

トマトに病原性を持つ *Fusarium oxysporum* の分化型 およびレースの PCR 法による識別

埼玉県農林総合研究センター ^{ひら}平 ^の野 ^{やす}泰 ^し志
東京農工大学 ^{あり}有 ^え江 ^{つとむ}力

はじめに

Fusarium oxysporum Schlechtend.: Fr は世界中で経済的に最も問題な植物病原菌の一つである。*F. oxysporum* は宿主植物の維管束組織に侵入し、組織を塞ぐことによって、萎凋、萎縮、腐敗、根腐れを生じ、重大な被害をもたらす。*F. oxysporum* の植物病原性は宿主植物に対する特異的病原性に基づいて分化型 (Formae speciales: f. sp.) に分けられ、150 以上の植物に特定された分化型が記述される。さらに分化型の多くが品種に特定の病原性に基づいてレースと呼ばれる特有なサブグループに細分される。*F. oxysporum* は無性であるが、種々の病原型が確認され、分子生物学的研究から多数の系統学的起源を持っていることが示されている。

トマト (*Solanum lycopersicum*) は経済的に重要な農産物である。*F. oxysporum* によるトマトの萎凋性病害には *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) によって生じるトマト萎凋病レース 1, レース 2, レース 3 並びに f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) によって起こるトマト根腐萎凋病の 4 種類がある。トマトで甚大な被害を及ぼす萎凋性病害の対策には化学農薬や土壌消毒が重要であるが、一部で効果に難がある。環境的、経済的に抵抗性品種あるいは抵抗性台木の使用が病害制御で最も有効であるが、病気の種類によって台木の種類が異なるため、正確な病気の診断が必要である。

Fusarium 菌種は選択培地上で観察された形態上特徴に基づいて判別されるが、分化型、レースは形態学的に識別することができず、植物に対する病原性試験で分類されている。分化型やレースが混在したコンプレックスの場合、さらに分類は難しくなる。今までの病害診断は検定植物に病原菌を接種して、発病程度や病状から判断しているため、1 か月以上を要し、即時性を欠き、次に間に合わないことがあった。

そこで、*F. oxysporum* 菌の変異を系統的に解析し、病原菌の種類を素早く診断するために PCR 法を利用したレース判別技術の開発を検討した。

I Polygalacturonase の系統解析

約 80 種類の *F. oxysporum* 菌を収集し、病原性関連の細胞壁分解酵素の主要な酵素群である 2 種の *endo*-polygalacturonase 遺伝子 (*pg1*, *pg5*) と 2 種の *exo*-polygalacturonase 遺伝子 (*pgx1*, *pgx4*) を解析した。17 の分化型を含めた 38 系統の *F. oxysporum* 分離菌の塩基配列を ClustalW でアライメントして、NJ 法で系統樹を作成 (図-1) した結果、*pg1* は 1,585 ~ 1,587 bp, *pg5* は 1,873 bp, *pgx1* は 1,794 ~ 1,813 bp, *pgx4* は 1,375 bp のヌクレオチド配列であった。各遺伝子で出現が一番多い配列 (コンセンサス配列) を基準としてそれぞれの *F. oxysporum* の配列における差を解析した結果、例えば、*pg1* 配列では、84 ポジションでヌクレオチド変異が認識された。バリエーションは 26 パターンにグループ化された。バリエーションは非翻訳領域 (UTRs), イントロン, エキソンと終止コドンに広がっていた。バリエーションの割合は、0.69% であり、変異率は、5' -UTR で 0.20%, エキソンで 0.25%, イントロンで 0.19%, 終止コドンで 0.003%, 3' -UTR で 0.05% であった。エキソンの 38 ヌクレオチド変異のうち、5 箇所所でアミノ酸置換、結果として 0.23% の相違を生じていた。4 種の polygalacturonase (PG) 全体では、エキソンの変異率はイントロン (0.01 ~ 0.64%) や非翻訳領域 (0.07 ~ 0.25%) より高く、0.23 ~ 0.93% であった。また、アミノ酸では 0.05 ~ 0.31% の変異をもたらして、*pgx1* が最も遺伝子の多様性を示した。異なる染色体上に存在する 4 種の PG 遺伝子の系統学的分析はそれぞれ異なった進化を示唆された (HIRANO and ARIE, 2009)。

