

農薬の有効利用へ向けて 土壌中の線虫を簡易に検出する 遺伝子診断方法

東京農工大学 大学院共生科学技術
研究院 先端生物システム学部門

准教授 豊田 剛己

本発明の背景

“有機農業をはじめとする環境保全型農業に関する意識・意向調査結果”（農林水産情報交流ネットワーク事業、2007年11月）によれば、

生産者・消費者の9割以上が減農薬を希望

“減農薬”＝世界的な流れ

農薬販売量

- 世界全体で年間約3兆円
 - 我が国では年間約4000億円
 - 本特許で対象とする殺線虫剤に絞っても
 - 燻蒸剤(D-D剤およびその混合剤)
 - 接触型薬剤(ネマトリンエース、ラグビーなど)約180億円(2007年版農薬要覧)
-

農薬使用の実態

殺線虫剤使用

```
graph TD; A[殺線虫剤使用] --> B[適切な施用]; A --> C[不必要な施用]; B --- B1["(不可避な施用)"]; C --- C1["(病害線虫がないのに 保険的に施用、過剰施用)"]; D["これらをなくせば減農薬につながる"] --> C;
```

適切な施用

(不可避な施用)

不必要な施用

(病害線虫がないのに
保険的に施用、過剰施用)

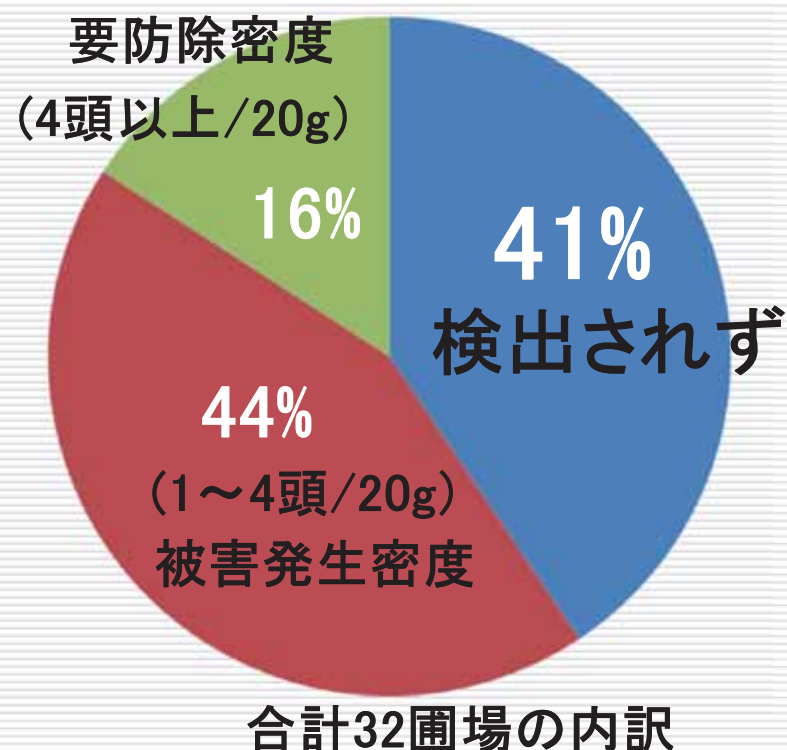
これらをなくせば減農薬につながる

不必要な殺線虫剤の使用量は？

- ・正確なデータはない。

- ・そこで、神奈川県ダイコン栽培地帯で予備調査を実施。

“作付け前の土壌を採取して、植物寄生性線虫が生息しているかどうかを調査。作付け前に生息していなければ、殺線虫剤を使用する必要はない。”



40%程度の圃場で保険的に使用＝削減可

不必要な殺線虫剤を無くすには？

- 農薬の要否を判断する線虫診断が必須。
- 実際に、線虫診断に関する研究例多い
(西澤1973、大林1989、相場2001、三平2002など)

