

輸入植物検疫において東南アジア産水草類苗から発見された バナナネモグリセンチュウ *Radopholus similis* (Tylenchida: Pratylenchidae)

海老名 崇生・関本 茂行¹⁾・関谷 政彦²⁾・久井 潤也¹⁾

横浜植物防疫所

A Banana Burrowing Nematode, *Radopholus similis* (Tylenchida: Pratylenchidae), Intercepted from Aquarium Plants from Southeast Asia in Japanese Import Plant Quarantine. Takao Ebina, Shigeyuki Sekimoto¹⁾, Masahiko Sekiya²⁾ and Junya Hisai¹⁾ (Yokohama Plant Protection Station, 5-57 Kitanakadori, Naka-Ku, Yokohama, Kanagawa Prefecture 231-0003, Japan. ¹⁾Research Division, Yokohama Plant Protection Station. ²⁾Chubu Airport Sub-station, Nagoya Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan*. 58: 19-29 (2022)

Abstract: A banana burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949, was intercepted in roots of aquarium plants (*Anubias* sp. and *Bucephalandra* sp.) imported to Japan from Southeast Asia in import plant inspections in 2018 and 2019. We describe the morphological and molecular characters of seven samples of *R. similis*. The morphology of seven samples of *R. similis* were in congruence with those of previous descriptions of this species. The results of the phylogenetic analyses of the ITS rRNA gene and D2-D3 expansion segments of 28S rRNA gene sequences confirmed the species identification and phylogenetic relationship of *R. similis* with other *Radopholus* species. In Japanese import plant quarantine, this is the first report of *R. similis* from *Anubias* sp. and *Bucephalandra* sp.

Key Words: *Anubias*, *Bucephalandra*, burrowing nematode, *Radopholus similis*

緒 言

Radopholus similis (Cobb, 1893) Thorne, 1949 (バナナネモグリセンチュウ) は、植物根内と土壤中を移動しながら根の組織を加害する移住性の内部寄生性線虫である (Orton Williams and Siddiqi, 1973; Castillo *et al.*, 2012)。本種はヨーロッパ、アフリカ、インド、東南アジア、北米、中南米、ハワイ諸島及びオーストラリア等全世界に広く分布し、バナナ (*Musa* spp.)、*Anthurium* 属、コショウ属 (*Piper* spp.) 及びショウガ (*Zingiber officinale*) 等に寄生することが知られている (Orton Williams and Siddiqi, 1973; CABI, 2021)。*Radopholus similis* は我が国未発生であり、経済的に重要な植物寄生性線虫の 1 種であることから、本邦への侵入が警戒されている。

日本の輸入植物検疫における 1970 年 (昭和 45 年) 以降の記録によれば、1990 年 (平成 2 年) にシンガポール産 *Anthurium* 属及びドミニカ産『プルブラータ (記録名)』から *Radopholus* 属線虫 (属までの同定) が発見され、1991～1997 年 (平成 3

～9 年) の間にはインドネシア産ショウガ生根茎から *R. similis* 及び *Radopholus* 属線虫が毎年継続的に発見された (農林水産省植物防疫所, 1972–1997, 2021)。また、1991 年 (平成 3 年) にはフィリピン産ショウガ生根茎からも *Radopholus* 属線虫 (属までの同定) が発見されている (農林水産省植物防疫所, 1972–1997)。しかし、1998～2017 年 (平成 10～29 年) の 20 年間、*Radopholus* 属線虫の発見記録はない (農林水産省植物防疫所, 2021)。

2018～2019 年 (平成 30～令和元年)、成田国際空港及び関西国際空港の輸入植物検疫において、東南アジアから輸入された水草類苗 (*Anubias* 属及び *Bucephalandra* 属) から *R. similis* が計 13 件発見された (農林水産省植物防疫所, 2021)。日本の輸入植物検疫において、*Anubias* 属及び *Bucephalandra* 属からの本種の発見は初めてである。今後の植物検疫業務に資するため、今回の発見事例のうち、形態学的及び分子生物学的データが十分に得られた 7 サンプルについて本著にとりまとめた。

¹⁾横浜植物防疫所調査研究部

²⁾名古屋植物防疫所中部空港支所

Table 1 Sample list of *Radopholus similis* intercepted from aquarium plants imported from Southeast Asia to Japan in import plant quarantine in 2018 and 2019.

Sample No.	Origin	Host plants	Date of collection	Morphological research		Molecular research				Notes: Sample Code
				♀♀	♂♂	ITS	D2D3	PCR-RFLP	Species-specific PCR	
1	Indonesia	<i>Bucephalandra</i> sp.	10. ix. 2019	10	10	+	+		+	31C-5
2	Singapore	<i>Anubias</i> sp.	14. v. 2018	11	11					30C-11
3			5. vi. 2018	20	3	+	+	+	+	30C-12
4			23. vii. 2018	13	11		+	+	+	30C-25
5	Thailand	<i>Anubias</i> sp.	16. x. 2018	16	13	+	+	+	+	30C-48
6			21. xi. 2018	5	8					30C-50
7			25. xi. 2018	11	9					30C-51

+, Indicates that the sample was identified as *Radopholus similis*.

材料及び方法

1. 形態学的調査

2018年及び2019年に日本(成田国際空港)の輸入植物検疫(航空貨物)において東南アジア(インドネシア、シンガポール及びタイ)産水草類苗(*Anubias*属及び*Bucephalandra*属)から発見された*Radopholus similis* 7サンプルについて形態学的特徴を調査した(Table 1)。なお、シンガポール産*Anubias*属(サンプルNo.3)については、同一荷口(同日輸入、同寄主植物及び同産地)で圃場別による判定別の事例2件を1サンプルとして取り扱った。

