

ミニ特集：オルピディウム菌媒介ウイルス病対策

メロンえそ斑点ウイルスを媒介する *Olpidium bornovanus* の段階的検出法

富山県農林水産総合技術センター 園芸研究所 ^{かわ}川 ^べ部 ^{まさ}眞 ^と登
農研機構 中央農業総合研究センター ^つ津 ^だ田 ^{しん}新 ^や哉

はじめに

メロンえそ斑点ウイルス (*Melon necrotic spot virus*: MNSV) は、一般的に冬を中心にメロンにえそ斑点病を引き起こす病原性ウイルスであり、絶対寄生菌 *Olpidium bornovanus* によって媒介される。MNSV は宿主植物であるメロンの全身に感染し、感染部位により様々な症状を示すことが知られている。この病害によってメロン生産は不安定となるため、メロン産地において脅威となる病害の一つである (古木, 1981; CAMPBELL et al., 1995)。

媒介菌である *O. bornovanus* はツボカビ類に属し、休眠孢子、遊走子囊および鞭毛を持つ遊走子の異なる三つの形態を持つ。この *O. bornovanus* はメロンに対する直接の病原性は持たないが、遊走子囊から放出された遊走子が、土壌中の水脈に乗ってメロン根に辿り着き侵入することにより新たな感染が成立し拡大してゆく (TOMLINSON and THOMAS, 1986; CAMPBELL and SIM, 1994)。その際、遊走子表面に MNSV が特異的に付着していると、遊走子の侵入と同時にウイルスが感染し、感染した MNSV によりメロンえそ斑点病が引き起こされる (古木, 1981)。

圃場における本病害の発生程度を定植前に推定するためには土壌中の病原性ウイルスの定量的な検出を行う必要があると考えているが、現在の技術では困難であり、また仮に定量 PCR などにより土壌中のウイルスの定量的検出ができたとしても、費用の面などから現場での使用は難しい。そのため、土壌中のウイルスを直接定量的に検出するのではなく、媒介菌である *O. bornovanus* を定量的に検出することにより、各圃場におけるメロンえそ斑点病の発生リスクを間接的に評価することが可能と考えた。それにより、圃場の土壌消毒の実施や次作の抵抗性品種選定等のメロンえそ斑点病対策技術導入の指標

の一つになり得るのではないかと考えた。しかし現在、土壌からの *O. bornovanus* の検出はメロン幼苗根への寄生の有無による定性的な方法に限られ (MOCHIZUKI et al., 2012)、定量的検出技術は皆無である。そこで、我々のグループは *O. bornovanus* の土壌中の汚染程度を、直接検出法・間接検出法といった二つの手法により定量性を持たせた段階的検出手法の構築を試み、間接検出法において *O. bornovanus* の定量的な検出法を考案した (川部ら, 2014)。本稿ではその内容を紹介する。

I *O. bornovanus* の段階的検出手法

土壌中の *O. bornovanus* を段階的に検出するため、直接検出法と間接検出法の二つの手法の構築を試みた。直接検出法は、サンプル土壌から抽出した全 DNA を鋳型とし、異なる検出感度の PCR (通常の PCR と nested PCR) を用いて目的の遺伝子断片の増幅を 2 段階で定量的に検出する手法である (図-1)。

もう一つは間接検出法で、サンプル土壌を宿主植物へ接種し、宿主植物根内でオルピディウム菌を増殖させた後に PCR で検出を行う手法である。間接検出法では定量的な検出とするため、宿主植物での菌の増殖期間を 2 段階 (接種後 1 週間培養または 2 週間培養) に設定し、それらの宿主根から抽出した全 DNA を鋳型 DNA とした。土壌中に菌が存在した場合、増殖期間が異なるため、もともと同一菌量を含む土壌からも、異なった量の DNA が得られることが見込まれる。そして、感度の異なる PCR を用いてそれぞれの鋳型 DNA より目的の遺伝子断片の増殖を試み、どの組合せにより目的遺伝子の増幅が起きたのかを確認することにより、段階的な定量結果とする手法である (図-1)。目的遺伝子の増殖に用いたプライマーは、既報の ITS 領域塩基配列情報 (MOCHIZUKI et al., 2012) を参考に設計した (表-1)。