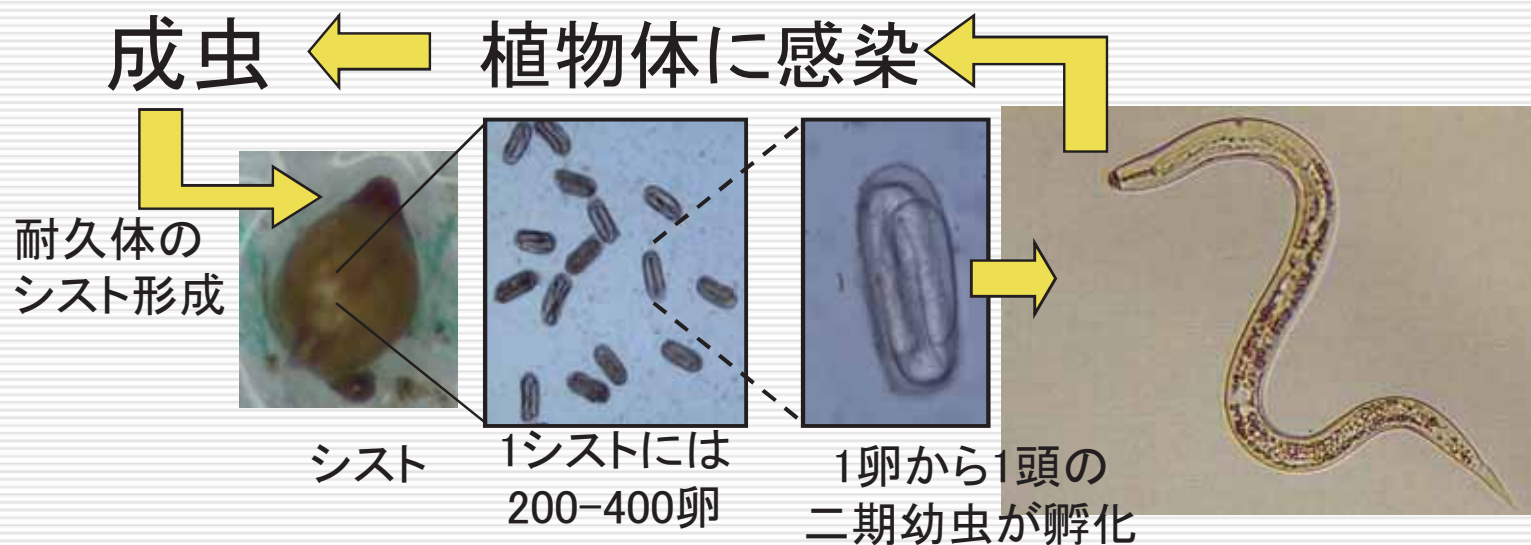
→ 普及していない

→ なぜか？

→ 診断に手間がかかる。
しかも精度に難点。

本特許ではこの2点を改善

線虫の生活環



シストセンチウの異なる形態とその検出方法

	シスト	卵	二期幼虫
運動性	なし	なし	あり
ベルマン法	×	×	○
締固め法	○	○	○

日本産の主要な植物寄生性線虫



ネグサレセンチュウ
(*Pratylenchus* spp.)

ダイコン、イチゴ、
ゴボウなどに加害



ネコブセンチュウ
(*Meloidogyne* spp.)

トマト、キュウリ、
サツマイモなどに加害



シストセンチュウ

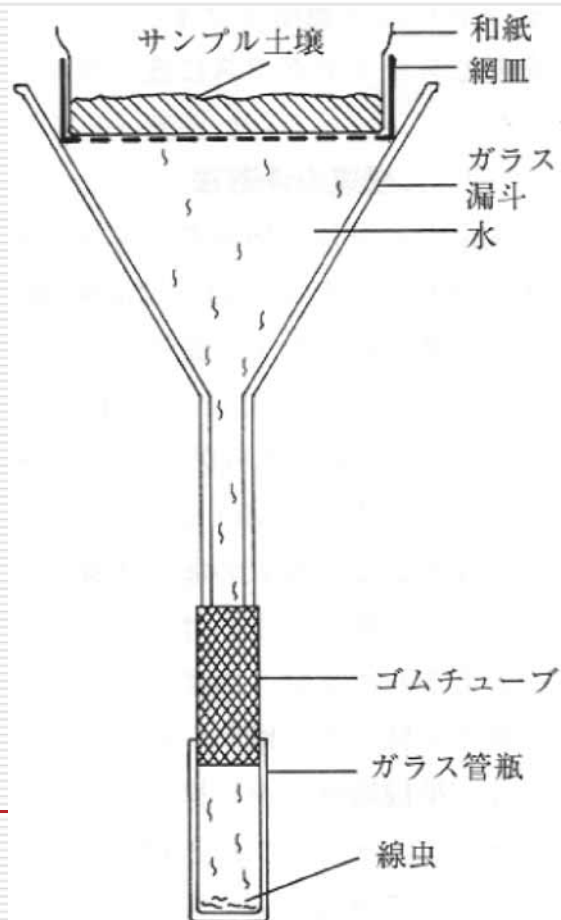
ダイズシストセンチュウ
(*Heterodera* spp.)

