

線虫学入門

E.C. McGawley¹, C. Overstreet², M.J. Pontif³ and A.M. Skantar⁴
¹⁻³Nematologists, LSU AgCenter, Baton Rouge, LA 70803 and ⁴Research
Molecular Biologist, USDA-ARS Nematology Laboratory, Beltsville, MD 20705
(2011年7月)

日本語訳: 竹内 祐子 (京都大学大学院農学研究科)
(2011年11月)

この文書にはスライド番号、必修ポイントの解説、この「線虫学入門」の各スライドに使用されている略語説明が掲載されています。

英語もしくは日本語での補足が必要と思われる箇所については (特に分類用語)、[] つきで英語版の用語や補足説明を併記してあります (日本語版のみ)。

スライド上では表示していないデータ提供者についても情報を掲載しています (122番スライド)。

このファイルに含まれるすべての情報は、植物線虫学および植物病理学、ならびに関連する植物保護学および寄生蠕虫学分野における非営利の教育目的で使用されることを想定したものです。

配布元はアメリカ線虫学会 [Society of Nematologists] および熱帯アメリカ線虫学機構 [Organization of Nematologists of Tropical America] です。使用者および閲覧者はこれら二つの組織のホームページ (<http://www.nematologists.org> と <http://ontaweb.org>) を訪問し、科学および農業に対する両機関のこれまでの貢献について詳細を確認するとともに、N.A. Cobb基金およびONTA基金の慈善事業についてもご理解いただくことを推奨します。

このファイルでは主として、農業上重要な植物に寄生する線虫に焦点を合わせています。使用者およびナレーション担当者は、ファイル中ではあまり強調されていませんが、この独特な動物グループ「線形動物門」に属するそれ以外の線虫がもつ多様性や、その計り知れない重要性についても聴衆に伝えるよう留意してください。

このファイルを使用したみなさんからのご意見を歓迎します。本文書の末尾に書かれた電子メールアドレスをご利用ください。

現在あるセクションを改良したり、植物寄生性線虫以外の線虫に関する新たなセクションを追加したりするための写真およびフォーマット済みデータの提供を歓迎します。このファイルは完成品ではありません。線虫に興味をもったみなさんからのデータ提供によって、線虫およびその自然界における役割について蓄積された生物学的、生態学的、そして科学的な知見を反映した現在進行形のプロジェクトへと発展していくことを願っています。

1.) **はじめに:** この入門用スライドの目的は、線虫が地球上のおよそ知りうるすべての生態学的地位 (ニッチ) に生息しているという事実を伝えることです。線虫は地球上で最も豊富な多細胞生物のひとつです。無脊椎動物が初めて出現したのは約6億年前ですが、レバノンで見つかった琥珀中の化石標本から、最初の線虫 (昆虫寄生性のシヘンチュウ種 [Mermithid]) は1億3500万年前~1億2000万年前に出現していたこと

が示唆されています (Poinar, G.O. et al. 1994. Fundam. Appl. Nematol., 17(5): 475-477)。

2.) **6つの界**. ここで示すデータはオンライン事典『生命の樹ウェブプロジェクト [Tree of Life web project], <http://tolweb.org/tree/>』に基づき、地球上の生物の多様性と、そのグループ分けについて解説するものです。動物のグループが現在までに記載された生物100万~150万に及ぶ種から成ることに注目してください。

3.) **蠕虫**. 動物界における蠕虫および蠕虫様生物の相対的位置を説明します。動物は放射相称もしくは左右相称を示します。さらに左右相称動物は新口動物と旧口動物に分かれます。最初のボックスではこれらの用語を説明して、三胚葉生物に表れる中胚葉組織の形成を理解する上で必要な発生学的知識を提供しています。蠕虫と線虫用生物はいずれも旧口動物で、二つの上門に分かれます。外部繊毛と櫛状フィルタ [filter combs] のいずれか、もしくは両方をもつもの (冠輪動物 [Lophotrochozoa]) と、脱皮シクチュラを有する脱皮動物 [Ecdysozoa]) です。詳細は http://www.wormbook.org/toc_nematodeevolecol.html でPaul DeLey氏による第2章を参照してください。冠輪動物には9つの門 (扁平動物門 [Platyhelminthes]、外肛動物門 [Bryozoa]、星口動物門 [Sipuncula]、軟体動物門 [Mollusca]、紐形動物門 [Nemertea]、内肛動物門 [Entoprocta]、環形動物門 [Annelida]、箒虫動物門 [Phoronida]、腕足動物門 [Brachiopoda]) が、脱皮動物には8つの門 (節足動物門 [Arthropoda]、有爪動物門 [Onychophora]、緩歩動物門 [Tardigrada]、類線形動物 [Nematomorpha]、動吻動物 [Kinorhyncha]、胴甲動物 [Loricifera]、鰓曳動物 [Priapulida]、線形動物門 [Nematoda]) があります。ここで2つめのボックスを表示して、サナダムシ (条虫) *Taenia pisiformis* の前端 (頭節) がウサギの腸に付着している様子を示してください (www.thiagoodview.com)。

4.) **線形動物門**. アニメーションで表示される6つのボックスは、線形動物門に属する線虫の特徴を紹介しています。「体腔」「偽体腔」「無体腔」という用語について1つめのボックスで説明しています。**ノート**: 専門家のなかには、偽体腔動物は人為的な側系統群であると主張する人もいます。ここでは偽体腔が線虫の特徴であることを概要として示すだけであり、このグループの系統学的な妥当性を支持するものではありません。

5.) **動物寄生性線虫**. 上段右: *Onchocerca volvulus*によって起こる河川盲目症。この線虫はブユの一種 *Simulium damnosum*によって媒介される; 中段右: イヌ回虫 *Toxocara canis*; 下段右: 一般的な飼いネコから出てきた *Toxocara cati* (petcaregt.com/cat-worm.htmlより改変); 下段左: 犬糸状虫 (フィラリア) *Dirofilaria immitis*; 上段左: 鉤虫 (または十二指腸虫) *Ancylostoma duodenale*。アニメーション1.) 目から取り除かれる線虫 *Loa loa*; 2.) 足からギニア虫 *Dracunculus medinensis*を取り除いているところ; 3.) 医学のシンボルであるカドゥケウス。ギネア虫とそれをヒトから除去する器具を示したものであるとする説もある (ノート: アメリカ以外では、多くの専門医や患者の集まる組織において、周囲にヘビの巻きついたアイスクラピーウスの杖がシンボルとして使用されています); 4.) 象皮病線虫 *Wuchereria bancrofti*に感染した患者の膨れ上がった足; 5.) 聖書でも言及されているギネア虫 *Dracunculus medinensis*による線虫感染と、鉤虫 *Ancylostoma duodenale* および *Necator americanus*によるヒトの皮膚幼虫移行症; 6.) 定着した家禽回虫。

