

植物防疫基礎講座：

植物病原菌の定性・定量法

—ピシウム属菌を例に—

岐阜大学流域圏科学研究センター 景山幸二

はじめに

近年、分子生物学的手法の応用により、これまでに不可能あるいは可能であっても労力・熟練が必要で困難であった植物病原菌の定性・定量が簡単・迅速にできるようになってきている。特に、これらの技術は土壤伝染性の病害で要望が高い。

土壤伝染性病原菌による病害は、苗立枯病、根腐病、萎凋病、根こぶ病等で、地上部の病気とは異なり、いつ病気に罹ったのかわからなく、病気の最終段階の萎凋や枯死といった手がつけられなくなったときに初めて病気として認識される。したがって、あらかじめ圃場がどの程度汚染しているのかどうかを診断することは重要である。また、空気伝染性の病原菌は外から飛来してくるものが第一次伝染源になる。これに対し、土壤伝染性病原菌は作付けしようとするその場所に生息していたり、トラクター・農機具・作業用長靴等に付着した土壤、育苗培養土、苗など人為的な要因により生産圃場にもたらされる。したがって、第一次伝染源を特定することは防除の対象を明確にするうえで重要である。このように、土壤伝染性の病害防除において、病原菌があらかじめいるのかどうか、どこからもたらされるのか、できればどのくらいいるのかを調べることができれば、防除の視点を明確にすることができる。すなわち、病原菌による汚染程度が明らかになれば、例えば抵抗性品種の導入で十分であるといった防除の程度を決めることができる。また、病原菌の生息場所が明らかになれば圃場全体を防除の対象にする必要はなくなる。

I Pythium 属菌における検出の意義

Pythium 属菌は、生育が早く、選択培地も開発されているので、他の糸状菌に比較して容易に検出は可能である。しかし、*Pythium* 属菌は、土壤などの環境サンプル中に複数種生息しているのが通常で、そのうち病原菌は1種あるいは2種である。したがって、選択培地を用い

た検出では、生育してきた菌叢すべてを分離・培養し、すべての菌株の同定を行わなければならない。これには、多くの労力・時間・熟練が必要であり、簡単・迅速な技術が強く要望されてきた。

Pythium 属菌による病害は種子腐敗や苗立枯が主で、根腐を起こして植物が枯れるような病気はほとんどなかった。ところが、近年養液栽培が野菜や花き類の生産に導入されることにより、成長した植物全体が枯死するような病害が増加している。養液栽培で問題となる *Pythium* 属菌は土壤伝染だけでなく、遊走子を形成し、水の中を遊泳して水媒伝染する性質をもっており、被害が甚大である。このような病原菌は、生産施設内にもち込まないことが防除のうえで特に重要である。すなわち、施設内外の衛生診断が必須であり、このために環境サンプルからの病原菌の検出技術が必要とされる(景山, 2006)。

II PCR による検出

PCR (Polymerase Chain Reaction) は、DNA を増幅する技術である。この技術は植物病原菌の検出に応用されることによりこれまで手間がかかり現実的でなかった検出が、現実的になってきた。PCR の原理は、景山 (2005) に詳細に紹介されている。PCR を用いた検出では、PCR プライマーを標的病原菌に特異的な塩基配列とすることで、標的病原菌の DNA のみを増幅し、その増幅を確認することにより、供試サンプル中の存在を判定できる。例えば、*Pythium* 属菌の土壤からの検出の場合、選択培地を用いた従来法では分離・培養・同定に1か月かかったのに対し、PCR では1日で結果を出すことができる。さらに、1回の PCR 反応で1種類の病原菌を検出していたが (Singleplex PCR)、2種類以上の病原菌を同時に検出する方法 (Multiplex PCR) も開発されてきている (ASANO et al., 2010)。また、環境サンプル中の標的病原菌の定量を可能にする PCR 法 (Real Time PCR) も開発されてきている (Li et al., 2010)。これまでに、報告されている *Pythium* 属菌に関連する Singleplex PCR, Mutiplex PCR, Real Time PCR の例を表-1 に示した。いずれのプライマーも rDNA-ITS 領域

Qualitative and Quantitative Detection of Plant Pathogens.—

Pythium — By Koji KAGEYAMA

(キーワード: PCR, 検出, ピシウム)

