

黒ボク土における土壤線虫の形態的特徴および18S rDNA部分塩基配列による同定・分類

山下千草・河野栄次・長友由隆・佐伯雄一

宮崎大学農学部応用生物科学科生物機能科学講座

(2006年1月25日 受理)

Morphology and Classification of Nematodes in Andosols

Chigusa YAMASHITA, Eiji KAWANO, Yoshitaka NAGATOMO, Yuichi SAEKI

Division of Biotechnology and Biochemistry

Summary : It is considered that free-living nematodes are important as one of biological indicators of soil productivity. In this study, we classified soil nematodes by morphological characteristics and 18S rDNA sequence analysis, and evaluated the consistency of the results by the morphological classification systems and the phylogenetic tree based on the 18S rDNA sequences. Soil nematodes were extracted from soil samples using Baermann funnels and isolated under microscopic observations. As the results, morphological characters of 50 nematodes were observed and classified into the order by the morphological characters of the esophagus. The 37 nematodes were identified by the sequence analysis of 18S rDNA gene, and classified into the genus. In the phylogenetic analysis, it was suggested that discrepancy between the classification system by morphological characters and the clusters in the phylogenetic tree based on 18S rDNA sequences was indicated in the order *Rhabditida* and the order *Tylenchida*. Furthermore, it was difficult to distinguish plant-parasitic nematodes and free-living nematodes in the phylogenetic tree. Further study of relationships in the morphology and the phylogenetic analysis will be necessary to establish the method of the identification by sequence analysis.

Key words : Morphology, Cluster analysis, Nematodes, Soil productivity, 18S rDNA.

緒言

線虫は袋形動物門に属しており、土壌中の他にも海水や淡水などの水域にも広く生息している水棲動物である。地球上の動物界で最も種類数の多いのは昆虫類であり、それに次ぐのは線虫類であると言われている。現在、線虫の既知種は15,000種と言われており、自然界には100万種の線虫が存在するのではないかとされている (Nielsen, 1998)。また、線虫はその生息域や摂食の違いによって「海産自活性線虫」、「動物(昆虫)寄生性

線虫」、「土壌線虫」に大別され、土壌線虫はまた「植物寄生性線虫」と「自由生活性線虫(自活性線虫)」とに分けられる。自活性線虫は、広食性で、食性の区分は必ずしも明確でないため、捕食性以外の自活性線虫は「腐生性線虫」と総称され、主に土壌中の有機物や動植物の遺体などを食べて生活している。また、現在までに同定された線虫種を比率で示すと、土壌線虫は全体の35%程度を占め、その内自活性線虫が約7割、そして植物寄生性線虫が残りの約3割を占めるとされている

(図1 西澤 1994). また, 一般的な土壌では生息する土壌線虫密度は 1 m^2 当たり 10^7 頭程度と見積もられているが, このうち農作物に寄生して被害を与える植物寄生性線虫は一部であり, 大半が自活性線虫である. 自活性線虫は農作物に対して直接的な影響は及ぼさないものの, 土壌中での圧倒的な個体数と数日間という生活環の短さから, 土壌中の食物連鎖, ひいては植物養分の循環過程における土壌肥沃度の維持・向上に重要な役割を果たしており, 土壌の地力に大きく貢献していると言われている(西澤 1994; 三枝 1993). したがって, 自活性線虫は「地力の指標」として見るができると考えられる. しかし, 自活性線虫の形態および生理・生態は, 寄生性線虫と比べてほとんど研究されていないのが現状である.

そこで本研究では, 自活性線虫の形態および生理・生態を解明する前提として, 土壌線虫の同定・分類手法を確立する必要があると考え, まず南九州で代表的な土壌である黒ボク土において自活性線虫, 植物寄生性線虫および捕食性線虫の形態観察および分類を行った. また, 従来からの土壌線虫の分類・同定は, 主に雌成虫の形態を指標として行われており, 形態による正確な種の判定には高度な熟練が必要とされる. したがって, 本実験では, 従来から分類の指標として用いられてきた形態的特徴に加えて, 土壌線虫の卵から雌雄成虫まですべてのステージに共通な分子情報である18S rDNA遺伝子配列を指標として同定を試みた.

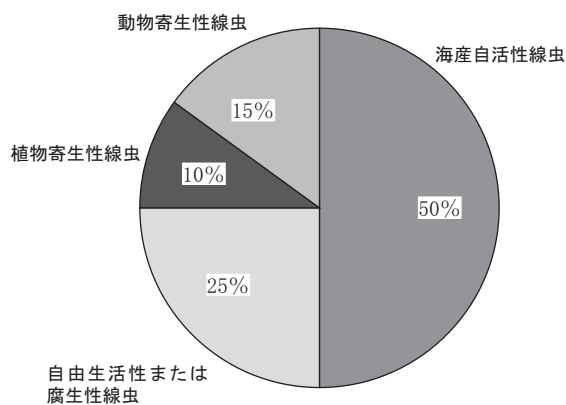


図1. 線虫の類別ごとの比率

材料および方法

供試土壌: 宮崎大学付属農場および本研究室の黒ボク土圃場より, 表層を除いた深さ5~15 cmの土壌を供試土壌とした. また, 採取地点は線虫密度の高い植物の株元やうねとした.

