[研究資料]

日本の主要ピーマン産地における
加害ネコブセンチュウ種と
抵抗性打破線虫の発生頻度岩堀英晶^{1*}・上杉謙太¹・杉田 亘²Root-knot nematode species and the frequency of
resistance-breaking nematodes in major green pepper
production regions of Japan.Hideaki Iwahori^{1,*}, Kenta Uesugi¹ and Wataru Sugita²

Abstract: Species of root-knot nematode (RKN) from 50 green pepper fields in Miyazaki, Kagoshima, Kochi, and Ibaraki prefectures were surveyed. Ten to 25 second juveniles (J2s) and female adults were collected, respectively, from each field and the species were identified individually by PCR-RFLP method. As a result, all RKN specimens, except one, were *Meloidogyne incognita*. Then each infested soil sample from 31 of the fields was inoculated to 3 breeding lines of nematode-resistant chili peppers (CM334, LS2341 and PI322719). Many galls and egg masses were observed after the inoculation in 6 (ca. 19%) of the infested soils. This indicates that resistance-breaking nematodes dominated at a high frequency in these fields. Nematol. Res. 45(1), 57-61 (2015).

Keywords: *Capsicum annuum*, chili pepper, distribution, identification, *Meloidogyne incognita*

緒 言

トウガラシ属 (*Capsicum*) の果菜類であるピーマン (*C. annuum* L. var. 'grossum')、パプリカ (同左)、トウガラシ (*C. annuum* L.) は、国内外で広く栽培されているが、ネコブ

センチュウ (*Meloidogyne* spp., 以下、線虫と記す) により大きな減収被害が発生している (Lindsey and Clayshuttle, 1982; Thies *et al.*, 1997)。現在、線虫防除の主な手法としては土壌燻蒸剤が用いられているが、環境保全や安全性への懸念から、今後ますますその使用が制限されることが予想され、より一層の被害拡大が懸念される。抜本的な線虫対策の1つとして抵抗性品種の導入が考えられるが、現在のところ線虫に対し抵抗性を示す有効なピーマン品種はない。そこで、抵抗性を有することが知られているトウガラシ (Hendy *et al.*, 1985; Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Thies and Fery, 2000; Barbary *et al.*, 2014) をピーマンの線虫抵抗性台木あるいは交配親として利用する必要性が高まってきている。

一方で、日本国内のピーマンに寄生する線虫種に関してはほとんど現地調査が行われておらず、また、それらに対するピーマンおよびトウガラシの有する抵抗性との関係についてもほとんど明らかになっていない。ピーマンおよびその抵抗性台木における実効性ある線虫抵抗性育種を実施するためには、これらの線虫の種に関する知見が不可欠である。

そこで、本研究では、各ピーマン産地における加害線虫種の特定制とその種構成の調査を行った。また、各ピーマン産地における線虫抵抗性トウガラシに寄生可能な抵抗性打破系統線虫の発生頻度を調査し、将来におけるピーマン栽培における抵抗性台木利用を推進する上での問題を提起する。

材料および方法

1. ピーマン圃場における線虫種の同定

2010年5月から2012年6月にかけて、日本の主要ピーマン産地である宮崎県、鹿児島県、高知県および茨城県の50圃場の土壌を採取した (Table 1 ~ 3)。土壌は圃場の数地点において、表層約5 cmの土壌を除去した後、深さ5 ~ 20 cm程度から採取し、合わせて2 ~ 5 kg程度を採取した。土壌の採取と同時に線虫加害による被害根についても、根こぶ被害が著しく卵嚢が着生しているような根を1 ~ 数地点から採取した。採取した土壌をよく混和し、その20 gからベルマン法 (室温・3日間) によって線虫を分離した。採取した被害根は水道水の流水でよく水洗し、キムタオルで軽く水切りした後ハサミで適宜切断し、70% エタノールに浸漬して保存した。

ベルマン法によって分離された線虫は、まず生物顕微鏡下で観察し、有害線虫について形態的に識別した。分離された有害線虫がネコブセンチュウの場合は線虫種をPCR-RFLP法によって同定した。2期幼虫を実体顕微鏡下で1頭ずつ細針を用いて釣り上げ、濾紙押しつぶし法 (Iwahori *et al.*, 2000) によりDNAを抽出し、Harris *et al.* (1990) の方法によって、分離された線虫がサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949) か、アレナリアネコブセンチュウ (*M.*

¹ 〒861-1192 熊本県合志市須屋 2421 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター (NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, 2421 Suya, Koshi, Kumamoto 861-1192, Japan)

² 〒880-0212 宮崎県宮崎市佐土原町下那珂 5805 宮崎県総合農業試験場 (Miyazaki Agricultural Research Institute, 5805 Shimonaka, Sadohara, Miyazaki 880-0212, Japan)

* 責任著者 (Corresponding author), e-mail: iwahori@affrc.go.jp (現住所) 〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5 龍谷大学農学部 (Present address: Ryukoku University Faculty of Agriculture, 1-5 Yokotani, Seta Oe-Cho, Otsu, Shiga 520-2194, Japan)

Table 1. Species of root-knot nematodes identified from green pepper fields in 2010.

