

PCRによるウリ科ホモプシス根腐病菌の検出法とその利用

千葉大学大学院園芸学研究科 穴 戸 雅 宏

はじめに

ウリ科ホモプシス根腐病は、主要な野菜作物が多数含まれるウリ科植物に急激な萎凋や根腐れ症状を引き起こす土壤伝染性病害である。van KESTEREN が1964年にオランダのキュウリで初めて報告した後、世界各地の温帯地域で被害が報告され、本邦でも1983年に埼玉県のキュウリで初確認された(橋本・吉野, 1985)。その後、メロン、スイカ、カボチャ等、主なウリ科作物全般で発生が認められ、被害地域も関東以北の冷涼な地域を中心に徐々に拡大している。また、生産圃場では、水分や養分の果実への供給が盛んになる収穫目前に本病が発症しやすいことから、生産者にとっては経済的にのみならず精神的にもダメージの大きい病害である。

本病の病原菌は *Phomopsis sclerotioides* van Kesteren であり、完全世代は *Diaporthe* 属であると考えられるが、いまだ確認はされていない。本菌は高温耐性が低いことから、関東以南の施設栽培では夏期の太陽熱消毒と土壤消毒剤の併用による防除が有効である(小林ら, 1997)。しかし、これらの方法を適用し難い東北地方の露地栽培では、試行錯誤的に防除対策を模索している段階にある(岩館ら, 2011)。また、年によってばらつきがあるものの、関東以南でも本病の被害は収束しておらず、防除対策の確立が急がれる(穴戸, 2006)。

一般に、防除が困難とされる土壤病害対策には、病原菌の生態的特性を明らかにすることが重要となる。筆者らは、本菌をモニタリングするために、リボゾームDNA-ITS領域中の塩基配列を利用して、本菌を特異的に検出・定量できるPCRアッセイを開発した(Shishido et al., 2010; 2012)。本稿では、PCRによるウリ科ホモプシス根腐病菌の分離・同定および検出・定量法を紹介し、それらの利用について、最近までに得られた知見を概説する。

I ホモプシス根腐病菌の分離・同定法

ホモプシス根腐病菌を植物から直接検出するには、後述するPCRによる方法が迅速で簡便である。しかし、病原菌を検出した後で接種試験を計画することも多く、その場合、菌株を分離・同定しておく必要がある。したがって、最初に *P. sclerotioides* の分離・同定法の概略を紹介する。

本菌を罹病組織から分離するには、本病に特徴的な病徴が観察される組織、すなわち、根部全体が茶褐色から黒色に腐敗し、偽子座(pseudostromata、入れ墨状に黒色化した組織)や疑似微小菌核(pseudomicrosclerotia)が形成している試料なら、根部ではなく胚軸でいまだ腐敗していない組織を表面殺菌し、素寒天培地に置床して分離源とする。また、根の一部が褐色に変色しているだけの軽微な病徴のサンプルであれば、罹病部と健全部の境目の組織を表面殺菌し、分離源とすることも可能である。しかし、一般に根部の罹病組織には腐生性の土壤糸状菌が多数生息しているので、培地上の分離源組織からは様々な雑菌が繁殖しやすい。もし罹病組織からの直接分離が不調であった場合は、次のような菌捕捉法を用いると比較的容易に分離できる。

まず罹病組織を小片に粉砕して滅菌土壤に混和し、人工汚染土を作製する。これに催芽したウリ科植物を播種し、発芽させる。供試植物として、メロンとキュウリは感受性が高く、かつ、病徴発現も早いので、このどちらかを使用するとよい。本病の発病適温は病原菌の生育適温よりやや低く、20℃程度である。通常、約10~20日で萎凋症状が見られるので、萎凋株の地際部の杯軸切片を表面殺菌後、素寒天培地に置床し、25℃で培養する。*P. sclerotioides* は培養3日目以降に培地上に現れるが、直ぐには見分けがつかないので培養7日目までに切片から伸展してくる異なるタイプの菌糸はすべて単離し、糸状菌用培地に移植する。

一方、本菌を土壤から直接、分離・培養することは極めて困難である。それは *P. sclerotioides* 用の選択培地が開発されていないこと、そして、菌糸生育が他の多くの土壤糸状菌よりも遅いためである、したがって、本菌を土壤から分離する場合、上記のようにウリ科植物を土壤