具体的な手法は以下に示す。

1 直接検出法

(1) 土壌からの DNA の抽出

土壌からの DNA の抽出には ISOIL for Beads beating (ニッポンジーン) を用い、プロトコルに従い鋳型とな

Stepwise Detection of *Olpidium bornovanus* by Propagation of Fungi in Root and PCR. By Masato KAWABE and Shinya TSUDA

(キーワード: メロンえそ斑点ウイルス, *Olpidium bornovanus*, 段階的検出法)

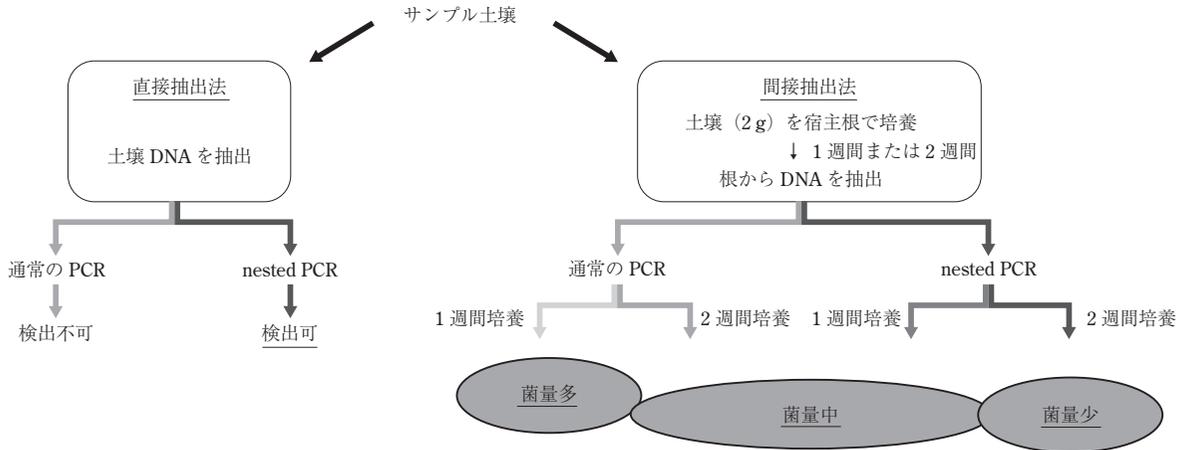


図-1 段階的検出法の簡易フローチャート

表-1 検出に用いるプライマー

名前	塩基配列 (5'-3')
O2	TCGCCGCCGCTCGTGCCGG
bor2	CCAATGTACACCGTCGATGC
F1	TCGAATCTTTGAACGCAC
R1	ATGCGGAGGAAGGCCTC

る DNA の抽出を行った。

(2) PCRによる *O. bornovanus* の検出

KOD-Plus-(TOYOBO) を用いた PCR 反応では、1 × PCR buffer, 160 μM each dNTPs, 0.25 mM 各プライマー, 1.5 mM 塩化マグネシウム, 10% ジメチルスルホキシド, 0.4U Taq DNA ポリメラーゼ, 鋳型 DNA 1 μl 含む 20 μl の反応液を用い、熱変性 94°C 30 秒, アニーリング 53°C 30 秒, 伸長反応 72°C 1 分, 40 サイクルの温度条件とした。

通常の PCR には F1 と R1 を使用し、*O. bornovanus* 特異的遺伝子断片の増幅を試み、nested PCR の 1 回目の増幅には O2 と bor2 を、2 回目の増幅には F1 と R1 を使用し、*O. bornovanus* 特異的遺伝子断片の増幅を試みた。nested PCR の 2 回目の増幅に用いる鋳型は、1 回目の増幅の反応液を 2 倍希釈したものを用いた。