6.) **自由生活性 (自活性) 線虫**. 上段右: *Acrobeles*属線虫の前部の電子顕微鏡写真; 中段右: モデル生物 *Caenorhabditis elegans*; 下段右: 別の線虫を捕食する *Mononchus*属線虫; 下段中: 動画; 左: *Dorylaimus*属線虫。アニメーション1 A.) *Thoracostoma* 属線虫; B.) *Acromoldavicus mojavicus*; C.) *Enoploides*属線虫; D.) *Pontonema cf. parpapilliferum*; E.) *Ceramonema*属線虫; F.) *Latronema*属線虫; G.) *Actinca irmae*; 2.) 別の線虫を捕食する *Mononchus* 属線虫。

7.) **海洋性線虫 (海洋性動物相の寄生種を含む)**. 上段右: *Rhabditis* 属線虫; 下段右: 北方の雷魚 *Channa argus* から出てきた *Eustrongyloides*属線虫; 下段中: *Trissonchulus* 属線虫; 下段左: *Glochinema bathyperuvensis* 雄の図 (dpc.uba.uva.nl); 中段左: *Onyx*属線虫; 上段左: 未同定の海洋種 (www.arcodiv.org)。アニメーション: (上) 魚のフィレに入っていた *Phocanema* 属線虫; (下) *Camallanus cotti* の前部。

8.) **植物寄生性線虫**. 上段左: (赤く見える食道) B.Y. Endo氏によるイラストを着色。アニメーション1~6: 植物寄生性線虫の主要な特徴; 7.) 植物寄生性線虫の最も一般的な属における相対的な大きさ比較図 (G.N. Agrios著『植物病理学 [Plant Pathology] 第5版』2005年 Elsevier Academic Pressを改変); 8.) 線虫の解剖学への初歩的なまえがき。**ノート:** 専門家のなかには、線虫の90%は海洋性であって、それと比べると植物および動物寄生性線虫はごく少数派であると主張する人もいます。また、これを勉強しているみなさんも植物寄生性線虫の大半が農業害虫ではなく単に自然生態系の一部であることに気付くでしょう。

9.) **植物病害の病原体**. 病原体の各グループについて、最初に見つかった病害と発見者をその年代順に並べたもの (原型はMactode Publicationsで入手可能)。個々の図表は G.N. Agrios著『植物病理学 [Plant Pathology] 第5版』(2005年Elsevier Academic Press) より。

10.) **物質交換の道具**. C= 口針錐 [cone]、S= 口針軸 [shaft]、K= 口針節球 [knob]、DEGO= 背部食道腺開口部 [dorsal esophageal gland orifice]、EL= 食道管腔 [esophageal lumen]、A= 双器膨囊 [ampulla]。アニメーション操作で上に口針が重なります。アニメーション1.) 口針の機能; 2.) 注意事項; 3.) Tylenchida目、Trichodoridae科、Dorylaimida目線虫の口針のイラスト (Trichodoridae科種は、F. Roca氏とM. Arias氏による *Paratrichodoros hispanus*のイラスト (Nematol. Medit. 14:181-185) より); 4.) 動画: *Gliocladium virens*の菌糸から吸汁するマツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* (実時間処理)。

11.) **生活史**. 卵 (単一の、卵塊中の、シスト内の、非分化および完全に分化した) 卵; 孵化した幼虫 (外部寄生性および内部寄生性); 成熟プロセス; 成虫 (雌および交配刺を含む尾部) の図解。アニメーション1.) ネコブセンチュウの卵から幼虫が孵る様子 (400倍、実時間処理); 2.) ニセフクロ (*reniform*) センチュウの卵から幼虫が孵る様子 (1000倍、実時間処理); 3.) 線虫の一世代あたりの時間。ノート: 2期幼虫 (J2) は多くの植物寄生性線虫において感染態です。ただし、最終期幼虫の雌が感染ステージとなるニセフクロセンチュウ *Rotylenchulus reniformis* のように例外もあります。

12~14.) **植物線虫学の簡単な歴史**. 基礎知識を与えてくれる資料のなかでも注目に値するのはパピルス古文書 [Ebers Papyrus] とウェブサイト picturesofparasites.com の蟯虫 (*Enterobius vermicularis*) 標本です。アニメーション1.) 線虫被害を受けた穀物の穂先に表れた病徴; 種子 (褐変); 穀物から脱出してきた2期幼虫; 無水生活期の幼虫 (下) (M. McClure氏提供); 2.) この線虫種についてNeedhamの書き記した文章の原文。スライド13と14は説明不要。

15.) **線虫の表型的分類**. アニメーション: *Scutellonema brachyurum*の事例。従来、種同定は幻器の有無をもとに行っていました (写真は染色したもの)。

16.) **線虫の系統的分類**. 双器綱 [Adenophorea] および双腺綱 [Secernentea] の特徴。Tylenchina亜目およびAphelenchina亜目における背部食道腺開口部 (DEGO) の位置。アニメーション: Paul De Ley氏による線虫の系統的なグループ分け。線虫における多様性の簡単な紹介と、線虫の系統分類の基盤 (2006年1月25日時点)。出典は『WormBook (シー・エレガンス研究会 [The *C. elegans* Research Community] 編、doi/10.1895/wormbook.1.41.1、<http://www.wormbook.org>)』。もうひとつの素晴らしいウェブサイト <http://insects.tamu.edu/research/collection/hallan/Nematoda/Family/0NematodaIndex0.htm> もご参照ください。

17.) **同定法**. 線虫を同定する上での食道 (表記は「esophagus」の他にも「oesophagus」や、より簡単に「pharynx」など) の重要性。アニメーション1.) ワセンチュウの食道; 2.) シャレ; 3.) 食道の一部; 4.) ハリセンチュウの中部食道球付近の横断面。食道管腔を示す; 5.) 中部食道球のポンプの模型アニメーション (P.M. Sforza氏とJ.D. Eisenback氏提供)。

18.) **形態**. 線虫の雌雄のイラスト。特定の種を示すものではありません。これらは大部分の植物寄生性線虫に共通して見られる基本的な外部形態について知ってもらうために作った、いわば「ハイブリッド型」です。ノート: 属レベルおよび種レベルでの同定に用いられるDeMan's 値は、線虫体の特定の領域の計測値に基づいたものです。アニメーション1.) 補足的なDeMan値; 2.) クチクラと側帯; 2.) 頭部 (正面); 3.) 感覚子のタイプ。

19.) **体内のシステム**. アニメーション1.) 植物寄生性線虫の生殖様式; 2と3.) 単卵巣型および双卵巣型の卵巣; 4.) 線虫における子宮の配置を示す用語; 5.) *C. elegans* のイラストを改変して子宮と陰門筋を示したものの。

20.) **陰門の位置**. 植物寄生性線虫の雌個体における陰門の位置の多様性。

21.) **生殖器系**. 上段右: 雄の尾部、ブルサ (交接囊) のタイプ (leptoderan-ブルサが尾端に達していない; peloderan-ブルサが尾部を包んでいる); アニメーション1: 総排泄腔 [cloaca] と副刺 (導帯ともいう) [gubernaculum] のある雄の尾部 (*C. elegans* のイラストより改変); 下段右: 交尾の相手を探す行動と交尾行動を示した動画 (*C. elegans*); 左: *C. elegans* およびネコブセンチュウ (RK) の陰門; アニメーション2: 卵の発達過程 (*C. elegans*); 根組織中の卵 (赤く着色してある) (ネグサレセンチュウ); 卵が孵ったところ

(オレンジ-線虫種不詳 (David Spears氏), 緑- *Heterodera schachtii*).