Application of PCR-Based Methods to Detect *Phomopsis sclerotioides*, the Causal Agent of Black Root Rot of Cucurbitaceae.
By Masahiro SHISHIDO

(キーワード: ホモプシス根腐病, PCR, ウリ科植物, *Phomopsis sclerotioides*)

試料に植えて菌を捕捉し、感染させた植物から分離する方法の成功率が高い。

P. sclerotioides の同定には、厳密には菌の形態および分子系統解析による検証が必要となる。しかし、本菌の主要な特徴の一つである分生子殻や分生子は植物組織内でも培地上でも容易には形成されない。(van Kesteren, 1966; Shishido et al., 2006)。したがって、分離された菌株から候補となる菌株を選定し、本菌に特異的な DNA 配列を利用した PCR による簡易同定を試みるのが現実的である。候補となる菌株の形態的特徴の目安として、太く厚壁化した褐色の菌糸 (図-1A) と疑似微小菌核 (図-1B) が培養中に容易に観察される。よって、単離した菌株の中で、図-1 のような特徴を示すものを *P. sclerotioides* 候補株とし、以下の PCR による同定に供試する。

一般に、PCR による糸状菌の同定には、種特異性が得やすいリボゾーム DNA の ITS 領域を用いることが多く、*P. sclerotioides* も例外ではない。本菌のリボゾーム DNA-ITS 領域は変異が極めて少なく、我々が調べた日本産菌株 13 菌株および ATCC に保存してある標準菌株においては 1 塩基の違いも見られなかった。この事実を利用して、*P. sclerotioides* の検出用 PCR プライマーを構築した。*P. sclerotioides* 以外で植物に病原性のあるホモプシス属菌 9 種に加え、ウリ類の主要な土壌病原糸状菌 7 種の ITS 領域配列を調査し、*P. sclerotioides* のみに特異的なプライマー候補の中から、CPs-1 (forward) と CPs-2 (reverse) を選抜した (表-1)。このプライマー組は上記病原菌株のほか、メロン根圏から無作為に分離した土壌糸状菌 10 菌株の DNA とも反応せず、また、*P. sclerotioides* DNA の増幅産物である 392 bp の塩基配列も標的とした ITS 領域配列と一致したことから、本菌の検出と同定に利用可能と判断した (Shishido et al., 2010)。

PCR の反応液組成は、10 pmol 5' 側プライマー (CPs-1)、10 pmol 3' 側プライマー (CPs-2)、0.01 pg 以上の鋳型 DNA、25 μ l *Premix Ex Taq* [(20 mM Tris-HCl (pH8.3)、100 mM 塩化カリウム、3 mM 塩化マグネシウム、各 0.4 mM デオキシリボヌクレオチド (dATG, dGTP, dCTP, dTTP)、1.25 U/ μ l *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ HS version (タカラバイオ社製)) で、全体の液量が 50 μ l となるように調整する。PCR 条件は、94°C で 4 分間保温した後、94°C で 30 秒間、67°C で 20 秒間、72°C で 20 秒間のサイクルを 30 回行い、最終サイクルにおける 72°C での保温を 7 分とする。なお、PCR 液量が 25 μ l になるように反応液組成を調整しても同様の結果が得られる。PCR 終了後の増幅産物は 1 \times TAE を含む 2% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下で想定増幅サイズ (392 bp) のバンドが認められれば、分離株は *P. sclerotioides* と見てほぼ間違いはない。また、分離株の接種試験は、上記のメロン苗またはキュウリ苗を使った菌捕捉法と同様に容易なので、病原性を確認しておくことより確実である。

II ホモプシス根腐病菌の検出と定量法

ホモプシス根腐病菌の自然試料からの検出は、前述の CPs-1 と CPs-2 プライマーを用いて、同定のための PCR と同じ手順で行えばよい。ただし、試料から抽出した鋳型 DNA に PCR 阻害物質が多いと結果が偽陰性 (false negative) になりやすい。この問題は特に有機物を多く含む土壌試料で顕著であるが、鋳型 DNA を精製するか、PCR 阻害抑制剤を用いることで解決できる。筆者らの研究室では、GENECLEAN[®] (Q-Biogene 社) による精製、あるいは Ampdirect[®] Plus (島津製作所) を用いた PCR によって良好な結果が得られている。なお、本 PCR アッセイに用いる *Taq* の種類によっては増