表-1 *Pythium* 属菌においてこれまでに報告された PCR 検出

Singleplex PCR	
<i>P. ultimum</i>	KAGEYAMA et al., 1997
<i>P. oligandrum</i>	GODFREY et al., 2003
<i>P. helicoides</i>	銀玲ら, 2007
<i>P. porphyrae</i>	PARK, 2006
<i>P. intermedium</i>	KLEMSDAL et al., 2008
<i>P. sulcatum</i>	
<i>P. sylvaticum</i>	
<i>P. violace</i>	
Multiplex PCR	
<i>P. aphanidermatum</i>	ASANO et al., 2010
<i>P. arrhenomanes</i>	
<i>P. graminicola</i>	
<i>P. torulosum</i>	
<i>P. vanterpoolii</i>	
Real time PCR	
<i>P. abappressorium</i>	SCHROEDER et al., 2006
<i>P. attarantheridium</i>	
<i>P. heterotallicum</i>	
<i>P. irregulare</i> group I	
<i>P. irregulare</i> group IV	
<i>P. paroecandrum</i>	
<i>P. rostratifingens</i>	
<i>P. sylvaticum</i>	
<i>P. ultimum</i>	
<i>P. irregulare</i>	
<i>P. ultimum</i>	KERNAGHAN et al., 2008
<i>P. ultimum</i>	
<i>P. intermedium</i>	Li et al., 2010

泳動で判別できなくなる。また、プライマーの Tm 値をできるだけあわせることが PCR 条件の設定を容易にする。プライマー以外の要因として、PCR 緩衝液中の塩化マグネシウムの濃度が重要で、この濃度は増幅効率を左右し、最適濃度を定めることが安定した増幅を可能にした。本 Multiplex PCR では種特異プライマーに加え、rDNA の 18S 領域に設計されたユニバーサルプライマー (18S-69F/18S-1118R ; The Helicosporidia Project Online, <http://helicosporidia.ifta.ufl.edu/>) を加えた。このプライマーセットは *Pythium* 属菌だけでなく広く糸状菌と反応することを確かめている。このプライマーセットによる増幅バンドの有無で、標的病原菌がいなかったのか、サンプルからの DNA 抽出の失敗によるのかを判断することができる。このプライマーは他のプライマーとの相性もよく、当研究室で開発した *Pythium helicoides* のプライマーとの組合せによる Multiplex PCR に成功している (図-2)。Multiplex PCR の開発に関する要因はこのほかにもいくつかあり、HENEGARIU et al. (1997) がそれらをまとめている。

IV Real Time PCR

植物病原菌の分子生物学的手法による定量には LAMP 法などいくつかの方法があるが、Real Time PCR 法が最も一般的である。*Pythium* 属菌の Real Time PCR による定量に関してこれまでに 3 例ある。ここでは植物病原菌としてはあまり報告はないが、森林土壌中での主要な種である *P. intermedium* について述べる (Li et al., 2010)。本種のプライマーは rDNA-ITS 領域から設計した。*Pythium* 属菌では rDNA のコピー数が菌株により異なることが *P. sylvaticum* などで報告されており (MARTIN, 1995)、他の種でも同様なことが考えられる。rDNA-ITS 領域は種に特異的な塩基配列があるとともに複数コピー存在することで高い感度が期待でき、検出用プライマー設計には適した領域であるが、定量の場合この点について注意が必要である。本研究では菌株間で感度に差がないことが確かめられたので、*P. intermedium* については問題ないと考えられた。Real Time PCR による増幅産物の検出法には TaqMan 法などがあるが、本研究では SYBR Green I を用いた検出系を採用した。本法はプローブ設計などを必要とせず、従来の PCR と同様に行えることに利点がある。ただし、PCR 産物は 300 bp 以下にする点、厳密なプライマーの特異性が必須である点に注意しなければならない。*P. intermedium* において確立した Real Time PCR 法を用いて実際の土壌中の DNA 量評価を行ったところ、Real Time PCR か

から設計されたものである。

III Multiplex PCR

当研究室では、芝草の病害に関係する 5 種の *Pythium* 属菌を同時に検出する Multiplex PCR を開発した (ASANO et al., 2010)。*Pythium* 属菌で Multiplex PCR の報告は初めてであり、この技術の開発について成功の要因を述べ、これからの研究に寄与にしたい。Multiplex PCR では、単純に個々の種に特異的なプライマーを混合すればよいわけではない。本研究のように種に特異的な塩基配列が集積している rDNA-ITS 領域といった同じ領域からプライマーを設計すると、プライマー同士の競合が起こり、種により増幅効率が異なり、特定の種が優先的に増幅する。この問題を解決するため数種に共通の半特異プライマーを設計することで総プライマー数を減らした (表-2, 図-1)。当然ではあるが、増幅される DNA のサイズが異なるようにしないと、最終的に電気