線虫を65~75°Cの温湯で熱殺した後、TAF固定液(37~40%ホルムアルデヒド(市販のホルマリン液)7.5ml、トリエタノールアミン2.0ml及び蒸留水90.5ml)で固定した。固定後の線虫を水道水で封入したプレパラート標本作製し、生物顕微鏡Olympus BX51(オリンパス株式会社、東京)を用いて観察を行い、撮影・画像計測装置Olympus FX380(オリンパス株式会社)を用いて撮影及び形態計測を実施した。その後、線虫標本をグリセリンに置換し、供試個体毎に保管した。なお、インドネシア産*Bucephalandra*属(サンプルNo.1)では、一部の個体を除き、サンプル内の線虫標本は一つの容器内に一括にまとめて保管した。形態学的調査には基本的に固定直後の線虫を供試したが、一部のサンプルについては補足的にグリセリン置換後の標本も供試した。グリセリン置換標本の撮影及び形態計測については、撮影・画像計測装置Olympus DP-27(オリンパス株式会社)を使用した。

2. 分子生物学的診断

(1) 供試サンプル

上記の形態学的調査を実施した7サンプルのうち、4サンプルについて分子生物学的診断を実施した(Table 1)。分子生物学的診断には、形態学的調査に供試した線虫とは別に1サンプルにつき2個体以上を供試した。

(2) DNA抽出

ろ紙及びDNA抽出キットISOHAIR(株式会社ニッポンジーン、東京)を用いた簡易抽出法により、線虫1個体ずつから鋳型DNAを抽出した。スライドガラス上で線虫を1個体ごとに約1mm四方の滅菌ろ紙で押し潰し(Iwahori *et al.*, 2000)、DNA抽出バッファー10µl(サンプルNo.3では30µl)を入れた0.5mlチューブにろ紙片を入れた。DNA抽出バッファーの組成は、ISOHAIRに添付されているEnzyme Solution、Lysis Solution及びTE Buffer(pH8.0)を5:4:100の割合で混合したものを用いた(Tanaka *et al.*, 2012)。60°C20分でインキュベートした後、滅菌蒸留水90µl(サンプルNo.3では70µl)を加えて希釈したものを鋳型DNAとした。すべての鋳型DNAは実験に供試するまで-20°Cで保存した。

(3) PCR及び塩基配列解析

核リボソームRNA遺伝子ITS1-5.8S-ITS2領域(以下、ITS領域)及びD2-D3領域について塩基配列解析を行った。ITS領域の増幅には18S(5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3')(Vrain *et al.*, 1992)及びF195(5'-TCC TCC GCT AAA TGA TAT G-3')(Ferris *et al.*, 1993)のプライマーペアを、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')(Nunn, 1992)のプライマーペアをそれぞれ用いた。PCRは反応容量を20µlとして、反応ごとに10×Ex Taq Buffer(20mM Mg²⁺ plus)(タカラバイオ株式会社、滋賀)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)(タカラバイオ株式会社)を0.1µl、鋳型DNAを1.0µl及び蒸留滅菌水を14.5µl加えた。PCR反応はPC-818 Program Temp Control System(株式会社アステック、福岡)またはGeneAtlas G(株式会社アステック)を用いて、94°C2分の熱変性後、94°C30秒、50°C30秒、72°C30秒を35サイクルとした。PCR産物をExoSAP-IT™(Applied Biosystems、アメリカ)で精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied

Biosystems) によるサイクルシーケンス反応を行った後、BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) で精製し、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 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 BLAST の相同性検索を行った後、MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) を用いて多重配列アライメントを行い、ベイズ法により分子系統解析を行った。進化モデルの選択には MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) を用い、AIC (Akaike Information Criterion: 赤池情報量基準) に基づいて最適モデルを選択した。ベイズ法による系統樹推定には MrBayes 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) を用い、ITS 領域には SYM + G モデル、D2-D3 領域には HKY + G モデルを用いた。塩基配列解析は ITS 領域で 3 サンプル、D2-D3 領域で 4 サンプルについてそれぞれ実施した (Table 1)。

(4) ITS 領域の PCR-RFLP

ITS 領域の PCR 産物を制限酵素 *AhaI* (タカラバイオ株式会社) 及び *RsaI* (株式会社ニッポンジーン) で処理し、バンドパターンを確認した。ITS 領域の PCR は上記 (3) の条件で行った。制限酵素処理は反応容量を 10µl とし、反応ごとに PCR 産物を 5.0µl、制限酵素を 0.2µl、制限酵素に付属する 10×Buffer を 1.0µl 及び滅菌蒸留水を 3.8µl 加え、37°C4 時間でインキュベートした。制限酵素処理後の PCR 産物は GelRed™ (Biotium、アメリカ) を混合した 2.0% アガロースゲル (アガロース S: 株式会社ニッポンジーン) 及び 0.5×TBE バッファーを用いて電気泳動し、UV 照射下でバンドパターンを確認した。PCR-RFLP は 3 サンプルについて実施した (Table 1)。

(5) 種特異的プライマーを用いた PCR

Radopholus similis 種特異的プライマー RsF1 (5'-TGT CAT CGC CTT TGG CAG CT-3') 及び RsR1 (5'-TGG TAA ACG ACC CTG AAC CAG-3') (Wang *et al.*, 2011) を用いて PCR を行った。PCR は反応容量を 10µl として、1 反応あたり 10×PCR Buffer (タカラバイオ株式会社) を 1.0µl、dNTP Mixture (2.5mM each) を 0.8µl、各プライマー (10µM) を 0.2µl、TaKaRa Taq™ (5U/µl) (タカラバイオ株式会社) を 0.1µl、鋳型 DNA を 5.0µl 及び蒸留滅菌水を 2.7µl 加え、PCR 温度条件は Wang *et al.* (2011) に従った。PCR 産物は GelRed™ (Biotium) を混合した 2.0% アガロースゲル及び 0.5×TBE バッファーを用いて電気泳動し、UV 照射下でバンドパターンを確認した。種特異的プライマーを用いた PCR は 4 サンプルについて実施した (Table 1)。

結 果

1. 形態学的調査結果

(1) 形態計測値

Table 2 に示す。

(2) 形態学的特徴 (Figs 1–3)