2 間接検出法

(1) 宿主植物の栽培

50 ml チューブに滅菌したパーミキュライトを 45 ml ほど充てんし、宿主植物 (メロン品種 '雅春秋系') を播種した。1 × Hoagland's No.2 basal salts (Sigma-Aldrich) + 2.3 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (ナカライテスク) 混合溶液 (pH7.5) を 25 ml 加え、27°C の恒温室で明期 16 時間、暗期 8 時間の条件下で

1 週間栽培した。

1 週間後、子葉が展開した宿主植物へサンプル土壌を 2 g 接種し、同条件下で 1 週間または 2 週間栽培した。

(2) 宿主植物からの DNA 抽出

サンプル土壌接種 1 週間あるいは 2 週間後の植物根より鋳型となる DNA の抽出を行った。植物からの通常の DNA 抽出では、根 0.1 g を液体窒素中で乳鉢を使用し破碎した後、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 3% (w/v) SDS, 1% (v/v) 2-メルカプトエタノール, pH7.2) 400 μl を加え 65°C で 1 時間処理し、フェノール処理・エタノール沈殿を行い (Sambrook and Russell, 2001), DNA 濃度が 50 ng/μl となるように滅菌蒸留水で調整した。

(3) PCRによる *O. bornovanus* の検出

KOD-Plus-を用いた PCR 反応、プライマーの使用条件、nested PCR における鋳型 DNA の調整は、直接検出法で用いた PCR 反応条件と同様に行った (上述)。

(4) 土壌中の菌量の評価

土壌中の菌量は 3 段階で評価し、土壌接種 1 週間後の根より抽出した DNA を鋳型として通常の PCR で目的の遺伝子断片の増幅が見られた場合を「菌量多」、接種 1 週間後の DNA を鋳型とし nested PCR を用いた場合と接種 2 週間後の DNA を鋳型とし通常の PCR で目的の遺伝子断片の増幅が見られた場合を「菌量中」、土壌接種 2 週間後の根より抽出した DNA を鋳型とし nested PCR で目的の遺伝子断片の増幅が見られた場合を「菌量少」とした (図-1)。

3 間接検出法の改良

より間接検出法を使いやすくするため、DNA 抽出の簡易化と PCR の高感度化の 2 点について改良を行った。

(1) 簡易 DNA 抽出

植物からの簡易 DNA 抽出では、根 0.1 g に TE 250 μ l とフェノール/クロロホルム/イソamilアルコール (25:24:1) (和光純薬) 100 μ l を加え、適量の 0.1 mm ガラスビーズと 2 個のステンレスボール No.1 (テラオカ) を用いたマルチビーズショッカー (2,500 rpm 20 秒, 静止 20 秒, 8 回) (安井器械) による破碎の後、遠心 (15,000 \times g, 10 分) を行い、上清を回収して滅菌蒸留水で 10 倍希釈した。

(2) Mango taq を用いた PCR 反応

Mango taq (Bioline) を用いた PCR 反応では、1 \times PCR buffer, 187.5 μ M each dNTPs, 0.8 mM 各プライマー, 1.25 mM 塩化マグネシウム, 1U Taq DNA ポリメラーゼ, 鋳型 DNA 1 μ l を含む 20 μ l の反応液を用い、熱変性 94°C 30 秒, アニーリング 60°C 30 秒, 伸張反応 72°C 1 分, 35 サイクルの温度条件とした。

II *O. bornovanus* の定量的検出

構築した直接検出法と間接検出法を用い、汚染圃場や栽培圃場から得たサンプル土壤中の *O. bornovanus* を段階的に検出することを試み、段階的検出手法の定量的性の調査や最適化等を行った。