土壌からの線虫分離: ゴム管を付けたベルマン漏斗 ($\phi 9.5 \text{ cm}$) の下端にラベルした管ピンを付け, 蒸留水を満たした. 土壌を十分混合した後, その約20 gをキムワイプで包み網皿に乗せてロータ台にセットし, 土壌の下半分が十分浸るように蒸留水を足した後, 気泡を取り除いた(図2). そして, $25\sim 30^\circ\text{C}$, 48時間にて分離した後, ゴム管をピンチコックで止め, 管ピンを取り外した(堀口 1999; 佐野 2004).

土壌線虫の形態による同定: 分離後の線虫を蒸留水ごとマイクロピペットでホールスライドグラスに移した後, 実体顕微鏡下 ($\times 40$) にて1頭を分離し, 別に数滴の滅菌水を落としたスライドグラスに下ろし, スライドグラスの下から軽く火であぶり線虫の固定を行った. 固定した線虫の形態を光学顕微鏡下 ($\times 400$) にて観察し, 線虫の同定を行うとともに, 土壌線虫の全身・頭部・尾部の写真を撮影した.

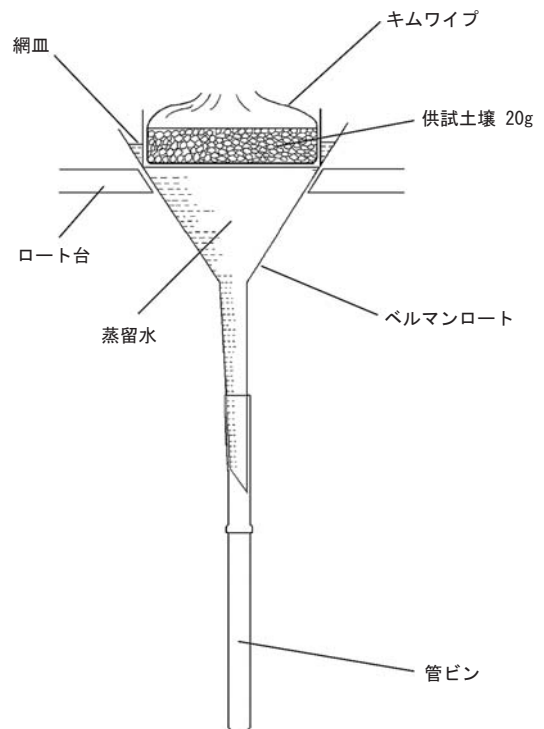


図2. ベルマン法による土壌線虫分離模式図

土壤線虫の18S rDNAによる同定：PCR増幅によって目的とするPCR産物を確実に得るために、土壤線虫1頭からのDNA抽出を行った。写真撮影後の線虫を1mm四方に切ったろ紙（No. 5B）で押しつぶし、そのろ紙をlysis buffer〔1% Nonidet P-40, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 µg/ml proteinase K〕15 µl の入った1.5 mlマイクロチューブに移し、60 °C, 1時間, 37 °C, 16時間インキュベートした後、-70 °Cで凍結させた。凍結サンプルは室温で融解させた後に、94 °C, 5分間処理し、これを鋳型DNAとした。18S rDNAの増幅は18S rDNAのユニバーサルプライマー（EUK18S-F：5'-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3', EUK18S-R：5'-GATCCTTCCGCAGGTTCCACC-3', 小柳津 1999）を用いてPCR増幅し（94 °C 5分, 94 °C 1分, 55 °C 1分, 72 °C 1分, 30サイクル, 72 °C 10分）、増幅産物を得た。得られたPCR産物をテンプレートとして、nested PCR（EUK18S-FおよびEUK 570-R：5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3', 小柳津 1999）を行った（94 °C 5分, 94 °C 1分, 55 °C 1分, 72 °C 1分, 30サイクル, 72 °C 10分）。得られたPCR産物の精製は、1.2%アガロースゲル（1×TAE）電気泳動後、ゲルの切り出しによって行った。精製後、ダイレクトシーケンシングを行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems, CA, USA）によって18S rDNA 5'末端側約400 bpの塩基配列を解読し、BLAST検索（DDBJ/GenBank/EMBL）によるホモロジー検索を行い、データベース上の相同性の高い塩基配列を抽出した。抽出した塩基配列を利用してUPGMA（Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages；無荷重平均距離法）法による遺伝子系統樹を作成して土壤線虫の属レベルでの分類を行った。

結果

土壤線虫の形態による同定：顕微鏡下にて観察・写真撮影を行った結果、総計104頭（サンプルNo. 1~104）の全身、頭部および尾部の形態写真を得た。また、得られた顕微鏡写真を用いて、分類基準となっている形態的特徴を表1にまとめた（表1）。しかし、子宮や卵巣は腸に隠れてほとんど確認できず、また多くの線虫体内に緑色の粒状のものが多数見られ、体内の各器官を観察するの

