

バナナバナマ病の分子診断法に関する最近の話題

東京農工大学農学部植物病理学研究室

柏 毅 (かしわ たけし) ・ 有江 力 (ありえ つとむ)

はじめに

近年、世界各国のバナナ (*Musa spp.*) 生産を脅かす存在として、土壌伝染性の植物病原糸状菌であるバナナ病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Focu*) が報告されている。20 世紀中盤に中央アメリカ地域などで猛威を振るった本病は、*Focu* レース 1 抵抗性を保持する ‘Cavendish’ (Cavendish 種として表記されることがあるが、三倍体の品種) の登場によって病気のまん延が抑えられていた。‘Cavendish’ は、現在、世界のバナナ生産の 5 割以上を占める優良品種であるが、本品種を侵す新たな *Focu* レースである TR4 の登場によって、再び世界のバナナ生産が脅威に晒されている。いまだ、新レースに対する有効な防除方法が確立されていない現在において、バナナ病罹病株や *Focu* 汚染土壌の検出や診断は、被害軽減へとつながる重要なステップである。近年、様々な植物病原菌において、簡便・迅速な診断法として分子生物学的手法が利用されている。そこで本稿では、現在研究が進められている、バナナ病の分子診断に関する話題を紹介する。

I パナマ病の歴史とその特徴

バナナバナマ病 (Panama disease または wilt) は *Focu* によって引き起こされる導管性の土壌病害であり、他の *Fusarium* 病同様、葉の黄化や萎凋等が病徴として観察される。罹病株の病徴は古い葉から新しい葉へと観察されはじめ、可食部には病徴は顕れない。罹病株は最終的に枯死してしまうだけでなく、*Focu* が形成する耐久体である厚膜胞子が土壌中で数十年間生存すること (Lucas, 1998) などから、バナナ病罹病株や発生圃場の汚染土壌の適切な診断・管理は、バナナ病防除の重要なステップとなる。

Focu には四つのレース (宿主品種が異なる系統) が報告されている。レース 1 は ‘Gros Michel’ や ‘Lady Finger’, ‘Apple’ といった AAB (異質三倍体) ゲノムを保持する品種を、レース 2 は ‘Bluggoe’ などの ABB ゲノムを保持する品種を宿主としている (表-1)。また、レース 3 は *Heliconia* 属植物 (バナナとは異なる) を宿主としており、現在は *Focu* のレースとして見なされていない (FRASER-SMITH et al., 2014)。近年、世界中のバナナ生産を脅かしているのはレース 4 であり、AAA (同質三倍体) ゲノムを保持する ‘Cavendish’ 品種を宿主としている。レース 4 は、亜熱帯地域で発生した SR4 (subtropical race 4) と、熱帯地域でも発生している TR4 (tropical race 4) に分けられる (表-1; PLOETZ and PEGG, 2000)。

「バナマ病」という名は、本病の大発生が最初に報告された地域に由来している。1890 年から 1960 年ころにかけて、バナナなどの中米カリブ海地域の約 40,000 ha のバナナ生産地域が、*Focu* によって引き起こされる病害の被害を受けた。バナナの *Fusarium* 病が最初に見いだされたのはオーストラリアのプランテーションとされるが (BANCROFT, 1876), 1900 年代には、世界各国において同様の病害が報告された。このような爆発的な病害の

表-1 *Focu* のレースとバナナ品種の関係

バナナ品種	<i>Focu</i> レース			
	1	2	SR4	TR4
Gros Michel	+ ^a	-	+	+
Bluggoe	- ^b	+	nd	+
Cavendish	nd ^c	nd	+ ^d	+

^a+, バナマ病に対し罹病性。

^b-, バナマ病に対し抵抗性。

^cnd, データなし。

^d+, 亜熱帯地域のみで発病。

広がり、*Focu* が感染している根茎や苗等を、別のプランテーションへと移動させてしまったことによって引き起こされたと考えられている (PLOETZ and PEGG, 2000)。この当時発生していたのは *Focu* レース 1 であり (表-1)、20 世紀前半に本レースによって引き起こされたバナナ生産の被害額は、約 23 億ドルにもものぼったことが報告されている (PLOETZ, 2005)。この年代のバナナ生産において中心に用いられていたのは 'Gros Michel' 品種である。その後、レース 1 抵抗性を保持する 'Cavendish' へ栽培品種が切り替えられたことによって、パナマ病の被害は軽減した (表-1)。しかし、レース 1 が根絶されたわけではなく、いくつかの地域では、依然として 'Gros Michel' などにおいて *Focu* レース 1 の被害が報告されている。一方、'Cavendish' でも、亜熱帯地域においてのみ *Focu* によるパナマ病被害が報告されていた。この病原は *Focu* SR4 (subtropical race 4) と名付けられたが、世界的な被害拡大には至っていなかった (PLOETZ, 1990; VIJJOEN, 2002)。

