



Title	植物寄生性線虫の診断技術に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	串田, 篤彦
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11998号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60162
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Atsuhiko_Kushida_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 串 田 篤 彦

学 位 論 文 題 名

植物寄生性線虫の診断技術に関する研究

ネグサレセンチュウ *Pratylenchus* spp.およびネコブセンチュウ *Meloidogyne* spp.は、多くの畑作物の根に寄生して、その生育を阻害し、特に根菜類では収穫物の外観形質の劣化や奇形を発生させるため、大きな減収被害を引き起こし、各地で問題となっている。国内の畑地には、9種のネグサレセンチュウ(*P. coffeae*, *P. crenatus*, *P. kumamotoensis*, *P. loosi*, *P. neglectus*, *P. penetrans*, *P. pseudocoffeae*, *P. vulnus*, *P. zae*)と4種のネコブセンチュウ(*M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica*)が分布しているが、これらに対して効率的な対策を行うには、その発生種や発生密度を把握することが不可欠である。しかし、現在の線虫診断は、顕微鏡を使った形態観察に基づく分類、計数が主流であり、これには専門的知識や熟練を要するため、実施できる機関に限られることや、調査には多大な労力と時間を要することなどが大きな問題となっている。本研究では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種類(以下、対象種)を1回のPCRと電気泳動の工程だけで検出し、種を識別する手法を開発することを目的とした。

1. DGGE法を応用した *Pratylenchus* および *Meloidogyne* の網羅的診断技術

18S-rRNA 遺伝子領域において、対象種に高い特異性を持つプライマーSNem(リバース)を設計した。SNem プライマー領域の配列には対象種間で複数の変異が認められたことから、それらの配列に対応させた4種のプライマーSNem-1, SNem-2, SNem-3, SNem-4 を作製し、混合して用いることとした。SSU18A をフォワードプライマーとし、各SNem プライマーにGCクランプを付加してPCR増幅させた場合に、DGGEゲル上で最も明瞭なバンド形成が認められた。各種のメインバンド位置が異なり、最も高い識別性が得られたDGGE条件は、変性剤濃度勾配が25-41%のゲルを用い、70V定電圧で17時間泳動した時であり、この条件でほとんどの対象種のバンド位置が明瞭に異なった。しかし、*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* の3種は泳動条件にかかわらず、バンド位置に違いがなく、識別することができなかった。最も高感度が見込めるPCR条件として、アニーリング温度54℃、35サイクルのPCR増幅を選定した。このPCR産物を10μl泳動することにより、2,000頭の雑多な線虫群集に混入した対象種1頭を把握することができた。人為的に作製した線虫群集モデルを用い、本法の検出感度や種の識別精度を評価した結果、3, 4種を同時に混入させた場合も、個体数が1, 2頭と少ない場合もほぼ確実に検出し、同時に種を把握できた。また、各地の畑52筆から分離した線虫群集を用いた検証結果からも、本法は対象種を高感度に検出でき、その種を同時に把握できることを確認した。また、対象種以外の線虫種に由来すると考えられるバンドは全く認められなかったことから、開発したグループ特異的プライマーの実用性は高いと判断された。

2. PAGE法を応用した *Pratylenchus* および *Meloidogyne* の網羅的診断技術

RISA法の原理を応用し、rDNA-ITS領域のDNA長の種間多型をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で検出することにより、種を識別する手法を検討した。rDNA-ITS1領域において対象種に高い特異性を示すプライマーPNem-FとPNem-Rを設計した。PNem-Rの領域には、対象種間で複数の変異が認められたことから、それらの配列に対応させたPNem-R1とPNem-R2を設計した。これらのプライマーは、シストセンチュウ(*Globodera* spp., *Heterodera* spp.)および*Scutellonema brachyurum*のDNAも増幅したが、それらのバンドが対象種バン

ドの識別性を損なうことはなく、実用性に問題はなかった。これらのプライマーによる各対象種の増幅 DNA は、PAGE での分離が良かったことから、簡易性や再現性の確保が期待できる市販ポリアクリルアミドゲル e-PAGEL(ATTO)を用いることとした。15%T(ポリアクリルアミド/ビス濃度)のゲルを用い、150V 定電圧で 250~270 分泳動した場合に最も高い分離結果が得られ、ほとんどの対象種のメインバンドをその位置により明瞭に区別することができた。10%T のゲルを用い、100V で 200 分泳動した場合もほぼ同等の識別性が得られた。しかし、本法においても *M. arenaria*、*M. incognita*、*M. javanica* の 3 種は泳動条件にかかわらず、バンド位置に違いがなく、識別することができなかった。PCR 増幅に適したアニーリング温度として 56°C を選定し、30 サイクル増幅させた PCR 産物を 4μl 泳動することにより、各対象種が 1 頭だけでも検出可能だった。1 と同様に線虫群集モデルおよび多数の地域線虫群集を用いた検証の結果、高感度、高精度に発生種を把握できることを確認した。検出感度やバンドの識別性は、本法の方が DGGE を応用した手法に比べてやや優れていた。

3. PAGE バンド輝度評価に基づく個体数簡易推定法の開発

キタネグサレセンチュウ(以下、Pp)を材料とし、PAGE のバンド輝度からその個体数を推定する手法を検討した。まず、大きさが極めて異なる Pp の 2 期幼虫と雌成虫(体長で約 2.5 倍、体幅で約 2 倍)の DNA 量を比較したところ、雌成虫の DNA 量は 2 期幼虫のおよそ 1.4 倍とほとんど変わらないことが明らかになった。このことから、様々な発育ステージが混在するネグサレセンチュウ群集においても DNA 量から個体数を推定することに妥当性はあると考えられた。Pp の個体数とそのバンド輝度は相関し、25 サイクルの PCR 産物を 8μl 泳動する条件で、最も広い密度範囲(1~200 頭)のサンプルを定量できることが明らかになった。10 頭及び 100 頭に相当する密度マーカー用 DNA を作製し、これをサンプルと同時に PCR と電気泳動を行い、輝度を比較することにより、簡易にその密度レベル(低: 1~10 頭、中: 10~100 頭、高: 100 頭以上)を判別できた。また、要防除密度に相当する密度マーカーを用いることにより、防除の要否を簡易に判定可能と考えられた。最も定量性が高かった PCR 条件は、2 で選定した高感度検出のための PCR 条件と異なったため、2 の泳動バンドをそのまま定量に利用することは困難だったが、バンド輝度調査による個体数推定技術は、簡易に線虫密度を把握できる手法として有用性があると考えられた。

以上の結果、国内の畑地に発生する *Pratylenchus* および *Meloidogyne* 計 13 種を簡易な一工程で高感度検出し、そのほとんどを種判別できる技術を開発できた。このことから、グループ特異的プライマーと群集解析に用いられる多型検出法の併用は、多種一斉診断を実現するのに有力な技術であることが明らかになった。