ジャガイモシストセンチュウ
(*Globodera* spp.)

特定の宿主に特定種
の線虫が感染

線虫診断の従来法ーベルマン法ー

□ ベルマン法:二期幼虫を分離



原理：線虫自身の活動性により
土壤から水層へと移動

特徴：日本で最も広く使われて
いる方法、**分離率は約50%**

欠点：活動性の低い（種類や季節）
線虫の分離率、粘土質土壤
での分離率

抽出まで2-3日必要

線虫診断の従来法ーベルマン法ー

□ 実際の計数



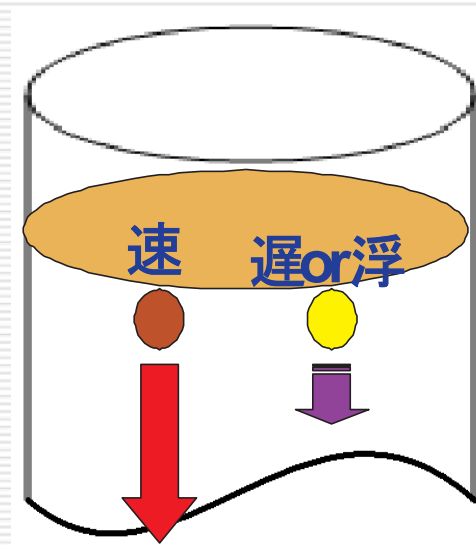
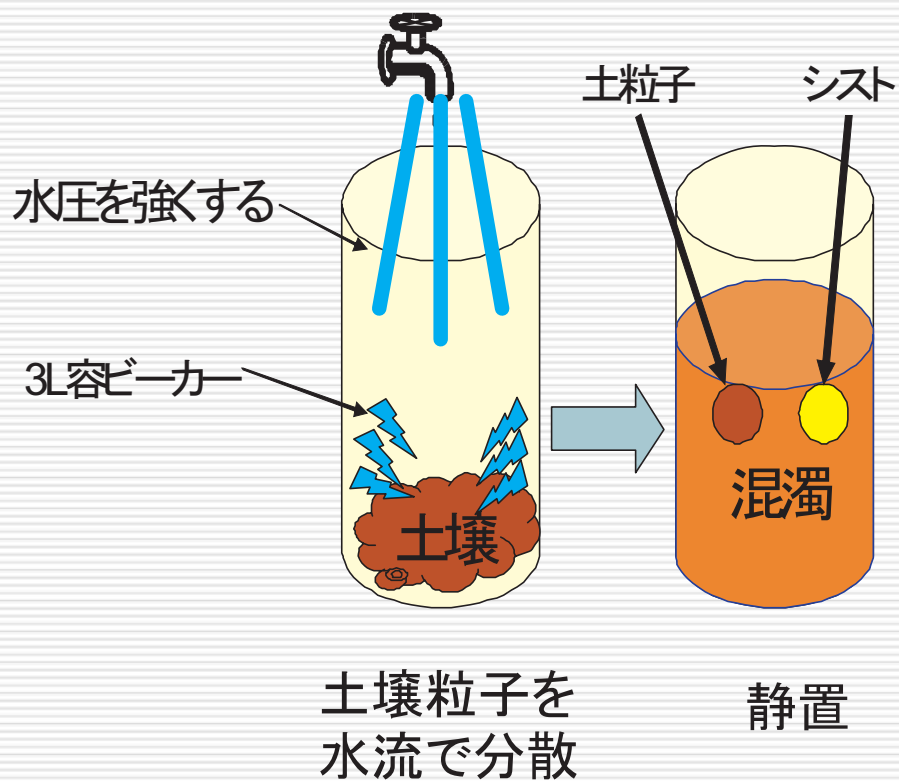
1mm

