

九州・沖縄地域のサツマイモおよびサトイモ圃場における 主要有害線虫

1. 中南部九州(熊本県・宮崎県・鹿児島県)における調査と DNA解析による効率的な線虫種判別法の開発

岩堀 英晶¹⁾・佐野 善一¹⁾・小川 哲治²⁾

(¹⁾九州農業試験場・²⁾長崎県病害虫防除所)

Distribution of main plant-parasitic nematodes in sweet potato and taro fields in Kyushu and Okinawa, Japan. 1. Survey in the central and southern parts in Kyushu Island (Kumamoto, Miyazaki and Kagoshima Prefs.) and development of an effective DNA analysis method for species identification. Hideaki Iwahori¹⁾, Zen-ichi Sano¹⁾ and Tetsuji Ogawa²⁾ (¹⁾Kyushu National Agricultural Experiment Station, Kumamoto 861-1192, Japan. ²⁾Nagasaki Prefectural Plant Disease and Insect Control Station, Nagasaki 854-0062, Japan)

Distribution of main plant-parasitic nematodes was surveyed in sweet potato and taro fields in the central and southern parts of Kyushu Island, Japan. Soil samples were collected from 85 sweet potato and 22 taro fields, and nematodes were extracted by the Baermann funnel technique. Species of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., were identified by PCR-RFLP analysis along with perineal pattern morphology. Root-lesion nematodes, *Pratylenchus* spp. were also identified by PCR-RFLP analysis. Root-knot nematodes were detected in almost all sweet potato fields and 96% of the nematodes were identified as *M. incognita* and the rest as *M. arenaria* or *M. javanica*. Root-knot nematodes were found from 59% of taro fields, and the ratio of *M. incognita* to *M. arenaria* or *M. javanica* was nearly the same. Root-lesion nematodes, primarily *P. coffeae*, were detected from 45% of taro and 22% of sweet potato fields. Reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* was isolated from 66% of sweet potato fields and 32% of taro fields. For identification of nematode species, an efficient and stable method of DNA extraction from a single nematode was developed. The procedure involved cutting the nematode with a minute pin in lysis buffer, storing at -80°C, and starting PCR with hot-start method.

Key words: distribution, DNA analysis, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, sweet potato, taro

九州・沖縄地域ではネコブセンチュウ類やネグサレセンチュウ類の被害が大きな問題となっている(照屋, 1971; 後藤, 1976; 中園, 1983; 古賀, 1992; 照屋, 1992)。また最近, 北方系線虫とされるキタネグサレセンチュウ(佐野・中園, 1987; 中園, 1990)やジャガイモシストセンチュウ(中須賀・中園, 1996)の九州における分布拡大や, 種苗移動に伴う有害線虫の伝搬が懸念されている(佐野, 1998)。さらには多種多様な農産物の輸入が増える傾向から, 海外の有害線虫が侵入する危険性も高まってきた。このような現状に対して, 九州・沖縄地域での有害線虫の全般的な分布について種レベルで調査し

た報告は少ない。そこで本研究では九州・沖縄地域の主要作物であるサツマイモとサトイモを中心に, これら作物に関わる有害線虫の分布状況を調査した。本報では熊本, 宮崎, 鹿児島各県の計107圃場における主要有害線虫の発生実態を報告する。

また調査に当たり, 線虫種の同定を効率的に行うために, 従来の形態観察による方法に加え, 近年急速な進歩を遂げてきたDNA解析技術に基づく種の同定法を確立するための実験も併せて行った。本研究では従来の方法(Harris et al., 1990; Cenis, 1993; Powers and Harris, 1993; Orui, 1996)に改良を加え, 1頭の線虫から, より

簡便・確実にPCRによるDNAの増幅を成功させ、PCR産物を制限酵素処理した後のDNA断片長多型による種の同定（以下PCR-RFLP法による同定）に供するための方法を考案した。

報告にあたり、線虫採集にご協力を頂いた宮崎県総合農業試験場、農業改良普及センター、および鹿児島県農業試験場大隅支場の方々に厚く御礼申し上げる。

材料および方法

1. 線虫の採集

線虫が高密度となる秋季（1999年10月および11月）に、熊本、宮崎、鹿児島各県のサツマイモおよびサトイモ圃場から土壌を採取し線虫の分離を行った。熊本県では大津町、益城町、西原村のサツマイモ圃場22筆、サトイモ圃場10筆、計32筆から土壌を採取した。宮崎県では串間市、田野町、新富町、門川町を中心に、3市8町のサツマイモ圃場34筆、サトイモ圃場7筆、計41筆で採取を行った。鹿児島県では、串良町、大崎町、吾平町を中心に、1市7町のサツマイモ圃場29筆、サトイモ圃場5筆、合計34筆で採取を行った。