雌成虫：体は糸状で、熱殺後は直線状または腹方にやや湾曲

する。唇部は比較的低く、半球状で、稀に側方が丸みを帯びたり、前縁がやや平坦の場合もある。唇部はわずかにくびれるか、またはくびれない場合もある。唇部体環数は 4–6 である。口針は頑強で、口針節球は球形で、稀に後方または前方に傾斜する場合があり、口針節球の前縁は丸みを帯びるか平坦、または僅かにくぼむ。排泄口は食道腸間弁に近い位置か、またはその後方に位置する。背部食道腺葉は背側で伸長して大部分が腸と重なる。卵巣は 2 本で、陰門から前後に伸び、両卵巣はほとんど同形かつ同長である。受精のうは卵形～球形で、ひも状の精子を保持する。postrectal intestinal sac は不明瞭か、または欠く。尾部は細長く、長めの円錐形状か、稀に円筒形状である。幻器は明瞭。尾端は先端が丸みを帯び、体環 (条溝) がない。側線は 4 本で、側帯の中央の帯は両側方の帯と同じ幅か、または稀に若干狭くなる場合がある。側帯は全身にかけて微細な横溝があり、特に尾部では明瞭である。また、尾部の前方 1/3 において側帯の中央の帯は幅が狭くなり、側線は幻器の直前または直後で 3 本となり、尾端まで 3 本のままで継続する。

雄成虫：体は糸状で、熱殺後は直線状またはやや腹方で湾曲する。唇部はドアノブ状で、明瞭にくびれる。唇部体環数は 3–5 である。口針は細く、基部は丸みを帯び、融合している口針節球を持つ。側線は 4 本。排泄口は食道腸間弁の近くか、またはその後方に位置する。中部食道球は退化し、紡錘形である。食道腺葉はおおむね雌成虫のものよりも縮小する。交接刺はティレンクス目において標準的な形状で、腹方に湾曲し、先端が尖る。精巣にはひも状の精子がある。尾部は細長く、長い円錐形状で、尾端には体環 (条溝) がない。交接のうは横から見た場合、尾部の 1/2 から 2/3 までの長さまで伸長する。

2. 分子生物学的診断

(1) 塩基配列解析

塩基配列解析に供試したサンプルの塩基配列長は ITS 領域で 814bp、D2-D3 領域で 733bp または 735bp であった。なお、シンガポール産 *Anubias* 属 (サンプル No.3) 及びタイ産 *Anubias* 属 (サンプル No. 5) から検出された個体は、いずれの領域においても塩基配列が完全に一致した。

ITS 領域の塩基配列を用いて BLAST 検索を行った結果、シンガポール産 *Anubias* 属 (サンプル No.3) 及びタイ産 *Anubias* 属 (サンプル No. 5) から検出された個体は塩基配列データベース既登録の *Radopholus similis* (KF234220) 及び *R. bridgei* Siddiqi & Hahn, 1995 (KJ845636) と 100% の相同性を示した。また、インドネシア産 *Bucephalandra* 属 (サンプル No. 1) から検出された個体は *R. similis* (KF234228 及び KF234226) と最も高い相同性 (97.1%) を示した。ベイズ法による分子系統解析の結果、シンガポール産 *Anubias* 属 (サンプル No. 3) 及びタイ産 *Anubias* 属 (サンプル No. 5) の個体は *R. similis* 及び *R. bridgei* と同じクレードに含まれた (Fig. 4)。一方、インドネシア産 *Bucephalandra* 属 (サンプル No. 1) の個体は *R. arabocoffeae* Trinh, Nguyen, Waeyenberge, Subbotin, Karssen & Moens, 2004、*R. duriophilus* Nguyen, Subbotin, Madani, Trinh & Moens, 2003 及び *R. similis* と同じクレードに含まれた (Fig. 4)。

Table 2 Morphometrics of females and males of the intercepted *Radopholus similis* samples. All measurements are in μm and in the form: mean \pm SD (range).