多様な線虫群の中から目的とする植物寄生性線虫のみを計数しなければならない

→ 熟練した技術が必須

線虫診断の従来法—篩い分け法—

□ 篩い分け法：シストを分離

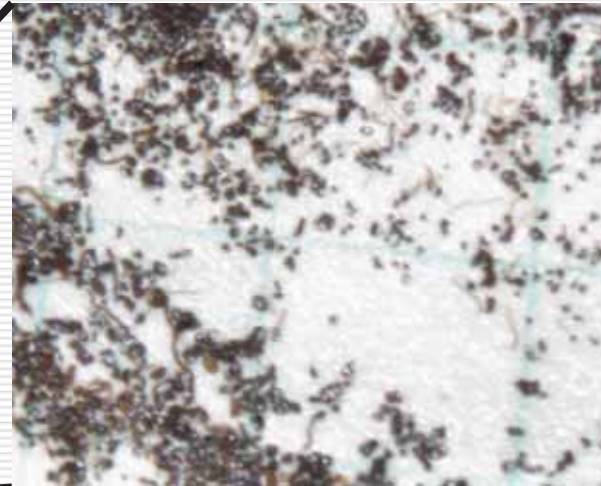


欠点：手間がかかる。計数に熟練した技術。計数値に個人差

浮遊したシストを篩いで回収

線虫診断の従来法—篩い分け法—

□ 実際のシストの観察状況



シスト以外にも様々な粒子が混入
→この中からシストを選別するのは非常に困難

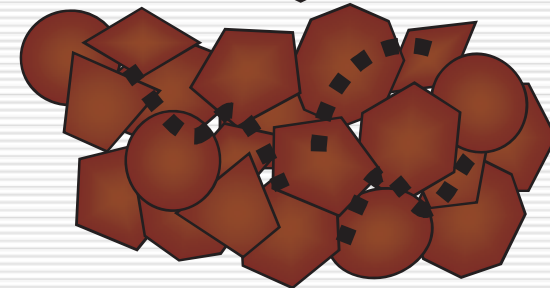
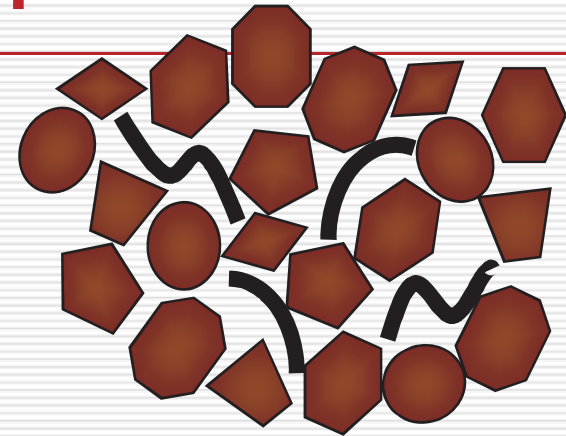
締固め法とは—その1—