II 識別技術の開発

1 識別プライマーの設計

4 種の PG の系統結果を基に識別技術の開発を試み、特異的なプライマーを設計した (表-1)。単離菌は 17 の分化型を含めて、38 の *F. oxysporum* 単離菌を供試した。

Molecular Phylogeny and PCR-based Differentiation of the Pathogenic Types of *Fusarium oxysporum* in Tomato. By Yasushi HIRANO and Tutomu ARIE

(キーワード: *Fusarium oxysporum*, 分子系統, レース, PCR, 識別)

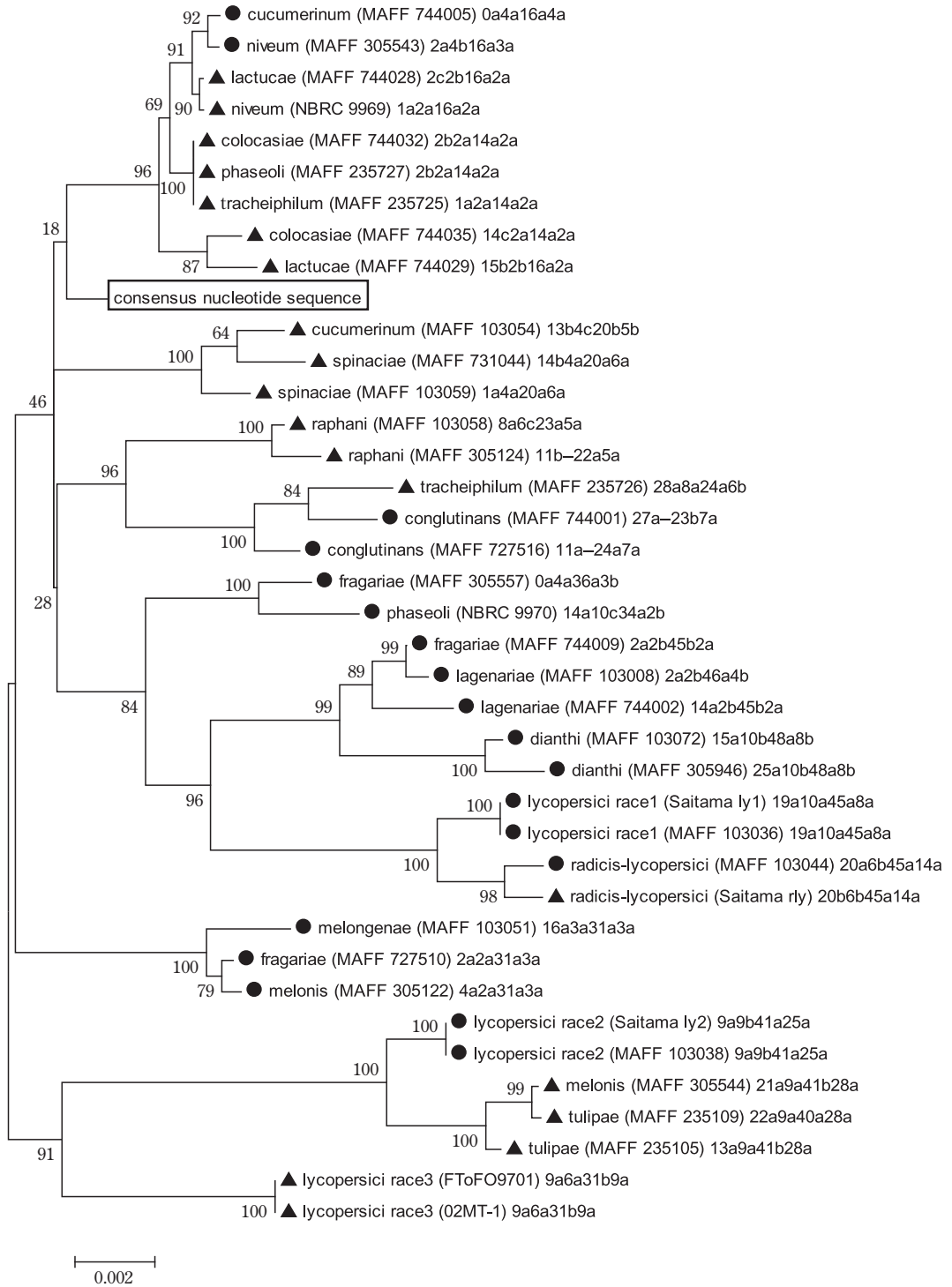


図-1 polygalacturonase の分子系統解析

● : MAT1-1, ▲ : MAT1-2

表-1 開発したプライマー

プライマー	プライマー配列	遺伝子配列の位置
uni ^{a)}		
unif	5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3'	nt 170-190 of Saitama ly1 <i>pg1</i>
unir	5'-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3'	nt 841-820 of Saitama ly1 <i>pg1</i>
sp13 ^{b)}		
sp13 f	5'-GTCAGTCCATTGGCTCTCTC-3'	nt 896-915 of Saitama rly <i>pgx4</i>
sp13 r	5'-TCCTTGACACCATCACAGAG-3'	nt 1340-1321 of Saitama rly <i>pgx4</i>
sp23 ^{c)}		
sp23 f	5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3'	nt 240-260 of Saitama ly1 <i>pg1</i>
sp23 r	5'-GCAACAGGTCGTGGGAAAA-3'	nt 757-738 of Saitama ly1 <i>pg1</i>
sprl ^{d)}		
sprlf	5'-GATGGTGAACGGTATGACC-3'	nt 385-404 of Saitama rly <i>pgx4</i>
sprlr	5'-CCATCACACAAGAACACAGGA-3'	nt 1330-1310 of Saitama rly <i>pgx4</i>

