

サツマイモ基腐病菌を高精度かつ高感度に検出・ 同定できるリアルタイムPCR法

農研機構 植物防疫研究部門 基盤防除技術研究領域
越境性・高リスク病害虫対策グループ 主任研究員

ふじわら かずき
藤原 和樹

はじめに

サツマイモ基腐病（基腐病）は、植物病原糸状菌である *Diaporthe destruens*（基腐病菌）によって引き起こされる。本病は、米国バージニア州で初めて発生が確認され¹⁾、これまでに南北アメリカ、アジア、アフリカ、およびオセアニアにおける一部の国々で発生が報告されている。国内では、2018年に沖縄県と鹿児島県で初めて発生が確認され、2019年には宮崎県においても発生が確認された²⁾。現在では、2022年1月末までに全国24都道府県で発生が報告されており、発生地域の拡大が懸念されている。

基腐病の対策では、健全なかんしょ苗や種イモを使用し、基腐病を圃場に「持ち込まない」、万が一に基腐病が発生した場合は、感染株をすみやかに抜き取り、病原菌を圃場で「増やさない」、そして罹病した植物残渣を圃場に「残さない」ことが重要である。中でも、基腐病の発生初期における対応が非常に重要であり、被害が大きくなる前に発見できれば被害を最小限に抑えることができる。そのため、基腐病菌を高精度かつ高感度に検出できる手法が必要不可欠である。本稿では、新たに開発したサツマイモ基腐病菌の検査手法について紹介する。

1 サツマイモ基腐病について

基腐病は、かんしょが基腐病菌に感染すると発病する。罹病かんしょでは、地際の茎組織に黒褐変の病斑、葉の赤紫色化や黄化症状、さらには茎葉に萎れが生じ、最終的には枯死に至る。地上部に加えて塊根では、主になり口側から水浸状の腐敗症状が認められ、独特の臭気を放つ。塊根の腐敗症状は貯蔵中に見つかることが多いが、栽培中に病勢が進み重篤化した場合には、土壌中でも塊根の腐敗が認められる。一方、収穫時に見た目が健全な塊根においても、潜在感染しているものがあり、貯蔵中に腐敗が生じることがある。黒褐変の組織や腐敗部位には、柄子殻と呼ばれる微小の黒粒が多数形成される。柄子殻には大量の胞子が含まれており、柄子殻から漏出した胞子が健全な苗や塊根へ広がることで二次的な感染が生じ、被害が拡大する。基腐病の病勢は、作付け直後は苗の草勢に比べて基腐病の進行が強く、症状が急速に現れることで本病による異常を発見しやすいものの、苗の生育が旺盛になると草勢が強くなり、基腐病の症状が発見しにくい。その後、収穫前に苗の草勢が弱くなると一転して基腐病の症状が顕在化し、被害の深刻さが露見する。

2 サツマイモ基腐病と類似する病害

基腐病に類似した症状を呈する主な病害は、サツマイモ乾腐病（乾腐病）³⁾、サツマイモつる割病（つる割病）、およびサツマイモ茎根腐細菌病（茎根腐細菌病）が挙げられる。乾腐病は基腐病の同属近縁種である *Diaporthe batatas* によって引き起こされる。本病は、栽培中に甚大な被害が発生することはほとんど無いものの症例は酷似している。塊根については、貯蔵中に発病することが多く、基腐病と類似した腐敗症状が認められ、基腐病と比べると塊根組織の褐色は濃いことが多く、また軟化症状の程度は低い。つる割病は *F. oxysporum* f. sp. *batatas* によって引き起こされ、また他の *Fusarium* 属菌（*F. acuminatum*、*F. incarnatum*、*F. proliferatum*、および *F. solani*）による同様の被害も報告されている⁴⁾。茎根腐細菌病は *Dickeya* 属細菌（旧名 *Erwinia chrysanthemi*）⁵⁾ によって引き起こされる。両病ともに栽培中の茎葉に萎れを伴う葉の黄化症状を呈し、最終的には枯死に至る。両病では、それぞれ特徴的な症例が認められており、つる割病においては、茎が繊維状に割けた症状を呈し、導管部が褐色になるものの、健全に肥大した塊根での腐敗は少ない。茎根腐細菌病では、症状が進展すると茎葉に軟化腐敗の症状が認められることがあり、さらに肥大した塊根でも腐敗症状が発生することが多い。上記のサツマイモ病害は、基腐病とは異なる症例が多いものの、目視で症状を診断するには専門的な知識を必要とすること、また異なる病原体が重複して感染していることもあり、基腐病と類似病害を見分けることが困難である場合が多い。中でも、基腐病と乾

