

特

集

海外から侵入したシストセンチュウ類の防除について 土壌サンプルからのテンサイシストセン チュウ DNA の検出と定量

龍谷大学農学部 あさみず 浅水 えりか 恵理香・いわほり 岩堀 ひであき 英晶
長野県諏訪地域振興局諏訪農業農村支援センター きた 北 ばやし 林 さとし 聡

はじめに

2017年、長野県原村のアブラナ科野菜圃場において、国内最初のテンサイシストセンチュウ発生が認められ、翌2018年には植物防疫法に基づき、農林水産省による緊急防除が開始された。特に農薬を用いた防除は功を奏し、汚染圃場における線虫密度は低下し、一部では作物の栽培を再開する圃場も出てきた。再開は検出感度以下になったことが確認された圃場ではあるが、土壌中にわずかにでもシストおよび幼虫が残存すると、再発の原因となる。また、線虫密度調査のための土壌サンプリングは労力的な問題からサンプル調査にならざるを得ず、「検出感度以下」は根絶されたことを保証するものではない。したがって、営農再開に向けて、作付け前の迅速な土壌中のシスト数の定量方法の開発が喫緊の課題となる。

従来のふ化促進法を用いた検出法は生物検定的一种であり、確実な線虫の生存が確認できるものの、幼虫ふ化まで1週間以上を要し、かつ、専用の設備や施設を用意する必要がある。そこで、DNAレベルでの検出と定量を目的として、土壌からの線虫DNA単離と、種特異的プライマーを利用したリアルタイムPCRの条件検討を行い、土壌中の線虫密度の推定を行った。さらにふ化試験によって、シスト中の幼虫数と検出DNA量との関連を調べ、生存シストおよびその中の幼虫数と、リアルタイムPCRにおけるCq値が相関していることを明らかにした。本手法は、迅速に多数の土壌サンプルを扱い、線虫DNA量より推定された線虫密度(Cq値)から、圃場におけるテンサイシストセンチュウの再発可能性を判断するのに有効である。

A Rapid DNA Detection and Quantification Method from Field Soil Infested by the Beet Cyst Nematode, *Heterodera schachtii*.

By Erika ASAMIZU, Hideaki IWAHORI and Satoshi KITABAYASHI

(キーワード: 土壌DNA, リアルタイムPCR, 半定量的検出, 休眠シスト)

I 土壌DNA単離とテンサイシストセンチュウDNA検出方法の開発

1 土壌サンプルからのDNA単離

本研究の目的は、テンサイシストセンチュウの発生が確認された圃場において、農薬処理による緊急防除後の営農再開可否を判断する技術開発であり、多数の土壌サンプルから迅速かつ簡便に線虫DNAを検出する方法の開発である。近年、水や土壌等の環境サンプルから直接DNAを単離する「環境DNA」とよばれる実験手法が注目されている。そこで、本研究では、TABERLET et al. (2018)に基づいて、方法を最適化した。

(1) 土壌サンプルの採取

テンサイシストセンチュウの発生が確認された長野県原村の圃場では、2018年に緊急防除が開始された。試験圃場全体(42×20 m²)を処理区(3×4 m²)に分割し、処理区間を互いに0.5~1.0 m隔てたうえで、農薬が処理された。農薬処理後にブロッコリー、カリフラワー、キャベツ、ハクサイ、ホウレンソウ等の野菜類が栽培され、防除効果が検証された。農薬と野菜類の組合せについては、表-1に記載した。野菜類栽培後の2018年8~10月にかけて各処理区から土壌をサンプリングした。

(2) 飽和リン酸バッファ法による土壌DNA単離

TABERLET et al.の方法では、飽和リン酸バッファを用いて土壌粒子に結合したDNAを遊離させており、元々は排泄物や遺体等に由来する細胞外DNAの単離を目的としている。対象とするサンプルは、土壌中に存在する硬い殻に覆われたシストであり、シスト内に卵が含まれる。卵のDNAを得るには、まず土壌ごとシストを粉碎する必要がある。加えて多数のサンプルを扱うには、サンプル当たりの土壌量はできるだけ少ないほうが好都合であった。そこで、各サンプルの乾燥土を10gずつ測り取り、マルチビーズショッカーMB3000(安井器械株式会社)を用いて粉碎し、ここから飽和リン酸バッファ法によりDNAの単離を行った(単離法の詳細につい