□ 締固め器を用いて圧密



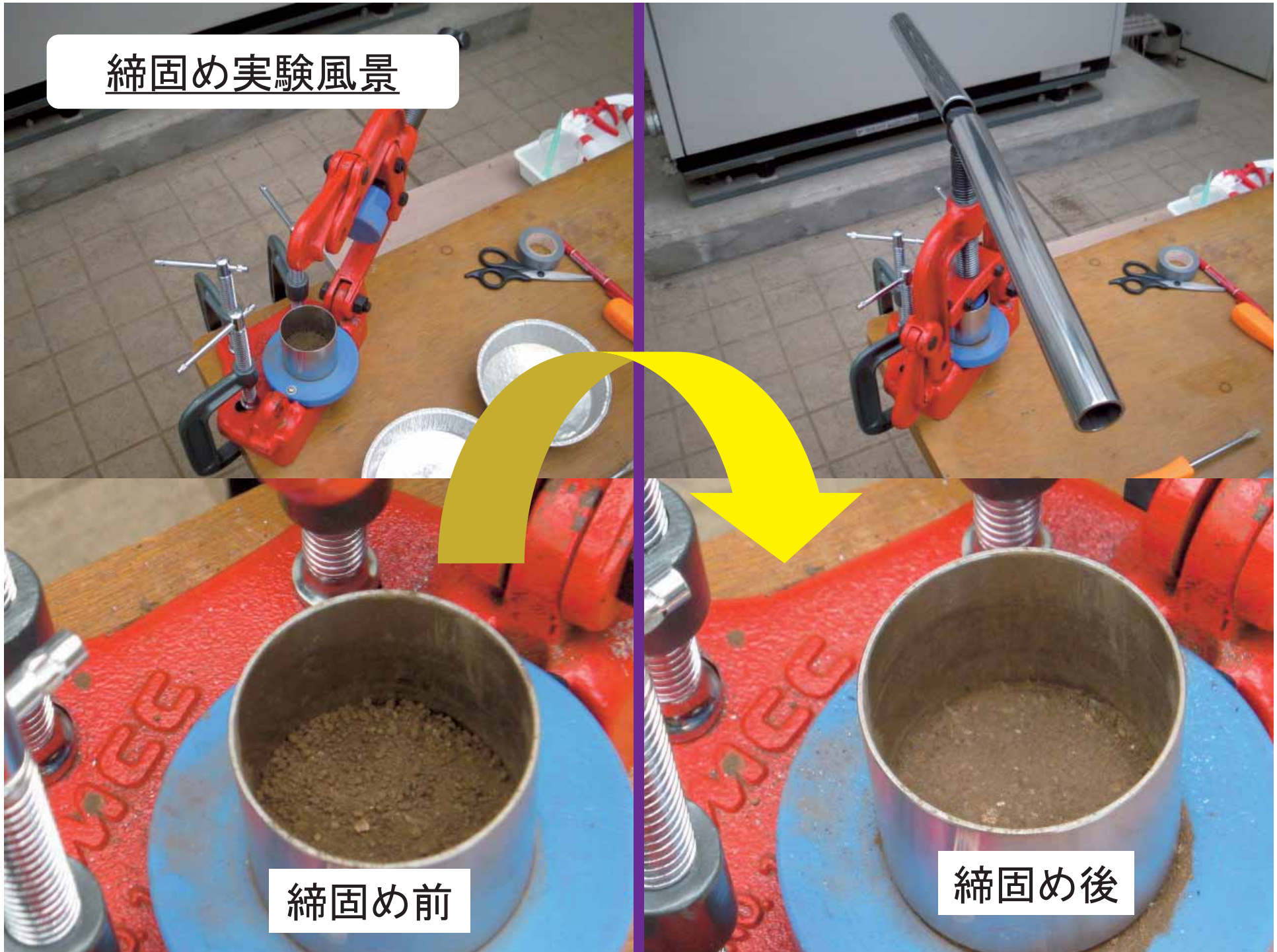
②万力のよ
うに、土壌を
上から圧密

①この容器
の中に土壌
を充填



圧密により線虫細胞
は物理的に破壊

締固め実験風景



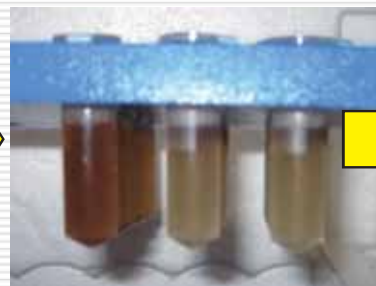
締固め法とはーその2ー

- 常法により土壌からDNAを抽出し、特異プライマーを用いたリアルタイムPCRにより検出

〔締固め前〕



〔締固め後〕



60g程度の土壌をブレンダーで完全に分散



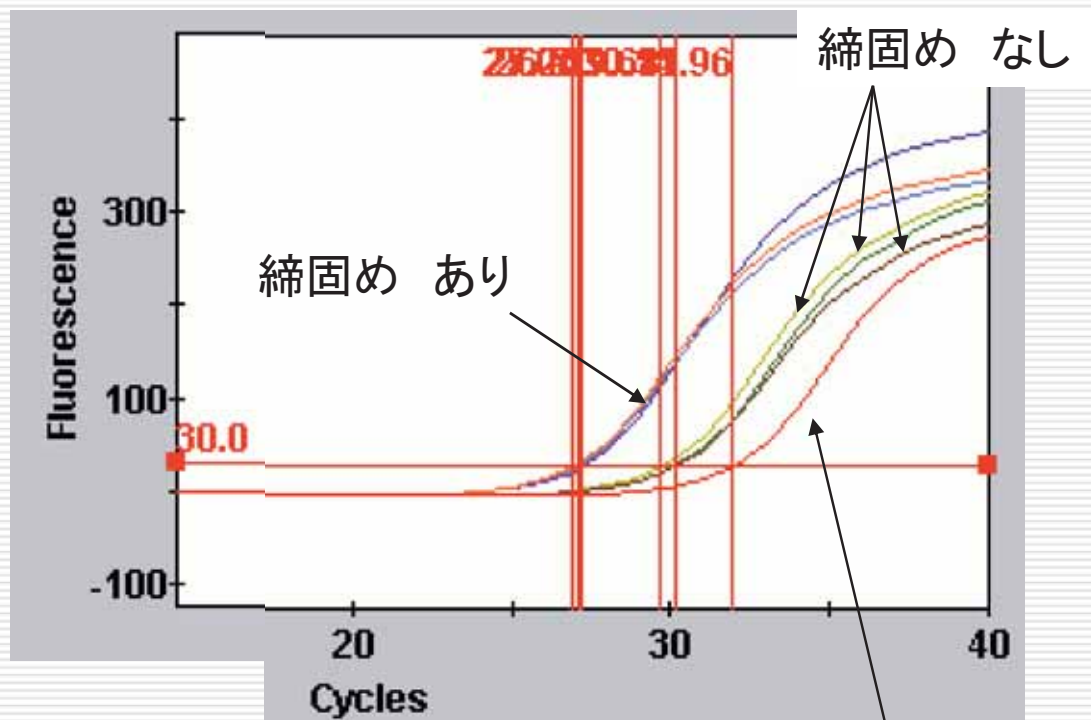
(Cephied 社)