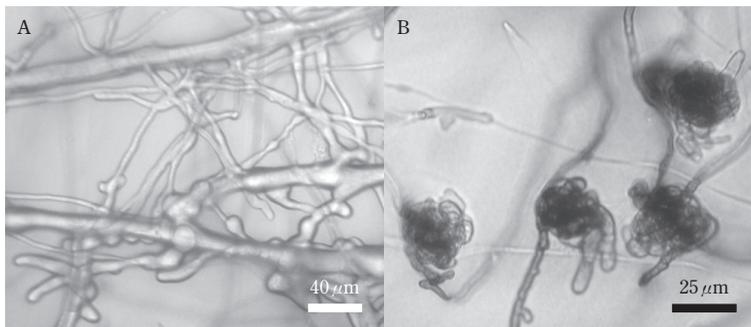


図-1 PDA培地上に形成されたウリ科ホモプシス根腐病菌 (*Phomopsis sclerotioides*) の疑似微小菌核 (A) と厚壁化した太い菌糸 (B)

表-1 ウリ科ホモプシス根腐病菌 (*Phomopsis sclerotioides*) を検出・定量するための PCR プライマーと TaqMan プロープの塩基配列 (5'—3')

Phomopsis sclerotioides 検出用 (SHISHIDO et al. 2010)

CPs-1 (forward) GCCTCGGCGCAGGCCGGCTCACC
 CPs-2 (reverse) GGGGCCTTCCAGAACGAAATATAATTT

注) SYBR Green I での定量も可能だが, 不安定. 増幅産物サイズ: 392 bp

Phomopsis sclerotioides 検出・定量用 (SHISHIDO et al. 2012)

CPs2f (forward) ACTGCTTGGTGTGGGGCACC
 CPs2r1 (reverse) TCCAGAACGAAATATAATTTACTACGCT
 CPs2t (probe) [FAM]-AAAGGGCGGGCCCTGAAATCTAGTGGCGA-[TAMRA]

注) プロープを省き, SYBR Green I での定量も可能. 増幅産物サイズ: 101 bp

土壌試料の内部標準用 (KLERKS et al. 2004)

FP_{GFP} (forward) TGGCCCTGTCTTTTACCAG
 RP_{GFP} (reverse) TTTTCGTGGGATCTTTTCGAA
 PYY_{GFP} (probe) [VIC]-AACCATACCTGTCCACACAATCTGCCC-[TAMRA]

注) プロープを省き, SYBR Green I を用いて外部標準としての利用も可能

植物試料の内部標準用 (WELLER et al. 2000)

COX-F (forward) CGTCGCATTCCAGATTATCCA
 COX-R (reverse) CAACTACGGATATATAAGAGCCAAAACCTG
 COX-P (probe) [VIC]-AGGGCATTCCATCCAGCGTAAGCA-[TAMRA]

注) プロープを省き, SYBR Green I を用いて外部標準としての利用も可能

幅効率が極端に低下する場合がありますので, 事前に確認しておくことが望ましい。

一方, ホモプシス根腐病菌の自然試料からの定量にはリアルタイム PCR を行う必要がある。リアルタイム PCR とは, PCR の増幅量をリアルタイムでモニターし解析する方法であり, サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した専用の機器が必要となる。リアルタイム PCR に用いられる蛍光モニター法にはいくつかの方法があるが, その中で, 筆者らがホモプシス根腐病菌用に適用しているのは, インターカレーター法と TaqMan プロープ法である。これらの原理については省略するが, 要するにどちらの方法でも PCR 時に発せられる蛍光の強度をリアルタイムで検出することで増幅産物の生成量をモニターできる。したがって, あらかじめ段階希釈した既知量の DNA をスタンダードとして PCR を行い, PCR 増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数 (threshold cycle ; Ct 値) と DNA 量の関係を基に検量線を作成しておけば, 未知濃度の試料についてもその Ct 値から試料中に存在する目的の DNA 量を算出できる。