a) Amplifies 672-bp fragment from ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici*

b) Amplifies 445-bp fragment from f. sp. *lycopersici* races 1 and 3

c) Amplifies 518-bp fragment from f. sp. *lycopersici* races 2 and 3

d) Amplifies 947-bp fragment from f. sp. *radicis-lycopersici*

pg1 と *pgx4* の塩基配列から特異的なプライマーを設計した。まず、*pg1* 配列を用いて、*FOL* (レース 1, レース 2, レース 3), *FORL*, ナス半枯病菌 (f. sp. *melongenae*), キュウリつる割病菌 (f. sp. *cucumerinum*) の単離菌 DNA からプライマーセットを作成した。「uni プライマーセット」は *FOL* と *FORL* 単離菌から 672 bp の断片を増幅した。「sp23 プライマーセット」は *FOL* レース 2 と 3 から 518 bp の断片を増幅した。*FOL* レース 1 と *FORL* から断片を増幅する有効なプライマーセットを *pg1* 上に設計されることができなかつたため、*pgx4* 配列からプライマーを設計した。「sp13 プライマーセット」は *FOL* レース 1, 3 から 445 bp の断片を増幅した。「sprl プライマーセット」は *FORL* から 947 bp の断片を増幅した (表-1)。

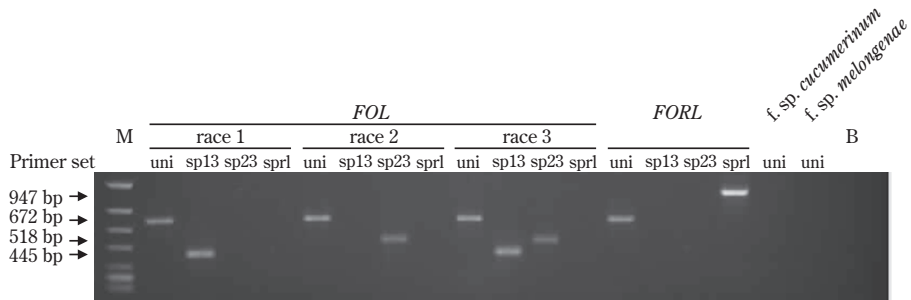
したがって、4種の菌に共通な「uni プライマーセット」を用いて PCR をすると「トマト萎凋病菌レース 1, レース 2, レース 3, トマト根腐萎凋病菌」を特異的に検出できた。「sp13 プライマーセット」を用いて PCR を行うと「トマト萎凋病菌レース 1, レース 3」を、「sp23 プライマーセット」を用いて PCR を行うと「トマト萎凋病菌レース 2, レース 3」を、「sprl プライマーセット」を用いて PCR を行うと「トマト根腐萎凋病菌」を特異的に検出できた。4種類のプライマーセット (uni, sp13, sp23, sprl) を組合せて PCR を行うことにより、トマト萎凋病菌の各レース並びにトマト根腐萎凋病菌の 4種を明確に判別することが可能となった (図-2)。