土壌は各圃場とも任意の約10箇所から、サツマイモまたはサトイモの株近傍から移植こてを用いて合わせて2-3kg採取した。調査に当たり、ネコブセンチュウについては卵嚢が着生した細根も合わせて採取し、ベレニアルパターンの作成に供した。

2. 主要有害線虫の検出および同定

線虫の検出にはバールマン法を用いた。土壌20gを供試し、室温下で3日間分離、2反復とした。分離された線虫は顕微鏡によりネコブセンチュウ類、ネグサレセンチュウ類、シストセンチュウ類、ニセフクロセンチュウ、ラセンセンチュウ類に分けて計数し、これらの県別および作物別の検出率を算出した。

ネコブセンチュウ類、ネグサレセンチュウ類についてはさらに種の同定を行った。サツマイモ圃場のネコブセンチュウは雌成虫のベレニアルパターンとPCR-RFLP法、サトイモ圃場ネコブセンチュウ、および両圃場のネグサレセンチュウはPCR-RFLP法のみにより同定した。ベレニアルパターンによる種の同定には、卵嚢を採集した圃場あたり雌成虫10頭前後を供試した。PCR-RFLP法による種の同定には土壌より分離された線虫を用い、ネコブセンチュウは第2期幼虫1頭、ネグサレセンチュウは第3期幼虫から成虫までのいずれかのステージ1頭を供試した。

3. PCR-RFLP法によるネコブセンチュウおよびネグサレセンチュウ同定の効率化

実体顕微鏡下で線虫1頭をDNA抽出用緩衝液（1%ノニデット、10mM Tris-HCl (pH 8.0)）2 μ l中に微小昆虫標本針で移し、その針の先で2つに切断した後、マイクロピペットで緩衝液ごとPCR用0.5mlマイクロチューブに移した。これに滅菌水2 μ lと14 μ g/ μ lプロテイナーース K (10mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液) 1 μ lを加えよく攪拌し、65°Cで30分間反応させた。その後PCRチューブを-80°Cに移し凍結させた。30分後、室温下で自然融解させ、これに10倍濃度PCR反应用緩衝液2.5 μ l、2.5mM dNTP 2 μ lを加えた。さらにネコブセンチュウ類用にはHarris et al. (1990)の用いたミトコンドリアDNAの一部を増幅させるプライマーを、ネグサレセンチュウ類用にはVrain et al. (1992)の用いたリボソームDNAの一部を増幅させるプライマーを各10mM水溶液1.5 μ lずつ加え、滅菌蒸留水を加えて24.8 μ lとした。これらをよく攪拌した後、あらかじめ94°Cに加熱しておいたPCR装置にセットし、10分間置くことによってプロテイナーース Kを失活させ、そのままTaqDNAポリメラーゼ0.2 μ l (1 U)を加えて計25 μ lとし、PCRを開始させた（ホットスタート法）。PCRは、ネコブセンチュウ類については94°C 2分、40サイクルの94°C 1分、48°C 2分、68°C 3分、最後に72°C 10分の順に行った。ネグサレセンチュウ類については94°C 2分、40サイクルの94°C 1分、50°C 1分、72°C 2分、最後に72°C 10分の順に行った。

PCR終了後、反応物のうちの5 μ lを取り、1.2%アガロースゲルで電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色による検出を行いDNAの増幅を確認した。確認後、別の0.5mlチューブに反応物4 μ lを取って制限酵素Hinf I 0.5 μ l (5 U)、および制限酵素に添付の10倍濃度緩衝液0.5 μ lを加えて計5 μ lとし、37°Cで12時間以上反応させた。

制限酵素処理終了後、2% MetaPhore アガロースゲルを用いて反応生成物の電気泳動を行い、その泳動パターンを調べることによって種の同定を行った。種の同定基準として、ネコブセンチュウ類についてはHarris et al. (1990)、ネグサレセンチュウ類についてはOrui (1996)の結果を参考とした。なお、Harris et al. (1990)のプライマーではキタネコブセンチュウの判別ができないため、本種の可能性が疑われる場合にはPowers et al. (1993)のプライマーを用いてPCRを行った。