1 間接検出法と直接検出法

メロンを連作した *O. bornovanus* 汚染圃場から土壌を採取し、それらサンプル土壤中の *O. bornovanus* を段階的に検出できるか、まずは直接検出法を用いて試みた。その結果、通常の PCR では目的遺伝子断片は増幅されず、nested PCR によって 12 検体中 4 検体から目的バンド (ca. 150 bp) が検出された (表-2)。また、複数の汚染圃場から採取したサンプル土壌に対して直接検出法を試みたが、通常 PCR ではいずれも検出できず、また汚染圃場にもかかわらず nested PCR でも目的遺伝子の検出ができなかったサンプル土壌もあった (図-2)。これらの結果より、直接検出法では定性的検出も含め *O. bornovanus* の検出は困難であると判断された。

次に、サンプル土壌から間接検出法を用いた *O. bornovanus* の段階的検出法を試みた。その結果、土壌接種 1 週間後の抽出 DNA を鋳型とした通常の PCR では目的遺伝子断片の増幅は見られず、そのサンプルを用いた nested PCR では 12 検体中 4 検体が検出された。次に、接種 2 週間後の抽出 DNA を鋳型とした通常 PCR では 12 検体中 8 検体、そのサンプルを用いた nested PCR ではすべての検体から目的の遺伝子断片の増幅が見られた (表-2)。これらの結果より、間接検出法では *O. bornovanus* を段階的に検出ができることが示唆された。

表-2 汚染土壌からの *Olpidium bornovanus* の検出

直接検出法		間接検出法			
		接種後 1 週間		接種後 2 週間	
通常 PCR	nested PCR	通常 PCR	nested PCR	通常 PCR	nested PCR
0/12 ^{a)}	4/12	0/12	4/12	8/12	12/12

a) 12 反復中の検出された検体数を示す。

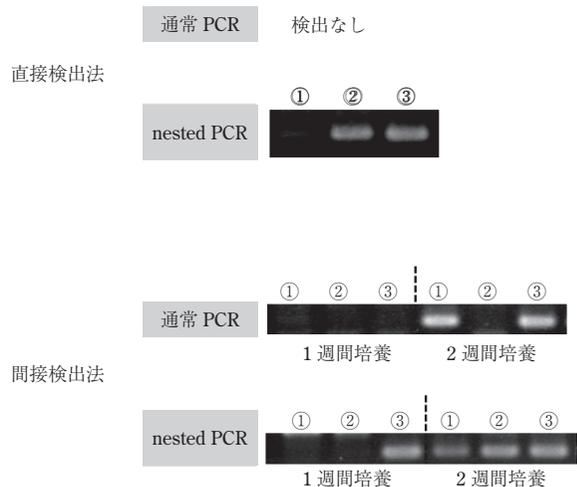


図-2 直接検出法と間接検出法での結果の一例

①～③：汚染圃場より採取した土壌。

表-3 希釈汚染土壌からの *Olpidium bornovanus* の間接検出法による段階的検出

汚染土壌希釈倍率	接種 1 週間後		接種 2 週間後	
	通常 PCR	nested PCR	通常 PCR	nested PCR
希釈なし	0/6 ^{a)}	3/6	6/6	6/6
3 倍希釈	0/6	1/6	5/6	6/6
9 倍希釈	0/6	0/6	4/6	5/6
27 倍希釈	0/6	0/6	4/6	5/6

a) 6 反復中の検出された検体数を示す。

また、この方法を異なる汚染土壌に用いた場合でもその得られた結果 (菌量) に差がつくことが認められ (図-2)、さらに汚染土壌を希釈すると希釈段階に応じた検出結果となることが示された (表-3)。これらの結果より、本法の検出感度は土壌中の菌量と相関的であることが示唆され、土壌中の菌量の定量的な検出が可能となることが示された。

2 間接検出法の改良

間接検出法を行う際、植物根からの DNA 抽出に手間

表-4 圃場土壌からの *Olpidium bornovanus* の間接検出法による段階的検出

土壌 ^{a)}	KOD-Plus-				Mango taq			
	接種1週間後		接種2週間後		接種1週間後		接種2週間後	
	通常 PCR	nested PCR	通常 PCR	nested PCR	通常 PCR	nested PCR	通常 PCR	nested PCR
栽培圃場	0/3 ^{a)}	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
汚染圃場 1	0/3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3
汚染圃場 2	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3
汚染圃場 3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3