2 萎凋病各レース, 根腐萎凋病におけるプライマーセットの識別の有効性

今回、開発したレース判別方法の有効性を確認するために国内の *F. oxysporum* を使って、開発したプライマーセットを用いて PCR を行った。9株のトマト萎凋病菌レース 1, 11株のトマト萎凋病菌レース 2, 5株のトマト萎凋病菌レース 3, 9株のトマト根腐萎凋病菌, 29株の他の分化型, 合計 69株を用いた。

その結果、「uni プライマーセット」でトマト萎凋病菌, トマト根腐萎凋病菌, キヤベツ萎黄病菌 (f. sp. *conglutinans*), チューリップ球根腐敗病菌 (f. sp. *tulipae*), カーネーション萎凋病菌 (f. sp. *dianthi*) の一部, メロンつる割病菌 (f. sp. *melonis*) の一部, 非病原性 *F. oxysporum* の一部で 672 bp の断片が増幅した。サトイモ乾腐病菌 (f. sp. *colocasiae*), キュウリつる割病菌, イチゴ萎黄病菌 (f. sp. *fragariae*), レタス根腐病菌 (f. sp. *lactucae*), ウリ科つる割病菌 (f. sp. *lagenariae*), ナス半枯病菌, スイカつる割病菌 (f. sp. *niveum*), ダイコン萎黄病菌 (f. sp. *raphani*), アズキ立枯病菌 (f. sp. *phaseoli*), ホウレンソウ萎凋病菌 (f. sp. *spinaciae*), ササゲ萎凋病菌 (f. sp. *tracheiphilum*) は検出されなかつた (図-3)。

トマト萎凋病菌各レースとトマト根腐萎凋病では、トマト萎凋病菌レース 1 とレース 3 のみが「sp13 プライマーセット」で 445 bp の断片が増幅し、トマト萎凋病菌レース 2 とレース 3 のみが「sp23 プライマーセット」で 518 bp の断片が増幅した。「sprl プライマーセット」



	Primer set			
	uni	sp13	sp23	sprl
FOL race 1	+	+	-	-
FOL race 2	+	-	+	-
FOL race 3	+	+	+	-
FORL	+	-	-	+

図-2 PCR法によるトマト萎凋病検出パターン

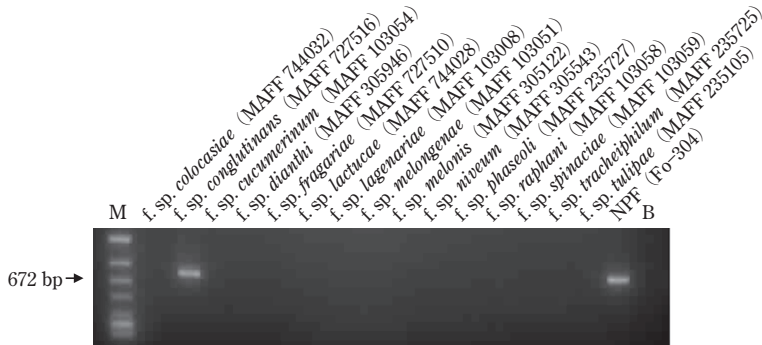


図-3 PCR法による各種フザリウム菌の検出

で 947 bp の断片がトマト根腐萎凋病菌から特異的に認められ、トマト萎凋病菌は増幅しなかった (表-2)。

また、他の 16 種類のフザリウム菌を検定した結果、4 種類のプライマーセットを組合せることによってキャベツ萎黄病菌以外は判別が可能であった。

3 PCR 反応の最適化

PCR 法で診断する場合、「プライマー」配列と PCR 法の反応条件が重要となる。「プライマー」が DNA を認識する時、温度や反応時間の違いでその認識性が損なわれる。そのため、まずそれぞれの断片が特異的に増幅される最適なアニーリング温度を調査した。トマト萎凋病菌、トマト根腐萎凋病菌、対照としてナス半枯病菌、キュウリつる割病菌の各 DNA を鋳型としてアニーリング温度を 52℃ から 70℃ まで 2℃ ずつ増加させた。「uni プライマーセット」を使って PCR 法を行った結果、64

℃ 以下でトマト萎凋病菌とトマト根腐萎凋病菌は 672 bp のバンドが認められた。他方、ナス半枯病菌とキュウリつる割病菌では、56℃ 以上で「uni プライマーセット」でバンドは検出されず、52℃ および 54℃ で弱いバンドが認められた。他のプライマーセットにおいても類似の結果が得られた (図-4)。

