植物防疫所調査研究報告（植防研報）
第 61 号：11 ～ 18　　令和 7 年（2025）

資　　料

輸入検疫において中国産ガジュマル苗木から発見された *Meloidogyne enterolobii*

中江　和紀・関本　茂行 [1)]・井関　崇

横浜植物防疫所調査研究部

Meloidogyne enterolobii Intercepted from *Ficus microcarpa* Seedlings from China during Import Plant Quarantine. Kazuki Nakae, Shigeyuki Sekimoto[1)] and Takashi Iseki (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10 Shin-yamashita, Naka-ku, Yokohama, Kanagawa, 231-0801, Japan. [1)]Yokohama Plant Protection Station) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* **61**: 11–18 (2025).

Abstract: In March 2023, root-knot nematodes (RKNs) suspected to be *Meloidogyne enterolobii* Yang and Eisenback, 1983 were found in *Ficus microcarpa* seedlings from China during an import plant quarantine inspection at Nagoya port, Japan. We identified the RKN population as *M. enterolobii* and reported the molecular, morphological and morphometrical characterization of this population. Phylogenetic analysis based on sequences of COII-16S rRNA and COI of mtDNA, and D2-D3 of 28S rRNA genes revealed that the intercepted population clustered with *M. enterolobii* and clearly differed from other RKN species. Moreover, the host pathogenicity test confirmed that *F. microcarpa* is a host of *M. enterolobii*. To the best of our knowledge, this is the first record of *M. enterolobii* from *F. microcarpa*.

Key Words: *Ficus microcarpa*, host, *Meloidogyne enterolobii*, root-knot nematode

緒言

2023 年（令和 5 年）3 月、名古屋港における輸入検疫で、中国産ガジュマル *Ficus microcarpa* 苗木から *Meloidogyne enterolobii* Yang and Eisenback, 1983 と疑われるネコブセンチュウが発見された。*Meloidogyne enterolobii* は植物防疫法施行規則別表二の二に規定されている本邦未発生のネコブセンチュウの一種で、我が国への侵入を警戒している重要線虫である。本種の寄主範囲は広く、トマト *Lycopersicon esculentum*（= *Solanum lycopersicum*）やダイズ *Glycine max* 等様々な植物に寄生することが報告されているが、これまでのところガジュマルが *M. enterolobii* の寄主植物であるという報告はない（CABI，2020；EPPO，2024）。そこで、中国産ガジュマル苗木から発見されたネコブセンチュウの遺伝学的及び形態学的調査を行い、当該線虫が *M. enterolobii* であることを確認するとともに、接種試験によりガジュマルが *M. enterolobii* の寄主植物であることを確認したので、その結果について報告する。

材料及び方法

1．供試線虫

中国産ガジュマル苗木の根から摘出したネコブセンチュウの雌成虫（Fig. 1 A–C）及び卵のうからふ化した 2 期幼虫を供試した。

2．遺伝学的調査

（1）DNA 抽出

DNA 抽出キット ISOHAIR（ニッポンジーン、東京）を用いた簡易抽出法により、雌成虫から鋳型 DNA を抽出した。スライドグラス上に雌成虫 1 個体を乗せて頸部を切断し、約 1mm 四方の滅菌ろ紙片で内容物を拭き取り、DNA 抽出バッファー 20μL を入れた 0.5mL チューブにろ紙片を入れた。DNA 抽出バッファーは、ISOHAIR に添付されている 0.01 ×抽出バッファー（TE Buffer（pH8.0）で希釈）18.5μL、Enzyme Solution 1.0μL 及び Lysis Solution 0.5μL を混合したものを用いた（岩堀，2014）。55℃ 30 分、95℃ 10 分で熱処理した後、滅菌蒸留水 80μL を加えて希釈したものを鋳型 DNA とした。全ての鋳型 DNA は調査に供試するまで－20℃で保存した。

（2）PCR 及び塩基配列解析

ミトコンドリア DNA の COII-16S rRNA 領域及び COI 領域並びに核 28S rRNA 遺伝子の D2-D3 領域について、PCR 及び塩基配列解析を行った。ミトコンドリア DNA の COII-16S rRNA 領域の増幅には C2F3（5′-GGT CAA TGT TCA GAA ATT TGT GG-3′）及び 1108（5′-TAC CTT TGA CCA ATC ACG CT-3′）