Prefecture	Field	n	J2		n	AF	
			Mi	Ma-Hon*		Mi	Ma-Hon*
Miyazaki	Miyazaki-city 1	12	12	0	-	-	-
	Miyazaki-city 2	21	21	0	17	17	0
	Miyazaki-city 3	16	16	0	12	12	0
	Miyazaki-city 4	18	18	0	19	19	0
Kagoshima	Kimotsuki-town	10	10	0	16	16	0
	Shibushi-city	12	12	0	14	14	0
	Kanoya-city	12	12	0	13	13	0
Kochi	Tosa-city 1	12	12	0	10	10	0
	Tosa-city 2	12	12	0	12	12	0
	Tosa-city 3	12	12	0	21	21	0
	Shimanto-city	12	12	0	17	17	0
	Shimanto-town	12	12	0	15	15	0
Ibaraki	Kamisu-city 1	15	15	0	21	21	0
	Kamisu-city 2	11	11	0	15	15	0
	Kamisu-city 3	12	12	0	13	13	0

Mi: *Meloidogyne incognita*, Ma-Hon: *M. arenaria* Honshu-type, n: number of samples, J2: 2nd-stage juveniles from soil, AF: adult females from roots, -: not performed, *: possibly *M. microcephala*.

Table 2. Species of root-knot nematodes identified from green pepper fields in 2011.

Prefecture	Field	n	J2		n	AF	
			Mi	Ma-Hon*		Mi	Ma-Hon*
Miyazaki	Miyazaki-city 1	21	21	0	10	10	0
	Miyazaki-city 2	20	20	0	14	14	0
	Miyazaki-city 3	20	20	0	14	14	0
	Miyazaki-city 4	20	20	0	11	11	0
	Kunitomi-town	13	13	0	11	11	0
	Saito-city 1	18	18	0	11	11	0
	Saito-city 2	14	14	0	11	11	0
	Saito-city 3	12	12	0	11	11	0
	Saito-city 4	20	20	0	11	11	0
	Kawaminami-town 1	20	20	0	11	11	0
	Kawaminami-town 2	19	19	0	12	12	0
	Kawaminami-town 3	19	19	0	11	11	0
	Kushima-city 1	12	12	0	11	11	0
	Kushima-city 2	12	12	0	11	11	0
	Kushima-city 3	12	12	0	12	12	0
	Nichinan-city	12	12	0	12	12	0
	Kitasato-town 1	12	12	0	12	12	0
	Kitasato-town 2	12	12	0	12	12	0
Kagoshima	Minamisatsuma-city	14	14	0	12	12	0
	Minamikyushu-city	15	15	0	-	-	-
	Higashikushira-town 1	20	20	0	25	25	0
	Higashikushira-town 2	20	19	1	11	11	0
	Higashikushira-town 4	17	17	0	12	12	0
	Kinko-town	18	18	0	12	12	0
	Shibushi-city	20	20	0	12	12	0
	Minamiosumi-town	20	20	0	11	11	0

Annotations are the same as in Table 1.

Table 3. Species of root-knot nematodes identified from green pepper fields in 2012.

Prefecture	Field	n	J2		n	AF	
			Mi	Ma-Hon*		Mi	Ma-Hon*
Miyazaki	Miyazaki-city	20	20	0	-	-	-
	Kawaminami-town	18	18	0	-	-	-
Kagoshima	Kanoya-city	17	17	0	-	-	-
Kochi	Tosa-city	20	20	0	-	-	-
	Shimanto-city	20	20	0	-	-	-
	Shimanto-town	18	18	0	-	-	-
	Kochi-city	19	19	0	20	20	0
Ibaraki	Kamisu-city 1	20	20	0	-	-	-
	Kamisu-city 2	19	19	0	-	-	-

Annotations are the same as in Table 1.

arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949) 本州型もしくはナンヨウネコブセンチュウ (*M. microcephala* Cliff and Hirschmann, 1984) か、ジャワネコブセンチュウ (*M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949) かを判別した。被害根より摘出した雌成虫についても同様に1頭ずつ種同定を行った。2期幼虫については各圃場から11～21頭、雌成虫については10～25頭を供試した。

