関東地方の作物圃場におけるネグサレセンチュウの種構成ならびに ミナミネグサレセンチュウとその形態的類似種の分布境界

大類 幸夫¹・水久保隆之²

Species Composition of *Pratylenchus* (Nematoda: Tylenchida) in Crop Fields of Central Japan, along with an Observation of the Geographic Border Lying between *Pratylenchus coffeae* and its Closely Allied Species. Yukio ORUI¹ and Takayuki MIZUKUBO².

A survey of the *Pratylenchus* species was conducted in crop fields of Central Japan to show the species composition, and a geographic border of distribution lying between *Pratylenchus coffeae* and its closely allied species (*Pratylenchus* sp.). *Pratylenchus* species were found in 47 soil samples from the fields of soybean, red bean, corn, taro, potato, barley, and upland rice. Identification of the species was solely conducted on the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) bases in a partial region of ribosomal DNA. Five species of *Pratylenchus* were detected in this region. *Pratylenchus penetrans* was found most frequently from the crop fields examined (species composition rate: 72.3%), followed by *Pratylenchus* sp. (14.9%), *P. neglectus* (12.8%), *P. coffeae* (8.5%), and *P. vulnus* (4.3%). Species composition of *Pratylenchus* within the kind of crops is compared. *Pratylenchus coffeae* was detected from four sites in Tochigi, Saitama and Chiba Prefectures, and *Pratylenchus* sp. was found from seven sites in Tochigi and Saitama Prefectures: it is presumed that the geographic border of the two species lies between Tochigi and Saitama-Prefectures. *Jpn. J. Nematol.* 29(1): 1-6 (1999).

Key words: geographical distribution, identification, PCR-RFLP, *Pratylenchus*, ribosomal DNA.

緒 言

ネグサレセンチュウ (*Pratylenchus* 属) は、熱帯、亜熱帯および温帯地域に広く分布し、農業上重要な種を多数含んでいる(5)。本属の線虫は多くの植物の根に寄生し、根に障害を与え植物の生育を抑制する。本属線虫に寄生された根菜類は奇形となり、商品価値が著しく低下する。また、この線虫が *Verticillium* 菌などの植物病原菌の発病を助長することが知られている(9)。

ネグサレセンチュウの作物圃場での種構成や地理的分布の解明は、被害防止の基礎となる重要な情報を与える。ネグサレセンチュウの地理的分布の調査における種の同定は、これまで形態に基づいて行われてきた(3、6、14)。しかし、ネグサレセンチュウを識別する形態的特徴は少なく、計測値の変異幅は種間でしばしば重複することからその形態分類には、困難が伴う。最近、日本産ネグサレセンチュウの主要種が PCR-RFLP 法 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)

¹ Leaf Tobacco Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., 1900, Idei, Oyama, Tochigi 323-0808, Japan. 日本たばこ産業(株)・葉たばこ研究所。

² National Agriculture Research Center, Koannon-dai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan. 農林水産省・農業研究センター。

により簡易に同定できるようになった(8、11、12)。

PCR-RFLP法によりミナミネグサレセンチュウ (*Pratylenchus coffeae* (ZIMMERMAN)) と、それに形態的に酷似する北日本に広く分布する未記載種 (*Pratylenchus* sp.) はPCR-RFLP法で同定可能である(11)。*Pratylenchus* sp.は東日本のタバコ圃場から広い範囲に高頻度で検出され *P. coffeae* は全く検出されなかったが、沖縄、長崎、徳島県のタバコ圃場からは *P. coffeae* だけが検出されている(13)。これらの結果は、*Pratylenchus* sp.と *P. coffeae* の分布境界が関東地方かそれより西にあることを示唆している。

そこで、関東地方の作物圃場から採取したネグサレセンチュウをPCR-RFLP法で同定し、それらの種構成を調査したので、その結果を報告する。あわせて、*P. coffeae* と *Pratylenchus* sp.の分布境界について考察した。

材料および方法

供試土壌およびネグサレセンチュウの種の同定

1995年9月から1996年9月にかけて、東京、群馬、神奈川、埼玉、栃木、茨城、千葉の1都6県のダイズ、アズキ、トウモロコシ、サトイモ、ジャガイモ、ムギ類および陸稲の圃場の土壌を採取した。採取にあたっては、圃場の1箇所につき3～5点から深さ10～20 cmの土壌を合計約1～2 kg採取し、それらを1つにまとめて1試料とした。

