

6. キャベツ・
てんさい・はくさい・
ほうれんそう

9. シストセンチュウ類

①ジャガイモシストセンチュウ：*Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens

②ジャガイモシロシストセンチュウ：*Globodera pallida* (Stone) Behrens

③テンサイシストセンチュウ：*Heterodera schachtii* Schmidt

※ シストセンチュウは植物の根に寄生するセンチュウで、雌成虫が自らの体内に産卵し、乾燥等過酷な環境でも生き残ることができるシストを形成することが特徴である。シストは非常に小さく（図1）、色も砂粒と変わらないため、土壌中にあると見つけにくい。宿主植物の根から分泌される物質に反応してシスト内の卵がふ化し、幼虫がシストから出て、根に寄生する（図2）。シストセンチュウは調査方法が同じなので、ここではジャガイモシストセンチュウ（以下「Gr」という。）、ジャガイモシロシストセンチュウ（以下「Gp」という。）、テンサイシストセンチュウ（以下「Hs」という。）をまとめて記述する。

ア 調査

【調査対象植物】

- 1) Gr及びGp：馬鈴しょ
- 2) Hs：キャベツ、テンサイ、ハクサイ、ブロッコリー又はホウレンソウ

【調査時期】

- 1) Gr及びGp：植付け後2か月以降の生育期間中に年1～2回（1回の場合は植付け後3か月以降）。
- 2) Hs：播種又は定植後1か月以降の生育期間中（夏～秋）に年1回実施。

※なお、調査時期があまりに遅くなると全ての雌成虫がシストになってしまい、株を抜き取ってもシストと土壌の区別がつかなくなるおそれがある。

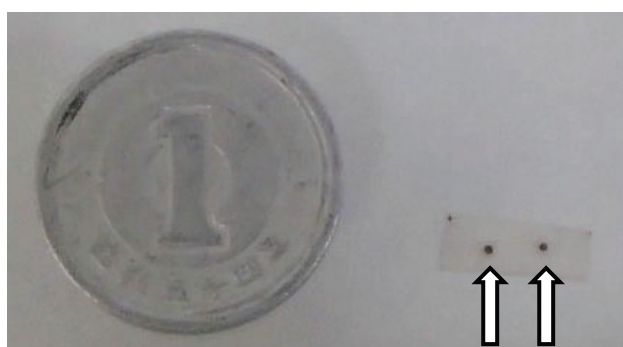


図1 Grの大きさ（植物防疫所原図。以下、特記が無い場合は植物防疫所原図。）
シストは非常に小さいので、注意すること

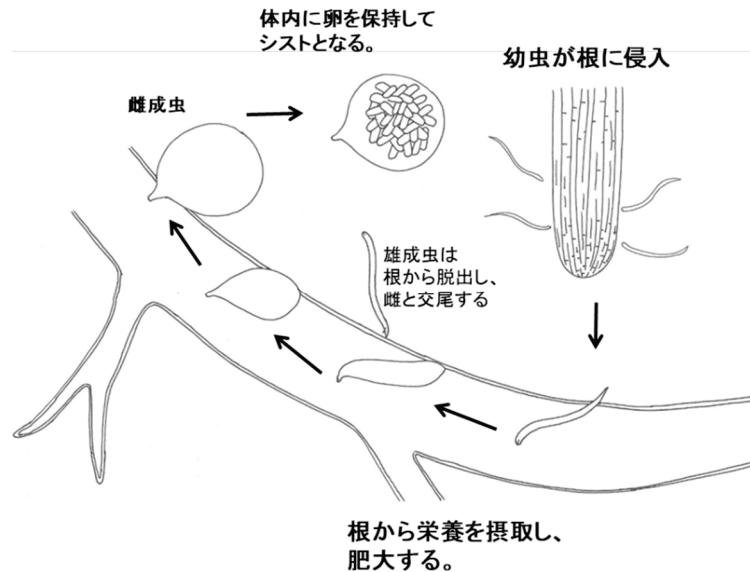


図2 シストセンチュウ Heteroderidae科 (*Globodera*属、*Heterodera*属など) の生活環

【調査方法及び調査内容】

- 1) 調査は、上記の調査対象植物の中から選定した上で、調査地点を設定する。なお、調査地点は各都道府県内で偏りが生じないように留意する。
- 2) ほ場内全体を見まわし、地上部の萎凋、下葉を中心とした黄化、枯死などの異常の有無を観察する(図27、28、31)。この場合、遠くから俯瞰的に観察し、近づいて異常の有無を確認する必要はない。
 なお、シストセンチュウの場合、ほ場内の被害株の分布がパッチ状になることが多い(図27)。ただし、シストセンチュウは侵入から作物に被害が出るまでに5年以上かかり、発見までに長期間を要することから、その間にはほ場全体に被害株の分布が広がってしまっている場合もある。
- 3) 異常株があった場合は、可能であれば地下部(根、塊茎等)ごと植物体を抜き取り、地下部に0.5ミリ程度の白色～黄色(図29、32、33、34、37。一般的にGrの雌成虫は黄色、HsやGpは白色を呈す。)の雌成虫や褐色のシスト(図35)が付着していないかを目視で調査する(以下「植物検診」という。)。植物検診が難しい場合には、参考1に記載の土壌検診を実施する。
- 4) 寄生が疑わしい場合は、寄生の様子等をデジタルカメラ等で撮影した上で、細い根ごと採取し、管ビン等に封入し、持ち帰る。

【調査に当たっての留意事項】

- 1) 生育不良は、ウイルスや根こぶ病その他病菌、肥料不足、排水不良による可能性もあるので、植物検診又は土壌検診を実施し、シストセンチュウによるものかどうか確認すること。地上部の被害だけでは判別できない。

- 2) 植物検診を実施する場合、株をシャベルやくわ等で掘り上げるが、掘り上げる際に乱暴に扱うとシストが脱落・散乱してしまうので慎重に行う（図3）。掘り上げた株を土壌ごと静かに地面に置き、まずは根回りの土壌にシストが無いか確認し、その後、根の土壌を静かに除きながら、根にシストセンチュウが寄生していないかを調査する。



図3 シャベルで土壌ごと静かに掘り上げる。

- 3) 根に寄生している状態（生きた状態）の雌成虫は、表面に艶があるので、他の類似物質と見分けがつくが、ネダニ類はシストと同じような艶があるので、注意が必要（図12、13）。また、Hsの雌成虫は土壌をまとっている場合があり、見分けが難しいときもある。疑義があれば持ち帰り、実体顕微鏡下で観察する。なお、HsやGpは白い（図33、38）が、Grは黄色（図34）になる時期がある。また、雌成虫が成熟してシストになると茶褐色になり、土壌と区別が付きにくくなる点に注意する。

根に発生する病害虫では、シストセンチュウの他に根こぶ病やネコブセンチュウ類がある。キャベツの根こぶ病（原因菌：*Plasmodiophora brassicae*（原生生物の仲間））の場合、主根や支根が肥大し根こぶ（数cm程度）を形成するが、シストセンチュウ類はこぶは形成しない。ネコブセンチュウ類（*Meloidogyne* spp.）の場合は根の一部が1～数mm程度盛り上がる小さなこぶを形成し、センチュウは其中で成長する。シストセンチュウの場合はこぶは形成せず、根に直接ごく小さな（0.5mm程度）の雌成虫あるいはシストが付着しているので、区別は極めて容易である。

（参考1）土壌検診

シストセンチュウの検出方法として、ほ場の土壌を採取し、篩を用いてシストを分離する土壌検診という方法がある。

- ① ほ場を8×8（又は16×16）歩（=5～10m）の間隔で縦横に線を引き（グリッドを設定）、その交点の土壌10g（スプーンで軽く掘って地表から5～10cmの深さの土壌）を採取する（図4）。なお、圃場に2歩×2歩入った地点から土壌採取を開始する。ほ場全体としては、5,000㎡あたり、200点程度（最大400点程度）採取することになる（採取量はほ場当たり1～3kg）。また、土壌採取地点をW字型とした簡便な方法（図5）も8×8歩法と同様の結果が得られている（開始地点は上記と同様、2歩×2歩入った地点から。）。なお、5点法（ほ場の四隅及び中央部で土壌採取する方法）は、ほ場を面で検査できないので、推奨しない。