が困難であったので、表1では子宮・卵巣の形態の項目を省き、各サンプルの形態の観察結果の欄には、本研究の顕微鏡写真から確認できた50サンプルの形態を記載した。比較的鮮明な像が得られたサンプルNo.9, 27, 36, 38, 40, 85, 87, 98は、目レベルの分類基準となっている食道部の形に特徴のある*Drylaimus*型（No. 87）・*Rhabditis*型（No. 40, 85, 98）・*Mononchus*型（No.9, 27, 36, 38）を示した（図3）。

土壤線虫の18S rDNAによる同定：Nested PCRによって検出されたバンドをゲル精製し、塩基配列の解読を行い、ホモロジー検索によって配列データと最も相同性の高い線虫種の同定を行った。抽出した104サンプル中、PCR増幅できたサンプルは67サンプルで37サンプルは増幅が認められなかった。また、67サンプル中シーケンシング結果が得られた59サンプルのうち、表1に示したサンプルNo.以外の22サンプルは糸状菌と同定された。結果として、37サンプルの線虫のシーケンシングデータが得られた。ホモロジー検索で線虫を同定できたサンプルについては、現段階で確立されている土壤線虫の形態的分類体系（横尾 1962；Duke 1986；佐野 1996；青木 1999）を参考にして分類表を作成した（表1）。加えて、形態による属の同定を九州農業試験場 地域基盤研究部 線虫制御研究室で行い、その同定結果も分類表に記載した（表1）。さらに、サンプルNo.2, 11, 24の食性の不明については、現在の分類体系において*Dorylaimida*目は捕食性あるいは藻食性の分類群と寄生性の分類群のどちらにも属しており、形態からの同定も試みたが、どちらの分類群に属するか現段階では区別できなかったため不明とした。また、ホモロジー検索で相同性の高い線虫および代表的な線虫の18S rDNA配列

[*Acrobeloides apiculatus* (AY284673)
Acrobeloides nanus (DQ102707)
Caenorhabditis elegans (AY268117)
Caenorhabditis japonica (AY602182)
Cephalobus cubaensis (AF202161)
Cephalobus oryzae (AF034390)
Cylindrolaimus communis (AY593939)
Globodera pallida (AF036592)
Globodera rostochiensis (AY593881)
Haemonchus placei (L04154)