22.) **神経系**. 上段右: *C. elegans* の雄尾部における感覚構造のイラストを一部改変: B=ブルサ、R=ブルサ放射ニューロン、to NR= 神経環へ; 下段右: *Contraecaecum rudolphii*: S= 感覚子 [sensillum]; 下段中: *Steinernema riobravis*; 下段左: *Xiphinema americanum*: CS= 頭部感覚子 [cephalic sensillum] (黒い矢印は双器口を示す); 上段左: NR= 神経環; 上段中: *C. elegans*雄の尾部; アニメーション1.) (上) *Laxus oneistus*の前部 (A=双器口); (下) *Scutellonema brachyurum*の幻器の開口部 (ヘマトキシリンで染色); 2.) (右から順に) *Rotylenchus*属線虫、*Dolichodoros*属線虫、*Neopsilenchus*属線虫の頭部 (K.B. Nguyen氏提供); 3.) A= 双器のイラスト。この感覚器官の複雑さをおわかりいただけるでしょう。

23.) **消化系**. 右中: ダイズ品種「Lee」の根における *Heterodera glycines* 2期幼虫の前部 (B.Y. Endo氏提供); アニメーション1.) 口針の開口部を含む線虫の前部; 2.) 口針の筋系および食道管腔との接続部の図解 (口針と食道管腔との接続部分を緑色で示す); 3.) *Hoplolaimus galeatus*の前部; 4.) さらに食道に沿って (*H. galeatus*); 5.) 線虫の前部から食道と腸の連結部までを示すイラスト; 6.) C= *Tylenchorhynchus claytoni* の食道腸間弁 (BBE = 後部食道球、INT=腸); 7.) DS= 消化系。消化系の最初から最後までを点の動きで示しています。

24.) **排泄/分泌系**. 上段左: *Plectus*属線虫のイラスト (改変済); 上段右: *C. elegans*の排出口; アニメーション: 排出口 (exc. pore) と腹腺 (gland) のイラスト。

25.) **筋系**. 線虫体の中央部 (A) および前部 (B) における筋系要素 (赤字)。『シー・エレガンスの解剖学図解 [The Atlas of *C. elegans* Anatomy] (Altun, Z.F., R. Lints and D.H. Hall, 2002-2006)』のイラストを一部改変。ノート: ウェブサイト www.wormatlas.org にはたくさんのすばらしい情報が掲載されていて、線虫に興味のある誰にとっても一見の価値があります。アニメーション1.) 図Aの横断面で反り返った卵巣が見える; 2.) 真皮の機能。

26.) **線虫の生息域**. 外部寄生性および内部寄生性線虫。上段左: ネグサレセンチュウと刺毛センチュウ (無彩色); 右: ネコブセンチュウ (RK) の幼虫 (赤)、雄 (緑)、雌 (濃青) およびシストセンチュウ (CN)。下のイラストの出典: Hesling, J.J. and H.R. Wallace, 1961. Observations on the biology of chrysanthemum eelworm *Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz) Steiner in florists chrysanthemum. I. Spread of eelworm infestation. *Annals of Applied Biology* 49:195-209.

27.) **寄生された根**. 上段左: ダイズに寄生したダイズシストセンチュウ (SCN) の白色雌 (www.entm.purdue.edu); 上段右: 卵から孵ったシストセンチュウの幼虫 (ucdnema.ucdavis.edu) とネグサレセンチュウの雌; 下段右: アルファルファの根を摂食するワセンチュウ; 下段中: 根端を摂食する *Longidorus africanus* (www.faculty.ucr.edu); 下段左: 線虫に寄生された、あるいはされていないサトウキビ根系 (便宜上線虫の大きさを強調しています); 拡大鏡の挿入図は、根の切片に膨張したネコブセンチュウとラセンセンチュウ (いずれも雌個体) がいるのを示しています。アニメーション1.) ダイズの根組織内の染色したダイズシストセンチュウ (www.extension.missouri.edu);

2.) 園芸作物の地上部に表れた病徴: A と B.) それぞれネコブセンチュウに感染したツゲの苗圃とツゲ苗 (米国ルイジアナ州アレクサンドリア); C.) オオハリセンチュウにより衰退したモモの樹 (同州クリントン); D.) ヤリセンチュウと刺毛センチュウにより衰退したゴルフ場の芝生 (同州バストロップ); 3.) 作物の地上部に表れた病徴; A~C.) (同州) A.) サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) 被害が発生したトウモロコシ圃場 (左の列はTelone薬剤施与、右の列は非施与); B.) ニセフクロセンチュウ (*Rotylenchulus reniformis*) 被害が発生した綿畑 (後方はTelone 薬剤施与、手前は非施与); C.) 両種 (*M. incognita* と *R. reniformis*) の被害が発生した綿畑; D.) ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) 被害の発生したダイズ圃場 (www.entm.purdue.edu).

28.) **葉部の (地上部の) 線虫害の病徴.** コメ (米国ルイジアナ州クローリー)、アネモネ (www.ppd1.purdue.edu)、フロックス [ハナシノブ科フロックス属](plant-disease.ipcc.orst.edu)、コムギ、アルファルファ (www.agf.gov.bc.ca)、ココナッツ (nematology.ifas.ufl.edu)、マツ (www.oznet.ksu.edu)。アニメーション1.) チューリップ (www.eppo.org); 2.) 説明不要; 3.) ここは熟考するポイントです!

29.) **植物寄生性線虫に起因する収穫高の損失.** 推定被害額は、低いもので大麦の6.3% というものから (左の列は生命維持に直結する作物)、高いものでトマトの20.6%まで (右, 経済的に重要な作物) 幅があります。これらの損失は全世界で770億U.S.ドルを超えると推定されています。

30.) **線虫の移動と伝搬.** アニメーション1.) 這い回る *C. elegans* の動画 (www.abac.edu); 2.) 運動様式 (Brusca, R.C. & J.G. Brusca. 1990. Invertebratesより改変); 3.) ユーモアに富んだ、ただし素晴らしい文献: Robinson, A.F., et al. 2005. Vertical distribution of *Rotylenchulus reniformis* in cotton fields. *Journal of Nematology* 37 (3): 265-271. 写真: 接ぎ木繁殖用の台木 (blog.agriculture.ph)、タイヤ (www.istockphoto.com)、廃棄用種子。アニメーション: 挿し絵は線虫の広がり方の一例として、ジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*) で知られているような鳥の糞を介したものを示しています。スライド94に概略を示すPoinar and Yanoviakによる研究も参照してください。

31.) **線虫採取法.** Zuckerman, Mai & Rhodeより改変。アニメーション: 生産者への簡単かつ効果的なメッセージ (左の画像はG.L. Tylka氏のものを改変)。

