

アイソザイムを用いた日本産ネコブセンチュウ 7 種の同定

角屋 竜雄・平田 賢司

横浜植物防疫所調査研究部

Use of enzyme phenotypes for the identification of seven *Meloidogyne* species in Japan. Tatsuo SUMIYA and Kenji HIRATA (Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shinyamashita Naka-ku, Yokohama 231-0801 Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 35: 131-133 (1999).

Abstract: Seven *Meloidogyne* species were examined to use of their enzyme phenotypes for identification of plant quarantine in Japan. Enzymes investigated were nonspecific esterase, malate dehydrogenase, superoxide dismutase, glutamate oxaloacetate transaminase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase and catalase. Multienzyme phenotypes represented by nonspecific esterase, malate dehydrogenase and profile more valuable for identification of *Meloidogyne* species than single enzyme.

Key words: electrophoresis, enzyme, phenotype, *Meloidogyne*, identification

はじめに

現在、輸出入検疫で発見されるネコブセンチュウの種の同定は、主に光学顕微鏡及び走査電子顕微鏡を用いた形態観察と、形態計測によって行われている。

しかし、これらの同定方法では線虫自体が微小であり、また、同じ種でも個体差があるため、多数の個体を調査しなければならず、多くの時間を必要とする。

したがって、このような同定方法よりも簡便で、迅速な同定方法が望まれている。近年、線虫のタンパク質や DNA を解析する生化学的手法が開発され、有効な同定方法となってきている。

ESBENSHADE and TRIANTAPHYLLOU (1985, 1987) は、世界各地から採集したネコブセンチュウのアイソザイムを比較し、同定に利用できることを報告した。また、奈良部ら (1989) は、日本産ネコブセンチュウ 3 種について、そのアイソザイムを比較し、それが海外での報告例とほぼ一致することを調査した。

そこで、生化学的手法の 1 つであるアイソザイム解析による手法が、植物検疫で発見されるネコブセンチュウの種の同定に利用できるかを調査するため、植物検疫で発見事例が多い種及びアイソザイム解析による報告例のない種を含めた日本産ネコブセンチュウ 7 種についてそのアイソザイムを調査した。

本報告にあたり試料を提供して頂いた農林水産省農

業研究センター病害虫防除部線虫害研究室 奈良部孝氏に感謝申し上げる。

材料及び方法

供試線虫: 線虫は、農業上重要種であるキタネコブセンチュウ (*Meloidogyne hapla*)、サツマイモネコブセンチュウ (*M. incognita*)、ジャワネコブセンチュウ (*M. javanica*)、アレナリアネコブセンチュウ (*M. arenaria*) の 4 種と、ツバキネコブセンチュウ (*M. camelliae*)、リンゴネコブセンチュウ (*M. mali*)、シバナネコブセンチュウ (*M. marylandi*) の合わせて 7 種を用いた (第 1 表)。供試する線虫の種の同定は、雌成虫の会陰紋と第 2 期幼虫及び雄成虫の形態計測等によって行い、その雌成虫から得られた卵塊をそれぞれの植物 (キタネコブセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウはトマト、ツバキネコブセンチュウはツバキ、リンゴネコブセンチュウはカエデ、そして、シバナネコブセンチュウはシバナ) に接種し、温室内で増殖して用いた。

タンパク質抽出: タンパク質の抽出に用いた線虫は、増殖した各植物の根部に形成されたゴールから雌成虫を摘出した。この場合、解析に必要なタンパク質が多

第1表 供試したネコブセンチュウ

種	産地	寄主植物
キタネコブセンチュウ (<i>Meloidogyne hapla</i>)	銚田 (茨城県)	ラッカセイ
サツマイモネコブセンチュウ (<i>M. incognita</i>)	横須賀 (神奈川県)	トマト
ジャワネコブセンチュウ (<i>M. javanica</i>)	富浦 (千葉県)	カーネーション
アレナリアネコブセンチュウ (<i>M. arenaria</i>)	大館 (青森県)	ヤマノイモ
ツバキネコブセンチュウ (<i>M. camelliae</i>)	相模原 (神奈川県)	ツバキ
リンゴネコブセンチュウ (<i>M. mali</i>)	川口 (埼玉県)	ヤマモミジ
シバナネコブセンチュウ (<i>M. marylandi</i>)	高原 (宮崎県)	バミューダグラス