しかし 1960 年代に入り、熱帯地域の台湾を皮切りに、90 年代にはインドネシアとマレーシア、その後、中国、フィリピン、モザンビークにおいて 'Cavendish' の壊滅的被害が報告された。病原は *Focu* の新たなレースである TR4 (tropical race 4) であることが特定されたが、現在までに TR4 に対する抵抗性を持ち、かつ生食用として有力な品種は見いだされていない。TR4 は、発生から 10 年余で爆発的な被害をもたらしており、現在、世界のバナナ生産は切迫した状況にあると言える。本病のような土壤病害の被害拡大を防ぐ方法としては、*Focu* に汚染された植物体・土壌の除去や、その移動の阻止が最も有効である。これまでに、*Focu* を迅速に検出する様々な手法が開発されてきた。次章では、その手法について紹介する。

II パナマ病の分子診断に関する取り組み

パナマ病の分子診断法として、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) などを用いた複数の手法が過去に開発されている (KOENIG et al., 1997; BENTLEY et al., 1998)。これらは対象のゲノム配列全体に基づいて診断する手法であるため、菌株の分子系統的關係に沿った診断結果を下すことができる。RFLP 法を用いた診断では、菌糸和合群 (vegetative compatibility group, VCG) に沿った診断が可能であり、菌株の系統的關係を推定する際に有効であることが報告されている (BENTLEY et al., 1998)。しかし、*F. oxysporum* においては、同一 VCG 内に異なるレースが存在する例が報告されて

いる (ELIAS and SCHNEIDER, 1991)。

また、*F. oxysporum* の分子系統解析の際に用いられる、リボソーム DNA 遺伝子間領域塩基配列 (rDNA-IGS) をターゲットとした分子診断手法も、リアルタイム PCR や LAMP 法 (loop-mediated isothermal amplification assay) を利用して開発されている (LIN et al., 2013; ZHANG, 2013)。これら手法は既報の TR4 を識別可能であり、さらに、蛍光強度に基づき DNA 増幅量を測定することから、*Focu* の DNA を定量可能である。さらに、LAMP 法は土壌中の病原菌の検出にも応用可能であることが示されている。LAMP 法は、定温での DNA 増幅が可能であり、特別な機器を使用することができない屋外における診断への応用が期待される手法である。病原菌 DNA の検出・定量を屋外で簡便に行えば、病害の拡大を未然に防ぐことにもつながる。

一般に、植物病原性 *F. oxysporum* においては、分子系統関係に基づく診断のほか、病原性にかかわる遺伝子群が診断の標的として用いられてきた。これは、*F. oxysporum* の分子系統関係と分化型・レース (宿主特異性) が必ずしも一致しないため、分子系統関係に基づく診断よりも、宿主への病原性を決定する遺伝子を標的とした診断のほうが、目的とする分化型・レースの識別を容易に行えると考えられるからである。例として、トマトを宿主とする *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) では、病原性に関与すると考えられる SIX 遺伝子群 (HOUTERMAN et al., 2007; SCHMIDT et al., 2013) を標的とした分子診断法が開発されてきた。*Fol* においては三つのレースが報告されているが、レースと分子系統関係は必ずしも一致しない (KAWABE et al., 2005)。しかし、*Fol* のレース分化は SIX 遺伝子の変異などによって引き起こされることが明らかとなり、それぞれのレースが保持する SIX 遺伝子を PCR やリアルタイム PCR で検出し、レース識別する手法が開発された (Lievens 2009, Inami 2010)。その後、他の *F. oxysporum* 分化型においても SIX 遺伝子のホモログが発見されており、*Fol* 以外の分化型においても病原性関連遺伝子として機能することが明らかになっている (KASHIWA et al., 2013)。

このように複数の分化型から見いだされている SIX 遺伝子ではあるが、*Focu* においては、SIX1, SIX2, SIX4, SIX6, SIX7, SIX8, SIX9, SIX13 を保持することが明らかになっている。特に、*Focu* が保持する SIX8 遺伝子には、レースによって特定の塩基の変異が見られることが明らかとなり、SR4 と TR4 の分子診断法として、SIX8 遺伝子を標的とした PCR が検討された (FRASER-SMITH et al., 2014)。このような、レース特異的な塩基配列変異を探