前項で, ホモプシス根腐病菌の同定や検出のために開発した CPs-1 と CPs-2 をプライマーとしても, インタ

ーカレーターの一つである SYBR Green I を用いて本菌のリアルタイム PCR は可能であった (SHISHIDO et al., 2010) しかし, これらのプライマーによる増幅産物サイズは 392 bp であり, 通常, 100 bp 程度が理想とされるリアルタイム PCR には長すぎるためか, データのばらつきが大きく, 安定性に欠けていた (SHISHIDO et al., 2010 ; 2012)。そこで, 増幅産物サイズが 101 bp となる新たなプライマー組候補を ITS2 領域から選抜し, 前項と同様に *P. sclerotioides* 以外の植物病原性ホモプシス属菌やウリ科に病原性を示す土壌病原糸状菌を用いて特異性の確認を行った。その結果, リアルタイム PCR 用のプライマーとして CPs2f (forward) と CPs2r1 (reverse) が選抜された (表-1)。この新プライマー組を使用した時の SYBR Green I によるリアルタイム PCR の増幅曲線と融解曲線および Ct 値と DNA 量との検量線から, CPs2f と CPs2r1 のプライマー組は *P. sclerotioides* の DNA と結合する配列が 1 箇所だけにあり, 菌体 DNA を用いた場合の検出限界値は約 0.4 fg であることが判明した。さらに, これらプライマーの間の ITS 領域中で *P. sclerotioides* に特異性の高い 29 塩基のオリゴヌクレオチドを BLAST 検索によって特定し, TaqMan プロープ (CPs2t) を作製した (表-1)。そして, この TaqMan プ

ローブ-PCRもSYBR Green I-PCRと同様の検出効率を示すことが確かめられた (SHISHIDO et al., 2012)。

III ホモプシス根腐病菌の定量的検出法の利用

前項で紹介したリアルタイム PCR アッセイは、インターカレーター法にせよ TaqMan プローブ法にせよ、従来法の PCR よりも約 100 倍高い検出感度を持つ。しかし、有機物が多い土壤などの試料から鋳型 DNA を抽出した場合、やはり PCR 阻害を受けることがあり、その結果は偽陰性 (false negative) となってしまう。この場合の対処法として、GENECLEAN®による精製および内部標準による Ct 値の補正が有効であることが確認された (SHISHIDO et al., 2012)。ただし、この対処法を適用できるのはマルチプレックスでリアルタイム PCR を行うことができる TaqMan プローブ法のみである。

具体的には、オワンクラゲ由来の green fluorescent protein (GFP) 遺伝子など、農地土壤には存在しない DNA 配列を組み込んだ大腸菌を、DNA を抽出する前にすべての試料に等量ずつ添加する。このとき、GFP 遺伝子入りの大腸菌のみが入った対照区も必要である。一方、GFP 遺伝子配列を標的とするプライマーと TaqMan プローブ組を準備し、その際、プローブには VIC などの FAM 以外の蛍光色素をレポーターとして修飾しておく (表-1)。この GFP 遺伝子用のプライマーと VIC-TaqMan プローブ組を *P. sclerotioides* 用の CPs2f/CPs2r1 プライマーと FAM-TaqMan プローブ組と一緒にリアルタイム PCR で反応させ、それぞれの蛍光強度を測定する。対照区と試料中で得られた VIC の Ct 値から、各試料中の GFP 遺伝子量が測定でき、その比率は各試料中の DNA が精製過程や PCR 阻害によって減少した比率と捉えることができる。したがって、*P. sclerotioides*

DNA が反応した Ct 値も同じ比率で補正できることとなる。実際に、千葉県内のスイカ圃場で、ホモプシス根腐病が発生しているにもかかわらず、PCR 反応で病原菌を確認できない 3 圃場の土壤を供試して、上記の方法で *P. sclerotioides* の DNA 量を測定した例が表-2 である。結果として得られた病原菌の DNA 量は、他の PCR 阻害が見られない病原菌汚染土壤のものとはほぼ同等のレベルであった。ただし、筆者らの経験では、マルチプレックスのリアルタイム PCR を行うと、時々はずれ値のような Ct 値が得られることがある。この場合、FAM と VIC をそれぞれ分けて定量すると比較的安定した Ct 値が得られた。