腐病の症状は酷似しており、他の病害よりも見分けることが難しいため、両菌をそれぞれ鑑別できる手法が必要がある。

3 サツマイモ基腐病菌の検査技術

基腐病菌の検査手法は、培養した基腐病菌を肉眼および顕微鏡観察によって形態学的に鑑別する手法と、遺伝学的に検出する手法（DNA バーコーディング法と迅速検出法）の2つに大別される。培養法は古くから病害診断に利用されており、罹病組織を培養源として人工的に微生物を培地上で生育させ、得られた菌叢や形態を観察することで目的の病原体を鑑別し同定する。しかしながら、基腐病菌の培養には2週間程度の日数を要し、また形態学的な知見に基づいた鑑別には高度な専門知識を必要とするため、適用が難しい場合がある。培養法に加えて、遺伝学的な知見に基づいた検査手法は、新たな同定法として利用されている。DNA バーコーディング法では、基腐病菌を含む糸状菌の同定においてリボソームRNA遺伝子（rDNA）の内部転写スペーサー（internal transcribed spacer, ITS）領域等の塩基配列情報を用いる。取得したITS領域の塩基配列（DNA バーコード）を国際塩基配列データベース（the International Nucleotide Sequence Databases, INSD）に登録されている配列情報と比較し同定する。本手法は、非常に優れた検査手法であるが、作業工程が多く検査に時間がかかる場合がある。迅速検出法は、PCR（Polymerase Chain Reaction）法等を用いてITS領域等における種特異的な配列を検出する手法である。例えば、基腐病菌に由来するDNAを鋳型として、プ

ライマー（目的のDNA配列に結合する相補的な一本鎖の合成DNA）を用いてITS領域に保存されている目的の領域を増幅し、増幅したPCR産物を電気泳動によって目視で確認することで、基腐病菌を検出する。これまでに海外の研究グループにより基腐病菌を検出可能なSPPDプライマーを用いたPCR法について報告されている。一方で、筆者らによる研究において、既報のSPPDプライマーは国内で発生している基腐病菌と乾腐病菌を区別できず、基腐病菌に対する特異性が低いことを確認している⁶⁾。また、供試検体によっては極めて低濃度の病原体を検出することが難しい場合がある。そこで、筆者らは、DNA濃度を数値化し、定量的に検出できるリアルタイムPCR法による新たな基腐病菌の検出・同定手法の開発に着手した。

基腐病菌と乾腐病菌をそれぞれ特異的に検出できるプライマーを設計するために、沖縄県、鹿児島県、および宮崎県から分離された基腐病菌17菌株と乾腐病菌11菌株のITS領域の塩基配列情報を取得し、INCDに登録されている基腐病菌および乾腐病菌の同領域の配列情報と比較解析することで、基腐病菌を標的としたDd ITS プライマーと、乾腐病菌を標的としたDb ITS プライマーをそれぞれ設計した。リアルタイムPCR機器はQuantStudio5リアルタイムPCRシステム(Thermo Fisher Scientific社)で、リアルタイムPCR試薬はTB Green Premix Ex Taq II (Takara社)を用いた。PCR反応液は、1×TBGreen Premix Ex Taq II、1×ROXリファレンスDye II、0.4 μ Mの各プライマー (Forward/Reverse)、および2 μ LのDNA鋳型溶液を最終容量

20 μ L中に含有した。リアルタイムPCR条件は、94℃で1分間の初期変性、続けて32サイクルの96℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、および72℃で30秒間の伸長から構成され、融解曲線解析は96℃で15秒間の変性、55℃で1分間の保持および55から96℃への15秒間の加熱で行った。リアルタイムPCRに供試する鋳型DNAは、上記の基腐病と乾腐病の分離菌株に加えて、農業生物資源ジーンバンク (https://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php) より入手した近縁糸状菌 (*Diaporthe gardeniae* (MAFF 410870), *D. nobilis* (MAFF 245916), *D. santonensis* (MAFF 410114), *Phomopsis asparagi* (MAFF 150068), *P. cucurbitae* (MAFF 410452), *P. fukushii* (MAFF 625033), *P. macrospora* (MAFF 410314), *P. velata* (MAFF 410118), and *P. vexans* (MAFF 150147)) を用いて、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen社) のプロトコルに準じて抽出したものを供試した。各菌株は、サツマイモ煮汁固形培地もしくはジャガイモ煮汁固形培地を用いて25℃で2週間培養し、培地上で伸長した菌糸を含む寒天片5 mmを切り出し、DNA抽出に用いた。加えて、健全なかんしょ茎および塊根についても同様にDNA抽出を行い供試した。