32.) **線虫抽出法.** (左側上下) Baermann法 {温室中 (根サンプルの場合など) もしくは温室外 (土壌サンプルの場合など) に漏斗を置いて行う}、もしくは大量の土壌試料から抽出する際に行われる改変Baermann法 {金網をポリ塩化ビニル製パイプ層との間にはさんで行う (一般に直径15~20 cm)}。(右側上下) 半自動洗浄装置。アニメーション: 技術者が、糖浮選沈殿による抽出手法を行っている様子。

33-36.) **線虫の個体群動態.** スライド36の情報は以下のものを改変: Norton, D.C., 1978. Pp. 59-79 *In*, Ecology of Plant-Parasitic Nematodes. John Wiley & Sons, New York. ノート: 農業環境においては、群集を形成する属の数はたいてい多くても6~8程度です。しかし、自然群集の場合はしばしば30~60に及びます。

37.) **線虫の影響、被害、そして経済的閾値 (経済的許容限界とも).** 写真: (左から順に)

ジャガイモシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) のシスト期、線虫傷害の典型的な病徴である矮化症状がパッチ上に発生した植物 (ダイズ)、ネコブセンチュウによるこぶのできたトマトと根の上に定着したニセフクロセンチュウの雌個体 (ワタ=綿)。アニメーション: ルイジアナ州以外の米国各地における線虫の経済的許容限界データ。用語: ET- スライド37上で定義; DT (被害閾値)- 顕著な被害の発生が見込まれる線虫レベル (線虫のいない条件下と比較して); AT (作用閾値)- なんらかの管理戦術を始動すべき線虫レベル。下の表は、各州における現在の各種閾値 (ET、DT、AT) の推奨値を示しています。データ提供者はAR (アーカンソー州; T. Kirkpatrick氏)、DE (デラウェア州; R. Mulrooney氏)、GA (ジョージア州; R. Kemerait氏)、IL (イリノイ州; G. Noel氏とJ. Bond氏)、IA (アイオワ州; G.L. Tylka氏)、MS (ミシシッピ州; G. Lawrence氏)、SC (サウスカロライナ州; J. Mueller氏)、TN (テネシー州; P. Donald氏とM. Newman氏)、VA (バージニア州; P. Phipps氏)。

38.) **線虫管理戦術**. 上段右: 不耕起栽培システム (www.prebleswcd.com)。

39.) **殺線虫剤**. メチルブロマイド (entwew.clemson.edu)、テミック (=アルジカルブ) (www.bayercropscience.cl)、フラダン (www.sonti.cn)。アニメーション1.) 人間の作った化合物から放出される塩素や臭素を含むガスによって南極大陸上空にできたオゾン層の「穴」 (www.nasa.gov); 2.) 非燻蒸型の殺線虫剤に関する情報。ノート: 2009年11月現在、製造中止となった燻蒸剤にはMeth-O-Gas、Brom-O-Gas、Terr-O-Gas、Vorlexの4つが含まれます。製造中止となった非燻蒸剤にはDasnitとNemacurがあります。また、種子に施用するタイプの殺線虫剤にはAvicta Complete CottonとAvicta Complete Corn (いずれもSyngenta社)、AERIS Seed-Applied Insecticide/Nematicide (Bayer Cropscience社) が含まれます。

40.) **線虫管理のための新たな戦術**. 写真: (左から順に) 少量の殺線虫剤を植え付けの際に畝間に噴霧する形で施用している様子; 農業における人工衛星 (www.fcc.gov) およびGPS技術の利用; 線虫補足菌 (*Arthrobotrys*属菌)。

41.) **殺線虫剤使用を軽減した、ある事例** (コロイド状試作品を用いた米国ルイジアナ州立大学AgCenterでの最新の研究から)。アニメーション1.) ルイジアナで試験に供した12の作物; 2.) 最も大きく収量に結果が反映されたワタ (3エーカーの圃場試験); 3.) 説明不要; 4.) この試作品で有効だった施与方法 (すべての試験において1% 溶液施与10回あたりの成績評価点平均 (GPA) を採用し、1% 溶液で8秒間の「植物浸漬」処理を行いました)。

42.) **特定の地域向けの農業、ある事例**. 特定の農場の正確な位置を把握するためにGPS技術を利用した例 (Google Earthより)。アニメーション: ネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) とニセフクロセンチュウ (*Rotylenchulus reniformis*) による重度の被害が発生した、100エーカーに及ぶ米国ルイジアナ州北部の綿畑。

43.) **特定の地域向けの農業2**. 上段左: アニメーション1.) Veris 3100土壤電気伝導度マップ作成システムの写真と動画; 下段: Veris 3100装置の(左) 略図と(右) どのようにして土壤電気伝導度 (EC) を測定するのかについての説明。その他のアニメーション: 2.) EC値の測定とマッピングによって作成された圃場マップ; 3.) 検証用通路の設置;

- 4.) 殺線虫剤 (Telone) 施用から1年後に効果を示した、もしくは示さなかった圃場範囲を示しています。
- 44.) **特定の地域向けの農業3.** 2年目に殺線虫剤を施用すべき、あるいはすべきでない圃場の範囲を示す管理区域マップ。アニメーション: 燻蒸剤施用器具。
- 45.) **特定の地域向けの農業4.** 最終結果。
- 46.) **特定の地域向けの農業5.** 農業生産者にとって有用なソフトウェアとハードウェア。
- 47.) **線虫の寄生者: *Pasteuria penetrans*.** *P. penetrans*に関する情報。生活史 (www.pasteuriabio.comの情報を改変)、電子顕微鏡写真 (それぞれB. Kerry & K. Daviesによる電子顕微鏡写真をグレースケールのままもしくは着色して示したもの。www.rothamsted.ac.ukより)、*P. penetrans*の内生孢子。アニメーション1.) (左) 刺毛センチュウ雌個体の低倍率写真、(右) 刺毛センチュウ雌個体の前部; 2.) 刺毛センチュウに付着した*P. penetrans*の内生孢子 (オレンジに着色); 3.) 他の*Pasteuria*属種と彼らが寄生する線虫についての情報。
- 48.) **線虫の寄生者: 菌類.** 上段左: *Arthrobotrys*属菌に捕捉された線虫の電子顕微鏡写真; 上段右: *Dactylaria brochopaga*によるループ状のわな (www.iwf.de); 下段: (左右) 菌に寄生されたネコブセンチュウの卵; 中: ARF菌に寄生されたジャガイモシストセンチュウの4期幼虫。
- 49.) **線虫類の表型的分類の拡張** (Mai & Lyon, 1975). DEGO (背部食道腺開口部). 上段右: (中) *Tylenchorhynchus martini*の雄個体、(左) *Gracilacus*属線虫の雌個体、(右) *Paratylenchus*属線虫の雌個体; 下段右: *Hemicriconemoides*属線虫の雌個体; 左: (上から順に) *Helicotylenchus*、*Hoplolaimus*、*Pratylenchus*の各属の雌個体。
- 50.) **Tylenchida目の主要な属.** 説明不要。
- 51.) **双腺綱における寄生性の進化.** (草本植物の根に寄生している*H. galeatus*を示した上段左のものを除いて) 写真と出典は既出。
- 52.) **寄生様式の図解.** R.P. Esser氏による美しい図解を改変。説明不要。
- 53-67.) **植物寄生性線虫の属を決定するための鍵.** このセクション中のいくつかの画像は、W.F. Mai and H. H. Lyon著『絵で示す植物寄生性線虫の属を決定するための鍵 [Pictorial Key to Genera of Plant Parasitic Nematodes]』(謝辞参照)の高解像度の画像をスキャンしたものです。(筆頭著者の目に)画質が悪いと思われたものについては、原本をあたって画像をスキャンして取り込み、Photoshop CS3ソフトウェアの「レイヤー」および「色調補正」の機能を使って調整してから本ファイル中で使用しています。ノート: 対句で示したポップアップ画像は特性描写を明確にするため、あるいは特定の属を解説するために役に立つものです(赤線で写真またはイラストと属名を結んでいます)。