表 1. 宮崎大学圃場黒ボク土から検出された線虫の形態的特徴および18S rDNA部分塩基配列による分類

目(亜目)	科(上科)	属(亜属)	同定方法 ^a	食性 ^b	体長(mm)	口腔の形態	節球の有無 ^c	節球の形 ^c	唇部の形	食道球の位置	陰門・交接刺の有無	陰門の位置 ^c	尾部の形態	その他の形態的特徴	サンプルNo. ^d
Tylenchida	<i>Heterodaridae</i>	<i>Globodera</i>	18S	寄生性	0.6-0.7	口針有	有り	球状	高く突出している	不明	陰門有り	中央	鈍い円錐状	らせん状, 体環が大きい	16, 18, 22 ^e
	<i>Anguinidae</i>	<i>Subanguina</i>	18S	寄生性	0.8	不明	不明	不明	やや突出している	不明	不明	不明	糸状で細長い	—	23
	<i>Trichodoridae</i>	<i>Paratrichodorus</i>	18S	寄生性	0.5	口針有	不明	不明	球状に大きく突出	不明	不明	不明	鈍い円錐状	ひれ状の突起が一對	47
	<i>Hoplolaimidae</i>	<i>Helicotylenchus</i>	形態	寄生性	0.7	口針有	有り	球状	高く突出している	不明	陰門有り	中央	鈍い円錐状	らせん状, 体環が大きい	17
	<i>Pratylenchidae</i>	<i>Pratylenchus</i>	形態	寄生性	0.5	口針有	有り	球状	平たく厚い唇が突出	中部に一つ	陰門有り	肛門の上方	円状	体環が大きい	42
Dorylaimida	<i>Longidoridae</i>	<i>Longidorus</i>	18S	寄生性	0.9-2.2	口針有	不明	不明	球状の唇が6片突出	中部に一つ	陰門有り	中央	背曲または鈍い円錐状	—	20, 33, 35, 37, 71
					0.4-1.2	口針有	不明	不明	やや突出している	中部~後部に一つ	陰門有り	中央	細いまたは鈍い円錐状	—	34, 48, 86
	<i>Longidoridae</i>	<i>Xiphinema</i>	18S	寄生性	0.4-1.2	口針有	不明	不明	やや突出している	中部に一つ	不明	不明	背曲円錐状または円状	—	30, 49, 51, 69, 70, 74, 83
					0.4-1.2	口針有	不明	不明	やや突出している	後部に一つ	陰門有り	中央	背曲円錐状	—	87, 91, 96
	<i>Longidoridae</i>	不明	形態	寄生性	1.0	口針有	不明	不明	球状の唇が突出	不明	陰門有り	中央	背曲円錐状	—	6
<i>Longidoridae</i>	不明	形態	不明	0.7-1.6	口針有	不明	不明	球状の唇が3片突出	不明	陰門有り	中央	鈍円錐状または糸状で細長い	—	2, 11, 24	
Dorylaimina (亜目)	<i>Dorylaimidae</i>	<i>Dorylaimus</i>	形態	捕食性	0.8-1.1	口針有	不明	不明	球状の唇が突出	不明	陰門有り	中央	背曲円錐状または円状	—	12, 13
Mermithida	<i>Mermithoidea</i> (上科)	<i>Mermis</i>	18S	捕食性	1.5	馬蹄状で歯を持つ	—	—	尖った唇が6片突出	不明	不明	不明	細い円錐状	—	36
Mononchida	<i>Mononchidae</i>	<i>Mylonchulus</i> (亜属)	18S	捕食性	1.1-1.2	馬蹄状で大歯	—	—	尖った唇が6片突出	不明	陰門有り	不明	指状	—	27, 38
	<i>Mononchidae</i>	<i>Mononchus</i> (亜属)	形態	捕食性	0.7	馬蹄状で大歯	—	—	突出せず平坦	不明	不明	不明	細い円錐状	—	9
Rhabditida	<i>Rhabditidae</i>	<i>Mesorhabditis</i>	18S	腐生性	0.5	ストロー状	—	—	不明	中部・後部に各一つ	陰門有り	肛門の上方	糸状で細長い	—	32, 40, 85
	<i>Cephalobidae</i>	<i>Cephalobus</i>	18S	腐生性	0.4-0.6	先端部がY字型	—	—	やや突出している	後部に一つ	交接刺有り	—	背曲円錐状または円状	体環が大きい	46, 102
	<i>Rhabditidae</i>	不明	形態	腐生性	0.4-0.5	先端部がY字型	—	—	不明	中部~後部に一つ	陰門有り	中央よりやや下	細い円錐状または円状	体環が大きい	14, 39, 43
	不明	不明	形態	腐生性	0.6	先端部がY字型	—	—	2片の唇が突出	中部・後部に各一つ	陰門有り	中央	細い円錐状	体環が大きい	98
Araolaimida	<i>Cylindrolaimidae</i>	<i>Cylindrolaimus</i>	18S	腐生性	0.4	不明	—	—	不明	不明	不明	不明	円状	—	101
	<i>Cylindrolaimidae</i>	不明	18S	腐生性	0.3	線状	—	—	高く突出している	中部に一つ	不明	不明	円状	—	103
Enoplida	<i>Prismatolaimidae</i>	<i>Prismatolaimus</i>	18S	腐生性	0.4-0.7	先端部がU字型	—	—	突出し突起が一對	不明	陰門有り	中央よりやや下	糸状で細長い	体環がある	61, 73, 95, 100