Origin Host plants Number of samples	Indonesia <i>Bucephalandra</i> sp.		Singapore <i>Anubias</i> sp.		Thailand <i>Anubias</i> sp.		All samples	
	1		3		3		7	
	female	male	female	male	female	male	female	male
<i>n</i>	10	10	44	25	32	30	86	65
L	625 \pm 44 (546–701)	571 \pm 33 (507–605)	681 \pm 39 (565–756)	654 \pm 28 (607–699)	637 \pm 43 (531–724)	595 \pm 39 (511–692)	658 \pm 47 (531–756)	614 \pm 47 (507–699)
<i>a</i>	27.2 \pm 1.7 (25.1–30.6)	33.0 \pm 2.2 (30.7–36.7)	30.5 \pm 2.9 (25.7–38.1)	35.5 \pm 3.0 (31.2–40.1)	26.2 \pm 2.4 (21.3–30.0)	32.7 \pm 3.8 (25.3–40.9)	28.5 \pm 3.3 (21.3–38.1)	33.8 \pm 3.6 (25.3–40.9)
<i>b</i>	7.5 \pm 0.4 (6.8–8.1)	7.5 \pm 0.3 (6.9–7.8)	8.0 \pm 0.6 (6.5–8.9)	7.8 \pm 0.4 (7.1–8.5)	7.4 \pm 0.3 (6.7–8.2)	7.2 \pm 0.6 (6.0–8.4)	7.7 \pm 0.6 (6.5–8.9)	7.5 \pm 0.6 (6.0–8.5)
<i>b'</i>	4.2 \pm 0.2 (3.8–4.4)	5.2 \pm 0.5 (4.5–6.0)	4.7 \pm 0.4 (3.6–5.4)	5.9 \pm 0.3 (5.4–6.7)	4.5 \pm 0.3 (3.9–5.4)	5.5 \pm 0.4 (4.8–6.3)	4.6 \pm 0.4 (3.6–5.4)	5.6 \pm 0.5 (4.5–6.7)
<i>c</i>	8.5 \pm 0.8 (7.3–9.5)	7.7 \pm 0.6 (7.0–9.1)	9.2 \pm 0.6 (8.1–10.9)	8.1 \pm 0.4 (7.3–9.4)	9.1 \pm 0.6 (8.1–11.0)	8.0 \pm 0.3 (7.4–8.6)	9.1 \pm 0.6 (7.3–11.0)	8.0 \pm 0.4 (7.0–9.4)
<i>c'</i>	4.3 \pm 0.4 (3.9–5.1)	5.8 \pm 0.5 (4.8–6.6)	4.8 \pm 0.5 (3.9–5.9)	6.2 \pm 0.4 (5.1–7.2)	4.2 \pm 0.4 (3.3–4.9)	5.7 \pm 0.4 (4.8–6.5)	4.5 \pm 0.5 (3.3–5.9)	5.9 \pm 0.5 (4.8–7.2)
V (%)	55.9 \pm 0.8 (54.7–57.0)	–	58.0 \pm 1.7 (55.4–65.4)	–	57.6 \pm 2.2 (50.3–61.4)	–	57.6 \pm 1.9 (50.3–65.4)	–
G1 (%)	22.8 \pm 3.9 (18.6–28.4)	–	19.9 \pm 2.8 (15.3–28.8)	–	23.8 \pm 5.4 (16.5–37.7)	–	21.7 \pm 4.4 (15.3–37.7)	–
G2 (%)	20.4 \pm 1.7 (16.2–22.1)	–	18.3 \pm 2.2 (14.5–25.2)	–	22.6 \pm 4.5 (16.6–32.1)	–	20.1 \pm 3.7 (14.5–32.1)	–
T (%)	–	40.9 \pm 3.9 (32.5–46.6)	–	28.2 \pm 4.0 (21.4–34.9)	–	32.0 \pm 3.8 (22.5–39.8)	–	31.9 \pm 5.7 (21.4–46.6)
Stylet length	16.9 \pm 0.5 (16.0–17.5)	12.3 \pm 0.3 (11.9–12.8)	17.8 \pm 0.6 (16.4–19.8)	12.7 \pm 0.4 (11.7–13.4)	17.3 \pm 0.4 (16.6–18.1)	12.6 \pm 0.5 (11.7–13.6)	17.5 \pm 0.6 (16.0–19.8)	12.6 \pm 0.4 (11.7–13.6)
DGO from stylet base	3.9 \pm 0.5 (3.0–4.6)	–	4.0 \pm 0.5 (2.9–5.0)	–	3.7 \pm 0.6 (2.4–4.9)	–	3.9 \pm 0.6 (2.4–5.0)	–
Anterior end to excretory pore	84 \pm 5.5 (77–93)	83 \pm 2.9 (77–86)	94 \pm 4.8 (84–107)	93 \pm 3.9 (85–100)	87 \pm 5.5 (80–98)	87 \pm 4.4 (80–100)	90 \pm 6.4 (77–107)	89 \pm 5.3 (77–100)
Anterior end to center of median bulb	54.4 \pm 3.5 (50.2–60.8)	48.9 \pm 2.3 (45.6–51.8)	57.3 \pm 2.8 (51.1–63.0)	53.6 \pm 2.3 (46.7–56.9)	56.0 \pm 3.3 (51.3–63.4)	51.8 \pm 2.2 (48.5–56.3)	56.5 \pm 3.2 (50.2–63.4)	52.0 \pm 2.7 (45.6–56.9)
Pharynx length	84 \pm 5.2 (78–95)	76 \pm 3.3 (71–82)	85 \pm 5.4 (77–107)	84 \pm 5.1 (78–96)	86 \pm 4.9 (78–98)	83 \pm 5.8 (74–96)	85 \pm 5.2 (77–107)	82 \pm 5.8 (71–96)
Anterior end to base of pharyngeal gland	150 \pm 11.3 (130–168)	110 \pm 6.6 (99–119)	146 \pm 13.4 (121–188)	111 \pm 5.5 (101–121)	142 \pm 10.0 (127–168)	109 \pm 6.0 (99–126)	145 \pm 12.2 (121–188)	110 \pm 5.9 (99–126)
Tail length	74 \pm 6.8 (66–84)	75 \pm 6.4 (64–82)	74 \pm 5.4 (65–85)	81 \pm 4.4 (71–87)	70 \pm 5.5 (59–82)	75 \pm 5.3 (63–87)	73 \pm 5.9 (59–85)	77 \pm 5.9 (63–87)
Hyaline length	7.8 \pm 1.0 (6.2–9.2)	4.5 \pm 1.3 (2.7–6.9)	8.2 \pm 1.8 (4.2–11.6)	5.6 \pm 1.6 (3.3–10.2)	8.9 \pm 2.2 (4.5–15.1)	5.3 \pm 1.4 (3.7–9.5)	8.4 \pm 1.9 (4.2–15.1)	5.3 \pm 1.5 (2.7–10.2)
Anterior genital branch length	144 \pm 31 (108–189)	–	136 \pm 22 (103–199)	–	152 \pm 39 (100–236)	–	143 \pm 31 (100–236)	–
Posterior genital branch length	128 \pm 14 (102–148)	–	125 \pm 18 (97–191)	–	145 \pm 34 (95–209)	–	132 \pm 26 (95–209)	–
Spicules length	–	18.8 \pm 0.5 (18.2–19.6)	–	18.6 \pm 0.7 (17.2–19.9)	–	18.6 \pm 0.8 (17.3–20.3)	–	18.6 \pm 0.7 (17.2–20.3)
Gubernaculum length	–	10.4 \pm 0.4 (9.8–11.0)	–	10.3 \pm 0.5 (9.4–11.1)	–	10.1 \pm 0.7 (8.1–11.0)	–	10.2 \pm 0.6 (8.1–11.1)
Testis length	–	233 \pm 25 (184–265)	–	185 \pm 29 (130–233)	–	190 \pm 24 (128–250)	–	195 \pm 31 (128–265)
Maximum body diam.	23.0 \pm 1.7 (19.7–25.0)	17.4 \pm 1.4 (15.4–19.5)	22.5 \pm 2.1 (18.5–27.3)	18.6 \pm 1.8 (15.3–21.3)	24.5 \pm 2.7 (20.0–30.6)	18.4 \pm 1.9 (15.0–22.8)	23.3 \pm 2.5 (18.5–30.6)	18.3 \pm 1.8 (15.0–22.8)
Vulval body diam.	22.8 \pm 1.7 (19.7–24.4)	–	21.9 \pm 2.2 (18.5–27.3)	–	24.1 \pm 2.9 (19.0–29.6)	–	22.9 \pm 2.6 (18.5–29.6)	–
Anal body diam.	17.0 \pm 1.2 (14.9–18.7)	13.0 \pm 0.5 (12.4–14.1)	15.5 \pm 1.1 (12.4–17.7)	13.0 \pm 0.7 (11.6–14.3)	16.6 \pm 1.2 (13.3–19.4)	13.0 \pm 0.5 (12.1–14.2)	16.1 \pm 1.3 (12.4–19.4)	13.0 \pm 0.6 (11.6–14.3)
Ratio of tail length to stylet length	4.4 \pm 0.3 (3.9–4.8)	6.1 \pm 0.5 (5.3–6.7)	4.2 \pm 0.3 (3.5–4.7)	6.4 \pm 0.3 (5.7–6.9)	4.1 \pm 0.3 (3.5–4.6)	5.9 \pm 0.5 (5.0–7.0)	4.2 \pm 0.3 (3.5–4.8)	6.1 \pm 0.5 (5.0–7.0)