68.) **一般的な線虫属の比較**. 同一属内であっても種間変異はかなりあります。例として *Heterodera* 属種の生活史におけるシスト期の「平均的な」大きさを示します。また、植物寄生性線虫以外にも、自由生活性線虫 (*Rhabditis* 属線虫) を円内の下方左あたりに示しています。

69.) **経済的に非常に重要な、あるいはその可能性のある線虫属**. 説明不要。写真: 上段右: *Rotylenchulus reniformis* の無水生活型幼虫; 中: 刺毛センチュウの幼虫の脱皮、*R. reniformis* の卵; 下段右: *Bursaphelenchus xylophilus* 雄の尾部; 下段中: ヤリセンチュウ雌の前部とヤリセンチュウ雌個体; 下段左: *Hoplolaimus galeatus* 雌の前部; 上段左: ネコブセンチュウの幼虫。

70.) **ニセフクロセンチュウ**. 写真: 上段: 無水生活期の幼虫と幼虫の食道; 中段: (左から) 根の上の雌 (LM= 光学顕微鏡写真)、根の上の雌 (EM= 電子顕微鏡写真)、根の上の感染態4期幼虫、雄; 下段: (左から) 根の上にいる雌、*R. reniformis* 被害の発生したダイズ圃場と綿畑、卵塊。アニメーション1.) 染色した卵塊と染色していない卵塊; 2.) 宿主範囲; 3.) 動画。

71.) **ジャガイモシストセンチュウ**. 写真: A.) シストセンチュウ被害の発生したダイズ圃場; B.) ダイズ根の「黄色雌」; C.) 中の卵が観察できるシスト; D.) シストの発達における「膨張」ステージ (白から茶色へ); E.) 体内に染色した幼虫をもったダイズの根; F.) 幼虫; G.) 雄の精子細胞; H.) 卵から出てきた2期幼虫。アニメーション1.) 成虫とシストの発達していく様子を示すイラスト (改変済み、出典不詳); 2.) (左) 雌と雄、(右) 卵の詰まったシスト; 3.) 雌線虫とダイズの根粒との大きさ比較 (G. L. Tylka氏による); 4.) 動画 (写真は根の上で雌と根粒の大きさを比較したもの); 5.) 卵の詰まった *Heterodera glycines* (100倍) のシスト。

72.) **ネコブセンチュウ**. 写真: A.) こぶの形成された根組織で膨らんだ内部共生性の雌個体と外に出された卵塊 (いずれも染色したもの); B.) 根組織中で染色された幼虫; C.) 線虫の世代 (卵を除く) が段階的に (左から右へと) 進んでいく様子; D.) こぶのできたトマトの根; E.) 宿主識別検定に使用された植物 (「一般的な」種およびレースを同定するための試験。スライド73参照); F.) こぶのできたニンジンの根。アニメーション1.) (左) 新鮮なキュウリ組織を解剖して取り出した雌、(右) アカザ [*Chenopodium*] より取り出された雌および卵塊 (E.C. Bernard氏提供); 2.) 米国ルイジアナ州アレキサンダリア近郊のダイズ圃場におけるネコブセンチュウ (*M. incognita*) 被害とこぶのできた根系; 3.) 動画。

73.) **ネコブセンチュウの宿主識別検定**. この検定法は1954年にJ. N. Sasser氏によって開発された、線虫学において非常に重要なものです。プラス (+) は感受性宿主を、マイナス (-) は抵抗性宿主を示します。アニメーション: 宿主識別検定に加えて、ネコブセンチュウの雌個体における会陰紋の形態 (上段中) が *Meloidogyne hapla* (Mh)、*M. javanica* (Mj)、*M. incognita* (Mi)、*M. arenaria* (Ma) の識別をするのに利用されます。最近ではさらに種同定を行う際、エステラーゼ表現型も利用されています。

74.) **ネグサレセンチュウ**. 根組織を摂食するネグサレセンチュウ; 上段左: ネグサレセンチュウの模型 (Mactode Publicationsで入手可能)。下段右: 雌個体。アニメーション:

説明不要。

75.) **刺毛センチュウ**. 説明不要。下段左: イチゴにおける刺毛センチュウ被害。アニメーション: 説明不要。

76.) **マツ材線虫病 (マツ枯れ) 1**. アニメーション: 罹病個体に見られるマツ枯れ症状: 1- 1981年米国ルイジアナ州; 2- 1995年ポルトガル; ポルトガルのセトゥバル近郊でマツ材試料を採取 (観察および試料採取はE.C. McGawley氏。同氏がフルブライト交流計画のサバティカル制度でポルトガルを訪れ、現地の農林業関係者に本病を紹介したことで、同国にもマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) が生息することが明らかになった); 3- 2008年日本; 4- 日本のマツ林におけるマツ枯れ症状; 写真: 上段左- マツ針葉の上のマツノマダラカミキリ *M. alternatus* (L.D. Dwinell氏提供) と青変菌の蔓延した枯死木丸太 (www.forestryimages.org) および *B. xylophilus* の幼虫でいっぱいになった *M. caroliniensis* の気管; 中- マツノザイセンチュウ感受性の非常に高いクロマツ; 右- マツ材パレット。マツノザイセンチュウ拡散の一因とみられる; 下段: 左- 青変菌によるとみられる変色を示すマツ丸太; 中- 特徴的な「薔薇の刺」用の交接刺をもったマツノザイセンチュウ雄の尾部 (L.D. Dwinell氏提供); 右- マツノザイセンチュウ雌個体 (www.metla.fi)。マツ材線虫病伝染環の図解はウェブサイト (www.forestresearch.gov.uk) より改変。

77.) **マツ材線虫病 (マツ枯れ) 2**. 写真: マツノザイセンチュウ (*B. xylophilus*) の蔓延した *Gliocladium virens* は成長が遅くなって孢子を形成しなくなり (左)、これは線虫がいない培養条件で古くなった孢子形成能のあるものと似ています (右); 後ろ側に示してあるのは、線虫接種から12日以上経過したもの; 上段右: 特徴的な「ボウリングのピン」様のフィアライド (梗子) を持った *G. virens* の培養形態; 下段左: (いずれも高倍率と低倍率で) *B. xylophilus* 雄の尾部、*G. virens* の菌糸を摂食する幼虫、雌の食道および陰門と成虫の線画; 下段右: ルイジアナ州立大学で接種試験に使用したスラッシュマツとテーダマツの苗。

78.) **ヤリセンチュウ**. 説明不要。

79-80.) **線虫複合病害**. このテーマに関するよい文献: Sikora, R.A. and W.W. Carter, 1987. Nematode Interactions with Fungal and Bacterial Pathogens – Fact or Fantasy. Pp. 307-312 *In*: Vistas on Nematology, J.A. Veech and D.W. Dickson, Eds., E.O. Painter Printing Co.