[1)] 横浜植物防疫所

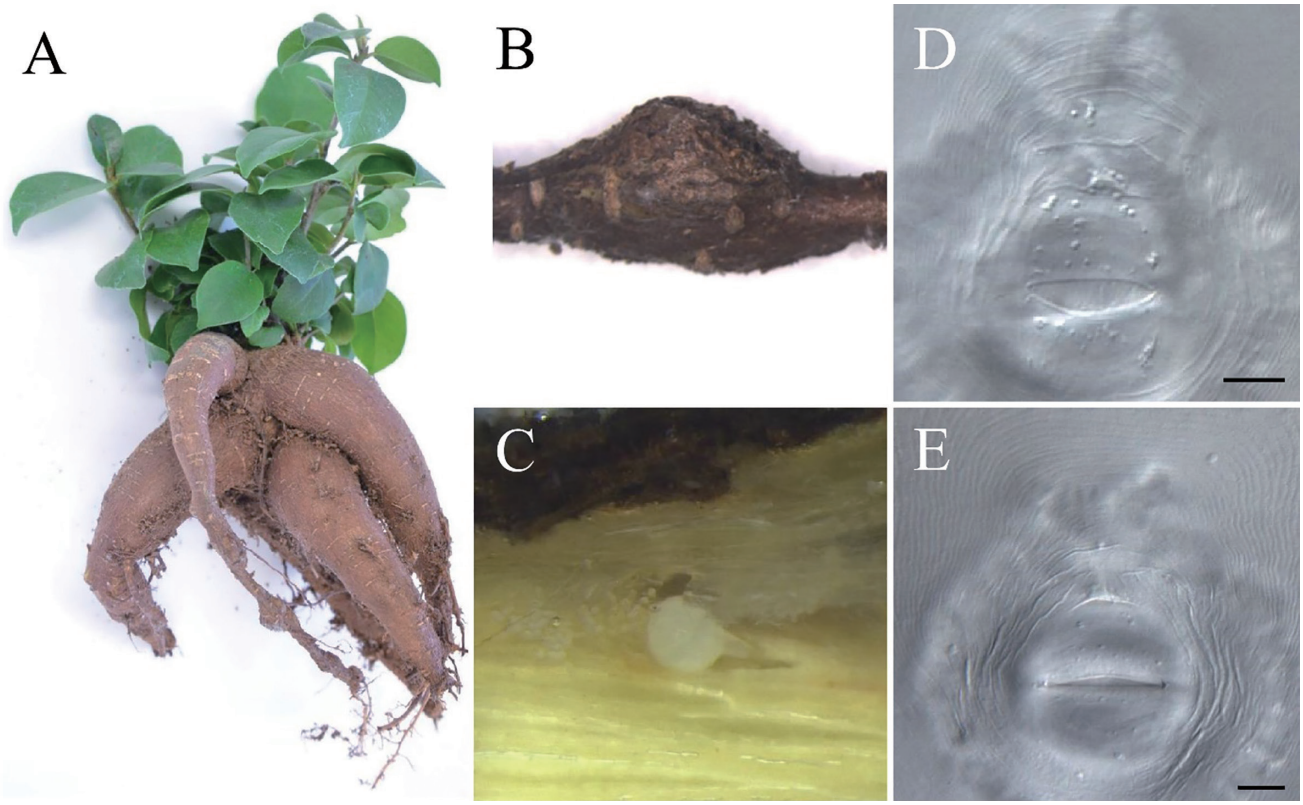

Fig. 1. *Ficus microcarpa* seedling from China infested by *Meloidogyne enterolobii*. (A) Whole seedling; (B) Root gall; (C) Adult female in root; (D, E) Perineal patterns of females. Scale bar, 10µm.