さらに、この TaqMan プローブ-PCR は、植物体中の *P. sclerotioides* 量を測定する際にもより正確な値を推定できる。WELLER et al. (2000) は cytochrome oxidase (COX) 遺伝子を内部標準として採用し (表-1)、ジャガイモ中の青枯病菌量を定量した。彼らが用いた PCR プライマーと TaqMan プローブ組は、ウリ科植物から抽出した DNA にも反応し、かつ、*P. sclerotioides* DNA には反応しなかったことから、ジャガイモ青枯病菌と同様にウリ類ホモプシス根腐病菌の定量にも利用できると考えられた。実際に、これらの COX 遺伝子用プライマーと TaqMan プローブ組を内部標準として、*P. sclerotioides* を人工接種したメロンおよびキュウリ内部の菌量を測定した結果を表-3 に示す。この結果から、ホモプシス根腐病菌は接種後 2 週間で、胚軸のみならず葉にまで菌糸を進展させていることが示唆された。ただし、得られた Ct 値を見る限り、COX 遺伝子内部標準による標的遺伝子の補正幅は極めて小さく、植物試料に関しては内部標準の必要性は低いと考えられた。TaqMan プローブ-PCR の難点として試薬類が高価であることを考慮する

表-2 PCR が阻害された土壤試料からのウリ科ホモプシス根腐病菌 DNA の定量^{a)}

土壤試料 ^{b)}	GFP 遺伝子を標的にした TaqMan プローブ-PCR の Ct 値 (VIC)	<i>P. sclerotioides</i> DNA を標的にした TaqMan プローブ-PCR		
		Ct 値 (FAM)	GFP 遺伝子を内部標準として補正した Ct 値 ^{c)}	<i>P. sclerotioides</i> DNA 量 (pg/100 mg 生土重)
スイカ圃場 1 ^{d)}	31.18 ± 0.85 ^{e)}	38.97 ± 0.50	26.07 ± 0.56	11.3 ± 4.3
スイカ圃場 2	31.12 ± 0.27	39.70 ± 0.15	26.59 ± 0.17	7.1 ± 0.8
スイカ圃場 3	33.31 ± 0.61	37.41 ± 1.00	23.40 ± 0.22	59.2 ± 8.2

^{a)} 阻抽出 DNA を鋳型とした PCR はすべての試料で増幅しなかったため、得られた DNA 試料は GENECLEAN® キットによってあらかじめ精製した。

^{b)} GFP 遺伝子を組み込んだ大腸菌 (7×10^5 cells/試料) を各試料の DNA 抽出前に混入した。

^{c)} GFP 遺伝子だけの Ct 値は 20.84 ± 0.27 であった。

^{d)} 2011 年に千葉県内でスイカホモプシス根腐病が発生した異なる 3 圃場。

^{e)} 平均 ± 標準誤差 ($n = 3$)。 (SHISHIDO et al. 2012 を改変)。

表-3 COX 遺伝子を内部標準とした植物体試料からのウリ科ホモプシス根腐病菌 DNA の定量

植物体試料 ^{a)}	COX 遺伝子を標	<i>P. sclerotiioides</i> DNA を標的にした TaqMan プローブ-PCR		
	的にした TaqMan プローブ-PCR の Ct 値 (VIC)	Ct 値 (FAM)	COX 遺伝子を内 部標準として補正 した Ct 値	<i>P. sclerotiioides</i> DNA 量 (pg/100 mg 生重)
メロン根	18.03 ± 0.36 ^{b)}	16.37 ± 0.91	16.35 ± 0.72	504.5 ± 246.7
メロン胚軸	17.72 ± 0.49	17.52 ± 0.79	17.52 ± 0.60	156.0 ± 60.1
メロン葉	22.09 ± 0.97	20.86 ± 1.63	20.80 ± 0.79	3.3 ± 1.7
キュウリ根	17.71 ± 0.62	16.29 ± 0.61	16.30 ± 0.47	215.3 ± 67.5
キュウリ胚軸	18.18 ± 0.77	17.43 ± 0.67	17.44 ± 0.12	87.8 ± 6.8
キュウリ葉	22.34 ± 1.15	21.18 ± 1.67	21.12 ± 0.64	2.1 ± 0.6

a) 接種後 2 週間目の苗 (メロン品種: 'アムス', キュウリ品種 'シャープ 1').

b) 平均 ± 標準誤差 (n = 3).