81.) **線虫-菌類の複合体**. 写真: 左: (上から下へ) *Sclerotium rolfsii* (www.bspp.org.uk) の培養物、*Fusarium oxysporum* の培養物、*Rhizoctonia solani* に感染したダイズの根; 上: (左から順に) *Heterodera schachtii* の幼虫 (www.rennes.inra.fr) および *H. glycines* の雌個体、ネコブセンチュウの雌と卵塊、染色した *H. glycines* の幼虫、植物組織から伸びた菌糸; アニメーション1.) 付加的作用の一例。イチゴ収量のデータは1989年~1991年までの累積値。その他詳細については、*Journal of Nematology* 誌の指示した巻を参照; 2.) 相乗的作用の一例。その他詳細については、*Journal of Nematology* 誌の指示した巻を参照; 3.) 拮抗的作用の一例。その他詳細については、*Nematologica* 誌の指示した巻を参照。

- 82.) **線虫-細菌の複合体**. 写真: 上: 細菌 *Ralstonia solanacearum* の培養物 (www.cals.ncsu.edu); 下: *Aphelenchoides ritzemabosi* の雌 (改変済)。アニメーション1.) 線虫に感染したダイズ根と健全なダイズ根における根粒の断面 (www.micro.biol.ethz.ch); 2.) *Rhodococcus fascians* の電子顕微鏡写真を着色したもの (www.mikrobenscout.de)。
- 83.) **一年生ライグラス毒性 (ARGT: Annual Ryegrass Toxicity)**. アニメーション: ARGTに冒されたヒツジ。写真: ライグラスの植物体 (members.iinet.net.au)、ライグラス種子、無水生活を送る線虫 (www.invasive.org)。
- 84.) **線虫とウイルスの組み合わせ**. 写真: 葉の病徴 (www.agf.gov.bc.ca); 電子顕微鏡写真 (www.ncbi.nlm.nih.gov)。線虫の食道のイラスト中の矢印は最もウイルスを保有している部位を示します。
- 85.) **線虫-線虫間相互作用1**. アニメーション: 線虫-線虫間の相互作用に関する一般情報。DeWitの連続置換解析手法についての紹介と引用。
- 86.) **線虫-線虫間相互作用2**. ネコブセンチュウとニセフクロセンチュウの相互作用を評価するために適用されたDeWitの連続置換解析。その他詳細についてはJournal of Nematology誌の指示した巻を参照。
- 87.) **線虫-雑草間相互作用**. 事例を一つ紹介します。この研究では、朝顔 (MG)、マメ科草本植物の一種 [hemp sesbania](HS)、ヒメモロコシ (JG) という3種類の草本植物から得られた根浸出液が、ワタ (C) 上でのニセフクロセンチュウ (*Rotylenchulus reniformis*) の繁殖が抑制されることが証明されました。上段の写真は各草本から根浸出液を回収するための実験設備を示しています (手前の吊り花かごには滅菌済みのパーライトと栄養培地のみを入れて、対照区として用いました)。右の表は2回の繰り返し実験によって得られたニセフクロセンチュウの平均個体数データをまとめたものです。下の写真は、根の滲出物をろ過する様子と、ニセフクロセンチュウの孵化に対するそれら浸出液の影響を評価している様子を示しています。アニメーション1.) 根の滲出液もしくは対照溶液を入れた小区画中での培養10日間あたりの (X軸)、未分化の、8~16細胞期の十分に発育した卵と生まれてくる幼虫の数 (Y軸) を示すデータ。3種の草本より得た浸出液はいずれも卵の発育を抑制しました。より詳細は、指示したNematologica誌を参照してください。2.) 農業において、より一般的な線虫-雑草間の関係; 3.) 農業における線虫-雑草間の関係についてのキーポイント; 4.) 雑草の茂ったダイズ圃場 (上- www.extension.iastate.edu) とヒメオドリコソウに感染したダイズシストセンチュウ雌の写真 (パデュー大学E. Creech氏提供)。最新の文献: Johnson, W. G., Creech, J. E., and Mock, V. A. 2008. Role of winter annual weeds as alternative hosts for soybean cyst nematode. Online. Crop Management doi:10.1094/CM-2008-0701-01-RV.
- 88.) **線虫-昆虫-菌類の相互作用**. この研究では、茎潰瘍菌 (DPC) の感染によって根組織におけるSCN (ジャガイモシストセンチュウ) の幼虫数が減少しました。反対に、SBL (ダイズシャクトリムシ, *Pseudoplusia includens*) による葉の加害は、根における幼虫数の顕著な増加を引き起こしました。全体としては、これらの3つの病原体による植物の生育および互いに対する影響は付加的なものです。その他詳細については、

Journal of Nematology誌の指示した巻を参照。

89.) **昆虫嗜好性線虫 1.** 1.) 大半の昆虫嗜好性線虫種の分類学的位置; 2.) Rhabditida目線虫の食道。アニメーション1.) *Heterorhabditis bacteriophora* (www.biocontrol.nl) と *Steinernema carpocapsae* (www.db.uac.pt) の写真; 2.) *Xenorhabdus nematophilus* の内在した *S. carpocapsae* の腸 (www.uconn.edu)。

90.) **昆虫嗜好性線虫 2.** *Photorhabdus luminescens* の生活史 (curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com)。写真: (左) 昆虫の死体からあふれ出した線虫; (右) *P. luminescens* に感染して発光するタバコスズメガ幼虫 (*Manduca sexta*) (www.nature.com)。アニメーション: *Photorhabdus luminescens* (www.sci.muni.cz)。 *Photorhabdus* とは「光る棒」を意味します。陸生の生物発光細菌として知られる唯一の種。

91.) **昆虫嗜好性線虫 3.** 写真: A.) ヒアリから脱出するシヘンチュウ類線虫 (S. Porter氏提供); B.) ハチミツガ (*Galleria mellonella*) から脱出する線虫; C.) 線虫に感染したグラス・シュリンプ (北米の淡水域に広く分布する小型のエビ) (mygrassshrimp.googlepages.com); D.) *Prenolepis*属の有翅型アリの雄個体から出てきた *Heydenius*属線虫の幼虫。この標本はバルト海岸の約4000万年前の琥珀中で保存されていました (2002年G. Poinar氏発表)。E.) シロアリを攻撃する線虫 (bexar-tx.tamu.edu); F.) カの幼虫から脱出する *Romanomermis culicivorax* の幼虫 (米国ネブラスカ大学、Lincoln Dept. of Entomology)。