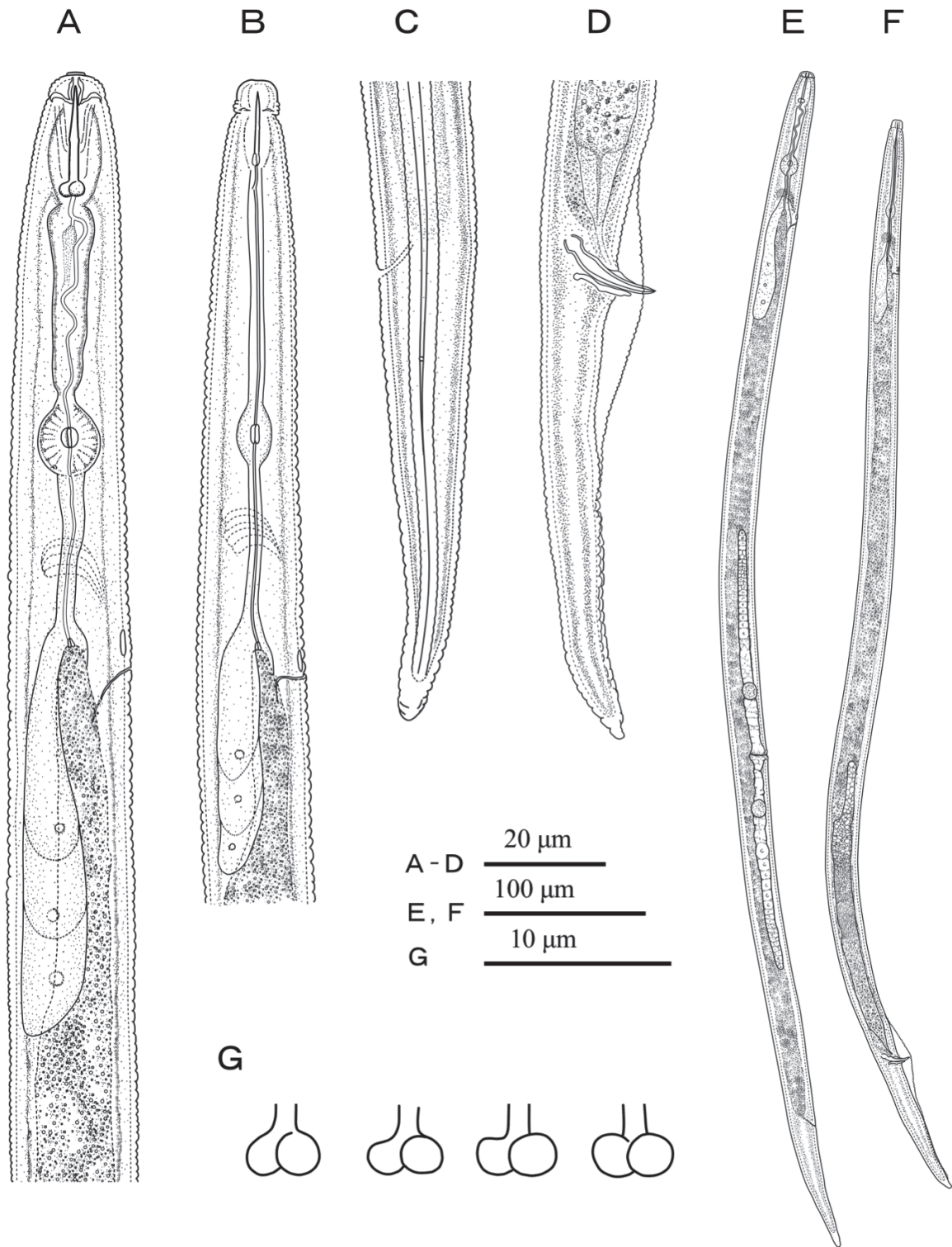


Fig. 1 *Radopholus similis*. A: Female anterior end, B: Male anterior end, C: Female tail region, D: Male tail region, E: Female whole body, F: Male whole body, G: Female stylet knobs.



Fig. 2 *Radopholus similis*. A: Female whole body, B: Male whole body, C: Female anterior end, D: Male anterior end, E: Testis region, F: Female tail region, G: Male tail region, H: Female lateral field, I: Male lateral field, J: Spicule and gubernaculum. Scale bar, A & B: 100 μ m, C–G: 20 μ m, H–J: 10 μ m.