（Powers and Harris, 1993）のプライマーセットを、COI 領域の増幅には JB3（5′-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3′）及び JB5（5′-AGC ACC TAA ACT TAA AAC ATA ATG AAA ATG-3′）（Derycke *et al.*, 2005）のプライマーセットをそれぞれ用いた。また、核 28S rRNA 遺伝子の D2-D3 領域の増幅には D2A（5′-ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG-3′）及び D3B（5′-TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA-3′）（De Ley *et al.*, 1999）のプライマーセットを用いた。PCR は反応容量を 20µL とし、COII-16S rRNA 領域の増幅では、反応ごとに 5 × PrimeSTAR Buffer（5mM Mg^{2+} plus）（タカラバイオ、滋賀）を 4.0µL、dNTP Mixture（2.5mM each）を 1.6µL、各プライマー（10µM）を 0.4µL、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase（2.5U/µL）（タカラバイオ）を 0.2µL、鋳型 DNA を 2.0µL 及び滅菌蒸留水を 11.4µL 加えた。COI 領域及び D2-D3 領域の増幅では、反応ごとに 10 × *Ex Taq* Buffer（20mM Mg^{2+} plus）（タカラバイオ）を 2.0µL、dNTP Mixture（2.5mM each）を 1.6µL、各プライマー（10µM）を 0.4µL、*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version（5U/µL）（タカラバイオ）を 0.1µL、鋳型 DNA を 2.0µL 及び滅菌蒸留水を 13.5µL 加えた。PCR 反応はサーマルサイクラー GeneAtlas G（アステック、福岡）を使用した。PCR 温度条件は、COII-16S rRNA 領域では 94℃ 2 分の熱変性後、94℃ 1 分、48℃ 1 分、72℃ 2 分を 35 サイクル及び 72℃ 5 分の最終伸長とし、COI 領域では 94℃ 2 分の熱変性後、94℃ 15 秒、46℃ 15 秒、72℃ 30 秒を 35 サイクル行った。また、D2-D3 領域では 94℃ 2 分の熱変性後、94℃ 1 分、53℃ 30 秒、72℃ 1 分を 35 サイクル及び 72℃ 5 分の最終伸長とした。PCR 産物を ExoSAP-IT™（Thermo Fisher Scientific、アメリカ）で精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Thermo Fisher Scientific）によるサイクルシーケンス反応を行った後、BigDye® Xterminator™ Purification Kit（Thermo Fisher Scientific）で精製し、SeqStudio™ Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific）を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

得られた塩基配列を用いて NCBI の BLAST の相同性検索を行った後、MEGA 11（Tamura *et al.*, 2021）内の MUSCLE で多重配列アライメントを行い、最尤法により系統樹を作成し、ブートストラップ検定（1,000 回）（Felsenstein, 1985）により枝の信頼度を確認した。AICc（corrected Akaike Information Criterion：補正赤池情報量基準）に基づいて最適な進化モデルを選択し、COII-16S rRNA 領域及び COI 領域には GTR + G モデルを、D2-D3 領域には GTR + G + I モデルを使用した。塩基配列解析は雌成虫 5 個体について実施し、得られた配列は DDBJ に登録した（アクセッションナンバー LC822789–LC822791）。

（3）種特異的プライマーを用いた PCR

Meloidogyne enterolobii 種特異的プライマー Me-F（5′-AAC TTT TGT GAA AGT GCC GCT G-3′）及び Me-R（5′-TCA GTT CAG GCA GGA TCA ACC-3′）（Long *et al.*, 2006）を用いて PCR を行った。PCR は反応容量を 10µL として、反応ごとに 10 × *Ex Taq* Buffer（20mM Mg^{2+} plus）（タカラバイオ）を 1.0µL、dNTP Mixture（2.5mM each）を 0.8µL、各プライマー（10µM）を 0.2µL、*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version（5U/µL）（タカラバイオ）を 0.1µL、鋳型 DNA を 1.0µL 及び滅菌蒸留水

を 6.7μL 加えた。PCR 温度条件は 94℃ 2 分の熱変性後、94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 35 サイクルとした。PCR 産物は GelRed™（Biotium、カナダ）を混合した 1.0％アガロースゲル（アガロース S:ニッポンジーン、東京）及び 1×TAE バッファーを用いて電気泳動し、UV 照射下でバンドを確認した。種特異的プライマーを用いた PCR は雌成虫 10 個体について行った。

３．形態学的調査

雌成虫の会陰紋の形態観察並びに 2 期幼虫の形態計測及び形態観察を行った。調査には DNA 抽出を行った雌成虫及び雌成虫の単卵のうからふ化した 2 期幼虫を用いた。会陰紋の標本は Hartman and Sasser（1985）の方法に基づいて作成し、2 期幼虫の標本は水封入による一時プレパラートを作成して、それぞれ生物顕微鏡下で調査を行った。

４．接種試験

発見されたネコブセンチュウのガジュマルへの寄生性を確認するため、ガジュマル苗への接種試験を実施した。

供試線虫は、中国産ガジュマル苗木から採取した雌成虫の単卵のうからふ化した 2 期幼虫をトマト「強力米寿」（タキイ種苗、京都）に接種し、増殖させた単卵のう系統を用いた。

供試植物は、市販のガジュマル苗木（挿し木苗）を購入し、滅菌済赤玉土を詰めた 4 号駄温鉢に移植したものを用いた。なお、本苗木については、移植前に、目視で根こぶ症状がないこと及び購入時から植えられていた土壌をベルマン法で調査し、ネコブセンチュウを含む植物寄生性線虫の寄生がないことを確認した。