く含まれている産卵前の内容物の詰まった乳白色で、袋状のままの雌成虫のみを使用した。摘出した雌成虫は蒸留水で数回洗浄し、サッカロース、界面活性剤及び蒸留水で作製した緩衝液120 μ lに20頭程度入れ、ホモジナイザーを用いて破碎した。そして、遠心分離器を用いて4°Cに保ちながら、15,000回転で15分間遠心した後、下層にたまった夾雑物と上層の脂質との間の層から試料液約80 μ lを取りだし、-20°Cで保存した。

電気泳動: 7%アクリルアミドと1.5Mトリス緩衝液を混ぜ、塩酸でpH8.6に調整したポリアクリルアミドスラブゲルと、pH8.3に調整した0.05Mトリス-0.384 Mグリシン泳動用緩衝液を用いた薄層スラブゲル電気泳動を使用した。

それぞれ約15 μ lの試料液をゲルに流し込み、ゲル1枚当たり20 mAの電流を2時間流した。ゲルの両端にはグリセリンを混ぜたプロモフェノールブルー溶液を充填した。通電中泳動槽は4°Cに保った。

染色: 染色に用いた酵素は、エステラーゼ (EST)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD)、スーパーオキシジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT) の6種類を用いた。

泳動終了後のゲルを蒸留水で数回洗浄後、MDHは常温で5分間、CATは過酸化水素水で20分間浸せきした後常温で1分間、その他は37°Cで約1時間それぞれの酵素反応液に浸せきした。

染色によって得られたバンドは、ゲルの両端に充填

したプロモフェノールブルー溶液に対する相対移動度 (Rm値) によって比較した。

結果及び考察

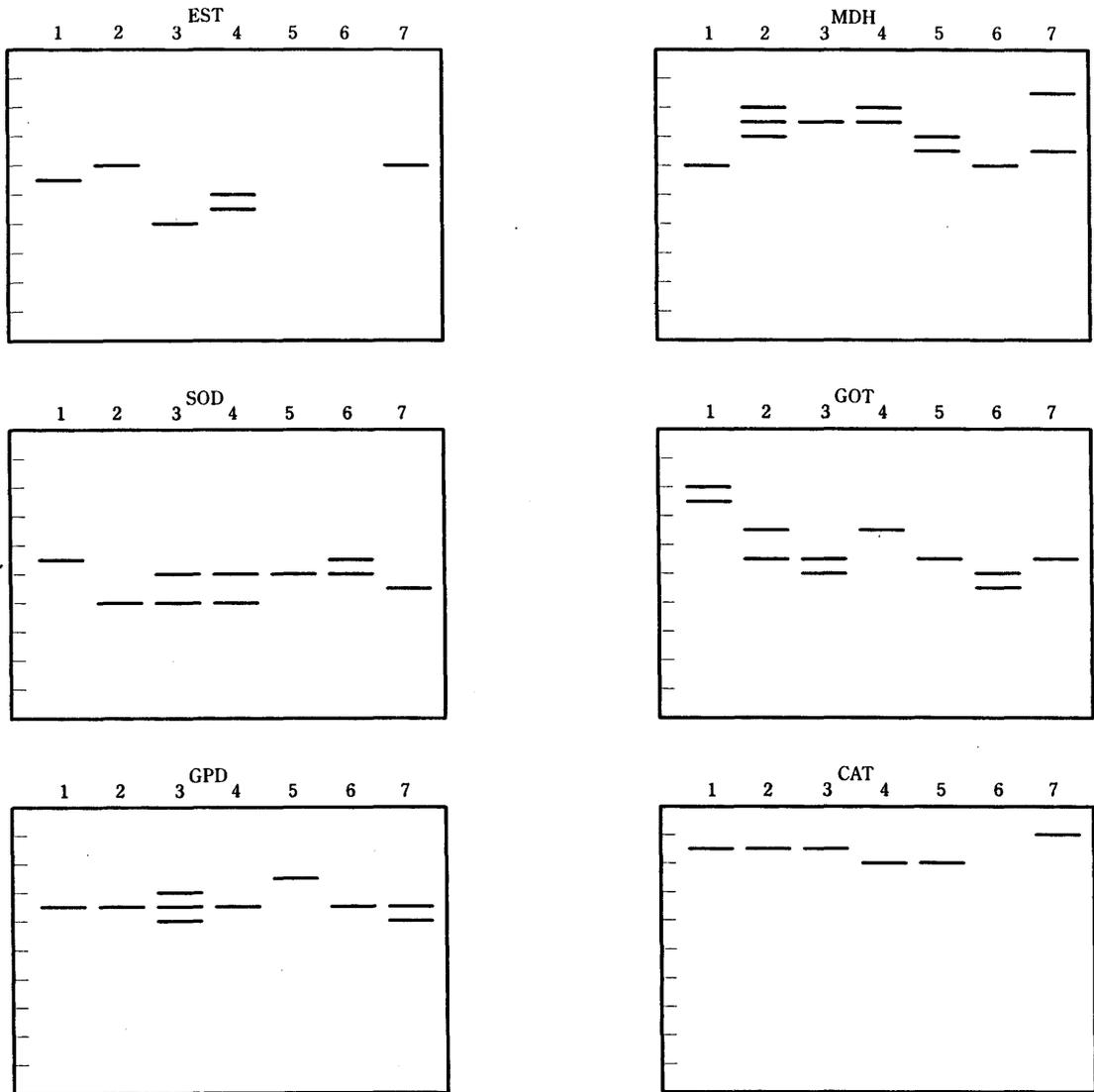
今回供試した7種のネコブセンチュウについて、6種類の酵素によって得られたアイソザイムパターンを第1図に示した。