と、植物体中の本菌の定量には SYBR Green I によるリアルタイム PCR の利用がより現実的かも知れない。

最後に、本稿で紹介した *P. sclerotiioides* の検出・定量法の理論上の問題点を述べる。まず、よく聞かれるのは「PCR で検出しているのは本菌に特異的な DNA 配列であって、菌そのものではない。したがって、検出・定量された DNA が生きた菌由来かどうかは定かではない」という問題である。確かにこの批判は正しく、本来、病原力を有する生菌のみを検出対象とすべきである。しかし、コムギ立枯病菌 (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; *Ggt*) の実験では、土壤に接種した死菌体の DNA は 2 日後に 99.6%, 4 日後には 99.8% が分解され、8 日後には全く検出されなかった (HERDINA et al., 2004)。*Ggt* が *P. sclerotiioides* と同じであるという確証はないが、どちらも土壤伝染性糸状菌であり、これらの菌体 DNA の分解特性が大きく異なるとは考え難い。

また、「リアルタイム PCR の場合、実際に検出しているのは目的の DNA 配列のコピー数であり、リボゾーム DNA-ITS 領域のコピー数は菌株毎に異なっている可能性が否定できない。よって、菌体量と DNA 量の関係が判明している既知の菌株以外は定量法として適用できない」という批判もある。この点も理論的に正しく、*P. sclerotiioides* の正確な定量には対象地域の菌株を分離し、あらかじめ菌体量と Ct 値の検量線を得ておく必要がある。しかし、等量の菌体 DNA を鋳型として供試した場合、今までに得られた *P. sclerotiioides* 菌株間での Ct 値の相違はすべて 1 サイクル以内であった (SHISHIDO et al., 2012)。したがって、実質的に日本産ホモプシス根腐病菌の ITS 領域のコピー数はそれほど大きな差はないと推察される。

おわりに

本邦において、ウリ科野菜にホモプシス根腐病が見つかるから約 30 年が経過した。その間、施設栽培環境であれば、太陽熱消毒や土壤くん蒸剤による消毒等によって有効な防除対策が確立されている (小林ら, 1997)。しかし、これらの手段を施設栽培外で適用することは困難で、東北地方の露地栽培を中心に本病の被害は拡大している (永坂・門田, 2008)。その対策として、マルチ畦内の土壤くん蒸処理と抵抗性台木の併用等、ある程度の効果は期待できるものの引き続き検討が必要である (岩館ら, 2011)。そのためにも本病原菌の生態的知見、特に土壤中および植物体内での動態と本病発生との関係を明らかにすることは重要である。また、抵抗性品種や抵抗性台木の育種は、他の防除法の確立にも増して潜在的な期待は大きい。本稿で紹介した PCR による *P. sclerotiioides* の検出および定量法は、これらを目的とした研究や技術開発に利用できるツールとして有望であると考えられる。

引用文献

- 1) 橋本光司・吉野正義 (1985): 植物防疫 39: 570 ~ 574.
- 2) HERDINA, K. et al. (2004): FEMS Microbiol. Ecol. 47: 143 ~ 152.
- 3) 岩館康哉ら (2011): 日植病報 77: 278 ~ 286.
- 4) KLERKS, M. M. et al. (2004): J. Microbiol. Methods 59: 337 ~ 349.
- 5) 小林正伸ら (1997): 関東病虫研報 44: 79 ~ 81.
- 6) 永坂 厚・門田育生 (2008): 植物防疫 62: 355 ~ 358.
- 7) 安戸雅宏 (2006): 同上 60: 583 ~ 586.
- 8) SHISHIDO, M. et al. (2006): J. Gen. Plant Pathol. 72: 220 ~ 227.
- 9) ——— et al. (2010): ibid. 76: 21 ~ 30.
- 10) ——— et al. (2012): ibid. (accepted).
- 11) van KESTEREN, H. A. (1966): Neth. J. Plant Pathol. 73: 112 ~ 116.
- 12) WELLER, S. A. et al. (2000): Appl. Environ. Microbiol. 66: 2853 ~ 2858.