<http://www.takara-bio.co.jp/prt/pdfs/prt2.pdf>

〔Real-time PCR〕

締固め法とは—その3—

□ リアルタイムPCRでの検出例

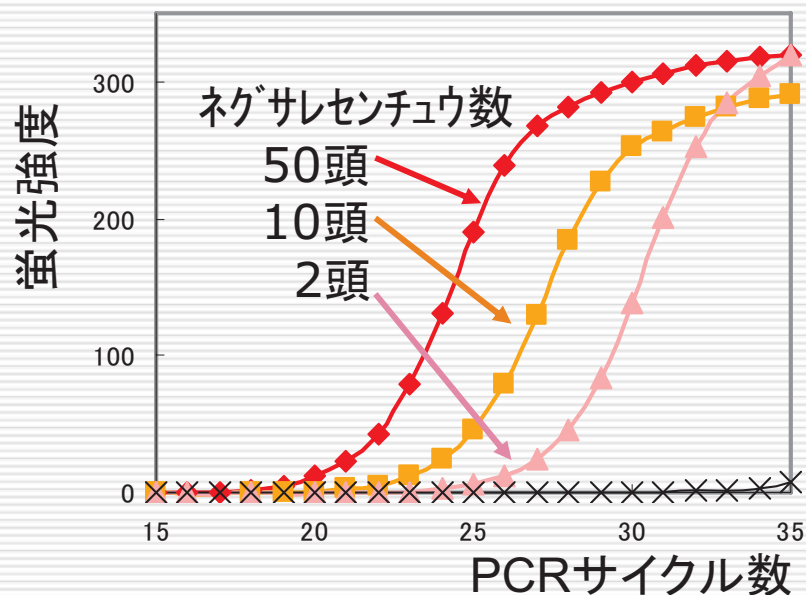


ダイズシストセンチュウ汚染土壌から3反復でDNAを抽出し、リアルタイムPCRにより検出。対象とする生物の遺伝子数が多いほど、早いサイクル数でDNAが増幅される

ネガティブコントロール

Real-time PCRによる植物寄生性線虫密度推定

既開発* { キタネグサレセンチュウ
 { サツマイモネコブセンチュウ
 { ダイズシストセンチュウ
 { ジャガイモシストセンチュウ



標的線虫種が多い

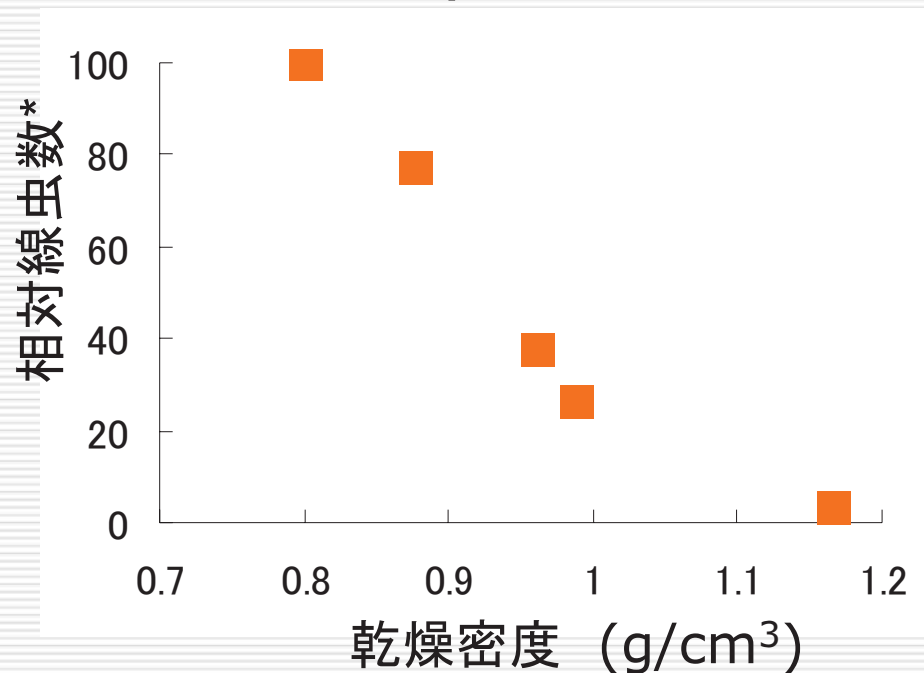
↓
標的DNAが多い

↓
少ないPCRサイクル数
で蛍光が検出される



締固め法による測定例—その1—

- 締固めが土壌中の線虫数(ベルマン法)に及ぼす影響



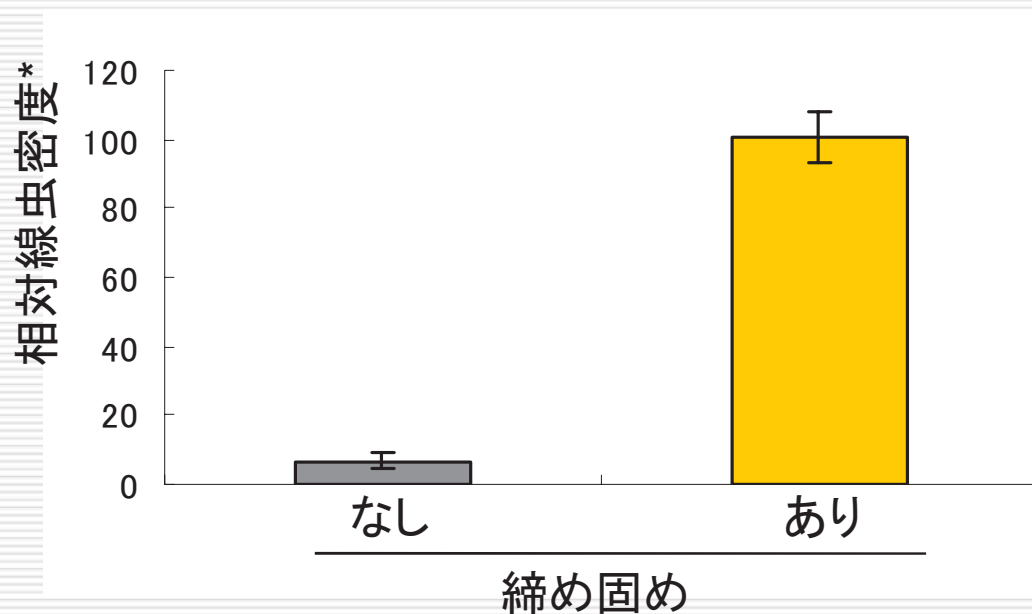
・締固め強度が高まる程、ベルマン法で計数される線虫数が減少

→締固めで
線虫が死滅