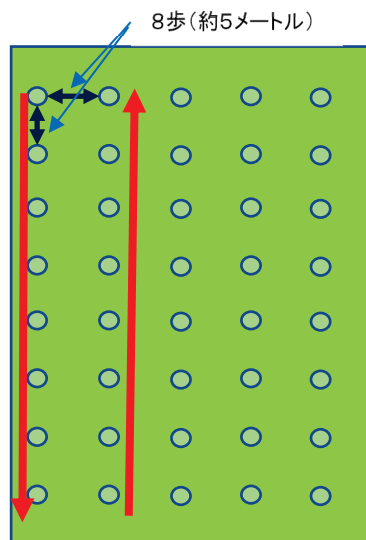


図4 8×8歩法

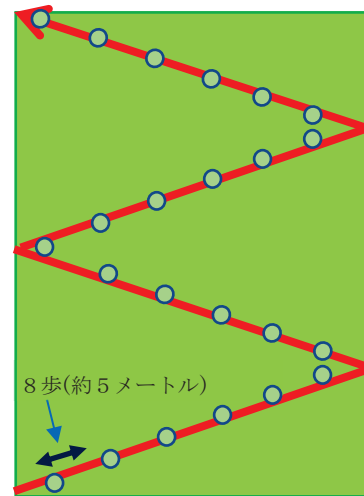


図5 W字法

- ② 採取した土壌は二重にした厚さ0.03mm以上のポリ袋に入れてよく混和し、持ち帰る。長期保存する場合は冷暗条件に置いておく。
- ③ 新聞紙を敷いたバットに土壌をなるべく平らに広げて、さらさらになるまで十分乾燥させる（土塊の中に湿り気があるとシストが十分乾燥せず、検出できない可能性があるため、大きな塊は砕いておく。）
- ④ 十分乾燥した土壌から200gをとり、大型ビーカーに水とともに入れ、よくかき混ぜる。なお、土塊中にシストが含まれていることがあるため、スプーンなどを使って小さな土塊まで残さず完全に潰す。
- ⑤ 20～30秒程度静置すると、砂礫等重いものは沈み、乾燥したシストは夾雑物とともに浮上する。
- ⑥ 浮上したシスト及び夾雑物を、16メッシュを上、60メッシュを下に重ねた篩に流し込む。シャワーの水流を使い、シストが含まれている可能性のある夾雑物を下の篩に落とし、大きな夾雑物を濾す（これら手順は、生きたシスト又は第2期幼虫が水道に流れ外部に分散しないよう鍋等の容器の中で行い、容器内に流れ出た水は作業後煮沸する。）。

⑦ 下の篩に集められたシストが含まれている可能性のある夾雑物を小さなビーカーや計数皿（ろ紙を用いてろ過してもよい。）に移し、実体顕微鏡で観察し、シストの有無を調べる。

※シストを分離する専用機材としてフェンウィック装置があるが、⑥で記載したような生きたシスト、第2期幼虫の分散防止の対策が出来た状況下での使用に限られる。

※土壌検診は、ある程度の発生密度でないと（シスト数が10,000m²当たり100万個が検出限界）、検出することが難しいとされている。植物検診についても同様に検出限界がある。

（参考2）カップ検診

Gr及びGpの検診方法として、小さな馬鈴しょ塊茎（小イモ）を土壌と一緒に透明なプラスチックカップ等に入れ、カップ内で発根させ、その根に寄生したシストセンチュウを検出するカップ検診法（奈良部他(2007)）という方法がある（図6、7）。この方法は、シストセンチュウを検出するために2～3か月かかること、小イモを準備する必要があるという問題点がある反面、だれでも簡便に実施でき（北海道では農協のほか、農家自身が実施している地域もある。）、カップ側面及び底面から肉眼でシストセンチュウを確認することができること、生きたシストセンチュウを検出できること等の利点がある。

- ① ほ場から上述（参考1）の①と同様に土壌を採取する。
- ② 100ml（又は250ml）の透明のプラスチックカップ、15g（250mlカップの場合は25g）程度の芽出しした小イモ（Gr及びGp感受性品種）を用意する。
- ③ 計量スプーン等を使って50ml（250mlカップの場合は125ml）の土壌をカップに詰める。芽を下にして小イモを土壌に埋め（小イモの上部が土壌から出ても構わない。）、蓋をする。1ほ場ごとに5カップ（5反復）検診する。



図6、7 小イモをセットしたカップ

- ④ 計量スプーンは土壌を採取したほ場が変わるごとに交換（又はアルコールで洗浄）する。
- ⑤ 小イモを設置したカップは、室温（18℃が最適だが、平均14～22℃であれば可）で、暗所で保管する。根がカップの裏面及び側面に回るようにするため、保管中は光を当てないことが重要であり、暗所での保管が必要。カップを段ボール箱に入れておけば、会議室等でも保管が可能。
- ⑥ 数日から2週間ごとに土の湿り状況を観察し、水分が不足しないよう、2～3mlほど給水する。蓋に給水用の穴を開けておけば、給水のたびに蓋を開ける面倒が省ける。
- ⑦ 早ければ5週目ごろから、白い雌成虫がカップの底面や側面の根に寄生していることが確認できる（図8）。特にGrの場合、雌成虫が黄色くなってくるので、見つけやすい。一方、Gpの場合は12週目でシストが検出される場合もあるので、3か月間、検診を続ける。
- ⑧ 検診に用いた土壌、器具等は、検診終了後、120℃で20分以上オートクレーブ（土壌以外は70℃で1時間以上の乾熱処理も可）で処理後、廃棄する。なお、シストの殻は分解しないので、絶対に土壌をほ場に戻さないこと。



図8 カップ側面でみられるGp雌成虫。（矢印がGpの雌成虫）

<参考文献>

奈良部他（2007）プラスチックカップを用いたジャガイモシストセンチュウの簡易検出・密度推定法。北海道農業研究成果情報（オンライン），入手先〈<https://www.naro.affrc.go.jp/org/harc/seika/h19/304.html>〉，（参照_2022-8-24）。

イ 同定診断手法

採取または送付された試料について、以下の手順で同定を実施する。

シストの形状はGr・Gpが球形、Hsはレモン型である（図9、10、11）。なお、Gr及びGpはシストの色のみで両種の区別はできない。

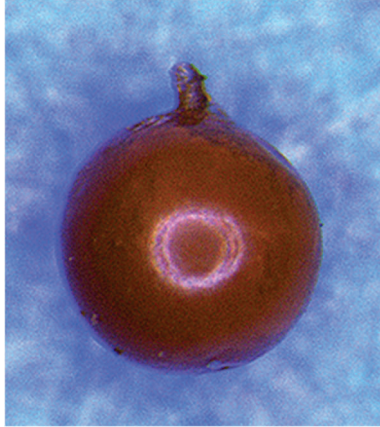
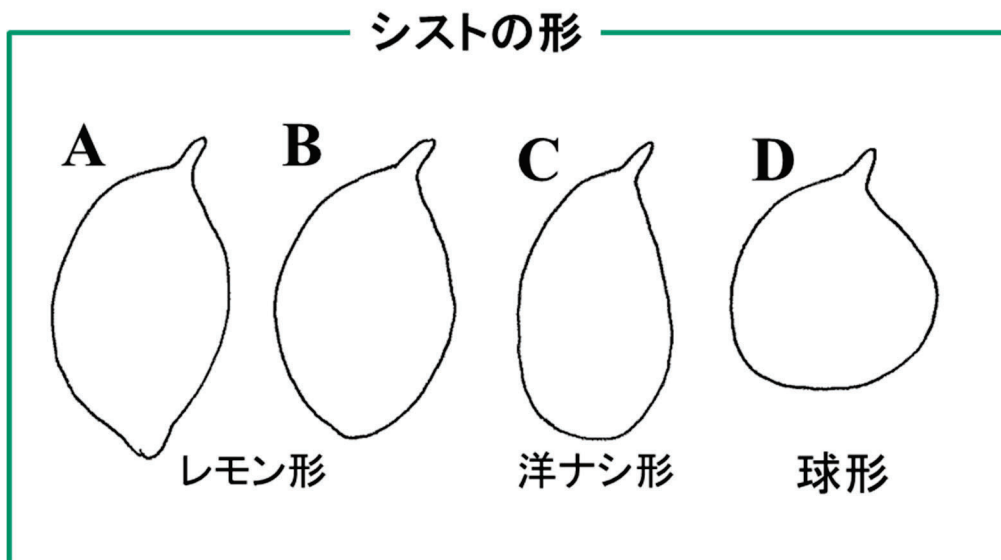


図9 Gr、Gp



図10 Hs



シストの形状 A: *Heterodera*属 B: *Cactodera*属
C: *Punctodera*属と*Dolichodera*属 D: *Globodera*属

図11 シストの形状。

シストセンチウは属によってシストの形が異なる。

1) 顕微鏡観察

Gr、Gp、Hsともに同属の種は日本に分布しているが、調査対象植物に寄生する近似種は知られていないため、馬鈴しょに寄生していればGr又はGp、キャベツ、テンサイ、ハクサイ、ブロッコリー及びホウレンソウに寄生していればHsの可能性が極めて高い。