a: すべての同定は形態観察を含み, 18Sはさらに18S rDNA部分塩基配列による同定を加えたもの

b: 寄生性は植物寄生性線虫, 捕食性は微生物や他の線虫を食べる線虫, 腐生性は土壌有機物や動植物の遺体を食べる線虫を示す

c: 顕微鏡観察の結果, 観察できなかったものを[不明], 本来持たないものを[-]とした

d: 示したNo.以外のサンプルはPCR増幅できなかったか糸状菌と同定されたため削除した

e: ホモロジー検索によって*Globodera*属と同定されたが, その形態は*Helicotylenchus*属(らせん線虫)の特徴を示した

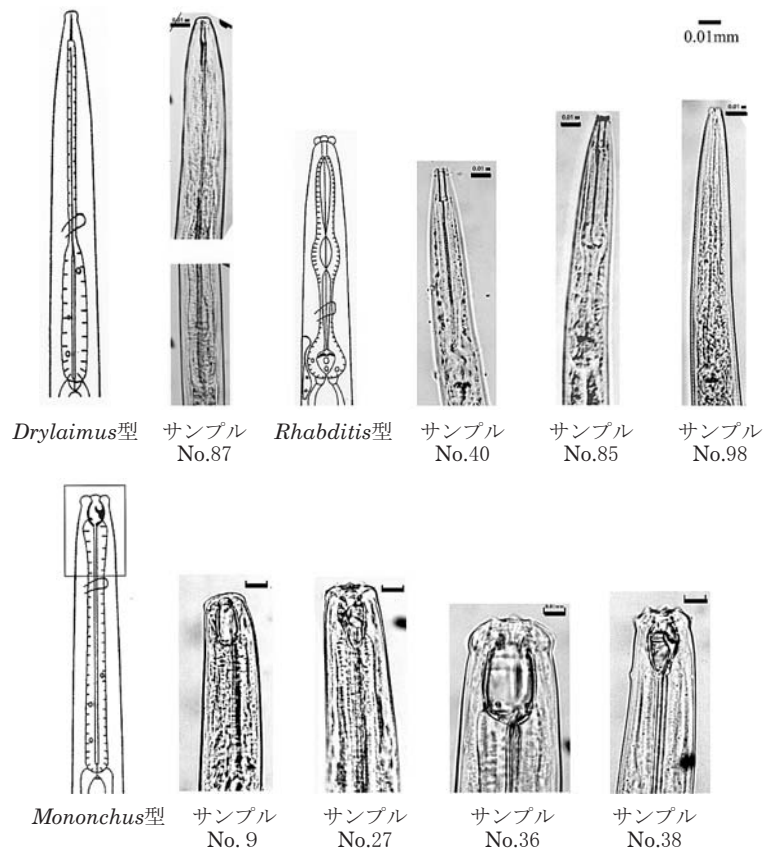


図3. 目レベルの分類基準となる食道型およびサンプルの頭部形態写真

Haemonchus similis (L04152)
Longidorus elongatus (AY687992)
Longidorus piceicola (AY687993)
Meloidogyne arenaria (AY268118)
Meloidogyne incognita (AY268120)
Mermis nigrescens (AF036641)
Mermithid sp. (AY284743)
Mesorhabditis anisomorpha (AF083013)
Mononchus aquaticus (AY284765)
Mononchus truncatus (AY284762)
Mylonchulus arenicolus (AF036596)
Mylonchulus brachyuris (AY284754)
Paratrichodorus allius (PAL439572)
Paratrichodorus macrostylus (PMA439622)
Plectus aquatilis (AF036602)
Plectus rhizophilus (AY593928)
Pratylenchoides magnicauda (AF202157)
Prismatolaimus dolichurus (AY593957)
Prismatolaimus intermedius (AY284729)
Subanguina radiculicola (AF202164)

Teratocephalus lirellus (AF036607)
Teratocephalus terrestris (AY284683)
Teratorhabditis palmarum (TPU13937)
Teratorhabditis synpapillata (AF083015)
Trichodorus primitivus (AF036609)
Tylocephalus auriculatus (AF202155)
Xiphinema surinamense (AY297833)

をデータベースより抽出し、約400 bpのシーケンスデータと共に系統樹を作成した(図4)。系統樹におけるクラスター分析の結果、目レベルでは37サンプル全てがクラスターごとに分類された。さらに、属レベルにおいて、*Longidorus*属と*Xiphinema*属、*Acrobeloides*属と*Cephalobus*属のような一部の近縁な属を除いて属の同定が可能であった。しかしながら、形態的特徴から判断された分類目に対応せず、系統的に離れた複数のクラスターが*Rhabditida*目および*Tylenchida*目において確認された。また、約400 bpの部分塩基配列の系統樹とデータベースから抽出したほぼ全長の18S rDNA配列の系統樹(図5)を比較したと