D2-D3 領域の塩基配列を用いて BLAST 検索を行った結果、シンガポール産 *Anubias* 属 (サンプル No.3) 及びタイ産 *Anubias* 属 (サンプル No. 5) から検出された個体は *R. similis* (EU555407) と 100% の相同性を示した。インドネシア産 *Bucephalandra* 属 (サンプル No. 1) から検出された個体は *R. similis* (JQ782248) と最も高い相同性 (98.8%) を示し、シンガポール産 *Anubias* 属 (サンプル No. 4) から検出された個体も *R. similis* (JQ782248 及び EU555407) と最も高い相同性 (98.9%) を示した。サイズ法による分子系統解析の結果、インドネシア産 *Bucephalandra* 属 (サンプル No. 1)、シンガポール産 *Anubias* 属 (サンプル No. 3 及び No. 4) 及びタイ産 *Anubias* 属 (サンプル No. 5) の個体はいずれも *R. similis* のみからなるクレードに含まれた (Fig. 5)。

(2) ITS 領域の PCR-RFLP

ITS 領域の PCR 産物を 2 種類の制限酵素で処理した結果、*AluI* 処理では約 380bp、約 340bp 及び約 140bp の 3 本のバンドが、*RsaI* 処理では約 630bp 及び約 130bp の 2 本のバンドが、供試した 3 サンプルすべてで検出された (Fig. 6)。なお、バンドパターンに種内変異は認められなかった。

(3) 種特異的プライマーを用いた PCR

種特異的プライマーを用いた PCR の結果、供試した 4 サンプルすべてで *R. similis* に種特異的なサイズの PCR 産物 (約 270bp) の増幅が確認された (Fig. 7)。

考 察

本調査における雌雄成虫の形態学的特徴は、既報の *Radopholus similis* の記載 (Sher, 1968; Orton Williams and Siddiqi, 1973; Loof, 1991; Ryss and Wouts, 1997; Elbadri *et al.*, 1999; Ryss, 2003; Xu *et al.*, 2014) とおおむね一致したが、雌雄成虫の口針長は既報のものと比較してやや短い傾向を示した (Table 2)。

Radopholus similis とその近似種 (*R. arabocoffeae*, *R. daklakensis* Trinh, Waeyenberge, Nguyen & Moens, 2012 及び *R. duriophilus*) は、雌成虫の postrectal intestinal sac の有無 (*R. similis* は postrectal intestinal sac を有するが、近似種は欠く) 及び雄成虫の交接のうの長さ (*R. similis* の交接のうは尾端に達するが、近似種は尾端に達しない) によって識別できるとされる (Nguyen *et al.*, 2003; Trinh *et al.*, 2004, 2012)。しかし、Múnera Uribe *et al.* (2010) はコロンビア産 *R. similis* 個体群の雌成虫が必ずしも postrectal intestinal sac を持たないこと、雄成虫の交接のうが必ずしも尾端には達しないことを報告したうえで、雌成虫の postrectal intestinal sac の有無及び雄成虫の交接のうの長さは *R. similis* と近似種を識別する形質として有効ではないと指摘している。本調査においても postrectal intestinal sac を欠く *R. similis* 雌成虫及び交接のうが尾端に達しない *R. similis* 雄成虫が確認され、上述の Múnera Uribe *et al.* (2010) の指摘を裏付ける結果となった。

本調査では一部の雄成虫について様々な角度から尾部を観察



Fig. 3 *Radopholus similis*. Male tail region from various perspectives. A: Lateroventral view. A stitched image with extended depth of focus using a function of the Olympus DP-27. B: Subdorsal view. C: Ventral view. An arrow indicates a cloaca. Scale bar, 20µm.

し、さらに深度合成写真を撮影した。その結果、交接のうが尾端に達しない個体 (Fig. 3A) と尾端に達する個体 (Fig. 3B) の両方が確認された。交接のうは後方に向かって幅が狭くなり、やや側方に寄るため、虫体を横から観察した場合には交接のうの後方部が見えづらい。そのため、実際には交接のうが尾端に達している個体であっても、横からの観察では尾端に達していないように見える可能性があるものと推測された。

ITS 領域及び D2-D3 領域の塩基配列解析、ITS 領域の PCR-RFLP 及び *R. similis* 種特異的プライマーを用いた PCR による分子生物学的診断結果は、いずれのサンプルも *R. similis*であることを示し、形態学的調査を支持する結果となった。

シンガポール産 *Anubias* 属 (サンプル No.3) 及びタイ産 *Anubias* 属 (サンプル No. 5) から検出された個体の ITS 領域の塩基配列は *R. similis* (KF234220) 及び *R. bridgei* (KJ845636) と 100% の相同性を示したが、D2-D3 領域の塩基配列、ITS 領域の PCR-RFLP、*R. similis* 種特異的プライマーを用いた PCR 及び形態学的調査の結果から、いずれの個体も *R. similis* と同定された。現在、塩基配列データベースに登録されている *R. bridgei* の ITS 領域の塩基配列は上記の 1 配列 (KJ845636) のみであり、本配列は *R. similis* と高い相同性 (95.9 ~ 100%) を示している。一方、ITS1 領域の塩基配列解析及びゲノム DNA の RAPD 解析の結果から、*R.*