この中で、EST、MDHとGOTでは、アイソザイムパターンに、一部の種間で明瞭な差が認められたが、SOD、GPDとCATについては、種間で共通したアイソザイムパターンが多く見られ、はっきりとした差は認められなかった。

ESBENSHADE and TRIANTAPHYLLOU (1990) は、農業上重要な4種のネコブセンチュウについて、ESTとMDHの2つの酵素によるアイソザイムパターンを1枚のゲル上に組み合わせて解析することにより、種が同定できることを示しており、本実験で供試した日本産7種のネコブセンチュウについても同様の結果を得ることができた。また、今回用いた分析方法では、植物組織に形成されたゴールからネコブセンチュウの雌成虫を摘出後、種の判定までに、3~4時間要したが、現在、ネコブセンチュウの種の同定で主に行われている雌成虫の会陰紋の観察等の方法と比較すると、容易で短時間に種の同定が行えることがわかった。

引用文献

- ESBENSHADE, P. R. & A. C. TRIANTAPHYLLOU (1985)
Use of enzyme phenotypes for identification of



第1図 日本産ネコブセンチュウ7種のアイソザイムによるバンドパターン

Lane 1: キタネコブセンチュウ, Lane 2: サツマイモネコブセンチュウ, Lane 3: ジャワネコブセンチュウ
 Lane 4: アレナリアネコブセンチュウ, Lane 5: ツバキネコブセンチュウ, Lane 6: リンゴネコブセンチュウ
 Lane 7: シバナネコブセンチュウ

EST: エステラーゼ, MDH: リンゴ酸デヒドロゲナーゼ, SOD: スーパーオキシドジスムターゼ
 GOT: グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ, GPD: グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
 CAT: カタラーゼ

Meloidogyne species. Journal of Nematology 17: 6-20.

ESBENSHADE, P. R. & A. C. TRIANTAPHYLLOU (1987)
 Enzymatic relationships and evolution in the genus
Meloidogyne (Nematoda: Tylenchida). Journal of
 Nematology 19: 8-18.

ESBENSHADE, P. R. & A. C. TRIANTAPHYLLOU (1990)

Isozyme phenotypes for the identification of
Meloidogyne species. Journal of Nematology 22:
 10-15.

奈良部孝・難波成任・山下修一・土屋常男 (1989)
 アイソザイムを用いた日本産ネコブセンチュウ3種
 の同定. 日線虫研誌 19: 46-51.