92.) **昆虫嗜好性線虫 4.** 写真: A.) *Steinernema feltiae* に感染したキノコバエの幼虫 (www.omafra.gov.on.ca); B.) *Heterorhabditis bacteriophora* に感染したカブトムシの幼虫 (www.yardscaping.org); C.) *Mermis nigrescens* に感染したグラスホッパー (バッタ、イナゴ、キリギリスの仲間); D.) *R. culicivorax* に感染したカの幼虫。アニメーション 1.) *Psammomermis*属線虫 (M. Hodda氏提供およびwww.csiro.gov.auより); 2.) カの防除用製剤「Skeeter Doom」の包装。商品1グラムあたり *Reesimermis nielsenii* がライフステージの混ざった状態で500頭含まれていることが明記されています。

93.) **昆虫嗜好性線虫 5.** 商品化された昆虫嗜好性線虫製剤。説明不要。

94.) **昆虫嗜好性線虫 6.** *Myrmeconema neotropicum* と *Cephalotes atratus* の関係。説明不要。

95.) **分子診断:** タイトルスライド。

96.) **なぜ分子法を使うのでしょうか?**

97.) **分子診断**には、生化学的手法、DNAに基づく手法、ゲノムに関する手法が含まれます。

98.) **生化学的手法:** 線虫診断に最もよく使われる生化学的手法は電気泳動によるアイソザイムパターンの分離解析です。エステラーゼやリンゴ酸脱水素酵素などが対象

とされます。一般にPHASTゲルシステム (Pharmacia, Inc.; 現存するかどうかは未確認) が使用されます。若い雌個体には適さない場合もあり、種内変異も存在します。熱帯性ネコブセンチュウの同定により手法とされています。

99.) **DESS**: 線虫のPCRを行うための汎用性保存料 (詳細はYoder et al., *Nematology*, 2006, Vol. 8(3), 367-376を参照)。DESS= ジメチルスルホキシド [DMSO]、エチレンジアミン四酢酸 [EDTA]、飽和塩類 [Saturated Salt] の頭文字から成ります。組成は 0.25M EDTA二ナトリウム pH 8.0、20% ジメチルスルホキシド、飽和量のNaCl。線虫の形態を保ち、DNAを劣化させるヌクレアーゼを失活させます。左: 黒海より採取した環境標本「4W5G5」; 右: Kern郡より採取した「5M7G5」。Paul DeLey氏とMelissa Yoder氏提供。

100.) **シネマ**. Paul De Ley氏、Luis Mundo氏、Manuel Mundo氏に提供していただいた動画。 *Pratylenchus penetrans* の側腺球付近と卵巣付近。

101.) **DNAに基づく手法**: 分子解析は試料のタイプを問わず適用可能ですが、シストや卵の場合はDNAが外に出てくるよう完全に粉砕するための工夫が必要となります。通常、診断が必要となる状況で手に入る試料が数頭の幼虫だけであることは多くあります。そのため、たった1頭の線虫でもうまくいくようなDNA抽出法と分子解析法を開発することが極めて重要となります。

102.) **分子解析のための線虫の準備**: 線虫のクチクラは堅いため、化学的な破壊 (NaOHなど。これはPCRに鋳型として使用する前に中和が必要。) だけでは不十分なことがあります、しばしば物理的な破壊が必要となります。PCRは1頭の線虫試料から準備した比較的粗製の抽出物でも行うことが可能ですが、市販のDNA調整キットを使用して大量の線虫体から抽出を行えば、より望ましいDNA収量および純度が達成できます。

103.) **さらなる分子解析**: ポリメラーゼ (重合化酵素) 連鎖反応は、熱安定性のDNAポリメラーゼ (Taqポリメラーゼ) を利用して標的DNAの複製を合成する手法です。DNA量を指数関数的に増加させることができます。

104.) **PCR法にもっと近づいてみる**: ここからのスライドでは、一般的なPCR反応の手順、汚染 (コンタミネーション) を防ぐ方法の概要、その他の注意点を紹介します。この写真はPCRの準備作業に適した無菌スペースで、反応溶液の調整に必要な一連の器具が写っています。

105.) **PCRにおける清潔さ**: PCRにとって最も重要なのは清潔さですが、反応試薬の汚染 (コンタミネーション) や劣化を軽減するためのステップはいくつかあります。「破砕した線虫体」からDNAを抽出すること自体は難しくありませんが、得られるDNAは純粋なものではなく、室温条件下では線虫体に含まれるヌクレアーゼ [核酸分解酵素] が活性をもつ可能性があります。抽出液およびPCR用の試薬類を冷却しておくことはDNAの劣化を防ぐ上で有効でしょう。エアロゾルを通さないフィルターチップを使用すれば、ピペットがDNAで汚染されるのを防ぎ、それによって検体から検体へと汚染が持ち越されるのを防ぐことができます。試薬のなかでどれが劣化し

ているのか探すのに何週間も費やすよりは、試薬の一部(少量)だけを廃棄する方が簡単なのは言うまでもないでしょう。Taq用バッファー、ヌクレオチドなどの試薬を少量ずつ分注することで過度の凍結・融解を避け、試薬のパフォーマンスが落ちるのを防ぐことができます。また、PCR解析の前と後とを分けて行えば、二次汚染の可能性を軽減できるでしょう。

106.) **PCR前:** アニメーション1) (中段) アガロースの計量; (左) アガロースゲル溶液を電子レンジで加熱し、(右) 冷却した溶液を専用のゲル容器に流し込みます。2) (左) スターラー上で電気泳動用バッファーをよく混ぜ、(右) ゲル容器に注ぎ込みます。3) (左) 各サンプルに1% ローディングダイ [電気泳動用の染色液] を添加して混合し、(右) サンプル溶液をウェル(ゲル上のくぼみ)に注入します。4) (左) ゲル内を電流が流れます。(右) 電気泳動がどの程度進んだか予想するために染色液が役に立ちます。5) (左) アガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色している様子; (右) 電気泳動像のデジタル保存に使用されるAlpha Imagerシステム。どの研究室にも独自の設備や作業の流れがありますが、PCR反応を分析するためには典型的なステップがあります。アガロースを計量する際には薬さじを使うとよいでしょう。取り出しすぎたアガロースは、適切な方法で忘れずに廃棄してください(試薬びんに戻してはいけません)。アガロース溶液を調整するときには、ほこりなどが立たないように気を付けてください(ほこりの粒子は紫外線を吸収して泳動像が乱れる原因になります)。加熱したアガロースは、容器に流し込む前に少し冷ましてください。ゲル容器は熱で歪んでしまうこともあります。最新の画像装置は電気泳動像を簡単に得ることができますが、紫外線ランプのセットされた箱の上部に覆いをかけて暗くしてカメラを設置するだけで、安く手軽に撮影することが可能になります。

107.) **PCR増幅から得られる代表的な泳動像:** 写真: PCR産物の電気泳動像。必要なゲルの大きさやアガロース濃度を検討することで、目的のPCR産物の分離効率を最適化することができます(一般的には、産物の塩基長が短いほど高濃度のアガロースが必要になります)。泳動する溶液量に見合った大きさのコームを使用し、十分な深さのゲルを作製するよう注意してください。また、コントロール(対照区のサンプル)とDNAサイズマーカーを流すためのウェルも忘れずに準備してください。アガロースゲル上のバンドはその後、滅菌したメスで切り出して精製し、ダイレクトシーケンシス(塩基配列解読)、制限消化、そしてクローニングに使用することができます。ただし、紫外線ランプの光源の上で作業をするときは目の保護を忘れないこと!

