

## 新技術解説

根こぶ1個からの迅速・簡便な  
ネコブセンチュウ DNA 抽出と種同定法龍谷大学農学部資源生物科学科 <sup>いわ</sup>岩 <sup>ほり</sup>堀 <sup>ひで</sup>英 <sup>あき</sup>晶

## はじめに

有害線虫はいったん圃場に侵入し定着すると根絶はほぼ不可能であるが、発生の極めて初期に対処できた場合は封じ込めが可能であった例もある。したがって、輸入検疫や国内での疑わしい事例については迅速な種同定の対応が必要である。種が特定されることによってその種の寄主範囲が判明し、また、生息適温などの生態的情報がわかることから、防除に関する指針を適切に立てることができる。しかしながら、国内の有害線虫専門家は少なく、かつ、海外の有害線虫種について通じている研究者も現在ほとんどいないため、可能な限り高度な線虫の専門知識を必要としない検出法の開発が必要とされている。そのためには、遺伝子情報に基づく簡易・迅速な検出・同定技術の開発が求められている。このような背景をもとに、本稿ではDNAバーコーディングなどの遺伝子情報を利用した迅速な検出・同定技術を開発したので紹介する。

植物検疫の現場で検出される有害線虫としてはネコブセンチュウの仲間が比較的多く、植物の根に見られる根こぶで感染が気づかれる場合が多い。したがって本研究では、ネコブセンチュウに感染した根のこぶ（根こぶ）より線虫 DNA を抽出し、種同定に供すことのできる手法の開発を行った。

## I これまでの DNA 抽出法

これまで有害線虫の種同定のために行われてきた線虫 DNA の抽出法としては、2期幼虫を針などで釣り、水やバッファー中で切断・破碎し、プロテインース K で分解し抽出する方法（岩堀，2014）や、DNA 抽出キット ISOHAIR（ニッポンジーン）を用いて抽出（TANAKA et al., 2012）する方法があるが、見つかった被害根、可能

であれば1個の根こぶから DNA を抽出する方法が、現場ではより望ましい。1個の根こぶから線虫 DNA を抽出する方法としては、植物から解剖して摘出し、1頭の線虫から行う方法と同様に DNA を抽出する方法のほか、寄生した植物部位ごと DNA を抽出するために植物から DNA を抽出する CTAB 法などいろいろな方法がある（Hu et al., 2011）。しかしながら、これらの方法は複数回の遠心、ホモジナイザーによるすりつぶし、液体窒素中で破碎、フェノール・クロロホルム・エタノール抽出等、煩雑なステップを経なければならず、DNA の抽出効率や時間的な損失が大きい。そこで、本研究では、DNA 抽出キットとビーズ破碎機を用い、根こぶ1個、あるいは感染が疑われる根の先端部位および中間部位約1cm からサツマイモネコブセンチュウの検出を試みた。

## II 根こぶ1個からの DNA 抽出

## 1 材料の採取

サツマイモネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita*（熊本県合志市産，原寄主サツマイモ）をミニトマト‘ブリッツ’に接種し，28℃，16L8D で径 12 cm のビニールポットで栽培し，約1か月半経過したものの感染根を用いた。ピンセットを用いて感染根より卵のうがまだ形成されていない根こぶを無作為に採取し，実験に供試した（図-1）。採取した根こぶは達観により比較的小さいもの，中くらいのもの，比較的大きいものの3グループに分けた。また，根こぶの見られない根の先端1cm，お



図-1 DNA 抽出に供試した根こぶ

Rapid and Easy Method of DNA Extraction and Species Identification Directly from an Individual Galls of Root-Knot Nematodes.  
By Hideaki IWAHORI

(キーワード：DNA 抽出法，種同定法，PCR，リアルタイム PCR，有害線虫)