*締め固めなし(=乾燥密度0.8)の時の線虫数を100とした相対値

締め固め法による測定例ーその2ー

- 土壌中におけるダイズシストセンチュウ数の計数(リアルタイムPCR法で検出)に及ぼす締め固めの影響



- ・締め固めにより検出された線虫数が15倍増加
→土壌中の線虫が締め固めにより破壊され死滅
→DNAが抽出されやすくなった

→**検出感度
大幅に改善**

*締め固めありの時の平均値を100としたときの相対値。

締固め法による測定例ーその3ー

- 土壌中におけるダイズシストセンチウ数の計
数値(リアルタイムPCR法で検出)の**バラツキ**に
及ぼす締固めの影響

変動係数(%)の比較

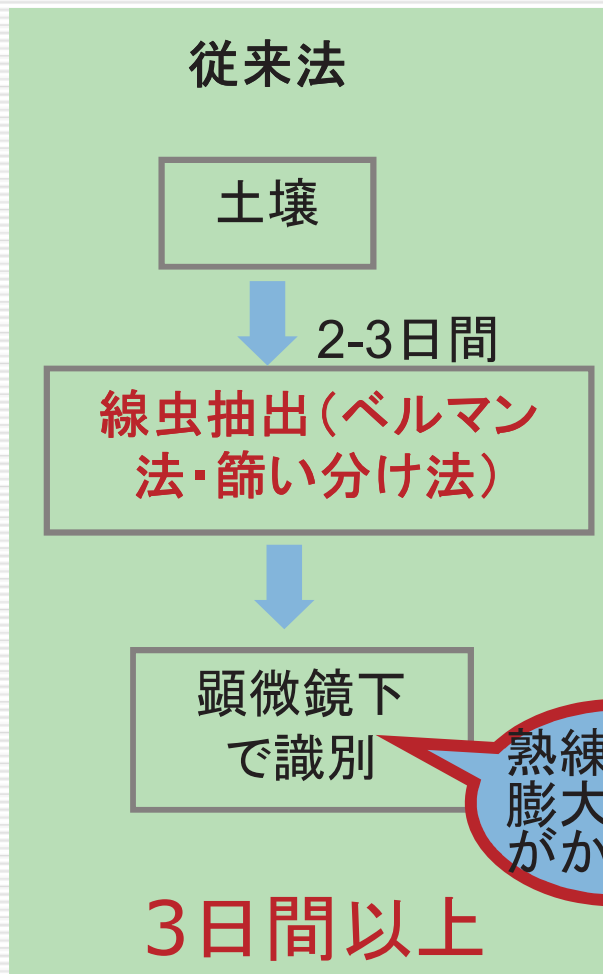
	締固め	
	なし	あり
測定例1	34.1	7.4
測定例2	19.1	11.7

締固めにより

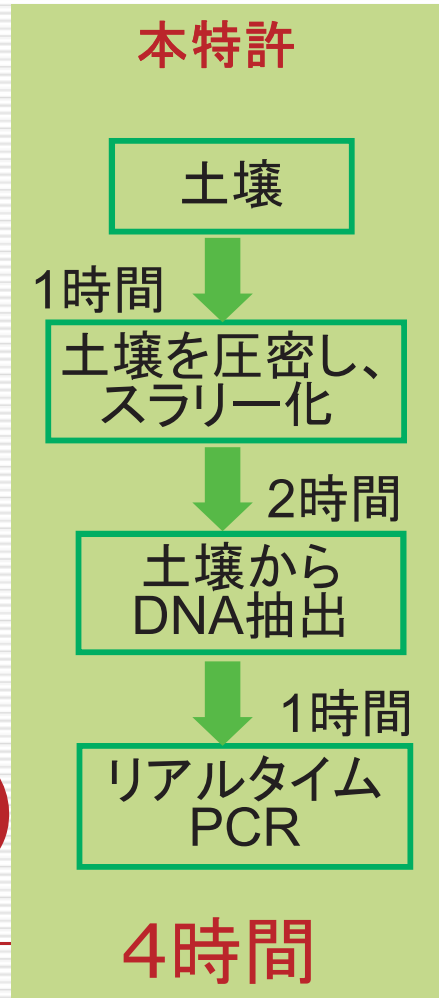
- ・変動係数が低下
→バラツキが少なくなる

→**検出精度向上**

分析所要時間の比較



熟練を要し、膨大な手間がかかる



実用化に向けた課題

- 検出限界(20g当たり)の改善:
 - ネグサレセンチュウ 黒ボク土 10頭