次に鋳型 DNA の適切な濃度を調査した。鋳型 DNA が少ないと反応しない場合があり、また逆に多いと非特異的な反応が生じる場合がある。そのため、PCR 反応液中の DNA 濃度を 10^{-3} から 10^4 g/μl まで変化させて反応性を調査した (アニーリング温度: 62℃)。すべてのプライマーセットにおいて鋳型 DNA が 10^{-3} と 10^{-2} pg/μl の濃度でバンドが観察されなかった。しかし、DNA 濃度が 1.0 pg/μl 以上の時に明確なバンドが検出された (図-5)。

表-2 4種プライマーによる *F. oxysporum* f. sp. 検定の特異性

菌	菌数	判別結果* ²	菌	菌数	判別結果* ²
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race 1	9	8 (race 1) 1 (race 2)* ¹	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	2	n.d.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race 2	11	11 (race 2)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lagenariae</i>	2	n.d.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race 3	5	5 (race 3)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melongenae</i>	1	n.d.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	9	9 (rly)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	2	n.d.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>colocasiae</i>	2	n.d.	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	2	n.d.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	2	race 1* ³	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	2	n.d.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	2	n.d.	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	2	n.d.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	2	n.d.	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i>	2	n.d.
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	3	n.d.	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	2	n.d.
			<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tulipae</i>	2	n.d.

*¹: 古い保存株. *²: n.d. トマト萎凋病以外と判定. *³: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* と遺伝的に近縁.