採集した疑義虫については、実体顕微鏡下で頸部や体表の様子を確認し、シ

ストセンチュウかどうか確認する。シストセンチュウであった場合は、形態（陰門、陰門錘などの形状）の観察又は2)の遺伝子診断を実施する。

シストに似たネダニが観察されることがあるが、ネダニの場合は脚があるので区別は容易（図 12、13）。また、昆虫等の卵であれば頸部や陰門錘は無い。

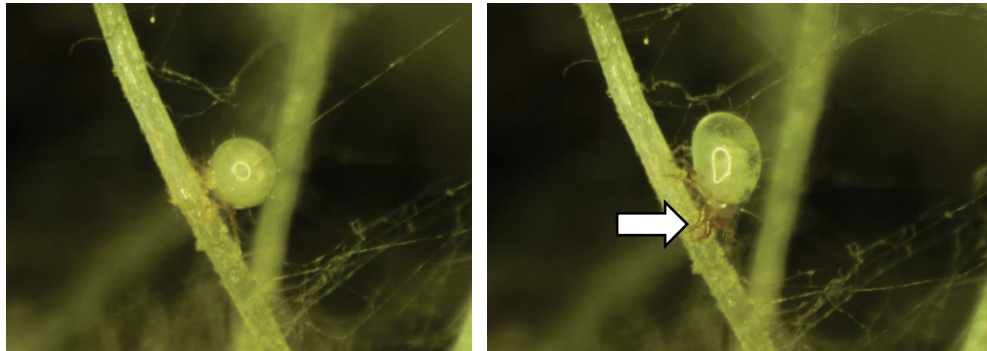


図 12、13 馬鈴しょの根に寄生するネダニの一種。

左の状態ではシストセンチュウと間違いやすいが、角度を変えて観察すると、右のように脚（矢印）が見え、ダニだと判る。

雌成虫が死んで体表が固く茶褐色になると、シストと呼ばれるようになる。

しかし、土壌中にはシストイドというシストに類似している物質（図 14）があり、土壌検診においてシストイドが検出されることがよくある。シストイドの多くは菌根の類と考えられている。シストイドは、表面の様子がシストと異なるほか、シストの頸部に当たる部分が非常に長い場合がある。表面の様子、陰門の有無を写真と比べながらよく観察する。陰門や肛門を傷つけないように注意しながらシストを割ると、シストであれば中から卵や第2期幼虫が出現することが多い（ただし、空シストの場合もある。）が、シストイドは殻が固い場合が多く、割っても卵や幼虫は出てこない。

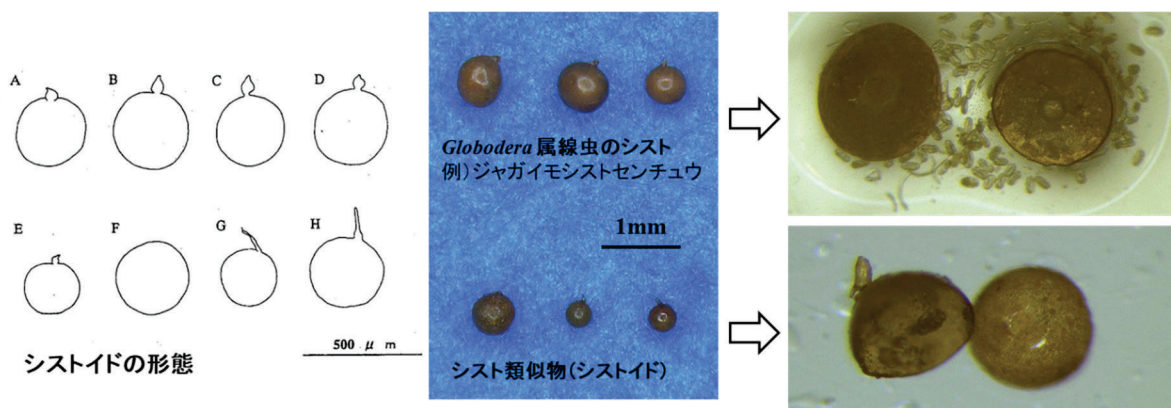


図 14 *Globodera* 属線虫のシストとシスト類似物（シストイド）との見分け方

Hs はシストに陰門錘があるので陰門の位置が比較的わかりやすいが(図 17)、Gr 及び Gp はシストが球形のため、陰門の位置が分かりにくい場合がある。

シストの形態による同定は熟練を要するため、線虫について専門知識を有する者に同定を依頼する。同定を依頼する際には、試料採取票(別記様式)を試料に添付する。

なお、参考までにシストでの同定方法を記載する。

Gr 及び Gp の場合、陰門及び肛門周辺の形態で種を区別するので、シストの陰門付近(図 15)を実体顕微鏡下で切り取り、プレパラートにして、生物顕微鏡(高倍率)で観察する。会陰部には陰門盤とその内側に陰門窓がある。また、陰門から数十 μm 離れたところに肛門がある(図 16)。陰門窓の直径(a)と陰門窓の端から肛門までの距離(b)の割合($b \div a$: グラネック値という。)が Gr は 3.0 ~ 4.5、Gp は 1.2 ~ 3.5(通常 3 以下)である。なお、*Globodera* 属は種によりシストの陰門盤と肛門の間のクチクラの隆起の数や長さが異なる他、第 2 期幼虫の形態も異なる。いずれも個体差(変異)があるので、多くの個体を観察する必要がある。

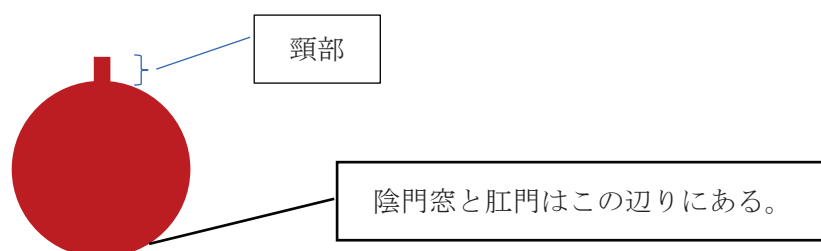


図 15 Gr や Gp のシストの模式図

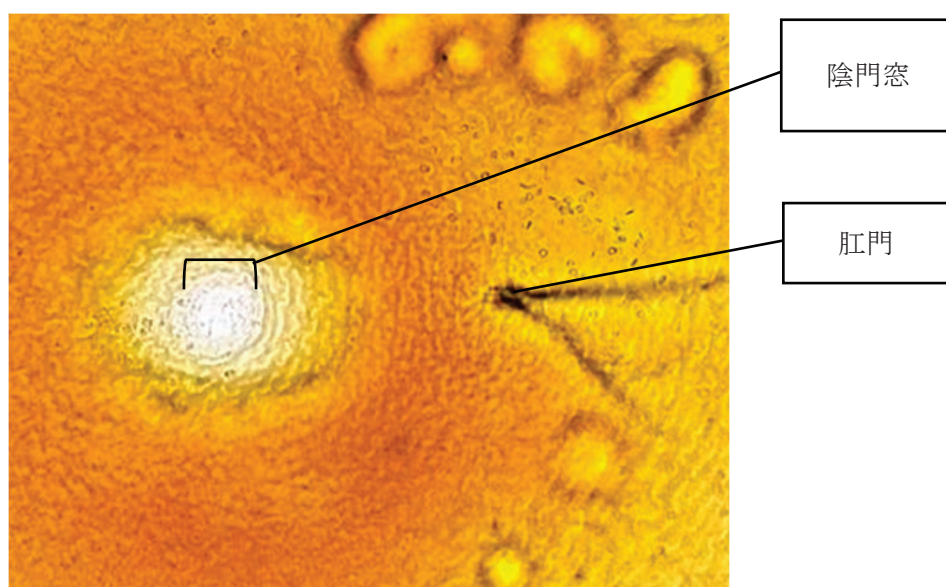


図 16 *Globodera* 属シストセンチウの陰門窓と肛門

Hs の場合、陰門錐の内部構造で他種と区別することができる。実体顕微鏡下で陰門錐（図 17）を切り出し、プレパラートにし（陰門錐は高さがあるので、スライドガラスとカバーガラスの間にカバーガラスの小片を挟み、陰門錐がつぶれないよう工夫する。）、生物顕微鏡（高倍率）で観察する。陰門錐内部に明瞭な下橋（図 18）があり（下橋長は $80\sim 120\mu\text{m}$ ）、下橋の両端は分岐し、下橋の周囲に奥歯型の珠胞という突起（図 19、20）が複数個並んでいる。なお、*Heterodera* 属は種により、下橋が発達しないもの、下橋の両端が分岐しないもの、珠胞が長楕円形のもの、密に並んでいるもの、珠胞が無いものなどがある（図 21、22）。また、珠胞の形態は個体差（変異）があるので、多くの個体を観察する必要がある。