結果および考察

1. 主要有害線虫の分布概要

中南部九州（熊本県・宮崎県・鹿児島県）のサツマイモおよびサトイモ圃場計107筆の主要有害線虫を調査した結果、ネコブセンチュウ類は熊本、宮崎、鹿児島各県のサツマイモ圃場から95%以上の極めて高い頻度で分離され、サツマイモ作付における線虫問題の深刻さが浮き彫りにされた（第1表）。またネコブセンチュウ類の検出率はサトイモ圃場においてもかなり高く、平均約60%にのぼった（第2表）。サトイモに対しては従来からミナミネグサレセンチュウの被害が大きな問題となっているが、この結果はネコブセンチュウ類も看過できない被害を及ぼしている可能性を示唆し、サトイモ作付においても両線虫を考慮した対策が必要であると考えられた。ネグサレセンチュウ類はサトイモ圃場、ニセフクロセン

チュウおよびラセンセンチュウ類はサツマイモ圃場からより多く検出された。ネグサレセンチュウ類の検出頻度は鹿児島、宮崎、熊本の順に高く、南部で頻出する傾向が見られた。特に鹿児島県のサツマイモ圃場ではネコブセンチュウ類のみならずネグサレセンチュウ類、ニセフクロセンチュウもまた高率に検出され、線虫問題の深刻さを示す結果であった。なおシストセンチュウ類は何れの圃場からも全く検出されなかった。

ネコブセンチュウ類の種構成は、ペレニアルパターンによる同定では、サツマイモ圃場においては3県とも約9割がサツマイモネコブセンチュウであり、約5%がジャワネコブセンチュウ、約3%がアレナリアネコブセンチュウと同定された（第3表）。PCR-RFLP法による同定でもサツマイモネコブセンチュウは95%以上の高い比率となり、その他にアレナリアネコブセンチュウが約4-5%検出された。しかしながらジャワネコブセン

第1表 中南部九州のサツマイモ圃場に発生する主要有害線虫^{a)}

県別調査圃場数	ネコブセンチュウ	ネグサレセンチュウ	ニセフクロセンチュウ	ラセンセンチュウ	シストセンチュウ
熊本県 n = 22	21 (95.5)	0 (0.0)	10 (82.1)	1 (15.5)	0 (0.0)
宮崎県 n = 34	34 (100.0)	6 (17.6)	19 (55.9)	8 (23.5)	0 (0.0)
鹿児島県 n = 29	28 (96.6)	13 (44.8)	27 (93.1)	16 (55.1)	0 (0.0)
計 n = 85	83 (97.6)	19 (22.4)	56 (65.9)	25 (29.4)	0 (0.0)

a) 結果は各線虫の検出圃場数（検出圃場率，%）を示す

第2表 中南部九州のサトイモ圃場に発生する主要有害線虫^{a)}

県別調査圃場数	ネコブセンチュウ	ネグサレセンチュウ	ニセフクロセンチュウ	ラセンセンチュウ	シストセンチュウ
熊本県 n = 10	7 (70.0)	1 (10.0)	3 (30.0)	1 (10.0)	0 (0.0)
宮崎県 n = 7	4 (57.1)	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
鹿児島県 n = 5	2 (40.0)	5 (100.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
計 n = 22	13 (59.1)	10 (45.4)	7 (31.8)	1 (4.5)	0 (0.0)

a) 結果は各線虫の検出圃場数（検出圃場率，%）を示す

第3表 中南部九州のサツマイモ圃場におけるネコブセンチュウ類の種別検出率（%）

県別検出圃場数	サツマイモネコブセンチュウ		アレナリアネコブセンチュウ		ジャワネコブセンチュウ		キタネコブセンチュウ		不明 ^{c)}	
	ベレ ^{a)}	DNA ^{b)}	ベレ	DNA	ベレ	DNA	ベレ	DNA	ベレ	DNA
熊本県 n = 21	93.5	95.2	0.0	4.8	5.1	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0
宮崎県 n = 34	90.7	97.1	6.0	3.9	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
鹿児島県 n = 28	86.2	96.4	0.0	3.6	6.9	0.0	0.0	0.0	6.9	0.0
計 n = 83	90.0	96.4	2.6	3.6	4.9	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0

検出率は全調査個体数に対する、同定された各々の種の個体数の割合（%）を示す

a) ペレニアルパターンによる同定

b) DNA解析による同定

c) 種の判別が困難であったもの

第4表 中南部九州のサトイモ圃場におけるネコブセンチュウ類の種別検出圃場数および検出圃場率 (%)