線虫接種方法については、単卵のう系統の卵のうを水道水に入れ、ふ化した 2 期幼虫を採取し、線虫懸濁液にして 1 鉢当たり 3,000 頭を接種した。温室内（平均気温 22℃）で 2 か月間栽培した後に鉢上げし、根こぶ症状の確認及び根こぶからの線虫の再分離を行った。得られた雌成虫については形態学的調査（会陰紋の形態観察）を、当該雌成虫の卵のうからふ化した 2 期幼虫については遺伝学的調査（COI 領域のシーケンス及び *M. enterolobii* 種特異的プライマーを用いた PCR）をそれぞれ行い、再分離した線虫が *M. enterolobii* であるかどうかを確認した。なお、接種区を 6 反復、未接種区を 3 反復とし、接種区から線虫を再分離した場合は、雌成虫 1 頭及びその雌成虫の卵のうからふ化した 2 期幼虫 1 頭を調査に用いた。

形態学的調査及び接種試験で得られた会陰紋の標本は横浜植物防疫所調査研究部害虫担当に保管した。

結果及び考察

１．遺伝学的調査

（1）塩基配列解析

雌成虫 5 個体の COII-16S rRNA 領域、COI 領域及び D2-D3 領域について塩基配列を決定したところ、それぞれ 662bp、393bp 及び 716bp の塩基配列が得られ、いずれの領域においても 5 個体間で塩基配列が完全に一致した。このため、DDBJ には 1 個体分の各領域の配列を登録した。これらの塩基配列を用いて BLAST 検索を行った結果、いずれの領域においても GenBank に登録されている *M. enterolobii* の塩基配列と高い相同性を示し、最も高い相同性を示した COII-16S rRNA 領域（MN809527）、COI 領域（MH399805）及び D2-D3 領域（MT193451）の塩基配列との相同性はそれぞれ 100％、100％及び 99.7％であった。また、分子系統解析の結果、いずれの領域においても新たに得られた塩基配列は *M. enterolobii* のみからなるクレードに含まれ、いずれも高いブートストラップ値（99–100％）で支持された（Figs. 2–4）。

（2）種特異的プライマーを用いた PCR

Meloidogyne enterolobii 種特異的プライマーを用いた PCR の結果、供試したサンプル全てで *M. enterolobii* に特異的なサイズの PCR 産物（約 240bp）のバンドが確認された（Fig. 5）。ネガティブコントロールではこのバンドは確認されなかった。

２．形態学的調査

雌成虫の会陰紋の形態観察の結果、背部弓状域は同心円状で円形や四角形に近い形をしており、高さは中程度から高めであった。また、側線は不明瞭で、条線は滑らかであった（Fig. 1 D, E）。これらの特徴は、*M. enterolobii* の原記載（Yang and Eisenback, 1983）における会陰紋の特徴とよく一致した。2 期幼虫の形態計測値は Table 1 に示した。最大体幅及び口針長は近似種のサツマイモネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949 の計測値に近かったものの、その他の値はおおむね *M. enterolobii* の計測値の範囲内であった。また、2 期幼虫の尾部は先細りとなるが、尾端は尖らず幅広で丸みを帯びていることも *M. enterolobii* の特徴と一致した。

３．接種試験

未接種区では根こぶ症状は観察されなかったが、接種区では明瞭な根こぶ症状が観察された（Fig. 6）。この根こぶから雌成虫及び卵のうを採取し、形態学的調査及び遺伝学的調査を行ったところ、雌成虫の会陰紋の形態観察では輸入検疫で発見された個体と同様な *M. enterolobii* の特徴が見られた。また、2 期幼虫を用いた遺伝学的調査では、全ての供試個体で COI 領域の塩基配列が輸入検疫で発見された個体の塩基配列（LC822789）と一致することを確認するとともに、*M. enterolobii* に種特異的なサイズの PCR 産物の増幅を確認した（データ省略）。これらのことから、*M. enterolobii* がガジュマルに寄生し、生活環を完了出来ることを確認した。

以上の結果より、中国産ガジュマル苗木から発見されたネコブセンチュウを *M. enterolobii* と同定するとともに、ガジュマルが当該線虫の寄主植物であることを明らかにした。我々の知る限り、本報告はガジュマルからの *M. enterolobii* の初記録となる。