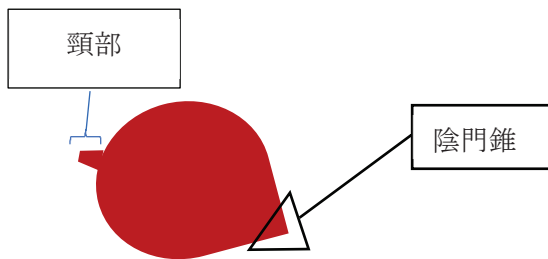


図 17 Hs のシストの模式図

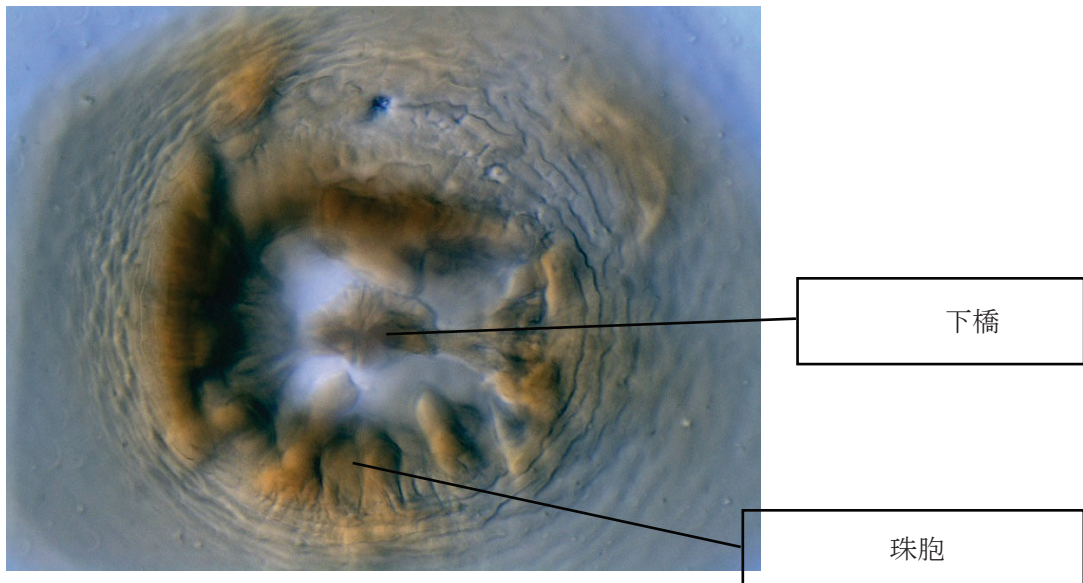


図 18 Hs 陰門錐内部の構造

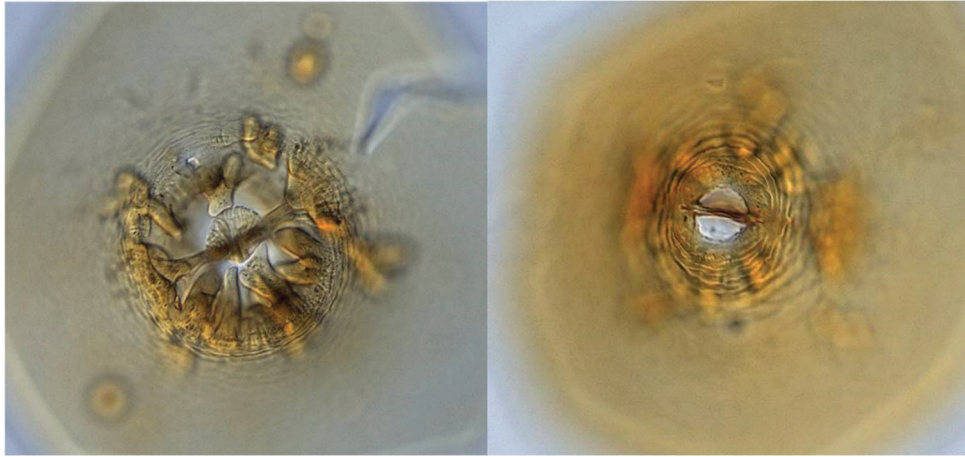


図 19 (左) Hs 陰門錐の頂点よりも下（陰門錐の中）にピントを合わせた図。
奥歯型の珠胞が並ぶ点の特徴。

図 20 (右) Hs 陰門錐の頂点にピントを合わせた図。

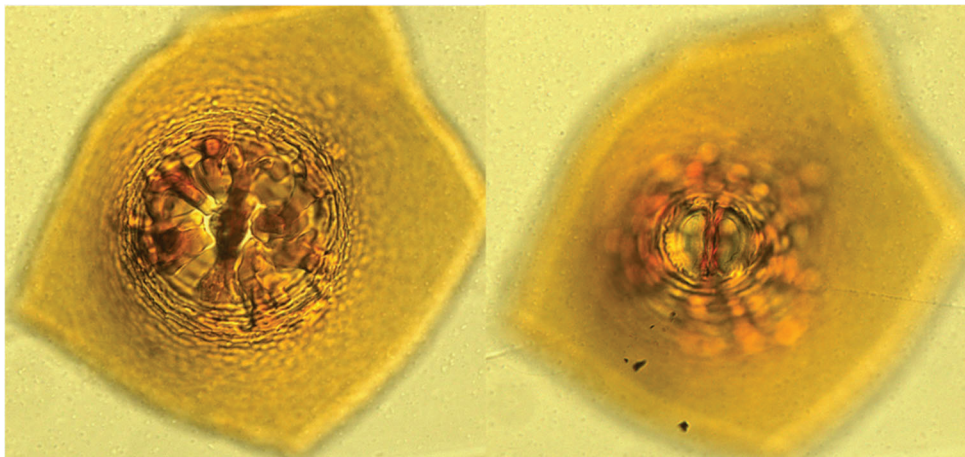


図 21 (左) ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) の陰門錐。

陰門錐の頂点よりも下（陰門錐の中）にピントを合わせた図。

Hs とは異なり、細長い珠胞が陰門錐内部に多数存在することが特徴。

図 22 (右) 陰門錐の頂点にピントを合わせた図。

*本種は国内に分布し、ダイズ、インゲン、アズキなどマメ科植物等を寄主とする。

2) 遺伝子診断

生きた状態の雌成虫（又はシスト内に卵や第2期幼虫）が見つかった場合、PCRにより同定することが可能である。

ア) Gr 及び Gp

遺伝子診断法については、農業・食品産業技術総合研究機構から「ジャガイモシストセンチュウ類2種の同時判別技術標準作業手順書」や「リアルタイムPCRによるジャガイモシストセンチュウ類の土壌検診法標準作業手順書」が公開されているので、詳細については当該手順書等を参照する。

「ジャガイモシストセンチュウ類 2 種の同時判別技術標準作業手順書」
<https://sop.naro.go.jp/document/detail/62> 「リアルタイム PCR によるジャガイモシストセンチュウ類の土壌検診法標準作業手順書」

<https://sop.naro.go.jp/document/detail/175>

イ) Hs

Hs 種特異的プライマーを用いたマルチプレックス PCR 及び PCR-RFLP による識別法 (Amiri et al. (2002)、Subbotin et al. (2010)) を紹介する。本法の場合、雌成虫 (又はシスト) 1 個体ずつ実施する必要がある。

(A) マルチプレックス PCR

○DNA 抽出

ここでは DNA 抽出キットを用いた核酸抽出法 (Tanaka et al. (2012) を一部改変) を例に挙げる。

- a) PCR チューブに調整した DNA 抽出バッファー (※) を $30\ \mu\text{l}$ ずつ分注。
(※キットに添付されている Enzyme solution: Lysis solution: TE (pH8.0) を 5:4:100 の割合で混合したもの)
- b) スライドグラス上に滅菌水 ($1\sim 2\ \mu\text{l}$) を滴下し、シストをその水の中に置く。シストの頭部付近をメス等で切断し、卵・幼虫を取り出す (通常、メスを入れると卵・幼虫が遊出する)。遊出した卵・幼虫を $1\sim 2\text{mm}$ 角に裁断した滅菌済ろ紙片で十分に押しつぶし、そのろ紙片を a) の DNA 抽出バッファーが入った PCR チューブに入れる。なお、コンタミ防止のため、ピンセット及びメスは一回使用するごとに 70%アルコールで拭き取り、ライター又はバーナーで火炎殺菌する。切断したシストの後端部はその後の形態調査に用いるため、水を入れた管ビン等で保管しておく。
- c) サーマルサイクラーを用いて、 60°C 20 分処理する。処理後は 4°C 又は -20°C で PCR に供するまで保存する。

○マルチプレックス PCR

シストセンチュウ共通プライマー (Sakai et al., 2019) 及び Hs 種特異的プライマー (Asamizu et al., 2022) を同時に用いて、ミトコンドリア DNA の C01 領域の一部を増幅する。前者で DNA 抽出の成否を、後者で Hs 由来遺伝子の有無を確認する。

a) プライマーの塩基配列

① シストセンチュウ共通プライマー

5. 8Sf2 : $5' -\text{CGGTGGATCACTCGGCTCGT}-3'$

28Sr : 5' -CTCGCCGTTACTAAGGGAATCCTCG-3'

② Hs 種特異的プライマー

Hs_C1f : 5' -GACTAATGAGGATTTATGGTACAC-3'

Hs_C2r : 5' -GTGCTACGACATAATAGGTATC-3'

b) プライマーミックスの調整

5.8Sf2	(10 μ M)	10 μ l
28Sr	(10 μ M)	10 μ l
Hs_C1f	(10 μ M)	40 μ l
Hs_C2r	(10 μ M)	40 μ l
		<hr/>
		Total 100 μ l

c) 反応液の調整

10 \times Ex Taq バッファー	1.0 μ l
dNTP mix (2.5mM each)	0.8 μ l
プライマーミックス	0.8 μ l
Ex Taq HS (5U/ μ l)	0.05 μ l
滅菌水	6.35 μ l
DNA 抽出液	1.0 μ l
<hr/>	
Total 10.0 μ l	