表-2 *Pythium graminicola* およびその近縁種のマルチプレックス PCR に用いたプライマーの塩基配列

種	プライマー	プライマーの向き	塩基配列 (5'-3')	Tm	増幅サイズ (bp)
<i>P. aphanidermatum</i>	APH1	forward	CAT GTT CTG TGC TCT CTT TC	52.2	730
	APH2	reverse	AGT TGT TCA CAA TAA ATT GC	48.1	
<i>P. arrhenomanes</i>	ARRF	forward	AAT TCT GTA CGC GTG GTC	53.4	617
	ARR5	reverse	TCC AAG AGC AAT AAC CAC TCT CA	56.1	
<i>P. graminicola</i>	GRA6	forward	TGG GCT GCA TGT ATG TGT AGT CT	58.3	644
	GRA7	reverse	CTC CTT TAC CCT CGA GAG GGC	59.7	
<i>P. torlosum</i>	TOR3	forward	TAG AGC TGC ATG TAA AAG TGC GGT T	59.0	657
	TOR4	reverse	CCT TTA CCC TAC GAG TAG GG	54.6	
<i>P. verterpoolii</i>	VAN1	forward	GGT GGA TAG CGG CGT ATT TA	55.2	641
	VAN2	reverse	GTT TAC AAG CAG CAA CTA GA	51.2	
All microorganisms	18S-69F ^{a)}	forward	CTG CGA ATG GCT CAT TAA ATC AGT	56.3	様々 ^{b)}
	18S-1118R ^{a)}	reverse	GGT GGT GCC CTT CCG TCA A	60.9	
糸状胞子のうを形成する <i>Pythium</i> group	PyF	forward	CTG TTC TTT CCT TGA GGT G	51.7	
<i>P. aphanidermatum</i>	APH2B	reverse	GCG CGT TGT TCA CAA TAA ATT GC	57.0	163
<i>P. arrhenomanes</i>	ARRR	reverse	CGT CCA AGA GCA ATA ACC ACT C	56.5	89
<i>P. torlosum</i>	TOR6	reverse	CGC CTG CCG AAA CAG ACT AG	58.9	150
<i>Pythium</i> および近縁 卵菌類	PyR	reverse	ATT CTG CAA TTC GCA TTA C	49.8	
<i>P. graminicola</i>	GRAF	forward	GGG CTG CAT GTA TGT GTA GT	55.6	181
<i>P. verterpoolii</i>	VANF	forward	GGT GGA TAG CGG CGT ATT T	55.8	208

^{a)} 18S-69F/18S-1118R は The Helicosporidia Project Online (<http://helicosporidia.ifta.ufl.edu/>) から引用した。

^{b)} 18S69-F/18S-1118R で増幅されるサイズは菌の種によって多少異なる。

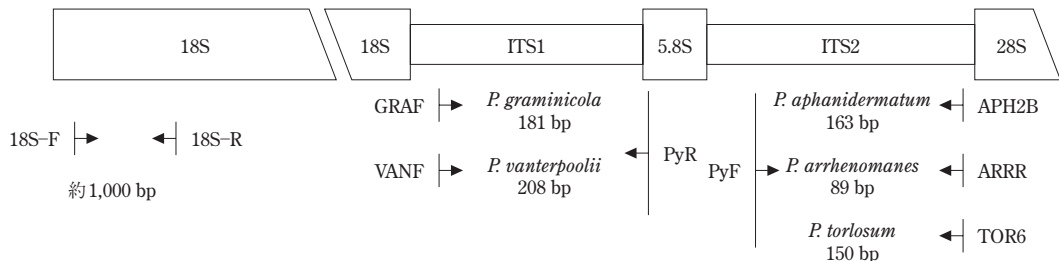


図-1 *Pythium graminicola* およびその近縁種のマルチプレックス PCR による検出のためのプライマーの設計位置

プライマーは rDNA-ITS 領域に設計した。18S-F と 18S-R は陽性対照として用いたユニバーサルプライマー。

ら得られた DNA 量と選択培地を用いた希釈平板法で得られた菌量との間には高い相関があり、Real Time PCR による菌量評価が可能であることが明らかとなった (図-3)。