線虫の種の同定法

採取土壌からベルマン法で線虫を分離し、光学顕微鏡下で吸入管(10)を用い、ネグサレセンチュウだけを発育ステージおよび雌雄に関係なく吸い上げて種の同定に供試した。供試個体数は1箇所につき10個体内外とした。種の同定は前報のPCR-RFLP法(11、12)に従って、1個体ごとに行った。鋳型DNAの調製は lysis buffer を用いる方法で行ない、FERRIS *et al.* (2) のプライマーセットでリボゾームDNA

(rDNA)の18Sと28Sの両遺伝子の一部を含む5.8S遺伝子および2つの internal transcribed spacer (ITS) 領域をPCR法により増幅した。その後、このPCR産物を2種類の制限酵素 *Alu* I と *Hinf* I でそれぞれ消化処理し、それぞれの断片パターンを2.0% MetaPhor agarose (FMC Corp.) ゲルの電気泳動で検出した。種の同定は、Fig. 1に示す *Alu* I と *Hinf* I の断片パターンに従って行った。制限酵素処理は2.5 μ l の増幅産物と0.5 μ l (8～12 U/ μ l) の制限酵素 (BRL Life Technologies) および7.0 μ l の緩衝液を混合し、37°Cの最適温度で4～6時間行なった。電気泳動は、室温にてMupid-2 (コスモ・バイオ㈱)装置を用い、50 Vの一定電圧で90～100分間行なった。電極用緩衝液は、TBE緩衝液を用いた。電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイド液 (0.5 μ g/ml) に浸漬して染色し、UVライトで増幅されたDNAを発光させ、ポラロイド型667フィルム (Polaroid Corp.)を用いて撮影した。

Fig. 1. Restriction fragment patterns with *Hinf* I and *Alu* I, discriminating the five *Pratylenchus* species, of the PCR-amplified ITS regions of the rDNA on a single individual on a 2.0% MetaPhor agarose gel. Nematodes: N, *P. neglectus*; P, *P. penetrans*; V, *P. vulnus*; C, *P. coffeae*; T, *Pratylenchus* sp.; M, BioMarker (BioVentures, Inc.).

Fig. 2. Sampling sites in crop fields of Central Japan where *Pratylenchus* species were detected.

結 果

ネグサレセンチュウが検出された 47箇所の調査圃場を Fig. 2 に示した。検出されたネグサレセンチュウの種は、キタネグサレセンチュウ (*P. penetrans* (COBB)), クルミネグサレセンチュウ (*P. vulnus* ALLEN & JENSEN), *P. coffeae*、ムギネグサレセンチュウ (*P. neglectus*

RENSCH) および *Pratylenchus* sp. の 5 種であった。この 5 種の各個体群の *Hinf* I および *Alu* I による RFLP パターンに種内変異はなかった。ネグサレセンチュウの種構成率をネグサレセンチュウが検出された 47箇所に対するその種が検出された圃場数の比率として、作物別の検出された種の構成を Table 1 に示した。

Pratylenchus penetrans は陸稲、サトイモ、ダイズ、ムギ類、ジャガイモおよびトウモロコシと最も多くの作物圃場から分離され、その種構成率は 72.3% と最も高く、広範囲に分布していた。*P. neglectus* はムギ類の圃場から分離されることが多く、ジャガイモおよび陸稲の圃場からも分離され、その種構成率は 12.8% であった。*P. vulnus* は埼玉および千葉県の大イモ圃場から分離され、種構成率は 4.3% であった (Fig. 3)。*P. coffeae* は、栃木、埼玉および千葉県の陸稲、サトイモの圃場から分離され、種構成率は 8.5% であった (Fig. 4)。*Pratylenchus* sp. は、栃木および千葉県の陸稲、ダイズおよびアズキの圃場から分離され、種構成率は 14.9% と高かった。

同一ほ場に 2 種のネグサレセンチュウが混生していた例は 8.5% あった。その組み合わせは、千葉県のサトイモ圃場 1 地点で *P. penetrans*

Table 1. Detection frequency of *Pratylenchus* species associated with various crop plants grown in Central Japan.

Kind of plant	Number of soil sample	Nematode species						Prefecture and number of soil samples habouring each <i>Pratylenchus</i> sp.
		<i>P. cof</i>	<i>P. sp.</i>	<i>P. pen</i>	<i>P. neg</i>	<i>P. vul</i>		
Soybean	19	•	3	14	•	2	Tochigi 7, Ibaraki 1, Gunma 1, Tokyo 1, Chiba 6, Saitama 3	
Upland rice	11	2	3	6	2	•	Tochigi 5, Ibaraki 4, Chiba 1, Saitama 1	
Taro	8	2	•	7	•	•	Tochigi 1, Tokyo 2, Chiba 3, Saitama 1, Kanagawa 1	
Potato	4	•	•	4	1	•	Tochigi 1, Ibaraki 1, Gunma 1, Tokyo 1	
Barley	3	•	•	2	3	•	Tochigi 1, Ibaraki 1, Gunma 1	
Corn	1	•	•	1	•	•	Tokyo 1	
Red bean	1	•	1	•	•	•	Tochigi 1	
Total	47	4	7	34	6	2		
Species composition								
rate(%)		8.5	14.9	72.3	12.8	4.3		