県別検出圃場数	サツマイモネコブセンチュウ	アレナリアネコブセンチュウ	ジャワネコブセンチュウ	キタネコブセンチュウ	不明 ^{a)}
熊本県 n=7	3 (42.9)	3 (42.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.2)
宮崎県 n=4	3 (75.0)	1 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
鹿児島県 n=2	0 (0.0)	1 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (50.0)
計 n=13	6 (46.1)	5 (38.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (15.4)

検出率は全調査個体数に対する、同定された各々の種の個体数の割合 (%) で示す
結果は全てDNA解析による同定

a) DNA解析の際、標本が失われたもの

第5表 中南部九州のサツマイモおよびサトイモ圃場におけるネグサレセンチュウ類の種別検出圃場数および検出圃場率 (%)

県別検出圃場数	ミナミネグサレセンチュウ	クルミネグサレセンチュウ	モロコシネグサレセンチュウ	キタネグサレセンチュウ	不明
熊本県 n=1	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
宮崎県 n=10	8 (80.0)	1 (10.0) ^{a)}	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (10.0)
鹿児島県 n=18	12 (66.7)	0 (0.0)	1 (5.5) ^{a)}	0 (0.0)	5 (27.8)
計 n=29	21 (72.5)	1 (3.4)	1 (3.4)	0 (0.0)	6 (20.7)

結果は全てDNA解析による同定による (1圃場1固体を調査)

a) サツマイモ圃場より検出

チュウはこの方法では検出されなかった。このような同定法の違いによる結果の違いが見られた原因としては、ベレニアルパターンによる同定の困難さが挙げられる。

アレナリアネコブセンチュウのベレニアルパターンには幾つかのタイプが見られ、ジャワネコブセンチュウに酷似したパターンを示すものもしばしば見られる。現在日本のアレナリアネコブセンチュウには種の同定に関する混乱があり、単一の種ではないとする意見もある (奈良部, 私信)。ジャワネコブセンチュウはサツマイモに対する寄生性がほとんど認められない (Sasser and Kirby, 1979) ことから、本サツマイモ圃場調査地においてジャワネコブセンチュウが検出される可能性は低く、現時点ではPCR-RFLP法による同定結果が信頼できるのではないかと考えられる。

一方サトイモ圃場においては、卵嚢が着生した細根が見つからず、雌成虫のベレニアルパターンによる同定ができなかったためPCR-RFLP法のみによる調査となった。結果はサツマイモ圃場と異なり、サツマイモネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウの検出率がほぼ同率であった (第4表)。このような作物間における検出率の差違は両種の寄生性の違いによると考えられるが、アレナリアネコブセンチュウのサトイモに対する加害性を示唆する興味深い事実であると言える。今回の調査では、サトイモへの加害が報告されている (Sipes et

al., 1995) ジャワネコブセンチュウは検出されなかった。

ジャワネコブセンチュウの日本における分布に関して、九州地域における報告はあるものの (後藤ら, 1964; 後藤, 1976), 奈良部 (1994) はベレニアルパターンでジャワネコブセンチュウと考えられた71個体群の形態およびアイソザイムパターン等の比較検討を行い、ジャワネコブセンチュウは沖縄県南部および千葉県で分布している特定の個体群のみと指摘した。また, Orui et al. (1996) による、北海道を除く日本各地のタバコ圃場におけるアイソザイムパターンにより種を同定したネコブセンチュウの調査でも、沖縄県以外の地域においてジャワネコブセンチュウは見つかっていない。従って、従来西日本に広く分布すると考えられていたジャワネコブセンチュウは、ほぼ全てアレナリアネコブセンチュウである可能性があり、本試験においてもそれを裏付ける結果となった。

なお、後藤ら (1964) がわずかながらサツマイモへの寄生を報告しているキタネコブセンチュウは、サツマイモ圃場、サトイモ圃場ともに、今回の調査においては何れの方法によっても検出されなかった。これは本種の分布が限定的、あるいは寄生性の低いサツマイモでは線虫密度も低く検出できなかったことなどが考えられる。