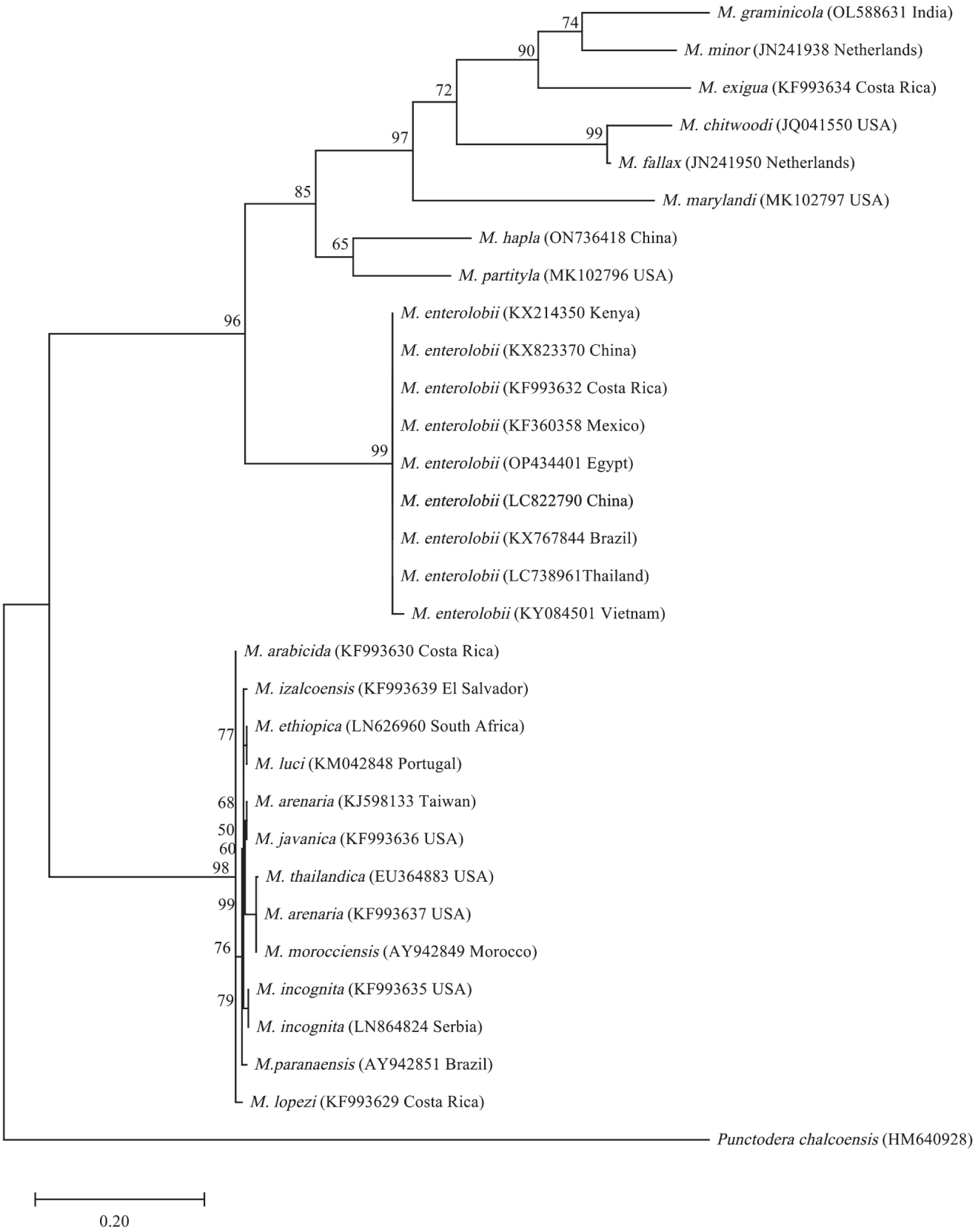

Fig. 2. Phylogenetic relationships between *Meloidogyne species* as inferred from analysis of the intergenic COII-16S rRNA gene sequence using the Maximum likelihood method under the GTR + G model. Numbers at nodes indicate bootstrap values (1,000 replicates). New sequence is indicated in bold.