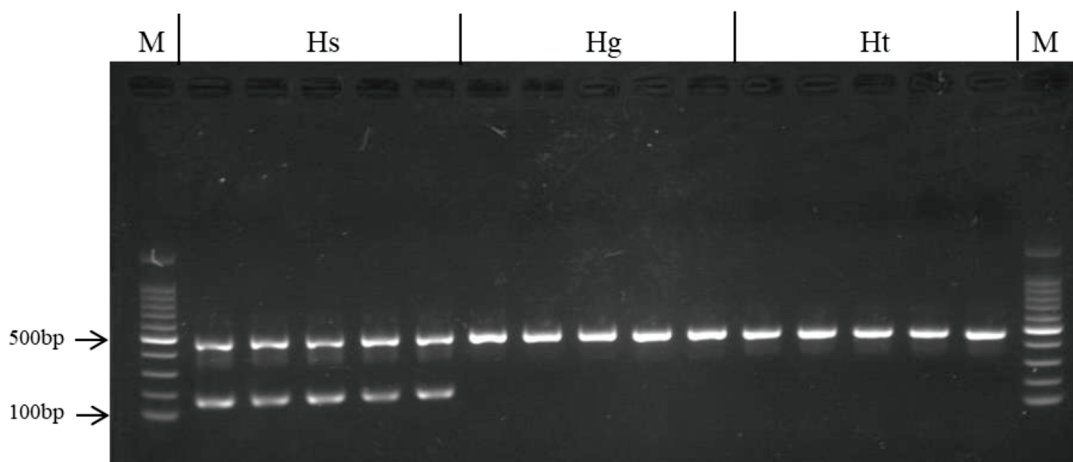
d) サーマルサイクラーを用いて以下の反応を実施 (Asamizu et al. (2022) を改変)。

95 $^{\circ}$ C \cdot 2 分 \rightarrow [95 $^{\circ}$ C \cdot 5 秒 \rightarrow 56 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒] \times 35 \rightarrow 15 $^{\circ}$ C

○電気泳動

a) PCR 産物 2.0 μ l と 6 \times ローディングバッファー 1.0 μ l をよく混合し、ゲルのウェルに入れ、両端のウェルに分子量マーカー 2.0 μ l を入れる。

b) 泳動を行う (2.0%濃度のアガロースゲルの場合、100V 約 40 分)。



M:分子量マーカー100bp

Hs:テンサイシストセンチュウ、Hg:ダイズシストセンチュウ、Ht:クローバーシストセンチュウ

- ・シストセンチュウ共通の増幅産物として約 450 bp 付近に明瞭な増幅バンドが確認できる。このバンドが増幅しない場合は、DNA 抽出又は PCR に問題があったことを示唆するため、検定不能として再検定を行う。
- ・Hs であれば約 160bp 付近に明瞭な増幅バンドが確認できる。約 160bp 付近のバンドがなく、約 450 bp 付近のバンドのみある場合は、Hs ではないシストセンチュウ種 (Hg や Ht 等) であることを示す。
- ・約 160bp 付近にごく薄い増幅が見られる場合は、鋳型の DNA が濃すぎることによる非特異反応が疑われる。この場合、抽出 DNA を希釈 (10~100 倍程度) して再度マルチプレックス PCR を実施するか、PCR-RFLP による識別又は塩基配列解析を行う。

(B) PCR-RFLP

○DNA 抽出

ここでは DNA 抽出キットを用いた核酸抽出法 (Tanaka et al. (2012) を一部改変) を例に挙げる。

- a) スライドガラス上に滅菌蒸留水を $2 \mu\text{l}$ 載せ、実体顕微鏡下で、蒸留水に雌成虫 1 個体 (幼虫や卵でも可) を入れる。その後、蒸留水が蒸発して虫体のみとなったら、ピンセットを用いて、約 1mm 角の滅菌ろ紙片で虫体を押しつぶす。
- b) 0.2ml または 0.5ml チューブに $10 \mu\text{l}$ の DNA 抽出バッファー (キットに添付されている Enzyme solution: Lysis solution: TE (pH8.0) を 5:4:100 の割合で混合したもの) を入れ、その中へ①のろ紙片を入れる
- c) サーマルサイクラー等で熱処理 (60°C、20 分) を行う。
- d) 滅菌水 90 μl を加えて混合し、使用時まで -20°C で保存する。

○PCR 1

- ・プライマー (Joyce et al. (1994))

TW81 (5' -GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3')

AB28 (5' -ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')

- ・反応条件 (Amiri et al. (2002) を改変)

94°C・2 分 → [94°C・30 秒 → 55°C・1 分 → 72°C・30 秒] × 35 → 4°C

・電気泳動

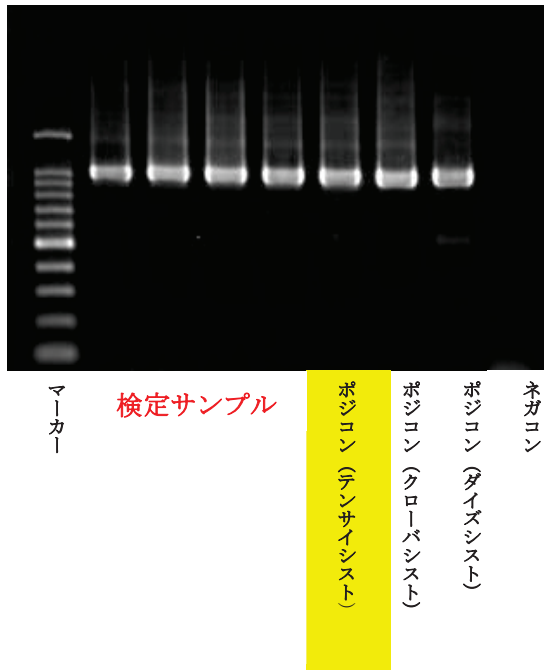


図 23 泳動パターン

○制限酵素処理

得られた PCR 産物を制限酵素 (*Mva I* (*BciT130 I*) 及び *ScrF I*) で反応 (37°C 4 時間) させ、再度電気泳動する (制限酵素が失活しないよう、反応液の調整は氷上で行う。)

- ・電気泳動：泳動パターン、制限酵素断片長を比較し、同定する。

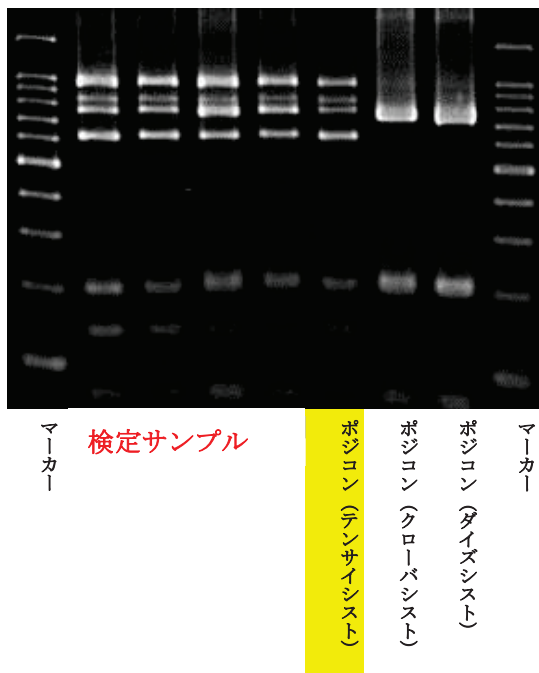


図 24 *Mva I* (*BciT130 I*) 処理の泳動パターン

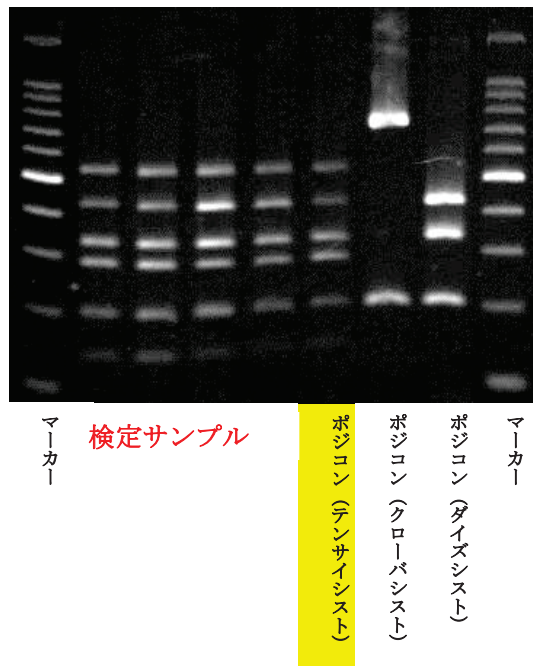


図 25 *ScrFI* 処理の泳動パターン

表 3 *Heterodera* 属シストセンチウの PCR-RFLP による制限酵素断片長*

	PCR産物		
	サイズ	<i>MvaI</i> (BicT130I)	<i>ScrFI</i>
テンサイシスト	1020	950, 810, 760, 620, 190, 140, 70	530, 430, 330, 290, 200, 140, 70
クローバシスト	1030	760, 200, 70	760, 200, 70
ダイズシスト	1030	760, 200, 70	430, 330, 200, 70