2. ピーマン産地における抵抗性打破系統線虫の発生頻度

線虫種の同定で用いた土壌のうち、バルマン法で分離された線虫密度が高かった31圃場の汚染土壌 (Table 4) を抵抗性打破系統線虫の検定に使用した。検定植物として、線虫抵抗性トウガラシ3系統 (CM334, LS2341, PI322719) および対照としてミニトマト「プリッツ」を、それぞれ128穴セルトレイに播種し、無加温温室内で3週間育苗した後、直径9 cmのポリポットに移植した。その1週間後、各圃場の線虫汚染土壌20 gを、葉匙を用いて各検定植物ポット苗の株元に接種した。各汚染土壌に対し各トウガラシ系統あるいはミニトマトを1株ずつ供試した。約40日後、株をポットから取り出し、よく根を水洗した後、0.02%フロキシシンBで卵嚢を染色し、再びよく水洗した後、抵抗性トウガラシ根に形成された卵嚢数を株ごとに計数し調査した。

結果および考察

1. ピーマン圃場における線虫種

生物顕微鏡による観察で確認された有害線虫はネコブセンチュウのみであった。さらに、2011年度採取した鹿児島県東串良町2圃場より検出された線虫1頭がアレナリアネコブセンチュウ本州型あるいはナンヨウネコブセンチュウであったことを除いて、すべてサツマイモネコブセンチュウであった (Table 1～3)。この結果より、日本のピーマン圃場における加害線虫はネコブセンチュウであり、さらには防除の対象種をサツマイモネコブセンチュウに絞り込むことができる。したがって、ピーマ

Table 4. Frequency of resistance-breaking root-knot nematodes collected from green pepper fields.

Prefecture	Field	Number of egg masses per plant			
		Tomato	CM ¹	LS ¹	PI ¹
Miyazaki	Miyazaki-city 1	533	9	5	15
	Miyazaki-city 2	144	0	0	0
	Miyazaki-city 3	573	8	20	15
	Miyazaki-city 4	1,225	0	1	1
	Miyazaki-city 5	288	212	99	151
	Kawaminami-town 1	278	83	40	130
	Kawaminami-town 2	949	106	92	103
	Saito-city	95	0	0	0
Kagoshima	Kushima-city	34	0	0	0
	Nichinan-city	278	-	0	-
	Kimotsuki-town	603	3	1	4
	Shibushi-city	606	0	0	0
	Kanoya-city 1	589	275	282	406
	Kanoya-city 2	188	0	0	0
	Minamisatsuma-city	201	3	2	2
	Higashikushira-town	68	-	0	-
Kochi	Shibushi-city	70	-	0	-
	Minamiosumi-town	454	-	1	-
	Tosa-city 1	43	8	15	2
	Tosa-city 2	44	0	0	0
	Tosa-city 3	193	0	0	0
	Tosa-city 4	338	20	8	12
	Tosa-city 5	275	1	1	0
	Shimanto-city 1	290	254	171	261
Ibaraki	Shimanto-city 2	219	155	128	83
	Shimanto-town 1	33	0	0	0
	Shimanto-town 2	386	4	1	0
	Kamisu-city 1	117	0	0	0
	Kamisu-city 2	171	9	7	19
	Kamisu-city 3	168	0	0	0
	Kamisu-city 4	339	8	8	4

Populations with a high frequency of resistance-breaking nematodes are in shaded areas, -: not performed.

¹ Resistant breeding lines of chili pepper; CM: CM334, LS: LS2341, PI: PI322719.

ン栽培上の線虫対策として、本種に対する抵抗性を有するピーマンの育種を最も重要な課題とすることができる。

2. ピーマン産地における抵抗性打破系統線虫の発生頻度

感受性のトマトに着生した卵嚢数と比較し、線虫抵抗性トウガラシに高い割合で根こぶおよび卵嚢を形成したのは、宮崎県3圃場、鹿児島県1圃場、および高知県2圃場の計6圃場(19%)の汚染土壌を供試した場合であった(表4)。したがって、これらの圃場では抵抗性打破線虫が土壌中に高い割合で含まれ、供試した線虫抵抗性トウガラシをピーマンの線虫抵抗性台木として利用したとしても線虫被害回避効果はないことが予測された。抵抗性打破系統線虫の発生圃場率は現在のところさほど高くないが、今後発生地が拡大する恐れがあるので注意を要する。抵抗性打破系統線虫はピーマン圃場以外からも検出されていることから(岩堀, 未発表)、抵抗性打破の性質を有する線虫個体群は今後どのような圃場においても発生する可能性があると考えられる。