表-2 *F.oxysporum* 種内における SIX 遺伝子分布

SIX	分化型 (f. sp.) ^a
SIX1	<i>lycopersici, conglutinans, cubense, fragariae, medicaginis, melonis, pisi, vasinfectum</i>
SIX2	<i>lycopersici, cubense</i>
SIX3	<i>lycopersici</i>
SIX4	<i>lycopersici, conglutinans, cubense, niveum, vasinfectum</i>
SIX5	<i>lycopersici</i>
SIX6	<i>lycopersici, cubense, melonis, niveum, passiflorae, radiscucumerinum, vasinfectum</i>
SIX7	<i>lycopersici, cubense, lili, zingiberi</i>
SIX8	<i>lycopersici, conglutinans, cubense, medicaginis, niveum, passiflorae, raphani, vasinfectum</i>
SIX9	<i>lycopersici, conglutinans, cubense, niveum, passiflorae, radiscucumerinum, raphani, vasinfectum</i>
SIX10	<i>lycopersici, zingiberi</i>
SIX11	<i>lycopersici, melonis, niveum, passiflorae</i>
SIX12	<i>lycopersici, zingiberi</i>
SIX13	<i>lycopersici, cubense, fragariae, medicaginis, melonis, niveum, pisi, vasinfectum</i>
SIX14	<i>lycopersici, pisi</i>

^a LIEVENS et al., 2009 ; KASHIWA et al., 2013 ; FRASER-SMITH et al., 2014 を基に作製。

索する方法として、FRASER-SMITH et al. (2014) は複数の *Focu* 系統の比較ゲノム解析を行っている。今後、さらに *Focu* のゲノム研究が進展することで、レース分化を司るようなゲノム領域の決定が期待される。このような知見は、病原性に則した新たな診断法の開発につながるばかりか、TR4 に対する抵抗性品種の育種に大きく貢献することができると考えられる (表-2)。

おわりに

本稿では、近年大きな問題となっているバナナバナマ病に対する対策の一例として、*Focu* の分子診断に関する話題を取り上げた。今後、*Focu* のレース分化を決定する因子などが明らかになれば、*Focu* の病原性に則した診断手法の開発につながることを期待される。等温条件下での DNA 増幅反応が可能であり、圃場での診断へ応用可能な LAMP 法など、分子診断に応用できる技術は進歩を続けている。バナマ病の被害拡大を防ぐためにも、今後の *Focu* 診断技術のさらなる発展が望まれる。

引用文献

- 1) BANCROFT, J. (1876) : Votes and Proceedings (3), Queensland, p. 1011 ~ 1038.
- 2) BENTLEY, S. et al. (1998) : *Phytopathology* **88**(12) : p. 1283 ~ 1293.
- 3) ELIAS, K. S. and R. W. SCHNEIDER (1991) : *ibid.* **81**(2) : 159 ~ 162.
- 4) FRASER-SMITH, S. et al. (2014) : *Plant pathology* **63**(5) : 1044 ~ 1052.
- 5) HOUTERMAN, P. M. et al. (2007) : *Molecular Plant Pathology* **8**(2) : 215 ~ 221.
- 6) INAMI, K. et al. (2010) : *Journal of General Plant Pathology* **76**(2) : 116 ~ 121.
- 7) KASHIWA, T. et al. (2013) : *Journal of General Plant Pathology* **79**(6) : 412 ~ 421.
- 8) KAWABE, M. et al. (2005) : *ibid.* **71**(4) : 263 ~ 272.
- 9) KOENIG, R. L. et al. (1997) : *Phytopathology* **87**(9) : 915 ~ 923.
- 10) LIEVENS, B. et al. (2009) : *FEMS Microbiology Letters* **300**(2) : 201 ~ 215.
- 11) LIN, Y. H. et al. (2013) : *European Journal of Plant Pathology* **135**(2) : 395 ~ 405.
- 12) LUCAS, J. A. (1998) : *Plant Pathology and Plant Pathogens* (3), Wiley-Blackwell, Oxford, 274 pp.
- 13) PLOETZ, R. C. (1990) : *Fusarium Wilt of Banana*, APS, Minnesota, 139 pp.
- 14) ——— and K.G. Pegg (2000) : *Fusarium wilt*. In : *Diseases of Banana, Abaca and Enset*, CABI, Wallingford, p. 143 ~ 159.
- 15) ——— (2005) : *Panama disease : an old nemesis rears its ugly head*. Part 1, APS, Online.
- 16) SCHMIDT, et al. (2013) : *BMC Genomics* **14** : 119.
- 17) VILJOEN, A. (2002) : *South African Journal of Science* **98**(7/8) : 341 ~ 344.
- 18) ZHANG, X. (2013) : *PLoS ONE* **8**(12) : e82841.