108.) **線虫同定によく使われる分子マーカー-1:** リボソーム遺伝子(=リボソーム遺伝子)は、線虫診断目的のPCRで最もよく標的とされる遺伝子です。リボソーム遺伝子配列はマルチコピーなので、線虫個体1頭からでも十分な量の標的DNAを得ることができます。1個体内におけるリボソームDNA配列には変異が少なく、これは協調進化として知られる均質化プロセスによるものです。このプロセスによって、個々のリボソームDNAの複製は互いに独立に進化することはありません。結果的に、1頭の線虫内もしくは1つの個体群内ではリボソーム遺伝子変異がほとんど見られなくなります。もちろん例外もあって、複合的な配列変異が認められるような場合は、均質化のプロセスがまだ不完全であると考えられます。

109.) **線虫同定によく使われる分子マーカー-2:** リボソームDNAのITS(内部転写ス

ペーサー) は、コード領域18Sと5.8Sの間の領域 (ITS1) と、5.8Sと28Sの間の領域 (ITS2) から成ります。ITS領域の両脇にあるコード領域では配列の保存性が高いため、汎用プライマー (TW81やAB28など) のセットを使用して植物寄生性線虫および自由生活性線虫の大部分についてはITS領域を増幅することが可能です。リボソーマルDNAのITS領域は、最も一般的に増幅される、最も有用な植物寄生性線虫の診断マーカーです。

110.) **線虫同定によく使われる分子マーカー-3:** 18SリボソーマルDNAは、小サブユニットリボソーマルRNA (SSU) とも呼ばれます。このマーカーは系統解析に使用されることの方が多いのですが、陸上環境や海洋環境からの標本調査などで、研究対象の属に含まれる種を同定するのに有用であることがわかっています。

111.) **線虫同定によく使われる分子マーカー-4:** 28SリボソーマルDNAは、大サブユニットリボソーマルRNA (LSU) とも呼ばれます。28S構造ドメインD2とD3は線虫のシークエンス解析や種同定に最もよく利用されています。ループ領域およびヘアピン領域に基づく二次構造予測は、重要なDNAや保存性の高い配列を知るために利用されます。これらの構造は、系統解析で配列アラインメントを行う際に役立ちます。図AとBの出典: Subbotin, S.A., Ragsdale, E.J., Mullens, T., Roberts, P.A., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J.G., A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters, *Molecular Phylogenetics and Evolution* (2008), doi: 10.1016/j.ympev.2008.04.028。

112.) **線虫同定によく使われる分子マーカー-5:** リボソーマルDNAのIGS (遺伝子間スペーサー領域) は28S遺伝子と5Sサブユニットの間の領域 (IGS1) と、5Sと18Sの間の領域 (IGS2) を指します。このマーカーはネコブセンチュウ種、特に *Meloidogyne mayaguensis* の特定に有効であることがわかっています。

113.) **線虫同定によく使われる分子マーカー-6:** ミトコンドリアDNAマーカー。ヒスチジン転移RNA遺伝子 (tRNA-His) を含むシトクロム酸化酵素II遺伝子 (COII) と、16S遺伝子の末端から構成されています。ネコブセンチュウの種を識別するためによく利用されます。PCR産物のサイズもしくは制限断片長多型によって診断可能な種もいます。

114.) **制限断片長多型:** PCR産物を制限酵素で消化すると、ゲル上での電気泳動によって解析可能な断片パターンが得られます。この手法は幅広い植物寄生性線虫に対して使用されてきた実績があり、比較的安価で簡便です。

115.) **対照となる基準種と未知種との比較:** 線虫診断にRFLPを上手に適用するための鍵となるのは、未知の試料と比較するための信頼できる基準種をそろえておくことです。

116.) **リアルタイムPCR:** リアルタイムPCRの主要な利点はその多用途性にあります。ただし、あらゆるPCR試験と同様に、検出感度と特異性を証明することが鍵となります。リアルタイムPCRには従来のPCRよりも特殊な機器が必要で、試薬や機器の

メンテナンスにかかるコストが制約となる場合もあります。実験設定およびデータ解析について適切な訓練を重ねることが重要です。

117.) **マルチプレックスPCR**: この手法では、ほとんどの場合、種特異的プライマーをいくつか組み合わせて線虫種を同時に検出もしくは識別できるようにします。最もよく知られているのは、ジャガイモシストセンチュウの *Globodera pallida* と *G. rostochiensis* を検出するためにリボソームDNAのITS領域を標的としたマルチプレックスPCRを使用した事例です。この手法は最近になってさらに改良され、*G. tabacum* も同時に検出することが可能になりました。選んだマーカーにおいて種内で多型が生じる可能性のある場合は注意が必要です。新たな手法を開発する際はいつも、広い地域の個体群および対照種に有効かどうか確認することが望まれます。

118.) **このセクションの提供者**: 説明不要。

119.) **緩衝生態系および非緩衝生態系**. 同一の地域もしくは地方に生息する独立した植物および動物のグループ内で、それぞれが食物を介して、あるいはすべての作用の影響が他者によって相殺されるような関係を介して互いに影響し合っており、その結果生じる、どの種も優勢となることのない、安定で均衡の保たれた、あるいは変化のない系のことを緩衝生態系と言います。

120.) **学生: 最も重要な「作品」**. 上段 (左から順に) C. Overstreet, K.L. Winchell, K.C. Hadden, J.P. Bond, I. Wenefrieda; 中段 (左から順に) E. Wosula, A. Sankaralingam, M.J. Pontif; 下段 (左から順に) F. Garces, S. R. Stetina, J. Bruce。アニメーション: (左) M. Parish; (右) A. Staszkiwicz。

121.) **おわりに**. 説明不要。

122.) **謝辞**. このファイルで使用したすべてのデータの提供者および引用元ウェブサイトが、シラバス内の謝辞およびスライド122で適切に網羅されていることを願っています。作成者自身のデータを使用した場合は特に明記してありません。このファイルを閲覧、使用した方のなかで、謝辞に漏れがあることに気付かれた方はぜひ作成者にご一報ください。適切に対応いたします。

123.) **補足**. 説明不要。

作成者の電子メールアドレス: emcgawley@agctr.lsu.edu,
coverstreet@agcenter.lsu.edu, mpontif@agcenter.lsu.edu, and
andrea.skantar@ars.usda.gov