^{a)} 3 反復中の検出された検体数を示す。

がかり大量の検体の処理が行えないため、DNA抽出法の改良を行った。大量の検体を処理するため、マルチピーズショッカーを用いた簡易 DNA 抽出法を構築したところ、検出能は通常 DNA 抽出法と比べ差は認められなかったが、大量検体を一気に処理できる点などから省力化に貢献した（データ省略）。

また、検出能向上のため、PCR 用 DNA ポリメラーゼの再選定と最適条件の探索を行い、新たな PCR 条件を構築した。新たに構築した簡易 DNA 抽出法により抽出した鋳型 DNA を用い、KOD-Plus-を用いた元の PCR 条件または Mango taq を用いた新たな PCR 条件により、メロン栽培圃場と *O. bornovanus* 汚染圃場からの *O. bornovanus* の検出を行った。栽培圃場から採取した土壌を用いた検出では、KOD-Plus-あるいは Mango taq を用いた両者の PCR で目的遺伝子断片は増幅されなかった（表-4）。汚染圃場から採取した土壌を用いた検出では、KOD-Plus-あるいは Mango taq の両者から *O. bornovanus* は検出されたが、Mango taq を用いた場合にのみ、2週間後の通常の PCR で「汚染圃場 2」と「汚染圃場 3」から目的遺伝子断片の増幅が見られた（表-4）。このことから、Mango taq を用いた場合の間接検出法の検出能は KOD-Plus-の検出能と比較してより高いことが示された。また、改良間接検出法で反復実験を行っても検出結果は同じ結果となったため（表-4）、栽培圃場の菌量は「検出不可」、汚染圃場 1～3 の菌量は「菌量中」と評価した。

以上のことより、改良した間接検出法は簡便化・高感度化ができ、改良間接検出法の使用が推奨される。

おわりに

本稿では媒介菌である *O. bornovanus* の定量性を持つ

段階的検出法の紹介を行った。*O. bornovanus* の定量的な検出を行うことにより、土壌消毒の実施時期や抵抗性品種の導入に関して (http://www.naro.affrc.go.jp/narc/contents/files/post_methylbromide/chiba_manual.pdf) 判断の一助となることが期待される。しかし、メロンえそ斑点病は *O. bornovanus* が直接を引き起こすのではなく、その菌が運ぶ病原ウイルスが感染することにより病害を引き起こされる。現在のところ、圃場中の媒介菌量の評価だけで圃場における発病程度を直接評価するのは不十分であることが徐々にわかってきた（未発表データ）。そのため、圃場におけるメロンえそ斑点病の発病程度を生物量で評価するためには、宿主・ウイルス・媒介菌の三者間の量的関係と発病程度を解析する必要があると思われる。また今後、メロンえそ斑点病と同様に土壌菌媒介病害であるレタスビッグベイン病やチュウリップ微斑病等の媒介菌である *Olpidium* 属菌を対象とした定量的検出技術の開発も必要とされており、今後それらの研究開発にも着手しなければならない。

引用文献

- 1) CAMPBELL, R. N. and S. T. SIM (1994): Can. J. Bot. **72**: 1136 ~ 1143.
- 2) ——— et al. (1995): Eur. J. Plant Pathol. **101**: 273 ~ 282.
- 3) 古木市重郎 (1981): 静岡県農試特別報告 **14**: 1 ~ 93.
- 4) 川部眞登ら (2014): 関西病虫研報 **56** (印刷中).
- 5) MOCHIZUKI, T. et al. (2012): J. Gen. Plant Pathol. **78**: 49 ~ 53.
- 6) SAMBROOK, J. and D. W. RUSSELL (2001): Molecular cloning, Cold Spring Harbor, New York.
- 7) TOMLINSON, J. A. and B. J. THOMAS (1986): Ann. Appl. Biol. **108**: 71 ~ 80.