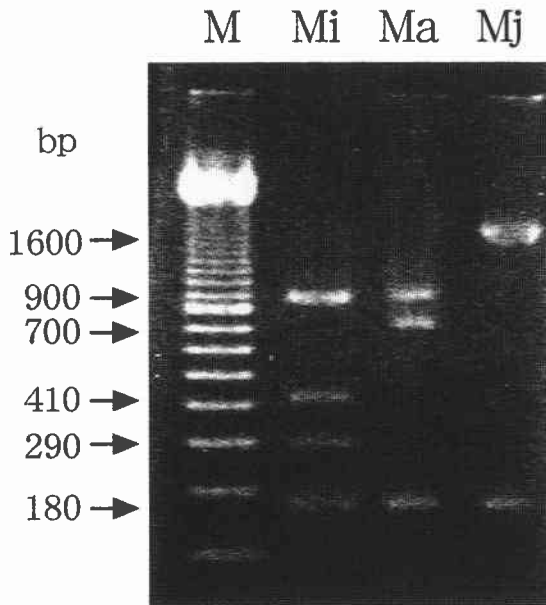
ネグサレセンチュウの種構成については、PCR-RFLP法により同定された種は、サツマイモ圃場、サトイモ圃

場ともにほとんどがミナミネグサレセンチュウで、本種の重要性が改めて確認された。その他のネグサレセンチュウとしては、宮崎県のサツマイモ圃場1地点でクルミネグサレセンチュウ、鹿児島県のサツマイモ圃場1地点よりモロコシネグサレセンチュウが検出された(第5表)。これら両種は九州にも広く分布が知られているものの、サツマイモ、サトイモに寄生性は見だされておらず(後藤, 1974)、雑草に寄生していたか、あるいは前作で増殖したことなどが考えられる。なお本調査においてはサツマイモ圃場、サトイモ圃場ともにキタネグサレセンチュウは検出されなかった。

2. 1頭の線虫からのPCR-RFLP法による効率的な種の同定法

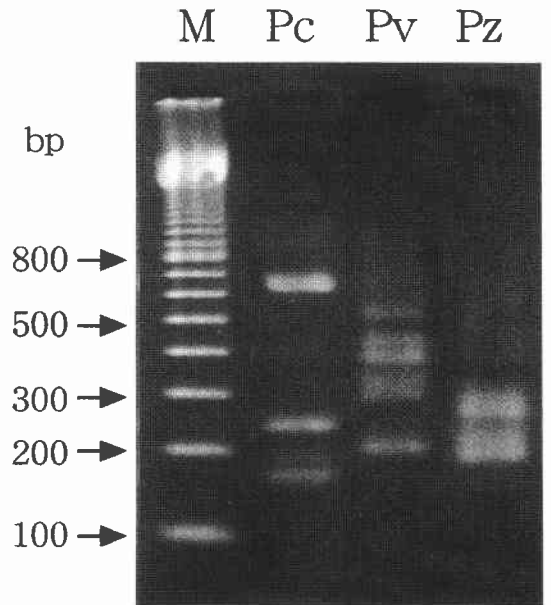
1頭の線虫からPCR-RFLP法により種を同定する際のDNA調整法として、従来の方法(Harris et al., 1990; Cenis, 1993; Powers and Harris)では、マイクロピペット用チップの先で、一方Orui(1996)では炎であぶり丸めたマイクロピペット用チップの先で、蒸留水中あるいは緩衝液中の線虫を潰す方法が採られてきた。しかし、その成功率はこれらの報告には明示されておらず、本研

究過程で同様に試みた限りでは、結果は熟練度および偶然性によりかなり左右された。本報告における方法は既往の方法と比較し、さほど熟練を必要とせず、かつ安定して成功率の高いものであり(PCRの成功率は90%以上)、1日の訓練で十分に習熟が可能である。また本報告では中南部九州の主要有害線虫を対象を絞ったため、通常数種類の制限酵素が種の同定には必要とされることを、制限酵素 *Hinf*I 処理のみで同定が可能と判断され、作業の簡便化が図られた。これらの手法を用いた結果、*Hinf*I 処理後のPCR産物の電気泳動パターンを、既往の報告と対比することにより、検出されたネコブセンチュウ類、ネグサレセンチュウ類の種を確実に同定できた(第1, 2図)。本研究で新しく開発された1頭の線虫からDNAを抽出する方法は、これらの線虫種に限らず全ての線虫種に適用可能と考えられ、極めて応用範囲が広い方法である。また、時期的に線虫が少ない、あるいは寄主選択性、作物側の性質などの理由により雌成虫が得られず、ベレニアルパターンが観察できない場合においても、PCR-RFLP法により種の同定を確実に行うことができるという利点もあげられる。一方、本法では1筆1頭