3. 総合考察

トウガラシには、これまで9つの線虫抵抗性遺伝子 *Me* (*Me1*, *Me2*, *Me3*, *Me4*, *Me5*, *Me7*, *Mech1*, *Mech2*) および *N* が知られており、それらの多くが第9染色体上にあることが知られている(Djian-Caporalino *et al.*, 2007; Fazari *et al.*, 2012)。本試験で使用したCM334は*Me7*, *Mech1* (Djian-Caporalino *et al.*, 1999)、PI322719は*Me3*, *Me4*を持つ(Djian-Caporalino *et al.*, 2001)ことが知られている。LS2341については詳細は不明であるが、その抵抗性遺伝子は第9染色体上にある(前畑ら, 2012)ことが明らかにされている。本試験の結果では、LS2341はCM334およびPI322719と同様の抵抗性反応を示し、類似した反応を示すことが明らかとなった。また、現地圃場の汚染土壌中線虫の抵抗性トウガラシに対する加害性調査により、これらの抵抗性遺伝子を打破する線虫系統が日本のピーマン栽培圃場において少なからぬ頻度で存在した。今後、抵抗性打破系統の線虫個体群の拡大が予測されることから、これらに対しても有効な抵抗性遺伝子の探索が、ピーマン栽培における抵抗性台木利用を推進する上で急務となるものと考えられる。

謝 辞

ピーマン圃場の汚染土壌採取に際し、宮崎県、鹿児島県、高知県、茨城県の関係者各位にお世話になった。この場を借りて篤く御礼申し上げる。本研究は農林水産省実用技術研究課題・新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業(22064)「ピーマン産地の連携による線虫抵抗性選抜システムの開発と土壌病虫害複合抵抗性台木品種の育成」(2010～2012年度)により行われた。

摘 要

ピーマンの主要産地である宮崎県、鹿児島県、高知県、茨城県の線虫汚染ピーマン圃場50カ所より土壌および被害根を採取し、これらよりネコブセンチュウの2期幼虫および雌成虫を分離し、PCR-RFLP法によって各圃場10～25個体を1頭ずつ同定した。その結果、同定された種は、1例を除きすべてサツマイモネコブセンチュウであった。また、上記の汚染圃場のうち31圃場について、これらの線虫汚染土壌20gを3系統の線虫抵抗性トウガラシ(CM334、LS2341、PI322719)に接種したところ、6圃場(19%)の汚染土壌において多数の根こぶおよび卵嚢が形成された。このことより、これらの圃場では抵抗性打破線虫が高い頻度で生息していると考えられた。

引用文献

- Barbary, A., Palloix, A., Fazari, A., Marteu, N., Castagnone-Sereno, P. and Djian-Caporalino, C. (2014) The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes *Me1* and *Me3*. *Theoretical and Applied Genetics* 127, 499–507.
- Djian-Caporalino, C., Fazari, A., Arguel, M. J., Vernie, T., VandeCastele, C., Faure, I., Brunoud, G., Pijarowski, L., Palloix, A., Lefebvre, V. and Abad, P. (2007) Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theoretical and Applied Genetics* 114(3), 473–486.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Fazari, A., Samson, M., Gaveau, L., O' Byrne, C., Lefebvre, V., Caranta, C., Palloix, A. and Abad, P. (2001) High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* 103, 592–600.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Januel, A., Lefebvre, V., Daubèze, A., Palloix, A., Dalmasso, A. and Abad, P. (1999) Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 99, 496–502.
- Fazari, A., Palloix, A., Wang, L. H., Hua, M. Y., Sage-Palloix, A. M., Zhang, B. X. and Djian-Caporalino, C. (2012) The root-knot nematode resistance *N*-gene co-localizes in the *Me*-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breeding* 131(5), 665–673.
- Harris, T. S., Sandall, L. J. and Powers, T. O. (1990) Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Nematology* 22, 518–524.
- Hendy, H., Dalmasso, A. and Cardin, M. C. (1985) Differences in resistant *Capsicum annuum* attacked by

- Meloidogyne* species. *Nematologica* 31, 72–78
- Iwahori, H., Kanzaki, N. and Futai, K. (2000) A simple, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-aided diagnosis method for pine wilt disease. *Forest Pathology* 30(3), 157–164.
- Lindsey, D. L. and Clayshulte, M. S. (1982) Influence of initial population densities of *Meloidogyne incognita* on three chili cultivars. *Journal of Nematology* 14, 353–358.
- 前畑 祐喜・杉田 亘・大山 暁男・長田 龍太郎 (2012) *Capsicum* 属の RILs および F2 集団におけるネコブセンチュウ抵抗性系統と抵抗性 QTL に近接する DNA マーカーとの関係. *九州農業研究* 75, 146.
- Thies, J. A. and Fery, R. L. (2000) Characterization of resistance conferred by the *N* gene to *Meloidogyne arenaria* Races 1 and 2, *M. hapla*, and *M. javanica* in two sets of isogenic lines of *Capsicum annuum* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125, 71–75.
- Thies, J. A., Mueller, J. D. and Fery, R. L. (1997) Effectiveness of resistance to southern root-knot nematode in ‘Carolina Cayenne’ pepper (*Capsicum annuum* L.) in greenhouse, microplot, and field tests. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122, 200–204.

受領：2014 年 12 月 25 日