Number of soil sample: Number of soil samples habouring *Pratylenchus* spp. Nematode species: *P. cof*, *P. coffeae*; *P. sp.*, *Pratylenchus* sp.; *P. pen*, *P. penetrans*; *P. neg*, *P. neglectus*; *P. vul*, *P. vulnus*. Species composition rate(%): $100 \times (\text{number of soil samples habouring each } Pratylenchus \text{ sp.}) / 47$ (47: number of all soil samples habouring *Pratylenchus* spp.). •: not found.

Fig. 3. Distribution of *P. penetrans* (●), *P. neglectus* (○) and *P. vulnus* (■) in crop fields of Central Japan.

Fig. 4. Distribution of *Pratylenchus* sp. (●) and *P. coffeae* (○) in crop fields of Central Japan.

と *P. coffeae*、栃木県の陸稲圃場1地点で *P. coffeae* と *Pratylenchus* sp.、群馬と茨城県のム

ギ類とジャガイモの各圃場2地点で *P. penetrans* と *P. neglectus* であった。

考 察

Pratylenchus penetrans が多犯性であることはよく知られている(1、3、5)。この種は、サトイモには極めて低い程度で、イネ、ムギ類、アズキ、ジャガイモおよびトウモロコシでは低い程度で、またダイズでは中程度でそれぞれ寄生するとされる(1)。本調査でもダイズ、陸稲、サトイモ、ムギ類、ジャガイモおよびトウモロコシの各圃場から検出された。*P. penetrans* は関東地方に広く分布し、調査したほとんどの作物に高頻度で寄生しているため、この地域で防除上最重要視すべき線虫である。

Pratylenchus neglectus は、ダイズ、アズキなどのマメ科、コムギ、トウモロコシなどのイネ科に寄生する傾向があり、ジャガイモなどのナス科では、侵入はしても褐変程度が低い(14)。本調査では、この種は主としてムギ類の圃場から検出され、陸稲、ジャガイモの圃場からも検出されたが、好適な寄主植物とされるマメ科の圃場からは検出されなかった。これらのことから、関東地方での分布は比較的狭いものと考えられる。

Pratylenchus vulnus の畑地での検出例はイチゴからのものが多いが(3、15)、一戸ら(4)は千葉県のダイズおよびベッチの圃場からこの種を検出している。本調査でも、埼玉および千葉県のダイズ圃場から検出されたが、検出頻度は低く、関東地方の作物圃場での分布は狭いものと考えられる。

東北地方の6県および関東地方の栃木、茨城、千葉の3県では、タバコ圃場から *Pratylenchus* sp. が高頻度で検出されたが、*P. coffeae* は全く検出されなかった(13)。本調査では、*P. coffeae* は栃木県小山市、千葉県松戸市、埼玉県鷲宮町および大宮市から検出され、それよりも北の調査圃場では、*Pratylenchus* sp. が高頻度で検出された。*P. coffeae* および *Pratylenchus* sp. の生

息境界は、これらの結果から栃木県と埼玉県の間境付近にあると推定される。*P. coffeae* および *Pratylenchus* sp. は、調査圃場が少なかったこともあり、神奈川県、東京都では検出されなかった。今後の詳細な調査が必要であるが、少なくとも *P. coffeae* は温暖地域に、*Pratylenchus* sp. は寒冷地域にそれぞれ分布しており、これらの2種は気候あるいは温度帯で棲み分けしているように見える。

Pratylenchus coffeae のインドネシア産基準個体群と熊本県産の個体群は PCR-RFLP 法で同一の泳動パターンを示しており、熊本県産の *P. coffeae* 個体群と北日本の *Pratylenchus* sp. の個体群との交雑によって得られた F1 は十分な妊性を持たなかったことから、*Pratylenchus* sp. と *P. coffeae* の間には不完全な生殖的隔離があり、両者は別種であると考えられている(7)。

Pratylenchus sp. と *P. coffeae* は形態では識別が難しいので(11)、前者はこれまでの調査で *P. coffeae* として扱われてきた可能性がある。*P. coffeae* が北海道を除く日本全国に広く分布し、世界的な傾向からみれば冷涼な地帯に進みすぎているという後藤(3)の指摘は、冷涼な地帯から検出された *P. coffeae* は、*Pratylenchus* sp. の誤認であったと考えれば矛盾なく説明できる。

