

## 等電点電気泳動法を用いた日本産 *Globodera* 属線虫 3 種の同定

角屋 竜雄・平田 賢司・八重樫 隆志\*

横浜植物防疫所

\*明治大学農学部

Identification of three *Globodera* species in Japan by using isoelectric focusing method. Tatsuo SUMIYA and Kenji HIRATA (Yokohama Plant Protection Station, 5-57 Kitanakadori, Naka-ku, Yokohama 231-0003, Japan) and Takashi YAEGASHI (Faculty of Agriculture, Meiji University). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 38: 49-51 (2002)

**Abstract:** Seven populations of three *Globodera* species were examined to use of isoelectric focusing and sensitive silver stain for identification of plant quarantine in Japan. Electrophoresis was carried out to use the Pharmacia PhastSystem. Single mature females of *G. rostochiensis* showed three major bands at pI 8.5, pI 7.35 and pI 5.9, *G. tabacum* at pI 7.35 and *G. hypolysi* at pI 5.8. Single cysts of *G. rostochiensis* showed at pI 5.9, *G. tabacum* at pI 5.8 and *G. hypolysi* showed two major bands between pI 5.85 and pI 5.8. All mature females and cysts of the three *Globodera* species were identified as respective species based on the banding patterns of isoelectric focusing.

**Key words:** identification, *Globodera*, isoelectric focusing

### はじめに

わが国の一部地域でこれまでに発生が確認された *Globodera* 属線虫は、ジャガイモシストセンチュウ (*G. rostochiensis*) とヨモギシストセンチュウ (*G. hypolysi*) であったが、平成 10 年 5 月に高知県香美郡夜須町のハウス栽培ナスから本属のシストセンチュウの 1 種が発見され、農業研究センター（現農業技術研究機構中央農業総合研究センター）線虫害研究室、北海道農業試験場（現農業技術研究機構北海道農業研究センター）線虫研究室及び横浜植物防疫所調査研究部による同定の結果、わが国未発生 of *G. tabacum* であることが確認された。

輸入検疫では、ジャガイモシストセンチュウやジャガイモシストセンチュウ (*G. pallida*) のわが国への侵入を防止するため、寄主植物などの輸入を禁止している。また、国内検疫では、種馬鈴しょ検疫によって一部地域に発生しているジャガイモシストセンチュウのまん延を防止している。これらの検疫では、線虫が発見された場合、その防除対策を実施する上からも迅速で的確な同定を行うことが必要である。

本属線虫の同定では、多くの線虫個体を用いた形態観察と形態計測の調査が必要である。また、寄生性の違いによる調査は種の同定に必要な場合もあり、調査

には長時間を要する。

このため、迅速で的確な同定法について調査するため、わが国既発生の本属線虫 3 種を供試して、雌成虫やシストのタンパク質を用いた生化学的な解析法の一つである等電点電気泳動法による調査を実施したので報告する。

今回の調査にあたり、北海道産のジャガイモシストセンチュウの試料をご提供いただいた北海道農業試験場線虫研究室の百田洋二室長及び串田篤彦氏に感謝申し上げます。

### 材料及び方法

#### 1. 供試線虫

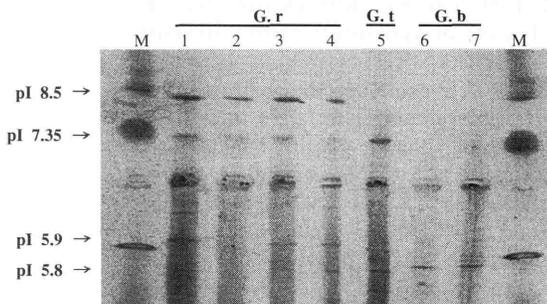
線虫は、国内で発生が確認されたジャガイモシストセンチュウ（長崎県産 1 個体群及び北海道産 3 個体群）、ヨモギシストセンチュウ（長崎県産 2 個体群）、高知県産 *G. tabacum* 1 個体群の 3 種 7 個体群を用いた（第 1 表）。

種の同定は、シストの陰門部のグラネック値（陰門窓の肛門側の縁から肛門までの長さ/陰門窓の長さ）と陰門と肛門の間の隆起の数及び第 2 期幼虫の口針の長さとお針節球の形状等により行った。

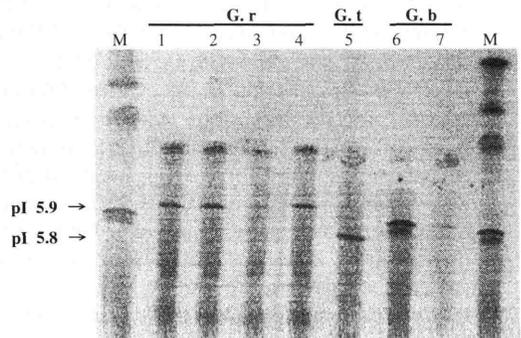
供試した線虫 3 種は、採取・同定後当所温室内で、

第1表 供試した *Globodera* 属線虫

種	産地	寄主植物
ジャガイモシストセンチュウ ( <i>Globodera rostochiensis</i> )	北海道虻田郡喜茂別町 北海道函館市 北海道斜里郡清里町 長崎県南高来郡瑞穂町	ジャガイモ ジャガイモ ジャガイモ ジャガイモ
<i>G. tabacum</i>	高知県香美郡夜須町	ナス
ヨモギシストセンチュウ ( <i>G. hypolysi</i> )	長崎県南高来郡国見町 長崎県南高来郡愛野町	ヨモギ ヨモギ