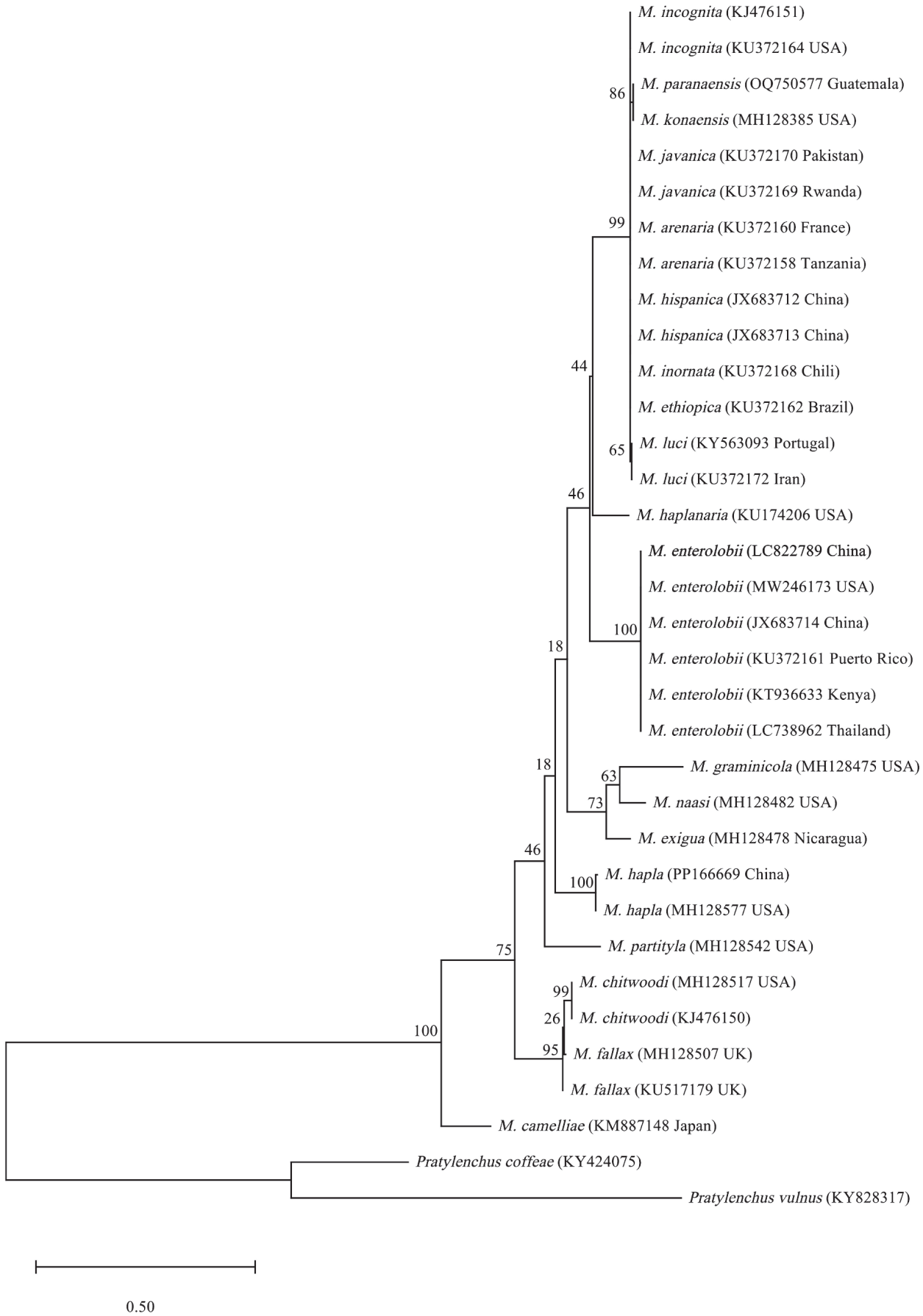

Fig. 3. Phylogenetic relationships between *Meloidogyne* species as inferred from analysis of the COI gene sequence using the Maximum likelihood method under the GTR + G model. Numbers at nodes indicate bootstrap values (1,000 replicates). New sequence is indicated in bold.