まず、設計したDb ITSプライマーとDd ITSプライマーの基腐病菌と乾腐病菌に対する検出精度について調べたところ、供試した近縁糸状菌やかんしょ茎および塊根では非特異的な増幅は認められず、基腐病菌と乾腐病菌にそれぞれ特異的な増幅産物が得られた (図1)。融解曲線分析において、基腐病菌と乾腐病菌の融解温度 (T_m 値)

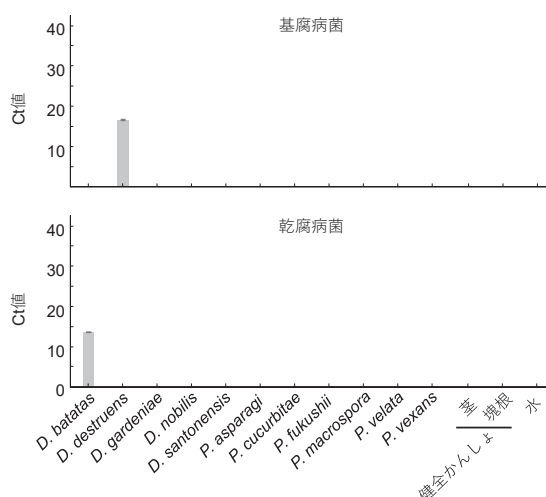


図1 リアルタイムPCRによる基腐病菌と乾腐病菌の特異的検出
新規プライマーを用いたリアルタイムPCRにより基腐病菌と乾腐病菌のDNAをそれぞれ特異的に検出できる。エラーバー：標準偏差 (N=3)。

は、それぞれ86.9 (± 0.4) と89.3 (± 0.4) を示した。次に、両菌から抽出したDNA量を5 ng/ μ Lに調整し、10万分の1まで希釈した鋳型DNA系列を作製し、検出感度を調べたところ、1万分の1まで希釈したDNA濃度においても、基腐病菌と乾腐病菌をそれぞれ特異的に検出できることが認められた。次に、乾腐病菌と基腐病菌が重複感染している状況を想定し、両菌DNAの濃度比を変えて混合すると、片方のDNA濃度がもう一方のDNA濃度の1万分の1でも定量的に検出できることが認められた。さらに、感染植物からの検出を想定し、かんしょDNAと両菌DNAの濃