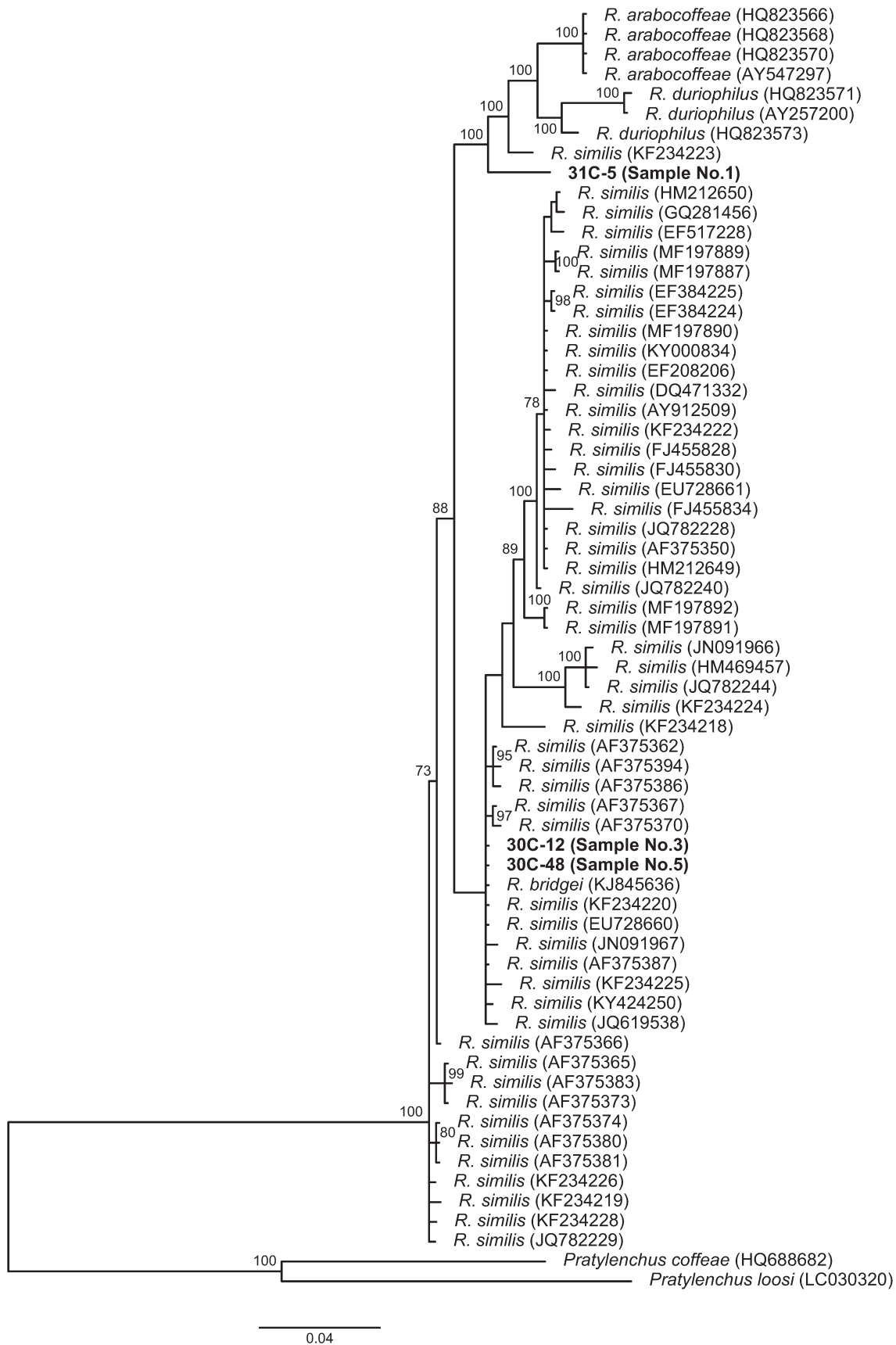


Fig. 4 Phylogenetic relationships between *Radopholus* species: Bayesian 50% majority rule consensus tree as inferred from the analysis of the ITS rRNA gene sequence alignment under the SYM + G model. Posterior probabilities exceeding 70% are given for appropriate clades. New sequences are indicated in bold font.



Fig. 5 Phylogenetic relationships between *Radopholus* species: Bayesian 50% majority rule consensus tree as inferred from the analysis of the D2-D3 of 28S rRNA gene sequence alignment under the HKY + G model. Posterior probabilities exceeding 70% are given for appropriate clades. New sequences are indicated in bold font.

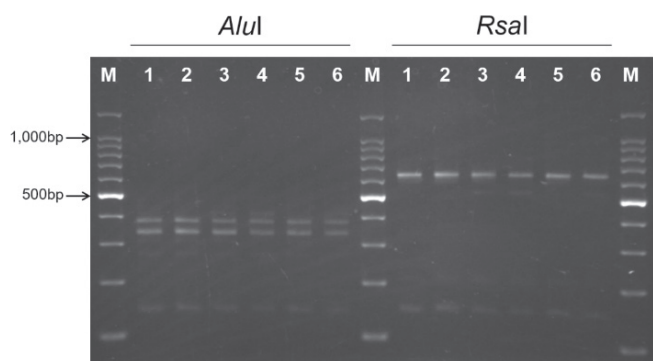


Fig. 6 Restriction fragments patterns of the amplified ITS region digested using *AluI* and *RsaI*. Lanes: M, 100 bp DNA ladder; 1–2, Sample No. 3; 3–4, Sample No. 4; 5–6, Sample No. 5.

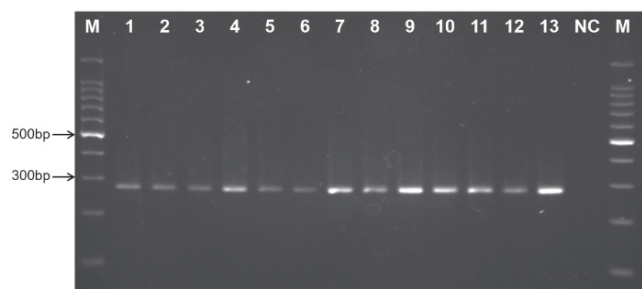


Fig. 7 PCR amplification products obtained using *Radopholus similis* species-specific primers RsF1/RsR1. Lanes: M, 100 bp DNA ladder; 1–3, Sample No. 1; 4–6, Sample No. 3; 7–9, Sample No. 4; 10–13, Sample No. 5; NC, Negative control.

bridgei は *R. similis* と遺伝的に大きく異なることが報告されている (Siddiqi and Hahn, 1995; Fallas *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 2000)。

本報告は我が国の輸入植物検疫における *Anubias* 属及び *Bucephalandra* 属からの *R. similis* の初発見事例である。ヨーロッパ (オランダ、ドイツ及びフランス等) の輸入植物検疫においても *Anubias* 属水草類苗から本種がたびたび発見されており (EPPO, 2021)、ポーランドの輸入植物検疫ではシンガポール産 *Anubias* 属水草類苗から *Radopholus* 属の別種である *R. bridgei* も発見されている (Ryss and Karnkowski, 2010)。*Radopholus* 属線虫には形態的にきわめて類似する種も存在することから、輸入植物検疫において *Radopholus* 属線虫が発見された場合には形態学的調査及び分子生物学的診断の両方を実施することで、より正確な種の同定が可能となる。

謝 辞

供試サンプルの提供に際してご助力いただいた横浜植物防疫所成田支所第1航空貨物担当の清野芳典次席同定官並びに現場の植物検疫官に感謝の意を表す。線虫の同定結果の確認や助言等を賜った川上清彦次席同定官 (神戸植物防疫所坂出支所)、稲葉哲也次席同定官 (名古屋植物防疫所本船貨物担当) 及び井関崇次席同定官 (横浜植物防疫所札幌支所) に感謝の意を表す。