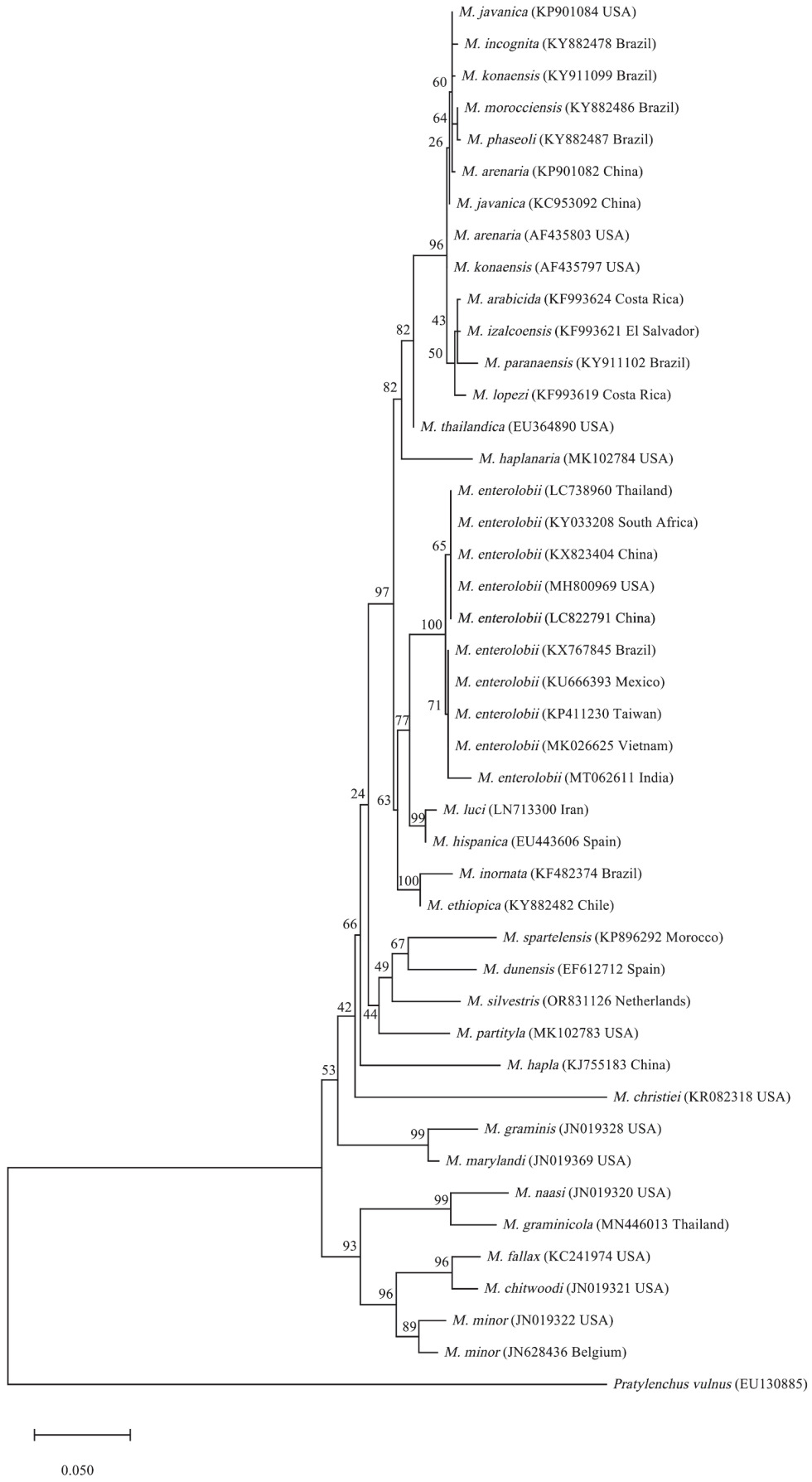

Fig. 4. Phylogenetic relationships between *Meloidogyne* species as inferred from analysis of the D2-D3 of 28S rRNA gene sequence using the Maximum likelihood method under the GTR + G + I model. Numbers at nodes indicate bootstrap values (1,000 replicates). New sequence is indicated in bold.

Table 1. Morphometrics of second-stage juveniles of *Meloidogyne* species. All measurements are in µm and are in the form: mean ± SD (range).