陸稲圃場からは *P. coffeae* および *Pratylenchus* sp. が検出されることから、陸稲は両種の共通の寄主植物と思われる。ダイズおよびアズキの圃場からは *Pratylenchus* sp. が、サトイモ圃場からは *P. coffeae* とどちらかの一方の種が検出されており、これらの作物が両種共通の寄主植物であるかどうかについては今後検討が必要である。

P. coffeae および *Pratylenchus* sp. の2種を識別し、寄主植物や有効積算温度などの生理・生態的特性を明らかにしてゆくことは、両種とも検出頻度が高い種であるだけに防除対策上重要である。

摘 要

関東地方の作物圃場におけるネグサレセンチュウの種構成、およびミナミネグサレセンチュウとその形態的に類似する未記載種(*Pratylenchus* sp.)の分布境界を明らかにする目的で調査した。ネグサレセンチュウは、ダイズ、アズキ、トウモロコシ、サトイモ、ジャガイモ、ムギ類および陸稲の圃場由来の47箇所の土壌サンプルから検出された。種の同定は、リボゾームDNAの一部領域のPCR-RFLP法に基づいて1頭ごとに行った。この地域からは5種のネグサレセンチュウが検出され、キタネグサレセンチュウは多くの作物圃場から高頻度(種構成率:72.3%)で検出され、次いで *Pratylenchus* sp. (同率:14.9%)、ムギネグサレセンチュウ(同率:12.8%)、ミナミネグサレセンチュウ(同率:8.5%) およびクルミネグサレセンチュウ(同率:4.3%)の順に検出された。作物ごとにネグサレセンチュウの種構成を比較した。ミナミネグサレセンチュウは栃木、埼玉および千葉県の4箇所から検出され、*Pratylenchus* sp. は栃木および埼玉県の7箇所から検出されることから、この2種の地理的分布境界が栃木および埼玉県の県境にあると推定された。

引用文献

- 1) 近岡一郎 (1979) キタネグサレセンチュウ (*Pratylenchus penetrans*) の寄主植物. 日本線虫研究会誌 9, 49-53.
- 2) FERRIS, V. R., FERRIS, J. M. & FAGHIHI, J. (1993) Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. Fundam. Appl. Nematol. 16, 177-184.
- 3) 後藤昭 (1974) 本邦におけるネグサレセンチュウ *Pratylenchus* spp. の地理的分布. 九州農業試験場報告 17, 139-224.
- 4) 一戸 稔・中園和年・岡本好一 (1963) 牧草・飼料作物の線虫. 植物防疫 17, 449-452.
- 5) LOOF, P. A. A. (1991) The family Pratylen-

- chidae THORNE, 1949. In: *Manual of Agricultural Nematology*. (W. R. NICKLE, ed.) Marcel Dekker Inc., New York, 363-421.
- 6) 真宮靖治 (1969) 国有林苗畑における植物寄生線虫の分布—東日本の苗畑について—. 林業試験場研究報告 **219**, 95-119.
- 7) MIZUKUBO, T. & HANADA, K. (1997) Comparative infectivity and fertility in RFLP phenotypes of *Pratylenchus coffeae* on sweet potato. *J. Nematol.* **29**, 594 (abstract).
- 8) MIZUKUBO, T., ORUI, Y. & MINAGAWA, N. (1997) Morphology and molecular characteristics of *Pratylenchus japonicus* (RYSS, 1988) n. stat. (Nematoda: Pratylenchidae). *ESAKIA* **37**, 203-214.
- 9) 百田洋二 (1988) 植物寄生線虫とバーティシリウム病. 植物防疫 **42**, 10-13.
- 10) 中島三夫 (1959) 便利な線虫実験器具について. 植物防疫 **13**, 36.
- 11) ORUI, Y. (1996) Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Appl. Entomol. Zool.* **31**, 505-514.
- 12) ORUI, Y. & MIZUKUBO, T. (1999) Discrimination of seven *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Appl. Entomol. Zool.* **34**, 205-211.
- 13) 大類幸夫・水久保隆之 (1999) 東日本のタバコ畑におけるネグサレセンチュウの地理的分布. 応動昆 **43**, 75-79.
- 14) 山田英一 (1968) ムギネグサレセンチュウの寄主作物について. 北日本病虫研年報 **19**, 98.
- 15) 山田英一・高倉重義 (1995) 北海道の農耕地におけるネグサレセンチュウの種類とその分布 第2報 分布並びに各種作物収穫期前後の線虫密度. 北海道立農業試験場集報 **51**, 19-29.

(受領：1998年9月4日)