 - ネコブセンチュウ 砂土 5頭
 - ジャガイモシストセンチュウ黒ボク土 20頭
 - ダイズシストセンチュウ 黒ボク土 10頭
 - 線虫密度が低い時(検出限界付近)の精度向上
 - コスト削減 人件費込み、減価償却なし
1サンプル2,500円
-

企業への期待

- 作物および土壌タイプ毎の診断基準の作成
ダイコン(黒ボク土、沖積土)
サツマイモ(砂土)

他の作物産地へ展開

ジャガイモ・イチゴ・キュウリ・トマトなど

- より高速の診断技術開発: キャピラリー型リアルタイムPCRなど。
 - より簡便な診断技術開発: ELISA、アレイなど。
-

本技術に関する知的財産権

- 名 称 : 土壌中の線虫を検出・定量する
方法及びその方法に用いる土壌
試料の圧密器具
- 出願番号 : 特願2008-039438PCT/JP2009/062794
- 出願人 : 国立大学法人東京農工大学、
大起理化工業株式会社
- 発明者 : 豊田剛己、大島忠男、佐藤恵利華、
後藤圭太、大石正行

お問い合わせ先
東京農工大学産官学連携・知的財産センター 木下麻美
TEL : 042-388-7283 FAX:042-388-7173
e-mail : mamikino@cc.tuat.ac.jp