり、これらを同時に評価・識別できる技術を目指した。

2. 方法

- (1) rDNA-ITS1 領域に対象種群に対して特異的であり、増幅 DNA 長に種間差が見込める配列を探索し、PCR プライマーを設計した。
- (2) 各対象種由来 PCR 産物をバンド位置で識別できる電気泳動法および泳動条件を検討した。
- (3) 対象線虫種 1 頭を検出できる PCR 条件を検討した。
- (4) 1,000 頭の自活性線虫に対象種を一定個体数混入させ、17 通りの線虫群集モデルを作製し、混在させた対象種を正確に検出、種判別できるか調査した。また、国内各地から採集した 52 地域(道内は 24 地域)の畑土壌由来の線虫群集に本法を適用し、得られた診断結果を顕微鏡観察や他の分子生物学的手法による同定結果と比較し、その精度を評価した。

3. 結果の概要

- (1) 対象種群に対して高い特異性を示すプライマー(グループ特異的プライマー)PNem-F(5'-AA CCAATTTAATCGCAGTG-3')と PNem-R1(5'-GGGCTCATYAAGTCTTAARCC-3'、Y : T+C、R : A+G)、PNem-R2(5'-GGCTCATTGAGTCTTAAACTGC-3')を選定した。これらを混合して PCR を行うことにより、対象種 DNA をほぼ選択的に増幅させることができた(図 1, 4)。対象種以外にシストセンチュウおよびフトラセンセンチュウの DNA を増幅したが、それらのバンドは全て対象種のバンド分布域外に認められたことから、たとえそれらが検出されても種判定の妨げにならないことを確認した。
- (2) 各対象種 DNA を識別できる泳動法としてポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を選定した。また、PAGE を簡単かつ迅速、安全に実施するため、市販の既製ゲル e-PAGEL(ATTO)を用いることとし、最適な識別性を得られる条件として、15%T アクリルアミドゲルを使用、150V 定電圧、270 分泳動を選定した。この条件では、ほとんどの種のメインバンド位置が異なり、識別が可能であったが、サツマイモネコブ、アレナリアネコブ、ジャワネコブの 3 種はバンド位置には違いがなく、識別できなかった(図 2)。
- (3) 30 サイクルの PCR で 2,000 頭の自活性線虫に混在したネグサレセンチュウ 2 期幼虫 1 頭を検出できることを確認した。開発した診断工程を図 3 に示した。
- (4) 複数種が混発し、その発生個体数が種間で大きく異なってもほとんどの場合、それらを正確に検出し、種判別できた。現地の線虫群集調査結果も顕微鏡調査や既存の分子生物学的調査による結果と全て一致し、診断精度は高いと判断された(図 4)。

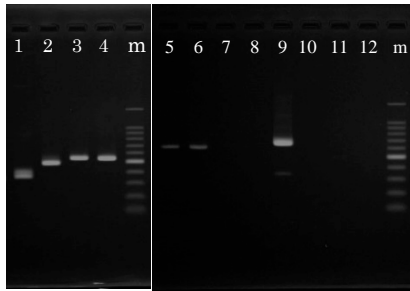


図1 各植物寄生性線虫種 DNA の増幅性 (1.5%アガロースゲル電気泳動像)

1: ノコギリネグサレ, 2: ミナネグサレ, 3: ヨモギシスト, 4: ジャガバシスト, 5: ダイシシスト, 6: クロバシスト, 7: イゲサレ, 8: ナミゼン, 9: フトラゼン, 10: ニセフコ (両性生殖型), 11: ニセフコ (単為生殖型), 12: ピン, m: 100bp マーカー