V PCR 検出の現場への応用

ここでは、*P. helicoides* について PCR 検出の応用例を紹介し、病害防除における検出の重要性を述べる。本菌

は 1996 年岐阜県のミニバラにおいて根腐病を引き起こすことが初めて報告された (KAGEYAMA et al., 2002)。それ以来、他のミニバラ生産地だけでなく、切バラ、ランコエ、球根ベゴニアあるいはイチゴやキウイフルーツの病原菌として報告されている。本菌は高温性の菌であることから温暖化により病気が拡大している可能性が考えられている。また、本菌は新病害を引き起こすだけでなく、日本では初めて発見された種であることから生

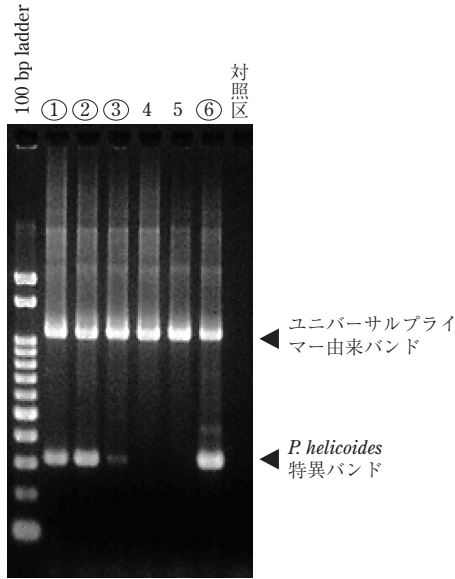


図-2 *Pythium helicoides* 特異プライマーと rDNA 18S ユニバーサルプライマーを用いた Multiplex PCR による土壌からの検出
* No. 1, 2, 3, 6 のサンプルで *P. helicoides* が検出されている。

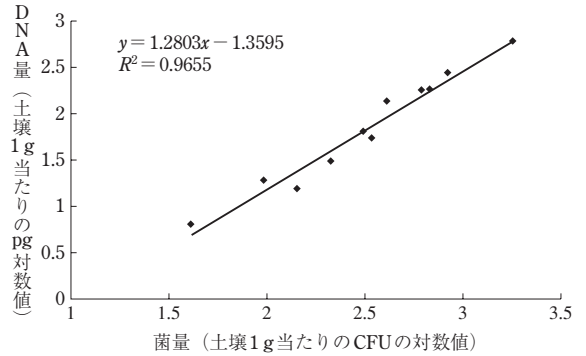


図-3 *Pythium intermedium* における Real Time PCR による土壌中の DNA 量と土壌希釈平板法による菌量との相関

表-3 PCR によるミニバラおよびカランコエ栽培施設内外の土壌中からの *Pythium helicoides* の検出^{a)}

栽培植物	場所	2003		2004	
		実験 1	実験 2	実験 1	実験 2
ミニバラ	育苗温室				
	温室内プールベンチ下	0/6	1/6	1/6	2/6
	温室内水耕液タンク周辺	1/6	1/6	0/6	1/6
	温室間廃棄場所	0/5	2/5	1/5	1/5
	温室外周	0/1	0/1	0/6	1/6
	出荷用育成温室				
	温室内プールベンチ下	1/5	2/5	1/5	1/5
	温室内水耕液タンク周辺	0/5	0/5	NT ^{b)}	NT
	温室外周	0/1	0/1	NT	NT
	冬季栽培用ハウス				
ビニールシート下	1/6	5/6	0/6	2/6	
カランコエ	温室内プールベンチ下	1/6	1/6	0/6	2/6
	温室内養液循環集水口	NT	NT	1/1	1/1
	温室内プールベンチ洗浄場所	1/2	1/2	0/1	0/1
	温室外周	0/6	0/6	NT	NT
	温室外排水溝	1/3	2/3	0/3	2/3
	温室外プールベンチ洗浄場所	NT	NT	1/1	1/1
	葉廃棄場所	NT	NT	0/1	0/1
	鉢の土壌と植物の廃棄場所	NT	NT	2/2	2/2