* 断片長のデータは Subbotin *et al.* (2010) および Amiri *et al.* (2002) からの引用。
 数値は一桁目を四捨五入し、一部は泳動パターンの原図から読み取った。
 バンドによっては薄くて確認しづらい時もあるので注意すること。

○PCR 2 (PCR 1 を改良)

- ・プライマー (Joyce *et al.* (1994) を改変)
 TW81m (5' -CGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGA-3')
 AB28 (5' -ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')

- ・反応条件 (Amiri *et al.* (2002) を改変)
 94°C・2分 → → [94°C・30秒 → 64°C・30秒 → 72°C・1分] × × 35 72°C・5分

- ・電気泳動(PCR 1 に同じ)

○制限酵素処理

得られた PCR 産物を制限酵素 (FastDigest *Alu I* (37°C、16 時間) および *Hinf I* で反応 (37°C、15 分~30 分) させ、再度電気泳動する (図 26)。制限酵素が失活しないよう、反応液の調整は氷上で行う。

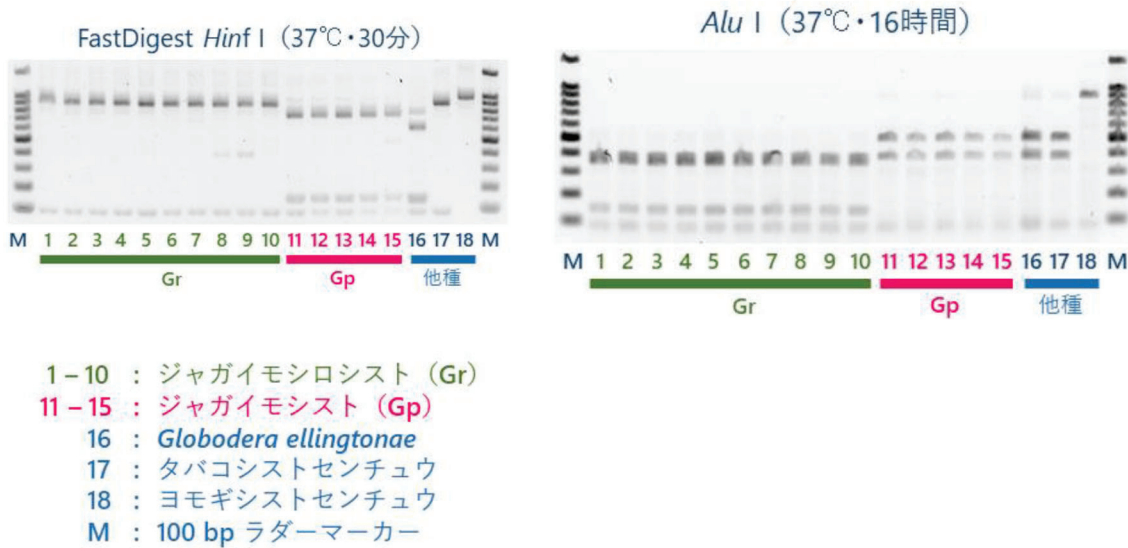


図 26 FastDigest *Alu I* (37°C、16 時間) および *Hinf I* で処理後の電気泳動パターン (防疫指針委託事業成果)

<参考文献>

- Subbotin, S. A. et al. (2010) Systematics of Cystnematodes (Nematoda: Heteroderinae), Nematology monographs and perspectives volume 8B.
- Amiri, S. et al. (2002) European Journal of Plant Pathology 108:497-506.
- Asamizu Erika, Satoshi Kitabayashi and Hideaki Iwahori (2022) A rapid method of DNA detection of the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, in infested field soil. Nematological Research Vol. 52 No. 1/2: 1-8.
- Sakai Hiromichi, Atsuhiko Kushida and Takashi Narabu (2019) Identification of the potato cyst nematodes based on two-step multiplex endpoint PCR with the dUTP/UNG system for carry-over prevention. Nematological Research Vol. 49 No. 2: 19-27.
- Tanaka Ryusei, Taisei Kikuchi, Takuya Aikawa and Natsumi Kanzaki. (2012) Simple and quick methods for nematode DNA preparation.

ウ 試料採取及び送付時の注意事項

生きたシストを送付する場合は、散逸しないよう、管ビン等に入れ、さらにポリ袋に入れるなど、厳重に封入する。遺伝子検査の場合は、アルコール液浸状態でも問題無く、かつ、シストが死滅しているため、理想的である（宅配便等で液浸標本を送付する場合は輸送業者に確認すること。）。土壌中のシストを送付する場合は、二重にした厚手のビニール袋に封入し丈夫な段ボール箱に入れるなどして、送付途中で散逸しないよう厳重に梱包する。

エ 被害写真等



図27 Gpの被害状況。ほ場内ではパッチ状（黒枠内）に被害株がある。



図28 Gpによる被害株。落花期には下葉が枯れ上がる。



図29 馬鈴しょの根に寄生しているGpの雌成虫及びシスト。

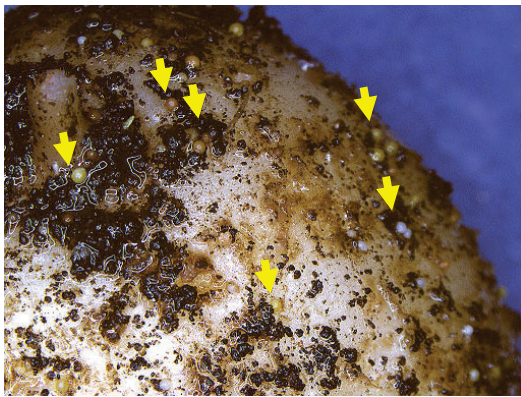


図30 馬鈴しょの塊茎に寄生しているシストセンチュウの雌成虫（矢印）。

発生密度が高いと馬鈴しょの塊茎にも寄生することがある。なお、矢印以外にも多数寄生しているのが見える。



図31 Hsの被害状況（左：健全、右：被害株）（長野県野菜花き試験場提供）

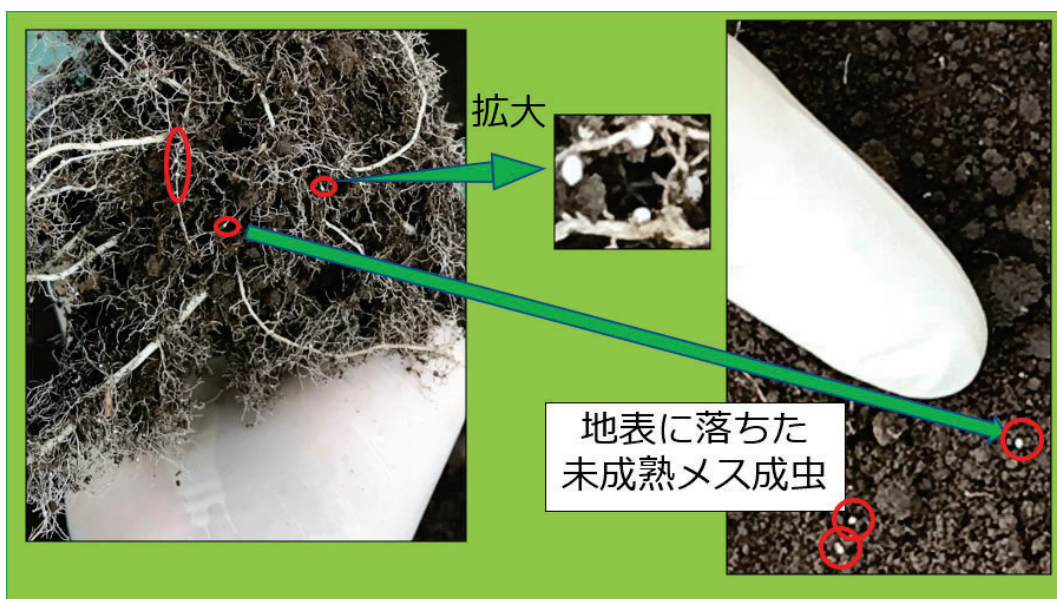


図32 キャベツの根に付着しているHsの雌成虫。(防疫指針委託事業成果)

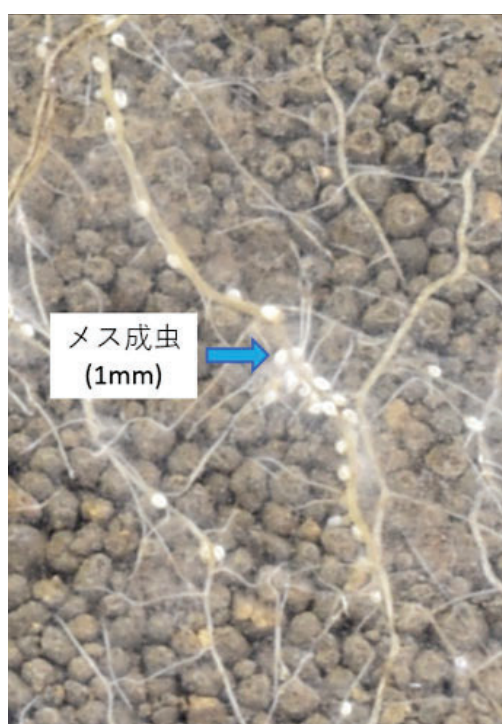


図33 試験容器内でのハクサイ根へのHsの寄生状況。(防疫指針委託事業成果)