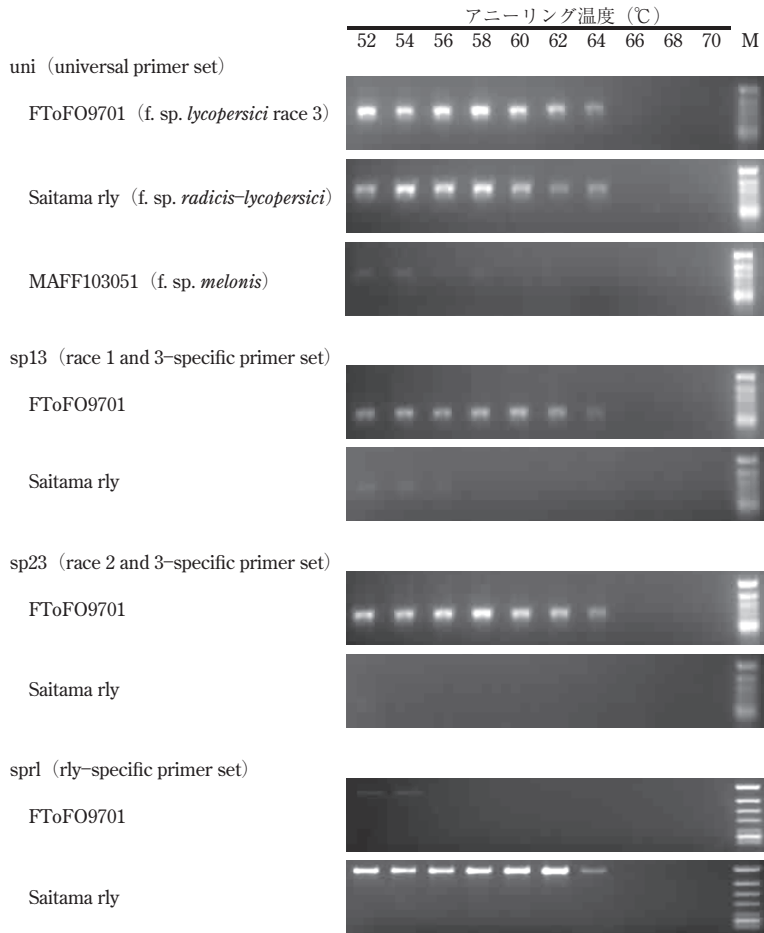


図-4 アニーリング温度と PCR 産物の関係

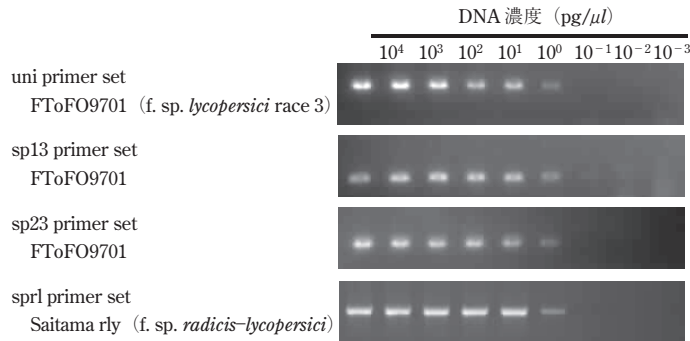


図-5 DNA濃度とPCR産物の関係

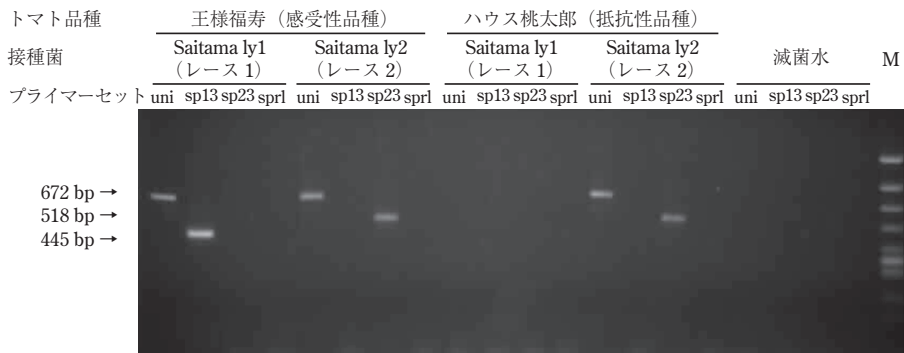


図-6 汚染土壌からのPCR法による検出結果

最後に最適なサイクル数を調べた。反復回数が少ないと非特異的な反応は少なくなる半面、反応がよくない。逆に反復回数が多いと反応性はよいが非特異反応が増加する。そのため、サイクル数を20回から50回まで10回ずつ増加させて反応性を調査した。その結果、それぞれのプライマーセットにおいて、20回のサイクル数ではバンドは認められなかった。30回のサイクル数では弱いバンドが認められた。40回ではバンドが認められ、50回において明確なバンドが観察された。

詳細にPCRの最適反応条件を検討した結果、DNA濃度は $1.0 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 以上、PCR法の反応条件は変性反応 94°C 1分、アニーリング 62°C 1分、伸長 72°C 2分で50回繰り返すことにより非特異的な反応を起こさずに検出することが可能であった。

4 トマト組織からの萎凋病各レース、根腐萎凋病のPCRによる識別

トマト萎凋病菌レース1またはトマト萎凋病菌レース2を接種したトマト品種「王様福寿」(トマト萎凋病レース1とレース2に感受性)並びに「ハウス桃太郎」(トマト萎凋病レース1に抵抗性、レース2に感受性)を用い

た。滅菌土壌を直径12 cmポットに入れ、培養したトマト萎凋病菌レース1またはトマト萎凋病菌レース2を混ぜた。トマトの第一葉開葉時に、トマト萎凋病菌汚染土壌にトマト稚苗を移植して菌を接種した。DNAは接種後、トマトの根部から抽出した。プライマーセットを用いてPCR法を行った結果、トマト萎凋病菌レース1あるいはレース2を接種した「王様福寿」並びにトマト萎凋病菌レース2を接種した「ハウス桃太郎」から予想されるバンドが観察された。定植20日目のトマトからは病原菌の検出が確実にでき、病状を呈したトマト組織から*F. oxysporum*の病原型を判定できることを示している(図-6)。

また、圃場で萎凋症状を呈した2株のトマト(台木品種:ヘルパーM, トマト萎凋病レース1とレース2に対して耐性)の茶色くなった維管束組織からDNAを抽出した。抽出DNAをプライマーセットを使ってPCRを行った結果、両試料から、672 bpと445 bpの断片がそれぞれ「uniプライマーセット」と「sp13プライマーセット」で増幅され、「sp23プライマーセット」と「sprlプライマーセット」では、観察されなかった(図-7)。

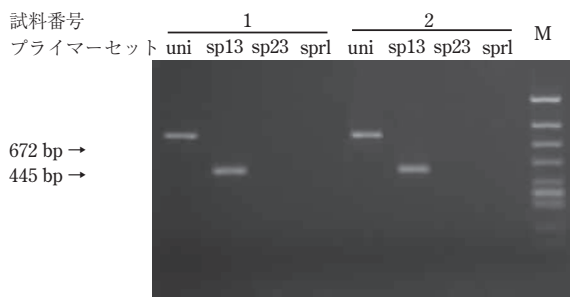


図-7 感染植物からの PCR 法による検出結果

したがって、トマト植物はトマト萎凋病菌レース 1 に感染したと推定され、生物検定による結果と一致した。PCR 法によって特異的に菌の検出が可能であり、圃場の萎凋病を診断することが可能であった (HIRANO and ARIE, 2006)。