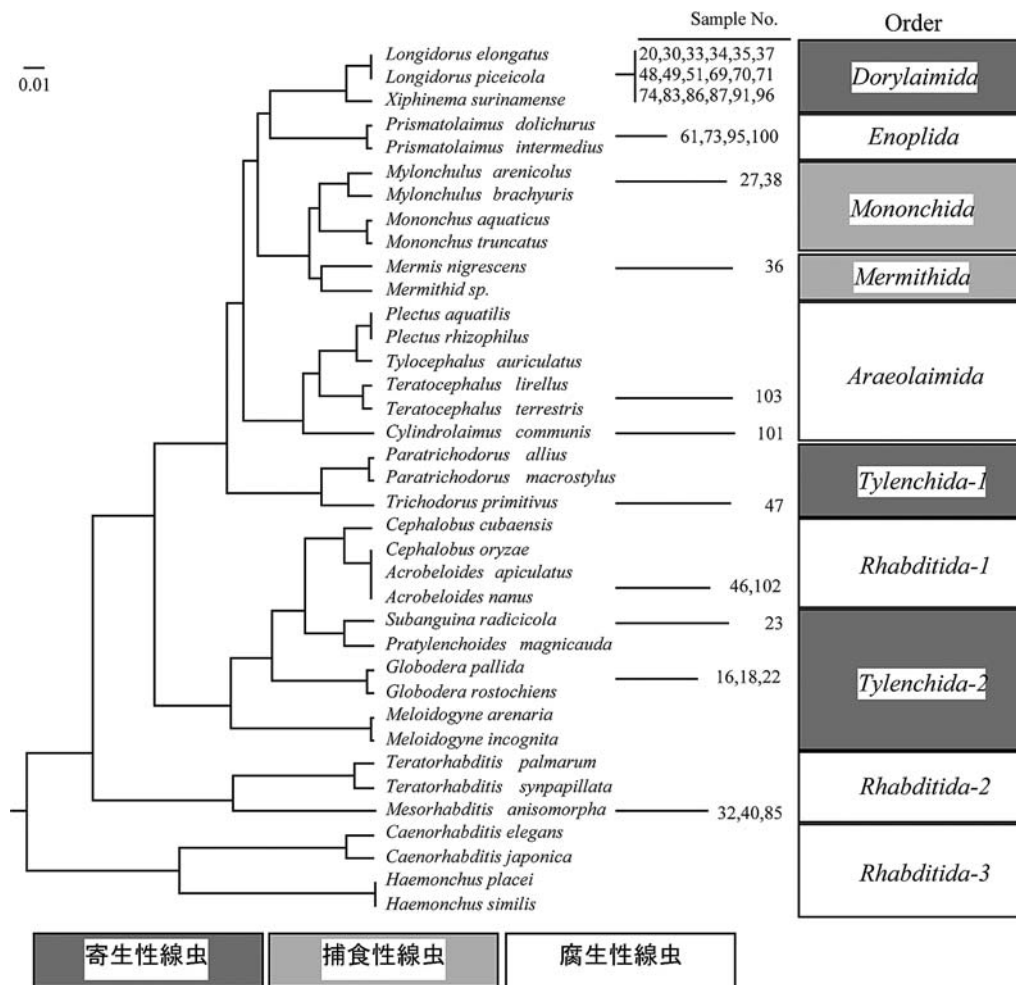


図4. 土壌線虫の18S rDNA部分塩基配列の系統樹 (UPGMA)

No.16,18,22のセンチチュウは18S rDNA部分塩基配列のホモロジー検索によって*Globodera*属と同定されたが、その形態は*Helicotylenchus*属 (らせん線虫) の特徴を示した

ころ。18S rDNAの約400bpの部分塩基配列では系統関係を正確に反映しないが、属の同定においては問題ないレベルであることが明らかとなった。

考 察

形態観察による同定の結果、400倍の頭部の顕微鏡写真を用いて、土壌線虫の食道の型による目レベルの分類が可能であった (荒城 2004c)。しかし、加熱による線虫の固定は組織の崩壊を早め、組織の形態が不明瞭になり易いことから、形態での同定が困難なサンプルが少なからず存在した。ホルマリン・酢酸固定液やトリエタノールアミン・ホルマリン固定液などを用いることで形態的特徴による更に確実な同定が可能であると考えられるが (荒城 2004b)、本研究で行ったような形態観

察後にPCR反応を適用する場合、固定液のPCR反応への影響が懸念され、PCR反応に影響しない固定法の開発が望まれる。

一方、18S rDNAによる同定では、PCR増幅産物を得られなかったサンプルが37サンプルと多く、その一因としてプライマーのミスマッチが挙げられた。全ゲノム配列が解読されている*Caenorhabditis elegans*の18S rDNAシークエンスデータとプライマー配列を比較したところ、EUK18S-Fプライマーのいくつかの塩基が一致していないことが明らかとなった。したがって、*Rhabditida-3*のクラスターに属する線虫の配列とEUK18S-Fプライマーの配列のミスマッチが増幅できなかった原因と考えられる。真核生物用の18S rDNAのユニバーサルプライマーとして一般的に