オ 対象病害の解説

1) ジャガイモシストセンチュウ

学名：*Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975

英名：yellow potato cyst nematode、golden nematode

分布

アジア：インド、インドネシア、スリランカ、パキスタン、フィリピン、イスラエル、イラン、トルコ、レバノン

欧州：アイスランド、アイルランド、アゼルバイジャン、アルメニア、イタリア、ウクライナ、ウズベキスタン、英国、エストニア、オーストリア、オランダ、カザフスタン、キプロス、ギリシャ、キルギス、クロアチア、ジョージア、スイス、スウェーデン、スペイン、スロバキア、スロベニア、タジキスタン、チェコ、デンマーク、ドイツ、ロシア等

アフリカ：アルジェリア、エジプト、カナリア諸島、ケニア、南アフリカ共和国

北米：アメリカ合衆国、カナダ

中南米：アルゼンチン、エルサルバドル、グアテマラ、コスタリカ、チリ、ニカラグア、パナマ、ベネズエラ、ベリーズ、ペルー、ボリビア、ホンジュラス、メキシコ

大洋州：オーストラリア、ニュージーランド
宿主植物：アカザ属、ナス科（馬鈴しょ、トマト、ナスなど）

寄主植物：あかざ属及びナス科（馬鈴しょ、トマト、ナスなど）

形態：大きさ

シスト：体形はほぼ球形。茶褐色～褐色（図35、36）。シストの体長（頸部を除く。）は 0.45 ± 0.05 mm、体幅は 0.38 ± 0.06 mmである。陰門窓の直径は 19.0 ± 2.0 μ m、肛門から陰門窓までの長さ 66.5 ± 10.3 μ m、グラネック値 3.6 ± 0.8 。

雌成虫：体形は初めは紡錘形で、シストになる直前になると球形となり、体長・体幅ともシストとほぼ同じになる（図34）。

雄成虫：体形は糸状。体長 $890-1,270$ μ m、排泄口の体幅 28 ± 1.7 μ m、口針長 26 ± 1.0 μ m、尾長 5.4 ± 1.0 μ m、交接刺長 35 ± 3.0 μ m。

第2期幼虫：体形は糸状。体長は 468 ± 100 μ mである。排泄口体幅は 18 ± 0.6 μ m、口針長は 22 ± 0.7 μ m。尾長は 44 ± 12 μ m、尾端透明部長は 26.5 ± 2 μ mである。



図34 馬鈴しよの根に寄生しているGrの雌成虫

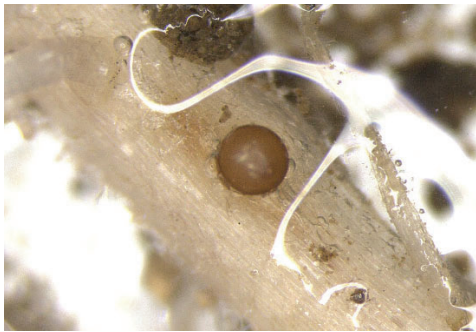


図35 馬鈴しよの根に付着しているGrのシスト

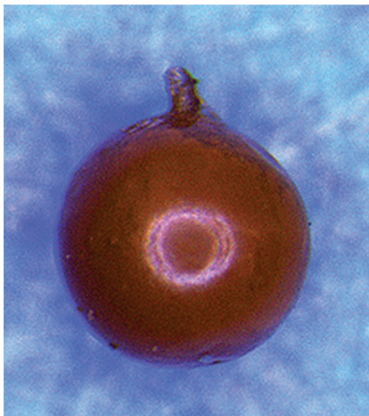


図36 Grのシスト

生態：

a) 繁殖様式

本種は雌雄が存在し有性生殖する。雌成虫は、200～500個程度の卵を産卵する。

b) 年間世代数

馬鈴しょでは、通常1作の間に1世代が経過するとされる。また、日本国内の研究では、恒温条件下で、土壌温度16℃で49～51日、22℃で37～39日で1世代を完了するとの報告がある。

c) シストの生存期間

*Globodera*属線虫のシスト内卵内幼虫は、硬化したシストと卵殻に包まれて、寄主植物がない場合などでは休眠状態となり、土壌中で15年以上生存が可能である。寄主植物の根から分泌されるふ化促進物質の刺激などにより、休眠が打破され、第2期幼虫がふ化する。シスト内卵内幼虫の年間平均減少率は、Grでは30%、Gpでは20%と見積もられている。

分散：

a) 自然分散

土壌中における線虫自身の移動は、第2期幼虫で最大でも1m程度である。また、汚染土壌では、表面が乾燥していると風により土壌とともに飛ばされたり、雨水・洪水によってシストが流されたりしてシストが移動分散する。汚染土壌が家畜類や野生の鳥獣類の足に付着して移動する場合もある。

b) 人為分散

線虫に寄生された馬鈴しょ塊茎、寄主植物地下部（苗等を含む。）、汚染土壌、汚染土壌が附着した植物・農業機械（トラクター等）・農機具・収穫用コンテナ・人の靴・車両（タイヤや跳ねた泥など）等の移動により、移動分散する。なお、本線虫は、ペルーから日本に輸入されたグアノ肥料内にシストが混入していたことで、日本国内に伝搬したとの報告がある。

防除：D-D剤、メチルイソチアネート等のくん蒸剤やオキシムカルバメート等の非くん蒸剤による化学的防除のほか、輪作や抵抗性品種、対抗植物を利用した耕種的防除、湛水や蒸気処理等の物理的防除が知られている。最近では、人工合成したふ化促進物質による防除の実証試験が行われている。

<参考文献>

令和元年度 国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業

事業報告書（令和2年3月13日）国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター

Globodera rostochiensis（ジャガイモシストセンチュウ）に関する病害虫リスクアナリシス報告書（令和3年2月3日版）農林水産省横浜植物防疫所

2) ジャガイモシロシストセンチュウ

学名：*Globodera pallida* Stone, 1973

英名：white potato cyst nematode、pale potato cyst nematode、pale cyst nematode

分布：

アジア：インド、パキスタン

中東：トルコ

欧州：アイスランド、アイルランド、アゼルバイジャン、アルメニア、イタリア、ウクライナ、ウズベキスタン、英国、エストニア、オーストリア、オランダ、カザフスタン、キプロス、ギリシャ、キルギス、ジョージア、スイス、スウェーデン、スペイン、ロシア等

アフリカ：アルジェリア、カナリア諸島、ケニア、モロッコ

北米：米国、カナダ

中南米：エクアドル、コスタリカ、コロンビア、チリ、パナマ、フオーランド諸島、ベネズエラ、ペルー、ボリビア

大洋州：ニュージーランド

(国内では現在、北海道の一部地域で発生が確認されており、当該地域において植物防疫法に基づく緊急防除を実施中。)

寄主植物：なす科（馬鈴しょ、トマト、ナスなど）

形態：

シスト：体形はほぼ球形。茶褐色～褐色（図39）。シストの体長（頸部を除く。）は 0.579 ± 0.07 mm、体幅は 0.534 ± 0.066 mmである。陰門窓の直径は 24.5 ± 5.0 μ m、肛門から陰門窓までの長さ 49.9 ± 13.4 μ m、グラネック値 2.1 ± 0.9 。

雌成虫：体形は初め紡錘形（図37）で、シストになる直前になると球形となり、体長・体幅ともシストとほぼ同じになる（図38）。

雄成虫：体形は糸状。体長 $1,198 \pm 104$ μ m、排泄口の体幅 28.4 ± 1.3 μ m、口針長 27.5 ± 1.0 μ m、尾長 5.2 ± 1.4 μ m、交接刺長 36.3 ± 4.1 μ m。

第2期幼虫：体形は糸状。体長は 486 ± 23 μ mである。排泄口体幅は 19.3 ± 0.6 μ m、口針長は 23.8 ± 1.0 μ m。尾長は 51.1 ± 2.8 μ m、尾端透明部長は 26.6 ± 4.1 μ mである。