引用文献

- CABI (2021) *Radopholus similis* (burrowing nematode). *Crop Protection Compendium*. <https://www.cabi.org/cpc/datasheet/46685> (accessed 2021)
- Castillo, P., J. Stanley, R.N. Inserra and R.H. Manzanilla-López (2012) Pratylenchidae - the lesion nematodes. In *Practical plant nematology* (Manzanilla-López, R.H. and N. Marbán-Mendoza ed.). Biblioteca Basica de Agricultura, Montecillo, Mexico: 411–478.
- Elbadri, G.A.A., E. Geraert and M. Moens (1999) Morphological differences among *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 populations. *Russ. J. Nematol.* **7**: 139–153.
- EPPO (2021) EPPO Reporting Service (2000–2021). *EPPO Global Database*. EU. <https://gd.eppo.int/reporting/> (accessed 2021)
- Fallas, G.A., M.L. Hahn, M. Fargette, P.R. Burrows and J.L. Sarah (1996) Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus* spp. from different areas of the world. *J. Nematol.* **28**: 422–430.
- Ferris, V.R., J.M. Ferris and J. Faghihi (1993) Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundam. Appl. Nematol.* **16**: 177–184.
- Iwahori, H., N. Kanzaki and K. Futai (2000) A simple, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-aided diagnosis method for pine wilt disease. *For. Pathol.* **30**: 157–164.
- Kaplan, D.T., W.K. Thomas, L.M. Frisse, J.L. Sarah, J.M. Stanton, P.R. Speijer, D.H. Mari and C.H. Opperman (2000) Phylogenetic analysis of geographically diverse *Radopholus similis* via rDNA sequence reveals a monomorphic motif. *J. Nematol.* **32**: 134–142.
- Loof, P.A.A. (1991) The family Pratylenchidae Thorne, 1949. In *Manual of agricultural nematology* (Nickle, W.R. ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA: 363–421.
- Múnera Uribe, G.E., W. Bert, A.R. Vierstraete, E. De La Peña, M. Moens and W. Decraemer (2010) Burrowing nematodes from Colombia and their relationship with *Radopholus similis* populations, *R. arabocoffeae* and *R. duriophilus*. *Nematology* **12**: 619–629.
- Nguyen, C.N., S.A. Subbotin, M. Madani, P.Q. Trinh and M. Moens (2003) *Radopholus duriophilus* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae) from Western Highland of Vietnam. *Nematology* **5**: 549–558.
- 農林水産省植物防疫所 (1972–1997) 1970年 (昭和45年)～1996年 (平成8年) 輸入植物検査病菌・害虫発見記録. 植物検疫統計.
- 農林水産省植物防疫所 (2021) 1997年 (平成9年)～2019年 (令和元年) 輸入植物検査病菌・害虫発見記録. 植物検疫統計—統計レポート. 植物防疫所ホームページ. <https://www.maff.go.jp/pps/j/tokei/index.html> (accessed 2021)
- Nunn, G.B. (1992) *Nematode molecular evolution*. Ph.D. Dissertation,

- University of Nottingham, Nottingham, UK, 192 pp.
- Nylander, J.A.A. (2004) *MrModeltest v2*. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Orton Williams, K.J. and M.R. Siddiqi (1973) *Radopholus similis*. C.I.H. Descriptions of plant-parasitic nematodes. Set 2, No.27. Commonwealth Institute of Helminthology, St Albans, UK, 4 pp.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard and J.P. Huelsenbeck (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **61**: 539–542.
- Ryss, A.Y. (2003) Taxonomy, evolution and phylogeny of the genus *Radopholus* (didelphic species) according to morphological data, with a key to species (Nematoda: Tylenchida). *Zoosyst. Ross.* **11**: 243–256.
- Ryss, A.Y. and W. Karnkowski (2010) Observations on *Radopholus bridgei* Siddiqi & Hahn, 1995 intercepted in exotic aquarium plants imported to Poland. *Nematology* **12**: 827–833.
- Ryss, A.Y. and W.M. Wouts (1997) The genus *Radopholus* (Nematoda: Pratylenchidae) from native vegetation in New Zealand, with descriptions of two new species. *Int. J. Nematol.* **7**: 1–17.
- Sher, S.A. (1968) Revision of the genus *Radopholus* Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchoidea). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* **35**: 219–237.
- Siddiqi, M.R. and M.L. Hahn (1995) *Radopholus bridgei* sp. n. (Tylenchida: Pratylenchidae) from Indonesia and its differentiation by morphological and molecular characters. *Afro-Asian J. Nematol.* **5**: 38–43.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731–2739.
- Tanaka, R., T. Kikuchi, T. Aikawa and N. Kanzaki (2012) Simple and quick methods for nematode DNA preparation. *Appl. Entomol. Zool.* **47**: 291–294.
- Trinh, P.Q., C.N. Nguyen, L. Waeyenberge, S.A. Subbotin, G. Karssen and M. Moens (2004) *Radopholus arabocoffeae* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae), a nematode pathogenic to *Coffea arabica* in Vietnam, and additional data on *R. duriophilus*. *Nematology* **6**: 681–693.
- Trinh, P.Q., L. Waeyenberge, C.N. Nguyen and M. Moens (2012) Morphological and molecular diversity of *Radopholus* on coffee in Vietnam and description of *R. daklakensis* sp. n. from Robusta coffee. *Nematology* **14**: 65–83.
- Vrain, T.C., D.A. Wakarchuk, A.C. Levesque and R.L. Hamilton (1992) Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundam. Appl. Nematol.* **15**: 563–573.
- Wang, Q., L.F. Geng, D.S. Zhang and D.L. Peng (2011) Species specific molecular diagnosis of burrowing nematode (*Radopholus similis*). *Acta Phytopathol. Sin.* **41**: 171–177. (In Chinese with English abstract)
- Xu, C.L., Y. Li, H. Xie, X. Huang, W.J. Wu, L. Yu and D.W. Wang (2014) Morphological and karyotypic differences within and among populations of *Radopholus similis*. *Zookeys* **444**: 69–93.