第1図 *Globodera* 属線虫3種の雌成虫の等電点電気泳動パターン

- Lane 1: ジャガイモシストセンチュウ (北海道虻田郡喜茂別町)  
Lane 2: ジャガイモシストセンチュウ (北海道函館市)  
Lane 3: ジャガイモシストセンチュウ (北海道斜里郡清里町)  
Lane 4: ジャガイモシストセンチュウ (長崎県南高来郡瑞穂町)  
Lane 5: *G. tabacum* (高知県香美郡夜須町)  
Lane 6: ヨモギシストセンチュウ (長崎県南高来郡国見町)  
Lane 7: ヨモギシストセンチュウ (長崎県南高来郡愛野町)

第2図 *Globodera* 属線虫3種のシストの等電点電気泳動パターン

- Lane 1: ジャガイモシストセンチュウ (北海道虻田郡喜茂別町)  
Lane 2: ジャガイモシストセンチュウ (北海道函館市)  
Lane 3: ジャガイモシストセンチュウ (北海道斜里郡清里町)  
Lane 4: ジャガイモシストセンチュウ (長崎県南高来郡瑞穂町)  
Lane 5: *G. tabacum* (高知県香美郡夜須町)  
Lane 6: ヨモギシストセンチュウ (長崎県南高来郡国見町)  
Lane 7: ヨモギシストセンチュウ (長崎県南高来郡愛野町)

それぞれ採取した植物と同じ種類の植物を用いて増殖した。

## 2. 電気泳動

調査は、*Globodera* 属線虫3種の成熟した雌成虫とシストの2種類について各々1頭(個)ごとに行った。また、電気泳動は、ジャガイモシストセンチュウとジャガイモシロシストセンチュウの識別を行う際に使用した KARSSEN (1995) の方法に基づき、アマシャム・ファルマシア社製の全自動電気泳動システム (PhastSystem) を用いた。

### (1) タンパク質抽出

成熟した雌成虫は、それぞれの寄主植物の根部に寄生していた中から、内容物の詰まった乳白色のものをピンセット等で丁寧に摘出して用いた。

シストは、増殖に用いた土を1週間程度風乾後、フェンウィック装置で分離した中から、卵や第2期幼虫を多く含むものを選んで用いた。また、シストは使用する前に1%グリセリン水溶液に12時間浸漬した。

取り出した雌成虫及びシストは蒸留水で数回洗浄し

た後1%グリセリン水溶液を入れた PhastSystem のサンプルウェルスタンプの1ウェルに1サンプルずつ入れ、ガラス棒でよくかき混ぜて処理した。

### (2) 電気泳動

電気泳動に用いたゲルは、ポリアクリルアミドを支持体とした縦横5cmの大きさで、pH 5~8に調整されたものを用いた。

泳動条件は PhastSystem のマニュアルに従い、約1時間泳動を行った。

### (3) 染色

染色は、銀染色法を用いた。

## 結果及び考察

今回供試した3種のシストセンチウの等電点電気泳動により得られたバンドパターンを第1図及び第2図に示した。

成熟した雌成虫では、ジャガイモシストセンチウが3本 (pI 8.5, pI 7.35 及び pI 5.9), *G. tabacum* が pI 7.35 及びヨモギシストセンチウが pI 5.8 にそれぞれはっきりとしたバンドを示した (第1図)。

シストでは、ジャガイモシストセンチウは pI 5.9, *G. tabacum* は pI 5.8 にそれぞれ1本ずつ、また、ヨモギシストセンチウは pI 5.85 と pI 5.8 のあいだに2本のバンドを示した (第2図)。

今回使用したジャガイモシストセンチウ及びヨモギシストセンチウでは雌成虫及びシストの個体群間に泳動パターンの違いは認められなかった。

また、ジャガイモシストセンチウでは、pI 5.9 にバンドが現れ、KARSSEN (1995) や FLEMING &

MARKS (1982; 1983) などの報告とはほぼ一致した。

以上の結果から、今回供試した *Globodera* 属線虫3種の成熟した雌成虫とシストの両方で、識別に有効なバンドパターンが得られた。

今回の結果では、1頭の雌成虫や1シストだけでも同定が可能であった。しかし、シストでは、その中に含まれる卵や2期幼虫が少ないと、バンドの現れない場合があり、調査にあたっては注意が必要である。

今後は、その他の電気泳動法や染色法を組み合わせで解析を行い、今回用いた方法よりも簡単に明瞭な違いの出る解析法の調査を進めていく。また、植物検疫でシストが発見された場合には今回調査した電気泳動による解析を行い、そのデータを蓄積することによって、植物検疫における本属の線虫の迅速で的確な同定法の確立に努めていくことが必要である。

## 引用文献

- FLEMING, C. C. and R. J. MARKS (1982) A method for the quantitative estimation of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* in mixed-species samples. *Record of Agricultural Research* **30**: 67-70.
- FLEMING, C. C. and R. J. MARKS (1983) The identification of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by isoelectric focusing of proteins on polyacrylamide gels. *Annals of Applied Biology* **103**: 277-281.
- KARSSEN, G. (1995) Species identification of cyst and root-knot nematodes from potato by electrophoresis of individual females. *Electrophoresis* **16**: 105-109.