おわりに

それぞれの「プライマーセット」を組合せることにより、トマト萎凋病各レース並びにトマト根腐萎凋病を迅速に判別できた。従来行われていた生物検定によるレース検定に加え、実験室内で安定的かつ効率的にレースを

判別することが可能となった。これにより、検定に関わる労力が省力化され、この技術を利用することで今まで 1 か月以上要していた病原菌の診断が半日で出来るようになり、迅速な野菜の土壌伝染性病害対策が可能になった。

感染している植物と同様に感染初期の徴候がほとんど観察できない段階で PCR 法による検定は生体内で種を識別することができる。圃場で萎凋症状を呈しているトマト苗、または土壌中にトマト稚苗を定植して 20 日後に PCR 法による検定により、病気の種類や汚染状況の診断が可能と考えられる。さらに、感染植物からの検出も可能であり、検定効率が向上する。また、汚染土壌のモニタリングなどにも応用できると考えられる。

今回は、4 種類のトマトの萎凋性病害 (トマト萎凋病レース 1, レース 2, レース 3 並びにトマト根腐萎凋病) の判別技術を開発した。他のフザリウム菌でも種々の病原菌が存在し、その判別は防除上必要である。他のフザリウム菌でも同様な方法で技術を開発すれば、迅速な診断技術となると考える。

引用文献

- 1) HIRANO, Y. and T. ARIE (2006): J. Gen. Plant Pathol. 72: 273 ~ 283.
- 2) ———— (2009): Microbes Environ. 24: 113 ~ 120.

登録が失効した農薬 (24.3.1 ~ 3.31)

掲載は、種類名、登録番号：商品名 (製造者又は輸入者) 登録失効年月日。

〔殺虫剤〕

- メスルフェンホス油剤
15004: ネマノーン注入剤 (バイエルクロップサイエンス) 12/03/17
- DDVP くん蒸剤
15185: パナプレート (国際衛生)
- カルボスルファン・フィプロニル粒剤
19562: アグロスギャング粒剤 (住友化学) 12/03/24
- アセフェート水和剤
19565: 家庭園芸用武田オルトラン水和剤 (住友化学園芸) 12/03/24
- アセフェート粒剤
19567: 家庭園芸用武田オルトラン粒剤 (住友化学園芸) 12/03/24
- MEP 乳剤
19588: 家庭園芸用武田スミチオン乳剤 (住友化学) 12/03/27
- 19589: 家庭園芸用ヤシマスミチオン乳剤 (協友アグリ) 12/03/27
- 19595: 家庭園芸用三共スミチオン乳剤 (三井化学アグロ) 12/03/27
- マラソン乳剤
19597: 家庭園芸用武田マラソン乳剤 (住友化学) 12/03/27
- 19598: 家庭園芸用ヤシママラソン乳剤 50 (協友アグリ) 12/03/27
- インドキサカルブ MP 粉剤
22355: ガリソン粉剤 DL (アグロ カネショウ) 12/03/04

〔殺虫殺菌剤〕

- エトフェンプロックス・EDDP 粉剤
17002: 三共ヒノトレボン粉剤 DL (ホクサン) 12/3/18
- クロチアニジン・ジクロシメット・フェリムゾン水和剤
21655: 三共ブラストップダントツフロアブル (ホクサン) 12/03/08

〔殺菌剤〕

- ストレプトマイシン水和剤
8084: アグリマイシン-20 (ファイザー) 12/03/10
- イブコナゾール・イミノクタジン酢酸塩水和剤
20338: 三共ベフランシードフロアブル (ホクサン) 12/03/31

〔除草剤〕

- カフェンストール・ダイムロン・ベンスルフロメチル粒剤
19610: 三共クサトリエース H ジャンボ (三井化学アグロ) 12/03/27
- 19613: 三共クサトリエース L ジャンボ (三井化学アグロ) 12/03/27
- ナプロパミド水和剤
20084: 日農クサレス顆粒水和剤 (日本農薬)