Character	*M. enterolobii* China This study	*M. enterolobii* China Yang and Eisenback (1983)	*M. enterolobii* USA Brito *et al*. (2004)	*M. incognita* India Khan *et al*. (2017)
n	10	30	20	20
L	438.4 ± 5.1 (430.0–450.3)	436.6 ± 16.6 (405.0–472.9)	461.1 ± 15.9 (433.0–481.0)	410.5 ± 21.5 (365.0–456.0)
W	13.9 ± 0.4 (13.1–14.4)	15.3 ± 0.9 (13.9–17.8)	15 ± 0.4 (14.5–16.1)	13.4 ± 0.6 (12.5–14.3)
Stylet length	10.1 ± 0.2 (9.9–10.7)	11.7 ± 0.5 (10.8–13.0)	10.9 ± 0.3 (10.4–11.5)	10.4 ± 0.3 (10.0–11.0)
DGO	3.5 ± 0.14 (3.2–3.7)	3.4 ± 0.3 (2.8–4.3)	3.8 ± 0.3 (2.9–4.1)	3.2 ± 0.2 (2.9–3.3)
Tail length	53.3 ± 1.5 (51.4–56.6)	56.4 ± 4.5 (41.5–63.4)	56.4 ± 2.9 (50.5–61.2)	49.5 ± 2.2 (46.5–53.2)
Length of hyaline part of tail	10.5 ± 2.2 (6.8–13.4)	-	11.1 ± 2.6 (5.0–14.7)	11.9 ± 1.1 (10.5–13.3)
a	31.6 ± 0.9 (30.4–33.3)	28.6 ± 1.9 (24.0–32.5)	30.8 ± 1.2 (28.3–32.5)	30.8 ± 1.9 (28.0–34.2)
c	8.2 ± 0.2 (7.9–8.5)	7.8 ± 0.7 (6.8–10.1)	8.2 ± 0.4 (7.6–8.6)	8.3 ± 0.5 (7.5–9.6)

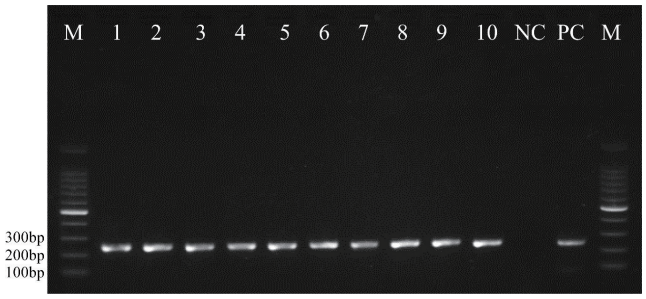

Fig. 5. PCR amplification products obtained using *Meloidogyne enterolobii* species-specific primers Me-F/Me-R. Lanes: 1–10, Root-knot nematode from *Ficus microcarpa* seedlings from China; NC, Negative control (water); PC, Positive control (DNA lysate of *M. enterolobii*); M, 100bp DNA marker.

Fig. 6. Galled root of *Ficus microcarpa* caused by *Meloidogyne enterolobii* in host pathogenicity test (arrow indicating egg mass).

謝辞

供試サンプルの提供に際しご助力いただいた名古屋植物防疫所総括及び本船貨物担当並びに種苗担当に感謝の意を表する。

引用文献

Brito, J., T. O. Powers, P. G. Mullin, R. N. Inserra and D.W. Dickson (2004) Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. *J. Nematol.* **36**(3): 232–240.

CABI (2020) *Meloidogyne enterolobii* (Pacara earpod tree root-knot nematode). *Crop Protection Compendium*. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.33238 (accessed 2024)

De Ley, P., M. A. Félix, L. M. Frisse, S. A. Nadler, P. W. Sternberg and W. K. Thomas (1999) Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology* **1**(6): 591–612.

Derycke, S., T. Remerie, A. Vierstraete, T. Backeljau, J. Vanfleteren, M. Vincx and T. Moens (2005) Mitochondrial DNA variation and cryptic speciation within the free-living marine nematode *Pellioditis marina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **300**: 91–103.

EPPO (2024) *Meloidogyne enterolobii*. EPPO Global Database (available online). https://gd.eppo.int/taxon/MELGMY

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**(4): 783–791.

Hartman, K. M. and J. N. Sasser (1985) Identification of *Meloidogyne* species on basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In *An advanced treatise on Meloidogyne. Volume II Methodology* (Barker, K. R., C. C. Carter and J. N. Sasser eds.). North Carolina State University Graphic, pp. 69–77.

岩堀英晶（2014）改変プロトコールによる土壌線虫１頭からのDNA抽出法．線虫学実験（水久保隆之・二井一禎　編）．京都大学学術出版会 p. 54.

Khan, M. R., S. Pal, G. T. Manohar, S. Bhattacharyya, A. Singh, P. Sarkar and S. Lalliansanga (2017) Detection, diagnosis and pathogenic potential of *Meloidogyne incognita* on passion fruit from Mizoram, India. *Pak. J. Zool*. **49**(4): 1207–1214.

Long, H., H. Liu and J. Xu (2006) Development of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. *Acta Phytopathol. Sin*. **36**(2): 109–115.

Powers, T. O. and T. S. Harris (1993) A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* **25**(1): 1–6.

Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar (2021) MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **38**(7): 3022–3027.

Yang, B. and J. D. Eisenback (1983) *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China. *J. Nematol*. **15**(3): 381–391.