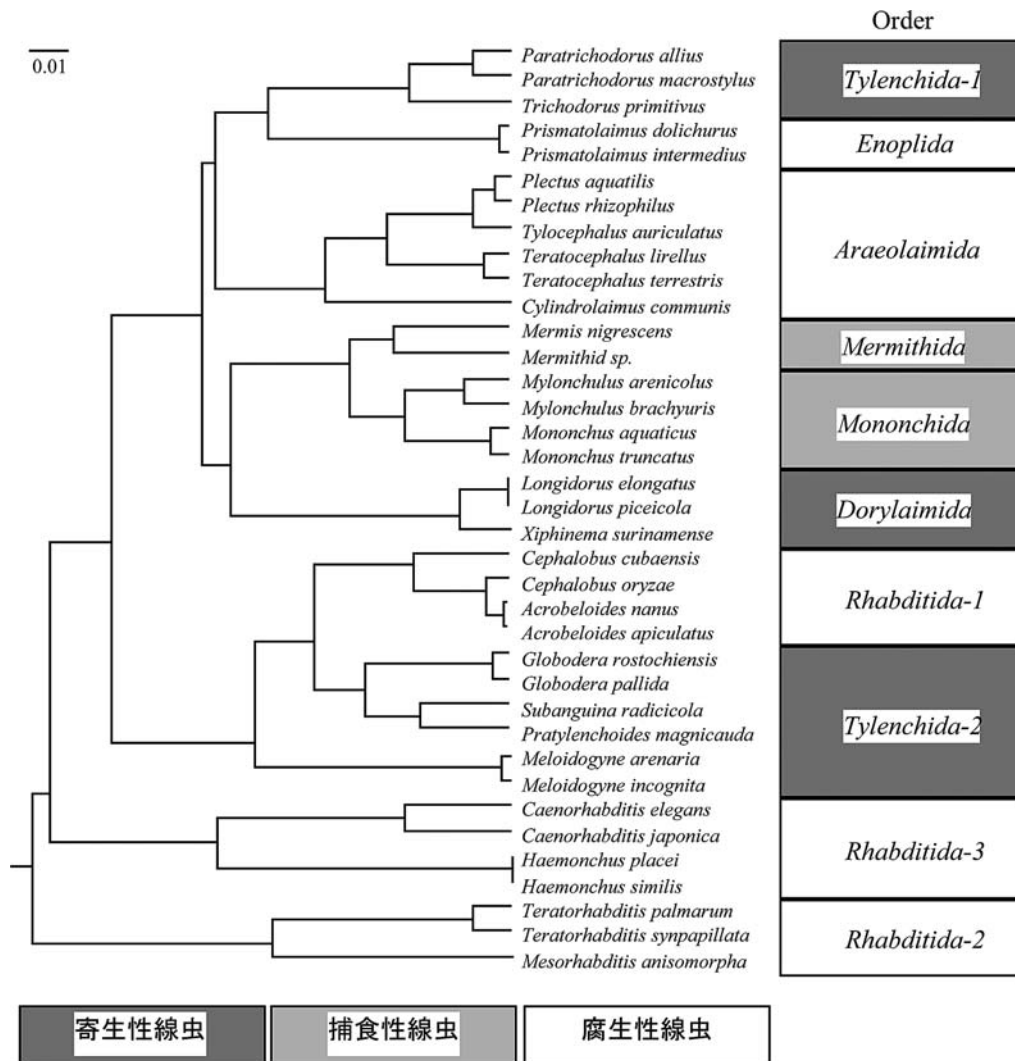


図5. 土壤線虫の18S rDNA塩基配列の系統樹 (UPGMA)

用いられているEUK18S-Fプライマーは、少なくとも線虫の18S rDNA用プライマーとしては使用できず、他の配列をプライマーとしてデザインすべきであることが明らかとなった。また、ホモロジー検索によって属の同定を行った際に22サンプルが糸状菌と同定されたが、この原因として、ベルマン法による25~30℃、48時間での分離中、線虫の入った管ビン中に土壌から混入したカビやカビの胞子が繁殖した可能性が考えられる。上原・岩堀 (2004) は、この対策として分離後の管ビンを速やかに分析に供試し、DNA抽出を行う事や、DNA抽出の際にスライドガラス上に滅菌水を2、3滴用意しておき、そこに釣り上げた線虫を順に移し体表面を洗浄する事によって、糸状菌の混入を軽減できると報告している。

サンプルNo.16,18,22 は、ホモロジー検索によっ

てGlobodera属 (ジャガイモシストセンチュウ) と同定されたが、頭部および尾部の形態や熱殺するとらせん状になったことから、形態的にHelicotylenchus属 (らせん線虫) である可能性が示唆された (大島 1986 ; Mai & Mullin 1996)。この原因として、ホモロジー検索の時点でデータベースにらせん線虫の18S rDNA塩基配列が存在しなかったため、データベースに登録されている線虫種の中で最も相同性の高いジャガイモシストセンチュウが同定されたと考えられる。また現段階においてらせん線虫だけでなく他の主要な植物寄生種の18S rDNA塩基配列もデータベースに登録されておらず、捕食性・腐生性線虫については登録データ数がさらに少数であることから、現段階では分子生物学的手法による同定および遺伝子進化的な分類だけでなく、形態による比較も同時

に行う必要があることが示唆された。部分塩基配列では属の同定が困難であった一部の近縁な属については、形態的特徴も非常に良く似ていたことから、形態的な同定が可能となるよう線虫写真の精度を上げると共に、現段階でまだ不足している自活性線虫の詳細な形態図の収集・作成が必要であると考えられた。また、今回はデータベース登録数の比較的多い18S rDNAを使用して分類を試み、約400bpの18S rDNA部分塩基配列を解読して、系統樹を作成し、分類を試みた結果、約1,600bpの全塩基配列を有する18S rDNAの系統樹の進化系統関係を反映していないことが明らかになったが、属の同定まではいくつかの近縁な線虫を除いて可能であった。属レベルでの明確な分類・同定を目的として、18S rDNAの全塩基配列を解読することは現実的ではないため、300~500 bpで分類可能な、もしくはPCR-RFLP解析によって分類可能な配列を見出すことが必要である。

さらに18S rDNAの系統樹で、*Rhabditida*目において、3つの、*Tylenchida*目において2つのクラスターが存在したが、これらは系統樹上で互いに独立した位置に存在しており、同目のクラスター同士が遺伝子進化的に遠い位置にあることを示唆していた。荒城(2004a)は形態的特徴を基盤とする従来の線虫分類体系と遺伝子進化的な分類には大きな食い違いがあることを示唆している。さらに、植物寄生性線虫種のクラスターと腐生性線虫種のクラスターは系統樹内で入り組んでおり、両者は互いに独立した分類群として進化したのではなく、同じ分類群として進化してきたことが示唆された(Blaxter et al. 1998)。近い将来、遺伝子の進化系統解析に基づく分類体系の確立が期待される

以上の結果から、形態による線虫分類体系と遺伝子進化的な分類には大きな食い違いがある事が示唆されたため、今後、分子生物学的手法による線虫同定法を確立していくためには、現段階では分子生物学的手法による同定および遺伝子進化的な分類だけでなく、従来の形態による分類も併せて行なう必要があるとともに、さらに多くの研究成果に伴うデータの蓄積が期待される。