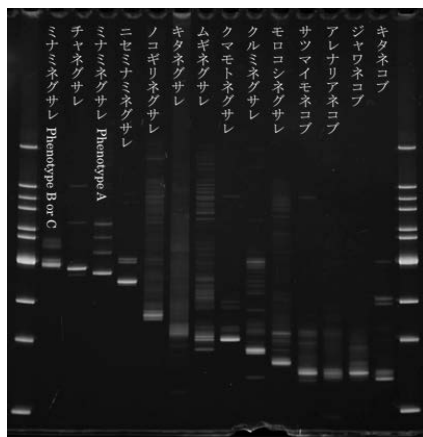


図2 各対象種の PAGE バンドパターン
両端は 100bp マーカー

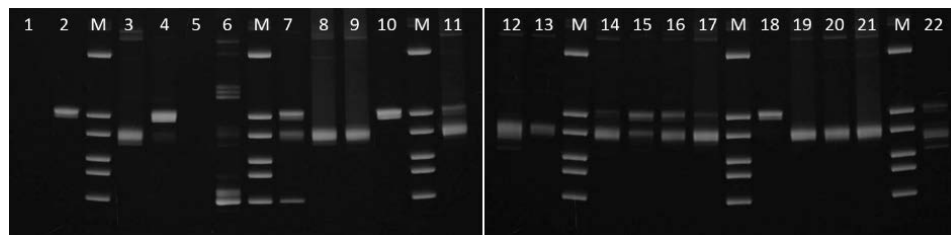


図4 異なる地域個体群の PAGE バンドパターン

M は種判別用マーカーで、バンドは上からミナネグサレ(フェタイプ B)、ノコギリネグサレ、ネグサレ、クミネグサレ、モロシネグサレ、ネコブを指示。数字は異なる地域圃場の線虫群集を示しており、たとえば圃場 7 はノコギリネグサレ、ネグサレ、ネコブの 3 種が混発していることを示す。調査した 52 地域のうち北海道産(2~22)を中心に示した。

4. 結果の要約

国内の畑地に発生するネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウ計 13 種を同時に診断できる技術を開発した。本技術は、線虫群集から抽出した DNA を元に、1 回の PCR と電気泳動の工程だけで上記有害線虫を高感度に検出し、そのほとんどを種判別できる。

[キーワード] ネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウ、簡易診断技術、多種同時評価

5. 今後の問題点と次年度以降の計画

線虫の密度を簡易に評価できる技術開発が必要であり、次年度以降に継続して検討する。

6. 結果の発表、活用等 (予定を含む)

Kushida A. and Kondo N. (2015) Nematol. Res. 45(2): 印刷中

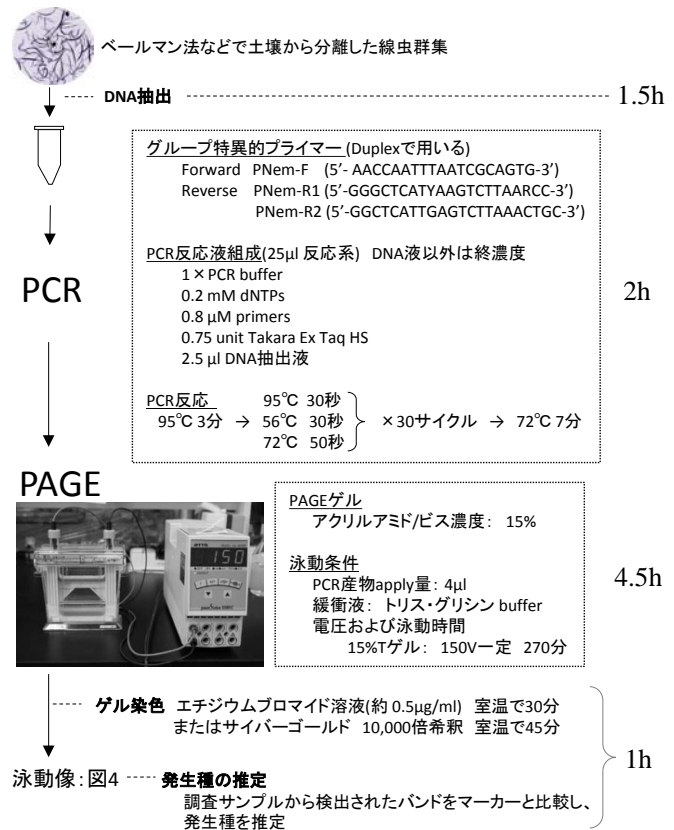


図3 診断技術の工程フロー