

線虫検査受託事業創出のための 新たな線虫検査システムの開発

谷田 昌穂 [株式会社ラボ／R&Dシニアアドバイザー]
増田 稔 [北海道大学農学研究院／教授]
植原 健人 [北海道農業研究センター／主任研究員]
斎野 智記 [JA道央技術普及課／課長]
奈良部 孝 [北海道農業研究センター／上席研究員]

背景・目的

ジャガイモシストセンチュウは、ジャガイモの収量を減じること、その完全な防除が困難であることから、ジャガイモ主産地の北海道にとって重大な病害虫である。従って、土壤の検診は線虫汚染の防止や対策に必須であるが、従来の検診法は労力を要するとともに、線虫種の同定には永年の経験が必要とされる。我々はすでに PHS (Plant Health Sensor) 法という土壤診断法を開発し、この方法がジャガイモシストセンチュウの検出にも有効であることを明らかにしてきた。

本課題では、従来法や PHS 法の再検討を行い、さらに、新たな分子生物学的方法を開発してそれらを組合することで、現場のニーズにそった線虫検査の新しいシステムを確立することを目的とした。

内容・方法

1) 従来法の検討

・本項目では、従来法を実際に実施し、シスト形態の系統的把握、卵数計測における生死判別など、試験者があってもできるだけ一致した結果が得られるように情報の整理とマニュアル化を図る(株ラボ)。そのために、高性能の実体顕微鏡・生物顕微鏡・LED 光源を導入し、シストや卵の形態観察を行う。

2) PHS 法の検討

・これまでの PHS 法の検討では、実際の圃場土壤についての検証数が少なかったことから、JA道央管

内の圃場から土壤を収集し(JA道央)、さらに各地からも圃場土壤を集め、それらについて従来法(JA道央・ラボ)と PHS 法を実施(ラボ)する。このように多くの試料についての結果を解析することで PHS 法の信頼性を確認する。

・これまでの PHS 法では、ダイズシストセンチュウに対しても反応してしまうことが問題であった。そこで、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を再度行い、ジャガイモシストセンチュウにのみ特異的に反応する遺伝子を探索する(北海道大学)。

3) 特異的検出法の検討

・PHS 法は、線虫の種類とともに生死を知る良い方法であるが、コストと時間に問題が残されている。そこで、より簡便な線虫種に特異的な検出方法を開発する。具体的には、リボゾーマル RNA の ITS 領域の PCR 増幅と制限酵素処理を組合せた PCR-RFLP 法、複数の線虫種を同時に検出するためのマルチプレックス PCR 法、抗原抗体反応を利用した ELISA 法について検討する(北海道農業研究センター)。

結果・成果

1) 従来法の検討

従来法(浮遊分離法)で汚染土壤からシストを分離・計数する際に問題となるのは、シストの形状で、必ずしも明らかな特徴(ジャガイモシストは1ヶの突起を持つ球形、ダイズシストは2ヶの突起を持つレモン形)が観察されないことである。また、シストを破碎してシスト中の卵を計数する際にも卵の生死や空卵などの問題がある。これらの問題に対し、高性能な顕微鏡で詳細な観察を行い、観察者が変わっても一定の判定結果が得られるような写真入りの判定表を作成した。

2) PHS 法の検討

・ジャガイモシストセンチュウに感染させたトマトの遺伝子についてマイクロアレイ解析を行い、新たに5種類の遺伝子を選抜した。これらの遺伝子をマイクロアレイに搭載し、PHS 法を行なうことで、ダイ

表1 新たなプローブ遺伝子を用いた PHS 法による判定

PCN卵数/1g乾土	SCNのみ (4サンプル)				SCN + PCN (5サンプル)				PCNのみ (10サンプル)										
	0	0	0	0	8	7	145	167	3	3	50	23	3	20	16	98	231	157	39
SCN卵数/1g乾土	160	1	112	387	1	4	1	38	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PCN判定	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表2 PHS 法によるジャガイモシストセンチュウの生死判定
PCN

PHS判定結果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	±	+	+	+	+	+	+
PCN卵数/1g乾土	0.2	0.2	0.3	0.3	0.9	1.3	1.4	1.9	3.1	3.3	3.4	3.5	6.5	16.1	20	23	49.9	98.3	
SCN卵数/1g乾土	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PCN生死判定	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

ズシストセンチュウの混在の有無に関係なくジャガイモセンチュウを検出できた(表1)。

・多くの圃場土壤について PHS 法を行い、その結果を従来法の結果と対比解析した。その結果、わずかな卵数が計測された場合でも、牧草地化した土壤など、シスト(卵)の活性が低いまたは死んでいると思われる土壤では PHS の反応が見られなかった。このことから、PHS 法はシスト(卵)の生死判別に有効な情報を与える方法であることが明らかとなった。

3) 特異的検出法の検討

- ・ rDNA-ITS 領域の PCR 増幅産物を制限酵素 *AluI* と *HinfI* で別々に切断した PCR-RFLP で、ジャガイモセンチュウとダイズセンチュウを明確に識別することができた。
- ・ 制限酵素処理を行なわないで、より短時間で線虫種を判別するために、ジャガイモセンチュウ、ダイズセンチュウそれぞれに特異的なプライマーを設計し、マルチプレックス PCR を行なった。その結果、図2に示したようにそれぞれの線虫に特異的なバンドが検出され迅速な識別が可能であった。
- ・ 幼虫や卵からの DNA 抽出が必要ない、Direct PCR Kit を用いることで、さらに簡便迅速な鑑別を可能にした。
- ・ 市販されているジャガイモセンチュウ特異的抗体を用いた ELISA 法について検討した。反応はジャガイモセンチュウで最も高かったが、ダイズセンチュウとクローバーシストセンチュウで非特異的反応が弱いながらも検出された。

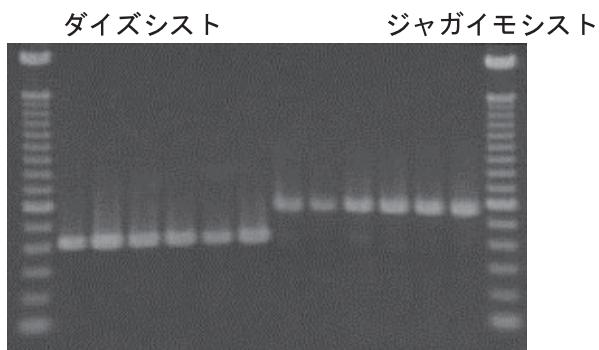


図2 マルチプレックス PCR 法による検出

イルス病など)にも関心が高いことから、これまでの基礎技術の応用範囲を広げて行くことも考えている。

今後の展望

線虫検査システムとしてはほぼ完成できたので、このシステムの特徴を道内の農協に広報することで、実際の分析受託につなげて行く。北海道にはジャガイモセンチュウのほかにダイズセンチュウ、キタネグサレセンチュウ、キタネコブセンチュウが農業上重要な線虫であることから、これら線虫の同時検出法についても開発して行きたい。さらに、各農協では線虫のほかに、各種作物が持つ独自の問題(ジャガイモやナガイモのウ