要 約

本研究では、「地力の指標」として農業上重要であると考えられる自由生活性線虫に着目し、その生理・生態を解明する前提として土壌線虫の分類法を確立する必要があると考え、土壌線虫の形態および18S rDNA部分配列による分類を試みた。その結果、形態分類においては、50頭の線虫の形態的特徴をまとめた一覧表を作成し、400倍の頭部の顕微鏡写真から食道の型における目レベルでの分類が可能であった。また、18S rDNA部分配列のホモロジー検索によって同定された37頭の土壌線虫について、目レベルでは全ての種類がクラスターごとに分類され、属レベルでは、一部の近縁な属を除いて同定が可能であった。しかしながら、形態的特徴から判断された分類目に対応しないクラスターが*Rhabditida*目および*Tylenchida*目において確認された。また、18S rDNAの系統樹では寄生性線虫と腐生性線虫とは同一クラスターに含まれるものが明らかとなった。さらに形態的特徴から*Rhabditida*目および*Tylenchida*目に分類される線虫は18S rDNAの系統樹では異なるクラスターに分類され、形態的特徴を基にした線虫分類体系と遺伝子進化的な分類には食い違いがある事、および18S rDNA塩基配列から寄生性線虫と腐生性線虫を区別する事は現段階では容易でない事が示唆された。さらに、分子生物学的手法による同定法を確立するためには、ホモロジー検索による分類・同定だけでは不十分であり、それを補うために形態による同定や、18S rDNA塩基配列データベースの更なる充実が必要である。

キーワード：クラスター分析，形態，
18S rDNA，線虫，地力

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂いた農林水産省九州農業試験場地域基盤研究部線虫制御研究室の佐野 善一室長（現 国際農林水産業研究センター 生産環境部）はじめ研究室の方々

引用文献

- 青木淳一 編著 (1999) 日本産土壤動物-分類のための図解検索-. 東海大学出版会. pp.15-38
- 荒城雅昭 (2004a) 第1章 線虫の一般形態・分類体系. 線虫学実験法. 日本線虫学会. pp.3-5.
- 荒城雅昭 (2004b) 第2章 線虫の標本作製法. 線虫学実験法. 日本線虫学会. pp.9-24.
- 荒城雅昭 (2004c) 第3章 線虫の形態観察法-分類・同定に有用な形態的特徴. 線虫学実験法. 日本線虫学会. pp.25-37.
- Blaxter, M. L., P. De Ley, J. R. Garey, L. X. Liu, P. Scheldeman, A. Bierstraete, J. R. Vanfleteren, L. Y. Mackey, M. Dorris, L. M. Frisse, J. T. Vida, W. K. Thomas (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, **392**, 71-75.
- Duke, J. A. 著, 星合和夫 訳 (1986) 世界有用マメ科植物ハンドブック. 幸書房. pp. 543-548.
- 堀口友美 (1999) 土壤線虫の密度調査法の検討. 宮崎大学農学部農林生産学科平成11年度卒業論文
- Mai W. F. & P. G. Mullin (1996) PLANT-PARASITIC NEMATODES. - A PICTORIAL KEY TO GENERA - Cornell University Press, pp. 68, 88.
- Nielsen, C. (1998) Systematics-Sequences lead to tree of worms. *Nature*, **392**, 25-26.
- 西澤 務 監修 (1994) 土壤線虫の話. タキイ種苗株式会社. pp.9-26.
- 大島康臣 (1986) 線虫研修会テキスト-同定・分類法-. (社)日本植物防疫協会. pp.39-47, 86-88.
- 小柳津広志 (1999) 分子系統進化. 微生物学実験法 (杉山純多・渡辺信・大和田紘一・黒岩常祥・高橋秀夫・徳田元 編) 講談社. 東京. pp.234-244
- 三枝敏郎 (1993) センチュウ おもしろ生態とかしこい防ぎ方. 農文協. pp.1, 12-22, 32-37, 107-113.
- 佐野善一 (1996) 「地域新技術研修」テキスト. 九病虫. pp.98, 104, 109-111, 123-126, 128, 138, 144, 145, 146.
- 佐野善一 (2004) 第6章 土壤線虫・植物寄生性線虫. 線虫学実験法. 日本線虫学会. pp.87,88.
- 杉山純多・渡辺 信・大和田紘一・黒岩常祥・高橋秀夫・徳田 元 (1999) 新版 微生物実験法. 講談社. pp.242.
- 上原健人 (1999) 分子生物学的手法による線虫の同定-線虫防除の戦略と展望-講演要旨. (社)日本植物防疫協会. pp.63-69.
- 上原健人・岩堀英晶 (2004) DNA解析による同定法. 線虫学実験法. 日本線虫学会. pp.60-62.
- 横尾多美男 (1962) 土壤線虫-生態と防除-. 東京明文堂. pp.17, 27, 28, 36-38, 59-74.