a) ミニバラおよびカランコエともにエプアンドフロー循環方式の灌水システムを導入した生産施設。

b) 供試しなかった。

態に関する研究は全くなかった。エプアンドフローやマツト灌水といった養液栽培で生産されているミニバラやカラコエ施設では、施設内はよく管理されている。また、これら鉢物は、発病株を含め出荷に伴いすべてが施設外に搬出され、土耕栽培とは異なり、病原菌は鉢植え植物とともに外にもち出され、リセットされると思われる。しかし、発病はくり返し発生するのが現状である。この原因として、植物を栽培しているベンチだけでなく施設内外に病原菌が生息し、作業中にベンチに混入することが考えられた。そこで、PCRによる *P. helicoides* の検出法を開発し、ミニバラおよびカラコエ生産施設における本菌の生息場所を探索した(銀玲ら, 2007)。その結果、ベンチ下や植物残渣廃棄場所などベンチ施設内外に生息していることが明らかとなった(表-3)。また、ミニバラ施設では、発病時以外にも年間を通して本菌が潜在的に生息していることも明らかになった。さらに、温室外の排水溝からも検出されたことから、他施設への本菌伝染の可能性も示唆された。以上のことから、施設内外での衛生が本菌防除に必須であることが明らかとなった。

おわりに

本稿では触れることができなかったが、定性・定量検出における問題点としてPCRの前の環境サンプルからのDNA抽出法がある。抽出キットが市販されているが、必ずしも万能ではない。本研究室ではKAGEYAMA et al. (2003)の方法を元に改良を加えながら(Li et al., 2010)、さらにDNA抽出効率と抽出作業性の向上を目指して万能な方法を開発中である。もう一つの課題として、サン

プリングの方法がある。土壌からのDNA抽出では少量の土壌、多くて数g、当研究室では0.2gを用いている。従来の土壌希釈平板法でも同じであるが、どれだけのサイズで、どのような広がりですamplingをすれば対象とした場所の代表値を得ることができるかを明らかにする必要がある。この問題は大きく、先に示した *P. intermedium* について森林中での分布をReal Time PCRで調べたところ、著しく不均一であることが明らかとなった。定量・定性検出はまだ手法の開発にとどまる報告が多く、これらを利用した実用的な研究が進むことにより、この問題が解決されることが期待される。

重要であることは認識されていたにもかかわらず容易でなかった病原菌の検出が進むことにより、*P. helicoides* の例で示したように防除の新しい視点が見えてくる。これにより効率で環境負荷の少ない病害防除の新しい可能性が開かれると考えられる。

引用文献

- 1) ASANO, T. et al. (2010) : J. Phytopath. **158** : 609 ~ 615.
- 2) GODFREY, S. A. C. et al. (2003) : Mycol. Res. **107** : 790 ~ 796.
- 3) HENEGARIU, O. et al. (1997) : BioTechniques **23** : 504 ~ 511.
- 4) KAGEYAMA K. et al. (1997) : Plant Dis. **81** : 1155 ~ 1160.
- 5) ——— et al. (2002) : J. Gen. Plant Path. **68** : 15 ~ 20.
- 6) ——— et al. (2003) : 同上 **69** : 153 ~ 160.
- 7) 景山幸二 (2005) : 植物防疫 **59** : 186 ~ 189.
- 8) ——— (2006) : 同上 **60** : 250 ~ 254.
- 9) KERNAGHAN, G. et al. (2008) : Appl. Soil Ecol. **40** : 447 ~ 455.
- 10) KLEMSDAL, S. S. et al. (2008) : Plant Path. **57** : 877 ~ 886.
- 11) LI, M. et al. (2010) : Microbiol. Res. (in press, doi : 10.1016/j.micres.2009.11.010)
- 12) MARTIN, F. N. (1995) : Mycologia **87** : 333 ~ 353.
- 13) PARK, C. S. (2006) : J. Appl. Phycol. **18** : 203 ~ 207.
- 14) SCHROEDER, K. I. et al. (2006) : Phytopathology **96** : 637 ~ 647.
- 15) 銀玲ら (2007) : 日植病報 **73** : 86 ~ 93.

(新しく登録された農薬48ページからの続き)

移植水稲：水田一年生雑草、マツバイ、ホタルイ、ウリカワ、ミズガヤツリ(北海道を除く)、ヘラオモダカ(北海道、東北)、オモダカ(北海道、近畿・中国・四国、九州)、クログワイ(北陸、近畿・中国・四国)、ヒルムシロ(北陸を除く)、セリ(北陸を除く)

●アシュラム液剤

22788：グリーンアーゼラン液剤(保土谷UPL)10/08/25

アシュラム：37.0%

日本芝：畑地一年生雑草

樹木等(公園、庭園、堤とう、駐車場、道路、運動場、宅地、のり面等)：一年生雑草、多年生広葉雑草、多年生イネ科雑草、クズ

すぎ(下刈り)：ススキ、アレチノギク・カラムシ・シシウド等の大型雑草、クズ