第1図 PCR-RFLP法によるネコブセンチュウの同定。

1頭の線虫を用いてPCRにより増幅したミトコンドリアDNAの一部に対する制限酵素 *Hinf*I 処理後の電気泳動パターン: M; 100bp ラダーマーカー, Mi; サツマイモネコブセンチュウ, Ma; アレナリアネコブセンチュウ, Mj; ジャワネコブセンチュウ



第2図 PCR-RFLP法によるネグサレセンチュウの同定。

1頭の線虫を用いてPCRにより増幅したリボソームDNAの一部に対する制限酵素 *Hinf*I 処理後の電気泳動パターン: M; 100bp ラダーマーカー, Pc; ミナミネグサレセンチュウ, Pv; クルミネグサレセンチュウ, Pz; モロコシネグサレセンチュウ

のみで種の判定を行うため、同一圃場内に複数種が存在していた場合、その種構成を解析することは不可能であり、今後本法を応用する際の検討課題と考えられる。以上のような課題はあるものの、広域を対象とした線虫の分布調査においては、生息する種の概要を把握する上で有用である。また線虫種の同定に当たり、形態的に極めて似通っている分類群、特にネコブセンチュウ類に対しては、PCR-RFLP法などのDNA解析による種の同定法は、曖昧さを排した極めて強力な手法として今後ますます多用されると考えられる。またネコブセンチュウにはサツマイモの品種に対する加害程度の差異から、いくつかのレースの存在が明らかになりつつあるが(佐野, 未発表), これらのレースを形態的に識別することは不可能である。今後DNA解析の応用により、異なるレースの簡便な検出法が確立され、線虫害の回避につながる適切な品種の選定や作付が可能となることが期待される。

引用文献

- Cenis, J. L. (1993) Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology* 83 : 76-80.
- 後藤 昭 (1974) 本邦におけるネグサレセンチュウ *Pratylenchus* spp. の地理的分布. 九州農業試験場報告17 : 139-224.
- 後藤 昭 (1976) 日本の暖地・亜熱帯の植物寄生性線虫の概要. 九州農試研究資料54 : 1-61.
- 後藤重喜・岩橋哲彦・川越 仁 (1964) 南九州におけるネコブセンチュウの種類について. 宮崎農試研報5 : 37-43.
- Harris, T. S., L. J. Sandall, and T. O. Powers (1990) Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *J. Nematol.* 22 : 518-524.
- 古賀成司 (1992) 九州の線虫. 線虫研究の歩み(中園和年編). 日本線虫研究会(つくば) : pp. 330-333.
- 中園和年 (1983) 九州地域における線虫の被害と防除上の問題点. 九州農業研究45 : 10-11.
- 中園和年 (1990) キタネグサレセンチュウの九州地域への侵入と分布拡大の驚威. 今月の農業34 (10) : 70-73.
- 中須賀孝正・中園和年 (1996) 長崎県下ジャガイモ畑からジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*) を検出. 日本線虫学会誌26 : 42-43 (講要).
- 奈良部孝 (1994) 本邦産ジャワネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウの分類の再検討. 日本線虫学会誌24 : 41 (講要).
- Orui, Y. (1996) Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Appl. Entomol. Zool.* 31 : 505-514.
- Orui, Y., T. Nishi, and H. Matsuzawa (1996) Geographical distribution of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida) in tobacco fields of Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 31 : 225-231.
- Powers, T. O. and T. S. Harris (1993) A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 25 : 1-6.
- 佐野善一 (1998) 植物寄生性線虫の伝搬をめぐる諸問題. 九防協年報1997 : 38-42.
- 佐野善一・中園和年 (1987) 九州中部平地のゴボウ畑におけるキタネグサレセンチュウの発生と被害. 日本線虫研究会誌17 : 57-58.
- Sasser, J. N. and M. F. Kirby (1979) Crop cultivars resistant to root-knot nematodes, *Meloidogyne* species. North Carolina State University (N.C.), pp.24.
- Sipes, B. S., S. C. Nelson, and A. Arakaki (1995) *Meloidogyne javanica* damage to dryland taro cultivars. Afro-Asian. *J. Nematol.* 5 : 141-147.
- 照屋林宏 (1971) 沖縄における有害線虫. 植物防疫25 : 458-460.
- 照屋林宏 (1992) 沖縄の線虫. 線虫研究の歩み(中園和年編). 日本線虫研究会(つくば) : pp. 334-338.
- Vrain, T. C., D. A. Wakarchuk, A. C. Levesque, and R. I. Hamilton (1992) Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundam. appl. Nematol.* 15 : 563-573.

(2000年4月30日 受領)