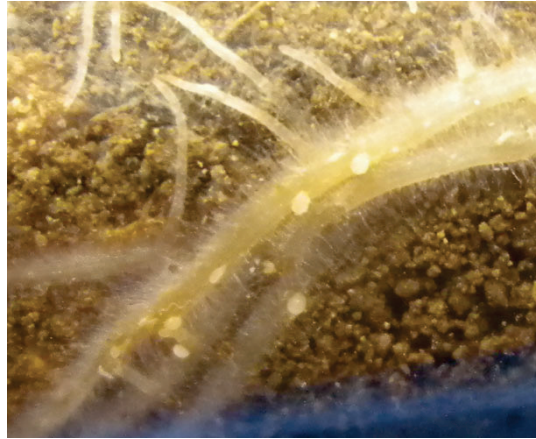


図37 馬鈴しよの根に寄生しているGpの雌成虫

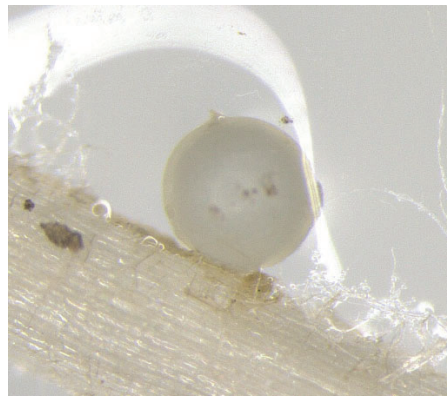


図38 馬鈴しよの根に寄生しているGpの雌成虫

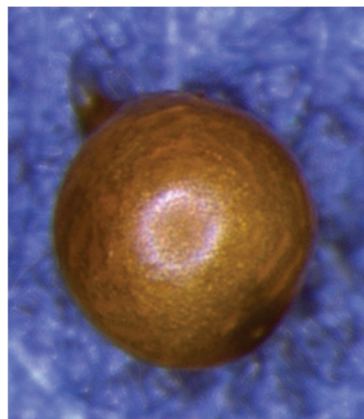


図39 Gpのシスト

生態：

a) 繁殖様式

本種は雌雄が存在し有性生殖する。雌成虫は、200～500個程度の卵を産卵する。

b) 年間世代数

馬鈴しょでは、通常1作の間に1世代が経過するとされる。

c) シストの生存期間

*Globodera*属線虫のシスト内卵内幼虫は、硬化したシストと卵殻に包まれて、寄主植物がない場合などでは休眠状態となり、土壤中で15年以上の生存が可能である。寄主植物の根から分泌されるふ化促進物質の刺激などにより、休眠が打破され、第2期幼虫がふ化する。シスト内卵内幼虫の年間平均減少率は、Grでは30%、Gpでは20%と見積もられている。

分散：

a) 自然分散

土壤中における線虫自身の移動は、第2期幼虫で最大でも1 m程度である。また、汚染土壤では、表面が乾燥していると風により土壤とともに飛ばされたり、雨水・洪水によってシストが流されたりしてシストが移動分散する。汚染土壤が家畜類や野生の鳥獣類の足に付着して移動する場合もある。

b) 人為分散

線虫に寄生された馬鈴しょ塊茎、寄主植物地下部（苗等を含む。）、汚染土壤、汚染土壤が附着した植物・農業機械（トラクター等）・農機具・収穫用コンテナ・人の靴・車両（タイヤや跳ねた泥など）等の移動により、移動分散する。

防除：D-D剤等のくん蒸剤やオキサミル等の非くん蒸剤による化学的防除のほか、輪作や抵抗性品種、対抗植物を利用した耕種的防除、湛水や蒸気処理等の物理的防除が知られている。最近では、人工合成したふ化促進物質による防除の実証試験が行われている。

<参考文献>

令和元年度 国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業事業報告書（令和2年3月13日）国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター

Globodera pallida（ジャガイモシロシストセンチュウ）に関する病害虫リスクアナリシス報告書（令和3年12月22日版）農林水産省横浜植物防疫所

3) テンサイシストセンチュウ

学名：*Heterodera schachtii* Schmidt, 1871

英名：beet cyst nematode

分布：

アジア：大韓民国、パキスタン 中東：イスラエル、イラク、イラン、シリア、トルコ、ヨルダン

欧州：アイルランド、アゼルバイジャン、アルバニア、アルメニア、イタリア、ウクライナ、ウズベキスタン、英国、エストニア、オーストリア、オランダ、カザフスタン、ギリシャ、キルギス、クロアチア、コソボ、ジョージア、スイス、スウェーデン、スペイン、スロバキア、スロベニア、セルビア、タジキスタン、チェコ、デンマーク、ドイツ、トルクメニスタン、ハンガリー、フィンランド、フランス、ブルガリア、ベラルーシ、ベルギー、ポーランド、ロシア等

アフリカ：エジプト、カーボベルデ、カナリア諸島、ガンビア、セネガル、南アフリカ共和国、モロッコ、リビア

北米：アメリカ合衆国、カナダ 中南米：チリ、ペルー、メキシコ

大洋州：オーストラリア、ニュージーランド、ハワイ諸島

(国内では現在、長野県の一部地域で発生が確認されており、当該地域において植物防疫法に基づく緊急防除を実施中。)

寄主植物：フダンソウ属、ハウレンソウ、アブラナ属、シヨクヨウダイオウ、トマト

形態：

シスト：外形はレモン形。茶褐色～褐色。その形態には変異があり（図41）、シストの体長（頸部を除く。）は0.5～0.9mm、体幅は0.3～0.6mmである。シスト表面には網目状の構造がある。通常、シスト内には卵及び第2期幼虫が存在する（図40）。

雌成虫：体長・体幅ともシストとほぼ同じ。レモン形。成熟雌成虫の体色は白色である。

雄成虫：体形は糸状。体長1,119-1,438 μm 、体幅28-42 μm 、口針長29 μm 、交接刺長34-38 μm 。

第2期幼虫：体形は糸状。体長は450(435-492) μm である。最大体幅は約21-22 μm 、口針長25(24.4-25.7) μm 。尾は円錐状で、尾長は47(38-60) μm 、尾端透明部長は26(20-30) μm である。



図40 Hsのシストから出てきた卵及び第2期幼虫（防疫指針委託事業成果）

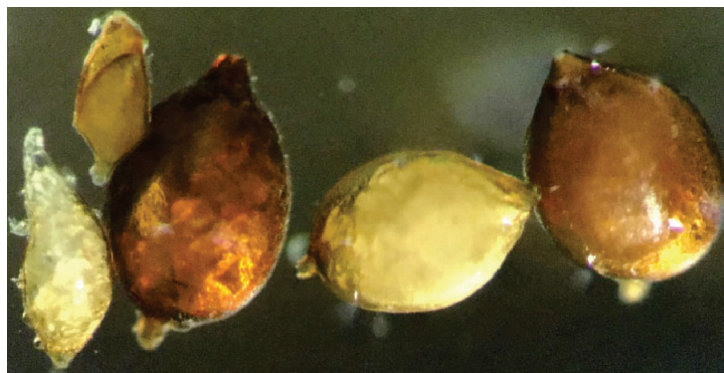


図41 Hsのシスト及び雌成虫（防疫指針委託事業成果）

生態：

a) 繁殖様式

本種は雌雄が存在し有性生殖を行うと考えられるが、詳細は不明。雌成虫は、体外にゼラチン状物質を排出し、その中に1～200個程度の卵を産卵する。その後、雌成虫はシストを形成し、シストは数個～600個程度の卵を内包する。米国で行われた調査では本種500頭のシスト内に平均286個の卵が含まれていたことが報告されている。

b) 年間世代数

米国カリフォルニアでは、テンサイ1作期間に3～5世代経過する。また、ドイツ北部の気象条件では、年間3世代としている。本種の発育適温は18～28℃で、最適温度は25℃とされている。なお、本種は好適条件下では、約30日間で生活史を完了する。

c) シストの生存期間

本種は土壤中にシストの状態でも6年以上の生存が可能とされている。ほ場調査では、テンサイを栽培してから12年後の土壤にも低い個体数ながら本種が生存していたとする報告がある。なお、休耕区又は非寄主植物のほ場では、気候や天敵により変動するものの、本種の頭数が年間40～60%減少するとの報告もある。

分散：

a) 自然分散

土壌中における線虫自身の移動距離は、一般に1年間あるいは一生のうち数～数十cmと考えられており、本種の第2期幼虫も同程度と考えられる。また、シストセンチュウは、孵化した第2期幼虫が根に侵入後、根に定着し移動しないが、雌成虫が死亡後にシストとなると、風によって飛ばされたり、雨水、洪水によって流されたりして移動分散する。汚染土壌が家畜類や野生の鳥獣類の足に付着して移動する場合もある。

b) 人為分散

寄主植物地下部、本種に汚染された土壌（汚染土壌）、汚染土壌が附着した植物・農業機械（トラクター等）・農機具・収穫用コンテナ・人の靴・車両（タイヤや跳ねた泥など）等の移動により、移動分散する。インドでは、輸入検疫で、寄主植物の種子と種子の間（すき間）にシストが夾雑物と一緒に混入しているのが発見されている。日本においても、輸入検疫で、ハウレンソウ種子からシストの発見事例がある。

防除：メチルイソチオシアネート・D-D油剤、D-D剤、クロルピクリンくん蒸剤等のくん蒸剤やイミシアホス粒剤、ホスチアゼート粒剤等の非くん蒸剤による化学的防除のほか、輪作や抵抗性品種、対抗植物を利用した耕種的防除、太陽熱消毒等の物理的防除が知られている。

<参考文献>

令和元年度 国際基準を踏まえた防疫指針策定のための調査委託事業事業報告書（令和2年3月13日）国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター

Heterodera schachtii（テンサイシストセンチュウ）に関する病害虫リスクアナリシス報告書（平成31年3月25日版）農林水産省横浜植物防疫所

【更新履歴】

令和8年3月31日 Hsの調査対象植物にブロッコリーを追加
Gr及びGpの遺伝子診断法の参照先を変更
Hsの遺伝子診断法(マルチプレックスPCR)を追加