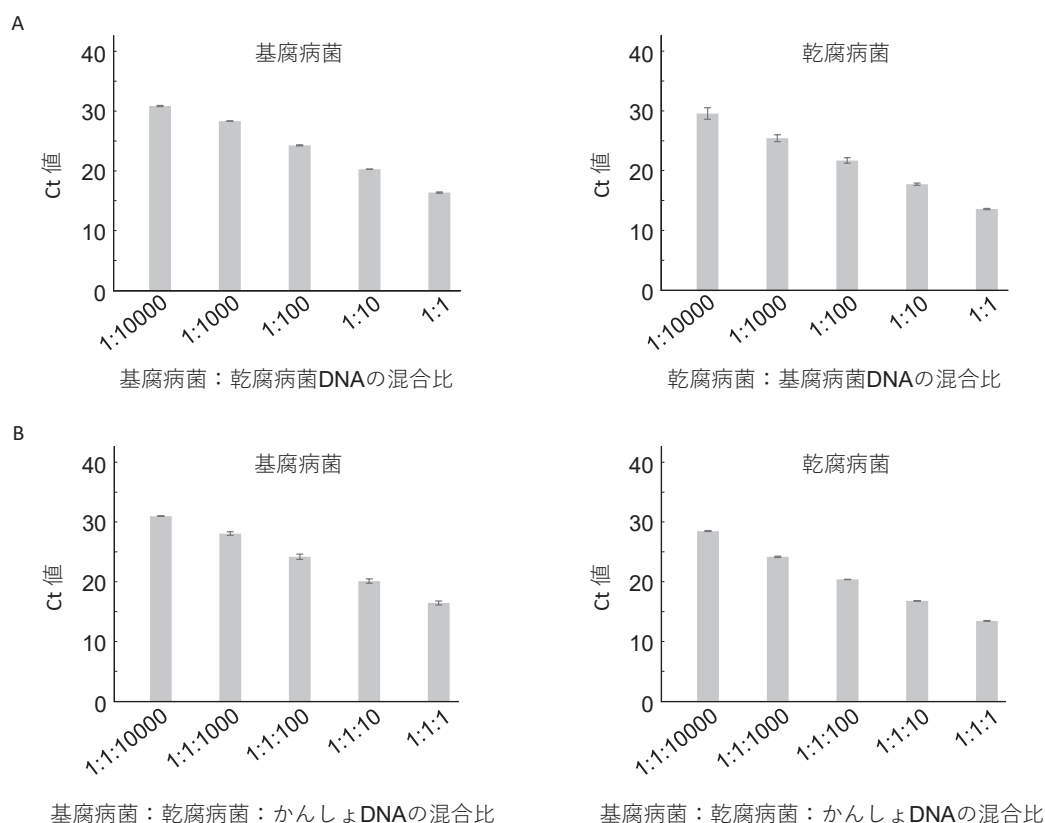


図2 リアルタイムPCRによる基腐病菌と乾腐病菌の高感度検出

A 基腐病菌と乾腐病菌のDNAがお互いの1万分の1の濃度 (0.0005 ng/ μ l) まで希釈されても、それぞれを高感度に検出できる。B 基腐病菌と乾腐病菌のDNAがかんしょDNAの1万分の1まで希釈されても、同様の感度で検出できる。エラーバー：標準偏差 (N=3)。

表1 新規プライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列	病原菌名	断片長 (bp)
Dd ITS-F	5'-GTTTTTATAGTGTATCTCTGAGC-3'	基腐病菌	258
Dd ITS-R	5'-GGCCTGCCCCCTTAAAAA-3'		
Db ITS-F	5'-GTTTCTATAGTGAATCTCTGAGT-3'	乾腐病菌	317
Db ITS-R	5'-TCCAGAGCGAGATGTAACTA-3'		

度比を変えて混合すると、病原菌のDNA濃度がかんしょDNA濃度の1万分の1でも同様に定量的に検出できることも認められた。本技術を利用し、圃場や貯蔵中に異常を示したかんしょ茎や塊根を対象に本遺伝子検査を行うことで、基腐病菌や乾腐病菌の検出が可能であることも確認している⁶⁾。これにより、新規プライマーを用いたりアルタイムPCRを実施することで、基腐病菌と乾腐病菌を高精度かつ高感度に検出できる新たな検査手法を提案することができた。

終わりに

基腐病は、かんしょ生産地域で最も警戒すべき病害の一つである。本病からかんしょ産地を守るためには、圃場での防除に加えて、種苗を通じた未発生地域への侵入や蔓延を防ぐためにも、疑わしい症状が発見された場合は、乾腐病を含む他のかんしょ病害と区別して直ちに適切な対応を取る必要がある。本稿では、基腐病菌と乾腐病菌をそれぞれ特異的に検出できる新規プライマーを用いたりアルタイムPCRを行うことで、両菌を高精度かつ高感度に検出できる新手法を紹介した。本手法を活用することにより、基腐病の発生を早期に把握

し、適切な防除対策を講ずることができれば被害拡大の抑制につながると考える。本手法は、これまでに基腐病の初発生を確認する場面で既に利用されており、かんしょ種苗や生産物の品質管理などの場面で利用されることで、基腐病に対する更なる対策強化を期待したい。

謝辞

本研究は、生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。共同研究者の方々や関係者の方々には多大なご協力、ご支援を賜りましたことから、心から感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Harter, L. L. (1913) Phytopathol. 3:243-245.
- 2) 小林 (2019) 植物防疫. 73:501-505.
- 3) Udayanga, et al. (2015) Fungal Biol. 5:383-407.
- 4) Scruggs, et al. (2016) Phytopathol. 106:909-919.
- 5) Schaad, N. W., and Brenner, D. (1977) Phytopathol. 67:302-308.
- 6) Fujiwara et al. (2021) Front. Plant Sci. 12:694053.